

(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.C1.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A 61 K 48/00</b> (2006.01)	A 61 K 48/00	Z N A 4 C 08 4
<b>A 61 K 45/00</b> (2006.01)	A 61 K 45/00	4 C 08 5
<b>A 61 P 37/04</b> (2006.01)	A 61 P 37/04	4 C 08 6
<b>A 61 P 43/00</b> (2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1
<b>A 61 K 31/7068</b> (2006.01)	A 61 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 イデラ ファーマシューティカルズ イン コーポレイテッド アメリカ合衆国 O 2 1 3 9 マサチューセッ ツ州ケンブリッジ、バッサー・ストリート 3 4 5 番
(86) (22) 出願日	平成16年5月14日 (2004.5.14)	(74) 代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
(85) 翻訳文提出日	平成18年1月16日 (2006.1.16)	(72) 発明者	カンディイマッラ, 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
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/015313		
(87) 國際公開番号	W02004/103301		
(87) 國際公開日	平成16年12月2日 (2004.12.2)		
(31) 優先権主張番号	60/471, 247		
(32) 優先日	平成15年5月16日 (2003.5.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

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、癌の相乘的処置

## (57) 【要約】

本発明は、相乘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、非ヌクレオチドオリンクマ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<sub>n</sub> - N1 - Y - Z - N1 - N<sub>n</sub> - 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；

N1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200オングストロームの長さを有するリンクマー、C2～C18アルキルリンクマー、ポリ(エチレングリコール)リンクマー、2 - アミノブチル - 1, 3 - プロパンジオールリンクマー、グリセリルリンクマー、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；

Nn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、アミノリンクマー、C2～C18アルキルリンクマー、ポリ(エチレングリコール)リンクマー、2 - アミノブチル - 1, 3 - プロパンジオールリンクマー、グリセリルリンクマー、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、N1またはNn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ンクマ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、ビンクリスチン、アドリアマイシン、シスプラチニン、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、マイトイマイシン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G L A、バルルビシン、カルムスタンインおよびポリフェルボサン、M M I 2 7 0、B A Y 1 2 - 9 5 6 6、R A S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、M M P、M T A / L Y 2 3 1 5 1 4、L Y 2 6 4 6 1 8 / 口メテキソール、グラモレク、C I - 9 9 4、T N P - 4 7 0、ヒカムチン/トポテカン、P K C 4 1 2、バルスボダール/ P S C 8 3 3、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、E 7 0 7 0、B C H - 4 5 5 6、C S - 6 8 2、9 - A C、A G 3 3 4 0、A G 3 4 3 3、インセル/ V X - 7 1 0、V X - 8 5 3、Z D 0 1 0 1、I S I 6 4 1、O D N 6 9 8、T A 2 5 1 6 / マルミスタット、B B 2 5 1 6 / マルミスタット、C D P 8 4 5、D 2 1 6 3、P D 1 8 3 8 0 5、D X 8 9 5 1 f、レモナールD P 2 2 0 2、F K 3 1 7、メシル酸イマチニブ/グリベック、ピシバニル/ O K - 4 3 2、A D 3 2 / バルルビシン、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、S P U - 0 7 7 / シスプラチニン、H M R 1 2 7 5 / フラボピリドール、C P - 3 5 8 ( 7 7 4 ) / E G F R、C P - 6 0 9 ( 7 5 4 ) R A S腫瘍遺伝子阻害剤、B M S - 1 8 2 7 5 1 / 経口プラチナ、U F T ( テガフル / ウラシル )、エルガミゾール / レバミソール、エニルウラシル / 7 7 6 C 8 5 / 5 F U エンハンサー、カンプト / レバミソール、カンプトサール / 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 / クラドリビン、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 / フルダラビン、ファルモルビシン / エピルビシン、デポシト、Z D 1 8 3 9、L U 7 9 5 5 3 / ビス - ナフタリミド、L U 1 0 3 7 9 3 / ドラスタン、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、Z D 0 4 7 3 / アノルメド、Y M 1 1 6、ロジンシード、C D K 4 および C D K 2 阻害剤、P A R P 阻害剤、D 4 8 0 9 / 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 / テニポシド、パラプラチン / カルボプラチン、プランチノール / シスプラチニン、ベペシド / エトポシド、Z D 9 3 3 1、タキソテレ / ドセタキセル、グアニニアラビノシドのブロドラッグ、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、アルバラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチニン、クロロンブシル、シタラビンH C 1、ダクチノマイシン、ダウノルビシンH C 1、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エトポシド ( 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 ( ヒドロシキカルバミド )、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 ( ナイトロジエンマスター )、メルカブトプリン、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、ブリカマイシン、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、チオテバ、硫酸ビンブラスチニン、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 )、テニポシド ( V M - 2 6 ) および硫酸ビンデシンからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

### 【請求項5】

イムノマーが、構造：

5 ' - T C G T T G X - Y - X G T T G C T - 5 '

式中、XはC 3 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。

10

20

30

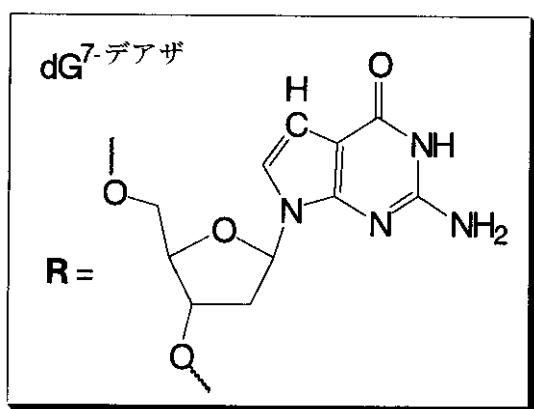
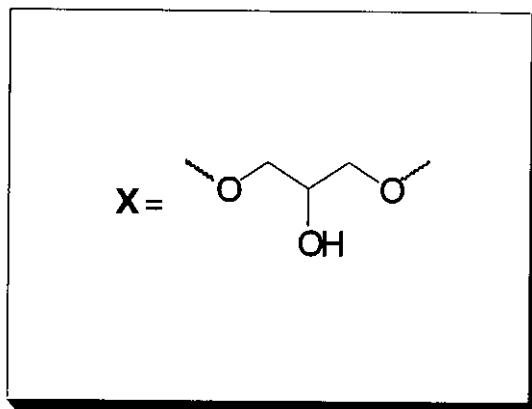
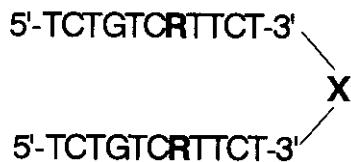
40

50

## 【請求項 6】

イムノマーが、構造：

## 【化 1】



10

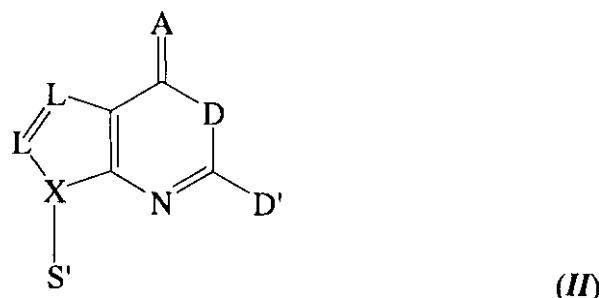
20

を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

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、ピリミジン・プリンジヌクレオシドを含み、ここで該プリンヌクレオシドは、構造(II)：

## 【化 2】



30

40

(i 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、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

水素結合供与体が、-NH-、-NH<sub>2</sub>、-SH および-OH からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

水素結合受容体が、C=O、C=S、-N= および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 7 に記載の方法。

## 【請求項 10】

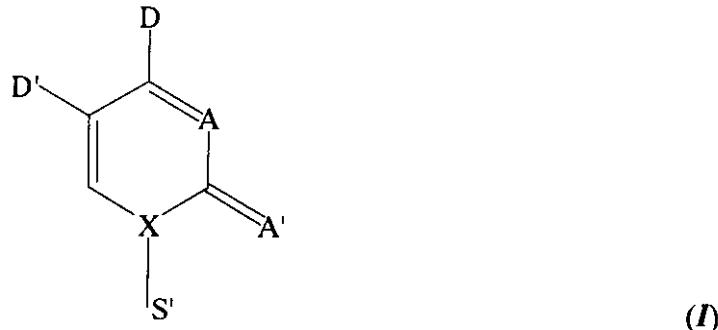
50

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】



10

20

30

40

50

( 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；

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 - 、- NH<sub>2</sub> 、- SH および - OH からなる群から選択され、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。

【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。

【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 2 0 0 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' 末端ヌクレオシ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

、からなる群から選択される非ヌクレオチドリンカーを含み、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、ハプテン、抗生物質、式： $\text{HO} - (\text{CH}_2)_n - \text{CH}(\text{OH}) - (\text{CH}_2)_p - \text{OH}$ で表され、式中、 $n$ 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】**

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】**

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vant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

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、インターフェロンア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 16:1216-124 (1998)は、CpG含有ホスホ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

10

20

30

40

50

教示している。McCluskie and Davis, J. Immunol. 161:4463-4466 (1998) は、CpG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】

CpG含有ホスホ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。

【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。

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。

【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、CpG、C\*<sup>p</sup>G、CpG\*、およびC\*<sup>p</sup>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 - リボフラノシリル) - 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CpGではない。

【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

10

20

30

40

50

および/またはイムノマーは、式(III)：

5' - Nn - N1 - Y - Z - N1 - Nn - 3' (III)

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 - 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； 10

【0009】

N1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200オング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； 20

【0010】

Nn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、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； 30

で表される免疫刺激性ドメインを含み、

ただし、N1またはNnの少なくとも1つは免疫刺激性部分であり；

ここでnは0～30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ンカ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。

【0011】

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。 40

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。

【0012】

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

10

20

30

40

50

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は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。

### 【0013】

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。

### 【0014】

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。

### 【0015】

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：ゲムシタビン、メトトレキサート、ビンクリスチン、アドリアマイシン、シスプラチニン、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、バルルビシン、カルムスタイン（carmustaine）およびポリフェルポサン（poliferposan）、MMI270、BAY12-9566、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/LY231514、LY264618/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）、PKC412、バルスポダール（Valspodar）/PSC833、ノバントロン/ミトロキサントロン（Novantrone/Mitoxantrone）、メタレット/スラミン（Metaret/Suramin）、バチマstattat（Batinostat）、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、インセル（Incel）/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN698、TA2516/マルミstattat（Marmistat）、BB2516/マルミstattat、CDP845、D2163、PD183805、DX8951f、レモナール（Lemonal）DP2202、FK317、メシル酸イマチニブ/グリベック、ピシバニル（Picibanil）/OK-432、AD32/バルルビシン、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）、エバセット（Evacet）/リポソームドキソルビシン、ユータキサン（Yewtaxan）/パクリタキセル

10

20

30

40

50

、タキソール／パクリタキセル、キセロアド／カペシタбин (Xeloda/Capecitabine)、フルツロン／ドキシフルリジン、シクロパックス (Cyclophosphamide) / 経口パクリタキセル、経口タキソイド、S P U - 0 7 7 / シスプラチン、H M R 1 2 7 5 / フラボピリドール (Flavopiridol)、C P - 3 5 8 (774) / E G F R、C P - 6 0 9 (754) R A S 腫瘍遺伝子阻害剤、B M S - 1 8 2 7 5 1 / 経口プラチナ、U F T (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) / 776 C 8 5 / 5 F U エンハンサー、カンプト／レバミゾール (Campto/Levamisole)、カンプトサール／イリノテカン、ツモデックス／ラリトレキセド (Tumodex/Raltitrexed)、ルイスタチン／クラドリビン (Leustatin/Cladribine)、パキセックス (Paxex) / 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 (Caelyx) / リポソームドキソルビシン、フルダラ／フルダラビン、ファルモルビシン／エビルビシン、デポシト (DepoCyt)、Z D 1 8 3 9、L U 7 9 5 5 3 / ビス - ナフタリミド (Bis-Naphthalimide)、L U 1 0 3 7 9 3 / ドラスタイン (Dolastain)、カエチックス (Caetix) / リポソームドキソルビシン、ゲムザール (Gemzar) / ゲムシタビン、Z D 0 4 7 3 / アノルメド (Anormed)、Y M 1 1 6、ロジンシード (Iodine seeds)、C D K 4 および C D K 2 阻害剤、P A R P 阻害剤、D 4 8 0 9 / デキシホスファミド、

10

20

30

## 【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、Z D 9 3 3 1、タキソテレ／ドセタキセル、グアニ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 (melphelan) 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、クロロンブシル (Chlorambucil)、シタラビン H C 1、ダクチノマイシン、ダウノルビシン H C 1、エストラムスチン (Estramustine) リン酸ナトリウム、エトポシド (V P 1 6 - 2 1 3)、フロクスウリジン (Flouxuridine)、フルオロウラシル (5 - F U)、フルタミド、ヒドロキシウレア (ヒドロシキカルバミド)、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 (Lomustine) (C C N U)、メクロレタミン (Mechlorethamine) H C 1 (ナイトロジエンマスター)、メルカブトブリン、メスナ (Mesna)、ミトタン (Mitotane) (o . p ' - D D D)、ミトキサントロン (Mitoxantrone) H C 1、オクトレオチド (Octreotide)、ブリカマイシン (Plicamycin)、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、チオテバ、硫酸ビンプラスチン、アムサクリン (Amsacrine) (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 (Hexamethylmelamine) (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 (Semustine) (メチル - C C N U)、テニポシド (V M - 2 6) および硫酸ビンデシン。

40

50

## 【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、腔、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ク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 . 0 0 0 1 マイクロモル ~ 約 1 0 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 . 0 0 0 1 m g / 患者・日 ~

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「組み合わせて」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。

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。

### 【 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 (d C) を含む。ある態様において、少なくとも1組の N n は、3 ~ 10 の d G s および / または G s のストリング、または 2' - 置換リボもしくはアラビノ G s を含む。

### 【 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、ペントフラノシリル、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ソース糖基を含む。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、

10

20

30

40

50

ホスホラミダイト (phosphoramidate) 、シロキサン、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、およびスルホンスクレオシド間結合を含む。用語「オリゴスクレオチド」はまた、1つまたは2つ以上の立体特異的スクレオシド間結合（例えば、(R<sub>p</sub>) - もしくは (S<sub>p</sub>) - 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）を有するポリスクレオシドも含む。本明細書において、用語「オリゴスクレオチド」および「ジスクレオチド」は、任意のかかるスクレオシド間結合を有するポリスクレオシドおよびジス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、これらス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のスクレオシド残基を、好ましくは約4～約30のスクレオシド残基を、より好ましくは約4～約20のスクレオシド残基を有するオリゴスクレオチドを含む。ある態様において、オリゴスクレオチドは、約5もしくは6～約18、または約5もしくは6～約14のス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、オリゴスクレオチドにおけるスクレオシド残基の数は重要ではなく、1つもしくは2つ少ないスクレオシド残基、または1つもしくは数個の余分なスクレオシド残基を有するオリゴスクレオチドもまた、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つ以上のオリゴスクレオチドは11個のスクレオチドを有する。

20

## 【0023】

用語「オリゴスクレオチド」はまた、限定なく、タンパク質基、親油性基、インターフェース剤、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スクレオシドを包含する。用語「オリゴスクレオチド」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スクレオチド、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ス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スクレオチドおよび/またはイムノマーは、天然に存在するスクレオシド、修飾スクレオシド、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「修飾スクレオシド」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スクレオシドである。ある態様において、修飾スクレオシドは、ここで述べるような非天然ピリミジンまたはプリンスクレオシドである。ある態様においては、修飾スクレオシドは2' - 置換リボスクレオシド、アラビノスクレオシドまたは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' - 置換リボスクレオシド」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 - 置換リボスクレオシドとなるリボスクレオシドを含む。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、アシリル、アシリルオキシ、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 - 置換リボスクレオシドの例は、限定なく、2' - O - メチルリボスクレオシドおよび2' - O - メトキシエチルリボスクレオシドを含む。

## 【0026】

50

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' - アリル、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ノ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WO 98/49288；2001年2月22日に公開されたWO 01/12804、2001年8月2日に公開されたWO 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' - Pyr - Pur - 3' で表される免疫刺激性ジヌクレオチドを含み、式中、Pyrは天然または合成ピリミジンヌクレオシドであり、Pur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。

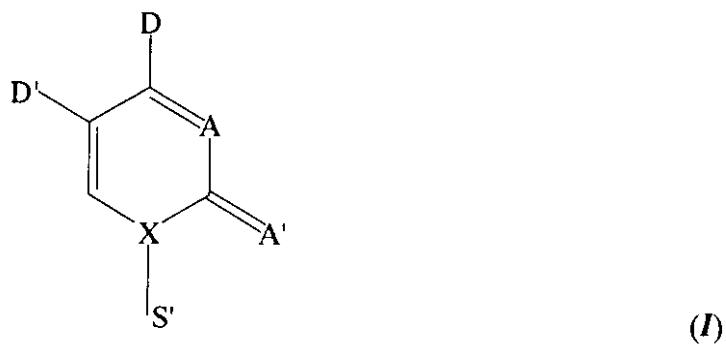
30

#### 【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】



10

20

30

40

(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；

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。

## 【0031】

好みしくは、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。

好みしい水素結合供与体は、限定なく、-NH-、-NH<sub>2</sub>、-SHおよび-OHを含む。好み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。

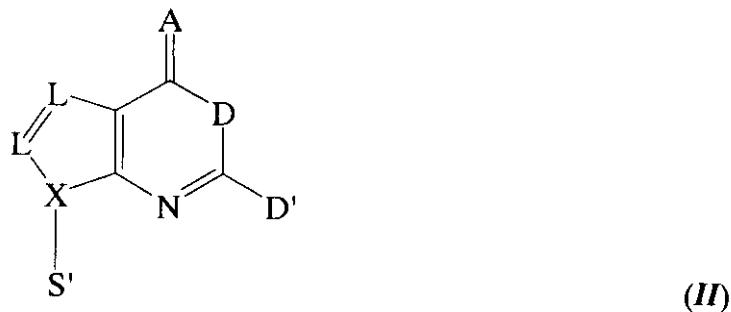
## 【0032】

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み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、好みしくは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、好みしい糖部分の例である。

## 【0033】

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、好みしいプリンヌクレオシド類似体は、構造(II)：

## 【化2】



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。

## 【0034】

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<sub>2</sub>、-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<sub>2</sub>、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。

## 【0035】

30

ある態様において、(II) 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、(II) 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。

## 【0036】

30

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<sup>\*</sup>pG、CpG<sup>\*</sup>、およびC<sup>\*</sup>pG<sup>\*</sup>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'-デオキシチジンであり、C<sup>\*</sup> 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-2'-D-リボフラノシリル)-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<sup>\*</sup> 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CpG ではない。

40

## 【0037】

50

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

オチドは、構造(ⅠⅠⅠ)：

5' - N<sub>n</sub> - N<sub>1</sub> - Y - Z - N<sub>1</sub> - N<sub>n</sub> - 3' (ⅠⅠⅠ)

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<sub>4</sub> - 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；

【0038】

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<sub>1</sub>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200オングストロームの長さを有するリンカー、C<sub>2</sub>～C<sub>18</sub>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ットヌクレオシド間結合から選択され；

【0039】

N<sub>n</sub>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<sub>2</sub>～C<sub>18</sub>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ッ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<sub>1</sub>またはN<sub>n</sub>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ンカ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。

【0040】

ある好ましい態様において、YZ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、メチルホスホネット、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、ボラノホスホネット、ホスホラミダイト、特に1級アミノ - ホスホラミダイト、N<sub>3</sub>ホスホラミダイトおよびN<sub>5</sub>ホスホラミダイト、および立体特異的結合(例えば、(R<sub>p</sub>) - または(S<sub>p</sub>) - ホスホロチオエート、アルキルホスホネット、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。

## 【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-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-)<sub>n</sub>(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。

## 【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-L-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。

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。

## 【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

10

20

30

40

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' - デオキシリジン、 $\beta$ -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るないとする

10

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<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-)<sub>n</sub>-、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<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-、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<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-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<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-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。

20

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、 $\beta$ -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、 $\beta$ -L-デオキシリボヌクレオシド、2'-O-プロパルギルーリボヌクレオシド、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、 $\beta$ -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

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】

40

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、 $\beta$ -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、 $\beta$ -L-デオキシリボヌクレオシド

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 オンゲストロームである。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。

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1,000Da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750Da未満の分子量を有する。

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 $\text{HO} - (\text{CH}_2)_p - \text{CH}(\text{OH}) - (\text{CH}_2)_q - \text{OH}$ 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、 $q$ 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 $\text{HO} - (\text{CH}_2)_m - \text{C}(\text{O})\text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{NH}\text{C}(\text{O}) - (\text{CH}_2)_n - \text{OH}$ 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。

#### 【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。

#### 【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

10

20

30

40

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、同一または非同一（長さ、塩基組成および／または組み込まれる化学修飾について）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（detriptylated）、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' └─HNCO-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3' └─HNCO-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'
6	5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -CONH └─3'-C-5' 5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -CONH └─3'-C-5'
7	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -CONH └─3'-C-5' 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -CONH └─3'-C-5'
8	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' └─3'-C-5' 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
9	5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3' └─3'-C-5' 5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3'
10	5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3' └─3'-C-5' 5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3'
11	5'-CTALCTGAYGTTCTCTGT-3' └─3'-C-5' 5'-CTALCTGAYGTTCTCTGT-3'
12	5'-CTALCTGACRTTCTCTGT-3' └─3'-C-5' 5'-CTALCTGACRTTCTCTGT-3'
13	5'-CTGACGTTCTCTGT-3'
14	5'-CTGACGTTCTCTGT-3' └─3'-C-5' 5'-CTGACGTTCTCTGT-3'

10

20

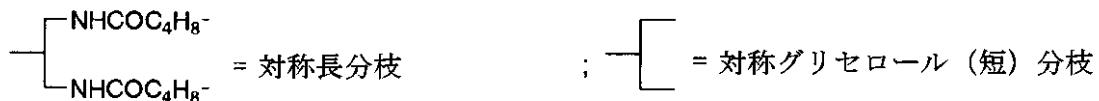
30

【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



$L = C_3$ -アルキルリンカー;  $X = 1'-2'$ -ジデオキシリボシド;  $Y = {}^{50}OH\ dC$ ;  $R = 7$ -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、非ヌクレオチドリンカーは、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、同じリポ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、ヌクレオシド間結合に付着してもよく、または非ヌクレオチドリンク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クーであってもよい。

## 【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、ゲムシタビン、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G L A、バルルビシン、カルムスタインおよびポリフェルポサン、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、バチマスタッフ、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、インセル/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN698、TA2516/マルミスタッフ、BB2516/マルミスタッフ、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、ピシバニル/OK-432、AD32/バルルビシン、

## 【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/カペシタビン、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/レバミソール、エニルウラシル/776C85/5FUエンハンサー、カンプト/レバミソール、カンプトサール/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/クラドリビン、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/フルダラビン、ファルモルビシン/エピルビシン、デポシト、ZD1839、LU79553/ビス-ナフタリミド、LU103793/ドラスタン、カエチックス/リポソームドキソルビシン、ゲムザール/ゲムシタビン、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、

## 【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/テニポシド、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

10

20

30

40

50

ド / エトポシド、Z D 9 3 3 1、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、カルボブチラン、クロロンブシル、シタラビン H C 1、ダクチノマイシン、ダウノルビシン H C 1、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エトポシド (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 (ヒドロシキカルバミド)、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)、メルカブトプリン、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、ブリカマイシン、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、チオテバ、硫酸ビンプラスチン、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)、テニポシド (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 (Melaccine)、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、单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单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、单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-Welicome)、リツキサン (Rituxan) (IDEA/Genentech/Hoffman La Roche)、ミロターグ (Mylotarg) (Wyeth)、キャンパス (Campath) (Millennium)、ゼバリン (Zevalin) (IDEA and Schering AG)、ベキサール (Bexxar) (Corixa/GSK)、エルビタックス (Erbitux) (Imclone/BMS)、アバストチン (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

## 【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, 18<sup>th</sup> Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990に記載されている。

40

## 【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 モチーフの腹膜投与も、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 I MHC 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ィ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 -  $\gamma$  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 - 12 k<sub>o</sub> マウスは IMO 処置に応答せず、この Th1 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 Th 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 IMO 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。IMO 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 IMO 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、CD 69 + および CD 86 + 細胞が大幅に減少することによって証拠付けられる。B 16 . 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ビシンを用いた従来の化学療法の効果は、IMO 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、IMO 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、Th 1 サイトカインである IL - 12 が、IMO 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、IMO 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 IMO 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 IMO 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、IMO 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。IMO 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 μmol スケールで DNA 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' - デオキシリボースホスホラミダイト、プロビル - 1 - ホスホラミダイト、2 - デオキシリジンホスホラミダイト、1 , 3 - ビス - [ 5 - ( 4 , 4 ' - デメトキシトリチル ) 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 - DMT - グリセロールホスホラミダイトおよびジ - DMT - 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、<sup>31</sup>P および <sup>1</sup>H NMR 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HPLC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、CGEおよびMALDI-TOF MSによりテストした。

#### 【0075】

##### 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8A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、LPS陽性対照よりも多くの脾細胞増殖をもたらす。

#### 【0076】

##### 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。5mg/kgの単回用量をBALB/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72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8B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。

#### 【0077】

##### 例4：サイトカイン解析

脊椎動物細胞、好ましくはBALB/cマウス脾臓細胞またはヒトPBM Cにおける、IL-12およびIL-6の分泌を、サンドイッチELISA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。ELISAプレート（Costar）は、PBS緩衝液（PBS/0.05%アジ化ナトリウム、pH 9.6）中の5μg/mL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PBS/1%BSAを用いて37にて30分間プロッキングした。細胞培養上清および標準サイトカインは、PBS/10%FBS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、25で2時間インキュベートした。プレートに1μg/mLの適当なビオチン化抗体を加え、25で1.5時間インキュベートした。次にプレートをPBS-T緩衝液（PBS/0.05%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25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5Aに結果を示す。

#### 【0078】

健康なボランティアの末梢血から、ヒト末梢血単核細胞（PBM 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、400×gで30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（PBS）で2回、250×gで10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10%FCSおよびペニシリン-ストレプトマイシン（100U/ml）を補充した。細胞は、24ウェルプレートで異なる期間、 $1 \times 10^6$ 細胞/ml/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ELISAにより、IL-6（BD Pharmingen, San Diego, CA）、IL-10（BD Pharmingen）、IL-12（BioSource International, Camari

10

20

30

40

50

Ho, CA)、IFN- $\alpha$  (BioSource International) および TNF- $\alpha$  (BD Pharmingen) および TNF- $\beta$  (BD Pharmingen) を含む種々のサイトカインのアッセイまで -70°C で凍結して保存した。結果を下の表 5 に示す。

【0079】

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- $\gamma$  および TNF- $\beta$  の濃度は、同じ実験条件下で作製された IL-10、IFN- $\gamma$  および TNF- $\beta$  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 <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	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- $\gamma$ (pg/mL)	
			D1	D2	D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18マー(PS)	37	88	125	84
26	5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	11マー(PS)	48	139	251	40

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

20

30

D 1 および D 2 はドナー 1 およびドナー 2 である。

【0080】

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') <i>X<sub>1</sub></i>	オリゴ長 または各鎖	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			3 μg/mL	10 μg/mL
26	5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	11マー(PS)	870	10670
27	5'-TCTGTCR <sub>2</sub> TTCT-3' 5'-TCTGTCR <sub>2</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	11マー(PS)	1441	7664
28	5'-TCTGTY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCT-3' 5'-TCTGTY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	11マー(PS)	1208	1021
29	5'-XXTCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-XXTCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	11マー(PS)	162	1013
30	5'-CTGTCR <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' 5'-CTGTCR <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	14マー(PO)	264	251
31	5'-CTGTY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' 5'-CTGTY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	14マー(PO)	149	119
32	5'-TCTGACR <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-TCTGACR <sub>1</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	11マー(PS)	2520	9699
33	5'-XXTCTGACR <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-XXTCTGACR <sub>1</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	11マー(PS)	2214	16881
34	5'-TCTGACR <sub>2</sub> TTCT-3' 5'-TCTGACR <sub>2</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	11マー(PS)	3945	10766
35	5'-TCTGAY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCT-3' 5'-TCTGAY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	11マー(PS)	2573	19411
36	5'-CTGAY <sub>2</sub> GTTCTCTGT-3' 5'-CTGAY <sub>2</sub> GTTCTCTGT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	14マー(PO)	2699	408
37	5'-CTGACR <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' 5'-CTGACR <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	14マー(PO)	839	85
38	5'-CTGAY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' 5'-CTGAY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' <i>X<sub>1</sub></i>	14マー(PO)	143	160

## 【0081】

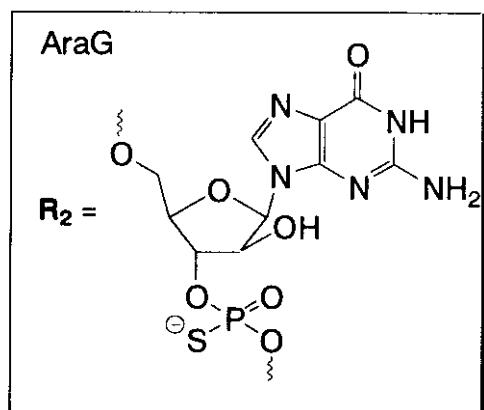
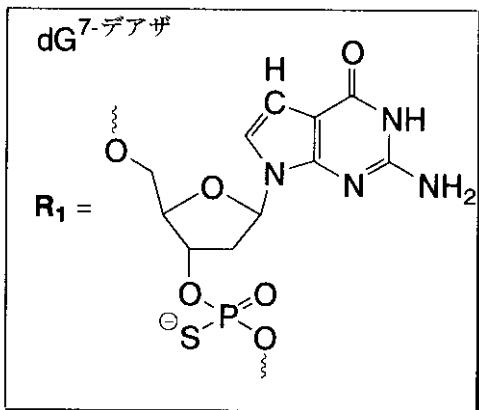
正体文字の表記は、ホスホロチオエート結合を示す；イタリック体はホスホジエステル結合を示す。

10

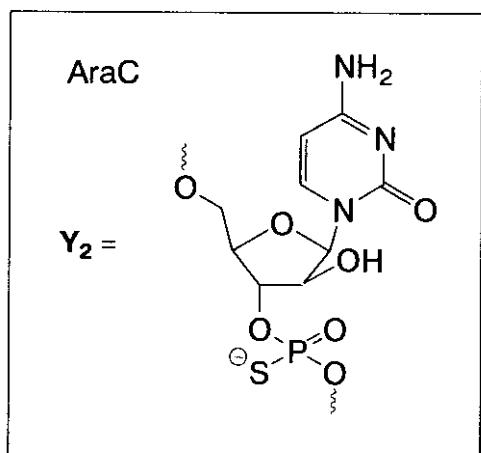
20

30

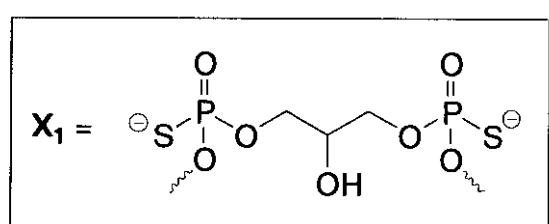
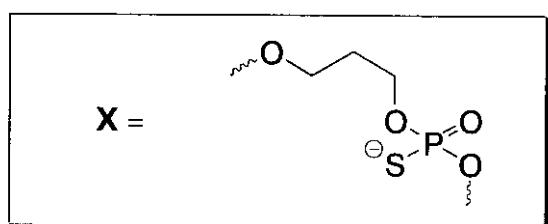
【化3】



10



20



30

さらに、図7A～7C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

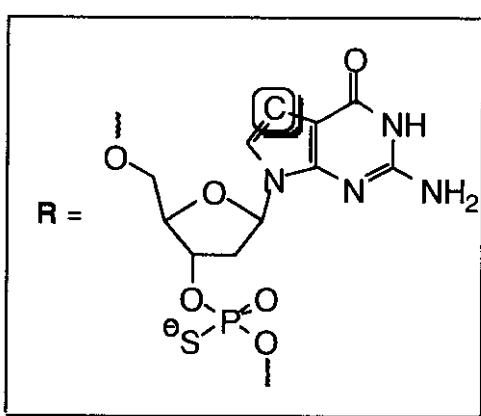
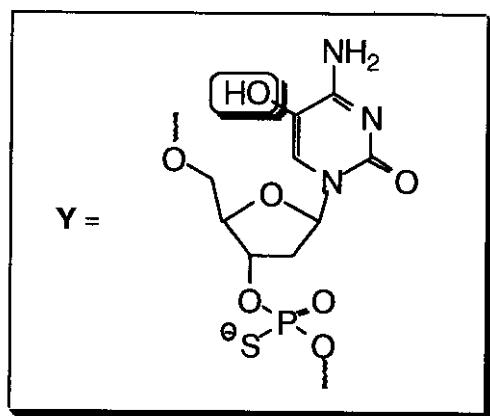
表9～11に示すように、免疫刺激性ジヌクレオチドモチーフ内に非天然のピリミジンヌクレオシドまたは非天然のプリンヌクレオシドを含む、種々の長さのイムノマーでは、免疫刺激活性は維持された。

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 µg/mL	@ 3 µg/mL
51	5'-CTCACTTCGTTCTCTGT-3'	18マー	404	348
57	5'-TCTTYGTTCT-3' 5'-TCTTYGTTCT-3' 3'-T-5'	11マー	591	365
58	5'-TCTTCRTTCT-3' 5'-TCTTCRTTCT-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

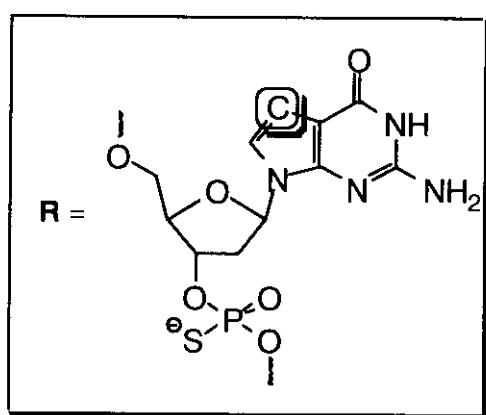
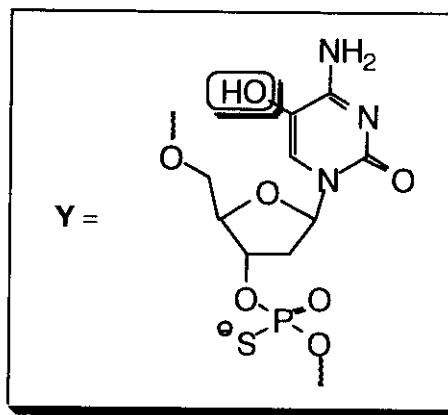
【0083】

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 µg/mL	3 µg/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'-GTYGTTCT-3' 5'-GTYGTTCT-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



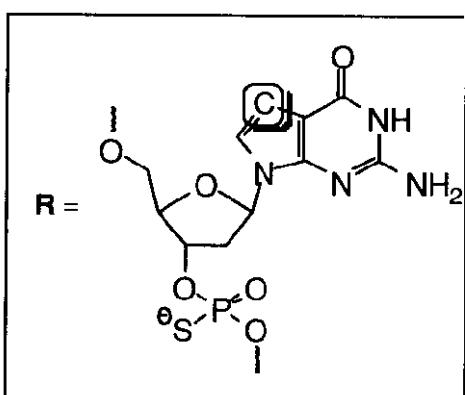
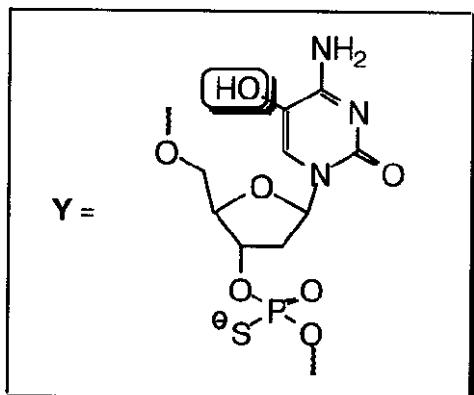
20

【0084】

表11. 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 μg/mL	3 μg/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



## 【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。

## 【0086】

## 表12. イムノマー構造および免疫刺激活性

10

20

30

40

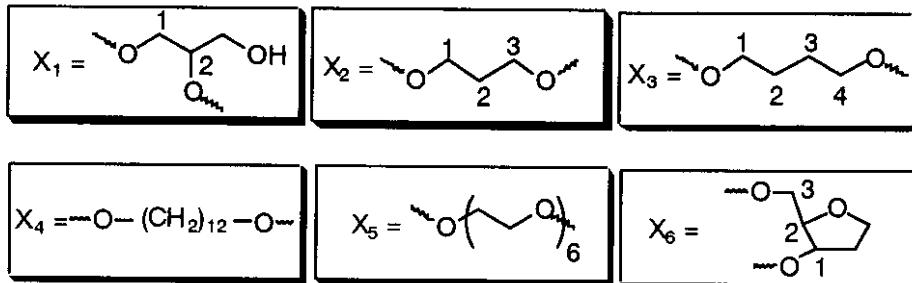
【表11】

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)
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18マー	257	635
73	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow X_1$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow X_1$	10マー	697	1454
74	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow X_2$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow X_2$	10マー	1162	669
75	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow X_3$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow X_3$	10マー	1074	1375
76	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow X_4$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow X_4$	10マー	563	705
77	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow X_5$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow X_5$	10マー	264	543
78	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow X_6$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow X_6$	10マー	1750	2258
79	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow (X_3psX_3)$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow (X_3psX_3)$	10マー	2255	2034
80	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow (X_3psX_3psX_3)$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow (X_3psX_3psX_3)$	10マー	1493	1197
81	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow (X_6psX_6)$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow (X_6psX_6)$	10マー	3625	2642
82	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow (X_6psX_6psX_6)$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow (X_6psX_6psX_6)$	10マー	4248	2988
83	5'-CTGACGTTCT-3' $\searrow PO_3S$ 5'-CTGACGTTCT-3' $\nearrow PO_3S$	10マー	1241	1964

10

20

30



【0087】

40

## 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

50

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'	14マー	1551	159
85	5'-LLCTGACGTTCTCTGT-3' 5'-LLCTGACGTTCTCTGT-3'	14マー	466	467

L = C 3 - リンカ -

【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's F12K培地で培養し、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's F12K培地(10%FBS)で2回洗浄し、FBSなしのHam's F12K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、各マウスの左前脚部に皮下注射した(5×10<sup>6</sup>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：1/2 a × b<sup>2</sup>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。ゲムシタビンHC1(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。

【0089】

G1：生理食塩水

G2：ゲムシタビン(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) + ゲムシタビン(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) + ゲムシタビン(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】

10

20

30

40

50

表14. 255、285、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		SD	SE	255	SD	SE	255	SD	SE	
				160 mg/kg	1 mg/kg									
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+GEM		SD	SE	285+GEM	SD	SE	
				1 mg/kg	0.5 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
3	52.3	9.3	4.2	64.7	9.0	4.0	45.1	8.2	3.7	44.6	8.7

【表14】

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15および図14に示す。イムノマー255または285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。ゲムシタビ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。

イムノマー 255 または 285 との組み合わせは、ゲムシタビ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	ゲムシタビン 160 mg/kg	SD	SE	255	SD	SE	255	SD	SE
							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

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	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

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 をゲムシタビ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、ゲムシタビ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。

【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、ゲムシタビ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】

10

20

30

【表16】

日	生理食塩水	SD	タキソテレ(15 mg/kg)		SD	165(20 mg/kg)	SD	255(1 mg/kg)	SD
			SE	タキソテレ(15 mg/kg)					
0.00	56.93	7.92	3.54	56.64	7.94	3.55	57.93	5.56	2.49
3.00	196.42	22.48	10.05	128.51	20.83	9.32	95.79	16.04	7.18
6.00	708.85	32.64	14.60	320.63	136.80	61.18	285.71	68.70	30.72
9.00	1370.95	239.99	107.33	598.69	196.60	87.92	534.93	225.19	100.71
12.00	2222.96	300.65	134.45	924.91	297.89	133.22	994.10	474.89	212.38
15.00	3303.04	672.86	300.91	1589.08	578.38	258.66	1601.73	576.19	257.68
タキソテレ + 255 (mg/kg)									
タキソテレ + 165	SD	SE	タキソテレ + 255 (mg/kg)	SD	SE	285(1 mg/kg)	SD	SE	SD
55.51	9.55	4.27	56.59	8.91	3.99	55.28	10.89	4.87	
78.47	21.79	9.74	80.14	21.59	9.65	91.01	23.60	10.55	
211.52	88.59	39.62	216.85	39.40	39.98	303.00	61.33	27.43	
302.66	178.36	79.76	307.53	184.05	82.31	512.30	110.16	49.26	
496.20	342.69	153.25	510.18	351.16	157.04	884.12	308.22	137.84	
686.47	385.97	172.61	703.50	394.65	176.49	1479.21	416.64	186.33	

【0095】

例10

図15に示すIMO化合物および非CpG DNA: (5' C T A T C T C A C C T T C 50

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 BALB / c ( H - 2<sup>d</sup> ) 、 C 57BL / 6 、並びに IL - 6 および IL - 12 ノックアウト ( ko ) マウス ( 両方とも C 57BL / 6 バックグラウンドにて ko ) で 5 ~ 8 週齢のものを、 Jackson Laboratory ( Bar Harbor, ME ) から購入した。 CT26 . WT ( ATCC, Rockville, MD ) は、 発癌物質誘導 BALB / c 未分化結腸癌である。 CT26 . CL25 ( ATCC, Rockville, MD ) は、 大腸菌 -gal 遺伝子と共に形質導入された CT26 . WT のサブクローニングである。 4T1 は、 BALB / c マウスの乳房腺癌細胞株である。 B16 . F0 は、 C 57BL / 6 由来のメラノーマ ( ATCC ) である。 CT26 . WT および 4T1 細胞は、 RPMI 1640 、熱で不活性化した 10 % ウシ胎仔血清 ( FBS 、 Atlas Biologicals, Fort Collins, CO ) 、 2 mM の L グルタミン、 100 µg / ml の streptomyces 、 100 U / ml のペニシリン ( Mediatech, VA ) 中で培養した。 CT26 . CL25 は、 同じ培地 + 400 µg / ml の G 418 硫酸塩 ( Life Technologies, Grand Island, NY ) 中に維持する。 B16 . F0 細胞は、 10 % FBS および抗生物質を含む DMEM 中で増殖させた。

#### 【 0096 】

血清サイトカイン濃度を評価するために、 BALB / 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 10 mg / kg ( 単回用量 ) の IMO 化合物を投与した。 血清を後眼窓採血 ( retro-orbital bleeding ) により IMO 投与の 4 時間後に収集し、 IL - 12 および IL - 6 をサンドイッチ ELISA 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。

#### 【 0097 】

血清抗体の解析のために、 96 ウェルプレートを室温で 3 時間、リン酸緩衝液 ( PBS ) 中の 2 µg / ml 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 ( NMS ) または抗血清、または -gal 特異的モノクローナル Ab ( Calbiochem Novabiochem, Pasadena CA ) でインキュベートし、 続いてマウス IgG ( H + L ) に特異的なホースラディッシュペルオキシダーゼ ( HRP ) 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、 HRP でラベルしたヒツジの抗マウス IgG1 および IgG2a ( Southern Biotechnology, Birmingham, AL ) を用いた。 抗体の結合を、免疫複合体と ABTS 基質 ( Zymed, San Francisco, CA ) との反応後、 405 nm における吸光度として測定した。

#### 【 0098 】

皮下の固体癌モデルについては、 100 µl の PBS 中の 10<sup>6</sup> の CT26 . CT25 細胞 / マウスまたは 5 × 10<sup>5</sup> の B16 . F0 細胞 / マウスを、 BALB / c または C 57BL / 6 マウスの右側腹低部に移植した。 腫瘍サイズは、 CT26 . CT25 については腫瘍接種の 6 日目に、 B16 . F0 については 8 日目に、 50 ~ 200 mg に達した。 次に、腫瘍を有するマウスは、 IMO 化合物または非 CpG DNA 対照を、 1 mg / kg の用量で 1 日おきに 10 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<sup>2</sup> ) を適用して、腫瘍増殖動態を決定した。

#### 【 0099 】

腹膜播種の腫瘍モデルについては、 3 × 10<sup>5</sup> の CT26 . WT または CT26 . CL25 細胞および 5 × 10<sup>4</sup> の B16 . F0 細胞を、それぞれ BALB / c または C 57BL / 6 マウスに i . p 注射した。 IMO 化合物または非 CpG DNA ( 2 . 5 mg / kg ) 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 ~ 10 匹のマウスを有した。

4T1 腫瘍モデルについては、 PBS 100 µl 中の 5 × 10<sup>5</sup> 細胞 / マウスを、 BALB / 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 50 mm<sup>2</sup> に達した時、 30 mg / kg のドキソルビシン ( 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。 PBS 100 µl 中に溶解した IMO 2 ( 1

$\text{mg} / \text{kg}$  ) は、腫瘍周辺の注射により週に 2 回、全部で 6 回投与した。

【 0 1 0 0 】

B 1 6 . F 0 メラノーマ腫瘍については、C 5 7 B L / 6 マウスに対し、P B S 1 0 0  $\mu\text{l}$  中の  $5 \times 10^4$  細胞 / マウスを i . p 注射した。マウスは 2 日目に、 $20 \text{ mg} / \text{kg}$  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、 $2.5 \text{ mg} / \text{kg}$  の I M O 2 を i . p 注射により与えた。

C T 2 6 . W T または C T 2 6 . C L 2 5 腹膜腫瘍を有し、I M O 化合物で処置されたマウスの長期生存動物 (n = 5) を、 $5 \times 10^5$  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 I M O 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 4 T 1 ( $5 \times 10^5$ ) 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。

【 0 1 0 1 】

適合免疫細胞移植を試験するため、B A L B / c マウスに対し、ナイーブ B A L B / c マウスまたは、C T 2 6 . W T もしくは C T 2 6 . C L 2 5 を有し I M O 処置された長期生存マウスからの  $5 \times 10^6$  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、 $3 \times 10^6$  の C T 2 6 . W T 、 C T 2 6 . C L 2 5 または 4 T 1 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 ( $2.5 \times 10^5$ ) は、 $2.5 \times 10^5$  の、マイトイマイシン C ( $50 \mu\text{g} / \text{ml}$  、Sigma, St. Louis, MO) で処置した -gal または O V A 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<sup>d</sup> 拘束 (H-2<sup>d</sup> restricted) された抗原特異的 (-gal<sub>8 7 6 - 8 8 4</sub>) 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 I L - 4 E L I S P O T 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)。

【 0 1 0 2 】

例 1 1 : I M O 化合物の血清サイトカイン分泌プロファイル

I M O 1 および I M O 2 は強い I L - 1 2 分泌を誘導し、一方 I M O 2 は、in vitro で低い I L - 6 産生を誘導する (図 1 6)。In vivo での免疫薬理学的効果を評価するため、I M O 化合物、C p G イムノマー、および非 C p G オリゴを、B A L B / c マウスに i . p 、 s . c または i . m にて  $10 \text{ mg} / \text{kg}$  の用量で投与し、4 時間後にこれらの血清を I L - 1 2 および I L - 6 について評価した。I M O 化合物は両方とも、従来の C p G オリゴと比べて、強い血清 I L - 1 2 分泌を誘導した (表 1 7)。しかし、合成 C p R モチーフを含有する I M O 2 は、全 3 投与経路において、有意に低い血清 I L - 6 を誘導し (表 1 7)、我々の初期の in vitro での研究結果が確認された。対照の非 C p G D N A は、有意でない I L - 1 2 および I L - 6 の誘導を示した。

表 1 7 . 異なる経路で投与された I M O 化合物による in vivo でのサイトカインの誘導<sup>a</sup>

【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

<sup>a</sup>: 値は、3匹の個別のマウスの平均値 (ng/mL) ± S.D.; Ndは検出不可。

10

20

20

## 【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1mg/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、1mg/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。

## 【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)。

## 【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-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<sup>d</sup>拘束(-gal<sub>876-884</sub>)抗原への有意に高い腫瘍特異的CTL反応が見出された。

## 【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

40

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はマウスマ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マウスマラノーマを有するマウスにおいてさらに試験した。B16.F0マラノーマを有する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マラノーマを有する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マ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マ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マラノーマを有する、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マ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）。

免疫細胞活性化に対するドセタキシルおよび IMO 2 処置の効果を、末梢血中の CD 6 9 + および CD 8 6 + の集団の変化を測定して試験した。 IMO 2 で処置したマウスは、 CD 6 9 + および CD 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 30 mg / kg の投与は、かかる活性化を阻害しなかった（図 2 4 C）。

【0111】

例 2 0 : ヒト特異的モチーフを含有する IMO 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 Th - 1 サイトカイン、IL - 12 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 IMO 2 の結果に基づき、ヒト特異的モチーフを含有する IMO 3 を合成し、マウスの CT 2 6 . CL 2 5 腫瘍に対するその活性を試験した。 IMO 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、 IMO 2 および IMO 3 の両者は、マウスにおいて IL - 12 分泌を誘導した（図 2 5 B）。さらに、図 2 6 に示すように、 IMO 3 によるヒト PBMC の活性化は、ヘルセプチンの存在下で Her - 2 陽性 BT - 474 細胞の溶解を誘導した。

【0112】

例 2 1 : IMO 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、 NOD / SCID 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、 50 mg / kg のリツキサンを 4 、 6 、 8 日目に、および / または 2.5 mg / kg の IMO 2 を 4 、 6 、 8 、 11 、 14 および 21 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 IMO 2 の組み合わせにより有意に阻害された。

【0113】

例 2 2 : IMO 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 Her - 2 過剰発現ヒト乳房腫瘍 (BT 474) を有するヌードマウスを、 10 mg / kg のヘルセプチンの腹腔内注射および / または 1 mg / kg の IMO 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 IMO 2 単独による処置の後の腫瘍増殖は、 PBS 対照群と比べて 70 % および 65 % 阻害された（図 2 9）。腫瘍増殖の 97 % の著しい阻害が、ヘルセプチンと IMO 2 の組み合わせ処置により見出された（図 2 9）。

【0114】

例 2 3 : IMO 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 Her - 2 過剰発現ヒト乳房腫瘍 (BT 474) 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 11 日目に、および / または IMO 2 を 5 、 7 、 9 、 11 および 13 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、 IMO 2 および、リツキサンと IMO 2 の組合せにより、有意に阻害された。

【0115】

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】

【0116】

【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パラレル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7A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7B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7C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。

【図8】図8A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8BはCpGモチーフの5'フランки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。

【図9】図9A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9B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9C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。

【図10】図10A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10B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10C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11A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11B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11C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。

【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

10

20

30

40

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)。<sup>\*</sup> 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<sup>-gal</sup>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<sup>6</sup>)における、(A) IFN-1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。

【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)<sup>\*</sup> 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2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。<sup>\*</sup> 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)、ドセタキシリル(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)またはドセタキシリルと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、ドセタキシリル(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)またはドセタキシリル(Doce)とIMO2で処置した

10

20

30

40

50

、 C 5 7 B L / 6 マウスの C D 6 9 + および C D 8 6 + 細胞の活性化。 C D 6 9 + (白いバー) および C D 8 6 + (黒いバー)。

【図 25】(A) マウスおよびヒト I M O 2、 I M O 3 それぞれの、 B A L B / c マウスにおける C T 2 6 . C L 2 5 結腸腫瘍に対する抗腫瘍効果を示す図である。 I M O 2 (丸)、 I M O 3 (三角)、または非 C p G D N A (四角)。(B) I M O モチーフ投与の 4 時間後のマウスにおける血清 I L - 1 2 濃度を示す図である。

【図 26】ヒト P B M C の I M O 3 による活性化は、ヘルセプチンの存在下での H e r - 2 陽性 B T - 4 7 4 細胞の溶解を誘導することを示す図である。

【0 1 2 2】

【図 27】 I M O 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 I M O の処置により腫瘍が 1 . 5 g 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 I M O 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 I M O 処置後の腫瘍増殖の阻害パーセンテージを示す。

【図 1】

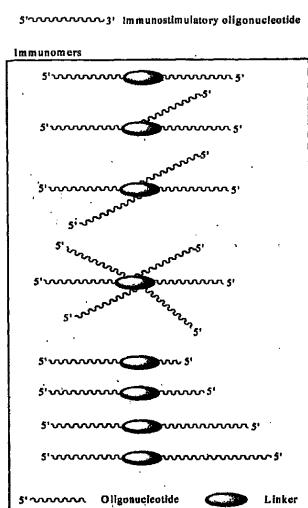
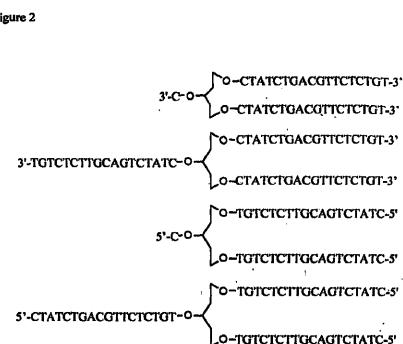


Figure 1

【図 2】



【図3】

Linkers for linear synthesis

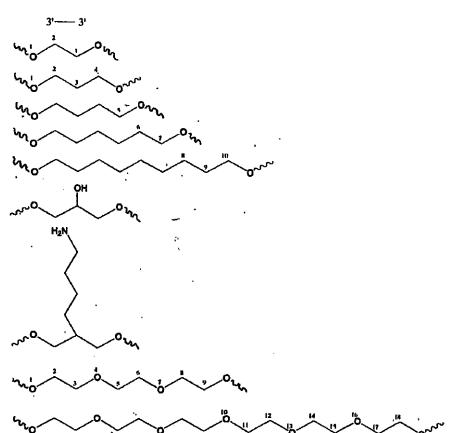


Figure 3

【図4】

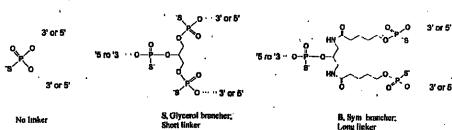
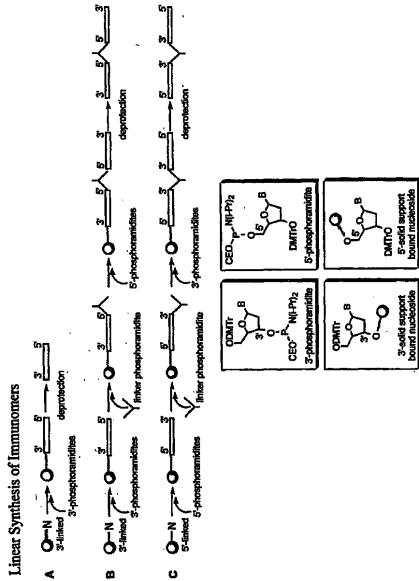


Figure 4

【図5】

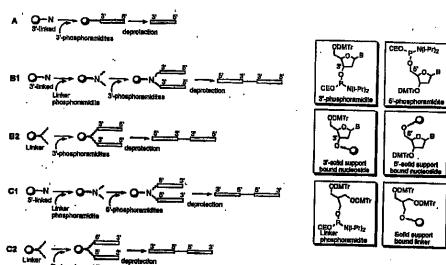
Figure 5



【図6】

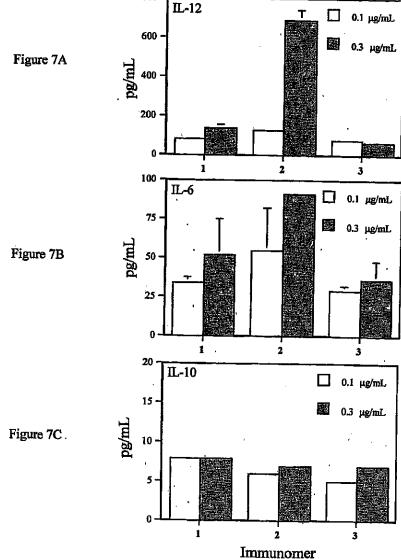
Figure 6

Parallel Synthesis of Immunomers



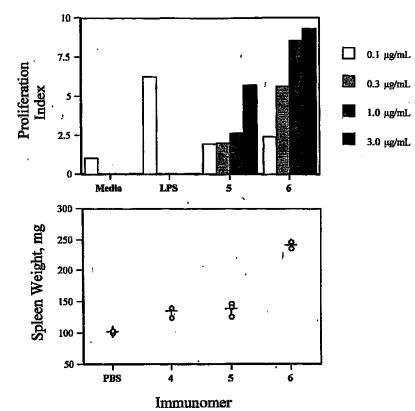
## 【図7】

Figure 7



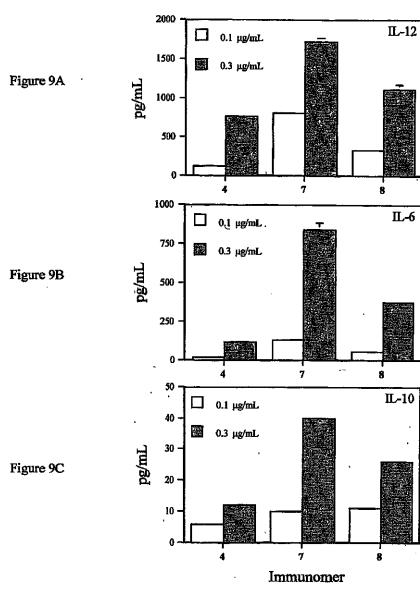
## 【図8】

Figure 8



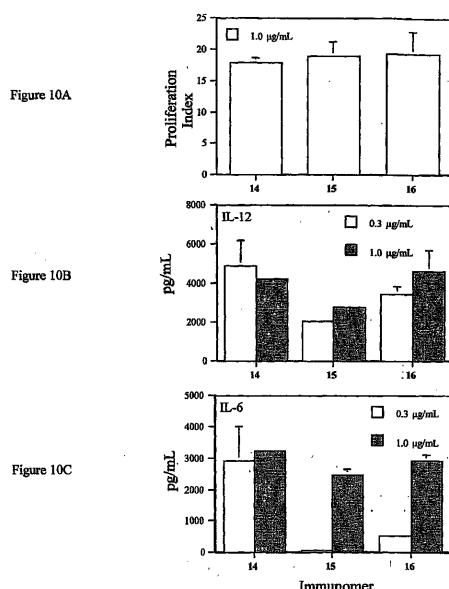
## 【図9】

Figure 9



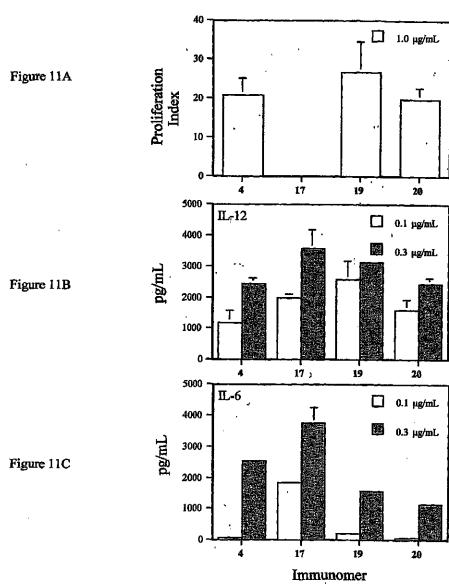
## 【図10】

Figure 10



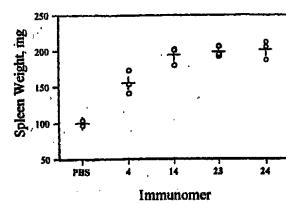
## 【図 1 1】

Figure 11



## 【図 1 2】

Figure 12



## 【図 1 3】

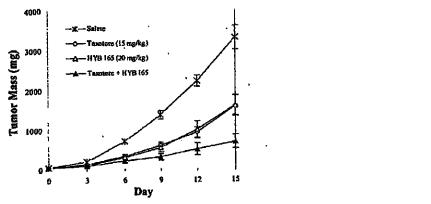
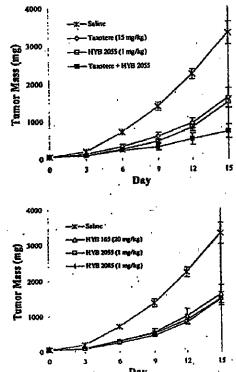


FIGURE 13



## 【図 1 4】

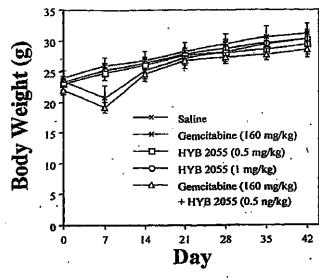
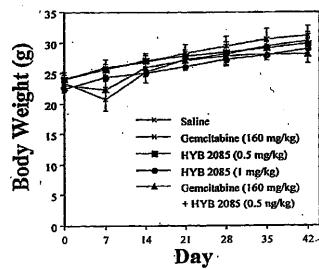


FIGURE 14



【図15】

Number	Structure*	Motif	Modification
IMO 1	5'-TCTGACGTTCT-X-TCTTGAGTCT-5'	Mouse	Natural CpG
IMO 2	5'-TCTGACRRTCT-X-TCTTROAGTCT-5'	Mouse	Synthetic CpR
IMO 3	5'-TCTGTGCRRTCT-X-TCTTRCTGTCT-5'	Human	Synthetic CpR

\* X and R are glycerol linker and 2'-deoxy-7-deazguanosine, respectively.

Figure 15

【図16】

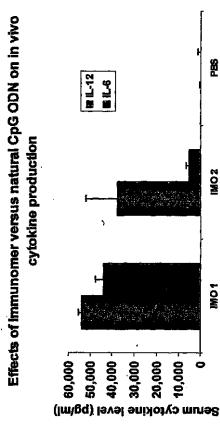


Figure 16

【図17】

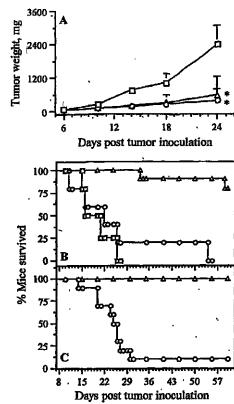


Figure 17

【図18】

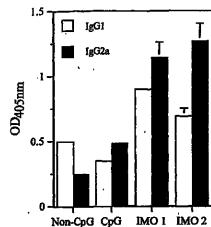


Figure 18

【図19】

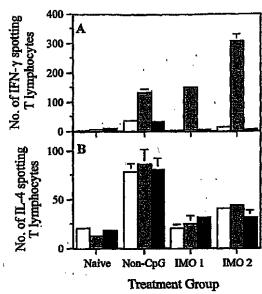


Figure 19

【図20】

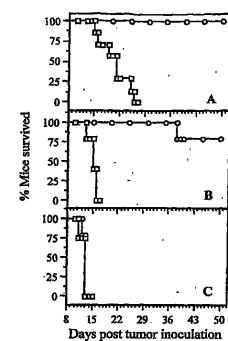


Figure 20

【図21】

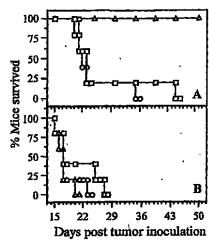


Figure 21

【図22】

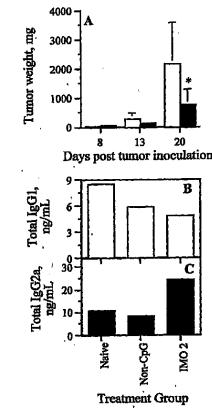


Figure 22

【図23】

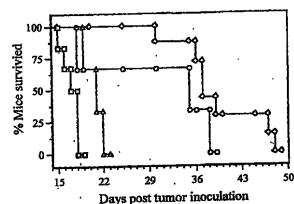


Figure 23

【図24】

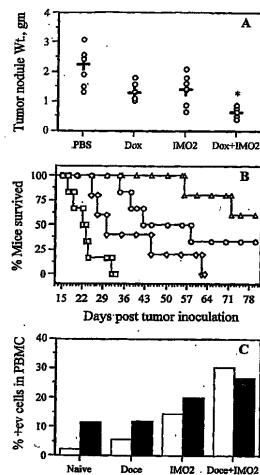


Figure 24

【図25】

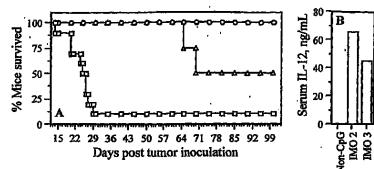


Figure 25

【図26】

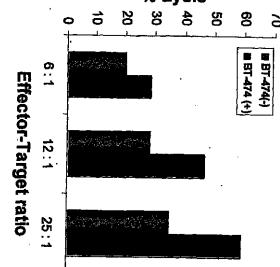
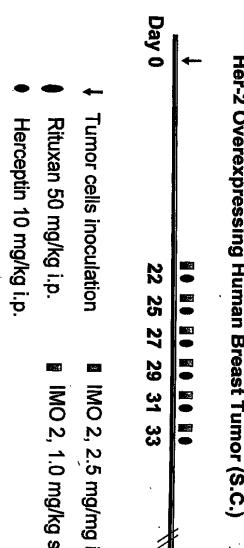
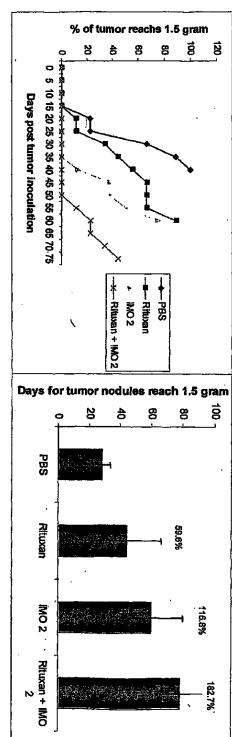


Figure 26

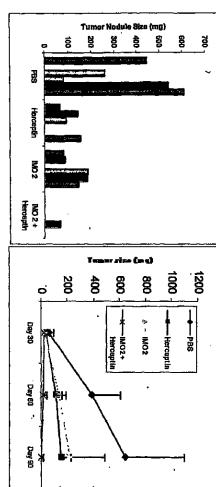
【図27】



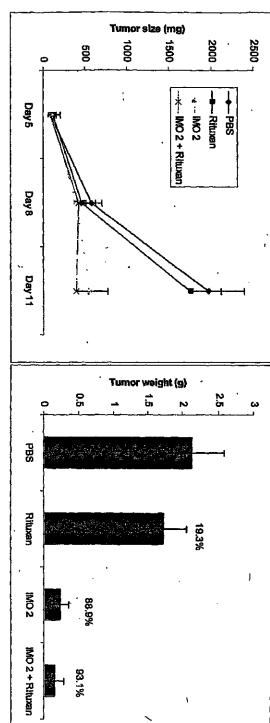
【図28】



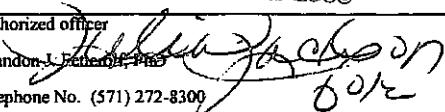
【図29】



【図30】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/15313																											
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> 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>B. FIELDS SEARCHED</b> 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																													
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">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.</td> <td style="padding: 2px;">1-3, 18, 20-22</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">Warren et al. Semin. Oncol. 2002, Vol. 29 (Suppl 2), pages 93-97, especially abstract.</td> <td style="padding: 2px;">1-2, 21, 22</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">Cheng et al. J. Nat. Cancer Inst. 2003, Vol. 95, pages 399-409, especially abstract, page 400, Figure 1.</td> <td style="padding: 2px;">11-14</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 03/035836 A2 (Agrawal et al.) 1 May 2003 (01.05.2003), pages 66-74.</td> <td style="padding: 2px;">1-3, 5-18, 20-25</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">US 6,406,705 (Davis et al.) 18 June 2002 (18.06.2002), especially abstract.</td> <td style="padding: 2px;">1-3, 21-25</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">US 2002/0132995 A1 (Agrawal et al.) 19 September 2002 (19.09.2002), entire document.</td> <td style="padding: 2px;">1-3, 5-10, 16-18, 20-25</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">P</td> <td style="padding: 2px;">Wiegel et al. Clin. Cancer Resear. 2003, Vol. 9, pages 3105-3114, especially abstract.</td> <td style="padding: 2px;">1-2, 4, 21</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">P/A</td> <td style="padding: 2px;">Kandimalla et al. PNAS 2003, Vol. 100, pages 14303-14308, especially abstract.</td> <td style="padding: 2px;">1-18, 19-25</td> </tr> </tbody> </table>			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
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 checked="" 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 "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																													
Date of the actual completion of the international search 06 July 2005 (06.07.2005)		Date of mailing of the international search report 31 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. Petheror, PMS Telephone No. (571) 272-8300																											

**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, synerg\$, 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)
<b>A 6 1 K 31/519 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/519	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00	Z
<b>A 6 1 K 39/39 (2006.01)</b>	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、ランブライター 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