

(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2005-510462  
(P2005-510462A)

(43) 公表日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**A61K 39/39**  
**A61K 39/12**  
**A61K 39/35**  
**A61P 31/12**  
**A61P 37/08**

F 1

A 61 K 39/39  
A 61 K 39/12  
A 61 K 39/35  
A 61 P 31/12  
A 61 P 37/08

テーマコード(参考)

4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2003-520774 (P2003-520774)	(71) 出願人	501161136 ダイナバックス テクノロジーズ コーポ レイション アメリカ合衆国, カリフォルニア 947 10, パークレイ, ポッター ストリート 717, スイート 100
(86) (22) 出願日	平成13年8月13日 (2001.8.13)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月10日 (2004.2.10)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(86) 國際出願番号	PCT/US2001/025364	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 國際公開番号	W02003/015816	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(87) 國際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)		
(31) 優先権主張番号	09/927, 422		
(32) 優先日	平成13年8月10日 (2001.8.10)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	09/927, 884		
(32) 優先日	平成13年8月10日 (2001.8.10)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫調節オリゴヌクレオチドの生成及びその使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、個体を免疫調節するための新たな組成物及びそのための方法を提供する。免疫調節は、免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリアー(IMP/MC)複合体を投与することにより行はれる。IMP/MC複合体が共有結合又は非共有結合でよく、マイクロキャリアー又はナノキャリアーに結合された少なくとも1の5'-CG-3'配列を含む、7量体オリゴヌクレオチドを特徴とする。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

[マイクロキャリア(MC)に結合したオリゴヌクレオチドで、そこでオリゴヌクレオチドの配列が、5' -TCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そのX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである]、を含む免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体。

**【請求項 2】**

オリゴヌクレオチドが、5' -TCGAAAA-3' , 5' -TCGCCCC-3' , 5' -TCGGGGG-3' , 5' -TCGTTTT-3' から成る群から選択される配列から成る請求項1記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 3】**

オリゴヌクレオチドが、配列5' -TCGTCGX<sub>1</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>が、ヌクレオチドである請求項1記載のIMP/MC複合体。 10

**【請求項 4】**

オリゴヌクレオチドが、配列5' -TCGTCGA-3' から成る、請求項3記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 5】**

[マイクロキャリア(MC)に結合したオリゴヌクレオチドで、そこでオリゴヌクレオチドの配列が、5' -X<sub>1</sub>TCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである]、を含む免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体。

**【請求項 6】**

[マイクロキャリア(MC)に結合したオリゴヌクレオチドで、そこでオリゴヌクレオチドの配列が、5' -X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである]、を含む免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体。 20

**【請求項 7】**

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアに共有結合される請求項1乃至6のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 8】**

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアに非共有結合される請求項1乃至6のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 9】**

前記マイクロキャリアが、液相マイクロキャリアである請求項1乃至6のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。 30

**【請求項 10】**

前記マイクロキャリアが、固相マイクロキャリアである請求項1乃至6のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 11】**

前記マイクロキャリアは、サイズが10 μmより小さい請求項1乃至6のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 12】**

前記マイクロキャリアは、サイズが25nm乃至5 μmである請求項11記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 13】**

前記マイクロキャリアは、サイズが1.0 μm乃至2.0 μmである請求項12記載のIMP/MC複合体。 40

**【請求項 14】**

前記マイクロキャリアは、サイズが1.4 μmである請求項13記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 15】**

前記マイクロキャリアは、陽イオンである請求項1乃至6のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 16】**

前記複合体が抗原のない請求項1乃至6のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 17】**

さらに前記複合体が抗原を含む請求項1乃至6のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。 50

**【請求項 18】**

前記抗原がアレルゲンである請求項17記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 19】**

前記オリゴヌクレオチドが、リン酸骨格の修飾を含む請求項1乃至6のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 20】**

前記リン酸骨格の修飾が、ホスホロチオエイトである請求項19記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 21】**

前記マイクロキャリアが、生物変性可能である請求項1乃至20のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。 10

**【請求項 22】**

前記マイクロキャリアが、非生物変性可能である請求項1乃至20のいずれか1項記載のIMP/MC複合体。

**【請求項 23】**

[前記個体に免疫応答を調節するための十分な量にて免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組生物を個体に投与し、前記複合体がマイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが、配列5' -TCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そのX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである]、を含む個体における免疫応答を調節する方法。 20

**【請求項 24】**

オリゴヌクレオチドが、5' -TCGAAAA-3' , 5' -TCGCCCC-3' , 5' -TCGGGGG-3' , 5' -TCGTTTT-3' から成る群から選択される配列から成る請求項23記載の方法。

**【請求項 25】**

オリゴヌクレオチドが、配列5' -TCGTCGX<sub>1</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>が、ヌクレオチドである請求項23記載の方法。

**【請求項 26】**

オリゴヌクレオチドが、配列5' -TCGTCGA-3' から成る請求項25記載の方法。

**【請求項 27】**

[前記個体に免疫応答を調節するための十分な量にて免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組生物を個体に投与し、前記複合体がマイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -X<sub>1</sub>TCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである]、を含む個体における免疫応答を調節する方法。 30

**【請求項 28】**

[前記個体に免疫応答を調節するための十分な量にて免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組生物を個体に投与し、前記複合体がマイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが、配列5' -X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである]、を含む個体における免疫応答を調節する方法。 40

**【請求項 29】**

前記マイクロキャリアが、固相マイクロキャリアである請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 30】**

前記マイクロキャリアが、液相マイクロキャリアである請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 31】**

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアに共有結合される請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 32】**

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアに非共有結合される請求項23乃至28 50

のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 3】

前記複合体が、抗原のない請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 4】

前記複合体が、さらに抗原を含む請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 5】

前記抗原がアレルゲンである請求項35記載の方法。

【請求項 3 6】

前記オリゴヌクレオチドが、リン酸骨格の修飾を含む請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 7】

前記リン酸骨格の修飾が、ホスホロチオエイトである請求項36記載の方法。

【請求項 3 8】

Th1型免疫応答が刺激される請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 9】

Th2型免疫応答が抑制される請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

【請求項 4 0】

前記マイクロキャリアが、生物的に変性可能である請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

【請求項 4 1】

前記マイクロキャリアが、生物的に非変性である請求項23乃至28のいずれか1項記載の方法。

【請求項 4 2】

[前記個体に免疫調節免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組成物の有効量を投与すること、前記複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -TCG X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、そして有効量が、前記個体においてIFN- $\gamma$ を増大させるための十分な量である]、

を含む前記個体にインターフェロン・ガンマー(IFN- $\gamma$ )を増大させる方法。

【請求項 4 3】

オリゴヌクレオチドが、5' -TCGAAAAA-3' , 5' -TCGCCCC-3' , 5' -TCGGGGG-3' , 5' -TCGTTTT-3' から成る群から選択される配列から成る請求項42記載の方法。

【請求項 4 4】

オリゴヌクレオチドが配列5' -TCGTCGX<sub>1</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>がヌクレオチドである、請求項42記載の方法。

【請求項 4 5】

オリゴヌクレオチドが配列5' -TCGTCGA-3' から成る請求項42記載の方法。

【請求項 4 6】

[前記個体に免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組成物の有効量を投与すること、前記複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -X<sub>1</sub>TCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、そして有効量が、前記個体においてIFN- $\gamma$ を増大させるための十分な量である]、

を含む前記個体にインターフェロン・ガンマー(IFN- $\gamma$ )を増大させる方法。

【請求項 4 7】

[前記個体に免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組成物の有効量を投与すること、前記複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、そして有効量が、前記個体においてIFN- $\gamma$ を増大させるための十分な量である]、

10

20

30

40

50

を含む前記個体にインターフェロン・ガンマー(IFN- )を増大させる方法。

【請求項 4 8】

前記マイクロキャリアが、固相マイクロキャリアである請求項42乃至47のいずれか1項記載の方法。

【請求項 4 9】

前記マイクロキャリアが、液相マイクロキャリアである請求項42乃至47のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 0】

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアに共有的に結合される請求項42乃至47のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 1】

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアに非共有的に結合される請求項42乃至47のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 2】

前記複合体が抗原のない請求項42乃至47のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 3】

前記複合体が、さらに抗原を含む請求項42乃至47のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 4】

前記抗原がアレルゲンである請求項53記載の方法。

【請求項 5 5】

前記オリゴヌクレオチドが、リン酸骨格の修飾を含む請求項42乃至47のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 6】

前記リン酸骨格の修飾が、ホスホロチオエイトである請求項56記載の方法。

【請求項 5 7】

前記マイクロキャリアが、生物的に変性可能である請求項42乃至56のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 8】

前記マイクロキャリアが、生物的に非変性である請求項42乃至56のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5 9】

[前記個体に免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組成物の有効量を投与すること、前記複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -TCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、そして有効量が、前記個体においてIFN- を増大させるための十分な量である]、

を含む前記個体にインターフェロン・アルファ(IFN- )を増大させる方法。

【請求項 6 0】

オリゴヌクレオチドが、5' -TCGAAAA-3' , 5' -TCGCCCC-3' , 5' -TCGGGGG-3' , 5' -TCGT  
TTT-3' から成る群から選択される配列から成る請求項59記載の方法。

【請求項 6 1】

オリゴヌクレオチドが配列5' -TCGTCGX<sub>1</sub> -3' から成り、そこでX<sub>1</sub>がヌクレオチドである、請求項59記載の方法。

【請求項 6 2】

オリゴヌクレオチドが配列5' -TCGTCGA-3' から成る請求項61記載の方法。

【請求項 6 3】

[前記個体に免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組成物の有効量を投与すること、前記複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -X<sub>1</sub>TCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、そして有効量が、前記個体においてIFN- を増大

10

20

30

40

50

させるための十分な量である]、

を含む前記個体にインターフェロン・アルファ(IFN- )を増大させる方法。

【請求項 6 4】

[前記個体に免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組成物の有効量を投与すること、前記複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、そして有効量が、前記個体においてIFN- を増大させるための十分な量である]、

を含む前記個体にインターフェロン・アルファ(IFN- )を増大させる方法。

【請求項 6 5】

前記個体がウイルス感染を有する請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6 6】

前記マイクロキャリアが、固相マイクロキャリアである請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6 7】

前記マイクロキャリアが、液相マイクロキャリアである請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6 8】

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアと共有結合される請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6 9】

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアと非共有結合される請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7 0】

前記複合体は、抗原がない請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7 1】

前記複合体は、さらに抗原を含む請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7 2】

前記抗原が、ウイルス抗原である請求項71記載の方法。

【請求項 7 3】

前記オリゴヌクレオチドが、リン酸骨格の修飾を含む請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7 4】

前記リン酸骨格修飾が、ホスホロチオエイトである請求項73記載の方法。

【請求項 7 5】

前記マイクロキャリアが、生物的に変性可能である請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7 6】

前記マイクロキャリアが、生物的に非変性である請求項59乃至64のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7 7】

[前記個体に免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組成物の有効量を投与すること、前記複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -TCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、そして有効量が、前記個体においてIgEのレベルを減少させるに十分な量である]、

を含む前記個体にIgEのレベルを減少させる方法。

【請求項 7 8】

オリゴヌクレオチドが、5' -TCGAAAA-3' , 5' -TCGCCCC-3' , 5' -TCGGGGG-3' , 5' -TCGT  
TTT-3' から成る群から選択される配列から成る請求項77記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 7 9】**

オリゴヌクレオチドが、配列5' -TCGTCGX<sub>1</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>がヌクレオチドである、請求項77記載の方法。

**【請求項 8 0】**

オリゴヌクレオチドが、配列5' -TCGTCGA-3' から成る請求項79記載の方法。

**【請求項 8 1】**

[前記個体に免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組成物の有効量を投与すること、前記複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -X<sub>1</sub>TCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、そして有効量が、前記個体においてIgEのレベルを減少させるために十分な量である]、

を含む前記個体にIgEのレベルを減少させる方法。

**【請求項 8 2】**

[前記個体に免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体を含む組成物の有効量を投与すること、前記複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、そして有効量が、前記個体においてIgEのレベルを減少させるために十分な量である]、

を含む前記個体にIgEのレベルを減少させる方法。

**【請求項 8 3】**

前記マイクロキャリアが、固相マイクロキャリアである請求項77乃至82のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 8 4】**

前記マイクロキャリアが、液相マイクロキャリアである請求項77乃至82のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 8 5】**

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアと共有結合される請求項77至82のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 8 6】**

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアと非共有結合される請求項77乃至82のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 8 7】**

前記複合体は、抗原がない請求項77乃至82のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 8 8】**

前記複合体は、さらに抗原を含む請求項77乃至82のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 8 9】**

前記抗原が、アレルゲンである請求項88記載の方法。

**【請求項 9 0】**

前記オリゴヌクレオチドが、リン酸骨格の修飾を含む請求項77乃至82のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 9 1】**

前記リン酸骨格修飾が、ホスホロチオエイトである請求項90記載の方法。

**【請求項 9 2】**

前記マイクロキャリアが、生物的に変性可能である請求項77乃至91のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 9 3】**

前記マイクロキャリアが、生物的に非変性である請求項77乃至91のいずれか1項記載の方法。

**【請求項 9 4】**

前記組成物が、さらに抗原を含む請求項59至64のいずれか1項記載の方法。

10

20

40

50

## 【請求項 9 5】

前記抗原が、ウイルス抗原である請求項94記載の方法。

## 【請求項 9 6】

前記組成物が、さらに抗原を含む請求項22乃至28、42乃至47及び77乃至82のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 9 7】

前記抗原が、アレルゲンである請求項96記載の方法。

## 【請求項 9 8】

[免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -TCG X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> -3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである]、  
を含むキット。 10

## 【請求項 9 9】

オリゴヌクレオチドが、5' -TCGAAAA-3' , 5' -TCGCCCC-3' , 5' -TCGGGGG-3' , 5' -TCGT TTT-3' から成る群から選択される配列から成る請求項98記載のキット。

## 【請求項 1 0 0】

オリゴヌクレオチドが、配列5' -TCGTCGX<sub>1</sub> -3' から成り、そこでX<sub>1</sub>がヌクレオチドである、請求項98記載のキット。

## 【請求項 1 0 1】

オリゴヌクレオチドが、配列5' -TCGTCGA-3' から成る請求項100記載の方法。 20

## 【請求項 1 0 2】

[免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' -X<sub>1</sub> TCGX<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> -3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである]、  
を含むキット。

## 【請求項 1 0 3】

[免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリア(IMP/MC)複合体が、マイクロキャリア(MC)に結合されるオリゴヌクレオチドを含む、そこでオリゴヌクレオチドが配列5' - X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> T CGX<sub>3</sub> X<sub>4</sub> -3' から成り、そこでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである]、  
を含むキット。 30

## 【請求項 1 0 4】

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアと共有結合される請求項98至103のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 1 0 5】

前記オリゴヌクレオチドが、前記マイクロキャリアと非共有結合される請求項98乃至10  
3のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 1 0 6】

前記マイクロキャリアが、液相マイクロキャリアである請求項98乃至103のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 1 0 7】

前記マイクロキャリアが、固相マイクロキャリアである請求項98乃至103のいずれか1項記載のキット。 40

## 【請求項 1 0 8】

前記マイクロキャリアは、サイズが10 μmより小さい請求項98乃至103のいずれか1項記載のキット。

## 【請求項 1 0 9】

前記マイクロキャリアは、サイズが25nm乃至5 μmである請求項108記載のキット。

## 【請求項 1 1 0】

前記マイクロキャリアは、サイズが1.0 μm乃至2.05 μmである請求項109記載のキット。

## 【請求項 1 1 1】

前記マイクロキャリアは、サイズが1.4μmである請求項110記載のキット。

【請求項112】

前記マイクロキャリアが、陽イオンである請求項98乃至103のいずれか1項記載のキット

。

【請求項113】

前記複合体が、抗原のない請求項98乃至103のいずれか1項記載のキット。

【請求項114】

前記複合体は、さらに抗原を含む請求項98乃至103のいずれか1項記載の方法。

【請求項115】

前記抗原が、アレルゲンである請求項114記載の方法。

【請求項116】

前記オリゴヌクレオチドが、リン酸骨格の修飾を含む請求項98乃至103のいずれか1項記載のキット。

【請求項117】

前記リン酸骨格修飾が、ホスホロチオエイトである請求項116記載のキット。

【請求項118】

さらに抗原を含む請求項98乃至103のいずれか1項記載のキット。

【請求項119】

前記抗原が、アレルゲンである請求項118記載のキット。

【請求項120】

抗原が、ウイルス抗原である請求項118記載のキット。

【請求項121】

前記マイクロキャリアが、生物的に変性可能である請求項98乃至120のいずれか1項記載のキット。

【請求項122】

前記マイクロキャリアが、生物的に非変性である請求項98乃至120のいずれか1項記載のキット。

【請求項123】

請求項1乃至6のいずれか1項のIMP/MC複合体、及び医薬的に受け入れ可能な賦形剤を含む組成物。

【請求項124】

組成物が抗原のない請求項123記載の組成物。

【請求項125】

組成物がさらに抗原を含む請求項123記載の組成物。

【請求項126】

抗原が、アレルゲンである請求項125記載による組成物。

【請求項127】

抗原が、ウイルス抗原である請求項125記載による組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチドを含む免疫調節組成物及びその使用方法に関する。特に本発明は、オリゴヌクレオチドの長さが7ヌクレオチドである微粒子に結合するオリゴヌクレオチドを含む免疫調節組成物に関する。さらに少なくとも1つの免疫応答を調節すべきオリゴヌクレオチド/微小担体の複合体を投与することに関する。

【背景技術】

【0002】

感染又は抗原投与にて起こる免疫応答の型は、通常その応答に関与するTヘルパー(The)細胞のサブセットにより一般的に識別することができる。Th1サブセットは、遅延型過敏症、及び細胞障害性T細胞(CTLs)の活性化など古典的な細胞介在機能に関与し、一方Th2サ

10

20

30

40

50

ブセットは、B細胞の活性化のヘルパーとしてより効果的に機能している。一般的には抗原に対する免疫応答の型は、抗原に応答する細胞により產生されるサイトカインによって影響される。Th1及びTh2細胞にて放出されるサイトカインの相違は、これら2つのサブセットにおける生物的機能の違いを反映すると考えられる。たとえばRomagnani(2000)Ann. Allergy Asthma Immunol.85:9-18を参照。

#### 【 0 0 0 3 】

Th1サブセットは、ウイルス感染、細胞内の障害、及び腫瘍細胞への応答に特に適しており、その理由は、それがIL-2及びINF- $\gamma$ を放出し、CTLsを活性化するからである。Th2サブセットが、生きた遊離細菌及び腸内の微生物への応答に特に適し、さらにアレルギー反応に介在することができ、その理由としてIL-4及びIL-5がIgEの產生及び好酸球の活性化をそれぞれ誘発すると知られているからである。一般的にTh1及びTh2細胞が、明らかに異なる形状のサイトカインを放出し、そしてそうした応答する一方の型が、もう一方の型の応答活性を適度にすることができます。Th1/Th2のバランスが移動すればたとえばアレルギー応答になるか、あるいは選択肢としてCTL応答が増大することになる。

#### 【 0 0 0 4 】

結核及びマラリヤなどの多くの感染性疾患に対し、Th2型の応答が、感染に対する保護価値をほとんど有しない。標的抗原から誘導される小ペプチドを使用する提示ワクチン、及び感染の可能性のある無傷ウイルス粒子の使用を避けた他の新たに使用される抗原剤が、治療効果を高めるために必要な免疫応答を常に惹起するとはかぎらない。治療的に有効なヒト免疫不全ウイルス(HIV)ワクチンが欠失していることが、これを失敗する残念な例である。タンパク質依存性ワクチンがTh2型免疫応答を典型的に誘発し、有意な細胞介在免疫性のないこと以外、中和抗体の高いタイマーを特徴とする。

#### 【 0 0 0 5 】

さらに抗体応答の幾つかの型では、ある種の不適切な明示があり、とくにアレルギーにおいて極めて顕著であり、それはIgEの抗体応答が、アナフィラキーショックを起す可能性があるということである。さらに一般的にアレルギー応答には、Th2型免疫応答が含まれる。アレルギー喘息を含むアレルギー応答は、早期応答を特徴とし、アレルゲンの暴露から数秒から数分にて起こり、そして細胞の脱顆粒を特徴とする、さらに後期応答では、応答が2乃至24時間後に起こり、そしてアレルゲンに露出する部位に好酸球が浸襲することを特徴とする。特に初期段階のアレルギー応答において、アレルゲンが、好塩基球及びマスト細胞にてIgE抗体とクロス・リンク(cross-links)し、さらにそれが脱顆粒化の引き金となり、その後マスト細胞及び好塩基球からヒスタミン及び炎症化の他の介在物を放出する。特に後期応答期間において、好酸球が、アレルゲン露出部位(組織が損傷及び機能不全となる部位)に侵襲する。

#### 【 0 0 0 6 】

アレルギー疾患に対する抗原免疫療法は、抗原を少量皮下注射するが徐々にその量を増やしていくことを含む。こうした免疫治療では、IgE介在のアナフィラキシを誘導する危険性があり、アレルギー後期応答のサイトカイン介在事象を有効に取り組めていない。したがってさらにこの方法は、限定しているが成功しているもののみ取り入れた。

#### 【 0 0 0 7 】

免疫刺激配列、つまり一般的に「ISS」として知られている、特定DNA配列を投与することで、Th1に関連するサイトカインの放出にて明示されるTh1型バイアス(bias)との免疫応答を導入する。抗原を伴う免疫刺激ポリヌクレオチドを投与することにより、投与された抗原へのTh1型免疫応答が起こる。Romanら(1997) Nature Med.3:849-854.をすることになる。たとえばマウスに、生理食塩水又はアジュバント・アルム中に大腸菌 ガラクトシターゼ(-Gal)にて皮下注射し、特異的なIgG1及びIgE抗体の產生に応答し、そしてIL-4及びIL-5を放出するがIFN- $\gamma$ を放出しないCD4 $^{+}$ 細胞が、T細胞では、Th2サブセットが支配的であることを示している。しかしながらマウスに、-Galをコードし、及びISSを含むプラスミドDNA(生理食塩水中)にて皮下注射(又はチン・スキンスクラッチ・アプリケータを用いる)して、IgG2a抗体を產生することにより応答し、そしてIFN- $\gamma$ を放出するがIL-4及

10

20

30

40

50

びIL-5を放出しないCD4<sup>+</sup>細胞が、T細胞ではTh1サブセットが支配的であることを示している。さらにプラスミドDNAにて注射されたマウスにより特異的なIgEの産生が、66乃至75%減少した。

#### 【0008】

Razら、(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:5141-5145を参照。一般的に剥き出しのDNA免疫化に対する応答が、抗原刺激CD4<sup>+</sup>T細胞によりIL-2, TNF 及びINF- の産生し、それがTh1型応答を明示することを特徴とする。これは、IgEの産生を減少させることにより示される、アレルギー及び喘息の治療に特に重要である。免疫刺激ポリヌクレオチドがTh1型免疫応答を刺激できることが、細菌抗原、ウイルス抗原、及びアレルゲンにより実証されてきた(たとえば、WO 98/55495を参照)。

10

#### 【0009】

微粒子(SEPHAROSE(商標)ビーズ)に結合したISSの含有オリゴヌクレオチドを、*in vitro*における免疫刺激活性を有することが前に示された。

Liangら (1996), J.Clin.Invest.98:1119-1129を参照。しかしながら最近の結果から、金、ラテックス、及び磁性粒子に結合したISSを含むオリゴヌクレオチドが、7TD1細胞増殖の刺激に活性でないが、ISS含有のオリゴヌクレオチドに応答して増殖することが示された(Manzelら (1999), Antisense Nucl.Acid Drug Dev.9:459-464)。

#### 【0010】

他の文献による記載のISSが、kriegら (1989)J.Immunol.143:2448-2451; Tokunagaら (1992)Microbiol.Immunol.36:55-66; Kataokaら (1992)Jptz. J.Cancer Res.83:244-247; Yamamotoら (1992)J.Immunol.148:4072-4076; Mojzikら (1993)Clin.Immuno.and Imnzuropathol.67:130-136; Brandaら (1993)Biochem.Pharmacol.45:2037-2043; Pisetskyら (1994)Life Sci.54(2):101-107; Yamamotoら (1994a)Antisense Research and Development.4:119-122; Yamamotoら (1994b)Jptz.J.Cancer Res.85:775-779; Razら (1994)Proc.Natl.Acad.Sci. USA 91:9519-9523; Kimuraら (1994) J. Biochem(Tokyo)116:991-994; Kriegら (1995)Nature 374:546-549; Pisetskyら (1995)Ann.N.Y.Acad.Sci.772:152-163; Pisetsky (1996a)J. Immunol.156:421-423; Pisetsky (1996b)Immunity 5:303-310; Zhaoら (1996)Biochem.Pharmacol. 51:173-182; Yiら (1996)J.Immunol.156:558-564; Krieg (1996) Trends Microbiol. 4(2):73-76; Kriegら (1996)Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 6:133-139; Klinmanら (1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.93:2879-2883; Razら (1996); Satoら (1996) Science 273:352-354; Staceyら (1996)J.Immunol.157:2116-2122; Ballasら (1996)J.Immunol. 157:1840-1845; Brandaら (1996)J.Lab.Clin.Med. 128:329-338; Soneharaら (1996) J.Interferon and Cytokine Res.16:799-803; Klinmanら (1997)J.Immunol.158:3635-3639; Sparwasserら (1997) Eur.J. Immunol.27:1671-1679; Romanら (1997); Carsonら (1997)J.Exp.Med.186:1621-1622; Chaceら (1997) Clin.Immunol. and Immunopathol.84:185; Chuら (1997)J.Exp.Med.186:1623-1631; Lipfordら (1997a) Eur.J.Immunol.27:2340-2344; Lipfordら (1997b)Eur.J.Immunol.27:3420-3426; Weinerら (1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:10833-10837; Macfarlaneら (1997)Immunology 91:586-593; Schwartzら (1997)J.Clin.Invest. 100:68-73; Steinら (1997)Antisense Technology, Ch.11pp.241-264, C.Lichtenstein and W.Nellen,Eds., IRL Press; Wooldridgeら (1997)Blood 89:2994-2998; Leclercら (1997) Cell.Immunol.179:97-106; Klineら (1997)J.Invest.Med.45(3):282A; Yiら (1998a)J. Immunol.160:1240-1245; Yiら (1998b)J.Immunol.160:4755-4761; Yiら (1998c)J.Immunol. 160:5898-5906; Yiら (1998d)J.Immunol.161:4493-4497; Krieg (1998)Applied Antisense Oligonucleotide Ch.24, pp. 431-448, C.A.Stein and A.M.Krieg, Eds., Wiley-Liss, Inc.; kriegら (1998a)Trends Microbiol.6:23-27; Kriegら (1998b)J.Immunol.161:2428-2434; Kriegら (1998c)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:12631-12636; Spiegelbergら (1998)Allergy 53(45S):93-97; Hornerら (1998) Cell Immunol.190:77-82; Jakobら (1998)J.Immunol.161:3042-3049; Redfordら (1998)J.Immunol.161:3930-3935; Weeratnaら (1998)Antisense & Nucleic Acid Drug Development 8:351-356; McCluskieら (1998) J.Immunol.161(9):4463-4466; Gramzinskiら (1998) Mol.Med.4:109-118; Liuら (1998)Blood 92:3730-3736; Moldoveanuら (1998)Vaccine 16:1250

20

30

40

50

16-1224;Brazolot Milanら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15553-15558;Briodeら (1998) J. Immunol. 161:7054-7062; Briodeら (1999) Int. Arch. Allergy Immunol. 118:453-456; Kovarikら (1999) J. Immunol. 162:1611-1617; Spiegelbergら (1999) Pediatr. Pulmonol. Supp. 1.18:118-121; Martin-Orozcoら (1999) Int. Immunol. 11:1111-1118; EP 468,520; WO 96/02555; WO 97/28259; WO 98/16247; WO 98/18810; WO 98/37919; WO 98/40100; WO 98/52581; WO 98/55495; WO 98/55609 and WO 99/11275が含まれる。

### 【0011】

さらにElkinsら (1999) J. Immunol. 162:2291-2298, WO 98/52962, WO 99/33488, WO 99/33868, WO 99/51259 and WO 99/62923を参照。さらにZimmermannら (1998) J. Immunol. 160:3627-3630; Krieg (1999) Trends Microbiol. 7:64-65; U.S. Patent Nos. 5,663,153, 5,723,335, 5,849,719 and 6,174,872を参照。さらにWO 99/56755, WO 00/06588; WO 00/16804; WO 00/21556; WO 00/67023 and WO 01/12223を参照。さらにVerthelyiら (2001) J. Immunol. 166:2372-2377; WO 00/54803; WO 00/61161; WO 00/54803; WO 01/15726; WO 01/22972; WO 01/22990; WO 01/35991; WO 01/51500; WO 01/54720; U.S. Patent Nos. 6,194,388, 6,207,646, 6,214,806, 6,239,116を参照。

### 【0012】

さらにGodardら (1995) Eur. J. Biochem. 232:404-410では、ポリ(イソヘキシルシアノアクリレート)に結合したコレステロール修飾アンチセンス・オリゴヌクレオチドを開示している。

### 【0013】

すべての特許、特許出願、及び本明細書に引用される公開文献が、これら全体を引用として取り入れられる。

### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

### 【0014】

本発明は、個体において、特にヒト個体における免疫応答を調節するための新たな組成物、及び方法に関する。

### 【課題を解決するための手段】

### 【0015】

1つの観点において、本発明は、免疫調節/マイクロキャリアー(IMP/MC)複合体を含む組成物に関する。IMP/MC複合体が、生物的に変性できるか、できないかのいずれでもよく、濾過性にて不溶性マイクロキャリアー(MC)に結合した5'-CG-3'を有する、7量体オリゴヌクレオチドを含む。そのオリゴヌクレオチドが、複合状態のマイクロキャリアーに共有的、又は非共有的に結合することができ、そしてそのオリゴヌクレオチドが、容易に複合体を形成するように修飾することができる。IMP/MC複合体に使用されるマイクロキャリアーは、液相マイクロキャリアー(たとえば、ポリマー又はオイル、好ましくは生物的に変性可能なポリマー又はオイル)も考えられるが、典型的には固相マイクロキャリアーである。マイクロキャリアーは、通常約150,120又は100μmより小さく、より一般的にサイズが約50乃至60μmより小さく、そして約10nmから約10μm又は25nmから5μmのサイズにて可能である。特定の例において本発明の組成物が、IMP/MC複合体及び医薬的に受け入れ可能な賦形剤を含む。特定の例において本発明の組成物が、抗原と遊離IMP/MC複合体を含む、即ちIMP/MC複合体が、抗原に(直接的又は間接的のいずれか)結合しなかった。特定の例においてさらにIMP/MC複合体が、抗原を含む。

### 【0016】

特定の例におけるIMP/MC複合体の7量体オリゴヌクレオチドが、5'-TCG-3'配列及び/又は5'-UCG-3'配列を含む。特定の例におけるIMP/MC複合体のオリゴヌクレオチドが、5'-CG-3'配列を、さらに5'-TCG-3'配列及び/又は5'-UCG-3'配列を含む。

### 【0017】

特定の例におけるIMP/MC複合体のオリゴヌクレオチドが、以下の式：5'-TCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'、5'-X<sub>1</sub>TCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'及び5'-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'からの1にて、ここでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>及びX<sub>4</sub>が又

10

20

30

40

40

50

クレオチドである、相当する配列から成る。

【0018】

他の観点において本発明は、個体内にて免疫応答を調節するに十分な量にて、IMP/MC複合体を含む組成物を、前記個体に投与することを含む、前記個体の免疫応答を調節する方法に関する。本発明の方法による免疫調節が、TH2型免疫応答(たとえばアレルギー又はアレルギーから誘導される喘息)と関連する疾患かかる個体、治療ワクチン(たとえばアレルギー・エピトープ、マイコバクテリア・エピトープ、又は腫瘍関連エピトープ)、又は予防ワクチンなどのワクチンを受ける個体、ガンを有する個体、感染性疾患有する個体、及び危険性のある感染性物質に暴露した個体、を含む個体上にて行うことができる。

【0019】

更なる観点において、本発明は、個体にIMP/MC複合体を含む組成物の有効量を投与することを含む、個体におけるインターフェロン-ガンマ(IFN- $\gamma$ )を増大させる方法に関する。本発明によるIMP/MC複合体を投与すれば、個体におけるIFN- $\gamma$ が増大する。この方法に対する適切な対象物が、特発性肺線維症(IPF)、強皮症、外皮の放射線誘導線維、住血吸虫症に誘導された肝臓線維を含む肝臓線維、腎臓線維、及びIFN- $\gamma$ の投与により改良される他の症状を含むこれらの個体を含む。

【0020】

他の観点において、本発明は、感染性疾患有する個体に、IMP/MC複合体を含む組成物の有効量を投与することを含む、感染性疾患の1又は複数の徴候を改善する方法に関する。本発明によるIMP/MC複合体を投与することにより、感染性疾患の1又は複数の徴候が改善される。本発明により処理できる感染性疾患が、本発明により処理可能な感染性疾患が、(たとえば、マイコバクテリア疾患、マラリア、リーシュマニア症、トキソプラズム、住血吸虫症、又は肝吸虫など)細胞病原体により起こる感染性疾患を含み、ウイルス疾患を含んでも良く、含まなくても良い。

【0021】

さらに本発明は、本発明の方法を行うためのキットに関する。本発明のキットが、IMP/MC複合体の(又は本明細書記載のようにIMP/MC複合体を產生するための物質)を含み、そして所望によりたとえば個体が、Th2型免疫応答に関連した疾患(たとえばアレルギー又はアレルギー誘導による喘息)に罹り、治療ワクチン(たとえばアレルギー・エピトープ、マイコバクテリア・エピトープ、又は腫瘍関連エピトープ)又は予防ワクチンなどのワクチンを受けている場合、ガンに罹る、感染性疾患に罹る、あるいは感染剤に危険性のある暴露がされた場合、個体の免疫調節においてIMP/MC複合体の使用に対し指示することを含む。

【0022】

本発明の実施する形態

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

我々は、ヒトを含む個体及び特定のヒトに免疫応答を調節するための新たな組成物及びそのための方法を発見した。本発明の組成物が、マイクロキャリアー(MC)と複合化された5'-C,G-3'配列を含む、7量体オリゴヌクレオチドを含む。ヌクレオチド長7のオリゴヌクレオチドを、ヒト免疫細胞と有効に調節する微小なマイクロキャリアー(直径が約1乃至4.5μm、2.0μmより小さいか又は約1.5μm)と結合させた。好ましくはIMP/MC複合体のオリゴヌクレオチドが、下記の式の1の配列から成り、つまりその配列が5'-TCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'、5'-X<sub>1</sub>TCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'及び5'-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'で、ここでX<sub>1</sub>,X<sub>2</sub>,X<sub>3</sub>及びX<sub>4</sub>がヌクレオチドである。当方の発見が、技術的に周知なものとしてヒトの細胞が、マウスなど通常使用される実験動物からの細胞よりオリゴヌクレオチドにより免疫調節に対する有意な耐性を可能にすることから、特に関心のあるものである。

【0024】

IMP/MC複合体は、免疫調節において遊離のオリゴヌクレオチドだけより少量の投与量で有意に有効なことが見出された。ヒトの細胞におけるIMP/MC複合体が、IFN- $\gamma$ 及びIFN- $\beta$ を誘発における遊離のオリゴヌクレオチドより通常有意に活性であった。

10

20

30

40

50

## 【0025】

IMP/MC複合体が、抗原を含んでも除外しても良い。幾つかの例において本発明は、抗原-遊離IMP/MC複合体、即ち抗原に結合されないIMP/MC複合体(直接的又は間接的)を含む組成物を提供する。他の例において本発明が、1又は複数の抗原と混合されたIMP/MC複合体を含む組成物を提供する。他の例における本発明は、抗原に結合されたIMP/MC複合体から成る組成物を提供する。

## 【0026】

当方では、ナノキャリアー(nanocarrier)粒子を含む共有結合したIMP/MC複合体が、高い活性の免疫調製剤であることが、さらに見出された。マイクロ粒子及びナノ粒子にしっかりと結合した免疫調節オリゴヌクレオチドは効果のないこと(特にManzelら)を、技術的に教示する前に示している。こうした技術的判断と照らして、当方は、当業者には、驚きと予期されない結果であろうと考える。

## 【0027】

本発明の免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリアー(IMP/MC)複合体が、共有又は非共有結合で良く、そして水に不溶、及び/又は濾出可能なマイクロキャリアー(たとえばサイズが10μmより小さいキャリアー)を含む。

## 【0028】

マイクロキャリアーは、液相のマイクロキャリアー(たとえば高分子又はオイルを、好みしくは生物的に変性可能な高分子又はオイルを含む水中の懸濁状オイル)も有益であるが、通常固相(たとえば高分子乳酸ビーズ)である。オリゴヌクレオチドが、MCに結合できるよう、又は結合が増大するように(たとえば遊離スルフヒドリル基を組み込み疎水性結合するためのコレステロールなど疎水性成分の共有的な架橋又は付加)修飾することができる。

## 【0029】

本発明は、共有IMP/MC複合体を生成するためにマイクロキャリアーに共有的に結合されたオリゴヌクレオチドを含む新たな組成物を提供する。オリゴヌクレオチドとMCとの間の結合を誘導することができ(たとえばオリゴヌクレオチドとMCとのスルフヒドリル基間の2硫化物の結合を介して)、又はその成分が、オリゴヌクレオチドとMCとの結合を分離する場合、1又は複数の原子の架橋成分により結合することができる。

## 【0030】

さらに提供されるものは、非共有IMP/MC複合体を提供するために、マイクロキャリアーに非共有的に結合したオリゴヌクレオチドを含む組成物である。当業者に理解されるように、天然のオリゴヌクレオチドの特性を、マイクロキャリアーに結合するように(たとえば陽イオン性ポリ(乳酸、グリコール酸)共重合体など陽イオンのマイクロキャリアーへ静電的に結合)使用できるが、非共有IMP/MC複合体が、通常マイクロキャリアーに結合できるように(たとえばオリゴヌクレオチドにコレステロール成分を付加し、オイル又は脂質に基づくマイクロキャリアーに疎水的に結合できる)修飾されたオリゴヌクレオチドを含む。

## 【0031】

さらに本発明は、個体にIMP/MC複合体を投与することにより、個体における免疫応答を調節するための方法を提供する。さらに提供されるものは、本発明の方法を実施するためのキットである。そのキットは、何らかのIMP/MC複合体、及び/又は適切に梱包する際のIMP/MC複合体のための組成物及びさらに対象物に免疫調節するためIMP/MC複合体を投与するための指示も含んでいる。

## 【0032】

## 一般的技術

本発明の実施は、別に明示されないかぎり、技術的な範囲内である分子生物学の従来技術(組み換え型技術を含む)、細菌生物学、細胞生物学、生物化学及び免疫学を用いることになる。こうした技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrookら 1989); Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture

10

20

30

40

50

(R.I. Freshney, ed., 1987); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller & M.P. Cabs, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et.al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); and Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W.H. Albert, and N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993)など、文献に十分に説明されている。

## 【0033】

10

## 定義

本明細書に使用されているように、単体形状としての「1つ(a)」、「1つ(an)」、「その(the)」が、別に指示されないかぎり複数の引用を含んでいる。たとえば「1つ(an)」ISSが、1又は複数のISSを含む。本明細書に交換可能に用いられているように、用語「ポリヌクレオチド」と「オリゴヌクレオチド」が、1本鎖DNA(ssDNA)、2本鎖DNA(dsDNA)、1本鎖RNA(ssRNA)、2本鎖RNA(dsRNA)、修飾されたオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオシド又はその組み合わせを含む。オリゴヌクレオチドが、直線形又は環状形の構造にて可能であり、又はオリゴヌクレオチドが、直線形又は環状形の両方の断片を含むことができる。オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエイト・エステルなど別の結合にて、オリゴヌクレオチドにも使用することができるが、通常リン酸エステルの結合を介し結合されたヌクレオシドの重合体である。ヌクレオシドは、糖に結合したプリン(アデニン、グアニン又はイノシン、又はその誘導体)、又はピリミジン(チミン、シトシン又はオラシル、又はその誘導体)塩基から成る。DNAにおける4つのヌクレオシド・ユニット(又は塩基対)が、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、及びデオキシシチジンと呼ばれる。ヌクレオチドが、ヌクレオシドのリン酸エステルである。

20

## 【0034】

本明細書に用いられている、用語「7量体」オリゴヌクレオチドは、長さにおいて7ヌクレオチド、又は塩基対(つまり塩基の対の数)であるオリゴヌクレオチドを言及している。本開示において、ヌクレオチド配列の塩基対を示すため1文字を使用し、ここではAはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミン、Uはウラシル、Iがイノシン、Rはプリン、及びYはピリミジンである。

30

## 【0035】

本明細書に用いられている、用語「ISS」は、単独及び/又はMCと複合されたポリヌクレオチド配列を指し、それがin vitro, in vivo 及び/又はex vivoにて測定された、測定可能な免疫応答を行うものである。測定可能な免疫応答の例が、抗原に特異的抗体の產生、サイトカインの放出、NK細胞、CD4+Tリンパ球、CD8+Tリンパ球、Bリンパ球などのリンパ球集団の活性化又は拡張を含むがそれに限定されない。好ましくは、このISS配列が、Th1型応答を好適に活性化する。本発明において使用するポリヌクレオチドは、少なくとも1つのISSを含む。本明細書に使用される「ISS」は、ISS含有ポリヌクレオチドのため短縮された用語である。

40

## 【0036】

本明細書に使用される用語「免疫調節ポリヌクレオチド」又は「IMP」が、少なくとも1つのISSを含むポリヌクレオチドを指している。特定の例においてIMPはISSである。

## 【0037】

用語「マイクロキャリアー」は、水に不溶でそしてサイズが約150,120又は100μmより小さいサイズ、より一般的に約50乃至60μm、好ましくは約10,5,2.5,2又は1.5μmより小さいサイズの粒子組成物を指している。マイクロキャリアーは、「ナノキャリアー」を含み、それが、約1μmより小さいサイズ、好ましくは約500nmより小さいサイズを有するマイクロキャリアーである。固相のマイクロキャリアーは、生物的に適合性のある天然に形成するポリマー、合成ポリマー又は合成コポリマーから形成される粒子で可能であり、そ

50

れが、アガロース又は架橋されたアガロース、及び技術的に周知の他の生物的に変性可能な物質から形成されるマイクロキャリアーを含んでもよく又は除外しても良い。本発明に使用するマイクロキャリアーは、生物的に変性できるもの、又は変性できないものでも良い。生物的に変性可能な固相マイクロキャリアーは、哺乳動物の生理的状態下、変性可能な(たとえばポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)及びそのコポリマー)又は侵蝕可能な(たとえばポリ(3,9-ジエチリジン-2,4,8,10-テトラオキサスオイロ[5,5]ウンデカン(DETOSU)などのオルソ・エステル)又はセバシン酸のポリ(無水物)などのポリ(無水物))であるポリマーから生成することができる。

【0038】

生物非変性マイクロキャリアーは、ポリスチレン、ポリプロピレン、シリカ、セラミック、ポリアクリルアミド、金、ラテックス、ヒドロキシアパタイト、デキストラン、及びフェロマクネテック及びパラマグネテック材料など動物の物理的条件下で、非侵蝕性及び/又は非変性である物質から形成することができる。さらにマイクロキャリアーは、抗原のないリポソーム、イスコム(iscoms)(コレステロール、及びリン脂質の安定化複合体にて、アジュバント-活性化サポニンである免疫刺激複合体)又は、水中におけるオイル又は水とオイルの乳化液に見出される小滴又はミセルなどの液相(オイル又は脂質を基にして)でも可能である。生物的に変性可能な液相マイクロキャリアーが、生物的に変性可能なオイルを典型的に取り入れ、その多くは、スクアレン及び植物油を含む技術的に知られたものである。マイクロキャリアーは典型的に球形の形状であるが、球形の形状からはずれたマイクロキャリアーも受け入れることができる(たとえば橢円形、棒形状など)。不溶性の特性(水に対して)により、マイクロキャリアーが、水及び水による(水溶性)溶液から濾出することができる。

【0039】

マイクロキャリアーの「サイズ」は、通常「設計サイズ」又は製造者が述べる粒子の意図されたサイズである。サイズは、直径の平均値又は最大値など直接に測定した寸法でよく、又は濾過スクリーニング・アッセイなどの間接アッセイにより決定することができる。マイクロキャリアーのサイズの直接による測定は、周知のサイズの粒子と比較して顕微鏡、通常光学顕微鏡、又は走査型電子顕微鏡(SEM)により、又はマイクロメータを基準として典型的に行われる。サイズの最小変動が、製造過程の期間に生じるため、測定により、マイクロキャリアーが、規定された測定の約±5乃至10%であることを示すと、マイクロキャリアーが規定のサイズであると考える。動的光分散及び暗所技術(dynamic light scattering or obscuration techniques)によっても決定される。別の選択肢としてマイクロキャリアー・サイズは、濾過スクリーニング・アッセイにより決定することができる。マイクロキャリアーが、少なくとも粒子の97%が、「スクリーン型」フィルターを通過する場合(すなわち保持された粒子が、フィルター内に留まる「デップス・フィルター(depth filter)」と対照的に、その保持された粒子が、ポリカーボネット、又はポリエーテルサルフォン・フィルターなどのフィルターの表面上にあるフィルター)、規定サイズより小さいとする。マイクロキャリアーが、少なくとも約97%のマイクロキャリアー粒子が、規定サイズのスクリーン型フィルターにて保持される場合、規定サイズより大きい。従って約10nmから約10μmのサイズの少なくとも約97%のマイクロキャリアーが、10μmの孔のスクリーン・フィルターを通過するが、10nmのスクリーン・フィルターにより保持される。

【0040】

上記により、マイクロキャリアーのサイズ又はサイズ範囲の基準が、おおよその変動、及びおおよそのサイズ及び/又はサイズ範囲を示唆的に含む。これは、サイズ及び/又はサイズ範囲の基準、及び「約」という基準のない形でのサイズ及び/又はサイズ範囲の基準は、サイズ及び/又はサイズ範囲が存在しない意味である場合、用語「約」を使用することにより反映される。

【0041】

マイクロキャリアーは、通常の哺乳動物の生理的条件下にて変性可能、又は侵蝕可能であれば、「生物的に変性可能」であると考えられる。一般的にマイクロキャリアーが、通

10

20

30

40

50

常のヒトの血清にて37℃で72時間インキュベーション後、変性されると(すなわち少なくとも5%の容量及び/又は平均ポリマー長を喪失する)生物的に変性可能であると考える。従って、そしてそれと反対に、マイクロキャリアーは、通常の哺乳動物の生理的条件下にて変性又は侵蝕されない場合、「生物的に非変性可能」であると考えられる。一般的にマイクロキャリアーが、通常のヒトの血清にて37℃で72時間インキュベーション後、変性されない場合(すなわち容量(mass)及び/又は平均ポリマー長の喪失が少なくとも5%より少ない)生物的に変性可能性がないと考える。

## 【0042】

用語「免疫調節オリゴクレオチド/マイクロキャリアー複合体」又は「IMP/MC複合体」は、5'-CG-3'配列を含む7量体オリゴヌクレオチド及び本発明のマイクロキャリアーの複合体を言及している。その複合体の成分は、共有又は非共有的に結合されても良い。非共有による結合は、疎水的相互作用、イオン(静電気的)結合、水素結合及び/又はファン・デル・ワールス引力によることを含む、何らかの非共有結合力にて介在することができる。疎水性の結合の場合その結合は、オリゴヌクレオチドに共有的に結合した疎水性成分(たとえばコレステロール)を通常介している。

10

## 【0043】

本明細書に使用されているように、「免疫調節」は、オリゴクレオチド及び/又はその複合体を言及する。従ってオリゴクレオチドだけとして提示される場合、IMP/MCのオリゴクレオチドが、比較可能な免疫調節活性を呈しない配列を有する場合でさえ、IMP/MCが免疫調節活性を呈することができる。幾つかの例において、単独にて提示される場合、IMP/MCのオリゴクレオチドが、「単離された免疫調節活性」を有さないか、又は「劣っている、単離された免疫調節活性」(すなわちIMP/MCに比較される場合)を有する。オリゴクレオチドの「単離された免疫調節活性」は、本明細書に記載のような免疫応答の少なくとも1つの観点を示す標準的なアッセイを用いて、同じ核酸のバックボーン(たとえば、ホスホロチオエイト、フォスフォジエステル、キメリック)を有する単離されたオリゴクレオチドの免疫調節活性を測定することにより、決定される。

20

## 【0044】

本明細書に用いられる用語「免疫調節」又は「免疫応答を調節する」が、免疫刺激効果及び免疫抑制効果を含む。さらに定量的な変化が免疫調節と結びつけて起こるにもかかわらず、免疫調節が、主に全体にわたる免疫応答の定性的変化である。本発明による免疫調節される免疫応答が、「Th2型」免疫応答に対照的な「Th1型」免疫応答にシフトされたものである。Th1型応答は、細胞免疫系(たとえば細胞障害性T細胞)応答と典型的に考えられ、一方でTh2型応答は、通常「液素性」又は「抗体に基づく」ものである。Th1型免疫応答では、通常抗原に対し「遅延型高感受性」反応することが特徴であり、IL-6も、同様にTh2型応答と関連できるが、IFN- $\gamma$ 及びIL-6ばかりかIFN- $\alpha$ , IL-2, IL-12, 及びTNF- $\alpha$ などTh1関連サイトカインのレベルを増大させることにより、生物化学レベルで検知することができる。Th1型免疫応答は、細胞障害性T細胞(CTLs)の産生、及び抗体の低レベルか一過性の産生と通常関連性がある。Th2型免疫応答は、IgEの産生、産生しない又は最小のCTL産生、及びIL-4などTh2関連サイトカインの発現を含む、高レベルの抗体産生と通常関連する。従って本発明による免疫調節が、たとえば処理しないもとの比較して本発明の方法による処理された個体におけるIFN- $\gamma$ の増大、及び/又はIgE産生の減少により認識することができる。

30

## 【0045】

用語「結合(conjugate)」は、5'-CG-3'配列を含むオリゴクレオチド及び抗原が結合(linked)される複合体を言及している。こうした連鎖的結合が、共有及び/又は非共有の結合を含む。

40

## 【0046】

用語「抗原」は、特に抗体又はT細胞抗原リセプターにより認識され、そして結合される物質の意味である。抗原は、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、ポリ多糖類、炭化水素複合体、砂糖、ガングリオシド、脂質及びリン脂質、その部分及びその組み合わせを

50

含むことができる。抗原は天然に見出されるもの、又は合成のものでもよい。ISSにて投与するため適切な抗原が、B細胞又はT細胞の抗原に特異的応答を惹起できるいづれかの分子を含む。好ましくは、抗原が、抗原に特異的な抗体の応答を惹起する。ハプテンが、「抗原」の範囲内に含まれる。ハプテンが、抗原決定基を含む免疫原分子と結合する場合、自己のみで免疫原とならないが、免疫原として与えられる低分子量化合物である。小分子を、抗原として与えられるためにハプテン化する必要性がある。好ましくは本発明の抗原が、ペプチド、脂質(たとえば、ステロール、脂肪酸、及びリン脂質)、ヘモフィルス(Hemophilus)インフルエンザ・ワクチンに使用されるものなどのポリ多糖類、 Ganglioside、及び糖タンパク質を含む。

## 【0047】

10

「アジュvant」は、抗原などの免疫原の薬剤に加えられた場合、その混合物に暴露下にて、受け入れる宿主にその薬剤に免疫応答を非特異的に増強又は効能を高める物質を言及している。

## 【0048】

用語「ペプチド」が、十分な長さであり、生物的な応答を行うべき、たとえば、ペプチドがハプテンであろうとなからうと、抗体の産生又はサイトカインの活性化を行うべき組成物である。典型的にペプチドでは、長さが少なくとも6個のアミノ酸残基がある。さらに用語「ペプチド」は、修飾されたアミノ酸(天然の生成であってもなくても、又は非天然であっても)を含み、こうした修飾には、リン酸化、グリコシリ化、ペグリル化、脂質化、及びメチル化が含まれるがそれに限定されない。

20

## 【0049】

「抗原ペプチド」は、精製された天然ペプチド、合成ペプチド、組み換えペプチド、粗製ペプチド抽出物、又は1部精製された、又は未精製の活性状態(1部弱毒化又は不活性なウイルス、細胞、又は微生物、又はこうしたペプチドの断片など)を含むことができる。従って「抗原ペプチド」又は「抗原ポリペプチド」が、1又は複数の抗原特性を示す全て、又は1部のポリペプチドの意味である。従ってたとえば、「Amb 1抗原ポリペプチド」又は「Amb 1ポリペプチド抗原」が、抗原特性(すなわち抗体又はT細胞リセプターに特異的に結合)示す全体の配列、1部の配列及び/又は修飾した配列であろうと、Ama 1からのアミノ酸配列である。

## 【0050】

30

「誘導分子」又は「誘導担体(vehicle)」は、特定部位に、及び/又は特定タイミングに対しIMP/MC複合体の誘導を、容易に、可能に、及び/又は増強する化学成分である。誘導担体が、免疫応答を追加的に刺激してもしなくてもよい。

## 【0051】

40

「抗原へのアレルギー応答」は、通常好酸球、及び/又は抗原特異的IgEの生成、及びこれらから得られた効果を特徴とする。技術的に周知のように、IgEが、マスト細胞及び好塩基球のIgEリセプターに結合する。IgEにより認識される抗原に後者の暴露により、抗原が、マスト細胞、及び好塩基球のIgEに架橋し、これら細胞の脱顆粒化を起こし、ヒスタミンを放出することを含むがそれらに限定されない。用語「抗原へのアレルギー応答」、「アレルギー」、及びアレルギー条件」は、本発明の幾つかの方法の適用するために等しく適切であると理解され、意図されている。さらに本発明の方法が、アレルギー応答の予防、及び前に存在するアレルギー症状を治療するために同じように適切であるもとを含むと理解されそして意図される。

## 【0052】

50

本明細書に使用されるように、用語「アレルゲン」が、対象物へ暴露することによるアレルギー応答を惹起する、抗原又は抗原部分の分子にて、通常タンパク質の意味である。典型的にその対象物が、たとえば膨疹及び発赤試験又は技術的に周知な何らかの方法により明示されるような、アレルゲンに対しアレルギー性である。分子は、対象物の小サブセットが、分子への暴露によるアレルギー(たとえばIgE)免疫応答を示すだけでアレルゲンであると云われる。多くの単離されたアレルゲンが技術的に知られている。これらは、

本明細書に表に提供されるものを含むがそれに限定されない。

【0053】

用語「脱感作」は、対象物が感作性を証明したアレルゲンの投与量を増大させるという投与する過程を言及している。脱感作のため使用されるアレルゲン用量の例は、技術的に知られ、たとえばFornadley(1998)Otolaryngol.Clin.North Am.31:111-127を参照。

【0054】

「抗原特異的免疫治療」は、抗原に関与しそして免疫応答の抗原特異的調節を形成する免疫治療の形態のいずれかを言及する。アレルギーの内容においてアレルゲン特異的免疫治療が、脱感作治療を含むがそれに限定されない。

【0055】

「固体」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物は、ヒト、靈長類、家畜、スポーツ用動物、げっ歯類及びペットを含むがそれに限定されない。さらに脊椎動物が、トリ(すなわち鳥類の個体)及び爬虫類(爬虫類の個体)を含むがそれに限定されない。

【0056】

物質の「有効量」又は「十分量」は、臨床結果を含め有益で、所望の結果を得るために十分な量であり、こうした「有効量」は、それが適用される内容に依存する。抗原に対する免疫応答を調節する組成物を投与する内容において、IMP/MC複合体の有効量は、抗原だけ投与される場合に得られた免疫応答と比較してこうした調節を行うための十分な量である。有効量を、1又は複数回の投与にて投与することができる。

【0057】

本明細書に使用される用語「共投与」は、免疫応答を調節するために少なくとも2種の異なる物質を一度に十分に閉じた形で投与することを言及している。好ましくは、少なくとも2種の異なる物質を同時投与することを指している。

【0058】

Th1応答など免疫応答の「同時化」が、応答の惹起及び/又は応答の強化を高める、応答の増大を意味する。

【0059】

「IgE関連疾患」は、IgEのレベルが部分的に上昇する生理的症状であり、それが継続性のある場合、又はない場合も良いことを特徴とする。IgE関連疾患は、アレルギー及びアレルギー反応、アレルギー関連疾患(下記のように)、喘息、鼻炎、結膜炎、蕁麻疹、発作、はち刺しアレルギー、及び薬物アレルギー、及び寄生虫への感染を含むがそれに限定されない。さらにその用語が、これらの疾患の発症に関連する。こうした影響は、低血圧及び発作を含むが限定されない。アナフィラキシーは、循環系内にて放出されるヒスタミンが、血管拡張を起こすと共に、循環系から著しく血漿を喪失する結果により毛細血管の浸透性が増大するというアレルギー関連疾患の例である。アナフィラキシーは、全身に発症する関連効果により、全身系として起こる場合、及び反応が特異的標的組織又は器官に限定される反応による局所的に起こる場合がある。

本明細書に用いられているように用語「ウイルス性疾患」は、病因となるものとしてウイルスを有する疾患を言及している。ウイルス疾患の例は、肝炎B、肝炎C、インフルエンザ、後天性免疫不全症候群(AIDS)、及びヘルペス帯状疱疹を含む。

【0060】

本明細書に用いられ、技術的に良く理解された、「治療」は、臨床結果を含む有益か又は、所望の結果を得るために方法である。本発明の目的のために、有益又は所望の臨床結果は、1又は複数の症状の緩和又は改善、疾患の程度の緩和、疾患状態の安定化(すなわち悪化しない)、症状拡大の防止、病状進行の遅延又は緩慢性、疾患状態の改善又は軽減、及び検出可能、又は可能でない場合でさえ、軽減(1部か全般的でも)を含むがそれに限定されない。さらに「治療」は、治療を受けないとしても期待される生存期間と比較して、生存期間を長くする意味でも良い。

【0061】

10

20

30

40

50

病気又は疾患を「軽減(palliating)」は、拡大した、及び／又は望ましくない病気又は疾患状態の臨床的発症を、少なくし、及び／又は進行の過程で、疾患を治療しない場合と比較して、遅く、長く延びることを意味する。特に当業者に良く理解されているようにアレルギー症状において軽減することは、アレルゲンに対する免疫応答の調節により起こる可能性がある。さらに症状の緩和が、1投与量を投与することにより生ずることが必ずしも必要としないが、しばしば一連の用量を投与することにより引き起こされる。従って応答又は疾患を緩和するに十分な量を、1又は複数の投与にて投与することができる。

#### 【0062】

IMP/MC複合体により「惹起」される「抗体の力価」又は「抗体量」が、IMP/MC複合体を投与後の時間において、測定された所定抗体の量を指している。

10

#### 【0063】

「Th1関連抗体」は、抗体の產生及び増大がTh1免疫応答に関連している抗体である。たとえば、IgG2aが、マウスにおけるTh1関連抗体である。本発明の目的のために、Th1関連抗体の測定は、1又は複数のこうした抗体の測定を可能にする。たとえばヒトにおいて、Th1関連抗体の測定が、IgG1及び／又はIgG3の測定を伴うことができる。

#### 【0064】

「Th2関連抗体」は、抗体の產生及び増大がTh2免疫応答に関連している抗体である。たとえば、IgG1が、マウスにおけるTh2関連抗体である。本発明の目的のために、Th2関連抗体の測定は、1又は複数のこうした抗体の測定を可能にする。たとえばヒトにおいて、Th2関連抗体の測定が、IgG2及び／又はIgG4の測定を伴うことができる。

20

#### 【0065】

サイトカインの產生、抗体の產生、又はヒスタミンの放出など、機能又は活性を「抑止」又は「阻害」することが、別の条件と比較して関心のある又は選択べきな条件又はパラメータのない場合の同じ条件を別にして比較される場合、機能又は活性化減少させることである。ヒスタミン放出を抑制する抗原又はその抗原を含めて投与されるIMP/MC複合体が、たとえば抗原単独による誘発されるヒスタミン放出と比較してヒスタミンの放出が減少した。

#### 【0066】

本明細書に用いられる用語「含む(comprising)」及びその対応系列が、これらを包含する意味にて使用され、すなわち用語「含む(including)」にそしてその対応系列に等しい。

30

#### 【0067】

##### 本発明の組成物

本発明は、個体に免疫調節するための新たな組成物を提供する。この新たな組成物は、5'-CG-3'配列を含む7量体オリゴヌクレオチドを含む、マイクロキャリアーと複合化された免疫調節ポリヌクレオチド/マイクロキャリアー(IMP/MC)複合体であり、生分解性又は非生分解性のいずれかでも良い。IMP/MC複合体が共有結合による複合体でなく、そこにおける複合体のオリゴヌクレオチド部分が、直接か又はリンカーを介して(間接に)のいずれかにて共有的に結合されるか、又はこれらが非共有的な複合体でも良い。

40

#### 【0068】

##### IMP/MC複合体のオリゴヌクレオチド

本発明によるオリゴヌクレオチドが、7塩基又は塩基対の長さで、少なくとも1つの5'-シトシン、グアニン-3'配列を含むことができ、そして修飾したものを含む2以上の5'-CG-3'配列を含む。さらにオリゴヌクレオチドが、さらに5'-T,C,G-3'の配列(すなわち1又は複数の)を含むことができる。したがって、オリゴヌクレオチドが、5'-CG-3'及び／又は5'-TCG-3'を含むことができる。オリゴヌクレオチドが、マイクロキャリアーと複合化した場合、in vitro, in vivo及び／又はex vivoにおいて測定されたように測定可能な免疫応答に影響をあたえる。複合化していない場合、in vitro, in vivo及び／又はex vivoにおいて測定されたように、幾つかの例においてオリゴヌクレオチドが、活性がないか又は幾つかの例において活性が少ない。

50

## 【 0 0 6 9 】

5'-シトシン、グアニン-3'配列は、特にC-5の部位にて通常非メチル化されている。用語「IMP/MC」が、伝達されそして定義されることから、IMP/MC複合体が、免疫応答に影響を与え、そして特定例において、こうしたオリゴヌクレオチドのシトシンのメチル化が、たとえばN-4の位置にて可能である。

## 【 0 0 7 0 】

幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-C,G,ピリミジン、ピリミジン,C,G-3(5'-CGTCG-3'など)の配列を含む。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-プリン、プリン、C,G,ピリミジン、ピリミジン-3'(5'-AACGTT-3'など)の配列を含む。幾つかの例におけるオリゴヌクレオチドが、5'-プリン、T,C,G,ピリミジン、ピリミジン-3'の配列を含むことができる。

## 【 0 0 7 1 】

幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、以下のいずれかの配列すなわち、  
: GACGCT; GACGTC; GACGTT; GACGCC; GACGCU; GACGUC; GACGUU; GACGUT; GACGTU; AGCGTT;  
AGCGCT; AGCGTC; AGCGCC; AGCGUU; AGCGCU; AGCGUC; AGCGUT; AGCGTU; AACGTC; AACGCC; AACGTT;  
AACGCT; AACGUC; AACGUU; AACGCU; AACGUT; AACGTU; GGCCTT; GGCCTC; GGCCTC; GGCCTC; GGCCTC;  
GGCGCU; GGCGUC; GGCGUT; GGCGTUを含む。

## 【 0 0 7 2 】

幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、以下のいずれかの配列すなわち、  
GAGGCT; GAGGTC; GAGGTT; GAGGCC; GAGGCU; GAGGUC; GAGGUU; GAGGUT; GAGGTU; AAGGCT; 20  
AAGGTC; AAGGCC; AAGGUU; AAGGCU; AAGGUC; AAGGUT; AAGGTU; AABGTC; AABGCC; AABGTT; AABGCT;  
AAGUC; AABGUU; AABGCU; AABGUT; AABGTU; GGBGTT; GGBGCT; GGBGTC; GGBGCC; GGBGUU;  
GGBGCU; GGBGUC; GGBGUT; GGBGTUの配列を含み、ここでBが5-プロモシトシンである。

## 【 0 0 7 3 】

幾つかに例においてオリゴヌクレオチドが、5'-TCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'又は5'-UCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'の配列から成り、ここでX<sub>1</sub>,X<sub>2</sub>,X<sub>3</sub>,X<sub>4</sub>がヌクレオチドである。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、以下の配列のいずれかから成り、すなわち5'-TCGTTTT-3':5'-TCGAAAA-3';5'-TCGCCCC-3';5'-TCGGGGG-3';5'-TCGUUUU-3';5'-TCGIIII-3';5'-UCGTTTT-3';5'-UCGAAAA-3';5'-UCGCCCC-3';5'-UCGGGGG-3';5'-UCGUUUU-3';5'-UCGIIII-3'から成る。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-X<sub>1</sub>TCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'又は5'-X<sub>1</sub>UCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'の配列から成り、ここでX<sub>1</sub>,X<sub>2</sub>,X<sub>3</sub>,X<sub>4</sub>がヌクレオチドである。幾つかの例におけるオリゴヌクレオチドが、以下のいずれかの配列、すなわち5'-TTCGTTT-3';5'-ATCGATT-3';5'-TUCGTTT-3';5'-AUCGATT-3'から成る。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'又は5'-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>UCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'の配列から成り、ここでX<sub>1</sub>,X<sub>2</sub>,X<sub>3</sub>,X<sub>4</sub>がヌクレオチドである。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが以下の配列のいずれかから成り、すなわち5'-TTTCGTT-3';5'-AATCGAT-3';5'-TTUCGTT-3';5'-AAUCGAT-3'から成る。

## 【 0 0 7 4 】

幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-TCGTCGX<sub>1</sub>-3'の配列から成り、ここでX<sub>1</sub>がヌクレオチドである。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、以下の配列のいずれかより成り、即ち:5'-TCGTCGA-3';5'-TCGTCGC-3';5'-TCGTCGG-3';5'-TCGTCGT-3';5'-TCGTCGU-3';5'-TCGTCGI-3'から成る。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-TCGUCGX<sub>1</sub>-3',5'-UCGTCGX<sub>1</sub>-3'、又は5'-UCGUCGX<sub>1</sub>-3'からなり、ここでX<sub>1</sub>がヌクレオチドである。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、以下の配列のいずれかより成り、すなわち:5'-TCGUCGA-3';5'-TCGUCGC-3';5'-TCGUCGG-3';5'-TCGUCGT-3';5'-TCGUCGU-3';5'-TCGUCGI-3';5'-UCGTCGA-3';5'-UCGTCGC-3';5'-UCGTCGG-3';5'-UCGTCGT-3';5'-UCGTCGU-3';5'-UCGTCGI-3';5'-UCGUCGA-3';5'-UCGUCGC-3';5'-UCGUCGG-3';5'-UCGUCGT-3';5'-UCGUCGU-3';5'-UCGUCGI-3'から成る。

## 【 0 0 7 5 】

幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-TmCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'又は5'-UMCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'の配列から成り、ここでX<sub>1</sub>,X<sub>2</sub>,X<sub>3</sub>,X<sub>4</sub>がヌクレオチドであり、mCが本明細書記載

10

20

30

40

50

のように修飾されたシトシンである。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5' - X<sub>1</sub>TmCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' 又は5' -X<sub>1</sub>UmCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' の配列から成りここでX<sub>1</sub>,X<sub>2</sub>,X<sub>3</sub>,X<sub>4</sub>がヌクレオチドである。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TmCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' 又は5'-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>UmCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3' の配列から成りここでX<sub>1</sub>,X<sub>2</sub>,X<sub>3</sub>,X<sub>4</sub>がヌクレオチドである。

#### 【 0 0 7 6 】

幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-TmCGTCGX<sub>1</sub>-3' 、5'-TmCGUCGX<sub>1</sub>-3' 又は5'UmCGTCGX<sub>1</sub>-3' 又は5'UmCGUCGX<sub>1</sub>-3' の配列から成り、ここでX<sub>1</sub>がヌクレオチドである。幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、5'-TCGTmCGX<sub>1</sub>-3' ,5'-UmCGTmCGX<sub>1</sub>-3' ,5'-TmCGUmGX<sub>1</sub>-3' 又は5'UmCGUmCGX<sub>1</sub>-3' の配列から成りここでX<sub>1</sub>がヌクレオチドである。明細書記載のように修飾されたシトシン(mC)は、シトシンのC-5及び/又はC-6に電子離脱成分の付加を含み、それは、5-プロモシトシンなどのC-5ハロゲン化シトシンを含むがそれに限定されない。

#### 【 0 0 7 7 】

従って幾つかの例において、オリゴヌクレオチドが、以下の配列のいずれかより成る、すなわち、:5'-TBGTTTT-3';5'-TBGAAAA-3';5'-TBGCCCC-3';5'-TBGGGGG-3';5'-TBGUUUU-3';5'-TBGIIII-3';5'-TBGTCGA-3';5'-TBGTCGC-3';5'-TBGTCGG-3';5'-TBGTCGT-3';5'-TBGTCGU-3';5'-TBGTCGI-3';5'-TCGTTBGA-3';5'-TCGTTBGC-3';5'-TCGTTBGG-3';5'-TCGTTBGT-3';5'-TCGTTBGU-3';5'-TCGTTBGI-3';5'-TBGTTBGA-3';5'-TBGTTB GC-3';5'-TBGTTBGG-3';5'-TBGTTBGT-3',5'-TBGTTBGU-3';5'-TBGTTBGI-3';から成り、ここでBは5-プロモシトシンである。

#### 【 0 0 7 8 】

7量体オリゴヌクレオチドが、修飾部を含んでも良い。7量体オリゴヌクレオチドの修飾には、3'OH又は5'OH基の修飾、ヌクレオチド塩基の修飾、糖成分の修飾、及びリン酸基の修飾など周知の技術を含むがそれに限定されない。こうした種々の修飾が下記に記載されている。

#### 【 0 0 7 9 】

オリゴヌクレオチドに存在するシトシンがメチル化されないが、しかしながら特定の例においてオリゴヌクレオチドが、1又は複数のメチル化シトシンを含むことができる。こうした例において、オリゴヌクレオチドの5'-CG-3'のシトシンが、C-5の位置にてメチル化されないことが好ましい。しかしながら、N-4の位置におけるメチル化は、メチル化シトシンを伴うオリゴヌクレオチドと規定される。

#### 【 0 0 8 0 】

7量体オリゴヌクレオチドが、1本鎖又は2本鎖及び1本鎖又は2本鎖RNA、或いは他の修飾ポリヌクレオチドでも良い。7量体オリゴヌクレオチドが、1又は複数の回交構造領域を含むことも、含まなくても可能であり、上記モチーフに存在しても良く、モチーフを越えて延長しても良い。7量体オリゴヌクレオチドが、天然による形成又は修飾され、非天然に形成された塩基を含んでも良く、そして修飾された糖、リン酸及び/又は末端を含むことができる。たとえば、リン酸による修飾には、リン酸化メチル、ホスホロチオエイト、ホスフォロアミダイト(架橋又は非架橋)、ホスフォロトリエステル、及びホスフォロジチオエイトを含むがそれに限定されなく、そしてなんらかの組み合わせにて使用することができる。非リン酸による他の結合成分も使用することができる。

#### 【 0 0 8 1 】

好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、ホスフォロジエステル及び/又はホスホロチオエイト・バックボーンを含む。2'-アルコキシ-RNAアナログ、2'-アミノ-RNAアナログ及び2'-アルコキシ-又はアミノ-RNA/DNAキメラ及び本明細書記載の他の成分など、この分野に知られた糖修飾成分が、さらに何らかのリン酸修飾化にて作成、及び組み合わせすることができる。塩基修飾の例は、ISSのシトシンにおけるC-5及び/又はC-6部位に、電子離脱成分を加えること(たとえば、5-プロモシトシン、5-クロロシトシン、5-フルオロシトシン、5-イオドシトシン)を含むがそれに限定されない。たとえば、国際特許出願番号WO 99/62923を参照。

10

20

30

40

50

## 【0082】

酵素による方法、化学方法及び大型オリゴヌクレオチド配列の変性を含むがそれに限定されない技術においてよく知られた技術及び核酸合成装置を用いて、7量体のオリゴヌクレオチドを合成することができる。Ausubelら(1987);及びSambrookら(1989)を参照。オリゴヌクレオチドの変性は、オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼに曝すことを介して行うことができ、それが米国特許番号4,650,675に明示されている。

## 【0083】

環状オリゴヌクレオチドが、単離、組み換え方法を介して合成され、又は化学的に合成可能である。小さな環状オリゴヌクレオチドの化学的合成が、文献記載の何らかの方法を用いて行うことができる。たとえば、Gaoら(1995)Nucleic Acids Res.23:2025-2029; and Wangら(1994)Nucleic Acids Res.22:2326-2333を参照。

10

## 【0084】

オリゴヌクレオチド及び修飾されたオリゴヌクレオチドを作成するための技術は技術的に知られている。リン酸ジエステル結合を含む天然に形成するDNA又はRNAが、3'末端にて固相担体に結合されたオリゴヌクレオチドを成長させる5'ヒドロキシル基に、適切なヌクレオシド・ホスホアミダイトを直線的に結合させ、次にリン酸トリエステルの中間体を酸化することによりリン酸トリエステルに、通常合成することができる。

## 【0085】

一旦所望のオリゴヌクレオチド配列が、合成されると、そのオリゴヌクレオチドが、担体から除外され、リン酸トリエステル基が、リン酸ジエステルに脱保護化され、そしてヌクレオシド塩基が、水溶性アンモニア又は他の塩基を用いて脱保護化される。たとえば、Beaucage(1993)「Oligodeoxyribonucleotide Synthesis」in *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawalら)Humana Press, Totowa, NJ; Wannerら(1984)DNA 3:401 and米国特許番号 4,458,066を参照。

20

## 【0086】

さらにオリゴヌクレオチドが、リン酸にて修飾された結合部を含むことができる。さらに修飾されたリン酸結合又は非リン酸結合を含むポリヌクレオチドの合成が、知られている。検討するには、Matteucci(1997)「Oligonucleotide Analogs: an Overview」in *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (D.J. Chadwick and G. Cardew, ed.) John Wiley and Sons, New York, NYを参照。本発明のオリゴヌクレオチドにおける糖成分及び糖類似成分に結合することのできるリン酸誘導体(又は修飾されたリン酸基)が、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、アルキルホスフォネット、ホスホロチオエイト、ホスホジチオエイトなどにて可能である。さらに上記リン酸アナロクの調製、及びヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドにこれらの組み入れが、それ自体周知であり、本明細書に詳細に記載する必要がない。Peyrottesら(1996) Nucleic Acids Res.24:1841-1848; Chaturvediら(1996)Nucleic Acids Res.24:2318-2323; and Schultzら(1996) Nucleic Acids Res.24:2966-2973を参照。たとえばホスホロチオエイトのオリゴヌクレオチドの合成が、酸化工程が、硫黄化工程(Zon(1993)「Oligonucleoside Phosphorothioates」in *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawalら)Humana Press, pp.165-190)により置き換えられることを除いて天然に形成するオリゴヌクレオチドに対する上の記載と類似している。さらにホスホロトリエステル (Millerら(1971)JACS 93:6657-6665)、非架橋ホスホアミダイト(lagerら(1988)Biochem.27:7247-7246), N3' to P5' phosphoramidates (Nelsonら(1997)JOC 62:7278-7287) and phosphorodithioates (米国特許番号5,453,496) など他のリン酸類似体の合成が、記載されている。さらに他の非リン酸依存の修飾オリゴヌクレオチドを使用することができる(Stirchakら(1989) Nucleic Acids Res.17:6129-6141)。ホスホロチオエイト骨格(backbones)を伴うオリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル骨格を伴うものよりも免疫原であり、そして宿主に注入された後変性に対して有意に耐性があると見られている。Braunら(1988)J. Immunol.141:2084-2089; and Latimerら(1995)Mol. Immunol.32:1057-1064を参照。

30

40

50

## 【0087】

本発明に用いられるオリゴヌクレオチドが、リボヌクレオチド(単独又は主要な糖成分としてのリボースを含む)、デオキシリボヌクレオチド(主要糖成分としてデオキシリボースを含む)を含むことができるか、又は技術的に知られたものとして、修飾された糖類又は糖類似体を、オリゴヌクレオチドに組み入れることができる。従ってリボース及びデオキシリボースに糖類成分の付加において、糖類成分には、ペントース、デオキシペントース、ヘキソース、デオキシヘキソース、グルコース、アラビノース、キシロース、リキソース及び糖「類似」のシクロペンチル・グループが可能である。糖は、ピラノシル又はフラノシルの形状にて良い。オリゴヌクレオチドにおける糖類成分が、好ましくはリボース、デオキシリボース、アラビノース又は2'-アルキルリボースのフラノシッドが好ましく、そして糖類が、又はアノマー構造のいずれかにおけるそれへテロサイサイクリック塩基の結合することができる。糖類の修飾は、2'-アルコキシ-RNA類似体、2'-アミノ-RNA類似体及び2'-アルコキシ-又はアミノ-RNA/DNAキメラを含むがそれに限定されない。これらの糖類又は糖類似体及びこうした糖類又はその類似体がヘテロサイサイクリック塩基(核酸塩基)に結合されるそれぞの「ヌクレオシド」の調製が、それ自体周知であり、こうした調製が特定する例に含むことができる範囲以外、本明細書に記載する必要がない。さらに糖の修飾は、オリゴヌクレオチドの調製におけるなんらかのリン酸修飾を作成又は結合することができる。

10

## 【0088】

オリゴヌクレオチドに組み入れられるヘテロサイサイクリック塩基、又は核酸塩基が、天然に形成する主なプリン及びピリミジン塩基(つまり上記のようなウラシル、チミン、シトシン、イノシン、アデニン)、及び前記主要塩基の天然による生成及び合成による修飾にて可能である。

20

## 【0089】

種々のヘテロサイサイクリック塩基、及び種々の糖成分(及び糖類似体)を含む多数の「合成」非天然ヌクレオシドが、技術的に利用可能であり、そして本発明の他の基準が満足される限り、オリゴヌクレオチドが、天然に形成する核酸の主要な5種の塩基成分以外1又は幾つかのヘテロサイサイクリック塩基を含むことができるということを、当業者が認めることに成ろう。しかしながら、好ましくはオリゴヌクレオチドにおけるヘテロサイサイクリック塩基は、ウラシル-5-イル、シトシン-5-イル、アデニン-7-イル、アデニン-8-イル、グアニン-7-イル、グアニン-8-イル、4-アミノピロロ[2.3-d]ピリミジン-5-イル、2-アミノ-4-オキソピロロ[2.3-d]ピリミジン-3基を含むが限定されず、ここでプリンを、9の位置を介してISSの糖成分に、1の位置を介してピリミジンに、7の位置を介してピロロピリミジン、及び1の位置を介してピラゾロピリミジンに結合する。

30

## 【0090】

オリゴヌクレオチドが、たとえば一般的に獲得された国際出願WO 99/62923に記載されたように少なくとも1の修飾塩基を含むことができる。本明細書に使用されるように、用語「修飾された塩基」が、「塩基類似体」と同義語であり、たとえば「修飾されたシトシン」が、「シトシン類似体」と同義語である。同様に「修飾された」ヌクレオシド又はヌクレオチドは、ヌクレオシド又はヌクレオチドの「類似体(analogs)」と同義語であると、本明細書に定義されている。塩基修飾の例は、ISSのシトシンのC-5及び/又はC-6に、電子離脱成分を付加することを含むがそれに限定されない。好ましくは、電子離脱成分がハロゲンである。修飾されるヒトシンは、アザシトシン、5-プロモシトシン、5-クロロシトシン、塩素化されたシトシン、シクロシトシン、シトシン・アラビノシド、5-フルオロシトシン、フルオロピリミジン、5,6-ジヒドロシトシン、5-イオドシトシン、ヒドロキシウレア、5-ニトロシトシン、5-ヒドロキシシトシン、及びいずれか他のピリミジン類似体又は修飾されたピリミジンを含むことができるが、それに限定されない。

40

## 【0091】

好ましく修飾されたウラシルは、好ましくはハロゲンによりC-5及び/又はC-6にて修飾され、そして5-プロモウラシルなどのプロモウラシル、5-クロロウラシルなどのクロロウ

50

ラシル、5-フルオロウラシルなどのフルオロウラシル、5-イオドウラシルなどのイオドウラシル及びヒドロキシウラシルを含むがそれに限定されない。さらにKandimallaら2001, Bioorg. Med. Chem. 9:807-813を参照。たとえば、国際特許出願第 WO 99/62923を参照。塩基修飾の他の例は、6-チオ-グアニン、4-チオ-チミン、及び4-チオ-ウラシルを含むがそれに限定されない塩基に、1又は複数のチオール(thiol)基を付加することを含む。さらに、幾つかのヌクレオチドが、どれかのグアノシン残基の代りに7-ジアザグアノシンなどの修飾された塩基を含むか、又は5'-CG-3'のシトシンを含むどれかのシトシン残基の代りにN-4エチルシトシン又はN-4メチルシトシンから選択される修飾されたシトシンを含むことができる。

## 【0092】

10

塩基にて修飾されたヌクレオシドの調製及び前駆体として前記修飾されたヌクレオシドを使用して修飾オリゴヌクレオチドの合成は、たとえば米国特許第4,910,300,4,948,582,及び5,093,231に記載されている。こうした塩基による修飾のヌクレオシドを、オリゴヌクレオチドの末端の位置又は内部の位置のいずれかに化学的に合成することにより、組み込みできるように、こうした塩基による修飾ヌクレオシドが設計された。オリゴヌクレオチドの末端の位置又は内部の位置のいずれかに存在するこうした塩基による修飾ヌクレオシドが、ペプチド又は他の抗原の結合部位として使用することができる。さらにこれらの糖成分に修飾されるヌクレオシドが、(たとえば、米国特許第4,849,513,5,015,733,5,118,800, 5,118,802を含むがそれに限定されない)に記載され、そして同様に用いることができる。

## 【0093】

20

ISSが技術的に記載されており、そしてサイトカインの放出、抗体の產生、NK細胞の活性化、及びT細胞の増殖などの免疫応答の種々の観点を明示する標準的なアッセイを用いて容易に同定することができる。WO 97/28259; WO 98/16247; WO 99/11275; Kregら(1995) Nature 374:546-549; Yamamotoら(1992a); Ballasら(1996); Klinmanら(1997); Satoら(1996); Pisetsky(1996a); Shimadaら(1986) Jpn. J. Cancer Res. 77:808-816; Cowderyら(1996) J. Immunol. 156:4570-4575; Romanら(1997)及びLirfordら(1997a)を参照。これらの方法は、IMP/MC複合体の免疫調節活性を評価するために同様に適用することができる。

## 【0094】

30

オリゴヌクレオチドの1つの特性が、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列と関連して「単離された免疫調節活性」である。オリゴヌクレオチドだけとして提示された場合、比較可能な免疫調節活性を呈さない配列を、オリゴヌクレオチドが有している場合でさえ、驚くことにIMP/MC複合体が免疫調節活性を呈するということを、上記のように本発明が発見した。

## 【0095】

幾つかの例において、IMP/MC複合体のオリゴヌクレオチドが、「単離された免疫調節活性」を有しないか、下記のように「有意に劣る単離された免疫調節活性」(すなわちIMP/MC複合体と比較した場合)を有する。

## 【0096】

40

オリゴヌクレオチドの「単離された免疫調節活性」が、同じ核酸の骨格を有す単離されたオリゴヌクレオチドの免疫調節活性(たとえば、ホスホロチオエイト、ホスホジエステル、キメリック)を測定することにより決定される。たとえばIMP/MC複合体におけるオリゴヌクレオチドの独立した免疫調節活性を決定するために、同じ配列(たとえば5'-TCGT CGA-3')、及び同じ骨格構造(たとえばホスホロチオエイト)を有する試験オリゴヌクレオチドが、所定の方法を用いて合成され、そしてその免疫調節活性が(できれば)測定される。免疫調節活性を、本明細書記載のものなど免疫応答の種々の観点を明示する標準アッセイを使用して決定することができる。たとえば、本明細書に記載されているヒトPBMCアッセイが、用いられる。ドナーの変化を説明するためにアッセイが、典型的に複数のドナーにて行われる。オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドと接触したPBMCsにより放出されたIFN- の量が、試験化合物のない場合より、又は(幾つかの例において)不活性な

50

コントロール化合物の存在(たとえば、5'-TGACTGTGAAACCTTAGAGATGA-3' (配列番号: 1)する場合より多数のドナーにおいて有意に大きくな(大きさが約2倍より少ない)場合、オリゴヌクレオチドが、「単離された免疫調節活性」を有しない。

【0097】

IMP/MC複合体と単離されたオリゴヌクレオチドの免疫調節活性を比較するために、免疫調節活性が、好ましくは測定されるが、ヒトPBMCAッセイを使用する必要がない。通常、2種の化合物の活性が、同じ条件下(たとえば同じ細胞を使用する)通常約20μ/mlの濃度にて、平行にこれらを評価することにより比較される。一般的に濃度が、260nmでの吸光を測定し、そして $0.50D_{260}/ml = 20\mu g/ml$ の転換を使用して決定される。これは、試験試料における全核酸の量を正規化する。選択肢として濃度又は重量が、技術的に他の周知の方法により測定することができる。

【0098】

試験オリゴヌクレオチドは、比較されるIMP/MC複合体より活性が低い場合、IMP/MC複合体のオリゴヌクレオチドが、「劣った免疫調節活性」を有するとしての特徴がある。好ましくは、この試験オリゴヌクレオチドの単離された免疫調節活性が、IMP/MC複合体の活性の約50%以下であり、より好ましくは約20%以下であり、最も好ましくはIMP/MC複合体の活性の約10%以下、又は幾つかの例においてそれ以下である。

【0099】

マイクロキャリアー

本発明において有益なマイクロキャリアーは、サイズが150,120又は100μmより小さく、好ましくはサイズが約10μmより小さく、そして純粋な水には不溶である。非生物的変性であるマイクロキャリアーが受け入れ可能であるにもかかわらず、本発明に使用されるマイクロキャリアーは、好ましくは生物的に変性可能なものである。生物変性ポリマー又はオイルを含む水中のオイルによる乳化物などの液相マイクロキャリアーがさらに考えられるが、マイクロキャリアーは、一般的に「ビーズ」又は他の粒子など固相である。マイクロキャリアーとして使用するため受け入れ可能な多様な生物変性及び非生物変性物質が、技術的に知られている。

【0100】

本発明における組成物、又は本発明の方法に使用するためのマイクロキャリアーは、サイズが通常約10μmより小さく(平均直径が約10μmより小さいか、又は少なくとも約97%の粒子が10μmのスクリーン・フィルターを通る)、そしてナノキャリアー(すなわちサイズが1μmより小さいキャリアー)を含む。好ましくは、マイクロキャリアーは、約9,7,5,2又は1μm又は900,800,700,600,500,400,300,250,200又は100nmの上限の限度内のサイズから選択され、及び約4,2又は1μm又は約800,600,500,400,300,250,200,150,100,50,25,又は10nmの下限の限度にて独立的に選択され、ここで有意に低い限度が上限の限度より小さい。幾つかの例においてマイクロキャリアーが、約1.0-1.5μm, 約1.0-2.0μm又は約0.9-1.6μmのサイズを有する。特定の好ましい例において、マイクロキャリアーが、約10nmから約5μm又は約25nmから約4.5μm、約1μm、約1.2μm、約1.4μm約1.5μm、約1.6μm、約1.8μm、約2.0μm、約2.5μm、又は約4.5μmのサイズを有する。マイクロキャリアーがナノキャリアーである場合、好ましい例は、約25から約300nm、約50から約200nm、約50nm又は約200nmを含む。

【0101】

固相生物変性マイクロキャリアーが、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、及びその共重合体(ブロック共重合体を含む)、及びポリ(乳酸)とポリ(エチレングリコール)のブロック共重合体; 3,9-ジエチリデン-2,4,8,10-テトラオキサピロ[5.5]ウンデカン(DETOSU)に基づくポリマーなどポリオルトエステル; セバシン酸などの相対的に親水性モノマーによるポリ(無水物)ポリマーなど高重合無水物; グリシン又はアラニンなどのアミノ酸(すなわちアミノ末端の窒素を介したイミド結合によりセバシン酸に結合)を組み込んだセバシン酸誘導のモノマーを基盤とした高重合無水物ポリマーなど高重合無水物イミド; 高重合無水物エステル; カルボン酸基の生成を介してポリマー骨格の変性を触媒できる無水物感

10

20

30

40

50

受性エステル基を含む特にポリ(ホスファゼン)(Schachtら(1996)Biotechnol. Bioeng.194:6:102);及びポリ(乳酸-co-リシン)などのポリアミドを含むがそれに限定されない生物的に変性可能なポリマーから製造することができる。さらにマイクロキャリアーを製造するために種々の適切な非生物変性物質が、ポリスチレン、ポリポロピレン、ポリエチレン、ラテックス、金、及びフェロマンガン又はパラマグネチック材料を含むが限定されず、周知である。特定例では、金、ラテックス及び/又は磁気ビーズが除かれる。特定例ではマイクロキャリアーが、第二の材料(たとえばポリスチレン)にて包含された第一の材料(たとえば磁気材料)から作成することができる。

## 【0102】

固相から成る微小球体が、技術的に周知な技術を用いて調製される。たとえば、これらが、乳化、溶媒抽出/蒸発技術により調製することができる。一般的にこの技術において、重合無水物(polyanhydrides)、ポリ(アルキル- $\omega$ -シアノアクリレート)及びポリ(-ヒドロキシ・エステル)などの生物変性可能ポリマー、たとえばポリ(グリコール酸)、ポリ(D,L-乳酸-co-グリコール酸)、及びポリ(カプロラクトン)などを、乳化液の分散相(DP)を構成するように、塩化メチレンなどの適切な有機溶媒に溶解する。分散相(DP)が、溶解される表面活性剤、たとえばポリビニール・アルコール(PVA)又はポリビニールピロロリデン(PVP)を含む過剰量の水性連続相(CP)に高速にて均一化することにより乳化される。CPにおける表面活性剤が、離散しそして適切なサイズの乳化状小滴に確実に形成するためである。次に有機溶媒がCP内にて抽出され、その後系の温度を上昇させることにより蒸発乾固する。次に固体の微粒子を、濃縮又は濾過により分離し、そしてたとえば4にて保存する前に、親液性化又は真空の適用により乾燥させる。

## 【0103】

乾燥された微小球体の平均サイズ、サイズの分布及び表面の電化などの物理化学的な特徴を決定することができる。サイズの特徴は、たとえば動的な光散乱技術により決定され、そして表面電荷を、ゼータ(ζ)電位を測定することにより決定した。

## 【0104】

液相によるマイクロキャリアーは、リポソーム、ミセル、油滴及び他の脂質又は生物変性ポリマー又はオイルを組み込むオイルベースの粒子を含む。特定例において、生物変性ポリマーが、表面活性剤である。他の例において、液相マイクロキャリアーが、スクアレン又は植物油などの生物変性可能オイルを含むことにより生物的変性が可能である。1の好ましい液相マイクロキャリアーは、水中のオイルによる乳化液内の油滴である。好ましくはマイクロキャリアーとして使用される水中のオイルによる乳化液が、スクワレンなどの生物変性可能な置換基を含む。

## 【0105】

## 抗原

抗原を含むIMP/MC複合体を調製でき、又は抗原のないIMP/MC複合体(すなわちIMP/MCが抗原に結合されない)を調製することが可能である。いずれの抗原も、抗原を含むIMP/MC複合体の調製に使用可能である。

## 【0106】

幾つかの例において抗原はアレルゲンである。組み換えアレルゲンの例は、組み換えアレルゲン表1に提供される。多くのアレルゲンの調製が技術的に周知であり、ブタクサの花粉の抗原E(Amb a1)(Rafnarら(1991)J.Biol.Chem.266:1229-1236)、主要チリダニ・アレルゲンDer pI and Der PII(Chuaら(1988)J.Exp.Med.167:175-182; Chuaら(1990)Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.91:124-129)、白樺の花粉Bet v1(Breitenederら(1989)EMBO J.8:1935-1938)、家のネコによるアレルゲンFel d I(Rogersら(1993)Mol.Immunol.30:559-568)、及び3種の花粉によるタンパク質抗原(Elsayedら(1991)Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl.204:17-31)が含まれるが、それに限定されない。明示されたように、3種類のアレルゲンは、樺の木、ビャクシン、及び日本のヒマラヤスギからのアレルゲンを含み、良く知られている。Vivoにおける投与のため草の花粉からタンパク質抗原の調製が、記載されている。Malley(1989)J.Reprod.Immunol.16:173-186を参照。組み換えアレルゲン表1が示し

10

20

30

40

50

ているように、幾つかの例においてアレルゲンが、ピーナツ・アレルゲンたとえばAra h 1などの食料アレルゲンであり、そして幾つかの例において、アレルゲンが、ライムギのアレルゲン、たとえばLol p 1など草アレルゲンである。組み換えアレルゲン表1が、使用可能なアレルゲンの一覧を表している。

【0107】

【表1】

組み換えアレルゲン表1

10

グループ	アレルゲン	文献
動物		
節足動物		
小エビ/ロブスター	トロポミオシン Pan s 1	Leung et al. (1996) J. Allergy Clin. Immunol. 98:954-961 Leung et al. (1998) Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 7:12-20
昆虫		
アリ	Sol i 2 (毒液)	Schmidt et al. J Allergy Clin Immunol., 1996, 98:82-8
ハチ	ホスホリパーゼA2 (PLA) ヒアルロニターゼ (Hya)	Muller et al. J Allergy Clin Immunol, 1995, 96:395-402 Forster et al. J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1229-35 Muller et al. Clin Exp Allergy, 1997, 27:915-20 Soldatova et al. J. Allergy Clin Immunol, 1998, 101:691-8
ゴキブリ	Bla g Bd90K Bla g 4 (a calycin) グルタチオン S-トラン スフェラーゼ Per a 3	Helm et al. J. Allergy Clin Immunol, 1996, 98:172-180 Viales et al. J. Allergy Clin Immunol, 1998, 101:274-280 Arruda et al. J Biol Chem, 1997, 272:20907-12 Wu et al. Mol Immunol, 1997, 34:1-8
チリダニ	Der p 2 (主要アレルゲ ン) Der p2 (変異体) Der f2 Der p10 Tyr p 2	Lynch et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:562-4 Hakkaart et al. Clin Exp Allergy, 1998, 28:169-74 Hakkaart et al. Clin Exp Allergy, 1998, 28:45-52 Hakkaart et al. Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115(2):15 0-6 Mueller et al. J Biol Chem, 1997, 272:26893-8 Smith et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:423-5 Yasue et al. Clin Exp Immunol, 1998, 113:1-9 Yasue et al. Cell Immunol, 1997, 181:30-7 Asturias et al. Biochim Biophys Acta, 1998, 1397:27-30 Eriksson et al. Eur J Biochem, 1998
スズメバチ	抗原 5 aka Dol m V (毒液)	Tomalski et al. Arch Insect Biochem Physiol, 1993, 22:303 -13
カ	Aed a 1 (唾液アピラー ゼ)	Xu et al. Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115:245-51

20

30

40

【0108】

【表2】

グループ	アレルゲン	文献
イエロー・ジャケット	抗原5、ヒアルロリナーゼ 及びホスホリバーゼ (毒液)	King et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:588-600
哺乳動物		
ネコ	Fel d 1	Slunt et al. J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1221-8 Hoffmann et al. (1997) J Allergy Clin Immunol 99:227-32 Hedlin Curr Opin Pediatr, 1995, 7:676-82
牛	Bos d 2 (dander ; a リポ カルシン) $\beta$ -lactoglobulin (BLG, 主要牛乳アレルゲン)	Zeiler et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:721-7 Rautiainen et al. Biochem Biophys Res Comm., 1998, 247:74 6-50 Chatel et al. Mol Immunol, 1996, 33:1113-8 Lehrer et al. Crit Rev Food Sci Nutr, 1996, 36:553-64
イヌ	Can f1 and Can f2, 唾 液リポカリリン	Konieczny et al. Immunology, 1997, 92:577-86 Spitzauer et al. J Allergy Clin Immunol, 1994, 93:614-27 Vrtala et al. J Immunol, 1998, 160:6137-44
ウマ	Equ c1(主要アレルゲン、 リポカリリン)	Gregoire et al. J Biol Chem, 1996, 271:32951-9
マウス	マウス尿タンパク質 (MUP)	Konieczny et al. Immunology, 1997, 92:577-86
他の哺乳動物の アレルゲン		
インスリン		Ganz et al. J Allergy Clin Immunol, 1990, 86:45-51 Grammer et al. J Lab Clin Med, 1987, 109:141-6 Gonzalo et al. Allergy, 1998, 53:106-7
インターフェロン	インターフェロン・アル ファ 2c	Detmar et al. Contact Dermatitis, 1989, 20:149-50
軟体動物	トボミオシン	Leung et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:954-61

10

20

30

40

【0109】

【表3】

グループ	アレルゲン	文献
植物アレルゲン		
オオムギ	Hor v 9	Astwood et al. <i>Adv Exp Med Biol.</i> , 1996, 409:269-77
カバの木	花粉アレルゲン、Bet v4 rBet v 1 Bet v 2: (プロフィリン)	Twardosz et al. <i>Biochem Biophys Res Comm.</i> , 1997, 239:197 Pauli et al. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> , 1996, 97:1100-9 van Neerven et al. <i>Clin Exp Allergy</i> , 1998, 28:423-33 Jahn-Schmid et al. <i>Immunotechnology</i> , 1996, 2:103-13 Breitwieser et al. <i>Biotechniques</i> , 1996, 21:918-25 Fuchs et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100:3 56-64
ブラジルナツの木	グロブリン	Bartolome et al. <i>Allergol Immunopathol</i> , 1997, 25:135-44
サクラ	Pru a 1 (主要アレルゲン)	Scheurer et al. <i>Mol Immunol.</i> , 1997, 34:619-29
トウモロコシ	Zml3 (花粉)	Heiss et al. <i>FEBS Lett.</i> , 1996, 381:217-21 Lehrer et al. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 113:122-4
草	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 (チモシ草花粉)  Hol l 5 ベルベット草花粉 ブルーグラス・アレルゲン Cyn d 7 バーミュダ草 Cyn d 12 (a プロフィリン)	Bufe et al. <i>Am J Respir Crit Care Med.</i> , 1998, 157:1269-76 Vrtala et al. <i>J Immunol Jun 15</i> , 1998, 160:6137-44 Niederberger et al. <i>J Allergy Clin Immun.</i> , 1998, 101:25 8-64 Schramm et al. <i>Eur J Biochem</i> , 1998, 252:200-6 Zhang et al. <i>J Immunol</i> , 1993, 151:791-9 Smith et al. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 114:265-71 Asturias et al. <i>Clin Exp Allergy</i> , 1997, 27:1307-13 Fuchs et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100:356-64
日本ヒマラヤスギ	Jun a 2 ( <i>Juniperus ashei</i> )  Cry j 1, Cry j 2 ( <i>Cryptomeria japonica</i> )	Yokoyama et al. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 2000, 275:195-202 Kingersu et al. <i>Immunology</i> , 2000, 99:625-629
ビャクシン	Jun o 2 (花粉)	Tinghino et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101:772-7
ラテックス	Hev b 7	Sowka et al. <i>Eur J Biochem</i> , 1998, 255:213-9 Fuchs et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100:3 56-64
マークリアリス	Mer a 1 (プロフィリン)	Valiverdu et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101:3 63-70

【表4】

グループ	アレルゲン	文献
マスター <sup>10</sup> (イエロウ)	Sin a 1 (種)	Gonzalez de la Pena et al. Biochem Biophys Res Comm., 1993, 190:648-53
アブラナ	Bra r 1 花粉アレルゲン	Smith et al. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 114:265-71
ピーナツ	Ara h 1	Stanley et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:213-6 Burks et al. J Clin Invest, 1995, 96:1715-21 Burks et al. Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107:248-50
ポア プラテンシス	Poa p9	Parronchi et al. Eur J Immunol, 1996, 26:697-703 Astwood et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:269-77
ブタクサ	Amb a 1	Sun et al. Biotechnology Aug, 1995, 13:779-86 Hirschwehr et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:196-206 Casale et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:110-21
ライムギ	Lol p 1	Tamborini et al. Eur J Biochem, 1997, 249:886-94
クルミの木	Jug r 1	Teuber et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:807-14
コムギ	アレルゲン	Fuchs et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:356-64 Donovan et al. Electrophoresis, 1993, 14:917-22
菌		
アスペルギルス	Asp f1, Asp f2, Asp f3, Asp f4, rAsp f6 過酸化マンガンシスムターゼ(MNSOD)	Crameri et al. Mycoses, 1998, 41 Suppl 1:56-60 Hermann et al. Eur J Immunol, 1998, 28:1155-60 Banerjee et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 99:821-7 Crameri Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115:99-114 Crameri et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:111-6 Moser et al. J Allergy Clin Immunol, 1994, 93:1-11 Mayer et al. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113:213-5
ブロミア	アレルゲン	Caraballo et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:81-3
ペニシリニウム	アレルゲン	Shen et al. Clin Exp Allergy, 1997, 27:682-90
ピジロサイブ	Psi c 2	Horner et al. Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107:298-300

10

20

30

40

## 【0111】

幾つかの例において、抗原は、原生動物、細菌、菌類(単細胞及び複数の細胞を含む)感染性剤、及びウイルス感染剤由来である。適切なウイルス抗原に例が、本明細書に記載され技術的に知られている。細菌には、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Hemophilus influenza*)、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)及び百日咳菌(*Bordetella pertussis*)が含まれる。原生動物感染剤は、マラリア原虫、リシュウマニア種、トリパノソーマ種、及び住血吸虫種を含む。菌類は、鶯口瘡カンジタ(*Candida albicans*)を含む。

## 【0112】

幾つかの例において抗原は、ウイルス性抗原である。ウイルス・ポリペプチド抗原は、HIVガグ(gag)タンパク質(膜アンカリング(MA)タンパク質、コア・キャップシド(CA)タン

50

パク質、及びヌクレオキヤプシド(NC)タンパク質を含むがそれに限定されない)などのHIVタンパク質、HIVポリメラーゼ、インフルエンザ・ウイルスマトリックス(M)タンパク質、及びインフルエンザ・ウイルスヌクレオキヤプシド(NP)タンパク質、肝炎B表面抗原(HBsAg)、肝炎Bコアタンパク質(HBcAg)、肝炎eタンパク質(HBeAg)、肝炎B DNAポリメラーゼ、肝炎C抗原などが含まれるがそれに限定されない。

#### 【0113】

インフルエンザのワクチン化を記載する文献では、Scherle and Gerhard(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4446-4450; Scherle and Gerhard(1986)J. Exp. Med. 164:1114-1128; Granoffら(1993)Vaccine 11:S46-51; Kodihalliら(1997)J. Virol. 71:3391-3396; Ahmeidaら(1993)Vaccine 11:1302-1309; Chenら(1999)Vaccine 17:653-659; Govorkova and Smirnov(1997)Acta Virol. (1997)41:251-257; Koideら(1995)Vaccine 13:3-5; Mbawuikeら(1994)Vaccine 12:1340-1348; Tamuraら(1994)Vaccine 12:310-316; Tamuraら(1992)Eur. J. Immunol. 22:477-481; Hirabayashiら(1990)Vaccine 8:595-599が含まれる。抗原ポリペプチドの他の例は、グループ、又はサブグループに特異的な抗原であり、それは多くの感染剤として知られ、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、乳頭腫ウイルス、呼吸器系のシンシチアル・ウイルス及びポックスウイルスを含むが限定されない。

#### 【0114】

多くの抗原ペプチド及びタンパク質が、技術的に知られそして利用することができ、他のものは、従来技術を用いて同定することができる。腫瘍形成に対する免疫化、又は存在する腫瘍の治療のために、免疫調節ペプチドは、腫瘍細胞(生きた又は照射された)、腫瘍細胞の抽出物、Her-2/neuなどの腫瘍抗原のタンパク質サブユニット、Mart1、ガン胎児性抗原(CEA)、ガングリオシド、ヒト乳脂小胞(HMFG)、ムシン(mucin(MUC1))、MAGE抗原、BA GE抗原、GAGE抗原、gp100、前立腺特異的抗原(PSA)、及びチロシナーゼを含むことができる。免疫に基づく避妊に向けたワクチンを、ISSを伴い投与される精子タンパク質を含むことにより生成することができる。Leaら(1996)Biochim. Biophys. Acta 1307:263を参照。

#### 【0115】

弱毒化され、そして不活性化されたウイルスは、抗原として本明細書に使用するに適している。これらのウイルスの調製は、技術的に良く知られ、そして多くが市場から入手することができる(たとえばPhysicians' Desk Reference(1998)52nd edition, Medical Economics Company, Inc.を参照)。たとえばポリオウイルスは、IPOL(商標)(Pasteur Merieux Connaught) and ORIMUNE(商標)(Lederle Laboratories), hepatitis A virus as VAQTA(商標)(Merck), measles virus as ATTENUVAX(商標)(Merck), mumps virus as MUMPSVAX(商標)(Merck) and rubella virus as MERUVAX(商標)II(Merck)として入手することができる。さらに. Additionally, attenuated and inactivated viruses such as HIV-1, HN-2, 単純ヘルペスウイルス、肝炎Bウイルス、ロバウイルス、ヒト及び非ヒト乳頭腫ウイルス、及び後期脳ウイルスなどの弱毒化され、そして不活性化されたウイルスが、ペプチド抗原を提供することができる。

#### 【0116】

幾つかの例において、抗原は、ワクチン、アデノウイルス、及びカナリア・ポックスなどのウイルス・ベクターを含む。抗原が、技術的に知られた精製技術を用いて、これらの資源から単離することができ、より好都合には、組み換え体の方法を用いて生成することができる。

#### 【0117】

抗原ペプチドが、精製された天然のペプチド、合成ペプチド、組み換え体のタンパク質、粗タンパク質抽出物、弱毒化されたか又は不活性なウイルス、細胞、微生物、又はこうしたペプチドの断片を含むことができる。免疫調節ペプチドは、天然でも良く、あるいは化学的に、又は酵素的に合成されたものでもよい。技術的に知られた化学的合成のどのような方法も適切である。液相によるペプチドの合成が、適切なサイズのペプチドを構成するために使用することができ、又はペプチドを化学的に構成するために、固体相を用いる

10

20

30

40

50

ことができる。Athertonら(1981)Hoppe Seylers Z Physiol. Chem. 362:833-839を参照。

#### 【0118】

さらにタンパク質分解酵素が、アミノ酸を結合し、ペプチドを生成するために利用することができる。Kullmann(1987) Enzymatic Peptide Synthesis, CRC Press, Incを参照。選択肢としてペプチドが、細胞の生物化学機構を使用することにより、又は生物的な資源から単離することにより得ることができる。組み換えDNA技術を、ペプチドの產生のため使用することができる。Hamesら(1987)Transcription and Translation: A Practical Approach, IRL Pressを参照。さらにペプチドを、親和性クロマトグラフィなどの標準的な技術を使用して単離することができる。

#### 【0119】

好ましくは、抗原は、ペプチド、脂質(コレステロールを除くステロール、脂肪酸、及びリン脂質)、H.I.インフルエンザ・ワクチンに使用されるものなどポリ多糖類、ガングリオシド及び糖タンパク質である。

#### 【0120】

これらは、化学的及び酵素的方法を用いて単離及び合成を含め技術的に知られた幾つかの方法を介して得ることができる。特定の例において、多くのステロール、脂肪酸、及びリン脂質に対するなど、分子の抗原部を市場から入手することができる。こうした抗原は、HIVエンベロープの糖タンパク質から誘導される抗原を含むがそれに限定されず、そのHIVエンベロープの糖タンパク質が、gp160, gp120及びgp41を含むがそれに限定されない。HIV遺伝子及び抗原の多くの配列が知られている。たとえば、the Los Alamos National Laboratory HIV Sequence Database collectsにて、HIVヌクレオチド及びアミノ酸配列を注釈している(curates and annotates)。このデータ・ベースは、via the インターネットの <http://hiv-web.lanl.gov/>にてアクセスすることができ、年間の出版では、Human Retroviruses and AIDS Compendium(たとえば1998版)を参照。

#### 【0121】

感染剤由来の抗原が、技術的に知られた方法を用いて、たとえば天然のウイルス、又は細菌、感染剤にて感染された細胞、精製されたポリペプチド、組み換えて的に作成されたポリペプチドから、及び合成ペプチドとして得ることができる。

#### 【0122】

IMP/MC複合体の生成が、抗腫瘍抗体及びその誘導体など、サイトカイン、アジュvant、及び抗体を含むがそれに限定されない他の免疫治療剤にて調製することができる。これらのIMP/MC複合体の生成は、抗原を使用する場合もしない場合も調製可能である。

#### 【0123】

##### IMP/MC複合体

IMP/MC複合体は、マイクロキャリアーの表面に結合されるか、又はその中に挿入される(すなわち7量体オリゴヌクレオチドが、MCにおいてカプセル化されない)5'-C,G-3'配列を含む7量体オリゴヌクレオチドを含む、そして好ましくは、各マイクロキャリアーに結合されるオリゴヌクレオチドの複数の分子を含む。特定例において、異なるオリゴヌクレオチドの混合物を、マイクロキャリアーと複合することができ、従ってそのマイクロキャリアーが、2以上のオリゴヌクレオチド種に結合される。7量体のオリゴヌクレオチドとMCとの間の結合は、共有でも非共有結合でも良い。当業者が理解できるように、7量体オリゴヌクレオチドが、修飾又は誘導されたものでも可能であり、そしてマイクロキャリアーの組成物を、IMP/MC複合体を形成するために所望する結合における所望の型を適用するよう、選択及び/又は修飾することができる。

#### 【0124】

本発明は、IMP/MC複合体を作成する方法、及びこうした方法による生成物を提供する。IMP/MC複合体を、複合体を形成するようにオリゴヌクレオチドとMCを結合させることにより作成する。複合体を形成するようオリゴヌクレオチドとMCを結合させるための特定の方法は、もちろんMCの型及び特性、及びオリゴヌクレオチドとMCの結合形態に依存することになる。MCが固相MCである場合、IMP/MC複合体を、好ましくは複合体の形成(複合体

10

20

30

40

50

に用いられる結合の型に依存する)を促進する条件下、オリゴヌクレオチドとMCを接触させることにより、作成することが好ましい。MCが液相の場合、オリゴヌクレオチドが、複合形成を促進する条件下にて、予め形成されたMCと結合できるか、又はMCを形成する前にMCの成分と結合することができる。オリゴヌクレオチドを、液相MCの成分と結合する状況において、MCを作成する過程では、オリゴヌクレオチドを組み入れることが可能であり、従ってIMP/MC複合体の同時作成する結果となるか、又は組み入れがない場合、その過程が、複合体の形成を促進する条件下にて、付加工程を含むようになる。

【0125】

本発明によるIMP/MC複合体が純水に不溶であり、そしてIMP/MC複合体組成物が、アセトニトリル、ジクロロエタン、トルエン、及び塩化メチレン(ジクロロメタン)のないものが好ましい。

【0126】

共有結合したIMP/MC複合体が、技術的に知られた共有架橋技術のいずれかを用いて結合することができる。典型的には、オリゴヌクレオチド部分を、付加成分を組み入れるか(たとえば、遊離アミン、カルボキシル又はスルフヒドリル基)、又はオリゴヌクレオチド部分を、マイクロキャリアーにて結合できる部位を提供するよう、修飾された(たとえばホスホロチオエイト)ヌクレオチド塩基を組み入れるかのいずれかにて、修飾することに成ろう。複合体のオリゴヌクレオチドとMC部分との結合が、オリゴヌクレオチドの3'又は5'末端で作成され、又はオリゴヌクレオチドの内部の部位の適切に修飾された塩基にて行うことができる。マイクロキャリアー上に通常存在する官能基類も利用可能であるが、さらにマイクロキャリアーを、一般的な修飾を行い、共有結合が形成できる成分が組み入れられる。IMP/MCが、共有結合の形成を可能にする(たとえば、可教剤の存在下、又はオリゴヌクレオチドと共有結合を形成する活性化された成分を含む活性化マイクロキャリアーの使用により)条件下にて、マイクロキャリアーを伴うオリゴヌクレオチドをインキュベートすることにより形成される。

【0127】

多様な架橋技術が、技術的に知られており、アミノ基、カルボキシル基及びスルフドリル基との架橋反応を含む。当業者に明らかなように、架橋剤の選択及び架橋方法は、オリゴヌクレオチド、及びマイクロキャリアーの構造、並びに所望する最終IMP/MC複合体に依存に依存する。その架橋剤は、ホモ二元機能又はヘテロ二元機能のいずれでもよい。ホモ二元機能の架橋剤が使用される場合、架橋剤が、オリゴヌクレオチド及びMC(たとえば、アルデヒド架橋剤を、オリゴヌクレオチドとMCが共に1又は複数の遊離アミンを含むオリゴヌクレオチドとMCに共有的に結合するように結合することができる)上の同じ成分を利用する。ヘテロ二元機能による架橋剤は、オリゴヌクレオチド及びMC(たとえば、マレイミド-N-ヒドロキシスクシンイミド・エステルが、オリゴヌクレオチド上の遊離スルフィドリルとMC上の遊離アミンを共有結合するように用いることができる)上の異なる成分を利用し、そしてマイクロキャリアー間の結合を最小にすることが好ましい。ほとんどの場合、マイクロキャリアー上の第一の架橋成分、及びオリゴヌクレオチド上の第二の架橋成分を介して架橋することが好ましく、ここで第二の架橋成分が、マイクロキャリアー上に存在しない。IMP/MC複合体を生成するための好ましい方法の1つが、ヘテロ二元機能架橋剤によりインキュベートすることによるマイクロキャリアーを「活性化」し、さらに反応のために適切な条件下にて、オリゴヌクレオチド及び活性化されたMCをインキュベートすることによりIMP/MC複合体を形成させる方法である。この架橋剤は、反応成分間に「スペイサー」アームを組み入れることが可能であり、又は架橋剤における2つの反応成分を直接結合させることもできる。

【0128】

好ましい例において、オリゴヌクレオチド部分は、マイクロキャリアーを架橋するため少なくとも1つの遊離スルフドリル(たとえば、5'-チオールに修飾された塩基又はリンカー)を含むが、マイクロキャリアーは、遊離アミノ基を含んでいる。スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-マルボキシレートなどこれら2つの基(たとえば

10

20

30

40

50

マレイミド基とNHS-エステルを含む架橋剤)とのヘテロ二元機能架橋剤の反応が、MCを活性化するために用いられ、従ってオリゴヌクレオチドを共有的に架橋しIMP/MC複合体を形成する。

【0129】

結合対が、オリゴヌクレオチドとMCを結合する場合、正常な例であるように、非共有IMP/MC複合体が、イオン結合(静電気的)、非共有IMP/MC複合体が、疎水的相互作用、水素結合、ワン・デンワールス引力などを含む何らかの非共有結合又は相互作用又は2以上の異なる相互作用の組み合わせにより結合することができる。

【0130】

好みしい非共有IMP/MC複合体が、疎水性又は静電気的(イオン的)相互作用又はその組み合わせ(たとえば、MCに結合されるオリゴヌクレオチドとポリヌクレオチドとの塩基対に介して、接合対から使用する)により典型的に複合される。ポリヌクレオチドの骨格の親水性的性質により、複合体を形成すべき疎水性相互作用によるIMP/MC複合体が、高い疎水的成分を組み入れるための複合体のオリゴヌクレオチド部分の修飾が必要である。好みしくは、疎水性成分は、生物的に適合可能な非免疫原であり、そして組成物を意図(たとえば、哺乳動物に、特にヒトに見出される)する個体に於いて天然に形成する。好みしい疎水性成分の例では、脂質、コレステロールなどのステロイド、及びテルペンスが含まれる。オリゴヌクレオチドに疎水性成分を結合する方法は、もちろんオリゴヌクレオチドの構造及び疎水性成分の同定に依存する。疎水性成分を、オリゴヌクレオチドの従来の部位のいずれかに付加することができ、好みしくは5'又は3'のいずれかであり、すなわちオリゴヌクレオチドにコレステロール成分を付加する場合、コレステロール成分を、従来の化学反応を用いて(Godardら(1995)Eur.J.Biochem.232:404-410を参照)オリゴヌクレオチドの5'末端に加えることが好みしい。好みしくは疎水性結合により結合されたIMP/MC複合体において使用するためのマイクロキャリアーは、疎水性成分を組み入れるよう修飾された疎水性材料が同様に使用できるが、油滴又は疎水性ポリマーなどの疎水性材料から作成される。マイクロキャリアーがリポソーム、又はルーメン(lumen)を含む他の液相である場合、IMP/MC複合体が、MCの調製過程中オリゴヌクレオチドのカプセル化を避けるために、MCの調製の後オリゴヌクレオチドとMCとを混合することにより、形成される。

【0131】

非共有結合のIMP/MC複合体が、ポリヌクレオチド骨格の強い陰性電荷を典型的に示す電気結合により結合した。したがって、非共有的に結合されたIMP/MC複合体において使用するためのマイクロキャリアーが、生理的なpH(たとえば約6.8乃至7.4)にて、通常陽性に荷電(陽イオン)される。マイクロキャリアーが、正電荷を固有に保持することができるが、通常正電荷を有しない化合物から作成されるマイクロキャリアーが、正に荷電するよう(たとえば陽イオン)誘導化することができ、そうでなくとも修飾することができる。たとえば、マイクロキャリアーを作成するために用いられるポリマーは、1級アミンなどの正の荷電した基を付加するよう誘導することができる。選択肢として製作中のマイクロキャリアーが形成される時、正に荷電した化合物を、組み入れることができる(たとえば、正に荷電した界面活性剤が、たとえば実施例2に記載されているように、得られたマイクロキャリアー粒子上に正電荷を与えるため、ポリ(乳酸)/ポリ(グリコール酸)の共重合を製造する期間に使用することができる)。従って、マイクロキャリアーが正に荷電した成分を含むことができる。

【0132】

本明細書に記載されているように、正電荷マイクロキャリアーを調製するために、正電荷脂質又はポリマー、たとえば1,2-ジオレイル-1,2,3-トリメチルアンモニオプロパン(DOTAP)、セチルトリメチルアンモニウム・プロマイド(CTAB)又はポリリシンが、これらの相における溶解性につき、DPかCPのいずれかに加えられる。

【0133】

本明細書記載のように、IMP/MC複合体が、オリゴヌクレオチドのインキュベーションによる陽イオン性微小球体、及び粒子上に、好みしくは水性混合液において吸着させるこ

10

20

30

40

50

とにより行うことができる。こうしチンキュベーションは、常温(室温)(たとえば約20 )を含む所望の条件のいずれかにて、又は冷凍下(役4 )にて行われる。陽イオン微小球体及びオリゴヌクレオチドが、比較的早く会合することから、インキュベーションが、1昼夜以上のインキュベーションを含めて、5, 10, 15分、又はそれ以上の期間など、従来のどの期間でも可能である。たとえば、5'-CG-3'を含むオリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドと粒子を4 で一昼夜水性によるインキュベートによる、陽イオン微小球体上に吸着させることができる。しかしながら、陽イオン微小球体及びオリゴヌクレオチドを、同時に会合することから、IMP/MC複合体を、オリゴヌクレオチド及びMCの単純な共投与することにより形成することができる。微小球体が、オリゴヌクレオチドの結合前後のサイズ、及び表面の電荷に対し特徴付けられる。

10

## 【0134】

次に選択されたバッヂにより、本明細書記載のように、たとえば確立されたヒト末梢血単核細胞(PBMC)及びマウスの脾細胞アッセイにおいて、適切なコントロールに対する活性を評価することができる。生成物質が、適切な動物のモードにて評価することが可能である。他の例における、結合対を、IMP/MC複合体にオリゴヌクレオチドとMCとを結合させるため、使用することができる。結合対は、リセプターとリガンド、抗体と抗原(又はエピトープ)、又は高い親和性(たとえば約 $10^{-8}$ より少ない $K_d$ )にて結合する他の結合対のいずれかにて良い。好ましい結合対の型の1つが、極めて強固な複合体を形成する、ビオチンとステップアップジン、又はビオチンとアビジンである。IMP/MC複合体の結合を介在するために、結合塩基対を使用する場合、オリゴヌクレオチドが、結合対の1つの部材を共に、共有的に結合することにより典型的に誘導され、そしてMCが、結合対の別の部材により誘導される。2つの誘導された化合物を混合することにより、IMP/MC複合体を成形する。

20

## 【0135】

多くのIMP/MC複合体の例は抗原を含まない、そして特定例では、IMP/MC複合体治療の目的である病気又は疾患と関連する抗原を排除する。さらなる例において、オリゴヌクレオチドが、1又は複数の分子にも結合される。たとえば、WO 98/16247に記載されているように、抗原を、共有結合及び/又は非共有結合に相互作用を含む、種々の方法にてIMP/MC複合体のオリゴヌクレオチド部分と結合することができる。選択肢として抗原を、マイクロキャリアーに結合して良い(直接的か間接的かのいずれか)。マイクロキャリアーに抗原を結合することは、技術的に知られた多くの方法のいずれかにより行うことができ、それが、直接的共有結合、架橋成分を介した共有結合(スペーサー・アームを含む)、特定結合対(たとえばブオチンとアビジン)を介した非共有結合、及び静電気又は疎水性結合を介した非共有結合が含まれるが、それに限定されない。

30

## 【0136】

オリゴヌクレオチドに結合される抗原を含むIMP/MC複合体における抗原とオリゴヌクレオチドの間の結合を、オリゴヌクレオチドの3'又は5'にて、又はオリゴヌクレオチドにおける内部位置にいける適切に修飾された塩基にて行うことができる。抗原が、ペプチドであり、そして適切な反応基(たとえばN-ヒドロキシスクシンイミド・エステル)を含む場合、シトシン残基のN<sup>4</sup>アミノ基と直接反応することができる。オリゴヌクレオチドの数及び位置により、1又は複数の残基での特異的な結合を実現することができる。

40

## 【0137】

選択肢として、技術的に知られている修飾されたヌクレオシド又はヌクレオチドが、末端又はオリゴヌクレオチドの内部位置に組み込むことができる。これらは、ブロックされた官能基を含むことができ、そしてブロックが解除されると関係する抗原上に存在可能なもの、あるいは結合可能な種々の官能基と反応する。

## 【0138】

抗原がペプチドである場合、この結合部分が、固体支持化学を介してオリゴヌクレオチドの3'末端に結合することができる。たとえば、オリゴヌクレオチド部分が、担体上に前合成されたポリペプチド部に付加することができる。Haralambidisら(1990a)Nucleic Acids Res.18:498-499:and Haralambidisら(1990b)Nucleic Acids Res.18:501-505を参照。

50

選択肢として、オリゴヌクレオチドを、3'末端から伸長する切断可能なリンカーを介して固体支持体に結合されるよう、合成することができる。支持体からオリゴヌクレオチドの化学的切断により、末端のチオール基が、オリゴヌクレオチドの3'末端にて残される(Zuckermannら(1987)Nucleic Acids Res.15:5305-5321; and Coreyら(1987)Science 238:1401-1403を参照)又は末端のアミノ基が、オリゴヌクレオチドの3'末端にて残される(Nelsonら(1989)Nucler.Acids Res.17:1781-1794を参照)。ペプチドのアミノ基にアミノにて修飾されたオリゴヌクレオチドとの結合が、Benoitら(1987)Neuromethods 6:43-72に記載のように、実現することができる。ペプチドのカルボキシル基にチオールにて修飾されたオリゴヌクレオチドの結合は、Sinhaら(1991),pp.185-210,Oligonucleotide Analogues:A Practical Approach, IRL Pressにて記載されているようにして行うことができる。ペプチドのシトシン残基のチオール側鎖に付加されるマレイミド移送するオリゴヌクレオチドの結合が、さらに記載されている。Tungら(1991)Bioconjug.Chem.2:464-465を参照。

10

20

## 【0139】

結合物のペプチド部分が、合成期間のオリゴヌクレオチドに組み入れられてきたアミン、チオール、又はカルボニル基を介してオリゴヌクレオチドの5'末端に結合することができる。好ましくは、オリゴヌクレオチドが固体支持体に固定され、一方の末端に保護されたアミン、チオール、又はカルボニル基を含む結合基、もう一方の末端にホスホロアミダイトが、5' -ヒドロキシル基に共有的に結合される。Agrawalら(1986)Nucleic Acids Res.14:6227-6245; Connolly(1985)Nucleic Acids Res.13:4485-4502; Kremskyら(1987)Nucleic Acids Res.15:2891-2909; Connolly(1987)Nucleic Acids Res.15:3131-3139; Bischoffら(1987)Anal. Biochem.164:336-344; Blanksら(1988)Nucleic Acids Res.16:10283-10299; and U.S.Patent Nos.4,849,513,5,015,733,5,118,800, and 5,118,802を参照。脱保護の後、アミン、チオール、又はカルボニルの官能基が、ペプチドにオリゴヌクレオチドを共有的に結合するよう使用することができる。Benoitら(1987); and Sinhaら(1991)を参照。

さらにオリゴヌクレオチドと抗原の結合が、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合及び/又はワン・デン・ワールス引力などの非共有的な相互作用を介して形成することができる。

30

40

50

## 【0140】

非共有的に結合された結合物質には、ビオチン-ストレプトアビジン複合体などの非共有相互作用を含むことができる。ビオチニル基が、たとえばオリゴヌクレオチドの修飾された塩基に結合することができる。Rogetら(1989) Nucleic Acids Res.17:7643-7651を参照。ペプチド部分にストレプトアビジンの組み入れることにより、ストレプトアビジンと結合したペプチド及びビオチン化オリゴヌクレオチドの非共有結合複合体を形成することができる。

## 【0141】

さらに非共有的な会合が、荷電したアミノ酸などの抗原内のオリゴヌクレオチド及び残基を含むイオン相互作用を介し、又はオリゴヌクレオチドと抗原との両方による相互作用することのできる荷電した残基を含む結合部分を使用することにより、形成することができる。たとえば非共有結合が、通常負に荷電したオリゴヌクレオチドとペプチド、たとえばポリリシン、ポリアルギニン、及びポリヒスチジン残基の正に荷電したアミノ酸残基の間に起こり得る。

オリゴヌクレオチドと抗原との間の非共有結合が、これらの天然のリガンドとしてDNAと相互作用する分子のDNA結合モチーフにより起こり得る。たとえば、こうしたDNA結合モチーフが、転写因子及び抗-DNA抗体において見出すことができる。

## 【0142】

標準的方法を用いて、脂質にオリゴヌクレオチドを結合させる。これらの方法は、オリゴヌクレオチドとリン脂質の結合(Yanagawaら(1988)Nucleic Acides Symp.Ser.19:189-192を参照)、オリゴヌクレオチドと脂肪酸の結合(Grabareckら(1990)Anal.Biochem.185:131-135; and Starosら(1986)Anal.Biochem.156:220-222参照)及びオリゴヌクレオチドとステ

ロールの結合(Boujradら(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:57728-5731を参照)が含まれるが、それに限定されない。

#### 【0143】

オリゴ多糖類に対するオリゴヌクレオチドの結合が、標準的周知な方法にて形成される。これらの方には、オリゴヌクレオチドとオリゴ多糖類の結合体の合成を含むがそれに限定されず、ここでオリゴ多糖類が、免疫グロブリンの成分である。O'Shannessyら(1985)J.Applied Biochem.7:347-355を参照。

#### 【0144】

ペプチド又は抗原に環状オリゴヌクレオチドの結合は、幾つかの方法にて形成することができる。環状オリゴヌクレオチドが、組み換え又は化学方法を用いて合成される場合、修飾されたヌクレオシドが適切である。Ruth(1991),pp.255-282,in Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach IRL Pressを参照。次に標準的な結合技術が、抗原又は他のペプチドに環状オリゴヌクレオチドを結合するように使用することができる。Goodchild(1990)Bioconjug.Chem.1:165を参照。ここで、環状オリゴヌクレオチドが単離されるか、又は組み換え又は化学的方法を用いて合成される場合、その結合が、抗原又は他のペプチドに組み入れられる、化学的活性又は光活性化反応基(たとえばカルベン・ラジカル)により形成される。

#### 【0145】

オリゴヌクレオチドにペプチド及び他の分子を結合するためのさらなる方法は、U.S. Patent No.5,391,723;Kessier(1992)「Nonradioactive labeling methods for nucleic acids」in Kricka(ed.) Nonisotopic DNA Probe Techniques,Academic Press:and Geogheganら(1992)Bioconjug.Chem.3:138-146に見出すことができる。

#### 【0146】

##### 本発明の方法

本発明は、免疫応答の所望の調節が行はれるよう個体にIMP/MC複合体(典型的に複合体及び医薬的に受け入れ可能な賦形剤)に投与することを含む、個体に、好ましくは哺乳動物に、より好ましくはヒトに対する免疫応答を調節するための方法を提供する。免疫調節には、Th1型免疫応答を刺激すること、及び/又はTh2型免疫応答を阻害又は減少させることができ、含まれる。本明細書に記載されるように、免疫応答の調節が、液性及び/又は細胞性でも良く、そして技術的に標準的な技術を用い、そして本明細書に記載のように測定される。

#### 【0147】

幾つかの例において、免疫調節は、IFN- $\gamma$ 、IL-12及び/又はIFN- $\alpha$ などの(すなわち1又は複数の)Th1-関連サイトカインを刺激することを含む。これらのパラメータを測定するには、技術的に標準的な方法が用いられ、そして本明細書にも記載されている。本明細書に記載されているように、さらにIMP/MCの投与としては、サイトカイン、アジュvant、及び抗体を含むがそれに限定されない又は複数の追加的な免疫治療剤(すなわち、免疫系を介して作用し、及び/又は免疫系から誘導される誘導される)の投与が含まれる。治療抗体の例は、ガン関係(たとえば抗腫瘍抗体)において使用されるものを含む。こうした付加的な免疫治療剤の投与が、本明細書に記載された全ての方法に適用する。

#### 【0148】

特定例において個体は、アレルギー又はアレルギーに誘導される喘息など、Th2型免疫応答に関連する疾患を受ける。IMP/MC複合体を投与することで免疫調節が生じ、1又は複数のTh1型応答関連サイトカインのレベルが増大し、アレルゲンに対する個体の応答と関連したTh2型応答特性の減少をもたらす場合がある。

#### 【0149】

Th2型応答関連疾患に伴う個体を免疫調節すれば、1又は複数の疾患における症状が減少又は改良される。疾患がアレルギー又はアレルギー誘導喘息の場合、1又は複数の症状を改良するには、1又は複数の以下のような、すなわち鼻炎、アレルギー性結膜炎、IgEの循環レベル、ヒスタミンの循環レベルの減少、及び/又は「救出(rescue)」の吸入治療(た

10

20

30

40

50

とえば用量の計量される吸入器、又は噴霧器)のための必要性が含まれる。

【0150】

さらなる例において、本発明の免疫調節治療に対する個体の課題は、ワクチンを受けている個体である。そのワクチンは、予防ワクチン又は治療ワクチンでも良い。予防ワクチンは、個体が危険となる可能性のある(たとえば結核を予防するためのワクチンとしてのM.tuberculosis)疾患に関連する1又は複数のエピトープを含む。治療ワクチンでは、結核患者のM.tuberculosis又はM.bovis表面の抗原、アレルギーに曝す個体において上記個体がアレルギーになる抗原(アレルギー脱感作治療)、ガンに罹っている個体からの腫瘍細胞(米国特許番号5,484,596)、又はガン患者における腫瘍関連細胞など、個体に影響を与える特定疾患に関連した1又は複数のエピトープが含まれる。IMP/MC複合体を、ワクチンと結合して与えても良く(たとえば同じ注入又は同時ではあるが分けて注入)、又はIMP/MC複合体を、分けて投与しても良い(たとえば、ワクチンの投与前後少なくとも12時間)。特定の例において、ワクチンの抗原が、IMP/MC複合体に対し共有結合、又は非共有結合のいずれかによるIMP/MC複合体の1部分である。ワクチンを受ける個体に対するIMP/MC複合体を投与する療法が、IMP/MC複合体のないワクチンを受ける個体と比較して、Th1型応答の方にシフトするワクチンに免疫応答を引き起こす。Th1型応答の方へのシフトは、INF- 及び他のTh1型応答関連のサイトカインの増大、INF- の増大、ワクチンの抗原に対し特異的なCTLの産生、ワクチンの抗原に対し特異的なIgEのレベルの低下又は減少、ワクチンの抗原に対し特異的なTh2関連抗体の減少、及び/又はワクチンの抗原に対し特異的なTh1関連抗体の増大を、ワクチンにおける抗原への遅延型過敏症(DTH)応答により認識することができる。治療ワクチンの場合、さらにIMP/MC複合体及びワクチンを投与することにより、ワクチンを治療に意図されている疾患の症状が改善するようになる。当業者に明らかになるように、これらの改善のための正確な症状及び方法が、治療するよう求められる疾患に依存することになる。たとえば、治療ワクチンが、結核向けたものであり、ワクチンを伴うIMP/MC複合体の治療では、咳、腹膜又は胸壁の苦痛、熱及び/又は技術的に知られたその他の症状が軽減する。ワクチンが、アレルギー性脱感作治療に使用されるアレルゲンであると、こうした治療により、1又は複数のアレルギー症状(たとえば、鼻炎、アレルギー結膜炎、循環レベルでのIgE、及び/又は循環レベルでのヒスタミンが減少)が減少することになる。

【0151】

本発明の他の例は、前から存在するガンや感染性疾患など病気又は疾患有する個体の免疫調節治療に関する。ガンは免疫調節のための魅力的な標的であり、その理由は、ほとんどのガンが、体内における他の細胞に見出されない腫瘍関連及び/又は腫瘍特異的抗原を発現するからである。腫瘍細胞に対するTh1型応答を刺激すると、免疫系により腫瘍細胞を直接に、及び/又は間接的に殺すことになり、がん細胞の減少及び症状の減少を導く。ガンを有する個体にIMP/MC複合体を投与すると、腫瘍細胞に対しTh1型免疫応答を刺激することになる。細胞免疫系の細胞(たとえば、CTLs)又は体液免疫系の組成物の直接作用により、又は免疫系により標的とされる細胞に隣接する細胞に影響を及ぼすバイスタンダー(bystander)のいずれかにより、こうした免疫応答が腫瘍細胞を殺すことができる。ガン関連においてさらにIMP/MC複合体の投与には、たとえば抗-腫瘍抗体、化学治療形態、及び/又は放射線治療などの付加的な1又は複数の療法剤の投与が含まれる。抗腫瘍抗体の断片及び/又はその誘導体、及びモノクロナール抗-腫瘍抗体、断片及び/又はその誘導体を含むがそれに限定されない抗腫瘍抗体が、ガン治療(たとえばRituxan(商標)(rituximab); Herceptin(商標)(trastuzumab)において、こうした抗体試薬を投与することとして、技術的に知られている。1又は複数の付加的な治療治療剤の投与は、IMP/MC複合体を投与する前、後、及び/又は同時に起こすことができる。

【0152】

さらに本発明による免疫調節治療が、感染性疾患、特に体液性免疫応答(たとえばマイコバクテリア及び細胞内の病原体により起こる疾患)に抵抗する感染性疾患に罹っている個体に対し有益である。免疫調節治療は、細胞病原体(細菌又は原虫)又は非細胞の病原体

10

20

30

40

50

(例えばウイルス)により引き起こされる感染性疾患の治療のため使用することができる。IMP/MC複合体による治療が、結核など(たとえば結核菌及び/又はボビス(*M. bovis*)菌による感染)、ライ病(ライ菌による感染)、マリナム菌(*M. marinum*)又はウルサラン菌(*M. ulcerans*)の感染などのマイコバクテリア疾患に罹っている個体に投与することができる。さらにIMP/MC複合体治療が、インフルエンザ・ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、肝ウイルスB、肝ウイルスC、ヘルペスウイルス、特に単純ヘルペスウイルス、及び乳頭種ウイルスによる感染を含む、ウイルス感染の治療に有益である。

#### 【0153】

マラリアなど(たとえば、*Plamodium vivax*, *P. ovale*, *P. faciparum* and/or *P. malariae*による感染)、リーシュマニア症(*Leishmania donovani*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. Peruviana*, *L. infantum*, *L. chagasi*, and/or *L. aethiopica*により感染)、及びトキソプラズマ症(すなわちToxoplasmosis gondiiによる感染)などの細胞内の寄生細菌により起こる疾患が、さらにIMP/MC複合体治療の恩恵が受けられる。さらにIMP/MCの治療では、住血吸虫症(すなわち、*S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, and *S. mekogi*などの住血吸虫属のblood flukesにより感染)、及び肝吸虫症(すなわち、*Clonorchis sinensis*による感染)などの寄生細菌の治療が有益である。感染疾患に罹っている個体に、IMP/MC複合体を投与すると、感染性疾患の1又は複数の症状が回復することになる。本明細書に示すように、幾つかの例において感染性疾患が、ウイルス疾患でない。

#### 【0154】

さらに本発明が、IL-2、IL-12、TFN-, 及びIFN- $\gamma$ を含む、個体における少なくとも1つのTh1関連サイトカインを増大させる方法を提供する。特定例において本発明は、特にIFN- $\gamma$ レベルの増大を必要とする個体において、その個体にIMP/MC複合体の有効量を投与することにより、前記個体におけるIFN- $\gamma$ を増大させる方法を提供する。IFN- $\gamma$ の増大を個体が、IFN- $\gamma$ の投与に応答する疾患有する個体である。こうした疾患には、腫瘍性大腸炎を含むがそれに限定されない多くの炎症性疾患が含まれる。さらにこうした疾患には、特発性肺線維症(IPF)、強皮症、皮膚放射に誘発される線維、住血吸虫症にて誘発された肝線維を含む肝線維、腎線維、及びIFN- $\gamma$ の投与にて改善可能なその他の症状を含むがそれに限定されない多くの線維疾患を含む。本発明によりIMP/MC複合体を投与すると、IFN- $\gamma$ のレベルが増大し、1又は複数の症状の改善、1又は複数の症状の安定化、IFN- $\gamma$ に応答する疾患の進行を防止すること(付加的な損傷又は症状の減少又は除去)になる。本発明の方法が、IPFにおける全身系コルチコステロイド治療(たとえば、コルチゾン)などの抗-炎症剤を投与などの疾患をケアする基準を構成する他の療法と組み合わせて行うことができる。

#### 【0155】

特定例において本発明が、IFN- $\gamma$ のレベルが増大するよう個体にIMP/MC複合体の有効量を投与することにより、特にIFN- $\gamma$ のレベルの増大が必要な個体において、上記個体にIFN- $\gamma$ を増大させる方法を提供する。IFN- $\gamma$ の増大を必要とする個体が、ウイルス感染及びガンを含むがそれに限定されない、組み換えIFN- $\gamma$ を含むIFN- $\gamma$ の投与に応答する疾患有する個体である。従って、本発明によるIMP/MC複合体を投与すると、IFN- $\gamma$ レベルの増大が生じ、そして1又は複数の症状の改善、1又は複数の症状の安定化、又はIFN- $\gamma$ に応答する疾患の進行の阻止(たとえば、付加的な病巣又は症状の減少又は除去)するようになる。本発明の方法は、ウイルス感染のための抗ウイルス剤を投与するなど疾患のための標準的ケアを構成する他の治療と組み合わせて、行うことができる。

#### 【0156】

さらに提供されるものは、IgEのレベルが減少されるように個体にIMP/MC複合体の有効量を投与することにより、IgE関連の疾患有する個体にIgEのレベル、特にその血清レベルを減少させる方法である。IgEが減少すれば、IgE関連疾患の症状が改善することになる。こうした症状は、アレルゲンに対する過敏性の減少、アレルギーを有する個体にアレルギー症状の低減、又はアレルギー応答の重篤度の低減において、鼻炎、結膜炎などのアレルギー症状を含む。

10

20

30

40

50

## 【0157】

当業者に明らかなように、本発明の方法は、IMP/MC複合体が投与される特定指示に対し、他の治療法と組み合わせて行うことができる。たとえばIMP/MC複合体による療法が、マラリヤ患者に対しクロロキニンなどの抗-マラリヤ薬剤と連係して、リシューマニア症患者に対してペニタミジン及び/又はアロブリノールなどのリシューマニア症薬剤と連係して、結核患者においてイソニアシド、リファンピン及び/又はエタンブトールなど抗-マイコバクテリアル薬剤と連係して、又はアトピー(アレルギー)患者に対しアレルゲン脱感作療法と連係して、投与することができる。

## 【0158】

免疫応答としての投与及び評価

10

IMP/MC複合体が、他の医薬剤及び/又は免疫原及び/又は免疫調節薬剤と組み合わせて投与することができ、その生理的に受け入れ可能な担体と組み合わせることができる。

## 【0159】

従ってIMP/MC複合体が、サイトカイン、アジュバント、及び抗体を含むがそれに限定されない他の免疫治療剤と連係して投与することができる。

## 【0160】

IMP/MC複合体が、IMP/MCが活性である限り、上記のようにオリゴヌクレオチドとMCの何らかの組み合わせを含むことができる。一般的に幾つかの例において、IMP/MC複合体が、それが、活性の少なくとも1つのアッセイにおいて、ネガチブ・コントロールの活性を、少なくとも約2回、好ましくは少なくとも約3回、より好ましくは、少なくとも約5回、さらに好ましくは少なくとも約10回(すなわち、*in vitro*, *in vivo*及び/又は*ex vivo*において測定されたような計測可能な免疫応答に影響を与える)の活性を有するなら、活性と考える。測定可能な免疫応答を評価する方法が、技術的に知られており、本明細書に開示されたヒトPBMCアッセイを含む。

20

## 【0161】

IMP/MC複合体のオリゴヌクレオチドが、上記のいずれでも良い。好ましくは、投与される7量体オリゴヌクレオチドが、配列5'-T,C,G-3'を含む。別の好ましい例は、配列5'-C G-3'を含み、さらに配列5'-TCG-3'を含むヌクレオチドを使用する。別の好ましい例は、5'-TCGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3', 5'-X<sub>1</sub>TCGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3', 5'-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TCGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-3'から成る群から選択される配列から成り、ここでX<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>がヌクレオチドである、オリゴヌクレオチドを使用する。

30

## 【0162】

免疫原組成物にかかわらず、特定のIMP/MC複合体の成形物を投与する免疫的な有効量及び投与する方法は、その状態が、当業者に治療可能であり、そのほかの要因が明らかな個体に基づいて変化する。考えられる要因は、抗原性、IMP/MC複合体がアジュバント又は導入分子を伴い投与されるか、又は共有的に結合されるか、投与経路、及び投与される免疫化投与量の数により投与され、それと共有的に結合される。こうした因子が、技術的に周知であり、過剰な実験をすることなくこうした決定を行うための技術的に十分な範囲内である。適切な投与範囲が、抗原に対する免疫応答の所望の調節を提供する範囲である。一般的に投与量が、IMP/MC複合体の全体量以外、患者に投与されるオリゴヌクレオチドの量により決定される。所定の誘導されるオリゴヌクレオチドの量において、IMP/MC複合体の有益な投与量範囲が、以下のいずれかより: 0.1 to 100 μg/kg, 0.1から50 μg/kg, 0.1から25 μg/kg, 0.1から10 μg/kg, 1から500 μg/kg, 100から400 μg/kg, 200から300 μg/kg, 1から100 μg/kg, 100から200 μg/kg, 300から400 μg/kg, 400から500 μg/kgにて可能である。選択肢として、その用量が、以下、つまり0.1 μg, 0.25 μg, 0.5 μg, 1.0 μg, 2.0 μg, 5.0 μg, 10 μg, 25 μg, 50 μg, 75 μg, 100 μgのいずれかにて可能である。

40

## 【0163】

従って用量範囲が、下限では以下の、つまり0.1 μg, 0.25 μg, 0.5 μg, 1.0 μg、そして上限では以下の、つまり25 μg, 50 μg, 100 μgの範囲にて可能である。各患者に与えられる絶対量は、投与における生物的利用性、許容度、及び投与経路などの薬理的特性に依存する。

50

## 【0164】

特定IMP/MC複合体形成物の投与する有効量及びその方法が、個体患者、及び当業者に明らかな疾患の段階、及びその他の要因に基づいて変化する。具体的な適応に有益な投与経路は、当業者に明らかである。投与経路は、経気管支の、及び経歯膿を含む、局所、皮膚、経皮性、経粘膜、上皮、非経口、胃腸、鼻咽頭及び肺を含むがそれに限定されない。適切な投与範囲が、血液のレベルにて測定されるように約1乃至10 $\mu$ Mの組織濃度を達成するためには十分なオリゴヌクレオチド組成物を提供する範囲である。各患者に与えられる絶対量が、投与における生物的利用性、許容度、及び投与経路などの薬理的特性に依存する。

## 【0165】

本明細書に記載されたように、APC及び高濃度のAPCの組織が、IMP/MC複合体のための好ましい標的である。従って、APCが比較的に高い濃度にて存在する場合、哺乳動物の皮膚及び/又は粘膜にIMP/MC複合体を投与することが、好ましい。

## 【0166】

本発明は、生理的に受け入れ可能な移植片、軟膏、クリーム、リンス及びゲルを含むが、それに限定されない局所的な塗布に適切なIMP/MC複合体の生成物を提供する。局所投与は、たとえば、導入系をそこに分散させた着けるか又は包帯状に巻くことにより、又は切開した、又は開いた創傷に導入系を直接投与することにより、又は関係する部位誘導する経皮下投与装置による。IMP/MC複合体をそこに分散するクリーム、リンス、ゲル、又は軟膏が、局所軟膏、又は創傷を満たす薬としての使用に適している。

## 【0167】

皮膚投与の好ましい経路は、少なくとも侵襲性のある経路である。これらの手段のうち好ましいのは、経皮による移送、上皮投与、および皮下注入である。これらの手段のうち、上皮投与が、皮下組織にあると予測される有意に高い濃度のAPCに対して好ましい。

## 【0168】

経皮投与は、IMP/MCの複合体を皮膚から血流に入ることのできるように、クリーム、リンス、ゲルなどを塗布することにより行はれる。経皮投与に適した組成物が、皮膚に直接塗布され、又は皮下投与装置(いわゆる「パッチ(patch)」)などの保護性担体に組み入れられる薬理的に受付け可能な懸濁物、オイル、クリーム、および軟膏を含むが、それに限定されない。適切なクリーム、軟膏などの例は、たとえばPhysician's Desk Referenceにおいて見出すことができる。

## 【0169】

経皮移送に対してイオン浸透療法が適切な方法である。イオン浸透による移送が、移送物質が、数日以上の日数の期間に、破壊されていない皮膚を介して継続的に生成する商業的に入手可能な頒布剤を用いて行うことができる。この方法を使用すると、比較的高い濃度にて薬理的組成物の移送を制御することができ、滲出性の薬剤を組み合わせることができ、そして吸着化促進剤を同時に使用することができる。

## 【0170】

本方法において使用するための典型的な頒布剤では、General Medical Company of Los Angeles, CAの商標製品としてLECTRO PATCH(商標)がある。この製品は、貯槽電極のpHを中性に、電気的に保持し、連続的及び/又は周期的な投与量とするように、異なった濃度での用量を提供するように、適用することができる。この頒布剤の調製及びその使用は、LECTRO PATCH製品に付随した製造業者が印刷した指示により、すなわち引例として本明細書に組み入れられているこれらの指示により行うべきである。他の貯蔵性頒布系が、さらに適切である。

## 【0171】

経皮性移送には、さらに低周波超音波誘導が、適切な方法である。Mitragotriら(1995)Science 269:850-853を参照。低周波の超音波周波数(約1MHz)を印加すると、高分子量の組成物を含め、通常治療組成物の移送を制御することができる。

## 【0172】

10

20

30

40

50

上皮投与では、刺激物質に免疫応答を十分惹起するよう上皮の最外層を機構的又は化学的に刺激することが特に含まれる。特にその刺激は、刺激部位にAPCを十分に引き付けるべきである。

【0173】

典型的な機構的な刺激手段としては、皮膚を刺激するよう使用できる、複数の直径が極めて細くて短いチンを用い、そして刺激部位にAPCを引き付け、そのチンの末端から移送されるIMP/MC複合体を構成する。たとえば、Pasteur Merieux of Lyon, Franceにより作成されたMONO-VACC旧ツベリクリン試験では、IMP/MC複合体を含む組成物を導入するための適切な装置が含まれる。

【0174】

その装置(Connaught Laboratories, Inc. of Swiftwater, PAにより米国に配布された)が、一端でシリンジ・プランジャーを有し、他端にてチン・ジスクを有するプラスチック容器から成る。チン・ジスクは、上皮細胞の最外層を引っ掻いて複数の細い径の長さのチンを支持する。MONO-VACCキットにおける各チンは、旧ツベリクリンにて被覆され、すなわち本発明において各針が、IMP/MC複合体の生成物の薬理的組成物にて被覆される。装置の使用において、装置製品にて含まれる製造者の書面による指示書によることが、好ましい。さらに本例に用いることのできる同様の装置が、アレルギー試験を行うために新たに用いられる装置である。

【0175】

IMP/MC複合体の上皮からの投与に対するその他の適切な方法は、上皮の最外層を刺激する化学的方法を使用することによる、したがってその領域にAPCを引き付けるため、十分な免疫応答を惹起する。試料は、商標NAIRに基づくNoxema Corporationにて販売された商業てきに入手できる局所脱毛クリームにおいて販売されるサルチル酸などのケラチオサイト剤である。さらにこの方法は、粘膜に上皮投与を行うためにも使用できる。さらに化学的刺激が、機械的刺激(たとえば、さらにMONO-VACC型チンが、化学的刺激剤にて被覆された場合、引き起こるものとして)と連係して適用することができる。IMP/MC複合体が、化学刺激剤も含む担体において懸濁可能であり、又はそれと共に同時に投与することもできる。

【0176】

投与の非経口経路が、電気的(微小電気泳動法)、又は中央静脈系に直接注入、静脈内の、筋肉内の、腹腔内の、皮内の、又は皮下の注入などの直接注入法を含むがそれに限定されない。非経口投与のために適切なIMP/MC生成物が、USP水又は注入のための水にて通常処方され、そしてpH緩衝液、塩のバルキング剤、防腐剤及び他の薬理的に受け入れ可能な賦形剤をさらに含むことができる。非経口注入するためのIMP/MC複合体は、注入のため生理食塩水及びリン酸緩衝の生理食塩水などの薬理的に受け入れ可能な滅菌性、等浸透性溶液にて、処方することができる。

【0177】

投与の胃腸経路は、摂取と直腸を含むがそれに限定されない。本発明は、薬理的に受け入れ可能な粉末、ピル又は摂取のための液状、及び直腸からの投与のための座薬を含んでいるが限定されない胃腸投与に適切なIMP/MC複合体生成を含む。当業者に明らかになるように、ピル又は座薬が、組成物のためバルクを提供するために、デンプンなど薬理的に受け入れ可能な固体をさらに含む。

【0178】

吸入により行はれる鼻咽頭より、及び肺への投与を含み、鼻内、経気管支、及び経歯膿経路など誘導経路を含む。本発明は、噴霧状態(aerosols)を形成するため懸濁状液体、及び乾燥粉末吸入誘導システムのための粉末形状を含むがそれに限定されない吸入による投与するために適切なIMP/MC複合体生成物を含む。IMP/MC複合体成形体を、吸入にて投与するための適切な装置は、噴霧器(atomizers)、蒸発器、ネブライザー(nebulizers)、及び乾燥粉末吸入誘導装置を含むがそれに限定されない。

【0179】

10

20

30

40

50

誘導経路の選択は、惹起された免疫応答を調節するために使用することができる。たとえば、インフルエンザ・ウイルスベクターが、筋肉内又は上皮(遺伝子ガン(gene gun))経路を介して投与された場合、IgGタイター及びCTL活性が同一であった、しかしながら、筋肉への摂取では主にIgG2aを生成したが、上皮経路ではほとんどIgG1を生成した。Pertmerら(1996)J.Viro.70:6119-6125を参照。従って当業者が、本発明の免疫調節オリゴヌクレオチドを投与する異なる経路により惹起される免疫原性のわずかな相違する利点を取ることができる。

#### 【0180】

上記組成物及び投与する方法は、本発明のIMP/MC複合体生成物を投与する方法の記載された意味であるがそれを限定していない。種々の組成物及び装置を製造するための方法は、当業者の能力の範囲内であり、そして本明細書に詳細に記載されていない。

#### 【0181】

IMP/MC複合体成形体に免疫応答の分析(定性分析と定量分析の両方)は、技術的に知られたいずれかの方法により可能であり、抗原特異的抗体の産生を測定(特異的抗体のサブクラスの測定を含む)、CD4+T細胞又はNK細胞などのリンパ球における特異的集団の活性化、IFN-, IFN-, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10又はIL-12及び/又はヒスタミン放出などのサイトカイン生成を含むがそれに限定されない。特異的抗体応答を測定するための方法は、酵素結合免疫溶媒アッセイ(ELISA)を含み、技術的に知られている。CD4+T細胞など特異型のリンパ球数の測定は、たとえば、蛍光活性化細胞選別機(FACS)にて行うことができる。細胞毒性試験は、Razら(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:9519-9523記載のように行うことができる。サイトカイン濃度が、たとえばELISAにより測定することができる。免疫原に対する免疫応答を評価するためのこれら、及び他のアッセイが、技術的に良く知られている。たとえば、Selected Methods in Cellular Immunology(1980)Mishell and Shiigi, eds., W.H.Freeman and Coを参照。

#### 【0182】

好ましくは、Th1型応答が刺激される、すなわち惹起及び/又は強化される。本発明に関し、Th1型免疫応答を刺激することが、ISSがなく処理されたものと比較して、ISSにて処理された細胞から産生するサイトカインを測定することにより、in vitro又はex vivoにおいて、決定することができる。細胞のサイトカイン産生を決定する方法では、本明細書に記載された及び技術的に周知なこれら の方法が含まれる。ISS処理に応答して産生されるサイトカインの型により、細胞による免疫応答にバイアスされるTh1型又はTh2型を明示する。本明細書に用いられているように、用語「Th1型バイアス」のサイトカイン産生物は、刺激のない場合のサイトカインの産生と比較して、刺激剤の存在するTh1型免疫応答に関連したサイトカインの計測可能な産生物の増大を言及している。こうしたTh1型バイアス・サイトカインの例は、IL-2, IL-12及びIFN- $\gamma$ を含むがそれに限定されない。対照的に「Th2型バイアス・サイトカイン」が、Th2型免疫と関連したものを指してしるが、IL-4, IL-5, 及びIL-13を含むがそれに限定されない。ISS活性の決定化に有益な細胞は、免疫系の細胞にて、宿主及び/又は細胞株から単離された主要細胞、好ましくはAPCs及びリンパ球、極めて好ましくはマクロファージ及びT細胞を含む。さらにTh1型免疫応答を刺激することは、IMP/MC複合体生成物により処理された宿主において測定することができ、そして技術的に周知ないすれかの方法により決定することができ、すなわち(1)抗原投与の前後に測定されたIL-4、又はIL-5のレベルが減少；又はISSがなく処理され、抗原にて感作され又は感作及び抗原投与されたコントロールとの比較して、IMP/MC複合体にて処理された宿主における低レベル(又は無い場合さえ)のIL-4又はIL-5を検知すること；(2)抗原投与する前後にIL-12, IL-18及び/又はIFN(、又は)のレベルの増大；又は抗原にて感作され、感作及び抗原投与され、ISSがなく処理されたコントロールとの比較して、IMP/MC複合体にて処理された宿主における高レベルのIL-12 IL-18及び/又はIFN(、又は)を検知すること、(3) ISSがなく処理されたコントロールに対する比較して、IMP/MC複合体にて処理された宿主における「Th1型バイアス」抗体産生；及び/又は(4)抗原投与の前後測定されたような抗原特異的IgEのレベルの減少；又は抗原にて感作され、感

10

20

30

40

50

作及び抗原投与され、ISSがなく処理されたコントロールとの比較として、IMP/MC複合体にて処理された宿主における低レベルの(又は無い場合さえ)抗原特異的IgEを検知すること、が含まれるがそれに限定されない。これら多様な決定を、本明細書に記載された、又は技術的に知られたいずれかの方法を用いて、in vitro又はex vivoにおいてAPCs及び/又はリンパ球、好ましくはマクロファージ及び/又は細胞により生成されるサイトカインを手段として、行うことができる。これらのいくつかの決定は、本明細書に記載された、又は技術的に知られたいずれかの方法を用いて、抗原特異的抗体の種又は亜種を測定することにより行うことができる。

#### 【0183】

IMP/MC複合体処理に応答して生成される抗原特異的抗体の種及び/又は亜種は、細胞によるTh1型又はTh2型でバイアスされる免疫応答を明示する。本明細書に用いられるよう、用語「Th1型バイアス」抗体の產生が、Th1型免疫応答(すなわちTh1関連抗体)と関連する抗体の測定可能な増大する產生を言及する。1又は複数のTh1関連の抗体を、測定することができる。こうしたTh1型バイアス抗体の例は、ヒトIgG1及び/又はIgG3(Widheら(1998)Scand.J.Immunol.47:575-581 and de Martinoら(1999)Anr.Allergy Asthma Immunol.83:160-164を参照)、及びネズミ(murine)のIgG2aを含むがそれに限定されない。対照的に「Th2型バイアス抗体」が、Th2型免疫応答に関連した抗体を言及し、そしてヒトIgG2,IgG4及び/又はIgE(たとえばWidheら(1998)and de Martinoら(1999)及びネズミ(murine)のIgG1及び/又はIgEを含むがそれに限定されない。

#### 【0184】

IMP/MC複合体投与する生成物の結果として生ずるTh1型バイアスによるサイトカインの誘導により、NK細胞、サイトカイン・キラー細胞、Th1ヘルパー細胞、及びメモリー細胞により行はれる細胞性免疫応答を高めることになる。特にこれらの応答は、ウイルス、菌、原虫、バクテリア、アレルギー疾患や喘息、および腫瘍に対して保護的又は治療的なワクチン化に使用に有益である。

#### 【0185】

幾つかの例において、Th2応答が抑制される。Th2応答の抑制が、たとえば、IL-4及びIL-5などのTh2関連のサイトカインのレベルの減少、及びIgEの減少、アレルゲンに応答したヒスタミン放出の減少により決定することができる。

#### 【0186】

本発明は、本発明の方法に使用するためのキットを提供する。特定例において、本発明のキットでは、IMP/MC複合体含む1又は複数の容器、および所望により意図される治療のため(たとえば、免疫調節、感染性疾患の1又は複数の症状を改善、IFN- $\gamma$ レベルを増大、IFN- $\alpha$ レベルを増大、又はIgE関連疾患の改善)IMP/MC複合体の使用に関するある種の指示、通常書面による指示が含まれる。

#### 【0187】

さらなる例において、本発明のキットが、IMP/MC複合体を產生するための物質の容器、IMP/MC複合体を產生するための指示書、及び所望による意図された治療のためのIMP/MC複合体の使用に関する指示を含む。たとえばIMP/MC複合体が、乾燥生成物(たとえば凍結乾燥又は乾燥粉末)である場合、弾性ストッパーを有する小型容器(vial)が通常用いられ、従ってIMP/MC複合体が、弾性ストッパーを介して注入することにより容易に再懸濁される。非弾性のアンプル、取り出し可能な密封容器(たとえば密封されたガラス)又は弾性ストッパーが、IMP/MC複合体の液体の形状のために最も都合よく使用される。さらに考えられることは、吸入器、鼻経由投与器(たとえば噴霧器)、又はミニポンプなどの侵出装置などの特定装置と組み合わせて使用するための総合課題である。

#### 【0188】

IMP/MCを產生するための物質を含むキットが、特定例における、MCを產生するための物質が、前に生成されたMCでなく供給されるものであるが、オリゴヌクレオチドおよびNCの分けた容器に含む。オリゴヌクレオチドおよびNCが、供給されるオリゴヌクレオチド及びMCを混合することにより、IMP/MC複合体を形成可能な形状にて、供給されるのが好ましい

10

20

30

40

50

。IMP/MC複合体が、非共有結合により結合される場合にこの構造が好ましい。さらにこのオリゴヌクレオチドやMCのいずれかが、異種2機能性架橋剤を介して架橋される場合、すなわち「活性化された」形状(たとえばオリゴヌクレオチドと反応性成分が利用できるよう異種2機能性架橋剤と結合された)にて供給されとさらに好ましい。

## 【0189】

固相MCを含むIMP/MC複合体用キットが、固相MCを生成するための物質を含む1又は複数の容器を含むことが好ましい。たとえば、陽イオン性MC用IMP/MCキットが、ポリマー及び正電荷表面活性剤を含む1又は複数の容器を含むことができる。容器の中身を、たとえば陽イオン性MCを生成するために乳化状に混合し、その後オリゴヌクレオチドと混合することができる。こうした物質には、ポリ(乳酸)/ポリ(グリコール酸)共重合体、陽イオン脂質容器、たとえばDOTAP、プラス水溶液相の1又は複数の容器(たとえば、薬理的に受け入れ可能な水性緩衝液)が含まれる。

## 【0190】

液相MCを含むIMP/MC複合体用キットが、液相MCを生成するための物質を含む1又は複数の容器を含むことが好ましい。たとえば、水中オイルから乳化状MCのためのIMP/MCキットが、オイル相及び水性相を含む1又は複数の容器を含むことができる。容器の中身は、MCを生成するため乳化され、次にオリゴヌクレオチドと混合することができ、疎水性成分組み入れるため、修飾されたオリゴヌクレオチドが好ましい。こうした物質は、水中オイルの乳化液を作成するためのオイル及び水、又は親脂質リポソーム成分(たとえば、リン脂質、コレステロール及び表面活性剤)プラス水性相の1又は複数の容器(たとえば薬理的受け入れ可能な水性緩衝液)を含む。

## 【0191】

意図された治療するためのIMP/MC複合体の使用に関する指示には、一般的に用量に関する情報、投与量計画、及び意図された治療するための投与経路が含まれる。オリゴヌクレオチドの容器は、単位用量、バルク・パッケージ(たとえば複数用量パッケージ)又はサブ単位用量で可能である。本発明のキットに提供される指示は、典型的にはラベル又はパッケージ挿入(たとえば、キット内に含まれる紙シート)の書面による指示であるが、機械的に読み取り可能な指示書(たとえば、磁気又は光記憶ジスク)にれ導かれる指示)も受け入れることができる。

## 【0192】

以下の実施例が、本発明の図面を提供するがそれに限定されない。

## 【0193】

## 実施例

## 【実施例1】

## 【0194】

## オリゴヌクレオチドの合成

ホスホロチオエイト・結合剤と配列5'-TCGTCGA-3'(配列番号:2)を有する7回反復の(7-mer)オリゴヌクレオチドを、Perseptive Biosystems Expedite 8909 automated DNA synthesizer上にて合成した。15μモルのホスホロチオエイトDNAの製造業者の方法を、以下の変化を伴い使用した:2.5分にわたるジクロロメタンに1.6mlの3%ジクロロ酢酸を、脱トリチル化工程に使用した;9:1のアセトニトリル:ピリジンに、1.1分にわたり0.02Mの3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン(ADTT)3.0ml、次に1.0mlの誘導体を1.0分にわたり硫化工程に使用した。ヌクレオシド・ホスホロアミダイト・モノマーを、アセトニトリル無水物において0.1M濃度に溶解した。その装置が、プログラム実行により所望の順序にてヌクレオチド・モノマーを付加し、その合成物が、3'から5'の方向に生じた。その合成サイクルがトリチル化工程、結合工程(ホスホロアミダイト・モノマー+1H-テトラゾール)、キャッピング工程、硫化工程、及び最終キャッピング工程から成る。

## 【0195】

そのアゼンブリーの完了で、「トリチル-オン」オリゴヌクレオチドを調節孔のガラスから切断し、その塩基を濃縮液化アンモニアにて、58にて16時間脱保護化した。

10

20

30

40

50

## 【0196】

7回反復の(7-mer)オリゴヌクレオチドが、0.1Mのトリエチルアンモニウム・アセテイトにアセトニトリルの成分を増大させて使用するPolymer Labs PLRP-Sカラム上RP-HPLCにより精製された。精製されたオリゴヌクレオチドを濃縮して乾燥させ、4,4'-ジメトキシリチル基を、80%の酢酸水溶液にて取り出し、さらにその化合物を、3容量のイソプロパノールにより、0.6Mの酢酸ナトリウム水溶液/pH5.0から2回析出させた。7回反復の(7-mer)オリゴヌクレオチドを、Milli Q水にて溶解し、そしてその生成物が、260nmの吸光度から決定される。最終的にオリゴヌクレオチドを、凍結乾燥して粉末にする。

## 【0197】

7回反復の(7-mer)オリゴヌクレオチドを、キャピラリー・ゲル電気泳動、電気スプレイ質量分光法、およびRP-HPLCにより特徴付け、組成物及び純度を確認した。さらにエンドトキシン含量アッセイ(LALアッセイ、Bio Whittaker)を行い、エンドトキシンのレベルが、<5EU/mg オリゴヌクレオチドであることを示した。

## 【0198】

その他の7回反復の(7-mer)ホスホロチオアイト・オリゴヌクレオチドを、同じ方法を方法を用いて合成され、5'-ACGTTCG-3' (配列番号: 3)、5'-ACGTTCG-3' (配列番号: 3)、5'-ACGTTCG-3' (配列番号: 3)、5'-ATCTCGA-3' (配列番号: 4)、5'-AGATGAT-3' (配列番号: 5)、5'-TCGTTTT-3' (配列番号: 6)、5'-TCGAAAA-3' (配列番号: 7)、5'-TCGCCCC-3' (配列番号: 8)、及び5'-TCGGGGG-3' (配列番号: 9)が含まれる。

## 【0199】

配列5'-TCGTCGA-3' (配列番号: 2)の7回反復の(7-mer)ホスホロチオエイト・オリゴヌクレオチドを、マイクロキャリアへの結合を容易にするように5'末端上の二硫化物リンカーにて合成した。一端に4,4'-ジメトキシリチル基にてC62の二硫化物リンカーを、そしてもう一端にシアノエチルホスホアミダイト(Glen Research)を、アセトニトリルに0.1Mの濃度にて溶解した。リンカーを、オリゴヌクレオチドの5'末端に結合し、そして得られたオリゴヌクレオチドを、上記のように精製し単離した。

## 【0200】

オリゴヌクレオチドの二硫化物基を、マイクロキャリアに結合する前にチオールに還元した。二硫化物-オリゴヌクレオチドを、100mMのリン酸ナトリウム/150mMの塩化ナトリウム/1mMのエチレンジアミン4酢酸(EDTA)/pH7.5緩衝液における25mg/mlの濃度に溶解した。次にtris(カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP; Pierce)の塩酸塩の5等量を加え、そしてその溶液を40℃2時間加熱した。チオール含有オリゴヌクレオチドを、サイズ排除クロマトグラフィにより小分子副生物から精製し、直ちに使用するか使用するまで-80℃にて保存するかのいずれかである。

## 【実施例2】

## 【0201】

## 生物にて変性可能な微小球体の調製

陽イオン・ポリ(乳酸、グリコール酸)(PLGA)微小球体を以下のように調製した。すなわち0.41dL/g(0.1%、クロロホルム、25℃)の固有粘度を有する、ポリ(D,L-ラクタード-co-グリコシド)50:50ポリマー0.875gを、7.875gの塩化メチレンに、0.3gのDOTAPと共に10%w/wの濃度にて溶解した。次に実験室の混合器(Silverson L4R, Silverson Instruments)を用いて、室温にて30分間4000rpmで均一化することにより、清浄な有機相が500mLのPVA水溶液(0.35%w/v)に乳化された。次に系の温度を混合容器のジャケットを通して熱水を循環させることにより、40℃に上昇させた。同時に攪拌速度を1500rpmまで減速させて、そして抽出するためにこれらの状態を2時間保持し、そして塩化メチレンを蒸発させた。微小球体の懸濁液を、冷却水の循環を支援として室温まで冷却する。

## 【0202】

微小粒子を、遠心分離を8000rpmにして室温にて10分間分離し、脱イオン水中おだやかな槽超音波処理にて再懸濁した。遠心式の洗浄をさらに2回繰り返し、粒子表面から過剰なPVAを除去した。最終的な粒子の遠心式によるペレットを、ほぼ10mLの水にて懸濁し、1

10

20

30

40

50

昼夜冷凍乾燥した。乾燥した陽イオン微小球体の粉末では、サイズ及び表面の電荷が、平均サイズ(秤量された数値、 $\mu$ ) = 1.4、ゼータ電位(mV) = 32.4が特徴である。

【0203】

修飾されないポリ(乳酸、グリコール酸)生物変性可能な微小球体を、0.3gのDOTAPが省かれたこと以外に上記のように合成し、すすぎ洗いし、乾燥した。乾燥した微小球体粉末は、サイズ及び表面の電荷が、平均サイズ(秤量された数値、 $\mu$ ) = 1.1、ゼータ電位(mV) = -18.1が特徴である。

【実施例3】

【0204】

生物的に変性可能な微小球体によるIMP/MCの調製

10

実施例2記載のように調製された200mgの陽イオン性PLGAを、槽超音波による0.1%w/vのTween溶液1.875mLに分散した。水溶性オリゴヌクレオチド溶液0.75mLを、微小球体の懸濁液に加え、2%w/w(微小球体に対するオリゴヌクレオチド)を負荷する近似的および理論的薬剤量がえられる。短時間混合した後、オリゴヌクレオチド-微小球体懸濁液を、4にて1昼夜インキュベイトした。微小球体を、Eppendorf centrifugeにて14,000rpmで、室温にて30分間遠心分離により分離される。上澄液及び微小球体を、遊離オリゴヌクレオチド、及び結合したオリゴヌクレオチドそれぞれを、オリゴヌクレオチド関連の効率又は負荷処理を決定するための実験室の標準的分析技術により評価される。微小球体に対するオリゴヌクレオチドの吸着が、オリゴヌクレオチドと微小球体の懸濁液を遠心分離した後、吸光度260nmを用いて水溶性の上澄液からオリゴヌクレオチドの損失を決定することにより確認された。オリゴヌクレオチドの結合の後、さらにその調製物を、サイズ及び表面の電荷が、平均サイズ(秤量された数値、 $\mu$ ) = 1.6、ゼータ電位(mV) = 33.3、オリゴヌクレオチドの結合(薬剤の負荷)=88(1.78%w/w)が特徴である。

20

【実施例4】

【0205】

ヒトの細胞においてIPM/MCによる免疫調節

7量体オリゴヌクレオチドを、ヒトPBMCアッセイにおいてPLGA微小球体のみ、およびその複合体の免疫調節活性のため試験した。末梢血を、静脈穿刺により健常なボランティアから、ヘパリン化の注射(syringes)を用いて採取した。血液を、FICOLL(商標)(Amersham Pharmacia Biotech)クッショングに置いて、遠心分離した。FICOLL(商標)インターフェースにて配置されたPBMCsを採取し、その後冷却したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて2回洗浄した。その細胞を再懸濁し、そして10%の加熱による非活性化ヒトAB血清プラス50単位/mLのペニシリン、50 $\mu$ g/mLのストレプトマイシン、300 $\mu$ g/mLのグルタミン、1mMのビルビン酸ナトリウム、及び1x MEM非必須アミノ酸(NEAA)にて、RPMIの $2 \times 10^6$ 細胞/mLにて、24又は48ウエル・プレートにて培養した。

30

【0206】

陽イオン及び非修飾PLGA微小球体を、実施例2記載のように調製した。オリゴヌクレオチドを、単一の薬剤として又はPLGA微小球体(未修飾又は陽イオン)と組み合わせて試験した。試験されたオリゴヌクレオチドは、5'-TCGTCGA-3'(配列番号:2)、5'-ACGTTCG-3'(配列番号:3)、5'-ATCTCGA-3'(配列番号:4)、及び5'-AGATGAT-3(配列番号:5)(コントロール)であった。含む全てのオリゴヌクレオチドが、100%のホスホロチオエイト・結合剤を含み、そして20 $\mu$ g/mLにて試験した。PLGAを、250 $\mu$ g/mLの濃度で加えた。オリゴヌクレオチドを、PLGAを伴い試験する場合、オリゴヌクレオチドとPLGAを、培養器に同時に加えた。SAC(PANSORBIN(商標)CalBiochem, 1/5000に希釈)及びIMP, 5'-TGACTGTGAACGTTCGAGATGA-3'(配列番号:10)を、正のコントロール、及びコントロール・オリゴヌクレオチド配列番号:1として使用し、そして細胞だけを、負のコントロールとして使用した。さらに未修飾マイクロキャリア(umm MC)及び陽イオンマイクロキャリア(cat MC)を単独にて試験した。SACは、Staph Aureus(Cowan I)細胞物質を含む。試料を、2人の健常なドナーを2重にして評価した。IFN- $\alpha$ 及びIFN- $\gamma$ を、製造業者の指示によりBioSource International, Inc.からCYTOSCREEN<sup>TM</sup> ELISAキットを使用して、評価した。

40

50

## 【0207】

ヒトPMBCアッセイにおいて、IFN- $\alpha$ の背景レベルが、ドナーにより極めて有意に変化する。しかしながら、IFN- $\alpha$ のレベルは、活性化の一般的な安定な形状実証し、そして刺激のない条件下の低い背景レベルを日常的に明示する。

配列番号表2は、アッセイの結果を示している。結果は、インターフェロン-ガンマ- (IFN- $\gamma$ )又はインターフェロン-アルファ (IFN- $\alpha$ )のミリリッター当たりピコグラム (pg/ml)にて示される。異なるヒトのドナーを用いるアッセイ間の変動性から、結果は、異なるドナー細胞(非経口における各値)を使用するアッセイを、そして手段として示される。

## 【0208】

配列番号表2の下に示すように、単独に使用する場合、PLGA微小球体(陽イオン又は非修飾)及び7量体は、もしあるとしても、活性がほとんどなかった。しかしながら、7量体オリゴヌクレオチド配列番号:2が、陽イオン性PLGA微小球体との組み合わせにおけるIFN- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ を誘発する活性である。陽イオン性PLGAが、静電気結合によりオリゴヌクレオチドを吸着し、オリゴヌクレオチド/マイクロキャリア複合体を生成するが、未修飾PLGAを生成しない。表における各値は、括弧にて囲った2つの読み込みの平均を表している。

## 【0209】

【表5】

配列番号表2

試料	IFN- $\gamma$ (pg/mL)	IFN- $\alpha$ (pg/mL)
配列番号：10	161 (99, 223)	67 (28, 106)
配列番号：1	5 (3, 8)	15 (0, 31)
配列番号：2	2 (1, 4)	16 (0, 32)
配列番号：3	2 (3, 1)	16 (0, 32)
配列番号：4	2 (0, 3)	29 (0, 57)
配列番号：5	1 (0, 3)	29 (0, 58)
unm MC	7 (4, 10)	154 (0, 308)
配列番号：10+unm MC	90 (38, 143)	115 (31, 199)
配列番号：1+unm MC	15 (18, 13)	16 (0, 32)
配列番号：2+unm MC	74 (16, 132)	499 (10, 988)
配列番号：3+unm MC	7 (6, 8)	14 (0, 28)
配列番号：4+unm MC	8 (4, 12)	16 (0, 32)
配列番号：5+unm MC	8 (6, 10)	15 (0, 31)
ネコMC	10 (13, 6)	28 (6, 50)
配列番号：10/ネコMC	398 (399, 397)	1748 (2000, 1496)
配列番号：1/ネコMC	9 (9, 10)	11 (0, 21)
配列番号：2/ネコMC	598 (454, 741)	832 (553, 1111)
配列番号：3/ネコMC	26 (15, 37)	97 (0, 193)
配列番号：4/ネコMC	7 (7, 8)	41 (0, 82)
配列番号：5/ネコMC	10 (16, 5)	20 (0, 40)
SAC	1589 (1179, 2000)	510 (50, 969)
細胞のみ	2 (0, 3)	9 (0, 18)

10

20

30

40

【0210】

配列番号表3の下側が、7量体オリゴヌクレオチド、配列番号：2は、陽イオン微小球体を使用した時であるが、単独にて使用した時でない2人以上の健常なヒトのドナーにおける活性であった。この場合、オリゴヌクレオチド及び陽イオン微小球体は、これらが培養器に加えられる前に、室温にて15分間前混合された。表における各値が、括弧にて囲った2つの読み込みの平均を表している。

【0211】

【表6】

配列番号表3

試料	IFN- $\gamma$ (pg/mL)	IFN- $\alpha$ (pg/mL)	
配列番号 : 10	1425 (2180, 669)	220 (401, 39)	
配列番号 : 1	231 (410, 51)	0 (0, 0)	10
配列番号 : 2	4 (8, 0)	0 (0, 0)	
ネコMC	97 (46, 148)	1 (2, 0)	
配列番号 : 10／ネコMC	1925 (3382, 468)	379 (587, 171)	
配列番号 : 1／ネコMC	131 (147, 115)	0 (0, 0)	
配列番号 : 2／ネコMC	2294 (3575, 1012)	5836 (9742, 1930)	
SAC	1588 (2040, 1136)	218 (393, 43)	20
細胞のみ	4 (8, 0)	0 (0, 0)	

## 【実施例5】

## 【0212】

## IMP/MC複合体による免疫調節

7量体オリゴヌクレオチドを、単独、及びヒトPBMCアッセイにおける2つの異なる状態下にて、陽イオンPLGA微小球体と複合化の免疫調節活性のため試験した。ヒトPBMCアッセイが、実施例4に記載されたように行われた。

30

## 【0213】

オリゴヌクレオチドを、他のオリゴヌクレオチドと組み合わせて、又は陽イオンPLGA微小球体と組み合わせて、単独薬剤として試験した。オリゴヌクレオチド及び微小球体の濃度は、それぞれ20  $\mu$ g/mlと250  $\mu$ g/mlである。オリゴヌクレオチドを、陽イオンPLGA微小球体にて試験した場合、オリゴヌクレオチド及び微小球体を、培養器に同時に付加した(同時に、配列番号表:5及び6における「同時に付加」を参照)。複数のオリゴヌクレオチドを組み合わせて試験した場合、等量の各オリゴヌクレオチドを前混合し、20  $\mu$ g/mlの濃度をすべてに使用した。さらにそのオリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチド/微小球体(16時間インキュベート)の2%w/w付加を得るために、実施例3記載される状態下で、陽イオンPLGA微小球体を複合化される。この場合、その複合体を、オリゴヌクレオチドの重量に基づいて、2および10  $\mu$ g/mlで試験した。SAC(PANSORBIN(商標)CalBiochem, 1/5000希釈)及びIMPs、配列番号:100及び5'-TCGTCGAACGTTGAGATG-3'(配列番号:11)を、正のコントロールとして、そしてコントロール・オリゴヌクレオチド、配列番号:1として使用し、そして単独の細胞を負のコントロールとして使用した。SACは、Staph Aureus(Cowan I)細胞物質を含む。試料を、2人の健常ドナーを2重にして評価した。配列番号表4,5及び6の下側に表されたデータは、単独にて使用された場合、7量体オリゴヌクレオチド、及びおよび陽イオンPLGA微小球体が、もしあったとしてもほとんど活性を有しない。さらに配列番号表4,5及び6も7量体オリゴヌクレオチドの混同物が、もしあったとしてもほとんど活性を有しなかった。しかしながら、前の実験と一致して、7量体オリゴヌクレオチド、配列番号:2が、陽イオンPLGA微小球体との状態のいずれかにの下に使用される場合、IFN-

40

50

と、IFN- $\gamma$ の誘発に活性である。表における各値が、括弧内の2つの読み込みの平均値を表している。

【0 2 1 4】

【表7】

配列番号表4

試料	IFN- $\gamma$ (pg/mL)	IFN- $\alpha$ (pg/mL)	10
配列番号 : 10	621 (73, 1170)	268 (54, 482)	
配列番号 : 1	37 (7, 66)	57 (20, 94)	
配列番号の混合体 : 2+3	4 (8, 0)	0 (0, 0)	
配列番号の混合体 : 2, 3, 4, 5	97 (46, 148)	1 (2, 0)	
SAC	593 (903, 284)	4337 (458, 8215)	
細胞のみ	28 (3, 52)	20 (20, 20)	20

【0 2 1 5】

【表8】

配列番号表5

試料	オリゴ+MC インキュベーション <sup>#</sup>	オリゴ用量 ( $\mu$ g/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
配列番号 : 10	-	20	27 (39, 14)	18 (26, 10)
配列番号 : 1	-	20	11 (12, 10)	10 (10, 10)
配列番号 : 11	-	20	182 (182, 181)	2597 (2831, 2363)
配列番号 : 2	-	20	10 (10, 10)	13 (16, 10)
配列番号 : 3	-	20	10 (10, 10)	16 (22, 10)
配列番号 : 5	-	20	10 (10, 10)	33 (10, 56)
配列番号の混合体 : 2+3	-	20	10 (10, 10)	15 (20, 10)
<hr/>				
ネコMC	-	-	10 (n/a*, 10)	10 (n/a, 10)
配列番号 : 10/ネコMC	同時付加	20	1691 (13779, 2002)	4038 (3748, 4327)
配列番号 : 1/ネコMC	同時付加	20	154 (173, 135)	118 (52, 183)
配列番号 : 11/ネコMC	同時付加	20	2810 (3924, 1695)	19004 (18008, 20000)
配列番号 : 2/ネコMC	同時付加	20	621 (n/a, 621)	6108 (n/a, 6108)
配列番号 : 3/ネコMC	同時付加	20	16 (10, 22)	50 (10, 89)
配列番号 : 5/ネコMC	同時付加	20	10 (10, 10)	10 (10, 10)
配列番号 : 2+3(混合)/ネコMC	同時付加	20	1041 (712, 1370)	6915 (7188, 6642)
配列番号 : 10/ネコMC	16時間	2.0	524 (466, 583)	9647 (11524, 7770)
配列番号 : 10/ネコMC	16時間	10	646 (492, 800)	5291 (5843, 4739)
配列番号 : 1/ネコMC	16時間	2.0	10 (10, 10)	24 (38, 10)
配列番号 : 1/ネコMC	16時間	10	10 (10, 10)	71 (131, 10)
配列番号 : 2/ネコMC	16時間	2.0	308 (559, 56)	3629 (5813, 1445)
配列番号 : 2/ネコMC	16時間	10	1524 (547, 2500)	12718 (14807, 10629)
配列番号 : 3/ネコMC	16時間	2.0	11 (12, 10)	15 (20, 10)
配列番号 : 3/ネコMC	16時間	10	47 (14, 79)	66 (122, 10)
配列番号 : 5/ネコMC	16時間	2.0	19 (13, 25)	68 (126, 10)
配列番号 : 5/ネコMC	16時間	10	10 (10, 10)	10 (10, 10)
配列番号 : 2+3(混合)/ネコMC	16時間	2.0	407 (419, 394)	5105 (6444, 3766)
配列番号 : 2+3(混合)/ネコMC	16時間	10	1739 (1511, 1966)	8892 (12050, 5733)
SAC	-	-	2500 (2500, 2500)	12685 (20000, 5369)
細胞のみ	-	-	10 (10, 10)	10 (10, 10)

(# 細胞へIMP/MCを付加する前に陽イオンMCにてインキュベートされたオリゴヌクレオチドの時間長)  
(\* n/a=利用できない)

【表9】

配列番号表6

試料	オリゴ+MC インキュベーション <sup>#</sup>	オリゴ用量 ( $\mu$ g/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)	IFN- $\alpha$ (pg/mL)
配列番号 : 10	-	20	26(2, 49)	9(0, 18)
配列番号 : 1	-	20	22(1, 42)	0(0, 0)
配列番号 : 2	-	20	3(1, 5)	0(0, 0)
配列番号 : 3	-	20	3(1, 5)	0(0, 0)
配列番号 : 5	-	20	5(2, 7)	0(0, 0)
配列番号の混合体 : 2+3	-	20	4(1, 6)	0(0, 0)
ネコMC	-	-	22(3, 40)	6(0, 12)
配列番号 : 10/ネコMC	同時付加	20	147(9, 284)	76(0, 151)
配列番号 : 1/ネコMC	同時付加	20	6(2, 10)	3(0, 5)
配列番号 : 2/ネコMC	同時付加	20	522(43, 1000)	1175(349, 2000)
配列番号 : 3/ネコMC	同時付加	20	25(3, 46)	11(0, 22)
配列番号 : 5/ネコMC	同時付加	20	36(2, 70)	8(0, 15)
配列番号 : 2+3(混合)/ネコMC	同時付加	20	191(36, 345)	882(300, 1463)
配列番号 : 10/ネコMC	16時間	2.0	78(32, 123)	970(162, 1777)
配列番号 : 10/ネコMC	16時間	10	87(9, 164)	1118(236, 2000)
配列番号 : 1/ネコMC	16時間	2.0	9(11, 6)	0(0, 0)
配列番号 : 1/ネコMC	16時間	10	5(1, 9)	0(0, 0)
配列番号 : 2/ネコMC	16時間	2.0	62(25, 99)	705(139, 1271)
配列番号 : 2/ネコMC	16時間	10	162(22, 301)	1115(230, 2000)
配列番号 : 3/ネコMC	16時間	2.0	21(17, 24)	33(19, 46)
配列番号 : 3/ネコMC	16時間	10	30(4, 56)	0(0, 0)
配列番号 : 5/ネコMC	16時間	2.0	21(17, 24)	21(0, 41)
配列番号 : 5/ネコMC	16時間	10	37(1, 72)	5(0, 10)
配列番号 : 2+3(混合)/ネコMC	16時間	2.0	205(17, 392)	486(48, 924)
配列番号 : 2+3(混合)/ネコMC	16時間	10	180(12, 347)	1058(116, 2000)
SAC	-	-	1000(1000, 1000)	2000(2000, 2000)
細胞のみ	-	-	6(6, 6)	0(0, 0)

(# 細胞へIMP/MCを付加する前に陽イオンMCIにてインキュベートされたオリゴヌクレオチドの時間長)

## 【実施例6】

## 【0217】

IMP/MC複合体による免疫調節

7量体オリゴヌクレオチドを、単独、及びヒトPBMSアッセイにおける陽イオンPLGA微小

球体による複合体の免疫調節活性のため試験した。そのオリゴヌクレオチドを、陽イオンPLGA微小球体にて、室温にて15分間前混合し、そして濃度をそれぞれ20μg/mlと250μg/mlとした。ヒトPBMCアッセイを、実施例4記載のように行い、陽イオンPLGA微小球体を、実施例2記載のよう、SAC(PANSORBIN(商標)CalBiochem,1/5000希釈)調製し、そしてIMP配列番号：10を、正のコントロールとして使用し、そしてコントロール・オリゴヌクレオチド配列番号：1及び細胞単独を、負のコントロールとして使用した。SACは、Staph.Aureus(Cowan I)細胞物質を含む。試料を、2人の健常なドナーを2重にして評価した。

【0218】

試験された7量体ホスホロチオエイトが、5'-TCGTCGA-3' (配列番号：2)、5'-TCGTTT T-3' (配列番号：6)、5'-TCGAAAA-3' (配列番号：7)、5'-TCGCCCC-3' (配列番号：8)、5'-TCGGGGG-3' (配列番号：9)、5'-AGATGAT-3' (配列番号：5)(コントロール)であった。

【0219】

配列番号7に示すように、単一の5' TCGを含む7量体オリゴヌクレオチドが、陽イオンPLGA微小球体にて生成される場合、ヒトPBMCアッセイにおけるIFN- $\alpha$ 及びIFN- $\beta$ を誘発において活性である。列になる4以上のグアノシンを伴うオリゴヌクレオチドが、テトラプレックス(tetraplex)構造を形成するため知られている。配列番号：9が、一列に5個のグアノシンを含み、毛細管電気泳動により集められるように見受けられる。

【0220】

【表10】

配列番号表7

試料	IFN- $\gamma$ (pg/ml)				IFN- $\alpha$ (pg/ml)			
	Ex1	Ex2	Ex3	Ex4	平均	Ex1	Ex2	Ex3
配列番号:10	211	131	86	840	317	31	0	15
配列番号:1	0	17	58	98	43	0	0	0
配列番号:2	0	0	14	0	4	0	0	0
配列番号:5	0	0	9	0	2	0	0	0
配列番号:6	0	0	11	0	3	0	0	0
配列番号:7	0	0	11	0	3	0	0	0
配列番号:8	0	0	10	0	3	0	0	0
配列番号:9	41	29	83	114	67	0	0	0
ネコMC	14	0	18	111	36	0	0	0
配列番号:10/ネコMC	662	534	689	4000	1471	151	62	240
配列番号:1/ネコMC	21	22	36	97	44	0	0	25
配列番号:2/ネコMC	1305	912	563	4000	1695	755	924	1881
配列番号:5/ネコMC	65	15	26	154	65	0	0	9
配列番号:6/ネコMC	2953	1316	1309	991	1642	702	1032	769
配列番号:7/ネコMC	740	430	350	1337	714	380	407	802
配列番号:8/ネコMC	1046	974	727	2543	1323	607	598	859
配列番号:9/ネコMC	512	96	149	579	334	81	0	39
SAC	2689	117	914	4000	1930	155	19	261
細胞のみ	0	0	14	0	0	0	0	0

## 【実施例7】

## 【0221】

誘導増殖アッセイにおけるIM/PC形成の効果

ヒトPBMCを、2つの通常の肝臓形成(heparanized)血液から単離した。幾つかのPBMCを、

残りを、MiltenyiからのCD+MACsビーズにてインキュベートしている間、予備的に保持した。次にこれらの細胞を磁気に通し正電荷の選択CD19+ B細胞に分離する。これらの集団は、FACS分析を介して>98%、CD19+に成るよう決定した。次にB細胞を、96ウエルの丸底プレートに $1 \times 10^5$ /200μl/ウエルにて培養した。さらにPBMCsを培養したが、 $2 \times 10^5$ /200μl/ウエルである。細胞を、単独か、100μg/mlの陽イオンPLGA微小球体(室温にて15分間前混合)を伴うかのいずれかにて2μg/mlにて、3重にて刺激した。培養期間は、37にて48時間であった。培養期間の最後に、そのプレートに、 $^3$ Hチミジン、1μCi/ウエルを加え、そしてさらに8時間インキュベートした。次にそのプレートを、標準的な液体シンチレーション技術を用いて採取し、カウント内に集められ、そしてデータが1分当たりの数として採取された。

10

## 【0222】

下側の配列番号表8に示されるように、7量体、配列番号:2が、単独にて用いる場合コントロール配列、配列番号:10よりヒトB細胞及びPBMCの増殖の誘発が少ない。

## 【0223】

しかしながら、7量体配列番号:2が、陽イオンPLGA微小球体により生成される場合、IMP、配列番号:1として同様の増殖量を生成することができる。実験1及び2に対する表の値が、3個のウエルのcpm平均を表している。

## 【0224】

## 【表11】

20

配列番号表8

試料	細胞	Ex1 (cpm)	Ex2 (cpm)	平均
配列番号:10	B細胞	30922	24976	27949
配列番号:1	B細胞	5916	3735	4825
配列番号:2	B細胞	697	572	634
配列番号:2/ネコMC	B細胞	23469	5958	14714
細胞のみ	B細胞	605	379	492
配列番号:10	PBMC	24635	22599	23617
配列番号:1	PBMC	8556	10033	9295
配列番号:2	PBMC	5063	1330	3197
配列番号:2/ネコMC	PBMC	25095	27228	26162
細胞のみ	PBMC	2444	1949	2196

30

40

## 【実施例8】

## 【0225】

非共有結合、液相IMP/MC複合体の生成

修飾されたオリゴヌクレオチド、及び液相MCを含むIMP/MC複合体が生成され、複合体形成用に試験した。

## 【0226】

オリゴヌクレオチドが、ホスホロアミダイト化学を用いてオリゴヌクレオチドの5'末

50

端に、コレステロール分子の付加により修飾される。水中オイルの乳化液を、pH6.5, 微細流化器を用い、4.5%(w/v)スクアレン、0.5%(w/v)ソルビタン・トリオレイト、0.5%(w/v)Tween(商標)80及び10mMのクエン酸ナトリウムの混合液を均一化することにより、作成される。この乳化液を検査し、決定された油滴の平均径を決定した。

## 【0227】

乳化液を、コレステロールにて修飾されたオリゴヌクレオチド、又は同じオリゴヌクレオチドの非修飾版と混合され、次にその混合物を、遠心分離にかけ、オイル相と水相を分離する。RP-HPLCが、各相からの試料に行はれ、ヌクレオチドの内容を決定する。

## 【実施例9】

## 【0228】

生物非変性可能なマイクロキャリアを伴うIMP/MC複合物による免疫調節

配列5'-CG-3'を含むオリゴヌクレオチドの混合物とコントロール・オリゴヌクレオチド(配列5'-CG-3'のない)を、硫化物に誘導されたポリカーボネートのマイクロ粒子又はナノ粒子(Polysciences, Inc.)で混合し、マウスの脾臓細胞における免疫調節活性に対して評価した。試験した粒子のサイズが、50nm, 200nm, 1μm及び4.5μmのものを含む。

## 【0229】

BALB/cマウスの脾臓の断片を、37℃にて45分間、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解したコラゲナーゼ/デスパーゼ(0.1U/mL/0.8U/mL)にて消化し、次に消化断片を金属スクリーンに強く通すことにより機械的に分散させた。その分散された脾臓細胞を、遠心分離によりペレット化され、さらに新たな培地(10%胎児牛血清によるRPMI 1640、プラス50単位/mLペニシリン、50μg/mLのストレプトマイシン、2mMのグルタミン、及び0.05mMのL-メルカプトエタノール)に再懸濁した。

## 【0230】

4×10<sup>5</sup>のマウスの脾臓細胞を、96ウェル・プレートのウェルに分配し、37℃にて1時間インキュベートした。その細胞を、5μg/mL, 1μg/mL, 及び0.1μg/mLのDNA投与量にてインキュベートした。2x濃度の試験試料又はコントロール100μLを加えて、その細胞をさらに24時間インキュベートした。培地を各ウェルから採取し、ELISAによるサイトカイン濃度に対し試験した。

## 【0231】

IFN-αを、sandwich-format ELISAを使用して評価した。マウス脾臓細胞アッセイからの培地を、抗-IFN-αモノクロナール抗体(Nunc)にて被覆されたマイクロタイター・プレートにてインキュベートする。結合したIFN-αを、ビオチン化された抗-IFN-α抗体及びステップアビジン・ワサビダイコン・パーオキシダーゼ結合二次抗体を用いて検出され、その複合体を、パーオキシダーゼの存在下クロモゲン・パーオキシダーゼ基質3,3',5<5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を用いて検出し、そしてEmax precision microplate reader(Molecular Devices)を用いて吸光度450nmで測定することにより、定量化した。IL-6及びIL-12を抗-IL-6抗体及び抗-IL-12抗体をそれぞれ使用して同じ方法にて評価した。

## 【実施例10】

## 【0232】

IMP/MC複合体によるマウス細胞の免疫調節

生物的に非変性なポリスチレン・ビーズ(サイズが200nmに設計)に共有的に結合したオリゴヌクレオチドでは、マウスの脾臓細胞の免疫調節活性が試験された。

## 【0233】

アミンに誘導されるポリスチレン・ビーズが、Molecular Probe, Inc., 及びPolysciences, Inc.から得られた。3種の型のビーズが用いられ、つまりアミン誘導ビーズ(Polysciences, Inc., Catalog No.15699)、励起/最大発光580及び605nm(「赤ビーズ」Molecular Probes, Inc., Catalog No.F8763)の蛍光団に結合したアミン誘導ビーズ、及び励起/最大発光55及び515nm(「黄ビーズ」Molecular Probes, Inc., Catalog No.F8764)の蛍光団に結合したアミン誘導ビーズが、製造者の指示によるスルフォ・SMCC(スルフォスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロペンタン-1-カルボキシレート,Pierce Chemical Co.)にて活

10

20

30

40

50

性化される。次にそのビーズを、チオールにて修飾化されたオリゴヌクレオチドに結合されるか、MCだけのコントロールとして使用するために遊離マレイミド基を消光するために処理される。IMP/MC複合体が、遠心分離により単離され、そしてリン酸緩衝生理食塩水にて3回洗浄し、過剰なオリゴヌクレオチドを除去した。

【0234】

IMP/MC複合体の免疫調節効果を、上記実施例9のマウスの脾臓を用いて試験した。その細胞を、20μg/ml, 5μg/ml及び1μg/mlのDNA投与量にてインキュベートした。免疫調節活性が、IMP/MC複合体の応答におけるIL-12, IL-6及び/又はIFN- $\gamma$ の検出により評価される。

【実施例11】

10

【0235】

生物非変性マイクロキャリアーとIMP/MC複合体によりヒト細胞の免疫調節

生物非変性ポリスチレン・ビーズ(200nm設計サイズ)に共有的に結合されるオリゴヌクレオチドでは、ヒトPBMCアッセイにおける免疫調節活性が試験される。ヒトPBMCアッセイは、実施例4記載のように行はれる。その細胞を、20μg/ml, 10μg/ml及び2μg/mlのDNA投与量にてインキュベートした。免疫調節活性が、IMP/MC複合体の応答におけるIFN- $\gamma$ 及び/又はIFN- $\beta$ 検出により評価される。

【0236】

20

先の発明が、明らかに、そして理解する目的にて図示及び実施例の方法により幾つか詳細に記載されているが、特定の変化及び変更を行うことができる当業者に明らかになろう。したがって、記載及び例が、本発明の範囲を限定するものとして構成されるべきでなく、それが添付の請求項に従って明示されている。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national Application No PCT/US 01/25364
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/39		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category "	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 00 21556 A (DYNAVAX TECHNOLOGIES CORP ;TAKABAYASHI KENJI (US); TIGHE HELEN (US) 20 April 2000 (2000-04-20) page 6, line 25 - line 31 page 11, line 24 - line 30 page 15, line 29 - line 30 page 16, line 26 - line 32 page 17, line 14 - line 19 page 25, last paragraph -page 26, line 14 page 34, line 1 -page 35, line 19 page 38, line 1 -page 39, line 2</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-127
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>° Special categories of cited documents:</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*S* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search  20 August 2002		Date of mailing of the international search report  27/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Noë, V

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
PCT/US 01/25364

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01 15726 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP ;KOJIC LJILJIANA D (CA); MUI BARBARA (CA) 8 March 2001 (2001-03-08) abstract page 12, line 19 - line 25 page 15, line 14 - line 19 page 12 page 10, line 5 -page 11, line 5 page 2, line 10 - line 6 ____	1-127
Y	WO 98 52581 A (WU TONG ;DAVIS HEATHER L (CA); OTTAWA CIVIC HOSPITAL LOEB RES (CA)) 26 November 1998 (1998-11-26) page 41, line 6 - line 8 , sentence 16 ____	1-127
A	WO 01 00231 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ;VOSS GERALD (BE); COHEN JOSEPH (BE); GA) 4 January 2001 (2001-01-04) abstract page 8, line 18 - line 28 page 16, last line ____	
E	WO 01 68144 A (NEST GARY VAN ;DYNAVAX TECHNOLOGIES CORP (US); TUCK STEPHEN (US)) 20 September 2001 (2001-09-20) the whole document ____	1-127
E	WO 01 68117 A (DYNAVAX TECHNOLOGIES CORP ;NEST GARY VAN (US)) 20 September 2001 (2001-09-20) the whole document ____	1-127

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 01/25364

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 23-97 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/US 01/25364

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0021556	A 20-04-2000	AU EP WO	6425999 A 1117433 A1 0021556 A1	01-05-2000 25-07-2001 20-04-2000
WO 0115726	A 08-03-2001	AU BR WO EP AU EP WO	6813900 A 0013834 A 0115726 A2 1212085 A2 6715600 A 1206250 A2 0113898 A2	26-03-2001 23-04-2002 08-03-2001 12-06-2002 19-03-2001 22-05-2002 01-03-2001
WO 9852581	A 26-11-1998	AU CA EP US WO	7690898 A 2301575 A1 1003531 A1 6339068 B1 9852581 A1	11-12-1998 26-11-1998 31-05-2000 15-01-2002 26-11-1998
WO 0100231	A 04-01-2001	AU WO EP	5977700 A 0100231 A2 1198243 A2	31-01-2001 04-01-2001 24-04-2002
WO 0168144	A 20-09-2001	AU WO	4563101 A 0168144 A2	24-09-2001 20-09-2001
WO 0168117	A 20-09-2001	WO AU	0168117 A2 4358801 A	20-09-2001 24-09-2001

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 バン ネスト, ゲイリー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94553, マルティネス, スカイライン ドライブ 639

(72)発明者 タック, スティーブン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94611, オークランド, ウッドヘブン ウェイ 1742

(72)発明者 ファーロン, カレン エル.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94549, ラファイエット, バレント コート 4064

(72)発明者 ディナ, ディーノ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94618, オークランド, ブエナ ビスタ アベニュー 6140

F ターム(参考) 4C085 AA11 AA38 BA51 BB03 CC08 DD88 EE06 FF11