

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7038045号

(P7038045)

(45)発行日 令和4年3月17日(2022.3.17)

(24)登録日 令和4年3月9日(2022.3.9)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z Z N A

C 1 2 N 15/117(2010.01)

C 1 2 N 15/117

Z

A 6 1 K 31/7125(2006.01)

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 K 47/56 (2017.01)

A 6 1 K 47/56

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

請求項の数 13 (全134頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-519358(P2018-519358)

(86)(22)出願日 平成28年10月14日(2016.10.14)

(65)公表番号 特表2018-530589(P2018-530589
A)

(43)公表日 平成30年10月18日(2018.10.18)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/057143

(87)国際公開番号 WO2017/066639

(87)国際公開日 平成29年4月20日(2017.4.20)

審査請求日 令和1年10月11日(2019.10.11)

(31)優先権主張番号 62/242,189

(32)優先日 平成27年10月15日(2015.10.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 598004424

シティ・オブ・ホープ

City of Hope

アメリカ合衆国カリフォルニア州910

10-0269, デュアーテ, イースト

・デュアーテ・ロード 1500

1500 East, Duarte Ro

ad, Duarte, Californ

ia 91010-0269, Unit

ed States of America

110001173

(74)代理人

特許業務法人川口国際特許事務所

(72)発明者

コルティレフスキ, マルチン・トマシュ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・91

016、モンロビア、オークデール・ア

最終頁に続く

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

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 抗マイクロRNA 126 (抗miR 126) 核酸配列に結合したホスホロチオエート化 CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG-ODN) を含む化合物、及び

(b) 化学療法剤

を含む、組成物。

【請求項2】

(a) 化合物が、前記 CpG-ODN と、抗miR 126 核酸配列との間に共有結合リンカーをさらに含む、

(b) 前記抗miR 126 核酸配列が、化学的に修飾されている、

(c) 前記 CpG-ODN 核酸配列が、クラスA CpG-ODN 核酸配列、クラスB CpG-ODN 核酸配列、及びクラスC CpG-ODN 核酸配列からなる群から選択される、または

(d) 前記 CpG-ODN が、ホスホロアミデート結合、ホスホロジアミデート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホノカルボン酸結合、ホスホノカルボキシレート結合、ホスホノ酢酸結合、ホスホノギ酸結合、メチルホスホネート結合、ハウ素ホスホネート結合、及びO-メチルホスホロアミダイト結合からなる群から選択されるホスホジエステル誘導体結合を含む、

請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

化合物が、CpG-ODNと、抗miR126核酸配列との間に共有結合リンカーを含み、さらに、

(a) 前記リンカーが、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリーレン、または置換もしくは非置換のヘテロアリーレンである、

(b) 前記リンカーが、置換もしくは非置換のC₁~C₄₀アルキレン、置換もしくは非置換の2~40員のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のC₃~C₈シクロアルキレン、置換もしくは非置換の3~8員のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のC₆~C₁₀アリーレン、または置換もしくは非置換の5~10員のヘテロアリーレンである、

10

(c) 前記リンカーが、非置換のC₁~C₄₀アルキレン、非置換の2~40員のヘテロアルキレン、非置換のC₃~C₈シクロアルキレン、非置換の3~8員のヘテロシクロアルキレン、非置換のC₆~C₁₀アリーレン、または非置換の5~10員のヘテロアリーレンである、または

(d) 前記リンカーが、置換された2~40員のヘテロアルキレンである、

請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

前記抗miR126核酸配列が、化学的に修飾され、さらに、

(a) 前記抗miR126核酸配列が、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5'-C-メチル、逆位デオキシ脱塩基残基組み込み、及びロックド核酸からなる群から選択される化学修飾を含む、

20

(b) 前記修飾が、前記抗miR126核酸配列の末端核酸塩基に、位置している、

(c) 前記修飾が、前記抗miR126核酸配列の前記末端核酸塩基には、位置していない、または

(d) 前記修飾が、血清由来のヌクレアーゼに対して保護する、

請求項2に記載の組成物。

【請求項5】

化学療法剤が、抗腫瘍もしくは抗癌剤である、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

化学療法剤が、細胞死促進剤である、請求項1に記載の組成物。

30

【請求項7】

化学療法剤が、ニロチニブ、アクチノマイシンD/ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ドキシソルピシン(ベグ化リボソーム)、エビルピシン、イダルピシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、エトポシド、ドセタキセル、イリノテカン、パクリタキセル、トポテカン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピノレルピン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、アテムツザマブ(Alemtuzumab)、BCG、ペバシズマブ、セツキシマブ、デノスマブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、インターフェロン、イピリムマブ、ラバチニブ、モノメチルオリスタチンE(MMEA)、メルタンシン(DM1)、リツキシマブ、スニチニブ、ソラフェニブ、テムシロリムス、及びトラスツズマブからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

40

【請求項8】

薬学的に許容される賦形剤と、請求項1~7のいずれか一項に記載の組成物とを含む医薬組成物。

【請求項9】

がんの治療に使用するための、請求項1~7のいずれか一項に記載の組成物または請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項10】

(a) 前記疾患が、がんである、

50

- (b) 前記疾患が、造血細胞癌である、
 - (c) 前記疾患が、造血細胞癌ではないがんである、
 - (d) 前記疾患が、骨髄腫または急性骨髄性白血病である、
 - (e) 前記疾患が、前立腺癌、乳癌、神経膠芽腫、卵巣癌、肺癌、頭頸部癌、食道癌、皮膚癌、悪性黒色腫、脳癌、大腸癌、リンパ腫、もしくは骨髄腫、膵臓癌、慢性骨髄性白血病 (CML)、または骨髄異形成症候群 (MDS) である、または
 - (f) 前記疾患が、化学療法後の再発がんである、
- 請求項 9 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 11】

再発がんが、化学療法耐性の再発がんである、請求項 10 に記載の組成物または医薬組成物。

10

【請求項 12】

前記組成物または医薬組成物が、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、経口、または局所投与によって、対象に投与されるために製剤化される、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 13】

化合物及び化学療法剤が、別個の製剤である、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物または医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年10月15日に出願された米国仮出願第62/242,189号の利益を主張するものであり、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照による組み込み

2016年10月14日に作成され、15,873バイトのサイズの48440-588001WO__ST25.TXTという名称のtxtファイルの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【背景技術】

【0003】

急性骨髄性白血病は、未成熟骨髄前駆細胞の蓄積によって特徴付けられる。白血病誘発は、骨髄性細胞系統の分化、自己複製、及び/または増殖を制御する発癌遺伝子、腫瘍抑制因子または転写因子の調節解除に起因する。本開示は、安定であり、播種性がんに対する全身投与に適した抗miR及びmiRNAミミックを用いた、がん、例えばAML、CML及び骨髄異形成症候群を治療する化合物、組成物及び方法に関する。

【発明の概要】

【0004】

一態様において、抗マイクロRNA (抗miR) またはマイクロRNA (miRNA) - 擬態核酸配列 (miRNA - ミミック) に抱合された、ホスホロチオエート化CpGオリゴデオキシヌクレオチド (CpG-ODN) を含む化合物が本明細書で提供される。

40

【0005】

別の態様において、抗miR配列が1つ以上のホスホロチオエート結合、及び1つ以上の化学的に修飾されたヌクレオチドを含有する抗マイクロRNA (抗miR) 配列を含む化合物が本明細書に提供される。

【0006】

別の態様において、薬学的に許容される賦形剤及び本明細書に記載される化合物を含む医薬組成物が本明細書に提供される。

【0007】

50

別の態様において、疾患の治療を、それを必要とする対象において施す方法が本明細書に提供される。本方法は、本明細書に記載される化合物または本明細書に記載される医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む。

【0008】

別の態様において、細胞中のマイクロRNAの活性を低下させる方法が本明細書に提供される。本方法は、細胞を本明細書に記載される化合物の有効量と接触させることを含む。

【0009】

本開示の他の特徴及び利点は、以下の詳細な記載及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0010】

そうではない旨の断りがない限り、本明細書で参照される全ての刊行物、参考文献、特許及び/または特許出願は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】化学的に安定化されたCpG-抗miR126 RNAオリゴヌクレオチドの設計を示す概略図である。アステリックス(*)はホスホロチオエート結合を示しており、mNは2'-OMe修飾ヌクレオチドを示す。

【図2A】図2A~2Dは正常、臍帯血、急性骨髄性白血病(AML)、及び慢性骨髄性白血病(CML)CD34+細胞における取り込み試験の結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。正常(NL)、臍帯血(CB)、AML及びCML34+細胞を、CpG-スクランブルRNA(500nM)及びCpG-miR126阻害剤-Cy3(500nm)で16時間培養した。図2Aは600CpG-siRNAによるNL/CB細胞における取り込みを示すヒストグラムである。取り込みは、フローサイトメトリーによって、これらの細胞中のCy3発現によって測定した。

【図2B】図2A~2Dは正常、臍帯血、急性骨髄性白血病(AML)、及び慢性骨髄性白血病(CML)CD34+細胞における取り込み試験の結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。正常(NL)、臍帯血(CB)、AML及びCML34+細胞を、CpG-スクランブルRNA(500nM)及びCpG-miR126阻害剤-Cy3(500nm)で16時間培養した。図2Bは500CpG-siRNAによるNL/CB細胞を示すヒストグラムである。取り込みは、フローサイトメトリーによって、これらの細胞中のCy3発現によって測定した。

【図2C】図2A~2Dは正常、臍帯血、急性骨髄性白血病(AML)、及び慢性骨髄性白血病(CML)CD34+細胞における取り込み試験の結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。正常(NL)、臍帯血(CB)、AML及びCML34+細胞を、CpG-スクランブルRNA(500nM)及びCpG-miR126阻害剤-Cy3(500nm)で16時間培養した。図2CはAML細胞における取り込みを示すヒストグラムである。取り込みは、フローサイトメトリーによって、これらの細胞中のCy3発現によって測定した。

【図2D】図2A~2Dは正常、臍帯血、急性骨髄性白血病(AML)、及び慢性骨髄性白血病(CML)CD34+細胞における取り込み試験の結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。正常(NL)、臍帯血(CB)、AML及びCML34+細胞を、CpG-スクランブルRNA(500nM)及びCpG-miR126阻害剤-Cy3(500nm)で16時間培養した。図2DはCML細胞における取り込みを示すヒストグラムである。取り込みは、フローサイトメトリーによって、これらの細胞中のCy3発現によって測定した。

【図3A】図3A~3GはAML及びCML細胞株におけるCpG-抗miR126の取り込みの結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。細胞を、miR126阻害剤-Cy3(Cy3-200nM0)、ヒトCD45(Ab-200nM)、またはantagomiR126-Cy3、CpG-miR126阻害剤-Cy3(CpG-Cy

10

20

30

40

50

3 - 200 nM及び500 nM)を含有するトランスフェリン(TF - 200 nM) - 抱合ナノ粒子(NP)で4時間培養し、次いで、フローサイトメトリーによりこれらの細胞におけるCy3発現を測定することにより、取り込みを分析した。図3Aは、K562細胞における取り込みを示すヒストグラムである。

【図3B】図3A～3GはAML及びCML細胞株におけるCpG - 抗miR126の取り込みの結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。細胞を、miR126阻害剤 - Cy3 (Cy3 - 200 nM0)、ヒトCD45 (Ab - 200 nM)、またはantagomiR126 - Cy3、CpG - miR126阻害剤 - Cy3 (CpG - Cy3 - 200 nM及び500 nM)を含有するトランスフェリン(TF - 200 nM) - 抱合ナノ粒子(NP)で4時間培養し、次いで、フローサイトメトリーによりこれらの細胞におけるCy3発現を測定することにより、取り込みを分析した。図3Bは、KG1A AML細胞における取り込みを示すヒストグラムである。

10

【図3C】図3A～3GはAML及びCML細胞株におけるCpG - 抗miR126の取り込みの結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。細胞を、miR126阻害剤 - Cy3 (Cy3 - 200 nM0)、ヒトCD45 (Ab - 200 nM)、またはantagomiR126 - Cy3、CpG - miR126阻害剤 - Cy3 (CpG - Cy3 - 200 nM及び500 nM)を含有するトランスフェリン(TF - 200 nM) - 抱合ナノ粒子(NP)で4時間培養し、次いで、フローサイトメトリーによりこれらの細胞におけるCy3発現を測定することにより、取り込みを分析した。図3Cは、MV4-11 AML細胞における取り込みを示すヒストグラムである。

20

【図3D】図3A～3GはAML及びCML細胞株におけるCpG - 抗miR126の取り込みの結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。細胞を、miR126阻害剤 - Cy3 (Cy3 - 200 nM0)、ヒトCD45 (Ab - 200 nM)、またはantagomiR126 - Cy3、CpG - miR126阻害剤 - Cy3 (CpG - Cy3 - 200 nM及び500 nM)を含有するトランスフェリン(TF - 200 nM) - 抱合ナノ粒子(NP)で4時間培養し、次いで、フローサイトメトリーによりこれらの細胞におけるCy3発現を測定することにより、取り込みを分析した。図3Dは、Molm13 AML細胞における取り込みを示すヒストグラムである。

【図3E】図3A～3GはAML及びCML細胞株におけるCpG - 抗miR126の取り込みの結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。細胞を、miR126阻害剤 - Cy3 (Cy3 - 200 nM0)、ヒトCD45 (Ab - 200 nM)、またはantagomiR126 - Cy3、CpG - miR126阻害剤 - Cy3 (CpG - Cy3 - 200 nM及び500 nM)を含有するトランスフェリン(TF - 200 nM) - 抱合ナノ粒子(NP)で4時間培養し、次いで、フローサイトメトリーによりこれらの細胞におけるCy3発現を測定することにより、取り込みを分析した。図3Eは、NB4 AML細胞における取り込みを示すヒストグラムである。

30

【図3F】図3A～3GはAML及びCML細胞株におけるCpG - 抗miR126の取り込みの結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。細胞を、miR126阻害剤 - Cy3 (Cy3 - 200 nM0)、ヒトCD45 (Ab - 200 nM)、またはantagomiR126 - Cy3、CpG - miR126阻害剤 - Cy3 (CpG - Cy3 - 200 nM及び500 nM)を含有するトランスフェリン(TF - 200 nM) - 抱合ナノ粒子(NP)で4時間培養し、次いで、フローサイトメトリーによりこれらの細胞におけるCy3発現を測定することにより、取り込みを分析した。図3Fは、OCI AML細胞における取り込みを示すヒストグラムである。

40

【図3G】図3A～3GはAML及びCML細胞株におけるCpG - 抗miR126の取り込みの結果を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。細胞を、miR126阻害剤 - Cy3 (Cy3 - 200 nM0)、ヒトCD45 (Ab - 200 nM)、またはantagomiR126 - Cy3、CpG - miR126阻害剤 - Cy3 (CpG - Cy3 - 200 nM及び500 nM)を含有するトランスフェリン(TF - 200 nM) - 抱合ナノ粒子(NP)で4時間培養し、次いで、フローサイトメトリーによりこれらの細胞

50

におけるCy3発現を測定することにより、取り込みを分析した。図3Gは、HL60 AML細胞における取り込みを示すヒストグラムである。

【図4A】図4A～4GはAML及びCML細胞株におけるmiRNA126発現を示す棒グラフである。細胞を、miR126-阻害剤-Cy3(Cy3-200nM)、ヒトCD45(Ab-200nM)、またはantagomiR-126-Cy3、CpG-miR126阻害剤-Cy3(CpG-Cy3-200nM及び500nM)を含有するトランスフェリン(TF-200nM)で24時間培養し、次いで、これらの細胞におけるmiR126及びRNU44(対照)発現をq-RT PCRによって分析した。miR126発現レベルをRNU44に対して正規化し、比較2^{-Ct}法を用いて計算した。図4Aは、K562 CML細胞株におけるmiRNA126の発現を示す棒グラフである。

10

【図4B】図4A～4GはAML及びCML細胞株におけるmiRNA126発現を示す棒グラフである。細胞を、miR126-阻害剤-Cy3(Cy3-200nM)、ヒトCD45(Ab-200nM)、またはantagomiR-126-Cy3、CpG-miR126阻害剤-Cy3(CpG-Cy3-200nM及び500nM)を含有するトランスフェリン(TF-200nM)で24時間培養し、次いで、これらの細胞におけるmiR126及びRNU44(対照)発現をq-RT PCRによって分析した。miR126発現レベルをRNU44に対して正規化し、比較2^{-Ct}法を用いて計算した。図4Bは、KG1A AML細胞株におけるmiRNA126発現を示す棒グラフである。

20

【図4C】図4A～4GはAML及びCML細胞株におけるmiRNA126発現を示す棒グラフである。細胞を、miR126-阻害剤-Cy3(Cy3-200nM)、ヒトCD45(Ab-200nM)、またはantagomiR-126-Cy3、CpG-miR126阻害剤-Cy3(CpG-Cy3-200nM及び500nM)を含有するトランスフェリン(TF-200nM)で24時間培養し、次いで、これらの細胞におけるmiR126及びRNU44(対照)発現をq-RT PCRによって分析した。miR126発現レベルをRNU44に対して正規化し、比較2^{-Ct}法を用いて計算した。図4Cは、MV4-11 AML細胞株におけるmiRNA126発現を示す棒グラフである。

【図4D】図4A～4GはAML及びCML細胞株におけるmiRNA126発現を示す棒グラフである。細胞を、miR126-阻害剤-Cy3(Cy3-200nM)、ヒトCD45(Ab-200nM)、またはantagomiR-126-Cy3、CpG-miR126阻害剤-Cy3(CpG-Cy3-200nM及び500nM)を含有するトランスフェリン(TF-200nM)で24時間培養し、次いで、これらの細胞におけるmiR126及びRNU44(対照)発現をq-RT PCRによって分析した。miR126発現レベルをRNU44に対して正規化し、比較2^{-Ct}法を用いて計算した。図4Dは、Molm13 AML細胞株におけるmiRNA126の発現を示す棒グラフである。

30

【図4E】図4A～4GはAML及びCML細胞株におけるmiRNA126発現を示す棒グラフである。細胞を、miR126-阻害剤-Cy3(Cy3-200nM)、ヒトCD45(Ab-200nM)、またはantagomiR-126-Cy3、CpG-miR126阻害剤-Cy3(CpG-Cy3-200nM及び500nM)を含有するトランスフェリン(TF-200nM)で24時間培養し、次いで、これらの細胞におけるmiR126及びRNU44(対照)発現をq-RT PCRによって分析した。miR126発現レベルをRNU44に対して正規化し、比較2^{-Ct}法を用いて計算した。図4Eは、NB4 AML細胞株におけるmiRNA126発現を示す棒グラフである。

40

【図4F】図4A～4GはAML及びCML細胞株におけるmiRNA126発現を示す棒グラフである。細胞を、miR126-阻害剤-Cy3(Cy3-200nM)、ヒトCD45(Ab-200nM)、またはantagomiR-126-Cy3、CpG

50

- miR126 阻害剤 - Cy3 (CpG - Cy3 - 200 nM 及び 500 nM) を含有するトランスフェリン (TF - 200 nM) で 24 時間培養し、次いで、これらの細胞における miR126 及び RNU44 (対照) 発現を q - RT - PCR によって分析した。miR126 発現レベルを RNU44 に対して正規化し、比較 2⁻ Ct 法を用いて計算した。図 4 F は、OCI AML 細胞株における miRNA126 発現を示す棒グラフである。

【図 4 G】図 4 A ~ 4 G は AML 及び CML 細胞株における miRNA126 発現を示す棒グラフである。細胞を、miR126 - 阻害剤 - Cy3 (Cy3 - 200 nM)、ヒト CD45 (Ab - 200 nM)、または antagomiR - 126 - Cy3、CpG - miR126 阻害剤 - Cy3 (CpG - Cy3 - 200 nM 及び 500 nM) を含有するトランスフェリン (TF - 200 nM) で 24 時間培養し、次いで、これらの細胞における miR126 及び RNU44 (対照) 発現を q - RT - PCR によって分析した。miR126 発現レベルを RNU44 に対して正規化し、比較 2⁻ Ct 法を用いて計算した。図 4 G は、HL60 AML 細胞株における miRNA126 発現を示す棒グラフである。

10

【図 5】NL / CB、AML 及び CML CD34 + 細胞における miRNA126 の発現を示す棒グラフである。正常な臍帯血、AML、及び CML CD34 + 細胞を、CpG スクランブル RNA (500 nM) 及び CpG - miR126 阻害剤 - Cy3 (500 nM) で 24 時間培養した。miR126 及び RNU44 (対照) 発現を q - RT - PCR によって分析した。miR126 発現レベルを RNU44 に対して正規化し、比較 2⁻ Ct 法を用いて計算した。

20

【図 6】CML CD34 + CD38 - 未分化前駆細胞における miR126 のより高い発現を、CD34 + CD38 - 系列決定前駆細胞と比較して示す棒グラフである。CML CD34 +、CD34 + CD38 + 系列決定前駆細胞、及び CD34 + CD38 - 未分化前駆細胞を選別し、次いで、これらの細胞における miR126 及び RNU44 (ctrl) 発現を Q - RT - PCR によって分析した。miR126 発現レベルを RNU44 に対して正規化し、比較 2⁻ Ct 法を用いて計算した。

【図 7】miR126 発現が、CpG - miR126 阻害剤で処置した CML CD34 + CD38 + 系列決定前駆細胞、及び CD34 + CD38 - 未分化前駆細胞において著しく減少したことを示す棒グラフである。CML CD34 + CD38 + 系列決定前駆細胞及び CD34 + CD38 - 未分化前駆細胞を、CpG - スクランブル RNA (500 nM) または CpG - miR126 阻害剤 (500 nM) で 36 時間培養し、次いで、これらの細胞における miR126 及び RNU44 (対照) 発現を q - RT - PCR によって分析した。miR126 発現レベルを RNU44 に対して正規化し、比較 2⁻ Ct 法を用いて計算した。

30

【図 8】CpG - miR126 阻害剤及びニロチニブ (NIL) で処置した CML CD34 +、CD34 + CD38 + 系列決定前駆細胞、及び CD34 + CD38 - 未分化前駆細胞のアポトーシスの増加を示す一連のプロット図である。CML CD34 +、CD34 + CD38 + 系列決定前駆細胞、及び CD34 + CD38 - 未分化前駆細胞を、CpG - スクランブル RNA (500 nM)、CpG - miR126 阻害剤 (500 nM)、CpG - スクランブル RNA (500 nM) + ニロチニブ (5 μM)、及び CpG - miR126 阻害剤 (500 nM) + NIL (5 μM) で 72 時間培養し、次いで、アネキシン V / DAPI 染色によりアポトーシスを分析した。

40

【図 9 A】図 9 A ~ 9 D は miR - 12 のノックダウン後の CD34 + CD38 - 細胞における細胞周期の増加を示す一連の細胞選別プロット図である。正常 (NL、図 9 A ~ 9 B)、及び CML ヒト CD34 + CD38 - 細胞 (図 9 C ~ 9 D) を選別し、次いで、500 nm CpG - miR126 inh - Cy3 または CpG - SCR 対照で 72 時間培養し、次いで、EDU / DAPI 染色により細胞周期を分析した。miR - 126 のノックダウン後のヒト CD34 + CD38 - 細胞において、細胞周期の増加を確認した (図 9 D)。

50

【図9B】図9A～9DはmiR-12のノックダウン後のCD34+CD38-細胞における細胞周期の増加を示す一連の細胞選別プロット図である。正常(NL、図9A～9B)、及びCMLヒトCD34+CD38-細胞(図9C～9D)を選別し、次いで、500nm CpG-miR126 inh-Cy3またはCpG-SCR対照で72時間培養し、次いで、EDU/DAPi染色により細胞周期を分析した。miR-126のノックダウン後のヒトCD34+CD38-細胞において、細胞周期の増加を確認した(図9D)。

【図9C】図9A～9DはmiR-12のノックダウン後のCD34+CD38-細胞における細胞周期の増加を示す一連の細胞選別プロット図である。正常(NL、図9A～9B)、及びCMLヒトCD34+CD38-細胞(図9C～9D)を選別し、次いで、500nm CpG-miR126 inh-Cy3またはCpG-SCR対照で72時間培養し、次いで、EDU/DAPi染色により細胞周期を分析した。miR-126のノックダウン後のヒトCD34+CD38-細胞において、細胞周期の増加を確認した(図9D)。

10

【図9D】図9A～9DはmiR-12のノックダウン後のCD34+CD38-細胞における細胞周期の増加を示す一連の細胞選別プロット図である。正常(NL、図9A～9B)、及びCMLヒトCD34+CD38-細胞(図9C～9D)を選別し、次いで、500nm CpG-miR126 inh-Cy3またはCpG-SCR対照で72時間培養し、次いで、EDU/DAPi染色により細胞周期を分析した。miR-126のノックダウン後のヒトCD34+CD38-細胞において、細胞周期の増加を確認した(図9D)。

20

【図10A】図10A～10DはmiR-126のノックダウン後の正常(NL)及びCML LTHSCにおける細胞周期の増加を示す一連の細胞選別プロット図である。正常(NL)及びCMLマウスLTHSC(Lin-Sca-1+Kit+Fit3 CD150+CD48-細胞)を選別し、次いで、500nmのCpG-miR126阻害剤またはCpG-SCRで72時間処置し、次いで、EDU/DAPi染色により細胞周期を分析した。miR-126のノックダウン後のNL及びCML LTHSCにおいて、細胞周期の増加を認めた(図10D)。

【図10B】図10A～10DはmiR-126のノックダウン後の正常(NL)及びCML LTHSCにおける細胞周期の増加を示す一連の細胞選別プロット図である。正常(NL)及びCMLマウスLTHSC(Lin-Sca-1+Kit+Fit3 CD150+CD48-細胞)を選別し、次いで、500nmのCpG-miR126阻害剤またはCpG-SCRで72時間処置し、次いで、EDU/DAPi染色により細胞周期を分析した。miR-126のノックダウン後のNL及びCML LTHSCにおいて、細胞周期の増加を認めた(図10D)。

30

【図10C】図10A～10DはmiR-126のノックダウン後の正常(NL)及びCML LTHSCにおける細胞周期の増加を示す一連の細胞選別プロット図である。正常(NL)及びCMLマウスLTHSC(Lin-Sca-1+Kit+Fit3 CD150+CD48-細胞)を選別し、次いで、500nmのCpG-miR126阻害剤またはCpG-SCRで72時間処置し、次いで、EDU/DAPi染色により細胞周期を分析した。miR-126のノックダウン後のNL及びCML LTHSCにおいて、細胞周期の増加を認めた(図10D)。

40

【図10D】図10A～10DはmiR-126のノックダウン後の正常(NL)及びCML LTHSCにおける細胞周期の増加を示す一連の細胞選別プロット図である。正常(NL)及びCMLマウスLTHSC(Lin-Sca-1+Kit+Fit3 CD150+CD48-細胞)を選別し、次いで、500nmのCpG-miR126阻害剤またはCpG-SCRで72時間処置し、次いで、EDU/DAPi染色により細胞周期を分析した。miR-126のノックダウン後のNL及びCML LTHSCにおいて、細胞周期の増加を認めた(図10D)。

【図11A】図11A～11BはSCR+NILと比較して、著しく増加したアポトーシ

50

ス及びLSCの細胞増殖の有意な減少を示す、細胞選別実験の棒グラフである。マウスCML白血球幹細胞(LSC、Lin-Sca-1+c-kit+Fit3-CD150+CD48-)を選別して、CpG-抗miR-126阻害剤またはCpG-SCR(500nM)で48時間処置し、次いで、miR126阻害剤+NILまたはSCR+NILで72時間さらに処置し、次いで、アポトーシス及び細胞増殖を測定した。CpG-抗miR126阻害剤+NILは、SCR+NILと比較して、LSCのアポトーシスを著しく増加させ(図11A)、かつLSCの細胞増殖を有意に減少させた(図11B)。

【図11B】図11A~11BはSCR+NILと比較して、著しく増加したアポトーシス及びLSCの細胞増殖の有意な減少を示す、細胞選別実験の棒グラフである。マウスCML白血球幹細胞(LSC、Lin-Sca-1+c-kit+Fit3-CD150+CD48-)を選別して、CpG-抗miR-126阻害剤またはCpG-SCR(500nM)で48時間処置し、次いで、miR126阻害剤+NILまたはSCR+NILで72時間さらに処置し、次いで、アポトーシス及び細胞増殖を測定した。CpG-抗miR126阻害剤+NILは、SCR+NILと比較して、LSCのアポトーシスを著しく増加させ(図11A)、かつLSCの細胞増殖を有意に減少させた(図11B)。

【図12A】図12Aは、SCR+Ara-c+Doxoと比較して細胞周期及びアポトーシスが著しく増加して細胞増殖の減少をもたらすことを示す散布図であり、図12B~12Cは、SCR+Ara-c+Doxoと比較して細胞周期及びアポトーシスが著しく増加して、細胞増殖の減少をもたらすことを示す、棒グラフである。AML CD34+細胞をCpG-抗miR-126またはCpG-SCR(500nM)で48時間培養し、次いで、miR126 inh+Ara-c+DoxoまたはSCR+A+Dで72時間さらに培養し、次いで、細胞周期、アポトーシス(図12B)及び細胞増殖(図12C)を分析した。Ara-c及びDoxoと組み合わせたCpG-抗miR-126阻害剤は、SCR+Ara-c+Doxoと比較して細胞周期及びアポトーシスを著しく増加させて、細胞増殖の減少をもたらした。

【図12B】図12Aは、SCR+Ara-c+Doxoと比較して細胞周期及びアポトーシスが著しく増加して細胞増殖の減少をもたらすことを示す散布図であり、図12B~12Cは、SCR+Ara-c+Doxoと比較して細胞周期及びアポトーシスが著しく増加して、細胞増殖の減少をもたらすことを示す、棒グラフである。AML CD34+細胞をCpG-抗miR-126またはCpG-SCR(500nM)で48時間培養し、次いで、miR126 inh+Ara-c+DoxoまたはSCR+A+Dで72時間さらに培養し、次いで、細胞周期、アポトーシス(図12B)及び細胞増殖(図12C)を分析した。Ara-c及びDoxoと組み合わせたCpG-抗miR-126阻害剤は、SCR+Ara-c+Doxoと比較して細胞周期及びアポトーシスを著しく増加させて、細胞増殖の減少をもたらした。

【図12C】図12Aは、SCR+Ara-c+Doxoと比較して細胞周期及びアポトーシスが著しく増加して細胞増殖の減少をもたらすことを示す散布図であり、図12B~12Cは、SCR+Ara-c+Doxoと比較して細胞周期及びアポトーシスが著しく増加して、細胞増殖の減少をもたらすことを示す、棒グラフである。AML CD34+細胞をCpG-抗miR-126またはCpG-SCR(500nM)で48時間培養し、次いで、miR126 inh+Ara-c+DoxoまたはSCR+A+Dで72時間さらに培養し、次いで、細胞周期、アポトーシス(図12B)及び細胞増殖(図12C)を分析した。Ara-c及びDoxoと組み合わせたCpG-抗miR-126阻害剤は、SCR+Ara-c+Doxoと比較して細胞周期及びアポトーシスを著しく増加させて、細胞増殖の減少をもたらした。

【図13A】図13A~13DはNIL+SCRで処置したマウスと比較して、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスの脾臓重量の減少(図13B)と、骨髄(BM)(図13C)及び脾臓(図13D)で観察されたCML細胞の減少とを示す散布図である。SCLtTA/BCR-ABLマウスを、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg、隔日、静脈内(iv)注射)、SCR(5mg/kg、隔日、静脈内注射)、NIL(

10

20

30

40

50

50 mg / kg、強制飼養により毎日) + SCR、NIL + miR - 126 阻害剤で3週間処置し、次いで、PB (図13A)、BM (図13C) 及び脾臓 (図13D) における残りのCML細胞を分析した。NIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスのPBにおけるCML白血球の減少が見られた (図13A)。NIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスのBM (図13C) 及び脾臓 (図13D) では、脾臓重量の減少 (図13B) 及びCML細胞の減少が観察された。

【図13B】図13A ~ 13DはNIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスの脾臓重量の減少 (図13B) と、骨髓 (BM) (図13C) 及び脾臓 (図13D) で観察されたCML細胞の減少とを示す散布図である。SCLtTA / BCR - ABLマウスを、CpG - miR - 126 阻害剤 (5 mg / kg、隔日、静脈内 (iv) 注射)、SCR (5 mg / kg、隔日、静脈内注射)、NIL (50 mg / kg、強制飼養により毎日) + SCR、NIL + miR - 126 阻害剤で3週間処置し、次いで、PB (図13A)、BM (図13C) 及び脾臓 (図13D) における残りのCML細胞を分析した。NIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスのPBにおけるCML白血球の減少が見られた (図13A)。NIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスのBM (図13C) 及び脾臓 (図13D) では、脾臓重量の減少 (図13B) 及びCML細胞の減少が観察された。

10

【図13C】図13A ~ 13DはNIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスの脾臓重量の減少 (図13B) と、骨髓 (BM) (図13C) 及び脾臓 (図13D) で観察されたCML細胞の減少とを示す散布図である。SCLtTA / BCR - ABLマウスを、CpG - miR - 126 阻害剤 (5 mg / kg、隔日、静脈内 (iv) 注射)、SCR (5 mg / kg、隔日、静脈内注射)、NIL (50 mg / kg、強制飼養により毎日) + SCR、NIL + miR - 126 阻害剤で3週間処置し、次いで、PB (図13A)、BM (図13C) 及び脾臓 (図13D) における残りのCML細胞を分析した。NIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスのPBにおけるCML白血球の減少が見られた (図13A)。NIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスのBM (図13C) 及び脾臓 (図13D) では、脾臓重量の減少 (図13B) 及びCML細胞の減少が観察された。

20

【図13D】図13A ~ 13DはNIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスの脾臓重量の減少 (図13B) と、骨髓 (BM) (図13C) 及び脾臓 (図13D) で観察されたCML細胞の減少とを示す散布図である。SCLtTA / BCR - ABLマウスを、CpG - miR - 126 阻害剤 (5 mg / kg、隔日、静脈内 (iv) 注射)、SCR (5 mg / kg、隔日、静脈内注射)、NIL (50 mg / kg、強制飼養により毎日) + SCR、NIL + miR - 126 阻害剤で3週間処置し、次いで、PB (図13A)、BM (図13C) 及び脾臓 (図13D) における残りのCML細胞を分析した。NIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスのPBにおけるCML白血球の減少が見られた (図13A)。NIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスのBM (図13C) 及び脾臓 (図13D) では、脾臓重量の減少 (図13B) 及びCML細胞の減少が観察された。

30

40

【図14A】図14A ~ 14DはNIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスの骨髓 (BM) (図14A、14C) 及び脾臓 (図14B、14D) で観察されたCML LSK及びLSCの減少を示す散布図である。SCLtTA / BCR - ABLマウスをCpG - miR - 126 阻害剤、SCR、NIL + SCR、NIL + miR - 126 阻害剤で3週間処置し、次いで、BM及び脾臓に残存するCML LSK未分化細胞及びLSCを分析した。NIL + SCRで処置したマウスと比較して、NIL + miR 126 阻害剤で処置したマウスのBM (図14A、14C) 及

50

び脾臓(図14B、14D)において、CML LSK及びLSCの減少が観察された。

【図14B】図14A~14DはNIL+SCRで処置したマウスと比較して、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスの骨髓(BM)(図14A、14C)及び脾臓(図14B、14D)で観察されたCML LSK及びLSCの減少を示す散布図である。SCLtTA/BCR-ABLマウスをCpG-miR-126阻害剤、SCR、NIL+SCR、NIL+miR-126阻害剤で3週間処置し、次いで、BM及び脾臓に残存するCML LSK未分化細胞及びLSCを分析した。NIL+SCRで処置したマウスと比較して、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスのBM(図14A、14C)及び脾臓(図14B、14D)において、CML LSK及びLSCの減少が観察された。

【図14C】図14A~14DはNIL+SCRで処置したマウスと比較して、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスの骨髓(BM)(図14A、14C)及び脾臓(図14B、14D)で観察されたCML LSK及びLSCの減少を示す散布図である。SCLtTA/BCR-ABLマウスをCpG-miR-126阻害剤、SCR、NIL+SCR、NIL+miR-126阻害剤で3週間処置し、次いで、BM及び脾臓に残存するCML LSK未分化細胞及びLSCを分析した。NIL+SCRで処置したマウスと比較して、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスのBM(図14A、14C)及び脾臓(図14B、14D)において、CML LSK及びLSCの減少が観察された。

【図14D】図14A~14DはNIL+SCRで処置したマウスと比較して、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスの骨髓(BM)(図14A、14C)及び脾臓(図14B、14D)で観察されたCML LSK及びLSCの減少を示す散布図である。SCLtTA/BCR-ABLマウスをCpG-miR-126阻害剤、SCR、NIL+SCR、NIL+miR-126阻害剤で3週間処置し、次いで、BM及び脾臓に残存するCML LSK未分化細胞及びLSCを分析した。NIL+SCRで処置したマウスと比較して、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスのBM(図14A、14C)及び脾臓(図14B、14D)において、CML LSK及びLSCの減少が観察された。

【図15】CpG-抗miRsの安定性。50%のヒト血清中の化学的に修飾されたCpG-抗miRの半減期。CpG-抗miRをヒト血清中、37℃で50%の濃度で最長7日間インキュベートした。次いで、試料を7.5M尿素/20%PAGEゲルで分離し、臭化エチジウムを用いて染色した。CpG-抗miR155の代表的なゲルを示す。3つの独立した実験から組み合わせたバンド強度の定量化を示すグラフであり、推定半減期は指示した通りである。

【図16A】図16A~16B。CpG-抗miR146aの細胞選択的取り込み。図16A~16B)いかなるトランスフェクション試薬もない状態の、標的免疫細胞及び白血病細胞によるCpG-anti-miR146aの内在化の用量及び時間依存性。CpG-抗miR146aをCy3標識して、フローサイトメトリーを用いて標的細胞による細胞内取り込みを検出した。図16A)ヒト免疫細胞を、示された濃度のCpG-抗miR146a-cy3で1時間インキュベートした。フローサイトメトリーを用いて、CD14+単球、CD1c+mDC、CD3+T細胞及びCD19+B細胞による取り込みを測定した。図16B)培養ヒトAML細胞KG1a、MOLM13、及びMOLM14細胞は、低濃度でもCpG-抗miR146a-coを迅速に内在化する。

【図16B】図16A~16B。CpG-抗miR146aの細胞選択的取り込み。図16A~16B)いかなるトランスフェクション試薬もない状態の、標的免疫細胞及び白血病細胞によるCpG-anti-miR146aの内在化の用量及び時間依存性。CpG-抗miR146aをCy3標識して、フローサイトメトリーを用いて標的細胞による細胞内取り込みを検出した。図16A)ヒト免疫細胞を、示された濃度のCpG-抗miR146a-cy3で1時間インキュベートした。フローサイトメトリーを用いて、CD14+単球、CD1c+mDC、CD3+T細胞及びCD19+B細胞による取り込みを測定した。図16B)培養ヒトAML細胞KG1a、MOLM13、及びMOLM14細胞は、低濃度でもCpG-抗miR146a-coを迅速に内在化する。

【図17A】図17A~17F。CpG-抗miR155の阻害効果。図17A~17F

) CpG - 抗miR155処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR - 155発現を低下させる。マウスRAW264.7 (マクロファージ) (図17A) 及びDC2.4 (樹状細胞) (図17B) ならびにヒトMV4 - 11 AML細胞 (図17C) を100nMのCpG - 抗miR155またはCpG - スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a (図17D)、MOLM13 (図17E) 及びMOLM14 (図17F) 細胞を、100nMのCpG - 抗miR155またはCpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR - 155発現を、TAQMAN (登録商標) qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに標準化した。未処置試料中のmiR - 155発現レベルを1.0とした。データは平均値 ± SEM (n = 3) として示されている。* P < 0.05である。

10

【図17B】図17A ~ 17F。CpG - 抗miR155の阻害効果。図17A ~ 17F) CpG - 抗miR155処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR - 155発現を低下させる。マウスRAW264.7 (マクロファージ) (図17A) 及びDC2.4 (樹状細胞) (図17B) ならびにヒトMV4 - 11 AML細胞 (図17C) を100nMのCpG - 抗miR155またはCpG - スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a (図17D)、MOLM13 (図17E) 及びMOLM14 (図17F) 細胞を、100nMのCpG - 抗miR155またはCpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR - 155発現を、TAQMAN (登録商標) qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに標準化した。未処置試料中のmiR - 155発現レベルを1.0とした。データは平均値 ± SEM (n = 3) として示されている。* P < 0.05である。

20

【図17C】図17A ~ 17F。CpG - 抗miR155の阻害効果。図17A ~ 17F) CpG - 抗miR155処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR - 155発現を低下させる。マウスRAW264.7 (マクロファージ) (図17A) 及びDC2.4 (樹状細胞) (図17B) ならびにヒトMV4 - 11 AML細胞 (図17C) を100nMのCpG - 抗miR155またはCpG - スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a (図17D)、MOLM13 (図17E) 及びMOLM14 (図17F) 細胞を、100nMのCpG - 抗miR155またはCpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR - 155発現を、TAQMAN (登録商標) qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに標準化した。未処置試料中のmiR - 155発現レベルを1.0とした。データは平均値 ± SEM (n = 3) として示されている。* P < 0.05である。

30

【図17D】図17A ~ 17F。CpG - 抗miR155の阻害効果。図17A ~ 17F) CpG - 抗miR155処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR - 155発現を低下させる。マウスRAW264.7 (マクロファージ) (図17A) 及びDC2.4 (樹状細胞) (図17B) ならびにヒトMV4 - 11 AML細胞 (図17C) を100nMのCpG - 抗miR155またはCpG - スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a (図17D)、MOLM13 (図17E) 及びMOLM14 (図17F) 細胞を、100nMのCpG - 抗miR155またはCpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR - 155発現を、TAQMAN (登録商標) qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに標準化した。未処置試料中のmiR - 155発現レベルを1.0とした。データは平均値 ± SEM (n = 3) として示されている。* P < 0.05である。

40

【図17E】図17A ~ 17F。CpG - 抗miR155の阻害効果。図17A ~ 17F) CpG - 抗miR155処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR - 155発現を低下させる。マウスRAW264.7 (マクロファージ) (図17A) 及びDC2.4 (樹状細胞) (図17B) ならびにヒトMV4 - 11 AML細胞 (図17C) を100nMのCpG - 抗miR155またはCpG - スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a (図17D)、MOLM13 (図17E) 及びMOLM14 (図17F) 細胞を、100nMのCpG - 抗miR155またはCpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR - 155発現を、TAQMAN (登録商標) qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに標準化した。未処置試料中のmiR - 155発現レベルを1.0とした。データは平均値 ± SEM (n = 3) として示されている。* P < 0.05である。

50

4 (樹状細胞) (図17B)ならびにヒトMV4-11 AML細胞 (図17C) を100 nMのCpG-抗miR155またはCpG-スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1 μ g/mlのLPSで4時間処置した。KG1a (図17D)、MOLM13 (図17E) 及びMOLM14 (図17F) 細胞を、100 nMのCpG-抗miR155またはCpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR-155発現を、TAQMAN (登録商標) qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに標準化した。未処置試料中のmiR-155発現レベルを1.0とした。データは平均値 \pm SEM (n = 3) として示されている。* P < 0.05である。

【図17F】図17A~17F。CpG-抗miR155の阻害効果。図17A~17F) CpG-抗miR155処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR-155発現を低下させる。マウスRAW264.7 (マクロファージ) (図17A) 及びDC2.4 (樹状細胞) (図17B) ならびにヒトMV4-11 AML細胞 (図17C) を100 nMのCpG-抗miR155またはCpG-スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1 μ g/mlのLPSで4時間処置した。KG1a (図17D)、MOLM13 (図17E) 及びMOLM14 (図17F) 細胞を、100 nMのCpG-抗miR155またはCpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR-155発現を、TAQMAN (登録商標) qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに標準化した。未処置試料中のmiR-155発現レベルを1.0とした。データは平均値 \pm SEM (n = 3) として示されている。* P < 0.05である。

10

20

【図18A】図18A~18F。CpG-抗miR125bの阻害効果。図18A~18F) CpG-抗miR125b処置は、様々な細胞モデルにおいてmiR-125b発現を低下させる。RAW264.7 (図18A)、DC2.4 (図18B) 及びMV4-11 (図18C) 細胞を、100 nMのCpG-抗miR125bまたはCpG-スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1 μ g/ml LPSで4時間処置した。ヒトAML細胞 - KG1a (図18D)、MOLM13 (図18E)、及びMOLM14 (図18F) を、100 nMのCpG-抗miR125bまたは対照CpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR-125b発現を、TAQMAN (登録商標) qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-125b発現レベルを1.0とした。データは平均値 \pm SEM (n = 3) として示されている。* P < 0.05である。

30

【図18B】図18A~18F。CpG-抗miR125bの阻害効果。図18A~18F) CpG-抗miR125b処置は、様々な細胞モデルにおいてmiR-125b発現を低下させる。RAW264.7 (図18A)、DC2.4 (図18B) 及びMV4-11 (図18C) 細胞を、100 nMのCpG-抗miR125bまたはCpG-スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1 μ g/ml LPSで4時間処置した。ヒトAML細胞 - KG1a (図18D)、MOLM13 (図18E)、及びMOLM14 (図18F) を、100 nMのCpG-抗miR125bまたは対照CpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR-125b発現を、TAQMAN (登録商標) qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-125b発現レベルを1.0とした。データは平均値 \pm SEM (n = 3) として示されている。* P < 0.05である。

40

【図18C】図18A~18F。CpG-抗miR125bの阻害効果。図18A~18F) CpG-抗miR125b処置は、様々な細胞モデルにおいてmiR-125b発現を低下させる。RAW264.7 (図18A)、DC2.4 (図18B) 及びMV4-11 (図18C) 細胞を、100 nMのCpG-抗miR125bまたはCpG-スクランブルRNA (陰性対照) で18時間インキュベートし、次いで、1 μ g/ml LPSで4時間処置した。ヒトAML細胞 - KG1a (図18D)、MOLM13 (図18E)、及びMOLM14 (図18F) を、100 nMのCpG-抗miR125bまたは対照CpG

50

スクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR-125b発現を、TAQMAN（登録商標）qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-125b発現レベルを1.0とした。データは平均値±SEM（n=3）として示されている。*P<0.05である。

【図18D】図18A~18F。CpG-抗miR125bの阻害効果。図18A~18F)CpG-抗miR125b処置は、様々な細胞モデルにおいてmiR-125b発現を低下させる。RAW264.7（図18A）、DC2.4（図18B）及びMV4-11（図18C）細胞を、100nMのCpG-抗miR125bまたはCpG-スクランブルRNA（陰性対照）で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlPSで4時間処置した。ヒトAML細胞-KG1a（図18D）、MOLM13（図18E）、及びMOLM14（図18F）を、100nMのCpG-抗miR125bまたは対照CpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR-125b発現を、TAQMAN（登録商標）qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-125b発現レベルを1.0とした。データは平均値±SEM（n=3）として示されている。*P<0.05である。

10

【図18E】図18A~18F。CpG-抗miR125bの阻害効果。図18A~18F)CpG-抗miR125b処置は、様々な細胞モデルにおいてmiR-125b発現を低下させる。RAW264.7（図18A）、DC2.4（図18B）及びMV4-11（図18C）細胞を、100nMのCpG-抗miR125bまたはCpG-スクランブルRNA（陰性対照）で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlPSで4時間処置した。ヒトAML細胞-KG1a（図18D）、MOLM13（図18E）、及びMOLM14（図18F）を、100nMのCpG-抗miR125bまたは対照CpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR-125b発現を、TAQMAN（登録商標）qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-125b発現レベルを1.0とした。データは平均値±SEM（n=3）として示されている。*P<0.05である。

20

【図18F】図18A~18F。CpG-抗miR125bの阻害効果。図18A~18F)CpG-抗miR125b処置は、様々な細胞モデルにおいてmiR-125b発現を低下させる。RAW264.7（図18A）、DC2.4（図18B）及びMV4-11（図18C）細胞を、100nMのCpG-抗miR125bまたはCpG-スクランブルRNA（陰性対照）で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlPSで4時間処置した。ヒトAML細胞-KG1a（図18D）、MOLM13（図18E）、及びMOLM14（図18F）を、100nMのCpG-抗miR125bまたは対照CpGスクランブルRNAで18時間インキュベートした。成熟miR-125b発現を、TAQMAN（登録商標）qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-125b発現レベルを1.0とした。データは平均値±SEM（n=3）として示されている。*P<0.05である。

30

【図19A】図19A~19H。CpG-抗miR146aの阻害効果。図19A~19F)CpG-抗miR146a処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR-146a発現を低下させる。マウスRAW264.7（マクロファージ）（図19A）及びDC2.4（樹状細胞）（図19B）ならびにヒトMV4-11（図19C）及びKG1aAML（図19D）細胞を、100nMのCpG-抗miR146aまたはCpG-スクランブルRNA（陰性対照）で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLP Sで4時間処置した。KG1a、MOLM13（図19E）、及びMOLM14（図19F）細胞を、100nMのCpG-抗miR146aまたはCpG-スクランブルRNAで18時間インキュベートした。図19G~19H)マウスCMM AML細胞（図19G）及びA20リンパ腫細胞（図19H）を、100nMのCpG-miR146aミミックで18時間インキュベートした。成熟miR-146a発現を、TAQMAN（登録商標）qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-146a発現レベルを1.0とした。データは平均±SEM（n=3

40

50

)として示されている。* $P < 0.05$ である。

【図19B】図19A~19H。CpG-抗miR146aの阻害効果。図19A~19F) CpG-抗miR146a処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR-146a発現を低下させる。マウスRAW264.7(マクロファージ)(図19A)及びDC2.4(樹状細胞)(図19B)ならびにヒトMV4-11(図19C)及びKG1aAML(図19D)細胞を、100nMのCpG-抗miR146aまたはCpG-スクランブルRNA(陰性対照)で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a、MOLM13(図19E)、及びMOLM14(図19F)細胞を、100nMのCpG-抗miR146aまたはCpG-スクランブルRNAで18時間インキュベートした。図19G~19H)マウスCMM AML細胞(図19G)及びA20リンパ腫細胞(図19H)を、100nMのCpG-miR146aミミックで18時間インキュベートした。成熟miR-146a発現を、TAQMAN(登録商標)qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-146a発現レベルを1.0とした。データは平均±SEM(n=3)として示されている。* $P < 0.05$ である。

10

【図19C】図19A~19H。CpG-抗miR146aの阻害効果。図19A~19F) CpG-抗miR146a処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR-146a発現を低下させる。マウスRAW264.7(マクロファージ)(図19A)及びDC2.4(樹状細胞)(図19B)ならびにヒトMV4-11(図19C)及びKG1aAML(図19D)細胞を、100nMのCpG-抗miR146aまたはCpG-スクランブルRNA(陰性対照)で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a、MOLM13(図19E)、及びMOLM14(図19F)細胞を、100nMのCpG-抗miR146aまたはCpG-スクランブルRNAで18時間インキュベートした。図19G~19H)マウスCMM AML細胞(図19G)及びA20リンパ腫細胞(図19H)を、100nMのCpG-miR146aミミックで18時間インキュベートした。成熟miR-146a発現を、TAQMAN(登録商標)qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-146a発現レベルを1.0とした。データは平均±SEM(n=3)として示されている。* $P < 0.05$ である。

20

【図19D】図19A~19H。CpG-抗miR146aの阻害効果。図19A~19F) CpG-抗miR146a処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR-146a発現を低下させる。マウスRAW264.7(マクロファージ)(図19A)及びDC2.4(樹状細胞)(図19B)ならびにヒトMV4-11(図19C)及びKG1aAML(図19D)細胞を、100nMのCpG-抗miR146aまたはCpG-スクランブルRNA(陰性対照)で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a、MOLM13(図19E)、及びMOLM14(図19F)細胞を、100nMのCpG-抗miR146aまたはCpG-スクランブルRNAで18時間インキュベートした。図19G~19H)マウスCMM AML細胞(図19G)及びA20リンパ腫細胞(図19H)を、100nMのCpG-miR146aミミックで18時間インキュベートした。成熟miR-146a発現を、TAQMAN(登録商標)qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR-146a発現レベルを1.0とした。データは平均±SEM(n=3)として示されている。* $P < 0.05$ である。

30

40

【図19E】図19A~19H。CpG-抗miR146aの阻害効果。図19A~19F) CpG-抗miR146a処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR-146a発現を低下させる。マウスRAW264.7(マクロファージ)(図19A)及びDC2.4(樹状細胞)(図19B)ならびにヒトMV4-11(図19C)及びKG1aAML(図19D)細胞を、100nMのCpG-抗miR146aまたはCpG-スクランブルRNA(陰性対照)で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a、MOLM13(図19E)、及びMOLM14(図19

50

F)細胞を、100 nMのCpG - 抗miR146aまたはCpG - スクランブルRNAで18時間インキュベートした。図19G~19H)マウスCMM AML細胞(図19G)及びA20リンパ腫細胞(図19H)を、100 nMのCpG - miR146aミミックで18時間インキュベートした。成熟miR - 146a発現を、TAQMAN(登録商標)qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR - 146a発現レベルを1.0とした。データは平均±SEM(n=3)として示されている。*P<0.05である。

【図19F】図19A~19H。CpG - 抗miR146aの阻害効果。図19A~19F)CpG - 抗miR146a処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR - 146a発現を低下させる。マウスRAW264.7(マクロファージ)(図19A)及びDC2.4(樹状細胞)(図19B)ならびにヒトMV4-11(図19C)及びKG1aAML(図19D)細胞を、100 nMのCpG - 抗miR146aまたはCpG - スクランブルRNA(陰性対照)で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a、MOLM13(図19E)、及びMOLM14(図19F)細胞を、100 nMのCpG - 抗miR146aまたはCpG - スクランブルRNAで18時間インキュベートした。図19G~19H)マウスCMM AML細胞(図19G)及びA20リンパ腫細胞(図19H)を、100 nMのCpG - miR146aミミックで18時間インキュベートした。成熟miR - 146a発現を、TAQMAN(登録商標)qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR - 146a発現レベルを1.0とした。データは平均±SEM(n=3)として示されている。*P<0.05である。

【図19G】図19A~19H。CpG - 抗miR146aの阻害効果。図19A~19F)CpG - 抗miR146a処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR - 146a発現を低下させる。マウスRAW264.7(マクロファージ)(図19A)及びDC2.4(樹状細胞)(図19B)ならびにヒトMV4-11(図19C)及びKG1aAML(図19D)細胞を、100 nMのCpG - 抗miR146aまたはCpG - スクランブルRNA(陰性対照)で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a、MOLM13(図19E)、及びMOLM14(図19F)細胞を、100 nMのCpG - 抗miR146aまたはCpG - スクランブルRNAで18時間インキュベートした。図19G~19H)マウスCMM AML細胞(図19G)及びA20リンパ腫細胞(図19H)を、100 nMのCpG - miR146aミミックで18時間インキュベートした。成熟miR - 146a発現を、TAQMAN(登録商標)qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR - 146a発現レベルを1.0とした。データは平均±SEM(n=3)として示されている。*P<0.05である。

【図19H】図19A~19H。CpG - 抗miR146aの阻害効果。図19A~19F)CpG - 抗miR146a処置は、ヒト及びマウスの骨髄細胞におけるmiR - 146a発現を低下させる。マウスRAW264.7(マクロファージ)(図19A)及びDC2.4(樹状細胞)(図19B)ならびにヒトMV4-11(図19C)及びKG1aAML(図19D)細胞を、100 nMのCpG - 抗miR146aまたはCpG - スクランブルRNA(陰性対照)で18時間インキュベートし、次いで、1vg/mlのLPSで4時間処置した。KG1a、MOLM13(図19E)、及びMOLM14(図19F)細胞を、100 nMのCpG - 抗miR146aまたはCpG - スクランブルRNAで18時間インキュベートした。図19G~19H)マウスCMM AML細胞(図19G)及びA20リンパ腫細胞(図19H)を、100 nMのCpG - miR146aミミックで18時間インキュベートした。成熟miR - 146a発現を、TAQMAN(登録商標)qPCRアッセイを用いて測定し、snRNA234レベルに正規化した。未処置試料中のmiR - 146a発現レベルを1.0とした。データは平均±SEM(n=3)として示されている。*P<0.05である。

【図20A】図20A~20D。下流標的に対するCpG - 抗miRNAの効果。図20

10

20

30

40

50

A ~ 20C) CpG - 抗miRは、miR155、miR125b、及びmiR146aの下流標的を調節する。マウスRAW264.7またはヒトMV4-11細胞を、250nMまたは500nMのCpG - 抗miR155、CpG - 抗miR125bまたはCpG - 抗miR146aまたは500nMのCpG - スケランブルで48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、SHIP1(miR155標的)(図20A)、IRF4(miR125b標的)(図20B)、またはIRAK1(miR146a標的)(図20C)に対する抗体によって電気泳動及び免疫プロットした。バンド強度を - アクチンに対して正規化して定量化した。対照タンパク質レベルに対する誘導倍率は、プロットの下に示される。図20D)MV4-11細胞を、500nMのCpG - 抗miR155、CpG - アンチmiR125b、CpG - 抗miR146a、またはCpG - スケランブルで24時間インキュベートし、細胞溶解物を採集し、電気泳動し、免疫プロットして、アポトーシスの誘導を示す活性化カスパ - ゼ3を検出した。

10

【図20B】図20A ~ 20D。下流標的に対するCpG - 抗miRNAの効果。図20A ~ 20C) CpG - 抗miRは、miR155、miR125b、及びmiR146aの下流標的を調節する。マウスRAW264.7またはヒトMV4-11細胞を、250nMまたは500nMのCpG - 抗miR155、CpG - 抗miR125bまたはCpG - 抗miR146aまたは500nMのCpG - スケランブルで48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、SHIP1(miR155標的)(図20A)、IRF4(miR125b標的)(図20B)、またはIRAK1(miR146a標的)(図20C)に対する抗体によって電気泳動及び免疫プロットした。バンド強度を - アクチンに対して正規化して定量化した。対照タンパク質レベルに対する誘導倍率は、プロットの下に示される。図20D)MV4-11細胞を、500nMのCpG - 抗miR155、CpG - アンチmiR125b、CpG - 抗miR146a、またはCpG - スケランブルで24時間インキュベートし、細胞溶解物を採集し、電気泳動し、免疫プロットして、アポトーシスの誘導を示す活性化カスパ - ゼ3を検出した。

20

【図20C】図20A ~ 20D。下流標的に対するCpG - 抗miRNAの効果。図20A ~ 20C) CpG - 抗miRは、miR155、miR125b、及びmiR146aの下流標的を調節する。マウスRAW264.7またはヒトMV4-11細胞を、250nMまたは500nMのCpG - 抗miR155、CpG - 抗miR125bまたはCpG - 抗miR146aまたは500nMのCpG - スケランブルで48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、SHIP1(miR155標的)(図20A)、IRF4(miR125b標的)(図20B)、またはIRAK1(miR146a標的)(図20C)に対する抗体によって電気泳動及び免疫プロットした。バンド強度を - アクチンに対して正規化して定量化した。対照タンパク質レベルに対する誘導倍率は、プロットの下に示される。図20D)MV4-11細胞を、500nMのCpG - 抗miR155、CpG - アンチmiR125b、CpG - 抗miR146a、またはCpG - スケランブルで24時間インキュベートし、細胞溶解物を採集し、電気泳動し、免疫プロットして、アポトーシスの誘導を示す活性化カスパ - ゼ3を検出した。

30

【図20D】図20A ~ 20D。下流標的に対するCpG - 抗miRNAの効果。図20A ~ 20C) CpG - 抗miRは、miR155、miR125b、及びmiR146aの下流標的を調節する。マウスRAW264.7またはヒトMV4-11細胞を、250nMまたは500nMのCpG - 抗miR155、CpG - 抗miR125bまたはCpG - 抗miR146aまたは500nMのCpG - スケランブルで48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、SHIP1(miR155標的)(図20A)、IRF4(miR125b標的)(図20B)、またはIRAK1(miR146a標的)(図20C)に対する抗体によって電気泳動及び免疫プロットした。バンド強度を - アクチンに対して正規化して定量化した。対照タンパク質レベルに対する誘導倍率は、プロットの下に示される。図20D)MV4-11細胞を、500nMのCpG - 抗miR155、CpG - アンチmiR125b、CpG - 抗miR146a、またはCpG - スケランブルで24時間インキュベートし、細胞溶解物を採集し、電気泳動し、免疫プロット

40

50

して、アポトーシスの誘導を示す活性化カспа - ゼ 3 を検出した。

【図 2 1 A】図 2 1 A ~ 2 1 H。C p G - 抗 m i R 及び G p C - 抗 m i R の阻害効果の比較。図 2 1 A ~ 2 1 D) C p G - 抗 m i R 1 5 5、C p G - 抗 m i R 1 5 5、C p G - 抗 m i R 1 4 6 a、及び G p C - 抗 m i R 1 4 6 a 処置は、R A W 2 6 4 . 7 (図 2 1 A、2 1 C) 及び A 2 0 細胞 (図 2 1 B、2 1 D) における m i R 1 5 5 または m i R 1 4 6 a 発現を低下させる。細胞を 1 0 0 n M の C p G - 抗 m i R または G p C - 抗 m i R と共に 1 8 時間インキュベートした。図 2 1 E ~ 2 1 H) C p G - 抗 m i R 及び G p C - 抗 m i R 処置は、m i R 1 5 5 及び m i R 1 4 6 a の下流標的を調節する。R A W 2 6 4 . 7 (図 2 1 E、2 1 G) または A 2 0 細胞 (図 2 1 F、2 1 H) を、5 0 0 n M の C p G - 抗 m i R 1 5 5、G p C - 抗 m i R 1 5 5、または C p G - 抗 m i R 1 4 6 a、G p C - 抗 m i R 1 4 6 a で 4 8 時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、S H I P 1 (m i R 1 5 5 標的) または I R A K 1 (m i R 1 4 6 a 標的) に対する抗体を用いて免疫プロットした。

10

【図 2 1 B】図 2 1 A ~ 2 1 H。C p G - 抗 m i R 及び G p C - 抗 m i R の阻害効果の比較。図 2 1 A ~ 2 1 D) C p G - 抗 m i R 1 5 5、C p G - 抗 m i R 1 5 5、C p G - 抗 m i R 1 4 6 a、及び G p C - 抗 m i R 1 4 6 a 処置は、R A W 2 6 4 . 7 (図 2 1 A、2 1 C) 及び A 2 0 細胞 (図 2 1 B、2 1 D) における m i R 1 5 5 または m i R 1 4 6 a 発現を低下させる。細胞を 1 0 0 n M の C p G - 抗 m i R または G p C - 抗 m i R と共に 1 8 時間インキュベートした。図 2 1 E ~ 2 1 H) C p G - 抗 m i R 及び G p C - 抗 m i R 処置は、m i R 1 5 5 及び m i R 1 4 6 a の下流標的を調節する。R A W 2 6 4 . 7 (図 2 1 E、2 1 G) または A 2 0 細胞 (図 2 1 F、2 1 H) を、5 0 0 n M の C p G - 抗 m i R 1 5 5、G p C - 抗 m i R 1 5 5、または C p G - 抗 m i R 1 4 6 a、G p C - 抗 m i R 1 4 6 a で 4 8 時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、S H I P 1 (m i R 1 5 5 標的) または I R A K 1 (m i R 1 4 6 a 標的) に対する抗体を用いて免疫プロットした。

20

【図 2 1 C】図 2 1 A ~ 2 1 H。C p G - 抗 m i R 及び G p C - 抗 m i R の阻害効果の比較。図 2 1 A ~ 2 1 D) C p G - 抗 m i R 1 5 5、C p G - 抗 m i R 1 5 5、C p G - 抗 m i R 1 4 6 a、及び G p C - 抗 m i R 1 4 6 a 処置は、R A W 2 6 4 . 7 (図 2 1 A、2 1 C) 及び A 2 0 細胞 (図 2 1 B、2 1 D) における m i R 1 5 5 または m i R 1 4 6 a 発現を低下させる。細胞を 1 0 0 n M の C p G - 抗 m i R または G p C - 抗 m i R と共に 1 8 時間インキュベートした。図 2 1 E ~ 2 1 H) C p G - 抗 m i R 及び G p C - 抗 m i R 処置は、m i R 1 5 5 及び m i R 1 4 6 a の下流標的を調節する。R A W 2 6 4 . 7 (図 2 1 E、2 1 G) または A 2 0 細胞 (図 2 1 F、2 1 H) を、5 0 0 n M の C p G - 抗 m i R 1 5 5、G p C - 抗 m i R 1 5 5、または C p G - 抗 m i R 1 4 6 a、G p C - 抗 m i R 1 4 6 a で 4 8 時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、S H I P 1 (m i R 1 5 5 標的) または I R A K 1 (m i R 1 4 6 a 標的) に対する抗体を用いて免疫プロットした。

30

【図 2 1 D】図 2 1 A ~ 2 1 H。C p G - 抗 m i R 及び G p C - 抗 m i R の阻害効果の比較。図 2 1 A ~ 2 1 D) C p G - 抗 m i R 1 5 5、C p G - 抗 m i R 1 5 5、C p G - 抗 m i R 1 4 6 a、及び G p C - 抗 m i R 1 4 6 a 処置は、R A W 2 6 4 . 7 (図 2 1 A、2 1 C) 及び A 2 0 細胞 (図 2 1 B、2 1 D) における m i R 1 5 5 または m i R 1 4 6 a 発現を低下させる。細胞を 1 0 0 n M の C p G - 抗 m i R または G p C - 抗 m i R と共に 1 8 時間インキュベートした。図 2 1 E ~ 2 1 H) C p G - 抗 m i R 及び G p C - 抗 m i R 処置は、m i R 1 5 5 及び m i R 1 4 6 a の下流標的を調節する。R A W 2 6 4 . 7 (図 2 1 E、2 1 G) または A 2 0 細胞 (図 2 1 F、2 1 H) を、5 0 0 n M の C p G - 抗 m i R 1 5 5、G p C - 抗 m i R 1 5 5、または C p G - 抗 m i R 1 4 6 a、G p C - 抗 m i R 1 4 6 a で 4 8 時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、S H I P 1 (m i R 1 5 5 標的) または I R A K 1 (m i R 1 4 6 a 標的) に対する抗体を用いて免疫プロットした。

40

【図 2 1 E】図 2 1 A ~ 2 1 H。C p G - 抗 m i R 及び G p C - 抗 m i R の阻害効果の比

50

較。図21A~21D) CpG - 抗miR155、CpG - 抗miR155、CpG - 抗miR146a、及びGpC - 抗miR146a処置は、RAW264.7 (図21A、21C) 及びA20細胞 (図21B、21D) におけるmiR155またはmiR146a発現を低下させる。細胞を100nMのCpG - 抗miRまたはGpC - 抗miRと共に18時間インキュベートした。図21E~21H) CpG - 抗miR及びGpC - 抗miR処置は、miR155及びmiR146aの下流標的を調節する。RAW264.7 (図21E、21G) またはA20細胞 (図21F、21H) を、500nMのCpG - 抗miR155、GpC - 抗miR155、またはCpG - 抗miR146a、GpC - 抗miR146aで48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、SHIP1 (miR155標的) またはIRAK1 (miR146a標的) に対する抗体を用いて免疫ブロットした。

10

【図21F】図21A~21H。CpG - 抗miR及びGpC - 抗miRの阻害効果の比較。図21A~21D) CpG - 抗miR155、CpG - 抗miR155、CpG - 抗miR146a、及びGpC - 抗miR146a処置は、RAW264.7 (図21A、21C) 及びA20細胞 (図21B、21D) におけるmiR155またはmiR146a発現を低下させる。細胞を100nMのCpG - 抗miRまたはGpC - 抗miRと共に18時間インキュベートした。図21E~21H) CpG - 抗miR及びGpC - 抗miR処置は、miR155及びmiR146aの下流標的を調節する。RAW264.7 (図21E、21G) またはA20細胞 (図21F、21H) を、500nMのCpG - 抗miR155、GpC - 抗miR155、またはCpG - 抗miR146a、GpC - 抗miR146aで48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、SHIP1 (miR155標的) またはIRAK1 (miR146a標的) に対する抗体を用いて免疫ブロットした。

20

【図21G】図21A~21H。CpG - 抗miR及びGpC - 抗miRの阻害効果の比較。図21A~21D) CpG - 抗miR155、CpG - 抗miR155、CpG - 抗miR146a、及びGpC - 抗miR146a処置は、RAW264.7 (図21A、21C) 及びA20細胞 (図21B、21D) におけるmiR155またはmiR146a発現を低下させる。細胞を100nMのCpG - 抗miRまたはGpC - 抗miRと共に18時間インキュベートした。図21E~21H) CpG - 抗miR及びGpC - 抗miR処置は、miR155及びmiR146aの下流標的を調節する。RAW264.7 (図21E、21G) またはA20細胞 (図21F、21H) を、500nMのCpG - 抗miR155、GpC - 抗miR155、またはCpG - 抗miR146a、GpC - 抗miR146aで48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、SHIP1 (miR155標的) またはIRAK1 (miR146a標的) に対する抗体を用いて免疫ブロットした。

30

【図21H】図21A~21H。CpG - 抗miR及びGpC - 抗miRの阻害効果の比較。図21A~21D) CpG - 抗miR155、CpG - 抗miR155、CpG - 抗miR146a、及びGpC - 抗miR146a処置は、RAW264.7 (図21A、21C) 及びA20細胞 (図21B、21D) におけるmiR155またはmiR146a発現を低下させる。細胞を100nMのCpG - 抗miRまたはGpC - 抗miRと共に18時間インキュベートした。図21E~21H) CpG - 抗miR及びGpC - 抗miR処置は、miR155及びmiR146aの下流標的を調節する。RAW264.7 (図21E、21G) またはA20細胞 (図21F、21H) を、500nMのCpG - 抗miR155、GpC - 抗miR155、またはCpG - 抗miR146a、GpC - 抗miR146aで48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、SHIP1 (miR155標的) またはIRAK1 (miR146a標的) に対する抗体を用いて免疫ブロットした。

40

【図22A】図22A~22E。CpG - miR146aミミックは、LPS誘発炎症性シグナル伝達を弱める。図22A~22B) CpG - miR146aミミックは、培養CMM白血病 (図22A) 及びA20リンパ腫細胞 (図22B) におけるmiR-146a

50

発現を増加させる。細胞を100 nMのCpG-miR146aミミックで18時間インキュベートした。図22C) CpG-miR146aミミックは、miR146aの下流標的であるIRAK1発現を阻害する。A20細胞を、500 nMのCpG-miR146aミミックまたはLPS(陽性対照として使用)で48時間インキュベートした後、細胞溶解物を採集し、IRAK1特異的抗体を用いて免疫プロットした。図22D~22E) NF-KB応答性レポーター遺伝子を発現するRAW-Blue細胞を、500 nMのCpG-miR146aミミックで24時間処置し、次いで1 pg/mlのLPSでさらに24時間処置した。培養培地を採取し、ELISAを用いて培地中のIL-6レベルに対してQuanti-Blueアッセイキット(図22D)を用いてNF-KB活性について分析した(図22E)。

10

【図22B】図22A~22E。CpG-miR146aミミックは、LPS誘発炎症性シグナル伝達を弱める。図22A~22B) CpG-miR146aミミックは、培養CMM白血病(図22A)及びA20リンパ腫細胞(図22B)におけるmiR-146a発現を増加させる。細胞を100 nMのCpG-miR146aミミックで18時間インキュベートした。図22C) CpG-miR146aミミックは、miR146aの下流標的であるIRAK1発現を阻害する。A20細胞を、500 nMのCpG-miR146aミミックまたはLPS(陽性対照として使用)で48時間インキュベートした後、細胞溶解物を採集し、IRAK1特異的抗体を用いて免疫プロットした。図22D~22E) NF-KB応答性レポーター遺伝子を発現するRAW-Blue細胞を、500 nMのCpG-miR146aミミックで24時間処置し、次いで1 pg/mlのLPSでさらに24時間処置した。培養培地を採取し、ELISAを用いて培地中のIL-6レベルに対してQuanti-Blueアッセイキット(図22D)を用いてNF-KB活性について分析した(図22E)。

20

【図22C】図22A~22E。CpG-miR146aミミックは、LPS誘発炎症性シグナル伝達を弱める。図22A~22B) CpG-miR146aミミックは、培養CMM白血病(図22A)及びA20リンパ腫細胞(図22B)におけるmiR-146a発現を増加させる。細胞を100 nMのCpG-miR146aミミックで18時間インキュベートした。図22C) CpG-miR146aミミックは、miR146aの下流標的であるIRAK1発現を阻害する。A20細胞を、500 nMのCpG-miR146aミミックまたはLPS(陽性対照として使用)で48時間インキュベートした後、細胞溶解物を採集し、IRAK1特異的抗体を用いて免疫プロットした。図22D~22E) NF-KB応答性レポーター遺伝子を発現するRAW-Blue細胞を、500 nMのCpG-miR146aミミックで24時間処置し、次いで1 pg/mlのLPSでさらに24時間処置した。培養培地を採取し、ELISAを用いて培地中のIL-6レベルに対してQuanti-Blueアッセイキット(図22D)を用いてNF-KB活性について分析した(図22E)。

30

【図22D】図22A~22E。CpG-miR146aミミックは、LPS誘発炎症性シグナル伝達を弱める。図22A~22B) CpG-miR146aミミックは、培養CMM白血病(図22A)及びA20リンパ腫細胞(図22B)におけるmiR-146a発現を増加させる。細胞を100 nMのCpG-miR146aミミックで18時間インキュベートした。図22C) CpG-miR146aミミックは、miR146aの下流標的であるIRAK1発現を阻害する。A20細胞を、500 nMのCpG-miR146aミミックまたはLPS(陽性対照として使用)で48時間インキュベートした後、細胞溶解物を採集し、IRAK1特異的抗体を用いて免疫プロットした。図22D~22E) NF-KB応答性レポーター遺伝子を発現するRAW-Blue細胞を、500 nMのCpG-miR146aミミックで24時間処置し、次いで1 pg/mlのLPSでさらに24時間処置した。培養培地を採取し、ELISAを用いて培地中のIL-6レベルに対してQuanti-Blueアッセイキット(図22D)を用いてNF-KB活性について分析した(図22E)。

40

【図22E】図22A~22E。CpG-miR146aミミックは、LPS誘発炎症性

50

シグナル伝達を弱める。図 2 2 A ~ 2 2 B) CpG - miR 1 4 6 a ミミックは、培養 CMM 白血病 (図 2 2 A) 及び A 2 0 リンパ腫細胞 (図 2 2 B) における miR - 1 4 6 a 発現を増加させる。細胞を 1 0 0 nM の CpG - miR 1 4 6 a ミミックで 1 8 時間インキュベートした。図 2 2 C) CpG - miR 1 4 6 a ミミックは、miR 1 4 6 a の下流標的である IRAK 1 発現を阻害する。A 2 0 細胞を、5 0 0 nM の CpG - miR 1 4 6 a ミミックまたは LPS (陽性対照として使用) で 4 8 時間インキュベートした後、細胞溶解物を採集し、IRAK 1 特異的抗体を用いて免疫プロットした。図 2 2 D ~ 2 2 E) NF - KB 応答性レポーター遺伝子を発現する RAW - Blue 細胞を、5 0 0 nM の CpG - miR 1 4 6 a ミミックで 2 4 時間処置し、次いで 1 p g / m l の LPS でさらに 2 4 時間処置した。培養培地を採取し、ELISA を用いて培地中の IL - 6 レベルに対して Quanti - Blue アッセイキット (図 2 2 D) を用いて NF - KB 活性について分析した (図 2 2 E) 。

10

【図 2 3 A】図 2 3 A ~ 2 3 K。CpG - miR - 1 2 6 阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K 5 6 2 細胞に miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3、または裸の miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3 (図 2 3 A 及び B では対照として標識されている) を含有する CpG - miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3 (CpG)、Ab - NP (Ab - NP) または TF - NP (TF - NP) の添加の 4 時間後 (図 2 3 A) 及び 2 4 時間後 (図 2 3 B) でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は 2 回繰り返した。K 5 6 2 における miR - 1 2 6 発現を 2 4 時間目に Q - RT - PCR により測定した (n = 3) (図 2 3 C)。CpG - miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3 (5 0 0 nM) の添加の 4 時間後の HUVEC (図 2 3 D)、ヒト正常 (図 2 3 E)、及び CML (図 2 3 F) CD 3 4 + CD 3 8 - 細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。CpG - miR - 1 2 6 阻害剤 (5 0 0 nM) で 2 4 時間処置した HUVEC (図 2 3 G)、正常 (図 2 3 H)、及び CML (図 2 3 I) CD 3 4 + CD 3 8 - 細胞における miR - 1 2 6 発現を示す (n = 4)。EDU 染色によって CpG - miR - 1 2 6 阻害剤 (5 0 0 nM) で処置した正常 (図 2 3 J) 及び CML (図 2 3 K) CD 3 4 + CD 3 8 - 細胞における 2 つの細胞周期実験の 1 つを示す。略語：ab - NP (CD 4 5 抗体抱合ナノ粒子)、TF - NP (トランスフェリン (TF) 抱合ナノ粒子)。

20

【図 2 3 B】図 2 3 A ~ 2 3 K。CpG - miR - 1 2 6 阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K 5 6 2 細胞に miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3、または裸の miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3 (図 2 3 A 及び B では対照として標識されている) を含有する CpG - miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3 (CpG)、Ab - NP (Ab - NP) または TF - NP (TF - NP) の添加の 4 時間後 (図 2 3 A) 及び 2 4 時間後 (図 2 3 B) でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は 2 回繰り返した。K 5 6 2 における miR - 1 2 6 発現を 2 4 時間目に Q - RT - PCR により測定した (n = 3) (図 2 3 C)。CpG - miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3 (5 0 0 nM) の添加の 4 時間後の HUVEC (図 2 3 D)、ヒト正常 (図 2 3 E)、及び CML (図 2 3 F) CD 3 4 + CD 3 8 - 細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。CpG - miR - 1 2 6 阻害剤 (5 0 0 nM) で 2 4 時間処置した HUVEC (図 2 3 G)、正常 (図 2 3 H)、及び CML (図 2 3 I) CD 3 4 + CD 3 8 - 細胞における miR - 1 2 6 発現を示す (n = 4)。EDU 染色によって CpG - miR - 1 2 6 阻害剤 (5 0 0 nM) で処置した正常 (図 2 3 J) 及び CML (図 2 3 K) CD 3 4 + CD 3 8 - 細胞における 2 つの細胞周期実験の 1 つを示す。略語：ab - NP (CD 4 5 抗体抱合ナノ粒子)、TF - NP (トランスフェリン (TF) 抱合ナノ粒子)。

30

40

【図 2 3 C】図 2 3 A ~ 2 3 K。CpG - miR - 1 2 6 阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K 5 6 2 細胞に miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3、または裸の miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3 (図 2 3 A 及び B では対照として標識されている) を含有する CpG - miR - 1 2 6 阻害剤 - Cy 3 (CpG)、Ab - NP (Ab - NP) または TF - NP (TF - NP) の添加の 4 時間後 (図 2 3 A) 及び 2 4 時間後 (図 2 3 B) でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験

50

。実験は2回繰り返した。K562におけるmiR-126発現を24時間目にQ-RT-PCRにより測定した(n=3)(図23C)。CpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)の添加の4時間後のHUVEC(図23D)、ヒト正常(図23E)、及びCML(図23F)CD34+CD38-細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。CpG-miR-126阻害剤(500nM)で24時間処置したHUVEC(図23G)、正常(図23H)、及びCML(図23I)CD34+CD38-細胞におけるmiR-126発現を示す(n=4)。EDU染色によってCpG-miR-126阻害剤(500nM)で処置した正常(図23J)及びCML(図23K)CD34+CD38-細胞における2つの細胞周期実験の1つを示す。略語: ab-NP(CD45抗体抱合ナノ粒子)、TF-NP(トランスフェリン(TF)抱合ナノ粒子)。

【図23D】図23A~23K。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K562細胞にmiR-126阻害剤-Cy3、または裸のmiR-126阻害剤-Cy3(図23A及びBでは対照として標識されている)を含有するCpG-miR-126阻害剤-Cy3(CpG)、Ab-NP(Ab-NP)またはTF-NP(TF-NP)の添加の4時間後(図23A)及び24時間後(図23B)でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は2回繰り返した。K562におけるmiR-126発現を24時間目にQ-RT-PCRにより測定した(n=3)(図23C)。CpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)の添加の4時間後のHUVEC(図23D)、ヒト正常(図23E)、及びCML(図23F)CD34+CD38-細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。CpG-miR-126阻害剤(500nM)で24時間処置したHUVEC(図23G)、正常(図23H)、及びCML(図23I)CD34+CD38-細胞におけるmiR-126発現を示す(n=4)。EDU染色によってCpG-miR-126阻害剤(500nM)で処置した正常(図23J)及びCML(図23K)CD34+CD38-細胞における2つの細胞周期実験の1つを示す。略語: ab-NP(CD45抗体抱合ナノ粒子)、TF-NP(トランスフェリン(TF)抱合ナノ粒子)。

【図23E】図23A~23K。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K562細胞にmiR-126阻害剤-Cy3、または裸のmiR-126阻害剤-Cy3(図23A及びBでは対照として標識されている)を含有するCpG-miR-126阻害剤-Cy3(CpG)、Ab-NP(Ab-NP)またはTF-NP(TF-NP)の添加の4時間後(図23A)及び24時間後(図23B)でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は2回繰り返した。K562におけるmiR-126発現を24時間目にQ-RT-PCRにより測定した(n=3)(図23C)。CpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)の添加の4時間後のHUVEC(図23D)、ヒト正常(図23E)、及びCML(図23F)CD34+CD38-細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。CpG-miR-126阻害剤(500nM)で24時間処置したHUVEC(図23G)、正常(図23H)、及びCML(図23I)CD34+CD38-細胞におけるmiR-126発現を示す(n=4)。EDU染色によってCpG-miR-126阻害剤(500nM)で処置した正常(図23J)及びCML(図23K)CD34+CD38-細胞における2つの細胞周期実験の1つを示す。略語: ab-NP(CD45抗体抱合ナノ粒子)、TF-NP(トランスフェリン(TF)抱合ナノ粒子)。

【図23F】図23A~23K。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K562細胞にmiR-126阻害剤-Cy3、または裸のmiR-126阻害剤-Cy3(図23A及びBでは対照として標識されている)を含有するCpG-miR-126阻害剤-Cy3(CpG)、Ab-NP(Ab-NP)またはTF-NP(TF-NP)の添加の4時間後(図23A)及び24時間後(図23B)でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は2回繰り返した。K562におけるmiR-126発現を24時間目にQ-RT-PCRにより測定した(n=3)(図23C)。CpG-miR-126阻害剤-Cy

10

20

30

40

50

3 (500 nM) の添加の4時間後のH U V E C (図23D)、ヒト正常(図23E)、及びC M L (図23F) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤(500 nM)で24時間処置したH U V E C (図23G)、正常(図23H)、及びC M L (図23I) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞におけるm i R - 1 2 6 発現を示す(n = 4)。E D U 染色によってC p G - m i R - 1 2 6 阻害剤(500 nM)で処置した正常(図23J)及びC M L (図23K) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞における2つの細胞周期実験の1つを示す。略語: a b - N P (C D 4 5 抗体抱合ナノ粒子)、T F - N P (トランスフェリン(T F)抱合ナノ粒子)。

【図23G】図23A ~ 23K。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K 5 6 2 細胞にm i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3、または裸のm i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (図23A及びBでは対照として標識されている)を含有するC p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (C p G)、A b - N P (A b - N P)またはT F - N P (T F - N P)の添加の4時間後(図23A)及び24時間後(図23B)でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は2回繰り返した。K 5 6 2 におけるm i R - 1 2 6 発現を24時間目にQ - R T - P C Rにより測定した(n = 3)(図23C)。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (500 nM)の添加の4時間後のH U V E C (図23D)、ヒト正常(図23E)、及びC M L (図23F) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤(500 nM)で24時間処置したH U V E C (図23G)、正常(図23H)、及びC M L (図23I) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞におけるm i R - 1 2 6 発現を示す(n = 4)。E D U 染色によってC p G - m i R - 1 2 6 阻害剤(500 nM)で処置した正常(図23J)及びC M L (図23K) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞における2つの細胞周期実験の1つを示す。略語: a b - N P (C D 4 5 抗体抱合ナノ粒子)、T F - N P (トランスフェリン(T F)抱合ナノ粒子)。

【図23H】図23A ~ 23K。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K 5 6 2 細胞にm i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3、または裸のm i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (図23A及びBでは対照として標識されている)を含有するC p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (C p G)、A b - N P (A b - N P)またはT F - N P (T F - N P)の添加の4時間後(図23A)及び24時間後(図23B)でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は2回繰り返した。K 5 6 2 におけるm i R - 1 2 6 発現を24時間目にQ - R T - P C Rにより測定した(n = 3)(図23C)。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (500 nM)の添加の4時間後のH U V E C (図23D)、ヒト正常(図23E)、及びC M L (図23F) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤(500 nM)で24時間処置したH U V E C (図23G)、正常(図23H)、及びC M L (図23I) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞におけるm i R - 1 2 6 発現を示す(n = 4)。E D U 染色によってC p G - m i R - 1 2 6 阻害剤(500 nM)で処置した正常(図23J)及びC M L (図23K) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞における2つの細胞周期実験の1つを示す。略語: a b - N P (C D 4 5 抗体抱合ナノ粒子)、T F - N P (トランスフェリン(T F)抱合ナノ粒子)。

【図23I】図23A ~ 23K。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K 5 6 2 細胞にm i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3、または裸のm i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (図23A及びBでは対照として標識されている)を含有するC p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (C p G)、A b - N P (A b - N P)またはT F - N P (T F - N P)の添加の4時間後(図23A)及び24時間後(図23B)でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は2回繰り返した。K 5 6 2 におけるm i R - 1 2 6 発現を24時間目にQ - R T - P C Rにより測定した(n = 3)(図23C)。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (500 nM)の添加の4時間後のH U V E C (図23D)、ヒト正常(図23E)、及びC M L (図23F) C D 3 4 + C D 3 8 - 細胞における取り込みをフローサイトメト

10

20

30

40

50

リーにより測定した。CpG-miR-126阻害剤(500nM)で24時間処置したHUV EC(図23G)、正常(図23H)、及びCML(図23I)CD34+CD38-細胞におけるmiR-126発現を示す(n=4)。EDU染色によってCpG-miR-126阻害剤(500nM)で処置した正常(図23J)及びCML(図23K)CD34+CD38-細胞における2つの細胞周期実験の1つを示す。略語:ab-NP(CD45抗体抱合ナノ粒子)、TF-NP(トランスフェリン(TF)抱合ナノ粒子)。

【図23J】図23A~23K。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K562細胞にmiR-126阻害剤-Cy3、または裸のmiR-126阻害剤-Cy3(図23A及びBでは対照として標識されている)を含有するCpG-miR-126阻害剤-Cy3(CpG)、Ab-NP(Ab-NP)またはTF-NP(TF-NP)の添加の4時間後(図23A)及び24時間後(図23B)でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は2回繰り返した。K562におけるmiR-126発現を24時間目にQ-RT-PCRにより測定した(n=3)(図23C)。CpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)の添加の4時間後のHUV EC(図23D)、ヒト正常(図23E)、及びCML(図23F)CD34+CD38-細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。CpG-miR-126阻害剤(500nM)で24時間処置したHUV EC(図23G)、正常(図23H)、及びCML(図23I)CD34+CD38-細胞におけるmiR-126発現を示す(n=4)。EDU染色によってCpG-miR-126阻害剤(500nM)で処置した正常(図23J)及びCML(図23K)CD34+CD38-細胞における2つの細胞周期実験の1つを示す。略語:ab-NP(CD45抗体抱合ナノ粒子)、TF-NP(トランスフェリン(TF)抱合ナノ粒子)。

【図23K】図23A~23K。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。K562細胞にmiR-126阻害剤-Cy3、または裸のmiR-126阻害剤-Cy3(図23A及びBでは対照として標識されている)を含有するCpG-miR-126阻害剤-Cy3(CpG)、Ab-NP(Ab-NP)またはTF-NP(TF-NP)の添加の4時間後(図23A)及び24時間後(図23B)でのフローサイトメトリー分析によって測定した取り込み試験。実験は2回繰り返した。K562におけるmiR-126発現を24時間目にQ-RT-PCRにより測定した(n=3)(図23C)。CpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)の添加の4時間後のHUV EC(図23D)、ヒト正常(図23E)、及びCML(図23F)CD34+CD38-細胞における取り込みをフローサイトメトリーにより測定した。CpG-miR-126阻害剤(500nM)で24時間処置したHUV EC(図23G)、正常(図23H)、及びCML(図23I)CD34+CD38-細胞におけるmiR-126発現を示す(n=4)。EDU染色によってCpG-miR-126阻害剤(500nM)で処置した正常(図23J)及びCML(図23K)CD34+CD38-細胞における2つの細胞周期実験の1つを示す。略語:ab-NP(CD45抗体抱合ナノ粒子)、TF-NP(トランスフェリン(TF)抱合ナノ粒子)。

【図24A】図24A~24I。CpG-miR-126阻害剤によるmiR-126のノックダウンは、インビボでのNILと組み合わせたマウスCML LSKの排除を高める。SCL-tTA/BCR-ABLマウス(CD45.2)由来のBM細胞を類遺伝子B6マウス(CD45.1、n=40)に移植して、CML様疾患のマウスのコホートを作製した。移植4週間後のCML発生の確認後、マウスを4群(各n=10)に無作為に分け、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-scrRNA(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-miR-126阻害剤+NIL(50mg/kg、強制飼養により毎日)、及びCpG-scrRNA+NILを3週間処置した。末梢血(PB)(図24A)、脾臓(図24B)及び骨髓(BM)(図24C)のドナーCML細胞の百分率、脾臓(24D)及び及びBM(図24E)におけるドナーCML LSKの数、ならびに3週間の処置後の脾臓(図24F)及びBM(図24G)におけるドナーCML長期造血幹細胞(LTHSC)の数を測定した。マウスの別のコホ

10

20

30

40

50

-トを3週間処置し、次いで処置の3週間後に生存試験を行った(各群で $n = 10$)(図24H)。処置した白血病マウス(3週間)からのBM細胞(CD45.2)をプールし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞/マウスを900cGyで照射された二次類遺伝子系統CD45.1レシピエントマウスに移植した($n = 6$ マウス/用量/条件 $\times 4$ 用量 $\times 4$ 条件=96マウス)。レシピエントマウスを、血液中のCML細胞生着及びWBCカウントによって白血病発生について16週間監視した。L-Calソフトウェアを用いてLICの頻度を定量した(図24I)。略語: NIL(ニロチニブ)、PB(末梢血)、BM(骨髄)、LTHSC(長期間の造血幹細胞)、LIC(白血病開始細胞)、LSK(系統: Sca-1+c-kit+細胞)。

【図24B】図24A~24I。CpG-miR-126阻害剤によるmiR-126のノックダウンは、インビボでのNILと組み合わせたマウスCML LSCの排除を高める。SCL-tTA/BCR-ABLマウス(CD45.2)由来のBM細胞を類遺伝子B6マウス(CD45.1、 $n = 40$)に移植して、CML様疾患のマウスのコホ-トを作製した。移植4週間後のCML発生の確認後、マウスを4群(各 $n = 10$)に無作為に分け、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-scrRNA(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-miR-126阻害剤+NIL(50mg/kg、強制飼養により毎日)、及びCpG-scrRNA+NILを3週間処置した。末梢血(PB)(図24A)、脾臓(図24B)及び骨髄(BM)(図24C)のドナーCML細胞の百分率、脾臓(24D)及び及びBM(図24E)におけるドナーCML LSKの数、ならびに3週間の処置後の脾臓(図24F)及びBM(図24G)におけるドナーCML長期造血幹細胞(LTHSC)の数を測定した。マウスの別のコホ-トを3週間処置し、次いで処置の3週間後に生存試験を行った(各群で $n = 10$)(図24H)。処置した白血病マウス(3週間)からのBM細胞(CD45.2)をプールし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞/マウスを900cGyで照射された二次類遺伝子系統CD45.1レシピエントマウスに移植した($n = 6$ マウス/用量/条件 $\times 4$ 用量 $\times 4$ 条件=96マウス)。レシピエントマウスを、血液中のCML細胞生着及びWBCカウントによって白血病発生について16週間監視した。L-Calソフトウェアを用いてLICの頻度を定量した(図24I)。略語: NIL(ニロチニブ)、PB(末梢血)、BM(骨髄)、LTHSC(長期間の造血幹細胞)、LIC(白血病開始細胞)、LSK(系統: Sca-1+c-kit+細胞)。

【図24C】図24A~24I。CpG-miR-126阻害剤によるmiR-126のノックダウンは、インビボでのNILと組み合わせたマウスCML LSCの排除を高める。SCL-tTA/BCR-ABLマウス(CD45.2)由来のBM細胞を類遺伝子B6マウス(CD45.1、 $n = 40$)に移植して、CML様疾患のマウスのコホ-トを作製した。移植4週間後のCML発生の確認後、マウスを4群(各 $n = 10$)に無作為に分け、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-scrRNA(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-miR-126阻害剤+NIL(50mg/kg、強制飼養により毎日)、及びCpG-scrRNA+NILを3週間処置した。末梢血(PB)(図24A)、脾臓(図24B)及び骨髄(BM)(図24C)のドナーCML細胞の百分率、脾臓(24D)及び及びBM(図24E)におけるドナーCML LSKの数、ならびに3週間の処置後の脾臓(図24F)及びBM(図24G)におけるドナーCML長期造血幹細胞(LTHSC)の数を測定した。マウスの別のコホ-トを3週間処置し、次いで処置の3週間後に生存試験を行った(各群で $n = 10$)(図24H)。処置した白血病マウス(3週間)からのBM細胞(CD45.2)をプールし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞/マウスを900cGyで照射された二次類遺伝子系統CD45.1レシピエントマウスに移植した($n = 6$ マウス/用量/条件 $\times 4$ 用量 $\times 4$ 条件=96マウス)。レシピエントマウスを、血液中のCML細胞生着及びWBCカウントによって白血病発生について16週間監視した。L-Calソフトウェアを用いてLICの頻度を定量した(図24I)。略語: NIL(ニロチニブ)、PB(末梢血)、BM(骨髄)、LTHSC(長期間の造血幹細胞)、LIC(白

10

20

30

40

50

血病開始細胞)、LSK(系統: Sca-1+c-kit+細胞)。

【図24D】図24A~24I。CpG-miR-126阻害剤によるmiR-126のノックダウンは、インビボでのNILと組み合わせたマウスCML LSCの排除を高める。SCL-tTA/BCR-ABLマウス(CD45.2)由来のBM細胞を類遺伝子B6マウス(CD45.1、n=40)に移植して、CML様疾患のマウスのコホ-トを作製した。移植4週間後のCML発生の確認後、マウスを4群(各n=10)に無作為に分け、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-scrRNA(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-miR-126阻害剤+NIL(50mg/kg、強制飼養により毎日)、及びCpG-scrRNA+NILを3週間処置した。末梢血(PB)(図24A)、脾臓(図24B)及び骨髄(BM)(図24C)のドナーCML細胞の百分率、脾臓(24D)及び及びBM(図24E)におけるドナーCML LSKの数、ならびに3週間の処置後の脾臓(図24F)及びBM(図24G)におけるドナーCML長期造血幹細胞(LTHSC)の数を測定した。マウスの別のコホ-トを3週間処置し、次いで処置の3週間後に生存試験を行った(各群でn=10)(図24H)。処置した白血病マウス(3週間)からのBM細胞(CD45.2)をプールし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞/マウスを900cGyで照射された二次類遺伝子系統CD45.1レシピエントマウスに移植した(n=6マウス/用量/条件×4用量×4条件=96マウス)。レシピエントマウスを、血液中のCML細胞生着及びWBCカウントによって白血病発生について16週間監視した。L-Calソフトウェアを用いてLICの頻度を定量した(図24I)。略語: NIL(ニロチニブ)、PB(末梢血)、BM(骨髄)、LTHSC(長期間の造血幹細胞)、LIC(白血病開始細胞)、LSK(系統: Sca-1+c-kit+細胞)。

10

20

【図24E】図24A~24I。CpG-miR-126阻害剤によるmiR-126のノックダウンは、インビボでのNILと組み合わせたマウスCML LSCの排除を高める。SCL-tTA/BCR-ABLマウス(CD45.2)由来のBM細胞を類遺伝子B6マウス(CD45.1、n=40)に移植して、CML様疾患のマウスのコホ-トを作製した。移植4週間後のCML発生の確認後、マウスを4群(各n=10)に無作為に分け、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-scrRNA(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-miR-126阻害剤+NIL(50mg/kg、強制飼養により毎日)、及びCpG-scrRNA+NILを3週間処置した。末梢血(PB)(図24A)、脾臓(図24B)及び骨髄(BM)(図24C)のドナーCML細胞の百分率、脾臓(24D)及び及びBM(図24E)におけるドナーCML LSKの数、ならびに3週間の処置後の脾臓(図24F)及びBM(図24G)におけるドナーCML長期造血幹細胞(LTHSC)の数を測定した。マウスの別のコホ-トを3週間処置し、次いで処置の3週間後に生存試験を行った(各群でn=10)(図24H)。処置した白血病マウス(3週間)からのBM細胞(CD45.2)をプールし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞/マウスを900cGyで照射された二次類遺伝子系統CD45.1レシピエントマウスに移植した(n=6マウス/用量/条件×4用量×4条件=96マウス)。レシピエントマウスを、血液中のCML細胞生着及びWBCカウントによって白血病発生について16週間監視した。L-Calソフトウェアを用いてLICの頻度を定量した(図24I)。略語: NIL(ニロチニブ)、PB(末梢血)、BM(骨髄)、LTHSC(長期間の造血幹細胞)、LIC(白血病開始細胞)、LSK(系統: Sca-1+c-kit+細胞)。

30

40

【図24F】図24A~24I。CpG-miR-126阻害剤によるmiR-126のノックダウンは、インビボでのNILと組み合わせたマウスCML LSCの排除を高める。SCL-tTA/BCR-ABLマウス(CD45.2)由来のBM細胞を類遺伝子B6マウス(CD45.1、n=40)に移植して、CML様疾患のマウスのコホ-トを作製した。移植4週間後のCML発生の確認後、マウスを4群(各n=10)に無作為に分け、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-scrRNA(5mg/kg、静脈内に週4回)、CpG-miR-126阻害剤+NIL(

50

50 mg / kg、強制飼養により毎日)、及び CpG - s c r R N A + N I L を 3 週間処置した。末梢血 (P B) (図 2 4 A)、脾臓 (図 2 4 B) 及び骨髄 (B M) (図 2 4 C) のドナー C M L 細胞の百分率、脾臓 (2 4 D) 及び及び B M (図 2 4 E) におけるドナー C M L L S K の数、ならびに 3 週間の処置後の脾臓 (図 2 4 F) 及び B M (図 2 4 G) におけるドナー C M L 長期造血幹細胞 (L T H S C) の数を測定した。マウスの別のコホ - トを 3 週間処置し、次いで処置の 3 週間後に生存試験を行った (各群で n = 1 0) (図 2 4 H)。処置した白血病マウス (3 週間) からの B M 細胞 (C D 4 5 . 2) をプールし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞 / マウスを 9 0 0 c G y で照射された二次類遺伝子系統 C D 4 5 . 1 レシピエントマウスに移植した (n = 6 マウス / 用量 / 条件 \times 4 用量 \times 4 条件 = 9 6 マウス)。レシピエントマウスを、血液中の C M L 細胞生着及び W B C カウントによって白血病発生について 1 6 週間監視した。L - C a l c ソフトウェアを用いて L I C の頻度を定量した (図 2 4 I)。略語: N I L (ニロチニブ)、P B (末梢血)、B M (骨髄)、L T H S C (長期間の造血幹細胞)、L I C (白血病開始細胞)、L S K (系統: S c a - 1 + c - k i t + 細胞)。

【図 2 4 G】図 2 4 A ~ 2 4 I。CpG - m i R - 1 2 6 阻害剤による m i R - 1 2 6 のノックダウンは、インビボでの N I L と組み合わせたマウス C M L L S C の排除を高める。S C L - t T A / B C R - A B L マウス (C D 4 5 . 2) 由来の B M 細胞を類遺伝子 B 6 マウス (C D 4 5 . 1、n = 4 0) に移植して、C M L 様疾患のマウスのコホ - トを作製した。移植 4 週間後の C M L 発生の確認後、マウスを 4 群 (各 n = 1 0) に無作為に分け、CpG - m i R - 1 2 6 阻害剤 (5 mg / kg、静脈内に週 4 回)、CpG - s c r R N A (5 mg / kg、静脈内に週 4 回)、CpG - m i R - 1 2 6 阻害剤 + N I L (5 0 mg / kg、強制飼養により毎日)、及び CpG - s c r R N A + N I L を 3 週間処置した。末梢血 (P B) (図 2 4 A)、脾臓 (図 2 4 B) 及び骨髄 (B M) (図 2 4 C) のドナー C M L 細胞の百分率、脾臓 (2 4 D) 及び及び B M (図 2 4 E) におけるドナー C M L L S K の数、ならびに 3 週間の処置後の脾臓 (図 2 4 F) 及び B M (図 2 4 G) におけるドナー C M L 長期造血幹細胞 (L T H S C) の数を測定した。マウスの別のコホ - トを 3 週間処置し、次いで処置の 3 週間後に生存試験を行った (各群で n = 1 0) (図 2 4 H)。処置した白血病マウス (3 週間) からの B M 細胞 (C D 4 5 . 2) をプールし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞 / マウスを 9 0 0 c G y で照射された二次類遺伝子系統 C D 4 5 . 1 レシピエントマウスに移植した (n = 6 マウス / 用量 / 条件 \times 4 用量 \times 4 条件 = 9 6 マウス)。レシピエントマウスを、血液中の C M L 細胞生着及び W B C カウントによって白血病発生について 1 6 週間監視した。L - C a l c ソフトウェアを用いて L I C の頻度を定量した (図 2 4 I)。略語: N I L (ニロチニブ)、P B (末梢血)、B M (骨髄)、L T H S C (長期間の造血幹細胞)、L I C (白血病開始細胞)、L S K (系統: S c a - 1 + c - k i t + 細胞)。

【図 2 4 H】図 2 4 A ~ 2 4 I。CpG - m i R - 1 2 6 阻害剤による m i R - 1 2 6 のノックダウンは、インビボでの N I L と組み合わせたマウス C M L L S C の排除を高める。S C L - t T A / B C R - A B L マウス (C D 4 5 . 2) 由来の B M 細胞を類遺伝子 B 6 マウス (C D 4 5 . 1、n = 4 0) に移植して、C M L 様疾患のマウスのコホ - トを作製した。移植 4 週間後の C M L 発生の確認後、マウスを 4 群 (各 n = 1 0) に無作為に分け、CpG - m i R - 1 2 6 阻害剤 (5 mg / kg、静脈内に週 4 回)、CpG - s c r R N A (5 mg / kg、静脈内に週 4 回)、CpG - m i R - 1 2 6 阻害剤 + N I L (5 0 mg / kg、強制飼養により毎日)、及び CpG - s c r R N A + N I L を 3 週間処置した。末梢血 (P B) (図 2 4 A)、脾臓 (図 2 4 B) 及び骨髄 (B M) (図 2 4 C) のドナー C M L 細胞の百分率、脾臓 (2 4 D) 及び及び B M (図 2 4 E) におけるドナー C M L L S K の数、ならびに 3 週間の処置後の脾臓 (図 2 4 F) 及び B M (図 2 4 G) におけるドナー C M L 長期造血幹細胞 (L T H S C) の数を測定した。マウスの別のコホ - トを 3 週間処置し、次いで処置の 3 週間後に生存試験を行った (各群で n = 1 0) (図 2 4 H)。処置した白血病マウス (3 週間) からの B M 細胞 (C D 4 5 . 2) をプールし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞 / マウスを 9 0 0 c G y で

10

20

30

40

50

照射された二次類遺伝子系統 CD45.1 レシピエントマウスに移植した (n = 6 マウス / 用量 / 条件 × 4 用量 × 4 条件 = 96 マウス)。レシピエントマウスを、血液中の CML 細胞生着及び WBC カウントによって白血病発生について 16 週間監視した。L - Cal c ソフトウェアを用いて LIC の頻度を定量した (図 24 I)。略語: NIL (ニロチニブ)、PB (末梢血)、BM (骨髄)、LTHSC (長期間の造血幹細胞)、LIC (白血病開始細胞)、LSK (系統: Sca-1 + c-kit + 細胞)。

【図 24 I】図 24 A ~ 24 I。CpG - miR - 126 阻害剤による miR - 126 のノックダウンは、インビボでの NIL と組み合わせたマウス CML LSC の排除を高める。SCL - tTA / BCR - ABL マウス (CD45.2) 由来の BM 細胞を類遺伝子 B6 マウス (CD45.1, n = 40) に移植して、CML 様疾患のマウスのコホ - トを 10 作製した。移植 4 週間後の CML 発生の確認後、マウスを 4 群 (各 n = 10) に無作為に分け、CpG - miR - 126 阻害剤 (5 mg / kg、静脈内に週 4 回)、CpG - s cr RNA (5 mg / kg、静脈内に週 4 回)、CpG - miR - 126 阻害剤 + NIL (50 mg / kg、強制飼養により毎日)、及び CpG - s cr RNA + NIL を 3 週間処置した。末梢血 (PB) (図 24 A)、脾臓 (図 24 B) 及び骨髄 (BM) (図 24 C) のドナー CML 細胞の百分率、脾臓 (24 D) 及び及び BM (図 24 E) におけるドナー CML LSK の数、ならびに 3 週間の処置後の脾臓 (図 24 F) 及び BM (図 24 G) におけるドナー CML 長期造血幹細胞 (LTHSC) の数を測定した。マウスの別のコホ - トを 3 週間処置し、次いで処置の 3 週間後に生存試験を行った (各群で n = 10) (図 24 H)。処置した白血病マウス (3 週間) からの BM 細胞 (CD45.2) をプー 20 ルし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞 / マウスを 900 cGy で照射された二次類遺伝子系統 CD45.1 レシピエントマウスに移植した (n = 6 マウス / 用量 / 条件 × 4 用量 × 4 条件 = 96 マウス)。レシピエントマウスを、血液中の CML 細胞生着及び WBC カウントによって白血病発生について 16 週間監視した。L - Cal c ソフトウェアを用いて LIC の頻度を定量した (図 24 I)。略語: NIL (ニロチニブ)、PB (末梢血)、BM (骨髄)、LTHSC (長期間の造血幹細胞)、LIC (白血病開始細胞)、LSK (系統: Sca-1 + c-kit + 細胞)。

【図 25 A】図 25 A ~ 25 O。CpG - miR - 126 阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウス CML BM、LTHSC 及び EC 細胞を CpG - miR - 126 阻害剤 - Cy3 (500 nM) で 4 時間処置し 30 及び、次いで Cy3 + 細胞をフローサイトメトリーによって検出した (図 25 A)。細胞をまた 24 時間後に採集し、Q - RT - PCR によって miR - 126 発現を測定した (図 25 B)。細胞周期は、CML BM LTHSC 中に CpG - miR - 126 阻害剤を添加して 72 時間後に EDU 染色により測定した。2 つの代表的なプロットの 1 つを (図 25 C) に示す。CML マウスを、CpG - miR 126 阻害剤 - Cy3 で、1 回用量 (5 mg / kg、静脈内注射) で処置し、処置から 16 時間後に、BM、LTHSC 及び EC における Cy3 の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した (図 25 D)。正常及び CML マウスも、CpG - miR - 126 阻害剤 (5 mg / kg / 日、静脈内に毎日) で 3 日間処置し、大腿骨からの BM、LTHSC 及び EC を選別し、miR - 126 発現を Q - RT - PCR によって決定した (図 25 E ~ 25 F)。野生型 B6 マウスを Cp 40 G - s cr RNA (s cr RNA) または CpG - miR - 126 阻害剤 (阻害剤) (5 mg / kg / 日、静脈内注射) で 3 週間処置し、BM 細胞を採集して分析した。赤血球 (RBC、図 25 G)、WBC (図 25 H)、PLT (図 25 I)、BM 単核細胞 (図 25 J)、LTHSC (図 25 K)、及び EC (図 25 L) の数を示す。処置した正常マウスからの BM 細胞 (CD45.2) を CD45.1 類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16 週目での血液中 (図 25 M) 及び BM 及び脾臓 (図 25 N) におけるドナー細胞生着、ならびに 16 週目での BM におけるドナーの LTHSC 数 (図 25 O) を監視した。示した結果は、平均値 ± SEM を表す。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001 である。略語: EC (内皮細胞)、PLT (血小板)。

【図 25 B】図 25 A ~ 25 O。CpG - miR - 126 阻害剤のインビトロ及びインビ 50

ボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いでCy3+細胞をフローサイトメトリーによって検出した(図25A)。細胞をまた24時間後に採集し、Q-RT-PCRによってmiR-126発現を測定した(図25B)。細胞周期は、CML BM LTHSC中にCpG-miR-126阻害剤を添加して72時間後にEDU染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを(図25C)に示す。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1回用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、処置から16時間後に、BM、LTHSC及びECにおけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR-126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して分析した。赤血球(RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)、及びEC(図25L)の数を示す。処置した正常マウスからのBM細胞(CD45.2)をCD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBM及び脾臓(図25N)におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ である。略語：EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

10

20

【図25C】図25A~25O。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いでCy3+細胞をフローサイトメトリーによって検出した(図25A)。細胞をまた24時間後に採集し、Q-RT-PCRによってmiR-126発現を測定した(図25B)。細胞周期は、CML BM LTHSC中にCpG-miR-126阻害剤を添加して72時間後にEDU染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを(図25C)に示す。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1回用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、処置から16時間後に、BM、LTHSC及びECにおけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR-126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して分析した。赤血球(RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)、及びEC(図25L)の数を示す。処置した正常マウスからのBM細胞(CD45.2)をCD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBM及び脾臓(図25N)におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ である。略語：EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

30

40

【図25D】図25A~25O。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いでCy3+細胞をフローサイトメトリーによって検出した(図25A)。細胞をまた24時間後に採集し、Q-RT-PCRによってmiR-126発現を測定した(図25B)。細胞周期は、CML BM LTHSC中にCpG-miR-126阻害剤を添加して72時間後にEDU染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを(図25

50

C)に示す。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1回用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、処置から16時間後に、BM、LTHSC及びECにおけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR-126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して分析した。赤血球(RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)、及びEC(図25L)の数を示す。処置した正常マウスからのBM細胞(CD45.2)をCD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBM及び脾臓(図25N)におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ である。略語: EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

10

【図25E】図25A~25O。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いでCy3+細胞をフローサイトメトリーによって検出した(図25A)。細胞をまた24時間後に採集し、Q-RT-PCRによってmiR-126発現を測定した(図25B)。細胞周期は、CML BM LTHSC中にCpG-miR-126阻害剤を添加して72時間後にEDU染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを(図25C)に示す。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1回用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、処置から16時間後に、BM、LTHSC及びECにおけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR-126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して分析した。赤血球(RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)、及びEC(図25L)の数を示す。処置した正常マウスからのBM細胞(CD45.2)をCD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBM及び脾臓(図25N)におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ である。略語: EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

20

30

【図25F】図25A~25O。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いでCy3+細胞をフローサイトメトリーによって検出した(図25A)。細胞をまた24時間後に採集し、Q-RT-PCRによってmiR-126発現を測定した(図25B)。細胞周期は、CML BM LTHSC中にCpG-miR-126阻害剤を添加して72時間後にEDU染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを(図25C)に示す。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1回用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、処置から16時間後に、BM、LTHSC及びECにおけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCp

40

50

G - s c r R N A (s c r R N A) または C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 (阻害剤) (5 m g / k g / 日、静脈内注射) で 3 週間処置し、B M 細胞を採集して分析した。赤血球 (R B C、図 2 5 G)、W B C (図 2 5 H)、P L T (図 2 5 I)、B M 単核細胞 (図 2 5 J)、L T H S C (図 2 5 K)、及び E C (図 2 5 L) の数を示す。処置した正常マウスからの B M 細胞 (C D 4 5 . 2) を C D 4 5 . 1 類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、1 6 週目での血液中 (図 2 5 M) 及び B M 及び脾臓 (図 2 5 N) におけるドナー細胞生着、ならびに 1 6 週目での B M におけるドナーの L T H S C 数 (図 2 5 O) を監視した。示した結果は、平均値 \pm S E M を表す。* $p < 0 . 0 5$ 、** $p < 0 . 0 1$ 、*** $p < 0 . 0 0 1$ である。略語：E C (内皮細胞)、P L T (血小板)。

【図 2 5 G】図 2 5 A ~ 2 5 O。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウス C M L B M、L T H S C 及び E C 細胞を C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (5 0 0 n M) で 4 時間処置し、次いで C y 3 + 細胞をフローサイトメトリーによって検出した (図 2 5 A)。細胞をまた 2 4 時間後に採集し、Q - R T - P C R によって m i R - 1 2 6 発現を測定した (図 2 5 B)。

細胞周期は、C M L B M L T H S C 中に C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤を添加して 7 2 時間後に E D U 染色により測定した。2 つの代表的なプロットの 1 つを (図 2 5 C) に示す。C M L マウスを、C p G - m i R 1 2 6 阻害剤 - C y 3 で、1 回用量 (5 m g / k g、静脈内注射) で処置し、処置から 1 6 時間後に、B M、L T H S C 及び E C における C y 3 の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した (図 2 5 D)。

正常及び C M L マウスも、C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 (5 m g / k g / 日、静脈内に毎日) で 3 日間処置し、大腿骨からの B M、L T H S C 及び E C を選別し、m i R - 1 2 6 発現を Q - R T - P C R によって決定した (図 2 5 E ~ 2 5 F)。

野生型 B 6 マウスを C p G - s c r R N A (s c r R N A) または C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 (阻害剤) (5 m g / k g / 日、静脈内注射) で 3 週間処置し、B M 細胞を採集して分析した。赤血球 (R B C、図 2 5 G)、W B C (図 2 5 H)、P L T (図 2 5 I)、B M 単核細胞 (図 2 5 J)、L T H S C (図 2 5 K)、及び E C (図 2 5 L) の数を示す。処置した正常マウスからの B M 細胞 (C D 4 5 . 2) を C D 4 5 . 1 類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、1 6 週目での血液中 (図 2 5 M) 及び B M 及び脾臓 (図 2 5 N) におけるドナー細胞生着、ならびに 1 6 週目での B M におけるドナーの L T H S C 数 (図 2 5 O) を監視した。

示した結果は、平均値 \pm S E M を表す。* $p < 0 . 0 5$ 、** $p < 0 . 0 1$ 、*** $p < 0 . 0 0 1$ である。略語：E C (内皮細胞)、P L T (血小板)。

【図 2 5 H】図 2 5 A ~ 2 5 O。C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウス C M L B M、L T H S C 及び E C 細胞を C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 - C y 3 (5 0 0 n M) で 4 時間処置し、次いで C y 3 + 細胞をフローサイトメトリーによって検出した (図 2 5 A)。細胞をまた 2 4 時間後に採集し、Q - R T - P C R によって m i R - 1 2 6 発現を測定した (図 2 5 B)。

細胞周期は、C M L B M L T H S C 中に C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤を添加して 7 2 時間後に E D U 染色により測定した。2 つの代表的なプロットの 1 つを (図 2 5 C) に示す。C M L マウスを、C p G - m i R 1 2 6 阻害剤 - C y 3 で、1 回用量 (5 m g / k g、静脈内注射) で処置し、処置から 1 6 時間後に、B M、L T H S C 及び E C における C y 3 の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した (図 2 5 D)。

正常及び C M L マウスも、C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 (5 m g / k g / 日、静脈内に毎日) で 3 日間処置し、大腿骨からの B M、L T H S C 及び E C を選別し、m i R - 1 2 6 発現を Q - R T - P C R によって決定した (図 2 5 E ~ 2 5 F)。

野生型 B 6 マウスを C p G - s c r R N A (s c r R N A) または C p G - m i R - 1 2 6 阻害剤 (阻害剤) (5 m g / k g / 日、静脈内注射) で 3 週間処置し、B M 細胞を採集して分析した。赤血球 (R B C、図 2 5 G)、W B C (図 2 5 H)、P L T (図 2 5 I)、B M 単核細胞 (図 2 5 J)、L T H S C (図 2 5 K)、及び E C (図 2 5 L) の数を示す。処置した正常マウスからの B M 細胞 (C D 4 5 . 2) を C D 4 5 . 1 類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、1 6 週目での血液中 (図 2 5 M) 及び B M 及び脾臓 (図 2 5 N) におけるドナー細胞

10

20

30

40

50

生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ である。略語: EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

【図25I】図25A~25O。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いでCy3+細胞をフローサイトメトリーによって検出した(図25A)。細胞をまた24時間後に採集し、Q-RT-PCRによってmiR-126発現を測定した(図25B)。細胞周期は、CML BM LTHSC中にCpG-miR-126阻害剤を添加して72時間後にEDU染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを(図25C)に示す。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1回用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、処置から16時間後に、BM、LTHSC及びECにおけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR-126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して分析した。赤血球(RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)、及びEC(図25L)の数を示す。処置した正常マウスからのBM細胞(CD45.2)をCD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBM及び脾臓(図25N)におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ である。略語: EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

【図25J】図25A~25O。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いでCy3+細胞をフローサイトメトリーによって検出した(図25A)。細胞をまた24時間後に採集し、Q-RT-PCRによってmiR-126発現を測定した(図25B)。細胞周期は、CML BM LTHSC中にCpG-miR-126阻害剤を添加して72時間後にEDU染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを(図25C)に示す。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1回用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、処置から16時間後に、BM、LTHSC及びECにおけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR-126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して分析した。赤血球(RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)、及びEC(図25L)の数を示す。処置した正常マウスからのBM細胞(CD45.2)をCD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBM及び脾臓(図25N)におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ である。略語: EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

【図25K】図25A~25O。CpG-miR-126阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し

10

20

30

40

50

、次いでC y 3 + 細胞をフローサイトメトリーによって検出した (図 2 5 A) 。細胞をまた24時間後に採集し、Q - R T - P C Rによってmi R - 1 2 6発現を測定した (図 2 5 B) 。細胞周期は、C M L B M L T H S C中にC p G - mi R - 1 2 6阻害剤を添加して72時間後にE D U染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを (図 2 5 C) に示す。C M Lマウスを、C p G - mi R 1 2 6阻害剤 - C y 3で、1回用量 (5 m g / k g、静脈内注射) で処置し、処置から16時間後に、B M、L T H S C及びE CにおけるC y 3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した (図 2 5 D) 。正常及びC M Lマウスも、C p G - mi R - 1 2 6阻害剤 (5 m g / k g / 日、静脈内に毎日) で3日間処置し、大腿骨からのB M、L T H S C及びE Cを選別し、mi R - 1 2 6発現をQ - R T - P C Rによって決定した (図 2 5 E ~ 2 5 F) 。野生型B 6マウスをC p G - s c r R N A (s c r R N A) またはC p G - mi R - 1 2 6阻害剤 (阻害剤) (5 m g / k g / 日、静脈内注射) で3週間処置し、B M細胞を採集して分析した。赤血球 (R B C、図 2 5 G)、W B C (図 2 5 H)、P L T (図 2 5 I)、B M単核細胞 (図 2 5 J)、L T H S C (図 2 5 K)、及びE C (図 2 5 L) の数を示す。処置した正常マウスからのB M細胞 (C D 4 5 . 2) をC D 4 5 . 1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中 (図 2 5 M) 及びB M及び脾臓 (図 2 5 N) におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのB MにおけるドナーのL T H S C数 (図 2 5 O) を監視した。示した結果は、平均値 ± S E Mを表す。* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、*** p < 0 . 0 0 1である。略語：E C (内皮細胞)、P L T (血小板) 。

10

【図 2 5 L】図 2 5 A ~ 2 5 O。C p G - mi R - 1 2 6阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスC M L B M、L T H S C及びE C細胞をC p G - mi R - 1 2 6阻害剤 - C y 3 (5 0 0 n M) で4時間処置し、次いでC y 3 + 細胞をフローサイトメトリーによって検出した (図 2 5 A) 。細胞をまた24時間後に採集し、Q - R T - P C Rによってmi R - 1 2 6発現を測定した (図 2 5 B) 。細胞周期は、C M L B M L T H S C中にC p G - mi R - 1 2 6阻害剤を添加して72時間後にE D U染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを (図 2 5 C) に示す。C M Lマウスを、C p G - mi R 1 2 6阻害剤 - C y 3で、1回用量 (5 m g / k g、静脈内注射) で処置し、処置から16時間後に、B M、L T H S C及びE CにおけるC y 3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した (図 2 5 D) 。正常及びC M Lマウスも、C p G - mi R - 1 2 6阻害剤 (5 m g / k g / 日、静脈内に毎日) で3日間処置し、大腿骨からのB M、L T H S C及びE Cを選別し、mi R - 1 2 6発現をQ - R T - P C Rによって決定した (図 2 5 E ~ 2 5 F) 。野生型B 6マウスをC p G - s c r R N A (s c r R N A) またはC p G - mi R - 1 2 6阻害剤 (阻害剤) (5 m g / k g / 日、静脈内注射) で3週間処置し、B M細胞を採集して分析した。赤血球 (R B C、図 2 5 G)、W B C (図 2 5 H)、P L T (図 2 5 I)、B M単核細胞 (図 2 5 J)、L T H S C (図 2 5 K)、及びE C (図 2 5 L) の数を示す。処置した正常マウスからのB M細胞 (C D 4 5 . 2) をC D 4 5 . 1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中 (図 2 5 M) 及びB M及び脾臓 (図 2 5 N) におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのB MにおけるドナーのL T H S C数 (図 2 5 O) を監視した。示した結果は、平均値 ± S E Mを表す。* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、*** p < 0 . 0 0 1である。略語：E C (内皮細胞)、P L T (血小板) 。

20

30

40

【図 2 5 M】図 2 5 A ~ 2 5 O。C p G - mi R - 1 2 6阻害剤のインビトロ及びインビボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスC M L B M、L T H S C及びE C細胞をC p G - mi R - 1 2 6阻害剤 - C y 3 (5 0 0 n M) で4時間処置し、次いでC y 3 + 細胞をフローサイトメトリーによって検出した (図 2 5 A) 。細胞をまた24時間後に採集し、Q - R T - P C Rによってmi R - 1 2 6発現を測定した (図 2 5 B) 。細胞周期は、C M L B M L T H S C中にC p G - mi R - 1 2 6阻害剤を添加して72時間後にE D U染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを (図 2 5 C) に示す。C M Lマウスを、C p G - mi R 1 2 6阻害剤 - C y 3で、1回用量 (5 m g / k g、静脈内注射) で処置し、処置から16時間後に、B M、L T H S C及びE Cに

50

おけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR-126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して分析した。赤血球(RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)、及びEC(図25L)の数を示す。処置した正常マウスからのBM細胞(CD45.2)をCD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBM及び脾臓(図25N)におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ である。略語: EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

【図25N】図25A~25O。CpG-miR-126阻害剤のインピトロ及びインピボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いでCy3+細胞をフローサイトメトリーによって検出した(図25A)。細胞をまた24時間後に採集し、Q-RT-PCRによってmiR-126発現を測定した(図25B)。細胞周期は、CML BM LTHSC中にCpG-miR-126阻害剤を添加して72時間後にEDU染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを(図25C)に示す。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1回用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、処置から16時間後に、BM、LTHSC及びECにおけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR-126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して分析した。赤血球(RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)、及びEC(図25L)の数を示す。処置した正常マウスからのBM細胞(CD45.2)をCD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBM及び脾臓(図25N)におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ である。略語: EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

【図25O】図25A~25O。CpG-miR-126阻害剤のインピトロ及びインピボでの、取り込みの効果及び遺伝子サイレンシング効果。マウスCML BM、LTHSC及びEC細胞をCpG-miR-126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いでCy3+細胞をフローサイトメトリーによって検出した(図25A)。細胞をまた24時間後に採集し、Q-RT-PCRによってmiR-126発現を測定した(図25B)。細胞周期は、CML BM LTHSC中にCpG-miR-126阻害剤を添加して72時間後にEDU染色により測定した。2つの代表的なプロットの1つを(図25C)に示す。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1回用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、処置から16時間後に、BM、LTHSC及びECにおけるCy3の取り込みを、フローサイトメトリーによって測定した(図25D)。正常及びCMLマウスも、CpG-miR-126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内に毎日)で3日間処置し、大腿骨からのBM、LTHSC及びECを選別し、miR-126発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスをCpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR-126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して分析した。赤血球(

10

20

30

40

50

RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)、及びEC(図25L)の数を示す。処置した正常マウスからのBM細胞(CD45.2)をCD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBM及び脾臓(図25N)におけるドナー細胞生着、ならびに16週目でのBMにおけるドナーのLTHSC数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMを表す。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ である。略語：EC(内皮細胞)、PLT(血小板)。

【図26A】図26A~26E。CpG、GpC及びPSと抱合されたmiR-126阻害剤によるmiR-126の有効なノックダウン、及びK562及びMV4-11細胞におけるmiR-126ミミックによる効果的な過剰発現。K562及びMV4-11細胞を、CpG、GpC、PS(図26A~26B)またはmiR-126ミミック(615、616及び617)(図26C~26D)(500nM)と抱合されたmiR-126阻害剤で24時間処置し、これらの細胞中のmiR-126発現を測定した。我々は、ここで、標的ODN配列においてCpGモチーフを省略できることを示した。GpC及び完全にPS修飾されたオリゴもmiR-126のブロッキングで成功する。miR-126ミミック、特にGM617とのインキュベーションは、K562及びMV4-11細胞におけるmiR-126発現を著しく増加させた。細胞内のmiR-126を減少させるのに非常に有効なCpG-miR-126阻害剤と同じように、いずれの形質導入試薬も使用せずに細胞中のmiR-126レベルを増加させるのに非常に有効なmiR-126ミミックも設計した。図26E)本明細書に記載された配列の表。

【図26B】図26A~26E。CpG、GpC及びPSと抱合されたmiR-126阻害剤によるmiR-126の有効なノックダウン、及びK562及びMV4-11細胞におけるmiR-126ミミックによる効果的な過剰発現。K562及びMV4-11細胞を、CpG、GpC、PS(図26A~26B)またはmiR-126ミミック(615、616及び617)(図26C~26D)(500nM)と抱合されたmiR-126阻害剤で24時間処置し、これらの細胞中のmiR-126発現を測定した。我々は、ここで、標的ODN配列においてCpGモチーフを省略できることを示した。GpC及び完全にPS修飾されたオリゴもmiR-126のブロッキングで成功する。miR-126ミミック、特にGM617とのインキュベーションは、K562及びMV4-11細胞におけるmiR-126発現を著しく増加させた。細胞内のmiR-126を減少させるのに非常に有効なCpG-miR-126阻害剤と同じように、いずれの形質導入試薬も使用せずに細胞中のmiR-126レベルを増加させるのに非常に有効なmiR-126ミミックも設計した。図26E)本明細書に記載された配列の表。

【図26C】図26A~26E。CpG、GpC及びPSと抱合されたmiR-126阻害剤によるmiR-126の有効なノックダウン、及びK562及びMV4-11細胞におけるmiR-126ミミックによる効果的な過剰発現。K562及びMV4-11細胞を、CpG、GpC、PS(図26A~26B)またはmiR-126ミミック(615、616及び617)(図26C~26D)(500nM)と抱合されたmiR-126阻害剤で24時間処置し、これらの細胞中のmiR-126発現を測定した。我々は、ここで、標的ODN配列においてCpGモチーフを省略できることを示した。GpC及び完全にPS修飾されたオリゴもmiR-126のブロッキングで成功する。miR-126ミミック、特にGM617とのインキュベーションは、K562及びMV4-11細胞におけるmiR-126発現を著しく増加させた。細胞内のmiR-126を減少させるのに非常に有効なCpG-miR-126阻害剤と同じように、いずれの形質導入試薬も使用せずに細胞中のmiR-126レベルを増加させるのに非常に有効なmiR-126ミミックも設計した。図26E)本明細書に記載された配列の表。

【図26D】図26A~26E。CpG、GpC及びPSと抱合されたmiR-126阻害剤によるmiR-126の有効なノックダウン、及びK562及びMV4-11細胞におけるmiR-126ミミックによる効果的な過剰発現。K562及びMV4-11細胞を、CpG、GpC、PS(図26A~26B)またはmiR-126ミミック(615

10

20

30

40

50

、616及び617)(図26C~26D)(500nM)と抱合されたmiR-126阻害剤で24時間処置し、これらの細胞中のmiR-126発現を測定した。我々は、ここで、標的ODN配列においてCpGモチーフを省略できることを示した。GpC及び完全にPS修飾されたオリゴもmiR126のブロッキングで成功する。miR-126ミミック、特にGM617とのインキュベーションは、K562及びMV4-11細胞におけるmiR-126発現を著しく増加させた。細胞内のmiR-126を減少させるのに非常に有効なCpG-miR-126阻害剤と同じように、いずれの形質導入試薬も使用せずに細胞中のmiR-126レベルを増加させるのに非常に有効なmiR-126ミミックも設計した。図26E)本明細書に記載された配列の表。

【図26E】図26A~26E。CpG、GpC及びPSと抱合されたmiR-126阻害剤によるmiR-126の有効なノックダウン、及びK562及びMV4-11細胞におけるmiR-126ミミックによる効果的な過剰発現。K562及びMV4-11細胞を、CpG、GpC、PS(図26A~26B)またはmiR-126ミミック(615、616及び617)(図26C~26D)(500nM)と抱合されたmiR-126阻害剤で24時間処置し、これらの細胞中のmiR-126発現を測定した。我々は、ここで、標的ODN配列においてCpGモチーフを省略できることを示した。GpC及び完全にPS修飾されたオリゴもmiR126のブロッキングで成功する。miR-126ミミック、特にGM617とのインキュベーションは、K562及びMV4-11細胞におけるmiR-126発現を著しく増加させた。細胞内のmiR-126を減少させるのに非常に有効なCpG-miR-126阻害剤と同じように、いずれの形質導入試薬も使用せずに細胞中のmiR-126レベルを増加させるのに非常に有効なmiR-126ミミックも設計した。図26E)本明細書に記載された配列の表。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本明細書において、とりわけ、抗マイクロRNA(抗miR)配列に、もしくはマイクロRNA(miRNA)擬態核酸配列(miRNA-ミミック)に抱合されたホスホロチオエート化CpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)を含む化合物または抗マイクロRNA(抗miR)配列を含む化合物が提供され、抗miR配列は、1つ以上のホスホロチオエート結合及び、1つ以上の化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。実施形態において、本明細書に記載される化合物は、抗miR及び/またはmiRNA-ミミックの内在化を促進する。実施形態において、本明細書中で使用される修飾体/抱合体は、エンドソームからの本明細書に記載される化合物の離脱を容易にする。実施形態において、本明細書中で使用される修飾体/抱合体は、本明細書で使用される抗-miR及び/またはmiRNA-ミミックを安定化する。

【0013】

定義

以下の定義は、本主題の理解及び添付の特許請求の範囲の構成の目的のために含まれる。本明細書で使用される略語は、化学的及び生物学的な技術分野内でのそれらの従来の意味を有する。

【0014】

他に定義されない限り、本明細書で使用される技術及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)を参照されたい。本明細書に記載されたものと類似または等価な任意の方法、装置及び材料は、本開示の実施において使用され得る。以下の定義は、本明細書において頻繁に使用される特定の用語の理解を容易にするために提供され、本開示の範囲を限定することを意図するものではない。

10

20

30

40

50

【0015】

「核酸」は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、及びそれらの一本、二本または多重鎖形態のポリマー、もしくはそれらの相補体を指す。「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの直鎖配列を指す。「ヌクレオチド」という用語は、典型的にはポリヌクレオチドの単一単位、すなわちモノマーを指す。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはそれらの修飾変形型であり得る。本明細書で企図されるポリヌクレオチドの例には、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖RNA (siRNAを含む)、ならびに一本鎖及び二本鎖DNA及びRNAの混合物を有するハイブリッド分子が含まれる。核酸は、直鎖であっても分枝鎖であってもよい。例えば、核酸は、ヌクレオチドの直鎖状であり得るか、または核酸は、例えば核酸が1つ以上のヌクレオチドのアームまたは分枝を含むように分枝状であり得る。任意に、分枝核酸は、繰り返して分岐して、例えば dendrimer などの高次構造を形成する。

10

【0016】

ホスホチオエート主鎖を有する核酸を含む核酸は、1つ以上の反応性部分を含むことができる。本明細書で使用される場合、反応性部分という用語は、共有結合、非共有結合、または他の相互作用を介して、別の分子、例えば、核酸またはポリペプチドと反応することができる任意の基を含む。例として、核酸は、共有結合、非共有結合、または他の相互作用を通してタンパク質またはポリペプチド上のアミノ酸と反応するアミノ酸反応性部分を含むことができる。

【0017】

本用語はまた、標準核酸と同様の結合特性を有し、かつ標準ヌクレオチドと同様の方法で代謝される、合成、天然由来、または非天然由来である、既知のヌクレオチド類似体または修飾された主鎖残基もしくは結合を含有する核酸を包含する。そのような類似体の例には、限定されないが、例えば、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオエート (ホスホチオエートとしても知られる)、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボキシレート、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、メチルホスホネート、ホウ素ホスホネート、またはO-メチルホスホロアミダイト結合 (Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press を参照されたい) を含むホスホジエステル誘導体、及びペプチド核酸主鎖また結合が含まれる。他の類似体核酸には、米国特許第5,235,033号及び第5,034,506号またASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Sanghui & Cook, edsのChapter 6及び7に記載されるものを含む、非イオン性主鎖、修飾された糖、及び非リボース主鎖 (例えば、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーまたはロッド核酸 (LNA)) などの正の主鎖を有するものが含まれる。1つ以上の炭素環糖を含む核酸も、核酸の1つの定義内に含まれる。リボース-リン酸主鎖の修飾は、様々な理由のために、例えば、生理学的環境における、またはバイオチップ上のプローブとしてのそのような分子の安定性及び半減期を増加させるために、行うことができる。天然由来の核酸と類似体の混合物を作製することができ、あるいは、異なる核酸類似体の混合物、ならびに天然由来の核酸及び類似体の混合物を作製することができる。

20

30

40

【0018】

本明細書で使用される場合、「核酸」、「核酸分子」、「核酸オリゴマー」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸配列」、「核酸断片」、及び「ポリヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらの類似体、誘導体もしくは修飾体のいずれかである、様々な長さを有することができる互いに共有結合したヌクレオチドのポリマー形態が含まれるよう意図しているが、これらに限定されない。異なるポリヌクレオチドは、異なる三次元構造を有してもよく、既知または未知の様々な機能を果たしてもよい。ポリヌクレオチドの非限定的な例には、遺伝子、遺伝子断片、エクソン、イントロン、遺伝子間DNA (ヘテロクロマチン性DNAを含むが

50

、これに限定されない)、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、配列の単離されたDNA、配列の単離されたRNA、核酸プロブ、及びプライマーが含まれる。本発明の方法において有用なポリヌクレオチドは、天然核酸配列及びその変異体、人工核酸配列、またはそのような配列の組み合わせを含み得る。

【0019】

ポリヌクレオチドは、典型的には、4つのヌクレオチド塩基、アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、及びチミン(T)の特定の配列から構成される(ポリヌクレオチドがRNAである場合は、チミン(T)に対してウラシル(U)である)。これにより、「ポリヌクレオチド配列」という用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示であり、あるいは、本用語は、ポリヌクレオチド分子自体に適用することができる。このアルファベット表現は、中央処理装置を有するコンピュータのデータベースに入力することができ、ゲノム機能解析やホモロジー検索などのバイオインフォマティクス用途に使用することができる。ポリヌクレオチドは、任意に、1つ以上の非標準ヌクレオチド(複数可)、ヌクレオチド類似体(複数可)、及び/または修飾ヌクレオチドを含んでもよい。

【0020】

別段の指示がない限り、以下の注釈は、本明細書に開示される核酸配列において使用され、* = ホスホロチオエート結合であり、xxxxx = 本明細書に記載されている任意のリンカーであり、実施形態において、xxxxx = 末端リン酸が任意に付加されている末端である以外は、両末端においてリン酸基に結合された $-(CH_2)_n-PO_4-[(CH_2)_n-PO_4]_z-(CH_2)_n$ であってもよく、5'xがOH末端を有し、3'xが最終のリン酸基に結合した $-C^6-NH_2$ を有し、他の結合がホスホジエステルであり、mNは2'OMe修飾ヌクレオチドを示し、fNは2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを示し、rNはリボヌクレオチドを示す。

【0021】

本明細書で使用される場合、「抗マイクロRNA (抗miR)」または「抗マイクロRNA (抗miR) 核酸配列」という用語は、その一般的かつ通常の意味に従って使用され、標的マイクロRNAの発現及び/または活性を抑制もしくは低減することができるRNAを指す。実施形態において、抗miRオリゴマーは、20~30個の塩基の一本鎖オリゴマーであってもよい。実施形態において、抗miRオリゴマーは、20~30個の塩基の二本鎖オリゴマーであってもよい。実施形態において、抗miRオリゴマーは、一本鎖オーバーハングを有し、部分的に二本鎖であってもよい。実施形態において、オリゴマーは2'化学修飾を有し得る。実施形態において、オリゴマーは、血清安定性増強化学修飾、例えばホスホチオエートヌクレオチド間結合、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、ユニバーサル塩基ヌクレオチド、5'-Cメチルヌクレオチド、逆位デオキシ脱塩基残基結合、またはロックド核酸を有することができる。実施形態において、抗miR配列は、対応するmiR配列にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションを引き起こすのに十分な相補性があれば、完全相補性は必ずしも必要ではない。いくつかの実施形態において、抗miR配列とその対応するmiR配列との間の相補性の程度は、適切なアライメントアルゴリズムを使用して最適に整列された場合、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%もしくはおおよそそれらを超える。最適なアライメントは、配列を整列させるための任意の適切なアルゴリズムを使用して決定することができ、その非限定的な例にはSmith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler Transform (例えばBurrows Wheeler Aligner) に基づくアルゴリズム、ClustalW、ClustalX、BLAT、Novoalign (Novocraft Technologies、ELAND (Illumina, San Diego, Calif.))、SOAP (s

oap.genomics.org.cnで入手可能)、Maq(maq.sourceforge.netで入手可能)が含まれる。実施形態において、抗miR配列は、標的miR配列の完全に相補的な配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。

【0022】

本明細書で使用される場合、「マイクロRNA」、「マイクロRNA核酸配列」、「miR」、「miRNA」は、遺伝子発現のRNAサイレンシング及び転写後調節において機能する核酸を指す。本用語には、miRNAのpri-(一次-)、pre-(未成熟-)、及び成熟形態など、全ての形態のmiRNAが含まれる。実施形態において、マイクロRNA(miRNA)は、mRNAの安定性及び翻訳の両方に影響を与えることによって、多細胞生物における遺伝子発現の転写後調節に関与する短い(20~24個のヌクレオチド(nt))非コードRNAである。miRNAは、タンパク質コードまたは非コードのいずれかであり得る、キャッピングされ、かつポリアデニル化された一次転写物(pri-miRNA)の一部としてRNAポリメラーゼIIIによって転写される。一次転写物は、ドロシャ(Drosha)リボヌクレアーゼIII酵素によって切断されて、約70ntステムループ前駆体miRNA(pre-miRNA)を産生し、細胞質ダイサー(Dicer)リボヌクレアーゼによってさらに切断されて、成熟miRNA及びアンチセンスmiRNAスター(miRNA*)生成物を生成する。成熟miRNAは、miRNAとの不完全な塩基対形成を通して標的mRNAを認識し、最も一般的に標的mRNAの翻訳阻害または不安定化をもたらすRNA誘発サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれる。実施形態において、本明細書に記載のmiRNA核酸配列は、約10~80個の長さのヌクレオチド(例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80個のヌクレオチド)である。実施形態において、本明細書に記載のmiRNA核酸配列は、約15~50個の長さのヌクレオチド(例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個のヌクレオチド)である。実施形態において、本明細書に記載のmiRNA核酸配列は、約18~25個の長さのヌクレオチド(例えば、18、19、20、21、22、23、24、25個のヌクレオチド)である。

【0023】

本明細書で使用される場合、「miR126」または「miR142核酸配列」という用語は、miR126のpri-、pre-及び成熟形態を含むmiR126の全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体(例えば、ネイティブmiR126と比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性の範囲内)を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部(例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分)に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。実施形態において、miR126は、NCBI基準配列NR_029695.1、または下記の配列によって特定されるmiRNAである。

```
1  c g c t g g c g a c   g g g a c a t t a t   t a c t t t t g g t   a c g c g c
t g t g   a c a c t t c a a a   c t c g t a c c g t   61  g a g t a a t a a t
g c g c c g t c c a   c g g c a   (配列番号37)。
```

【0024】

10

20

30

40

50

「抗miR126」または「抗miR126核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR126核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

【0025】

本明細書で使用される場合、「miR142」または「miR142核酸配列」という用語は、miR142のpri-、pre-及び成熟形態を含むmiR142の全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体（例えば、ネイティブmiR142と比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内）を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。実施形態において、miR142は、NCBI基準配列NR_029683.1、または下記の配列によって特定されるmiRNAである。

```
1  g a c a g t g c a g   t c a c c c a t a a   a g t a g a a a g c   a c t a c t
a a c a   g c a c t g g a g g   g t g t a g t g t t
61  t c c t a c t t t a   t g g a t g a g t g   t a c t g t g   (配列番号38)。
```

【0026】

「抗miR142」または「抗miR142核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR142核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

【0027】

本明細書で使用される場合、「miR155」または「miR155核酸配列」という用語は、miR155のpri-、pre-及び成熟形態を含むmiR155の全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体（例えば、ネイティブmiR155と比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内）を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。実施形態において、miR155は、NCBI基準配列NR_030784.1、または下記の配列によって特定されるmiRNAである。

```
1  c t g t t a a t g c   t a a t c g t g a t   a g g g g t t t t t   g c c t c c
a a c t   g a c t c c t a c a   t a t t a g c a t t
61  a a c a g   (配列番号39)。
```

【0028】

「抗miR155」または「抗miR155核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR155核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

【0029】

本明細書で使用される場合、「miR9」または「miR9核酸配列」という用語は、miR9のpri-、pre-及び成熟形態を含むmiR9の全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体（例えば、ネイティブmiR9と比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内）を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、

10

20

30

40

50

94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。実施形態において、miR9は、NCBI基準配列NR_029691.1、NCBI参照配列NR_029692.1、または下記の配列によって特定されるmiRNAである。

```
1  c g g g g t t g g t   t g t t a t c t t t   g g t t a t c t a g   c t g t a t
g a g t   g g t g t g g a g t   c t t c a t a a a g
6 1  c t a g a t a a c c   g a a a g t a a a a   a t a a c c c c c a   (配列番号40);
```

```
1  g g a g g c c c g t   t t c t c t c t t t   g g t t a t c t a g   c t g t a t
g a g t   g c c a c a g a g c   c g t c a t a a a g
6 1  c t a g a t a a c c   g a a a g t a g a a   a t g a t t c t c a   (配列番号41)。
```

【0030】

「抗miR9」または「抗miR9核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR9核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

【0031】

本明細書で使用される場合、「miR10b」または「miR10b核酸配列」という用語は、miR10bのpi-、pre-及び成熟形態を含むmiR10bの全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体（例えば、ネイティブmiR10bと比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内）を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。実施形態において、miR10bは、NCBI基準配列NR_029609.1、または下記の配列によって特定されるmiRNAである。

```
1  c c a g a g g t t g   t a a c g t t g t c   t a t a t a t a c c   c t g t a g
a a c c   g a a t t t g t g t   g g t a t c c g t a
6 1  t a g t c a c a g a   t t c g a t t c t a   g g g g a a t a t a   t g g t c
g a t g c   a a a a a c t t c a   (配列番号42)。
```

【0032】

「抗miR10b」または「抗miR10b核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR10b核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

【0033】

本明細書で使用される場合、「miR21」または「miR21核酸配列」という用語は、miR21のpi-、pre-及び成熟形態を含むmiR21の全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体（例えば、ネイティブmiR21と比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内）を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。実施形態において、miR21は、NCBI基準配列NR_029493.1、または下記の配列によって特定されるmiRNAである。

```
1  t g t c g g g t a g   c t t a t c a g a c   t g a t g t t g a c   t g t t g a
a t c t   c a t g g c a a c a   c c a g t c g a t g
```

10

20

30

40

50

6 1 g g c t g t c t g a c a (配列番号43)。

【0034】

「抗miR21」または「抗miR21核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR21核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

【0035】

本明細書で使用される場合、「miR17」または「miR17核酸配列」という用語は、miR17のpi-、pre-及び成熟形態を含むmiR17の全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体(例えば、ネイティブmiR17と比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内)を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部(例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分)に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。実施形態において、miR17は、NCBI基準配列NR_029487.1、または下記の配列によって特定されるmiRNAである。

1 g t c a g a a t a a t g t c a a a g t g c t t a c a g t g c a g g t a g
t g a t a t g t g c a t c t a c t g c a g t g a

6 1 a g g c a c t t g t a g c a t t a t g g t g a c (配列番号44)。

【0036】

「抗miR17」または「抗miR17核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR17核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

【0037】

本明細書で使用される場合、「miR92」または「miR92核酸配列」という用語は、miR92のpi-、pre-及び成熟形態を含むmiR92の全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体(例えば、ネイティブmiR92と比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内)を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部(例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分)に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。実施形態において、miR92は、NCBI基準配列NR_029508.1、または下記の配列によって特定されるmiRNAである。

1 c t t t c t a c a c a g g t t g g g a t c g g t t g c a a t g c t g t g
t t t c t g t a t g g t a t t g c a c t t g t c

6 1 c c g g c c t g t t g a g t t t g g (配列番号45)。

【0038】

「抗miR92」または「抗miR92核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR92核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

【0039】

本明細書で使用される場合、「miR125b」または「miR125b核酸配列」という用語は、miR125bのpi-、pre-及び成熟形態を含むmiR125bの全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体(例えば、ネイティブmiR125bと比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内)を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部(例えば、10、

10

20

30

40

50

15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分)に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。実施形態において、miR125bは、NCBI基準配列NR_029671.1、または下記の配列によって特定されるmiRNAである。

```
1  t g c g c t c c t c   t c a g t c c c t g   a g a c c c t a a c   t t g t g a
t g t t   t a c c g t t t a a   a t c c a c g g g t
```

```
6 1  t a g g c t c t t g   g g a g c t g c g a   g t c g t g c t   (配列番号46)。
```

【0040】

「抗miR125b」または「抗miR125b核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR125b核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

10

【0041】

本明細書で使用される場合、「miR146a」または「miR146a核酸配列」という用語は、miR146aのpi-、pre-及び成熟形態を含むmiR146aの全ての形態、ならびにその変異体、相同体、修飾体及び誘導体(例えば、ネイティブmiR146aと比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内)を含む。実施形態において、変異体または相同体または誘導体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部(例えば、10、

20

```
1  c c g a t g t g t a   t c c t c a g c t t   t g a g a a c t g a   a t t c c a
t g g g   t t g t g t c a g t   g t c a g a c c t c
```

```
6 1  t g a a a t t c a g   t t c t t c a g c t   g g g a t a t c t c   t g t c a
t c g t   (配列番号47)。
```

【0042】

「抗miR146a」または「抗miR146a核酸配列」という用語は、上記で定義された標的miR146a核酸と完全に相補的な配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性である配列を指す。

30

【0043】

本明細書で使用される場合、「マイクロRNA-ミミック(miRNA-ミミック)」または「miRNA-ミミック核酸配列」という用語は、その一般的かつ通常の意味に従って使用され、マイクロRNAと同様の生物学的機能を果たすことができる一本鎖、二本鎖、または三本鎖のオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miRNA-ミミックは、非天然の二本鎖miR様RNA断片であり得る。そのようなRNA断片は、標的遺伝子に特有の3'UTR中の選択された配列に対して部分的に相補的なモチーフを持つその5'末端を有するように設計することができる。一旦細胞に導入されると、このRNA断片は、内因性miRNAを擬態し、その標的遺伝子に特異的に結合し、遺伝子の転写後抑制、より具体的には翻訳阻害を生じる。内因性miRNAとは異なり、miRNA-ミミックは遺伝子特異的な様式で作用し得る。実施形態において、miRNA-ミミックは、20~30個の塩基(例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個の塩基)の二本鎖オリゴマーであり得る。実施形態において、miRNA-ミミックは、20~30個の塩基(例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個の塩基)の三本鎖オリゴマーであり得る。実施形態において、miRNA-ミミックは、2'化学修飾を有し得る。実施形態において、miRNA-ミミ

40

50

ックは、血清安定性増強化学修飾、例えば、ホスホチオエートヌクレオチド間結合、2' - O - メチルリボヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロリボヌクレオチド、2' - デオキシリボヌクレオチド、ユニバーサル塩基ヌクレオチド、5 - Cメチルヌクレオチド、逆位デオキシ脱塩基残基結合、またはロックド核酸を有し得る。

【0044】

本明細書で使用される場合、「miR126 - ミミック」または「miR26 - ミミック核酸配列」という用語は、miR126と構造的に実質的に類似し、miR126と同様の生物学的機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR126 - ミミックは、ネイティブmiR126と比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR126 - ミミックは、ネイティブmiR126と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

10

【0045】

本明細書で使用される場合、「miR142 - ミミック」または「miR142 - ミミック核酸配列」という用語は、miR142と構造的に実質的に類似し、miR142と同様の生物学的機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR142 - ミミックは、ネイティブmiR142と比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR142 - ミミックは、ネイティブmiR142と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

20

【0046】

本明細書で使用される場合、「miR155 - ミミック」または「miR155 - ミミック核酸配列」という用語は、miR155と構造的に実質的に類似し、miR155と同様の生物学的機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR155 - ミミックは、ネイティブmiR155と比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR155 - ミミックは、ネイティブmiR155と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

30

【0047】

本明細書で使用される場合、「miR9 - ミミック」または「miR9 - ミミック核酸配列」という用語は、miR9と構造的に実質的に類似し、miR9と同様の生物学的機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR9 - ミミックは、ネイティブmiR9と比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR9 - ミミックは、ネイティブmiR9と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

40

【0048】

本明細書で使用される場合、「miR10b - ミミック」または「miR10b - ミミック

50

ク核酸配列」という用語は、miR10bと構造的に実質的に類似し、miR10bと同様の生物学的機能を達成することができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR10b - ミミックは、ネイティブmiR10bと比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR10b - ミミックは、ネイティブmiR10bと比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

【0049】

本明細書で使用される場合、「miR21 - ミミック」または「miR21 - ミミック核酸配列」という用語は、miR21と構造的に実質的に類似し、miR21と同様の生物学的機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR21 - ミミックは、ネイティブmiR21と比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR21 - ミミックは、ネイティブmiR21と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

【0050】

本明細書で使用される場合、「miR17 - ミミック」または「miR17 - ミミック核酸配列」という用語は、miR17と構造的に実質的に類似し、miR17と同様の生物学的機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR17 - ミミックは、ネイティブmiR17と比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR17 - ミミックは、ネイティブmiR17と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

【0051】

本明細書で使用される場合、「miR92 - ミミック」または「miR92 - ミミック核酸配列」という用語は、miR92と構造的に実質的に類似し、miR92と同様の生物学的機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR92 - ミミックは、ネイティブmiR92と比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR92 - ミミックは、ネイティブmiR92と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分）に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

【0052】

本明細書で使用される場合、用語「miR125b - ミミック」または「miR125b - ミミック核酸配列」は、miR125bと構造的に実質的に類似し、miR125bと同様の生物学的機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR125b - ミミックは、ネイティブmiR125bと比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR125b - ミミックは、ネイティブmiR125bと比較して、配列全体または配列の一部（例えば、10、15、20、25、30、40

10

20

30

40

50

、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分)に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

【0053】

本明細書で使用される場合、「miR146a - ミミック」または「miR146a - ミミック核酸配列」という用語は、miR146aと構造的に実質的に類似し、miR146aと同様の生物学的機能を果たすことができるオリゴヌクレオチドを指す。実施形態において、miR146a - ミミックは、ネイティブmiR146aと比較して、少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性を有する。実施形態において、miR146a - ミミックは、ネイティブmiR146aと比較して、配列全体または配列の一部(例えば、10、15、20、25、30、40、45、50、55、60、65、70、75、または80個の連続したヌクレオチド部分)に対して、少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する。

10

【0054】

本明細書で使用される場合、「ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)」という用語は、その中のいくつかのまたは全てのヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合を構成する核酸配列、例えば「CpG核酸配列」または「GpC核酸配列」を指す。実施形態において、ホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)は、15~30個の塩基長であり、一本鎖であり、部分的にまたは完全にホスホロチオエート化されている。部分的にホスホロチオエート化されたODNは、その中で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28個のヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合を構成するODNである。

20

【0055】

実施形態において、核酸中の「CpGモチーフ」という用語は、その中で5' Cヌクレオチドが、ホスホジエステルヌクレオチド間結合またはホスホジエステル誘導体ヌクレオチド間結合を介して3' Gヌクレオチドに連結されている核酸を指す。実施形態において、核酸中の「CpGモチーフ」という用語は、その中で5' Gヌクレオチドが、ホスホジエステルヌクレオチド間結合またはホスホジエステル誘導体ヌクレオチド間結合を介して3' Cヌクレオチドに連結されている核酸を指す(「GpC核酸配列としても知られる」)。実施形態において、CpGモチーフは、ホスホジエステルヌクレオチド間結合を含む。実施形態において、CpGモチーフには、ホスホジエステル誘導体ヌクレオチド間結合を含む。実施形態において、CpGモチーフは、ホスホロチオエート結合を含む。

30

【0056】

本明細書で使用される場合、「クラスA CpG ODN」または「AクラスCpG ODN」または「D型CpG ODN」または「クラスA CpG DNA配列」という用語は、化学的及び生物学的な科学におけるその一般的な意味に従って使用され、5'、3'または両方の末端にポリ-G配列のうちの一つ以上；CpGモチーフを含む内部パルンドロム配列；またはデオキシヌクレオチドを連結する一つ以上のホスホジエステル誘導体を含むオリゴデオキシヌクレオチドを含むCpGモチーフを指す。実施形態において、クラスA CpG ODNは、5'、3'または両方の末端にポリ-G配列；CpGモチーフを含む内部パルンドロム配列；及びデオキシヌクレオチドを連結する一つ以上のホスホジエステル誘導体を含む。実施形態において、ホスホジエステル誘導体はホスホロチオエートである。クラスA CpG ODNの例には、ODN D19、ODN 1585、ODN 2216、及びODN 2336が含まれる。

40

【0057】

本明細書で使用される場合、「クラスB CpG ODN」または「クラスB CpG O

50

DN」または「K型 CpG ODN」または「クラスB CpG DNA配列」という用語は、化学的及び生物学的な科学におけるその一般的な意味に従って使用され、CpGモチーフを含む6merモチーフのうちの一つ以上；全てのデオキシヌクレオチドを連結するホスホジエステル誘導体を含むオリゴデオキシヌクレオチドを含むCpGモチーフを指す。実施形態において、6merモチーフは、5'-PuPyCGPyPu-3'（配列番号15）を含み、式中、Puは核酸塩基（例えば、AまたはG）を含有するプリンを表し、Pyは核酸塩基（例えば、T/UまたはC）を含有するピリミジンを表す。実施形態において、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む6merモチーフのうちの一つ以上のコピー及び全てのデオキシヌクレオチドを連結するホスホジエステル誘導体を含む。実施形態において、ホスホジエステル誘導体はホスホロチオエートである。実施形態において、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む一つの6merモチーフを含む。実施形態において、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む6merモチーフの2つのコピーを含む。実施形態において、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む6merモチーフの3つのコピーを含む。実施形態において、クラスB CpG ODNは、CpGモチーフを含む6merモチーフの4つのコピーを含む。クラスB CpG ODNの例には、ODN1668、ODN1826、ODN2006、及びODN2007が含まれる。

10

【0058】

本明細書で使用される場合、「クラスC CpG ODN」または「Cクラス CpG ODN」または「C型 CpG DNA配列」という用語は、化学的及び生物学的な科学におけるその一般的な意味に従って使用され、CpGモチーフを含むパリンドロム配列及び全てのデオキシヌクレオチドを連結するホスホジエステル誘導体（ホスホロチオエート）を含むオリゴデオキシヌクレオチドを指す。クラスC CpG ODNの例には、ODN2395及びODN M362が含まれる。

20

【0059】

本明細書で使用される略語は、化学的及び生物学的な技術分野におけるそれらの従来の意味を有する。本明細書に記載される化学構造及び式は、化学技術分野において知られている化学原子価の標準規則に従って構築される。

【0060】

置換基が、左から右へ書かれたそれらの従来の化学式によって特定される場合、構造を右から左へ書くことから生じる化学的に同一の置換基を等しく包含し、例えば-CH₂O-は-OCH₂-と同等である。

30

【0061】

「アルキル」という用語は、特に明記しない限り、それ自体が、または別の置換基の一部として、直鎖（すなわち、非分岐の）もしくは分岐鎖の非環状炭素鎖（または炭素）、またはこれらの組み合わせを意味し、アルキルは、完全に飽和された、モノまたはポリ不飽和であってもよく、表示された炭素原子の数（すなわち、C₁~C₁₀は1~10個の炭素を意味する）を有する二価及び多価のラジカルを含むことができる。飽和炭化水素ラジカルの例には、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、（シクロヘキシル）メチルなどの基、例えば、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチルの相同体及び異性体等が含まれるが、これらに限定されない。不飽和アルキル基は、一つ以上の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例には、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-（ブタジエニル）、2,4-ペンタジエニル、3-（1,4-ペンタジエニル）、エチニル、1-及び3-プロピニル、3-ブチニル、及びより高次の相同体及び異性体が含まれるが、これらに限定されない。アルコキシは、酸素リンカー（-O-）を介して分子の残部に結合したアルキルである。

40

【0062】

「アルキレン」という用語は、特に明記しない限り、それ自体が、または別の置換基の一部として、-CH₂CH₂CH₂-で例示されるがこれに限定されないアルキルから誘導

50

される二価の基を意味する。典型的には、アルキル（またはアルキレン）基は1～24個の炭素原子を有するであろう。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は、一般に8個以下の炭素原子を有する、より短い鎖のアルキルまたはアルキレン基である。「アルケニレン」という用語は、特に明記しない限り、それ自体が、または別の置換基の一部として、アルケンから誘導される二価の基を意味する。

【0063】

「ヘテロアルキル」という用語は、特に明記しない限り、それ自体で、または別の用語と組み合わせて、少なくとも1つの炭素原子及びO、N、P、Si、及びSからなる群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含む、安定した非環状の直鎖もしくは分枝鎖、またはそれらの組み合わせを意味し、窒素及びイオウ原子は任意に酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は任意に四級化されていてもよい。ヘテロ原子（複数可）O、N、P、S、及びSiは、ヘテロアルキル基の任意の内部位置に、またはアルキル基が分子の残部に結合している位置に配置されてもよい。例には、 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ 、 $-CH=CH-O-CH_3$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-CH=N-OCH_3$ 、 $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-O-CH_3$ 、 $-O-CH_2-CH_3$ 、及び $-CN$ が含まれるが、これらに限定されない。例えば、 $-CH_2-NH-OCH_3$ 及び $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ などの、最大2個または3個のヘテロ原子が連続しているものでもよい。

【0064】

同様に、「ヘテロアルキレン」という用語は、特に明記しない限り、それ自体が、または別の置換基の一部として、 $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ 及び $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ で例示されるがこれらに限定されないヘテロアルキルから誘導される二価の基を意味する。ヘテロアルキレン基の場合、ヘテロ原子は、鎖末端の一方または両方（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）を占有することもできる。さらに、アルキレン及びヘテロアルキレン結合基の場合、結合基の配向は、結合基の式が書かれている方向によって示唆されていない。例えば、式 $-C(O)_2R'$ は、 $-C(O)_2R'$ 及び $-R'C(O)_2-$ の両方を表す。上記のように、ヘテロアルキル基には、本明細書で使用される場合、 $-C(O)R'$ 、 $-C(O)NR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-OR'$ 、 $-SR'$ 及び/または「~~など~~」のヘテロ原子を介して分子の残りに結合している基が含まれる。「ヘテロアルキル」が列挙され、続いて例えば $-NR'R''$ などの特定のヘテロアルキル基が列挙される場合、ヘテロアルキルという用語及び $-NR'R''$ は重複または相互排他的ではないことが理解されよう。むしろ、特定のヘテロアルキル基は、明らかにするために列挙される。これにより、「ヘテロアルキル」という用語は、例えば $-NR'R''$ などの特定のヘテロアルキル基を排除するものとして本明細書で解釈されるべきではない。

【0065】

「シクロアルキル」及び「ヘテロシクロアルキル」という用語は、特に明記しない限り、単独でまたは他の用語と組み合わせて、それぞれ「アルキル」及び「ヘテロアルキル」の環式非芳香族変形型を意味し、ここで、環を構成する炭素は、非水素原子との結合に関与する全ての炭素原子価のために必ずしも水素に結合する必要はない。加えて、ヘテロシクロアルキルの場合、ヘテロ原子は、複素環が分子の残部に結合している位置を占有することができる。シクロアルキルの例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘブチルなどが含まれるが、これらに限定されない。ヘテロシクロアルキルの例には、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニルなどが含まれるが、これらに限定されない。「シク

ロアルキレン」及び「ヘテロシクロアルキレン」は、単独でまたは別の置換基の一部として、シクロアルキル及びヘテロシクロアルキルからそれぞれ誘導される二価のラジカルを意味する。

【0066】

「ハロ」または「ハロゲン」という用語は、特に明記しない限り、単独でまたは別の置換基の一部として、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素原子を意味する。加えて、「ハロアルキル」などの用語は、モノハロアルキル及びポリハロアルキルを含むことを意味する。例えば、「ハロ(C₁~C₄)アルキル」という用語には、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、4-クロロブチル、3-プロモプロピルなどが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0067】

「アシル」という用語は、特に明記しない限り、-C(O)Rを意味し、ここで、Rは、置換または非置換アルキル、置換または非置換シクロアルキル、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換ヘテロシクロアルキル、置換または非置換アリール、または置換または非置換ヘテロアリールである。

【0068】

「アリール」という用語は、特に明記しない限り、互いに縮合した(例えば、縮合環アリール)または共有結合した(例えば、ビフェニル)単環または多重環(好ましくは1~3環)とすることができる、ポリ不飽和、芳香族炭化水素置換基を意味する。縮合環アリールは、縮合した環のうちの少なくとも1つがアリール環である、互いに縮合した多環を指す。「ヘテロアリール」という用語は、N、O、またはSなどの少なくとも1つのヘテロ原子を含有するアリール基(または環)を指し、ここでは窒素及びイオウ原子は任意に酸化され、窒素原子(複数可)は任意に四級化される。それゆえ、「ヘテロアリール」という用語は、縮合環ヘテロアリール基(すなわち、縮合環の少なくとも1つがヘテロ芳香環である複数の互いに縮合した環)を含む。5, 6-縮合環ヘテロアリーレンは、互いに縮合した2つの環を指し、ここで、一方の環は5員環を有し、他方の環は6員環を有し、少なくとも1つの環はヘテロアリール環である。同様に、6, 6-縮合環ヘテロアリーレンは、互いに縮合した2つの環を指し、ここで、一方の環は6員環を有し、他方の環は6員環を有し、少なくとも1つの環はヘテロアリール環である。また、6, 5-縮合環ヘテロアリーレンは、互いに縮合した2つの環を指し、ここで、一方の環は6員環を有し、他方の環は5員環を有し、少なくとも1つの環はヘテロアリール環である。ヘテロアリール基は、炭素またはヘテロ原子を介して分子の残部に結合することができる。アリール及びヘテロアリール基の非限定的な例には、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ビフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソキサゾリル、5-イソキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、プリニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、及び6-キノリルが含まれる。上記アリール及びヘテロアリール環系のそれぞれの置換基は、以下に記載される許容される置換基の群から選択される。「アリーレン」及び「ヘテロアリーレン」は、単独でまたは別の置換基の一部として、アリール及びヘテロアリールからそれぞれ誘導される二価のラジカルを意味する。ヘテロアリール基の非限定的な例には、ピリジニル、ピリミジニル、チオフェニル、チエニル、フラニル、インドリル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾジオキサリル、ベンゾジオキサニル、チアナフタニル、ピロロピリジニル、インダゾリル、キノリニル、キノキサリニル、ピリドピラジニル、キナゾリノニル、ベンゾイソオキサゾリル、イミダゾピリジニル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ベンゾチオフェニル、フェニル、ナフチル、ビフェニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、ピラジニル、オキサゾリル、イ

20

30

40

50

ソキサゾリル、チアゾリル、フリルチエニル、ピリジル、ピリミジル、ベンゾチアゾリル、プリニル、ベンズイミダゾリル、イソキノリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、ピロリル、ジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ベンゾチアジアゾリル、イソチアゾリル、ピラゾロピリミジニル、ピロロピリミジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾオキサゾリルまたはキノリルが含まれる。上記の例は、置換または非置換であってもよく、上記の各ヘテロアリールの例の二価のラジカルは、ヘテロアリーレンの非限定的な例である。

【0069】

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

10

【0070】

本明細書で使用される場合、「オキソ」という用語は、炭素原子に二重結合している酸素を意味する。

【0071】

本明細書で使用される場合、「アルキルスルホニル」という用語は、式 - S(O₂) - R' を有する部分を意味し、ここで、R' は、上記で定義されたような置換もしくは非置換アルキル基である。R' は、炭素の特定の数を有してもよい（例えば、「C₁ ~ C₄ アルキルスルホニル」）。

20

【0072】

上記の用語（すなわち、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」及び「ヘテロアリール」）のそれぞれは、示されたラジカルの置換型及び非置換型の両方を含む。各型のラジカルのための好ましい置換基は以下に提供される。

【0073】

アルキル及びヘテロアルキルラジカル（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、及びヘテロシクロアルケニルとしてしばしば言及される基を含む）の置換基は、0 ~ (2m' + 1) の範囲の数で（式中、m' はそのようなラジカル中の炭素原子の総数である）、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R"、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R"R"'、-OC(O)R'、-C(O)R'、 $\frac{1}{2}$ RO、-CONR'R"、-OC(O)NR'R"、-NR"C(O)R'、-NR'-C(O)NR"R"'、-NR₂RC'(O)NR-C(NR'R"R"')=NR"、-NR-C(NR'R")=NR"'、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R"、-NRSOR'、NR'NR"R"'、ONR'R"、NR'C=(O)NR"NR"'R"、-CN、 $\frac{1}{2}$ から選択されるがこれらに限定されない、様々な基の1つ以上であり得る。R'、R"、R"'、及びR"" は、好ましくは、それぞれ独立して、水素、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール（例えば、1 ~ 3個のハロゲンで置換されたアリール）、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が複数のR基を含むとき、例えば、これらの基の2つ以上が存在する場合、R基のそれぞれは、R'、R"、R"'、及びR"" 基のように独立して選択される。R' 及びR" が同じ窒素原子に結合しているとき、それらは窒素原子と結合して4、5、6または7員環を形成することができる。例えば、-NR'R" には、1 - ピロリジニル及び4 - モルホリニルが含まれるが、これらに限定されない。置換基の上記の説明から、当業者であれば、「アルキル」という用語は、ハロアルキル（例えば、-C

30

50

F₃やCH₂CF₃)及びアシル(例えば、-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OCH₃など)などの、水素基以外の基に結合した炭素原子を含む基を含むことを意味することを理解するであろう。

【0074】

アルキル基について記載した置換基と同様に、アリール及びヘテロアリール基の置換基は変化し、また、ゼロから芳香族環系上の空いた原子価の総数までの範囲の数で、例えば、-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R'''、-NR''C(=O)R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR''、-NR-C(NR'R''R''')=NR''、-S(O)R'、-S(=O)R'、-S(O)₂NR'R''、-NRSO₂R'、-NR'NR''R'''、-ONR'R''、NR'C=(O)NR''NR''R'''、-CN、-NO₂、-R'、-N₃、-CH(Ph)₂、フルオロ(C₁~C₄)アルコキシ、及びフルオロ(C₁~C₄)アルキルから選択され、ここで、R'、R''、R'''、及びR''''は、好ましくは、独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、及び置換もしくは非置換のヘテロアリールから選択される。本発明の化合物が2つ以上のR基を含むとき、例えば、R基のそれぞれは、R'、R''、R'''及びR''''基がこれらの基の2つ以上存在するときのように独立して選択される。

【0075】

20

2つ以上の置換基は、任意に結合してアリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはヘテロシクロアルキル基を形成してもよい。そのようないわゆる環形成置換基は、必ずしも必要ではないが、通常は、環状基本構造に結合していることが分かる。一実施形態において、環形成置換基は、基本構造の隣接するメンバーに結合している。例えば、環状基本構造の隣接するメンバーに結合した2つの環形成置換基は、縮合環構造を生成する。別の実施形態において、環形成置換基は、基本構造の単一の構成員に結合される。例えば、環状基本構造の単一構成員に結合した2つの環形成置換基は、スピロ環構造を生成する。さらに別の実施形態において、環形成置換基は、基本構造の隣接していない構成員に結合される。

【0076】

30

アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子上の置換基のうちの2つは、任意に、式 -T-C(O)-(CRR')_q-U-の環を形成することができ、式中、T及びUは独立して-NR-、-O-、-CRR'-、または単結合であり、またqは0~3の整数である。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基の2つは、式 -A-(CH₂)_r-B-で置換することができ、式中、A及びBは独立して-CRR'-、-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂NR'-または単結合であり、またrは1~4の整数である。そのようにして形成された新しい環の単結合のうちの1つは、任意に、二重結合で置換することができる。あるいは、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子上の置換基のうちの2つは、式 -(CRR')_s-X'-(C''R''R''')_d-の置換基で任意に置換することができ、式中、s及びdは独立して0~3の整数であり、またX'は、-O-、-NR'-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、または-S(O)₂NR'-である。置換基R、R'、R''及びR''''は、好ましくは、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換のアリール、及び置換もしくは非置換のヘテロアリールから独立して選択される。

40

【0077】

本明細書で使用される場合、「ヘテロ原子」または「環ヘテロ原子」という用語は、酸素(O)、窒素(N)、イオウ(S)、リン(P)、及びケイ素(Si)を含むことを意味する。

【0078】

50

本明細書で使用される場合、「置換基」は、以下の部分から選択される基を意味する：

(A) オキソ、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_2Cl$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $NHNH_2$ 、 ONH_2 、 $NHC=(O)NHNH_2$ 、 $-NHC=(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC=(O)H$ 、 $-NHC(O)-OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-NHSO_2CH_3$ 、 $-N_3$ 、非置換のアルキル、非置換のヘテロアルキル、非置換のシクロアルキル、非置換のヘテロシクロアルキル、非置換のアリール、非置換のヘテロアリールと、

(B) (i) オキソ、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_2Cl$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC=(O)NHNH_2$ 、 $-NHC=(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC=(O)H$ 、 $-NHC(O)-OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-NHSO_2CH_3$ 、 $-N_3$ 、非置換のアルキル、非置換のヘテロアルキル、非置換のシクロアルキル、非置換のヘテロシクロアルキル、非置換のアリール、非置換のヘテロアリール、及び

10

(ii) 以下から選択される少なくとも1つの置換基で置換されたアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール：

(a) オキソ、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_2Cl$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC=(O)NHNH_2$ 、 $-NHC=(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC=(O)H$ 、 $-NHC(O)-OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCHF_2$ 、 $-NHSO_2CH_3$ 、 $-N_3$ 、非置換アルキル、非置換ヘテロアルキル、非置換シクロアルキル、非置換ヘテロシクロアルキル、非置換アリール、非置換ヘテロアリールと、

20

(b) オキソ、ハロゲン、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_2Cl$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC=(O)NHNH_2$ 、 $-NHC=(O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC=(O)H$ 、 $-NHC(O)-OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCHF_2$ 、 $NHSO_2CH_3$ 、 $-N_3$ 、非置換のアルキル、非置換のヘテロアルキル、非置換のシクロアルキル、非置換のヘテロシクロアルキル、非置換のアリール、非置換のヘテロアリールから選択される少なくとも1つの置換基で置換されたアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリールと、から選択される少なくとも1つの置換基で置換されたアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール。

30

【0079】

本明細書で使用される場合、「サイズ制限置換基 (substituent)」または「サイズ制限置換基 (substituent group)」は、「置換基」について上記に記載された全ての置換基から選択される基を意味し、各置換もしくは非置換のアルキルは、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{20}$ アルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2～20員のヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキルは、置換もしくは非置換の $C_3 \sim C_8$ シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の3～8員のヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のアリールは、置換もしくは非置換の $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり、及び各置換もしくは非置換のヘテロアリールは、置換もしくは非置換の5～10員のヘテロアリールである。

40

【0080】

本明細書で使用される場合、「低級置換基 (substituent)」または「低級置換基 (substituent group)」は、「置換基」について上記に記載された全ての置換基から選択される基を意味し、ここで、各置換もしくは非置換のアルキルは、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_8$ アルキル、各置換もしくは非置換のヘテロアルキルは

50

、置換もしくは非置換の2～8員ヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキルは、置換もしくは非置換のC₃～C₇シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の3～7員ヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のアリールは、置換もしくは非置換のC₆～C₁₀アリールであり、及び各置換もしくは非置換のヘテロアリールは、置換もしくは非置換の5～9員ヘテロアリールである。

【0081】

いくつかの実施形態において、本明細書の化合物で記載される各置換基は、少なくとも1つの置換基で置換されている。より具体的には、いくつかの実施形態において、各置換アルキル、置換ヘテロアルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、置換ヘテロアリール、置換アルキレン、置換ヘテロアルキレン、置換シクロアルキレン、置換ヘテロシクロアルキレン、置換アリーレン及び/または置換ヘテロアリーレンは、少なくとも1つの置換基で置換されている。他の実施形態において、これらの基の少なくとも1つまたは全てが、少なくとも1つのサイズ制限置換基で置換されている。他の実施形態において、これらの基の少なくとも1つまたは全てが、少なくとも1つの低級置換基で置換されている。

【0082】

本明細書の化合物の他の実施形態において、各置換もしくは非置換のアルキルは、置換もしくは非置換のC₁～C₂₀アルキルであってもよく、各置換もしくは非置換のヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2～20員ヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキルは、置換もしくは非置換のC₃～C₈シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の3～8員ヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のアリールは、置換もしくは非置換のC₆～C₁₀アリールであり、及び/または各置換もしくは非置換のヘテロアリールは、置換もしくは非置換の5～10員ヘテロアリールである。本明細書の化合物のいくつかの実施形態において、各置換もしくは非置換のアルキレンは、置換もしくは非置換のC₁～C₂₀アルキレンであり、各置換もしくは非置換のヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の2～20員ヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキレンは、置換もしくは非置換のC₃～C₈シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の3～8員ヘテロシクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のアリーレンは、置換もしくは非置換のC₆～C₁₀アリーレンであり、及び/または各置換もしくは非置換のヘテロアリーレンは、置換もしくは非置換の5～10員ヘテロアリーレンである。

【0083】

いくつかの実施形態において、各置換もしくは非置換のアルキルは、置換もしくは非置換のC₁～C₈アルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロアルキルは、置換もしくは非置換の2～8員ヘテロアルキルであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキルは、置換もしくは非置換のC₃～C₇シクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルは、置換もしくは非置換の3～7員ヘテロシクロアルキルであり、各置換もしくは非置換のアリールは、置換もしくは非置換のC₆～C₁₀アリールであり、及び/または各置換もしくは非置換のヘテロアリールは、置換もしくは非置換の5～9員ヘテロアリールである。いくつかの実施形態において、各置換もしくは非置換のアルキレンは、置換もしくは非置換のC₁～C₈アルキレンであり、各置換もしくは非置換のヘテロアルキレンは、置換もしくは非置換の2～8員のヘテロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のシクロアルキレンは、置換もしくは非置換のC₃～C₇シクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレンは、置換もしくは非置換の3～7員ヘテロシクロアルキレンであり、各置換もしくは非置換のアリーレンは、置換もしくは非置換のC₆～C₁₀アリーレンであり、及び/または各置換もしくは非置換のヘテロアリーレンは、置換もしくは非置換の5～9員ヘテロアリーレンである。いくつかの実施形態において、化合物は、以下の実施例の項に明示される化学種である。

【 0 0 8 4 】

本明細書で使用される場合、2つの部分を指すときの「抱合された」という用語は、2つの部分が結合されていることを意味し、2つの部分を結合する結合または結合（複数）は、共有結合または非共有結合であってもよい。実施形態において、2つの部分は、互いに（例えば、直接的に、または共有結合した中間体を介して）共有結合している。実施形態において、2つの部分は、非共有結合で（例えば、イオン結合（複数可）、ファンデルワールス結合（複数可）/相互作用、水素結合（複数可）、極性結合（複数可）、またはそれらの組合せまたは混合物を介して）結合される。

【 0 0 8 5 】

「標識」または「検出可能な部分」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的方法、磁気共鳴画像法、または他の物理的手段によって検出可能な組成物である。例えば、有用な検出可能な部分には、 ^{32}P 、蛍光染料、高電子密度試薬、酵素（例えば、ELISAにおいて一般的に使用されるようなもの）、ビオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、超小型超常磁性酸化鉄（「USPIO」）ナノ粒子、USPIOナノ粒子凝集体、超常磁性酸化鉄（「SPIO」）ナノ粒子、SPIOナノ粒子凝集体、単結晶SPIO、単結晶SPIO凝集体、単結晶酸化鉄ナノ粒子、単結晶酸化鉄、他のナノ粒子造影剤、リポソームまたはガドリニウムキレート（「Gd-キレート」）分子を含有する他の送達ビヒクル、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種（例えば、炭素11、窒素13、酸素15、フッ素18、ルビジウム82）、フルオロデオキシグルコース（例えば、フッ素-18標識）、放射性核種を放出する任意の線、陽電子放出型放射性核種、放射標識グルコース、放射標識水、放射標識アンモニア、バイオコロイド、マイクロバブル（例えば、アルブミン、ガラクトース、脂質、及び/またはポリマーを含むマイクロバブルシェル、空気、重質ガス（複数可）、ペルフルオロカーボン、窒素、オクタフルオロプロパン、パーフレキシシン脂質ミクロスフェア、ペルフルトレンなどを含むマイクロバブルガスコア）、ヨード造影剤（例えば、イオヘキソール、イोजキサノール、イオベルソール、イオパミドール、イオキシラン、イプロマイド、ジアリーゾアート、メトリゾアート、イオキサグラート）、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、二光子フルオロフォア、または、例えば、標的ペプチドと特異的に反応するペプチドまたは抗体に放射性標識を組み込むことによって検出可能にすることができるハプテン及びタンパク質または他の実在物が含まれる。検出可能な部分はまた、標的薬剤（例えば、本明細書に記載の化合物）への結合のために誘導体化された、追加の組成物でコーティングされたナノ粒子、粒子、凝集体中に封入された上記組成物のいずれかを含む。オリゴヌクレオチドまたはタンパク質を標識に抱合させるために、当該分野で周知の任意の方法を用いることができ、例えば、Hermanson, Bioc conjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diegoに記載されている方法を使用することができる。

【 0 0 8 6 】

本明細書で使用される場合、「細胞」は、そのゲノムDNAを保存または複製するために十分な代謝または他の機能を実行する細胞を指す。細胞は、例えば、無傷膜の存在、特定の染料による染色、子孫を産生する能力、または配偶子の場合には、生存可能な子孫を産生するために第2の配偶子と結合する能力を含む、当該技術分野で周知の方法によって特定することができる。細胞は、原核細胞及び真核細胞を含み得る。原核細胞としては、細菌が含まれるが、これに限定されない。真核細胞には、酵母細胞ならびに植物及び動物由来の細胞、例えば哺乳動物、昆虫（例えば、spodoptera）及びヒト細胞が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「細胞」という用語はまた、そのような細胞に由来する個々の細胞、細胞株、または培養物を指す。「培養物」は、同一または異なる型の単離された細胞を含む組成物を指す。

【 0 0 8 7 】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈における「同一の」または「同一性」パーセントという用語は、後述するデフォルトパラメータを有するBLASTまたはBLAS

10

20

30

40

50

T 2.0 配列比較アルゴリズムを使用して、または手作業によるアライメント及び目視検査（例えば、NCBIウェブサイト等参照）によって測定した場合と同じ、または特定の百分率（例えば、比較ウィンドウまたは指定された領域にわたって最大に一致するように比較及び整列されたとき、特定の領域に対して、約60%の同一性、好ましくは61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性）の同じアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する2つ以上の配列または部分配列を指す。このときそのような配列は、「実質的に同一」とされると言われる。この定義はまた、試験配列の補体を指しても、または試験配列の補体に適用されてもよい。定義には、欠失及び/または付加を有する配列、ならびに置換基を有する配列も含まれる。後述するように、好ましいアルゴリズムは、ギャップ等を説明することができる。好ましくは、同一性は、少なくとも約10個のアミノ酸または20個のヌクレオチド長、またはより好ましくは10~50個のアミノ酸または20~50個のヌクレオチド長である領域に対して存在する。本明細書で使用される場合、核酸配列同一性パーセント(%)は、配列を整列させ、最大の配列同一性パーセントを達成するために必要に応じてギャップを導入した後、基準配列中のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドの百分率として定義される。配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2またはMegalign(DNASTAR)

10

20

【0088】

配列比較のために、典型的には、1つの配列は、試験配列が比較される基準配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用するとき、試験及び基準配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。好ましくは、デフォルトプログラムパラメータを使用することができ、または代替パラメータを指定することができる。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、基準配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。

30

【0089】

「相補的」または「相補性」という用語は、伝統的なワトソン・クリックまたは他の非伝統的な型のいずれかによって別の核酸配列と水素結合(複数可)を形成する核酸の能力を指す。例えば、配列A-G-Tは、配列T-C-Aに相補的である。相補性パーセントは、第2の核酸配列と水素結合(例えば、ワトソン・クリック塩基対形成)を形成することができる核酸分子中の残基の百分率(例えば、10個中の5、6、7、8、9、10個は、50%、60%、70%、80%、90%、及び100%相補的となる)を示す。「完全に相補的」とは、核酸配列の全ての隣接残基が、第2の核酸配列中の同数の連続残基と水素結合することを意味する。本明細書で使用される場合、「実質的に相補的」とは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50個、またはそれ以上のヌクレオチドの領域に対して、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%である相補性の程度を指し、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸を指す。

40

【0090】

本明細書で使用される場合、ハイブリダイゼーションのための「ストリンジェントな条件」とは、標的配列に対して相補性を有する核酸が標的配列と優勢にハイブリダイズし、非標的配列に実質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、概して配列依存性であり、いくつかの要因によって変化する。概して、配列が長いほど、配列

50

がその標的配列に特異的にハイブリダイズする温度が高くなる。ストリンジェントな条件の非限定的な例は、Tijssen (1993), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology - Hybridization With Nucleic Acid Probes Part 1, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay", Elsevier, N.Y. に詳細に記載されている。

【0091】

「ハイブリダイゼーション」は、1つ以上のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対形成、フーグスティーン (Hoogsteijn) 結合、または任意の他の配列特異的な様式によって生じ得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2本鎖、多重鎖複合体を形成する3本以上の鎖、単一の自己17ハイブリタイズ鎖、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、PCRの開始、または酵素によるポリヌクレオチドの開裂などの、より広範なプロセスにおける1ステップを構成し得る。所与の配列とハイブリダイズすることができる配列は、所与の配列の「補体」と称される。

10

【0092】

「患者」、「対象」、「それを必要とする患者」及び「それを必要とする対象」は、本明細書では互換的に使用され、また本明細書で提供される方法及び組成物を使用して投与することによって治療することができる疾患または病態に、罹患しているかまたはその傾向がある生存生物を指す。非限定的な例には、ヒト、他の哺乳動物の、ウシ、ラット、マウス、イヌ、サル、ヤギ、ヒツジ、ウシ、シカ、及び他の非哺乳類動物が含まれる。いくつかの実施形態において、患者はヒトである。インビトロで得られたまたはインビトロで培養された生物学的実在物の組織、細胞及びそれらの子孫もまた企図される。

20

【0093】

本明細書で使用される場合、「投与する」という用語は、経口投与、坐剤としての投与、局所接触、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、病巣内、髄腔内、鼻腔内もしくは皮下投与、または徐放デバイス、例えばミニ浸透圧ポンプの対象への埋め込みを意味する。投与は、非経口及び経粘膜（例えば、頬、舌下、口蓋、歯肉、鼻、膣、直腸または経皮）を含む、任意の経路による。非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内及び頭蓋内が含まれる。他の送達様式には、リポソーム製剤の使用、静脈内注入、経皮パッチなどが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0094】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」または「治療」及び他の文法的同等語は、疾患、病態または症状を緩和、軽減、改善または予防すること、追加症状を予防し、症状の代謝性の基礎原因を予防しもしくは改善し、疾患または状態を阻害し、例えば、疾患または状態の進行を停止し、疾患または病態を緩和すること、疾患または病態を退行させ、疾患または病態によって引き起こされる状態を緩和し、または疾患または病態の症状を休止させることを含み、予防法を含むことが意図される。本用語は、治療的有用性及び/または予防的有用性を達成することをさらに含む。治療的有用性とは、治療される基礎疾患の根絶または改善を意味する。また、治療的有用性は、患者が依然として基礎疾患に罹患している可能性があるにもかかわらず、患者に改善が観察されるように、基礎疾患に関連する1つ以上の生理学的症状の根絶または改善によって達成される。

40

【0095】

本明細書で使用される場合、「予防する」、「予防すること」または「予防」という用語及び他の文法上の等価物には、疾患または病態症状の発症、発生を避けること、妨害または回避すること、ならびに症状の発生を減少させることが含まれる。治療がない場合に発症する可能性が高い症状よりも少ない症状が観察されるように、予防は完全（すなわち、

50

検出可能な症状がない)、または部分的であってもよい。本用語には、予防的有用性がさらに含まれる。疾患または状態を予防するために、本組成物は、特定の疾患を発症するリスクのある患者、または疾患の1つ以上の生理学的症状を訴える患者に、この疾患の診断が下されない可能性があったとしても投与されてもよい。

【0096】

「阻害すること」という用語はまた、本開示の化合物または組成物の非存在下での状態に対する効果(遺伝子/タンパク質/mRNAの疾患状態または発現レベル)を低下させることを意味する。

【0097】

本明細書で使用される場合、「試験化合物」は、特定の生物学的標的もしくは経路の活性、非活性、または他の調節を特定するためのスクリーニングプロセスにおいて使用される実験化合物を指す。

10

【0098】

「対照」または「対照実験」は、その一般的な通常の意味で使用され、実験の対象もしくは試薬が、実験の手順、試薬、または変数の省略を除いては、並行実験のように処理される実験を指す。場合によっては、対照は、実験効果を評価する際の比較の基準として使用される。いくつかの実施形態において、対照は、本明細書に記載されるような化合物の非存在下でのタンパク質の活性の測定である(実施形態及び実施例を含む)。

【0099】

「疾患」または「病態」は、本明細書で提供される化合物または方法で治療することができる患者または対象の病態もしくは健康状態を指す。場合によっては、「疾患」または「病態」は「がん」を指す。

20

【0100】

本明細書で使用される場合、「がん」という用語は、白血病、癌腫及び肉腫を含む、哺乳動物に見られる全ての型のがん、新生物、悪性腫瘍または良性腫瘍を指す。例示的ながんには、乳癌、卵巣癌、大腸癌、肝臓癌、腎臓癌、及び膵臓癌が含まれる。追加の例には、白血病(例えば、急性骨髄性白血病(「AML」)または慢性骨髄性白血病(「CML」))、脳癌、肺癌、非小細胞肺癌、メラノーマ、肉腫、及び前立腺癌、子宮頸癌、胃癌、頭頸部癌、子宮癌、中皮腫、転移性骨癌、髄芽腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、原発性血小板増加症、原発性マクログロブリン血症、原発性脳腫瘍、悪性膵臓インスリノーマ、悪性カルチノイド、膀胱癌、前悪性皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞腫、食道癌、尿生殖器癌、悪性高カルシウム血症、子宮内膜癌、副腎皮質癌、膵臓内分節及び外分泌部の新生物が含まれる。

30

【0101】

自己免疫疾患は、身体の免疫系が健康な細胞を攻撃する疾患を指す。自己免疫疾患の例には、リウマチ性関節炎、乾癬、全身性エリテマトーデス(SLE)、I型糖尿病、非アルコール性脂肪肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、多発性硬化症(MS)、パーキンソン病(PD)、アルツハイマー病(AD)及び炎症性腸疾患(IBD)が含まれるが、これらに限定されない。

【0102】

感染性疾患とは、体内の有害生物(例えば、細菌、ウイルス、真菌または寄生虫)の増殖及び拡散によって引き起こされる医学的状態を指す。感染性疾患の例には、結核、インフルエンザ、エボラ出血熱、HIV、HPV感染、及び肝炎が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0103】

「接触すること」は、その一般的な通常の意味に従って使用され、少なくとも2つの異なる種(例えば、生体分子または細胞を含む化学化合物)が、反応、相互作用、または物理的に触れるために十分に接近することを可能にするプロセスを指す。しかしながら、得られた反応生成物は、添加された試薬間の反応から、または反応混合物中で生成することができる1つ以上の添加された試薬に由来する中間体から直接的に生成することができるこ

50

とを理解されたい。いくつかの実施形態において、接触することは、本明細書に記載の化合物をタンパク質または酵素と相互作用させることを含む。

【0104】

本明細書で使用される場合、「表現型」及び「表現型の」という用語は、疾患症状の発症もしくは進行、生化学的特性、または生理学的特性などの生物の観察可能な特徴を指す。

【0105】

DNA 核酸配列（例えば、遺伝子）に関して本明細書で使用される場合、「発現」または「発現された」という単語は、その配列の転写産物及び/または翻訳産物を意味する。細胞内の DNA 分子の発現レベルは、細胞内に存在する対応する mRNA の量、または細胞によって産生されるその DNA によってコードされるタンパク質の量のいずれかに基づいて決定することができる (Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.1 - 18.88)。ポリペプチドに関して使用されるとき、発現には、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌を含むがこれらに限定されないポリペプチドの産生に關与する任意のステップが含まれる。発現は、タンパク質を検出するための従来の技術（例えば、ELISA、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー、免疫蛍光、免疫組織化学法など）を用いて検出することができる。

10

【0106】

「遺伝子」という用語は、タンパク質の産生に關与する DNA のセグメントを意味し、それは、コード領域の前後の領域（リーダ及びトレーラ）ならびに個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含む。リーダ、トレーラならびにイントロンは、遺伝子の転写及び翻訳の間に必要な調節要素を含む。さらに、「タンパク質遺伝子産物」は、特定の遺伝子から発現されるタンパク質である。

20

【0107】

本明細書に記載された特定のタンパク質（例えば、CD34 または CD38）に関して、命名されたタンパク質は、タンパク質の天然由来の形態、変異体または相同体のいずれかを含む（例えば、ネイティブタンパク質と比較して少なくとも 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の活性内）。いくつかの実施形態において、変異体または相同体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、50、100、150 または 200 個の連続したアミノ酸部分）に対して少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% のアミノ酸配列同一性を有する。他の実施形態において、タンパク質は、その NCBI 配列基準によって特定されるタンパク質である。他の実施形態において、タンパク質は、その NCBI 配列基準、その相同体または機能的断片によって特定されるタンパク質である。

30

【0108】

「CD34」という用語は、ヒトにおける CD34 遺伝子によってコードされる CD34 抗原としても知られる造血性前駆細胞抗原 CD34 を指す。それは細胞表面糖タンパク質であり、細胞-細胞接着因子として機能する。本明細書で提供される場合、「CD34」という用語は、CD34 の活性を維持する天然由来の CD34 タンパク質、相同体または変異体のいずれかを含む（例えば、ナイーブタンパク質と比較して少なくとも 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の活性内）。実施形態において、変異体または相同体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部（例えば、50、100、150 または 200 個の連続したアミノ酸部分）に対して少なくとも 50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% のアミノ酸配列同一性を有する。実施形態において、CD34 タンパク質は、NCBI 配列基準 NP_001764 または NP_001020280.1、その相同体または機能的断片によって特定されるタンパク質である。

40

【0109】

「CD38」という用語は、ヒトにおける CD38 遺伝子によってコードされる環状 AD

50

プリボ - ス加水分解酵素としても知られる分化抗原分類38 (cluster of differentiation 38) を指す。それは細胞表面糖タンパク質であり、細胞 - 細胞接着及びシグナル伝達において機能する。本明細書で提供される場合、「CD38」という用語は、CD38の活性を維持する天然由来のCD38タンパク質、相同体または変異体のいずれかを含む(例えば、ネイティブタンパク質と比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の活性内)。実施形態において、変異体または相同体は、天然由来の形態と比較して、配列全体または配列の一部(例えば、50、100、150または200個の連続したアミノ酸部分)に対して少なくとも50%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%のアミノ酸配列同一性を有する。実施形態において、CD38タンパク質は、NCBI配列標準号NP_001766.2、その相同体または機能的断片によって特定されるタンパク質である。

10

【0110】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに関して「~の量」という用語は、成分または要素が検出される量を指す。この量は、対照に対して測定することができ、例えば、対照と比較した特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルの増加は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの富化を示す。これにより、実施形態において、増加した量は、本明細書に記載のHSPCを宿主(例えば、マウス)に移植するより高いレベルまたは効率を示す。本用語は、濃縮物の定量的測定ならびに対照と比較した増加または減少の定性的測定を指す。

20

【0111】

本明細書の説明及び特許請求の範囲の全体にわたって、語「含む(comprise)」及び「含む(comprising)」や「含む(comprises)」などの他の形態は、含むことを意味するがこれに限定されず、例えば、他の構成要素を排除することを意図するものではない。

【0112】

「類似物(analog)」、「類似体(analogue)」、または「誘導体」は、化学及び生物学の一般的な通常の意味に従って使用され、別の薬剤(すなわち、いわゆる「参照」薬剤)と構造的に類似している化学薬剤を指すが、例えば、1つの原子を異なる元素の原子で置換する場合、または特定の官能基が存在する場合、または1つの官能基を別の官能基で置換する場合、または参照薬剤のキラル中心の絶対立体化学である場合、組成が異なる。いくつかの実施形態において、誘導体は、薬学的に許容される薬剤、例えばリン酸塩またはホスホン酸塩と抱合されてもよい。

30

【0113】

本明細書で使用される場合、「塩」という用語は、本明細書で使用される薬剤の酸または塩基塩を指す。許容される塩の例示的であるが非限定的な例は、鉱酸(塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸など)塩、有機酸(酢酸、プロピオン酸、グルタミン酸、クエン酸など)塩、及び第4級アンモニウム(ヨウ化メチル、ヨウ化エチルなど)塩である。

【0114】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書に記載の化合物に見られる特定の置換基に応じて、比較的非毒性の酸または塩基で調製される活性化合物の塩を含むことを意味する。本開示の化合物が比較的酸性の官能基を含むとき、塩基付加塩は、そのような化合物の中性形態を、無溶媒で、または適切な不活性溶媒中で十分な量の所望の塩基と接触させることによって得ることができる。薬学的に許容される塩基付加塩の例には、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノ、またはマグネシウム塩、もしくは同様の塩が含まれる。本開示の化合物が比較的塩基性の官能基を含むとき、酸付加塩は、そのような化合物の中性形態を、無溶媒で、または適切な不活性溶媒中で十分な量の酸と接触させることによって得ることができる。薬学的に許容される酸付加塩の例には、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、一酸化炭素、リン酸、一水素リン酸、二水素リン酸、硫酸、一水素硫酸、ヨウ化水素酸、または亜リン酸などのような無機酸から誘導されるもの、

40

50

ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸などのような比較的無毒性の有機酸から誘導される塩が含まれる。また、例えばアルギン酸塩などのアミノ酸の塩、及びグルクロン酸またはガラクトuron酸などのような有機酸の塩も含まれる（例えば、Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science 66: 1-19 (1977)を参照されたい）。本開示のある特定の化合物は、化合物が塩基または酸付加塩のいずれかに変換されることを可能にする塩基性官能基及び酸性官能基の両方を含む。当業者に周知の他の薬学的に許容される担体は、本開示に好適である。塩は、対応する遊離塩基形態である水性または他のプロトン性溶媒中により可溶性である傾向がある。他の場合には、調製物は、使用前に緩衝液と混合された、1 mM ~ 50 mM ヒスチジン、0.1% ~ 2% スクロ-ス、pH 範囲 4.5 ~ 5.5 の 2% ~ 7% マンニト-ル中の凍結乾燥粉末であってもよい。

10

【0115】

したがって、本開示の化合物は、薬学的に許容される酸などの塩として存在し得る。本開示は、そのような塩を含む。そのような塩の例には、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、メタンスルホン酸塩、硝酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩（例えば、(+)-酒石酸塩、(-)-酒石酸塩、またはラセミ混合物を含むそれらの混合物）、コハク酸塩、安息香酸塩、及びグルタミン酸などのアミノ酸との塩が含まれる。これらの塩は、当業者に既知の方法によって調製することができる。

20

【0116】

「アジュバント」（補助する、という意味のラテン語の *adjuvare* に由来）は、他の薬剤の効果を改変する薬理的及び/または免疫学的薬剤である。

【0117】

「希釈剤」（充填剤、賦形剤またはシンナーとも称される）は、希釈用薬剤である。特定の流体は簡単にポンプ圧送できないほど粘度が高いか、またはある特定の点から他の特定の点へ流れないほど高密度である。そのような流体をこの状態で移送することが経済的に実現可能でない可能性があるため、これは問題となり得る。この制限された動きを容易にするために、希釈剤が添加される。これは、流体の粘度を低下させ、それによって、ポンプ圧送/移送コストも減少させる。

30

【0118】

「投与」または「投与する」という用語は、現行の実施形態の薬剤または現行の実施形態の薬剤を含む医薬組成物を、治療が必要な個体に提供する行為を指す。

【0119】

「併用投与する」とは、本明細書に記載の組成物が、追加の療法の投与と同時に、直前に、または直後に投与されることを意味する。本開示の化合物または組成物は、患者に単独で投与することができるか、または併用投与することができる。併用投与は、化合物を個別にまたは（2つ以上の化合物または薬剤を）組み合わせ、同時にまたは逐次的に投与することを含むことを意味する。所望であれば、（例えば、代謝分解を減少させる）他の活性物質と組み合わせることもできる。

40

【0120】

本明細書で使用される場合、「逐次投与」は、2つの薬剤（例えば、本明細書に記載の化合物または組成物）の投与が、同じ日に別々に行われるか、または同じ日には行われない（すなわち、連日に行われる）ことを含む。

【0121】

本明細書で使用される場合、「同時投与」は、持続時間において少なくとも部分的には重複することを含む。例えば、2つの薬剤（例えば、生物活性を有する本明細書に記載されるいずれかの薬剤または薬剤の部類）が同時に投与されるとき、それらの投与は、ある特定の所望の特定の時間内に行われる。薬剤の投与は、同じ日に開始して終了してもよい。1つの薬剤の投与は、両方の薬剤が同じ日に少なくとも1回服用される限り、第2の薬剤

50

の投与を1日(複数可)前に行うこともできる。同様に、1つの薬剤の投与は、両方の薬剤が同じ日に少なくとも1回服用される限り、第2の薬剤の投与を超えて延長することができる。生物活性剤/薬剤は、同時投与を含むために毎日同じ時間に服用する必要はない。

【0122】

本明細書で使用される場合、「間欠投与」には、一定期間(「第1の投与期間」とみなすことができる)の薬剤の投与、その後の薬剤を摂取しないか、またはより低い維持量で摂取する時間(「オフ期間」とみなすことができる)、その後に薬剤が再度投与される期間(「第2の投与期間」とみなすことができる)が含まれる。概して、第2の投与段階の間、薬剤の投与量レベルは、投与の第1の期間中に投与される量と一致するが、医学的に必要な場合に増加または減少させることができる。

10

【0123】

本明細書で使用される場合、「投与する」という用語は、経口投与、座剤としての投与、局所接触、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、病巣内、髄腔内、鼻腔内または皮下投与、または徐放デバイス、例えばミニ浸透圧ポンプの対象への埋め込みを意味する。投与は、非経口及び経粘膜(例えば、頬側、舌下、口蓋、歯肉、鼻、膣、直腸または経皮)を含む、任意の経路による。非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内及びびが含まれる。他の送達様式には、リポソーム製剤の使用、静脈内注入、経皮パッチなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0124】

本明細書中に開示される組成物は、塗布棒、溶液、懸濁液、乳剤、ゲル、クリーム、軟膏、ペースト、ゼリー、塗料、粉末、及びエアロゾルとして製剤化されて、局所経路によって経皮的に送達され得る。経口製剤には、錠剤、丸剤、粉剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、トローチ剤、カシエ剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁液など、患者の摂取に適したものが含まれる。固形製剤には、粉剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、カシエ剤、坐剤及び分散性顆粒剤が含まれる。液状製剤には、溶液、懸濁液、及び乳剤、例えば、水または水/プロピレングリコール溶液が含まれる。本開示の組成物は、追加的に持続性放出及び/または快適さを提供する成分を含み得る。そのような成分には、高分子量、陰イオン性の粘液模倣剤ポリマー、ゲル化多糖類及び細分化された薬物担体基剤が含まれる。これらの成分は、米国特許第4,911,920号、同第5,403,841号、同第5,212,162号、及び同第4,861,760号にさらに詳細に論議されている。これらの特許の全内容は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に開示された組成物は、体内で徐放するための微細球として送達することもできる。例えば、微細球は、生分解性及び注射用ゲル製剤(例えば、Gao Phann. Res. 12:857-863, 1995を参照されたい)、または経口投与のための微細球として(例えば、Eyles, J. Phann. Pharmacol. 49:669-674, 1997を参照されたい)、皮下的に徐放する(Rao, J. Bioniate r Sci. Polym. Ed. 7:623-645, 1995を参照されたい)薬物含有微細球の皮内注射を介して投与することができる。

20

30

【0125】

本明細書で使用される場合、「有効量」または「治療有効量」は、臨床結果を含む有益な結果などの所望の生物学的効果に影響を及ぼすために十分な量である。かくして、「有効量」は、それが適用されている文脈に依存する。有効量は、治療される個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重などの、当技術分野において既知の因子によって変化し得る。いくつかの分割用量を毎日投与してもよく、または治療状況の緊急性によって示されるように用量を比例的に減少させてもよい。加えて、本開示の組成物/製剤は、治療量を達成するために必要な頻度で投与することができる。

40

【0126】

医薬組成物は、治療薬(例えば、実施形態または実施例を含む本明細書に記載の薬剤)が治療有効量で、すなわちその意図された目的を達成するための有効な量で含まれる組成物を含み得る。特定の用途のための有効な実際の量は、とりわけ、治療される病態に依存す

50

る。疾患を治療するための方法で投与されるとき、そのような組成物は、所望の結果、例えば、標的分子の活性を調節する、及び/または疾患症状の進行を軽減する、排除する、または遅らせることを達成するために有効な治療薬の量を含む。

【0127】

哺乳動物に投与される投与量及び頻度（単回または複数回投与）は、様々な因子、例えば、哺乳動物が別の疾患及びその投与経路に患っているかどうか、レシピエントのサイズ、年齢、性別、健康状態、体重、体格指数、及び食事、治療される疾患の症状の性質及び程度、併用治療の種類、治療されている疾患の合併症または他の健康関連の問題に依存して変化し得る。他の治療レジメンまたは薬剤は、本開示の方法及び薬剤と併用することができる。確立された投与量（例えば、頻度及び持続時間）の調節及び操作は、十分に当業者の能力の範囲内である。

10

【0128】

本明細書中に記載される任意の治療薬剤について、治療有効量は、最初に、細胞培養アッセイから決定され得る。標的濃度は、本明細書に記載の、または当技術分野において既知の方法を用いて測定されるような、本明細書に記載の方法を達成することができる治療薬（複数可）の濃度である。

【0129】

当技術分野において周知のように、ヒトにおいて使用するための治療有効量は、動物モデルから決定することもできる。例えば、ヒトのための用量は、動物において有効であることが分かっている濃度を達成するように製剤化することができる。ヒトの用量は、上記のように、薬剤の有効性を監視し、用量を上向きまたは下向きに調節することによって調整することができる。上記の方法及び他の方法に基づいて、ヒトにおいて最大の有効性を達成するために用量を調節することは、十分に当業者の能力の範囲内である。

20

【0130】

投与量は、用いられる患者及び治療薬の必要条件に応じて変化し得る。患者に投与される用量は、時間の経過とともに患者に有益な治療応答をもたらすために十分であるべきである。用量のサイズはまた、任意の有害な副作用の存在、性質及び程度によって決定されよう。特定の状況のための適切な投与量の決定は、施術者の技術の範囲内である。概して、治療は、薬剤の最適用量よりも少ない、より少ない用量で開始される。その後、状況下で最適な効果に達するまで、用量は少しずつ増加される。投与量及び間隔は、治療される特定の臨床的適応に対して有効な、投与された薬剤のレベルを提供するために個々に調整することができる。これは、個体の疾患状態の重篤度に見合った治療レジメンを提供する。

30

【0131】

成分の重量パーセントは、特に断らない限り、成分が含まれる製剤または組成物の総重量に基づく。

【0132】

「賦形剤」は、本明細書では、賦形剤が治療上または生物学的に活性な薬剤/薬剤ではない、開示された薬剤中に含まれるか、または開示された薬剤と組み合わせることができる他の薬剤を含むために使用される。したがって、賦形剤は、薬学的または生物学的に許容され得るかまたは関連しているべきである（例えば、賦形剤は概して個体にとって無毒であるべきである）。「賦形剤」は単一のそのような薬剤を含み、また複数の賦形剤も含むことが意図される。本開示の目的のために、「賦形剤」及び「担体」という用語は、本開示のいくつかの実施形態において互換的に使用され、該用語は、本明細書では、「安全かつ有効な医薬組成物の製剤化の実践において使用される成分」として定義される。

40

【0133】

「約」という用語は、製剤の調製及び疾患または障害の治療において薬剤の有効性を変化させない薬剤の濃度または量における任意の最小限の変化を指す。本開示の薬剤（例えば、治療剤/活性剤）の濃度範囲に関する「約」という用語はまた、有効量または範囲である所定の量または範囲の任意の変化を指す。

【0134】

50

範囲は、「約」1つの特定の値から、及び/または「約」別の特定の値までとして本明細書で表すことができる。そのように範囲が表される場合、別の態様は、特定の1つの値から、及び/または他の特定の値までを含む。同様に、値が近似値として表現されるとき、先行する「約」の使用によって、特定の値が別の態様を形成することが理解される。さらに、各範囲の終点は、他方の終点に関して重要であり、他方の終点とは独立していることがさらに理解される。また、本明細書に開示されているいくつかの値があり、各値は、値それ自体に加えてその特定の値について「約」として開示されていることも理解される。また、本出願全体にわたって、多数の異なる様式でデータが提供され、このデータは、データ点の任意の組み合わせに対する終点及び開始点及び範囲を表すことも理解される。例えば、特定のデータ点「10」及び特定のデータ点「15」が開示されている場合、10及び15を超える、それら以上、それら未満、それらより小さいか等しい、及び等しいとみなされ、ならびに10から15の間で開示されるとみなされる。2つの特定の単位間の各単位もまた開示されることも理解される。例えば、10及び15が開示されるならば、このときは、11、12、13、及び14もまた開示される。

10

【0135】

化合物

一態様において、抗マイクロRNA（抗miR）またはマイクロRNA（miRNA）擬態核酸配列（miRNA-ミミック）に抱合されたホスホロチオエ-ト化CpGオリゴデオキシヌクレオチド（CpG-ODN）を含む化合物が本明細書で提供される。実施形態において、CpG-ODNは、15～30個の塩基（核酸塩基）長の、一本鎖の、部分的または完全にホスホロチオエ-ト化されたオリゴデオキシヌクレオチドである。

20

【0136】

一態様において、抗マイクロRNA（抗miR）配列を含む化合物が本明細書に提供され、抗miR配列は、1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個、またはそれ以上）のホスホロチオエ-ト結合と、1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個、またはそれ以上）の化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。

30

【0137】

実施形態において、本化合物は、抗miRに抱合された、配列番号1～14のうちの1つの少なくとも15個の核酸塩基連続配列と、約80%～100%（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有する核酸配列（CpG-ODN）を含む。実施形態において、本化合物は、抗miRに抱合された、配列番号1～14のうちの1つと約80%～100%（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有する核酸配列（CpG-ODN）を含む。実施形態において、miRNA-ミミックに抱合された配列番号1～14のうちの1つの少なくとも15個の核酸塩基連続配列と、約80%～約100%（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）の配列同一性を有する核酸配列（CpG-ODN）を含む化合物が本明細書で提供される。実施形態において、本化合物は、miRNA-ミミックに抱合された配列番号1～14の1つと約80%～100%（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）の配列同一性を有する核酸配列（CpG-ODN）を含む。実施形態において、核酸配列（CpG-ODN）は15～30個（例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個）の塩基長の、一本鎖の、部分的または完全にホスホロチオエ-ト化されたオリゴデオキシヌクレオチドである。

40

50

【0138】

実施形態において、本開示の化合物は、抗miRまたはmiRNA - ミミックと抱合された配列番号1~14のうちの1つの少なくとも15個の核酸塩基連続配列と、約80~85%、約85~90%、約90~95%、約95~100%の配列同一性を有する核酸配列(CpG - ODN)を含む。実施形態において、本開示の化合物は、抗miRまたはmiRNA - ミミックと抱合された配列番号1~14のうち1つと、約80~85%、約85~90%、約90~95%、約95~100%の配列同一性を有する核酸配列(CpG - ODN)を含む。実施形態において、核酸配列(CpG - ODN)は15~30個(例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個)の塩基長の、一本鎖の、部分的または完全にホスホロチオエート化されたオリゴデオキシヌクレオチドである。

10

【0139】

実施形態において、抗miRは抗miR126である。実施形態において、抗miRは抗miR155である。実施形態において、抗miRは抗R125bである。実施形態において、抗miRは抗miR146aである。実施形態において、抗miRは抗miR9である。実施形態において、抗miRは抗miR142である。実施形態において、抗miRは抗miR10bである。実施形態において、抗miRは抗miR21である。実施形態において、抗miRは抗miR17である。実施形態において、抗miRは抗miR92である。

20

【0140】

実施形態において、miRNA - ミミックはmiR126 - ミミックである。実施形態において、miRNA - ミミックはmiR155 - ミミックである。実施形態において、miRNA - ミミックはR125b - ミミックである。実施形態において、miRNA - ミミックは、miR146a - ミミックである。実施形態において、miRNA - ミミックはmiR9 - ミミックである。実施形態において、miRNA - ミミックはmiR142 - ミミックである。実施形態において、miRNA - ミミックはmiR10b - ミミックである。実施形態において、miRNA - ミミックはmiR21 - ミミックである。実施形態において、miRNA - ミミックはmiR17 - ミミックである。実施形態において、miRNA - ミミックはmiR92 - ミミックである。

30

【0141】

配列番号1~14の核酸配列(CpG - ODN)を表1に列挙する。

【0142】

40

50

【表 1】

表 1 : 化合物及び成分配列

| 名称 | 配列 5' - 3' (* = ホスホロチオエート結合) | 配列番号 : |
|---------------------------|---|--------|
| CpG (A)-0 DN | G**TGCATCGATGCAGG**G**G**G | 1 |
| GpC (A)-0 DN | G**T GCA TGC ATG CAG G**G**G**G | 2 |
| D19-PS | G**T**G**C**A**T**C**G**A**T**G**C**A**G**G**G**G**G | 3 |
| CpG (B)-0 DN | T**C**C**A**T**G**A**C**G**T**T**C**C**T**G**A**T**G**C**T | 4 |
| ODN 1585 | G**GGTCAACGTTGAG**G**G**G**G または G**GGTCAACGTTGAG**G**G**G**G | 5 |
| ODN 2216 | G**GGGACGA:TCGTCC**G**G**G**G または G**GGGACGA:TCGTCC**G**G**G**G | 6 |
| ODN D19 | G**TGCATCGATGCAGG**G**G**G**G または G**GTGCATCGATGCAGG**G**G**G**G | 7 |
| ODN 2336 | G**G**GACGAC:GTCGTGG**G**G**G**G または G**GGACGAC:GTCGTGG**G**G**G**G | 8 |
| ODN 1668 | T**C**C**A**T**G**A**C**G**T**T**C**C**T**G**A**T**G**C**T | 9 |
| ODN 1826 | T**C**C**A**T**G**A**C**G**T**T**C**C**T**G**A**C**G**T**T | 10 |
| ODN 2006 (ODN7909) | T**C**G**T**C**G**T**T**T**T**G**T**C**G**T**T**T**T**G**T**C**G**T**T | 11 |
| ODN 2007 | T**C**G**T**C**G**T**T**G**T**C**G**T**T**T**T**G**T**C**G**T**T | 12 |
| ODN 2395 | T**C**G**T**C**G**T**T**T**T**C**G**G**C**G**C**G**C**G**C**C**G | 13 |
| ODN M362 | T**C**G**T**C**G**T**C**G**T**T**C**G**A**A**C**G**A**C**G**T**T**G** A**T | 14 |

10

20

30

【 0 1 4 3 】

実施形態において、抗miRNA配列は、抗miR126、抗miR142、抗miR155、抗miR125b、抗miR146a、抗miR9、抗miR10b、抗miR17、抗miR18、抗miR19、抗miR20、抗miR21、抗miR22、抗miR23、抗miR24、抗miR25、抗miR26、抗miR27、抗miR28、抗miR29、抗miR30、抗miR31、抗miR32、抗miR33、抗miR34、抗miR35、抗miR36、抗miR37、抗miR38、抗miR39、抗miR40、抗miR41、抗miR42、抗miR43、抗miR44、抗miR45、抗miR46、抗miR47、抗miR48、抗miR49、抗miR50、抗miR51、抗miR52、抗miR53、抗miR54、抗miR55、抗miR56、抗miR57、抗miR58、抗miR59、抗miR60、抗miR61、抗miR62、抗miR63、抗miR64、抗miR65、抗miR66、抗miR67、抗miR68、抗miR69、抗miR70、抗miR71、抗miR72、抗miR73、抗miR74、抗miR75、抗miR76、抗miR77、抗miR78、抗miR79、抗miR80、抗miR81、抗miR82、抗miR83、抗miR84、抗miR85、抗miR86、抗miR87、抗miR88、抗miR89、抗miR90、抗miR91、

40

50

または抗miR92核酸配列である。

【0144】

実施形態において、本開示の化合物のミミックは、miR126 - ミミック、miR142 - ミミック、miR155 - ミミック、miR125b - ミミック、miR146a - ミミック、miR9 - ミミック、miR10b - ミミック、miR17 - ミミック、miR18 - ミミック、miR19 - ミミック、miR20 - ミミック、miR21 - ミミック、miR22 - ミミック、miR23 - ミミック、miR24 - ミミック、miR25 - ミミック、miR26 - ミミック、miR27 - ミミック、miR28 - ミミック、miR29 - ミミック、miR30 - ミミック、miR31 - ミミック、miR32 - ミミック、miR33 - ミミック、miR34 - ミミック、miR35 - ミミック、miR36 - ミミック、miR37 - ミミック、miR38 - ミミック、miR39 - ミミック、miR40 - ミミック、miR41 - ミミック、miR42 - ミミック、miR43 - ミミック、miR44 - ミミック、miR45 - ミミック、miR46 - ミミック、miR47 - ミミック、miR48 - ミミック、miR49 - ミミック、miR50 - ミミック、miR51 - ミミック、miR52 - ミミック、miR53 - ミミック、miR54 - ミミック、miR55 - ミミック、miR56 - ミミック、miR57 - ミミック、miR58 - ミミック、miR59 - ミミック、miR60 - ミミック、miR61 - ミミック、miR62 - ミミック、miR63 - ミミック、miR64 - ミミック、miR65 - ミミック、miR66 - ミミック、miR67 - ミミック、miR68 - ミミック、miR69 - ミミック、miR70 - ミミック、miR71 - ミミック、miR72 - ミミック、miR73 - ミミック、miR74 - ミミック、miR75 - ミミック、miR76 - ミミック、miR77 - ミミック、miR78 - ミミック、miR79 - ミミック、miR80 - ミミック、miR81 - ミミック、miR82 - ミミック、miR83 - ミミック、miR84 - ミミック、miR85 - ミミック、miR86 - ミミック、miR87 - ミミック、miR88 - ミミック、miR89 - ミミック、miR90 - ミミック、miR91 - ミミック、またはmiR92 - ミミック核酸配列である。

10

20

【0145】

実施形態において、配列：5' G*G*TGCAATCGATGCAGG*G*G*G*G (配列番号1) xxxxxCGCAUUAUUACUCACGGUACGA (配列番号16) 3' であって、xxxxxが、本明細書に記載されている1つ以上のリンカーを示す配列を有する、CpG-ODNを抗miR126に連結する化合物が本明細書に提供される。実施形態において、配列：5' G*G*TGCAATCGATGCAGG*G*G*G*G (配列番号1) xxxxxmCmGmCmA mUmUmAmUmUmAmCmUmCmA mCmGmGmUmAmCmGmA (配列番号17) 3' であって、xxxxxが、本明細書に記載されている1つ以上のリンカーを示す配列を有する、CpG-ODNを抗miR126に連結する化合物が、本明細書に提供される。

30

【0146】

実施形態において、配列：5' G*GTGCATGCATGCAGG*G*G*G*G (配列番号2) xxxxxCGCAUUAUUACUCACGGUACGA (配列番号16) 3' を有する、CpG-ODNを抗miR126に連結する化合物が本明細書に提供される。実施形態において、配列：5' G*GTGCATGCATGCAGG*G*G*G*G (配列番号2) xxxxxmCmGmCmA mUmUmAmUmUmAmCmUmCmA mCmGmGmUmAmCmGmA (配列番号17) 3' であって、式中xxxxxが、本明細書に記載されている1つ以上のリンカーを示す配列を有する、CpG-ODNを抗miR126に連結する化合物が本明細書に提供される。

40

【0147】

実施形態において、配列：5' G*G*T*G*C*A*T*C*G*A*T*G*C*A*G*G*G*G*G (配列番号3) xxxxxCGCAUUAUUACUCACGGUACGA (配列番号16) 3' を有する、CpG-ODNを抗miR126に連結する化合物が本明細書に提供される。実施形態において、配列：5' G*G*T*G*C*A*

50

T * C * G * A * T * G * C * A * G * G * G * G * G * G (配列番号 3) x x x x x m
 C m G m C m A m U m U m A m U m U m A m C m U m C m A m C m G m G m U m A m C m
 G m A (配列番号 1 7) 3 ' であって、式中 x x x x x が、本明細書に記載されている 1 つ
 以上のリンカーを示す配列を有する、C p G - O D N を抗 m i R 1 2 6 に連結する化合物
 が本明細書に提供される。実施形態において、配列：5 ' G * G * T * G * C * A * T * C
 * G * A * T * G * C * A * G * G * G * G * G * G (配列番号 3) x x x x x m C * m
 G * m C * m A * m U * m U * m A * m U * m U * m A * m C * m U * m C * m A * m C
 * m G * m G * m U * m A * m C * m G * m A (配列番号 4 8) 3 ' であって、式中 x x x
 x x が、本明細書に記載されている 1 つ以上のリンカーを示す配列を有する、C p G - O
 D N を抗 m i R 1 2 6 に連結する化合物が本明細書に提供される。

10

【 0 1 4 8 】

例示的な m i R 1 2 6 - ミミック配列を、表 2 に列挙する。

【 0 1 4 9 】

【 表 2 】

表 2 ; m i R 1 2 6 - ミミックに連結した C p G - O D N を含む化合物

| | | | |
|--|---------------------|---|-----------|
| 非修飾型 C p G (D 1 9) - セン ス m i R 1 2 6 | PS + 3 x | 5' -G*G*TGCATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx rUrCrG rUrArC rCrGrU rGrArG rUrArA rUrArA rUrGrC rGrUrU-3' | 配列番号 1、18 |
| 3' 末端でフルオロ修飾された 2 U を有する C p G (D 1 9) - セン ス m i R 1 2 6 | PS + 3 x 2' F | 5' -G*G*TGCATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx rUrCrG rUrArC rCrGrU rGrArG rUrArA rUrArA rUrGrC rGfUfU-3' | 配列番号 1、19 |
| 全ピリミジンフルオロ修飾された C p G D 1 9 - セン ス m i r 1 2 6 | PS + 3 x 2' F | 5' -G*G*TGCATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx fUrAfC fCrGfU rGrArG fUrArA fUrArA fUrGfC rGfUfU-3' | 配列番号 1、20 |
| 相補的 m i r | | 5' -rCrGrC rArUrU rArUrU rArCrU rCrArC rGrGrU rArCrG rA -3' | 配列番号 21 |
| 上記の配列において、x x x x x は、- (C H 2) n - P O 4 - [(C H 2) n - P O 4] z - (C H 2) n であり得る。 * : ホスホロチオエート化 (イオウで置き換えられた 1 つの非架橋酸素) | | | |

20

30

40

【 0 1 5 0 】

実施形態において、本明細書に記載される (例えば、表 2、3、及び 4 (下記)) 「 x x x x x 」などで表されるリンカーは、結合、置換 (例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された) もしくは非置換アルキレン、置換 (例えば、置換

50

基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された) もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された) もしくは非置換のシクロアルキレン、置換(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された) もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された) もしくは非置換のアリーレン、置換(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された) もしくは非置換のシクロヘテロアルキレン、または $-(CH_2)_n-PO_4-[(CH_2)_n-PO_4]_z-(CH_2)_n$ (この中で、記号 n は 1 ~ 5 (例えば、3) の整数であり、記号 z は 0 ~ 50 (例えば、0 ~ 25、0 ~ 10、または 0 ~ 5) の整数である) である。実施形態において、 n は 3 であり、 z は 0 ~ 5 または 1 ~ 5 である。実施形態において、 n は 3 であり、 z は 0 ~ 4 または 1 ~ 4 である。実施形態において、 n は 3 であり、 z は 0 ~ 3 または 1 ~ 3 である。実施形態において、 n は 3 であり、 z は 3 である。2'OMe (2'-O-メチルヌクレオシドは、2'-Oメチルで置き換えられた 2' 位のヒドロキシルであり; PS はホスホロチオエート化である。1つの非架橋酸素がイオウで置き換えられている PS + 3 は、修飾された配列中の 3 つのリン酸を表し、1つの非架橋酸素がイオウで置換されており; PS + 5 は修飾された配列中の 5 個のリン酸を表し、1つの非架橋酸素がイオウで置き換えられている。

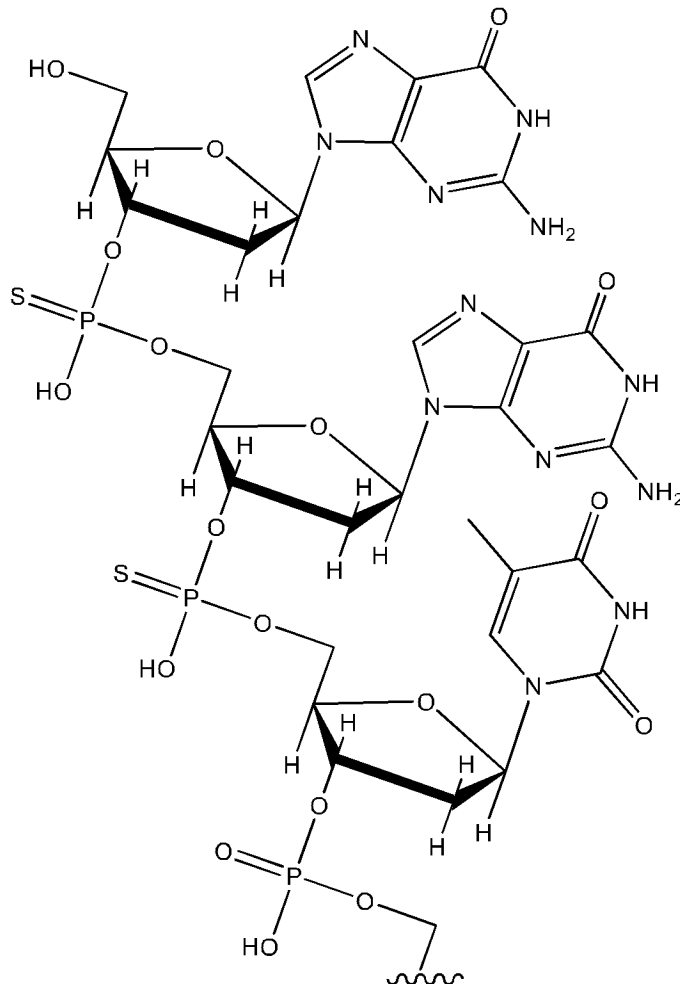
10

【0151】

例えば、以下に示すように、実施形態において、本開示の配列のホスホロチオエート化オリゴヌクレオチド中の核酸塩基は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み得る。そのようなホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドの一部を以下に示す。

20

【化1】



30

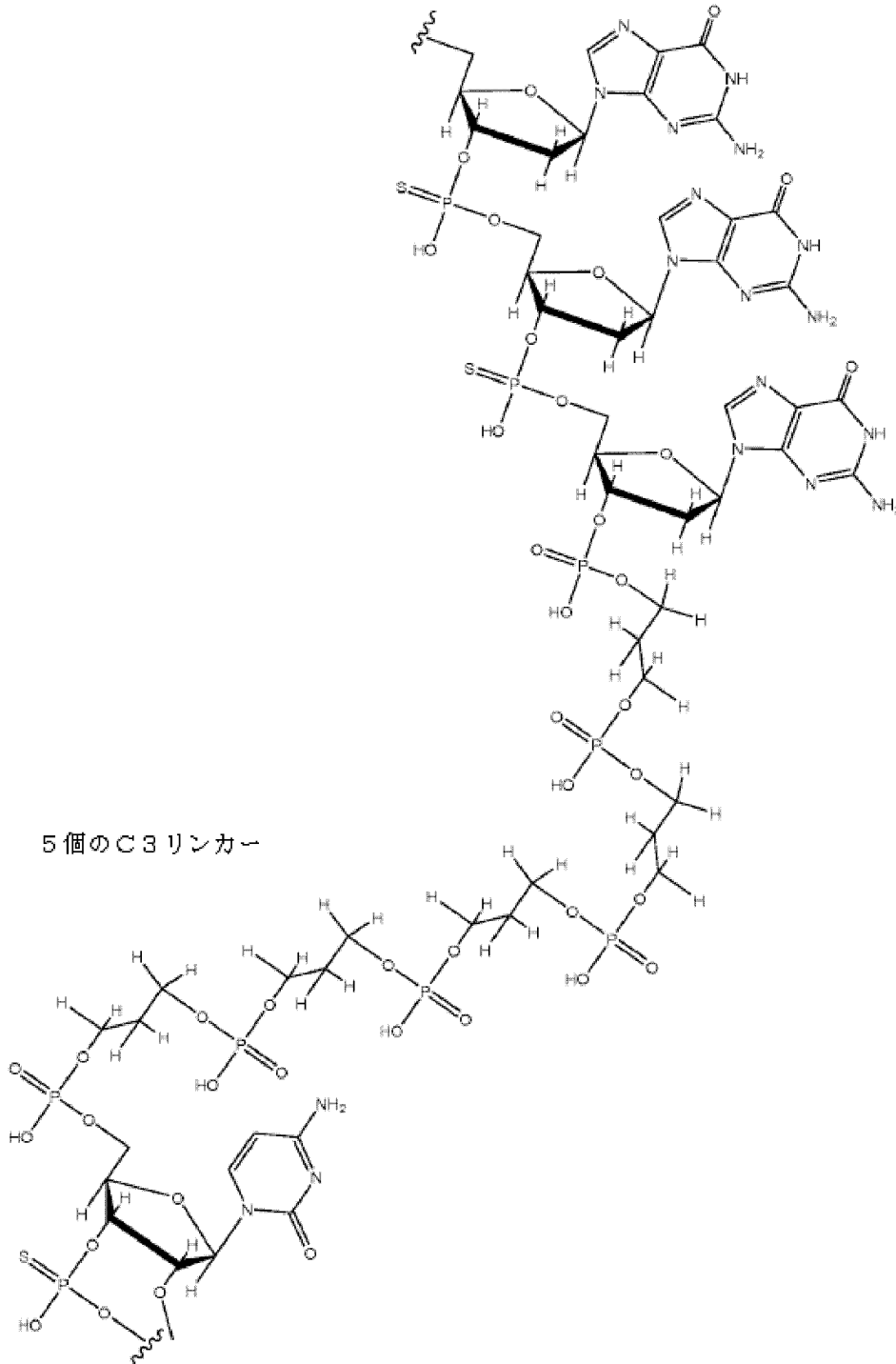
40

50

【 0 1 5 2 】

リンカーは、以下の構造を有することができ、ここで、リンカーは一方の末端のグアニンの3'リン酸と他方の末端のチミジンの5'リン酸とに結合し、アンチセンス部分の核酸塩基は2'OMeで修飾されてもよい。

【化2】



【 0 1 5 3 】

上記の式は、アンチセンスRNAの5'リン酸に連結する、(CH₂)₃リンカー(本明細書ではC3リンカーとも称される)で3'-OH末端に結合したCpG-ODNの一部を表す。

【 0 1 5 4 】

10

20

30

40

50

リンカーは、結合、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換アルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のシクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）または非置換のヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアリーレン、置換もしくは非置換のヘテロアリーレンであってもよい。

【0155】

実施形態において、本開示は、配列：5' G*G*TG CATCGATGCAGG*G*G*G*G*G*G*G*G (配列番号1) xxxxx UCCAUA AAGUAGGAAACACUACA (配列番号22) 3' を有する、本開示のホスホロチオエ-ト化オリゴヌクレオチドを抗miR142に連結する組成物を含む。miR142-ミミックを表3に列挙する。

10

【0156】

【表3】

表3：化合物及び成分配列

| 名称 | 配列(*=ホスホロチオエ-ト結合)、xxxxxは、末端リン酸塩が任意に付加される末端以外の両端におけるリン酸基に結合した-(CH ₂) _n -PO ₄ -[(CH ₂) _n -PO ₄] _z -(CH ₂) _n であり得、5' xは、OH末端を有し、3' xは、最終リン酸基に結合した-C ⁶ -NH ₂ を有し、他の結合はホスホジエステルである。 | 配列番号 |
|---|---|------|
| 修飾型 CpG D19-センス miR142 | 5' -G*G*TG CATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx rUrGrU rArGrU rGrUrU rUrCrC rUrArC rUrUrU rArUrG rGrArUrU-3' | 1、23 |
| 3'末端でフルオロ修飾された2Uを有する CpG D12-センス miR142 | 5' -G*G*TG CATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx rUrGrU rArGrU rGrUrU rUrCrC rUrArC rUrUrU rArUrG rGrAfUfU-3' | 1、24 |
| 相補的 miR | 5' -rUrCrC rArUrA rArArG rUrArG rGrArA rArCrA rCrUrA rCrA -3' | 25 |

20

30

【0157】

実施形態において、配列：5' G*G*TG CATCGATGCAGG*G*G*G*G*G*G*G*G (配列番号1) xxxxx UGUUAAUGCUAAUAUGUAGGAG (配列番号26) 3' を有する、CpG-ODNを抗miR155に連結する組成物が本明細書に提供される。実施形態において、配列：5' G*G*TG CATCGATGCAGG*G*G*G*G*G*G*G*G (配列番号1) xxxxx ACCCTATCACAATTAGCATTA (配列番号27) 3' を有する、CpG-ODNを抗miR155に連結する組成物が本明細書に提供され、配列番号27におけるヌクレオチドTは、ヌクレオチドUで置換され得る。実施形態において、本明細書に記載される化合物は、配列：5' G*G*TG CATCGATGCAGG*G*G*G*G*G*G*G*G (配列番号1) xxxxx mA*mC*mC*mC*mC*mU*mA*mU*mC*mA*mC*mA*mA*mU*mU*mA*mG*mC*mA

40

50

*mU*mU*mA*mA (配列番号28)3'を有する、CpG-ODNを抗miR155に連結する組成物を含む。実施形態において、配列：5' T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T (配列番号11) xxxxx ACCCTATCACAATTAGCATTA (配列番号27)3'を有する、CpG-ODNを抗miR155に連結する組成物が本明細書に提供される。実施形態において、配列：5' T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T (配列番号11) xxxxx mA*mC*mC*mC*mC*mU*mA*mU*mC*mA*mC*mA*mA*mU*mU*mA*mG*mC*mA*mU*mU*mA*mA (配列番号28)3'を有する、CpG-ODNを抗miR155に連結する組成物が本明細書に提供される。miR155ミミックの配列を、表4に列記する。

10

【0158】

【表4】

表4：化合物及び成分配列

| 名称 | 配列(*=ホスホロチオエート結合)、xxxxxは、末端リン酸塩が任意に付加される末端以外の両端におけるリン酸基に結合した-(CH ₂) _n -PO ₄ -[(CH ₂) _n -PO ₄] _z -(CH ₂) _n であり得、5' xは、OH末端を有し、3' xは、最終リン酸基に結合した-C ⁶ -NH ₂ を有し、他の結合はホスホジエステルである。 | 配列番号 |
|--|---|------|
| 非修飾型 CpG D19-センス miR155 | 5' -G*G*TGCATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx rCrUrC rCrUrA rCrArU rArUrU rArGrC rArUrU rArArC rArUrU-3' | 1、29 |
| 3'末端でフルオロ修飾された2Uを有する CpG D12センス muR155 | 5' -G*G*TGCATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx rCrUrC rCrUrA rCrArU rArUrU rArGrC rArUrU rArArC rAfUfU-3' | 1、30 |
| 相補型 miR | 5' -rUrGrU rUrArA rUrGrC rUrArA rUrArU rGrUrA rGrGrA rG -3' | 31 |

20

30

【0159】

実施形態において、配列5' G*G*TGCATCGATGCAGG*G*G*G*G (配列番号1) xxxxx mGmUmAmGmAmAmCmCmGmUmAmCmUmCmGmUmCmAmCmUmUmA (配列番号32)3'のCpG(D19)-スクランブル化RNAは、対照ODNとして使用される(図1に含まれる)。

40

【0160】

実施形態において、配列5' G*G*TGCATCGATGCAGG*G*G*G*G (配列番号1) xxxxx TCACAAGTTAGGGTCTCAGGGA (配列番号33)3'を有する、CpG-ODNを抗miR125bに連結する組成物が本明細書に提供され、配列番号33におけるヌクレオチドTは、ヌクレオチドUで置換することができる。実施形態において、配列5' G*G*TGCATCGATGCAGG*G*G*G*G (配列番号1) xxxxx mU*mC*mA*mC*mA*mA*mG*mU*mU*mA*mG*mG*mG*mU*mC*mU*mC*mA*mG*mG*mG*mA (配列番号3

50

4) 3'を有する、CpG-ODNを抗miR125bに連結する組成物が本明細書に提供される。

【0161】

実施形態において、配列：5' G*G*TGCAATCGATGCAGG*G*G*G*G (配列番号1) xxxxxCCCATGGAAATTCAGTTCTCA (配列番号35) 3'を有する、CpG-ODNを抗miR146aに連結する組成物が本明細書に提供され、配列番号35におけるヌクレオチドTは、ヌクレオチドUで置換することができる。実施形態において、配列：5' G*G*TGCAATCGATGCAGG*G*G*G*G (配列番号1) xxxxxmC*mC*mC*mA*MT*mG*mG*mA*mA*MT*mT*mC*mA*mG*mT*mT*mC*mT*mC*mA (配列番号36) 3'を有する、CpG-ODNを抗miR125bに連結する組成物が本明細書に提供される。実施形態において、配列：5' G*G*TGCAATGCATGCAGG*G*G*G*G (配列番号2) xxxxxCCCATGGAAATTCAGTTCTCA (配列番号35) 3'を有する、CpG-ODNを抗miR146aに連結する組成物が本明細書に提供される。実施形態において、配列：G*G*TGCAATGCATGCAGG*G*G*G*G (配列番号2) xxxxxmC*mC*mC*mA*MT*mG*mG*mA*mA*MT*mT*mC*mA*mG*mT*mT*mC*mT*mC*mA (配列番号36) 3'を有する、CpG-ODNを抗miR146aに連結する組成物が本明細書に提供される。

10

【0162】

実施形態において、核酸配列(CpG-ODN)を含む化合物は、本明細書に記載される1つ以上のリンカーで、抗miRもしくはmiRNA-ミミック配列に抱合されている。

20

【0163】

実施形態において、配列番号1~14のうちの1つの少なくとも15個の核酸塩基配列と約80%~100%(例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%)の配列同一性を有する核酸配列(CpG-ODN)を含む化合物は、本明細書に記載される1つ以上のリンカーで、抗miRもしくはmiRNA-ミミック配列に抱合されている。

【0164】

実施形態において、配列番号1~14のうちの1つの少なくとも15個の核酸塩基配列と約80%~100%(例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%)の配列同一性を有する核酸配列(CpG-ODN)を含む化合物は、配列番号16~31、33~36及び48のうちの1つの少なくとも15個の核酸塩基配列と約80%~100%(例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%)の配列同一性を有する核酸配列に、本明細書に記載される1つ以上のリンカーで抱合されている。

30

【0165】

実施形態において、配列番号1~14のうちの1つの少なくとも15個の核酸塩基配列と約80%~100%(例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%)の配列同一性を有する核酸配列(CpG-ODN)を含む化合物は、配列番号16~31、33~36及び48のうちの1つの少なくとも15個の核酸塩基配列と約80%~100%(例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%)の配列同一性を有する第2の核酸配列に、本明細書に記載される1つ以上のリンカーで抱合されており、第2の核酸配列は、1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの)ホスホロチオエート結合を含有する。

40

【0166】

実施形態において、配列番号1~14のうちの1つの少なくとも15個の核酸塩基配列と

50

約 80% ~ 100% (例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100%) の配列同一性を有する核酸配列 (CpG-ODN) を含む化合物は、配列番号 16 ~ 31、33 ~ 36 及び 48 のうちの 1 つの少なくとも 15 個の核酸塩基配列と約 80% ~ 100% (例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100%) の配列同一性を有する第 2 の核酸配列に、本明細書に記載される 1 つ以上のリンカーで抱合されており、第 2 の核酸配列は、1 つ以上の (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの) 化学的に修飾されたヌクレオチドを含有する。実施形態において、化学修飾は、2' O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5-C-メチル、逆位デオキシ脱塩基残基結合、及びロックド核酸からなる群から選択される。

10

【0167】

実施形態において、配列番号 1 ~ 14 のうちの 1 つの少なくとも 15 個の核酸塩基配列と約 80% ~ 100% (例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100%) の配列同一性を有する核酸配列 (CpG-ODN) を含む化合物は、配列番号 16 ~ 31、33 ~ 36 及び 48 のうちの 1 つの少なくとも 15 個の核酸塩基配列と約 80% ~ 100% (例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100%) の配列同一性を有する第 2 の核酸配列に、本明細書に記載される 1 つ以上のリンカーで抱合されており、第 2 の核酸配列は、1 つ以上の (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの) ホスホロチオエート結合及び 1 つ以上の (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの) 化学的に修飾されたヌクレオチドを含有する。実施形態において、化学修飾は、2' O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5-C-メチル、逆位デオキシ脱塩基残基結合、及びロックド核酸からなる群から選択される。

20

30

【0168】

実施形態において、配列番号 1 ~ 14 から選択される核酸配列 (CpG-ODN) を含む化合物は、本明細書に記載される 1 つ以上のリンカーで、抗 miR もしくは miRNA-ミミック配列に抱合されている。

【0169】

実施形態において、配列番号 1 ~ 14 の 1 つから選択される核酸配列 (CpG-ODN) を含む化合物は、本明細書に記載される 1 つ以上のリンカーで、配列番号 16 ~ 31、33 ~ 36 及び 48 から選択される核酸配列に抱合されている。

【0170】

実施形態において、配列番号 1 ~ 14 の 1 つから選択される核酸配列 (CpG-ODN) を含む化合物は、本明細書に記載される 1 つ以上のリンカーで、配列番号 16 ~ 31、33 ~ 36 及び 48 から選択される第 2 の核酸配列に抱合されており、第 2 の核酸配列は、1 つ以上の (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの) ホスホロチオエート結合を含有する。

40

【0171】

実施形態において、配列番号 1 ~ 14 の 1 つから選択される核酸配列 (CpG-ODN) を含む化合物は、本明細書に記載される 1 つ以上のリンカーで、配列番号 16 ~ 31、33 ~ 36 及び 48 から選択される第 2 の核酸配列に抱合されており、第 2 の核酸配列は、1 つ以上の (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、

50

14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの) 化学的に修飾されたヌクレオチドを含有する。実施形態において、化学修飾は、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5-C-メチル、逆位デオキシ脱塩基残基結合、及びロックド核酸からなる群から選択される。

【0172】

実施形態において、配列番号1~14の1つから選択される核酸配列(CpG-ODN)を含む化合物は、本明細書に記載される1つ以上のリンカーで、配列番号16~31、33~36及び48から選択される第2の核酸配列に抱合されており、第2の核酸配列は、1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの)ホスホロチオエート結合及び1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの)化学的に修飾されたヌクレオチドを含有する。実施形態において、化学修飾は、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5-C-メチル、逆位デオキシ脱塩基残基結合、及びロックド核酸からなる群から選択される。

10

【0173】

実施形態において、配列番号1~14の1つから選択される核酸配列(CpG-ODN)を含む化合物は、本明細書に記載される1つ以上のリンカーで、配列番号16~31、33~36及び48から選択される第2の核酸配列に抱合されており、第2の核酸配列は、全てのヌクレオチド間結合に対してホスホロチオエート結合を含有する。

20

【0174】

実施形態において、配列番号1~14の1つから選択される核酸配列(CpG-ODN)を含む化合物は、本明細書に記載される1つ以上のリンカーで、配列番号16~31、33~36及び48から選択される第2の核酸配列に抱合されており、第2の核酸配列は、全てが化学的に修飾されているヌクレオチド(例えば、2'-O-メチル)を含有する。

【0175】

実施形態において、配列番号1~14の1つから選択される核酸配列(CpG-ODN)を含む化合物は、本明細書に記載される1つ以上のリンカーで、配列番号16~31、33~36及び48から選択される第2の核酸配列に抱合されており、第2の核酸配列は、全てのヌクレオチド間結合に対してホスホロチオエート結合を含有し、かつ全てが化学的に修飾されているヌクレオチド(例えば、2'-O-メチル)を含有する。

30

【0176】

実施形態において、化合物は抗miRもしくはmiRNA-ミミック配列の核酸配列を含み、核酸配列が、1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの)ホスホロチオエート結合及び/または1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの)化学的に修飾されたヌクレオチドを含有する。実施形態において、化学修飾は、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5-C-メチル、逆位デオキシ脱塩基残基結合、及びロックド核酸からなる群から選択される。

40

【0177】

実施形態において、化合物は、配列番号16~31、33~36及び48から選択される抗miRもしくはmiRNA-ミミック配列の核酸配列を含み、核酸配列が、1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、

50

29、30、またはそれより多くの)ホスホロチオエート結合及び/または1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くの)化学的に修飾されたヌクレオチドを含有する。実施形態において、化学修飾は、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5-C-メチル、逆位デオキシ脱塩基残基結合、及びロックド核酸からなる群から選択される。

【0178】

実施形態において、リンカーは共有結合リンカー(すなわち、化合物の少なくとも2つ(例えば、2つの)部分で共有結合されたリンカー)である。実施形態において、リンカーは、置換の(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)もしくは非置換のアルキレンまたはヘテロアルキレンリンカーであるか、またはこれらを含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合された核酸は2つ以上の置換(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)または非置換のヘテロアルキレンリンカーを含む。リンカーは、合成中に順番に添加され得る。実施形態において、ヘテロアルキレンリンカーは、介在するリン酸結合によって、互いに連結されている。実施形態において、共有結合リンカーは、置換の(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)もしくは非置換のヘテロアルキレンリンカーである。

【0179】

実施形態において、リンカーは、置換の(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)もしくは非置換のヘテロアルキレン、または置換の(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)もしくは非置換のシクロヘテロアルキレンである。「シクロヘテロアルキレン」とは、本明細書で使用される場合、ヘテロアルキレン鎖内に、1つ以上の二価の環状部分を有するヘテロアルキレンである。環状部分は、置換の(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)もしくは非置換のシクロアルキレン、置換の(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換の(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)もしくは非置換のアリーレン、または置換の(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)もしくは非置換のヘテロアリーレンであってもよい。実施形態では、環状部分は、置換の(例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された)もしくは非置換のリボ-ス(例えば、ヌクレオシド)である。実施形態では、環状部分は、それによって分岐状リンカーを形成するためのリンカーの分岐点としての機能を果たす。環状部分の分岐点は、検出可能な部分、薬物部分または生体分子などの追加の官能部分を、本明細書に提供される抱合体に連結するために使用されてもよい。以下により詳細に説明するように、追加の官能部分は、当該技術分野において既知であるように、クリックケミストリー技術を用いて連結されてもよい。

【0180】

実施形態において、リンカーは、式：

$- (CH_2)_n - PO_4 - [(CH_2)_n - PO_4]_z - (CH_2)_n -$ を有する部分であるか、またはこれを含む。

【0181】

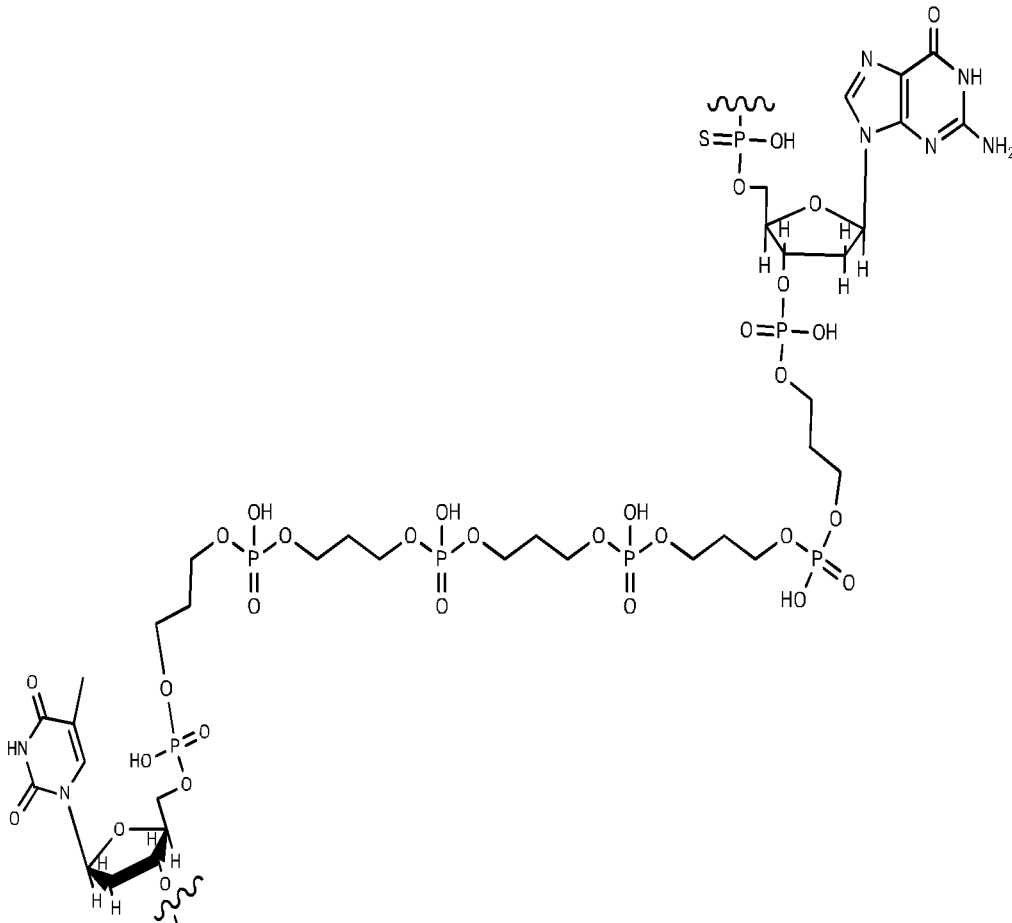
上記式において、符号nは、1~5の整数(例えば、3)であり、符号zは、0~50の整数(例えば、0~25、0~10、または0~5)である。実施形態において、nは3であり、zは0~5、または1~5である。実施形態において、nは3であり、zは0~4、または1~4である。実施形態において、nは3であり、zは0~3、または1~3である。実施形態において、nは3であり、zは3である。

【0182】

例えば、リンカーは、以下の構造を有してもよく、このリンカーは、一方の末端でグアニ

ンの3'リン酸と連結し、他方の末端でチミジンの5'リン酸と連結する。

【化3】



10

20

【0183】

実施形態において、上記グアニジンは、核酸配列(CpG-ODN)に連結されており、チミジンは、抗miRもしくはmiRNA-ミミック配列に連結されている。

30

【0184】

実施形態において、リンカーは、アジド基、保護アミノ基、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)基、及び保護スルフヒドリル基から選択される部分を含んでもよい。

【0185】

実施形態において、ジビニルスルホン誘導体、アクリロイル誘導体、及び/またはマレイミド誘導体からなる群から選択される部分に抱合されている保護スルフヒドリル基を含んでもよい。実施形態において、アクリロイル誘導体は、塩化アクリロイルである。

【0186】

実施形態において、リンカーは、ポリエチレングリコール(PEG)またはビスホスホネート部分に抱合されてもよい。

40

【0187】

実施形態において、リンカーは、非置換のC₃ヘテロアルキレンを含み得る。

【0188】

実施形態において、リンカーは、非置換のC₆~C₁₂ヘテロアルキレンを含み得る。

【0189】

実施形態において、リンカーは、反応性基(例えば、クリックケミストリー反応性基)または保護反応性基で置換されてもよい。反応性基は、CpG-ODNを、抗miRまたはmiR-ミミックに、及び/または検出可能部分または生体分子(例えば、標的化部分)に本明細書に記載される追加の官能部分に抱合させるために使用され得る。

【0190】

50

したがって、リンカーは、追加の部分のさらなる修飾、抱合、または連結を含んでもよい。

【0191】

CpG-ODNを、追加の官能部分に至る抗miRもしくはmiRNA-ミミック化合物に抱合させるために使用される反応性基は、バイオコンジュゲ-ト化学で有用な任意の適用可能な反応性基であってもよい。Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diegoを参照されたい。

【0192】

実施形態において、反応性基は、クリックケミストリー反応性基である。クリックケミストリーとは、速く、簡単に使え、精製が容易であり、多用途であり、位置特異性で、かつ高生成物収率をもたらす一群の反応を指す。4種の異なるクリック反応が可能である：(1)付加環化-これらは主として、1,3-双極子付加環化を指すが、ヘテロディールス・アルダー付加環化も含まれ；(2)求核的開環-これらは、アジリジン、エポキシド、環状硫酸エステル、アジリジニウムイオン、エプスルホニウムイオンなどの歪んだ複素環求電子物質の開環を指し；(3)非アルド-ル反応型のカルボニル化学-例として、尿素、チオ尿素、ヒドラゾン、オキシムエーテル、アミド、芳香族複素間の形成が挙げられ；(4)炭素-炭素多重結合の付加-例として、エポキシ化、アジリジン化、ジヒドロキシル化、ハロゲン化スルフェニル付加、ハロゲン化ニトロシル付加、及び特定のマイケル付加が含まれる。実施形態において、使用されるクリック反応は、1,2,3-トリアゾールを形成するための、アジドまたは末端アルキンのCu^I触媒のヒュスゲン(Huisgen)1,3-双極子付加環化(HDC)であってもよい。実施形態において、クリック反応は、銅フリー反応であってもよい。

【0193】

実施形態では、クリックケミストリー反応性基は、アジド基、アルケン基、アミノ基、N-ヒドロキシスクシンイミド基、スルフヒドリル基、ジビニルスルホン誘導体、またはマレイミド誘導体であるか、またはこれらを含む。したがって、実施形態において、リンカーは、反応性基(例えば、クリックケミストリー反応性基)または例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)化学による抱合に好適な保護アミノ基もしくはN-ヒドロキシスクシンイミド基；ジビニルスルホンと抱合され得るスルフヒドリル基；1-アルキル-3-メチルアクリロイル(アクリロイル)クロリドもしくはアクリロイル誘導体と抱合され得る保護スルフヒドリル基；マレイミド誘導体と抱合され得る保護スルフヒドリル基が含まれる、保護反応性基で置換される。

【0194】

シクロヘテロアルキレン分岐状リンカーの構造例を以下に提供する。

10

20

30

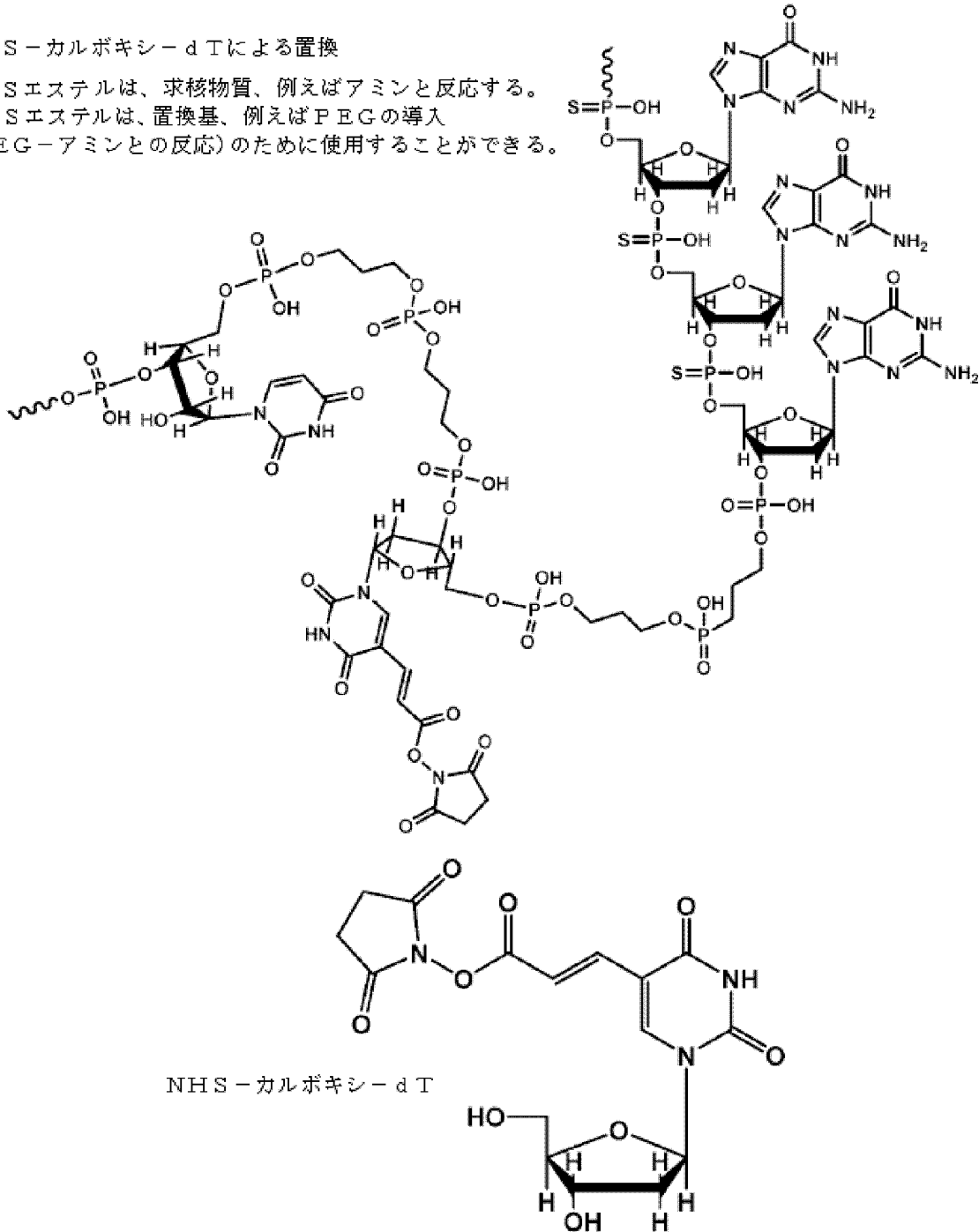
40

50

【化4】

NHS-カルボキシー-dTによる置換

NHSエステルは、求核物質、例えばアミンと反応する。
NHSエステルは、置換基、例えばPEGの導入
(PEG-アミンとの反応)のために使用することができる。



【0195】

上で示したように、シクロヘテロアルキレン分岐状リンカーは、一方の末端でグアニンの3'リン酸と連結し、他方の末端でチミジンの5'リン酸と連結する。シクロヘテロアルキレン分岐状リンカーの部分は分岐点であり、5置換チミジンである。チミジンは、NHS部分を含む反応性基と5位で置換されており、これは、追加の官能部分へ連結するための反応性基としての機能を果たすことができる。

【0196】

反応性官能基及び保護反応性官能基を含む、部分の分岐点として機能するために使用され得る化合物の追加の例を、以下に提供する。

【0197】

10

20

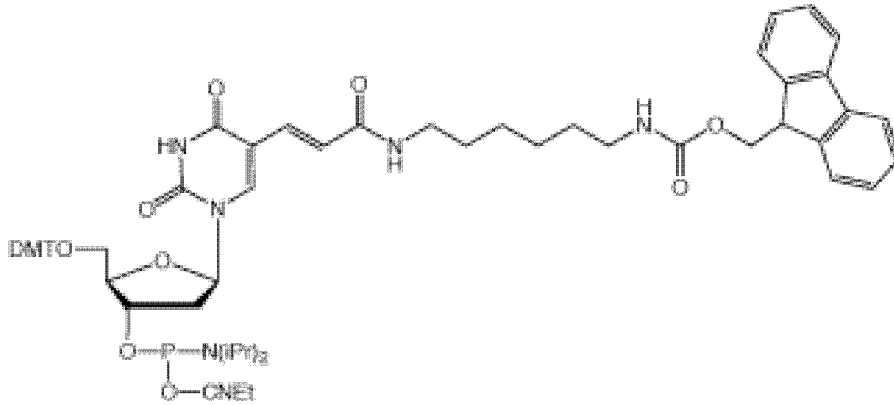
30

40

50

【化5】

FmocアミノモディファイヤーC6-dT

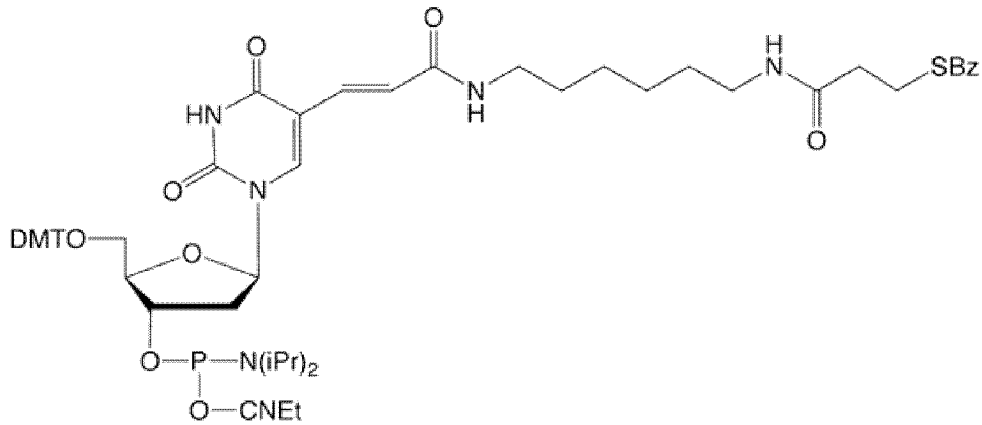


10

【0198】

【化6】

S-Bz-チオールモディファイヤーC6-dT

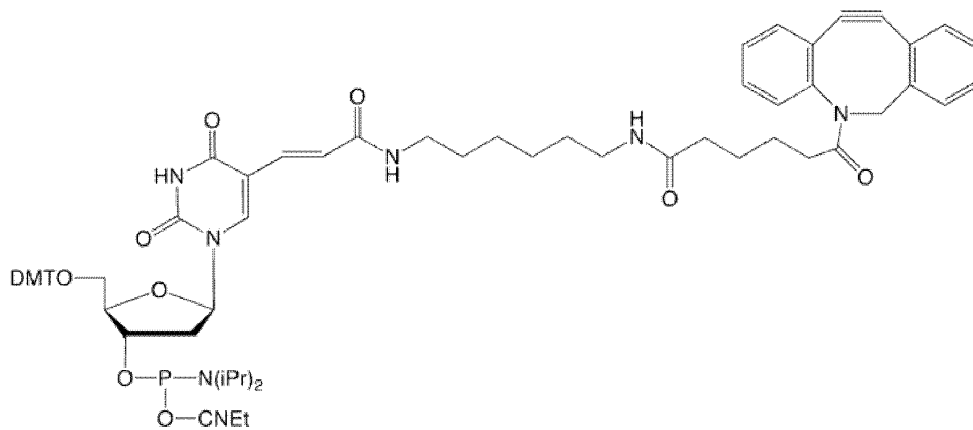


20

【0199】

【化7】

DBCO-dT



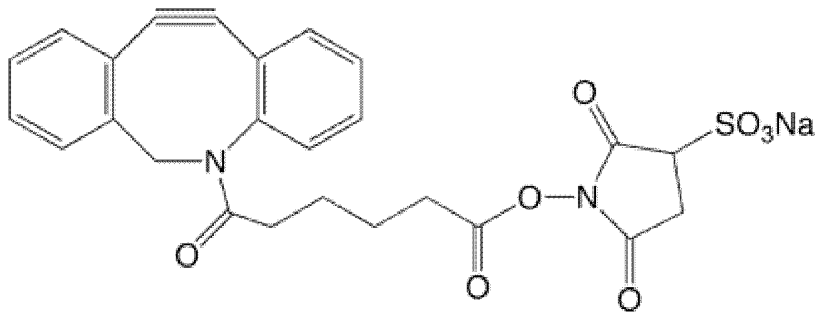
40

【0200】

50

【化 8】

D B C O - スルホ - N H S エステル

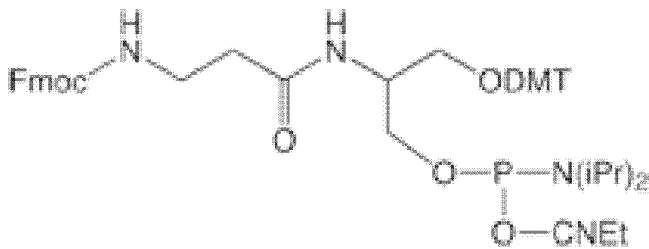


10

【 0 2 0 1】

実施形態において、リンカー分岐点は、非環状であってもよい。反応性官能基及び保護反応性官能基を含有するリンカー内の非環状部分の分岐点として機能するために使用され得る化合物の例が、以下に提供される。

【化 9】



20

【 0 2 0 2】

上述したように、反応性基は、C p G - O D N を抗 m i R または m i R N A ミミック核酸配列及び/または検出可能な部分、治療的部分（例えば、薬物部分）、標的化部分または生体分子などの追加の官能部分に抱合させるために使用されてもよい。追加の官能部分には、蛍光標識、標的化合物（骨標的化ビスホスホネート）、薬物、または抗体が含まれる。実施形態において、追加の部分は、化学的反応性部分、検出可能な部分、治療的部分（例えば、抗癌剤または抗ウイルス剤）、核酸配列、DNA配列、または核酸類似体である。実施形態では、検出可能な部分は、蛍光染料、電子高密度試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、造影剤、磁気共鳴造影剤、X線造影剤、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種、フルオロデオキシグルコース、ガンマ線放出放射性核種、ポジトロン放出放射性核種、生体コロイド、マイクロバブル、ヨード造影剤、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、二光子フルオロフォア、ハプテン、タンパク質、または蛍光部分である。実施形態において、追加の部分は、治療的部分（例えば、抗癌剤または抗ウイルス剤）である。

30

【 0 2 0 3】

実施形態において、追加の官能部分は、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアリール、または置換の（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアリールである。実施形態において、追加の部分は、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）

40

50

置換 2 ~ 40 員のヘテロアルキルである。実施形態では、追加の官能部分は、置換 10 ~ 50 員のヘテロアルキルである。実施形態では、追加の官能部分は、置換 20 ~ 40 員のヘテロアルキルである。実施形態では、追加の官能部分は、置換 25 ~ 40 員のヘテロアルキルである。実施形態では、追加の官能部分は、置換 30 ~ 40 員のヘテロアルキルである。

【0204】

R¹ は、オキソ、ハロゲン、-CN、-CF₃、-NH₂、-OH、-SH、N₃、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換の置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアリール、または置換もしくは非置換のヘテロアリールである。実施形態において、追加の官能部分における R¹ は、検出可能な部分または治療的部分である。実施形態において、追加の官能部分における R¹ は、検出可能な部分である。実施形態において、検出可能な部分は、蛍光染料、電子高密度試薬、酵素、ピオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、造影剤、磁気共鳴造影剤、X線造影剤、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種、フルオロデオキシグルコース、ガンマ線放出放射性核種、ポジトロン放出放射性核種、生体コロイド、マイクロバブル、ヨード造影剤、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、二光子フルオロフォア、ハプテン、タンパク質、または蛍光部分である。実施形態において、追加の官能部分における R¹ は、治療的部分（例えば、抗癌剤または抗ウイルス剤）である。実施形態において、追加の官能部分における R¹ は、H である。実施形態において、追加の官能部分は、オキソである。実施形態において、追加の官能部分は、酸素である。実施形態において、追加の官能部分は、イオウである。実施形態において、追加の官能部分は、=S である。

【0205】

実施形態において、さらなる連結置換基には、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のシクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアリーレン、または置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアリーレンが含まれる。さらなる連結置換基には、反応性基または追加の部分に連結した PEG 部分が含まれてもよい。

【0206】

実施形態において、リンカーには、非置換の C₃ アルキレン（例えば、上記のような）が含まれる。実施形態において、リンカーには、非置換の C₁₅ アルキレンが含まれてもよい。実施形態において、リンカーは、非置換の C₆ ~ C₁₆ アルキレンが含まれる。実施形態において、リンカーは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のシクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のア

10

20

30

40

50

10 アリーレン、または非置換の5～10員のヘテロアリーレンである。実施形態において、リンカーは、非置換のC₁～C₂₀アルキレンである。実施形態では、リンカーは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のC₁～C₄₀アルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換の2～40員のヘテロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のC₃～C₈シクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換の3～8員のヘテロシクロアルキレン、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のC₆～C₁₀アリーレン、または置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換の5～10員のヘテロアリーレンである。実施形態では、リンカーは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のC₁～C₄₀アルキレンである。実施形態において、リンカーは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換の2～40員のヘテロアルキレンである。実施形態において、リンカーにはアルキルリン酸（例えば、プロピルリン酸）が含まれる。実施形態において、リンカーは、両末端においてリン酸によって、化合物の残部に結合されたアルキルリン酸（例えば、プロピルリン酸）を有する。実施形態において、リンカーは、両末端においてリン酸によって、化合物の残部に結合された1～5個のアルキルリン酸（例えば、プロピルリン酸）を有する。実施形態において、リンカーは、両末端においてリン酸によって、化合物の残部に結合された1～4個のアルキルリン酸（例えば、プロピルリン酸）を有する。実施形態において、リンカーは、両末端においてリン酸によって、化合物の残部に結合された4個のアルキルリン酸（例えば、プロピルリン酸）を有する。当業者であれば、両末端においてリン酸によって、化合物の残部に結合されているアルキルリン酸を有するリンカーが、アルキレン基よりも1つ多いリン酸を有するであろうこと（例えば、両末端においてリン酸によって、化合物の残部に結合されている4個のアルキルリン酸を有するリンカーが、交互のリン酸基及びアルキル基を伴って、5個のリン酸及び4個のアルキル基を有するであろうこと）を認識されよう。

【0209】

実施形態において、抗miR及びmiRNAミミックは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5'-C-メチル、逆位デオキシ脱塩基残基結合、またはロックド核酸、もしくはこれらの任意の組み合わせ（複数可）などの修飾を含み得る。実施形態において、抗miR及びmiRNAミミックは、抗miR及びmiRNAミミックの末端核酸塩基に位置する修飾を有してもよい。実施形態において、抗miR及びmiRNAミミックは、抗miR及びmiRNAミミックの末端核酸塩基に位置する修飾を有さずともよい。実施形態において、抗miR及びmiRNAミミックは、血清由来のヌクレアーゼに対して化合物を保護する（例えば、ヌクレアーゼ耐性である）。

【0210】

実施形態において、抗miRまたはmiRNAミミック抱合（CpG-ODN）は、末端部分を有する。末端部分は、化学的反応性部分、検出可能部分、治療的部分（例えば、抗癌剤または抗ウイルス剤）、核酸配列、DNA配列、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアリール、または置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアリールである。

10

20

30

40

50

【0211】

実施形態において、末端部分は、化学的反応性部分、検出可能な部分、治療的部分（例えば、抗癌剤または抗ウイルス剤）、核酸配列、DNA配列、核酸類似体、R¹置換もしくは非置換のアルキル、R¹置換もしくは非置換のヘテロアルキル、R¹置換もしくは非置換のシクロアルキル、R¹置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、R¹置換もしくは非置換のアリール、またはR¹置換もしくは非置換のヘテロアリールである。

【0212】

実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODN核酸配列の抱合体は、末端部分を含み、この末端部分は、検出可能な部分である。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、蛍光染料、電子高密度試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、造影剤、磁気共鳴造影剤、X線造影剤、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種、フルオロデオキシグルコース、ガンマ線放出放射性核種、ポジトロン放出放射性核種、生体コロイド、マイクロバブル、ヨード造影剤、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、二光子フルオロフォア、ハプテン、タンパク質、または蛍光部分などの末端の検出可能な部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、治療的部分（例えば、抗癌剤または抗ウイルス剤）である末端部分を含む。

【0213】

実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、オキソ、ハロゲン、-CN、-CF₃、-NH₂、-OH、-SH、N₃、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のアリール、または置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のヘテロアリールである、末端部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のC₁~C₄₀アルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換の2~40員のヘテロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のC₃~C₈シクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換の3~8員のヘテロシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換のC₆~C₁₀アリール、または置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）もしくは非置換の5~10員のヘテロアリールである、末端部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）C₁~C₄₀アルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）2~40員のヘテロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）C₃~C₈シクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）3~8員のヘテロシクロアルキル、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）C₆~C₁₀アリール、または置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）5~10員のヘテロアリールである、末端部分を含む。実施形態において、末端部分は、R¹置換C₁~C₄₀アルキル、R¹置換2~40員のヘテロアルキル、R¹置換C₃~

10

20

30

40

50

C₈シクロアルキル、R¹置換3～8員のヘテロシクロアルキル、R¹置換C₆～C₁₀アリール、またはR¹置換5～10員のヘテロアリールである。実施形態において、末端部分は、R¹置換C₁～C₄₀アルキルである。実施形態において、末端部分は、-（非置換のC₁～C₄₀アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₁～C₄₀アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換のC₃～C₂₁アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換のC₃～C₁₈アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₃～C₁₅アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₆～C₂₁アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₉～C₂₁アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₉～C₁₈アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₉～C₁₅アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₁₂～C₁₅アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₁₂アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₁₃アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₁₄アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（非置換の直鎖C₁₅アルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、R¹置換2～40員のヘテロアルキルである。実施形態において、末端部分は、-（非置換2～40員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換直鎖2～40員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換5～40員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換10～40員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換15～40員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換20～40員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換30～40員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換2～35員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換2～30員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換2～25員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換2～20員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換2～10員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換2～50員のヘテロアルキレン）-R¹である。実施形態において、末端部分は、-（置換2～60員のヘテロアルキレン）-R¹である。

【0214】

実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）の2～40員のヘテロアルキルである末端部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）10～50員のヘテロアルキルである末端部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）20～40員のヘテロアルキルである末端部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）25～40員のヘテロアルキルである末端部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）30～40員のヘテロアルキルである末端部分を含む。

【0215】

実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODN

は、R¹基を有する末端部分を含み、このR¹は、検出可能な部分または治療的部分である。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNにおけるR¹は、検出可能な部分である末端部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNにおけるR¹は、蛍光染料、電子高密度試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、造影剤、磁気共鳴造影剤、X線造影剤、ガドリニウム、放射性同位体、放射性核種、フルオロデオキシグルコース、ガンマ線放出放射性核種、ポジトロン放出放射性核種、生体コロイド、マイクロバブル、ヨード造影剤、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、二光子フルオロフォア、ハプテン、タンパク質、または蛍光部分である、検出可能な部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNにおけるR¹は、治療的部分（例えば、抗癌剤または抗ウイルス剤）である末端部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNにおけるR¹は、Hである末端部分を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNにおけるR¹は、末端部分としてオキソを含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNにおけるR¹は、末端部分として酸素を含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNにおけるR¹は、末端部分としてイオウを含む。実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNにおけるR¹は、末端部分として=Sを含む。

10

20

【0216】

実施形態において、本化合物のCpG-ODN核酸配列は、非メチル化CpGモチーフ（例えば、CpG核酸配列またはGpC核酸配列）を含む。実施形態において、CpG-ODN核酸配列は、クラスA CpG核酸配列、クラスB CpG核酸配列、またはクラスC CpG核酸配列を含む。

【0217】

実施形態において、本化合物は、その中のC及びGが、ホスホジエステルヌクレオチド間結合によって連結されたヌクレオチドであるCpG-ODNを含む。実施形態において、本化合物は、その中のC及びGが、ホスホジエステル誘導体ヌクレオチド間結合によって連結されたヌクレオチドであるCpGを含む。実施形態において、CpGモチーフは、メチル化されていない。実施形態において、C及びGは、5' C-G 3'として連結されている。実施形態において、C及びGは、5' G-C 3'として連結されている。

30

【0218】

実施形態において、Toll様受容体（TLR）結合DNA置換基は、クラスA CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）である。実施形態において、TLR結合DNA置換基は、クラスB CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）である。実施形態において、TLR結合DNA置換基は、クラスC CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）である。実施形態において、TLR結合DNA置換基（例えば、TLR9結合DNA置換基）は、A、G、C、またはT塩基と、ホスホジエステル結合及び/またはホスホジエステル誘導体結合（例えば、ホスホロチオエート結合（複数可））からなる。

40

【0219】

実施形態において、本化合物は、エンドソームTLRに結合する。実施形態において、本化合物は、エンドソームTLRに他のTLRに対して優先的に結合する。実施形態において、本化合物は、エンドソームTLRに特異的に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR3に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR3に他のTLRに対して優先的に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR3に特異的に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR7に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR7に他のTLRに対して優先的に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR7に特異的に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR8に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR8に他のTLRに対して優先的に結合する。実施形態にお

50

いて、本化合物は、TLR8に特異的に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR9に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR9に他のTLRに対して優先的に結合する。実施形態において、本化合物は、TLR9に特異的に結合する。実施形態において、本化合物は、その中のC及びGが、ホスホジエステルヌクレオチド間結合またはホスホジエステル誘導体ヌクレオチド間結合によって連結されたヌクレオチドである、CpGを含む。

【0220】

実施形態において、TLR結合DNA置換基は、クラスA CpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)である。実施形態において、TLR結合DNA置換基は、クラスB CpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)である。実施形態において、TLR結合DNA置換基は、クラスC CpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)である。実施形態において、TLR結合DNA置換基は、ODN 1585、ODN 2216、ODN D19、またはODN 2336である。実施形態において、TLR結合DNA置換基は、ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006、またはODN 2007である。実施形態において、TLR結合DNA置換基は、ODN 2395またはODN M362である。実施形態において、TLR結合DNA置換基は、ODN 1585、ODN 2216、ODN D19、ODN 2336、ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006、ODN 2007、ODN 2395、またはODN M362の誘導体である。実施形態において、ODN 1585、ODN 2216、ODN D19、ODN 2336、ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006、ODN 2007、ODN 2395、またはODN M362の誘導体は、1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の)ヌクレオチド置換(例えば、異なるヌクレオチドで置換されたA、C、G、またはT)を含む。実施形態において、ODN 1585、ODN 2216、ODN D19、ODN 2336、ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006、ODN 2007、ODN 2395、またはODN M362の誘導体は、1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の)ヌクレオチド間結合置き換え(例えば、ホスホジエステル誘導体で置き換えられたホスホジエステルまたはホスホジエステルで置き換えられたホスホジエステル誘導体)を含む。実施形態において、ODN 1585、ODN 2216、ODN D19、ODN 2336、ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006、ODN 2007、ODN 2395、またはODN M362の誘導体は、1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100個の)ヌクレオチド欠失を含む。実施形態において、ODN 1585、ODN 2216、ODN D19、ODN 2336、ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006、ODN 2007、ODN 2395、またはODN M362の誘導体は、1つ以上の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の)ヌクレオチド付加を含む。

【0221】

実施形態において、本化合物は、ホスホジエステル誘導体結合(例えば、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボキシレート、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、メチルホスホネート、ハウ素ホスホネート、またはO-メチルホスホロアミダイト結合)を含む。実施形態において、本化合物は、複数のホスホジエステル誘導体結合(例えば、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカル

10

20

30

40

50

ボン酸、ホスホノカルボキシレート、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、メチルホスホネート、ホウ素ホスホネート、O-メチルホスホロアミダイト結合、またはこれらの組み合わせ)を含む。実施形態において、本化合物は、TLR9結合DNA置換基中に、ホスホジエステル誘導体結合(例えば、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボキシレート、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、メチルホスホネート、ホウ素ホスホネート、またはO-メチルホスホロアミダイト結合)を含む。実施形態において、本化合物は、TLR結合核酸(例えば、エンドソームTLR-、TLR3-、TLR7、-TLR8-、またはTLR9-結合核酸)置換基中に、ホスホジエステル誘導体結合(例えば、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボキシレート、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、メチルホスホネート、ホウ素ホスホネート、またはO-メチルホスホロアミダイト結合)を含む。

10

【0222】

実施形態において、本化合物中のホスホジエステル誘導体結合は、ホスホロアミデート結合、ホスホロジアミデート結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホノカルボン酸結合、ホスホノカルボキシレート結合、ホスホノ酢酸結合、ホスホノギ酸結合、メチルホスホネート結合、ホウ素ホスホネート結合、またはO-メチルホスホロアミダイト結合であってもよい。

【0223】

実施形態において、本化合物中の核酸ヌクレオチド間結合の内の1つ以上は、ホスホジエステル誘導体結合(例えば、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボキシレート、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、メチルホスホネート、ホウ素ホスホネート、またはO-メチルホスホロアミダイト結合)である(例えば、本化合物中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または全てのヌクレオチド間結合が、ホスホジエステル誘導体結合(例えば、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホノカルボン酸、ホスホノカルボキシレート、ホスホノ酢酸、ホスホノギ酸、メチルホスホネート、ホウ素ホスホネート、O-メチルホスホロアミダイト結合、またはこれらの組み合わせ)である)。

20

【0224】

実施形態において、CpG-ODNを、miR-126を標的化する抗miRに、またはmiR-142のmiRNA-ミミックに連結する化合物が本明細書に提供される。

30

【0225】

実施形態において、CpG-ODNを、miR-155を標的化する抗miRに連結する化合物が本明細書に提供される。

【0226】

実施形態において、CpG-ODNを、miR-125bを標的化する抗miRに連結する化合物が本明細書に提供される。

【0227】

実施形態において、CpG-ODNを、miR-146aを標的化する抗miRに、またはmiR-146aのmiRNA-ミミックに連結する化合物が本明細書に提供される。

40

【0228】

実施形態において、抗miRもしくはmiRNA-ミミックに抱合されたCpG-ODNは、細胞質中(及び細胞核中)に存在する。

【0229】

医薬組成物

一態様では、薬学的に許容される賦形剤と、本明細書に開示される化合物とを含む医薬組成物が本明細書に提供される。実施形態において、本組成物は、第2の治療薬を含む。実施形態において、第2の治療薬は、抗腫瘍もしくは抗癌剤、血管新生阻害剤、細胞傷害性薬剤、細胞増殖抑制剤、抗炎症剤、鎮痛剤、抗感染症薬、増殖阻害剤、免疫原性薬剤、免

50

疫調節剤、またはケモカインである。実施形態において、本開示の医薬生成物中の抗腫瘍もしくは抗癌剤は、細胞死促進剤である。

【0230】

実施形態において、本開示の医薬組成物中の第2の治療薬には、クチノマイシンD (ctinomaycin D) /ダクチノマイシン、プレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ドキソルビシン(ペグ化リポソーム)、エピルビシン、イダルビシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、エトポシド、ドセタキセル、イリノテカン、パクリタキセル、トポテカン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、シスプラチン(Cisplatin)、オキサリプラチン、アレムツザマブ(Alemtuzumab)、BCG、ペバシズマブ、セツキシマブ、デノスマブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、インターフェロン、イピリムマブ、ラパチニブ、モノメチルオリスタチンE(MMEA)、メルタンシン(DM1)、リツキシマブ、スニチニブ、ソラフェニブ、テムシロリムス、トラスツズマブ、またはこれらの任意の組み合わせ(複数可)が含まれる。

10

【0231】

実施形態において、本開示は、本開示の化合物と、1つ以上の追加の抗癌剤治療剤、例えば、抗VEGF抗体、または抗STAT剤との組み合わせの組成物を含む。

【0232】

方法及び使用のいずれかの実施形態において、本開示は、本開示の化合物及び化学療法剤の有効量を、がんと診断された対象に投与することによって、がんを治療することを含む。様々な化学療法剤が、本開示の併用治療法及び使用で使用されてもよい。実施形態において、化学療法剤は、テモロゾロミド(temolozolomide)であってもよい。実施形態では、化学療法剤は、放射線療法と同時に投与されてもよい。

20

【0233】

一例では、併用治療は、別個の製剤または単一の医薬製剤を用いる同時投与、及び両方の(または全ての)活性薬剤が同時にそれらの生物学的活性を及ぼす期間があり得る、いずれかの順序での連続投与を含む投与を伴い得る。このような化学療法剤についての調製及び投与スケジュールは、製造元の指示書に従って用いられてもよく、または熟練した施術者によって経験的に決定されてもよい。化学療法剤についての調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)にも記載されている。化学療法剤は、本開示の化合物もしくは組成物の投与の前であってもその後であってもよく、またはそれと同時に与えられてもよい。

30

【0234】

方法及び使用のいずれかの実施形態において、本開示の化合物との併用腫瘍療法に有用な他の治療薬には、VEGF、EGFR、ErbB3、ErbB4、STATまたはTNFなどの腫瘍増殖に関与している他の因子のアンタゴニストが含まれる。時には、1つ以上のサイトカインを対象に投与することも有益な場合もある。実施形態において、本開示の化合物もしくは組成物は、増殖阻害剤と併用投与される。例えば、増殖阻害剤が最初に投与され、その後、本開示の化合物もしくは組成物が投与されてもよい。しかしながら、同時投与または本開示の化合物もしくは組成物の投与が最初に行われることが可能であり得る。増殖阻害剤の好適な投与量は、現在使用されている量であり、増殖阻害剤及び本開示の化合物の組み合わせ作用(相乗効果)のために低下させてもよい。

40

【0235】

本明細書の組成物はまた、治療される特定の徴候、例えば、互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性によるものに対して、必要に応じて2つ以上の活性化化合物を含有してもよい。例えば、EGFR、VEGF(例えば、VEGF上の異なるエピトープまたは同じエピトープに結合する抗体)、EGFR、またはErbB2に結合する薬剤1つの製剤中にさらに提供することが望ましい場合がある。このような分子は、意図された目的のために有効である量で組み合わせ適切に存在し得る。

50

【0236】

方法及び使用の実施形態において、本開示の化合物もしくは組成物との併用癌療法に有用な他の治療薬には、他の血管新生阻害剤が含まれる。多くの血管新生阻害剤が特定されており、当該技術分野において既知であり、Carmeliet and Jain (2000) によって列記されたものが含まれる。実施形態において、本開示の化合物もしくは組成物は、別のmiRアンタゴニスト、miR複合体に対する中和抗体、miRの低分子量阻害剤、及びこれらの任意の組み合わせと併用して使用される。

【0237】

本開示は、有効用量の本開示の化合物を有する組成物を含む。有効用量は、薬剤中約0.001mg/kg～約100mg/kg（例えば、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100mg/kg）であつてもよい。

【0238】

実施形態において、有効用量の、本開示の抗miR、例えば抗miR126を含む化合物は、疾患（例えば、がん、自己免疫疾患、または感染性疾患）を治療するために、それを必要とする対象に投与される。抗miRは、細胞中のmiR（例えば、miR126）の発現/活性を抑制して、細胞周期を、がん細胞（例えば、白血病幹細胞（LS））に誘導し、がん細胞（例えば、LS）に化学療法に対してより感受性を高めさせる。

【0239】

実施形態において、本開示のmiR-ミミック、例えば抗miR142-ミミックを含む化合物の有効用量は、疾患（例えば、がん、自己免疫疾患、または感染性疾患）を治療するために、それを必要とする対象に投与される。miR-ミミックは、がん、例えば白血病の発症をブロックする。

【0240】

本化合物は、約0.001mg/kg～約0.01mg/kgの化合物、約0.01mg/kg～約0.1mg/kgの化合物、約0.1mg/kg～約1.0mg/kgの化合物、約1.0mg/kg～約5.0mg/kgの化合物、約5.0mg/kg～約10mg/kgの化合物、約10mg/kg～約15mg/kgの化合物、約15mg/kg～約20mg/kgの化合物、約20mg/kg～約25mg/kgの化合物、約25mg/kg～約30mg/kgの化合物、約30mg/kg～約35mg/kgの化合物、約35mg/kg～約40mg/kgの化合物、約40mg/kg～約45mg/kgの化合物、約45mg/kg～約50mg/kgの化合物、約50mg/kg～約55mg/kgの化合物、約55mg/kg～約60mg/kgの化合物、約60mg/kg～約65mg/kgの化合物、約65mg/kg～約70mg/kgの化合物、約70mg/kg～約75mg/kgの化合物、約75mg/kg～約80mg/kgの化合物、約80mg/kg～約85mg/kgの化合物、約85mg/kg～約90mg/kgの化合物、約90mg/kg～約95mg/kgの化合物、または約95mg/kg～約100mg/kgの化合物の用量で、それを必要とする対象に投与され得る。

【0241】

実施形態において、本開示は、本化合物が、組成物の約0.1%～約20重量/体積%であり得る、本開示の化合物の有効用量を含む組成物を含む。

【0242】

例えば、本明細書に開示される化合物の有効用量は、組成物の重量/体積基準で約0.0

10

20

30

40

50

0.1%～約0.001%、約0.01%～約0.1%、約0.1%～約1.0%、約1.0%～約2.0%、約2.0%～約3.0%、約3.0%～約4.0%、約4.0%～約5.0%、約5.0%～約6.0%、約6.0%～約7.0%、約7.0%～約8.0%、約8.0%～約9.0%、約9.0%～約10.0%、約10%～約11%、約11%～約12%、約12%～約13%、約13%～約14%、約14%～約15%、約15%～約16%、約16%～約17%、約17%～約18%、約18%～約19%、または約19%～約20%であってもよい。

【0243】

治療または使用方法

疾患の治療方法を、それを必要とする対象において施す方法が、本明細書で提供され、本方法は、化合物または本明細書に開示される化合物を含む医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む。実施形態において、疾患は、がん、自己免疫疾患、または感染性疾患である。

10

【0244】

実施形態において、がんは、造血細胞癌である。実施形態において、がんは、造血細胞癌ではない。実施形態において、がんは、骨髄腫または急性骨髄性白血病もしくは慢性骨髄性白血病である。実施形態において、がんは、前立腺癌、乳癌、神経膠芽腫、卵巣癌、肺癌、頭頸部癌、食道癌、皮膚癌、悪性黒色腫、脳癌、大腸癌、白血病、リンパ腫、または骨髄腫である。

【0245】

実施形態において、自己免疫疾患は、リウマチ性関節炎、乾癬、全身性エリテマトーデス（SLE）、I型糖尿病、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、多発性硬化症（MS）、パーキンソン病（PD）、アルツハイマー病（AD）または炎症性腸疾患（IBD）である。

20

【0246】

実施形態において、感染性疾患は、結核、インフルエンザ、エボラ出血熱、HIV、HPV感染症もしくは肝炎である。

【0247】

実施形態において、化合物もしくは組成物は、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、経口、または局所投与によって、対象に投与される。実施形態において、治療は、化合物もしくは組成物の用量依存性である。実施形態において、約0.001mg/kg～約100mg/kgの化合物が対象に投与される。この範囲内の全ての数字及び様々な範囲も暗示される。

30

【0248】

細胞中のmiR、例えばmiR126を抑制する方法が本明細書に提供され、本方法は、細胞を化合物または本明細書に開示される化合物の組成物の有効量と接触させることを含む。細胞を化合物または本明細書に開示される化合物の組成物の有効量と接触させることを含む細胞を阻害する方法が本明細書に提供される。

【0249】

実施形態において、細胞は、がん細胞である。実施形態において、細胞は、急性骨髄性白血病（AML）細胞または慢性骨髄性白血病細胞（CML）である。実施形態において、AML細胞は、骨髄からのものである。実施形態において、細胞は、インビトロでの培養細胞であり、細胞は宿主中の*in situ*のものであり、細胞は、*ex vivo*での培養組織内にある。実施形態において、接触するステップは、ウイルス形質導入を含まない。実施形態において、接触するステップは、ウイルス形質導入を含まず、細胞は、本開示の化合物または本開示の化合物を含む医薬組成物と接触される。実施形態において、細胞は、約1ナノモル～約100ナノモル（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、

40

50

50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 nm) の化合物と接触される。この範囲内の全ての数字及び様々な範囲も暗示される。

【0250】

実施形態において、ヘテロアルキレンリンカーは、合成の完了後の追加の部分のさらなる修飾、抱合、または連結を可能にし、この間、オリゴヌクレオチドは支持体になお連結されている。

【0251】

実施形態において、合成中及びオリゴヌクレオチドが支持体に連結している間の、さらなる修飾、抱合、または連結を可能にし得る、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）ヘテロアルキレンリンカーを有する、抗miRもしくはmiRNA - ミミックに抱合されたCpG - ODNが本明細書に提供される。

【0252】

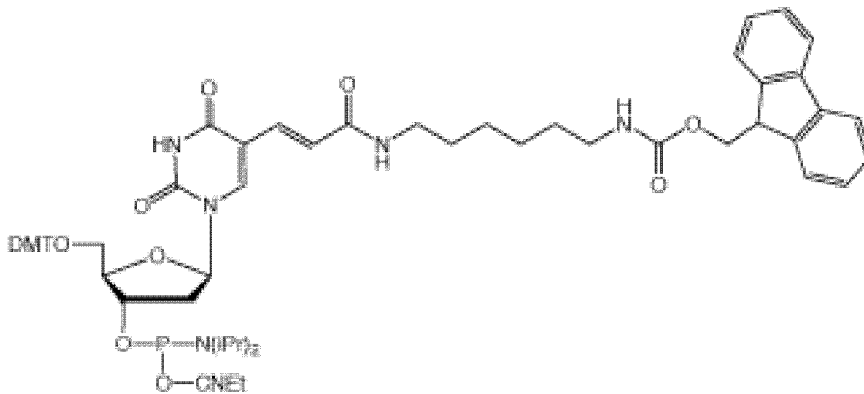
実施形態において、置換（例えば、置換基、サイズ制限置換基、または低級置換基によって置換された）ヘテロアルキレンリンカーは、修飾され、抱合され、または置換基に連結されている。修飾には、元の置換基の異なる置換基への変換が含まれ得る。例えば、臭素 - アルカン置換基が、アジド - アルカンに変換されてもよい。抱合は、2つの大きな部分の互いの結合をもたらし得る。例えば、NHS誘導体は、PEG - NH₂と抱合されてもよい。ペプチドもオリゴヌクレオチドと抱合されてもよく、抗体は、オリゴヌクレオチドと抱合されてもよい。連結は、小分子の大分子への結合をもたらし得る。例えば、ピオチンのNHSエステルは、オリゴのアミノ誘導体に連結されてもよい。

【0253】

実施形態において、リンカーの複数の異なるリンカー、複数の同一のリンカー、または以下の群から選択されるリンカーの置換を有する、抗miRもしくはmiRNA - ミミックに抱合されたCpG - ODNが本明細書で提供される。

NHSエステル及びジビニルスルホンならびにその類似体と反応することにより、官能基化にさらに使用され得る、FmocアミノモディファイヤーC6 - dT（アミノ基の導入）

【化10】



ジビニルスルホン及びアクリル酸類似体と反応することにより、官能基化にさらに使用され得る、S - Bz - チオールモディファイヤーC6 - dT（スルフヒドリル基の導入）

10

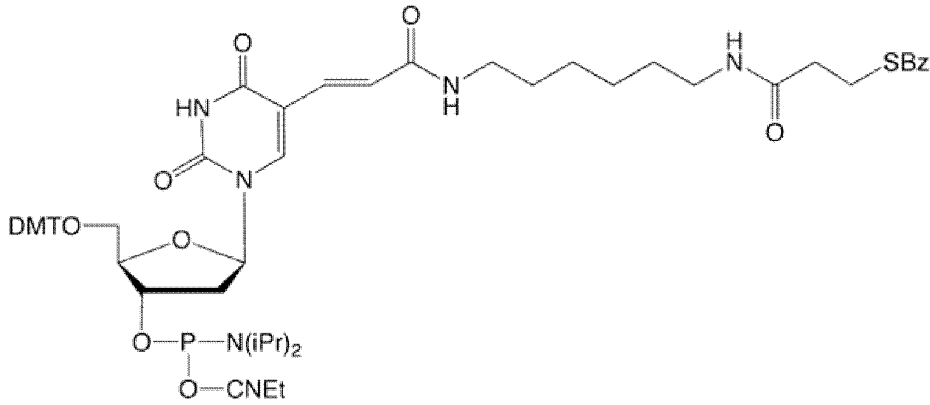
20

30

40

50

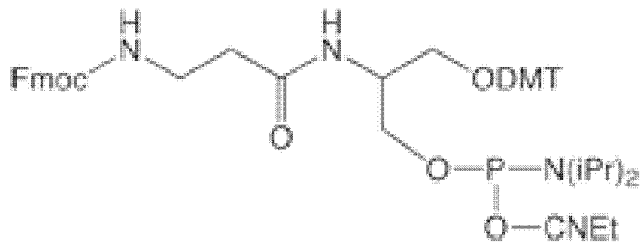
【化 1 1】



10

NHS エステル及びジビニルスルホンならびにその類似体と反応することにより、官能基化にさらに使用され得る、アミノモディファイヤーセリノールホスホルアミダイト（アミノ基の導入）

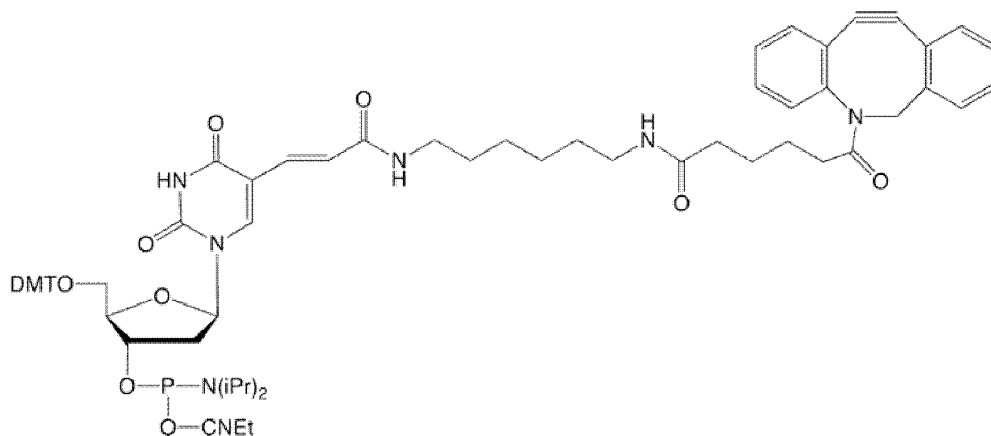
【化 1 2】



20

アジド反応物質による官能基化にさらに使用され得る、DBCO-dT（アルキンの導入、銅フリークリックケミストリー）

【化 1 3】



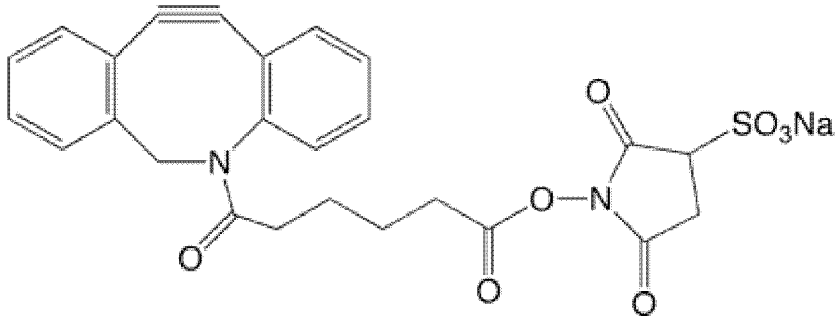
30

40

DBCO-スルホ-NHS エステル（アルキンの導入、アミノ基と反応させることによる銅フリークリックケミストリー）

50

【化 1 4】



10

【実施例】

【0254】

実施例 1：正常、臍帯血、AML 及び CML CD34+ 細胞における CpG - 抗 miR 126 阻害剤の取り込み

【0255】

正常、臍帯血、AML 及び CML CD34+ 細胞を、CpG - 抗 miR 126 阻害剤 - Cy3 または抗 miR 126 阻害剤 - Cy3 で 16 時間培養し、取り込みを、フローサイトメトリーによって細胞中の Cy3 発現により測定した (図 2 A ~ 2 D)。全ての試験細胞は、CpG - 抗 miR 126 - Cy3 を高効率で内在化させたが、抗 - miR 126 - Cy3 は内在化させなかった。

20

【0256】

実施例 2：AML 及び CML 細胞株における CpG - 抗 miR 126 阻害剤の取り込み及び発現

【0257】

CML (K562) (図 3 A) 及び AML 細胞株 (KG1A、MV4-11、Molm13、NB4、OCI 及び HL60) (図 3 B ~ 3 G) を、抗 miR 126 阻害剤 - Cy3 (Cy3 - 200 nM) 単独、抗 miR 126 - Cy3 を含有するヒト CD45 (Ab - 200 nM) もしくはトランスフェリン (TF - 200 nM) 抱合ナノ粒子 (NP) または 2 つの濃度での (200 nM 及び 500 nM) 製剤化されていない CpG 抗 miR 126 阻害剤 - Cy3 で 4 時間培養し、フローサイトメトリーによってこれらの細胞中の Cy3 発現を測定することによって、取り込みを分析した。骨髓性細胞に特異的な CpG - 抗 miR 126 抱合体は、インビトロにおいて様々なヒト AML 及び CML 細胞株によって迅速かつ用量依存的に内在化された。いかなるトランスフェクション試薬も不在下での CpG - 抗 miR 126 内在化のレベルは、NP 製剤化抗 miR 126 阻害剤を含む全ての他のオリゴヌクレオチドのものを超えた。

30

【0258】

AML 及び CML 株における miRNA 126 の発現を評価した。CML (K562) (図 4 A) 及び AML 細胞株 (KG1A、MV4-11、Molm13、NB4、OCI 及び HL60) (図 4 B ~ 4 G) を、抗 miR 126 阻害剤 - Cy3 (Cy3 対照、200 nM)、ヒト CD45 (Ab - NP、200 nM) または抗 miR 126 - Cy3 を含有するトランスフェリン (TF - NP 200 nM) 抱合 NP、または CpG 抗 miR 126 阻害剤 - Cy3 (CpG - 200 nm 及び 500 nM) で 24 時間培養し、次いで、これらの細胞中の miR 126 及び RNU (対照) 発現を、Q-RT-PCR によって分析した。骨髓性細胞に特異的な CpG 抗 miR 126 抱合体 (500 nM) は、HL60、K562、MV4-11、MOLM13 及び OCI 細胞中の標的 miRNA 発現を、50% を超えて低減させた状態で、インビトロにおいて、全ての試験されたヒト AML 及び CML 細胞株において、miRNA 126 の最も有効なダウンレギュレーションをもたらした。

40

【0259】

50

実施例3：NL/CB、AML及びCML CD34+細胞中のmiRNA126の発現【0260】

正常、臍帯血、AML及びCML CD34+細胞を、CpG-スクランブルRNA (500nM)及びCpG-抗miR126阻害剤-Cy3 (500nM)で24時間培養し、次いで、これらの細胞中のmiR126及びRNU44 (対照)発現を、Q-RT-PCRによって分析した(図5)。miR126の発現レベルをRNU44に正規化し、比較2⁻Ct法を用いて算出した。骨髓性細胞に特異的なCpG-抗miR126抱合体(500nM)は、インビトロにおいて、様々な患者の一次AML及びCML CD34+細胞によって迅速に内在化され、miR126の発現の有意な減少(60%~90%)を、これらの細胞で確認した。

10

【0261】

実施例4：CML CD34+CD38-未分化前駆細胞は、CD34+CD38+系統決定前駆細胞よりも高いmiR126発現を示した。

【0262】

CML CD34+、CD34+CD38+系統決定前駆細胞及びCD34+CD38-未分化前駆細胞を選別し、次いで、これらの細胞中のmiRNA126及びRNU44 (対照)の発現を、Q-RT-PCRによって分析した。miR126の発現レベルをRNU44に正規化し、比較2⁻Ct法を用いて算出した(図6)。CML CD34+CD38-未分化前駆細胞は、CD34+CD38+系統決定前駆細胞よりも高いmiR126発現を示した。

20

【0263】

実施例5：CpG-抗miR126阻害剤及びNILで処置されたCML CD34+、CD34+CD38+系統決定前駆細胞及びCD34+CD38-未分化前駆細胞のアポトーシスの増加

【0264】

CML CD34+、CD34+CD38+系統決定前駆細胞及びCD34+CD38-未分化前駆細胞を、CpG-スクランブルRNA (500nM)、CpG-抗miR126阻害剤(500nM)、CpG-スクランブルRNA (500nM)+ニロチニブ(NIL、5uM)、及びCpG-抗miR126阻害剤(500nM)+NIL(5uM)で72時間培養し、次いで、細胞周期及びアポトーシスを、EDU/DaPi及びアネキシンV/DaPi染色によって分析した。90%を超えるmiR126発現の減少を、CpG-抗miR126阻害剤処置細胞で確認した(図7)。CpG-スクランブル及びNILで処置された細胞と比べて、CpG-抗miR126阻害剤及びNILで処置されたCML CD34+、CD34+CD38+系統決定前駆細胞及びCD34+CD38-未分化前駆細胞の増加したアポトーシスを観察した(図8)。増加した細胞周期を、CpG-抗miR126阻害剤で処置された正常及びCML CD34+CD38未分化前駆細胞で確認した(図9)。

30

【0265】

さらに、CpG-抗miR126阻害剤(500nM)とのインキュベーションは、CpG-Scrと比べて、EDU/DaPi染色によって測定された、正常及びCMLマウスからの長期造血幹細胞(LTHSC、Lin-Sca-1+c-kit+Fit3-CD150+CD48-)の増加した細胞周期開始をもたらした(図10)。NILと組み合わせられたCpG-抗miR126阻害剤もまた、CpG-SCR+NIL処置と比べて、LSCの著しく増加したアポトーシス(図11A)及び細胞増殖の有意な減少(図11B)をもたらした。

40

【0266】

実施例6：アラビノースc及びDoxoと組み合わせられたCpG-抗miR126阻害剤によるmiR126のサイレンシングは、各処置の単独と比べて、LSCのアポトーシスを著しく増加させた。

【0267】

50

Ara-c及びDoxoと組み合わせられたCpG-抗miR126阻害剤(500nM)によるヒトAML CD34+細胞中のmiR126のサイレンシングは、Ara-c及びDoxo単独と比べて、細胞周期(図12A)及びアポトーシス(図12B)を著しく増加させ、細胞増殖の低減をもたらした(図12C)。

【0268】

実施例7：一次AML及びCML LSCの増殖に及ぼすCpG-抗miR126のインビボの効果ならびに治療応答

【0269】

SCLtTA/BCR-ABLマウスをCpG-miR126阻害剤(5mg/kg、隔日、静脈内(iv)注射)、SCR(5mg/kg、隔日、静脈内注射)、NIL(50mg/kg、毎日、強制飼養による)+SCR、NIL+miR126阻害剤で3週間処置し、次いで、PB、BM及び脾臓中の残存するCML細胞を分析した。NIL+SCRで処置したマウスと比べて、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスのPBにおける減少したCML白血球細胞を確認した(図13A)。NIL+SCRで処置したマウスと比べて、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスの減少した脾臓重量を確認した(図13B)。NIL+SCRで処置したマウスと比べて、NIL+miR126阻害剤で処置したマウスのBM及び脾臓において、減少したCML細胞、CML LSK及びCML LTHSCを観察した(図13C~D、図14A~D)。インビボでのCpG-抗miR126の一次AML LSCの増殖及び治療応答に及ぼす効果は、現在進行中である。これらの観察は、本開示の他の化合物の中でも、骨髄性細胞に特異的なCpG-抗miR126 ODN阻害剤によるmiR126のブロックは、非常に有効であり、したがって、白血病及び本明細書に開示される他の種類のがんにおけるmiRNAを標的化する新規な治療方法を表している。

10

20

【0270】

実施例8：CpG-抗miRNAの取り込み及び阻害効果

【0271】

本試験において使用された例示の化合物の配列は、

CpG-抗miR155：

5' G*G*TGCA TCGATGCA GG*G*G*G*G(配列番号1)xxxxxm
A*mC*mC*mC*mC*mU*mA*mU*mC*mA*mC*mA*mA*mU
*mU*mA*mG*mC*mA*mU*mU*mA*mA(配列番号28)3'；

30

CpG-抗miR125b：

5' G*G*TGCA TCGATGCA GG*G*G*G*G(配列番号1)xxxxxm
U*mC*mA*mC*mA*mA*mG*mU*mU*mA*mG*mG*mG*mU
*mC*mU*mC*mA*mG*mG*mG*mA(配列番号34)3'；及び

CpG-抗miR146a：

5' G*G*TGCA TCGATGCA GG*G*G*G*G(配列番号1)xxxxxm
C*mC*mC*mA*mU*mG*mG*mA*mA*mU*mU*mC*mA*mG
*mU*mU*mC*mU*mC*mA(配列番号36)3'であり、

式中、*は、ホスホロチオエート結合を示し、mNは、2'OMe修飾ヌクレオチドを示し、xは、本明細書に記載されるリンカーを示す。

40

CpG-抗miRNAをCy3標識して、フローサイトメトリーを用いて、標的細胞による細胞内取り込みを検出した。ヒト免疫細胞を、指示した濃度のCpG-抗miR146a、CpG-抗miR155またはCpG-抗miR125bとインキュベートして、これらの化合物の取り込みを細胞中で観察した(図16A~16B、17A~17F、18A~18F、19A~19H)。これらの化合物の処置は、ヒト及びマウス骨髄性細胞中の対応するmiR発現を低減した(図17A~17F、18A~18F、19A~19H)。

【0272】

CpG、GpC及びPSと抱合されたmiR126阻害剤によるmiR126の効果的な

50

ノックダウンならびにK562及びMV4-11細胞中のmiR126-ミミックによる効果的な過剰発現。K562及びMV4-11細胞を、CpG、GpC及びPSと抱合されたmiR126阻害剤(図26A~26B)またはmiR126-ミミック(615、616及び617)(図26C~26D)(500nM)で24時間処置し、これらの細胞中のmiR126の発現を測定した。我々は、ここで、CpGモチーフが、ODN配列の標的化において省かれ得ることを示した。GpC及び相補的PS修飾オリゴもまた、miR126のブロックに成功した。miR126-ミミック、特にGM617とのインキュベーションは、K562及びMV4-11細胞中のmiR126の発現を著しく増加させた。細胞中のmiR126の低減において非常に有効であるCpG-miR126阻害剤と同様に、我々はまた、miR126-ミミックを設計し、これらも、いかなる形質導入試薬を使用することなく、細胞中のmiR126レベルの増加において非常に有効である。

10

【0273】

実施例9：CpG-抗miRNAの下流標的に及ぼす効果

【0274】

CpG-抗miRは、miR155、miR125b、及びmiR146aの下流標的を調節する(図20A~C)。マウスRAW264.7またはヒトMV4-11細胞を、250nMもしくは500nMのCpG-抗miR155、CpG-抗miR125b、またはCpG-抗miR146b、あるいは500nMのCpG-スクランブルでインキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集し、電気泳動して、SHIP1(miR155標的)(図20A)、IRF4(miR125b標的)(図20B)、またはIRAK1(miR146a標的)(図20C)に対する抗体によって、イムノプロットした。バンド強度を-アクチンに対して正規化し、定量化した。対照タンパク質レベルに対する誘導倍率を以下のプロットに示している(図20)。MV4-11細胞を500nMのCpG-抗miR155、CpG-抗miR125b、CpG-抗miR146b、またはCpG-スクランブルで24時間インキュベートし、次いで細胞溶解物を採集し、電気泳動して、イムノプロットして、アポトーシスの誘導を示唆する活性化カスパゼ3を検出した。SHIP1及びIRAK1は、CpG-抗miRの処置後に、両方ともアップレギュレートされる。

20

【0275】

実施例10：CpG-抗miR及びGpC-抗miRの阻害効果の比較

【0276】

CpG-抗miR155、GpC-抗miR155、CpG-抗miR146a、及びGpC-抗miR146aの処置は、RAW264.7(図21A、21C)及びA20細胞(図21B、21D)中のmiR155またはmiR146aの発現を低減する。細胞を100nMのCpG-抗miRまたはGpC-抗miRで18時間インキュベートした。図21E~21H)では、CpG-抗miR及びGpC-抗miR処置は、miR155及びmiR146aの下流標的を調節する。RAW264.7(図21E、21G)またはA20細胞(図21F、21H)を、500nMのCpG-抗miR155、GpC-抗miR155、またはCpG-抗miR146a、GpC-抗miR146aで48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集して、SHIP1(miR155標的)またはIRAK1(miR146a標的)に対する抗体を用いてイムノプロットした。これらの結果は、両CpG及びGpC核酸配列が、本明細書に記載される化合物中で有効であることを裏付けている。

40

【0277】

実施例11：CpG-miR146a-ミミックは、LPS誘導炎症シグナル伝達を弱める。

【0278】

CpG-miR146a-ミミックは、培養されたCMM白血病細胞(図22A)及びA20リンパ腫細胞(図22B)中のmiR-146aの発現を増加させる。細胞を100

50

nMのCpG-miR146a-ミミックと18時間インキュベートした。図22C)では、CpG-miR146a-ミミックは、miR146aの下流標的であるIRAK1の発現を阻害する。A20細胞を、500nMのCpG-miR146a-ミミックまたはLPS(陽性対照として使用)で48時間インキュベートし、次いで、細胞溶解物を採集して、IRAK1特異的抗体を用いてイムノプロットした。図22D~22E)では、NF-KB応答性レポーター遺伝子を発現するRAW-Blue細胞を、500nMのCpG-miR146a-ミミックで24時間処置し、次いで、1pg/mlのLPSでさらに24時間処置した。培養培地を採集し、Quantibluアッセイキットを用いて、NF-KB活性について(図22D)、ELISAを用いて培地中のIL-6レベルについて(図22E)分析した。

10

【0279】

実施例12: CpG-miR127阻害剤の有効なインピトク及びインピボ取り込みならびに遺伝子サイレンシング効果

【0280】

CpG-miR126阻害剤-Cy3、Ab-NPもしくはTF-NP含有miR-126阻害剤-Cy3、または裸のmiR-126阻害剤-Cy3のK562細胞中の添加から4時間後(図23A)及び24時間後(図23B)において、取り込み試験をフローサイトメトリー分析によって測定した。実験を2回繰り返した。K562中のmiR126の発現を、24時間目に、Q-RT-PCRにより測定した(n=3)(図23C)。CpG-miR126阻害剤-Cy3(500nM)の添加から4時間後に、HVEC(図23D)、ヒト正常細胞(図23E)及びCML(図23F)CD34+CD38-細胞における取り込みを、フローサイトメトリーにより測定した。CpG-miR126阻害剤(500nM)で24時間処置された、HVEC(図23G)、正常細胞(図23H)、及びCML(図23I)CD34+CD38-細胞中のmiR126の発現を示す(n=4)。EDU染色による、CpG-miR126阻害剤(500nM)で処置された、正常細胞(図23J)及びCML(図23K)CD34+CD38-細胞における2つの細胞周期実験のうちの1つを示している。

20

【0281】

ネズミCML BM、LTHSC及びEC細胞を、CpG-miR126阻害剤-Cy3(500nM)で4時間処置し、次いで、Cy3+細胞を、フローサイトメトリーにより検出した(図25A)。細胞をまた24時間目に採集し、miR126発現を、Q-RT-PCRにより決定した(図25B)。CpG-miR126阻害剤のCML BM LTHSC中への添加から72時間後に、細胞周期を、EDU染色によって測定した。2つの代表的なプロットのうちの1つを、(図25C)に示している。CMLマウスを、CpG-miR126阻害剤-Cy3で、1つの用量(5mg/kg、静脈内注射)で処置し、BM、LTHSC及びEC中のCy3取り込みを、処置から16時間後にフローサイトメトリーにより測定した(図25D)。正常及びCMLマウスもまた、CpG-miR126阻害剤(5mg/kg/日、静脈内、毎日)で3日間処置し、大腿からBM、LTHSC及びECを選別して、miR126の発現をQ-RT-PCRによって決定した(図25E~25F)。野生型B6マウスを、CpG-scrRNA(scrRNA)またはCpG-miR126阻害剤(阻害剤)(5mg/kg/日、静脈内注射)で3週間処置し、BM細胞を採集して、分析した。赤血球(RBC、図25G)、WBC(図25H)、PLT(図25I)、BM単核細胞(図25J)、LTHSC(図25K)及びEC(図25L)の数を示している。処置された正常マウスからのBM細胞(CD45.2)を、CD45.1類遺伝子系統レシピエントマウスに移植し、16週目での血液中(図25M)及びBMならびに脾臓のドナー細胞生着(図25N)及び16週目でのBM中のドナーLTHSCの数(図25O)を監視した。示した結果は、平均値±SEMで表している。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001である。略語: EC(内皮細胞); PLT(血小板)である。

30

40

【0282】

50

実施例 13 : 本明細書に記載される化合物及び別の治療薬との組み合わせ

【0283】

CpG-miR126阻害剤によるmiR126のノックダウンは、インビボでのNILとの組み合わせにおいてマウスのCML LSKの排除を増強させる。SL-tTA/BCR-ABLマウスからのBM細胞(CD45.2)を、類遺伝子系統B6マウス中に移植し(CD45.1, n=40)、CML様疾患を有するマウスのコホ-トを生成した。移植から4週間後に、CML発症を確認した後、マウスを無作為に4つの群に分け(それぞれn=10)、CpG-miR126阻害剤(5mg/kg、静脈内、1週間に4回)、CpG-scrRNA(5mg/kg、静脈内、1週間に4回)、CG-miR126阻害剤に加えてNIL(50mg/kg、強制飼養による)、及びCpG-scrRNAに加えてNILで3週間処置した。3週間の処置後に、末梢血(PB)(図24A)、脾臓(図24B)、及び骨髓(BM)(図24C)中のドナーCML細胞の百分率、脾臓(図24D)及びBM(図24E)中のドナーCML LSKの数、脾臓(図24F)及びBM(図24G)中のドナーCMLの長期造血幹細胞(LTHSC)の数を測定した。マウスの別のコホ-トを3週間処置し、次いで、処置の3週間後に生存研究を追った(各群においてn=10)(図24H)。処置された白血病マウス(3週目)からのBM細胞(CD45.2)をプールし、 4×10^6 、 2×10^6 、 1×10^6 、及び 5×10^5 細胞/マウスを、900cGyで照射した二次類遺伝子系統CD45.1レシピエントマウスに移植した(n=6マウス/用量/状態 \times 4用量 \times 4状態=96マウス)。レシピエントマウスを、血液中のCML細胞生着及び白血病の発症について、WBC数によって16週間監視した。LICの頻度を、L-Calソフトウェアを用いて定量化した(図24I)。略語: NIL(ニロチニブ); PB(末梢血); BM(骨髓); LTHSC(長期造血幹細胞); LIC(白血病開始細胞); LSK(分化抗原: Sca-1+c-kit+細胞)である。

10

20

【0284】

他の実施形態

本開示が、その詳細な説明と併せて説明されてきたが、前述の説明は例示を意図しており、本開示の範囲を限定することを意図するものではなく、本開示の範囲は、添付の特許請求項の範囲によって規定されている。他の態様、利点、及び修正は、以下の請求項の範囲内である。

30

【0285】

本明細書に開示される実施形態は、以下の実施形態P1~P51を含む。

【0286】

実施形態P1. 抗マイクロRNA(抗miR)配列に抱合されたホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)を含む単離化合物。

【0287】

実施形態P2. 該抗miR配列が、抗miR126、抗miR142、抗miR155、抗miR9、抗miR10b、抗miR21、抗miR17、または抗miR92核酸配列である、実施形態P1に記載の化合物。

【0288】

実施形態P3. マイクロRNA(miRNA)擬態核酸配列(miRNA-ミミック)に抱合されたホスホロチオエート化オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)を含む単離化合物。

40

【0289】

実施形態P4. 該擬態核酸配列が、miR126-ミミック、miR142-ミミック、miR155-ミミック、miR9-ミミック、miR10b-ミミック、miR21-ミミック、miR17-ミミック、またはmiR92-ミミック核酸配列である、実施形態P3に記載の化合物。

【0290】

実施形態P5. ODNと、それぞれ抗miRもしくはmiRNA-ミミック配列との間に

50

1つ以上のリンカーをさらに含む、実施形態 P 1 または実施形態 P 3 のいずれかに記載の化合物。

【0291】

実施形態 P 6 . リンカーが、置換もしくは非置換のアルキレンまたはヘテロアルキレンリンカーを含む、実施形態 P 5 に記載の化合物。

【0292】

実施形態 P 7 . 置換アルキレンまたはヘテロアルキレンリンカーが、アジド基、保護アミノ基、N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 基、及び保護スルフヒドリル基からなる群から選択される部分を含む、実施形態 P 6 に記載の化合物。

【0293】

実施形態 P 8 . 保護スルフヒドリル基を含む置換アルキレンまたはヘテロアルキレンリンカーが、ジビニルスルホン誘導体、アクリロイル誘導体、及びマレイミド誘導体からなる群から選択される部分に抱合されている、実施形態 P 7 に記載の化合物。

【0294】

実施形態 P 9 . アクリロイル誘導体が、塩化アクリロイルである、実施形態 P 8 に記載の化合物。

【0295】

実施形態 P 10 . 置換アルキレンまたはヘテロアルキレンリンカーが、ポリエチレングリコール (PEG) またはビスホスホネート部分に抱合されている、実施形態 P 6 に記載の化合物。

【0296】

実施形態 P 11 . アルキレンまたはヘテロアルキレンリンカーが、非置換の C 3 ヘテロアルキレンを含む、実施形態 P 6 に記載の化合物。

【0297】

実施形態 P 12 . アルキレンまたはヘテロアルキレンリンカーが、非置換の C 6 ~ C 12 ヘテロアルキレンを含む、実施形態 P 6 に記載の化合物。

【0298】

実施形態 P 13 . リンカーが、置換もしくは非置換のアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換のシクロアルキレン、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換のアリーレン、または置換もしくは非置換のヘテロアリーレンである、実施形態 P 5 に記載の化合物。

【0299】

実施形態 P 14 . リンカーが、置換もしくは非置換の C 1 ~ C 40 アルキレン、置換もしくは非置換の 2 ~ 40 員のヘテロアルキレン、置換もしくは非置換の C 3 ~ C 8 シクロアルキレン、置換もしくは非置換の 3 ~ 8 員のヘテロシクロアルキレン、置換もしくは非置換の C 6 ~ C 10 アリーレン、または置換もしくは非置換の 5 ~ 10 員のヘテロアリーレンである、実施形態 P 5 に記載の化合物。

【0300】

実施形態 P 15 . リンカーが、非置換の C 1 ~ C 40 アルキレン、非置換の 2 ~ 40 員のヘテロアルキレン、非置換の C 3 ~ C 8 シクロアルキレン、非置換の 3 ~ 8 員のヘテロシクロアルキレン、非置換の C 6 ~ C 10 アリーレン、または非置換の 5 ~ 10 員のヘテロアリーレンである、実施形態 P 5 に記載の化合物。

【0301】

実施形態 P 16 . リンカーが、置換 2 ~ 40 員のヘテロアルキレンである、実施形態 P 5 に記載の化合物。

【0302】

実施形態 P 17 . 該抗 mi R もしくは mi RNA - ミミック配列が、それぞれ、化学的に修飾されている、実施形態 P 1 または実施形態 P 3 のいずれかに記載の化合物。

【0303】

実施形態 P 18 . 該抗 mi R もしくは mi RNA - ミミック配列が、それぞれ、2' O - メ

10

20

30

40

50

チル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、ユニバーサル塩基、5-C-メチル、逆位デオキシ脱塩基残基結合、及びロックド核酸からなる群から選択される化学修飾を含む、実施形態P17に記載の化合物。

【0304】

実施形態P19. 該修飾が、該抗miRもしくはmiRNA-ミミック配列の末端核酸塩基に、それぞれ位置している、実施形態18に記載の化合物。

【0305】

実施形態P20. 修飾が、該抗miRもしくはmiRNA-ミミック配列の末端核酸塩基には、それぞれ位置していない、実施形態P18に記載の化合物。

【0306】

実施形態P21. 該修飾が、血清由来のヌクレアーゼに対して保護する、実施形態P18に記載の化合物。

【0307】

実施形態P22. 該ODN配列が、クラスACpG-ODN核酸配列、クラスBCpG-ODN核酸配列、及びクラスCCpG-ODN核酸配列からなる群から選択される、CpG-ODN核酸配列を含む、実施形態P1に記載の化合物。

【0308】

実施形態P23. 該ODNが、ホスホジエステル誘導体結合を含む、実施形態P1またはP3に記載の化合物。

【0309】

実施形態P24. 該CpG核酸配列中の該ホスホジエステル誘導体結合が、ホスホロアミデート結合、ホスホロジアミデート結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホノカルボン酸結合、ホスホノカルボキシレート結合、ホスホノ酢酸結合、ホスホノギ酸結合、メチルホスホネート結合、ホウ素ホスホネート結合、及びO-メチルホスホロアミダイト結合からなる群から選択される、実施形態P23に記載の化合物。

【0310】

実施形態P25. 薬学的に許容される賦形剤と、実施形態P1または実施形態P3のいずれかに記載の化合物とを含む医薬組成物。

【0311】

実施形態P26. 第2の治療薬をさらに含む、実施形態P25に記載の医薬組成物。

【0312】

実施形態P27. 第2の治療薬が、抗腫瘍もしくは抗癌剤、細胞傷害性薬剤、細胞増殖抑制剤、抗炎症剤、鎮痛剤、抗感染症薬、増殖阻害剤、免疫原性薬剤、免疫調節剤、及びケモカインからなる群から選択される、実施形態P26に記載の医薬組成物。

【0313】

実施形態P28. 該抗癌剤が、細胞死促進剤である、実施形態P27に記載の医薬組成物。

【0314】

実施形態P29. 該第2の治療薬が、アクチノマイシンD/ダクチノマイシン、プレオマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ドキシソルピシン(ペグ化リポソーム)、エピルピシン、イダルピシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、エトポシド、ドセタキセル、イリノテカン、パクリタキセル、トポテカン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピノレルピン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、アレムツザマブ(Alemtuzumab)、BCG、ベバシズマブ、セツキシマブ、デノスマブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、インターフェロン、イピリムマブ、ラパチニブ、モノメチルオリストチンE(MMEA)、メルタンシン(DM1)、リツキシマブ、スニチニブ、ソラフェニブ、テムシロリムス、及びトラスツズマブ、またはこれらの任意の組み合わせ(複数可)からなる群から選択される、実施形態P27に記載の医薬組成物。

【0315】

実施形態P30. がんの治療を、それを必要とする対象に施す方法であって、本方法が、実施形態P1もしくは実施形態P3のいずれかに記載の化合物または実施形態P25に記

10

20

30

40

50

載の医薬組成物の有効量を、該対象に投与することを含む、方法。

【0316】

実施形態 P 3 1 . 実施形態 P 1 もしくは実施形態 P 3 のいずれかに記載の化合物、または実施形態 P 2 5 に記載の医薬組成物が、それぞれ抗 m i R 1 2 6 配列または m i R 1 4 2 - ミミックを含む、実施形態 P 3 0 に記載の方法。

【0317】

実施形態 P 3 2 . がんが、造血細胞癌である、実施形態 P 3 0 に記載の方法。

【0318】

実施形態 P 3 3 . がんが、造血細胞癌ではない、実施形態 P 3 0 に記載の方法。

【0319】

実施形態 P 3 4 . がんが、骨髄腫または急性骨髄性白血病である、実施形態 P 3 0 に記載の方法。

【0320】

実施形態 P 3 5 . がんが、前立腺癌、乳癌、神経膠芽腫、卵巣癌、肺癌、頭頸部癌、食道癌、皮膚癌、悪性黒色腫、脳癌、大腸癌、リンパ腫、もしくは骨髄腫、脾臓癌、慢性骨髄性白血病 (C M L)、または骨髄異形成症候群 (M D S) である、実施形態 P 3 0 に記載の方法。

【0321】

実施形態 P 3 6 . 本化合物または本組成物が、静脈内、非経口、皮下、筋肉内、経皮、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、経口、または局所投与によって、対象に投与される、実施形態 P 3 0 ~ P 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【0322】

実施形態 P 3 7 . 該治療が、該化合物もしくは組成物の用量に依存性である、実施形態 P 3 0 ~ P 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【0323】

実施形態 P 3 8 . 該化合物の約 0 . 0 0 1 m g / k g ~ 約 1 0 0 m g / k g が、該対象に投与される、実施形態 P 3 0 ~ P 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【0324】

実施形態 P 3 9 . 該がんが、化学療法後の再発がんである、実施形態 P 3 0 ~ P 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【0325】

実施形態 P 4 0 . 再発がんが、化学療法耐性である、実施形態 P 3 9 に記載の方法。

【0326】

実施形態 P 4 1 . 該化合物または該組成物が、がん幹細胞の細胞周期開始を促進し、これによって前記がんを治療する、実施形態 P 3 0 ~ P 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【0327】

実施形態 P 4 2 . 該がん幹細胞が、白血病幹細胞 (L S C) である、実施形態 P 4 1 に記載の方法。

【0328】

実施形態 P 4 3 . 該 L S C が、C D 3 4 + C D 3 8 + 系統決定前駆細胞または未分化 C D 3 4 + C D 3 8 - 前駆細胞である、実施形態 P 4 2 に記載の方法。

【0329】

実施形態 P 4 4 . 細胞中のマイクロ R N A の活性を低下させる方法であって、細胞を実施形態 P 1 に記載の化合物の有効量と接触させることを含む、方法。

【0330】

実施形態 P 4 5 . 該細胞が、がん細胞である、実施形態 P 4 4 に記載の方法。

【0331】

実施形態 P 4 6 . 該細胞が、急性骨髄性リンパ系 (A M L) 細胞、前立腺癌細胞、乳癌細胞、神経膠芽腫細胞、卵巣癌細胞、肺癌細胞、頭頸部癌細胞、食道癌細胞、皮膚癌細胞、悪性黒色腫細胞、脳癌細胞、大腸癌細胞、リンパ腫細胞、骨髄腫細胞、脾臓癌細胞、慢性

10

20

30

40

50

骨髄性白血病（CML）細胞、または骨髄異形成症候群（MDS）細胞である、実施形態 P 4 5 に記載の方法。

【0332】

実施形態 P 4 7 . 該 A M L 細胞が、骨髄からのものである、実施形態 P 4 6 に記載の方法。

【0333】

実施形態 P 4 8 . 該細胞が、インビトロで培養された細胞である、実施形態 P 4 4 ~ P 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【0334】

実施形態 P 4 9 . 該細胞が、宿主中の *i n s i t u* にある、実施形態 P 4 4 ~ P 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

【0335】

実施形態 P 5 0 . 該細胞が、*e x v i v o* で培養された組織内にある、実施形態 P 4 4 ~ P 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【0336】

実施形態 P 5 1 . 該接触させるステップが、ウイルス形質導入を含まない、実施形態 P 4 4 ~ P 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【0337】

実施形態 P 5 2 . 該接触させるステップが、ウイルス形質導入を含まず、前記細胞が、実施形態 P 1 の前記化合物と接触される、実施形態 P 4 4 ~ P 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【0338】

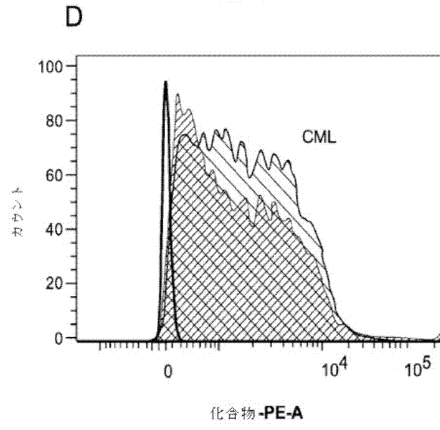
実施形態 P 5 3 . 該細胞が、該化合物の約 1 ~ 1 0 0 ナノモル濃度と接触される、実施形態 P 4 4 ~ P 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

30

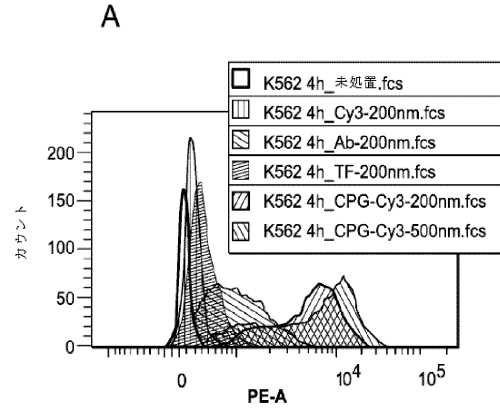
40

50

【図 2 D】

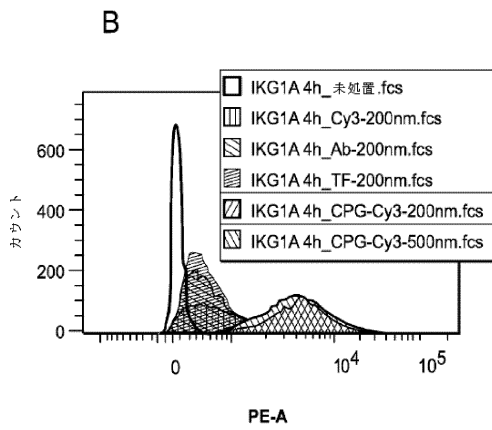


【図 3 A】

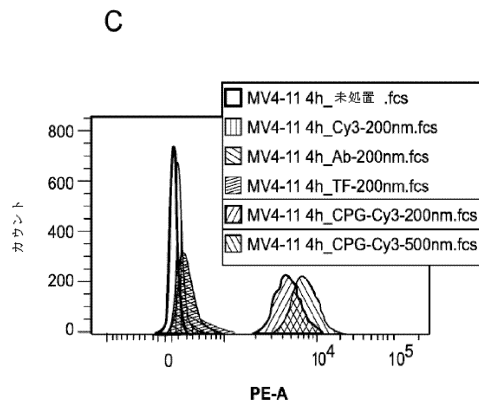


10

【図 3 B】

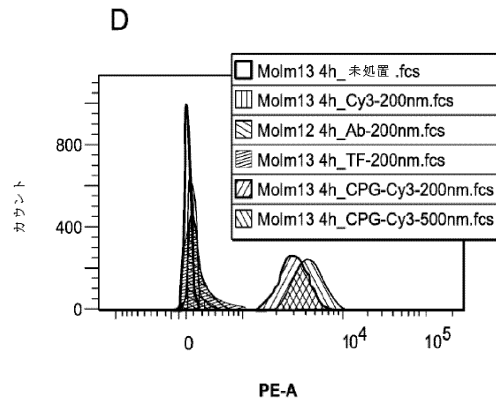


【図 3 C】

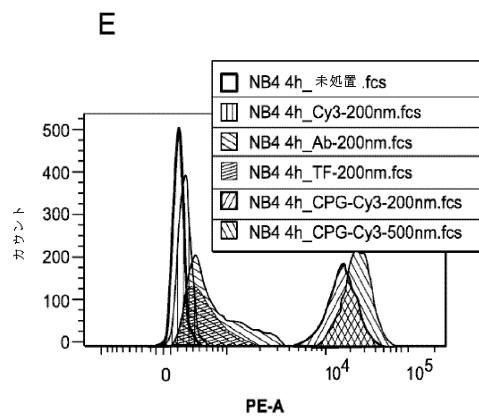


20

【図 3 D】



【図 3 E】

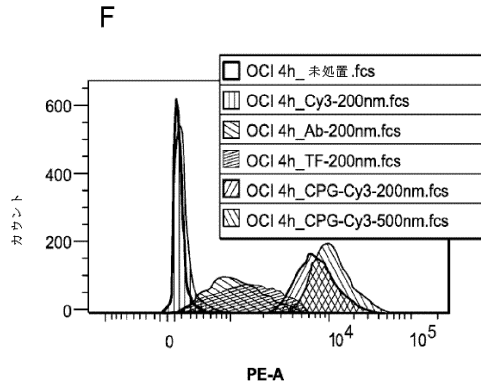


30

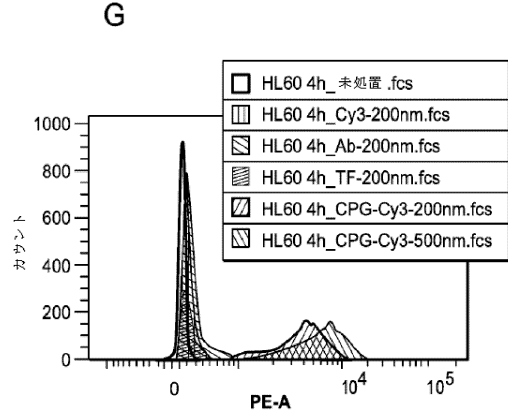
40

50

【 3 F 】

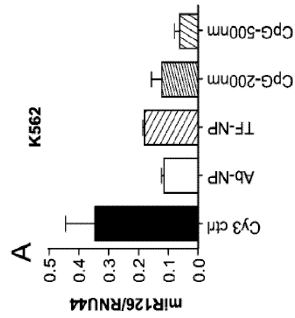


【 3 G 】

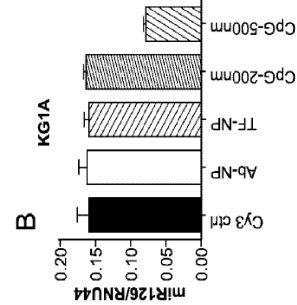


10

【 4 A 】

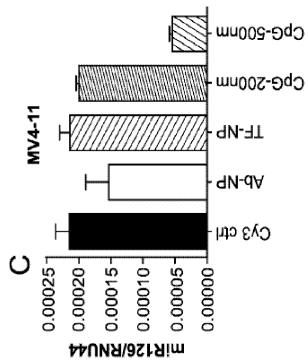


【 4 B 】

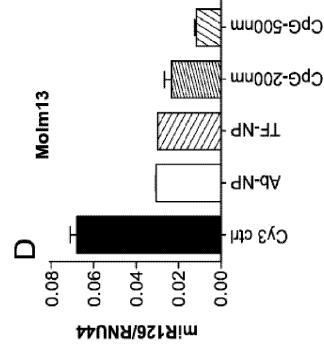


20

【 4 C 】



【 4 D 】

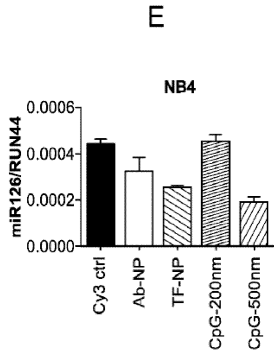


30

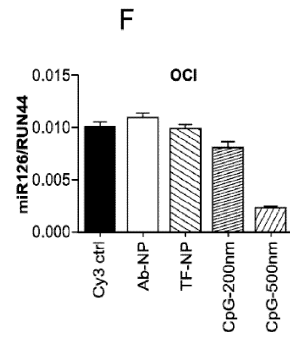
40

50

【 図 4 E 】

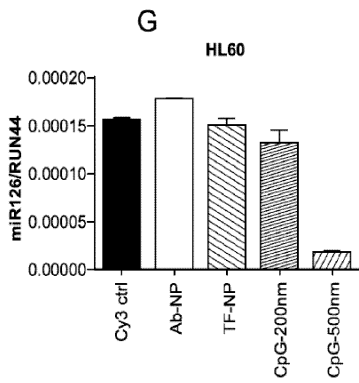


【 図 4 F 】

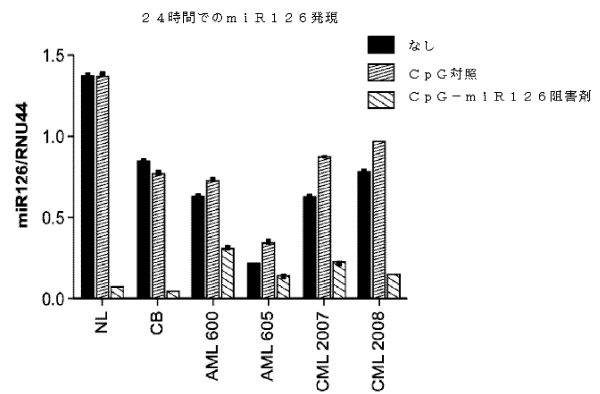


10

【 図 4 G 】

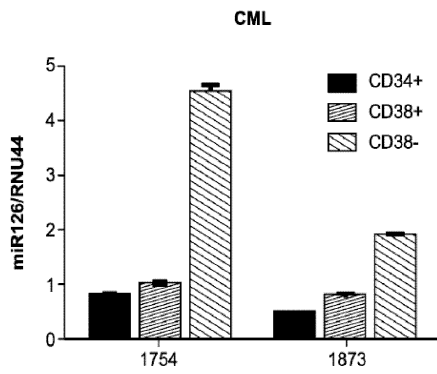


【 図 5 】

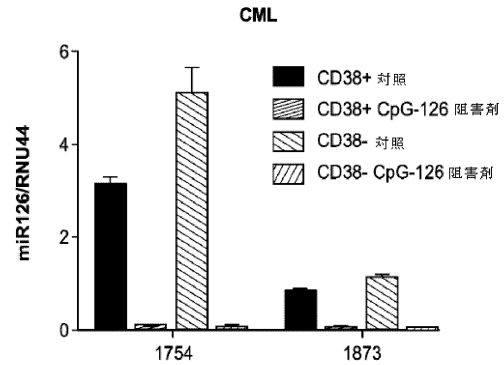


20

【 図 6 】



【 図 7 】

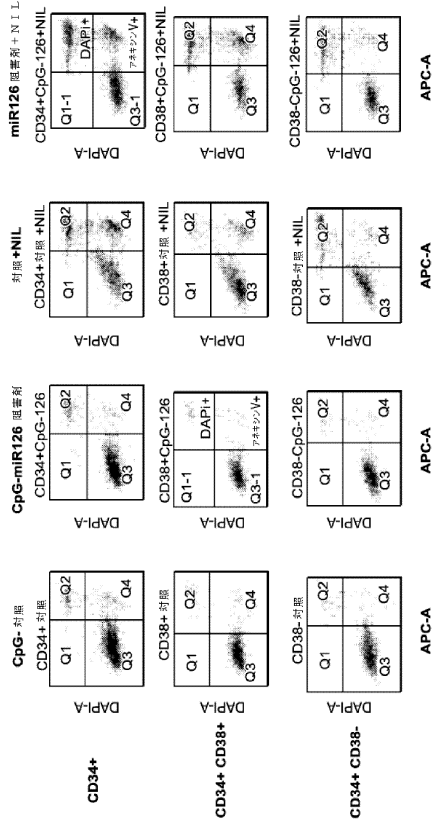


30

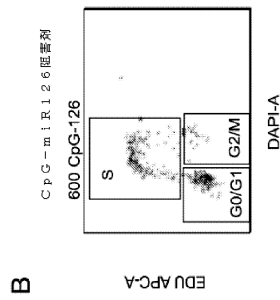
40

50

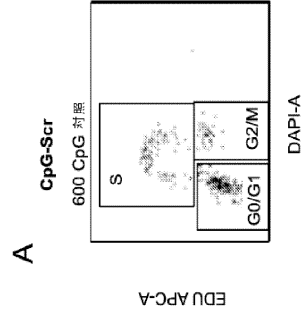
【 図 8 】



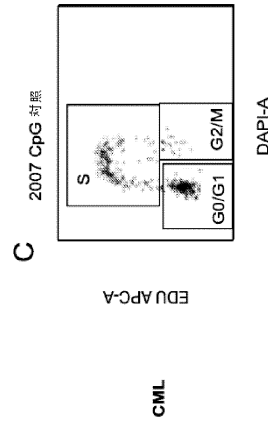
【 図 9 B 】



【 図 9 A 】



【 図 9 C 】



10

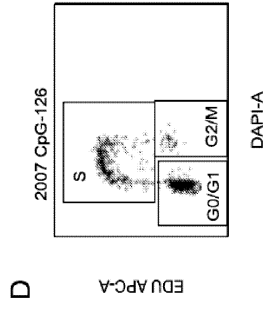
20

30

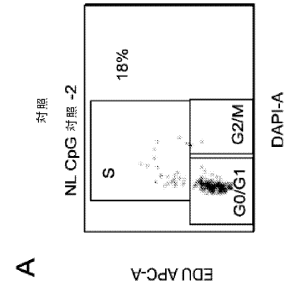
40

50

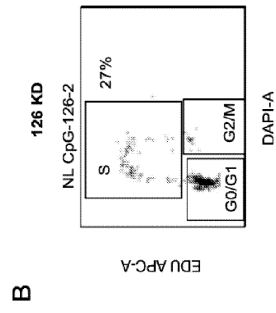
【 9 D 】



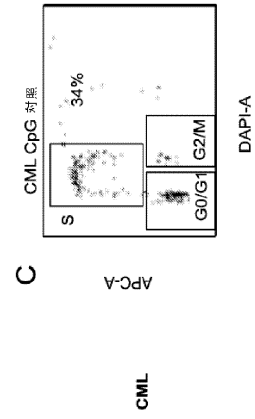
【 1 0 A 】



【 1 0 B 】



【 1 0 C 】



10

正常

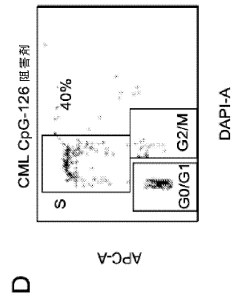
20

30

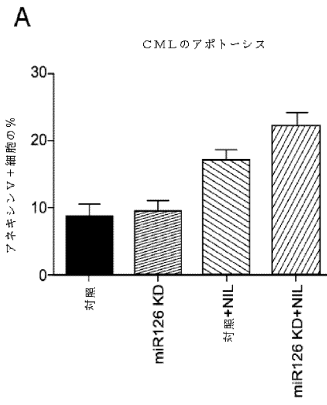
40

50

【図 1 0 D】

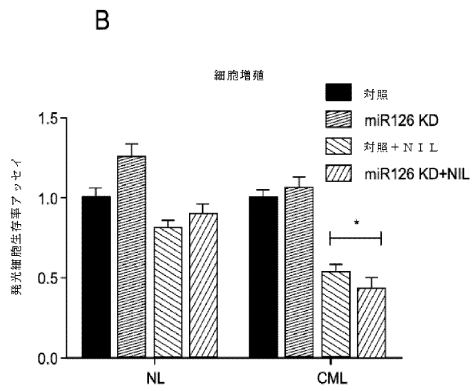


【図 1 1 A】

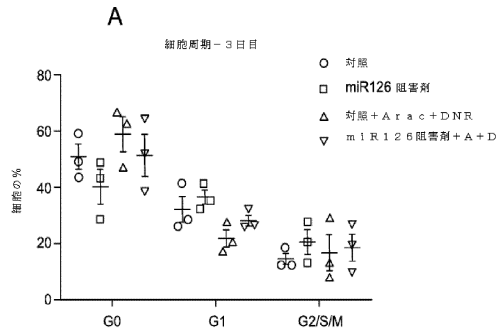


10

【図 1 1 B】



【図 1 2 A】



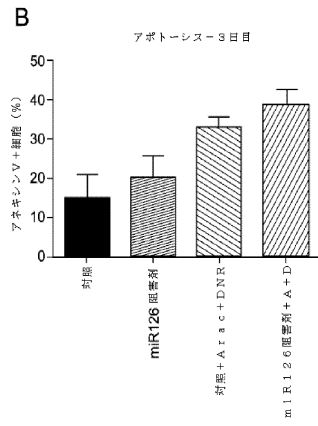
20

30

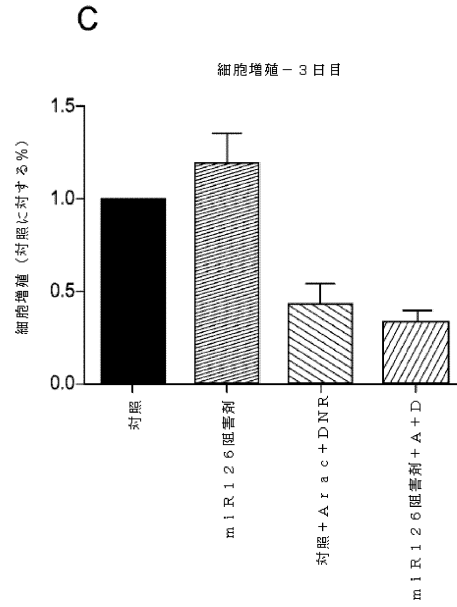
40

50

【図 1 2 B】



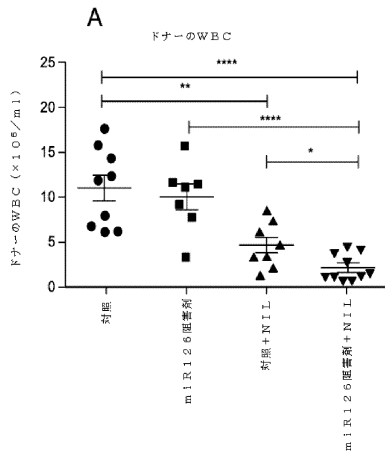
【図 1 2 C】



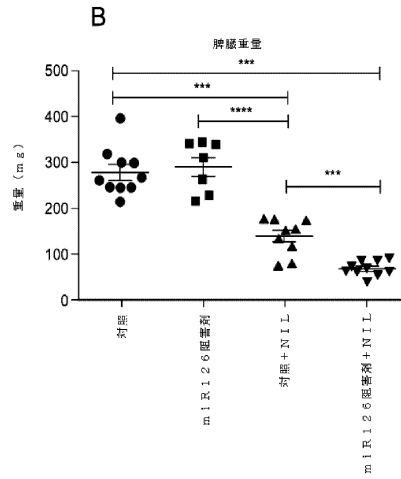
10

20

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】

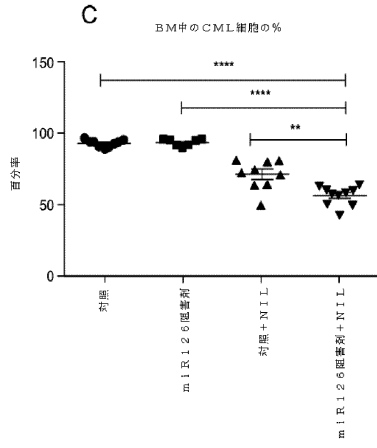


30

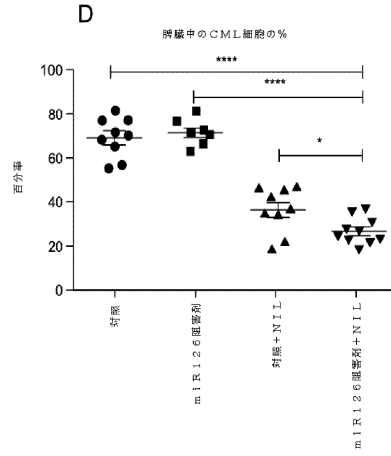
40

50

【図 1 3 C】

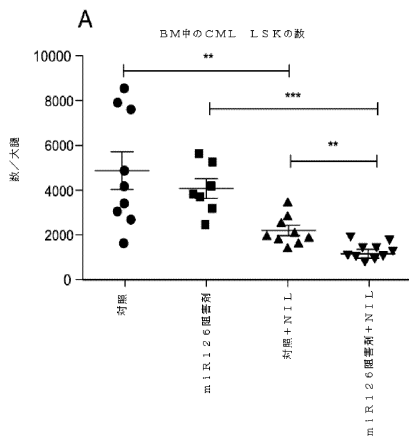


【図 1 3 D】

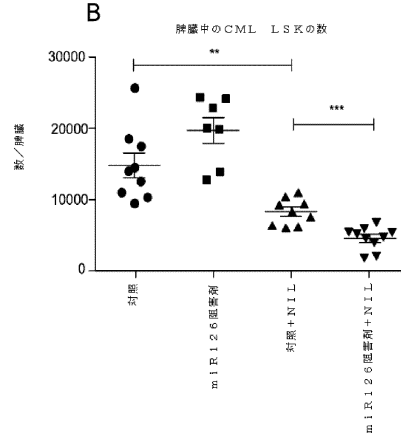


10

【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



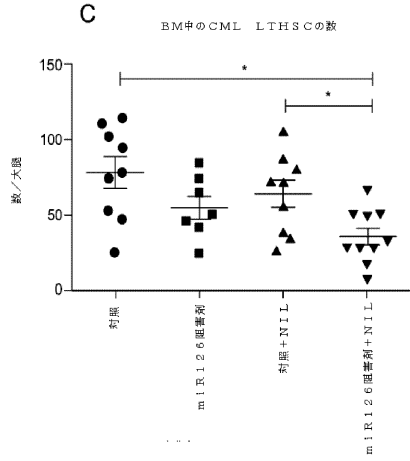
20

30

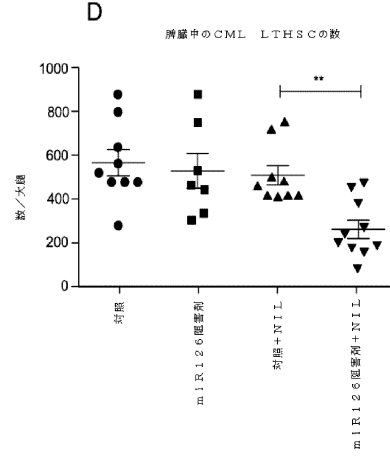
40

50

【図 14 C】

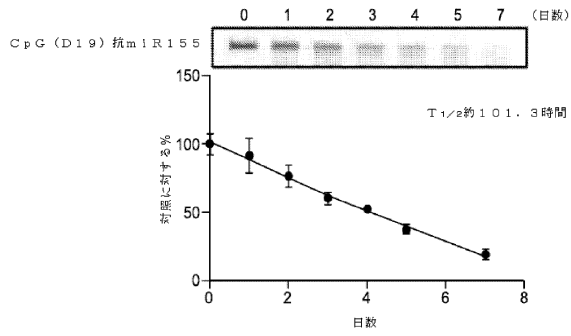


【図 14 D】

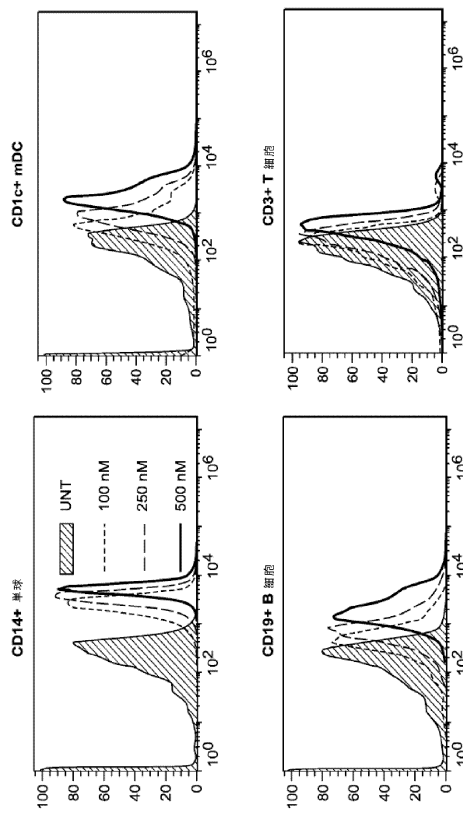


10

【図 15】



【図 16 A】



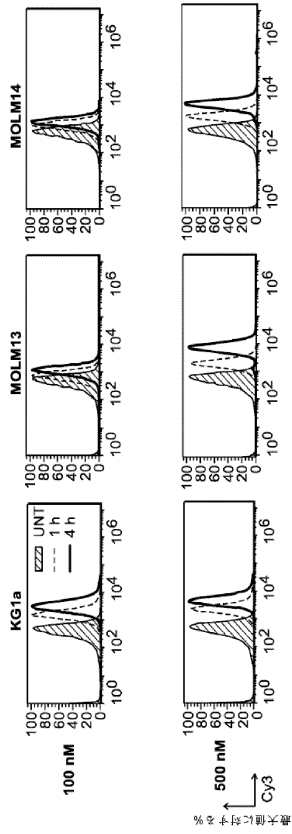
20

30

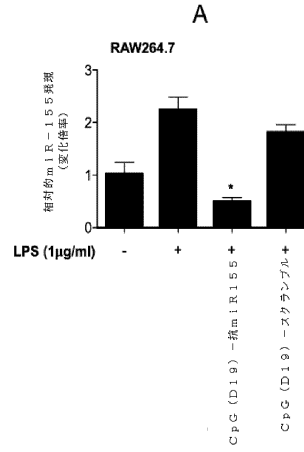
40

50

【図 16 B】



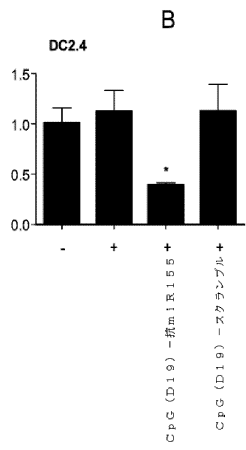
【図 17 A】



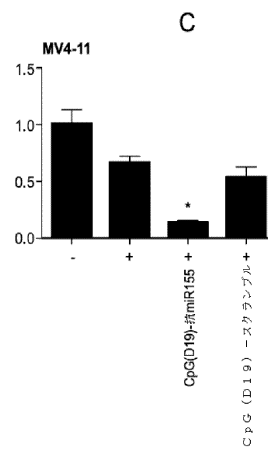
10

20

【図 17 B】



【図 17 C】

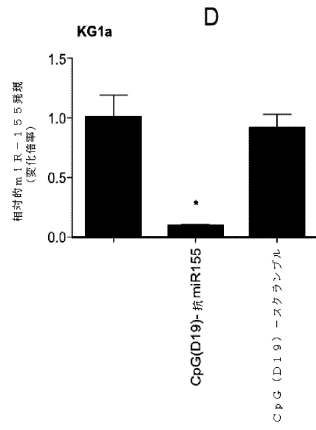


30

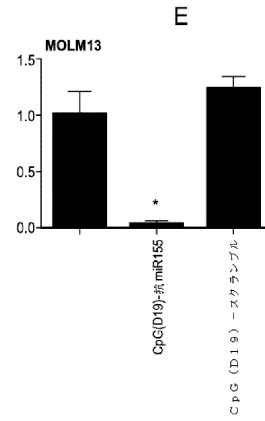
40

50

【 図 17 D 】

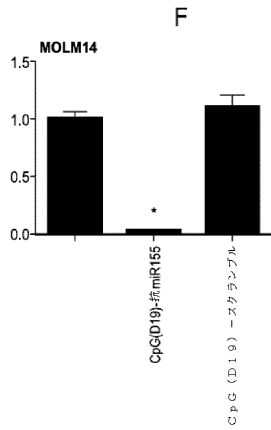


【 図 17 E 】

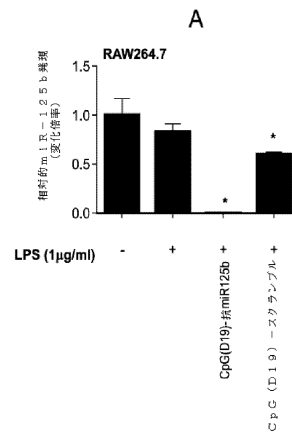


10

【 図 17 F 】



【 図 18 A 】



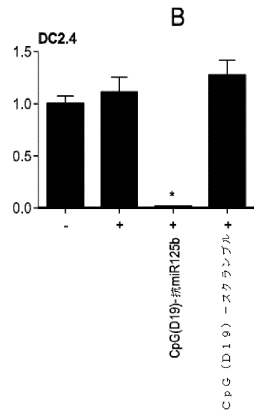
20

30

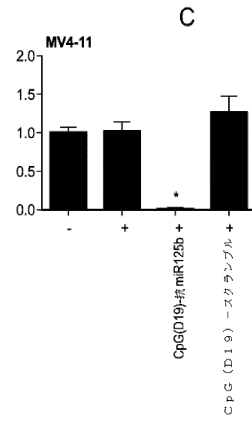
40

50

【 図 1 8 B 】

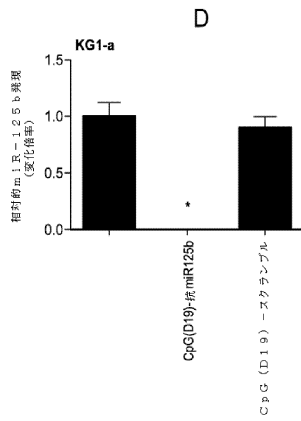


【 図 1 8 C 】

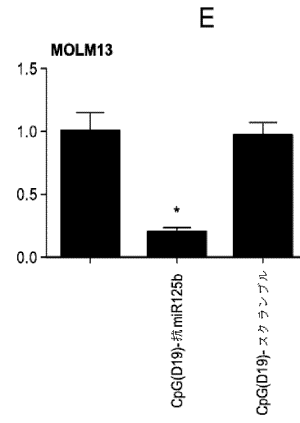


10

【 図 1 8 D 】



【 図 1 8 E 】



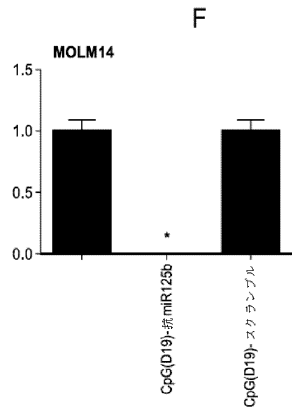
20

30

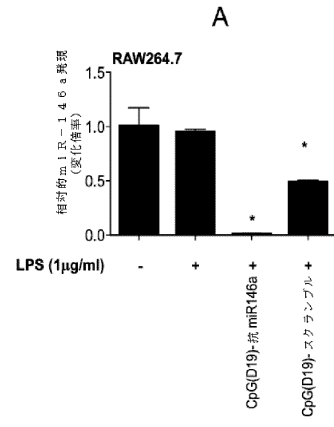
40

50

【 図 18 F 】

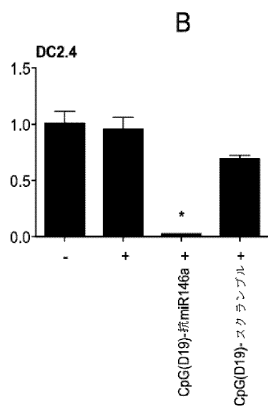


【 図 19 A 】

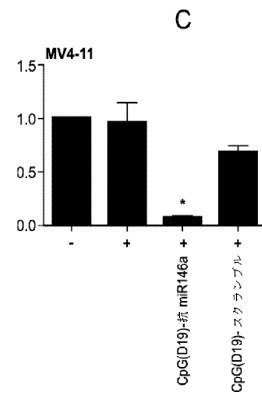


10

【 図 19 B 】

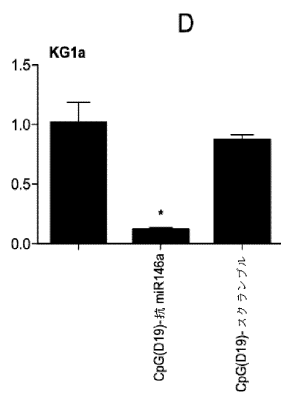


【 図 19 C 】

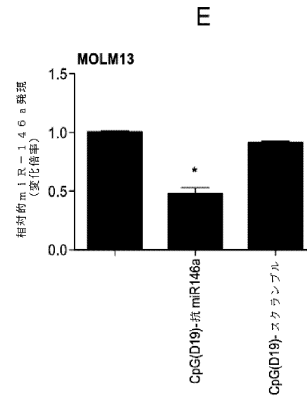


20

【 図 19 D 】



【 図 19 E 】

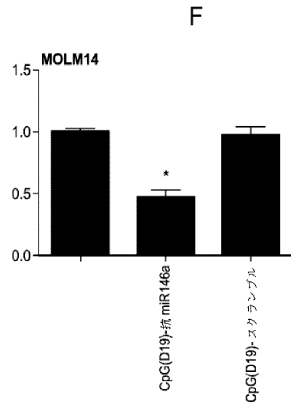


30

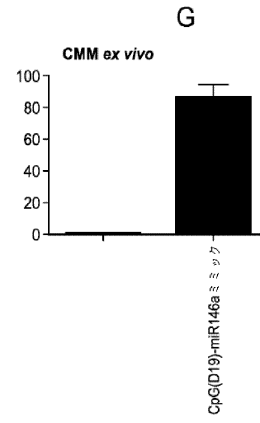
40

50

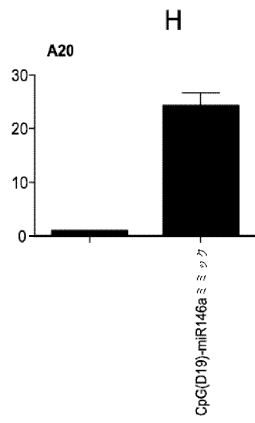
【 図 19 F 】



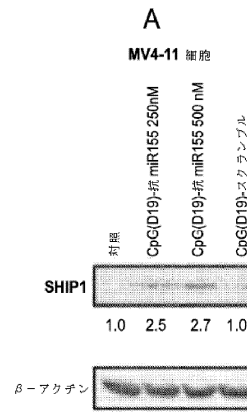
【 図 19 G 】



【 図 19 H 】



【 図 20 A 】



10

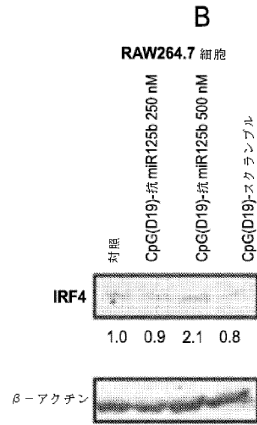
20

30

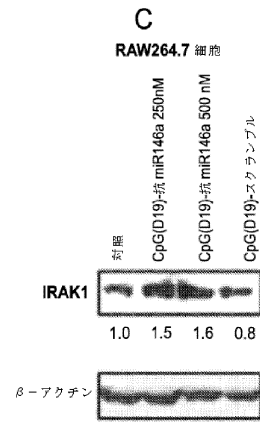
40

50

【図 20 B】

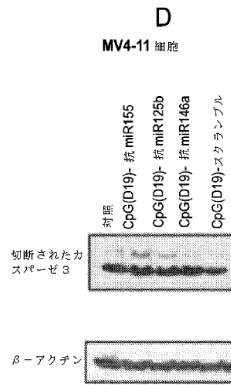


【図 20 C】

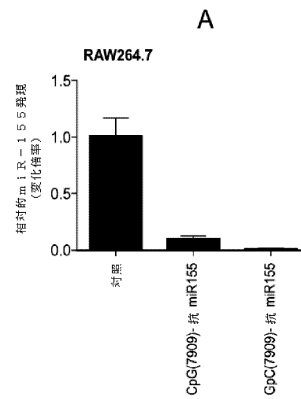


10

【図 20 D】



【図 21 A】



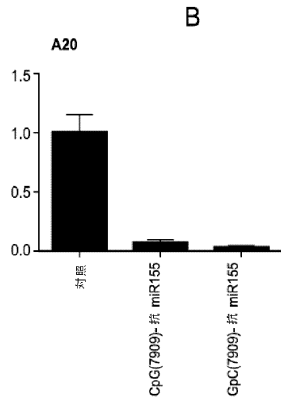
20

30

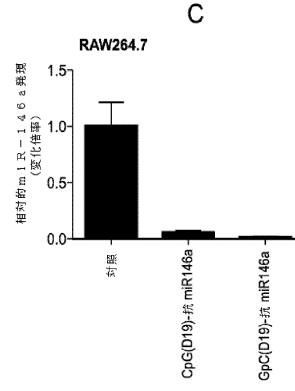
40

50

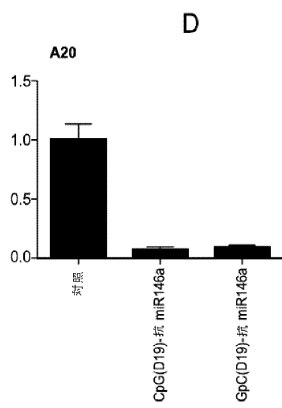
【 図 2 1 B 】



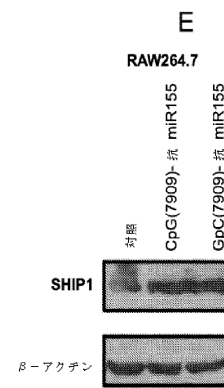
【 図 2 1 C 】



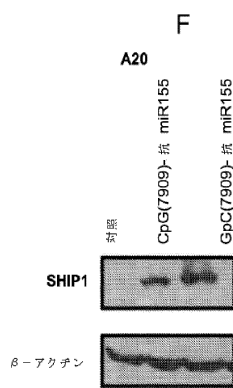
【 図 2 1 D 】



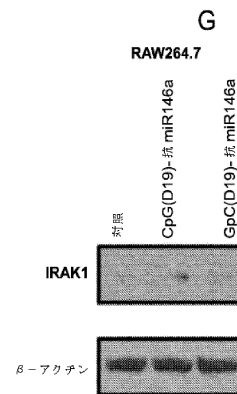
【 図 2 1 E 】



【 図 2 1 F 】



【 図 2 1 G 】



10

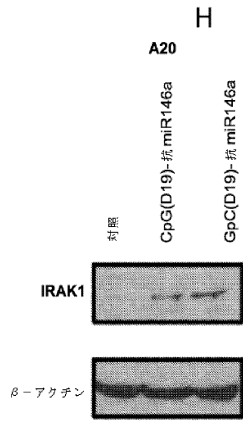
20

30

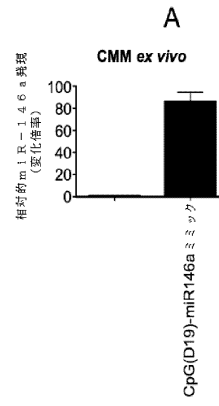
40

50

【図 2 1 H】

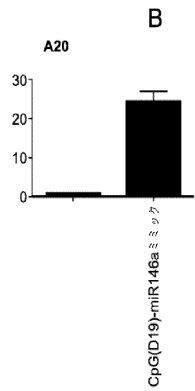


【図 2 2 A】

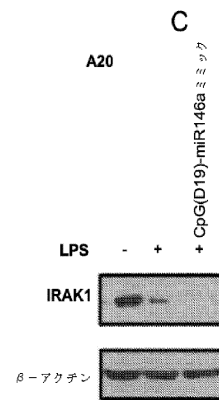


10

【図 2 2 B】



【図 2 2 C】



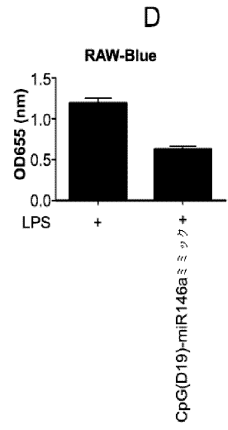
20

30

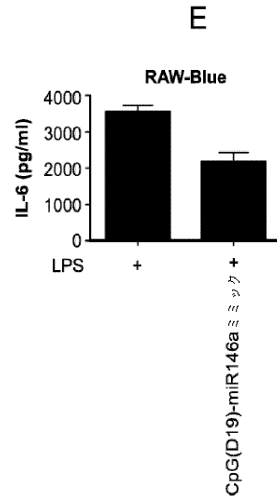
40

50

【 2 2 D】

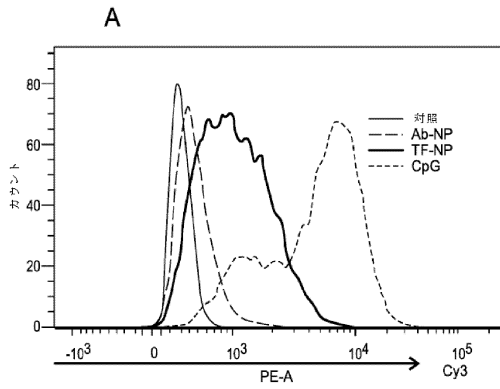


【 2 2 E】

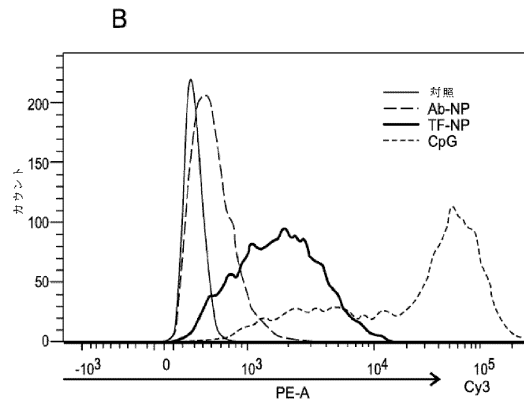


10

【 2 3 A】



【 2 3 B】



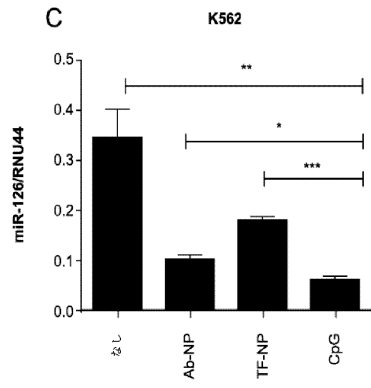
20

30

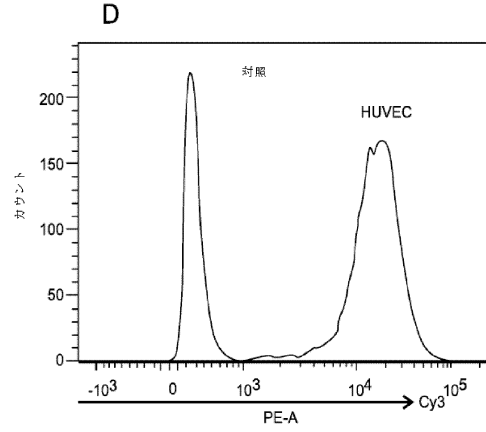
40

50

【図 2 3 C】

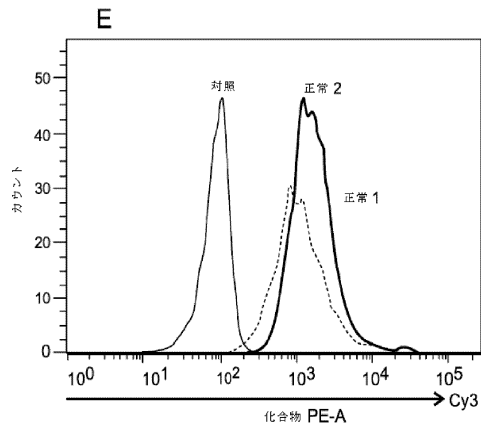


【図 2 3 D】

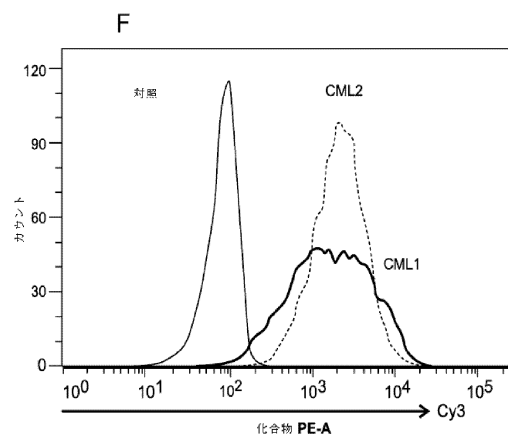


10

【図 2 3 E】



【図 2 3 F】



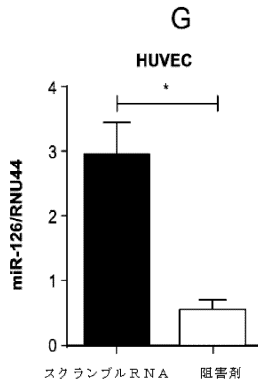
20

30

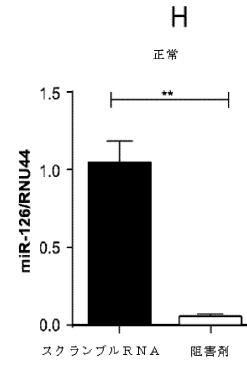
40

50

【 2 3 G 】

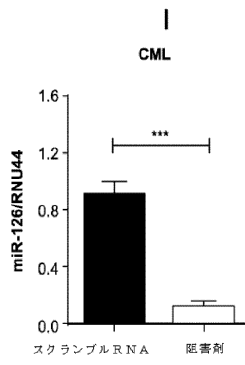


【 2 3 H 】

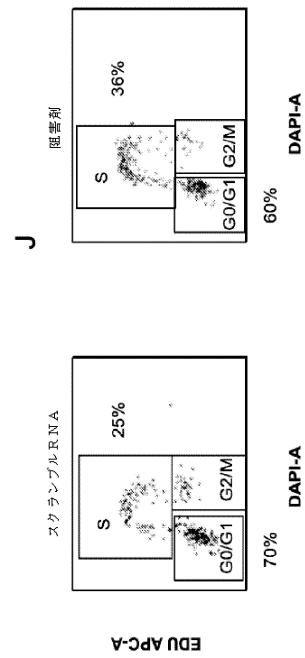


10

【 2 3 I 】



【 2 3 J 】



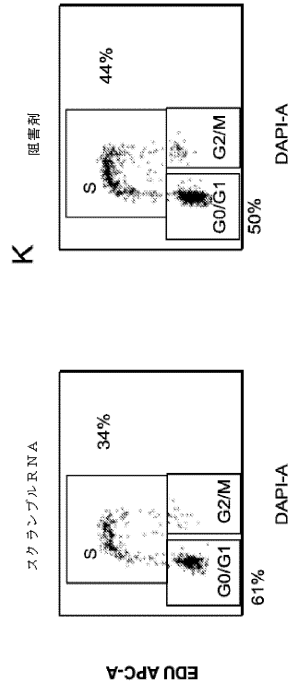
20

30

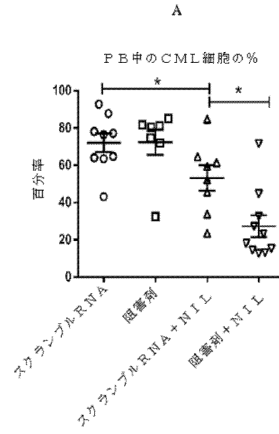
40

50

【 図 2 3 K 】

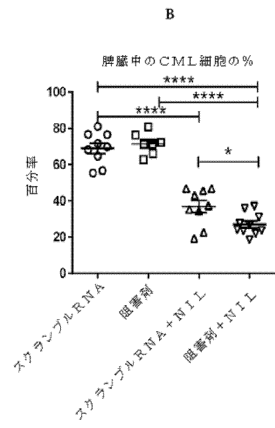


【 図 2 4 A 】

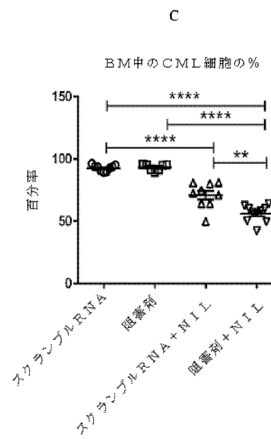


10

【 図 2 4 B 】



【 図 2 4 C 】



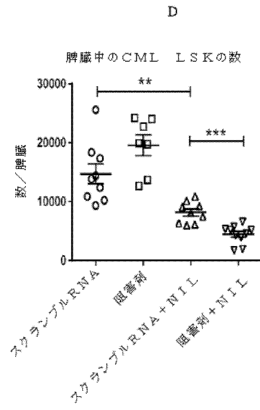
20

30

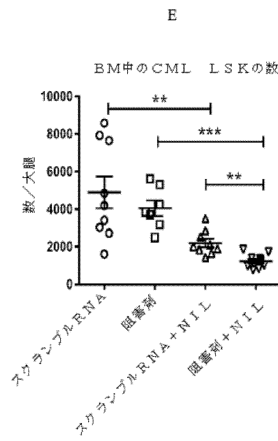
40

50

【図 2 4 D】

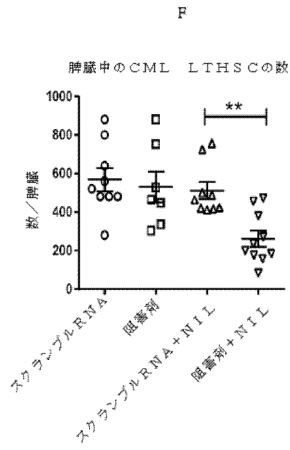


【図 2 4 E】

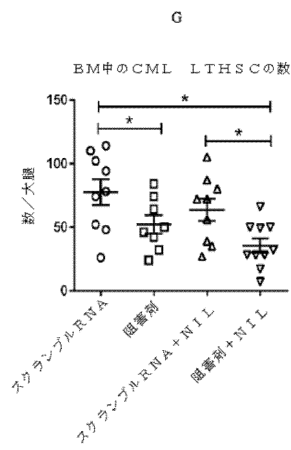


10

【図 2 4 F】



【図 2 4 G】



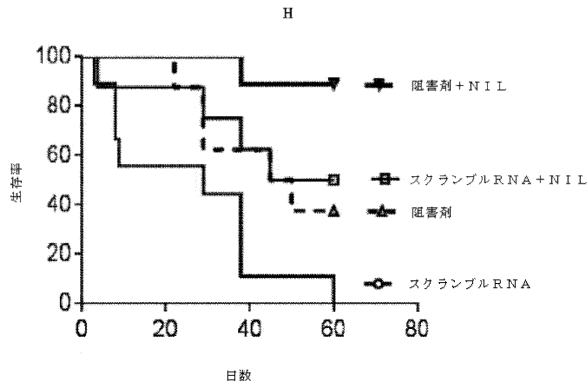
20

30

40

50

【図 2 4 H】



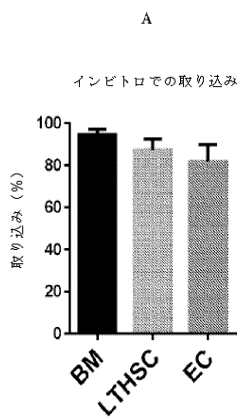
【図 2 4 I】

I

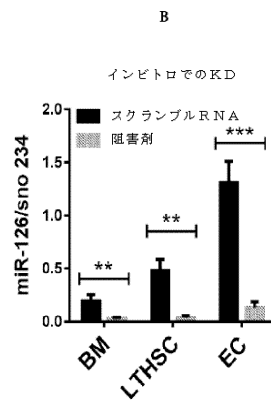
| 細胞用量/マウス | 発症した白血病/試験 | | | |
|-----------|------------|----------|---------------|----------|
| | スクランブルRNA | 阻害剤 | スクランブルRNA+NIL | 阻害剤 +NIL |
| 400万 | 6/6 | 2/6 | 3/6 | 0/6 |
| 200万 | 2/6 | 1/6 | 3/6 | 0/6 |
| 100万 | 2/6 | 0/6 | 2/6 | 0/6 |
| 50万 | 1/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| L I C の頻度 | 4.20E-07 | 7.54E-08 | 2.36E-07 | 0 |

10

【図 2 5 A】



【図 2 5 B】



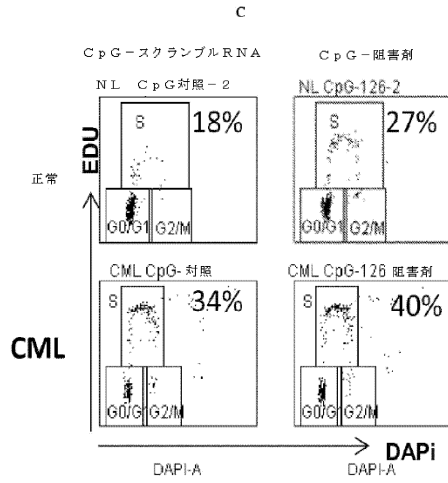
20

30

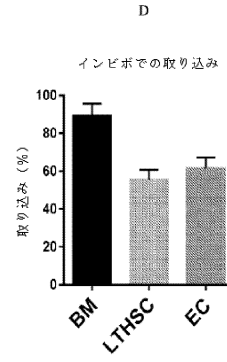
40

50

【図 2 5 C】

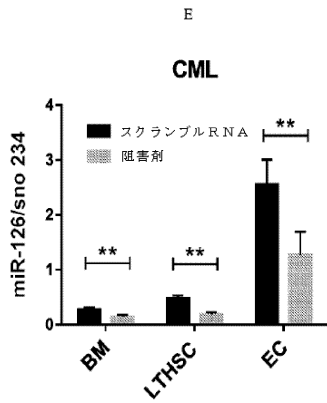


【図 2 5 D】

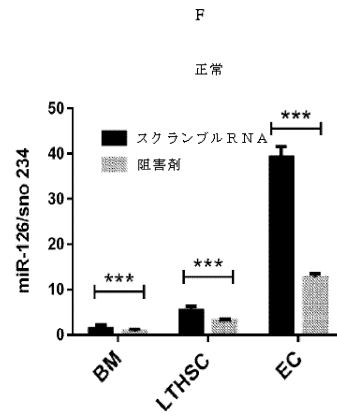


10

【図 2 5 E】



【図 2 5 F】



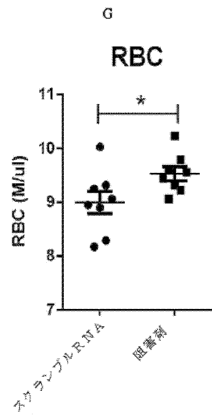
20

30

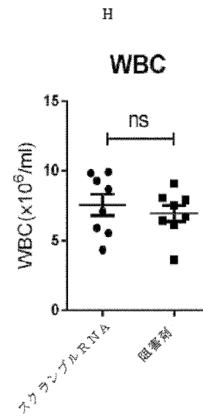
40

50

【 図 2 5 G 】

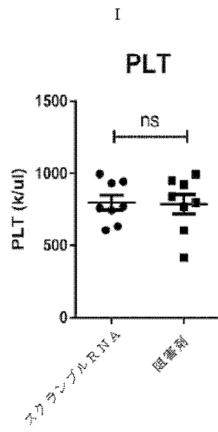


【 図 2 5 H 】

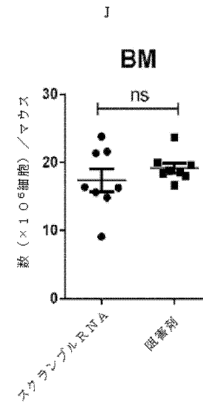


10

【 図 2 5 I 】



【 図 2 5 J 】



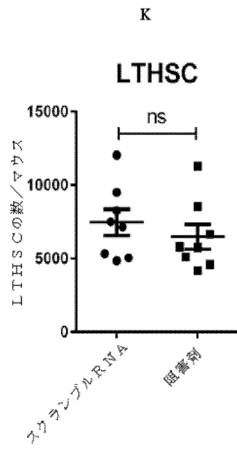
20

30

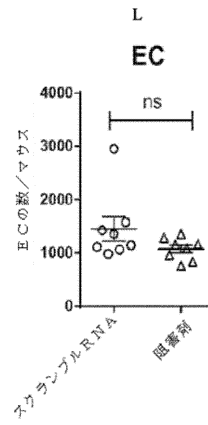
40

50

【図 2 5 K】

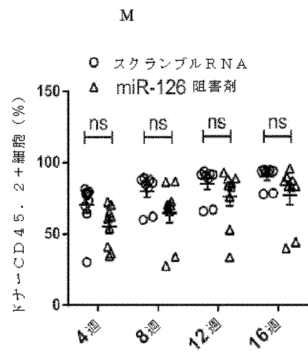


【図 2 5 L】

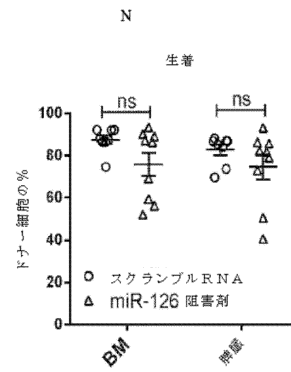


10

【図 2 5 M】



【図 2 5 N】



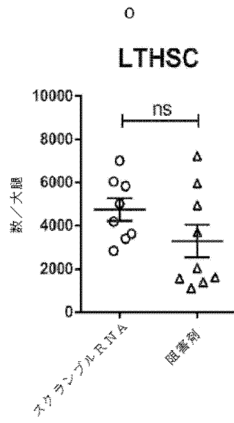
20

30

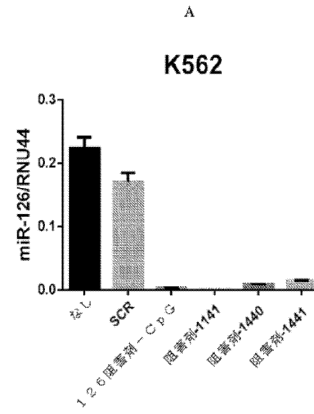
40

50

【図 250】

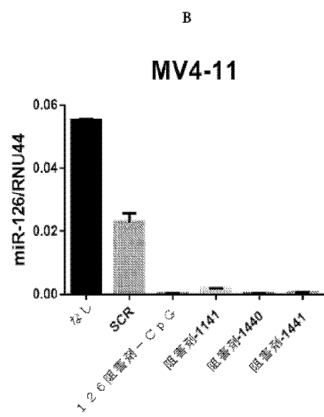


【図 26 A】

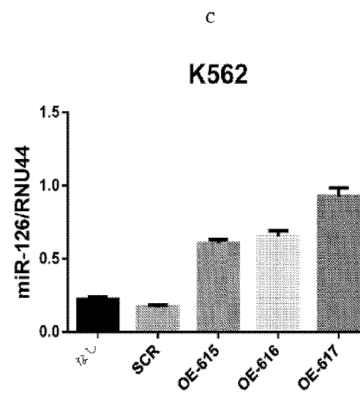


10

【図 26 B】



【図 26 C】



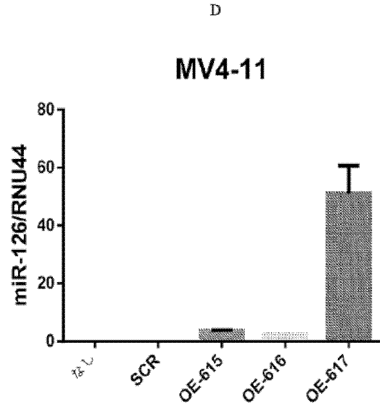
20

30

40

50

【 図 2 6 D 】



【 図 2 6 E 】

E

| | | | |
|----------|---|-------------------|--|
| CpG | CpG(D19)- 抗 - mir126 | 2'OMe | 5' G*G*T GCA TCG ATG CAG G*G*G*G*G xxxxx mCmGmC mAmUmU mAmUmU mAmCmU mCmAmC mGmGmU mAmCmG mA 3' |
| GM1440 | GpC(D19)- 抗 - mir126 | PS + 2'OMe | 5' G*G*T GCA TCG ATG CAG G*G*G*G*G xxxxx mCmGmC mAmUmU mAmUmU mAmCmU mCmAmC mGmGmU mAmCmG mA 3' |
| GM1441 | PS(D19)- 抗 - mir126 | 全 PS 2'OMe | 5' G*G*T*G*C*A*T*C*G*A*T*G*C*A*G*G*G*G*G xxxxx mCmGmC mAmUmU mAmUmU mAmCmU mCmAmC mGmGmU mAmCmG mA 3' |
| GM1441B | PS(D19)- 抗 - mir126 | 全 PS 2'OMe + 全 PS | 5' G*G*T*G*C*A*T*C*G*A*T*G*C*A*G*G*G*G*G*G xxxxx mC*mG*mC* mA*mU*mU* mA*mU*mU* mA*mC*mU* mC*mA*mC* mG*mG*mU* mA*mC*mG*mA 3' |
| GM 1141: | 部分的ホスホロチオエート化 m i R N A (=GM1441B) | | |
| GM615 | 非修飾型 CpG D19- センズ mir126 | | 5'- G*G*TGATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx rUrCrG rUrArC rCrGrU rGrArG rUrArA rUrArA rUrGrC rGrUrU-3' (配列番号 1、18) |
| GM616 | 末端においてフルオロ修飾された 2 U の CpG D19- センズ mir126 | | 5'- G*G*TGATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx rUrCrG rUrArC rCrGrU rGrArG rUrArA rUrArA rUrGrC rGrUrU-3' (配列番号 1、19) |
| GM617 | 全ビリミジンがフルオロ修飾された CpG D19- センズ mir126 | | 5'- G*G*TGATCGATGCAGG*G*G*G*G xxxxx rUrArC rCrGrU rGrArG rUrArA rUrArA rUrGrC rGrUrU- 3' (配列番号 1、20) |
| | 相補的 m i r | | 5'- rCrGrC rArUrU rArUrU rArCrU rCrArC rCrGrU rArCrG rA -3' (配列番号 21) |

10

20

60544576v.1

【 配列表 】

0007038045000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

| | | | | |
|---------|-----------------|---------|--------|-------|
| | | F I | | |
| A 6 1 P | 43/00 (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 | 1 2 1 |
| A 6 1 P | 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 37/02 (2006.01) | A 6 1 P | 37/02 | |
| A 6 1 P | 35/02 (2006.01) | A 6 1 P | 35/02 | |
| A 6 1 K | 31/506(2006.01) | A 6 1 P | 43/00 | 1 0 5 |
| A 6 1 K | 9/12 (2006.01) | A 6 1 K | 31/506 | |
| | | A 6 1 K | 9/12 | |

ベニュー・722

(72)発明者

シフィデルスキ, ピオトル・マレク

アメリカ合衆国、カリフォルニア・91773、サン・ディマス、ホーリーグレン・レイン・162

(72)発明者

マルクッチ, ガイド

アメリカ合衆国、カリフォルニア・91010、ドゥアーテ、イースト・ドゥアーテ・ロード・1500

(72)発明者

ジャン, ピン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・91010、ドゥアーテ、イースト・ドゥアーテ・ロード・1500

(72)発明者

クオ, ヤー - フーエイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・91010、ドゥアーテ、イースト・ドゥアーテ・ロード・1500

審査官

竹内 祐樹

(56)参考文献

国際公開第2008/116267(WO, A1)

米国特許出願公開第2014/0004154(US, A1)

米国特許出願公開第2012/0295963(US, A1)

特表2014-527819(JP, A)

ZIEGLER, Saskia et al., NUCLEIC ACID THERAPEUTICS, 2013年11月16日, Vol. 23, No. 6, pp. 427-434

DE LEEUW, David C. et al., Cancer Research, 2014年01月29日, Vol. 74, No. 7, pp. 2094-2105

(58)調査した分野

(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)