

(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2004-519452
(P2004-519452A)

(43) 公表日 平成16年7月2日(2004.7.2)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 39/39
A61K 39/00
A61K 39/02
A61K 39/12
A61P 35/00

F 1

A 61 K 39/39
A 61 K 39/00
A 61 K 39/00
A 61 K 39/02
A 61 K 39/12

テーマコード(参考)

4 C 0 8 5

H

K

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-554133 (P2002-554133)	(71) 出願人	502270718 インターツェル・アクチエンゲゼルシャフト INTERCELL AG オーストリア、アーレン30ヴィエナ、 キャンパス・ヴィエナ・バイオセンター6 番
(86) (22) 出願日	平成14年1月7日 (2002.1.7)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月7日 (2003.7.7)	(74) 代理人	100076521 弁理士 坪井 有四郎
(86) 國際出願番号	PCT/EP2002/000062	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(87) 國際公開番号	W02002/053184		
(87) 國際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)		
(31) 優先権主張番号	PCT/EP01/00087		
(32) 優先日	平成13年1月5日 (2001.1.5)		
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	A 672/2001		
(32) 優先日	平成13年4月25日 (2001.4.25)		
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ポリカチオン性化合物の用途

(57) 【要約】

本発明は、インビボでの放出が遅延した医薬を調製するためのポリカチオン性化合物の使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インビポでの放出が遅延した医薬の調製のためのポリカチオン性化合物の使用。

【請求項 2】

該医薬がワクチンである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

該医薬が抗原を含む、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 4】

該抗原が、ウイルス病原体または細菌病原体からの抗原、真核生物病原体からの抗原、腫瘍抗原、自己免疫抗原またはそれらの混合物よりなる群から選ばれる、請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の使用。 10

【請求項 5】

該ポリカチオン性化合物が、ポリカチオン性ペプチド、好ましくは塩基性のポリペプチド、ペプチド結合を含む有機ポリカチオン、またはそれらの混合物である、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 6】

該ポリカチオン性化合物が、ポリリジン、ポリアルギニン、5 を超える、とりわけ 10 を超えるアミノ酸残基の範囲に 50 % を超える塩基性アミノ酸残基を含むポリペプチド、またはそれらの混合物である、請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 7】

該ポリカチオン性化合物が、3 ~ 7 の疎水性アミノ酸のリンカーによって隔てられた少なくとも 2 つの K L K モチーフを含む合成ペプチドである、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の使用。 20

【請求項 8】

該医薬が、炎症を引き起こす可能性のある化合物をさらに含む、請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の使用。

【請求項 9】

該医薬が、10 分未満、好ましくは 5 分未満、特に 1 分未満の投与部位での薬理学的半減期を有する化合物をさらに含む、請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の使用。 30

【請求項 10】

該医薬が、免疫原性の核酸分子をさらに含む、請求項 1 ないし 9 のいずれかに記載の使用。

【請求項 11】

該医薬が、免疫原性のオリゴデオキシ核酸分子 (ODN)、とりわけ C p G モチーフを含む ODN (C p G - ODN)、イノシン含有 ODN (I - ODN)、またはそれらの混合物または組み合わせをさらに含む、請求項 1 ないし 10 のいずれかに記載の使用。

【請求項 12】

該医薬が局所的に作用する医薬である、請求項 1 ないし 11 のいずれかに記載の使用。

【請求項 13】

該医薬がさらに活性物質を含み、該活性物質が該ポリカチオン性化合物に対する親和性を有する、請求項 1 ないし 12 のいずれかに記載の使用。 40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ポリカチオン性化合物の新規な用途に関する。

【背景技術】**【0002】**

製薬学的に使用したポリカチオン性化合物、たとえばポリカチオン性のアミノ酸ポリマーであるポリ-L-アルギニンおよびポリ-L-リジンは、インビトロおよびインビボで抗原提示細胞 (APC) に抗原を非常に効率的に負荷させる (charging) ことが示されてい 50

る。これは、免疫力スケードを誘起する重要な事象であると考えられ、最終的に標的を破壊ないし中和しうる抗原特異的な免疫エフェクター細胞の誘発に導く。以前にも多くのポリカチオン性化合物が免疫細胞に対する作用を発揮することが示されている (Buschleら、Gene Ther. Mol. Biol. 1 (1998), 309-321; Buschleら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 (1997), 3256-3261)。

【0003】

ポリ-L-アルギニンおよびポリ-L-リジンとワクチンとしての適当な抗原との混合物の同時注射は、幾つかの動物モデルにおいて動物を腫瘍増殖から保護する。ポリカチオン性化合物と抗原とからなるワクチンは、治療の非常に有効な形態であるとして当該技術分野で受け入れられている (WO 97/30721)。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

個体に投与した多くの薬理学的物質は、しばしば速やかに生体中に分散される。薬剤の速やかな全身的分布は、通常、強力かつ有害な副作用を引き起こす。医学的効果は、医薬が注射部位に一層高い量で留まり、少量が生体全体に徐々にかつ連続的に放出される場合のほうが好ましい。

【0005】

本発明の目的は、局所的に作用することが望まれる医薬を注射部位 (貯蔵部 (depot)) に保持する手段を提供することである。本発明のさらなる目的は、薬剤のあまりにも速やかな生体中の分布による副作用を防ぎ、または改善することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

これら目的は、インビボ放出が遅延した医薬の調製にポリカチオン性化合物を使用することにより解決される。驚くべきことに、本発明により、ポリカチオン性化合物が、ポリカチオン性化合物なしで投与したときには個体中で速やかに分散する他の薬理学的に活性な化合物とともに投与した場合に、該活性な化合物の投与部位からの放出を遅延させる作用を示すことが見出された。ポリカチオン性化合物は活性な薬理学的化合物を貯蔵部に保持すると思われ、それにより薬理学的に活性な原理により有効な治療をするうえでしばしば望まれる医薬のインビボ放出の遅延が可能となる。

30

【0007】

そのようなインビボ放出の遅延が有利である重要な分野はワクチン接種である。ワクチン接種すべき個体の免疫系に抗原が長期間にわたって提示されるなら、免疫系はそのような抗原に対する有効な免疫応答を生成する可能性が高まるであろう。一方、そのような抗原が生体中を速やかに分散してしまえば、抗原は速やかに分解および希釈され、それゆえ多くの有望な抗原について有効な免疫応答を達成することができないであろう。従って、本発明により、たとえばそのような抗原の貯蔵部を提供するためにポリカチオン性化合物が使用され、該貯蔵部は保護的な免疫を生成するためにこの抗原を免疫系に長期間にわたって連続的かつ有効に提示することを可能にする。さらに、抗原を免疫刺激性の化合物 (CpG-ODN) と組み合わせて投与する場合に、これら免疫刺激性の化合物の貯蔵部からのゆっくりとした放出は免疫系の連続的な刺激という結果となるに違いない。

40

【0008】

本発明は、組み合わせ医薬を、たとえば皮下、静脈内、鼻内、筋肉内、皮内または経皮的に投与したときに特に有利である。しかしながら、他の投与形態、たとえば非経口または局所投与もまた本発明に適している。しかしながら、貯蔵部の効果は組成物を注射またはインプラントした場合に最も有意であると思われる。

【0009】

本発明は、インビボ放出の遅延が望まれるあらゆる医薬、たとえば、抗原、アレルゲン、医薬 (サイトカイン、ケモカイン、免疫刺激性の核酸、細胞毒性の薬剤または抗血管形成剤 (anti-angiogenic) または創傷の治癒に必要な化合物を含む) と関連して用いるのが

50

好ましい。

【0010】

本発明に使用すべき抗原は重要ではなく、好ましくはウイルスまたは細菌病原体からの抗原、真核生物病原体からの抗原、腫瘍抗原、自己免疫抗原、またはそれらの混合物よりなる群から選ばれる。特に好ましいのは、負に荷電した抗原または疎水性の抗原である。抗原のさらなる例は、不活化したウイルスまたは細菌、真菌、原生生物あるいは癌細胞などの完全に殺した生物である。抗原はまた、これら生物／組織の下部画分 (subfractions) 、タンパク質、または最も単純な形態でペプチドからなっていてもよい。抗原はまた、グリコシリ化タンパク質またはペプチドの形態で免疫系によって認識されてよく、多糖または脂質であるかまたは含んでいてよい。短いペプチドを用いることができる、なぜなら、たとえば細胞障害性T細胞 (CTL) は主要組織適合複合体 (MHC) と結合した通常8～11アミノ酸長の短い形態の抗原を認識するからである。B細胞は約15アミノ酸から開始して一層長いペプチドを認識する。T細胞エピソードと対照的に、B細胞抗原の三次元構造はまた抗体による認識に重要である。

10

【0011】

好ましい病原体は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 、A型およびB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス (HCV) 、ラウス肉腫ウイルス (RSV) 、エプスタインバーウィルス (EBV) 、インフルエンザウイルス、口タウイルス、*Staphylococcus aureus*、*Chlamydia pneumoniae*、*Chlamydia trachomatis*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Bacillus anthracis*、*Vibrio cholerae*、*Plasmodium*種 (*Pl. falciparum*, *P. vivax*など) 、*Aspergillus*種または*Candida albicans*から選択される。抗原はまた癌細胞によって発現される分子 (腫瘍抗原) であってもよい。抗原はまた抗原から得ることもできる。そのような抗原を得るプロセスは、病原体／癌細胞からの特定のタンパク質の精製、病原体の不活化並びにそのようなタンパク質のタンパク質加水分解的または化学的な誘導体化または安定化を含む。同様にして、腫瘍抗原 (癌ワクチン) または自己免疫抗原を本発明に従ってポリカチオン性化合物とともに用いることができる。

20

【0012】

本発明に従って用いるポリカチオン性化合物は、WO 97/30721による特徴的な作用を示すあらゆるポリカチオン性化合物であってよく、あるいはカチオン性リポソーム、ポリエチレンアミン、キトサン、DNA導入に使用するポリカチオンなどの他のものであってよい。好ましいポリカチオン性化合物は、塩基性ポリペプチド、有機ポリカチオン、塩基性ポリアミノ酸、またはその混合物から選ばれる。これらポリアミノ酸は、少なくとも4アミノ酸残基の鎖長を有していなければならない (Goldmanら (1983) に記載のTuftsinを参照)。特に好ましいのは、ポリリジン、ポリアルギニン、および8を超える、とりわけ20を超えるアミノ酸残基の範囲に20%を超える、とりわけ50%を超える塩基性アミノ酸を含むポリペプチドまたはその混合物のようなペプチド結合を含む物質である。他の好ましいポリカチオンおよびその医薬組成物は、WO 97/30721 (たとえば、ポリエチレンイミン) およびWO 99/38528に記載されている。好ましくは、これらポリペプチドは5～500アミノ酸残基、とりわけ10～200残基を含む。

30

【0013】

これらポリカチオン性化合物は化学的にまたは組換えにより製造してよく、あるいは天然の採取源に由来してもよい。

40

カチオン性 (ポリ) ペプチドはまた、GanzおよびLehrer, 1999; Hancock, 1999に概説されている特性を有するポリカチオン性で抗菌性の微生物ペプチドであってよい。これら (ポリ) ペプチドは、原核生物または動物または植物起源のものであってよく、化学的にまたは組換えにより製造されてよい (AndreuおよびRivas, 1998; GanzおよびLehrer, 1999; Simmacoら、1998)。ペプチドはまた、デフェンシンのクラスに属していてよい (Ganz, 1999; GanzおよびLehrer, 1999)。そのようなペプチドの配列は、たとえば以下のインターネットアドレスの下に抗菌配列データベース (Antimicrobial Sequences Database) 中に見出すことができる：

50

<http://www.bbcm.univ.trieste.it/tossi/pag1.html>。

【0014】

そのような宿主防御ペプチドまたはデフェンシンもまた、本発明によるポリカチオン性ポリマーの好ましい形態である。一般に、好ましくはA P C（樹状細胞を含む）によって媒介される獲得免疫系を活性化（またはダウンレギュレーション）することを可能にする化合物はポリカチオン性ポリマーとして用いる。

【0015】

本発明においてポリカチオン性物質として使用するのに特に好ましいのは、カテリシジン（cathelicidin）由来の抗菌ペプチドまたはその誘導体（A 1 4 1 6 / 2 0 0 0、参照のため本明細書中に引用する）、とりわけ哺乳動物、好ましくはヒト、ウシまたはマウスのカテリシジンに由来する抗菌ペプチドである。

【0016】

天然の採取源に由来するポリカチオン性化合物としては、H I V - R E V またはH I V - T A T 由来のカチオン性ペプチド、アンテナペディア（antennapedia）ペプチド、キトサンまたはキトサンの他の誘導体または生化学的な製造または組換え製造によりこれらペプチドまたはタンパク質に由来する他のペプチドが挙げられる。他の好ましいポリカチオン性化合物は、カテリン（cathelin）またはカテリンの関連物質またはカテリンに由来する物質である。たとえば、マウスカテリンは、アミノ酸配列：N H₂ - R L A G L L R K G G E K I G E K L K K I G O K I K N F F Q K L V P Q P E - C O O H を有するペプチドである。カテリンの関連物質またはカテリンに由来する物質はカテリン配列の全部または一部を含み、少なくとも15～20アミノ酸残基を有する。誘導体化は、20の標準アミノ酸以外のアミノ酸による天然アミノ酸の置換または修飾を含む。さらに、さらなるカチオン性残基がそのようなカテリン分子中に導入されてよい。これらカテリン分子は、抗原および本発明による免疫原性O D Nと組み合わせるのが好ましい。しかしながら、これらカテリン分子は驚くべきことに、さらなるアジュバントを加えなくとも抗原に対するアジュバントとして有効なことがわかった。それゆえ、そのようなカテリン分子は、さらなる免疫刺激物質を用いたまたは用いないワクチン製剤において有効なアジュバントとして用いることが可能である。

【0017】

本発明に従って用いることのできる他の好ましいポリカチオン性物質は、3～7の疎水性アミノ酸のリンカーによって隔てられた少なくとも2のK L K - モチーフを含む合成ペプチドである（A 1 7 8 9 / 2 0 0 0、参照のため本明細書中に引用する）。

上記のように、ポリカチオン性化合物は本発明に従い、個体の生体中での速やかな拡散ゆえの副作用が知られている薬剤とともに使用するのが好ましい。一般に、ポリカチオン性化合物およびゆっくりと放出する必要のある薬剤は、同じ時間に同じ部位でいっしょに投与する。本発明による組み合わせ医薬において、そのような薬剤は、たとえばポリカチオン性化合物と単に混合するか、または共有結合した医薬として提供することができる。

【0018】

本発明に使用できる炎症を引き起こす可能性のある好ましい化合物は、免疫原性の核酸分子である。哺乳動物（およびおそらく全てではないにしても殆どの脊椎動物）の免疫系は、細菌を含む下等生物のD N Aを、おそらく病原体と宿主とのD N Aの構造上および配列使用上の差異ゆえに認識することが知られている。とりわけ、非脊椎動物に由来するD N Aの短いストレッチ、あるいはある種の塩基の前後関係での非メチル化シトシン - グアニジヌクレオチド（C p G）を含む短いオリゴデオキシヌクレオチド（O D N）の形態のものが標的にされる。C p Gモチーフは細菌D N Aでは予想された頻度で見出されるが、脊椎動物D N Aでは遙かに低い頻度でしか見出されない。さらに、非脊椎動物（すなわち、細菌）のC p Gモチーフはメチル化されていないのに対して脊椎動物のC p G配列はメチル化されている。そのようなC p Gモチーフを含有するO D N（C p G - O D N）は、単球およびB細胞を直接活性化することができる。その結果、C p G - O D Nによる単球およびN K細胞の活性化は、T h 1型応答の誘発および細胞障害性T細胞の発生を促進す

10

20

30

40

50

る。さらに、そのような免疫原性ODNは、ワクチンアジュバントとして用いて特定の抗原に対する抗体応答を促進する(たとえば、EP0468520A2、WO96/02555、WO98/16247など)。

【0019】

CpG-ODNは抗原と組み合わせて動物に投与した場合に、CpG-ODN分子は、所望の作用を開始すべき投与部位において有効な最小濃度を達成することなく生体中を速やかに分散する。ポリカチオン性化合物は、これら分子が直ちに分散するのを抑制し、注射部位でのCpG-ODNの貯蔵部の生成を誘発すること、その結果、CpG-ODNによって誘発される抗原特異的なインビボでの免疫応答の非常な長期化となること、を本発明の動物モデルにより示すことができた。それゆえ、このCpG-ODNモデルは、ポリカチオン性化合物の貯蔵部効果を示すうえで優れていた。CpG-ODNを抗原と組み合わせて注射により投与すると、CpG-ODN分子は所望の効果の開始が望まれる投与部に有効な最小濃度をもたらすことなく生体中を速やかに分散する。ポリカチオン性化合物は、これら分子が直ちに拡散するのを抑制し、注射部位での抗原およびCpG-ODNの貯蔵部の生成を誘発すること、その結果、CpG-ODNによって誘発される抗原特異的なインビボでの免疫応答の非常な長期化となることを示すことができた。

【0020】

それゆえ、本発明の好ましい態様は、ポリカチオン性化合物とともに適用すべき医薬がさらに免疫原性オリゴデオキシ核酸分子(ODN)、とりわけCpGモチーフを含むODN(CpG-ODN)、イノシン含有ODN(I-ODN)またはそれらの混合物または組み合わせを含むことを特徴とする。I-ODNは、たとえばオーストリア特許出願A1973/2000(参照のため本明細書に引用する)に記載されている。I-ODNとCpG-ODNとの混合物もまた、これら2つの原理の組み合わせ、たとえばCpGモチーフを含むI-ODNと同様に提供できる。

【0021】

本発明による貯蔵部効果の誘発は、もちろん、所定の投与部位で局所的に作用する必要のある薬理学的に活性な物質の場合に望ましい。それゆえ、本発明は、局所的に作用すべきであるのにこの部位から拡散や輸送プロセスによって生体中を容易に輸送および拡散されてしまう物質の場合に特に有利である。そのような物質としては、抗原、アレルゲン、サイトカイン、ケモカイン、免疫刺激性の核酸、細胞毒性の薬剤または抗血管形成剤または創傷の治癒に必要な化合物が挙げられる。

【0022】

本発明の好ましい態様は、さもないと投与部位から速やかに拡散してしまう物質、すなわち、とりわけ投与部位に関してかなり短い薬理学的半減期を有する物質と組み合わせたポリカチオン性物質の使用に関する。それゆえ、速やかに拡散する好ましい物質は、とりわけ投与部位において10分未満、さらに好ましくは5分未満、特に1分未満の薬理学的半減期(物質の濃度の半減)を有するものである。

【0023】

好ましくは、貯蔵部効果を達成するためにポリカチオン性化合物とともに投与すべきそのような物質は、ポリカチオン性化合物に対してある種の親和性、すなわち、疎水性相互作用、水素架橋、静電的相互作用、極性または非極性の相互作用を示す。もちろん、貯蔵部効果は組み合わせ医薬製剤中の各成分の共有結合によっても達成されるが、薬剤とポリカチオン性化合物との非共有的相互作用が好ましい。

【0024】

ポリカチオン性化合物およびCpG-ODNと抗原との同時投与は、ポリカチオン性化合物なしで注射したときに比べて抗原特異的な免疫応答の誘発を強力かつ相乗的に促進することが知られている(PCT/EP01/00087)。それは、排液したリンパ節から単離したIFN- γ 産生細胞が多数であることに反映されている(ELISPOTアッセイ)。上記に記載したように、本発明に従い、抗原およびポリカチオン性化合物(一例としてポリアルギニンpR60を使用)とCpG-ODNとの混合物の1回の注射後に誘発

10

20

30

40

50

されたこの強い局所免疫応答（第4日目／排液したリンパ節細胞）が、非常に長期間にわたって持続する全身的な免疫応答に変わることを示すことができた。本発明に従い、CpG-ODNなどの物質がポリカチオン性化合物と複合体を形成する能力を、そのような化合物の全身的な分布およびその後の速やかな再吸収を防ぐのに用い、それによってそのような物質の特性の強力な長期化、たとえばCpG-ODNの免疫刺激特性の長期化をもたらすことができる。さらに、全身的な分布を防ぐことは、免疫刺激剤の有害な潜在的で全身的な副作用の誘発を回避する。

【0025】

CpG-ODNおよびポリカチオン性ペプチドを用いたこのモデルは、実施例のセクションでさらに記載および分析する。さらに、分析可能な医薬標的を提供するため、卵アルブミン由来ペプチド（OVA₂₅₇₋₂₆₄）をモデル化合物（モデル抗原）として用いる。
10

【0026】

本発明はまた、インビボで遅延して放出する必要のある薬剤で患者を治療する方法であって、該薬剤を、該薬剤の貯蔵部効果を誘発するのに有効な量のポリカチオン性化合物とともに投与することを含む方法にも関する。

【0027】

投与すべきポリカチオン性化合物の量は、個々の組成物の必要性および場合によりポリカチオン性ポリマーとともに投与すべき医薬に大きく依存する。ポリ-L-アルギニンおよびポリ-L-リジンの場合、ポリカチオンの好ましい量は、0.001～1000 μg / 投与単位、さらに好ましくは0.1～10 mg / 投与量、とりわけ約0.1 mg / 20 g 体重（マウス）かまたはそれ以上またはヒトの等価量である。
20

本発明を以下の実施例および図面によりさらに詳細に記載するが、本発明はこれら特定の態様に限られるわけではない。

【実施例】

【0028】

本発明の実施例では、抗原とpR60およびCpG-ODNの混合物との1回の注射の後に誘発された強い局所的な免疫応答（第4日目／排液リンパ節細胞）が、最も重要なことは非常に長期間にわたって持続する全身的な免疫応答に変わることが示される（実施例1）。注射の第372日目（分析した最も遅い時点）でさえも、100万の末梢血リンパ球当たり約500の抗原特異的なIFN- γ 産生T細胞を検出することができる。この効果に対する一つの可能な説明は、ポリ-L-アルギニンとのCpG-ODNの複合体形成が、CpG-ODNの全身的な分布およびその後のCpG-ODNの速やかな再吸収を防ぐというものである。それゆえ、このことはCpG-ODNの免疫刺激特性の強力な長期化という結果となる。
30

【0029】

この仮定を調べるため、蛍光標識した化合物をいっしょにマウスの横腹に皮下注射した。この処理後の異なる時点で注射部位を標識化合物の存在について調べた。実施例2aおよび実施例2bでは、OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチド（非標識）、ポリ-L-アルギニン-FITC（黄色）およびCpG-ODN-Cy5（青色）を注射に用いた。OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチドをポリ-L-アルギニン-FITCとともに注射した後、注射部位に貯蔵部（depot）の生成を検出することができた。OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチドをCpG-ODN-Cy5とともに注射すると、CpG-ODN-Cy5の全皮膚にわたる分布という結果となつた（実施例2a）。FACS分析によって同時に決定されるように（実施例2b）、CpG-ODN-Cy5はまた二次リンパ性臓器（排液したリンパ節、脾臓）および非リンパ性組織（肺、肝臓、腎臓、心臓）でも検出することができる。対照的に、OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチドおよびCpG-ODN-Cy5をポリ-L-アルギニン-FITCとともに注射したときには、CpG-ODN-Cy5はポリ-L-アルギニンによって生成される貯蔵部に限られていた（実施例2a）。これらマウスからのFACS分析（実施例2b）から、CpG-ODN-Cy5が注射部位での貯蔵部にポリ-L-アルギニンによって捕捉されるという事実のためにCpG-ODN-Cy5は末梢では検出できないことを明らか
40
50

にした。ポリ - L - アルギニン - FITC および CpG - ODN - Cy5 の両者がこの貯蔵部に注射後の少なくとも第 92 日目まで（分析した最も遅い時点）検出することができる。この観察は、ペプチドおよびポリ - L - アルギニンと CpG - ODN との組み合わせがペプチドおよびポリ - L - アルギニンの組み合わせに比べて貯蔵部でのはるかに一層長期間の存在に導いたことを意味している。実施例 3 では、TRP - 2₁₈₁₋₁₈₈ - ペプチド - FITC（黄色）、ポリ - L - アルギニン - TRITC（赤色 - バイオレット）、CpG - ODN - Cy5（青色）を注射に用いた。TRP - 2₁₈₁₋₁₈₈ - ペプチド - FITC を単独かまたは CpG - ODN - Cy5 と組み合わせて注射したときには、該ペプチドは第 4 日目に注射部位で検出することができなかった。ポリ - L - アルギニン - TRITC 単独の注射は、全皮膚にわたる分布という結果となつた。CpG - ODN - Cy5 を単独かまたは TRP - 2₁₈₁₋₁₈₈ - ペプチド - FITC と組み合わせて注射すると、CpG - ODN - Cy5 の全皮膚にわたる分布という結果となつた。この実験はまた、ポリ - L - アルギニンを少なくとも 1 つのさらなる分子（ペプチドおよび / または CpG - ODN）とともに注射したときにポリ - L - アルギニンが貯蔵部の生成を誘発したことをも示している。
10

【0030】

それゆえ、これら知見は、ポリ - L - アルギニンが、他の化合物（抗原および / または免疫刺激性 CpG - ODN）が保持されている注射部位での貯蔵部を誘発することを意味している。OVA₂₅₇₋₂₆₄ - ペプチド、ポリ - L - アルギニンおよび CpG - ODN の同時注射の場合、この貯蔵部からのペプチドおよび CpG - ODN の両者のゆっくりとした放出は、おそらく補助細胞の持続的な活性化およびその後の T 細胞の持続的な刺激によるものである。その結果、このことが 1 回の注射後に末梢で観察された多数の抗原特異的 T 細胞の長期間持続する存在に導くのである。
20

【0031】

CpG - ODN は、その強力な免疫刺激作用に加え、TNF - α や IL - 6 などの炎症促進性サイトカインの多量の全身的放出を誘発する（このことはショック症候群を誘発しうる（Sparwasser 1997, Lipford 1997））点で潜在的に有害な副作用を有することが記載されている。実施例 2 a、実施例 2 b および実施例 3 に記載するように、CpG - ODN はポリ - L - アルギニンと組み合わせて注射した場合には全身的には存在しない。それゆえ、ポリ - L - アルギニンの同時投与が CpG - ODN によって誘発される TNF - α および IL - 6 の全身的な産生に影響を及ぼすか否かを調べた。両サイトカインの血清レベルを注射 1 時間後に ELISA により決定した。実施例 4 は、OVA₂₅₇₋₂₆₄ - ペプチド単独の注射もポリ - L - アルギニンと組み合わせた注射もともに血清中の有意の量の TNF - α および IL - 6 の誘発に導くことはなかったが、一方、OVA₂₅₇₋₂₆₄ - ペプチドを CpG - ODN と組み合わせて注射すると高濃度の両サイトカインを誘発することを示している。しかしながら、OVA₂₅₇₋₂₆₄ - ペプチドをポリ - L - アルギニンおよび CpG - ODN とともに同時投与すると、この TNF - α および IL - 6 の全身的産生は完全に排除された。それゆえ、これらのデータを実施例 2 および実施例 3 に示す知見と合わせると、ポリ - L - アルギニンによって媒体された貯蔵部の生成による CpG - ODN の局所化が、CpG - ODN の全身分布およびその後の炎症促進性サイトカインの全身的放出を防いでいることが示される。
30 40

【0032】

これと平行して、ポリ - L - アルギニンによる CpG - ODN の複合体形成が、TNF - α および IL - 6 の産生に関して CpG - ODN によるマウス骨髄由来 CD11c⁺ 樹状細胞の刺激にも直接影響を及ぼすことができるか否かを解明すべくインビトロ実験を行つた。この目的のため、CD11c⁺ 樹状細胞をポリ - L - アルギニン、CpG - ODN、またはポリ - L - アルギニンと CpG - ODN との組み合わせとともにインキュベートした（実施例 5）。これら培養液からの上澄み液中の TNF - α および IL - 6 のレベルを決定した。ポリ - L - アルギニンとともにインキュベートした後には TNF - α および IL - 6 のいずれも検出することができなかつたが、一方、CpG - ODN とともにインキ
50

ュベートした後には有意の量の両サイトカインが産生される。印象的にも、ポリ-L-アルギニンの存在はこれら細胞によるCpG-ODNによって誘発されるTNF-αおよびIL-6の産生を抑制した。

【0033】

それゆえ、これら結果は、ポリ-L-アルギニンによるCpG-ODNの複合体生成が、炎症促進性サイトカインの全身的な放出のみならず局所的な放出をも抑制することを示している。その結果、ポリ-L-アルギニンのこれら有利な作用は、おそらく、CpG-ODNによって誘発された制御されずかつ過剰な全身的および局所的な免疫応答を防ぐものである。

さらに、インビトロの実験は、ポリ-L-アルギニンがヒト樹状細胞によるポリイノシン酸・ポリシチジン酸によって誘発される炎症促進性サイトカインの産生をも抑制することを明らかにした。

【0034】

それゆえ、これらの観察は、ポリ-L-アルギニンの一般的な抗炎症作用を示唆している。免疫原性であるが潜在的に有害な物質の投与のリスクは、おそらく、ポリ-L-アルギニンの同時投与によって最小にすることができる。そのような物質の速やかな全身分布は、全ての化合物が捕捉された貯蔵部を生成するポリ-L-アルギニンの特性によって防ぐことができる。さらに、ポリ-L-アルギニンによるこれら物質の複合体生成は、たとえば、毒性量の炎症促進性サイトカインの局所放出を抑制することができる。

【0035】

実施例1：

卵アルブミン-ペプチド/ポリ-L-アルギニン(pR60)/CpG-ODNの組み合
わせ投与は全身的かつ非常に長期間にわたって持続する強い抗原特異的な免疫応答の誘発
に導く

マウス：C57B1/6 (Harlan/Olac)

ペプチド：ニワトリ卵アルブミンのMHCクラスI (H-2Kb) 拘束エピトープであるOVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチド (S I I N F E K L) (Rotzschke, O.ら、Eur. J. Immunol. 1991 21(11): 2891-4) を標準固相F-moc合成法を用いて合成し、HPLC精製し、ついで純度をマススペクトロメトリーにより分析した。投与量：300 μg / マウス。

【0036】

ポリL-アルギニン60 (pR60)：平均重合度が60アルギニン残基のポリL-アルギニン；SIGMA chemicals。投与量：100 μg / マウス。

CpG-ODN1668：CpGモチーフ：tcc atg acg ttc ctg atg ctを含むチオホスフェート修飾オリゴジヌクレオチド：NAPS GmbH、ゲッティンゲンにより合成。投与量：5ナノモル / マウス。

【0037】

実験群(1群5匹のマウス)

1. OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチド + CpG-ODN + pR60

2. OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチド + CpG-ODN

3. OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチド + pR60

【0038】

第0日目にマウスの後肢に上記化合物を含む全量100 μl (各足当たり50 μl) を注射した。所定の時点で尾静脈により採血し、末梢血リンパ球 (PBLs) をフィコール勾配を用いて単離した。PBLsを、ワクチン接種に用いた抗原、培地 (バックグラウンド) およびコンカナバリンA (正の対照) でエクスピボ刺激した。IFN-α - E L I S P O Tを記載に従って (Miyahiraら、1995) 行った。この方法は、抗原特異的なT細胞の定量をするために広く用いられている手順である。単一のIFN-α 産生T細胞を表すスポットをカウントし、バックグラウンドスポットの数を全試料から差し引いた。Con Aで刺激した後に多くのスポットが検出され (データは示していない) 、使用したリンパ球が良好な状態にあることを示していた。マウスの各実験群について図1にスポット数 / 1 ×

10

20

30

40

50

10⁶細胞を示す。

【0039】

実施例2a:

ポリ-L-アルギニンは注射部位に貯蔵部の生成を誘発する

マウス: C57B1/6 (Harlan/Olac)

ペプチド: ニワトリ卵アルブミンのMHCクラスI (H-2Kb) 拘束エピトープであるOVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチド (SIIINFEKL) (Rotzschke, O.ら、Eur. J. Immunol. 1991 21(11): 2891-4) を標準固相F-moc合成法を用いて合成し、HPLC精製し、ついで純度をマススペクトロメトリーにより分析した。投与量: 300 μg / マウス。

【0040】

ポリL-アルギニン60-FITC (pR60-FITC): 平均重合度が60アルギニン残基のポリL-アルギニン; SIGMA chemicals。ポリ-L-アルギニンのフルオレセイン(FITC)標識のため、ポリ-L-アルギニンを50mM HEPES (pH 7.9)に溶解した(10mg / 500 μl)。このポリ-L-アルギニン溶液に等量のDMSO中の5倍モル過剰のFITC (Molecular Probes、ユージーン、オレゴン)を加えた。溶液を室温、暗所で2.5時間保持した。この混合物をPD10カラム (Pharmacia、ウプサラ、スウェーデン)にかけ、50mM HEPES (pH 7.9)を溶出液として用いて未反応の染料を分離した。ついで、溶液を2×5リットルのaqua dest. (pH 7.4; 0.1M HCl)に対して一夜、透析した。凍結乾燥後、ポリ-L-アルギニンFITCをaqua bidest.に10mg / mlの濃度にて溶解した。投与量: 100 μg / マウス。

CpG-ODN1668-Cy5: CpGモチーフ: tcc atg acg ttc ctg atg ctを含むチオホスフェート修飾、Cy5-標識オリゴジヌクレオチド: NAPS GmbH、ゲッtingenにより合成。投与量: 5ナノモル / マウス。

【0041】

実験群 (1匹のマウス / 1群 / 指定した時点、3匹のマウス / 2~4群 / 指定した時点)

1. 处理せず

2. OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチド + pR60-FITC

3. OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチド + CpG-ODN1668-Cy5

4. OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチド + pR60-FITC + CpG-ODN1668-Cy5

第0日目にマウスの右横腹に上記化合物を含む全容量100 μlを皮下注射した。注射後、所定の時点で被験動物を屠殺し、注射部位の写真を撮った(図2a)。

【0042】

実施例2b:

ポリ-L-アルギニンの同時投与はCpG-ODN-Cy5の全皮膚にわたる分布を抑制する

マウス: C57B1/6 (Harlan/Olac)

ポリ-L-アルギニン60-FITC (pR60-FITC): 平均重合度が60アルギニン残基のポリ-L-アルギニン; SIGMA chemicals。ポリ-L-アルギニンのフルオレセイン(FITC)標識のため、ポリ-L-アルギニンを50mM HEPES (pH 7.9)に溶解した(10mg / 500 μl)。このポリ-L-アルギニン溶液に等量のDMSO中の5倍モル過剰のFITC (Molecular Probes、ユージーン、オレゴン)を加えた。溶液を室温、暗所で2.5時間保持した。この混合物をPD10カラム (Pharmacia、ウプサラ、スウェーデン)にかけ、50mM HEPES (pH 7.9)を溶出液として用いて未反応の染料を分離した。ついで、溶液を2×5リットルのaqua dest. (pH 7.4; 0.1M HCl)に対して一夜、透析した。凍結乾燥後、ポリ-L-アルギニンFITCをaqua bidest.に10mg / mlの濃度にて溶解した。投与量: 100 μg / マウス。

CpG-ODN1668-Cy5: CpGモチーフ: tcc atg acg ttc ctg atg ctを含むチオホスフェート修飾、Cy5-標識オリゴジヌクレオチド: NAPS GmbH、ゲッtingenにより合成。投与量: 5ナノモル / マウス。

10

20

30

40

50

【0043】

CpG-ODN1668-Cy5 : CpGモチーフ : tcc atg acg ttc ctg atg ctを含むチオホスフェート修飾、Cy5 - 標識オリゴジヌクレオチド : NAPS GmbH、ゲッティンゲンにより合成。投与量 : 5ナノモル / マウス。

【0044】

実験群 (1匹のマウス / 1群 / 指定した時点、3匹のマウス / 2 ~ 4群 / 指定した時点)

1. 処理せず

2. CpG-ODN1688-Cy5

3. pR60-FITC + CpG-ODN1688-Cy5

マウスの右横腹に上記化合物を含む全容量 100 μl を皮下注射した。注射 1 日後に被験動物を屠殺し、二次リンパ性臓器（排液リンパ節、脾臓）並びに非リンパ性組織（肺、肝臓、腎臓、心臓）から FACS 分析を行った（図 2b）。

【0045】

実施例3：

ポリ-L-アルギニンは少なくとも1つのさらなる分子と一緒に注射したときに注射部位での貯蔵部の生成を誘発する

マウス : C57B1 / 6 (Harlan/Olac)

ペプチド : マウスチロシナーゼ関連タンパク質 - 2 の MHC クラス I (H-2Kb) 拘束エピトープである TRP-2 - ペプチド (VYDFFVWL) (Bloom, M. B.ら、J. Exp. Med. 1997 185, 453-459) を標準固相 F-moc 合成法を用いて合成し、HPLC 精製し、ついで純度をマススペクトロメトリーにより分析した。フルオレセイン (FITC) 標識のため、TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ - ペプチドを 1 mM ホウ酸ナトリウム (pH 7.9) に溶解した。このペプチド溶液に等量の DMF 中の 8 倍モル過剰の FITC (Molecular Probes、ユージーン、オレゴン) を加えた。溶液を室温で 4 時間保持した。この混合物を G25 ゲルfiltrationカラム (Pharmacia、ウプサラ、スウェーデン) にかけ、水中の 0.1% TFA を溶出液として用いて未反応の染料を分離した。ペプチド 1 モル当たり 2 モルの FITC が導入されていた (N 末端、リジンの側鎖)。投与量 : 100 μg / マウス。

【0046】

ポリ-L-アルギニン 60 - TRITC (pR60 - TRITC) : 平均重合度が 60 アルギニン残基のポリ-L-アルギニン ; SIGMA chemicals。ポリ-L-アルギニンの TRITC 標識のため、ポリ-L-アルギニンを 50 mM HEPES (pH 7.9) に溶解した (10 mg / 500 μl)。このポリ-L-アルギニン溶液に等量の DMSO 中の 5 倍モル過剰の FITC (Molecular Probes、ユージーン、オレゴン) を加えた。溶液を室温、暗所で 2.5 時間保持した。この混合物を PD10 カラム (Pharmacia、ウプサラ、スウェーデン) にかけ、50 mM HEPES (pH 7.9) を溶出液として用いて未反応の染料を分離した。ついで、溶液を 2 × 5 リットルの aqua dest. (pH 7.4 ; 0.1 M HCl) に対して一夜、透析した。凍結乾燥後、ポリ-L-アルギニン - TRITC を aqua bidest. に 10 mg / ml の濃度にて溶解した。投与量 : 100 μg / マウス。

【0047】

CpG-ODN1668-Cy5 : CpGモチーフ : tcc atg acg ttc ctg atg ctを含むチオホスフェート修飾、Cy5 - 標識オリゴジヌクレオチド : NAPS GmbH、ゲッティンゲンにより合成。投与量 : 5ナノモル / マウス。

実験群 (1匹のマウス / 第1群 / 指定した時点、3匹のマウス / 2 ~ 4群 / 指定した時点)

1. 処理せず

2. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ - FITC

3. pR60-TRITC

4. CpG-ODN1688-Cy5

5. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ - FITC + pR60-TRITC

6. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ - FITC + CpG-ODN1688-Cy5

10

20

30

40

50

7. p R 6 0 - T R I T C + C p G - O D N 1 6 8 8 - C y 5

8. T R P - 2₁₈₁₋₁₈₈ - F I T C + p R 6 0 - T R I T C + C p G - O D N 1 6 8

8 - C y 5

第0日目にマウスの右横腹に上記化合物を含む全容量100μlを皮下注射した。注射後、第4日目に被験動物を屠殺し、注射部位の写真を撮った(図3)。

【0048】

実施例4:

ポリ-L-アルギニンの同時注射はCpG-ODNによって誘発されるTNF-およびIL-6の全身的な産生をインピボで防ぐ

マウス: C57B1/6 (Harlan/Olac)

10

ペプチド: ニワトリ卵アルブミンのMHCクラスI (H-2Kb) 拘束エピトープであるOVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIIINFEKL) (Rotschkeら、1991) を標準固相F-moc合成法を用いて合成し、HPLC精製し、ついで純度をマススペクトロメトリーにより分析した。投与量: 300μg/マウス。

【0049】

ポリL-アルギニン60 (pR60): 平均重合度が60アルギニン残基のポリL-アルギニン; SIGMA chemicals。投与量: 100μg/マウス。

CpG-ODN1668: CpGモチーフ: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CTを含むチオホスフェート修飾オリゴデオキシヌクレオチド: NAPS GmbH、ゲッチンゲンにより合成。投与量: 5ナノモル/マウス。

20

【0050】

実験群(1群4匹のマウス)

1. OVA₂₅₇₋₂₆₄

2. pR60

3. CpG1668 + OVA₂₅₇₋₂₆₄

4. CpG1668 + pR60 + OVA₂₅₇₋₂₆₄

【0051】

マウスの後肢に上記化合物を含む全量100μl(各足当たり50μl)を注射した。注射1時間後、尾静脈から採血し、血清を調製した。血清中の炎症促進性サイトカインであるTNF-およびIL-6の量を、サイトカイン特異的なELISAにより製造業者(R&D Systems, Inc.、ミネアポリス、ミネソタ)の指示に従って決定した。

30

この実験は、OVA₂₅₇₋₂₆₄の単独またはポリ-L-アルギニンと組み合わせた注射が検出しうる量のTNF-またはIL-6の産生を誘発しないことを示している(図4)。対照的に、OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチドをCpG-ODN1688とともに注射するとTNF-およびIL-6の全身的な産生が誘発される。ペプチドおよびCpG-ODNをポリ-L-アルギニンと同時に注射したときには、CpG-ODNによって誘発される炎症促進性サイトカインの産生は抑制された。

【0052】

参照文献

【表1】

40

Andreu, D., および Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415-433.

Ganz, T. (1999). Defensins and host defense [comment]. *Science* 286, 420-421.

Ganz, T., および Lehrer, R. I. (1999). Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today* 5, 292-297.

10

Goldman, R., Bar-Shavit, Z. (1983). On the mechanism of the augmentation of the phagocytic capability of phagocytic cells by Tuftsin, substance P, neuropeptides, and kentsin and the interrelationship between their receptors. *Ann N Y Acad. Sci.* 419:143-55.

Inabaら (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693

20

【0053】

【表2】

Hancock, R. E. (1999). Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs* 57, 469-473.

30

Lipford, G.B., T. Sparwasser, M. Bauer, S. Zimmermann, E. Koch, K. Heeg, H. Wagner. 1997. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur. J. Immunol.* 27:3420

Sparwasser, T. T. Miethke, G. Lipford, A. Erdmann, H. Häcker, K. Heeg, H. Wagner. 1997. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur J Immunol.* 27:1671

40

Verdijk, R.M., T. Mutis, B. Esendam, J. Kamp, C.J. Melief, A. Brand, E. Gouly. 1999. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol.* 163:57

40

【図面の簡単な説明】

50

【0054】

【図1】ポリ-L-アルギニン、CpG-ODNおよび抗原の組み合わせ投与が、全身的かつ非常に長期間にわたって持続する強い抗原特異的な免疫応答を引き起こすことを示す。この図は、OVA₂₅₇₋₂₆₄-ペプチドでイクスピボで刺激した末梢血リンパ球を示す。

【0055】

【図2a】ポリ-L-アルギニンが注射部位で貯蔵部の生成を誘発することを示す。この図は、ワクチン接種後の所定の時点で注射部位から撮った写真を示す。ワクチンの蛍光標識化合物を検出できる領域の周囲を白色線が囲んでいる。

【0056】

【図2b】ポリ-L-アルギニンの同時投与が、CpG-ODN-Cy5の生体中の拡散を防ぐことを示す。この図は、CpG-ODN-Cy5(B)またはCpG-ODN-Cy5およびpR60-FITC(C)の注射後第1日目におけるリンパ性組織および非リンパ性組織のFACS分析を示す。非処理マウスを対照として用いた(A)。

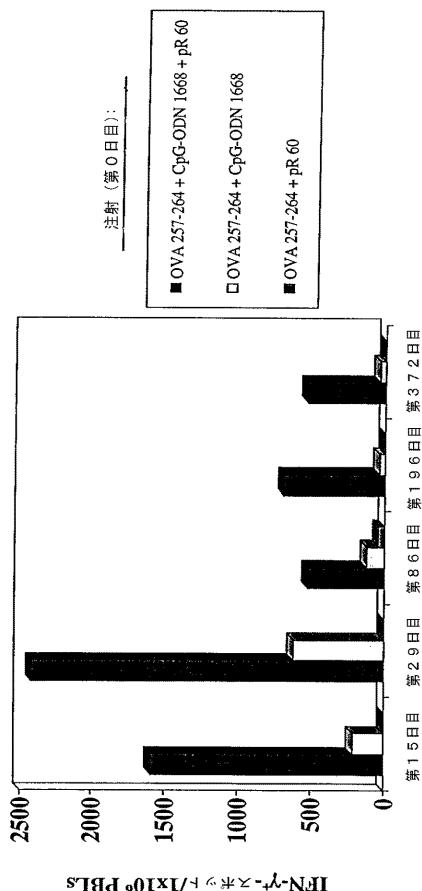
【0057】

【図3】ポリ-L-アルギニンが、少なくとも1のさらなる分子と一緒に注射したときに注射部位で貯蔵部の生成を誘発することを示す。この図は、ワクチン接種後第4日目に注射部位から撮った写真を示す。

【0058】

【図4】ポリ-L-アルギニンの同時注射が、CpG-ODNによって誘発されるTNF-αおよびIL-6の全身的産生をインビボで防ぐことを示す。マウスの後肢に注射し、1時間後に血清を調製した。血清中のTNF-αおよびIL-6の量をELISAにより決定した。

【図1】



ワクチン接種後の日数

FIG. 1

【図2a】

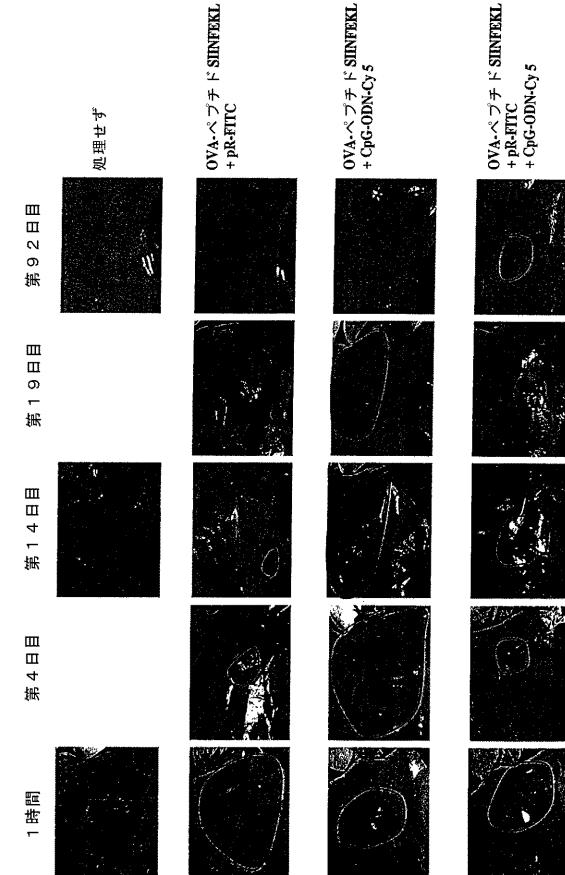


FIG. 2a

【図2b】

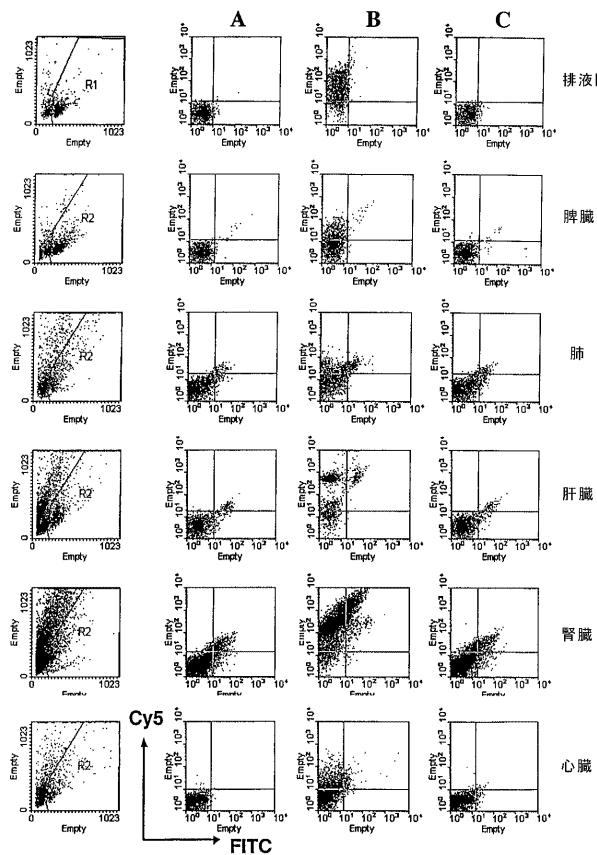


FIG. 2b

【図3】

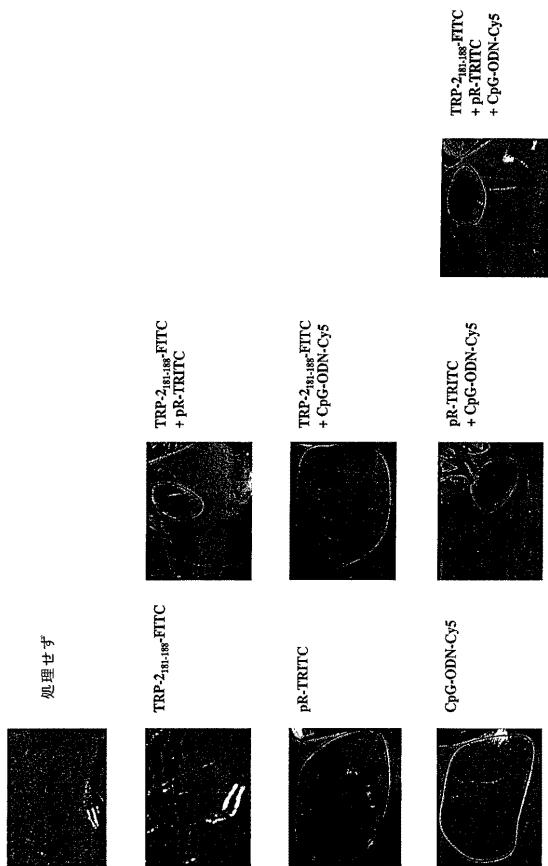


FIG. 3

【図4】

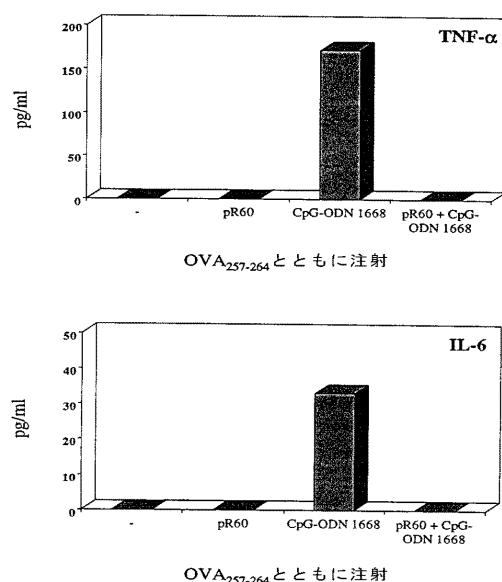


FIG. 4

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053184 A2

(51) International Patent Classification*: A61K 39/39

(21) International Application Number: PCT/EP02/00062

(22) International Filing Date: 7 January 2002 (07.01.2002)

(25) Filing Language: English

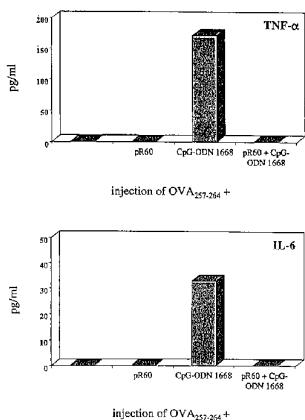
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PCT/EP01/00087 5 January 2001 (05.01.2001) EP
A 672/2001 25 April 2001 (25.04.2001) AT(71) Applicants (for all designated States except US): INTER-
CELL BIOMEDIZINISCHE FORSCHUNGS- UND
ENTWICKLUNGS AG [AT/AT]; Rennweg 95a, A-1030
Vienna (AT); CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH
[AT/AT]; Rennweg 95b, A-1030 Vienna (AT).

(54) Title: USES FOR POLYCATIONIC COMPOUNDS



WO 02/053184 A2



(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LINGNAU, Karen [DE/AT]; Galigasse 8/10, A-1130 Vienna (AT); MAT-
TNER, Frank [DE/AT]; Krottenbachstrasse 267/D/12,
A-1190 Vienna (AT); SCHMIDT, Walter [D/AT/AT]; Stein-
gasse 18/1/10, A-1030 Vienna (AT); BIRNSTIEL, Max
[CH/CH]; Nucleo, CH-6953 Lugaggia (CH); BUSCHEL,
Michael [DE/AT]; Goelchestrass 2/29, A-2380 Perch-
toldsdorf (AT).(74) Agents: SONN, Helmut et al.; Riemergasse 14, A-1010
Vienna (AT).(81) Designated States (national): AE; AG; AI; AM; AU; AU,
AZ; BA; BB; BG; BR; BY; CA; CH; CN; CO; CR; CU;
CZ; DE; DK; DM; DZ; EC; EE; ES; FI; GB; GD; GE; GI;
GM; IIR; IUV; ID; IL; IN; JP; KE; KG; KP; KR; KZ; LC;
LK; LR; LS; LT; LU; LV; MA; MD; MG; MK; MN; MW;
MX; MZ; NO; NZ; OM; PH; PL; PT; RO; RU; SD; SE; SG;

[Continued on next page]

(57) Abstract: The invention relates to the use of
a polycationic compound for the preparation of a
medicament with retarded in vivo release.

WO 02/053184 A2



SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 1 -

Uses for Polycationic Compounds

The invention relates to new uses for polycationic compounds.

Pharmaceutically used polycationic compounds, for example the polycationic amino acid polymers poly-L-arginine and poly-L-lysine, have been shown to allow very efficient charging of antigen presenting cells (APCs) with antigens *in vitro* and *in vivo*. This is thought to be the key event for triggering immune cascades, eventually leading to the induction of antigen specific immune effector cells that are able to destroy or neutralise targets. It has been shown previously that a number of polycationic compounds exert effects on immune cells (Buschle et al., Gene Ther. Mol. Biol. 1 (1998), 309-321; Buschle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 (1997), 3256-3261).

Co-injection of a mixture of poly-L-arginine and poly-L-lysine together with an appropriate antigen as a vaccine protects animals from tumor growth in several animal models. A vaccine consisting of polycationic compounds and antigens is accepted in the art as being a very effective form of treatment (WO 97/30721).

Many pharmaceutical substances administered to an individual are often quickly distributed throughout the body. The rapid systemic distribution of the drug usually causes strong and harmful side effects. The medical effect would be better if the medicament would stay in higher amounts at the site of administration and be gradually and continuously released to the whole body in small amounts.

It is an object of the present invention to provide means for keeping a medicament which is desired to act locally at the site of administration (depot effect). It is a further object of the invention to prevent or ameliorate side effects of drugs which are due to a too fast distribution of this drug throughout the body.

These objects are solved by the use of a polycationic compound for the preparation of a medicament with retarded *in vivo* release. It has surprisingly been found out in the course of the

CONFIRMATION COPY

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 2 -

present invention that polycationic compounds, if applied together with other pharmaceutically active compounds, which are quickly distributed in the individual, when administered without polycationic compounds, exhibit an effect of a retarded release of the active compound from the site of administration. The polycationic compound seems to keep the active pharmaceutical compound in a depot which allows a retarded in vivo release of the medicament which is often desired for an effective treatment with the pharmaceutically active principle.

An important field, where such a retarded in vivo release is advantageous is vaccination. If an antigen is presented for an extended period of time to the immune system of an individual to be vaccinated, the immune system has an enhanced possibility to create an efficient immune response against such an antigen. If, on the other hand, such an antigen is quickly distributed throughout the body, the antigen is quickly degraded and diluted so that an efficient immune response may not be achieved for many promising antigens. According to the present invention polycationic compounds therefore are used for providing a depot of e.g. such an antigen, which allows a long lasting continuous and effective presentation of this antigen to the immune system in order to create a protective immunity. Furthermore, when the antigens are applied in combination with immunostimulatory compounds (e.g. CpG-ODN), the slow release of these immunostimulatory compounds from the depot should result in a continuous stimulation of the immune system.

The present invention is especially beneficial if the combined medicament is administered, e.g. subcutaneously, intravenously, intranasally, intramuscularly, intradermally or transdermally. However, other application forms, such as parenteral or topical application, are also suitable for the present invention. However, the depot effect seems to be mostly significant if the composition is injected or implanted.

The present invention is preferably used in connection with all medicaments for which a retarded in vivo release is desired, e.g. antigens, allergens, drugs, which include cytokines, chemokines, immunostimulatory nucleic acids, cytotoxic drugs or anti-angio-

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 3 -

genic drugs or compounds needed for wound healing.

The antigen to be used within the course of the present invention is not critical, it may preferably be selected from the group consisting of an antigen from a viral, bacterial or a parasitic pathogen, an antigen from an eucaryotic pathogen, a tumor antigen, an autoimmune antigen or mixtures thereof. Especially preferred are negatively charged antigens or hydrophobic antigens. Further examples of antigens are whole-killed organisms, such as inactivated viruses or bacteria, fungi, protozoa or even cancer cells. Antigens may also consist of subfractions of these organisms/tissues, of proteins, or, in their most simple form, of peptides. Antigens can also be recognised by the immune system in form of glycosylated proteins or peptides and may also be or contain polysaccharides or lipids. Short peptides can be used, since e.g. cytotoxic T cells (CTL) recognise antigens in form of short usually 8-11 amino acids long peptides in conjunction with major histocompatibility complex (MHC). B cells recognise longer peptides starting at around 15 amino acids. By contrast to T cell epitopes, the three dimensional structure of B cell antigens may also be important for recognition by antibodies.

Preferred pathogens are selected from human immune deficiency virus (HIV), hepatitis A and B viruses, hepatitis C virus (HCV), Rous sarcoma virus (RSV), Epstein Barr virus (EBV), Influenza virus, Rotavirus, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, *Plasmodium* sp. (*Pl. falciparum*, *Pl. vivax*, etc.), *Aspergillus* sp. or *Candida albicans*. Antigens may also be molecules expressed by cancer cells (tumor antigens). Antigens may also be derived antigens. The derivation process may include the purification of a specific protein from the pathogen/cancer cells, the inactivation of the pathogen as well as the proteolytic or chemical derivatisation or stabilisation of such a protein. In the same way also tumor antigens (cancer vaccines) or autoimmune antigens may be used together with a polycationic compound according to the present invention.

The polycationic compound(s) to be used according to the present

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 4 -

invention may be any polycationic compound, which shows e.g. the characteristic effect according to the WO 97/30721, or others like cationic liposomes, poly-ethylene-amine, chitosan or polycations for DNA transfer. Preferred polycationic compounds are selected from basic polypeptides, organic polycations, basic polyaminoacids or mixtures thereof. These polyaminoacids should have a chain length of at least 4 amino acid residues (see: Tuftsin as described in Goldman et al (1983)). Especially preferred are substances containing peptidic bounds, like polylysine, polyarginine and polypeptides containing more than 20%, especially more than 50% of basic amino acid residues in a range of more than 8, especially more than 20, amino acid residues or mixtures thereof. Other preferred polycations and their pharmaceutical compositions are described in WO 97/30721 (e.g. polyethyleneimine) and WO 99/38528. Preferably these polypeptides contain between 5 and 500 amino acid residues, especially between 10 and 200 residues.

These polycationic compounds may be produced chemically or recombinantly or may be derived from natural sources.

Cationic (poly)peptides may also be polycationic anti-bacterial microbial peptides with properties as reviewed in (Ganz and Lehrer, 1999; Hancock, 1999). These (poly)peptides may be of prokaryotic or animal or plant origin or may be produced chemically or recombinantly (Andreu and Rivas, 1998; Ganz and Lehrer, 1999; Simmaco et al., 1998). Peptides may also belong to the class of defensins (Ganz, 1999; Ganz and Lehrer, 1999). Sequences of such peptides can, for example, be found in the Antimicrobial Sequences Database under the following internet address:

<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.html>

Such host defense peptides or defensines are also a preferred form of the polycationic polymer according to the present invention. Generally, a compound allowing for activation (or down-regulation) of the adaptive immune system, preferably mediated by APCs (including dendritic cells) is used as polycationic polymer.

Especially preferred for use as polycationic substance in the present invention are cathelicidin derived anti-microbial pep-

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 5 -

tides or derivatives thereof (A 1416/2000, incorporated herein by reference), especially anti-microbial peptides derived from mammal cathelicidin, preferably from human, bovine or mouse.

Polycationic compounds derived from natural sources include HIV-REV or HIV-TAT (derived cationic peptides, antennapedia peptides, chitosan or other derivatives of chitin) or other peptides derived from these peptides or proteins by biochemical or recombinant production. Other preferred polycationic compounds are cathelin or related or derived substances from cathelin. For example, mouse cathelin is a peptide which has the amino acid sequence NH₂-RLAGLLRKGGEKIGEKLKKICOKIKNFFQKLVPQPE-COOH. Related or derived cathelin substances contain the whole or parts of the cathelin sequence with at least 15-20 amino acid residues. Derivations may include the substitution or modification of the natural amino acids by amino acids which are not among the 20 standard amino acids. Moreover, further cationic residues may be introduced into such cathelin molecules. These cathelin molecules are preferred to be combined with the antigen and the immunogenic ODNs according to the present invention. However, these cathelin molecules surprisingly have turned out to be also effective as an adjuvant for an antigen without the addition of further adjuvants. It is therefore possible to use such cathelin molecules as efficient adjuvants in vaccine formulations with or without further immunostimulating substances.

Another preferred polycationic substance to be used according to the present invention is a synthetic peptide containing at least 2 KLK-motifs separated by a linker of 3 to 7 hydrophobic amino acids (A 1789/2000, incorporated herein by reference).

As mentioned above polycationic compounds may according to the present invention be preferably used together with a drug for which side effects due to a quick spread throughout the body of an individual are known. In general, the polycationic compound and the drug supposed to be released slowly are administered together at the same time and at the same site. In the combined medicament according to the present invention, such drugs may be e.g. simply mixed with the polycationic compounds or provided as a covalently combined medicament.

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 6 -

Preferred compounds with inflammatory potential to be used within the course of the present invention are immunogenic nucleic acid molecules. It is known that the immune system of mammals (and probably most if not all vertebrates) recognises DNA of lower organisms, including bacteria probably due to structural and sequence usage differences between pathogen and host DNA. In particular, short stretches of DNA derived from non-vertebrates or short form oligodeoxynucleotides (ODNs) containing non-methylated cytosine-guanine dinucleotides (CpG) in a certain base context, are targeted. CpG motifs are found at the expected frequency in bacterial DNA but are much less frequent in vertebrate DNA. In addition, non-vertebrate (i.e. bacterial) CpG motifs are not methylated, whereas vertebrate CpG sequences are. Such ODNs containing CpG motifs (CpG-ODNs) can directly activate monocytes and B cells. In consequence, the activation of monocytes and NK cells by CpG-ODNs promotes the induction of a Th1-type response and the development of cytotoxic T cells. In addition, such immunogenic ODNs are used as vaccine adjuvants to enhance the antibody response to specific antigens (e.g. EP 0 468 520 A2, WO 96/02555, WO 98/16247, etc.).

When CpG-ODNs are applied in combination with an antigen to an animal, the CpG-ODN molecules are quickly distributed throughout the body without providing an effective minimum concentration at the site of administration where the desired effect should be initiated. It could be shown by the present animal model that the polycationic compounds inhibit the immediate spread of these molecules and induce the formation of a depot of CpG-ODNs at the injection site which resulted in a strongly prolonged CpG-ODN induced antigen specific immune response in vivo. This CpG-ODN model therefore was excellent for showing the depot effect of polycationic compounds. If CpG-ODNs are applied in combination with an antigen via injection, the CpG-ODN molecules are quickly distributed throughout the body without providing an effective minimum concentration at the site of administration where the desired effect should be initiated. It could be shown by the present animal model that the polycationic compounds inhibit the immediate spread of these molecules and induce the formation of a depot antigen and CpG-ODNs at the injection site, which resulted

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 7 -

in a strongly prolonged CpG-ODN induced antigen-specific immune response in vivo.

Therefore, a preferred embodiment of the present invention is characterised in that the medicament is to be applied together with the polycationic compound further comprises immunogenic oligodeoxy nucleic acid molecules (ODNs), especially ODNs containing CpG motifs (CpG-ODNs), inosine containing ODNs (I-ODNs) or mixtures or combinations thereof. I-ODNs are described for example in the Austrian patent application A 1973/2000 (incorporated herein by reference). Mixtures of I-ODNs with CpG-ODNs may also be provided as well as combinations of these two principles, e.g. an I-ODN containing CpG motifs.

The induction of a depot effect according to the present invention is of course most desired for pharmaceutically active substances which are supposed to act locally at the given administration site. Therefore, the invention is significantly advantageous for substances, which should act locally but are easily transported and diffused away from this site by diffusion of transportation processes in the body. Such substances may include antigens, allergens, cytokines, chemokines, immunostimulatory nucleic acids, cytotoxic drugs or anti-angiogenic drugs or compound needed for wound healing.

A preferred embodiment of the present invention relates to the use of the polycationic substances in combination with substances which otherwise rapidly diffuse from the administration site, i.e. have a rather short pharmacological half life, especially with respect to the site of administration. Therefore, preferred rapidly diffusing substances with a pharmacological half life (drop of the concentration of the substance by half), especially at the site of administration, of below 10 minutes, more preferred below 5 minutes, especially below 1 minute.

Preferably, such substances to be applied together with polycationic compounds in order to achieve a depot effect show a certain affinity to the polycationic compound, i.e. hydrophobic interaction, hydrogen bridges, electrostatic interactions, polar or ionic interactions. Of course, the depot effect may also be

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 8 -

achieved by covalent binding of the components in the combined pharmaceutical preparation; although non-covalent interactions of drug and polycationic compounds are preferred.

It is known (PCT/EP 01/00087) that the co-application of polycationic compounds and CpG-ODNs with an antigen strongly and synergistically enhances the induction of an antigen specific immune response when compared to the injection without poly-cationic compounds. That is reflected by a high number of IFN- γ -producing cells isolated from draining lymph nodes (ELISPOT assay). As stated above within the course of the present invention, it could be shown that this strong local immune response (day 4/draining lymph node cells) induced after one single injection of an antigen with a mixture of polycationic compounds (as an example polyarginine pR 60 is used) and CpG-ODNs converts to a systemic immune response which is very long lasting. According to the present invention, the complex formation ability of substances such as CpG-ODNs with polycationic compounds is used for preventing a systemic distribution and the subsequent fast resorption of such substances, thereby providing a strong prolongation of the properties of such substances, e.g. a prolongation of the immunostimulatory properties of CpG-ODNs. In addition, preventing the systemic distribution avoids the induction of potential harmful systemic side effects of immunostimulatory agents.

This model using CpG-ODNs and polycationic peptides is further described and analysed in the example section. Moreover, to provide an analysable pharmaceutical target, an Ovalbumin-derived peptide (OVA₂₅₇₋₂₆₄) is used as a model compound (a model antigen).

The present invention also relates to treating a patient with a drug, supposed to be retardedly released in vivo comprising administering that drug together with an effective amount of a polycationic compound inducing a depot effect of that drug.

The amounts of polycationic compound to be administered is highly depending on the necessities of the individual composition and optionally on the drug to be administered together with the polycationic polymer. In case of poly-L-arginine and poly-L-lysine preferred amounts of polycation are 0.001-1000 μ g/administration

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 9 -

unit, more preferred 0,1-10 mg/dose, especially around or beyond 0,1 mg/20g body weight (of mice) or the equivalent dose for humans.

The invention will be described in more detail by way of the following examples and the drawing figures, yet it is not restricted to these particular embodiments.

Fig. 1 shows that the combined application of poly-L-arginine, CpG-ODN and antigen induces strong antigen-specific immune responses which are systemic and very long lasting. The figure shows peripheral blood lymphocytes stimulated ex vivo with OVA₂₅₇₋₂₆₄-peptide;

Fig. 2a shows that poly-L-arginine induces the formation of a depot at the injection site. This figure shows photos from the injection sites at the indicated time points after vaccination. White lines surround the area where the fluorescence labelled compounds of the vaccine can be detected;

Fig. 2b shows that the co-application of poly-L-arginine inhibits the spreading of CpG-ODN-Cy5 throughout the body. This figure shows FACS analyses of lymphoid and non-lymphoid tissues at day 1 after injection of CpG-ODN-Cy5 (B) or CpG-ODN-Cy5 and pR 60-FITC (C). Untreated mice were used as a control (A);

Fig. 3 shows that poly-L-arginine induces the formation of a depot at the injection site when co-injected at least with one more molecule. This figure shows photos from the injection sites at day 4 after vaccination;

Fig. 4 shows that co-injected poly-L-arginine prevents the CpG-ODN-induced systemic production of TNF- α and IL-6 in vivo. Mice were injected into the hind footpads and one hour later serum was prepared. The amount of TNF- α and IL-6 in the sera was determined by ELISA;

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 10 -

E X A M P L E S

In the present examples it is shown that the strong local immune response (day 4/draining lymph node cells) induced after one single injection of antigen with a mixture of pR60 and CpG-ODN converts to a systemic immune response which is, most importantly, very long lasting (Example 1). Even 372 days after injection (the latest time point analysed), around 500 antigen-specific, IFN- γ producing T cells per million peripheral blood lymphocytes can be detected. One possible explanation for this effect might be that a complex-formation of CpG-ODN with poly-L-arginine prevents the systemic distribution of CpG-ODN and the subsequent fast resorption of CpG-ODN. Hence, this results in a strong prolongation of the immunostimulatory properties of CpG-ODNs.

In order to investigate this assumption, fluorescence-labeled compounds were injected together subcutaneously into the flank of mice. At different time points after this treatment, injection sites were inspected for the presence of labeled compounds. In example 2a and 2b, OVA₂₅₇₋₂₆₄-peptide (unlabeled), poly-L-arginine-FITC (yellow) and CpG-ODN-Cy5 (blue) were used for injections. After injection of OVA₂₅₇₋₂₆₄-peptide with poly-L-arginine-FITC the formation of a depot could be detected at the injection site. The injection of OVA₂₅₇₋₂₆₄-peptide with CpG-ODN-Cy5 resulted in the distribution of CpG-ODN-Cy5 all over the skin (example 2a). As simultaneously determined by FACS analyses (example 2b), CpG-ODN-Cy5 is also detectable in secondary lymphoid organs (draining lymph node, spleen) and non-lymphoid tissues (lung, liver, kidney, heart). In contrast, when OVA₂₅₇₋₂₆₄-peptide and CpG-ODN-Cy5 were injected together with poly-L-arginine-FITC, the CpG-ODN-Cy5 was restricted to the depot formed by poly-L-arginine (example 2a). FACS analyses from these mice (example 2b) revealed that CpG-ODN-Cy5 is not detectable in the periphery, due to the fact that CpG-ODN-Cy5 is trapped by poly-L-arginine in the depot at the injection site. Both, poly-L-arginine-FITC and CpG-ODN-Cy5 can be detected within this depot at least up to day 92 after injection (the latest time point analysed). This observation implies that the combination of peptide and poly-L-arginine with CpG-ODN led to a far long lasting existence of the depot compared

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 11 -

to the combination of peptide and poly-L-arginine. In example 3, TRP- $2_{181-188}$ -peptide-FITC (yellow), poly-L-arginine-TRITC (red-violet), CpG-ODN-Cy5 (blue) were used for injections. When TRP- $2_{181-188}$ -peptide-FITC was injected either alone or in combination with CpG-ODN-Cy5, the peptide was not detectable at the injection site at day 4. The injection of poly-L-arginine-TRITC alone resulted in its distribution all over the skin. The injection of CpG-ODN-Cy5 either alone or in combination with TRP- $2_{181-188}$ -peptide-FITC resulted in the distribution of CpG-ODN-Cy5 all over the skin. This experiment also indicates that poly-L-arginine only induced the formation of a depot when it was injected with at least one more molecule (peptide and/or CpG-ODN).

Thus, these findings imply that poly-L-arginine induces a depot at the injection site within other compounds (antigen and/or immunostimulatory CpG-ODN) are kept. In the case of co-injection of OVA $_{257-264}$ -peptide, poly-L-arginine and CpG-ODN, the slow release of both peptide and CpG-ODN from this depot is most likely responsible for the persistent activation of accessory cells and subsequently the persistent stimulation of T cells. In consequence, this leads to the observed long lasting existence of high numbers of antigen-specific T cells in the periphery after one single injection.

Beside their potent immunostimulatory effects, CpG-ODNs are described to have potentially harmful side effects in that they induce the systemic release of high amounts of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6, which could induce a shock syndrome (Sparwasser 1997, Lipford 1997). As described in example 2a, 2b and 3, CpG-ODNs are not systemically present when injected in combination with poly-L-arginine. Therefore, it was investigated whether the co-administration of poly-L-arginine affects the CpG-ODN-induced systemic production of TNF- α and IL-6. Serum levels of both cytokines were determined by ELISA one hour after injection. Example 4 demonstrates that neither the injection of OVA $_{257-264}$ -peptide alone nor in combination with poly-L-arginine led to the induction of significant amounts of TNF- α and IL-6 in the serum, whereas the injection of OVA $_{257-264}$ -peptide in combination with CpG-ODN induces high concentrations of both cytokines. However, upon co-administration of OVA $_{257-264}$ -peptide with poly-L-argi-

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 12 -

ginine and CpG-ODN, this systemic production of TNF- α and IL-6 was totally abolished. Thus, these data in combination with the findings demonstrated in Example 2 and 3 indicate that the localisation of CpG-ODN via the depot formation mediated by poly-L-arginine prevents the systemic distribution of CpG-ODN and subsequently the systemic release of pro-inflammatory cytokines.

In parallel, in vitro studies were performed to clarify whether the complexation of CpG-ODN by poly-L-arginine can also directly influence the stimulation of mouse bone marrow-derived CD11c $^{+}$ dendritic cells by CpG-ODN concerning the production of TNF- α and IL-6. For this purpose, CD11c $^{+}$ dendritic cells were incubated either with poly-L-arginine, CpG-ODN or the combination of poly-L-arginine and CpG-ODN (example 5). The levels of TNF- α and IL-6 were determined in the supernatants derived from these cultures. After incubation with poly-L-arginine neither TNF- α nor IL-6 were detectable, whereas after incubation with CpG-ODN significant amounts of both cytokines are produced. Impressively, the presence of poly-L-arginine inhibited the CpG-ODN-induced production of TNF- α and IL-6 by these cells.

Thus, these results indicate that the complexation of CpG-ODN by poly-L-arginine not only inhibits the systemic but also the local release of pro-inflammatory cytokines. In consequence, these beneficial effects of poly-L-arginine prevent probably uncontrolled and excessive systemic and local immune responses induced by CpG-ODNs.

Further in vitro-experiments revealed that poly-L-arginine also inhibits the polyinosinic-polycytidylic acid-induced production of pro-inflammatory cytokines by human dendritic cells.

Thus, these observations imply a general anti-inflammatory effect of poly-L-arginine. The risks of the application of immunogenic but potential harmful substances can be probably minimised by the co-application of poly-L-arginine. The rapid systemic distribution of such substances can be prevented by the property of poly-L-arginine to form a depot in which all compounds are trapped. Furthermore, the complexation of these substances by poly-L-arginine can e.g. inhibit the release of toxic amounts of pro-in-

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 13 -

flammatory cytokines.

Example 1:

The combined application of Ovalbumin-peptide/poly-L-arginine (pR 60)/ CpG-ODN leads to the induction of strong antigen-specific immune responses which are systemic and very long lasting.

Mice C57BL/6 (Harlan/Olac)
Peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptide (SIINFEKL), a MHC class I (H-2Kb)-restricted epitope of chicken Ovalbumin (Rotzschke, O. et al., Eur. J. Immunol. 1991 21 (11): 2891-4), synthesised by standard solid phase Fmoc synthesis, HPLC purified and analysed by mass spectroscopy for purity.
Dose: 300 µg/mouse

Poly-L-Arginine 60 (pR60)
Poly-L-Arginine with an average degree of polymerisation of 60 arginine residues; SIGMA chemicals
Dose: 100 µg/mouse

CpG-ODN 1668 phosphothioate-modified oligodinucleotides containing a CpG- motif: tcc atg acg ttc ctg atg ct, synthesised by NAPS Göttingen GmbH.
Dose: 5nmol/mouse

Experimental groups (5 mice per group)

1. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptide + CpG-ODN + pR 60
2. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptide + CpG-ODN
3. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptide + pR 60

On day 0, mice were injected into each hind footpad with a total volume of 100µl (50µl per footpad) containing the above mentioned compounds. Blood was taken via the tail vein at the indicated time points and peripheral blood lymphocytes (PBLs) were isolated using a Ficoll gradient. PBLs were stimulated ex vivo with the antigen used for vaccination, with medium (background) and Concanavalin A (positive control). IFN-γ-ELISPOTs were carried out as described (Miyahira et al., 1995). This method is a widely used procedure allowing the quantification of antigen-specific T cells. Spots representing single IFN-γ producing T cells were

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 14 -

counted and the number of background spots was subtracted from all samples. There were many spots detected after the stimulation with Con A (data not shown) indicating a good condition of the used lymphocytes. For each experimental group of mice the number of spots/ 1×10^6 PBLS are illustrated in Figure 1.

Example 2a:
Poly-L-arginine induces the formation of a depot at the injection site

Mice C57BL/6 (Harlan/Olac)
Peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptide (SIINFEKL), a MHC class I (H-2K^b)-restricted epitope of chicken Ovalbumin (Rotzschke, O. et al., Eur. J. Immunol. 1991 21(11): 2891-4), synthesised by standard solid phase F-moc synthesis, HPLC purified and analysed by mass spectroscopy for purity.
Dose: 300 μ g/mouse
Poly-L-Arginine 60-FITC (pR60-FITC)
Poly-L-Arginine with an average degree of polymerisation of 60 arginine residues; SIGMA chemicals
For fluorescein (FITC) labeling of poly-L-arginine, the poly-L-arginine was dissolved in 50mM HEPES pH 7,9 (10mg/500 μ l). A 5-fold molar excess of FITC (Molecular Probes, Eugene, OR) in an equal volume of DMSO was added to the poly-L-arginine solution. The solution was kept at room temperature in the dark for 2,5 hours. Unreacted dye was separated by running the mixture over a PD10 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden), using 50mM Hepes, pH 7,9, as eluent. The solution was then dialysed against 2 x 5 liter aqua dest., pH 7,4 (0,1M HCL), over night. After lyophilisation poly-L-arginine FITC was dissolved in aqua bidest. with a concentration of 10mg/ml.
Dose: 100 μ g/mouse
CpG-ODN 1668-Cy5
phosphothioate-modified, Cy5-labeled oligodinu-

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 15 -

cleotides containing a CpG motif:
tcc atg acc ttc ctg atg ct, synthesised by NAPS
Göttingen GmbH.
Dose: 5nmol/mouse

Experimental groups (1 mouse / group 1/ indicated time point, 3 mice / group 2-4 / time point)

1. untreated
2. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptide + pR 60-FITC
3. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptide + CpG-ODN1668-Cy5
4. OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptide + pR 60-FITC + CpG-ODN 1668-Cy5

On day 0 mice were injected subcutaneously into the right flank with a total volume of 100µl containing the above mentioned compounds. Animals were sacrificed at the indicated time points after injection and photos were taken from the injection sites (Fig. 2a).

Example 2b:

Co-application of poly-L-arginine inhibits the distribution of CpG-ODN-Cy5 throughout the body

Mice C57Bl/6 (Harlan/Olac)
Poly-L-Arginine 60-FITC (pR60-FITC)
Poly-L-Arginine with an average degree of polymerisation of 60 arginine residues; SIGMA chemicals
For fluorescein (FITC) labeling of poly-L-arginine, the poly-L-arginine was dissolved in 50mM HEPES pH 7,9 (10mg/500µl). A 5-fold molar excess of FITC (Molecular Probes, Eugene, OR) in an equal volume of DMSO was added to the poly-L-arginine solution. The solution was kept at room temperature in the dark for 2,5 hours. Unreacted dye was separated by running the mixture over a PD10 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using 50mM HEPES pH 7,9 as eluent. The solution was then dialysed against 2 x 5 liter aqua dest., pH 7,4 (0,1M HCL), over night. After lyophilisation poly-L-argi-

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 16 -

gine-FITC was dissolved in aqua bidest. with a concentration of 10mg/ml.

Dose: 100 µg/mouse

CpG-ODN 1668-Cy5

phophothioate-modified, Cy5-labeled oligodinucleotides containing a CpG motif: tcc atg acg ttc ctg atg ct, synthesised by NAPS Göttingen GmbH.

Dose: 5nmol/mouse

Experimental groups (1 mouse / group 1/ indicated time point, 3 mice / group 2-4 / time point)

1. untreated
2. CpG-ODN1668-Cy5
3. pR 60-FITC + CpG-ODN 1668-Cy5

Mice were injected subcutaneously into the right flank with a total volume of 100µl containing the above mentioned compounds. One day after injection, mice were sacrificed and FACS-analyses were performed from secondary lymphoid organs (draining lymph node, spleen) as well as non-lymphoid tissues (lung, liver, kidney, heart) (Fig. 2b).

Example 3:

Poly-L-arginine induces the formation of a depot at the injection site when co-injected at least with one more molecule

Mice C57Bl/6 (Harlan/Olac)
Peptide TRP-2-Peptide (VYDFFVWL), a MHC class I (H-2Kb)-restricted epitope of mouse tyrosinase related protein-2 (Bloom, M.B. et al., J Exp Med 1997 185, 453-459), synthesised by standard solid phase F-moc synthesis, HPLC purified and analysed by mass spectroscopy for purity. For fluorescein (FITC) labeling, the TRP-2₁₈₁₋₁₈₉-peptide was dissolved in 1M sodium borate, pH 7,9. An 8-fold molar excess of FITC (Molecular Probes, Eugene, OR) in an equal volume of DMF was added to the peptide solution. The solution was kept at room temperature for four hours. Unreacted dye was separated by running the

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 17 -

mixture over a G25 gel filtration column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using 0,1% TFA in water as eluent. Two moles of FITC were incorporated per mol of peptide (N-terminus, side chain of lysine)

Dose: 100µg/mouse

Poly-L-Arginine 60-TRITC (pR60-TRITC)

Poly-L-Arginine with an average degree of polymerisation of 60 arginine residues; SIGMA chemicals. For TRITC-labeling of poly-L-arginine, the poly-L-arginine was dissolved in 50mM HEPES pH 7,9 (10mg/500µl). A 5-fold molar excess of FITC (Molecular Probes, Eugene, OR) in an equal volume of DMSO was added to the poly-L-arginine solution.

The solution was kept at room temperature in the dark for 2,5 hours. Unreacted dye was separated by running the mixture over a PD10 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden), using 50mM Hepes, pH 7,9, as eluent. The solution was then dialysed against 2 x 5 liter aqua dest., pH 7,4 (0,1M HCL), over night. After lyophilisation poly-L-arginine-TRITC was dissolved in aqua bidest. with a concentration of 10mg/ml.

Dose: 100 µg/mouse

CpG-ODN 1668-Cy5

phosphothioate-modified, Cy5-labeled oligodinucleotides containing a CpG motif: tcc atg acg ttc ctg atg ct, synthesised by NAPS Göttingen GmbH.

Dose: 5nmol/mouse

Experimental groups (1 mouse / group 1/ indicated time point, 3 mice / group 2-4 / time point)

1. untreated
2. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈-FITC
3. pR60-TRITC
4. CpG-ODN1668-Cy5
5. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈-FITC + pR60-TRITC
6. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈-FITC + CpG-ODN-Cy5
7. pR60-TRITC + CpG-ODN 1668-Cy5
8. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈-FITC + pR 60-TRITC + CpG-ODN 1668-Cy5

On day 0 mice were injected subcutaneously into the right flank with a total volume of 100 μ l containing the above mentioned compounds. Animals were sacrificed at day 4 after injection and photos were taken from the injection sites (Fig. 3).

Example 4

The co-injection of poly-L-arginine prevents the CpG-ODN-induced systemic production of TNF- α and IL-6 in vivo

Mice C57Bl/6 (Harlan/Olac)

Peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL), an MHC class I (H-2Kb)-restricted epitope of chicken ovalbumin (Rotzschke et al., 1991), was synthesised using standard solid phase F-moc synthesis, HPLC-purified and analysed by mass spectroscopy for purity

Dose: 300 μ g/mouse

Poly-L-arginine 60 (pR60)

Poly-L-arginine with an average degree of polymerisation of 60 arginine residues; SIGMA Chemicals

Dose: 100 μ g/mouse

CpG-ODN 1668 phosphothioate-modified oligodeoxynucleotides containing a CpG motif: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT, synthesised by NAPS GmbH, Göttingen.

Dose: 5 nmol/mouse

Experimental groups: 4 mice per group

1. OVA₂₅₇₋₂₆₄

2. pR60

3. CpG 1668 + OVA₂₅₇₋₂₆₄

4. CpG 1668 + pR60 + OVA₂₅₇₋₂₆₄

Mice were injected into each hind footpad with a total volume of 100 μ l (50 μ l per footpad), containing the above mentioned compounds. One hour after injection blood was taken from the tail-vein and serum was prepared. The amount of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in the sera was determined by cytokine-

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 19 -

specific ELISAs according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN).

This experiment shows that injection of OVA₂₅₇₋₂₆₄ alone or in combination with poly-L-arginine does not induce the production of detectable amounts of TNF- α or IL-6 (Figure 4). In contrast, the injection of OVA₂₅₇₋₂₆₄-peptide with CpG-ODN 1668 induces the systemic production of TNF- α and IL-6. When peptide and CpG-ODN were co-injected with poly-L-arginine, the CpG-ODN induced production of pro-inflammatory cytokines was inhibited.

References:

Andreu, D., and Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415-433.

Ganz, T. (1999). Defensins and host defense [comment]. *Science* 286, 420-421.

Ganz, T., and Lehrer, R. I. (1999). Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today* 5, 292-297.

Goldman, R., Bar-Shavit, Z. (1983). On the mechanism of the augmentation of the phagocytic capability of phagocytic cells by Tuftsin, substance P, neuropeptid Y, and kentsin and the interrelationship between their receptors. *Ann N Y Acad. Sci.* 419:143-55.

Inaba et al. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693

Hancock, R. E. (1999). Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs* 57, 469-473.

Lipford, G.B., T. Sparwasser, M. Bauer, S. Zimmermann, E. Koch, K. Heeg, H. Wagner. 1997. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur. J. Immunol.* 27:3420

Sparwasser, T. T. Miethke, G. Lipford, A. Erdmann, H. Häcker, K. Heeg, H. Wagner. 1997. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur J Immunol.* 27:1671

Verdijk, R.M., T. Mutis, B. Esendam, J. Kamp, C.J. Melief, A. Brand, E. Goulymy. 1999. Polyribenosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol.* 163:57

Claims:

- 1.: Use of a polycationic compound for the preparation of a medicament with retarded in vivo release.
- 2.: Use according to claim 1, characterized in that said medicament is a vaccine.
- 3.: Use according to claim 1 or 2, characterized in that said medicament comprises an antigen.
- 4.: Use according to any one of claims 1 to 3, characterized in that said antigen is selected from the group consisting of an antigen from a viral or a bacterial pathogen, an antigen from an eukaryotic pathogen, a tumor antigen, an autoimmune antigen or mixtures thereof.
- 5.: Use according to any one of claims 1 to 4, characterized in that said polycationic compound is a polycationic peptide, preferably a basic polypeptide, an organic polycation comprising peptide bonds or mixtures thereof.
- 6.: Use according to any one of claims 1 to 5, characterized in that said polycationic compound is polylysine, polyarginine, a polypeptide containing more than 50 % of basic amino acid residues in a range of more than 5, especially more than 10, amino acid residues or mixtures thereof.
- 7.: Use according to any one of claims 1 to 6, characterized in that said polycationic compound is a synthetic peptide containing at least two KLK-motifs separated by a linker of 3 to 7 hydrophobic amino acids.
- 8.: Use according to any one of claims 1 to 7, characterized in that said medicament further comprises a compound with an inflammatory potential.
- 9.: Use according to any one of claims 1 to 8, characterized in that said medicament further comprises a compound with a pharma-

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

- 22 -

co logical half time at the site of administration of below 10 minutes, preferably below 5 minutes, especially below 1 minute.

10.: Use according to any one of claims 1 to 9, characterized in that said medicament further comprises immunogenic nucleic acid molecules.

11.: Use according to any one of claims 1 to 10, characterized in that said medicament further comprises immunogenic oligodesoxy nucleic acid molecules (ODNs), especially ODNs comprising CpG motifs (CpG-ODNs), inosine containing ODNs (I-ODNs) or mixtures or combinations thereof.

12.: Use according to any one of claims 1 to 11, characterized in that said medicament is a locally acting medicament.

13.: Use according to any one of claims 1 to 12, characterized in that said medicament further comprises an active substance, said active substance having an affinity to said polycationic compound.

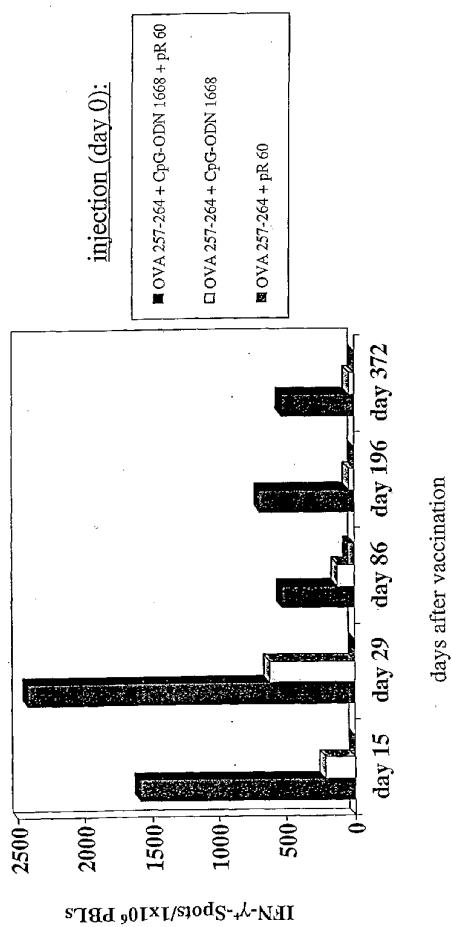


FIG. 1

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

2/5

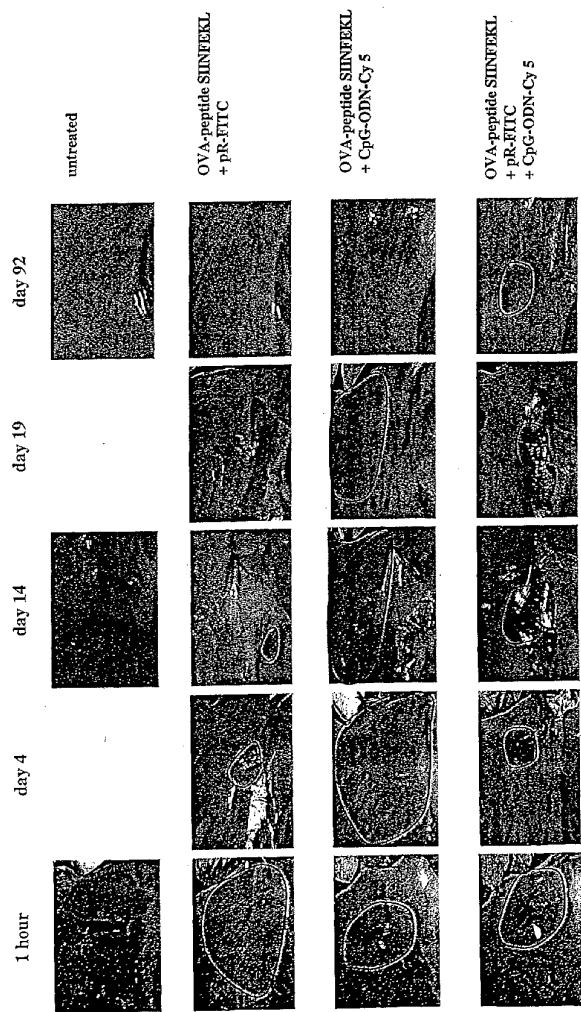


FIG. 2a

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

3/5

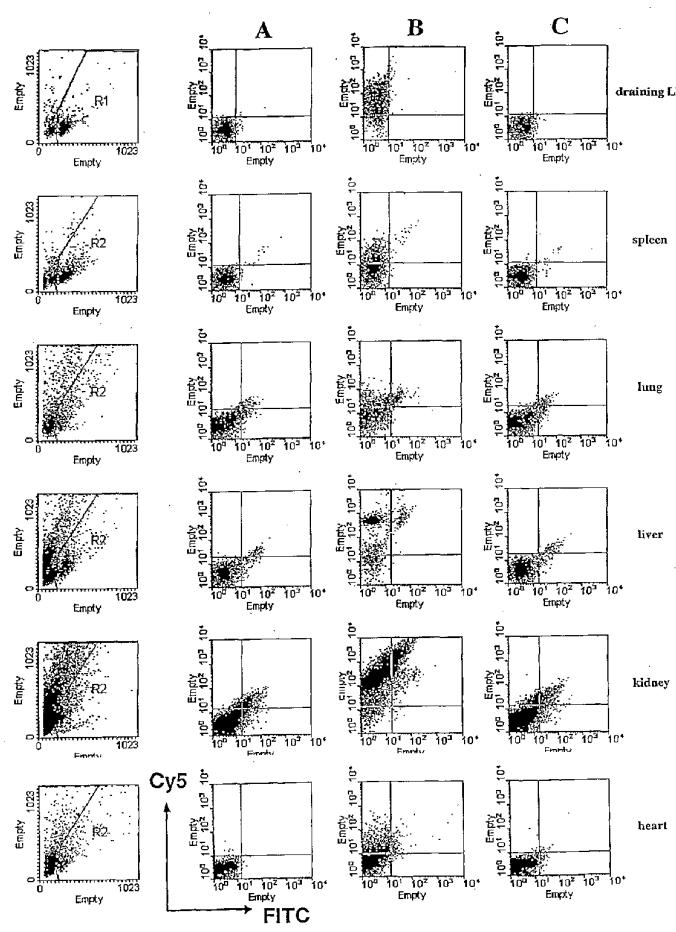


FIG. 2b

WO 02/053184

PCT/EP02/00062

4/5

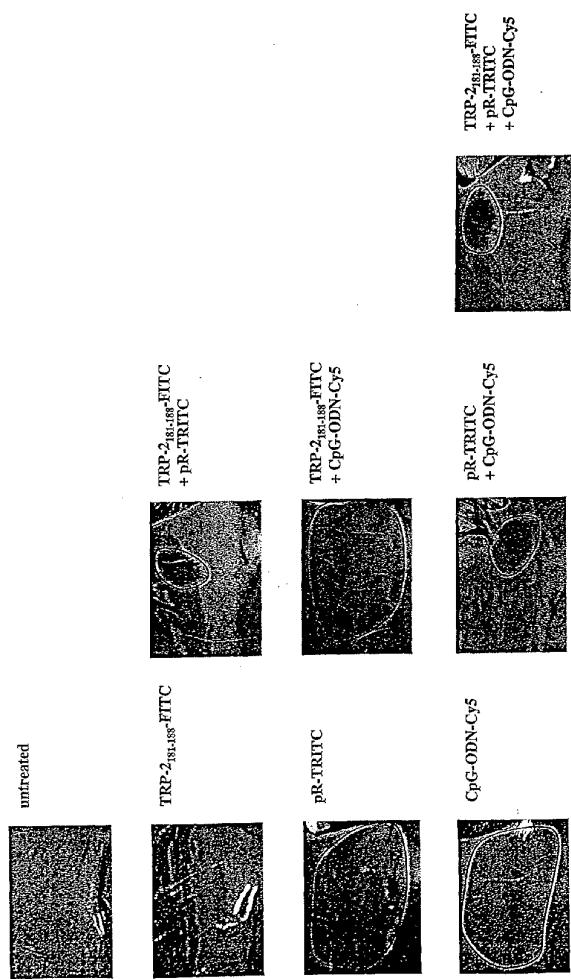


FIG. 3

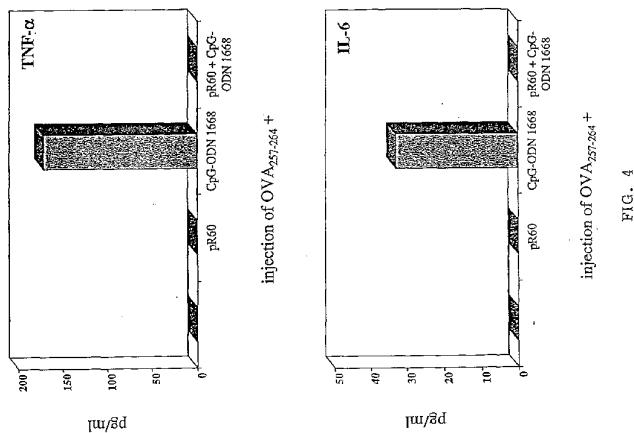


FIG. 4

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053184 A3

(51) International Patent Classification: A61K 39/00. (74) Agents: SONN, Helmut et al.; Riemergasse 14, A-1010 Vienna (AT). 39/02, 39/12, 31/7125, 31/7084, 39/002, A61P 35/00, 37/00

(21) International Application Number: PCT/EP02/00062

(22) International Filing Date: 7 January 2002 (07.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PCT/EP01/00087 5 January 2001 (05.01.2001) EP
A 672/2001 25 April 2001 (25.04.2001) AT

(71) Applicants (for all designated States except US): INTER-CELL BIOMEDIZINISCHE FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGS AG [AT/AT]; Rennweg 95b, A-1030 Vienna (AT). CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH [AT/AT]; Rennweg 95b, A-1030 Vienna (AT).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LINGNAU, Karen [DE/AT]; Galfgasse 8/10, A-1130 Vienna (AT). MAT-TNER, Frank [DE/AT]; Krottenbachstrasse 267/D12, A-1190 Vienna (AT). SCHMIDT, Walter [DE/AT]; Stein-gasse 18/1/10, A-1030 Vienna (AT). BIRNSTIEL, Max [CH/CH]; Nuckoo, CH-6953 Lugaggia (CH). BUSCHEL, Michael [DE/AT]; Goethestrasse 2/29, A-2380 Perchtoldsdorf (AT).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, FE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US onlyPublished:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
19 September 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/053184 A3

(54) Title: USES FOR POLYCATIONIC COMPOUNDS AS VACCINE ADJUVANTS

(57) Abstract: The invention relates to the use of a polycationic compound for the preparation of a medicament with retarded in vivo release.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 02/00062												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K31/7125 A61K31/7084 A61K39/002 A61P35/00 A61P37/00														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, LIFESCIENCES														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">P, X</td> <td style="padding: 2px;">WO 01 93905 A (CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH ;EGYED ALENA (AT); LINGNAU KAREN (AT);) 13 December 2001 (2001-12-13) claim 13 ----</td> <td style="padding: 2px;">10,11</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 97 30721 A (SCHWEIGHOFFER TAMAS ;BIRNSTIEL MAX (AT); BUSCHLE MICHAEL (AT); SCH) 28 August 1997 (1997-08-28) cited in the application page 19; example 5 ----</td> <td style="padding: 2px;">1-6,10, 13</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">P, X</td> <td style="padding: 2px;">WO 01 24822 A (CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH ;MATTNER FRANK (AT); BUSCHLE MICHAEL () 12 April 2001 (2001-04-12) page 8 ----</td> <td style="padding: 2px;">1-6 -/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	P, X	WO 01 93905 A (CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH ;EGYED ALENA (AT); LINGNAU KAREN (AT);) 13 December 2001 (2001-12-13) claim 13 ----	10,11	X	WO 97 30721 A (SCHWEIGHOFFER TAMAS ;BIRNSTIEL MAX (AT); BUSCHLE MICHAEL (AT); SCH) 28 August 1997 (1997-08-28) cited in the application page 19; example 5 ----	1-6,10, 13	P, X	WO 01 24822 A (CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH ;MATTNER FRANK (AT); BUSCHLE MICHAEL () 12 April 2001 (2001-04-12) page 8 ----	1-6 -/-
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
P, X	WO 01 93905 A (CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH ;EGYED ALENA (AT); LINGNAU KAREN (AT);) 13 December 2001 (2001-12-13) claim 13 ----	10,11												
X	WO 97 30721 A (SCHWEIGHOFFER TAMAS ;BIRNSTIEL MAX (AT); BUSCHLE MICHAEL (AT); SCH) 28 August 1997 (1997-08-28) cited in the application page 19; example 5 ----	1-6,10, 13												
P, X	WO 01 24822 A (CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH ;MATTNER FRANK (AT); BUSCHLE MICHAEL () 12 April 2001 (2001-04-12) page 8 ----	1-6 -/-												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Parent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the priority date of another document as a special reason (art. 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 prior art documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search: 27 June 2002		Date of mailing of the international search report: 04/07/2002												
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2290 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Wagner, R												

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 02/00062
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	GB 744 988 A (BRITISH DRUG HOUSES LTD; WELLCOME FOUND; ALLEN & HANBURY'S LTD; BOOTS PU) 15 February 1956 (1956-02-15) page 1 ---	1,3,5,6
X	WO 00 62800 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ; FRIEDE MARTIN (BE); GARCON NATHALIE (BE) 26 October 2000 (2000-10-26) page 6; example 5 ---	1-5,10, 11
X	WO 91 04052 A (PEPTIDE TECHNOLOGY LTD) 4 April 1991 (1991-04-04) page 10 ---	1-6
X	WO 00 41679 A (LEONG KAM W ; SONG RUIJIANG (US); AUGUST J THOMAS (US); LIU SHU QI) 20 July 2000 (2000-07-20) page 8; example 7 ---	1,2,5,6, 8,10
A	SCHMIDT W ET AL: "Cell-free tumor antigen peptide-based cancer vaccines" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 94, April 1997 (1997-04), pages 3262-3267, XP002168512 ISSN: 0027-8424 the whole document ---	1-6
E	WO 02 32451 A (CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH ; FRITZ JOERG (AT); MATTNER FRANK (AT);) 25 April 2002 (2002-04-25) abstract ---	7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No: PCT/EP 02/00062
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 7, 9, 12 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a). 	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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 <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. </div>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/EP 02 00062

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 7,9,12

Claim 7 is not supported by the description (Article 6 PCT) and not sufficiently disclosed (Article 5 PCT) because the present application does not provide any substantive support that a peptide of a maximum 13 amino acids containing only 4 cationic amino-acids has the desired effect. In addition claim 7 is in contradiction to claim 6, on which it is directly dependent, because claim 6 requires that a minimum of 50% of the amino-acid residues are cationic.

Claim 9 is not clear (Article 6 PCT) because the formulation "half time at the site of administration" is not well defined. The features of claim 9 are also in contradiction to claim 1 on which it is dependent because claim 9 requires a component with a short half-life at the site and the main characteristic feature of the independent claim is a retarded release.

Claim 12 is not clear (Article 6 PCT) because the expression "locally acting" is vague and because the concept of locally acting is in contradiction with the fact that, according to claim 2 on which claim 12 is dependent, the medicament is a vaccine which consequently involves the immune system which is definitely not limited to the site of administration.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			
International Application No PCT/EP 02/00062			
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0193905	A 13-12-2001	AU 6234501 A AU 8181201 A WO 0193905 A1 WO 0193903 A1	17-12-2001 17-12-2001 13-12-2001 13-12-2001
-----	-----	-----	-----
WO 9730721	A 28-08-1997	DE 19607044 A1 DE 19638313 A1 DE 19648687 A1 AU 722264 B2 AU 1875997 A AU 720131 B2 AU 7694796 A BG 62999 B1 BG 102439 A BG 102714 A BR 9611466 A BR 9707694 A CA 2238176 A1 CN 1202931 A CN 1211926 A CZ 9801589 A3 CZ 9802689 A3 EE 9800161 A EE 9800255 A WO 9719169 A1 WO 9730721 A1 EP 0866851 A1 EP 0881906 A1 HR 970100 A1 HU 0000318 A2 HU 9901186 A2 JP 2000502052 T JP 2000506125 T	28-08-1997 02-04-1998 28-05-1998 27-07-2000 10-09-1997 25-05-2000 11-06-1997 31-01-2001 29-01-1999 30-06-1999 18-05-1999 27-07-1999 29-05-1997 23-12-1998 24-03-1999 16-06-1999 14-07-1999 15-12-1998 15-02-1999 29-05-1997 28-08-1997 30-09-1998 09-12-1998 30-04-1998 28-06-2000 28-07-1999 22-02-2000 23-05-2000
-----	-----	-----	-----
WO 0124822	A 12-04-2001	AT 408721 B AT 168099 A AU 7912100 A WO 0124822 A2	25-02-2002 15-07-2001 10-05-2001 12-04-2001
-----	-----	-----	-----
GB 744988	A 15-02-1956	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO 0062800	A 26-10-2000	AU 4114900 A BR 0010612 A CZ 20013774 A3 WO 0062800 A2 EP 1187629 A2 NO 20015073 A	02-11-2000 13-02-2002 13-03-2002 26-10-2000 20-03-2002 22-11-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No	
Information on patent family members				PCT/EP 02/00062	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 0062800	A	TR 200103018 T2	21-02-2002		
WO 9104052	A	04-04-1991 AU 640414 B2	26-08-1993		
		AU 6421090 A	18-04-1991		
		CA 2066653 A1	23-03-1991		
		EP 0491833 A1	01-07-1992		
		WO 9104052 A1	04-04-1991		
WO 0041679	A	20-07-2000 EP 1143934 A1	17-10-2001		
		WO 0041679 A1	20-07-2000		
WO 0232451	A	25-04-2002 WO 0232451 A1	25-04-2002		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

page 2 of 2

フロントページの続き

(51) Int.CI.⁷

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 35/00

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

(72) 発明者 カレン・リングナウ

オーストリア、アー- 1 1 3 0 ヴィエナ、ガルガッセ 8 / 1 0 番

(72) 発明者 フランク・マットナー

オーストリア、アー- 1 1 9 0 ヴィエナ、クロッテンバッハシュトラーセ 2 6 7 / デ- 1 2 番

(72) 発明者 ヴァルター・シュミット

オーストリア、アー- 1 0 3 0 ヴィエナ、シュタインガッセ 1 8 / 1 / 1 0 番

(72) 発明者 ミヒヤエル・ブッシュレ

オーストリア、アー- 2 3 8 0 ペルヒトルツドルフ、ゲーテシュトラーセ 2 / 2 / 9 番

F ターム(参考) 4C085 AA03 BA07 BA49 BA51 BB11 DD86 FF13