

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4989225号  
(P4989225)

(45) 発行日 平成24年8月1日(2012.8.1)

(24) 登録日 平成24年5月11日(2012.5.11)

(51) Int.Cl.	F I		
A 6 1 K 31/711	(2006.01)	A 6 1 K 31/711	Z N A
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	

請求項の数 25 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-528305 (P2006-528305)  
 (86) (22) 出願日 平成16年9月27日 (2004.9.27)  
 (65) 公表番号 特表2007-506790 (P2007-506790A)  
 (43) 公表日 平成19年3月22日 (2007.3.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/031748  
 (87) 国際公開番号 W02005/030259  
 (87) 国際公開日 平成17年4月7日 (2005.4.7)  
 審査請求日 平成19年7月27日 (2007.7.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/505,977  
 (32) 優先日 平成15年9月25日 (2003.9.25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508147669  
 コーリー ファーマシューティカル グル  
 ープ, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国10017ニューヨーク州  
 ニューヨーク市イースト・フォーティーセ  
 カンド・ストリート235  
 (73) 特許権者 502102051  
 コーリー ファーマシューティカル ゲー  
 ムベーハー  
 ドイツ国 40225 デュッセルドルフ  
 , メロヴィンガープラッツ 1アー  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸親油性接合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫応答を調節するための組成物であって、以下：



を含有し、 $N_1$  および  $N_2$  は独立して、0 ~ 100ヌクレオチド長の核酸であり、Pは、パリンドロームを含み、かつ少なくとも1つのYRジヌクレオチドを含む核酸であり、Yは、シトシンまたは修飾されたシトシンであり、そしてRは、グアニンまたは修飾されたグアニンであり、Lは、親油基であり、ここで、Lは $N_1PN_2$ の3'末端で該ヌクレオチドに連結されており、Lはコレステリル、修飾されたコレステリル、コレステロール誘導体、還元されたコレステロールおよび置換されたコレステロールからなる群より選択され、Pは $X_1 - Y - R - X_2$ であり、 $X_1$  および  $X_2$  は独立して、2、3または4ヌクレオチドである、組成物。

【請求項2】

$N_1PN_2$  が、3 ~ 14ヌクレオチド長である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

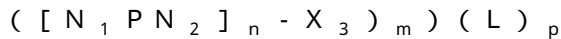
Lが、リンカーによって、 $N_1PN_2$ 中のヌクレオチドの2'位が、 $N_1PN_2$ 中のヌクレオチドの複素環式塩基が、または $N_1PN_2$ 中のホスホジエステル結合に連結される、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記還元されたコレステロールが、コレスタンである、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記式が、以下：



を包含し、 $X_3$  は、リンカーであり、 $m$  は、 $0 \sim 20$  (好ましくは  $1 \sim 10$ ) の整数であり、 $n$  は、 $0 \sim 20$  (好ましくは  $1 \sim 10$ ) の整数であり、 $p$  は、 $1 \sim 10$  (好ましくは  $1$ ) の整数であり、そして該オリゴヌクレオチド  $N_1 P N_2$  は、 $4 \sim 40$  ヌクレオチド長を有する、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 6】

$X_3$  が、無塩基残基 (d スペース)、トリエチレングリコール (スペース 9) またはヘキサエチレングリコール (スペース 18) のようなオリゴエチレングリコール、およびブタンジオールのようなアルカンジオールからなる群より選択される非ヌクレオチドリ

10

## 【請求項 7】

前記リンカーが、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、およびアミド結合からなる群より選択される結合を介して、前記オリゴヌクレオチドに結合される、請求項 5 に記載の組成物。

## 【請求項 8】

$X_1$  が、チミジン、デオキシウリジン、および 5 - 置換デオキシウリジンからなる群より選択されるピリミジンであり、そして / あるいは  $X_2$  が、パリンドローム、または逆方向反復であり、該パリンドロームまたは該逆方向反復が、少なくとも 1 つの非メチル化 Cp

20

G モチーフを含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記オリゴヌクレオチド  $N_1 P N_2$  が、 $4 \sim 20$  ヌクレオチド長を有する、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記オリゴヌクレオチド  $N_1 P N_2$  が、 $6 \sim 14$  ヌクレオチド長を有する、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つの安定化したヌクレオチド間結合を含み、該安定化したヌクレオチド間結合が、Y と R との間の結合であり、そして該安定化したヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエート結合である、請求項 1 に記載の組成物。

30

## 【請求項 12】

核酸をさらに含有する、請求項 1 に記載の組成物であって、該核酸が、

(a) 少なくとも 1 つの Y R ジヌクレオチド、

(b) 少なくとも 1 つの 1 本鎖領域、および

(c) 少なくとも 1 つの 2 本鎖領域

を含む核酸であり、該核酸は、少なくとも 1 つの親油基と連結されており、Y は、シトシンまたは修飾されたシトシンであり、そして R は、グアニンまたは修飾されたグアニンであり、そして該核酸は、少なくとも 1 つの露出した 5' 末端を有する、組成物。

40

## 【請求項 13】

前記核酸が、少なくとも 2 つの親油基に連結される、請求項 12 に記載の組成物。

## 【請求項 14】

前記親油基が、前記核酸の 3' 末端でヌクレオチドに連結される、請求項 12 に記載の組成物。

## 【請求項 15】

免疫応答を調節するための薬学的組成物であって、請求項 1 ~ 請求項 14 のいずれか 1 項に記載の組成物を、免疫応答を調節するのに有効な量で含有する、薬学的組成物。

## 【請求項 16】

前記組成物が、被験体の喘息を処置するための、該被験体への送達に適している、請求項

50

15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

前記組成物が、被験体のアレルギーを処置するための、該被験体への送達に適している、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 18】

前記組成物が、被験体の癌を処置するための、該被験体への送達に適している、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

前記組成物が、被験体の感染症を処置するための、該被験体への送達に適している、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 20】

前記組成物が、被験体の自己免疫疾患を処置するための、該被験体への送達に適している、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

前記組成物が、被験体の気道リモデリングを処置するための、該被験体への送達に適している、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 22】

請求項 15 に記載の薬学的組成物であって、該組成物がワクチンであり、そして抗原をさらに含有する、薬学的組成物。

【請求項 23】

前記オリゴヌクレオチドが、該オリゴヌクレオチドの、5'末端および3'末端における、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項 11 に記載の組成物。

20

【請求項 24】

$(N_1PN_2)L$

を含有する、免疫応答を調節するための組成物であって、 $N_1$  および  $N_2$  は独立して、0 ~ 100ヌクレオチド長の核酸であり、Pは、パリンドロームを含み、かつ少なくとも1つのYRジヌクレオチドを含む核酸であり、Yは、シトシンまたは修飾されたシトシンであり、そしてRは、グアニンまたは修飾されたグアニンであり、そしてLは、コレステロールであり、ここで、Lは $N_1PN_2$ の3'末端で該ヌクレオチドに連結されている、組成物。

30

【請求項 25】

$N_1PN_2$  が、5' TCGACGTCGT3' (配列番号 111)、および5' TCGACGTCGA3' (配列番号 112) からなる群より選択される、請求項 24 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は概して、核酸親油性接合体、これらの組成物、およびその接合体を使用する方法に関連する。

40

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

細菌DNAは、B細胞およびナチュラルキラー細胞を活性化する免疫刺激効果を有するが、脊椎動物DNAはその効果を有さない(非特許文献1、非特許文献2および非特許文献3)。細菌DNAのこれらの免疫刺激効果は、特定の塩基内容(base context)(CpGモチーフ)における非メチル化CpGジヌクレオチドの存在の結果であり、その非メチル化CpGジヌクレオチドは、細菌DNAにおいて一般的であるが、脊椎動物DNAにおいてはメチル化されかつ十分に示されない(非特許文献4)。上記細菌DN

50

Aの免疫刺激効果は、これらのCpGモチーフを有する合成オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)を用いて模倣され得る。このようなCpG ODNは、B細胞増殖、サイトカインの分泌および免疫グロブリンの分泌、ナチュラルキラー(NK)細胞の細胞溶解活性およびIFN-分泌、および樹状細胞(DC)の活性化、ならびに共起刺激分子を発現させ、そしてサイトカイン(特に、Th1様T細胞応答の発生の促進に重要なTh1様サイトカイン)の分泌を与える他の抗原提示細胞の活性化を含む、ヒトの白血球およびマウスの白血球に対する高い刺激効果を有する。ネイティブなホスホジエステル骨格のCpG ODNのこれらの免疫刺激効果は、そのCpGモチーフが、メチル化されるか、GpCに変換されるか、または別の方法で除去されるか、もしくは変化する場合、上記効果を劇的に減少させる点で、高度にCpG特異的である(非特許文献5)。

10

## 【0003】

初期の研究において、上記免疫刺激性CpGモチーフは、式：プリン-プリン-CpG-ピリミジン-ピリミジンに従うと考えられた(非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8、非特許文献9)。しかし、現在、マウスリンパ球が、この「式」に従わないホスホジエステルCpGモチーフに、非常に良く応答し、(非特許文献10)、同じことが、ヒトB細胞および樹状細胞にも当てはまる(非特許文献11、非特許文献12)ことが明らかである。それにも関わらず、用語「CpGモチーフ」は概して、CpGジヌクレオチドが、その中心にある6量体モチーフを称するために使用される。

【非特許文献1】Tokunaga, T.ら、1988. Jpn. J. Cancer Res. 79: 682-686; Tokunaga, T.ら、1984, JNCI 72: 955-962; Messina, J. P.ら、1991, J. Immunol. 147: 1759-1764

20

【非特許文献2】Applied oligonucleotide Technology, CA. SteinおよびA. M. Krieg, (編)中John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, 431-448ページのKriegによる概説

【非特許文献3】Krieg, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects (2002) Annu. Rev. Immunol. 20: 709-760

【非特許文献4】Kriegら、1995 Nature 374: 546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 93321: 1-10

30

【非特許文献5】Kriegら、1995 Nature 374: 546-549; Hartmannら、1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 9305-10

【非特許文献6】Kriegら、1995 Nature 374: 546-549

【非特許文献7】Pisetsky, 1996 J. Immunol. 156: 421-423

【非特許文献8】Hackerら、1998 EMBO J. 17: 6230-6240

【非特許文献9】Lipfordら、1998 Trends in Microbiol. 6: 496-500

40

【非特許文献10】Yiら、1998 J. Immunol. 160: 5898-5906

【非特許文献11】Hartmannら、1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 9305-10

【非特許文献12】Liang, 1996 J. Clin. Invest. 98: 1119-1129

## 【発明の開示】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

50

## (発明の要旨)

本発明は部分的に、親油基に連結された免疫刺激性核酸に関連する。親油基に連結された特定の免疫刺激性核酸が、活性を上昇させたのに対して、他の免疫刺激性核酸への親油基の結合は、その分子の免疫刺激能力に対する効果が最小限であることが、見出されていた。

## 【0005】

1つの局面において、本発明は、 $(N_1PN_2)L$ の組成物に関連し、 $N_1$ および $N_2$ は独立して、0~100ヌクレオチド長の核酸であり、Pは、パリンドロームを含み、かつ少なくとも1つのYRジヌクレオチドを含む核酸であり、ここでYは、シトシンまたは修飾されたシトシンであり、そしてRは、グアニンまたは修飾されたグアニンであり、Lは、親油基である。1つの実施形態において、 $N_1PN_2$ は、3~14ヌクレオチド長である。別の実施形態において、Lは、 $N_1PN_2$ の3'末端で上記ヌクレオチドに連結される。必要に応じて、上記ヌクレオチドは、 $N_1PN_2$ の3'末端におけるヌクレオチド、および内部のヌクレオチドからなる群より選択される。1つの実施形態において、Pは、2~100ヌクレオチド長である。別の実施形態において、Pは、4~14ヌクレオチド長である。

10

## 【0006】

他の実施形態において、Lは、リンカーによって、 $N_1PN_2$ 中のヌクレオチドの2'位か、 $N_1PN_2$ 中のヌクレオチドの複素環式塩基か、または $N_1PN_2$ 中のホスホジエステル結合に連結される。

20

## 【0007】

Lは、親油基であり、それは、コレステロール、修飾されたコレステロール、コレステロール誘導体、還元されたコレステロール、置換されたコレステロール、コレスタン、C16アルキル鎖、胆汁酸類、コール酸、タウロコール酸、デオキシコレート (deoxycholate)、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸 (oleoyl cholenic acid)、糖脂質類、リン脂質類、スフィンゴ脂質類、ステロイド類のようなイソプレノイド類、ビタミンEのようなビタミン類、飽和脂肪酸類、不飽和脂肪酸類、トリグリセリド類のような脂肪酸エステル類、ピレン類、ポルフィリン類、テキサフィリン (Texaphyrine)、アダマンタン、アクリジン、ピオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、シアニン色素 (例えば、Cy3またはCy5)、Hoechst 33258色素、ソラレン、またはイブプロフェンである。上記組成物は、少なくとも2Lを含み得る。

30

## 【0008】

いくつかの実施形態において、上記式は、 $N_1PN_2-L-N_3PN_4$ を包含し、 $N_3$ および $N_4$ は独立して、0~100ヌクレオチド長の核酸である。Lは、-3'-L-3'-、-2'-L-2'-、-3'-L-2'-、および-2'-L-3'-からなる群より選択される結合を介して、 $N_1PN_2$ および $N_3PN_4$ に連結され得る。いくつかの実施形態において、 $N_1PN_2$ および $N_3PN_4$ は、同一である。他の実施形態において、 $N_1PN_2$ および $N_3PN_4$ は、異なる。

40

## 【0009】

本発明の他の局面における組成物は、以下の式： $([N_1PN_2]_n - X_3)_m \cdot (L)_p$ である。 $X_3$ は、リンカーであり、mは、0~20 (好ましくは1~10)の整数であり、nは、0~20 (好ましくは1~10)の整数であり、pは、1~10 (好ましくは1)の整数である。上記オリゴヌクレオチド $N_1PN_2$ は、4~40ヌクレオチド長を有する。nは、1より大きく、そして上記複数の $[N_1PN_2]$ は、3'末端を介して連結される。

## 【0010】

いくつかの実施形態において、 $X_3$ は、無塩基残基 (dスペーサー (d spacer))、トリエチレングリコール (スペーサー (spacer) 9) またはヘキサエチレング

50

リコール（スペーサー 18）のようなオリゴエチレングリコール、およびブタンジオールのようなアルカンジオールからなる群より選択される非ヌクレオチド性リンカーである。

【0011】

他の実施形態において、上記リンカーは、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、およびアミド結合からなる群より選択される結合を介して、オリゴヌクレオチドに結合される。

【0012】

必要に応じて、 $N_1PN_2$  は、分枝ODNであり、 $N_1$  は、少なくとも1つのCGヌクレオチドを含む。

【0013】

Lは、上記オリゴヌクレオチド $[N_1PN_2]$ の3'末端に結合され得る。Lと $N_1PN_2$ との間の結合は、代謝的に安定であり得るか、または代謝的に不安定であり得る。

【0014】

Pは、式： $X_1 - Y - R - X_2$ を有し得、 $X_1$ および $X_2$ は独立して、0~4ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、 $X_1$ は1~2ヌクレオチドである。他の実施形態において、 $X_1$ は、ピリミジンである。必要に応じて、上記ピリミジンは、チミジン、デオキシウリジンおよび5-置換デオキシウリジンからなる群より選択される。他の実施形態において、 $X_2$ は、パリンドロームまたは逆方向反復（部分的にパリンドローム）である。上記パリンドロームまたは逆方向反復（部分的にパリンドローム）は、少なくとも1つの非メチル化CpGモチーフを含み得る。Pは、C\_\_G\_\_A\_\_C、C\_\_G\_\_T\_\_C、T\_\_C\_\_G\_\_A\_\_C、C\_\_G\_\_A\_\_C\_\_G\_\_T\_\_C、C\_\_G\_\_G\_\_C\_\_G\_\_G、およびG\_\_A\_\_C\_\_G\_\_Aからなる群より選択され得る。

【0015】

いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチド $N_1PN_2$ は、4~20ヌクレオチド長、または6~14ヌクレオチドの長さを有する。

【0016】

必要に応じて、上記オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの、直鎖状の非ヌクレオシド結合、または分枝状の非ヌクレオシド結合を含む。

【0017】

免疫刺激分子は、上記組成物に関連し得る。免疫刺激分子の例は、TLR9リガンドである。

【0018】

上記オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの安定化したヌクレオチド間結合を含み得る。好ましくは、上記安定化したヌクレオチド間結合は、YとRとの間の結合であり、そしてその安定化したヌクレオチド間結合は、Rp立体配置（configuration）におけるホスホロチオエート結合である。好ましくは、上記オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、全てホスホジエステル結合である。

【0019】

上記オリゴヌクレオチド中の少なくとも1つのヌクレオチドは、置換されたプリンもしくは置換されたピリミジン、または修飾されたプリンもしくは修飾されたピリミジンである。1つの実施形態において、上記置換されたピリミジンは、C5置換であるか、または上記置換されたプリンは、C8置換もしくはC7置換である。別の実施形態において、上記置換されたプリンもしくは置換されたピリミジン、または修飾されたプリンもしくは修飾されたピリミジンは、5-置換シトシン類（例えば、5-メチル-シトシン、5-フルオロ-シトシン、5-クロロ-シトシン、5-プロモ-シトシン、5-ヨード-シトシン、5-ヒドロキシ-シトシン、5-ヒドロキシメチル-シトシン、5-ジフルオロメチル-シトシン、および非置換5-アルキニル-シトシンまたは置換5-アルキニル-シトシン）、6-置換シトシン類、N4-置換シトシン類（例えば、N4-エチル-シトシン）、5-アザ-シトシン、2-メルカプト-シトシン、イソシトシン、プソイド（pseudo）-イソシトシン、縮合環系を有するシトシン類似物類（例えば、N, N'-プロ

10

20

30

40

50

ピレンシトシンまたはフェノキサジン)、ならびにウラシルおよびその誘導体類(例えば、5-フルオロ-ウラシル、5-プロモ-ウラシル、5-プロモビニル-ウラシル、4-チオ-ウラシル、5-ヒドロキシ-ウラシル、5-プロピニル-ウラシル)、チミン誘導体類(例えば、2-チオチミン、4-チオチミン、6-置換チミン)、7-デアザグアニン、7-デアザ-7-置換グアニン(例えば、7-デアザ-7-(C2-C6)アルキニルグアニン)、7-デアザ-8-置換グアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、ヒポキサンチン、N2-置換グアニン類(例えば、N2-メチル-グアニン)、5-アミノ-3-メチル-3H,6H-チアゾール[4,5-d]ピリミジン-2,7-ジオン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノプリン、プリン、インドール、アデニン、置換アデニン類(例えば、N6-メチル-アデニン、8-オキソ-アデニン)、8-置換グアニン(例えば、8-ヒドロキシグアニン、および8-プロモグアニン)、および6-チオグアニンからなる群より選択される。本発明の別の実施形態において、上記塩基は、一般的な塩基(例えば、4-メチル-インドール、5-ニトロ-インドール、3-ニトロピロール、P塩基(P-base)、およびK塩基(K-base))、芳香環系(例えば、ベンズイミダゾールまたはジクロロベンズイミダゾール、1-メチル-1H-[1,2,4]トリアゾール-3-カルボン酸アミド)、芳香環系(例えば、フルオロベンゼンまたはジフルオロベンゼン)、および水素原子(dスペーサー)によって置換される。

10

## 【0020】

複数のオリゴヌクレオチド類は、複数のダブラー(doubler)部分または複数のトレブラー(trebler)部分によって連結され得、デンドリマーを形成し得る。

20

## 【0021】

上記組成物は、アミド結合によって連結された、少なくとも1つのアミノ酸残基を含みうる。

## 【0022】

必要に応じて、上記オリゴヌクレオチドは、3'5'-結合、2'5'-結合、3'3'-結合、および5'5'-結合からなる群より選択される、少なくとも1つのヌクレオチド間結合を含む。

## 【0023】

1つの実施形態において、Lは、キャリアに関連する。必要に応じて、上記キャリアは、リポソーム、ISCOM、疎水性ビーズ、疎水性処方物、ポリマー、ペプチド、タンパク質、および核酸からなる群より選択される。上記組成物はまた、治療因子を含み得る。

30

## 【0024】

他の局面における本発明は、少なくとも1つの露出した5'末端を有する核酸をさらに含有する組成物であって、その核酸は、少なくとも1つのYRジヌクレオチド(ここでYは、シトシンまたは修飾されたシトシンであり、そしてRは、グアニンまたは修飾されたグアニンである)、少なくとも1つの1本鎖領域、少なくとも1つの2本鎖領域を含み、そして、上記核酸は、少なくとも1つの親油基と連結される。

## 【0025】

上記核酸は、1本鎖核酸であり得るか、またはその2本鎖領域のそれぞれの側に少なくとも2つの核酸の塩基対形成を含む2本鎖領域を有し得る。1つの実施形態において、上記核酸は、その2本鎖領域のそれぞれの側に少なくとも3つの核酸の塩基対形成を含む2本鎖領域を形成する。

40

## 【0026】

いくつかの実施形態において、上記核酸は、分枝状核酸である。

## 【0027】

他の実施形態において、上記核酸は、互いに、少なくとも部分的にハイブリダイズした2つの1本鎖核酸である。

## 【0028】

50

上記核酸は、少なくとも2つの親油基に連結され得る。必要に応じて、上記親油基は、上記核酸の3'末端で上記ヌクレオチドに連結される。

【0029】

別の局面において、本発明は、 $(N_1 Y R N_2) \cdot L$ の親油性組成物であり、 $N_1$ および $N_2$ は独立して、0~100ヌクレオチド長の核酸であり、Yは、シトシンまたは修飾されたシトシンであり、そしてRは、グアニンまたは修飾されたグアニンであり、そして $N_1 Y R N_2$ は、少なくとも10ヌクレオチド長である。Lは、 $N_1 Y R N_2$ 中のヌクレオチドの2'位か、または $N_1 Y R N_2$ 中のヌクレオチドの複素環式塩基に連結された親油基である。1つの実施形態において、 $N_1 Y R N_2$ は、5'TCCG3'、5'TTCG3'、または5'TCGTCG3'である。

10

【0030】

なお別の局面において、本発明は、 $(N_1 P N_2) \cdot L$ の組成物であり、 $N_1$ および $N_2$ は独立して、0~100ヌクレオチド長の核酸であり、Pは、パリンドロームを含み、かつ少なくとも1つのYRジヌクレオチドを含有する核酸であり、ここでYは、シトシンまたは修飾されたシトシンであり、そしてRは、グアニンまたは修飾されたグアニンであり、そしてLは、コレステロールである。特定の実施形態において、Lは、 $N_1 P N_2$ の3'末端で上記ヌクレオチドに連結される。特定の実施形態において、 $N_1 P N_2$ は、5'TCGACGTCGT3'(配列番号111)、および5'TCGACGTCGA3'(配列番号112)からなる群より選択される。

【0031】

別の局面において、本発明は、アレルギーまたは喘息を処置するための方法に関連する。本方法は、アレルギーもしくは喘息を有するか、またはそれらを有する危険がある被験体に、本明細書中に記載される免疫刺激性CpGオリゴヌクレオチドを、アレルギーまたは喘息を処置するのに有効な量で投与することによって実施される。1つの実施形態において、そのオリゴヌクレオチドは、粘膜の表面(例えば、呼吸器の組織)に投与される。他の実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、エアロゾル処方物で投与される。必要に応じて、上記オリゴヌクレオチドは、鼻腔内に投与される。他の実施形態において、上記被験体は、アレルギー性喘息を有するか、またはそれを発症する危険を有する。

20

【0032】

サイトカイン産生を誘導するための方法は、本発明の別の局面によって提供される。本方法は、本明細書中に記載される免疫賦活性CpGオリゴヌクレオチドを、IP10、IL6、IL8、IL12、IL18、TNF、IFN-、ケモカイン、およびIFN-からなる群より選択されるサイトカインを誘導するために有効な量で、被験体に投与することによって実施される。

30

【0033】

別の局面において、本発明は、抗原または他の治療的化合物(例えば、抗微生物薬または抗癌剤)との組み合わせた、本明細書中に記載される親油性接合体の組成物である。上記抗微生物薬は、例えば、抗ウイルス薬、抗寄生虫薬、抗菌薬または抗真菌薬であり得る。

【0034】

上記組成物は必要に応じて、薬学的キャリアを含み得、そして/または送達デバイス中に処方され得る。いくつかの実施形態において、上記送達デバイスは、カチオン性脂質、細胞浸透性タンパク質、および徐放性デバイスからなる群より選択される。1つの実施形態において、上記徐放性デバイスは、生分解性ポリマーであるか、マイクロ粒子である。

40

【0035】

本発明の別の局面によって、免疫応答を刺激する方法が、提供される。その方法は、親油性接合体を、被験体における免疫応答を誘導するのに有効な量でその被験体に投与する工程を包含する。好ましくは、上記親油性接合体は、経口的にか、局所的にか、徐放性デバイスによってか、経粘膜的にか、全身的にか、非経口的にか、または筋肉内に投与される。上記親油性接合体が、粘膜表面に投与される場合、それは、粘膜の免疫応答または全

50



身性の免疫応答を誘発するのに有効な量で送達され得る。好ましい実施形態において、上記粘膜表面は、口腔の表面、鼻腔の表面、直腸の表面、膣の表面、または眼の表面である。

【0036】

いくつかの実施形態において、本方法は、上記被験体を抗原に曝す工程を包含し、その免疫応答は、抗原特異的な免疫応答である。いくつかの実施形態において、上記抗原は、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原およびペプチド抗原からなる群より選択される。

【0037】

CpG免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、広範囲の免疫応答を引き起こすことが可能である。例えば、これらの親油性接合体は、Th2をTh1免疫応答に変えるために使用され得る。親油性接合体はまた、リンパ球（例えば、B細胞およびT細胞）、樹状細胞、およびNK細胞のような免疫細胞を活性化するために使用され得る。上記活性化は、インビボ、インビトロ、エキソビボ、すなわち、上記被験体から免疫細胞を単離し、その免疫細胞と、その免疫細胞を活性化するのに有効な量の親油性接合体とを接触し、そしてその活性化された免疫細胞をその被験体に再投与することによって行われ得る。いくつかの実施形態において、上記樹状細胞は、癌抗原を示す。上記樹状細胞は、エキソビボにて上記癌抗原に曝され得る。

10

【0038】

親油性接合体によって産生される上記免疫応答はまた、サイトカイン産生（例えば、IP10、IL6、IL8、IL12、IL18、TNF、IFN- $\gamma$ 、ケモカイン、およびIFN- $\alpha$ の産生）の誘導を生じ得る。

20

【0039】

さらに別の実施形態において、上記親油性接合体は、癌を有するか、または癌を発症する危険を有する被験体において、癌を処置するのに有用である。上記癌は、胆道癌、乳癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸癌、子宮内膜癌、胃癌、上皮内新生物、リンパ腫、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞癌および非小細胞癌）、黒色腫、神経芽細胞種、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、肉腫、甲状腺癌、および腎臓癌、ならびに他の癌腫および肉腫からなる群より選択され得る。いくつかの重要な実施形態において、上記癌は、骨癌、脳癌および中枢神経系の癌、結合組織の癌、食道癌、眼の癌、ホジキンリンパ腫、喉頭癌、口腔癌、皮膚癌、および精巣癌からなる群より選択される。

30

【0040】

必要に応じて、親油性接合体が、抗癌療法との組み合わせで投与される場合、親油性接合体はまた、癌治療（すなわち、抗癌療法）に対する癌細胞の反応性を向上させるために使用され得る。上記抗癌療法は、例えば、化学療法、ワクチン（例えば、インビトロにてプライミングした樹状細胞のワクチンもしくは癌抗原のワクチン）または免疫療法物質（例えば、抗体ベースの治療薬）であり得る。この後者の治療法はまた、例えば癌細胞の細胞表面抗原に対して特異的な抗体を投与する工程を包含し、その免疫応答は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ADCC）を生じる。1つの実施形態において、上記抗体は、リブタキシン（Ributaxin）、ハーセプチン、クアドラメット（Quadramet）、パノレックス（Panorex）、IDEC-Y2B8、BEC2、C225、オンコリム（Oncolymp）、SMART M195、ATRAGEN、オバレックス（Ovarex）、ベキサール（Bexxar）、LDP-03、ior-t6、MDX-210、MDX-11、MDX-22、OV103、3622W94、抗VEGF、ゼナパックス（Zenapax）、MDX-220、MDX-447、MELIMMUNE-2、MELIMMUNE-1、CEACIDE、プレターゲット（Pretarget）、NovoMab-G2、TNT、Gliomab-H、GNI-250、EMD-72000、LymphoCide、CMA 676、Monopharm-C、4B5、ior-egf.r3、ior-c5、BABS、抗FLK-2、MDX-260、ANAAb、SMART 1D10 Ab、SMART ABL 364 AbおよびImmu

40

50

R A I T - C E A からなる群より選択され得る。

【 0 0 4 1 】

従って、本発明のいくつかの局面によって、癌を有するか、または癌を有する危険のある被験体は、親油性接合体および抗癌療法を施される。いくつかの実施形態において、上記抗癌療法は、化学療法剤、免疫治療因子および癌ワクチンからなる群より選択される。

【 0 0 4 2 】

本方法のさらに別の実施形態は、癌を処置することに関し、その被験体はさらに、インターフェロン - を投与され得る。

【 0 0 4 3 】

他の局面において、本発明は、上記被験体に親油性接合体を、生得的な免疫応答を活性化するのに有効な量で投与することによって、生得的な免疫応答を誘導するための方法である。従って、上記 O D N は、病原体（例えば、リュシュマニア属、リステリア属、および炭疽菌）を処置するのに有用である。

10

【 0 0 4 4 】

本発明の別の局面によって、ウイルス感染またはレトロウイルス感染を処置するための方法が、提供される。その方法は、ウイルス感染またはレトロウイルス感染を有するか、またはそれらを有する危険がある被験体に、ウイルス感染またはレトロウイルス感染を処置するのに有効な量の、本発明の組成物のいずれかを投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、ウイルス性疾患は、肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎もしくはC型肝炎）、H I V、ヘルペスウイルス、またはパピローマウイルスによって引き起こされる。

20

【 0 0 4 5 】

細菌感染を処置するための方法が、本発明の別の局面によって提供される。その方法は、細菌感染を有するか、または細菌感染を有する危険がある被験体に、細菌感染を処置するのに有効な量の、本発明の組成物のいずれかを投与する工程を包含する。1つの実施形態において、その細菌感染は、細胞内の細菌に起因する。

【 0 0 4 6 】

別の局面において、本発明は、寄生虫感染を有するか、または寄生虫感染を有する危険がある被験体に、寄生虫感染を処置するのに有効な量の、本発明の組成物のいずれかを投与することによって、寄生虫感染を処置するための方法である。1つの実施形態において、その寄生虫感染は、細胞内の寄生虫に起因する。別の実施形態において、その寄生虫感染は、非駆虫性の寄生虫に起因する。

30

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、ヒトであり、そして他の実施形態において、その被験体は、非ヒト脊椎動物（例えば、犬、猫、馬、牛、豚、七面鳥、山羊、魚、猿、鶏、ラット、マウス、または羊）である。

【 0 0 4 8 】

別の局面において、本発明は、被験体に本発明の組成物のいずれかを、T H I 免疫応答を引き起こすのに有効な量で投与することによって、T H 1 型免疫応答を誘導するための方法に関連する。

40

本発明のそれぞれの限界は、本発明の種々の実施形態を包含し得る。これにより、本発明のそれぞれの限界は、いずれか1つの要素、または要素の組み合わせを含み、その限界は、本発明のそれぞれの局面に含まれ得る。

【 0 0 4 9 】

本発明は、添付の図と組み合わせた場合、より容易かつ完全に理解され得る。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 5 0 】

（詳細な説明）

1つの局面における本発明は、親油基に連結した免疫刺激性オリゴヌクレオチドの特定のサブクラスが、免疫刺激効果を媒介する工程において非常に効果的であるという発見を

50

含む。これらの接合体は、癌、感染症、アレルギー、喘息および他の疾患を処置するために免疫系を刺激する工程に対して、治療的および予防的に有用である。

【0051】

Aクラス免疫刺激性 CpG オリゴヌクレオチド（例えば、配列番号40のオリゴヌクレオチド）は、それらの非常に効果的な IFN - 分泌の誘導と、低い B 細胞刺激によって特徴付けされる。配列番号40は、ホスホロチオエート（G）<sub>n</sub> ストレッチによって固定された、パリンドロームのホスホジエステル CpG 配列（配列番号110）で構成されている。ODN 配列は、以下の表1に示される。Aクラス免疫刺激性 CpG オリゴヌクレオチドは、その3'末端および5'末端が、ホスホロチオエート修飾されており、そしてその中心部分はホスホジエステルであり、そのオリゴヌクレオチドの両端に、少なくとも4つの一連の G 残基を有する。高分子量凝集物を生じる、分子間の4分子形成の結果としての、G リッチオリゴヌクレオチドの開発は困難であった。このクラスの化合物の生物物理学的特性に関連する問題点としては、凝集の傾向、乏しい安定性、品質管理の困難性および PK 研究で使用される固相抽出（SPE）が挙げられる。

10

【0052】

オリゴヌクレオチドの（G）<sub>n</sub> ストレッチ（n = 4）は、非同質的な高分子量凝集物を生じる分子間の4分子形成を導くことが知られる。（G）<sub>n</sub> ストレッチを伴うオリゴヌクレオチドの取り込みは、非凝集オリゴヌクレオチドの取り込みより、約20倍～40倍高く、そしてその細胞内局在性もまた、異なるようである。これらの知見が、生物学的活性とどのように関連するのは、理解されていない。

20

【0053】

Aクラスオリゴヌクレオチド（例えば、配列番号40であるが、G リッチオリゴヌクレオチドより、より好ましい生物物理学的特性）と同様の能力を有する新規の免疫刺激性オリゴヌクレオチドを見出すための試みにおいて、（G）<sub>n</sub> ストレッチを有さないが、共有結合した親油性残基を有する一連のオリゴヌクレオチドが、本発明によって開発されてきた。意外なことに、オリゴヌクレオチドが、Aクラス活性に重大な意味を有すると考えられている G<sub>n</sub> 配列を有さなくとも、パリンドロームの中心領域を有し、好ましくはホスホジエステル結合、および結合した少なくとも1つの親油基を伴う場合、高いインターフェロン - （IFN - ）誘導が、検出された。最も高い IFN - 誘導に関して、ホスホロチオエート残基の数が、最小限に保たれることが好ましい。IFN - 分泌の予想外に高い誘導は、5' - TCG を伴い、そしてただいくつかのホスホロチオエート結合を有するか、またはホスホロチオエート結合を有さないオリゴヌクレオチドの3'末端に結合した L（親油基）で構成される組成物に観察された。

30

【0054】

Bクラス CpG オリゴヌクレオチドが、3'末端でコレステロールによって修飾された場合（配列番号38）、その B クラス CpG オリゴヌクレオチドが、IFN - 誘導および TLR9 アッセイの両方で、対応する3' - 非修飾オリゴヌクレオチド（配列番号36）より、低い免疫刺激性であることもまた興味深い。同様に、5' - コレステロール修飾 ODN（配列番号37）の活性は、5' - 非修飾配列番号36の活性より、非常に低い。Bクラス ODN は、非パリンドローム配列からなり、そしてそれは通常、完全に修飾されたホスホロチオエートである。コレステロール修飾から生じる B クラス CpG ODN の減少した活性は、本明細書中に記載されるパリンドロームのホスホジエステル CpG ODN とは対照的である。3'末端における後者のコレステロール修飾（配列番号4）は、増加した免疫刺激活性を生じるが、同じ配列の5' - コレステロール修飾（配列番号6）は、活性を完全に消失させる。

40

【0055】

いくつかの例において、ホスホジエステル骨格を有するオリゴヌクレオチドを含む非パリンドローム YR はまた、親油基が、そのオリゴヌクレオチドの3'末端に接合される場合、増加した免疫刺激活性を有する。ホスホジエステルである YR モチーフを少なくとも1つ有するが、オリゴヌクレオチドの5'末端および3'末端において、少なくとも1つ

50

のホスホロチオエート結合または他の修飾された結合を有する、キメラオリゴヌクレオチドもまた、親油基が、その分子の3'末端に結合される場合、増加した免疫刺激活性を有する。このようなキメラオリゴヌクレオチド中のY Rモチーフは、パリンドロームまたは非パリンドロームであり得る。

【0056】

従って、1つの局面において、本発明は、親油基に連結された免疫刺激性オリゴヌクレオチドの部分集合が、改良された免疫刺激特性を有するという発見を含む。いくつかの局面において、本発明は、以下の式： $(N_1 P N_2) \cdot L$ を有する接合体である。Lは、親油基である。

【0057】

上記親油基Lは、好ましくは、コレステロールであるか、コレステリルであるか、または修飾されたコレステリル残基である。そのコレステロール部分は、還元され得るか（例えば、コレスタンの場合のように）、または置換され得る（例えば、ハロゲンによって）。1分子中の異なる親油基の組み合わせもまた、可能である。他の親油基としては、胆汁酸類、コール酸またはタウロコール酸、デオキシコレート、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質類、リン脂質類、スフィンゴ脂質類、ステロイド類のようなイソプレノイド類、ビタミンEのようなビタミン類、飽和または不飽和のいずれかの脂肪酸類、トリグリセリド類のような脂肪酸エステル類、ピレン類、ポルフィリン類、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン類、ピオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、シアニン色素（例えば、Cy3またはCy5）、Hoechst 33258色素、ソラレン、またはイブプロフェンが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、Lは、コレステロールではない。

【0058】

最も高い免疫刺激活性は、他の末端修飾（例えば、ヘキセデシル、ビタミンEまたはトリエチレングリコール）に比べ、コレステロール修飾によってもたらされた。しかし、これらの物質は、2つ以上の因子がオリゴヌクレオチドに結合される場合、より大きい活性を生じることが、推測される。従って、いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、複数のL基を有する。

【0059】

Lは、好ましくは、上記オリゴヌクレオチドが、分枝オリゴヌクレオチドであり、少なくとも1つの遮られない5' CpGモチーフが存在する場合を除いて、オリゴヌクレオチドの3'末端にあるか、またはその近傍にある。試験されたオリゴヌクレオチドの唯一利用可能な5'末端におけるコレステロール置換（配列番号5および配列番号6）は、その免疫刺激効果にとって有害であった。

【0060】

Lは、リンカー部分によって上記オリゴヌクレオチドに接続され得る。必要に応じて、そのリンカー部分は、非ヌクレオチドリンカー部分である。非ヌクレオチドリンカーは、例えば、無塩基残基（dスペーサー）、トリエチレングリコール（スペーサー9）またはヘキサエチレングリコール（スペーサー18）のようなオリゴエチレングリコール、またはブタンジオールのようなアルカンジオールである。そのスペーサーユニットは、好ましくはホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合によって連結される。そのリンカーユニットは、その分子中にただ一度だけ現れ得るか、または、例えば、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、もしくはアミド結合を介して数回取り込まれ得る。

【0061】

上記親油基Lは、上記オリゴヌクレオチドの種々の位置に結合され得る。上述のように、その親油基Lは、オリゴヌクレオチドの3'末端に連結され、それはまた、3'-エキソヌクレアーゼに対するオリゴマーの安定性を向上させる目的を果たす。あるいは、それは、内部のヌクレオチド、または分枝上のヌクレオチドに連結され得る。その親油基Lは

10

20

30

40

50

、そのヌクレオチドの2'位に結合され得る。その親油基Lはまた、ヌクレオチドの複素環式塩基に結合され得る。

【0062】

上記オリゴヌクレオチドは、1つまたは2つ以上の接近可能な5'末端を有し得る。このことは、例えば、3'-3'結合、もしくは他の結合を介して2つのオリゴヌクレオチドを結合することによってか、または1つもしくは2つの接近可能な5'末端を有するオリゴヌクレオチドを生成するL基を通じて、2つの3'末端を接続して達成され得る。このような構造は、5'TCGN<sub>1</sub>-L-N<sub>1</sub>GCT5'のような式を有し得た。その3'-3'-結合は、例えば、ホスホジエステル架橋、ホスホロチオエート架橋または任意の他の修飾されたヌクレオシド間架橋であり得る。このような結合を達成するための方法は、  
10  
当該分野で公知である。例えば、このような結合は、以下：Seligler, H.ら、Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'- internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, Nucleosides & Nucleotides (1991), 10(1-3), 469-77、およびJiangら、Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, Bioorganic & Medicinal Chemistry (1999), 7(12), 2727-2735に開示されてきた。

【0063】

さらに、3'末端のヌクレオチドの間の結合が、ホスホジエステル架橋、ホスホロチオエート架橋、または他の修飾された架橋ではない、3'-3'-結合型ODNは、トリ-エチレングリコールホスフェート部分、またはテトラ-エチレングリコールホスフェート部分のような、さらなるスペーサーを使用して調製され得る(Durand, M.ら、Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)<sub>12</sub> and two (dT)<sub>12</sub> sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, Biochemistry (1992), 31(38), 9197-204、米国特許第5658738号、および米国特許第5668265号)。  
30  
あるいは、上記非ヌクレオチドリinkerは、エタンジオール、プロパンジオールに由来し得るか、または標準的なホスホラミダイト化学的性質を使用する無塩基のデオキシリボース(dスペーサー)ユニット(Fontanel, Marie Laurenceら、Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; Nucleic Acids Research (1994), 22(11), 2022-7)に由来し得る。その非ヌクレオチドリinkerは、1回または複数回取り込まれ得るか、または相互に組み合わせられて、連結されるべき2つのODNの3'末端の間の、任意の望ましい距離を可能にし得る。

【0064】

親油性修飾が、2つの隣接したヌクレオチドを接続する上記ヌクレオチド間結合の一部である式のオリゴヌクレオチドが、さらに好ましい。上記親油性残基が、その配列内にある場合、異なる配列部分を一緒に連結し、次いで、その配列部分は、それらの5'末端を介して優先的には、接続されない。この場合において、2つ以上の3'-3'-連結型配列は、好ましい。また好ましくは、それぞれ、2'-2'-連結型配列、3'-2'-連結型、配列または2'-3'-連結型配列である。必要に応じて、その結合は5'-3'結合であり得た。2つ以上の配列が連結された場合、これらは、同一であり得るか、または異なり得る。好ましい結合は、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、尿素結合、チオ尿素結合、スルホンアミド結合、シッフ塩基結合、およびジスルフィド結合である。別の可能性は、Solulink BioC  
40  
50

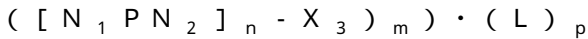
onjugation Systemの使用である。

【0065】

上記親油性基は、さらなるスペーサーを伴わないオリゴヌクレオチド ( $m = 0$ ) に連結され得るか、または1つ以上のリンカーユニット ( $m > 1$ ) を介して連結され得る。上記オリゴヌクレオチドと親油性残基との間の結合は、代謝的に安定な結合であり得るか、代謝的に不安定な結合であり得る。

【0066】

従って、いくつかの実施形態において、上記接合体は、以下の式：



を有し得る。

【0067】

$N_1$  および  $N_2$  は独立して、0 ~ 100ヌクレオチド長の核酸であり、Pは、パリンドロームを含み、かつ少なくとも1つのYRジヌクレオチドを含む核酸であり、Yは、シトシンまたは修飾されたシトシンであり、そしてRは、グアニンまたは修飾されたグアニンである。

【0068】

Nは必要に応じて、散在型の、直鎖状の非ヌクレオシド結合もしくは分枝状の非ヌクレオシド結合、または他の免疫刺激接合体（例えば、TLR分子に対するリガンド）を有する。5'TCGまたは5'UCGを有するオリゴヌクレオチドは、特に強い免疫刺激能力を有することが見出されている。

【0069】

上記式のオリゴヌクレオチド（ヌクレオチドをLに接続するリンカーとは別である）はまた、非ヌクレオチドリナー（特に、無塩基性リンカー（dスペーサー）、トリエチレングリコールユニット、またはヘキサエチレングリコールユニット）を含み得る。さらに好ましいリンカーは、アルキルアミノリンカー（例えば、C3アミノリンカー、C6アミノリンカー、C12アミノリンカー）であり、そしてまた、アルキルチオールリンカー（例えば、C3チオールリンカーまたはC6チオールリンカー）である。3'3'-結合を有するオリゴヌクレオチドはまた、ダブルユニットまたはトレブラーユニットを含み得る。複数のダブル部分または複数のトレブラー部分によるオリゴヌクレオチドの枝分かれは、本発明のさらなる実施形態であるデンドリマーを導く。式Iのオリゴヌクレオチドはまた、ペプチド修飾試薬またはオリゴヌクレオチド修飾試薬から生じるリンカーユニットを含む。さらに、それは、1つ以上の、天然のアミノ酸残基または非天然のアミノ酸残基を含み得、そのアミノ酸残基は、ペプチド（アミド）結合によって接続される。上記式中のヌクレオチドは、3'5'-結合、および/または2'5'-結合を通じて連結され得る。それはさらに、互いに独立して、1つ以上の3'3'-結合、および/または5'5'-結合を含み得る。

【0070】

Pは、パリンドローム、または逆方向反復（すなわち、部分的なパリンドローム）である。好ましくは、パリンドローム、または逆方向反復（部分的なパリンドローム）は、少なくとも1つの非メチル化CpGモチーフを含む。いくつかの実施形態において、それは、少なくとも2つまたは3つのCpGモチーフを含む。配列番号4において、上記配列（TCGACGTCGT、配列番号111）は、部分的にパリンドローム（CGACGTCG）（すなわち、逆方向反復）であるだけであり、これに対して、配列番号13の配列は、完全なパリンドロームを形成する。好ましくは、パリンドローム中または逆方向反復（部分的なパリンドローム）中の、少なくとも1つのCpGモチーフは、TCGA、ACGT、またはCGGCである。いくつかの好ましいパリンドローム配列としては、以下：

C\_\_G\_\_A\_\_C\_\_G\_\_T\_\_C\_\_G

C\_\_G\_\_T\_\_C\_\_G\_\_A\_\_C\_\_G

T\_\_C\_\_G\_\_A\_\_C\_\_G\_\_T\_\_C\_\_G\_\_A

配列番号112

10

20

30

40

50

C \_ G \_ A \_ C \_ G \_ T \_ C \_ G \_ A \_ C \_ G \_ T \_ C \_ G 配列番号 1 1 3  
 C \_ G \_ G \_ C \_ G \_ G \_ C \_ C \_ G \_ C \_ C \_ G 配列番号 1 1 4  
 G \_ A \_ C \_ G \_ A \_ T \_ C \_ G \_ T \_ C 配列番号 1 1 5

が挙げられる。

【 0 0 7 1 】

上記免疫刺激性オリゴヌクレオチドは概して、4ヌクレオチドと100ヌクレオチドとの間の範囲の長さを有する。いくつかの実施形態において、その長さは、4ヌクレオチド～40ヌクレオチド、13ヌクレオチド～100ヌクレオチド、13ヌクレオチド～40ヌクレオチド、13ヌクレオチド～30ヌクレオチド、15ヌクレオチド～50ヌクレオチド、もしくは15ヌクレオチド～30ヌクレオチドの範囲、またはこれらの間の範囲の任意の整数の範囲内である。

10

【 0 0 7 2 】

用語「核酸」および用語「オリゴヌクレオチド」は、交換可能に使用されて複数のヌクレオチド（すなわち、リン酸基および交換可能な有機塩基に連結された糖（例えば、リボースまたはデオキシリボース）を含有する分子であり、その有機塩基は、置換されたピリミジン（例えば、シトシン（C）、チミン（T）もしくはウラシル（U））、または置換されたプリン（例えば、アデニン（A）もしくはグアニン（G））のいずれかである）を意味する。本明細書中で使用される場合、用語「核酸」および用語「オリゴヌクレオチド」は、オリゴリボヌクレオチド、ならびにオリゴデオキシリボヌクレオチドを称する。用語「核酸」および用語「オリゴヌクレオチド」はまた、ポリヌクレオチド（すなわち、リン酸のないポリヌクレオチド）、およびポリマーを含む他の有機塩基を含む。核酸分子は、既存の核酸供給源（例えば、ゲノムDNAまたはcDNA）から入手され得るが、好ましくは合成的（例えば、核酸合成によって生成される）である。用語「オリゴヌクレオチド」は概して、より短い分子（すなわち、100ヌクレオチド以下）を称する。

20

【 0 0 7 3 】

用語「核酸」および用語「オリゴヌクレオチド」はまた、置換または修飾（例えば、塩基および/もしくは糖における）を伴う、核酸またはオリゴヌクレオチドを包含する。例えば、それらとしては、骨格糖を有する核酸があげられ、その骨格糖は、2'位におけるヒドロキシル基以外、および5'位における、リン酸基またはヒドロキシル基以外の低分子量の有機基に共有結合される。従って、修飾された核酸は、2'-O-アルキル化リボース基を含み得る。さらに、修飾された核酸は、リボースの代わりに、アラビノースまたは2'-フルオロアラビノースのような糖を含み得る。従って、その核酸は、骨格組成物において不均一であり得、それによって、その骨格組成物は、一緒に連結されたポリマーユニットの任意の可能な組み合わせ（例えば、ペプチド-核酸（核酸塩基を伴うアミノ酸骨格を有する））を含む。他の例は、以下により詳細に記載される。

30

【 0 0 7 4 】

本発明の免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、天然のRNAおよび天然のDNAと比較して、ホスホジエステルヌクレオチド間架橋、-D-リボースユニット、および/または天然のヌクレオチド塩基（アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル）を含む、種々の化学的修飾および化学的置換を含み得る。化学的修飾の例は、当業者にとって公知であり、そしてその化学的修飾は、例えば、Uhlmann E.ら、(1990) Chem Rev 90: 543; Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques (S. Agrawal, 編、Humana Press, Totowa, USA 1993)中の「Protocols for Oligonucleotides and Analogs」; Crooke STら、(1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 107-129; および Hunziker J.ら、(1995) Mod Synth Methods 7: 331-417に記載される。本発明のオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾を有し得、それぞれの修飾は、天然のDNAまたは天然のRNAで構成される、同じ配列のオリゴヌクレオチドと比較して、特定のホ

40

50

スホジエステルヌクレオシド間架橋の位置、および/または特定の - D - リボースユニットの位置、および/または特定の天然のヌクレオシド塩基の位置にある。

【 0 0 7 5 】

例えば、上記オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾を含み得、そしてそれぞれの修飾は独立して、以下：

- a) ヌクレオシドの、3'末端および/または5'末端に位置するホスホジエステルヌクレオシド間架橋の、修飾されたヌクレオチド間架橋による置換；
- b) ヌクレオシドの、3'末端および/または5'末端に位置するホスホジエステル架橋の、デホスホ ( d e p h o s p h o ) 架橋による置換；
- c) 糖リン酸骨格由来の糖リン酸ユニットの、別のユニットによる置換；
- d) - D - リボースユニットの、修飾された糖ユニットによる置換；ならびに
- e) 天然のヌクレオシド塩基の、修飾されたヌクレオシド塩基による置換より選択される。

10

【 0 0 7 6 】

オリゴヌクレオチドの化学的修飾についてのより詳細な例は、以下の通りである。

【 0 0 7 7 】

上記オリゴヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド間結合（例えば、上の a または b に記載した置換）を含み得る。これらの修飾された結合は、分解に対して部分的に耐性であり得る（例えば、安定化される）。「安定化されたオリゴヌクレオチド分子」は、このような修飾の形成を生じるインビボ分解（例えば、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼによって）に対して比較的耐性であるオリゴヌクレオチドを意味する。いくつかの実施形態において、ホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドは、最大の活性を提供し得、ならびにそのオリゴヌクレオチドを、細胞内の、エキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼによる分解から保護し得る。

20

【 0 0 7 8 】

ヌクレオシドの3'末端および5'末端に位置するホスホジエステルヌクレオシド間架橋は、修飾されたヌクレオシド間架橋によって置換され得、その修飾されたヌクレオシド間架橋は、例えば、ホスホロチオエート架橋、ホスホロジチオエート架橋、 $NR^1R^2$ -ホスホラミデート架橋、ボラノホスフェート架橋、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジルホスホネート架橋、ホスフェート- $(C_1-C_{21})$ -O-アルキルエステル架橋、ホスフェート-[ $(C_6-C_{12})$ アリール- $(C_1-C_{21})$ -O-アルキル]エステル架橋、 $(C_1-C_8)$ アルキルホスホネート架橋、および/または $(C_6-C_{12})$ アリールホスホネート架橋、 $(C_7-C_{12})$ - $\beta$ -ヒドロキシメチル-アリール（例えば、WO 95/01363に開示される）より選択され、 $(C_6-C_{12})$ アリール、 $(C_6-C_{20})$ アリールおよび $(C_6-C_{14})$ アリールは必要に応じて、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、ニトロ、シアノによって置換され、そして $R^1$ および $R^2$ は、それぞれ独立して、水素、 $(C_1-C_{18})$ -アルキル、 $(C_6-C_{20})$ -アリール、 $(C_6-C_{14})$ -アリール- $(C_1-C_8)$ -アルキルであり、好ましくは、水素、 $(C_1-C_8)$ -アルキルであり、好ましくは、 $(C_1-C_4)$ -アルキルおよび/またはメトキシエチルであるか、または $R^1$ および $R^2$ は、それらを保有する窒素原子と一緒にあって、群O、SおよびNに由来するさらなるヘテロ原子を、さらに含み得る5員環~6員環の複素環を形成する。

30

40

【 0 0 7 9 】

ホスホジエステル架橋の置換は、デホスホ架橋（デホスホ架橋は、例えば、Uhlmann EおよびPeyman Aの「Methods in Molecular Biology」, 20巻, 「Protocols for Oligonucleotides and Analogs」, S. Agrawal編, Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp. 355 ffに記載される）によって、ヌクレオシドの3'末端および5'末端に位置し、デホスホ架橋は、例えば、デホスホ架橋ホルムアセタール基、3'-チオホルムアセタール基、メチルヒドロキシルア

50



ミン基、オキシム基、メチレンジメチルヒドラゾ基、ジメチレンスルフォン基、および/またはシリル基から選択される。

【0080】

糖リン酸骨格(すなわち、糖リン酸骨格は、糖リン酸ユニットで構成される)由来の糖リン酸ユニット(すなわち、糖リン酸ユニットと一緒に形成する、 $\beta$ -D-リボースおよびホスホジエステルヌクレオシド間架橋)は、別のユニットによって置き換えられ、他のユニットは、例えば、「モルホリノ誘導体」オリゴマー(例えば、Stirchak EPら、(1989) Nucleic Acids Res 17:6129-41に記載される)を構築する(すなわち、例えば、モルホリノ誘導体ユニットによる置換である)か、ポリアミド核酸(「PNA」;例えば、Nielsen PEら、(1994) Bioconj Chem 5:3-7に記載される)を構築する(すなわち、例えば、PNA骨格ユニット(例えば、2-アミノエチルグリシンによる)による置換である)のに適している。そのオリゴヌクレオチドは、他の炭化水素骨格修飾および他の炭化水素骨格置換(例えば、リン酸基を有するペプチド核酸(PHONA)、ロックされた(locked)核酸(LNA)、およびアルキルリンカーまたはアミノリンカーを伴う骨格部分を有するオリゴヌクレオチド)を有し得る。アルキルリンカーは、分枝状または非分枝状、置換または非置換、および掌性的に純粋であるか、またはラセミ体の混合物であり得る。

10

【0081】

$\beta$ -リボースユニットまたは $\beta$ -D-2'-デオキシリボースユニットは、修飾された糖ユニットによって置き換えられ得、その修飾された糖ユニットは、例えば、 $\beta$ -D-リボース、 $\beta$ -D-2'-デオキシリボース、L-2'-デオキシリボース、2'-F-2'-デオキシリボース、2'-F-アラビノース、2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルリボースから選択され、好ましくは2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)リボースは、2'-O-メチルリボース、2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)アルケニルリボース、2'-[O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキル]-リボース、2'-NH<sub>2</sub>-2'-デオキシリボース、 $\beta$ -D-キシロフラノース、 $\beta$ -アラビノフラノース、2,4-デオキシ- $\beta$ -D-エリスロ-ヘキソ-ピラノース、および炭素環式糖類似物(例えば、Froehler J(1992) Am Chem Soc 114:8320に記載される)、および/または開鎖の糖類似物(例えば、Vandendriesscheら、(1993) Tetrahedron 49:7223に記載される)、および/またはビシクロ糖類似物(例えば、Tarkov Mら、(1993) Helv Chim Acta 76:481に記載される)である。

20

30

【0082】

いくつかの実施形態において、その糖は、特に、ホスホジエステルヌクレオシド間結合またはホスホジエステル様のヌクレオシド間結合によって結合される、1つまたは両方のヌクレオチドのための2'-O-メチルリボースである。

【0083】

核酸はまた、置換されたプリン、および置換されたピリミジン(例えば、C-5プロリンピリミジン修飾塩基、および7-デアザ-7-置換プリン修飾塩基(Wagner RWら、(1996) Nat Biotechnol 14:840-4))を含む。プリンおよびピリミジンとしては、アデニン、シトシン、グアニン、およびチミン、ならびに他の天然の核酸塩基および非天然の核酸塩基、置換された芳香族部分および置換されない芳香族成分が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0084】

修飾された塩基は、代表的にDNA中およびRNA中に見出されるT、C、G、A、およびUのような天然の塩基と、化学的に区別される任意の塩基であるが、修飾された塩基は、これらの天然の塩基と、基本的化学構造を共にする。例えば、その修飾されたヌクレオチド塩基は、ヒポキサンチン、ウラシル、ジヒドロウラシル、プソイドウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-アミノウラシル、5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-アルキル

50

ウラシル、5 - (C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>) - アルケニルウラシル、5 - (C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>) - アルキニルウラシル、5 - (ヒドロキシメチル)ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - ヒドロキシシトシン、5 - (C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>) - アルキルシトシン、5 - (C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>) - アルケニルシトシン、5 - (C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>) - アルキニルシトシン、5 - クロロシトシン、5 - フルオロシトシン、5 - プロモシトシン、N<sup>2</sup> - ジメチルグアニン、2, 4 - ジアミノ - プリン、8 - アザプリン、置換された7 - デアザプリン(好ましくは、7 - デアザ - 7 - 置換プリンおよび/または7 - デアザ - 8 - 置換プリン)、5 - ヒドロキシメチルシトシン、N4 - アルキルシトシン(例えば、N4 - エチルシトシン)、5 - ヒドロキシデオキシシチジン、5 - ヒドロキシメチルデオキシシチジン、N4 - アルキルデオキシシチジン(例えば、N4 - エチルデオキシシチジン)、6 - チオデオキシグアノシン、およびニトロピロールのデオキシリボヌクレオシド、C5 - プロピニルピリミジン、およびジアミノプリン(例えば、2, 6 - ジアミノプリン)、イノシン、5 - メチルシトシン、2 - アミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、ヒポキサンチンまたは天然のヌクレオシド塩基の他の修飾より選択され得る。この一覧は、例示的な意図であり、限定であると解釈されるべきではない。

#### 【0085】

本明細書中に記載された特定の式において、1組の修飾された塩基が、定義される。例えば、文字Yは、シトシンまたは修飾されたシトシンを含むヌクレオチドを称するために使用される。本明細書中で使用される場合、修飾されたシトシンは、天然または非天然の、シトシンのピリミジン塩基類似物であり、この類似物は、上記オリゴヌクレオチドの免疫刺激活性を損なわずにこの塩基を置換し得る。修飾されたシトシンとしては、5 - 置換シトシン(例えば、5 - メチル - シトシン、5 - フルオロ - シトシン、5 - クロロ - シトシン、5 - プロモ - シトシン、5 - ヨード - シトシン、5 - ヒドロキシ - シトシン、5 - ヒドロキシメチル - シトシン、5 - ジフルオロメチル - シトシン、および置換されていない5 - アルキニル - シトシンまたは置換された5 - アルキニル - シトシン)、6 - 置換シトシン、N4 - 置換シトシン(例えば、N4 - エチル - シトシン)5 - アザ - シトシン、2 - メルカプト - シトシン、イソシトシン、プソイド - イソシトシン、縮合環系を有するシトシン類似物(例えば、N, N' - プロピレンシトシンまたはフェノキサジン)、ならびにウラシルおよびその誘導体(例えば、5 - フルオロ - ウラシル、5 - プロモ - ウラシル、5 - プロモビニル - ウラシル、4 - チオ - ウラシル、5 - ヒドロキシ - ウラシル、5 - プロピニル - ウラシル)が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの好ましいシトシンとしては、5 - メチル - シトシン、5 - フルオロ - シトシン、5 - ヒドロキシ - シトシン、5 - ヒドロキシメチル - シトシン、およびN4 - エチル - シトシンが挙げられる。本発明の別の実施形態において、そのシトシン塩基は、ユニバーサル塩基(universal base)(例えば、3 - ニトロピロール、P塩基)、芳香環系(例えば、フルオロベンゼンまたはジフルオロベンゼン)、または水素原子(dスペーサー)によって置換される。

#### 【0086】

文字Rは、グアニンまたは修飾されたグアニン塩基を称するために使用される。本明細書中で使用される場合、修飾されたグアニンは、天然のまたは非天然の、グアニンのプリン塩基類似物であり、この類似物は、上記オリゴヌクレオチドの免疫刺激活性を損なわずにこの塩基を置換し得る。修飾されたグアニンとしては、7 - デアザグアニン、7 - デアザ - 7 - 置換グアニン(例えば、7 - デアザ - 7 - (C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>)アルキニルグアニン)、7 - デアザ - 8 - 置換グアニン、ヒポキサンチン、N2 - 置換グアニン(例えば、N2 - メチル - グアニン)、5 - アミノ - 3 - メチル - 3H, 6H - チアゾール[4, 5 - d]ピリミジン - 2, 7 - ジオン、2, 6 - ジアミノプリン、2 - アミノプリン、プリン、インドール、アデニン、置換されたアデニン(例えば、N6 - メチル - アデニン、8 - オキソ - アデニン)、8 - 置換グアニン(例えば、8 - ヒドロキシグアニンおよび8 - プロモグアニン)、および6 - チオグアニンが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の別の実施形態において、そのグアニン塩基は、ユニバーサル塩基(例えば、4 - メチル

10

20

30

40

50

- インドール、5 - ニトロ - インドール、および K 塩基)、芳香環系(例えば、ベンズイミダゾールまたはジクロロベンズイミダゾール、1 - メチル - 1 H - [ 1 , 2 , 4 ] トリアゾール - 3 - カルボン酸アミド)、または水素原子(d スペース)によって置換される。

【 0 0 8 7 】

特定の塩基修飾がまた、許容された。末端どちらかの T 残基が、デオキシウリジン(U)によって置換された配列番号 29 は、IFN - の強力な誘導因子であることが分かった。対照的に、全ての CpG モチーフ中のデオキシイノシン(I)による G の置換(配列番号 30 における場合)は、IFN - 誘導を完全に消滅させた。意外にも、7 - デアザデオキシグアノシン(配列番号 31)のような G 残基の修飾は、高 IFN - 誘導を生じた。これにより、Hoogsteen 塩基対形成を介する 4 分子形成についての必要性(これまでに記載された G リッチの A クラスオリゴヌクレオチドの高い活性についての必要条件)は、新規のコレステロール修飾 A クラス免疫刺激オリゴヌクレオチドのために排除され得る。

10

【 0 0 8 8 】

本発明における使用に関して、本発明のオリゴヌクレオチドは、当該分野で周知である多くの手段のいずれかを使用して、デノボに合成され得る。例えば、その手段は、- シアノエチルホスホラミダイト法(Beaucage, S. L., および Caruthers, M. H., Tet. Let. 22: 1859, 1981); ヌクレオチド H - ホスホネート法(Gareggら, Tet. Let. 27: 4051 - 4054, 1986; Froehlerら, Nucl. Acid. Res. 14: 5399 - 5407, 1986; Gareggら, Tet. Let. 27: 4055 - 4058, 1986, Gaffneyら, Tet. Let. 29: 2619 - 2622, 1988)である。これらの化学反応は、市販の種々の自動核酸合成機によって、実施され得る。これらのオリゴヌクレオチドは、合成オリゴヌクレオチドと称される。単離されたオリゴヌクレオチドは概して、それが天然では通常結合した構成成分から分離されたオリゴヌクレオチドを称する。例として、単離されたオリゴヌクレオチドは、細胞からか、核からか、ミトコンドリアからか、またはクロマチンから分離されるものであり得る。

20

【 0 0 8 9 】

上記オリゴヌクレオチド中のヌクレオチド間結合は、(ヌクレアーゼに対して)非安定化された結合か、または安定化された結合であり得、好ましくは、ホスホジエステル(非安定化された)骨格か、ホスホロチオエート(安定化された)骨格か、または別の荷電した骨格であり得、最も好ましくは、ホスホジエステル結合であり得る。Y - R におけるヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエートである場合、この結合の掌性は、無作為であり得るか、または好ましくは Rp 立体配置のホスホロチオエート結合である。特に 5' 末端における、ホスホロチオエート結合の数の増加(配列番号 3、配列番号 15、配列番号 25)は、減少された IFN - 誘導を生じるか、または IFN - 誘導を生じない。

30

【 0 0 9 0 】

ホスホロチオエートのような修飾された骨格は、ホスホラミデート化学反応または H - ホスホネート化学反応のいずれかを利用する、自動化された技術を使用して合成され得る。アリール - ホスホネートおよびアルキル - ホスホネートは、例えば、米国特許第 4, 469, 863 号に記載されるように作製され得、そしてアルキルホスホトリエステル(荷電した酸素部分が、米国特許第 5, 023, 243 号および欧州特許第 092, 574 号に記載されるようにアルキル化される)は、市販の試薬を使用する自動固相合成によって調製され得る。他の DNA 骨格修飾および他の DNA 骨格置換をなすための方法が、記載されてきた(例えば、Uhlmann, E. および Peyman, A., Chem. Rev. 90: 544, 1990; Goodchild, J., Bioc conjugate Chem. 1: 165, 1990)。

40

【 0 0 9 1 】

【表 1 - 1】

表1

ODN #	配列
配列番号 1	T*C G A C G T C G T teg
配列番号 2	T*C G A C G T C G T L
配列番号 3	T*C G A C G T C G*T-Chol
配列番号 4	T C G A C G T C G T Chol
配列番号 5	Chol-T C G A C G T C G T-Chol
配列番号 6	Chol T C G A C G T C G T teg
配列番号 7	T C G T C G A C G T G Chol
配列番号 8	T C G A C G T C G T T Chol
配列番号 9	G T C G A C G T C G T Chol
配列番号 10	G T C G A C G T C G T T Chol
配列番号 11	T C G T C G A C G T T Chol
配列番号 12	A C G A C G T C G T Chol
配列番号 13	T C G A C G T C G A Chol
配列番号 14	G A C G A C G T C G T T Chol
配列番号 15	T*C*G*A*C*G*T*C*G*T Chol
配列番号 16	T*C G A C G T C G T Chol
配列番号 17	T C G A C G T C G*T Chol
配列番号 18	T C G A C G T C G T teg
配列番号 19	T C G A C G T C G A C G T C G T Chol
配列番号 20	T C G T C G T C G T Chol
配列番号 21	T G C A G C T G C T-Chol
配列番号 22	..C G A C G T C G.. Chol
配列番号 23	T A A C G T T T Chol
配列番号 24	T G A C G T T T Chol
配列番号 25	T*C*G*T C G A C G T C G T Chol

10

20

30

【 0 0 9 2 】

【表 1 - 2】

配列番号 26	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T C G A C G T C G T Chol
配列番号 27	T C G G C G G C C G C C G Chol
配列番号 28	T*C*G*T C G G C G G C C G C C G T Chol
配列番号 29	U C G A C G T C G U-Chol
配列番号 30	T C I A C I T C I T-Chol
配列番号 31	T C 7 A C 7 T C 7 T-Chol
配列番号 32	T C A T C G A T G A Chol
配列番号 33	...G A C G A T C G T C Chol
配列番号 34	T C A C C G G T G A Chol
配列番号 35	G A C G T T A A C G T C Chol
配列番号 36	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T (B- クラス ODN)
配列番号 37	Chol_T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G* T*T
配列番号 38	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T_ Chol
配列番号 39	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G (C- クラス ODN)
配列番号 40	G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G*G (A- クラス ODN)
配列番号 41	T_C_G_A_Chol
配列番号 42	T_C_G_C_G_A_Chol
配列番号 43	T_C_G_C_G_C_G_A_Chol
配列番号 44	T_C_G_C_C_G_G_C_G_A_Chol
配列番号 45	T_C_G_G_C_G_C_C_G_A_Chol
配列番号 46	T_C_G_C_G_C_G_C_G_A_Chol
配列番号 47	T_C_G_T_C_G_A_C_G_A_Chol
配列番号 48	T_C_G_T_A_C_G_A_Chol
配列番号 49	T_C_G_A_A_T_T_C_G_A_Chol
配列番号 50	T_C_G_T_T_A_A_C_G_A_Chol
配列番号 51	T_C_G_A_A_C_G_T_T_C_G_A_Chol

10

20

30

40

【 0 0 9 3 】

【表 1 - 3】

配列番号 52	T_C_G_T_T_C_G_A_A_C_G_A_Chol	
配列番号 53	T_C_G_A_C_G_A_T_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 54	T_C_G_G_A_C_G_A_T_C_G_T_C_C_G_A_Chol	
配列番号 55	T_C_G_A_C_G_A_G_C_T_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 56	T_C_G_G_C_G_G_C_C_G_C_C_G_A_Chol	
配列番号 57	T_C_G_A_C_G_T_C_G_A*Chol	10
配列番号 58	T_C_G_A_C_G_T_C_G*A_Chol	
配列番号 59	T_C_G_A_C_G_T_C*G*A_Chol	
配列番号 60	T_C_G_A_C_G_T*C*G*A_Chol	
配列番号 61	G_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 62	C_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 63	I_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	20
配列番号 64	U_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 65	Z_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 66	T_T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 67	T_T_T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 68	T_C_G_T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 69	T_C_G_A_A_T_A_T_A_T_A_T_T_A_C_G_A_chol	
配列番号 70	T_C_G_A_A_T_A_T_A_T_A_T_T_A_chol	30
配列番号 71	T_C_A_T_C_G_A_T_G_A_Chol	
配列番号 72	T_C_G_A_C_G_T_T_G_A_Chol	
配列番号 73	F_C_G_A_C_G_F_C_G_A_Chol	
配列番号 74	T_H_G_A_H_G_T_H_G_A_Chol	
配列番号 75	T_Z_G_A_Z_G_T_Z_G_A_Chol	
配列番号 76	T_C_G_V_C_G_T_C_G_V_Chol	40

【 0 0 9 4 】

【表 1 - 4】

配列番号 77	T_C_V_A_C_V_T_C_V_A_Chol	
配列番号 78	T_C_R_A_C_R_T_C_R_A_Chol	
配列番号 79	T_C_O_A_C_O_T_C_O_A_Chol	
配列番号 80	T_C_S_A_C_S_T_C_S_A_Chol	
配列番号 81	T_C_G_S_C_G_T_C_G_S_Chol	
配列番号 82	T_S_G_A_S_G_T_S_G_A_Chol	10
配列番号 83	T_C_G_A_C_G_S_C_G_A_Chol	
配列番号 84	T_C_6G_A_C_6G_T_C_6G_A_Chol	
配列番号 85	ff_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 86	4T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 87	yU_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 88	5U_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	20
配列番号 89	T_C_D_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 90	T_C_G_A_D_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 91	T_C_G_A_C_G_T_C_D_A_Chol	
配列番号 92	T_C_G_A_D_D_T_C_G_A_Chol	
配列番号 93	5T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 94	3T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 95	T_aC_G_A_aC_G_T_aC_G_A_Chol	30
配列番号 96	T_fc_G_A_fc_G_T_fc_G_A_Chol	
配列番号 97	fU_C_G_A_C_G_fU_C_G_A_Chol	
配列番号 98	mU_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 99	mU_mC_mG_mA_mC_mG_mU_mC_mG_mA_Chol	
配列番号 100	rU_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	
配列番号 101	rU_rC_rG_rA_rC_rG_rU_rC_rG_rA_Chol	40

【 0 0 9 5 】

【表 1 - 5】

配列番号 102	mU&mC&mG&mA&mC&mG&mU&mC&mG&mA_chol
配列番号 103	T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_D_D_D_D_T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_chol
配列番号 104	3'-teg_A_G_C_T_G_C_A_G_C_T_(5'5'連結)D_D_D_D_T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_chol-3'

記号\*は安定化したヌクレオチド間結合の存在を称し、そして記号\_はホスホジエステル結合の存在を称する。以下は、表1中の記号および文字の定義である:

10

&	ホスホジエステルのような2' 5' - 結合	
*	ホスホロチオエート	
*p	5' -チオホスフェート	
—	ホスホジエステル(PO結合)	
A, C, G, T	2' -デオキシヌクレオチド (dA, dC, dG, T)	
chol	コレステロール	
D	dスペーサー(無塩基残基)	
7	7-デアザ-dG	
F	5-フルオロ-dU	
H	5-ヒドロキシ-dC	20
I	イノシン(デオキシ)	
J	スペーサー-C3(プロバンジオールホスフェート)	
L	スペーサー-18(ヘキサエチレングリコールホスフェート)	
mA, mC, mG	2' -オオター3' -O-メチルリボヌクレオチド (A, C, G)	
mA, mC, mG	3' -O-メチル-A (C, G)	
mT	3' -O-メチル-T	
mU	2' -O-メチルウリジン	
O	8-オキソ-dG	
p*	3' -チオホスフェート	
Q	8-オキソ-dA	
R	2-アミノプリン(デオキシリボフラノシド)	
rA, rC, rG, rU	RNA	30
S	5NI = 5-ニトロインドール	
teg	スペーサー-9(トリエチレングリコールホスフェート)	
U	2'-デオキシウリジン	
V	2,6-ジアミノプリン(デオキシリボフラノシド)	
vitE	ビタミンE	
W	ネブラリン(デオキシリボフラノシド)	
Z	5-メチル-デオキシシチジン	
5T	5-メトキシ-デオキシチミジン	
doub	ダブル (Glenresearch)	
doub2	ダブル-2 (Chemgenes)	
but	1, 4-ブタンジオール	
6G	6-チオデオキシグアノシン	40
ff	ジフルオロトルイルデオキシリボヌクレオチド	

【 0 0 9 6 】



## 【表 1 - 6】

4T	4-チオチミジン
yU	プソイドデオキシウリジン
5U	5-ヒドロキシメチルデオキシウリジン
5T	5-メトキシチミジン
3T	2'3'-ジデオキシチミジン
aC	アラ-シチジン (5'5'-連結型)
fC	2'-フルオロ-シチジン
fU	2'-フルオロ-ウリジン
rU	リボ-ウリジン
bC	5'-プロモ-シチジン
eC	N-4-エチル-シチジン
dP	P-塩基
cC	アミノ-修飾-C6-シチジン

10

本発明はまた、2本鎖を形成する1組のオリゴヌクレオチドである組成物に関連する。以下の例に示すように、そのオリゴヌクレオチドは、単独で使用される場合、最小限の活性を有するか、または活性を有さない。しかし、それらは、2本鎖として調製される場合、その2本鎖の活性は、大きく向上する。

## 【0097】

上記2つのオリゴヌクレオチドの間に形成する2本鎖は、部分的相補性を有する。部分的相補性は少なくとも、互いに塩基対形成するヌクレオチドを含む2本鎖の一部を称する。従って、第1のオリゴヌクレオチドの1つの領域は、第2のオリゴヌクレオチドの領域中の相補的ヌクレオチドとの塩基対を形成する、少なくともいくつかのヌクレオチドを含み得る。その部分的相補性は、外因性安定剤の、存在下または非存在下において、2本鎖を安定化するのに十分な量である。一般的に、部分的相補性の領域は、それぞれのオリゴヌクレオチド上に、少なくとも2つのヌクレオチドを含むべきであり、そのオリゴヌクレオチドは、他のオリゴヌクレオチドと塩基対形成が可能であり、その塩基対形成は、そのオリゴヌクレオチド対の長さに依存する。いくつかの実施形態において、部分的相補性の領域は、2ヌクレオチドより大きいことが、好ましい。例えば、その領域は、それぞれのオリゴヌクレオチド上に少なくとも、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、または10ヌクレオチドを含み得る。従って、その部分的相補性を有するヌクレオチドの領域は、1つ以上のヌクレオチドミスマッチ (nucleotide mismatch) を含み得る。

20

30

## 【0098】

あるいは、上記2本鎖に関与するヌクレオチドの全領域は、完全に相補的であり得る。完全に相補的である領域は、その他のオリゴヌクレオチド上で相補的ヌクレオチドと塩基対形成するヌクレオチドのみを含む領域である。

## 【0099】

上記2本鎖は、塩基対形成するヌクレオチドの間の相互作用によって安定化され得る。いくつかの事例において、その2本鎖は、外因性安定剤の使用によって安定化され得るか、さらに安定化され得る。外因性安定剤は、任意の分子(例えば、その2本鎖の解離のレベルを減少するリンカー、または言い換えればその2本鎖の安定性を向上させるリンカー)である。

40

## 【0100】

上記オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、YRモチーフを含み、そして好ましくはCGモチーフを含む。片方または両方のオリゴヌクレオチドは、必要ではないが、パリンδροームを含み得る。いくつかの実施形態において、いずれのヌクレオチドも、パリンδροームを含まない。

## 【0101】

オリゴヌクレオチドの機能的活性2本鎖の例は、配列番号108および配列番号109である。

50

配列番号 108 5' - T \_ C \_ G \_ T \_ C \_ G \_ T \_ C \_ G \_ A \_ C h o l

配列番号 109 C h o l - A \_ G \_ C \_ A \_ G \_ C \_ A \_ G \_ C \_ T - 5'

本発明によって、上記1組の親油性接合体が、ヒト細胞に対して劇的な免疫刺激効果を有することが発見され、このことは、これらの接合体が、放射線または化学療法、および他の免疫調節適用に続く、ヒトのワクチン接種、癌の免疫療法、喘息の免疫療法、一般的な免疫機能の向上、造血回復の向上についての効果的な治療薬であることを示唆。

【0102】

本明細書中で使用される場合、用語「処置 (treat)」, 用語「処置された (treated)」, 用語「処置する (treating)」は、疾患 (例えば、感染症、癌、アレルギー、または喘息) に関して使用される場合、予防的な処置を称し、その処置は、疾患の発症に対する (例えば、病原体による感染に対する) 被験体の抵抗性を増加し、または言い換えれば、その被験体が疾患を発症する (例えば、病原体により感染する) 可能性を減少し、そして疾患と闘う (例えば、感染を軽減しまたは排除する) ため、または疾患の悪化を防ぐための、被験体が疾患を発症した後の処置である。

【0103】

従って、本発明のいくつかの局面において、上記親油性接合体は、アレルギーもしくは喘息、感染性の生物による感染もしくは特定の癌抗原が確認された癌を、有するか、または発症する危険のある被験体の処置のためのワクチンとして有用である。親油性接合体はまた、感染、アレルギーまたは癌に対する防御のための抗原またはアレルゲンを伴わずに単独で投与され得るか、他の治療薬と一緒に投与され得る。反復投与は、より長い期間の防御を可能にし得る。本明細書中で使用されるような危険にある被験体は、感染を引き起こす病原体、または癌、またはアレルゲンに対する曝露の危険のいずれか、または癌を発症する危険を有する被験体である。例えば、危険にある被験体は、特定の型の感染因子が見出される地域への旅行を計画している被験体であり得るか、またはその危険にある被験体は、ライフスタイルまたは医療手順を通じて、感染性の生物を含み得る体液に曝されるか、もしくは直接的にその生物に曝され得るか、または感染性の生物もしくはアレルゲンが確認されている地域に生きる任意の被験体でさえある。感染を発症する危険のある被験体はまた、医療機関が、特定の感染性の生物の抗原を用いるワクチン接種を推奨する、一般的な集団を含む。その抗原が、アレルゲンであり、そしてその被験体が、その特定の抗原に対してアレルギー反応を発症し、そしてその被験体が、その抗原に曝露され得る (すなわち、花粉の季節の間) 場合、その被験体は、上記抗原への曝露の危険がある。アレルギーから喘息を発症する危険のある被験体としては、アレルギーまたは喘息を有することが確認されてきた被験体が挙げられるが、その被験体は、上記親油性接合体による処置の間に、活動性の疾患を有さず、そして遺伝的要因または環境的要因がもとで、これらの疾患を発症する危険にあると考えられる被験体である。

【0104】

癌を発症する危険のある被験体は、癌を発症する高い確率を有する被験体である。例えば、これらの被験体としては、その存在が癌を発症する、より高い可能性に対して、相関関係を有することが実証されてきた遺伝的異常を有する被験体、および癌を引き起こす因子 (例えば、タバコ、アスベスト、もしくは他の化学的毒素) に曝露される被験体、またはこれまでに癌について処置され、そして表面上は回復状態にある被験体が挙げられる。癌を発症する危険のある被験体が、親油性接合体、および必要に応じて、被験体が発症する危険のある癌の型に特異的な抗原を用いて処置される場合、その被験体は、癌が発症する場合、その癌細胞を殺傷することが可能であり得る。上記被験体中で腫瘍の形成が始まる場合、その被験体は、生得的な免疫応答、またはその腫瘍抗原に対する特異的な免疫応答を発生する。

【0105】

予防的処置についての上記親油性接合体の使用に加えて、本発明はまた、感染、アレルギー、喘息、または癌を有する被験体の処置についての親油性接合体の使用を包含する。

【0106】

10

20

30

40

50

感染を有する被験体は、感染性病原体に曝された被験体であり、そしてその被験体は、身体の中に、急性のまたは慢性的な、その病原体の検出可能なレベルを有する。上記親油性接合体は、抗原もしくは他の治療因子を伴うか、または伴わずに使用され得、その治療因子は、生得的もしくは抗原特異的な全身性免疫応答、または生得的もしくは抗原特異的な粘膜の免疫応答を起こし、その免疫応答は、その感染性病原体のレベルの減少すること、またはその感染性病原体を根絶することができる。本明細書中で使用される場合、感染症は、身体の中の外来性の微生物の存在に起因する疾患である。効果的なワクチンによる方法、および病原体侵入の主要な部位である身体の粘膜表面を保護するための処置を開発することは、特に重要である。

【 0 1 0 7 】

アレルギーを有する被験体は、アレルゲンに対する応答におけるアレルギー反応を発生する可能性のある被験体である。アレルギーは、物質（アレルゲン）に対する後天性の過敏症を称する。アレルギー性状態としては、湿疹、アレルギー性鼻炎またはアレルギー性コリーザ、枯草熱、結膜炎、気管支喘息、アレルギー性喘息、じんま疹（*urticaria*）（じんま疹（*hives*））および食物アレルギー、および他のアトピー性の状態が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 8 】

アレルギーは概して、無害なアレルゲンに対する I g E 抗体産生によって引き起こされる。親油性接合体の、全身的投与または粘膜的投与によって誘導されるサイトカインは、主に、T h 1 と呼ばれるクラスのサイトカイン（例は、I L - 1 2、I P - 1 0、I F N - 、および I F N - である）であり、そしてこれらは、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を誘導する。他の主な型の免疫応答は、I L - 4 サイトカインおよび I L - 5 サイトカインの産生に関連し、その免疫応答は、T h 2 免疫応答と称される。一般的に、アレルギー性疾患は、T h 2 型免疫応答によって媒介されるようである。優勢な T h 2 応答（I g E 抗体およびアレルギーの産生に関連する応答である）から、バランスのとれた T h 2 / T h 1 応答（アレルギー性反応に対して防御的である応答）に、被験体中の免疫応答を移行する本明細書中に記載される親油性接合体の能力に基づいて、親油性接合体の免疫応答を誘導するのに効果的な用量が、喘息およびアレルギーを処置するために、被験体に投与され得る。

【 0 1 0 9 】

従って、上記親油性接合体は、アレルギー性状態およびアレルギー性喘息の処置における実質的な治療有用性を有する。T h 2 サイトカイン、特に、I L - 4 および I L - 5 は、喘息被験体の気道中で上昇する。これらのサイトカインは、喘息性炎症応答の重要な局面を促し、その局面は、I g E 同位体切り替え、好酸球走化作用および好酸球活性化、ならびに肥満細胞増殖を含む。T h 1 サイトカイン、特に、I F N - および I L - 1 2 は、T h 2 クローンの形成および T h 2 サイトカインの産生を抑制し得る。喘息は、炎症、気道の縮小、および吸入因子に対する気道の増強した反応によって特徴付けされた呼吸器系の疾患を称する。喘息は、独占的にアトピー性症状またはアレルギー性症状に、頻繁に関連するが、独占的に関連しない。従って、喘息としては、アレルギー性喘息および非アレルギー性喘息が挙げられる。

【 0 1 1 0 】

癌を有する被験体は、検出可能な癌性細胞を有する被験体である。その癌は、悪性の癌または非悪性の癌であり得る。癌または腫瘍としては、胆道癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、上皮内新生物、リンパ腫、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞癌および非小細胞癌）、黒色腫、神経芽細胞種、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、肉腫、皮膚癌、精巣癌、甲状腺癌、および腎臓癌、ならびに他の癌腫および肉腫が挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、その癌は、ヘアリーセル白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚の T 細胞白血病、多発骨髄腫、濾胞性リンパ腫、悪性黒色腫、扁平上皮癌、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱細胞癌または大腸癌である。

10

20

30

40

50

## 【0111】

被験体は、ヒト、または、脊椎動物もしくは哺乳動物を意味し、脊椎動物もしくは哺乳動物としては、犬、猫、馬、牛、豚、羊、山羊、七面鳥、鶏、霊長類（例えば、猿）、および魚（水産養殖の生物種）（例えば、鮭）が挙げられるが、これらに限定されない。従って、上記化合物は、癌および腫瘍、感染、ならびにヒト被検体および非ヒト被験体における、アレルギーノ喘息を処置するために使用され得る。癌は、コンパニオンアニマル（companion animal）（例えば、猫および犬）の死の原因を導く要因の一つである。

## 【0112】

上記 CpG オリゴヌクレオチドが、抗原と共に投与される事例において、その被験体は、その抗原に曝され得る。本明細書中で使用される場合、用語「に曝される（exposed to）」は、上記被験体と抗原とを接触する能動的な工程、またはインビボでの、その抗原に対するその被験体の受動的な曝露のいずれかを称する。抗原に対する被験体の能動的な曝露のための方法は、当該分野で周知である。一般的に、抗原は、任意の手段（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、口への投与、経皮的投与、粘膜への投与、鼻腔内への投与、気管内への投与、皮下投与）によって、その被験体に直接的に投与される。その抗原は、全身的または局所的に投与され得る。その抗原およびその親油性接合体を投与するための方法は、以下に、より詳細に記載される。抗原がその身体において、免疫細胞に対する曝露に利用可能になる場合、被験体は、抗原に受動的に曝される。被験体は、例えば、その身体の中への、外来性の病原体の侵入によってか、またはその表面上で外来性の抗原を発現する腫瘍細胞の発生によって、抗原に受動的に曝露され得る。

## 【0113】

被験体が、抗原に対して受動的に曝露される方法は、特に、上記親油性接合体の投与の時期に依存する。例えば、癌、または感染症、またはアレルギー性反応もしくは喘息の反応を発症する危険のある被験体において、その危険が、最も高い（すなわち、アレルギーの季節の間、または癌を引き起こす因子に対する曝露の後）場合、その被験体は、通常の基準でその親油性接合体を投与され得る。さらに、その親油性接合体は、旅行者が、感染性因子への曝露の危険がある外国の土地へ旅行する前に、その旅行者に投与され得る。同様に、その親油性接合体は、抗原に対する、全身性免疫応答または粘膜の免疫応答を誘導する生物戦争への曝露の危険がある、軍人または一般人に投与され得、そして被験体が、それに曝された場合、投与され得る。

## 【0114】

本明細書中で使用される抗原は、免疫応答を引き起こすことができる分子である。抗原としては、細胞、細胞抽出物、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、多糖類、多糖類の接合体、多糖類および他の分子の、ペプチド性模倣物（mimic）および非ペプチド性模倣物、低分子、脂質、糖脂質、炭水化物、ウイルスおよびウイルス抽出物、ならびに多細胞生物（例えば、寄生虫およびアレルギー）が挙げられるが、これらに限定されない。用語「抗原」は、外来性である場合、宿主免疫系によって認識される任意の分子の型を広く含む。抗原としては、癌抗原、微生物抗原、およびアレルギーが、挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0115】

本明細書中で使用される癌抗原は、腫瘍細胞表面または癌細胞表面と関係がある化合物（例えば、ペプチドまたはタンパク質）であり、そしてその化合物は、MHC分子の状況において細胞を提示する抗原の表面上に発現されるときに、免疫応答を引き起こすことができる。癌抗原は、癌細胞の粗製抽出物を調製すること（例えば、Cohenら、1994, Cancer Research, 54:1055に記載される）によってか、特にその抗原を精製することによってか、組換え技術によってか、または公知の抗原のデノボ合成によってかのいずれかで、癌細胞から調製され得る。癌抗原としては、組換え的（recombinantly）に発現された抗原、それらの免疫原性部分、または腫瘍細胞の全体もしくは癌細胞の全体が挙げられるが、これらに限定されない。このような抗原は

10

20

30

40

50

、単離され得るか、または組換え的に調製され得るか、または当該分野で公知の任意の他の手段によって調製され得る。

【0116】

本明細書中で使用される場合、用語「癌抗原」および用語「腫瘍抗原」は、癌細胞によって差次的に発現された抗原を称するために、交換可能に使用されるそれによって癌細胞を標的化するために利用され得る。がん抗原は、腫瘍特異的免疫応答を潜在的に、明白に刺激し得る抗原である。これらの抗原のいくつかは、正常な細胞によって、コードされるが、必ずしも発現されない。これらの抗原は、正常な細胞において、普通は無症候性（すなわち、発現されない）である抗原、分化の特定の段階においてのみ発現される抗原および一時的に発現される抗原（例えば、胚性の抗原および胎性の抗原）として特徴付けされ得る。他の癌抗原は、癌遺伝子（例えば、活性化された *ras* 癌遺伝子）、サプレッサー遺伝子（例えば、変異 *p53*）、内部欠失または染色体転座から生じる融合タンパク質のような変異細胞内遺伝子によってコードされる。さらに他の癌抗原は、ウイルス遺伝子（例えば、RNA腫瘍ウイルスおよびDNA腫瘍ウイルスに保持される遺伝子）によってコードされ得る。

10

【0117】

本明細書中で使用される微生物抗原は、微生物の抗原であり、そしてその微生物としてはウイルス、細菌、寄生虫および真菌が挙げられるが、これらに限定されない。このような抗原としては、インタクトな微生物、ならびに天然の単離物および天然のフラグメントまたはそれらの誘導体、ならびに合成化合物も挙げられ、その合成化合物は、天然の微生物の抗原と同一であるか、または類似であり、その微生物に対して特異的な免疫応答を誘導する。化合物が、天然の微生物抗原に対する免疫応答（体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答）を誘導する場合、その化合物は、天然の微生物の抗原に類似する。このような抗原は、当該分野で日常的に使用され、その抗原は、当業者にとって周知である。

20

【0118】

ヒトにおいて見出されて来たウイルスの例としては、レトロウイルス科（例えば、HIV-1 (HTLV-III、LAVもしくはHTLV-III/LAV、またはHIV-IIIとも称される)のようなヒト免疫不全ウイルス、およびHIV-LPのような他の単離体)、ピコルナウイルス科（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）、カルシウイルス科 (Calciviridae)（例えば、胃腸炎を引き起こす株）、トガウイルス科（例えば、馬脳炎ウイルス、風疹ウイルス）、フラビウイルス科（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）、コロナウイルス科 (Coronaviridae)（例えば、コロナウイルス）、ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae)（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）、コロナウイルス科 (Coronaviridae)（例えば、コロナウイルス）、ラブドウイルス科（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）、フィロウイルス科（例えば、エボラウイルス）、パラミクソウイルス科（例えば、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルス）、オルトミクソウイルス科（例えば、インフルエンザウイルス）、ブンヤウイルス科 (Bunyaviridae)（例えば、ハンタウイルス、ブンヤウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス）、アレナウイルス科（出血熱ウイルス）、レオウイルス科（例えば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス）、ビルナウイルス科、ヘパドナウイルス科 (B型肝炎ウイルス)、パルボウイルス科 (パルボウイルス)、パポバウイルス科 (パピローマウイルス、ポリオーマウイルス)、アデノウイルス科 (ほとんどのアデノウイルス)、ヘルペスウイルス科 (単純疱疹1型ウイルスおよび単純疱疹2型ウイルス (HSV)、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、ヘルペスウイルス)、ポックスウイルス科 (天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス)、およびイリドウイルス科 (例えば、アフリカ豚コレラウイルス)、ならびに分類されていないウイルス (例えば、デルタ型肝炎の外的病原因子 (B型肝炎ウイルスの不完全な付随体と考えられる)、C型肝炎ウイルス、ノ

30

40

50

ーウォークウイルスおよびそれに関連したウイルス、ならびにアストロウイルス)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0119】

グラム陰性菌およびグラム陽性菌の両方は、脊椎動物において抗原として作用する。このようなグラム陽性菌としては、パスツレラ種、ブドウ球菌種、および連鎖球菌種が挙げられるが、これらに限定されない。グラム陰性菌としては、*Escherichia coli*、シュードモナス種およびサルモネラ種が挙げられるが、これらに限定されない。感染性細菌の特定の例としては、以下：

【0120】

【化1】

*Helicobacter*

*pyloris*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, ミコバクテリア種 (例えば *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (A群連鎖球菌), *Streptococcus agalactiae* (B群連鎖球菌),

連鎖球菌属 (ピリダナス群), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, 連鎖球菌属 (嫌気性の種), *Streptococcus pneumoniae*, 病原性の

カンピロバクター種, エンテロコッカス種, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, コリネバクテリウム種, *Erysipelothrix rhusiopathiae*,

*Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, バクテロイデス種, *Fusobacterium nucleatum*,

*Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, レプトスピラ, リケッチア属, および *Actinomyces israelii*.

が挙げられるが、これらには限定されない。

【0121】

真菌の例としては、*Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans* が挙げられる。

【0122】

他の感染性の生物 (すなわち、原生生物) としては、プラズモディウム種 (例えば、*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, および *Plasmodium vivax*)、ならびに *Toxoplasma gondii* が挙げられる。血液に運ばれる寄生虫および/または組織の寄生虫としては、プラズモディウム種、*Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, リーシュマニア種、*Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* および *Trypanosoma rhodesiense* (アフリカ睡眠病)、*Trypanosoma cruzi* (シャーガス病)、ならびに *Toxoplasma gondii* が挙げられる。

【0123】

他の医学的に関連する微生物は、文献 (例えば、C. G. A. Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983 を参照のこと) に広く記載され、その内容の全体は、参考によって本明細書中に参考として援用される。

【0124】

10

20

30

40

50

アレルゲンは、感受性の被験体において、アレルギー反応または喘息の反応を誘導し得る物質（抗原）を称する。アレルゲンの一覧は、莫大な数であり、そしてアレルゲンとしては、花粉、昆虫の毒液、動物の鱗屑の塵（dander dust）、真菌の孢子、および薬物（例えば、ペニシリン）が挙げられ得る。天然の、動物性アレルゲンおよび植物性アレルゲンの例としては、以下の属：

【 0 1 2 5 】  
【 化 2 】

イヌ (*Canis familiaris*); ヒョウヒダニ

(例えは *Dermatophagoides farinae*); ネコ (*Felis domesticus*); ブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*); ドクムギ (例えは *Lolium perenne* または *Lolium multiflorum*); スギ (*Cryptomeria japonica*); アルテルナリア (*Alternaria alternata*); ハンノキ ; ハンノキ (*Alnus gultinoasa*); カバノキ (*Betula verrucosa*); 白オーク (*Quercus alba*); オリーブ (*Olea europa*);

10

ヨモギ (*Artemisia vulgaris*); オオバコ (例えは *Plantago lanceolata*); ヒカゲミズ (例えは *Parietaria officinalis* または *Parietaria judaica*); <sup>チヤ</sup>バネコギ (例えは *Blattella germanica*); ミツバチ (例えは *Apis multiflorum*); ヒノキ (例えは *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* および *Cupressus macrocarpa*); ハイネズ (例えは *Juniperus sabinooides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* および *Juniperus ashei*); コノテガシワ (例えは *Thuja orientalis*);

20

ヒノキ (例えは *Chamaecyparis obtusa*); ワモンコキブリ (例えは *Periplaneta americana*); カモジグサ (例えは *Agropyron repens*); ライムギ (例えは *Secale cereale*); パンコムギ (例えは *Triticum aestivum*); カモガヤ (例えは *Dactylis glomerata*); ウシノケグサ (例えは *Festuca elatior*); <sup>イチゴ</sup>ツチギ (例えは *Poa pratensis* または *Poa compressa*); カラスムギ (例えは *Avena sativa*); シラゲガヤ (例えは *Holcus lanatus*); ハルガヤ (例えは *Anthoxanthum odoratum*); オオカニツリ (例えは *Arrhenatherum elatius*); ヌカボ (例えは *Agrostis alba*); アワガエリ (例えは *Phleum pratense*); クサヨシ (例えは *Phalaris arundinacea*); スズメノヒエ (例えは *Paspalum notatum*); モロコシ (例えは *Sorghum halepensis*); および イヌムギ (例えは *Bromus inermis*).

に特異的なタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 1 2 6 】

上記抗原は、実質的に精製され得る。本明細書中で使用される用語「実質的に精製され（substantially purified）」は、抗原（すなわち、それが天然で結合している他のタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質が実質的にないポリペプチド）を称する。当業者は、タンパク質精製のための標準的な技術を使用して、ポリペプチド抗原を精製し得る。実質的に純粋なポリペプチドは、多くの場合、非還元のアクリルアミドゲル上に、単一の主要なバンドを生じる。部分的にグリコシル化されたポリペプチドの場合、またはいくつかの開始コドンをもつポリペプチドの場合、非還元のアクリルアミドゲル上に、いくつかのバンドが存在し得るが、それらのバンドは、そのポリペプチドに対する特有のパターンを形成する。そのポリペプチド抗原の精製はまた、アミノ末端のアミノ酸配列の分析によって決定され得る。他の型の抗原（例えば、多糖類、低分子、模倣物など）は、本発明内に含まれ、そしてその抗原は、必要に応じて実質的に純粋であり得る。

40

【 0 1 2 7 】

本発明の接合体は、抗微生物因子と共に、被験体に投与され得る。本明細書中で使用される場合、抗微生物因子は、天然に存在する化合物または合成化合物を称し、それらは、感染性の微生物を、殺傷することができるか、または抑制することができる。本発明に従った有用な抗微生物剤の型は、被験体が、感染されるか、または感染される危険のある微生物の型に依存する。抗微生物剤としては、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、および抗寄生虫剤が挙げられるが、これらに限定されない。「抗感染剤」、「抗菌剤」、「抗ウイ

50

ルス剤」、「抗真菌剤」、「抗寄生虫剤」および「駆虫薬」のような表現は、当業者に定着した意味を有し、そしてその表現は、標準的な医学の教科書に定義される。簡潔に言えば、抗菌薬は、細菌を殺傷または抑制し、そして抗生物質ならびに類似の機能を有するその他の合成または天然化合物を含む。抗生物質は、微生物のような細胞によって二次代謝物として産生される低分子量分子である。一般的に、抗生物質は、1つ以上の細菌の機能または構造を妨害し、それは、微生物に特異的であり、そして宿主細胞に存在しない。抗ウイルス薬は、天然供給源から単離され得るか、または合成され得、そしてウイルスを殺傷または抑制するために有用である。抗真菌剤は、表在性の真菌感染、ならびに日和見性および原発性の、全身性真菌感染を処置するために使用される。抗寄生虫剤は、寄生虫を殺傷または抑制する。

10

**【0128】**

抗寄生虫薬の例はまた、ヒト投与のための有用な駆虫薬と称され、抗寄生虫薬としては、アルベンダゾール、アムホテリシンB、ベンズニダゾールピチオノール、塩酸クロロキン、リン酸クロロキン、クリンダマイシン、デヒドロエメチン、ジエチルカルバマジン、ジロキサニドフロエート、エフロルニチン、フラゾリダオン (f u r a z o l i d a o n e)、糖質コルチコイド、ハロファントリン、ヨードキノール、アイバメクチン、メベンダゾール、メフロキン、メグルミンアンチモニエート、メラルソプロール、メトリホネート、メトロニダゾール、ニコロサミド、ニフルチモックス、オキサニドニキン、パロモマイシン、ペンタミジンイセチオネート、ピペラジン、ブラジカンテル、リン酸プリマキン、プログアニル、ピランテルパモエート、ピリメタミンスルホンアミド (p y r i m e t h a n m i n - s u l f o n a m i d e)、ピリメタミンスルファドキシニ、塩酸キナクリン、硫酸キニネ、グルコン酸キニジン、スピラマイシン、スチボグルコン酸ナトリウム (グルコン酸アンチモンナトリウム)、スラミン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、チアベンダゾール、チニダゾール、トリメトプリム - スルファメトキサゾール ( t r i m e t h r o p r i m - s u l f a m e t h o x a z o l e)、およびトリパルサミド (これらのいくつかは、単独で使用されるか、もしくは他と組み合わせて使用される) が挙げられるが、これらに限定されない。

20

**【0129】**

抗菌薬は、細菌を殺傷するか、または細菌の増殖または機能を抑制する。抗菌薬の大きな分類は抗生物質である。広い範囲の細菌を殺傷または抑制するために有効である抗生物質は、広域スペクトル抗生物質と称される。他の型の抗生物質は、グラム陽性またはグラム陰性の分類の細菌に対して優先的に有効である。これらの型の抗生物質は、狭域スペクトル抗生物質と称される。単一の生物または疾患に対して有効であり、そしてその他のタイプの細菌に対しては有効でないその他の抗生物質は、限定スペクトル抗生物質と称される。抗菌薬は、それらの主な作用の様式に基づいて分類されることもある。一般的に、抗菌薬は、細胞壁合成インヒビター、細胞膜インヒビター、タンパク質合成インヒビター、核酸合成インヒビターまたは機能的インヒビター、および競争的インヒビターである。

30

**【0130】**

抗ウイルス薬は、ウイルスによる細胞の感染、または細胞内のウイルスの複製を防ぐ化合物である。抗ウイルス性薬物は、抗菌剤よりはかなり少ない。なぜならば、ウイルス複製のプロセスは、宿主細胞内のDNA複製に密接に関係しており、非特異的な抗ウイルス剤は、多くの場合、宿主に毒性であるからである。抗ウイルス薬によって遮断され得るか、または阻害され得るウイルス感染のプロセス内のいくつかの段階が存在する。これらの段階としては、ウイルスの宿主細胞への付着 (免疫グロブリンまたは結合性ペプチド)、ウイルスの脱殻 (例えば、アマンタジン)、ウイルスmRNAの、合成または翻訳 (例えば、インターフェロン)、ウイルスRNAまたはウイルスDNAの複製 (例えば、ヌクレオシド類似物)、新しいウイルスタンパク質の成熟 (例えば、プロテアーゼインヒビター)、およびウイルスの出芽およびウイルスの放出が挙げられる。

40

**【0131】**

ヌクレオチド類似物は、ヌクレオチドに類似している合成化合物であるが、不完全また

50



は異常な、デオキシリボース基またはリボース基を有している。一旦、ヌクレオチド類似物が細胞内に存在すると、それらは、リン酸化され、ウイルスDNA中またはウイルスRNA中への取り込みに関して正常ヌクレオチドと競合する、トリホスフェート形態を生成する。一旦、ヌクレオチド類似物のトリホスフェート形態が、伸長する核酸鎖中に取り込まれると、それは、ウイルスポリメラーゼと不可逆的な結合を引き起こし、そしてそれ故、鎖終結(chain termination)を引き起こす。ヌクレオチド類似物としては、アシクロビル(単純ヘルペスウイルスおよび水痘帯状疱疹ウイルスの処置に用いられる)、ガンシクロビル(サイトメガロウイルスの処置に有用である)、イドクスウリジン、リバピリン(呼吸器合胞体ウイルスの処置に有用である)、ジデオキシイノシン、ジデオキシシチジン、ジドブジン(アジドチミジン)、イミキモッドおよびレスイミキモッド(resimipumod)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0132】

上記インターフェロンは、ウイルス感染細胞ならびに免疫細胞によって分泌されるサイトカインである。インターフェロンは、感染細胞に隣接する細胞上の特異的レセプターに結合することによって機能し、細胞においてそれをウイルス感染から保護する変化を引き起こす。 - インターフェロンおよび - インターフェロンはまた、感染細胞の表面上のクラスI MHC分子およびクラスII MHC分子の発現を誘導し、宿主免疫細胞認識のための増加した抗原提示を生じる。 - インターフェロンおよび - インターフェロンは、組換え形態として入手可能であり、そして慢性の、B型肝炎感染およびC型肝炎感染の処置のために使用されてきた。抗ウイルス治療のために有効な投薬量で、インターフェロンは、発熱、倦怠感および体重減少のような重篤な副作用を有している。

20

#### 【0133】

本発明で有用な抗ウイルス薬としては、免疫グロブリン類、アマンタジン、インターフェロン類、ヌクレオシド類似物、およびプロテアーゼインヒビター類が挙げられるが、これらに限定されない。抗ウイルス薬の特定の例としては、アセマンナン、アシクロビル、アシクロビルナトリウム、アデフォビル、アロブジン(Alovudine)、アルビルセプトストックス(Alvircept Sudotox)、塩酸アマンタジン、アラノチン(Aranotin)、アシルドン、アテビルジンメシレート(Ateciridine Mesylate)、アブリジン、シドフォビル、シパムフィリン(Cipamfylline)、塩酸シタラビン、デラビルジンメシレート、デスシクロビル(Desciclovir)、ジダノシン、ジソキサリル、エドクスジン、エンピラデン、エンピロキシム、ファミシクロビル(Famciclovir)、塩酸ファミチン(Famotidine Hydrochloride)、フィアシタビン、フィアルリジン、フォサリレート、フォスカーネットナトリウム、フォスフォネットナトリウム、ガンシクロビル、ガンシクロビルナトリウム、イドクスウリジン、ケトキサール(Kethoxal)、ラミブジン、ロブカビル、塩酸メモチン、メチサゾン、ネビラピン、ペンシクロビル、ピロダビル、リバピリン、塩酸リマンタジン、サキナビルメシレート、塩酸ソマンタジン、ソリブジン、スタトロン(Statolon)、スタブジン、塩酸チロロン、トリフルリジン、塩酸バラシクロビル、ビダラビン、リン酸ビダラビン、ビダラビンリン酸ナトリウム、ピロキシム(Viroxime)、ザルシタビン、ジドブジン、およびジンピロキシムが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0134】

抗真菌薬は、感染性真菌の、処置および予防に有用である。抗真菌薬は、それらの作用機構によって分類されることもある。いくつかの抗真菌薬は、グルコース合成を阻害することによって、細胞壁インヒビターとして機能する。これらとしては、バシウンギン(basungin)/ECBが挙げられるが、これに限定されない。他の抗真菌薬は、膜の統合性を不安定化させることによって機能する。これらとしては、クロトリマゾール、セルタコンゾール(sertaconazole)、フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ミコナゾール、およびボリコナコール(voriconazole)のようなイミダゾール類、ならびにFK 463、アンホテリシンB, BAY 38-950

50

2、MK 991、プラディマイシン、UK 292、ブテナフィン、およびテルピナフィンが挙げられるが、これらに限定されない。他の抗真菌薬は、キチンを分解することによって（例えば、キチナーゼ）、または免疫抑制によって（501クリーム）、機能する。

【0135】

親油性接合体は、アジュバントのような他の治療的因子と組み合わせられて、免疫応答を向上させ得る。その親油性接合体および他の治療的因子は、同時にまたは連続して投与され得る。他の治療的因子が、同時に投与される場合、それらは、同一の処方物、または別の処方物中で同時に投与され得る。上記他の治療的因子および上記親油性接合体の投与が、一時的に分離される場合、上記他の治療的因子は、連続して、および親油性接合体と連続して投与される。これらの化合物の投与の間の時間の隔たりは、数分か、またはそれより長いものであり得る。他の治療的因子としては、アジュバント、サイトカイン、抗体、抗原などが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0136】

本発明の組成物はまた、非核酸性アジュバントと共に投与され得る。非核酸性アジュバントは、本明細書中に記載される親油性接合体を除く、任意の分子または任意の化合物であり、その親油性接合体は、体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答を刺激し得る。非核酸性アジュバントとしては、例えば、デポ（depo）効果を引き起こすアジュバント、免疫刺激アジュバント、およびデポ効果を引き起こし、そして免疫系を刺激するアジュバントが挙げられる。

20

【0137】

上記親油性接合体はまた、粘膜アジュバントとして有用である。これまでに、全身性免疫および粘膜免疫の両方が、CpG核酸の粘膜送達によって誘導されることが見出されてきた。従って、そのオリゴヌクレオチドは、他の粘膜アジュバントとの組み合わせで投与され得る。

【0138】

免疫応答はまた、サイトカイン（BuelerおよびMulligan, 1996; Chowら, 1997; Geisslerら, 1997; Iwasakiら, 1997; Kimら, 1997）、またはB7のような共起刺激性分子（Iwasakiら; 1997; Tsujiら, 1997）と親油性接合体との同時投与または共直線性（co-linear）発現によって、誘導または増強され得る。用語サイトカインは、ナノモル濃度からピコモル濃度で体液性調節因子として作用し、そして正常な条件下または病理学的条件下のいずれかにおいて、個々の細胞および組織の機能的活性を調節する可溶性タンパク質および可溶性ペプチドの種々の群についての一般的な名称として使用される。これらのタンパク質はまた、直接的に細胞間の相互作用を媒介し、そして細胞外環境で行われるプロセスを調節する。サイトカインの例としては、IP-10、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、インターフェロン-（IFN-）、IFN-、腫瘍壊死因子（TNF）、TGF-、FLT-3リガンド、およびCD40リガンドが挙げられるが、これらに限定されない。サイトカインに加えて、そのCpGオリゴヌクレオチドは、特定のサイトカインに対する抗体（例えば、抗IL-10および抗TGF-、ならびにCoxインヒビター（すなわち、COX-1インヒビターおよびCOX-2インヒビター））との組み合わせで使用され得る。

30

40

【0139】

上記オリゴヌクレオチドはまた、細胞のToll様レセプター（TLR）を介して免疫応答を媒介するのに有用である。TLRは、一連のシグナル伝達パターン認識レセプターであり、それは、炎症反応および免疫の誘導において主要な役割を果たすことが知られる。異なるTLRは、直接的または間接的に、異なる微生物分子に結合する。例えば、TLR-2は、ペプチドグリカンおよびリポタンパク質を認識し、TLR-4は、リポ多糖類

50

およびリポテイコ酸を認識し、TLR-5は、細菌のフラゲリンを認識し、そしてTLR-9は、細菌DNAを認識する。TLRの刺激は、細胞核にシグナルを伝達し、細胞内調節分子（例えば、サイトカイン）の合成をコードする遺伝子の発現を誘導する。そのサイトカインは、順に、他の防御細胞上のサイトカインレセプターに結合する。これらのサイトカインは、生得的な免疫防御（例えば、炎症、発熱および食作用）を誘発し、そして侵入する微生物に対する即時的な反応を与える。TLRはまた、体液性免疫（抗体の産生）および細胞媒介性免疫（細胞障害性Tリンパ球およびさらなるサイトカインの産生）に必要とされる、種々の2次的シグナルを誘発することによって、養子免疫に参与する。本発明のオリゴヌクレオチドは、TLRの免疫応答を媒介するのに有用であり、そして本発明のオリゴヌクレオチドは、TLR依存様式における特定のサイトカインの産生を刺激し得る。

10

#### 【0140】

上記オリゴヌクレオチドはまた、免疫応答をTh2型免疫応答からTh1型免疫応答へ移行するために有用である。このことは、比較的バランスのとれたTh1/Th2環境の産生を生じる。Th2型免疫応答からTh1型免疫応答への免疫応答の移行は、その核酸に対する反応において産生されたサイトカインのレベルを測定することによって（例えば、IL-12、IFN- $\gamma$  およびGM-CSFを含む、単核細胞およびTh1サイトカインを産生する他の細胞を誘導することによって）評価され得る。Th2応答からTh1応答への免疫応答の、移行またはリバランス（rebalance）は、喘息の処置に、特に有用である。例えば、喘息を処置するのに有効な量は、喘息に関連するTh2型の免疫応答を、Th1型の免疫応答またはバランスのとれたTh1/Th2環境に移行するために有用な量であり得る。Th2サイトカイン、特にIL-4およびIL-5は、喘息の被検体の気道において上昇する。本明細書中に記載される親油性接合体は、免疫系のリバランスを補助するTh1サイトカインの増加を引き起こし、それは優勢なTh2型免疫応答に関連する悪影響を防ぐか、または減少する。

20

#### 【0141】

上記親油性接合体は、細胞の生存、細胞の分化、細胞の活性化および樹状細胞の成熟を促進する固有の能力を有し、そして樹状細胞を含む、インピトロ、インピボ、およびエキソピボにおける方法について有用である。

#### 【0142】

親油性接合体はまた、ナチュラルキラー細胞の細胞溶解活性および抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ADCC）を増強する。ADCCは、細胞標的（例えば、癌細胞）に対して特異的な抗体との組み合わせで、親油性接合体を使用して行われ得る。その親油性接合体が、その抗体との組み合わせで被検体に投与される場合、その被検体の免疫系は誘導され、その腫瘍細胞を殺傷する。そのADCCの手順に有用な抗体は、身体の中の細胞と相互作用する抗体を含む。細胞標的に対して特異的である多くのこのような抗体は、当該分野において記載されてきて、その多くは市販されている。

30

#### 【0143】

上記親油性接合体はまた、抗癌療法と組み合わせで投与され得る。抗癌療法としては、癌治療薬（cancer medication）、放射線および外科的手順が挙げられる。本明細書中で使用される場合、「癌治療薬」とは、癌を処置する目的で被験体に投与される薬剤を指す。本明細書中で使用される場合、「癌の処置」とは、癌の発症を防ぐこと、癌の症状を軽減させること、および/もしくは確立した癌の成長を阻害することを含む。他の局面において、その癌治療薬は、癌を発症する危険を有する被験体に、その癌を発症する危険を減少させる目的で投与される。癌の処置のための種々の型の医薬が、本明細書中に記載される。本明細書の目的のため、癌治療薬は、化学療法剤、免疫治療因子、癌ワクチン、ホルモン治療、および生物学的反応修飾因子として分類される。

40

#### 【0144】

さらに、本発明の方法は、上記親油性接合体とともに1種より多くの癌治療薬の使用を含むことが意図される。例として、適切な場合、その親油性接合体は、化学療法剤および

50

免疫治療因子の両方とともに投与され得る。あるいは、その癌治療薬は、癌を有するか、もしくは癌を発症する危険性のある被験体を処置する目的で1個体の被験体に全て投与される、免疫治療因子および癌ワクチン、または化学療法剤および癌ワクチン、または化学療法剤、免疫治療因子、および癌ワクチンを含み得る。

【0145】

上記化学療法剤は、例えば、メトトレキサート、ビンクリスチン、アドリアマイシン、シスプラチン、クロロエチルニトロソ尿素を含む非糖成分、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、ブレオマイシン、ドキシソルピシン、タキソール、ダカルバジン、フラジリン (fragyl line)、Meglamine GLA、バルルピシン (valrubicin)、カームスタイン (carmustaine) およびポリフェルポサン (polyferposan)、MMI270、BAY 12-9566、RASファメシル (famesyl) トランスフェラーゼインヒビター、ファメシルトランスフェラーゼインヒビター、MMP、MTA/LY231514、LY264618/ロメテキソール (Lometexol)、グラモレック (Glamolec)、CI-994、TNP-470、ハイカムチン/トポテカン、PKC412、バルスポダール/PSC833、ノバントロン/ミトキサントロン、メタレット (Metaret)/スラミン、バスマスタット (Batimastat)、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、インセル (Incel)/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN 698、TA 2516/マーミスタット (Marmistat)、BB2516/マーミスタット、CDP 845、D2163、PD183805、DX8951f、レモナル (Lemonal) DP 2202、FK 317、ピシバニール/OK-432、AD 32/バルルピシン、メタストロン (Metastron)/ストロンチウム誘導体、テモダール/テモゾロマイド、エバセツト (Evacet)/リポソーム化ドキシソルピシン、ユーロタキサン (Yewtaxan)/パクリタキセル、タキソール/パクリタキセル、キセロード (Xeload)/カペシタビン、フルツロン/ドキシフルリジン、シクロパックス (Cyclopaax)/経口パクリタキセル、経口タキソイド、SPU-077/シスプラチン、HMR 1275/フラボピリドール、CP-358 (774)/EGFR、CP-609 (754)/RAS癌遺伝子インヒビター、BMS-182751/経口白金錯体製剤、UFT (テガフルール/ウラシル)、エルガミゾール/レバミゾール、エニルウラシル/776C85/5FUエンハンサー、カンプト/レバミゾール、カンプトサル/イリノテカン、ツモデックス (Tumodex)/ラルイトレキセド (Ralitrexed)、リウスタチン/クラドリピン、パクセックス (Paxex)/パクリタキセル、ドキシル/リポソーム化ドキシソルピシン、シーリクス (Caelyx)/リポソーム化ドキシソルピシン、フルダラ/フルダラピン、ファーマルピシン (Pharmarubicin)/エピルピシン、DepoCyt、ZD1839、LU 79553/ビス-ナフタルイミド (Bis-Naphthalimide)、LU 103793/Dolastain、シーティクス (Caetyx)/リポソーム化ドキシソルピシン、ジェムザール/ゲムシタビン、ZD 0473/アノルメッド (Anormed)、YM 116、ヨウ素種 (Iodine seed)、CDK4インヒビターおよびCDK2インヒビター、PARPインヒビター、D4809/デキシフォスアミド (Dexifosamide)、イフェス (Ifes)/Mesnex/イフォスファミド (Ifosamide)、ピューモン/テニボシド、パラブラチン/カルボプラチン、プランチノール (Plantinol)/シスプラチン、ベプシド (Vepeside)/エトボシド、ZD 9331、タキソテール/ドセタキセル、グアニンアラビノシドのプロドラッグ、タキサン類似物、ニトロソ尿素、メルフェラン (melfelan) およびシクロフォスファミドのようなアルキル化剤、アミノグルテチミド、アスパラギナーゼ、プスルファン、カルボプラチン、クロロムブシル (Chlorombucil)、塩酸シタラビン、ダクチノマイシン、塩酸ダウノルピシン、リン酸エストラムスチンナトリウム、エトボシド (VP16-213)、フロクスウリジン、フルオロウラシル (5-FU)、フルタミド、ヒドロキシ尿素 (ヒドロキシカルバミド)

10

20

30

40

50

、イホスファミド、インターフェロン - 2 a、インターフェロン - 2 b、酢酸ロイプロリド (LHRH - 放出因子類似物)、ロムスチン (CCNU)、塩酸メクロレタミン (ナイトロジェンマスタード)、メルカプトプリン、メスナ、ミトタン (o.p' - DDD)、塩酸ミトキサントロン、オクトレオチド、プリカマイシン、塩酸プロカルバジン、ストレプトゾシン、クエン酸タモキシフェン、チオグアニン、チオテバ、硫酸ピンブラスチン、アムサクリン (m-AMSA)、アザシチジン、エリスロポエチン、ヘキサメチルメラミン (HMM)、インターロイキン 2、ミトグアゾン (メチル - GAG; メチルグリオキサールビス - グアニルヒドラゾン; MGBG)、ペントスタチン (2' デオキシコホルマイシン)、セムスチン (メチル - CCNU)、テニポシド (VM - 26)、または硫酸ピンデシンであり得るが、これらに限定されない。

10

## 【0146】

上記免疫治療因子は、例えば、リブタキシン (Ributaxin)、ハーセプチン、クアドラメット、パノレックス (Panorex)、IDEC - Y2B8、BEC2、C225、オンコリム (Oncolymp)、SMART M195、ATRAGEN、オバレックス (Ovarex)、ベキサール (Bexxar)、LDP - 03、ior t6、MDX - 210、MDX - 11、MDX - 22、OV103、3622W94、抗VEGF、ゼナパックス (Zenapax)、MDX - 220、MDX - 447、MELIMMUNE - 2、MELIMMUNE - 1、CEACIDE、プレターゲット、NovoMAb - G2、TNT、Gliomab - H、GNI - 250、EMD - 72000、LymphoCide、CMA 676、Monopharm - C、4B5、ior egf . r3、ior c5、BABS、抗FLK - 2、MDX - 260、ANA Ab、SMART 1D10 Ab、SMART ABL 364 Ab、またはImmuraIT - CE Aであり得るが、これらに限定されない。

20

## 【0147】

上記癌ワクチンは、例えば、EGF、抗イディオタイプの癌ワクチン、Gp75抗原、GMKメラノーマワクチン、MGVガングリオシド結合ワクチン、Her2/neu、オバレックス (Ovarex)、M - Vax、O - Vax、L - Vax、STn - KHLセラトープ (theratope)、BLP25 (MUC - 1)、リボソーム化したイディオタイプのワクチン、メラシン、ペプチド抗原のワクチン、毒素 / 抗原型ワクチン、MVAベースのワクチン、PACIS、BCGワクチン、TA - HPV、TA - CIN、DISC - ウイルス、またはImmucyst / Theracysであり得るが、これらに限定されない。

30

## 【0148】

免疫治療因子 (例えば、モノクローナル抗体) に組み合わせられた上記親油性接合体の使用は、ADCCの有意な増強を含む多くの機構 (上記で議論される)、ナチュラルキラー (NK) 細胞の活性化、およびIFN - レベルの増加を通じて、長期生存を延長し得る。モノクローナル抗体と組み合わせる場合、核酸は、生物学的結果を達成するのに必要とされる抗体の用量を減少させるように作用する。

## 【0149】

本発明はまた、抗原に非特異的な生得的免疫の活性化、および感染性の攻撃に対する広いスペクトルの抵抗性を誘導するための方法を包含し、それは、上記親油性接合体を使用する。本明細書中で使用される場合、用語「生得的免疫の活性化」は、記憶B細胞以外の免疫細胞の活性化を称し、そして例えばそれは、NK細胞、T細胞および / または抗原非依存的な様式で応答し得る他の免疫細胞の活性化を包含し得る。感染性の攻撃に対する広いスペクトルの抵抗性は、誘導される。なぜなら、その免疫細胞が活性型であり、そしてプライムされて、任意の侵入化合物および任意の侵入微生物に応答するので誘導される。その細胞は、特定の抗原に対して特異的にプライムされなくてもよい。このことは、生物兵器を用いた戦争、および上述のような他の状況 (例えば、旅行者) において、特に有用である。

40

## 【0150】

50

本発明の接合体は、他のオリゴヌクレオチドのように処方され得るか、または親油基に起因する変化物（例えば、表面のL基の、結合または埋め込みによる、マルチマーの処方物（例えば、リポソーム、ISCOM、または他の適切な疎水性ビーズもしくは処方物）と一緒に処方され得る。その接合体は、好ましいキャリア構造を有する複合体（例えば、ポリマー、ペプチド、タンパク質、または対象となる核酸）中に処方され得る。その接合体は、本明細書中に記載されるような親油性化合物を主に含むか、その親油性化合物がほとんどであるベシクル中に処方され得る。本発明はまた、処方試薬に対する親和性を増加するために、免疫刺激性オリゴヌクレオチドの親油性を増加するための方法を提供する。従って、本明細書中に記載されるオリゴヌクレオチドは、脂質組成物中に封入される場合、好ましい特性を有する。従来型のリポソームにおいて、多くの場合、高濃度の薬物を内包するのは困難である。免疫刺激性オリゴヌクレオチドを親油性にする誘導体化、およびリポソームへの取り込みによって、そのオリゴヌクレオチドは、長期の保存に、より適切になり得、それは、そのリポソームからの薬物の漏出が、より少なくなるからである。上記親油性リガンドはまたは、バイオアベイラビリティおよび特定の器官（例えば、肝臓）への好ましい生体内分布の改善を導き得、そしてまた、有毒性の副作用を減少し得る。作用の特定の機構に縛られることはない。このようなマルチマーの高分子から突き出している、ODNの遊離5'末端は、レセプターの架橋を導く方法で、TLR9レセプターと相互作用するために利用可能であり、それは、なおさらに増加されたIFN- $\gamma$ の産生を誘導し得る。

#### 【0151】

親油性接合体および/または抗原および/または他の治療剤は、単独で（例えば、生理食塩水中でまたは緩衝液中で）、あるいは当該分野で公知の任意の送達ビヒクルを使用して投与され得る。例えば、以下の送達ビヒクルが記載されている：コキレート（Cochleates）（Gould-Fogeriteら、1994、1996）；エマルソーム（Emulsomes）（Vancottら、1998、Lowellら、1997）；ISCOMs（Mowatら、1993、Carlssonら、1991、Huら、1998、Moreinら、1999）；リポソーム（Childersら、1999、Michalekら、1989、1992、de Haan 1995a、1995b）；生きた細菌ベクター（例えば、サルモネラ属、Escherichia coli、Bacillus calmatte-guerin、シゲラ属、ラクトバシラス属）（Honeら、1996、Pouwelsら、1998、Chatfieldら、1993、Stoverら、1991、Nugentら、1998）；生きたウイルスベクター（例えば、ワクシニア、アデノウイルス、単純ヘルペス）（Gallichanら、1993、1995、Mossら、1996、Nugentら、1998、Flexnerら、1988、Morrowら、1999）；ミクロスフェア（Guptaら、1998、Jonesら、1996、Maloyら、1994、Mooreら、1995、O'Haganら、1994、Eldridgeら、1989）；核酸ワクチン（Fynanら、1993、Kuklinら、1997、Sasakiら、1998、Okadaら、1997、Ishiiら、1997）；ポリマー（例えば、カルボキシメチルセルロース、キトサン）（Hamajimaら、1998、Jabbal-Gillら、1998）；ポリマー環（Wyattら、1998）；プロテオソーム（Vancottら、1998、Lowellら、1988、1996、1997）；フッ化ナトリウム（Hashiら、1998）；トランスジェニック植物（Tacketら、1998、Masonら、1998、Haqら、1995）；ピロソーム（Gluckら、1992、Mengiardira、1995、Cryzら、1998）；ウイルス様粒子（Jiangら、1999、Leiblerら、1998）。他の送達ビヒクルは、当該分野で公知であり、いくつかのさらなる例が、ベクターについての考察において以下に提供される。

#### 【0152】

用語、「親油性接合体の有効量」とは、望ましい生物学的効果を実現するのに必要なまたは十分な量を称する。例えば、粘液の免疫を誘導するための親油性接合体の有効量は、

抗原に曝露した際に、抗原に反応してIgAの発生を引き起こすのに必要な量であるのに対して、全身性免疫を誘導するために必要とされる量は、抗原に曝露した際に、抗原に反応してIgGの発生を引き起こすのに必要な量である。本明細書中に提供される教示と組み合わせ、種々の活性化化合物を選択し、そして因子（例えば、効力、相対的バイオアベイラビリティ、患者体重、有害な副作用の重篤度および投与の好ましい様式）を比較検討することによって、有効な予防処置レジメンまたは治療処置レジメン（実質的な毒性を引き起こさず、なお特定の被験体を処置するのに完全に有効である）が計画され得る。任意の特定の適用についての有効量は、処置される疾患または状態、投与される特定の親油性接合体、被験体の大きさ、または疾患もしくは状態の重篤度のような因子に依存して変動し得る。当業者は、過度な実験を必要とすることなく、特定の親油性接合体および/または抗原および/または他の治療剤の有効量を経験的に決定し得る。

10

#### 【0153】

粘膜送達または局所送達のために本明細書中に記載される化合物の被験体用量は、代表的に、投与当たり約10 $\mu$ g~1000mgの範囲であり、これは、毎日、毎週、または毎月およびそれらの間の任意の他の時間の量で与えられ得る適用または他に必要とされる場合に依存する。より代表的には、粘膜用量または局所用量は、投与当たり100 $\mu$ g~50mg、最も代表的には、約500 $\mu$ g~5mgの範囲であり、2~4回の投与が、日または週の間隔をあけてなされる。より代表的には、免疫刺激用量は、毎日または毎週の投与で投与当たり100 $\mu$ g~1000mg、最も代表的には、500 $\mu$ g~50mgの範囲である。親油性接合体が他の治療因子と組み合わせまたは特定の送達ビヒクル中で投与される場合、先天性免疫応答を誘導するため、またはADCCを増加させるため、または抗原特異的免疫応答を誘導するために、非経口の送達のための本明細書中に記載される化合物の用量は、代表的に、投与当たり約10 $\mu$ g~1000mgの範囲であり、これは、毎日、毎週、または毎月およびそれらの間の任意の他の時間の量で与えられ得る適用または他に必要とされる場合に依存する。より代表的には、これらの目的のための非経口用量は、投与当たり約100 $\mu$ g~50mg、最も代表的には、約1000 $\mu$ g~10mgの範囲であり、2~4回の投与が、日または週の間隔をおかれてなされる。しかし、ある実施形態において、これらの目的のための非経口用量は、上記の代表的な用量よりも5~10,000倍高い範囲で使用され得る。

20

#### 【0154】

本明細書中に記載される任意の化合物について、治療有効量は、動物モデルから最初に決定され得る。治療有効量はまた、ヒトにおいて試験されている他のCpGオリゴヌクレオチド（ヒト臨床試験が開始されている）について、および類似の薬理的活性を示すことが公知である化合物（例えば、他のアジュバント（例えば、LTおよびワクチン接種目的の他の抗原）についてのヒトデータから最初に決定され得る。より多い用量は、非経口投与のために必要とされ得る。適用される用量は、投与される化合物の相対的なバイオアベイラビリティおよび効力に基づいて調節され得る。上記の方法および当該分野において周知の他の方法に基づいて、最大の効力を達成するための用量を調節することは、十分に当業者の能力の範囲内である。

30

#### 【0155】

本発明の処方物は、薬学的に受容可能な溶液で投与され、これは、日常的には、薬学的に受容可能な濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適合性キャリア、アジュバント、および必要に応じて他の治療成分を含有し得る。

40

#### 【0156】

治療において使用するために、有効量の親油性接合体および/または他の治療剤が、化合物を所望の表面（例えば、局所粘膜、全身）に送達する任意の様式によって、被験体に投与され得る。本発明の薬学的組成物を投与することは、当業者に公知の任意の手段によって達成され得る。好ましい投与経路としては、経口、非経口、筋肉内、鼻内、舌下、期間内、吸入、眼、膈および直腸が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0157】

50

経口投与のために、上記化合物（すなわち、親油性接合体、抗原および/または他の治療剤）は、活性化化合物と当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアとを組み合わせることによって容易に処方され得る。このようなキャリアによって、本発明の化合物が、錠剤、丸剤、糖剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして、処置される被験体による経口摂取のために、処方され得る。経口使用のための薬学的調製物は、必要に応じて、得られた混合物を粉碎し、そして錠剤または糖剤コア（*dragee core*）を得るために、所望の場合、適切な補助剤を添加した後に、顆粒の混合物を処理して、固体賦形剤として得られ得る。適切な賦形剤は、特に、充填剤（例えば、糖（ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む）；セルロース調製物（例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム）、および/またはポリビニルピロリドン（PVP）である。所望の場合、崩壊剤（例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸またはその塩（例えば、アルギン酸ナトリウム））が添加され得る。必要に応じて、経口処方物はまた、内部酸条件を中和するために生理食塩水または緩衝液中に処方され得るか、あるいは、いかなるキャリアもなしで投与され得る。

【0158】

糖剤コアは、適切なコーティングを伴って提供される。この目的のために、濃縮糖溶液が使用され得、これは、必要に応じて、アラビアゴム、滑石、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含有し得る。色素または顔料は、活性化化合物用量の異なる組合せを同定または特徴付けするために、錠剤または糖剤コーティングに添加され得る。

【0159】

経口的に使用され得る薬学的調製物としては、ゼラチンから作製された押し込み型（*push-fit*）カプセル、ならびにゼラチンおよび可塑剤（例えば、グリセロールまたはソルビトール）から作製された軟質密封カプセルが挙げられる。押し込み型カプセルは、充填剤（例えば、ラクトース）、結合剤（例えば、デンプン）、および/または滑沢剤（例えば、滑石またはステアリン酸マグネシウム）および必要に応じて安定化剤と混合されて、活性成分を含み得る。軟質カプセルにおいて、活性化化合物は、適切な液体（例えば、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコール）中に溶解または懸濁され得る。さらに、安定化剤が添加され得る。経口投与のために処方されるミクロスフェアもまた使用され得る。このようなミクロスフェアは、当該分野において十分に規定されている。経口投与のための全ての処方物は、このような投与のために適切な投薬量であるべきである。

【0160】

口腔（*buccal*）投与のために、この組成物は、従来の様式で処方される錠剤または口ゼンジの形態を採り得る。

【0161】

上記化合物は、吸入によって肺の経路へ、特に気管支へ、そしてより特定の、肺の深部の肺胞中へ投与され得、投与には、標準的な吸入デバイスを使用する。その化合物は、適切な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切な気体）を使用して、加圧型のバックまたはネブライザーから、エアロゾルスプレー状の形態で送達され得る。加圧されたエアロゾルの場合、その投与単位は、測定した量を送達するためのバルブを提供することによって、決定され得る。吸入器具は、その化合物を被験体に送達するために使用され得る。本明細書中で使用する場合、吸入器具は、エアロゾル（例えば、その化合物の乾燥粉末形態）を投与するための任意のデバイスである。この型の装置は、当該分野において周知であり、そしてそれは、詳細に記載されてきた（例えば、*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 第19版、1

10

20

30

40

50



995, Mac Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1676-1692 ページに見出される記述)。多くの米国特許もまた吸入デバイスを記載する(例えば、米国特許第6,116,237号)。

【0162】

本明細書中で使用される場合、「粉末」は、細かく分散した固体粒子からなる組成物を称する。好ましくは、上記化合物は、比較的自由に流れ、そして吸入デバイス中に分散可能であり、次いで、被験体に吸入され、その化合物は、肺に到達して肺胞中に浸透される。「ドライパウダー」は、水分を含む成分を有する粉末組成物を称し、従って、その粒子は、吸入デバイス中に、容易に分散可能であり、エアロゾルを形成する。その水分含有量は概して、約10重量%以下の水であり、そしていくつかの実施形態において、約5重量%以下であり、そして好ましくは、約3重量%未満である。その粉末は、ポリマーと共に処方され得るか、または必要に応じて、他の物質(例えば、リボソーム、アルブミンおよび/または他のキャリア)と共に処方され得る。

10

【0163】

エアロゾルの投与量および送達システムは、当業者によって、例えば、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990)中のGonda, I. 「Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract,」およびAerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy, Morenら、編、Elsevier, Amsterdam, 1985中のMoren, 「Aerosol dosage forms and formulations,」に記載されるような、特定の治療適用のために選択される。

20

【0164】

化合物を全身的に送達することが望ましい場合、その化合物は、注射による(例えば、ボラス注射または連続注入による)、非経口的な投与のために処方され得る。注射のための処方物は、単位投与形態(例えば、アンプル中)または多回投与用の容器中で、添加された保存剤と共に存在し得る。上記組成物は、油性ビヒクルもしくは水性ビヒクル中の、懸濁物、溶液またはエマルジョンのような形態を取り得、そして上記組成物は、処方剤(例えば、懸濁剤、安定化剤、および/または分散剤)を含有し得る。

30

【0165】

非経口投与のための薬学的処方物は、水溶性形態での活性化合物の水溶液を含有する。さらに、活性化合物の懸濁物が、適切な油状注射懸濁物として、調製され得る。適切な親油性溶媒または親油性ビヒクルとしては、脂肪油(例えば、ゴマ油)、または合成脂肪酸エステル類(例えば、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリド類)、またはリボソームが挙げられる。水性注射懸濁物は、その懸濁物の粘性を増加する物質(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン)を含有し得る。必要に応じて、その懸濁物はまた、適切な安定化剤、または上記化合物の溶解度を増加して高濃縮溶液の調製を可能にする薬剤も含有し得る。

40

【0166】

あるいは、その活性化合物は、適切なビヒクル(例えば、発熱性物質を含まない滅菌水)を用いて使用前に構成するための粉末形態であり得る。

【0167】

上記化合物はまた、直腸に適用される組成物または膣に適用される組成物(例えば、坐剤または保持浣腸)の状態、例えば、従来の坐剤基剤(例えば、カカオ脂または他のグリセリド)を含んで、処方され得る。

【0168】

上記の処方物に加えて、上記化合物はまた、持続性(deposit)製剤として処方され得る。このような長期作用性処方物は、適切なポリマー物質もしくは疎水性物質(例えば

50

、受容可能な油中のエマルジョンとして)またはイオン交換樹脂を用いて、またはやや溶解しにくい誘導体(例えば、やや溶解しにくい塩)として、処方され得る。

【0169】

上記薬学的組成物はまた、適切な固体もしくはゲル相の、キャリアまたは賦形剤を含有し得る。このようなキャリアまたは賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖類、デンプン類、セルロース誘導体類、ゼラチン、およびポリマー類(例えば、ポリエチレングリコール)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0170】

適切な液体もしくは固体の薬学的調製物形態は、例えば、吸入用の水溶液もしくは生理食塩水溶液であるか、マイクロカプセル化されているか、渦巻き状(en-cochleated)になっているか、顕微的な金粒子上にコーティングされているか、リポソーム中に含まれるか、噴霧されるか、エアロゾルであるか、皮膚移植用のペレットであるか、または皮膚中に挿き入れるべき鋭利な物体上に乾燥されている。上記薬学的組成物はまた、顆粒、散剤、錠剤、コーティングされた錠剤、(マイクロ)カプセル、坐剤、シロップ、エマルジョン、顕濁物、クリーム、活性化合物を長期放出する液滴もしくは調製物を包含し、その調製賦形剤および添加剤および/または補助剤(例えば、崩壊剤、結合剤、コーティング剤、膨張剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、甘味剤または溶解剤)は、上記のように慣習的に使用される。上記薬学的組成物は、種々の薬物送達系において使用するために適切である。薬物送達のための方法の簡略な概説について、Langer, Science 249: 1527~1533, 1990(これは、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

【0171】

上記親油性接合体と、必要に応じて、他の治療剤および/または薬剤とが、それ自体で(そのまま)投与され得るか、または薬学的に受容可能な塩の形態で投与され得る。医薬において使用される場合、それらの塩は、薬学的に受容可能であるべきであるが、薬学的に受容可能でない塩が、その薬学的に受容可能な塩を調製するために好都合に使用され得る。そのような塩としては、以下の酸から調製した塩が挙げられるが、これらに限定されない:塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸。また、そのような塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩(例えば、カルボン酸基のナトリウム塩、カリウム塩、もしくはカルシウム塩)として、調製され得る。

【0172】

適切な緩衝剤としては、酢酸と塩(1~2%w/v);クエン酸と塩(1~3%w/v);ホウ酸と塩(0.5~2.5%w/v);およびリン酸と塩(0.8~2%w/v)が挙げられる。適切な保存剤としては、塩化ベンザルコニウム(0.003~0.03%w/v);クロロブタノール(0.3~0.9%w/v);パラベン(0.01~0.25%w/v)およびチメロサル(0.004~0.02%w/v)が挙げられる。

【0173】

本発明の薬学的組成物は、有効量の親油性接合体と、必要に応じて抗原および/または他の治療剤とを含有し、必要に応じてそれらを、薬学的に受容可能なキャリア中に含有する。用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、ヒトまたは他の脊椎動物に投与するために適切な、1種以上の適合性の固体もしくは液体の、充填剤、希釈剤、または封入された物質を意味する。用語「キャリア」とは、適用を容易にするために活性成分が混合される、有機成分または無機成分(天然でも、または合成でもよい)を意味する。上記薬学的組成物の成分はまた、所望の薬学的有効性を実質的に損なう相互作用が存在しない様式で、本発明の化合物と混合可能であり、そして互いに混合可能である。

【0174】

本発明は、以下の実施例によってさらに例証される。以下の実施例は、さらなる限定としては決して解釈されるべきではない。本出願全体を通して引用された参考文献(文献参

10

20

30

40

50

照物、発行された特許、公開された特許出願、および同時係属中の特許出願を含む)のすべての内容全体が、本明細書中に参考として明示的に援用される。

【実施例】

【0175】

(実施例1~5の材料および方法)

オリゴヌクレオチド。すべてのODNは、Coley Pharmaceutical Group (Langenfeld, Germany) から提供され、Limulus アッセイ (BioWhittaker, Verviers, Belgium) によって測定したエンドトキシンレベルは、検出不可能 ( $< 0.1 \text{ EU/ml}$ ) であった。ODNを、エンドトキシンを含まない、滅菌したTris-EDTA (Sigma, Deisenhofen, Germany) に懸濁し、そして保存し、そして無菌条件下で操作して微生物汚染およびエンドトキシン汚染の両方を防いだ。すべての希釈を、発熱物質を含まないリン酸緩衝化生理食塩水 (Life Technologies, Eggenstein, Germany) を使用して行った。

10

【0176】

TLR9アッセイ。HEK293細胞を、ヒトTLR9を発現するベクターおよび $6 \times 10^4$  NF- $\kappa$ B-ルシフェラーゼレポータープラスミドを用いて、エレクトロポレーションによってトランスフェクトした。安定なトランスフェクト産物 ( $3 \times 10^4$  細胞/ウェル) を、加湿したインキュベーターにおいて、 $37^\circ\text{C}$  で16時間、ODNとインキュベートした。各データ点は、3連で行った。細胞を溶解し、そしてルシフェラーゼ遺伝子活性についてアッセイした (Perkin-Elmer, Ueberlingen, Germany) のBritLiteキットを使用して)。刺激指数を、ODNを添加しない培地のレポーター遺伝子活性を参照して計算した。

20

【0177】

細胞純化。健常ヒト供与体由来の末梢血軟膜調製物を、Blood Bank of the University of Dusseldorf (Germany) から入手し、そしてFicoll-Hypaque (Sigma) に対する遠心分離によって、PBMCを精製した。細胞を、5% (v/v) 熱不活性化ヒトAB血清 (BioWhittaker)、または10% (v/v) の、加熱して不活性化したFCS、 $1.5 \text{ mM}$  L-グルタミン、 $100 \text{ U/ml}$  ペニシリン、 $100 \mu\text{g/ml}$  ストレプトマイシン (全てSigma由来) を補充したRPMI 1640培地中で、加湿したインキュベーターにおいて $37^\circ\text{C}$  にて培養した。

30

【0178】

サイトカイン検出。PBMCを $5 \times 10^6$  細胞/mlの濃度で再懸濁し、48ウェル平底プレート ( $1 \text{ ml/ウェル}$ ) または96ウェル円底プレート ( $200 \mu\text{l/ウェル}$ ) に添加し、このプレートにはその前に、何も添加していないか、または異なる濃度のODNを添加しておいた。培養上清 (SN) を、指定した時点の後に収集した。すぐに使用しない場合、上清を、必要になるまで $-20^\circ\text{C}$  で凍結した。上清中のサイトカインの量を、市販のELISAキット (IL-6, IL-10; Diaclone, Besancon, France から入手) または市販の抗体 (複数のIFN- $\gamma$  種の検出のためにPBL, New Brunswick, NJ, USA から入手) を使用して開発した組織内のELISAを使用して評価した。

40

【0179】

(実施例6~9の材料および方法)

CpG ODN。使用したCpG ODNの配列はTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTGTT (配列番号116) およびT-C-G-A-C-G-T-C-G-A-コレステロール (配列番号13) であった。配列番号116のGpC類似物を、非CpGコントロールとして使用した。全てのODNは、Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA) によって供給された。全てのODNを、エンドトキシンを含まない滅菌したTE (pH 8.0) (OmniPer (登録商標))

50

; E M Science, Gibbstown, NJ) 中に再懸濁し、そして保存し、そして無菌条件下で操作して微生物汚染およびエンドトキシン汚染の両方を防いだ。アッセイのためのODNの希釈を、エンドトキシンを含まない滅菌したPBS (pH 7.2) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)で行った。  
【0180】

動物。雌性BALB/cマウス(Charles River Canada; Montreal, Quebec, Canadaから購入した)、TLR9ノックアウトまたはそれらの野生型対照体(Osaka University, JapanのDr. S. Akiraより入手し、the Coley Canada Animal Care Facilityで飼育した)(6~8週齢)を、実験のために使用した。全ての動物を、the Coley Canada Animal Care Facilityにおいて、微小アイソレーター(micro-isolator)中に収容し、そして実験を、the Animal Care Committeeの承認された状態で、the Canadian Council on Animal Careの指針の下で行った。  
【0181】

インビトロアッセイ。未処置のBALB/c脾細胞(1mlあたり $5 \times 10^6$ 細胞)を、 $0.3 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $3 \mu\text{g/ml}$ 、もしくは $10 \mu\text{g/ml}$ の、配列番号116のCpG、配列番号13のCpGまたは非CpGコントロールのいずれかによって刺激した。コンカナバリンA( $10 \mu\text{g/ml}$ , Sigma Chemical Company)をポジティブコントロールとして使用し、そして培地のみで培養した細胞をネガティブコントロールとして使用した。培養上清を、6時間(TNF- について)にて、または24時間(IL-6およびIL-12について)にて収集し、そして市販のELISAキット(マウスOptEIAキット; Pharmingen, Mississauga, ON)を使用してサイトカインについて試験した。

【0182】

インビボアッセイ。雌性BALB/cマウス( $n = 3$ または $5$ /群)に $500 \mu\text{g}$ のODN、または $500 \mu\text{l}$ のPBS(ネガティブコントロール)を、皮下または静脈内のいずれかで注射し、そしてODN投与後、3時間または8時間で採血した。血漿を、ELISAによって、IP-10、IL-6またはIL-12について試験した。

【0183】

(実施例1: 親油性接合体は、向上したIFN- 産生を実証する)

ヒトPBMCを、配列番号36(CpG Bクラス)、配列番号39(CpG Cクラス)、非CpGコントロール、配列番号40(CpG Aクラス)、非CpGコントロールAクラス、または配列番号4(親油性接合体を有するCpG ODN)の濃度を増加して、48時間インキュベートした。上清を回収して、ELISAによってIFN- を測定した。3つの血液供与体の平均 $\pm$ 標準誤差を示す。結果を、図1に示す。親油性接合体を有するCpG ODN、CpG Cクラスオリゴヌクレオチド、およびCpG Aクラスオリゴヌクレオチドの全てが、IFN- 産生を誘導した。 $0.5 \mu\text{g/ml}$ および $2 \mu\text{g/ml}$ の濃度の、親油性接合体を有するCpG ODNを測定し、約 $1000 \text{pg/ml}$ および約 $3250 \text{pg/ml}$ のIFN- 産生を、それぞれ誘導した。CpG Bクラスオリゴヌクレオチド、非CpGコントロールオリゴヌクレオチド、および非CpGコントロールAクラスオリゴヌクレオチドは、測定可能なIFN- 応答を全く誘導しなかった。

【0184】

(実施例2: 親油基接合体は、IL-6産生における有効性を実証する)

ヒトPBMCを、配列番号36(CpG Bクラス)、配列番号39(CpG Cクラス)、非CpGコントロール、配列番号40(CpG Aクラス)、非CpGコントロールAクラス、または配列番号4(親油性接合体を有するCpG ODN)の濃度を増加して、24時間インキュベートした。上清を回収して、ELISAによってIL-6を測定した。3つの血液供与体の平均 $\pm$ 標準誤差を示す。結果を、図2に示す。このアッセイに

において、 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度の、親油性接合体を有するCpG ODNは、使用した他のODNと比較して、測定された最も高いIL-6の誘導（約 $750 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）を示した。より低い濃度（ $0.031$ 、 $0.125$ および $0.5$ ）において、親油性接合体を有するCpG ODNは、減少した有効性でIL-6を誘導した。CpG BクラスODN、CpG CクラスODN、および特定の伸長したCpG AクラスODNは全て、IL-6誘導における有効性を実証した。非CpGコントロールおよび非CpGコントロールAクラスオリゴヌクレオチドは、IL-6の誘導を示さないか、またはIL-6の誘導についての低い能力を示した。

【0185】

（実施例3：親油性接合体は、IL-10産生において減少した有効性を実証する）

ヒトPBMCを、配列番号36（CpG Bクラス）、配列番号39（CpG Cクラス）、非CpGコントロール、配列番号40（CpG Aクラス）、非CpGコントロールAクラス、または配列番号4（親油性接合体を有するCpG ODN）の濃度を増加して、24時間インキュベートした。上清を回収して、ELISAによってIL-6を測定した。3つの血液供与体の平均±標準誤差を示す。結果を、図3に示す。親油性接合体を有するCpG ODNは、IL-10産生に対する刺激において、顕著に減少した有効性を示した。使用した最も高い濃度である $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ においてさえ、親油性接合体を有するCpG ODNは、IL-10刺激を顕著に誘導しなかった。同様の結果が、AクラスODNで得られたが、対照的に、BクラスODNおよびCクラスODNは、IL-10産生の誘導について、高い能力を示した。非CpGコントロールおよび非CpGコントロールAクラスオリゴヌクレオチドは、IL-10の誘導を示さないか、またはIL-10の誘導についての低い能力を示した。

【0186】

（実施例4：親油性接合体は、TLR9依存性NF Bシグナル伝達を誘導する）

ヒトTLR9を発現するHEK293細胞を、示されたODN濃度でインキュベートした。NF B刺激を、ルシフェラーゼ活性を通じて測定した。刺激指数を、CpG ODNを添加しない培地のルシフェラーゼ活性を参照して計算した（ルシフェラーゼ活性の誘導倍数）。結果を、図4に示す。 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の使用した最も高い用量における、親油性接合体を有するCpG ODNは、約20の刺激指数を誘導した。相対的に、BクラスODNは、ずっと低い濃度である $0.625 \mu\text{g} / \text{ml}$ において、20の刺激指数を誘導した。AクラスODNは、最も低いNF B刺激を示し、そして測定された最も高い刺激指数は、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ のODN濃度に対して5であった。

【0187】

（実施例5：IFN- $\gamma$ 産生に対する接合体の配列および親油基の効果）

3つの供与体のヒトPBMCを、示したODNと一緒に48時間インキュベートした。上清を回収して、ELISAによってIFN- $\gamma$ を測定した。それぞれのODNの活性化のレベルを、-：無し；+：低い；+/++：中間；+++ /++++：強いによって示し、ならびにそれぞれのODNによって誘導された最大のIFN- $\gamma$ の量を示す。結果を、表2に示す。

【0188】

【表2-1】

表2

ODN #	配列および修飾	IFN- $\alpha$ 分泌	
配列番号 36	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T *T*G*T*C*G*T*T	+	65/400
配列番号 40	G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G *G*G*G*G*G	++++	3134
配列番号 3	T*C_G_A_C_G_T_C_G*T-Chol	+	1126

10

20

30

40

50

【 0 1 8 9 】

【 表 2 - 2 】

配列番号 4	T_C_G_A_C_G_T_C_G_T_Chol	+++	2134
配列番号 5	Chol-T_C_G_A_C_G_T_C_G_T-Chol	+	456
配列番号 6	Chol_T_C_G_A_C_G_T_C_G_T_teg	-	7
配列番号 36	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T *T*G*T*C*G*T*T	+	58
配列番号 39	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C* G*C*G*C*C*G	+++	3198
配列番号 40	G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G *G*G*G*G*G	++++	5018
配列番号 4	T_C_G_A_C_G_T_C_G_T_Chol	+++	3439
配列番号 7	T_C_G_T_C_G_A_C_G_T_G_Chol	+++	3395
配列番号 8	T_C_G_A_C_G_T_C_G_T_T_Chol	+++	3383
配列番号 9	G_T_C_G_A_C_G_T_C_G_T_Chol	+++	3408
配列番号 10	G_T_C_G_A_C_G_T_C_G_T_T_Chol	+++	3511
配列番号 11	T_C_G_T_C_G_A_C_G_T_T_Chol	+++	3468
配列番号 19	T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_C_G_T_C_G_T Chol	++	3351
配列番号 25	T*C*G*T_C_G_A_C_G_T_C_G_T_Chol	+	374
配列番号 26	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T_C_G_A_C_G_T C_G_T_Chol	-	23
配列番号 27	T_C_G_G_C_G_G_C_C_G_C_C_G_Chol	+++	3233
配列番号 28	T*C*G*T_C_G_G_C_G_G_C_C_G_C_C_G T_Chol	+	208
配列番号 29	U_C_G_A_C_G_T_C_G_U-Chol	+++	2190
配列番号 30	T_C_I_A_C_I_T_C_I_T-Chol	-	9
配列番号 31	T_C_7_A_C_7_T_C_7_T-Chol	+++	2259
配列番号 36	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T *T*G*T*C*G*T*T	+	477
配列番号 39	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C* G*C*G*C*C*G	+++	2329
配列番号 40	G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G *G*G*G*G*G	++++	3667
配列番号 12	A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_Chol	+/-	71
配列番号 13	T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	++++	2894

10

20

30

40

【 0 1 9 0 】

【表 2 - 3】

配列番号 14	G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_T_Chol	++	3490
配列番号 15	T*C*G*A*C*G*T*C*G*T_Chol	-	7
配列番号 16	T*C_G_A_C_G_T_C_G_T_Chol	+	2717
配列番号 17	T_C_G_A_C_G_T_C_G*T_Chol	+++	3600
配列番号 18	T_C_G_A_C_G_T_C_G_T_teg	-	21
配列番号 19	T_C_G_T_C_G_T_C_G_T_Chol	-	21
配列番号 20	T_G_C_A_G_C_T_G_C_T-Chol	-	14
配列番号 21	..C_G_A_C_G_T_C_G.._Chol	-	8
配列番号 22	T_A_A_C_G_T_T_T_Chol	-	24
配列番号 23	T_G_A_C_G_T_T_T_Chol	-	18
配列番号 32	T_C_A_T_C_G_A_T_G_A_Chol	+	650
配列番号 33	...G_A_C_G_A_T_C_G_T_C_Chol	+	877
配列番号 34	T_C_A_C_C_G_G_T_G_A_Chol	-	7
配列番号 35	G_A_C_G_T_T_A_A_C_G_T_C_Chol	-	0
配列番号 105	T_C_A_A_C_G_T_T_G_A-Chol	+	418
配列番号 36	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T *T*G*T*C*G*T*T	+	315
配列番号 39	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C* G*C*G*C*C*G	+++	3053
配列番号 40	G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G *G*G*G*G*G	++++	4503
配列番号 4	T_C_G_A_C_G_T_C_G_T_Chol	+++	
配列番号 13	T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	++++	3610
配列番号 41	T_C_G_A_Chol	-	73
配列番号 42	T_C_G_C_G_A_Chol	-	23
配列番号 43	T_C_G_C_G_C_G_A_Chol	-	44
配列番号 48	T_C_G_T_A_C_G_A_Chol	++(+)	2531
配列番号 44	T_C_G_C_C_G_G_C_G_A_Chol	++	2060
配列番号 45	T_C_G_G_C_G_C_C_G_A_Chol	+++	3654
配列番号 46	T_C_G_C_G_C_G_C_G_A_Chol	+++	3573
配列番号 47	T_C_G_T_C_G_A_C_G_A_Chol	-	40
配列番号 49	T_C_G_A_A_T_T_C_G_A_Chol	++	2788
配列番号 50	T_C_G_T_T_A_A_C_G_A_Chol	++++	4161

10

20

30

40

【 0 1 9 1 】

【表 2 - 4】

配列番号 51	T_C_G_A_A_C_G_T_T_C_G_A_Chol	++(+)	2954
配列番号 52	T_C_G_T_T_C_G_A_A_C_G_A_Chol	++++	4033
配列番号 53	T_C_G_A_C_G_A_T_C_G_T_C_G_A_Chol	+(+)	3187
配列番号 56	T_C_G_G_C_G_G_C_C_G_C_C_G_A_Chol	+	1385
配列番号 54	T_C_G_G_A_C_G_A_T_C_G_T_C_C_G_A_Chol	++(+)	3391
配列番号 36	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T *T*G*T*C*G*T*T	+	776
配列番号 39	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C* G*C*G*C*C*G	+++	3201
配列番号 40	G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G *G*G*G*G*G	++++	3706
配列番号 13	T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	++++	3485
配列番号 59	T_C_G_A_C_G_T_C*G*A_Chol	+++ (+)	2744
配列番号 60	T_C_G_A_C_G_T*C*G*A_Chol	+++ (+)	3297
配列番号 61	G_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	-	304
配列番号 62	C_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	-	562
配列番号 63	I_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	-	226
配列番号 64	U_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	+(+)	1578
配列番号 65	Z_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	-	272
配列番号 66	T_T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	+++ (+)	2619
配列番号 67	T_T_T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	++	1800
配列番号 68	T_C_G_T_C_G_A_C_G_T_C_G_A_Chol	+++	2593
配列番号 69	T_C_G_A_A_T_A_T_A_T_A_T_T_A_C_G_A_chol	-	43
配列番号 70	T_C_G_A_A_T_A_T_A_T_A_T_T_A_chol	-	96
配列番号 71	T_C_A_T_C_G_A_T_G_A_Chol	-	293
配列番号 106	T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T_c hol	-	108
配列番号 107	T_C_G_T_C_G_T_T_T_C_G_T_C_G_T_T_c hol	-	48
配列番号 36	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T *T*G*T*C*G*T*T	+	177
配列番号 39	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C* G*C*G*C*C*G	+++	1881

10

20

30

40

【 0 1 9 2 】



【表 2 - 5】

配列番号 40	G*G*G G A C G A C G T C G T G G *G*G*G*G*G	++++	2309
配列番号 13	T C G A C G T C G A Chol	+++	2562
配列番号 108	T C G T C G T C G A Chol	-	35
配列番号 109	T C G A C G A C G A Chol	+	635
配列番号 108 + 配列番号 109		+++	2340

少なくとも1つのCpGモチーフを有する、パリンδροーム配列または部分的にパリンδροームな配列が必要とされたが、高いIFN-誘導には十分ではなかった。パリンδροームCGGCGGCCCGCCG(配列番号114)および5'末端におけるさらなるTを有する配列番号27は、IFN-の強力な誘導を生じた。5'末端へのG残基の付加または3'末端へのT残基の付加(例えば、配列番号9、配列番号10、および配列番号8にある)は同様の生物学的活性を生じた。しかし、そのパリンδροームの顕著な伸長(配列番号19)は、IFN-誘導の僅かな減少を生じた。これらの結果は、この長さのオリゴヌクレオチドを有すること、そしてODNの配列を設計することは、少なくとも部分的にパリンδροームでなければならず、そして5'末端または5'末端近傍における、TCG(例えば、配列番号4、配列番号13)モチーフ、GTCG(配列番号9)モチーフ、GACG(配列番号14)モチーフ、またはUCG(配列番号29にあるような)モチーフは、高いIFN-誘導を得るのに、特に有利であることを示唆する。

## 【0193】

3'-コレステロール修飾した配列番号4は、IFN-の高い分泌を示すが、低いIL-10分泌の誘導(AクラスCpGオリゴヌクレオチドの特有の特性)を示す。

## 【0194】

(実施例6:インビトロマウス脾細胞刺激)

BALB/cマウス脾細胞を、示された濃度の配列番号13またはコントロールの配列番号117と一緒に24時間(図5a~b)、または6時間(図5c)インキュベートした。SNを回収し、そしてサイトカインをELISAによって測定した。図5aに示すように、親油性接合体を有するCpG ODNは、用量依存的様式で、IL-6産生を誘導した。試験した最も高いODN濃度(10µg/ml)において測定されたIL-6応答は、約900pg/mlであった。コントロールの非CpG ODNは、全くIL-6誘導を刺激しなかった。図5bは親油性接合体を有するCpG ODNによるIL-12の誘導を示す。その親油性接合体を有するCpG ODNは、用量依存的様式で、IL-12産生を誘導し、使用した最も高いODN濃度(10µg/ml)において測定されたIL-12応答は、約3750pg/mlであった。対照的に、コントロールの非CpG ODNは、任意のIL-12産生を刺激しなかった。図5cは、コントロールの非CpG ODNと比較して、親油性接合体を有するCpG ODNは、約140pg/mlのTNF-を誘導したが、対照的に、コントロールの非CpG ODNは、任意のTNF-産生をほとんど誘導しなかった。

## 【0195】

(実施例7:インビトロTLR9+/+脾細胞刺激およびインビトロTLR9-/-脾細胞刺激)

TLR9+/+マウス由来のBALB/c脾細胞(図6a)またはTLR9-/-マウス由来のBALB/c脾細胞(図6b)を、示した濃度の配列番号13、またはコントロールの配列番号117と一緒に24時間インキュベートした。SNを回収し、そしてIL-12p40をELISAによって測定した。図6aは、親油性接合体を有するCpG ODNが、IL-12用量反応を誘導し、それは、TLR依存性であったことを示す。使用した。親油性接合体を有する最も高いCpG ODNの濃度(10µg/ml)は、1

10

20

30

40

50

200 pg/mlのIL-12濃度を誘導した。対照的に、コントロールの非CpG ODNは、使用したいずれの濃度においても、任意のIL-12産生をほとんど誘導しなかった。図6bは、親油性接合体を有するCpG ODNおよびコントロールの非CpG ODNの両方が、10 μg/mlの濃度においてでさえ、TLR欠乏性細胞中で任意のIL-12産生をほとんど誘導しなかったことを示す。

【0196】

(実施例8：インビボでの時間依存的な血漿IP-10刺激)

Balb/cマウス(n=5)に、500 μgの配列番号13を皮下注射し、そしてそのマウスをODN投与の、1時間後、2時間後、3時間後、6時間後、8時間後、12時間後、および24時間後に採血した。血漿を、ELISAによって、IP-10について試験した(図7)。図7に示すように、親油性接合体を有するCpG ODNは、時間依存的様式でIP-10の産生を刺激した。注射後の最初の3時間の間は、検出可能なIP-10誘導はなかった。注射後6時間において、IP-10濃度を、500 pg/mlまで増加した。注射後8時間において、IP-10刺激は、約2000 pg/mlで頂点に達した。注射後12時間において、IP-10濃度は、約500 pg/mlまで減少し、注射後6時間において測定された刺激と等しくなった。注射後24時間において、検出可能なIP-10産生の刺激はなかった。コントロールのPBS処置は、試験したいずれの時点においてもIP-10産生の誘導を示さなかった。

【0197】

(実施例9：インビボの、血漿サイトカイン刺激および血漿ケモカイン刺激)

Balb/cマウス(n=3)に、500 μgの配列番号13、または500 μlのPBS(ネガティブコントロール)を静脈内注射し、そしてODN投与の、3時間後および8時間後に採血した。血漿は、ELISAによって、サイトカインまたはケモカインについて試験した(図8)。塗りつぶした棒=3時間;斜線の棒=8時間である。図8aは、親油性接合体を有するCpG ODNが、IP-10の産生を時間依存的様式で刺激し、それぞれ、3時間および8時間において、約9000 pg/mlおよび4000 pg/mlの、IP-10が刺激されたことを示す。対照的に、コントロールの非CpG ODN(配列番号117)は、同じ時点において、任意のIP-10産生を刺激しなかった。図8bは、親油性接合体を有するCpG ODNによるIL-12産生の刺激が、3時間(約20,000 pg/mlのIL-12を産生した)では、8時間(約25,000 pg/mlのIL-12を産生した)より、より低かったことを示す。コントロールの非CpG ODNは、試験したいずれの時点においても、任意のIL-12産生を誘導しなかった。図8cは、親油性接合体を有するCpG ODNが、時間依存的様式でIL-6の産生を刺激したことを示す。注射後3時間において、IL-6産生は、250 pg/ml~500 pg/mlの範囲であったが、注射後8時間においては、そのIL-6産生は、約400 pg/mlであった。コントロールの非CpG ODNは、PBSコントロールと比較して、IL-6産生の有意な誘導を示さなかった。

【0198】

上に記載される明細書は、当業者が本発明を実施することを可能にするために十分であると考えられる。本明細書中に示されかつ記載されるものに加えて、本発明の種々の改変は、上の記載から当業者にとって明らかになり、そして添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれる。本発明の利点および目的は、必ずしも本発明の各実施形態に含まれない。

【図面の簡単な説明】

【0199】

【図1】図1は、免疫刺激性核酸に対する親油基の結合の効果を、IFN- の誘導によって示すグラフである。

【図2】図2は、免疫刺激性核酸に対する親油基の結合の効果を、IL-6の誘導によって示す棒グラフである。

【図3】図3は、免疫刺激性核酸に対する親油基の結合の効果を、IL-10の誘導によって示す棒グラフである。

10

20

30

40

50

【図4】図4は、免疫刺激性核酸に接合した親油基が、TLR9依存性NF- $\kappa$ Bシグナル伝達の誘導を向上させることを実証する棒グラフである。

【図5】図5は、免疫刺激性核酸に対する親油基の結合のインビトロマウス脾細胞刺激効果を、IL-6、IL-12およびTNF- $\alpha$ の誘導によって示す棒グラフである。

【図6】図6は、免疫刺激性核酸に対する親油基の結合の、インビトロTLR9<sup>+/+</sup>マウス脾細胞刺激効果およびインビトロTLR9<sup>-/-</sup>マウス脾細胞刺激効果を、IL-12の誘導によって示す棒グラフである。

【図7】図7は、免疫刺激性核酸に対する親油基の結合の、インビボ時間依存的効果を、IP-10の誘導によって示す棒グラフである。

【図8】図8は、免疫刺激性核酸に対する親油基の結合の、インビボ刺激効果を、IP-10、IL-12およびIL-6の誘導によって示す棒グラフである。

【図1】

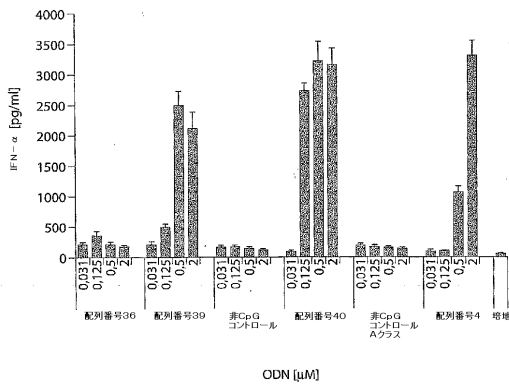


Fig. 1

【図3】

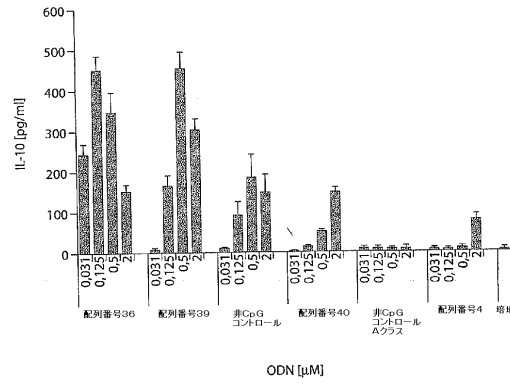


Fig. 3

【図2】

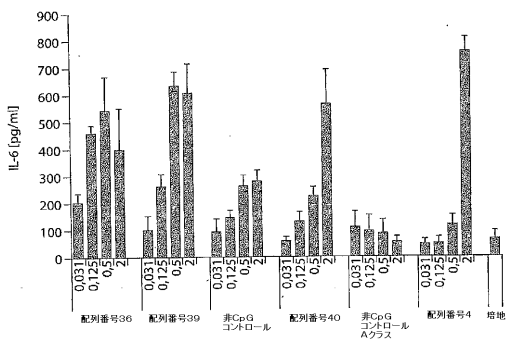


Fig. 2

【図4】

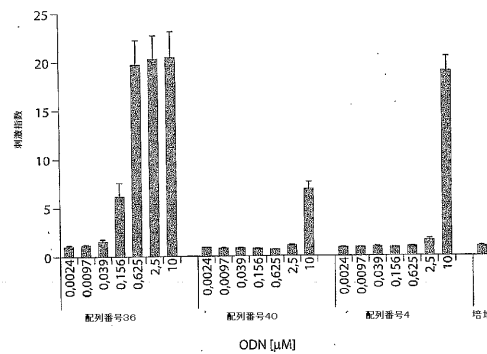


Fig. 4

【 図 5 】

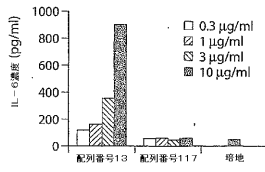


Fig. 5A

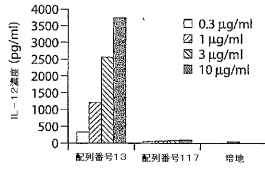


Fig. 5B

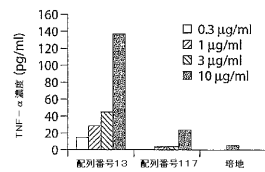


Fig. 5C

【 図 7 】

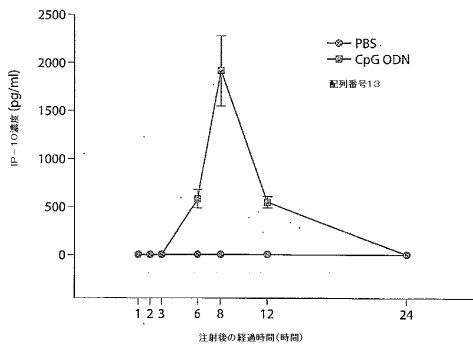


Fig. 7

【 図 6 】

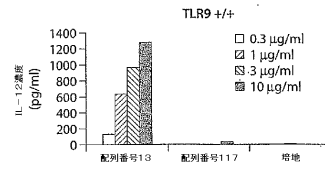


Fig. 6A

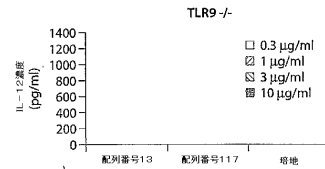


Fig. 6B

【 図 8 】

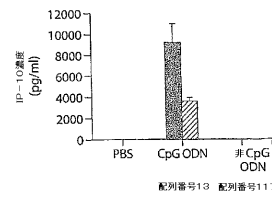


Fig. 8A

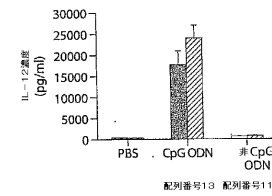


Fig. 8B

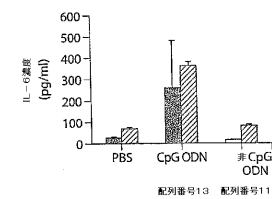


Fig. 8C

【配列表】

0004989225000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 フォルマー, イェルク

ドイツ国 4 0 5 9 1 デュッセルドルフ, コールラウシェヴェーグ 2 4

(72)発明者 クレイグ, アーサー エム.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 8 1, ウェルスリー, ウィンディング リバー  
ロード 1 7 3

(72)発明者 ウールマン, オイゲン

ドイツ国 6 1 4 7 9 グラスヒュッテン, ツーム タールビック 3 1

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 6 2 9 2 3 (WO, A 1)

DALPKE,A.H. et al, Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo, Immunology, 2 0 0 2 年, Vol.106, No.1, p.102-12

MACKELLAR,C. et al, Synthesis and physical properties of anti-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups, Nucleic Acids Res, 1 9 9 2 年, Vol.20, No.13, p.3411-7

POLANCZYK, M, immunostimulatory effects of DNA and CpG motifs, Central European Journal of Immunology, 2 0 0 0 年, Vol.25, No.3, p.160-166

HARTMANN,G. et al, CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells, Proc Natl Acad Sci U S A, 1 9 9 9 年, Vol.96, No.16, p.9305-10

KRIEG A M, NATURE, 英国, 1 9 9 5 年 4 月 6 日, V374, P546-549

BOUJRAD,N. et al, Inhibition of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured Leydig tumor cells by a cholesterol-linked phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to diazepam-binding inhibitor, Proc Natl Acad Sci U S A, 1 9 9 3 年, Vol.90, No.12, p.5728-31

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A61K 31/00-33/44

A61K 48/00

A61K 47/00-47/48

A61K 9/00- 9/72