

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-528697**(P2006-528697A)**

(43) 公表日 平成18年12月21日(2006. 12. 21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00 Z N A	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
A 6 1 P 37/04 (2006. 01)	A 6 1 P 37/04	4 C O 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 31/7068 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7068	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-533117 (P2006-533117)	(71) 出願人	398032717
(86) (22) 出願日	平成16年5月14日 (2004. 5. 14)		イデラ ファーマシューティカルズ イン
(85) 翻訳文提出日	平成18年1月16日 (2006. 1. 16)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/015313		アメリカ合衆国 O 2 1 3 9 マサチューセッ
(87) 国際公開番号	W02004/103301		ツ州ケンブリッジ、バッサー・ストリート
(87) 国際公開日	平成16年12月2日 (2004. 12. 2)		3 4 5 番
(31) 優先権主張番号	60/471, 247	(74) 代理人	100102842
(32) 優先日	平成15年5月16日 (2003. 5. 16)		弁理士 葛和 清司
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	カンディマツラ, エカンバー, アール
			.
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
			1 7 7 2、サウスバロ、キャンドルウッド
			レーン 6
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イムノマーを化学療法剤と組み合わせて用いる、癌の相乗的処置

(57) 【要約】

本発明は、相乗的治療効果を提供するための、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーの、化学療法剤と組み合わせた治療的使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌患者における癌を処置するための方法であって、該患者に免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーを化学療法剤と組み合わせて投与することを含み、ここで前記免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーおよび化学療法剤は相乗効果を作り出す、前記方法。

【請求項 2】

イムノマーが、非ヌクレチドオリンカーによって結合された、1つより多い5'末端を有する少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含み、ここで前記オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは到達可能5'末端を有する免疫刺激性オリゴヌクレオチドであり、免疫刺激性ジヌクレオチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーが、構造：

5' - N n - N 1 - Y - Z - N 1 - N n - 3' (I I I)

式中、

Y は、シチジン、2'-デオキシシチジン、アラビノシチジン、2'-デオキシチミジン、2'-デオキシ-2'-置換アラビノシチジン、2'-O-置換アラビノシチジン、2'-デオキシ-5'-ヒドロキシシチジン、2'-デオキシ-N4-アルキル-シチジン、2'-デオキシ-4'-チオウリジン、その他の非天然ピリミジンヌクレオシド、または1-(2'-デオキシ-D-リボフラノシル)-2-オキソ-7-デアザ-8-メチル-プリンであり；

Z は、グアノシンまたは2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシ-7-デアザグアノシン、2'-デオキシ-6'-チオグアノシン、アラビノグアノシン、2'-デオキシ-2'-置換アラビノグアノシン、2'-O-置換アラビノグアノシン、2'-デオキシイノシンまたはその他の非天然プリンヌクレオシドであり；

N 1 は、各々の場合に、天然に存在するかまたは合成のヌクレオシドまたは免疫刺激性部分であって、これらは、脱塩基ヌクレオシド、アラビノヌクレオシド、2'-デオキシウリジン、-デオキシリボヌクレオシド、-L-デオキシリボヌクレオシド、およびホスホジエステルまたは修飾ヌクレオシド間結合により隣接ヌクレオシドの3'側へ結合されたヌクレオシド、からなる群から選択され、ここで前記修飾ヌクレオシド間結合は、限定することなく、約200ngストローム~約2000ngストロームの長さを有するリンカー、C2~C18アルキルリンカー、ポリ(エチレングリコール)リンカー、2-アミノブチル-1,3-プロパンジオールリンカー、グリセリルリンカー、2'-5'ヌクレオシド間結合、およびホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、もしくはメチルホスホネートヌクレオシド間結合から選択され；

N n は、各々の場合に、好ましくは天然に存在するヌクレオシドまたは免疫刺激性部分であって、これらは、脱塩基ヌクレオシド、アラビノヌクレオシド、2'-デオキシウリジン、-デオキシリボヌクレオシド、2'-O-置換リボヌクレオシド、および修飾ヌクレオシド間結合により隣接ヌクレオシドの3'側へ結合されたヌクレオシド、からなる群から選択され、ここで前記修飾ヌクレオシド間結合は、好ましくは、アミノリンカー、C2~C18アルキルリンカー、ポリ(エチレングリコール)リンカー、2-アミノブチル-1,3-プロパンジオールリンカー、グリセリルリンカー、2'-5'ヌクレオシド間結合、およびメチルホスホネートヌクレオシド間結合からなる群から選択される；

で表される前記構造を有し、

ただし、N 1 または N n の少なくとも1つは免疫刺激性部分であり；

ここで各 n は独立して、0~30までの数であり；そして

ここで、イムノマーの場合は、3'末端は直接または非ヌクレオチドリナーを介して他のオリゴヌクレオチドに結合されており、これは免疫刺激性であってもなくてもよい；

請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

30

40

50

化学療法剤が、ゲムシタピン、メトトレキサート、ピンクリスチン、アドリアマイシン、シスプラチン、糖非含有クロロエチルニトロソウレア、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、プレオマイシン、ドキシソルピシン、ダカルバジン、タキソール、フラギリン、メグラミンGLA、バルルピシン、カルムスタインおよびポリフェルボサン、MMI270、BAY12-9566、RASファメシルトランスフェラーゼ阻害剤、ファメシルトランスフェラーゼ阻害剤、MMP、MTA/LY231514、LY264618/ロメテキソール、グラモレク、CI-994、TNP-470、ヒカムチン/トボテカン、PKC412、バルスポダール/PSC833、ノバントロン/ミトロキサントロン、メタレット/スラミン、パチマスタット、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、インセル/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN698、TA2516/マルミスタット、BB2516/マルミスタット、CDP845、D2163、PD183805、DX8951f、レモナルDP2202、FK317、メシル酸イマチニブ/グリベック、ピシバニル/OK-432、AD32/バルルピシン、メタストロン/ストロンチウム誘導体、テモダール/テモゾロミド、エバセット/リボソームドキシソルピシン、ユータキサン/パクリタキセル、タキソール/パクリタキセル、キセロアド/カベシタピン、フルツロン/ドキシフルリジン、シクロボックス/経口パクリタキセル、経口タキソイド、SPU-077/シスプラチン、HMR1275/フラボピリドール、CP-358(774)/EGFR、CP-609(754)RAS腫瘍遺伝子阻害剤、BMS-182751/経口プラチナ、UFT(テガフル/ウラシル)、エルガミゾール/レバミゾール、エニルウラシル/776C85/5FUエンハンサー、カンプト/レバミゾール、カンプトサル/イリノテカン、ツモデックス/ラリトレキセド、ルイスタチン/クラドリピン、パキセックス/パクリタキセル、ドキシル/リボソームドキシソルピシン、カエリクス/リボソームドキシソルピシン、フルダラ/フルダラピン、ファルモルピシン/エピルピシン、デポシト、ZD1839、LU79553/ビス-ナフタリミド、LU103793/ドラスタイン、カエチックス/リボソームドキシソルピシン、ゲムザール/ゲムシタピン、ZD0473/アノルメド、YM116、ロジンシード、CDK4およびCDK2阻害剤、PARP阻害剤、D4809/デキシホスファミド、イフェス/メスネックス/イホスファミド、ブモン/テニボシド、パラプラチン/カルボプラチン、プランチノール/シスプラチン、ベペシド/エトボシド、ZD9331、タキソテレ/ドセタキセル、グアニンアラビノシドのブ
 10
 20
 30
 40
 50
 60
 70
 80
 90
 100
 110
 120
 130
 140
 150
 160
 170
 180
 190
 200
 210
 220
 230
 240
 250
 260
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 630
 640
 650
 660
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750
 760
 770
 780
 790
 800
 810
 820
 830
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 3300
 3310
 3320
 3330
 3340
 3350
 3360
 3370
 3380
 3390
 3400
 3410
 3420
 3430
 3440
 3450
 3460
 3470
 3480
 3490
 3500
 3510
 3520
 3530
 3540
 3550
 3560
 3570
 3580
 3590
 3600
 3610
 3620
 3630
 3640
 3650
 3660
 3670
 3680
 3690
 3700
 3710
 3720
 3730
 3740
 3750
 3760
 3770
 3780
 3790
 3800
 3810
 3820
 3830
 3840
 3850
 3860
 3870
 3880
 3890
 3900
 3910
 3920
 3930
 3940
 3950
 3960
 3970
 3980
 3990
 4000
 4010
 4020
 4030
 4040
 4050
 4060
 4070
 4080
 4090
 4100
 4110
 4120
 4130
 4140
 4150
 4160
 4170
 4180
 4190
 4200
 4210
 4220
 4230
 4240
 4250
 4260
 4270
 4280
 4290
 4300
 4310
 4320
 4330
 4340
 4350
 4360
 4370
 4380
 4390
 4400
 4410
 4420
 4430
 4440
 4450
 4460
 4470
 4480
 4490
 4500
 4510
 4520
 4530
 4540
 4550
 4560
 4570
 4580
 4590
 4600
 4610
 4620
 4630
 4640
 4650
 4660
 4670
 4680
 4690
 4700
 4710
 4720
 4730
 4740
 4750
 4760
 4770
 4780
 4790
 4800
 4810
 4820
 4830
 4840
 4850
 4860
 4870
 4880
 4890
 4900
 4910
 4920
 4930
 4940
 4950
 4960
 4970
 4980
 4990
 5000
 5010
 5020
 5030
 5040
 5050
 5060
 5070
 5080
 5090
 5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9700
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9800
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9900
 9910
 9920
 9930
 9940
 9950
 9960
 9970
 9980
 9990
 10000

【請求項5】

イムノマーが、構造：

5'-TCGTTGX-Y-XGTTGCT-5'

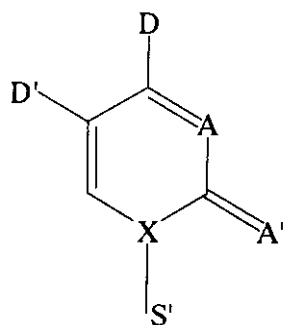
式中、XはC3リンカーであり、Yはグリセロールリンカーである、
を有する、請求項1に記載の方法。

天然に存在しないプリンが 6 - チオグアニンまたは 7 - デアザグアニンである、請求項 7 に記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび / またはイムノマー。

【請求項 1 1】

天然に存在しないピリミジンが、構造 (I) :

【化 3】



(I)

10

(i v) 式中、

D は、水素結合供与体であり ;

D ' は、水素、水素結合供与体、水素結合受容体、親水基、疎水基、電子求引基および電子供与基からなる群から選択され ;

20

A は、水素結合受容体または親水基であり ;

A ' は、水素結合受容体、親水基、疎水基、電子求引基および電子供与基からなる群から選択され ;

X は、炭素または窒素であり ; そして

S ' は、ペントースもしくはヘキソース糖環、または天然に存在しない糖である、を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

水素結合供与体が、 - NH - 、 - NH₂ 、 - SH および - OH からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

水素結合受容体が、 C = O 、 C = S 、およびシトシンの N 3 を含む芳香族複素環の環窒素原子からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

30

【請求項 1 4】

(I) の塩基部分が、天然に存在しないピリミジン塩基である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

天然に存在しないピリミジン塩基が、 5 - ヒドロキシシトシン、 5 - ヒドロキシメチルシトシン、 N 4 - アルキルシトシンからなる群から、好ましくは N 4 - エチルシトシンおよび 4 - チオウラシルから選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

(I) における糖部分 S ' が、天然に存在しない糖部分である、請求項 1 1 に記載の方法。

40

【請求項 1 7】

天然に存在しない糖部分が、ヘキソース、アラビノースおよびアラビノース誘導体からなる群から選択される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび / またはイムノマーが、約 2 オングストローム ~ 約 200 オングストロームの長さのリンカー、金属、溶解性または非溶解性の生体分解性ポリマービーズ、オリゴヌクレオチドの 3 ' 末端ヌクレオチドへの付着を許容する官能基を有する有機部分、生体分子、環式または非環式の小分子、脂肪族または芳香族炭化水素

50

、からなる群から選択される非ヌクレオチドリinkerを含み、これらのいずれもが、オリゴヌクレオチドに結合しているかまたはそれに付加されている直鎖において、ヒドロキシ、アミノ、チオール、チオエーテル、エーテル、アミド、チオアミド、エステル、尿素、およびチオ尿素；アミノ酸、炭水化物、シクロデキストリン、アダマンタン、コレステロール、ハブテン、抗生物質、式： $\text{HO} - (\text{CH}_2)_o - \text{CH}(\text{OH}) - (\text{CH}_2)_p - \text{OH}$ で表され、式中、 o および p は独立して1～約6の整数であるグリセロールまたはグリセロールホモログ、および1, 3 - ジアミノ - 2 - ヒドロキシプロパンの誘導体、からなる群から選択される1個または2個以上の官能基を随意的に含むことができる、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

10

免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーが、本質的にホスホジエステル結合からなるヌクレオシド間結合を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

癌患者における癌を処置するための方法であって、該患者に化学療法剤と組み合わせて免疫刺激性オリゴヌクレオチド結合体および/またはイムノマー結合体を投与することを含む、前記方法。

【請求項21】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマー、化学療法剤および生理学的に許容し得る担体を含む、医薬製剤。

【請求項22】

20

ワクチンを投与することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーまたはワクチン、または両方が、免疫原性タンパク質に結合している、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

アジュバントを投与することをさらに含む、請求項23に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

30

本出願は、2003年5月16日に出願された米国仮出願第60/471,247号の利益を主張し、該仮出願は参照としてその全体が組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、イムノマーを治療薬として用いる抗癌用途に関する。

【0003】

関連分野の概要

近年、数人の研究者らにより、オリゴヌクレオチドを免疫療法の用途において免疫刺激剤として用いることの有効性が示された。ホスホジエステルオリゴヌクレオチドおよびホスホロチオエートオリゴヌクレオチドが免疫刺激を誘導できるとの観察は、これらの化合物を治療ツールとして開発することへの関心を創出した。これらの努力は、天然のジヌクレオチドCpGを含むホスホロチオエートオリゴヌクレオチドに集中した。Kuramoto et al., Jpn. J. Cancer Res. 83:1128-1131 (1992)は、CpGジヌクレオチドを含むパリンドロームを含むホスホジエステルオリゴヌクレオチドが、インターフェロナルファおよびガンマの合成を誘導し、ナチュラルキラー活性を増強できることを教示している。Krieg et al., Nature 371:546-549 (1995)は、ホスホロチオエートCpG含有オリゴヌクレオチドが免疫刺激性であることを開示している。Liang et al., J. Clin. Invest. 98:1119-1129 (1996)は、かかるオリゴヌクレオチドがヒトB細胞を活性化することを開示している。Moldoveanu et al., Vaccine 16:1216-1224 (1998)は、CpG含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドが、インフルエンザウィルスに対する免疫反応を増強することを

40

50

教示している。McCluskie and Davis, J. Immunol.161:4463-4466 (1998)は、C p G含有オリゴヌクレオチドが、強力なアジュバントとして作用し、B型肝炎ウィルス表面抗原に対する免疫反応を増強することを教示している。

【0004】

C p G含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの他の修飾は、免疫反応の調節剤として作用するそれらの能力にも影響を及ぼし得る。例えば、Zhao et al., Biochem. Pharmacol. (1996) 51:173-182; Zhao et al., Biochem. Pharmacol. (1996) 52:1537-1544; Zhao et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. (1997) 7:495-502; Zhao et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. (1999) 9:3453-3458; Zhao et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. (2000) 10:1051-1054; Yu et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. (2000) 10:2585-2588; Yu et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. (2001) 11:2263-2267; およびKandimalla et al., Bioorg. Med. Chem. (2001)9:807-813を参照のこと。米国特許第6,426,334号は、これらの化合物が抗癌剤として期待されることを示す。

10

【0005】

多くのマウスおよびヒト腫瘍が、宿主免疫システムによって認識できる免疫原性エピトープを有することがよく示されているにもかかわらず、多くの場合、宿主防御は適切な応答をしかけることに失敗し、癌患者における制御されない腫瘍の増殖をもたらす。宿主免疫システムが腫瘍細胞に対する防御の誘導に失敗することは、腫瘍抗原の低い免疫原性および/または宿主免疫システムそれ自体の欠陥に関連している可能性がある。

これらの報告は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドの抗癌活性を増強する必要性の存在を明確にしている。

20

発明の簡単な概要

【0006】

本発明は、免疫刺激性オリゴヌクレオチド化合物の抗癌活性を増強するための方法を提供する。本発明による方法は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドの免疫刺激効果と化学療法剤の治療効果の相乗効果を可能にする。免疫刺激性オリゴヌクレオチドを修飾して5'末端を最適に提示するようにすると、その抗癌活性が劇的に増強される。かかるオリゴヌクレオチドは、本明細書において「イムノマー (immunomer)」と呼ばれ、これは1つまたは2つ以上の免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含むことができる。

従って第1の側面において、本発明は、癌患者における癌を処置するための、該患者に免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーを化学療法剤と組み合わせて投与することを含む方法を提供し、ここで前記免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーおよび化学療法剤は相乗治療効果を創出する。

30

【0007】

ある態様において、本発明による方法において用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーは、C p G、C^{*} p G、C p G^{*}、およびC^{*} p G^{*}からなる群から選択される免疫刺激性ジヌクレオチドを含み、この式中、Cはシチジンまたは2'-デオキシシチジンであり、C^{*}は2'-デオキシチミジン、アラビノシチジン、2'-デオキシ-2'-置換アラビノシチジン、2'-O-置換アラビノシチジン、2'-デオキシ-5'-ヒドロキシシチジン、2'-デオキシ-N⁴-アルキル-シチジン、2'-デオキシ-4'-チオウリジン、他の非天然ピリミジンヌクレオシド、または1-(2'-デオキシ- -D-リボフラノシル)-2'-オキソ-7'-デアザ-8'-メチル-プリンであり; Gは、グアノシンまたは2'-デオキシグアノシンであり、G^{*}は、2'-デオキシ-7'-デアザグアノシン、2'-デオキシ-6'-チオグアノシン、アラビノグアノシン、2'-デオキシ-2'-置換-アラビノグアノシン、2'-O-置換-アラビノグアノシン、または他の非天然プリンヌクレオシドであり、そしてpは、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、およびホスホロジチオエートからなる群から選択されるヌクレオシド間結合である。ある好ましい態様において、免疫刺激性ジヌクレオチドはC p Gではない。

40

【0008】

ある態様において、本発明による方法において用いる免疫刺激性オリゴヌクレオチドお

50

よび／またはイムノマーは、式 (I I I) :

5' - N n - N 1 - Y - Z - N 1 - N n - 3' (I I I)

式中、

Y は、シチジン、2' - デオキシチミジン、2' - デオキシシチジン、アラビノシチジン、2' - デオキシ - 2' - 置換アラビノシチジン、2' - O - 置換アラビノシチジン、2' - デオキシ - 5 - ヒドロキシシチジン、2' - デオキシ - N 4 - アルキル - シチジン、2' - デオキシ - 4 - チオウリジン、その他の非天然ピリミジンヌクレオシド、または 1 - (2' - デオキシ - D - リボフラノシル) - 2 - オキソ - 7 - デアザ - 8 - メチル - プリンであり；

Z は、グアノシンまたは 2' - デオキシグアノシン、2' デオキシ - 7 - デアザグアノシン、2' - デオキシ - 6 - チオグアノシン、アラビノグアノシン、2' - デオキシ - 2' 置換アラビノグアノシン、2' - O - 置換アラビノグアノシン、2' - デオキシイノシンまたはその他の非天然プリンヌクレオシドであり；

【 0 0 0 9 】

N 1 は、各々の場合に、好ましくは天然に存在するかまたは合成のヌクレオシドまたは免疫刺激性部分であって、これらは、脱塩基 (abasic) ヌクレオシド、アラビノヌクレオシド、2' - デオキシウリジン、- デオキシリボヌクレオシド、- L - デオキシリボヌクレオシド、およびホスホジエステルまたは修飾ヌクレオシド間結合により隣接ヌクレオシドの 3' 側へ結合されたヌクレオシド、からなる群から選択され、ここで前記修飾ヌクレオシド間結合は、限定することなく、約 2 オングストローム ~ 約 2 0 0 オングストロームの長さを有するリンカー、C 2 ~ C 1 8 アルキルリンカー、ポリ (エチレングリコール) リンカー、2 - アミノブチル - 1 , 3 - プロパンジオールリンカー、グリセリルリンカー、2' - 5' ヌクレオシド間結合、およびホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、もしくはメチルホスホネートヌクレオシド間結合から選択され；

【 0 0 1 0 】

N n は、各々の場合に、天然に存在するヌクレオシドまたは免疫刺激性部分であって、これらは好ましくは、脱塩基ヌクレオシド、アラビノヌクレオシド、2' - デオキシウリジン、- デオキシリボヌクレオシド、2' - O - 置換リボヌクレオシド、および修飾ヌクレオシド間結合により隣接ヌクレオシドの 3' 側へ結合されたヌクレオシド、からなる群から選択され、ここで前記修飾ヌクレオシド間結合は、アミノリンカー、C 2 ~ C 1 8 アルキルリンカー、ポリ (エチレングリコール) リンカー、2 - アミノブチル - 1 , 3 - プロパンジオールリンカー、グリセリルリンカー、2' - 5' ヌクレオシド間結合、およびメチルホスホネートヌクレオシド間結合からなる群から選択される；

で表される免疫刺激性ドメインを含み、

ただし、N 1 または N n の少なくとも 1 つは免疫刺激性部分であり；

ここで n は 0 ~ 3 0 の数であり；

ここで 3' ヌクレオシドは、随意的に、直接または非ヌクレオチドリナーを介して他のオリゴヌクレオチドに結合されており、これは免疫刺激性であってもなくてもよい。

【 0 0 1 1 】

第 2 の側面において、本発明は、癌患者における癌を処置する方法を提供し、該方法は、上に記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマーと、該免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマーの到達可能 5' 末端以外の位置に結合された癌抗原とを含む、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマー結合体を、化学療法剤と組み合わせて投与することを含む。

第 3 の側面において、本発明は、本発明による免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／または免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマーまたはイムノマー結合体、化学療法剤および生理学的に許容し得る担体とを含む、医薬製剤を提供する。

【 0 0 1 2 】

好ましい態様の詳細な説明

本発明は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマーを抗癌剤として化

学療法剤と組み合わせて治療に用いることに関する。本明細書に引用された、発行された特許、特許出願、および参考文献は、その各々が具体的また個別に参照として組み込まれると示された場合同様に、参照としてここに組み込まれる。本明細書に引用された任意の参考文献の任意の教示と本明細書の間に不一致がある場合は、本発明のために後者を優先する。

【 0 0 1 3 】

本発明は、癌の処置のための免疫療法用途で用いられる、免疫刺激性化合物によって生じる、抗癌効果を増強するための方法を提供する。本発明のイムノマーおよび/または免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、腫瘍または癌（例えば、脳、肺（例えば小細胞および非小細胞）、子宮、乳房、前立腺、直腸などの癌、グリオーマ、さらに他のメラノーマ、カルシノーマ、白血病、リンパ腫および肉腫）の発症および/または進行を処置する、抑制するまたは改善するために用いることができる。本発明による方法において、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーは、化学療法剤と組み合わせて用いた場合に、相乗的治療効果を提供する。この結果は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよびイムノマーは免疫系細胞の細胞分裂を引き起こし、一方、化学療法剤は一般に、活発に分裂する細胞を殺すという事実からみれば驚くべきことである。

10

【 0 0 1 4 】

第1の側面において、本発明は、化学療法剤と組み合わせて免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーを投与することを含む、癌患者における癌を処置するための方法を提供し、ここで後者は、該イムノマーが2個以上の5'末端を有するように一緒に結合された少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含み、ここでオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは免疫刺激性オリゴヌクレオチドである。本明細書において、用語「到達可能5'末端」とは、イムノマーを認識して結合し免疫系を刺激する因子が到達できるように、オリゴヌクレオチドの5'末端が十分に利用可能であることを意味する。随意的に、5'OHは、ホスフェート、ホスホロチオエート、もしくはホスホロジチオエート部分、芳香族もしくは脂肪族リンカー、コレステロール、または到達可能性を損なわない他の実体と結合することができる。免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよびイムノマーは、脊椎動物に投与されると、免疫反応を引き起こすことができる。化学療法剤と組み合わせて用いると、相乗的治療効果が得られる。

20

【 0 0 1 5 】

本発明による方法において用いられる、好ましい化学療法剤は、限定することなく以下を含む：ゲムシタピン、メトトレキサート、ビンクリスチン、アドリアマイシン、シスプラチン、糖非含有（non-sugar containing）クロロエチルニトロソウレア、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、ブレオマイシン、ドキソルビシン、ダカルバジン、タキソール、フラジリン（fragyline）、メグラミン（Meglamine）GLA、バルルピシン、カルムスタイン（carmustaine）およびポリフェルポサン（poliferposan）、MMI 270、BAY 12-9566、RASファメシル（famesyl）トランスフェラーゼ阻害剤、ファメシルトランスフェラーゼ阻害剤、MMP、MTA/LY 231514、LY 264618/ロメテキソール（Lometexol）、グラモレク（Glamolec）、CI-994、TNP-470、ヒカムチン/トポテカン（Hycamtin/Topotecan）、PKC 412、バルスポダール（Valspodar）/PSC 833、ノバントロン/ミトロキサントロン（Novantrone/Mitroxantrone）、メタレット/スラミン（Metaret/Suramin）、パチマスタット（Batimastat）、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG 3340、AG 3433、インセル（Incel）/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI 641、ODN 698、TA 2516/マルミスタット（Marmistat）、BB 2516/マルミスタット、CDP 845、D 2163、PD 183805、DX 8951f、レモナール（Lemonal）DP 2202、FK 317、メシル酸イマチニブ/グリベック、ピシバニル（Picibanil）/OK-432、AD 32/バルルピシン、メタストロン（Metastron）/ストロンチウム誘導体、テモダール/テモゾロミド（Temodal/Temozolomide）、エバセツト（Evacet）/リボソームドキソルビシン、ユータキサン（Yewtaxan）/パクリタキセル

30

40

50

、タキソール／パクリタキセル、キセロアド／カペシタピン（Xeload/Capecitabine）、フルツロン／ドキシフルリジン、シクロパックス（Cyclopax）／経口パクリタキセル、経口タキソイド、SPU-077／シスプラチン、HMR1275／フラボピリドール（Flavopiridol）、CP-358（774）／EGFR、CP-609（754）RAS腫瘍遺伝子阻害剤、BMS-182751／経口プラチナ、UFT（テガフル／ウラシル）、エルガミゾール／レバミゾール（Ergamisol/Levamisole）、エニルウラシル（Eniluracil）／776C85／5FUエンハンサー、カンプト／レバミゾール（Campto/Levamisole）、カンプトサル／イリノテカン、ツモデックス／ラリトレキセド（Tumodex/Ralitrexed）、ルイスタチン／クラドリピン（Leustatin/Cladribine）、パキセックス（Paxex）／パクリタキセル、ドキシル／リボソームドキシソルピシン、カエリクス（Caelyx）／リボソームドキシソルピシン、フルダラ／フルダラピン、ファルモルピシン／エピルピシン、デボシト（DepoCyt）、ZD1839、LU79553／ビス-ナフタリミド（Bis-Naphtalimide）、LU103793／ドラスタイン（Dolastain）、カエチックス（Caetyx）／リボソームドキシソルピシン、ゲムザール（Gemzar）／ゲムシタピン、ZD0473／アノルメド（Anormed）、YM116、ロジンシード（Iodine seeds）、CDK4およびCDK2阻害剤、PARP阻害剤、D4809／デキシホスファミド、

10

【0016】

イフェス／メスネックス（Ifes/Mesnex）／イホスファミド、ブモン／テニポシド（Vumon/Teniposide）、パラプラチン／カルボプラチン、プランチノール（Plantinol）／シスプラチン、ベペシド（Vepeside）／エトポシド、ZD9331、タキソテレ／ドセタキセル、グアニンアラビノシドのプロドラッグ、タキサン類似体、ニトロソウレア、メルフェラン（melfelan）およびシクロホスファミドなどのアルキル化剤、アミノグルテチミド、アルバラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クロロンブシル（Chlorombucil）、シタラピンHCl、ダクチノマイシン、ダウノルピシンHCl、エストラムスチン（Estramustine）リン酸ナトリウム、エトポシド（VP16-213）、フロクスウリジン（Flouxuridine）、フルオロウラシル（5-FU）、フルタミド、ヒドロキシウレア（ヒドロシカルバミド）、イホスファミド、インターフェロンアルファ-2a、アルファ-2b、酢酸ロイプロリド（LHRH放出因子類似体）、ロムスチン（Lomustine）（CCNU）、メクロレタミン（Methlorethamine）HCl（ナイトロジェンマスタード）、メルカプトプリン、メスナ（Mesna）、ミトタン（Mitotane）（o.p'-DDD）、ミトキサントロン（Mitoxantrone）HCl、オクトレオチド（Octreotide）、プリカマイシン（Plicamycin）、プロカルバジンHCl、ストレプトゾシン、クエン酸タモキシフェン、チオグアニン、チオテバ、硫酸ビンブラスチン、アムサクリン（Amsacrine）（m-AMSA）、アザシチジン、エリスロポエチン、ヘキサメチルメラミン（Hexamethylmelamine）（HMM）、インターロイキン2、ミトグアゾン（メチル-GAG；メチルグリオキサールビス-グアニルヒドラゾン；MGBG）、ペントスタチン（2'-デオキシコホルマイシン）、セムスチン（Semustine）（メチル-CCNU）、テニポシド（VM-26）および硫酸ビンデシン。

20

30

【0017】

本発明のこの側面による方法において、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマーの投与は任意の好適な経路で実施でき、これには、限定することなく、非経口、経口、舌下、経皮、局所、鼻内、エアロゾル、眼球内、気管内、直腸内、膣、遺伝子銃、皮膚パッチまたは点眼液またはうがい薬の形態を含む。免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマーの治療組成物の投与は、既知の方法を用いて、疾患の症状または代理マーカーを低減するのに効果的な用量および期間で、実施することができる。全身的に投与する場合、治療組成物は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマーの約0.0001マイクロモル～約10マイクロモルの血中濃度を達成するのに十分な用量で投与するのが好ましい。局所投与に対しては、これより大幅に低い濃度も効果的であることができ、そして大幅に高い濃度も耐容され得る。好ましくは、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマーの総用量は、約0.0001mg／患者・日～

40

50

約 200 mg / 体重 1 kg ・ 日の範囲である。1 種または 2 種以上の本発明の治療組成物の治療的に有効な量を、1 回の処置として、同時にまたは連続して投与するのが望ましい。

【0018】

本発明のこの側面のために、用語「組み合わせる」は、同一患者の同一疾患を処置する過程において、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび / またはイムノマーおよび / または化学療法剤を任意の順序で投与することを含むことを意味し、これは同時投与および、数日間までの時間的に間隔をあけた順序での投与を含む。かかる組み合わせ処置はまた、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび / またはイムノマー、および / または単独の化学療法剤の、1 回を超える投与を含むことができる。免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび / またはイムノマーおよび / または化学療法剤の投与は、同一または異なる経路で実施してよい。

10

ある態様において、本発明による方法において用いるイムノマーは、2 つまたは 3 つ以上の免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含み、(イムノマーとの関連において) これは同一または異なっていてよい。好ましくは、かかる免疫刺激性オリゴヌクレオチドの各々は、少なくとも 1 つの到達可能 5' 末端を有する。

【0019】

本発明による方法のある態様において、イムノマーはまた、1 つまたは 2 つ以上の免疫刺激性オリゴヌクレオチドに加えて、遺伝子に相補的な少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含む。本明細書において、用語「相補的な」とは、生理的条件の下で、オリゴヌクレオチドが遺伝子のある部位にハイブリダイズすることを意味する。ある態様において、オリゴヌクレオチドは遺伝子の発現を下方制御する。かかる下方制御オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイムオリゴヌクレオチド、小阻害性 RNA (small inhibitory RNA) およびデコイオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるのが好ましい。本明細書において、用語「遺伝子を下方制御する」とは、遺伝子の転写または遺伝子産物の翻訳を阻害することを意味する。従って、本発明による方法において用いられるイムノマーは、1 つまたは 2 つ以上の特定疾患ターゲットを標的化し、一方で免疫システムを刺激するのに用いることができる。

20

【0020】

ある態様において、本発明による方法において用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび / またはイムノマーは、リボザイムまたはデコイオリゴヌクレオチドを含む。本明細書において、用語「リボザイム」は、触媒作用を有するオリゴヌクレオチドを指す。好ましくは、リボザイムは、特定の核酸標的に結合して、該標的を開裂する。本明細書において、用語「デコイオリゴヌクレオチド」は、配列特異的様式で転写因子に結合し、転写活性を阻むオリゴヌクレオチドを指す。好ましくは、リボザイムまたはデコイオリゴヌクレオチドは二次構造を示し、これにはステムループまたはヘアピン構造を含むが、これらに限定はされない。ある態様において、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドはポリ (I) - ポリ (dC) を含む。ある態様において、少なくとも 1 組の Nn は、3 ~ 10 の dGs および / または Gs のストリング、または 2' - 置換リボもしくはアラビノGsを含む。

30

40

【0021】

本発明のためには、用語「オリゴヌクレオチド」は、複数の結合したヌクレオシド単位から形成されるポリヌクレオシドを指す。かかるオリゴヌクレオチドは、ゲノム DNA または cDNA を含む既存の核酸源から得ることができるが、好ましくは合成方法により製造される。好ましい態様においては、各ヌクレオシド単位は、複素環塩基および、ペントフラノシル、トレハロース、アラビノース、2' - デオキシ - 2' - 置換アラビノース、2' - O - 置換アラビノースまたはヘキサース糖基を含む。ヌクレオシド残基は、多くの知られたヌクレオシド間結合の任意のものによって互いに結合され得る。かかるヌクレオシド間結合は、限定することなく、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホネート、アルキルホスホノチオエート、ホスホトリエステル、

50

ホスホラミダイト (phosphoramidate)、シロキササン、カーボネート、カルボアルコキシ、アセトアミデート、カルバメート、モルホリノ、ボラノ、チオエーテル、架橋ホスホラミダイト、架橋メチレンホスホネート、架橋ホスホロチオエート、およびスルホンヌクレオシド間結合を含む。用語「オリゴヌクレオチド」はまた、1つまたは2つ以上の立体特異的ヌクレオシド間結合（例えば、(R_p) - もしくは (S_p) - ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、またはホスホトリエステル結合）を有するポリヌクレオシドも含む。本明細書において、用語「オリゴヌクレオチド」および「ジヌクレオチド」は、任意のかかるヌクレオシド間結合を有するポリヌクレオシドおよびジヌクレオシドを含むことを明確に意図し、前記結合がホスフェート基を含むか含まないかは問わない。ある好ましい態様においては、これらヌクレオシド間結合はホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート結合、またはこれらの組み合わせであってもよい。

10

【0022】

ある態様において、イムノマーは、各々が約3～約35のヌクレオシド残基を、好ましくは約4～約30のヌクレオシド残基を、より好ましくは約4～約20のヌクレオシド残基を有するオリゴヌクレオチドを含む。ある態様において、オリゴヌクレオチドは、約5もしくは6～約18、または約5もしくは6～約14のヌクレオシド残基を含む。本明細書において、用語「約」とは、正確な数値が重要ではないことを意味する。従って、オリゴヌクレオチドにおけるヌクレオシド残基の数は重要ではなく、1つもしくは2つ少ないヌクレオシド残基、または1つもしくは数個の余分なヌクレオシド残基を有するオリゴヌクレオチドもまた、本発明のためには、上記の態様の各々と等価であると考えられる。ある態様において、1つまたは2つ以上のオリゴヌクレオチドは11個のヌクレオチドを有する。

20

【0023】

用語「オリゴヌクレオチド」はまた、限定なく、タンパク質基、親油性基、インターカレート剤、ジアミン、葉酸、コレステロール、およびアダマンタンを含む付加的置換基を有するポリヌクレオチドを包含する。用語「オリゴヌクレオチド」はまた、ポリマーを包含する他の任意の核酸塩基を含み、これらには、限定なしに、ペプチド核酸 (PNA)、ホスフェート基を有するペプチド核酸 (PHONA)、ロックド核酸 (LNA)、モルホリノ骨格オリゴヌクレオチド、およびアルキルリンカーやアミノリンカーをもつ骨格部分を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。

30

【0024】

本発明による方法において用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーは、天然に存在するヌクレオシド、修飾ヌクレオシド、またはこれらの混合物を含むことができる。本明細書において、用語「修飾ヌクレオシド」とは、修飾複素環塩基、修飾糖部分またはこれらの組み合わせを含むヌクレオシドである。ある態様において、修飾ヌクレオシドは、ここで述べるような非天然ピリミジンまたはプリンヌクレオシドである。ある態様においては、修飾ヌクレオシドは2'-置換リボヌクレオシド、アラビノヌクレオシドまたは2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノシドである。

40

【0025】

本発明のためには、用語「2'-置換リボヌクレオシド」は、ペントース部分の2'位におけるヒドロキシル基が置換されて2'-O-置換リボヌクレオシドとなるリボヌクレオシドを含む。好ましくは、かかる置換は、1～6個の飽和もしくは不飽和炭素原子を含む低級アルキル基、または、6～10個の炭素原子を有するアリール基によりなされ、かかるアルキルまたはアリール基は、置換されていなくてもよく、または、例えばハロ (halo)、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アシル、アシルオキシ、アルコキシ、カルボキシル、カルボアルコキシ、もしくはアミノ基に置換されていてもよい。かかる2'-O-置換リボヌクレオシドの例は、限定なく、2'-O-メチルリボヌクレオシドおよび2'-O-メトキシエチルリボヌクレオシドを含む。

50

【0026】

用語「2'-置換リボヌクレオシド」はまた、2'-ヒドロキシル基が、1～6個の飽和または不飽和炭素原子を含む低級アルキル基またはアミノもしくはハロ基により置換されている、リボヌクレオシドを含む。そのような2'-置換リボヌクレオシドの例は、限定なく、2'-アミノ、2'-フルオロ、2'-アシル、および2'-プロパルギルリボヌクレオシドを含む。

用語「オリゴヌクレオチド」はハイブリッドおよびキメラオリゴヌクレオチドを含む。「キメラオリゴヌクレオチド」は、1種より多いヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドである。かかるキメラオリゴヌクレオチドの好ましい1例は、ホスホロチオエート、ホスホジエステルまたはホスホロジチオエート部位およびアルキルホスホネートまたはアルキルホスホチオエート結合などの非イオン結合を含むキメラオリゴヌクレオチドである（例えばPederson et al.の、米国特許第5,635,377号および第5,366,878号などを参照）。

10

【0027】

「ハイブリッドオリゴヌクレオチド」は、1種より多いヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドである。かかるハイブリッドオリゴヌクレオチドの好ましい1例は、リボヌクレオチド、または2'-置換リボヌクレオチド部位、およびデオキシリボヌクレオチド部位を含む（例えばMetelevおよびAgrawal、米国特許第5,652,355号、第6,346,614号および第6,143,881号を参照）。

【0028】

本発明のためには、用語「免疫刺激性オリゴヌクレオチド」は、魚類、鳥類または哺乳類などの脊椎動物に投与された場合に免疫反応を引き起こす、上記のオリゴヌクレオチドを指す。本明細書において、用語「哺乳類」は、限定なく、ラット、マウス、ネコ、イヌ、ウマ、家畜、ウシ、ブタ、ウサギ、非ヒト霊長類、およびヒトを含む。有用な免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、Agrawal et al.らの、1998年11月5日に公開されたW0 98/49288；2001年2月22日に公開されたW0 01/12804、2001年8月2日に公開されたW0 01/55370、2001年4月30日に申請されたPCT/US01/13682；および2001年9月26日に申請されたPCT/US01/30137に記載されている。好ましくは、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、またはホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む。

20

【0029】

ある態様において、イムノマーの少なくとも1つの免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、式：5'-Py r -P u r -3'で表される免疫刺激性ジヌクレオチドを含み、式中、Py rは天然または合成ピリミジンヌクレオシドであり、P u rは天然または合成プリンヌクレオシドである。本明細書において、用語「ピリミジンヌクレオシド」は、ヌクレオシドの塩基成分がピリミジン塩基であるヌクレオシドを指す。同様に、用語「プリンヌクレオシド」は、ヌクレオシドの塩基成分がプリン塩基であるヌクレオシドを指す。本発明のためには、「合成」ピリミジンまたはプリンヌクレオシドは、天然に存在しないピリミジンまたはプリン塩基、天然に存在しない糖部分、またはこれらの組み合わせを含む。

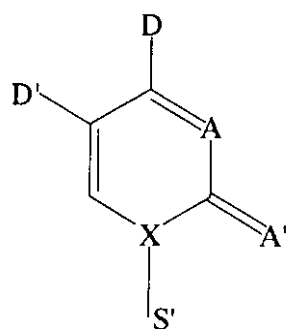
30

【0030】

本発明による方法において用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーにおける好ましいピリミジンヌクレオシドは、構造（I）：

40

【化 1】



(I)

10

(i) 式中、

D は、水素結合供与体 (hydrogen bond donor) であり；

D' は、水素、水素結合供与体、水素結合受容体 (hydrogen bond acceptor)、親水基、疎水基、電子求引基および電子供与基からなる群から選択され；

A は、水素結合受容体または親水基であり；

A' は、水素結合受容体、親水基、疎水基、電子求引基および電子供与基からなる群から選択され；

20

X は、炭素または窒素であり；そして

S' は、ペントースもしくはヘキソース糖環、または天然に存在しない糖である、を有する。

【 0 0 3 1】

好ましくは、糖環は、ホスフェート部分、修飾ホスフェート部分、またはピリミジンヌクレオシドを他のヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体に結合するのに好適な他のリンカー部分により誘導体化されている。

好ましい水素結合供与体は、限定なく、 $-NH-$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ および $-OH$ を含む。好ましい水素結合受容体は、限定なく、 $C=O$ 、 $C=S$ 、および芳香族複素環の環窒素原子、例えばシトシンの N3 を含む。

30

【 0 0 3 2】

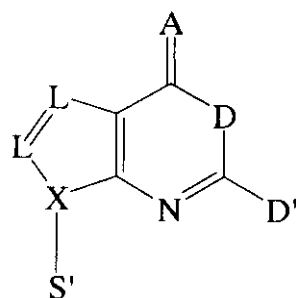
ある態様において、(I) の塩基部分は、天然に存在しないピリミジン塩基である。天然に存在しない好ましいピリミジン塩基の例は、限定なく、5 - ヒドロキシシトシン、5 - ヒドロキシメチルシトシン、N4 - アルキルシトシン、好ましくは N4 - エチルシトシンおよび 4 - チオウラシルを含む。ある態様において (I) の糖部分 S' は、天然に存在しない糖部分である。本発明のためには、「天然に存在する糖部分」は、例えばリボースおよび 2' - デオキシリボースなどの、核酸の一部として天然に存在する糖部分であり、「天然に存在しない糖部分」は、核酸の一部として天然に存在しない任意の糖であるが、ヘキソースなどのオリゴヌクレオチドの骨格において用いることのできるものである。アラビノースおよびアラビノース誘導体は、好ましい糖部分の例である。

40

【 0 0 3 3】

本発明による方法において用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび / またはイムノマーにおける、好ましいプリンヌクレオシド類似体は、構造 (II)：

【化 2】



(II)

10

(i i) 式中、

D は、水素結合供与体であり；

D' は、水素、水素結合供与体、および親水基からなる群から選択され；

A は、水素結合受容体または親水基であり；

X は、炭素または窒素であり；

各 L は、独立して C、O、N および S からなる群から選択され；そして、

S' は、ペントースもしくはヘキソース糖環、または天然に存在しない糖である、を有する。

【 0 0 3 4 】

20

好ましくは、糖環は、ホスフェート部分、修飾ホスフェート部分、またはピリミジンヌクレオシドを他のヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体に結合するのに好適な他のリンカー部分により誘導体化されている。

好ましい水素結合供与体は、限定なく、 $-NH-$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ および $-OH$ を含む。好ましい水素結合受容体は、限定なく、 $C=O$ 、 $C=S$ 、 $-NO_2$ 、および芳香族複素環の環窒素原子、例えばグアニンの N1 を含む。

【 0 0 3 5 】

ある態様において、(I I) の塩基部分は、天然に存在しないプリン塩基である。天然に存在しない好ましいプリン塩基の例は、限定なく、6 - チオグアニンおよび 7 - デアザグアニンを含む。ある態様において、(I I) の糖部分 S' は、構造 (I) について上記したように、天然に存在する糖部分である。

30

【 0 0 3 6 】

好ましい態様において、本発明による方法において用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび / またはイムノマーにおける免疫刺激性ジヌクレオチドは、 CpG 、 C^*pG 、 CpG^* 、および C^*pG^* からなる群から選択され、この式中、C は、シチジンまたは 2' - デオキシシチジンであり、 C^* は、2' - デオキシチミジン、アラビノシチジン、2' - デオキシチミジン、2' - デオキシ - 2' - 置換アラビノシチジン、2' - O - 置換アラビノシチジン、2' - デオキシ - 5 - ヒドロキシシチジン、2' - デオキシ - N4 - アルキル - シチジン、2' - デオキシ - 4 - チオウリジン、他の非天然ピリミジンヌクレオチド、または 1 - (2' - デオキシ - D - リボフラノシル) - 2 - オキソ - 7 - デアザ - 8 - メチル - プリンであり；G は、グアノシンまたは 2' - デオキシグアノシンであり、 G^* は、2' - デオキシ - 7 - デアザグアノシン、2' - デオキシ - 6 - チオグアノシン、アラビノグアノシン、2' - デオキシ - 2' - 置換 - アラビノグアノシン、2' - O - 置換 - アラビノグアノシン、2' - デオキシイノシン、または他の非天然プリンヌクレオチドであり、そして p は、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、およびホスホロジチオエートからなる群から選択されるヌクレオチド間結合である。ある好ましい態様において、免疫刺激性ジヌクレオチドは CpG ではない。

40

【 0 0 3 7 】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、免疫刺激性部分を、免疫刺激性ジヌクレオチドの片側または両側に含むことができる。従って、ある態様において、免疫刺激性オリゴヌクレ

50

オチドは、構造 (I I I) :

5' - N n - N 1 - Y - Z - N 1 - N n - 3' (I I I)

式中、

Y は、シチジン、2' - デオキシチミジン、2' - デオキシシチジン、アラビノシチジン、2' - デオキシ - 2' - 置換アラビノシチジン、2' - デオキシチミジン、2' - O - 置換アラビノシチジン、2' - デオキシ - 5 - ヒドロキシシチジン、2' - デオキシ - N 4 - アルキル - シチジン、2' - デオキシ - 4 - チオウリジン、その他の非天然ピリミジンヌクレオシド、または 1 - (2' - デオキシ - D - リボフラノシル) - 2 - オキソ - 7 - デアザ - 8 - メチル - プリンであり；

【 0 0 3 8 】

Z は、グアノシンまたは 2' - デオキシグアノシン、2' - デオキシ - 7 - デアザグアノシン、2' - デオキシ - 6 - チオグアノシン、アラビノグアノシン、2' - デオキシ - 2' - 置換アラビノグアノシン、2' - O - 置換アラビノグアノシン、2' - デオキシイノシンまたはその他の非天然プリンヌクレオシドであり；

N 1 は、各々の場合に、天然に存在するかまたは合成のヌクレオシドまたは免疫刺激部分であって、これらは、脱塩基ヌクレオシド、アラビノヌクレオシド、2' - デオキシウリジン、- デオキシリボヌクレオシド、- L - デオキシリボヌクレオシド、およびホスホジエステルまたは修飾ヌクレオシド間結合により隣接ヌクレオシドの 3' 側へ結合されたヌクレオシドからなる群から選択され、ここで前記修飾ヌクレオシド間結合は、限定することなく、約 2 オングストローム ~ 約 2 0 0 オングストロームの長さを有するリンカー、C 2 ~ C 1 8 アルキルリンカー、ポリ (エチレングリコール) リンカー、2 - アミノブチル - 1 , 3 - プロパンジオールリンカー、グリセリルリンカー、2' - 5' ヌクレオシド間結合、およびホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、もしくはメチルホスホネートヌクレオシド間結合から選択され；

【 0 0 3 9 】

N n は、各々の場合に、好ましくは天然に存在するヌクレオシドまたは免疫刺激部分であって、これらは、脱塩基ヌクレオシド、アラビノヌクレオシド、2' - デオキシウリジン、- デオキシリボヌクレオシド、2' - O - 置換リボヌクレオシド、および修飾ヌクレオシド間結合により隣接ヌクレオシドの 3' 側へ結合されたヌクレオシド、からなる群から選択され、ここで前記修飾ヌクレオシド間結合は、好ましくは、アミノリンカー、C 2 ~ C 1 8 アルキルリンカー、ポリ (エチレングリコール) リンカー、2 - アミノブチル - 1 , 3 - プロパンジオールリンカー、グリセリルリンカー、2' - 5' ヌクレオシド間結合、およびメチルホスホネートヌクレオシド間結合からなる群から選択される；

で表される免疫刺激性ドメインを含み、

ただし、N 1 または N n の少なくとも 1 つは免疫刺激性部分であり；

ここで各 n は独立して、0 ~ 3 0 の数であり；そして

ここで、イムノマーの場合は、3' 末端は直接または非ヌクレオチドリナーを介して他のオリゴヌクレオチドに結合されており、これは免疫刺激性であってもなくてもよい。

【 0 0 4 0 】

ある好ましい態様において、Y Z は、アラビノシチジンまたは 2' - デオキシ - 2' - 置換アラビノシチジンおよび、アラビノグアノシンまたは 2' - デオキシ - 2' - 置換アラビノグアノシンである。好ましい免疫刺激性部分はホスフェート骨格の修飾を含み、これには、限定なく、メチルホスホネート、メチルホスホノチオエート、ホスホトリエステル、ホスホチオトリエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、トリエステルプロドラッグ、スルホン、スルホンアミド、スルファメート、ホルムアセタール、N - メチルヒドロキシルアミン、カーボネート、カルバメート、モルホリノ、ボラノホスホネート、ホスホラミダイト、特に 1 級アミノ - ホスホラミダイト、N 3 ホスホラミダイトおよび N 5 ホスホラミダイト、および立体特異的結合 (例えば、(R_p) - または (S_p) - ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、またはホスホトリエステル結合) が含まれる。

10

20

30

40

50

【0041】

本発明による好ましい免疫刺激性部分は、糖修飾を有するヌクレオシドをさらに含み、これには限定なく以下が含まれる：限定なく2'-O-メチルリボース、2'-O-メトキシエチルリボース、2'-O-プロパルギルリボース、および2'-デオキシ-2'-フルオロリボースを含む、2'-置換ペントース糖；限定なく3'-O-メチルリボースを含む、3'-置換ペントース糖；1', 2'-ジデオキシリボース；アラビノース；限定なく1'-メチルアラビノース、3'-ヒドロキシメチルアラビノース、4'-ヒドロキシチルアラビノース、および2'-置換アラビノース糖を含む、置換アラビノース糖；限定なく1, 5-アンヒドロヘキシトールを含む、ヘキソース糖；並びにアルファ-アノマー。修飾糖が3'-デオキシリボヌクレオシドまたは3'-O-置換リボヌクレオシドである態様においては、免疫刺激性部分は、2'-5'ヌクレオシド間結合によって隣接するヌクレオシドに付着している。

10

【0042】

本発明による方法において用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーにおける好ましい免疫刺激性部分は、他の炭水化物骨格修飾物および置換物を有するオリゴヌクレオチドをさらに含み、これには以下が含まれる：ペプチド核酸(PNA)、ホスフェート基を有するペプチド核酸(PHONA)、ロックド核酸(LNA)、モルホリノ骨格オリゴヌクレオチド、および約2オングストローム~約200オングストロームの長さを有する骨格リンカー部を有するオリゴヌクレオチドであって、限定なくアルキルリンカーまたはアミノリンカーを含むもの。アルキルリンカーは、分枝または非分枝であってもよく、置換または無置換であってもよく、キラル的に純粋であってもラセミ混合物であってもよい。最も好ましくは、かかるアルキルリンカーは約2~約18個の炭素原子を有する。ある好ましい態様においては、かかるアルキルリンカーは約3~約9個の炭素原子を有する。あるアルキルリンカーは、ヒドロキシ、アミノ、チオール、エーテル、アミド、チオアミド、エステル、尿素およびチオエーテルからなる群から選択される、1つまたは2つ以上の官能基を含む。かかる官能基アルキルリンカーのあるものは、式-O-(CH₂-CH₂-O)_n(n=1~9)で表されるポリ(エチレングリコール)リンカーである。かかる官能基アルキルリンカーの他のあるものは、ペプチドまたはアミノ酸である。

20

【0043】

本発明による方法において用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーにおける、好ましい免疫刺激性部分は、限定なく-L-デオキシリボヌクレオシドおよび-D-デオキシリボヌクレオシドを含むDNAアイソフォームを、さらに含む。好ましい免疫刺激性部分は、3'修飾を組み込み、そして、限定なく2'-5'、2'-2'、3'-3'および5'-5'結合を含む、非天然のヌクレオシド間結合位を有するヌクレオシドをさらに含む。

30

本発明による方法において用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーにおける、好ましい免疫刺激性部分は、修飾複素環塩基を有するヌクレオシドをさらに含み、これらは、限定なく、5-ヒドロキシシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、N⁴-アルキルシトシン、好ましくはN⁴-エチルシトシン、4-チオウラシル、6-チオグアニン、7-デアザグアニン、イノシン、ニトロピロール、C⁵-プロピニルピリミジン、および限定なく2, 6-ジアミノプリンを含むジアミノプリンを含む。

40

【0044】

具体的な例により、そして限定することなく、例えば、構造(III)の免疫刺激性ドメインにおいて、N¹位またはNⁿ位のメチルホスホネートヌクレオシド間結合は、免疫刺激性部分であり、リンカーは約2オングストローム~約200オングストロームの長さを有し、X¹位のC²~C¹⁸アルキルリンカーは免疫刺激性部分であり、そしてX¹位の-L-デオキシリボヌクレオシドは免疫刺激性部分である。免疫刺激性部分の代表的な位置および構造については、下の表1を参照のこと。特定位置における免疫刺激性部分としてのリンカーの言及は、その位置のヌクレオシド残基がその3'-ヒドロキシルにお

50

いて指定のリンカーによって置換され、それによって、そのヌクレオシド残基と3'側の隣接するヌクレオシドとの間に修飾ヌクレオシド間結合を生成することを意味すると理解される。同様に、特定位置における免疫刺激性部分としての修飾ヌクレオシド間結合の言及は、その位置のヌクレオシド残基が、3'側の隣接するヌクレオシドに、列挙された結合によって結合されていることを意味する。

【0045】

表 1

【表 1】

位置	代表的な免疫刺激性部分
N1	天然に存在するヌクレオシド、脱塩基ヌクレオシド、アラビノヌクレオシド、2'-デオキシウリジン、β-L-デオキシリボヌクレオシド、C2~C18アルキルリンカー、ポリ(エチレングリコール)結合、2-アミノブチル-1, 3-プロパンジオールリンカー(アミノリンカー)、2'-5'ヌクレオシド間結合、メチルホスホネートヌクレオシド間結合
Nn	天然に存在するヌクレオシド、脱塩基ヌクレオシド、アラビノヌクレオシド、2'-デオキシウリジン、2'-O-置換リボヌクレオシド、2'-5'ヌクレオシド間結合、メチルホスホネートヌクレオシド間結合、ただしN1およびN2の両方ともが脱塩基結合とはなり得ないとする

10

20

表 2 は、上流増強ドメイン(upstream potentiation domain)を有する免疫刺激性オリゴヌクレオチド内の免疫刺激性部分の代表的な位置および構造を示す。本明細書において、用語「スペーサー 9」は、式 $-O-(CH_2CH_2-O)_n-$ 、式中 n は 3 である、で表されるポリ(エチレングリコール)リンカーを指す。用語「スペーサー 18」は、式 $-O-(CH_2CH_2-O)_n-$ 、式中 n は 6 である、で表されるポリ(エチレングリコール)リンカーを指す。本明細書において、用語「C2~C18アルキルリンカー」は、式 $-O-(CH_2)_q-O-$ 、式中 q は 2~18 の整数である、で表されるリンカーを指す。従って、用語「C3リンカー」および「C3アルキルリンカー」は、式 $-O-(CH_2)_3-O-$ で表されるリンカーを指す。スペーサー 9、スペーサー 18、および C2~C18アルキルリンカーの各々について、リンカーは、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートまたはメチルホスホネート結合によって、隣接するヌクレオシドに結合される。

30

【0046】

表 2

【表 2】

位置	代表的な免疫刺激性部分
5' N2	天然に存在するヌクレオシド、2-アミノブチル-1, 3-プロパンジオールリンカー
5' N1	天然に存在するヌクレオシド、 β -L-デオキシリボヌクレオシド、C2~C18アルキルリンカー、ポリ(エチレングリコール)、脱塩基リンカー、2-アミノブチル-1, 3-プロパンジオールリンカー
3' N1	天然に存在するヌクレオシド、1', 2'-ジデオキシリボース、2'-O-メチルリボヌクレオシド、C2~C18アルキルリンカー、スペーサー9、スペーサー18
3' N2	天然に存在するヌクレオシド、1', 2'-ジデオキシリボース、3'-デオキシリボヌクレオシド、 β -L-デオキシリボヌクレオシド、2'-O-プロパルギルリボヌクレオシド、C2~C18アルキルリンカー、スペーサー9、スペーサー18、メチルホスホネートヌクレオシド間結合
3' N3	天然に存在するヌクレオシド、1', 2'-ジデオキシリボース、C2~C18アルキルリンカー、スペーサー9、スペーサー18、メチルホスホネートヌクレオシド間結合、2'-5'ヌクレオシド間結合、d(G)n、ポリI-ポリdC
3' N2+3' N3	1', 2'-ジデオキシリボース、 β -L-デオキシリボヌクレオシド、C2~C18アルキルリンカー、d(G)n、ポリI-ポリdC
3' N3+3' N4	2'-O-メトキシエチルリボヌクレオシド、メチルホスホネートヌクレオシド間結合、d(G)n、ポリI-ポリdC
3' N5+3' N6	1', 2'-ジデオキシリボース、C2~C18アルキルリンカー、d(G)n、ポリI-ポリdC
5' N1+3' N3	1', 2'-ジデオキシリボース、d(G)n、ポリI-ポリdC

10

20

表 3 は、下流増強ドメイン (downstream potentiation domain) を有する免疫刺激性オリゴヌクレオチド内の免疫刺激性部分の代表的な位置および構造を示す。

【0047】

表 3

30

【表 3】

位置	代表的な免疫刺激性部分
5' N2	メチルホスホネートヌクレオシド間結合
5' N1	メチルホスホネートヌクレオシド間結合
3' N1	1', 2'-ジデオキシリボース、メチルホスホネートヌクレオシド間結合、2'-O-メチル
3' N2	1', 2'-ジデオキシリボース、 β -L-デオキシリボヌクレオシド、C2~C18アルキルリンカー、スペーサー9、スペーサー18、2-アミノブチル-1, 3-プロパンジオールリンカー、メチルホスホネートヌクレオシド間結合、2'-O-メチル
3' N3	3'-デオキシリボヌクレオシド、3'-O-置換リボヌクレオシド、2'-O-プロパルギルリボヌクレオシド
3' N2+3' N3	1', 2'-ジデオキシリボース、 β -L-デオキシリボヌクレオシド

40

本発明による方法において用いるイムノマーは、直接または非ヌクレオチドリンカーを介して結合した、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。本発明のためには、「非ヌクレオチドリンカー」は、オリゴヌクレオチドに共有結合または非共有結合で結合できる任意の部分である。好ましくは、かかるリンカーの長さは約2オングストローム~約2

50

00 オングストロームである。好ましいリンカーの幾つかの例が、以下に記されている。非共有結合は、限定はされないが、静電相互作用、疎水性相互作用、スタッキング相互作用、および水素結合を含む。用語「非ヌクレオチドリンカー」は、上記のような、例えばホスホジエステル、ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート官能基などの、2つのヌクレオシドの3'-ヒドロキシル基を直接結合するヌクレオシド間結合を指すことは意味しない。本発明のためには、かかる直接3'-3'結合は「ヌクレオチド結合」と考えられる。

【0048】

ある態様において、非ヌクレオチドリンカーは金属であり、限定なく、金粒子を含む。他のある態様において、非ヌクレオチドリンカーは溶解性または不溶解性の生体分解性ポリマービーズである。

10

さらに他の態様において、非ヌクレオチドリンカーは、オリゴヌクレオチドへの付着を許容する官能基を有する有機部分である。かかる付着は、任意の安定な共有結合によるのが好ましい。

【0049】

ある態様において、非ヌクレオチドリンカーは生体分子であり、限定なく、ポリペプチド、抗体、脂質、抗原、アレルゲンおよびオリゴ糖を含む。他のある態様において、非ヌクレオチドリンカーは小分子である。本発明のためには、小分子は1,000 Da未満の分子量を有する有機部分である。ある態様において、小分子は750 Da未満の分子量を有する。

20

ある態様において、小分子は脂肪族または芳香族炭化水素であり、これらのどちらも、随意的に、オリゴヌクレオチドを結合する直鎖においてまたはそれに付加されて、ヒドロキシ、アミノ、チオール、チオエーテル、エーテル、アミド、チオアミド、エステル、尿素、およびチオ尿素からなる群から選択される1つまたは2つ以上の官能基を含むことができる。小分子は、環式または非環式であることができる。小分子リンカーの例は、限定はされないが、アミノ酸、炭水化物、シクロデキストリン、アダマンタン、コレステロール、ハプテンおよび抗生物質を含む。しかし、非ヌクレオチドリンカーを記述するために、用語「小分子」はヌクレオシドを含むことを意図しない。

【0050】

ある態様において、小分子リンカーは、式 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$ で表されるグリセロールまたはグリセロールホモログであり、式中、 o および p は独立して、1~約6、1~約4、または1~約3の整数である。他のある態様において、小分子リンカーは、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン誘導体である。幾つかのかかる誘導体は、式 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$ で表され、式中、 m は、0~約10、0~約6、2~約6、または2~約4の整数である。

30

【0051】

本発明による方法において用いるイムノマーにおける、ある非ヌクレオチドリンカーは、図1に模式的に示すように、2つより多いオリゴヌクレオチドの付着を許容する。例えば、小分子リンカーグリセロールは、オリゴヌクレオチドが共有的にそれに付着できる3個のヒドロキシル基を有する。本発明によるあるイムノマーは、従って、非ヌクレオチドリンカーに3'末端で結合する、2つより多いオリゴヌクレオチドを含む。幾つかのかかるイムノマーは、その各々が到達可能5'末端を有する、少なくとも2つの免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含む。

40

【0052】

本発明による方法において用いる免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーは、図5および図6に模式的に示されるように、また例にさらに記載されるように、自動合成装置およびホスホラミダイトアプローチを用いて好都合に合成することができる。ある態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーは、直線合成アプローチ(図5参照)により合成される。本明細書において、用語「直線合成」は

50

、イムノマーの1つの末端から開始して、直線的に他の末端へと進行する合成を指す。直線合成は、同一または非同ー（長さ、塩基組成および／または組み込まれる化学修飾に関して）のモノマー単位を、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマーに組み込むことを許容する。

【0053】

イムノマーの合成の代替的な様式は「パラレル合成」であり、ここで合成は中心リンカー部分から外向きに進行する（図6参照）。パラレル合成には、米国特許第5,912,332号に記載されているように固体サポート付着リンカー（solid support attached linker）を用いることができる。代替的に、例えば制御ポアガラスサポートに付着したホスフェートなどのユニバーサル固体サポートを用いることもできる。

10

イムノマーのパラレル合成は、直線合成に対して幾つかの利点を有する：（1）パラレル合成は同一のモノマー単位の組み込みを許容する；（2）直線合成とは異なり、両方（または全て）のモノマー単位が同時に合成され、そのため合成に必要な合成ステップ数および時間が、モノマー単位のそれらと同じになる；および（3）合成ステップ数の減少は、最終イムノマー産物の純度および収率を改善する。

【0054】

直線合成またはパラレル合成プロトコルによる合成の最後に、本発明による方法において用いる免疫刺激性オリゴヌクレオチドまたはイムノマーは好都合に脱保護することができ、これは濃縮アンモニア溶液を用いて、またはもし修飾ヌクレオシドが組み込まれる場合はホスホラミダイト供給者による推奨に従って行う。免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび／またはイムノマー産物は、逆相HPLCにより好ましくは精製され、脱トリチル化され（detritylated）、脱塩されそして透析される。

20

【0055】

表4は、本発明による方法において用いられる代表的イムノマーを示す。さらなるイムノマーは例に記載される。

表4．イムノマーの配列の例

【表 4】

表 4. イムノマーの配列の例

オリゴまたは イムノマー No.	配列および修飾 (5'-3')
1	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
2	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'-3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5'
3	3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5'-5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
5	5'-T-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{HNCO-C}_4\text{H}_8\text{-5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'} \\ \text{HNCO-C}_4\text{H}_8\text{-5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$
6	$\left. \begin{array}{l} 5\text{'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \\ 5\text{'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \end{array} \right\} 3\text{'-C-5'}$
7	$\left. \begin{array}{l} 5\text{'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \\ 5\text{'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \end{array} \right\} 3\text{'-C-5'}$
8	$\left. \begin{array}{l} 5\text{'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'} \\ 5\text{'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right\} 3\text{'-C-5'}$
9	$\left. \begin{array}{l} 5\text{'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3'} \\ 5\text{'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right\} 3\text{'-C-5'}$
10	$\left. \begin{array}{l} 5\text{'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3'} \\ 5\text{'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3'} \end{array} \right\} 3\text{'-C-5'}$
11	$\left. \begin{array}{l} 5\text{'-CTALCTGAYGTTCTCTGT-3'} \\ 5\text{'-CTALCTGAYGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right\} 3\text{'-C-5'}$
12	$\left. \begin{array}{l} 5\text{'-CTALCTGACRTTCTCTGT-3'} \\ 5\text{'-CTALCTGACRTTCTCTGT-3'} \end{array} \right\} 3\text{'-C-5'}$
13	5'-CTGACGTTCTCTGT-3'
14	$\left. \begin{array}{l} 5\text{'-CTGACGTTCTCTGT-3'} \\ 5\text{'-CTGACGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right\} 3\text{'-C-5'}$

10

20

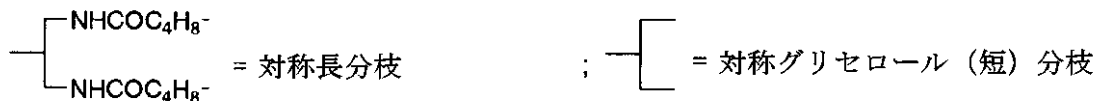
30

【表 5】

15	5'-CTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTGAYGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
16	5'-CTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTGACRTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
17	5'-XXTGACGTTCTCTGT-3'	
18	5'-XXXTGACGTTCTCTGT-3' 5'-XXXTGACGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
19	5'-XXXTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-XXXTGAYGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
20	5'-XXXTGACRTTCTCTGT-3' 5'-XXXTGACRTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
21	5'-TCTGACGTTCT-3'	
22	5'-XXXTCTGACGTTCT-3' 5'-XXXTCTGACGTTCT-3'	3'-C-5'
23	5'-XXXTCTGAYGTTCT-3' 5'-XXXTCTGAYGTTCT-3'	3'-C-5'
24	5'-XXXTCTGACRTTCT-3' 5'-XXXTCTGACRTTCT-3'	3'-C-5'

10

20



L = C3-アルキルリンカー; X = 1'-2'-ジデオキシリボシド; Y = ^{5OH}dC; R = 7-デアザ-dG

【0056】

第2の側面において、本発明は、患者に対して、化学療法剤を免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマー結合体と組み合わせて投与することを含む、癌患者における癌を処置する方法を提供し、該結合体は、上記の免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマー、および到達可能5'末端以外の位置において免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーに結合される抗原を含む。ある態様において、非ヌクレオチドリinkerは、癌に関連する抗原を含み、該抗原はオリゴヌクレオチドに結合される。他のある態様において、抗原は、3'末端以外の位置においてオリゴヌクレオチドに結合される。ある態様において、抗原は、ワクチン効果を生じる。本発明のためには、用語「関連する」は、癌が存在する場合には抗原が存在するが、癌が不在の場合は、抗原が存在しないかまたは少ない量で存在することを意味する。

30

【0057】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーは、抗原に共有結合で結合するか、そうでなければ、抗原と動作可能に結合する。本明細書において、用語「動作可能に結合する」は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーおよび抗原の両方の活性を維持する任意の結合を指す。かかる動作可能な結合の非限定的な例は、同じリボソームまたは他のかかる送達ビヒクルもしくは試薬の一部となることである。さらに、抗原をコードする核酸分子を発現ベクターにクローニングして、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーと組み合わせて投与することができる。本明細書において、用語「ベクター」は、それらが結合した他の核酸を輸送する能力のある核酸分子を指す。好ましいベクターは、それらが結合した核酸（例えばエピソーム）の自己複製および発現が可能なベクターである。それらが動作可能に結合した遺伝子の発現を方向付けることができるベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組み換えDNA技術において有用な発現ベクターはしばしば「プラスミド」の形をしており、

40

50

通常、環状二本鎖DNAループと呼ばれ、そのベクター形態においてクロモソームに結合されない。本明細書において「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であるため、同義的に用いられる。しかし、本発明は、等価な機能をもたらし、これから続いて当分野に知られるようになる発現ベクターの他の形態も包含することが意図される。

【0058】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーが抗原に共有結合で結合している態様においては、かかる共有結合は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドの到達可能5'末端以外の、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーの任意の位置であるのが好ましい。例えば、抗原は、ヌクレオチド間結合に付着してもよく、または非ヌクレオチドリンカーに付着してもよい。代替的に、抗原はそれ自体が非ヌクレオチドリンカーであってもよい。

10

【0059】

第3の側面において、本発明は、本発明の免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/または免疫刺激性オリゴヌクレオチド結合体および/またはイムノマーまたはイムノマー結合体、化学療法剤および生理学的に許容し得る担体を含む、医薬製剤を提供する。本明細書において、用語「生理学的に許容し得る」とは、イムノマーの有効性を妨げず、細胞、細胞培養物、組織、または生物などの生体系と適合する物質を指す。好ましくは、生体系は脊椎動物などの生物である。好ましい化学療法剤は、限定なく、ゲムシタピン、メトトレキサート、ビンクリスチン、アドリマイシン、シスプラチン、糖非含有クロロエチルニトロソウレア、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、ブレオマイシン、ドキソルビシン、ダカルバジン、タキソール、フラギリン、メグラミンGLA、バルルピシン、カルムスタインおよびポリフェルボサン、MMI270、BAY12-9566、RASファメシルトランスフェラーゼ阻害剤、ファメシルトランスフェラーゼ阻害剤、MMP、MTA/LY231514、LY264618/ロメテキソール、グラモレク、CI-994、TNP-470、ヒカムチン/トポテカン、PKC412、バルスポダール/PSC833、ノバントロン/ミトロキサントロン、メタレット/スラミン、バチマスタット、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、インセル/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN698、TA2516/マルミスタット、BB2516/マルミスタット、CDP845、D2163、PD183805、DX8951f、レモナールDP2202、FK317、メシル酸イマチニブ/グリベック、ピシパニル/OK-432、AD32/バルルピシン、

20

30

【0060】

メタストロン/ストロンチウム誘導体、テモダール/テモゾロミド、エバセット/リポソームドキソルビシン、ユータキサン/パクリタキセル、タキソール/パクリタキセル、キセロアド/カペシタピン、フルツロン/ドキシフルリジン、シクロパックス/経口パクリタキセル、経口タキソイド、SPU-077/シスプラチン、HMR1275/フラボピリドール、CP-358(774)/EGFR、CP-609(754)RAS腫瘍遺伝子阻害剤、BMS-182751/経口プラチナ、UFT(テガフル/ウラシル)、エルガミゾール/レバミゾール、エニルウラシル/776C85/5FUエンハンサー、カンプト/レバミゾール、カンプトサル/イリノテカン、ツモデックス/ラリトレキセド、ルイスタチン/クラドリピン、パキセックス/パクリタキセル、ドキシル/リポソームドキソルビシン、カエリクス/リポソームドキソルビシン、フルダラ/フルダラピン、ファルモルピシン/エピルピシン、デポシト、ZD1839、LU79553/ビス-ナフタリミド、LU103793/ドラスティン、カエチックス/リポソームドキソルビシン、ゲムザール/ゲムシタピン、ZD0473/アノルメド、YM116、ロジンシード、CDK4およびCDK2阻害剤、PARP阻害剤、

40

【0061】

D4809/デキシホスファアミド、イフェス/メスネックス/イホスファミド、ブモン/テニボシド、パラプラチン/カルボプラチン、プランチノール/シスプラチン、ベペシ

50

ドノエトボシド、Z D 9 3 3 1、タキソテレノドセタキセル、グアニンアラビノシドのプロドラッグ、タキサン類似体、ニトロソウレア、メルフェランおよびシクロホスファミドなどのアルキル化剤、アミノグルテチミド、アルパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クロロンプシル、シタラピンH C 1、ダクチノマイシン、ダウノルピシンH C 1、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エトボシド(V P 1 6 - 2 1 3)、フロクスウリジン、フルオロウラシル(5 - F U)、フルタミド、ヒドロキシウレア(ヒドロシカルバミド)、イホスファミド、インターフェロンアルファ - 2 a、アルファ - 2 b、酢酸ロイプロリド(L H R H放出因子類似体)、ロムスチン(C C N U)、メクロレタミンH C 1(ナイトロジェンマスタード)、メルカプトプリン、メスナ、ミトタン(o . p ' - D D D)、ミトキサントロンH C 1、オクトレオチド、プリカマイシン、プロカルバジンH C 1、ストレプトゾシン、クエン酸タモキシフェン、チオグアニン、チオテパ、硫酸ピンブラスチン、アムサクリン(m - A M S A)、アザシチジン、エリスロポエチン、ヘキサメチルメラミン(H M M)、インターロイキン2、ミトグアゾン(メチル - G A G ; メチルグリオキサールビス - グアニルヒドラゾン ; M G B G)、ペントスタチン(2'デオキシコホルマイシン)、セムスチン(メチル - C C N U)、テニボシド(V M - 2 6)および硫酸ビンデシンを含む。

10

【0062】

さらに他の態様において、製剤は、E F G、抗イディオタイプ癌ワクチン、G p 7 5 抗原、G M Kメラノーマワクチン、M G Vガングリオシド結合ワクチン、H e r 2 / n e w、オバレックス(Ovarex)、M - V a x、O - V a x、L - V a x、S T n - K H Lテラトープ(theratope)、B L P 2 5(M U C - 1)、リポソームイディオタイプワクチン、メラシン(Melacine)、ペプチド抗原ワクチン、毒素/抗原ワクチン、M V Aベース(MVA-vased)ワクチン、P A C I S、B C Gワクチン、T A - H P V、T A - C I N、D I S C ウィルスおよびImmunCyst/TheraCys、からなる群から選択される癌ワクチンを含む。

20

【0063】

さらなる側面において、本発明は、モノクローナル抗体を本明細書に記載の免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーと組み合わせて患者に投与することを含む、癌患者における癌を処置する方法を提供する。抗体の形態、そして特にモノクローナル抗体の形態での受動免疫療法は、抗癌剤として多くの研究および開発の主題であった。本明細書における用語「モノクローナル抗体」は、単一の分子組成の抗体分子を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を示す。従って、用語「ヒトモノクローナル抗体」は、単一の結合特異性を示し、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を指す。抗癌剤の例は、限定はされないが、パノレックス(Panorex)(Glaxo-Wellcome)、リツキサン(Rituxan)(IDEC/Genentech/Hoffman la Roche)、ミロターグ(Mylotarg)(Wyeth)、キャンパス(Campath)(Millennium)、ゼバリン(Zevalin)(IDEC and Schering AG)、ベキサール(Bexxar)(Corixa/GSK)、エルピタックス(Erbitux)(Imclone/BMS)、アバスチン(Avastin)(Genentech)およびヘルセプチン(Herceptin)(Genentech/Hoffman la Roche)を含む。抗体はまた、癌抗原を(免疫学的な意味において)模倣するように見える抗イディオタイプ抗体を利用する、能動免疫療法において用いてもよい。モノクローナル抗体は、組み換えD N A技術の分野の業者に知られている方法によって、作製することができる。

30

40

【0064】

本明細書において、用語「担体」は、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定剤、溶解剤、脂質、または医薬製剤において用いるために当分野で知られている他の物質を包含する。担体、賦形剤または希釈剤の特性は、特定用途のための投与経路に依存することが理解される。これらの物質を含む薬学的に許容し得る製剤の製造は、例えばRemingtonのPharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990に記載されている。

【0065】

50

本発明は、化学療法剤および免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーを含むキットを提供し、ここで前記免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/またはイムノマーは、イムノマーが1つより多い5'末端を有するように一緒に結合された少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含み、ここで少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは免疫刺激性オリゴヌクレオチドである。他の側面において、キットは、本発明の免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび/または免疫刺激性オリゴヌクレオチド結合体および/またはイムノマーまたはイムノマー結合体、化学療法剤、および生理学的に許容し得る担体を含む。キットは一般に、使用のための指示書のセットも含む。

【0066】

イムノマー構造と合成刺激性モチーフとの組み合わせ、例えばCpR (R = 2' -デオキシ-7 -デアザグアノシン) は、合成刺激性モチーフなしの場合とは異なったサイトカイン発現プロファイルを誘導した。その結果IMO化合物は、全細菌性産物で頻繁に見られるよりも副作用が少ないだけでなく、癌の種類に依存したより特異的な免疫反応を示す。

【0067】

IMO化合物の腫瘍周辺への繰り返しの適用は、確立された同系腫瘍CT26、CL25およびB16、F0を強く阻害または根絶した。IMOモチーフの腹腔投与も、腹腔内に広がったB16、F0、CT26、WTまたはCT26、CL25腫瘍増殖を抑制した。IMO化合物の幾つかの免疫特性がこの治療効果を説明する。特定の理論に束縛されないことを意図すると、IMOモチーフは、腫瘍小結節周辺に迅速な急性期反応を引き起こす可能性があり、該反応には、マクロファージ、樹状細胞およびNK細胞の補充および活性化並びにサイトカイン分泌の誘導が含まれる。免疫細胞の活性化と整合して、IMO投与の後、血清IL-12および循環NK細胞およびマクロファージ細胞は4時間以内に著しく増加し、24時間持続する(データ示さず)。かかる細胞免疫反応の増強は、腫瘍細胞に対して厳しい環境を作り出し得る。さらに、かかる環境における腫瘍細胞の破壊により、腫瘍抗原が近くの樹状細胞(DC)およびマクロファージへ供給される。IMO化合物は、DCによる抗原提示およびマクロファージの機能的成熟を直接的かつ迅速に促進し、MHCおよび副刺激分子の表面発現を増加させることが示されている。活性化された抗原提示細胞は次に、腫瘍を有するマウスにおいて、Tリンパ球が媒介する特異的な強い適応免疫反応を引き起こす。

【0068】

先天性免疫に加えて、CT26結腸腫瘍を有するマウスの処置は、強い適応免疫反応の発達をもたらす。第1に、-galをモデル抗原として発現する腫瘍を有するマウスのIMO処置は、強力なクラスIMHC拘束性特異的T細胞反応を示した。第2に、腫瘍を有しIMO化合物で処置されたマウスは、同じ腫瘍細胞によるその後のチャレンジに対して特異的に保護され、メモリーTリンパ球の関与が示唆された。第3に、腫瘍を有しIMO化合物で処置されたマウスから得た脾臓細胞を適合的に移植されたナイーブマウスは、特異的抗腫瘍免疫を発達させ、同じ腫瘍のチャレンジを拒絶した。

【0069】

Th2型サイトカインは抗腫瘍免疫力を下方制御し、Th1細胞反応の活性化は抗腫瘍免疫力を増強することができる。従って、Th1型サイトカイン産生へのシフトは、癌の免疫療法およびウイルス感染の処置への有望なアプローチとなり得る。高濃度のTh2サイトカイン、IL-4が、PBSまたは非CpGのDNA対照で処置されたCT26、CL25腫瘍を有するマウスから得た脾臓細胞の培養物中に見出される。対照的に、IMOで処置された、同じ腫瘍を有するマウスからの脾細胞は、より高いIFN- γ を産生し、IMO化合物が、腫瘍を有するマウスにおいてTh2型サイトカイン産生をTh1反応に反転させ得ることを示唆する。さらに、IMO療法は、循環-gal特異的IgG2aの濃度を5倍増加させ(OD単位)、IgG2a/IgG1比率の大幅な増加をもたらした。さらに、IL-12koマウスはIMO処置に応答せず、このTh-1サイトカインの、IMO抗腫瘍活性における役割を示唆した。総合すると、これは、IMO化合物が腫瘍を

10

20

30

40

50

有するマウスにおける T h 1 免疫反応を強力に活性化することを明白に示している。

【 0 0 7 0 】

化学療法単独での、または手術後の追跡治療としての化学療法の主な制限は、毒性および薬剤耐性である。免疫療法を手術および化学療法と組み合わせると、残留腫瘍細胞を一掃し薬剤用量を低減させるという利点を有することができる。これは特に I M O に基づく免疫療法に関してあてはまり、なぜならば、先天性および適応免疫システムの両方を活性化するからである。I M O 処置は化学療法剤の免疫抑制効果を克服することができ、これは、腫瘍を有し I M O 2 とドセタキセルの組み合わせで処置されたマウスにおいて、腫瘍を有しドセタキセルのみで処置されたマウスと比べて、C D 6 9 + および C D 8 6 + 細胞が大幅に減少することによって証拠付けられる。B 1 6 , F 0 メラノーマまたは 4 T 1 乳癌を有するマウスの、それぞれドセタキセルまたはドキソルピシンを用いた従来の化学療法の効果は、I M O 化合物と組み合わせると大幅に増強された。

【 0 0 7 1 】

総合すると、現在の結果は、I M O 化合物が強い免疫薬学的効果および抗腫瘍効果を *in vivo* で誘導することを示唆する。ノックアウトマウスにおける腫瘍実験は、T h 1 サイトカインである I L - 1 2 が、I M O が誘導する抗腫瘍効果に必要とされることを示唆する。さらに、I M O 化合物による処置は、腫瘍の退縮をもたらすだけでなく、強い腫瘍特異的適応免疫反応の発達も導く。さらに、ヒト特異的 I M O 化合物は、同系腫瘍モデルにおける有効な抗癌活性を示す。化学療法剤と I M O 処置との組み合わせにより相乗効果が見出された。さらに、I M O 化合物は化学療法の後に免疫細胞活性化を示し、化学療法によって引き起こされた免疫抑制を克服するための方法として、組み合わせ療法が示唆される。I M O 処置に関連する毒性は、どの腫瘍モデルのマウスにおいても試験された用量では観察されなかった。

以下の例は、本発明のある好ましい態様をさらに説明することを意図しており、本発明の範囲を限定することは意図していない。

【 0 0 7 2 】

例

例 1 : 免疫刺激性部分を含有するオリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドを、1 μ m o l スケールで D N A 自動合成装置 (Expedite 8909; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) を用いて、図 5 および図 6 に概説した直線合成またはパラレル合成方法に従って合成した。

【 0 0 7 3 】

デオキシヌクレオシドホスホラミダイトは、Applied Biosystem (Foster City, CA) から入手した。1' , 2' - ジデオキシリボースホスホラミダイト、プロピル - 1 - ホスホラミダイト、2 - デオキシウリジンホスホラミダイト、1 , 3 - ピス - [5 - (4 , 4' - ジメトキシトリチル) ペンチルアミジル] - 2 - プロパノールホスホラミダイトおよびメチルホスホラミダイトは、Glen Research (Sterling, VA) から入手した。- L - 2' - デオキシリボヌクレオシドホスホラミダイト、- 2' - デオキシリボヌクレオシドホスホラミダイト、モノ - D M T - グリセロールホスホラミダイトおよびジ - D M T - グリセロールホスホラミダイトは、ChemGenes (Ashland, MA) から入手した。(4 - アミノブチル) - 1 , 3 - プロパンジオールホスホラミダイトは、Clontech (Palo Alto, CA) から入手した。アラビノシチジンホスホラミダイト、アラビノグアノシン、アラビノチミジンおよびアラビノウリジンは、Reliable Pharmaceutical (St. Louis, MO) から入手した。アラビノグアノシンホスホラミダイト、アラビノチミジンホスホラミダイトおよびアラビノウリジンホスホラミダイトは、Hybridon, Inc. (Cambridge, MA) にて合成した (Noronha et al. (2000) Biochem., 39:7050-7062)。

【 0 0 7 4 】

全てのヌクレオシドホスホラミダイトは、³¹P および ¹H N M R スペクトルにより特性を明らかにした。修飾ヌクレオシドは、特定部位に通常のカプリングサイクルを用いて組み込んだ。合成の後、オリゴヌクレオチドは濃縮水酸化アンモニウムを用いて脱保護し

、逆相 H P L C により精製して、透析した。ナトリウム塩形態の精製オリゴヌクレオチドは、使用前に凍結乾燥した。純度は、C G E および M A L D I - T O F M S によりテストした。

【 0 0 7 5 】

例 2 : 脾臓細胞増殖の解析

脾細胞増殖の *in vitro* 解析を、前に記載した標準的方法 (例えば、Zhao et al., Biochem Pharma 51:173-182(1996)を参照) を用いて行った。図 8 A に結果を示す。これらの結果は、高濃度において、2 つの到達可能 5 ' 末端を有するイムノマー 6 は、到達可能 5 ' 末端を有さないイムノマー 5 または 1 つの到達可能 5 ' 末端を有するオリゴヌクレオチド 4 よりも、多くの脾細胞増殖をもたらすことが示される。イムノマー 6 はまた、L P S 陽性対照よりも多くの脾細胞増殖をもたらす。

【 0 0 7 6 】

例 3 : *in vivo* 脾腫試験

in vitro での結果を *in vivo* モデルに適用可能かどうかを試験するために、選択したオリゴヌクレオチドをマウスに投与し、免疫刺激活性レベルの指標として脾腫の程度を測定した。5 m g / k g の単回用量を B A L B / c マウス (雌、4 ~ 6 週齢、Harlan Sprague Dawley Inc. Baltic, CT) に腹腔内投与した。オリゴヌクレオチド投与の 7 2 時間後にマウスを犠牲にし、脾臓を採取して重量測定した。図 8 B に結果を示す。これらの結果は、2 つの到達可能 5 ' 末端を有するイムノマー 6 が、オリゴヌクレオチド 4 またはイムノマー 5 よりも大幅に高い免疫刺激効果を有することを示す。

【 0 0 7 7 】

例 4 : サイトカイン解析

脊椎動物細胞、好ましくは B A L B / c マウス脾臓細胞またはヒト P B M C における、I L - 1 2 および I L - 6 の分泌を、サンドイッチ E L I S A で測定した。サイトカイン抗体および標準サイトカインを含む必要な試薬は、PharMingen, San Diego, CA より購入した。E L I S A プレート (Costar) は、P B S N 緩衝液 (P B S / 0 . 0 5 % アジ化ナトリウム、p H 9 . 6) 中の 5 μ g / m L の適当な抗体を用いて 4 にて 1 晩インキュベートし、次に P B S / 1 % B S A を用いて 3 7 にて 3 0 分間ブロッキングした。細胞培養上清および標準サイトカインは、P B S / 1 0 % F B S で適切に希釈し、前記プレートにトリプリケート (triplicate) で添加し、2 5 で 2 時間インキュベートした。プレートに 1 μ g / m L の適当なビオチン化抗体を加え、2 5 で 1 . 5 時間インキュベートした。次にプレートを P B S - T 緩衝液 (P B S / 0 . 0 5 % Tween 20) でよく洗浄し、ストレプトアビジン結合ペルオキシダーゼ (Sigma, St. Louis, MO) を加えた後 2 5 で 1 . 5 時間さらにインキュベートした。プレートを Sure Blue (登録商標) (Kirkegaard and Perry) 発色試薬 (chromogenic reagent) で発色させ、Stop Solution (Kirkegaard and Perry) を加えて反応を終了させた。色の変化を Ceres 900 HDI 分光光度計 (Bio-Tek Instruments) で測定した。下の表 5 A に結果を示す。

【 0 0 7 8 】

健康なボランティアの末梢血から、ヒト末梢血単核細胞 (P B M C) を Ficoll-Paque 密度勾配遠心分離 (Histopaque-1077, Sigma, St. Louis, MO) により単離した。簡単に述べると、ヘパリン化された血液を円錐遠心分離機内の Histopaque-1077 上 (等量) に層状にし、4 0 0 x g で 3 0 分間室温にて遠心分離した。単核細胞を含む軟膜 (buffy coat) を注意して採取し、等浸透圧のリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 2 回、2 5 0 x g で 1 0 分間の遠心分離により洗浄した。得られた細胞ペレットは次に、L - グルタミンを含有する RPMI 1640 培地 (Media Tech, Inc., Herndon, VA) 内に再懸濁させ、熱により不活性化させた 1 0 % F C S およびペニシリン - ストレプトマイシン (1 0 0 U / m l) を補充した。細胞は、2 4 ウェルプレートで異なる期間、1 x 1 0 ⁶ 細胞 / m l / ウェルで、オリゴヌクレオチドの存在下または非存在下で培養した。インキュベーション期間の終わりに上清を収集し、サンドイッチ E L I S A により、I L - 6 (BD Pharmingen, San Diego, CA)、I L - 1 0 (BD Pharmingen)、I L - 1 2 (BioSource International, Camari

IL-6 (CA)、IFN- γ (BioSource International) および IL-12 (BD Pharmingen) および TNF- α (BD Pharmingen) を含む種々のサイトカインのアッセイまで - 70℃ で凍結して保存した。結果を下の表 5 に示す。

【 0 0 7 9 】

全ての場合において、細胞培養上清における IL-12 および IL-16 の濃度は、同じ実験条件下で作製された IL-12 および IL-16 の標準カーブからそれぞれ計算した。細胞培養上清における IL-10、IFN- γ および TNF- α の濃度は、同じ実験条件下で作製された IL-10、IFN- γ および TNF- α の標準カーブからそれぞれ計算した。

表 5 . ヒト P B M C 培養物におけるイムノマー構造および免疫刺激活性

10

【 表 6 】

オリゴ No.	配列および修飾 (5'-3')	オリゴ長/ または各鎖	IL-12 (pg/mL)		IL-6 (pg/mL)	
			D1	D2	D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18マー(PS)	184	332	3077	5369
26	5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' 5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' \searrow X ₁	11マー(PS)	237	352	3724	4892

オリゴ No.	配列および修飾 (5'-3')	オリゴ長/ または各鎖	IL-10 (pg/mL)		IFN- γ (pg/mL)	
			D1	D2	D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18マー(PS)	37	88	125	84
26	5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' 5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' \searrow X ₁	11マー(PS)	48	139	251	40

20

オリゴ No.	配列および修飾 (5'-3')	オリゴ長/ または各鎖	TNF- α (pg/mL)	
			D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18マー(PS)	537	nt
26	5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' 5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' \searrow X ₁	11マー(PS)	681	nt

30

D 1 および D 2 はドナー 1 およびドナー 2 である。

【 0 0 8 0 】

表 5 A . B A L B / c マウスの脾臓細胞培養物におけるイムノマー構造および免疫刺激活性

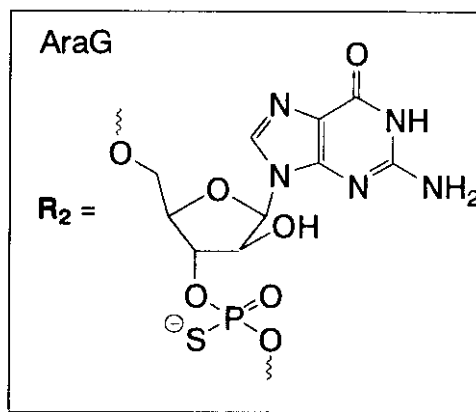
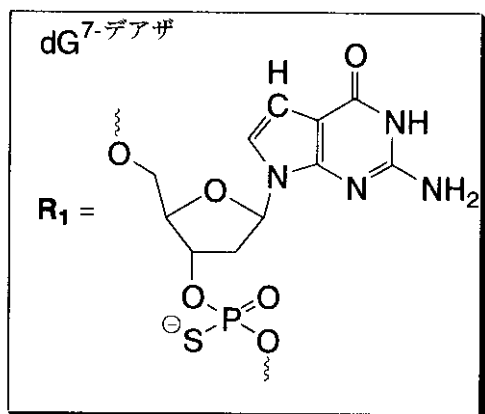
【表 7】

オリゴ No.	配列および修飾 (5'-3')	オリゴ長/ または各鎖	IL-12 (pg/mL)		IL-6 (pg/mL)
			3 μ g/mL	10 μ g/mL	
26	5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' \searrow X ₁ 5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3'	11マー (PS)	870	10670	
27	5'-TCTGTCR ₂ TTCT-3' \searrow X ₁ 5'-TCTGTCR ₂ TTCT-3'	11マー (PS)	1441	7664	
28	5'-TCTGTY ₂ R ₂ TTCT-3' \searrow X ₁ 5'-TCTGTY ₂ R ₂ TTCT-3'	11マー (PS)	1208	1021	10
29	5'-XXTCTGTCR ₁ TTCT-3' \searrow X ₁ 5'-XXTCTGTCR ₁ TTCT-3'	11マー (PS)	162	1013	
30	5'-CTGTCR ₂ TTCTCTGT-3' \searrow X ₁ 5'-CTGTCR ₂ TTCTCTGT-3'	14マー (PO)	264	251	
31	5'-CTGTY ₂ R ₂ TTCTCTGT-3' \searrow X ₁ 5'-CTGTY ₂ R ₂ TTCTCTGT-3'	14マー (PO)	149	119	
32	5'-TCTGACR ₁ TTCT-3' \searrow X ₁ 5'-TCTGACR ₁ TTCT-3'	11マー (PS)	2520	9699	20
33	5'-XXTCTGACR ₁ TTCT-3' \searrow X ₁ 5'-XXTCTGACR ₁ TTCT-3'	11マー (PS)	2214	16881	
34	5'-TCTGACR ₂ TTCT-3' \searrow X ₁ 5'-TCTGACR ₂ TTCT-3'	11マー (PS)	3945	10766	
35	5'-TCTGAY ₂ R ₂ TTCT-3' \searrow X ₁ 5'-TCTGAY ₂ R ₂ TTCT-3'	11マー (PS)	2573	19411	
36	5'-CTGAY ₂ GTTCTCTGT-3' \searrow X ₁ 5'-CTGAY ₂ GTTCTCTGT-3'	14マー (PO)	2699	408	
37	5'-CTGACR ₂ TTCTCTGT-3' \searrow X ₁ 5'-CTGACR ₂ TTCTCTGT-3'	14マー (PO)	839	85	30
38	5'-CTGAY ₂ R ₂ TTCTCTGT-3' \searrow X ₁ 5'-CTGAY ₂ R ₂ TTCTCTGT-3'	14マー (PO)	143	160	

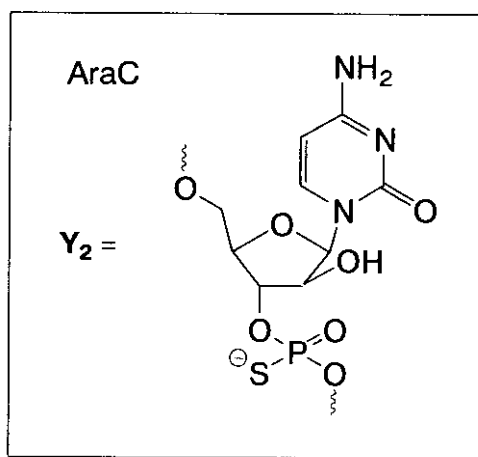
【 0 0 8 1 】

正体文字の表記は、ホスホロチオエート結合を示す；イタリック体はホスホジエステル結合を示す。

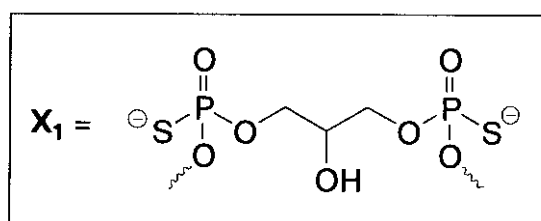
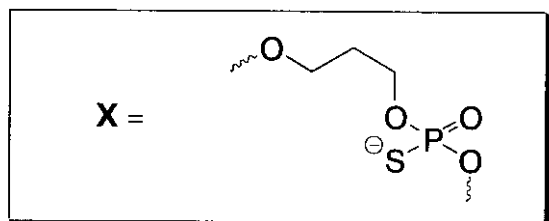
【化 3】



10



20



30

さらに、図 7 A ~ 7 C に示された結果は、2 つの到達可能 5' 末端を有するイムノマー 2 は、それぞれ 1 つまたは 0 個の到達可能 5' 末端を有するオリゴヌクレオチド 1 または 3 と比べて、より低い濃度において IL - 12 および IL - 6 濃度を上昇させるが、IL - 10 濃度は上昇させないことを示す。

【0082】

例 5：非天然のピリミジンまたは非天然のプリンヌクレオチドを含むイムノマーの免疫刺激活性

40

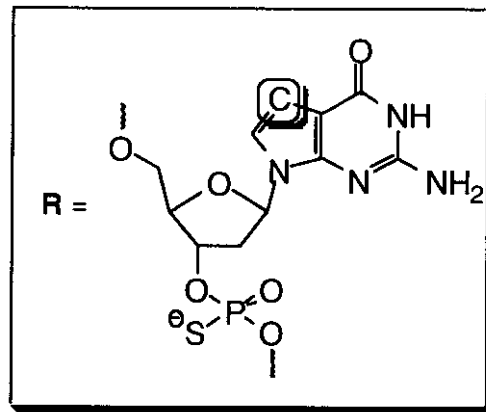
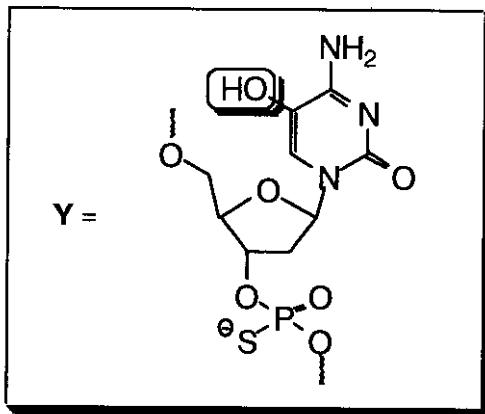
表 9 ~ 11 に示すように、免疫刺激性ジヌクレオチドモチーフ内に非天然のピリミジンヌクレオチドまたは非天然のプリンヌクレオチドを含む、種々の長さのイムノマーでは、免疫刺激活性は維持された。

表 9．イムノマー構造および免疫刺激活性

【表 8】

No.	配列および修飾 (5'-3')	オリゴ長/ または各鎖	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			@ 3 μ g/mL	@ 3 μ g/mL
51	5'-CTCACTTTTCGTTCTCTGT-3'	18マー	404	348
57	5'-TCTTTYGTTCT-3' 5'-TCTTTYGTTCT-3' } 3'-T-5'	11マー	591	365
58	5'-TCTTTCRTTCT-3' 5'-TCTTTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	11マー	303	283
59	5'-TTYGTTCT-3' 5'-TTYGTTCT-3' } 3'-T-5'	8マー	55	66
60	5'-TTCRTTCT-3' 5'-TTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	8マー	242	143

10



20

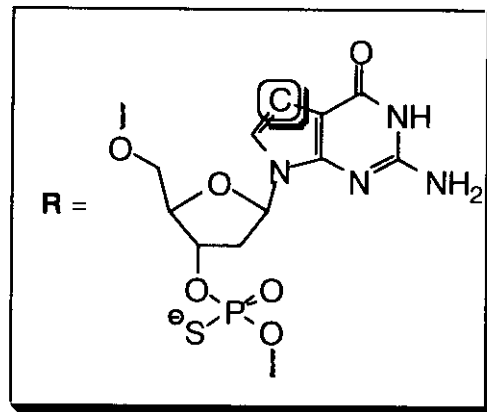
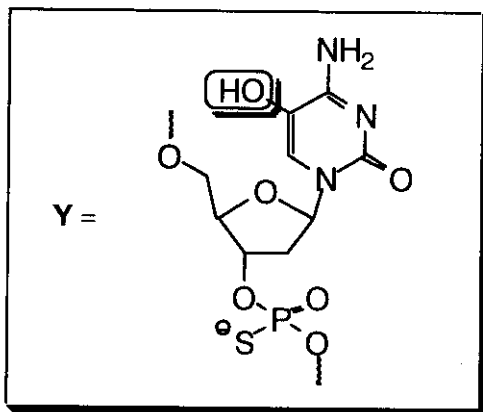
【 0 0 8 3 】

表 10 . イムノマー構造および免疫刺激活性

【表 9】

No.	配列および修飾 (5'-3')	オリゴ長/ または各鎖	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			3 μ g/mL	3 μ g/mL
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18マー	379	339
61	5'-TCTGTYGTTCT-3' 5'-TCTGTYGTTCT-3' } 3'-T-5'	11マー	1127	470
62	5'-TCTGTCRTTCT-3' 5'-TCTGTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	11マー	787	296
63	5'-GTGTTCT-3' 5'-GTGTTCT-3' } 3'-T-5'	8マー	64	126
64	5'-GTCRTTCT-3' 5'-GTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	8マー	246	113

10



20

【 0 0 8 4 】

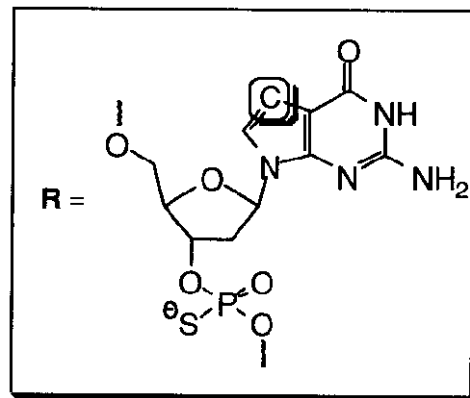
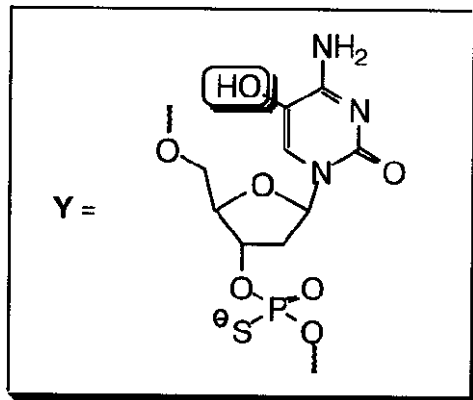
表 1 1 . イムノマー構造および免疫刺激活性

【表 10】

No.	配列および修飾 (5'-3')	オリゴ長/ または各鎖	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			3 μ g/mL	3 μ g/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18マー	1176	1892
65	5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18マー	443	192
66	5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18マー	627	464
67	5'-CTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTGAYGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14マー	548	152
68	5'-CTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTGACRTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14マー	1052	1020
69	5'-TCTGAYGTTCT-3' 5'-TCTGAYGTTCT-3' } 3'-T-5'	11マー	2050	2724
70	5'-TCTGACRTTCT-3' 5'-TCTGACRTTCT-3' } 3'-T-5'	11マー	1780	1741
71	5'-GAYGTTCT-3' 5'-GAYGTTCT-3' } 3'-T-5'	8マー	189	55
72	5'-GACRTTCT-3' 5'-GACRTTCT-3' } 3'-T-5'	8マー	397	212

10

20



30

【0085】

例 6：免疫刺激活性におけるリンカーの効果

2つのオリゴヌクレオチドを結合するリンカーの長さの効果を試験するため、同じオリゴヌクレオチドを含むがリンカーの異なるイムノマーを合成し、免疫刺激活性を試験した。表 12 に示す結果は、リンカーの長さはイムノマーの免疫刺激活性に役割を果たすことを示唆する。最大の免疫刺激活性は、C3～C6-アルキルリンカーまたは分散されたホスフェート電荷 (interspersed phosphate charge) を有する脱塩基リンカーにより達成された。

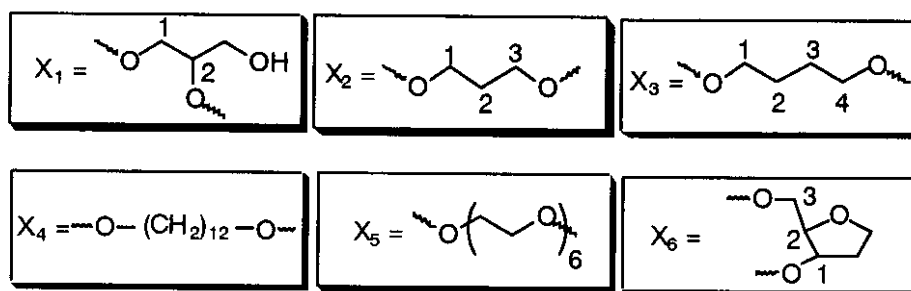
40

【0086】

表 12. イムノマー構造および免疫刺激活性

【表 1 1】

No.	配列および修飾 (5'-3')	オリゴ長/ または各鎖	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			0.3 μg/mL	1 μg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18マー	257	635
73	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow X ₁	10マー	697	1454
74	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow X ₂	10マー	1162	669
75	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow X ₃	10マー	1074	1375
76	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow X ₄	10マー	563	705
77	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow X ₅	10マー	264	543
78	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow X ₆	10マー	1750	2258
79	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow (X ₃ psX ₃)	10マー	2255	2034
80	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow (X ₃ psX ₃ psX ₃)	10マー	1493	1197
81	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow (X ₆ psX ₆)	10マー	3625	2642
82	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow (X ₆ psX ₆ psX ₆)	10マー	4248	2988
83	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' \searrow PO ₃ S	10マー	1241	1964



【 0 0 8 7 】

例 7 : 免疫刺激活性に及ぼすオリゴヌクレオチド主鎖の効果

一般に、天然のホスホジエステル主鎖を含む免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート主鎖を有する同じ長さのオリゴヌクレオチドより免疫刺激性が低い。この低い免疫刺激活性の程度は、部分的に、実験条件下におけるホスホジエステルオリゴヌクレオチドの迅速な分解による可能性がある。オリゴヌクレオチドの分解は、第1に3'エキソヌクレアーゼの結果であり、該ヌクレアーゼは3'末端からオリゴヌクレオチドを消化する。この例のイムノマーは遊離の3'末端を含まない。従って、ホスホジエステル骨格を有するイムノマーは、実験条件下において対応するモノマーオリゴヌクレオチドより長い半減期を有するはずであり、従って改善された免疫刺激活性を示す。表13に示す結果はこの効果を示しており、イムノマー84および85は、BALB/cマウスの脾臓細胞

培養におけるサイトカイン誘導によって決定される免疫刺激活性を示す。

表 13 . イムノマー構造および免疫刺激活性

【表 12】

No.	配列および修飾 (5'-3')	オリゴ長/ または各鎖	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			0.3 µg/mL	1 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18マー	225	1462
84	5'-CTGACGTTCTCTGT-3' 5'-CTGACGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5' (PO)	14マー	1551	159
85	5'-LLCTGACGTTCTCTGT-3' 5'-LLCTGACGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5' (F)	14マー	466	467

10

L = C3 - リンカー

【0088】

例 8 : 化学療法剤と組み合わせたイムノマーの *in vivo* 抗癌活性

PC3細胞を、ペニシリン100U/mlおよびストレプトマイシン100µg/mlの存在下で10%ウシ胎仔血清(FBS)を含む90%Ham'sF12K培地中で培養し、ヒト前立腺癌モデル(PC3)を確立した。4~6週齢の雄の胸腺欠損ヌードマウス(Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick MD)を、試験前に環境調節のため6日間順応させた。培養PC3細胞は、単層培養から収集し、Ham'sF12K培地(10%FBS)で2回洗浄し、FBSなしのHam'sF12K培地:マトリゲル基底膜マトリクス(Becton Dickinson Labware, Bedford, MA)(5:1;V/V)中に再懸濁させ、各マウスの左前肢部に皮下注射した(5×10⁶細胞、全量0.2ml)。動物は、通常の臨床的所見、体重、および腫瘍増殖について観察した。腫瘍増殖は、キャリパー(caliper)を用いて、移植組織の2つの直交する直径を測定して監視した。腫瘍質量(グラムによる重量)は、式:1/2a×b²により計算し、式中「a」は長径(cm)、「b」は短径(cm)である。平均腫瘍サイズが~80mgに達したら、ヒト癌の異種移植片を有する動物を処置群および対照群(1群あたり5匹)にランダムに分けた。対照群には無菌生理食塩水(0.9%NaCl)のみを与えた。生理食塩水に無菌的に溶解したイムノマー255または285を、皮下注射により、0.5または1.0mg/kg/日を3用量/週で投与した。ゲムシタピンHCl(Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN)を、腹腔内注射により、160mg/kgで2回、0日目および3日目に与えた。詳細な処置のスケジュールを以下に示す。

20

30

【0089】

G1: 生理食塩水

G2: ゲムシタピン(160mg/kg/日、IP、0日目および3日目)

G3: 255(1.0mg/kg/日、SC、3用量/週で6週間)

G4: 255(0.5mg/kg/日、SC、3用量/週で6週間)

G5: 285(1.0mg/kg/日、SC、3用量/週で6週間)

G6: 285(0.5mg/kg/日、SC、3用量/週で6週間)

G7: 255(0.5mg/kg/日、SC、3用量/週で6週間)+ゲムシタピン(160mg/kg/日、IP、0日目および3日目)

G8: 285(0.5mg/kg/日、SC、3用量/週で6週間)+ゲムシタピン(160mg/kg/日、IP、0日目および3日目)

種々の処置の後の腫瘍の測定値は、表14および図13に示す。イムノマー255および285で処置した全動物は、生理食塩水対照群に比べて、腫瘍の増殖が顕著に阻害された(p<0.5)。これらの処置群には用量反応関係の傾向が見られた(図13)。イムノマー255と285の間には有意な差はなかった(表14)。

【0090】

40

50

【表 1 3】

表 1 4. 2 5 5、2 8 5、ゲムシタビンによる処置または組み合わせ療法の後の、腫瘍を有するマウスの腫瘍質量

日	生理食塩水	SD	SE	ゲムシタビン 160 mg/kg	SD	SE	255	SD	SE	255	SD	SE
0	82.7	16.7	7.5	82.6	15.7	7.0	80.1	10.6	4.7	80.4	10.5	4.7
3	81.9	13.3	5.9	73.0	3.4	1.5	67.5	8.1	3.6	54.3	8.4	3.7
6	80.5	11.5	5.2	50.4	11.7	5.2	50.4	9.0	4.0	45.3	5.5	2.5
9	87.7	8.2	3.7	35.7	6.3	2.8	40.9	5.1	2.3	43.9	9.3	4.2
12	97.6	18.6	8.3	36.2	3.3	1.5	41.3	6.2	2.8	46.5	3.8	1.7
15	112.0	21.5	9.6	31.7	4.1	1.8	42.8	12.8	5.7	50.0	14.1	6.3
18	126.3	17.3	7.7	40.8	8.4	3.7	54.9	7.6	3.4	59.3	6.7	3.0
21	152.5	25.5	11.4	47.4	9.8	4.4	62.5	10.4	4.6	71.0	16.7	7.5
24	187.0	29.2	13.1	56.5	5.2	2.3	79.5	24.1	10.8	100.1	9.7	4.3
27	245.2	24.1	10.8	68.0	14.8	6.6	94.1	28.9	12.9	124.5	21.1	9.5
30	343.6	63.9	28.6	89.4	11.1	5.0	119.8	18.7	8.3	162.4	37.5	16.8
33	438.5	107.1	47.9	106.5	14.1	6.3	176.6	43.8	19.6	213.6	66.7	29.8
36	614.4	185.1	82.8	144.2	48.2	21.6	248.7	47.0	21.0	325.3	106.2	47.5
39	866.8	237.4	106.2	175.3	61.4	27.5	320.1	64.2	28.7	416.8	154.5	69.1
42	1136.9	205.9	92.1	269.1	78.8	35.2	417.8	78.7	35.2	546.9	139.1	62.2
45				383.8	146.4	65.5	550.8	134.2	60.0	667.6	284.9	127.4
48				538.6	260.1	116.3	736.0	197.3	88.2	852.8	399.3	178.6

日	285	SD	SE	285	SD	SE	255+GEM	SD	SE	285+GEM	SD	SE
	1 mg/kg			0.5 mg/kg			0.5 / 160 mg/kg			0.5 / 160 mg/kg		
0	80.4	11.0	4.9	79.9	10.3	4.6	79.4	10.1	4.5	78.7	12.0	5.4
3	52.3	9.3	4.2	64.7	9.0	4.0	45.1	8.2	3.7	44.6	8.7	3.9

【 0 0 9 1】

10

20

30

40

【表 1 4】

6	38.8	4.6	2.1	46.9	14.7	6.6	31.2	5.9	2.6	34.7	4.4	2.0
9	34.5	9.5	4.3	43.5	13.6	6.1	22.1	4.8	2.1	23.0	3.2	1.5
12	35.8	9.4	4.2	43.0	15.9	7.1	15.0	3.8	1.7	11.9	2.2	1.0
15	36.6	8.7	3.9	48.6	15.4	6.9	18.0	3.1	1.4	12.4	3.5	1.6
18	45.1	14.6	6.5	62.0	20.2	9.0	17.9	3.1	1.4	15.5	1.7	0.8
21	53.5	12.3	5.5	73.6	20.5	9.2	18.3	2.8	1.2	14.8	2.1	1.0
24	72.6	22.7	10.1	93.6	23.0	10.3	23.6	4.5	2.0	23.0	1.5	0.7
27	86.5	13.7	6.1	119.3	17.3	7.8	27.8	4.1	1.8	25.9	3.7	1.7
30	114.5	22.8	10.2	157.1	49.0	21.9	33.6	5.0	2.2	36.9	6.5	2.9
33	161.4	44.1	19.7	218.1	81.2	36.3	43.8	10.9	4.9	47.7	16.1	7.2
36	198.3	43.5	19.4	313.2	104.6	46.8	50.3	13.6	6.1	46.4	16.4	7.3
39	249.8	77.9	34.9	420.2	199.4	89.2	67.3	29.4	13.2	59.4	28.7	12.9
42	366.5	110.5	49.4	527.5	219.0	98.0	77.2	28.0	12.5	82.1	29.1	13.0
45	490.2	122.2	54.7	620.3	258.1	115.4	104.9	57.9	25.9	110.7	46.3	20.7
48	683.4	144.6	64.7	759.1	223.0	99.7	128.2	77.7	34.7	133.4	62.6	28.0
51							177.9	109.6	49.0	177.3	68.0	30.4
54							233.1	143.5	64.2	224.0	79.8	35.7
57							297.7	190.7	85.3	289.7	121.9	54.5

処置後の種々の期間における体重測定値を表 1 5 および図 1 4 に示す。イムノマー 2 5 5 または 2 8 5 単独の場合を対照と比較すると、体重増加には有意差は見られなかった。ゲムシタピンで処置した動物は、第 1 週目に体重減少を示し、その 1 週間後に回復した。

10

20

30

40

50

イムノマー 255 または 285 との組み合わせは、ゲムシタピンの副作用プロファイルを変化させなかった。全群において、他の臨床的異常または死亡は観察されなかった。

【0092】

表 15. 255 または生理食塩水による処置後の、腫瘍を有するマウスの体重

【表 15】

日	生理食塩水	SD	SE	ゲムシタピン	SD	SE	255	SD	SE	255	SD	SE
				160 mg/kg			1 mg/kg			0.5 mg/kg		
0	24.1	2.5	1.1	23.5	0.9	0.4	23.2	1.4	0.6	23.0	2.4	1.1
7	25.8	3.0	1.3	20.7	4.4	2.0	25.2	2.4	1.1	24.8	2.8	1.2
14	26.8	3.2	1.4	25.2	4.0	1.8	26.3	2.0	0.9	26.0	2.9	1.3
21	28.2	3.3	1.5	27.1	3.9	1.7	27.8	2.0	0.9	27.6	2.8	1.2
28	29.4	3.5	1.6	28.1	4.3	1.9	28.6	2.6	1.1	28.0	2.7	1.2
35	30.6	3.7	1.6	29.4	2.9	1.3	29.5	2.3	1.0	28.6	2.8	1.3
42	31.1	3.7	1.7	30.3	3.0	1.4	30.2	2.3	1.0	29.4	3.9	1.7

10

日	285	SD	SE	285	SD	SE	255+GEM	SD	SE	285+GEM	SD	SE
	1 mg/kg			0.5 mg/kg			0.5 / 160 mg/kg			0.5 / 160 mg/kg		
0	22.5	1.3	0.6	24.1	1.6	0.7	21.9	1.7	0.7	23.0	0.8	0.4
7	24.3	0.9	0.4	25.6	2.0	0.9	19.1	2.0	0.9	22.3	3.3	1.5
14	25.1	1.3	0.6	27.0	2.1	0.9	24.6	1.6	0.7	25.9	2.7	1.2
21	26.1	1.3	0.6	27.8	1.5	0.7	26.8	1.6	0.7	27.1	2.6	1.2
28	27.2	1.5	0.7	28.3	2.2	1.0	27.2	1.6	0.7	27.7	3.2	1.4
35	28.0	1.4	0.6	29.1	2.3	1.0	27.7	2.1	1.0	28.0	2.4	1.1
42	28.9	1.5	0.7	29.8	2.2	1.0	28.4	2.8	1.2	28.1	3.4	1.5

20

まとめると、イムノマー 255 および 285 は、重大な副作用なしに、ヒト前立腺癌 PC3 異種移植片を有するヌードマウスにおける腫瘍増殖を有意に抑制した。イムノマー 255 または 285 をゲムシタピンと組み合わせて与えた場合、各化合物は、副作用プロファイルを変えることなく、ゲムシタピンの治療効果を有意に増加させた。さらに、イムノマー 255 または 285 の処置には用量反応関係の傾向が見られた。

30

【0093】

例 9：化学療法剤と組み合わせたイムノマーの *in vivo* 抗癌活性

例 8 の実験を、ゲムシタピンの代わりにタキソテレを用いて繰り返した。タキソテレは、0 日目および 7 日目に投与した。イムノマー 165 は週に 5 日投与した。イムノマー 255 および 285 は、0、2、4、7、9 および 11 日目に投与した。結果を下の表 16 に示す。これらの結果は、イムノマーとタキソテレの間に明らかな相乗効果を示す。

【0094】

【表 1 6】

表 1 6. 他の化学療法剤と組み合わせたイムノマーのin vivo抗癌活性

日	生理食塩水	SD	SE	タキソテレ (15 mg/kg)	SD	SE	165 (20 mg/kg)	SD	SE	255 (1 mg/kg)	SD	SE
0.00	56.93	7.92	3.54	56.64	7.94	3.55	57.93	5.56	2.49	56.74	7.79	3.48
3.00	196.42	22.48	10.05	128.51	20.83	9.32	95.79	16.04	7.18	87.12	6.64	2.97
6.00	708.85	32.64	14.60	320.63	136.80	61.18	285.71	68.70	30.72	250.36	52.58	23.51
9.00	1370.95	239.99	107.33	598.69	196.60	87.92	534.93	225.19	100.71	450.46	92.25	41.26
12.00	2222.96	300.65	134.45	924.91	297.89	133.22	994.10	474.89	212.38	814.21	197.16	88.17
15.00	3303.04	672.86	300.91	1589.08	578.38	258.66	1601.73	576.19	257.68	1465.87	348.37	155.80
タキソテレ + 165												
55.51	55.51	9.55	4.27	56.59	8.91	3.99	55.28	10.89	4.87			
78.47	78.47	21.79	9.74	80.14	21.59	9.65	91.01	23.60	10.55			
211.52	211.52	88.59	39.62	216.85	89.40	39.98	303.00	61.33	27.43			
302.66	302.66	178.36	79.76	307.53	184.05	82.31	512.30	110.16	49.26			
496.20	496.20	342.69	153.25	510.18	351.16	157.04	884.12	308.22	137.84			
686.47	686.47	385.97	172.61	703.50	394.65	176.49	1479.21	416.64	186.33			
タキソテレ + 255 (**)												

10

20

30

40

【0 0 9 5】

例 1 0

図 1 5 に示す I M O 化合物および非 C p G D N A : (5 ' C T A T C T C A C C T T C

T C T G T - 3 ') を、上述のように合成、精製および解析した。

雌の B A L B / c (H - 2 ^d)、C 5 7 B L / 6、並びに I L - 6 および I L - 1 2 ノックアウト (k o) マウス (両方とも C 5 7 B L / 6 バックグランドにて k o) で 5 ~ 8 週齢のものを、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入した。C T 2 6 . W T (A TCC, Rockville, MD) は、発癌物質誘導 B A L B / c 未分化結腸癌である。C T 2 6 . C L 2 5 (ATCC, Rockville, MD) は、大腸菌 -gal 遺伝子と共に形質導入された C T 2 6 . W T のサブクローンである。4 T 1 は、B A L B / c マウスの乳房腺癌細胞株である。B 1 6 . F 0 は、C 5 7 B L / 6 由来のメラノーマ (A T C C) である。C T 2 6 . W T および 4 T 1 細胞は、R P M I 1 6 4 0、熱で不活性化した 1 0 % ウシ胎仔血清 (F B S、Atlas Biologicals, Fort Collins, CO)、2 m M の L グルタミン、1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシン、1 0 0 U / m l のペニシリン (Mediatech, VA) 中で培養した。C T 2 6 . C L 2 5 は、同じ培地 + 4 0 0 μ g / m l の G 4 1 8 硫酸塩 (Life Technologies, Grand Island, NY) 中に維持する。B 1 6 . F 0 細胞は、1 0 % F B S および抗生物質を含む D M E M 中で増殖させた。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

血清サイトカイン濃度を評価するために、B A L B / c マウス (n = 5) に腹腔内 (i . p)、皮下 (s . c) または筋肉内 (i . m) 注射で 1 0 m g / k g (単回用量) の I M O 化合物を投与した。血清を後眼窩採血 (retro-orbital bleeding) により I M O 投与の 4 時間後に収集し、I L - 1 2 および I L - 6 をサンドイッチ E L I S A で決定した。サイトカイン抗体および標準サイトカインは、PharMingen (San Diego, CA) から購入した。

【 0 0 9 7 】

血清抗体の解析のために、9 6 ウェルプレート室温で 3 時間、リン酸緩衝液 (P B S) 中の 2 μ g / m l の -gal タンパク質 (Calbiochem Novabiochem, Pasadena, CA) でインキュベートした。固相は 4 で 1 晩、正常マウス血清 (N M S) または抗血清、または -gal 特異的モノクローナル A b (Calbiochem Novabiochem, Pasadena CA) でインキュベートし、続いてマウス I g G (H + L) に特異的なホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) 結合抗体でインキュベートした。アイソタイプ解析のために、H R P でラベルしたヒツジの抗マウス I g G 1 および I g G 2 a (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) を用いた。抗体の結合を、免疫複合体と A B T S 基質 (Zymed, San Francisco, CA) との反応後、4 0 5 n m における吸光度として測定した。

【 0 0 9 8 】

皮下の固形癌モデルについては、1 0 0 μ l の P B S 中の 1 0 ⁶ の C T 2 6 . C T 2 5 細胞 / マウスまたは 5 × 1 0 ⁵ の B 1 6 . F 0 細胞 / マウスを、B A L B / c または C 5 7 B L / 6 マウスの右側腹低部に移植した。腫瘍サイズは、C T 2 6 . C T 2 5 については腫瘍接種の 6 日目に、B 1 6 . F 0 については 8 日目に、5 0 ~ 2 0 0 m g に達した。次に、腫瘍を有するマウスは、I M O 化合物または非 C p G D N A 対照を、1 m g / k g の用量で 1 日おきに 1 0 回腫瘍周辺に注射して処置した。腫瘍増殖は、キャリパーを使って腫瘍の長径および短径を測定して記録した。腫瘍の容積はキャリパーを用いて測定し、式 (0 . 5 × 長さ × 幅 ²) を適用して、腫瘍増殖動態を決定した。

【 0 0 9 9 】

腹膜播種の腫瘍モデルについては、3 × 1 0 ⁵ の C T 2 6 . W T または C T 2 6 . C L 2 5 細胞および 5 × 1 0 ⁴ の B 1 6 . F 0 細胞を、それぞれ B A L B / c または C 5 7 B L / 6 マウスに i . p 注射した。I M O 化合物または非 C p G D N A (2 . 5 m g / k g) を、週に 2 回、1 日目から開始して全 5 回、i . p 投与した。マウスは腫瘍増殖と生存について毎日チェックした。各用量群は 6 ~ 1 0 匹のマウスを有した。

4 T 1 腫瘍モデルについては、P B S 1 0 0 μ l 中の 5 × 1 0 ⁵ 細胞 / マウスを、B A L B / c マウスの右側腹低部に移植した。5 日目に平均腫瘍サイズが 5 0 m m ² に達した時、3 0 m g / k g のドキソルピシン (Bedford lab. Bedford, OH) を 3 回、5、6 および 7 日目に i . p 注射してマウスに与えた。P B S 1 0 0 μ l 中に溶解した I M O 2 (1

mg/kg) は、腫瘍周辺の注射により週に2回、全部で6回投与した。

【0100】

B16.F0メラノーマ腫瘍については、C57BL/6マウスに対し、PBS 100 µl中の 5×10^4 細胞/マウスをi.p注射した。マウスは2日目に、20 mg/kgのドセタキセル (Aventis, Bridgewater, NJ) を1回i.p注射して処置し、次に3、6、9、12および15日目に、2.5 mg/kgのIMO2をi.p注射により与えた。

CT26.WTまたはCT26.CL25腹膜腫瘍を有し、IMO化合物で処置されたマウスの長期生存動物 (n=5) を、 5×10^5 の元の腫瘍細胞のi.pまたはi.vにより、さらなる処置なしで再チャレンジした。腫瘍を有するマウスにおけるIMO誘導抗腫瘍反応の特異性を評価するために、これらの長期生存動物 (n=5) は、同系の臓器非関連乳房腫瘍4T1 (5×10^5) でも再チャレンジした。i.v再チャレンジ群では、マウスは13日目に犠牲にし、肺を収集して、肺への転移を計測した。 10

【0101】

適合免疫細胞移植を試験するため、BALB/cマウスに対し、ナイーブBALB/cマウスまたは、CT26.WTもしくはCT26.CL25を有しIMO処置された長期生存マウスからの 5×10^6 の同系脾細胞を適合的にi.p移植し、次にマウス (5匹/群) を、 3×10^6 のCT26.WT、CT26.CL25または4T1細胞にて3日目にi.p交差チャレンジした。

T細胞反応を決定するため、各群からの2匹または3匹のマウスをs.c.腫瘍移植後26日目またはi.p.腫瘍接種後21日目に犠牲にし、各群の脾細胞からのプールされたT細胞を、T細胞濃縮カラム (R&D systems, Minneapolis, MN) を用いて精製した。精製したT細胞 (2.5×10^5) は、 2.5×10^5 の、マイトマイシンC ($50 \mu\text{g/ml}$, Sigma, St. Louis, MO) で処置した-galまたはOVAペプチドパルス同系脾臓細胞で24時間刺激した。次に、H-2^d拘束 (H-2^d restricted) された抗原特異的 (-gal₈₇₆₋₈₈₄) 再刺激に特異的に反応するT細胞を、インターフェロン-ガンマ (IFN-) およびIL-4 ELISPOT解析により、製造業者 (R&D Systems) の指示に従って決定した。スポットは電子的に計測した (Zellnet, New York, NY)。 20

【0102】

例11: IMO化合物の血清サイトカイン分泌プロファイル

IMO1およびIMO2は強いIL-12分泌を誘導し、一方IMO2は、in vitroで低いIL-6産生を誘導する (図16)。In vivoでの免疫薬理学的効果を評価するため、IMO化合物、CpGイムノマー、および非CpGオリゴを、BALB/cマウスにi.p、s.cまたはi.mにて10 mg/kgの用量で投与し、4時間後にそれらの血清をIL-12およびIL-6について評価した。IMO化合物は両方とも、従来のCpGオリゴと比べて、強い血清IL-12分泌を誘導した (表17)。しかし、合成CpRモチーフを含有するIMO2は、全3投与経路において、有意に低い血清IL-6を誘導し (表17)、我々の初期のin vitroでの研究結果が確認された。対照の非CpGDNAは、有意でないIL-12およびIL-6の誘導を示した。 30

表17. 異なる経路で投与されたIMO化合物によるin vivoでのサイトカインの誘導^a

【表 17】

オリゴ	腹腔内 (i.p)		筋肉内 (i.m)		皮下 (s.c)	
	IL-12	IL-6	IL-12	IL-6	IL-12	IL-6
CpG DNA	36.0 ± 0.5	1.1 ± 0.2	62.7 ± 6.4	0.6 ± 0.07	48.6 ± 6.9	0.3 ± 0.03
IMO 1	59.0 ± 11	5.9 ± 0.2	109.3 ± 25	5.8 ± 0.5	98.3 ± 15	4.3 ± 0.3
IMO 2	51.7 ± 0.9	2.5 ± 0.2	87.9 ± 3.2	1.2 ± 0.1	136.9 ± 17	2.3 ± 0.4
Non-CpG	0.86 ± 0.5	0.7 ± 0.3	1.6 ± 0.07	Nd	1.7 ± 0.04	Nd

^a 値は、3匹の個別のマウスの平均値 (ng/mL) ±SD ; n dは検出不可。

10

【0103】

例 12 : IMO 化合物はマウス結腸癌モデルにおいて強力な抗腫瘍活性を示す。

ネズミ結腸癌 CT26、CL25 モデルにおける IMO 化合物の抗腫瘍活性を評価した。CT26、CL25 皮下固形腫瘍を有する BALB/c マウスを、腫瘍接種 6 日目より、IMO 化合物 1 mg/kg を 1 日おきに 10 回腫瘍周辺に投与して処置した。IMO 化合物による処置は、75% までの動物において腫瘍増殖の完全な拒絶または阻害を引き起こした (図 17A)。非 CpG DNA で処置したマウスと比べて、24 日目に、平均の腫瘍増殖阻害率 72% および 85% がそれぞれ IMO1 および IMO2 によって処置されたマウスで観察された。さらに、腹膜播種性腹水 (peritoneal disseminated ascites) CT26、WT (図 17B) および CT26、CL25 (図 17C) を有するマウスに対して、1 mg/kg の用量で IMO2 を腹膜投与すると、マウスの生存率が大きく増加した。

20

【0104】

例 13 : -gal 特異的循環 IgG1 および IgG2a サブクラスの濃度

IMO 化合物で処置後の CT26、CL25 腫瘍を有するマウスの血清を、-gal 特異的 IgG1 および IgG2a 抗体濃度について解析した。IMO 化合物で処置したマウスは、抗 -gal 特異的 IgG2a 抗体濃度が 5 倍以上 (OD 単位) 増加した (図 18)。従来の CpG DNA による処置は、-gal 特異的 IgG2a 濃度が約 2 倍増加しただけであった。対象的に、-gal 特異的 IgG1 濃度は、中程度の 0.5 ~ 2 倍の増加のみが観察された (図 18)。

30

【0105】

例 14 : IMO 化合物は腫瘍特異的 CTL 反応を誘導する。

腫瘍を有するマウスに対する IMO による処置が、腫瘍特異的 CTL 反応を引き起こすかどうかを試験するため、CT26、CL25 腫瘍を有するマウスの異なる処置群から得た脾細胞から精製した T 細胞を、マイトマイシン C で処置した -gal または OVA ペプチドパルス同系脾臓細胞で 24 時間刺激した。対照の非 CpG DNA で処置したマウスに比べて、IMO 化合物および CpG DNA で処置したマウスにおいては、より高い IFN- γ 誘導 (図 19A) が検出されたが IL-4 は検出されなかった (図 19B) ように、H-2^d 拘束 (-gal₈₇₆₋₈₈₄) 抗原への有意に高い腫瘍特異的 CTL 反応が見出された。

40

【0106】

例 15 : IMO 処置後の抗腫瘍メモリーの持続

IMO による処置が、腫瘍特異的適応免疫反応も誘導するかどうかを試験するため、CT26、CL25 腹膜腫瘍を IMO 処置により除去されたマウスを、再チャレンジした。前に IMO2 で処置したマウスは、CT26、WT および CT26、CL25 腫瘍の i.p 再チャレンジを拒絶した (図 20A および 20B)。腹膜注射した腫瘍から IMO2 に

50

よる処置後に生存したマウスはまた、i.v.接種の後の同じ腫瘍の肺転移を拒絶した（データ示さず）。同様の結果が、CT26.WTまたはCT26.CL25細胞で再チャレンジした、CT26.WT腫瘍モデル実験において見出された（データ示さず）。これらのデータは、IMO2で処置したマウスは、モデル腫瘍抗原 -galに対してのみでなく、親腫瘍（CT26）抗原に対しても適応免疫反応を発達させたことを示す。しかし、かかる免疫メモリーは腫瘍特異的であり、同じマウスは、同系の、臓器非関連4T1乳癌のチャレンジからは保護されなかった（図20C）。

【0107】

例16：ナイーブマウスは、IMOで処置したマウスからの免疫細胞の適合的移植の後に、抗腫瘍保護を発達させる。

IMO2の処置が特異的な抗腫瘍免疫を誘導するという概念と整合して、IMO処置後にCT26.CL25腫瘍を拒絶したマウスからの脾細胞をナイーブマウスに移植し、これらのマウスをCT26.CL25または4T1腫瘍細胞でチャレンジした。IMO2で処置したマウスからの脾細胞は、ナイーブマウスからの脾細胞と異なり、CT26.CL25腫瘍細胞による致命的な腫瘍チャレンジに対して保護された（図21A）。腫瘍再チャレンジ実験の場合と同様に、この保護は腫瘍特異的であり、4T1腫瘍細胞チャレンジには当てはまらなかった（図21B）。

【0108】

例17：IMO2はマウスメラノーマモデルにおいて強力な抗腫瘍活性を示しIgG2a抗体産生を誘導する。

IMO2の抗腫瘍活性について、B16.F0マウスメラノーマを有するマウスにおいてさらに試験した。B16.F0メラノーマを有するC57BL/6マウスを、腫瘍接種の8日目に開始して、1日おきに10回、1mg/kgのIMO2を腫瘍周辺に投与して処置した。図22Aに示すように、IMO2は、皮下にB16.F0メラノーマを有するC57BL/6マウスにおいて、71%の腫瘍増殖の阻害をもたらした。IMO1による処置もまた、IMO2と同じ程度の腫瘍阻害をもたらした（データ示さず）。

CT26.CL25結腸癌の場合と同様、B16.F0腫瘍を有するマウスのIMO2による処置は、対照の非CpG DNAで処置したマウスと比べて、血清IgG2aの総循環の有意な増加と、総IgG1濃度の減少または無変化をもたらした（図22Bおよび22C）。これらの結果は、B16.F0メラノーマを有するマウスにおける、IMO処置後の強力なTh1型免疫反応を示唆する。

【0109】

例18：IMOが誘導するTh1型反応はB16.F0メラノーマを有するマウスにおける抗腫瘍保護に必須である。

IgG2a濃度の増加および腫瘍抗原特異的CTL反応を含む上記のデータは、結腸癌モデルにおける、IMO処置後の、Th1優位反応（Th1-dominated response）への明確なシフトを示唆した。B16メラノーマを有する、野生型（wt）、IL-12ko、およびIL-6koのC57BL/6マウスにおける、IMO化合物の抗腫瘍効果を試験した。B16.F0腫瘍を有するwtおよびIL-6ko C57BL/6マウスの、IMO2による処置は、腫瘍増殖の有意な減少をもたらした（図23）。しかし、IMOによる処置は、同じ腫瘍を有するIL-12koマウスに対して有意な効果を有さず、IMO誘導抗腫瘍活性にIL-12が必要であることを示唆している（図23）。

【0110】

例19：従来の化学療法剤とIMO化合物の組み合わせ療法の相乗効果

B16.F0腹水腫瘍または4T1皮下固形腫瘍を有するマウスにおける、化学療法剤とIMO化合物の相乗効果を試験した。IMO2の腫瘍周辺への注射およびドキソルビシン全身投与は、単独で、4T1腫瘍増殖の強力な阻害をもたらした（図24A）。組み合わせると、2つの処置はさらに強力であった（図24A）。ドセタキシルおよびIMO2の組み合わせ療法はまた、腹膜分散B16.F0メラノーマに対して大きな相乗効果を示し、各剤単独での処置に比べて、マウスの生存率が延長された（図24B）。

10

20

30

40

50

免疫細胞活性化に対するドセタキシルおよび I M O 2 処置の効果を、末梢血中の C D 6 9 + および C D 8 6 + の集団の変化を測定して試験した。I M O 2 で処置したマウスは、C D 6 9 + および C D 8 6 + 細胞のパーセンテージの大幅な増加を示したが、1日目および3日目のドセタキシル 3 0 m g / k g の投与は、かかる活性化を阻害しなかった(図 2 4 C)。

【0 1 1 1】

例 2 0 : ヒト特異的モチーフを含有する I M O 3 は強力な抗腫瘍活性を示し、腫瘍を有するマウスにおいて T h - 1 サイトカイン、I L - 1 2 を誘導する。

マウス特異的免疫刺激性モチーフを含有する I M O 2 の結果に基づき、ヒト特異的モチーフを含有する I M O 3 を合成し、マウスの C T 2 6、C L 2 5 腫瘍に対するその活性を試験した。I M O 3 は、この腫瘍モデルに対しても強力な抗腫瘍活性を示した(図 2 5 A)。予想通り、I M O 2 および I M O 3 の両方は、マウスにおいて I L - 1 2 分泌を誘導した(図 2 5 B)。さらに、図 2 6 に示すように、I M O 3 によるヒト P B M C の活性化は、ヘルセプチンの存在下で H e r - 2 陽性 B T - 4 7 4 細胞の溶解を誘導した。

【0 1 1 2】

例 2 1 : I M O 化合物と組み合わせたリツキサンの増強された抗腫瘍効果

ナマルワ (Namalwa) B 細胞リンパ腫細胞を、N O D / S C I D マウスに腹腔内注射により移植して、高度 B 細胞ヒト非ホジキンスリンパ腫と同様の疾患を生成した。腫瘍を有するマウスは、5 0 m g / k g のリツキサンを 4、6、8 日目に、および / または 2 . 5 m g / k g の I M O 2 を 4、6、8、1 1、1 4 および 2 1 日目に、腹腔内注射して処置した(図 2 7)。図 2 8 に示すように、腫瘍増殖は、リツキサンと I M O 2 の組み合わせにより有意に阻害された。

【0 1 1 3】

例 2 2 : I M O 化合物はヘルセプチンの抗腫瘍効果を増強する

皮下移植された H e r - 2 過剰発現ヒト乳房腫瘍 (B T 4 7 4) を有するヌードマウスを、1 0 m g / k g のヘルセプチンの腹腔内注射および / または 1 m g / k g の I M O 化合物の腫瘍周辺注射により、週 2 回、6 週間処置した(図 2 7)。ヘルセプチンまたは I M O 2 単独による処置の後の腫瘍増殖は、P B S 対照群と比べて 7 0 % および 6 5 % 阻害された(図 2 9)。腫瘍増殖の 9 7 % の著しい阻害が、ヘルセプチンと I M O 2 の組み合わせ処置により見出された(図 2 9)。

【0 1 1 4】

例 2 3 : I M O 化合物はヘルセプチンの抗腫瘍効果を増強する

皮下移植された H e r - 2 過剰発現ヒト乳房腫瘍 (B T 4 7 4) を有するヌードマウス。腫瘍を有するマウスは、リツキサンを 5、7、9 および 1 1 日目に、および / または I M O 2 を 5、7、9、1 1 および 1 3 日目に、腹腔内注射して処置した。図 3 0 に示すように、腫瘍増殖は、I M O 2 および、リツキサンと I M O 2 の組合せにより、有意に阻害された。

【0 1 1 5】

均等

前述の発明を、明確さと理解のためにある程度詳細に記述したが、この開示を読んだ当業者には、本発明の真の範囲および付属のクレームから乖離することなく、形態および詳細についての種々の改変が可能であることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0 1 1 6】

【図 1】本発明の代表的なイムノマーの模式図である。

【図 2】本発明の幾つかの代表的なイムノマーを表す図である。

【図 3】本発明のイムノマーの直線合成に好適な代表的小分子リンカーの群を表す図である。

【図 4】本発明のイムノマーの平行合成に好適な代表的小分子リンカーの群を表す図である。

10

20

30

40

50

【図 5】本発明のイムノマーの直線合成のための合成スキームである。DMTr = 4, 4' - ジメトキシトリチル; CE = シアノエチル。

【0117】

【図 6】本発明のイムノマーのパラレル合成のための合成スキームである。DMTr = 4, 4' - ジメトキシトリチル; CE = シアノエチル。

【図 7】図 7 A は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、オリゴヌクレオチド 1 およびイムノマー 2 ~ 3 による IL - 12 の誘導を示すグラフである。これらのデータは、到達可能 5' 末端を有するイムノマー 2 は、モノマーオリゴ 1 より強い IL - 12 の誘導因子であること、および、到達可能 5' 末端を有さないイムノマー 3 は、オリゴ 1 に比べて同等かまたは低い免疫刺激を生成することを示唆する。図 7 B は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、オリゴヌクレオチド 1 およびイムノマー 2 ~ 3 による IL - 6 の誘導（それぞれ上から下へ）を示すグラフである。これらのデータは、到達可能 5' 末端を有するイムノマー 2 は、モノマーオリゴ 1 より強い IL - 6 の誘導因子であること、および、到達可能 5' 末端を有さないイムノマー 3 は、オリゴ 1 に比べて同等かまたは低い免疫刺激を生成することを示唆する。図 7 C は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、オリゴヌクレオチド 1 およびイムノマー 2 ~ 3 による IL - 10 の誘導（それぞれ上から下へ）を示すグラフである。

10

【図 8】図 8 A はそれぞれ到達不能 5' 末端および到達可能 5' 末端を有する異なる濃度のイムノマー 5 および 6 による、細胞培養における BALB / c マウス脾臓細胞増殖の誘導を示すグラフである。図 8 B は CpG モチーフの 5' フランキング配列に免疫化学的修飾を有するオリゴヌクレオチド 4 およびイムノマー 5 ~ 6 による、BALB / c マウス脾臓の腫大を示すグラフである。ここでも、到達可能 5' 末端を有するイムノマー (6) は、到達可能 5' 末端を有さないイムノマー 5 およびモノマーオリゴヌクレオチド 4 と比べて、脾臓腫大を増加させるより強い能力を有する。

20

【図 9】図 9 A は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、異なる濃度のオリゴヌクレオチド 4 並びにイムノマー 7 および 8 による IL - 12 の誘導を示すグラフである。図 9 B は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、異なる濃度のオリゴヌクレオチド 4 並びにイムノマー 7 および 8 による IL - 6 の誘導を示すグラフである。図 9 C は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、異なる濃度のオリゴヌクレオチド 4 並びにイムノマー 7 および 8 による IL - 10 の誘導を示すグラフである。

30

【図 10】図 10 A は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、イムノマー 14、15 および 16 による細胞増殖の誘導を示すグラフである。図 10 B は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、異なる濃度のイムノマー 14 および 16 による、IL - 12 による細胞増殖の誘導を示すグラフである。図 10 C は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、異なる濃度のイムノマー 14 および 16 による、IL - 6 による細胞増殖の誘導を示すグラフである。

【0118】

【図 11】図 11 A は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、オリゴヌクレオチド 4 および 17 並びにイムノマー 19 および 20 による細胞増殖の誘導を示すグラフである。図 11 B は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、異なる濃度のオリゴヌクレオチド 4 および 17 並びにイムノマー 19 および 20 による IL - 12 細胞増殖の誘導を示すグラフである。図 11 C は BALB / c マウス脾臓細胞培養物における、異なる濃度のオリゴヌクレオチド 4 および 17 並びにイムノマー 19 および 20 による IL - 6 細胞増殖の誘導を示すグラフである。

40

【図 12】オリゴヌクレオチド 4 並びにイムノマー 14、23 および 24 を用いた、BALB / c マウス脾臓の腫大を示すグラフである。

【図 13】本発明による方法の、前立腺癌のヌードマウスモデルにおける腫瘍増殖に及ぼす効果を示す図である。

【0119】

【図 14】本発明による方法の、研究に用いたマウスの体重に及ぼす効果を示す図である

50

。

【図15】IMO化合物の構造および修飾の例を示す図である。

【図16】IMO化合物の *in vitro*でのサイトカイン誘導プロファイルを示す図である。

【図17】(A) BALB/cマウスのCT26、CL25結腸腫瘍に対するIMO化合物の抗腫瘍活性を示す図である。IMO1(丸)、IMO2(三角)、または対照非CpG DNA(四角)。* 非CpG DNA対照群と比較して $p < 0.001$ 。プロットは、異なる処置群の(B)CT26、WTまたは(C)CT26、CL25腫瘍を有するBALB/cマウスの生存率を示す。PBS(四角)または対照非CpG DNA(丸)またはIMO2(三角)。

【図18】CT26、CL25腫瘍を有するBALB/cマウスの24日目における -gal 10
特異的IgG1(白いバー)およびIgG2a(黒いバー)の血清濃度を示す図である。

。

【図19】種々の処置群において24日目に、CT26、CL25結腸腫瘍を有するマウスの脾臓から単離した全T細胞(10^6)における、(A)IFN- および(B)IL-4分泌Tリンパ球を示す図である。PBS(白いバー)、 -gal(灰色のバー)、またはOVAペプチド(黒いバー)。

【0120】

【図20】IMO処置後の抗腫瘍メモリーの維持を示す図である。CT26、CL25腹 20
膜腫瘍を有するIMO処置マウスを、(A)CT26、WT結腸癌細胞、(B)CT26、CL25結腸癌細胞、または(C)4T1乳癌細胞で再チャレンジしたものの、長期生存動物の生存プロットである。IMO2(丸)またはIMOモチーフで処置しなかったナイーブマウス(四角)。

【図21】ナイーブマウスは、腫瘍を有しIMO化合物で処置したマウスからの免疫細胞の適合的移植の後に、特異的抗腫瘍保護を発達させたことを示す図である(A)IMO2で処置したマウス(三角)またはナイーブマウス(丸)から得た免疫細胞の適合的移植の後の、親CT26、CL25腫瘍細胞によるチャレンジに対するマウスの生存率。(B)IMO2で処置したマウス(三角)またはナイーブマウス(丸)から得た免疫細胞の適合的移植の後の、4T1乳癌細胞によるチャレンジに対するマウスの生存率。対照として、PBSを注射しCT26、CL25細胞でチャレンジしたマウスが、両図において四角で示される。 30

【図22】C57BL/6マウスにおける、B16、F0メラノーマに対するIMO化合物の抗腫瘍活性を示す図である。IMO2(黒いバー)または対照非CpG DNA(白いバー) * 非CpG DNA対照群と比較して $p < 0.0183$ 。B16、F0腫瘍を有するC57BL/6マウスにおける、IMO2または対照非CpG DNAによる処置22日後における、全血清の(B)IgG1および(C)IgG2a抗体サブクラス。

【図23】B16、F0メラノーマを有するwt、IL-6koおよびIL-12ko C57BL/6マウスの生存に及ぼすIMO2の効果を示す図である。非CpG DNAの野生型(wt)(四角)に対する効果、並びに、IMO2のwt(ひし形)、IL-6ノックアウト(ko)(丸)およびIL-12ko(三角)に対する効果。

【0121】

【図24】従来の化学療法とIMO免疫療法の組み合わせの、相乗的抗腫瘍活性を示す図である。(A)種々の処置群のBALB/cマウスにおける4T1乳癌の増殖阻害。各丸印は単一の動物のデータを示し、+は平均値を示す。* PBS対照群と比較して $p = 0.0004$ 。(B)種々の処置群における、腹膜に分散されたB16、F0メラノーマを有するC57BL/6マウスの生存のプロット。PBS(四角)、ドセタキシル(20mg/kg、i.p.)の単一用量を2日目に(ひし形)、IMO2(2.5mg/kg、i.p.、3、6、9、12および15日目)(丸)またはドセタキシルとIMO2の単一療法と同じ用量およびスケジュールでの組み合わせ(三角)。(C)PBS、ドセタキシル(Doce、30mg/kg、i.p.、1および3日目)、IMO2(5mg/kg、i.p.、1、3、5および7日目)またはドセタキシル(Doce)とIMO2で処置した 50

、C57BL/6マウスのCD69+およびCD86+細胞の活性化。CD69+（白いバー）およびCD86+（黒いバー）。

【図25】(A)マウスおよびヒトIMO2、IMO3それぞれの、BALB/cマウスにおけるCT26、CL25結腸腫瘍に対する抗腫瘍効果を示す図である。IMO2（丸）、IMO3（三角）、または非CpG DNA（四角）。(B)IMOモチーフ投与の4時間後のマウスにおける血清IL-12濃度を示す図である。

【図26】ヒトPBMCのIMO3による活性化は、ヘルセプチンの存在下でのHer-2陽性BT-474細胞の溶解を誘導することを示す図である。

【0122】

【図27】IMO化合物とリツキサンまたはヘルセプチンの組み合わせ処置において用いられる治療スケジュールを示す図である。 10

【図28】リツキサンおよび/またはIMOの処置により腫瘍が1.5gに到達するのに必要な日数とその割合を示す図である。

【図29】ヘルセプチンおよび/またはIMO処置後の腫瘍増殖の阻害パーセンテージを示す。

【図30】リツキサンおよび/またはIMO処置後の腫瘍増殖の阻害パーセンテージを示す。

【図1】

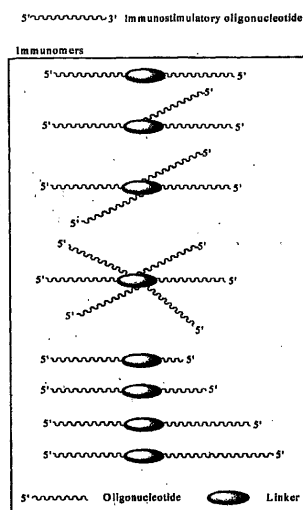


Figure 1

【図2】

Figure 2



【 図 3 】

Linkers for linear synthesis

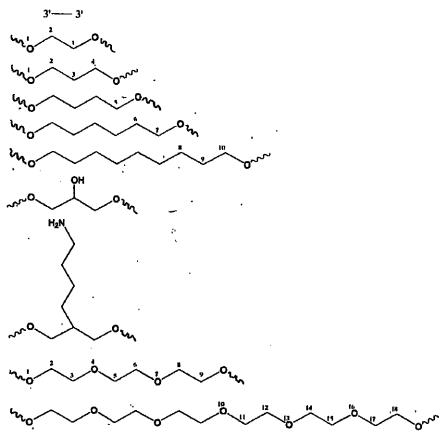


Figure 3

【 図 4 】

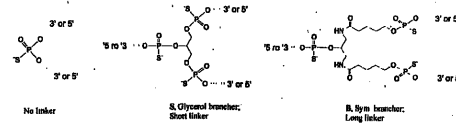


Figure 4

【 図 5 】

Linear Synthesis of Immunomers

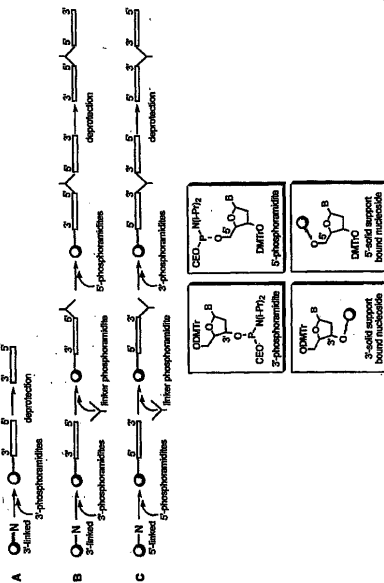
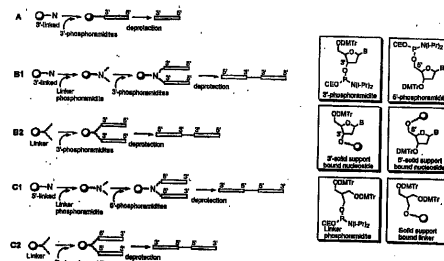


Figure 5

【 図 6 】

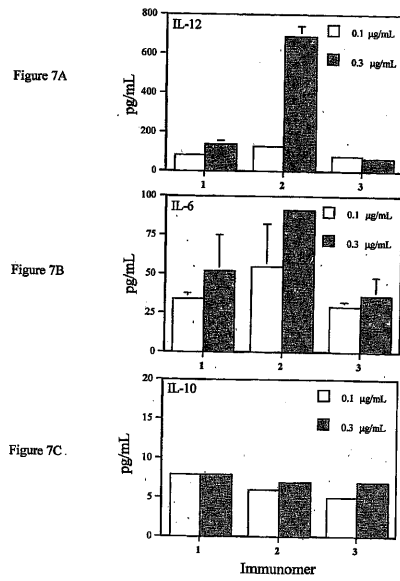
Figure 6

Parallel Synthesis of Immunomers



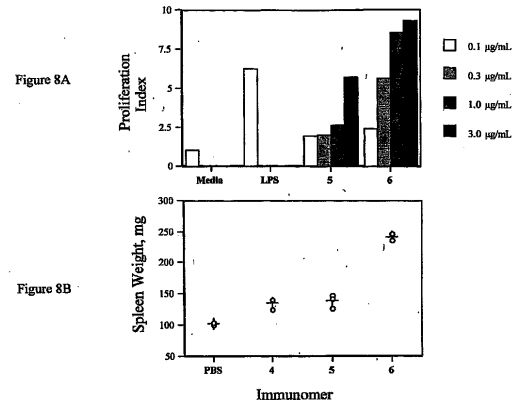
【 図 7 】

Figure 7



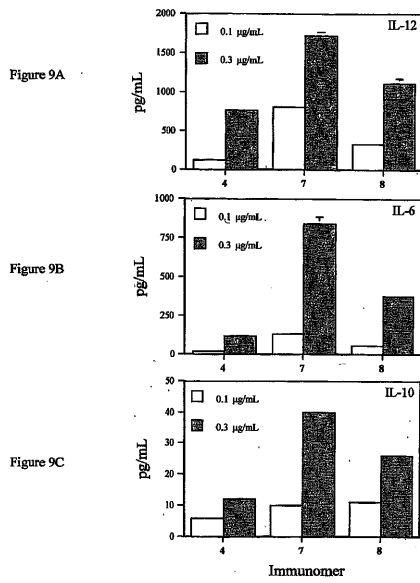
【 図 8 】

Figure 8



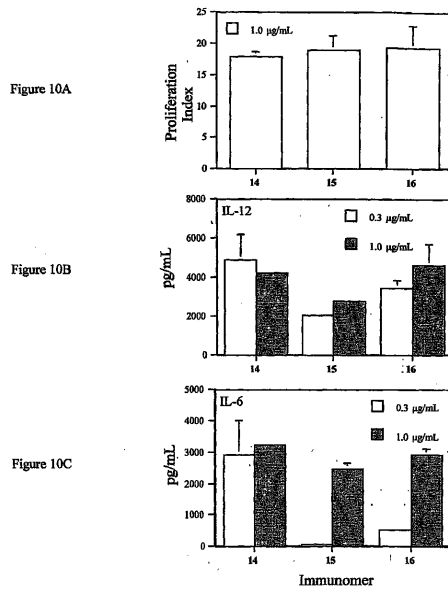
【 図 9 】

Figure 9



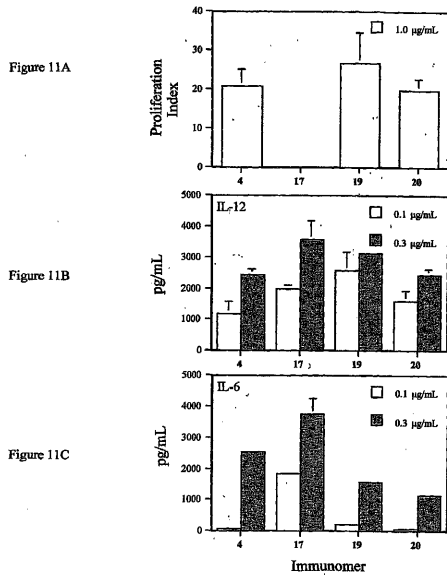
【 図 10 】

Figure 10



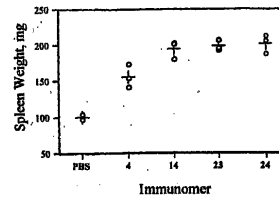
【 図 1 1 】

Figure 11



【 図 1 2 】

Figure 12.



【 図 1 3 】

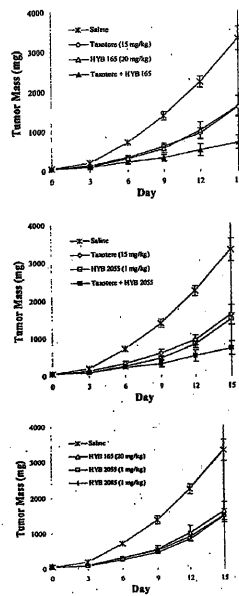


FIGURE 13

【 図 1 4 】

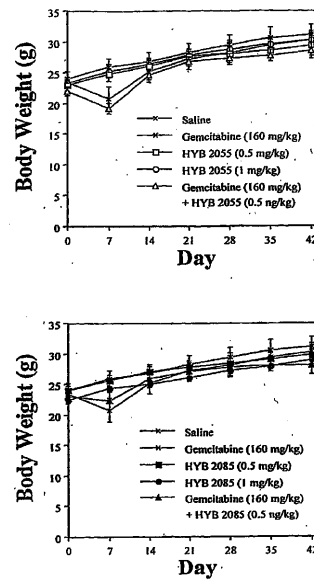


FIGURE 14

【 15 】

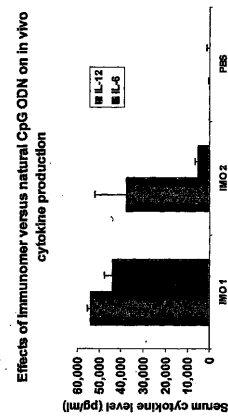
Figure 15

Number	Structure*	Motif	Modification
IMO 1	5'-TCTGACGTTCT-X-TCTTGACGTTCT-5'	Mouse	Natural CpG
IMO 2	5'-TCTGACRTTCT-X-TCTTTCAGGTTCT-5'	Mouse	Synthetic CpR
IMO 3	5'-TCTGTCRTTCT-X-TCTTTCAGGTTCT-5'	Human	Synthetic CpR

*: X and R are glycerol linker and 2'-deoxy-7-deazaguanosine, respectively.

【 16 】

Figure 16



【 17 】

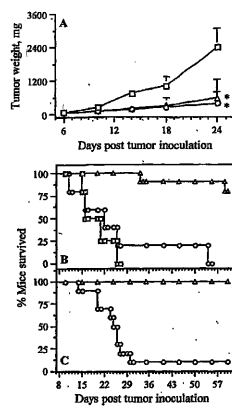


Figure 17

【 18 】

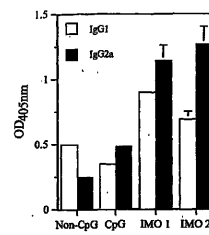


Figure 18

【 図 19 】

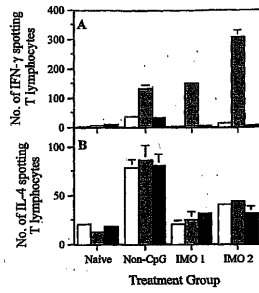


Figure 19

【 図 20 】

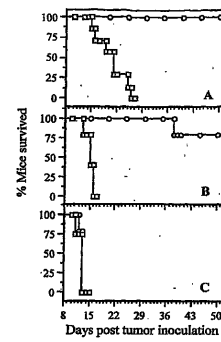


Figure 20

【 図 21 】

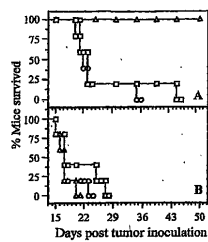


Figure 21

【 図 22 】

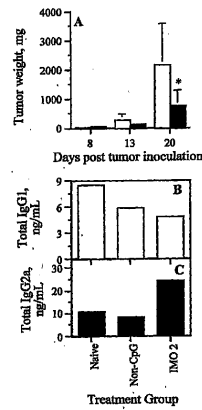


Figure 22

【 2 3 】

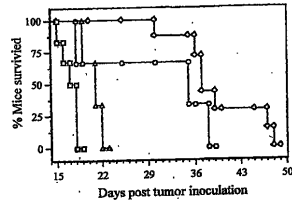


Figure 23

【 2 4 】

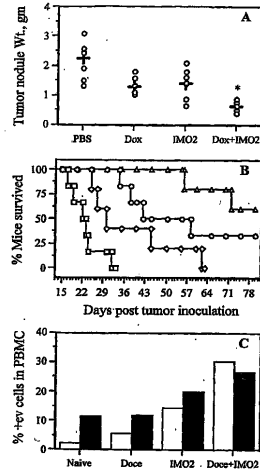


Figure 24

【 2 5 】

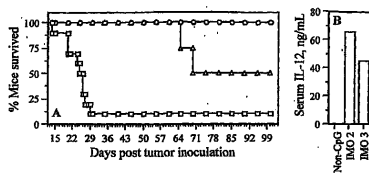


Figure 25

【 2 6 】

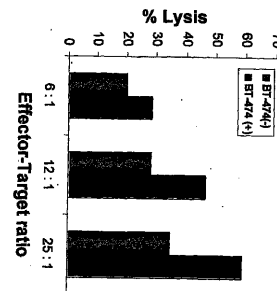


Figure 26

【 2 8 】

Figure 28

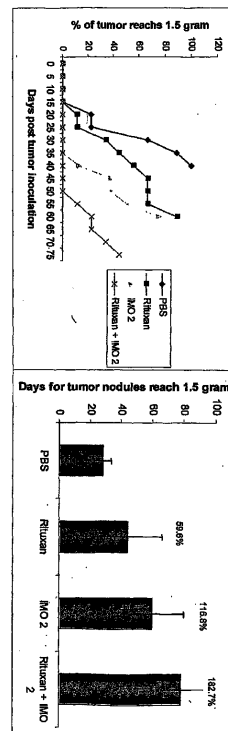
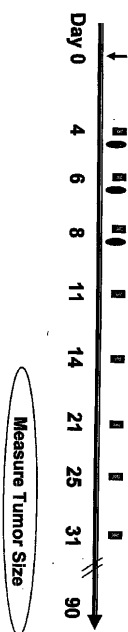


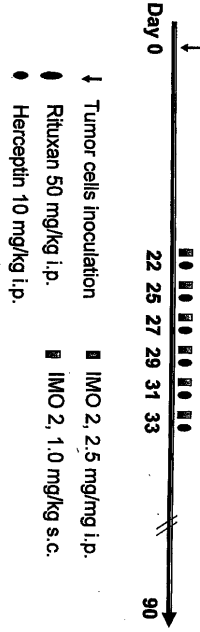
Figure 27

Therapeutic Schedule

Human B-Cell Non-Hodgkins Lymphoma (I.P.)



Her-2 Overexpressing Human Breast Tumor (S.C.)



【 2 7 】

【 3 0 】

Figure 30

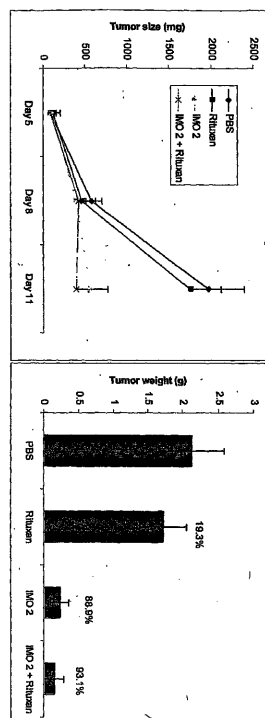
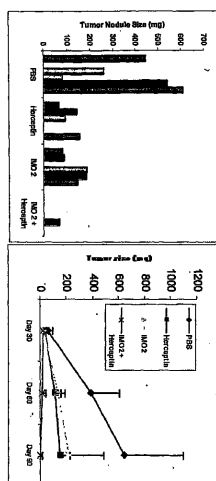


Figure 29



【 2 9 】

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/15313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01N 43/04; A61K 31/715 US CL : 514/44 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/44 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2001/0034330 A1 (Charlotte Kensil) 25 October 2001 (25.10.2001), abstract; page 3, paragraphs 0024, 0025 and 0026; page 5, paragraph 0045, 0046 and 0047; page 6, paragraph 0054; page 7, paragraph 0055.	1-3, 18, 20-22
X	Warren et al. Semin. Oncol. 2002, Vol. 29 (Suppl 2), pages 93-97, especially abstract.	1-2, 21, 22
A	Cheng et al. J. Nat. Cancer Inst. 2003, Vol. 95, pages 399-409, especially abstract, page 400, Figure 1.	11-14
A	WO 03/035836 A2 (Agrawal et al.) 1 May 2003 (01.05.2003), pages 66-74.	1-3, 5-18, 20-25
A	US 6,406,705 (Davis et al.) 18 June 2002 (18.06.2002), especially abstract.	1-3, 21-25
A	US 2002/0132995 A1 (Agrawal et al.) 19 September 2002 (19.09.2002), entire document.	1-3, 5-10, 16-18, 20-25
P	Wiegel et al. Clin. Cancer Resear. 2003, Vol. 9, pages 3105-3114, especially abstract.	1-2, 4, 21
P/A	Kandimalla et al. PNAS 2003, Vol. 100, pages 14303-14308, especially abstract.	1-18, 19-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 06 July 2005 (06.07.2005)		Date of mailing of the international search report 30 AUG 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Brandon J. Edwards, PhD Telephone No. (571) 272-8300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/15313

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN (MEDLINE, CAPLUS, PCTFULL, CANCERLIT), PubMed, WEST, Google
KW: CpG, immunomer, synerg3, cancer, tumor, cytidine, guanoside

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アグラワル, サディール
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01545、シュルーズベリー、ランプライター ドライブ 61

(72) 発明者 ワン, ダキン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01730、ベッドフォード、セルフリッジ ロード 7
Fターム(参考) 4C084 AA13 AA17 BA35 CA59 MA02 NA05 ZB091 ZB261 ZC751
4C085 AA03 AA38 FF24
4C086 AA01 CB09 EA17 MA02 MA04 NA05 ZB09 ZB26 ZC75