(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2010-535248
(P2010-535248A)
(43)公表日　平成22年11月18日(2010.11.18)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	ZNA	4B024
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102	4B065
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48		4C076
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00		4C084
A61K 31/713	(2006.01)	A61K	31/713		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 142 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-520207 (P2010-520207)
(86)(22)出願日　平成20年7月31日 (2008.7.31)
(85)翻訳文提出日　平成22年3月25日 (2010.3.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/071858
(87)国際公開番号　WO2009/018500
(87)国際公開日　平成21年2月5日 (2009.2.5)
(31)優先権主張番号　61/007,895
(32)優先日　平成19年7月31日 (2007.7.31)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/022,173
(32)優先日　平成20年1月18日 (2008.1.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　510027021
ザ　ジョンズ　ホプキンス　ユニバーシティー
アメリカ合衆国　メリーランド州　ボルティモア　ノース　チャールズ　ストリート　１００　第５　フロアー　ジョンズ　ホプキンス　テクノロジー　トランスファー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腫瘍性障害または感染症の免疫学的予防または免疫療法のためのポリペプチド－核酸複合体

(57)【要約】
本発明は、抗体/ペプチド-核酸複合体の特性を利用することによって、標的細胞において、免疫を介したデスシグナル伝達および直接的なデスシグナル伝達の交差活性化(cross-activation)を誘導する組成物を開示する。この複合体は、複数のデスシグナル伝達機構を同時に活性化することができる。本発明の複合体を、感染症、腫瘍性障害、または他の疾患を治療または予防するための免疫療法として使用する方法を開示する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞成分または特定の分子に結合する標的化部分;
1つもしくは複数の核酸分子;および
1つもしくは複数の抗原性ペプチドまたは1つもしくは複数のポリペプチド
を含む、単離された標的化部分-生物活性薬剤複合体。
【請求項２】
標的化部分が、抗体、ペプチド、アプタマー、リガンド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の複合体。
【請求項３】
細胞成分が、腫瘍抗原、腫瘍関連抗原、または腫瘍細胞表面分子である、請求項1記載の複合体。
【請求項４】
細胞成分が、正常細胞上に存在する細胞表面分子である、請求項1記載の複合体。
【請求項５】
細胞成分が、免疫細胞上に存在する分子である、請求項1記載の複合体。
【請求項６】
細胞成分が、病原体または微生物の抗原または抗原決定基である、請求項1記載の複合体。
【請求項７】
成分が、抗原およびタグを含む融合タンパク質である、請求項1記載の複合体。
【請求項８】
核酸分子が、二本鎖DNA(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、多鎖DNA、二本鎖RNA(dsRNA)、一本鎖RNA(ssRNA)、多鎖RNA、DNA-RNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、ペプチド核酸(PNA)、PNA-DNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、PNA-RNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、ロックド核酸(LNA)、LNA-DNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、およびLNA-RNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)からなる群より選択される、請求項1記載の複合体。
【請求項９】
核酸分子が、標的細胞において転写および/または翻訳されるコード配列を含む、請求項1記載の複合体。
【請求項１０】
コード配列が、DNAプラスミド、またはプラスミドに由来するDNA分子である、請求項9記載の複合体。
【請求項１１】
核酸分子が、部位特異的組換えによりプラスミドから作製された環状二本鎖DNA分子を含み、該DNA分子が、細胞特異的発現調節エレメントに機能的に連結された関心対象の遺伝子を含み、かつ複製起点を含有せず、任意でマーカー遺伝子も含有しない、請求項10記載の複合体。
【請求項１２】
DNA分子が、オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることが予め確かめられているヌクレオチド配列を含む、請求項10または11記載の複合体。
【請求項１３】
オリゴヌクレオチドがDNA分子と一緒に多鎖核酸（multistrand nucleic）を形成する構成となっている、請求項12記載の複合体。
【請求項１４】
オリゴヌクレオチドが線状の一本鎖RNAまたは二本鎖RNAである、請求項13記載の複合体。
【請求項１５】
オリゴヌクレオチドが、線状一本鎖DNAまたは二本鎖DNAペプチド核酸(PNA)、ロックド核酸(LNA)、ハイブリッドDNA-LNA、DNA-PNAである、請求項13記載の複合体。

【請求項１６】
標的化部分がオリゴヌクレオチドに結合し、かつ該オリゴヌクレオチドがDNA分子にさらに結合している、請求項14または15記載の複合体。
【請求項１７】
標的化部分がアプタマー分子である、請求項14記載の複合体。
【請求項１８】
アプタマーがオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項17記載の複合体。
【請求項１９】
細胞成分に結合する標的化部分;および
免疫応答を増強するように設計された1つまたは複数の産物をコードする核酸分子
を含む、単離された標的化部分-生物活性薬剤複合体。
【請求項２０】
核酸分子が、免疫応答を刺激することができる二本鎖DNAを含む、請求項1または19記載の複合体。
【請求項２１】
核酸分子が、PAMPを含む群より選択される1つまたは複数の免疫刺激分子を含む、請求項1または19記載の複合体。
【請求項２２】
核酸分子が、1つまたは複数の抗原決定基をコードする配列を含む、請求項1または19記載の複合体。
【請求項２３】
抗原決定基が、CD4+T細胞エピトープ、CD8+T細胞エピトープ、B細胞エピトープ、およびそれらの組み合わせより選択される、請求項22記載の複合体。
【請求項２４】
抗原決定基が病原体または微生物に由来する、請求項23記載の複合体。
【請求項２５】
抗原決定基が、破傷風毒素、ジフテリア毒素、百日咳毒素、肝炎表面抗原、またはpDOM1に由来する、請求項24記載の複合体。
【請求項２６】
核酸分子が、
腫瘍抗原;および病原体または微生物に由来する少なくとも1つのCD4+T細胞エピトープ
をコードする二本鎖DNA分子を含む、請求項1または19記載の複合体。
【請求項２７】
1つまたは複数の産物が、病原体関連分子パターン(PAMP)、アラーミン、および/またはダメージ関連分子パターン(DAMP)を含む、請求項1または19記載の複合体。
【請求項２８】
核酸分子が、1つまたは複数の免疫刺激性サイトカインをさらにコードする、請求項27記載の複合体。
【請求項２９】
核酸分子が、1つまたは複数の補助刺激ポリペプチドをさらにコードする、請求項1または19記載の複合体。
【請求項３０】
核酸分子が、抗原提示細胞または樹状細胞を動員する、該細胞に結合する、該細胞を成熟させる/増殖させる、または活性化する1つまたは複数の分子をさらにコードする、請求項1または19記載の複合体。
【請求項３１】
核酸分子が、1つまたは複数の免疫刺激性RNA分子をコードする、請求項1または19記載の複合体。
【請求項３２】
核酸分子が、少なくとも1つの遺伝子の発現を妨害することができる1つまたは複数のRN

A分子をコードする、請求項19記載の複合体。
【請求項３３】
核酸分子が、標的細胞の死を誘導する分子をコードする、請求項1または19記載の複合体。
【請求項３４】
核酸分子が、標的細胞において機能活性がある転写プロモーターの制御下にある1つまたは複数の関心対象の遺伝子をコードする、請求項1または19記載の複合体。
【請求項３５】
カチオン性ペプチド、カチオン性リポソーム、親油性部分、またはナノ粒子をさらに含む、請求項1または19記載の複合体。
【請求項３６】
アラーミンをさらに含む、請求項1または19記載の複合体。
【請求項３７】
カテリシジン由来LL37ペプチドをさらに含む、請求項1または19記載の複合体。
【請求項３８】
核酸分子が、多鎖核酸ヘリックス、DNA、RNA、DNA-RNAハイブリッド、PNA-DNAハイブリッド、LNA-DNAハイブリッド、またはLNA-RNAハイブリッドである、請求項1または19記載の複合体。
【請求項３９】
核酸分子が、DNA、RNA、PNAまたはLNAである、請求項1または19記載の複合体。
【請求項４０】
抗原または抗原決定基とさらに連結している、請求項1、19、または27記載の複合体。
【請求項４１】
抗原または抗原決定基がカチオン性ペプチドと融合している、請求項40記載の複合体。
【請求項４２】
カチオン性ペプチドが、LL37、His6、およびArg9からなる群より選択される、請求項41記載の複合体。
【請求項４３】
標的化部分が、腫瘍細胞、腫瘍関連抗原、または腫瘍血管系に結合する、請求項5、24、または25記載の複合体。
【請求項４４】
標的化部分が、正常な皮膚細胞または筋肉細胞上に存在する分子に結合することができる、請求項1または19記載の複合体。
【請求項４５】
標的化部分がEGFRに結合することができる、請求項1または19記載の複合体。
【請求項４６】
標的化部分が抗原提示細胞または樹状細胞に結合することができる、請求項1または19記載の複合体。
【請求項４７】
標的化部分がDC抗原取り込み受容体に結合することができる、請求項1または19記載の複合体。
【請求項４８】
受容体が、C型レプチン様受容体、Fc受容体、インテグリン、およびスカベンジャー受容体からなる群より選択される、請求項47記載の複合体。
【請求項４９】
受容体が、DEC205、Fcγ受容体、αVβ5、CD36、Lox1、およびCD91からなる群より選択される、請求項1または19記載の複合体。
【請求項５０】
標的化部分が、腫瘍抗原、腫瘍関連抗原、または腫瘍細胞表面分子に結合することができる、請求項1または19記載の複合体。

【請求項５１】
標的化部分がカチオン性ペプチドに結合することができる、請求項1または19記載の複合体。
【請求項５２】
標的化部分がLL37、His6、またはArg9とカップリングしている、請求項40記載の複合体。
【請求項５３】
核酸分子が線状DNAまたはミニサークルDNAである、請求項1または19記載の複合体。
【請求項５４】
DNAが、病原体または微生物に由来する抗原決定基をコードする、請求項53記載の複合体。
【請求項５５】
DAMPまたはアラーミンを含む非コード核酸分子をさらに含む、請求項51記載の複合体。
【請求項５６】
核酸が腫瘍抗原をコードする、請求項1、19、または53記載の複合体。
【請求項５７】
抗原決定基が病原体に由来する、請求項53記載の複合体。
【請求項５８】
核酸が、PAMPである配列をさらに含む、請求項53記載の複合体。
【請求項５９】
ミニサークルが、病原体または微生物に由来する抗原と融合している腫瘍抗原を含む融合タンパク質をコードする、請求項51記載の複合体。
【請求項６１】
標的化部分が、EGFRに結合することができる、請求項1または19記載の複合体。
【請求項６２】
治療的有効量の請求項1または19記載の複合体を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、腫瘍性障害を治療または予防するための方法。
【請求項６３】
治療的有効量の請求項1または19記載の複合体を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、感染症の治療または予防を必要とする対象において感染症を治療または予防するための方法。
【請求項６４】
免疫細胞と請求項1または19記載の組成物とを接触させる工程を含む、免疫細胞をエクスビボで活性化するための方法。
【請求項６５】
治療的有効量の免疫細胞を、それを必要とする対象に投与する工程をさらに含む、請求項64記載の方法。
【請求項６６】
請求項1または19の組成物を、対応する微生物ワクチンと組み合わせて投与する工程を含み、複合体が、微生物に由来する抗原決定基を含む、腫瘍を治療する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、概して、腫瘍性障害、感染症、および/または他の疾患を治療または予防するための免疫刺激治療法に関し、より具体的には、抗体/ペプチド-核酸複合体に関する。
【背景技術】
【０００２】
背景情報
免疫系は、ヒトの身体に、微生物ならびに外来のものまたは潜在的に有害であると認め

られる物質を認識および防御する手段を提供する。感染性生物の予防的ワクチン接種には、感染から集団を守ることに大きな利益があった。しかしながら、多くの流行性感染症および持続性感染症に有効な免疫学的予防および免疫療法が依然として必要とされている。モノクローナル抗体による癌の受動免疫療法および腫瘍細胞を攻撃するT細胞の受動移入(passive transfer)は臨床的有効性を証明しているが、治療的能動ワクチン接種が、これらの免疫エフェクターを誘導し、腫瘍細胞に対する免疫記憶を確立するという目標は依然として困難である。いくつかの腫瘍特異的抗原および腫瘍関連抗原が特定されているが、これらの抗原は概して免疫原性が弱く、腫瘍は、免疫寛容誘発環境を作り出して免疫攻撃を逃れるために多様な機構を用いている。このような免疫寛容を克服する戦略ならびに強いレベルの抗体応答および/またはT細胞応答の活性化が、有効な癌免疫療法への鍵を握っている。

【０００３】

樹状細胞(DC)は、一次免疫応答の開始および調節において中心的な役割を果たしている特殊化した抗原提示細胞(APC)である。(i)抗原の取り込みおよび提示:DCは、ファゴサイトーシス、エンドサイトーシス、およびピノサイトーシスを介して、病原体(細菌、ウイルス)、死細胞または死につつある細胞、タンパク質、および免疫複合体を捕捉する。DCには抗原取り込みのための数多くの細胞表面受容体があり、これらの受容体はシグナル伝達および細胞間相互作用においても機能し得る(表1)。DCは、捕捉したタンパク質を処理して、主要組織適合複合体クラスIおよびII(MHC IおよびII)分子上に積み込まれるペプチドにし、これらのペプチド-MHC複合体は、抗原特異的CD8+T細胞(MHC I)および抗原特異的CD4+T細胞(MHC II)により認識されるために細胞表面に輸送される。DCサイトゾル内で内因的に合成された抗原は、典型的には、プロテアソームを介した経路を介して処理されて小胞体に入り、MHC I上に積み込まれるのに対して、細胞外環境から外因的に得られた抗原は、典型的には、エンドソーム/リソソーム内で分解され、MHC II上に積み込まれる。特異的DC抗原取り込み受容体と関連している別の経路(表2)でも、DCは外因性抗原を処理してMHC I上に積み込むことができる(交差提示)。交差提示によって、DCは、外因性抗原、例えば、腫瘍細胞、病原体感染細胞、および免疫複合体に対してCD8+T細胞応答ならびにCD4+T細胞応答を誘発することが可能になる。(ii)DC成熟-TLRの役割:DCの成熟は、DCを、特殊化した抗原捕捉細胞から、T細胞を刺激することができる細胞に変える最終分化プロセスである。DC成熟は、病原体由来成分の認識によって、または炎症もしくは組織ダメージに関連する内因性宿主分子(「デンジャーシグナル(danger signal)」と呼ばれる)によって誘導される。これらの成熟シグナルは、細胞内シグナル伝達経路を誘発する、DC上で発現する受容体に結合する。多様な感染性微生物(細菌、真菌、原生動物、ウイルス)が発現する病原体関連分子パターン(PAMP)、およびダメージを受けた宿主組織が放出する分子(ダメージ関連分子パターン/アラーミン)の認識は、パターン認識受容体(PRR)、例えば、DC上で発現するToll様受容体(TLR)ファミリーのメンバーによって媒介される。TLRはI型膜糖タンパク質である。ヒトでは、特異的発現パターン、細胞内局在、および異なる分子に対する認識能を有する、10種類の公知の機能的TLRがある。ヒトでは、骨髄系DCはTLR1～5、7、および/または8を発現するのに対して、形質細胞様DCはTLR1、7、および9を発現する。TLRの中には細胞表面で働くものもあるが(TLR1、2、4、5、6、10)、TLR3、7、8、および9は細胞内区画(主に、エンドソームおよび小胞体)において発現し、リガンド結合ドメインは小胞の内腔をサンプリングする。病原体によってコードされるTLRリガンドのTLR認識は、構造が類似する分子の3つの広いカテゴリー:脂質およびリポペプチド(TLR2/TLR1;TLR2/TLR6;TLR4)、タンパク質(TLR5)、ならびに核酸(TLR3、7、8、および9)に分けられる。免疫刺激核酸を認識するTLRのうち、TLR3はdsRNAに結合し、TLR7/8はssRNAに結合し、TLR9はDNAに結合する。微生物リガンドに加えて、ほとんどのTLRの内因性リガンドが特定されている(TLR3についてはmRNA、TLR7/8についてはssRNA免疫複合体、およびTLR9についてはDNA免疫複合体)。ほとんどのTLRの合成リガンドも述べられており、TLR3、7、8を活性化することができる免疫刺激核酸配列(INAS)(dsRNA、ssRNA)、およびTLR9を活性化することができる免疫刺激核酸配列(INAS)(非メチル化CpGモチーフを含有するオリゴデ

オキシヌクレオチド)が含まれる(表3)。リガンドがTLRに結合すると様々なアダプタータンパク質が動員され、細胞タイプ特異的なシグナル伝達経路および応答が活性化される。しかしながら、DC/APCのサブセット間でのTLR発現パターンの違い(ヒトPDCはTLR9を発現し、DNAに応答するが、MDCはTLR9を発現せず、DNAに応答しない;PDCおよびMDCはssRNAに異なる応答を示す)、ならびに異なる解剖学的部位でのAPC細胞分布の違いは、異なるTLRリガンド(天然または合成)に対して、または同じリガンドの様々な投与経路に対して多様な応答をもたらす可能性がある。TLRアゴニストまたは他の刺激(サイトカイン、免疫複合体、接着分子)に応答したDCの成熟は、貪食機能の低下、リンパ組織への遊走、およびT細胞活性化能の上昇を伴う。DCの成熟は、MHC I分子およびMHC II分子の形成能を高め、交差提示を誘導し、T細胞活性化に必要な免疫シナプスに関与する接着分子および補助刺激分子(CD40、CD80、CD86)の発現を増大させ、CD4+Tヘルパー型(T_H1)またはCD8+細胞傷害性リンパ球(CTL)へのT細胞分化をガイドするサイトカイン(IFN-γ、IFN-α、IL-12)、ならびに単球、DC、およびT細胞を局所環境に動員するケモカインの分泌を誘導する。成熟DCはまたリンパ節のT細胞区域に遊走できるようになる。DCは抗原特異的T細胞免疫応答を初回刺激する能力に加えて、免疫監視ならびに病原体および腫瘍の排除を容易にするために、NK細胞との複雑な双方向クロストークに関与する。活性化DCはまた、B細胞増殖を誘導し、アイソタイプスイッチを誘導し、抗体を産生するように形質細胞の分化を誘導する。DCは自然免疫応答および適応免疫応答の協調活性化において重要な役割を果たしているので、抗原特異的なT細胞およびNK細胞のDCを介した活性化を刺激する戦略は、自然免疫系の直接的な抗腫瘍作用または抗病原体作用を利用するだけでなく、腫瘍特異的または病原体特異的な持続性の適応免疫応答の発生を容易にするかもしれない。

【０００４】

抗原提示細胞が抗原を二次リンパ組織の「プライム(prime)」T細胞に提示し、それにより、T細胞の活性化、増殖、ならびにエフェクターTリンパ球および記憶細胞への分化が起こった時に、古典的免疫応答は開始する。T細胞応答がどういったものかは、DC上の抗原の濃度、対応するpMHCに対するT細胞受容体の親和性、およびDC成熟の状態に依存する。未熟なDCは、活性化によって誘導される、抗原特異的T細胞の細胞死と共に初期増殖を中断し、調節性T細胞の誘導を介して寛容を誘導することもできる。しかしながら、成熟DCによる刺激は、長期間のT細胞生存ならびに記憶細胞およびエフェクター細胞への分化をもたらすと同時に、天然Tr細胞が阻害される。ナイーブT細胞は、抗原、例えば、感染に起因する抗原に曝露された後に、異なる機能を有するT_H1細胞およびT_H2細胞、またはT_H3細胞、Tr1細胞、T_H17細胞、または調節性T細胞(T_{reg})に分化し得る。CD4+Tヘルパー(T_H)細胞は、免疫応答および記憶の誘導および維持に重要である。この作用は、T_H細胞とDCとのリガンド/受容体相互作用、例えば、DC上で発現するCD40へのCD40Lの結合によって媒介される。初回刺激時でのT_H細胞ヘルプは、CD8+T細胞の初回刺激および二次増殖、ならびに抗体産生のためのB細胞へのヘルプの供給に極めて必要とされている。CD8+記憶T細胞が誘導されたら、継続的な抗原特異的T_Hの支持にもはや頼らない。自己由来腫瘍抗原は、通常、有意なT_H応答を誘導できないので、腫瘍細胞に対する内因性CD8+エフェクターT細胞応答は低い。腫瘍はまた、抗原もしくはMHC発現の消失または免疫抑制機構、例えば、TGF-□の分泌を介して免疫を逃れることもできる。免疫応答の求心性アーム(afferent arm)を妨げることに加えて、腫瘍細胞はまた、遺伝子異常を有するか、または増殖因子受容体を介した生存経路を増強することもあり、それらは細胞傷害性T細胞によって同期する遠心性(efferent)デスシグナル伝達経路に応答したアポトーシスに対する感受性を低下させる。

【発明の概要】

【０００５】

本発明は、腫瘍または病原体に対する自然免疫応答および適応免疫応答を効果的に発生することができる多機能性標的化免疫複合体部分について述べる。これらの免疫複合体は、標的の腫瘍または病原体に対する有効な抗体性免疫応答および/または細胞性免疫応答を開始するための複数の重要な必要条件を同時に満たすことができる。すなわち、(i)抗

原提示細胞(APC)/樹状細胞(DC)による、腫瘍または病原体の抗原または抗原決定基の取込みおよび交差提示を誘導または増強する;(ii)標的細胞環境における樹状細胞(DC)の成熟を促進する;(iii)腫瘍または病原体に対するCD8+T細胞記憶および抗体を生じるようにCD4+T細胞ヘルプをもたらす;(iv)標的の腫瘍細胞を、抗体依存性細胞傷害(ADCC)およびT細胞を介した死に対する感受性を増加させる。さらに、本発明は、腫瘍性障害、感染症、および他の疾患の標的化免疫療法または免疫学的予防に使用することができる。

【０００６】

概して、本発明の組成物および方法は、標的の分子または細胞成分に結合することができる標的化部分、および所望の抗原または細胞に対する免疫応答を増強する1つまたは複数の活性薬剤を含む、治療用化合物または診断用化合物を含む。さらに本明細書に記載のように、標的化部分は、癌もしくは腫瘍、正常細胞(例えば、樹状細胞もしくはケラチノサイト)、または感染因子もしくは病原体の分子または成分に特異的である。さらに、活性薬剤には、核酸、ペプチド、ポリペプチド、リポペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【０００７】

本発明の第1の局面において、本発明の産物およびプロセスは、標的化部分(T)、および1種類、2種類、3種類、またはそれ以上の活性薬剤(A)を含む組成物に関する。

【０００８】

1つの態様において、本発明の組成物は、活性薬剤にカップリングされた標的化部分を含む。別の態様において、組成物は、標的化部分および少なくとも2種類の活性薬剤を含み、活性薬剤は、非コード核酸分子またはコード核酸分子およびペプチドまたはポリペプチドまたはリポペプチドを含む。さらなる態様において、少なくとも2種類の活性薬剤は、非コード核酸分子およびコード核酸分子(例えば、プラスミドまたはミニサークル)を含む。なおさらなる態様において、少なくとも2種類の活性薬剤は、非コード核酸分子またはコード核酸分子、および抗原性のペプチドまたはポリペプチドを含む。単純化して説明するために、本発明の組成物は、以下の式:T-A_1またはT-A_1-A_2によってカバーすることができる。式中、T=標的化部分であり、A_1は、核酸分子、またはペプチド、またはポリペプチド、またはリポペプチドであり、A_2は、核酸分子、またはペプチド、またはポリペプチド、またはリポペプチドである。さらに、核酸分子は、本明細書に記載のコード配列または非コード配列でもよい。さらなる態様において、A_1は、核酸分子、ペプチド、ポリペプチド、またはリポペプチドを含む、さらなる成分に(直接的または間接的に)カップリングすることができる。または、さらなる態様において、活性薬剤は、核酸分子をパッケージングおよび/または送達するための成分である。

【０００９】

本明細書で使用する「標的化部分」は、正常細胞/組織および/もしくは癌細胞/腫瘍の上に存在する標的分子または他の分子に局在化および結合する能力を有する分子を指す。言い換えると、このような標的化部分を含む本発明の組成物は、標的細胞または標的分子に(直接的または間接的に)結合することができる。生物活性薬剤と共に使用することが意図される本発明の標的化部分には、標的細胞または標的分子の成分に結合することができる、抗体、ポリペプチド、ペプチド、アプタマー、他のリガンド、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【００１０】

本明細書において開示されるように、核酸分子は、二本鎖DNA(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、多鎖DNA、二本鎖RNA(dsRNA)、一本鎖RNA(ssRNA)、多鎖RNA、DNA-RNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、ペプチド核酸(PNA)、PNA-DNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、PNA-RNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、ロックド核酸(LNA)、LNA-DNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、LNA-RNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)の1つまたは複数を含む。1つの態様において、核酸分子は、1つまたは複数の産物(例えば、RNAなどの核酸、ペプチド、ポリペプチド、融合ペプチド)をコードする。1つの態様において、核酸分子は、免疫細胞を活性化することができる1つまたは複数の免疫刺激核酸配列(INAS)を含む。

【００１１】
1つの態様において、本発明の組成物は、癌または腫瘍の標的分子または標的成分に結合する1つまたは複数の標的化部分(T)(腫瘍標的化部分)を含む。標的化分子は、腫瘍細胞、腫瘍血管系、または腫瘍微小環境の成分でもよい。
【００１２】
1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と核酸分子との複合体を含む。ここで、核酸分子は、1つまたは複数の産物(例えば、RNAなどの核酸、ペプチド、ポリペプチド、融合ペプチド)をコードし、免疫応答を刺激することができる。1つの態様において、核酸分子には、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフが含まれる。別の態様において、核酸分子は、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含み、かつ免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。
【００１３】
関連する態様において、腫瘍標的化複合体の核酸分子は、T細胞および/またはB細胞による認識のために処理および提示することができる1つまたは複数の抗原または抗原決定基をコードする。コードされる抗原決定基は、$CD4^+$T細胞エピトープ、$CD8^+$T細胞エピトープ、B細胞エピトープのそれぞれの1つまたは複数を含む。1つの態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基をコードする。例えば、核酸は、$CD4^+$T細胞ヘルプをもたらす破傷風毒素由来配列[例えば、破傷風菌由来T_H活性化配列:フラグメントC(FrC)、FrCドメインDOM1、またはプロミスキャス(promiscuous)MHCクラスII結合ペプチドp30]をコードする。関連する態様において、核酸は、微生物ワクチンまたは他の非自己供給源(例えば、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)外毒素、緑色蛍光タンパク質、植物ウイルスのコートタンパク質)に由来する、1つまたは複数の抗原または抗原決定基をコードする。
【００１４】
関連する態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分、1つもしくは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、および/または1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する1つもしくは複数の抗原もしくは抗原決定基(T細胞エピトープもしくはB細胞エピトープ)をコードする核酸分子の複合体を含む。関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分および1つまたは複数のPAMPを含む。別の関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分、および1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する1つもしくは複数の抗原もしくは抗原決定基(T細胞エピトープもしくはB細胞エピトープ)をコードする1つもしくは複数の核酸分子を含む。別の関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分、1つもしくは複数のPAMP、および1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する1つもしくは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープもしくはB細胞エピトープ)をコードする1つもしくは複数の核酸分子を含む。
【００１５】
1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分、1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)またはアラーミン、および1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子の複合体を含む。関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分および1つまたは複数のDAMP/アラーミンを含む。別の関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分、および1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子を含む。別の関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分、1つまたは複数のDAMP/アラーミン、および1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸

分子を含む。

【００１６】

1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と、(i)1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)、(ii)1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、(iii)1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)/アラーミン、(iv)抗原提示細胞もしくは樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子、ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド/抗体、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)を含む、1つまたは複数の免疫刺激分子の1つまたは複数をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の腫瘍抗原/抗原決定基または腫瘍抗原を含有する融合タンパク質をさらにコードする。1つの局面において、腫瘍抗原の融合パートナーは、DCによる抗原取り込み、免疫認識、および/または免疫刺激を容易にする。別の例において、融合パートナーは、DC取り込み受容体を標的とする分子を含む。別の例において、融合パートナーは、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する抗原または抗原決定基である。別の例において、融合パートナーはアラーミンである。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【００１７】

1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と、1つまたは複数の標的細胞遺伝子の発現を妨害することができる1つまたは複数のRNA分子[例えば、短鎖干渉(short interfering)RNA(siRNA)、ショートヘアピンRNA(shRNA)]をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。別の態様において、複合体の核酸分子は1つまたは複数の免疫刺激性RNA分子をコードする。

【００１８】

1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と、標的細胞の死を誘導する分子をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。

【００１９】

本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体のそれぞれにおいて、核酸分子は、所望の細胞において機能活性がある転写プロモーターの制御下にある1つまたは複数の関心対象の遺伝子をコードする。1つの態様において、所望の細胞タイプにおける標的化発現のために、組織または腫瘍細胞に選択的なプロモーターが用いられる。

【００２０】

1つの態様において、本明細書に記載の腫瘍標的化部分-核酸複合体はそれぞれ、核酸分子または複合体をパッケージングおよび/または送達するための1つまたは複数の成分に連結される。例えば、これらの分子には、カチオン性ペプチド、細胞透過ペプチド、DC標的化ペプチド、核酸結合分子、核局在化ペプチド、カチオン性リポソーム、親油性部分、ナノ粒子が含まれる。

【００２１】

1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と、1つまたは複数の核酸分子、および1つまたは複数のペプチド/ポリペプチド/リポペプチドとの複合体を含む。1つの態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを組み込み、かつ/または本明細書に記載の、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする(注:0017)。様々な関連する態様において、ペプチド/ポリペプチド/リポペプチドには、(i)1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(例えば、CD4+T細胞エピトープ)、(ii)アラーミン、(iii)DC結合分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド)の1つまたは複数が含まれる。1つの局面において、本明細書に記載の複合体ペプチド/ポリペプチドは、互いに融合/連結されてもよく、かつ/または核酸結合ペプチドもしくは細胞透過ペプチド[例え

ば、カチオン性ペプチド、プロタミン、HIV-tat、アルギニンリッチ配列もしくはヒスチジンリッチ配列、LL-37)に融合/連結されてもよい。

【００２２】

1つの態様において、本発明は、抗体またはアプタマーなどの腫瘍標的化部分と、(a)1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、(b)以下のペプチド/ポリペプチド/リポペプチドの1つまたは複数:(i)1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(例えば、CD4+T細胞エピトープ)、(ii)アラーミン、(iii)DC結合分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド)、の1つまたは複数との複合体を含む。1つの局面において、本明細書に記載の複合体のペプチド/ポリペプチドは、互いに、および/または核酸結合ペプチド（例えば、カチオン性ペプチド、プロタミン、HIV-tat、アルギニンリッチ配列またはヒスチジンリッチ配列、LL-37)に融合/連結されてもよい。1つの局面において、複合体は免疫刺激核酸を含む。

【００２３】

1つの態様において、本発明は、抗体などの標的化部分と、アプタマーである核酸分子との複合体を含む。1つの態様において、抗体および核酸アプタマーは、同じ細胞タイプ上または異なる細胞タイプ上にある異なる標的に結合する。1つの態様において、複合体は、腫瘍細胞表面受容体(EGFR)を標的とする抗体および前立腺特異的膜抗原(PSMA)を標的とするアプタマーを含み、それにより、2つとも前立腺癌細胞のタンパク質を標的とする。1つの態様において、核酸分子は、アプタマーと、(i)PAMPまたは他の免疫刺激核酸、(ii)本明細書に記載の、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードするDNA(注:0017)の1つまたは複数とを含む。

【００２４】

1つの態様において、本発明の組成物は、正常な細胞または組織、例えば、皮膚のケラチノサイトの標的分子または標的成分に結合する1つまたは複数の標的化部分(T)(組織標的化部分)を含む。1つの態様において、標的化部分は、ケラチノサイト上にある細胞表面分子または受容体、例えば、上皮細胞成長因子受容体(EGFR)に結合する。

【００２５】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の産物(例えば、RNAなどの核酸、ペプチド、ポリペプチド、融合ペプチド)をコードし免疫応答を刺激することができる核酸分子との複合体を含む。1つの態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含む。別の態様において、核酸分子は、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含み、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。

【００２６】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と核酸分子との複合体を含み、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)を含み、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする。

【００２７】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、および1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする核酸分子との複合体を含む。

【００２８】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)またはアラーミン、および1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする核酸分子との複合体を含む。

【００２９】
1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する1つもしくは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープもしくはB細胞エピトープ)をコードし、(i)1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、(ii)1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)/アラーミン、(iii)抗原提示細胞もしくは樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子、ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド/抗体、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)を含む、1つまたは複数の免疫刺激性分子を、コードしない、1つをコードする、または複数をコードする、1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、融合タンパク質として1つまたは複数の病原体抗原/抗原決定基をコードする。1つの局面において、抗原の融合パートナーは、DCによる抗原取り込み、免疫認識、および/または免疫刺激を容易にする。別の例において、融合パートナーは、DC取り込み受容体を標的とする分子を含む。別の例において、融合パートナーはアラーミンである。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【００３０】
1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の腫瘍抗原/抗原決定基をコードし、(i)1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(例えば、CD4+T細胞エピトープ)、(ii) 1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、(ii)1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)/アラーミン、(iii) 抗原提示細胞もしくは樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子、ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド/抗体、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)を含む、1つまたは複数の免疫刺激分子の1つまたは複数をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の腫瘍抗原含有融合タンパク質をコードする。1つの局面において、腫瘍抗原の融合パートナーは、DCによる抗原取り込み、免疫認識、および/または免疫活性化を容易にする。別の例において、融合パートナーは、DC取り込み受容体を標的とする分子を含む。別の例において、融合パートナーは、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する抗原または抗原決定基(CD4+T細胞エピトープ)である。別の例において、融合パートナーはアラーミンである。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【００３１】
1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)および/またはアラーミンと、(i)1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基、(ii)1つまたは複数の腫瘍抗原または抗原決定基の1つまたは複数を含む抗原性ペプチド/ポリペプチドとの複合体を含む。複合体の1つの局面において、腫瘍または病原体に由来する抗原または抗原決定基はアラーミン(例えば、LL37)に連結または融合される。

【００３２】
1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の核酸分子と、1つまたは複数のペプチド/ポリペプチドとの複合体を含む。1つの態様において、核酸分子は、1つもしくは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)もしくは他の免疫刺激性モチーフを組み込み、および/または本明細書に記載の、抗原特異的免疫応答を刺激する1つもしくは複数の産物をコードする(注:0030、0031)。複合体の様々な態様において、ペプチド/ポリペプチドは、(i)1つまたは複数の病原体および/または腫瘍の抗原または抗原決定基、(ii)アラーミン、(iii)DC結合分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド)

の1つまたは複数を含む。1つの局面において、本明細書に記載の複合体のペプチド/ポリペプチドは、互いに、および/または核酸結合ペプチド(例えば、カチオン性ペプチド、プロタミン、HIV-tat、アルギニンリッチ配列またはヒスチジンリッチ配列、LL-37、核局在化ペプチド)に融合/連結されてもよい。

【００３３】

1つの態様において、本発明の組成物は、正常な免疫細胞または組織、例えば、抗原提示細胞または樹状細胞の標的分子または標的成分に結合する1つまたは複数の標的化部分(T)(APC/DC標的化部分)を含む。1つの態様において、標的化部分は、樹状細胞の取り込み受容体、例えば、DEC-205に結合する。

【００３４】

1つの態様において、本発明は、抗原提示細胞(APC)/樹状細胞(DC)を標的とする、例えばDC取り込み受容体を標的とする抗体または他の部分と、関心対象の遺伝子をコードする核酸分子とを含む複合体を含む。

【００３５】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と核酸分子との複合体を含み、核酸分子は、1つまたは複数の産物(例えば、RNAなどの核酸、ペプチド、ポリペプチド、融合ペプチド)をコードし、免疫応答を刺激することができる。1つの態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含む。別の態様において、核酸分子は、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含み、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。

【００３６】

1つの態様において、本発明は、DEC-205抗体などのAPC/DC標的化部分と、1つまたは複数の核酸分子との複合体を含み、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)を含み、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【００３７】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)と、1つまたは複数の1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つまたは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【００３８】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)またはアラーミンと、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。

【００３９】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードし、1つまたは複数の免疫刺激分子、例えば、抗原提示細胞または樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、融合タンパク質として1つまたは複数の病原体抗原/抗原決定基をコードする。関連する態様において、本明細

書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。1つの局面において、複合体は、1つまたは複数の病原体に由来する抗原または抗原決定基を含む1つまたは複数のペプチドをさらに含む。

【００４０】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数の腫瘍抗原をコードし、(i)1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(例えば、CD4+T細胞エピトープ)、(ii)1つまたは複数の免疫刺激分子、例えば、抗原提示細胞もしくは樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子、ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)の1つまたは複数をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、融合タンパク質として、1つまたは複数の腫瘍抗原と、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する抗原または抗原決定基(CD4+T細胞エピトープ)をコードする。別の例において、融合パートナーはアラーミンである。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。1つの局面において、複合体は、1つまたは複数の、病原体に由来するまたは腫瘍の抗原または抗原決定基を含む1つまたは複数のペプチドをさらに含む。

【００４１】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つもしくは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)および/または1つもしくは複数のアラーミンと、1つまたは複数の腫瘍抗原および/または1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する抗原もしくは抗原決定基(T細胞もしくはB細胞エピトープ)を含む1つまたは複数の抗原性ペプチドとの複合体を含む。1つの態様において、抗原性ペプチドは標的化部分に融合されるか、または標的化部分の中に組み込まれる。別の局面において、抗原性ペプチドはアラーミン(例えば、LL-37)に融合される。

【００４２】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数の核酸分子と、1つまたは複数の抗原性ペプチドとの複合体を含み、核酸分子は1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)を含み、抗原性ペプチドは、1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する腫瘍抗原および/または抗原もしくは抗原決定基(T細胞もしくはB細胞エピトープ)を含む。1つの態様において、抗原性ペプチドは標的化部分に融合されるか、または標的化部分の中に組み込まれる。複合体の関連する一態様において、抗原性ペプチドは、核酸結合ペプチド(例えば、カチオン性ペプチド、NLS、Tat、プロタミン、His6、Arg9、LL-37)に融合される。別の局面において、抗原性ペプチドは、DC取り込み受容体を標的とするペプチドモチーフに融合される。1つの局面において、抗原性ペプチドは標的化部分に融合されるか、または標的化部分の中に組み込まれる。別の局面において、抗原性ペプチドはアラーミンに融合される。

【００４３】

1つの態様において、本発明は、DC標的化ペプチド、抗原性ペプチドおよび核酸結合ペプチド(アラーミン、例えば、LL-37)を組み込んでいる、複合体または融合タンパク質を含む。前記タンパク質は、核酸分子(コードまたは非コード)に共有結合または非共有結合している。1つの局面において、核酸分子は1つまたは複数のPAMPを含む。別の局面において、核酸分子は、(i)1つまたは複数の、腫瘍抗原または1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する抗原決定基、(ii)1つまたは複数の免疫刺激分子、例えば、抗原提示細胞または樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子および免疫抑制を打ち消す分子(例えば、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)の1つまたは複数をさらにコードする。

【００４４】

1つの態様において、本発明は、融合抗原性ペプチド/タンパク質および抗体の免疫複合体を含む複合体を含み、融合ペプチド/タンパク質は、抗原性ペプチドおよび前記抗体に結合する特異的タグペプチドを組み込んでいる。複合体の1つの局面において、免疫複合体の融合ペプチド/タンパク質は、核酸結合ペプチド(例えば、カチオン性ペプチド、プロタミン、HIV-tat、アルギニンリッチ配列またはヒスチジンリッチ配列、LL-37、核局在化ペプチド)をさらに含む。複合体の別の局面において、免疫複合体の融合ペプチドはアラーミン(例えば、LL-37)をさらに含む。複合体の別の局面において、免疫複合体の融合ペプチドは、DC取り込み受容体に結合するペプチドをさらに組み込んでいる。別の態様において、複合体は、抗体または融合ペプチド抗原のいずれかに連結した免疫刺激核酸分子を含み、核酸分子は1つまたは複数のPAMPを含む。別の局面において、核酸分子は、(i)1つまたは複数の、腫瘍抗原または1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する抗原もしくは抗原決定基、(ii)1つまたは複数の免疫刺激分子の1つまたは複数をさらにコードする。

【００４５】

本発明による例示的な方法および組成物が詳述される。

【図面の簡単な説明】

【００４６】

【図１】ヌクレオチド(DNA/RNA)複合化抗体を示す。

【図２】ヌクレオチド(DNA/RNA)複合化腫瘍標的化ペプチドを示す。

【図３】核酸-抗体複合体(INAS=免疫刺激核酸配列)の作用機構を示す。

【図４】DNAまたはRNA(INAS)と抗体/ポリペプチド/ペプチドを共有結合する方法を示す。段階1.カルボジイミドクロスリンカーEDCを用いて、オリゴヌクレオチド(例えば、CpG DNA)の3'リン酸基が抗体のアミン基に複合化される。段階2.EDCにより活性化されたオリゴヌクレオチドはイミダゾールと反応して、複合化のための活性中間体を形成する。段階3.活性ヌクレオチド中間体は標的化抗体(例えば、抗EGFRまたは抗HER2)と共有結合を形成する。段階4.10kDカットオフカラムに通し、PBSで洗浄することによって、イミダゾールおよび複合化されなかったヌクレオチド残基を除去する。

【図５】DNAまたはRNAが複合化した抗EGFR抗体および抗HER2抗体を証明するイムノブロットを示す。抗ヒトEGFR抗体-DNA複合体(DNA= SEQ ID:1)。抗ヒトHER2抗体-DNA複合体(DNA= SEQ ID:1)。抗EGFR抗体-RNA複合体(EGFR抗体-SVM274)。

【図６】抗EGFR抗体(EGFR Ab)またはDNA複合化抗EGFR抗体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1もしくはEGFR Ab-DNA SEQ ID NO:2)によるEGFRリン酸化(Tyr1068)の阻害を証明するイムノブロットである。

【図７】DNA複合化抗EGFR抗体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1)により樹状細胞は成熟するが、EGFR抗体では成熟しないことを証明するFACS分析を示す。

【図８】PBMCにおけるインターフェロン-γ(IFN-γ)およびApo2L/TRAILの発現に及ぼすDNA複合化抗体の影響を証明する棒グラフを示す。A)は、抗EGFR抗体(抗EGFR Ab)5μg/ml、抗ヒトHER2抗体(抗HER2 Ab)5μg/ml、DNA(ODN-SEQ ID NO:1)5μg/ml、抗EGFR Ab-DNA 5μg/ml、抗HER2 Ab-DNA 5μg/mlで処理されたPBMC、または未処理(対照)のPBMCの上清中のELISAによるIFN-γ(pg/ml)の定量を示す。B)は、抗EGFR抗体(抗EGFR Ab)5μg/ml、抗ヒトHER2抗体(抗HER2 Ab)5μg/ml、DNA(ODN-SEQ ID NO:1) 5μg/ml、抗EGFR Ab-DNA 5μg/ml、抗HER2 Ab-DNA 5μg/mlで処理されたPBMC、または未処理(対照)のPBMCの上清中のELISAによるApo2L/TRAIL(pg/ml)の定量を示す。

【図９】EGFR抗体-DNA複合体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1)による処理後に$CD56^{+}$PBMCが増殖したが、EGFR抗体(対照)では増殖しなかったフローサイトメトリー分析を示す。

【図１０】EGFR抗体-ヌクレオチド複合体(EGFR-DNAまたはEGFR-RNA)による処理後にPBMCにおいてMHC分子(DR;クラスII)の発現が増加したことを証明する表を示す。

【図１１】EGFR抗体-DNA複合体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1またはEGFR Ab-DNA SEQ ID NO:2)による処理に応答してEGFR発現腫瘍細胞(MDA-MB468)において、およびHER2抗体-DNA複合体(HER2 Ab-DNA SEQ ID NO:1またはHER2 Ab-DNA SEQ ID NO:2)による処理に応答してHE

R2/neu発現腫瘍細胞(SKBr-3)において、Apo2L/TRAILが誘導されたことを証明する表を示す。
【図１２】EGFR抗体-DNA複合体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1またはEGFR Ab-DNA SEQ ID NO:2)による処理に応答して、EGFR発現ヒト結腸癌細胞(HT29細胞)において直接的な死(細胞超融合による)が誘導されたことを証明する顕微鏡写真を示す。
【図１３】EGFR抗体-DNA複合体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1)による処理に応答してEGFR発現ヒト結腸癌細胞(HT29細胞)の直接的な死(コロニー形成消失による)が誘導されたが、EGFR抗体または複合化されていない核酸(DNA SEQ ID NO:1)では誘導されなかったことを証明する細胞培養プレートを示す。
【図１４】EGFR抗体-DNA複合体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1)による処理に応答してEGFR発現ヒト乳癌細胞(MCF-7またはMDA-MB468細胞)の直接的な死が誘導されたことを証明する顕微鏡写真を示す。
【図１５】EGFR抗体-DNA複合体[EGFR Ab-DNA1(SEQ ID NO:1)またはEGFR Ab-DNA2(SEQ ID NO:2)]による処理に応答してEGFR発現ヒト乳癌細胞(MCF-7細胞)の直接的な死(コロニー形成消失による)が誘導されたが、EGFR抗体または複合化されていない核酸(DNA SEQ ID NO:1またはDNA SEQ ID NO:2)では誘導されなかったことを証明する細胞培養プレートを示す。
【図１６】HER2抗体-DNA複合体[HER2 Ab-DNA1(SEQ ID NO:1)またはHER2 Ab-DNA2(SEQ ID NO:2)による処理に応答してHER2/neu発現ヒト乳癌細胞(MCF-7およびSKBr-3細胞)の直接的な死(細胞超融合による)が誘導されたことを証明する顕微鏡写真を示す。4つの超融合した合体細胞体の分析は、死細胞(トリパンブルー染色)および散在した細胞断片を証明する。
【図１７】Neu抗体-DNA複合体[Neu Ab-DNA 1(SEQ ID NO:1)またはNeu Ab-DNA2(SEQ ID NO:2)による処理に応答してNeu発現マウス乳癌細胞の直接的な死(細胞超融合による)が誘導されたことを証明する顕微鏡写真を示す。
【図１８】PBMC:腫瘍細胞比の関数として(A)または時間の関数として(B)、抗EGFR抗体または抗EGFR抗体-DNA複合体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1)によりHT-29腫瘍細胞死が誘導されたことを証明するグラフを示す。
【図１９】EGFR抗体のみ、DNAのみ(DNA SEQ ID NO:1)、または複合化されていない抗体および核酸の組み合わせによる処理と比較して、DNA複合化抗EGFR抗体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1)が投与された後にEGFR発現HT-29腫瘍成長が阻害されたことを示す。
【図２０】Neu抗体のみまたはDNAのみ(DNA SEQ ID NO:1)による処理と比較して、Neu抗体-DNA複合体[Neu Ab-DNA SEQ ID NO:1]による処理に応答して、FVBマウスにおいて同系Neu+腫瘍の成長が阻害され、同系Neu+腫瘍の体積が減少したことを証明するグラフを示す。
【図２１】DNA複合化抗neu抗体の腫瘍内投与または全身投与に応答した(neu-N)-トランスジェニックマウスにおける腫瘍成長の阻害を示すグラフである。(A)無処置対照マウスにおける腫瘍量。(B)Neu抗体-DNA複合体処置マウスにおける腫瘍量[Neu Ab-DNA SEQ ID NO:1]。
【図２２】ヒスチジン(His)-タグ化炭疽菌防御抗原(PA)とオリゴヌクレオチドの結合を示す。
【図２３】オリゴヌクレオチドとプラスミドとの三重鎖形成を示す。
【図２４】抗EGFR抗体-HIV Tatペプチド複合体によるプラスミド送達および遺伝子発現を示す。
【発明を実施するための形態】
【００４７】
参考文献の援用
本明細書で述べられる全ての刊行物および特許は、それぞれ個々の刊行物または特許出願が参照により組み入れられるように詳細かつ個々に示されるのと同じ程度に参照により本明細書に組み入れられる。
【００４８】

発明の詳細な説明

本発明の組成物、方法、および方法論が説明される前に、本発明は、説明される特定の組成物、方法、および実験条件に限定されず、このような組成物、方法、および条件は変化してもよいことが理解すべきである。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本明細書において使用する用語は特定の態様のみを説明することを目的とし、本発明の範囲を限定することを目的としないことも理解すべきである。

【００４９】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、特に文脈によってはっきりと規定されていない限り複数の指示物を含む。従って、例えば、「1つの核酸」についての言及は、1つまたは複数の核酸を含み、および/または本明細書に記載のタイプの組成物は、本開示などを読めば当業者に明らかになるだろう。

【００５０】

本明細書で使用する「免疫エフェクター細胞」は、T細胞、NK細胞、B細胞、単球、マクロファージ、および樹状細胞(DC)を含む。

【００５１】

本明細書で使用する「腫瘍標的化ペプチド」は、100未満のアミノ酸を含有し、腫瘍細胞の細胞成分、腫瘍血管系、および/または腫瘍微小環境の成分に特異的に結合するポリマーを含む。

【００５２】

本明細書で使用する「新生物」はその文法上の語尾変化を含めて、新しくかつ異常な組織増殖を意味し、良性または癌性でもよい。関連する局面において、新生物は、様々な癌を含むが、これらに限定されない新生物疾患または腫瘍性障害を示す。例えば、このような癌は、前立腺癌、膵臓癌、胆管癌、結腸癌、黒色腫癌、肉腫癌、肝臓癌、腎臓癌、肺癌、精巣癌、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、脳癌、頭頚部癌、黒色腫癌、白血病癌、リンパ腫癌などを含んでもよい。

【００５３】

本明細書において使用する「対象」はその文法上の語尾変化を含めて、ヒト、またはイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、サル、ラット、およびマウスを含む脊椎動物を意味する。

【００５４】

本明細書で使用する「複合化」はその文法上の語尾変化を含めて、外来DNAまたは外来RNAと、標的特異的抗体および/または標的特異的ペプチドおよび/または腫瘍標的化部分が、化学的に、静電気的に、非共有結合により、または他の技法により、直接的または間接的に連結、カップリング、結合などしていることを意味する。例えば、本発明により開示される、単離された抗体-核酸複合体またはペプチド-核酸複合体は本定義に入るだろう。

【００５５】

「免疫刺激核酸配列」(INAS)は、病原体関連分子パターン(PAMP)または免疫細胞を活性化することができる他のモチーフである核酸分子を指し、二本鎖DNA(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、CpG DNA(CpG)、単純ヘルペスウイルス(HSV)DNA、二本鎖RNA(dsRNA)、および一本鎖RNA(ssRNA)を含むが、これらに限定されない。関連する局面において、INASは、コード配列または非コード配列でもよい。例示として、INASはDNA(SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2)でもよく、RNA(以下を参照されたい)でもよい。

【００５６】

「治療的有効量」という用語は、研究者、獣医師、医師または他の臨床家によって捜し求められている、組織、系、動物またはヒトの生物学的応答または医学的応答を誘発する本化合物の量を意味する。

【００５７】

本明細書で使用する「組成物」という用語は、特定の成分を特定の量で含む生成物、ならびに特定の量の特定の成分の組み合わせに直接的または間接的に起因する任意の生成物

を含むことが意図される。「薬学的に許容される」とは、担体、希釈剤または賦形剤が製剤の他の成分と適合し、そのレシピエントに無害でなければならないことを意味する。

【００５８】

化合物「の投与」および/または化合物を「投与する」という用語は、治療を必要とする個体に、治療的有効量の本発明の化合物を提供することを意味するものと理解すべきである。投与は、腫瘍内または全身(静脈内)への投与でもよい。さらに、レシピエントに病原体抗原ワクチン(例えば、破傷風トキソイド)をワクチン接種することを伴う。さらに、調節性T細胞を枯渇および不活性化する薬剤(例えば、シクロホスファミド)またはサプレッサー骨髄系細胞を枯渇および不活性化する薬剤(例えば、ゲムシタビン)を伴う。さらなる例において、養子細胞免疫療法用の腫瘍反応性免疫細胞または病原体抗原反応性免疫細胞を作製するための免疫細胞および腫瘍細胞のエクスビボ処理。投与は皮内または皮下でもよい。さらに、投与は、1 種類もしくは複数の種類のさらなる調節性T細胞を枯渇および不活性化する治療剤(例えば、シクロホスファミド)またはサプレッサー骨髄系細胞を枯渇および不活性化する治療剤(例えば、ゲムシタビン)と組み合わせてもよい。本明細書において特定される本発明の薬学的組成物は、本明細書に記載の病態/適応症(例えば、癌、病原性感染因子、その関連状態)の1つまたは複数の予防的処置および/または治療的処置のための、非経口投与、局所投与、経口投与、鼻投与(もしくは吸入投与)、直腸投与、または局所投与、例えば、エアゾール剤もしくは経皮投与による局所投与に有用である。薬学的組成物は、投与方法に応じて様々な単位剤形で投与することができる。適切な単位剤形は、散剤、錠剤、丸剤、カプセル、トローチ剤、坐剤、パッチ、点鼻薬、注射剤(injectible)、埋め込み型の徐放製剤、脂質複合体などを含むが、これらに限定されない。

【００５９】

特別の定めのない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者に通常理解されるものと同じ意味を有する。修正および変更が本開示の精神および範囲の中に含まれると理解されるので、本発明の実施または試験において、本明細書に記載のものと同様のまたは等価な任意の方法および材料を使用することができる。

【００６０】

概して、本発明の組成物および方法は、標的細胞に特異的な標的化部分、および標的細胞に対する免疫応答を増強する活性薬剤を含む、治療用化合物および診断用化合物を含む。さらに本明細書に記載のように、標的化部分は、癌または腫瘍の分子もしくは成分、感染因子の分子もしくは成分、または正常細胞の分子もしくは成分に特異的である。さらに、活性薬剤は、核酸、ペプチド、またはそれらの組み合わせを含む。

【００６１】

本発明の第1の局面において、本発明の生成物およびプロセスは、標的化部分、および1種類、2種類、3種類、またはそれ以上の活性薬剤を含む組成物に関する。

【００６２】

1つの態様において、本発明の組成物は、活性薬剤にカップリングされた標的化部分を含む。別の態様において、組成物は、標的化部分および少なくとも2種類の活性薬剤を含み、活性薬剤は、非コード核酸分子およびペプチドまたはポリペプチドを含む。さらなる態様において、少なくとも2種類の活性薬剤は、非コード核酸分子およびコード核酸分子(例えば、プラスミドまたはミニサークル)を含む。なおさらなる態様において、少なくとも2種類の活性薬剤は、非コード核酸分子またはコード核酸分子、および抗原性のペプチドまたはポリペプチドを含む。単純化して説明するために、本発明の組成物は、以下の式:T-A_1またはT-A_1-A_2によってカバーすることができる。式中、T=標的化部分であり、A_1は、核酸分子、またはペプチド、またはポリペプチド、またはリポペプチドであり、A_2は、核酸分子、またはペプチド、またはポリペプチド、またはリポペプチドである。さらに、核酸分子は、本明細書においてさらに説明される、コード配列または非コード配列でもよい。さらなる態様において、A_1は、核酸分子、ペプチド、ポリペプチド、またはリポペプチドを含む、さらなる成分に(直接的または間接的に)カップリングすることができる。または、さらなる態様において、活性薬剤は、核酸分子をパッケージングおよび/または送

達するための成分である。

【００６３】

例えば、本発明のある態様において、T=腫瘍細胞、正常細胞、または感染因子の成分を標的とする、アプタマー、ペプチド、または抗体であり、A_1=免疫刺激性非コード核酸分子であり、A_2=対象(例えば、組成物が投与される動物)に対して抗原性のペプチドまたはポリペプチドである。別の態様において、本発明の組成物は、T-A_1を含む。

【００６４】

III.標的化部分

標的化部分(例えば、抗体)は、複合化された生物活性薬剤(例えば、核酸)の標的細胞への送達を(例えば、標的細胞受容体に結合する抗体の、受容体を介したエンドサイトーシスを介して)容易にする。例えば、標的化部分は、抗体結合腫瘍標的から免疫細胞への生物活性薬剤(例えば、INAS)および免疫原性アポトーシス材料の送達を、Fcと(免疫細胞上の)Fc受容体との相互作用を介して容易にする。これは、エンドサイトーシスおよびエンドソームパターン認識受容体(例えば、Toll様受容体)の活性化を介して核酸内部移行を促進する。

【００６５】

例えば、免疫刺激性のDNA複合化抗体/ペプチドまたはRNA複合化抗体/ペプチドを導入すると、標的細胞(例えば、新生細胞)内でデスシグナル伝達が活性化される(図3)。理論に拘束されるつもりはなく、かつ遺伝毒性化学療法剤の影響とは対照的に、DNA複合化抗体/ペプチドまたはRNA複合化抗体/ペプチドを使用すると、標的化分子を発現しない正常組織、または新生細胞と比較してかなり低レベルの分子を発現する正常組織では対応する影響が現れることなく、標的細胞内のデスシグナル伝達を活性化することができる。

【００６６】

本発明の1つの局面において、標的化部分-生物活性薬剤複合体は、生物活性薬剤の配列を除いて、免疫応答を誘導するように機能する。様々な態様において、本発明の複合体は標的細胞の死を促進できると同時に、自然免疫系および適応免疫系を直接的または間接的に誘導することができる。例えば、INAS-抗体複合体の細胞内認識は、標的細胞によるサイトカイン/補助刺激分子/アラーミン/ダメージ関連分子パターン(内因性デンジャーシグナル)の産生を活性化し、直接的なおよび免疫を介した標的細胞死を促進し、抗原提示細胞による(核酸を運んでいる)アポトーシス細胞の取り込みを容易にし、交差提示された腫瘍抗原に対する抗腫瘍応答を生じるように免疫系を活性化するのに役立つ(図3)。これらの抗体-核酸免疫複合体は、マクロファージおよび樹状細胞によりアポトーシス腫瘍細胞が貪食された後に、エンドソームTLRを介した免疫応答またはTLR非依存性の免疫応答を活性化することができる。これは、抗体結合アポトーシス腫瘍細胞に由来する抗原に対する自己免疫応答を誘導することができる。

【００６７】

本明細書で使用する「標的化部分」は、対象の正常細胞/組織および/もしくは癌細胞/腫瘍の上に存在する分子に局在化および結合する能力を有する分子を指す。言い換えると、このような標的化部分を含む本発明の組成物は、細胞上に存在するリガンドに(直接的または間接的に)結合することができる。さらに、標的化部分は、正常細胞/組織および/もしくは癌細胞/腫瘍の上に存在する標的分子または他の分子に局在化および結合する能力を有する分子を指す。言い換えると、このような標的化部分を含む本発明の組成物は、標的細胞または標的分子に(直接的または間接的に)結合することができる。生物活性薬剤と共に使用することが意図される本発明の標的化部分には、標的細胞または標的分子の成分に結合することができる、抗体、ポリペプチド、ペプチド、アプタマー、他のリガンド、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【００６８】

1つの態様において、標的化部分は、対象に投与された後に、腫瘍細胞に結合するか、または腫瘍細胞の近く(例えば、腫瘍血管系または腫瘍微小環境)に結合することができる。標的化部分は、癌細胞表面上にある受容体またはリガンドに結合してもよく、標的が分

子に接近でできれば癌細胞の細胞内標的に結合してもよい。細胞内癌細胞標的への接近は、アポトーシス、壊死などを受けている細胞などの、傷ついた原形質膜を有するがん細胞の中で生じてもよい。癌標的化分子の中には、傷ついた原形質膜を有しない細胞の細胞内部分に結合できるものもある。

【００６９】

本発明の別の局面において、非癌細胞または非癌組織に特異的な標的化部分が選択される。例えば、標的化部分は、ある特定の細胞または組織に通常存在する分子に特異的でもよい。さらに、ある態様において、同じ分子が正常細胞および癌細胞に存在してもよい。様々な細胞成分および分子が公知である。例えば、標的化部分がEGFRに特異的であれば、結果として生じる本発明の複合体は、EGFRを発現する癌細胞ならびにEGFRを発現する正常皮膚表皮細胞を標的とすることができる。従って、ある態様において、本発明の複合体は、本明細書においてさらに議論されるように、2つ別々の機構(癌細胞を標的とする機構および非癌細胞を標的とする機構)によって動いてもよい。なおさらなる態様において、本発明の複合体は、感染因子の成分または分子に特異的な標的化部分を含む。

【００７０】

本明細書において開示される本発明の様々な局面において、本発明の複合体は、細胞成分、例えば、腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、マイコプラズマ抗原、真菌抗原、プリオン抗原、寄生生物に由来する抗原に結合し、これらを標的とすることができる標的化部分を含む。本明細書で使用する、細胞成分、抗原または分子はそれぞれ、標的化部分の所望の標的を意味するように使用することができる。例えば、様々な態様において、標的化部分は、上皮細胞成長因子受容体(EGFR、ErbB-1、HER1)、ErbB-2(HER2/neu)、ErbB-3/HER3、ErbB-4/HER4、EGFRリガンドファミリー;インシュリン様増殖因子受容体(IGFR)ファミリー、IGF結合タンパク質(IGFBP)、IGFRリガンドファミリー;血小板由来成長因子受容体(PDGFR)ファミリー、PDGFRリガンドファミリー;線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)ファミリー、FGFRリガンドファミリー、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)ファミリー、VEGFファミリー;HGF受容体ファミリー;TRK受容体ファミリー;エフリン(EPH)受容体ファミリー;AXL受容体ファミリー;白血球チロシンキナーゼ(LTK)受容体ファミリー;TIE受容体ファミリー、アンジオポエチン1、2;受容体型チロシンキナーゼ様オーファン受容体(ROR)受容体ファミリー;ジスコイジンドメイン受容体(DDR)ファミリー;RET受容体ファミリー;KLG受容体ファミリー;RYK受容体ファミリー;MuSK受容体ファミリー;トランスフォーミング成長因子α(TGF-α)受容体、TGF-β;サイトカイン受容体、クラスI(ヘマトポエチンファミリー)およびクラスII(インターフェロン/IL-10ファミリー)受容体、腫瘍壊死因子(TNF)受容体スーパーファミリー(TNFRSF)、デスレセプターファミリー;癌-精巣(CT)抗原、系列特異的抗原、分化抗原、α-アクチニン-4、ARTC1、breakpoint cluster region-Abelson(Bcr-abl)融合産物、B-RAF、カスパーゼ-5(CASP-5)、カスパーゼ-8(CASP-8)、β-カテニン(CTNNB1)、cell division cycle 27(CDC27)、サイクリン依存性キナーゼ4(CDK4)、CDKN2A、COA-1、dek-can融合タンパク質、EFTUD-2、伸長因子2(ELF2)、Ets変異体遺伝子6/急性骨髄性白血病1遺伝子ETS(ETC6-AML1)融合タンパク質、フィブロネクチン(FN)、GPNMB、低密度脂質受容体/GDP-Lフコース:β-Dガラクトース2-α-Lフコシルトランスフェラーゼ(LDLR/FUT)融合タンパク質、HLA-A2.HLA-A2遺伝子のα2-ドメインのαヘリックスの残基170のアルギニンからイソロイシンへの置換(HLA-A*201-R170I)、HLA-A11、熱ショックタンパク質70-2変異型(HSP70-2M)、KIAA0205、MART2、melanoma ubiquitous mutated 1、2、3(MUM-1、2、3)、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)、neo-PAP、ミオシンクラスI、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合タンパク質、PRDX5、PTPRK、K-ras(KRAS2)、N-ras(NRAS)、HRAS、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1またはSYT-SSX2融合タンパク質、トリオースリン酸イソメラーゼ、BAGE、BAGE-1、BAGE-2、3、4、5、GAGE-1、2、3、4、5、6、7、8、GnT-V(異常なN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV、MGAT5)、HERV-K-MEL、KK-LC、KM-HN-1、LAGE、LAGE-1、CTLにより認識される黒色腫抗原(CAMEL)、MAGE-A1(MAGE-1)、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-3、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C1、MAGE-C2、ムチン1(MUC1)、MART

-1/Melan-A(MLANA)、gp100、gp100/Pmel17(SILV)、チロシナーゼ(TYR)、TRP-1、HAGE、NA-88、NY-ESO-1、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-1、2、3、4、TRP2-INT2、癌胎児抗原(CEA)、カリクレイン4、マンマグロビン-A、OA1、前立腺特異的抗原(PSA)、TRP-1/gp75、TRP-2、アディポフィリン(adipophilin)、黒色腫2に存在しないインターフェロン誘導性タンパク質(AIM-2)、BING-4、CPSF、サイクリンD1、上皮細胞接着分子(Ep-CAM)、EphA3、線維芽細胞増殖因子-5(FGF-5)、糖タンパク質250(gp250)、EGFR(ERBB1)、HER-2/neu(ERBB2)、インターロイキン13受容体α2鎖(IL13Ralpha2)、IL-6受容体、腸カルボキシルエステラーゼ(iCE)、α-フェトプロテイン(AFP)、M-CSF、mdm-2、MUC1、p53(TP53)、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU2AS、SOX10、STEAP1、サバイビン(BIRC5)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、テロメラーゼ、ウィルムス腫瘍遺伝子(WT1)、SYCP1、BRDT、SPANX、XAGE、ADAM2、PAGE-5、LIP1、CTAGE-1、CSAGE、MMA1、CAGE、BORIS、HOM-TES-85、AF15q14、HCA661、LDHC、MORC、SGY-1、SPO11、TPX1、NY-SAR-35、FTHL17、NXF2、TDRD1、TEX15、FATE、TPTE、免疫グロブリンイディオタイプ、ベンス・ジョーンズタンパク質、エストロゲン受容体(ER)、アンドロゲン受容体(AR)、CD40、CD30、CD20、CD19、CD33、癌抗原72-4(CA72-4)、癌抗原15-3(CA15-3)、癌抗原27-29(CA27-29)、癌抗原125(CA125)、癌抗原19-9(CA19-9)、β-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、β-2ミクログロブリン、扁平上皮癌抗原、ニューロン特異的エノラーゼ、熱ショックタンパク質gp96、GM2、サルグラモスチム、CTLA-4、707アラニンプロリン(707-AP)、T細胞4により認識される腺癌抗原(ART-4)、癌胚形成(carcinoembryogenic)抗原ペプチド-1(CAP-1)、カルシウム活性化塩素イオンチャネル-2(CLCA2)、シクロフィリンB(Cyp-B)、ヒト印環腫瘍-2(HST-2)、ヒトパピローマウイルス(HPV)タンパク質(HPV-E6、HPV-E7、メジャーまたはマイナーキャプシド抗原、その他)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)タンパク質(EBV潜在性膜タンパク質-LMP1、LMP2;その他)、B型肝炎またはC型肝炎ウイルスタンパク質、およびHIVタンパク質を含むが、これらに限定されない成分に特異的であり、これらに結合する。複合体は、前述のものをペプチド/ポリペプチドとして、および/またはこれらをコードするものをさらに含んでもよい。

【００７１】

本明細書において述べたように、様々な態様において、本発明の化合物は、感染因子の成分(例えば、抗原)に結合する標的化部分を含む。ここで、このような化合物は、生物活性薬剤にカップリングされ、対象において免疫刺激応答を(直接的/間接的のいずれかで)誘導する。概して、このような感染因子は、細菌、酵母、真菌、ウイルス、真核生物寄生生物などを含むが、これらに限定されない任意の病原体でよい。様々な態様において、本発明の化合物は、病原体/感染因子に存在する成分に向けられる標的化部分を含む。病原体/感染因子には、レトロウイルス科(Retroviridae)(例えば、ヒト免疫不全症ウイルス、例えば、HIV-1(HTLV-III、LAVまたはHTLV-III/LAV、またはHIV-IIIとも呼ばれる);および他の分離株、例えば、HIV-LP);ピコルナウイルス科(Picornaviridae)(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(Coxsackie)ウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス);カルシウイルス科(Calciviridae)(例えば、胃腸炎の原因となる株);トガウイルス科(Togaviridae)(例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス);フラビウイルス科(Flaviridae)(例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス);コロナウイルス科(Coronoviridae)(例えば、コロナウイルス);ラブドウイルス科(Rhabdoviradae)(例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス);フィロウイルス科(Filoviridae)(例えば、エボラウイルス);パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)(例えば、パラインフルエンザウイルス、おたふくかぜウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス);オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)(例えば、インフルエンザウイルス);ブニヤウイルス科(Bungaviridae)(例えば、ハンタンウイルス、ブンガ(bunga)ウイルス、フレボウイルスおよびナイロ(Nairo)ウイルス);アレナウイルス科(Arenaviridae)(出血熱ウイルス);レオウイルス科(Reoviridae)(例えば、レオウイルス、オルビウイルス(orbiviurses)およびロタウイルス);ビマウイルス科(Bimaviridae);ヘパドナウイルス科(Hepadnaviridae)(B型肝炎ウイルス);パルボウイルス科(Parvovirida)(パルボウイルス);パポバウ

イルス科(Papovaviridae)(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス);アデノウイルス科(Adenoviridae)(ほとんどのアデノウイルス);ヘルペスウイルス科(Herpesviridae)(単純ヘルペスウイルス(HSV)1および2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ヘルペスウイルス);ラウス肉腫ウイルス(RSV)、トリ白血病ウイルス(ALV)、およびトリ骨髄芽球症ウイルス(AMV))、ならびにC型B群(ネコ白血病ウイルス(FeLV)、テナガザル白血病ウイルス(GALV)、脾臓壊死ウイルス(SNV)、細網内皮症ウイルス(RV)およびサル肉腫ウイルス(SSV)を含む)、マソン・ファイザー・サルウイルス(MPMV)およびサルレトロウイルス1型(SRV-1)を含むD型レトロウイルス、レンチウイルス、T細胞白血病ウイルスおよびフォーミーウイルスの亜群を含む複合レトロウイルス、HIV-1、HIV-2、SIV、ビスナウイルス、ネコ免疫不全症ウイルス(FIV)、およびウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)、サルT細胞白血病ウイルス(STLV)、およびウシ白血病ウイルス(BLV)を含むレンチウイルス、ヒトフォーミーウイルス(HFV)、サルフォーミーウイルス(SFV)およびウシフォーミーウイルス(BFV)を含むフォーミーウイルス、ポックスウイルス科(Poxviridae)(痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス);ならびにイリドウイルス科(Iridoviridae)(例えば、アフリカブタ熱ウイルス);ならびに未分類のウイルス(例えば、海綿状脳症の病因因子、δ型肝炎因子(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非B肝炎因子(クラス1=内部伝播;クラス2=非経口伝播(すなわち、C型肝炎);ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス)、マイコバクテリウム属(Mycobacterium)(結核菌(Mycobacterium tuberculosis)、マイコバクテリウム・ボビス(M. bovis)、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ(M.avium-intracellulare)、らい菌(M.leprae))、肺炎球菌(Pneumococcus)、連鎖球菌属(Streptococcus)、ブドウ球菌属(Staphylcococcus)、ジフテリア菌、リステリア属(Listeria)、エリシペロスリクス属(Erysipelothrix)、炭疽菌(Anthrax)、破傷風菌、クロストリジウム属(Clostridium)、混合嫌気性菌、ナイセリア属(Neisseria)、サルモネラ属(Salmonella)、赤痢菌属(Shigella)、ヘモフィルス属(Hemophilus)、大腸菌、クレブシエラ属(Klebsiella)、エンテロバクター属(Enterobacter)、セラチア属(Serratia)、シュードモナス属(Pseudomonas)、ボルデテラ属(Bordatella)、野兎病菌(Francisella tularensis)、エルシニア属(Yersinia)、コレラ菌(Vibrio cholerae)、バルトネラ属(Bartonella)、レジオネラ属(Legionella)、スピロヘータ類(Spirochaetes)(トレポネーマ属(Treponema)、レプトスピラ属(Leptospira)、ボレリア属(Borrelia))、真菌、放線菌属(Actinomyces)、リケッチア属(Rickettsia)、マイコプラズマ属、クラミジア属(Chlamydia)、原生動物(エントアメーバ属(Entamoeba)、プラスモディウム属(Plasmodium)、リーシュマニア属(Leishmania)、トリパノソーマ属(Trypanosoma)、トキソプラズマ属(Toxoplasma)、ニューモシスチス属(Pneumocystis)、ババシア属(Babasia)、ジアルジア属(Giardia)、クリプトスポリジウム属(Cryptosporidium)、トリコモナス属(Trichomonas)を含む)、蠕虫類(Helminths)(トリキネラ属(Trichinella)、ウケレリア属(Wucheraria)、オンコセルカ属(Onchocerca)、シストソーマ属(Schistosoma)、線虫類(Nematodes)、条虫類(Cestodes)、吸虫類(Trematodes))が含まれるが、これらに限定されない。本発明の組成物の標的となり得る抗原のさらなる例は公知であり、例えば、米国特許出願第2007/0066554号に開示される。本発明のさらなる局面において、複合体は、標的化部分および免疫刺激核酸(nuclec acid)分子に加えて、本明細書に記載の抗原または細胞成分を含んでもよい。さらに本明細書の下記に記載のように、本発明の組成物は、標的化部分、免疫刺激核酸または関心対象のポリペプチドもしくはペプチドをコードする核酸、および感染因子に関連するペプチドまたはポリペプチド(抗原)を含んでもよい。複合体は、前述のものをペプチド/ポリペプチドとして、および/またはこれらをコードするものをさらに含んでもよい。さらに、DNAワクチン接種のために、免疫応答を増強するコード配列が送達され、腫瘍細胞ならびにDCにおいて発現される。

【００７２】

前述および下記のリストはそれぞれ例示であり、限定することを目的としない。

【００７３】

様々な態様において、本発明の化合物は、本明細書に記載の感染因子に対する標的化部

分、および免疫刺激核酸またはタンパク質分子である生物活性薬剤を含む。さらなる態様において、このような免疫刺激性生物活性薬剤は、SEQ ID NO:56～228に対応する1つまたは複数の核酸またはタンパク質分子を含む。さらに、この配列は、腫瘍細胞またはDC内でポリペプチドを発現させて免疫応答を増強するために複合体に含めることができる。なおさらなる態様において、本発明の化合物(例えば、複合体)は、同じまたは異なる生物活性薬剤の2つまたはそれ以上を含む。

【００７４】

標的化部分は、様々なタイプの感染因子に特有の特定の抗原に特異的でもよい。例えば、インフルエンザウイルスは、オルトミクソウイルス科のオルトミクソウイルス属に属し、らせん対称性を有するssRNAエンベロープウイルスである。エンベロープのある粒子は直径80～120nmである。RNAは核タンパク質(NP)と密接に会合して、らせん構造を形成している。ゲノムは、8つのRNA断片(インフルエンザCの場合、7つ)に分節している。4つの主要な抗原である血球凝集素(H)、ノイラミニダーゼ(N)、核タンパク質(NP)、およびマトリックス(M)タンパク質が存在する。NPは、3つの型A、B、およびCに生じる型特異的抗原であり、ヒトインフルエンザウイルスと非ヒトインフルエンザウイルスを分類する基礎をなしている。マトリックスタンパク質(Mタンパク質)はヌクレオキャプシドを囲み、粒子質量の35～45％を構成する。さらに、2種類の表面糖タンパク質が桿状の隆起として表面上に見られる。赤血球凝集素(H)は2つのサブユニットH1およびH2からなる。赤血球凝集素は、ウイルスが細胞受容体に付着するのを媒介する。ノイラミニダーゼ分子はエンベロープに少量存在する。インフルエンザAウイルスの血球凝集素およびノイラミニダーゼ抗原の抗原性の違いはサブタイプを分類する基礎となっている。例えば、A/香港/1/68(H3N2)は、1968年に患者から単離され、サブタイプH3N2ならびに特定の標的成分のインフルエンザAウイルスを表している。複合体は、前述のものをペプチド/ポリペプチドとして、および/またはこれらをコードするものをさらに含んでもよい。さらに、DNAワクチン接種のために、免疫応答を増強するコード配列が送達され、腫瘍細胞ならびにDCにおいて発現される。

【００７５】

従って、様々な態様において、本発明の化合物は、標的化部分、および感染因子を標的とする免疫応答を誘導する生物活性薬剤を含む。例えば、標的化部分は、xが1～9であり、yが1～16である任意のHxNyまたはxyのその任意の組み合わせのインフルエンザウイルスA型に特異的でもよい。例えば、1つの態様において、本発明の化合物は、抗原、例えば、インフルエンザAサブタイプH1N5を含む抗原または融合ペプチドに結合する、標的化部分を含む。

【００７６】

1つの態様において、感染因子成分に特異的な標的化部分はエピトープを認識する。本明細書で使用する「エピトープ」という用語は、動物、好ましくは、哺乳動物、最も好ましくは、ヒトにおいて抗原活性または免疫原活性を有するポリペプチドの一部を指す。本明細書で使用する「免疫原性エピトープ」は、当技術分野において公知の任意の方法によって確かめられるように、動物において抗体応答を誘発する、またはT細胞応答を誘導する、ポリペプチドの一部と定義される(例えば、Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998 4002(1983)を参照されたい)。本明細書で使用する「抗原性エピトープ」という用語は、当技術分野において周知の方法によって確かめられるように、抗体がその抗原に免疫特異的に結合することができる、タンパク質の一部と定義される。免疫特異的結合は非特異的結合を除くが、必ずしも、他の抗原との交差反応性を除くとは限らない。抗原性エピトープは、必ずしも、免疫原性である必要はない。抗原性エピトープはT細胞エピトープでもよく、この場合、T細胞受容体はMHC分子の中でT細胞エピトープに免疫特異的に結合することができる。エピトープは、エピトープに特有の空間高次構造において3個のアミノ酸を含むことがある。一般的に、エピトープは、少なくとも約5個のこのようなアミノ酸からなり、さらに通常は、少なくとも約8～10個のこのようなアミノ酸からなる。エピトープが有機分子であれば、ニトロフェニルと同じくらい小さい場合がある。

【００７７】
本発明の複合体の標的化部分は、感染因子に関連する公知の抗原に特異的でもよい。<fda.gov/cber/products/testkits.htm>(HIV、HBV、HTLVを含む、市販の抗体/アッセイが利用可能な様々な抗原を列挙している)を参照されたい。さらに、標的成分のさらなる例は、米国特許出願公開第20070172881号(真菌);同第20070166319号(HPV);同第20060252132号(インフルエンザ変異体);同第20060115497号(マイコバクテリウム属);米国特許第5,378,805号(HTLV);同第20060099219号(HPV):同第20070154883号(風疹);同第7,060,283号(エプスタイン・バーウイルス);同第7,232,566号(HIV);同第7,205,101号(HIV);および同第6,878,816号(ボレリア属(Borrelia))に開示される。複合体は、前述のものをペプチド/ポリペプチドとして、および/またはこれらをコードするものをさらに含んでもよい。さらに、DNAワクチン接種のために、免疫応答を増強するコード配列が送達され、腫瘍細胞ならびにDCにおいて発現される。

【００７８】
A.抗体
1つの態様において、本発明の組成物は標的化部分を含み、標的化部分は、生物活性薬剤(例えば、免疫応答を誘導する核酸分子、所望のペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸分子、ペプチドおよび抗原)と会合した(例えば、複合化した)ポリペプチドである。ある特定の態様において、抗体は、同じタイプまたは異なるタイプの生物活性薬剤の2つ、3つ、または4つとカップリングされる。例えば、ある態様において、本発明の組成物は、免疫刺激性の非コード核酸分子、および免疫刺激性のペプチド、ポリペプチド、またはPNAにカップリングされた標的化部分を含む。

【００７９】
ある態様において、本発明の組成物は、タグ(例えば、ヒスタジン(histadine)タグ)にカップリングされた標的化部分を含む。別の態様において、組成物は、標的化部分、核酸分子、およびタグ(例えば、ビオチン/アビジン)を含む。さらなる態様において、抗原性のペプチドまたはポリペプチドを含む融合タンパク質上にあるタグに抗体が結合することができる。

【００８０】
1つの態様において、複合体のポリペプチド分子は免疫グロブリンである。本明細書で使用する「免疫グロブリン」という用語は、天然または人工の一価抗体または多価抗体を含み、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーにより産生されたフラグメント、抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、および前記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを含むが、これらに限定されない。本明細書で使用する「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を指す。本発明の免疫グロブリン分子は、任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、任意のクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)、または任意のサブクラスの免疫グロブリン分子でよい。

【００８１】
本発明の複合体は、その抗体標的化部分を介して、腫瘍細胞の細胞成分、腫瘍血管系または腫瘍微小環境に結合し、それにより、生存シグナルの阻害(例えば、増殖因子もしくはサイトカインもしくはホルモン受容体のアンタゴニスト)、デスシグナルの活性化、および/または免疫を介した細胞傷害、例えば、抗体依存性細胞傷害によって標的細胞のアポトーシスを促進する。このような複合体は、腫瘍細胞を阻止、低減、または排除するいくつかの機構、例えば、複合化されたINASの腫瘍標的への送達を容易にする、例えば、標的細胞受容体に結合する抗体の、受容体を介したエンドサイトーシスを介して容易にする機構;抗体結合腫瘍標的から免疫細胞へのINASおよび免疫原性アポトーシス材料の送達を、Fcと(免疫細胞上の)Fc受容体との相互作用を介して容易にする機構を介して機能しても

よい。これは、エンドサイトーシスおよびエンドソームパターン認識受容体(例えば、Toll様受容体)の活性化を介してINASの内部移行を促進する。または、このような複合体は、Fcと(免疫細胞上の)Fc受容体との相互作用を介して、および複合化されたINASを介して、免疫細胞(例えば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞)を動員、結合、活性化、および/または活性化することができる。さらに、場合によっては、前述の経路の1つまたは複数は、本発明の1つまたは複数の複合体が投与された時に動いてもよい。

【００８２】

本発明の抗体は、Fab、Fab'およびF(ab')2、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド連結Fv(sdFv)、ならびにVLまたはVHドメインのいずれかを含むフラグメントを含むが、これらに限定されない、抗体フラグメントを含む。単鎖抗体を含む抗原結合抗体フラグメントは、可変領域のみ、またはヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメインの全体もしくは一部と組み合わせて含んでもよい。可変領域とヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメインの任意の組み合わせも含む抗原結合フラグメントも本発明に含まれる。Fcフラグメント、抗原-Fc融合タンパク質、およびFc-標的化部分複合体または融合産物(Fc-ペプチド、Fc-アプタマー)も本発明に含まれる。本発明の抗体は、トリおよび哺乳動物を含む任意の動物に由来してもよい。1つの局面において、抗体は、ヒト、ネズミ(例えば、マウスおよびラット)、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。さらに、このような抗体は、動物抗体のヒト化バージョンでもよい。本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、またはそれより多い多重特異性でもよい。

【００８３】

本発明の抗体は、当技術分野において公知の任意の適切な方法によって作製することができる。関心対象の抗原に対するポリクローナル抗体は、当技術分野において周知の様々な手順によって作製することができる。例えば、本発明のポリペプチドを、ウサギ、マウス、ラットなどを含むが、これらに限定されない様々な宿主動物に投与して、抗原に特異的なポリクローナル抗体を含有する血清の生成を誘導することができる。免疫応答を高めるために、宿主種に応じて様々なアジュバントを使用することができる。アジュバントには、フロイント(完全および不完全)、無機質ゲル、例えば、水酸化アルミニウム、界面活性物質、例えば、リゾレシチン、プルロニック(pluronic)ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、および潜在的に有用なヒトアジュバント、例えば、BCG(カルメット・ゲラン桿菌)およびコリネバクテリウム・パルバム(Corynebacterium parvum)が含まれるが、これらに限定されない。このようなアジュバントも当技術分野において周知である。さらに、抗体および抗体様結合タンパク質はファージディスプレイによって作ることができる。さらに、抗体は、当技術分野において公知のように、植物において作製することができる。

【００８４】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む当技術分野において公知の多種多様な技法を用いて調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野において公知であり、例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier, N.Y., 1981)に開示されたものを含むハイブリドーマ技法を用いて作製することができる。本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術によって作製された抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含む単一クローンに由来する抗体を指し、作製方法を指さない。

【００８５】

モノクローナル抗体は、ただ1つの抗原部位に対して作られているので高特異性である。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、それぞれのモノクローナル抗体は、抗原にあるただ1つの決定基に対し

て作られている。モノクローナル抗体は、その特異性に加えて、他の抗体に汚染されずに合成できる点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、抗体が実質的に均一な抗体集団から得られているという特徴を示し、特定の方法による抗体作製を必要すると解釈してはならない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は、Kohler, et al(1975) Nature 256:495によって最初に述べられたハイブリドーマ法によって作製されてもよく、組換えDNA法によって作成されてもよい(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al(1991)Nature 352:624-628およびMarks et al(1991)J. Mol. Biol. 222:581-597に記載の技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーからも単離することができる。

【００８６】

本明細書においてモノクローナル抗体は、具体的には、所望の生物学的活性を示す限り、重鎖および/または軽鎖の一部が、ある特定の種に由来する抗体またはある特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残りが、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体ならびにこのような抗体のフラグメントを含む(米国特許第4,816,567号;およびMorrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855)。本明細書において関心対象のキメラ抗体は、非ヒト霊長類(例えば、旧世界ザル、類人猿など)に由来する可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む。

【００８７】

モノクローナル抗体(MAb)を作製するために様々な方法が用いられている。1種類の抗体を産生するクローニング細胞株を指すハイブリドーマ技術では、マウス(ネズミ)、ハムスター、ラット、およびヒトを含む様々な種の細胞が用いられる。別のMAb作製法では、組換えDNA法を含む遺伝子工学が用いられる。これらの技法から作られるモノクローナル抗体には、とりわけ、キメラ抗体およびヒト化抗体が含まれる。キメラ抗体は、複数のタイプの種に由来するDNAコード領域を組み合わせている。例えば、キメラ抗体の可変領域はマウスに由来してもよく、定常領域はヒトに由来してもよい。ヒト化抗体は、非ヒト部分を含有するが、主にヒトに由来する。キメラ抗体と同様に、ヒト化抗体は、完全にヒトの定常領域を含有してもよい。しかし、キメラ抗体とは異なり、可変領域は部分的にヒトに由来してもよい。ヒト化抗体の非ヒト合成部分は、マウス抗体のCDRに由来することが多い。いずれにしても、これらの領域は、抗体が、特定の抗原を認識し、結合するのに重要である。ネズミ抗体は診断および短期療法に有用であるが、有害な免疫原性応答のリスクを高めることなく長期間ヒトに投与することはできない。この応答はヒト抗マウス抗体(HAMA)と呼ばれ、ヒト免疫系がマウス抗体を異物として認識し、攻撃する時に起こる。HAMA応答は毒性ショック、さらには死を引き起こすことがある。キメラ抗体およびヒト化抗体は、投与される抗体の非ヒト部分を最小限にすることによってHAMA応答の可能性を少なくしている。さらに、キメラ抗体およびヒト化抗体は、二次ヒト免疫応答、例えば、抗体依存性細胞傷害を活性化するというさらなる利点を有し得る。

【００８８】

「抗体フラグメント」は、例えば、抗原結合領域またはその可変領域を含む、インタクトな抗体の一部を含む。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')2、およびFvフラグメント;Fcフラグメントまたはfc-融合産物;ダイアボディ;直鎖抗体;単鎖抗体分子;および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が含まれる。

【００８９】

「インタクトな」抗体は、抗原結合可変領域ならびに軽鎖定常ドメイン(CL)および重鎖定常ドメイン、CH1、CH2およびCH3を含む抗体である。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)、そのアミノ酸配列変異体、または他の任意の改変Fc(例えば、グリコシル化もしくは他の操作されたFc)でもよい。

【００９０】

インタクトな抗体は、抗体のFc領域(天然配列Fc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域

または他の任意の改変Fc領域)に起因する生物学的活性を指す、1つまたは複数の「エフェクター機能」を有してもよい。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合;補体依存性細胞傷害;Fc受容体結合;抗体依存性細胞傷害(ADCC);ファゴサイトーシス;細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体;BCR)のダウンレギュレーションなどが含まれる。

【００９１】

重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、インタクトな抗体は異なる「クラス」に割り当てることができる。インタクトな抗体の5種類の主なクラス体:IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのいくつかは、「サブクラス」(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2にさらに分けることができる。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、Δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元配置は周知である。

【００９２】

様々な態様において、抗体/標的化部分は、(抗体内の)Fcと(免疫細胞上の)Fc受容体との相互作用を介して、および抗体/ペプチド/リガンドまたは他の標的化部分の場合、複合化されたINASを介して、免疫細胞(例えば、NK細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞)の動員、結合、および/または活性化を行う。本発明の組成物および方法に組み込むことができる抗体の例には、セツキシマブ(上皮細胞成長因子受容体EGFRに対するキメラモノクローナル抗体)、パニツムマブ(抗EGFR)、ニモツズマブ(nimotuzumab)(抗EGFR)、B8、リツキシマブ(キメラマウス/ヒト抗CD20 MAb);ハーセプチン、トラスツズマブ(抗Her2 hMAb);Panorex@(17-1A)(ネズミモノクローナル抗体);Panorex@(17-1A)(キメラネズミモノクローナル抗体);IDEC-Y2B8(マウス、抗CD20 MAb);BEC2(抗イディオタイプMAb、GDエピトープを模倣する)(BCGを含む);オンコリム(Oncolym)(Lym-1モノクローナル抗体);SMART MI95 Ab、ヒト化13' ILYM-1(Oncolym)、オバレックス(Ovarex)(B43.13、抗イディオタイプマウスMAb);MDX-210(ヒト化抗HER-2二重特異性抗体);腺癌上のEGP40(17-1A)パンカルシノーマ(pancarcinoma)抗原に結合する3622W94 MAb;抗VEGF, RhuMab(アバスチン(Avastin);血管新生阻害);ゾナパックス(Zenapax)(SMART抗Tac(IL-2受容体);SMART MI95Ab、ヒト化Ab、ヒト化);MDX-210(ヒト化抗HER-2二重特異性抗体);MDX-447(ヒト化抗EGF受容体二重特異性抗体);NovoMAb-G2(パンカルシノーマ特異的Ab);TNT(ヒストン抗原に対するキメラMAb);TNT(ヒストン抗原に対するキメラMAb);グリオマブ(Gliomab)-H(モノクローナルヒト化Ab);GNI-250 Mab;EMD-72000(キメラ-EGFアンタゴニスト);リンホシド(LymphoCide)(ヒト化LL2抗体);およびMDX-260二重特異性、標的GD-2、ANA Ab、SMART lDlO Ab、SMART ABL 364 Ab、またはImmuRAIT-CEAなどの抗体が含まれるが、これらに限定されない。前述のリストに例示されるように、ある特定の標的エピトープに対する抗体を作ることは従来からある。

【００９３】

A.アプタマー

本発明の1つの局面において、標的化部分は、免疫刺激性配列に連結されたアプタマー分子である。例えば、ある態様において、アプタマーは標的化部分として機能する核酸からなり、1つまたは複数の免疫刺激核酸にカップリングされるか、1つまたは複数の免疫刺激核酸をさらに含む。様々な態様において、本発明の組成物は、腫瘍細胞、腫瘍血管系、および/または腫瘍微小環境上の分子に特異的なアプタマーを含む。さらに、このような組成物は生物活性薬剤(例えば、核酸またはペプチド)を含む。しかしながら、アプタマーそれ自体が、標的化モジュール(配列)に加えて、標的細胞に対する免疫応答を誘導することができる生物学的に活性な配列からなってもよいことが明らかになるはずである。言い換えると、このようなアプタマー分子は、本発明の二重用途(dual use)組成物である。ある態様において、本発明の組成物はアプタマーと抗体との複合化を含み、アプタマーおよび抗体は、腫瘍細胞、腫瘍血管系、腫瘍微小環境、および/または免疫細胞上の別個の分子に結合する特異性をもつ。

【００９４】

「アプタマー」という用語は、ある特定の分子に特異的に結合する特性に基づいて選択された、DNA、RNA、またはペプチドを含む。例えば、本明細書において開示されるように

、腫瘍細胞、腫瘍血管系、腫瘍微小環境、および/または免疫細胞にある、ある特定の遺伝子または遺伝子産物に結合するように、アプタマーを選択することができる。ここで、選択は、当技術分野において公知の、および当業者によく知られている方法によって行われる。その後に、免疫応答を調整または調節するために、アプタマーを対象に投与することができる。

【００９５】

ある特定のタンパク質、DNA、アミノ酸、およびヌクレオチドに対して親和性を有するアプタマーが述べられている(例えば、K. Y. Wang, et al., Biochemistry 32:1899-1904 (1993); Pitner et al., 米国特許第5,691,145号; Gold, et al., Ann. Rev. Biochem. 64:763-797 (1995); Szostak et al., 米国特許第5,631,146号)。コンビナトリアルライブラリーから高親和性および高特異性の結合アプタマーが得られている(前記, Gold, et al.)。アプタマーは、使用した選択に応じてμMからnM以下の平衡解離定数を有する高親和性を有してもよい。アプタマーはまた高選択性を示してもよく、例えば、7-メチルgとg(Haller and Sarnow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8521-8526(1997))、またはD-トリプトファンとL-トリプトファン(前記, Gold et al.)を1000倍差で識別する。

【００９６】

本発明のさらに別の局面によれば、免疫障害、炎症性疾患、感染症、および腫瘍性障害/癌より選択される疾患または状態の、診断用、検出用、および/もしくは画像化用の製品ならびに/または予防用および/もしくは治療用の医用薬剤を製造するための、前記で定義した化合物またはアプタマーの使用が提供される。腫瘍性障害/癌には、頭頚部癌、気道消化癌、胃腸癌、食道癌、胃癌(stomach/gastric cancer)、膵臓癌、肝胆道癌/肝癌、結腸直腸癌、肛門癌、小腸癌、尿生殖器癌、泌尿器癌、腎臓癌(renal/kidney cancer)、膀胱癌、尿管癌、精巣癌、尿道癌/陰茎癌、婦人科癌、卵巣癌/ファロピウス管癌、腹膜癌、子宮癌/子宮内膜癌、子宮頚/膣/外陰の癌、妊娠性絨毛疾患、前立腺癌、骨癌、肉腫(軟部組織/骨)、肺癌、中皮腫、縦隔癌、乳癌、中枢神経系癌、脳癌、黒色腫、血液悪性腫瘍、白血病、リンパ腫(ホジキン疾患および非ホジキンリンパ腫)、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、グリア芽細胞腫、形質細胞新生物、骨髄腫、骨髄異形成症候群、内分泌腫瘍、皮膚癌、黒色腫、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、膵臓内分泌癌、カルチノイド、多発性内分泌腫瘍、AIDS関連悪性腫瘍、原発部位が分からない癌、ならびに様々な小児期癌が含まれるが、これらに限定されない。

【００９７】

本発明の別の局面によれば、本発明の化合物、アプタマー、または組成物を含む、免疫障害、炎症性疾患、感染症、および腫瘍性障害/癌より選択される疾患または状態の予防、治療、診断、検出および/または画像化のためのキットが提供される。

【００９８】

従って、本発明の様々な態様のために、特定の分子標的化に基づいて1つまたは複数のアプタマー(例えば、EGFRまたは他の癌マーカーを標的とするアプタマー)が選択される。標準的なインビトロ選択手順、例えば、全て従うことができる、または当技術分野において公知の改良および改善を加えて行うことができる、Science 249 (4968) 505-510 (1990)およびNature (London), 346 (6287) 818-822(1990)に記載のselex実験が公知である。例えば、標的配列の断片を、hi trapカラム(nhs活性化)(選択用カラム,Pharmacia biotechにより提供)に、製造業者の説明書に従って結合させる。このカラムは、第一級アミノ基、例えば、ポリペプチドの末端アミノ基を有する化合物と共有結合を形成する。DNAテンプレートプール(ライブラリー)をクロマトグラフィーカラムに添加し、標的ペプチドと室温で約1時間反応させる。結合しなかったアプタマーを除去するためにカラムを洗浄し、結合したアプタマーを溶出緩衝液(3M チオシアニトナトリウム(sodium thiocyanite))で溶出させる。次いで、溶出した試料をnap-10カラム(Pharmacia biotechにより提供)で脱塩し、最後に、エッペンドルフ内で滅菌水で溶出させる。その後に、これらを凍結乾燥し、ポリメラーゼ連鎖反応(「pcr」)のために乾燥オリゴヌクレオチドを調製するために、pcr試薬を乾燥オリゴヌクレオチドに添加する。pcrは、56℃のアニーリング温度を用いて9

9サイクル行う。pcr法の後に、この増幅から生じたDNAをクロマトグラフィーカラムに添加し、次回の選択に使用する。これらの選択および増幅を連続して10回行う。得られた最終産物は約100μlのPCR産物であった。

【００９９】

10回の選択および増幅の後に、所望の標的分子(例えば、EGFR)に対して親和性を有するDNA親和性をスクリーニングするために、プールをクローニングする(ta topo クローニングキット, Invitrogen, UK)。個々のクローンを、アニーリング温度48℃、35サイクル、m13プライマーを用いる一般的なpcrプロトコールを用いて特徴付け、2.5%アガロースゲル上で視覚化する。その後に、陽性クローンを、アンピシリンの存在下でlb培地において増殖させ、標準的なプラスミドDNA単離キット(Quiagen, UK)を用いて単離する。プールを、標準的なird-800放射性方法(sequitherm excel ii, epicentre technologies, Madison, USA)を用いてさらに配列決定する。

【０１００】

このように、標的分子(例えば、癌マーカー、例えば、EGFR)に特異的なアプタマーが選択される。このような標的は、前記のようなアプタマーの同定において、支持体に結合することができる。例えば、標的ペプチドを、クロマトグラフィーカラム内の官能化セファロース(sepharose)ビーズに固定化する。従って、結合したアプタマーはカラム内に保持され、結合しなかったアプタマーまたは弱く結合しているアプタマーは洗い流される。次いで、PCR増幅のために、強く結合しているアプタマーを取り出すことができる。最も強く結合しているアプタマーを区別するために、カラム選択/増幅の工程を繰り返すことができる。異なるアプタマー集団が連続した各サイクルに存在し、最初に、大きな集団が存在することが理解されるはずである。競合結合によって親和性を成熟させるために、全プロセスを、例えば、選択および増幅を連続10回繰り返すことができる。結果として生じた最終アプタマーをクローニングおよび配列決定することができ、高い親和性および特異性のある成功したアプタマーを同定することができる。他の選択/増幅サイクル数を使用することができる。

【０１０１】

本発明の強く結合したアプタマーは多くのやり方で使用することができる。例えば、強く結合したアプタマーは、標的分子が発生する疾患または状態の治療および/または予防において使用することができる。強く結合したアプタマーはまた、例えば、インビトロまたはインビボでの方法または試験による、このような疾患および状態の診断または検出において使用することができる。特に、本発明のアプタマーは、他の薬剤を標的の近くに向けるのに使用することができる。従って、アプタマーは、細胞を死滅させるもしくは細胞にダメージを与える薬剤および/またはインビトロもしくはインビボで標的濃度を位置づけるために検出することができる薬剤に結合されてもよい。様々な態様において、腫瘍/癌細胞または腫瘍血管系または腫瘍微小環境の成分を標的とするアプタマーは1つまたは複数の免疫刺激性配列に複合化される。他の態様において、腫瘍を標的とするアプタマーそれ自体が、1つまたは複数の免疫刺激核酸配列(免疫刺激性アプタマー)からなってもよい。1つの局面において、免疫刺激性アプタマーは抗体に複合化されてもよく、アプタマーおよび/または抗体は、腫瘍細胞/腫瘍血管系/腫瘍微小環境または免疫細胞(例えば、マクロファージもしくは樹状細胞もしくはその他)の異なる成分に結合することができる。これにより、腫瘍細胞の異なる成分を二重特異的または多重特異的に標的化すると同時に、標的細胞に対する免疫応答を活性化することが可能になる。

【０１０２】

例えば、メチオニンアームのカルボキシル基またはポルフィリン上にあるカルボキシル基を、標的化アプタマーを取り付ける点として使用することができる。この基は、アプタマー上のアミノ基を介して複合体を取り付けるペプチド結合による方法を使用することを可能にする。このように、腫瘍療法のための治療部分を運ぶ(例えば、免疫刺激性配列または放射性同位体などを運ぶ)アプタマーを作製することができる。このような結合法は穏やかな条件下で進行し、複数の複合体を1つのアプタマーに付加できるので魅力的であ

る。このようにして、1つまたは複数の治療部分の高い局所濃度を腫瘍部位に実現することができる。前記の標識プロトコールに用いられるポルフィリンリガンドは市販されているか、確立した方法、例えば、tetrahedron, 1997, 53, 6755-6790に記載の方法を用いて合成される。

【０１０３】

従って、様々な態様において、アプタマーは標識部分に連結されてもよい。例えば、使用される標識に応じて、広範囲の物理学的技法を用いて、例えば、吸収分光法、質量分析法、ローダミンおよびフルオレセインなどの蛍光標識の場合は、蛍光分光法、ならびにMRI活性標識の場合は緩和時間測定法によって、アプタマー複合体の標識を確認することができる。

【０１０４】

アプタマー標識は、標準的なペプチド結合プロトコールを用いて実施することができる。例えば、0.01mmol(0.004g)の化合物11または0.01mmol(0.009g)のポルフィリンを0.5cm^3水および0.5cm^3dmfに溶解する。この溶液に、0.002gのedciを添加し、室温で15分間攪拌する。1cm^3水に溶解した1当量のアプタマーを添加し、反応を1時間進める。試料をゲル濾過カラム(nap-10)にアプライし、12cm^3PBS(リン酸緩衝食塩水)を用いて複合体を溶出させる。1cm^3画分を集め、複合体を含有する画分を組み合わせる。

【０１０５】

標的化のために、放射性標識アプタマーを調製することができる。治療剤または診断剤としてのアプタマーの効力を評価するために、放射性核種が発生装置となるので、リガンドに放射性核種を付加し、次いで、アプタマーにカップリングし、すぐに投与する。または、最初にリガンドをアプタマーにカップリングし、次いで、放射性核種の付加は投与前にしか行わない。各投与後および治療中のガンマカメラ下でのモニタリングは、診断試薬または治療試薬としてのアプタマーの効力の証拠となるだろう。

【０１０６】

本発明の方法はDNAアプタマーに限定されないことが理解されるはずである。他のタイプのオリゴヌクレオチド、例えば、RNA、ピラノシルRNA(pRNA)、および修飾部分、例えば、非天然塩基または修飾天然塩基を含むオリゴヌクレオチドにも適用することができる。従って、ある態様において、アプタマー分子は、DNA、RNA、pRNAと治療部分からなる。

【０１０７】

本発明の別の局面において、アプタマーは、1つもしくは複数の治療部分および/または1つもしくは複数の標識部分に連結することができる多価官能化アプタマー分子を提供する。官能化アプタマーは、取り付けられた1つのリガンドを有してもよい。しかしながら、複数のリガンドをアプタマーに取り付ける、および/または複数のアプタマーをリガンドに取り付けることができる。5個のリガンドおよび4個のアプタマーを含む単位を以下に摸式的に示した。3'末端および5'末端の両方に修飾を有するアミノ修飾アプタマーを使用する。例えば、4個のアプタマー認識単位が関与してもよく、dotaの4個のカルボキシ基へのペプチド結合を介して、利用可能な全てのカップリング部位へのカップリングを可能にするために過剰なアプタマー出発物(dotaに対して4倍以上のアプタマー)と標準的なペプチド結合反応を用いて取り付けられる。次いで、Mag3(または他の任意のリガンド、例えば、リガンド9または他の市販のリガンド)を、アプタマーのもう一方の末端にカップリングして、標的化部分および/または治療部分(例えば、免疫刺激核酸、抗体、免疫刺激分子、細胞傷害剤、および/または放射性核種)が付加している5個のリガンドを効果的に運ぶ4アプタマー複合体を得る。

【０１０８】

多価アプローチは、細胞標的に送達され得る治療効果の量または頑健性(robustness)を高める。さらに、このようなアプローチはまた、アプタマー-治療部分分子の安定性(例えば、ヌクレアーゼ耐性)を高め、アプタマー半減期を延ばして、体内で活性なままにすることができる。さらに、多価性は、アプタマー治療剤のサイズを大きくする。例えば、4個のアプタマーを一緒に連結することによって、分子のサイズは効果的に大きくなる(個

々の単位で10kdaではなく、合計で約40kdaになる)。従って、系からのクリアランスは限定され、さらなる有用な循環時間が得られる。このような修飾アプタマーの循環時間は数時間の場合があり、これは、関連する放射性核種の半減期と一致するか、またはこれを上回る。

【０１０９】

前記から明らかなはずであるので、本発明のアプタマーまたはそのバリエーションは、様々な用途、例えば、療法または診断のために別の化合物に接続することができる。アプタマーは、例えば、イオン結合もしくは共有結合、または他のやり方、例えば、水素結合によって、リガンド、例えば、本明細書に開示のリガンドに接続することができる。従って、アプタマーはリガンドを標的にガイドすることができる。アプタマーは、好ましくは、リガンドに直接的に接続される。具体的には、アプタマーは、ペプチドテザー(tether)を用いることなくリガンドに結合されてもよい。アプタマーは、ペンタント部分、例えば、アミノ基またはヒドロキシル基によって、リガンドまたは他の薬剤に接続されてもよい。いくつかの他の薬剤が同じアプタマーに取り付けられてもよく、いくつかのアプタマーが同じ薬剤に取り付けられてもよい。アプタマーは、mag2(メルカプトアセチルジグリセリン)、mag3(メルカプトアセチルトリグリセリン)、hynic(ヒドラジノニコチン酸)、n.sub.4-キレート剤、ヒドラジノ型キレート剤およびチオール含有キレート剤などのリガンドに連結することができる。特に、アプタマーを官能化するために、dotaおよび関連するサイクレン由来リガンドが適している。また、アプタマーは、蛍光基またはリン光基およびMRI薬剤に連結することができる。例には、フルオレセイン、ローダミン、ビオチン、シアニン、アクリジン、ジゴキシゲニン-11-dutp、およびランタニドが含まれる。

【０１１０】

C.ペプチド

本発明のある局面において、生物活性薬剤を送達するための標的化部分はペプチドである。例えば、INASを、癌または腫瘍細胞の成分に結合することができるペプチドに複合化することができる。従って、このような本発明の複合体は、腫瘍細胞の細胞成分、腫瘍血管系、および/または腫瘍微小環境の成分に結合するペプチド標的化部分を含む。ある態様において、標的化部分ペプチドは、インテグリンのアンタゴニストまたはアゴニストでもよい。インテグリンはαおよびβサブユニットを含み、

$\forall_1\beta_1$, $\forall_2\beta_1$, $\forall_3\beta_1$, $\forall_4\beta_1$, $\forall_5\beta_1$, $\forall_6\beta_1$,

$\forall_7\beta_1$, $\forall_8\beta_1$, $\forall_9\beta_1$, $\forall_1\beta_1$, $\forall_6\beta_4$, $\forall_4\beta_7$, $\forall_D\beta_2$, $\forall_D\beta_2$, $\forall_L\beta_2$, $\forall_M\beta_2$, $\forall_v\beta_1$, $\forall_v\beta_3$, $\forall_v\beta_5$, $\forall_v\beta_6$, $\forall_v\beta_8$, $\forall_x\beta_2$, $\forall_{IIb}\beta_3$, $\forall_{IELb}\beta_7$,

など

を含む非常に多くのタイプを含む。

【０１１１】

1つの態様において、標的化部分は$\alpha_v\beta_3$である。インテグリン$\alpha_v\beta_3$は様々な細胞で発現し、骨マトリックスへの破骨細胞の接着、血管平滑筋細胞の遊走、および血管新生を含む、いくつかの生物学的に関連するプロセスを媒介することが示されている。適切なインテグリン標的化分子には、他のインテグリン、例えば、

$\forall_4.\beta_1$ (VLA-4), $\forall_4.\beta_7$ (例えば、U.S. Pat. No. 6,365,619; Chang et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:159-163 (2002)

Lin et al., Bioorganic & Medicinal Chem Lett, 12:133-136(2002)を参照されたい)などの、RGDペプチドまたはペプチドミメティックならびに非RGDペプチドまたはペプチドミメティック(例えば、米国特許第5,767,071号および同第5,780,426号を参照されたい)が含まれる。

【０１１２】

本発明の特定の態様において、標的化部分ペプチドはファージディスプレイまたは他の供給源から得られてもよく、

αvβ1インテグリン(CRRETAWAC (SEQ ID NO:5)), αvβ3インテグリン
(CDCRGDCFC (SEQ ID NO:6)/RGD-4C; RGDWXE (SEQ ID NO:7)), αvβ5インテグリン(TRGDTF
(SEQ ID NO:8)), αvβ6 (RGDLxxL (SEQ ID NO:9) or xxDLxxL (SEQ ID NO: 10)), αIIβ3 (SRGDM (SEQ ID
NO:11)),αvβ5に対するアネキシンV模倣物(VVISYSMPD (SEQ ID NO:12)), E-セレクチン(IELLQAR (SEQ ID
NO:13)), 内皮細胞ミトコンドリア(CNGRC-GG-(KLAKLAK)2 (SEQ ID NO:14)), エフリン-A2およびエフリン-A4
(CVSNPRWKC (SEQ ID NO:15), CHVLWSTRC (SEQ ID NO:16)),フィブロネクチン(CWDDGWLC (SEQ ID
NO:17)), ICAM-Iまたはフォンウィルブランド因子(CPCFLLGCC (SEQ ID NO:18)/ LLG-4C),ラミン-1(DFKLFAVY
(SEQ ID NO:19)),P-セレクチン(EWVDV (SEQ ID NO:20)), MMP-9:インテグリン複合体(D/E)(D/E)(G/L)W (SEQ
ID NO:21), MMP-9 およびMMP-2 (ゼラチナーゼ) (CTTHWGFTLC (SEQ ID NO:22)),内皮上のI型カドヘリン
(N-Ac-CHAVC-NH2), VEGFのF1t-1領域 NxxEIExYxxWxxxxxY(SEQ ID NO:23),
VEGFのKDR領域(HTMYYHHYQHHL (SEQ ID NO:24), ATWLPPR(SEQ ID NO:25)), VEGF 受容体
(WHSDMEWWYLLG (SEQ ID NO:26), RRKRRR (SEQ ID NO:27),アミノペプチダーゼ N/CD13 (NGR), NG2
プロテオグリカン(TAASGVRSMH (SEQ ID NO:28), LTLRWVGLMS (SEQ ID NO:29)), 副腎由来ペプチド
(LMLPRAD (SEQ ID NO:30)), 脂肪組織由来ペプチド(CKGGRAKDC SEQ ID NO:31)),
脳由来ペプチド(SRl), 脳内皮由来ペプチド (CLSSRLDAC (SEQ ID NO:32)), 神経膠腫細胞由来ペプチド
(VGLPEHTQ (SEQ ID NO:33)), 神経芽細胞腫由来ペプチド (VPWMEPAYQRFL (SEQ
ID NO:34)),骨髄由来ペプチド(GGG, GFS, LWS), 乳癌(HER2/neu)由来ペプチド(
LTVxPWx (SEQ ID NO:35), LTVxPWY (SEQ ID NO:36), HER2 Ab/トラスツズマブミモトープ –
LLGPYELWELSH (SEQ ID NO:37)), 結腸由来ペプチド (RPMC (SEQ ID NO:38)), 腸由来ペプチド
(YSGKWGW (SEQ ID NO:39)), 頭頚部扁平上皮細胞癌由来ペプチド
(TSPLNIHNGQKL (SEQ ID NO:40)), 肺血管系由来ペプチド(CGFELETC(SEQ ID NO:41)),
冠動脈内皮由来ペプチド(NSVRDL(G/S) (SEQ ID NO:42), NSVSSx(S/A) (SEQ ID NO:43)),
リンパ管由来ペプチド(CGNKRTRGC (SEQ ID NO:44)/ Lyp-1), 多臓器由来ペプチド
(GVL, EGRx (SEQ ID NO:45), xFG(G/V) (SEQ ID NO:46)), 膵島由来ペプチド(CVSSNPRWKC
(SEQ ID NO:47), CHVLWSTRC (SEQ ID NO:48)), 膵臓由来ペプチド(SWCEPGWCR (SEQ ID
NO:49)), 前立腺由来ペプチド(AGG, DPRATPGS (SEQ ID NO:50), SMSIARL (SEQ ID NO:51),
CGRRAGGSC (SEQ ID NO:52), GVL), 網膜由来ペプチド(RDV, CSCFRDVCC (SEQ ID NO:53)),
催奇形物質リガンド由来ペプチド(TPKTSVT (SEQ ID NO:54)), および子宮由来ペプチド(GLSGGRS (SEQ
ID NO:55))

を含むが、これらに限定されない。

【０１１３】

1つの局面において、$\alpha_v\beta_3$ペプチドは、$\alpha_v\beta_3$の天然リガンド、または$\alpha_v\beta_3$それ自体にある$\alpha_v\beta_3$-リガンド相互作用に関与する領域の配列特徴を有してもよい。1つの局面において、$\alpha_v\beta_3$ペプチドはRGDトリペプチドを含有し、RGD含有領域において天然リガンドと配列が一致する。

【０１１４】

1つの局面において、RGD含有ペプチドは、$\alpha_v\beta_3$の天然リガンド、例えば、フィブリノゲン、ビトロネクチン、フォン・ウィルブランド因子、ラミニン、トロンボスポンジンなどのリガンドのRGD含有領域のアミノ酸残基配列に対応する配列を有する。これらの$\alpha_v\beta_3$リガンドの配列は周知である。従って、$\alpha_v\beta_3$ペプチドは任意の天然リガンドから得ることができる。

【０１１５】

別の局面において、$\alpha_v\beta_3$ペプチドは、他のインテグリンと比較して、$\alpha_v\beta_3$がその天然リガンドに結合するのを優先的に阻害する。$\alpha_v\beta_3$に対して選択性を有する$\alpha_v\beta_3$ペプ

チドの特定は、典型的な結合阻害アッセイ、例えば、ELISAアッセイにおいて容易に特定することができる。

【０１１６】

本発明のペプチドは、典型的には、約100以下のアミノ酸残基、好ましくは、約60以下の残基、より好ましくは約30以下の残基を含む。本発明のペプチドは線状でもよく環状でもよい。

【０１１７】

本ペプチドは$\alpha_v\beta_3$天然リガンドのアミノ酸残基配列と同一である必要はないことが理解されるはずである。

例示的な配列には、

CDCRGDCFC (SEQ ID NO: 3)および

GGCDGRCG (SEQ ID NO: 4)

が含まれる。

【０１１８】

本発明のペプチドには、本明細書において示されたアミノ酸残基配列を有するペプチドの任意の類似体、断片、または化学的誘導体も含まれる。したがって、本発明のペプチドは、その使用時に特定の利点を提供する種々の変化、置換、挿入、および欠失に供することができる。この点に関して、本発明の$\alpha_v\beta_3$ペプチドは、記載されたペプチドの配列と同一のものではなく、これに対応するものであり、1つまたは複数の変化が加えられ、1つまたは複数のアッセイ法において$\alpha_v\beta_3$ペプチドとして機能する能力を保持する。

【０１１９】

「類似体」という用語には、1つまたは複数の残基が機能的に類似した残基によって保存的に置換されており、かつ本明細書に記載される$\alpha_v\beta_3$活性を示す、本明細書に具体的に示される配列と実質的に同一のアミノ酸残基配列を有する任意のペプチドが含まれる。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン、もしくはメチオニンなどのある非極性(疎水性)残基の、別の残基との置換、アルギニンとリジン間、グルタミンとアスパラギン間、グリシンとセリン間などの極性(疎水性)残基の、別の残基との置換、リジン、アルギニン、もしくはヒスチジンなどある塩基性残基の、別の残基との置換、またはアスパラギン酸もしくはグルタミン酸などある酸性残基の、別の残基との置換が含まれる。

【０１２０】

「断片」という用語は、本明細書において開示されるアミノ酸残基配列を有するポリペプチドのアミノ酸残基配列よりも短いアミノ酸残基配列を有する任意の本ポリペプチドを指す。

【０１２１】

本明細書で使用する「腫瘍標的化ペプチド」には、100未満のアミノ酸を含むポリマーが含まれ、このポリマーは、腫瘍細胞の細胞成分、腫瘍血管系、および/または腫瘍微小環境の成分に特異的に結合する。

【０１２２】

本発明のペプチドは、組換えDNA法を含む、ポリペプチド分野の当業者に公知の任意の技法によって合成することができる。合成化学法、例えば、純度、抗原特異性、望ましくない副産物の無いこと、生成の容易さなどの理由で、メリフィールド型固相合成が好ましい。多くの利用可能な技法の優れた概要が、Steward et al., 「Solid Phase Peptide Synthesis」, W. H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Bodanszky, et al., 「Peptide Synthesis」, John Wiley & Sons, Second Edition, 1976; J. Meienhofer, 「Hormonal Proteins and Peptides」, Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983; Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-96, 1969; Fields et al., Int. J. Peptide Protein Res., 35:161-214, 1990において見られ、固相ペプチド合成については、米国特許第4,244,946号、古典的な液相合成についてはSchroder et al., 「The Peptides」, Vol. 1, Academic Press (New York), 1965において見られる。このような合成において使用することができる適切な保護基は、前記の教科書およびJ. F. W. McOmie, 「Protective Groups in

Organic Chemistry」, Plenum Press, New York, 1973に記載されている。

【０１２３】

II.活性薬剤

本明細書に記載のように、本発明の組成物は、治療剤にカップリングされた、標的細胞上に存在する分子に特異的な標的化部分を含む。さらに具体的には、このような治療剤は、標的細胞に対する免疫応答を誘導する生物活性薬剤である。従って、ある態様では、本発明の組成物の使用方法は、癌を予防または治療すること、例えば、腫瘍細胞の増殖の阻止、腫瘍細胞の排除もしくは低減、および/または腫瘍成長の阻止を含む。さらなる態様において、本発明の組成物の使用方法は、感染因子に関連する疾患を予防または治療することおを含む。

【０１２４】

b.核酸分子

本明細書において開示されるように、核酸分子は、二本鎖DNA(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、多鎖DNA、二本鎖RNA(dsRNA)、一本鎖RNA(ssRNA)、多鎖RNA、DNA-RNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、ペプチド核酸(PNA)、PNA-DNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、PNA-RNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、ロックド核酸(LNA)、LNA-DNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)、LNA-RNAハイブリッド(一本鎖または多鎖)の1つまたは複数を含む。1つの態様において、核酸分子は、1つまたは複数の産物(例えば、RNAなどの核酸、ペプチド、ポリペプチド、融合ペプチド)をコードする。1つの態様において、核酸分子は、免疫細胞を活性化することができる、1つまたは複数の免疫刺激核酸配列(INAS)を含む。

【０１２５】

1.免疫刺激核酸分子

ある態様において、治療剤は、免疫系の活性化、標的細胞への免疫エフェクター細胞の動員、および免疫学的細胞傷害に対する腫瘍細胞の感受性の増加(例えば、増殖因子を介したシグナル伝達の同時遮断による)を同時に行う、免疫刺激性のDNAまたはRNAに複合化した抗体または他の標的化部分である。免疫エフェクター細胞は、腫瘍細胞アポトーシスを誘導するために、DNAまたはRNAにより誘導された直接的なデスシグナル伝達と協力する。また、アポトーシス腫瘍細胞により放出された腫瘍抗原は、例えば、持続性の抗腫瘍性適応免疫応答を生じるように樹状細胞(DC)により提示される。従って、正常細胞に対する毒性が無く、細胞内デスシグナル伝達の選択的活性化および標的化腫瘍細胞の免疫学的排除を実現することができる。

【０１２６】

1つの局面において、治療剤は、免疫刺激効果とは無関係の機構を介して標的化腫瘍細胞の直接的な死を誘導する、ヌクレオチド複合化抗体またはヌクレオチド複合化標的化部分である。DNA複合化抗EGFR抗体によりEGFR発現癌細胞を処理する、またはDNA複合化抗HER2/neu抗体によりHER2/neu発現癌細胞を処理すると、PBMCの非存在下で直接的な標的受容体特異的死が起こる。ヌクレオチド結合抗体による処理に応答して、標的細胞の細胞間融合の調節が解除されると、寿命が限られ、複製能が損なわれた合体細胞(ハイブリッド細胞または多核細胞)が形成される。この新規の形の標的化細胞死(細胞超融合(cell hyperfusion))は、複合化されていない親抗体(抗EGFR抗体もしくは抗HER2/neu抗体)または遊離DNAによる処理に応答して観察されない。直接細胞死を誘導する抗体複合化ヌクレオチド配列の例は、

5'G*G*GGACGACGTCGTG-G*G*G*G*G*G 3' (SEQ ID NO: 1); 5'

G*G*GGGAGCATGCTGG*G*G*G*G*G 3' (SEQ ID NO: 2)

である(*はホスホロチオエート結合を表し、残りはホスホジエステルである)。細胞超融合は、細胞生存/増殖をアッセイする方法によって観察することができる。細胞生存/増殖をアッセイする方法には、位相差顕微鏡法、トリパンブルー排除、クリスタルバイオレット染色、合体した細胞体の検出、および/または多核細胞体の形成の検出を含むが、これらに限定されない。

【０１２７】
1つの局面において、DNA複合化またはRNA複合化ポリペプチド/ペプチドまたは腫瘍標的化部分は、腫瘍細胞の環境における抗腫瘍免疫応答の活性化と、腫瘍血管新生の阻害を同時に行う。関連局面において、腫瘍細胞、腫瘍血管系、または腫瘍微小環境を標的とするポリペプチド/ペプチドは、免疫刺激DNA/RNAを腫瘍に送達する上で役立ち、かつ腫瘍血管新生も阻害する。
【０１２８】
1つの態様において、標的化部分は、病原体関連分子パターン(PAMP)、または免疫細胞の活性化、成熟、増殖、および/もしくは生存を直接的または間接的に誘導する他の配列を含む核酸配列に連結される。このような免疫細胞には、樹状細胞、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、Bリンパ球、単球、またはマクロファージが含まれるが、これらに限定されない。さらに、このような核酸配列は、例えば、Toll様受容体(TLR)遺伝子ファミリーおよびヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン(NOD)遺伝子ファミリーのメンバーを含む、エンドソームで発現される受容体に連結することによって、ならびに/またはレチノイン酸誘導性タンパク質I(RIG-I)およびMDA-5による検出を含む、TLR非依存性免疫細胞刺激によって、ならびに/またはアラーミン、サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子を含む内因性免疫刺激分子の発現もしくは放出などの標的細胞応答によって、かつ/またはダメージを受けた標的細胞もしくは死につつある標的細胞からの免疫デンジャーシグナルを介して、自然免疫または適応免疫を活性化することができる。様々な態様において、標的化部分にカップリングされる生物活性薬剤は、TLR3、TLR7/8およびTLR9を含むが、これらに限定されないTLRのアゴニストである。
【０１２９】
本発明の様々な態様において、1つまたは複数の標的化部分は、核酸分子を含む1つまたは複数の生物活性薬剤にカップリングされる。例えば、活性薬剤は、1つまたは複数の免疫刺激核酸配列(INAS)でもよい。1つの態様において、核酸配列の1つまたは複数は、病原体関連分子パターン(PAMP)、または免疫細胞のToll様受容体(TLR)依存性またはTLR非依存性の活性化、増殖および/もしくは生存を直接的に誘導および/もしくは促進する他の配列を含んでもよい。別の態様において、活性薬剤は、リソソーム分解を逃れた未消化ヌクレオチドに対する細胞応答を介して免疫細胞の活性化/増殖/生存を誘導する安定した/安定化された核酸配列を含んでもよい。別の態様において、核酸配列は、免疫細胞の活性化、増殖、および/または生存を誘導または促進する細胞応答を誘発するデンジャーシグナルまたはダメージ関連分子パターン(DAMP)として認識される構造または配列を含んでもよい。さらに別の態様において、このような核酸配列は、標的細胞死を促進する(デスシグナル伝達応答を活性化する、および/または生存遺伝子発現を阻害する)、ならびにストレスが加わった、ダメージを受けた、または死につつある/アポトーシスの標的細胞からの免疫刺激分子によって誘発される二次免疫活性化を促進する、コード配列または非コード配列である。別の態様において、核酸分子は、その二次構造によって免疫刺激分子として機能する。
【０１３０】
本開示全体に基づいて明らかなように、INASは、ssDNA、ds DNA、アンチセンスDNA、オリゴデオキシヌクレオチド、ds RNA、ss RNA、siRNA、shRNA、miRNA、オリゴリボヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、DNA/RNAハイブリッド、またはアプタマーより選択することができる。
【０１３１】
様々な態様において、本発明の組成物は、病原体関連分子パターン(PAMP)、または免疫細胞のToll様受容体(TLR)依存性もしくはTLR非依存性活性化、増殖および/もしくは生存を誘導および/もしくは促進する他の配列を含む1つまたは複数の核酸配列にカップリングされた本明細書に記載の標的化部分を含む。
【０１３２】
病原体関連分子パターン(PAMP)は、病原体またはダメージを受けた宿主細胞に由来する

モチーフ、例えば、Toll様受容体(TLR)遺伝子ファミリーおよびヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン(NOD)遺伝子ファミリーのメンバーを含む受容体を介して免疫系によって認識される核酸である。核酸配列[二本鎖(ds)RNA、一本鎖(ss)RNA、ds DNA、およびss DNA]が、マクロファージ、単球、樹状細胞、および他の抗原提示細胞(APC)において発現する特定のTLRによる認識/結合を介して、自然免疫系または適応免疫系を活性化する。マクロファージおよび樹状細胞では、核酸を認識するTLRはエンドソーム内で発現する。これらには、TLR3、TLR7/8、およびTLR9が含まれ、それぞれ、ds RNA、ss RNA、およびDNAを感知する。(例えば、抗体介在性、受容体介在性エンドサイトーシスによって)核酸リガンドが細胞内エンドソームに効率的に移行すると、TLR活性化および免疫刺激が誘導される。

【０１３３】

様々な態様において、本発明の組成物は、TLRアゴニストにカップリングされた本明細書に記載の標的化部分を含む。TLRは、微生物供給源から放出された天然分子;微生物産物に基づく合成分子;天然リガンドと構造上の明らかな関連性のない低分子;および宿主由来の内因性リガンドによって活性化される。

【０１３４】

1つの態様において、標的化部分(例えば、EGFR特異的抗体)にカップリングされる生物活性薬剤はINASであり、INASは、PAMPまたはTLRアゴニストを含む任意の配列でよい。INASは、TLR活性化を誘発することができる(TLRアゴニスト)、および/または免疫応答を刺激することができる、構造または化学的特性を有する任意の核酸配列を含んでもよい。TLRには、TLR1～TLR11を含むが、これらに限定されない任意のTLRが含まれる。INASは、標的化部分に複合化されることによってマクロファージ、単球、および/または樹状細胞に導入されると、TLRを活性化および/または免疫を刺激することができる配列または構造を有する任意のDNAまたはRNAを含んでもよい。核酸と抗体が複合化すると、免疫細胞への核酸のエンドソーム送達(抗体介在性Fc受容体介在性エンドサイトーシスを介する)が容易になり、核酸が免疫系を活性化する能力が高まる。特定のまたは正規の免疫刺激性モチーフに厳密に従わないDNA配列またはRNA配列もまた、抗体に複合化されることによってマクロファージまたは樹状細胞に導入されると、TLRを活性化および/または免疫を刺激することができる。

【０１３５】

ある態様において、INAS、PAMP、またはTLRアゴニスト(例えば、細菌またはウイルス)を運ぶ、弱毒化または不活化した(生きているまたは死滅させた)免疫刺激性病原体は、腫瘍標的化部分(例えば、抗体、ペプチド、アプタマー)に発現または複合化されることによって腫瘍に標的化される。

【０１３６】

様々な態様において、本発明の組成物および方法において使用することが意図されるINASは、細菌病原体またはウイルス病原体に由来するゲノム核酸配列(DNAまたはRNA)である。別の態様において、INASは、病原体または生物のゲノムの一部に対応する合成のDNAまたはRNA「模倣物」(例えば、誘導体および類似体)である。例示的な非限定的な配列には、細菌のDNAまたはRNA(例えば、弱毒化されたマイコバクテリアカルメット・ゲラン桿菌DNA;炭疽菌;ブルセラ属(Brucella);サルモネラ属;赤痢菌属)、およびウイルスDNAまたはRNA(例えば、フラビウイルス科(Flaviviridae)、パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae);単純ヘルペスウイルス1型または2型DNA;レオウイルスds RNA;インフルエンザウイルスss RNA;トリインフルエンザ;ノロウイルス;HIV-1 ss RNA;HIV gag mRNA)が含まれる。

【０１３７】

様々な態様において、本発明の組成物および方法において使用することが意図される、このような活性薬剤(INASまたはTLRアゴニスト)には、二本鎖RNA(dsRNA);一本鎖(ss)RNA;短鎖干渉RNA(siRNA);ショートヘアピンRNA(sh RNA)の形態をとってもよい、TLR3、TLR7、TLR8のアゴニストが含まれるが、これらに限定されない。このようなアゴニストは、TLR3

、TLR7、および/またはTLR8を活性化することができる、ならびに樹状細胞(DC)および/または他の免疫細胞を活性化することができる、異なる配列および長さの天然または合成のRNAでもよい。

【０１３８】

様々な態様において、INAS(インビトロで転写されたRNAまたは化学合成されたオリゴリボヌクレオチド)の免疫刺激活性は、メチル化ヌクレオシド(5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、N7-メチルグアノシン5-メチルウリジン、2'-O-メチル化ヌクレオシドを含む)が無いこと;U残基(2-チオウリジンまたはプソイドウリジンを含む)の修飾が無いこと;3'ポリ(A)テールが無いこと;5'末端キャップ構造が無いこと;5'三リン酸部分があること;最小長さが19塩基の配列;またはヌクレアーゼに対する耐性(例えば、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合)の仕様の1つまたは複数によって高めることができる。例示的な非限定的な配列には、例えば、

5' pUGGAUCCGGCUUUG

AGAUCUU (SEQ ID NO: [[]]); 5' ppGGGAGACAGGGGUGUCCGCCAUUUCCAGGUU(SEQ ID NO:);または

5' pppGGGAGACAGGCUAUAACUCACAUAAUGUAUU (SEQ ID NO:)

が含まれる。

【０１３９】

さらなる態様において、このような活性薬剤(INASまたはTLRアゴニスト)はTLR3アゴニストであり、dsRNA、ポリイノシン-ポリシチジル酸(ポリI:C);長いdsRNA(>30塩基);siRNA二重鎖を含むが、これらに限定されない。

【０１４０】

さらに他の態様では、このような活性薬剤(INASまたはTLRアゴニスト)は、TLR7またはTLR8のアゴニストであり、一本鎖(ss)RNA;二本鎖(ds)RNA;短鎖干渉RNA(siRNA);ショートヘアピンRNA(sh RNA);免疫刺激性配列/モチーフを有するRNAが含まれるが、これらに限定されない。

【０１４１】

様々な他の態様において、標的化部分にカップリングされる生物活性薬剤には、siRNA二重鎖またはds RNAまたはss RNAまたはshRNAの一方の鎖に5'-UGUGU-3'または5'-UGU-3'モチーフが位置している合成RNAが含まれるが、これらに限定されない。例示的な配列には、以下のRNA:

5'- CUACACAAAUCAGCGAUUU(SEQ ID NO:); 3'-

GAUGUGUUUAGUCGCUAAA(SEQ ID NO: [[]]); 5'-UUGAUGUGUUUAGUCGCUA(SEQ ID NO:); 3'-

AACUACACAAAUCA GCGAU(SEQ ID NO:); 5'-GAUUAUGUCCGGUUAUGUA(SEQ ID NO:); 3'-

CUAAUACAG GCCAAUACAU(SEQ ID NO:); 5'-AUGUAUUGGCCUGUAUUAG(SEQ ID NO:); 3'-

UACAUAACCGGACAUAAUC(SEQ ID NO:); 5'-GGUCGGAAUCGAAGGUUUA(SEQ ID NO:); 3'-

CCAGCCUUAGCUUCCAAAU(SEQ ID NO:); 5'-GGUCGGAGCUAAAG GUUUA(SEQ ID NO:); 3'-

CCAGCCUCGAUUUCCAAAU(SEQ ID NO:); 5'-CAGCUUU GUGUGAGCGUAU(SEQ ID NO:); 3'-

GUCGAAACACACUCGCAUA(SEQ ID NO:)

が含まれるが、これらに限定されない。

【０１４２】

様々な他の態様において、標的化部分にカップリングされる生物活性薬剤には、siRNA二重鎖の一方の鎖または一本鎖RNAまたはショートヘアピン(sh)RNAに5'-GUCCUUCAA-3'モチーフが位置している合成RNAが含まれるが、これらに限定されない。ある態様において、このような薬剤は、最小長さのRNA=19塩基を有し、TLR9非依存性である。このような活性薬剤の例示的な配列には、

5'-AGCUUAACCU GUCCUUCAAdTdT-3' (SEQ ID NO:); 5'-UUGAAGGACAGGUUA AGCUdTdT-3' (SEQ ID NO:[[]]); 5'-ACCUGUCCUUCAAUUACCAdTdT-3' (SEQ ID NO:); 5'-UGGUAAUUG AAGGACAGGUdTdT-3' (SEQ ID NO:); 5'-AAAAAAAACUGUCCUUCAA (SEQ ID NO:); 5'- AAAAAAAAAUGUCCUUCAA (SEQ ID NO:); 5'- AAAAAAAAAAGUCCUUCAA (SEQ ID NO:); 5'-UGUCCUUCAAUGUCCUUCAA(SEQ ID NO:); 5'-AGCUUAACCU GUCCUUCAA (SEQ ID NO:);または 5'-AGCUUAACCU GUCCUUCAACUACACAAA UUGAAGGACAGGUUAAGCU(SEQ ID NO:).

が含まれる。

【０１４３】

さらなる態様において、このような活性薬剤は、GUリッチ配列またはUリッチ配列である。このような活性薬剤の例示的な配列には、(G+U)リッチ一本鎖RNA(GUジヌクレオチド);ポリ(U)リッチssRNA

5'-UUUUUUUUUUUUUUUUUU (SEQ ID NO:[[]]);

が含まれるが、これらに限定されない。

【０１４４】

さらなる態様において、このような活性薬剤は、イミダゾールキノリン(例えば、イミキモド、レシクモイド(resiquimod));グアノシンヌクレオチドおよび類似体(例えば、ロキソリビン;'7-チア-8-オキソ-グアノシン;7-デアザグアノシン;7-アリル-8-オキソグアノシン)である。

【０１４５】

さらなる態様において、このような活性薬剤は、反復要素、単純な反復および連続した反復、または1種類の塩基(アデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン酸、もしくはキサンチル酸)の「一続き（run）」、例えば、ポリ(A)、ポリ(C)、ポリ(G)、ポリ(U)、ポリ(X)、ポリ(I)を有するRNA配列である。

【０１４６】

本発明の他の態様において、生物活性薬剤は、TLR9アゴニスト、例えば、一本鎖DNA(ss DNA)または二本鎖DNA(ds DNA)、細菌DNA、ウイルスDNA、またはプラスミドDNAである。１つの例において、このようなアゴニストは単純ヘルペスウイルス1型DNAを含む。

【０１４７】

他の態様において、このようなTLR9アゴニスト活性薬剤は、CpGを有するオリゴデオキシヌクレオチド(すなわち、「CpG DNA」またはシトシンの次にグアノシンを含有し、リン酸結合により連結しているDNA)、例えば、CpGモチーフ

[TCGTTまたはTCGTAまたはTCGACGXまたはTCGATCG]

を有するオリゴデオキシヌクレオチド(メチル化または非メチル化)である。このような免疫刺激核酸配列の例には、CpG A:ホスホロチオエート(*)混合バックボーン;シングルCpGモチーフ(六量体プリン-ピリミジン-CG-プリン-ピリミジン);CpG隣接領域はパリンドローム(ステムループ構造を形成する可能性のある自己相補塩基)を形成する;3'末端のポリ-Gテール(ODNクラスターを形成するように相互作用することができる)(例えば、

G*G*TGCATCGATGCAG*G*G*G*G*G (SEQ ID NO:[[]]))); CpG B:ホスホロチオエートバックボーン;複数のCpGモチーフ;TCG(例えば、

TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT (SEQ ID NO:))); CpG C:ホスホロチオエートバックボーン;複数のCpGモチーフ;5'末端のTCG二量体;中心パリンドロームに埋め込まれたCpGモチーフ(例えば、

TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG (SEQ ID NO:[[]]))); 他のCpG化合物:

5'-TCGXCGXおよび5'- TCGXTCG

(X=任意のヌクレオチド)が含まれる。

【０１４８】

他の態様において、このような活性薬剤は、親水性スペーサーと共に、または親水性ス

ペーサーを伴わずに、遊離5'末端にホスホロチオエートバックボーンがある(例えば、5'TCGACGT(分岐、スペーサーあり);または5'TCGATCG(分岐、スペーサーあり))、複数コピーとして示される。

【０１４９】

1つの態様において、本発明は、以下の式:

$5'N_1X_1CGX_2N_23'$

によって表されるCpGモチーフを含有する免疫刺激核酸配列を提供する。式中、連続したCpGを少なくとも1つのヌクレオチドが分離し;X_1は、アデニン、グアニン、またはチミンであり;X_2はシトシンまたはチミンであり;Nは任意のヌクレオチドであり、N_1+N_2は約0～26個の塩基であり、但し、N_1およびN_2は、CCGG四量体(quadmer)も複数のCCGもしくはCGG三量体も含まず;かつ核酸配列は約8～30塩基長である。

【０１５０】

別の態様において、本発明は、以下の式:

$5'N_1X_1X_2CGX_3X_4N_23'$

によって表されるCpGモチーフを含む単離された免疫刺激核酸配列を提供する。式中、連続したCpGを少なくとも1つのヌクレオチドが分離し;X_1X_2にはGpT、GpG、GpA、ApT、およびApAが含まれ;X_3X_4にはTpTまたはCpTが含まれ;Nは任意のヌクレオチドであり、N_1+N_2は約0～26個の塩基であり、但し、N_1およびN_2は、CCGG四量体も、複数のCCGもしくはCGG三量体も含まず;かつ核酸配列は約8～30塩基長である。

【０１５１】

関連局面において、本発明の免疫刺激核酸配列は、GpT、GpG、GpA、およびApAから選択されるX_1X_2を含み、X_3X_4はTpT、CpT、およびGpTから選択される。細胞への取り込みを促進するために、CpG含有免疫刺激核酸分子は8～30塩基長の範囲内であってよい。しかしながら、十分な免疫刺激モチーフが存在するのであれば、このような大きな核酸は細胞内でオリゴヌクレオチドに分解されるため、任意の大きさの核酸(数kb長であっても)も免疫刺激性である。別の局面において、合成オリゴヌクレオチドは、5'末端および/もしくは3'末端において、またはその近傍において、CGG 四量体も、複数のCCGまたはCGG三量体も含まない、および/あるいは分裂促進性コンセンサスCpGモチーフはパリンドロームではない。免疫刺激の持続は、リン酸バックボーン修飾を組み入れた安定化オリゴヌクレオチドを用いて得ることができる。例えば、修飾は、ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート修飾である。より具体的には、リン酸バックボーン修飾は、核酸の5'末端、例えば、核酸の5'末端の最初の2ヌクレオチドで行われる。さらに、リン酸バックボーン修飾は、核酸の3'末端、例えば、核酸の3'末端の最後の5ヌクレオチドで行われてもよい。

【０１５２】

1つの局面において、CpG DNAは、オリゴヌクレオチドである場合、8～30塩基の大きさの範囲内である。または、CpGジヌクレオチドはプラスミドにおいて大規模に作製することもでき、これは対象に投与された後にオリゴヌクレオチドに分解される。別の局面において、核酸分子は、B細胞、単球、および/またはナチュラルキラー細胞応答(例えば、サイトカイン、増殖、溶解、またはその他の応答)に関して、比較的高い刺激指数を有する。

【０１５３】

例示的なCpG DNA配列は、

5' G*G*GGACGACGTCGTGG*G*G*G*G*G 3' (SEQ ID NO: 1)

-ホスホロチオエート(*)混合バックボーンである。

【０１５４】

ある態様において、本発明の複合体は、非メチル化CpGモチーフ(CpG RNA)を有するRNA、例えば、ホスホロチオエート(PS)バックボーン、非メチル化CpGモチーフ、および3'ポリGテールを有するオリゴリボヌクレオチド(例えば、CpG ORN)を含む、免疫刺激核酸配列(INAS)を有する。このような配列は、単球を直接活性化してIL-12を産生するように、およびNK細胞を間接的に刺激してIFN-□を産生するように機能することができる。例示的な

CpG ORN配列には、
5’-GGUGCAUCGAUGCAGGGGGG (SEQ ID NO:[[]]); 5’-
GGUGCUUCGUUGCAGGGGGG (SEQ ID NO:); 5’-GGUGCUUCGAUGCAGGGGGG (SEQ ID NO:);または
5’-GGUGCUACGU UGCAGGGGGG (SEQ ID NO:)
が含まれる。

【０１５５】

ある態様において、本発明の複合体は、非メチル化CpGを含有しない合成オリゴデオキシヌクレオチドを含む生物活性薬剤を有する。このような免疫刺激核酸配列の例には、正規のCpGモチーフの無いssDNA(GC逆位またはメチル化シトシン)は、(受容体介在性エンドサイトーシスを介したエンドソーム移行の後に)TLR-9を活性化することもできる;自己相補ポリヌクレオチド、ポリ-(dG, dC);非メチル化CpG配列の含有率が低いDNA;およびホスホロチオエート(PS*)バックボーンを有する非CpG ODN(PS-ODN)が含まれる。CpGモチーフの無いPS-ODNが、CpG非依存的に、単球を、高レベルのCD83、CD86、CD40、およびHLA-DR、ならびに低レベルのCD14を発現するDC表現型に分化させ、CCL3およびCCL4β-ケモカインを分泌するように誘導できることは注目に値する。例えば、ある態様において、このようなTLR9アゴニストは、
T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T (SEQ ID NO:[[]])または
T*C*C*T*C*C*T*T*T*T*G*T*C*C*T*T*T*T*G*T*C*C*T*T (SEQ ID NO:)
である。

【０１５６】

ある態様において、本発明の複合体は、免疫刺激性モチーフ-
PyN(T/A)(T/C/G)(T/C/G)(T/G)GT
を有するオリゴデオキシリボヌクレオチドを含む生物活性薬剤を有する。式中、Py=C/T;N=任意のデオキシリボヌクレオチド;括弧内の少なくとも2つの位置はTであり;少なくとも20またはそれ以上のヌクレオチド;一本鎖;隣接配列-5'XXモチーフXXXX-3。例示的な配列には、
5’-TCATCATTTTGT CATTTTGTCATT (SEQ ID NO:[[]]); 5’-TCATTATTTTGT
TATTTTGTCATT(SEQ ID NO:); 5’-TCATCCTTTTGT CCTTTTGTCATT(SEQ ID NO:); 5’-
TCATCTTTTTGT CTTTTTGTCATT(SEQ ID NO:); 5’-TCATCAATTTGT CAATTTGTCATT(SEQ ID NO:
); 5’-TCATCATCTTGT CATCTTGTCATT(SEQ ID NO:); 5’-TCATCATGTTGT CATGTTGTCATT(SEQ
ID NO:); 5’-TCATCATTCTGT CATTCTGTCATT(SEQ ID NO:); 5’-TCATCATTGTGT
CATTGTGTCATT(SEQ ID NO:); 5’-TCATCATTTGGT CATTTGGTCATT(SEQ ID NO:); 5’-
TCATTTTTTTGT TTTTTTGTCATT(SEQ ID NO:); 5’-TCATTGTTTTGT TGTTTTGTCATT (SEQ ID NO:
); 5’-TCATTCTTTTGT TCTTTTGTCATT(SEQ ID NO:)
が含まれるが、これらに限定されない。

【０１５７】

ある態様において、本発明の複合体は、レチノイン酸誘導性タンパク質1(RIG-1)およびMDA-5を介したTLR非依存性免疫刺激を誘導する核酸配列を含む。病原体由来核酸の検出は、2種類のサイトゾルヘリカーゼであるレチノイン酸誘導性タンパク質1(RIG-1)およびMDA-5を伴い、これらは有効な抗ウイルス防御に必須のものである。RIG-1は、特定の一組のRNAウイルス(フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、およびラブドウイルス科)を認識するのに対して、MDA-5は、別の一組のRNAウイルス(ピコルナウイルス科)に対する防御を担っている。ウイルスRNAと、ウイルス感染した細胞の細胞質内にある豊富な自己RNAを区別する構造上の根拠は、ウイルスポリメラーゼにより生じたRNAの5'-三リン酸末端の、RIG-1を介した検出を伴う。5'-三リン酸RNAの検出は、5'-三リン酸末端のキャッピングによって、またはRNAのヌクレオシド修飾によって抑止され、両

方とも真核生物では転写後RNAプロセシングの間に起こる。マイナス鎖RNAウイルスから調製されたゲノムRNAおよびウイルス感染細胞から調製された(非感染細胞からは調製されない)RNAは、強力なインターフェロン-α応答を誘導することができる。さらに、RIG-1による三リン酸RNAの認識は、DC、単球、他の真核細胞においてインターフェロン応答を誘導する。このような応答は免疫細胞に限定されない。

【０１５８】

従って、様々な態様において、INASは、RIG-1により認識される分子サイン(molecular signature):無キャップ5'-三リン酸RNA(現在、3pRNAと呼ばれている);5'末端キャップ構造(7-メチルグアノシンキャップ)が無いこと;およびウリジン修飾(プソイドウリジンまたは2-チオウリジンまたは2'-O-メチル化UTP)が無いこと、を有するRNA配列を含んでもよい。

【０１５９】

他の態様において、本発明の複合体は、フラビウイルス科のプラス鎖RNAウイルス;分節NSV(VSV、インフルエンザ);パラミクソウイルスおよびラブドウイルスを含む、非分節NSVを含むが、これらに限定されない、(サイトゾル内で無キャップ5'-三リン酸を生成する)ウイルスポリメラーゼをコードする核酸(DNAまたはRNA)ワクチンを含む。

【０１６０】

他の態様において、本発明の複合体は、最小長さが19塩基のRNA(5'-三リン酸)、例えば、インビトロで転写されたRNAの以下の例、

5'-pppAGCUUAACCUGUCCUUCAA-

5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'(SEQ ID NO:[[]]);

5'-pppGGGGAU GAAC UUCAGGGUCAGCUU-3'(SEQ ID NO:);

5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'

3'-UUCGACUGGGACUUCAAGUAGGGGppp-5'(SEQ ID NO:)

を含む(ここで、特定の配列モチーフは必要とされず、一本鎖でもよく二本鎖でもよい)

【０１６１】

なおさらなる態様において、本発明の複合体は、サイトゾルで発現されたT7 RNAポリメラーゼを介してインビトロで転写された三リン酸RNA;ウイルスゲノム配列(例えば、ニューカッスル病ウイルス)のインビトロで生成されたdsRNA断片;RNAウイルス(例えば、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、およびラブドウイルス科)からのゲノムRNAまたはインビトロで生成されたRNAを含む。

【０１６２】

なおさらなる態様において、本発明の複合体は、長い二本鎖RNA、短いds RNA(例えば、siRNA)、または平滑末端を有する短いdsRNAでもよい、INASを含む。

【０１６３】

なおさらなる態様において、INASは、MDA-5により認識される分子サイン、例えば、長い二本鎖RNAまたはポリ(I:C)を有するRNA配列を含んでもよい。

【０１６４】

様々な態様において、生物活性薬剤は、リソソーム分解を逃れた未消化ヌクレオチドに対する細胞応答を介して免疫細胞の活性化/増殖/生存を誘導する安定化された核酸配列である。

【０１６５】

マクロファージは、プログラム細胞死の間に生じた、死につつあるアポトーシス細胞を貪食し、リソソームDNアーゼによりDNAを消化する。マクロファージおよび樹状細胞におけるリソソーム分解を逃れた内因性DNAは、自然免疫系を活性化するI型インターフェロンおよび他のサイトカイン/ケモカインの産生をもたらすToll様受容体非依存性遺伝子誘導

プログラムを誘発する。内因性DNA-免疫グロブリン複合体がマクロファージまたは樹状細胞に導入されると、免疫細胞が活性化され、公知のTLRまたはTLRシグナル伝達分子(TLR9、TLR3、TLR1-2、TLR5-8;MyD88、TRIFアダプター)とは無関係に自己免疫が誘発される。DNアーゼに欠損がある、またはアポトーシス細胞クリアランスに欠陥があるマウスまたはヒトは自己免疫を発症する。核酸-高分子を含有するアポトーシス破片に会合した自己抗原に対する交差反応性は全身性自己免疫を動かすことがある。

【０１６６】

腫瘍標的化抗体をINASに複合化すると、腫瘍細胞アポトーシスを誘導することによって、(Fc-FcR相互作用を介した)マクロファージ/樹状細胞による結合アポトーシス小体の取り込み/内部移行を増強することによって、ならびに(ヌクレアーゼ耐性INASおよび/またはダメージを受けた/死につつある/アポトーシスの腫瘍細胞からの未消化核酸を介した)免疫細胞活性化を促進することによって、腫瘍細胞に対する自己免疫応答を誘導することができる。

【０１６７】

ある態様において、本発明の複合体は、アポトーシスDNAによる免疫細胞のTLR依存性活性化またはTLR非依存性活性化を模倣することができる、安定した/安定化された任意の核酸配列(ss DNA、ds DNA、ss RNA)でもよいINASを含む。例えば、このような生物活性薬剤は、アポトーシス小体内の核酸含有高分子(ヌクレオソーム)に由来する免疫刺激核酸配列;細胞の困難(distress)およびDNAダメージに応答して生成される免疫刺激核酸配列;抗体との複合体として、または免疫複合体(例えば、DNA-免疫グロブリン)としてマクロファージまたは樹状細胞に導入された時に免疫細胞を活性化することができる核酸配列;免疫系を活性化する細胞応答を誘発する天然デンジャーシグナルとして認識される安定した/安定化された核酸配列を含んでもよい。

【０１６８】

ある態様において、アポトーシス小体に会合している小さな核リボ核タンパク質粒子(snRNP)の中にあるss RNA配列が生物活性薬剤として用いられる。

【０１６９】

このような活性薬剤の例示的な配列には、U snRNA配列(または誘導体):

5'- GGACUGCGUUCGCGCUUUCC-3'(SEQ ID NO:[[]]); 5'-GGCUUAUCCAUUGCACUCCGGA-3'(SEQ ID NO:); 5'-ACGAAGGUGGUUUUCCCAG-3'(SEQ ID NO:); 5'- UUUGUGGUAGUGGGGGACUG-3' (SEQ ID NO:); 5'-GUAGUGUUUGUGGGGGACUG-3'(SEQ ID NO:); 5'- GUAGUGGGGGACUGUUUGUG-3' (SEQ ID NO:); 5'-GGACUGCGUUGUGGCUUUCC-3'(SEQ ID NO:); 5'-GAUACUUACCUG-3'(SEQ ID NO:); 5'-AAUUUGUGG-3'(SEQ ID NO:); 5'-AAUUUUUGA-3'(SEQ ID NO:)

以下の式:5'-RAUxGR-3'(R=プリンG/A;x=3-6)に当てはまる核酸配列が含まれるが、これらに限定されない。さらに、このような活性薬剤の例示的な配列には、hY1-5 RNA配列(または誘導体):

5'- GACUAGCUUGCUGUUU-3'(SEQ ID NO:); 5'- GACUAGCCUUU-3'(SEQ ID NO:)

を含む、Roリボ核タンパク質(Ro RNP)の中のRNA配列が含まれるが、これらに限定されない。

【０１７０】

別の態様において、核酸配列は、免疫細胞の活性化、増殖、および/または生存を誘導または促進する細胞応答を誘発する、デンジャーシグナルまたはダメージ関連分子パターン(DAMP)として認識される構造または配列を含んでもよい。

【０１７１】

INASを、標的細胞上の分子に結合する標的化部分(抗体、リガンド、ペプチド、その他)に複合化すると、(受容体を介したエンドサイトーシス、エレクトロポレーション、他の機構を介して)INASを標的細胞に導入することができる。INASは、免疫系を二次的に活性

化する標的細胞応答を誘発するデンジャーシグナルまたはDAMPとして認識される核酸配列を含んでもよい。細胞内ヌクレオチド(INAS)がデンジャーシグナルまたはDAMPとして認識されると、標的細胞におけるサイトカイン/ケモカイン/補助刺激分子(例えば、インターフェロン.NKG2Dリガンド)のアップレギュレーションおよび/もしくは放出を介して、ストレスが加わった/ダメージを受けた/死につつある標的細胞による免疫刺激性細胞内タンパク質/内因性分子(例えば、アラーミン)のアップレギュレーションおよび/もしくは放出を介して、ならびに/またはマクロファージ/樹状細胞による、死につつあるもしくは死んだ(アポトーシスの)標的細胞からの免疫刺激性物質(と分解しなかったINAS)の二次消化を介して、免疫細胞の活性化が誘導される。

【０１７２】

様々な態様において、本発明の組成物は、標的化部分、ならびに以下の細胞応答:(細胞周期チェックポイントの活性化を介した)標的細胞増殖の阻害、および/または(内因性デスシグナル伝達の活性化を介した)標的細胞アポトーシスの誘導;転写因子およびキナーゼ(例えば、レチノイン酸誘導性遺伝子1、IKK、TBK1、IRF、NF-□B、p53、Chk2)の活性化を介した、I型インターフェロン、他のサイトカイン/ケモカイン/補助刺激分子(例えば、NKG2Dリガンド)のTLR依存性またはTLR非依存性の産生および/または放出;ストレスが加わった/ダメージを受けた/死につつある標的細胞による免疫刺激性細胞内タンパク質/内因性分子(例えば、PAMP、DAMP、アラーミン)のアップレギュレーションおよび/または放出を含む、真核細胞におけるDNAダメージまたはストレス応答[例えば、毛細血管拡張性運動失調症変異体(ATM)キナーゼ、Chk2、p53、およびDNA-ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PK)の活性化を介する]の1つまたは複数の活性化をもたらす、一本鎖(ss)DNAおよび二本鎖(ds)DNAまたはRNA(INAS)を含む。

【０１７３】

さらに、本発明の複合体を投与すると、[例えば、リガンド、サイトカイン、ケモカインの発現および/または放出の増大、および/または免疫細胞の補助刺激シグナル、および/または内因性デンジャーシグナルを介して]免疫細胞の成熟、活性化、増殖、および/または生存をもたらす、標的細胞(腫瘍細胞または腫瘍微小環境内の細胞)においてストレス応答を誘導することができる。例えば、ある態様において、投与は、アラーミンデフェンシン、カテリシジン、高移動度群Boxタンパク質1(HMGB1)、S100タンパク質、ヘパトーム由来増殖因子(HDGF)、好酸球由来神経毒(EDN)、熱ショックタンパク質、IL-1α、尿酸、ガレクチン、サイモシン、ヌクレオリン、アネキシン、任意の疎水性タンパク質部分(Hypo)、または他の防御エフェクターの放出をもたらす。

【０１７４】

免疫系は、感染などの危険な状況に関連すると認知されている抗原に応答する。デンジャーシグナルは、外来抗原を提示し、Tリンパ球を刺激できるように成熟するように樹状細胞を刺激することによって作用する。例えば、多細胞動物は、病原体関連分子パターン(PAMP)を認識する一組の受容体を介して病原体を検出している。死につつある哺乳動物細胞もまた、傷ついた細胞に関連する抗原に対する免疫応答を促進するデンジャーシグナル(危険関連分子パターン)を放出することが見出されている。死につつある細胞/死細胞により放出された細胞内タンパク質/内因性分子(「アラーミン」と呼ばれる)を、受容体を介して検出することによって、組織/細胞ダメージが認識される。アラーミンは、病原体攻撃後に迅速に放出される、構造多様性のある多機能宿主タンパク質のグループである、および/または細胞死は、抗原提示細胞を動員および活性化することができる。デフェンシン、カテリシジン、好酸球由来神経毒、および高移動度群boxタンパク質1を含む、これらの強力な免疫刺激薬は、自然免疫系および適応免疫系を活性化する初期の警告シグナルとして役立つ。アラーミンには、免疫応答のシグナルを伝達する/免疫応答を活性化する細胞内成分が含まれる。

【０１７５】

アラーミンは、TLR、IL-1R、RAGE、または他の受容体に結合することができる。自然免疫および適応免疫のエフェクター細胞は非古典的経路を介してアラーミンを分泌すること

ができ、多くの場合、PAMPまたは他のアラーミンにより活性化された時にアラーミンを分泌する。従って、内因性アラーミンおよび外因性PAMPは、類似したメッセージを伝え、類似した応答を誘発し、大きな一組のサブグループであるダメージ関連分子パターン(DAMP)とみなすことができる。PAMPおよびアラーミンは協力して免疫細胞活性化を強化することができる。さらなるアラーミンが公知であり、下記に(以下のペプチドの項で)さらに開示される。

【０１７６】

様々な態様において、本発明の複合体は、免疫細胞活性化につながる標的細胞応答を誘発するデンジャーシグナルまたはDAMPとして認識される、1つまたは複数の安定した/安定化された核酸配列にカップリングされた標的化部分を含む。例示的な配列には、ssDNA(CpG配列配は必要とされない;TLR非依存性):

5' – AAG AGG TGG TGG AGG AGG TGG TGG AGG AGG TGG AGG-3'(SEQ ID NO:);5' – TTG AAT TCC TAG TTT CCC AGA TAC AGT-3'; 5'- TCG GTA ACG GG-3'(SEQ ID NO:); 5' – TTA GGG TTA GGG TTA GGG-3'(SEQ ID NO:); 5' – CGTTA-3' (SEQ ID NO:); 5' – GCCACTGC-3' (SEQ ID NO:); 5'- GCAGTGGC-3' (SEQ ID NO:)

が含まれる。

【０１７７】

さらなる態様において、このような活性薬剤は、ヒトテロメアDNA配列-(TTAGGG)n反復;ポリ-Gモチーフ;二本鎖B型DNA(TLR非依存性;CpG配列は必要とされない);線状化プラスミドDNA;大きなギャップを有する環状DNA;一本鎖環状ファージミド、dsRNAまたはssRNAを含む。

【０１７８】

細胞ダメージ/ストレスに関連する内因性デンジャーシグナルのアップレギュレーションおよび/または放出は、DC動員、抗原取り込み、成熟、および抗原提示、ならびに抗腫瘍T細胞の補助刺激/初回刺激を促進する。従って、本発明の様々な態様において、1つまたは複数の標的化部分は、INASおよびさらなる活性薬剤、例えば、DAMPおよび/またはアラーミンを含む、1つまたは複数の生物活性薬剤にカップリングされている。

【０１７９】

さらに別の態様において、本発明の複合体は、活性薬剤、例えば、標的細胞死を促進する、ならびにストレスが加わった、ダメージを受けた、または死につつある/アポトーシスの標的細胞からの免疫刺激分子によって誘発される二次免疫活性化を促進する活性薬剤、例えば、コード核酸配列または非コード核酸配列にカップリングされた標的化部分を含む。

【０１８０】

例えば、このような活性薬剤は、免疫原性アポトーシス材料により誘発されるアポトーシスおよび二次免疫活性化をもたらすデスシグナル伝達応答を活性化する、安定した/安定化されたコード核酸配列または非コード核酸配列;免疫原性アポトーシス材料により誘発される生存遺伝子発現の阻害および二次免疫活性化を介して標的細胞死(アポトーシス)を促進する、安定した/安定化されたコード核酸配列または非コード核酸配列を含む。

【０１８１】

本発明の別の局面において、核酸は二次構造をとってもよい。これらの二次構造は、一般的に、ヘリックス(隣接する塩基対)および様々な種類のループ(ヘリックスに囲まれた不対ヌクレオチド)に分けられる。塩基対を形成したヘリックス末端が短い不対ループで終わっているステムループ構造はごくありふれたものであり、より大きな構造モチーフ、例えば、4つのヘリックスがつながっているクローバー葉構造の基本要素である。内部ループ(長い対形成したヘリックスの中に、短い一続きの不対塩基がある)、およびバルジ(ヘリックスの一方の鎖に、反対の鎖に対応する塩基が無い「余分な」挿入された塩基がある領域)もまた頻繁にある。

【０１８２】

例えば、ステムループの分子内塩基対形成は、核酸分子内で起こり得るパターンである。この構造はヘアピンまたはヘアピンループとも知られ、同じ分子の2つの領域、通常、ヌクレオチド配列内の回文構造領域が塩基対を形成して、不対ループで終わる二重鎖を形成する。

【０１８３】

ステムループ構造の形成は、結果として生じるヘリックス領域およびループ領域の安定性に依存している。従って、第1の必要条件は、それ自身で折り畳んで、対形成した二重鎖を形成することができる配列が存在することである。このヘリックスの安定性は、その長さ、含まれるミスマッチまたはバルジの数(少ない数は、特に、長いヘリックスでは容認される)、および対形成した領域の塩基組成によって決まる。グアニンとシトシンの対は3つの水素結合を有し、2つしか水素結合が無いアデニン-チミン対と比較して安定性が高い。塩基の芳香環のπ軌道を好ましい方向に整列させる塩基スタッキング相互作用は、ヘリックス形成を促進することができる。

【０１８４】

ループの安定性もまたステムループ構造の形成に影響を及ぼす。長さが3塩基未満の「ループ」は立体的に不可能であり、形成しない。例示的なループ長さは約4～8塩基長でよい。

【０１８５】

例えば、パリンドロームDNA配列

---CCTGCXXXXXXXGCAGG---

は、以下のヘアピン構造

---C G---

ＣＧ

ＴＡ

ＧＣ

ＣＧ

ＸＸ

Ｘ Ｘ

ＸＸ

Ｘ

を形成することができる。

【０１８６】

天然の二次構造、例えば、反復遺伝子外パリンドローム(REP) 配列は、免疫系を刺激することが観察されている。Magnusson et al. The Journal of Immunology, 2007, 179: 31-35。「REP配列」という用語は、21～65塩基の長さを有する、反復性で、かつ回文構造の配列を含む。REP配列は、一部の細菌ゲノム遺伝子外空間において検出されており、総遺伝子外空間の>0.5%を構成する。これらの配列は多くのグラム陰性細菌に存在し、DNAの生理機能およびゲノムの可塑性において重要な役割を果たしている。REPなどのモチーフを含む強力な免疫刺激性ODNは、適切な長さを有し、かつ回文構造であるので、本発明において使用することができる。REPには回文構造があるので、REPがとり得る、可能性のあるステムループ二次構造が予想される。DNAの二次構造または三次構造は、REPに、より高い安定性およびDNアーゼ耐性を与えることができる。さらに、REPには、免疫による細

菌認識の標的の点で、2つのさらなる有利な特徴、すなわち存在量および保存がある。グラム陰性ヒト病原体、例えば、大腸菌、S.エンテリカ・チフィ(S. enterica typhi)、髄膜炎菌(N.meningitidis)、および緑膿菌に由来するREPを含むODNは自然免疫系を刺激し、これはTLR9受容体によって媒介される。Magnusson et al. The Journal of Immunology, 2007, 179:31-35。TLR9による検出は、REPがとり得る安定したステムループ二次構造により促進されると考えられている。変性条件下でも安定なDNA三次構造もまたIFN-α放出を刺激することができる。

【０１８７】

様々な態様において、本発明の標的化部分-生物活性薬剤複合体は、その二次構造によって免疫刺激分子として機能する核酸分子を含む。1つの態様において、天然ホスホジエステルバックボーンを有するdsODNは、二次構造、例えば、REPにおいて見られる二次構造を模倣するのに使用することができる。従って、炎症誘発性サイトカイン、例えば、IFN-αの産生を活性化するために、細菌、例えば、大腸菌、S.エンテリカ・チフィ、髄膜炎菌、および緑膿菌に由来する代表的なREPの配列を有する二本鎖ホスホジエステルオリゴヌクレオチドを使用することができる。別の態様において、合成バックボーンを有するdsODNを使用することができる。さらに別の態様において、免疫刺激性の二次構造および三次構造を形成するssODNを使用することができる。様々なこのような態様において、標的化部分は、腫瘍細胞上に存在する成分に特異的な抗体である。他の様々なこのような態様において、標的化部分は、病原体(例えば、細菌またはウイルス)上に存在する成分に特異的な抗体である。

【０１８８】

本開示全体に基づいて明らかなように、1つまたは複数の標的化部分は、1つまたは複数の核酸分子/配列を含む1つまたは複数の生物活性薬剤にカップリングされる。様々な態様において、活性薬剤は、免疫細胞(例えば、樹状細胞、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、Bリンパ球、単球、マクロファージ)の活性化、増殖、および/または生存を誘導する1つまたは複数の核酸配列(免疫刺激核酸配列=INASと呼ばれる)を含む。INASは、病原体関連分子パターン(PAMP)、または免疫細胞のTLR依存性もしくはTLR非依存性の活性化/増殖/生存を直接誘導する他の配列/構造;ならびに/あるいはリソソーム分解を逃れた未消化ヌクレオチドに対する細胞応答を介して免疫細胞の活性化/増殖/生存を誘導する、安定したもしくは安定化された核酸配列/構造;免疫系を活性化する細胞応答を誘発する天然デンジャーシグナルもしくはダメージ関連分子パターン(DAMP)として認識される核酸配列/構造;ならびに/あるいはストレスが加わった、ダメージを受けた、または死につつある/アポトーシスの標的細胞からの免疫刺激分子によって誘発される標的細胞死および二次免疫刺激を促進する、コード核酸配列または非コード核酸配列;ならびに/あるいは二次構造によって免疫刺激分子として機能する核酸分子のいずれかを含んでもよい。

【０１８９】

別の態様において、INASは、抗体(もしくはフラグメント)、リガンド、ペプチド、アプタマーまたは他の腫瘍標的化部分に複合化されてもよい。複合体の腫瘍標的または免疫細胞への侵入は、受容体を介したエンドサイトーシスまたはエレクトロポレーションを含む任意の方法により容易にすることができる。

【０１９０】

1つの態様において、本発明の複合体は、同じまたは異なる標的細胞成分に対する複数の標的化部分という文脈の中では、ならびに同じまたは異なる生物活性薬剤の1つまたは複数という文脈の中では、多価分子である。従って、例えば、異なる組み合わせの生物活性薬剤を用いる本発明の様々な態様において、治療上の相乗効果が起こる。

【０１９１】

様々な態様において、抗体または標的化部分に複合化されるINASは、特定の遺伝子発現を誘導する、裸のプラスミドDNAでもよく、免疫刺激性コード核酸配列(DNA、RNA)でもよい。1つの態様において、コード核酸はミニサークルである。

【０１９２】

従って、1つの態様において、少なくとも標的化部分と関心対象の遺伝子をコードする核酸分子とを含む組成物を投与すると、標的細胞タイプの標的化(すなわち、標的化部分が、ある特定の細胞タイプ(例えば、腫瘍細胞または他の細胞)に特異的である)、関心対象の遺伝子の発現、および標的細胞に対する免疫応答の同時活性化(抗体を介したプラスミドのエンドサイトーシスおよび細胞内環状非複製エピソームを介した遺伝子の標的化発現:抗体指向性非ウイルス遺伝子免疫療法)が可能になる。

【０１９３】

様々な態様において、標的細胞成分(例えば、HER2、EGFR、その他)に対する抗体または標的化部分は、裸のプラスミドDNA;自己複製RNAベクターを発現するプラスミドレプリコン(レプリカーゼに基づく核酸-DNAまたはRNA、例えば、アルファウイルスレプリコンまたはシンドビスウイルスレプリコン);ウイルスRNAポリメラーゼをコードするプラスミド;あるいは関心対象の遺伝子、例えば、標的/腫瘍抗原(DNAワクチン)、免疫刺激分子(サイトカイン、補助刺激分子、もしくは他の免疫刺激分子、例えば、内因性デンジャーシグナル、例えば、アラーミン、TLRアゴニスト)、膜結合Fcフラグメントもしくはは受容体(FcR)(例えば、CD32a)、または標的細胞死を促進する分子(例えば、デスレセプター-TRAIL-受容体、Fas;デスリガンド-TRAIL、FasL)をコードするプラスミドより選択されるプラスミドベクターに複合化される。様々な態様において、このような腫瘍標的化抗体または標的化部分は、本明細書において開示される任意の標的細胞成分(例えば、HER2、EGFRなど)を標的とするように設計することができる。

【０１９４】

ある態様において、抗体または標的化部分に複合化されるINASは、特異的な遺伝子発現を阻害する免疫刺激核酸(siRNAまたはアンチセンスまたはshRNA)でもよい。これは、腫瘍細胞の2つの成分を二重特異的に標的化すると同時に、標的細胞に対する免疫応答を活性化することができる。1つの態様において、標的細胞成分(例えば、HER2)に対する抗体は、生存遺伝子をサイレンシングするsiRNAまたは生存遺伝子をサイレンシングするリボザイムに複合化される。さらなる態様において、このような腫瘍標的化抗体は、免疫抑制分子(例えば、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO))の発現をサイレンシングする、siRNAまたはリボザイムに複合化される。

【０１９５】

1つの局面において、抗体に複合化されるINASは、腫瘍細胞/腫瘍血管系/腫瘍微小環境または免疫細胞(例えば、マクロファージまたは樹状細胞またはその他)の成分に結合することができる免疫刺激性アプタマー(RNAまたはDNA)でもよい。これは、腫瘍細胞の2つの成分を二重特異的に標的化すると同時に、標的細胞に対する免疫応答を活性化することができる。

【０１９６】

従って、様々な態様において、腫瘍標的化抗体は、別の腫瘍抗原または受容体(例えば、エストロゲン受容体;EGFR、本明細書に開示される任意の成分)を標的とするINASアプタマーに複合化される;腫瘍標的化抗体は、樹状細胞(DC)受容体を標的とするINASアプタマーに複合化される;腫瘍標的化抗体は、デスレセプター(例えば、TRAIL受容体またはCD95/Fas)を標的とするINASアプタマーに複合化される;またはデスレセプターに対する腫瘍標的化抗体は、腫瘍抗原または受容体(例えば、HER-2)を標的とするINASアプタマーに複合化される。さらに別の態様において、エストロゲン受容体(ER)結合分子(例えば、タモキシフェン)にINASが複合化される。

【０１９７】

前述の任意の態様において、および本明細書において開示される後の態様において、腫瘍標的化抗体は、腫瘍抗原または腫瘍関連抗原(すなわち、本明細書に記載の細胞成分、例えば、HER2、EGFRなど)を標的とするように設計することができる。

【０１９８】

別の態様において、INASは、1つまたは複数の腫瘍抗原/エピトープまたは病原体由来抗原に結合する抗体に複合化される。抗原および抗体-INASを含む免疫複合体は、特定の腫

瘍抗原または病原体由来抗原に対する免疫応答を生じるために使用することができる。

【０１９９】

別の態様において、INASは、免疫細胞(DCまたはその他)の成分に対する抗体に複合化される。このINAS-抗体複合体は、二次的に、1つまたは複数の腫瘍抗原/エピトープまたは病原体由来抗原に複合化されてもよい。抗原-抗体-INAS免疫複合体は、特定の腫瘍抗原または病原体由来抗原に対する免疫応答を生じるために使用することができる。例えば、活性薬剤は、DC抗原取り込み受容体に対する抗体に複合化されたINASおよび抗原を含んでもよい。

【０２００】

別の態様において、INASおよび抗原は、免疫細胞抗原または受容体(例えば、CD40、CD28などに対する受容体)を標的とする抗体に複合化される。

【０２０１】

さらなる態様において、INASは、免疫細胞抗原または受容体(例えば、CD40、T細胞抗原(antien)、例えば、CD3、CD4など)に対する抗体に複合化される。このようなINASの例には、特定の分子、例えば、GATA-3、IDOなど)の発現をサイレンシングするためのsiRNAが含まれる。

【０２０２】

ある態様において、INASは、Fcタンパク質または抗原-Fc融合タンパク質に複合化され、抗原は腫瘍抗原または病原体由来エピトープである。INAS-Fc複合体またはINAS-抗原-Fc複合体は、特定の腫瘍抗原または病原体由来抗原に対する免疫応答を生じるために使用することができる。

【０２０３】

別の態様において、二重特異性抗体は、特定の腫瘍抗原(抗腫瘍抗体)ならびに免疫刺激核酸(INAS-DNAまたはRNA)(抗INAS抗体)に結合する。これらの核酸を含有する免疫複合体(INASおよびアポトーシス細胞に結合する)は、マクロファージおよび樹状細胞により貪食された後に、エンドソームTLRを介した免疫応答またはTLR非依存性の免疫応答を活性化することができる。これは、抗体結合アポトーシス腫瘍細胞に由来する抗原に対する自己免疫応答を誘導することができる(患者特異的腫瘍DNAワクチン)。

【０２０４】

別の態様において、免疫刺激核酸配列(INAS)は、特定の腫瘍抗原ならびに抗体が結合するとデスシグナル伝達を活性化するデスレセプターに結合する二重特異性抗体に複合化される。二重特異性抗体は標的化腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し、アポトーシス細胞(INASに結合した免疫複合体を含有する)は、マクロファージおよび樹状細胞により貪食された後に、エンドソームTLRを介した免疫応答またはTLR非依存性の免疫応答を活性化することができる。これは、抗体結合アポトーシス腫瘍細胞に由来する抗原に対する自己免疫応答を誘導することができる(患者特異的腫瘍DNAワクチン)。

【０２０５】

別の態様において、免疫刺激核酸配列(INAS)は、特定の腫瘍抗原ならびに免疫細胞、例えば、樹状細胞に結合する二重特異性抗体に複合化される。この二重特異性抗体は、標的化腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し、アポトーシス細胞(INASに結合した免疫複合体を含有する)は、マクロファージおよび樹状細胞により貪食された後に、エンドソームTLRを介した免疫応答またはTLR非依存性免疫応答を活性化することができる。これは、抗体が結合したアポトーシス腫瘍細胞に由来する抗原に対して自己免疫応答を誘導することができる(患者特異的腫瘍DNAワクチン)。

【０２０６】

別の態様において、本発明の複合体(例えば、抗体-INASまたは標的化部分-INAS複合体)は、ウイルスの決定認識を模倣するように、2つの病原体関連分子パターン、例えば、dsRNAおよびDNAを組み合わせて検出できるように設計される。これにより、腫瘍ワクチン接種または免疫療法に用いることができる自然免疫応答が増強される。1つの態様において、複合体は、ウイルスRNAポリメラーゼまたはRNAレプリコンをコードするプラスミドCpG

DNAを含む。別の態様において、複合体は、DNA-RNAハイブリッドINAS(DNA+RNA)に複合化された抗体を含む。

【０２０７】

別の態様において、本発明の複合体(例えば、標的化部分-INASまたは抗体-INAS複合体)はまた、別のINAS(DNAもしくはRNA)またはINAS非依存性免疫刺激分子、例えば、別のPAMP、ダメージ関連分子パターン(DAMP)、Toll様受容体リガンド、TLR非依存性免疫刺激性リガンド、あるいはTLRリガンド:(天然、合成類似体、または完全に合成された低分子);TLR1(例えば、トリアシルリポペプチド);TLR2(例えば、リポタンパク質/リポペプチド、ペプチドグリカン、リポテイコ酸、リポアラビノマンナン、非定型のリポ多糖、ジアシルおよびトリアシルリポペプチド、HSP70);TLR3(INAS、例えば、ds RNA、ポリイノシン-ポリシチジル酸、他のアゴニスト);TLR4[例えば、リポ多糖、タキソール、HSP60(クラミジア・ニューモニエ(Chlamydia pneumoniae))、LPS/リピドA模倣物、例えば、モノホスホリルリピドA、合成リピドA、E5564、Ribi529、ヒアルロン酸のオリゴ糖、ヒアルロナン(HA));TLR5(例えば、細菌フラジェリン、不連続13アミノ酸ペプチド;TLR6(例えば、ジアシルリポペプチド);TLR7(INAS、例えば、ss RNA、オリゴヌクレオチド、ロキソリビン、レシキモド、イミキモド、他のアゴニスト);TLR8(INAS、例えば、ssRNA、他のアゴニスト);TLR9(INAS、例えば、細菌DNAまたはウイルスDNA、CpGオリゴデオキシヌクレオチド、非CpG DNA、他のアゴニスト);アラーミン、例えば、デフェンシン、カテリシジン、高移動度群Boxタンパク質1(HMGB1)、S100タンパク質、ヘパトーム由来増殖因子(HDGF)、好酸球由来神経毒(EDN)、熱ショックタンパク質(hsp70、hsp90、gp96 eHsp、例えば、Hsp72、その他を含む)、IL-1□、尿酸、ガレクチン、サイモシン、ヌクレオリン、アネキシン、または任意の疎水性タンパク質部分(Hyppo)を含むが、これらに限定されない免疫刺激性デンジャーシグナルを含むが、これらに限定されない、免疫刺激性デンジャーシグナルに、二次的に複合化/連結されてもよい。

【０２０８】

様々な態様において、INASは、以下のカテゴリー:(弱毒化させた、または生きた、または死滅させた)免疫刺激性病原体/生物を含む病原体由来核酸;病原体/生物に由来するゲノムDNA配列またはRNA配列;病原体または生物のゲノムの一部に対応する、合成のDNAまたはRNAの「模倣物」(例えば、誘導体および類似体)のいずれかに由来するDNA、またはRNA、またはDNA/RNAハイブリッド配列でよい。

【０２０９】

(1)2.関心対象の遺伝子をコードする核酸

本発明の別の局面において、関心対象の1つまたは複数のポリペプチドをコードする線状核酸分子または環状核酸分子にカップリングされた標的化部分を含む組成物および方法が提供される。従って、ある態様において、核酸分子は、関心対象の遺伝子を発現(すなわち、転写および/または翻訳)する。このようなコード核酸分子の例には、ウイルスベクター、プラスミド、ミニサークル、線状および環状dsDNAが含まれるが、これらに限定されない。1つの態様において、本発明の組成物は、関心対象のペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸分子である活性薬剤にカップリングされた本明細書に記載の標的化部分を含む。このようにコードおよび発現されるポリペプチドには、対象の免疫応答を増強または刺激する、本明細書において開示され、かつ当技術分野において公知の腫瘍抗原および感染因子抗原が含まれる。従って、標的化部分は、ある特定の細胞または組織を標的とし、免疫刺激性の所望の産物をコードする核酸分子を効果的に送達する。

【０２１０】

このような機構は、ある特定の疾患または感染因子のワクチンを接種するために、および免疫応答を増強または増大させる方法を提供するために使用することができる。発現ベクターは広く用いられており、本発明の組成物および方法と共に使用するように合わせることができる。米国特許第7,049,098号、同第6,143,530号、同第7,384,744号、同第7,279,568号、同第7,262,014号、同第6,977,296号、および同第6,692,750号;ならびに米国特許出願公開第2008/0145376号;同第2006/0281703号;同第2006/0211117号;同第2004/0214329

号、および同第2004/0209836号において例が示されている。

【０２１１】

プラスミド。様々な態様において、ワクチン接種は、いくつかのタイプのDNA構築物によって媒介することができる。例えば、1つの態様において、本発明の複合体は、関心対象の遺伝子を送達するために環状プラスミドDNA全体を含む。これらの環状二本鎖DNA構築物は細菌から得られ、関心対象の遺伝子と、哺乳動物に特異的なプロモーターおよびターミネーターだけでなく、細菌細胞での複製および維持に必要なエレメント(複製起点および抗生物質耐性カセットを含む)も含有する。このような発現ベクターの例は公知であり、本発明の状況において適用することができる。

【０２１２】

ミニサークル。本明細書において議論するように、1つの態様において、本発明の複合体は、所望の関心対象の遺伝子のコーディングおよび発現に使用することができるDNAミニサークルを含む。関心対象の遺伝子の発現ならびにDNAワクチンの全安全性を改善しようとして、ミニサークルが生まれた。ミニサークルは、プラスミドDNAを2つの部分であるミニサークルおよびミニプラスミドに組換えすることによって形成される。組換えの後に、ミニサークルは、DNAワクチンの必須の要素、すなわち、哺乳動物特異的プロモーター、関心対象の遺伝子、およびターミネーターのみを含有する。ミニサークルはまた他の配列、例えば、組換え部位も含有してよいが、可能な限り小さなDNAを含有するような構成にすることができる。ミニプラスミドは、DNAワクチンにおいて通常必要でない、または不要な他のプラスミドの複製配列、維持配列および細菌由来配列の全てを含有する。ミニサークルワクチンの一例は、Chen et. al.の例である(Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo, Molecular Therapy 8 (3), 2003; Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. Human Gene Therapy (16) p 126-131, 2005)。このミニサークル系は4つの鍵となる成分を有する。最初の2つは、ΦC31リコンビナーゼのDNAコード配列およびその認識配列(構築物内で2回反復)からなる。細菌内で産生されている間に、ΦC31発現が誘導され、親プラスミドのミニサークル(DNAワクチン部分を含有する)およびミニプラスミドへの組換えが起こる。第2の鍵となる2つの成分は、配列特異的制限エンドヌクレアーゼI-SceIのDNAコード配列およびプラスミドバックボーン内にコードされているその認識配列からなる。組換えの後に、ミニプラスミドは切断され、I-SceIによって線状化され、内因性細菌エンドヌクレアーゼによって分解される。次いで、ミニサークルは標準的なプラスミド精製プロセスによって精製される。

【０２１３】

さらに別の態様において、本発明の複合体は、関心対象の遺伝子をコードする線状DNA構築物を含む。これらの構築物において、DNAワクチンコード構築物(すなわち、プロモーター、抗原、ターミネーター)を増幅するために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)が用いられる。増幅された構築物は、通常、インビボで使用する際に分解されないように細胞ヌクレアーゼ耐性になるように操作される。例えば、Johansson et. al.(PCR-generated linear DNA fragments utilized as a hantavirus DNA vaccine, Vaccine 20 p. 3379-3388, 2002)は、ワクチン接種の際のエキソヌクレアーゼ分解を阻止するために、ホスホロチオエート修飾PCRプライマーを用いてDNAワクチン構築物を増幅した。

【０２１４】

さらに別の態様において、本発明の複合体は、minimalistic, immunologically defined gene expression(MIDGE)を含む。MIDGEは、2つのショートヘアピンオリゴヌクレオチド配列が隣接する、プロモーター、遺伝子、およびRNA安定化配列を含む発現カセットを含有する最小サイズの遺伝子導入単位である。結果として生じるベクターは、小さな、線状の、共有結合により閉じたダンベル型分子である。所望の遺伝子をコードしないDNAはできるだけ小さくされている。

【０２１５】

さらなる態様において、複合体は、2つの異なる核酸分子のハイブリダイゼーションを可能にする核酸修飾を含む。例えば、部位特異的にオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしかつ結合するヌクレオチド配列を組み込むように、dsDNA(環状プラスミド/ミニサークルまたは線状DNA)が修飾される。従って、標的化部分がオリゴヌクレオチド(oligonculeotide)にカップリングされたら、次に、オリゴヌクレオチドは発現ベクター(例えば、dsDNA)に連結することができる。別の態様では、本発明の標的化部分が発現ベクターにカップリングされたら、次に、発現ベクターはオリゴヌクレオチドに連結することができる。どちらの場合でも、オリゴヌクレオチド(oliognucleotide)は、PAMP、DAMP、TLRアゴニスト、またはアラーミンとしての特性に基づいて予め選択することができる。

【０２１６】

a)発現調節配列

さらなる態様において、所望の関心対象の遺伝子は、転写の開始および速度を制御する核酸配列の領域である制御配列である「プロモーター」を含む核酸分子によって発現される。プロモーターは、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節タンパク質および調節分子が結合し得る遺伝因子を含有してもよい。「機能的に配置された」「機能的に連結された」、「制御下にある」、および「転写制御下にある」という句は、プロモーターが、核酸配列の転写開始および/または発現を制御するために、核酸配列(すなわち、ORF)に対して正しい機能的な位置および/または方向にあることを意味する。プロモーターは「エンハンサー」と共に用いられてもよく、用いられなくてもよい。エンハンサーは、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用調節配列を指す。

【０２１７】

コード核酸セグメントを組換えプロモーターまたは異種プロモーターの制御下に置くことによって、ある特定の利益が得られる。組換えプロモーターまたは異種プロモーターは、天然環境において核酸配列と通常関連していないプロモーターを指す。組換エンハンサーまたは異種エンハンサーも、天然環境において核酸配列と通常関連していないエンハンサーを指す。このようなプロモーターまたはエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、ならびに他の任意の原核細胞、ウイルス細胞、または真核細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、ならびに「天然」ではないプロモーターまたはエンハンサー、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメントおよび/または発現を変える変異を含有するプロモーターまたはエンハンサーを含んでもよい。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成により生成することに加えて、配列は、本明細書において開示される組成物と共に、組換えクローニング技術および/またはPCR(商標)を含む核酸増幅技術を用いて生成されてもよい(米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照されたい。それぞれ参照により本明細書に組み入れられる)。さらに、配列を、直接、ミトコンドリア、葉緑体などの核でない細胞小器官の中で転写および/または発現させる制御配列も使用できることが意図される。しかしながら、ある特定の態様において、プロモーターは遺伝子または配列と天然で関連しているものでもよく、コードセグメントおよび/またはエキソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得ることができる。このようなプロモーターは「内因性」プロモーターと呼ばれることがある。同様に、エンハンサーは核酸配列と天然で関連しているものでもよく、核酸配列の下流に位置してもよく、上流に位置してもよい。

【０２１８】

もちろん、発現のために選択された細胞小器官、細胞、組織、および生物においてDNAセグメントを効率的に発現させるプロモーターおよび/またはエンハンサーを使用することが重要な場合もある。分子生物学の当業者であれば、タンパク質を発現させるために、プロモーター、エンハンサー、および細胞タイプの組み合わせを用いることを通常知っている。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Sambrook et al.(1989)を参照されたい。使用されるプロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、誘導性プロモーター、および/または導入されたDNAセグメントを高レベルに発現させるのに適切な条件下で有用なプロモーターでよい。様々な態様において、関心対象のコード配列

の高レベル発現を得るために、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)最初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端反復配列、β-アクチン、ラットインシュリンプロモーター、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼを使用することができる。発現レベルが所定の目的に十分であれば、関心対象のコード配列を発現させるために、当技術分野において周知の他のウイルスプロモーターまたは哺乳動細胞プロモーターまたは細菌ファージプロモーターを使用することも意図される。周知の特性を有するプロモーターを使用することによって、トランスフェクションまたは形質転換の後に、関心対象のタンパク質の発現レベルおよび発現パターンを最適化することができる。

【０２１９】

特定の生理学的シグナルまたは合成シグナルに応答して調節されるプロモーターを選択すると、遺伝子産物の誘導発現することが可能になる。有用な周知の誘導系の1つは、最初にGossenおよびBujard(Gossen and Bujard, 1992; Gossen et al., 1995)によって開発された、Tet-Off(商標)またはTet-On(商標)系(Clontech, Palo Alto, Calif.)である。このシステムはまた、高レベルの遺伝子発現を、テトラサイクリンまたはテトラサイクリン誘導体、例えば、ドキシサイクリンに応じて調節することができる。Tet-On(商標)系では、ドキシサイクリンの存在下で遺伝子が発現されるのに対して、Tet-Off(商標)系では、ドキシサイクリンの非存在下で遺伝子が発現される。これらの系は、大腸菌のテトラサイクリン耐性オペロンに由来する2つの調節エレメント、テトラサイクリンリプレッサーが結合するテトラサイクリンオペレーター配列と、テトラサイクリンリプレッサータンパク質に基づいている。関心対象の遺伝子は、テトラサイクリン応答配列を有するプロモーターの後にある発現エレメントにクローニングされる。第2のプラスミドは、テトラサイクリン制御トランス活性化因子と呼ばれる調節エレメントを含有する。これは、Tet-Off(商標)系では、単純ヘルペスウイルス由来VP16ドメインおよび野生型テトラサイクリン(tertracycline)リプレッサーからなる。従って、ドキシサイクリンの非存在下では、構成的に転写が行われる。Tet-On(商標)系では、テトラサイクリンリプレッサーは野生型でなく、ドキシサイクリンの存在下で転写を活性化する。遺伝子療法ベクターを作製するには、Tet-Off(商標)系は、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンの存在下で産生細胞が増殖し、潜在的に毒性のあるトランスジーンの発現を阻止できるが、ベクターが患者に導入された場合には、構成的に遺伝子が発現されるので好ましいだろう。

【０２２０】

場合によっては、遺伝子療法ベクターの中でトランスジーンの発現を調節することが好ましい。例えば、所望の発現レベルに応じて、様々な活性強度を有する異なるウイルスプロモーターが用いられる。哺乳動物細胞では、強力な転写活性化をもたらすために、CMV最初期プロモーターがよく用いられる。低レベルのトランスジーン発現が望ましい場合、あまり強力でない改変版CMVプロモーターも用いられている。造血細胞におけるトランスジーン発現が望ましい場合、レトロウイルスプロモーター、例えば、MLVまたはMMTVに由来するLTRがよく用いられる。所望の効果に応じて用いられる他のウイルスプロモーターには、SV40、RSV LTR、HIV-1およびHIV-2 LTR、アデノウイルスプロモーター、例えば、E1A、E2A、またはMLP領域に由来するプロモーター、AAV LTR、HSV-TK、およびトリ肉腫ウイルスが含まれる。同様に、非標的化組織に対する潜在的な毒性または望ましくない作用を減らすために、特定の組織または細胞において転写させるために、組織特異的プロモーターが用いられる。例えば、PSAに関連するプロモーターまたは前立腺特異的な腺性カリクレインなどのプロモーター。

【０２２１】

ある特定の適応症では、遺伝子療法ベクターが投与された後、ある特定の時間で転写を活性化させることが望ましい。これは、ホルモンまたはサイトカインにより調節可能なプロモーターのようなプロモーターを用いて行われる。使用することができる、サイトカインおよび炎症性タンパク質に応答性のプロモーターには、KおよびTキニノーゲン(Kageyama et al., 1987)、c-fos、TNF-α、C反応性タンパク質(Arcone et al., 1988)、ハプトグ

ロビン(Oliviero et al., 1987)、血清アミロイドA2、C/EBPα、IL-1、IL-6(Poli and Cortese, 1989)、補体C3(Wilson et al., 1990)、IL-8、α-1酸性糖タンパク質(Prowse and Baumann, 1988)、α-1抗トリプシン、リポタンパク質リパーゼ(Zechner et al., 1988)、アンギオテンシノゲン(Ron et al., 1991)、フィブリノゲン、c-jun(ホルボールエステル、TNF-α、UV線、レチノイン酸、および過酸化水素により誘導される)、コラゲナーゼ(ホルボールエステルおよびレチノイン酸により誘導される)、メタロチオネイン(重金属およびグルココルチコイドにより誘導される)、ストロメライシン(ホルボールエステル、インターロイキン-1およびEGFにより誘導される)、α-2マクログロブリン、ならびにα-1抗キモトリプシンが含まれる。

【０２２２】

i.エンハンサー

エンハンサーは、同じDNA分子の離れた位置にある、プロモーターからの転写を増大させる遺伝因子である。エンハンサーはプロモーターに非常によく似た構成をしている。すなわち、エンハンサーは多くの個々のエレメントからなり、これらはそれぞれ1つまたは複数の転写タンパク質に結合する。エンハンサーとプロモーターの基本的な違いは操作上の違いである。エンハンサー領域は全体として、ある距離をおいて転写を刺激できなければならない。これは、プロモーター領域またはその成分エレメントについても当てはまる必要はない。他方で、プロモーターは、ある特定の部位にかつある特定の方向で、RNA合成を開始する1つまたは複数のエレメントを有しなければならない。これに対して、エンハンサーはこれらの特異性を欠いている。プロモーターおよびエンハンサーは重複かつ連続していることが多く、非常に似たモジュール構成を有するように見えることが多い。

【０２２３】

遺伝子を発現させるために、プロモーター/エンハンサーの任意の組み合わせ(真核生物プロモーターデータベースEPDBに従う)を使用することができる。真核細胞は、適切な細菌ポリメラーゼが送達複合体の一部として、またはさらなる遺伝子発現構築物として提供されれば、ある特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持することができる。

【０２２４】

c).ポリアデニル化シグナル

cDNAインサートが用いられる場合、典型的には、遺伝子転写物を適切にポリアデニル化するためにポリアデニル化シグナルを含めることが望ましいだろう。ポリアデニル化シグナルがどういったものであるかは本発明の実施の成功に重要だと考えられておらず、このような任意の配列、例えば、ヒトまたはウシの成長ホルモンポリアデニル化シグナルおよびSV40ポリアデニル化シグナルが用いられる。発現カセットのエレメントとしてターミネーター(terninator)も意図される。これらのエレメントはメッセージレベルを増強し、カセットから他の配列への読み通しを最小限にするのに役立ち得る。

【０２２５】

d)開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位

コード配列が効率的に翻訳されるには、ある特定の開始シグナルも必要とされる場合がある。これらのシグナルには、ATG開始コドンまたは隣接配列が含まれる。ATG開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルを設けることが必要な場合がある。当業者であれば、このことを容易に決定し、必要なシグナルを設けることができるだろう。インサート全体の翻訳を確実にするために、開始コドンが所望のコード配列の読み枠とインフレームでなければならないことは周知である。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは天然のものでもよく、合成のものでもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントの含有によって増強することができる。

【０２２６】

本発明のある特定の態様において、多重遺伝子のメッセージまたはポリシストロニックなメッセージを作り出すために、配列内リボソーム進入部位(IRES)エレメントの使用が用いられる。IRESエレメントは、5'メチル化キャップ依存性翻訳のリボソームスキャニングモデルを迂回し、内部部位で翻訳を開始することができる(Pelletier and Sonenberg, 19

88)。ピコルナウイルス科の2つのメンバー(ポリオおよび脳心筋炎)に由来するIRESエレメントが述べられおり(Pelletier and Sonenberg, 1988)、哺乳動物メッセージに由来するIRESも述べられている(Macejak and Sarnow, 1991)。IRESエレメントは異種オープンリーディングフレームと連結することができる。それぞれIRESによって分けられた複数のオープンリーディングフレームを一緒に転写して、ポリシストロニックなメッセージを作り出すことができる。IRESエレメントによって、それぞれのオープンリーディングフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームに接近することができる。1種類のプロモーター/エンハンサーを用いて1本のメッセージを転写するように、複数の遺伝子を効率的に発現させることができる(それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,925,565号および同第5,935,819号を参照されたい)。

【０２２７】

プロモーターは異種プロモーターでもよく、内因性プロモーターでもよい。例えば、ポリヌクレオチドプロモーター配列は、構成的プロモーター(すなわち、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルスプロモーター、ヒト免疫不全症ウイルス長末端反復配列プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン-バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ヒトアクチオン(action)プロモーター、ヒトミオシンプロモーター、ヒトヘモグロビンプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、EF1-αプロモーター、およびヒト筋肉クレアチンプロモーター)、誘導性プロモーター(すなわち、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリンプロモーター)、ならびに組織特異的プロモーター(すなわち、樹状細胞(すなわち、CD11c)、PSA関連プロモーターまたは前立腺特異的腺性カリクレイン)からなる群より選択される。本発明の組成物および方法に組み込むことができる様々なプロモーターエレメントのさらなる例は公知である。例えば、様々な調節配列データベースに開示されるプロモーターエレメント:tiprod.cbi.pku.edu.cn:8080/index.htmlで利用可能な組織特異的プロモーターデータベース;http://www.epd.isb-sib.ch/で利用可能な真核生物プロモーターデータベース;オルソロガスプロモーターデータベースhttp://doop.abc.hu。

【０２２８】

このようなプロモーターは、所望の遺伝子産物を発現させるために、本発明の組成物が送達される標的細胞または組織に基づいて選択することができる。さらに、標的化における別の選択性のレベルは、所望の細胞タイプまたは組織タイプに選択的な標的化部分を利用することを含む。例えば、このような態様では、組成物は、細胞タイプに特異的な標的化部分を含み、発現が細胞タイプに特異的なプロモーターの制御下にある、所望の抗原をコードする核酸分子をさらに含む。

【０２２９】

さらに別の態様において、組成物(compsition)は、一方の標的化部位が細胞タイプ特異的であり、他方の標的化部位が疾患特異的(例えば、標的腫瘍抗原または感染因子関連抗原)に特異的である2種類の標的化部位を含む。従って、このような組成物の一般式は、T1-T2-A1-A2またはまたはそのバリエーションによって示すことができる。式中、T1=標的化部分1であり、T2=標的化部分2である。さらに、このような組成物は、1つまたは複数の非コード免疫刺激(immunotimulatory)核酸分子(moleucle)、1つまたは複数の抗原性ペプチド、および抗原性のポリペプチドまたは補助刺激ポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸分子(moleucle)を含んでもよい。

【０２３０】

B.ペプチド-補助刺激

本明細書において示したように、様々な態様において、本発明の組成物は、免疫刺激核酸分子を含む。本発明の別の局面において、本発明の組成物は、対象の免疫応答を刺激するポリペプチドまたは対象の免疫応答を刺激するポリペプチドをコードする核酸を含む。

【０２３１】

自然免疫系は、微生物に存在する保存された分子パターンを認識するために、生殖系列によってコードされている一組の受容体を使用する。これらの分子パターンは、リポ多糖、ペプチドグリカン、リポテイコ酸、ホスファチジルコリン、リポタンパク質を含む細菌特異的タンパク質、細菌DNA、ウイルス一本鎖および二本鎖RNA、非メチル化CpG-DNA、マンナン、ならびに様々な他の細菌細胞壁成分および真菌細胞壁成分を含む、微生物のある特定の構成物において生じる。このような分子パターンはまた、他の分子、例えば、植物アルカロイドにおいても生じることがある。これらの自然免疫認識標的は、微生物が産生するが、感染宿主生物は産生しないので、病原体関連分子パターン(PAMP)と呼ばれる(Janeway et al., 1989; Medzhitov et al., 1997)。

【０２３２】

PAMPを認識する自然免疫系の受容体は、パターン認識受容体(PRR)と呼ばれる(Janeway et al., 1989; Medzhitov et al., 1997)。これらの受容体は構造が異なり、いくつかの異なるタンパク質ファミリーに属する。これらの受容体の一部はPAMPを直接認識するのに対して(例えば、CD14、DEC205、コレクチン)、他の受容体(例えば、補体受容体)は、PAMP認識によって生じた産物を認識する。これらの受容体のファミリーのメンバーは大まかに3つのタイプ:1)血漿中を循環する体液性受容体;2)免疫細胞表面上で発現するエンドサイトーシス受容体、および3)細胞表面上または細胞内で発現することができるシグナル伝達受容体に分けることができる(Medzhitov et al., 1997; Fearon et al., 1996)。

【０２３３】

細胞PRRは、適応免疫においてプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)として機能する細胞を含む、自然免疫系のエフェクター細胞上で発現する。このようなエフェクター細胞には、マクロファージ、樹状細胞、Bリンパ球、および表面上皮が含まれるが、これらに限定されない。この発現プロファイルのために、PRRは自然免疫エフェクター機構を直接誘導することができ、一組の内因性シグナル、例えば、下記の炎症性サイトカインおよびケモカインの発現を誘導することによって、宿主生物に感染因子が存在すると警告することもできる。この後者の機能は、侵入者と戦うように、エフェクターの力を効率的に動員することを可能にする。

【０２３４】

樹状細胞(DC)の主な機能は、末梢組織における抗原の獲得、二次リンパ組織への移動、および免疫系のエフェクターT細胞への抗原の提示である(Banchereau, et al., 2000; Banchereau, et al., 1998)。DCは免疫応答において重要な役割を行う時に、それぞれの環境に適した機能を果たすのを可能にする成熟変化を経る(Termeer, C. C. et al., 2000)。DC成熟の間に、抗原取り込み能は失われ、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子およびクラスII分子の表面密度は10～100倍高まり、補助刺激分子および接着分子であるCD40の発現もまた大幅に増加する(Lanzavecchia, A. et al., 2000)。さらに、他の遺伝子変化によって、DCは、流入領域リンパ節のT細胞に富む傍皮質へのホーミング、ナイーブ細胞および記憶T細胞を誘引するT細胞ケモカインの発現、ならびに抗原特異的ナイーブTH0細胞の初回刺激が可能になる(Adema, G. J. et al., 1997)。この段階の間、成熟DCは、MHC II分子を介してCD4+Tヘルパー細胞に抗原を提示し、T細胞CD40リガンド(CD40L)のアップレギュレーションを誘導し、次に、T細胞CD40リガンド(CD40L)はDC CD40受容体に結合する。このDC:T細胞相互作用は、MHC I分子およびII分子、接着分子、補助刺激分子(例えば、B7.1、B7.2)、サイトカイン(例えば、IL-12)、および抗アポトーシスタンパク質(例えば、Bcl-2)のさらなるアップレギュレーションを含む、強力なCD8+細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答の開始に重要なさらなるDC分子の急速な発現を誘導する(Anderson, D. M., et al., 1997; Caux, C., et al., 1997; Ohshima, Y., et al., 1997; Sallusto, F., et al., 1998)。CD8+T細胞はリンパ節から出て、循環に再び入り、病原体または悪性細胞を破壊するために元の炎症部位にホーミングする。

【０２３５】

DCの機能に影響を及ぼす、鍵となるパラメータの1つが、DCの「オンスイッチ」として役立つCD40受容体である(Bennett, S. R. et al., 1998; Clark, S. R. et al., 2000; F

ernandez, N. C., et al., 1999; Ridge, J. P. et al., 1998; Schoenberger, S. P., et al., 1998)。CD40は、TNF受容体スーパーファミリーの48kDa膜貫通メンバーである(Mcwhirter, S. M., et al., 1999)。CD40-CD40L相互作用は、TNF受容体関連因子(TRAF)を伴うシグナル伝達カスケードの開始に必要なCD40三量体形成を誘導する(Ni, C. Z., et al., 2000; Pullen, S. S. et al., 1999)。CD40は、これらのシグナル伝達分子を用いて、NF.κ.B、AP-1、STAT3、およびp38MAPKを含む、DCのいくつかの転写因子を活性化する(McWhirter, S. M., et al., 1999)。

【０２３６】

補助刺激ポリペプチドには、NFκB経路、Akt経路、および/またはp38経路を活性化する任意の分子またはポリペプチドが含まれる。DC活性化系は、リガンド結合ドメイン(すなわち、低分子結合ドメイン)と融合した組換えシグナル伝達分子の利用に基づいている。ここで、補助刺激ポリペプチドはオリゴマー化リガンド(すなわち、脂質透過性有機二量体化薬物)により活性化および/または調節される。補助刺激ポリペプチドを架橋またはオリゴマー化するのに使用することができる他の系には、抗体、天然リガンド、および/または人工交差反応リガンドもしくは合成リガンドが含まれる。なおさらに、意図される他の二量体化系には、クーママイシン/DNAジャイレースB系が含まれる。

【０２３７】

本発明において使用することができる補助刺激ポリペプチドには、NFκBおよび他の可変シグナル伝達カスケード、例えば、p38経路および/またはAkt経路を活性化する補助刺激ポリペプチドが含まれる。このような補助刺激ポリペプチドには、パターン認識受容体、C反応性タンパク質受容体(すなわち、Nod1、Nod2、PtX3-R)、TNF受容体(すなわち、CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1BB)、およびHSP受容体(Lox-1およびCD-91)が含まれるが、これらに限定されない。

【０２３８】

本明細書に記載のように、PRRには、エンドサイトーシスパターン認識受容体(すなわち、マンノース受容体、スカベンジャー受容体(すなわち、Mac-1、LRP、ペプチドグリカン、タイコ酸(techoic acid)、毒素、CD11c/CR4));外部シグナルパターン認識受容体(Toll様受容体(TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11)、ペプチドグリカン認識タンパク質、(PGRPは細菌ペプチドグリカンおよびCD14に結合する);ならびに内部シグナルパターン認識受容体(すなわち、NOD-受容体1および2)が含まれるが、これらに限定されない。

【０２３９】

なおさらなる態様において、本発明の組成物は、標的化部分、および少なくとも、1つまたは複数の補助刺激ポリペプチドをコードする核酸配列を含む。抗原性ポリペプチドに加えて、または抗原性ポリペプチドの代わりに、補助刺激ポリペプチドを発現することができる。例えば、1つの態様において、免疫複合体は、標的化部分、免疫刺激核酸(例えば、PAMP)、および1つまたは複数の(例えば、2種類または3種類の)補助刺激ポリペプチドをコードする発現可能な核酸を含む。さらなる態様において、免疫複合体は、抗原性ペプチドもしくはポリペプチド、または抗原性ペプチドもしくはポリペプチドをコードするさらなる核酸分子を含む。

【０２４０】

補助刺激ポリペプチドには、パターン認識受容体、C反応性タンパク質受容体(すなわち、Nod1、Nod2、PtX3-R)、TNF受容体(すなわち、CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1BB)、ならびにHSP受容体(Lox-1およびCD-91)が含まれるが、これらに限定されない。具体的には、補助刺激ポリペプチドはCD40細胞質ドメインである。

【０２４１】

従って、本発明の様々な態様において、組成物は、標的化部分、および少なくとも1つの補助刺激ポリペプチドまたは補助刺激ポリペプチドをコードする核酸分子を含む。このような補助刺激ポリペプチド分子は、抗原提示分子の樹状細胞発現をアップレギュレートすることによって、T細胞を介した応答を増幅することができる。本発明において意図さ

れる補助刺激タンパク質には、例えば、腫瘍壊死因子(TNF)ファミリーのメンバー(すなわち、CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1B)、Toll様受容体、C反応性タンパク質受容体、パターン認識受容体、およびHSP受容体が含まれるが、これらに限定されない。1つの態様において、本発明の組成物は、これらの補助刺激ポリペプチドに由来する細胞質ドメインを発現する核酸分子を含む。様々な補助刺激ポリペプチドの1つに由来する細胞質ドメインはその変異体を含めて公知であり、細胞質ドメインの認識配列は、細胞質ドメインに関連する転写の開始に関与し、または、このような配列に応答する遺伝子は公知である。本明細書において本発明の状況において共に使用することができる補助刺激ポリペプチドのさらなる例は当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第7,404,950号;同第6,891,030号;同第6,803,192号;および同第7,074,590号、ならびに米国特許出願第2007/0172947号;同第20060269566号および同第2005/0084913号に開示されている。

【０２４２】

C.抗菌性ペプチド(アラーミン)

別の態様において、本発明の複合体は、1つもしくは複数の抗菌性ペプチドをコードする配列に連結されるか、または1つもしくは複数の抗菌性ペプチドをコードする配列を含む。本発明による抗菌性ペプチドは、微生物を死滅することができる、または微生物の増殖を阻害することができるペプチドである。本発明の抗菌性ペプチドの抗菌活性には、抗菌活性、抗ウイルス活性、または抗真菌活性が含まれるが、それらに限定されるわけではない。抗菌性ペプチドには、様々なペプチドクラス、例えば、植物ならびに動物から最初に単離されたペプチドが含まれる。動物では、抗菌性ペプチドは通常、好中球および上皮細胞を含む様々な細胞によって発現される。ヒトを含む哺乳動物では、抗菌性ペプチドは通常、舌、気管、および腸上部の表面に見出される。天然の抗菌性ペプチドは一般的に、100未満のアミノ酸を含む両親媒性分子である。これらのペプチドの多くは一般的に、正味の正電荷を有し(すなわち、陽イオン性であり)、大部分がらせん構造を形成する。

【０２４３】

1つの態様において、本発明による抗菌性ペプチドは、約2～約100アミノ酸、約5～約50アミノ酸、または約7～約20アミノ酸を含む。1つの好ましい態様において、標的化ペプチドは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30のアミノ酸長を有する。

【０２４４】

別の態様において、抗菌性ペプチドは、約40μM以下、約30μM以下、20μM以下、または10μM以下の最小阻害濃度(MIC)で抗菌活性を有する。

【０２４５】

別の態様において、抗菌性ペプチドは、アレキソマイシン(alexomycin)、アンドロピン(andropin)、アピダエシン(apidaecin)、バクテリオシン、β-プリーツシートバクテリオシン、バクテネシン、ブフォリン(buforin)、カテリシジン、α-らせん状クラバニン、セクロピン、ドデカペプチド、デフェンシン、β-デフェンシン、α-デフェンシン、ゲグリン(gaegurin)、ヒスタチン、インドリシジン、マガイニン、メリチン、ニシン、ノビスピリンG10、プロテグリン、ラナレキシン(ranalexin)、タキプレシン、およびそれらの誘導体を含むが、それらに限定されるわけではない1つまたは複数の抗菌性ペプチドを含む。

【０２４６】

これらの公知の抗菌性ペプチドの中で、タキプレシンは、抗真菌活性および抗菌活性を有することが知られている。アンドロピン、アピダエシン(apidaecin)、バクテンシン(bactencin)、クラバニン、ドデカペプチド、デフェンシン、およびインドリシジンは、抗細菌活性を有する抗菌性ペプチドである。ブフォリン、ニシン、およびセクロピンペプチドは、大腸菌、志賀赤痢菌(Shigella disenteriae)、ネズミチフス菌(Salmonella typhimurium)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)、黄色ブドウ球菌、および緑膿菌に抗菌作用を及ぼすことが実証されている。マガイニンおよびラナレキシンペプチドは、同じ生物に抗菌作用を及ぼし、さらにはカンジダ・アルビカンス、クリプトコックス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)、カンジダ・クルセイ(Candida krusei)、およびヘ

リコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)にも、そのような作用を及ぼすことが実証されている。マガイニンは、単純ヘルペスウイルスに抗菌作用を及ぼすことも実証されている。アレクソマイシンペプチドは、カンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter jejuni)、モラクセラ・カタラーリス(Moraxella catarrhalis)、およびインフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)に抗菌作用を及ぼすことが実証されており、その一方でデフェンシンおよびβ-プリーツシートデフェンシンペプチドは、肺炎連鎖球菌に抗菌作用を及ぼすことが明らかにされている。ヒスタチンペプチドおよびその誘導体は、ミュータンス連鎖球菌(Streptococcus mutans)を含む様々な生物に対して抗真菌活性および抗細菌活性を有するもう一つのクラスの抗菌性ペプチドである(MacKay, B. J. et al., Infect. Immun. 44:695-701(1984); Xu, et al., J. Dent. Res. 69:239(1990))。

【０２４７】

1つの態様において、本発明の抗菌性ペプチドは、ヒスタジンペプチドのクラスおよびその誘導体に由来する1つまたは複数の抗菌性ペプチドを含有する。さらなる例は、米国特許出願第US20080170991号に示されている。

【０２４８】

別の態様において、本発明の抗菌性ペプチドは、プロテグリンのクラスおよびその誘導体に由来する1つまたは複数の抗菌性ペプチドを含有する。例えば、本発明の抗菌性ペプチドはプロテグリンPG-1を含有する。

【０２４９】

プロテグリンペプチドは、米国特許第5,693,486号、同第5,708,145号、同第5,804,558号、同第5,994,306号、および同第6,159,936号に記載されている。これらは全て参照により本明細書に組み入れられる。

【０２５０】

本発明による抗菌性ペプチドは、当業者に公知の任意の適切な方法によって、単独で、または標的化ペプチドおよびリンカーペプチドと組み合わせて生成することができる。例えば、抗菌性ペプチドは合成機により化学合成されてもよく、発現系、例えば、細菌発現系、酵母発現系、または真核細胞発現系を用いて組換えにより作られてもよい。化学合成において、抗菌性ペプチドは、L-アミノ酸鏡像異性体またはD-アミノ酸鏡像異性体によって作ることができる。

【０２５１】

1つの態様において、本発明の複合体は、抗菌性ペプチドLL-37-カテリシジン由来抗菌性ペプチド:アラーミンを含む。

【０２５２】

抗菌性ペプチドは、微生物侵入者に対する多細胞生物の自然免疫宿主防御において重要な役割を果たしている。抗菌性ペプチドの中で共通する特徴は、疎水性アミノ酸のクラスターおよびカチオン性アミノ酸のクラスターが分子の別個の区画に空間的に配置されている、両親媒性コンホメーションをとる能力である。デフェンシンおよびカテリシジンは、哺乳動物における2つの主要な抗菌性ペプチドファミリーである。カテリシジンは、高度に保存されたN末端カテリン(cathelin)ドメインおよび多様性のある抗菌性C末端からなる。LL-37は、2個のN末端ロイシンを有する37アミノ酸ペプチドであり、唯一知られているヒトカテリン関連抗菌性ペプチドである。LL-37、hCAP-18、およびそのマウスホモログCRAMPの前駆体は主に骨髄細胞において発現されるが、精巣上体、精子細胞、および多くの臓器の上皮細胞を含む非骨髄組織においても広範囲に発現されている。重要なことに、LL-37の発現は、ケラチノサイトおよび他の部位の上皮細胞では、感染刺激または炎症刺激の際に誘導される。LL-37は細菌細胞の溶解を誘導し、細菌エンドトキシンを中和し、白血球に対して化学誘引作用を有する。LL-37は、樹状細胞を活性化することができるアラーミンおよびTLRアゴニストを代表する。LL-37は、プラスミドDNAを血清ヌクレアーゼ分解から守り、DNAを哺乳動物細胞の核区画に効率的に標的化する。LL-37-DNA複合体は、非カベオラ脂質ラフトドメインならびに細胞表面プロテオグリカンが関与するエンドサイトーシスを介して哺乳動物細胞に侵入する。

【０２５３】
抗体-DNA複合体およびLL37複合体の調製。LL-37ペプチド
(LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES-C-アミド)
は合成され、ペプチド配列は、逆相高圧液体クロマトグラフィーおよび質量分析法によって確認されている。LL-37-DNA複合体を形成するためには、DNA(10μg/ml)およびLL-37(5～100μg/ml)を逆さまにして混合し、室温で30分間インキュベートする。または、LL-37を、抗体に共有結合によりカップリングしてもよく、融合タンパク質として抗体/標的化リガンドに組み込んでもよい。
【０２５４】
ある態様において、複合体は、ヒスチジンリッチ両親媒性抗菌性ペプチドを含む。変数のヒスチジン残基を含有する合成カチオン性両親媒性ペプチドもまた、本発明の抗体-DNA複合体と複合体化することができる。トランスフェクション効率は、ペプチド内のヒスチジン残基の数および位置、ならびに内面から膜貫通への移行(in-plane to transmembrane transition)が起こるpHに依存する。エンドソームの酸性化も必要とされる。これらのペプチドは、DNAと複合体化した時でも高レベルの抗菌活性を維持している。例には、アラニン残基およびロイシン残基に富み、様々な数のリジン残基およびヒスチジン残基を有する両親媒性ペプチドが含まれる。ペプチドの両端にあるリジンはDNA縮合を助けるのに対して、ヒスチジン残基はDNAのエンドソームエスケープに有利に働く(11)。ペプチド配列の例には、
KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA;
KKALLALALHHLAHLAHHLALALKKA;またはKKALLALALHHLALLAHHLALALKKA-NH_2
が含まれる。
【０２５５】
ペプチド-DNA複合体を形成する例示的な方法。ペプチド(4～6ug/1ugDNA)およびDNA(それぞれ、100μlの150mM NaClで希釈する)を混合し、室温で20分間インキュベートする。または、ペプチドを、抗体に共有結合によりカップリングしてもよく、融合タンパク質として抗体/標的化リガンドに組み込んでもよい。
【０２５６】
本発明の状況において使用するための他のペプチドには、多塩基性抗菌性ペプチド、例えば、DNAに結合し、膜を不安定化する多官能性ペプチドが含まれる。さらに、このようなペプチドには、多塩基性「膜透過ペプチド」:HIV-1トランス活性化因子(Tat)-
YGRKKRRQRRRPPQC
;ショウジョウバエ(Drosophila)のアンテナペディア(Antennapedia)タンパク質-
RQIKIWFQNRRMKWKK
;単純ヘルペスVP22;またはポリリジンが含まれる。これらのペプチドは、PG依存性エンドサイトーシスおよび非カテリン介在性エンドサイトーシスを介した、DNA内部移行を媒介する。
【０２５７】
さらなる態様において、ペプチドには、抗菌性ペプチド、例えば、KALA、ppTG20、およびVpr52-96が含まれる。KALAおよびppTG20は、DNA結合に必要な正に荷電したリジンまたはアルギニンの配列と、融合性ペプチドGALAおよびJTS-1に由来する両親媒性膜不安定化ドメインを組み合わせている。これらのトランスフェクティングペプチドは、リジンまたはアルギニンをヘリックスの1つの面に配置する、αヘリックスコンホメーションの強い傾向を有する。
【０２５８】
なおさらなる態様において、本発明の複合体は硫酸プロタミンに連結される。例えば、抗体-DNA複合体は、核酸結合タンパク質、または精子DNAを核形成するプロタミン断片(アミノ酸8-29)に連結される。または、このペプチドを、抗体に共有結合によりカップリングしてもよく、融合タンパク質として抗体/標的化リガンドに組み込んでもよい。さらに、他のポリカチオン(例えば、ポリエチレンイミン(PEI))またはカチオン性リポソーム(例

えば、DOTAP)は当技術分野において公知であり、本発明の複合体の状況において使用することができる。

【０２５９】

なおさらなる態様において、本発明の複合体は、記載されたこのようなペプチド、およびPAMP(例えば、明細書に列挙したTLRアゴニスト)またはDAMP(例えば、明細書に列挙したアラーミン)を含む(例えば、本明細書に記載の抗体-DNA複合体に連結される)。

【０２６０】

D.透過ペプチド

ある態様において、組成物(複合体)は1つまたは複数の透過ペプチドを含む。このようなペプチドは、従来のカップリング法および本明細書において開示の方法を用いて本発明の複合体にカップリングすることができる。タンパク質または核酸を細胞膜に効率的に通過させることは、細胞生物学における大きな問題の1つである。選択されたタンパク質の機能ドメインを無傷の細胞の外側から内側へ送達するためには、担体が必要とされる。細胞透過ペプチドはタンパク質導入ドメイン(PTD)とも知られ、細胞膜を自由に横断することができる小さなペプチドドメインを有する担体である。タンパク質導入と知られるプロセスにおいて、融合タンパク質を効率的に細胞膜透過させる、いくつかのPTDが同定されている。研究から、HIV TATタンパク質に由来するTATペプチドはペプチドまたはタンパク質を様々な細胞に導入できることが証明されている。PTDは抗癌剤戦略において用いられている。例えば、細胞透過性のBcl-2結合ペプチド、cpm1285は、マウスにおけるヒト骨髄性白血病増殖を遅くする活性を示している。細胞透過性リンペプチド、例えば、特異的SH2ドメイン含有タンパク質の受容体結合部位を模倣するFGFR730pYは、癌研究および細胞シグナル伝達機構研究ための有望なツールである。

【０２６１】

本発明の組成物および方法に組み込みことができるペプチドの例には、(Arg)9、TAMRA標識、(Arg)9FAM標識、[Cys58]105Y、細胞透過ペプチド、1-抗トリプシン(358-374)105Y、α1-抗トリプシン(359-374)、アミノペプチダーゼNリガンド(CD13)、NGRペプチド、アミノペプチダーゼNリガンド(CD13)、NGRペプチド、アンテナペディアリーダーペプチド(CT)、アンテナペディアペプチド、酸、アンテナペディアペプチド、アミド、抗βγ(MPS-ホスデューシン様タンパク質C末端)、抗βγ(MPS-ホスデューシン様タンパク質C末端)、ビオチン-TAT(47-57)、ブホリン(Buforin)、キメラ狂犬病ウイルス糖タンパク質断片(RVG-9R)、Cys(Npys)アンテナペディアペプチド、アミド、Cys(Npys)-(Arg)9、Cys(Npys)-(D-Arg)9、Cys(Npys)-TAT(47-57)、Cys(Npys)-TAT(47-57)、FAM標識、Cys-TAT(47-57)、FITC-LC-アンテナペディアペプチド、FITC-LC-MTS、FITC-LC-TAT(47-57)、脂質膜透過ペプチド、脂質膜透過ペプチド、D-異性体、マストパラン、マストパランX、MEK1由来ペプチド阻害剤1、MEK1由来ペプチド阻害剤1、膜透過配列、MPS、MPG、HIV関連、MPS-Gαi2、MPS-Gαi3、ミリストール、NGRペプチド1,2,3,4、核局在化(Nuclear Localiation)シグナルペプチド、Pep-1:チャリオット(Chariot)(ペプチドおよびタンパク質の非共有結合送達)、狂犬病ウイルスマトリックスタンパク質断片(RV-MAT)、ステアリル-MEK-1由来ペプチド阻害剤1、アミド、SynB1、TAT(47-57)、TAT(47-57)GGG-Cys(Npys)、TAT(47-57)、FAM標識、TAT(47-57)、TAMRA標識、TAT(47-57)-Lys(TAMRA)、Tat(48-57)、Tat-C(48-57)、Tat-NR2Bct、TAT-NSF222融合ペプチド、TAT-NSF222scr融合ポリペプチド、スクランブルド(scrambled)、TAT-NSF700融合ペプチド、TAT-NSF700scr、TAT-NSF81scr融合ポリペプチド、スクランブルド、経皮ペプチド、またはトランスポータン(Transportan)が含まれるが、これらに限定されない。さらに、これらのペプチドは核酸結合に使用することができる。

【０２６２】

III.組成物

A.腫瘍標的化組成物

本発明の別の局面において、本明細書に記載の疾患状態の予防または治療を可能にする組成物および方法が提供される。1つの態様において、本発明の組成物は、動物にワクチン接種する手段を提供する。

【０２６３】
1つの態様において、本発明の組成物は、癌または腫瘍の標的分子または標的成分に結合する1つまたは複数の標的化部分(T)(腫瘍標的化部分)を含む。標的化分子は、腫瘍細胞、腫瘍血管系、または腫瘍微小環境の成分でもよい。
【０２６４】
1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と核酸分子との複合体を含む。ここで、核酸分子は、1つまたは複数の産物(例えば、RNAなどの核酸、ペプチド、ポリペプチド、融合ペプチド)をコードし、免疫応答を刺激することができる。1つの態様において、核酸分子には、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフが含まれる。別の態様において、核酸分子は、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含み、および免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。
【０２６５】
関連する態様において、腫瘍標的化複合体の核酸分子は、T細胞および/またはB細胞による認識のために処理および提示することができる1つまたは複数の抗原または抗原決定基をコードする。コードされる抗原決定基は、$CD4^+$T細胞エピトープ、$CD8^+$T細胞エピトープ、B細胞エピトープのそれぞれの1つまたは複数を含む。1つの態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基をコードする。例えば、核酸は、$CD4^+$T細胞ヘルプをもたらす破傷風毒素由来配列[例えば、破傷風菌由来T_H活性化配列:断片C(FrC)、FrCドメインDOM1、またはプロミスキャスMHCクラスII結合ペプチドp30]をコードする。関連する態様において、核酸は、微生物ワクチンまたは他の非自己供給源(例えば、緑膿菌外毒素、緑色蛍光タンパク質、植物ウイルスのコートタンパク質)に由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基をコードする。
【０２６６】
関連する態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分、1つもしくは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、および/または1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する1つもしくは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープもしくはB細胞エピトープ)をコードする核酸分子の複合体を含む。関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分および1つまたは複数のPAMPを含む。別の関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分、および1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子を含む。別の関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分、1つまたは複数のPAMP、および1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子を含む。
【０２６７】
1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と、1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)またはアラーミンと、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分および1つまたは複数のDAMP/アラーミンを含む。別の関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分、および1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子を含む。別の関連する態様において、複合体は、腫瘍標的化部分、1つまたは複数のDAMP/アラーミン、および1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子を含む。

【０２６８】
1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と、(i)1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)、(ii)1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、(iii)1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)/アラーミン、(iv)抗原提示細胞もしくは樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子、ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド/抗体、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)を含む、1つまたは複数の免疫刺激分子の1つまたは複数をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の腫瘍抗原/抗原決定基または腫瘍抗原を含有する融合タンパク質をさらにコードする。1つの局面において、腫瘍抗原の融合パートナーは、DCによる抗原取り込み、免疫認識、および/または免疫活性化を容易にする。別の例において、融合パートナーは、DC取り込み受容体を標的とする分子を含む。別の例において、融合パートナーは、1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する抗原または抗原決定基である。別の例において、融合パートナーはアラーミンである。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【０２６９】
1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と、1つまたは複数の標的細胞遺伝子の発現を妨害することができる1つまたは複数のRNA分子[例えば、短鎖干渉RNA(siRNA)、ショートヘアピンRNA(shRNA)]をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。別の態様において、複合体の核酸分子は、1つまたは複数の免疫刺激性RNA分子をコードする。

【０２７０】
1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と、標的細胞の死を誘導する分子をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。

【０２７１】
本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体のそれぞれにおいて、核酸分子は、所望の細胞において機能活性がある転写プロモーターの制御下にある1つまたは複数の関心対象の遺伝子をコードする。1つの態様において、所望の細胞タイプにおける標的化発現のために、組織または腫瘍細胞に選択的なプロモーターが用いられる。

【０２７２】
1つの態様において、本明細書に記載の腫瘍標的化部分-核酸複合体はそれぞれ、核酸分子または複合体をパッケージングおよび/または送達するための1つまたは複数の成分に連結される。例えば、これらの分子には、カチオン性ペプチド、細胞透過ペプチド、DC標的化ペプチド、核酸結合分子、核局在化ペプチド、カチオン性リポソーム、親油性部分、ナノ粒子が含まれる。

【０２７３】
1つの態様において、本発明は、抗体などの腫瘍標的化部分と、1つまたは複数の核酸分子と、1つまたは複数のペプチド/ポリペプチド/リポペプチドとの複合体を含む。1つの態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを組み込んでいる、および/または本明細書に記載の、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする(注:0017)。様々な関連する態様において、ペプチド/ポリペプチド/リポペプチドには、(i)1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(例えば、CD4+T細胞エピトープ)、(ii)アラーミン、(iii)DC結合分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド)の1つまたは複数が含まれる。1つの局面において、本明細書に記載の複合体のペプチド/ポリペプチドは、互いに、および/または核酸結合ペプチドもしくは細胞透過ペプチド[例えば、カチオン性ペプチド、プロタミン、HIV-tat、アルギニンリッチ配列もしくはヒスチジンリッチ配列

、LL-37)に融合/連結されてもよい。

【０２７４】

1つの態様において、本発明は、抗体またはアプタマーなどの腫瘍標的化部分と、(a)1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、(b)以下のペプチド/ポリペプチド/リポペプチドの1つまたは複数:(i)1つまたは複数の病原体、微生物、またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(例えば、CD4+T細胞エピトープ)、(ii)アラーミン、(iii)DC結合分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド)、の1つまたは複数との複合体を含む。1つの局面において、本明細書に記載の複合体のペプチド/ポリペプチドは、互いに、および/または核酸結合ペプチド（例えば、カチオン性ペプチド、プロタミン、HIV-tat、アルギニンリッチ配列またはヒスチジンリッチ配列、LL-37)に融合/連結されてもよい。1つの局面において、複合体は免疫刺激核酸を含む。

【０２７５】

1つの態様において、本発明は、抗体などの標的化部分と、アプタマーである核酸分子との複合体を含む。1つの態様において、抗体および核酸アプタマーは、同じ細胞タイプ上または異なる細胞タイプ上にある異なる標的に結合する。1つの態様において、複合体は、腫瘍細胞表面受容体(EGFR)を標的とする抗体および前立腺特異的膜抗原(PSMA)を標的とするアプタマーを含み、それにより、2つとも前立腺癌細胞のタンパク質を標的とする。1つの態様において、核酸分子は、アプタマー、および(i)PAMPまたは他の免疫刺激核酸、(ii)本明細書に記載の、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードするDNAの1つまたは複数を含む。

【０２７６】

いずれか1つの作用機序に限定されるつもりはないが、本発明の複合体が働くことができる機構の1つは以下の通りである。(1)抗体-DNA複合体は、標的化分子、例えば、腫瘍細胞上の細胞表面抗原または受容体に結合する。(2)複合体と腫瘍細胞が結合すると、受容体を介したエンドサイトーシスが起こり、核酸分子の細胞侵入が促進される。(3)細胞に侵入すると、核酸分子によってコードされる関心対象の遺伝子がプロモーターにより発現される。(4)標的化腫瘍細胞において、特定の関心対象の遺伝子が発現すると、以下の作用が誘発される:(a)1つまたは複数のコードされている、病原体のまたは病原体に由来する抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)の発現;(b)T細胞(CD4+もしくはCD8+)またはB細胞が認識するための主要組織適合複合体(MHC)分子の状況では、腫瘍細胞(およびDC)における病原体抗原由来エピトープの提示;(c)病原体抗原由来B細胞エピトープを認識する抗体が、これらのエピトープを提示している腫瘍細胞に結合し、(Fc-Fc受容体相互作用を介して)腫瘍細胞の抗体依存性細胞傷害を促進する;これらの抗体は、病原体抗原ワクチンに以前に曝露されたことがあることでレシピエントに既にあってもよく、または複合体投与後に生成される;(d)病原体抗原由来T細胞エピトープを認識するT細胞が、(DCおよびCD8+T細胞に)CD4+T細胞ヘルプをもたらし、これらのエピトープを提示する腫瘍細胞のCD8+T細胞性細胞傷害をもたらす;これらのT細胞は、病原体抗原ワクチンに以前に曝露されたことがあることでレシピエントに既にあってもよく、または複合体投与後に生成されるか、またはエクスビボで活性化/増殖させた抗原反応性T細胞を養子移入することによって送達される。

【０２７７】

さらに、樹状細胞(DC)が、抗体でコーティングされた腫瘍細胞(オプソニン化細胞)を貪食することによって、MHC分子の状況では、(Fc-Fc受容体相互作用を介して)病原体由来抗原および腫瘍関連抗原の交差提示が促進される。さらに、抗原提示細胞(DC)は、(a)病原体関連分子パターン(複合体の核酸分子内にある);(b)ダメージ関連分子パターン(死につつある腫瘍細胞によって産生される内因性アラーミン);(c)病原体由来CD4+T細胞エピトープを認識するCD4+Tヘルパー細胞によって活性化される。従って、交差提示された病原体抗原由来エピトープまたは腫瘍抗原由来エピトープを認識する、CD4+Tヘルパー(T_H)細胞およびCD8+T細胞が活性化されると、アンチゲンスプレッディング(antigen spreading)が起こる。さらに、活性化されたT細胞は、病原体由来T細胞エピトープを発現する腫瘍細胞

ならびに内因性腫瘍抗原エピトープを発現する腫瘍細胞の細胞傷害を誘導する。

【０２７８】

さらに、以下のクラスの、コードされている免疫刺激分子:(1)免疫刺激性サイトカイン(例えば、インターフェロン、IL-12、IL-15、GM-CSF);(2)T細胞補助刺激分子;(3)DC動員または活性化分子(PAMP、DAMP、アラーミン)が発現すると、病原体抗原エピトープまたは腫瘍細胞上の腫瘍抗原エピトープを認識する、DCおよび/またはT細胞の動員、増殖、生存および/または活性化を増強することができる。

【０２７９】

また、免疫刺激性DAMPの産生と共に、以下のクラスの、標的化腫瘍細胞の死を誘導する、コードされている分子:(1)関心対象の生存遺伝子をサイレンシングするsiRNA;(2)直接的な細胞破壊タンパク質またはデスシグナル伝達タンパク質;および(3)自殺遺伝子によってコードされるタンパク質が発現すると、病原体抗原エピトープまたは腫瘍細胞上の腫瘍抗原エピトープを認識する、DCおよび/またはT細胞の動員、増殖、生存および/または活性化を増強することができる。

【０２８０】

1つの態様において、複合体は、腫瘍標的化抗体、および病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAプラスミド/ミニサークルを含む。例えば、抗体は、腫瘍細胞上のヒト上皮細胞成長因子受容体細胞表面受容体を標的とする(抗EGFR)。または、抗体は、腫瘍細胞上のヒトHER2/neu受容体細胞表面受容体を標的とする(抗HER2/neu)。

【０２８１】

別の態様において、複合体は、腫瘍標的化アプタマーおよび病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAプラスミド/ミニサークルを含む。例えば、アプタマーは、腫瘍細胞上の細胞表面分子(前立腺特異的膜抗原(PSMA)を標的とする(PSMA RNAアプタマー)。

【０２８２】

別の態様において、複合体は、腫瘍標的化ペプチドおよび病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAミニサークルを含む。このような腫瘍標的化ペプチドの例は公知であり、本明細書において開示される(例えば、RGDペプチド)。

【０２８３】

DNAワクチン設計および原理:CD4+Tヘルパー(T_H)細胞は免疫応答の誘導および維持にとって重要である。T_Hは、CD8+T細胞の初回刺激および二次増殖、ならびに抗体を産生するようにB細胞にヘルプをもたらすのに必要である。自己由来腫瘍抗原は有意なT_H応答を誘導できないので、既存の抗菌レパートリーからのT_H細胞が、免疫複合体の標的である腫瘍細胞に由来する腫瘍抗原および/または同じプラスミドもしくはミニサークルの中に共にコードされている/融合されている抗原に対するCD8+T細胞および/またはB細胞の応答の開始を助けることができるように、本発明の腫瘍標的化DNA複合体ワクチンは、コードされる病原体由来配列、例えば、破傷風毒素または緑膿菌外毒素を組み込んでいる。DNAワクチンはまた、他の非自己抗原、例えば、(単独で、または腫瘍抗原と共発現、または融合パートナーとして)緑色蛍光タンパク質、植物ウイルスコートタンパク質、または免疫標的化分子を組み込むことによって、T細胞ヘルプをもたらすこともできる。

【０２８４】

病原体由来配列を組み込んでいるDNAワクチンと腫瘍標的化部分を複合化すると、これらの抗原決定基が標的化腫瘍細胞において発現され、標的化腫瘍細胞を貪食したAPCに、抗原性材料(病原体由来および内因性腫瘍細胞/抗原)が間接的に導入される(交差提示)。抗体-DNAワクチンの一部はまた、(APC FcR上のFc受容体との抗体Fc相互作用を介して)APCに直接取り込まれ、APCにより提示されることがある。病原体由来抗原および腫瘍由来抗原のこのような交差提示および直接提示は、効果的なT細胞ヘルプをもたらし、以下の免疫応答をもたらすことができる。(1)病原体抗原特異的抗体および腫瘍抗原特異的抗体の誘導:本発明の抗体-DNA複合体は、標的化腫瘍細胞における病原体抗原(例えば、破傷風毒素由来断片C-FrC)の発現、ならびに(アポトーシス腫瘍細胞および/またはワクチン内で共にコードされている/融合されている腫瘍抗原からの)DCによるFrCおよび腫瘍抗原の交差

提示を可能にする。DCによって刺激された(FrC)特異的T_H細胞は、FrCペプチドまたは腫瘍細胞抗原に対する抗体を産生するようにB細胞を初回刺激および追加刺激することができる(CD40-CD40リガンド相互作用およびサイトカイン産生を介する)。腫瘍細胞におけるFrC抗原決定基の発現はまた、抗FrC抗体または抗腫瘍抗体によって腫瘍細胞をADCC感受性にし、それにより、オプソニン化腫瘍細胞またはアポトーシス腫瘍細胞を貪食したDCによる、これらの抗原の交差提示が強化される;(2)腫瘍反応性細胞傷害性T細胞の誘導:微生物抗原または他の非自己抗原をコードする、抗体-DNAワクチンを用いて、広範囲の弱い腫瘍抗原に対するCD8+Tリンパ球(CTL)免疫応答を開始および増幅することができる。(FrC)特異的T_H細胞は、弱い腫瘍抗原に対するCD8+T細胞応答を初回刺激および追加刺激するように、FrCおよび腫瘍抗原を交差提示するDCを許可する。免疫優性の病原体由来ペプチドはサブドミナント(sub-dominant)な腫瘍由来エピトープに対する応答を制限する可能性があるので、DNAワクチンによりコードされる病原体由来抗原は、CD4+T細胞ヘルプに必要なエピトープを含有するよう最小限にされてもよい(例えば、FrC-DOM1のシングルドメイン、またはプロミスキャスMHCクラスII結合ペプチド、例えば、破傷風毒素p30)。

【０２８５】

これらの免疫応答は、本発明の免疫複合体が、(1)複合体に組み込まれているPAMP(例えば、免疫刺激核酸);(2)複合体に含まれているダメージ関連分子パターン(DAMP)(例えば、アラーミン、例えば、LL-37カテリシジン);(3)コードされている遺伝子の発現を介して、または細胞ストレスおよびダメージに応答して産生された内因性PAMPまたはDAMP;(4)コードされている遺伝子の発現を介して、または腫瘍細胞環境において免疫応答を活性化するバイスタンダー効果として産生された他の内因性免疫刺激分子の1つまたは複数を介して、DCを同時に活性化する能力によって促進および強化される。

【０２８６】

また、免疫刺激性DAMPが産生されると共に、以下のクラスの、標的化腫瘍細胞の死を誘導する、コードされている分子:(1)関心対象の生存遺伝子をサイレンシングするsiRNA;(2)直接的な細胞破壊タンパク質またはデスシグナル伝達タンパク質;および(3)自殺遺伝子によってコードされるタンパク質が発現すると、病原体抗原エピトープまたは腫瘍細胞上の腫瘍抗原エピトープを認識する、DCおよび/またはT細胞の動員、増殖、生存および/または活性化を増強することができる。

【０２８７】

1つの態様において、複合体は、腫瘍標的化抗体および病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAプラスミド/ミニサークルを含む。例えば、抗体は、腫瘍細胞上のヒト上皮細胞成長因子受容体細胞表面受容体を標的とする(抗EGFR);または抗体は、腫瘍細胞上のヒトHER2/neu受容体細胞表面受容体を標的とする(抗HER2/neu)。

【０２８８】

別の態様において、複合体は、腫瘍標的化アプタマーおよび病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAプラスミド/ミニサークルを含む。例えば、アプタマーは、腫瘍細胞上の細胞表面分子(前立腺特異的膜抗原(PSMA))を標的とする(PSMA RNAアプタマー)。

【０２８９】

別の態様において、複合体は、腫瘍標的化ペプチドおよび病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAミニサークルを含む。このような腫瘍標的化ペプチドの例は公知であり、本明細書において開示される(例えば、RGDペプチド)。

【０２９０】

以下は、腫瘍標的化部分-DNAワクチン複合体を作製する例示的な方法を提供する:(1)病原体由来遺伝子をコードするDNAミニサークルワクチン(a)炭疽菌防御抗原(PA)をコードするDNAミニサークル;(b)炭疽菌防御抗原(PA)のDNA配列は、哺乳動物細胞において効率的に発現するようにコドン最適化した(DNA2.0);(c)破傷風菌(破傷風)毒素由来遺伝子断片(例えば、破傷風毒素断片C-FrC、またはDOM1)のDNAミニサークル。例えば、破傷風菌(破傷風)毒素由来遺伝子断片(破傷風断片CまたはDOM1)のDNA配列は、哺乳動物細胞において効率的に発現するようにコドン最適化した(DNA2.0)。

【０２９１】
DNAワクチン設計および原理:CD4+Tヘルパー(T_H)細胞は免疫応答の誘導および維持にとって重要である。T_Hは、CD8+T細胞の初回刺激および二次増殖、ならびに抗体を産生するようにB細胞にヘルプをもたらすのに必要である。自己由来腫瘍抗原は有意なT_H応答を誘導できないので、既存の抗菌レパートリーからのT_H細胞が、免疫複合体の標的である腫瘍細胞に由来する腫瘍抗原および/または同じプラスミドもしくはミニサークルの中に共にコードされている/融合されている抗原に対するCD8+T細胞および/またはB細胞の応答の開始を助けることができるように、本発明の腫瘍標的化DNA複合体ワクチンは、コードされる病原体由来配列、例えば、破傷風毒素または緑膿菌外毒素を組み込んでいる。DNAワクチンはまた、他の非自己抗原、例えば、(単独で、または腫瘍抗原と共発現、または融合パートナーとして)緑色蛍光タンパク質、植物ウイルスコートタンパク質、または免疫標的化分子を組み込むことによって、T細胞ヘルプをもたらすこともできる。
【０２９２】
病原体由来配列を組み込んでいるDNAワクチンと腫瘍標的化部分を複合化すると、これらの抗原決定基は標的化腫瘍細胞において発現され、標的化腫瘍細胞を貪食したAPCに、抗原性材料(病原体由来および内因性腫瘍細胞/抗原)が間接的に導入される(交差提示)。抗体-DNAワクチンの一部はまた、(APC FcR上のFc受容体との抗体Fc相互作用を介して)APCに直接取り込まれ、APCにより提示されることがある。病原体由来抗原および腫瘍由来抗原のこのような交差提示および直接提示は、効果的なT細胞ヘルプをもたらし、以下の免疫応答をもたらすことができる。(1)病原体抗原特異的抗体および腫瘍抗原特異的抗体の誘導:本発明の抗体-DNA複合体は、標的化腫瘍細胞における病原体抗原(例えば、破傷風毒素由来断片C-FrC)の発現、ならびに(アポトーシス腫瘍細胞および/またはワクチン内で共にコードされている/融合されている腫瘍抗原からの)DCによるFrCおよび腫瘍抗原の交差提示を可能にする。DCによって刺激された(FrC)特異的T_H細胞は、FrCペプチドまたは腫瘍細胞抗原に対する抗体を産生するようにB細胞を初回刺激および追加刺激することができる(CD40-CD40リガンド相互作用およびサイトカイン産生を介する)。腫瘍細胞におけるFrC抗原決定基の発現はまた、抗FrC抗体または抗腫瘍抗体によって腫瘍細胞をADCC感受性にし、それにより、オプソニン化腫瘍細胞またはアポトーシス腫瘍細胞を貪食したDCによる、これらの抗原の交差提示が強化される;(2)腫瘍反応性細胞傷害性T細胞の誘導:微生物抗原または他の非自己抗原をコードする、抗体-DNAワクチンを用いて、広範囲の弱い腫瘍抗原に対するCD8+Tリンパ球(CTL)免疫応答を開始および増幅することができる。(FrC)特異的T_H細胞は、弱い腫瘍抗原に対するCD8+T細胞応答を初回刺激および追加刺激するように、FrCおよび腫瘍抗原を交差提示するDCを許可する。免疫優性の病原体由来ペプチドはサブドミナントな腫瘍由来エピトープに対する応答を制限する可能性があるので、DNAワクチンによりコードされる病原体由来抗原は、CD4+T細胞ヘルプに必要なエピトープを含有するよう最小限にされてもよい(例えば、FrC-DOM1のシングルドメイン、またはプロミスキャスMHCクラスII結合ペプチド、例えば、破傷風毒素p30)。
【０２９３】
これらの免疫応答は、本発明の免疫複合体が、(1)複合体に組み込まれているPAMP(例えば、免疫刺激核酸);(2)複合体に含まれているダメージ関連分子パターン(DAMP)(例えば、アラーミン、例えば、LL-37カテリシジン);(3)コードされている遺伝子の発現を介して、または細胞ストレスおよびダメージに応答して産生された内因性PAMPまたはDAMP;(4)コードされている遺伝子の発現を介して、または腫瘍細胞環境において免疫応答を活性化するバイスタンダー効果として産生された他の内因性免疫刺激分子の1つまたは複数を介して、DCを同時に活性化する能力によって促進および強化される。
【０２９４】
1つの態様において、DNAプラスミド/ミニサークルワクチンの製剤が本発明の複合体において用いられる。コドン最適化された特定の病原体由来DNA配列(PAまたは破傷風断片C/DOM1)、ならびにGeneGripプラスミドシリーズに見られる反復結合部位1および2にあるDNA配列を、CMVieプロモーターおよびSV40ターミネーターベクターを含有する中間哺乳動物

発現ベクターにクローニングする。配列確認の後に、SpeI(5'末端)またはApaI(3'末端)制限エンドヌクレアーゼ部位に特異的なテールを含有するPCRプライマーを用いて、発現カセット全体(CMVプロモーター、抗原、SV40、オリゴヌクレオチド結合モチーフ)をPCR増幅する。次いで、PCR産物をSpeIおよびApaIで消化し、p2ΦC31ミニサークルベクターのSpeI部位およびApaI部位に連結する。次いで、構築物p2ΦC31-PAを形質転換により大腸菌NM522細胞に導入し、組換え能力について試験する。プラスミドを含有する大腸菌を増殖させ、次いで、アラビノース(0.25%最終濃度)を添加することによって組換えを誘導する。誘導前(0時)ならびに誘導後(60分および120分)に培養アリコートを採取し、ミニプレッププラスミド単離に供する。母プラスミドがミニプラスミドおよびミニサークルと組換えを起こしたかどうか確かめるために、結果として生じたプラスミド調製物を電気泳動に供する。組換えは、ゲル上にミニサークルバンドが存在すると確かめられた時に成功している。バックボーンプラスミドバンド(ミニプラスミド)も存在するが、その強度は経時的に減少する(プラスミドバックボーンがI-SceI酵素によって切断され、細胞エンドヌクレアーゼによって分解されたことを示している)。

【０２９５】

DNAミニサークルワクチンと腫瘍標的化部分との複合化

特定のDNAワクチンと本発明に記載の腫瘍標的化部分とを複合化すると、抗腫瘍効力が多くの要因によって改善される。(1)DNAワクチンが腫瘍細胞に標的化送達、保持、および受容体介在性内部移行される。コードされている病原体由来抗原が腫瘍細胞において発現すると、病原体抗原反応性抗体が腫瘍細胞をオプソニン化できるようになり、それにより、ADCCならびにDCによる病原体抗原および内因性腫瘍抗原のFc介在性交差提示が高まる。(2)抗体-DNA複合体によりコーティングされた腫瘍細胞は、複合体に由来する外因性の免疫刺激性PAMPおよびDAMPならびに細胞に由来する内因性の免疫刺激性PAMPおよびDAMPを介して、腫瘍細胞を貪食したDCの活性化を増強し、それにより、腫瘍細胞に対するCD4+Tヘルパー細胞およびCD8+細胞傷害性T細胞の活性化が促進される。DC-NK細胞クロストークにより、抗体-複合体によりコーティングされた腫瘍細胞のADCCおよび補体介在性溶解がさらに増幅される。(3)抗体/受容体介在性エンドサイトーシスを介して、複合体の免疫刺激分子(免疫刺激核酸、PAMP)が腫瘍細胞に細胞内送達されることにより、B細胞およびT細胞が腫瘍細胞を認識するための、MHC分子のアップレギュレーションおよび腫瘍由来抗原の提示につながる細胞応答が起こる。(4)腫瘍成長因子受容体を標的とする抗体-複合体は、受容体を介した腫瘍細胞生存シグナルおよび成長シグナルをブロックし、それにより、CTLを介した細胞傷害に対する感受性が改善される。(5)抗体-DNAワクチンにより、複合体が結合したアポトーシス腫瘍細胞はDCに交差提示できるようになり、それにより、広範囲の内因性腫瘍由来抗原に対する記憶T細胞のバイスタンダー刺激が誘導される(アンチゲンスプレッディング)。これは、選択された抗原を発現しない変異腫瘍細胞の回避によって効力が制限されることのある、選択された特定の腫瘍ペプチドを送達または発現するDNAワクチンにとって好ましい。

【０２９６】

前述は、腫瘍標的化抗体とミニサークルDNAワクチンとの複合体を形成するための例示的なプロセスであり、限定的なプロセスでない。ここで、両部分とも配列特異的、部位特異的、および方向特異的に直接カップリングされ、管理された数のプラスミド/ミニサークルDNAコピーが各抗体に取り付けられ、それにより、抗体の鍵となる基本特性の維持ならびにDNAワクチンの腫瘍標的化発現が可能になる。特異的腫瘍標的化抗体の選択、およびDNAミニサークル内にコードされている病原体抗原遺伝子の組成は、複合体の相乗的な機能成分を抗腫瘍療法のために最適化するように設計される。本発明により可能となる、鍵となる別の機能は、標的化腫瘍細胞および腫瘍環境において、コードされている病原体抗原決定基が発現され、これが可能となることにより特異的免疫応答が誘発されることである。これらの特徴は、本発明の特定の腫瘍抗体-DNAワクチン複合体と、他のDNAワクチンおよび送達プラットフォーム、例えば、粒子を介した送達、遺伝子銃、ウイルスベクターもしくは細菌ベクター、またはエレクトロポレーションとを区別する。

【０２９７】

抗体-プラスミド/ミニサークルDNA複合体を合成する一方法では、線状一本鎖オリゴヌクレオチド[二本鎖プラスミドまたはミニサークル内の対応する二本鎖DNA配列に相補的な(CT)nまたは(GA)n反復モチーフのいずれかを含有するLNA/DNA ODN]を、スーパーコイル二本鎖ミニサークルDNAに結合させる。

LNA ODN (5'-NH_2-GAGG- CTCTCTCTCTCTC-3')
免疫刺激CpG DNAホスホロチオエートバックボーンを有する ハイブリッドLNA-DNA
5' tccatgacgttcctgacgttt CTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'
5' cggcggataaccgcgagcggttattcgccctacgg CTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'
(反復遺伝子外パリンドローム-REP配列;緑膿菌)
5' gggggacgatcgtcgggggg CTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'
(AクラスCpG ODN)

【０２９８】

例えば、最大4～40倍モル過剰のODN:プラスミド内ODN結合部位で、ミニサークルDNAと、LNA ODNまたはCpG DNAホスホロチオエートバックボーンを有するハイブリッドLNA-DNA ODNを、10mMリン酸緩衝液、1mM EDTA、pH5.8中で37℃で16時間インキュベートする。記載のように、抗体-DNA複合体を作製するために、一端にアミン反応性NHSエステル、他方の端にスルフヒドリル反応性マレイミド 基を含有するヘテロ二官能性試薬が用いられる(Bioconjugate techniques, Hermanson, G.T., Academic Press, 1996, pages 456-527を参照されたい)。

【０２９９】

抗体-プラスミド/ミニサークル複合体は、ヌクレアーゼからのDNAの保護を促進し、細胞侵入を容易にし、および/またはDC活性化を増強することができる、記載のカチオン性ペプチド、例えば、アラーミンLL-37を取り込んでもよい。

【０３００】

標的化部分-DNAワクチン複合体の効果の分析は以下のように行うことができる。(1)標的腫瘍細胞(例えば、EGFR+またはHER2+細胞)における受容体介在性エンドサイトーシス;(2)標的腫瘍細胞における関心対象の遺伝子の発現-病原体抗原由来エピトープ(B細胞抗原決定基またはT細胞抗原決定基)がMHC分子によって提示される;(3)APC/DCによるオプソニン化腫瘍細胞の貪食:TLRアゴニスト、PAMPによるDCの活性化;病原体抗原CD4+T細胞エピトープおよびB細胞エピトープの提示;ならびに腫瘍関連抗原の交差提示;(4)病原体抗原反応性CD4+Tヘルパー細胞の活性化;腫瘍抗原を交差提示するDCへのヘルプ;病原体抗原反応性抗体を産生するためのB細胞へのヘルプ;および病原体抗原反応性または腫瘍反応性のCD8+T細胞の活性化および生存のためのヘルプ;(5)腫瘍細胞の細胞溶解素:ADCC(病原体抗原反応性抗体);CD8+T細胞性細胞傷害(病原体抗原反応性T細胞);およびCD8+T細胞性細胞傷害(腫瘍抗原反応性CD8+T細胞-アンチゲンスプレッディング)。

【０３０１】

B.皮膚標的化組成物

1つの態様において、本発明の組成物は、正常な細胞または組織、例えば、皮膚のケラチノサイトの標的分子または標的成分に結合する1つまたは複数の標的化部分(T)(組織標的化部分)を含む。1つの態様において、標的化部分は、ケラチノサイト上にある細胞表面分子または受容体、例えば、上皮細胞成長因子受容体(EGFR)に結合する。

【０３０２】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、核酸分子との複合体を含み、ここで、核酸分子は、1つまたは複数の産物(例えば、RNAなどの核酸、ペプチド、ポリペプチド、融合ペプチド)をコードし、免疫応答を刺激することができる。1つの

態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含む。別の態様において、核酸分子は、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含み、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。

【０３０３】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と核酸分子との複合体を含み、ここで、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)を含み、および1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする。

【０３０４】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)と、1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする核酸分子との複合体を含む。

【０３０５】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)またはアラーミンと、1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする核酸分子との複合体を含む。

【０３０６】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードし、(i)1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、(ii)1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)/アラーミン、(iii)抗原提示細胞もしくは樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子、ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド/抗体、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)を含む、1つまたは複数の免疫刺激分子の1つまたは複数をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、融合タンパク質として1つまたは複数の病原体抗原/抗原決定基をコードする。1つの局面において、抗原の融合パートナーは、DCによる抗原取り込み、免疫認識、および/または免疫刺激を容易にする。別の局面において、融合パートナーは、DC取り込み受容体を標的とする分子を含む。別の局面において、融合パートナーはアラーミンである。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【０３０７】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の腫瘍抗原/抗原決定基をコードし、(i)1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(例えば、CD4+T細胞エピトープ)、(ii)1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)、(ii)1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)/アラーミン、(iii)抗原提示細胞もしくは樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子、ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド/抗体、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)を含む、1つまたは複数の免疫刺激分子の1つまたは複数をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の腫瘍抗原含有融合タンパク質をコードする。1つの局面において、腫瘍抗原の融合パートナーは、DCによる抗原取り込み、免疫認識、および/または免疫活性化を容易にする。別の例において、融合パートナーは、DC取り込み受容体を標的とする分子を含む。別の例において、融合パートナーは、1つまた

は複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する抗原または抗原決定基(CD4+T細胞エピトープ)である。別の例において、融合パートナーはアラーミンである。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【０３０８】

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)および/またはアラーミンと、(i)1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基、(ii)1つまたは複数の腫瘍抗原または抗原決定基の1つまたは複数を含む、抗原性ペプチド/ポリペプチドとの複合体を含む。複合体の1つの局面において、腫瘍または病原体に由来する抗原または抗原決定基はアラーミン(例えば、LL37)と連結または融合される。

【０３０９】

別の態様において、本発明は、皮膚細胞表面受容体(例えば、EGFR)を標的とする抗体または他の部分と、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)と、1つまたは複数の病原体または病原体に由来する抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする遺伝子を組み込んでいる核酸分子との複合体を含む。例えば、本発明の複合体は、標的化部分と、任意のPAMPと、病原体抗原をコードするプラスミド/ミニサークルDNAとを含む。

【０３１０】

別の態様において、複合体は、皮膚細胞表面受容体(例えば、EGFR)を標的とする抗体または他の部分、1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)またはアラーミン、および1つまたは複数の病原体または病原体に由来する抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする遺伝子を組み込んでいる核酸分子を含む。例えば、複合体は、標的化部分と、任意のDAMP/アラーミンと、病原体抗原をコードするプラスミド/ミニサークルDNAとを含む。

【０３１１】

さらに別の態様において、複合体は、皮膚細胞表面受容体(例えば、EGFR)を標的とする抗体または他の部分、および病原体または病原体に由来する抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)、病原体関連分子パターン(PAMP)、ダメージ関連分子パターン(DAMP)、アラーミンの1つまたは複数をコードする遺伝子を組み込んでいる核酸分子を含む。例えば、複合体は、標的化部分と、病原体または病原体に由来する抗原または抗原決定をコードするDNAとを含む。または、複合体は、標的化部分と、病原体または病原体に由来する抗原または抗原決定基および1つまたは複数のPAMP、DAMP、アラーミンをコードするDNAとを含む。

【０３１２】

別の態様において、複合体は、皮膚細胞表面受容体(例えば、EGFR)を標的とする抗体または他の部分、1つまたは複数の腫瘍抗原をコードする遺伝子を組み込んでいる核酸分子、および病原体または病原体に由来する抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)、病原体関連分子パターン(PAMP)、ダメージ関連分子パターン(DAMP)、アラーミンの1つまたは複数を含む。例えば、複合体は、標的化部分と、腫瘍抗原をコードするDNAと、病原体または病原体に由来する抗原または抗原決定基、DAMP、アラーミンとを含む。

【０３１３】

1つの態様において、本発明は、皮膚細胞表面受容体(例えば、EGFR)を標的とする抗体または他の部分、ならびに1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)および1つまたは複数の病原体または病原体に由来する抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする遺伝子を組み込んでいる核酸分子を含む複合体を含む。

【０３１４】

さらに別の態様において、本発明は、皮膚細胞表面受容体(例えば、EGFR)を標的とする抗体または他の部分と、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)/アラーミンと、

1つまたは複数の病原体または病原体由来または腫瘍の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする遺伝子を組み込んでいる核酸分子との複合体を含む。例えば、複合体は、標的化部分と、任意のPAMP/アラーミンと、腫瘍抗原をコードするプラスミド/ミニサークルDNAとを含む。または、複合体は、標的化部分と、任意のPAMP/アラーミンと、腫瘍抗原および病原体抗原をコードするプラスミド/ミニサークルDNAとを含む。

【０３１５】

いずれか1つの作用機序に限定されるつもりはないが、以下は、本発明の複合体の1つの作用様式である。(a)標的皮膚細胞(ケラチノサイト)へのミニサークル/プラスミドDNAのEGFR受容体介在性結合、および皮膚におけるDNAの保持/固定化;(b)ケラチノサイトにおける受容体介在性エンドサイトーシス、および標的における関心対象の遺伝子をコードするミニサークルの発現、例えば、プラスモディウム属エピトープ(CSP-1抗原に由来するB細胞抗原決定基またはT細胞抗原決定基)がMHC分子によって提示される;(c)皮膚におけるAPC/DCによる複合体-オプソニン化ケラチノサイトのファゴサイトーシス(ランゲルハンス細胞):(i)抗体Fc-DC Fc受容体相互作用を介した、病原体抗原エピトープまたは腫瘍抗原エピトープ(T細胞エピトープおよびB細胞エピトープ)をコードするDNAの提示-間接的な抗原交差提示;(ii)ミニサークルの取り込み-APCにおける関心対象の遺伝子の発現(T細胞エピトープおよびB細胞エピトープ)-直接的な提示;(iii)TLRアゴニスト、PAMP、DAMP、アラーミン(複合体由来および内因性)によるDCの活性化;(iv)病原体抗原由来エピトープまたは腫瘍抗原由来エピトープ(例えば、複数のCSP-1エピトープ)を認識する抗原反応性T細胞およびB細胞の活性化。

【０３１６】

1つの態様において、複合体は、EGFR標的化部分および病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAプラスミド/ミニサークルを含む。別の態様において、複合体は、ケラチノサイト上のヒト上皮細胞成長因子受容体を標的化する抗体(抗EGFR Ab:例えば、セツキシマブ、ニモツズマブ、パニツムマブ)と、病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAミニサークルとを含む。なおさらなる態様において、ケラチノサイト上のヒト上皮細胞成長因子受容体を標的化するアプタマー(抗EGFR DNAまたはRNAアプタマー)と病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAミニサークルとの複合体。さらに、標的化部分はEGFR標的化ペプチドでもよく、DNAミニサークルは病原体抗原由来遺伝子をコードしてもよい。

【０３１７】

病原体抗原由来遺伝子をコードするDNAプラスミドおよびミニサークルの例を本明細書において示す。1つの態様において、コードされている抗原は、プラスモディウム属に由来するスポロゾイド周囲タンパク質(CSP-1)(マラリア抗原)である。さらなる態様において、このような複合体は、マラリアCSP-p28構築物によるDNAワクチン接種のために投与することができる。マラリアスポロゾイド周囲タンパク質(CSP)は、スポロゾイトの主要な表面タンパク質であり、マウスマラリア防御モデルを与えることが示されている。Bergmann-Leitner et. al. (C3d-defined complement receptor-binding peptide p28 conjugated to circumsporozoite protein provides protection against Plasmodium berghei. Vaccine 25 (45), 2007)は、3コピーのC3d補体受容体結合ペプチドp28とCSPとをコードするDNAワクチンがマウスP.ベルゲイ(P.berghei)感染モデルにおいて攻撃に対する防御を誘導したことを証明した。本明細書に含まれる複合体を形成するために、このワクチンはEGFR抗体に直接複合化される。このように、このタイプの複合体はケラチノサイトを標的とし、コードされている抗原-p28融合タンパク質はDC取り込み受容体を標的とすることができる。

【０３１８】

さらなる態様において、コードされている抗原は、プラスモディウム属に由来するメロゾイト抗原;炭疽菌防御抗原(PA);結核菌抗原;赤痢菌属IpaBおよびIpaC;インフルエンザウイルス抗原またはそれらの組み合わせである。病原性抗原の拡大したリストは当技術分野において公知であり、このような抗原は本発明の状況において容易に使用することができ

る。

【０３１９】

本発明の別の局面において、EGFR標的化部分と、1つまたは複数の腫瘍抗原または腫瘍関連抗原をコードするDNAプラスミド/ミニサークルとの複合体。

【０３２０】

1つの態様において、複合体は、ケラチノサイト上のヒト上皮細胞成長因子受容体を標的とする抗体(抗EGFR Ab:例えば、セツキシマブ、ニモツズマブ、パニツムマブ)および腫瘍抗原または腫瘍関連抗原をコードするDNAミニサークルを含む。さらなる態様において、標的化部分は、本明細書において開示されるどのバリエーション(例えば、アプタマー、ペプチド)でもよい。

【０３２１】

腫瘍抗原または腫瘍関連抗原の拡大したリストは当技術分野において公知であり、このような抗原は本発明の状況において使用することができる。このような抗原のいくつかの非限定的な例には、いくつか例を挙げると、癌精巣抗原;例えば、MAGE-1、BAGE、GAGE-1、NY-ESO-1;系列特異的抗原:例えば、メラノサイト抗原(チロシナーゼ、MART-1、gp100);腫瘍特異的な変化した遺伝子産物(増幅、異常発現、過剰発現、または変異した遺伝子、スプライスバリアント、遺伝子融合産物):例えば、HER2/neu、p53、Ras遺伝子-KRAS2、HRAS、NRAS、ムチン-1、βカテニン、MUM1、CDK4、BCR-ABL融合産物、surviving、TERT、CEA、AFP、N-アセチルグルコサミン転移酵素V;B細胞悪性腫瘍の免疫グロブリンイディオタイプ;ウイルスの癌抗原(oncoantigen);例えば、ヒトパピローマウイルスに由来するHPV E6およびE7抗原、EBV LMP1およびLMP2が含まれる。さらなる態様において、(前記の腫瘍標的化複合体について述べられたように)CD4+T細胞ヘルプをもたらすために、1つまたは複数の腫瘍抗原が、病原体に由来する抗原決定基(例えば、破傷風FrCまたはDOM1)の下流に、または融合パートナーとしてDNAミニサークル内にコードされてもよい。

【０３２２】

このような複合体を作る例示的な方法は以下の通りである。従来のミニサークル単離法を用いて、炭疽菌防御抗原(PA)をコードするDNAプラスミド/ミニサークルを単離する;コドン最適化を用いて、哺乳動物細胞において効率的に発現するように炭疽菌防御抗原(PA)のDNA配列を最適化する(DNA2.0)。別の態様において、DNAプラスミド/ミニサークルは、スポロゾイト周囲(Cricumsporozoite)タンパク質(CSP-1)をコードし、これもまた哺乳動物細胞において発現するようにコドン最適化される。さらに、発現は、当技術分野において公知の、および本明細書において開示される組織/細胞特異的なプロモーターを用いて調節することができる。

【０３２３】

DNAワクチン設計および原理:病原体抗原由来配列または腫瘍抗原由来配列を組み込んでいるDNAワクチンと、EGFR標的化部分とが複合化すると、これらの抗原決定基は標的化ケラチノサイトにおいて発現され、標的化ケラチノサイトを貪食したAPCに、抗原性材料(病原体由来抗原または腫瘍抗原由来抗原)が間接的に導入される(交差提示;APC FcR上のFc受容体と抗体Fcとの相互作用を介して促進される)。抗体-DNAワクチンの一部はまたAPCに直接取り込まれ、APCにより提示される。病原体由来抗原および腫瘍由来抗原のこのような交差提示および直接提示は、効果的なT細胞ヘルプをもたらし、以下の免疫応答をもたらすことができる。

【０３２４】

病原体抗原特異的抗体および腫瘍抗原特異的抗体の誘導:本発明の抗体-DNA複合体は、標的化ケラチノサイトにおける病原体抗原の発現、ならびに(貪食されたオプソニン化ケラチノサイトおよび/またはワクチン内で共にコードされている/融合されている抗原からの)DCによる病原体抗原および腫瘍抗原の交差提示を可能にする。抗体-DNA複合体は、複合体に由来する外因性の免疫刺激性PAMPおよびDAMPならびに細胞に由来する内因性の免疫刺激性PAMPおよびDAMPを介して、これらの抗原を提示するDCの活性化を増強し、それにより、抗原反応性のCD4+Tヘルパー細胞およびCD8+細胞傷害性T細胞の活性化が促進される。

DCによって刺激された病原体抗原特異的T_H細胞は、交差提示抗原に対する抗体を産生するようにB細胞を初回刺激および追加刺激することができる(CD40-CD40リガンド相互作用およびサイトカイン産生を介する)。

【０３２５】

病原体抗原反応性または腫瘍反応性の細胞傷害性T細胞の誘導:微生物抗原または他の非自己抗原をコードする抗体-DNAワクチンを用いて、広範囲の弱い腫瘍抗原に対するCD8+Tリンパ球(CTL)免疫応答を開始および増幅することができる。例えば、破傷風FrC特異的T_H細胞は、弱い腫瘍抗原に対するCD8+T細胞応答を初回刺激および追加刺激するように、FrCおよび腫瘍抗原を交差提示するDCを許可する。免疫優性の病原体由来ペプチドはサブドミナントな腫瘍由来エピトープに対する応答を制限する可能性があるので、抗腫瘍DNAワクチンにより共にコードされる病原体由来抗原は、CD4+T細胞ヘルプに必要なエピトープを含有するよう最小限にされてもよい(例えば、FrC-DOM1のシングルドメイン、またはプロミスキャスMHCクラスII結合ペプチド、例えば、破傷風毒素p30)。

【０３２６】

DNAプラスミド/ミニサークルワクチンの製剤:コドン最適化された特定の病原体由来DNA配列(DNAミニサークルは、3コピーのC3d補体受容体領域p28と共に、または伴わずに、PAまたはCSPをコードする)、ならびにGeneGripプラスミドシリーズに見られる反復結合部位1および2にあるDNA配列を、CMVieプロモーターおよびSV40ターミネーターベクターを含有する中間哺乳動物発現ベクターにクローニングする。配列確認の後に、SpeI(5'末端)またはApaI(3'末端)制限エンドヌクレアーゼ部位に特異的なテールを含有するPCRプライマーを用いて、発現カセット全体(CMVプロモーター、抗原、SV40、オリゴヌクレオチド結合モチーフ)をPCR増幅する。次いで、PCR産物をSpeIおよびApaIで消化し、p2ΦC31ミニサークルベクターのSpeI部位およびApaI部位に連結する。次いで、構築物p2ΦC31-PAを形質転換により大腸菌NM522細胞に導入し、組換え能力について試験する。プラスミドを含有する大腸菌を増殖させ、次いで、アラビノース(0.25%最終濃度)を添加することによって組換えを誘導する。誘導前(0時)ならびに誘導後(60分および120分)に培養アリコートを採取し、ミニプレッププラスミド単離に供する。母プラスミドがミニプラスミドおよびミニサークルと組換えを起こしたかどうか確かめるために、結果として生じたプラスミド調製物を電気泳動に供する。ゲル上にミニサークルバンドが存在すると確かめられた時に、組換えは成功している。バックボーンプラスミドバンド(ミニプラスミド)も存在するが、その強度は経時的に減少した(プラスミドバックボーンがI-SceI酵素によって切断され、細胞エンドヌクレアーゼによって分解されたことを示している)。

【０３２７】

DNAプラスミド/ミニサークルワクチンとEGFR標的化部分との複合化。本発明に記載のDNAワクチン/EGFR標的化部分の複合体は、多くの要因によって免疫効力を改善する。(1)DNAワクチンがケラチノサイトに標的化送達、保持、および受容体介在性内部移行され、コードされている病原体由来抗原または腫瘍由来抗原がケラチノサイトにおいて発現される。(2)複合体オプソニン化ケラチノサイトのファゴサイトーシスは、DCによるFcを介した病原体抗原および腫瘍抗原の交差提示、ならびにDCにおける複合体によりコードされている遺伝子の直接的な発現および提示を容易にする。(3)抗体-DNA複合体によりコーティングされた腫瘍細胞は、複合体に由来する外因性の免疫刺激性PAMPおよびDAMPならびに細胞に由来する内因性の免疫刺激性PAMPおよびDAMPを介して、DCの活性化を増強し、それにより、提示された抗原に反応するCD4+Tヘルパー細胞およびB細胞およびCD8+細胞傷害性T細胞の活性化が促進される。

【０３２８】

1つの態様において、本発明の複合体は、複合体をミニサークルにカップリングするのに用いられるオリゴヌクレオチドを含む。このようなオリゴヌクレオチドは、線状一本鎖オリゴヌクレオチド[二本鎖プラスミドまたはミニサークルDNA内の対応する二本鎖DNA配列に相補的な(CT)nまたは(GA)n反復モチーフのいずれかを含有するLNA/DNA ODN]を含んでもよく、スーパーコイル二本鎖ミニサークルDNAに結合される。このようなオリゴヌクレ

オチド(oligonucoleotide)の例には、LNA ODN
(5'-NH_2- GAGG- CTCTCTCTCTCTC-3')
;CpG DNAホスホロチオエートバックボーンを有するハイブリッドLNA-DNA ODN:
5'
tccatgacgttcctgacgttt CTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'; 5' cggcggataaccgcgagcggttattcgccctacgg
CTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'

(反復遺伝子外パリンドローム-REP配列;緑膿菌);または
5' gggggacgatcgtcgggggCTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'(A class CpG ODN)

(AクラスCpG ODN)が含まれるが、これらに限定されない。

【０３２９】

例えば、最大4～40倍モル過剰のODN:プラスミド内ODN結合部位で、ミニサークルDNAと、LNA ODNまたはCpG DNAホスホロチオエートバックボーンを有するハイブリッドLNA-DNA ODNを、10mMリン酸緩衝液、1mM EDTA、pH5.8中で37℃で16時間インキュベートする。記載のように、抗体-DNA複合体を作製するために、一端にアミン反応性NHSエステル、他方の端にスルフヒドリル反応性マレイミド基を含有するヘテロ二官能性試薬が用いられる(Bioconjugate techniques, Hermanson, G.T., Academic Press, 1996, pages 456-527を参照されたい)。

【０３３０】

さらなる態様において、抗体-プラスミド/ミニサークル複合体は、記載のカチオン性ペプチド、例えば、アラーミンLL-37を組み込んでもよい。カチオン性ペプチドは、ヌクレアーゼからのDNAの保護を促進し、細胞への侵入を容易にし、および/またはDC活性化を増強することができる。

【０３３１】

標的化部分-DNAワクチン複合体の効果は、(a)標的細胞(例えば、ケラチノサイト)におけるEGFRを介したエンドサイトーシス;(b)ケラチノサイトにおける関心対象の遺伝子の発現-病原体抗原由来エピトープまたは腫瘍抗原エピトープ(B細胞またはT細胞抗原決定基)がMHC分子によって提示される;(c)APC/DCによるオプソニン化ケラチノサイトのファゴサイトーシス:(i)複合体に由来するPAMP、DAMPによるDCの活性化;(ii)病原体抗原CD4+T細胞およびB細胞エピトープ(eiptopes)の提示;(iii)腫瘍関連抗原の交差提示;(d)病原体抗原反応性CD4+Tヘルパー細胞の活性化;(i)腫瘍抗原を交差提示するDCにヘルプをもたらす;(ii)病原体抗原反応性抗体の産生のためにB細胞にヘルプをもたらす;(iii)病原体抗原反応性または腫瘍反応性CD8+T細胞の活性化および生存のためにヘルプをもたらす、のように分析することができる。

【０３３２】

C.APC/DC標的化組成物

1つの態様において、本発明は、EGFR抗体などの組織標的化部分と、1つまたは複数の核酸分子と、1つまたは複数のペプチド/ポリペプチドとの複合体を含む。1つの態様において、核酸分子は、1つもしくは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)もしくは他の免疫刺激性モチーフを組み込み、および/または本明細書に記載の、抗原特異的免疫応答を刺激する1つもしくは複数の産物をコードする(注:0030、0031)。複合体の様々な態様において、ペプチド/ポリペプチドは、(i)1つまたは複数の病原体および/または腫瘍抗原または抗原決定基、(ii)アラーミン、(iii)DC結合分子(例えば、DC取り込み受容体のリガンド)の1つまたは複数を含む。1つの局面において、本明細書に記載の複合体のペプチド/ポリペプチドは、互いに、および/または核酸結合ペプチド(例えば、カチオン性ペプチド、プロタミン、HIV-tat、アルギニンリッチ配列もしくはヒスチジンリッチ配列、LL-37、核局在化ペプチド)に融合/連結されてもよい。

【０３３３】

1つの態様において、本発明の組成物は、正常な免疫細胞または組織、例えば、抗原提

示細胞または樹状細胞の標的分子または標的成分に結合する1つまたは複数の標的化部分(T)(APC/DC標的化部分)を含む。1つの態様において、標的化部分は、樹状細胞の取り込み受容体、例えば、DEC-205に結合する。

【０３３４】

1つの態様において、本発明は、抗原提示細胞(APC)/樹状細胞(DC)、例えば、DC取り込み受容体を標的とする抗体または他の部分、および関心対象の遺伝子をコードする核酸分子を含む複合体を含む。

【０３３５】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と核酸分子との複合体を含む。ここで、核酸分子は、1つまたは複数の産物(例えば、RNAなどの核酸、ペプチド、ポリペプチド、融合ペプチド)をコードし、免疫応答を刺激することができる。1つの態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含む。別の態様において、核酸分子は、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)または他の免疫刺激性モチーフを含み、免疫応答を刺激する1つまたは複数の産物をコードする。

【０３３６】

1つの態様において、本発明は、DEC-205抗体などのAPC/DC標的化部分と、1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。ここで、核酸分子は、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)を含み、1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【０３３７】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)と、1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つまたは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。

【０３３８】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数のダメージ関連分子パターン(DAMP)またはアラーミンと、1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。

【０３３９】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)をコードし、かつ1つまたは複数の免疫刺激分子、例えば、抗原提示細胞または樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、融合タンパク質として1つまたは複数の病原体抗原/抗原決定基をコードする。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。1つの局面において、複合体は、1つまたは複数の病原体に由来する抗原または抗原決定基を含む1つまたは複数のペプチドをさらに含む。

【０３４０】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数の腫瘍抗原をコードする1つまたは複数の核酸分子と、(i)1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルス

に由来する1つまたは複数の抗原または抗原決定基(例えば、CD4+T細胞エピトープ)、(ii)1つまたは複数の免疫刺激分子、例えば、抗原提示細胞または樹状細胞または他の免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞)を動員、結合、活性化、成熟、および/または増殖する分子ならびに免疫抑制を打ち消す分子(例えば、免疫刺激性サイトカイン、ケモカイン、補助刺激分子、増殖因子)をコードする1つまたは複数の核酸分子との複合体を含む。関連する態様において、核酸分子は、1つまたは複数の病原体、微生物またはウイルスに由来する抗原または抗原決定基(CD4+T細胞エピトープ)との融合タンパク質として1つまたは複数の腫瘍抗原をコードする。別の例において、融合パートナーはアラーミンである。関連する態様において、本明細書に記載の標的化部分-核酸複合体は、1つもしくは複数のPAMPおよび/または1つもしくは複数のDAMP/アラーミンをさらに含む。1つの局面において、複合体は、1つまたは複数の病原体由来または腫瘍の抗原または抗原決定基を含む1つまたは複数のペプチドをさらに含む。

【０３４１】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つもしくは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)および/または1つもしくは複数のアラーミンと、1つもしくは複数の腫瘍抗原および/または1つもしくは複数の病原体、微生物、もしくはウイルスに由来する抗原もしくは抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)を含む1つまたは複数の抗原性ペプチドとの複合体を含む。1つの態様において、抗原性ペプチドは標的化部分に融合されるか、または標的化部分の中に組み込まれる。別の局面において、抗原性ペプチドはアラーミン(例えば、LL-37)に融合される。

【０３４２】

1つの態様において、本発明は、APC/DC標的化部分と、1つまたは複数の核酸分子と、1つまたは複数の抗原性ペプチドとの複合体を含む。ここで、核酸分子は、1つもしくは複数の病原体関連分子パターン(PAMP)を含み、抗原性ペプチドは、腫瘍抗原および/または1つもしくは複数の病原体、微生物もしくはウイルスに由来する抗原もしくは抗原決定基(T細胞エピトープまたはB細胞エピトープ)を含む。1つの態様において、抗原性ペプチドは標的化部分に融合されるか、または標的化部分の中に組み込まれる。複合体の1つの関連する態様において、抗原性ペプチドは核酸結合ペプチド(例えば、カチオン性ペプチド、NLS、Tat、プロタミン、His6、Arg9、LL-37)に融合される。別の局面において、抗原性ペプチドは、DC取り込み受容体を標的とするペプチドモチーフに融合される。1つの局面において、抗原性ペプチドは標的化部分に融合されるか、または標的化部分の中に組み込まれる。別の局面において、抗原性ペプチドはアラーミンに融合される。

【０３４３】

DCを伴う作用機序の非限定的な1つの例は以下の通りである。樹状細胞は、吸収性エンドサイトーシスにより効率的かつ特異的に抗原を捕捉するために広範囲の取り込み受容体を有する。DCは捕捉抗原を処理し、抗原を主にペプチド-主要組織適合複合体(MHC)分子複合体として提示して、特異的なT細胞活性化をもたらす。このプロセスには、DCが環境刺激に応答して、例えば、パターン関連分子パターン(PAMP)、または内因性刺激、例えば、アラーミンを認識することによって活性化および成熟することが必要である。本発明の複合体は、抗原遺伝子発現(抗原提示のため)およびDC活性化/成熟(カップリングまたはコードされているPAMP/DAMPによる)が同時に起こり、それによって、抗原特異的免疫細胞をインビボまたはエクスビボで活性化する能力を高めることを可能にする。

【０３４４】

従って、複合体は、以下の作用機構を有する多機能性分子である。(a)樹状細胞におけるDC受容体介在性取り込み/エンドサイトーシス;(b)DCにおける関心対象の遺伝子の発現-腫瘍または病原体エピトープまたは融合産物(抗原に由来するB細胞抗原決定基またはT細胞抗原決定基)がMHC分子によって提示される;(c)T細胞エピトープまたはB細胞エピトープの提示およびAPC/DCの同時活性化:(i)コードまたは連結されているPAMP、DAMP/アラーミンによるTLRの活性化;(ii)T細胞エピトープおよびB細胞エピトープの提示;ならびに(iii)抗原エピトープを認識する抗原反応性のT細胞およびB細胞の活性化。

【０３４５】
様々な態様において、DC標的化部分には、DC取り込み受容体、例えば、C型レクチン様受容体:DC-SIGN(樹状細胞特異的ICAM-3結合ノンインテグリン)、MMR(MRC1)(マクロファージマンノース受容体)、DEC-205(LY75)(抗DEC-205抗体より連結される)、BDCA-2(血液樹状細胞抗原)(C型レクチンスーパーファミリーCLECSF11)、ランゲリン(Langerin)またはデクチン(Dectin)-1;Fc受容体:(免疫複合体およびオプソニン化細胞により連結される)、FcgRI(CD32)、FcgRII(CD64);インテグリン:(アポトーシス細胞およびオプソニン化抗原により連結される)、aVb5、aMb2(CD11b/CD18、補体受容体3-CR3)、またはaXb2(CD11c/CD18、補体受容体4-CR4);スカベンジャー受容体:(アポトーシス細胞および熱ショックタンパク質(hsp)-ペプチド複合体により連結される)、CD36、LOX-1低密度リポタンパク質、酸化受容体(oxidized,receptor)-1(OLR1);またはCD91、アクアポリンを標的とする、抗体、アプタマー、ペプチド、またはリガンドが含まれ得る。例えば、DEC-205、Fcg受容体、aVb5インテグリン、CD36、LOX-1、およびCD91を介した抗原取り込みは全て交差提示と関連付けられている。

【０３４６】
DC標的化部分は公知であり、本発明の状況において使用することができる。1つの態様において、DC標的化部分は抗DEC205であり、DEC-205(NLDC-145)は、DCにおいて高レベルで発現されるエンドサイトーシス受容体である。

【０３４７】
抗体は、従来の技法を用いて調製することができる。DC標的化ペプチド(例えば、p28)。本発明のDNA-抗体複合体を調製するために、C3dによって規定される補体受容体に結合するペプチドp28が用いられる。

【０３４８】
複合体の合成に用いられるDNAワクチンには、線状もしくは環状のプラスミド、ミニサークルDNA、またはMIDGEが含まれ得る。DNAワクチンによりコードされる特定の遺伝子は、DNAプラスミドまたはミニサークルによりコードされる病原体抗原由来遺伝子;プラスモディウム属に由来するスポロゾイド周囲タンパク質(CSP-1)またはメロゾイトタンパク質(マラリア抗原):寄生生物;炭疽菌防御抗原(PA):グラム陽性細菌;結核菌抗原:マイコバクテリア;赤痢菌属IpaBおよびIpaC:グラム陰性細菌;インフルエンザウイルス抗原:ウイルスより選択される。

【０３４９】
DNAプラスミドまたはミニサークルによりコードされる腫瘍抗原および腫瘍関連抗原(明細書にある完全なリスト);癌精巣抗原;例えば、MAGE-1、BAGE、GAGE-1、NY-ESO-1;系列特異的抗原;例えば、メラノサイト抗原(チロシナーゼ、MART-1、gp100);腫瘍特異的な変化した遺伝子産物(増幅、異常発現、過剰発現、または変異した遺伝子、スプライスバリアント、遺伝子融合産物)、例えば、HER2/neu、p53、Ras遺伝子-KRAS2、HRAS、NRAS、ムチン-1、βカテニン、MUM1、CDK4、BCR-ABL融合産物、surviving、TERT、CEA、AFP、N-アセチルグルコサミン転移酵素V;B細胞悪性腫瘍の免疫グロブリンイディオタイプ;ウイルスの癌抗原;例えば、ヒトパピローマウイルスに由来するHPV E6およびE7抗原、EBV LMP1およびLMP2。さらなる態様において、(前記の腫瘍標的化複合体について述べられたように)CD4+T細胞ヘルプをもたらすために、腫瘍抗原は、病原体に由来する抗原決定基(例えば、破傷風FrCまたはDOM1)の下流に、または融合パートナーとしてDNAミニサークル内にコードされてもよい。

【０３５０】
別の態様において、免疫細胞活性化/成熟および標的細胞死を誘導する核酸複合体を特定する方法が開示される。この方法は、1つまたは複数の細胞と、腫瘍細胞の細胞成分、腫瘍血管系、および/または腫瘍微小環境の成分に特異的に結合する、抗体またはペプチドまたは標的化部分を含有する試験核酸複合体をインビトロで接触させる工程であって、抗体またはペプチドまたは標的化部分は、1つまたは複数の免疫刺激核酸配列(INAS)を含む核酸に複合化され、核酸配列の1つまたは複数は、病原体関連分子パターン(PAMP)また

は免疫細胞を活性化することができる他のモチーフを含む工程、ならびに免疫細胞の存在下または非存在下で、1つまたは複数の細胞におけるマーカーの誘導または表現型の変化を確かめる工程であって、試験抗体/ペプチド-核酸結合の存在下で誘導または変化が確かめられたことは、免疫細胞の活性化/成熟、標的細胞シグナル伝達の調節、および標的細胞の死を示している工程を含む。

【０３５１】

別の局面において、抗体-核酸複合体は、ウイルス、細菌、マイコバクテリア、スピロヘータ、真菌、リケッチア、マイコプラズマ、クラミジア、原生動物および後生動物寄生生物、または蠕虫類を含む、感染性微生物または病原性微生物に由来する抗原とさらに複合化される。

【０３５２】

IV.方法

本発明の様々な局面において、本発明の組成物は、疾患状態を予防または治療するために、本発明の組成物を必要とする対象に投与される。様々な態様において、本発明の組成物は、その標的化部分および活性薬剤に基づいて選択される。本明細書に前記のように、治療または予防が求められる特定の疾患に基づいて、式T-A_1-A_2またはそのバリエーションが用いられる。

【０３５３】

例えば、疾患状態が膵臓癌の場合、免疫複合体は、腫瘍抗原および/もしくは膵臓細胞成分に選択的な標的化部分、1つもしくは複数の免疫刺激核酸分子(例えば、PAMP、DAMP、アラーミン、および/または抗原性ポリペプチド)を含むように選択される。別の例において、免疫複合体は、抗原性ポリペプチド、補助刺激ポリペプチド、またはその両方をコードする核酸分子(例えば、標的化部分にカップリングされたミニサークル)をさらに含んでもよい。

【０３５４】

様々な態様において、送達および免疫系による認識を促進するために、複合体を含む核酸配列は、(ヌクレアーゼ耐性またはリソソーム分解耐性になるように)安定していてもよく/安定化されてもよい。

【０３５５】

「安定した」または「安定化された核酸分子」とは、(例えば、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを介した)インビボ分解に対して比較的耐性のある核酸分子を意味するものとする。安定化は長さまたは二次構造の関数の場合がある。短い免疫刺激核酸分子の場合、二次構造は免疫刺激核酸分子の効果を安定化し、高めることができる。例えば、折り畳まれ、一種のステムループ構造を形成できるように、核酸分子の3'末端が上流領域と自己相補すれば、核酸分子は安定化され、従って、より大きな活性を示す。

【０３５６】

1つの局面において、本発明の安定化された核酸分子は、改変されたバックボーンを有する。免疫刺激において使用するために、安定化された核酸分子は、ホスホロチオエート(すなわち、核酸分子のホスフェート酸素の少なくとも1つが硫黄によって置換されている)またはホスホロジチオエートにより改変された核酸分子を含んでもよい。さらに具体的には、ホスフェートバックボーンの改変は、核酸の5'末端、例えば、核酸の5'末端の最初の2つのヌクレオチドで行われてもよい。さらに、ホスフェートバックボーンの改変は、核酸の3'末端、例えば、核酸の3'末端の最後の5つのヌクレオチドで行われてもよい。核酸分子を安定化することに加えて、本明細書においてさらに報告するように、ホスホロチオエートにより改変された核酸分子(ホスホロジチオエートにより改変された核酸分子を含む)は、核酸分子の免疫刺激の程度を高めることができる。

【０３５７】

他の安定化された核酸分子には、非イオンDNA類似体、例えば、アルキル-ホスホネートおよびアリール-ホスホネート(荷電ホスホネート酸素がアルキル基またはアリール基によって置換されている)、ホスホジエステルおよびアルキルホスホトリエステル(荷電酸素部

分がアルキル化されている)が含まれる。一端または両端にジオール、例えば、テトラエチレングリコールまたはヘキサエチレングリコールを含有する核酸分子もまた、実質的にヌクレアーゼ分解耐性であることが示されている。1つの局面において、核酸分子はペプチド結合を含有する(すなわち、ペプチド核酸:PNA)。

【０３５８】

本発明の組成物および方法と共に使用することができる、核酸をインビボで安定化するさらなる方法は公知であり、例えば、米国特許第7,223,741号;同第7,220,549号;同第6,239,116号;同第6,379,930号;同第6,406,705号;同第6,218,371号;同第6,429,199号;同第6,55,206号;同第6,271,206号;米国特許出願公開第20070161590号;同第20070135372号;同第20070078104号;同第20070065467号;同第20070037767号;同第20060240093号;同第20060211639号;同第20060172966号;同第20060008910号;および同第20050191342に開示される。

【０３５９】

カップリング

本発明の様々な態様において、本発明の組成物に含まれる1つまたは複数の成分は、共有結合または非共有結合により共にカップリングされる。核酸分子と他の核酸分子、核酸分子とペプチドまたはポリペプチド、およびペプチド/ポリペプチドと他のペプチド/ポリペプチドをカップリングする様々な従来法が当技術分野において公知である。非共有結合カップリングは、水素結合、イオン相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用、および疎水性結合によるものでもよい。

【０３６０】

さらに、活性薬剤を共有結合によりカップリングするための様々な化学を用いる様々な方法が公知である。このような薬剤には、標的化部分、例えば、抗体、ポリペプチドおよび核酸、ならびに活性薬剤を選択された標的細胞に向ける他の物質が含まれ得る。例えば、活性薬剤は様々な粒子担体に複合化され、血清分解から活性薬剤が保護されるリポソーム、ミセルおよびナノ粒子に包まれている。

【０３６１】

例えば、プラスミド/ミニサークルに結合したオリゴヌクレオチド(3'末端または5'末端)を、標的化部分、例えば、抗体に複合化することができる。抗体-DNA複合体を生成するために、一端にアミン反応性NHSエステル、他方の端にスルフヒドリル反応性マレイミド基を含有するヘテロ二官能性試薬が用いられる。これらの官能基を有する架橋試薬(例えば、SMCCまたはスルホ-SMCC)を用いて、複合体を合成することができる。これにより、DNAまたは抗体は、アミン反応性NHSエステル末端を介して活性化され、それにより、マレイミド活性化中間体が得られる。中間体種は、複合化しようとする第2の分子と混合する前に、過剰なクロスリンカーおよび反応副産物から精製される。このプロセスの多段階性は、複合化されたタンパク質の重合を制限し、架橋の程度および部位を制御する。SMCCによるDNA活性化およびその後の抗体分子との複合化を伴うプロトコールでは、抗体は、以下の選択肢を介してスルフヒドリル基を導入することにより、DNA上のマレイミド基にカップリングするように調製される。(a)遊離スルフヒドリル基を曝露するために、IgG構造のヒンジ領域にあるジスルフィド残基を、2-メルカプトエチルアミンまたはジチオスレイトール(DTT)を用いて還元することができる;(b)チオール化試薬を用いて、インタクトな抗体がスルフヒドリル基を含有するように修飾することができる(例えば、SATAおよびトラウト(Traut)試薬;2-イミノチオラン)(Bioconjugate techniques, Hermanson, G.T., Academic Press, 1996, pages 456-527を参照されたい)。

【０３６２】

NHSエステル-マレイミドクロスリンカーによるDNAの活性化:三重鎖と、末端アミンを有するオリゴヌクレオチドDNAをスルホ-SMCCで処理してマレイミド-DNAを得、次いで、カラムクロマトグラフィーによって過剰なクロスリンカーから精製する。マレイミド活性化DNAは、抗体を複合化するためにすぐに用いてもよく、後で使用するために凍結乾燥してもよい。

【０３６３】

別の例では、マレイミド活性化DNAと、還元またはチオール化された抗体が複合化される。金属触媒作用によるスルフヒドリルの再酸化を避けるためにEDTAの存在下で、抗体を、MEAまたはDTTを用いて還元する。還元されたIgGをカラムクロマトグラフィーによって精製する。抗体をチオール化するために、抗体を、チオール化剤(例えば、2-イミノチオランまたはSATA)(10～50x超のモル過剰の抗体)と37℃で30分間または室温で1時間反応させる。チオール化抗体をカラムクロマトグラフィーによって精製する。還元またはチオール化された抗体の画分をマレイミド活性化DNAと所望のDNA:抗体比(例えば、4:1～15:1モル比)で混合し、37℃で30～60分間または室温で2時間または4℃で一晩インキュベートする。複合体を、記載のように、アフィニティクロマトグラフィーによって、複合化されていないDNAから精製する。複合体を凍結するか、凍結乾燥するか、または滅菌濾過し、4℃に保つ。他の方法が当技術分野において提供されている(Bioconjugate techniques, Hermanson, G.T., Academic Press, 1996, pages 456-527を参照されたい)。

【０３６４】

さらなる態様において、本発明の複合体は、ヌクレアーゼ分解からDNAを保護し、かつ細胞侵入を容易にする補助分子の取り付けを用いて生成された複合体の製剤を含む。

【０３６５】

ある態様において、標的化部分、例えば、インタクトな抗体、抗体フラグメント(例えば、Fabなど)、単鎖抗体は、免疫刺激分子(例えば、核酸および/またはペプチド/ポリペプチド)に直接、またはリンカーを介して化学的に複合化される。リンカーは、短い配列(例えば、3から15まで、25までのアミノ酸または核酸塩基)でもよい。本発明の状況において使用することができるリンカーの例は、米国特許出願公開第2007/0003514号に開示される。

【０３６６】

1つの態様において、本発明の標的化部分は1つまたは複数の成分に架橋される。例えば、抗体はアビジンにカップリングされてもよく、他の抗体はビオチンにカップリングされてもよい。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に標的化することができる(例えば、US4,676,980を参照されたい)。適切なペプチド架橋薬剤および技法が当技術分野において周知であり、このような薬剤および技法の例は、例えば、US4,676,980に開示される。

【０３６７】

さらに、分子を化学的に複合化する手段は当業者に周知である。免疫刺激分子を抗体に取り付ける手順は、薬剤の化学構造によって異なる。ポリペプチドは、典型的には、エフェクターが結合する、エフェクター分子上の適切な官能基と反応するのに利用可能な様々な官能基;例えば、カルボン酸(COOH)基または遊離アミン(--NH_2)基を含有する。

【０３６８】

さらに、標的化部分は、例えば、循環半減期を延ばすために、ポリマーとの共有結合による複合化によって化学修飾されてもよい。例示的なポリマーおよびポリマーをペプチドに取り付ける方法は、例えば、US4,766,106、US4,179,337、US4,495,285、およびUS4,609,546に例示される。さらなる例示的なポリマーには、ポリオキシエチレン化ポリオールおよびポリエチレングリコール(PEG)(例えば、約1,000～約40,000、例えば、約2000～約20,000、例えば、約3,000～12,000の分子量を有するPEG)が含まれる。標的化部分はまた、任意の適切なタイプの化学基、例えば、メチル基もしくはエチル基、または炭水化物基に複合化することができる。これらのおよび他の適切な複合化された基は、標的化部分、例えば、抗体またはその機能断片の生物学的特徴を改善するために、例えば、血清半減期を延ばすために、溶解度を上げるために、および/または組織結合を強めるために使用することができる。

【０３６９】

抗体誘導体は、タンパク質または他の薬剤/部分/化合物を、(a)抗体またはそのサブユニット(例えば、抗CD38抗体H鎖、L鎖、もしくはその抗CD38特異的/選択的断片)のN末端側またはC末端側、適切な置換基基または側鎖、あるいは(b)抗体の糖鎖に化学的に複合化す

ることによって作製することができる(例えば、Antibody Engineering Handbook, Osamu Kanemitsuにより編集, Chijin Shokanにより出版(1994)を参照されたい)。誘導体はまた、適宜、内部の残基または糖での複合化によって作製されてもよい。

【０３７０】

抗体はまた、検出薬剤、例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、ランタニド蛍光体などを含む、蛍光化合物を用いて誘導体化することができる。適切な蛍光標識のさらなる例には、^{125}Eu標識、イソチオシアネート標識、フィコエリトリン標識、フィコシアニン標識、アロフィコシアニン標識、o-フタルアルデヒド標識、フルオレサミン標識などが含まれる。化学発光標識の例には、ルミナール(luminal)標識、イソルミナール(isoluminal)標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジニウム塩標識、シュウ酸エステル標識、ルシフェリン標識、ルシフェラーゼ標識、エクオリン標識などが含まれる。

【０３７１】

1つの態様において、抗体誘導体は、複合化された核酸または核酸関連分子を含む。本明細書において提供されるように、核酸分子は、コード核酸、非コード核酸、またはコード核酸および非コード核酸配列の組み合わせでもよい。1つの態様において、非コード配列は、それ自体で、およびそれ1つで免疫刺激性である。

【０３７２】

または、抗体および/または免疫刺激性成分は、さらなる反応性官能基を曝露または取り付けるために誘導体化されてもよい。誘導体化は、Pierce Chemical Company, Rockford イリノイ州から入手可能なリンカー分子などの、多くのリンカー分子のいずれの取り付けを伴ってもよい。さらに、本発明の状況において使用するための適切な架橋剤には、異なる反応をする2種類の反応基が適切なスペーサー(例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)によって分けられたヘテロ二官能性架橋剤、またはホモ二官能性架橋剤(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)が含まれる。このようなリンカーはPierce Chemical Companyからも入手することができる。

【０３７３】

本明細書で使用する「リンカー」は、核酸分子および/またはポリペプチドまたはペプチドを含む免疫刺激性成分に抗体を接続するのに用いられる分子である。リンカーは、典型的には、抗体および免疫刺激活性薬剤の両方に共有結合を形成することができる。適切なリンカーは当業者に周知であり、直鎖または分岐鎖の炭素リンカー、複素環式炭素リンカー、またはペプチドリンカーを含むが、これらに限定されない。抗体および免疫刺激分子がポリペプチドである場合、リンカーは、構成アミノ酸の側鎖を介して構成アミノ酸に(例えば、ジスルフィド結合を介してシステインに)接続することができる。しかしながら、1つの態様では、リンカーは、末端アミノ酸のα炭素アミノ基およびカルボキシル基に接続される。

【０３７４】

ある態様において、リンカーは1つまたは複数の切断部位を提供することができる。従って、本発明の複合体は、切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーを含んでもよい。本発明のために、生物学的に切断可能な連結(biocleavable linkage)は、本明細書に記載の成分、例えば、核酸、インターカレーター、活性薬剤、標的化部分、両親媒性分子およびポリマーを共有結合によりカップリングまたは架橋するために、組成物と共に使用することができる特定の化学部分または化学基のタイプと定義される。経口送達において使用するのに適した一部の例が、V. R. Sinha, et al, Europ. J Pharmaceutical Sci. 18, 3-18(2003)およびこの中の参考文献により開示されている。生物学的に切断可能な連結または結合は、これらの構造および機能により区別することができる。

【０３７５】

切断可能なペプチド結合。生物学的に切断可能な連結の別の好ましいカテゴリーは、2～100残基長、好ましくは、3～20残基長の生物学的に切断可能なペプチドまたはポリペプ

チドである。これらは、主に細胞内で見出される特定の酵素(細胞内酵素)、例えば、カテプシンによって切断される、ある特定のアミノ酸配列(すなわち、通常、疎水性)を含有する、ある特定の天然ポリペプチドまたは合成ポリペプチドと定義される。左側をアミノ末端または「N」末端、右側をカルボキシル末端または「C」末端にするという規則を用いて、いくつかの例は、対となったアミノ酸Phe-Leu、Leu-Phe、またはPhe-Pheを含有する任意のペプチド、例えば、Gly-Phe-Leu-Gly(GFLG)、および他の組み合わせである。(特に)好ましい実施例には、参照により本明細書に組み入れられる、J.J. Peterson, et al, in Bioconj. Chem., Vol. 10, 553-557, (1999)およびその中の参考文献ならびに米国特許出願第10/923,112号により開示される、ロイシンエンケファリン誘導体およびカテプシンにより切断可能な任意のペプチド結合配列が含まれる。

【０３７６】

生物学的に切断可能な連結の別の好ましいタイプは、チオレートイオンまたは他の切断機構からの攻撃を立体的に阻害する、「妨害」または「保護」された任意のジスルフィド結合である。このような保護ジスルフィド結合の（非限定的な）例は、カップリング剤:S-4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-α-メチルベンジルイオサルフェート(SMBT)および4-スクシンイミジルオキシカルボニル-α-メチル-α-(2-ピリジルジチオ)トルエン(SMPT)に見られる。還元に対して耐性のある別の有用なカップリング剤は、Worrell, et al., Anticancer Drug Design 1:179-188 (1986)により開示されるSPDBである。また、ジスルフィドに隣接するメチル基またはフェニル基で置換された、ある特定のアリールジチオチオイミデート(aryldithio thioimidate)があり、これには、S. Arpicco, et al., Bioconj. Chem. 8 (3):327-337 (1997)により開示されるエチルS-アセチル3-メルカプトブチロチオイミデート(M-AMPT)および3-(4-カルボキシアミドフェニルジチオ)プロピオンチオイミデート(CDPT)が含まれる。

【０３７７】

様々な化合物を、タンパク質、例えば、抗体に取り付けるための多くの手順およびリンカー分子は公知である(例えば、欧州特許出願第188,256号;米国特許第4,671,958号、同第4,659,839号、同第4,414,148号、同第4,699,784号;同第4,680,338号;同第4,569,789号;および同第4,589,071;ならびにBorlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075を参照されたい)。

【０３７８】

キメラ部分の各成分にある基と反応する1つの官能基を有する、二官能性リンカーまたは三官能性リンカーを、所望の免疫複合体を形成するのに使用することができる。または、ある特定の態様においては、誘導体化は、抗体の化学処理、例えば、過ヨウ素酸塩を用いて糖タンパク質抗体の糖部分をグリコール切断して、遊離アルデヒド基を生成することを伴ってもよい。抗体上の遊離アルデヒド基は、遊離のアミン基またはヒドラジン基、例えば、ポリペプチドに結合するリンカー上の遊離のアミン基またはヒドラジン基と反応することができる(例えば、米国特許第4,671,958号を参照されたい)。ポリペプチド、例えば、抗体または抗体フラグメントにある遊離スルフヒドリル基を作製する手順も公知である(例えば、米国特許第4,659,839号を参照されたい)。

【０３７９】

別の態様において、カップリングは、二本鎖核酸分子と一本鎖核酸の間にある。別の態様では、一本鎖または二本鎖を標的化部分にカップリングすることができる。1つの態様において、標的化部分は、別の核酸分子にカップリング(例えば、複合化)して三重鎖核酸分子を形成する核酸分子に連結される。さらに、三重鎖核酸分子それ自体が二本鎖または一本鎖核酸とさらに反応する、すなわち四重鎖および五重鎖（quantaplex）の核酸分子を形成してもよい。1つの態様において、ワトソン・クリック塩基対形成およびフーグスティーン塩基対形成に応じて3本のDNA鎖が複合体を形成する、三重鎖が形成される。三重鎖分子は、高い親和性および特異性で標的領域に結合することができる。様々な異なる標的分子に結合する三重鎖形成分子を作るおよび使用する方法の代表例は、以下の非限定的な米国特許のリスト:US5,176,996、US5,645,985、US5,650,316、US5,683,874、US5,693,773

、US5,834,185、US5,869,246、US5,874,566、およびUS5,962,426において見られる。

【０３８０】

1つの態様において、本発明の組成物は、免疫刺激性であり、1つまたは複数の腫瘍抗原をコードする核酸分子と三重鎖を形成する核酸分子を含む。さらなる態様において、核酸は、1つまたは複数の腫瘍抗原をコードし、病原体に関連する1つまたは複数の抗原をさらにコードするか、代わりにコードする。さらに別の態様において、このようなポリペプチドをコードする核酸は、ミニサークルDNAである。ミニサークル発現ベクターは公知であり、本発明の状況と共に使用することができ、米国特許:US6,143,530、US6,825,012およびUS7,018,833に開示されるものを含む。

【０３８１】

さらに別の方法では、抗体と活性薬剤(例えば、核酸分子)は光親和性によってカップリングされる。抗体は、光親和性化合物を選択部位特異的に取り付けるための1つまたは複数の光親和性部位を含有する。特に、抗体は、プリン、アジド-プリンおよび他の類似した複素環式有機化合物、具体的には、ATP類似体またはGTP類似体に対して高親和性の1つまたは複数の部位を含むことが発見されている。さらに、他の光親和性結合部位は、例えば、抗体と、プリンを含有しない光親和性化合物、例えば、ピリミジン誘導体、例えば、5-アジド-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸(5-N.sub.3 dUTP)を含む、dUTPの光活性類似体を反応させることによってさらに特定することができる。

【０３８２】

プリンまたはアジドプリン(azidopurine)のヌクレオチド親和性部位は、以下では「プリン環結合」または単に「PRB」ドメインもしくは「PRB」部位と呼ぶ。光親和性化合物、特に、プリンまたはアジドプリン光親和性化合物が、穏やかな生理学的条件下での光活性化化学反応によって抗体および抗体フラグメントに容易にくっつくと本発明者らによって見出された後に、抗体分子上のPRB部位は発見された。具体的には、抗体は、プリンおよびアジドプリン光親和性類似体に対してこのような高親和性を示す、1つまたは複数のPRB部位を含む。穏やかな生理学的条件下で、具体的には、1回だけの2～5分間の光分解の後に、抗体とプリンおよびアジドプリン光親和性類似体が反応すると、ほぼ100％、光によりくっつく。

【０３８３】

米国特許第5,693,764号に記載のように、光親和性によって、ヌクレオチドまたはヌクレオシド光親和性化合物、好ましくは、プリン、アジドプリン、または光親和性類似体を含有する類似の複素環式塩基、最も好ましくは、ATP類似体またはGTP類似体光親和性化合物は、抗体分子に効果的に光挿入(photoinsertion)される。これにより、抗原結合は実質的に消失しない。

【０３８４】

ヌクレオチド光親和性類似体をタンパク質に取り付けるのに適した方法は、例えば、Potter & Haley, Meth. in Enzymol., 91:613-633, (1983); Owens & Haley, J. Biol. Chem., 259:14843-148 48, (1987); Atherton et al, Biol. of Reprod., 32:155-171, (1985); Khatoon et al, Ann. of Neurology, 26:210-219, (1989); King et al, J. Biol. Chem., 269:10210-10218, (1989); Dholakia et al, J. Biol. Chem., 264:20638-20642, (1989); Campbell et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:1243-1246, (1990); and Kim et al, J. Biol. Chem., 265:3636-3641, (1990)
に記載されている。これらの参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０３８５】

ヌクレオチドまたはヌクレオシド光親和性化合物に効果的に結合する組成物を含有する、いずれの抗体または抗体も本発明の範囲内にある。例として、これには、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、単鎖抗体、異なる種(例えば、マウス、ヤギ、ウサギ、ヒト、ラット、ウシなど)に由来する抗体、抗イディオタイプ抗体、異なるアイソタイプ(IgG、IgM、IgE、IgAなど)の抗体、ならびに

そのフラグメントおよび誘導体(例えば、$(Fab)_2$フラグメント)が含まれる。

【０３８６】

例として、プラスミドおよびミニサークルDNAに含まれるヌクレオチド配列は、以下の仕様に従って作製することができる。

【０３８７】

オリゴヌクレオチドとハイブリダイズしかつ結合することができるdsDNA配列。

【０３８８】

特異的配列は、好ましくは、三重鎖の形成に用いられるオリゴヌクレオチドに完全に相補的である。

【０３８９】

配列は、プロモーターによる、関心対象の遺伝子の発現に影響を及ぼさない部位に組み込まれる。

【０３９０】

配列は3～50塩基対長、好ましくは、>10塩基対でもよい。

【０３９１】

例示的な配列は、好ましくは、ホモプリン(Pu)-ホモピリミジン(Py)dsDNAでもよい。

【０３９２】

(CT)nに基づく反復配列のプラスミド内領域と、反対鎖にある相補反復(GA)n、例えば、

5’ CTCTCTCTCTCTCTC 3’ (SEQ ID NO: _)

1)

3’ GAGAGAGAGAGAGAG 5’ (SEQ ID NO: _)

2)(CCTT)nに基づく反復配列のプラスミド内領域と、相補鎖(GGAA)n、例えば、

5’ CCTTCCTTCCTTCC 3’ (SEQ ID NO: _)

(2)

3’ GGAAGGAAGGAAGG 3’(SEQ ID NO: _)

(CTT)nに基づく反復配列のプラスミド内領域と、相補鎖(GAA)n、例えば、

5’ CTT CTT CTT CTT CTT CTT 3’(SEQ ID NO: _)

a.

3’ GAA GAA GAA GAA GAA GAA 5’(SEQ ID NO: _)

(CCT)nに基づく反復配列のプラスミド内領域と、相補鎖(GAA)n、例えば、

5’ CCT CCT CCT CCT CCT CCT 3’(SEQ ID NO: _)

b.

3’ GGA GGA GGA GGA GGA GGA 5’(SEQ ID NO: _)

他の任意のホモプリン-ホモピリミジン配列、例えば、

5’ TCT CCT CCT TT 3’(SEQ ID NO: _)

3’ AGA GGA GGA AA 5’(SEQ ID NO: _)

。

【０３９３】

ある態様において、グアニンリッチDNAは、Gカルテットの多数の平面正方形配列(square-planar array)に基づいて、4本鎖構造を形成するように集合ことができる(1～4)。Gカルテットは、フーグスティーン型塩基対形成によって連結された4個のグアニンからなる。一価カチオンがGカルテット間の中心の穴に選択的に結合し、具体的には、これらの構造はカリウムによって安定化される。ナトリウムでは安定性の低い複合体が生じるのに対して、リチウムは集合を阻害する(5,6)。G四重鎖は、4本のDNA鎖の分子内会合によって(5,7,8)、2本のGトラクトを含有する配列の二量体化によって(9,10)、または少なくとも4本のGトラクトを含有する1本の鎖の分子内フォールディングによって(11～15)、形成するこ

とができる。特に、テロメア配列は、高度に反復したGリッチ配列、例えば、ヒトおよび他の高等生物では(GGGTTA)n、テトラヒメナ(Tetrahymena)では(GGGGTT)n、およびオキシトリチア(Oxytrichia)では(GGGGTTTT)nからなる。四重鎖は、一部の癌遺伝子、特に、c-myc(16,17)、免疫グロブリンスイッチ領域(3)、網膜芽細胞腫(retinblastoma)感受性遺伝子(18)、FMR-1遺伝子(19)、ニワトリβ-グロビン遺伝子(20)、およびインシュリン遺伝子(21)の制御領域に結び付けられてきた。さらに、いくつかの合成アプタマーは、HIV-インテグラーゼ(22)およびトロンビン(12)への標的化を含めて、G四重鎖プラットフォームに基づくことが知られている。Gカルテットを含有する分子は、非ワトソン・クリック型のグアニン・グアニン塩基対分子内構造を形成することによって自己会合することができる。これらの構造は、中程度のイオン強度および中性pH、40℃未満で形成し、ヘアピン二重鎖のように振る舞う。末端T(3'末端または5'末端)を付加すると四重鎖構造が安定することが以前に示されており(37)、この効果は、さらなる塩基スタッキングによって引き起こされ、恐らく、一部は末端Gカルテットと塩基対形成している(38)。例えば、形成のための配列は5'TGGGGT3'でもよい。

(1)3'TGGGGT5' 。

【０３９４】

1つの態様において、(標的細胞において活性のあるプロモーター配列、関心対象の遺伝子、およびオリゴヌクレオチド結合配列を含む)特定のヌクレオチド配列をプラスミドまたはミニサークルDNAに組み込む方法は、以下のように提供される。まず最初に、関心対象の遺伝子のDNA配列を、哺乳動物細胞において効率的に発現するようにコドン最適化する(DNA2.0)。選択された配列(標的細胞特異的プロモーター、関心対象の遺伝子、オリゴヌクレオチド結合モチーフ)を、CMVieプロモーターおよびSV40ターミネーターベクターを含有する中間哺乳動物発現ベクターにクローニングする。[例えば、遺伝子発現を駆動するCMV最初期プロモーターを含むプラスミドpGL3 Basic(Promega)]。配列確認の後に、SpeI(5'末端)またはApaI(3'末端)制限エンドヌクレアーゼ部位に特異的なテールを含有するPCRプライマーを用いて、発現カセット全体(プロモーター、関心対象の遺伝子、SV40ターミネーター、オリゴヌクレオチド結合モチーフ)をPCR増幅する。次いで、PCR産物をSpeIおよびApaIで消化し、p2ΦC31ミニサークルベクターのSpeI部位およびApaI部位に連結する。次いで、構築物p2ΦC31-遺伝子を形質転換により大腸菌NM522細胞に導入し、組換え能力について試験する。プラスミドを含有する大腸菌を増殖させ、次いで、アラビノース(0.25%最終濃度)を添加することによって組換えを誘導する。誘導前(0時)ならびに誘導後(60分および120分)に培養アリコートを採取し、ミニプレッププラスミド単離に供する。母プラスミドがミニプラスミドおよびミニサークルと組換えを起こしたかどうか確かめるために、結果として生じたプラスミド調製物を電気泳動に供する。組換えの成功は、ゲル上にミニサークルバンドが存在することによって確かめられる。バックボーンプラスミドバンド(ミニプラスミド)の強度が経時的に減少すれば、プラスミドバックボーンがI-SceI酵素によって切断され、細胞エンドヌクレアーゼによって分解されたことが分かる。

【０３９５】

プラスミドDNAは、Qiagen Maxi Prep法を用いて、またはQiagen Endofree Plasmid Maxiキットによって調製され、TE(10mM Tris±HCl、1mM EDTA)pH8.0に1mg/mlで再懸濁される。プラスミドはアガロースゲル電気泳動によって>95%スーパーコイルになっている。

【０３９６】

分子的方法 および クローニング法、例えば、制限酵素による消化、ゲル電気泳動、大腸菌の形質転換(タイプ-メチル化)、核酸沈殿、核酸ハイブリダイゼーションなどが文献に記載されている(Maniatis et al., T, E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; Ausubel F. M., R. Brent, R.E. Kinston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Willey and Sons, New York)。

【０３９７】

ある態様において、プラスミドは、オリゴヌクレオチド、例えば、DNA、LNA、PNAを部位特異的に結合することができる。ルシフェラーゼ(gWiz)または緑色蛍光タンパク質(GFP; pGGGFP)を発現する、pGeneGripシリーズをベースとするプラスミド[GTS;Zelphati et al.(8)]。遺伝子発現を妨げることなく部位特異的結合を可能にする、プラスミドgWizおよびpGGGFPの転写ターミネーターの中には、(CT)nに基づく反復配列のプラスミド内領域であるGeneGrip部位1と、反対鎖に相補反復(GA)nがある。サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの5'側にある部位2は(CCTT)nに基づき、相補鎖には(GGAA)nがあり、プラスミドpGG2XGFPおよびpGG2XEMPTYにしか見られない。プラスミドpGG2XGFPおよびpGG2XEMPTYは部位1をさらに含有する[GTS Catalogue 2002; Zephati et al.(8)]。プラスミドpGG2XEMPTYは、pGG2XGFPからGFP遺伝子を欠失することによって得られる。プラスミドpGG2XEMPTYを構築するために、pGG2XGFPをNheIおよびBamHIで消化し、残っている5.1kbプラスミド断片をゲル精製し、Klenow DNAポリメラーゼで処理し、連結によって再環状化する(33)。

【０３９８】

オリゴヌクレオチド(Olignucleotide)は従来の方法を用いて作製することができる。例えば、プラスミド/ミニサークルDNAにハイブリダイゼーションするための線状一本鎖オリゴヌクレオチドの合成。ある態様において、オリゴヌクレオチドは、二本鎖プラスミドまたはミニサークルDNA分子の中のヌクレオチド配列に結合する(好ましくは、相補的な)特定の配列を含む、DNA、RNA、LNA、PNAまたはハイブリッド(DNA-LNA、DNA-PNA、RNA-LNA、RNA-PNAなど)の線状鎖である。

【０３９９】

さらに、オリゴヌクレオチド配列は、ハイブリダイゼーションにより三重鎖のフーグスティーン塩基対形成を介してプラスミドまたはミニサークルDNAに結合してもよい。フーグスティーン塩基対形成は、シトシン残基ではなくプソイドイソシトシンを含有するPNAについては、フーグスティーン塩基対形成が5±6超の高pHで可能であるのでロバストネスが高く、これに対して、シトシンを含有するPNAは5±6より低い低pHでしか結合しない(30)。ある特定のアミノ酸を付加すると、DNAに結合した「bis」PNAの安定性が改善される。

【０４００】

または、オリゴヌクレオチド(olignucleotide)は、ワトソン・クリック塩基対鎖の侵入および鎖置換を介してプラスミド/ミニサークルDNAに結合してもよい。例えば、LNA ODNは、スーパーコイルプラスミドDNAの鎖置換剤である。プラスミドDNAのコグネイト結合部位に配列特異的にLNA ODNが結合すると、結合しなかったDNA鎖の鎖置換が起こる。正に荷電した数個のアミノ酸が付加した「bis」PNA ODNもまた優れた鎖置換剤である。

【０４０１】

さらに、このような核酸分子は4重鎖を形成することができる。例えば、オリゴヌクレオチドは、Gカルテットの多数の平面正方形配列に基づいて、4本鎖構造を形成するように集合することができるグアニンリッチヌクレオチドを含んでもよい。

【０４０２】

オリゴヌクレオチドは、以下の塩基:チミジン(T)- ds DNAのAと塩基対を、および/またはATダブレットとトリプレットを形成する;シトシンまたはプロトン化シトシン(C+)-ds DNAのGと塩基対を、および/またはGCダブレットとトリプレットを形成する;アデニン(A)-ds DNAのTと塩基対を、および/またはATダブレットとトリプレットを形成する;グアニン(G)-ds DNAのCと塩基対を、および/またはGCダブレットとトリプレットを形成する;ウラシル(U)-ds DNAのAと塩基対を、および/またはATダブレットとトリプレットを形成する、を含有してもよい。

【０４０３】

さらなる態様において、オリゴヌクレオチドは、修飾されていない天然塩基、またはヌクレアーゼ耐性を高めるために、および/もしくは相補ds DNAに対する親和性を改善するために、化学修飾された塩基:ヌクレアーゼ耐性-バックボーンの修飾(メチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホアミデートなど);2'Oメチル修飾;および/またはプラスミド/ミニサークル内の相補ds DNAへの結合を改善するために、例えば、(中性pHで安定し

た三重鎖を形成するための)シトシンのメチル化からなってもよい。

【０４０４】

ある態様において、オリゴヌクレオチドの長さは3～50塩基でよく、ハイブリダイズ領域は、好ましくは、10塩基、11塩基、12塩基、13塩基、14塩基、15塩基、16塩基、17塩基、18塩基、19塩基、または20塩基より大きい。

【０４０５】

1つの態様において、「ハイブリッド」オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズ領域(DNA、LNA、PNA)、および機能を付加するための任意の長さの延長(DNA、RNA、LNA、PNA)(標的化部分を取り付けるためのリンカーアーム、免疫刺激性配列、例えば、CpGモチーフ、さらなる結合モチーフ、環状化を可能にする配列など)からなってもよい。例えば、LNA(ハイブリダイゼーションモチーフ)をホスホロチオエートCpG ODNまで延長する。LNAを用いて、PTO CpG ODNを、抗原をコードするプラスミドに結合すると、高レベル抗原発現を阻害することなく、免疫アジュバント効果を得ることができる。さらに、リンカーアームは、プラスミド/ミニサークルDNAとのハイブリダイゼーションを妨げず、好ましい距離でプラスミド/ミニサークルと抗体をカップリングする塩基を有する任意の配列でよい(例えば、リンカーは3～20個のプリン塩基を含有してもよい;GAGG)。

【０４０６】

別の態様において、オリゴヌクレオチドは、配列特異的三重鎖形成に基づく二重鎖DNAのためのパドロック(Padlock)オリゴヌクレオチドに従ってもよい。オリゴヌクレオチドは、オリゴプリン-オリゴピリミジン配列にあるDNA主溝に結合する、三重鎖形成を介して二本鎖DNAを取り囲んで環状化することができる。三重鎖形成を介した二本鎖DNA標的を配列特異的に認識した後に、三重鎖形成オリゴヌクレオチドの末端は、T4 DNAリガーゼの働きによって接続して、標的配列を含有するプラスミドに連結された環状DNA分子を作り出すことができる。二本鎖DNA配列の標識は、この配列に化学的修飾または酵素的修飾を加えることなく行われている。これらの「パドロック」オリゴヌクレオチドは、スーパーコイルプラスミドまたは他の二本鎖DNAに非共有結合タグを不可逆的に取り付けるツールを提供する [Padlock oligonucleotides for duplex DNA based on sequence-specific triple helix formation. Escude, C., T Garestier, C Helene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 10603-10607, September 1999, Biochemistryを参照されたい]。

【０４０７】

オリゴヌクレオチドは、任意の公知の技法(核酸合成機、ホスホルアミダイト化学)によって合成することができる。ある態様において、オリゴヌクレオチドは、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、エステル結合、アミド結合、またはアミン結合を介して、(ジスルフィド、マレイミド、アミン、カルボキシル、エステル、エポキシド、またはアルデヒドを有する)標的化部分/抗体に共有結合的に複合化するために、3'修飾および/または5'修飾(アミン基、チオール基、カルボキシル基、リン酸基など)により官能化されてもよい。標準的なプロトコールによる公知の二官能性カップリング試薬を介した標的化部分/抗体への複合化のために、オリゴヌクレオチドの他の任意の官能化も行ってよい。

【０４０８】

オリゴヌクレオチド(プラスミド/ミニサークルdsDNAに組み込まれた相補DNAに対応する)の例示的な配列:

(i)(CT)nに基づく反復配列のプラスミド内領域に相補的であり、反対鎖に相補反復(GA)nを有する。

例えば、オリゴヌクレオチド=

Oligonucleotide = 5' CTCTCTCTCTCTCTC 3'

プラスミド/ミニサークルDNA;

5' CTCTCTCTCTCTCTC 3'

i)

3' GAGAGAGAGAGAGAG 5'

(ii)(CCTT)nに基づく反復配列のプラスミド内領域に相補的であり、相補鎖(GGAA)nを有す

る。
例えば、オリゴヌクレオチド=
5' CCTTCCTTCCTTCC 3'
プラスミド/ミニサークルDNA;
5' CCTTCCTTCCTTCC 3'
2)
3' GGAAGGAAGGAAGG 3'
(iii)(CTT)nに基づく反復配列のプラスミド内領域に相補的であり、相補鎖(GAA)nを有する。
例えば、オリゴヌクレオチド=
5' CTT CTT CTT CTT CTT CTT 3'
プラスミド/ミニサークルDNA;
5' CTT CTT CTT CTT CTT CTT 3'
a)
3' GAA GAA GAA GAA GAA GAA 5'
(iv)(CCT)nに基づく反復配列のプラスミド内領域に相補的であり、相補鎖(GGA)nを有する。
例えば、オリゴヌクレオチド=
5' CCT CCT CCT CCT CCT CCT 3'
プラスミド/ミニサークルDNA;
5' CCT CCT CCT CCT CCT CCT 3'
b)
3' GGA GGA GGA GGA GGA GGA 5'
(v)他の任意のホモプリン-ホモピリミジン配列に相補的である。
例えば、オリゴヌクレオチド=
5' TCT CCT CCT TT 3'
プラスミド/ミニサークルDNA:
5' TCT CCT CCT TT 3'

3' AGA GGA GGA AA 5'
(vi)Gカルテットの多数の平面正方形配列に基づいて、四本鎖構造を形成するように集合することができるグアニンリッチヌクレオチド。
例えば、オリゴヌクレオチド=5'TGGGGT3'
ii.3'TGGGGT5'
プラスミド/ミニサークルDNA:5'TGGGGT3'
1)3'TGGGGT5'
【０４０９】
ある態様では、オリゴヌクレオチド(oligonculeotide)は、ssRNAオリゴヌクレオチド(プラスミド/ミニサークルdsDNAに組み込まれた相補dsDNAに対応する)である。例示的な配列は、以下の通りである。

i. 5’ CUCUCUCUCUCUCUC 3’

ii. 5’ CCUUCCUUCCUUCC 3’

iii. 5’ CUU CUU CUU CUU CUU CUU 3’

iv. 5’ CCU CCU CCU CCU CCU CCU 3’

v. 5’ UCU CCU CCU UU 3’

vi. 5’ UGGGGU 3’

【０４１０】

LNAおよびPNAオリゴヌクレオチドの例示的な配列(GeneGripプラスミドシリーズに存在するODN結合部位;LNA ODNおよびPNA ODNは、GeneGripプラスミドシリーズ(GTS)に見出される反復結合部位1および2のDNA配列に基づいている。(CT)nまたは(GA)n反復モチーフを含有するPNA/LNA ODNは、GeneGrip部位1に結合するように設計されている。(CCTT)nおよび(GGAA)nを含有するODNは、GeneGrip部位2に結合するように設計されている。

説明	配列
13マー100% LNA	5'-NH2-CTCTCTCTCTCTC-3'
13マー100% LNA	5'-NH2-GAGAGAGAGAGAG-3'
17マー50% LNA	5'-NH2-CtCtCtCtCtCtCtCtC-3'
14マー100% LNA	5'-NH2-CCTTCCTTCCTTCC-3'
14マー100% LNA	5'-NH2-GGAAGGAAGGAAGG-3'
9マー`bis' 50% LNA,50% DNA	5'-NH2-CtCtCtCtC-XXX- CtCtCtCtC-3'
21マーDNA, 13マーLNA	5'-tccatgacgttcctgacgtttGAGAGAGAGAGAG-3'
21マーDNA, 13マーLNA	5'-tccatgagcttcctgagtcttGAGAGAGAGAGAG-3'
GTS PNA 8マー `bis' 100%PNA	5'O-O-TCTCTCTC-O-O-O-JTJTJTJT-CONH2
OsPNA13マー `bis' 100%PNA	5'O-O-gCTCTCTCTCTCTC-O-CTCTCTCTCTCTCk
OsPNA13マー `bis' 100% PNA	5'O-O-gCTCTCTCTCTCTC-O-O-O-CTCTCTCTCTCTCk
OsPNA13マー 100% PNA	5'O-O-gCTCTCTCTCTCTCk
35マーDNA REP,13マーLNA(反復遺伝子外パリンドローム-REP配列;緑膿菌)	5' cggcggataaccgcgagcggttattcgccctacgg-CTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'
19マーCpG A DNA,13マーLNA	5' gggggacgatcgtcggggg- CTCTCTCTCTCTC -GGAG-NH_2-3'

LNA残基は太字の大文字である;DNA残基は太字の小文字である;
PTO残基はさらにイタリック体にした;
PNAアミノ酸残基はイタリック体の通常文字であり、PNA塩基は大文字である;
O=8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸リンカー;J=プソイドイソシトシン;g=グリシン;k=リジン;X=「PEGスペーサー」-9-O-ジメトキシトリチル-トリエチレングリコール,1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホルアミダイト,スペーサーホスホルアミダート9;
NH2=5'-アミノモディファイアーC12ホスホルアミダイトスペーサー。

【０４１１】

[Use of locked nucleic acid oligonucleotides to add functionality to plasmid DNA. Kirsten M. L. Hertoghs, Jonathan H. Ellis and Ian R. Catchpole. Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 20 5817-5830を参照されたい]。

【０４１２】

ある態様において、本発明の複合体は、パドロックオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む。dsDNAを取り囲んで環状化するためのパドロックオリゴヌクレオチドの例示的な配列は、2個のT_nリンカーによって、それぞれ10塩基対を形成することができる配列に接続された、中心三重鎖形成配列を含有するオリゴヌクレオチド(A)と、20マーのオリゴヌクレオチド(B)である。オリゴヌクレオチド(A)の全長は、15塩基のトリプレット三重鎖を形成することによって二重鎖標的に、20bpの二重鎖を形成することによって20マーのテンプレート(オリゴヌクレオチドB)に結合することが可能でなければならない。酵素的環状化のために必要に応じて、このオリゴヌクレオチドの5'末端にリン酸基が付加される。

….3’- CTCCCCTCCCCTCCC -5’……

….5’-GAGGGGAGGGGAGGG-3’……

Tn…….. [GAGGGGAGGGGAGGG…….Tn]

GCTCGGATCC -3’ ODN A 5’CGTACGGTCG

ODN B 3 ’CGAGCCTAGG GCATGCCAGC 5’

【０４１３】

従って、本明細書において開示されるオリゴヌクレオチドはいずれも、線状オリゴヌクレオチドと、二本鎖プラスミドまたはミニサークルDNAにある相補ヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションに使用することができる。オリゴヌクレオチドとプラスミドまたはミニサークルDNAとを結合させるための例示的な方法は、以下の仕様を含んでもよい。(i)最大4～40倍モル過剰のODN:プラスミド内のODN-結合部位で、プラスミドとPNA/LNA ODNを、10mMリン酸緩衝液、1mM EDTA、pH5.8中、37℃で16時間インキュベートする;(ii)プラスミドに結合するDNA±LNA ODNの場合、ODNを80℃で10分間、予熱し、次いで、プラスミド結合に影響を及ぼし得る、DNA塩基とODN内のLNA塩基との自己相補相互作用を壊すために氷に投げ込む。DNA ODNと、プラスミドDNA±LNA複合体とのさらなる結合は、4mM DNA ODNでは、10mMリン酸ナトリウムpH7.1、1mM EDTA中、37℃で45分間行う;(iii)三重鎖形成のためのアニーリング法:(a)DNAオリゴヌクレオチドを、0.2M酢酸ナトリウムおよび0.1M塩化ナトリウムを含有する緩衝液中で、相補ds DNAヌクレオチド配列を含有するプラスミド/ミニサークルに添加する;混合物を20℃で30分間インキュベートする。(b)二重鎖DNAおよび三重鎖形成オリゴヌクレオチドの三重鎖を、150mM NaClを含有する50mM酢酸ナトリウムpH5.0中で調製する。(c)三重鎖形成のために、オリゴヌクレオチド(100fmol)を、様々な量の二本鎖標的の存在下で、50mM Tris HCl、pH7.5 10 mM MgCl2 10mM DTT、1mM ATP 25mg/ml BSA 10ml中でインキュベートする。試料を75℃まで加熱し、次いで、45℃までゆっくりと冷却する。プラスミド/ミニサークルおよびオリゴヌクレオチドを含有する三重鎖を、エタノール沈殿および遠心分離によって回収する。

【０４１４】

さらに、結合したODNを視覚化するために、2.5mgのプラスミドDNAを、臭化エチジウム(EtBr)を含まないアガロース±TAEゲル電気泳動によって分析する。高パーセント(2%)ゲルを用いて、プラスミドに結合したODNおよび遊離のODNの分離を最大にする。結合しなかったODNを、MicroSpin Sephacryl S400 HRカラムを用いたゲル排除クロマトグラフィーによって、プラスミドおよびプラスミドに結合したODNから分離する。

【０４１５】

さらに、制限酵素分析も行うことができる。LNAまたはPNA ODNを37℃で一晩結合させた後、2.5mgのプラスミドDNAの制限酵素消化を行う。プラスミドgWizをBsaIおよびSphIで消

化し、プラスミドpGG2XGFPをNdeIで消化する。次いで、試料を、EtBrを含まない2%アガロース±TAEゲル上で分析する。

【０４１６】

プラスミドDNAへのLNAまたはPNA結合による鎖置換の確認:DNA配列決定反応:標準的なdsDNA配列決定は、蛍光ジデオキシターミネーター方法を用いる「ビックダイ(big dye)」PCRに基づくサーモサイクルシークエンシングによって実施し、PE-Biosystems Prism 3700キャピラリーシークエンサーによって行い、ABI 3700 DNAアナライザーによって視覚化する。プラスミドDNAへのLNAまたはPNA ODN結合による鎖置換を特定するために、PNAまたはLNA ODN鎖置換を証明する確立された方法に基づいて、ssDNA配列決定アッセイを実施する。

【０４１７】

最適なDNA配列決定用プライマー(RevGG2B,22マー100%DNA--5'(Cy5) ggaaggaagttaggaaggaagg-3')を設計し、標準的な「ビックダイ」シークエンシングによる、pGG2XGFP内のGeneGrip部位2反復領域にわたる良質の配列決定によって確認する。プラスミドpGG2XGFP(0.024mM)の25mgアリコートをODN LNA(低濃度:0.5mM)と結合させ、結合しなかったLNA ODNを除去する。次いで、結合したLNAを含むプラスミドpGG2XGFPおよび結合したLNAを含まないプラスミドpGG2XGFPを、AutoRead配列決定キット(Amersham Pharmacia Biotech)と、Cy5-標識RevGG2B DNAプライマーおよびT7 DNAポリメラーゼを用いる改良されたssDNA配列決定プロトコールに供する。テンプレートプラスミドDNAの用量は1～3mgであり、アニーリング温度を37℃または42℃まで下げるが、アニーリング時間は、プラスミドの二本鎖特性を破壊しない条件下で、DNA配列決定プライマーと置換されたssDNA領域との配列特異的結合が最大となるように30分まで延ばす。次いで、配列決定反応をVisible Genetics DNAシークエンサーにより行い、Chromasソフトウェアを用いて修正する。領域の公知のDNA配列を用いて、LNAが結合したプラスミドについて得られたDNA配列を眼で解釈する。[Use of locked nucleic acid oligonucleotides to add functionality to plasmid DNA. Kirsten M. L. Hertoghs, Jonathan H. Ellis and Ian R. Catchpole. Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 20 5817-5830を参照されたい]。

【０４１８】

ある態様において、オリゴヌクレオチドはプラスミド/ミニサークルに環状化される。プラスミド結合オリゴヌクレオチドを環状化するためには、連結反応を、緩衝液(50mM Tris-HCl、pH7.5、10mM MgCl2、10mM DTT、1mM ATP、25mg/ml BSA)中で、テンプレートオリゴヌクレオチド(1pmol)および40単位のT4 DNAリガーゼを添加し、45℃で1時間インキュベートすることによって行う。リガーゼを65℃で15分間熱失活させる。[Padlock oligonucleotides for duplex DNA based on sequence-specific triple helix formation. Escude, C., T Garestier, C Helene. Proc. Natl . Acad. Sci . USA Vol. 96, pp. 10603-10607, September 1999, Biochemistryを参照されたい]。

【０４１９】

核酸およびポリペプチド/ペプチドをカップリングするための前述の手段は単なる例示であり、限定するものではない。

【０４２０】

本発明の方法は、一般的に、INASを、ペプチドおよび抗体を含む様々なアミノ酸ポリマーに連結するのに使用することができる。生物活性薬剤と標的化部分(例えば、ペプチド、抗体、アプタマー)とは、共有結合または非共有結合による複合化、化学的な複合化、物理的な複合化、リンカー(例えば、プロタミン、ビオチン-アビジン結合など)を介した複合化を含む任意の従来の方法によって複合化することができる。さらに、ある態様において、本発明の組成物は核酸分子を含み、ここで、組成物は、ポリカチオン(例えば、プロタミン)、または細胞への送達のために核酸分子を凝縮もしくは包装するのに従来より用いられる他の薬剤と会合している。

【０４２１】

例示的な複合化方法を図4に開示および図示した。

【０４２２】

本発明の組成物の2種類以上の成分をカップリングまたは会合するさらなる方法は従来の方法であり、三重鎖または四重鎖の核酸鎖形成の使用を含む。このような方法には、活性化剤の添加による、ペプチドまたは抗体上のカルボン酸部分の活性化が含まれるが、これらに限定されない。活性化剤には、HATU(O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N',-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸)；HBTU(O-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N',-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸)；TBTU(2-(1H-ベンゾトリアゾ-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸)；TFFH(N,N',N'',N''-テトラメチルウロニウム2-フルオロ-ヘキサフルオロリン酸)；BOP(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン酸)；PyBOP(ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロリン酸)；EEDQ(2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロ-キノリン)；DCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド)；DIPCDI(ジイソプロピルカルボジイミド)；HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)；N-ヒドロキシスクシンイミド；MSNT(1-(メシチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール)；アリールスルホニルハロゲン化物、例えば、塩化トリイソプロピルベンゼンスルホニルが含まれる。好ましい活性化剤はカルボジイミドである。1つの局面において、活性化剤は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(ECD)および/または1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド(CDC)である。

【０４２３】

前記の活性化カルボン酸部分は、活性化カルボン酸部分と求核部分との反応を促進するのに十分な、当業者に公知の条件下において、INAS上の求核部分と反応する。適切な条件下では、比較的低いpH、すなわち約6.5未満のpHが維持される。伝統的な方法では(すなわち、より高いpHレベルでは)、活性化カルボン酸および/または活性化剤は急速に加水分解し、複合化反応の効率が減少すると考えられる。

【０４２４】

本発明の生物活性薬剤は、従来法により本発明の標的化部分にカップリングすることができる。例えば、本発明の免疫刺激核酸分子(INAS)については、INASを、複合化(連結)を含むが、これらに限定されない多くのやり方で、ペプチドまたはポリペプチドにカップリングすることができる。ポリヌクレオチド部分を、共有結合相互作用および/または非共有結合相互作用を含む、複合体のペプチド部分またはポリペプチド部分にカップリングすることができる。一般的に、腫瘍または標的細胞による複合体の取り込みを増強または容易にするように、INASとペプチドまたはポリペプチドは連結される。

【０４２５】

ペプチドまたはポリペプチドとINASの連結は、INASの3'末端もしくは5'末端で、またはINASの内部位置にある適切に修飾された塩基で行うことができる。ペプチドまたはポリペプチドが適切な反応基(例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)を含有するのであれば、シトシン残基のN^4アミノ基と直接反応することができる。INASにあるシトシン残基の数および位置に応じて、1つまたは複数の残基において特異的なカップリングを行うことができる。

【０４２６】

本発明の方法を用いて、種々の複合体を調製することができる。1つの局面において、本発明の複合体には、DNA-抗体複合体、DNA-ペプチド複合体、RNA-抗体複合体、およびRNA-ペプチド複合体が含まれるが、これらに限定されない。

【０４２７】

複合化反応後に、当業者に周知の種々の方法によって複合体を単離することができる。例えば、反応混合物をカラムクロマトグラフィー系に供し、サイズ排除により分離することができる。さらに、腫瘍標的または免疫細胞への複合体(例えば、標的化部分-INAS複合体)の侵入は、受容体を介したエンドサイトーシスまたはエレクトロポレーションを含む

任意の方法によって容易にすることができる。

【０４２８】

B.スクリーニング

本発明の別の局面は、生物活性薬剤が免疫刺激性であるかどうか確かめるために、このような試験薬剤をスクリーニングする方法に関する。一般的に、このようなスクリーニング方法は、どの薬剤が免疫刺激性であるか、このような薬剤はどの程度、免疫刺激性であるかどうか確かめるための手段を提供する。このような薬剤は、本明細書に記載の本発明の標的化部分(例えば、抗体、アプタマー、ペプチド)にカップリングされた任意の核酸分子、ペプチドまたはポリペプチドでよい。本発明の様々な態様において、標的化部分および生物活性薬剤は任意の従来法によって直接複合化されてもよく、ペプチドリンカーまたは核酸リンカーであり得るリンカーを介してカップリングされる。

【０４２９】

例えば、DNAダメージまたは細胞ストレスを確かめるために、試験薬剤の投与前/投与後に、マーカーをスクリーニングすることができる。例えば、DNA二本鎖切断が起こる場合があり、これをアッセイすることができる。細胞は、DNA修復機構の活性化、ならびにDNAダメージが取り除かれるまでの細胞周期進行の停止または遅延という主な機能を有するチェックポイント事象の誘発を含む、広範囲の応答を開始することによってDSBに反応する(Shiloh, Y. Nature Reviews Cancer 3, 155-68 (2003), Nyberg, K. A. et al Annu Rev Genet 36, 617-56 (2002), Khanna & Jackson Nat. Genet 27 247-254(2001))。

【０４３０】

例えば、細胞は、ATMまたはATRキナーゼの活性上昇についてアッセイされてもよい。IRによりヒト細胞を処理すると、DNAダメージトランスデューサーであるプロテインキナーゼATMおよびATRが迅速に活性化される。次いで、これらのキナーゼは、エフェクタープロテインキナーゼCHK1およびCHK2、ならびにチェックポイントメディエータータンパク質53BP1およびMDC1を含む、一連の下流標的をリン酸化および活性化する。さらに、ATMおよびATRはヒストン変異体H2AXのSer-139をリン酸化する。この反応は、IR曝露の1分以内に検出することができ、最終的に、DNAダメージ部位に隣接する大きなクロマチンドメインに及ぶ。この進化上保存されている応答は、たった1箇所のDNA DSBによって誘発することができ(Chen, H. T. et al. Science 290, 1962-1964(2000))、このタイプのダメージがインビボで発生した特異的かつ明白なマーカーとして広く認識されている。次いで、ヒストンH2AXのリン酸化によって、53BP1、MDC1、MRE11/RAD50/NBS1複合体、およびリン酸化型structural maintenance of chromosome 1(SMC1)タンパク質を含む、一連のチェックポイント因子およびDNA修復因子のDNAダメージ部位への動員が促進される。DNA DSB部位における、これらのフォーカスの形成は、チェックポイント応答の特徴である(Goldberg, M. et al. Nature 421, 952-6(2003))。前述は、本発明の化合物および方法を用いて、1つまたは複数の生物活性薬剤をアッセイする方法においてスクリーニングすることができる様々なマーカーの一例である。

【０４３１】

例えば、試験薬剤(例えば、アポトーシス誘導剤)を細胞に及ぼす影響についてスクリーニングする方法では、チェックポイント応答ポリペプチドをアッセイすることができる(例えば、発現/タンパク質活性についての免疫化学またはPCR)。このようなポリペプチドは、DNAダメージ、特に二本鎖切断に応答した細胞周期チェックポイント、すなわち、DNAダメージチェックポイント応答経路の成分であるポリペプチドの活性化を媒介する活性がある。適切なポリペプチドには、ATM、ATR、ATRIP、CHK1、CHK2、BRCA1、NBS1、RAD50、MRE11、CDC25C、14-3-3σ、CDK2/サイクリンE、CDK2/サイクリンB1、53BP1、MDC1、ヒストン変異体H2AX、SMC1、RAD17、RAD1、RAD9、HUS1、およびMRC1が含まれる。本明細書に記載のDNAダメージチェックポイント応答には、ATMおよびATRに依存性のシグナル伝達経路が含まれる。

【０４３２】

DNAダメージチェックポイント経路ポリペプチドのリン酸化は、その活性化状態を示し

ていることがある。従って、DNAダメージチェックポイント経路ポリペプチドのリン酸化を確かめることによって、活性を確かめることもできる。リン酸化によって活性化されるDNAダメージチェックポイント経路ポリペプチドには、ATRIP、CHK1、CHK2、BRCA1、NBS1、RAD50、MRE11、CDC25C、14-3-3σ、CDK2/サイクリンE、CDK2/サイクリンB1、53BP1、MDC1、ヒストン変異体H2AX、SMC1、RAD17、RAD1、RAD9、HUS1およびMRC1が含まれる。

【０４３３】

ヒトおよび酵母におけるDNAダメージチェックポイント経路の様々な成分の核酸配列およびタンパク質配列は、GenBankデータベースから、以下のアクセッション番号:ヒトATM(核酸コード配列(CDS):W82828、タンパク質配列:AAB65827、ヒトCHK1(CDS:AF016582、タンパク質:AAC51736)、ヒトCHK2(CDS:NM.sub.--007194、タンパク質:096017)、NBS1(CDS:AF3169124、タンパク質:BAA28616)、ヒトRAD50(CDS:5032016、タンパク質:NP.sub.--005723)、MRE11(CDS:U37359、タンパク質:AAC78721)、BRCA1(CDS:U14680、タンパク質:A58881)、ATR、(CDS:NM.sub.--001184、タンパク質:NP.sub.--001175)ATRIP(CDS:AF451323、タンパク質:AAL38042.1)、CDC25C(CDS:NM.sub.--001790、タンパク質:NP001781.1)、53BP1(CDS:NM.sub.--005657、タンパク質:NP.sub.--005648)、MDC1(CDS:NM.sub.--014641タンパク質:NP.sub.--055456)、ヒストン変異体H2AX(CDS:NM.sub.--002105、タンパク質:NP.sub.--002096)、SMC1(CDS:NM.sub.--006306、タンパク質:NP.sub.--006297)、RAD17(CDS:NM.sub.--133338、タンパク質:NP.sub.--579916)、RAD1(CDS:NM.sub.--002853、タンパク質:NP.sub.--002844)、RAD9(CDS:NM.sub.--004584、タンパク質:NP.sub.--004575)、HUS1(CDS:NM.sub.--148959、タンパク質:NP.sub.--683762)およびMRC1(CDS:NM.sub.--002438、タンパク質:NP.sub.--002429)により入手することができる。

【０４３４】

さらに、本発明のスクリーニング方法は、免疫刺激化合物の活性をアッセイする工程を含んでもよい。例えば、免疫刺激活性は、樹状細胞によるインターフェロン、IL-12、NKG2Dリガンド、IL-15、およびIL-2の刺激から生じてもよい。これは、IFN-γを産生するようにNK細胞を刺激し、$CD4^+$Th1細胞の発達を誘導する。次いで、誘導されたTh1細胞はIFN-γおよびIL-2を産生する。次いで、IL-2は、Th1細胞のさらなる増殖、および抗原(例えば、腫瘍および病原体)に特異的な$CD8^+$T細胞の分化を増強する。IL-2およびIFNはまた、自然免疫系のNK細胞の細胞溶解活性も刺激する。

【０４３５】

本明細書に記載のアッセイ方法の他の態様において、細胞または動物における免疫刺激応答は、1つまたは複数の試験化合物と接触された免疫細胞の応答をアッセイすることによって確かめられる。従って、炎症促進因子または免疫刺激因子をアッセイすることができる。例えば、IL-12は1型免疫(Th1応答)の主要なメディエーターであることが知られている。IL-12は、自然免疫応答の一部としてIFN-γを産生するようにナチュラルキラー(NK)細胞を誘導し、IFNγを産生する$CD4^+$Th1細胞および細胞傷害性$CD8^+$細胞の増殖を促進する。従って、IL-12は、腫瘍へのT細胞の侵入、およびT細胞の侵入に対する腫瘍細胞の感受性を高める。

【０４３６】

従って、本発明の方法を用いて試験化合物がアッセイされ、例えば、サイトカイン分泌の刺激物質であると確かめられれば、免疫刺激性であると確かめられる。特に好ましいのは、インビトロで、1つまたは複数のサイトカイン(例えば、Th1サイトカイン、例えば、IFN、IL-12および/またはIL-2と、任意で、1つまたは複数の他のサイトカイン)の放出を誘導、増強、活性化、または刺激する化合物である。試験化合物のこのような免疫調節活性は、ある特定の医療用途において特に重要である。例えば、IFNおよびIL-12の産生を増大させると、癌細胞による免疫回避において観察される自然免疫および細胞免疫の抑制を克服することができる。

【０４３７】

さらに、示されたサイトカイン刺激は、全てまたは一部、補助刺激因子の存在に依存してもよい。このような補助刺激因子には、例えば、Toll様受容体(TLR)リガンドを含む、

自然免疫系を刺激する因子が含まれ得る。

【０４３８】

本発明の様々な態様において、免疫刺激活性について試験薬剤をスクリーニングする方法は、生物活性薬剤を確かめるために、細胞と本発明の複合体(多価複合体を含む)を接触させる工程を含む。このような任意の態様において、生物活性薬剤が細胞に投与され、結果として生じた読み取り値から、試験薬剤(例えば、核酸分子、ペプチド、ポリペプチド)が細胞ストレス(例えば、DNAダメージ)、アポトーシス、物理ストレス、細胞超融合、または細胞ストレス関連マーカーの発現増加をもたらしたかどうかについての情報が得られる。

【０４３９】

別の態様において、読み取り値は、試験複合体に存在するマーカー(例えば、蛍光マーカーまたは放射性同位体マーカー)によって得られる。ここで、読み取り値から、試験複合体が標的細胞(例えば、免疫細胞、例えば、樹状細胞、マクロファージ)に取り込まれたかどうか、試験薬剤が免疫細胞活性(例えば、NK活性、補助刺激受容体発現;免疫細胞の結合、例えば、CD40、B7ファミリー、CD86/CD83を介した免疫細胞の結合、MHC発現、サイトカイン放出、炎症促進性応答など)を誘導したかどうかについての情報が得られる。このような免疫活性マーカーは公知であり、従来の技法、例えば、ELISA、免疫化学を用いて測定することができる(例えば、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan, John E. et. al., eds. 1999を参照されたい)。米国特許出願公開第20070155814号、同第20070135372号、または同第20070134261号も参照されたい。

【０４４０】

例えば、細胞(例えば、樹状細胞、腫瘍細胞)を培養状態で、このような細胞上に存在する成分に特異的に結合する標的化部分を含む化合物と接触させることができる。この化合物はまた、1つまたは複数の試験薬剤(例えば、核酸またはペプチド)および1つまたは複数の検出可能な標識(例えば、蛍光標識または放射標識)も含む。タグ化マーカーが細胞内に観察されるかどうか(例えば、取り込まれたかかどうか)確かめるために、従って、試験薬剤が細胞膜を横断(例えば、エンドサイトーシス)できるかどうか確かめるために、細胞を顕微鏡下で調べることができる。

【０４４１】

他の態様において、免疫刺激効果を確かめるために、1つまたは複数の試験薬剤が非ヒト動物に投与される。例えば、従来の技法を用いてマウス側腹部に移植された腫瘍を、試験複合体によって(例えば、腫瘍細胞抗原特異的抗体を用いて)標的化することができ、腫瘍を採取した後に、試験複合体を尾静脈を介して全身投与するか、または腫瘍に直接注射することができる。その後に、試験薬剤が免疫応答を誘導したかどうか確かめるために、免疫活性化マーカーを評価することができる。発現されるマーカーに応じて、本発明のスクリーニング方法は、試験薬剤が、PAMP、DAMP(例えば、LL37)、アラーミン誘導薬剤、Toll様受容体(TLR)非依存性;TLR依存性アクチベーター(例えば、TLR3、7、8もしくは9);デスシグナル伝達を活性化する、もしくは生存遺伝子発現を阻害する薬剤;または細胞ストレス/ダメージを引き起こすことによって免疫応答を間接的に誘導する薬剤であるかどうか確かめるのに使用することができる。

【０４４２】

試験薬剤は、プラスミド、ODN、RNA、DNA、ssRNA、ssDNA、dsDNA、RNA-DNAハイブリッド、PNA、ペプチドまたはポリペプチド(polyeptide)を含む、任意の核酸分子でよい。様々な態様において、1つまたは複数の試験薬剤を含む多価化合物を投与することができ、このような化合物はまた、(例えば、インビトロまたはインビボで)特定の標的細胞に結合する本発明の標的化部分も含む。例えば、本発明の多価複合体の場合、相乗効果が観察されるかどうか確かめるために、異なる試験薬剤の2つ以上の組み合わせをスクリーニングすることができる。さらに、本発明のスクリーニング方法または治療方法では、それぞれが同じ(または異なる)細胞成分に対する標的化部分を含む2種類またはそれ以上の化合物を使用することができる。なおさらなる態様において、それぞれが同じまたは異なる標的

化部分を含む2種類またはそれ以上の化合物は、同じまたは異なる試験薬剤を含む。例えば、第1の化合物は標的化部分aを含むのに対して、第2の化合物は標的化部分bを含み、第1の化合物は試験薬剤xを含むのに対して、第2の化合物は試験薬剤yを含む。言い換えると、標的化部分および試験薬剤が多様に組み合わされた複数の種類の試験薬剤を、本発明のスクリーニング方法または治療方法において使用することができる。

【０４４３】

もちろん、さらなる態様において、試験複合体は、腫瘍細胞の成長または増殖を低減または無くす免疫刺激応答の誘導における、このような複合体と1つまたは複数のこのような化合物との相乗効果を確かめるために、1つまたは複数の薬学的化合物と共にスクリーニングすることができる。前記のように、マーカーを用いて試験複合体を「タグ化」した場合、細胞への侵入を確認および/または測定することができる。

【０４４４】

様々な態様において、免疫刺激に関連するマーカーの測定は、従来の増幅(例えば、PCR、RT-PCR)によって行うことができる。RT-PCRについては、例えば、Qiagen One-step RT-PCRキットおよびApplied Biosytems TaqMan One-step RT-PCR Master Mix試薬キットを含むOne-step RT-PCR試薬などの様々な市販の試薬を使用することができる。このような試薬を用いると、対照細胞/動物における免疫応答に関連するマーカー遺伝子の発現レベルの調節に対する、本明細書に記載の1つまたは複数の試験化合物と接触された細胞/動物における免疫応答に関連するマーカー遺伝子の発現レベルの調節を確かめることができる。

【０４４５】

さらに、ある態様において、試験薬剤は、プラスミドレプリコン(例えば、核酸配列によりコードされるペプチド/タンパク質を発現することができる)でもよい。従って、このようなプラスミドは、検出可能なおよび/または定量可能な「タグ化」タンパク質を発現することができる。

【０４４６】

本発明の化合物にカップリングすることができ、本発明の細胞培養法またはインビボ法において使用することができる検出可能な標識(マーカーとも呼ばれる)には、発色団、電気化学的部分、酵素、放射性部分、リン光基、蛍光部分、化学発光部分、または量子ドット、さらに具体的には、放射標識、発蛍光団-標識、量子ドット-標識、発色団-標識、酵素-標識、親和性リガンド-標識、電磁気スピン標識、重原子標識、ナノ粒子光散乱標識もしくは他のナノ粒子で標識されたプローブ、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、TRITC、ローダミン、テトラメチルローダミン、R-フィコエリトリン、Cy-3、Cy-5、Cy-7、テキサスレッド、Phar-Red、アロフィコシアニン(APC)、エピトープタグ、例えば、FLAGもしくはHAエピトープ、および酵素タグ、例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、I^2-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、もしくはアセチルコリンエステラーゼ、およびハプテン複合体、例えば、ジゴキシゲニンもしくはジニトロフェニル、または複合体を形成することができる結合ペアのメンバー、例えば、ストレプトアビジン/ビオチン、アビジン/ビオチン、もしくは、例えば、ウサギIgGおよび抗ウサギIgGを含む抗原/抗体複合体;発蛍光団、例えば、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、緑色蛍光タンパク質、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、カスケードブルー、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、フィコエリトリン、蛍光ランタニド複合体、例えば、ユーロピウムおよびテルビウムを含むもの、Cy3、Cy5、分子ビーコンおよびその蛍光誘導体、発光材料、例えば、ルミノール;光散乱またはプラズモン共鳴材料、例えば、金粒子もしくは銀粒子または量子ドット;あるいは^{14}C、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I、Tc99m、^{35}S、または^{3}Hを含む放射性材料、インターカレーティング色素、例えば、フェナントリジンおよびアクリジン(例えば、臭化エチジウム、ヨウ化プロピジウム、ヨウ化ヘキシジウム、ジヒドロエチジウム、エチジウムホモ二量体-1および-2、エチジウムモノアジド、およびACMA);一部の副溝(minor grove)結合剤、例えば、インドールお

よびイミダゾール(例えば、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst 34580およびDAPI);および種々の核酸染色液、例えば、アクリジンオレンジ(インターカレーションも可能)、7-AAD、アクチノマイシンD、LDS751、およびヒドロキシスチルバミジン;シアニン色素、例えば、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、POPO-1、POPO-3、YOYO-1、YOYO-3、TOTO-1、TOTO-3、JOJO-1、LOLO-1、BOBO-1、BOBO-3、PO-PRO-1、PO-PRO-3、BO-PRO-1、BO-PRO-3、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TO-PRO-5、JO-PRO-1、LO-PRO-1、YO-PRO-1、YO-PRO-3、PicoGreen、OliGreen、RiboGreen、SYBR Gold、SYBR Green I、SYBR Green II、SYBRDX、SYTO-40、-41、-42、-43、-44、-45(ブルー)、SYTO-13、-16、-24、-21、-23、-12、-11、-20、-22、-15、-14、-25(グリーン)、SYTO-81、-80、-82、-83、-84、-85(オレンジ)、SYTO-64、-17、-59、-61、-62、-60、-63(レッド)が含まれるが、これらに限定されない。例えば、 Principles of Fluorescence Spectroscopy, Joseph R. Lakowicz (Editor), Plenum Pub Corp, 2nd edition (July 1999)、およびRichard P. HoaglandによるMolecular Probes Handbookの第6版を参照されたい。米国特許第6,207,392号も参照されたい。

【０４４７】

1つの態様において、細胞死、細胞成熟、および/またはNKG2Dリガンド依存性シグナル伝達を誘導する本発明の複合体を同定する方法が開示される。この方法は、1つまたは複数の細胞と、腫瘍細胞の細胞成分、腫瘍血管系、および/もしくは腫瘍微小環境の成分に特異的に結合する抗体、またはRGDモチーフもしくはCDGRCモチーフを含有するインテグリン由来ペプチドを含有する試験複合体をインビトロで接触させる工程であって、抗体またはペプチドは、1つまたは複数の免疫刺激核酸配列を含む核酸に複合化され、1つまたは複数の核酸配列は、病原体関連分子パターン(PAMP)を含む、工程、ならびに免疫細胞の存在下または非存在下で、1つまたは複数の細胞におけるマーカーまたは表現型の変化の誘導を確認する工程であって、1つまたは複数の細胞において試験核酸複合体の存在下で誘導または変化が確認されたことは、細胞死シグナル伝達、細胞成熟、および/またはNKG2Dリガンド依存性シグナル伝達を示している、工程を含む。例えば、接触によって、(a)免疫細胞の非存在下で、腫瘍細胞である細胞が融合する、(b)PBMC細胞および腫瘍細胞の混合物中で腫瘍細胞が溶解する、ならびに(c)細胞がPBMCまたは樹状細胞(DC)である場合、CD86、IFN-γ、および/またはApo2L/TRAILが含まれるが、これらに限定されない1つまたは複数のマーカーの発現が誘導されるのであれば、試験複合体は、細胞死シグナル伝達、細胞成熟、および/またはNKG2Dリガンド依存性シグナル伝達の誘導と関連する。

【０４４８】

発現マーカーの誘導は細胞選別によって行われてもよい。さらに、細胞は、ヒト細胞を含むが、これらに限定されない非胎児動物の骨髄から得られる。胎児細胞も使用することができる。

【０４４９】

細胞選別は、蛍光活性化細胞選別(FACS)および磁気ビーズ細胞選別(MACS)による選別を含む、当技術分野において公知の任意の方法によるものでよい。MACSにより細胞を選別するためには、細胞を磁気ビーズで標識し、細胞を常磁性分離カラムに通す。分離カラムを強力な永久磁石の中に入れ、それにより、磁場がカラムの中に生じる。磁気標識された細胞はカラムの中にトラップされる。磁気標識されなかった細胞はカラムを通過する。次いで、トラップされた細胞をカラムから溶出させる。

【０４５０】

1つの態様において、腫瘍細胞の細胞成分、腫瘍血管系、および/もしくは腫瘍微小環境の成分に特異的に結合する抗体を含む、抗体-核酸複合体が開示される。腫瘍微小環境は、腫瘍を取り囲む、上皮細胞、基底膜、線維芽細胞、ストローマ細胞、および/または筋線維芽細胞を含有してもよい。さらに関連する局面において、腫瘍を取り囲んでいる、このような細胞は機能的CLIC4を発現してもよい。さらに、複合体は、複合体が腫瘍細胞の細胞成分に結合した後に、腫瘍細胞間の細胞超融合をインビトロで誘発する結合親和性を含めて、少なくとも1nM～20nMの結合親和性を有する。

【０４５１】

C.治療

概して、本発明の組成物および方法は、癌または感染症の予防または治療に関する。本発明の様々な局面において、新生物を予防、低減、または排除するために、1つまたは複数の生物活性薬剤にカップリングされた1つまたは複数の標的化部分を含む本発明の組成物が細胞に投与される。本発明の他の局面において、感染因子によって引き起こされる疾患または状態を予防、低減、または排除するために、1つまたは複数の生物活性薬剤にカップリングされた1つまたは複数の標的化部分を含む本発明の組成物が細胞に投与される。ある態様において、本明細書に記載の腫瘍性障害または感染症に罹患している対象を治療するために、本発明の組成物が単独で、または他の治療剤と組み合わせて投与される。

【０４５２】

例えば、様々な態様において、癌を予防または治療するために、このような細胞成分を特異的標的とする、抗体またはその機能フラグメント、ポリペプチド(例えば、抗体)、アプタマーまたはリガンドが投与される。このような組成物は、標的化部分、ならびに本発明の1つまたは複数の生物学的に活性な成分を含む。

【０４５３】

本発明のさらに別の局面によれば、疾患または状態の、診断用、検出用、および/もしくは画像化用の製品ならびに/または予防用および/もしくは治療用の医用薬剤を製造するための、(前記で定義した)1つまたは複数の生物活性薬剤にカップリングされた1つまたは複数の標的化部分を含む化合物(複合体)の使用が提供される。このような疾患または状態には、免疫疾患、炎症性疾患、感染症、および腫瘍性障害/癌が含まれるが、これらに限定されない。腫瘍性障害/癌には、頭頸部癌、気道消化癌、胃腸癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝胆道癌/肝癌、結腸直腸癌、肛門癌、小腸癌、尿生殖器癌、泌尿器癌、腎臓癌、膀胱癌、尿管癌、精巣癌、尿道/陰茎癌、婦人科癌、卵巣癌/ファローピウス管癌、腹膜癌、子宮癌/子宮内膜癌、子宮頚/膣/外陰の癌、妊娠性絨毛疾患、前立腺癌、骨癌、肉腫(軟部組織/骨)、肺癌(例えば、非小細胞肺、小細胞肺)、中皮腫、縦隔癌、乳癌、中枢神経系癌、脳癌、黒色腫、血液悪性腫瘍、白血病、リンパ腫(ホジキン疾患および非ホジキンリンパ腫)、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、グリア芽細胞腫、形質細胞新生物、骨髄腫、骨髄異形成症候群、内分泌腫瘍、皮膚癌、黒色腫、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、膵臓内分泌癌、カルチノイド、多発性内分泌腫瘍、AIDS関連悪性腫瘍、原発部位が分からない癌、および様々な小児期癌が含まれるが、これらに限定されない。癌は、腫瘍細胞からなる腫瘍を含んでもよい。例えば、腫瘍細胞は、黒色腫細胞、膀胱癌細胞、乳癌細胞、肺癌細胞、結腸癌細胞、前立腺癌細胞、肝臓癌細胞、膵臓癌細胞、胃癌細胞、精巣癌細胞、脳癌細胞、卵巣癌細胞、リンパ癌細胞、皮膚癌細胞、脳癌細胞、骨癌細胞、または軟部組織癌細胞を含んでもよいが、これらに限定されない。

【０４５４】

疾患の原因となる病原体および感染因子の例は公知であり、本明細書において開示される。

【０４５５】

1つの局面において、本発明の複合体は単独で、または他の抗癌剤、例えば、化学療法剤、電離放射線、ホルモン療法、サイトカイン、免疫療法、細胞療法、ワクチン、モノクローナル抗体、抗血管新生剤、標的化治療剤(低分子薬物)、または生物療法と組み合わせて用いられる。例えば、化学療法剤には、抗腫瘍アルキル化剤、例えば、マスタード(メクロレタミンHCl、メルファラン、クロランブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、ブスルファン)、ニトロソ尿素(BCNU/カルムスチン、CCNU/ロムスチン、MeCCNU/セムスチン、ホテムスチン、ストレプトゾトシン)、テトラジン(ダカルバジン、ミトゾロミド、テモゾロミド)、アジリジン(チオテパ、マイトマイシンC、AZQ/ジアジクオン)、プロカルバジンHCl、ヘキサメチルメラミン、アドゼレシン;シスプラチンおよびその類似体、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン;代謝拮抗物質、メトトレキセート、他の葉酸代謝拮抗薬、5-フルオロピリミジン(5-フルオロウラシル/5-FU)、シタラビン、アザシチジン、ゲムシタビン、6-チオプリン(6-メルカプトプリン、チオグアニン)、ヒドロ

キシウレア;トポイソメラーゼ相互作用薬剤エピポドフィロトキシン(エトポシド、テニポシド)、カンプトテシン類似体(トポテカンHCl、イリノテカン、9-アミノカンプトテシン)、アントラサイクリンおよび関連化合物(ドキソルビシンHCl、リポソームドキソルビシン、ダウノルビシンHCl、ダウノルビシンHClクエン酸塩リポソーム、エピルビシン、イダルビシン)、ミトキサントロン、ロソキサントロン、アクチノマイシン-D、アムサクリン、ピラゾロアクリジン;抗微小管剤ビンカアルカロイド(ビンデシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン)、タキサン(パクリタキセル、ドセタキセル)、エストラムスチン;フルダラビン、2-クロロデオキシアデノシン、2'-デオキシコホルマイシン、ホモハリングトニン、スラミン、ブレオマイシン、L-アスパラギナーゼ、フロクスウリジン、カペシタビン、クラドリビン、ロイコボリン、ペントスタチン、レチノイド(オールトランスレチノイン酸、13-cis-レチノイン酸、9-cis-レチノイン酸、イソトレチノイン、トレチノイン)、パミドロネート、サリドマイド、シクロスポリン;ホルモン療法抗エストロゲン(タモキシフェン、トレミフェン、 酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール)、アロマターゼ阻害剤(アミノグルテチミド、レトロゾール/フェマラ、アナストロゾール/アリミデックス、エキセメスタン/アロマシン(aromasin)、ボロゾール)、性腺刺激ホルモン放出ホルモン類似体、抗アンドロゲン(フルタミド、カソデックス)、フルオキシメテロン(fluoxymeterone)、ジエチルスチルベストロール、オクトレオチド、酢酸ロイプロリド、ゾラデックス;ステロイド性および非ステロイド性抗炎症剤(デキサメタゾン、プレドニゾン);抗HER2/neu抗体(ハーセプチン/トラスツズマブ)、抗EGFR抗体(セツキシマブ/エルビタックス、ABX-EGF/パニツムマブ、ニモツズマブ)、抗CD20抗体(リツキサン/リツキシマブ、イブリツモマブ/Zevalin、トシツモマブ/Bexxar)、抗CD33抗体(ゲムツズマブ/MyloTarg)、アレムツズマブ/Campath、ベバシズマブ/Avastinを含むが、これらに限定されない、モノクローナル抗体;ならびに低分子阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。

【０４５６】

1つの局面において、本発明の複合体は、化学療法、放射線、デスリガンド、抗体、寒冷療法、ラジオ波焼灼療法、毒素、エレクトロポレーション、ウイルス遺伝子療法、非ウイルス遺伝子療法、プラスミド、ワクチン、ナノ粒子、アプタマー、ペプチド/ペプチドミメティック、ホルモン療法、サイトカイン、細菌製剤療法、他の癌治療法を含むが、これらに限定されない、腫瘍細胞死を誘導するおよび/または腫瘍成長を阻害するように設計された補助的療法と併用される。

【０４５７】

1つの局面において、本発明の複合体は、腫瘍抗原/細胞に対する寛容を壊す、および/または腫瘍細胞に対する免疫応答を増幅する、および/または免疫を介した腫瘍細胞死を高めるように設計された補助的療法、例えば、同種異系T細胞もしくは自己由来T細胞;同種異系樹状細胞もしくは自己由来樹状細胞(DC);同種異系NK細胞もしくは自己由来NK細胞の1つもしくは複数を用いた(a)同種異系細胞療法もしくは自己由来細胞療法;および/または(b)ワクチン(例えば、腫瘍ワクチンもしくは病原体ワクチン);および/または(c)(抗体、例えば、抗CD25;化学療法;極性化の調節、例えば、GATA3阻害;インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害;TLRアゴニスト;もしくは他の方法を介した)調節性T細胞/サプレッサーT細胞の枯渇または不活性化;および/または(d)サイトカインもしくは補助刺激分子もしくは免疫応答を増強する他の免疫刺激性薬剤(flt-3リガンド、IL-12、GM-CSF、CD40L、B7-1、IL-2、TLRアゴニスト、アラーミン、PAMP、DAMP)の送達もしくは発現;および/または(e)免疫応答を増強する抗体(例えば、抗CTLA-4、抗41BB、抗CD28、抗CD40、抗B7ファミリー)の投与;および/または(f)腫瘍細胞、腫瘍血管系、または腫瘍微小環境に対する抗体の投与(例えば、様々な腫瘍のもしくは腫瘍に関連する抗原もしくは受容体を標的とする抗体;複合化抗体);および/または(g)シグナル伝達阻害剤(STI)、脱メチル剤(例えば、アザシチジン)、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)モジュレーターを含む、腫瘍遺伝子発現もしくは標的細胞シグナル伝達を改変することができる任意の薬剤の投与と併用される。

【０４５８】
本発明の1つの局面において、本明細書に記載の標的化-治療剤複合体が投与される前、投与された後、または投与されると同時に、(前記で定義した)1つまたは複数の活性薬剤は投与される。このような態様において、1つまたは複数の活性薬剤は腫瘍細胞死を高めてもよく、腫瘍成長を阻害してもよく、および/または抗腫瘍免疫応答を増強してもよい。

【０４５９】
例えば、1つの態様において、1つまたは複数の活性薬剤は、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害剤である。IDO阻害剤は酵素レベルにあってもよく、例えば、酵素の活性部位をブロックする、または酵素の活性部位に結合する低分子阻害剤である。または、阻害剤は遺伝子発現レベルで機能してもよく、例えば、IDO活性を低下させるためにアンチセンス、siRNAまたはリボザイムにより標的化する。従って、様々な態様において、本発明の治療剤(例えば、抗体-INAS複合体)は任意のIDO阻害剤と共に投与され、投与は任意の順番で連続して、または同時に行われる。

【０４６０】
肝臓外酵素インドールアミン2、3-ジオキシゲナーゼ(IDO)は、中心的な代謝因子ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)を生合成する最初のかつ律速の段階においてトリプトファン分解を触媒する。IDOは、IDO発現がインターフェロン-γにより刺激されるという観察により免疫学的な役割と結び付けられ、その後に、母子免疫からの胎児の保護において生理学的に重要であるという発見によって確認された。IDOは、通常、腫瘍および流入領域リンパ節において多く、腫瘍微小環境におけるT細胞免疫を抑制する。癌では、IDO活性は、腫瘍抗原に対する寛容の獲得の促進を助けている可能性がある。IDOは、腫瘍抗原に対する末梢寛容を作り出すことによって、腫瘍成長促進の根底にある炎症環境の状況において、腫瘍細胞生存を邪魔する免疫応答を損なうことができる。前臨床研究において、IDOの低分子阻害剤は、この免疫抑制機構を傷つけ、様々な古典的化学療法剤の効力に強い影響を及ぼしており、このことは、治療目標としてのIDO阻害剤の臨床開発を裏付けている。

【０４６１】
臨床試験のためにIDO阻害剤1-メチル-トリプトファンが開発されている。Hou et al. Cancer Res. 2007 Jan 15;67(2):792-801。Hou et al.により示されたように、IDO遺伝子が破壊されたマウスにおいて(IDO-ノックアウトマウス)、D-1-メチル-トリプトファンの抗腫瘍効果は完全に無かったので、1-メチル-トリプトファンのD異性体はIDO遺伝子を特異的に標的化する。従って、様々な態様において、IDO阻害をもたらし、宿主を介した免疫抑制をブロックし、本発明の治療剤と組み合わせた状況において抗腫瘍免疫を増強するために、D異性体またはL異性体、好ましくは、D-1-メチル-トリプトファンが投与される。

【０４６２】
さらに、他の態様において、併用投与は、IDO発現の活性化を防ぐことによってIDO活性を低減するまたは無くすために、IDO活性の上流アクチベーターを標的化する工程をさらに含んでもよい。例えば、IDOは、インターフェロン(IFN)-γを介した、signal transducer and activator of transcription 1α(STAT1α)およびインターフェロン調節因子(interferon regulatory factor)(IRF)-1の効果によって誘導される。IDOの誘導はまたIFN-γ非依存性機構によって媒介されることがあるが、この誘導機構は特定されていない。従って、IDO発現の上流アクチベーターを標的とする低分子阻害剤またはノックダウン核酸は、本発明の組成物および方法の抗癌効果を増強するさらなる標的となる。関連した局面において、標的化部分と、IDOを標的とする免疫刺激性siRNA(INAS)との複合体を用いて、抗腫瘍免疫を増強することができる。

【０４６３】
従って、本発明の組成物および方法は、低分子阻害剤ならびにIDO発現および/または活性を阻止する化合物を含む、1つまたは複数の他の活性薬剤と併用することができる。こ

のような活性薬剤は、本発明の治療用組成物および方法と共に投与されることが意図される。このような活性薬剤およびその使用方法は公知であり、例えば、米国特許出願第20070173524号、同第20070105907号、同第20070099844号、同第20070077234号、同第20060292618号、同第20060110371号、同第20050186289号、および同第20040294623号に開示されている。

【０４６４】

本発明のさらに別の局面によれば、微生物感染、真菌感染、寄生生物感染、細菌感染、およびウイルス感染からなる群より選択される感染より引き起こされる感染症の、診断用、検出用、および/もしくは画像化用の製品ならびに/または予防用および/もしくは治療用の医用薬剤を製造するための、(前記で定義した)1つまたは複数の生物活性薬剤にカップリングされた1つまたは複数の標的化部分を含む複合体の使用が提供される。

【０４６５】

本発明はまた、有効量で疾患を治療することができる少なくとも1つの化合物、および薬学的に許容されるビヒクルまたは希釈剤を含む薬学的組成物を提供する。本発明の組成物は、記載の他の治療剤を含有してもよく、例えば、薬学的製剤の技術分野において周知の技法などの技法に従って、従来の固体または液体のビヒクルまたは希釈剤、ならびに所望の投与方法に適したタイプの薬学的な添加物(例えば、賦形剤、結合剤、保存剤、安定剤、着香剤など)を使用することによって処方することができる。

【０４６６】

本発明の製造物品の成分として用いられる薬学的組成物は、固体、溶液、エマルジョン、分散液、ミセル、リポソームなどの形で使用することができる。ここで、結果として生じる組成物は、活性成分として前記に記載された化合物の1つまたは複数を、腸用途または非経口用途に適した有機または無機の担体または賦形剤と混合して含有する。本発明の製造物品の成分として用いられる化合物は、例えば、使用に適した、錠剤、ペレット、カプセル、坐剤、液剤、エマルジョン、懸濁液、および他の任意の形のための通常の無毒の薬学的に許容される担体と組み合わせることができる。使用することができる担体には、グルコース、ラクトース、アラビアゴム、ゼラチン、マンニトール、デンプンのり、三ケイ酸マグネシウム、タルク、コーンスターチ、ケラチン、コロイドシリカ、バレイショデンプン、尿素、中鎖長トリグリセリド、デキストラン、および固体、半固体、または液体の形をした調製物の製造において使用するのに適した他の担体が含まれる。さらに、補助剤、安定化剤、増粘剤、ならびに着色剤および香料を使用してもよい。

【０４６７】

本発明の薬学的組成物は任意の適切な手段によって投与することができ、例えば、無毒の薬学的に許容されるビヒクルまたは希釈剤を含有する投与単位製剤にして、錠剤、カプセル、顆粒もしくは散剤の形で、経口投与、舌下投与、頬投与、例えば、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、もしくは槽内への注射法または注入法(例えば、滅菌注射用水溶液もしくは非水溶液もしくは懸濁液として)により経口投与、例えば、吸入スプレーにより鼻腔投与、例えば、クリームもしくは軟膏の形で、局所投与、または例えば、坐剤の形で、直腸投与することができる。本化合物は、例えば、速放または徐放に適した形で投与することができる。速放または徐放は、本化合物を含む適切な薬学的組成物を使用するか、または特に徐放の場合、装置、例えば、皮下移植片または浸透圧ポンプを使用することによって達成することができる。本複合体はまたリポソームにより投与することができる。1つの局面において、組成物は、全身投与、腫瘍内投与、または腫瘍周囲投与することができる。

【０４６８】

ヒトなどの霊長類に加えて、様々な他の哺乳動物を本発明の方法に従って治療することができる。例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、または他のウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、げっ歯類またはネズミ種を含むが、これらに限定されない哺乳動物を治療することができる。しかしながら、前記方法はまた他の種、例えば、トリ種(例えば、ニワトリ)においても実施することができる。

【０４６９】
調節のために細胞標的化が所望される、上記の方法で治療が施される対象は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、またはその他のウシ種、ヒツジ種、ウマ種、イヌ種、ネコ種、げっ歯類種もしくはネズミ種を含むが、これらに限定されない哺乳動物であり、好ましくは、男性または女性のヒトである。
【０４７０】
本発明の化合物の投与のための薬学的組成物は、単位剤形として存在することが便利であると考えられ、薬学の技術分野において周知の方法のいずれかにより調製することができる。全ての方法は、活性成分を、1つまたは複数の補助成分を構成する担体と配合する工程を含む。一般的に、薬学的組成物は、活性成分を液体担体もしくは超微粒子状の固体担体またはその両者と均一かつ密接に配合し、次いで、必要に応じて生成物を所望の製剤に成型することによって調製される。薬学的組成物中には、疾患の経過または状態に対して所望の効果をもたらすのに十分な量で、目的の活性化合物を含める。
【０４７１】
活性成分を含有する薬学的組成物は、例えば、錠剤、トローチ剤、ロゼンジ剤、水性または油性の懸濁液、分散性散剤または顆粒剤、エマルジョン、硬カプセル剤もしくは軟カプセル剤、またはシロップ剤もしくはエリキシル剤として、経口使用に適した形でよい。
【０４７２】
経口使用を目的とした組成物は、薬学的組成物を製造するための当技術分野で公知の任意の方法に従って調製することができ、このような組成物は、薬学的に洗練されかつ口当たりのよい調製物を提供するために、甘味剤、香味剤、着色剤、および保存剤からなる群より選択される1つまたは複数の薬剤を含んでもよい。錠剤は、錠剤の製造に適した無毒の薬学的に許容される賦形剤と混合して、活性成分を含有する。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム、またはリン酸ナトリウム；造粒剤および崩壊剤、例えば、コーンスターチまたはアルギン酸；結合剤、例えば、デンプン、ゼラチン、またはアラビアゴム、ならびに潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクでもよい。錠剤はコーティングしなくてもよいし、または公知の技法によってコーティングを施して、胃腸管内で崩壊および吸収を遅延させ、それにより長期にわたる持続的な作用を提供することもできる。例えば、モノステアリン酸グリセリンまたはジステアリン酸グリセリルなどの遅延物質を使用することができる。錠剤はまた、制御放出のための浸透性治療用錠剤を形成するようコーティングすることもできる。
【０４７３】
経口使用のための製剤はまた、不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリンと混合された硬ゼラチンカプセルとして示されてもよく、活性成分が水または油媒質、例えばピーナッツ油、流動パラフィン、またはオリーブ油と混合された軟ゼラチンカプセルとして示されてもよい。
【０４７４】
水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤と混合して、活性材料を含有する。このような賦形剤は、懸濁剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル-ピロリドン、トラガカントゴム、およびアラビアゴムであり；分散剤または湿潤剤は、天然ホスファチド、例えば、レシチン、または酸化アルキレンと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、またはエチレンオキシドと脂肪酸および無水ヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエートでもよい。水性懸濁液はまた、1つまたは複数の保存剤、例えば、エチルまたはn-プロピル、p-ヒドロキシ安息香酸、1つまたは複数の着色剤、1つまたは複数の

香味剤、および1つまたは複数の甘味剤、例えば、スクロースまたはサッカリンを含有してもよい。

【０４７５】

油性懸濁液は、植物油、例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、もしくはヤシ油中に、または鉱油、例えば、流動パラフィン中に活性成分を懸濁することによって処方することができる。油性懸濁液は、増粘剤、例えば、蜜ろう、固形パラフィン、またはセチルアルコールを含有してもよい。口当たりのよい経口調製物を提供するために、上記のような甘味剤および香味剤を添加してもよい。これらの組成物は、アスコルビン酸などの酸化防止剤の添加により、保存することができる。

【０４７６】

水の添加による水性懸濁液の調製に適した分散性粉末剤または顆粒剤は、分散剤または湿潤剤、懸濁剤、および1つまたは複数の保存剤と混合して、活性成分を提供する。適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤は、既に上記したものにより例証される。さらなる賦形剤、例えば、甘味剤、香味剤、および着色剤もまた存在してよい。

【０４７７】

シロップ剤およびエリキシル剤は、甘味剤、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、またはスクロースを用いて処方することができる。このような製剤はまた、粘滑剤、保存剤、ならびに香味剤および着色剤もまた含んでよい。

【０４７８】

薬学的組成物は、無菌注射用水性懸濁液または油性懸濁液の形態であってもよい。この懸濁液は、上記の適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて、公知の技術に従って製剤化することができる。無菌注射用調製物はまた、例えば、1,3-ブタンジオール溶液として、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌注射用溶液または懸濁液であってもよい。使用され得る許容可能な媒体および溶媒には、水、リンガー溶液、および等張塩化ナトリウム溶液が含まれる。さらに、無菌不揮発性油が、溶媒または懸濁媒体として簡便に用いられる。この目的では、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の無菌不揮発性油を使用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸が注射剤の調製において有用である。

【０４７９】

本発明の化合物はまた、薬物の直腸投与のための坐剤の形態で投与することもできる。常温では固体であるが直腸温度では液体であり、よって直腸内で溶解して薬物を放出する適切な非刺激性賦形剤と、薬物を混合することによって、これらの組成物を調製することができる。このような物質は、カカオ脂およびポリエチレングリコールである。

【０４８０】

局所使用には、本発明の化合物を含有するクリーム剤、軟膏剤、ゼリー剤、溶液、または懸濁液などが用いられる。(この適用の目的では、局所適用には洗口剤およびうがい薬も含まれる)。

【０４８１】

調節のために細胞が標的化される対象の治療において、適切な投与量レベルは、一般に、約0.01～500mg/kg患者体重/日であり、これは単回用量または複数回用量として投与することができる。好ましくは、投与量レベルは約0.1～約250mg/kg/日であり；より好ましくは、約0.5～約100mg/kg/日である。適切な投与量レベルは、約0.01～250mg/kg/日、約0.05～100mg/kg/日、または約0.1～約50mg/kg/日でもよい。この範囲内で、投与量は0.05～0.5、0.5～5、または5～50mg/kg/日でもよい。経口投与の場合、組成物は好ましくは、治療すべき患者に対して投与量を対症的に調整するよう、1.0～1000ミリグラムの活性成分、特に、約1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0、および1000.0ミリグラムの活性成分を含有する錠剤の形態で提供される。化合物は、1日当たり1～4回、好ましくは、1日当たり1回または2回の投与計画で投与することができる。

【０４８２】

しかしながら、任意の特定の患者に対する特定の用量レベルおよび投与頻度は変動する可能性があり、使用する特定の化合物の活性、その化合物の代謝安定性および作用期間、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食習慣、投与様式および投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、特定の状態の重篤度、ならびに宿主が受けている療法を含む様々な要因に依存することが理解されよう。

【０４８３】

1つの態様においては、哺乳動物対象、好ましくは、ヒトから血液のアリコートを抽出し、この血液のアリコートをエクスビボで本発明の複合体により処理する。複合体の効果は、アリコート中に含まれる血液中の免疫エフェクター細胞の活性の調節である。次に、ワクチン接種に適した任意の経路より、調節済みのアリコートを対象の身体に再導入する。

【０４８４】

1つの局面においては、対象から免疫細胞を取り出す工程、細胞をエクスビボで複合体と接触させる工程、および細胞を対象に再導入する工程を含む方法を開示する。

【０４８５】

1つの局面において、アリコートの量は、抗凝固剤(例えば、クエン酸ナトリウム2ml)と併せて最大で約400mlであり、約0.1ml～約100ml、約5ml～約15ml、約8ml～約12ml、または約10mlである。

【０４８６】

1つの局面において、対象は一連の治療を受け、このような個々の治療には、血液アリコートの取り出し、上記の処理、および処理済みアリコートの対象への再投与が含まれる。このような一連の治療には、何日かの連続した日にわたる処理済み血液アリコートの毎日の投与が含まれてよく、または指定期間にわたる最初の毎日治療過程、それに続く休止期間、次に、1回もしくは複数回のさらなる毎日治療過程が含まれてもよい。

【０４８７】

関連する局面において、対象は、4～6アリコートの処理済み血液の投与を含む最初の治療過程を受ける。別の好ましい態様では、対象は、2～4アリコートの処理済み血液の投与を含む最初の治療過程を受け、任意の対をなす連続したアリコートの投与は、連続した日に行われるか、またはアリコートが患者に投与されない1～21日間の休息期間によって隔てられ、連続したアリコートの1つの選択された対を隔てる休息期間は約3～15日である。別の関連する局面においては、最初の治療過程の投与量計画は全部で3つのアリコートを含み、第1および第2アリコートは連続した日に投与され、第2アリコートと第3アリコートの投与の間に11日の休息期間が設けられる。

【０４８８】

さらに関連する局面においては、最初の治療過程の後に追加の治療過程を続ける。例えば、その後の治療過程は、最初の治療過程の終了後の少なくとも約3週間目に施す。1つの局面において、対象は、最初の治療過程の終了後に、処理済み血液の1つのアリコートの30日ごとの投与を含む第2治療過程を6カ月の期間にわたり受ける。

【０４８９】

連続する治療過程の間隔は、本発明の治療の好ましい効果が維持されるようなものであるべきであり、個々の対象の応答の観察に基づいて決定され得ることが理解されよう。

【０４９０】

以下の実施例は本発明を説明することを目的とするものであって、限定を意図するものではない。

【０４９１】

実施例

実施例1:複合化された抗体またはペプチドの作製

核酸配列(DNAまたはRNA)と抗ヒトEGFR抗体、抗ヒトHER2抗体、および抗マウスneu抗体との複合化:

抗体:

(1)抗ヒトEGFR抗体(キメラ)
(2)抗ヒトHER2/neu抗体
(3)抗マウスneu抗体。
【０４９２】
DNA配列:
(1)オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)-(SEQ ID NO:1)
5' G*G*G GAC GAC GTC GTG G*G*G *G*G*G-3'リン酸
(*はホスホロチオエート結合を表し、残りはホスホジエステル結合である)
タイプ=DNA-PS;サイズ=21;Epsilon 1/(mMcm)=208;
MW(g/mole)=6842 CpG A;クラス=CpG A;21.92μM。
【０４９３】
オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)-(SEQ ID NO:2)
5' G*G*G GGA GCA TGC TGG*G*G *G*G*G-3'リン酸
(*ホスホロチオエート結合、残りはホスホジエステル結合である)
タイプ=DNA-PS;サイズ=20;Epsilon 1/(mMcm)=197.6;
MW(g/mole)=6553;クラス=非CpG;18.34μM。
【０４９４】
プラスミドDNA
DpnI+Hhaで切断して100bp～250bpのサイズにしたプラスミドDNA(空のプラスミドDNAベクター)を90℃で変性し、フェノールおよびクロロホルムならびにEtOH中で精製する。精製された変性プラスミドDNA断片を、以下のように、抗体に複合化した。
【０４９５】
RNA配列:
(1)オリゴリボヌクレオチド-(SEQ ID NO:)
5'リン酸 GGG GAC GAC GUC GUG GGG GGG
(*ホスホロチオエート結合-安定したssRNA)。
【０４９６】
siRNA
5'-UGUCCUUCAAUGUCCUUCAA -- (SEQ ID NO:)

5'-AAUUGUGUAAUGUCCUUCAA– (SEQ ID NO:)

。
【０４９７】
腫瘍標的化ペプチド配列:
i.-
CDCRGDCFC (RGD-4Cペプチド) - (SEQ ID NO: 3)
(2)GGCDGRCG-(SEQ ID NO:4)
CDGRC-(SEQ ID NO:5)。
【０４９８】
500μlの抗体ペプチド溶液をエッペンドルフチューブに移し、これに540μlの0.1Mイミダゾールを添加した(すなわち、3MイミダゾールをPBSで0.1Mまで希釈した)。別のチューブの中で、5mgの塩酸1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド(EDC)をCpG DNA(ODN)と混合し、抗体イミダゾール溶液またはペプチドイミダゾール溶液とすぐに混合した(Ab:ODNモル比=1:30.6)。
【０４９９】
内容物が溶解するまでチューブをボルテックスし、溶液を短時間だけ遠心分離した。遠心分離後に、さらに250μlの0.1Mイミダゾールを添加し、結果として生じた溶液を50℃で2時間インキュベートした。
【０５００】

反応しなかったEDC、その副産物、およびイミダゾールを、CENTRICON(登録商標)濾過(Millipore Corporation, Billerica, MA)によって除去した。次いで、ヌクレオチドと抗体および/またはペプチドとの複合化を確かめるために、試料をSDS-PAGEゲルおよび質量分析によってアッセイした。抗体濃度またはペプチド濃度を定量するために、プロテインアッセイを行った。

【０５０１】

核酸と抗体/標的化部分との複合化方法(図4)。

【０５０２】

SDS-PAGE/イムノブロッティングにより、DNA複合化モノクローナル抗体およびRNA複合化モノクローナル抗体が実際に作製されたことが証明された(図5)。

【０５０３】

実施例2:DNA複合化抗EGFR抗体によるEGFR活性の阻害

HT-29結腸癌腫細胞を、0.5%胎仔ウシ血清中で、抗EGFR抗体またはDNA複合化抗EGFR抗体[抗EGFR Ab-DNA 1(SEQ ID NO:1)または抗EGFR Ab-DNA 2(SEQ ID NO:2)の存在下で培養し、次いで、EGF(5ng/ml)により37℃で20分間刺激した。次いで、細胞を、1mMオルトバナジン酸ナトリウムを含有する氷冷PBSで洗浄し、細胞溶解産物を、リン酸化部位特異的EGFRを検出する抗体(チロシン1068;Cell Signalling)を用いたウエスタンブロット分析に供した。HT-29細胞を抗EGFR抗体またはDNA複合化抗EGFR抗体により処理すると、EGFRのEGF刺激リン酸化が阻害された(図6)。

【０５０４】

実施例3:DNA/RNA複合化抗EGFR抗体による樹状細胞の成熟

ヒト単球を骨髄単核細胞から単離し、AIM5培地(10%ヒトAB血清を含む)、および(1)以下のサイトカイン:RANKL 1μg/ml+TNF-α 20ng/ml+GM-CSF 800U/ml+IL-4 500U/mlの組み合わせ;(2)オリゴデオキシヌクレオチドSEQ ID NO:1(DNA)(5μg/ml)(サイトカインなし);(3)DNA複合化抗EGFR抗体(EGFR Ab-DNA)(5μg/ml)(サイトカインなし)のいずれかにおいて、6日間培養した。7日目に細胞を採取し、MHCクラスI PE、MHCクラスII FITC、およびCD86-PEに対する抗体を用いて染色した。樹状細胞(DC)の成熟を、成熟マーカーの細胞表面発現が上昇したかどうかCD86フローサイトメトリー分析によって評価した。DNA複合化抗EGFR抗体は、サイトカインカクテルに応答して観察されたものと同様のCD86発現(すなわち、DCの成熟)を誘導した(図7)。抗EGFR Ab-DNA 2(SEQ ID NO:2)、抗EGFR Ab-プラスミドDNA、および抗EGFR Ab-RNA複合体によって、同様の結果が得られた。

【０５０５】

実施例4:DNA複合化抗EGFR抗体またはDNA複合化抗HER2抗体は、ヒト末梢血単核球(PBMC)によるサイトカイン[インターフェロン-γ(INF-γ)およびApo2L/TRAIL]の発現を誘導する

ヒト末梢血単核球(PBMC)を、抗ヒトEGFR抗体(抗EGFR Ab)5μg/ml、抗ヒトHER2抗体(抗HER2 Ab)5μg/ml、オリゴデオキシヌクレオチドSEQ ID NO:1(DNA)5μg/ml、またはDNA複合化抗体[抗EGFR抗体-DNA(抗EGFR Ab-DNA)または抗HER2 抗体-DNA(抗HER2 Ab-DNA)5μg/ml]で処理した。24時間後に、PBMCの上清中のサイトカイン(INF-γまたはApo2L/TRAIL)のレベルを、ELISA(pg/ml)によって評価した。DNA(SEQ ID NO:1)またはDNA複合化抗体によりPBMCを処理すると、細胞上清中の可溶性INF-γまたはApo2L/TRAILの発現が上昇した(図8)。抗EGFR Ab-DNA 2(SEQ ID NO:2)によって、同様の結果が得られた。

【０５０６】

実施例5:DNA複合化抗EGFR抗体によるナチュラルキラー細胞の活性化

正常な末梢血単核球(PBMC)(Johns Hopkins leucopheresis Unit)を、DNA複合化抗EGFR抗体[抗EGFR Ab-DNA 1(SEQ ID NO:1)]またはEGFR Ab(対照)(4μg/ml)で3日間処理したか、処理しなかった。細胞を、抗CD56フィコエリトリン(CD56 PE)および抗CD8 FITC(CD8 FITC)で標識し、次いで、フローサイトメトリーにより分析した。PBMCは、EGFR Ab-DNA 1複合体による刺激後に、$CD56^+$細胞数の増加を示した(図9)。

【０５０７】

実施例6:DNA複合化抗EGFR抗体またはRNA複合化抗EGFR抗体によるMHC発現の上昇

正常な末梢血単核球(PBMC)(Johns Hopkins leucopheresis Unit)を、DNA複合化抗EGFR抗体[抗EGFR Ab-プラスミドDNA]または抗EGFR Ab-RNA(SEQ ID NO:)またはEGFR Ab(対照)(4μg/ml)で3日間処理したか、処理しなかった。細胞を抗HLAクラスII(DR)で標識し、フローサイトメトリーにより分析した。PBMCは、EGFR Ab-プラスミドDNAまたはEGFR Ab-RNA複合体による刺激後に、DR^+細胞パーセントの増加を示した(図10)。

【０５０８】

実施例7:DNA複合化抗EGFR抗体またはDNA複合化抗HER2抗体に応答した、腫瘍細胞におけるApo2L/TRAILの誘導

EGFR発現MDA-MB468細胞を、EGFR抗体-DNA複合体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1またはEGFR Ab-DNA SEQ ID NO:2)またはEGFR Ab(対照)(5μg/ml)で3日間処理した。HER2発現SKBr-3細胞を、HER2抗体-DNA複合体(HER2 Ab-DNA SEQ ID NO:1またはHER2 Ab-DNA SEQ ID NO:2)またはHER2 Ab(対照)(5μg/ml)で3日間処理した。細胞におけるApo2L/TRAILレベルを、24時間後、48時間後、および72時間後に定量PCRによって評価した。Apo2L/TRAIL発現は、EGFR抗体-DNA複合体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1またはEGFR Ab-DNA SEQ ID NO:2)による処理に応答してEGFR発現腫瘍細胞(MDA-MB468)において誘導され、HER2抗体-DNA複合体(HER2 Ab-DNA SEQ ID NO:1またはHER2 Ab-DNA SEQ ID NO:2)による処理に応答してHER2/neu発現腫瘍細胞(SKBr-3)において誘導された(図11)。

【０５０９】

実施例8:DNA複合化抗体は新規の形の標的化腫瘍細胞死-細胞超融合-を直接誘導し、細胞超融合は非複合化抗体または公知の任意のクラスの抗癌剤に応答して観察されない

EGFR発現ヒト結腸癌細胞(HT-29)を、抗EGFR抗体(抗EGFR Ab)またはEGFR抗体-DNA複合体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1またはEGFR Ab-DNA SEQ ID NO:2)または遊離オリゴデオキシヌクレオチド(DNA)(5μg/ml)の存在下でプレーティングした($5x10^4$細胞/ml)。細胞を位相差顕微鏡法および経時的顕微鏡法によって96時間追跡した。DNA複合化抗EGFR抗体により処理すると、HT-29細胞の融合が誘導され、EGFR Abまたは遊離DNAでは観察されない、寿命が短く、複製能が損なわれた合体細胞(ハイブリッド細胞または多核細胞)が形成された(超融合)(図12)。HT29細胞培養プレートにより、EGFR抗体-DNA複合体による処理に応答した直接的な死(コロニー形成消失による)の誘導が証明されたが、EGFR抗体または非複合化核酸では証明されなかった(図13)。

【０５１０】

EGFR発現ヒト乳癌細胞(MCF-7またはMDA-MB-468)を、抗EGFR抗体(抗EGFR Ab)(2～8μg/ml)またはDNA複合化抗EGFR抗体(EGFR Ab-DNA SEQ ID NO:1またはEGFR Ab-DNA SEQ ID NO:2)(2～4μg/ml)または遊離オリゴデオキシヌクレオチド(DNA)(4μg/ml)の存在下でプレーティングした($5x10^4$細胞/ml)。DNA複合化抗EGFR抗体で処理すると、乳癌細胞の超融合が誘導され、(非複合化)抗EGFR親抗体で処理された細胞と比較して、寿命が短く、複製能の乏しい合体細胞体が形成された(図14)。細胞培養プレートにより、EGFR抗体-DNA複合体による処理に応答した直接的な死(コロニー形成消失による)の誘導が証明されたが、EGFR抗体または非複合化核酸では証明されなかった(図15)。

【０５１１】

HER2/neu発現ヒト乳癌細胞(SKBrまたはMCF-7)を、抗ヒトHER2/neu抗体(抗HER2/neu Ab)またはDNA複合化抗HER2/neu抗体(抗HER2/neu Ab-DNA 1;SEQ ID NO:1または抗HER2/neu Ab-DNA 2;SEQ ID:2)(5μg/ml)の存在下でプレーティングした($5x10^4$細胞/ml)。細胞生存/増殖を位相差顕微鏡法によって評価した。DNA複合化抗HER2/neu抗体で処理すると、乳癌細胞の超融合が誘導され、抗HER2/neu親抗体により処理された細胞では観察されない、寿命が短く、複製能の乏しい合体細胞体が形成された(図16)。

【０５１２】

マウスneu発現乳癌細胞(NT2細胞)を、抗neu抗体(抗neu Ab)またはDNA複合化抗neu抗体(抗neu Ab-DNA1;SEQ ID NO:1)(5μg/ml)の存在下でプレーティングした($5x10^4$細胞/ml)。細胞生存/増殖を位相差顕微鏡法およびトリパンブルー色素排除アッセイによって評価した。DNA複合化抗neu抗体で処理すると、マウスneu発現乳癌細胞(NT2)の超融合が誘導され

、寿命が短く、複製能の乏しい合体細胞体が形成された。これもまた、このような超融合および細胞死は非複合化抗体またはDNAによっては誘導されなかった(図17)。

【０５１３】

実施例9:DNA複合化抗EGFR抗体はEGFR発現腫瘍細胞の免疫細胞性溶解を誘導する

HT-29結腸癌腫細胞を^{3}H-チミジン(2.5μCi/ml)で標識し、トリプシン処理し、PBSで洗浄し、EGFR-AbまたはEGFR Ab-DNA1(SEQ ID NO:1)または遊離DNA(4μg/ml)で処理し、96ウェルプレート(5x10^{3}細胞/ウェル)において、PBMCと様々なE:T比で、37℃で4時間～72時間、トリプリケートで共培養した。細胞をフィルターペーパー上に採取し、特異的^{3}H-チミジン放出のパーセントによって細胞死/生存を定量した。EGFR-Abと比較して、EGFR Ab-DNAで処理すると、HT-29細胞は4時間にわたって迅速に死滅した(図18A)。EGFR-AbまたはDNAによるHT-29細胞の処理とは対照的に、EGFR Ab-DNAでHT-29細胞を処理すると、HT-29細胞は72時間にわたって排除された(PBMC:腫瘍細胞比=25)(図18B)。

【０５１４】

実施例10:DNA複合化抗EGFR抗体はヌードマウスにおけるヒトEGFR^{+}結腸癌異種移植片の成長を阻害する

BALB/cヌードマウスに、HT-29ヒト結腸癌細胞(4x10^{6})を皮下注射した。腫瘍を接種して5日後に、マウスに、抗EGFR抗体またはDNA複合化抗EGFR抗体(EGFR Ab-DNA1-SEQ ID NO:1)(20μg、腫瘍周囲、3週間にわたって1週間に2回)を投与したか、処置しなかった。腫瘍サイズおよび腫瘍量の分析によって、EGFR Ab-DNAが投与された後に、腫瘍成長が著しく阻害されたことが証明された。この阻害は、複合化されていない抗EGFR親抗体による阻害より著しく大きかった(図19A、19B)。EGFR Abの一過的な効果とは対照的に、EGFR Ab-DNAによる処理に応答した腫瘍成長阻害は12ヶ月超続いた。

【０５１５】

実施例11:DNA複合化抗neu抗体は、同系FVBマウスにおけるNeu+腫瘍およびHER2/neuトランスジェニックマウスにおける自然発生腫瘍の成長を阻害する

FVBマウスにNT2 neu+乳癌細胞(4x10^{6})を皮下注射した。腫瘍を接種して5日後に、マウスに、抗Neu抗体またはDNA複合化抗Neu抗体(Neu Ab-DNA 1-SEQ ID NO:1)(20μg、腫瘍周囲、3週間にわたって1週間に2回)を投与したか、処置しなかった。腫瘍サイズおよび腫瘍量の分析によって、Neu Ab-DNAが投与された後に、腫瘍成長が著しく阻害されたことが証明された、この阻害は、複合化されていない抗Neu親抗体またはDNAによる阻害より著しく大きかった(図20)。

【０５１６】

自然発生乳癌を有するNeu(neu/N)-トランスジェニックマウスに、DNA複合化抗neu抗体(Neu Ab-DNA 1-SEQ ID NO:1)(100μg、腹腔内、2週間にわたって1週間に2回、または50μg、腫瘍内、2週間にわたって1週間に2回)を投与したか、処置しなかった。腫瘍サイズおよび腫瘍量の分析によって、DNA複合化抗neu抗体が投与された後に、腫瘍成長が著しく阻害され、腫瘍量が減少したことが証明された(図21Aおよび21B)。

【０５１７】

本発明を上記の実施例を参照して説明したが、修正および変更が本発明の精神および範囲の範囲内に包含されることが理解されよう。したがって、本発明は以下の特許請求の範囲によってのみ制限される。

【０５１８】

配列	SEQ ID NO:
5' pUGGAUCCGGCUUUGAGAUCUU	56
5' ppGGGAGACAGGGGUGUCCGCCAUUUCCAGGUU	57
5' pppGGGAGACAGGCUAUAACUCACAUAAUGUAUU	58
5'-UUUUUUUUUUUUUUUUUU	59
5'-UGUGU-3'	60
5'-UGU-3'	61
5'- CUACACAAAUCAGCGAUUU	62
3'-GAUGUGUUUAGUCGCUAAA	63
5'-UUGAUGUGUUUAGUCGCUA	64
3'-AACUACACAAAUCAGCGAU	65
5'-GAUUAUGUCCGGUUAUGUA	66
3'-CUAAUACAGGCCAAUACAU	67
5'-AUGUAUUGGCCUGUAUUAG	68
3'-UACAUAACCGGACAUAAUC	69
5'-GGUCGGAAUCGAAGGUUUA	70
3'-CCAGCCUUAGCUUCCAAAU	71
5'-GGUCGGAGCUAAAGGUUUA	72
3'-CCAGCCUCGAUUUCCAAAU	73
5'-CAGCUUUGUGUGAGCGUAU	74
3'-GUCGAAACACACUCGCAUA	75
5'-GUCCUUCAA-3'	76
5'-GUCCUUCAA-3'	77
5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAAdTdT-3'	78
5'-UUGAAGGACAGGUUAAGCUdTdT-3'	79
5'-ACCUGUCCUUCAAUUACCAdTdT-3'	80
5'-UGGUAAUUGAAGGACAGGUdTdT-3'	81
5'-AAAAAAAACUGUCCUUCAA	82
5'- AAAAAAAAAUGUCCUUCAA	83
5'- AAAAAAAAAAGUCCUUCAA	84
5'-UGUCCUUCAAUGUCCUUCAA	85
5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAA	86
5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAACUACA CAAAUUGAAGGACAGGUUAAGCU	87
5'- GGACUGCGUUCGCGCUUUCC-3'	88
5'- GGCUUAUCCAUUGCACUCCGGA-3'	89
5'-ACGAAGGUGGUUUUCCCAG-3'	90
5'- UUUGUGGUAGUGGGGGACUG-3'	91
5'-GUAGUGUUUGUGGGGGACUG-3'	92
5'- GUAGUGGGGGACUGUUUGUG-3'	93
5'-GGACUGCGUUGUGGCUUUCC-3'	94
5'-GAUACUUACCUG-3'	95
5'-AAUUUGUGG-3'	96
5'- AAUUUUUGA-3'	97
5'- RAUxGR-3'	98
5'- GACUAGCUUGCUGUUU-3'	99
5'- GACUAGCCUUU-3'	100
G*G*TGCATCGATGCAG*G*G*G*G*G	101
TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT	102
TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG	103
5'-TCGXCGX	104
5'-TCGXTCG	105
5'TCGACGT	106
5'TCGATCG	107
T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T	108
T*C*C*T*C*C*T*T*T*T*G*T*C*C*T*T*T*T*T*G*T*C*C*T*T	109
5'-pppAGCUUAACCUGUCCUUCAA-3'	110
5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'	111
5'-pppGGGGAUGAACUUCAGGGUCAGCUU-3'	112

配列	SEQ ID NO:
5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'	113
3'- UUCGACUGGGACUUCAAGUAGGGGppp-5'	114
5'-GGUGCAUCGAUGCAGGGGGG	115
5'-GGUGCUUCGUUGCAGGGGGG	116
5'-GGUGCUUCGAUGCAGGGGGG	117
5'-GGUGCUACGUUGCAGGGGGG	118
5'-TCATCATTTTGT CATTTTGTCATT	119
5'-TCATTATTTTGT TATTTTGTCATT	120
5'-TCATCCTTTTGT CCTTTTGTCATT	121
5'-TCATCTTTTTGT CTTTTTGTCATT	122
5'-TCATCAATTTGT CAATTTGTCATT	123
5'-TCATCATCTTGT CATCTTGTCATT	124
5'-TCATCATGTTGT CATGTTGTCATT	125
5'-TCATCATTCTGT CATTCTGTCATT	126
5'-TCATCATTGTGT CATTGTGTCATT	127
5'-TCATCATTTGGT CATTTGGTCATT	128
5'-TCATTTTTTTGT TTTTTTGTCATT	129
5'-TCATTGTTTTGT TGTTTTGTCATT	130
5'-TCATTCTTTTGT TCTTTTGTCATT	131
5' – AAG AGG TGG TGG AGG AGG TGG TGG AGG AGG TGG AGG-3'	132
5' – TTG AAT TCC TAG TTT CCC AGA TAC AGT-3'	133
5'- TCG GTA ACG GG-3'	134
5' – TTA GGG TTA GGG TTA GGG-3'	135
5' – CGTTA-3'	136
5' – GCCACTGC-3'	137
5'- GCAGTGGC-3'	138

病原体配列	SEQ. ID NOS.
炭疽菌: 防御抗原	139

atgaaaaaacgaaaagtgttaataccattaatggcattgtctacgatattagtttcaagcacaggtaatttagaggtgat
tcaggcagaagttaaacaggagaaccggttattaaatgaatcagaatcaagttcccaggggttactaggatactatttta
gtgatttgaattttcaagcacccatggtggttacctcttctactacaggggatttatctattcctagttctgagttagaa
aatattccatcggaaaaccaatattttcaatctgctatttggtcaggatttatcaaagttaagaagagtgatgaatatac
atttgctacttccgctgataatcatgtaacaatgtgggtagatgaccaagaagtgattaataaagcttctaattctaaca
aaatcagattagaaaaaggaagattatatcaaataaaaattcaatatcaacgagaaaatcctactgaaaaaggattgga
t
ttcaagttgtactggaccgattctcaaaataaaaaagaagtgatttctagtgataacttacaattgccagaattaaaaca
aaaatcttcgaactcaagaaaaaagcgaagtacaagtgctggacctacggttccagaccgtgacaatgatggaatcc
ctg
attcattagaggtagaaggatatacggttgatgtcaaaaataaaagaacttttctttcaccatggatttctaatattcat
gaaaagaaaggattaaccaaatataaatcatctcctgaaaaatggagcacggcttctgatccgtacagtgatttcgaaa
a
ggttacaggacggattgataagaatgtatcaccagaggcaagacacccccttgtggcagcttatccgattgtacatgta
g
atatggagaatattattctctcaaaaaatgaggatcaatccacacagaatactgatagtcaaacgagaacaataagtaa
a
aatacttctacaagtaggacacatactagtgaagtacatggaaatgcagaagtgcatgcgtcgttctttgatattggtgg
gagtgtatctgcaggatttagtaattcgaattcaagtacggtcgcaattgatcattcactatctctagcaggggaaagaa
cttgggctgaaacaatgggtttaaataccgctgatacagcaagattaaatgccaatattagatatgtaaatactgggacg
gctccaatctacaacgtgttaccaacgacttcgttagtgttaggaaaaaatcaaacactcgcgacaattaaagctaagg
a
aaaccaattaagtcaaatacttgcacctaataattattatccttctaaaaacttggcgccaatcgcattaaatgcacaag
acgatttcagttctactccaattacaatgaattacaatcaatttcttgagttagaaaaaacgaaacaattaagattagat
acggatcaagtatatgggaatatagcaacatacaattttgaaaatggaagagtgagggtggatacaggctcgaactg
gag
tgaagtgttaccgcaaattcaagaaacaactgcacgtatcatttttaatggaaaagatttaaatctggtagaaaggcgga
tagcggcggttaatcctagtgatccattagaaacgactaaaccggatatgacattaaaagaagcccttaaaatagcattt
ggatttaacgaaccgaatggaaacttacaatatcaagggaaagacataaccgaatttgattttaatttcgatcaacaaac
atctcaaaatatcaagaatcagttagcggaattaaacgcaactaacatatatactgtattagataaaatcaaattaaatg

配列	SEQ ID NO:
caaaaatgaatattttaataagagataaacgttttcattatgatagaaataacatagcagttggggcggatgagtcagta gttaaggaggctcatagagaagtaattaattcgtcaacagagggattattgttaaatattgataaggatataagaaaaat attatcaggttatattgtagaaattgaagatactgaagggcttaaagaagttataaatgacagatatgatatgttgaata tttctagtttacggcaagatggaaaaacatttatagattttaaaaaatataatgataaattaccgttatatataagtaat cccaattataaggtaaatgtatatgctgttactaaagaaaacactattattaatcctagtgagaatggggatactagtac caacgggatcaagaaaattttaatcttttctaaaaaaggctatgagataggataa	
タンパク質	140
MKKRKVLIPLMALSTILVSSTGNLEVIQAEVKQENRLLNESESSSQGLLGY YFSDLNFQAPMVVTSSTTGDLSIPSSELE NIPSENQYFQSAIWSGFIKVKKSDEYTFATSADNHVTMWVDDQEVINKAS NSNKIRLEKGRLYQIKIQYQRENPTEKGLDFKLYWTDSQNKKEVISSDNL QLPELKQKSSNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRT FLSPWISNIHEKKGLTKYKSSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDKNVSPEAR HPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRTISKNTSTSRTHTSEV HGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHSLSLAGERTWAETMGLN TADTARLNANIRYVNTGTAPIYNVLPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQLSQI LAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLELEKTKQLRLDTDQ VYGNIATYNFENGRVRVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRI AAVNPSDPLETTKPDMTLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGKDITEFDFNFD QQTSQNIKNQLAELNATNIYTVLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAV GADESVVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVIN DRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKKYNDKLPLYISNPNYKVNVYAVTKENTII NPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG	10 20
AhpC TSA	141
atgttattaatcggcacagaagtaaaaccgtttaaagctaatgcttaccataatggagaatttatccaagttactgacga aagtttaaaaggaaaatggagtgtagtttgtttctacccagctgacttcacattcgtttgcccaactgaacttgaagact tacaaaaccaatatgcaactcttaaagagttaggcgttgaagtatactctgtatctacagacactcacttcactcacaaa gcatggcatgatagctcagaaactatcggtaaaatcgagtacatcatgattggtgacccaactcgcacaatcactacaa a cttcaacgttttaatggaagaagaaggtcttgctgctcgtggtacattcatcatcgatccagacggtgttatccaatcta tggaaatcaatgctgacggtatcggccgtgacgcaagcattcttgttaacaaaattaaagcagctcaatacgtacgtaa c aacccaggtgaagtttgcccagctaaatggcaagagggttctgctacacttaaaccaagccttgaccttgtaggcaaa at ctaa	30
タンパク質	142
MLLIGTEVKPFKANAYHNGEFIQVTDESLKGKWSVVCFYPADFTFVCPTE LEDLQNQYATLKELGVEVYSVSTDTHFTHKAWHDSSETIGKIEYIMIGDPT RTITTNFNVLMEEEGLAARGTFIIDPDGVIQSMEINADGIGRDASILVNKIK AAQYVRNNPGEVCPAKWQEGSATLKPSLDLVGKI.	
アラニンラセマーゼ	143
atggaagaagcaccattttatcgtgacacttgggtggaagtggatttagatgccatttataacaacgttacacatattaa agaatttatcccgagtgatgtagaaatttttgccgttgttaaagggaatgcatatgggcacgattatgtaccggtggcta aaatagcattagaagcgggggcgacaaggttagcagttgcgttcttagatgaagctttagtgcttcgaagagctggtat t actgcgccaattttggtgttaggtccttctcctcctcgtgatataaatgtagctgctgaaaatgatgtagcattaactgt ttttcaaaaggaatgggtagatgaagcaatcaaactttgggatggttcgtctacgatgaaataccatattaatttcgata gtggtatggggagaattggaatacgtgaacgtaaagaattaaaaggatttttaaaaagcttagaaggtgcaccattctta gagttggaaggagtttatacgcattttgcaacagcagatgaggtggagacttcttactttgataagcaatataacacatt tttggagcagttaagttggttgaaagaattcggagtggatcctaagtttgttcatacagctaatagtgctgcaacgctac gttttcaagggattacatttaatgcagtacgaattggcattgcgatgtatgggttatctccatctgtagaaatacgccct tttttaccgtttaaattagaaccagcgctatcattgcatacgaaagttgctcatattaaacaggtgattaaaggggatgg aattagttataacgtcacttatcgaacgaaaactgaagaatggattgcgaccgttgcaattggttatgcagatggctggc	40

配列	SEQ ID NO:
ttagaagattacaaggatttgaagtacttgtaaatggtaaaagggtaccgattgtagggcgagtaacgatggatcaatt c	
atgattcaccttccttgtgaagtgcctcttggtacgaaagttacactcattggaaggcaaggagatgaatatattagcgc tacagaggttgcggaatattcagggactattaattatgaaattattacgacgatcagttttcgtgtgccgagaatattta tacggaatggaaaagttgtggaagtaattaattatttgaacgatatatag	
タンパク質	144
MEEAPFYRDTWVEVDLDAIYNNVTHIKEFIPSDVEIFAVVKGNAYGHDYV PVAKIALEAGATRLAVAFLDEALVLRRAGITAPILVLGPSPPRDINVAAEN DVALTVFQKEWVDEAIKLWDGSSTMKYHINFDSGMGRIGIRERKELKGFL KSLEGAPFLELEGVYTHFATADEVETSYFDKQYNTFLEQLSWLKEFGVDP KFVHTANSAATLRFQGITFNAVRIGIAMYGLSPSVEIRPFLPFKLEPALSLH TKVAHIKQVIKGDGISYNVTYRTKTEEWIATVAIGYADGWLRRLQGFEVL VNGKRVPIVGRVTMDQFMIHLPCEVPLGTKVTLIGRQGDEYISATEVAEY SGTINYEIITTISFRVPRIFIRNGKVVEVINYLNDI.	
LSUリボソームタンパク質12P	145
atgactaaagaacaaatcattgaagcagttaaatctatgactgtattagaacttaacgacttagtaaaagctatcgagga agaattcggcgtaactgctgctgctcctgtagctgttgctggtggcgctggagaagctgctgctgagaaaactgaatttt g atgtggaactaactagcgctggtgcacaaaaaatcaaagttatcaaagttgttcgtgaaatcactggtcttggcttaaaa gaagctaaagaattagttgacaacactccaaaagtaatcaaagaagctgctgctaaagaagaagctgaagaaatcaa agc taaacttgaagaagttggcgctgctgtagaagttaagtaa	
タンパク質	146
MTKEQIIEAVKSMTVLELNDLVKAIEEEFGVTAAAPVAVAGGAGEAAAE KTEFDVELTSAGAQKIKVIKVVREITGLGLKEAKELVDNTPKVIKEAAAKE EAEEIKAKLEEVGAAVEVK.	
オリゴペプチドABD輸送体	147
atgaagaaaaagatgaagaagttcacggcagttgtagcgcctgttttagcgatgagtgtggcgttgacagcttgttctg g atctggtggggagaagaaatcaactacgacgtctagtggtggtggggaagagaaaaagtctgaaattaaatacgca gcga aacaagtgttaaatcgtacagagaatcaagagattccgacgatggatgtttcaaaatctaccgatacattaggttctcaa attttagggaacacgatggaaggtttatatcgattagataaagataataagccaatcccagctgcagcagaatctagta c gaaaagcgaggatggcaaaaaatatacatttaaattacgtaaagatgcaaaatggtcaaatggtgatcctgtaacagc ga aagatttcgtatatgcatggcagcgcttacttgataaaaatacagcggcagaatatgcatttattgcttactatattaaa aacgcagaggcaattaataaaggtgaaaaaccactaacagatttaggagcaaaagcggtagatgattatacgctaga agt agaattagagaaaccagtaccatatttcttgaatttaatggcattcccatcttactatcctttaaatgaaaagttcgtaa aagaaaaaggagataaattcggtttagaagcagatacaacgttgtataacggaccgttcgttatggcttcatggaaaca t gaacaaggatggcagctaaagaaaaatgataagtactgggataataagactgtaaaattagaagaaattaactatagt gt agtaaaagaagttgcgacgaaagtaaacttatatgatacaggatcaattgatttcacgttattatcaggagaattcgttg ataaatataaatcgaacaaagaagagtacggcgagtattcggaagcaagtacattcttcttacgtttaaatcaaaagcgt aacggacaagatacaccgttaaagagcaaaaaacttcgtgaagcgatcgcattatcaattgataaaaaaggattagca ac cgttattttaaataacggttcaaaagcaacagatcaattagtaccaaaagggcttgcgacaggaccagacggtaaaga ct accaagatacgtttaaaaatggtctaaaatatgatccgaaaaaaggtgcagcagcttgggaagaagcgaaaaaagaa ctt ggaaaagatcaagtgacaattgaattactaagctatgatgatggaactgcgaaaaaaattgctgactactttaaagatc a aattgagaaaaacttaaaaggtgtaacggttaacacgaaaattcaaccgttcaaacaaaaactaaaattagagtcagca c	

配列 SEQ ID NO:

aagattatgaagtttcgtttgcaggttggagtccagattattcggatccaatgacatttattgatatgtttgaatcgaag
agcccatataaccaaatgagttattcgaatccaaaatatgatgaaatggtagcgaaagcaggtaatgaattactgtctg
a
tccgaagaagcgttgggaaacgttaggaaaagcagagaaattattccttgaagaagatgcaggattagttcctttatat
c
aaacaggaagagcgtatgtaatgaaaccgaatgtaaaaggaattgtgaaacataacattagtccagaatatagctttaa
g
tgggcttatgtaacggaaggtaaataa

タンパク質 148

MKKKMKKFTAVVAPVLAMSVALTACSGSGGEKKSTTTSSGGGEEKKSEI
KYAAKQVLNRTENQEIPTMDVSKSTDTLGSQILGNTMEGLYRLDKDNKPI
PAAAESSTKSEDGKKYTFKLRKDAKWSNGDPVTAKDFVYAWQRLLDKN
TAAEYAFIAYYIKNAEAINKGEKPLTDLGAKAVDDYTLEVELEKPVPYFL
NLMAFPSYYPLNEKFVKEKGDKFGLEADTTLYNGPFVMASWKHEQGWQ
LKKNDKYWDNKTVKLEEINYSVVKEVATKVNLYDTGSIDFTLLSGEFVD
KYKSNKEEYGEYSEASTFFLRLNQKRNGQDTPLKSKKLREAIALSIDKKG
LATVILNNGSKATDQLVPKGLATGPDGKDYQDTFKNGLKYDPKKGAAA
WEEAKKELGKDQVTIELLSYDDGTAKKIADYFKDQIEKNLKGVTVNTKIQ
PFKQKLKLESAQDYEVSFAGWSPDYSDPMTFIDMFESKSPYNQMSYSNPK
YDEMVAKAGNELLSDPKKRWETLGKAEKLFLEEDAGLVPLYQTGRAYV
MKPNVKGIVKHNISPEYSFKWAYVTEGK.

アルデヒド脱水素酵素 149

atgagtcaactagctgtaaatcttcatgaaaaggtagaaaagtttcttcaaggtacgaaaaagttatatgtgaatggatc
attcattgaaagcgcttccggtaagacgtttaatacacctaatccagcaactggcgaaacacttgccgtcgtttctgaag
ccggtcgcgaagatattcataaagctgtagttgcagctcgcatggcttttgacgaaggtccttggtctcgcatgagcac
t
gcggagcgaagccgtcttatgtacaagttagctgatttaatggaagaacataaagaagagcttgcacagctcgagac
gtt
agataacggaaagccaatccgtgaaacaatggcagcagacataccacttgcaattgagcacatgcgctattatgctg
gct
gggcgacgaaaatcgttggtcaaacaatccctgtttccggtgatttctttaactatacacgccatgaagctgttggtgtc
gttggtcaaattatcccttggaacttcccgcttcttatggccatgtggaaaatgggagcagcgcttgctacaggatgtac
aatcgttttaaaacctgcagaacaaactccactatctgctctatacttagctgaattaattgaagaagctggattcccga
aaggcgttattaatatcgttcctggattcggtgaatcagctggacaagctctcgttaatcatccactcgttgataaaatt
gcatttaccggttctactccagtcggtaaacaaattatgcgacaagcatctgaatccttgaaacgtgttactttagagct
tggtggtaaatcaccgaacattattttaccagacgctgatttatctcgcgcaattcctggtgcactttctggtgttatgt
ttaaccaagggcaagtatgctctgctggatcacgcctatttgttccgaagaaaatgtatgataatgtcatggctgatctc
gtcctctattctaaaaaactaaatcaaggtgtcggtcttgaccctgaaacgacaattggtcctctcgtttccgaagaaca
acaaaaacgtgtaatgggctacattgaaaaagggattgaagaaggcgctgaagtactttgcggaggaaataatccatt
cg
atcaaggctacttcatttctcctacagtattcgctgacgtaaatgacgaaatgacaatcgcaaaagaagaaatttttcggt
ccagttatttctgcaatacctttttaacgatattgatgaagtaattgaacgagcaaataaatcacaattcggcttagcggc
tggtgtgtggacagaaaatgttaaaacagcacactatgttgcaagtaaagtacgtgcaggtacagtatgggttaactgt
t
acaacgtctttgatgcagcatctccatttggaggatttaaacaatctggtctcggccgtgaaatgggatcttacgcatta
aataactatacagaagtgaagagcgtttggcttaacttaaattaa

タンパク質 150

MSQLAVNLHEKVEKFLQGTKKLYVNGSFIESASGKTFNTPNPATGETLAV
VSEAGREDIHKAVVAARMAFDEGPWSRMSTAERSRLMYKLADLMEEHK
EELAQLETLDNGKPIRETMAADIPLAIEHMRYYAGWATKIVGQTIPVSGDF
FNYTRHEAVGVVGQIIPWNFPLLMAMWKMGAALATGCTIVLKPAEQTPL
SALYLAELIEEAGFPKGVINIVPGFGESAGQALVNHPLVDKIAFTGSTPVG
KQIMRQASESLKRVTLELGGKSPNIILPDADLSRAIPGALSGVMFNQGQVC
SAGSRLFVPKKMYDNVMADLVLYSKKLNQGVGLDPETTIGPLVSEEQQK
RVMGYIEKGIEEGAEVLCGGNNPFDQGYFISPTVFADVNDEMTIAKEEIFG
PVISAIPFNDIDEVIERANKSQFGLAAGVWTENVKTAHYVASKVRAGTVW
VNCYNVFDAASPFGGFKQSGLGREMGSYALNNYTEVKSVWLNLN.

配列	SEQ ID NO:
ATP合成酵素ファミリー	151
atgaataaagggcgcgttacgcaaatcatgggtccggttgtagacgttaagtttgatggcggaaagctaccagaaatc ta caacgcccttacggtaaaacagagcaacgaaaacggaacaagcattaacttaacatttgaagttgcacttcatttaggt g atgacacagttcgtacagttgcaatgtcttccacagatggacttgttcgtggcacagaagtagaagatactggtaaagc a atctctgtaccagttggtgatgcaacacttggtcgtgtatttaacgtattaggtgatgcaattgacttagatggtgaggt tcctgcggatgtacgtcgtgatccaattcaccgtcaagcacctgcattcgaagaattatctactaaagtagaaattcttg aaactggtattaaagtagtagacttacttgctccttacattaagggtggtaagatcggtctattcggtggtgccggtgta ggtaaaacggtattaattcaggaattaatcaataacatcgcacaagaacacggtggtatctctgtattcgctggtgtagg tgagcgtactcgtgagggtaatgacttataccacgaaatgagcgattctggcgtaattaagaaaactgcgatggtattc g gacaaatgaacgagccacctggagcacgtcaacgtgttgcgttaacaggtttaacaatggctgagcatttccgtgatg ag caaggacaagatgtacttctgttcatcgataatatcttccgtttcacgcaagcaggttctgaagtatctgcccttcttgg ccgtatgccatctgcggtaggttaccaaccaacacttgcaacagaaatgggtcaattacaagagcgtattacatctaca a ataaagggtctatcacgtctatccaagcggtatatgtaccagccgatgactatactgacccagcaccagctacaacgtt c gctcacttagatgcaacaacaaacttagagcgtcgtttaacacaaatgggtatttacccagccgtagatccattagcatc tacatctcgtgcactttctccagaaatcgtaggagaagagcattatgaagtggctcgtcaagtacagcaaactttacaa c gctacaaagagcttcaagatatcatcgctatcttaggtatggatgagttatctgaagaagataagttagttgtacatcgt gctcgtcgtattcaattcttcttatctcaaaacttccacgtagcggagcagtttacaggtcaaaaaggttcttatgtacc tgtaaaagaaacagttcgtggtttcaaagaaattctagaaggaaaatatgatgaccttccagaagatgcattccgcttag ttggtggcattgaagaagttattgaaaacgcgaagaaaatgatggcgtaa	152
タンパク質 MNKGRVTQIMGPVVDVKFDGGKLPEIYNALTVKQSNENGTSINLTFEVAL HLGDDTVRTVAMSSTDGLVRGTEVEDTGKAISVPVGDATLGRVFNVLGD AIDLDGEVPADVRRDPIHRQAPAFEELSTKVEILETGIKVVDLLAPYIKGG KIGLFGGAGVGKTVLIQELINNIAQEHGGISVFAGVGERTREGNDLYHEMS DSGVIKKTAMVFGQMNEPPGARQRVALTGLTMAEHFRDEQGQDVLLFID NIFRFTQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGQLQERITSTNKGSITSIQ AVYVPADDYTDPAPATTFAHLDATTNLERRLTQMGIYPAVDPLASTSRAL SPEIVGEEHYEVARQVQQTLQRYKELQDIIAILGMDELSEEDKLVVHRAR RIQFFLSQNFHVAEQFTGQKGSYVPVKETVRGFKEILEGKYDDLPEDAFRL VGGIEEVIENAKKMMA.	153
CLPプロテアーゼ	
atgaatttaattcctacagtaattgaacaaacaaatcgtggagaacgcgcttacgatatttactctcgactattaaaaga ccgtatcattatgcttggtagtgcaattgatgacaacgtagctaactcaatcgtttcccagcttttattcttggaatctc aagatcctgaaaaagatattcatatctacatcaacagccctggtggttctatcacagcaggtatggcaatttacgataca atgcagtttattaaaccgcaagtatcaacaatctgtatcggtatggctgcatctatgggtgcattcttacttgcagcagg tgaaaaaggaaaacgttatgcacttccaaacagtgaagcaatgattcaccaaccacttggtggggcacaaggtcaag cga ctgaaatcgaaatcgctgctaaacgtatcctattcttacgtgaaaaactaaaccaaattcttgctgaccgcacaggtcaa ccacttgaagtactacaacgcgacacagaccgcgacaacttcatgacagcagaaaaagctttagaatacggtttaatc ga taagatctttacaaatcgttaa	154
タンパク質 MNLIPTVIEQTNRGERAYDIYSRLLKDRIIMLGSAIDDNVANSIVSQLLFLE SQDPEKDIHIYINSPGGSITAGMAIYDTMQFIKPQVSTICIGMAASMGAFLL AAGEKGKRYALPNSEAMIHQPLGGAQGQATEIEIAAKRILFLREKLNQILA DRTGQPLEVLQRDTDRDNFMTAEKALEYGLIDKIFTNR.	
CotJC	155

配列	SEQ ID NO:
atgtggatttatgaaaaaaaattacaataccctgttaaagtaggaacttgtaatccagcacttgcaaaattattaattga gcaatacggtggtgcagatggagaattagctgctgcactacgttacttaaatcagcgttatacaatcccggataaagtc a ttggcctccttaccgatattggtacagaagaatttgcgcatcttgaaatgattgctacgatggtttataagctgacaaaa gatgcgactcctgaacagatgaaggcagctggtctcgaccctcattacgtcgatcatgacagcgcacttcattaccata a cgcagctggtgttccatttactgcaacctatatacaagctaaaggtgatccaattgccgacctatacgaagatattgcgg ctgaagaaaaagcgcgtgccacatatcaatggcttatcaaccaatctgacgatcccgacataaatgacagtttacgctt t ttacgcgaacgagaaattgtccattcacaacgtttccgagaagcggttgaaattttaaaagaagaacgcgatagaaaa at atatttttaa00	
タンパク質 MWIYEKKLQYPVKVGTCNPALAKLLIEQYGGADGELAAALRYLNQRYTI PDKVIGLLTDIGTEEFAHLEMIATMVYKLTKDATPEQMKAAGLDPHYVD HDSALHYHNAAGVPFTATYIQAKGDPIADLYEDIAAEEKARATYQWLINQ SDDPDINDSLRFLREREIVHSQRFREAVEILKEERDRKIYF	156
DHAP合成酵素ファミリー	157
atggcaaatcatgaattagatcaattacgtaaacaggtagatgaaattaacttacaactattacacctttaaacaaacg cggtgaaatcgttcaaaaaattggggaacaaaagcaagtacaaggtacaaaacgttttgatccagtacgtgagcgtg aag tgcttgatatgattgcagagaataacgaaggaccattcgaaacatcaacagttcaacatattttcaaaacaatcttcaaa gctagcttagaattacaagaagatgataaccgtaaagcattactagtatcacgtaaaaagaaacaagaaaacacaatc gt tgatgtaaaaggtgaattgattggtaacggcacacaaacgttcatcatgggaccttgcgcggtagaaagcttagagca ag ttcgccaagtagggcaagcgatgaaagaccaaggcttaaaattaatgcgcggtggtgctttcaaaccgagaacatct cca tacgatttccaaggtttaggagtagaagggctacaaattttacgtcaagtagcagatgagttcgacttagcgatcattag tgagattttaaatccaaacgatgttgaaatggcattagactacgttgatgtaattcaagttggtgcacgtaacatgcaaa acttcgatttactacgagctgtaggtaaagttaacaagccagtattattaaaacgtggattagcagcaacaattgatgag ttcattaatgcagcggaatacatcattgcacaaggtaatgaccaaattattctatgtgagcgcggtattcgcacatacga aagagcaacacgtaacacattagacatttcagcagtaccgatcttaaagaaagaaacacatttaccagttgttgttgac g taacgcattcaactggacgtagagatttattattaccaacagcgaaagcggctcttgcaattggtgcagatgcagtaat g gctgaagtacatccagacccagcagttgcattatcagattctgcacaacaaatggatattccggaattccatagattcat ggaagagttaaaaggtttcaaaaataaattatcttaa	158
タンパク質 MANHELDQLRKQVDEINLQLLHLLNKRGEIVQKIGEQKQVQGTKRFDPV RREREVLDMIAENNEGPFETSTVQHIFKTIFKASLELQEDDNRKALLVSRKK KQENTIVDVKGELIGNGTQTFIMGPCAVESLEQVRQVGQAMKDQGLKLM RGGAFKPRTSPYDFQGLGVEGLQILRQVADEFDLAIISEILNPNDVEMALD YVDVIQVGARNMQNFDLLRAVGKVNKPVLLKRGLAATIDEFINAAEYIIA QGNDQIILCERGIRTYERATRNTLDISAVPILKKETHLPVVVDVTHSTGRR DLLLPTAKAALAIGADAVMAEVHPDPAVALSDSAQQMDIPEFHRFMEEL KGFKNKLS.	159
ExsFA atgttctcttctgattgcgaatttactaaaattgattgcgaggcaaaaccagctagtacactacctgccttcggttttgcttt caacgcgtctgcacctcagttcgcttcattatttacaccactactattacctagcgtaagtccaaacccaaatattactgtt cctgtaataaatgatacagtaagtgtcggagatggcattcgaattctacgagctggtatttatcaaatcagttatacattaa caattagtcttgataactcacctgttgcaccagaagctggtcgtttcttcttatcattaggtacaccagctaacattattcct ggatcaggtacagcggttcgttctaacgttattggtactggtgaagtagacgtatccagcggtgttattcttattaacttaa accctggtgacttaatcagaatcgtaccagttgaattgattggaactgtagacatccgtgcagcagcattaacagttgca caaattagctag	159
タンパク質 MFSSDCEFTKIDCEAKPASTLPAFGFAFNASAPQFASLFTPLLLPSVSPNPNI	160

配列	SEQ ID NO:
TVPVINDTVSVGDGIRILRAGIYQISYTLTISLDNSPVAPEAGRFFLSLGTPA NIIPGSGTAVRSNVIGTGEVDVSSGVILINLNPGDLIRIVPVELIGTVDIRAA ALTVAQIS	
ExsFY	161
atgcgatcatctagtcgtaagctcacaaactttaattgtagagcacaagcccccagtacactaccagctctcggttttgc ttttaatgctacttcacctcaatttgcaacactatttacaccactactactacctagtacaggcccaaatccaaacatta ctgtccctgtaatcaatgatacaattagtacaggaactggtattagaattcaagtagctggtatttatcaaatcagttat acattaacaatcagcctcgataatgttccagtaaccccggaagcagcgcgctttttcttaacactaaactcatcaactaa tattattgcaggatctggaaccgcagtccgttctaatatcattggcactggtgaagtagatgtatccagcggtgtcattc taataaacttaaaccctggtgatttaattcaaattgtacccgttgaagtaattggtacagtagatattcgttctgccgct ttaacagttgcacaaattcgttaa	10
タンパク質	162
MRSSSRKLTNFNCRAQAPSTLPALGFAFNATSPQFATLFTPLLLPSTGPNPN ITVPVINDTISTGTGIRIQVAGIYQISYTLTISLDNVPVTPEAARFFLTLNSST NIIAGSGTAVRSNIIGTGEVDVSSGVILINLNPGDLIQIVPVEVIGTVDIRSAA LTVAQIR.	
フルクトース二リン酸	163
gtggaaagaagtttatctatggagttagtacgtgtaacagaggctgcagctttatcatcagcgcgttggatgggacgcg g gaaaaaggatgaggcagacggtgcagcaacatcagctatgcgtgatgtatttgatacaattccgatgaaaggtacagt tg taattggtgaaggtgaaatggatgaagcaccaatgctatatatcggagaaaaattaggtacaggatatggtccacgtgt a gacgttgcagttgatcctttagaagggacaaacattgtagcagctggtggatggaatgctcttgctgttattgcaattgc agatcacggtaatttgttacatgctcctgacatgtacatggataaaatcgcggttggcccagaagcggttggggcggt cg atattgatgcgcctattatcgataacttacgtgcagttgcgaaagcgaaaaacaaggatattgaagatgttgtagcgac a gttttaaaccgtccacgtcatcaagcgattattgaagaaattcgtaaagctggtgctcgtattaaattgattaatgatgg agacgtagcaggtgcaattaatactgcatttgatcgtacaggtgtagatattttattcggatctggtggtgcgcctgagg gtgtattagcagcagttgcattaaaatgtttaggtggcgaaattcacggaaagctattaccacaaaacgaagctgaatt g gcgcgttgcaaaaagatgggcatagaagacatcaaccgcatccttcgcatggaggacttagtaaaaggtgacgatg caat ctttgcagcaacaggtgtaacagacggagaactattacgcggcgttcaatttaaaggtagcgtaggaacaacacaatc tc ttgttatgcgtgcaaaatcaggcacagtacgcttcgtagacggacgtcatagcttaaataaaaaaccgaacttggttatt aaataa	20 30
タンパク質	164
VERSLSMELVRVTEAAALSSARWMGRGKKDEADGAATSAMRDVFDTIP MKGTVVIGEGEMDEAPMLYIGEKLGTGYGPRVDVAVDPLEGTNIVAAGG WNALAVIAIADHGNLLHAPDMYMDKIAVGPEAVGAVDIDAPIIDNLRAV AKAKNKDIEDVVATVLNRPRHQAIIEEIRKAGARIKLINDGDVAGAINTAF DRTGVDILFGSGGAPEGVLAAVALKCLGGEIHGKLLPQNEAELARCKKM GIEDINRILRMEDLVKGDDAIFAATGVTDGELLRGVQFKGSVGTTQSLVM RAKSGTVRFVDGRHSLNKKPNLVIK.	
OMP31b	165
atgtttagcttaaaagggactgttatgaaaaccgcacttcttgcatccgtcgcaatgttgttcacaagctcggctatggc tgccgacatcatcgttgctgaaccggcacccgttgcagtcgacacgttctcttggactggcggctatattggtatcaatg ctggttacgctggcggcaagttcaagcatccgttctcaggcatcgagcaggatggggcccaagatttttcaggttcgc tc gacgtcacggccagcggctttgttggcggcgttcaggccggttataactggcagcttgccaacggcctcgtgcttggt gg cgaagctgacttccagggctcgacggttaagagcaagcttgttgacaacggtgacctctccgatatcggcgttgcag	

配列	SEQ ID NO:
gca acctcagcggcgacgaaagcttcgtcctcgagaccaaggttcagtggtttggaacggtgcgtgcgcgcctcggcttc acc ccgactgaacgcctgatggtctatggtaccggtggtttggcctatggtaaggtcaagacgtcgcttagcgcctatgac ga tggtgaatcgttcagcgccggaaactctaagaccaaggctggctggacgcttggtgcaggtgtagaatacgccgtca cca acaattggaccctgaagtcggaatacctctacaccgacctcggcaagcgttccttcaattacattgatgaagaaaacgt c aatattaacatggaaaacaaggtgaacttccacaccgtccgcctcggtctgaactacaagttctaa	
タンパク質 MFSLKGTVMKTALLASVAMLFTSSAMAADIIVAEPAPVAVDTFSWTGGYI GINAGYAGGKFKHPFSGIEQDGAQDFSGSLDVTASGFVGGVQAGYNWQL ANGLVLGGEADFQGSTVKSKLVDNGDLSDIGVAGNLSGDESFVLETKVQ WFGTVRARLGFTPTERLMVYGTGGLAYGKVKTSLSAYDDGESFSAGNSK TKAGWTLGAGVEYAVTNNWTLKSEYLYTDLGKRSFNYIDEENVNINME NKVNFHTVRLGLNYKF.	166
新規のSLHアミダーゼ	167
gtcgttcttggtttaccagttgatccaaaagcaaagccatcatttaaagatgcacaaaaccattgggcagctccgtacat tgctgcagtggaaaaagcaggtgtaattaatggggatggtactggtaaattcaatccatcaagccaaattaaccgtgca t ctatggcatctatgttagtacaagcatactcattagataagaaaattattggagaacttccaacacagtttaaagatttg gaacctcattggggtaagaaacaagctaatattttagtagctttagagatttctaaaggtacgggaaatggctggaatcc tgaaggaactgtaactcgtgcagaagcagctcagtttattgcgatggctgatcaaaataaaacaagtacatcaaaaag aa tgtatatgaacagaaacgttattacatatcatcaaccatcattatcctctggtattactgatgttcaacataagccacaa atggttgaagtgacagagcaaagagcagacggctggttgaaaattgtaacaagtaaaggtgagaagtggacacctct aac agaaaaaacagaaacgattaatgaagaatttactacttatgaaacagcttcacatagttctaaagtgctaggtacatata atgcacaaacagtaacggttatggaagagagtggtagctggattcgtatccgcgtaggcgctggtttccagtgggttg at aaaaatcaattaaatccagtaaaacaagagaacttttagaaggtaaagcaattattattgatccaggtcatggtggaat tgactcaggtaatgttggttattacgagaaagaaagtgaaactgtattagatgtatcattacgattaaagaaaatatttg agcaaaaagcaccatttactgttatgttcactcgtacagataatacacgtccaggagtaaactcaacagattcattgaaa aaacgagtagagtttgctcaggaacataatggagatatctttgtaagtatccatgctaatggttctgcagagaaaaatgg acaaggtacagaaacattatattatcagtcagcaagagcaaaagtaacgaatccgcatgtagaagacagtaagttatta g cacaaaaaattcaagaccgtcttgtagcagcacttggaacaaaagatcgtggtgtgaaacatcaggacttatacgttac t agagaaaatacaatgccagctgtattaacagaattagcatttgtagataataaaagtgatgcagataaaattgctacacc aaaacagagacaagctgcagcagaagcgatttatcaaggtattttagattattacgaagcaaagggtaataacgtatct t ctttccgttaa	
タンパク質 VVLGLPVDPKAKPSFKDAQNHWAAPYIAAVEKAGVINGDGTGKFNPSSQI NRASMASMLVQAYSLDKKIIGELPTQFKDLEPHWGKKQANILVALEISKG TGNGWNPEGTVTRAEAAQFIAMADQNKTSTSKRMYMNRNVITYHQPSLS SGITDVQHKPQMVEVTEQRADGWLKIVTSKGEKWTPLTEKTETINEEFTT YETASHSSKVLGTYNAQTVTVMEESGSWIRIRVGAGFQWVDKNQLNPVK QENFLEGKAIIIDPGHGGIDSGNVGYYEKESETVLDVSLRLLKKIFEQKAPFT VMFTRTDNTRPGVNSTDSLKKRVEFAQEHNGDIFVSIHANGSAEKNGQGT ETLYYQSARAKVTNPHVEDSKLLAQKIQDRLVAALGTKDRGVKHQDLY VTRENTMPAVLTELAFVDNKSDADKIATPKQRQAAAEAIYQGILDYYEA KGNNVSSFR	168
新規のSLHタンパク質	169

配列 SEQ ID NO:

atgaagaagaacatgttacgtataatggcaacggtaactattatgggcggcttgtttgtaagtacgaatgttccaaacgt
aaaagcagaagaatatccagaaatgattgtatttgatgatgttccagtaaaccactgggcatatgacgatataatggac
g
tagtatacaataaagtaatgttaggctatggaaatggtaagtttggtgtaggagataatgtaacacgagaacaagtagct
gcagtactctatcgtacattgaatttgaaaaaagaaggacctttaaaaaatccatacaaagatatttcagagagggctac
attctttttagatgaaattttagtattaacaaagcatggtatttttgaaggcgatgaaaaaggaaattttagaccagccg
caccagtaacacgtgcagaaacggcgcaaattcttacgaaggcatttacatttgaagtgaagaagaaccatacatttaa
a
gatgtaccaaataatcattgggcaaaaaatgcgattagtgcactgcagtctaatcatgtcatagtaggaacagggaatg
g
gaaatttgaaccgaataaagttgtaacacgtgagcaatatgcaacgtttttaaataaagctgtttttttatttccagtaa
aagatgagaattatgaatga

10

タンパク質 170

MKKNMLRIMATVTIMGGLFVSTNVPNVKAEEYPEMIVFDDVPVNHWAY
DDIMDVVYNKVMLGYGNGKFGVGDNVTREQVAAVLYRTLNLKKEGPL
KNPYKDISERATFFLDEILVLTKHGIFEGDEKGNFRPAAPVTRAETAQILTK
AFTFEVKKNHTFKDVPNNHWAKNAISALQSNHVIVGTGNGKFEPNKVVT
REQYATFLNKAVFYFPVKDENYE.

メチルクエン酸脱水酵素 171

atgattaaaacaaatgaaattaaacaaaaagatgcaatattagaagagattacggattatgtattaaataaagaggtaac
aagtgcagaagcattcagtactgctcgttacgtattatttgatacacttggatgcggaattttagcattacaatatccag
agtgtacgaaattattaggaccagttgtaccaggaacaatcgtgccaaatggaacacgagtgccaggtacgtcttatgt
a
ttagatccagtgaaaggtgcatttaatatcggatgtatgatccgttggttagactataacgatacttggcttgcagcaga
atggggacatccatctgataaccttggcggcattttagcagttgcagattatattagccgtgttcgtatatcagaaggaa
aagaaccgttaaaagtacgtgaagtattagaaatgatgattaaagcacatgaaattcaaggtgtattagctttagaaaac
agcttaaaccgggttggtcttgaccacgtattatacgtaaaagtagcaacaactgctgtagttgcgaaaatgcttggcg
g
aacacgtgaagaaatctttaatgcattatcacatgcatggattgataattctagtcttcgtacatatcgtcacgctccaa
atactggatcacgtaaatcatgggcagcaggtgatgcaacaagtcgcggtgttcaccttgcaatgactgctttaaaag
gt
gaaatgggttatccaacagcattatctgcaccgggttggggattccaagatgtattatttaataaacaagaattaaagtt
agctagaccattagagtcttatgtaatggaaaatgtattatttaaagtttcatatccagcagaattccatgcacaaacag
ctgcagaatgtgctgtaaaattacatccggaaattaaagaaagattagatgaaattgaccgtattacaattacaactcat
gaatcagcaattcgtattattgataaagaaggtccattaaataacccagctgatcgtgatcattgtttacaatatattac
ggcaattggtttattaaagggagatatcgttgcggatgattatgaggatgcagtagcaaatgatccacgtgtagatgaat
tacgtaataagatggttgttgttgaaaacaaacagtacagtttagattaccttgacccgaacaagcgctcaatcgccaac
gctgttcaagttcatttcaaggatggaactgtaacagaaaacgtggaatgtgaatatccacttggtcaccgtttccgtag
agacgaagcaattccaaaagttgttcaaaaattcactgcaagtatggcaggtcattattctagtaaacagcaagaacaa
a
ttcatgaagtttgtttaaatgaagagaaactagaaaatatgaatgtaaacgaatttgtagatctattcttaatttaa

タンパク質 172

MIKTNEIKQKDAILEEITDYVLNKEVTSAEAFSTARYVLFDTLGCGILALQ
YPECTKLLGPVVPGTIVPNGTRVPGTSYVLDPVKGAFNIGCMIRWLDYND
TWLAAEWGHPSDNLGGILAVADYISRVRISEGKEPLKVREVLEMMIKAHE
IQGVLALENSLNRVGLDHVLYVKVATTAVVAKMLGGTREEIFNALSHAW
IDNSSLRTYRHAPNTGSRKSWAAGDATSRGVHLAMTALKGEMGYPTALS
APGWGFQDVLFNKQELKLARPLESYVMENVLFKVSYPAEFHAQTAAECA
VKLHPEIKERLDEIDRITITTHESAIRIIDKEGPLNNPADRDHCLQYITAIGLL
KGDIVADDYEDAVANDPRVDELRNKMVVVENKQYSLDYLDPNKRSIAN
AVQVHFKDGTVTENVECEYPLGHRFRRDEAIPKVVQKFTASMAGHYSSK
QQEQIHEVCLNEEKLENMNVNEFVDLFLI.

ペプチジルプロリルイソメラーゼ 173

配列	SEQ ID NO:
atggctgcaaaatgggaaaaattagaaggtaacgtaggcgttttaacaatcgaagttgatgctaaagaagtaaacaac tc tatcgacgctgcgttcaaaaaagtagtaaaaacaatcaacgtaccaggtttccgtaaaggaaaaatgcctcgtccgtta t tcgaacaacgctttggtatcgaatctttataccaagatgctttagatatcatcttaccaaaagcatacggtgaagcgatc gatgaagctggtatcttcccagttgctcatcctgaaatcgacatcgagaagttcgaaaaaaatgctaaccttatcttcac tgcaaaagttacagtgaaacctgaagttaaattaggtgagtacaaaggtttagcagtagaaaaagttgaaacaactgta a ctgacgaagatgtagagaacgaattaaaatctttacaagagcgtcaagctgaactagttgttaaagaagaaggaactg tt gaaaacggtgatacagctgtaatcgacttcgaaggtttcgttgatggcgaagcatttgaaggcggaaaaggcgaaaa cta ctctctagcaatcggttctggtacattcatcccaggtttcgaagagcaagtaattggtcttaaatctggtgagtctaaag acgttgaagtatcattcccagaagagtaccatgctgctgaattagctggcaaaccagcaacattcaaagtaacagttca c gaaatcaaaacaaaagaacttcctgagttaaacgacgagttcgctaaagaagctgacgaagcggttgcaactcttgat ga attaaaagcaaaacttcgcacaaacttagaagaaggcaaaaagcacgaagctgagcacaaagtacgtgatgaagta gtag aattagctgctgctaacgctgaaatcgacattccagaagctatgatcgacactgagttagatcgtatggttcgtgaattc gagcaacgtttaagccaacaaggtatgaaccttgagctttactaccaattcacaggtactgatgctgacaagttaaaag a gcaaatgaaagaagacgctcaaaaacgcgtaagaatcaaccttgttcttgaagctatcattgaagctgaaaacatcga ag ttactgaagaagaagtaactgcagaagttgaaaaaatggctgaaatgtacggtatgccagtagacgctatcaagcaa gct cttggaagcgtagacgctttagctgaagatcttaaagttcgtaaagctgtagacttcttagtagaaaacgctgcataa	
タンパク質 MAAKWEKLEGNVGVLTIEVDAKEVNNSIDAAFKKVVKTINVPGFRKGK MPRPLFEQRFGIESLYQDALDIILPKAYGEAIDEAGIFPVAHPEIDIEKFEKN ANLIFTAKVTVKPEVKLGEYKGLAVEKVETTVTDEDVENELKSLQERQAE LVVKEEGTVENGDTAVIDFEGFVDGEAFEGGKGENYSLAIGSGTFIPGFEE QVIGLKSGESKDVEVSFPEEYHAAELAGKPATFKVTVHEIKTKELPELNDE FAKEADEAVATLDELKAKLRTNLEEGKKHEAEHKVRDEVVELAAANAEI DIPEAMIDTELDRMVREFEQRLSQQGMNLELYYQFTGTDADKLKEQMKE DAQKRVRINLVLEAIIEAENIEVTEEEVTAEVEKMAEMYGMPVDAIKQAL GSVDALAEDLKVRKAVDFLVENAA.	174
pX01-130	175
atgaaaattgcatttacaaagatggtaggtatattaactattagttcaatgttagtgttagtaggctgtcagacttcagg ttcatctaaaaagcaagagcaaacatctgaaagtcatacacacgaaaatgaacacgatcacagtcatgatcatagtcat g ctcatgatgaatcaacagaaaaaatttatgaagggtatttcgaagacaaccaagtgaaggatcgatcactctccgattg g aaaggagactggcaatcggtatatccatatttacaagatggaacgcttgatgaggtatttgcttacaaagcgaaacata a aggtaaaatgtcagccaaagaatataaggagtattataatgaaggatatcaaacagatgtcaaccgtatcgtgattcaa g gagatactgtaacattctacaaaaacaaagaagaatattctggtaaatatatctatgatgggtacaaaattttgacatat gatgcagggaatagaggtgtaagatacatatttaaactagcagaaaaaacagaaggagttcctcagtatattcaattta g tgatcatggtatttatccgaataaagctaatcactaccacttgtattggggtgacaatcgtgaagctttattcgatgaag tcatacactggcctacctactacccatcggatatgaatggacatgatattgcgcacgagatgatggcgcattaa	
タンパク質 MKIAFTKMVGILTISSMLVLVGCQTSGSSKKQEQTSESHTHENEHDHSHD HSHAHDESTEKIYEGYFEDNQVKDRSLSDWKGDWQSVYPYLQDGTLDE VFAYKAKHKGKMSAKEYKEYYNEGYQTDVNRIVIQGDTVTFYKNKEEY	176

配列	SEQ ID NO:
SGKYIYDGYKILTYDAGNRGVRYIFKLAEKTEGVPQYIQFSDHGIYPNKA NHYHLYWGDNREALFDEVIHWPTYYPSDMNGHDIAHEMMAH.	
ピロリン脱水素酵素	177
atggtagtagcatacaaacatgagccatttacagatttttcagtagaggctaacaaattagcgtttgaagaaggtttaaa gaaagtagaatcttatcttggacaagactatccattaattattgggggagaaaaaatcactacagaagacaaaattgttt ctgtaaaccctgcaaataaagaggaacttgttggtcgcgtttcaaaagcaagccgtgagttagctgaaaaagcaatgc aa	
gtagcggatgaaacattccaaacttggagaaagtcaaaaccagaaatgcgtgcagacattttattccgtgctgcagcg at	
cgttcgtcgtagaaaacatgaattctctgctattcttgtaaaagaagcaggtaaaccgtggaatgaggcagatgctgat a	10
cagcagaagcaatcgactttatggaatattatggtcgccaaatgttgaaattaaaagacggaattccagtagaaagcc gt	
ccaattgaatataatcgtttctcttacattccattaggagtaggtgttatcatttctccttggaacttcccattcgcaat	
tatggcaggtatgacaacagctgctttagtttctggtaacacagtattactaaaaccagctagtacaactcctgtagtag	
cagcgaaattcatggaagtattagaagaagctggcttaccagctggcgtagtaaacttcgtaccaggtaatggttctga a	
gttggtgactacttagtagatcaccctcgtacacgcttcattagcttcactggatctcgtgatgtaggtatccgtattta	
tgagcgcgcagcgaaagtaaacccaggccaaatctggttaaaacgcgttatcgctgaaatgggtggtaaagatacaa ttg	
ttgttgataaagaagcagatcttgaattagcagctaaatctatcgttgcatcagcattcggattctcaggacaaaaatgt	
tctgcatgttctcgtgcagtaatccacgaagatgtatacgatcacgtattaaatcgtgctgttgaattaacgaaagaatt	
aacagttgctaacccagctgtattaggtacaaacatgggtcctgttaatgaccaagctgcattcgataaagtaatgagct	20
atgttgcaattggtaaagaagaaggtagaattttagcaggtggcgaaggagacgactctaaaggctggttcatccaac ca	
acaatcgttgctgacgttgcagaagatgctcgcctaatgaaagaagaaatcttcggaccagtagtagcattctgtaaag c	
aaaagactttgatcatgcacttgcaattgcaaacaatacagaatacggtttaacaggagcagttatctctaacaaccgtg	
atcatattgaaaaagcacgtgaagacttccacgtaggtaacttatacttcaaccgtggatgtactggtgcaatcgtagga	
taccaaccattcggtggctttaacatgtctggtacagactctaaagctggtggtcctgactacttagcgcttcacatgca	
agcaaaaactacttctgaaactttataa	
タンパク質	178
MVVAYKHEPFTDFSVEANKLAFEEGLKKVESYLGQDYPLIIGGEKITTED KIVSVNPANKEELVGRVSKASRELAEKAMQVADETFQTWRKSKPEMRAD ILFRAAAIVRRRKHEFSAILVKEAGKPWNEADADTAEAIDFMEYYGRQML KLKDGIPVESRPIEYNRFSYIPLGVGVIISPWNFPFAIMAGMTTAALVSGNT VLLKPASTTPVVAAKFMEVLEEAGLPAGVVNFVPGNGSEVGDYLVDHPR TRFISFTGSRDVGIRIYERAAKVNPGQIWLKRVIAEMGGKDTIVVDKEADL ELAAKSIVASAFGFSGQKCSACSRAVIHEDVYDHVLNRAVELTKELTVAN PAVLGTNMGPVNDQAAFDKVMSYVAIGKEEGRILAGGEGDDSKGWFIQP TIVADVAEDARLMKEEIFGPVVAFCKAKDFDHALAIANNTEYGLTGAVIS NNRDHIEKAREDFHVGNLYFNRGCTGAIVGYQPFGGFNMSGTDSKAGGP DYLALHMQAKTTSETL.	
SAP	179
atggcaaagactaactcttacaaaaaagtaatcgctggtacaatgacagcagcaatggtagcaggtgttgtttctccag t	
agcagcagcaggtaaaacattcccagacgttcctgctgatcactggggaattgattctattaactacttagtagaaaaa g	
gcgcagttaaaggtaacgacaaaggaatgttcgagcctggaaaagaattaactcgtgcagaagcagctacaatgatg gct	40
caaatcttaaacttaccaatcgataaagatgctaaaccatctttcgctgactctcaaggccaatggtacactccattcat	
cgcagctgtagaaaaagctggcgttattaaaggtacaggaaacggctttgagccaaacggaaaaatcgaccgcgttt cta	
tggcatctcttcttgtagaagcttacaaattagatactaaagtaaacggtactccagcaactaaattcaaagatttagaa	
acattaaactggggtaaagaaaaagctaacatcttagttgaattaggaatctctgttggtactggtgatcaatgggagcc	
taagaaaactgtaactaaagcagaagctgctcaattcattgctaagactgacaagcagttcggtacagaagcagcaaa	

配列 SEQ ID NO:

ag
ttgaatctgcaaaagctgttacaactcaaaaagtagaagttaaattcagcaaagctgttgaaaaattaactaaagaagat
atcaaagtaactaacaaagctaacaacgataaagtactagttaaagaggtaactttatcagaagataaaaaatctgcta
c
agttgaattatatagtaacttagcagctaaacaaacttacactgtagatgtaaacaaagttggtaaaacagaagtagctg
taggttctttagaagcaaaaacaatcgaaatggctgaccaaacagttgtagctgatgagccaacagcattacaattcac
a
gttaaagatgaaaacggtactgaagttgtttcaccagagggtattgaatttgtaacgccagctgcagaaaaaattaatg
c
aaaaggtgaaatcactttagcaaaaggtacttcaactactgtaaaagctgtttataaaaaagacggtaaagtagtagct
g
aaagtaaagaagtaaaagtttctgctgaaggtgctgcagtagcttcaatctctaactggacagttgcagaacaaaataa
a
gctgactttacttctaaagatttcaaacaaaacaataaagtttacgaaggcgacaacgcttacgttcaagtagaattgaa
agatcaatttaacgcagtaacaactggaaaagttgaatatgagtcgttaaacacagaagttgctgtagtagataaagct
a
ctggtaaagtaactgtattatctgcaggaaaagcaccagtaaaagtaactgtaaaagattcaaaaggtaaagaacttgt
t
tcaaaaacagttgaaattgaagctttcgctcaaaaagcaatgaaagaaattaaattagaaaaaactaacgtagcgctttc
tacaaaagatgtaacagatttaaaagtaaaagctccagtactagatcaatacggtaaagagtttacagctcctgtaaca
g
tgaaagtacttgataaagatggtaaagaattaaaagaacaaaaattagaagctaaatatgtgaacaaagaattagttctg
aatgcagcaggtcaagaagctggtaattatacagttgtattaactgcaaaatctggtgaaaaagaagcaaaagctacat
t
agctctagaattaaaagctccaggtgcattctctaaatttgaagttcgtggtttagaaaaagaattagataaatatgtta
ctgaggaaaaccaaaagaatgcaatgactgtttcagttcttcctgtagatgcaaatggattagtattaaaaggtgcagaa
gcagctgaactaaaagtaacaacaacaaacaaagaaggtaaagaagtagacgcaactgatgcacaagttactgtac
aaaa
taacagtgtaattactgttggtcaaggtgcaaaagctggtgaaacttataaagtaacagttgtactagatggtaaattaa
tcacaactcattcattcaaagttgttgatacagcaccaactgctaaaggattagcagtagaatttacaagcacatctctt
aaagaagtagctccaaatgctgatttaaaagctgcacttttaaatatcttatctgttgatggtgtacctgcgactacagc
aaaagcaacagtttctaatgtagaatttgtttctgctgacacaaatgttgtagctgaaaatggtacagttggtgcaaaag
gtgcaacatctatctatgtgaaaaacctgacagttgtaaaagatggaaaagagcaaaaagtagaatttgataaagctgt
a
caagttgcagtttctattaaagaagcaaaacctgcaacaaaataa

タンパク質 180

MAKTNSYKKVIAGTMTAAMVAGVVSPVAAAGKTFPDVPADHWGIDSIN
YLVEKGAVKGNDKGMFEPGKELTRAEAATMMAQILNLPIDKDAKPSFAD
SQGQWYTPFIAAVEKAGVIKGTGNGFEPNGKIDRVSMASLLVEAYKLDT
KVNGTPATKFKDLETLNWGKEKANILVELGISVGTGDQWEPKKTVTKAE
AAQFIAKTDKQFGTEAAKVESAKAVTTQKVEVKFSKAVEKLTKEDIKVT
NKANNDKVLVKEVTLSEDKKSATVELYSNLAAKQTYTVDVNKVGKTEV
AVGSLEAKTIEMADQTVVADEPTALQFTVKDENGTEVVSPEGIEFVTPAA
EKINAKGEITLAKGTSTTVKAVYKKDGKVVAESKEVKVSAEGAAVASISN
WTVAEQNKADFTSKDFKQNNKVYEGDNAYVQVELKDQFNAVTTGKVE
YESLNTEVAVVDKATGKVTVLSAGKAPVKVTVKDSKGKELVSKTVEIEA
FAQKAMKEIKLEKTNVALSTKDVTDLKVKAPVLDQYGKEFTAPVTVKVL
DKDGKELKEQKLEAKYVNKELVLNAAGQEAGNYTVVLTAKSGEKEAKA
TLALELKAPGAFSKFEVRGLEKELDKYVTEENQKNAMTVSVLPVDANGL
VLKGAEAAELKVTTTNKEGKEVDATDAQVTVQNNSVITVGQGAKAGET
YKVTVVLDGKLITTHSFKVVDTAPTAKGLAVEFTSTSLKEVAPNADLKAA
LLNILSVDGVPATTAKATVSNVEFVSADTNVVAENGTVGAKGATSIYVK
NLTVVKDGKEQKVEFDKAVQVAVSIKEAKPATK

第5段階胞子タンパク質（stage V spore protein） 181

atgaaagcaactggaatcgtacgtcgaattgatgatttaggtagggtagtaatcccaaaggaaattcgtagaactttac
g
tattcgagaaggggacccattagaaatatttgttgatcgcgatggagaagtaattttaaagaaatattctccaattagcg

配列	SEQ ID NO:
aactaggtgattttgcaaaagaatatgcagaggctttatatgatagcttaggacataatgtgcttgtatgcgatcgagat tctattatcgcagtatcaggcgtatcaaaaaaagaatacttaaataaaagcgttggcgatttaattgaaaaaacgatgga agaaagaaagtctgttattatgacggacgaaagtgatgtttccattattgatggtgtaacagaaaaggttcattcttata cagttggaccgattgttgcaaatggagacccaattggggctgtcattatttttttcaaaagaagcgattataagcgaaata gagcacaaagcggtcaatactgctgccagtttcttagcgaaacaaatggaacagtaa	
タンパク質 MKATGIVRRIDDLGRVVIPKEIRRTLRIREGDPLEIFVDRDGEVILKKYSPIS ELGDFAKEYAEALYDSLGHNVLVCDRDSIIAVSGVSKKEYLNKSVGDLIE KTMEERKSVIMTDESDVSIIDGVTEKVHSYTVGPIVANGDPIGAVIIFSKEA IISEIEHKAVNTAASFLAKQMEQ	182
サーモライシンメタロペプチダーゼα	183
atgaaaaagaaaagtttagcgttagtgttagcgacaggaatggcagttacaacgtttggagggacaggctctgcttttg c agattctaaaaatgtgctctctacgaagaagtacaatgagacagtacagtcaccggagtttatttctggggatttaactg aagcaactggtaagaaagcagaatctgttgtgtttgattacttaaatgcagcaaaaggtgattataagttaggggaaaa g agtgcgcaagattctttcaaagtgaaacaagcgaagaaagatgctgtaactgattcaacagtattacgtttgcaacaag t ttacgaaggagtacctgtatgggttctacgcaagtagctcacgtaagtaaagatggttcattaaaagtattgtctggaa cagttgcacctgatttagacaaaaaagaaaagttgaaaaataaaaataagatcgaaggcgcaaaagcaattgaaattg cg caaaaagatttaggtgttacacctaaatatgaggtagaaccaaaagcggacttatatgtatatcaaaatggtgaagaaa c aacatatgcatacgttgtaaatttaaacttcttagagccaagcccaggaaactactactatttcattgaagcggacagcg gtaaagtattaaataaatataataaattggatcatgtagcaaatgaagataagtcaccagttaagcaagaggcacctaa a caagaagcgaaaccggctgtaaagcctgtaacaggcacaaatgcagtgggtactggtaaaggtgtattaggagata cgaa gtcacttaatacaacgttatctgcatcatcttactatttacaagataatacgcgcggagcaacgattttcacatatgatg cgaaaaaccgctcaacattaccaggaacgttatgggtagatgcggataatgttttcaatgcagcgtatgatgcagcgg ca gtagatgctcactactatgctggtagaacatatgattactataaagcgacatttaatagaaactctattaatgatgcagg agcaccattaaaatcaacagttcattatggaagtagatataataatgcgttctggaatggctctcaaatggtatacggag atggtgatggtgtaacattcacttcattgtctggtggaattgatgtaattggccatgaattaacgcatgctgttacagag tatagctcagatttaatttatcaaaatgaatcaggagcattaaatgaagctatttcagatgtatttggtacattagtaga gtattatgataaccgtaaccctgattgggaaattggtgaagatatttacacgcctggtaaagctggagatgcacttcgct ctatgagtgatccaacgaaatatggtgatccagatcattattctaagcgttacacaggtactggtgataacggtggcgtt catacaaatagcggtattattaacaaagcggcttacttactagcgaatggtggtacgcattacggtgttactgtaaacgg tattggtaaagataaagtaggagcgatttattaccgtgcaaatacgcaatatttcacacaatctactacgtttagtcaag ctcgtgctggattagtacaagctgcagctgacttatatggtgctagctctgcagaagtagcagcagttaagcaatcatat agtgctgttggcgtaaactaa	184
タンパク質 MKKKSLALVLATGMAVTTFGGTGSAFADSKNVLSTKKYNETVQSPEFISG DLTEATGKKAESVVFDYLNAAKGDYKLGEKSAQDSFKVKQAKKDAVTD STVLRLQQVYEGVPVWGSTQVAHVSKDGSLKVLSGTVAPDLDKKEKLK NKNKIEGAKAIEIAQKDLGVTPKYEVEPKADLYVYQNGEETTYAYVVNL NFLEPSPGNYYYFIEADSGKVLNKYNKLDHVANEDKSPVKQEAPKQEAK PAVKPVTGTNAVGTGKGVLGDTKSLNTTLSASSYYLQDNTRGATIFTYDA KNRSTLPGTLWVDADNVFNAAYDAAAVDAHYYAGRTYDYYKATFNRN SINDAGAPLKSTVHYGSRYNNAFWNGSQMVYGDGDGVTFTSLSGGIDVI GHELTHAVTEYSSDLIYQNESGALNEAISDVFGTLVEYYDNRNPDWEIGE DIYTPGKAGDALRSMSDPTKYGDPDHYSKRYTGTGDNGGVHTNSGIINK AAYLLANGGTHYGVTVNGIGKDKVGAIYYRANTQYFTQSTTFSQARAGL VQAAADLYGASSAEVAAVKQSYSAVGVN	185
2オキソ酸脱水素酵素アセリトランスフェラーゼ(acelytransferase)	
gtggcatttgaatttaaactaccagatatcggtgaaggtatccacgaaggtgaaatcgtaaaatggtttattaaaccagg	

配列	SEQ ID NO:
cgacgaagtaaacgaagacgacgtacttcttgaagtacaaaatgataaagcagtagtagaaattccttctcctgttaaa g gtaaagtacttgaagtacttgtagaagaaggtacggttgcagtagttggagatacattaattaaatttgatgctccagga tacgaaaaccttaaatttaaaggcgacgatcatgacgaagctcctaaagctgaagctactccagcagcaactgcaga agt agtaaatgagcgcgtaatcgctatgccatctgttcgtaaatatgctcgtgaaaacggcgtagacattcataaagtagct g gttctggtaagaacggtcgtatcgtaaaagctgacatcgatgcatttgcaaatggtggacaagcagtagcagcaactg ag gctccagcagcagtagaagctactccagcagcagcgaaagaagaagcaccaaaagcacaaccaatcccagctggt gaata	10
tccagaaactcgtgagaaaatgagtggtatccgtaaagcaattgcgaaagcaatggttaactctaaacatacagctcct c acgtaacattaatggatgaagtagatgtaactgaacttgttgctcaccgtaagaagttcaaagctgtggcagctgacaa a ggtattaaattaacttaccttccatacgttgttaaagctttaacatctgcattacgtgaatacccaatgttaaacacttc tttagatgatgcttctcaagaagtagttcataaacattacttcaacatcggtatcgcagctgatacagacaaaggtctat tagtaccagttgttaaagatacagatcgcaagtctatcttcacaatttctaacgagatcaatgatcttgctggtaaagca cgtgaaggtcgtttagctcctgctgaaatgaaaggcgcttcttgcacaattacaaacattggttctgcaggtggacaatg gttcactccagttatcaaccacccagaagtagcaatccttggtatcggccgtatcgctgagaaaccagttgtgaaaaac g gtgagatcgttgcagctccagtattagcattatctctaagctttgaccatcgtttaattgacggcgcaactgctcaaaaa gcattaaaccaaattaaacgtctattgaatgacccacaattattagtaatggaggcgtaa	
タンパク質 VAFEFKLPDIGEGIHEGEIVKWFIKPGDEVNEDDVLLEVQNDKAVVEIPSP VKGKVLEVLVEEGTVAVVGDTLIKFDAPGYENLKFKGDDHDEAPKAEAT PAATAEVVNERVIAMPSVRKYARENGVDIHKVAGSGKNGRIVKADIDAF ANGGQAVAATEAPAAVEATPAAAKEEAPKAQPIPAGEYPETREKMSGIR KAIAKAMVNSKHTAPHVTLMDEVDVTELVAHRKKFKAVAADKGIKLTY LPYVVKALTSALREYPMLNTSLDDASQEVVHKHYFNIGIAADTDKGLLVP VVKDTDRKSIFTISNEINDLAGKAREGRLAPAEMKGASCTITNIGSAGGQW FTPVINHPEVAILGIGRIAEKPVVKNGEIVAAPVLALSLSFDHRLIDGATAQ KALNQIKRLLNDPQLLVMEA	186
5-メチルテトラヒドロプテロイルトリグルタミン酸 -ホモシステインメチルトランスフェラーゼ	187
atggcaattcaaacaagtaacttaggttatccacgtatcggattacaacgagagtggaaaaaaacattggaagctttttg gtccaataaaatcaatgaagaacaatttttaacaacaatgaaagaaattcgccttcaacacgtaaaagtacagcaagaa a aagggattgaactcattccaattggcgactttacatattacgatcacgttttggatactgcttatatgctaggatttatc ccatcacgtttttctgagtttacatcttacctagatgtatattttgcaatggcgcgtggctctaaagatcacgtagcttc cgaaatgacaaaatggtttaacacaaactatcattatatcgttcctgaatatgaagagggattacaaatctctttaaaag ataatcgtccacttcgcttatacgaagaggcaaaacaagaattgggtgtagatggaaaacctgttattttaggaccatat actttcttgaaattagctaaaggctatacacaagagcaatttgctactattttaaaacagttagttgcaccttacgtaca actgctttcagaactacatgcagctggtgcacaaatcattcmagttgatgaaccgattttcgcttctttaacgaaagaag aagttcaacaagcaaaagaaatttatgaagctattcgtaaagaggttccaaatgcgactcttcttttacaaacatacttt gatagtgtagaagaaaactatgaagaaattattacattcccagtatcaagtattggattagatttcgttcatggtaaaga aggtaatttaaatgctatttcaaaatatggattcccagctgataaaactttagctgttggttgtatagatggccgtaaca tttggagagctgaccttgatgaagttcttacgttatttacaacgttacaaaaacaagtccaaacgaaagatctcatcgtt caaccttcttgtagcttattgcatacaccaatcgataaaacagaagaaactcacttatcaactgagctatttgatgcgtt ggcatttgcaaatcaaaaattagaagagttagttcttattcattccgctctgactcaaggtacagaaagcattagtaatg aactggaaacatatcgaaacgtacatcatacaattcgttcatctgctgcacgtaaccgagaagatgtcaaagcagcac ga acagcactaaaagaagaagatttttcacgtcctcttccatttgaaaaacgatacgaattacaacaagttgccctaaagtt accgttgttaccaacaacgactatcggtagcttccctcaaacaactgaagttcgccaaacgcgaaaagaatggcgtaa tg gtattatttcaaatgaacaatatgaacaatttattgaaaaagagacagaaaaatggattcgttaccaagaagaaattggt cttgatgttcttgttcatggcgagtttgaaagaactgacatggtcgaatattttggtgagcgccttgctggcttctcatt cactaaaaacggttgggtacaatcatacggttctcgttgcgtaaaaccacctgttatttatggtgatgtagcctttatta	

10 20 30 40

配列	SEQ ID NO:
acggcatgactattaaggaaacggtttatgcacaaagcttaacagagaaagttgtaaaaggaatgttaactggacctgt t acgattttaaattggtccttcgttcgaaatgacattccaagaaaagaagtttcgtatcaaattgcattagctcttcgtca tgaaattgaactacttgaatcttctggaattcgagtgatccaagtcgatgagccagcacttcgtgaaggaatgccactg a aagaaaaagattgggacgcttatattacatgggcagtacaatccttccttttagcaacttcttctgtagcaaatgaaaca caaattcatacgcatatgtgttacagtaacttcgaagatattgttgacgcgattcgcgcattagatgcagatgtgatttc tatcgaaacatcaagaagtcacggagaatttattgatacattaaaacatacaacatacgaaaagggcatcggtctaggt g tatatgatattcatagcccacgtgtaccaagtaaagatgaaatgtataaaatcgtagaacaatctttacaagtatgcgat cctaaatatttctggattaatcctgattgtggtttaaaaacgcgaagaacagaagaagttattccagctctagaacatat ggtgcaagcagcaaaagatgctcgttccctactaaaaacaaacgcataa	
タンパク質 MAIQTSNLGYPRIGLQREWKKTLEAFWSNKINEEQFLTTMKEIRLQHVKV QQEKGIELIPIGDFTYYDHVLDTAYMLGFIPSRFSEFTSYLDVYFAMARGS KDHVASEMTKWFNTNYHYIVPEYEEGLQISLKDNRPLRLYEEAKQELGV DGKPVILGPYTFLKLAKGYTQEQFATILKQLVAPYVQLLSELHAAGAQIIX VDEPIFASLTKEEVQQAKEIYEAIRKEVPNATLLLQTYFDSVEENYEEIITFP VSSIGLDFVHGKEGNLNAISKYGFPADKTLAVGCIDGRNIWRADLDEVLT LFTTLQKQVQTKDLIVQPSCSLLHTPIDKTEETHLSTELFDALAFANQKLEE LVLIHSALTQGTESISNELETYRNVHHTIRSSAARNREDVKAARTALKEED FSRPLPFEKRYELQQVALKLPLLPTTTIGSFPQTTEVRQTRKEWRNGIISNE QYEQFIEKETEKWIRYQEEIGLDVLVHGEFERTDMVEYFGERLAGFSFTK NGWVQSYGSRCVKPPVIYGDVAFINGMTIKETVYAQSLTEKVVKGMLTG PVTILNWSFVRNDIPRKEVSYQIALALRHEIELLESSGIRVIQVDEPALREG MPLKEKDWDAYITWAVQSFLLATSSVANETQIHTHMCYSNFEDIVDAIRA LDADVISIETSRSHGEFIDTLKHTTYEKGIGLGVYDIHSPRVPSKDEMYKIV EQSLQVCDPKYFWINPDCGLKTRRTEEVIPALEHMVQAAKDARSLLKTN A.	188
ピルビン酸脱水素酵素複合体E3成分, ジヒドロリポアミド脱水素酵素	189
atggtagtaggagatttcccaattgaattagatacagtcgttgttggtgcaggtcctggtggatacgttgcggcaattcg tgcagcacaattaggtcaaaaggtagcaattattgaaaaagctaaccttggtggcgtatgcttaaacgttggatgtattc cttcaaaagcgttaatcaatgcaggtcatcgttatgagaatgcaatgcattctgatgacatgggtatcactgcagagaac gtaaaagttgactttacaaaagttcaagaatggaaaaacggcgtagttaagaaattaactggcggtgttgaaggccttc t taaaggtaacaaagttgaaatcattcgcggtgaagcttacttcgtagatgctaatacattacgcgttatgactgaagagg cagctcaaacttatacgtttaaaaatgctgttcttgcaactggttctacaccaatcgaaattccaggattcaaatactct aaacgtgttatcaactctacaggcgctttaagcttacctgaaattcctaaaaaacttgttgtaatcggcggcggttacat cggtatggaattaggtactgcatatgctaacttcggtacagaagttactgtagtagaagctggcgacgaaatcttagct g gtttcgaaaaagctatgagctctgttgttaaacgtgctctacagaaaaaaggtaacgtaaatatccatacaaaagctatg gctaaaggcgttgaagaaacagaaactggcgtaaaagttagctttgaagttaaaggtgaaatccaaactgtagaagc aga ttacgtattagtaactgtaggtcgtcgtccaaacactcaagaaatcggtcttgagcaagttggagttaaaatgactgacc gcggcatcatcgaaatcgatgagcaatgtcgtacaaacgtaccaaacatctatgcaatcggtgatatcgttcctggacc a ccattagctcacaaagcttcttacgaaggtaaagtagctgtagaagcaattagtggccatgcatcagctatcgattacat cggaattcctgcagtatgcttcactgatccagaattagcatctgttggttacactaagaaacaagctgaagaagctgga a tgactgtaactgtatctaagttcccattcgctgctaacggtcgtgcattatcattaaacagcactgacggtttcttacaa cttgtaacacgtaaagaagatggtcttcttgtaggtgctcaagttgcaggtgcaggcgcttctgatattatttctgagat tggtttagctatcgaagctggaatgacagcagaagatatcgctcaaacaatccacgctcacccaacattaggtgaaat ca caatggaagcagctgaagttgctcttggaatgccaattcacattgtaaaataa	
タンパク質 MVVGDFPIELDTVVVGAGPGGYVAAIRAAQLGQKVAIIEKANLGGVCLN	190

配列	SEQ ID NO:
VGCIPSKALINAGHRYENAMHSDDMGITAENVKVDFTKVQEWKNGVVK KLTGGVEGLLKGNKVEIIRGEAYFVDANTLRVMTEEAAQTYTFKNAVLA TGSTPIEIPGFKYSKRVINSTGALSLPEIPKKLVVIGGGYIGMELGTAYANF GTEVTVVEAGDEILAGFEKAMSSVVKRALQKKGNVNIHTKAMAKGVEET ETGVKVSFEVKGEIQTVEADYVLVTVGRRPNTQEIGLEQVGVKMTDRGII EIDEQCRTNVPNIYAIGDIVPGPPLAHKASYEGKVAVEAISGHASAIDYIGIP AVCFTDPELASVGYTKKQAEEAGMTVTVSKFPFAANGRALSLNSTDGFL QLVTRKEDGLLVGAQVAGAGASDIISEIGLAIEAGMTAEDIAQTIHAHPTL GEITMEAAEVALGMPIHIVK	
ブルセラ属	191
L7-L12 atggctgatctcgcaaagatcgttgaagacctttcggccctgaccgttctggaagccgctgagctgtccaagcttctcg aagagaagtggggcgtttcggctgctgctccggtcgctgttgctgctgccggtggcgctgcccctgctgctgccgca gaagaaaagaccgaattcgacgtcgttctcgctgacggcggcgctaacaagatcaacgtgatcaaggaagtgcgcg cactcaccggtctcggcctcaaggaagccaaggacctggtcgaaggcgctccgaaggctgtcaaggaaggcgcct cgaaggacgaagctgagaagatcaaggcacagctcgaagctgctggcgccaaggttgaactcaagtaa	
タンパク質	192
MADLAKIVEDLSALTVLEAAELSKLLEEKWGVSAAAPVAVAAAGGAAP AAAAEEKTEFDVVLADGGANKINVIKEVRALTGLGLKEAKDLVEGAPKA VKEGASKDEAEKIKAQLEAAGAKVELK	
LSUリボソームタンパク質L9P	193
atggaagtcattcttctggaacgcattggccgcctcggccagatgggcgacaccgtcaaggtcaaggacggctatgc ccgcaacttcctgctgccgcagggcaaggctcttcgtgccaacgaagccaacaagaagaagtttgaaggccagcg cgcacagcttgaagcccagaacctggaacgcaagaacgaagcccaggctgttgccgacaagctcaatggcgaaa gcttcatcgtcgtgcgttcggcaggtgaaaccggccagctctacggttccgtttcgacccgcgacatcgccgaaatca tcacggccaacggcttcacgctgcaccgcaaccaggttgagctgaaccacccgatcaagacgatcggcctgcacg aagtttcggtttcgctgcacccggaagtccaggtcaaggtcatggtcaacatcgcgcgctcgaccgaagaagccga atgtcaggccaagggtgaagacctcacctcgatcgaagccatctacggcatcgaagagcagccgctttcggaagaa gtcttcgacgacgaagacgaagctgaagatcaggcttga	
タンパク質	194
MEVILLERIGRLGQMGDTVKVKDGYARNFLLPQGKALRANEANKKKFEG QRAQLEAQNLERKNEAQAVADKLNGESFIVVRSAGETGQLYGSVSTRDIA EIITANGFTLHRNQVELNHPIKTIGLHEVSVSLHPEVQVKVMVNIARSTEE AECQAKGEDLTSIEAIYGIEEQPLSEEVFDDEDEAEDQA	
OMIPP25	195
atgcgcactcttaagtctctcgtaatcgtctcggctgcgttgctgccgttctctgcgaccgcttttgctgccgacgccatc caggaacagcctccggttccggctccggttgaagtagctccccagtatagctgggctggtggctataccggtctttac cttggctacggctggaacaaggccaagaccagcaccgttggcagcatcaagcctgacgattggaaggctggcgcc tttgctggctggaacttccagcaggaccagatcgtatacggtgttgaaggtgatgcaggttattcctgggccaagaagt ccaaggacggcctggaagtcaagcagggctttgaaggctcgctgcgtgcccgcgttggctacgacctgaacccggt tatgccgtacctcacggctggtattgccggttcgcagatcaagcttaacaacggcttggacgacgaaagcaagttccg cgtgggttggacggctggtgccggtctcgaagccaagctgacggacaacatcctcggccgcgttgagtaccgttac acccagtacggcaacaagaactatgatctggccggtacgactgttcgcaacaagctggacacgcaggatttccgcgt cggcatcggctacaagttctaa	
タンパク質	196
MRTLKSLVIVSAALLPFSATAFAADAIQEQPPVPAPVEVAPQYSWAGGYT GLYLGYGWNKAKTSTVGSIKPDDWKAGAFAGWNFQQDQIVYGVEGDA GYSWAKKSKDGLEVKQGFEGSLRARVGYDLNPVMPYLTAGIAGSQIKLN NGLDDESKFRVGWTAGAGLEAKLTDNILGRVEYRYTQYGNKNYDLAGT TVRNKLDTQDFRVGIGYKF	
OMIPP31	197
atgtttagcttaaaagggactgttatgaaaaccgcacttcttgcatccgtcgcaatgttgttcacaagctcggctatggc tgccgacatcatcgttgctgaaccggcacccgttgcagtcgacacgttctcttggactggcggctatattggtatcaatg ctggttacgctggcggcaagttcaagcatccgttctcaggcatcgagcaggatggggcccaagatttttcaggttcgc	

配列	SEQ ID NO:
tc gacgtcacggccagcggctttgttggcggcgttcaggccggttataactggcagcttgccaacggcctcgtgcttggt gg cgaagctgacttccagggctcgacggttaagagcaagcttgttgacaacggtgacctctccgatatcggcgttgcag gca acctcagcggcgacgaaagcttcgtcctcgagaccaaggttcagtggtttggaacggtgcgtgcgcgcctcggcttc acc ccgactgaacgcctgatggtctatggtaccggtggtttggcctatggtaaggtcaagacgtcgcttagcgcctatgac ga tggtgaatcgttcagcgccggaaactctaagaccaaggctggctggacgcttggtgcaggtgtagaatacgccgtca cca acaattggaccctgaagtcggaatacctctacaccgacctcggcaagcgttccttcaattacattgatgaagaaaacgt c aatattaacatggaaaacaaggtgaacttccacaccgtccgcctcggtctgaactacaagttctaa	
タンパク質 MFSLKGTVMKTALLASVAMLFTSSAMAADIIVAEPAPVAVDTFSWTGGYI GINAGYAGGKFKHPFSGIEQDGAQDFSGSLDVTASGFVGGVQAGYNWQL ANGLVLGGEADFQGSTVKSKLVDNGDLSDIGVAGNLSGDESFVLETKVQ WFGTVRARLGFTPTERLMVYGTGGLAYGKVKTSLSAYDDGESFSAGNSK TKAGWTLGAGVEYAVTNNWTLKSEYLYTDLGKRSFNYIDEENVNINME NKVNFHTVRLGLNYKF	198
Omp2bポーリン	199
atgcccagacccatttttaactttgactggaggtcagaaatgaacatcaagagccttctccttggctccgctgcagctct ggttgcagcttccggcgctcaggctgccgacgcaatcgtcgcgccagagcccgaagccgttgaatatgtccgcgttt gcgacgcttacggcgctggctacttctacattccgggcaccgaaatctgcctgcgcgtccatggttacgtccgttacg acgtaaagggcggcgatgacgtttactccggtaccgaccgcaatggctgggacaagggcgctcgtttcgcactccg cgtttccaccggttcggaaaccgaactcggcaccctcaagaccttcaccgaactgcgcttcaactatgctgcgaacaa ttcgggcgtagatggtaaatatggtaatgaaaccagcagcggcaccgtcatggagttcgcgtatatccagctcggtgg tctgcgcgttggtatcgatgaatcggaattccataccttcaccggttacctcggcgatgtcatcaacgatgacgtgatct cggctggctcctaccgcaccggcaagatctcgtacaccttcactggcggaaacggcttctcggctgtgatcgctctcg aacagggtggcgacaacgacggtggttacactggcacgaccaactaccacatcgacggctacatgcctgacgttgtt ggcggcctgaagtatgctggcggctggggttcgatcgctggtgttgttgcctatgactcggtcatcgaagaatgggct gccaaggttcgtggcgacgtcaacatcaccgaccagttctcggtttggttgcagggcgcatattcgtccgctgctacg ccggatcagaactacggccagtggggcggcgattgggctgtctggggtggtctgaagtatcaggctacgcagaag gctgccttcaacctgcaggctgcgcatgacgactggggcaagacggcagttacggctaacgttgcttacgaactggt tcctggcttcaccgttacgccggaagtttcctacaccaagtttggtggcgagtggaagaacactgttgctgaagacaat gcttggggcggtatcgttcgcttccagcgttcgttctaa	
タンパク質 MPRPIFNFDWRSEMNIKSLLLGSAAALVAASGAQAADAIVAPEPEAVEYV RVCDAYGAGYFYIPGTEICLRVHGYVRYDVKGGDDVYSGTDRNGWDKG ARFALRVSTGSETELGTLKTFTELRFNYAANNSGVDGKYGNETSSGTVME FAYIQLGGLRVGIDESEFHTFTGYLGDVINDDVISAGSYRTGKISYTFTGGN GFSAVIALEQGGDNDGGYTGTTNYHIDGYMPDVVGGLKYAGGWGSIAG VVAYDSVIEEWAAKVRGDVNITDQFSVWLQGAYSSAATPDQNYGQWGG DWAVWGGLKYQATQKAAFNLQAAHDDWGKTAVTANVAYELVPGFTV TPEVSYTKFGGEWKNTVAEDNAWGGIVRFQRSF	200
OMP31b	201
atgtttagcttaaaagggactgttatgaaaaccgcacttcttgcatccgtcgcaatgttgttcacaagctcggctatggct gccgacatcatcgttgctgaaccggcacccgttgcagtcgacacgttctcttggactggcggctatattggtatcaatg ctggttacgctggcggcaagttcaagcatccgttctcaggcatcgagcaggatggggcccaagatttttcaggttcgc tcgacgtcacggccagcggctttgttggcggcgttcaggccggttataactggcagcttgccaacggcctcgtgcttg gtggcgaagctgacttccagggctcgacggttaagagcaagcttgttgacaacggtgacctctccgatatcggcgttg caggcaacctcagcggcgacgaaagcttcgtcctcgagaccaaggttcagtggtttggaacggtgcgtgcgcgcct cggcttcaccccgactgaacgcctgatggtctatggtaccggtggtttggcctatggtaaggtcaagacgtcgcttag cgcctatgacgatggtgaatcgttcagcgccggaaactctaagaccaaggctggctggacgcttggtgcaggtgtag aatacgccgtcaccaacaattggaccctgaagtcggaatacctctacaccgacctcggcaagcgttccttcaattacat	

配列	SEQ ID NO:
tgatgaagaaaacgtcaatattaacatggaaaacaaggtgaacttccacaccgtccgcctcggtctgaactacaagttc taa	
タンパク質 MFSLKGTVMKTALLASVAMLFTSSAMAADIIVAEPAPVAVDTFSWTGGYI GINAGYAGGKFKHPFSGIEQDGAQDFSGSLDVTASGFVGGVQAGYNWQL ANGLVLGGEADFQGSTVKSKLVDNGDLSDIGVAGNLSGDESFVLETKVQ WFGTVRARLGFTPTERLMVYGTGGLAYGKVKTSLSAYDDGESFSAGNSK TKAGWTLGAGVEYAVTNNWTLKSEYLYTDLGKRSFNYIDEENVNINME NKVNFHTVRLGLNYKF	202
スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)	203
atgaagtccttatttattgcatcgacaatggtgcttatggcttttccggctttcgcagaaagcacgacggtaaaaatgtat gaggcgctgccgaccggaccgggtaaagaagttggcaccgtggtcatttccgaagccccgggcgggctgcacttc aaggtgaatatggaaaagctgacgccgggctatcatggctttcatgttcacgaaaatccaagctgcgctccgggaga aaaagacggcaagatcgtaccggctcttgctgccggcgggcattatgatccgggtaatacccatcaccatttagggc ctgaaggtgatggacatatgggcgatttgccacgcctgagcgccaatgctgacggcaaggtgagtgaaaccgttgtc gctccacatctcaagaaattggcggaaatcaagcagcgttctttgatggtccatgtcggaggggataattattccgata agcctgagccgcttggtggcggtggtgcccgttttgcctgcggcgtgatcgaataa	
タンパク質 MKSLFIASTMVLMAFPAFAESTTVKMYEALPTGPGKEVGTVVISEAPGGL HFKVNMEKLTPGYHGFHVHENPSCAPGEKDGKIVPALAAGGHYDPGNTH HHLGPEGDGHMGDLPRLSANADGKVSETVVAPHLKKLAEIKQRSLMVH VGGDNYSDKPEPLGGGGARFACGVIE	204
SSUリボソームタンパク質S1P	205
atggctattccggatgcaccaggagtatacatgtctcaatccaaccctacccgcgcagatttcgagtccctgctggca gaatcctttgcggaacatgatcttgctgaaggctatgtcgtcaagggccgcatcgtcgccatcgaaaaggacatggc gatcatcgacgccggtctgaaggtcgaaggtcgcgtgccgttgaaggaatttggcgcaaagggcaaagacggcac gctgaagccgggcgacgaagtggaagtttacgtcgagcgtatcgaaaacgctctgggcgaagctgtcctgtcgcgc gaaaaagcacgccgcgaagaaagctgggtcaagctcgagcagaagtttgccaatggcgagcgcgtcgatggtgtc atcttcaatcaggtcaagggtggtttcaccgtcgacctcgatggtgctgttgccttcctgccgcgcagccaggtcgata tccgtccgatccgcgacgtcaccccactcatgcacgtcccgcaaccgtttgaaatcctcaagatggacaagcgccgc ggcaacatcgttgtctcgcgccgtaccgttcttgaagaaagccgtgcggaacagcgttcggaaatcgtccagaacctt gaagaaggtcaggtcgttgaaggcgtcgtcaagaacatcaccgattacggtgcgttcgtcgacctcggcggcattga cggtctcctgcacgtgaccgacatggcatggcgccgcgtcaaccatccgtcggaaatcctcaccatcggccagacg gtcaaggtgcagatcatccgcatcaaccaggaaacccatcgtatctcgctcggcatgaagcagcttgagagcgatcc ttgggatggtatcggcgcgaagtacccgatcggcaaaaagatcaccggcaccgtcacgaacatcaccgattacggt gcgttcgtcgaaatcgagccgggcatcgaaggcctcatccacgtttccgaaatgtcgtggaccaagaagaatgtcca tccgggcaagattctgtccaccacgcaggaagtcgaagtcgttgtgctcgaagttgatccggtcaagcgccgtatctc gctcggcctcaagcagaccctcgacaatccgtggacgaccttgcccagaagtaccctgtcggtaccgtcgttgaag gcgaagtcaagaacaagaccgaattcggcctgttcatcggcctcgacggcgacgttgacggcatggttcacctctcc gacctcgactggaaccgtccgggcgaacaggtcatcgaagagtacaacaagggtgaagtggtcaaggctgtcgttc tcgacgttgatgtcgagaaggaacgcatctcgctcggcatcaagcagctttccggcgacaaggtcggcgaagcagc agcttccggcgaactgcgcaagaatgccgtcgtcacctgcgaagtgaccgccgttaccgatggtggccttgaggtcc gtctggtcgatcacgacctcgacagcttcatccgccgttcggatctgtcgcgtgaccgcgacgaacagcgtccggaa cgcttcacggtcggtcagaaggttgacgcccgcgtcatcgccttcgacaagaagacccgcaagttgcaggtctcgat caaggcgctcgaaatcgctgaagaaaaggaagcagtcgctcagtacggttcgtccgactccggcgcttcgctcggc gacattctcggcgctgccctgaagaagcaggaaaagaactga	
タンパク質 MAIPDAPGVYMSQSNPTRADFESLLAESFAEHDLAEGYVVKGRIVAIEKD MAIIDAGLKVEGRVPLKEFGAKGKDGTLKPGDEVEVYVERIENALGEAVL SREKARREESWVKLEQKFANGERVDGVIFNQVKGGFTVDLDGAVAFLPR SQVDIRPIRDVTPLMHVPQPFEILKMDKRRGNIVVSRRTVLEESRAEQRSEI VQNLEEGQVVEGVVKNITDYGAFVDLGGIDGLLHVTDMAWRRVNHPSEI LTIGQTVKVQIIRINQETHRISLGMKQLESDPWDGIGAKYPIGKKITGTVTN ITDYGAFVEIEPGIEGLIHVSEMSWTKKNVHPGKILSTTQEVEVVVLEVDP VKRRISLGLKQTLDNPWTTFAQKYPVGTVVEGEVKNKTEFGLFIGLDGDV DGMVHLSDLDWNRPGEQVIEEYNKGEVVKAVVLDVDVEKERISLGIKQL	

配列	SEQ ID NO:
SGDKVGEAAASGELRKNAVVTCEVTAVTDGGLEVRLVDHDLDSFIRRSD LSRDRDEQRPERFTVGQKVDARVIAFDKKTRKLQVSIKALEIAEEKEAVA QYGSSDSGASLGDILGAALKKQEKN	
トリインフルエンザ	207
HA1 (H5トリインフルエンザ由来(他にも適用))	
ataatggagaaaattgtactgctgttcgcgattgttagcctggtgaagtccgatcagatctgcatcggttatcatgctaac aacagcaccgaacaagttgataccatcatggagaaaaacgtaaccgtcacccacgctcaggacatcctggaaaaaa agcacaacggtaaactgtgcgatctggatggtgtgaaaccgctgatcctgcgtgactgctccgtagcaggttggctgc tgggtaacccgatgtgcgacgagttcatcaacgttccagaatggtcctacattgtcgaaaaagctaacccggttaacg acctgtgttatccgggtgatttcaacgattatgaagaactgaagcacctgctgtctcgcatcaaccactttgaaaagatc cagattatcccaaaatcctcttggtcttcccacgaagcgtctctgggtgtgagcagcgcttgtccgtaccagggtaaat cctctttcttccgtaacgttgtttggctgatcaagaaaaattctacctacccaaccatcaaacgttcttacaacaacaccaa tcaggaggatctgctggttctgtggggtatccaccacccgaacgacgcagcagaacagactaagctgtaccagaac ccgaccacctacatcagcgttggcacttctactctgaaccagcgtctggtgccgcgcatcgcgacccgttctaaggta aatggtcagtctggtcgtatggaatttttctggaccatcctgaaaccgaacgacgcgatcaactttgagtccaacggta acttcatcgctccagaatacgcgtacaaaatcgttaaaaagggcgattctactattatgaagtctgaactggaatacggt aactgcaatactaaatgccagacgccgatgggtgctattaacagcagcatgccatttcacaacattcaccctctgactat cggcgagtgcccgaaatacgtaaaaagcaaccgtctggttctggcgaccggcctgcgtaactctccgata	
タンパク質	208
IMEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILE KKHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKA NPVNDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASLGVSSAC PYQGKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAA EQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPN DAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINS SMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPI	
HAエピトープ(様々なインフルエンザH5タンパク質に由来するエピトープ配列)DNA	209
atggtaccggcaccagcgatggaaaaaaatgttaccgttactcatgctcaagacattctggaaaaaaagcataatggt aaagcgcctgctgacctggacggtgtaaaaccactgattctgcgtgattgttccgtagctggcgctcctgctccggtta acgatctgtgttatccaggcgatttcaacgactacgaggaactggcaccggcgattcagatcatcccgaaatcttcctg gtctagccacgaagcgtccctgggcgtttcctccgcttgcccttaccaaggcaaaagctctgcaccggcacgcaacg ttgtatggctgatcaagaaaaactccacctatccgaccatcaaacgcagctacaataacaccaaccaggaggacgct ccggctcaccatccgaatgacgccgcagaacagacgaagctgtaccagaacccgaccaccgctccagccgttaaa aagggtgacagcacgattatgaaaagcgagctggaatacggcaactgcaacactaaatgccagactccaatgggc gctattaacagctccatgccgtttgctccggccattcaaatcattccaaaatctagctggtccgaccatgaagcatccag cggcgtgtcctctgcctgcccatatcagggcaccccgagcgcaccggctgttccacgcatcgctacgcgttctaagg tgaacggtcagtctggtcgtgctccggctgttaagaaaggcgatagcgccattgttaagtctgaagtggaatacggta actgtaacactaagtgtcaaactcctatcggtgccatcaactcttccatgccgttcgcaccggcaggtgttagcagcgc atgcccgtaccagggccgcagctctgcgccggctggtgttagctccgcttgtccgtatctgggttctccgagcgcacc agcgggcgttagctctgcctgtccgtacctgggtcgttccagcgctccggca	
タンパク質	210
MVPAPAMEKNVTVTHAQDILEKKHNGKAPADLDGVKPLILRDCSVAGAP APVNDLCYPGDFNDYEELAPAIQIIPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSA PARNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDAPAHHPNDAAEQTKLYQNPT TAPAVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFAPAIQIIPKSSW SDHEASSGVSSACPYQGTPSAPAVPRIATRSKVNGQSGRAPAVKKGDSAI VKSEVEYGNCNTKCQTPIGAINSSMPFAPAGVSSACPYQGRSSAPAGVSSA CPYLGSPSAPAGVSSACPYLGRSSAPA	
M1-M2マトリックスタンパク質	211
atgtctctgctgaccgaagtagaaactccaactcgtaatgaatgggaatgccgctgctctgactctagcgaccctatcg ttgtggcggcaaacattatcggcatcctgcacctgattctgtggattctggaccgcctgtttttcaaatgtatctaccgcc gtctgaaatacggtctgaaacgcggtccggctacggcaggcgttccggagtctatgcgcgaagaataccgtcagga gcaacagtctgccgtggatgttgatgacggccacttcgtaaacattgaactggaaggtggtatgtccctgctgactgaa gtagaaacctatgtcctgtccatcattccgtctggcccgctgaaagctgagattgctcaaaaactggaagacgttttcgc tggtaaaaataccgatctggaggctctgatggagtggctgaaaacccgcccgatcctgtccccactgaccaaaggta tcctgggtttcgttttcaccctgactgtaccgtccgaacgtggtctgcaacgccgtcgctttgtgcaaaacgctctgaac	

配列 SEQ ID NO:

ggcaatggtgacccgaacaatatggaccgtgctgtgaaactgtataaaaagctgaagcgtgaaatcaccttccacgg
cgccaaagaagttgctctgtcctacagcaccggtgcactggcttcctgcatgggtctgatctacaaccgtatgggcact
gtaacgacggaagttgccttcggtctggtctgtgccacctgtgaacaaatcgcggattctcagcaccgctcccaccgt
cagatggcgactatcactaacccgctgattcgtcacgaaaaccgtatggttctggcgtccactaccgcgaaagcaatg
gaacagatggctggttcctccgaacaggccgcagaggctatggaaatcgctaaccaagctcgtcagatggttcagg
ctatgcgcactattggtacccatccgaactcttccgccggtctgcgtgataacctgctggaaaacctgcaagcctacca
gaaacgtatgggtgtgcaaatgcagcgtttcaaataa

タンパク質 212

MSLLTEVETPTRNEWECRCSDSSDPIVVAANIIGILHLILWILDRLFFKCIYR
RLKYGLKRGPATAGVPESMREEYRQEQQSAVDVDDGHFVNIELEGGMSL
LTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQKLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPL
TKGILGFVFTLTVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYKKLK
REITFHGAKEVALSYSTGALASCMGLIYNRMGTVTTEVAFGLVCATCEQI
ADSQHRSHRQMATITNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAAEA
MEIANQARQMVQAMRTIGTHPNSSAGLRDNLLENLQAYQKRMGVQMQR
FK

ノロウイルス Snow Mountain株からのORF2(主要キャプシドタンパク質) 213
大腸菌において最適に発現するようにコドン最適化したDNA配列

aaaatggcttctaatgatgctgctccttctactgatggtgctgctggtctggtgccagaatccaacaacgaagtcatggc
cctggagccggttgcgggtgcagcgctggcagcgccggtaaccggtcagaccaatatcatcgatccgtggattcgt
gctaatttcgtgcaggccccgaacggcgagtttaccgtgtccccgcgtaacgcaccgggtgaggttctgctgaacct
ggaactgggcccggaactgaacccgtatctggcacacctggcgcgtatgtacaacggttatgccggtggtatggag
gttcaggttatgctggcaggtaacgcgtttaccgcgggcaagctggtatttgcggccgtgcctcctcatttcccagtgg
agaacctgagcccgcagcagatcaccatgttcccacatgtgattattgatgttcgtactctggaacctgtgctgctgcc
gctgccggatgttcgcaacaatttcttccactataaccagaaagacgacccgaaaatgcgcatcgtcgctatgctgtat
acgccgctgcgttccaatggttctggtgatgacgttttcactgtaagctgccgtgtactgactcgtccatctccggatttc
gactttacttacctggtgccgccgactgtagagtctaaaaccaaaccgttcactctgccgatcctgaccctgggtgaac
tgtctaactctcgtttcccggtatctatcgaccagatgtatacctctcctaatgaagttatctccgtccagtgccagaacg
gtcgctgcaccctggacggtgaactgcaaggcaccacccaactgcaagtttccggcatctgcgctttcaaaggcgaa
gtaaccgctcacctgcaagataacgatcacctgtataacatcacgatcaccaacctgaacggcagcccgttcgaccc
gtctgaggacattccggccccactgggtgtaccggatttccagggccgtgtgtttggtgttatcacccaacgtgacaaa
cagaacgcggcaggtcagagccagccggcgaaccgtggtcatgacgcagttgttcctacttacacggcgcagtaca
ccccaaaactgggccaggtacaaatcggtacttggcagactgatgatctgaaggttaaccagccagtgaaattcacc
ccggttggtctgaacgacactgagcactttaaccagtgggttgtaccgcgttatgcgggtgctctgaatctgaacacca
acctggcgcctagcgtggctccggtattcccgggcgaacgcctgctgttctttcgttcctacctgccgctgaaaggtg
gttatggtaacccggctattgattgcctgctgccgcaggagtgggtgcagcacttctatcaggaggcggctccgtcca
tgtctgaagttgcgctggttcgttacatcaacccggacaccggccgtgcgctgttcgaagcgaaactgcaccgcgca
ggcttcatgaccgtgtcctctaatacttccgcaccggttgttgtacctgccaatggttacttccgcttcgattcttgggtaa
accagttttactctctggcaccgatgggtactggcaacggccgtcgccgtatccagtaa

タンパク質 214

KMASNDAAPSTDGAAGLVPESNNEVMALEPVAGAALAAPVTGQTNIIDP
WIRANFVQAPNGEFTVSPRNAPGEVLLNLELGPELNPYLAHLARMYNGY
AGGMEVQVMLAGNAFTAGKLVFAAVPPHFPVENLSPQQITMFPHVIIDVR
TLEPVLLPLPDVRNNFFHYNQKDDPKMRIVAMLYTPLRSNGSGDDVFTVS
CRVLTRPSPDFDFTYLVPPTVESKTKPFTLPILTLGELSNSRFPVSIDQMYTS
PNEVISVQCQNGRCTLDGELQGTTQLQVSGICAFKGEVTAHLQDNDHLY
NITITNLNGSPFDPSEDIPAPLGVPDFQGRVFGVITQRDKQNAAGQSQPAN
RGHDAVVPTYTAQYTPKLGQVQIGTWQTDDLKVNQPVKFTPVGLNDTE
HFNQWVVPRYAGALNLNTNLAPSVAPVFPGERLLFFRSYLPLKGGYGNP
AIDCLLPQEWVQHFYQEAAPSMSEVALVRYINPDTGRALFEAKLHRAGF
MTVSSNTSAPVVVPANGYFRFDSWVNQFYSLAPMGTGNGRRRIQ

サルモネラ 215
fliC
gi:16765297
産物="フラジェリン
1 atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa

配列 SEQ ID NO:

61 tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc
121 gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt
181 ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc
241 gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtctgct
301 aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg
361 aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag
421 gacaacaccc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg
481 aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacgctga atgtgcaaca aaaatataag
541 gtcagcgata cggctgcaac tgttacagga tatgccgata ctacgattgc tttagacaat
601 agtactttta aagcctcggc tactggtctt ggtggtactg accagaaaat tgatggcgat
661 ttaaaatttg atgatacgac tggaaaatat tacgccaaag ttaccgttac gggggaact
721 ggtaaagatg gctattatga agtttccgtt gataagacga acggtgaggt gactcttgct
781 ggcggtgcga cttccccgct tacaggtgga ctacctgcga cagcaactga ggatgtgaaa
841 aatgtacaag ttgcaaatgc tgatttgaca gaggctaaag ccgcattgac agcagcaggt
901 gttaccggca cagcatctgt tgttaagatg tcttatactg ataataacgg taaaactatt
961 gatggtggtt tagcagttaa ggtaggcgat gattactatt ctgcaactca aaataaagat
1021 ggttccataa gtattaatac tacgaaatac actgcagatg acggtacatc caaaactgca
1081 ctaaacaaac tgggtggcgc agacggcaaa accgaagttg tttctattgg tggtaaaact
1141 tacgctgcaa gtaaagccga aggtcacaac tttaaagcac agcctgatct ggcggaagcg
1201 gctgctacaa ccaccgaaaa cccgctgcag aaaattgatg ctgctttggc acaggttgac
1261 acgttacgtt ctgacctggg tgcggtacag aaccgtttca actccgctat taccaacctg
1321 ggcaacaccg taaacaacct gacttctgcc cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg
1381 accgaagttt ccaacatgtc tcgcgcgcag attctgcagc aggccggtac ctccgttctg
1441 gcgcaggcga accaggttcc gcaaaacgtc ctctctttac tgcgttaa

タンパク質 216

1 maqvintnsl slltqnnlnk sqsalgtaie rlssglrins akddaagqai anrftanikg
61 ltqasrnand gisiaqtteg alneinnnlq rvrelavqsa nstnsqsdld siqaeitqrl
121 neidrvsgqt qfngvkvlaq dntltiqvga ndgetididl kqinsqtlgl dtlnvqqkyk
181 vsdtaatvtg yadttialdn stfkasatgl ggtdqkidgd lkfddttgky yakvtvtggt
241 gkdgyyevsv dktngevtla ggatspltgg lpatatedvk nvqvanadlt eakaaltaag
301 vtgtasvvkm sytdnngkti dgglavkvgd dyysatqnkd gsisinttky taddgtskta
361 lnklggadgk tevvsiggkt yaaskaeghn fkaqpdlaea aatttenplq kidaalaqvd
421 tlrsdlgavq nrfnsaitnl gntvnnltsa rsriedsdya tevsnmsraq ilqqagtsvl
481 aqanqvpqnv lsllr

Sef14線毛サブユニット前駆体 217
遺伝子="sefA
gi:1405814

1 atgcgtaaat cagcatctgc agtagcagtt cttgctttaa ttgcatgtgg cagtgcccac
61 gcagctggct ttgttggtaa caaagcagag gttcaggcag cggttactat tgcagctcag
121 aatacaacat cagccaactg gagtcaggat cctggcttta cagggcctgc tgttgctgct
181 ggtcagaaag ttggtactct cagcattact gctactggtc cacataactc agtatctatt
241 gcaggtaaag gggcttcggt atctggtggt gtagccactg tcccgttcgt tgatggacaa
301 ggacagcctg ttttccgtgg gcgtattcag ggagccaata ttaatgacca agcaaatact
361 ggaattgacg ggcttgcagg ttggcgagtt gccagctctc aagaaacgct aaatgtccct
421 gtcacaacct ttggtaaatc gaccctgcca gcagggactt tcactgcgac cttctacgtt
481 cagcagtatc aaaactaa

タンパク質 218

MRKSASAVAVLALIACGSAHAAGFVGNKAEVQAAVTIAAQNTTSANWS
QDPGFTGPAVAAGQKVGTLSITATGPHNSVSIAGKGASVSGGVATVPFVD
GQGQPVFRGRIQGANINDQANTGIDGLAGWRVASSQETLNVPVTTFGKST
LPAGTF TATFYVQQYQN

フィンブリン/fimA 219

配列 SEQ ID NO:

1 atgacctcta ctattgcgag tctgatgttt gtcgctggcg cagcggttgc ggctgatcct
61 actccggtga gcgtgagtgg cggtactatt catttcgaag gtaaactggt taatgcagcc
121 tgtgccgtca gcactaaatc cgccgatcaa acggtgacgc tgggtcaata ccgtaccgcc
181 agctttacgg cgattggtaa tacgactgcg caggtgcctt tctccatcgt cctgaatgac
241 tgcgatccga aagtggcggc caacgctgcc gtggctttct ctggtcaggc agataacacc
301 aaccctaatt tgctggctgt ctcctctgcg gacaatagca ctaccgcaac cggcgtcggg
361 attgagattc ttgataatac ctcttcaccg ttgaagccgg acggcgcgac cttctcggcg
421 aagcagtcgc tggttgaagg caccaatacg ctgcgtttta ccgcacgcta taaggcaacc
481 gccgccgcca cgacgccagg ccaggctaat gccgacgcca cctttatcat gaaatacgaa
541 taa

タンパク質 220

1
MTSTIASLMFVAGAAVAADPTPVSVSGGTIHFEGKLVNAACAVSTKSADQ
TVTLGQYRTA
61
SFTAIGNTTAQVPFSIVLNDCDPKVAANAAVAFSGQADNTNPNLLAVSSA
DNSTTATGVG
121
IEILDNTSSPLKPDGATFSAKQSLVEGTNTLRFTARYKATAAATTPGQAN
ADATFIMKYE

prgI/ニードル複合体主要サブユニット 221
gi:16766179

1 atggcaacac cttggtcagg ctatctggat gacgtctcag caaaatttga tacgggcgtt
61 gataatctac aaacgcaggt aacagaggcg ctggataaat tagcagcaaa accctccgat
121 ccggcgctac tggcggcgta tcagagtaag ctctcggaat ataacttgta ccgtaacgcg
181 caatcgaaca cggtaaaagt ctttaaggat attgatgctg ccattattca gaacttccgt
241 taa

タンパク質 222
1
MATPWSGYLDDVSAKFDTGVDNLQTQVTEALDKLAAKPSDPALLAAYQ
SKLSEYNLYRNA
61 QSNTVKVFKD IDAAIIQNFR

赤痢菌 223
IpaB
cataatgtaagcaccacaaccactggttttcctcttgccaaaatattggcttccactgagcttggagacaatactatcca
agctgcaaatgatgcagctaacaaattattttctcttacaattgctgatcttactgctaaccaaaatattaatacaacta
atgcacactcaacttcaaatatattaatccctgaacttaaagcaccaaagtcattaaatgcaagttcccaactaacgctt
ttaattggaaaccttattcaaatactcggtgaaaaatctttaactgcattaacaaataaaattactgcttggaagtccca
gcaacaggcaagacagcaaaaaaacctagaattctccgataaaattaacactcttctatctgaaactgaaggactaac
ca
gagactatgaaaaacaaattaataaactaaaaaacgcagattctaaaataaaagacctagaaaataaaattaaccaaat
t
caaacaagattatccgaactcgacccagagtcaccagaaaagaaaaaattaagccgggaagaaatacaactcactat
caa
aaaagacgcagcagttaaagacaggacattgattgagcagaaaaccctgtcaattcatagcaaacttacagataaatc
aa
tgcaactcgaaaaagaaatagactctttttctgcattttcaaacacagcatctgctgaacagctatcaacccagcagaaa
tcattaaccggacttgccagtgttactcaattgatggcaacctttattcaactagttggaaaaaataatgaagaatcttt
aaaaaatgatctggctctattccagtctctccaagaatcaagaaaaactgaaatggagagaaaatctgatgagtatgct
g
ctgaagtacgtaaagcagaagaactcaacagagtaatgggttgtgttgggaaaatacttggggcacttttaactatcgtt
agtgttgttgcagcagctttttctggaggagcctctctagcactggcagctgttggtttagctcttatggttacggatgc
tatagtacaagcagcgaccggcaattccttcatggaacaagccctgaatccgatcatgaaagcagtcattgaaccctta
a
tcaaactcctttcagatgcatttacaaaaatgctcgaaggcttgggcgtcgactcgaaaaaagccaaaatgattggctc

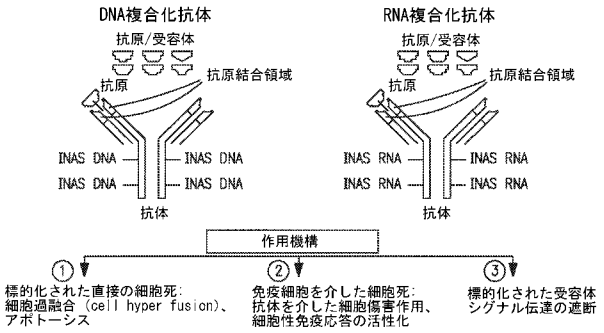
配列	SEQ ID NO:
t attctgggggcaatcgcaggcgctcttgtcctagttgcagcagtcgttctcgtagccactgttggtaaacaggcagca gc aaaacttgcagaaaatattggcaaaataataggtaaaaccctcacagaccttataccaaagtttctcaagaatttttctt ctcaactggacgatttaatcactaatgctgttgccagattaaataaatttcttggtgcagcgggtgatgaagtaatatcc aaacaaattatttccacccatttaaaccaagcagttttattaggagaaagtgttaactctgccacacaagcgggaggaa g tgtcgcttctgctgttttccagaacagcgcgtcgacaaatctagcagacctgacattatcgaaatatcaagttgaacaac tgtcaaaatatatcagtgaagcaatagaaaaattcggccaattgcaggaagtaattgcagatctattagcctcaatgtcc aactctcaggctaatagaactgatgttgcaaaagcaattttgcaacaaactactgcttga	
タンパク質	224
HNVSTTTTGFPLAKILASTELGDNTIQAANDAANKLFSLTIADLTANQNIN TTNAHSTSNILIPELKAPKSLNASSQLTL LIGNLIQILGEKSLTALTNKITAWKSQQQARQQKNLEFSDKINTLLSETEGL TRDYEKQINKLKNADSKIKDLENKINQI QTRLSELDPESPEKKKLSREEIQLTIKKDAAVKDRTLIEQKTLSIHSKLTDK SMQLEKEIDSFSAFSNTASAEQLSTQQK SLTGLASVTQLMATFIQLVGKNNEESLKNDLALFQSLQESRKTEMERKSD EYAAEVRKAEELNRVMGCVGKILGALLTIVSVVAAAFSGGASLALAAVG LALMVTDAIVQAATGNSFMEQALNPIMKAVIEPLIKLLSDAFTKMLEGLG VDSKKAKMIGSILGAIAGALVLVAAVVLVATVGKQAAAKLAENIGKIIGK TLTDLIPKFLKNFSSQLDDLITNAVARLNKFLGAAGDEVISKQIISTHLNQA VLLGESVNSATQAGGSVASAVFQNSASTNLADLTLSKYQVEQLSKYISEAI EKFGQLQEVIADLLASMSNSQANRTDVAKAILQQTTA	
IpaC	225
gaaattcaaaacacaaaaccaacccagactttatatacagatatatccacaaaacaaactcaaagttcttccgaaacac a aaaatcacaaaattatcagcagattgcagcgcatattccacttaatgtcggtaaaaatcccgtattaacaaccacattaa atgatgatcaacttttaaagttatcagagcaggttcagcatgattcagaaatcattgctcgccttactgacaaaaagatg aaagatctttcagagatgagtcacacccttactccagagaacactctggatatttccagtctttcttctaatgctgtttc tttaattattagtgtagccgttctactttctgctctccgcactgcagaaactaaattgggctctcaattgtcattgattg cgttcgatgctacaaaatcagctgcagagaacattgttcggcaaggcctggcagccctatcatcaagcattactggag ca gtcacacaagtaggtataacgggtatcggtgccaaaaaaacgcattcagggattagcgaccaaaaaggagccttaa gaaa gaaccttgccactgctcaatctcttgaaaaagagcttgcaggttctaaattagggttaaataaacaaatagatacaaata tcacctcaccacaaactaactctagcacaaaatttttaggtaaaaataaactggcgccagataatatatccctgtcaact gaacataaaacttctcttagttctcccgatatttctttgcaggataaaattgacacccagagaagaacttacgagctcaa taccctttctgcgcagcaaaaacaaaacattggccgtgcaacaatggaaacatcagccgttgctggtaatatatccaca t caggagggcgttatgcatctgctcttgaagaagaagaacaactaatcagtcaggccagcagtaaacaagcagagga agca tcccaagtatctaaagaagcatcccaagcgacaaatcaattaatacaaaaattattgaatataattgacagcatcaacca atcaaagaattcgacagccagtcagattgctggtaacattcgagcttaa	
タンパク質	226
EIQNTKPTQTLYTDISTKQTQSSSETQKSQNYQQIAAHIPLNVGKNPVLTTT LNDDQLLKLSEQVQHDSEIIARLTDKKM KDLSEMSHTLTPENTLDISSLSSNAVSLIISVAVLLSALRTAETKLGSQLSLI AFDATKSAAENIVRQGLAALSSSITGA VTQVGITGIGAKKTHSGISDQKGALRKNLATAQSLEKELAGSKLGLNKQI DTNITSPQTNSSTKFLGKNKLAPDNISLST EHKTSLSSPDISLQDKIDTQRRTYELNTLSAQQKQNIGRATMETSAVAGNI STSGGRYASALEEEEQLISQASSKQAEEA SQVSKEASQATNQLIQKLLNIIDSINQSKNSTASQIAGNIRA.	
MxiH	227

配列 SEQ ID NO:

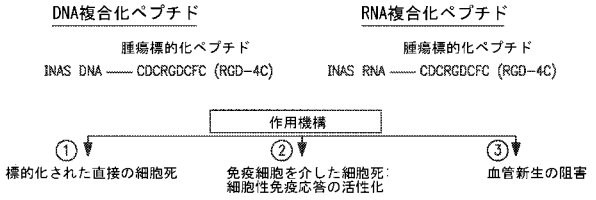
agtgttacagtaccgaatgatgattggacattgagttcattatctgaaacttttgatgatggaactcaaacattacaagg
tgaactaacattggcactagataaattagctaaaaatccttcgaatccacagttgctggctgaataccaaagtaaattat
ctgaatatacattatataggaacgcgcaatccaatacagtgaaagtgattaaggatgttgatgctgcaattattcaaaac
ttcagataa

タンパク質 228
SVTVPNDDWTLSSLSETFDDGTQTLQGELTLALDKLAKNPSNPQLLAEYQ
SKLSEYTLYRNAQSNTVKVIKDVDAAIIQNFR

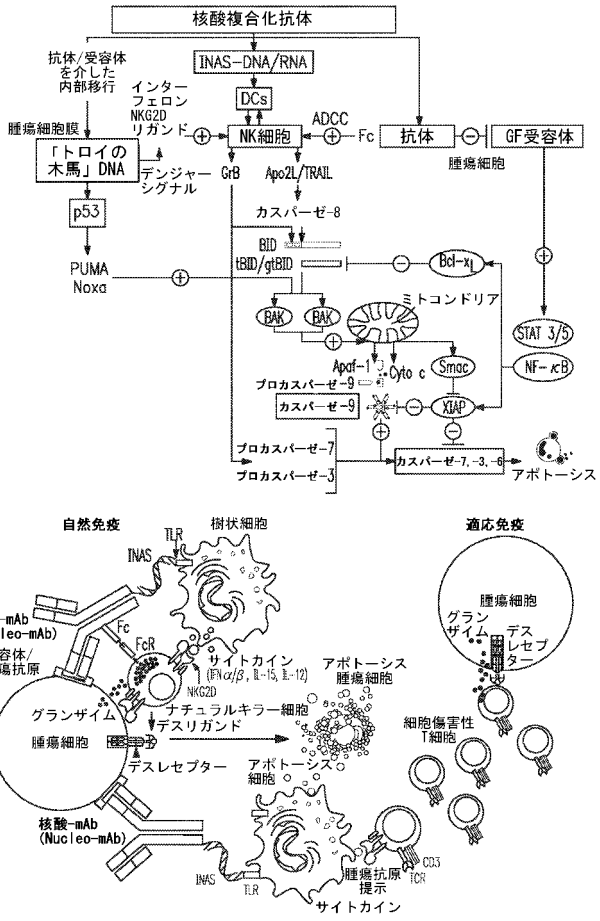
【図１】



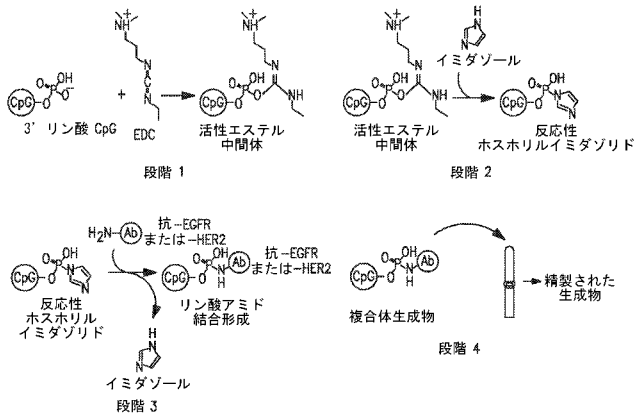
【図２】



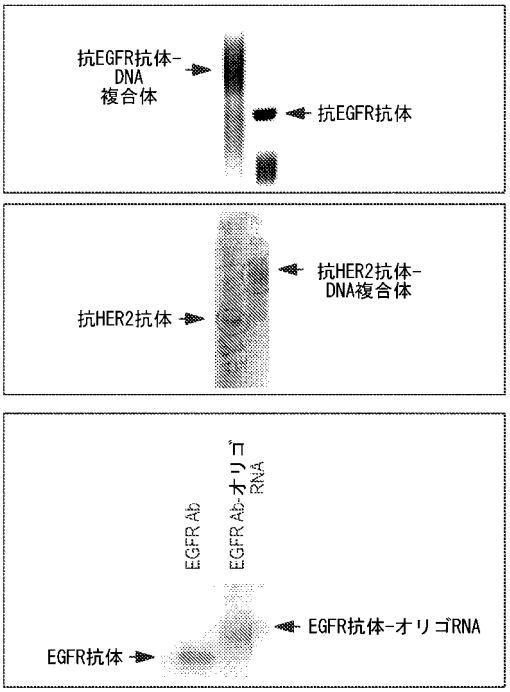
【図３】



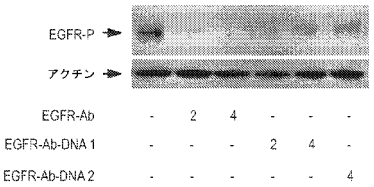
【図４】



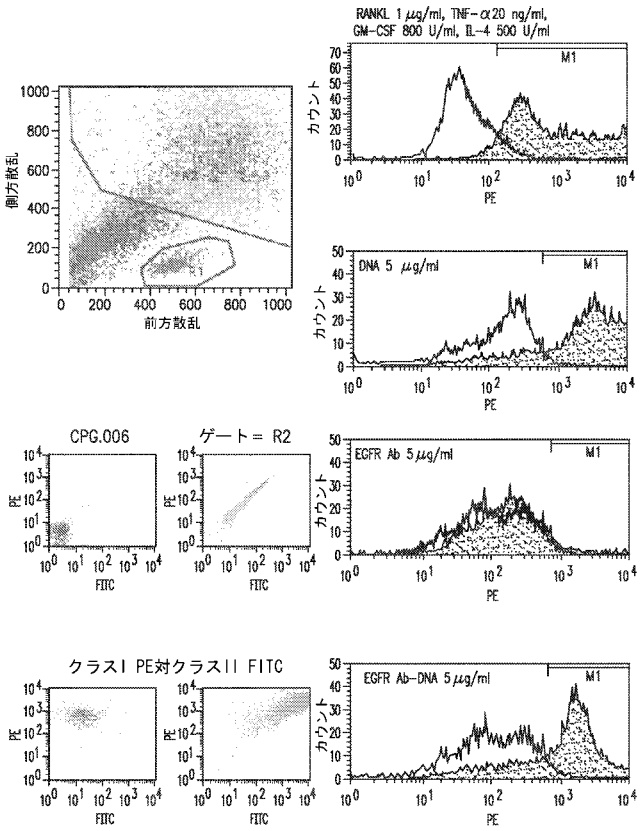
【図５】



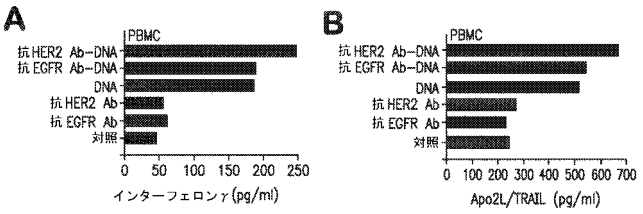
【図６】



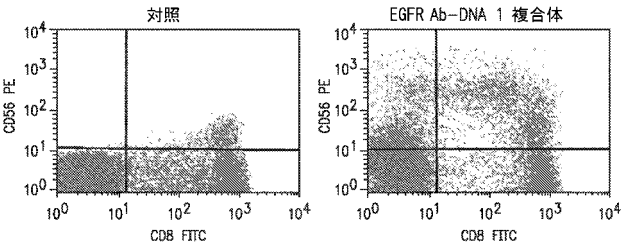
【図７】



【図８】



【図９】



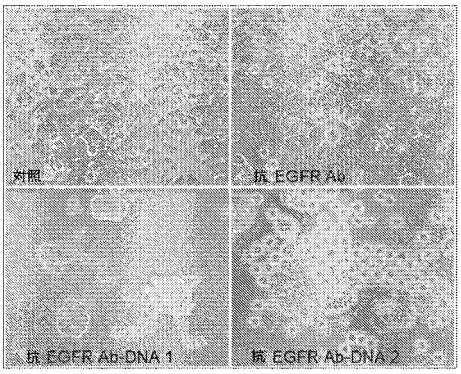
【図１０】

HLAクラスII (MHC) (%)	
対照	12.2
EGFR Ab−DNA	31.5
EGFR Ab−RNA	21.0
PMA	39.6

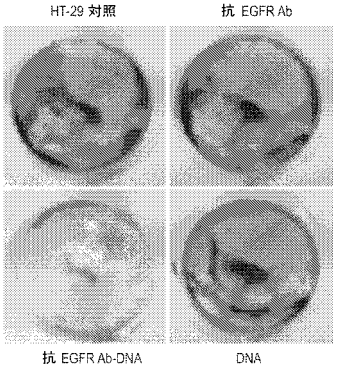
【図１１】

MDA-MB468（EGFR+ヒト乳癌）			SKBr3（HER2+ ヒト乳癌）		
Apo2L/TRAIL 発現	時間	倍差（×対照）	Apo2L/TRAIL 発現	時間	倍差（×対照）
EGFR Ab-DNA 1	24時間	1.5	HER2 Ab-DNA 1	48時間	4.3
	48時間	2.7			
	72時間	3.8			
EGFR Ab-DNA 2	24時間	1.5	HER2 Ab-DNA 2	48時間	4.8
	48時間	2.7			
	72時間	3.8			

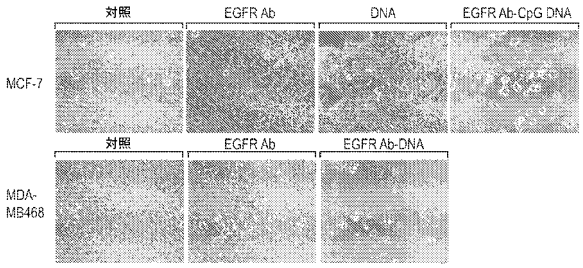
【図１２】



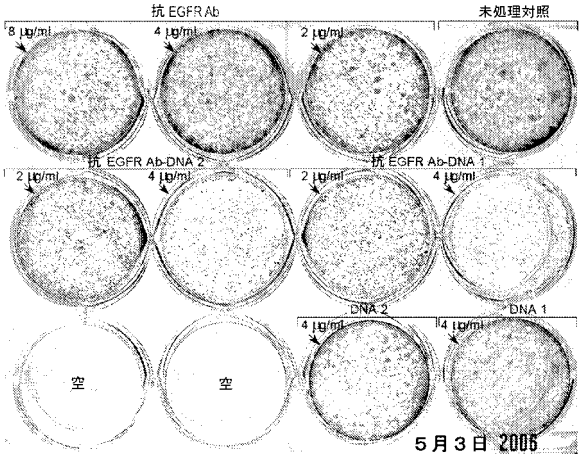
【図１３】



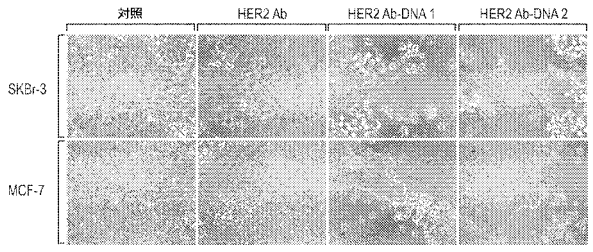
【図１４】



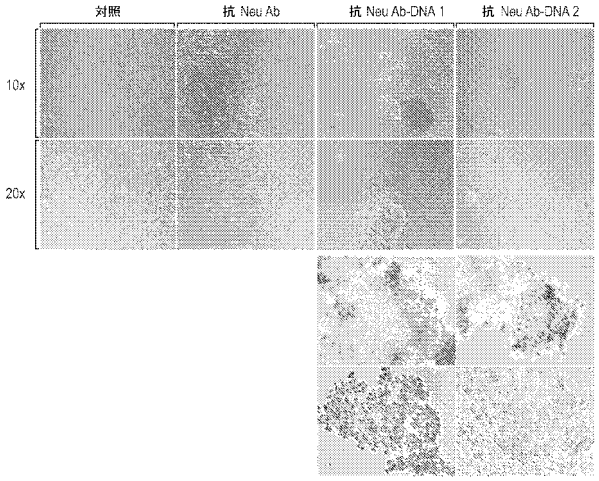
【図１５】



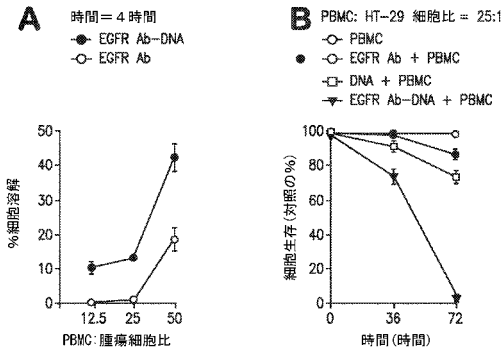
【図１６】



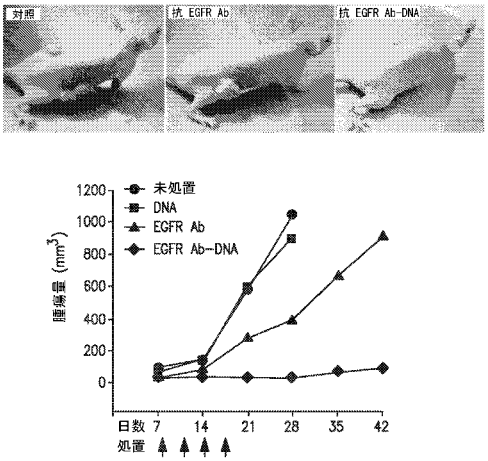
【図１７】



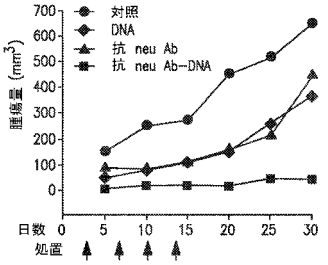
【図１８】



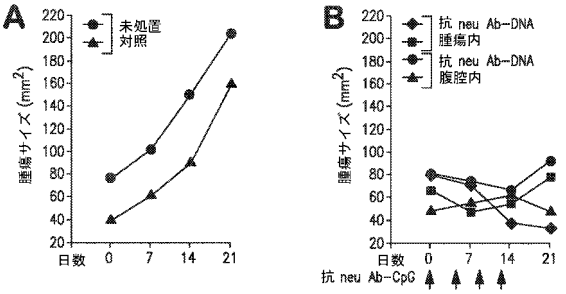
【図１９】



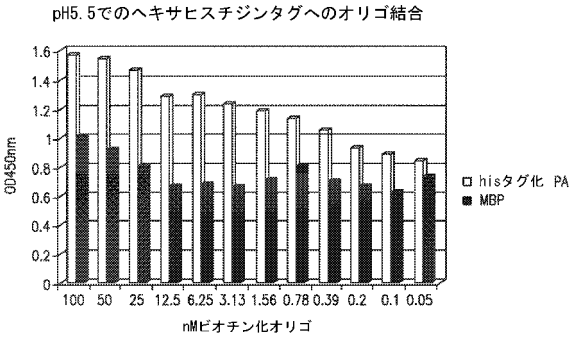
【図２０】



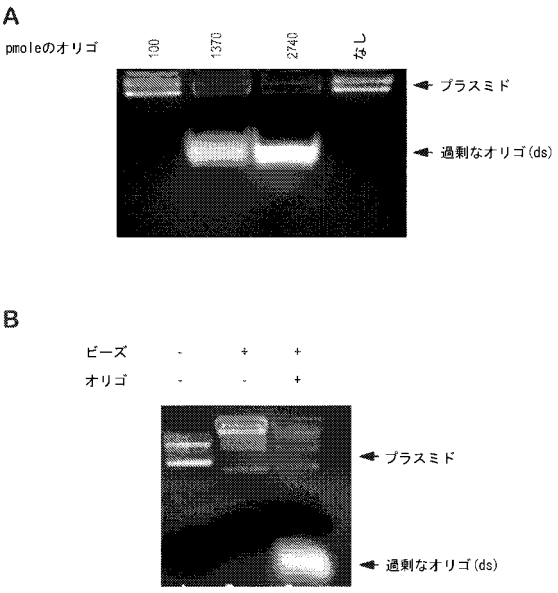
【図２１】



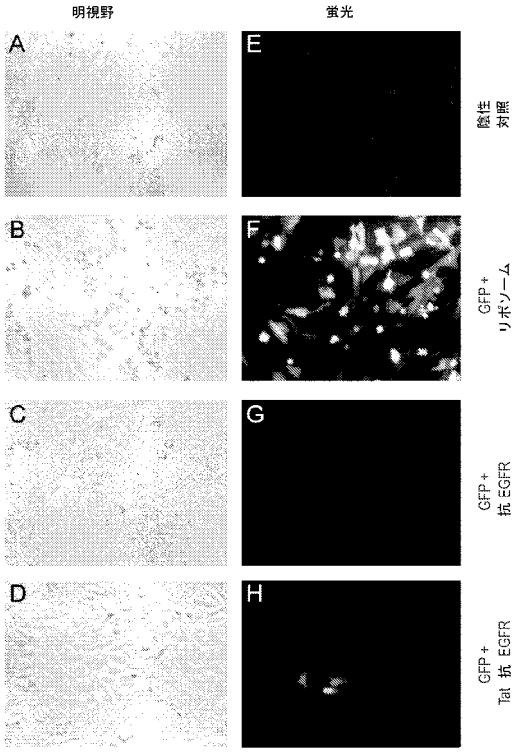
【図２２】



【図２３】



【図２４】



【配列表】
2010535248000001.xml
【手続補正書】
【提出日】平成22年4月27日(2010.4.27)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2010535248000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/71858

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07H 21/00; C07K 2/00 (2008.04)
USPC - 530/300, 350; 536/23.1
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)
USPC: 530/300, 350; 536/23.1

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 practicable, search terms used)
PubWest: PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB; Google Scholar; Google Patents; Text: polypeptide-nucleic acid; conjugate; targeting; moeity; molecule; fusion molecule; antigentic peptide; cellular component; antibody; tumor antigen; tumor associated antigen; tumor cell; cell surface molecule; immune cell; pathogen; microorganism;

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2006/0135459 A1 (EPSTEIN et al.) 22 June 2006 (22.06.2006). para [0032]; para [0061] to para [0072]; para [0032]; para [0061]; para [0075]; para [0061]; para [0020]; abstract; para [0062]; para [0109]; para [0030]; para [0074]; para [0015]; para [0007]	1-7, 19, 50 and 64-66 --- 8-15, 17, 18, 20-39, 44-49, 51, 53-55, 57-59, 61-63
Y	US 2002/0177551 A1 (TERMAN) 28 November 2002 (28.11.2002). para [0062]; (para [0065] to para [0075]; para [0077]; para [0030]; para [0510]; para [0077]; para [0243]; para [0545]; para [0356]; para [0547]; para [0181]; para [1723]; para [0016]; para [0033]; para [1206]; para [0259]; para [0378]; para [0868]; para [0356]; para [0423]; para [0438]; para [0519]; abstract	8-15, 17, 18, 20, 22-26, 28-37, 38, 39, 44-49, 51, 53, 54, 55, 57-59 and 61-63
Y	US 2003/0175287 A1 (MEDZHITOV et al.) 18 September 2003 (18.09.2003). para [0027]	21, 27, 28 and 58
Y	KORNBLUTH et al. Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants. Journal of Leukocyte Biology, November 2006, Vol. 80, pg. 1-19. Abstract; pg. 6, col 2, para 3	36, 37, 51, 55 and 59

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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 application or patent 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 December 2008 (14.12.2008)	19 DEC 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/71858

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:

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.: 16, 40-43, 52, 56
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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 and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	***31/7105***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	31/7105		４Ｃ０８６
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｈ０４５
A61P	***31/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/00		
A61P	***37/04***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	37/04		
A61K	***38/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/02		
A61K	***47/42***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/42		
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｃ	
C07K	*16/30*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/30		
C07K	*16/12*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/12		
C07K	*16/08*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/08		
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28		
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	
C12N	*15/115*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ｈ	
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(71)出願人 510027168
ザ ボード オブ スーパーバイザーズ オブ ルイジアナ ステイト ユニバーシティー アンド アグリカルチュラル アンド メカニカル カレッジ
アメリカ合衆国 ルイジアナ州 バトン ルージュ ルイジアナ エマージング テクノロジー センター ２０６ ルイジアナ ステイト ユニバーシティー コマーシャリゼーション アンド ディベロップメント オフィス オブ インテレクチュアル プロパティー
(74)代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100114340

弁理士　大関　雅人
(74)代理人　100121072
弁理士　川本　和弥
(72)発明者　ベディ　アトゥル
アメリカ合衆国　メリーランド州　ティモニアム　ディルウッド　ロード　２２１１
(72)発明者　ラヴィ　ラジャニ
アメリカ合衆国　メリーランド州　ラックストン　ボールストン　ロード　７８１０
(72)発明者　リ　スーリン
アメリカ合衆国　ルイジアナ州　バトン　ルージュ　リバーベンド　レイク　ドライブ　６３２２

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA41 BA80 CA02 CA07 GA11 HA17
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 BB19 CA44
4C076 AA95 CC06 CC07 CC41 EE41 EE59
4C084 AA13 AA14 BA41 MA02 NA05 ZB022 ZB052 ZB092
4C085 AA03 AA04 AA21 BB11 BB23 EE01 EE03 GG01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 NA14 ZB02 ZB05 ZB09
4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 DA86 EA22 EA29 FA74