

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532315

(P2005-532315A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005. 10. 27)

(51) Int. Cl.⁷

A 6 1 K 39/39

A 6 1 K 47/18

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 35/00

// C 1 2 N 15/09

F I

A 6 1 K 39/39

A 6 1 K 47/18

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 35/00

C 1 2 N 15/00 Z N A A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 C O 7 6

4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁)

(21) 出願番号 特願2004-503046 (P2004-503046)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月12日 (2003. 5. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年1月7日 (2005. 1. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2003/000678
 (87) 国際公開番号 W02003/094963
 (87) 国際公開日 平成15年11月20日 (2003. 11. 20)
 (31) 優先権主張番号 60/379, 343
 (32) 優先日 平成14年5月10日 (2002. 5. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/290, 545
 (32) 優先日 平成14年11月7日 (2002. 11. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/460, 646
 (32) 優先日 平成15年4月4日 (2003. 4. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500082894
 イネックス ファーマシューティカルズ
 コーポレーション
 カナダ国, プリティッシュ コロンビア
 ブイ5ジェイ 5ジェイ8, パーナビー,
 グレンリオン ビジネス パーク, グレン
 リオン パークウェイ 100-8900
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メチル化免疫刺激性オリゴヌクレオチド及びその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、メチル化核酸、特別にはメチル化オリゴヌクレオチド、そしてより特別にはメチル化されたCpGジヌクレオチドモチーフのシトシンを含むメチル化オリゴヌクレオチドが、脂質粒子中に核酸を内包することによって、免疫刺激性とされ得ることを開示する。通常はインピボで免疫刺激性でない内包されたメチル化核酸が、内包されたそれらの非メチル化対応物と同等又はより有効であることがさらに開示される。本明細書中に開示された組成物及び方法を使用する抗原性刺激に応答して、樹状細胞集団を活性化及び/又は増殖させるための方法も開示される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

動物において免疫応答を刺激するための脂質 - メチル化核酸製剤であって、脂質成分及びメチル化核酸配列を含む核酸成分を含む、前記製剤。

【請求項 2】

前記メチル化核酸配列が、メチル化シトシンを有する CpG ジヌクレオチドを少なくとも 1 つ含む、請求項 1 に記載の脂質 - 核酸製剤。

【請求項 3】

前記メチル化シトシンが、4 位の炭素 (4-mC) 又は 5 位の炭素 (5-mC) に結合したメチル又はヒドロキシメチル基を含む、請求項 2 に記載の製剤。

【請求項 4】

脂質 - 核酸 (LNA) 製剤を含むアジュバントであって、ここで、前記 LNA 製剤が以下の：

a) 少なくとも 1 の陽イオン性脂質を含む脂質成分；及び

b) 少なくとも 1 のメチル化オリゴヌクレオチドを含む核酸成分；

を含み、ここで、前記アジュバントが抗原刺激に应答して、インビボで樹状細胞を刺激することができる、前記アジュバント。

【請求項 5】

CD11c 及び DEC205 マーカーのうちの少なくとも 1 を発現する抗原提示細胞の数を増加させることを特徴とする、インビボでの樹状細胞の増殖を刺激することのできる、請求項 4 に記載のアジュバント。

【請求項 6】

CD86 マーカーとともに、CD11c 及び DEC205 マーカーのうちの少なくとも 1 を発現する抗原提示細胞の数を増加させることを特徴とする、インビボでの樹状細胞の活性化を刺激することのできる、請求項 4 に記載のアジュバント。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 のメチル化オリゴヌクレオチドが、メチル化シトシンを有する単一の CpG ジヌクレオチドを含む、請求項 4 に記載のアジュバント。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 のメチル化オリゴヌクレオチドが、配列 5' TAACGTTGAGGGGCAT 3' を含む (ODN1m)、請求項 7 に記載のアジュバント。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 のメチル化オリゴヌクレオチドが、2 の CpG ジヌクレオチドを含み、ここで、前記 CpG ジヌクレオチド中の少なくとも 1 のシトシンがメチル化されている、請求項 4 に記載のアジュバント。

【請求項 10】

前記メチル化核酸配列が、配列 5' TTCCATGACGTTCTGACGTT 3' を有するオリゴヌクレオチド (ODN2m) である、請求項 9 に記載の製剤。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 のメチル化オリゴヌクレオチドが、メチル化シトシンを有する CpG ジヌクレオチドを少なくとも 1 つ含む、請求項 4 に記載のアジュバント。

【請求項 12】

前記オリゴヌクレオチドが、修飾されたリン酸骨格を含む、請求項 4 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のアジュバント。

【請求項 13】

前記修飾されたリン酸骨格が、ホスホロチオエートである、請求項 12 に記載のアジュバント。

【請求項 14】

少なくとも 1 の標的抗原とともに脂質 - 核酸 (LNA) 製剤を含むワクチンであって、ここで、前記少なくとも 1 の標的抗原が、前記 LNA 製剤と混合又は会合させられ、前記製剤が、以下の：

10

20

30

40

50

a) 少なくとも1の陽イオン性脂質を含む脂質成分；及び

b) 少なくとも1のメチル化オリゴヌクレオチドを含む核酸成分；

を含み、ここで、前記ワクチンが、前記製剤による、前記少なくとも1の標的抗原の抗原提示細胞への提示に応答して、インビボで樹状細胞を刺激することができる、前記ワクチン。

【請求項15】

前記ワクチンが、CD11c及びDEC205マーカーのうちの少なくとも1を発現する抗原提示細胞の数を増加させることを特徴とする、インビボでの樹状細胞の増殖を刺激することのできる、請求項14に記載のワクチン。

【請求項16】

前記ワクチンが、CD86マーカーとともに、CD11c及びDEC205マーカーのうちの少なくとも1を発現する抗原提示細胞の数を増加させることに特徴を有する、インビボでの樹状細胞の活性化を刺激することのできる、請求項14に記載のワクチン。

【請求項17】

前記少なくとも1のメチル化オリゴヌクレオチドが、メチル化シトシンを有する、単一のCpGジヌクレオチドを含む、請求項14に記載のワクチン。

【請求項18】

前記少なくとも1のメチル化オリゴヌクレオチドが、複数のCpGを含み、ここで、前記CpGジヌクレオチドのうちの少なくとも1がメチル化シトシンを含む、請求項14に記載のワクチン。

【請求項19】

前記少なくとも1のメチル化オリゴヌクレオチドが、メチル化シトシンを有するCpGジヌクレオチドを少なくとも1つ含む、請求項14に記載のワクチン。

【請求項20】

前記少なくとも1の標的抗原が、微生物抗原を含む、請求項14～19のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項21】

前記少なくとも1の標的抗原が、腫瘍関連抗原を含む、請求項14～19のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項22】

前記少なくとも1の標的抗原が、同じ抗原からの複数のエピトープを含む、請求項14に記載のワクチン。

【請求項23】

前記少なくとも1の標的抗原が、異なる抗原からの複数のエピトープを含む、請求項14に記載のワクチン。

【請求項24】

前記オリゴヌクレオチドが修飾されたリン酸骨格を含む、請求項14～23のいずれか1項に記載のワクチン。

【請求項25】

前記修飾されたリン酸骨格が、ホスホロチオエートである、請求項24に記載のワクチン。

【請求項26】

抗原刺激への宿主の亢進された免疫応答を刺激するための方法であって、前記宿主に脂質-核酸(LNA)製剤を投与するステップを含み、ここで、前記LNA製剤が、以下の：

a) 少なくとも1の陽イオン性脂質を含む脂質成分；及び、

b) 少なくとも1のメチル化オリゴヌクレオチドを含む核酸成分

を含み、ここで、前記LNA製剤が、抗原刺激に応答して、インビボで樹状細胞を刺激することのできる、前記方法。

【請求項27】

前記LNA製剤が、CD11c及びDEC205マーカーのうちの少なくとも1を発現する抗原提示細胞

10

20

30

40

50

胞の数を増加させることを特徴とする、インビボでの樹状細胞の増殖を刺激することができる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 LNA 製剤が、CD86 マーカーとともに、CD11c 及び DEC205 マーカーのうちの少なくとも 1 を発現する抗原提示細胞の数を増加させることに特徴を有する、インビボでの樹状細胞の活性化を刺激することができる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

前記少なくとも 1 のメチル化オリゴヌクレオチドが、メチル化シトシンを有する単一の CpG ジヌクレオチドを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記少なくとも 1 のメチル化オリゴヌクレオチドが、配列 5' TAACGTTGAGGGGCAT 3' を含む (ODN1m)、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記少なくとも 1 のメチル化オリゴヌクレオチドが、少なくとも 2 の CpG ジヌクレオチドを含み、ここで、前記 CpG ジヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つの中のシトシンがメチル化されている、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

前記メチル化核酸配列が、配列 5' TTCCATGACGTTCTGACGTT 3' を有するオリゴヌクレオチド (ODN2m) である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記 LNA 製剤が、少なくとも 1 の標的抗原とともに投与され、ここで、前記少なくとも 1 の標的抗原が前記 LNA 製剤と混合され又は会合させられている、請求項 26 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

前記少なくとも 1 の標的抗原が前記 LNA 製剤と混合されている、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記少なくとも 1 の標的抗原が、前記 LNA 製剤と会合させられている、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記メチル化オリゴヌクレオチドが、修飾されたリン酸骨格を含む、請求項 26 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記メチル化オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエート骨格を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

樹状細胞を刺激するための方法であって、少なくとも 1 の樹状細胞を、脂質成分及びメチル化核酸配列を含む核酸成分を含む脂質 - メチル化核酸製剤と接触させるステップを含む、前記方法。

【請求項 39】

インビボで宿主の樹状細胞を刺激するための方法であって、前記宿主に、脂質成分及びメチル化核酸配列を含む核酸成分を含む脂質 - メチル化核酸製剤を投与するステップを含み、ここで、前記製剤が、抗原刺激に応答して、インビボで樹状細胞を刺激することができる、前記方法。

【請求項 40】

樹状細胞の刺激が、CD11c 及び DEC205 マーカーのうちの少なくとも 1 を発現する抗原提示細胞の数を増加させることを特徴とする、樹状細胞の増殖を含む、請求項 38 又は 39 に記載の方法。

【請求項 41】

樹状細胞の刺激が、CD86 マーカーとともに CD11c 及び DEC205 マーカーのうちの少なくと

10

20

30

40

50

も 1 を発現する抗原提示細胞の数を増加させることを特徴とする、樹状細胞の活性化を含む、請求項 38 又は 39 に記載の方法。

【請求項 42】

前記メチル化核酸配列が、メチル化シトシンを有する CpG ジヌクレオチドを少なくとも 1 つ含む、請求項 38 ~ 41 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】

前記メチル化シトシンが、4 位の炭素 (4-mC) 又は 5 位の炭素 (5-mC) に結合したメチル基又はヒドロキシメチル基を含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

抗原提示細胞に、抗原及びアジュバントの免疫刺激を同時にデリバリーするための方法であって、標的抗原と会合した脂質 - 核酸 (LNA) 製剤を投与するステップを含み、ここで、前記 LNA 製剤が以下の：

a) 少なくとも 1 の陽イオン性脂質を含む脂質成分；及び

b) 少なくとも 1 の CpG ジヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを少なくとも 1 つ含む核酸成分；

を含み、ここで、前記 LNA 製剤がインビボで樹状細胞を刺激することができる、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2002年5月10日に出願された米国仮出願第60/379,343号；及び2002年11月7日に出願された米国特許出願第10/290,545号；及び2003年4月4日に出願された米国特許出願第60/460,646号に基づく優先権を主張する。

【0002】

技術分野

本発明は、脂質 - 核酸製剤及びインビボでの疫応答の刺激におけるそれらの使用方法、及び特に、相乗的にそれらの免疫刺激活性を高めるように、少なくとも 1 のメチル化シトシンを含む核酸配列のリボソーム製剤に関し、ここで、該メチル化シトシンが好ましくは CpG モチーフを形成する。

【背景技術】

【0003】

シトシンのメチル化は、真核生物において唯一知られた DNA の内因性の修飾であって、シトシンの 4 位の炭素又は 5 位の炭素へのメチル又はヒドロキシメチル基の酵素的付加によって起こる。Costello and Plass, 2001, *J. Med. Genet.* 38:285。より高い頻度でメチル化シトシン残基を有するが、いかなる応答も刺激しない脊椎動物 DNA とは対照的に、細菌 DNA 中で発見された、より低頻度で起こるメチル化シトシン残基が、細菌 DNA がインビトロ及びインビボで免疫応答を引き出すことができた理由として、多くの研究者によって示唆された。Messina et al, 1991, *J. Immunol* 147: 1759。末梢血単核細胞アッセイ (PBMC) を用いてインビトロでのオリゴヌクレオチドの分裂促進性を測定したその後の研究は、非メチル化 DNA が分裂を促進することができるが、メチル化 DNA が分裂を促進できないことを示した。試験した多くのオリゴヌクレオチド配列の中で、CpG ジヌクレオチドモチーフを有する配列が特別に分裂を促進することが示された。Kreig et al, 1995, *Nature* 374:546-9。CpG ジヌクレオチドモチーフを有するオリゴヌクレオチドはまた、該ジヌクレオチドのシトシンがメチル化されていないという条件で、インビボで免疫刺激性であることも示された。Parronchi P, et al 1999, *J. Immunol* 163:5946-53; Kreig A.M. 1999, *Biochim Biophys Acta* 1489: 107-16。

【0004】

同様に、米国特許第6,194,388号は、インビトロでのPBMCへのチミジンの取り込みに基づいて分裂促進性を測定することによって、T細胞除去された脾細胞中のB細胞分裂促進性

10

20

30

40

50

が、CpGモチーフのシトシンがメチル化されると消滅するが、他のシトシンがメチル化されても消滅しないことを開示した。続いて、インビトロでのウリジン取り込みの測定による、T細胞除去された脾細胞中のB細胞活性化を誘導する能力についての300を超えるオリゴヌクレオチドのスクリーニングに基づいて、関連する米国特許出願第6,207,646号は、非メチル化CpGジヌクレオチドモチーフを有するオリゴヌクレオチドが、CpGモチーフを欠くオリゴヌクレオチドよりも分裂促進の刺激においてより有効であり、そして同じCpGオリゴヌクレオチドのメチル化対応物はそれほど有効でなかったということを開示した。B細胞分裂促進性に対して最も負の衝撃をあたえたメチル化部位が、CpGジヌクレオチドのシトシンであることが再び示され、これは、メチル化された場合、他のシトシンのメチル化に比べてインビトロでの刺激をより減少させた。

10

【0005】

同じ出願人のグループは、米国特許第6,236,116号（メチル化配列における、減少したNK細胞溶解活性）、同第6,406,705号（非CpGオリゴヌクレオチドが、HBsAgと併用されると、アジュバント効果を欠く）及び同第6,429,199号（GM-CSFと組み合わせると、CpGモチーフのメチル化が刺激効果を失わせた）において同様の結論に達した。したがって、概して、メチル化CpGオリゴヌクレオチドは、インビトロでの分裂促進効果の刺激又はインビボでの免疫刺激効果の誘発において、一貫して、無効であるか又はメチル化オリゴヌクレオチドよりもかなり有効性が低いということが示された。

【0006】

最近、PCT国際出願公開第W002/069369号において、Schetterらは、CD86、CD80、CD25及びCD69を含む、一定の白血球表面マーカーの産生を測定するインビトロのPBMCアッセイに基づいて、あるタイプのメチル化CpGオリゴヌクレオチドが免疫刺激活性を有することができることを示唆した。しかしながら、試験した核酸配列は、1～4のCpGジヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド中の4～9の部位において高度にメチル化されており、例示されたすべての場合において、メチル化オリゴヌクレオチドは、それらの非メチル化対応物よりもより有効性が低いままであった。グアノシンを置換したイノシン、イノシンに隣接するシトシン、イノシンに隣接する塩基を置換した塩基を欠く糖を有する「dスパーサー」、Zが2-デオキシウリジン、5-フルオロ-2'デオキシウリジンによって置換されたZpGジヌクレオチド、及びYが、2-アミノプリン、キサントシン、N7-メチル-キサントシン、ネブラリン又はdスパーサーである、CpYジヌクレオチドを含む多様な追加のオリゴヌクレオチド構造も研究された。不運なことに、インビトロのアッセイの予想値及び/又は提案された、インビボで生じるかも知れない免疫刺激活性に関する出願人の結論の正確性を実証するための、無作為化された配列又は同じ長さの配列の混合物のような有用な対照配列はなかった。さらに、抗原提示細胞の主要なサブセットである樹状細胞では、免疫刺激活性は見られなかった。

20

30

【0007】

本分野においては、亢進された免疫刺激活性を有する、改善されたアジュバント組成物が持続的に必要とされている。該組成物は、特に樹状細胞を含む、より広い範囲の抗原提示細胞を刺激することができなくてはならない。さらに、該組成物は、単独で、及び腫瘍、病原体又は他の抗原との併用の両方で、インビボにおいて有効な免疫応答を刺激することができなくてはならない。

40

【0008】

免疫刺激性のアジュバントとして使用されることのできる核酸配列モチーフの幅を広げることにも着目されている。特別に必要とされるのは、メチル化シトシンを有するCpGジヌクレオチド配列並びにインビトロにおける免疫刺激活性に顕著な可変性を示す他のオリゴヌクレオチド構造から、一貫した免疫刺激活性を誘導することのできる組成物及び方法である。

【発明の開示】

【0009】

発明の要約

50

発明者らは、本明細書中に記載された、脂質核酸（LNA）製剤中へのメチル化核酸配列の取り込みが、従来技術における上記の問題を解決し、相乗的な利益を与えることを発見した。特別には、本発明にしたがって使用された場合、メチル化核酸配列の免疫刺激活性は、著しく亢進されることができ、従来技術において報告された広く可変な結果とは非常に対照的に、一貫してインビボでの免疫刺激の改善を達成した。驚くべきことに、本発明の脂質 - メチル化核酸製剤はまた、対応する非メチル化配列を採用する類似の脂質 - 核酸製剤と同等、そして多くの場合により高い治療的有効性を示す。さらに、免疫刺激活性は、より広いクラスの抗原提示細胞、そして特に樹状細胞において得られた。さらに、本明細書において示され、そして従来技術とは異なるように、単一のメチル化CpGジヌクレオチドのみを有する内包された核酸によって、有効な免疫刺激が達成されることができ

10

【0010】

1の側面において、本発明は、動物において免疫応答を刺激するための、脂質成分及び少なくとも1のメチル化核酸配列を含む核酸成分を含む、脂質 - メチル化核酸製剤を提供する。ある好ましい実施態様において、メチル化核酸配列は、少なくとも1のシトシンの4位の炭素（4-mC）又は5位の炭素（5-mC）に結合したメチル又はヒドロキシメチル基を含み、ここでメチル化シトシン残基は、一般的に上記配列中に位置するCpGジヌクレオチドモチーフの一部である。他の好ましい実施態様においては、メチル化核酸は、完全に脂質成分中に内包され、本明細書中でさらに記載されるリポソーム粒子を形成する。

【0011】

ある実施態様において、メチル化核酸配列は、遊離の核酸として動物に投与された場合、インビボにおける免疫刺激活性を有さない。他の実施態様においては、脂質 - メチル化核酸製剤は、インビボにおいて、同じ配列を有するが1以上のシトシン残基のメチル化を有さない対応する脂質核酸製剤と同等又はより高い免疫刺激性を有する。

20

【0012】

1の実施態様において、核酸配列は、メチル化シトシンを有する少なくとも1のCpGジヌクレオチドを含む。好ましい実施態様において、核酸配列は、単一のCpGジヌクレオチドを含み、ここで、上記CpGジヌクレオチド中のシトシンは、メチル化されている。特別な実施態様において、上記核酸配列は、配列5' TAACGTTGAGGGGCAT3'（ODN1m）を含む。他の実施態様において、上記核酸配列は、少なくとも2のCpGジヌクレオチドを含み、ここで、CpGジヌクレオチド中の少なくとも1のシトシンがメチル化されている。他の特別な実施態様において、上記核酸配列は、配列5' TTCCATGACGTTCTGACGTT3'（ODN2m）を含む。他の実施態様において、上記核酸配列は、複数のCpGジヌクレオチドを含み、ここで、上記CpGジヌクレオチドの少なくとも1がメチル化シトシンを含む。しかしながら、重要なことに、そして従来技術とは異なり、メチル化シトシンを有する単一のCpGジヌクレオチドのみ、又は複数のCpGジヌクレオチドであって、該CpGジヌクレオチドのシトシンの1又は2, 3個がメチル化されているものを利用して、本明細書中に記載の有効な免疫刺激が得られることができる。

30

【0013】

好ましい実施態様において、インビボで動物に投与された場合、上記脂質 - メチル化核酸製剤は、樹状細胞を活性化及び/又は増殖させることができる。1の側面において、CD11c及びDEC205マーカーのうちの少なくとも1を含む樹状細胞は、対象製剤の投与、好ましくは抗原刺激とともに行われる該投与によって、インビボで増殖される。他の側面において、CD11c又はDEC205マーカーを含む樹状細胞は、インビボにおいて活性化されて、対象製剤の投与後、ここでも好ましくは抗原刺激とともに行われる該投与後に、CD86マーカーを発現する。

40

【0014】

多様な実施態様において、上記脂質 - 核酸製剤はさらに、薬剤として許容可能な担体、緩衝液又は希釈剤を含む。

【0015】

ある実施態様において、上記核酸は、ホスホジエステル骨格から成る。他の実施態様に

50

において、上記核酸は、非ホスホジエステル骨格から成る。より特別な実施態様において、上記非ホスホジエステル骨格は、ホスホロチオエート骨格である。

【0016】

組成物の多様な実施態様において、リポソーム粒子は、陽イオン性脂質を含む。陽イオン性脂質の例は、DDAB、DODAC、DOTAP、DMRIE、DOSPA、DMDMA、DC-Chol、DODMA、DODAP及びそれらの混合物からなる陽イオン性脂質の群から選ばれる。さらなる実施態様において、リポソーム粒子は、さらに、DOPE、DSPC、POPC、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジエタノラミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、セレプロシド、及びそれらの混合物からなる群から選ばれる中性脂質を含む。他の実施態様において、リポソーム粒子は、DOPE、DSPC、POPC、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジエタノラミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、セレプロシド及びそれらの混合物からなる群から選ばれる中性脂質のみを含む。他の実施態様においては、脂質粒子は、DODAP、DODMA、DSPC、POPC及びそれらの混合物からなる群から選ばれる脂質を含む。他のある実施態様においては、脂質粒子は、スフィンゴミエリンとDODAP、DODMA、DSPC、POPC及びそれらの混合物からなる群から選ばれる脂質の混合物を含む。さらに他の実施態様においては、脂質成分は、DSPC、DODMA、Chol、及びPEG-DMGを含み、上記DSPC対上記DODMA対上記Chol対上記PEG-DMGの比率は、約20：25：45：10モル／モルである。さらなるより特別な実施態様においては、上記脂質成分対上記核酸成分の比率は、約0.01～0.25重量／重量である。

10

【0017】

他の実施態様において、上記脂質粒子はさらに、脂質粒子表面上の立体障壁脂質成分を含む。ある実施態様において、立体障壁脂質成分は、PEG-DMG、PEG-PE、及びPEGセラミドからなる群から選ばれる。1の実施態様において、上記PEGセラミドは、PEG-セラミドC-14である。他の実施態様において、上記PEGセラミドは、PEG-セラミドC-20である。

20

【0018】

なおさらなる実施態様において、着目の抗原を、上記の脂質 - メチル化核酸製剤とともに含む組成物が提供される。抗原は、脂質 - メチル化核酸製剤と混合されることができ、又は会合させられることができる。好ましくは、上記抗原は、本明細書中に記載の通りに、上記製剤と会合させられる。1の実施態様において、上記抗原は、腫瘍抗原である。好ましい実施態様において、メチル化核酸配列は、少なくとも1のCpGジヌクレオチドモチーフ内に位置する4-mC又は5-mCを含む。特別に好ましい実施態様において、メチル化核酸配列は、リポソーム粒子中に内包される。さらなる実施態様において、上記抗原もまた、リポソーム粒子中に内包される。

30

【0019】

他の側面において、本発明は、改善された免疫応答を誘導するために、先の組成物のいずれかを動物に投与することを含む、上記動物において亢進された免疫活性を刺激する方法を提供する。上記LNA製剤は、直接的にアジュバントとして使用されるか、又は1以上の標的抗原とともにワクチン製剤中で有利に組み合わせられることができる。好ましくは、対象の組成物の投与は、上記動物の免疫系中に存在する1以上の樹状細胞を刺激することができる。1の実施態様において、標的抗原は、本明細書中に記載の脂質 - 核酸製剤、より好ましくはリポソーム粒子、と会合して投与される。さらに好ましい実施態様において、上記抗原は、リポソーム粒子中に内包される。ある実施態様において、上記抗原は、1以上の腫瘍抗原又は微生物抗原からの1以上のエピトープを含む。

40

【0020】

さらなる側面において、インビトロ、エキスビボ、又はインビボにおいて、少なくとも1の抗原提示細胞を、本明細書中に記載の免疫刺激性組成物と接触させるステップを含む、抗原提示細胞の刺激方法が提供される。好ましい実施態様において、上記抗原提示細胞は、樹状細胞を含む。

【0021】

1の実施態様において、CpGジヌクレオチド中に位置する少なくとも1の4mC又は5m

50

Cを有する核酸配列を含む、対象の脂質 - 核酸製剤を宿主に投与することを含み、ここで、上記投与が上記宿主中で樹状細胞を増殖させるのに有効である、インビボにおいて樹状細胞を増殖させる方法が提供される。好ましくは、上記樹状細胞の増殖は、CD11c 及びDEC205マーカーのうちの少なくとも1を発現する、宿主の抗原提示細胞数を増加させることに特徴を有する。

【0022】

他の実施態様において、CpGジヌクレオチド内に位置する少なくとも1の4mC又は5mCを有する核酸配列を含む、対象の脂質 - 核酸製剤を宿主に投与することを含み、ここで、上記投与が、抗原刺激に応答して上記宿主中で樹状細胞を増殖させるのに有効である、インビボにおいて樹状細胞を活性化する方法が提供される。好ましくは、上記樹状細胞の活性化は、CD86マーカーとともに、CD11c 又はDEC205マーカーのうちの少なくとも1を同時発現させる宿主抗原提示細胞の数を増加させることに特徴を有する。特別に好ましい実施態様においては、抗原刺激は、対象の製剤を1以上の着目の標的抗原とともに、脂質 - メチル化核酸製剤と混合して又は会合させて、投与することのいずれかによって達成される。

10

【0023】

発明の詳細な説明

本発明は、メチル化核酸、特別にはメチル化オリゴヌクレオチド、より特別にはCpGジヌクレオチドモチーフのメチル化シトシンを含むメチル化オリゴヌクレオチド、が、該核酸を脂質粒子中に内包することによって、インビトロ、エクスピボ及びインビボのいずれかにおいて免疫応答の刺激を亢進することができるという発見に基づいて、製剤及びその使用方法を提供する。通常はその遊離の形態においてインビボで免疫刺激性でない脂質に内包されたメチル化核酸が、対象の製剤中に内包された場合には、実際にそれらの非メチル化対応物に比べて、免疫応答の刺激において同等、及びいくつかの場合にはより有効であることができることがさらに開示された。

20

【0024】

本発明は、多様な骨格とともに構成され、そして多様な脂質粒子製剤中に内包された多様なオリゴヌクレオチドのメチル化及び非メチル化対応物を試験することによって、例解される。通常のホスホジエステル(P0)骨格並びにホスホロチオエート(PS)骨格を有する、脂質に内包されたメチル化オリゴヌクレオチドは、免疫刺激性である。いくつかの場合には、PS骨格がTh-1を介する体液性免疫応答を刺激することができる一方、P0骨格がTh-1を介する細胞性免疫応答を亢進することができることがさらに開示される。本発明のある側面において、脂質に内包されたメチル化オリゴヌクレオチドは、さらに、標的抗原、特別には微生物抗原及び/又は腫瘍関連抗原と組み合わせられる。

30

【0025】

特別には、本発明にしたがって使用された場合、メチル化核酸配列の免疫刺激活性は、顕著に亢進され、従来技術において報告された広く可変な結果とは非常に対照的に、改善された免疫刺激は、インビボにおいても一致して達成される。さらに、免疫刺激活性は、より広いクラスの抗原提示細胞、特に樹状細胞において得られる。本発明は、脂質に内包された場合の、メチル化オリゴヌクレオチド処理による樹状細胞の活性化及び増殖を最初に実証するものである。したがって、樹状細胞の活性化及び/又は増殖の亢進方法は、本発明の他の側面である。本発明の多様な製剤の製造、使用及び試験方法は、以下において、及びそっくりそのまま参考文献として本明細書に援用されている引用文献中において記載される。

40

【0026】

略語及び定義

以下の略語は本明細書中で使用される：RBC、赤血球；DDAB、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロマイド；DODAC、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロライド；DOPE、1,2-sn-ジオレイルホスファチジルエタノラミン；DOSPA、2,3-ジオレイロキシ-N-(2(スベルミンカルボキサミド)エチル)-N,N-ジメチル-1-プロパナミ

50

ニウムトリフルオロアセテート；DOTAP、1,2-ジオレオイロキシ-3-(N,N,N-トリメチルアミノ)プロパンクロライド；DOTMA、1,2-ジオレオイロキシ-3-(N,N,N-トリメチルアミノ)プロパンクロライド；OSDAC、N-オレイル-N-ステアシル-N,N-ジメチルアンモニウムクロライド；RT、室温；HEPES、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸；FBS、ウシ胎児血清；DMEM、ダルベッコ改変イーグルス培地；PEG-Cer-C.sub.14、1-O-(2'-(オメガ-メトキシポリエチレングリコール)サクシノイル)-2-N-ミリストイル-スフィンゴシン；PEG-Cer-C.sub.20、1-O-(2'-(オメガ-メトキシポリエチレングリコール)サクシノイル)-2-N-アラキドイル-スフィンゴシン；PBS、リン酸緩衝生理食塩水；THF、テトラヒドロフラン；EGTA、エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)-テトラ酢酸；SF-DMEM、血清除去DMEM；NP40、ノニルフェノキシポリエトキシエタノール；1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアミノプロパン(DODAP)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)及びジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)。

10

【0027】

本明細書中で使用される技術的及び科学的用語は、特記されない限り、本発明が属する分野の当業者に普通に理解される意味を有する。本明細書中で、当業者に知られた多様な方法論について言及される。言及されるそのような知られた方法論を説明する刊行物及び他の物はそっくりそのまま本明細書中に参考文献として援用されている。組換えDNA技術について説明している標準的な参考文献は、以下の：Sambrook, J., et al Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainville, N.Y. (1989); McPherson, M., J., Ed., Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford(1991); Jones, J., Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford Science Publications, Oxford (1992); Austen, B. M. and Westwood, O.M.R., Protein Targeting and Secretion, IRL Press, Oxford (1991)を含む。当業者に知られたいずれかの好適な材料及び/又は方法が本発明を実施するのに使用されることができ、好ましい材料及び/又は方法が記載される。以下の記載及び実施例において言及される材料、試薬等は、特記されない限り商業的な供給源から入手可能である。当業者は本明細書の記載に基づいて本発明を最も完全に利用できる。本出願全体に記載される(参考文献、発行された特許、公報に記載の特許出願、及び同時係属特許出願を含む)参考文献すべての内容は参考文献として明白に援用されている。

20

【0028】

本発明の方法中で使用される免疫刺激性の組成物は、一般的には、少なくとも1の脂質成分及び少なくとも1の治療剤を含み、インビボにおいて治療剤単独よりも大きな免疫刺激活性を有する脂質-治療剤(「LTA」)製剤を意味する。本明細書中で使用される「治療剤」又は「治療化合物」又は「薬物」は相互に交換可能に使用されることができ、対象の医療処置において有益な効果を提供する合成の、組換えの、又は天然のいずれかの分子を意味する。治療剤の例は、核酸、ペプチド、及び化学物質を含むが、これらに限定されない。

30

【0029】

本明細書中に記載の好ましい実施態様においては、治療剤は少なくとも1のメチル化核酸配列、より好ましくは少なくとも1のメチル化オリゴヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも1のメチル化オリゴデオキシヌクレオチド(「ODN」)を含む。好ましい実施態様において、メチル化シトシン残基は、上記配列中に位置するCpGジヌクレオチドモチーフの部分である。CpGは、少なくとも1のシトシンの4位の炭素(4-mC)又は5位の炭素(5-mC)に結合したメチル又はヒドロキシメチル基を含む。さらなる実施態様においては、Henry et al. 2000 J. Pharmacol. Exp. Ther. 292:468, Zhao et al. 1999 Bioorg. Med. Chem Lett. 9:3453, Zhao et al. 2000 Bioorg Med. Chem Lett. 10:1051に記載のとおり、メチル化核酸配列は、デオキシリボース又はリボースの糖部分のメチル修飾を、選択的に又は付加的に含むことができる。特別に好ましい実施態様において、ODNは、免疫刺激活性を有し、非メチル化形態において免疫刺激性配列(「ISS」)と名づけられたメチル化核酸配列を含む。

40

50

【0030】

本明細書中で使用される「対象」又は「宿主」は、免疫系を有する雄性又は雌性の生物、好ましくは動物、より好ましくは脊椎動物、さらにより好ましくは哺乳動物、なおより好ましくはげっ歯類、最も好ましくはヒトを意味する。対象のさらなる例は、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、マウス、ウサギ及びラットを含むがこれらに限定されない。本明細書中で使用される「患者」は、健康に問題のある状態（例えば、病気又は障害）の治療を必要とする対象を意味する。

【0031】

本明細書中で使用される「インビボ」は、生物において、好ましくは哺乳動物において、より好ましくはげっ歯類において、最も好ましくはヒトにおいてということを意味する。

10

【0032】

本明細書中で使用される「免疫刺激性の」、「免疫刺激活性」又は「免疫応答を刺激する」又はそれらの文法的な同義語は、免疫応答を誘導、増加、亢進、又は調節する、或いは他の方法で免疫応答に関して有益な効果を提供することを意味する。本明細書中で使用されるとおり、「免疫応答」は、全身的な及び／又は粘膜の免疫応答を意味する。好ましくは、そして従来技術中で報告されたインビトロの実験結果における広い変動に鑑みて、所定の製剤及び核酸配列の免疫刺激活性は、本明細書に記載の好適なインビボアッセイにおいて決定される。

【0033】

本明細書中で使用される「標的抗原」は、免疫応答がそれに方向づけられ又は刺激される、着目の抗原を意味する。標的抗原に対する免疫応答を刺激するための本発明の組成物中で使用されるその標的抗原は、合成の、天然の、又は単離された分子又はそのフラグメントであることができ、1又は複数のエピトープを含むことができる。したがって、本発明の組成物は、抗原の1又は複数のエピトープに対する免疫応答を刺激することができる。好ましい実施態様において、標的抗原は本発明の脂質粒子に結合されている。「会合して」、「と会合させられて」又はそれらの文法的な同義語は、抗原（又は標的抗原）に関して本明細書中で使用される場合、他の成分に結合又は内包された抗原を意味する。本発明の脂質粒子又はリポソームに関して、抗原は例えば、脂質粒子のルーメン又はラメラ内スペースに内包され；脂質膜内に配置若しくは結合され、又は部分的に配置若しくは結合され、或いは脂質粒子に結合（例えば、共有結合又はイオン結合）されることができ、抗原は脂質粒子の内側に結合されることができ、又はより好ましくは抗原は脂質粒子の外側に結合されることができ、好ましい実施態様において、抗原は脂質粒子内に内包される。

20

30

【0034】

本発明の組成物及び方法において有用な抗原の例は、ペプチド又はタンパク質、細胞、細胞抽出物、ポリサッカライド、ポリサッカライド結合体、脂質、糖脂質、糖タンパク質、及び炭水化物を含むが、これらに限定されない。1の実施態様において、抗原はペプチド又はタンパク質抗原の形態にある。他の実施態様において、抗原は対象中での発現及びその対象の免疫系への提示に好適な形態のペプチド又はタンパク質をコードする核酸である。好ましい実施態様において、本発明の方法中で使用される組成物は、哺乳動物において標的抗原への免疫応答を刺激するペプチド又はタンパク質である標的抗原を含む。好ましくは標的抗原は、哺乳動物に感染することのできる病原体（「標的病原体」）であり、例えば、哺乳動物種に感染することのできる細菌、ウイルス、真菌、酵母、寄生体及び他の微生物を含む。或いは、標的抗原は腫瘍関連抗原であることができる。

40

【0035】

本明細書中で使用される「腫瘍関連抗原」は、腫瘍又は癌細胞に関連する分子又は化合物（例えば、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、脂質、糖脂質、炭水化物及び／又はDNA）であり、そしてMHC分子との関連において抗原提示細胞表面上に提示された場合、免疫応答を引き起こすことができる。腫瘍関連抗原は、自己抗原、並びに動物に投与された

50

場合に特異的に癌と関連しないかも知れないが、それでもなお癌の成長に対する免疫応答及び／又は癌の成長の減少を亢進する他の抗原を含む。自己免疫反応の潜在的リスクに鑑みると、対象のワクチン中での自己抗原の使用は、乳房、前立腺、精巣、メラニン細胞などの決定的でない組織に限定されることができる。より特異的な実施態様は本明細書中に提供される。

【0036】

本明細書中で使用される「微生物抗原」は、微生物の抗原及び感染性のウイルス、感染性の細菌、感染性の寄生生物及び感染性の真菌を含むがこれらに限定されない。微生物抗原は、完全な微生物及び天然の単離物、断片又はそれらの誘導体、天然の微生物抗原と同一又はこれに類似した合成化合物であって、好ましくは（天然の微生物抗原がそれに由来する）対応する微生物に特異的な免疫応答を誘導するものであることができる。好ましい実施態様において、化合物は、それが天然の微生物抗原に対する（体液性及び／又は細胞性の）免疫応答を誘導する場合、天然の微生物抗原に類似する。天然の微生物抗原に類似する化合物又は抗原は、当業者に周知である。天然の微生物抗原に類似する化合物の制限されない例は、ポリサッカライド抗原のペプチド擬態である。より特異的な実施態様は、本明細書中に提供される。

10

【0037】

「抗原」という用語はさらに、上記のような知られた又は野生型の抗原のペプチド又はタンパク質アナログを含むことを意図する。アナログは野生型抗原よりもより溶解性又はより安定であることができ、また抗原を免疫的により活性なものとする突然変異又は修飾を含むことができる。所望の抗原のアミノ酸配列に相同性のあるアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質もまた、本発明の組成物及び方法中で有用であり、ここで、相同性のある抗原はそれぞれの病原体への免疫応答を誘導する。

20

【0038】

本明細書中で使用される「相同な」は、例えば、2の核酸分子（例えば、2のDNA分子又は2のRNA分子）或いは2のポリペプチド分子である、2のポリマー分子間のサブユニット配列の類似性を意味する。両分子中のサブユニット位置が同一のモノマーサブユニット、例えば、仮に2のDNA中の位置がアデニンで占められる場合、それらはその位置において相同である。2の配列間の相同性は、マッチする位置又は相同な位置の数の直接的な関数であり、例えば、仮に2の化合物配列中の半分の位置（例えば、10サブユニット長のポリマー中の5の位置）が相同であれば、その2の配列は50%相同であり、仮に位置の90%、例えば10のうちの9がマッチするか相同であれば、その2の配列は90%の相同性を共有する。例として、DNA配列5'-CCGTTA-3'と5'-GCGTAT-3'は50%の相同性を共有する。本明細書中で使用される「実質的に相同」という用語によって所望の核酸に対して約50%相同な、好ましくは約70%相同な、さらに好ましくは約80%相同な、そして最も好ましくは約90%相同なDNA又はRNAが意味される。所望の抗原をコードする配列に相同な遺伝子は、それらが所望の抗原に実質的に類似した生理活性を有するタンパク質又はポリペプチドをコードするという条件で、本発明の範囲に含まれると解釈されるべきである。本明細書において、タンパク質及び／又はDNA配列は、同定された配列に対するそれらの相同性又は同一性パーセントによって定義され、相同性パーセント又は同一性パーセントの計算に使用されるアルゴリズムは以下の：Smith-Watermanアルゴリズム（J. F. Collins et al, *Comput. Appl. Biosci.*, (1988) 4:67-72; J.F. Collins et al, *Molecular Sequence Comparison and Alignment*, (M.J. Bishop et al, eds.) In Practical Approach Series: Nucleic Acid and Protein Sequence Analysis XVIII, IRL Press: Oxford, England, UK(1987)417）並びにBLSAT及びFASTAプログラム（E.G. Shpaer et al, 1996, *Genomics*, 38:179-191）を含む。これらの出典は、本明細書中に参考文献として援用されている。

30

40

【0039】

本明細書中に記載された抗原のアナログは、保存的アミノ酸配列の違い又は配列に影響を及ぼさない修飾のいずれか又は両方によって天然のタンパク質又はペプチドと相違する

50

。例えば、保存的アミノ酸配列の変更は行われることができ、そしてそれらがタンパク質又はペプチドの一次配列を変更させるにもかかわらず、通常はその機能を変化させない。(通常は一次配列を変更しない)修飾は、ポリペプチドのインビボ又はインビトロの化学的誘導体化、例えばアセチル化又はカルボキシル化を含む。抗原としては、例えば、その合成中及びプロセシング中に、又はさらなるプロセシングステップ中で、例えば、哺乳動物のグリコシル化又は脱グリコシル化酵素のようなグリコシル化に影響する酵素にポリペプチドを露出することによって、ポリペプチドのグリコシル化パターンを改変することによって作られる、グリコシル化によって修飾されたタンパク質をも意図する。アミノ酸配列であって、例えば、ホスホチロシン、ホスホセリン、又はホスホスレオニンのようなリン酸化されたアミノ酸残基を有するものも抗原として意図される。ポリペプチドであって、タンパク分解に対するそれらの耐性を向上させるように、又は溶解性を最適化するように通常の分子生物学の技術を用いて修飾されたものも抗原として意図される。そのようなポリペプチドのアナログは、天然のL-アミノ酸以外の残基、例えば、D-アミノ酸又は非天然の合成アミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0040】

本発明の抗原は、本明細書中に列挙された特異的な例示的プロセスの産物に限定されない。本発明において有用な抗原は、実質的に完全な長さのポリペプチドに加えて、ポリペプチドの免疫的に活性のあるフラグメントを含む。抗原は例えば、少なくとも1のエピトープを含む完全な抗原のフラグメントであることができる。本明細書中で使用される「エピトープ」は、抗体の抗原結合部位がそこへ結合することのできる、抗原上のいずれかの抗原決定基を意味する。エピトープの決定基は、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの化学的活性のある表面分子群からなり、通常、特別な3次元構造特性を有する。本発明の組成物及び方法の特別に好ましい実施態様は、同じ標的抗原からの複数のエピトープ、又は2以上の異なる標的抗原からのエピトープを含むコンビネーション抗原(すなわち、ポリトープワクチン)を含む。例えば、コンビネーション抗原は、例えば、ペプチド-ペプチド抗原、糖脂質-ペプチド抗原又は糖脂質-糖脂質抗原のような同じ又は異なるタイプであることができる。

【0041】

ポリペプチド又は抗原は、それが標的抗原又は病原に対する免疫応答を誘導する場合、「免疫的に活性」である。本明細書中で使用される「ワクチン」は、標的抗原を含み、標的抗原に対する特異的免疫応答を刺激する組成物を意味する。

【0042】

本明細書中で使用される「アジュバント」は、免疫応答を刺激することのできるいずれかの物質を意味する。いくつかのアジュバントは免疫系の細胞を活性化することができ、例えば、アジュバントは免疫系の細胞にサイトカインを産生させ、そして分泌させることができる。免疫細胞の活性化を引き起こすことのできるアジュバントの例は、Q.サポナリア(Q. saponaria tree)の樹皮から精製されたサポニン、例えばQS21(HPLC分画の21番目のピーク中に溶出する糖脂質; Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, Mass.); ポリ(ジ(カルボキシラートフェノキシ)ホスファゼン(PCPPポリマー; Virus Research Institute, USA); モノホスホリルリピッドA(MPL; Ribic ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.)のようなリポポリサッカライド誘導体、ムラミルジペプチド(MDP; Ribic)及びトレオニル-ムラミルジペプチド(t-MDP; Ribic); OM-174(リピッドAに関連したグルコサミンジサッカライド; OM Pharma SA, Meyrin, Switzerland); 及びレイシュマニア伸長因子(精製レイシュマニアタンパク質; Corixa Corporation, Seattle, Wash.)を含むが、これらに限定されない。伝統的なアジュバントは本分野において周知であり、例えばリン酸アルミニウム又はヒドロキシド塩(「ミョウバン」)を含む。

【0043】

本発明は、知られたアジュバントに比べて改善されたアジュバントであって、亢進されたTh-1にかたよった免疫応答を相乗的に刺激する脂質及び核酸の組み合わせを含むものを提供する。好ましい実施態様において、本発明のそのような組成物は核酸成分及び脂質成

分を含む。好ましくは、核酸成分は少なくとも1のオリゴヌクレオチド、より好ましくは少なくとも1のODN、そして最も好ましくは少なくとも1のCpGモチーフを含む少なくとも1のODNを含む。

【0044】

好ましい実施態様において、本発明の方法中で使用される免疫刺激性の組成物は、治療剤を内包する脂質膜を含む脂質成分を含む。本明細書中で使用される「リポソーム粒子」、「リポソーム」、「脂質ビヒクル」及び「リポソームビヒクル」又はそれらの文法的同義語は交換可能に使用され、水性の内容物を入れるか、又は内包する脂質含有膜を含む構造、粒子、複合体、又は製剤を意味する。好ましい実施態様において、リポソームは核酸のような治療剤を入れるか、又は内包している。リポソームは1以上の脂質膜を有することができる。本明細書において、1の脂質含有膜を有するリポソームは「単一層」と呼ばれる。複数の脂質含有膜を有するリポソームは、本明細書において「多重層」と呼ばれる。本明細書中で使用される「脂質二重層」は、2の層を有する、脂質含有膜を意味する。好ましい実施態様において、リポソームは多重層である。

10

【0045】

本発明の方法において使用される免疫刺激性の組成物は、一般的に、少なくとも1のメチル化核酸を内包する脂質粒子を含む。

【0046】

核酸

本発明の組成物中における使用に好適な核酸は、例えば、DNA又はRNAを含む。好ましくは、核酸はオリゴヌクレオチド、より好ましくはODN、そして最も好ましくはISSを含み（「ISS ODN」）、且つ少なくとも1のメチル化シトシを含むODNである。

20

【0047】

本明細書中で使用される「核酸」は、複数のヌクレオチド（すなわち、リン酸基及び交換可能な有機塩基に結合した糖（例えば、リボース又はデオキシリボース）である置換ピリミジン（例えば、シトシン（C）、チミン（T）又はウラシル（U））又は置換プリン（例えば、アデニン（A）又はグアニン（G））を含む分子）を意味する。核酸は、例えば、DNA又はRNAであることができる。好ましくは、核酸はオリゴリボヌクレオチドであり、より好ましくはODNである。核酸は、ポリヌクレオチド、すなわち、ポリヌクレオチドからリン酸塩を除いたもの、及び他のいずれかの有機塩基を含むポリマーであることもできる。本発明の免疫刺激性の組成物は核酸成分を含む。本明細書中で本発明の組成物に関して使用される「核酸成分」は、核酸を含む成分を意味する。

30

【0048】

好ましい実施態様において、オリゴヌクレオチドは一本鎖であり、5～50ヌクレオチド（「nt」）の範囲の長さである。しかしながら、例えば、500～50,000塩基対（「bp」）の範囲の大きな二本鎖プラスミドDNAを含むいずれかのオリゴヌクレオチドが使用されることができる。

【0049】

本発明の組成物及び方法において有用な核酸は、知られた供給源から得ることができ、また本分野において周知の方法を用いて単離することができる。核酸はまた、同様に本分野において周知の組換え方法又は合成方法によって調製されることもできる。そのような核酸はその後、脂質粒子中に内包されることができ、得られた組成物は本明細書中に記載された本発明の方法を用いて免疫刺激活性について試験される。

40

【0050】

インビボでの使用のためには、核酸は（例えば、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼを介した）分解に対して比較的耐性であることができる。ステムループのような二次構造は核酸を分解に対して安定化させることができる。或いは、核酸の安定化はリン酸塩骨格の修飾によって達成されることができる。好ましい安定化された核酸は、少なくとも部分的にホスホロチオエート修飾された骨格を有する。ホスホロチオエートはホスホラミデート又はH-ホスホネートの化学作用のいずれかを採用する自動化された技術を用いて

50

合成されることができる。例えば、米国特許第4,469,863号中に記載のようにアリール - 及びアルキル - ホスホネートは生成されることができ；そして（米国特許第5,023,243号及びヨーロッパ特許第092,574号に記載のとおり、荷電した酸素部分がアルキル化された）アルキルホスホトリエステルは、商業的に入手可能な試薬を用いて自動化された固相合成によって調製されることができる。他のDNA骨格の修飾方法及び置換方法は記載されている（Uhlmann, E. and Peyman, Chem. Rev. 90:544, 1990; Goodchild, Bioconjugate Chem. 1:165, 1990）。しかしながら、本明細書に記載の通り、本発明の方法及び組成物は、対象の核酸へそのような修飾を含める必要性を軽減する。

【0051】

したがって、本発明の組成物及び方法中で有用なオリゴヌクレオチドは、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、並びにそれらを相互に組み合わせたもの及び／又はそれらとホスホジエステルオリゴヌクレオチドの組み合わせなどの修飾されたリン酸骨格を有することができる。さらに、他の修飾オリゴヌクレオチドは以下の：アルキル - 及びアリールリン酸塩（その中の荷電したホスホネートの酸素がアルキル又はアリール基で置換されている）のような非イオン性DNAアナログ、その中の荷電した酸素部分がアルキル化されているアルキルホスホトリエステルを含む。本明細書中に記載の通り、細胞性免疫応答が望まれる場合にはPO ODNが好ましい一方、体液性免疫応答が望まれる場合には、PS ODNのような修飾ODNが好ましい。

10

【0052】

塩基、糖又は結合部分への他の多くの化学的修飾もまた有用である。塩基はメチル化又は非メチル化されることができる。好ましい実施態様において、メチル又はヒドロキシメチル基が、少なくとも1のシトシンの4位の炭素（4-mC）又は5位の炭素（5-mC）に結合している。好ましくは、メチル化シトシンは、核酸配列中のCpGモチーフ内に位置する。或いは、又はさらに、糖部分は、従来技術の記載のように、メチル基で修飾されることができる。

20

【0053】

本発明の組成物及び方法中で有用なヌクレオチド配列は、アンチセンスオリゴヌクレオチドのように患者／対象のmRNAに相補的なものであることができ、或いはそれらは外来又は非相補的なもの（例えば、該ヌクレオチド配列は患者／対象のゲノムに特異的にハイブリダイズしない。）であることができる。ヌクレオチド配列は発現されることができ、得られた発現産物はRNA及び／又はタンパク質であることができる。さらに、そのようなヌクレオチド配列は適切なプロモーター及び発現要素に連結されることができ、発現ベクターに含まれることができる。本発明の組成物及び方法中で有用なヌクレオチド配列は、ヘアピン二次構造（Yamamoto S., et al. (1992) J. Immunol. 148:4072-4076を参照のこと）、又はCpGモチーフ、或いは他の知られたISSの特徴（例えば、マルチGドメイン、PCT国際特許出願公開第W096/11266号を参照のこと）へ導く一定のパリンドロームのようなISSであることができる。特別に好ましい実施態様において、核酸配列は、メチル化シトシンを含む、少なくとも1のCpGモチーフを含む。

30

【0054】

本発明の核酸は、本分野において周知の多数の方法のいずれかを用いてデノボ合成されることができる。例えば、b - シアノエチルホスホラミダイト法（Beaucage, S.L., and Caruthers, M.H. Tet. Let. 22:1859, 1981）；ヌクレオシド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）である。これらの化学は、市場で入手可能な多様な自動化されたオリゴヌクレオチド合成装置によって実施されることができる。また、CpGジヌクレオチドもプラスミド中で大量に産生されることができる（Sambrook, T. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989を参照のこと）。そのようなプラスミドはまた、DNAワクチンの場合の抗原をコードす

40

50

る遺伝子のように、発現される他の遺伝子をコードすることもできる。オリゴヌクレオチドは制限酵素、エキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼを採用するもののような知られた技術を用いて、現存の核酸配列（例えば、ゲノムの又はcDNA）から調製されることもできる。

【0055】

インビボでの投与のためには、その成分、例えば脂質成分又は核酸成分、を含む本発明の組成物は、標的細胞（例えば、B細胞、単核球細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞）表面へより高い親和性をもって結合し、及び/又は標的細胞による細胞取り込みが増加することとなる分子と会合させられることができる。その成分を含む本発明の組成物は、本分野において周知の技術を用いて所望の分子にイオン結合又は共有結合で会合させられることができる。プロテインA、カルボジイミド、及びN-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）などの多様なカップリング剤又は架橋剤が使用されることが

10

【0056】

生物中における核酸配列の免疫刺激活性は、問題の配列を他の免疫刺激剤、例えば、他のアジュバント又はISSと比較することにより；或いは、問題の配列の免疫刺激活性を検出又は測定、例えば宿主の防御機構の活性化又は免疫系成分の活性化を検出又は測定することによる単純な実験によって決定されることができる。そのようなアッセイは本分野において周知である。また、当業者は、本明細書中に記載され、及び/又は本分野において知られた日常のアッセイを使用する、着目の特定の哺乳動物種に対して有用な最適のオリ

20

【0057】

本発明の組成物及び方法中で使用するのに好適な特別なODNの核酸配列は、本明細書中に参考文献として援用されている、米国特許出願第60/379,343号、同第09/649,527号、PCT国際特許出願公開第W002/069369号、同第W001/15726号、米国特許第6,406,705号及びRaney et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 298:1185-1192(2001)に記載されている。ODNの例示的配列は表1に示された核酸配列を含むが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、本発明の組成物及び方法中で使用されるODNはホスホジエステル（「PO」）骨格又はホスホロチオエート（「PS」）骨格、及びCpGモチーフ中の少なくとも1のメチル化シトシン残基を有する。

30

【0058】

【表 1】

表 1

| ODNの名 | ODN配列番号 | ODN配列 (5' -3') |
|------------------------------|-----------|---------------------------|
| ODN 1 (INX-6295) ヒト c-myc | 配列番号 : 2 | 5' -TAACGTTGAGGGGCAT-3 |
| *ODN 1m (INX-6303) | 配列番号 : 4 | 5' -TAAZGTTGAGGGGCAT-3 |
| ODN 2 (INX-1826) | 配列番号 : 1 | 5' -TCCATGACGTTCTGACGTT-3 |
| *ODN 2m (INX-1826m) | 配列番号 : 31 | 5' -TCCATGAZGTTCTGAZGTT-3 |
| ODN 3 (INX-6300) | 配列番号 : 3 | 5' -TAAGCATACGGGGTGT-3 |
| ODN 5 (INX-5001) | 配列番号 : 5 | 5' -AACGTT-3 |

10

20

【 0 0 5 9 】

【表 2】

表 1 のつづき

| ODNの名 | ODN配列番号 | ODN配列 (5' -3') |
|--|-----------|--|
| ODN 6 (INX-3002) | 配列番号 : 6 | 5' -GATGCTGTGTCTGGGGTCTCCGGGC-3' |
| ODN 7 (INX-2006) | 配列番号 : 7 | 5' -TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' |
| ODN 7m (INX-2006m) | 配列番号 : 32 | 5' -TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT-3' |
| ODN 8 (INX-1982) | 配列番号 : 8 | 5' -TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3' |
| ODN 9 (INX-G3139) | 配列番号 : 9 | 5' -TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3' |
| ODN 10 (PS-3082) マウス細胞内接着分子-1 | 配列番号 : 10 | 5' -TGCATCCCCAGGCCACCAT-3 |
| ODN 11 (PS-2302) ヒト細胞内接着分子-1 | 配列番号 : 11 | 5' -GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3' |
| ODN 12 (PS-8997) ヒト細胞内接着分子-1 | 配列番号 : 12 | 5' -GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3' |
| ODN 13 (US3) ヒトerb-B-2 | 配列番号 : 13 | 5' -GGT GCTCACTGC GGC-3' |
| ODN 14 (LR-3280) ヒトc-myc | 配列番号 : 14 | 5' -AACC GTT GAG GGG CAT-3' |
| ODN 15 (LR-3001) ヒトc-myc | 配列番号 : 15 | 5' -TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC-3' |
| ODN 16 (Inx-6298) | 配列番号 : 16 | 5' -GTGCCG GGGTCTTCGGGC-3' |
| ODN 17 (hIGF-1R) ヒトインシュリン様 成長因子1-受容体 | 配列番号 : 17 | 5' -GGACCCTCCTCCGGAGCC-3' |
| ODN 18 (LR-52) ヒトインシュリン様 成長因子1-受容体 | 配列番号 : 18 | 5' -TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3' |
| ODN 19 (hEGFR) ヒト上皮細胞成長因子-受容体 | 配列番号 : 19 | 5' -AAC GTT GAG GGG CAT-3' |
| ODN 20 (EGFR) ヒト上皮細胞成長因子-受容体 | 配列番号 : 20 | 5' -CCGTGGTCA TGCTCC-3' |
| ODN 21 (hVEGF) ヒト血管内皮細胞成長因子 | 配列番号 : 21 | 5' -CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3' |

10

20

30

40

【表 3】

表 1 のつづき

| ODNの名 | ODN配列番号 | ODN配列 (5' -3') |
|---|-----------|--|
| ODN 22 (PS-4189) マウスホスホキナーゼ C-アルファ | 配列番号 : 22 | 5' -CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC-3' |
| ODN 23 (PS-3521) | 配列番号 : 23 | 5' -GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3' |
| ODN 24 (hBcl-2) ヒトBcl-2 | 配列番号 : 24 | 5' -TCT CCCAGCGTGCGCCAT-3' |
| ODN 25 (hC-Raf-1) ヒトC-Raf-s | 配列番号 : 25 | 5' -GTG CTC CAT TGA TGC-3' |
| ODN #26 (hVEGF-R1) ヒト血管内皮細胞成長因子受容体-1 | 配列番号 : 26 | 5' -GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGGCCG AAAGUCUG-3' |
| ODN #27 | 配列番号 : 27 | 5' -RRCGY-3' |
| ODN #28 (INX-3280) | 配列番号 : 28 | 5' -AACGTTGAGGGGCAT-3' |
| ODN #29 (INX-6302) | 配列番号 : 29 | 5' -CAACGTTATGGGGAGA-3' |
| ODN #30 (INX-6298) ヒトc-myc | 配列番号 : 30 | 5' -TAACGTTGAGGGGCAT-3' |

・「Z」は、メチル化シトシン残基を表す。

・注：ODN 14は、15-merオリゴヌクレオチドであり、ODN 1は、同じオリゴヌクレオチドの5'末端にチミジンを付加することによってODN 1を16-merとしたものである。ODN 14とODN 1の間に生理活性の相違は検出されず、どちらも類似の免疫刺激活性を示す (Mui et al., 2001)。

【0061】

脂質及び他の成分

脂質製剤及びデリバリービヒクルとしてのリポソームの調製方法は本分野において知られており、そのような製剤のいずれも本明細書においてその有利な使用を見出すことができ、それらは、その開示が本明細書中に参考文献として援用されている、以下の：米国特許第6,465,439号、同第6,379,698号、同第6,365,611号及び同第6,093,816号中に記載されたものを含む。好ましい脂質製剤は、本明細書中に記載されている脂質粒子製剤であって、より充分には例えば米国特許第5,785,992号、同第6,287,591号、同第6,287,591B1号、同時継続の米国特許出願第60/379,343号および同時継続の米国特許出願第09/649,527号に記載されており、そのすべてが参考文献として本明細書中に援用されている。

【0062】

1の好ましい実施態様において、好ましい脂質製剤は、DSPC、DODMA、Chol、及びPEG-DMGを20:25:45:10モル/モルの比率で有する。本明細書中で使用されるとおり

、脂質製剤中の各脂質のモル量は脂質が列挙されたのと同じ順番で割り当てられる（例えば、DSPC対DODMA対Chol対PEG-DMGの比率は20 DSPC：25 DODMA：45 Chol：10 PEG-DMG又は20：25：45：10である）。他の実施態様において、DSPCは、POPCで置換されることができ、DODMAはDODAPで置換され、そしてPEG-DMGはPEGCer14又はPEGCer20で置換されることができる。

【0063】

「脂質」という用語は、水に不溶であるが多くの有機溶媒には溶解性であることに特徴を有する、脂肪酸エステルである有機化合物の群を意味する。それらは通常は少なくとも以下の3のクラス：（1）脂肪及び油並びにワックスを含む「単純脂質」；（2）リン脂質及び糖脂質を含む「複合脂質」；及び（3）ステロイド及び脂質を操作することによって得られる誘導体化合物のような「脂質誘導体」に分けられる。広く多様な脂質が本発明とともに使用され、そのうちのいくつかが以下に記載される。

10

【0064】

「荷電された脂質」という用語は、陽性の電荷又は陰性の電荷を有する脂質種又は純粋な中性に荷電されていない、一般的にその脂質が見出される溶液のpHへの言及を必要とする双性イオンである脂質種を意味する。

【0065】

生理的pHにおいて陽性に荷電された脂質は、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロライド（「DODAC」）；N-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド（「DOTMA」）；N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロマイド（「DDAB」）；N-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド（「DOTAP」）；3b-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール（「DC-Chol」）及びN-(1,2-ジミリスチロキシプロプ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド（「DMRIE」）を含むが、これらに限定されない。さらに、本発明において使用されることのできる多くの陽イオン性脂質の調製物が商業的に入手可能である。これらは、例えば、(GIBCO/BRL, Grand Island, New York, U.S.A.からの、DOTMA及び1,2-ジオレオイル-sn-3-ホスホエタノラミン（「DOPE」）を含む商業的に入手可能な陽イオン性リポソームである）リポフェクチン（商標）（Lipofectin）；及び（N-(1-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル)-N-(2-(スベルミンカルボキサミド)エチル)-N,N-ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート（「DOSPA」）を含む商業的に入手可能な陽イオン性リポソームである）リポフェクタミン（商標）（Lipofectamine）；を含む。

20

30

【0066】

いくつかの陽性に荷電された脂質が滴定可能であり、すなわち、それらは生理的pHに近いpKaを有し、本発明の重要な結論としてそれらは弱酸性条件下で強力に陽イオン性であり、生理的pHにおいて弱い陽イオン性である（か、又は陽イオン性でない）。そのような陽性に荷電された脂質は、N-(2,3-ジオレイロキシ)プロピル)-N,N-ジメチルアンモニウムクロライド（「DODMA」）及び1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン（「DODAP」）を含むが、これらに限定されない。DMDMAもまた、有用な滴定可能な陽イオン性脂質である。

40

【0067】

生理的pHにおいて陰イオン性に荷電された脂質は、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ジホスファチジルグリセロール、ポリ（エチレングリコール）-ホスファチジルエタノラミン、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジラウロイルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール、ジミリストイルリン酸、ジパルミトイルリン酸、ジミリストイルホスファチジルセリン、ジパルミトイルホスファチジルセリン、脳ホスファチジルセリン等を含むがこれらに限定されない。

【0068】

50

いくつかの陰性に荷電された脂質が滴定可能であり、すなわち、それらは生理的pH又はそれに近いpKaを有し、本発明の重要な結論としてそれらは弱い塩基性条件下で強力に陰イオン性であり、そして生理的pHにおいて弱い陰イオン性である（か、又は陰イオン性でない）。そのような陰性に荷電された脂質は本明細書中に開示された原理に基づいて当業者によって同定されることができる。

【0069】

「中性脂質」という用語は、生理的pHにおいて荷電されない形態又は中性の双性イオン形態のいずれかで存在する多くの脂質種のいずれかを意味する。そのような脂質は、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジエタノラミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシド及びジアシルグリセロールを含む。

10

【0070】

本発明において使用される、ある好ましい脂質製剤は、PEG-脂質又は（ATTA-脂質のような）ポリアミドオリゴマー-脂質、及び他の立体障壁（steric barrier）又は「ステルス」-脂質、界面活性剤などのような凝集防止化合物を含む。そのような脂質は、米国特許第4,320,121号、同第5,820,873号、同第5,885,613号、PCT国際出願公開第WO 98/51278号、及びポリアミドオリゴマーに関する米国特許出願第09/218,988号中に記載され、これらはすべて参考文献として本明細書中に援用されている。これらの脂質及び界面活性化合物は、反対に荷電された脂質及び治療剤を含む製剤の沈殿及び凝集を防止する。これらの脂質はまた、インビボにおける循環中の寿命を改善するために採用されることもでき（Klibanov et al.(1990) FEBS Letters, 268(1): 235-237を参照のこと）、又はそれらはインビボにおける製剤からの迅速な交換のために選択されることができる（本明細書中に参考文献として援用されている米国特許第5,885,613号を参照のこと）。

20

【0071】

本発明の好ましい実施態様は、（そのすべてが参考文献として本明細書中に援用されている、米国特許第5,820,873号、同第5,885,613号及び米国特許出願第09/094540及び米国特許第6,320,017号中に記載された）交換可能な立体障壁脂質を採用する。PEG 2000-CerC14及びATTA8-CerC14のような交換可能な立体障壁脂質は、対象/患者に投与することによって急速に脂質粒子の外側の一重層から交換する立体障壁脂質である。そのような各脂質は、アシル鎖の長さ、飽和度、立体障壁部分のサイズ、膜組成物及び血清組成物などを含む多様な因子に依存する、粒子からの交換速度に特徴を有する。そのような脂質は、粒子形成の間の凝集を防止し、投与された上でのそれらの粒子からの促進された離脱は上記の特許出願書類中に記載されたように、プログラム可能な膜融合性及び粒子不安定化活性のような利益を提供する。

30

【0072】

いくつかの脂質粒子製剤が、一定の標的細胞又は標的組織におけるリボソームの局在化を促進するように設計されたターゲティング部分を採用することができる。ターゲティング部分は製剤中又は製剤後に脂質粒子の外側の二重層に会合されることができる（すなわち、直接的な結合、疎水性の相互作用などによって）。これらの方法は本分野において周知である。さらに、いくつかの脂質粒子製剤がPEAA、ヘマグルチニン、他のリポペプチド（そのすべてが参考文献として本明細書中に援用されている、米国特許第6,417,326号及び米国特許出願第09/674,191号を参照のこと）及びインビボ及び/又は細胞内デリバリーに有用な他の形の膜融合性ポリマーを採用することができる。

40

【0073】

他の好ましい実施態様において、本発明の脂質粒子の脂質成分はスフィンゴミエリン及びコレステロールを含む（「スフィンゴソーム」）。好ましい実施態様において、本発明の組成物及び方法中で使用される脂質粒子はスフィンゴミエリン及びコレステロールを含み、酸性のリボソーム内pHを有する。スフィンゴミエリン及びコレステロールを含む脂質粒子は、他の製剤と比較していくつかの利点を有する。スフィンゴミエリン/コレステロールの組み合わせは、試験した他のリボソーム製剤よりも延長された循環中の寿命を有し

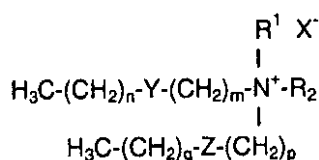
50

、酸による加水分解に対して大いに安定であり、顕著により良好な薬物保持特性を有し、腫瘍等へのより良好な負荷特性を有し、顕著により良好な抗腫瘍効力を示すリポソームを生成する。

【 0 0 7 4 】

好ましい実施態様において、本発明の脂質粒子は以下の式 I :

【 化 1 】



I

10

により表される陽イオン性化合物、及び少なくとも 1 の以下の（そして本明細書中に参考文献として援用されている米国特許第 5,785,992 号中に完全に記載された）中性脂質を含む。好ましい実施態様において、本発明の LNA 製剤は、式 I の陽イオン性化合物及び少なくとも 1 の以下の（そして本明細書中に参考文献として援用されている米国特許第 5,785,992 号中に完全に記載された）中性脂質を含む。

20

【 0 0 7 5 】

式 I において、

R^1 及び R^2 はそれぞれ独立して $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキルであり；

Y 及び Z はアルキル鎖又はアルケニル鎖であって、Y 及び Z が両方とも $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ でないという条件で、それぞれ独立して以下の： $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ 又は $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}-$ であり；

n + m 及び q + p がそれぞれ 10 ~ 14 の間の整数であるという条件で、n 及び q という文字は 3 ~ 7 の間の整数を表し、m 及び p という文字は 4 ~ 9 の間の整数を表し；

30

シンボル X^- は薬剤として許容可能な陰イオンを表し；

二重結合の配向性はシス又はトランスのいずれでもよいが、シスアイソマーが一般的に好ましい。

【 0 0 7 6 】

他の好ましい実施態様において、陽イオン性化合物は上記の式 I により表され、

ここで、

R^1 及び R^2 はメチルであり；

Y 及び Z はそれぞれ独立して以下の： $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ 又は $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ である。好ましい実施態様において、 R^1 及び R^2 はメチルであり；Y 及び Z はそれぞれ $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ であり；n 及び q は両方とも 7 であり；m 及び p は両方とも 5 である。他の好ましい実施態様において、陽イオン性の化合物は DODAC (N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロライド) である。DODAC は本分野において知られており、界面活性剤及びシャンプー中に添加剤として広く使用される化合物である。DODA もまた、他の界面活性剤と共にリポソーム組成物中の共存脂質として使用される (Takahashi, et al., GB2147243 を参照のこと)。

40

【 0 0 7 7 】

本発明の LNA 製剤中の中性脂質は、典型的には界面活性剤中で使用され、或いはミセル又はリポソームの形成のために使用される多様な中性脂質のいずれかであることができる。本発明の組成物において有用な中性脂質の例は、ジアシルホスファチジルコリン、ジア

50

シルホスファチジルエタノラミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、及びセレブロシドであるが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、本発明の組成物はジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノラミン、セラミド又はスフィンゴミエリンである中性脂質の1以上を含む。これらの中性脂質中のアシル基は、好ましくは $C_{10} \sim C_{24}$ の炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基である。より好ましくは、アシル基はラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、又はオレオイルである。特別に好ましい実施態様においては、中性脂質は1,2-sn-ジオレオイルホスファチジルエタノラミンである。

【0078】

陰イオン X^- は、同様に薬剤として許容可能な多様な陰イオンのいずれかであることができる。これらの陰イオンは、例えば Br^- 、 Cl^- 、 F^- 、 I^- 、硫酸、リン酸、酢酸、硝酸、安息香酸、クエン酸、グルタミン酸、及び乳酸イオンを含む、有機又は無機のイオンであることができる。好ましい実施態様において、 X^- は Cl^- 又は AcO^- である。

10

【0079】

本明細書中に記載された他の成分に加えて、本発明の組成物は薬剤として許容可能な担体を含むことができる。薬剤として許容可能な担体は本分野において周知である。担体の選択は、投与される特別な組成物並びにその組成物の投与に使用される特別な方法により部分的に決定される。好ましくは、薬剤担体は水又は生理食塩水の溶液である。

【0080】

本発明の組成物において、陽イオン性化合物の中性脂質に対する比率は、好ましくは約25:75(陽イオン性化合物:中性脂質)~好ましくは約75:25(陽イオン性化合物:中性脂質)の範囲内にあり、又は好ましくは約50:50である。

20

【0081】

本発明の組成物中で使用される陽イオン性化合物は、標準的な合成反応(本明細書中に参考文献として援用されているMarch, Advanced Organic Chemistry, 4th Ed., Wiley-Interscience, NY, N.Y. (1992)を参照のこと)を用いる当業者に知られた方法によって調製されることができる。例えば、OSDACの合成は、最初に、アミンの還元的アルキル化となる条件下でホルムアルデヒドとシアノボロハイドライドナトリウムでオレイルアミンを処理することによって実施されることができる。このアプローチは、対応するアンモニウム塩を形成するためにその後ステアリルブロマイドでアルキル化される、ジメチルオレイルアミンを提供する。陰イオン交換によりOSDACが形成される。ジメチルオレイルアミンはまた、大過剰のジメチルアミンによってオレイルブロマイドを処理し、さらに上記のように誘導体化されることによって合成されることができる。

30

【0082】

両方の脂肪酸鎖が不飽和である陽イオン性化合物(すなわち、DODAC)については、以下の一般的な手順が使用されることができる。不飽和脂肪酸(すなわち、オレイン酸)は、オキサリクロライド、チオニルクロライド、 PCl_3 又は PCl_5 のような試薬によってそれに対応するアシルクロライドに変換されることができる。アシルクロライドは不飽和アミン(すなわち、オレイルアミン)で処理されて対応するアミドを提供することができる。例えば、リチウムアルミニウムハイドライドによるアミドの還元は、両方のアルキル基が不飽和長鎖アルキル基である二級アミンを提供する。二級アミンはその後、メチルヨウダイドのようなアルキルハライドで処理されて四級アンモニウム化合物を提供することができる。その後、陰イオン交換が所望の薬剤として許容可能な陰イオンを有する陽イオン性化合物を提供するために実施されることができる。アルキルアミン前駆体は、同様のやり方で合成されることができる。例えば、アルキルハライドを大過剰のアンモニアのメタノール溶液で処理することは精製後に必要なアミンを産生するだろう。或いは、適当なカルボン酸をオキサリクロライドで処理することによって生成されたアシルクロライドは、アンモニアと反応させられてアミドを産生することができる。 $LiAlH_4$ によるアミドの還元は必要なアルキルアミンを提供するだろう。

40

【0083】

50

好ましい実施態様において、本発明の医薬組成物はミセル又はリポソームとして製剤される。本発明の陽イオン性化合物及び中性脂質を含むミセルは本分野において周知の方法によって調製されることができる。本発明の組成物のミセル製剤に加えて、本発明はリソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノラミン、リソホスファチジルセリン、リソホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノラミン - ポリオキシエチレン結合体、セラミド - ポリオキシエチレン結合体又はホスファチジン酸 - ポリオキシエチレン結合体のような他の種を含むミセル製剤をも提供する。

【0084】

本発明の組成物において使用されるポリオキシエチレン結合体は、結合基（すなわち、ホスファチジン酸又はホスファチジルエタノラミン）と適当に官能化されたポリオキシエチレン誘導体とを結合させることによって調製されることができる。例えば、ホスファチジルエタノラミンはオメガ - メトキシポリエチレングリコールコハク酸塩と結合されてホスファチジルエタノラミン - ポリオキシエチレン結合体を提供することができる（例えば、本明細書中に参考文献として援用されているParr et al., Biochim. Biophys. Acta. 195:21-30(1994)を参照のこと）。

【0085】

本発明の組成物及び方法中で使用されるための中性脂質の選択は一般的に例えば、リポソームサイズ及び血流中でのリポソームの安定性などを考慮することによって導かれることができる。上記のように、リポソーム中の中性脂質成分は2のアシル基を有する脂質（すなわち、ジアシルホスファチジルコリン及びジアシルホスファチジル - エタノラミン）である。多様な長さおよび飽和度を有する多様なアシル鎖を有する脂質は入手可能であり、又は周知の技術によって単離又は合成されることができる。一般的に、濾過滅菌のためにリポソームが約0.3ミクロン未満に寸法ぎめされなければならない場合には特別に、より飽和度の低い脂質はより容易に寸法ぎめされることができる。1の群の実施態様において、飽和脂肪酸を含む脂質であって炭素鎖の長さが $C_{14} \sim C_{22}$ の範囲であるものが好ましい。実施態様の他の群においては、炭素鎖の長さが $C_{14} \sim C_{22}$ の範囲のモノ又はジ不飽和脂肪酸を有する脂質が使用される。さらに、飽和及び不飽和脂肪酸鎖の混合物を有する脂質が使用されることができる。

【0086】

本発明の組成物及び方法中で有用なリポソームはまた、スフィンゴミエリン又は、セリン及びイノシトールのような他の頭部を有するリン脂質を含むこともできる。本発明において有用なさらに他のリポソームはコレステロール、ジグリセリド、セラミド、ホスファチジルエタノラミン - ポリオキシエチレン結合体、ホスファチジン酸 - ポリオキシエチレン結合体、又はポリエチレングリコール - セラミド結合体（例えば、PEG-Cer-C14又はPEG-Cer-C20）を含むだろう。リポソームの寸法決め及び濾過滅菌において使用される方法は以下に検討される。

【0087】

リポソームの多様な調製方法が本分野において知られている（例えば、そのすべてが参考文献として本明細書中に援用されている、Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467(1980)、米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、the text Liposomes, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, 1983, Chapter 1, 及びHope, et al., Chem Phys. Lip. 40:89 (1986)を参照のこと）。1の知られた方法は、不均質なサイズの多重層ビヒクルを産生する。この方法において、ビヒクルを形成する脂質は好適な有機溶媒又は溶媒系に溶解され、真空下又は不活性ガス中で脂質の薄膜を形成するように乾燥される。所望により、該膜はtert-ブタノールのような好適な溶媒に再溶解され、その後、より容易に水和される粉状形態である、より均一な脂質混合物を形成するように凍結乾燥されることができる。この膜は水性の緩衝溶液で覆われ、典型的には15～60分の間振とうすることによって水和される。得られた多重層ビヒクルのサイズ分布は、より激しい振とう条件下又はデオキシコール酸塩のような溶解度を高める界面活性剤を添加することによって、より小さいサイズへシフトされることができる。

【0088】

リボソームの調製に続いて、リボソームは所望のサイズ範囲及び比較的狭いリボソームサイズ分布を達成するような寸法に作られることができる。約0.2~0.4ミクロンのサイズ範囲は、リボソーム懸濁液が慣用のフィルター、典型的には0.22ミクロンフィルターを通す濾過によって滅菌されることを可能とする。仮にリボソームが約0.2~0.4ミクロンにサイズが小さくなっていれば、濾過滅菌法はハイスループットで実施されることができる。

【0089】

所望の寸法にリボソームの大きさを作るためのいくつかの技術がある。1のサイジング法は本明細書中に参考文献として援用されている米国特許第4,737,323号中に記載されている。浴又はプローブソニケーションによるリボソーム懸濁液のソニケーションは、約0.05ミクロン未満のサイズの小さな単一層ビヒクルへ革新的に寸法を減少させる。ホモジェナイズは、大きなリボソームからより小さいリボソームへ細分化するための剪断エネルギーに依存する別の方法である。典型的なホモジェナイズ方法においては、多重層ビヒクルは標準的なエマルジョンホモジェナイザーを介して、選ばれたリボソームサイズ、典型的には約0.1~0.5ミクロンの間であることが観察されるまで再循環される。両方法において、粒子のサイズ分布は、慣用のレーザービームによる粒子サイズの識別によってモニターされることができる。

【0090】

小孔ポリカーボネート膜又は非対称のセラミック膜を通してリボソームを押し出すことも、比較的明確なサイズ分布にリボソームサイズを減少させる有効な方法である。典型的には、懸濁液は所望のリボソームサイズ分布が達成されるまで、1回以上膜を通して循環させられる。リボソームは、リボソームサイズを徐々に減少させるために、引き続いてより孔の小さい膜を通して押し出されることができる。本発明における使用のために、約0.05ミクロン~約0.15ミクロンのサイズを有するリボソームが好ましい。

【0091】

以下においてさらに記載されるように、本発明の組成物は知られた投与ルート of のいずれかによって対象に投与されることができる。いったん細胞に吸着されると、(先に記載された複合体を含む)リボソームは細胞のある部分によってエンドサイトーシスされ、細胞膜と脂質を交換し、又は細胞と融合することができる。複合体のポリアニオン性部分の転位又は取り込みは、これらの経路のいずれかを介して行われることができる。特別には、融合が起こる場合、リボソーム膜は細胞膜に統合され、リボソームの内容物が細胞内流体と結合することができる。

【0092】

以下に詳細に記載されるように、治療化合物であることもできる追加の成分が、本発明の脂質粒子を特定の細胞を標的とさせるために、加えられることができる。例えば、全身投与に続いてリボソームを標的に向かわせる手段を提供することによって、リボソームは癌関連抗原のような特定のタイプの細胞上にのみ存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体又はその結合断片に結合されることができる。或いは、標的の細胞タイプの表面受容体に結合するリガンドもまた、リボソームに結合されることができる。リボソームを標的に向かわせる他の手段もまた、本発明中で採用されることができる。

【0093】

リボソームを含む溶媒から遊離の薬物を除去するために必要であることのできる分離ステップに続いて、患者又は宿主の細胞へ投与するための薬剤として許容可能な担体中のリボソーム懸濁液が所望の濃度とされる。多くの薬剤として許容可能な担体が本発明の組成物及び方法中で採用されることができる。例えば、水、緩衝化された水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、などの多様な水性の担体を使用されることができ、アルブミン、リボタンパク質、グロブリンのような、安定性を高めるための糖たんぱく質を含むことができる。一般的には、通常の緩衝生理食塩水(135~150mMのNaCl)が薬剤として許容可能な担体として採用されるが、他の好適な担体でも十分である。これらの組成物は

10

20

30

40

50

濾過のような慣用のリボソーム滅菌技術によって滅菌されることができる。組成物は生理学的状態を近似するために必要とされる、薬剤として許容可能な補助物質、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムであるpH調節剤及び緩衝剤、張力調節剤などを含むことができる。これらの組成物は上記の技術によって滅菌されることができ、又は滅菌条件下で製造されることができる。得られた水性の溶液は使用のために包装され、又は無菌状態で濾過されそして凍結乾燥され、凍結乾燥調製物は、投与に先立って滅菌水性溶液と併合されることができる。

【0094】

担体中のリボソーム濃度は可変であることができる。好ましい実施態様において、リボソームの濃度は約0.1~200mg/mlである。当業者は、異なるリボソーム成分を用いる治療又は特別な患者のための治療を最適化するためにこれらの濃度をいかに変化させるかを知っているだろう。例えば、治療に関連した流体負荷を減らすために上記濃度は増加されることができる。

10

【0095】

対象の細胞は、通常はインビボ又はエクスピボの投与によって、本発明の組成物に露出されている。本明細書中に記載された好ましい実施態様において、本発明の組成物は、静脈内などの全身的に投与されることができ、筋肉内、皮下そして局所投与もまた、熟考される。或いは、鼻腔内又は気管内投与も使用されることができる。気管内投与は、液体、好ましくはエアロゾルとして提供されることができる。例えば、直径70~100µmの滴のエアロゾルを作り出すためにネブライザーが使用されることができる。滴のサイズは一般的にリボソームのサイズよりも大きくあるべきであるということは理解されるであろう。

20

【0096】

患者への多数の投与方法が考察された。治療の用量計画は、病気及び患者の状態によって決定されるであろう。本分野において周知である、免疫刺激性の組成物（例えば、ワクチン）を含む治療化合物による標準的な治療は、治療化合物を含むリボソームによる治療への指針としての役割を果たす。治療の持続時間とスケジュールは当業者に周知の方法によって変更されることができるが、増加された循環時間と減らされたリボソームの漏出は用量が一般的には先に採用されたよりも低く調整されることを可能とするだろう。本発明のリボソームの用量は臨床状態及び治療を受ける動物又は患者の大きさに依存して変化することができる。治療化合物の標準的な用量は、内包されていない場合、リボソームに内包された化合物の用量への指針としての役割を果たすことができるだろう。上記用量は典型的には、治療の過程にわたって一定であるだろうが、いくつかの場合には上記用量は変化することができる。標準的な生理学的パラメーターは、治療の間に評価されることができ、それは本発明のリボソームの用量を変更するために使用されることができる。

30

【0097】

抗原

本明細書の記載の通り、リボソームに内包されたメチル化核酸は、少なくとも1の標的抗原と会合させられることができる。本発明の組成物及び方法において有用な抗原は、元来、免疫原性又は非免疫原性又は僅かに免疫原性である。抗原の例は、合成の、組換えの、外来の、又は相同の抗原を含むが、これらに限定されない。抗原のさらなる例は、以下の：（組換え又はその他の）HBA-B型肝炎抗原；他の肝炎ペプチド；HIVタンパク質GP120及びGP160；マイコプラズマ細胞壁脂質；いずれかの腫瘍関連抗原；癌胎児性抗原（CEA）；腫瘍特異的抗原として発現される他の胎児性ペプチド；ガングリオシド（GM2、GM3）；ミコバクテリウム糖脂質；PGL-1；Ag85B；TBGL；ナイセリア・ゴノロエエ（*Neisseria gonorrhoeae*）からの淋菌性の脂質-オリゴサッカライドエピトープ2C7；ルイス（Lewis(y)）；及びGlobo-H；Tn；TF；STn；PorA；TspA又はウイルスの糖脂質/糖タンパク質及び表面タンパク質を含むが、これらに限定されない。

40

【0098】

抗原はペプチド抗原の形態であることができ、又は対象における発現に好適でありかつ

50

免疫化された対象の免疫系への提示に好適な形態で、抗原ペプチドをコードする核酸であることができる。抗原はまた、糖脂質又は糖ペプチドであることもできる。さらに、抗原は完全な抗原又は少なくとも1の治療に係るエピトープを含む、完全な抗原の断片であることもできる。抗原に関して本明細書中で言及される「コンビネーション抗原」は、同じ標的抗原からの複数のエピトープ、或いは同じ型の標的抗原（例えば、両方の抗原がペプチド又は両方の抗原が糖脂質）又は異なる型の標的抗原（例えば、糖脂質抗原及びペプチド抗原）に由来する2以上の異なる標的抗原からの複数のエピトープ（ポリトープワクチン）を意味する。

【0099】

抗原は本発明の組成物及び方法中で、粗製の、精製された、合成の、単離された、又は組換え形態で使用されることができる。核酸によってコードされた（例えば、ポリサッカライドのペプチド擬態である抗原を含む）ポリペプチド又はペプチド抗原もまた、本発明の組成物及び方法において使用されることができる。抗原という用語は、宿主の免疫系によって外来であると認識されるいずれかの型の分子を広く含む。抗原は、癌抗原、微生物抗原、及びアレルゲンを含むがこれらに限定されない。

10

【0100】

広く多様な抗原が、本発明の製剤における使用に好適である。一般的に、抗原は、ある物質に対して宿主を免疫化するために、脊椎動物宿主に投与される同じ物質である。典型的には、抗原は、ウイルス感染、細菌感染、及び多様な悪性度のような病気の状態に関連する物質を含む。これらの物質は、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、脂質、糖脂質、炭化水素及びDNAを含むことができるが、これらに限定されない。

20

【0101】

脂質製剤の抗原は、リポソーム又は脂質粒子に内包され、会合され、又はこれと混合されることができる。本発明のある実施態様において、抗原は、リポソーム又は脂質粒子中に内包される。他の実施態様において、抗原は、リポソーム又は脂質粒子と混合される。他の実施態様において、抗原は、リポソーム又は脂質粒子と会合させられる。1の側面において、抗原は、リポソーム又は脂質粒子に吸着される。他の側面において、抗原は、リポソーム又は脂質粒子に共有結合で結合される。抗原を共有結合でリポソーム又は脂質粒子に結合させるのに使用される方法は、当業者に知られた標準的な方法である。

【0102】

本発明における使用に好適な抗原の例は、ポリペプチド抗原、及びDNA抗原を含むが、これらに限定されない。抗原の特別な例は、A型肝炎、B型肝炎、天然痘、ポリオ、炭疽、インフルエンザ、チフス、破傷風、はしか、ロタウイルス、ジフテリア、百日咳、結核、及び風疹抗原である。好ましい実施態様において、抗原は組換えB型肝炎抗原である。他の側面において、抗原は、組換えA型肝炎抗原である。他の側面において、抗原は、腫瘍抗原である。そのような腫瘍関連抗原の例は、MUC-1、EBV抗原及びパーキットリンパ腫に関連する抗原である。さらなる側面において、抗原は組換えチロシナーゼ関連タンパク質腫瘍抗原である。当業者は、本発明における使用に好適な他の抗原を知っているであろう。

30

【0103】

対象の発明における使用に好適な腫瘍関連抗原は、単一の腫瘍タイプを表示する、数種の腫瘍タイプにわたることを表示する、及び/又は正常の細胞に比べて腫瘍細胞において独占的に発現しているか又は過剰発現していることを表示することのできる、突然変異した及び突然変異していない分子の両方を含む。タンパク質及び糖タンパク質に加えて、炭化水素、ガングリオシド、糖脂質及びムチンの発現の腫瘍特異的パターンもまた、実証された。上記のMoingeon。対象の癌ワクチン中で使用される、例示的な腫瘍関連抗原は、癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子及び腫瘍細胞独自の突然変異又は再配列を有する遺伝子のタンパク質産物、再活性化された胚遺伝子の産物、癌胎児性抗原、組織特異的（しかし、腫瘍特異的でない）分化抗原、成長因子受容体、細胞表面の炭化水素残基、外来のウイルスタンパク質及び多数の他の自己タンパク質を含む。

40

50

【 0 1 0 4 】

腫瘍関連抗原の特別な実施態様は、例えば、以下の：Rasp 2 1 プロトオンコジーンのタンパク質産物、腫瘍サプレッサー p 5 3 及び HER-2/neu 及び BCR-abl オンコジーン、並びに CDK4、MUM1、Caspase 8、及び カテニンのような突然変異抗原；ガレクチン 4、ガレクチン 9、カルボニックアンヒドラーゼ、アルドラーゼ A、PRAME、Her2/neu、ErbB-2 及び KSA のような過剰発現された抗原；アルファフェトプロテイン（AFP）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）のような癌胎児性抗原；癌胎児性抗原（CEA）のような自己抗原及び Mart 1/MelanA、gp100、gp75、チロシナーゼ、TRP1 及び TRP 2 のようなメラニン細胞分化抗原；PSA、PAP、PSMA、PSM-P1、及び PSM-P2 のような前立腺関連抗原；MAGE1、MAGE 3、MAGE4、GAGE1、GAGE 2、BAGE、RAGE のような再活性化された胚遺伝子産物並びに NY-ES01、SSX2、及び SCP1 のような他の癌精巢抗原；Muc-1 及び Muc-2 のようなムチン；GM2、GD2 及び GD3 のようなガングリオシド、中性糖脂質及び ルイス（y）及び グロボ-H（globo-H）のような糖タンパク質；そして Tn、トンプソン-フリードリッヒ抗原（TF）及び sTn のような糖タンパク質を含む。完全な細胞及び腫瘍細胞ライセート並びにそれらの免疫原性の部分、並びに B 細胞リンパ腫に対して使用される B リンパ球のモノクローナル増殖において発現された イムノグロブリンイディオタイプもまた、本明細書中で腫瘍関連抗原に含まれる。

10

【 0 1 0 5 】

腫瘍関連抗原は、本分野において知られた方法によって調製されることができる。例えば、これらの抗原は、（例えば、Cohen et al., *Cancer Res.*, 54:1055(1994) に記載のように）癌細胞の粗抽出物を調製することによって、抗原を部分的に精製することによって、組換え技術によって、又は知られた抗原のデノボ合成のいずれかによって癌細胞から調製されることができる。抗原は、対象中での発現及び免疫化された対象の免疫系への提示に好適な形態の抗原性ペプチドをコードする核酸の形態であることもできる。さらに、抗原は、完全な抗原、又は少なくとも 1 のエピトープを含む完全な抗原の断片であることができる。

20

【 0 1 0 6 】

病原体は、哺乳動物、より特別にはヒトに感染する感染性のウイルスを含むが、これらに限定されない。感染性のウイルスの例は以下の：レトロウイルス（例えば、HIV-1（HTLV-III）、LAV 又は HTLV-III/LAV 又は HIV-III とも呼ばれる）のようなヒト免疫不全症ウイルス；及び HIV-LP のような他の単離物；ピコルナウイルス属（例えば、ポリオウイルス、A 型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カルシウイルス属（例えば、胃腸炎を引き起こす株）；トガウイルス属（例えば、ウマの脳炎ウイルス、ルベラウイルス）；フラウイルス属（例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロノウイルス属（例えば、コロナウイルス）；ラブドウイルス属（例えば、水泡性口炎ウイルス、ラビスウイルス（rabies viruses））；コロナウイルス属（例えば、コロナウイルス）；フィロウイルス属（例えば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス属（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、はしかウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）；オルトミクソウイルス属（例えば、インフルエンザウイルス）；ブングウイルス属（例えば、ハンタウイルス、ブングウイルス、フレボウイルス及びナイロウイルス）；アレナウイルス属（出血熱ウイルス）；レオウイルス属（例えば、レオウイルス、オルビウイルス及びロタウイルス）；ビルナウイルス属（Birnaviridae）；ヘパドナウイルス属（B 型肝炎ウイルス）；パルボウイルス属（パルボウイルス）；パポバウイルス属（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス属（ほとんどのアデノウイルス）；ヘルペスウイルス属（単純ヘルペスウイルス（HSV）1 及び 2、バリセラゾスターウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス）；ポックスウイルス属（バリオラウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；並びにイリドウイルス属（例えば、アフリカブタ熱ウイルス）；並びに分類されないウイルス（例えば、海綿状脳症の病因作用物質、デルタ肝炎の作用物質（B 型肝炎ウイルスの欠損サテライトと考えられている）、非 A 型及び非 B 型肝炎の作用物質（クラス 1 は内部へ伝達され；クラス 2 は腸管外に伝達される（すなわち、C 型肝炎）；ノーウ

30

40

50

オーク及び関連するウイルス、及びアストロウイルス)を含むが、これらに限定されない。

【0107】

グラム陰性及びグラム陽性細菌もまた、脊椎動物において抗原となる。そのようなグラム陽性細菌は、パストレラ種、スタフィロコッカス種、及びストレプトコッカス種を含むが、これらに限定されない。グラム陰性細菌は、大腸菌 (*Escherichia coli*)、シュードモナス種及びサルモネラ種を含むがこれらに限定されない。感染性の細菌の特異的な例は、ヘリコバクターピロリ、ボレリアブルグドフェリ、レジオネラ・ニューモフィラ、マイコバクテリア種 (例えば、*M. ツベルクロシス*、*M. アビウム*、*M. イントラセルラーレ*、*M. カンサイ*、*M. ゴロドナエ*)、スタフィロコッカス・アウレウス、ナイセリア・ゴ
10
ノロエエ、ナイセリア・メニンギチジス、リステリア・モノサイトゲンス、ストレプトコッカス・ピオゲネス (ストレプトコッカスA群)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (ストレプトコッカスB群)、ストレプトコッカス (ビリダンス群)、ストレプトコッカスフェーカリス、ストレプトコッカス・ボビス、ストレプトコッカス (嫌気性種)、ストレプトコッカス・ニューモニエ、病原性カンピロバクター種、エンテロコッカス種、ヘモフィラス・インフルエンゼ、バシラス・アントラシス、コリネバクテリウム・ジフテリアエ、コリネバクテリウム種、丹毒菌、クロストリジウム・パーフリンジエス、クロストリジウム・テタニ、エンテロバクター・アエロゲンス、クレブシエラ・ニューモニエ、パス
20
ツレラ・マルトシダ、バクテロイデス種、フソバクテリウム・ヌクレアタム、ストレプトバシラス・モニリフォルミス、トレポネーマ・パリジウム、トレポネーマ・パーテニューエ、レプトスピラ、リケッチア、及びアクチノミセス・イスラエリを含むが、これらに限定されない。

【0108】

病原体の例は、哺乳動物、より特別にはヒトに感染する感染性の真菌を含むが、これに限定されない。感染性の真菌の例は以下の：クリプトコッカス・ネオフォルマンس、ヒストプラズマ・カプスラタム、コクシジオデス・イミティス、ブラストミセス・デルマチチジス、クラミジア・トラコマティス、カンジダ・アルビカンسを含むがこれらに限定されない。感染性の寄生生物は熱帯熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、及び三日熱マラリア原虫のようなマラリア病原虫を含む。他の感染性生物は (すなわち、原生生物) はトキソプラズマ原虫を含む。
30

【0109】

他の医学に関連する、哺乳動物、より特別にはヒトにおいて抗原となる微生物は以下の文献中で広く記載される。：例えば、その内容すべてが本明細書中に参考文献として援用される、C.G.A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983を参照のこと。感染性のヒトの病気の治療に加えて、本発明の組成物及び方法は、非ヒト哺乳動物の感染の治療に有効である。

【0110】

好ましい実施態様において、本明細書中で感染性の病原体について使用される「治療」「治療する」「治療すること」は、対象の病原体による感染への耐性を増加させ、又は対象が病原体に感染する可能性を減少させ；及び/又は対象が感染した後に感染と戦うため
40
に、例えば、感染を減少又は除去し、又はより悪化することを防止する予防的治療を意味する。非ヒト哺乳動物の治療のための多くのワクチンが以下の：Bennett, K. Compendium of Veterinary Products 3rd ed. North American Compendiums, Inc., 1995に開示されている。上で検討したとおり、抗原は、自然の供給源または合成によって誘導されたウイルス、細菌、寄生生物、及び真菌並びにそれらのフラグメントのような感染性の微生物を含む。ヒト及び非ヒト哺乳動物の両方の感染性のウイルスはレトロウイルス、RNAウイルス、及びDNAウイルスを含む。レトロウイルスのこの群は、単純レトロウイルス、及び複合レトロウイルスの両方を含む。単純レトロウイルスはレトロウイルスB群、レトロウイルスC群、及びレトロウイルスD群の亜群を含む。レトロウイルスB群の例は、マウス乳癌ウイルス (「MMTV」) である。レトロウイルスC群は (ラウス・サルコーマウイルス (「R
50

SV」、鳥白血病ウイルス（「ALV」）、及び鳥ミエロブラストーマウイルス（「AMV」）を含むA群C型、及び（ネズミ白血病ウイルス（「MLV」）、ネコ白血病ウイルス（「FeLV」）、ネズミサルコーマウイルス、（「MSV」）、ギボンサル白血病ウイルス（「GALV」）、ブタネクローシスウイルス（「SNV」）、レティキュロエンドセリオース・ウイルス（「RV」）およびシミアンサルコーマウイルス（「SSV」）を含むB群C型を含む。レトロウイルスD群は、Mason-Pfizerサルウイルス（「MPMV」）、及びシミアンレトロウイルス1型（「SRV-1」）を含む。複合レトロウイルスは、レンチウイルスの亜群、T細胞白血病ウイルス及び泡沫状ウイルスを含む。レンチウイルスは、HIV-1を含むが、HIV-2、SIV、ピスナウイルス、ネコ免疫不全ウイルス（「FIV」）、及びウマ感染性アネミアウイルス（「EIAV」）をも含む。T細胞白血病ウイルスは、HTLV-I、HTLV-II、シミアンT細胞白血病ウイルス（「STLV」）及びウシ白血病ウイルス（「BLV」）を含む。泡沫状ウイルスは、ヒト泡沫状ウイルス（「HFV」）、シミアン泡沫状ウイルス（「SFV」）及びウシ泡沫状ウイルス（「BFV」）を含む。

10

【0111】

細菌性病原体のポリペプチドは、鉄により調節される外膜タンパク質（「IROMP」）、外膜たんぱく質（「OMP」）、及びフルンケル症を起こすアエロモニス・サルモニシダ（*Aeromonis salmonicida*）のAタンパク質；細菌性腎臓病（「BKD」）を起こすレニバクテリウム・サルモニナラム（*Renibacterium salmoninarum*）のp57タンパク質、エルシニオシス（*Yersiniosis*）の主要表面結合抗原（「msa」）、表面提示サイトトキシン（「mpr」）、表面提示ヘモライシン（「ish」）、及びべん毛抗原；パスツレローシス（*Pasteurellosis*）の細胞外たんぱく質（「ECP」）、鉄により調節される外膜タンパク質（「IROMP」）、および構造タンパク質；ビブローシス・アンギラルム（*Vibrosis anguillarum*）及び*V.オルダリイ*（*V. ordalii*）のOMP及びべん毛タンパク質；エドワードシエローシス、イクタルリ（*Edwardsiellosis ictaluri*）及び*E.タルダ*（*E. tarda*）のべん毛タンパク質、OMPタンパク質、アロA、及びプルA（*purA*）；イクチオフチリウス（*Ichthyophthirius*）の表面抗原；及びサイトファーガ・コルムナリ（*Cytophaga columnari*）の構造タンパク質及び調節タンパク質；並びにリケッチアの構造及び調節たんぱく質を含むが、これらに限定されない。

20

【0112】

寄生性病原体のポリペプチドはイクチオフチリウスの表面抗原を含むが、これに限定されない。

30

【0113】

「アレルゲン」は、アレルギー性または喘息性の応答を感受性のある対象において誘導することのできる物質（抗原）をさす。アレルゲンのリストは膨大であり、花粉、昆虫の毒液、動物のふけ、カビの胞子、及び薬物（例えば、ペニシリン）を含むことができる。自然の動物性または植物性のアレルゲンは、以下の属：イヌ属（犬）；表皮ダニ属（例えば、デルマトファゴイデス・ファリネ）；ネコ属（猫）；ブタクサ（アンプロシア・アルテミスフォリア）；ホソムギ（例えば、ロリウム・ペレネ（*Lolium perenne*）又はロリウム・マルチフロラム（*Lolium multiflorum*））；スギ（クリプトメリア・ジャポニカ（*Cryptomeria Japonica*））；アルテルナリア（アルテルナリア・アルテナータ（*Alternaria alternata*））；ハンノキ；カバノキ科ハンノキ属（アルナス・グルチノアサ（*Alnus glutinosa*））；マカンバ属（ベツラ・ベルコサ（*Betula verrucosa*））；コナラ属（ケルカス・アルバ（*Quercus alba*））；オリーブ（オレア・エウロパ（*Olea europaea*））；ヨモギ属（アルテミシア・バルガリス（*Artemisia vulgaris*））；オオバコ属（例えば、プランタゴ・ランセオラータ（*Plantago lanceolata*））；ヒカゲミズ（例えば、パリエタリア・オフィシナリス（*Parietaria officinalis*）又はパリエタリア・ジュダイカ（*Parietaria judaica*））；チャパネゴキブリ科（例えば、チャパネゴキブリ（*Blattella germanica*））；ミツバチ属（例えば、アピス・マルチフロラム（*Apis multiflorum*））；イトスギ属（例えば、クプレッサス・センペルビレンス（*Cupressus sempervirens*）、クプレッサス・アリゾニカ（*Cupressus arizonica*）及びクプレッサス・マクロカルパ（*Cupre*

40

50

ssus macrocarpa)) ; ビャクシン属 (例えば、ジュニペラス・サビノイデス (*Juniperus sabinooides*) 、ジュニペラス・ビルギニアナ (*Juniperus virginiana*) 、ジュニペラス・コムニス (*Juniperus communis*) 及びジュニペラス・アシェイ (*Juniperus ashei*)) ; ツーヤ属 (例えば、ツーヤ・オリエンタリス (*Thuya orientalis*)) ; ヒノキ属 (例えば、カミシパリス・オブツサ (*Chamaecyparis obtusa*)) ; ゴキブリ属 (例えば、ワモンゴキブリ (ペリプラネタ・アメリカーナ) (*Periplaneta americana*)) ; カモジグサ (例えば、アグロピロン・レペンス (*Agropyron repens*)) ; ライムギ属 (例えば、シカール・セラアレ (*Secale cereale*)) ; コムギ属 (例えば、トリチカム・アエスチバム (*Triticum aestivum*)) ; カモガヤ属 (例えば、ダクチリス・グロメラータ (*Dactylis glomerata*)) ; ウシノケグサ属 (例えば、フェスツカ・エラチオル (*Festuca elatior*)) ;
10 ナガハグサ属 (例えば、ポア・プラテンシス (*Poa pratensis*)) 又はポア・コムプレッサ (*Poa compressa*)) ; カラスムギ属 (例えば、アベナ・サチバ (*Avena sativa*)) ; シラゲガヤ属 (例えば、ホルカス・イアナタス (*Holcus lanatus*)) ; ハルガヤ属 (例えば、アントキサンタム・オドラツム (*Anthoxanthum odoratum*)) ; オオカニツリ属 (例えば、パレナタルム・エラチウス (*Parthenatherum elatius*)) ; コヌカグサ属 (例えば、
(アグロスチス・アルバ (*Agrostis alba*)) ; アワガエリ属 (例えば、フレウム・プラ
テンス (*Phleum pratense*)) ; クサヨシ属 (*Phalaris*) (例えば、ファラリス・アルン
ジナセア (*Phalaris arundinacea*)) ; スズメノヒエ属 (例えば、パスパラム・ノタツム
(*Paspalum notatum*)) ; ソルガム (例えば、ソルガム・ハレペンシス (*Sorghum halepense*)) ; 及びスズメノチャヒキ属 (*Bromus*) (例えば、ブロマス・イネルミス (*Bromus
20 inermis*)) , に特異的なタンパク質を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 1 4 】

他の薬物成分

本発明の好ましい実施態様は例えば、薬物又は生理活性物質のような他の治療剤をさらに含む。これらのさらなる成分は追加の直接的な治療的利益又は追加の免疫刺激性の利益を提供することができる。広く多様な治療化合物が本発明の組成物及び方法によってデリバリーされることができる。治療化合物の例は、核酸、たんぱく質、ペプチド、腫瘍細胞崩壊剤、抗感染剤、抗不安薬、向精神薬、免疫調節剤、イオノトロープ、ゲロニンのような毒素及び真核生物のたんぱく合成の阻害剤などを含むがこれらに限定されない。本発明のリボソーム中に閉じ込められる好ましい治療化合物は、脂肪親和性の陽イオンである。
30 これらの中には、リボソームの脂質二重層を仕切ることができ、したがって膜の形態のリボソームと会合することのできる脂肪親和性の分子のクラスに属する治療剤がある。治療化合物の更なる例は、プロスタグランジン、アンフォテリシンB、メトトレキセート、シスプラチン及び誘導体、プロゲステロン、テストステロン、エストラジオール、ドキソルピシン、エピルピシン、ベクロメタゾン、及びエステル、ビタミンE、コルチゾン、デキサメタゾン、及びエステル、ベタメタゾン吉草酸塩及び他のステロイド、フッ化キノロン抗菌剤シプロフロキサシン及びその誘導体、並びにアルカロイド化合物及びそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない。アルカロイド誘導体の中には、スワインソニン及びピンカアルカロイドのメンバー並びにヒンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、エト
40 ポシド、エトポシドリン酸塩及びテニポシドのようなそれらの半合成誘導体がある。この群の中では、ピンブラスチン及びピンクリスチン、並びにスワインソニンが特別に好ましい。スワインソニン (Creaven and Mihich, Semin. Oncol. 4:147(1977)) は骨髄の増殖を刺激する能力を有する (White and Olden, Cancer Commun. 3:83(1991)) 。スワインソニンはまた、IL-1、IL-2、TNF、GM-CSF及びインターフェロンを含む複数のサイトカインの産生をも刺激する (Newton, Cancer Commun. 1:373(1989); Olden, K., J. Natl. Cancer Inst., 83:1149(1991)) 。さらに、スワインソニンがインビトロにおいてB及びT細胞性免疫、ナチュラルキラーT細胞及びマクロファージによって誘導された腫瘍細胞の崩壊を誘導すること、及びインターフェロンと併用された場合には、インビボにおいて結腸癌及びメラノーマ癌に対する直接的な抗腫瘍活性を有することが報告された (Dennis, J., Cancer Res. 50:1867(1990) ; Olden, K., Pharm. Ther. 44:85(1989); White and Olden, 50

Anticancer Res., 10:1515 (1990))。本発明の組成物及び方法において有用な他のアルカロイドは、パクリタキセル(タキソール)、及びその合成誘導体を含むが、これらに限定されない。さらなる薬物成分は、脂質粒子内へ取り込まれることのできる本分野において知られたいずれかの生理活性物質を含むがこれらに限定されない。

【0115】

これらの追加の薬物成分は、本明細書中に記載された脂質粒子中に内包されるか又は他の方法でこれに結合されることができる。或いは、本発明の組成物は、脂質-核酸粒子と会合しない薬物又は生理活性物質を含むことができる。そのような薬物又は生理活性物質は別の脂質担体中にあるか又は同時投与されることができる。

【0116】

組成物の製造

本発明の組成物の製造はいずれかの技術によって達成されることができるが、最も好ましくはエタノール透析又界面活性剤透析法であって、本明細書中に参考文献として援用される以下の刊行物、特許、及び特許出願中に詳述されている：米国特許第5,705,385号；同第5,976,567号；米国特許出願第09/140,476号；米国特許第5,981,501号；同第6,287,591号；PCT国際出願公開第W096/40964号；及び同第W098/51278号。これらの製造方法は、脂質粒子に内包された治療剤、好ましくは脂質-核酸粒子を含む免疫刺激性組成物の小規模及び大規模の製造を提供する。該方法はまた、優れた薬剤特性を有するそのような粒子を作り出す。

【0117】

本発明のワクチン組成物は、(それに対する免疫応答が望まれる)標的抗原を加えることによって調製されることができる。抗原の混和手段は本分野において周知であり、例えば以下のステップ：1)製剤プロセス中における抗原の受動的な内包(例えば、抗原はODNを含有する溶液中に添加されることができる)；2)エタノール脂質混合物中への糖脂質及び他の抗原性脂質の添加及び本明細書中に記載のエタノールに基づくプロトコールによる製剤；3)脂質ビヒクル(例えば、抗原-脂質は、ビヒクルと抗原-脂質ミセルをインキュベートすることによって、形成された脂質ビヒクル中へ加えられることができる)中への挿入；及び4)抗原は製剤後に添加されることができる(例えば、リンカー部分を有する脂質が製剤された粒子中に含まれ、そして製剤後に望ましい抗原と結合するためにリンカーが活性化される)を含む。標準的結合及び架橋方法は本分野において周知である。他の調製物は、核酸を含まない脂質粒子中へ抗原を混和し、これらの粒子は対象への投与の前に脂質-核酸粒子と混合される。

【0118】

本発明の方法中で使用される組成物の特徴付け

本発明の方法中で使用される組成物の好ましい特徴は以下のとおりである。

【0119】

本発明の好ましい脂質-核酸粒子は、内部空間を完全に内包する脂質膜の(一般的にはりん脂質二重層)外側部分を含む。時には本明細書中で脂質膜ビヒクルと呼ばれるこれらの粒子は、平均直径50~200nm、好ましくは60~130nmの小粒子である。静脈内投与に最も好ましいのは、粒子の95%が平均で30nm以内である、比較的均一なサイズの粒子である。核酸及び他の生理活性物質は内部空間に含まれ、又は内包している膜の内部表面に会合している。

【0120】

本明細書中で使用される「完全に内包された」とは、粒子を血清又は顕著に遊離のDNAを分解するヌクレアーゼアッセイに露出した後に、粒子内の核酸が顕著に分解されていないということの意味する。完全に内包された系においては、普通は遊離の核酸の100%を分解する処置において、好ましくは25%未満の核酸粒子が分解され、より好ましくは10%未満、最も好ましくは5%未満の核酸粒子が分解される。或いは、完全な内包はOligreen(商標)アッセイによって決定されることができる。完全に内包された、とは、粒子が血清に対して安定である、すなわちそれらがインビボの投与において急速にそれらの

10

20

30

40

50

成分部分に分解しないということも示唆する。

【0121】

本発明の組成物のこれらの特徴は、本発明の好ましい粒子をDOTMA / DOPE (リポフェクチン (LIPOFECTIN) (商標)) 製剤のような (陽イオン性複合体又はリポプレキシスとしても知られる) 脂質 - 核酸凝集物から識別する。これらの凝集物は、一般的には直径がもっと大きく (250 nmより大きい)、ヌクレアーゼ消化にコンピテントには耐えられない。それらは、一般的にインビボ投与によって分解する。陽イオン性の脂質 - 核酸凝集物と弱い抗原を含む上記の脂質 - 核酸製剤は、筋肉内、腹腔内及びくも膜下投与、より好ましくは鼻腔内投与のような局所的、且つ部位的な適用に好適なワクチンを提供することができる。

10

【0122】

本発明のリボソーム粒子は広い範囲の薬物：脂質比率で製剤されることができる。本明細書中で使用される「薬物対脂質の比率」は、定義された調製物の容量中の治療的な核酸の量 (すなわち、内包され、血液への露出によって急速に分解されない核酸の量) ÷ 同容量中の脂質量、を意味する。これはモル / モル又は重量 / 重量、或いは重量 / モルに基づいて決定される。薬物の脂質に対する比率は、核酸の所定の用量に関連した脂質量を決定することができる。好ましい実施態様において、本発明の組成物は約 0.01 ~ 0.25 (重量 / 重量) の範囲の薬物：脂質比率を有する。

【0123】

本発明の組成物及び方法の使用

20

Bリンパ球及びTリンパ球の組み合わせは、基礎を成す体液性及び細胞性免疫応答の働きをそれぞれ確立する。体液性及び細胞性免疫応答は、抗原からの刺激及び続く多様なサイトカインの分泌に応答して、それぞれの細胞タイプが活性化することによって、それぞれ進行する。未処置のCD4+ Tヘルパー細胞への抗原ペプチドの提示は、該細胞が、その機能及びサイトカイン発現特性によって識別される、ヘルパー細胞の2の異なるサブセット (Th-1及びTh-2) に分化することを引き起こす。Mosman et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 7: 145-173 (1989); Paul et al., *Cell*, 76: 241-251 (1994); O'Garra, *Immunity*, 8: 275-283 (1998)。

【0124】

CD4 + Th細胞から分泌されるサイトカインの特異的パターンは、(IFN-、IL-1、IL-2、IL-12及びTNF-を含む) 優勢に細胞性のタイプ - 1 応答、又は (IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10及びIL-13を含む) 主に体液性のタイプ - 2 応答へ免疫応答を向かわせる。Glimcher and Murphy, *Genes Dev.*, 14: 1693-1711 (2000); Abbas et al., *Nature*, 383: 787-793 (1996)。Th-1サブセットは、CTL及びNK細胞の活性化による細胞を介する免疫、そしてヒトにおけるIgMからIgG及びIgA並びにマウスにおけるIgMからIgG2aへの免疫グロブリンのクラススイッチに特徴を有する、体液性免疫の両方を促進する。Th-1応答はまた、遅延型の過感受性及び自己免疫疾患と関連することができる。Th-2サブセットは、主に、体液性免疫を誘導し、そしてヒトにおけるIgG1及びIgEへのクラススイッチを誘導する。Th-1 応答に関連する抗体アイソタイプは、一般的に良好な中和及びオプソニン化能を有するが、Th-2応答に関連するものは、一般的に、よりアレルギー応答に関連している。

40

【0125】

本明細書において示すとおり、対象の免疫刺激性組成物は、微生物抗原及び腫瘍関連抗原などの抗原刺激に対する、Th-1に偏った強い免疫応答を刺激することができ、そして宿主の免疫応答の細胞性及び体液性の両要素を亢進することができる。したがって、本明細書に記載の免疫刺激性組成物は、一般的にはTh-1に偏った免疫応答を誘導する方法、そして着目の特異的抗原に対するワクチンにおけるアジュバントとしての使用を見出す。また、体液性の応答の成熟を亢進する方法並びに抗原性刺激に対する応答における抗体アイソタイプのスイッチングを増加させる方法もまた、本明細書において提供される。

【0126】

これらの免疫応答は、以下の：(B細胞、T細胞、樹状細胞又はマクロファージのような

50

APCs、NK細胞、NKT細胞などの)免疫系の細胞の活性化、増殖又は分化;アップレギュレーション又はダウンレギュレーションされた、マーカーの発現;サイトカイン分泌;IgA、IgM、又はIgGの刺激又はその力価の増加;アイソタイプクラススイッチ;及び(脾臓細胞性の増加を含む)脾腫を含むがこれらに限られない多くの方法で測定されることができる。特にTh-1に偏った免疫応答の存在は、(IFN-、IL-12などの)Th-1サイトカイン及び抗原特異的CD8+CTLの誘導によって直接的に決定されることができる。したがって、本発明によれば、Th-1サイトカイン又はCTLが誘導されると、Th-1に偏った免疫応答が誘導される。同様に、亢進された体液性応答及び体液性応答の成熟の改善は、(マウスにおけるIgG2a、IgG1、ヒトにおけるIgG及びIgAなどの)誘導されたタイプ-1抗原特異的抗体のアイソタイプを検出すること、及び本明細書中に例解されるように、IgMからIgG又はIgAへのアイソタイプスイッチが起こったかについて判定することによって示唆される。他のアジュバントに比較して、アイソタイプのスイッチングが増加した場合、本発明によって、亢進された体液性免疫応答が誘導される。

10

20

30

40

50

【0127】

好ましい実施態様において、本発明の方法は、メチル化核酸を含むLNA製剤を含有する有効量の免疫刺激性組成物を対象に投与することによって、抗原刺激に対する、Th-1に偏った免疫応答を刺激することを含む。そのようなLNA製剤を1以上の着目の抗原の1以上のエピトープとともに含むワクチンもまた、提供される。好ましくは、上記抗原はLNA粒子と会合しており、最も好ましくは、複数の抗原が使用される。1の実施態様において、ODNはPS又は他の修飾された非ホスホジエステル骨格を含む。Th1応答を誘導する他のアジュバントは、MPL、MDP、ISCOMS、IL-12、IFN-、及びSB-AS2を含むが、これらに限定されない。

【0128】

さらなる実施態様において、本発明の組成物および方法は、サイトカインレベルを調節するために使用されることができる。サイトカインに関して本明細書で使用される「調節」は、低レベルが望ましい場合の特別なサイトカインの発現抑制又は高レベルが望ましい場合の特別なサイトカインの発現の増強を意味することができる。特別なサイトカインの調節は、局所的又は全身的に起こることができる。好ましい実施態様において、本発明の組成物及び方法は、サイトカインを分泌するようにマクロファージ及び樹状細胞を活性化するために使用されることができる。一般的に、Th-1タイプのサイトカインが誘導されることができ、したがって、本発明の免疫刺激性組成物は、細胞毒性T細胞を含むTh-1タイプ抗原特異的免疫応答を促進することができる。

【0129】

適応症、投与及び用量

本発明の組成物及び方法は、免疫系の刺激を必要とするいずれかの患者又は生物における使用を意図されたものである。そのような必要性は、腫瘍学、炎症、関節炎及びリウマチ、免疫不全障害のようなほとんどの医学分野を包含するが、これらに限定されない。当業者は、本明細書の開示に基づいて有効性を試験するために適切な適応症を選択することができる。好ましい実施態様において、本発明の組成物及び方法は以下の実施例に記載の腫瘍症のような腫瘍症(病理学的又は潜在的に病理学的ないずれかの新形成細胞の増殖)を治療するために使用される。

【0130】

対象への本発明の組成物の投与は、インビボ又はエキスピボの方法を含むいずれかの方法によることができる。インビボの方法は局所的、部分的又は全身的適用を含む。好ましい実施態様において、該組成物は、粒子が患者のB細胞、マクロファージ又は脾臓細胞に到達できるように、及び/又は粒子がリンパ球の増殖を刺激し、該患者においてIL-6、IL-12、IFN γ 及び/又はIgMが分泌されるように、静脈内投与される。

【0131】

本発明のワクチン組成物は、いずれかの知られた投与経路で投与されることができる。1の実施態様において、本発明の組成物は静脈注射を介して投与される。他の実施態様に

において、筋肉内又は皮下注射が採用され、この方法では大きなサイズの（150～300 nm）脂質粒子が使用されることができる。結局、高価な排出ステップの必要性が減らされ又は除かれることができ、粒子が循環する必要がないため、より安価な材料に都合のよいように脂質成分を偏って選択することができる。例えば、Chol 量が減少されることができ、DSPCがなんらかのより柔軟なもの（例えば、POPC又はDMPC）に置換されることができ、そしてPEG-脂質がより安価なPEG-アシル鎖に置換されることができる。なおさらなる実施態様においては、本発明の組成物は、気管内点滴注入法又は鼻腔内吸入などによって、気道を介して投与されることができる。

【0132】

当業者は、例えば補体の活性化、凝集、腎毒性、肝臓酵素アッセイなどの、製剤の可能性のある毒性の同定方法を知っているであろう。そのような毒性は、生物間で異なることができる。

10

【0133】

組成物の医薬調製物は通常、デリバリー様式を改善又は補助する追加の担体を採用する。典型的には、本発明の組成物は普通の生理食塩水又は標準的な医薬の実施にしたがって選択されたリン酸緩衝液のような生理学的に許容可能な担体中で投与されるだろう。他の好適な担体は水、0.9%生理食塩水、0.3%グリシン、などを含み、アルブミン、リポタンパク質、グロブリンなどのような安定性の向上のための糖タンパク質を含む。

【0134】

脂質 核酸製剤の用量は、所望の脂質用量、所望の核酸用量、及び組成物の薬物：脂質の比率に依存する。当業者は本明細書中に提供された情報に基づいて適切な用量を選択することができる。

20

【0135】

初回免疫、追加免疫、及び免疫維持のための免疫療法又はワクチン接種プロトコールは当業者に周知であり、さらに以下で記載される。特別には、当業者は対象、特別には哺乳動物、及びより特別にはヒトへの投与量を本明細書中に記載の投与量に基づいていかに計算するかを認識するであろう。1の動物から他の動物へ（例えば、マウスからヒトへ）投与量を変更するための変換因子は本分野において周知であり、例えば、本明細書中に援用されているFood and Drug Administration Web site（の腫瘍学ツールセクション中）のwww.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htmlにおいて完全に記載されている。遊離の核酸を含む知られた免疫刺激性の組成物に比べて、本発明の免疫刺激性の組成物及び方法は、より少ない量の核酸を、亢進された免疫応答をインビボにおいて刺激するために利用することができる。

30

【0136】

本発明の製剤中の核酸の量は、一般的に、約0.001～60mg/kg（1用量あたりのマウスの体重1kgあたりの核酸のmg）である。静脈内（i.v.）投与のための好ましい実施態様において、本発明の組成物及び方法は、約1～50mg/kg、より好ましくは約5～20mg/kgを利用する。皮下（s.c.）投与のための好ましい実施態様において、本発明の組成物及び方法は、約1～10mg/kg、より好ましくは約1～5mg/kg、通常は、約3～5mg/kgを利用する。本発明の脂質粒子と会合する抗原の量は、好ましくは約0.04～40mg/kg、より好ましくは約0.04～4mg/kgである。上記のように、当業者は上記において同定された周知の変換因子及びさらなる経験的な試験に基づいて、本明細書中に記載された投与量から他の哺乳動物のために好適な用量を容易に決定することができる。

40

【0137】

本発明の製剤は薬剤として許容可能な溶液であって、薬剤として許容可能な濃度の塩、緩衝物質、保存剤、融和性の担体、アジュバント、及び場合により他の治療的成分を日常的に含む溶液中で投与される。

【0138】

治療における使用のために、本発明の免疫刺激性の組成物の有効量が、適切な標的細胞による取り込みを可能とするいずれかの様式で対象に投与されることができる。本発明の

50

免疫刺激性の組成物の「投与」は当業者に知られたいずれかの手段によって達成されることが出来る。好ましい投与経路は、非経口注射（皮下、皮内、静脈内、腸管外、腹腔内、くも膜等）、並び粘膜の、鼻腔内、気管内、吸入、及び眼内、腔内；又は経口、経皮（例えば、パッチを介する）投与を含むが、これらに限定されない。注射はボラス又は持続的輸注であることができる。

【0139】

例えば、本発明の免疫刺激性の組成物は、筋肉内若しくは皮内注射、又は他の非経口手段によって、或いはバイオリスティックな「遺伝子銃」を表皮に適用することによって投与されることが出来る。本発明の免疫刺激性の組成物は、例えば、吸入、局所的、静脈内、経口、移植、直腸内、又は腔内に投与されることも出来る。好適な液体又は固体の医薬調製物の形態は、例えば、注射又は吸入のための水溶液又は生理食塩水溶液、顕微鏡的な金粒子上ヘエンコキレート（encochleate）され、被覆され及び霧状にされたものである。薬物デリバリーのための本方法の簡単な総説として、本明細書中に参考文献として援用されている、Langer, Science 249:1527-1533, 1990を参照のこと。

10

【0140】

医薬組成物は好ましくは用量単位で調製され、そして投与される。液体の用量単位は注射又は他の非経口投与のためのバイアル又はアンプルである。固体の用量単位は、錠剤、カプセル及び坐剤である。患者の治療のためには、化合物の活性、投与方法、免疫化の目的（すなわち、予防的又は治療的）、障害の性質及び重篤度、患者の年齢及び体重に依存して異なる用量が必要である。所定の用量の投与は、個別の用量単位の形態での単回投与又はその他のより小さい用量単位のいくつかのどちらで実施されることも出来る。何週か又は何ヶ月かの特別な間隔を置いた複数回の用量投与が、抗原特異的応答を追加免疫するために普通である。

20

【0141】

好適な緩衝剤は以下の：酢酸及び塩（1~2%重量/容量）；クエン酸及び塩（1~3%重量/容量）；ホウ酸及び塩（0.5~2.5%重量/容量）及びリン酸及び塩（0.8~2%重量/容量）を含む。好適な保存剤は塩化ベンザルコニウム（0.003~0.03%重量/容量）；塩化ブタノール（0.3~0.9%重量/容量）；パラベン（0.01~0.25%重量/容量）及びチメロサル（0.004~0.02%重量/容量）を含む。

【0142】

好ましい実施態様において、本発明の免疫刺激性の組成物は、アジュバントと抗原の組み合わせの有効量を、場合により薬剤として許容可能な担体中を含む。本明細書中で使用される「薬剤として許容可能な担体」は、ヒト又は他の哺乳動物への投与に好適な、1以上の融和性の固体又は液体の充填剤、希釈剤又は内包剤を意味する。本明細書中で使用される「担体」は、それによって活性成分が適用を容易にするように併合される、天然又は合成の有機成分又は無機成分を意味する。本発明の免疫刺激性の組成物の成分は、実質的に所望の薬効を損なうような相互作用のない方法で本発明の化合物と、そして相互に混合されることも出来る。

30

【0143】

非経口投与に好適な組成物は、受容者の血液と等張であることができる滅菌水性調製物を便利に含む。許容可能なビヒクル及び溶媒には、水、リンガー溶液、リン酸緩衝生理食塩水及び等張の塩化ナトリウム溶液がある。さらに、滅菌された固定油が溶媒又は懸濁媒体として慣用的に採用される。この目的のために、合成のモノオルディグリセライドを含むいずれかのブランドの固定鉱油又は非鉱油が採用されることが出来る。さらに、オレイン酸のような脂肪酸は、注射剤の調製において使用される。皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内などの投与に好適な担体制剤が Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa. 中に見出される。

40

【0144】

本発明において有用なアジュバント又は抗原は、2以上のアジュバント又は抗原の混合物としてデリバリーされることが出来る。混合物は、本明細書に記載のLNA製剤に加えて

50

いくつかのアジュバントから成ることができる。

【0145】

多様な投与経路が可能である。選択される特別な様式は、もちろん選択された特別なアジュバント又は抗原、対象の年齢及び一般的な健康状態、治療される特別な状態及び治療効果のため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、医学的に許容可能ないずれかの投与様式を使用して実施されることができ、それは臨床的に許容不可能な副作用なしに有効なレベルの免疫応答を生じさせるいずれかの様式を意味する。好ましい投与様式は上記のとおりである。

【0146】

組成物は単位用量形態で便利に与えられることができ、薬剤術の分野において周知の方法のいずれかによって調製されることができ、すべての方法は、化合物を1以上の付属成分から成る担体と会合させるステップを含む。一般的に、組成物は化合物を液体の担体、細かく分割された固体の担体、又はその両方と会合させ、そして所望により生成物を成形することによって均一にそして完全に調製される。

【0147】

他のデリバリーシステムは除放性の、遅延性の又は持続性の放出のデリバリーシステムを含むことができる。そのようなシステムは化合物の繰り返し投与を回避することができ、対象及び医師の便宜を向上させることができる。多くの放出型のデリバリーシステムが入手可能であり、当業者に知られている。それらは、ポリ(ラクチド グリコリド)、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステラミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシブチル酸、及びポリアンハイドライドのようなポリマーに基づくシステムを含む。薬物を含む先のポリマーのマイクロカプセルが例えば、米国特許第5,075,109号中に記載される。デリバリーシステムは、以下の非ポリマーシステム：コレステロール、コレステロールエステルのようなステロイド及び脂肪酸又はモノ ジ 及びトリ グリセリドのような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；ペプチドに基づくシステム；ワックスコーティング；慣用の結合剤及び賦型剤を使用した圧縮錠剤；部分的に融合したインプラントなども含む。特別な例は以下の：(a)米国特許第4,452,775号、同第4,675,189号及び同第5,736,152号に記載されたような、本発明の作用物質がマトリックス内に含まれる形態の侵食型システム及び(b)米国特許第3,854,480号、同第5,133,974号及び同第5,407,686号中に記載されたような、活性成分が制御された速度でポリマーから浸透する拡散性システムを含むが、これらに限定されない。さらに、ポンプに基づくハードウェアデリバリーシステムが使用されることができ、そのうちのいくつかはインプラントに適応させられる。

【0148】

本発明のある特別な側面に目を向けると、活性化マーカーを含む多様な白血球マーカーの刺激に対するオリゴヌクレオチドの効果を示すインビトロのデータは、実際、遊離のオリゴヌクレオチドがインビボにおいて免疫刺激性であるか又は治療効果を有するかについての決定要因ではないという認識からの側面が生じる。

【実施例】

【0149】

実施例の詳細

マウス。雌性、Balb/c又はC57/BL6(「B6」)マウス(6~8週齢)をHarlan-Sprague Dawley(Indianapolis, IN)から購入した。すべての動物を使用の1週間前に検疫に供した。すべての試験を、Canadian Council on Animal Care(CCAC)及びInstitutional Animal Care and User Committee(IACUC)によって確立されたガイドラインにしたがって実施した。

【0150】

ペプチド。ペプチドはCommonwealth Biotechnologiesから入手し、HPLCによって95%を超える純度であると決定された。QC分析結果を各ペプチドについて得た。

【0151】

オリゴヌクレオチド製剤。オリゴヌクレオチドをAvecia又はProligo又はTrilinkから入手した。すべてのODNを滅菌水中で再び水和し、滅菌DPBS、pH 7.2中で好適な濃度に希釈した。

【0152】

LNA製剤。LNA製剤は、以下のように調製した。最初のODN：脂質比率は0.25、w/w。ホスホジエステル製剤については、ODNを溶解するために、300mMクエン酸緩衝液の代わりに20mMクエン酸緩衝液を使用した。これを失敗すると、内包効率が非常に低下する結果となる（すなわち、最終的に3%以下）。

【0153】

ワクチン接種。B6マウスを注射1回あたり100mlで皮下（SC）にワクチン接種した。投薬スケジュールはq7d×2又はq4d×4のいずれかであり、各図の説明中に示される。CFA混合物は、非常に粘稠であり、より大きなゲージのシリンジによって投与しなければならなかった。体液性に関する試験については、初回（第0日）及び追加免疫（第14日）によるストラテジーを使用し、血液サンプルをテール・ニッキングによっていろいろな時点で採取した。

10

【0154】

有効性試験。E.G7-OVA又はEL-4胸腺腫細胞株を、試験の間を通じて使用した。これらの細胞は、確立された方法にしたがって、インビトロで培養した。腫瘍に関する試験については、1%FCSを含有するPBS、50ml中で、 2.5×10^6 のE.G7-OVA細胞を皮下に注射した。腫瘍の測定は、腫瘍寸法を繰り返し垂直測定し、以下の式：

20

容量（mm³）=（L×W×H）p/6

を使用して行った。

【0155】

TRP-2及びgp100試験を、B16/BL6マウスメラノーマモデルを用いて行った。B16細胞（ 1.0×10^5 ）を200mlの容量で静脈内に注射した。典型的には、動物を毎週2～3回の注射でワクチン接種し、B16細胞を最後のワクチン接種の1～2日後に投与した。動物をB16注射の14～18日後に屠殺し、肺を切除し、立体顕微鏡を使用して転移を計数した。

【0156】

フローサイトメトリー分析。MHCテトラマー（Beckman Coulter）又はDimerX試薬（PharMingen）のいずれかを使用して、ワクチン接種されたマウスにおける抗原特異的T細胞をいろいろな時点で測定した。着目の細胞集団を同定するために、CD8a、B220、及びCD4に対する抗体を使用し、いらない集団を除外した。脾臓及びリンパ節の単一の細胞の懸濁液をCurrent Protocols in Immunologyに概説されたプロトコールに従って、調製した。抗体染色を4に保った96穴プレート中の 1×10^6 個の細胞について行った。一般的に、 1×10^6 細胞あたり、各抗体0.2mgを使用した。

30

【0157】

実施例1

遊離又は内包されたオリゴヌクレオチドへの露出による、全血細胞中の白血球のインビトロ対インビボにおける活性化

インビボにおける免疫刺激を予想するための、インビトロアッセイの有効性を実証するために、CD69の発現の比較を図1及び2に示す。CD69は細胞活性化マーカーであって、NK細胞、B細胞及び単球の活性化を定量化する。NK細胞上でのCD69の発現は、細胞活性化及びIFN- γ の産生を示し、これはTh-1免疫応答の誘導に重要である。遊離の及び内包されたODN1及び2を、それらがCD69の発現を誘導する能力についてインビトロ及びインビボで試験した。0.1mg/mlの用量のODN2及び10mg/mlのODN1をインビトロで、10mg/mlのODN2及び20mg/mlのODN1をインビボで使用した。各オリゴヌクレオチドを、POPC：CHOL：DODMA：PEGDMGが20：45：25：10の比率で含まれる脂質粒子中に内包した。

40

【0158】

図1は、特別にODN1及び2である、遊離のオリゴヌクレオチド及び内包されたオリゴヌクレオチドでマウス全血を処理することによる、活性化マーカーCD69を発現する白血球の

50

インビトロでの刺激を例解する。マウス全血をインビトロで遊離のオリゴヌクレオチドで処理した場合、処理後15時間で、CD69陽性のB細胞、単球及びいくらかのNK細胞の量が使用した遊離のオリゴヌクレオチドの用量依存的に増加した。このインビトロのアッセイにおいて、遊離のODN2は、遊離のODN1にくらべて、かなり大きくCD69を刺激した。しかしながら、これらの同じオリゴヌクレオチドを脂質ビヒクル中に内包した場合、インビトロでのこれらの同じ細胞タイプにおけるCD69産生の刺激は、減少し又はすべて消滅した。

【0159】

しかしながら、同じオリゴヌクレオチドをインビボで試験した場合、おどろくべき結果が得られた。図2は、内包された又は遊離のオリゴヌクレオチドの注射によるICRマウスのインビボでの処置において、結果はインビトロで得られたものと反対であったことを示す。この図は、インビボで、脂質に内包されたオリゴヌクレオチドが、遊離のオリゴヌクレオチドよりも、注射の16及び24時間後において同じ細胞タイプ上のCD69マーカーをより有効に刺激することを明らかに実証する。結果は、インビトロのデータが、オリゴヌクレオチドがインビボで免疫刺激性であるか否かを判定するためには不十分であることを示す。さらに、図1及び2は、脂質による内包が、オリゴヌクレオチドがインビボで有効であるか否かを判定するのに重要な因子であることを示唆している。インビトロの結果が、脂質によるODN1及び2の内包が、対照レベル未満にNK細胞上のCD69の刺激を減少させることを示唆するにもかかわらず、インビボの結果は、内包されたODN1及びODN2がどちらもNK細胞上でのCD69の産生を刺激することができることを示す。

【0160】

以上のインビボでの結果は、インビボでのCD69産生細胞の刺激によって測定すると、遊離のオリゴヌクレオチドは脂質ビヒクル中に内包されない限り、必ずしも免疫刺激性でないということを示す。これは、CD69の刺激が遊離のODNによっても観察されるとしても、真実である。さらに、結果は、内包されたオリゴヌクレオチドが、それがインビトロで有効であると示されないとしても、インビボで有効であることができることを示唆する。

【0161】

実施例2

インビボにおける、メチル化オリゴヌクレオチドによる樹状細胞の活性化

背景技術の項において論じたとおり、従来技術は、インビボ或いはインビトロで測定されるかにかかわらず、免疫応答の刺激において、メチル化CpGオリゴヌクレオチドが一般的に有効でないか、又は非メチル化CpGオリゴヌクレオチドに比べて有効性が低いことを教示する。米国特許第6,429,199号は、メチル化オリゴヌクレオチドが、NK細胞又はヒトB細胞におけるCD40の発現を促進せず、また、Th-1応答における体液性及び細胞性免疫に含まれる主要抗原提示細胞である、樹状細胞の生存を改善しなかったことを開示する。さらに、開示されたメチル化CpGオリゴヌクレオチドは、インビトロで、樹状細胞の生存、分化、活性化又は成熟の改善において不活性であった。同様に、PCT国際出願公開第W002/069369号に開示された、インビトロのPBMCの結果は、樹状細胞に対するメチル化オリゴヌクレオチドのいずれの活性をも実証するものではなかった。

【0162】

対照的に、本発明は、メチル化オリゴヌクレオチドが、樹状細胞の増殖の誘導において少なくとも効果的であり、そして典型的には、非メチル化オリゴヌクレオチドよりもより有効であることを示す。単一のCpGジヌクレオチド配列のシトシン残基がメチル化された、非メチル化ODN1の対応物を作製し、ODN1mと呼ぶ。

【0163】

メチル化オリゴヌクレオチドが樹状細胞を刺激可能であることを実証するために、ODN1とODN1mのそれぞれを、POPC:CHOL:DODMA:PEGDMGを20:45:25:10の比率で含む、脂質ビヒクルに内包する。PBSを対照として使用する。実験の結果を図3に示す。

【0164】

図3は、内包されたODN1mが樹状細胞を活性化する能力を明らかに例解する。さらに、

脂質ビヒクル中に内包された場合、メチル化ODN1mは、インビボでの樹状細胞の活性化の刺激においてその非メチル化対応物よりもより活性があった。樹状細胞の活性化は、IFN-g 分泌細胞のパーセンテージによって測定した。これらの細胞は、細胞タイプを示す抗体で標識し、樹状細胞マーカーを有するもののみをこの測定に含めた。

【0165】

脂質に内包された非メチル化及びメチル化CpGオリゴヌクレオチドの投与による、樹状細胞の増殖を実証するために、血液、脾臓、及びリンパ節からの細胞を、樹状細胞集団の活性化及び増殖について分析した。ICRマウスを、20 mg/kgの用量の内包されたオリゴヌクレオチドの単回静脈内注射で免疫化し、対照ICRマウスには、PBSを注射した。図4及び5に示すとおり、脾臓、血液及びリンパ節のそれぞれの細胞をさまざまな時点で単離し、そして樹状細胞マーカーCD11c及びDEC205を用いて、樹状細胞の増殖及び活性化を定量した。これらの各マーカーは、それらが異なる細胞亜集団を代表することができるにもかかわらず、樹状細胞に特異的である。図4及び5のそれぞれにおいて、対照を100%に等しいとしてプロットし、各骨格構成についてのODN1mの効果を対照に対するパーセンテージとしてプロットした。図4Aは、その各パネル中で、メチル化ODN1mが脾臓細胞及び全血細胞中で、対照に比較してCD11c陽性樹状細胞の増殖を刺激したが、リンパ系組織では刺激しなかったことを例解する。ODN1mについて、P0及びPS骨格はどちらも樹状細胞の増殖を示した。図4Bは、各パネルにおいて、メチル化ODN1mが脾臓細胞及びリンパ系組織においても、対照に比較してDEC205陽性樹状細胞の増殖を刺激したが、全血細胞中では刺激しなかったことを示す。

10

20

【0166】

図5はまた、樹状細胞の活性化を示す。細胞サンプルを集めた後、先ず、細胞活性化の指標となるCD86並びに樹状細胞表現型マーカーCD11c及びDEC205の同時発現をフローサイトメトリーによって分析した。活性化された樹状細胞のパーセンテージを、100%としたPBS対照に対してプロットした。図5の各パネルは、オリゴヌクレオチドが脂質に内包された場合、メチル化ODN1mがCD11c陽性樹状細胞におけるCD86の発現を誘導することを示す。DEC205陽性の樹状細胞を測定した場合の同様の結果が、図5のパネルに示される。

【0167】

実施例3

血漿サイトカインレベルに対する、PS及びP0骨格構成の効果

30

上記のように、脂質に内包されないオリゴヌクレオチドでは、伝統的には、骨格はヌクレアーゼによる分子の分解を減らすように修飾される。しかしながら、内包すると、そのような修飾はもはや分解防止のために必要ではない。脂質による内包によって誘導されたサイトカイン刺激に対する、異なるリン酸骨格の効果を確立するために、マウスに、P0及びPS骨格の両方を有するオリゴヌクレオチドを注射し、そして(図6及び図7Bに示すような)一連の時点で、そして図7Aに示すような傾斜した用量スケールでサイトカイン刺激を測定した。この実験において、ICRマウスに、遊離のP0 ODN1、内包されたP0-ODN1及び内包されたPS-ODN1を20 mgODN/kgの用量で静脈内注射した。Th-1及びTh-2の両方に共通するサイトカイン(IL-12、IL-6及びIFN-g)及びMCP-1(マクロファージケモカイン)を、投与後24時間にわたって測定した。サイトカイン刺激は、一般的に、MCP-1におけるケモカイン応答としての細胞性免疫応答の指標である。オリゴヌクレオチドを、DSPC:Chol:DODAP:PEG-CER14を20:45:25:10の比率で含む脂質粒子中に内包した。

40

【0168】

図6は、遊離のP0-ODN1のインビボ投与が、IL-6、IL-12、IFN-g又はMCP-1の刺激に効果を及ぼさず、オリゴヌクレオチドがヌクレアーゼで分解されたい、ということを示唆した。遊離のオリゴヌクレオチドを投与する場合、ヌクレアーゼによる分解を避けるためにPS骨格が必要であることは、本分野において周知である。対照的に、脂質に内包されたP0及びPS ODN1のインビボ投与は、これらの各サイトカイン及びケモカインの産生を刺激した。しかしながら、図6は、P0-ODNがサイトカイン及びケモカイン産生の誘導においてより有効であることを示唆する。

50

【0169】

図7Aは、ICRマウスの内包されたP0又はPS ODN14による処理が、遊離のODN14による処理に比べて、傾斜した用量スケールにわたる測定において、IL-12の誘導を増加させたことを例解する。この図は、IL-12の増加によって証明されたとおり、脂質による内包がサイトカイン刺激の有効性を増加させるということ、そして、サイトカイン応答の誘導においてP0-ODNがPS-ODNよりもより有効であるという、図6から得られた結論を支持する。実際に、同じ用量であるが内包された形態で投与された場合、IL-6(1000倍)及びIFN- γ (20倍)のような他のサイトカインにおけるさらなる劇的な増加とともに、血漿IL-12のピークは2.5倍増加したことを観察した。図7Aもまた、内包された場合、脂質粒子の存在しない状態で投与された遊離のオリゴヌクレオチドに比べて、サイトカイン応答を促進するのに必要とされるオリゴヌクレオチドがより低用量であることを実証する。

10

【0170】

さらにP0-ODNとPS-ODNの相違を明らかにするために、図7Bは、PS及びP0骨格構成に特異的な、時間の経過に伴うIFN- γ サイトカイン刺激における相違を例解する。内包されたPS ODN14による処理が、より少ないがそれでもなお有効なIFN- γ の誘導を刺激する一方、内包されたP0 ODN14による処理は、早期のIFN- γ の誘導を強力に刺激する。さらに、図7Bは、PS-ODNにより刺激した場合、数日にわたって第2の大きなIFN- γ のピークが発生したことを示し、これは、内包されたPS-ODNによる処理によって、おそらく処理後のNK細胞の増殖を介してより効果的にIL-12産生に応答するように、免疫系が初回刺激されたことを示唆することができる。

20

【0171】

図22は、さらに実施例4において検討するように、図7B中に見られる、同じオリゴヌクレオチドのP0異形に比べて遅い、PS-ODNについてのIFN- γ のピークを同様に示す。

【0172】

本発明による脂質による内包の重要な特徴は、従来技術においてはPS骨格がインビボの活性のために必要であったにもかかわらず、自然のP0骨格を有するオリゴヌクレオチドが免疫系の応答の刺激に使用されることができることを発見したことである。以下の実施例7において示すように、抗腫瘍活性の評価において、内包されたP0オリゴヌクレオチドはPSオリゴヌクレオチドよりもより有効であり、それは、オリゴヌクレオチドがメチル化されている場合には特別である。

30

【0173】

実施例4

PS及びP0骨格を有するCpG ODNの免疫刺激特性の評価

特にP0及びPS骨格を有するODNに関連した応答のレベルを差別化する場合、さらなる側面は、評価される応答のタイプ、より特別には応答が体液性であるか又は細胞性であるか、の分析である。骨格の効果を評価するために、PS-ODN及びP0-ODNの、体液性免疫応答の成熟を開始しそして誘導する(すなわち、アイソタイプのスイッチングの促進)能力に着目して実験を行った。内包されたP0-ODN及びPS-ODNの投与によって促進された体液性免疫応答の大きさ及び動力学を比較した。P0-ODN及びPS-ODNのそれぞれを、第0日及び第14日に設定された $q14 \times 2$ の初回-追加免疫における100mg/用量で、皮下投与し、第6週の第35日で評価した。対照マウスを、OVA-PBS、OVA-Alumを同じ用量で使用して免疫した。オリゴヌクレオチドを、DSPC:Chol:DODMA:PEG-DMGの20:45:25:10の比率からなる脂質粒子に内包した。

40

【0174】

P0及びPS ODNの両方が体液性免疫応答を誘導可能であるにもかかわらず、応答の性質は異なると結論することができる。図8及び9は、多様なオリゴヌクレオチド及び対照についての6週後のIgM及びIgG応答の大きさを、吸収によって例解した。図において明らかに示されるとおり、P0-ODN2が強いIgM応答を引き起こしたにもかかわらず、PS-ODN1及びPS-ODN2のそれぞれは、弱いIgM応答を生じさせた。反対に、試験した各PS-ODNは、P0骨格を有する同じオリゴヌクレオチドに比べて一貫して良好なIgG応答を引き起こした。これは

50

、PS-ODNが優位なIgG応答を引き起こすことを示唆する。これらのデータは、P0及びPS ODNの両方が体液性免疫応答を開始することができる一方、アイソタイプスイッチングの欠如及びIgMアイソタイプの優勢によって示されるように、P0応答は成熟しない、ということを示す。一方、PS-ODNは、体液性免疫応答を開始し、並びにIgGアイソタイプ抗体優位へのアイソタイプスイッチングによって示されるように、応答の成熟を誘導することができる。

【0175】

この現象は、P0対PS ODNによって誘導されたサイトカインプロファイルに関連するかもしれない。図7(b)及び図22は、内包されたPSオリゴヌクレオチドODN1及びODN2が、内包されたP0オリゴヌクレオチドによっては引き起こされない、強いIFN- γ のピークを処理の6日後に引き起こしたことを例解する。IFN- γ のようなサイトカインが多様なIgGアイソタイプへの優先的なアイソタイプスイッチングを起こすことは報告されている。したがって、PS-ODNにより誘導された遅いIFN- γ の大きなピークは、P0-ODN処理マウスにおけるそのようなピークの欠如がアイソタイプスイッチングを起こさない一方、IgMからIgGアイソタイプへのアイソタイプスイッチングを誘導することができる。P0-ODNによるこの減少した遅いIFN- γ のピークの原因は不明であるが、結果は、内包された、PSオリゴヌクレオチドではなくP0オリゴヌクレオチドが、IL-12の発現を阻害するI型インターフェロンの誘導を先に引き起こし、これが、NK又はT細胞におけるIFN- γ の発現を促進するのに必要であるということを示唆することができる。

【0176】

同様に、図6は、オリゴヌクレオチドの内包が先に検討したTh-1応答に導くサイトカイン産生の刺激に重要であることを示すのみならず、内包されたPSオリゴヌクレオチドよりも内包されたP0オリゴヌクレオチドを用いて、より多量のサイトカインが産生されることを示す。これは、一般的に、インビボでのオリゴヌクレオチドの分解を防ぐためにはP0オリゴヌクレオチドよりもPS骨格が好ましいということを示す、従来技術において教示されたような遊離のオリゴヌクレオチドの投与とは対照的である。

【0177】

実施例5

サイトカインの誘導、テトラマーの分析及び細胞毒性アッセイ(CTL)によって測定される、オリゴヌクレオチド処理に対するインビボの免疫応答

サイトカインの誘導、テトラマーの分析及び細胞毒性アッセイ(CTL)によって測定される、オリゴヌクレオチド処理に対するインビボの免疫応答

【0178】

皮下の免疫化に対する免疫応答をモニターするために、MHCクラスIテトラマー分析、細胞毒性アッセイ及びサイトカイン放出アッセイを用いて抗原特異的細胞性免疫応答をモニターする一方、体液性免疫応答を血漿抗体レベルを測定することによってモニターした。細胞性及び体液性応答を、C57Bl/6及びBalb/Cマウスにおいてそれぞれ評価した(1群あたり5動物)。細胞性の応答の分析のために、q7d \times 3で皮下に3回注射する投与計画で第0、7及び14日に20mgの抗原と併せた100mgのオリゴヌクレオチドの用量で、マウスを免疫化した。脾臓、肝臓、リンパ節及び血液組織を第21日に集めた。固体組織を機械的に解離させ、単核細胞を集めるために処理した。体液性応答の分析のために、動物をq14d \times 2で第0日及び第14日の2回免疫化し、免疫グロブリンレベルについて血漿を分析するために第35日に血液を集めた。この一連の実験において、オリゴヌクレオチドを、DSPC:Chol:DODMA:PEG-DMG又はPOPC:Chol:DODMA:PEG-DMGの20:45:25:10の比率から成る脂質粒子に内包した。すべての比較を類似脂質粒子を用いて行った。

【0179】

CD8+ve、MHCクラスI複合体との関係における標的抗原を産生する標的細胞の認識及び溶解を可能とする適切なT細胞受容体を有する細胞毒性Tリンパ球、を検出するために、MHC-テトラマー分析を設計する。免疫化された動物から単離された脾細胞を免疫優性のOVA SI INFEKLペプチドと複合化されたPE-標識MHCクラスIテトラマー(H2Kb)並びにFITC標識抗C

D8抗体及びCy-クロム標識抗TCR抗体で染色し、フローサイトメトリーによる分析にかけた。CD8+ve、TCR+veTリンパ球を、MHCクラスI分子との関係においてOVAを特異的に認識し、そしてこれに結合することのできるT細胞受容体を有する細胞の数について評価した。

【0180】

細胞毒性アッセイのために、免疫化した動物からの脾細胞の、抗原特異的な方法で特異的に標的細胞を認識し、そして溶解する能力を4時間の51クロミウム放出アッセイを用いて評価した。標的細胞をCr⁵¹で標識し、免疫エフェクター細胞によって溶解した標的からの上清中への放射性核種の放出量によって、細胞毒性量を決定した。免疫化した動物から単離した脾細胞を、すぐに、又はOVA-パルスした同系の抗原提示細胞によるインビトロの5日間の再刺激の後に、OVAを発現しない細胞であるEL4に比べてOVAを過剰発現する標的細胞、EG.7を特異的に溶解するそれらの能力について試験した。

10

【0181】

サイトカイン放出アッセイの目的は、特異的な抗原による刺激に应答してサイトカイン、特別にはIFN- γ を産生し分泌するように活性化された、抗原特異的な免疫エフェクター細胞を検出することである。細胞を免疫化した動物の脾臓、肝臓、血液及びリンパ節から単離し、Cytokine Secretion Assay(Miltenyi Biotec)を用いて分析した。細胞を、OVA-パルスした、自己の抗原提示細胞で刺激し、捕捉試薬(免疫細胞表面上のCD45エピトープ及びIFN- γ を認識する二重特異性抗体)で標識した。抗原刺激を認識しこれに应答することのできるいずれの細胞もサイトカインを合成、分泌し、これらはその後、細胞に結合した捕捉試薬によって捕捉され、それらの表面上のIFN- γ 結合マーカーとなる。その後、細胞は、IFN- γ 及び多様な表現型のマーカーに対する、蛍光標識された抗体で標識され、IFN- γ を分泌するように活性化された特別な細胞タイプの検出を可能とするフローサイトメトリーによって分析される。

20

【0182】

免疫化したマウスの血漿中の抗原特異的なIgGのレベルを決定するために、体液性の应答の分析を設計した。心臓穿刺によって血液を集め、血漿を集めるために遠心分離した。総IgM、IgG及びIgG1、IgG2aサブクラスの力価を測定するためのエンドポイント希釈ELISA法によって、抗原特異的な免疫グロブリン産生を測定した。プールした血漿のサンプルを連続的に希釈し、希釈サンプル中のOVA特異的な抗体を捕捉するためにOVAコートしたプレートに入れた。その後、OVA特異的な抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgM、IgG、IgG1又はIgG2aウサギ抗体及びTMB基質で検出した。比色反応の吸収を、450nmにおいてELISAプレートリーダー上で測定し、カットオフ値0.05で、未処置動物よりも2倍超高い吸収値を得た血漿の最高の希釈度として、エンドポイント希釈力価を定義した。これを、抗体陽転及び应答の強度を評価するため、及び应答のThタイプを評価するために使用した。

30

【0183】

図10及び11はそれぞれ、ODN1mの、その非メチル化対応物ODN1への規準化を例解する。これらの図における各バーは、メチル化ODN処理した1の動物群(1群あたり5動物)及び非メチル化対応物で処理した第2の群の直接比較を表し、ここで、各オリゴヌクレオチドは同一の脂質粒子中に内包されている。各群について非メチル化集団の結果を100%として、メチル化群をこの100%標準に対して測定した。200%にあたるバーにおいては、これがカットオフ値であり、実際に200%の線は200%以上であることを表す。

40

【0184】

図10は、上記のサイトカイン放出アッセイの結果を示す。この図は、脂質に内包された、メチル化及び非メチル化オリゴヌクレオチドがどちらも免疫应答を表すにもかかわらず、メチル化ODNを非メチル化ODNに比較すると一連のスクリーニングを通して、図10A、B、及びCにおけるサイトカイン分泌によって示される、樹状細胞、NK細胞及びCD8+T細胞の増殖の刺激において、メチル化オリゴヌクレオチドは非メチル化オリゴヌクレオチドと同等又はしばしばそれ以上であることを例解する。

50

【0185】

テトラマー及びCTL分析の結果を図11A~Cに示す。これらの図も、メチル化及び非メチル化ODNの両方が免疫応答を刺激する能力を例解する。しかしながら、図11A及びBは、内包されたメチル化及び非メチル化オリゴヌクレオチドODNで処理された動物の一連のスクリーニングを通して、テトラマー及びCTL分析のそれぞれにおいて、メチル化オリゴヌクレオチドが、細胞毒性Tリンパ球及びテトラマーリンパ球細胞の増殖刺激において、一貫して非メチル化ODNよりも優れていたことをさらに実証する。さらに、図11Cは、代表的なテトラマー試験からのデータを例解し、ここで、全体の平均を図11Bに示す。ODN5、ODN5m、ODN7、及びODN7mのそれぞれを、上記のプロトコールに従って試験した。図11cにおいては、脂質に内包されたODN5m及びODN7mが、脂質に内包されたそれらの非メチル化対応物に比較して、より大きな数の抗原特異的CD8T細胞を誘導することを明らかに示す。

10

【0186】

図10及び11のそれぞれは、メチル化ODN1mによる免疫化により得られた免疫刺激が、その非メチル化オリゴヌクレオチド対応物による同じ処理と少なくとも同等、そしてしばしばより優れていることを一貫して示す。これは、以下の実施例においてさらに実証される。

【0187】

実施例6

EG7-OVA腫瘍モデルにおける、メチル化及び非メチル化オリゴヌクレオチドの予防的抗腫瘍有効性の比較

20

本明細書中に提供される、癌ワクチンは、インビボにおいて抗原及び腫瘍に対する免疫応答を刺激するために、腫瘍関連抗原とともに脂質-核酸製剤を含む。ニワトリ卵アルブミン(オボアルブミン; OVA)は、広く研究された抗原系モデルである。体液性及び細胞を介する免疫応答の両方をモニターするために、抗原決定基はマッピングされ、試薬及びモデルが存在する。さらに、OVA遺伝子を含む細胞株が確立され、特徴づけられ、そしてワクチン接種に続く抗腫瘍免疫応答を評価するために、日常的に使用されてきた。特別には、EG7-OVAは、OVAタンパク質を異種間の腫瘍関連抗原として発現するように操作され、宿主の免疫系をインビボにおける悪性細胞を特異的に攻撃するように誘導するのに必要な因子を探索するための一般に認められたモデルである、ネズミ胸腺細胞株である。強いTh1サイトカイン応答及び抗原特異的CD8+Tリンパ球の誘導は、有効な抗腫瘍免疫反応を備えるのに必須であると考えられている。

30

【0188】

皮下への免疫化によって誘導された抗腫瘍有効性を、予防的免疫化モデルにおいてC57BL/6(1群あたり5動物)で評価した。マウスを、q7d×3の投与計画で、第0、7及び14日において、100µgオリゴヌクレオチド及び20µgのOVA抗原の用量で皮下において免疫化した。その後、第21日において、EG.7Ova発現腫瘍細胞を 2.5×10^6 個皮下注射することによって接種した。腫瘍の成長及び重量増加を評価するために、マウスを週3回モニターした。対照マウスに、上記と同じスケジュールでPBS又はHBSのどちらか一方と20µgのOVAを注射した。それぞれ25:45:20:10の比率のPOPC:CHOL:DODAP:PEGCer14又はDSPC:CHOL:DODAP:PEGCer14のうちのどちらか一方の脂質組成を有する脂質粒子中に、オリゴヌクレオチドを内包した。類似の脂質粒子を用いて、メチル化及び非メチル化オリゴヌクレオチドの比較をすべて行なった。これらの有効性試験の結果を図12~15、18~21、及び25~28に詳解する。各図の第0日は、各動物に腫瘍を接種した日である。

40

【0189】

図12は、動物が遊離のODNで免疫化される場合の有効性の傾向を示す。示された結果は、従来技術と一致しており、すなわち、動物に遊離のオリゴヌクレオチドを投与した場合、メチル化オリゴヌクレオチドは非メチル化オリゴヌクレオチドよりも腫瘍の成長を減少させることにおいてより治療的有效性が低い。特別には、ヌクレアーゼによる分解を避

50

けるようにPS骨格を有する遊離の非メチル化ODN1及びODN2は、それらのメチル化対応物であるODN1m及びODN2mよりも腫瘍の成長をより大きく減少させた。これは、メチル化オリゴヌクレオチドを投与した腫瘍の成長速度がPBS緩衝液のみで処理した対照動物における速度に近づいた場合、腫瘍接種の約25日後には最も特別に真実であった。

【0190】

図13～15は、オリゴヌクレオチドの内包が、メチル化オリゴヌクレオチド、特に該オリゴヌクレオチドが天然のホスホジエステル(P0)骨格を含む場合、を非メチル化オリゴヌクレオチドと同等又はより治療的に有効なものとすることを例解する。図13は、腫瘍の移植後、PS骨格を有する内包されたメチル化ODN1mによる処理は、非メチル化ODN1に比較して、治療の有効性において同等であったことを示す。対照的に、図14は、P0骨格を有する、対応する内包された、メチル化ODN1m及び非メチル化ODN1オリゴヌクレオチドの効果を示し、ここで、治療の有効性は、移植の32日後のメチル化された異形において最大であり、一方、非メチル化された異形はその有効性を失った。図15は、非メチル化ODN2及びそのメチル化対応物ODN2mが腫瘍成長の減少において全く同じ有効性を有したことを示す。したがって、ある実施態様においては、PS骨格で構成された場合、メチル化オリゴヌクレオチドは、少なくとも非メチル化対応物と同じに有効であることを示す。

10

【0191】

図18、19、20及び21のそれぞれはさらに、上記の有効性に関するデータを敷衍する。図18は、メチル化PS-ODN1mの脂質による内包が、PS-ODN1の内包によってより延長された期間、腫瘍の成長を低下させるよりもより有効な、治療的利益を提供することを示す。この有効性は、内包されたPS-ODN1mで処理されたマウスの、図19に示される2の異なる試験におけるPS-ODN1による処理に比べて優れた生存率によってさらに証明された。図19Aは、一連の時点における、腫瘍を有さない動物のパーセンテージを、図19Bは、これらの同じ時点において実験に残っている動物の数を例解する。図19Bにおいて明らかに示されるとおり、ODN1及びODN1mで処理した実験に残っている動物の数は、本質的に実験を通じて同じであった。しかしながら、図19Aは、メチル化ODN1mで処理した場合、非メチル化ODN1で処理した動物に比べて腫瘍を有さない動物のパーセンテージがより大きいことを例解する。

20

【0192】

同様に、図20は、2のオリゴヌクレオチドで処理したマウスの時間の経過に伴う腫瘍の容量を例解し、図21は、時間の経過に伴う生存動物数である。図20は、動物を内包されたメチル化ODN1mで処理した場合の、内包された非メチル化対応物であるODN1に比べて改善された有効性を示す。これに対応して、図21は、メチル化ODN1mの非メチル化ODN1に比較した、マウスの生存率の増加を示す。

30

【0193】

同じ腫瘍モデルに対して、異なる免疫化プロトコルを用いて、さらなる有効性の実験を行った。この実験においては、皮下への免疫化により誘導された抗腫瘍効果を、C57BL/6の予防的免疫化モデル(1群あたり5動物)において評価した。q7d×2の投与計画において、オリゴヌクレオチド100µg及び抗原20µgの用量で、マウスの皮下に第0及び第7日の2回注射して免疫化した。その後、第21日に、動物をEG.7発現腫瘍細胞を 5×10^5 細胞数皮下注射して接種した。腫瘍の成長及び重量増加を評価するために、週3回マウスをモニターした。対照のマウスに、上記と同じスケジュールでPBSを注射した。図24(b)中のオリゴヌクレオチドを、脂質組成がDSPC:CHOL:DODAP:PEGCer-14が25:45:20:10の脂質粒子中に内包した。メチル化及び非メチル化オリゴのすべての比較を、類似の脂質粒子を用いておこなった。これらの有効性実験の結果を図24に詳細に示す。図の第0日は、各動物に腫瘍を接種した日である。

40

【0194】

図24は、それぞれ非メチル化されたPS-ODN1、PS-ODN2、メチル化されたPS-ODN1mの脂質に内包されたものを、この場合、脂質粒子にそれらの表面に結合されることによって会合されたE-G7 OVA腫瘍抗原とともに用いた、実験的腫瘍E-G7の治療の例を例解する。図

50

2 4 Aは、オリゴヌクレオチドが免疫刺激性の脂質粒子の非存在下で投与された場合、メチル化PS-ODN1mが腫瘍の成長に対して僅かな効果を有することを示す。非メチル化オリゴヌクレオチドPS-ODN2が腫瘍の容量減少に部分的に有効であったにもかかわらず、対応する非メチル化オリゴヌクレオチドであるPS-ODN-1は、有効であった。図 2 4 Bは、脂質粒子中へのオリゴヌクレオチドの内包は、非メチル化PS-ODN2の有効性をODN1のレベルまで増加させたのみならず、内包された非メチル化オリゴヌクレオチドのいずれよりもより有効であったことを示す。

【 0 1 9 5 】

図 2 5 ~ 2 8 は、さらに、オリゴヌクレオチドの内包が、非メチル化オリゴヌクレオチドと同等又はより高い治療的有効性を内包されたメチル化オリゴヌクレオチドに提供することを例解する。図 2 5 は、メチル化PS-ODN5mの脂質による内包が、時間の経過に伴って腫瘍の成長を減少させることにおいて、非メチル化PS-ODN5の内包に比べてより有効な治療的利益を提供したことを例解する。有効性は、図 2 6 に示す非メチル化PS-ODN5に比較して内包されたメチル化PS-ODN5mで処理したマウスの優れた生存率によってさらに証明される。図 2 7 は、遊離の非メチル化PS-ODN7が、なんらかの抗腫瘍効果を提供する一方、遊離の非メチル化PS-ODN7及びPO-ODN7並びに遊離のメチル化PS-ODN 7 及びPO-ODN7が、腫瘍の成長の減少において相対的により有効でなかったことを例解する。しかしながら、メチル化PO-ODN7mの脂質による内包は、腫瘍の成長の減少において有効な治療的利益を提供した。同様に、これらの傾向は、図 2 8 のこれらと同じODNで処理したマウスの生存率においても例解される。

【 0 1 9 6 】

実施例 7

B-16メラノーマ腫瘍モデルにおける、メチル化及び非メチル化オリゴヌクレオチドの治療的抗腫瘍有効性の比較

尾の静脈内への免疫化によって誘導された、抗腫瘍有効性を、治療的免疫化モデルのC57Bl/6 (1 群あたり 8 動物) において評価した。動物に、 3.0×10^5 のEG.7 B16/BL6ネズミメラノーマ発現腫瘍細胞を第 0 日に皮下注射することによって接種した。その後、マウスを第 4 日を最初として第 1 4 日まで 1 日おきに20mg/kgの用量のODNで処置した。腫瘍の成長及び重量増加を評価するために、マウスを 1 日おきにモニターした。対照のマウスに上記と同じスケジュールでHBSを注射した。オリゴヌクレオチドを脂質組成でDSPC : CHOL : DODAP : PEGCer 1 4 を 25 : 45 : 20 : 10 の比率で含む、脂質粒子中に内包した。この有効性に関する実験からの結果は、図 1 6 及び 1 7 に詳細に記載される。各図における第 0 日は、各動物に腫瘍を接種した日である。

【 0 1 9 7 】

図 1 6 は、その非メチル化対応物であるPS-ODN1と比較した、メチル化PS-ODN1mのB16メラノーマ腫瘍を接種された動物への投与の治療的有効性を例解する。脂質粒子へのPS-ODN 1mの内包は、腫瘍の容量減少におけるその有効性を、少なくとも内包された非メチル化PS-ODN1の有効性にまで増加させた。

【 0 1 9 8 】

図 1 7 は、第 2 2 日における各マウスの平均腫瘍重量を示す。遊離のメチル化PS-ODN1mで処理したマウスの平均腫瘍サイズは、緩衝液で処理した対照マウスにおけるものと同様であったが、遊離の非メチル化PS-ODN 1 で処理したマウスは、腫瘍成長の減少を示した。対照的に、マウスを脂質粒子に内包したメチル化PS-ODN1で処理した場合、腫瘍の減少量は、脂質に内包された非メチル化PS-ODN1で得られた量とほとんど同じであった。したがって、メチル化オリゴヌクレオチドの脂質による内包は、遊離のメチル化オリゴヌクレオチドの効果が僅か又は無いにもかかわらず、インビボでの腫瘍の治療において効果を得ることができる。

【 0 1 9 9 】

実施例 8

内包されたオリゴヌクレオチドで処理した場合の血液クリアランスレベル

有効な免疫刺激の重要な側面は、特異的な抗原に対する抗体の応答を起こす免疫系の能力である。抗原に結合した脂質に内包されたオリゴヌクレオチドのそのような応答を開始する能力の最初の実証の一つを図 2 3 に示すデータによって例解する。

【 0 2 0 0 】

ODN1及びODN1mのそれぞれを 2 の異なる脂質粒子；DSPC：CHOL：DODAP：PEGCer20である、脂質 1（L1）及びPEGCer20の代わりにPEGCer14を有する、脂質 2（L2）中に内包した。リボソーム内でのPEGCer20の半減期は、PEGCer14の半減期よりももっと長く、したがって、PEGCer20は、脂質粒子内により長い時間留まる。第 0 日に開始して、マウスに一連の 4 回の尾への静脈内注射を行い、3 週間にわたって 1 週間に 1 回投与した。各週に、注射後の 1 時間で血液を集め、内包されたODNの存在について分析した。

10

【 0 2 0 1 】

図 2 3 は、異なるPEG-セラミド立体コーティング（それぞれ、PEG-セラミド C-2 0 及びPEG-セラミド-C-1 4）を有する異なる脂質組成物であるL1及びL2と、メチル化又は非メチル化オリゴヌクレオチドであるODN1m及びODN1のそれぞれとの組み合わせについてマウス血液からのクリアランスに対する効果を例解する。注射 1 の後、結果は、組成にかかわらず、両方の内包されたODNの延長した循環 / 血液サンプルからの遅いクリアランスを示す。しかしながら、注射 2、3 及び 4 のそれぞれについては、結果は、寿命の長いPEGCer20を含むL1リボソーム（L1-ODN1及びL1-ODN1m）は短い循環 / 速いクリアランスを有し、一方、寿命の短いPEG-セラミドC-14を含むL2-ODN1及びL2-ODN1mは、PEGCer20脂質を含む脂質粒子に内包されたものより長い循環 / 遅いクリアランスを有していた。

20

【 0 2 0 2 】

本明細書中で示されるデータは、以下の 2 の点：（1）抗原特異的な抗体の誘導；及び（2）非メチル化及びメチル化オリゴヌクレオチドの相対的免疫刺激能力、を実証する。抗原特異的な抗体の誘導については、最初の注射は、PEG-セラミド立体障壁脂質のPEG部分に対する抗体を誘導した。注射された動物の血漿中のこれらの抗体の存在は、オプソニン化及びこれに続く、PEGCer20を含むL1リボソームにおいて見られたような、注射 2、3 及び 4 の後のPEG含有リボソームの循環からの速いクリアランスを起こす。しかしながら、そこからPEGが循環中で急速に解離するPEGCer14を含むL2リボソームのような、PEGを含まないリボソームを注射された動物は、オプソニン化されず、そしてしたがって比較的長い循環時間を有した。非メチル化オリゴヌクレオチド対メチル化オリゴヌクレオチドの相対的免疫刺激能力については、非メチル化オリゴヌクレオチド又は対応するそのメチル化形態のいずれかを含むリボソームのクリアランスは、同様の速度であり、したがって、どちらも抗原特異的な抗体を誘導することができることを示す。

30

【 0 2 0 3 】

実施例 9

複数の腫瘍関連抗原によるポリトープアプローチを用いたCTL応答の誘導

単一のエピトープに基づくアプローチは、MHC拘束されたCTL応答が一つの抗原に対してのみ引き起こされるという不利益を有する。さらに、多くの癌抗原が上で例証したTRP-2のような突然変異をうけていない分化抗原であり、したがって、宿主中の自己反応性T細胞が胸腺教育の間に主に除去される。ポリトープアプローチは、複数の抗原が同時に標的とされることを可能とし、そしてそのような自己抗原に対する抗腫瘍CTL応答のスペクトルを増加させるにちがいない。異なる悪性度において腫瘍抗原及びMHCアレルの発現が可変であるとする、複数の抗原に特異的であり、複数のMHCアレルによって拘束されるCTL応答は、より広い免疫反応性にとって明らかに望ましい。特別な悪性度に関連した複数の抗原を標的とすることは、抗原のダウンレギュレーション又はエピトープの突然変異による腫瘍エスケープの機会を最小化するだろう。

40

【 0 2 0 4 】

複数の抗原及びMHCアレルを標的とすることは、合成ペプチドエピトープの複数の組換え抗原混合物を使用することによって達成されることができる。これらの複数エピトープを有する抗原に対する免疫応答を改善するためには、いくつかのアジュバントがアッセイ

50

される。この実験は、POPC : Chol : DODMA : PEG-DMGを2のネズミメラノーマ抗原、TRP2 (H₂K_b, VYDFFVWL) 及びGp100 (H₂D_b, EGSRNQDWL) とともに使用した、内包されたPS-ODN 1 mを採用する。C57BL/6マウスにいずれかの抗原、又は両方の抗原を内包されたPS-ODN 1 mの存在下で3回注射する。陽性対照として、我々は、CTL応答を強力に誘導することが知られている樹状細胞を使用した。複数のエピトープによる免疫性を誘導する能力について、複数のエピトープを含むB16ライセートもまた、ODN1m又はDCのいずれかとともにアッセイした。CD8+ T細胞が抗原特異的な方法で腫瘍細胞に対する細胞毒性を仲介する能力によって、免疫応答を評価した。

【0205】

結果：内包されたODN1mとともに注射した場合、両方の抗原に対するCTL応答が引き起こされた(図29)。PS-ODN 1 mは、DCと同様に一緒にデリバリーされた両方の抗原に対するCTL応答を起した(図30)。PS-ODN1mとともにB16ライセートを注射すると、B16ライセートとともにインキュベートしたDCを注射するよりもより強力にCTLを誘導した(図31)。

10

【0206】

提供された実施例は、本発明の一定の実施態様を例解する。しかしながら、より一般的な意味では、本発明は(ヒトを含む)哺乳動物の対象に治療的利益を提供するための組成物及び方法であって、そのような組成物を利用するものを含む。本発明の組成物は、脂質膜ビヒクル；及び完全に上記ビヒクルに内包された核酸の形態である。特別な抗原に対する応答を刺激することが望ましい場合には、上記組成物は、例えば、ビヒクルの外部表面への化学的結合、疎水性結合又はイオン性結合によって、或いは、ビヒクル内への内包によって上記ビヒクルと抗原を結びつけることもできる。

20

【0207】

好ましい組成物は、その中で核酸が、該組成物重量の4%超であるものである。

【0208】

本発明の組成物中の核酸は、好適には、処置される動物のゲノムに相補的でなく、該哺乳動物の核酸との相補的な塩基対形成相互作用に依存しないメカニズムを介する免疫刺激を提供する核酸であることができる。そのような核酸は、しばしば、CpGモチーフ又は免疫刺激性パリンドロームのような免疫刺激性の配列を含む。

【0209】

本発明の組成物中で使用される核酸は、未処置の哺乳動物に遊離の形態で投与された場合、免疫応答を誘導しないか、又は未処置の哺乳動物に遊離の形態で投与された場合に、免疫刺激性の配列のヌクレオチドに対する免疫応答を抑制する核酸であることができる。

30

【0210】

該核酸は、独占的にヌクレオチド間のホスホジエステル結合を有するか、又はそれらが修飾されたヌクレオチド間結合とともに複数のヌクレオチド間のホスホジエステル結合を有するような方法で修飾されることができる。該核酸はまた、独占的に修飾された結合又は複数の修飾された結合を有することもできる。例えば、該核酸は独占的にヌクレオチド間のホスホロチオエート結合又は複数のヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含むことができる。

40

【0211】

組成物の製剤において好適に使用される陽イオン性脂質は、DODAP、DODMA、DMDMA、DOTAP、DC-Chol、DDAB、DODAC、DMRIE、及びDOSPAから選ばれる。さらに、脂質製剤は、好ましくはPEG-脂質、PAO-脂質又はガングリオシドのような凝集防止化合物を含む。

【0212】

抗原に加えて又はその代わりに、本発明の化合物はドキソルビシンのような共に内包される細胞毒性物質を含むことができる。脂質膜ビヒクルは、核酸及び細胞毒性物質の両方を完全に内包する。このタイプの組成物は、本発明のさらなる側面である方法によって調製されることができる。この方法においては、治療用組成物は、エタノール中で脂質を調製すること；水性の緩衝液中で脂質をオリゴヌクレオチドを混合して、オリゴヌクレオチ

50

ドを負荷された脂質ビヒクルを形成すること；及び細胞毒性物質が上記ビヒクルの内部空間中に活性を有して蓄積するように、オリゴヌクレオチドを負荷した脂質ビヒクルを細胞毒性物質に露出することによって調製される。

【0213】

本発明の組成物は、陽イオン性の脂質を含む脂質製剤中に完全に内包された核酸を含む脂質 核酸粒子を薬品の製造において使用することを介して、ヒトを含む哺乳動物に治療的利益を提供するための多様な方法において使用されることができる。したがって、上記組成物は、哺乳動物において免疫応答を誘導するための、哺乳動物においてCTL又はB細胞を活性化するための、或いは腫瘍を有する哺乳動物における腫瘍症を治療するための方法において使用されることができる。そして該方法は、以下のステップ：陽イオン性脂質を含む脂質製剤中に完全に内包された核酸を含む脂質 核酸粒子を調製すること；及び該脂質 核酸粒子を上記哺乳動物に投与することを含む。

10

【0214】

抗原が上記組成物に含まれる場合、本発明は該抗原に対する免疫応答を誘導する方法を提供し、該方法は、以下のステップ；脂質膜ビヒクル中に完全に内包された核酸及び上記ビヒクルの外部表面に結合した、それに対する免疫応答が望まれる抗原を含む上記ビヒクルを含む粒子を調製すること；及び上記粒子を、治療されるべき哺乳動物対象に投与することを含む。

【0215】

上記の実施例中で実証されたように、本発明による組成物中での脂質担体の利用は、所望の免疫系の刺激を達成するのに必要とされるオリゴヌクレオチドの量を実質的に減らすことを可能とする。いくつかの場合において、これは、遊離の形態では明らかな活性を有さなかったオリゴヌクレオチドが、脂質に内包された形態で提供された場合に免疫応答を刺激するために有用であるという事実反映される。他の場合には、これは、同じレベルの応答を達成するのに必要とされるODNの量が、より低いODN用量であるという事実反映される。したがって、哺乳動物において免疫応答を刺激するための有効量のオリゴヌクレオチドを採用する方法の実施において、本発明は、脂質ビヒクル内に完全にオリゴヌクレオチドを内包すること、及び上記有効量のオリゴヌクレオチドの20%未満を哺乳動物対象に投与すること、そしてそれによって上記哺乳動物対象において所望の免疫応答を得ることを含む、改善を提供する。

20

30

【0216】

本明細書中に示されたデータは、完全性及び一貫性のために提供される、本発明の或る例示的な実施態様を用いて、インビボにおける免疫刺激活性及び治療の有効性を実証するものであるが、本発明はこれらの例示的な実施態様に限られると解してはならない。当業者は、本明細書中に提供される教示と一致する本発明の他の特別な実施態様を容易に作製及び使用することができるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0217】

【図1】図1は、遊離のオリゴヌクレオチドで全血を処理して得られる活性化マーカーCD69を有する白血球のインビトロでの刺激を例解する。インビトロで、マウス全血を本明細書においてODN1又はODN2と名づけられた遊離のオリゴヌクレオチドで処理した。

40

【図2】図2は、内包されたODN1及びODN2又は遊離のODN1及びODN2の注射による、インビボでのマウスの処置が、インビトロで得られたものと反対の結果を生じることを例解する。

【図3】図3は、脂質ビヒクルに内包された場合、メチル化ODN1mが、非メチル化対応物ODN1よりもインビボでの樹状細胞活性化の刺激においてより活性であったことを示す。

【図4A】図4Aは、メチル化ODN1m及び非メチル化ODN1が、脾臓及び全血中のCD11c陽性細胞の増殖を刺激したことを示す。

【図4B】図4Bは、ODN1及びODN1mが両方とも脾臓、全血及びリンパ節中のDEC205陽性細胞の増殖を刺激したことを示す。

50

【図 5】図 5 は、メチル化ODN1m又は非メチル化対応物ODN1のいずれかが脂質に内包された場合、CD86発現の刺激において、メチル化ODN1mが非メチル化対応物であるODN1よりもより活性であったことを示す。

【図 6】図 6 は、遊離のオリゴヌクレオチドのインピボでの投与が、IL-6、IL-12、IFN-ガンマ又はMCP-1の刺激に影響しなかったことを示す。対照的に、脂質に内包されたオリゴヌクレオチドのインピボでの投与は、これらのサイトカインそれぞれの産生を刺激した。

【図 7 A . 7 B】図 7 Aは、オリゴヌクレオチド用量の段階にわたって測定し、遊離のオリゴヌクレオチドODN1に比べて、内包されたP0又はPSオリゴヌクレオチドODN1のいずれかによるマウスの処置が、IL-12の誘導を増加させたことを示す。図 7 Bは、内包されたPSオリゴヌクレオチドによる処置が、少ないが、なお有効にIFN-ガンマの誘導を刺激する一方、内包されたP0オリゴヌクレオチドがIFN-ガンマの強い、早期の誘導を刺激することを示す。

【図 8】図 8 は、Th-1応答の指標であるIgM力価の、遊離のPS又はP0オリゴヌクレオチドの投与による比較を示す。

【図 9】図 9 は、Th-2応答の指標であるIgG産生の、メチル化オリゴヌクレオチドを含む、遊離のPS又はP0オリゴヌクレオチドの投与による比較を示す。

【図 10】図 10 は、脂質に内包された、メチル化又は非メチル化オリゴヌクレオチドで処置された動物の一連のスクリーニングにわたって、樹状細胞、NK細胞及びCD8+ T細胞の増殖刺激において、メチル化オリゴヌクレオチドが非メチル化オリゴヌクレオチドとほぼ同等又はより優れていることを示す。

【図 11 A . 11 B】図 11 A及び図 11 Bは、脂質に内包された、メチル化又は非メチル化オリゴヌクレオチドで処置された動物の一連のスクリーニングにわたって、細胞毒性Tリンパ球及びAg - 特異的リンパ球の増殖刺激において、メチル化オリゴヌクレオチドが非メチル化オリゴヌクレオチドよりも優れていることを示す。

【図 11 C】図 11 Cは、図 11 A及び図 11 Bに記載されたスクリーニング全体に含まれた、代表的なテトラマーの試験からのデータを例解する。

【図 12】図 12 は、遊離のオリゴヌクレオチドとして動物に投与された場合、腫瘍の成長を減少させることにおいて、メチル化された異形が非メチル化ヌクレオチドよりも治療的有効性が低いことを例解する。

【図 13】図 13 は、特に、オリゴヌクレオチドが天然のホスホロチオエート (PS) 骨格を含む場合に、オリゴヌクレオチドを内包することが、遊離のODNよりも改善された有効性をメチル化及び非メチル化オリゴヌクレオチドに提供することを例解する。

【図 14】図 14 は、オリゴヌクレオチドがホスホジエステル (P0) 骨格を含む場合に、オリゴヌクレオチドを内包することが、遊離のODNよりも改善された有効性をメチル化及び非メチル化オリゴヌクレオチドに提供することを示す。

【図 15】図 15 は、脂質に内包されたPSオリゴヌクレオチドである、ODN 2 及びODN 2 m がそれぞれ、治療的有効性を表すことを示す。

【図 16】図 16 は、B16メラノーマ腫瘍を接種された動物へのメチル化ODN1mの投与のアジュバント効果及び治療的有効性を例解する。脂質粒子中へのODN1mの内包は、腫瘍容量を減少させることにおけるその有効性を増加させた。

【図 17】図 17 は、B16メラノーマを接種され、続いて20mg/kgの用量のオリゴヌクレオチドの投与によって処置された一連のマウスについて、内包された、及び遊離のオリゴヌクレオチドODN1及びODN1mで処置されたマウスの平均腫瘍サイズを示す。

【図 18】図 18 は、マウスが内包されたメチル化オリゴヌクレオチドODN1m及び非メチル化対応物ODN1で処置された場合の腫瘍容量の減少を示す。

【図 19】図 19 は、2の異なる実験における、内包されたメチル化ODN1mで処置されたマウスの、非メチル化ODN1による処置に比較した生存率を示す。

【図 20】図 20 は、メチル化ODN1m及び非メチル化対応物ODN 1 が脂質粒子中に内包された場合の、腫瘍容量に関する有効性を例解する。

10

20

30

40

50

【図 2 1】図 2 1 は、内包された非メチル化ODN1による処置に対する、内包されたメチル化ODN1mで処置されたマウスの生存率を示す。

【図 2 2】図 2 2 は、内包されたPSオリゴヌクレオチドODN 1 及びODN2が、処置の 6 日後に、内包されたPOオリゴヌクレオチドによってはできないIFN-ガンマのピークを作り出したことを例解する。

【図 2 3】図 2 3 は、異なるPEGセラミド立体コーティングを有する脂質粒子中に内包された、メチル化又は非メチル化オリゴヌクレオチドの、マウスの血中クリアランスに及ぼす効果を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、腫瘍を有する動物に組成物を投与することによる、メチル化又は非メチル化CpGオリゴヌクレオチドを内包するリポソーム粒子の治療的有効性を例解する。

10

【図 2 5】図 2 5 は、時間の経過に伴う腫瘍の成長の減少において、メチル化PS-ODN5 mの脂質による内包が、等価の非メチル化PS-ODN5の内包よりもより有効な治療的利益を提供したことを例解する。

【図 2 6】図 2 6 は、内包された非メチル化ODN 5 及び遊離の非メチル化ODN5による処置に対する、内包されたメチル化ODN5及び遊離のメチル化ODN5で処置されたマウスの生存率を示す。

【図 2 7】図 2 7 は、遊離の非メチル化PS及びPO ODN 7 並びに遊離のメチル化PS及びPO ODN 7 そして遊離のPO ODN 7 及び内包されたPO PDN 7 で処理した場合の、腫瘍容量に関する有効性を例解する。

【図 2 8】図 2 8 は、内包されたPO ODN 7 mに比較した、遊離の非メチル化PS及びPO ODN 7 並びに遊離のメチル化PS及びPO ODN 7 で処理したマウスの生存率を示す。

20

【図 2 9】図 2 9 は、内包されたODN 1 mを使用した複数のエピトープの癌ワクチンによる免疫化後のB 1 6 細胞標的に対するCTL応答を示す。

【図 3 0】図 3 0 は、ペプチド - パルスした樹状細胞を使用した複数のエピトープの癌ワクチンによる免疫化後のB 1 6 細胞標的に対するCTL応答を示す。

【図 3 1】図 3 1 は、腫瘍細胞ライセートとともに内包されたODN 1 m又は樹状細胞で免疫化後の、B 1 6 細胞標的に対するCTL応答を示す。

【図 1】

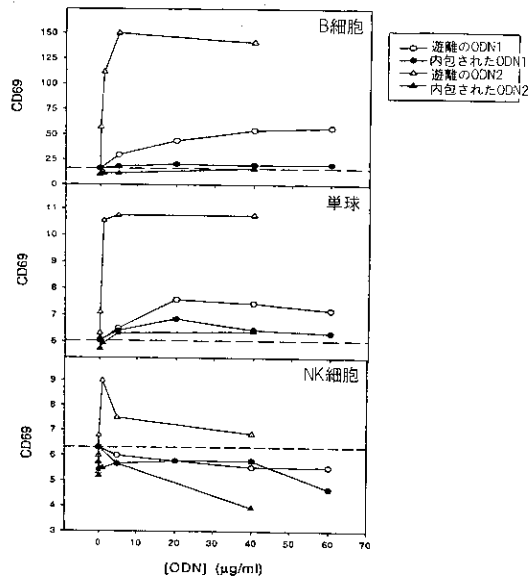


Figure 1

【図 2】

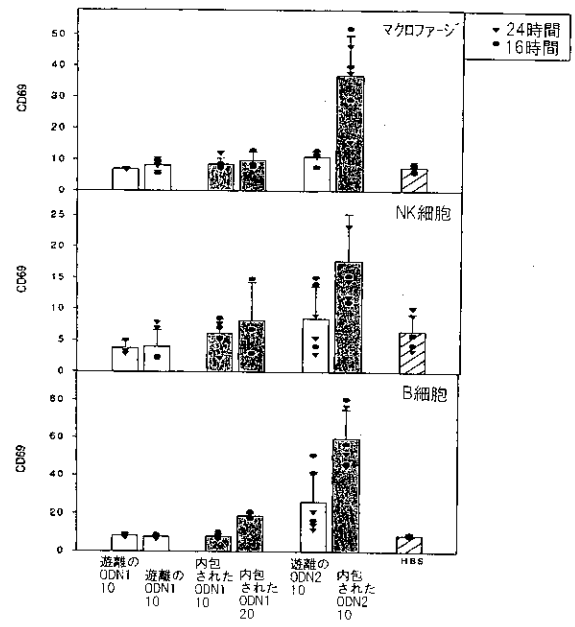


Figure 2

【図 3】

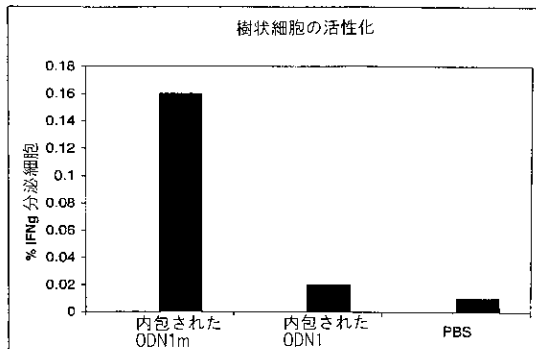


Figure 3

【図 4 A】

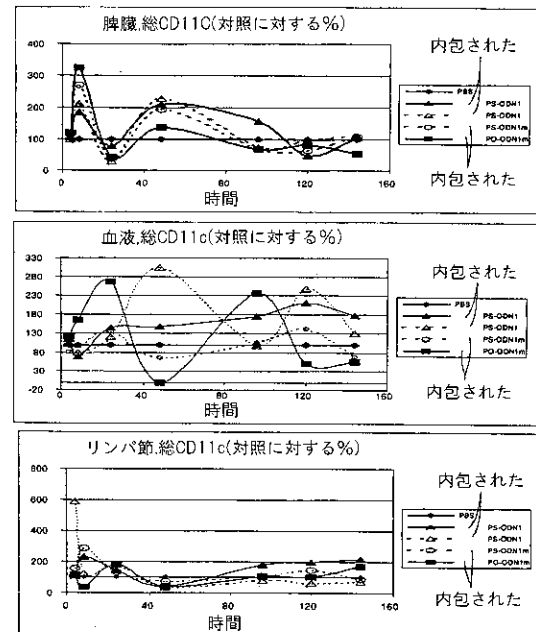


Figure 4A

【 図 5 A 】

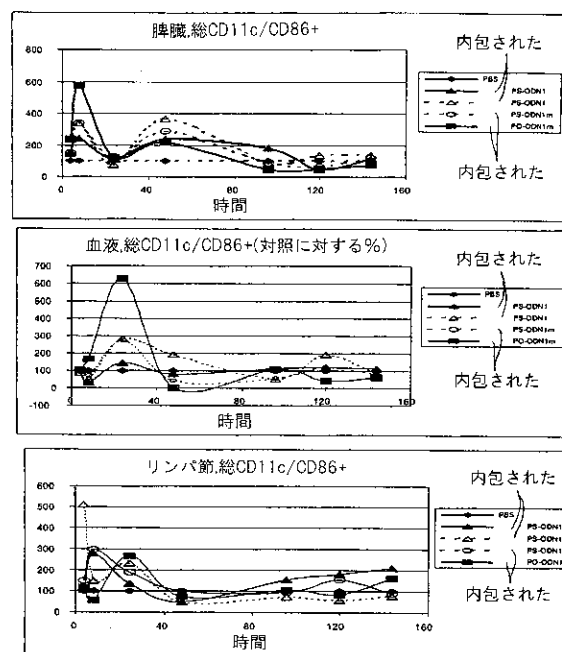


Figure 5A

【 図 6 】

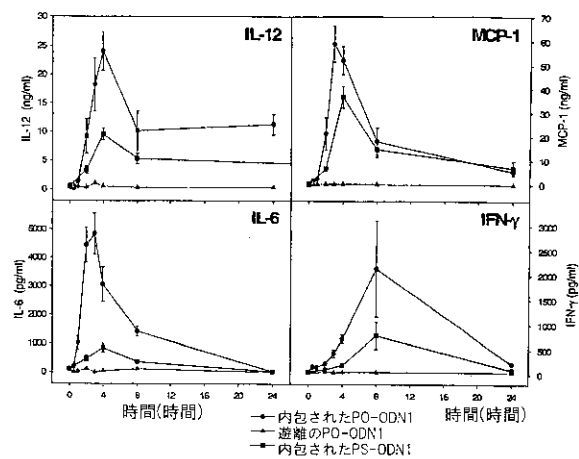


Figure 6

【図 7 A】

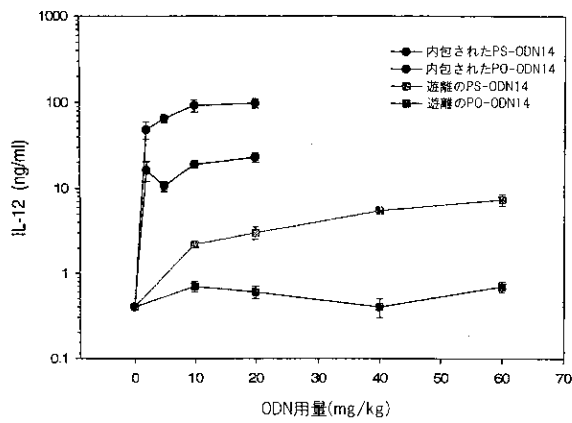


Figure 7A

【図 7 B】

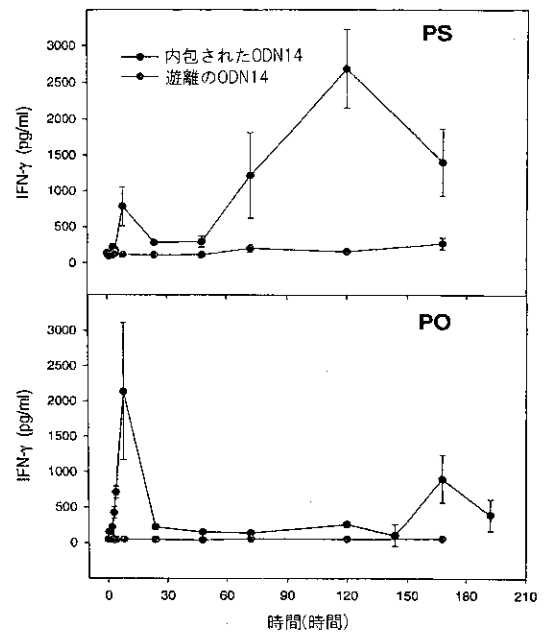


Figure 7B

【図 8】

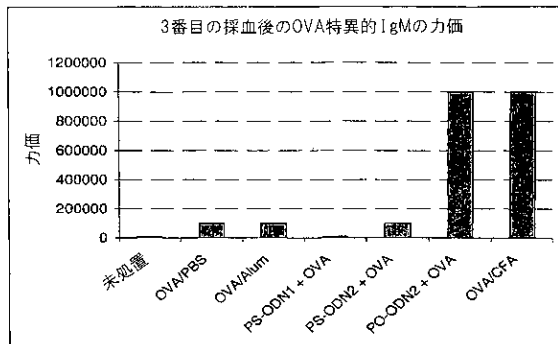


Figure 8

【図 9】

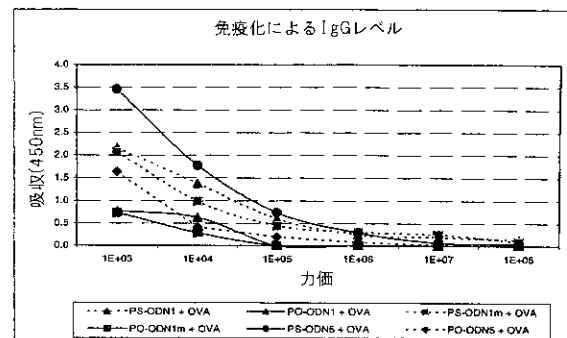


Figure 9

【図 10】

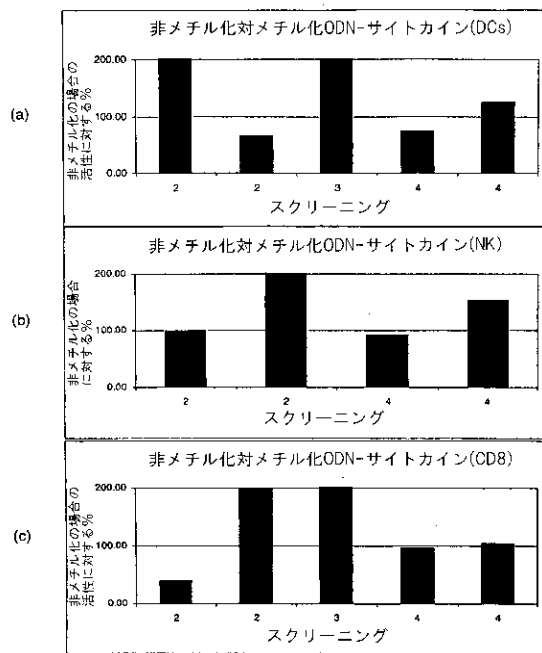


Figure 10

【図 11】

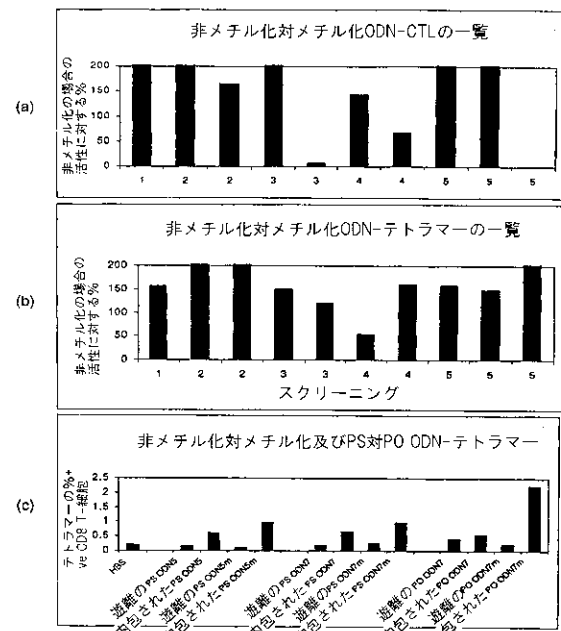


Figure 11

【図 12】

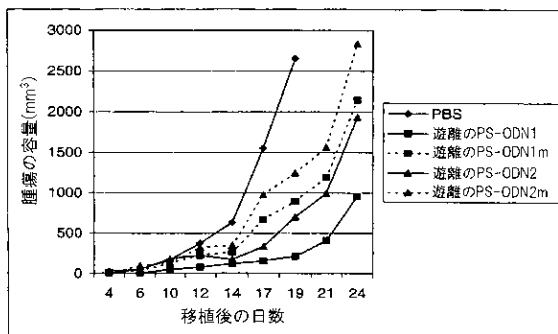


Figure 12

【図 13】

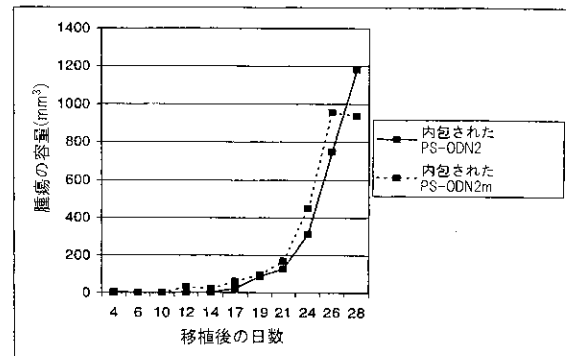


Figure 13

【図 14】

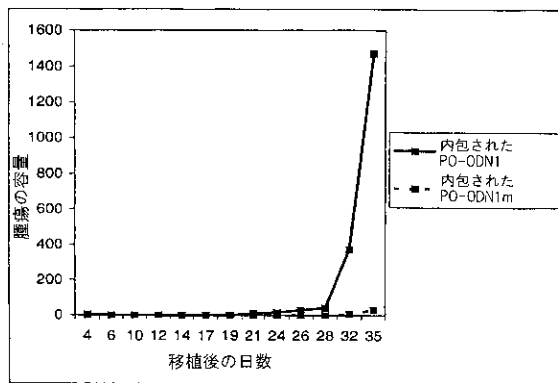


Figure 14

【図 15】

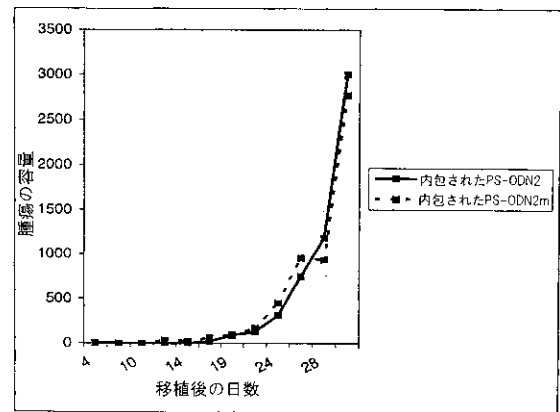


Figure 15

【図 16】

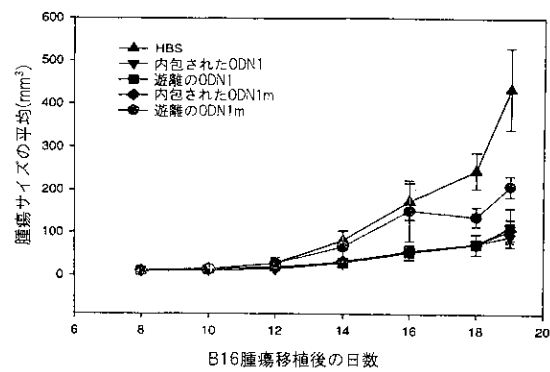


Figure 16

【図 17】

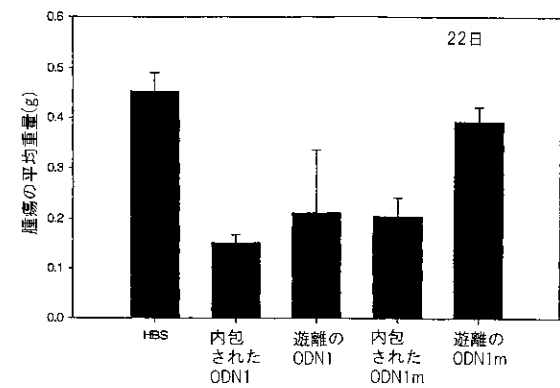


Figure 17

【図 18】

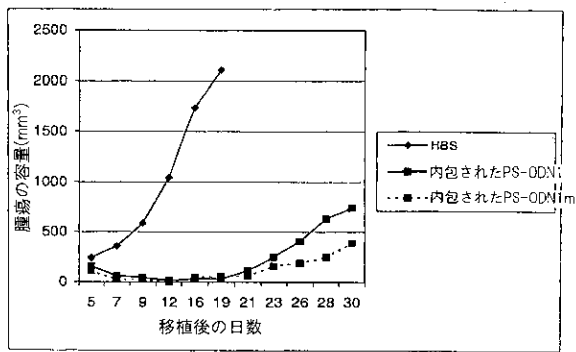


Figure 18

【図 19】

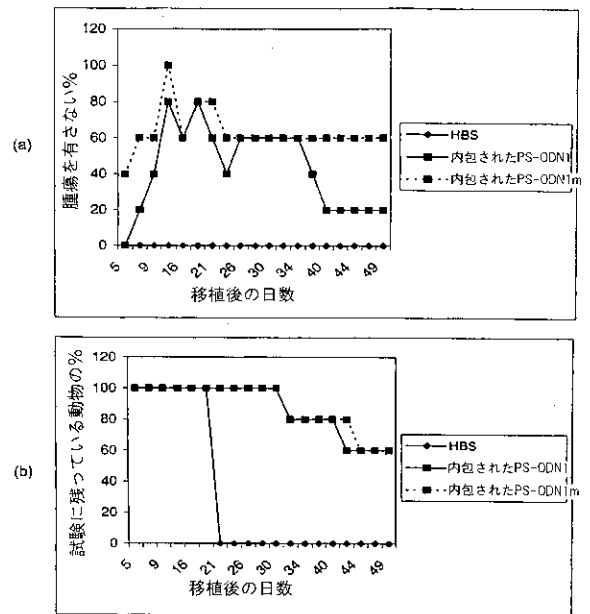


Figure 19

【図 20】

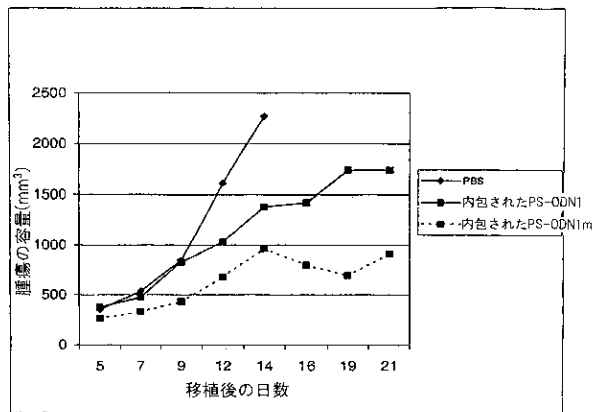


Figure 20

【図 21】

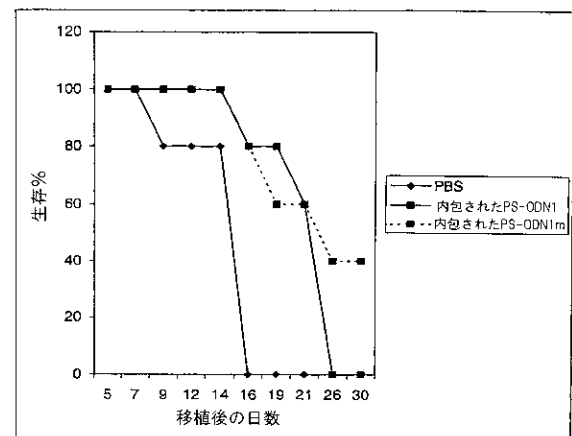


Figure 21

【図 2 2】

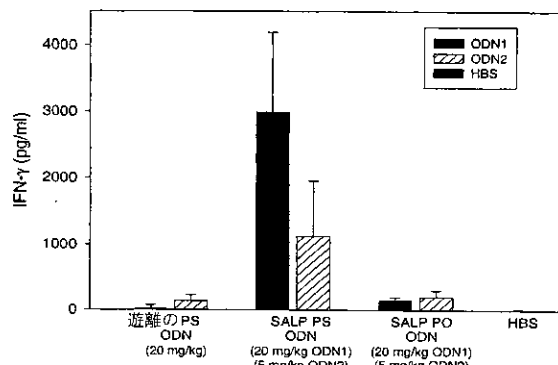


Figure 22

【図 2 3】

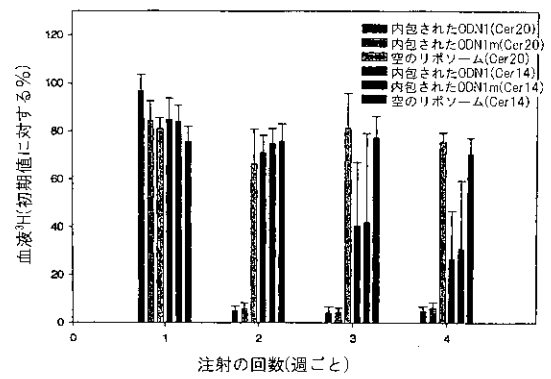


Figure 23

【図 2 4】

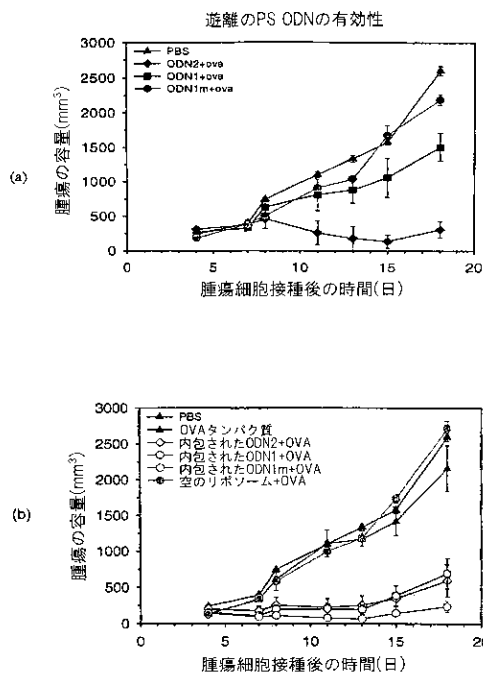


Figure 24

【図 2 5】

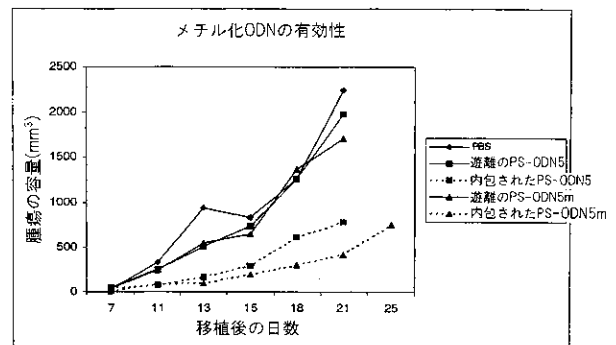


Figure 25

【図 26】

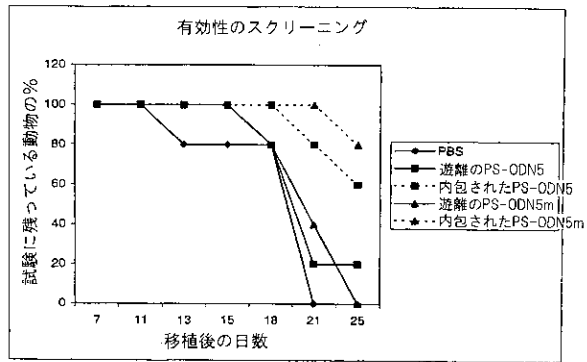


Figure 26

【図 27】

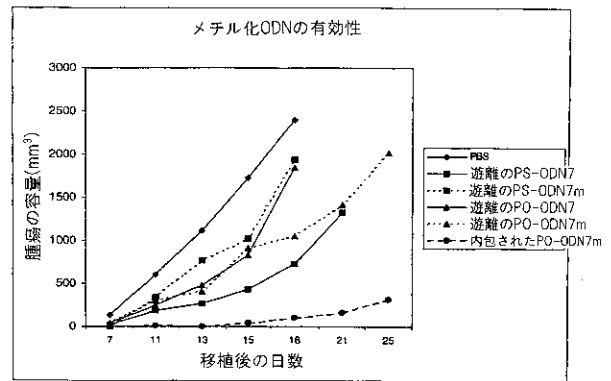


Figure 27

【図 28】

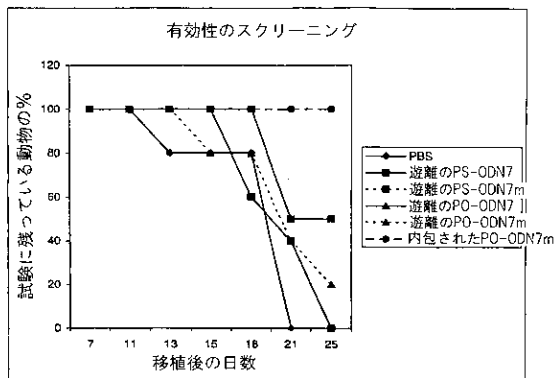


Figure 28

【図 29】

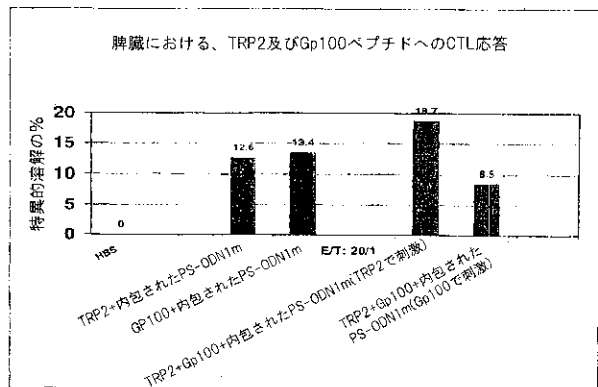


Figure 29

【図 30】

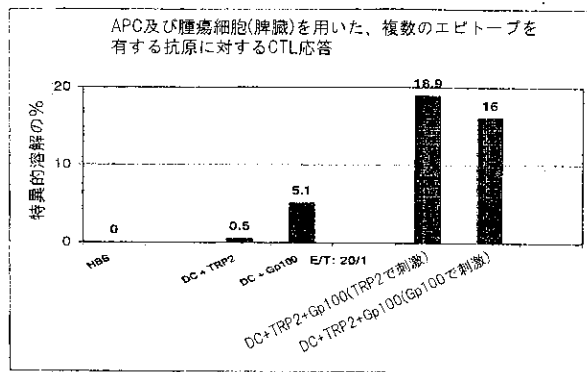


Figure 30

【図 31】

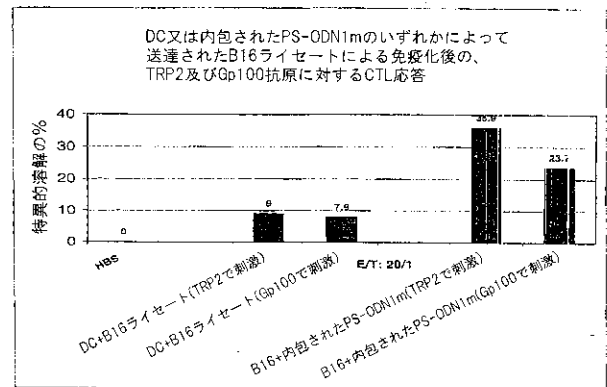


Figure 31

【配列表】

2005532315000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CA 03/00678

| | | |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC 7 | A61K39/39 | A61P37/00 A61P35/00 A61P31/00 |
| 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 | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 01 15726 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP.) 8 March 2001 (2001-03-08) cited in the application the whole document | 1-44 |
| A | MCCLUSKIE M J ET AL: "The potential of oligodeoxynucleotides as mucosal and parenteral adjuvants" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 17-19, 21 March 2001 (2001-03-21), pages 2657-2660, XP004231093 ISSN: 0264-410X the whole document | 1-44 |
| -/-- | | |
| <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 |
| 7 November 2003 | | 20/11/2003 |
| 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 Moreau, J |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CA 03/00678

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | LEONETTI CARLO ET AL: "Encapsulation of c-myc antisense oligodeoxynucleotides in lipid particles improves antitumoral efficacy in vivo in a human melanoma line" CANCER GENE THERAPY, vol. 8, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 459-468, XP002260435 & ISSN: 0929-1903 the whole document | 1-44 |
| A | WO 96 02555 A (THE UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 1 February 1996 (1996-02-01) the whole document | 1-44 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 03/00678

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 26-44 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/CA 03/00678

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0115726 | A | 08-03-2001 | AU 6813900 A | 26-03-2001 |
| | | | BR 0013834 A | 23-04-2002 |
| | | | WO 0115726 A2 | 08-03-2001 |
| | | | CA 2382611 A1 | 08-03-2001 |
| | | | CZ 20021029 A3 | 14-08-2002 |
| | | | EP 1212085 A2 | 12-06-2002 |
| | | | HU 0202327 A2 | 28-10-2002 |
| | | | JP 2003509341 T | 11-03-2003 |
| | | | US 2003104044 A1 | 05-06-2003 |
| | | | AU 6715600 A | 19-03-2001 |
| | | | CA 2380333 A1 | 01-03-2001 |
| | | | EP 1206250 A2 | 22-05-2002 |
| | | | WO 0113898 A2 | 01-03-2001 |
| WO 9602555 | A | 01-02-1996 | AU 713040 B2 | 18-11-1999 |
| | | | AU 1912795 A | 16-02-1996 |
| | | | CA 2194761 A1 | 01-02-1996 |
| | | | EP 1167377 A2 | 02-01-2002 |
| | | | EP 1167378 A2 | 02-01-2002 |
| | | | EP 1167379 A2 | 02-01-2002 |
| | | | EP 0772619 A1 | 14-05-1997 |
| | | | JP 10506265 T | 23-06-1998 |
| | | | JP 2003144184 A | 20-05-2003 |
| | | | WO 9602555 A1 | 01-02-1996 |
| | | | US 2003100527 A1 | 29-05-2003 |
| | | | US 6429199 B1 | 06-08-2002 |
| | | | US 2003191079 A1 | 09-10-2003 |
| | | | US 6194388 B1 | 27-02-2001 |
| | | | US 6207646 B1 | 27-03-2001 |
| | | | US 2003050261 A1 | 13-03-2003 |
| | | | US 2003050263 A1 | 13-03-2003 |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,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,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,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100127085

弁理士 越阪部 倫子

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 タム, イン ケー.

カナダ国, プリティッシュ コロンビア ブイ6エス 1シー3, バンクーバー, ウェスト ナイ
ンティーンズ アベニュー 3 5 7 5

(72)発明者 センプル, ショーン

カナダ国, プリティッシュ コロンビア ブイ6ジー 3イー3, バンクーバー, プロウトン ス
トリート 2 2 0 1 - 5 8 8

(72)発明者 クリマック, サンドラ

カナダ国, プリティッシュ コロンビア ブイ6ケー 4ケー7, バンクーバー, ウェスト セブ
ンス アベニュー 2 0 8 - 2 1 9 0

(72)発明者 チク, ガニア

カナダ国, プリティッシュ コロンビア ブイ6ジー 1エム9, バンクーバー, ネルソン スト
リート 1 8 7 3, アpartment # 6 0 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA11 DA02 EA10 GA11

4C076 AA19 BB13 CC27 CC31 CC50 DD52H DD63H DD70H

4C085 AA38 BA01 EE01 EE03 EE06 EE07 FF12 GG01 GG02 GG08