

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-515277

(P2006-515277A)

(43) 公表日 平成18年5月25日(2006.5.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	2 G 0 4 5
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66 G	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-547932 (P2004-547932)
 (86) (22) 出願日 平成15年10月29日 (2003.10.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年6月28日 (2005.6.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2003/005520
 (87) 国際公開番号 W02004/039829
 (87) 国際公開日 平成16年5月13日 (2004.5.13)
 (31) 優先権主張番号 60/421,987
 (32) 優先日 平成14年10月29日 (2002.10.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

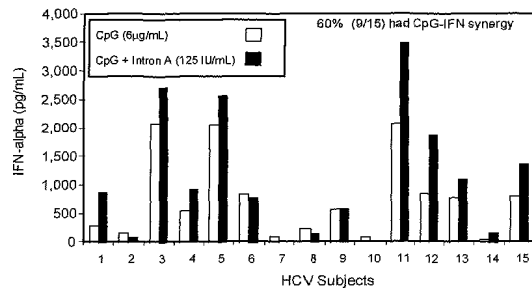
(71) 出願人 505161932
 コーリー ファーマシューティカル グループ, リミテッド
 カナダ国 ケー2ケー 3エー2 オンタリオ, カナタ (オタワ), テリー フォックス ドライブ 340, スイート 200
 (71) 出願人 502102051
 コーリー ファーマシューティカル ゲーエムベーハー
 ドイツ国 デー-40764 ランゲンフェルト, エリザベス-ゼルベルト-シュトラッセ 9
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルス感染の処置および予防に関する方法および製品

(57) 【要約】

本発明は、C型肝炎ウイルスに慢性的に感染した対象の確認同定および処置のための方法を提供する。いくつかの場合、対象は、非CpG治療に無反応なものである。好ましくは、対象を、セミソフトな骨格を有するCクラスCpG免疫刺激性核酸により処置する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以前の非 C p G 治療を使用した処置に成功しなかった H C V 感染を有する対象を処置するための方法であって、かかる処置を必要としている対象に、C p G 免疫刺激性核酸を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む前記方法。

【請求項 2】

非 C p G 治療は、インターフェロンアルファを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

インターフェロンアルファは、インターフェロンアルファ - 2 b、インターフェロン - アルファ - 2 a またはコンセンサスインターフェロンアルファである、請求項 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

非 C p G 治療は、インターフェロンアルファおよびリバビリンを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

非 C p G 治療は、ペグ化インターフェロンアルファおよびリバビリンを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

C p G 免疫刺激性核酸は、A クラス C p G 免疫刺激性核酸である、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 7】

C p G 免疫刺激性核酸は、B クラス C p G 免疫刺激性核酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

C p G 免疫刺激性核酸は、C クラス C p G 免疫刺激性核酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

さらにインターフェロンアルファを対象に投与するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 10】

インターフェロンアルファは、インターフェロンアルファ - 2 b、インターフェロンアルファ - 2 a またはコンセンサスインターフェロンアルファである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

インターフェロンアルファは、実質的に C p G 免疫刺激性核酸と同時に投与される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

C p G 免疫刺激性核酸は、骨格修飾を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

骨格修飾は、チオリン酸ホスホロチオエート骨格修飾である、請求項 12 に記載の方法。 40

【請求項 14】

C p G 免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

H C V 感染を有し、非 C p G 治療に無反応でありそうな対象を処置するための方法であって、かかる処置を必要としている対象に、C p G 免疫刺激性核酸を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む前記方法。

【請求項 16】

さらに非CpG治療に無反応でありそのような対象を確認同定することを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

対象は、樹枝状細胞樹状細胞あたり産生されたインターフェロンアルファの検定アッセイに基づき無反応でありそうであると確認同定される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

対象は、HCV遺伝子型に基づき無反応でありそうであると確認同定される、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

非CpG治療は、インターフェロンアルファを含む、請求項15に記載の方法。 10

【請求項20】

非CpG治療は、インターフェロンアルファおよびリバビリンを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項21】

さらに対象に抗ウイルス剤を投与することを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

抗ウイルス剤は、インターフェロンアルファである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

インターフェロンアルファは、インターフェロンアルファ-2b、インターフェロンアルファ-2aまたはコンセンサスインターフェロンアルファである、請求項22に記載の方法。 20

【請求項24】

インターフェロンアルファは、治療量以下で投与される、請求項21に記載の方法。

【請求項25】

CpG免疫刺激性核酸は、CクラスCpG免疫刺激性核酸である、請求項15に記載の方法。

【請求項26】

CpG免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項27】

慢性のC型肝炎ウイルス感染の処置に有用なCpG免疫刺激性核酸をスクリーニングする方法であって、慢性のC型肝炎ウイルス感染を有する対象からの末梢血単核細胞を、CpG免疫刺激性核酸と接触させること、および曝露後の前記末梢血液単核細胞の試験反応を測定すること、ここで対象は以前の治療を使用した処置に成功しなかった、を含む、前記方法。 30

【請求項28】

試験反応は、B細胞の刺激、IL-6の分泌、IL-10の分泌、IL-12の分泌、インターフェロンガンマの分泌、1型インターフェロン(アルファ+ベータ)の分泌、IP-10の分泌、NKの活性、CD80の発現、CD86の発現、CD83の発現、およびMHCクラスIIの発現の上方調節からなる群から選択される、請求項27に記載の方法。 40

【請求項29】

末梢血単核細胞は、樹枝状細胞樹状細胞を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項30】

樹枝状細胞樹状細胞は、形質細胞様樹枝状細胞樹状細胞を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

試験反応は、IL-12の分泌、1型インターフェロンの分泌、CD80の発現、CD86の発現、CD83の発現、およびMHCクラスIIの発現の上方調節からなる群から 50

選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

接触は *in vitro* で生じる、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

末梢血単核細胞は、培養される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

CpG 免疫刺激性核酸は、培養末梢血単核細胞に添加される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

以前の治療は、非 CpG 治療である、請求項 29 に記載の方法。

10

【請求項 36】

以前の治療は、異なる配列またはクラスの CpG 核酸による治療である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 37】

さらに正常な対象からの末梢血単核細胞からの制御反応を刺激する能力について、CpG 免疫刺激性核酸をスクリーニングすることを含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 38】

さらに実質的に CpG 免疫刺激性核酸と同時に、末梢血単核細胞を、実質的に CpG 免疫刺激性核酸と同時にインターフェロナルファに接触させることを含む、請求項 29 に記載の方法。

20

【請求項 39】

CpG 免疫刺激性核酸は、C クラス CpG 免疫刺激性核酸である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 40】

HCV 感染を有し、非 CpG 治療に無反応でありそうな対象を確認同定するための方法であって、
C 型肝炎ウイルス感染を有する対象から採取した末梢血単核細胞を CpG 免疫刺激性核酸に曝露すること、
前記細胞から産生されたインターフェロナルファを測定すること、および
樹枝状細胞樹状細胞あたり産生されたインターフェロナルファの量を決定すること、ここで 1.0 pg/ml より少ない量は、非 CpG 治療に無反応でありそうな対象を示す、
を含む、前記方法。

30

【請求項 41】

0.5 pg/ml より少ない量は、非 CpG 治療に無反応でありそうな対象を示す、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

非 CpG 治療は、インターフェロナルファを含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 43】

非 CpG 治療は、リバビリンを含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

IFN-アルファは、ペグ化インターフェロナルファである、請求項 42 に記載の方法。

40

【請求項 45】

CpG 免疫刺激性核酸は、A クラスまたは C クラス CpG 免疫刺激性核酸である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 46】

末梢血単核細胞は、さらに CpG 免疫刺激性核酸と共に抗ウイルス剤に曝露される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 47】

抗ウイルス剤は、インターフェロナルファである、請求項 46 に記載の方法。

50

【請求項 48】

インターフェロナルファは、インターフェロナルファ - 2 b、インターフェロナルファ - 2 a または コンセンサスインターフェロナルファである、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

末梢血単核細胞は、樹枝状細胞樹状細胞を含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 50】

樹枝状細胞樹状細胞は、形質細胞様樹枝状細胞樹状細胞を含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

C 型肝炎ウイルス感染は、急性の C 型肝炎ウイルス感染である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 52】

さらに HCV の遺伝子型を決定することを含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 53】

C 型肝炎ウイルス感染を有する対象を処置するための方法であって、請求項 40 に記載の方法に従って確認同定した対象に、CpG 免疫刺激性核酸分子を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む、前記方法。

【請求項 54】

対象にインターフェロナルファをさらに投与することを含む、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

インターフェロナルファは、インターフェロナルファ - 2 b、インターフェロナルファ - 2 a または コンセンサスインターフェロナルファである、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

CpG 免疫刺激性核酸は、A クラス CpG 免疫刺激性核酸である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 57】

CpG 免疫刺激性核酸は、B クラス CpG 免疫刺激性核酸である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 58】

CpG 免疫刺激性核酸は、C クラス CpG 免疫刺激性核酸である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 59】

CpG 免疫刺激性核酸は、骨格修飾を含む、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 60】

骨格修飾は、チオリン酸ホスホロチオエート骨格修飾である、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

CpG 免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を含む、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 62】

C 型肝炎ウイルス感染は、慢性の C 型肝炎ウイルス感染である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 63】

C 型肝炎ウイルス感染は、急性の C 型肝炎ウイルス感染である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 64】

以前の非 CpG 治療を使用した処置に成功しなかった HCV 感染を有する対象を処置するための方法であって、

10

20

30

40

50

かかる処置を必要としている対象に、セミソフトな骨格を有するCクラスCpG免疫刺激性核酸を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む前記方法。

【請求項65】

HCV感染を有し、非CpG治療に無反応でありそうな対象を処置するための方法であつて、

かかる処置を必要としている対象に、セミソフトな骨格を有するCクラスCpG免疫刺激性核酸を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む前記方法。

【請求項66】

HCV感染を有し、非CpG治療に無反応でありそうな対象を確認同定するための方法であつて、

C型肝炎ウイルス感染を有する対象から採取した末梢血単核細胞をAクラスまたはCクラスCpG免疫刺激性核酸に曝露すること、

前記細胞から産生されたインターフェロナルファを測定すること、および樹枝状細胞樹状細胞あたり産生されたインターフェロナルファの量を決定すること、ここで1.0pg/mlより少ない量は、非CpG治療に無反応でありそうな対象を示す、を含む、前記方法。

【請求項67】

以前の非CpG治療を使用した処置に成功しなかったHCV感染を有する対象を処置する方法であつて、

かかる処置を必要としている対象からの末梢血単核細胞を、免疫反応を刺激するのに有効な量のCpG免疫刺激性核酸と接触させること、および前記細胞を対象に再注入することを含む前記方法。

【請求項68】

末梢血単核細胞は、樹枝状細胞樹状細胞を含む、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

樹枝状細胞樹状細胞は、形質細胞様樹枝状細胞樹状細胞を含む、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

CpG免疫刺激性核酸は、Cクラス免疫刺激性核酸である、請求項67に記載の方法。

【請求項71】

Cクラス免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を有する、請求項70に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、C型肝炎ウイルスに慢性的に感染した対象の処置のための方法および製品を提供する。

【0002】

発明の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は、フラビウイルス(Flavivirus)科のプラス鎖RNAウイルスであり、ヒトおよび他の霊長類数種の肝細胞に感染する。1989年に最初に特徴付けられ(1)、HCVは、3つの構造タンパク質：コアおよび2つのエンベロープ糖タンパク質(E1およびE2)、ならびにウイルス複製および宿主細胞との相互作用に参与するいくつかの非構造(NS)タンパク質をコードする、9.5kbのゲノムを有する(2)し、3つの構造タンパク質：コアおよび2つのエンベロープ糖タンパク質(E1およびE2)、ならびにウイルス複製および宿主細胞との相互作用に参与するいくつかの非構造(NS)タンパク質(2)をエンコードする。

【0003】

HCVは、深刻な公衆衛生問題であり、非経口の非A、非B型肝炎の>90%をもたらす(1)。世界の人口の0.4~1.5%は、感染しており(3、4)、約300,000

10

20

30

40

50

0 人のカナダ人を含む (Health Canada)。急性の感染の圧倒的多数が無症状であることから、疫学的統計を編集するのは難しい；しかしながら、HCV 感染した個人の 50 ~ 80 % は、ウィルスを除去できないと推定され、彼らのほとんどが一生キャリアとなる。キャリアの約 50 % が慢性の肝炎を発症し、彼らの 20 % が肝硬変を発症し、彼らの多くが続いて肝細胞癌を発症するだろう (5 ~ 9)。C 型肝炎は、米国内で年間推定 8,000 ~ 10,000 人の死者をもたらす (CDC)。

米国およびカナダ国において、2 種類の異なる処方計画があり、C 型肝炎の治療として認可されている：アルファインターフェロンによる単剤治療ならびにアルファインターフェロンおよびリバビリン (Ribavirin) による併用治療である。より高価で、より多くの副作用を伴うにもかかわらず、併用治療は、一貫して単剤治療より高い割合の持続的反応をもたらす。

10

【0004】

いくつかの形態のアルファインターフェロンが、利用可能である (アルファ - 2a、アルファ - 2b、およびコンセンサスインターフェロン (Alfacon))。これらのインターフェロンを、典型的に毎週 3 回皮下に与える。ペグ化 (pegylated) インターフェロン、すなわち、循環における継続期間を増加させるために、ポリエチレングリコール (PEG) の付添加により修飾されたアルファインターフェロンは、別のインターフェロンであり、毎週 1 回のみ与えられる。リバビリンは、対照的に、経口抗ウイルス剤であり、200 mg カプセルで 1 日 2 回与えられる。

アルファインターフェロンの副作用は、以下を含む：けん怠感、筋肉痛、頭痛、悪心および嘔吐、注射部位の皮膚の炎症、微熱、体重減少、被刺激性、うつ病、自殺、軽度の骨髄抑制および抜け毛 (可逆性改善可能)。リバビリンについては、以下の副作用を含む；貧血けん怠感および被刺激性、そう痒、皮膚の発疹、鼻詰まり、副鼻腔炎および咳。

20

【0005】

インターフェロン単独でのまたはインターフェロンおよびリバビリンを併用する処置は、患者の 50 ~ 75 % における血清 ALT レベルの急速な改善および患者の 30 ~ 50 % における血清からの検出可能な HCV RNA の消失へと至らしめる。肝疾患における長期の改善は通常たいてい、HCV RNA が治療中消失し、治療完了後少なくとも 6 月間検出不可能なままである場合にのみ生じる。併用処置は、処置における HCV RNA のより高い喪失率および処置が完了したときのより低い再発率の両方をもたらす。しかしながら、結果は、ウィルスの遺伝子型に強く依存し、より良い結果が遺伝子型 2 および 3 についてはより良い結果が得られるが (ペグ化 IFN - およびリバビリンによる 1 年間の処置により約 90 %)、遺伝子型 1 の HCV についてはより乏しい結果 (約 40 % の持続的反応) が得られる。現在、北米における HCV 慢性キャリアの大多数は、遺伝子型 1 である。

30

【0006】

最適な処置継続期間は、インターフェロンの単剤治療または併用治療を使用するか、ならびに HCV 遺伝子型により、様々である。典型的に、継続期間は 6 ~ 12 月に及ぶ。

現在、HCV に対するワクチン、または慢性の感染に極めて有効な治療はない。したがって、慢性キャリアを処置するのに使用することができる有効な処置が至急必要である。

40

【0007】

発明の概要

本発明は、一つには CpG 免疫刺激性核酸を C 型肝炎ウイルス (HCV) に慢性的に感染し、以前の投与した非 CpG 治療に無反応である対象を処置するのに使用することができるという所見を含む、いくつかの驚くべき発見を前提とする。本発明はさらに、一つには CpG 免疫刺激性核酸および IFN - アルファなどの抗ウイルス剤の併用によりから、かかる対象において相乗反応を有することが可能であるという所見を前提とする。

【0008】

一つの側面において、本発明は、以前の非 CpG 治療を使用した処置に成功しなかった HCV 感染を有する対象を処置するための方法であり、かかる処置を必要としている対象

50

に、C p G免疫刺激性核酸を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む前記方法を提供する。

【0009】

一つの態様において、非C p G治療は、インターフェロナルファを含む。関連する態様において、インターフェロナルファは、インターフェロナルファ - 2 b、インターフェロン - アルファ - 2 aまたはコンセンサスインターフェロナルファである。別の態様において、非C p G治療は、インターフェロナルファおよびリバビリン、またはインターフェロナルファおよびリバビリンおよびエマンチジン(emantidine)を含む。いくつかの重要な態様において、非C p G治療は、ペグ化インターフェロナルファおよびリバビリンなどの抗ウイルス薬を含む。

10

一つの態様において、C p G免疫刺激性核酸は、AクラスC p G免疫刺激性核酸である。別の態様において、C p G免疫刺激性核酸は、BクラスC p G免疫刺激性核酸である。

さらなる態様において、C p G免疫刺激性核酸は、CクラスC p G免疫刺激性核酸である。

【0010】

さらにインターフェロナルファなどの抗ウイルス薬をC p G免疫刺激性核酸と共に対象に投与することを随意に含んでもよい。

インターフェロナルファは、インターフェロナルファ - 2 b、インターフェロナルファ - 2 aまたはコンセンサスインターフェロナルファであってもよいが、そのようにそれほど限定されない。一つの態様において、抗ウイルス薬は、実質的にC p G免疫刺激性核酸と同時に投与される。

20

一つの態様において、C p G免疫刺激性核酸は、骨格修飾を含む。関連する態様において、骨格修飾は、チオリン酸ホスホロチオエート骨格修飾である。いくつかの重要な態様において、C p G免疫刺激性核酸は、セミソフト(semi-soft)な骨格を含む。他の重要な態様において、C p G免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を有するCクラス免疫刺激性核酸である。

【0011】

したがって、別の側面において、以前の非C p G治療を使用した処置に成功しなかったH C V感染を有する対象を処置するための方法であり、かかる処置を必要としている対象に、セミソフトな骨格を有するCクラスC p G免疫刺激性核酸を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む前記方法を提供する。

30

さらに別の側面において、以前の非C p G治療を使用した処置に成功しなかったH C V感染を有する対象を処置する方法であり、かかる処置を必要としている対象からの末梢血単核細胞を、免疫反応を刺激するのに有効な量のC p G免疫刺激性核酸と接触させること、および前記細胞を対象に再注入することを含む前記方法を提供する。

【0012】

一つの態様において、末梢血単核細胞は、樹枝状細胞樹状細胞を含む。別の態様において、樹枝状細胞樹状細胞は、形質細胞様樹枝状細胞樹状細胞を含む。一つの態様において、C p G免疫刺激性核酸は、Cクラス免疫刺激性核酸である。関連する態様において、Cクラス免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を有する。

40

別の側面において、本発明は、H C V感染を有し、非C p G治療に無反応でありそうな対象を処置するための方法であり、かかる処置を必要としている対象に、C p G免疫刺激性核酸を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む前記方法を提供する。

【0013】

一つの態様において、本方法は、さらに非C p G治療に無反応でありそうな対象を確認同定することを含む。一つの態様において、対象は、樹枝状細胞樹状細胞あたり産生されたインターフェロナルファの検定アッセイに基づき無反応でありそうであると確認同定される。別の態様において、対象は、H C V遺伝子型に基づき無反応でありそうであると確認同定される。

一つの態様において、非C p G治療は、I F N -アルファを含む。関連する態様におい

50

て、非CpG治療は、インターフェロンアルファおよびリバビリンを含む。

【0014】

一つの態様において、本方法は、さらに対象に抗ウイルス剤を投与することを含む。重要な態様において、抗ウイルス剤は、インターフェロンアルファである。インターフェロンアルファは、インターフェロンアルファ-2b、インターフェロンアルファ-2aまたはコンセンサスインターフェロンアルファであってもよいが、そのようにそれほど限定されない。一つの態様において、インターフェロンアルファは、治療量以下で投与され、随意にCpG免疫刺激性核酸およびインターフェロンアルファの組み合わせは、相乗的である。

【0015】

一つの態様において、対象を処置するのに使用されるCpG免疫刺激性核酸は、AクラスCpG免疫刺激性核酸、BクラスCpG免疫刺激性核酸、またはCクラスCpG免疫刺激性核酸である。

一つの態様において、対象が非CpG治療に無反応でありそうかどうかを確認同定するのに使用されるCpG免疫刺激性核酸は、AクラスCpG免疫刺激性核酸、またはCクラスCpG免疫刺激性核酸である。

【0016】

一つの態様において、抗ウイルス剤は、実質的にCpG免疫刺激性核酸と同時に投与される。他の態様において、インターフェロンアルファは、CpG免疫刺激性核酸による処置の前に、ある期間投与される。

ある態様において、CpG免疫刺激性核酸は、骨格修飾を含む。関連する態様において、骨格修飾は、チオリン酸ホスホロチオエート骨格修飾である。いくつかの好ましい態様において、CpG免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を含み、いくつかのより好ましい態様において、CpG免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を有するCクラスCpG免疫刺激性核酸である。

【0017】

別の側面において、HCV感染を有し、非CpG治療に無反応でありそうな対象を処置するための方法であり、かかる処置を必要としている対象に、セミソフトな骨格を有するCクラスCpG免疫刺激性核酸を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む前記方法を提供する。

【0018】

さらに別の側面において、本発明は、慢性のC型肝炎ウイルス感染の処置に有用なCpG免疫刺激性核酸をスクリーニングする方法を提供する。本方法は、慢性のC型肝炎ウイルス感染を有する対象からの末梢血単核細胞を、CpG免疫刺激性核酸に接触させること、および曝露後の前記血液単核細胞の試験反応を測定することを伴う。対象からの末梢血単核細胞であり、該対象は治療を使用した処置に成功しなかった。

【0019】

一つの態様において、試験反応は、B細胞の刺激、IL-6の分泌、IL-10の分泌、IL-12の分泌、インターフェロンガンマの分泌、1型インターフェロン(アルファ+ベータ)の分泌、IP-10の分泌、NKの活性、CD80の発現、CD86の発現、CD83の発現、およびクラスIIのMHCクラスIIの発現の上方調節からなる群から選択される。

【0020】

別の態様において、末梢血単核細胞は、樹枝状細胞樹状細胞を含む。関連する態様において、樹枝状細胞樹状細胞は、形質細胞様樹枝状細胞樹状細胞を含む。さらに別の態様において、細胞は、樹枝状細胞樹状細胞であり、試験反応は、IL-12の分泌、1型インターフェロンの分泌、CD80の発現、CD86の発現、CD83の発現、およびクラスIIのMHCの発現の上方調節からなる群から選択される。

【0021】

一つの態様において、接触はin vitroで生じる。別の態様において、末梢血単核細胞を、

10

20

30

40

50

培養する。さらに別の態様において、C p G免疫刺激性核酸を、培養末梢血単核細胞に添加する。

一つの態様において、以前の治療は、非C p G治療である。別の態様において、非C p G治療は、インターフェロンアルファを含む。別の態様において、非C p G治療は、さらにリバビリンを含む。他の態様において、インターフェロンアルファは、ペグ化インターフェロンアルファである。一つの態様において、以前の治療は、異なる配列またはクラスのC p G核酸による治療である。

【0022】

他の態様において、本方法は、さらに正常な対象からの末梢血単核細胞からの制御反応を刺激する能力について、C p G免疫刺激性核酸をスクリーニングすることを含む。

10

本方法は、さらに実質的にC p G免疫刺激性核酸と同時に、末梢血単核細胞を、実質的にC p G免疫刺激性核酸と同時にインターフェロンアルファに接触させることを含んでもよい。

【0023】

一つの態様において、C p G免疫刺激性核酸は、骨格修飾を含む。関連する態様において、骨格修飾は、チオリン酸ホスホロチオエート骨格修飾である。重要な態様において、C p G免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を含む。C p G免疫刺激性核酸は、AクラスC p G免疫刺激性核酸、BクラスC p G免疫刺激性核酸、またはCクラスC p G免疫刺激性核酸であってよい。いくつかの態様において、C p G免疫刺激性核酸は、Cクラス免疫刺激性核酸であり、他の態様において、C p G免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を有するCクラス免疫刺激性核酸である。

20

【0024】

別の側面において、本発明は、H C V感染を有し、非C p G治療に無反応でありそうな対象を確認同定するための方法を提供する。本方法は、C型肝炎ウイルス感染を有する対象から採取した末梢血単核細胞をC p G免疫刺激性核酸に曝露すること、前記細胞から産生されたインターフェロンアルファを測定すること、および樹枝状細胞樹状細胞あたり産生されたインターフェロンアルファの量を決定することを含み、ここで1.0 pg/mlより少ない量は、非C p G治療に無反応でありそうな対象を示す。一つの態様において、0.5 pg/mlより少ない量は、非C p G治療に無反応でありそうな対象を示す。

【0025】

30

一つの態様において、非C p G治療は、インターフェロンアルファを含む。別の態様において、非C p G治療は、リバビリンを含む。別の態様において、I F N - アルファは、ペグ化I F N - アルファである。

いくつかの重要な態様において、C p G免疫刺激性核酸は、AクラスまたはCクラスC p G免疫刺激性核酸である。

さらに他の態様において、末梢血単核細胞を、さらにC p G免疫刺激性核酸と一緒に抗ウイルス剤に曝露する。抗ウイルス剤は、インターフェロンアルファであってもよいが、そのようにれほど限定されない。一つの態様において、インターフェロンアルファは、インターフェロンアルファ - 2 b、インターフェロンアルファ - 2 aまたはコンセンサスイインターフェロンアルファである。

40

【0026】

一つの態様において、末梢血単核細胞は、樹枝状細胞樹状細胞を含む。別の態様において、樹枝状細胞樹状細胞は、形質細胞様樹枝状細胞樹状細胞を含む。

別の態様において、C型肝炎ウイルス感染は、急性のC型肝炎ウイルス感染である。

別の態様において、本方法は、さらにH C Vの遺伝子型を決定することを含む。

【0027】

さらなる側面において、H C V感染を有し、非C p G治療に無反応でありそうな対象を確認同定するための方法であり、C型肝炎ウイルス感染を有する対象から採取した末梢血単核細胞をAクラスまたはCクラスC p G免疫刺激性核酸に曝露すること、細胞から産生されたインターフェロンアルファを測定すること、および樹枝状細胞樹状細胞あたり産生

50

されたインターフェロナルファの量を決定することを含み、ここで1.0 pg/mlより少ない量は、非CpG治療に無反応でありそうな対象を示す、前記方法が提供される。

【0028】

さらに別の側面において、本発明は、C型肝炎ウイルス感染を有する対象を処置するための方法であり、上述の方法に従って確認同定した対象に、CpG免疫刺激性核酸分子を前記感染を処置するのに有効な量で投与することを含む、前記方法を提供する。

一つの態様において、本方法は、対象にインターフェロナルファをさらに投与することを含む。一つの態様において、インターフェロナルファは、インターフェロナルファ-2b、インターフェロナルファ-2aまたはコンセンサスインターフェロナルファである。

【0029】

一つの態様において、対象を処置するのに使用されるCpG免疫刺激性核酸は、AクラスCpG免疫刺激性核酸、BクラスCpG免疫刺激性核酸、またはCクラスCpG免疫刺激性核酸である。

別の態様において、CpG免疫刺激性核酸は、骨格修飾を含む。関連する態様において、骨格修飾は、チオリン酸ホスホロチオエート骨格修飾である。さらに別の態様において、CpG免疫刺激性核酸は、セミソフトな骨格を含む。

一つの態様において、C型肝炎ウイルス感染は、慢性のC型肝炎ウイルス感染である。別の態様において、C型肝炎ウイルス感染は、急性のC型肝炎ウイルス感染である。

【0030】

本発明の各限定は、本発明の様々な態様を包含する。したがって、一つの要素または要素の組み合わせを伴う本発明の各限定を、本発明の各側面に含むことができることが予想される。

本発明のこれらのおよび他の側面は、以下に詳細に記載する。

【0031】

図面の簡単な説明

図1は、3クラスのCpGによる刺激の後のHCV感染したおよび正常なPBMCからのIFN-分泌の誘導を示す。正常なまたはHCV感染した対象からのPBMCを、異なるクラスのCpGと共に48時間インキュベートした。細胞上清を採集し、市販のELISAキットにより、IFN-分泌について検定アッセイした。正常な10対象およびHCV感染した10対象についての平均IFN-分泌を、黒いバーで示す。

図2は、慢性のHCVキャリアおよび正常な対象から新しく単離したPBMCのフローサイトメトリー分析を示す。PBMCを、HCV感染した対象および正常な健康な提供者の血液から単離し、蛍光標識した抗形質細胞様樹状細胞樹状細胞(pDC)抗体で免疫染色した。細胞をフローサイトメーターで分析し、結果をCpGにより刺激したときのこれらの同じ対象についてのIFN-分泌データと比較した。

【0032】

図3は、CクラスおよびソフトなCオリゴヌクレオチドによるPBMCの刺激によるIFN-誘導を示す。正常なまたはHCV感染した対象からのPBMCを、異なるクラスのCpGと共に48時間インキュベートした。細胞上清を採集し、市販のELISAキットにより、IFN-分泌について検定アッセイした。正常な10対象およびHCV感染した10対象についての平均IFN-分泌を、黒いバーで示す。

図4は、セミソフトなCクラスCpGのパネルによる刺激の後のIFN-誘導を示す。HCV感染した5対象から単離したPBMCを、セミソフトなCクラスのオリゴヌクレオチドのパネルと共に48時間インキュベートした。細胞上清を採集し、市販のELISAキットにより、IFN-分泌について検定アッセイした。HCV感染した5対象についての平均IFN-分泌を、黒いバーで示す。

【0033】

図5は、3クラスのCpGによる刺激の後のIFN-分泌を示す。正常なまたはHCV感染した対象からのPBMCを、異なるクラスのCpGと共に48時間インキュベート

10

20

30

40

50

した。細胞上清を採集し、市販のELISAキットにより、IFN-分泌について検定アッセイした。正常な10対象およびHCV感染した10対象についての平均IFN-分泌を、黒いバーで示す。

図6は、セミソフトなCクラスCpGのパネルによる刺激の後のIFN-誘導を示す。HCV感染した5対象から単離したPBMCを、セミソフトなCクラスのオリゴヌクレオチドのパネルと共に48時間インキュベートした。細胞上清を採集し、市販のELISAキットにより、IFN-分泌について検定アッセイした。HCV感染した5対象についての平均IFN-分泌を、黒いバーで示す。

【0034】

図7は、3クラスのCpGによる刺激の後のIP-10分泌を示す。正常なまたはHCV感染した対象からのPBMCを、異なるクラスのCpGと共に48時間インキュベートした。細胞上清を採集し、市販のELISAキットにより、IP-10分泌について検定アッセイした。正常な10対象およびHCV感染した10対象についての平均IP-10分泌を、黒いバーで示す。

10

図8は、B細胞の増殖へのCpGの効果を示す。HCV感染したまたは正常な提供者からのPBMCを、クラスA、BまたはCのCpGと共に5日間インキュベートした。細胞を、放射活性能測定の前に16~18時間、³H-チミジンを用いてパルス(pulse)した。値を対照の培地と比較した刺激指数として表す(SI=CpGを用いてインキュベートした細胞のcpm/培地のみを用いてインキュベートした細胞のcpm)。

【0035】

20

図9は、B細胞の増殖へのセミソフトなCクラスCpGの効果を示す。HCV感染した5対象から単離したPBMCを、A、B、CおよびセミソフトなCクラスCpGと共に5日間インキュベートした。そして細胞を、放射活性能測定の前に16~18時間³H-チミジンを用いてパルスした。値を対照の培地と比較した刺激指数として表す(SI=CpGを用いてインキュベートした細胞のcpm/培地のみを用いてインキュベートした細胞のcpm)。

図10は、3クラスのCpGによる刺激の後のIL-10分泌を示す。正常なまたはHCV感染した対象からのPBMCを、異なるクラスのCpGと共に48時間インキュベートした。細胞上清を採集し、市販のELISAキットにより、IL-10分泌について検定アッセイした。正常な10対象およびHCV感染した10対象についての平均IL-10分泌を、黒いバーで示す。

30

【0036】

図11は、リバビリンおよびCpG単独でまたはイントロンAとの組み合わせによるHCV感染した細胞の刺激の後のIFN-分泌を示す。HCV感染した10対象および正常で健康な10提供者から単離したPBMCを、イントロンA、リバビリンまたはC-クラスCpG単独と共にならびにまたイントロンA(精製した外因性源のIFN-源)と共におよびイントロンAなしで48時間インキュベートした。細胞上清を採集し、市販のELISAキットにより、IFN-分泌について検定アッセイした。各対象についてのためにイントロンA単独について測定したIFN-の量を、バックグラウンドとみなし、データをグラフに含めさせる前に、イントロンA、リバビリン+イントロンAおよびCクラス+イントロンAから、これらの同じ対象について差し引いた。正常なおよびHCV対象についての平均値を、それぞれ黒いおよび白いバーで示す。

40

図12は、HCV感染した細胞によるIFN-分泌へのイントロンAを併用したCpGの相乗効果である。HCV感染した15対象からのPBMCを、CクラスCpG単独でまたはイントロンA(精製した外因性源のIFN-源)と共に48時間インキュベートした。細胞上清を採集し、市販のELISAキットにより、IFN-分泌について検定アッセイした。各対象についてのためにイントロンA単独について測定したIFN-の量を、データをグラフに含めさせる前に、CpG+イントロンAから、これらの同じ対象について差し引いた。

図は、請求の範囲に記載されている発明の実施可能性に必要ないと理解される。

50

【0037】

発明の詳細な説明

本発明によると、CpGオリゴヌクレオチドは、以前のインターフェロナルファ（IFN-）治療が失敗した患者を含む、HCVに慢性的に感染した患者からのPBMCを、健康な対象からのPBMCと同様の方法で活性化することができることが発見された。

【0038】

内因性IFN-分泌は、機能障害および他の刺激に反応する機能障害および能力の低下をもたらすHCVにより感染したと思われる形質細胞様樹状細胞樹状細胞（PDC）から強く誘導されるたことが発見された。ある場合には、健康なボランティアからのPBMCにおいて高レベルのIFN-を誘導するAおよびC CpGクラスが、pDCから最も高いレベルのIFN-を誘導することが見出された。さらに、セミソフトなCクラスCpG ODNもまた、特にこの効果に有用であることが発見された。これらのODNは、反復投与により腎臓内に蓄積しないため、いくつかの態様において好ましいだろう。

10

【0039】

本発明によると、外因性IFN-（イントロンA）とリバビリンはのいずれも、単独でまたは一緒に使用されたとき、正常な対象またはHCV慢性のキャリアからのPBMCに対してへのいかなる検出可能な直接的な免疫刺激効果を全く有しないことがさらに発見された。しかしながら、イントロンAおよびCpG ODN（例、BまたはCクラス）を一緒に使用するときには、内因性IFN-の産生についての強力な相乗効果が、観察される。

20

これらの結果は、CpG ODNが、単独で、またはIFN-と共に、慢性のHCV感染を処置するのに、有効な処置であることを示す。本発明は、これらの発見に基づき、HCV感染を防止するおよび処置する方法および製品を提供する。

【0040】

慢性の感染は、少なくとも一部は、急速なHCVの突然変異速度率に起因するようであり、免疫の監視を逃れることができる類似種の産生をもたらす（10、11）。体液性免疫および細胞性媒介免疫（CMI）の両方の反応を、慢性的に感染した個人において検出することができる。抗体を不活性化することが、感染からの防御に重要絶対不可欠である一方、細胞性媒介免疫（CMI）は、一度感染が定着すると、ウィルス除去において主要な役割を果たすようである。

30

【0041】

一つの側面において、本発明は、以前の非CpG治療を用いた処置に成功しないC型肝炎ウィルス（HCV）に感染した対象を処置するための方法を提供する。本方法は、かかる処置を必要としている対象に、CpG免疫刺激性核酸を前記感染を阻害するのに有効な量で投与することを含む。

【0042】

本明細書中、非CpG治療は、CpG免疫刺激性核酸ではない活性または不活性化化合物を使用する治療である。様々な態様において、非CpG治療は、インターフェロナルファを含む。ペグ化IFN-アルファは一般に、好ましくはリバビリンおよび随意にアマンタジンと組み合わせて、HCV対象（例、ヒトHCV患者）に投与される。インターフェロナルファは、インターフェロナルファ-2b、インターフェロナルファ-2aまたはコンセンサスインターフェロナルファであり得る。前述のインターフェロナルファ処置の全てを、非CpG治療の定義に含む。

40

【0043】

以前の非CpG治療を用いた処置に成功しない対象は、前の処置にもかかわらず、治療中止の6月後、血流中に検出可能なウィルス量を未だに有する対象である。これらの対象は、以前の非CpG治療に反応するかもしれないが、検出可能なウィルス量により示されたように、感染および続いて再発を制御できない対象を含む。本明細書中、そして便宜上、これらの対象を「無反応者」というが、しかしながらこの用語は、臨床設定において定義されたようにではなく、本明細書中に定義されたように理解される。すなわち、臨床設

50

定において「無反応者」は、処置にいかなる反応も示さない狭い一部の対象のみを定義するにもかかわらず、本発明においては、以前の処置にいくらかのレベルの反応がある一方、未だ処置に成功しないより広い部類の対象を指す。処置に成功する対象は、処置の中止の6月後、血流中に検出可能なウイルス量を有しない対象である。成功した処置とは、処置の中止後少なくとも6月間持続的に、血流中における検出不可能なレベルのウイルス量へと至らしめる処置を意味する。無反応者とはまた、本明細書中、暗にHCVに慢性的に感染したと理解される。

【0044】

本明細書中、CpG核酸を使用する処置というとき、本方法を対象の成功した処置を達成するのに使用する。CpG処置を使用する対象の成功した処置とは、治療中止の6月後、血流中におけるウイルス量の検出不可能なレベルへの低減と定義する。興味深いことに、ウイルス量は、CpG処置中または直後、減少することが観察されないかもしれないが、むしろ処置後時間と共に減少し、処置の中止の6月後これらの対象の血流中に検出可能なウイルスがないという最終的な結果となるのみかもしれない。感染を処置するとは、したがって、対象の血流中においてウイルス量を検出不可能なレベルに低減させ、そのレベルを処置の中止後6月間持続させることを意味する。したがって、剤の有効な量を、この最終結果を達成するために投与する。

10

【0045】

いくつかの態様において、潜在的無反応者は、予期して確認同定されてもよく（すなわち、非CpG治療による実際のin vivo処置前に）、そして本発明は、かかる対象の確認同定のためのみならず、それらの処置のための方法を提供する。潜在的無反応者を、特にAクラスおよびCクラスのCpG免疫刺激性核酸に反応する能力を評価することにより確認同定してもよい。CpG免疫刺激性核酸に反応する能力を、HCV感染した対象におけるpDCあたり産生されたインターフェロナルファの量により評価する。本発明によると、IFN-アルファ治療などの非CpG治療に反応しそうなHCV感染した対象を、かかる処置を受ける前に確認同定できることが発見された。In vivo治療前にかかる対象を確認同定することが可能であることにより能力は、不必要な処置を排除し、対象を、本発明のCpG免疫刺激性核酸単独での、またはIFN-アルファを含むが、それに限定されない他の抗HCV治療と組み合わせたの処置に、治療的に有利な位置に置く。これらの対象は、成功しない処置を受けないことにより、細胞毒性に冒されることが少なくなり、ウイルス増殖期間がを、成功しない処置を受けないことにより、低減少させられるだろう。pDCあたり妥当なレベル以下のIFN-アルファ誘導を有する対象は、IFN-アルファによる処置に不成功でありそうであり、したがって本明細書中に提供した方法を使用して処置すべきである。IFN-アルファ誘導およびpDC数の測定を、例においてより詳細に記載する。

20

30

【0046】

本明細書中で論じた治療剤および方法のいずれによっても処置に成功するHCV感染した対象はおそらく、まだ体内にウイルスを有するだろうと理解される。しかしながら、対象は、ウイルスを完全に根絶することはできない一方、ウイルス量を（検出不可能なレベルに）制御することができる。ある特定の理論に束縛されることを意図していないがにもかかわらず、かかる対象における検出不可能なウイルス量の維持は、制御するウイルスの複製および蔓延を制御することができる免疫系を伴うことが予想される。

40

【0047】

本明細書中に提供された教示指導を受けた当業者は、対象がIFN-アルファ治療に対して「無反応者」でありそうかどうか決定することができるだろう。一例として、IFN-アルファ誘導が、核酸指定の配列番号1で指定された核酸などのAクラス核酸により、例に記載された培養条件下で行なわれた場合、IFN-アルファ治療に反応する能力を示す正常な反応は、pDCあたり少なくとも1pg/mlだろう。これより少ない量は、いくらかのpDC機能障害を示す。pDCあたり0.5pg/ml未満の量は、IFN-アルファ処置へのより高い確率の無反応と相関関係がある。当業者は、検定アッセイにおい

50

て使用された核酸の特定の型についてかかるカットオフ値を決定することができ、したがって（少なくとも）そのようにかかる対象を実際に処置する前に、IFN-アルファ治療による処置に成功しないと予想される対象を確認同定する能力がある。

【0048】

さらに他の態様において、非CpG治療（例、IFN-アルファ治療）に対する無反応者でありそうな対象を確認同定する方法は、さらに該対象が感染したHCVの遺伝子型の同定を含む。例えば、遺伝子型1のHCVに感染した対象は、IFN-アルファ治療による処置に成功しない可能性が高い。したがって、かかる対象におけるDCあたりのIFN-アルファの産生を評価するのに加えて、それらのHCV遺伝子型もまた決定することができ（当該技術分野で既知の方法を使用して）、そして情報のこの組み合わせを、IFN-アルファ治療に無反応でありそうな対象を確認同定するのに使用することができる。

10

【0049】

いくつかの側面において、本発明は、非CpG治療を使用する処置に成功しそうな対象を確認同定し（非CpG治療により対象を実際に処置することなく）、そしてCpG免疫刺激性核酸単独で、または限定はされないが、IFN-アルファなどの抗ウイルス剤と組み合わせて使用して、対象を処置する方法を提供するとさらに理解される。

上記方法はまた、特定のCpG免疫刺激性核酸への反応について、対象をスクリーニングするために使用することができる。

【0050】

さらに他の態様において、本方法は、以前の非CpG治療を受けたことがあるが処置に成功していない対象を確認同定する追加のステップを伴ってもよい。本明細書中に提供された教示指導を受けた当業者は、かかる対象を確認同定することができるだろう。一例として、かかる対象は、処置の中止の6月後、血流中に検出可能なウイルス量を有するだろう。いくつかの態様において、これらの対象はまた、処置の直後にウイルス量の低減を実証するかもしれないが、この低減は、持続しない。

20

【0051】

本発明は、とりわけ、CpG免疫刺激性核酸単独で、またはHCV感染について以前記載されたものなどの他の活性剤との組み合わせを使用して、以前の非CpG治療による処置に成功しない対象を処置することを意図する。広く定義されたように、CpG免疫刺激性核酸は、少なくとも1つのCpGジヌクレオチドモチーフを有する核酸であり、ここで少なくともジヌクレオチドのCは、非メチル化されていないである。CpG免疫刺激性核酸は、本明細書中ならびに本明細書中に引用されたおよび参照として組み込まれた特許および特許出願により詳細に記載されているように、Aクラス、BクラスおよびCクラスCpG免疫刺激性核酸を含むが、これらに限定されない。これらのクラスのCpG免疫刺激性核酸は、異なる特性および活性化プロファイルを有する。

30

【0052】

重要な態様において、CpG免疫刺激性核酸は、Cクラス免疫刺激性核酸である。本発明によると、Cクラス免疫刺激性核酸は、クラスAおよびBクラスの間の特徴を有していたが、いくつかの態様において、Aより好ましかったことが、驚くべきことに見出された。本明細書中に提供された例は、以前の非CpG治療による処置に成功しない、慢性的に感染した対象のpDCは、自体HCVに感染し、それによりいくつかの側面において機能障害になるが、かかる細胞のCpG免疫刺激性核酸、特にCクラス免疫刺激性核酸への曝露は、それらの機能を回復させることを実証する。いくつかの態様において、本明細書中により詳細に記載されているように、Cクラス免疫刺激性核酸はまた、「ソフト」または「セミソフト」な変種のいずれかであることが好ましい。いくつかの好ましい態様において、CpG免疫刺激は、セミソフトなCクラス核酸である。

40

【0053】

他の側面において、CpG免疫刺激性核酸は、活性剤と組み合わせて使用し、好ましくはHCV処置について以前記載したものを含む。特に重要なのは、インターフェロン（例、イントロンA）とCpG免疫刺激性核酸との使用である。本発明のCpG免疫刺激

50

性核酸と組み合わせて使用することができるインターフェロンは、インターフェロンアルファ - 2 b、インターフェロンアルファ - 2 a またはコンセンサスインターフェロンアルファを含むが、これらに限定されない。他の抗ウイルス剤は、本明細書中に記載されている。C p G クラスのいずれも、これらの組み合わせで使用できる。一例として、本発明によると、外因的に投与されたインターフェロン - は、これらの対象の処置に成功しないにもかかわらず、C p G 免疫刺激性核酸と組み合わせるとき、治療的に有効であることが、予想外に見出された。いくつかの態様において、C p G 免疫刺激性核酸は、C クラス免疫刺激性核酸である。いくつかの好ましい態様においては、セミソフトな C クラス核酸である。

【 0 0 5 4 】

10

C p G 核酸および抗ウイルス剤（例、インターフェロンアルファ）の投与のタイミングは、対象および感染の重篤度に依存して変化してもよい。C p G 核酸を、C p G 免疫刺激性核酸と実質的に同時に投与してもよい。これは、2つの剤を、投与前に組み合わせてもよく、または投与の過程において（例えば、対象の静脈ライン内へ両方供給して）組み合わせてもよく、あるいは別々だが、2つの投与を行なうのにかかる時間内で（例えば、対象に2回注射する時間）投与してもよいことを意味する。本剤を実質的に同時にまたは互い違いの形で投与するかどうかに関わらず、順序は変化してもよい。したがって、いくつかの態様において、C p G 免疫刺激性核酸を I F N - アルファなどの抗ウイルス剤の前に投与してもよい一方、他では抗ウイルス剤の後に投与してもよい。

【 0 0 5 5 】

20

C p G 核酸を他の抗ウイルス剤（例、I F N - アルファ）と一緒に使用するとき、これらの化合物を、治療的に有効な複合量において投与してもよい。いずれかの化合物の量は、したがって治療量以下または治療量以上（すなわち、単独で投与したとき治療的に有効であろう量以下または以上）であってもよい。あるいは、化合物をそれぞれ治療量で投与してもよいが、それらの剤の組み合わせは、副作用の低減などの治療的利益有効性を引き起こすもたらす。好ましい態様において、抗ウイルス薬が I F N - アルファである場合、治療量を投与する。実際投与する量に関わらず、剤の組み合わせは、相乗的であってもよい。相乗反応は、剤の組み合わせにより予想される相加的付加反応より大きいものである。

【 0 0 5 6 】

30

さらに他の側面においておよび上に提供した説明に合わせて、本発明は、H C V に慢性的に感染し、非 C p G 治療による処置に成功しない、または非 C p G 治療への無反応者でありそうな対象から単離した免疫細胞を刺激する能力について C p G 核酸をスクリーニングする方法を提供する。これらのスクリーニング方法は、一般的に末梢血単核細胞（P B M C）を C p G 免疫刺激性核酸と、免疫反応を刺激するのに十分な有効量で接触することにより、*in vitro*で行なわれる。免疫反応は、様々なマーカーにより測定することができ、I F N - アルファの産生、B 細胞の刺激、I L - 6、I L - 1 0、I L - 1 2、インターフェロンガンマ、1 型インターフェロン（アルファ + ベータ）などのサイトカインの分泌、I P - 1 0 などのケモカインの分泌、N K の活性、副刺激分子（例、C D 8 0、C D 8 6）および成熟分子（例、C D 8 3）の発現ならびに M H C クラス I I の発現の上方調節を含む。

40

【 0 0 5 7 】

いくつかの重要な態様において、免疫細胞は、樹枝状細胞樹状細胞であり、好ましくは形質細胞様樹枝状細胞樹状細胞（p D C）であり、免疫反応マーカーは、この細胞種型に特異的である。これらは、副刺激分子（例、C D 8 0 および C D 8 6）の発現、成熟分子（例、C D 8 3）の発現、I L - 1 2 および 1 型インターフェロン（アルファ + ベータ）の発現および / または分泌、および M H C クラス I I の発現の上方調節を含むが、限定されない。これらの *in vitro* 検定アッセイは、P B M C の残留物からの p D C などの樹枝状細胞樹状細胞の単離に依存しないと理解される。むしろ検定アッセイは、P B M C の同一の集団において行なうことができる。

50

【0058】

さらに別の側面において、本発明は、C p G免疫刺激性核酸により処置される慢性のC型肝炎ウイルス感染を有する対象を確認同定するための方法を提供する。本方法は、慢性のC型肝炎ウイルス感染を有する対象から採取した末梢血単核細胞を、i) C p G免疫刺激性核酸、およびii) C p G免疫刺激性核酸および抗ウイルス薬(例、インターフェロナルファ)に曝露すること、ならびに曝露後、末梢血単核細胞の反応を測定することを伴う。C p G免疫刺激性核酸への反応は、非C p G治療の後または代わりにC p G免疫刺激性核酸により処置する対象を示す(上記のとおりであるが、非C p G治療に反応しそうでない対象を確認同定した後のみ)。C p G免疫刺激性核酸単独への反応より大きい、抗ウイルス剤(例、インターフェロナルファ)と一緒にC p G免疫刺激性核酸への反応は、組み合わせて処置する対象を示す。本明細書中に記載したように、抗ウイルス剤は、インターフェロナルファであることができ、インターフェロナルファ-2b、インターフェロナルファ-2aまたはコンセンサスインターフェロナルファを含むがこれらに限定されない。好ましくは、末梢血単核細胞は、形質細胞様樹状細胞樹状細胞などの樹状細胞樹状細胞を含む。本発明は、このように、C p G免疫刺激性核酸単独でまたは抗ウイルス剤(例、IFN-アルファ)と組み合わせて使用して確認同定された対象の処置をさらに含み、スクリーニング検定アッセイの結果に依存する。

10

【0059】

臨床戦略は、局所のおよび全身のかかる核酸のin vivo投与、ならびに無反応であるHCV感染した対象から単離したpDCを免疫刺激性核酸によりin vitroで活性化し、そして患者に局所的にまたは全身的に再注入するex vivo戦略を含む。これらの治療戦略は、他の増殖因子(IL-3、GM-CSF、flt3-リガンド、など)ならびに他の刺激(超抗原、ウイルス産物)と組み合わせて含んでもよい。天然IFN- γ は、121ダース以上の独立した遺伝子産物のファミリー仲間であり、個々の産物が独自の活性プロファイルを有することから、天然インターフェロンの臨床使用は、単一の組み換えIFN- γ 遺伝子由来の組み換えIFN- γ と比較して好ましいだろう。

20

【0060】

本発明は、さらにC型肝炎に感染した対象からのpDCを活性化する方法を提供する。本方法は、かかる処置を必要としている対象からpDCを単離すること、単離したpDCをin vitroで培養すること、pDCをin vitroで有効量の単離した免疫刺激性核酸と接触させすること、および接触させた細胞を対象に戻すことを伴う。細胞はまた、in vitroで増殖因子またはサイトカインと接触することができる。本発明のこの側面によると、免疫刺激性核酸およびIFN- γ による処置を求める条件は、上記のとおりである。

30

【0061】

IFN-アルファ自体は、121ダース以上の関連する、相同タンパク質(アイソフォームイソ型、以下の表1参照)のファミリー仲間を表し、それぞれは独自の遺伝子によりエンコードされ、それぞれは独自の活性プロファイルを示す。ウイルスにおける異なるアルファインターフェロン種の活性は、最高20倍またはそれ以上変化することができる。臨床使用におけるIFN-アルファ製品産物は、組み換えタンパク質または単一のアイソフォームイソ型の高純度の天然タンパク質である。米国において、IFN- γ は、組み換えヒトIFN- γ 2a(ロフェロン-A)、組み換えヒトIFN- γ 2b(イントロンA)、および精製した天然IFN- γ n3(アルフェロン(ALFERON)N)として入手可能である。米国外では、IFN- γ はまた、精製した天然IFN- γ n1(ウェルフェロン(WELLFERON))として入手可能である。

40

【0062】

表1. ヒトIFN- γ のファミリー仲間

【表 1】

IFN- α A	(IFN- α 2a)
IFN- α 2	(IFN- α 2b)
IFN- α 4b	(IFN- α 4)
IFN- α B2	(IFN- α 8)
IFN- α C	(IFN- α 10)
IFN- α D	(IFN- α 1)
IFN- α F	(IFN- α 21)
IFN- α G	(IFN- α 5)
IFN- α H2	(IFN- α 14)
IFN- α I	(IFN- α 17)
IFN- α J1	(IFN- α 7)
IFN- α K	(IFN- α 6)
IFN- α M1	
IFN- α N	
IFN- α WA	(IFN- α 16)

10

【0063】

本発明の方法のいくつかは、IFN- の存在を検出することを含む免疫反応の測定を必要とする。IFN- についての検定アッセイは、当該技術分野において周知である。これらは、直接的な試験、例えば、少なくとも1つのIFN- に特異的な酵素結合イムノソルベント検定アッセイ法 (ELISA)、および間接的な試験、例えば、NK細胞活性化/細胞毒性 (Trinchieri G Adv Immunol 47: 187-376 (1989)) を含み、クラスIのMHCについて蛍光活性化細胞選別 (FACS) 分析により表現型の検査をする機能試験を含む。当該技術分野で周知の追加の特異的な検定アッセイ方法は、IFN- の局所濃度または局所的存在が重要である状況設定において、特に有用であり得る。これらの方法は、例えば、免疫組織化学、核酸ハイブリダイゼーションド形成 (例、ノーザンブロットティング)、ウェスタンブロットティング、逆転写酵素/ポリメラーゼ連鎖反応 (RT/PCR)、および *in situ* 原位置のRT/PCRを含む。細胞内IFN- もまた、フローサイトメトリーを使用して検出することができる。

20

【0064】

いくつかの側面において、本発明は、pDC活性化の測定を伴う。pDC活性化は、多くの方法により、検定アッセイすることができる。これらは、IFN- の産生、副刺激分子 (例、CD80およびCD86) の発現、成熟分子 (例、CD83) の発現、IL-12の発現、およびクラスIIのMHCクラスIIの発現の上方調節を含む。外因性IFN- の投与とは違い、pDCの活性化は、様々な、IFN- の全ての種類形状ではないが、IFN- などの他のI型IFNの産生へと至らしめる。したがって、いくつかの態様において、pDCは、IFN- を含むI型インターフェロンを産生する能力により測定されたように活性化される。

30

【0065】

本発明は、免疫刺激性核酸を伴う様々な方法を提供する。免疫刺激性核酸は、核酸分子であり、免疫系の細胞への接触において、それ自体、増殖するおよび/または活性化するために、免疫系の接触した細胞を誘導する能力がある。接触は、直接的または間接的であることができ、例えば、免疫刺激性核酸は、産物を発現するために第一の種の免疫細胞の第一の型を直接的に刺激してもよく、該産物は順に免疫刺激性核酸に曝露されていないか、または第二の種の反応しない免疫細胞の第二の型を刺激するであろう。免疫刺激性核酸の免疫刺激効果は、免疫刺激性核酸の配列により偶然エンコードされ得るかもしれないいかなる産物からも分離区別される。同様に、免疫刺激性核酸の免疫刺激効果は、いかなるアンチセンスメカニズム機構とも異なり、依存しない。

40

【0066】

ある限られた核酸のみが、免疫刺激性核酸である。最初は、あるパリンδροーム配列は、免疫刺激性であると信じられていた。Tokunaga T et al. Microbiol Immunol 36: 55

50

-66 (1992); Yamamoto T et al. Antisense Res Dev 4: 119-22 (1994)。さらなる研究は、非パリンδροーム配列もはまた、免疫刺激性であり、ただし、特定の配列状況を有する CpG ジヌクレオチド (CpG モチーフ) を含有することを実証した。Krieg AM et al. Nature 374: 546-9 (1995)。

【0067】

免疫刺激性核酸は、一本鎖または二本鎖であってよい。一般的に、二本鎖核酸分子は *in vivo* にてより安定している一方、一本鎖核酸分子は増大した免疫活性を有する。したがって、本発明のいくつかの側面において、免疫刺激性核酸は一本鎖が好ましく、他の側面において、免疫刺激性核酸は二本鎖が好ましい。

【0068】

本発明に従って提供する方法および製品は、CpG オリゴヌクレオチドの使用に関する。CpG ODN は、ほとんどの (>95%) B 細胞の増殖、免疫グロブリン (Ig)、IL-6 および IL-12 の分泌ならびにアポトーシスからの保護を引き起こす誘因する。加えて、CpG ODN はまた、DC の成熟をもたらし、DC、単球、およびマクロファージを直接的に活性化し、IFN- γ 、IL-6、IL-12、GM-CSF、ケモカインおよび TNF- α を分泌させる。これらのサイトカインは、IFN- γ を分泌するためにナチュラルキラー (NK) 細胞を刺激して IFN- γ を分泌させ、増大した溶解活性を増大させる有する。概して、CpG は、IL-12 および IFN- γ に支配され、Th2 サイトカインの分泌がほとんどない状態で、IL-12 および IFN- γ に支配されるサイトカイン産生の強力な Th1 様の傾向パターンのサイトカイン産生を誘導する。

【0069】

先天性の、免疫反応の誘導に加えて、CpG DNA はまた、(i) B 細胞の抗原受容体を通じておよび CpG により惹起誘因された B 細胞のシグナル経路間の強力な相乗効果、(ii) B および T 細胞抗原特異的反応の両方を増大させる抗原特異的 T 細胞の助けを置き換えまたは増大させる、Th1 様サイトカイン、ならびにおよび (iii) 細胞反応に必要な副刺激分子の上方調節のため、抗原特異的反応を増大させる。

【0070】

CpG ODN は、明らかな Th1 様反応を有する BALB/c マウスにおいて、HBsAg への強力な補助剤アジュバントであることを示してきた (主に IgG2a 抗体および強力な CTL) (49)。CpG ODN は、モノホスホリル脂質 A (MPL, Corixa) などの他の Th1 補助剤アジュバントより、またはヒトへの使用には毒性が強すぎる完全フロイント補助剤アジュバント (CFA) よりも、優れていることが見出された。同様の結果が、CpG ODN の様々な他の抗原 (47、50~53) との使用で報告されている。CpG ODN はまた、Th2 抗原 (すなわち、住血吸虫 (Schistosomiasis) の表面抗原) (54) または Th2 補助剤アジュバント (すなわち、ミョウバン) の予防接種により以前に確立された Th2 反応を変えることが報告されている。

【0071】

健康なヒトの PBMC を刺激するのに有効であることが見出された少なくとも 3 つの基本的なクラスの CpG ODN がある (表 1)。これらは、CpG ODN が免疫細胞を刺激することが可能な異なる方法に関連しそうな差動区別できる効果を有する。

B クラスの CpG ODN は、ヌクレアーゼ耐性チオリン酸ホスホロチオエート骨格と共に合成され、一般的に良好な B 細胞および DC の活性化を特徴とし、IL-12 および抗体の産生へと至らしめるが、限られた NK 細胞の活性化は限定的でしかないのみである。CpG (このクラスの一員) (配列番号: 2) を市販の肝炎 B ワクチンに対する補助剤アジュバントとして、市販の肝炎 B ワクチンに試験する第 I / II 相臨床試験において既の実証されているように、このクラスの ODN は、ワクチン補助剤アジュバントとして良好に機能する (60)。

【0072】

A クラスの CpG ODN は、キメラ骨格と共に合成され、ここで 5' および 3' 末端

10

20

30

40

50

は、チオリン酸ホスホロチオエートであり、中心CpGモチーフ領域は、ホスホジエステルである。これらのODNは、良好なNK細胞およびDCの活性化を特徴とし、IFN- α のより多い産生へと至らしめるが、限られたB細胞活性化は限定的でしかないである。

CクラスのCpG ODNは、チオリン酸ホスホロチオエート骨格と共に合成され、他の2つのクラスのCpG ODNの中間の刺激特性を有する（例、B細胞の良好な活性化ならびにNK細胞およびDCの活性化）。

【0073】

表1：3つの異なるクラスのCpG ODNにより誘導されたin vitro免疫活性化のパターン

【表2】

クラス	骨格	B細胞	ナチュラルキラー細胞	樹状細胞	IFN- α
A	SOS ²	+	++++	++++	++++
B	S ¹	++++	++	++++	+
C	S ¹	+++	+++	+++	+++

¹ S - ODNは、チオリン酸ホスホロチオエート骨格から作られる。

² SOS - ODNは、キメラ骨格から作られ、ここで中心CpG含有の領域は、ホスホジエステル連鎖を有し、ODNの3'および5'末端は、チオリン酸ホスホロチオエート連鎖から作られる。

【0074】

本発明の方法は、Aクラス、BクラスおよびCクラスCpG免疫刺激性核酸の使用を包含してもよい。CpG核酸については、異なるクラスのCpG核酸があると最近いわれている。1つのクラスは、B細胞を活性化するには強力であるが、IFN- α およびNK細胞の活性化の誘導においては比較的弱い；このクラスは、Bクラスと呼ばれている。BクラスCpG核酸は典型的に、完全に安定化され、ある好ましい塩基状況内で非メチル化CpGジヌクレオチドを含む。例えば、米国特許6,194,388；6,207,646；6,214,806；6,218,371；6,239,116；および6,339,068参照。別のクラスは、IFN- α およびNK細胞の活性化を誘導するには強力であるが、B細胞の刺激においては比較的弱い；このクラスは、Aクラスと呼ばれている。AクラスCpG核酸は典型的に、5'および3'末端に安定したポリ(poly)G配列および少なくとも6つのヌクレオチドのパリンドロームホスホジエステルCpGジヌクレオチド含有の配列を有する。例えば、公開済の特許出願PCT/US00/26527 (WO 01/22990) 参照。さらに別のクラスのCpG核酸は、B細胞およびNK細胞を活性化し、IFN- α を誘導する；このクラスは、Cクラスと呼ばれている。CクラスCpG核酸は、第一の特徴として、典型的に完全に安定化されており、Bクラス型の配列およびGC含量が高いパリンドロームまたはパリンドロームに近いもの(near-palindrome)を含む。このクラスは、2001年8月17日出願の米国仮特許出願60/313,273、米国にて2002年8月19日出願のUS10/224,523に記載されており、これら全体の内容は、参照参考文献により本明細書中に組み込まれる。

【0075】

「Aクラス」CpG免疫刺激性核酸は、共に2000年9月27日に出願された、米国非仮出願09/672,126および公開済のPCT出願PCT/US00/26527 (WO01/22990) に記載されている。これらの核酸は、高レベルのインターフェロナルファを誘導する能力がある一方、B細胞活性化への最小限の効果を有することを特徴とする。AクラスCpG免疫刺激性核酸は、Yamamotoおよび同僚により記載された六量体のパリンドロームGACGTC、AGCGCT、またはAACGTTを必ずしも含有する必要はない。Yamamoto S et al. J Immunol 148: 4072-6 (1992)。

10

20

30

40

50

【0076】

Aクラス免疫刺激性核酸の典型的な配列は、共に2000年9月27日に出願された、米国非仮特許出願09/672,126および公開済のPCT出願PCT/US00/26527(W001/22990)に記載されている。

BクラスCpG免疫刺激性核酸は、ヒトB細胞を強力に活性化するが、インターフェロン- γ を誘導する最小限の効果を有する。BクラスCpG免疫刺激性核酸は、それぞれ2001年2月27日および2001年5月29日に発行された、米国特許6,194,388 B1および米国特許6,239,116 B1に記載されている。

【0077】

本発明のCpGオリゴヌクレオチドは、少なくとも1種の実質的に非メチル化CpGジヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである。少なくとも1種の実質的に非メチル化CpGジヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチドは、非メチル化シトシン-グアニンジヌクレオチド配列(すなわち、「CpG DNA」または、後に3'グアニンが続きかつリン酸結合により連鎖した5'シトシンを含有するし、3'グアニンが続き、そしてリン酸結合により連鎖するDNA)を含有し、免疫系を活性化する核酸分子である。CpGオリゴヌクレオチド全体は、非メチル化することができ、または一部を非メチル化してもよいが、少なくとも5'CG3'のCは、非メチル化しなければならない。用語CpGオリゴヌクレオチドまたはCpG核酸は、本明細書中、特に明記のない限り、免疫刺激性CpGオリゴヌクレオチドまたは核酸を意味する。

10

【0078】

一つの態様において、本発明は、少なくとも式：



式中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、および X_4 は、ヌクレオチドである、

で表される、BクラスCpGオリゴヌクレオチドを提供する。一つの態様において、 X_2 は、アデニン、グアニン、またはチミンである。別の態様において、 X_3 は、シトシン、アデニン、またはチミンである。

20

【0079】

別の態様において、本発明は、少なくとも式：



式中、 X_1 、 X_2 、 X_3 、および X_4 は、ヌクレオチドであり、Nは、ヌクレオチドのいずれでもよく、 N_1 および N_2 は、それぞれ約0~25Nからなる核酸配列である、

で表される、単離したBクラスCpGオリゴヌクレオチドを提供する。一つの態様において、 $X_1 X_2$ は、GpT、GpG、GpA、ApA、ApT、ApG、CpT、CpA、CpG、TpA、TpT、およびTpGからなる群から選択されるジヌクレオチドであり； $X_3 X_4$ は、TpT、ApT、TpG、ApG、CpG、TpC、ApC、CpC、TpA、ApA、およびCpAからなる群から選択されるジヌクレオチドである。好ましくは、 $X_1 X_2$ は、GpAまたはGpTであり、 $X_3 X_4$ は、TpTである。他の態様において、 X_1 または X_2 または両方は、プリンであり、 X_3 または X_4 または両方は、ピリミジンであるか、あるいは $X_1 X_2$ は、GpAであり、 X_3 または X_4 または両方は、ピリミジンである。別の好ましい態様において、 $X_1 X_2$ は、TpA、ApA、ApC、ApG、およびGpGからなる群から選択されるジヌクレオチドである。さらに別の態様において、 $X_3 X_4$ は、TpT、TpA、TpG、ApA、ApG、GpA、およびCpAからなる群から選択されるジヌクレオチドである。 $X_1 X_2$ は、別の態様において、TpT、TpG、ApT、GpC、CpC、CpT、TpC、GpTおよびCpGからなる群から選択されるジヌクレオチドであり； X_3 は、AおよびTからなる群から選択されるヌクレオチドであり、 X_4 は、ヌクレオチドであるが、ここで、 $X_1 X_2$ が、TpC、GpT、またはCpGのとき、 $X_3 X_4$ は、TpC、ApTまたはApCではない。

30

40

【0080】

別の好ましい態様において、CpGオリゴヌクレオチドは、配列5'TCN₁TX₁X₂CGX₃X₄3'(配列番号：26)を有する。本発明のCpGオリゴヌクレオチドは

50

、いくつかの態様において、G p T、G p G、G p AおよびA p Aからなる群から選択される X_1 、 X_2 を含み、 X_3 、 X_4 は、T p T、C p TおよびT p Cからなる群から選択される。

【0081】

本発明のBクラスC p G核酸配列は、上記に広く記載されたものであり、PCT公開済の特許出願PCT/US95/01570およびPCT/US97/19791、ならびにそれぞれ2001年2月27日および2001年5月29日に発行された、米国特許6,194,388 B1および米国特許6,239,116 B1に開示されている。典型的な配列は、これらの後者の出願および特許に開示されているものを含むが、これらに限定されない。

【0082】

Cクラス免疫刺激性核酸は、免疫系の細胞への独自のおよび所望の刺激効果を有する、少なくとも2つの相異なるモチーフを含有する。これらのODNのいくつかは、旧来の「刺激性」C p G配列および「GC含量が高い」または「B細胞中和」モチーフの両方を有する。これらの組み合わせのモチーフ核酸は、B細胞の活性化および樹枝状細胞樹状細胞(DC)の活性化の強力な誘導物質である旧来の「クラスB」C p G ODNと関連する効果と、IFN- γ およびナチュラルキラー(NK)細胞の活性化の強力な誘導物質であるが、B細胞およびDCの活性化の比較的弱い誘導物質であるより最近記載されたクラスの免疫刺激性核酸(「クラスA」C p G ODN)と関連する効果との中間に位置する免疫刺激効果を有する。Krieg AM et al. (1995) Nature 374: 546-9; Ballas ZK et al. (1996) J Immunol 157: 1840-5; Yamamoto S et al. (1992) Immunol 148: 4072-6。好ましいクラスBのC p G ODNはしばしばチオリン酸ホスホロチオエート骨格を有し、好ましいクラスAのC p G ODNは混合またはキメラ骨格を有する一方、Cクラスの組み合わせモチーフ免疫刺激性核酸は、安定した、例えば、チオリン酸ホスホロチオエート、キメラ、またはホスホジエステルの骨格を有してもよく、いくつかの好ましい態様において、それらはセミソフトな骨格を有する。

【0083】

一つの側面において、本発明は、この新しいクラスの組み合わせモチーフ免疫刺激性核酸に属する免疫刺激性核酸を提供する。B細胞刺激ドメインは、式： $5' X_1 DCGHX_2 3'$ により定義される。Dは、C以外のヌクレオチドである。Cは、シトシンである。Gは、グアニンである。Hは、G以外のヌクレオチドである。

X_1 および X_2 は、0~10ヌクレオチド長の核酸配列のいずれでもよい。 X_1 は、CGを含んでもよく、この場合、好ましくはこのCGの直前にTがある。いくつかの態様において、DCGは、TCGである。 X_1 は、好ましくは0~6ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、 X_2 は、ポリGまたはポリAモチーフのいずれも含有しない。他の態様において、免疫刺激性核酸は、5'末端または3'末端にポリT配列を有する。本明細書中、「ポリA」または「ポリT」は、一続きの4または5以上の連続したAまたはT、それぞれ例えば、 $5' A A A A 3'$ または $5' T T T T 3'$ を意味する。

【0084】

本明細書中、「ポリG末端」は、一続きの4または5以上の連続したG、例えば、核酸の5'末端または3'末端に生じる、 $5' G G G G 3'$ を意味する。本明細書中、「ポリG核酸」は、式 $5' X_1 X_2 G G G X_3 X_4 3'$ を有する核酸を意味し、ここで X_1 、 X_2 、 X_3 、および X_4 は、ヌクレオチドであり、好ましくは少なくとも X_3 および X_4 の1つは、Gである。

【0085】

この式のもとで、B細胞刺激ドメインについてのいくつかの好ましいデザインは、TTTTCG、TCG、TTCG、TTTCG、TTTTTCG、TCGT、TTCGT、TTCGT、TCGTCGTを含む。

核酸の第二のモチーフは、PまたはNであり、 X_1 のすぐ5'側または X_2 のすぐ3'側に位置する。

【0086】

10

20

30

40

50

Nは、B細胞中和配列であり、CGGトリヌクレオチドで始まり、少なくとも10ヌクレオチド長である。B細胞中和モチーフは、少なくとも1つのCpG配列を含み、ここでCGは、Cが先行するか、またはGが続くか(Krieg AM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95: 12631-12636)、あるいは、CGのCがメチル化されている、CG含有DNA配列である配列含有のCGであり、ここで、CGのCは、メチル化される。本明細書中、「CpG」は、3'グアニン(G)が続く5'シトシン(C)であり、リン酸結合により連鎖している。5'CG3'の少なくともCは、非メチル化されていなければならない。中和モチーフは、他の非刺激性モチーフ中に存在するとき、ある程度の免疫刺激能力を有するモチーフであるが、他の免疫刺激性モチーフの状況に存在するとき、他のモチーフの免疫刺激の潜在性を低減させる役目をする。

10

【0087】

Pは、GC含量が高いパリンドロームであり、少なくとも10ヌクレオチド長の配列を含有する。本明細書中、「パリンドローム」および、同等に、「パリンドローム配列」とは、逆方向反復のことであり、すなわち、ABCDEE'D'CB'A'などの配列であり、ここでAおよびA'、BおよびB'などは、通常のワトソクリック塩基対を形成することができる塩基である。

本明細書中、「GC含量が高いパリンドローム」とは、GおよびCを塩基組成物の少なくとも3分の2有するパリンドロームである。いくつかの態様において、GC含量が高いドメインは、好ましくは「B細胞刺激ドメイン」に対してへの3'である。10塩基長のGC含量が高いパリンドロームの場合、パリンドロームは、したがって少なくとも8つのGおよびCを含有する。12塩基長のGC含量が高いパリンドロームの場合、パリンドロームはまた、少なくとも8つのGおよびCを含有する。14-merのGC含量が高いパリンドロームの場合、パリンドロームの少なくとも10の塩基は、GおよびCである。いくつかの態様において、GC含量が高いパリンドロームは、GおよびCのみで構成されている。

20

【0088】

いくつかの態様において、GC含量が高いパリンドロームは、GおよびCを塩基組成物の少なくとも81%有する。かかる10塩基長のGC含量が高いパリンドロームの場合、パリンドロームは、したがってGおよびCのみで構成されている。かかる12塩基長のGC含量が高いパリンドロームの場合、パリンドロームの少なくとも10の塩基(83%)がGおよびCであることが好ましい。いくつかの好ましい態様において、12塩基長のGC含量が高いパリンドロームは、GおよびCのみで構成されている。14-merのGC含量が高いパリンドロームの場合、パリンドロームの少なくとも12の塩基(86%)は、GおよびCである。いくつかの好ましい態様において、14塩基長のGC含量が高いパリンドロームは、GおよびCのみで構成されている。GC含量が高いパリンドロームのCは、非メチル化され得るか、またはそれらはメチル化され得る。

30

【0089】

一般的にこのドメインは、少なくとも3つのCおよびGを有し、より好ましくはそれぞれ4つ、および最も好ましくは、それぞれ5または6以上である。このドメインにおけるCおよびGの数は、同一である必要はない。CおよびGは、自己相補的二重らせん、またはCCGCCGCCGなどのパリンドロームを形成することができるよう、配置列されるのが好ましい。これは、AまたはTにより中断されてもよいが、好ましい自己相補性は、少なくとも部分的に例えばモチーフCGACGTTCTCGTCG(配列番号: _____)またはCGGCCGCCGTCGCCG(配列番号: _____)として保たれる。相補性が保たれないとき、非相補的塩基対は、TGが好ましい。好ましい態様において、パリンドロームの一部ではない3つ以内の連続した塩基があり、好ましくは2つ以内、およびもっとの好ましくはたった1つである。いくつかの態様において、GC含量が高いパリンドロームは、少なくとも1つのCGG三量体、少なくとも1つのCCG三量体、または少なくとも1つのCGCCG四量体を含む。他の態様において、GC含量が高いパリンドロームは、CCCCCGGGGGGG(配列番号: _____)またはGGGGGGCCCCC(配列番号: _____)、

40

50

CCCCCGGGGG (配列番号: _____) または GGGGGCCCCC (配列番号: _____) ではない。

GC 含量が高い領域の G の少なくとも 1 つは、イノシン (I) で置換してもよい。いくつかの態様において、P は、I を 2 つ以上含む。

【0090】

ある態様において、免疫刺激性核酸は、以下の式の 1 つである：5'NX₁DCGHX₂3'、5'X₁DCGHX₂N3'、5'PX₁DCGHX₂3'、5'X₁DCGHX₂P3'、5'X₁DCGHX₂PX₃3'、5'X₁DCGHPX₃3'、5'DCGHX₂PX₃3'、5'TCGHX₂PX₃3'、5'DCGHPX₃3'、または 5'DCGHP3'。

10

【0091】

他の側面において、本発明は、式：5'N₁PyGN₂P3'により定義される免疫刺激性核酸を提供する。N₁ は、1~6ヌクレオチド長のいかなるどの配列でもよい。Py は、ピリミジンである。G は、グアニンである。N₂ は、0~30ヌクレオチド長のいかなるどの配列でもよい。P は、少なくとも 10ヌクレオチド長の配列を含有する、GC 含量が高いパリンドロームである。

N₁ および N₂ は、50%以上のピリミジンを含有してもよく、より好ましくは、50%以上の T を含有してもよい。N₁ は、CG を含有してもよく、この場合、好ましくはこの CG の直前に T がある。いくつかの態様において、N₁PyG は、TCG (5'TCGG を有する ODN 5376 など) であり、最も好ましくは、TCGN₂ であり、ここで N₂ は、G ではない。

20

【0092】

N₁PyGN₂P は、1 または 2 以上のイノシン (I) ヌクレオチドを含んでもよい。N₁ 中の C または G のいずれかは、イノシンにより置き換えられてもよいが、CpI は、IpG より好ましい。IpG などのイノシンの置換については、最適な活性は、「セミソフト」なまたはキメラ骨格の使用により達成してもよく、ここで IG 間または CI 間の連鎖は、ホスホジエステルである。N₁ は、少なくとも 1 つの CI、TCI、IG または TI Gモチーフを含んでもよい。

【0093】

ある態様において、N₁PyGN₂ は、TTTTTCG、TCG、TTCG、TTTCG、TTTTTCG、TCGT、TTCGT、TTTCGT、および TCGTCGT からなる群から選択される配列である。

30

C クラス核酸のいくつかの非限定的な例は、以下を含む：

【表 3】

配列番号	配列
17	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
18	T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
19	T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
20	T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
21	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
22	T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
23	T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
24	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G
25	T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G

40

【0094】

50

細胞への取り込みを促進させるために、C p G含有のオリゴヌクレオチドを含む免疫刺激性核酸は、好ましくは8～100塩基長の範囲である。しかしながら、8ヌクレオチドより大きいいずれのどの大きさの核酸でも(大きいkb長でさえも)、より大きな核酸は、細胞内でオリゴヌクレオチドに分解されるため、本発明によると、十分な免疫刺激性モチーフが存在する場合、本発明による免疫反応を誘導することができる。好ましくは、免疫刺激性核酸は、8～100ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの好ましい態様において、免疫刺激性核酸は、12～40ヌクレオチド長である。より好ましい態様において、免疫刺激性核酸は、8～30ヌクレオチド長である。最も好ましい態様において、免疫刺激性核酸は、8～24ヌクレオチド長である。

【0095】

「パリンドローム配列」は、逆方向反復、すなわち、A B C D E E ' D ' C ' B ' A ' などの配列を意味し、ここでAおよびA'、BおよびB'、CおよびC'、DおよびD'、およびEおよびE'は、通常のワトソンクリック塩基対を形成することができる塩基である。In vivoにおいて、かかるパリンドローム配列は、二本鎖構造を形成してもよい。一つの態様において、C p Gオリゴヌクレオチドは、パリンドローム配列を含有する。この状況において使用されるパリンドローム配列は、パリンドロームのことであり、ここでC p Gは、パリンドロームの一部であり、好ましくはパリンドロームの中心である。別の態様において、C p Gオリゴヌクレオチドは、パリンドロームを含んでいない。パリンドロームを含んでいないC p Gオリゴヌクレオチドは、C p Gジヌクレオチドがパリンドロームの一部ではないものである。かかるオリゴヌクレオチドは、パリンドロームを含んでもよく、ここでC p Gは、パリンドロームの中心ではない。

10

20

【0096】

本発明のいくつかの態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、「C p Gジヌクレオチド」である免疫刺激性モチーフを含む。C p Gジヌクレオチドは、メチル化されていてもよくまたは非メチル化されていてもよいであり得る。少なくとも1つの非メチル化C p Gジヌクレオチドを含有する免疫刺激性核酸は、非メチル化シトシン-グアニンジヌクレオチド配列(すなわち、非メチル化5'シチジンに3'グアノシンが続き、リン酸結合により連鎖している)を含有し、免疫系を活性化する核酸分子である;かかる免疫刺激性核酸は、C p G核酸である。C p G核酸は、多数の発行交付済の特許、公開済の特許出願、および他の刊行物に記載されており、米国特許6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; および6,339,068を含む。

30

【0097】

少なくとも1つのメチル化C p Gジヌクレオチドを含有する免疫刺激性核酸は、メチル化シトシン-グアニンジヌクレオチド配列(すなわち、メチル化5'シチジンに3'グアノシンが続き、リン酸結合により連鎖している)を含有し、免疫系を活性化する核酸である。他の態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、C p Gジヌクレオチドを含まない。C p Gジヌクレオチドを含まないこれらのオリゴヌクレオチドは、非C p Gオリゴヌクレオチドと呼ばれ、非C p G免疫刺激性モチーフを有する。本発明は、したがって、メチル化または非メチル化されていてもよいであり得る他の型の免疫刺激性モチーフを有する核酸を包含する。本発明の免疫刺激性オリゴヌクレオチドはさらに、メチル化および非メチル化C p Gおよび非C p G免疫刺激性モチーフのどの組み合わせも含み得る。

40

【0098】

免疫刺激性核酸分子は、キメラ骨格を有してもよい。本発明の目的のために、キメラ骨格とは、部分的に安定化した骨格のことであり、ここで少なくとも1つのインターヌクレオチド連鎖は、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様であり、ここで少なくとも1つの他のインターヌクレオチド連鎖は、安定化したインターヌクレオチド連鎖であり、ここで少なくとも1つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様連鎖および少なくとも1つの安定化した連鎖が異なる。ボラノホスホネート連鎖は、ホスホジエステル連鎖に対して安定化されていると報告されていることから、骨格のキメラ性質の目的のために、ボラノホスホネート連鎖は、状況に依存して、ホスホジエステル様としてまたは安定化として

50

分類され得る。例えば、本発明のキメラ骨格は、一つの態様において、少なくとも1つのホスホジエステル（ホスホジエステルまたはホスホジエステル様）連鎖および少なくとも1つのボラノホスホネート（安定化した）連鎖を含み得る。

【0099】

別の態様において、本発明のキメラ骨格は、ボラノホスホネート（ホスホジエステルまたはホスホジエステル様）およびチオリン酸ホスホロチオエート（安定化した）連鎖を含み得る。「安定化したインターヌクレオチド連鎖」は、ホスホジエステルインターヌクレオチド連鎖と比較して、例えば、エキソ-またはエンド-ヌクレアーゼを介した）in vivo分解に比較的耐性がある（例えば、エクソ-またはエンド-ヌクレアーゼ経路で）インターヌクレオチド連鎖を意味する。好ましい安定化したインターヌクレオチド連鎖は、限定はなく、チオリン酸ホスホロチオエート、ジチオリン酸ホスホロジチオエート、ホスホン酸メチルホスホネート、およびチオリン酸メチルホスホロチオエートメチルを含む。他の安定化したインターヌクレオチド連鎖は、限定はなく：ペプチド、アルキル、デホスホ（dephospho）、および上記の他のものを含む。

10

【0100】

チオリン酸ホスホロチオエートなどの修飾された骨格を、ホスホルアミドまたはH-ホスホネートの化学反応を使った自動化技術を使用して合成してもよい。アリアルおよびアルキル-ホスホネートは、例えば、米国特許4,469,863に記載されているように作ることができ；およびアルキルホスホトリエステル（ここで、荷電酸素部分を米国特許5,023,243および欧州特許092,574に記載のようにアルキル化する）を、自動化固体相合成により、市販の試薬を使用して調製することができる。他のDNA骨格修飾物および置換物を作る方法が、記載されている。Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90: 544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165. キメラオリゴヌクレオチドを調製する方法もまた、既知である。例えば、Uhlmannらに交付された特許に、かかる技術を記載している。

20

【0101】

混合骨格修飾されたODNを、市販のDNAシンセサイザーおよび標準のホスホロアミダイト化学反応を使用して合成してもよい。（F. E. Eckstein, "Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach" IRL Press, Oxford, UK 1991およびM. D. Matteucci and M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21, 719 (1980)）。カップリング連鎖後、PS連鎖を、Beaucage試薬（R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan and S. L. Beaucage, J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990)）（アセトニトリル中0.075M）またはフェニルアセチルジスルフィド（PADS）を使用して硫化により導入し、無水酢酸、テトラヒドロフラン（1:1:8；v:v:v）中2,6-ルチジンおよびN-メチルイミダゾール（テトラヒドロフラン中16%）によるカップリングが続く。このカップリングステップを、硫化反応後に行い、チオリン酸ホスホロチオエート連鎖が存在位置すべき位置での望ましくないホスホジエステル（PO）連鎖の形成を最小限に抑える。例えば、CpGジヌクレオチドでの、ホスホジエステル連鎖の導入の場合、中間リン-IIIを、水/ピリジン中のヨウ素溶液を用いた処置により酸化する。

30

【0102】

固体支持体からの開裂および濃アンモニアを用いた処置（50で15時間）による最終的な脱保護の後、ODNを、NaCl勾配（例、緩衝液A：アセトニトリル/水=1:4/v:v中10mMのNaH₂PO₄/水=1:4/v:v pH6.8；緩衝液B：10mMのNaH₂PO₄、アセトニトリル/水=1:4/v:v中1.5MのNaCl/水=1:4/v:v；5~60%のB 1ml/分で30分）を使用してGen-Pak Faxカラム（Millipore-Waters）上でHPLCによりまたはキャピラリーゲル電気泳動により分析する。ODNを、Source High Performanceカラム（Amersham Pharmacia）上でHPLCによりまたはFPLCにより精製することができる。HPLCのと同質一の分画を組み合わせ、C18カラム経路でまたは限外ろ過により組み合わせ、脱塩する。ODNを、計算した質量を確認するために、MALDI-TOF質量分析により分析した。

40

【0103】

50

本発明の核酸はまた、他の修飾を含むことができる。これらは、アルキル - およびアール - ホスフェート（ここで、荷電しているホスホネートの酸素を、アルキルまたはアール基により置き換える）、ホスホジエステルおよびアルキルホスホトリエステル、ここで荷電酸素部分がアルキル化されている、などの、非イオン性のDNA類似体を含む。いずれかまたは両方の末端にテトラエチレングリコールまたはヘキサエチレングリコールなどのジオールを含む核酸もまた、実質的にヌクレアーゼ分解に耐性があることを示されている。

【0104】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ソフトまたはセミソフトなオリゴヌクレオチドであってよい。ソフトなオリゴヌクレオチドは、部分的に安定化した骨格を有する免疫刺激性オリゴヌクレオチドであり、ここでホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、少なくとも1つの内部(internal)ピリミジン - プリンジヌクレオチド(YZ)内でのみおよびそれに直接隣接してのみ生じる。好ましくは、YZは、YGであり、ピリミジン - グアノシン(YG)ジヌクレオチドである。少なくとも1つの内部YZジヌクレオチド自体は、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖を有する。少なくとも1つの内部YZジヌクレオチドに直接隣接して生じるホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、少なくとも1つの内部YZジヌクレオチドに対してへの5'、3'、または5'および3'の両方であることができる。

【0105】

特に、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、「内部ジヌクレオチド」を伴う。内部ジヌクレオチドは一般的に、インターヌクレオチド連鎖により結合した隣接したヌクレオチドのどの対を意味してもよく、ここでヌクレオチド対のいずれのヌクレオチドも、末端ヌクレオチドではなく、すなわち、ヌクレオチド対のいずれのヌクレオチドも、オリゴヌクレオチドの5'または3'末端を定義すづけるヌクレオチドではない。

【0106】

したがって、nヌクレオチド長である直鎖状オリゴヌクレオチドは、合計n-1のジヌクレオチドおよびたったn-3の内部ジヌクレオチドを有する。内部ジヌクレオチド中の各インターヌクレオチド連鎖は、内部インターヌクレオチド連鎖である。したがって、nヌクレオチド長である直鎖状オリゴヌクレオチドは、合計n-1のインターヌクレオチド連鎖およびたったn-3の内部インターヌクレオチド連鎖を有する。戦略的に配位置したホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、したがって、核酸配列におけるヌクレオチドの全てのどの対の間に位置してもよいホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖をいうのである。いくつかの態様において、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、5'または3'末端に一番近いヌクレオチド対のいずれかの間に位置しない。

【0107】

好ましくは、少なくとも1つの内部YZジヌクレオチドに直接隣接して生じるホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、それ自体内部インターヌクレオチド連鎖である。したがって、配列 N_1 YZ N_2 について、ここで N_1 および N_2 はそれぞれ、他から独立して、単一のヌクレオチドのいずれでもあり、YZジヌクレオチドは、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖を有し、および加えて(a) N_1 およびYは、 N_1 が内部ヌクレオチドのとき、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖により連鎖し、(b)Zおよび N_2 は、 N_2 が内部ヌクレオチドのとき、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖により連鎖し、または(c) N_1 およびYは、 N_1 が内部ヌクレオチドのとき、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖により連鎖し、そしてZおよび N_2 は、 N_2 が内部ヌクレオチドのとき、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖により連鎖する。

【0108】

本発明のソフトなオリゴヌクレオチドは、完全に安定化したオリゴヌクレオチドと比較して、ヌクレアーゼの開裂に比較的感受性があると信じられている。特定の理論またはメカニズム機構に結びつく意味はなく、本発明のソフトなオリゴヌクレオチドは、ソフトな全長オリゴヌクレオチドに対して免疫刺激活性が低いまたは無いフラグメントに開裂可能であると信じられている。特にオリゴヌクレオチドの中央付近への、少なくとも1つのヌクレアーゼ感受性のインターヌクレオチド連鎖の取り込みは、オリゴヌクレオチドの薬物動態を変える「オフスイッチ」を提供し、オリゴヌクレオチド最大免疫刺激活性の継続期間を低減させると信じられている。これは、慢性の局所の炎症または免疫刺激、例えば、腎臓に関する障害を回避するのが望ましい組織および臨床用途における組織において特別な価値があるり、ここで、慢性の局所の炎症または免疫刺激、例えば、腎臓に関する障害を回避するのが望ましい。

10

【0109】

セミソフトなオリゴヌクレオチドは、部分的に安定化した骨格を有する免疫刺激性オリゴヌクレオチドであり、ここで、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、少なくとも1つの内部ピリミジン-プリン(YZ)ジヌクレオチド内でのみ生じる。セミソフトなオリゴヌクレオチドは一般的に、対応する完全に安定化した免疫刺激性オリゴヌクレオチドと比べてに関する増大した免疫刺激効力を有する。セミソフトなオリゴヌクレオチドのより大きい効力のため、セミソフトなオリゴヌクレオチドは、ある場合には、より低い効果的な濃度で使用してもよく、所望の生物学的効果を達成するのに、従来完全に安定化した免疫刺激性オリゴヌクレオチドよりもより低い有効な用量を有する。

20

【0110】

セミソフトなオリゴヌクレオチドの前述の特性は一般的に、内部YZジヌクレオチドを伴うホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖の「用量」の増加に伴って増加すると信じられている。したがって、例えば、一般的に、5つの内部YZジヌクレオチドを有するあるオリゴヌクレオチド配列について、5つの内部ホスホジエステルまたはホスホジエステル様YZインターヌクレオチド連鎖を有するオリゴヌクレオチドは、4つの内部ホスホジエステルまたはホスホジエステル様YGインターヌクレオチド連鎖を有するオリゴヌクレオチドよりも免疫刺激性があり、同様に、3つの内部ホスホジエステルまたはホスホジエステル様YZインターヌクレオチド連鎖を有するオリゴヌクレオチドよりも免疫刺激性があり、同様に、2つの内部ホスホジエステルまたはホスホジエステル様YZインターヌクレオチド連鎖を有するオリゴヌクレオチドよりも免疫刺激性があり、同様に、1つの内部ホスホジエステルまたはホスホジエステル様YZインターヌクレオチド連鎖を有するオリゴヌクレオチドよりも免疫刺激性があると信じられている。重要なことに、1つの内部ホスホジエステルまたはホスホジエステル様YZインターヌクレオチド連鎖の含有でさえも、内部ホスホジエステルまたはホスホジエステル様YZインターヌクレオチド連鎖が無いより有利であると信じられている。ホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖の数に加えて、核酸全長での位置もまた、効力に影響を与え得る。

30

40

【0111】

ソフトおよびセミソフトなオリゴヌクレオチドは一般的に、好ましい内部位置におけるホスホジエステルまたはホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖に加えて、分解に耐性がある5'および3'末端を含むだろう。かかる分解耐性末端は、対応する非修飾末端にわたるエキソヌクレアーゼの消化に対する増大した耐性をもたらすの結果になる全てのどんな好適な修飾をも含み伴い得る。例えば、5'および3'末端は、骨格の少なくとも1つのリン酸修飾の含有により安定化され得る。好ましい態様において、各末端での骨格のは少なくとも1つのリン酸修飾は、独立してチオリン酸ホスホロチオエート、ジチオリン酸ホスホロジチオエート、ホスホン酸メチルホスホネート、またはチオリン酸メチルホスホロチオエートメチルインターヌクレオチド連鎖である。別の態様において、分解

50

耐性末端は、3'末端でペプチドまたはアミド連鎖により結合接続した1または2以上のヌクレオチド単位を含む。

【0112】

ホスホジエステルインターヌクレオチド連鎖は、自然界で見出された核酸の特徴を示す連鎖の型である。ホスホジエステルインターヌクレオチド連鎖は、2つの架橋酸素原子により隣接し、およびまた、一方は荷電のおよび他方は非荷電の、2つの追加の酸素原子により結合したリン原子を含む。ホスホジエステルインターヌクレオチド連鎖は、オリゴヌクレオチドの組織半減期を低減させることがのに重要であるとき、特に好ましい。

【0113】

ホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、化学的におよび/またはジアステレオマー的に(diastereomerically)ホスホジエステルに似ているリン含有の架橋基の部分である。ホスホジエステルへの類似性の測定は、ヌクレアーゼの消化への感受性およびRNAse Hを活性化する能力を含む。したがって例えば、ホスホジエステルであるが、チオリン酸ホスホロチオエートではない、オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼの消化に感受性がある一方、ホスホジエステルおよびチオリン酸ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの両方は、RNAse Hを活性化する。好ましい態様において、ホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、ボラノホスフェート(または同等に、ボラノホスホネート)連鎖である。米国特許5,177,198; 米国特許5,859,231; 米国特許6,160,109; 米国特許6,207,819; Sergueev et al., (1998) J Am Chem Soc 120:9417-27。別の好ましい態様において、ホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖は、ジアステレオマー的に純粋なR_pチオリン酸ホスホロチオエートである。ジアステレオマー的に純粋なR_pチオリン酸ホスホロチオエートは、ヌクレアーゼの消化に対してより感受性であり、RNAse Hの活性化において、混合またはジアステレオマー的に純粋なS_pチオリン酸ホスホロチオエートよりも良好であると信じられている。CpGオリゴヌクレオチドの立体異性体は、同時係属の1999年7月27日出願の米国特許出願09/361,575、および公開済のPCT出願PCT/US99/17100(WO 00/06588)の主題対象である。本発明の目的のためには、用語「ホスホジエステル様インターヌクレオチド連鎖」は、特異的にジチオリン酸ホスホロチオエートおよびホスホン酸メチルホスホネートインターヌクレオチド連鎖を除くことに注意すべきである。

【0114】

上述のように、本発明のソフトおよびセミソフトなオリゴヌクレオチドは、CおよびGの間にホスホジエステル様連鎖を有してもよい。ホスホジエステル様連鎖の一例は、R_p構造におけるチオリン酸ホスホロチオエート連鎖である。オリゴヌクレオチドのp-キラリティーは、活性を測定する時点に依存して、CpGオリゴヌクレオチドの免疫活性に明らかに反対の効果をもたせることができる。40分の早い時点で、チオリン酸ホスホロチオエートCpGオリゴヌクレオチドのR_pではあるがS_pではない立体異性体は、マウス脾臓細胞におけるJNKのリン酸化を誘導する。対照的に、44時間の遅い時点で検定アッセイしたときには、S_pではあるがR_pではない立体異性体は、脾臓細胞の増殖のを刺激するのにおいて活性である。R_pおよびS_p立体異性体の速度論および生物活性におけるこの違いは、細胞の取り込みにおけるこの違いからの結果に由来してもないが、むしろp-キラリティーの2つの対立する生物学的役割によるものである可能性が最も高い。第一に、早い時点での免疫細胞を刺激することに関してはついて、S_pと比較したR_pの立体異性体の向上した活性は、S_pと比較して、CpG受容体である、TLR9との相互作用、または下流情報伝達経路の誘導において、より有効であってもよいことを示す。他方では、S_pと比較したて、R_pPS-オリゴヌクレオチドのより速い分解は、情報伝達のより短い継続期間をもたらすため、S_pPS-オリゴヌクレオチドが、遅い時点で試験したとき、生物学的により活性であるようである。らしいように情報伝達のより短い継続期間をもたらす。

【0115】

驚くべき強力な効果は、CpGジヌクレオチド自体においてp-キラリティーにより達

10

20

30

40

50

成される。立体ランダム (stereo-random) な C p G オリゴヌクレオチドと比較して、単一の C p G ジヌクレオチドが R_p において連鎖した同族体は、わずかにより活性であった一方、S_p 連鎖含有の同族体は、脾臓細胞の増殖の誘導についてほぼ不活性であった。

【0116】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドの大きさ (すなわち、核酸の全長でのヌクレオチド残基の数) もまた、オリゴヌクレオチドの刺激性活性に貢献してもよい。細胞への取り込みを促進させるために、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは好ましくは、最短6ヌクレオチド残基を有する。6ヌクレオチドよりも大きいなどの大きさの核酸でも (大きいkb長でさえも)、より大きな核酸は、細胞内で分解されるため、十分な免疫刺激性モチーフが存在する場合、本発明によると、免疫反応を誘導することができる。本発明者らは、4ヌクレオチドくらい短いセミソフトなオリゴヌクレオチドもまた、細胞の内部に送達され得る場合、免疫刺激性であり得ると信じている。本発明によるある好ましい態様において、本発明によると、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、4~100ヌクレオチド長である。典型的な態様において、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、6~40ヌクレオチド長である。ある好ましい態様において、本発明によると、免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、6~19ヌクレオチド長である。

10

【0117】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドは一般的に、4~100、いくつかの態様において、10~40の範囲の長さを有する。長さは、16~24ヌクレオチドの範囲であってもよい。

20

【0118】

用語「核酸」および「オリゴヌクレオチド」もまた、塩基および/または糖類などにおいて置換または修飾を有する核酸またはオリゴヌクレオチドを包含する。例えば、これらは、2'位のヒドロキシル基以外のおよび5'位のリン酸基またはヒドロキシ基以外の低分子量の有機基に共有結合した骨格糖類を有する核酸を含む。したがって修飾核酸は、2'-O-アルキル化リボース基を含んでもよい。加えて、修飾核酸は、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などの糖類を含んでもよい。したがって、核酸は、骨格組成物において異質 (heterogeneous) ヘテロ遺伝子であってもよく、それにより、(核酸塩基と共にアミノ酸骨格を有する) ペプチド核酸などと一緒に連鎖したポリマー単位のどの可能な組み合わせでも含有する。

30

【0119】

核酸もまた、C-5プロピン、ピリミジンおよび7-デアザ-7-置換プリン修飾された塩基などの置換プリンおよびピリミジンを含む。Wagner RW et al. (1996) Nat Biotechnol 14: 840-4。プリンおよびピリミジンは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシシトシン、5-フルオロシトシン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、および他の天然および非天然由来の核酸塩基、置換および非置換の芳香族部分を含むが、それらに限定されない。他のかかる修飾は、当業者に周知である。

【0120】

本発明の免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、天然RNAおよびDNAと比較して、様々な化学修飾および置換を包含することができ、ホスホジエステルインターヌクレオチド架橋、D-リボース単位および/または天然ヌクレオチド塩基 (アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル) を含む伴う。化学修飾の例は、当業者に既知であり、例えば、Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90: 543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST et al. (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 107-129; およびHunziker J et al. (1995) Mod Synth Methods 7: 331-417に記載がある。本発明によるオリゴヌクレオチドは、本発明によると、1または2以上の修飾を有してもよく、ここで各修飾は、天然DNAまたはRNAからなる同じ配列のオリゴヌクレオチドと比較して、特定のホスホジエステルインターヌクレオチド架橋お

40

50

よび/または特定の - D - リボース単位および/または特定の天然ヌクレオチド塩基位置に位置する。

【0121】

例えば、本発明は、1または2以上の修飾を含むオリゴヌクレオチドに関し、ここで各修飾は、独立して：

- a) 修飾されたインターヌクレオチド架橋によりヌクレオチドの3'および/または5'末端に位置するホスホジエステルインターヌクレオチド架橋の置換、
 - b) デホスホ架橋によるヌクレオチドの3'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置換、
 - c) 別の単位による糖リン酸骨格からの糖リン酸単位の置換、
 - d) 修飾された糖単位による P - D - リボース単位の置換、および
 - e) 修飾されたヌクレオチド塩基による天然ヌクレオチド塩基の置換、
- から選択される。

10

オリゴヌクレオチドの化学修飾についてのより詳細な例は、以下の通りである。

【0122】

ヌクレオチドの3'および/または5'末端に位置するホスホジエステルインターヌクレオチド架橋を、修飾されたインターヌクレオチド架橋により置き換えることができ、ここで、修飾されたインターヌクレオチド架橋は、例えばチオリン酸ホスホロチオエート、ジチオリン酸ホスホロジチオエート、NR¹R²-ホスホルアミデートド、ボラノホスフェート、-ヒドロキシベンジルホスホネート、ホスフェート-(C₁-C₂₁)-O-アルキルエステル、ホスフェート-[(C₆-C₁₂)アリール(C₁-C₂₁)-O-アルキル]エステル、(C₁-C₈)アルキルホスホネートおよび/または(C₆-C₁₂)アリールホスホネート架橋、(C₇-C₁₂)-ヒドロキシメチル-アリール(例、W095/01363に開示)から選択され、ここで、(C₆-C₁₂)アリール、(C₆-C₂₀)アリールおよび(C₆-C₁₄)アリールは、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、ニトロ、シアノにより随意に置換され、およびここでR¹およびR²は、互いに独立して、水素、(C₁-C₁₈)-アルキル、(C₆-C₂₀)-アリール、(C₆-C₁₄)-アリール(C₁-C₈)-アルキル、好ましくは水素、(C₁-C₈)-アルキル、好ましくは(C₁-C₄)-アルキルおよび/またはメトキシエチルであり、あるいはR¹およびR²は、それらを有する窒素原子と共に、群O、SおよびNからのさらなるヘテロ原子を更に含み得る5~6員の複素環を形成する。

20

30

【0123】

デホスホ架橋によるヌクレオチドの3'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置換(デホスホ架橋は、例えばUhlmann E and Peyman A in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotide and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp. 355 ffに記載がある)、ここで、デホスホ架橋は、例えばデホスホ架橋ホルムアセタール、3'-チオホルムアセタール、メチルヒドロキシルアミン、オキシム、メチレンジメチル-ヒドラゾ、ジメチレンスルホンおよび/またはシリル基から選択される。

【0124】

糖リン酸骨格からの糖リン酸単位(すなわち、一緒に糖リン酸単位を形成する-D-リボースおよびホスホジエステルインターヌクレオチド架橋)(すなわち、糖リン酸骨格は、糖リン酸単位からなる)は、別の単位により置き換えることができ、ここで他の単位は、例えば「モルホリノ誘導体」オリゴマー(例えば、Stirchak EP et al. (1989) Nucleic Acids Res 17: 6129-41に記載のように)、つまり、例えば、モルホリノ誘導体単位による置換を作る;またはポリアミド核酸(「PNA」;例えば、Nielsen PE et al. (1994) Bioconjug Chem 5: 3-7に記載のように)、つまり、例えば、PNA骨格単位による、例えば、2-アミノエチルグリシンによる置換を作るのに好適である。

40

【0125】

-リボース単位または-D-2'-デオキシリボース単位は、修飾された糖単位に

50

より置き換えることができ、ここで、修飾された糖単位は、例えば - D - リボース、
 - 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 - (C₁ - C₆) アルキル - リボース、
 好ましくは 2' - O - (C₁ - C₆) アルキル - リボースは、2' - O - メチルリボース
 、2' - O - (C₂ - C₆) アルケニル - リボース、2' - [O - (C₁ - C₆) アルキ
 ル - O - (C₁ - C₆) アルキル] - リボース、2' - NH₂ - 2' - デオキシリボース
 、 - D - キシロ - フラノース、 - アラビノフラノース、2,、4 - ジデオキシ - -
 D - エリストロ - ヘキソ - ピラノース、ならびに炭素環 (例えば、Froehler J (1992) Am
 Chem Soc 114: 8320に記載) および / または開鎖糖類似体 (例えば、Vandendriessche e
 t al. (1993) Tetrahedron 49: 7223に記載) および / または二環糖類似体 (例えば、Tar
 kov M et al. (1993) Helv Chim Acta 76: 481に記載) から選択される。 10

【0126】

いくつかの好ましい態様において、糖は、特にホスホジエステルまたはホスホジエス
 テル様インターヌクレオチド連鎖により連鎖した一方または両方のヌクレオチドについて、
 2' - O - メチルリボースである。

【0127】

核酸もまた、C - 5 プロピン、ピリミジンおよび 7 - デアザ - 7 - 置換プリン修飾され
 た塩基などの置換プリンおよびピリミジンを含む。Wagner RW et al. (1996) Nat Biotech
 nol 14: 840-4。プリンおよびピリミジンは、アデニン、シトシン、グアニン、およびチ
 ミン、ならびに他の天然および非天然由来の核酸塩基、置換および非置換の芳香族部分
 を含むが、それらに限定されない。 20

【0128】

修飾された塩基は、T、C、G、A、およびUなどのDNAおよびRNAにおいて典型
 的に見出される天然由来の塩基からは化学的に相異なるが、これらの天然由来の塩基と
 基本的な化学構造を共有するどんな塩基でもよい。修飾されたヌクレオチド塩基は、例
 えば、ヒポキサンチン、ウラシル、ジヒドロウラシル、プソイド (pseudo) 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 - (C₁ - C₆) - アルキ
 ルウラシル、5 - (C₂ - C₆) - アルケニルウラシル、5 - (C₂ - C₆) - 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 - (C₁ - C₆) - アルキ
 ルシトシン、5 - (C₂ - C₆) - アルケニルシトシン、5 - (C₂ - C₆) - 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、N² -
 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 7 - デアザプリン
 、好ましくは 7 - デアザ - 7 - 置換および / 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チド、C₅ - プロピニルピリミジン
 、ならびに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
 たは天然ヌクレオチド塩基の他の修飾物から選択されてもよい。このリストは、例示典型
 的なものであり、限定と解釈されない。 30

【0129】

本明細書中に記載の特定の式中の、一連組の修飾された塩基を定義する。例えば文字 Y
 は、シトシンまたは修飾されたシトシン含有のヌクレオチドの意味で使用される。修飾さ
 れたシトシンとは、本明細書中、この塩基をオリゴヌクレオチドの免疫刺激活性を低下さ
 せることなく置き換えることができる、シトシンの天然由来のまたは非天然由来のピリミ
 ジン塩基類似体である。 40

【0130】

修飾されたシトシンは、5 - 置換シトシン (例、5 - メチル - シトシン、5 - フルオロ 50

- シトシン、5 - クロロ - シトシン、5 - ブロモ - 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、および非置換または置換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、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体(例、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、5 - フルオロ - ウラシル、5 - ブロモ - ウラシル、5 - ブロモビニル - 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)を含むが、それらに限定されない。いくつかの好ましいシトシンは、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 - シトシンを含む。本発明の別の態様において、シトシン塩基は、ユニバーサル塩基(例、3 - ニトロピロール、P - 塩基)、芳香族環系(例、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 S p a c e r)により置換される。

10

【0131】

文字Zは、グアニンまたは修飾されたグアニン塩基の意味で使用される。修飾されたグアニンは、本明細書中、この塩基オリゴヌクレオチドの免疫刺激活性を低下させることなくこの塩基を置き換えることができる、グアニンの天然由来のまたは非天然由来のプリン塩基類似体である。修飾されたグアニンは、7 - デアザグアニン、7 - デアザ - 7 - 置換グアニン(7 - デアザ - 7 - (C2 - C6)アルキニルグアニンなど)、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、N2 - メチル - グアニン)、5 - アミノ - 3 - メチル - 3H, 6H - チアゾロ[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(例、N6 - メチル - アデニン、8 - オキソ - アデニン)、8 - 置換グアニン(例、8 - ヒドロキシグアニンおよび8 - ブロモグアニン)、および6 - チオグアニンを含むが、それらに限定されない。本発明の別の態様において、グアニン塩基は、ユニバーサル塩基(例、4 - メチル - インドール、5 - ニトロ - インドール、およびK - 塩基)、芳香族環系(例、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 - カルボンキシル酸アミド)または水素原子(d S p a c e r)により置換される。

20

30

【0132】

オリゴヌクレオチドは、1または2以上のアクセス可能な5'末端を有してもよい。2つのかかる5'末端を有する修飾されたオリゴヌクレオチドを作り出すことが可能である。これを、例えば、1つまたは2つのアクセス可能な5'末端を有するオリゴヌクレオチドを作製す発生させるために、3'3'連鎖を介してを通じて2つのオリゴヌクレオチドを結合接触させることにより達成してもよい。3'3'連鎖は、ホスホジエステル、チオリン酸ホスホ口チオエートまたは他の修飾されたインターヌクレオチド架橋でもよい。かかる連鎖を成し遂げる方法は、当業者に既知である。例えば、かかる連鎖は、Seliger, H.; et al., Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotide linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleotides & Nucleotides* (1991), 10 (1-3), 469-77およびJiang, et al., Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7 (12), 2727-2735に記載されている。

40

【0133】

加えて、3'末端ヌクレオチド間の連鎖が、ホスホジエステル、チオリン酸ホスホ口チオエートまたは他の修飾された架橋ではない、3'3'連鎖核酸はを、トリ - またはテトラ - エチレングリコールホスフェートリン酸部分などの追加のスペーサーを使用して調製することができる(Durand, M. et al, Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA) 12 and two (dT) 12 sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31 (38), 9197-204、米国特許5658738、および米

50

国特許5668265)。あるいは、非ヌクレオチドリinkerは、エタンジオール、プロパンジオールが、または標準のホスホロアミダイト化学反応を使用して、脱塩基(abasic)デオキシリボース(dSpacer)単位に由来であってもよい(Fontanel, Marie Laurence et al., Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; Nucleic Acids Research (1994), 22 (11), 2022-7)。非ヌクレオチドリinkerを、1回または複数回組み込むことができるか、あるいは互いに結合することができ、連鎖されるべきする2つのODNの3'末端間のどの所望の距離も可能にする。

【0134】

本発明における使用のために、本発明のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で周知の多数の手順を使用して、新たに合成することができる。例、b-シアノエチルホスホロアミダイト法(Beaucage, S. L., and Caruthers, M. H., Tet. Let. 22: 1859,1981);ヌクレオチドH-ホスホネート法(Garegg et al., Tet. Let. 27: 4051-4054,1986; Froehler et al, Nucl. Acid. Res. 14: 5399-5407, 1986,; Garegg et al, Tet. Let. 27: 4055-4058, 1986, Gaffney et al., Tet. Let. 29: 2619-2622, 1988)。これらの化学反応を、市場に流通している様々な自動化核酸シンセサイザーにより、行なうことができる。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いう。単離したオリゴヌクレオチドとは、は一般的に、自然界で通常関連する成分から分離されたオリゴヌクレオチドをいうである。一例として、単離したオリゴヌクレオチドは、細胞から、細胞核から、ミトコンドリアからまたはクロマチンから分離したものであってもよい。

【0135】

オリゴヌクレオチドは、部分的に分解に耐性がある(例えば、安定化している)。「安定化したオリゴヌクレオチド分子」は、(例えば、エキソ-またはエンド-ヌクレアーゼを介した)in vivo分解に(例えば、エクソ-またはエンド-ヌクレアーゼ経由で)比較的耐性があるオリゴヌクレオチドを意味する。核酸の安定化は、骨格修飾により経由で成し遂げることができる。チオリン酸ホスホロチオエート連鎖を有するオリゴヌクレオチドは、最大活性を提供し、細胞内エキソ-およびエンド-ヌクレアーゼによる分解からオリゴヌクレオチドを保護する。他の修飾されたオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル修飾核酸、ホスホジエステルおよびチオリン酸ホスホロチオエート核酸の組み合わせ、ホスホン酸メチルホスホネート、チオリン酸メチルホスホロチオエートメチル、ジチオリン酸ホスホロジチオエート、p-エトキシ、およびこれらの組み合わせを含む。

【0136】

チオリン酸ホスホロチオエートなどの修飾された骨格は、ホスホルアミドまたはH-ホスホネートの化学反応を使った自動化技術を使用して合成してもよい。アリールおよびアルキル-ホスホネートは、例えば、米国特許4,469,863に記載したように作ることができ;アルキルホスホトリエステル(ここで、荷電酸素部分は、米国特許5,023,243および欧州特許092,574に記載したようにアルキル化されている)は、市販の試薬を使用して自動化固体相合成により調製することができる。他のDNA骨格修飾および置換を作る方法は、記載がある(例、Uhlmann, E. and Peyman, A., Chem. Rev. 90: 544,1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1: 165,1990)。

【0137】

他の安定化したオリゴヌクレオチドは、以下のものを含む:アルキル-およびアリール-ホスフェート(ここで、荷電ホスホネート酸素(phosphonate oxygen)は、アルキルまたはアリール基により置き換えられる)などの非イオン性のDNA類似体、ホスホジエステルおよびアルキルホスホトリエステル、ここで、荷電酸素部分は、アルキル化されている。末端の一方または両方にテトラエチレングリコールまたはヘキサエチレングリコールなどのジオールを含む核酸はまた、末端の一方または両方で、実質的にヌクレアーゼ分解に耐性があることを示している。

【0138】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドもまた、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体部分の

10

20

30

40

50

間で1または2以上の通常と異なる異常な連鎖を含有してもよい。通常のインターヌクレオシド連鎖は、3'5'連鎖である。他の全ての連鎖は、2'5'、5'5'、3'3'、2'2'、2'3'連鎖などの通常と異なる異常なインターヌクレオシド連鎖と見なす。それにより、2'から5'の命名法は、リボースの炭素原子に従って選択される。しかしながら、環拡大糖類似体(例、ヘキサノース(hexanose)、シクロヘキセンまたはピラノース)または二-または三環式糖類似体などの非天然糖部分を使う場合、この命名法は、単量体の命名法に従って変わる。3'-デオキシ-D-リボピラノース類似体(p-DNAとも呼ばれる)において、モノヌクレオチドは、例えば4'2'連鎖経路で結合接続する。

【0139】

ヌクレオチドが、1つの3'3'連鎖を含む場合、このオリゴヌクレオチド類似体は、非連鎖の5'末端を有するだろう。同様に、ヌクレオチドが、1つの5'5'連鎖を有する場合、このオリゴヌクレオチド類似体は、2つの非連鎖の3'末端を有するだろう。ヌクレオチドの非連鎖の末端のアクセス可能性は、それらの受容体によって、よりアクセス可能であってもよい。通常と異なる異常な連鎖(3'3'および5'5')の両方の型については、Ramalho Ortigaoら(Antisense Research and Development (1992) 2, 129-46)による記載があり、これにより、3'3'連鎖を有するオリゴヌクレオチドが、ヌクレアーゼによる開裂に対する向上した安定性を示すことが報告された。

【0140】

連鎖の異なる型もまた、1つの分子内で結合することができ、オリゴマーの分枝化へと至らしめる。オリゴヌクレオチドの一部が、3'末端で3'3'連鎖を介して経路で第二のオリゴヌクレオチド部分におよび2'末端で2'3'連鎖を介して経路で分子の第三の部分に結合した場合、これは、3つの5'末端(3'3'、2'3'分枝)を有する分枝状オリゴヌクレオチドをもたらす。

【0141】

原則として、オリゴヌクレオチドの異なる部分の間または異なるオリゴヌクレオチドの間の連鎖はそれぞれ、その受容体による認識に負の干渉緩衝をしない限りは、分子の全部を介して経路で生じ得る。核酸の性質に従って、連鎖は糖部分(Su)、複素環核酸塩基(Ba)またはリン酸骨格(Ph)を伴うことができる。したがって、Su-Su、Su-Ph、Su-Ba、Ba-Ba、Ba-Su、Ba-Ph、Ph-Ph、Ph-Su、およびPh-Ba型の連鎖が可能である。オリゴヌクレオチドが、ある非ヌクレオチド置換基によりさらに修飾される場合、連鎖もまた、オリゴヌクレオチドの修飾された部分を介して経路で生じ得る。これらの修飾もまた、修飾核酸、例えば、PNA、LNA、またはモルホリノオリゴヌクレオチド類似体を含む。

【0142】

連鎖は、好ましくはC、H、N、O、S、B、P、およびハロゲンからなり、3~300原子を含む。3原子の一例は、アセタール連鎖(ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2; Froehler and Matteucci)であり、例えば、1つのヌクレオチドの3'-ヒドロキシ基を第二のオリゴヌクレオチドの3'-ヒドロキシ基に結合する。約300原子の一例は、PEG-40(テトラコンタポリエチレングリコール)である。好ましい連鎖は、ホスホジエステル、チオリン酸ホスホロチオエート、ホスホン酸メチルホスホネート、ホスホルアミデート、ポラノホスホネートン酸、アミド、エーテル、チオエーテル、アセタール、チオアセタール、ウレア、チオウレア、スルホンアミド、シッフ塩基およびジスルフィド連鎖である。別の可能性は、Solulink BioConjugation System(www.trilinkbiotech.com)の使用である。

【0143】

オリゴヌクレオチドが、2または3以上の配列部分からなる場合、これらの部分は、同一または異なり得る。したがって、3'3'連鎖を有するオリゴヌクレオチドにおいて、配列は、同一の5'-ODN1-3'3'-ODN1-5'または異なる5'-ODN1-3'3'-ODN2-5'であり得る。さらに、様々なオリゴヌクレオチド部分ならば

10

20

30

40

50

にそれらに結合するリンカーの化学修飾は、異なってもよい。短いオリゴヌクレオチドの取り込みが、長いオリゴヌクレオチドより非効率的なようであるため、2または3以上の短い配列の連鎖は、免疫刺激の改善をもたらす。短いオリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは2~20ヌクレオチド、より好ましくは3~16ヌクレオチドだが、最も好ましくは5~10ヌクレオチドである。好ましくは、2または3以上の非連鎖の5'末端を有する連鎖オリゴヌクレオチドである。

【0144】

オリゴヌクレオチドの部分配列もまた、非ヌクレオチドリナー、特に脱塩基リンカー (d Spacers)、トリエチレングリコール単位またはヘキサエチレングリコール単位により連鎖してもよい。さらに好ましいリンカーは、C3、C6、C12のアミノリンカーなどのアルキルアミノリンカー、およびまたC3またはC6のチオールリンカーなどのアルキルチオールリンカーである。オリゴヌクレオチドもまた、さらにアルキルまたは置換アルキル基により置換してもよい芳香族残基によって、連鎖することができる。オリゴヌクレオチドもまた、ダブラー (Doublar) またはトレブラー (Trebler) 単位 (www.glenres.com)、特に3'3'連鎖を有するオリゴヌクレオチドを含んでもよい。複数のダブラー、トレブラー、または他の乗数単位によるオリゴヌクレオチドの分枝化は、本発明のさらなる態様である dendrimer へと至らしめる。オリゴヌクレオチドもまた、ペプチド修飾試薬またはオリゴヌクレオチド修飾試薬 (www.glenres.com) に由来起因するリンカー単位を含んでもよい。さらに、ペプチド (アミド) 連鎖により結合接続する1または2以上の天然または非天然アミノ酸残基を含んでもよい。

10

20

【0145】

オリゴヌクレオチドを連鎖する別の可能性は、複素環塩基の架橋を介するもの經由である (Verma and Eckstein; Annu. Rev. Biochem. (1998) 67: 99-134; 124頁)。さらに別の可能性は、1つの配列部分の糖部分と別の配列部分の複素環塩基との間の連鎖である (Iyer et al. Curr. Opin. Mol. Therapeutics (1999) 1: 344-358; 352頁)。

【0146】

異なるオリゴヌクレオチドは、確立された方法により合成され、固体相合成中オンラインで一緒に連鎖することができる。あるいは、それらを、個々の部分配列の合成後、一緒に連鎖してもよい。

【0147】

「対象」とは、ヒトまたは脊椎動物を意味し、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、非ヒトの霊長類 (例、サル)、魚 (養殖種、例えば、サケ)、ウサギ、ラット、およびマウスを含むがこれらに限定されない。

30

【0148】

「ウイルス感染を有する対象」とは、ウイルスに曝露されていて、急性のまたは慢性の徴候あるまたは体内に検出可能なレベルウイルスを有する対象である。本発明の好ましい態様において、対象は、慢性のウイルス感染を有するものであり、より好ましくは、慢性のC型肝炎感染を有するものである。本発明の重要な側面において、対象は、C型肝炎感染の以前の治療に無反応であるものである。例えば、無反応である対象は、本明細書中に記載のように、C型肝炎感染について、例えば、IFN- (例、イントロンA) により以前に処置したが、かかる処置が成功しなかったものを含む。本発明は、有効な処置に優先順位を付けるために、無反応である対象を処置することを、そしてある場合には無反応であるであろう対象を確認同定することを意図する。

40

【0149】

免疫刺激性核酸は、どんな脊椎動物においても有効であり得る。異なる免疫刺激性核酸は、哺乳動物種に依存して最適な免疫刺激を引き起こし得る。したがって、ヒトでは最適な刺激または抑制を引き起こす免疫刺激性核酸は、ヒトでは最適な刺激または抑制を引き起こすが、マウスでは最適な刺激または抑制を引き起こさないかもしれなく、逆もまた同様である。当業者は、本明細書中に提供支給した教示指導を使用して、本明細書中に記載のおよび/または当業者に既知である通常の検定アッセイを使用して、目的の関心のあ

50

る特定の哺乳動物種に有用な最も適切な免疫刺激性核酸を確認同定することができる。

【0150】

免疫刺激性核酸を、対象に直接投与してもよく、または核酸送達複合体と併せて投与してもよい。「核酸送達複合体」とは、ターゲティング手段標的とする方法と関連する（例えば、イオンまたは共有結合している、または内部に封入してある）核酸分子を意味する（例えば、標的細胞（例、pDCまたはB細胞）へのより高い親和性結合および/または標的細胞による増大した細胞の取り込みをもたらす分子）。核酸送達複合体の例は、ステロール（例、コレステロール）、脂質（例、陽イオン性脂質、ピロソーム(virosome)またはリポソーム）、または標的細胞に特異的な結合剤（例、標的細胞に特異的な受容体により認識されるリガンド）に関連する核酸を含む。好ましい複合体は、標的細胞によるイン 10
ターナリゼーション内在化の前に著しい分離非連鎖を防止するために、in vivoで十分に安定であっていてもよい。しかしながら、複合体は、核酸を機能的な形状で放出するよう、細胞内の適切な条件下で開裂することができる。

【0151】

免疫刺激性核酸または他の治療は、単独で投与してもよく（例、生理食塩水または緩衝液中に）または当業者に既知であるどんな送達ビヒクルでも使用してよい。例えば、以下の送達ビヒクルについて記載がある：コチレート(cochleates)；エマルソーム(emulsomes)；ISCOMs；リポソーム；生(live)バクテリアベクター（例、サルモネラ菌、大腸菌、BacillusCalmette-Guerin、赤痢菌、乳酸菌）；生ウィルスベクター（例、ワクシ 20
ニア、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス）；ミクロスフィア；核酸ワクチン；ポリマー（例、カルボキシメチルセルロース、キトサン）；ポリマー環；プロテオソーム；フッ化ナトリウム；遺伝子組み換え植物；ピロソーム；ウィルス様粒子。当業者は、当業者に既知である他の送達ビヒクルもまた、使用してよいことを認識するだろう。

【0152】

本明細書に提供された指導と組み合わせ、様々な活性化化合物を選ぶことにより、そして効力、相対的バイオアベイラビリティ、患者の体重、有害な副作用の重篤度および好ましい投与方法などの因子を考慮することにより、相当な毒性をもたらさず、それでいて、上記のように特定の対象を処置するのに完全に有効な、有効な治療上の処置処方計画を立てることができる。いかなる特定の用途への有効な量も、処置する疾患または条件、投与する特定の免疫刺激性核酸（例えば、CpG免疫刺激性核酸のクラス、非メチル化 30
CpGモチーフの数またはそれらの核酸内での位置、オリゴヌクレオチドへのキラリティーなど）、抗原もまた投与するかどうかおよびかかる抗原の性質、対象の大きさ、疾患または条件の重篤度などの因子に依存して変化することができる。当業者は経験的に、過度の実験を必要とすることなく特定の免疫刺激性核酸および/または他の治療剤の有効量を決定することができる。

【0153】

成人したヒト対象について、本明細書中に記載の免疫刺激性核酸化合物の用量は典型的に、約50μg/回投与量~20mg/回投与量、より典型的に約80μg/回投与量~ 8mg/回投与量、および最も典型的に約800μg/回投与量~4mg/回投与量の範囲である。対象の体重の観点で述べると、典型的な用量は、約0.5~500μg/kg 40
/回投与量、より典型的に約1~100μg/kg/回投与量、および最も典型的に約10~50μg/kg/回投与量の範囲である。用量は、投与の経路を含む因子に依存し、例えば、経口投与は、皮下投与よりも実質的に多い用投与量が必要だろう。

【0154】

本発明の処方は、薬学的に許容し得る溶液で投与され、薬学的に許容し得る濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適合性担体、アジュバント補助剤、および随意に他の治療成分を通常含んでもよい。

【0155】

免疫刺激性核酸を、ウィルス感染の処置に有用な、当業者に既知である他の剤と併せて与えることができる。例の部で実証したように、相乗反応を提供するために、特に重要な 50

のは、IFN- などの抗ウイルス剤との免疫刺激性核酸の組み合わせである。免疫刺激性核酸は、現在IFN- と一緒に投与しているリバビリンの代用として使用することができる。IFN- と組み合わせでの使用のための、現在使用されているかまたは調査中であるか他の剤の例は、アマンタジン、およびサイトカインを含み、IL-2、IL-10、IL-12、およびIFN- を含む。

【0156】

抗ウイルス剤は、ウイルスによる細胞の感染または細胞内でのウイルスの複製を防止する化合物である。ウイルス複製の過程は、宿主細胞内のDNA複製に密接に関連することから、非特異的抗ウイルス剤は宿主にしばしば有害であるため、抗ウイルス薬剤は、抗菌バクテリア薬剤よりも大幅に少ない。抗ウイルス剤によりブロックまたは抑制することができる、ウイルス感染の過程内にいくつかの段階がある。これらの段階は、宿主細胞へのウイルスの付着（免疫グロブリンまたは結合ペプチド）、ウイルスの脱殻（例、アマンタジン）、翻訳開始（例、インターフェロン、アンチセンス、およびリボザイム）を含むウイルス性mRNAの合成または翻訳（例、インターフェロン、アンチセンス、およびリボザイム）、ウイルス酵素（例、非構造セリンプロテアーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素およびヘリカーゼ）、ウイルスRNAまたはDNAの複製（例、ヌクレオシド類似体）、新しいウイルスタンパク質の成熟（例、Boehringer Ingelheim製セリンプロテアーゼ抑制剤BILN2061ZWなどのプロテアーゼ抑制剤）、Livfit（米国特許6,136,316）などの抗酸化剤、ならびにのウイルス出芽および放出を含む。他の抗ウイルス剤は、米国特許6,130,326、および米国特許6,440,985、および公開済の米国特許出願20020095033に記載がある。リバビリン類似体もまた、本発明により包含された抗ウイルス剤である。

10

20

【0157】

ヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドと同様の合成化合物であるが、不完全なまたは異常なデオキシリボースまたはリボース基を有する。ヌクレオチド類似体が細胞内にあると、これらはリン酸化されてし、三リン酸形成物を産生し、ウイルスDNAまたはRNA内への取り込みの際に正常なヌクレオチドと競合する。ヌクレオチド類似体の三リン酸型が、伸長中の核酸鎖内に取り込まれると、ウイルスポリメラーゼとの不可逆的な関係をもたらす、したがって連鎖停止との、不可逆的な関係をもたらす。

【0158】

免疫グロブリン治療は典型的に、ウイルス感染の予防に使用されるが、ウイルスの循環および新しく形成された細胞の感染からの防止のレベルを低減させるのにも使用される。ウイルス感染についての免疫グロブリン治療は、抗原特異的であるよりもむしろ、免疫グロブリン治療は、細胞外ビリオンへの結合ならびにウイルス感染に感受性がある細胞に付着することおよび入ることの防止により機能するため、バクテリア感染と異なる。本治療は、抗体が宿主内に存在する期間中、ウイルス血の低減に有用である。一般的に2種類の型の免疫グロブリン治療があり、通常免疫グロブリン治療および高力価免疫グロブリン治療である。通常免疫グロブリン治療は、正常な血液提供者の血清から調製し、プールした抗体製品を使用する。このプールした製品は、A型肝炎、パルボウイルス、エンテロウイルス（特に新生児内の）などの広範囲のヒトウイルスに対するへの低力価の抗体の低力価を含む。通常免疫グロブリン治療をHCVに使用するため、血清を、HCVに以前感染し、自発的にまたはいくつかの治療形態により、感染を除去するのに成功した人から得なければならないだろう。高力価免疫グロブリン治療は、特定のウイルスに対するへの高力価の抗体の高力価を有する個体人の血清から調製した抗体を使用する。そしてそれらの抗体を、特異的ウイルスに対して使用する。HCVについて、高力価免疫グロブリンを、C型肝炎免疫グロブリンを産生するために組み換えHCVタンパク質によりボランティアを予防接種することにより産生することができる。

30

40

【0159】

本発明の方法において好適な他の抗ウイルス剤は、Triangle Pharmaceuticals, Inc., Gilead, ICN, Procter and GambleおよびViroPharma Incorporatedにより製造される。

【0160】

50

治療での使用のために、有効量の免疫刺激性核酸を、免疫刺激性核酸を所望の部位、例えば、粘膜、全身に送達させるいかなる方法によっても対象に投与することができる。本発明の医薬組成物を「投与すること」は、当業者に既知のいかなる方法により成し遂げてもよい。投与の好ましい経路は、経口、非経口、病巣内、局所、経皮、筋肉内、鼻腔内、気管内、吸入、眼、膺、および直腸を含むが、それらに限定されない。

【0161】

経口投与のために、化合物（すなわち、免疫刺激性核酸、または他の治療剤）を、当該技術分野で周知の薬学的に許容し得る担体と併せて容易に処方することができる。かかる担体は、処置する対象による経口摂取のために、本発明の化合物を、錠剤、ピル、ドラジェー、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方することを可能にする。経口使用のための医薬製剤は、固体賦形剤として得ることができ、所望の場合、好適な助剤を添加した後、随意に得られる混合物を挽いて、顆粒の混合物を加工し、錠剤またはドラジェーコアを得る。好適な賦形剤は、特に、乳糖、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む、糖類などの充填剤；例えば、コーンスターチ、小麦デンプン、米デンプン、パレイショデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、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）などのセルロース製剤である。所望の場合、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸、あるいはアルギン酸ナトリウムなどのそれらの塩などの崩壊剤を添加してもよい。随意に経口処方または、内部酸条件を中和するために生理食塩水または緩衝液内に処方してもよく、またはいかなる担体も用いず投与してもよい。

10

20

【0162】

ドラジェーコアは、好適な被覆剤と共に提供する。この目的のために、濃糖溶液を使用してもよく、随意にアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールジェル、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、および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有してもよい。染料または色素を、活性化合物の投与量の異なる組み合わせを同定または特徴づけるために、錠剤またはドラジェー被覆剤に添加してもよい。

【0163】

経口で使用することができる医薬製剤は、ゼラチンで作られた押し込み型のカプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤で作られた、ソフトな密閉カプセルを含む。押し込み型のカプセルは、乳糖などの充填剤、デンプンなどの結合剤、および/またはタルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、ならびに、随意に、安定剤を有する混和物中に活性成分を含むことができる。ソフトカプセル地中で、活性化合物は、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの好適な液体中に溶解または懸濁されていてもよい。加えて、安定剤を添加してもよい。経口投与のために処方されたマイクロスフィアもまた使用してよい。かかるマイクロスフィアは、当該技術分野で明確である。経口投与のためのすべての処方は、かかる投与に好適な用量であるべきである。

30

【0164】

口腔投与については、組成物を、従来の方法で処方した錠剤またはトローチ剤の形で摂ってもよい。

40

吸入による投与については、本発明の使用化合物は、好適な噴射剤、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好適な気体の使用と共に、加圧パックからのエアゾールスプレーの形表現または噴霧器の形態形で都合よく送達してもよい。加圧エアゾールの場合、用量単位を、定量を送達させるバルブを提供することにより決定してもよい。吸入器または吹付け器における使用のための、例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物および乳糖またはデンプンなどの好適な粉剤ベースの粉剤混合物を含んで処方してもよい。

【0165】

50

化合物は、それらを全身的に送達させるのが望ましいとき、注射による、例えば、ボーラス注射または連続注入による非経口の投与のために処方してもよい。注射のための処方、単位用量形状で、例えば、アンプルまたは複数投与量の容器で、添加保存剤と共に、提供され表してもよい。組成物は、懸濁液、溶液または油性または水性のビヒクル中の乳液などの形状を取ってもよく、懸濁剤、安定剤および/または分散剤などの処方(formulatory)剤を含んでもよい。

【0166】

非経口の投与のための医薬処方は、水溶性の形状での活性化合物の水溶液を含む。加えて、活性化合物の懸濁液を、適切な油性の注射懸濁液として調製してもよい。好適な親油性溶媒またはビヒクルは、ゴマ油などの脂肪油、あるいは、オレイン酸エチルまたはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームを含む。水性の注射懸濁液は、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などの懸濁液の粘度を増加させる物質を含んでもよい。随意に、懸濁液はまた、好適な安定剤、または高濃度の溶液の調製物ができるよう、化合物の溶解度を増加させる剤を含んでもよい。

10

あるいは、活性化合物は、使用前に、好適なビヒクル、例えば、無菌の発熱物質を含まない水と一緒に構成するために、粉剤の形状であってもよい。

【0167】

化合物もまた、坐薬または停留浣腸剤などの直腸または膣組成物において処方してよく、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐薬基材を含む。

以前記載した処方に加えて、本化合物はもまた、デポー製剤として処方してもよい。かかる長時間作用型の処方は、好適なポリマーまたは疎水性の材料(例えば許容し得る油中の乳液として)あるいはイオン交換樹脂と共に、またはやや溶けにくい誘導体として、例えば、やや溶けにくい塩として、処方してもよい。

20

【0168】

医薬組成物はまた、好適な固体またはゲル相担体あるいは賦形剤を含んでもよい。かかる担体または賦形剤の例は、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖類、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールなどのポリマーを含むが、それらに限定されない。

【0169】

好適な液体または固体の医薬調製物の形状は、例えば、吸入用の水性溶液または生理食塩水性の溶液、マイクロカプセル、コチレート化(encochleated)、微細な金粒子への被覆、リポソーム中に含有、噴霧、エアゾール、皮膚に埋め込むためのペレット、または皮膚に傷を付けて入れるための鋭利な物の上での乾燥である。医薬組成物はまた、顆粒、粉剤、錠剤、被覆錠、(マイクロ)カプセル、坐薬、シロップ、乳液、懸濁液、クリーム、ドロップまたは活性化合物の長時間放出をする製剤を含み、崩壊剤錠剤分解物質、結合剤、被覆剤、膨張剤、潤滑剤、香味料、甘味料または可溶化剤などの調製賦形剤および添加剤および/または助剤は、上記のとおり習慣的に使用される。医薬組成物は、様々な薬剤送達システムにおける使用に好適である。薬剤送達の方法の簡単な概要については、参照により本明細書中に組み込まれている、Langer Science 249: 1527 (1990)を参照。

30

【0170】

免疫刺激性核酸は、それ自体(ストレートで(neat))または薬学的に許容し得る塩の形状で投与してもよい。薬に使用するとき、塩は、薬学的に許容し得るべきであるが、薬学的に許容し得る塩でないものは、その薬学的に許容し得る塩の調製に都合よく使用してもよい。かかる塩は、以下の酸:塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリルチル酸、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から調製したものを含むが、それらに限定されない。また、かかる塩は、アルカリ金属あるいはカルボキシル酸基のナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩などのアルカリ土類塩として調製することができる。

40

【0171】

50

好適な緩衝剤は、酢酸および塩（1～2% w/v）；クエン酸および塩（1～3% w/v）；ホウ酸および塩（0.5～2.5% w/v）；ならびにリン酸および塩（0.8～2% w/v）を含む。好適な保存剤は、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）を含む。

【0172】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容し得る担体を含む。用語「薬学的に許容し得る担体」とは、ヒトまたは他の脊椎動物に投与するのに好適な、1または2以上の適合性固体または液体充填剤、希釈剤またはカプセル化物質を意味する。用語「担体」とは、活性成分を適用を促進させるために活性成分と組み合わせる併せた、天然または合成の、有機または無機成分を意味する。医薬組成物の成分もまた、所望の医薬的効率を実質的に低下させるであろう相互作用がない方法で、本発明の化合物と共に、および互いに混ざり合うことができる。

10

【0173】

様々な投与経路が、利用可能である。選択した特定の方法は、もちろん、選択した特定の補助剤アジュバントまたは抗原、処置する特定の条件および治療の有効性に必要な用量に依存するだろう。本発明の方法は、一般的に言えば、医学的に許容し得るどんな投与方法でも使用して実行してよく、つまり、臨床的に許容できない有害な効果をもたらすことなく有効なレベルの免疫反応を生み出すどんな方法も意味する。好ましい投与方法は、上述の通りである。

20

【0174】

組成物は、都合よく単位用量の形状で提供され表してよく、薬学の技術分野で周知のどんな方法によって調製してもよい。すべての方法は、化合物を1または2以上の副成分を構成する担体と関連させるステップを含む。一般的に、組成物を、均一におよび密接に化合物を液体担体、細かく分裂した固体担体、または両方と関連させて調製し、そして、必要な場合、製品を成形する。液体投与量単位は、バイアルまたはアンプルである。固体投与量単位は、錠剤、カプセルおよび坐薬である。患者の処置のために、化合物の活性、投与の方法、予防接種の目的（すなわち、予防または治療）、障害の性質および重篤度、患者の年齢および体重に依存して、異なる用量を必要としてもよい。ある投与量の投与は、個々の投与量単位の形での単一の投与による、あるいはいくつかのより小さな投与量単位による両方により、行なうことができる。

30

【0175】

他の送達システムは、時間放出、遅延放出または持続的放出の送達システムを含むことができる。かかるシステムは、化合物の反復投与を回避することができ、対象および医師の利便性を増加させる。多くの型の放出送達システムが、利用可能であり、当業者に既知である。それらは、ポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート(copolyoxalates)、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシブチル酸、およびポリ無水物などのポリマーをベースとしたシステムを含む。薬剤含有の前述のポリマーのマイクロカプセルが、例えば、米国特許5,075,109に記載されている。送達システムはまた、コレステロール、コレステロールエステルおよび脂肪酸などのステロールまたはモノ-、ジ-およびトリ-グリセリドなどの中性脂肪を含む脂質；ヒドロゲル放出システム；シラスティックシステム；ペプチドをベースとしたシステム；ワックス被覆剤；従来の結合剤および賦形剤を使用する圧縮錠剤；部分的に融合した移植片；などを含む非ポリマーシステムを含む。具体例は、(a)浸食システム、ここで、本発明の剤は、米国特許4,452,775、4,675,189、および5,736,152などに記載のマトリックスの形状内に含まれ、および(b)拡散システム、ここで、活性成分が、米国特許3,854,480、5,133,974および5,407,686などに記載のポリマーから制御された速度で浸透する、を含むが、それらに限定されない。加えて、ポンプをベースとしたハードウェア送達システムを使用することもでき、そのうちいくつかは、移植に適合している。

40

【0176】

50

いくつかの態様において、免疫刺激性核酸は、修飾される。ある態様において、免疫刺激性核酸は、少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性インターヌクレオチド連鎖を有する修飾された骨格を有する。ヌクレアーゼ耐性インターヌクレオチド連鎖は、チオリン酸ホスホロチオエート連鎖、ジチオリン酸ホスホロジチオエート連鎖、ホスホン酸メチルホスホネート連鎖、およびペプチド連鎖を含む群から選択することができる。ある態様において、修飾免疫刺激性核酸は、少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含む。免疫刺激性核酸は、ある態様においてパリンドロームである一方、他の態様において、免疫刺激性核酸はパリンドロームではない。いくつかの好ましい態様において、免疫刺激性核酸は、8～100ヌクレオチド長である一方、他の好ましい態様において、免疫刺激性核酸は、12～40ヌクレオチド長である。好ましい大きさ、配列および修飾は、以下により詳細に記載する。 10

【0177】

以下の例は、説明の目的のために含まれ、本発明の範囲を限定するものではない。

【0178】

例

この研究の目的は、異なるクラスのCpG ODNの、HCV慢性のキャリアからのPBMCを刺激する能力を評価することであった。PBMCを、正常で健康なボランティアおよびHCVの慢性のキャリアから採集した全血から単離し、in vitroでの異なるクラスのCpG ODNならびにソフトおよびセミソフトな分子の、B細胞の増殖、サイトカイン分泌（IFN- γ 、TNF- α 、IL-10 およびIFN- β ）およびケモカイン分泌（IP-10）を刺激する能力を評価した。 20

また、外因性IFN- β （イントロンA）およびリバビリンの、どちらか単独で、互いに組み合わせて、およびCpG ODN（BおよびCクラス）と組み合わせての免疫刺激効果を評価した。

【0179】

材料および方法

オリゴヌクレオチド

すべてのオリゴヌクレオチドのストックを、pH 8.0のTE緩衝液中に再懸濁した（OmniPer（登録商標）；EM Science, Gibbstown, NJ）。細胞検定アッセイにおいて使用する直前に、様々なODNの希釈物を、10%の熱で不活性化した、正常なヒトAB血清（Wisent Inc, St. Bruno, QC）および1%のペニシリン/ストレプトマイシン（Gibco BRL, Grand Island, NY）を含有するのRPMI 1640完全培地（Gibco BRL, Grand Island, NY）中内で作製した。外因性IFN- β の相乗効果実験のために、イントロンA（インターフェロンアルファ-2 β 、DIN 02223406, Schering Canada Inc., Pointe-Claire, Quebec, Canada）をODN溶液に添加し、最終濃度125または1000 IU/mlを得た。リバビリン（CAS 36791-04-5, Calbiochem, CN Biosciences Inc., La Jolla, CA, USA）を滅菌蒸留水で再構成し、500 μ mのストックを作り出し、上記のとおり培地中内で希釈し、ウェル内で最終濃度5 μ mを得た。細胞を、5%CO₂を用いて37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。48時間後、細胞上清を各ウェルから採集し、-80 $^{\circ}$ Cで冷凍した。 30

【0180】

実験で使用したODNを以下の表に示す：

表2：実験で使用したオリゴの配列

【表 4】

配列番号	クラス	配列
1	A	G-G-GGACGACGTCGTGG-G-G-G-G-G
2	B	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT
3	Bクラス用 対照	TGC TGC TTT TTG CTG GCT TTT T
4	C	TCGTCGTTTTTCGGCGGCCGCCG
5	B	TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT
6	B	TCG TCG TTT TTC GTG CGT TTT T
7	ソフトc	TCGTCGTTT-T-C-G-G-CGGCCGCCG
8	セミソフトB	TC-GTC-GTTTT-GTC-GTTTTGTC-GTT
9	セミソフトc	TCGTC-GTTTTTCGGC-GGCCGCCG
10	セミソフトc	TCGTCGTTTTC-GGCGGCC-GCCG
11	セミソフトc	TCGTCG-TTTTC-GGCGCGC-GCCG
12	セミソフトc	TCGTC-GTTTTTC-GGC-GCGC-GCCG
13	セミソフトc	TCGTCGTTTAC-GGC-GCC-GTGCCG
14	セミソフトc	TCGTCG-TTTTAC-GGCGCC-GTGCCG
15	セミソフトc	TCGTC-GTTTTAC-GGCGCC-GTGCCG
16	セミソフトc	TCGTC-GTTTTTC-GGCGGCC-GCCG

10

20

* オリゴヌクレオチド骨格内でチオリン酸ホスホロチオエート結合を置き換えるホスホジエステル結合を、(-)により示す

【0181】

30

P B M C の単離

全血(200ml)を、正常で健康な10成人の対象ならびに、以前6月の一連のIFN- γ をベースとした治療を受け、処置に失敗したか、または再発した反応者である、HCVに慢性的に感染した15成人の対象から、静脈穿刺によりヘパリン化したグリーントップ(green top)のパキュテイナー(vacutainer)に採集した。

末梢血単核細胞(PBMC)を、Ficoll-Hypaque(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて400 \times gで35分間、遠心分離により精製した。細胞を、10%の正常なヒトAB血清(熱で不活性化した)および1%のペニシリン/ストレプトマイシン含有のRPMI完全培地中 1.0×10^6 /mlの濃度で再懸濁した。

【0182】

40

B細胞の増殖

細胞を、上記のとおり単離し、完全RPMI培地中 1×10^6 /mlで再懸濁し、100 μ lの細胞を、丸底の96ウェルプレートの各ウェルに添加した。ODN溶液(100 μ l)をウェルに添加し、選択した範囲の最終濃度(1、3、6 μ g/ml)を得た。細胞を5日間培養し、そして放射活性測定のためにろ紙の上に採取する前に、 3 H-チミジン(1 μ Ci/ウェル)により18時間パルスを送った(pulsed)。結果を、無処置の対照培地に対する刺激指数(SI)として報告する。

【0183】

サイトカイン検定アッセイ

新しく単離したPBMCを、 1.0×10^6 /ml(2 \times 最終濃度)で再懸濁し、100

50

μl の細胞を、等量のODN溶液(2×最終所望濃度)含有の平底の96ウェルプレートの各ウェルに添加した。一連の濃度(1、3、6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を、各ODNに試験ついでした。細胞を、5%CO₂を用いて37℃でインキュベートした。48時間後、細胞上清を各ウェルから採集し、-80℃で検定アッセイするまで冷凍した。

【0184】

上清澄み中のIFN- α 、IP-10、IL-10およびIFN- γ レベルを、市販のELISAキット(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; IP-10, Cat# DIP 100, IL-10, Cat# D1000, IFN- α Cat# DIF50またはPBL Biomedical, IFN- γ Cat# 4110S)を使用して測定した。測定したELISA値が、製造元指定のキットの検出限界より低かったとき、最低の検出可能な限界と等しい値を、データの表に入力した。

10

【0185】

結果

15人の慢性的に感染したHCV対象および正常で健康な10ボランティアから採集した血液から単離したPBMCを、異なるクラスのCpG(例、クラスA、B、C、ソフトなC、セミソフトなBおよびセミソフトなC)と共に37℃でインキュベートし、および細胞上清を、インキュベーション期間中、サイトカインの存在を示すサイトカイン分泌について評価した。これらの実験の結果を、以下に示す。

【0186】

PBMCによるIFN- α 分泌の誘導

3クラスのCpG ODNを、正常なボランティアからのPBMCについて試験したとき、非常に高いレベルのIFN- α がAクラス(CpG配列番号1)により、適度なレベルがCクラス(CpG配列番号4)により産生され、そしてほんの低レベルが、Bクラス(CpG配列番号2)により誘導された(図1)。IFN- α の主な細胞源は、pDCである。

20

【0187】

HCV慢性のキャリアから得られたPBMCを用いて、すべての3クラスのCpGは、IFN- α の分泌を誘導することができた。BおよびCクラスを用いたレベルは、正常なPBMCを用いて得られたものと同じであった。対照的に、Aクラスは、正常なレベルのたった約50%を誘導し(図1)、HCV感染したpDCの機能障害は、IFN- α を誘導するAクラスCpGの有効性に対する影響がいくらかあるが、Cクラスはないことを提案している。したがって、AまたはCクラスCpGは、HCV慢性のキャリアの処置に使用することができるが、ある場合には、Cクラスが好ましいだろう。

30

【0188】

pDCの数を、FACS分析により決定した。AおよびCクラスCpG ODNのいずれかにより分泌されたIFN- α の量と比較して、直鎖状の線形回帰をこれに対し行ない、正常な対象についての妥当な相関関係(例、それぞれ $R = 0.43$ および 0.58)が見出された。相関関係が、CクラスODNについてわずかに良いことがさらに発見された。対照的に、HCV感染した対象について、pDCの数および分泌したIFN- α の量の間で、相関関係が見られなかった(それぞれ $R = 0.02$ および 0.08)(図3)。HCV感染したDCは、それにもかかわらず、CpG ODNへの反応においてIFN- α を分泌することができる。

40

【0189】

これらのODSのソフトおよびセミソフトの変化交代の効果もまた、分析した。分子の中心領域に1列のホスホジエステル結合を有するソフトな分子を合成した。CpGモチーフのシトシンおよびグアニンヌクレオチド間にある1または2以上の個々のホスホジエステル結合を有するセミソフトな分子を合成した。ソフト(図3)およびセミソフト(図4)なCクラスCpG ODNの両方は、最初のCクラスCpG ODNと同様の方法で、正常なまたはHCVのPBMCからのIFN- α 分泌を刺激することができた。いくつかのセミソフトなCクラスCpG ODNは、普通のCクラスCpG配列番号4よりもさらに強力だった(図4)。これは、分子は、最大の免疫刺激を有するのにまだ十分に安定で

50

あしており、CpGモチーフ？集団？の中心のホスホジエステルは、その活性を増加させるからであろう。

【0190】

PBMCによるIFN- 分泌の誘導

図5は、Th1サイトカインである、IFN- の分泌を誘導する異なるクラスのCpGの能力を比較する。クラスAは、低レベルのIFN- を誘導したのに比べて、クラスBは適度の量を産生し、クラスCのCpGは、高濃度のIFN- を刺激した。HCV感染したおよび正常なPBMCの両方は、すべての3クラスのCpGへの同様のTh1反応を示した。同様の結果が、セミソフトなクラスCのCpG ODNを用いて得られた(図6)。

【0191】

PBMCによるIP-10分泌の誘導

1型および2型インターフェロンの産生と関連するケモカインであるIP-10もまた、CpG ODNにより誘導される。最高レベルがをAクラスにより誘導されし、次が高いのがCクラスによるものであり、最も低いのが、BクラスCpG ODNによるものである。CpG ODNのクラスに関わらず、同様のレベルのIP-10がを、正常な対象およびHCV慢性のキャリアからのPBMCにより誘導されした(図7)。

【0192】

CpG ODNによるB細胞の刺激

B細胞の刺激へのCpGの効果もまた、調査した。図8および9に示したように、CpGクラスAは、HCV感染したおよび正常な集団の両方について、B細胞の弱い刺激因子であった。対照的に、クラスB、CおよびセミソフトなCのCpGは、B細胞を強力に活性化した。正常なおよびHCV感染した対象からのPBMCの間では、差異がなかった。

【0193】

CpG ODNによる刺激後のPBMCからのIL-10分泌

CpGによる刺激後のサイトカインIL-10の産生もまた評価し、これらの結果を、図10に示した。HCV感染したおよび正常な対象の両方について、すべてのクラスのCpGは、IL-10分泌を著しく誘導し、正常なボランティアからのPBMCおよびHCV慢性のキャリアからのPBMCの間で差異はなかった。いくつかの細胞種型は、CpGによるインキュベーション後、IL-10を産生できる；しかしながらB細胞は、このサイトカインの主要な生産元であることから、IL-10産生は、B細胞活性化のレベルの指標として使用することができる。

【0194】

イントロンAおよびリバビリンの効果

リバビリンおよび外因性IFN- イントロンAの、単独でまたはCpGと組み合わせでのin vitro効果を、HCV感染した細胞について試験した。リバビリンとイントロンAのいずれも、それら自体または一緒に、HCV感染したPBMCによるIFN- 分泌の誘導をもたらさなかった(図11)。

上述のように、AおよびCクラスのCpG ODNは、正常なおよびHCV感染した対象からのpDCからのIFN- 分泌の強力な誘導をもたらす。さらに、CpGおよびイントロンAと一緒に使用したとき、対象の大多数(60%)について相乗反応があった(図12)。

【0195】

考察

CpG ODNは、クラスAおよびCのCpGを使用して、より高いレベルで、およびクラスBのCpG ODNを使用してより低いレベルで、IFN- を分泌するために、HCVに慢性的に感染した患者からDCを誘導することができる。分泌したIFN- のレベルは、正常な健康なボランティアからの細胞を用いて観察されたものと同程度である。なお、IP-10がを、刺激されたHCVのPBMCから誘導されることからし、さらにTh1型の免疫活性化を示している。

10

20

30

40

50

H C V 抗原に特異的な免疫反応は、H C V に慢性的に感染した人の中に既に存在した。これらは、T h 2 に偏っており、したがってH C V 感染した細胞の除去を引き起こすことができない。T h 1 型の反応は、ウイルス除去に必要であろう。全身のT h 1 サイトカインのレベルの増大は、追加の抗原なしに、H C V に慢性的に感染した人が、ウイルス除去に役立つT h 1 型のH C V に特異的な免疫反応を発展させるようにする。すべてのクラスのC p G (A、B および C) は、T h 1 型の反応を確立することができる。これらのT h 1 型反応は、H C V 慢性の感染の長期の除去に必須であるが、直接的な抗ウイルス効果を有するが免疫系に直接的な効果を有しない、外因性I F N - 治療により誘導するのは難しい。C p G O D N は、したがって、H C V 慢性のキャリアを処置するために、外因性I F N - と組み合わせて使用することができる。

10

【 0 1 9 6 】

あるいは、C p G O D N はまた、単独で使用することもできる。I F N - およびI F N - などのサイトカインの誘導のおかげで、T h 1 型のH C V に特異的な免疫反応の誘導に加えて、C p G O D N はそれ自体によりそのまま、直接的な抗ウイルス効果を有する。ある場合には、A および C クラス分子が、より高いレベルのI F N を誘導することから、好ましい。それらの特徴的な配列に依存して、C p G O D N は、p D C の機能、成熟およびI 型I F N の産生を選択的に刺激することができる (Krug, A et al., Eur J Immunol, 2001; 31: 2154-2163)。本発明によると、2 つのクラスのC p G O D N が、I F N - 産生の刺激において優れていることを示したにもかかわらず、どのC p G O D N も、骨格またはC p G 配列に関わらず、慢性のH C V の処置に使用することができた。In vivoでの特異なC p G O D N による異なるI 型のI F N アイソフォームタイプの制御された放出は、単一のサブタイプ垂型である組み換えI 型I F N (例えば、イントロンA は、I F N - 2 b のみ) の全身の投与より優れている。C p G O D N のソフトおよびセミソフトな変形は、それらの親分子と同様のレベルのI F N - の刺激をすることができる。C p G O D N のソフトまたはセミソフトな変形、特にC クラスは、より簡単に分解され、したがって器官、特に肝臓、脾臓および腎臓内に蓄積することが予想されないため、選択的にH C V の慢性の処置に使用することができた。

20

【 0 1 9 7 】

少なくとも50%のH C V 対象が、外因性I F N - 治療に反応するのに失敗したが、しかしながらC p G O D N (特にA およびC クラス) は、すべての対象において、正常な健康なボランティアと同程度のレベルで、in vitroでI F N - 分泌を誘導することができた。

30

C p G O D N は、したがって、I F N がベグ化していてもいなくても、そして処置もまたリバビリンを含んでいてもいなくても、外因性I F N - 治療に反応するのに失敗した患者を処置するのに使用することができた。高レベルのI F N - を誘導するC p G O D N のクラスが好ましく、さらにより好ましい長期処置は、セミソフトな変形だろう。

【 0 1 9 8 】

市販のイントロンA (I F N - 2 b) とリバビリンのいずれも、単独でまたは組み合わせて、in vitroで正常なまたはH C V 感染した対象からのP B M C からのI F N - 分泌を誘導することはできなかった。しかしながらC p G O D N をイントロンA と組み合わせて使用したとき、相乗効果が、H C V 感染した対象からのP B M C からのI F N - 分泌について、相乗効果が観察された。C クラスのO D N は、外因性I F N - による相乗効果を有することを示した；しかしながら、市販のアルファインターフェロンによるどのクラスのC p G O D N による処置も、治療的に効果的であろう。以前述べたように、無刺激の代謝産物への分解が比較的簡単なため、C p G O D N のセミソフトな変形を、腎臓などの末端器官における蓄積の心配なく慢性の処置に使用することができた。

40

【 0 1 9 9 】

リバビリンは、T h 1 効果を有するといわれているが、これらの研究において、ヒトP B M C において免疫刺激活性を有しなかった。イントロンA と組み合わせても、リバビリンは、内因性のI F N - 産生を向上させしなかった。したがって、リバビリンをH C V

50

の併用治療においてCpG ODNと置き換えることは、持続的ウィルス反応の割合を増加させるだろう。CpG ODNと併せたとき、リバビリンは、CpGの有効性を低減させた。CpG ODNは、したがって、リバビリンの非存在下でアルファインターフェロンと組み合わせて与えるべきである。

【0200】

CpG ODNを、IM、SCおよびIVでヒト対象に投与し、そして耐容用性があり、安全であると決定された(臨床研究、進行中)。SC、IM、IV、吸入、その他、などのどんな有効な経路投与でも許容し得るだろう。しかしながら皮下投与が、選択される経路だろう。CpG ODNをTE緩衝液中に希釈し、PBMCに添加したが、しかしながら、CpG ODNはまた、生物接着性(bioadhesive)ポリマー(Sha et al., 1999)、コチレート(Gould-Fogerite et al., 1994, 1996)、デンドリマー(Kukowska-Latallo et al., 1996, Qin et al., 1998)、腸溶被覆カプセル(Czerlinsky et al., 1987, Levine et al., 1987)、エマルソーム(Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997)、ISCOMs(Mowat et al., 1993, Morein et al., 1999, Hu et al., 1998, Carlsson et al., 1991)、リポソーム(Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992)、ミクロスフィア(Gupta et al., 1998, Maloy et al., 1994, Eldridge et al., 1989)、ナノスフィア(Roy et al., 1999)、ポリマー環(Wyatt et al., 1998)、プロテオソーム(Lowell et al., 1988, 1996)およびピロソーム(Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998)などの送達システムにおいて処方することもできる。

10

【0201】

HCV慢性のキャリアの処置のために、CpG ODNを、反復して、毎日1回から毎月1回投与することができるが、好ましくは3~10日間に1回、最も好ましくは毎週、長期間である。この期間は、1月から2年であることができるが、好ましくは3~12月、最も好ましくは6月である。したがって最適な治療は、毎週2回または毎週1回6月間与えられる。また、誘導期中、より頻繁に(最初の1~3月間、毎日または隔日おきあるいは毎週2回または毎週1回)、そして維持のために頻度を低くして(さらに数ヶ月間、毎週、隔週、または毎月)与えることもできる。

20

【0202】

併用治療のために、CpGおよびアルファインターフェロン(ペグ化しているまたはしていない)を潜在的に、(i)一緒に混合し、同時に同じ経路で(皮下)与える、(ii)同時におよび同じ経路で与えるが、混合しない、(iii)同時にだが異なる異なる経路で与える(例えば、アルファインターフェロンは、SCで与えることができ、CpGは、IV、IM、ID、経口または局所的に与えることができる)、(iv)同じまたは異なる経路で、異なる時間および計画で与える、あるいは(v)連続して与えることができる。この後者の場合、好ましくはIFN- α を、ウィルス量を低減させるために最初に与え、そしてCpG ODNをその後、長期間の制御のために、Th1型適応免疫を誘導するおよび持続させるために与える。

30

【0203】

参考文献

【表 5】

1. Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 244: 359-62.
2. Choo, Q. L., K. H. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, P. J. Barr, et al. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 2451-5.
3. van der Poel, C. L., H. T. Cuypers, H. W. Reesink. 1994. Hepatitis C virus six years on. *Lancet*. 344: 1475-9. 10
4. van der Poel, C. L. 1994. Hepatitis C virus. *Epidemiology, transmission and prevention*. *Curr Stud Hematol Blood Transfus*: 137-63.
5. Kiyosawa, K., T. Sodeyama, E. Tanaka, Y. Gibo, K. Yoshizawa, Y. Nakano, S. Furuta, Y. Akahane, K. Nishioka, R. H. Purcell, et al. 1990. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology*. 12: 671-5.
6. Alter, M. J., H. S. Margolis, K. Krawczynski, F. N. Judson, A. Mares, W. J. Alexander, P. Y. Hu, J. K. Miller, M. A. Gerber, R. E. Sampliner, et al. 1992. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med*. 327: 1899-905. 20

【 0 2 0 4 】

【表 6】

7. Alter, M. J. 1994. Transmission of hepatitis C virus--route, dose, and titer. *N Engl J Med.* 330: 784-6.
8. Alter, M. J. 1994. Review of serologic testing for hepatitis C virus infection and risk of posttransfusion hepatitis C. *Arch Pathol Lab Med.* 118: 342-5.
9. Alter, M. J., E. E. Mast. 1994. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin North Am.* 23: 437-55.
10. Weiner, A. J., H. M. Geysen, C. Christopherson, J. E. Hall, T. J. Mason, G. Saracco, F. Bonino, K. Crawford, C. D. Marion, K. A. Crawford, et al. 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 3468-72.
11. Kato, N., Y. Ootsuyama, H. Sekiya, S. Ohkoshi, T. Nakazawa, M. Hijikata, K. Shimotohno. 1994. Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol.* 68: 4776-84.
12. Diepolder, H. M., R. Zachoval, R. M. Hoffmann, E. A. Wierenga, T. Santantonio, M. C. Jung, D. Eichenlaub, G. R. Pape. 1995. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet.* 346: 1006-7.
13. Missale, G., R. Bertoni, V. Lamonaca, A. Valli, M. Massari, C. Mori, M. G. Rumi, M. Houghton, F. Fiaccadori, C. Ferrari. 1996. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest.* 98: 706-14.
14. Tsai, S. L., Y. F. Liaw, M. H. Chen, C. Y. Huang, G. C. Kuo. 1997. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology.* 25: 449-58.
15. Reherrmann, B., K. M. Chang, J. G. McHutchison, R. Kokka, M. Houghton, F. V. Chisari. 1996. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Investigation.* 98: 1432-1440.
16. Erickson, A. L., M. Houghton, Q. L. Choo, A. J. Weiner, R. Ralston, E. Muchmore, C. M. Walker. 1993. Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J Immunol.* 151: 4189-99.

【 0 2 0 5 】

【表 7】

17. Chen, M., M. Sallberg, A. Sonnerborg, O. Weiland, L. Mattsson, L. Jin, A. Birkett, D. Peterson, D. R. Milich. 1999. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 116: 135-43.
18. Nagler, A., L. L. Lanier, J. H. Phillips. 1988. The effects of IL-4 on human natural killer cells. A potent regulator of IL-2 activation and proliferation. *J Immunol*. 141: 2349-51.
19. Martinez, O. M., R. S. Gibbons, M. R. Garovoy, F. R. Aronson. 1990. IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T-cells. *J Immunol*. 144: 2211-5. 10
20. Moore, K. W., O. G. A, R. de Waal Malefy, P. Vieira, T. R. Mosmann. 1993. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 11: 165-90.
21. de Waal Malefy, R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T-cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 174: 915-24. 20
22. Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore, O. G. A. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 146: 3444-51.
23. Schlaak, J. F., T. Pitz, H. F. Lohr, K. H. Meyer zum Buschenfelde, G. Gerken. 1998. Interleukin 12 enhances deficient HCV-antigen-induced Th1-type immune response of peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 56: 112-7.
24. Cacciarelli, T. V., O. M. Martinez, R. G. Gish, J. C. Villanueva, S. M. Krams. 1996. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology*. 24: 6-9. 30
25. Kuzushita, N., N. Hayashi, K. Katayama, T. Kamada. 1995. [Histological features and HLA-DNA types in HCV carriers with persistently normal ALT levels]. *Nippon Rinsho*. 53: 576-81.
26. Kanto, T., N. Hayashi, T. Takehara, T. Tatsumi, N. Kuzushita, A. Ito, Y. Sasaki, A. Kasahara, M. Hori. 1999. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol*. 162: 5584-91. 40

【 0 2 0 6 】

【表 8】

27. Bain, C., A. Fatmi, F. Zoulim, J. P. Zarski, C. Trepo, G. Inchauspe. 2001. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*. 120: 512-24.
28. Sansonno, D., C. Lotesoriere, V. Cornacchiulo, M. Fanelli, P. Gatti, G. Iodice, V. Racanelli, F. Dammacco. 1998. Hepatitis C virus infection involves CD34(+) hematopoietic progenitor cells in hepatitis C virus chronic carriers. *Blood*. 92: 3328-37. 10
29. Auffermann-Gretzinger, S., E. B. Keeffe, S. Levy. 2001. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood*. 97: 3171-6.
30. Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, G. Stelz, C. Kuhnt, G. Schuler, J. Hauber, A. Steinkasserer. 2000. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol*. 74: 7127-36.
31. Fugier-Vivier, I., C. Servet-Delprat, P. Rivaller, M. C. Rissoan, Y. J. Liu, C. Rabourdin-Combe. 1997. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T-cells. *J Exp Med*. 186: 813-23. 20
32. Sarobe et.al. 2002, *Journal of Virology* 76:10, 5062-5070
- Chisari, F. V., C. Ferrari. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 13: 29-60
33. Chisari, F. V. 1997. Cytotoxic T-cells and viral hepatitis. *Journal of Clinical Investigation*. 99: 1472-1477
34. Marianneau, P., A. M. Steffan, C. Royer, M. T. Drouet, D. Jaeck, A. Kirn, V. Deubel. 1999. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J Virol*. 73: 5201-6. 30
35. Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 374: 546-9
36. Yi, A. K., P. Hornbeck, D. E. Lafrenz, A. M. Krieg. 1996. CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J Immunol*. 157: 4918-4925 40

【 0 2 0 7 】

【表 9】

37. Yi, A. K., J. H. Chace, J. S. Cowdery, A. M. Krieg. 1996. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology*. 156: 558-64
38. Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, A. M. Krieg. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 2879-2883 10
39. Klinman, D. M., D. Verthelyi, F. Takeshita, K. J. Ishii. 1999. Immune recognition of foreign DNA: a cure for bioterrorism? *Immunity*. 11: 123-9
40. Halpern, M. D., R. J. Kurlander, D. S. Pisetsky. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol*. 167: 72-8
41. Cowdery, J. S., J. H. Chace, A. K. Yi, A. M. Krieg. 1996. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol*. 156: 4570-4575 20
42. Schwartz, D. A., T. J. Quinn, P. S. Thorne, S. Sayeed, A. K. Yi, A. M. Krieg. 1997. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *Journal of Clinical Investigation*. 100: 68-73
43. Yamamoto, S., T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano, T. Tokunaga. 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated natural killer activity. *J Immunol*. 148: 4072-6.
44. Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen, A. M. Krieg. 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol*. 157: 1840-1845 30
45. Chace, J. H., N. A. Hooker, K. L. Mildenstein, A. M. Krieg, J. S. Cowdery. 1997. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clinical Immunology & Immunopathology*. 84: 185-93
46. Roman, M., E. Martin-Orozco, J. S. Goodman, M. D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R. S. Kornbluth, D. D. Richman, D. A. Carson, E. Raz. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants [see comments]. *Nat Med*. 3: 849-54 40

【 0 2 0 8 】

【表 1 0】

47. Krieg, A. M., S. Matson, K. Cheng, E. Fisher, G. A. Koretzky, J. G. Koland. 1997. Identification of an oligodeoxynucleotide sequence motif that specifically inhibits phosphorylation by protein tyrosine kinases. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. 7: 115-23
48. Davis, H. L., R. Weeranta, T. J. Waldschmidt, L. Tygrett, J. Schorr, A. M. Krieg. 1998. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *Journal of Immunology*. 160: 870-6 10
49. Moldoveanu, Z., L. Love-Homan, W. Q. Huang, A. M. Krieg. 1998. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine*. 16: 1216-24
50. Chu, R. S., O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann, C. V. Harding. 1997. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *Journal of Experimental Medicine*. 186: 1623-31
51. Lipford, G. B., M. Bauer, C. Blank, R. Reiter, H. Wagner, K. Heeg. 1997. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T-cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol*. 27: 2340-4 20
52. Weiner, G. J., H. M. Liu, J. E. Wooldridge, C. E. Dahle, A. M. Krieg. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 10833-7
53. Kline, J. N., T. J. Waldschmidt, T. R. Businga, J. E. Lemish, J. V. Weinstock, P. S. Thorne, A. M. Krieg. 1998. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol*. 160: 2555-9 30
54. Krieg, A. M. 2001. Now I know my CpGs. *Trends Microbiol*. 9: 249-52.
55. Krieg, A. M., L. Love-Homan, A. K. Yi, J. T. Harty. 1998. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol*. 161: 2428-34
56. Walker, P. S., T. Scharton-Kersten, A. M. Krieg, L. Love-Homan, E. D. Rowton, M. C. Udey, J. C. Vogel. 1999. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 6970-5 40

【 0 2 0 9 】

【表 1 1】

57. Gramzinski, R. A., D. L. Doolan, M. Sedegah, H. L. Davis, A. M. Krieg, S. L. Hoffman. 2001. Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun.* 69: 1643-9.
58. Roffi, L., G. C. Mels, G. Antonelli, G. Bellati, F. Panizzuti, A. Piperno, M. Pozzi, D. Ravizza, G. Angeli, F. Dianzani, et al. 1995. Breakthrough during recombinant interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: prevalence, etiology, and management. *Hepatology.* 21: 645-9. 10
59. Imai, Y., S. Kawata, S. Tamura, I. Yabuuchi, S. Noda, M. Inada, Y. Maeda, Y. Shirai, T. Fukuzaki, I. Kaji, H. Ishikawa, Y. Matsuda, M. Nishikawa, K. Seki, Y. Matsuzawa. 1998. Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. Osaka Hepatocellular Carcinoma Prevention Study Group. *Ann Intern Med.* 129: 94-9.
60. Davis HL CC, Morris ML, Efler SM, Cameron DW, Heathcote J. 2000. CpG ODN is safe and highly effective in humans as adjuvant to HBV vaccine: Preliminary results of Phase I trial with CpG ODN SEQ ID NO. 2. Presented at The Third Annual Conference on Vaccine Research. S25: 47. 20

【0 2 1 0】

均等物

様々な修飾は、本明細書中に開示された態様のために与えられたと理解されるものである。したがって、上記記載は、限定として解釈すべきではないが、単に好ましい態様の例示として解釈すべきである。当業者は、本明細書に付随する特許請求の範囲内で他の修飾を想定することができるだろう。

本明細書に開示されたすべての参考文献、特許および特許出願は、全体として参照参考文献によって組み込まれる。 30

【図面の簡単な説明】

【0 2 1 1】

【図 1】3クラスの CpG による刺激の後の HCV 感染したおよび正常な PBMC からの IFN - 分泌の誘導を示した図である。

【図 2】慢性の HCV キャリアおよび正常な対象から新しく単離した PBMC のフローサイトメトリー分析を示した図である。

【図 3】Cクラスおよびソフトな Cオリゴヌクレオチドによる PBMC の刺激による IFN - 誘導を示した図である。

【図 4】セミソフトな Cクラス CpG のパネルによる刺激の後の IFN - 誘導を示した図である。 40

【図 5】3クラスの CpG による刺激の後の IFN - 分泌を示した図である。

【図 6】セミソフトな Cクラス CpG のパネルによる刺激の後の IFN - 誘導を示した図である。

【図 7】3クラスの CpG による刺激の後の IP - 10 分泌を示した図である。

【図 8】B細胞の増殖への CpG の効果を示した図である。

【図 9】B細胞の増殖へのセミソフトな Cクラス CpG の効果を示した図である。

【図 10】3クラスの CpG による刺激の後の IL - 10 分泌を示した図である。

【図 11】リバビリンおよび CpG 単独でまたはイントロン A との組み合わせによる HCV 感染した細胞の刺激の後の IFN - 分泌を示した図である。

【図 12】HCV 感染した細胞による IFN - 分泌へのイントロン A を併用した CpG 50

の相乗効果を示した図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>	COLEY PHARMACEUTICAL GROUP LTD COLEY PHARMACEUTICAL GmbH		
<120>	METHODS AND PRODUCTS RELATED TO TREATMENT AND PREVENTION OF HEPATITIS C VIRUS INFECTION		
<130>	C1037.70035US00		
<140>	NOT YET ASSIGNED		
<141>	2003-10-29		10
<150>	US 60/421,987		
<151>	2002-10-29		
<160>	26		
<170>	PatentIn version 3.2		
<210>	1		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial sequence		
<220>			
<223>	Oligonucleotide		20
<400>	1 ggggacgacg tcgtgggggg g	21	
<210>	2		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	Artificial sequence		
<220>			
<223>	Oligonucleotide		
<400>	2 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt	24	30
<210>	3		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	Artificial sequence		
<220>			
<223>	Oligonucleotide		
<400>	3 tgctgctttt tgctggcttt tt	22	
<210>	4		40
<211>	22		
<212>	DNA		

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 4

tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 5

tcgtcgtttc gtcgttttgt cgtt

24

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

20

<400> 6

tcgtcgtttt tcgtgcgttt tt

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 7

tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

30

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 8

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

40

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 9
 tcgtcgtttt cggcggcgc cg

22

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

10

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 10
 tcgtcgtttt cggcggcgc cg

22

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

20

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 11
 tcgtcgtttt cggcgcgc cg

22

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 12
 tcgtcgtttt cggcgcgc cg

22

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

40

<400> 13 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg	24	
<210> 14 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide		
<400> 14 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg	24	10
<210> 15 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide		
<400> 15 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg	24	
<210> 16 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial sequence		20
<220>		
<223> Oligonucleotide		
<400> 16 tcgtcgtttt cggcgccgc cg	22	
<210> 17 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial sequence		30
<220>		
<223> Oligonucleotide		
<400> 17 tcgcgtcgtt cggcgccgc cg	22	
<210> 18 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial sequence		
<220>		40

<223> Oligonucleotide
 <400> 18
 tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>

 <223> Oligonucleotide 10
 <400> 19
 tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21

 <210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>

 <223> Oligonucleotide
 <400> 20
 tcggacgttc ggcgcgcgcg 19 20

 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>

 <223> Oligonucleotide
 <400> 21
 tcgcgtcgtt cggcgcgcgcg 20

 <210> 22 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>

 <223> Oligonucleotide
 <400> 22
 tcgacgttcg ggcgcgcgccg 20

 <210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence 40

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 23
tcgacgttcg gcgcgccg 18

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide 10

<400> 24
tcgcgtcgtt cggcgccg 18

<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 25
tcgcgacgtt cggcgcgccg cg 22 20

<210> 26
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

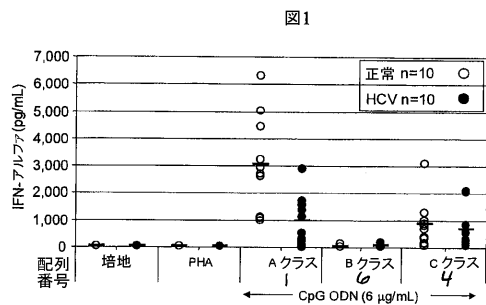
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n is a, c, g, or t 30

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> n is selected from GpT, GpG, GpA, or ApA

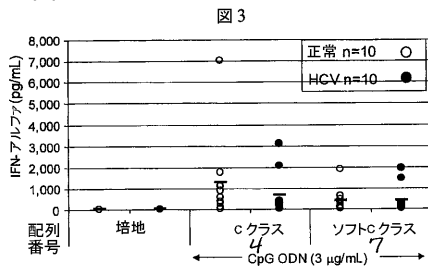
<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> n is selected from TpT, CpT, or TpC

<400> 26
tcntnncgmn 10

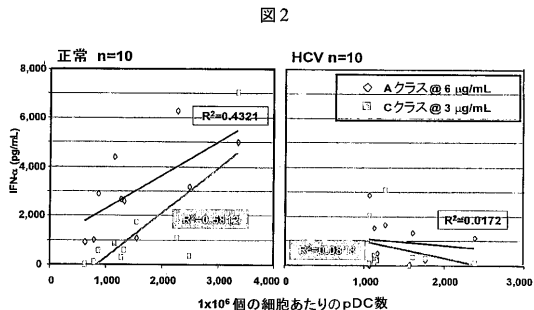
【 図 1 】



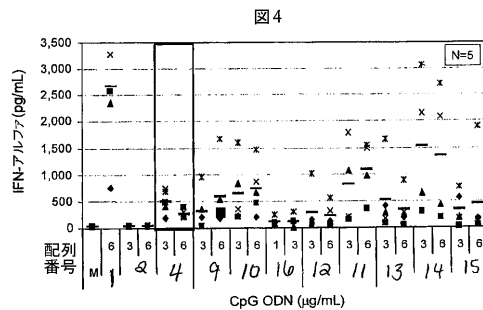
【 図 3 】



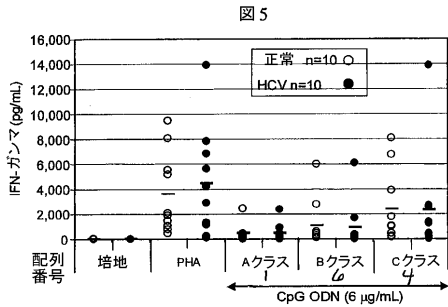
【 図 2 】



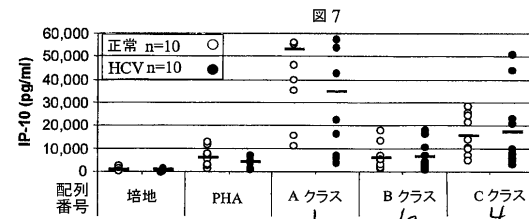
【 図 4 】



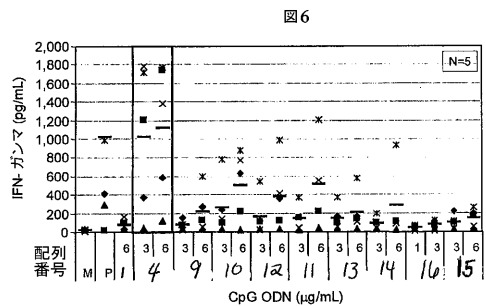
【 図 5 】



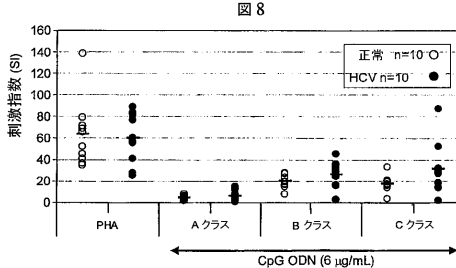
【 図 7 】



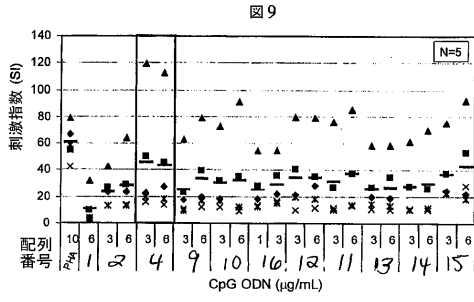
【 図 6 】



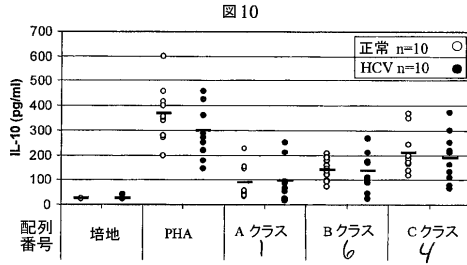
【 図 8 】



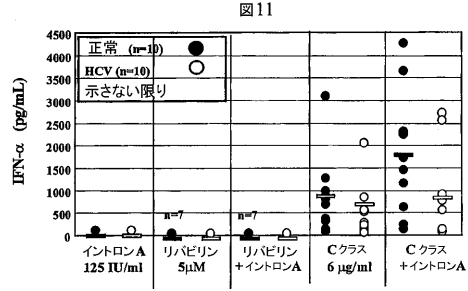
【 図 9 】



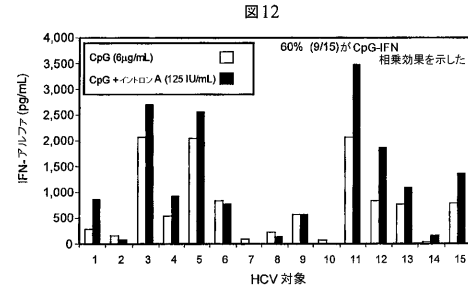
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/IB 03/05520

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/21 A61P31/14 //(A61K38/21,31:7088)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/22990 A (COLEY PHARM GROUP INC ; UNIV IOWA RES FOUND (US)) 5 April 2001 (2001-04-05) page 5, line 5 - page 10, line 23; claims 1,12,23; example 15 -----	1-71
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200203 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2002-023500 XP002285703 & KR 2001 063 153 A (GENEXINE INC) 9 July 2001 (2001-07-09) the whole document ----- -/--	1-26, 53-65
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
23 June 2004	12/07/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Deck, A	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 03/05520

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DAVIS H L ET AL: "CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 18, no. 18, March 2000 (2000-03), pages 1920-1924, XP004190074 ISSN: 0264-410X page 1923, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1	1-71
Y	MALANCHERE-BRES E ET AL: "CpG oligodeoxynucleotides with hepatitis B surface antigen (HBsAg) for vaccination in HBsAg-transgenic mice" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 75, no. 14, July 2001 (2001-07), pages 6482-6491, XP002285701 ISSN: 0022-538X page 6482, left-hand column, paragraph 2 page 6489, last paragraph - page 6490	1-71
A	WEERATNA RISINI D ET AL: "CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice" FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 1, December 2001 (2001-12), pages 65-71, XP002285702 ISSN: 0928-8244 the whole document	1-71
P, X	WO 03/002065 A (CHIRON CORP ; O'HAGAN DEREK (US); COATES STEPHEN R (US); HOUGHTON MICH) 9 January 2003 (2003-01-09) page 38, line 26 - page 37; claims	1-8, 12-21, 25,26, 53,56-65

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/IB 03/05520
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

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

Although claims 1-26, 53-65, 67, 68 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 03/05520

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0122990	A	05-04-2001	AU 7619000 A	30-04-2001
			CA 2386019 A1	05-04-2001
			EP 1220684 A2	10-07-2002
			JP 2003510290 T	18-03-2003
			WO 0122990 A2	05-04-2001
			ZA 200201959 A	10-03-2003
KR 2001063153	A	09-07-2001	NONE	
WO 03002065	A	09-01-2003	CA 2451739 A1	09-01-2003
			WO 03002065 A2	09-01-2003
			US 2003138458 A1	24-07-2003

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/68	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 7
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/68	
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
		G 0 1 N	33/50	Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アルワリア, ネブニート ケー.

カナダ国 オーエヌ, オタワ, カーリング アベニュー 909-1316

(72) 発明者 エフラー, スーザン エム.

カナダ国 ケー2ピー 8エヌ7 オンタリオ, オタワ, リガ プライベート 140

(72) 発明者 デービス, ヘザー エル.

カナダ国 ケー1エス 1ティー4 オンタリオ, オタワ, ウィラード ストリート 33

(72) 発明者 ボルマー, ジョーグ

ドイツ国 40591 デュッセルドルフ, コールラウシュヴェーク 24

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CA20 CB01 CB21 DA36 FB03

4C084 AA02 AA03 AA19 BA44 DA22 ZB032 ZB331 ZB332 ZC752

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA07 ZA75 ZB03 ZB33

ZC75