

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4280309号
(P4280309)

(45) 発行日 平成21年6月17日 (2009.6.17)

(24) 登録日 平成21年3月19日 (2009.3.19)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

A 6 1 K 31/7052 (2006.01)

A 6 1 K 31/7052

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

請求項の数 68 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-502803
 (86) (22) 出願日 平成10年6月5日 (1998.6.5)
 (65) 公表番号 特表2002-505580 (P2002-505580A)
 (43) 公表日 平成14年2月19日 (2002.2.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/011391
 (87) 国際公開番号 WO1998/055609
 (87) 国際公開日 平成10年12月10日 (1998.12.10)
 審査請求日 平成17年6月1日 (2005.6.1)
 (31) 優先権主張番号 60/048,793
 (32) 優先日 平成9年6月6日 (1997.6.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503399148
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティー オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 94607-5200
 カリフォルニア州、オークランド、フラン
 クリン ストリート 1111, オフィス
 オブ テクノロジー トランスファー,
 12 ティーエイチ フロア
 (73) 特許権者 508142077
 ダイナヴァックス テクノロジーズ コー
 ポレーション
 アメリカ合衆国 94710 カリフォル
 ニア州、バークレー、スイート 100,
 セブンスストリート 2929

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA免疫刺激配列活性の阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1. 医薬組成物であって、

(a) 以下:

i) 5'-プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ピリミジン-3'

i i) 5'-プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ピリミジン-3'

i i i) 5'-プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ポリ(ピリミジン)-3'

i V) 5'-プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ポリ(ピリミジン)-3'

から選択される式で表されるヌクレオチド配列を含む核酸分子、ここで前記核酸は、少なくとも1つの非メチル化5'-CG-3'モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示し、当該核酸は45ヌクレオチドまでの長さを有する; および

(b) 製薬上許容される担体、
 を含む前記組成物。

【請求項 2】

(a) ヘキサマーヌクレオチド配列AAGGTTを含む核酸分子、ここで前記核酸は、少なくとも1つの非メチル化5'-CG-3'モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示し、当該核酸は45ヌクレオチドまでの長さを有する;

(b) 製薬上許容される担体、
 を含む医薬組成物。

【請求項 3】

核酸分子が滅菌バイアル中に存在する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

組成物がさらに抗原を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

抗原が核酸分子にコンジュゲートされている、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

(a) ヘキサマーヌクレオチド配列AAGCTTを含む核酸分子、ここで前記核酸は、少なくとも 1 つの非メチル化5' -CG-3' モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示し、当該核酸は 4 5 ヌクレオチドまでの長さを有する；

(b) 製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

10

【請求項 7】

核酸分子が滅菌バイアル中に存在する、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

組成物がさらに抗原を含む、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 9】

抗原が核酸分子にコンジュゲートされている、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

(a) ヌクレオチド配列AGGGCTを含む核酸分子、ここで前記核酸は、少なくとも 1 つの非メチル化5' -CG-3' モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示し、当該核酸は 4 5 ヌクレオチドまでの長さを有する；

(b) 製薬上許容される担体、を含む医薬組成物。

20

【請求項 11】

核酸分子が滅菌バイアル中に存在する、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

組成物がさらに抗原を含む、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 13】

抗原が核酸分子にコンジュゲートされている、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

(a) ヘキサマーヌクレオチド配列GAGGTTを含む核酸分子、ここで前記核酸は、少なくとも 1 つの非メチル化5' -CG-3' モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示し、当該核酸は 4 5 ヌクレオチドまでの長さを有する；

(b) 製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

30

【請求項 15】

核酸分子が滅菌バイアル中に存在する、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

組成物がさらに抗原を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 17】

抗原が核酸分子にコンジュゲートされている、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

(a) AAGGTT、AGGGCT、GAGGTT、AAGCTT、GAGCTT、GGGCTT、AAGCCT、AGGCTC、GAGCTC、GGGCTC、AGGCC、GAGCCC、GGGCCC、AGGCCT、GAGCCT、GGGGCT、GGGGTT、GAGGTC、およびAAGCC Cよりなる配列の群から選択されるヘキサマーヌクレオチド配列を含む核酸分子、ここで前記核酸は、少なくとも 1 つの非メチル化5' -CG-3' モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示し、当該核酸は 4 5 ヌクレオチドまでの長さを有する；

(b) 製薬上許容される担体、を含む医薬組成物。

40

50

【請求項 19】

核酸分子が滅菌バイアル中に存在する、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

組成物がさらに抗原を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

抗原が核酸分子にコンジュゲートされている、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

核酸分子がペプチドにコンジュゲートされている、請求項 1、2、6、10、14 又は 18 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 23】

核酸分子が滅菌バイアル中に存在する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 24】

組成物がさらに抗原を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 25】

抗原が核酸分子にコンジュゲートされている、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

核酸がバックボーンリン酸基修飾を含む、請求項 1 から 25 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

バックボーンリン酸基修飾がホスホロチオエート修飾である、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

バックボーンリン酸基修飾がホスホロジチオエート修飾である、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 29】

核酸分子が長さにして 6～45ヌクレオチドである、請求項 1 から 28 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

請求項 1 から 29 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を、滅菌バイアル中に含むキット。

【請求項 31】

キットがさらに抗原を含む、請求項 30 に記載のキット。

【請求項 32】

免疫刺激ポリヌクレオチド (ISS) によって仲介される免疫応答を有する個体において ISS の免疫刺激活性を減少させるための医薬の製造における、以下：

- i) 5'-プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ピリミジン-3'
- ii) 5'-プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ピリミジン-3'
- iii) 5'-プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ポリ(ピリミジン)-3'
- iv) 5'-プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ポリ(ピリミジン)-3'

から選択される式で表されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の使用であって、ここで当該核酸は 45ヌクレオチドまでの長さを有し、前記核酸は、少なくとも 1 つの非メチル化 5'-CG-3'モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示すものであり、Th1型免疫応答の減少が免疫刺激活性の減少が達成されたことを示す前記使用。

【請求項 33】

自己抗原に対するTh1免疫応答を低減するための、請求項 32 に記載の使用。

【請求項 34】

ISSが組換え発現ベクター中に存在する、請求項 32 に記載の使用。

【請求項 35】

組換え発現ベクターおよび核酸分子が個体に同時投与される、請求項 34 に記載の使用。

【請求項 36】

ヌクレオチド配列が、AAGGTT、AGGGCT、GAGGTT、AAGCTT、GAGCTT、GGGCTT、AAGCCT、AGGC

10

20

30

40

50

TC、GAGCTC、GGGCTC、AGGCCC、GAGCCC、GGGCCC、AGGCCT、GAGCCT、GGGGCT、GGGGTT、GAGGTC、およびAAGCCCよりなる配列の群から選択される、請求項 3 2 に記載の使用。

【請求項 3 7】

免疫刺激ポリヌクレオチド (ISS) の免疫刺激活性を変更させるための医薬の製造における、以下：

i) 5' - プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ピリミジン-3'

ii) 5' - プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ピリミジン-3'

iii) 5' - プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ポリ (ピリミジン) -3'

iv) 5' - プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ポリ (ピリミジン) -3'

から選択される式で表されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の使用であって、ここで当該核酸は 4 5 ヌクレオチドまでの長さを有し、前記核酸は、少なくとも 1 つの非メチル化 5' -CG-3' モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示すものであり、Th1型免疫応答の減少またはTh2型応答の増加が免疫刺激活性の変更が達成されたことを示す前記使用。

10

【請求項 3 8】

ISSおよび核酸分子の両方が脊椎動物宿主に投与される、請求項 3 7 に記載の使用。

【請求項 3 9】

ヌクレオチド配列が、AAGGTT、AGGGCT、GAGGTT、AAGCTT、GAGCTT、GGGCTT、AAGCCT、AGGCCT、GAGCTC、GGGCTC、AGGCCC、GAGCCC、GGGCCC、AGGCCT、GAGCCT、GGGGCT、GGGGTT、GAGGTC、およびAAGCCCよりなる配列の群から選択される、請求項 3 7 に記載の使用。

20

【請求項 4 0】

個体における抗原に対するTh2型免疫応答を増強するための医薬の製造における核酸分子の使用であって、

前記核酸分子が、以下：

i) 5' - プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ピリミジン-3'

ii) 5' - プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ピリミジン-3'

iii) 5' - プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ポリ (ピリミジン) -3'

iv) 5' - プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ポリ (ピリミジン) -3'

から選択される式で表されるヌクレオチド配列を含んでおり、ここで当該核酸は 4 5 ヌクレオチドまでの長さを有し、前記核酸は、少なくとも 1 つの非メチル化 5' -CG-3' モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示すものであり、ここでTh1型免疫応答の減少またはTh2型応答の増加が、抗原に対するTh2型免疫応答の増強が達成されたことを示す前記使用。

30

【請求項 4 1】

ヌクレオチド配列が、AAGGTT、AGGGCT、GAGGTT、AAGCTT、GAGCTT、GGGCTT、AAGCCT、AGGCCT、GAGCTC、GGGCTC、AGGCCC、GAGCCC、GGGCCC、AGGCCT、GAGCCT、GGGGCT、GGGGTT、GAGGTC、およびAAGCCCよりなる配列の群から選択される、請求項 4 0 に記載の使用。

【請求項 4 2】

免疫刺激オリゴヌクレオチド (ISS) の免疫刺激活性を阻害する核酸分子を同定する方法であって、前記方法が、

40

(a) 抗原刺激された免疫細胞の集団をISSと接触させて、そのことにより該細胞集団にTh1型応答を誘導し；

(b) 該細胞集団におけるTh1型応答の変化を測定し；

(c) 該抗原刺激された細胞集団と候補核酸分子とを接触させ；

(d) Th1型応答またはTh2型応答における変化を測定することを含んでなり、ここでTh1型応答の減少および/またはTh2型応答の増加が、該核酸分子がISSの免疫刺激活性を阻害することを示す前記方法。

【請求項 4 3】

候補阻害性核酸分子が、以下：

i) 5' - プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ピリミジン-3'

50

i i) 5' - プリン - プリン - G - C - ピリミジン - ピリミジン - 3'
 i i i) 5' - プリン - プリン - G - G - ピリミジン - ポリ (ピリミジン) - 3'
 i V) 5' - プリン - プリン - G - C - ピリミジン - ポリ (ピリミジン) - 3'

から選択される式で表されるヌクレオチド配列を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

Th2型応答がIgE生産を測定することにより測定される、請求項 3 7 または 4 0 に記載の使用。

【請求項 4 5】

Th2型応答がIgE生産を測定することにより測定される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

個体におけるTh1によって仲介されるサイトカイン生産を減少させるための医薬の製造における核酸分子の使用であって、前記核酸分子が、以下：

i) 5' - プリン - プリン - G - G - ピリミジン - ピリミジン - 3'
 i i) 5' - プリン - プリン - G - C - ピリミジン - ピリミジン - 3'
 i i i) 5' - プリン - プリン - G - G - ピリミジン - ポリ (ピリミジン) - 3'
 i V) 5' - プリン - プリン - G - C - ピリミジン - ポリ (ピリミジン) - 3'

から選択される式で表されるヌクレオチド配列を含んでおり、ここで当該核酸は 4 5 ヌクレオチドまでの長さを有し、前記核酸は、少なくとも 1 つの非メチル化 5' - CG - 3' モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示すものであり、ここで個体におけるTh1によって仲介されるサイトカインのレベルが減少する前記使用。

【請求項 4 7】

Th1によって仲介されるサイトカイン生産が免疫刺激ポリヌクレオチド配列によって刺激される、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 4 8】

Th1によって仲介されるサイトカインがIL-12、インターフェロン- γ 、および腫瘍壊死因子- γ よりなる群から選択される、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 4 9】

ヌクレオチド配列が、AAGGTT、AGGGCT、GAGGTT、AAGCTT、GAGCTT、GGGCTT、AAGCCT、AGGC TC、GAGCTC、GGGCTC、AGGCCC、GAGCCC、GGGCCC、AGGCCT、GAGCCT、GGGGCT、GGGGTT、GAGG TC、およびAAGCCCよりなる配列の群から選択される、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 5 0】

(a) AAGGTT、AAGCTT、AGGGCT、TTGCAA、およびGAGGTCよりなる配列の群から選択されるヘキサマーヌクレオチド配列を含む核酸分子、ここで前記核酸は、少なくとも 1 つの非メチル化 5' - CG - 3' モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示し、当該核酸は 4 5 ヌクレオチドまでの長さを有する；および

(b) 製薬上許容される担体、
を含む医薬組成物。

【請求項 5 1】

免疫刺激ポリヌクレオチド配列 (ISS) によって仲介される免疫応答を有する個体においてISSの免疫刺激活性を減少させるための請求項 5 0 に記載の組成物であって、Th1型の免疫応答が減少し、該組成物がISSの免疫刺激活性を減少させるのに有効である、前記組成物。

【請求項 5 2】

Th1型応答が、リンパ球増殖、IFN- γ 分泌、IFN- γ 分泌、IFN- γ 分泌、IL-12分泌及びIL-18分泌よりなる群から選択されるパラメータを測定することにより測定される、請求項 3 2、3 7 又は 4 0 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5 3】

Th1型応答が、リンパ球増殖、IFN- γ 分泌、IFN- γ 分泌、IFN- γ 分泌、IL-12分泌及びIL-18分泌よりなる群から選択されるパラメータを測定することにより測定される、請求項 4 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 4】

Th1型応答が、リンパ球増殖、IFN- 分泌、IFN- 分泌、IFN- 分泌、IL-12分泌及びIL-18分泌よりなる群から選択されるパラメータを測定することにより測定される、請求項 5 1に記載の組成物。

【請求項 5 5】

個体における抗原に対するTh2型免疫応答を増強させるためのものであって、Th1型免疫応答の減少またはTh2型応答の増加が、組成物が抗原に対するTh2型免疫応答を増強させるのに有効であることを示す、請求項 5 0に記載の組成物。

【請求項 5 6】

個体におけるTh1によって仲介されるサイトカイン生産を減少させるためのものであって、個体におけるTh1によって仲介されるサイトカインのレベルが減少する、請求項 5 0に記載の組成物。

10

【請求項 5 7】

個体におけるリンパ球増殖を減少させるためのものであって、免疫刺激配列に応答して個体におけるリンパ球増殖が減少する、請求項 5 0に記載の組成物。

【請求項 5 8】

組成物がさらに抗原を含む、請求項 5 0に記載の組成物。

【請求項 5 9】

抗原が核酸分子にコンジュゲートされている、請求項 5 8に記載の組成物。

【請求項 6 0】

核酸分子が滅菌バイアル中に存在する、請求項 5 0に記載の組成物。

20

【請求項 6 1】

核酸分子がペプチドにコンジュゲートされている、請求項 5 0に記載の組成物。

【請求項 6 2】

核酸分子がバックボーンリン酸基修飾を含む、請求項 5 0に記載の組成物。

【請求項 6 3】

バックボーンリン酸基修飾がホスホロチオエート修飾である、請求項 6 2に記載の組成物。

【請求項 6 4】

バックボーンリン酸基修飾がホスホロジチオエート修飾である、請求項 6 2に記載の組成物。

30

【請求項 6 5】

核酸分子が長さにして6～45ヌクレオチドである、請求項 5 0に記載の医薬組成物。

【請求項 6 6】

個体におけるリンパ球増殖を減少させるための医薬の製造における核酸分子の使用であって、前記核酸分子が、以下：

i) 5'-プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ピリミジン-3'

i i) 5'-プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ピリミジン-3'

i i i) 5'-プリン-プリン-G-G-ピリミジン-ポリ(ピリミジン)-3'

i V) 5'-プリン-プリン-G-C-ピリミジン-ポリ(ピリミジン)-3'

40

から選択される式で表されるヌクレオチド配列を含んでおり、ここで当該核酸は45ヌクレオチドまでの長さを有し、前記核酸は、少なくとも1つの非メチル化5'-CG-3'モチーフを有する免疫刺激ポリヌクレオチドに対する免疫阻害作用を示すものであり、ここで個体におけるリンパ球増殖が減少する、前記使用。

【請求項 6 7】

リンパ球増殖が免疫刺激配列に応答したものである、請求項 6 6に記載の使用。

【請求項 6 8】

ヌクレオチド配列がAAGGTT、AGGGCT、GAGGTT、AAGCTT、GAGCTT、GGGCTT、AAGCCT、AGGCTC、GAGCTC、GGGCTC、AGGCCC、GAGCCC、GGGCCC、AGGCCT、GAGCCT、GGGGCT、GGGGTT、GAGGTC、およびAAGCCCよりなる配列の群から選択される、請求項 6 6に記載の使用。

50

【発明の詳細な説明】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、DNAにおける免疫刺激配列に関する。本発明はさらに遺伝子治療に使用するための組換え発現ベクターに関する。

2. 関連技術の歴史

組換え発現ベクターは、研究者や臨床医が遺伝子治療や遺伝子免疫感作の目的を達成するために使用する道具である。遺伝子治療においては、ウイルスあるいは非ウイルスベクターを使用して発現可能な遺伝子を宿主中に供給し、喪失された遺伝子あるいは欠損のある遺伝子を置換するものであり、あるいは治療上有用なポリペプチドを宿主に供給するものである。遺伝子免疫感作においては、殆どの場合、非ウイルスベクターを使用して発現された抗原に対する宿主による免疫反応を誘発する。

遺伝子治療及び遺伝子免疫感作の両者において臨床実務を成功させるための障害の1つは、多くの場合における *in vivo* で得られる遺伝子発現の一過性の性質である。一過性の遺伝子発現は遺伝子免疫感作においては問題となることはより少なく、この場合は特定の免疫感作スキームについての十分な免疫反応は発現された抗原に対する短時間の露出でも刺激され得る。さらに、抗原に対する宿主免疫反応を増強するいくつかの方法があり、そのようなものとしてはベクター自体を所望の免疫反応のアジュバントとして使用することが挙げられ、これは宿主をベクター中に存在する非コード免疫刺激ヌクレオチド配列 (ISS-ODN) に露出することにより行われる (Satoら、Science, 273:352-354 (1996))。

しかし、遺伝子治療のプロトコールにおいては、遺伝子発現の未熟なことによる損失により宿主において得られるべき治療の利点が減じられてしまう (Friedmann, Scientific American, "Making Gene Therapy Work" (June 1997))。反復投与により宿主の治療用ペプチドに対する露出を延長するためには、それぞれの投与量を送達するために異なるベクターを使用し、ベクター抗原に対する宿主免疫反応を最低限にする必要がある (Tripathyら、Nature Med., 2:545-550 (1996))。

ベクターの免疫原性の1つの可能性のあるソースは、組換え発現ベクターを構築するのに使用した微生物種のゲノム中のISS-ODNである。すなわち、ISS-ODNを特徴付けるCpGモチーフは脊椎動物ゲノムと比較して細菌あるいはウイルス (レトロウイルスを含む) にはるかに頻繁に存在する。ISS-ODN活性は、インターフェロン- (INF-)、INF- 及びインターロイキン-12 (IL-12) のようなサイトカインのISS-ODNに誘発された生産を招く。このISS-ODNにより誘発された炎症は、脊椎動物において微生物感染に対して防御となると考えられ、またオリゴヌクレオチドまたは組換え発現ベクターの一部として宿主に導入されたISS-ODNに応答して生産されると考えられる。

発明の概要

本発明は、ISS-ODNの免疫刺激活性を特異的に阻害するオリゴデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、あるいはそれらの類似体からなる化合物を提供する。

特にISS-ODNにより誘発されたINF- の分泌は、組換え遺伝子発現を阻害でき、トランスフェクトされた細胞においてmRNA及びタンパク質合成を直接阻害する。すなわち、ISS-ODN活性の阻害により、ISS-ODNにより誘発される遺伝子発現の損失が実質的に回避され、これによりISS-ODNを含む組換え発現ベクターを使用した遺伝子治療あるいは遺伝子免疫感作を受けている宿主における発現ポリペプチドの利用可能性が延長される。さらに、発現タンパク質の利用可能性を延長するための反復投与、及びISS-ODN配列を除去するための組換え配列ベクターの大規模な再構築の必要性が本発明の化合物の使用により回避される。

また本発明の化合物は、アジュバントとして投与されたISS-ODNの免疫刺激活性を調整して、例えば免疫治療において抗原に対する免疫反応を増強するのにも有用である。この場合、本発明の化合物により宿主中でのISS-ODNに基づくアジュバントの効果について精緻な制御が可能となる。

さらに本発明の化合物は、ISS-ODN含有細菌あるいはウイルスによる感染に応答して生成

される宿主の炎症を低減する。本発明の化合物は、微生物に存在する特定のISS-ODNの実体が不明な場合でも該微生物が発揮するISS-ODN活性を阻害するために投与することができるという利点を有する。すなわち、本発明の化合物は広いスペクトルの抗炎症剤であると考えることができる。

1つの態様においては、本発明のISS-ODN阻害化合物は、以下の一般的一次構造を有する合成オリゴヌクレオチド(I-ON)である。

5'-プリン-プリン-[Y]-[Z]-ピリミジン-ピリミジン-3'または

5'-プリン-プリン-[Y]-[Z]-ピリミジン-pピリミジン-3'

上記式中、Yはシトシン以外の任意の天然または合成ヌクレオチドであり、好ましくはグアノシンまたはイノシン(RNA I-ONの場合)である。一般に、Zは任意の天然または合成ヌクレオチドまたは同一のヌクレオチドの反復である。好ましくは、Yがイノシンの場合、Zはイノシンまたは1以上のグアノシンである。Yがグアノシンの場合、Zは好ましくはグアノシンまたは1以上の非メチル化シトシンである。しかし、Yがグアノシンまたはイノシンでない場合、Zはグアノシンまたはイノシンである。最も好ましくは、5'プリンは同一のヌクレオチドであり、3'ピリミジンも同様である。例えば、**がYZである場合、5'プリン及び3'ピリミジンは、AA**TT、AG**TT、GA**TT、GG**TT、AA**TC、AG**TC等であり得る。このヘキサマーコア配列に隣接して存在する配列はいずれも任意の公知のISS-ODNに存在する隣接配列に実質的に一致するように構築する。

本発明の阻害性I-ONは、宿主に使用するための医薬として許容される組成物中のものとして製造する。I-ONは単独で組成物に混合してもよく、複数のコピーとして混合してもよく、異なるI-ONの混合物として混合してもよい。あるいは、本発明の阻害性I-ONは、組換え発現ベクター中に組み込んでよい。また阻害性I-ONは、阻害性I-ONと、対象となる遺伝子を含むか挿入することができる組換え発現ベクター構築物とを含むキットの形態で提供されてもよい。

本発明のI-ONの特別な利点は、任意のISS-ODN含有組換え発現ベクターまたは微生物においてISS-ODNを標的化するために使用でき、該ベクターまたは微生物のヌクレオチド組成が判っているかどうかにかかわらずそのようにできるということである。実際に、ベクターあるいは微生物中のISS-ODNの存在、実体あるいは位置が判っている必要はない。ベクターあるいは微生物中にISS-ODNが存在しない場合、本発明のI-ONは単に効果を示さないだけである。しかし、ベクターまたは微生物中にISS-ODNが存在すると、ベクターまたは微生物中のISS-ODNの特定の構造や位置が判っていなくてもその免疫刺激活性はI-ONにより投与量に依存して阻害されると予測できる。

従って別の態様においては、本発明は、ベクター中に存在する全てのISS-ODNを同定し、それらを除くことにより、組換え発現ベクターからISS-ODNを除く困難な作業の単純で効果的な代替手段を提供するものである。

さらにこれに関し、本発明は、ISS-ODNの存在について組換え発現ベクターをスクリーニングする方法、及び別の阻害性I-ONを同定する方法を提供する。前者の態様においては、組換え発現ベクター中におけるISS-ODNの存在の確認は、リンパ球の集団中のベクターを公知の阻害活性を有するI-ONとインキュベートし、I-ONとのインキュベーションの前後においてリンパ球によるISS誘発性サイトカインの生産のレベルに違いがある場合はそれを比較することにより行なう。

後者の態様においては、本明細書に記載した特徴を有する別の阻害性I-ONを、公知のISS-含有ポリヌクレオチドまたは組換え発現ベクターの免疫刺激活性を阻害する能力により同定する。

さらに別の態様においては、本発明はさらに感染性細菌あるいはウイルスに存在する任意のISS-ODNの免疫刺激活性を阻害するために使用できる有用な抗炎症剤を提供する。

さらに本発明は、免疫刺激のために宿主に供給されたISS-ODNの免疫刺激活性を調節するための有用な手段を提供する(例えばアジュバントとして)。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明の阻害性I-ON(I-ON DY1019及びDY1041(それぞれAAGGTT及びAAGCTTからな

10

20

30

40

50

るヘキサマー領域を有する)によるISS-ODN免疫刺激活性のin vivo阻害を示すグラフである。ネズミモデル中でISS-ODN(DY1038、AACGTTからなるヘキサマー領域を有する)により刺激されたリンパ球増殖をI-ONの存在下あるいは不存在下で比較した。図中、測定された1分あたりのカウント(CPM:縦軸)の減少がISS-ODN免疫刺激活性の阻害を示す。試験した各I-ONの投与量は横軸に示した。DY1039(シトシンを有するISS-ODN)、DY1040、DY1042及びDY1043(いずれもDY1038のCGジヌクレオチドの代わりにCCジヌクレオチドを有する)を対照とした。DY1038との可能性のある競合の位置を確認するため、オリゴヌクレオチドはいずれも特定したヘキサマー領域を除くDY1038及びDY1043(無関係な配列対照)と同一とした。

図2は、本発明のDY1019及びDY1041 I-ONによるISS-ODN免疫刺激活性のin vivoにおける投与量に依存する阻害を確認するグラフである。ネズミモデル中で図1の実験で試験したものの以外の異なるISS-ODN(DY1018)により刺激されたリンパ球増殖をI-ONの存在下あるいは不存在下で比較した。図中、測定された1分あたりのカウント(CPM:縦軸)の減少がISS-ODN免疫刺激活性の阻害を示す。試験した各I-ONの投与量は横軸に示した。I-ON DY1019及びDY1041の阻害活性は投与量に従って増加し、DY1019の活性の増加は投与量の増加に比例した。DY1018との可能性のある競合の位置を確認するため、DY1019及びDY1041は特定したヘキサマー領域を除いてDY1018と同一である。

図3は、本発明のいくつかの阻害性I-ONによるISS-ODN免疫刺激活性のin vivoにおける投与量に依存する阻害を示すグラフである。ネズミモデル中でDY1038により刺激されたリンパ球増殖をI-ONの存在下あるいは不存在下で比較した。図中、測定された1分あたりのカウント(CPM:縦軸)の減少がISS-ODN免疫刺激活性の阻害を示す。試験した各I-ONの投与量は横軸に示した。減少傾向によれば、最も高い阻害活性は、I-ON DY1019、DY1041、DY1048、DY1050及びDY1060により示された(後のものはそれぞれAGGGTT、GAGGTC及びTTGCAAからなるヘキサマー領域を有する)。DY1039(メチル化シトシンを有するISS-ODN)、DY1040及びDY1043(後者はDY1038のCGジヌクレオチドの代わりにCCジヌクレオチドを有する)を対照とした。DY1038との可能性のある競合の位置を確認するため、オリゴヌクレオチドはいずれも特定したヘキサマー領域を除くDY1038及びDY1043(無関係な配列対照)と同一とした。

図4は、本発明の阻害性I-ONによるISS-ODN免疫刺激活性のin vivoにおける投与量に依存する阻害を示すグラフである。ネズミモデル中でDY1018 ISS-ODNにより刺激されたINF- γ 産生をI-ONの存在下あるいは不存在下で比較した。図中、測定されたINF- γ (縦軸)の減少がISS-ODN免疫刺激活性の阻害を示す。試験した各I-ONの投与量は横軸に示した。1つのI-ONを除いて全てにおいていくらかの阻害活性が見られ、最も高い活性はI-ON DY1019及びDY1041、並びにDY1042(TTCCTTからなるヘキサマー領域を有する)により示された。挿入図はDY1019によるINF- γ 産生の阻害のデータを別に示したものである。DY1018との可能性のある競合の位置を確認するため、オリゴヌクレオチドはいずれも特定したヘキサマー領域を除くDY1018及びDY1043(無関係な配列対照)に同一とした。

図5はIIS-ODNのアジュバントとしての特性を示すグラフであり、抗原(α -ガラクトシダーゼ)免疫感作マウスにおけるTh-2型細胞免疫反応を、抗原とIIS-ODN DY1019の同時投与(図中、 α -gal/M-ODNとして示した)により誘導した。Th2応答は追加免疫後に測定したIgEレベルにより示される。得られた値を、抗原及びISS-ODN組成物(α -gal/ISS-ODN(5'-ATTCAACGTTTCGC-3'))、pKISS-3(バックボーンにAACGTT ISS-ODNヘキサマーを3コピー有するプラスミド)及びpKISS-0(バックボーンにAACGTT ISS-ODNヘキサマーのコピーを有しないプラスミド)により免疫感作されたマウス、並びに食塩水のみを投与されたマウスで測定されたIgEレベルと比較する。1000 CPMを越える強力なIgE応答(Th2-型応答)は、食塩水を投与されたマウス(追加免疫後1週間で約1200 CPM)及び α -gal/M-ODN(追加免疫後1週間で約1750 CPM)を投与されたマウスのみで得られた。

発明の詳細な説明

A. IIS-ONの活性及び構造

1. IIS-ONの活性及びスクリーニングアッセイ

10

20

30

40

50

本発明のIIS-ONは、ISS-ODNの免疫刺激効果を低下させる。構造的には、ISS-ODNは、1個以上の非メチル化CGモチーフを含んでもよい6量体またはそれ以上の長さの非コードオリゴヌクレオチドである。一定の哺乳動物の種（例えば齧歯動物）で免疫刺激活性を有するISS-ODNにおいて、各CG配列の相対的位置は5'-CG-3'である（つまり、このCは3'位のGに対して5'位にある）。公知のISS-ODNの多くでは、CGモチーフに2以上のプリンヌクレオチド（例えばGAやAA）及び2以上のピリミジンヌクレオチド（例えばTCやTT）が隣接しており、免疫刺激ポリヌクレオチドのBリンパ球刺激活性を高めている（例えばKriegら、Nature, 374:546-549, 1995参照）。

機能的には、ISS-ODNは、宿主の細胞性及び体液性免疫応答、特にリンパ球の増殖や、宿主の単球及びナチュラルキラー（NK）細胞によるサイトカイン（IFNを含む）の放出を増強する。細菌のDNAは、概ね16個の塩基につき1個の頻度で非メチル化CpGジヌクレチドを含む。このようなジヌクレチドは、ある種のウイルス種にも存在するが、脊椎動物種では極めて少数しか存在しない。

マイコバクテリア並びに他の細菌やウイルスの種が、リンパ球の増殖、IL-12の産生、腫瘍壊死因子（TNF）の産生、ナチュラルキラー（NK）細胞活性、及びIFN- γ の分泌を刺激する能力を有するのは、細菌やウイルスのDNAにISS-ODNが存在するためであると考えられている（例えばKrieg, Trends in Microbiology, 4:73-76 (1996) 参照）。これに対して、脊椎動物におけるCpGの阻害やメチル化は、細菌やウイルス感染の脅威に対する進化的反応である可能性がある。興味深いことに、近年になって、細菌のISS-ODNに相当するようなCpGを含むオリゴヌクレオチドが、IL-12依存性経路を介する自己免疫疾患の発症や悪化に関連することが提唱されている（Segalら、J. Immunol., 158:5087 (1997)）。

合成ISS-ODNによるin vivoでの免疫刺激は、宿主のリンパ球と、例えばISS-ODNオリゴヌクレオチド、ISS-ODNオリゴヌクレオチドコンジュゲート、及びISSを含む組換え発現ベクターとを接触させることによって生ずる（ISS-ODNコンジュゲートの活性及びISS-ODNベクターに関するデータは、本出願と譲受人が同一の同時係属出願である米国特許出願第60/028,118号及び第08/593,554号に記載されており、この特許出願に記載のデータは、in vivoでのISS-ODNの免疫刺激活性を明示する目的のためにのみ引用により本明細書の一部とする）。従って、天然の微生物ISS-ODNは、宿主の免疫系が感染に応答するのを刺激するが、これらのISS-ODNの合成類似体は、微生物抗原のみならず、腫瘍抗原、アレルゲン、及び他の物質に対しての宿主の免疫応答も調節するために治療上有用である可能性がある（前述）。

本発明はIIS-ONの作用機序に関する何らかの理論により限定されるものではないが、IIS-ONは、宿主リンパ球の細胞膜への結合についてISS-ODNと競合すると考えられる。免疫刺激活性を与えるISS-ODNの領域は、非メチル化ジヌクレチド（例えばCpG）を含む6量体またはそれ以上の長さのヌクレオチドであると考えられる。従って、内部に1個以上の競合するジヌクレチド（後述する化学式において[Y]-[Z]及び[Y]-ポリ[Z]として定義される）を有する概ね6量体かそれ以上の長さの領域が、本発明のIIS-ONに対してISS阻害活性を与えると考えられる。

従って、本発明の阻害性化合物は、脊椎動物及び脊椎動物の免疫細胞におけるISS-ODNの免疫刺激活性を阻害する合成オリゴヌクレオチド（IIS-ON）である。

合成したIIS-ON候補物質群のプールからIIS-ONを同定するためには、以下の段階が、候補物質のプールを速やかにスクリーニングする単純で有効な方法となる。

a. 抗原で刺激した培養リンパ球及び/または単球の集団をISS-ODNと接触させて、リンパ球の増殖、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-12、及びIL-18サイトカインの分泌、及び/またはIgG2抗体の産生を誘導する。

b. ISS-ODNとの接触後の細胞培養物におけるリンパ球の数、分泌されたIFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-12及びIL-18サイトカインのレベル、IgG1若しくはIgG2抗体のレベル、またはIgE抗体のレベルの変化を測定する。

c. これらの細胞を候補IIS-ONに接触させる。

d. 該オリゴヌクレオチドと接触後の細胞の集団におけるリンパ球の数、分泌されたサイ

10

20

30

40

50

トカインのレベル、IgG2抗体のレベル、またはIgE抗体のレベルの変化を測定する。これらの値（IgG1及びIgE抗体を除く）の何れかがステップ（2）での測定値と比較して低下することが、候補オリゴヌクレオチドが本発明のIIS-ONであること、つまりそれがISS-ODNの免疫刺激活性を阻害することを表す。

あるいは、IgG1またはIgE抗体の測定されたレベルの上昇は、Th2型リンパ球応答の上昇を間接的に示すものであり、IIS-ODNが存在するとISS-ODNのTh1刺激活性が低下することを示している。上記の段階を実施する際の使用に適した測定技術は、後述の実施例の項で説明する。本明細書の開示内容に照らし、ISS-ODNで誘導されたリンパ球の増殖またはサイトカインの分泌の変化を測定するための他のアッセイ技術は、当業者には明らかであろう。

またこのスクリーニング方法を、宿主から採取された免疫細胞のサンプルにおけるISS-ODNの検出のために用いることもできる。本発明のこの態様は、宿主に抗原（例えば微生物抗原）や自己抗原を含むISS-ODNが存在することを確認する際に役立つ。この目的には、上述のスクリーニング方法のステップを変更して以下のステップを含むようにする。

a. 宿主から免疫細胞を得る。この細胞は、抗原または自己抗原に露出されていたと思われるものである。

b. 宿主の免疫細胞のサンプルにおけるリンパ球の増殖、同サンプルからのIFN γ 、IFN α 、IFN β 、IL-12及びIL-18サイトカインの分泌、同サンプルによるIgG1若しくはIgG2抗体の産生、または同サンプルによるIgE抗体の産生のレベルを測定する。

c. 宿主の免疫細胞のサンプルをIIS-ONに接触させる。

d. IIS-ODNとの接触後の宿主の免疫細胞のサンプルにおけるリンパ球の数、または分泌されたIFN γ 、IFN α 、IFN β 、IL-12及びIL-18サイトカインのレベル、及び/またはIgEもしくはIgG1抗体のレベルの変化を測定する。リンパ球の増殖、サイトカインの分泌、またはIgG2抗体の産生についての測定値が段階（b）での測定値と比較して低くなること、並びにIgG1及びIgE抗体の産生についての測定値がステップ（b）での測定値と比較して高くなることは、IIS-ONによる阻害を受けたISS-ODNが宿主の免疫細胞のサンプルに存在することを示す。

2. 典型的なIIS-ONの構造

CpGモチーフを含むISS-ODNの活性を阻害する具体的なIIS-ONは、以下の一般的な一次構造で構成されるオリゴヌクレオチドを含む。

5'-プリン-プリン-[Y]-[Z]-ピリミジン-ピリミジン-3'または

5'-プリン-プリン-[Y]-[Z]-ピリミジン-ポリピリミジン-3'

上記中Yはシトシン以外の任意の天然または合成ヌクレオチドであり、好ましくはグアノシン、アデノシンまたはイノシン（RNA I-ONの場合）であり、最も好ましくはグアノシンである。一般に、Zは任意の天然または合成ヌクレオチドまたは同じヌクレオチドの反復である。好ましくは、Yがイノシンの場合、Zはイノシンまたは1以上のグアノシンである。Yがグアノシンの場合は、Zは好ましくはグアノシンまたは1以上の非メチル化シトシンである。Yがアデノシンである場合、Zは好ましくはグアノシンである。しかしYがグアノシン、アデノシンまたはイノシンでない場合は、Zはグアノシン、アデノシンまたはイノシンである。最も好ましくは、5'プリンが同じヌクレオチドであり、3'ピリミジンも同様である。例えば、**がYZであるとすると、5'プリン及び3'ピリミジンは、AA**TT、AG**TT、GA**TT、GG**TT、AA**TC、AG**TC等であり得る。

前述のIIS-ONのコアヘキサマー構造には、その上流及び/または下流に、任意の数または組成のヌクレオチドまたはヌクレオチド群が隣接し得る。しかし、IIS-ONは、好ましくは、IIS-ONの取込みを増強するとともに、IIS-ONと標的組換え発現ベクターまたは宿主細胞との非特異的な相互作用を最小限にするために、6量体、あるいは6~45量体の何れかの長さを有するものである。IIS-ONに存在する隣接配列は、任意の公知のISS-ODNに存在する隣接配列（例えば隣接配列DY1038（TTGACTGTG*****AGAGATGA）、ここで*****は免疫刺激ヘキサマー配列である）に一致する構成であるのが好ましい。当業者であれば、報告された公知のISS-ODNのヌクレオチド配列に精通しているか、あるいは容易に特定すること

10

20

30

40

50

ができるであろう。これに関して容易に参照できるものとしては、以下の出典のものが特に有用である。

Yamamotoら、Microbiol.Immunol.,36:983 (1992)

Ballasら、J.Immunol.,157:1840 (1996)

Klinmanら、J.Immunol.,158:3635 (1997)

Satoら、Science,273:352 (1996)

上記の各文献は、ISS-ODNのヌクレオチドの組成に関する当分野での知識の水準を示す目的で、引用により本明細書の一部とする。

具体的な本発明の阻害性IIS-ONには、以下のヘキサマー配列を有するものが含まれる。

1. “GG”ジヌクレチドを有するIIS-ODN、即ちAAGGTT、AGGGTT、GGGGTT、GGGGTC、AAGGTC、AAGGCC、AGGGTT、AGGGTC、GAGGTT、GAGGTC、GAGGCC、GGGGCT等。

2. “GC”ジヌクレチドを有するIIS-ODN、即ちAAGCTT、AGGCTC、AGGCCC、GAGCTT、GAGCTC、GAGCCC、GGGCTT、GGGCTC、GGGCCC、AAGCCC、AAGCCT、AGGCCT、GAGCCT等。

3. 上記化学式に従って作製した前記ヘキサマー配列のヌクレオチドを、イノシン及び/またはアデノシンで置換したもの。

特に強力な阻害性活性を有すると予想されるIIS-ONヘキサマーは、GG及びGC競合ジヌクレチドを有するもの、具体的にはAAGGTT (図のDY1019)、AAGCTT (図のDY1041)、AGGGCT及びGAGGTT (それらの3'ピリミジン-pピリミジン類似体を含む)である。

IIS-ONは、一本鎖もしくは二本鎖のDNA、一本鎖もしくは二本鎖のRNA、及び/またはオリゴヌクレオチドであり得る。競合するジヌクレオチドが隣接するIIS-ONのヌクレオチドの塩基は、公知の天然塩基または合成の非天然塩基 (例えばTCAGまたは、RNAでのUACGI) であり得る。他の化合物 (例えばペプチド) が結合する点として使用するために、オリゴヌクレオチドを慣用の技術を用いてIIS-ONの内部領域及び/または末端に組み込むことができる。IIS-ONの阻害活性の他に所望の特性を有するIIS-ONを作製するために、当業者に公知の方法でIIS-ONの塩基、糖部分、リン酸基、及び末端を修飾することもできる。例えば、糖部分を、IIS-ONのヌクレオチド塩基に任意の立体配置で結合することができる。さらに、バックボーンリン酸基修飾 (例えば、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、ホスホロジチオエートによるヌクレオチド間結合) によって、IIS-ONに抗微生物活性を賦与して、治療上の用途において特に有用なものとすることができる。

オリゴヌクレオチドにこのようなリン酸基修飾を形成するための技術は当分野において周知であり、詳細な説明は要しない。このような有用な技術の一例を概括すると、標的オリゴヌクレオチド産物に対する中間体リン酸トリエステルを調製し、ヨウ素水溶液、あるいは無水アミンのような他の薬剤で酸化して天然のリン酸トリエステルにする。得られたオリゴヌクレオチドホスホロアミデートを硫黄で処理し、ホスホロチオエートを得る。同一の一般的な技術 (硫黄処理段階を除く) を適用して、メチルホスホネートからメチルホスホルアミダイト (methylphosphamidites) を得ることができる。リン酸基修飾技術のさらに詳細な点については、当業者は、米国特許第4,425,732号、第4,458,066号、第5,218,103号、及び第5,453,496号、並びにTetrahedron Lett.21:4149 (1995), 7:5575 (1986), 25:1437 (1984) 及びJournal Am.Chem.Soc., 93:6657 (1987) を参考にされたい。上記文献の開示内容は、上記化合物の調製に関する当分野における標準的な知識の水準を示すことのみを目的として、引用により本明細書の一部とする。

特に有用なリン酸基修飾は、IIS-ONオリゴヌクレオチドのホスホロチオエートまたはホスホロジチオエートへの変換である。ホスホロチオエート及びホスホロジチオエートは、その強力な抗微生物特性に加えて、それに対応する未修飾オリゴヌクレオチドと比較してin vivoでの分解に対するより高い耐性を有し、本発明のIIS-ONを宿主がより利用しやすいものにする。

IIS-ONを、当分野で周知の技術及び核酸合成装置を用いて合成することができる。これに関する参考文献として、例えばAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Chs.2及び4 (Wiley Interscience, 1989); Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab., New York, 1982); 米国特許第4,458,066号及び米国特許

10

20

30

40

50

第4,650,675号を参照されたい。これらの参考文献は、合成オリゴヌクレオチドの生成に関する当分野における知識を示すことのみを目的として、引用により本明細書の一部とする。

あるいは、単離した微生物ISS-ODNの突然変異によってIIS-ONを得て、天然CpGモチーフを競合するジヌクレチドに置換することができる。適切なプローブまたは抗体が利用できる場合、核酸ハイブリダイゼーションに基づくスクリーニング方法により任意の生物から任意のポリヌクレオチド配列を単離することができる。オリゴヌクレオチドプローブは、当該タンパク質をコードする配列の一部分に対応するもので、化学的に合成することができる。これを行うためには、アミノ酸配列の短いオリゴペプチド配列が判っていなければならない。該タンパク質をコードするDNA配列を遺伝暗号から類推することもできるが、遺伝暗号の縮重を考慮に入れなければならない。

10

例えば、目的のISSを含むポリヌクレオチドを含むと考えられるcDNAライブラリーのスクリーニングは、cDNAに由来する種々のmRNAを卵母細胞に注入し、cDNAの遺伝子産物が発現するために十分な時間を取り、かつ、例えば目的のポリヌクレオチドにコードされるペプチドに特異的な抗体を用いるか、あるいは目的のポリヌクレオチドにコードされるペプチドに特徴的な反復モチーフに対するプローブ及び組織発現パターンを用いることにより所望のcDNA発現産物の存在について試験することによって行うことができる。あるいは、1個以上のエピトープを有する目的のペプチドの発現を、該ペプチドに特異的な抗体を用いてcDNAライブラリーを間接的にスクリーニングすることができる。このような抗体は、ポリクローナル抗体としてまたはモノクローナル抗体として誘導され得、目的のcDNAの存在を示す発現産物を検出するために用いることができる。

20

ISSを含むポリヌクレオチドが得られれば、例えば従来技術を用いた酵素による切断によって所望の長さまで短くすることができる。次にISS-ODNオリゴヌクレオチド産物のCpGモチーフを変異させて、CpGモチーフを競合するジヌクレチドに置換する。既知の配列を有するDNAの特定の部位において置換変異させるための技術、例えばPCRによるM13プライマー変異誘発はよく知られている。IIS-ONが非コードであることから、置換変異の誘発におけるオープンリーディングフレームの維持についての問題は起こらない。しかし、*in vivo*で使用する場合、ポリヌクレオチド出発材料、ISS-ODNオリゴヌクレオチド中間体、またはIIS-ON変異体産物は、実質的に純粋な状態（即ち、当業者に選択された既存の技術を用いて可能な限り天然の汚染物質及びLPSが無い状態で）にしなければならない。

30

本発明のIIS-ONは単体で用いても、組換え発現ベクター（プラスミド、コスミド、ウイルス、またはレトロウイルス）にcis-またはtrans-に組み込んでもよく、それらのベクターは組換え発現ベクターにより引き渡され得る任意の治療上有益なタンパク質をコードし得る。利便性の点からいえば、IIS-ONは、発現ベクターに組み込まずに投与するのが好ましい。しかし、発現ベクターに組み込むことが必要な場合は、当業者には詳しい説明は不要な慣用の技術を用いてそのような組み込みを行うことが可能である。しかし概観のためには当業者はAusubel, Current Protocols in Molecular Biology, (前出)を参考にし得る。

簡単に説明すると、組換え発現ベクターの構築には標準的なライゲーション技術を利用する。構築したベクターに正しい配列があることを確認する解析のためには、ライゲーション混合物を用いて宿主細胞を形質転換し、適切な抗生物質耐性に基づいて正しく形質転換されたものを選択する。この形質転換体からベクターを作製し、制限酵素消化により分析し、及び/または例えばMessingら、(Nucleic Acids Res., 9:309, 1981)の方法、Maxamら、(Methods in Enzymology, 65:499, 1980)の方法、または当業者が知る他の適切な方法によって配列決定する。切断された断片のサイズによる分離は、例えばManiatisら (Molecular Cloning, pp133-134, 1982)に記載された従来のゲル電気泳動法によって行う。

40

宿主細胞は、本発明の発現ベクターで形質転換し、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または遺伝子の増幅に適するように改変した従来の培養培地で培養する。温度やpH等のような培養条件は、発現のために選択した宿主細胞についてこれまでに用いられていた条件であり、当業者には明らかであろう。

50

本発明のIIS-ONの担体として組換え発現ベクターを用いる場合は、病原性を欠いていることからプラスミドやコスミドが特に好ましい。しかし、プラスミドやコスミドはin vivoでウイルスより早く分解されるため、全身に投与される遺伝子治療用ベクターにより發揮されるISS-ODNの免疫刺激活性を実質的に阻害するために適当な用量のIIS-ONを供給できないことがある。ウイルスベクター代替物のなかで、アデノ随伴ウイルスは病原性が低いという利点を有する。アデノ随伴ウイルスは外来遺伝子の挿入を受容する能力が比較的低いが、本発明のIIS-ONが比較的小さいサイズにしか合成できないことから、この点について問題はない。

本発明において利用できる他のウイルスベクターには、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、またはレトロウイルスのようなRNAウイルスがある。レトロウイルスベクターは、好ましくはネズミ、トリ、またはヒトHIVレトロウイルスの誘導体である。1つの外来遺伝子を挿入可能なレトロウイルスベクターの例には、限定するものではないが、モロニーマウス白血病ウイルス (MoMuLV)、ハーベイマウス肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳腺癌ウイルス (MuMTV)、及びラウス肉腫ウイルス (RSV) がある。多くの他のレトロウイルスベクターは複数の遺伝子を組み込むことができる。これらのベクターはいずれも選択マーカーの遺伝子を転位あるいは組み込むことが可能であり、従って形質導入された細胞を同定し、生成することができる。

組換えレトロウイルスは不完全であることから、感染性のベクター粒子を作製するために補助が必要である。例えばLTR内に制御配列の制御下にあるレトロウイルスの構造遺伝子の全てをコードするプラスミドを含むヘルパー細胞系 (helper cell lines) を用いることによって、この補助を与えることができる。これらのプラスミドは、パッケージング機構がキャプシド形成のためのRNA転写物を認識できるようにするヌクレオチド配列を欠いている。パッケージングシグナルを欠くヘルパー細胞系としては、限定するものではないが、例えば 2、PA317、及びPA12がある。これらの細胞系は、ゲノムがパッケージングされないため、空のウイルス粒子を生成する。パッケージングシグナルは損なわれていないが、構造遺伝子が目的の他の遺伝子で置換されているこのようなヘルパー細胞系にレトロウイルスベクターを導入すると、ベクターのパッケージングが可能となり、ベクターウイルス粒子を作り出すことができる。

例えば、特定の標的細胞上の受容体に対するリガンドをコードする遺伝子とともに1種以上の目的の配列をウイルスベクターに挿入することによって、ベクターに標的への特異性を賦与することができる。例えば、糖、糖脂質、またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入することによって、レトロウイルスベクターを標的特異的なものとすることができる。好ましいターゲティングは、標的のレトロウイルスベクターに対する抗体を用いることによって達成できる。レトロウイルスのゲノムに挿入して目的のポリヌクレオチドを含むレトロウイルスベクターの標的特異的なデリバリーを可能にすることができる特定のポリヌクレオチド配列は、当業者が知り得、あるいは過度の実験を行うことなく容易に確認できるものである。

あるいは、標的への送達のためにコロイド分散系を用いてもよい。コロイド分散系には、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、及び水中油エマルション、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質性の系が含まれる。本発明の好ましいコロイド形はリポソームである。

リポソームは、in vitro及びin vivoでのデリバリー用担体として有用な人工膜の小胞である。直径が0.2~4.0 µmの大きな単ラメラ小胞 (LUV) は、大きな高分子を含む水性バッファのかなりの割合を包入できることが示されている。RNA、DNA、及び完全なウイルス粒子を水性の内部に包入し、生物学的に活性な形態で細胞に送達することができる (Fralleyら、Trends Biochem.Sci., 6:77, 1981)。哺乳動物の細胞の他、植物、酵母菌、及び細菌におけるポリヌクレオチドの送達のためにリポソームが用いられてきた。リポソームを効率的な遺伝子移送用担体とするためには、以下の特徴が存在しなければならない。すなわち、(1) アンチセンスポリヌクレオチドをコードする遺伝子を包入するとともに、その生物学的活性を損なわないこと、(2) 標的でない細胞より標的の細胞に優先的に大多

10

20

30

40

50

数が結合すること、(3)高い効率で標的細胞の細胞質に小胞の水性内容物を送達すること、及び(4)遺伝情報を正しく効率的に発現することである(Manninoら、Biotechniques, 6:682, 1988)。

リポソームの組成は、通常リン脂質、特に相転移温度の高いリン脂質を、通常はステロイド、特にコレステロールと組み合わせた配合物である。他のリン脂質または他の脂質を用いてもよい。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度、及び二価の陽イオンの存在によって変わる。

リポソームの作製に有用な脂質の例としては、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシド、及びガングリオシドのようなホスファチジル化合物が挙げられる。特に有用なのは、ジアシルホスファチジルグリセロールで、脂質部分が14~18個の炭素原子、特に16~18個の炭素原子を含み、かつ飽和しているものである。リン脂質の具体例として、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、及びジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。

リポソームのターゲティングは、解剖学的及び機械論的因子に基づいて分類できる。解剖学的分類は、例えば器官特異的、細胞特異的、及び細胞器官特異的といった選択性のレベルに基づいた分類である。機械論的ターゲティングは、そのターゲティングが受動的、能動的の何れであるかということによって分類できる。受動的ターゲティングでは、類洞の毛細血管を有する器官における細網内皮系組織(RES)の細胞に分布するというリポソームの自然の傾向を利用する。他方、能動的ターゲティングでは、天然の局在部位以外の器官や細胞型へのターゲティングを達成するために、例えばモノクローナル抗体、糖、糖脂質、またはタンパク質のような特定のリガンドにリポソームを結合したり、あるいはリポソームの組成やサイズを変更することによってリポソームを改変する。

標的を与えられるデリバリーシステムの表面は、さまざまに改変することができる。標的を与えられるデリバリーシステムがリポソームの場合は、ターゲティングリガンドを脂質二重層に安定的に結合させておくために、脂質基をリポソームの脂質二重層に組み込むことができる。脂質鎖をターゲティングリガンドに結合するために、周知のさまざまな結合基を用いることができる(例えば、Yanagawaら、Nuc.Acids Symp.Ser., 19:189 (1988); Grabarekら、Anal.Biochem., 185:131 (1990); Starosら、Anal.Biochem., 156:220 (1986) 及びBoujradら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:5728 (1993)を参照、これらの開示内容はオリゴヌクレオチドと脂質の結合についての当分野における標準的な知識の水準を示すのみの目的で引用により本明細書の一部とする)。

IIS-ONの標的への送達も、IIS-ONを、ウイルス組換え発現ベクターまたは非ウイルス組換え発現ベクターに、抗原または他のリガンドに、モノクローナル抗体に、あるいは所望の結合特異性を有する他の分子に結合することによって達成できる。対象とするIIS-ODNコンジュゲートの具体例は、自己抗原または自己抗体がIIS-ODNコンジュゲートのパートナーであるものである。IIS-ODN自己抗原コンジュゲートは、その自己抗原に対する宿主のTh2型免疫応答を追加刺激する(同時に自己抗原自体により誘発されたTh1型免疫応答を阻害する; Conboyら、J.Exp.Med., 185:439-451 (1997)参照)のに有用であり、IIS-ODN自己抗体コンジュゲートは、自己免疫状態にある宿主において受動免疫を誘導するのに役立つ。このようなコンジュゲート並びに一般にIIS-ONをデリバリーするための具体的な方法は後により詳細に説明する。

IIS-ONコンジュゲートとして有用な自己抗原及び自己抗体の材料については、当業者のよく知るところであり、あるいは容易に確認できるところであろう。このようなコンジュゲート材料の例には、ミエリン塩基タンパク質(例えばSegalら、J.Immunol., 158:5087 (1997); Matsuoら、Am.J.Pathol., 150:1253 (1997); 及びSchluesener, FEMS Immunol.Med.Microbiol., 17:179 (1997)に記載の配列及び材料の情報を参照)、シェーグレン症候群自己抗原(例えばHanjeiら、Science, 276:604 (1997)参照)、ヘモクロマトーシス自己抗原(例えばRuddyら、Genome Res., 7:441 (1997)参照)、La/SSBタンパク質(例えばCastroら、Cell Calcium, 20:493 (1996)参照)、HsEg5狼瘡自己抗原(例えばWhiteheadら、A

10

20

30

40

50

rthritis Rheum., 39:1635 (1996) 参照)、Ki核狼瘡自己抗原(例えばPaesen及びNuttal, Biochem.Biophys.Acta, 1309:9 (1996) 参照)、及びそれに対する抗体(例えばMenonら、J.Autoimmun., 10:43 (1997) 及びRahmanら、Semin.Arthritis Rheum., 26:515 (1996) [ヒト抗リン脂質(抗-DNA)モノクローナル抗体]; 及びKramersら、J.Autoimmun., 9:723 (1997) [モノクローナル抗ヌクレオソーム狼瘡自己抗体]参照)が含まれる。各引用文献は、自己抗原及び自己抗体の同定、活性、及び構造に関する当業者の知識の水準を示すのみの目的で本明細書の一部とする。

他の有用な結合パートナーの例としては、免疫原性抗原(アレルゲン、生きた弱毒化ウイルス粒子及び腫瘍抗原を含む)、ターゲティングペプチド(例えば受容体リガンド、抗体及び抗体断片、ホルモン及び酵素)、非ペプチド抗原(ペプチド結合により結合した、例えば脂質、多糖類、糖タンパク質、ガングリオシド等)、及びサイトカイン(インターロイキン、インターフェロン、エリスロポエチン、腫瘍壊死因子、及びコロニー刺激因子を含む)が挙げられる。このような結合パートナーは、慣用の技術(例えばペプチド合成)によって調製でき、その多くは市販されている。

オリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートの調製に有用な方法も、当業者のよく知るところであり、あるいは容易に確認できるところであろう。コンジュゲーションは、IIS-ONの何れかの末端、内部に位置する適当に修飾した塩基(例えばシトシンまたはウラシル)において行うことができる。参考までに、オリゴヌクレオチドをIgのオリゴ糖部分及びタンパク質にコンジュゲートする方法は公知である(例えばO'Shannessyら、J.Applied Biochem., 7:347 (1985) 参照。この文献の内容は、オリゴヌクレオチドコンジュゲーション技術に関する当分野における標準的な知識の水準を示すためのみの目的で引用により本明細書の一部とする)。他の有用な参考文献は、Kricka(ed.), Nonisotopic DNA Probe Techniques (Acad.Press, 1992) に記載されたKessler: "Nonradioactive Labeling Methods for Nucleic Acids" である。

簡単に説明すると、公知の適切なコンジュゲーション方法の例には、固体支持体化学反応を用いた3'末端結合によるコンジュゲーションが含まれる(例えばHaralambidisら、Nuc.Acids Res., 18:493 (1990) 及びHaralambidisら、Nuc.Acids Res., 18:501 (1990) [ペプチド結合パートナーの固体支持体上合成]; Zuckermannら、Nuc.Acids Res., 15:5305 (1987), Coreyら、Science, 238:1401 (1987), 及びNelsonら、Nuc.Acids Res., 17:1781 (1989) [オリゴヌクレオチド結合パートナーの固体支持体上合成]参照)。Benoitら、Neuromethods, 6:43 (1987) に記載のようにアミノ-アミノ基結合を行うことができ、Sinahら、Oligonucleotide Analogues: A Practical Approach (IRL Press, 1991) に記載のようにチオール-カルボキシル基結合を行うこともできる。これら後者の方法では、オリゴヌクレオチド結合パートナーを固体支持体上で合成し、ホスホルアミダイトの反対側に保護されたアミン、チオール、またはカルボキシル基を有する結合基を、5'末端のヒドロキシル基に共有結合させる(例えば米国特許第4,849,513号、第5,015,733号、第5,118,800号、及び第5,118,802号を参照)。

またオリゴヌクレオチドパートナーのペプチドへの結合は、リンカーアーム(例えばアミンまたはカルボキシル基)を修飾したシトシンまたはウラシル塩基に組み込むことによってもできる(例えばRuth, 4th Annual Congress for Recombinant DNA Research 123参照)。アフィニティ結合(例えばビオチン-ストレプトアビジン)を用いてもよい(例えばRogetら、Nuc.Acids Res., 17:7643 (1989) 参照)。

オリゴヌクレオチドを脂質に結合する方法も公知であり、オリゴ-リン脂質コンジュゲートの合成(例えばYanagawaら、Nuc.Acids Symp.Ser., 19:189 (1988) 参照)、オリゴ-脂肪酸コンジュゲートの合成(例えばGrabarekら、Anal.Biochem., 185:131 (1990) 参照)、及びオリゴ-ステロールコンジュゲートの合成(例えばBoujradら、Proc.Natl.Acad.Sci USA, 90:5728 (1993) 参照)が挙げられる。

上記の各引用文献は、オリゴヌクレオチドコンジュゲーション方法に関する当分野における知識や技術の水準を示すためのみの目的で引用により本明細書の一部とする。

ベクターや他のデリバリーシステムを使用することなくデリバリーする場合は、IIS-ONを

10

20

30

40

50

医薬上許容される組成物に調製する。本発明のIIS-ONとともに用いるのに適した医薬上許容される担体には、滅菌水性または非水性溶液、懸濁液、及びエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、オリーブ油のような植物油、及びオレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルが挙げられる。水性の担体としては、水、アルコール性水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が挙げられ、食塩水や緩衝媒体が含まれる。非経口投与用の担体としては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖液、ブドウ糖及び塩化ナトリウム、乳酸化リンゲル液、または不揮発性油が含まれる。静脈内投与用の担体としては、水分及び栄養補給液、電解質補給液（例えばリンゲルブドウ糖液ベースのもの）等が挙げられる。防腐剤や他の添加物、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス等が存在してもよい。IIS-ONの組成物は、周知の方法を用いて凍結乾燥し、後で再形成して本発明に従って使用してもよい。

10

B. 本発明のIIS-ONの投与方法及び使用方法

本発明のIIS-ONは、どこに存在していても、ISSの免疫刺激活性の阻害のために有用である。従って、IIS-ONは、例えば細菌やウイルスのISS-ODNに対する宿主の免疫応答を低下させる抗炎症剤として有用である。IIS-ONは、組換え発現ベクター、特に遺伝子治療や免疫化に用いるベクターに存在する、既知あるいは未知のISS-ODNの免疫刺激活性を抑制する薬剤としても有用である。この他、微生物のISS-ODNにより刺激された宿主の自己免疫応答の阻害や、抗原に対するTh2型応答の追加刺激にも有用である。

本明細書において「阻害」とは、IIS-ODNの投与前のISS-ODNで刺激された宿主の免疫応答のレベルと比較したときの宿主の免疫応答の低下をいう。ISS-ODNがある種のサイトカイン（例えばIL-12、IL-18、及びIFN）の分泌を刺激し、宿主細胞の免疫応答をTh1レパートリーにシフトさせる傾向を有することから、サイトカインレベルの測定値、サイトカインで刺激されたリンパ球増殖の測定値、IgG2抗体レベル（その産生がTh1リンパ球応答を表す）の測定値、IgEレベル（その抑制がTh1リンパ球応答を表す）の測定値、及びIgG1抗体レベル（その産生がTh2リンパ球応答を表す）の測定値は、いずれもIIS-ODNの阻害活性の検出に使用するのに適した評価基準である。このような数値を求める方法の具体例や詳細は後述する。

20

Th1/Th2レパートリーのシフト及びその結果としてのサイトカインレベルの変化については、CD4+リンパ球が、通常2種の異なるサブセット、即ちTh1及びTh2細胞の一方に入るということを想起することが理解の助けとなる。Th1細胞は、主にIL-2、IFN、及びTNF（後者の2つは、マクロファージの活性化及び遅延型過敏反応を媒介する）を分泌し、Th2細胞は、主にIL-4（これはIgE抗体の産生を刺激する）、IL-5、IL-6、及びIL-10を分泌する。このようなCD4+サブセットは、互いに負の影響を与え合う。即ち、Th1リンパ球の分泌によってTh2リンパ球の分泌が阻害され、逆もまた同様である。さらに、Th2細胞が細胞障害性Tリンパ球（CTL）に露出されるとTh2細胞の活性も抑制されると考えられる。

30

Th1の活性化を助けると考えられる因子は、ウイルス感染によって誘導される因子と共通点があり、このような因子としては、細胞内病原体、IFN- α 、IFN- γ 、IFN- β 、IL-12、及びIL-18への露出、並びにAPCの存在及び少量の抗原に露出されることが挙げられる。Th1型免疫応答は、自己免疫疾患においても支配的である。Th2の活性化を助けると考えられる因子には、IL-4及びIL-10への露出、Bリンパ細胞の一部でのAPC活性及び大量の抗原等が挙げられる。活性Th1（IFN- γ ）細胞は細胞性免疫を増強し、このため細胞内感染に対する応答において特に重要である。一方活性Th2細胞は抗体産生を増強し、このため（IL-4で刺激されたIgE抗体産生の誘導に関連するアナフィラキシー性事象の生ずる危険性にも関わらず）細胞外感染に対する応答において特に重要である。従って、宿主の免疫応答を、Th1からTh2レパートリーへ及びその逆にシフトさせる能力は、感染やアレルギーに対する宿主の免疫を増強及び調節するために臨床的に極めて重要である。さらに、Th1/Th2媒介サイトカイン放出を制御することによって、（自己免疫疾患の治療のために臨床的に重要な）自己抗原に対する宿主の免疫応答、及び（遺伝子治療及び遺伝子免疫化のための遺伝子発現の調節のために臨床的に重要な）組換え発現ベクター抗原に対する宿主の免疫応

40

50

答を制御することが可能となる。

組換え発現ベクターの免疫原性の調整に使用する場合は、本発明のIIS-ONは、*in vivo*及び*ex vivo*経路を含む、標的組換え発現ベクターを宿主に投与するとき用いる任意の経路及び手段によって投与する。宿主細胞によるIIS-ONの取込みは、少なくとも治療用及び免疫化用ベクターの取込みの場合と同程度の強さで生じ、同程度でない場合は一層強く生じ、これはプラスミド、ウイルス、及びレトロウイルスの核酸の全体の大きさと比較してIIS-ONのサイズが小さいためである。

本発明において、IIS-ON投与の1つの具体的な目標は、ISS-ODNに刺激された、Th1媒介サイトカイン産生を阻害することである。従って、処置を受けた宿主におけるそのようなサイトカインレベルの測定可能な低下が、本発明のこの態様におけるIIS-ONの治療活性を構成することを意味する。本発明におけるIIS-ONの治療的活性は、遺伝子発現レベルがIIS-ONが存在しない場合の発現レベルより延長されることによって示される。治療用ベクター及び免疫化用ベクターの投与、ひいてはIIS-ONの投与のための臨床的に許容される手段及び経路については、遺伝子治療及び免疫化技術の分野の通常の技術者のよく知るところであり、あるいは容易に確認できるところであろう。

抗炎症剤として使用するためには、IIS-ON及びIIS-ONコンジュゲートは、公知の抗炎症剤及び抗生物質を投与するとき用いる任意の経路及び手段によって投与する。この場合のIIS-ODN投与の具体的な目標は、ISS-ODNに刺激されたTh1媒介サイトカイン産生を阻害することである。従って、処置を受けた宿主におけるそのようなサイトカインレベルの測定可能な低下が、本発明のこの態様におけるIIS-ODNの治療活性を構成する。抗炎症剤及び抗生物質、ひいてはIIS-ON及びそのコンジュゲートの投与のための臨床的に許容される手段及び経路については、感染症治療の分野の通常の技術者のよく知るところであり、あるいは容易に確認できるところであろう。

自己免疫調整剤として使用するためには、IIS-ON及びIIS-ON自己抗原または自己抗体コンジュゲートを、公知の自己免疫疾患の治療法を実施するとき用いる任意の経路及び手段によって投与する。この場合のIIS-ODN投与の具体的な目標は、ISS-ODNに刺激された、Th1媒介IL-12産生を阻害することである。従って、自己免疫宿主におけるIL-12レベルの測定可能な低下が、本発明のこの態様におけるIIS-ODNの治療的活性を構成する。IIS-ON及びそのコンジュゲートの投与のための臨床的に許容される手段及び経路については、自己免疫疾患の治療の分野の通常の技術者のよく知るところであり、あるいは容易に確認できるところであろう。

免疫賦活薬として投与されるISS-ODNの調整剤として使用する場合は、本発明のIIS-ON及びIIS-ONコンジュゲートを、*in vivo*及び*ex vivo*経路を含む、標的のISS-ODNを宿主に投与するとき用いる任意の経路及び手段によって投与する。例えば、ISS-ODNを免疫化プロトコルにおけるアジュバントとして投与する場合は（本出願と譲受人が同一の同時係属出願である米国特許出願第60/028,118号及び第08/593,554号を参照）、その後治療経過を変化させるためにISS-ODN免疫刺激活性を低下、または除去できることが望ましいことがある。従ってこの場合、IIS-ONがISS-ODNを「オフ」状態にするスイッチとしての役目を果たし、これによりIIS-ON及びIIS-ONコンジュゲートの活性は、ISS-ODNに刺激されたサイトカイン産生やISS-ODNに刺激されたリンパ球産生の測定された低下、またはTh1リンパ球レパートリーからシフトして離れることにより示される。

細胞外抗原に対するTh2免疫応答のアジュバントとして使用するためには、本発明のIIS-ONは、抗原をベースにしたワクチンを宿主に投与するとき用いる任意の経路及び手段によって投与する。Th1リンパ球レパートリーからシフトして離れることが、抗原の存在下でIIS-ON及びIIS-ONコンジュゲートをTh2リンパ球刺激アジュバントとして用いる場合の有効性の基準である。

本発明のIIS-ONの具体的な利点は、それが比較的低用量でもISS-ODN阻害活性を発揮する能力を有する点である。使用される用量は達成すべき臨床的な目標に応じて変わるが、適切な用量の範囲は、単回の投与で1mlの担体当たり約1～200 µgのIIS-ONを与える範囲である。本発明によるIIS-ONの投与に関する適切なパラメータについては、本明細書の開示内

10

20

30

40

50

容に照らし、臨床技術の分野の通常の知識を有する者がよく知るところであり、あるいは容易に確認できるところであろう。

これに関し、IIS-ONの阻害活性は実質的に用量に依存する。従って、IIS-ONの効力を2倍にするためには、各単回の投与における濃度を2倍にする。ISS-ODNの活性（組換え発現ベクターにおけるISS-ODNの活性を含む）の阻害に使用するためには、IIS-ONと標的ISS-ODNまたはベクターを等しい用量だけ投与し、次に阻害に必要なレベルを得るために必要な程度にIIS-ONの用量を高めるのが有用である。抗炎症剤として用いる場合は、IIS-ONを低用量（例えば約1 $\mu\text{g/ml}$ ~ 約50 $\mu\text{g/ml}$ ）投与し、次に必要な治療上の目標を達成するために必要な程度にIIS-ONの用量を高めるのが有用である。あるいは、IIS-ONの目標用量は、IIS-ONの投与後初めの24~48時間以内に宿主から採取した血液サンプルにおいて約1~10 μM となる量であると考えることができる。

10

ISS-ODNの免疫刺激活性を阻害するIIS-ONの効果を最大にするためには、IIS-ONを標的ISS-ODNまたは組換え発現ベクターと同時に投与するのが好ましい。さらに、宿主への投与の前にIIS-ONを標的組換え発現ベクターとともにプレインキュベートし、治療または免疫化のための投薬計画における処置の間に、標的組換え発現ベクターが宿主におけるISS-ODN免疫刺激活性を示す能力を低下させることもできる。抗炎症剤として使用の場合は、IIS-ONを他の抗炎症剤と同時に投与するか、あるいは処置を受ける宿主に他の抗炎症剤を別に投薬してもよい。

これらの目的のため、IIS-ODNを、一用量のバイアルとして及び/または適切な用量のISS-ODN、組換え発現ベクターまたは抗炎症剤とともにキットとして提供するのが便利である。組換え発現ベクターを含むキットでは、IIS-ON及びベクターを一用量のバイアルに予め混合しておくことが可能である。必要な場合は、各用量を宿主に投与するための手段（例えば注射器、経皮吸収用パッチ、イオン導入装置及び吸入器）をキットに含める。

20

IIS-ONの免疫阻害活性を示す実施例を以下に説明する。この実施例は、単に参考とするためのもので、添付の請求の範囲に定義される本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。実施例の説明で使用される全ての略語及び用語は、特に断りのない場合は、予想されるその通常の意味を有する。

実施例 I

リンパ球増殖の減少により測定されるIIS-ON阻害活性を確認するためのアッセイ

免疫学的に感受性の雌性Balb/cマウス（6~8週齢）からの脾細胞をそれぞれの動物から回収した。回収した脾細胞の上清を標準生理食塩水中の1 $\mu\text{g/ml}$ のDY1018 ISS-ODNまたは1 $\mu\text{g/ml}$ のDY1038 ISS-ODN（オリゴヌクレオチド配列はいずれも図面中の説明、及び図面の簡単な説明に記載した）とインキュベートした。DY1018及びDY1038の両者のバックボーンをホスホロチオエートとして修飾した。この場合、ISS-ODNは免疫系のin vitro刺激の非特異的アジュバントとなる。

30

ISS-ODNの接触の4時間以内に上清を種々のレベルのIIS-ONあるいは対照とインキュベートした。DY1039（メチル化シトシンを有するISS）、DY1040及びDY1043（後者はDY1018及びDY1038のCGジヌクレオチドの代わりにCCジヌクレオチドを有する）を対照とした。DY1018及びDY1038との可能性のある競合の位置を確立するため、オリゴヌクレオチドはいずれも図面中に特定したヘキサマー領域を除いてDY1038（図1及び3）またはDY1018（図2）に、そしてDY1043（無関係な配列対照）に同一とした。

40

IIS-ODN投与前及び投与後のリンパ球の増殖を慣用のアッセイ法を使用して（1分あたりのカウントの関数として）測定した。上清におけるリンパ球増殖の観察された変化を全て記録した。図1~3に示した値は各群の試験したマウスの平均値である。

これらのアッセイの結果は図1~3に示す。DY1038（図1及び3）及びDY1018（図2）の両者については、これらの実験における本発明の阻害性IIS-ONによるISS免疫刺激活性の最も強い阻害はIIS-ON DY1019（AAGGTTからなるヘキサマー領域を有する）により示された。その他の強力な阻害を示す試験したIIS-ONはDY1048（ヘキサマー領域=GAGGTC）、DY1050（ヘキサマー領域=AGGGCT）、DY1060（ヘキサマー領域=TTGCAA）及びDY1041（ヘキサマー領域=AAGCTT）であった（図3）。阻害の強さは投与量に依存し、一般に投与量は測定され

50

たリンパ球増殖の減少に比例する関係にあった。

実施例II

INF- 分泌の減少により測定されるIIS-ON阻害活性を確認するためのアッセイ

マウスの群を実施例Iに記載したように免疫化し、屠殺して脾細胞を回収した。回収した脾細胞の上清を実施例Iに記載したように生理食塩水中の1 µg/mlのDY1018 ISS-ODNとインキュベートした。4時間以内に上清を種々のレベルのIIS-ONまたは対照とインキュベートした。DY1039（メチル化シトシンを有するISS）、DY1040及びDY1043（後のものはDY1018のCGジヌクレオチドの代わりにCCジヌクレオチドを有する）を対照とした（オリゴヌクレオチド配列はいずれも図面中の説明及び図面の簡単な説明に記載した）。DY1018との可能性のある競合の位置を確立するため、オリゴヌクレオチドはいずれも特定したヘキサマー領域を除いてDY1018に、そしてDY1043（無関係な配列対照）に同一とした。

IIS-ODN接触前及び後のIFN- レベルを測定した。上清におけるIFN- 分泌（pg/ml上清）の観察できる変化を全て記録した。図4に示した値は各群の試験したマウスの平均値である。

これらのアッセイの結果を図4に示す。これらの実験における本発明の阻害IIS-ONによるISS免疫刺激活性の最も強い阻害はやはりIIS-ON DY1019（AAGGTTからなるヘキサマー領域を有する）により示された。DY1041（ヘキサマー領域=AAGCTT）は低投与量（1 µg/ml生理食塩水）でも強力な阻害を示した。より高い投与量（10 µg/ml）では対照マウスにおいても同様にINF- レベルは低下し始めた。

実施例III

抗原に対するTh2型免疫反応のIIS-ODNによる追加刺激

4匹のBalb/cマウスの群を10 µgの -ガラクトシダーゼ抗原及び50 µg（50 µlの標準生理食塩水中）のIIS-ODN DY 1019（図中、 -gal/M-ODNとして示した）、ISS-ODN組成物 -gal/ISS-ODN（5' -AATTCAACGTTTCGC-3'）、 -gal抗原及びpKISS-3（基本骨格にAACGTT ISS-ODNヘキサマーを3コピー有するプラスミド）、もしくは -gal抗原及びpKISS-0（基本骨格にAACGTT ISS-ODNヘキサマーのコピーを有しない対照プラスミド）で同時免疫化し、あるいは食塩水のみを投与した。マウスの各群におけるTh2-型応答を、追加刺激後に得たIgEの関数としてELISAにより測定した。図5に示したように、強力なTh2-型応答（1000 CPMを越える）は、生理食塩水を投与されたマウス（追加免疫後1週間で約1200 CPM）及び -gal/M-ODN（追加免疫後1週間で約1750 CPM）を投与されたマウスのみで得られた。

さらに、ISS-ODN処理マウスにおいて抗原に应答して高レベルのIgG2a抗体及び低レベルのIgG1抗体（それぞれTh1及びTh2型応答）が誘導され、一方IIS-ON処理マウスにおいては逆の応答が得られ、従って後者の群におけるTh2レパートリーへのシフトが示された。

本発明を十分に説明したが、当業者には開示した態様を改変することは自明であろう。そのような改変は請求の範囲に定義された本発明の範囲内にあるものである。

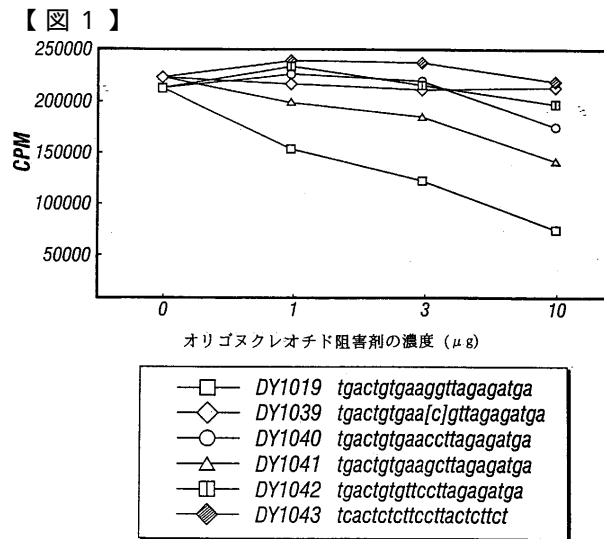


FIG. 1

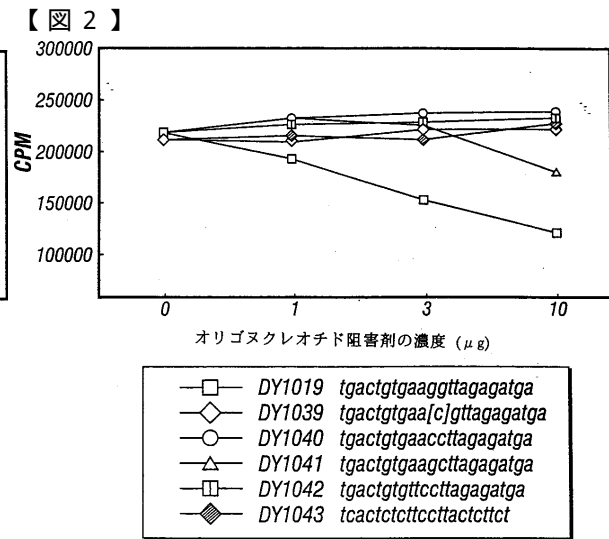


FIG. 2

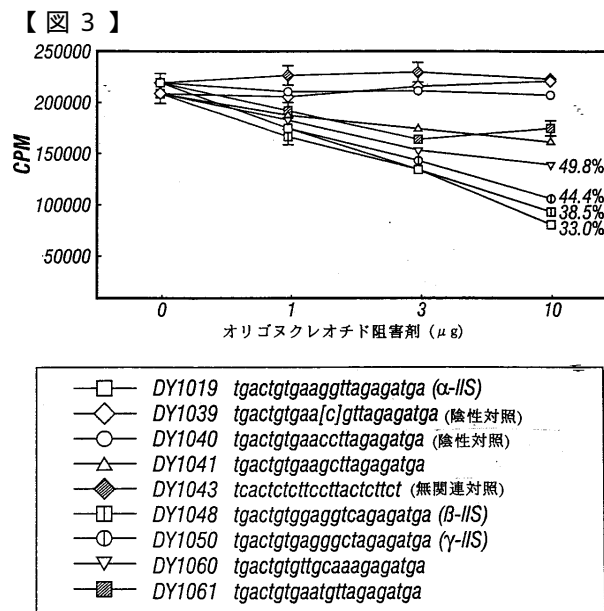


FIG. 3

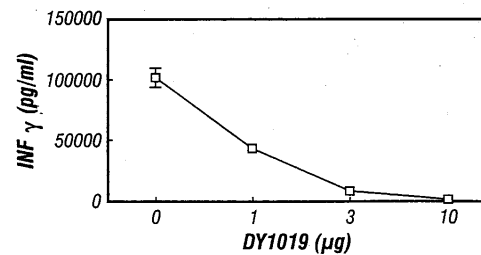
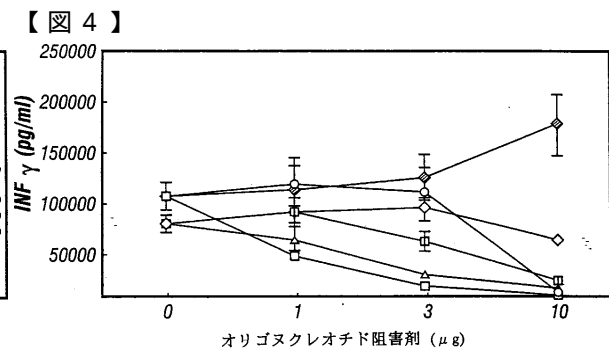


FIG. 4

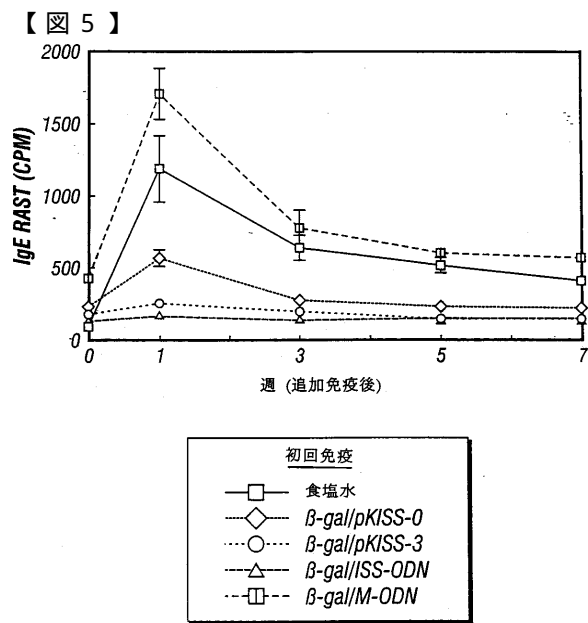


FIG. 5

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

(74)代理人 100149294

弁理士 内田 直人

(74)代理人 100137512

弁理士 奥原 康司

(72)発明者 ラズ, イーオル

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州, サンディエゴ, カミノ ウエルタ 7 9 6 5

(72)発明者 ローマン, マーク

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラ ホヤ, ヴィラ ラ ホヤ ドライブ 8 7
4 2 3 3

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第 9 6 / 0 0 2 5 5 5 (WO , A 1)

J. Immunol., vol.157, pp.1840-1845 (1996)

Nature, vol.374, pp.546-549 (1995)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)