

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5873794号
(P5873794)

(45) 発行日 平成28年3月1日 (2016.3.1)

(24) 登録日 平成28年1月22日 (2016.1.22)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/117 (2010.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/337 (2006.01)
A 6 1 K 31/03 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A J
A 6 1 K 39/395 A
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/337
A 6 1 K 31/03

請求項の数 18 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-507779 (P2012-507779)
(86) (22) 出願日 平成22年4月30日 (2010.4.30)
(65) 公表番号 特表2012-525132 (P2012-525132A)
(43) 公表日 平成24年10月22日 (2012.10.22)
(86) 国際出願番号 PCT/EP2010/055903
(87) 国際公開番号 W02010/125182
(87) 国際公開日 平成22年11月4日 (2010.11.4)
審査請求日 平成24年1月5日 (2012.1.5)
(31) 優先権主張番号 09075220.5
(32) 優先日 平成21年4月30日 (2009.4.30)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 505106324
モロゲン・アーゲー
ドイツ連邦共和国、ベルリン 14195
、ファベックストラッセ 30
(74) 代理人 100091502
弁理士 井出 正威
(74) 代理人 100125933
弁理士 野上 晃
(72) 発明者 シュロフ、マティアス
ドイツ国、14195 ベルリン、タイロ
ルシュトラッセ 4ペー
(72) 発明者 ビティッヒ、ブルクハルト
ドイツ国、14129 ベルリン、ザルツ
ァハシュトラッセ 33

最終頁に続く

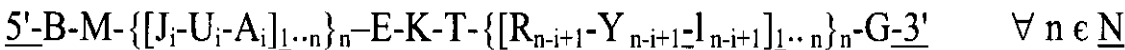
(54) 【発明の名称】 免疫調節用コンカテマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトまたは動物の免疫系の活性を調節するためのコンカテマー分子であって、下式に示されるとおり、互いに共有結合により結合した少なくとも4個のモノマー単位を含むコンカテマー分子：

【化 3】



10

式中、

前記モノマー単位は、 $G-B-M$ 、 $J_i-U_i-A_i$ 、 $E-K-T$ 及び $R_{n-i+1}-Y_{n-i+1}-l_{n-i+1}$ で表わされ、

A_i 、 B 、 E 、 G 、 l_{n-i+1} 、 J_i 、 K 、 M 、 R_{n-i+1} 、 T 、 U_i 、 Y_{n-i+1} は、デオキシリボヌクレオチド配列であり、

下付き文字*i*は、 $\{[J_i-U_i-A_i]_{1..n}\}_n$ で表わされる繰り返し配列におけるモノマー単位 $J_i-U_i-A_i$ の上記式の5'末端からの順番を意味し、下付き文字*n-i+1*は、 $\{[R_{n-i+1}-Y_{n-i+1}-l_{n-i+1}]_{1..n}\}_n$ で表わされる繰り返し配列におけるモノマー単位 $R_{n-i+1}-Y_{n-i+1}-l_{n-i+1}$ の上記式の3'末端からの順番を意味し、

「-」は、デオキシリボヌクレオチド配列が互いに共有結合するホスホジエステル結合

20

を表し、

n が2以上の場合、複数の $J_i-U_i-A_i$ は異なっているいなくてもよく、かつ、複数の $R_{n-i+1}-Y_{n-i+1}-l_{n-i+1}$ は異なっているいなくてもよく、

A_i 、 B 、 E 、 G 、 l_{n-i+1} 、 J_i 、 K 、 M 、 R_{n-i+1} 、 T 、 U_i 、 Y_{n-i+1} のうち少なくとも1つは、デオキシリボヌクレオチド配列cgを有するモチーフを含み、

B 、 U_i 、 K および Y_{n-i+1} は、1本鎖であり、

B 、 U_i 、 K および Y_{n-i+1} は、それぞれ、少なくとも4個のデオキシリボヌクレオチドで組み立てられており、

J_i と l_{n-i+1} 、 A_i と R_{n-i+1} 、 M と G および E と T の配列は、互いに逆相補的であり、

G は、ホスホジエステル結合によって B に共有結合されており、

上記モノマー単位は、塩基配列 $n^1n^2cgn^3n^4$ （式中、 n^1n^2 はgt、gg、ga、at及びaaの群から選択され、 n^3n^4 はct及びttの群から選択される）を含み、

上記において、cはデオキシシトシン、gはデオキシグアノシン、aはデオキシアデノシンおよびtはデオキシチミジンである。

【請求項2】

前記分子は、

5'-gggttaccaccttcattggaaaacgttcttcggggcggttcttaggtggtaaccc-3' (SEQ ID No. 1)

5'-ccctaggggttaccaccttcattggaaaacgttcttcggggc-gttctttccccaatggtgga-3' (SEQ ID No. 4)

5'-cccttccaccattggggatcattggaaaacgttcttcggggc-gttcttaggtggtaacccct-3' (SEQ ID No. 5)

及び

5'-aggggttaccaccttcattggaaaacgttcttcggggcggttct-taggtggtaac-3' (SEQ ID No. 6)

からなる群より選択された配列を含み、かつ、

最大400ヌクレオチドの長さを有する、請求項1に記載の分子。

【請求項3】

請求項1または2に記載の分子ならびに、抗体、アルキル化剤、白金類似体、インターカレート剤、抗生物質、有糸分裂抑制剤、タキサン、トポイソメラーゼ抑制剤、代謝拮抗剤および／またはL-アスパラギナーゼ、ヒドロキシカルバミド、ミトタンおよび／またはアマニチンを含む群から選択される化学療法薬を含む組成物。

【請求項4】

前記アルキル化剤が、

シクロホスファミド、

イホスファミド、

トロホスファミド、

メルファランおよび

クロラムブシル

からなる群より選ばれたナイトロジェンマスタード誘導体、

ブスルファンおよび

トレオスルファン

からなる群より選ばれたアルキルスルホン酸、

カルムスチン、

ロムスチン、

ニムスチン、

エストラムスチンおよび

ストレプトゾトシン

からなる群より選ばれたニトロソウレア、

プロカルバジンおよびダカルバジン、

テモゾロミド、ならびに

チオテパ

を含む群から選択され、 前記白金類似体が、 シスプラチン、 カルボプラチン、 <u>および</u> オキサリプラチン	
を含む群から選択され、 前記インターカレート剤が、 <u>ドキシルビシン（アドリアマイシン）</u> 、 ダウノルビシン、 エピルビシン <u>および</u> イダルビシン	10
<u>からなる群より選ばれたアントラサイクリン</u> 、 ミトキサントロン、 アムサクリン、 <u>および</u> ドキシフルリジン	
を含む群から選択され、 前記抗生物質が、 ブレオマイシン、 アクチノマイシン D（ダクチノマイシン）、 <u>および</u> マイトマイシン	20
を含む群から選択され、 前記有糸分裂抑制剤が、 <u>ビノレルビン</u> 、 ビンクリスチン（オンコビン）、 ビンブラスチン <u>および</u> ビンデシン	
<u>からなる群より選ばれたニチニチソウアルカロイド</u>	
を含む群から選択され、 前記タキサンが、 パクリタキセル、 <u>および</u> ドセタキセル	30
を含む群から選択され、 前記トポイソメラーゼ抑制剤が、 <u>カンプトテシン</u> 、 トポテカン <u>および</u> イリノテカン	
<u>からなる群より選ばれたトポイソメラーゼ I 阻害剤、および</u> <u>エトポシド</u> <u>および</u> テニポシド	
<u>からなる群より選ばれたトポイソメラーゼ I 阻害剤</u>	40
を含む群から選択され、 前記代謝拮抗剤が、 <u>メトトレキセート</u>	
<u>からなる群より選ばれた葉酸拮抗剤</u> 、 <u>5-フルオロウラシル（5-flouridacil）</u> 、 カペシタビン、 シトシンアラビノシド（シタラビン） <u>および</u> ゲムシタビン	
<u>からなる群より選ばれたピリミジン類似体、および</u> <u>6-チオグアニン（6-thioguanine）</u> 、	50

ペントスタチン、
 アザチオプリン、
 6-メルカプトプリン、
フルダラビンおよび
 クラドリビン

からなる群より選ばれたプリン類似体

を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

請求項 1 もしくは 2 に記載の分子および／または請求項 3 もしくは 4 に記載の組成物を
 含むキット。

【請求項 6】

医薬として使用するための、請求項 1 もしくは 2 に記載の分子、または、請求項 3 もしくは 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

請求項 1 もしくは 2 に記載の分子および／または請求項 3 もしくは 4 に記載の組成物を
 含む医薬品。

【請求項 8】

ヒトもしくは動物の免疫系の調節のための治療薬を製造するための、または、前記免疫系の活性の調節のための治療薬を製造するための、請求項 1 もしくは 2 に記載の分子、請求項 3 もしくは 4 に記載の組成物、または、請求項 7 に記載の医薬品の使用。

【請求項 9】

前記調節が前記免疫系の活性の増加であり、前記免疫系の単一細胞または細胞小集団の活性が刺激または促進される、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

前記調節が T 細胞媒介性免疫応答もしくは T 細胞非依存性免疫応答を含むこと、並びに／または、前記免疫応答が B 細胞の増殖および／もしくは B 細胞活性化を含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 11】

前記免疫系の調節が、サイトカインの分泌を含むことを特徴とする、請求項 8 から 10 の一項に記載の使用。

【請求項 12】

請求項 1 もしくは 2 に記載の分子および／または請求項 3 もしくは 4 に記載の組成物が、治療用ワクチンまたは予防用ワクチンにおいてアジュバントとして使用されることを特徴とする、請求項 8 から 11 の一項に記載の使用。

【請求項 13】

細胞増殖障害の治療のための治療薬を製造するための、請求項 1 もしくは 2 に記載の分子、請求項 3 もしくは 4 に記載の組成物、または請求項 7 に記載の医薬品の使用。

【請求項 14】

前記細胞増殖障害が腫瘍疾患であることを特徴とする、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 15】

前記腫瘍疾患が、内鼻、副鼻腔、鼻咽喉、唇、口腔、中咽頭、喉頭、下喉頭、耳、唾液腺の腫瘍およびパラガングリオーマを含む耳鼻咽喉領域の腫瘍、非小細胞性気管支癌腫、小細胞性気管支癌腫を含む肺の腫瘍、縦隔腫瘍、食道、胃、脾臓、肝臓、胆嚢および胆道、小腸、結腸および直腸の腫瘍ならびに肛門癌を含む胃腸管腫瘍、腎臓、尿管、膀胱、前立腺、尿道、陰茎および睾丸の腫瘍を含む泌尿器性生殖器腫瘍、子宮頸部、膣、外陰の腫瘍、子宮癌、悪性絨毛性疾患、卵巣癌腫、卵管 (T u b a F a l l o p i i) の腫瘍を含む婦人科腫瘍、腹腔の腫瘍、乳癌、甲状腺、副甲状腺、副腎皮質の腫瘍、脾内分泌部腫瘍、カルチノイド腫瘍およびカルチノイド症候群、多発性内分泌腫瘍を含む内分泌器官の腫瘍、骨および軟部組織の肉腫、甲皮腫、皮膚腫瘍、皮膚および眼球内黒色腫を含む黒色腫、中枢神経系の腫瘍、網膜芽腫、ウィルムス腫瘍、神経線維腫症、神経芽細胞腫、ユーイ

10

20

30

40

50

ング肉腫腫瘍ファミリー、横紋筋肉腫を含む幼児期の腫瘍、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、中枢神経系の原発性リンパ腫、ホジキン病を含むリンパ腫、急性白血病、慢性骨髄性およびリンパ性白血病を含む白血病、形質細胞腫、脊髄異形成症状群、腫瘍随伴症候群、原発不明腫瘍による腫瘍転移（CUP症状群）、腹膜癌、カポジ肉腫及びその他のAIDS関連悪性腫瘍、AIDS関連リンパ腫、中枢神経系のAIDS関連リンパ腫、AIDS関連ホジキン病およびAIDS関連肛門性器部腫瘍、移植関連悪性腫瘍を含む免疫抑制に関連する悪性腫瘍、脳転移、肺転移、肝転移、骨転移、胸膜転移および心膜転移を含む転移腫瘍、ならびに悪性腹水を含む群から選択される疾患であることを特徴とする、請求項14に記載の使用。

【請求項16】

10

水中に5'リン酸化DNA分子を提供するステップ、乾燥残渣が得られるまで50℃で凍結乾燥し、その後緩衝液中に再懸濁するステップ、T4 DNAーリガーゼを添加し、反応混合物を形成するステップ、および37℃で少なくとも30分間反応混合物をインキュベートするステップ、を含む、請求項1に記載のヒトまたは動物の免疫系の活性を調節するためのコンカテマー分子の製造方法。

【請求項17】

凍結乾燥前に、前記DNA分子をポリアクリルアミドゲル電気泳動またはHPLC及びFPLCの組み合わせで精製する、請求項16に記載の製造方法。

【請求項18】

20

前記凍結乾燥は、塩化マグネシウムの存在下に行われる、請求項16または17に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトおよび動物の免疫系の活性を調節するための非コーディングポリマー核酸分子、ならびにその製造方法及びこの非コーディングポリマー核酸分子を含むワクチンに関し、この非コーディングポリマー核酸分子は、前記非コーディング核酸分子の少なくとも4個の共有結合した分子（テトラマー）を含む非コーディング核酸分子と理解することができる。

30

【背景技術】

【0002】

獲得免疫応答は、それぞれの病原体に対する特異的なリンパ球の選択、それらのリンパ球のクローン増殖、およびエフェクター細胞への分化の後に（3～5日）遅れて開始するが、その後、免疫記憶を形成することによってそれぞれの病原体に対して持続的な防御をもたらす一方、自然免疫系の細胞は、生殖細胞がコードする受容体によって、保存された病原体関連分子パターン（PAMP）を介して病原体を認識し、即時に反応する。サイトカイン（例えば、IL-1、IL-6、TNF-α）およびケモカイン（例えば、IL-8/CXCL8、MIP-1α/β、MCP-1）の分泌、エフェクター機構（食作用、呼吸による放散、殺菌因子または細胞傷害性物質または溶解性顆粒の放出）の活性化、共刺激分子（CD80、CD86）の発現ならびにMHC分子の発現増強のように、様々な反応が、様々な細胞型の種類に属している。それによって、一方でエフェクター細胞が動員され、活性化され、侵入した病原体を排除することができ、他方で獲得免疫の細胞が活性化に必要なシグナルを受け取る。

40

【0003】

免疫応答を改善するために、免疫応答性CpG-オリゴヌクレオチド（CpG-ODN）が新型の免疫調節分子として使用されてきた。このような非メチル化CGモチーフは、細菌DNAに見出すことができ、免疫系にとって「危険なシグナル」となる。それらは病原体関連分子パターン（PAMP）として自然免疫系の非特異的活性化を引き起こす（Krieg、Nat. Med. 2003、9：831～835）。CpG-ODNはサイト

50

カインであるインターロイキン-12、インターフェロン- γ および腫瘍壊死因子- α を介して T_H1 ベースの免疫応答を誘導する。

【0004】

前記CpG-ODNを含む免疫刺激核酸(ISS)の長さは数塩基で、タンパク質発現のためのオープンリーディングフレームを含まない。

【0005】

ISSは直鎖状の核酸分子で、その両末端は開放しているか(遊離型ヒドロキシル基およびリン酸基)、または合成基によって保護されている。

【0006】

細胞性免疫応答を刺激するとフィードバックループに影響を及ぼすことが可能であるが、治療を受けていない患者では十分な免疫活性は生じないはずである。

【0007】

ホスホチオエート主鎖によるCpC-ODNの改変は、CpG-DNAを安定するために使用されるが、いくつかの重大な欠点を有する。この改変には特に際だった毒性があり(Heikenwalder 2004、Levin 1999)、タンパク質に対する非特異的結合も引き起こす(Brown 1994)。

【0008】

そのため、共有結合により閉環した新型免疫調節DNAが開発された(WO01/07055/EP1196178)。これらのDNA分子は、2個の化学合成DNA-ODNから構成されており、回文構造的重複末端を備えた5'および3'末端の自己相補的部分を有し、したがって両DNA分子が連結して共有結合により閉環した分子を生じる。非相補的部分にCGモチーフを有するこれらのDNA分子は、CpG-ODNと類似の活性(B細胞上の表面分子CD80、CD40、MHCの発現増加およびPBMCによるIL-6、IFN- γ 、IFN- α 、IL-12、TNF α の分泌)を示すが、ホスホチオエート主鎖を有するCpG-ODNと比較して、誘導されたサイトカインの発現パターンに差異があり、マウスにおける毒性が明らかに低い。従来技術によるこの免疫調節DNAは、ヒトおよび動物の免疫系の活性調節に関していくつかの欠点を有する。これはヒトおよび動物の免疫系の活性を所望する程度に調節すること、特に活性化することができない。例えば、WO01/07055による分子は、図1または請求項11で示したように、部分的に1本鎖のダンベル型であり、共有結合により閉環したDNA分子を形成する数個のデオキシリボヌクレオチド残基から構成され、本発明の範囲内ではダイマーと称される。WO01/07055によれば、開始材料として使用されるモノマー核酸は連結前に加熱され、それぞれがダンベル型のダイマーから構成される均一な核酸分子となる(WO01/07055の図1と比較)。得られた核酸は、WO01/07055の図1のダンベルである。本発明の意味において、モノマーとは、例えば、単一の塩基からなる構造を意味するのではなく、それ自体が数個のデオキシリボヌクレオチドリン酸から構成され(WO01/07055の図1または請求項11と比較)、その確定された塩基配列または確定された3次元構造ゆえに全体としてモノマーに典型的な特性を形成する核酸を意味する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

この技術水準から、本発明の目的は、改善された免疫応答を開始させる適切な免疫調節DNA分子並びにそれらの製造方法および前記免疫調節DNA分子を含むワクチンを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の状況において、免疫調節とは、免疫系のメディエータ細胞およびエフェクター細胞、例えば主に、ヘルパー機能を備えた現在知られている胸腺細胞および細胞傷害性胸腺細胞、B細胞およびいわゆるNK(ナチュラルキラー)細胞、マクロファージおよび単

10

20

30

40

50

核球ならびに樹状細胞およびそれらの前駆体、ならびに免疫系で機能するが今まで明らかに同定されていない機能を有する細胞集団の増殖、移動、分化または活性が、核酸分子を使用することによって刺激されることを意味する。免疫調節とは、前記で定義した意味の免疫応答の全般的な改善の他に、免疫反応の開始または発達に影響を及ぼすか、またはそれらの特性に関して確立された反応を変化させることによって、免疫反応の種類または特性が影響を受けることも意味する。

【0011】

本発明が請求する改善された免疫調節特性を有する分子は、WO 01/07055のダイマー物質とは対照的に、非コーディングポリマー核酸分子である。ポリマー核酸分子は、いわゆる高分子コンカテマーと理解すべきである。発明したポリマー分子は、以下のステップ、

5'リン酸化デオキシリボヌクレオチド酸を提供するステップ、

アルコール沈殿し、その後、乾燥残渣が得られるまで50℃でこの沈殿物を乾燥するか、または、特にMgCl₂の存在下で50℃でDNA分子を凍結乾燥し、その後緩衝液中に再懸濁するステップ、

T4-DNAリガーゼを添加し、それによって反応混合物を生成するステップ、およびこの反応混合物を37℃で少なくとも30分インキュベートするステップを含む方法によって製造することができる。

【0012】

コンカテマーは、全体として閉環した共有結合モノマー単位を含み、構成要素であるモノマーの範囲内には2本鎖部分および好ましくは1本鎖部分に存在する免疫調節CGモチーフが有る。非常に驚くべきことに、共有結合により閉環した免疫調節DNAのテトラマー、ヘキサマーまたは高分子集合体を含むこれらのポリマーは、従来技術のダイマー分子と比較して驚くほど改善された効果を有する。

【0013】

特許請求されているポリマー分子の分子的性質に関しては図1および2に示し、機能的性質に関しては図3および4に示し、このポリマーは当業者がその製造方法を適用することによって生じる。記載した方法において、回文構造の5'末端および3'末端を有する核酸分子を反応物質として使用することによって、様々な大きさのポリマーが生じ、そのうち特許請求されているテトラマーまたは高分子集合体のみが高い潜在的機能を満たす。構造特性によって特徴付けることは、分子の大きさが幅広く異なっているため実行不可能なので、製造方法によってポリマーを特徴付けることが非常に正確である。新規方法は、従来技術で記載されたものとは異なる産物をもたらす。これは、図3で示したように、ダイマーと本発明によるポリマーの性質の明らかな違いによって示すことができる。本発明による高分子ポリマーは驚くべきことに、従来技術で知られている非ポリマー型構造物よりも免疫調節に適している。

【0014】

本発明による分子はまた、ポリアクリルアミドゲル電気泳動と同等の方法、特にHPLC次いでFPLCを併用した精製方法によって精製するならば、5'リン酸化デオキシリボヌクレオチド酸を水中で形成することによって製造することができる。HPLCまたはFPLCなどのいくつかの高性能な方法を併用することによって、PAGE精製と類似の精製度を得ることができることは、当業者に知られている。

【0015】

驚くべきことに、この方法のこれらの単一ステップのこの順序によって、環状に互いに安定に共有結合したモノマーから構成されて少なくとも24ヌクレオチドを有する多量体分子が生じる。同時に形成された高分子ポリマーは常に、同数のモノマー成分を含む。形成された分子鎖は、遊離の5'末端または3'末端を含まない。本発明の分子間エステル化によって上記分子を形成するモノマーの特徴は、

適切な条件下でモノマーの別の部分と2本鎖のステムを形成する少なくとも2個の連続したヌクレオチドの部分を含み、

10

20

30

40

50

これらの逆相補的部分の間が少なくとも4ヌクレオチドであり、
細胞構造によって認識されるCGモチーフは好ましくは1本鎖部分に存在し、
改変されたヌクレオチドはまた、脂肪酸、糖またはアミノ酸に共有結合する1本鎖領域の一部であり得ることである。

【0016】

本発明による分子は、少なくとも4個のモノマーを含み、その立体構造に関しては前述の合成の間に形成される。このモノマーは共有結合を形成することによって、分子間結合を介して2、4、6個以上の連鎖を形成している。これによって、いわゆるダイマー、テトラマーまたはヘキサマーの形成が引き起こされ、ダイマー以外は全てポリマーと称される。

10

【0017】

本発明による分子はまた、コンカテマーと定義することができる。好ましい実施形態において、本発明による分子はコンカテマー分子であり、個々のモノマーの少なくとも4個のループが互いに結合しており、好ましくは直鎖であり、したがって好ましくは2個の、特に好ましくは数個の2本鎖部分が1本鎖ループ要素によって互いから分離されているものである。

【0018】

本発明による分子は、従来技術の分子と比較してヒトまたは動物の免疫系の活性を良好に改変することができる。従来技術による分子は、既知の免疫調節核酸配列であり、低分子のダンベル型構造として効果的である。最も知られている、免疫を調節する短いオリゴデオキシリボヌクレオチド酸には、非メチル化シトシン-グアノシン-モチーフが含まれる。このような核酸の生理学的効果はまた免疫調節、つまり本発明の意味における免疫系の活性の調節として理解される。EP1196178は、例えば、EP1196178の図1および2に開示されているように、少なくとも1個のループを有するステムからなるいくつかの分子をさらに開示している。本発明の意味において、このような分子はダイマー構造である。本発明には、このようなダイマーは含まれない。ポリマーという用語は、科学においてはいくつかの異なる意味で使用されることに注意しなければならない。ポリマーは、例えば、長い核酸、ならびに大きな集合体を形成する同一の、または類似の分子をいくつか含む構造であってもよい。本発明の意味においてポリマーとは、少なくとも4個のモノマーを含む分子の連鎖を意味する。好ましいモノマーを使用すれば、得られるテトラマーの分子量は、約170kDa（図2参照）に対応する。本発明の意味におけるポリマーは、例えば、図1に示したいくつかのステムループ構造で、同じ、または類似のステムループ構造のいくつかによって高分子構造（ポリマー）が組み立てられている。ポリマーは、23kDaより大きいことが示された本発明による分子全てである。記載された反応条件は、モノマーの一時的な付着が連結する間に生じ、この連結はリガーゼによってエステル化され得る。得られたポリマーは、その立体構造に関する合成の間に、特殊な反応条件下でのみ形成される。既に形成されたダイマーからは高分子ポリマーを製造することはできない。ポリマーを形成するモノマー構造は、互いに共有結合している。形成したポリマーは、熱または変性剤に関して安定で、反対にダイマーは、単純な物理的手段で、本発明による高分子から得ることはできない。

20

30

40

【0019】

驚くべきことに、比較的簡単な方法のステップによって、ダイマー構造と比較して改善された非自明な特性を有するこのようなポリマー構造を得ることができる。例えば、高分子集合体の製造は、免疫系の調節に関してダイマーと比較して改善された性質を有する非常に複雑な構造、例えば、テトラマー、ヘキサマーまたはその他を検出し入手するために、遠心分離、ゲル電気泳動またはカラムクロマトグラフィーによって実施することができる（図3および4参照）。研究動物またはヒトにおける様々な形態の免疫調節によってこのことは解明された。

【0020】

以下の特徴によるデオキシリボ核酸は全て、重合化方法で使用するすることができる。

50

5' - P - W - S - 3'、式中、

P、W、Sは、ホスホジエステル結合「-」を介して、列記した読み取りの順番で互いに結合した核酸であり、

核酸P、WまたはSの配列は、デオキシリボヌクレオチド配列CGの少なくとも1個のモチーフを含み、

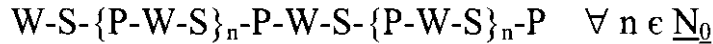
Wは少なくとも4ヌクレオチドの長さであり、

核酸部分SおよびPの配列は、互いに逆相補的である。

【0021】

得られたポリマーは、下式に従う。すなわち、

【化1】



式中、

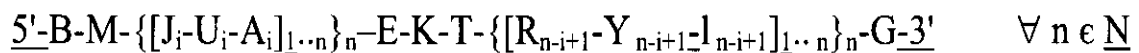
式の右側の核酸Pは左の核酸Wに共有結合しており、

「n」は内部のモノマー単位の数を示すことによってコンカテマー化の程度を表す。

【0022】

特許請求されているポリマーは、立体構造によって性質が形成されるので、本出願の意味におけるポリマー構造は、配列同一性のないモノマーから組み立てることができる。核酸群Wは、この連結分子中にB、U、K、Yの配列を含むことができ、核酸群PはJ、E、R、Gの配列を有する分子を含むことができ、核酸群SはM、A、T、Iの配列を含むことができる。得られたポリマーの中心部分のモノマーの数nに応じて、いくつかの異なる配列部分J-U-AおよびR-Y-Iそれぞれが存在し、互いに関して配列同一性である必要はなく、このことは指標「i」および「n-i+1」それぞれによって示される。同一の、または異なるモノマー成分の配列を有する特許請求されているポリマーは、下式に従う。すなわち、

【化2】



式中、

前記モノマー単位は、 $G-B-M$ 、 $J_i-U_i-A_i$ 、 $E-K-T$ 及び $R_{n-i+1}-Y_{n-i+1}-I_{n-i+1}$ で表わされ、

A_i 、 B 、 E 、 G 、 I_{n-i+1} 、 J_i 、 K 、 M 、 R_{n-i+1} 、 T 、 U_i 、 Y_{n-i+1} は、デオキシリボヌクレオチド配列であり、

下付き文字iは、 $\{[J_i-U_i-A_i]_{1..n}\}_n$ で表わされる繰り返し配列におけるモノマー単位 $J_i-U_i-A_i$ の上記式の5'末端からの順番を意味し、下付き文字n-i+1は、 $\{[R_{n-i+1}-Y_{n-i+1}-I_{n-i+1}]_{1..n}\}_n$ で表わされる繰り返し配列におけるモノマー単位 $R_{n-i+1}-Y_{n-i+1}-I_{n-i+1}$ の上記式の3'末端からの順番を意味し、

「-」は、デオキシリボヌクレオチド配列が互いに共有結合するホスホジエステル結合を表し、

nが2以上の場合、複数の $J_i-U_i-A_i$ は異なってもいなくてもよく、かつ、複数の $R_{n-i+1}-Y_{n-i+1}-I_{n-i+1}$ は異なってもいなくてもよく、

A_i 、 B 、 E 、 G 、 I_{n-i+1} 、 J_i 、 K 、 M 、 R_{n-i+1} 、 T 、 U_i 、 Y_{n-i+1} のうち少なくとも1つは、デオキシリボヌクレオチド配列cgを有するモチーフを含み、

B 、 U_i 、 K および Y_{n-i+1} は、1本鎖であり、

B 、 U_i 、 K および Y_{n-i+1} は、それぞれ、少なくとも4個のデオキシリボヌクレオチドで組み立てられており、

10

20

30

40

50

J_i と l_{n-i+1} 、 A_i と R_{n-i+1} 、 M と G および E と T の配列は、互いに逆相補的であり、 G は、ホスホジエステル結合によって B に共有結合されている。

【0023】

好ましくは、本発明によるポリマーは、この方法で使用されるデオキシリボ核酸が以下の配列：

5'-gggttaccaccttcattggaaaacgttcttcggggcggttcttaggtggtaaccc-3' (SEQ ID No. 1)

を含むことを特徴とし、このデオキシリボ核酸は、20 から 400 ヌクレオチドの長さを有する。

【0024】

好ましい配列を有する反応物質を合成することによって、免疫応答の調節に驚くほど適した分子が生じる。1 本鎖分子部分内の塩基配列が部分的または完全に以下の配列、

5'-tcattggaaacgttcttcggggcggttctt-3' (SEQ ID No. 2)

に従うならば、特に好ましい。

【0025】

これらの配列の存在が、コンカテマーポリマーの非常に良好な活性を引き起こすことは驚くべきことである。分子のコンカテマー構造内のデオキシリボヌクレオチドの部分的に 1 本鎖である共有結合により閉環した鎖は、導入された標的生物内における分子の長期効果に参与する。

【0026】

本発明のさらに好ましい実施形態では、モノマーは、塩基配列 $n^1n^2cgn^3n^4$ を含み、式中、 n^1n^2 は、gt、gg、ga、at または aa の群の要素であり、 n^3n^4 は ct または tt の群の要素であり、ならびに c はデオキシシトシン、g はデオキシグアノシン、a はデオキシアデノシンおよび t はデオキシチミジンであるものとする。

【0027】

特に好ましい実施形態では、塩基配列 $n^1n^2cgn^3n^4$ はデオキシリボヌクレオチドの閉環した鎖の 1 本鎖部分内に位置するものとする。特に、これらの好ましい分子は、免疫系の調節中、非常に強い効果を示す。

【0028】

当然、本発明による分子は、共有結合を介して結合した 1 個または複数の置換基を有し得る。このような置換基は、例えば、ペプチド、タンパク質、糖類、脂質、抗原構造、DNA および/または RNA であってもよい。

【0029】

本発明は、産物の前述した構造的および機能的な特徴の他に、以下のステップ、
ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製して、水中に 5' リン酸化 DNA 分子を提供するステップ、

乾燥残渣が得られるまで 50℃ で凍結乾燥し、その後緩衝液中に再懸濁するステップ、

T4 DNA-リガーゼを添加し、反応混合物を形成するステップ、および

37℃ で少なくとも 30 分間反応混合物をインキュベートするステップ、あるいは、

沈殿後、デオキシリボヌクレオチド酸モノマーを提供し、その後沈殿物を 50℃ で乾燥するか、または DNA 分子を塩化マグネシウムの存在下で 50℃ で凍結乾燥するステップ

T4 DNA-リガーゼを添加するステップ、および

37℃ で少なくとも 10 分間、好ましくは少なくとも 30 分間インキュベートするステップを含む、分子の製造方法にも関する。

【0030】

上記沈殿または凍結乾燥を塩化マグネシウムの存在下で行うことによって、特に、デオキシリボヌクレオチド酸がポリアクリルアミド電気泳動、または HPLC および FPLC の組み合わせで精製された場合、ポリマーの製造に関して同じ結果を得ることができる。

【0031】

この方法を適用することによって、従来技術 (WO 2007/131495 または WO

10

20

30

40

50

01/07055)で記載されたダイマーとは異なる分子構造が生じることは非常に驚くべきことである。この方法では、いくつかのステップにおける違いのみが示されているが、より驚くべきことは、比較的わずかな改変で異なる分子の製造がもたらされたことである。従来技術(WO01/07055またはWO2007/131495)で知られている方法で得られた構造は、著しい異なる性質を示す。これらの分子は、免疫調節効果に関して明らかに差異を示し、例えば、副作用などのその他の特性においても差異を示す。方法のステップの相違の他に、好ましい配列を有する反応物質を使用することによって、特異的で、優れた性質を備えた非常に特異的な反応産物の形成がもたらされる。前述の方法ステップと一緒に本発明による配列を使用すると、従来技術で得られたポリマーよりも好ましい特性を示す有利なポリマーが生じる。

10

【0032】

本発明によるポリマーは、好ましくは2+2モノマーを含み(図1参照)、好ましくは部分的に1本鎖の、デオキシリボヌクレオチド成分の共有結合により閉環した鎖であり、このモノマーはステムおよびループを有し、ステムは少なくとも2個のデオキシリボヌクレオチドを有し、ループは少なくとも4個のデオキシリボヌクレオチドを有し、ループは1から6個のCGモチーフを有し、変数nは自然数全体の集合の1要素である。

【0033】

本発明はさらに、本発明による少なくとも1個の分子および化学療法薬を含む組成物に関する。本発明の分子による免疫応答の予期せぬ強力な改善はさらに、既知の化学療法薬と本発明による療法を併用し、好ましくは、例えば腫瘍の治療のための組成物を使用することによって、明らかに改善され得ることは驚くべきことであつた。当業者には、WO01/07055によるダイマーが免疫調節効果を有することは知られており、化学療法薬が腫瘍に対して効果を有することはさらに知られているが、モノマーから構成される免疫調節ダイマーが化学療法薬と組み合わせて相加効果以上の効果を引き起こすことは驚くべきことである。さらにより驚くべきことに、モノマーからなるポリマー、つまりコンカテマーは化学療法薬と組み合わせることによってダイマーより正の効果を示す。本発明による組成物と一緒にした要素は、病原、特に腫瘍を治療する同じ目的に対して効果を有する。各要素は、本発明による組成物内で個々の結果を示すだけでなく、単一の要素間の相互作用によって驚くべき効果をもたらす、その効果はダイマーよりもポリマーにおいて顕著である。本発明による組成物はキットとして供給され、キット内で、本発明による分子および従来技術による化学療法薬は別々に供給される。したがって、好ましい実施形態では、キットの少なくとも2個の成分は、同時に、または時間をおいて適用することができる。本発明による組成物の適用によって、例えば、免疫系を活性化することができ、したがって、その後化学療法薬を適用すると非常に良好な効果を得ることができる。化学療法薬を最初に適用し、その後、時間をおいて本発明による分子をヒトまたは動物の生体内に適用することが可能であることは当然である。特定の腫瘍には、本発明による分子と化学療法薬の同時適用が好ましい。

20

30

【0034】

本発明の好ましい実施形態では、化学療法薬は、抗体、アルキル化剤、白金類似体、インターカレート剤、抗生物質、有糸分裂抑制剤、タキサン、トポイソメラーゼ抑制剤、代謝拮抗剤および/またはL-アスパラギナーゼ、ヒドロキシカルバミド、ミトタンおよび/またはアミニチンを含む群から選択される。

40

【0035】

本発明の好ましい実施形態では、アルキル化剤は、
ナイトロジェンマスタード誘導体、特に
シクロホスファミド、
イホスファミド、
トロホスファミド、
メルファランおよび/もしくは
クロラムブシル、

50

- アルキルスルホン酸、特に
ブスルファン、および／もしくは
トレオスルファン、
ニトロソウレア、特に
カルムスチン、
ロムスチン、
ニムスチン、
エストラムスチン、および／もしくは
ストレプトゾトシン、
プロカルバジンおよびダカルバジン、
テモゾロミドならびに／または
チオテパ
を含む群から選択される。 10
- 【0036】
アルキル化剤は、腫瘍に対して非常に良好な効果を有し、その増殖を阻害する。
- 【0037】
本発明の好ましい実施形態では、プラチナ類似体は、
シスプラチン、
カルボプラチン、および／または
オキサリプラチンを含む群から選択される。 20
- 【0038】
本発明のさらに好ましい実施形態では、インターカレート剤は、
アントラサイクリン、特に
ドキソルビシン（アドリアマイシン）、
ダウノルビシン、
エピルビシンおよび／もしくは
イダルビシン、
ミトキサントロン、
アムサクリンならびに／または
ドキシフルリジン 30
を含む群から選択されるものとする。
- 【0039】
本発明のさらに好ましい実施形態では、抗生物質は、
ブレオマイシン、
アクチノマイシンD（ダクチノマイシン）および／または
マイトマイシン
を含む群から選択されるものとする。
- 【0040】
本発明の有利な別の好ましい実施形態では、有糸分裂抑制剤は、
ニチニチソウアルカロイド、特に
ビノレルビン、
ビンクリスチン（オンコビン）、
ビンブラスチンおよび／または
ビンデシン 40
を含む群から選択されるものとすることができる。
- 【0041】
本発明のさらに特に好ましい実施形態では、タキサンは、
パクリタキセルおよび／または
ドセタキセル
を含む群から選択される。 50

【0042】

さらに、トポイソメラーゼ抑制剤は、
トポイソメラーゼ I 阻害剤、特に
カンプトテシン、
トポテカンおよび／もしくは
イリノテカンならびに／または
トポイソメラーゼ II 阻害剤、特に
エトポシド、
テニポシド

を含む群から選択されることが好ましい可能性がある。

10

【0043】

さらに、本発明の特別な実施形態では、代謝拮抗剤は、
葉酸拮抗剤、特に
メトトレキセート、
ピリミジン類似体、特に
5-フルオロウラシル (5-flouridacil)、
カペシタビン、
シトシンアラビノシド (シタラビン) および／または
ゲムシタビン、
プリン類似体、特に、
6-チオグアニン (6-thioguanine)、
ペントスタチン、
アザチオプリン、
6-メルカプトプリン、
フルダラビンおよび／または
クラドリビン

を含む群から選択されることが好ましい。

20

【0044】

本発明はさらに、適切であれば、キットの内容物の組み合わせについての情報と一緒に、本発明による分子および化学療法薬を含むキットに関する。本発明はまた、既に記載したように、適切であれば、薬学的に適合性の担体と一緒に、本発明による分子または組成物を含む製剤に関する。

30

【0045】

本発明はさらに、ヒトもしくは動物の免疫系の調節のため、または前記免疫系の活性の調節のための治療薬を製造するための分子、組成物または製剤の使用に関する。ヒトまたは動物の免疫系の調節は、免疫系に対するそれぞれの影響と理解され、免疫系は腫瘍または癌を阻害する効果を有する。免疫系の活性の調節は、これと同義に理解することができるか、または当業者にとって腫瘍を対象とする免疫系の公知の活性として記述することができる。本発明による治療薬によってその効果が驚くほど増加する。調節とは特に、免疫系の効果、つまり免疫系自体の刺激または増加であり、腫瘍抑制効果または腫瘍緩解予防効果を意味する。したがって、本発明による治療薬は、好ましい実施形態では、T細胞媒介性免疫応答を刺激するためだけでなく、T細胞非依存性免疫応答も変化させるためにも使用することができる。このプロセスは、本発明の好ましい実施形態において、B細胞の増殖またはB細胞活性化を含むことができる。

40

【0046】

特に好ましい実施形態では、免疫系の活性の調節によって改善が引き起こされ、様々な関連細胞集団のサイトカインの分泌が変化または逆戻りする効果が生じる。本発明による分子および本発明による組成物は治療用ワクチンまたは予防用ワクチンにおいてアジュバントとして使用されることが特に好ましい可能性がある。本発明による治療薬は、細胞増殖性障害の治療に非常に有効に使用することができ、好ましい実施形態では、この細胞増

50

殖性障害は腫瘍疾患である。好ましくは、腫瘍疾患は、内鼻、副鼻腔、鼻咽喉、唇、口腔、中咽頭、喉頭、下喉頭、耳、唾液腺の腫瘍およびパラガングリオーマを含む耳鼻咽喉領域の腫瘍、非小細胞性気管支癌腫、小細胞性気管支癌腫を含む肺の腫瘍、縦隔腫瘍、食道、胃、膵臓、肝臓、胆嚢および胆道、小腸、結腸および直腸の腫瘍ならびに肛門癌を含む胃腸管腫瘍、腎臓、尿管、膀胱、前立腺、尿道、陰茎および睾丸の腫瘍を含む泌尿器性殖器腫瘍、子宮頸部、膣、外陰の腫瘍、子宮癌、悪性絨毛性疾患、卵巣癌腫、卵管（T u b a F a l o p p i i）の腫瘍を含む婦人科腫瘍、腹腔の腫瘍、乳癌、甲状腺、副甲状腺、副腎皮質の腫瘍、膵内分泌部腫瘍、カルチノイド腫瘍およびカルチノイド症候群、多発性内分泌腫瘍を含む内分泌器官の腫瘍、骨および軟部組織の肉腫、甲皮腫、皮膚腫瘍、皮膚および眼球内黒色腫を含む黒色腫、中枢神経系の腫瘍、網膜芽腫、ウイルス腫瘍、神経線維腫症、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫腫瘍ファミリー、横紋筋肉腫を含む幼児期の腫瘍、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、中枢神経系の原発性リンパ腫、ホジキン病を含むリンパ腫、急性白血病、慢性骨髄性およびリンパ性白血病を含む白血病、形質細胞腫、脊髄異形成症候群、腫瘍随伴症候群、原発不明腫瘍による腫瘍転移（C U P 症候群）、脳転移、肺転移、肝転移、骨転移、胸膜および心膜転移および悪性腹水、腹膜癌を含む転移腫瘍、カポジ肉腫などのA I D S 関連悪性腫瘍、A I D S 関連リンパ腫、中枢神経系のA I D S 関連リンパ腫、A I D S 関連ホジキン病およびA I D S 関連肛門性器部腫瘍、移植関連悪性腫瘍を含む免疫抑制に関連する悪性腫瘍を含む群から選択される疾患である。

10

【発明を実施するための形態】

20

【0047】

以下では、実施例によって本発明を例示するが、これらの実施例に限定はされない。

【0048】

免疫調節核酸分子を製造するための実施例

a) 特許請求されていない二量体モノマーの製造：

配列

cctaggggtt accaccttcattggaaaacgttcttcggggcggttcttaggtggttaacc (SEQ ID No. 3)

を有する5'-リン酸化オリゴデオキシリボヌクレオチド（ODN）を90℃で5分間加熱し、その後、ヘアピン構造の発達を可能にするために氷上で冷却した。自己相補的オーバーハングは、最終濃度1mg/ml DNAで、T4 DNAリガーゼ（0.1U/μg ODN）の存在下において37℃で24時間で連結した。

30

精製した連結産物の3%アガロースゲルによる分離、図2の列2参照。

b) 特許請求されているポリマーの例であるテトラマーの製造：

重合化の程度は、使用した核酸の濃度によってのみある程度まで影響を受け得る。図2に示したように、二量体コンカテマーの具体的な製造では、製造方法は以下のように改変した。

5'-ccctaggggttaccaccttcattggaaaacgttcttcggggcggttctttccccaatggtgga-3' (SEQ ID No. 4)および

5'-cccttccaccattggggatcattgg aaaacgttcttcggggcggttcttaggtggttaaccct-3' (SEQ ID No. 5)

40

を等モル濃度（50 μM）で95℃で5分間変性し、その後25℃まで50分かけてゆっくり冷却した。

これに配列

5'-aggggttaccaccttcattggaaaacgttcttcggggcggttcttaggtggttaac-3' (SEQ ID No. 6)

を有する5'-リン酸化核酸を1モル過剰に添加した。

他の全ステップは、前述した方法にしたがって実施した。

精製した連結産物の3%アガロースゲルによる分離、図2、列2参照。

c) 高分子ポリマーの製造：

1mg/mlの濃度の配列

5'-ptaggggttaccacctacaaaaaa aacgaaattcggggcgaaggagggtggttaaccc-3' (SEQ ID No. 7

50

)
を有する核酸を酢酸ナトリウム 0.3 M (pH 5.25)、MgCl₂ 10 mM および 3 倍量の無水エタノールで沈殿させた。遠心 (4℃、13000 rpm) 後、ODN を 50℃ で 10 分間乾燥させた。ペレットを直接連結に使用し (0.5 U/μg ODN)、37℃ で 60 分間インキュベートした。連結産物を 3% アガロースゲルで分離した、図 2、列 4 参照。

【0049】

図 2 の説明

分子量を測定するために、製造した分子を 3% アガロースゲルで分離した。左の列 1 は 2 本鎖 DNA の分子量を示し、異なる移動距離に対応して、各バンドの質量を示している。列 2 から 4 は、異なる重合化反応の産物を添加した。ダイマー (列 2) およびテトラマー (列 3) およびポリマーの全形態を含むラダー (列 4) に対応して、1 本のバンドを認めることができる。

10

【0050】

本発明による分子の機能の立証

【0051】

本発明による分子の免疫調節性を解明するために、様々な細胞培養実験を実施した。TLR9 を刺激する能力は、緑色蛍光タンパク質 EGFP の発現が NF-κB プロモータによって調節された TLR9 によって正に制御されている細胞系 RAW264 のマウスマクロファージを使用することによって調べた。細胞を 125000 細胞/cm² で接種し、16 時間後、本発明によるダイマー (方法 a によって製造) およびポリマー (方法 c によって製造) 分子を添加した。7 時間インキュベーション (37℃、5% CO₂) した後、細胞を収集し、EGFP 発現による測定は、蛍光表示式細胞分取器 (FACS) を使用して実施した。結果を使用して図 3 に示したような濃度-効果曲線を作成し、直接比較を可能にするため、両群の分子の分子量としてダイマーの重量をベースに使用した。

20

【0052】

本発明によるポリマー分子の効力 (上の黒い印の曲線) は、低分子量の分子 (下の白い印の波線の曲線) と比較して 10 倍高い。本発明による高分子ポリマーは、適切な量のダイマーまたはモノマー分子と同量で明らかに良好な効果を有する。高い TLR9 刺激能力は、多量体分子による局所的な高濃度が実現するためと考えることができるが、特にインビボにおいては、高用量は、例えば、適用可能な量のため、実現することはできない。同時に、高分子コンカテマーの効力が高いことは全く驚くべきことで、現在の科学の知識では説明することができない。

30

【0053】

サイトカイン産生のための PBMC の刺激

【0054】

刺激アッセイを実施するために、末梢血単核球 (PBMC) をヒト全血またはいわゆる「 Buffy Coat」から単離した。単離した細胞 (PBMC) をマルチウェルプレートに接種した。最初の混合物は、陰性対象として刺激していない細胞を含有し、第 2 の混合物は、従来技術との比較としてダイマーで刺激され、第 3 はテトラマーポリマーで刺激され、ダイマーおよびポリマーは同じ質量を同容量で使用した。ELISA で、2 日後の細胞培養上清からのサイトカイン、インターフェロン-γ、インターフェロン-α およびインターロイキン-6 の分泌を測定した、図 4 参照。

40

【0055】

図 4 によれば、本発明によるポリマー分子で PBMC を刺激すると、ダイマー分子による刺激と比較して 2 倍のインターフェロン分泌が引き起こされる。図はさらに、ポリマー分子の刺激による IL-6 分泌は、ダイマーによる刺激と比較して著しく高いことを示している。

【0056】

以下の配列のモノマー

50

a) 5'-ctaggggttaccaccttctatagaaaacgttcttcggggcggtt cttcatcggttaaccc-3' (SEQ ID No. 8)

または

b) 5'-agctgggttaccaccttcattggaaaacgttcttcggggcggtt cttaggtggtaaccc-3' (SEQ ID No. 9)

または

c) 各5'末端がリン酸化した核酸、もしくは図1で示したような立体構造をとることができ、記載した立体構造の基準を満たし、互いに少なくとも4個の適切なヌクレオチドの1本鎖オーバーハング（突出末端）を介してハイブリダイズする配列を有する核酸の混合物

10

を使用することによって、本発明による分子を製造することができる。

反応物質として使用したデオキシリボ核酸配列は連結前に加熱せず、ポリアクリルアミド電気泳動と同程度の精製度を有する。反応物質はHPLCの後FPLCによって精製することができる。HPLCおよびFPLCの組み合わせは、ポリアクリルアミド電気泳動と同等の精製度を生じる。その後、DNA反応物質は乾燥残渣が得られるまで50℃で凍結乾燥する。緩衝液に溶かした懸濁物を作製し、T4-DNAリガーゼを添加し、その後37℃で40分間インキュベートする。驚くべきことに、得られたコンカテマーは、マウスにおいて改善された免疫調節を引き起こす。驚くべきことに、本発明によるコンカテマーの単一の成分と化学療法薬の組み合わせは、改善された効果をもたらす。改善された効果は、単一成分の効果よりも驚くほど高く、相加効果を上回る。化学療法薬として、抗体、アルキル化剤、白金類似体、インターカレート剤、抗生物質、有糸分裂抑制剤、タキサン、トポイソメラーゼ抑制剤、代謝拮抗剤および／またはL-アスパラギナーゼ、ヒドロキシカルバミド、ミトタンおよび／またはアミニチンを使用してもよい。

20

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】特許請求されているポリマー分子の分子的性質（立体構造）を示す図である。

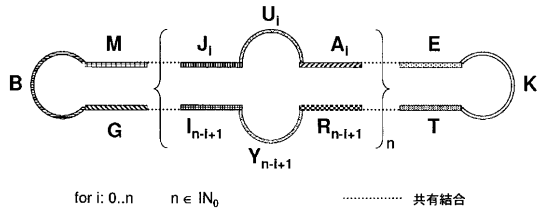
【図2】特許請求されているポリマー分子の分子的性質（分子量）を示す図である。

【図3】特許請求されているポリマー分子の機能的性質（TLR9活性化）を示す図である。

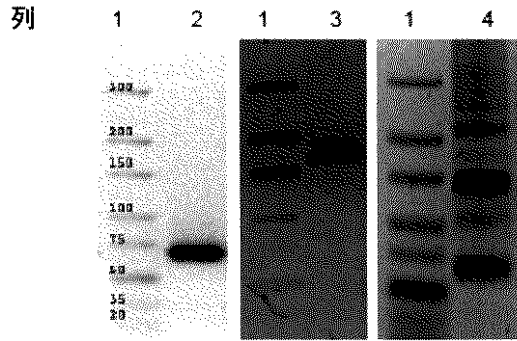
【図4】特許請求されているポリマー分子の機能的性質（サイトカイン分泌性）を示す図である。

30

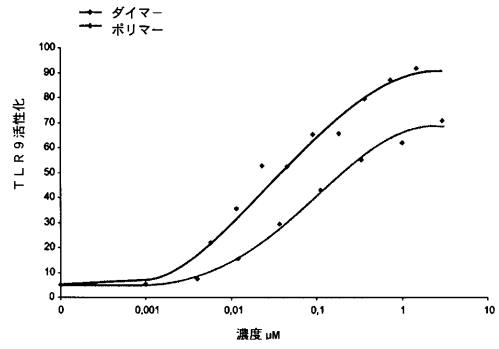
【図 1】



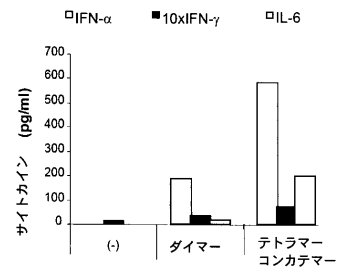
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0005873794000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04

(72)発明者 シュミット, マヌエル
ドイツ国、1 4 1 9 5 ベルリン、ティーラッレー 2 3

(72)発明者 クロイス, クリスティアネ
ドイツ国、1 2 2 0 3 ベルリン、ヒンデンプルクダム 4 7

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 7 / 1 3 1 4 9 5 (WO, A 2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S / W P I X (STN)