

(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2016-534094
(P2016-534094A)

(43) 公表日 平成28年11月4日(2016.11.4)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	4 C 076
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00 Z N A	4 C 084
A 61 K 31/7105 (2006.01)	A 61 K 31/7105	4 C 085
A 61 K 31/711 (2006.01)	A 61 K 31/711	4 C 086
A 61 K 31/713 (2006.01)	A 61 K 31/713	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-530087 (P2016-530087)
(86) (22) 出願日	平成26年7月25日 (2014. 7. 25)
(85) 翻訳文提出日	平成28年3月24日 (2016. 3. 24)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/048294
(87) 國際公開番号	W02015/013675
(87) 國際公開日	平成27年1月29日 (2015. 1. 29)
(31) 優先権主張番号	61/858,584
(32) 優先日	平成25年7月25日 (2013. 7. 25)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人	516025298 イグジキュア、インコーポレーテッド EX CURE, INC. アメリカ合衆国 イリノイ州 60077 -5318、スコーキー、ラモン アベニ ュー 8045、スイート 410 8045 Lamont Avenue, Suite 410, Skokie, Illinois 60077-5318 U. S. A.
(74) 代理人	100102842 弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫調節剤としての球状核酸に基づくコンストラクト

(57) 【要約】

本発明の側面は、ナノスケールコンストラクトならびに関連する方法およびその組成物に関する。本発明の組成物は、自己免疫疾患または他の炎症に基づく疾患もしくは障害などの、免疫細胞の活性化のレベルに対して感受性である障害を処置するために有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

核酸相互作用複合体のアンタゴニストのコロナ、ここで前記核酸相互作用複合体のアンタゴニストの表面密度が少なくとも 0.3 pmol/cm^2 である、を含む、ナノスケールコンストラクト。

【請求項 2】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストのコロナ、および該コロナ中に組み込まれた抗原、ここで該抗原の表面密度が少なくとも 0.3 pmol/cm^2 である、を含む、ナノスケールコンストラクト。

【請求項 3】

抗原が、少なくとも 2 つの異なる型の抗原を含む、請求項 2 に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 4】

組み込まれた核酸相互作用複合体の少なくとも 2 つのアンタゴニストを有するコロナ、ここで前記アンタゴニストが、TLR3、7/8 および / または 9 のアンタゴニストからなる群より選択される、を含む、ナノスケールコンストラクト。

【請求項 5】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストがスペーサーを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 6】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストが RNA または DNA である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 7】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストが二本鎖 RNA または二本鎖 DNA である、請求項 6 に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 8】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストが一本鎖 RNA である、請求項 6 に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 9】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストの表面密度が少なくとも 15 pmol/cm^2 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 10】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストの表面密度が少なくとも 45 pmol/cm^2 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 11】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストが非メチル化デオキシリボ核酸である、請求項 6 に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 12】

非メチル化デオキシリボ核酸が、最適化された免疫調節配列を含む、請求項 11 に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 13】

ナノスケールコンストラクトが、金属性であるナノ粒子コアを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 14】

金属コアが、金、銀、白金、アルミニウム、パラジウム、銅、コバルト、インジウム、ニッケルおよびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項 13 に記載のナノスケールコンストラクト。

【請求項 15】

ナノ粒子コアが金を含む、請求項 13 に記載のナノスケールコンストラクト。

10

20

30

40

50

【請求項 1 6】

ナノスケールコンストラクトが分解可能である、1～16のいずれか一項に記載のナノ粒子コンストラクト。

【請求項 1 7】

ナノスケールコンストラクトの直径が、平均直径において1nm～約250nm、平均直径において約1nm～約240nm、平均直径において約1nm～約230nm、平均直径において約1nm～約220nm、平均直径において約1nm～約210nm、平均直径において約1nm～約200nm、平均直径において約1nm～約190nm、平均直径において約1nm～約180nm、平均直径において約1nm～約170nm、平均直径において約1nm～約160nm、平均直径において約1nm～約150nm、平均直径において約1nm～約140nm、平均直径において約1nm～約130nm、平均直径において約1nm～約120nm、平均直径において約1nm～約110nm、平均直径において約1nm～約100nm、平均直径において約1nm～約90nm、平均直径において約1nm～約80nm、平均直径において約1nm～約70nm、平均直径において約1nm～約60nm、平均直径において約1nm～約50nm、平均直径において約1nm～約40nm、平均直径において約1nm～約30nm、または平均直径において約1nm～約20nm、または平均直径において約1nm～約10nmである、請求項1～16のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクト。10

【請求項 1 8】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストの球状コロナ、ここで、アンタゴニストが、少なくとも1のホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する核酸である、20
を含む、ナノスケールコンストラクト。

【請求項 1 9】

アンタゴニストがCpGオリゴヌクレオチドである、請求項18に記載のナノスケールコンストラクト。20

【請求項 2 0】

核酸の各々のヌクレオチド間結合がホスホジエステル結合である、請求項18または19に記載のナノスケールコンストラクト。20

【請求項 2 1】

コロナが球状コロナである、請求項1～20のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクト。30

【請求項 2 2】

請求項1～21のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクトおよびキャリアを含む、ワクチン。

【請求項 2 3】

請求項1～21のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクトを細胞に送達することを含む、治療剤を細胞に送達するための方法。

【請求項 2 4】

請求項1～21のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクトを細胞に送達することを含む、標的分子の発現を調節するための方法。40

【請求項 2 5】

標的分子が、TLR3、7、8および9からなる群より選択されるTLRである、請求項24に記載の方法。

【請求項 2 6】

請求項1～21のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクトを細胞に送達することを含む、TLRをアンタゴナイズするための方法。

【請求項 2 7】

対象に、請求項1～21のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクトを、免疫応答を低下させるための有効量で投与すること

を含む、対象を処置する方法。50

【請求項 2 8】

対象が感染性疾患を有する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

対象が炎症により誘導される癌を有する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

対象が自己免疫疾患を有する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 1】

対象がアレルギーを有する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 2】

対象がアレルギー性疾患を有する、請求項 2 7 に記載の方法。 10

【請求項 3 3】

対象が炎症性疾患を有する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 4】

対象が代謝性疾患を有する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 5】

対象が心臓血管疾患を有する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 6】

対象が、組織もしくは臓器移植のための候補またはそのレシピエントである、請求項 2 7 に記載の方法。 20

【請求項 3 7】

対象における免疫応答を調節する方法であって、

対象に、請求項 1 8 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のナノスケールコンストラクトを、免疫応答を調節するための有効量で投与すること
を含む、前記方法。 30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願**

本願は、2013年7月25日に出願された米国仮出願番号61/858,584、表題「SPHERICAL NUCLEIC ACID-BASED CONSTRUCTS AS IMMUNOSTIMULATORY AGENTS FOR PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC USE」に対する、35 U.S.C. § 119(e)下の優先権を主張し、当該仮出願は、本明細書においてその全体において参考として援用される。 30

発明の分野

本発明は、核酸相互作用複合体のアンタゴニストを送達するためのナノスケールコンストラクト、ならびにその方法および組成物に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】****発明の背景**

免疫細胞、特にマクロファージ、樹状細胞およびB細胞は、細菌成分および外来DNAまたはRNAなどの外来の材料について環境を調べるために、Toll様受容体（TLR）を用いる⁴ - ¹⁰。これらの受容体が活性化されると、特異的な細胞シグナル伝達経路を通して、第一に転写因子であるNF- κ Bを通して、大規模な炎症応答が生じる¹ - ¹¹。NF- κ Bの活性化は、次いで、付近の免疫細胞に対して炎症応答を促進するTNF- α などの、いくつかの分泌型シグナル伝達分子の産生をもたらす¹ - ¹¹。この免疫性知覚システムは、先天性免疫応答と称される。いくつかの自己免疫障害においては、身体はDNAおよびRNAなどの自己の成分を外来のものとして誤って認識し、強力な炎症応答を開始するが、これは制御されない場合には破壊的であり、痛みを伴い、生命を脅かし得る。このことの最も一般的な例として、第一に関節を攻撃し、注意深く制御されない場合、軟骨および骨を破壊し得る関節リウマチおよびまた、心臓、腎臓および肺などの内部臓器を攻撃し、制御されない場合は致命的となり得るループスが含まれる。現在の治療は、主に、結果として生じる免疫細胞からのサ 40

イトカイン産生をTNFaに結合する抗体（エタネルセプトなど）を通して封鎖すること、ならびにメトトレキサートなどの化学治療剤による一般的な免疫抑制、および獲得免疫応答を回避するためのB細胞集団の除去に依存する。しかし、これらの処置は、しばしば耐容性が低く、および／または時間と共に抵抗性が獲得されやすい。したがって、このシグナル伝達カスケードの開始時におけるTLRの活性化に対するアンタゴニストの開発は、自己免疫障害を罹患する患者における自己DNAおよびRNAの不適切な認識を遮断するための強力な治療であり得る。

【0003】

TLR7、8および9は、全て、免疫細胞のエンドソームと共に存在する。TLR9は、細菌DNAに共通するがヒトDNAには共通しない非メチル化CpGモチーフを認識する⁵、¹⁰。TLR7および8は、いずれも、ウイルス感染に共通する短い一本鎖RNAの特異的な配列を認識する⁶、⁸。重要なことに、それらのそれぞれのTLRをアンタゴナイズして下流のシグナル伝達を阻害し得る、これらの共通認識モチーフの模倣物が知られている¹²、¹⁷。しかし、治療におけるそれらの使用は、それらがin vivoで分解されることなく病気の部位に送達される能力に起因して、限定される。

10

【発明の概要】

【0004】

本明細書において記載されるのは、ナノスケールコンストラクトを用いるTLRなどの受容体相互作用の修飾を通して免疫応答を調節するための、新規の方法および組成物である。本発明の側面は、核酸相互作用複合体のアンタゴニストのコロナを有するナノスケールコンストラクトに関し、ここで、核酸相互作用複合体のアンタゴニストの表面密度は、少なくとも0.3pmol/cm²である。

20

本発明の他の側面におけるものは、核酸相互作用複合体のアンタゴニストのコロナ、および該コロナ中に組み込まれた抗原を有する、ナノスケールコンストラクトである。いくつかの態様において、抗原の表面密度は、少なくとも0.3pmol/cm²である。他の態様において、抗原は、少なくとも2つの異なる型の抗原を含む。

【0005】

さらにほかの側面において、本発明は、組み込まれる核酸相互作用複合体の少なくとも2つのアンタゴニストがあるコロナを有するナノスケールコンストラクトであって、ここで、前記アンタゴニストは、TLR3、7/8および／または9のアンタゴニストからなる群より選択される。

30

いくつかの態様において、核酸相互作用複合体のアンタゴニストは、スペーサーを含む。

他の態様において、核酸相互作用複合体のアンタゴニストは、RNAまたはDNAである。核酸相互作用複合体のアンタゴニストは、例えば、二本鎖RNAまたは二本鎖DNAであってよい。あるいは、核酸相互作用複合体のアンタゴニストは、一本鎖RNAであってよい。いくつかの態様において、核酸相互作用複合体のアンタゴニストは、最適化された免疫調節配列などの非メチル化デオキシリボ核酸である。

【0006】

ある態様において、ナノスケールコンストラクトはナノ粒子コアを含み、任意に、該ナノ粒子コアは、金属性である。ある態様において、金属は、金、銀、白金、アルミニウム、パラジウム、銅、コバルト、インジウム、ニッケルおよびそれらの混合物からなる群より選択される。ある態様において、ナノ粒子コアは、金を含む。ある態様において、ナノ粒子コアは、分解可能な金を含む格子構造である。いくつかの態様において、ナノスケールコンストラクトは、分解可能である。

40

【0007】

ある態様において、ナノスケールコンストラクトの直径は、平均直径において1nm～約250nm、平均直径において約1nm～約240nm、平均直径において約1nm～約230nm、平均直径において約1nm～約220nm、平均直径において約1nm～約210nm、平均直径において約1nm～約200nm、平均直径において約1nm～

50

約190nm、平均直径において約1nm～約180nm、平均直径において約1nm～約170nm、平均直径において約1nm～約160nm、平均直径において約1nm～約150nm、平均直径において約1nm～約140nm、平均直径において約1nm～約130nm、平均直径において約1nm～約120nm、平均直径において約1nm～約110nm、平均直径において約1nm～約100nm、平均直径において約1nm～約90nm、平均直径において約1nm～約80nm、平均直径において約1nm～約70nm、平均直径において約1nm～約60nm、平均直径において約1nm～約50nm、平均直径において約1nm～約40nm、平均直径において約1nm～約30nm、または平均直径において約1nm～約20nm、または、平均直径において約1nm～約10nmである。

10

【0008】

本発明の他の側面におけるものは、核酸相互作用複合体のアンタゴニストの球状コロナを有するナノスケールコンストラクトであって、ここで、前記アンタゴニストは、少なくとも1のホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する核酸である。いくつかの態様において、前記核酸の各々のヌクレオチド間結合は、ホスホジエステル結合である。

本発明のいくつかの態様において、コロナは球状コロナである。

本明細書において記載されるナノスケールコンストラクトおよびキャリアからなるワクチンが、本発明の他の側面において提供される。

20

【0009】

本発明のナノスケールコンストラクトを細胞に送達することによる、治療剤を細胞に送達するための方法が、他の側面において提供される。

標的分子の発現を調節するための方法が、本発明の他の側面において提供される。方法は、本発明のナノスケールコンストラクトを細胞に送達することを含む。いくつかの態様において、標的分子は、TLR3、7、8および9からなる群より選択されるTLRである。

本明細書において記載されるナノスケールコンストラクトを細胞に送達することにより、TLRをアンタゴナイズするための方法が、本発明の他の側面において提供される。

30

【0010】

他の側面により、本発明は、対象に、本明細書において記載されるナノスケールコンストラクトを、免疫応答を低下させるための有効量で投与することを含む、対象を処置する方法である。いくつかの態様において、対象は、感染性疾患、癌、自己免疫疾患、喘息、またはアレルギー性疾患、炎症性疾患、代謝性疾患、心臓血管疾患有するか、あるいは、組織もしくは臓器の移植のための候補またはそのレシピエントである。

30

他の側面において本発明は、対象に、核酸相互作用複合体のアンタゴニストのコロナのナノスケールコンストラクト（ここで、前記アンタゴニストは、少なくとも1のホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する核酸である）を、免疫応答を調節するための有効量で投与することにより、対象における免疫応答を調節する方法である。

ある態様において、方法は、治療または検出モダリティーを細胞に送達することを含む。

【0011】

本発明のさらなる側面は、ナノ粒子コア；アンタゴニスト、およびアンタゴニスト-ナノ粒子の構築のための指示を含む、キットに関する。ある態様において、キットはさらに、使用のための指示を含む。

40

本発明の限定の各々は、本発明の多様な態様を包含し得る。したがって、任意の要素または要素の組み合わせを含む本発明の限定の各々が、本発明の各々の側面において含まれ得ることが予測される。本発明は、その適用において、以下の説明において記載されるかまたは図面において説明される構成の詳細および成分の配置に限定されない。本発明は、他の態様が可能であり、多様な方法において実施されるか実行されることが可能である。

【0012】

図面の簡単な説明

50

添付の図面は、実寸において描かれることを意図されない。図面において、多様な図面

において描かれる各々の同一またはほぼ同一の成分は、類似の記号により表される。明瞭化を目的として、全ての成分が、全ての図面においてラベルされるとは限らない。図面において：

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1A～1Dは、マクロファージ様RAW Blue細胞において、本発明のコンストラクト（AST-015）が、CpGにより誘導されるTLR9活性化を抑制することができるることを示すグラフのセットである。図1AはAST-012を示し、図1BはAST-013を示し、図1CはAST-014を示し、図1DはAST-015を示す。

【図2】図2A～2Dは、マクロファージ様RAW-Blue細胞において、本発明のコンストラクト（AST-015）による前処置が、CpGにより誘導されるTLR9活性化を抑制することができるることを示すグラフのセットである。細胞を、免疫調節コンストラクトと共にインキュベートし、その後、TLR9アゴニストで刺激した。IC₅₀値は、ナノモル濃度（nM）において表す。「未処置」の線は、いかなる刺激因子にも会合したことのない細胞のTLRの活性化レベルを指す。

【0014】

【図3】図3A～3Dは、マクロファージ様RAW-Blue細胞において、本発明のコンストラクト（AST-015）およびCpG DNAによる刺激処置が、CpGにより誘導されるTLR9活性化を抑制することができることを示す、グラフのセットである。RAW-Blueレポーター細胞株において、TLR活性化について、遊離の免疫調節DNA（図3Aおよび3B）および免疫調節SNA（図3Cおよび3D）の効力を比較した。これらの条件下において、細胞を、免疫調節コンストラクトと共にインキュベートし、同時にTLR9アゴニストで刺激した。IC₅₀値は、ナノモル濃度（nM）において表す。「未処置」の線は、いかなる刺激因子にも会合したことのない細胞のTLRの活性化レベルを指す。

【0015】

【図4】図4は、慢性的に刺激されたマクロファージ様RAW-Blue細胞において、本発明のコンストラクト（AST-015）が、CpGにより誘導されるTLR9活性を抑制することができることを示すグラフである。RAW-Blueレポーター細胞株において、TLR活性化について、遊離の免疫調節DNAの効力を決定した。これらの条件下において、細胞を、第一に、TLR9アゴニストコンストラクトで慢性レベルまで予め刺激し、次いで、免疫調節コンストラクトと共にインキュベートし、同時にTLR9アゴニストで再刺激した。IC₅₀値は、ナノモル濃度（nM）において表す。「未処置」の線は、いかなる刺激因子にも会合したことのない細胞のTLRの活性化レベルを参照する。「o/n未処置」の線は、刺激因子と一緒に会合したが、翌日の第2の刺激因子の用量は受容しなかった細胞を指す。

【0016】

【図5】図5Aおよび5Bは、マクロファージ様RAW-Blue細胞において、ASTにより開発された免疫調節配列4084F7/8が、CpGにより誘導されるTLR9活性およびssRNAにより誘導されるTLR7/8活性の両方を抑制することができることを示すグラフのセットである。ASTにおいて開発されたAST-015および修飾された4084F7/8配列において用いられた4084F配列を、Dynavaxからの臨床例IRS869およびIRS954と、TLR9（図5A）およびTLR7/8（図5B）アゴニストに対する効力について比較した。IC₅₀値は、ナノモル濃度（nM）において表す。「未処置」の線は、いかなる刺激因子にも会合したことのない細胞のTLRの活性化レベルを指す。

【0017】

【図6】図6は、免疫調節DNA（irDNA）を含む新規のコンストラクトの代表を示す。図6は、irSNAは、付加のための鋸型として13nm直径の金ナノ粒子、またはチオール化irDNAおよび短いエチレングリコールポリマーを用いて合成できることを示す。

【図7】図7A～7Dは、本発明のコンストラクトが多様なアゴニストを遮断する能力を表すグラフである。試験されたコンストラクトはいずれも、試験される3つ全てのアゴニスト：イミキモド（TLR7、図7B）、CpG 1826（CpG、TLR9、図7D）、細菌リポ多糖（L

10

20

30

40

50

PS、TLR4、図7C)、または同時に3つ全て(図7B)による刺激を遮断することができた。

【発明を実施するための形態】

【0018】

詳細な説明

本発明は、その適用において、以下の説明において記載されるかまたは図面において説明される構成の詳細および成分の配置に限定されない。本発明は、他の態様が可能であり、多様な方法において実施されるか実行されることが可能である。また、本明細書において用いられる語法および用語は、説明を目的とするものであり、限定するものとしてみなされるべきではない。本明細書における「含む(including)」、「含む(comprising)」、または「having」、「含む(containing)」、「含む(involving)」、およびそれらの変化形は、その後に列記される項目およびそれらの均等物、ならびにさらなる項目を包含することを意図される。

10

【0019】

本発明は、いくつかの側面において、免疫調節DNA(irDNA)を含む新規のコンストラクトまたは粒子に関する。免疫調節DNAは、例えば、TLR9、TLR7/8、および/またはTLR7/8/9のアンタゴニストであるDNAオリゴヌクレオチドであってよい。粒子は、それに接着した、本明細書において同等にナノ粒子コンストラクト、ナノスケールコンストラクトまたはirSNAとして言及される、オリゴヌクレオチド構造の密集した配置を有する。これらのコンストラクトは、いくつかの自己免疫性の病態に共通する非メチル化CpGを含有する一本鎖オリゴヌクレオチドおよび一本鎖RNAアゴニストに応答した、TLRにより媒介されるシグナル伝達をアンタゴナイズすることができる。いくつかの例示的なデータを、以下の例において提示する。このデータにおいて、irSNAは、付加のための鑄型として13nmの直径金ナノ粒子、またはチオール化irDNAおよび短いエチレングリコールポリマーを用いて合成することができるが示される(スキーム1、図6Bにおいて示す)。エンドソームに常在するTLRに対するirDNAを含むirSNAが、関節リウマチなどの自己免疫障害などの障害に共通するTLRにより媒介されるシグナル伝達経路の過剰活性化の遮断のためにirDNAを免疫細胞に送達するための、強力かつ新規のアプローチを提供することができることを発見した。これらのコンストラクトが、障害の処置のためにirDNAを送達するための既存の方法よりも著しく有効であったという知見は、極めて予想外であった。出願人は、機序により拘束されないが、本発明のコンストラクト中に存在するような密度のirDNAは、核酸受容体の調節を大きく増強すると考えられる。

20

【0020】

例において提示されるデータは、マウスマクロファージ様細胞(RAW)において、irSNAが、TLR9およびTLR7/8により媒介されるNF BおよびTNF の免疫活性化シグナル伝達の強力な阻害剤であることを示す。一例において、irSNA中に組み込まれた低nMの用量の免疫調節オリゴヌクレオチド配列は、活性化されたTLR9により、およびTLR7/8により媒介されるNF B/TNF シグナル伝達を遮断することができた。重要なことに、天然のホスホジエステル骨格を有するDNAは、irSNA中に組み込まれた場合には有効であるが、溶液中で遊離のオリゴヌクレオチドとして投与された場合には有効ではない。ホスホチオエート(pS)骨格を含有する配列を組み込んでいるirSNAは、遊離DNAの投与と同じくらいに効率的にTLR活性化を調節することができたが、より長い放出プロフィールの利点が付加されている。最新のDNAに基づく治療は、何らかの効力のためにホスホチオエート骨格修飾を必要とするが、ホスホチオエートにより媒介される一般的な毒性に起因して、治療ウィンドウは限定される。本発明のコンストラクトが、天然の、および修飾された骨格の化学の両方を組み込むことができるという事実は、このプラットフォームにおいて開発される治療のための潜在的な治療ウィンドウを大きく増強する。

30

【0021】

NF BおよびTNF シグナル伝達経路は、自己免疫障害、特にRAの急性の病態の主要な原因である¹⁻⁸。伝統的な治療は、主に、過剰に活性化された免疫系の効果を下方調節する

40

50

ための隔離 (sequestration) 戦略に依存し、本来反動的である^{1 9 - 2 1}。irSNAは、主に炎症促進性の細胞応答の活性化をもたらすシグナル伝達のカスケードの原因である受容体を遮断することにより、免疫シグナル伝達を前向きに制御する。この作用機序を用いることは、RA患者を含む自己免疫患者を処置することにおいて著しい潜在的な改善を提供し、例えば、効力の増強、抵抗性の機会の減少、およびより大きな治療ウインドウについての可能性をもたらす。多くの広域スペクトル処置とは異なり、irSNAは、免疫細胞においてのみ主に存在するこれらのシグナル伝達経路の過剰活性化のみを遮断するので、irSNAの投与により、正常な組織および細胞に対する副作用を軽減するか、取り除くことすらできる。

【0022】

10

本発明の側面は、ナノスケールコンストラクトに関する。ナノスケールコンストラクトとは、幾何学的な位置において保持される1または2以上の核酸を有するナノメートルサイズのコンストラクトを指す。ナノスケールコンストラクトは、典型的には、核酸のセットのコロナとして言及される。コロナとは、本明細書において用いられる場合、核酸分子からなる外部の殻を指す。コロナは、核酸、または金属などの他の材料からなるナノ粒子コアを有していてもよい。あるいは、コロナは、単純に、中空のコアを有する幾何学的形状に配置された核酸のセット、すなわち3次元的な形状の核酸の層であってもよい。典型的には、必ずではないが、コロナは球状の形状を有する。

【0023】

20

コロナがナノ粒子コアを含む例において、核酸は、コアに直接的に結合していてもよい。核酸のうちの一部または全ては、直接的にまたは間接的に、共有または非共有結合を通して、他の核酸に結合していてもよい。1つの核酸の別の核酸への結合は、その核酸のコアへの結合に加えるものであっても、その代わりであってもよい。核酸のうちの1または2以上はまた、抗原などの他の分子に結合していてもよい。

コロナがナノ粒子コアを含まない場合、核酸は、互いに、直接的にまたは間接的に、共有または非共有結合を通して結合していてもよい。いくつかの態様において、ナノ粒子コアを含まないコロナは、格子または他の溶解可能な構造上に核酸を層状化し、次いで、空の中心を作るために格子または他の構造を溶解することにより形成することができる。

【0024】

30

本明細書において用いられる場合、ナノスケールコンストラクトとは、ナノメートル(すなわち約1nm～約1マイクロメートル)の桁の平均直径を有するコンストラクトである。例えば、いくつかの例において、ナノ粒子の直径は、平均直径において約1nm～約250nm、平均直径において約1nm～約240nm、平均直径において約1nm～約230nm、平均直径において約1nm～約220nm、平均直径において約1nm～約210nm、平均直径において約1nm～約200nm、平均直径において約1nm～約190nm、平均直径において約1nm～約180nm、平均直径において約1nm～約170nm、平均直径において約1nm～約160nm、平均直径において約1nm～約150nm、平均直径において約1nm～約140nm、平均直径において約1nm～約130nm、平均直径において約1nm～約120nm、平均直径において約1nm～約110nm、平均直径において約1nm～約100nm、平均直径において約1nm～約90nm、平均直径において約1nm～約80nm、平均直径において約1nm～約70nm、平均直径において約1nm～約60nm、平均直径において約1nm～約50nm、平均直径において約1nm～約40nm、平均直径において約1nm～約30nm、平均直径において約1nm～約20nm、平均直径において約1nm～約10nm、平均直径において約5nm～約150nm、平均直径において約5～約50nm、平均直径において約10～約30nm、平均直径において約10～約150nm、平均直径において約1～約100nm、平均直径において約10～約50nm、平均直径において約30～約100nm、または平均直径において約40～約80nmである。

【0025】

40

いくつかの例において、コロナは、1または2以上の核酸相互作用複合体のアンタゴニ

50

ストおよび／または抗原に結合したナノ粒子コアを含む。本明細書において用いられる場合、ナノ粒子コアとは、任意の結合したモダリティーを含まない、ナノ粒子コンストラクトからなるナノ粒子成分を指す。いくつかの例において、ナノ粒子コアは金属性である。ナノ粒子コアが任意の金属を含むことができる事が、理解されるべきである。いくつかの非限定的な金属の例として、金、銀、白金、アルミニウム、パラジウム、銅、コバルト、インジウム、ニッケルおよびそれらの混合物が挙げられる。いくつかの態様において、ナノ粒子コアは、金を含む。例えば、ナノ粒子コアは、分解可能な金を含む格子構造であってよい。ナノ粒子はまた、半導体または磁性の材料を含んでもよい。

【0026】

本発明の側面に適合性のナノ粒子の非限定的な例は、以下において記載され、これらから参照により組み込まれる：米国特許第7,238,472号、米国特許公開番号2003/0147966、米国特許公開番号2008/0306016、米国特許公開番号2009/0209629、米国特許公開番号2010/0136682、米国特許公開番号2010/0184844、米国特許公開番号2010/0294952、米国特許公開番号2010/0129808、米国特許公開番号2010/0233270、米国特許公開番号2011/0111974、PCT公開番号WO 2002/096262、PCT公開番号WO 2003/08539、PCT公開番号WO 2006/138145、PCT公開番号WO 2008/127789、PCT公開番号WO 2008/098248、PCT公開番号WO 2011/079290、PCT公開番号WO 2011/053940、PCT公開番号WO 2011/017690およびPCT公開番号WO 2011/017456。本発明に関連するナノ粒子は、当該分野において公知の任意の手段により合成しても、市販で入手してもよい。例えば、ナノ粒子の商業的サプライヤーのいくつかの非限定的な例として、以下が挙げられる：Ted Pella, Inc. (Redding, CA)、Nanoprobes, Inc. (Yaphank, NY)、Vacuum Metallurgical Co., Ltd. (Chiba, Japan) およびVector Laboratories, Inc. (Burlington, CA)。

【0027】

核酸相互作用複合体とは、本明細書において用いられる場合、核酸分子と相互作用して、例えば、その相互作用に応答して刺激されて免疫応答を引き起こす、分子または分子の複合体を指す。分子または分子の複合体は、受容体であってもよい。いくつかの態様において、核酸相互作用複合体は、パターン認識受容体（PRR）複合体である。PRRは、微生物病原体または細胞ストレスに関連する病原体関連分子パターン（PAMP）、ならびに、細胞損傷の間に放出される細胞成分に関連する損傷関連分子パターン（DAMP）を同定するための、自然免疫系の細胞により発現されるタンパク質からなる免疫系の原始的部分である。PRRとして、限定されないが、受容体キナーゼ、Toll様受容体（TLR）、およびC型レクチン受容体（CLR）（マンノース受容体およびアシアロ糖タンパク質受容体）などの膜結合型PRR；RIG-I様受容体（RLR）、RNAヘリカーゼ、植物PRRおよびNonRDキナーゼなどの細胞質PRR；ならびに分泌型PRRが挙げられる。

【0028】

核酸相互作用複合体として、限定されないが、TLR、RIG-I、転写因子、細胞の翻訳機構、細胞の転写機構、酵素に作用する核酸、および自己抗原に関連する核酸が挙げられる。核酸相互作用複合体のアンタゴニストである核酸分子として、限定されないが、TLRアンタゴニストおよびRIG-Iのアンタゴニスト、転写因子、細胞の翻訳機構、細胞の転写機構、酵素に作用する核酸、および自己抗原に関連する核酸が挙げられる。

いくつかの態様において、核酸相互作用複合体のアンタゴニストは、TLRアンタゴニストである。TLRアンタゴニストとは、本明細書において用いられる場合、TLRと相互作用して、その活性を調節する、すなわちこれを低下させる核酸分子である。

【0029】

Toll様受容体（TLR）は、哺乳動物における自然免疫において重要な役割を果たす、高度に保存されたポリペプチドのファミリーである。TLR1～TLR10と名付けられた少なくとも10のファミリーメンバーが同定されている。多様なTLRの細胞質ドメインは、Toll-インターロイキン1（IL-1）受容体（TIR）ドメインにより特徴づけられる（Medzhitov R et al. (1998) Mol Cell 2:253-8）。TLRによる微生物の浸潤の認識は、ショウジョウバエおよび哺乳動物において進化的に保存されるシグナル伝達カスケードの活性化を引き起

10

20

30

40

50

こす。TIRドメインを含有するアダプタータンパク質であるMyD88は、TLRと関連すること、ならびにIL-1受容体関連キナーゼ（IRAK）および腫瘍壞死因子（TNF）受容体関連因子6（TRAF6）をTLRに動員することが報告されている。MyD88依存的なシグナル伝達経路は、NF- κ B転写因子およびc-Jun N末端キナーゼ（Jnk）マイトジエン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）の活性化をもたらすと考えられ、これらは、免疫活性化および炎症性サイトカインの産生における重要なステップである。概説については、Aderem A et al. (2000) Nature 406:782-87を参照。

【0030】

TLRは、多様な組織において、および多様な型の免疫細胞上に、差次的に発現されると考えられる。例えば、ヒトTLR7は、胎盤、肺、脾臓、リンパ節、扁桃腺において、および形質細胞様前駆体樹状細胞（pDC）上に発現されることが報告されている（Chuang T-H et al. (2000) Eur Cytokine Netw 11:372-8）；Kadowaki N et al. (2001) J Exp Med 194:863-9）。ヒトTLR8は、肺、末梢血白血球（PBL）、胎盤、脾臓、リンパ節において、および単球上に発現されることが報告されている（Kadowaki N et al. (2001) J Exp Med 194:863-9；Chuang T-H et al. (2000) Eur Cytokine Netw 11:372-8）。ヒトTLR9は、報告によれば、脾臓、リンパ節、骨髄、PBLにおいて、ならびにpDCおよびB細胞上で発現される（Kadowaki N et al. (2001) J Exp Med 194:863-9；Bauer S et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:9237-42；Chuang T-H et al. (2000) Eur Cytokine Netw 11:372-8）。

【0031】

ヒトおよびマウスのTLR7のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は公知である。例えば、GenBankアクセション番号AF240467、AF245702、NM_016562、AF334942、NM_133211；ならびにAAF60188、AAF78035、NP_057646、AAL73191、およびAAL73192を参照：これらのすべての内容は、本明細書において参考として援用される。ヒトTLR7は、1049アミノ酸長であると報告される。マウスTLR7は、1050アミノ酸長であると報告される。TLR7ポリペプチドは、ロイシンリッチな反復領域を有する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびTIRドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【0032】

ヒトおよびマウスのTLR8のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は公知である。例えば、GenBankアクセション番号AF246971、AF245703、NM_016610、XM_045706、AY035890、NM_133212；ならびにAAF64061、AAF78036、NP_057694、XP_045706、AAK62677、およびNP_573475を参照：これらのすべての内容は、本明細書において参考として援用される。ヒトTLR8は、少なくとも2つのアイソフォームにおいて存在すると報告され、一方は1041アミノ酸長であり、他方は1059アミノ酸長である。マウスTLR8は、1032アミノ酸長である。TLR8ポリペプチドは、ロイシンリッチな反復領域を有する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびTIRドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【0033】

ヒトおよびマウスのTLR9のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は公知である。例えば、GenBankアクセション番号NM_017442、AF259262、AB045180、AF245704、AB045181、AF348140、AF314224、NM_031178；ならびにNP_059138、AAF72189、BAB19259、AAF78037、BAB19260、AAK29625、AAK28488、およびNP_112455を参照：これらのすべての内容は、本明細書において参考として援用される。ヒトTLR9は、少なくとも2つのアイソフォームにおいて存在すると報告され、一方は1032アミノ酸長であり、他方は1055アミノ酸である。マウスTLR9は、1032アミノ酸長である。TLR9ポリペプチドは、ロイシンリッチな反復領域を有する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、およびTIRドメインを含む細胞内ドメインを含む。

【0034】

本明細書において用いられる場合、用語「TLRシグナル伝達」とは、TLRを通したシグナル伝達に関連する細胞内シグナル伝達の任意の側面を指す。本明細書において用いられる場合、用語「TLRにより媒介される免疫応答」とは、TLRシグナル伝達に関連する免疫応答

10

20

30

40

50

を指す。TLRシグナル伝達または活性の減少とは、基線に相対的なシグナル伝達または活性の減少を指す。基線レベルは、免疫刺激分子がTLRの刺激を引き起こしているレベルであってよい。その例においては、シグナル伝達または活性の減少とは、免疫刺激分子により達成される、シグナル伝達または活性のレベルに関するシグナル伝達または活性の減少である。

【0035】

TLR7により媒介される免疫応答とは、TLR7シグナル伝達に関連する応答である。TLR7により媒介される免疫応答は、一般に、IFN- β 、ならびにIP-10およびI-TACなどのIFN誘導性サイトカインの誘導により特徴づけられる。TLR7により媒介される免疫応答において誘導されるサイトカインIL-1 β 、IL-6、IL-8、MIP-1 α およびMIP-3 α のレベルは、TLR8により媒介される免疫応答において誘導されるものより低い。
10

TLR8により媒介される免疫応答とは、TLR8シグナル伝達に関連する応答である。この応答は、IFN- β 、IL-12p40/70、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、MIP-1 α およびMIP-3 α などの炎症促進性サイトカインの誘導により、さらに特徴づけられる。

TLR9により媒介される免疫応答とは、TLR9シグナル伝達に関連する応答である。この応答は、少なくともIFN- β およびIL-12の産生/分泌により(TLR8により媒介される免疫応答を介して達成されるものよりも低いレベルにおいてではあるが)、さらに特徴づけられる。

【0036】

本明細書において用いられる場合、「TLR7/8アンタゴニスト」とは、集合的に、TLR7および/またはTLR8シグナル伝達を、基線レベルと比較して減少させることができる任意の核酸(すなわち、TLR7および/またはTLR8のアンタゴニスト)を指す。いくつかのTLR7/8アンタゴニストは、TLR7シグナル伝達のみを減少させ(例えばTLR7特異的アンタゴニスト)、いくつかは、TLR8シグナル伝達のみを減少させ(例えばTLR8特異的アンタゴニスト)、他のものは、TLR7およびTLR8の両方のシグナル伝達を減少させる。
20

本明細書において用いられる場合、用語「TLR9アンタゴニスト」とは、TLR9シグナル伝達を減少させができる任意の剤(すなわち、TLR9のアンタゴニスト)を指す。

【0037】

いくつかの態様において、TLR7、8または9のアンタゴニストは、免疫調節核酸を含む。免疫調節核酸として、限定されないが、以下の式に該当する核酸が挙げられる：5' R_n J G C N_z 3'、ここで、各々のRはヌクレオチドであり、nは約0～10の整数であり、JはUまたはTであり、各々のNはヌクレオチドであり、およびzは約1～約100の整数である。いくつかの態様において、nは0であり、zは約1～約50である。いくつかの態様において、Nは、5' S₁ S₂ S₃ S₄ 3'であり、ここで、S₁、S₂、S₃およびS₄は、独立して、G、Iまたは7-デアザ-dGである。いくつかの態様において、TLR7、TLR8および/またはTLR9のアンタゴニストは、以下からなる群より選択される：
30

TCCTGGAGGGTTGT(配列番号1)、

TGCTCCTGGAGGGTTGT(配列番号2)、

TGCTGGATGGGAA(配列番号3)、

TGCCCTGGATGGGAA(配列番号4)、

TGCTTGACACCTGGATGGGAA(配列番号5)、

TGCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP；配列番号6)、

TGCCCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP；配列番号7)、

TGCTTGACACCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP；配列番号8)、

TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(配列番号9)、

TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP；配列番号10)、

【0038】

TTCTGGCGGGGAAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(配列番号11)、

CTCCTATTGGGGGTTCCAT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(配列番号12)、

10

20

30

40

50

ACCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (配列番号 1 3)、
 CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (配列番号 1 4)、
 TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 1 5)、
 CTCCTATTGGGGTTCTAT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 1 6)、
 ACCCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 1 7)

、
 CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 1 8)、

C*C*T*GGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 1 9)、
 CCTGGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 2 0)、

【0 0 3 9】

C*C*T*GGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 2 1)、

/ChoI/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 2 2)、

/StryI/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 2 3)、

/Palm/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 2 4)

T*C*C*T*G*G*A*G*G*G*T*T*G*T (配列番号 2 5)

T*G*C*T*C*C*T*G*G*A*G*G*G*T*T*G*T (配列番号 2 6)

T*G*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A (配列番号 2 7)

T*G*C*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A (配列番号 2 8)

T*G*C*T*T*G*A*C*A*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A (配列番号 2 9)

T*G*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 0)

【0 0 4 0】

T*G*C*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 1)

T*G*C*T*T*G*A*C*A*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 2)

T*C*C*T*G*A*G*C*T*T*G*A*A*G*T*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 3)

T*C*C*T*G*A*G*C*T*T*G*A*A*G*T*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 4)

T*T*C*T*G*G*C*G*G*G*A*A*G*T*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 5)

C*T*C*C*T*A*T*T*G*G*G*G*T*T*T*C*C*T*A*T*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 6)

A*C*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*T*C*T*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 7)

C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 8)

T*T*C*T*G*G*C*G*G*G*A*A*G*T*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 3 9)

C*T*C*C*T*A*T*T*G*G*G*G*T*T*T*C*C*T*A*T*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 4 0)

【0 0 4 1】

A*C*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*T*C*T*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 4 1)

C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP; 配列番号 4 2)
 (13nm AuNP) /5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*G*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A
 (13nm AuNP; 配列番号 4 3)

/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*G*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A (配列番号 4 4)
 (13nm AuNP) /5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*G*C*T*T*G*A*C*A*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A
 (配列番号 4 5)

(13nm AuNP) /5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*C*C*T*G*A*G*C*T*T*G*A*A*G*T (配列番号 50

4 6)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*T*C*C*T*G*A*G*C*T*T*G*A*A*G*T (配列番号

4 7)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*T*T*C*T*G*G*C*G*G*G*A*A*G*T (配列番号

4 8)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*C*T*C*C*T*A*T*T*G*G*G*G*T*T*T*C*C*T*A*T (配列番号 4 9)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*A*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*T*C*T (配列番号 5 0)

【 0 0 4 2 】

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A (配列番号 5 1)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*T*T*C*T*G*G*C*G*G*G*A*A*G*T (配列番号 5 2)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*C*T*C*C*T*A*T*T*G*G*G*G*T*T*T*C*C*T*A*T (配列番号 5 3)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*A*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*T*C*T (配列番号 5 4)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A (配列番号 5 5)

TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (配列番号 5 6)

T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G (配列番号 5 7)

TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (配列番号 5 8)

/ iSp18 // iSp18 // 3ThioMC3-D / (13nm AuNP) T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G* (配列番号 5 9)

/ iSp18 // iSp18 // 3ThioMC3-D / (13nm AuNP) (13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (配列番号 6 0)

【 0 0 4 3 】

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G* (配列番号 6 1)

CTATCTGUCGTTCTCTGU (配列番号 6 2)

C*T*A*T*C*T*G*U*C*G*T*T*C*T*C*T*G*U (配列番号 6 3)

CTATCTGUCGTTCTCTGU (配列番号 6 4)

/ iSp18 // iSp18 // 3ThioMC3-D / (13nm AuNP) C*T*A*T*C*T*G*U*C*G*T*T*C*T*C*T*G*U* (配列番号 6 5)

/ iSp18 // iSp18 // 3ThioMC3-D / (13nm AuNP) (13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / CTATCTGUCGTTCTCTGU (配列番号 6 6)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 /*C*T*A*T*C*T*G*U*C*G*T*T*C*T*C*T*G*U (配列番号 6 7)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (配列番号 6 8)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G* (配列番号 6 9)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / CTATCTGUCGTTCTCTGU (配列番号 7 0)

【 0 0 4 4 】

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / C*T*A*T*C*T*G*U*C*G*T*T*C*T*C*T*G*U* (配列番号 7 1)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / TGCTGGATGGAA (配列番号 7 2)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / TGCCCTGGATGGAA (配列番号 7 3)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / TGCTTGACACCTGGATGGAA (配列番号 7 4)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / TCCTGAGCTTGAAGT (配列番号 7 5)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / TCCTGAGCTTGAAGT (配列番号 7 6)

(13nm AuNP) / 5ThioMC3-D // iSp18 // iSp18 / TTCTGGCGGGGAAGT (配列番号 7 7)

10

20

30

40

50

(13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/CTCCTATTGGGGTTTCCTAT (配列番号 7 8)
 (13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/ACCCCCCTCTACCCCCCTCTACCCCTCT (配列番号 7 9)
)
 (13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/CCTGGATGGGAA (配列番号 8 0)

【 0 0 4 5 】

(13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/TTCTGGCGGGGAAGT (配列番号 8 1)
 (13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/CTCCTATTGGGGTTTCCTAT (配列番号 8 2)
 (13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/ACCCCCCTCTACCCCCCTCTACCCCTCT (配列番号 8 3)

)
 (13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/CCTGGATGGGAA (配列番号 8 4)

10

(13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/C*C*T*GGATGGGAA (配列番号 8 5)

(13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/CCTGGATG*G*AA (配列番号 8 6)

(13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/C*C*T*GGATG*G*AA (配列番号 8 7)

(13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/CCTGGATGGGAA/Chol/ (配列番号 8 8)

(13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/CCTGGATGGGAA/Stryl/ (配列番号 8 9) および
 (13nm AuNP) /5ThioMC3-D// iSp18// iSp18/CCTGGATGGGAA/Palm/ (配列番号 9 0)。

いくつかの態様において、核酸相互作用複合体のアンタゴニストは、参考文献 2 3 および 2 4 において記載され、これらの各々は、参考として援用される。

【 0 0 4 6 】

用語「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、相互交換可能に用いられ、リン酸基に、および、置換されたピリミジン（例えばシトシン（ C ）、チミジン（ T ）もしくはウラシル（ U ））または置換されたプリン（例えばアデニン（ A ）もしくはグアニン（ G ））のいずれかである交換可能な有機塩基に結合した、複数のヌクレオチド（すなわち、糖を含む分子（例えばリボースまたはデオキシリボース）を意味する。したがって、該用語は、DNA および RNA オリゴヌクレオチドの両方を包含する。該用語はまた、ポリヌクレオシド（すなわち、ポリヌクレオチドからリン酸を引いたもの）および任意の他の有機塩基含有ポリマーを含むであろう。オリゴヌクレオチドは、既存の核酸ソース（例えばゲノムまたは cDNA ）から得ることができるが、好ましくは合成である（例えば核酸合成により生成される）。

20

ナノスケールコンストラクト（任意にナノ粒子コアに結合したもの）のポリヌクレオチドは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。二本鎖ポリヌクレオチドはまた、本明細書において、デュプレックス（ duplex ）としても言及される。本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、2 本の別々の相補的核酸鎖を含んでもよい。

30

【 0 0 4 7 】

本明細書において用いられる場合、「デュプレックス」は、相補的配列が互いに水素結合している二本鎖核酸分子を含む。相補的配列は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでもよい。アンチセンスヌクレオチド配列は、標的遺伝子と同一であっても、または、有効な標的遺伝子の阻害を媒介するために十分に標的遺伝子配列と同一（例えば少なくとも約 9 8 % 同一、 9 6 % 同一、 9 4 % 、 9 0 % 同一、 8 5 % 同一または 8 0 % 同一）であつてよい。

40

【 0 0 4 8 】

二本鎖ポリヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であってよく、これは、それがオーバーハングする一本鎖配列を有さず、したがって平滑末端であることを意味する。他の態様において、二本鎖ポリヌクレオチドの2 本の鎖は、異なる長さを有し、1 または 2 以上の一本鎖オーバーハングを生じてもよい。本発明の二本鎖ポリヌクレオチドは、ミスマッチおよび / またはループもしくはバルジを含んでもよい。いくつかの態様において、それは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % または 9 9 % にわたって二本鎖である。いくつかの態様において、本発明の二本鎖ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 または 1 5 個、またはこれらの数までのミスマッチを含む

50

。

【0049】

本発明に関連するポリヌクレオチドは、糖部分、ホスホジエステル結合、および／または塩基などにおいて、修飾されていてもよい。本明細書において用いられる場合、「糖部分」は、ペントース、リボースおよびデオキシリボースを含む天然の非修飾糖、修飾糖ならびに糖アナログを含む。糖部分の修飾として、ヒドロキシル基の、ハロゲン、ヘテロ原子または脂肪族基による置き換えを挙げることができ、例えばエーテル、アミンまたはチオールとしてのヒドロキシル基の官能化を挙げることができる。

糖部分の修飾として、2'-O-メチルヌクレオチドを挙げることができ、これは、「メチル化されている」として言及される。いくつかの例において、本発明に関連するポリヌクレオチドは、修飾されたまたは未修飾の糖部分のみを含んでもよく、一方、他の例においては、ポリヌクレオチドは、修飾されたいくつかの糖部分、および修飾されていないいくつかのものを含む。

【0050】

いくつかの例において、修飾されたヌクレオモノマー(nucleomonomer)として、糖または骨格が修飾されたリボヌクレオチドが挙げられる。修飾されたリボヌクレオチドは、5'の位置において修飾されたウリジンまたはシチジン、例えば5'-(2-アミノ)プロピルウリジンおよび5'-(ブロモウリジン；8位において修飾されたアデノシンおよびグアノシン、例えば8-(ブロモグアノシン；デアザヌクレオチド、例えば7-デアザ-アデノシン；ならびにN-アルキル化されたヌクレオチド、例えばN6-メチルアデノシンなどの、天然に存在しない塩基を含んでもよい。また、糖修飾されたリボヌクレオチドは、H、アルコキシ(もしくはOR)、Rまたはアルキル、ハロゲン、SH、SR、アミノ(NH₂、NHR、NR₂など)、またはCN基により置き換えられた2'-OH基を有していてもよく、ここで、Rは低級アルキル、アルケニルまたはアルキニルである。いくつかの態様において、修飾されたリボヌクレオチドは、修飾された基により置き換えられた隣接するリボヌクレオチドに結合しているホスホジエステル基、例えばホスホロチオエート基を有していてもよい。

【0051】

いくつかの側面において、2'-O-メチル修飾は、二本鎖核酸に対するインターフェロン応答などの細胞ストレス応答を軽減するために有益であり得る。修飾された糖として、D-リボース、2'-O-アルキル(2'-O-メチルおよび2'-O-エチルを含む)、すなわち、2'-アルコキシ、2'-アミノ、2'-S-アルキル、2'-ハロ(2'-フルオロを含む)、2'-メトキシエトキシ、2'-アリルオキシ(-OCH₂CH=CH₂)、2'-プロパルギル、2'-プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、ならびにシアノなどを挙げができる。糖部分はまた、ヘキトースであってもよい。

【0052】

用語「アルキル」は、飽和脂肪族基を含み、これは、直鎖アルキル基(例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなど)、分枝鎖アルキル基(イソプロピル、tert-ブチル、イソブチルなど)、シクロアルキル(脂環式)基(シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル)、アルキル置換されたシクロアルキル基、およびシクロアルキル置換されたアルキル基を含む。いくつかの態様において、直鎖または分枝鎖アルキルは、その骨格中に、6個以下(例えば直鎖についてはC₁-C₆、分枝鎖についてはC₃-C₆)、より好ましくは4個以下の炭素原子を有する。同様に、好ましいシクロアルキルは、それらの環構造中に3~8個の炭素原子を有し、より好ましくは、環構造中に5または6個の炭素を有する。用語C₁-C₆は、1~6個の炭素原子を含むアルキル基を含む。

【0053】

他に特定されない限り、用語アルキルは、「未置換のアルキル」および「置換されたアルキル」の両方を含み、それらの後者は、炭化水素骨格の1または2以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有するアルキル部分を指す。かかる置換基とし

10

20

30

40

50

て、例えば、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、リン酸、ホスホナト (phosphonato)、ホスフィナト (phosphinato)、シアノ、アミノ (アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、およびアルキルアリールアミノを含む)、アシルアミノ (アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む)、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、硫酸、アルキルスルフィニル、スルホナト (sulfonato)、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリール、または芳香族もしくはヘテロ芳香族部分が挙げられ得る。シクロアルキルは、例えば上記の置換基で、さらに置換されていてもよい。「アルキルアリール」または「アリールアルキル」部分は、アリールで置換されたアルキル (例えばフェニルメチル (ベンジル)) である。用語「アルキル」はまた、天然および非天然のアミノ酸の側鎖を含む。用語「n - アルキル」とは、直鎖 (すなわち、非分枝状の) 未置換のアルキル基を意味する。

10

【0054】

用語「アルケニル」は、長さおよび可能な置換について上記のアルキルと類似する不飽和脂肪族基であって、少なくとも 1 の二重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルケニル」は、直鎖アルケニル基 (例えばエチレンイル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニルなど)、分枝鎖アルケニル基、シクロアルケニル (脂環式) 基 (シクロプロペニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニル)、アルキルまたはアルケニルで置換されたシクロアルケニル基、およびシクロアルキルまたはシクロアルケニルで置換されたアルケニル基を含む。いくつかの態様において、直鎖または分枝鎖アルケニル基は、その骨格中に 6 個以下の炭素原子を有する (直鎖については C₂ - C₆、分枝鎖については C₃ - C₆)。同様に、シクロアルケニル基は、その環構造中に 3 ~ 8 個の炭素原子を有していてもよく、より好ましくは環構造中に 5 または 6 個の炭素を有していてもよい。用語 C₂ - C₆ は、2 ~ 6 個の炭素原子を含むアルケニル基を含む。

20

【0055】

他に特定されない限り、用語アルケニルは、「未置換のアルケニル」および「置換されたアルケニル」の両方を含み、それらの後者は、炭化水素骨格の 1 または 2 以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択された置換基を有するアルケニル部分を指す。かかる置換基として、例えば、アルキル基、アルキニル基、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、リン酸、ホスホナト、ホスフィナト、シアノ、アミノ (アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、およびアルキルアリールアミノを含む)、アシルアミノ (アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む)、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、硫酸、アルキルスルフィニル、スルホナト、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリール、または芳香族もしくはヘテロ芳香族部分が挙げられ得る。

30

【0056】

用語「疎水性修飾」は、全体的な疎水性は増大するが、塩基がなお規則的なワトン - クリック相互作用の近くで形成することができるような、塩基の修飾を指す。塩基修飾の非限定的な例として、フェニル、4 - ピリジル、2 - ピリジル、インドリルおよびイソブ

40

50

チル、フェニル（C₆H₅OH）；トリプトファニル（C₈H₆N）CH₂CH（NH₂）CO）、イソブチル、ブチル、アミノベンジル；フェニル；およびナフチルなどの、5位のウリジンおよびシチジン修飾が挙げられる。

【0057】

用語「ヘテロ原子」は、炭素または水素以外の任意の要素の原子を含む。いくつかの様において、好ましいヘテロ原子は、窒素、酸素、硫黄およびリンである。用語「ヒドロキシ」または「ヒドロキシリ」は、-OHまたは-O⁻を（適切な対イオンと共に）有する基を含む。用語「ハロゲン」は、フッ素、臭素、塩素、ヨウ素などを含む。用語「過ハロゲン化された」とは、一般に、全ての水素がハロゲン原子により置き換えられる部分を指す。

10

【0058】

用語「置換された」は、独立して選択される置換基であって、当該部分上に位置することができ、当該分子がその意図される機能を遂行することを可能にするものを含む。置換基の例として、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、(CR'R')₀₋₃NR'R'、(CR'R')₀₋₃CN、NO₂、ハロゲン、(CR'R')₀₋₃C（ハロゲン）₃、(CR'R')₀₋₃CH（ハロゲン）₂、(CR'R')₀₋₃CH₂（ハロゲン）、(CR'R')₀₋₃CONR'R'、(CR'R')₀₋₃S（O）₁₋₂NR'R'、(CR'R')₀₋₃CHO、(CR'R')₀₋₃O（CR'R')₀₋₃H、(CR'R')₀₋₃S（O）₀₋₂R'、(CR'R')₀₋₃O（CR'R')₀₋₃H、(CR'R')₀₋₃COR'、(CR'R')₀₋₃CO₂R'、または(CR'R')₀₋₃OR'基が挙げられ；ここで、各々のR'およびR''は、互いに独立して、水素、C₁-C₅アルキル、C₂-C₅アルケニル、C₂-C₅アルキニル、もしくはアリール基、またはR'与R''とは一緒にになって、ベンジリデン基もしくは-(CH₂)₂O(CH₂)₂-基である。

20

【0059】

用語「アミン」または「アミノ」は、窒素原子が、少なくとも1の炭素またはヘテロ原子に共有結合している化合物または部分を含む。用語「アルキルアミノ」は、窒素が、少なくとも1のさらなるアルキル基に結合している基および化合物を含む。用語「ジアルキルアミノ」は、窒素原子が、少なくとも2つのさらなるアルキル基に結合している基を含む。

30

用語「エーテル」は、2つの異なる炭素原子またはヘテロ原子に結合した酸素を含む、化合物または部分を含む。例えば、該用語は、「アルコキシアルキル」を含み、これは、別のアルキル基に共有結合している酸素原子に共有結合した、アルキル、アルケニルまたはアルキニル基を指す。

【0060】

用語「塩基」は、既知のプリンおよびピリミジンヘテロ環式塩基、デアザプリン、ならびにアナログ（ヘテロ環により置換されたアナログ、例えばアミノエトキシフェノキサジンを含む）、誘導体（例えば1-アルキル誘導体、1-アルケニル誘導体、ヘテロ芳香族誘導体および1-アルキニル誘導体）ならびにこれらの互変異性体を含む。プリンの例として、アデニン、グアニン、イノシン、ジアミノプリン、ならびにキサンチンおよびアナログ（例えば8-オキソ-N⁶-メチルアデニンまたは7-ジアザキサンチン）、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。ピリミジンとして、例えば、チミジン、ウラシルおよびシトシン、ならびにそれらのアナログ（例えば5-メチルシトシン、5-メチルウラシル、5-(1-プロピニル)ウラシル、5-(1-プロピニル)シトシンおよび4,4-エタノシトシン）が挙げられる。好適な塩基の他の例として、2-アミノピリジンおよびトリアジンなどの非プリニルおよび非ピリミジニル塩基が挙げられる。

40

【0061】

いくつかの側面において、本発明のポリヌクレオチドのヌクレオモノマーは、RNAヌクレオチドであり、これは修飾されたRNAヌクレオチドを含む。

用語「ヌクレオシド」は、糖部分、好ましくはリボースまたはデオキシリボースに共有

50

結合した塩基を含む。好ましいヌクレオシドの例として、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドが挙げられる。ヌクレオシドはまた、アミノ酸またはアミノ酸アナログ（これは遊離カルボキシル基、遊離アミノ基、または保護基を含んでもよい）に結合した塩基を含む。好適な保護基は、当該分野において周知である（P. G. M. WutsおよびT. W. Greene, 「Protective Groups in Organic Synthesis」、第2版、Wiley-Interscience、New York、1999年を参照）。

用語「ヌクレオチド」は、さらにリン酸基またはリン酸アナログを含むヌクレオシドを含む。

【0062】

本明細書において用いられる場合、用語「結合」は、天然に存在する未修飾のホスホジエステル部分（-O-（PO²⁻）-O-）であって、隣接するヌクレオモノマーに共有的に連結するものを含む。本明細書において用いられる場合、用語「置換基結合」は、ネイティブなホスホジエステル基の任意のアナログまたは誘導体であって、隣接するヌクレオモノマーに共有的に連結するものを含む。置換基結合は、ホスホジエステルのアナログ、例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、およびP-エトキシホスホジエステル、P-エトキシホスホジエステル、P-アルキルオキシホスホトリエステル、メチルホスホナート、ならびに非リン含有結合、例えばアセタールおよびアミドを含む。かかる置換基結合は、当該分野において公知である（例えばBjergarde et al. 1991. Nucleic Acids Res. 19:5843; Caruthers et al. 1991. Nucleosides Nucleotides. 10:47を参照）。ある態様においては、ホスホロチオエート結合などの非加水分解性結合が好ましい。

10

20

30

40

50

【0063】

いくつかの側面において、本発明のポリヌクレオチドは、3'および5'末端を含む（環状オリゴヌクレオチドを除く）。ポリヌクレオチドの3'および5'末端は、例えば3'または5'結合を修飾することにより、ヌクレアーゼから実質的に保護することができる（例えば米国特許第5,849,902号およびWO 98/13526）。オリゴヌクレオチドは、「プロッキング基」を含めることにより、耐性にすることができる。用語「プロッキング基」とは、本明細書において用いられる場合、保護基または合成のためのカップリング基のいずれかとして、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合することができる置換基（例えばOH基以外のもの）を指す（例えばFITC、プロピル（CH₂-CH₂-CH₃）、グリコール（-O-CH₂-CH₂-O-）、リン酸（PO₃²⁻）、リン酸水素またはホスホロアミダイト）。「プロッキング基」はまた、オリゴヌクレオチドの5'および3'末端を保護する「末端プロッキング基」または「エキソヌクレアーゼプロッキング基」を含み、これは、修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドのエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む。

【0064】

例示的な末端プロッキング基として、キャップ構造（例えば7-メチルグアノシンキャップ）、例えば3'-3'または5'-5'末端逆位による逆位（inverted）ヌクレオモノマー（例えばOrtiagao et al. 1992. Antisense Res. Dev. 2:129を参照）、メチルホスホナート、ホスホロアミダイト、非ヌクレオチド基（例えば非ヌクレオチドリンカー、アミノリンカー、コンジュゲート）などが挙げられる。3'末端ヌクレオモノマーは、修飾された糖部分を含んでもよい。3'末端ヌクレオモノマーは、3'-Oを含み、これは、オリゴヌクレオチドの3'-エキソヌクレアーゼ分解を防ぐプロッキング基により任意に置換されていてもよい。例えば、3'-ヒドロキシルが、3'-3'ヌクレオチド間結合を通してヌクレオチドにエステル化されていてもよい。例えば、アルキルオキシラジカルは、メトキシ、エトキシまたはイソプロポキシ、および好ましくはエトキシであってよい。任意に、3'末端において3'-3'結合したヌクレオチドは、置換結合（substituted linkage）により結合していてもよい。ヌクレアーゼ分解を軽減するために、最5'側の3'-5'結合は、修飾された結合、例えばホスホロチオエートまたはP-アルキルオキシホスホトリエステル結合であってよい。好ましくは、2つの最5'側の3'-5'結合は、修飾された結合である。任意に、5'末端ヒドロキシ部分は、リン含有部分、例え

ばリン酸、ホスホロチオエートまたはP-エトキシリル酸によりエステル化されていてもよい。

いくつかの側面において、ポリヌクレオチドは、DNAおよびRNAの両方を含んでもよい。

【0065】

いくつかの側面において、近接するポリヌクレオチドの少なくとも一部は、置換結合、例えばホスホロチオエート結合により結合している。置換結合の存在により、血清タンパク質に対するそれらのより高いアフィニティーに起因して、薬物動態を改善することができる。

ナノスケールコンストラクトのオリゴヌクレオチドは、好ましくは、6～100塩基の範囲の長さである。しかし、6ヌクレオチドより大きな任意のサイズの核酸（数kbの長さですら）が、十分な免疫調節モチーフが存在する場合には、本発明により免疫応答を誘導することができる。好ましくは、核酸は、8～100の範囲、いくつかの態様においては、8～50または8～30ヌクレオチドのサイズである。

10

【0066】

いくつかの態様において、免疫調節オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート(PS)骨格などの修飾された骨格を有する。他の態様において、免疫調節オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル(PO)骨格を有する。さらに他の態様において、免疫調節オリゴヌクレオチドは、POとPSとの混合骨格を有する。

核酸相互作用複合体のアンタゴニストおよび抗原を含む、本発明に関連するモダリティーは、当該分野において公知の任意の手段により、ナノ粒子コアに結合していくてもよい。オリゴヌクレオチドをナノ粒子に結合させるための方法は、米国特許公開番号2010/0129808において詳細に記載され、これは参考として援用される。

20

【0067】

ナノ粒子は、ポリヌクレオチドに結合させるために官能化することができる。あるいは、またはこれに加えて、ポリヌクレオチドを官能化してもよい。官能化のための一機構は、金ナノ粒子または他の金属、半導体もしくは磁性材料を含むナノ粒子への結合に先立って、オリゴヌクレオチドをそれらの3'または5'末端においてアルカンチオールで官能化する、アルカンチオール法である。かかる方法は、例えばWhitesides, *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry*, Houston, Tex., 109-121頁(1995)、およびMucic et al. *Chem. Commun.* 555-557(1996)において記載される。オリゴヌクレオチドはまた、米国特許第5,472,881号において記載され、参考として援用されるように、ホスホロチオエート基などの他の官能基を用いて、または、Burwell, *Chemical Technology*, 4, 370-377(1974)およびMatteucci and Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191(1981)において記載され、参考として援用されるように、置換されたアルキルシロキサンを用いて、ナノ粒子に結合させることもできる。いくつかの例において、ポリヌクレオチドは、5'または3'チオヌクレオシドによりポリヌクレオチドを終結させることにより、ナノ粒子に結合させる。他の例において、ポリヌクレオチドをナノ粒子に結合させるために、米国特許第6,361,944号、同第6,506,569号、同第6,767,702号、および同第6,750,016号、ならびにPCT公開番号WO 1998/004740、WO 2001/000876、WO 2001/051665およびWO 2001/073123において記載され、参考として援用されるように、エイジングプロセスを用いる。

30

【0068】

いくつかの例において、核酸および/または抗原は、金-チオール結合を通してなど、ナノ粒子コアに共有結合する。結合部位と、取り込み制御部分および/または結合部分との間に、スペーサー配列が含まれていてもよい。いくつかの態様において、スペーサー配列は、オリゴヌクレオチド、ペプチド、ポリマーまたはオリゴエチレンを含むか、またはこれらからなる。

ナノスケールコンストラクトは、複数の化学により設計することができる。例えば、DTPA(ジチオールホスホロアミダイト)結合を用いることができる。DTPAは、チオールによるフレア(flare)の細胞内放出に抵抗し、シグナル・ノイズ比を増大させるために役立

40

50

ち得る。

【0069】

本明細書において記載される方法により生成されるコンジュゲートは、他の方法により生成されるものよりも、少なからず安定である。この増大した安定性は、ナノ粒子コアの表面上のオリゴヌクレオチドの密度の増大、またはコロナの表面を形成することに起因する。界面活性剤、例えば約0.01%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、Tween、またはポリエチレンギリコール(PEG)の存在下において塩の添加を行うことにより、約1時間以内に塩エイジングプロセスを行うことができる。

【0070】

表面密度は、ナノ粒子のサイズおよび型、ならびにオリゴヌクレオチドの長さ、配列および濃度に依存し得る。ナノ粒子を安定にするために適切な表面密度、およびナノ粒子とオリゴヌクレオチドとの所望される組み合わせについてそれを得るために必要な条件は、経験的に決定することができる。一般的には、少なくとも10ピコモル/cm²の表面密度が、安定なナノ粒子-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを提供するために適切であろう。好ましくは、表面密度は、少なくとも15ピコモル/cm²である。表面密度が高すぎると、コンジュゲートのオリゴヌクレオチドが標的とハイブリダイズする能力が減少するため、表面密度は、任意に、約35~40ピコモル/cm²以下である。また、オリゴヌクレオチドが、少なくとも10pmol/cm²、少なくとも15pmol/cm²、少なくとも20pmol/cm²、少なくとも25pmol/cm²、少なくとも30pmol/cm²、少なくとも35pmol/cm²、少なくとも40pmol/cm²、少なくとも45pmol/cm²、少なくとも50pmol/cm²、または50pmol/cm²またはそれより高い表面密度で、ナノ粒子に結合する方法も提供される。

【0071】

本発明の側面は、治療および/または診断用途のための、対象へのナノスケールコンストラクトの送達に関する。粒子は、単独で、または液体(例えば食塩水)もしくは粉末などのin vivoでの投与のための任意の適切な医薬用キャリア中で投与することができる。それらはまた、より大きなキャリア粒子と共に、または投与デバイス内において、共送達することができる。粒子を製剤化してもよい。本発明の製剤は、薬学的に受容可能な溶液中で投与してもよく、これは、慣用的に、薬学的に受容可能な濃度の塩、緩衝化剤、保存剤、適合性のキャリア、アジュバント、および任意に他の治療成分を含んでもよい。いくつかの態様において、本発明に関連するナノスケールコンストラクトは、ローション(例えば、aquaphor)などの物質と混合され、対象の皮膚に投与され、それにより、ナノスケールコンストラクトは対象の皮膚を通して送達される。当該分野において公知のナノ粒子の送達の任意の方法が、本発明の側面に適合性であり得ることが、理解されるべきである。

【0072】

治療における使用のために、粒子を所望される細胞に送達する任意の様式により、粒子の有効量を対象に投与することができる。医薬組成物を投与することは、当業者に公知の任意の手段により達成することができる。投与の経路として、限定されないが、経口、非経口、筋肉内、静脈内、皮下、粘膜、鼻内、舌下、気管内、吸入、眼、腔、皮膚、直腸、および直接的な注射が挙げられる。

【0073】

したがって、本発明は、一側面において、核酸相互作用複合体のアンタゴニストが、免疫調節効果を媒介することにおいて高度に有効であるという知見に関係する。これらの核酸相互作用複合体のアンタゴニストは、癌、感染性疾患、アレルギー、喘息、自己免疫疾患、および他の炎症に基づく疾患を処置するために免疫系を調節するために、治療的および予防的に有用である。

【0074】

本発明の他の側面によるものは、対象に、本明細書において記載されるナノスケールコンストラクトを、免疫応答を低下させるための有効量で投与することを含む、対象を処置

10

20

30

40

50

する方法である。いくつかの態様において、対象は、感染性疾患、癌、自己免疫疾患、喘息、またはアレルギー性疾患、炎症性疾患、代謝性疾患、心臓血管疾患有するか、あるいは組織もしくは臓器の移植のための候補またはそのレシピエントである。

【0075】

代謝性疾患の例として、限定されないが、I型糖尿病、炭水化物代謝、アミノ酸代謝、有機酸代謝、脂肪酸の酸化およびミトコンドリア代謝、ポルフィリン代謝、プリンまたはピリミジン代謝、ステロイド代謝、リソソーム性のミトコンドリアの機能、ペルオキシソームの機能の障害、リソソーム蓄積、尿素回路障害（例えばN-アセチルグルタミン酸シンテターゼ欠損、カルバミルリン酸シンターゼ欠損、オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ欠損、アルギニノコハク酸酸性尿症、シトルリン血症、アルギナーゼ欠損）、アミノ酸障害（例えば非ケトーシス型高グリシン血症、チロシン血症（I型）、メープルシロップ尿症）、有機酸血症（例えばイソ吉草酸血症、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、グルタル酸尿症（glutaric aciduria）I型、グルタル酸血症I & II型）、ミトコンドリア障害（例えばカルボキシラーゼ欠損、ミトコンドリア筋症、乳酸アシドーシス（ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠損）、先天性乳酸アシドーシス、ミトコンドリア呼吸鎖異常、シスチン症、ゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ムコ多糖症I、ムコ多糖症II、ムコ多糖症V）が挙げられる。10

【0076】

心臓血管疾患は、心臓および血管系の多数の障害を指す。典型的には、心臓血管疾患は、以下からなる群より選択される：心肥大；心筋梗塞；脳卒中；動脈硬化症；および心不全。いくつかの例において、心臓血管疾患は、炎症に関連する（例えばアテローム動脈硬化症に関連する炎症）。20

【0077】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストは、本発明のいくつかの側面において、アレルギーまたは喘息、感染性生物による感染症、または特異的癌抗原が同定されている癌を発症するリスクがある対象またはこれを有する対象の処置のためのワクチンとして有用である。これらは、免疫抑制剤と共に投与してもよい。それは、アレルギー、アレルギー性疾患および自己免疫疾患の処置のために、特に有用である。核酸相互作用複合体のアンタゴニストはまた、抗原またはアレルゲンなしで、感染、アレルギーまたは癌に対する保護のために投与してもよく、この場合は、繰り返しの用量により、より長期の保護が可能となる。リスクがある対象とは、本明細書において用いられる場合、感染を引き起こす病原体もしくは癌もしくはアレルゲンへの暴露の任意のリスク、または癌を発症するリスクを有する対象である。30

【0078】

感染症を有する対象とは、感染性病原体に暴露されており、急性または慢性の検出可能なレベルの病原体を体内において有する対象である。免疫調節オリゴヌクレオチドは、感染に関連する免疫応答を軽減するために用いることができる。それは、対象が敗血症を発症するリスクがある場合に、特に望ましい。本発明のコンストラクトは、敗血症などの感染に関連する異常な応答を予防するために有用である。

【0079】

アレルギーを有する対象とは、アレルゲンに応答してのアレルギー反応を有するか、これを発症するリスクがある対象である。アレルギーとは、物質（アレルゲン）に対して獲得された過感受性を指す。アレルギー性の状態として、限定されないが、湿疹、アレルギー性鼻炎または鼻感冒、花粉症、結膜炎、気管支喘息、蕁麻疹（urticaria/hives）および食物アレルギー、および他のアトピー性状態が挙げられる。40

【0080】

癌を有する対象とは、検出可能な癌性細胞を有する対象である。特に、癌は、慢性炎症に関連する癌である。例えば、感染により引き起こされる炎症に関連する癌、または慢性炎症性腸疾患などの状態は、多数の癌に関連する。癌のリスクまたはその進行を増大するいくつかの原因として、感染（例えば胃癌および粘膜リンパ腫についてはHelicobacter p

10

20

30

40

50

ylori；子宮頸癌および肝臓癌についてはそれぞれパピローマウイルスおよび肝炎ウイルス）、自己免疫疾患（例えば大腸癌については炎症性腸疾患）、ならびに原因不明の炎症状態（例えば前立腺癌についての前立腺炎）が挙げられる。本発明のコンストラクトは、慢性の炎症を制御すること、癌の発生または増悪を減少させることにおいて役立つ。

【0081】

対象は、ヒト、または、限定されないが、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、シチメンチョウ、ニワトリ、靈長類、例えばサル、および魚類（水産養殖腫）、例えばサケを含む脊椎動物を意味するであろう。したがって、本発明はまた、非ヒト対象において、癌および腫瘍、感染、およびアレルギー／喘息を処置するために用いることができる。

10

【0082】

本明細書において用いられる場合、用語、処置（treat）、処置された（treated）、または処置すること（treating）とは、感染性疾患、癌、アレルギーまたは喘息などの障害に関して用いられる場合、疾患の発症に対する（例えば病原体による感染に対する）対象の抵抗性を増大するか、または言い換えれば、対象が疾患を発症する（例えば病原体に感染する）可能性を軽減する、予防的処置、ならびに、対象が疾患を発症した後の、疾患と戦う（例えば感染を軽減または取り除く）か、疾患が悪化することを防ぐための処置を指す。

【0083】

抗原とは、本明細書において用いられる場合、免疫応答を惹起することができる分子である。抗原として、限定されないが、細胞、細胞抽出物、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、多糖、多糖コンジュゲート、多糖および他の分子のペプチドおよび非ペプチド模倣物、低分子、脂質、糖脂質、炭水化物、ウイルスおよびウイルス抽出物、ならびに寄生虫などの多細胞生物、ならびにアレルゲンが挙げられる。用語、抗原は、広く、宿主の免疫系により外来性であると認識される任意の型の分子を含む。抗原として、限定されないが、癌抗原、微生物抗原およびアレルゲンが挙げられる。

20

【0084】

癌抗原とは、本明細書において用いられる場合、腫瘍または癌細胞の表面に結合しており、MHC分子に関連して抗原提示細胞の表面上に発現された場合に免疫応答を惹起することができる、ペプチドまたはタンパク質などの化合物である。癌抗原は、例えばCohen, et al., 1994, Cancer Research, 54:1055において記載されるように癌細胞の粗抽出物を調製することにより、抗原を部分的に精製することにより、組み換え技術により、または既知の抗原のde novo合成により、癌細胞から調製することができる。癌抗原として、限定されないが、組み換えにより発現される抗原、腫瘍もしくは癌の免疫原性部分、または腫瘍もしくは癌全体が挙げられる。かかる抗原は、組み換えにより、または当該分野において公知の任意の他の手段により、単離または調製することができる。

30

【0085】

微生物抗原とは、本明細書において用いられる場合、微生物の抗原であり、限定されないが、ウイルス、細菌、寄生虫および真菌を含む。かかる抗原は、完全な微生物、ならびにその天然の単離物およびフラグメントまたは誘導体、ならびにまた、天然の微生物抗原と同一またはこれに類似する合成化合物であって、その微生物に特異的な免疫応答を誘導するものを含む。化合物は、それが天然の微生物抗原に対して免疫応答（体液性および/または細胞性）を誘導する場合、天然の微生物抗原に類似する。かかる抗原は、当該分野において慣用的に用いられ、当業者に周知である。

40

【0086】

アレルゲンとは、感受性の対象においてアレルギー性または喘息性の応答を誘導することができる物質（抗原）を指す。アレルゲンのリストは膨大であり、花粉、昆虫の毒液、動物の鱗屑、真菌の胞子および薬物（例えばペニシリソ）を含み得る。天然の動物および植物のアレルゲンの例として、限定されないが、以下の属に特異的なタンパク質が挙げられる：Canine (Canis familiaris) ; Dermatophagoides (例えばDermatophagoides farin

50

ae) ; Felis (*Felis domesticus*) ; Ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia* ; *Lolium* (例えば *Lolium perenne* または *Lolium multiflorum*) ; *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*) ; *Alternaria* (*Alternaria alternata*) ; *Alder* ; *Alnus* (*Alnus glutinosa*) ; *Betula* (*Betula verrucosa*) ; *Quercus* (*Quercus alba*) ; *Olea* (*Olea europaea*) ; *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*) ; *Plantago* (例えば *Plantago lanceolata*) ; *Parietaria* (例えば *Parietaria officinalis* または *Parietaria judaica*) ; *Blattella* (例えば *Blattella germanica*) ; *Apis* (例えば *Apis mellifera*) ; *Cupressus* (例えば *Cupressus sempervirens* 、 *Cupressus arizonica* および *Cupressus macrocarpa*) ; *Juniperus* (例えば *Juniperus sabina* 、 *Juniperus virginiana* 、 *Juniperus communis* および *Juniperus ashei*) ; *Thuya* (例えば *Thuya orientalis*) ; *Chamaecyparis* (例えば *Chamaecyparis obtusa*) ; *Periplaneta* (例えば *Periplaneta americana*) ; *Agropyron* (例えば *Agropyron repens*) ; *Secale* (例えば *Secale cereale*) ; *Triticum* (例えば *Triticum aestivum*) ; *Dactylis* (例えば *Dactylis glomerata*) ; *Festuca* (例えば *Festuca elatior*) ; *Poa* (例えば *Poa pratensis* または *Poa compressa*) ; *Avena* (例えば *Avena sativa*) ; *Holcus* (例えば *Holcus lanatus*) ; *Anthoxanthum* (例えば *Anthoxanthum odoratum*) ; *Arrhenatherum* (例えば *Arrhenatherum elatius*) ; *Agrostis* (例えば *Agrostis alba*) ; *Phleum* (例えば *Phleum pratense*) ; *Phalaris* (例えば *Phalaris arundinacea*) ; *Paspalum* (例えば *Paspalum notatum*) ; *Sorghum* (例えば *Sorghum halepense*) ; ならびに *Bromus* (例えば *Bromus inermis*) 。

【 0087 】

本発明のナノスケールコンストラクトはまた、抗微生物剤で被覆しても、または抗微生物剤と配合して投与してもよい。抗微生物剤とは、本明細書において用いられる場合、感染性微生物を殺傷または阻害することができる、天然に存在するかまたは合成の化合物を指す。本発明により有用な抗微生物剤の型は、対象が感染しているかまたは感染するリスクがある微生物の型に依存するであろう。抗微生物剤として、限定されないが、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤および抗寄生虫剤が挙げられる。「抗感染症剤」、「抗細菌剤」、「抗ウイルス剤」、「抗真菌剤」、「抗寄生虫剤」および「寄生虫駆除剤」などの句は、当業者にとってよく確立された意味を有し、標準的な医学書において定義される。簡単に述べると、抗細菌剤は、細菌を殺傷または阻害し、抗生物質ならびに類似の機能を有する他の合成または天然の化合物を含む。抗生物質は、微生物などの細胞による二次代謝物として産生される低分子量の分子である。一般に、抗生物質は、微生物に特異的であって宿主細胞においては存在しない 1 または 2 以上の細菌の機能または構造を妨害する。抗ウイルス剤は、天然のソースから単離するかまたは合成することができ、ウイルスを殺傷または阻害するために有用である。抗真菌剤は、表在性真菌感染ならびに日和見真菌感染および原発性全身性真菌感染を処置するために用いられる。抗寄生虫剤は、寄生虫を殺傷または阻害する。

【 0088 】

抗細菌剤は、細菌を殺傷するか、またはその増殖もしくは機能を阻害する。抗細菌剤の大きなクラスは、抗生物質である。広範な細菌を殺傷または阻害することにおいて有効である抗生物質は、広域スペクトル抗生物質と称される。他の型の抗生物質は、主に、グラム陽性またはグラム陰性のクラスの細菌に対して有効である。これらの型の抗生物質は、狭域スペクトル抗生物質と称される。单一の生物または疾患に対して有効であって他の型の細菌に対しては有効ではない他の抗生物質は、限定スペクトル抗生物質 (limited spectrum antibiotics) と称される。抗細菌剤は、ときに、それらの主要な作用様式に基づいて分類される。一般的に、抗細菌剤は、細胞壁合成阻害剤、細胞膜阻害剤、タンパク質合成阻害剤、核酸合成または機能阻害剤、および競合的阻害剤である。

【 0089 】

抗ウイルス剤は、ウイルスによる細胞の感染または細胞内でのウイルスの複製を予防する化合物である。ウイルス複製のプロセスは、宿主細胞内でのDNA複製に非常に緊密に関連し、非特異的な抗ウイルス剤はしばしば宿主に毒性であるため、存在する抗ウイルス薬は、抗細菌薬よりもはるかに少数である。ウイルス感染のプロセス内のいくつかの段階を

10

20

30

40

50

、抗ウイルス剤によって遮断または阻害することができる。これらの段階は、ウイルスの宿主細胞への付着（免疫グロブリンまたは結合ペプチド）、ウイルスの脱殻（例えばアマンタジン）、ウイルスmRNAの合成または翻訳（例えばインターフェロン）、ウイルスRNAまたはDNAの複製（例えばヌクレオチドアナログ）、新たなウイルスタンパク質の成熟（例えばプロテアーゼ阻害剤）、およびウイルスの出芽および放出を含む。

【0090】

本明細書において用いられる場合、用語「癌抗原」および「腫瘍抗原」は、交換可能に用いられ、癌細胞において差次的に発現され、それにより癌細胞を標的化するために利用することができる抗原を指す。癌抗原は、見かけ上腫瘍特異的な免疫応答を潜在的に刺激し得る抗原である。これらの抗原のうちのいくつかは、正常細胞によっては、コードされているが必ずしも発現されない。これらの抗原は、正常細胞においては通常ではサイレントである（すなわち発現されない）もの、分化の特定の段階においてのみ発現されるもの、ならびに胚性および胎性の抗原のように一時的に発現されるものとして特徴づけることができる。他の癌抗原は、癌遺伝子（例えば活性化ras癌遺伝子）、抑制遺伝子（例えば変異体p53）、内部欠失または染色体転座から生じる融合タンパク質などの、変異体細胞遺伝子によってコードされる。なお他の癌抗原は、RNAおよびDNA腫瘍ウイルスに運搬されるものののようなウイルス遺伝子によりコードされ得る。

10

【0091】

核酸相互作用複合体のアンタゴニストはまた、自己免疫疾患を処置および予防するため有用である。自己免疫疾患は、対象の自己の抗体が宿主の組織に反応する、または免疫エフェクターT細胞が内因性の自己ペプチドに対して自己反応性であり、組織の破壊を引き起こす疾患のクラスである。したがって、免疫応答が、対象の自己の抗原（自己抗原と称される）に対して開始される。自己免疫疾患として、限定されないが、関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、前肢性エリテマトーデス（SLE）、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症（MG）、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、天疱瘡（例えば尋常性天疱瘡）、グレーヴス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、抗コラーゲン抗体による強皮症、混合性結合組織病、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アジソン病、自己免疫関連不妊症、糸球体腎炎（例えば半月体形成性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎）、水泡性類天疱瘡、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性および自己免疫性糖尿病が挙げられる。

20

【0092】

「自己抗原」とは、本明細書において用いられる場合、正常な宿主組織の抗原を指す。正常な宿主組織は、癌細胞を含まない。したがって、自己免疫疾患に関して、自己抗原に対して開始される免疫応答は、望ましくない免疫応答であって正常組織の破壊および損傷に寄与し、一方、癌抗原に対して開始される免疫応答は、望ましい免疫応答であって、腫瘍または癌の破壊に寄与する。したがって、自己免疫障害を処置することを目的とする本発明のいくつかの側面において、免疫調節核酸を、自己抗原（特に、自己免疫障害の標的であるもの）と共に投与することは推奨されない。

30

【0093】

他の例において、免疫調節核酸は、低用量の自己抗原と共に送達してもよい。多数の動物実験が、低用量の抗原の粘膜投与が、免疫反応低下の状態または「寛容」をもたらし得ることを示している。活性な機序は、サイトカインにより媒介される、Th1からTh2およびTh3優勢な（すなわち、TGF-β支配的な）応答への免疫偏向（immune deviation）であると考えられる。低用量の抗原の送達による能動的な抑制はまた、無関係な免疫応答をも抑制し得（傍観者抑制（bystander suppression））、これは、自己免疫疾患、例えば関節リウマチおよびSLEの治療において、少なからず重要である。傍観者抑制は、抗原特異的または抗原非特異的な様式のいずれかにおいて炎症促進性サイトカインおよびTh1サイトカインが放出される局所環境における、Th1対抗制御的なサブレッサーサイトカインの分泌を含む。「寛容」とは、本明細書において用いられる場合、この現象を指すように用いられる。実際に、経口寛容は、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、実験的自己免疫性重

40

50

症筋無力症、コラーゲン誘発性関節炎（CIA）、およびインスリン依存性糖尿病を含む、動物における多数の自己免疫疾患の処置において有用であった。これらのモデルにおいて、自己免疫疾患の予防及び抑制は、抗原特異的な体液性および細胞性応答におけるTh1からTh2 / Th3応答へのシフトに関連する。

【0094】

別の側面において、本発明は、先に議論された組成物のうちの1または2以上を含むキットに関する。「キット」は、本明細書において用いられる場合、典型的には、本発明の組成物のうちの1または2以上、および／または例えば先に記載されるような本発明に関連する他の組成物を含む、パッケージまたはアセンブリーを定義する。キットの組成物の各々は、存在する場合は、液体の形態で（例えば溶液で）、または固体の形態（例えば乾燥粉末）で提供することができる。ある場合において、組成物のいくつかは、例えば好適な溶媒または他の種（これはキットにより提供されてもされなくてもよい）の添加により、構成可能または他に（例えば活性形態に）処理可能であってもよい。本発明に関連してもよい他の組成物の例として、限定されないが、組成物の成分を、例えば試料および／または対象に対して、特定の用途のために、例えば使用、投与、改変、組み立て、貯蔵、包装、調製、混合、希釈および／または保存するための、溶媒、界面活性剤、希釈剤、塩、緩衝化剤、乳化剤、キレート剤、充填剤、抗酸化剤、結合剤、增量剤（bulking agent）、保存剤、乾燥剤、抗微生物剤、針、シリンジ、包装材、チューブ、ボトル、フラスコ、ビーカー、ディッシュ、フリット、フィルター、リング、クランプ、ラップ、パッチ、容器、テープ、粘着材などが挙げられる。10

【0095】

いくつかの態様において、本発明に関連するキットは、金を含むナノ粒子コアなどの1または2以上のナノ粒子コアを含む。キットはまた、1または2以上の核酸相互作用複合体のアンタゴニストを含んでもよい。キットはまた、1または2以上の抗原を含んでもよい。20

本発明のキットは、いくつかの場合において、任意の形態における指示を含んでもよく、これは、本発明の組成物に関して、当業者がその指示は本発明の組成物に関連するべきものと認識するであろう様式において提供される。例えば、指示は、組成物および／またはキットに関連する他の組成物の、使用、改変、混合、希釈、保存、投与、組み立て、貯蔵、包装および／または調製のための指示を含んでもよい。いくつかの場合において、指示はまた、例えば特定の用途のための、例えば試料に対する、組成物の使用のための指示を含んでもよい。指示はまた、当業者により、かかる指示を含むために好適な媒体であると認識される任意の形態、例えば、任意の様式において提供される、書面または刊行による、口頭での、可聴式（例えば電話式）の、デジタルの、光学的、視覚的（例えばビデオテープ、DVDなど）または電子的なコミュニケーション（インターネットまたはウェブベースのコミュニケーションを含む）において提供することができる。30

【0096】

いくつかの態様において、本発明は、本明細書において議論される本発明の1または2以上の態様を促進する方法に関する。本明細書において用いられる場合、「促進すること」は、ビジネスを行う全ての方法を含み、限定されないが、本発明のシステム、デバイス、器具、物品、方法、組成物、キットなどに関連して、販売（sell）、広告、譲渡、ライセンス、契約、指示、教育、研究、輸入、輸出、交渉、融資（finance）、融資（loan）、取引（trade）、販売（vend）、転売、卸売り、修理、置き換え、保険契約、訴訟、特許取得などが挙げられる。促進する方法は、限定されないが、個人当事者、ビジネス（公共または民間の）、パートナーシップ、法人、契約代理人または下請け代理人、カレッジまたは大学などの教育機関、研究機関、病院または他の臨床機関、政府機関などを含む、任意の当事者により行われ得る。促進活動は、本発明に明らかに関連する任意の形態のコミュニケーション（例えば書面、口頭、および／または限定されないがe-mail、電話、インターネット、ウェブベースのものなどの電子コミュニケーション）を含んでもよい。40

【0097】

10

20

30

40

50

1セットの態様において、促進の方法は、1または2以上の指示を含んでもよい。本明細書において用いられる場合、「指示」は、指示的用途の成分（例えば、説明書、手引書、警告、ラベル、注釈、FAQまたは「よくある質問」など）を定義し得、典型的には、発明の上または発明および/または発明の包装に関連した、書面の指示を含む。指示はまた、ユーザーが、当該指示が、本明細書において議論される本発明に関連することを明らかに認識するであろう任意の様式におけるものであるならば、任意の形態（例えば口頭、電子、可聴式、デジタル、光学的、可視的など）における指示的コミュニケーションを含んでもよい。

【0098】

本発明は、以下の例によりさらに説明され、これは、決してさらに限定するものとして解釈されるべきではない。本願を通して引用される参考文献（学術文献、発行された特許、公開された特許出願、および同時係属の特許出願）の全ての全内容は、本明細書により参照により明示的に組み込まれる。

【0099】

例

例1：

TLR9を阻害する4つの主な強力な配列、ODN2088^{1 4 、 1 5}、ODN G^{1 2 、 1 7}、ODN MT01^{2 2}、およびODN 4084F^{1 3 、 1 6}が同定されている。これらを表1に示す。本発明者らは、これらの配列を用いるコンストラクトを開発した。これらのコンストラクトは、本明細書中の適切な箇所において、irSNAとして言及される。本明細書において、irSNAが、多様な刺激条件下において、TLR9の活性化を阻害することにおいて有効であったことが示される。このタスクを達成するために、本発明者らは、RAW-Blueマウスマクロファージレポーター系の系(Invivogen)を用いた。簡単に述べると、RAW-Blue系は、TLR活性化の下流のNF-Bシグナル伝達に対して応答性のレポータープラスミドを安定に発現するマウスマクロファージからなる。このNF-Bにより制御されるプラスミドは、アルカリホスファターゼを発現し、これは細胞により分泌され、収集され、生細胞におけるTLR活性化をモニタリングするために比色検出剤を用いて定量することができる。本発明者らは、RAW-Blue細胞を、各々の型の天然のホスホジエステル(po)もしくはホスホチオエート(ps)のいずれかの骨格を有する遊離のirDNAオリゴヌクレオチドの濃度を増加しながら、または各々のそれぞれの免疫調節オリゴヌクレオチドをロードしたirSNAと共に(表1を参照)、2時間にわたりインキュベートした。このインキュベーションの後で、細胞を、いずれもTLR9を刺激することが知られる^{1 、 1 0}0.5 μMのホスホチオエート骨格を有するCpG含有DNAまたは10 μMのホスホジエステル骨格を有するCpG含有DNAのいずれかにより刺激し、細胞を一晩インキュベートした。TLR9の活性化を、次いで、レポーターアッセイを用いて測定し、相対的活性化レベルを、免疫調節DNAまたはSNAコンストラクトの濃度に対してプロットし、非線形最小二乗回帰フィットを行い、Hill Slope = 1を仮定して、GraphPad Prismソフトウェアを用いてIC₅₀値を決定した。

【0100】

結果を図1に示す。2088 DNAは、553 nMのIC₅₀により高ナノモル濃度の効力を示し、一方、対応するirSNAコンストラクト、AST-012のIC₅₀値は、アッセイにおける用量限界に起因して決定することができなかった(図1A)。G DNAは、4.2 nMの低ナノモル濃度IC₅₀を示したが、高濃度におけるSNA中への安定な組み込みに不適合であった(図1B)。MT01 DNAは、278.6 nMのIC₅₀を有し、それぞれのirSNA、AST-014のIC₅₀は、アッセイにおける用量限界に起因して決定することができなかった(図1C)。しかし、4084F DNAは、1.6 nMのIC₅₀により最も強力な効力を示し、それぞれのAST-015 SNAアログは、1.3 nMのIC₅₀により同等の効力を示した。このことは、AST-015コンストラクトが遊離のオリゴヌクレオチドと同じくらい有効であり、irDNA配列がSNAの構造に適合性であったことを示した。したがって、図1に示されるとおり、AST-015は、マクロファージ様RAW-Blue細胞において、CpGにより誘導されるTLR9活性化を抑制することができた。

10

20

30

40

50

【0101】

例2

免疫調節性オリゴヌクレオチドを利用する現在の治療は、生物の体液中のオリゴヌクレオチドの分解を防ぐために、ホスホロチオエート骨格の使用を必要とする。しかし、ホスホロチオエート骨格は、望ましくないレベルの毒性を導入し、天然のホスホジエステル骨格を用いることができれば、特に有利である。本発明者らは、天然のホスホジエステル化学を組み込むSNAがTLRの活性を遮断する能力を試験した。本発明者らは、初めに、免疫調節コンストラクト、p oもしくはp s化学における遊離の4084F DNA、またはp oもしくはp s化学におけるAST-015のいずれかと共にプレインキュベートされた細胞が、マクロファージ様細胞(RAW-Blue)を、TLR9アンタゴニストであるCpG DNAに対して不応性にするか否かを調べた。簡単に述べると、増加する濃度の免疫調節コンストラクトを、2時間にわたり細胞に添加して、取り込ませてエンドソーム区画中に組み込ませた。このインキュベーションの後で、0.5 μMのCpG DNA 1668psまたは10 μMのCpG DNA 1826poのいずれかを添加して、細胞を一晩インキュベートし、次いで上記のように刺激を定量した。

【0102】

比較のための基線として、本発明者らは、遊離の4084F DNAの効力を初めに調べた。結果を図2に示す。ホスホジエステルCpG刺激性DNAに暴露された場合、4084F DNApoは、7.1 nMのIC₅₀を有し、一方、4084F DNAsは、0.4 nMのIC₅₀を有し、約1桁有効性が高かった。このことは、遊離4084Fのホスホジエステルおよびホスホロチオエートの両方のバージョンが、遊離ホスホジエステルCpGにより誘導される免疫刺激を遮断することができることを示す(図2A)。同じ系において、より安定なホスホロチオエートCpG DNAに暴露された場合、遊離4084F DNApoは、刺激を遮断することができなかつたが、しかし、4084F DNAsは、4 nMのIC₅₀により刺激を遮断することができた(図2B)。これらの値を比較のための基線として、本発明者らは次に、AST-015について効力値を決定した。ホスホジエステルCpG DNAに暴露された場合、AST-015poは7.1 nMのIC₅₀を有し、一方、AST-015psは、1.4 nMのIC₅₀を有し、これらはいずれも遊離DNAのものとほぼ同一であった(図2C)。興味深いことに、より安定なホスホロチオエートCpG DNAに暴露された場合、その遊離DNAアナログがホスホロチオエートCpG DNAに対して先には有効でなかったAST-015poは、24.1 nMのIC₅₀により有効であった。AST-015ps処置はまた、0.7 nMのIC₅₀により有効であった(図2D)。これらのデータは、免疫調節DNA配列のSNA構造中への組み込みが、遊離DNAのみを超えて、ユニークかつ新規の利点を付与することを示す。

【0103】

例3

先の例は、AST-015が、CpG含有免疫刺激性DNAを刺激する前に添加された場合にTLR9により誘導されるシグナル伝達を抑制する能力を調べた。本発明者らは次に、AST-015が、同時に添加された場合に免疫刺激性DNAに競り勝つことができるか否かを決定しようとした。これを達成するために、RAW-Blue細胞を、0.5 μMのCpG DNA 1668psまたは10 μMのCpG DNA 1826poのいずれかにより、増加する濃度のp oおよびp sの両方における遊離4084F DNAまたはp oおよびp sの両方におけるAST-015のいずれかの存在下において、刺激した。結果を図3に示す。

【0104】

ホスホジエステルCpG刺激性DNAと同時に暴露された場合、4084F DNApoは、11.2 nMのIC₅₀を有し、一方、4084F DNAsは、0.5 nMのIC₅₀を有し、約1桁有効性が高かった(図3A)。同じ系において、より安定なホスホロチオエートCpG DNAに暴露された場合、遊離4084F DNApoは、刺激を遮断することができなかつたが、しかし、4084F DNAsは、17.6 nMのIC₅₀により刺激を遮断することができた(図3B)。これらの値を比較のための基線として、本発明者らは次に、AST-015について効力値を決定した。ホスホジエステルCpG DNAに暴露された場合、AST-015poは、9.9 nMのIC₅₀

10

20

30

40

50

を有し、一方、AST015psは、 $2 \sim 3 \text{ nM}$ のIC₅₀を有し、これらはいずれも遊離DNAのものとほぼ同一であった（図3C）。先に記載されるirSNAによる前処置と同様に、より安定なホスホロチオエートCpG DNAと同時に暴露された場合、その遊離DNAアナログが先にホスホロチオエートCpG DNAに対して有効でなかったAST-015poは、 $77 \sim 3 \text{ nM}$ のIC₅₀により有効であった。AST-015ps処置はまた、 $1 \sim 9 \text{ nM}$ のIC₅₀により有効であった（図3D）。

【0105】

例4

本発明者らは次に、患者が既に過剰活性化された免疫系を提示している臨床的シナリオのためのモデルとして、既に慢性刺激状態におかれていた細胞において、遊離の4084F DNAが、CpGにより誘導されるTLR9活性化を抑制することができるか否かを調べた。これを達成するために、RAW-Blue細胞を、 $0 \sim 5 \mu\text{M}$ のCpG 1668psで18時間にわたりマクロファージを活性化するために刺激し、培地を、追加の $0 \sim 5 \mu\text{M}$ の用量のCpG1668psで、増加する濃度のp oまたはp s化学のいずれかにおける遊離4084F DNAの存在下において、さらなる18時間にわたり交換し、その後、比色検出アッセイを用いて定量した。結果を図4に示す。

【0106】

遊離4084F DNAsは、これらの慢性処置されたマクロファージにおいて、 241 nM のIC₅₀により有効であった。これは、 $0 \sim 9 \text{ nM}$ のIC₅₀を有した4084F DNAsの効力よりも大まかに2桁効力が低く、このことは、そのホスホジエステル形態における遊離のDNAが、比較的弱いTLR活性化のリプレッサーであることを示唆する（図4）。

重要なことに、これらのデータは、免疫調節配列の前処置が、コンストラクトが有効であるために必要ではないことを示す。これは、当該技術を、臨床において炎症症状が存在する場合に、予防薬として、および急性の処置として用いることを可能にするので、重要な特徴である。

【0107】

興味深いことに、p o形態のAST-015は、ホスホロチオエートTLR9を活性化するCpG含有DNAに対して低ナノモル濃度の効力を示し、一方、そのそれぞれの遊離DNA等価物は、この活性を遮断することにおいて無効である。p s形態のAST-015は、その遊離DNA等価物に対して、等効力であった。このことは、免疫調節DNAは、活性を喪失することなくSNAコンストラクト中にロードすることができ、その効力は、遊離DNA等価物から予測されるであろうものとは異なることを示す。このデータを考慮して、オリゴヌクレオチドコンストラクトは、塩基配列の選択的な修飾により設計することができる。例えば特異的部位におけるホスホロチオエート骨格の選択的組み込み、ならびに、膜結合を促進するためのコレステロール、ステアリル基および/またはパルミトイル基などの親油性剤の組み込みを行ってもよい（表2を参照）。このことは、現在の遊離DNA処置アプローチと比較してより効果的な治療を開発するために、生物体液中の分解耐性の増強、生体分布の増強、およびin vivoでのコンストラクトの迅速な取り込みなどの、SNAの構造の有利な特性の利用を可能にする。

【0108】

例5：irSNAは複数のTLRをアンタゴナイズすることができる

SNAコンストラクトを、より広範囲のTLRに対するアンタゴニストとして役立つように、カスタマイズされた調節配列を組み込むために調整した。これらのコンストラクトを、現在の最先端のアンタゴニストの送達と比較した。これを達成するために、新規のTLR7/8/9アンタゴニスト配列を設計し、効力について、現在臨床的に適切であるDynavaxにより開発された配列に対して、比較した^{2 3}、^{2 4}（表3）。上記と同じ系を用いて、RAW-Blue細胞を、増加する濃度の、いずれもホスホロチオエート骨格化学を有する4084F、IRS869、IRS954、またはASTにより開発された4084F7/8と共に、2時間にわたりインキュベートして、取り込ませてエンドソームにより内部移行させた。次いで、細胞を、 $0 \sim 5 \mu\text{M}$ のホスホロチオエート骨格を有するTLR9を活性化するCpG 1668 DNA、または $5 \mu\text{M}$ のTLR7/8

10

20

30

40

50

を活性化する一本鎖RNAであるssRNA 06^{6 - 8} のいずれかに一晩暴露し、上記の比色アッセイを用いてTLR活性化を測定した。結果を図5に示す。

【0109】

興味深いことに、AST-015中に組み込まれる4084F配列は、最先端のDynavax配列であるIRS869およびIRS954と同様に、TLR9に対して有効であり (IC_{50} : 4084F = 2 . 8 nM ; IRS869 = 3 . 0 nM ; IRS954 = 9 . 4 nM) 、ASTにより開発されたTLR7/8/9アンタゴニスト4084F7/8は、より弱いがなお有効な 196 nM の IC_{50} を有した(図5A)。重要なことに、4084F7/8は、Dynavax配列と同じ効力を有するその塩基配列カウンターパートである4084Fに対して、TLR7/8活性化をアンタゴナイズする能力を獲得した (IC_{50} : 4084F > 10,000 nM ; IRS869 = 4,775 nM ; IRS954 = 3,134 nM ; 4084F7/8 = 3,956 nM) (図5B)。
10

【0110】

重要なことに、この例は、広範なエンドソームTLRを塩基配列の修飾を通してアンタゴナイズするために、特異的配列を設計することができることを示す。これらのデータに基づいて、当業者は、それらの遊離DNAカウンターパートまたは現在の最先端の臨床的に試験されたコンストラクトと同等かまたはそれより良好に機能するであろう、特異的TLRアンタゴニストおよび広範なTLRアンタゴニストの両方をSNA形態において開発することができる。

【0111】

例6：リポソーム球状核酸の多様なtoll様受容体アゴニスト活性の拮抗作用

従来のリポソーム押し出しプロセスにより形成されるDOPC (1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン) からなる脂質ミセルコアを形成することにより、リポソームSNAを調製した。DOPCミセル形成の後で、配列4084F (5' - C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A - 3') (配列番号121)、*は、ホスホロチオエートを示す) または4084F-Ext (5' - T*G*C*T*T*G*A*C*A*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A - 3') (配列番号122) のオリゴヌクレオチドを、3'末端において、ジステアリルまたはトコフェロール基などの脂質基に結合させ、簡単に混合することによりミセル中に組み込み、その後、接線流ろ過(TFF)により精製して、約100オリゴ/SNAを有する精製されたリポソームSNAを得た。RAW-Blueマクロファージ(InVivoGen)を、示されたTLRアゴニスト、イミキモド(TLR7、図7B)、CpG 1826(CpG、TLR9、図7D)、細菌リポ多糖(LPS、TLR4、図7C)、または同時に3つ全て(図7A)と共に、4時間インキュベートし、その後、示されたリポソームSNAまたはPBSと共に一晩インキュベートして、未処置のものを参照した。データを図7に示す。いずれのコンストラクトも3つ全てのアゴニストによる刺激を遮断することができることを見出した。
20
30

【0112】

【表1】

免疫調節配列			
名称	配列	Ref.	配列番号
2088 DNA	TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	14,25	91
G DNA	CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	12,17	92
MT01 DNA	ACCCCCCTCACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	22	93
4084F DNA	CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	13,16	94
AST-012	TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	95
AST-013	CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	96
AST-014	ACCCCCCTCACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	97
AST-015	CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	98
Ctrl DNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	14,25	99
Ctrl SNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	100
免疫刺激性配列			
CpG 1826	TCCATGACGTTCTGACGTT	5,10	101
CpG 1668	TCCATGACGTTCTGATGCT	5,12	102

表1:本研究において用いられる TLR9 アンタゴニストおよび刺激性配列のアイデンティティ。
全配列はデオキシリボヌクレオチドからなる。/iSp18/=内部スペーサー18 リンカー;/3ThioMC3-D/=3炭素
リンカーを有する3'末端チオール;13nm AuNP=直径13ナノメートルの金ナノ粒子;テキスト中の「po」は全ホ
スホジエステル骨格化学を指す;テキスト中の「ps」は全ホスホチオエート骨格化学を指す。

【0 1 1 3】

10

20

30

【表2】

免疫調節配列			
名称	配列	Ref.	配列番号
AST-015mod1	C*C*T*GGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	103
AST-015mod2	CCTGGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	104
AST-015mod3	C*C*T*GGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	105
AST-015mod4	/Chol/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	106
AST-015mod5	/Stryl/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	107
AST-015mod6	/Palm/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	108

表2:効力を促進するために考えられるAST-015に対する修飾

全配列はデオキシリボヌクレオチドからなる。/iSp18/=内部スペーサー18 リンカー;/3ThioMC3-D/=3炭素リンカーを有する3'末端チオール;13nm AuNP=直径13 ナノメートルの金ナノ粒子;*=ホスホロチオエート結合;/Chol/=コレステロール;/Stryl/=C16/C18 ステアリル基;/Palm/=パルミトイル基。

【0 1 1 4】

【表3】

免疫調節配列			
名称	配列	Ref.	配列番号
IRS869	TCCTGGAGGGGTTGT	²⁴	109
IRS954	TGCTCCTGGAGGGGTTGT	²⁴	110
4084F7/8 DNA	TGCTGGATGGGAA	AST	111
4084F7/8Ext	TGCCCTGGATGGGAA	AST	112
4084D7/8Full	TGCTTGACACCTGGATGGGAA	AST	113
AST-016	TGCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	114
AST-017	TGCCCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	115
AST-018	TGCTTGACACCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	116
Ctrl DNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	²⁴	117
Ctrl SNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/ (13nm AuNP)	AST	118

免疫刺激配列

ssRNA06	TCCATGACGTTCCCTGACGTT	⁶⁻⁸	119
CpG 1668	TCCATGACGTTCCCTGATGCT	¹⁰	120

表3:本研究において用いられる TLR7/8/9 アンタゴニストおよび刺激性配列のアイデンティティ。

リボヌクレオチドからなる ssRNA06 を除き、全配列はデオキシリボヌクレオチドからなる。/iSp18/=内部スペーサー18 リンカー;/3ThioMC3-D/=3炭素リンカーを有する3'末端チオール;13nm AuNP=直径13 ナノメートルの金ナノ粒子;テキスト中の「po」は、全ホスホジエステル骨格化学を指す;テキスト中の「ps」は、全ホスホロチオエート骨格化学を指す。

【0 1 1 5】

参考文献

10

20

30

【表4】

- (1) Hornung, V.; Rothenfusser, S.; Britsch, S.; Krug, A.; Jahrsdorfer, B.; Giese, T.; Endres, S.; Hartmann, G. *J Immunol* **2002**, *168*, 4531.
- (2) Stacey, K. J.; Sweet, M. J.; Hume, D. A. *J Immunol* **1996**, *157*, 2116.
- (3) Zaremba, K. A.; Godowski, P. J. *J Immunol* **2002**, *168*, 554.
- (4) Bauer, M.; Redecke, V.; Ellwart, J. W.; Scherer, B.; Kremer, J. P.; Wagner, H.; Lipford, G. B. *J Immunol* **2001**, *166*, 5000.
- (5) Bauer, S.; Kirschning, C. J.; Hacker, H.; Redecke, V.; Hausmann, S.; Akira, S.; Wagner, H.; Lipford, G. B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 9237.
- (6) Diebold, S. S.; Massacrier, C.; Akira, S.; Paturel, C.; Morel, Y.; Reis e Sousa, C. *European journal of immunology* **2006**, *36*, 3256.
- (7) Forsbach, A.; Nemorin, J. G.; Montino, C.; Muller, C.; Samulowitz, U.; Vicari, A. P.; Jurk, M.; Mutwiri, G. K.; Krieg, A. M.; Lipford, G. B.; Vollmer, J. *J Immunol* **2008**, *180*, 3729.
- (8) Heil, F.; Hemmi, H.; Hochrein, H.; Ampenberger, F.; Kirschning, C.; Akira, S.; Lipford, G.; Wagner, H.; Bauer, S. *Science* **2004**, *303*, 1526.
- (9) Krieg, A. M. *Journal of clinical immunology* **1995**, *15*, 284.
- (10) Krieg, A. M.; Yi, A. K.; Matson, S.; Waldschmidt, T. J.; Bishop, G. A.; Teasdale, R.; Koretzky, G. A.; Klinman, D. M. *Nature* **1995**, *374*, 546.
- (11) West, A. P.; Koblansky, A. A.; Ghosh, S. *Annual review of cell and developmental biology* **2006**, *22*, 409.
- (12) Peter, M.; Bode, K.; Lipford, G. B.; Eberle, F.; Heeg, K.; Dalpke, A. H. *Immunology* **2008**, *123*, 118.
- (13) Lenert, P.; Yi, A. K.; Krieg, A. M.; Stunz, L. L.; Ashman, R. F. *Antisense & nucleic acid drug development* **2003**, *13*, 143.
- (14) Stunz, L. L.; Lenert, P.; Peckham, D.; Yi, A. K.; Haxhinasto, S.; Chang, M.; Krieg, A. M.; Ashman, R. F. *European journal of immunology* **2002**, *32*, 1212.
- (15) Krieg, J.; Hartmann, S.; Vicentini, A.; Glasner, W.; Hess, D.; Hofsteenge, J. *Molecular biology of the cell* **1998**, *9*, 301.
- (16) Lenert, P.; Rasmussen, W.; Ashman, R. F.; Ballas, Z. K. *DNA and cell biology* **2003**, *22*, 621.
- (17) Gursel, I.; Gursel, M.; Yamada, H.; Ishii, K. J.; Takeshita, F.; Klinman, D. M. *J Immunol* **2003**, *171*, 1393.
- (18) Goh, F. G.; Midwood, K. S. *Rheumatology (Oxford)* **2012**, *51*, 7.
- (19) Chabaud, M.; Durand, J. M.; Buchs, N.; Fossiez, F.; Page, G.; Frappart, L.; Miossec, P. *Arthritis and rheumatism* **1999**, *42*, 963.
- (20) van den Berg, W. B.; Miossec, P. *Nature reviews. Rheumatology* **2009**, *5*, 549.
- (21) Emery, P.; Fleischmann, R.; Filipowicz-Sosnowska, A.; Schechtman, J.; Szczepanski, L.; Kavanaugh, A.; Racewicz, A. J.; van Vollenhoven, R. F.; Li, N. F.; Agarwal, S.; Hessey, E. W.; Shaw, T. M. *Arthritis and rheumatism* **2006**, *54*, 1390.
- (22) Yang, G.; Wan, M.; Zhang, Y.; Sun, L.; Sun, R.; Hu, D.; Zhou, X.; Wang, L.; Wu, X.; Yu, Y. *Immunology* **2010**, *131*, 501.
- (23) Kanzler, H.; Barrat, F. J.; Hessel, E. M.; Coffman, R. L. *Nature medicine* **2007**, *13*, 552.
- (24) Barrat, F. J.; Meeker, T.; Gregorio, J.; Chan, J. H.; Uematsu, S.; Akira, S.; Chang, B.; Duramad, O.; Coffman, R. L. *The Journal of experimental medicine* **2005**, *202*, 1131.
- (25) Krieg, A. M.; Wu, T.; Weeratna, R.; Efler, S. M.; Love-Homan, L.; Yang, L.; Yi, A. K.; Short, D.; Davis, H. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 12631.

【0 1 1 6】

均等物

50

当業者は、本明細書において記載される本発明の具体的な態様に対する多くの均等物を、認識するか、または慣用的な実験のみを用いて確認することができる。かかる均等物は、以下の請求の範囲により包含されることが意図される。

本明細書において開示される特許書類を含む全ての参考文献は、その全体において参考として援用される。

【図1A - B】

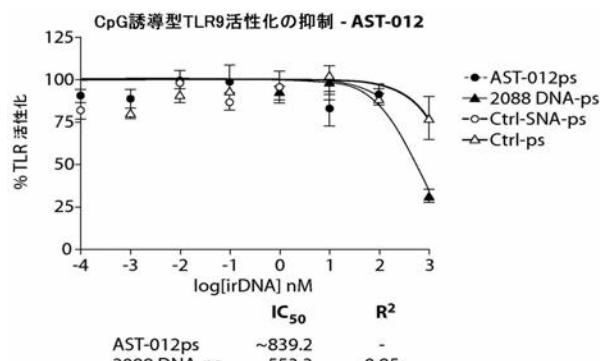


図1A

【図1C - D】

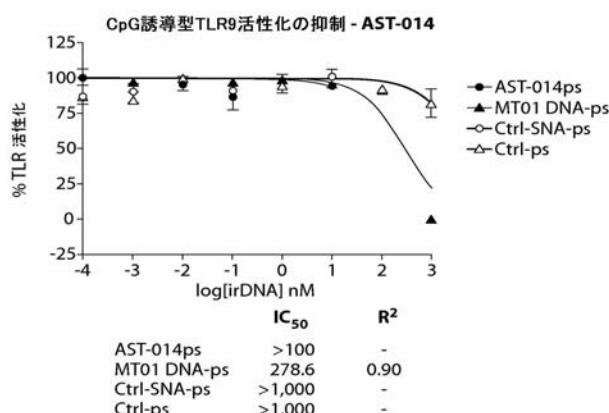


図1C

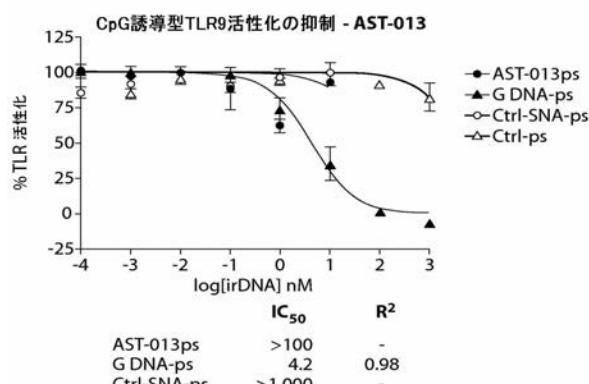


図1B

CpG誘導型TLR9活性化の抑制 - AST-015

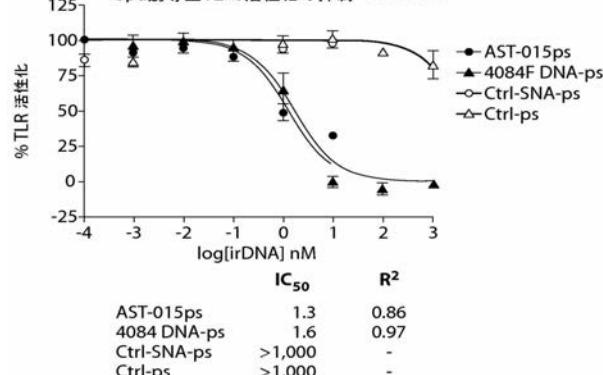


図1D

【図2A - B】

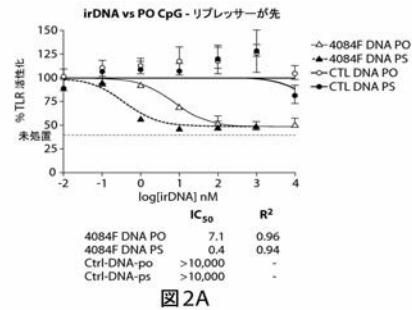


図2A

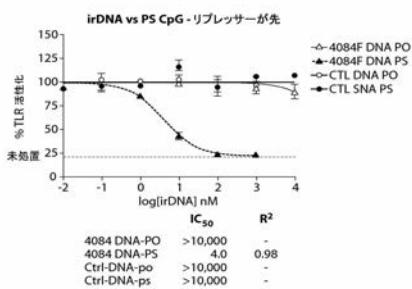


図2B

【図2C - D】

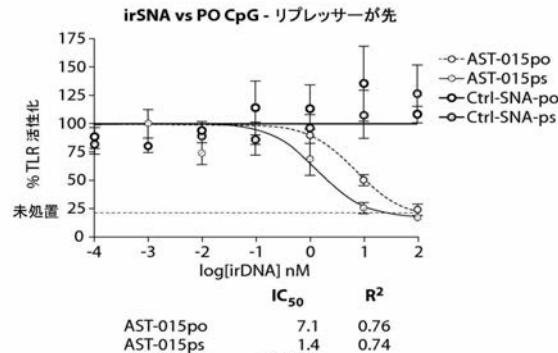


図2C

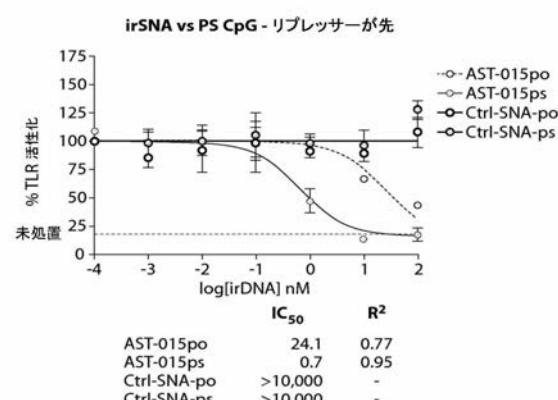


図2D

【図3A - B】

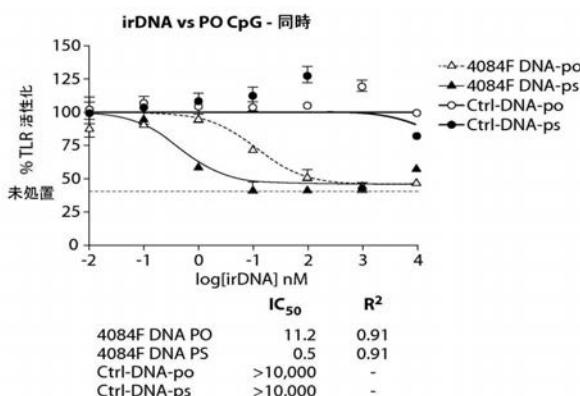


図3A

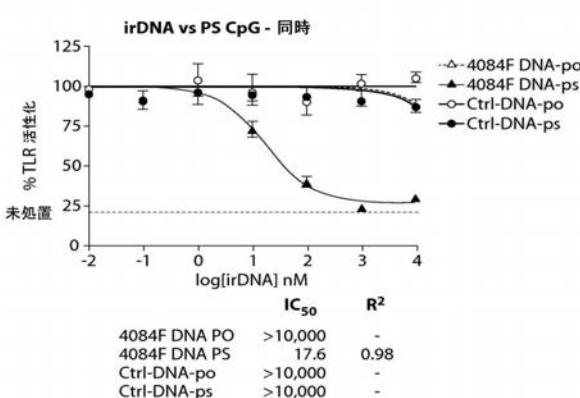


図3B

【図3C - D】

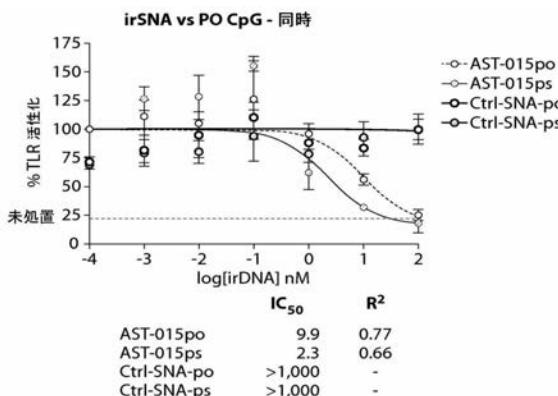


図3C

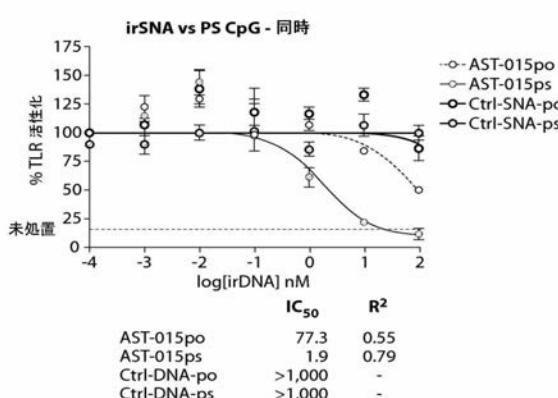


図3D

【図4】

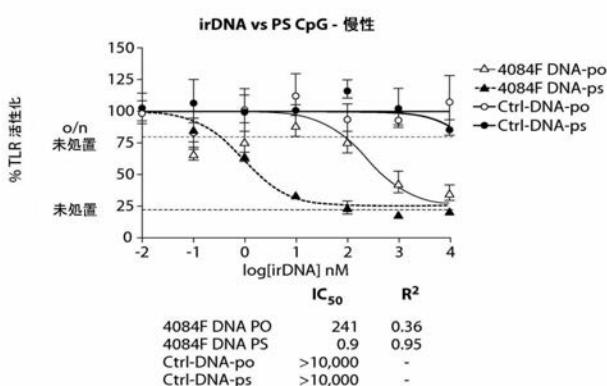


図4

【図5】

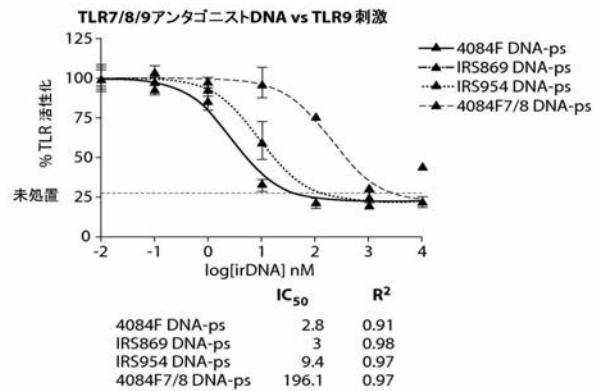


図5A

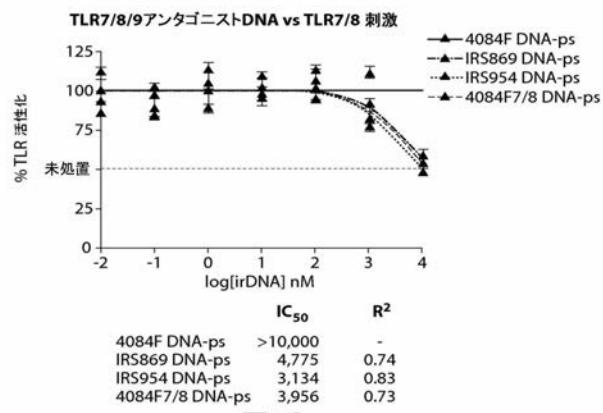


図5B

【図6】

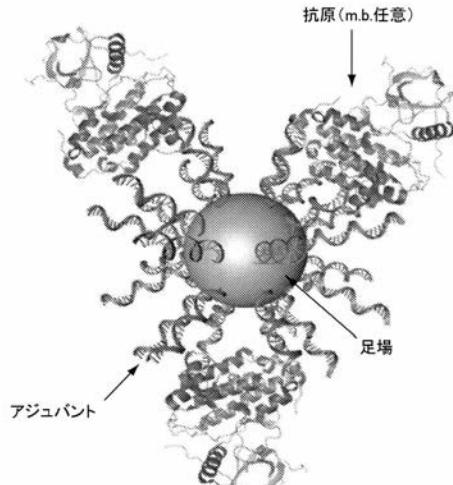


図6

【図7 A - B】

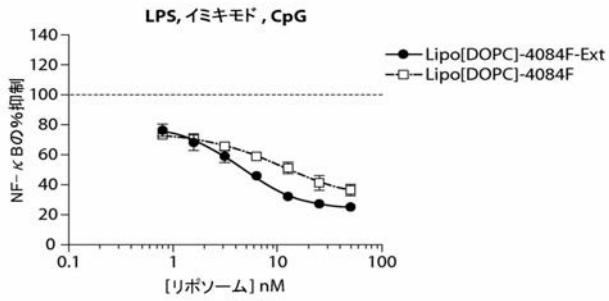


図7A

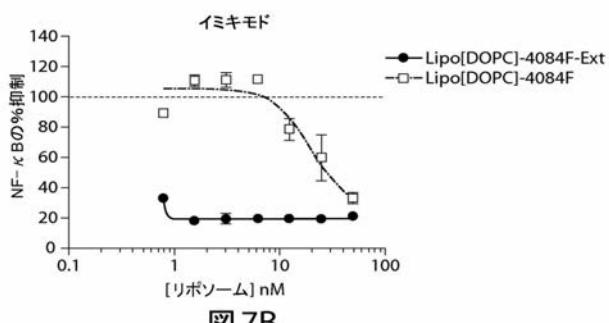


図7B

【図 7 C - D】

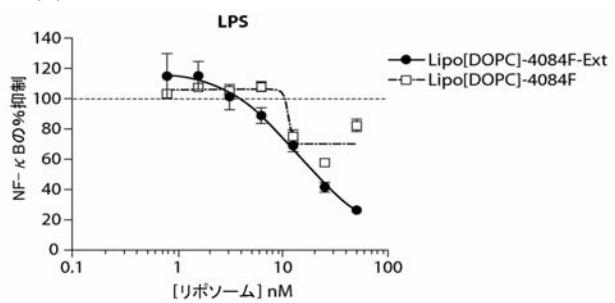


図 7C

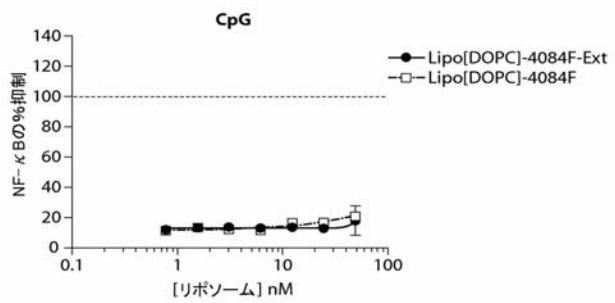


図 7D

【配列表】

2016534094000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2014/048294
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 A61P35/00 A61P31/00 A61P37/00 A61P37/04 A61P37/08		
ADD. <small>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</small>		
B. FIELDS SEARCHED <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> A61K		
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small>		
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small> EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/233270 A1 (MIRKIN CHAD A [US] ET AL) 16 September 2010 (2010-09-16) cited in the application paragraphs [0176], [0177], [0027], [0182], [0145]; claims 1, 11; figure all; example 1	1,5,6, 8-10, 13-15, 17,23, 24, 27-29,33
X	WO 2011/017456 A2 (UNIV NORTHWESTERN [US]; MIRKIN CHAD A [US]; OMARY REED A [US]; THAXTON) 10 February 2011 (2011-02-10) cited in the application paragraphs [0049], [0050], [0068], [0076], [0077], [0130]; claims 1, 3-7, 30-33	1,6-10, 13-15, 17, 22-24, 27,29
	-----	-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<small>* Special categories of cited documents :</small>		
<small>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</small>		
<small>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</small>		
<small>"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)</small>		
<small>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</small>		
<small>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</small>		
<small>"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</small>		
<small>"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</small>		
<small>"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</small>		
<small>"&" document member of the same patent family</small>		
Date of the actual completion of the international search 3 November 2014		Date of mailing of the international search report 17/12/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Langer, Miren

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/048294

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.: 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:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.:

1(completely); 5-17, 21-37(partially)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/048294

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADAM YUH LIN ET AL: "Gold Nanoparticle Delivery of Modified CpG Stimulates Macrophages and Inhibits Tumor Growth for Enhanced Immunotherapy", PLOS ONE, vol. 8, no. 5, 15 May 2013 (2013-05-15), page e63550, XP055141757, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0063550 abstract page 3, column 2, paragraph 3 -----	1,5-17, 21-37
X	EP 2 399 608 A1 (FUCHS SEBASTIAN [DE]; COESTER CONRAD [DE]; GEHLEN HEIDRUN [DE]; KLIER) 28 December 2011 (2011-12-28)	1
A	-----	5-17, 21-37
A	MIN WEI ET AL: "Polyvalent Immunostimulatory Nanoagents with Self-Assembled CpG Oligonucleotide-Conjugated Gold Nanoparticles", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 51, no. 5, 27 January 2012 (2012-01-27), pages 1202-1206, XP055141776, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201105187 -----	1,5-17, 21-37
A	KERKMANN M ET AL: "Immunostimulatory properties of CpG-oligonucleotides are enhanced by the use of protamine nanoparticles", OLIGONUCLEOTIDES, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US , vol. 16, no. 4 1 January 2006 (2006-01-01), pages 313-322, XP008108013, ISSN: 1545-4576 Retrieved from the Internet: URL: http://www.liebertonline.com/loi/oli -----	1,5-17, 21-37
A	SHANMUGAVEL CHINNATHAMBI ET AL: "Binding Mode of CpG Oligodeoxynucleotides to Nanoparticles Regulates Bifurcated Cytokine induction via Toll-like Receptor 9", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 2, 26 July 2012 (2012-07-26), XP055141852, DOI: 10.1038/srep00534 -----	1,5-17, 21-37
	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/048294

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KERKMANN MIREN ET AL: "Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 280, no. 9, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 8086-8093, XP002454062, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M410868200 -----	1,5-17, 21-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/048294

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2010233270	A1	16-09-2010	US	2010233270 A1 US 2013172404 A1	16-09-2010 04-07-2013	
WO 2011017456	A2	10-02-2011	US	2012277283 A1 WO 2011017456 A2	01-11-2012 10-02-2011	
EP 2399608	A1	28-12-2011	EP	2399608 A1	28-12-2011	
			US	2012231041 A1	13-09-2012	

International Application No. PCT/ US2014/ 048294

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1(completely); 5-17, 21-37(partially)

A nanoscale construct comprising:
a corona of an antagonist of nucleic acid-interacting complexes wherein the surface density of the antagonist of nucleic acid-interacting complexes is at least 0.3 pmol/cm².
A vaccine comprising said nanoscale construct and a carrier.
A method for delivering a therapeutic agent to a cell comprising delivering the said nanoscale construct to the cell.
A method for regulating expression of a target molecule comprising delivering said nanoscale construct to the cell.
A method for antagonizing a TLR comprising delivering said nanoscale construct to the cell.
A method of treating a subject, comprising administering to the subject said nanoscale construct in an effective amount to reduce an immune response.
A method of modulating an immune response in a subject, comprising administering to the subject said nanoscale construct in an effective amount to modulate an immune response.

2. claims: 2, 3(completely); 5-17, 21-37(partially)

A nanoscale construct comprising:
a corona of an antagonist of nucleic acid-interacting complexes, and an antigen incorporated into the corona, wherein the surface density of the antigen is at least 0.3 pmol/cm².
A vaccine comprising said nanoscale construct and a carrier.
A method for delivering a therapeutic agent to a cell comprising delivering the said nanoscale construct to the cell.
A method for regulating expression of a target molecule comprising delivering said nanoscale construct to the cell.
A method for antagonizing a TLR comprising delivering said nanoscale construct to the cell.
A method of treating a subject, comprising administering to the subject said nanoscale construct in an effective amount to reduce an immune response.
A method of modulating an immune response in a subject, comprising administering to the subject said nanoscale construct in an effective amount to modulate an immune response.

3. claims: 4(completely); 5-17, 21-37(partially)

A nanoscale construct comprising:
a corona with at least two antagonists of nucleic acid-interacting complexes incorporated, wherein the

International Application No. PCT/ US2014/ 048294

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

antagonists are selected from the group consisting of TLR 3, 7/8, and/or 9 antagonists.
A vaccine comprising said nanoscale construct and a carrier.
A method for delivering a therapeutic agent to a cell comprising delivering the said nanoscale construct to the cell.
A method for regulating expression of a target molecule comprising delivering said nanoscale construct to the cell.
A method for antagonizing a TLR comprising delivering said nanoscale construct to the cell.
A method of treating a subject, comprising administering to the subject said nanoscale construct in an effective amount to reduce an immune response.
A method of modulating an immune response in a subject, comprising administering to the subject said nanoscale construct in an effective amount to modulate an immune response.

4. claims: 18-20(completely); 21-37(partially)

A nanoscale construct comprising;
a spherical corona of an antagonist of nucleic acid-interacting complexes, wherein the antagonist is nucleic acid having at least one phosphodiester internucleotide linkage.
A vaccine comprising said nanoscale construct and a carrier.
A method for delivering a therapeutic agent to a cell comprising delivering the said nanoscale construct to the cell.
A method for regulating expression of a target molecule comprising delivering said nanoscale construct to the cell.
A method for antagonizing a TLR comprising delivering said nanoscale construct to the cell.
A method of treating a subject, comprising administering to the subject said nanoscale construct in an effective amount to reduce an immune response.
A method of modulating an immune response in a subject, comprising administering to the subject said nanoscale construct in an effective amount to modulate an immune response.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
B 8 2 Y 5/00 (2011.01)	B 8 2 Y 5/00	
B 8 2 Y 40/00 (2011.01)	B 8 2 Y 40/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72) 発明者 グリヤズノフ,セルゲイ

アメリカ合衆国 イリノイ州 60077-5318、スコーキー、ラモン アベニュー 804
5、スイート 410

(72) 発明者 マーダー,クリストファー,シー.

アメリカ合衆国 イリノイ州 60077-5318、スコーキー、ラモン アベニュー 804
5、スイート 410

(72) 発明者 ハロ,ティファニー,エル.

アメリカ合衆国 イリノイ州 60077-5318、スコーキー、ラモン アベニュー 804
5、スイート 410

(72) 発明者 ラドヴィッヂ-モレノ,アレクサンダー,フィリップ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 16801、ステート カレッジ、クラブアップル ドライ
ブ 1055

(72) 発明者 リッシュ,クレイトン

アメリカ合衆国 イリノイ州 60077-5318、スコーキー、ラモン アベニュー 804
5、スイート 410

(72) 発明者 アナンタトムラ,サガール

アメリカ合衆国 イリノイ州 60077-5318、スコーキー、ラモン アベニュー 804
5、スイート 410

F ターム(参考) 4C076 AA30 AA65 AA95 BB01 BB02 BB13 BB15 BB16 BB21 BB25
BB27 BB29 BB30 BB31 CC06 CC07 CC41 DD21 DD29 EE59

FF34 FF70
4C084 AA13 AA17 AA19 AA20 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59
MA60 MA63 MA66 NA05 NA13 NA14 ZA36 ZB07 ZB08 ZB09
ZB11 ZB13 ZB26 ZB32 ZC21 ZC42
4C085 AA03 BB23 DD51 DD90 EE01 GG02 GG03 GG04 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 NA05 NA13 NA14 ZA36 ZB08 ZB09 ZB11
ZB13 ZB32 ZC21 ZC42