

(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2008-506683

(P2008-506683A)

(43) 公表日 平成20年3月6日(2008.3.6)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 47/48 (2006.01)	A 61 K 47/48	4 B 02 4
A61P 37/02 (2006.01)	A 61 P 37/02	4 C 07 6
A61K 47/26 (2006.01)	A 61 K 47/26	4 C 08 4
A61P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	4 C 08 5
A61P 31/04 (2006.01)	A 61 P 31/04	4 C 08 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く

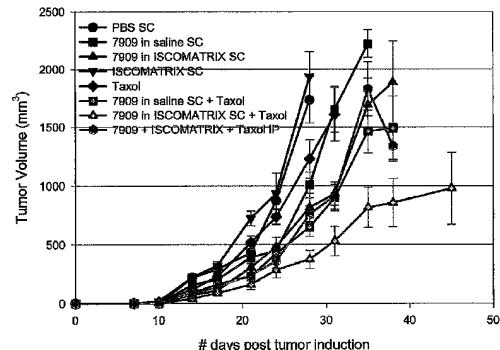
(21) 出願番号	特願2007-520925 (P2007-520925)	(71) 出願人	505161932 コーリー ファーマシューティカル グループ, リミテッド カナダ国 ケ-2ケー 3エ-2 オンタリオ, カナタ (オタワ), テリー フォックス ドライブ 340, スイート 200
(86) (22) 出願日	平成17年7月18日 (2005.7.18)	(71) 出願人	500021413 シーエスエル、リミテッド オーストラリア連邦ビクトリア州、パークビル、ポプラー、ロード、45
(85) 翻訳文提出日	平成19年3月15日 (2007.3.15)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 國際出願番号	PCT/IB2005/004188	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(87) 國際公開番号	W02006/134423		
(87) 國際公開日	平成18年12月21日 (2006.12.21)		
(31) 優先権主張番号	60/589, 258		
(32) 優先日	平成16年7月18日 (2004.7.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】先天免疫応答を誘導するための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、免疫刺激複合体を含むTLRリガンド処方物、および先天免疫を誘導する際ににおけるその使用に関する。具体的には、本出願は、先天免疫応答を誘導するための方法を提供し、その方法は、その必要がある被験体に対して、不活性TLRリガンドおよび免疫刺激複合体を、先天免疫応答を誘導するために有効な量で投与する工程を包含する。本出願はさらに、不活性TLRリガンドと、免疫刺激複合体と、を含む、組成物を提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

先天免疫応答を誘導するための方法であって、該方法は、

その必要がある被験体に対して、不活性 TLR リガンドおよび免疫刺激複合体を、先天免疫応答を誘導するために有効な量で投与する工程；
を包含する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記先天免疫応答は、ナチュラルキラー (NK) 細胞活性化を含む、方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、前記不活性 TLR リガンドは、オリゴヌクレオチドである、方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチドである、方法。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドである、方法。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、改変型リン酸骨格を有する、方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、前記改変型リン酸骨格は、部分的に改変されているか、または全体的に改変されている、方法。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の方法であって、前記改変型リン酸骨格は、ホスホロチオエート改変を含む、方法。

【請求項 9】

請求項 3 に記載の方法であって、前記オリゴヌクレオチドは、パリンドロームを含む、方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の方法であって、前記被験体は、癌を有するか、または癌を発症する危険がある、方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、前記癌は、胆道癌、骨の癌、脳および中枢神経系の癌、乳癌、子宮頸部癌、絨毛癌、結腸癌、結合組織癌、子宮内膜癌、食道癌、眼の癌、胃癌、ホジキンリンパ腫、上皮内新生物、喉頭癌、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞癌および非小細胞癌）、リンパ腫、黒色腫、神経芽細胞腫、口の癌、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、皮膚癌、精巣癌、および甲状腺癌からなる群より選択される、方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法であって、前記被験体は、感染を有するか、または感染を発症する危険がある、方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、前記感染は、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染、寄生生物感染、およびマイコバクテリア感染からなる群より選択される、方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法であって、前記ウイルス感染は、慢性ウイルス感染である、方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

請求項 1 4 に記載の方法であって、前記慢性ウイルス感染は、B 型肝炎ウイルス感染、C 型肝炎ウイルス感染、HIV 感染、HSV 感染、およびHPV 感染からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 に記載の方法であって、前記被験体は、プリオン疾患を有するか、またはプリオン疾患を有する危険がある、方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 に記載の方法であって、前記被験体は、アレルギーを有するか、またはアレルギーを発症する危険がある、方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 に記載の方法であって、前記不活性TLR リガンドおよび前記免疫刺激複合体は、筋肉内投与または皮下投与される、方法。

10

【請求項 1 9】

請求項 1 に記載の方法であって、前記不活性TLR リガンドは、投与する前に前記免疫刺激複合体と一緒に混合される、方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 に記載の方法であって、前記免疫刺激複合体は、リン脂質をさらに含む、方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 に記載の方法であって、前記不活性TLR リガンドは、ステロール結合型であるか、リン脂質結合型であるか、またはグリコシド結合型である、方法。

20

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の方法であって、前記ステロール結合型TLR リガンドは、前記免疫刺激複合体におけるステロールを置換する、方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 に記載の方法であって、前記グリコシド結合型TLR リガンドは、サポニン結合型TLR リガンドである、方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の方法であって、前記サポニン結合型TLR リガンドは、前記免疫刺激複合体におけるサポニンを置換する、方法。

30

【請求項 2 5】

請求項 1 に記載の方法であって、
前記被験体に対して治療レジメンを投与する工程；
をさらに包含する、方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記治療レジメンは、手術である、方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記治療レジメンは、放射線である、方法。

【請求項 2 8】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記治療レジメンは、化学療法である、方法。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 に記載の方法であって、前記化学療法は、抗癌剤、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生生物剤、抗マイコバクテリア剤、抗アレルギー剤、または抗喘息剤である、方法。

40

【請求項 3 0】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記治療レジメンは、抗体療法である、方法。

【請求項 3 1】

不活性TLR リガンドと、
免疫刺激複合体と、
を含む、組成物。

【請求項 3 2】

50

請求項 3 1 に記載の組成物であって、前記不活性 TLR リガンドおよび前記免疫刺激複合体は、先天免疫応答を誘導するために有効な量で存在する、組成物。

【請求項 3 3】

請求項 3 1 に記載の組成物であって、薬学的に受容可能である、組成物。

【請求項 3 4】

請求項 3 1 に記載の組成物であって、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む、組成物。

【請求項 3 5】

請求項 3 1 に記載の組成物であって、非経口投与のために処方されている、組成物。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 に記載の組成物であって、筋肉内投与のために処方されている、組成物。

【請求項 3 7】

請求項 3 5 に記載の組成物であって、皮下投与のために処方されている、組成物。

【請求項 3 8】

請求項 3 1 に記載の組成物であって、前記不活性 TLR リガンドは、オリゴヌクレオチドである、組成物。

【請求項 3 9】

請求項 3 8 に記載の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチドである、組成物。

【請求項 4 0】

請求項 3 8 に記載の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドである、組成物。

【請求項 4 1】

請求項 3 8 に記載の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドは、改変型リン酸骨格を有する、組成物。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 に記載の組成物であって、前記改変型リン酸骨格は、部分的に改変されているか、または全体的に改変されている、組成物。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 に記載の組成物であって、前記改変型リン酸骨格は、ホスホロチオエート改変を含む、組成物。

【請求項 4 4】

請求項 3 8 に記載の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドは、パリンドロームを含む、組成物。

【請求項 4 5】

請求項 3 1 に記載の組成物であって、前記不活性 TLR リガンドと前記免疫刺激複合体とを一緒に混合することによって生成される、組成物。

【請求項 4 6】

請求項 3 1 に記載の組成物であって、前記免疫刺激複合体は、リン脂質をさらに含む、組成物。

【請求項 4 7】

請求項 3 1 に記載の組成物であって、前記不活性 TLR リガンドは、ステロール結合型であるか、リン脂質結合型であるか、またはグリコシド結合型である、組成物。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載の組成物であって、前記ステロール結合型 TLR リガンドは、前記免疫刺激複合体におけるステロールを置換する、組成物。

【請求項 4 9】

請求項 4 7 に記載の組成物であって、前記グリコシド結合型 TLR リガンドは、サポニン結合型 TLR リガンドである、組成物。

【請求項 5 0】

10

20

30

40

50

請求項 4 9 に記載の組成物であって、前記サポニン結合型 T L R リガンドは、前記免疫刺激複合体におけるサポニンを置換する、組成物。

【請求項 5 1】

請求項 3 1 に記載の組成物であって、化学療法を投与することをさらに包含する、組成物。

【請求項 5 2】

請求項 5 1 に記載の組成物であって、前記化学療法は、抗癌剤、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生生物剤、抗マイコバクテリア剤、抗アレルギー剤、または抗喘息剤である、組成物。

【請求項 5 3】

腫瘍のサイズを減少させるための方法であって、該方法は、

5' T C G T C G T T T T G T C G T T T T G T C G T T 3' (配列番号 1) のヌクレオチド配列を含む C p G オリゴヌクレオチドと、免疫刺激複合体と、抗癌剤とを、腫瘍のサイズを減少させるために有効な量で、その必要がある被験体に対して投与する工程；を包含し、該 C p G オリゴヌクレオチドおよび該免疫刺激複合体は、該抗癌剤とは異なる経路によって投与される、方法。

【請求項 5 4】

請求項 5 3 に記載の方法であって、C p G オリゴヌクレオチドと免疫刺激複合体との比は、100 : 1 または 20 : 1 である、方法。

【請求項 5 5】

腫瘍のサイズを減少するための方法であって、該方法は、

5' T C G T C G T T T T G T C G T T T T G T C G T T 3' (配列番号 1) のヌクレオチド配列を含む C p G オリゴヌクレオチドと、免疫刺激複合体と、抗癌剤とを、腫瘍のサイズを減少させるために有効な量で、その必要がある被験体に対して投与する工程；を包含し、該 C p G オリゴヌクレオチドおよび該免疫刺激複合体は、20 : 1 または 100 : 1 の比で存在する、方法。

【請求項 5 6】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記 C p G オリゴヌクレオチドは、改変型リン酸骨格を有する、方法。

【請求項 5 7】

請求項 5 6 に記載の方法であって、前記改変型リン酸骨格は、部分的に改変されているか、または全体的に改変されている、方法。

【請求項 5 8】

請求項 5 6 に記載の方法であって、前記改変型リン酸骨格は、ホスホロチオエート改変を含む、方法。

【請求項 5 9】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記 C p G オリゴヌクレオチドは、パリンドロームを含む、方法。

【請求項 6 0】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記被験体は、胆道癌、骨の癌、脳および中枢神経系の癌、乳癌、子宮頸部癌、絨毛癌、結腸癌、結合組織癌、子宮内膜癌、食道癌、眼の癌、胃癌、ホジキンリンパ腫、上皮内新生物、喉頭癌、肝臓癌、小細胞癌、非小細胞癌、リンパ腫、黑色腫、神経芽細胞腫、口の癌、口腔癌、卵巣癌、脾臓癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、皮膚癌、精巣癌、および甲状腺癌からなる群より選択される癌を有する、方法。

【請求項 6 1】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記癌は、乳癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌、および腎臓癌からなる群より選択される、方法。

【請求項 6 2】

請求項 6 1 に記載の方法であって、前記癌は、肺癌である、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3】

請求項 6 1 に記載の方法であって、前記肺癌は、非小細胞肺癌である、方法。

【請求項 6 4】

請求項 5 5 に記載の方法であって、前記 C p G オリゴヌクレオチドおよび前記免疫刺激複合体は、前記抗癌治療とは異なる経路にて投与される、方法。

【請求項 6 5】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記 C p G オリゴヌクレオチドおよび前記免疫刺激複合体は、非経口投与される、方法。

【請求項 6 6】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記 C p G オリゴヌクレオチドおよび前記免疫刺激複合体は、皮下投与される、方法。 10

【請求項 6 7】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記抗癌剤は、腹腔内投与される、方法。

【請求項 6 8】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記 C p G オリゴヌクレオチドは、投与の前に前記免疫刺激複合体とともに混合される、方法。

【請求項 6 9】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記免疫刺激複合体は、リン脂質をさらに含む、方法。

【請求項 7 0】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記 C p G オリゴヌクレオチドは、ステロール結合型であるか、リン脂質結合型であるか、またはグリコシド結合型である、方法。 20

【請求項 7 1】

請求項 7 0 に記載の方法であって、前記ステロール結合型 C p G オリゴヌクレオチドは、前記免疫刺激複合体におけるステロールを置換する、方法。

【請求項 7 2】

請求項 7 0 に記載の方法であって、前記グリコシド結合型 C p G オリゴヌクレオチドは、サポニン結合型 C p G オリゴヌクレオチドである、方法。

【請求項 7 3】

請求項 7 2 に記載の方法であって、前記サポニン結合型 C p G オリゴヌクレオチドは、前記免疫刺激複合体におけるサポニンを置換する、方法。 30

【請求項 7 4】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記抗癌剤は、化学療法剤である、方法。

【請求項 7 5】

請求項 7 4 に記載の方法であって、前記化学療法剤は、タキソールである、方法。

【請求項 7 6】

請求項 7 4 に記載の方法であって、前記化学療法剤は、シスプラチンである、方法。

【請求項 7 7】

請求項 7 4 に記載の方法であって、前記化学療法剤は、カルボプラチンである、方法。

【請求項 7 8】

請求項 7 4 に記載の方法であって、前記化学療法剤は、5 - フルオロウラシル (5 - FU) である、方法。 40

【請求項 7 9】

請求項 7 4 に記載の方法であって、前記化学療法剤は、パクリタキセルである、方法。

【請求項 8 0】

請求項 7 9 に記載の方法であって、前記パクリタキセルは、経口パクリタキセルである、方法。

【請求項 8 1】

請求項 7 4 に記載の方法であって、前記化学療法剤は、経口タキソイドである、方法。

【請求項 8 2】

請求項 7 4 に記載の方法であって、前記化学療法剤は、カペシタビンである、方法。

【請求項 8 3】

請求項 7 4 に記載の方法であって、前記化学療法剤は、ゲムシタビンである、方法。

【請求項 8 4】

請求項 5 3 または 5 5 に記載の方法であって、前記抗癌療法は、免疫治療剤である、方法。

。

【請求項 8 5】

請求項 8 4 に記載の方法であって、前記免疫療法剤は、ハーセプチニンである、方法。

【請求項 8 6】

請求項 8 4 に記載の方法であって、前記免疫療法剤は、C 2 2 5 である、方法。

10

【請求項 8 7】

請求項 8 4 に記載の方法であって、前記免疫療法剤は、抗 V E G F である、方法。

【請求項 8 8】

請求項 8 4 に記載の方法であって、前記免疫療法剤は、M D X - 2 1 0 である、方法。

【請求項 8 9】

請求項 8 4 に記載の方法であって、前記免疫療法剤は、M D X - 2 2 0 である、方法。

【請求項 9 0】

請求項 8 4 に記載の方法であって、前記免疫療法剤は、E M D - 7 2 0 0 0 である、方法

。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願)

本願は、2004年7月18日に出願された米国仮特許出願番号 60/589,258 号(発明の名称「METHOD AND COMPOSITIONS FOR INDUCING INNATE IMMUNE RESPONSES」)に対する優先権を主張する。この米国仮特許出願の内容全体が、本明細書において参考として援用される。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は、一般的には、TLRリガンドおよび免疫刺激複合体と、先天免疫を誘導する際のそれらの使用とに関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

(発明の背景)

細菌DNAは、B細胞およびナチュラルキラー細胞を活性化する免疫刺激効果を有するが、脊椎動物DNAは、そうではない(非特許文献1;非特許文献2;非特許文献3;非特許文献4に概説される)。細菌DNAのこれらの免疫刺激効果は、特定の塩基文脈(CpGモチーフ)(これは、細菌DNAにおいて共通するが、メチル化シトシンを含み、脊椎動物DNA中には不十分にしか示されない)における非メチル化CpGジヌクレオチド(すなわち、グアノシンに結合している非メチル化シトシン)の存在の結果である(非特許文献5;非特許文献6)ことが、現在理解されている。細菌DNAの免疫刺激効果は、これらのCpGモチーフを含む合成オリゴヌクレオチド(ODN)を用いて模倣され得る。そのようなCpG ODNは、ヒトおよびマウスの白血球に対して高度な刺激効果(B細胞増殖の誘導、サイトカインおよび免疫グロブリンの分泌の誘導、ナチュラルキラー(NK)細胞溶解活性の誘導、ならびにIFN- γ 分泌の誘導;ならびに副刺激分子を発現しサイトカイン(特に、Th1様T細胞応答の発生を促進する際に重要であるTh1様サイトカイン)を分泌するように、樹状細胞および(DC)および他の抗原提示細胞を活性化すること)を有する。ネイティブホスホジエステル骨格CpG ODNのこれらの免疫刺激効果は、上記CpGモチーフのシトシン残基がメチル化されているあるいは上記CpGモチーフがCpCへと変えられるか排除されるかまたは変化された場合に、その効果

40

50

が劇的に低減されるという点で、非常に C p G 特異的である（非特許文献 7；非特許文献 8）。

【0004】

動物は、外来物質（例えば、微生物）に対して自身を保護するための種々の機構を保有するように進化してきた。これらの機構としては、物理的障壁、血液中および組織中における食細胞、ナチュラルキラー細胞、ならびに種々の血液由来分子が挙げられる。これらの機構のうちのいくつかは、感染性微生物または外来物質に対する曝露の前に、存在する。さらに、これらは、ほとんどの外来物質を区別しない。一般的には、これらは、その外来物質に対する曝露によっていかなる程度にも増強されない。ある意味に限定されるが、これらはまた、適応免疫または後天免疫が誘発されるまでは、唯一の防御線である。被験体が先天免疫応答を開始する能力は、被験体間で変化し得る。これらの差異は、感染がいかなる症状もないかもしくは少なくとも実質的な症状のない状態で解決するか否か、またはその被験体が感染およびその関連する種々の症状を経験するか否かを、制御し得る。最初の防御線としてのその重要性を考慮すると、先天免疫を促進する治療は、望ましい。例えば、より強固な先天免疫応答は、この多剤耐性微生物の時代における、より多様な抗生素の必要性を打開する。

【非特許文献 1】Tokunaga, T.ら、Jpn. J. Cancer Res. (1988) 79: 682~686

【非特許文献 2】Tokunaga, T.ら、JNCI (1984) 72: 955~962

【非特許文献 3】Messina, J. P.ら、J. Immunol. (1991) 147: 1759~1764

【非特許文献 4】SteinおよびA. M. Krieg編、Krieg、Applied Oligonucleotide Technology, John Wiley and Sons, Inc., New York, (1998) pp. 431~448

【非特許文献 5】Kriegら、Nature (1995) 374: 546~549

【非特許文献 6】Krieg、Biochim. Biophys. Acta (1999) 93321: 1~10

【非特許文献 7】Kriegら、Nature (1995) 374: 546~549

【非特許文献 8】Hartmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 9305~10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

（発明の概要）

本発明は、不活性 TLR リガンドが、免疫刺激複合体と合わせてそれらを投与することによって、免疫刺激 TLR リガンドへと変換され得るという、予測不能であった知見に部分的に基づく。不活性 TLR リガンドとは、本発明の前には免疫刺激性であることが観察されていないか、またはせいぜい不十分にしか免疫刺激性ではない（すなわち、免疫刺激複合体の非存在下では以前のアッセイにおいては、コントロール分子の免疫刺激レベルであるかまたはその付近である）ことが観察されている、TLR リガンドである。この知見は、これらの TLR リガンドに関して観察される免疫刺激の欠如（免疫刺激複合体の非存在下で使用される場合）は、細胞およびレセプター（例えば、TLR レセプターファミリー）へのそれらの TLR リガンドの非効率的送達に起因し得ることを示唆する。従って、本発明は、その処方物の結果として、多数の免疫学的に不活性な TLR リガンドを、免疫刺激因子へと変換する。従って、不活性 TLR リガンドは、本発明の免疫刺激複合体と一緒に使用される場合には、先天免疫を誘導することにおいて有用である。

【0006】

従って、一局面において、本発明は、先天免疫応答を誘導するための方法を提供する。この方法は、

10

20

30

40

50

その必要がある被験体に対して、不活性T L Rリガンドおよび免疫刺激複合体を、先天免疫応答を誘導するために有効な量で投与する工程；
を包含する。

【0007】

一実施形態において、上記先天免疫応答は、ナチュラルキラー（NK）細胞活性の活性化を含む。NK細胞は、先天免疫系の一部であり、従って、病原体に対する防御の最前線に関与する。別の実施形態において、上記先天免疫応答は、1種以上のサイトカインまたは増殖因子（例えば、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10、IL-12、およびIFN- β ）の生成および／もしくは分泌を含む。先天免疫は、マクロファージ、樹状細胞、および単球の関与をさらに含み得る。

10

【0008】

一実施形態において、上記不活性T L Rリガンドは、上記免疫刺激複合体中に組み込まれる。別の実施形態において、上記不活性T L Rリガンドは、単に、上記複合体と結合（例えば、非共有結合および非イオン結合）している。

【0009】

本明細書中で使用される場合、不活性T L Rリガンドと免疫刺激複合体とを含む処方物は、不活性T L Rリガンド／複合体処方物と呼ばれる。

【0010】

一実施形態において、上記処方物は、上記不活性T L Rリガンドと上記免疫刺激複合体とを一緒に混合することによって、生成される。別の実施形態において、上記不活性T L Rリガンドは、上記免疫刺激複合体内に組み込まれた部分（例えば、ステロール（例えば、コレステロール）またはサポニン）を内因的に含むか、またはその部分を含むように外因的に改変されている。上記不活性T L Rリガンドはまた、脂質化タグ（例えば、パルミチン酸タグ、オレイン酸タグなどであるが、これらに限定されない）を（内因的または外因的に）含み得る。例えば、上記T L Rリガンドは、ステロール結合型、グリコシド結合型（例えば、サポニン結合型）、リン脂質結合型などであり得る。その後、上記不活性T L Rリガンドは、上記複合体の一部を形成する部分によって、上記複合体中に組み込まれる。

20

【0011】

上記不活性T L Rリガンドは、オリゴヌクレオチドであり得、これはまた、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを包含し得る。一実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、部分的に改変されたリン酸骨格または全体的に改変されたリン酸骨格（例えば、部分的に改変されたホスホロチオエートである骨格、または全体的に改変されたホスホロチオエートである骨格）を有する。上記T L Rリガンドは、パリンドロームを含んでも含まなくてもよい。

30

【0012】

免疫刺激複合体は、少なくともステロールとサポニンとから構成される複合体である。これらの免疫刺激複合体は、必要に応じて、リン脂質または他の脂質部分を含み得るが、これは、本明細書中に記載される効果を観察する必要は特にはない。免疫刺激複合体の例としては、ISCOM（登録商標）アジュバントおよびISCOMATRIX（登録商標）アジュバントが挙げられる。上記免疫刺激複合体は、本明細書においては、ステロール／サポニン複合体、または処方物と呼ばれ得る。

40

【0013】

上記不活性T L Rリガンドは、一定の比率の複合体中に存在し得る（例えば、少なくとも25%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、またはすべての複合体が、上記不活性T L Rリガンドを含む）。一実施形態において、上記不活性T L Rリガンドおよび上記免疫刺激複合体は、筋肉内または皮下のいずれかに投与される。

【0014】

上記方法は、種々の治療背景または予防背景（種々の状態もしくは疾患を有する被験体

50

、または種々の状態もしくは疾患を有する危険がある被験体を含む)に対し得る。そのような被験体はまた、感染性疾患を発症する危険があり得る。従って、上記方法は、上記被験体において癌もしくは感染性疾患(または両方)を予防または処置するための方法である。日和見感染症は、免疫無防備状態の被験体(例えば、抗癌処置を受けている癌患者)において一般的である。

【 0 0 1 5 】

一実施形態において、上記癌は、癌腫または肉腫である。上記癌は、胆道癌、骨の癌(bone cancer)、脳および中枢神経系の癌、乳癌、子宮頸部癌(cervical cancer)、絨毛癌、結腸癌、結合組織癌、子宮内膜癌、食道癌、眼の癌、胃癌、ホジキンリンパ腫、上皮内新生物、喉頭癌、肝臓癌、肺癌(例えば、小細胞癌および非小細胞癌)、リンパ腫、黒色腫、神経芽細胞腫、口の癌(oral cancer)、口腔癌(oral cavity)、卵巣癌、脾臓癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、皮膚癌、精巣癌、および甲状腺癌からなる群より選択され得る。

〔 0 0 1 6 〕

別の実施形態において、上記被験体は、感染を有するか、または感染を発症する危険がある。上記感染は、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染、寄生生物感染、およびマイコバクテリア感染からなる群より選択され得る。一実施形態において、上記感染は、慢性ウイルス感染（例えば、B型肝炎ウイルス感染、C型肝炎ウイルス感染、HIV感染、HSV感染、またはHPV感染であるが、これらに限定はされない）である。いくつかの実施形態において、上記寄生生物感染は、細胞内寄生生物感染である。別の実施形態において、上記寄生生物感染は、非寄生虫性寄生生物感染である。各微生物感染の他の例が、本明細書に記載される。

【 0 0 1 7 】

別の実施形態において、上記被験体は、プリオントン疾患有するか、またはプリオントン疾患有する危険がある。

【 0 0 1 8 】

別の実施形態において、上記被験体は、アレルギーもしくは喘息を有するか、またはアレルギーもしくは喘息を発症する危険がある。

〔 0 0 1 9 〕

上記組成物は、任意の経路によって投与され得るが、いくつかの実施形態において、皮下経路または筋肉内経路が、好ましい。

【 0 0 2 0 】

一実施形態において、上記方法は、上記被験体に対して治療レジメンを投与する工程をさらに包含する。上記治療レジメンは、手術、放射線、または化学療法であり得る。化学療法は、抗癌剤、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生生物剤、抗マイコバクテリア剤、抗アレルギー剤、および抗喘息剤であり得るが、これらに限定はされない。上記治療レジメンはまた、抗体療法であり得る。癌を有する被験体または癌を発症する危険がある被験体の処置に関する実施形態において、上記方法は、上記TLRリガンドおよび上記免疫刺激複合体の内部にあるかまたはそれらとは別個での、インターフェロンの投与をさらに包含し得る。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、ヒトである。他の実施形態において、上記被験体は、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、七面鳥、ヤギ、魚類、サル、ニワトリ、ラット、マウス、およびヒツジからなる群より選択される非ヒト脊椎動物である。

【 0 0 2 2 】

本発明は、不活性T L Rリガンドと免疫刺激複合体とを含む組成物をさらに提供する。上記された種々の実施形態は、本発明の組成物に対して等しく適用され、重ねて記載はされない。上記組成物の成分は、一緒に、先天免疫応答を刺激するために有効な量で提供され得る。上記組成物は、薬学的に受容可能であり得、そしてこのことと一致して、上記組成物は、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含み得る。上記組成物は、好ましくは、非

経口投与（例えば、筋肉内投与または皮下投与）のためにさらに処方されている。

【0023】

なお別の実施形態において、本発明は、不活性TLRリガンドと免疫刺激複合体を含む医薬（好ましくは、先天免疫応答を刺激するための医薬）を製造するための方法を提供する。

【0024】

別の局面において、本発明は、腫瘍のサイズを減少させるための方法を提供する。この方法は、

CpGオリゴヌクレオチド（例えば、5' TCGTCGTTTGTCTCGTTTGT CGTT3'（配列番号1）のヌクレオチド配列を含むCpGオリゴヌクレオチド）と、免疫刺激複合体と、抗癌剤とを、腫瘍のサイズを減少させるために有効な量で、その必要がある被験体に対して投与する工程；

を包含する。上記CpGオリゴヌクレオチドおよび上記免疫刺激複合体は、上記抗癌剤とは異なる経路によって投与される。一実施形態において、上記CpGオリゴヌクレオチドと上記免疫刺激複合体との比は、100:1または20:1である。

【0025】

なお別の局面において、本発明は、腫瘍のサイズを減少させるための方法を提供する。この方法は、

CpGオリゴヌクレオチド（例えば、5' TCGTCGTTTGTCTCGTTTGT CGTT3'（配列番号1）のヌクレオチド配列を含むCpGオリゴヌクレオチド）と、免疫刺激複合体と、抗癌剤とを、腫瘍のサイズを減少させるために有効な量で、その必要がある被験体に対して投与する工程；

を包含する。上記CpGオリゴヌクレオチドおよび上記免疫刺激複合体は、20:1または100:1の比で存在する。一実施形態において、上記CpGオリゴヌクレオチドおよび上記免疫刺激複合体は、上記抗癌剤とは異なる経路によって投与される。

【0026】

同様の実施形態が、本発明のこれらの局面および種々の他の局面に適用される。これらの実施形態が、下記に記載される。それらの実施形態は、本発明の種々の局面に等しく適用されることが、理解されるべきである。

【0027】

従って、一実施形態において、上記CpGオリゴヌクレオチドは、改変型リン酸骨格を有する。上記改変型リン酸骨格は、部分的に改変されていてもよいし、または全体的に改変されていてもよい。あるいは、上記改変型リン酸骨格は、ホスホロチオエート改変を含み得る。上記CpGオリゴヌクレオチドは、パリンドロームを含み得る。

【0028】

別の実施形態において、上記被験体は、胆道癌、骨の癌、脳および中枢神経系の癌、乳癌、子宮頸部癌、絨毛癌、結腸癌、結合組織癌、子宮内膜癌、食道癌、眼の癌、胃癌、エジキンリンパ腫、上皮内新生物、喉頭癌、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞癌および非小細胞癌）、リンパ腫、黒色腫、神経芽細胞腫、口の癌、口腔癌、卵巣癌、肺臓癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、皮膚癌、精巣癌、および甲状腺癌からなる群より選択される癌を有する。

【0029】

別の実施形態において、上記CpGオリゴヌクレオチドおよび上記免疫刺激複合体は、非経口（例えば、皮下）投与される。上記抗癌剤は、腹腔内投与、経口投与、または静脈内投与され得る。

【0030】

上記CpGオリゴヌクレオチドは、投与の前に上記免疫刺激複合体とともに混合され得る。

【0031】

一実施形態において、上記免疫刺激複合体は、リン脂質をさらに含む。別の実施形態に

10

20

30

40

50

おいて、上記 CpGオリゴヌクレオチドは、ステロール結合型であるか、リン脂質結合型であるか、またはグリコシド結合型である。関連実施形態において、上記ステロール結合型CpGオリゴヌクレオチドは、上記免疫刺激複合体におけるステロールを置換するか、または上記サポニン結合型CpGオリゴヌクレオチドは、上記免疫刺激複合体におけるサポニンを置換する。

【0032】

一実施形態において、上記抗癌剤は、化学療法剤である。上記化学療法剤は、タキソール、シスプラチン、5-フルオロウラシル(5-FU)、パクリタキセル(例えば、経口パクリタキセル、経口タキソイド、カペシタビン(capcitabine)、またはゲムシタビン(gemcitabine)であり得る。

10

【0033】

別の実施形態において、上記抗癌療法は、免疫治療剤である。上記免疫療法剤は、ハーセプチン(herceptin)、C225、抗VEGF、MDX-210、MDX-220、またはEMD-7200であり得る。

【0034】

いくつかの実施形態において、上記抗癌剤は、毎週(初日～35日目を含む)投与される。いくつかの実施形態において、上記CpGオリゴヌクレオチドおよび免疫刺激複合体は、隔日で、および/または毎週(1日目、3日目、7日目を含む)投与され、その後、1ヶ月間、2ヶ月間、またはそれ以上の期間の間、毎週投与される。

20

【0035】

本発明の限定の各々は、本発明の種々の実施形態を包含し得る。従って、本発明の限定(任意の1つの要素または要素の組み合わせを含む)の各々は、本発明の各局面に包含され得ることが、予期される。本発明は、以下の説明に示されるかまたは図面に示される成分の構築および配置の詳細に対して、その適用において限定されない。本発明は、他の実施形態が可能であり、種々の様式で実施または実行可能である。

【0036】

本明細書中で使用される表現および用語法は、説明のためのものであり、限定するものと見なされるべきではない。本明細書における「含む(including)」、「包含する(comprising)」、「有する(having)」、「含有する(containing)」、「伴う(involved)」、およびそれらの変化形は、その後に列挙される項目およびその等価物、ならびにさらなる項目を包含する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

(発明の詳細な説明)

本発明は、広範には、TLRリガンドのための予期せぬほど効率的な送達ビヒクルとしての特定の処方物に関する。上記処方物は、免疫刺激複合体を含み、これはステロールおよびサポニンを含む。適切な免疫刺激複合体の例としては、ISCOM(登録商標)アジュvantおよびISCOMATRIX(登録商標)アジュvantが挙げられる。これらは両方とも、CSL Limited(Parkville, Victoria, Australia)から市販されている。本発明は、免疫刺激複合体が、TLRリガンド(特に、上記免疫刺激複合体と一緒に投与されない場合に免疫学的に不活性であるかまたは不十分にしか免疫刺激でないTLRリガンド)の送達のための特に有効なビヒクルであるという、予測されなかつた発見に部分的に基づく。いかなる特定の機構によっても拘束されることは意図しないが、上記免疫刺激複合体は、そのようなリガンドの、その個々のレセプター(例えば、特定のTLRファミリーメンバー)への、および/またはレセプターの関与には関係なく特定の細胞への送達を、増強すると、想定される。このことは、上記リガンド/複合体処方物が特定の実験的治療背景において使用される場合に、観察される先天免疫応答の相乗作用的増強をもたらした。

40

【0038】

免疫刺激複合体の使用は、以前に特徴付けられた免疫学的に不活性なTLRリガンド(

50

例えば、オリゴヌクレオチドを、免疫刺激リガンド（例えば、オリゴヌクレオチド）へと本質的に変換し得ることは、予期されなかつた。この知見は、免疫刺激目的のために使用され得るTLRリガンドの属（例えば、オリゴヌクレオチド）を、以前に特徴付けられた免疫刺激モチーフを含まずかつ／または以前に特徴付けられた免疫刺激能力を有さないかもしくは以前に特徴付けられた低い免疫刺激能力しか有さないオリゴヌクレオチドを含むまでに拡張する。この所見は、完全に予測されていなかつた。上記不活性TLR利gなどと免疫刺激複合体との組み合わせについて観察された相乗作用は、他の核酸アジュvantおよび送達系と合わせた場合にそのようなリガンドについて観察される相乗作用のレベルよりもかなり大きかったことは、さらに予測されていなかつた。

【0039】

10

実施例において、より詳細に記載されるように、免疫刺激複合体（例えば、ISCOMATRIX（登録商標）アジュvant）と、配列TCGTCGTTTGTCTTTGTCGTTTGTCTT（配列番号1）（ODN7909）を有するCpG免疫刺激オリゴヌクレオチドとの同時投与は、腎細胞癌腫モデルにおいて試験した場合に、いずれかの因子単独よりも増加した生存および制御された腫瘍増殖を生じた。

【0040】

重要なことには、これらの知見は、マウス癌モデルにおいてなされた。このことは、少なくとも癌治療について本明細書中に提供される処方物の治療的有用性を示す。

【0041】

20

従つて、免疫刺激オリゴヌクレオチドまたは免疫学的に「不活性な」オリゴヌクレオチドに対して免疫刺激複合体を添加することは、腫瘍を保有する被験体の治療結果に対してこれらの組み合わせが影響を与える能力によって示されるように、強い先天免疫応答の誘導を生じる。これらの所見は、試験されるオリゴヌクレオチドのうちのいくらかの免疫学的に「不活性な」特徴に少なくとも一部起因して、予想外である。

【0042】

これらの所見は、免疫刺激複合体とオリゴヌクレオチドとを含む処方物が、先天免疫治療（例えば、感染症、癌、アレルギー、および喘息に対するものであるが、これらに限定されない）を最適化する際に有用であることを示す。

【0043】

30

免疫刺激複合体は、大きさが10nm～100nm（より一般的には30nm～50nm）の範囲の直径を有し、かつグリコシドおよびステロールから構成される、粒子であり、これらは、マトリックスを形成し、そのマトリックスの上に、抗原（使用される場合）が多量体化し得る。上記複合体は、アジュvantならびに抗原送達系および非抗原送達系として機能し得る。本明細書中に記載される方法および実施例において、外因性抗原は使用されなかつたか、実際に必要ではなかつた。上記TLRリガンドと上記免疫刺激複合体とを合わせた使用は、被験体の先天免疫系が、実験的に誘導された癌を異物として認識するため十分であった。

【0044】

40

上記免疫刺激複合体は、グリコシド（例えば、Quillaja saponin）、ステロール（例えば、コレステロール）を含み、これは必要に応じて、リン脂質（例えば、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンであるが、これらに限定はされない）を含み得る。好ましくは、上記グリコシドは、ISCOPEP（登録商標）サポニンである。これは、Quillaja saponariaの木の樹皮から得られるQuillajaに由来する精製サポニン画分である。免疫刺激複合体粗放物は、EP 109942AおよびEP 231039Aにおいて、しより詳細に記載されている。免疫刺激複合体はまた、米国特許第5,178,860号に記載されるように調製され得る。これらの参考文献の内容全体は、本明細書中に参考として援用される。いくつかの実施形態において、上記処方物中には、遊離サポニンも遊離ステロールも存在しない。

【0045】

50

本発明は、非抗原含有複合体（すなわち、被験体に対する投与の前に抗原を「装填（1

o a d)」も組み合わせてもいい、複合体)の使用を包含する。上記免疫刺激複合体は、文献(Moreinら、1989、Vaccines: Recent trends and Progress, Gergoriadisら(編)、Plenum Press, New York, pp. 153~161; Coxら、1997、Vaccine Design: The Role of Cytokine Networks, Gergoriadisら(編)Plenum Press, New York, pp. 33~49; Coulterら、1998, Vaccine 16: 1243~1253)中に記載されている周知技術を使用して、研究規模で調製され得る。上記複合体はまた、文献(Kerstenら、2004、Novel Vaccination Strategies, Kaufman(編)、WILEY-VCH, Germany)中に記載されている周知技術を使用して、大規模で調製され得る。
10

【0046】

上記TLRリガンドは、上記免疫刺激複合体を用いて多数の様式で処方され得る。例えば、上記TLRリガンドは、例えば、上記複合体の成分のうちの1つ以上を提供することによって、それ自体が上記複合体のマトリックスの一部であり得る。例として、上記TLRリガンドは、ステロール(例えば、コレステロール)に結合体化され得る。その後、上記TLRリガンドは、上記ステロールに対する結合体化により、上記複合体のマトリックスの一部になり得る。上記TLRリガンドは、あるいは、またはさらに、他の物質(例えば、疎水性分子(例えば、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸など)に結合体化され得る。その後、この様式で結合体化されたオリゴヌクレオチドは、上記疎水性分子とともに上記複合体中に組み込まれ得、上記複合体のマトリックスを提供する。オリゴヌクレオチド-脂質結合体化の例および合成は、2003年9月25日に出願された米国特許出願第60/505,977号(その内容全体が、本明細書中に参考として援用される)において、より詳細に記載されている。
20

【0047】

TLRリガンド処方物に関して、TLRリガンドと免疫刺激複合体との比は、100:1~1:100の範囲であり得る。好ましい実施形態において、上記比は、1:1、3:1、10:1、または20:1である。

【0048】

本発明の処方物および組成物の一成分は、TLRリガンドである。本明細書中で使用される場合、TLRリガンドは、TLR(すなわちToll様レセプター)に結合する分子である。現在までに同定されている多数のTLR(TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、およびTLR11が挙げられる)が、存在する。同様に、現在までに同定されている多数のTLRリガンドが存在、そのうちのいくつかは、免疫刺激性であることが観察されている(例えば、CpGオリゴヌクレオチド)。本発明は、TLRリガンドであると以前に同定されているが免疫学的に不活性であることも観察されているTLRリガンドを、包含することを意図する。本明細書中で使用される場合、免疫学的に不活性なTLRリガンドとは、免疫刺激能力を有さないかまたは低い免疫刺激能力しか有さないことが観察されている、TLRリガンドである。本発明はまた、本発明に従って、免疫刺激複合体の存在下および非存在下で試験され、かつ不活性化合物から免疫刺激化合物へと変換されることが見出される、化合物を包含することを意図する。いくつかの実施形態において、上記TLRリガンドは、以前に特徴付けられた免疫刺激モチーフ(例えば、非メチル化CpGモチーフ、メチル化CpGモチーフ、ポリTモチーフ、Tリッチモチーフ、ポリGモチーフなどであるが、これらに限定はされない)を保有しないオリゴヌクレオチドである。免疫刺激モチーフの例は、2003年9月25日および2003年11月13日にそれぞれ公開された米国特許出願公開第2003/018406 A1およびUS 2003/021026 A1(これらの内容は、その全体が参考として本明細書中に援用される)において、より詳細に記載されている。しかし、これらの後者の種類のオリゴヌクレオチド(すなわち、以前に特徴付けられた免疫刺激モチーフを保有するオリゴヌクレオチド)のうちの免疫学的に不
30
40
50

活性な種は、本明細書中に記載されるように、それらの種を免疫刺激複合体と合わせることによって、免疫刺激性にされ得る。

【0049】

TLRリガンドについてのスクリーニングアッセイは、2003年6月5日に公開された米国特許出願公開第2003/0104523号（その内容全体が、本明細書中に参考として援用される）に記載されている。本発明は、TLRリガンドであることが（例えば、放射性標識リガンド-レセプターアッセイを介して）示されているが、例えば、免疫刺激オリゴヌクレオチドと比較した場合には不活性であるように見える化合物の使用を包含することを意図する。なぜなら、その相対的免疫刺激能力は、相対的に、無視できるか、または治療上は有用ではないからである。

10

【0050】

そのような不活性TLRリガンドの一カテゴリーは、免疫刺激複合体の非存在下では、免疫刺激能力を有さないかまたは低い免疫刺激能力しか有さないが、免疫刺激複合体とともに処方された場合には、当該分野で公知のアッセイによって測定した場合に、免疫刺激能力において少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、またはその以上の増加を示す、TLRリガンドである。

【0051】

いくつかの不活性TLRリガンドは、ほぼ真のネガティブコントロール（例えば、生理食塩水、または、免疫刺激能力において複合体により誘導される増加を示さない化合物）の活性である活性を、免疫刺激複合体の非存在下で示す。それらは、真ネガティブコントロールの5%以内、10%以内、25%以内、50%以内、または75%以内である免疫刺激能力を示し得る。

20

【0052】

いくつかの重要な実施形態において、上記TLRリガンドは、TLR3リガンド、TLR7リガンド、TLR8リガンド、およびTLR9リガンドである。

【0053】

以前にスクリーニングされて非TLRリガンドとして特徴づけられた多くの因子は、実際には、特定のスクリーニングアッセイ（例えば、TLR結合ではなくTLRシグナル伝達の読み出しを使用するアッセイ）においては免疫刺激性ではなかった可能性がある。本発明は、免疫刺激複合体と組み合わせた場合に免疫刺激性であることを示す場合に、以前に無視された種々のこれらの化合物を包含することを意図する。

30

【0054】

本発明は、事実上DNAまたはRNAであるオリゴヌクレオチドを包含することを意図する。結果として、用語「オリゴヌクレオチド」とは、オリゴデオキシヌクレオチド(DNA)およびオリゴデオキシリボヌクレオチド(RNA)の両方を指す。

【0055】

免疫刺激オリゴヌクレオチドとは、本明細書中で使用される場合、免疫刺激複合体の非存在下でさえ免疫刺激能力を示す、オリゴヌクレオチドである。好ましくは、これらのオリゴヌクレオチドは、治療上有効なレベルの免疫刺激を提供する。他のものが、より高いレベル（従って、治療上有効なレベルの）免疫刺激を誘導するために、上記免疫刺激複合体と組み合わされ得る。免疫刺激オリゴヌクレオチドの例としては、非メチル化CpGジヌクレオチドモチーフならびにメチル化CpGジヌクレオチドモチーフを含むCpG免疫刺激オリゴヌクレオチド、Tリッチ免疫刺激オリゴヌクレオチドおよびポリT免疫刺激オリゴヌクレオチド、ポリG免疫刺激オリゴヌクレオチド、およびホスホロチオエート免疫刺激オリゴヌクレオチドが挙げられる。これらの各々は、以下において、より詳細に考察される。

40

【0056】

免疫刺激オリゴヌクレオチドは、免疫応答を惹起することが以前に示された特定の配列を含む。これらの特定の配列は、「免疫刺激モチーフ」と呼ばれ、少なくとも1つの免疫

50

刺激モチーフを含むオリゴヌクレオチドは、「免疫刺激オリゴヌクレオチド」と呼ばれる。上記免疫刺激モチーフは、「内部免疫刺激モチーフ」であり得る。用語「内部免疫刺激モチーフ」とは、より長い核酸配列（これは、上記免疫刺激モチーフ配列の5'末端および3'末端の両方に結合している少なくとも1つのヌクレオチドの分、上記モチーフ配列よりも長さが長い）内における上記モチーフ配列の位置を指す。

【0057】

免疫刺激オリゴヌクレオチドはまた、免疫刺激複合体と組み合わされた場合に、増加した免疫刺激能力（腫瘍を保有する被験体における生存を増加し腫瘍体積を減少させる能力を含む）を示す。従って、既に免疫刺激性であるオリゴヌクレオチドさえも、免疫刺激複合体との組み合わせから恩恵を受ける。

10

【0058】

免疫刺激オリゴヌクレオチドは、いくつかの場合においては、CpG免疫刺激モチーフを含む。そのようなオリゴヌクレオチドは、CpGオリゴヌクレオチドと呼ばれる。CpGオリゴヌクレオチドとは、本明細書中で使用される場合、免疫刺激CpGオリゴヌクレオチドを指す。従って、これらの用語は、そうではないと示されない限りは、交換可能に使用される。CpG免疫刺激モチーフは、メチル化状態でも、非メチル化状態でもよい。上記CpG免疫刺激モチーフのメチル化状態とは、一般的には、上記ジヌクレオチド中のシトシン残基を指す。少なくとも1つの非メチル化CpGジヌクレオチドを含む免疫刺激オリゴヌクレオチドは、3'グアニンに結合しているホスフェートにより連結された5'非メチル化シトシンを含み、かつ免疫系を活性化する、オリゴヌクレオチドである。少なくとも1つのメチル化CpGジヌクレオチドを含む免疫刺激オリゴヌクレオチドは、3'グアニンに結合しているホスフェートにより連結された5'メチル化シトシンを含み、かつ免疫系を活性化する、オリゴヌクレオチドである。CpG免疫刺激オリゴヌクレオチドは、パリンドロームを含み得、CpGジヌクレオチドを包含し得る。

20

【0059】

CpGオリゴヌクレオチドは、多数の発行された特許、公開特許出願、および他の刊行物（米国特許第6,194,388号；米国特許第6,207,646号；米国特許第6,214,806号；米国特許第6,218,371号；米国特許第6,239,116号；および米国特許第6,339,068号が挙げられる）に記載されている。

30

【0060】

いくつかの免疫刺激オリゴヌクレオチドは、CpGジヌクレオチドを含まない。CpGジヌクレオチドを含まない免疫刺激オリゴヌクレオチドは、非CpG免疫刺激オリゴヌクレオチドと呼ばれ、それは、非CpG免疫刺激モチーフを有する。免疫刺激オリゴヌクレオチドは、メチル化CpG免疫刺激モチーフと、メチル化非CpG免疫刺激モチーフと、非メチル化CpG免疫刺激モチーフと、非メチル化CpG免疫刺激モチーフとの任意の組み合わせを含み得る。

【0061】

非CpGオリゴヌクレオチドのいくつかの例としては、

【0062】

【化1】

T*Z*G*T*Z*G*T*T*T*G*T*Z*G*T*T*T*G*T*Z*G*T*T (配列番号 19);
 T*G*C*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T*T (配列番号 20);
 T*G_C*T*G_C*T*T*T*T_G*T*G_C*T*T*T*T*G*T*G_C*T*T (配列番号 21);
 G*T*G*C*T*C*C*T*T*G*T*T*G*T*T*C*T*G*T*G*T*T (配列番号 22);
 A*A*G*C*A*C*A*A*G*C*A*C*A*A*G*C*A*G*C*A (配列番号 23);
 T*G*C*T*G*G*C*C*T*C*C*T*G*G*C*C*T*G*G*T*G*C (配列番号 24);
 T*G*T*G*C*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T (配列番号 25);
 T*C*C*A*G*G*A*C*T*T*C*T*C*T*C*A*G*G*T*T (配列番号 26);
 G*C*C*A*G*G*A*C*C*T*C*A*C*A*G*G*A*T (配列番号 27)

が挙げられる。

【0063】

公知の免疫刺激モチーフ（例えば、本明細書中に記載されるもの、および当該分野で公知のもの）を含まないオリゴヌクレオチドは、本明細書中では、非免疫刺激モチーフオリゴヌクレオチドと呼ばれる。これらのオリゴヌクレオチドは、非メチル化 C p G 免疫刺激モチーフ、メチル化 C p G 免疫刺激モチーフ、ポリ T モチーフ、ポリ G モチーフ、C p G 様免疫刺激モチーフ（2003年9月25日に公開された米国特許出願公開第2003/0181406 A1号に記載されるようなもの）を欠き、それはまた、Tリッチ（2003年11月13日に公開された米国特許出願公開第2003/0212026号に記載されるようなもの）を欠く。

【0064】

種々の種類の C p G 免疫刺激オリゴヌクレオチドが、最近同定されている。これらは、Aクラス、Bクラス、およびCクラスと呼ばれ、以下において、より詳細に記載される。

【0065】

「Aクラス」C p G 免疫刺激オリゴヌクレオチドは、高レベルのインターフェロン を誘導する能力およびNK細胞活性化を誘導しつつB細胞活性化に対して最小限の影響しか有さないことによって、機能的に特徴付けられる。構造的に、このクラスは、代表的には、5'末端および3'末端において、安定化したポリ G 配列を有する。これはまた、少なくとも6ヌクレオチドのパリンドロームホスホジエステル C p G ジヌクレオチド含有配列を有するが、これは、Yamamoto およびその同僚（Yamamoto Sら、J Immunol 148:4072~6 (1992)）により記載される以下のヘキサマーパリンドローム：G A C G T C、A G C G C T、またはA A C G T T のうちの1つを必ずしも含まない。Aクラス C p G 免疫刺激オリゴヌクレオチドおよびこのクラスの例示的配列は、2000年9月27日に出願された米国特許出願第09/672,126号および2000年9月27日に出願された公開 PCT 出願 PCT/US00/26527 (WO 01/22990)において記載されている。

【0066】

「Bクラス」C p G 免疫刺激オリゴヌクレオチドは、B細胞を活性化する能力によって機能的に特徴付けられるが、IFN- α およびNK細胞活性化を誘導することにおいては比較的弱い。構造的には、このクラスは、代表的には、完全に安定化されており、非メチル化 C p G ジヌクレオチドを、必要な場合には特定の好ましい塩基文脈内に、含む。

【0067】

一実施形態において、本発明は、少なくとも式：

5' X₁ X₂ C G X₃ X₄ 3'

により示されるBクラス C p G オリゴヌクレオチドを提供し、X₁、X₂、X₃、およびX₄はヌクレオチドである。一実施形態において、X₂は、アデニン、グアニン、または

チミンである。別の実施形態において、 X_3 は、シトシン、アデニン、またはチミンである。

【0068】

単離された B クラス C p G オリゴヌクレオチドのーカテゴリーは、少なくとも式：

5' N₁ X₁ X₂ C G X₃ X₄ N₂ 3'

により示され、 X_1 、 X_2 、 X_3 、および X_4 はヌクレオチドである。N は、任意のヌクレオチドであり、 N_1 および N_2 は、約 0 個～約 25 個の N から各々構成される核酸配列である。一実施形態において、 X_1 X_2 は、G p T、G p G、G p A、A p A、A p T、A p G、C p T、C p A、C p G、T p A、T p T、および T p G からなる群より選択されるジヌクレオチドである。 X_3 X_4 は、T p T、A p T、T p G、A p G、C p G、T p C、A p C、C p C、T p A、A p A、および C p A からなる群より選択されるジヌクレオチドである。好ましくは、 X_1 X_2 は、G p A または G p T であり、 X_3 X_4 は、T p T である。他の実施形態において、 X_1 もしくは X_2 またはその両方は、プリンであり、かつ X_3 もしくは X_4 またはその両方は、ピリミジンであるか、 X_1 X_2 は G p A であり、 X_3 もしくは X_4 またはその両方は、ピリミジンである。一つの好ましい実施形態において、 X_1 X_2 は、T p A、A p A、A p C、A p G、および G p G からなる群より選択されるジヌクレオチドである。なお別の実施形態において、 X_3 X_4 は、T p T、T p A、T p G、A p A、A p G、G p A、および C p A からなる群より選択されるジヌクレオチドである。 X_1 X_2 は、別の実施形態において、T p T、T p G、A p T、G p C、C p C、C p T、T p C、G p T、および C p G からなる群より選択されるジヌクレオチドである。 X_3 は、A および T からなる群より選択されるヌクレオチドであり、 X_4 は、ヌクレオチドであるが、 X_1 X_2 は、T p C、G p T、または C p G である場合には、 X_3 X_4 は、T p C でも、A p T でも A p C でもない。

10

20

20

【0069】

別の好ましい実施形態において、上記 C p G オリゴヌクレオチドは、配列 5' T C N₁ T X₁ X₂ C G X₃ X₄ 3' (配列番号 2) を有する。上記 C p G オリゴヌクレオチドは、いくつかの場合には、G p T、G p G、G p A、および A p A からなる群より選択される X_1 X_2 と、T p T、C p T、および T p C からなる群より選択される X_3 X_4 とを含む。

30

【0070】

本発明の B クラス C p G オリゴヌクレオチド配列は、上記に広範に記載されたもの、ならびに公開 PCT 特許出願 PCT / U S 95 / 01570 (WO 96 / 02555) および PCT / U S 97 / 19791 (WO 98 / 18810) 中、ならびに米国特許第 6,194,388 号、米国特許第 6,207,646 号、米国特許第 6,214,806 号、米国特許第 6,218,371 号、米国特許第 6,239,116 号、および米国特許第 6,339,068 号中に広範に開示されるものである。例示的な配列としては、これらの後者の出願および特許に開示されるものが挙げられるが、これらに限定はされない。

30

【0071】

「C クラス」の C p G 免疫刺激オリゴヌクレオチドは、B 細胞および N K 細胞を活性化して INF- α を誘導する能力によって機能的に特徴付けられる。構造的には、このクラスは、代表的には、B クラス型免疫刺激モチーフ配列、および G C リッチパリンドロームまたは近傍 (near) パリンドロームを含む。これらのオリゴヌクレオチドのうちのいくつかは、伝統的な「刺激性」C p G 配列と、「G C リッチ」モチーフまたは「B 細胞中和」モチーフとの両方を有する。これらの組み合わせモチーフオリゴヌクレオチドは、伝統的な B クラス C p G オリゴヌクレオチドに関連する効果 (すなわち、B 細胞活性化および樹状細胞 (DC) 活性化) と、A クラス C p G ODN に関連する効果 (すなわち、IFN- α および N K 細胞活性化の強力な誘導、しかし、B 細胞および DC 活性化の比較的乏しい誘導) との間のどこかに当たる免疫刺激効果を有する。Krieg AMら (1995) Nature 374: 546⁸ ; Ballas ZKら (1996) J

40

50

Immuno1 157:1840~5; Yamamoto Sら(1992) J Immunol 148:4072~6。さらに、好ましいBクラスCpGオリゴヌクレオチドは、しばしばホスホロチオエート骨格を有し、好ましいAクラスCpGオリゴヌクレオチドは、混合型骨格またはキメラ骨格を有するが、上記Cクラスの組み合わせモチーフ免疫刺激オリゴヌクレオチドは、いずれかの安定化された骨格(例えば、ホスホロチオエート骨格、キメラ骨格、またはホスホジエステル骨格)を有し得、いくつかの好ましい実施形態においては、Cクラスの組み合わせモチーフ免疫刺激オリゴヌクレオチドは、半軟質(semi-soft)骨格を有する。このクラスは、2002年8月19日に出願された米国特許出願第10/224,523号、2003年3月6日に公開された米国特許出願公開第2003/0148976 A1号(これらの内容全体は、本明細書において参考として援用される)において記載されている。

10

【0072】

CクラスCpGオリゴヌクレオチドの一つ刺激ドメインまたは刺激モチーフは、式5'， X_1DCGHX_23' により定義される。Dは、C以外のヌクレオチドである。Cは、シトシンである。Gは、グアニンである。Hは、G以外のヌクレオチドである。 X_1 および X_2 は、0ヌクレオチド長~10ヌクレオチド長の任意の核酸配列である。 X_1 は、CGを含み得、この場合、好ましくは、このCGの直前はTである。いくつかの実施形態において、DCGは、TCGである。 X_1 は、好ましくは、0ヌクレオチド長~6ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、 X_2 は、いかなるポリGモチーフもポリAモチーフも含まない。他の実施形態において、上記免疫刺激オリゴヌクレオチドは、5'末端または3'末端にポリT配列を有する。本明細書中で使用される場合、「ポリA」または「ポリT」とは、それぞれ、4個以上連続する一連のAまたはT(例えば、5'AAA A3'または5'TTTT3')を指す。本明細書中で使用される場合、「ポリG末端」とは、核酸の5'末端または3'末端に存在する、4個以上連続する一連のG(例えば、5'GGGG3')を指す。本明細書中で使用される場合、「ポリGオリゴヌクレオチド」とは、式5'， $X_1X_2GGGX_3X_43'$ を有するオリゴヌクレオチドを指し、 X_1 、 X_2 、 X_3 、および X_4 は、ヌクレオチドであり、好ましくは、 X_3 および X_4 のうちの少なくとも1つは、Gである。この式のもとでのB細胞刺激ドメインのためのいくつかの好ましい設計としては、TTTTTCG、TCG、TTCG、TTTCG、TTTTCG、TCGT、TTCGT、TTTCGT、TCGTCGTが挙げられる。

20

【0073】

CクラスCpGオリゴヌクレオチドの第二のモチーフは、PまたはNと呼ばれ、 X_1 のすぐ5'側に位置するのか、または X_2 のすぐ3'側に存在する。

30

【0074】

Nは、CGGトリヌクレオチドで始まりかつ少なくとも10ヌクレオチド長である、B細胞中和配列である。B細胞中和モチーフは、少なくとも1つのCpG配列(CGの前にCがあるが、またはCGの後にGが続く(Krieg AMら(1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:12631~12636))を含むか、あるいはCGのうちのCがメチル化DNA配列を含有するCGである。中和モチーフまたは中和配列とは、他の非刺激性モチーフ中に存在する場合にはある程度の免疫刺激能力を有するが、他の免疫刺激モチーフの文脈中に存在する場合には上記の他のモチーフの免疫刺激能力を低減するように作用する。

40

【0075】

Pは、少なくとも10ヌクレオチド長のGCリッチパリンドローム含有配列である。本明細書中で使用される場合、「パリンドローム」および同等に「パリンドローム配列」とは、逆方向反復(すなわち、ABCDEE'D'C'B'A'(AおよびA'、BおよびB'などは、通常のワトソン-クリック塩基対を形成可能な塩基である)のような配列)を指す。

【0076】

本明細書中で使用される場合、「GCリッチパリンドローム」とは、少なくとも3分の

50

2がGおよびCである塩基組成を有するパリンドロームを指す。いくつかの実施形態において、上記G Cリッチドメインは、好ましくは、「B細胞刺激ドメイン」に対して3'側にある。10塩基長のG Cリッチパリンドロームの場合、そのパリンドロームは、少なくとも8個のGおよびCを含む。12塩基長のG Cリッチパリンドロームの場合、そのパリンドロームはまた、少なくとも8個のGおよびCを含む。14マーのG Cリッチパリンドロームの場合、そのパリンドロームの少なくとも10塩基は、GおよびCである。いくつかの実施形態において、上記G Cリッチパリンドロームは、GおよびCのみから生成される。

【0077】

いくつかの実施形態において、上記G Cリッチパリンドロームは、少なくとも81%がGおよびCである塩基組成を有する。そのような10塩基長のG Cリッチパリンドロームの場合、上記パリンドロームは、GおよびCのみから生成される。そのような12塩基長のG Cリッチパリンドロームの場合、そのパリンドロームのうちの少なくとも10塩基(83%)がGおよびCであることが、好ましい。いくつかの好ましい実施形態において、12塩基長のG Cリッチパリンドロームは、GおよびCのみから生成される。14マーのG Cリッチパリンドロームの場合、そのパリンドロームのうちの少なくとも12塩基(86%)は、GおよびCである。いくつかの好ましい実施形態において、14塩基長のG Cリッチパリンドロームは、GおよびCのみから生成される。G CリッチパリンドロームのCは、メチル化されていなくても、メチル化されていてもよい。

【0078】

一般的には、このドメインは、少なくとも3つのCおよびG、より好ましくは各々4つ、最も好ましくは各々5つ以上を有する。このドメイン中のCおよびGの数は、同じである必要はない。そのCおよびGは、それらのCおよびGが自己相補性二重鎖すなわちパリンドローム(例えば、C C G C G C G G)を形成可能であるように配置されることが、好ましい。これは、AまたはTが割り込んでもよいが、その自己相補性は、例えばモチーフC G A C G T T C G T C G(配列番号3)またはC G G C G C C G T G C C G(配列番号4)中のように、少なくとも部分的に保存されることが、好ましい。相補性が保存されない場合、その非相補性塩基対は、TGであることが、好ましい。好ましい実施形態において、パリンドロームの一部ではない3個以下(好ましくは、2個以下、最も好ましくは1個だけ)連続する塩基が存在する。いくつかの実施形態において、上記G Cリッチパリンドロームは、少なくとも1つのC G Gトリマー、少なくとも1つのC C Gトリマー、または少なくとも1つのC G C Gテトラマーを含む。他の実施形態において、上記G Cリッチパリンドロームは、C C C C C C G G G G G G(配列番号5)でも、G G G G G G C C C C C C(配列番号6)でも、C C C C C G G G G G G(配列番号7)でも、G G G G G G C C C C C C(配列番号8)でもない。

【0079】

上記のG Cリッチ領域のGのうちの少なくとも1つは、イノシン(I)で置換され得る。いくつかの実施形態において、Pは、1つよりも多い数のIを含む。

【0080】

上記免疫刺激オリゴヌクレオチドは、以下の式：5' N₁ D C G H X₂ 3'、5' X₁ D C G H X₂ 3'、5' P₁ D C G H X₂ 3'、5' X₁ D C G H X₂ P₃ 3'、5' X₁ D C G H X₂ P X₃ 3'、5' X₁ D C G H X₂ P X₃ 3'、5' D C G H X₂ P X₃ 3'、5' T C G H X₂ P X₃ 3'、5' D C G H P X₂ 3'、または5' D C G H P 3'のうちの1つを有し得る。

【0081】

他の免疫刺激オリゴヌクレオチドは、式5' N₁ P_y G N₂ P₃ 3'により定義される。N₁は、1ヌクレオチド長～6ヌクレオチド長である任意の配列である。P_yは、ピリミジンである。Gは、グアニンである。N₂は、0ヌクレオチド長～30ヌクレオチド長である任意の配列である。Pは、少なくとも10ヌクレオチド長の配列を含む、G Cリッチパリンドロームである。

10

20

30

40

50

【0082】

N_1 および N_2 は、50%よりも多くのピリミジンを含み得、より好ましくは、50%よりも多くのTを含み得る。 N_1 は、CGであり、この場合、好ましくは、このCGの直前にTが存在する。いくつかの実施形態は、 N_1 PyGは、TCGであり（例えば、TCG GCG CGC GCC GTG CTG CTT T（配列番号18））、最も好ましくは、TCGN₂（ N_2 はGではない）である。

【0083】

N_1 PyGN₂Pは、1つ以上のイノシン（I）ヌクレオチドを含み得る。 N_1 中のCまたはGのうちのいずれかは、イノシンによって置換され得るが、CpIは、IpGである方が好ましい。イノシン置換物（例えば、IpG）に関して、最適な活性は、「半軟質（semi-soft）」骨格またはキメラ骨格の使用によって達成され得、そのIGまたはCIの間の結合は、ホスホジエステル結合である。 N_1 は、少なくとも1つのCIモチーフ、TCIモチーフ、IGモチーフ、またはTIGモチーフを含み得る。

10

【0084】

特定の実施形態において、 N_1 PyGN₂は、TTTTTCG、TCG、TTCG、TTTCG、TTTTCG、TCGT、TTCGT、TTTCGT、およびTCGTCGTからなる群より選択される配列である。

【0085】

Cクラスオリゴヌクレオチドの非限定的例としては、

20

【0086】

【化2】

（配列番号9） T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 （配列番号10） T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 （配列番号11） T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 （配列番号12） T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
 （配列番号13） T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
 （配列番号14） T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 （配列番号15） T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
 （配列番号16） T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G
 （配列番号17） T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G

30

が挙げられ、「*」とは、ホスホチオエート結合を指し、「-」とは、ホスホジエステル結合を指す。

【0087】

他の免疫刺激オリゴヌクレオチドは、Tリッチであるオリゴヌクレオチド、および/またはポリTモチーフを保有するオリゴヌクレオチドである。これらは、米国特許出願公開第2003/0212026 A1において、より詳細に記載されている。なお他の免疫刺激オリゴヌクレオチドは、ポリGモチーフを保有する。これらは、2000年3月16日に公開された公開PCT出願WO00/14217において、より詳細に記載されている。なお他の免疫刺激オリゴヌクレオチドは、CpG様オリゴヌクレオチドであり、これらは、2003年9月25日公開された米国特許出願公開第2003/0181406 A1において、より詳細に記載されている。これらの公開出願の内容は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

40

【0088】

本発明のいくつかの局面は、上記免疫刺激複合体の成分（例えば、ステロールまたはサポニン）に結合体化された非CpGオリゴヌクレオチドを使用する。これらの局面だけにおいては、非CpGオリゴヌクレオチドとは、免疫刺激性であるかそうではないかに関わらず、非メチル化CpGモチーフを欠くオリゴヌクレオチドを指す。従って、Tリッチオリゴヌクレオチド、ポリTリッチオリゴヌクレオチド、ポリGリッチオリゴヌクレオチド、メチル化CpGオリゴヌクレオチド、および他のCpG様オリゴヌクレオチドが、本明細書中で提供される方法および組成物によって包含され、但し、それらは、ステロール結

50

合型、グリコシド結合型（例えば、サポニン結合型）、リン脂質結合型などである。

【0089】

上記オリゴヌクレオチドは、分解に対して部分的に抵抗性であり得る（例えば、安定化されている）。「安定化されたオリゴヌクレオチド分子」とは、（例えば、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを介する）インビボ分解に対して比較的抵抗性であるオリゴヌクレオチドを意味する。核酸安定化は、骨格改変を介して達成され得る。ホスホチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドは、最大の活性を提供し、細胞内エキソヌクレアーゼおよび細胞内エンドヌクレアーゼによる分解からそのオリゴヌクレオチドを保護する。他の改変型オリゴヌクレオチドとしては、ホスホジエステル改変型オリゴヌクレオチド、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドおよびホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの組み合わせ、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、p-エトキシ、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

10

【0090】

上記オリゴヌクレオチドは、キメラ骨格を有し得る。本発明の目的のためには、キメラ骨格とは、部分的に安定化された骨格を指し、少なくとも1つのヌクレオチド間結合は、ホスホジエステル結合またはホスホジエステル様結合であり、少なくとも1つの他のヌクレオチド間結合は、安定化されたヌクレオチド間結合であり、上記の少なくとも1つのホスホジエステル結合またはホスホジエステル様結合と、上記の少なくとも1つの安定化された結合とは、異なる。ボラノホスホネート (boranophosphate) 結合は、ホスホジエステル結合と比較して安定化されていると報告されているので、上記骨格のキメラ性質のためには、ボラノホスホネート結合は、その文脈に依存して、ホスホジエステル様として、または安定化されているとして、分類され得る。例えば、一実施形態において、キメラ骨格は、少なくとも1つのホスホジエステル（ホスホジエステルまたはホスホジエステル）結合と、少なくとも1つのボラノホスホネート（安定化された）結合とを含み得る。別の実施形態において、キメラ骨格は、ボラノホスホネート（ホスホジエステルまたはホスホジエステル様）結合と、ホスホロチオエート（安定化された）結合とを含み得る。「安定化されたヌクレオチド間結合」とは、ホスホジエステルヌクレオチド間結合と比較して、（例えば、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを介する）インビボ分解に対して比較的抵抗性であるヌクレオチド間結合を意味する。好ましい安定化されたヌクレオチド間結合としては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびメチルホスホロチオエートが挙げられるが、これらに限定はされない。他の安定化されたヌクレオチド間結合としては、ペプチド、アルキル、デホスホ (dephospho)、および上記されている他の結合が挙げられるが、これらに限定はされない。

20

【0091】

ホスホロチオエートのような改変型骨格は、ホスホラミダイト化学またはH-ホスホネート化学のいずれかを利用した自動化された技術を使用して合成され得る。アリール-ホスホネートおよびアルキル-ホスホネートは、例えば、米国特許第4,469,863号に記載されるように作製され得、そしてアルキルホスホトリエステル（ここで荷電した酸素部分が米国特許第5,023,243号および欧州特許第092,574号に記載されるようにアルキル化される）は、市販されている試薬を使用して自動化された固相合成によって調製され得る。他のDNA骨格改変およびDNA骨格置換を作製するための方法は、記載されている。Uhlmann Eら (1990) Chem Rev 90:544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1:165。キメラオリゴヌクレオチドを調製するための方法もまた、公知である。例えば、Uhlmannらに対して発行された特許が、このような技術を記載している。

30

【0092】

混合型の骨格改変型ODNは、市販されているDNA合成機および標準的なホスホラミダイト化学を使用して合成され得る。（F. E. Eckstein、「Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach」

40

50

ach」、IRL Press、Oxford、UK、1991、およびM. D. MatteucciおよびM. H. Caruthers、*Tetrahedron Lett.* 21、719 (1980)。カップリングした後、PS結合が、Beaucage試薬 (R. P. Iyer、W. Egan、J. B. ReganおよびS. L. Beaucage、*J. Am. Chem. Soc.* 112、1253 (1990)) (アセトニトリル中に0.075M) またはフェニルアセチルジスルフィド (PADS) を使用した硫化 (sulfurization) を行い、次いで無水酢酸、2,6-ルチジンを含むテトラヒドロフラン (1:1:8; v:v:v)、およびN-メチルイミダゾール (テトラヒドロフラン中に16%) によりキャップ形成することによって導入される。このキャップ形成する工程は、ホスホロチオエート結合が配置されるべき位置における望ましくないホスホジエステル (PO) 結合の形成を最小化する硫化反応の後に行われる。例えば、CpGジヌクレオチドにおけるホスホジエステル結合の導入の場合、中間体のリン (III) は、水 / ピリジン中のヨウ素の溶液を用いた処理によって酸化される。固体支持体からの切断および濃アンモニアを用いた処理による最終的な脱保護 (50にて15時間) の後、上記ODNは、NaCl勾配 (例えば、アセトニトリル / 水中の緩衝液A: 10mM NaH₂PO₄ = 1:4 / v:v (pH 6.8); アセトニトリル / 水中の緩衝液B: 10mM NaH₂PO₄、15M NaCl = 1:4 / v:v; 1ml / 分にて30分間で5~60% B) を使用したGen-Pak Faxカラム上でのHPLCによってか、またはキャピラリーゲル電気泳動によって分析される。ODNは、HPLCによってか、またはSource High Performanceカラム (Amersham Pharmacia) 上でのFPLCによって精製され得る。HPLCの同質な分画は、合わせられ、そしてC18カラムを介してか、または限外濾過によって脱塩される。そのODNを、MALDI-TOF質量分析によって分析し、予測された質量を確認した。

10

20

30

40

50

【0093】

上記オリゴヌクレオチドはまた、他の改変を含み得る。これらは、非イオン性DNAアナログ (例えば、アリール-ホスフェートおよびアルキル-ホスフェート (ここで、荷電したホスホネートの酸素がアルキル基またはアリール基によって置換される)、荷電した酸素部分がアルキル化される、ホスホジエステルおよびアルキルホスホトリエステルを含む。いずれかの末端または両方の末端にてジオールを含む核酸 (例えば、テトラエチレングリコールまたはヘキサエチレングリコール) はまた、ヌクレアーゼ分解に対して十分に抵抗性であることを示した。

【0094】

いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、軟質 (soft) オリゴヌクレオチドまたは半軟質 (semi-soft) オリゴヌクレオチドであり得る。軟質オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合が、少なくとも1つの内部ピリミジン-プリンジヌクレオチド (YZ) 内であり、かつピリミジン-プリンジヌクレオチドに直接隣接してのみ生じる、部分的に安定化した骨格を有するオリゴヌクレオチドである。好ましくは、YZは、YG (ピリミジン-グアニン (YG)) ディヌクレオチドである。少なくとも1つの内部YZディヌクレオチド自体は、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合を有する。少なくとも1つの内部YZディヌクレオチドに直接隣接して生じる、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合は、少なくとも1つの内部YZディヌクレオチドに対して、5'、3'または5'と3'との両方であり得る。

【0095】

特に、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合は、「内部ジヌクレオチド」を含む。一般に、内部ジヌクレオチドは、ヌクレオチド間結合によって連結された隣接したヌクレオチドの任意の対を意味し、このヌクレオチド間結合において、ヌクレオチドの対におけるいずれのヌクレオチドも、末端ヌクレオチドではなく、すなわち、ヌクレオチドの対におけるいずれのヌクレオチドも、オリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端を規定するヌクレオチドではない。従って、nヌクレオチド長である直鎖

状オリゴヌクレオチドは、合計で $n - 1$ 個のジヌクレオチドを有し、 $n - 3$ 個だけの内部ジヌクレオチドを有する。内部ジヌクレオチド中の各ヌクレオチド間結合は、内部ヌクレオチド間結合である。従って、 n ヌクレオチド長である直鎖状オリゴヌクレオチドは、合計で $n - 1$ 個のヌクレオチド間結合を有し、そして $n - 3$ 個だけの内部ヌクレオチド間結合を有する。従って、戦略的に配置されたホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合とは、その核酸配列中のヌクレオチドの任意の対の間に位置付けられたホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合をいう。いくつかの実施形態において、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合は、5'末端または3'末端に最も近いヌクレオチドの対のいずれの間に位置付けられない。

10

【0096】

好みしくは、少なくとも 1 つの内部 YZ ジヌクレオチドに直接隣接して生じるホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合は、それ自体、内部ヌクレオチド間結合である。従って、配列 $N_1 Y Z N_2$ に関して、 N_1 および N_2 は、それぞれ他方から独立した、任意の単一のヌクレオチドであり、 YZ ジヌクレオチドは、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合を有し、さらに、(a) N_1 および Y は、 N_1 が内部ヌクレオチドである場合に、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合によって結合されるか、(b) Z および N_2 は、 N_1 が内部ヌクレオチドである場合に、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合によって結合されるか、または(c) N_1 および Y は、 N_1 が内部ヌクレオチドである場合に、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合によって結合され、そして Z および N_2 は、 N_2 が内部ヌクレオチドである場合に、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合によって結合される。

20

【0097】

軟質オリゴヌクレオチドは、完全に安定化したオリゴヌクレオチドと比較して、ヌクレアーゼ切斷に比較的影響されやすいと考えられる。少なくとも 1 つのヌクレアーゼ感受性のヌクレオチド間結合の組み込み（特に、オリゴヌクレオチドの中央付近）は、オリゴヌクレオチドの最大免疫刺激活性の持続時間を減少させるための、オリゴヌクレオチドの薬物動態を変化させる「オフスイッチ（off switch）」を提供すると考えられる。これは、組織、および慢性的な局所の炎症または免疫刺激（例えば、腎臓）に関連した傷害を回避することが望ましい臨床適用において、特に価値のあるものである。

30

【0098】

半軟質オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合が、少なくとも 1 つの内部ピリミジン-プリンジヌクレオチド（ YZ ）内であり、かつピリミジン-プリンジヌクレオチドに直接隣接してのみ生じる、部分的に安定化した骨格を有するオリゴヌクレオチドである。半軟質オリゴヌクレオチドは、対応する完全に安定化したオリゴヌクレオチドと比較して上昇した免疫刺激性の効力を有し得る。半軟質オリゴヌクレオチドのより大きい効力に起因して、半軟質オリゴヌクレオチドは、いくつかの例において、より低い有効濃度で使用され得、そして所望の生物学的効果を達成するために、完全に安定化したオリゴヌクレオチドより低い有効用量を有し得る。

40

【0099】

半軟質オリゴヌクレオチドの上記の特性は、一般に、内部 YZ ジヌクレオチドを含む、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合の増加性の「用量」によって増加することが考えられる。従って、例えば、5 つの内部 YZ ジヌクレオチドを有する所定のオリゴヌクレオチド配列に関して、5 つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部 YZ ヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、4 つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部 YG ヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドより、免疫刺激性であり、次に、4 つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部 YG ヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、3 つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部 YZ ヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチド

50

より、免疫刺激性であり、次に、3つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部YZヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、2つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部YZヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドより、免疫刺激性であり、次に、2つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部YZヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、1つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部YZヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドより、免疫刺激性である。重要なことには、1つでさえ、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部YZヌクレオチド間結合を含むことは、ホスホジエステルまたはホスホジエステル様の内部YZヌクレオチド間結合を含まないより、有益であると考えられる。ホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合の数に加えて、核酸の長さに沿った位置もまた、効力に影響し得る。

10

【0100】

軟質オリゴヌクレオチドおよび半軟質オリゴヌクレオチドは、一般に、好ましい内部位置におけるホスホジエステルまたはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合に加えて、分解に対して抵抗性である5'末端および3'末端を含む。このような分解抵抗性の末端は、エンドヌクレアーゼ消化に対して、対応する未改変の末端を上回る増加した抵抗性を生じる、任意の適切な改変を含み得る。例えば、5'末端および3'末端は、上記骨格の少なくとも1つのリン酸改変の存在を含むことによって安定化され得る。好ましい実施形態において、各末端における上記骨格の少なくとも1つのリン酸改変は、独立して、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、ホスホロジチオエートヌクレオチド間結合、メチルホスホネートヌクレオチド間結合またはメチルホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。別の実施形態において、分解抵抗性の末端は、3'末端におけるペプチド結合またはアミド結合によって連結された1つ以上のヌクレオチド単位を含む。

20

【0101】

ホスホジエステルヌクレオチド間結合は、天然に見出される核酸の結合特性の型である。ホスホジエステルヌクレオチド間結合は、酸素原子の2つの架橋によって隣接され、そしてまた2つのさらなる酸素原子（一方は荷電しており、そして他方は荷電していない）によって結合されたリン原子を含む。ホスホジエステルヌクレオチド間結合は、上記オリゴヌクレオチドの組織半減期を減少させることが重要である場合に、特に好ましい。

30

【0102】

ホスホジエステル様ヌクレオチド間結合は、化学的に、そして/またはジアステレオマーとしてホスホジエステルに類似する、リン含有架橋基である。ホスホジエステルに対する類似性の尺度は、ヌクレアーゼ消化に対する感受性、およびRNase Hを活性化する能力を含む。従って、例えば、ホスホジエステルのオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ消化に対して感受性であるが、ホスホロチオエートのオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ消化に対して感受性ではない一方で、ホスホジエステルのオリゴヌクレオチドおよびホスホロチオエートのオリゴヌクレオチドの両方は、RNase Hを活性化する。好ましい実施形態において、ホスホジエステル様ヌクレオチド間結合は、ボラノホスフェート（または同等に、ボラノホスホネート（boranophosphonate））である。米国特許第5,177,198号；同第5,859,231号；同第6,160,109号；同第6,207,819号；Sergueevら、(1998) J Am Chem Soc 129: 9417-27。別の好ましい実施形態において、ホスホジエステル様ヌクレオチド間結合は、ジアステレオマーとして純粋なRpホスホロチオエートである。ジアステレオマーとして純粋なRpホスホロチオエートは、ヌクレアーゼ消化に対して、より感受性であり、そして混合型Spホスホロチオエート、またはジアステレオマーとして純粋なSpホスホロチオエートより、RNase Hを良好に活性化すると考えられる。CpGオリゴヌクレオチドの立体異性体は、公開されたPCT出願PCT/US99/17100(WO00/06588)の対象である。本発明の目的のために、用語「ホスホジエステル様ヌクレオチド間結合」が具体的にはホスホロジチオエートヌクレオチド間結合およびメチルホスホネートヌクレオチド間結合を除外することに、留意すべきで

40

50

ある。

【0103】

上に記載される通り、軟質オリゴヌクレオチドおよび半軟質オリゴヌクレオチドは、CとGとの間にホスホジエステル様結合を有し得る。ホスホジエステル様結合の1つの例は、R_p立体配座におけるホスホロチオエート結合である。オリゴヌクレオチドのp-キラリティーは、活性が測定される時点に依存して、CpGオリゴヌクレオチドの免疫活性において明らかに反対の効果を有し得る。40分の早期の時点において、ホスホロチオエートのCpGオリゴヌクレオチドのR_p立体異性体は、マウス脾臓細胞においてJNKリン酸化を誘導するが、S_p立体異性体は、JNKリン酸化を誘導しない。対照的に、44時間の後期の時点においてアッセイした場合、S_p立体異性体は、マウス脾臓細胞の刺激を活性化するが、R_p立体異性体は、マウス脾臓細胞の刺激を活性化しない。R_p立体異性体およびS_p立体異性体の動態および生物活性におけるこの相違は、細胞の取り込みにおける任意の相違から生じないが、むしろ、p-キラリティーの2つの対立する生物学的な役割にほぼ起因する。第1に、早期の時点における免疫細胞の刺激に関してS_pと比較した場合の、R_p立体異性体の増強した活性は、R_pが、CpGレセプター(ILR9)との相互作用、または下流のシグナル伝達経路の誘導において、より有効であり得ることを示す。一方で、S_pと比較して、R_pPS-オリゴヌクレオチドの、より速い分解は、シグナル伝達のずっと短い持続時間を生じ、その結果、R_pPS-オリゴヌクレオチドは、より後期の時点において試験した場合に、より生物学的に活性であるようである。

10

【0104】

思いのほか強力な効果は、CpGジヌクレオチド自体におけるp-キラリティーによって達成される。立体的にランダムなCpGオリゴヌクレオチドと比較して、単一のジヌクレオチドがR_pにおいて結合された同種が、わずかに、より活性であった一方で、S_p結合を含む同種は、脾臓細胞増殖の誘導に関してほぼ不活性であった。

20

【0105】

上記オリゴヌクレオチドのサイズ(すなわち、オリゴヌクレオチドの長さに従ったヌクレオチド残基の数)はまた、そのオリゴヌクレオチドの刺激活性に寄与し得る。細胞中への取り込みの促進に関して、好ましくは、オリゴヌクレオチドは、6ヌクレオチド残基の最小の長さを有する。6ヌクレオチドより大きい任意のサイズのオリゴヌクレオチド(数kb長でさえ)は、免疫応答を誘導し得る。なぜなら、より大きいオリゴヌクレオチドは、細胞内で分解されるからである。4ヌクレオチド程度の短さの半軟質オリゴヌクレオチドはまた、それらが細胞の内部に送達され得る場合に、免疫刺激性であり得ると考えられる。特定の好ましい実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、4ヌクレオチド長~100ヌクレオチド長であるか、または8ヌクレオチド長~100ヌクレオチド長である。代表的な実施形態において、上記免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、4ヌクレオチド長~40ヌクレオチド長であるか、6ヌクレオチド長~40ヌクレオチド長であるか、または8ヌクレオチド長~40ヌクレオチド長である。重要な実施形態において、本発明の核酸およびオリゴヌクレオチドは、プラスミドでも発現ベクターでもない。

30

【0106】

用語「オリゴヌクレオチド」はまた、例えば、塩基および/もしくは糖における置換または改変を有するオリゴヌクレオチドを包含する。例えば、それらは、2'位の水酸基以外、および5'位のリン酸基または水酸基以外の低分子量有機基に共有結合した骨格糖を有するオリゴヌクレオチドを含む。従って、改変型オリゴヌクレオチドは、2' - O - アルキル化リボース基を含み得る。さらに、改変型オリゴヌクレオチドは、リボースの代わりに、アラビノースまたは2' - フルオロアラビノースのような糖を含み得る。従って、上記オリゴヌクレオチドは、骨格組成において不均一であり、それによって、ペプチド-核酸(核酸塩基を伴うアミノ酸骨格を有する)のような一緒に結合したポリマー単位のあらゆる可能な組み合わせを含み得る。上記のことは、本明細書中に開示された核酸に対して等しく適用される。

40

【0107】

50

上記オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステルのヌクレオチド間架橋、-D-リボース単位および/または天然のヌクレオチド塩基(アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル)を含む天然のRNAおよび天然のDNAと比較して、種々の化学的改変および化学的置換を含み得る。化学的改変の例は、当業者に公知であり、そして例えば、Uhlmann Eら(1990)Chem Rev 90:543;「Protocols for Oligonucleotides and Analogs」、Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques、S Agrawal編、Humana Press、Totowa、USA 1993; Crooke STら(1996)Ann Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129;およびHunziker Jら(1995)Mod Synth Methods 7:331-417に記載される。オリゴヌクレオチドは、1つ以上の改変を有し得、各改変は、天然のDNAまたは天然のRNAから構成される同じ配列のオリゴヌクレオチドと比較して、特定のホスホジエステルのヌクレオチド間架橋および/または特定の-D-リボース単位および/または特定の天然のヌクレオチド塩基の位置に配置される。10

【0108】

例えば、本発明は、1つ以上の改変を含み得るオリゴヌクレオチドに関連し、そして各改変は、独立して、以下から選択される:

- a) 改変型ヌクレオチド間架橋による、ヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に配置されるホスホジエステルのヌクレオチド間架橋の置換;20
- b) 脱リン酸(dephospho)架橋によるヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に配置されるホスホジエステル架橋の置換;
- c) 別の単位による糖リン酸骨格由来の糖リン酸単位の置換;
- d) 改変型糖単位による-D-リボースの置換;および
- e) 改変型ヌクレオチド塩基による天然のヌクレオチド塩基の置換。

【0109】

オリゴヌクレオチドの化学的改変についてのより詳細な例は、以下の通りである。

【0110】

ヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に配置されるホスホジエステルのヌクレオチド間架橋は、改変型ヌクレオチド間架橋によって置換され得、この改変型ヌクレオチド間架橋は、例えば、ホスホロチオエート架橋、ホスホジチオエート架橋、NR¹R²-ホスホラミデート架橋、ボラノホスフェート架橋、-ヒドロキシベンジルホスフェート架橋、ホスフェート-(C₁~C₂)-O-アルキルエステル架橋、ホスフェート-[C₆~C₁₂]アリール-(C₁~C₂)-O-アルキル]エステル架橋、(C₁~C₈)アルキルホスホネート架橋および/または(C₆~C₁₂)アリールホスホネート架橋、(C₇~C₁₂)-ヒドロキシメチル-アリール(例えば、WO 95/01363に開示される)から選択され、(C₆~C₁₂)アリール、(C₆~C₂₀)アリールおよび(C₆~C₁₄)は、必要に応じて、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、ニトロ、シアノによって置換され、そしてR¹およびR²は、互いに独立して、水素、(C₁~C₁₈)アルキル、(C₆~C₂₀)アリール、(C₆~C₁₄)アリール-(C₁~C₈)アルキルであり、好ましくは、水素、(C₁~C₈)アルキルであり、好ましくは、(C₁~C₄)アルキルおよび/もしくはメトキシエチルであるか、またはR¹およびR²型は、それらを担持する窒素原子と一緒にになって、O、SおよびNという基からのさらなるヘテロ原子をさらに含み得る5~6員の複素環を形成する。30

【0111】

ヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に配置されるホスホジエステル架橋は、脱リン酸架橋(脱リン酸架橋は、例えば、Uhlmann EおよびPeyman A、「Methods in Molecular Biology」、第20巻、「Protocols for Oligonucleotides and Analogs」、S Agrawal編、Humana Press、Totowa 1993、第140

6章、pp. 355 ffに記載される)によって置換され、脱リン酸架橋は、例えば、脱リン酸架橋ホルムアセタール基、3'-チオホルムアセタール基、メチルヒドロキシルアミン基、オキシム基、メチレンジメチル-ヒドラゾ基、ジメチレンスルホン基および/またはシリル基から選択される。

【0112】

糖リン酸単位(すなわち、一緒になって糖リン酸単位を形成する-D-リボースおよびホスホジエステルのヌクレオチド間架橋)は、糖リン酸骨格(すなわち、糖リン酸骨格は、糖リン酸単位から構成される)に由来し、この糖リン酸単位は、別の単位によって置換され得、他の単位は、例えば、「モルホリノ誘導体」オリゴマー(Stirchak Eら(1989) Nucleic Acids Res 17: 6129-41に記載されるような)を構築(すなわち、例えば、モルホリノ誘導体単位による置換)するのに適しているか、またはポリアミド核酸(「PNA」; 例えば、Nielsen PEら(1994) Bioconjug Chem 5: 3-7に記載される)を構築(すなわち、例えば、PNA骨格単位(例えば、2-アミノエチルグリシン)による置換)するのに適している。

【0113】

-リボース単位または-D-2'-デオキシリボース単位は、改変型糖単位によって置換され得、この改変型糖単位は、例えば、-D-リボース、-D-2'-デオキシリボース、L-2'-デオキシリボース、2'-F-2'-デオキシリボース、2'-F-アラビノース、2'-O-(C₁~C₆)アルキル-リボースから選択され、好ましくは、2'-O-(C₁~C₆)アルキル-リボースは、2'-O-メチルリボース、2'-O-(C₂~C₆)アルケニル-リボース、2'-(O-(C₁~C₆)アルキル-O-(C₁~C₆)アルキル]-リボース、2'-NH₂-2'-デオキシリボース、-D-キシロ-フラノース、-アラビノフラノース、2',4'-ジデオキシ-D-エリスロ-ヘキソ-ピラノース、ならびに炭素環式糖アナログ(例えば、Froehle J(1992) Am Chem Soc 114: 8320に記載される)および/または開鎖糖アナログ(例えば、Vandendriesscheら(1993) Tetrahedron 49: 7223に記載される)および/またはビシクロ糖アナログ(例えば、Tarkov Mら(1993) Helv Chim Acta 76: 481に記載される)である。

【0114】

いくつかの実施形態において、上記糖は、特に、ホスホジエステルもしくはホスホジエステル様のヌクレオチド間結合によって結合される一方または両方のヌクレオチドについて、2'-O-メチルリボースである。

【0115】

オリゴヌクレオチドはまた、置換プリンおよび置換ピリミジン(例えば、C-5プロピニピリミジンおよび7-デアザ-7-置換プリン改変型塩基)を含む。Wagner RWら(1996) Nat Biotechnol 14: 840-4。アデニン、シトシン、グアニン、チミンおよびウラシルからなる、より一般的な天然に存在するに加えて、上記オリゴヌクレオチドはまた、他の天然に存在する塩基および天然に存在しない塩基、置換および非置換の芳香族部分を含む。改変型塩基は、代表的にはDNAおよびRNA中に見出される天然に存在する塩基(例えば、チミン、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシル)と化学的に異なるが、基本的な化学構造をこれらの天然に存在する塩基と共有する任意の塩基である。改変型ヌクレオチド塩基としては、例えば、5-(C₂~C₆)-アルケニルシトシン、5-(C₂~C₆)-アルケニルウラシル、N4-アルキルシトシン(例えば、N4-エチルシトシン)、N4-アルキルデオキシシチジン(例えば、N4-エチルデオキシシチジン)、5-(C₁~C₆)-アルキルシトシン、5-(C₁~C₆)-アルキルウラシル、5-(C₂~C₆)-アルキニルシトシン、5-(C₂~C₆)-アルキニルウラシル、2-アミノ-6-クロロプリン、2-アミノプリン、5-アミノウラシル、8-アザプリン、5-ブロモシトシン、5-ブロモウラシル、5-クロ

10

20

30

40

50

ロシトシン、5-クロロウラシル、ニトロピロールのデオキシリボヌクレオチド、ジアミノプリン（例えば、2,4-ジアミノプリンおよび2,6-ジアミノプリン）、ジヒドロウラシル、N²-ジメチルグアニン、5-フルオロシトシン、5-フルオロウラシル、5-ヒドロキシシトシン、5-ヒドロキシデオキシシチジン、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-ヒドロキシメチルデオキシシチジン、5-ヒドロキシメチルウラシル、ヒポキサンチン、イノシン、5-メチルシトシン、C5-プロピニルピリミジン、シュードウラシル、置換7-デアザプリン（好ましくは、7-デアザ-7-置換プリンおよび/または7-デアザ-8-置換プリン）6-チオデオキシグアノシン、2-チオウラシル、4-チオウラシル、ウラシルなどが挙げられる。この一覧は、例示であることを意味し、そして限定として解釈されるべきではない。他のこのような改変は、当業者に公知である。

10

【0116】

本明細書中に記載される特定の式において、一連の改変型塩基が、定義される。例えば、文字Yは、シトシンまたは改変型シトシンを含むヌクレオチドに言及するために使用される。本明細書中で使用されるような改変型シトシンは、上記オリゴヌクレオチドの活性を損なうことなくこの塩基を置換し得る。改変型シトシンとしては、5-置換シトシン（例えば、5-メチル-シトシン、5-フルオロ-シトシン、5-クロロ-シトシン、5-プロモ-シトシン、5-ヨード-シトシン、5-ヒドロキシ-シトシン、5-ヒドロキシメチル-シトシン、5-ジフルオロメチル-シトシン、および非置換または置換の5-アルキニル-シトシン）、6-置換シトシン、N4-置換シトシン（例えば、N4-エチル-シトシン）、5-アザ-シトシン、2-メルカプト-シトシン、イソシトシン、シュード-イソシトシン、縮合環系を有するシトシンアナログ（例えば、N,N'-プロピレンシトシンまたはフェノキサジン）、ならびにウラシルおよびその誘導体（例えば、5-フルオロ-ウラシル、5-プロモ-ウラシル、5-プロモビニル-ウラシル、4-チオ-ウラシル、5-ヒドロキシ-ウラシル、5-プロピニル-ウラシル）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましいシトシンのいくつかは、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-ヒドロキシシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、およびN4-エチルシトシンが挙げられる。別の実施形態において、シトシン塩基は、ユニバーサル塩基（例えば、3-ニトロピロール、P-塩基）、芳香環系（例えば、フルオロベンゼンまたはジフルオロベンゼン）または水素原子（dSpacer）によって置換される。

20

【0117】

文字Zは、グアニンまたは改変型グアニン塩基に言及するために使用される。本明細書中で使用されるような改変型グアニンは、上記オリゴヌクレオチドの活性を損なうことなくこの塩基を置換し得る、グアニンの天然に存在するプリン塩基アナログまたはグアニンの天然に存在しないプリン塩基アナログである。改変型グアニンとしては、7-デアザグアニン、7-デアザ-7-置換グアニン（例えば、7-デアザ-7-(C2~C6)アルキニルグアニン）、7-デアザ-8-置換グアニン、ヒポキサンチン、N2-置換グアニン（例えば、N2-メチル-グアニン）、5-アミノ-3-メチル-3H,6H-チアゾール[4,5-d]ピリミジン-2,7-ジオン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノプリン、プリン、インドール、アデニン、置換アデニン（例えば、N6-メチル-アデニン、8-オキソ-アデニン）、8-置換グアニン（例えば、8-ヒドロキシグアニンおよび8-プロモグアニン）、および6-チオグアニンが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の別の実施形態において、上記グアニン塩基は、ユニバーサル塩基（例えば、4-メチル-インドール、5-ニトロ-インドール、およびK-塩基）、芳香環系（例えば、ベンズイミダゾールまたはジクロロベンズイミダゾール、1-メチル-1H-[1,2,4]トリアゾール-3-カルボン酸アミド）または水素原子（dSpacer）によって置換される。

40

【0118】

上記オリゴヌクレオチドは、1つ以上の接触可能な5'末端を有し得る。これは、例えば、3'-3'結合を介して2つのオリゴヌクレオチドを接続して、1つまたは2つの利用可能な5'末端を生成することによって達成され得る。上記3'-3'-結合は、ホスホ

50

ジエステルヌクレオチド間架橋、ホスホロチオエートヌクレオチド間架橋、または任意の他の改変型ヌクレオチド間架橋であり得る。このような結合を達成するための方法は、当該分野において公知である。例えば、このような結合は、Seliger, Hら、「Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression」、Nucleotides & Nucleotides (1991)、10(1-3)、469-77およびJiangら、「Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties」、Bioorganic & Medicinal Chemistry (1999)、7(12)、2727-2735に記載されている。
10

【0119】

さらに、3'末端のヌクレオチドの間の結合がホスホジエステル、ホスホロチオエートまたは他の改変型架橋でない3'3'-結合したオリゴヌクレオチドは、さらなるスペーサー（例えば、トリ-エチレンギリコールホスフェート部分またはテトラ-エチレンギリコールホスフェート部分）を使用して調製され得る(Durand, Mら、「Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one(dA)₁₂ and two(dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains」、Biochemistry (1992)、31(38)、9197-204、米国特許第5,658,738号および同第5,668,265号）。あるいは、非ヌクレオチド性リンカーは、標準的なホスホラミダイト化学を使用した、エタンジオール、プロパンジオール、または無塩基デオキシリボース(dSpacer)単位(Fontanel, Marie Laurenceら、「Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; Nucleic Acids Research (1994)、22(11)、2022-7）に由来し得る。非ヌクレオチド性リンカーは、1回または複数回取り込まれ得るか、または互いに組み合わされ得、結合される2つのODNの3'末端の間に任意の望ましい距離を与える。
20
30

【0120】

上記オリゴヌクレオチドはまた、ヌクレオチドの間またはヌクレオチドアナログ部分の間に、1つ以上の異常な結合を含み得る。通常のヌクレオシド間結合は、3'5'-結合である。全ての他の結合は、異常なヌクレオシド間結合（例えば、2'5'-結合、5'5'-結合、3'3'-結合、2'2'-結合、2'3'-結合）と見なされる。2'から5'までの命名法は、リボースの炭素原子に従って選択される。しかし、天然でない(unnatural)糖部分（例えば、環が拡大した糖アナログ（例えば、ヘキサノース、シクロヘキセンまたはピラノース）または二環式糖アナログもしくは三環式糖アナログ）が利用される場合、この命名法は、モノマーの命名法にしたがって変化する。3' - デオキシ - - D - リボピラノースアナログ(p-DNAとも称される)において、モノヌクレオチドが、例えば、4'2' - 結合を介して連結される。
40

【0121】

上記ヌクレオチドが、1つの3'3'-結合を含む場合、このオリゴヌクレオチドは、2つの結合していない5'末端を有し得る。同様に、上記オリゴヌクレオチドが1つの5'5'-結合を含む場合、このオリゴヌクレオチドは、2つの結合していない3'末端を有し得る。ヌクレオチドの結合していない末端の接触性は、それらのレセプターによって、より良好に接触可能であり得る。異常な結合の両方の型（3'3'および5'5'）は、Ramalho Ortigaoら（Antisense Research and Development (1992) 2、129-46）によって記載され、それによって、3'3'-結合を有するオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼによる切断に対する
50

安定性の向上を示すことが報告された。

【0122】

種々の型の結合がまた、1個の分子中で組み合わせられ得、上記オリゴマーの分枝形成を生じ得る。上記オリゴヌクレオチドの一部が、3'末端にて3'3'-結合を介して第2のオリゴヌクレオチド部分連結され、そして2'末端にて2'3'-結合を介してその分子の第3の部分に連結される場合、この結果は、例えば、3つの5'末端を有する分枝状オリゴヌクレオチド(3'3'-、2'3'-分枝)を生じる。

【0123】

原理的には、オリゴヌクレオチドの異なる部分の間の結合、または異なるオリゴヌクレオチドの間の結合は、それぞれ、その分子の全ての部分を通じて起こり得るが、但し、これは、そのレセプターによる認識にネガティブに干渉しない。上記オリゴヌクレオチドの性質に従って、上記結合は、糖部分(Su)、複素環式核酸塩基(Ba)またはリン酸骨格(Ph)に関与し得る。従って、Su-Su型、Su-Ph型、Su-Ba型、Ba-Ba型、Ba-Su型、Ba-Ph型、Ph-Ph型、Ph-Su型、およびPh-Ba型の結合が可能である。上記オリゴヌクレオチドが、特定の非ヌクレオチド性置換基によってさらに改変される場合、上記結合はまた、そのヌクレオチドの改変された部分を介して生じ得る。これらの改変はまた、改変型オリゴヌクレオチド(例えば、PNA、LNA、またはモルホリノオリゴヌクレオチドアナログ)を含む。

10

【0124】

上記結合は、好ましくは、C、H、N、O、S、B、P、およびハロゲンから構成され、3個~300個の原子を含む。3個の原子による例は、例えば、1つのヌクレオチドの3'-水酸基を第2のオリゴヌクレオチドの3'-水酸基に連結するアセチル結合(ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2)である。約300個の原子による例は、PEG-40(テトラコンタポリエチレン glycol)である。好ましい結合は、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、ホスホラミデート結合、ボラノホスホネート結合、アミド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、アセタール結合、チオアセタール結合、尿素結合、チオ尿素結合、スルホンアミド結合、S chiff塩基による結合およびジスルフィド結合である。「trilink biotech」のウェブサイトにて入手可能なSolulink Bioc conjugation Systemを使用することも、可能である。

20

【0125】

上記オリゴヌクレオチドが、2つ以上の配列部分から構成される場合、これらの部分は、同一であっても異なっていてもよい。従って、3'3'-結合を有するオリゴヌクレオチドにおいて、その配列は、同一の5'-ODN1-3'3'-ODN1-5'または異なる5'-ODN1-3'3'-ODN2-5'であり得る。さらに、種々のオリゴヌクレオチド部分の化学的改変、およびそれらを連結するリンカーは、異なり得る。短いオリゴヌクレオチドの取り込みは、長いオリゴヌクレオチドの取り込みより効率的でないようであるので、2つ以上の短い配列を結合することは、改善された免疫刺激を生じる。短いオリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは2ヌクレオチド~20ヌクレオチドであり、より好ましくは3ヌクレオチド~16ヌクレオチドであるが、最も好ましくは5ヌクレオチド~10ヌクレオチドである。2つ以上の結合していない5'末端を有する結合したオリゴヌクレオチドが、好ましい。

30

【0126】

上記オリゴヌクレオチドの部分配列はまた、非ヌクレオチド性リンカー(特に、無塩基リンカー(d spacer)、トリエチレン glycol 単位またはヘキサエチレン glycol 単位)によって結合され得る。さらに好ましいリンカーは、アルキルアミノリンカー(例えば、C3アミノリンカー、C6アミノリンカー、C12アミノリンカー)であり、そしてまた、アルキルチオールリンカー(例えば、C3チオールリンカーまたはC6チオールリンカー)である。上記オリゴヌクレオチドはまた、アルキル基または置換アルキル基によってさらに置換され得る芳香族残基によって結合され得る。上記オリゴヌクレオチ

40

50

ドはまた、「glenress」のウェブサイトに記載されるようなDoubler単位またはTrebleler単位を含み得る(特に、3'3'-結合を有するオリゴヌクレオチド)。複数のダブラー(doubler)単位、トレブラー(trebleler)単位、またはマルチプライヤー(multiplier)単位による上記オリゴヌクレオチドの分枝形成は、本発明のさらなる実施形態であるデンドリマーをもたらす。上記オリゴヌクレオチドはまた、「glenress」のウェブサイトに記載されるような、ペプチド改変試薬またはオリゴヌクレオチド改変試薬から生じるリンカー単位を含み得る。さらに、このオリゴヌクレオチドは、ペプチド(アミド)結合によって連結される、1つ以上の天然のアミノ酸残基または天然でないアミノ酸残基を含み得る。

【0127】

10

オリゴヌクレオチドを結合するための別の可能性は、複素環式塩基の架橋を介するものである(VermaおよびEckstein; Annu. Rev. Biochem. (1998) 67: 99-134; 124ページ)。1つの配列の糖部分と、別の配列部分の複素環式塩基との間の結合(Iyerら、Curr Opin Mol. Therapeutic (1999) 1: 344-358; 352ページ)もまた、使用され得る。

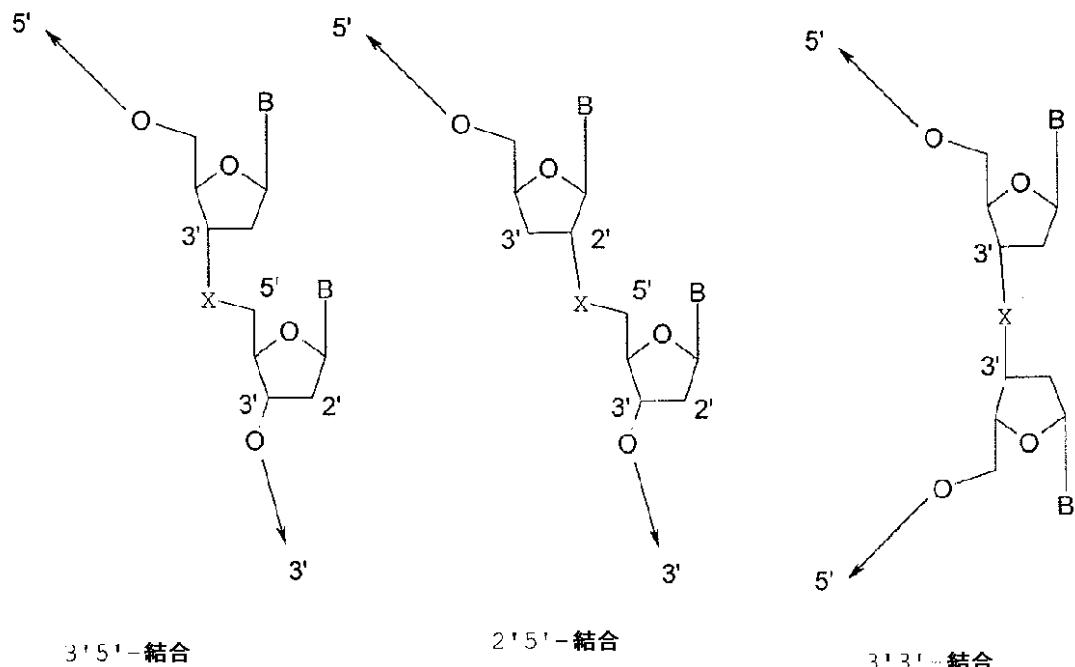
【0128】

上記の異なるオリゴヌクレオチドは、確立された方法によって合成され、そして固相合成の間に、同時(on-line)に連結され得る。あるいは、上記の異なるオリゴヌクレオチドは、個々の部分配列の合成後に結合され得る。

【0129】

20

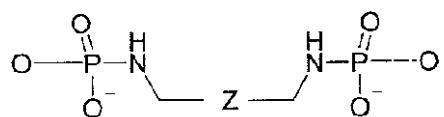
【化3】



10

20

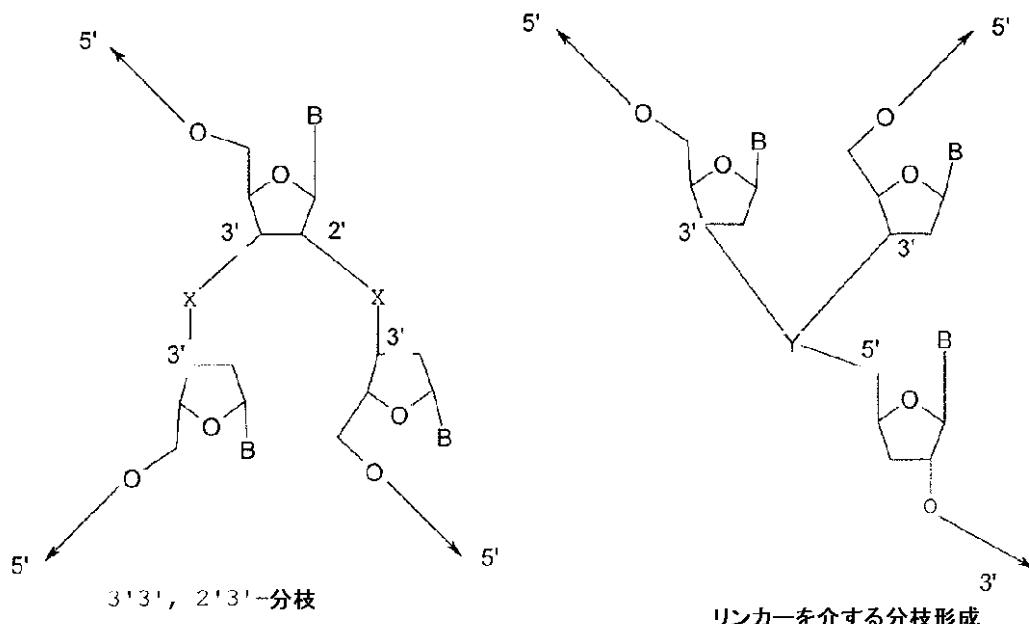
X は、例えば、以下である：



30

【0130】

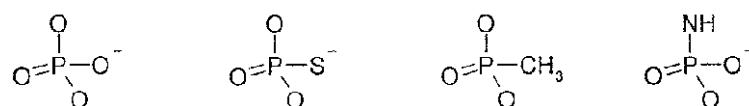
【化4】



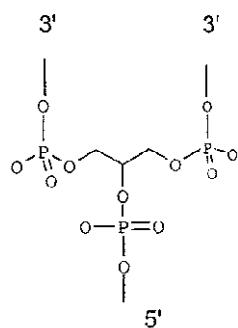
10

20

X は、例えば、以下である：



Y は、例えば、以下である：



30

単離された形態とは、その物質が通常一緒に存在するかまたは見出され得る成分からその物質が物理的に分離されている形態である。

【0131】

用語「実質的に精製されている」とは、本明細書中で使用される場合、天然で会合されるタンパク質、脂質、炭水化物または他の材料を実質的に含まない物質をいう。当業者は、タンパク質の精製のための標準的な技術を使用して、ウイルスポリペプチドまたは細菌のポリペプチドを精製し得る。実質的に純粋なポリペプチドはしばしば、非還元性ポリアクリルアミドゲル上で单一の主要なバンドを生じる。部分的にグリコシル化されたポリペプチドまたはいくつかの開始コドンを有するペプチドの場合、非還元性ポリアクリルアミドゲル上でいくつかのバンドが存在し得るが、これらはそのポリペプチドに特有のパターンを形成する。ウイルスポリペプチドまたは細菌のポリペプチドの純度はまた、アミノ末端アミノ酸配列の分析によって決定され得る。

【0132】

T L R リガンドはまた、それらの単離された形態で一般に使用される。単離されたオリゴヌクレオチドは、通常一緒に会合される物質から物理的に分離されるオリゴヌク

40

50

レオチドである。オリゴヌクレオチドが天然に存在する供給源から生成される場合、このオリゴヌクレオチドは、その天然に存在する供給源の他の成分（例えば、細胞、タンパク質、核、クロモソームなど）から物理的に分離される。

【0133】

本明細書中で使用される場合、用語「処置する」、「処置される」または「処置すること」は、障害（例えば、感染性疾患、癌、またはアレルギー）に関係して使用される場合、その疾患の発症（例えば、病原体に感染すること）に対する被験体の耐性を増加する予防的処置、または換言すると、被験体がその疾患を発症する（例えば、病原体に感染されるようになる）可能性を低下させる予防的処置、ならびに被験体がその疾患を発症した後に疾患と闘う（例えば、感染を低減させるかまたは排除する）かまたはその疾患が悪化することを予防するための治療処置、をいう。

10

【0134】

本明細書中に記載される処方物は、免疫系を刺激して、癌、感染性疾患、アレルギー、喘息および他の障害を処置するのに必要である先天免疫応答を形成するため、治療上かつ予防上有用である。処方物は、他のアジュvantの組合せと比較した場合、予期せぬより良い免疫刺激効果を実証する。

【0135】

被験体は、ヒトまたは脊椎動物を意味し、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）、魚（水産養殖種）（例えば、サケ）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明を使用して、ヒト被験体または非ヒト被験体において、癌および腫瘍、感染疾患、ならびにアレルギー／喘息を処置し得る。癌は、コンパニオンアニマル（例えば、ネコおよびイヌ）における主要な死因のうちの1つである。

20

【0136】

先天免疫は外来抗原に対して宿主を部分的に保護するために発達したので、（例えば、外来病原体）、本発明の方法は、外来病原体に接触する危険にある被験体を処置するいくつかの例において適切である。このような主題において、被験体は、その危険性が最大である場合（すなわち、アレルギーの季節の間、または癌を生じる因子に曝された後）、標準の規定に基いてTLRリガンドおよび免疫刺激複合体を投与され得る。さらに、TLRリガンドおよび免疫刺激複合体は、感染性因子に対する曝露の危険のある外国へと旅行する前の旅行者に投与され得る。同様に、TLRリガンドおよび免疫刺激複合体は、生物兵器に対する曝露の危険のある兵士または市民に投与され得る。

30

【0137】

本明細書中で使用される場合、危険がある被験体は、感染、癌またはアレルギーを発症する通常よりも高い危険を有する被験体である。

【0138】

感染を発症する危険がある被験体は、特定の型の感染因子が流行している地域に旅行することを計画している被験体であり得るか、またはそのような被験体は、生活もしくは医療的手順を介して感染性生物体を含み得る体液に曝され得るかもしくはその生物体に直接曝され得るか、またはさらに感染性生物体が確認されている地域に住む任意の被験体でもある。感染を発症する危険にある被験体はまた、医療機関が特定の微生物抗原を用いたワクチン接種を推奨する一般的な集団を含む。

40

【0139】

感染を有する被験体は、感染性病原体に曝されており、そして体内で病原体の急性検出レベルまたは慢性検出レベルを有する被験体である。本明細書中で使用される場合、感染性疾患は、体内で外来微生物の存在から生じる疾患である。病原体の侵入の主要な部位である、生体の粘膜表面を保護するのに有効な先天免疫ストラテジーおよび処置を開発することが、特に重要である。

【0140】

感染性疾患は、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染、寄生虫感染、またはミコバクテリ

50

ア感染であり得るが、この疾患はそのように限定されない。これらの例は、本明細書中に列挙され、そして以下に追加される。

【0141】

細菌感染は、以下であり得るがこれらに限定されない：*Actinomycetes*感染、炭疽菌感染、*Bacterioides*感染、*Borrelia*感染、*Campylobacter*感染、*Citrobacter*感染、*Clostridium difficile*感染、*Corynebacterium*感染、*E. coli*感染、*Enterobacter*感染、*Gardnerella*感染、*Haemophilus*感染、*H. pylori*感染、*Klebsiella*感染、*Legionella*感染、*Listeria*感染、*Neisseria*感染、*Nocardia*感染、*Pasteurella*感染、*Pneumococcus*感染、*Proteus*感染、*Pseudomonas*感染、*Salmonella*感染、*Shigella*感染、*Spirillum*感染、*Spirochaeta*感染、*Staphylococcal*感染、*Streptobacillus*感染、*Streptococcal*感染、および*Treponema*感染。
10

【0142】

グラム陽性細菌としては、*Staphylococci*種、および*Streptococcus*種が挙げられるが、これらに限定されない。グラム陰性細菌としては、*Escherichia coli*、*Pseudomonas*種、および*Salmonella*種が挙げられるが、これらに限定されない。感染性細菌の特定の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：*Helicobacter pylons*、*Borrelia burgdorferi*、*Legionella pneumophila*、*Mycobacteria*種(例えば、*M. tuberculosis*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. kansaii*、*M. gordonae*)、*Staphylococcus aureus*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Listeria monocytogenes*、*Streptococcus pyogenes*(A群の*Streptococcus*)、*Streptococcus agalactiae*(B群の*Streptococcus*)、*Streptococcus viridans*群)、*Streptococcus faecalis*、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus*(嫌気性種)、*Streptococcus pneumoniae*、病原性*Campylobacter*種、*Enterococcus*種、*Haemophilus influenzae*、*Bacillus antracis*、*Corynebacterium diphtheriae*、*corynebacterium*種、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Enterobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pasturella multocida*、*Bacteroides*種、*Fusobacterium nucleatum*、*Streptobacillus moniliformis*、*Treponema pallidum*、*Treponema pertenue*、*Leptospira*、*Rickettsia*、および*Actinomycetes israelii*。
20
30
40

【0143】

ウイルス感染は、アデノウイルス感染、レトロウイルス感染、ロタウイルス感染などであり得るが、これらに限定されない。このウイルス感染は、以下であり得るが、これらに限定されない：サイトメガロウイルス感染、エプルタインバーウイルス感染、A型肝炎ウイルス感染、B型肝炎ウイルス感染、C型肝炎ウイルス感染、C型肝炎ウイルス感染、1型単純疱疹ウイルス感染、2型単純疱疹ウイルス感染、HIV感染、ヒトパピローマウイルス感染、インフルエンザA型ウイルス感染、サル痘感染、呼吸器合胞体ウイルス感染、SARS感染、痘瘡感染、水痘-帯状疱疹ウイルス感染。いくつかの実施形態において、感染性疾患は、慢性的なウイルス感染のような慢性的な感染である。例としては、肝炎ウ
50

イルス感染、ヒトパピローマウイルス感染、HIV感染、および単純疱疹ウイルス感染が挙げられる。

【0144】

ヒトに見出されているウイルスの分類としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：Retroviridae（例えば、ヒト免疫不全ウイルス、例えばHIV-I（また、HDTV-IIII、LAVEもしくはHTLV-III/LAV、またはHIV-IIとされる）および他の単離物（例えば、HIV-LP）；Picornaviridae（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；Caliciviridae（例えば、胃腸炎を引き起こす株）；Togaviridae（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；Flaviviridae（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；Coronoviridae（例えば、コロナウイルス）；Rhabdoviridae（例えば、水痘口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；Filoviridae（例えば、エボラウイルス）；Paramyxoviridae（例えば、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）；Orthomyxoviridae（例えば、インフルエンザウイルス）；Bunyaviridae（例えば、ハンターンウイルス、ブンヤウイルス（bungavirus）、フレボウイルスおよびナイロウイルス）；Arenaviridae（出血熱ウイルス）；Reoviridae（例えば、レオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス）；Birnaviridae；Hepadnaviridae（B型肝炎ウイルス）；Parvoviridae（パルボウイルス）；Papovaviridae（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；Adenoviridae（大部分のアデノウイルス）；Herpesviridae（単純疱疹ウイルス（HSV）1型および2型、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス；Poxviridae（痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、痘ウイルス）；およびIridoviridae（例えば、アフリカブタ熱ウイルス）；および未分類のウイルス（例えば、デルタ型肝炎の因子（B型肝炎ウイルスの欠損性サテライトであると考えられる）、非A型非B型肝炎の因子（クラス1=内部で伝染される；クラス2=非経口で伝染される（すなわち、C型肝炎）；ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス）。

10

20

30

40

【0145】

真菌感染は、以下であり得るがこれらに限定されない：アルペルギルス症、プラストミセス症、カンジダ症、クロモミコーシス、クリプトコックス症（cryptococcosis）、ヒストプラスマ症、菌腫感染、パラコクシジオイドミコーシス、シュードアレシエリア症、白癬、およびでん風感染。

【0146】

真菌の例としては、Cryptococcus neoformans、Histoplasma capsulatum、Coccidioides immitis、Blastomyces dermatitidis、Chlamydia trachomatis、およびCandida albicansが挙げられる。

【0147】

マイコバクテリア感染は、M. tuberculosisおよびM. lepraeであり得るが、これらに限定されない。

【0148】

寄生生物感染は、エキノコックス属感染、肝蛭症、膜様条虫属の感染、リーシュマニア症、オンコセルカ症、アメリカ鉤虫属感染、神経囊虫症（neurocysticercosis）、肺吸虫症、プラスモディウム感染、ニューモシスティス感染、住血吸虫症、テニア感染、臍トリコモナス感染、ヒト鞭虫感染、トリパノソーマ感染およびクルーズトリパノソーマ感染。

【0149】

50

寄生生物としては、以下が挙げられる：Plasmodium種（例えば、Plasmodium falciparum、Plasmodium malariae、Plasmodium ovale、およびPlasmodium vivaxおよびToxoplasma gondii）。血中に保持される（Blood-borne）および/または組織寄生虫としては、以下が挙げられる：Plasmodium種、Babesia microti、Babesia divergens、Leishmania tropica、Leishmania種、Leishmania braziliensis、Leishmania donovani、Trypanosoma gambienseおよびTrypanosoma rhodesiense（アフリカ睡眠病）、Trypanosoma cruzi（シャーガス病）、ならびにToxoplasma gondii。

10

【0150】

他の医学的に関係する微生物は、文献に広範に記載されており、例えば、C. G. A. Thomas, Medical Microbiology, Baillière Tindall, Great Britain 1983（この内容全体が本明細中に参考として援用される）を参照のこと。

20

【0151】

アレルギーおよび喘息を発症する危険がある被験体は、遺伝的要因または環境的要因に起因して、アレルギーまたは喘息を有するとして同定得されている患者であるが、オリゴヌクレオチド処理の間には活発な疾患を有さず、そしてこれらの疾患を発症するに危険にあるとはみなされない患者である。被験体が、例えば花粉の季節の間にアレルゲンに曝され得る場合、その被験体はアレルゲンに対する曝露の危険にある。

20

【0152】

アレルギーを有する被験体は、アレルゲンに応答してアレルギー性反応を有するかまたは発症する危険にある。アレルギーは、物質（アレルギー性物質）の対する後天性の過敏症をいう。アレルギー状態としては、湿疹、アレルギー性鼻炎またはコリーザ、枯草熱、結膜炎、気管支喘息、じんま疹、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が、これらに限定されない。

30

【0153】

癌を発症する危険がある被験体は、癌を発症することについて通常よりも高い危険を有する（すなわち、一般集団より高い可能性を有する）。これらの被験体は、例えば、遺伝子の異常（この異常の存在は、癌を発症することについて通常よりも高い可能性と相関関係を有すると実証された）を有する被験体、および癌誘発因子（例えば、タバコ、アスベストまたは他の化学毒物）に曝された被験体、または癌に対して以前に処置されて見かけ上寛解している被験体、が挙げられる。

30

【0154】

癌を有する被験体は、検出可能な癌性細胞を有する被験体である。免疫刺激性オリゴヌクレオチド、特に非メチル化CpG免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、免疫刺激複合体と一緒に投与される場合、腫瘍を有する被験体において先天免疫を誘導することを示している。この誘導された先天免疫は、そのような被験体において、腫瘍体積を低減するのに十分であり、そして生存率を向上させるのに十分であった。オリゴヌクレオチドおよび複合体の皮下投与は、腹腔内投与と比較して、そのような応答をよりよく誘導することが明らかであった。少なくとも1つの抗癌剤とのさらなる組み合わせは、腫瘍体積の低減においてより良好な結果を提供するようであり、そして生存率を向上させたが、統計学的に有意なレベルではなかった。

40

【0155】

癌は、癌腫または肉腫であり得るが、これらに限定されない。例えば、癌は、基底細胞癌腫、胆管癌、膀胱癌、骨の癌、脳の癌、乳癌、子宮頸癌、緘毛癌、CNS癌、結腸癌および直腸癌、結合組織の癌、消化系の癌、子宮内膜癌、食道癌、腎臓癌、咽頭癌、白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髓性白血病、慢性リンパ急性白血病、慢性骨髓性白血病、

50

皮膚 T 細胞性白血病、濾胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、黒色腫、骨髓腫、多発性骨髓腫、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、呼吸系の癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、皮膚癌、扁平細胞癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、泌尿器系の癌および子宮癌であり得る。

【0156】

本発明はまた、非ヒト被験体における癌および腫瘍を処置するために使用され得る。癌は、コンパニオンアニマル（例えば、ネコおよびイヌ）における主要な死因の1つである。癌は通常、屋内ペットの場合、家族に参入されるようになった高齢の動物を襲う。10歳より高齢のイヌのうち45%は、疾患に屈する可能性がある。最も一般的な処置の選択肢としては、外科手術、化学療法および放射線療法が挙げられる。いくらか首尾よく使用された他の処置様式は、レーザ療法、冷凍手術、温熱療法および免疫療法である。処置の選択は、癌の種類および蔓延の程度に依存する。悪性腫瘍が生体中で離散的な領域に限定されない場合、この悪性腫瘍は、正常細胞に影響を及ぼすことなく悪性組織のみを除去するのが困難である。

10

【0157】

イヌおよびネコにおいて共通に診断される悪性障害としては、以下が挙げられるがこれらに限られない：リンパ肉腫、骨肉腫、乳腺腫瘍、肥満細胞腫、脳腫瘍、黒色腫、腺扁平上皮癌、カルチノイド肺腫瘍、気管支腺腫瘍、肺胞細胞癌、線維腫、粘液軟骨腫、肺肉腫、神経肉腫、骨腫、乳頭腫、網膜芽細胞腫、ユーイング肉腫、ウィルムの腫瘍、バーキットリンパ腫、小神経膠細胞腫、神経芽細胞腫、骨巨細胞腫、口内の新生物、線維肉腫、骨肉腫および横紋筋肉腫。イヌにおける他の新生物としては、以下が挙げられる：生殖扁平上皮癌、性交伝播性（transmissible venereal）の腫瘍、精巣腫瘍、精上皮腫、セルトーリ細胞腫、血管周囲細胞腫、組織球腫（histiocytoma）、緑色腫（顆粒球性肉腫）、角膜乳頭腫、角膜扁平上皮癌、血管肉腫、胸膜の中皮腫、基底細胞腫瘍、胸腺腫、胃腫瘍、副腎癌、口内の乳頭腫症、血管内皮腫および囊腺腫。ネコにおいて診断されるさらなる悪性物としては、濾胞性リンパ腫、腸のリンパ肉腫、線維肉腫および肺扁平上皮癌が挙げられる。以前より高い人気の住宅ペットであるフェレットは、インスリノーマ、リンパ腫、肉腫、神経腫、膀胱島細胞腫瘍、胃 MALT リンパ腫および胃腺癌を発症することが公知である。

20

【0158】

30

農業家畜に影響する新生物としては、白血病、血管外皮細胞腫およびウシ眼新形成（牛において）；包皮の線維肉腫、潰瘍性の扁平上皮細胞癌、包皮の癌、結合組織新生物、および肥満細胞腫（ウマにおいて）；肝細胞癌（ブタにおいて）；リンパ腫および肺腺腫症（ヒツジにおいて）；肺肉腫、リンパ腫、ラウス肉腫、網状内皮症、纖維肉腫、腎芽細胞腫、B細胞リンパ腫およびリンパ球系の白血病（鳥類の種において）、網膜芽細胞腫、肝臓の新生物、リンパ肉腫（リンパ芽球性リンパ腫）、形質細胞腫（plasmacytoid）白血病および浮袋肉腫（魚において）、チーズ様の lymphadenitis（CLL）：細菌の *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* により引き起こされる、ヒツジおよびヤギの慢性、伝染性、接触感染性の疾患、ならびにおよび *jaagsiekte* により引き起こされるヒツジの接触感染性の肺腫瘍。

40

【0159】

プリオン疾患は、異常に高次構造で存在する、正常なタンパク質の集合により引き起こされると考えられる、多くの致命的な神経変性疾患を含む。正常なプリオンタンパク質は、通常、多くの組織（特に、神経組織）の細胞膜に存在する。異常に高次形成（conformation）されたプリオンタンパク質は、通常、正常に高次形成されたプリオンタンパク質をより多くの異常に高次形成されたプリオンタンパク質に変換することに直接関係していると考えられている。次いで、凝集物へと自己組織化して、この凝集物はニューロンの組織解剖および機能に損傷を与える。

【0160】

50

プリオントン疾患の少なくともいくつかは伝播性である。しかしながら、細菌、ウイルス、真菌、寄生虫および他の複製性病原体とは異なり、伝播性プリオントンは単なるタンパク質である；これらは、核酸を全くともなくことなしに伝播性である。まだ完全には理解されていない理由のため、異常に高次形成されたプリオントンタンパク質は一般に、免疫応答を惹起しない。従って、異常に高次形成されたプリオントンタンパク質に対して健常な個体を曝露することは、プリオントン疾患を開始させ得、これは免疫系によって妨げられずに進行する。

【0161】

本発明の処方物はプリオントン疾患の処置において有用であり、この疾患としては、クロイツフェルト-ヤコブ病（CJD）、牛海綿状脳症（BSE）およびスクレーピが挙げられる。CJDは、医原性のCJD（iCJD）、変異型CJD（vCJD）または散発的CJD（sCJD）であり得る。処方物はまた、異常タンパク質の沈着物または凝集を含んでいる他の神経疾患の処置に有用である。このような疾患としては、アミロイドの沈着を含むアルツハイマー病が挙げられる。アミロイド斑の主要成分は、アミロイド-ペプチド（Aβ）であり、これは細胞外に蓄積して、ニューロンの死を引き起こす原線維の40～42アミノ酸のペプチドである。さらに、プリオントン疾患、その危険にある被験体、および以前に疾患を有する被験体の診断に対する参考は、公開されたPCT出願WO2004/007743（これは2004年1月22日に公開された）に見い出され得る。この全体の内容は、本願明細書においてその全部が引用される。

10

【0162】

被験体は、他の治療薬またはレジメンを施され得る。例として、抗菌剤、抗癌剤、抗アレルギー剤および抗喘息剤が挙げられる。これらの他の薬剤は、本発明のTLRリガンド/複合体調製物と一緒に処方され得るか、または別々に処方され得る。

20

【0163】

抗微生物剤とは、本明細書中で使用される場合、感染性微生物を殺傷または阻害し得る、天然に存在する化合物または合成化合物をいう。本発明に従う有用な抗微生物剤の型は、被験体が感染している微生物型、または被験体が感染される危険にある微生物型に依存する。抗微生物剤としては、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生生物剤、および抗マイコバクテリア剤が挙げられるが、これらに限られない。語句「抗感染剤」、「抗細菌剤」、「抗ウイルス剤」、「抗真菌剤」、「抗寄生生物剤」、「駆虫剤」および「抗マイコバクテリア薬剤」は、当業者に意味を確立しており、標準的な医学テキストにおいて定義される。

30

【0164】

抗細菌剤は、細菌を殺すかまたは阻害し、そして抗生物質、および類似の機能を有する他の合成化合物または天然の化合物が挙げられる。抗生物質は、細胞（例えば、微生物）による二次代謝産物として生じる低分子量の分子である。一般に、抗生物質は、微生物に特有であって宿主細胞には存在しない、一つ以上の細菌の機能または構造を妨げる。抗ウイルス剤は、天然の供給源から単離され得るか、または合成され得、そしてウイルスを殺すかまたは阻害するのに有用である。抗真菌剤は、表面的な真菌感染、ならびに日和見の真菌感染および主要な全身性真菌感染を処置するために使用される。抗寄生虫剤は、寄生虫を殺すかまたは阻害する。抗マイコバクテリア剤は、マイコバクテリアを殺すかまたは阻害する。

40

【0165】

抗細菌剤は、細菌の増殖または機能を殺すかまたは阻害する。抗菌剤の巨大なクラスは抗生物質である。抗生物質（これは、広範囲にわたる細菌を殺すかまたは阻害するために効果的である）は、広域抗生物質といわれる。他の型の抗生物質は、グラム陽性菌クラスまたはグラム陰性菌クラスに対して主に効果的である。この型の抗生物質は、狭域抗生物質といわれる。単一の生物体または疾患に対して効果的であり、他の型の細菌に対して効果的でない他の抗生物質は、限定範囲の抗生物質といわれる。抗菌剤は時々、それらの主要な作用様式に基づいて分類される。一般に、抗菌剤は、細胞壁合成インヒビター、細胞膜インヒビター、タンパク合成インヒビター、核酸合成インヒビターまたは機能性インヒ

50

ビター、および競合インヒビターである。

【0166】

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妨げる化合物である。抗菌薬物よりもずっと少ない抗ウイルス薬物が存在する。なぜなら、ウイルス複製のプロセスが宿主細胞内のDNA複製と非常に密接に関連があり、非特異的な抗ウイルス剤はしばしば宿主に有毒であるからである。抗ウイルス剤によってブロックされ得るかまたは阻害され得る、ウイルス感染プロセス内にいくつかの段階が存在する。これらの段階としては、宿主細胞へのウイルスの接着（免疫グロブリンまたは結合ペプチド）、ウイルスの脱被覆（uncloathing）（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またはウイルsDNAの複製（例えば、ヌクレオチドアナログ）、新規ウイルスタンパク質の成熟（例えば、プロテアーゼインヒビター）、ならびにウイルスの出芽および解放、が挙げられる。

【0167】

ヌクレオチドアナログである抗ウイルス剤としては、アシクロビル（単純疱疹ウイルスおよび水痘・帯状疱疹ウイルスの処置のために使用される）、ガンシクロビル（サイトメガロウイルスの処置に有用である）、イドクスウリジン、リバビリン（呼吸器合胞体ウイルスの処置に有用である）、ジデオキシイノシン、ジデオキシシチジン、ジドブジン（アジドチミジン）、イミキモド（imiquimod）およびレスイミキモド（resimiquimod）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0168】

本発明において有用な抗ウイルス剤としては、免疫グロブリン、アマンタジン、インターフェロン、ヌクレオチドアナログ、およびプロテアーゼインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。抗ウイルス剤の具体例としては、以下が挙げられるがこれらに限られない：アセマンナン；アシクロビル；アシクロビルナトリウム；アデフォビル；アロブジン（Allovudine）；アルビルセプトシュードトックス（Alvircept Sudotox）；塩酸アマンタジン；アラノチン；アリルドン；メシル酸アテビリジン（Atevirdine Mesylate）；アブリジン；シドホビル；シパンフィリン（Cipamfylline）；塩酸シタラビン；メシル酸デラビリジン（Delavirdine Mesylate）；デスシクロビル；ジダノシン；ジソキサリル；エドクスジン；エンピラデン；エンピロキシム；ファムシクロビル；塩酸ファモチン；フィアシタビン；フィアルウリジン；ホサリラート；ホスカルネットナトリウム；フォスフォネットナトリウム；ガンシクロビル；ガンシクロビルナトリウム；イドクスウリジン；ケトキサール；ラミブジン；ロブカルビル（lobucavir）；塩酸メモチン；メチサゾン；ネビラビン；ベンシクロビル；ピロダビル（Pirodavir）；リバビリン；塩酸リマンタジン；メシル酸サキナビル；塩酸ソマンタジン；ソリブジン；スタトロン；スタブジン；塩酸チロロン；トリフルリジン；塩酸バラシクロビル；ビダラビン；リン酸ビダラビン；ビダラビンリン酸ナトリウム；ビロキシム；ザルシタビン（Zalcitabine）；ジドブジン；ならびにジンビロキシム。

【0169】

抗真菌剤は、感染性真菌の処置および予防に有用である。抗真菌剤は時々、それらの作用機構により分類される。いくつかの抗真菌剤は、グルコースシントーゼを阻害することによって、細胞壁インヒビターとして機能する。これらとしては、限定はされないが、バシウンジン（basungin）/ECBが挙げられる。他の抗真菌剤は、膜の完全性を不安定にすることによって機能する。これらとしては、イミダゾール（例えば、クロトリマゾール）、セルタコナゾール、フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ミコナゾールおよびボリコナコール（voriconazole）ならびにFK463、アンフォテリシンB、BAY38-9502、MK991、プラディマイシン、UK292、ブテナフィンおよびテルビナフィンが挙げられるが、これらに限定されない。他の抗真菌剤は、キチンを壊すこと（例えば、キチナーゼ）または免疫抑制（501クリーム）によって機能する。

10

20

30

40

50

【0170】

駆虫薬ともいわれ、ヒトの投与に有用な抗寄生生物剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アルベンダゾール、アンフォテリシンB、ベンズニダゾール、ピチオノール、クロロキンH C 1、リン酸クロロキン、クリンダマイシン、デヒドロエメチン、ジエチルカルバマジン、フロン酸ジロキサンド、エフロルニチン、フラゾリドン (furazolidone)、グルココルチコイド、ハロファントリン、ヨードキノール、イベルメクチン、メベンダゾール、メフロキン、アンチモン酸メグルミン (meglumine antimoniate)、メラルソプロール、メトリホナート、メトロニダゾール、ニクロサミド、ニフルチモックス、オキサムニキン、パロモマイシン、ペニタミジンイセチオネット、ピペラジン、プラジカンテル、リン酸プリマキン、プログアニル、パモ酸ピランテル、ピリメタミン (pyrimethamine) - スルホンアミド、ピリメタミン (pyrimethamine) - スルファドキシン、キナクリンH C 1、硫酸キニーネ、キニジングルコン酸、スピラマイシン、スチボグルコネートナトリウム (グルコン酸ナトリウムアンチモン)、スラミン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、チアベンダゾール、チニダゾール、トリメトプリム (trimethoprim) - スルファメトキサゾール、およびトリパルサミド。これらのうちのいくつかは、単独または他のものと組み合わせて使用される。

【0171】

処方物はまた、抗癌剤と組み合わせて投与され得る。抗癌剤は、癌を処置する目的のために被験体に投与される薬剤であって、好ましくは特に増殖している細胞に対して細胞傷害性である。本明細書の目的のため、抗癌剤は、化学療法剤、免疫療法剤、ホルモン療法および生体応答調節剤として分類される。

【0172】

化学療法剤は、以下からなる群より選択され得る：メトレキセート、ビンクリスチン、アドリアマイシン、シスプラチン、糖を含まないクロロエチルニトロソウレア、5 - フルオロウラシル、マイトマイシンC、ブレオマイシン、ドキソルビシン、ダカルバジン、タキソール、フラジリン (fraglyline)、メグラミン (Meglamine) GLA、バルルビシン (valrubicin)、カルムスチン (carmustaine) およびポリフェルポサン (polifermposan)、MMI 270、BAY 12 - 9566、RASファルネシル (famesyl) トランスフェラーゼインヒビター、ファルネシル (famesyl) トランスフェラーゼインヒビター、MMMP、MTA / LY 231514、LY 264618 / ロメテキソール (Lometexol)、グラモレク (Glamolec)、CI - 994、TNP - 470、Hycamtin / トポテカン、PKC 412、Valspodar / PSC 833、ノバントロン / ミトキサトロン、Metaret / スラミン、バチマstatt (Batumastat)、E 7070、BCH - 4556、CS - 682、9 - AC、AG 3340、AG 3433、インセル (Incel) / VX - 710、VX - 853、ZD 0101、ISI 641、ODN 698、TA 2516 / マーミスタット (Marmistat)、BB 2516 / マーミスタット、CDP 845、D 2163、PD 183805、DX 8951f、レモナール (Lemonal) DP 2202、FK 317、ビシバニール / OK - 432、AD 32 / バルルビシン (Valrubicin)、Metastron / ストロンチウム誘導体、Temodal / テモゾロミド、Evacet / リポソームドキソルビシン、Yewtaxan / パクリタキセル、タキソール / パクリタキセル、Xeloda / カペシタビン (Capcitabine)、Furtulon / ドキシフルリジン、シクロパックス (Cyclophax) / 経口パクリタキセル、経口タキソイド (Oral Taxoid)、SPU - 077 / シスプラチン、HMR 1275 / フラボピリドール (Flavopiridol)、CP - 358 (774) / EGFR、CP - 609 (754) / RASオンコジーンインヒビター、BMS - 18275 I / 経口プラチナ、UFT (テガフル / ユラシル)、Ergamisol / レバミゾール、Eniluracil / 776C85 / 5FUエンハンサー、Campto / レバミゾール、Camptosar / イリノテカン

10

20

30

40

50

、Tumodex / ラリトレキセド (Ralitrexed) 、Leustatin / クラドリビン (Cladribine) 、Paxex / パクリタキセル、Doxil / リポソームドキソルビシン、Caelyx / リポソームドキソルビシン、Fludara / フルダラビン、Pharmarubicin / エピルビシン、Depocyt、ZD1839、LU79553 / ビス - ナフタルイミド (Naphthalimide) 、LU103793 / ドラスタチン (Dolastain) 、Caetyx / リポソームドキソルビシン、Gemzar / ゲムシタピン、ZD0473 / アノーメド (Anormed) 、YM116、ヨウ素種 (Iodine seeds) 、CDK4インヒビターおよびCDK2インヒビター、PARPインヒビター、D4809 / デキシフォサミド (Dexifosamide) 、Ifes / Mesnex / イホスファミド、Vumon / テニポシド、Paraplatin / カルボプラチン、Plantinol / シスプラチン、Vepeside / エトポシド、ZD9331、タキソテール / ドセタキセル (Docetaxel) 、グアニニアラビノシドのプロドラッグ、タキサンのアナログ (Taxane Analog) 、ニトロソ尿素、アルキル化剤 (例えば、メルファラン (melphelan) およびシクロホスファミド) 、アミノグルテミド、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クロランブシル (Chlorambucil) 、シタラピンHC1、ダクチノマイシン、ダウノルビシンHC1、エストラムスチンリン酸塩ナトリウム、エトポシド (VP16-213) 、フロクスウリジン、フルオロウラシル (5-FU) 、フルタミド、ヒドロキシ尿素 (ヒドロキシカルバミド) 、イフオスファミド、インターフェロン - 2a、インターフェロン - 2b、酢酸ロイプロリド (LHRH - 放出因子アナログ) 、ロムスチン (CCNU) 、メクロレタミンHC1 (ナイトロジエンマスター) 、メルカプトプリン、メスナ、ミトタン (o. p' - DDD) 、ミトキサントロンHC1、オクトレオチド、プリカマイシン、プロカルバジンHC1、ストレプトゾシン、クエン酸タモキシフェン、チオグアニン、チオテパ、硫酸ビンプラスチン、アムサクリン (m-AMSA) 、アザシチジン、エリスロポエチン (Erythropoietin) 、ヘキサメチルメラミン (HMM) 、インターロイキン2、ミトグアゾン (メチル - GAG ; メチルグリオキサールビス - グアニルヒドラゾン ; MGBG) 、ペントスタチン (2' デオキシコフォマイシン (deoxycoformycin)) 、セムスチン (メチル - CCNU) 、テニポシド (VM-26) 、ならびに硫酸ビンデシン。

【0173】

癌抗原に対する抗体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない : RituxanTM 、HerceptinTM 、Quadramet 、Panorex 、IDE-C-Y2B8 、BEC2 、C225 、Qnco1ym 、SMART M195 、ATRAGEN 、Ovarex 、Bexxar 、LDP-03 、ior t6 、MPX-210 、MDX-11 、MDX-22 、OV103 、3622W94 、抗VEGF 、Zenapax 、MDX-220 、MDX-447 、MELIMMUNE-2 、MELIMMUNE-1 、CEACIDE 、Pretarget 、NovoMAb-G2 、TNT 、Glioma b-H 、GNI-250 、EMD-72000 、Lymphocide 、CMA 676 、Monopharm-C 、4B5 、ior egf.r3 、ior c5 、BABS 、抗FLK-2 、MDX-260 、ANA Ab 、SMART ID10 Ab 、SMART ABL 364 Ab 、およびImmurait-CEA。

【0174】

抗喘息剤 / 抗アレルギー剤は、PDE-4インヒビター、Bronchodilator / -2アゴニスト、K+チャネルオーブナー、VLA-4アンタゴニスト、ニューロキニン (Neurokinin) アンタゴニスト、TX A2合成インヒビター、キサンチン (Xanthanine) 、アラキドン酸アンタゴニスト、5リポキシゲナーゼ活性化タンパク質 (5-lipox activation protein) のインヒビター、トロンボキサン (Thromboxin) A2レセプターアンタゴニスト、トロンボキサンA2アンタゴニスト、5リポキシゲナーゼ活性化タンパク質のインヒビター、およびプロテアーゼからなる群より選択され得るが、これらに限定されない。いくつかの重要な実

10

20

30

40

50

施形態において、喘息／アレルギーの医薬は、Bronchodilator / - 2 アゴニストであり、これは、サルメテロール、サルブタモール、テルブタリン、D 2 5 2 2 / フォルモテロール、フェノテロールおよびオルシプレナリンからなる群より選択される。

【0175】

抗喘息／アレルギー剤はまた、抗ヒスタミン剤およびプロスタグランジン誘導因子であり得る。一実施形態において、抗ヒスタミン剤は、ロラチジン (loratadine) 、セトリジン (cetirizine) 、ブクリジン、セトリジンアナログ、フェキソフェナジン (fexofenadine) 、テルフェナジン、デスローラタジン (desloratadine) 、ノルアステミゾール、エピナスチン、エバスチン、エバスチン、アステミゾール、レボカバスチン、アゼラスチン、トラニラスト、テルフェナジン、ミゾラスチン (mizolastine) 、ベータタスチン (betaastine) 、CS 5 6 0 およびHSR 6 0 9 からなる群から選択される。他の実施形態において、プロスタグランジン誘導因子はS - 5 7 5 1 である。

10

【0176】

抗喘息／アレルギー剤はまた、ステロイドおよび免疫調節因子であり得る。免疫調節因子は、抗炎症薬、ロイコトリエンアンタゴニスト、IL - 4 突然変異タンパク質、可溶性IL - 4 レセプター、免疫抑制剤、抗IL - 4 抗体、IL - 4 アンタゴニスト、抗IL - 5 抗体、可溶性IL - 13 レセプター - Fc 融合タンパク、抗IL - 9 抗体、CCR3 アンタゴニスト、CCR5 アンタゴニスト、VLA - 4 インヒビターおよび免疫グロブリンEのダウンレギュレーターからなる群より選択され得るが、これらに限定されない。一実施形態において、免疫グロブリンEのダウンレギュレーターは、抗免疫グロブリンEである。ステロイドは、ベクロメタゾン、フルチカゾン、トラムシノロン (tramcino lone) 、ブデソニドおよびブデソニドでもよい。

20

【0177】

サイトカインまたはB - 7 副刺激分子 (Bueler およびMulligan, 1996; Chowら, 1997; Geisslerら, 1997; Iwasakiら, 1997; Kimら, 1997; Iwasakiら, 1997; Tsujiiら, 1997) はまた、TLRリガンド／複合体の処方物と一緒にまたは別々かのいずれかで、処置されるべき被験体に投与され得る。用語サイトカインが、ナノモル濃度～ピコモル濃度で体液性調節因子として作用し、かつ正常状態または病理学的状態のいずれかの下でこの細胞または組織の機能活性を調節する、可溶性タンパク質および可溶性ペプチドの多様な群に対する一般名として使用される。これらのタンパク質はまた、細胞の間の直接的な相互作用を媒介し、そして細胞外の環境において起こるプロセスを調節する。サイトカインの例としては、例えば、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 10、IL - 12、IL - 15、IL - 18、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF) 、顆粒球コロニー刺激因子 (G - CSF) 、IFN - 、腫瘍壊死因子 (TNF) 、TGF - 、FLT - 3 リガンドおよびCD40 リガンドが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0178】

本発明の薬剤は、他の治療剤および／またはレジメンによって、同時にかまたは連続して投与され得る。他の治療剤が本発明の薬剤と実質的に同時に投与される場合、それら治療剤は、同じ処方物または別々の処方物（但し、実質的に同じ時間（すなわち、一般的には、互いの数分以内、または当業者がそれら2つの物質を投与するのにかかる時間以内）に投与される）において投与され得る。他の治療剤が本発明の薬剤と共に順次投与される場合、他の治療剤およびこれらの薬剤の投与は、時間的に分離される。これら化合物の投与間の時間の分離は、数分、数時間、数日またはそれより長くあり得る。

40

【0179】

組成物またはその成分の有効量という用語は、所望の生物学的効果を実現するのに必要である量またはそれに十分な量をいう。例えば、先天免疫応答を誘発するためのTLRリ

50

ガンド / 複合体処方物の有効量は、NK細胞を活性化すること、本明細書中に開示される先天免疫サイトカインのうちの1つの産生および / または分泌を刺激すること、あるいは最終的にいくつかの臨床的变化（例えば、腫瘍体積の減少または腫瘍を有する被験体の生存率の上昇）を明示することに必要な量である。

【0180】

本明細書中に提供される教示と組み合わせて、さまざまな活性化合物の中から選択すること、および要因（例えば、力価、相対的バイオアベイラビリティー、患者の体重、不利な副作用の重篤度および好ましい投与形態）に重みをつけることによって、実質的な毒性を生じずに特定の被験体を処置するのにまだ完全に効果的である、有効な予防的または治療的な処置レジメンが計画され得る。特定用途に対する有効量は、処置される疾患または状態の型、投与される特定のオリゴヌクレオチド、投与される免疫刺激複合体の用量、被験体のサイズ、またはその疾患もしくは状態の重篤度のような要因に依存して、変化し得る。当業者は、特定のTLRリガンド / 複合体処方物および / または他の治療薬の有効量を、過度の実験を必要とすることなく経験的に決めることができる。

10

【0181】

本明細書中に記載されている化合物の目的用量は、代表的に、投与あたり約0.1μg ~ 10mgの範囲であり、これは、用途に依存して、毎日、毎週、またはその間の任意の他の時間量で投与され得る。さらに代表的には、容量は、数日または数週間の間隔をあけた2~4回の投与で、投与あたり約1μg ~ 10mgの範囲であり、さらにより代表的には、投与あたり約10μg ~ 5mgの範囲であり、さらにより代表的には10μg ~ 1mgの範囲であり、そして最も代表的には約100μg ~ 1mgの範囲である。

20

【0182】

本発明のいくつかの局面において、一方または両方の薬剤の最適以下のレベルが用いられ得る。本明細書で使用される場合、薬剤の最適以下のレベルは、単独で使われる（または本発明の協同するパートナーが少なくともなしである）場合に、最大の治療利益を生じないが、協同するパートナーと組み合せて使用される場合に最大に生じる治療利益を生じる量である。治療剤の最適以下の用量を使用する能力は有用である。なぜなら、このことは、それが治療剤のあらゆる潜在的副作用の低減を可能にするからである。

【0183】

第2の治療剤が本発明のTLRリガンド / 複合体処方物と一緒に使われる場合、その第2の治療剤の最適以下のレベルのみが必要とされ得る。このことは、多くの理由のために同様に有用であり、その理由としては、その第2の治療剤と関連した副作用を減らすことが挙げられるがこれに限定されない。本明細書で使用する場合、第2の治療剤とは、本明細書中に記載されているような、抗細菌剤、抗癌剤、抗喘息 / アレルギー剤（など）をいう。

30

【0184】

本明細書中に記載されるあらゆる化合物について、治療上有効な量は、まず最初に動物モデルから決定され得る。治療上有効な用量はまた、ヒト（ヒトの臨床試験が開始されている）において個々に試験された、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび複合体に対するヒトのデータから決定され得る。適用用量は、投与された化合物の相対的なバイオアベイラビリティーおよび力価に基づいて調整され得る。上記の方法および他の方法に基づいて最大の有効性を達成するように用量を調節することは、当該分野で公知であり、当業者の能力の範囲内である。

40

【0185】

本発明の組成物は、適切な溶液または薬学的に受容可能な溶液において投与され得、次に、この溶液は、塩、緩衝剤、防腐剤、適合性のキャリア、および必要に応じて他の治療成分の薬学的に受容可能な濃度を含み得る。

【0186】

TLRリガンド / 複合体処方物は、任意の投与様式によって被験体に投与され得る。好適な投与経路としては、非経口投与（例えば、筋肉内および皮下）が挙げられるがこれら

50

に限られない。いくつかの実施形態において、T L R リガンド / 複合体処方物は、粘膜経路（例えば、口、鼻、吸入、直腸、腔など）を介して投与され得る。

【 0 1 8 7 】

経口投与のため、化合物は、活性化合物と、当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせることによって、容易に処方され得る。このようなキャリアは、本発明の化合物が、処置されるべき被験体による経口摂取のために、錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁物などとして処方されることを可能にする。経口的使用のための薬学的調製物は、固体の賦形剤が、必要に応じて得られた混合物を粉碎し、そして所望の場合には適切な助剤を加えた後にこの顆粒混合物を処理して錠剤または糖衣錠コアを得る場合に、得られ得る。適切な賦形剤は、特に、充填剤（例えば糖であって、ラクトース、ショ糖、マンニトールまたはソルビトールが挙げられる）；セルロース調製物（例えば、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロースおよび / またはポリビニルピロリドン（P V P）、である。所望される場合、崩壊剤が添加されてもよく、この崩壊剤は例えば、架橋したポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（例えば、アルギン酸ナトリウム）である。必要に応じて、経口処方物は、体内の酸性条件を中和するために、生理食塩水中または緩衝液（すなわち、E D T A）中に処方されてもよいし、または任意のキャリアなしで投与されてもよい。

【 0 1 8 8 】

上記成分の経口投与形態もまた具体的に企図される。これらの成分は、誘導体の口内送達が有効であるように、化学的に改変され得る。一般的に、企図される化学的改変は、その成分の分子自体に対して少なくとも一つの部分を結合することあり、ここで、上記部分は、（a）タンパク質分解の阻害、および / または（b）胃もしくは腸からの血流への取り込み、を可能にする。成分の全体的な安定性の増加および生体中での循環時間の増加もまた所望される。このような部分の例としては、ポリエチレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ならびにポリプロリンが挙げられる。A b u c h o w s k i および D a v i s , 1 9 8 1 , 「 S o l u b l e P o l y m e r - E n z y m e A d d u c t s 」 : E n z y m e s a s D r u g s , H o c e n b e r g および R o b e r t s 編, W i l e y - I n t e r s c i e n c e , N e w Y o r k , N Y , p p . 3 6 7 - 3 8 3 ; N e w m a r k ら, 1 9 8 2 , J . A p p l . B i o c h e m . 4 : 1 8 5 - 1 8 9 。使用され得る他のポリマーは、ポリ - 1 , 3 - ジオキソランおよびポリ - 1 , 3 , 6 - チオキソカン（t i o x o c a n e ）である。上記のように、ポリエチレングリコール部分は、薬学的使用に好まれる。

【 0 1 8 9 】

放出位置は、胃、小腸（十二指腸、空腸または回腸）または大腸でもよい。当業者は、胃において溶解しない処方物が利用可能であるが、十二指腸または腸の他の場所で材料を放出する。好ましくは、この放出は、オリゴヌクレオチドの保護、または胃環境を越える（例えば腸において）の生物学的活性材料の放出のいずれかによって、胃環境の有害作用を回避する。

【 0 1 9 0 】

胃での完全な抵抗を確実にするため、少なくともp H 5 . 0 に対して非透過性のコーティングが重要である。腸溶性コーティングとして使われる、より一般的な不活性成分の例は、酢酸トリメリット酸セルロース（C A T）、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート（H P M C P）、H P M C P 5 0 、H P M C P 5 5 、ポリビニル酢酸フタレート（P V A P）、E u d r a g i t L 3 0 D 、A q u a t e r i c 、セルロース酢酸フタレート（C A P）、E u d r a g i t L 、E u d r a g i t S および S h e l l a c である。これらのコーティングは、混合膜として使用され得る。

【 0 1 9 1 】

10

20

30

40

50

コーティングまたはコーティング混合物は、錠剤上に使用され得、それは胃からの保護を目的としない。これには、糖コーティングまたは嚥下するのがより容易な錠剤を作製するコーティングが挙げられる。カプセルは、乾燥治療物（すなわち粉末）の送達のための硬質シェル（例えば、ゼラチン）を含み得る；液体形態のために、軟質ゼラチンシェルが使用され得る。カシェ剤のシェル材料は、厚いデンプンまたは他の食用の紙であり得る。丸剤、ロゼンジ、成形錠剤または錠剤粉碎物（tablet triturate）のため、湿式の集合化技術が使用され得る。

【0192】

治療物は、約1mmの粒子サイズの顆粒またはペレットの形態での、微細な複数の粒子として処方物に含まれ得る。カプセル投与のための材料の処方物はまた、粉末、軽く圧縮したプラグ、またはさらに錠剤としてのものであり得る。治療物は、圧縮により調製され得る。

10

【0193】

着色剤および矯味矯臭剤は、全て含まれ得る。例えば、処方物は、食用の製品（例えば、着色剤および香料を含んでいる冷蔵された飲料）の中に含まれ得る。

【0194】

不活性材料を用いて治療物の容量を希釈または増加させ得る。これらの希釈物としては、炭水化物、特にマンニトール、α-ラクトース、無水ラクトース、セルロース、ショ糖、改変デキストランおよびデンプンが挙げられ得る。特定の無機塩もまた充填剤として使用され得、これらには、カルシウム三リン酸、炭酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムが挙げられる。いくつかの市販の希釈剤は、Fast-Flow、Emdex、STA-Rx 1500、EmcompressおよびAvicel 11である。

20

【0195】

崩壊剤は、固体投与形態としての処方物に含まれ得る。崩壊剤として使用する材料としては、デンプン粉が挙げられるが、これに限定されず、そのデンプンとしては、デンプンベースの商用の崩壊剤であるExplobが挙げられる。グリコール酸ナトリウムデンプン、アンバーライト、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ウルトラミロベクチン（ultramylopectin）、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジの皮、酸性カルボキシメチルセルロース、天然のスponジ、およびベントナイトが全て使用され得る。崩壊剤の他の形は、不溶性カチオン交換樹脂である。粉末状のゴムは、崩壊剤および結合剤として使用され得る。そしてこれらには、寒天、カラヤまたはトラガカンタのような粉末状のゴムが挙げられ得る。アルギン酸およびそのナトリウム塩もまた崩壊剤として有用である。

30

【0196】

結合剤は治療薬を一緒に保持して硬質の錠剤を形成するために使用され得、そしてこの結合剤としては、アカシア、トラガカンタ、デンプンおよびゼラチンのような天然産物由来の材料が挙げられる。他には、メチルセルロース（MC）、エチルセルロース（EC）、およびカルボキシメチルセルロース（CMC）が挙げられる。ポリビニルピロリドン（PVP）およびヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）の両方は、治療物を顆粒化するためにアルコール溶液中で使用され得る。

40

【0197】

抗摩擦剤は、処方プロセスの間に粘着を防止するために、処方物中に含まれ得る。滑沢剤は、治療物とダイの壁との間の層として使用され得、そしてこれらには、以下が挙げられるが、これに限定されない：ステアリン酸（そのマグネシウム塩およびカルシウム塩が挙げられる）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、流動パラフィン、植物油、およびワックス。可溶性の滑沢剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、さまざまな分子量のポリエチレングリコール、Carbowax 4000およびCarbowax 6000）もまた使用され得る。

【0198】

処方物の流動特性を改善し得、そして圧縮の間に再配置を助け得る流動剤（glida

50

nt) が添加され得る。流動剤としては、デンプン、タルク、熱分解シリカおよび水和したケイ素アルミニ酸が挙げられる。

【0199】

水性環境中への治療物の溶解を補助するため、表面活性剤が湿润剤として加えられ得る。表面活性剤は、ラウリル硫酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウムおよびジオクチルスルфон酸ナトリウムのような陰イオン性界面活性剤が挙げられ得る。カチオン性界面活性剤が使用され得、それこれには、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウム (benzethonium) が挙げられる。表面活性剤として処方物中に含まれ得る潜在的な非イオン性界面活性剤のリストは、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン水素化ヒマシ油10、50および60、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート40、60、65および80、ショ糖脂肪酸エステル、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロース、である。これらの表面活性剤は、単独でかまたは異なる比率の混合として、処方物中に存在し得る。

10

【0200】

経口投与に使用され得る薬学的調製物は、ゼラチンから作製される押し込みばめカプセル、ならびにゼラチンおよび可塑剤（例えば、グリセロールまたはソルビトール）から作製される密封性軟カプセルが挙げられる。この押し込みばめカプセルは、充填剤（例えば、ラクトース）、結合剤（例えば、デンプン）および/または滑沢剤（例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウム）、ならびに必要に応じて安定剤を有する混合物中に、活性成分を含有し得る。軟質カプセルにおいて、活性化合物は、好適な液体（例えば、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコール）中に溶解され得るかまたは懸濁され得る。さらに、安定剤が加えられてもよい。経口投与のために処方されるミクロスフィアもまた使用され得る。このようなミクロスフィアは、当該分野で周知である。経口投与のための全ての処方物は、このような投与に適している投与量であるべきである。

20

【0201】

頸内投与のため、処方物は、従来の様式で処方される錠剤またはロゼンジの形態をとり得る。

【0202】

吸入による投与のため、処方物は、適切な推進剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガス）を使用して、加圧パックまたは噴霧器からエアゾールスプレーを提供する形態で都合よく送達され得る。加圧式エアロゾールの場合、投与量単位は、計量された量を送達するためのバルブを備えることにより決定され得る。吸入器または注入器に使用するためのカプセルとカートリッジ（例えば、ゼラチン）は、本化合物と適切な粉剤ベース（例えば、ラクトースまたはデンプン）との粉剤混合物を収容して処方され得る。

30

【0203】

処方物は、吸入の間に哺乳動物の肺に送達され得、そして肺上皮の裏打ち (lining) を横切って血流へと横断する。吸入される分子の他の報告としては、以下が挙げられる：Adjeiら, 1990, Pharmaceutical Research, 7: 565-569; Adjeiら, 1990, International Journal of Pharmaceutics, 63: 135-144 (酢酸ロイプロリド); Braquetら, 1989, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13 (追補5): 143-146 (エンドセリン-1); Hubbardら, 1989, Annals of Internal Medicine, 第III卷, 206-212頁 (a1-アンチトリプシン); Smithら, 1989, J. Clin. Invest. 84: 1145-1146 (a-1-プロテイナーゼ); Qsweinら, 1990, 'Aerosolization of Proteins', Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (組換えヒト成長ホルモン); Debsら, 1988, J. Immunol. 1

40

50

40:3482-3488 (IFN- および腫瘍壊死因子)、およびPlatzら、米国特許第5,284,656号(顆粒球コロニー刺激因子)。全身効果のための薬物の肺送達に関する方法および組成物は、Wongらに対する米国特許第5,451,569号(1995年9月19日発行)に記載される。

【0204】

本発明の実施における使用のために、治療製品の肺送達のために設計された広範に種々の機械デバイスが企図される。このデバイスとしては、噴霧器、計量吸入器および粉末吸入器が挙げられるが、これらに限定されない。これらは全て、当業者になじみがある。

【0205】

本発明の実施に適した市販のデバイスのいくつかの具体例は、Ultaravent噴霧器(Mallinckrodt, Inc.、St. Louis, Missouriによって製造される); Acorn II噴霧器(Marquest Medical Products, Englewood, Coloradoにより製造される); Ventolin計量吸入器(Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolinaにより製造される); およびSpinhaler粉末吸入器(Fisons Corp., Bedford, Massachusettsにより製造される)である。

【0206】

本発明の医薬品組成物の鼻内送達もまた、企図される。鼻内配達は、肺における製品の堆積を必要とせずに、鼻に治療製品を投与した後に、直接血流中に本発明の医薬品組成物を通過させる。鼻内配達のための処方物としては、デキストランまたはシクロデキストランを含むものが挙げられる。

【0207】

鼻内投与のために、有用なデバイスは、メーター計量用噴霧器が取り付けられる、小さな硬質のボトルである。一実施形態において、このメーター計量された用量は、本発明の溶液の薬学的組成物を規定された容量のチャンバーに汲みいれることによって送達される。このチャンバーは、そのチャンバー中の液体が圧縮されたときに噴霧を形成することによって処方物をエアロゾル化するような寸法の開口部を有する。このチャンバーは、本発明の薬学的組成物を投与するために圧縮されている。特定の実施形態において、このチャンバーにはピストンが配置されている。このようなデバイスは、市販されている。

【0208】

あるいは、圧搾されるときに噴霧を形成することによって、エアロゾル処方物をエアロゾル化するような寸法の開口部または開口を有するプラスチック圧縮ボトルが、使用される。この開口は、通常、ボトルの頂部において存在し、この頂部は、エアロゾル処方物の効率的な投与のための鼻内通路に部分的に適合するように、ほぼテーパー状である。好ましくは、この鼻内吸入器は、メーター計量された薬物の投与のために、メーター計量された量のエアロゾル処方物を提供する。

【0209】

全身的に送達されるのが望ましい場合、化合物は、例えばボーラス注射または継続的点滴によって、注射による非経口投与のために処方され得る。注射用の処方物は、追加された保存剤とともに、単位投薬形態(例えば、アンプルまたは多用量容器)に存在し得る。この組成物は、油性または水性のビヒクル中で、懸濁液、溶液またはエマルジョンのような形態をとることができ、例えば懸濁剤、安定化剤および/または分散剤のような処方剤を含むことができる。

【0210】

非経口投与用の薬学的処方物は、水溶性形態で、活性化合物の水溶液を含む。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注射懸濁液として調製され得る。適した親油性溶媒またはビヒクルとしては、ゴマ油などの脂肪油、エチルオレエートまたはトリグリセライドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームが挙げられる。水性の注射懸濁液は、懸濁液の粘性を増加させる物質(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビト

10

20

30

40

50

ールまたはデキストラン)を含み得る。必要に応じて、この懸濁液は、高度に濃縮された溶液の調製を可能にするために、化合物の溶解性を増加させる適切な安定剤または因子を含み得る。

【0211】

あるいは、活性化合物は、適切なビヒクル(例えば、発熱性物質を含まない水)との構成のために、使用の前には粉末形態であり得る。

【0212】

上記化合物は、坐薬または保持浣腸のような直腸組成物または膣組成物(例えば、カカオ脂または他のグリセリドのような従来の坐剤基剤を含んでいる)において、処方され得る。

10

【0213】

上記薬学的組成物はまた、適した固相またはゲル相のキャリアまたは賦形剤も含み得る。そのようなキャリアまたは賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチンおよびポリエチレングリコールのようなポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0214】

適切な液体薬学的調製物または固体薬学的調製物の形態は、例えば、水性であるか、もしくは吸入用の生理食塩水溶液であるか、マイクロカプセル化されるか、渦巻形にされる(*encocchleated*)か、微視的な金粒子上にコーティングされるか、リボソーム中に含まれるか、噴霧化される(*nebulized*)か、エアロゾルであるか、皮膚への移植用のペレットであるか、または皮膚に掻き入れるために尖った物体(*sharp object*)上に乾燥される。

薬学的組成物としてはまた、顆粒、粉末、錠剤、コーティングされた錠剤、(マイクロ)カプセル、坐剤、シロップ、エマルション、懸濁液、クリーム、活性化合物の徐放のための点滴剤または調製物が挙げられ、これらの調製において、賦形剤ならびに添加剤および/または助剤(例えば、崩壊剤、結合剤、コーティング剤、膨張剤、滑沢剤、香料、甘味料、または安定剤)が、上に記載されるように、慣習的に使用される。薬学的組成物は、種々の薬物送達システムにおいて使用するのに適切である。薬物送達のための方法の簡単な概説については、*Langer, Science 249: 1527-1533, 1990*(これは、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

20

【0215】

処方物、および必要に応じて、他の治療剤は、それ自体で(そのままで)投与され得るか、または薬学的に受容可能な塩の形態で投与され得る。医薬において使用される場合、上記塩が、薬学的に受容可能であるべきであるが、薬学的に受容不可能な塩は、それらの薬学的に受容可能な塩を調製するために都合良く使用され得る。そのような塩としては、以下の酸から調製される塩が挙げられるが、これに限定されない:塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸。また、そのような塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩(例えば、上記カルボン酸群のナトリウム塩、カリウム塩、またはカルシウム塩)として調製され得る。

30

【0216】

適切な緩衝剤としては、以下が挙げられる:酢酸および塩(1~2% w/v);クエン酸および塩(1~3% w/v);ホウ酸および塩(0.5~2.5% w/v);ならびにリン酸および塩(0.8~2% w/v)。適切な保存料としては、以下が挙げられる:塩化ベンザルコニウム(0.003~0.03% w/v);クロロブタノール(0.3~0.9% w/v);パラベン(0.01~0.25% w/v)ならびにチメロサール(0.004~0.02% w/v)。

40

【0217】

処方物は、必要に応じて、薬学的に受容可能なキャリアを含む。用語「薬学的に受容可

50

能なキャリア」は、ヒトもしくは他の脊椎動物に投与するのに適した、1種以上の適合性の固体または液体のフィラー (filler)、希釈剤、あるいはカプセル化物質を意味する。用語「キャリア」は、活性成分が適用を容易にするために組み合わされる、天然もしくは合成の有機成分または無機成分を意味する。薬学的組成物の構成成分はまた、所望の薬学的有効性を実質的に損なう相互作用が存在しない様式で、本発明の化合物および互いに混合可能である。

【0218】

本発明は、以下の実施例によってさらに示され、この実施例は、さらなる限定として解釈されるべきではない。本願の全体にわたって列挙される全ての参考文献（文献の参考文献、発行された特許、公開された特許出願、および同時継続中の特許出願が挙げられる）の全内容は、参考として本明細書によって明白に援用される。

10

【実施例】

【0219】

以下の実施例は、実験的なマウス癌モデルにおいて、先天免疫を誘導するための免疫刺激複合体とTLRリガンドとの併用の治療的有用性を示す。

【0220】

免疫刺激性 C p G 7909 (TCG TCG TTT TGT CGT TTT G T C G T T ; 配列番号1) の抗腫瘍効果は、先に数種のマウス癌モデルを使用して示された。さらに、C p G 7909 は、いくつかの化学療法薬の抗腫瘍効果を増強することが示された。

20

【0221】

免疫刺激複合体は、アジュバント（特に、ワクチンの設定において）として機能し、そして送達ビヒクルおよびデポーエフェクター (depot effector) として機能する。免疫刺激複合体のデポー機能は、単剤療法（すなわち、非ワクチン処置）におけるTLRリガンドの使用に影響を与えるようである。

【0222】

（一般的な材料）

マウス：全ての実験を、6～8週齢の雌BALB/cマウスを使用し、1実験群または1コントロール群あたり10匹用いて実施した。

30

【0223】

オリゴヌクレオチド：全てのオリゴヌクレオチドを、Coley Pharmaceutical GmbH, Langenfeld, Germany から入手した。

【0224】

免疫刺激複合体：ISCOMATRIX（登録商標）アジュバント（本明細書中でIMXと称される）は、これらの実施例において使用した免疫刺激複合体であった。IMXを、本質的に、Moreinら、1998の方法による透析を使用して、実験室スケールにて調製した。簡単にいうと、800μlのリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）（pH 6.2）に対して、20% w/v Megal-10中の17mg/mlコレステロールおよび10mg/mlジパルミトイロホスファチジルコリン（DPPC）を含む溶液の100μlを添加し、次いでPBS（pH 6.2）中の32mg/ml ISCOPEP（登録商標）サポニン（CSL Limited, Parkville, Victoria, Australia）を添加した。この溶液を、穏やかに混合しながら25にて1時間保持し、次いでPBS（pH 6.2）に対して広範囲（extensively）に透析した。透析の間に、ISCOPEP（登録商標）サポニン、コレステロールおよびDPPCを含むIMXが、形成された。

40

【0225】

（実験1）

雌BALB/cマウス（1つの群あたりn=10）に、 2×10^5 個のRenca（腎臓癌）細胞を、SC注射によって左側腹部に注射した。C p G 7909単独、ISCOMATRIX（登録商標）（IMX）単独、またはC p G 7909とIMXとの組み合

50

わせを、腫瘍細胞注射の10日後～28日後に、腫瘍細胞の周辺に毎週、SC注射によって投与することで、動物を処置した。コントロール動物に、100μlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)を、腫瘍細胞注射の10日後～38日後に毎週注射した。動物を、生存(図1、パネルA)および腫瘍増殖(図1、パネルB)についてモニタリングした。腫瘍のサイズ(長さおよび幅)を、デジタル式のノギスを使用して測定した。腫瘍体積を、以下の式を使用して算出した：腫瘍体積 = (0.4)(ab²)、a = 大きな直径、b = より小さい直径。腫瘍体積のグラフ(図1、パネルB)において、平均腫瘍体積の変化を、各動物群において50%が死亡するまで示した。

【0226】

(実験2)

10

雌C57BL/6マウス(1つの群あたりn=10)に、2×10⁶個のLewis肺癌細胞を、0日目にSC注射によって注射した。CpG 7909単独、IMX単独、またはCpG 7909とIMXとの組み合わせを、1日目、3日目、7日目に腫瘍細胞の周辺に毎週、SC注射によって投与し、その後2ヶ月間にわたって、腫瘍細胞の周辺に毎週、SC注射によって投与することで、動物を処置した。動物を、生存(図2、パネルA)および腫瘍増殖(図2、パネルB)についてモニタリングした。腫瘍のサイズ(長さおよび幅)を、デジタル式のノギスを使用して測定した。腫瘍体積を、以下の式を使用して算出した：腫瘍体積 = (0.4)(ab²)、a = 大きな直径、b = より小さい直径。腫瘍体積のグラフ(図2、パネルB)において、平均腫瘍体積の変化を、各動物群の50%が死亡するまで示した。

20

【0227】

(実験3)

材料、動物群および処置スケジュールを、以下の表に記載する。

【0228】

【表1】

材料:

試薬	供給源, ロット番号	ストック濃度	最終濃度	LSP-CDN
Lewis 肺癌細胞	ATCC# CRL-1642	該当無し	2×10^7 個/ml	GL015
CPG 7909	ACZ-01D-006-M	20.64mg/ml	1mg/ml	GL006
Taxol	Bristol-Myers Squibb, 3A65544	6mg/ml	0.7308mg/ml	CA001, CA002
CSL ISCOMs (IMX)	525524F37	1.064mg/ml	0.05mg/ml	該当無し
PBS	Sigma, #P0261	該当無し	該当無し	該当無し

10

動物群 [C57Bl/6]:

Grp	サイズ	処置	経路	ODN 用量	IMX 用量	処置日	LLC 細胞
2016	10	PBS	SC	100μl		1, 3, 7日目および2ヶ月間にわたって毎週	2×10^6
2017	10	生理食塩水中の7909	SC	100μg		1, 3, 7日目および2ヶ月間にわたって毎週	2×10^6
2018	10	IMX中の7909	SC	100μg	5μg	1, 3, 7日目および2ヶ月間にわたって毎週	2×10^6
2019	10	IMXのみ	SC		5μg	1, 3, 7日目および2ヶ月間にわたって毎週	2×10^6
2020	10	Taxol	IP	36mg/kg		D7からD35まで毎週	2×10^6
2021	10	Taxol 生理食塩水中の79 09	IP SC	36mg/kg 100μg		D7からD35まで毎週 1, 3, 7日目および2ヶ月間にわたって毎週	2×10^6
2022	10	Taxol IMX中の7909	IP SC	36mg/kg 100μg	5μg	D7からD35まで毎週 1, 3, 7日目および2ヶ月間にわたって毎週	2×10^6
2023	10	IMX中の (Taxol + 7909)	IP(一緒に)	36mg/kg + 100μg	5μg	D7からD35まで毎週 (組み合わせて)	2×10^6
		IMX中の 7909	SC	100μg		1, 3, 42, 49, 56日目	

20

【0 2 2 9】

30

【表2】

処置スケジュール

日数	群の番号	処置	
0	2016-2023	細胞を注射した(SC)	
1	2016-19/2021-2023	CPG, プラセボ (SC)	
3	2016-19/2021-2023	CPG, プラセボ (SC)	
7	2016-19/2021-2022 2020-2023	CPG, プラセボ (SC) Taxol (IP)	10
14	2016-19/2021-2022 2020-2023	CPG, プラセボ (SC) Taxol (IP)	
21	2016-19/2021-2022 2020-2023	CPG, プラセボ (SC) Taxol (IP)	
28	2016-19/2021-2022 2020-2023	CPG, プラセボ (SC) Taxol (IP)	
35	2016-19/2021-2022 2020-2023	CPG, プラセボ (SC) Taxol (IP)	
42	2016-19/2021-2023	CPG, プラセボ (SC)	
49	2016-19/2021-2023	CPG, プラセボ (SC)	
56	2016-19/2021-2023	CPG, プラセボ (SC)	20

測定スケジュール： L L C は、速く増殖する腫瘍細胞株である。測定は、7日目から開始して、週に2回、火曜日および金曜日に行なわれる。

【0230】

結果を、図3および図4に示す。

【0231】

図3は、雌C57BL/6マウス(1つの群あたりn=10)に、 2×10^6 個のLewi s肺癌細胞を、0日目にSC注射によって注射した実験に対応する。動物を、単独のSC注射による、5μlのIMX、100μgのCPG 7909+/-5μg IMXおよび36mg/kgのTaxolとの組み合わせによって処置した。CPG 7909を、1日目、3日目、7日目に注射し、そして2ヶ月間にわたって毎週注射した。Taxolを、7日目から35日目まで、IPで毎週与えた。組み合わせた7909+IMX+Taxolを、7日目から35日目まで、IPで毎週与えたか、あるいは、7909+IMXをSCで、1日目、3日目、42日目、49日目、52日目に与えた。プラセボのコントロール動物は、SC注射によってPBS(100μl)を受容した。動物を、生存についてモニタリングした。

【0232】

腫瘍を有する被験体の生存に関して、CPG 7909およびTaxolは、各々を、単剤療法として使用した場合、同様の効果を有した(p=0.5)。CPG 7909とTaxolとの組み合わせは、いずれかの薬剤単独より、有効であり、これらの薬剤の間の協力効果を示した。そして、図2は、CPG 7909、IMXおよびTaxolが、一緒になったCPG 7909およびTaxolより、わずかに良好に作用したことを示したが、その相違(少なくともこれらの実験についての)は、統計学的に有意ではなかった。これらの結果は、最低限、免疫刺激複合体がCPGとTaxolとの組み合わせによって認められる相乗作用を妨げないことを示した。

【0233】

腫瘍増殖に関して、図4に示す通り、CPG 7909およびTaxolは、各々を、単剤療法として使用した場合、同様の効果を有した(p=0.27)。一緒になったCPG 7909およびTaxolは、いずれかの薬剤単独より、有効であった。さらに、C

10

20

30

40

50

p G 7909、Taxol および IMX は、Taxol と一緒にした場合の CpG 7909 より良好に、腫瘍増殖を制御した。従って、腫瘍増殖に関して、免疫刺激複合体は、CpG 7909 と Taxol との間の協力作用を増強した。

【0234】

(等価物)

以上に記載される明細書は、当業者が本発明を実施するのに十分であるとみなされる。本発明は、提供される実施例によって範囲を限定されるべきではない。なぜなら、この実施例は本発明の 1 つの局面の単なる説明として意図され、そして他の機能的に同等な実施形態が本発明の範囲内にあるからである。本明細書中に示されかつ記載される内容に加えて、本発明の種々の改変は、以上の記載から当業者にとって明らかになり、そして添付の特許請求の範囲内に収まる。本発明の利点および目的は、必ずしも本発明の各実施形態によって含まれない。

10

【図面の簡単な説明】

【0235】

図面は、本明細書中に開示される発明の例示するだけであり、その実施可能用件のためには必要とされない。

【図 1 A】図 1 A は、腎細胞癌モデルにおいて、IMX とともに処方された CpG 7909 を受容した動物に関して、時間の関数として生存パーセントを示すグラフである。

20

【図 1 B】図 1 B は、腎細胞癌モデルにおいて、IMX とともに処方された CpG 7909 を受容した動物に関して、時間の関数として腫瘍体積を示すグラフである。

【図 2 A】図 2 A は、NSCLC モデルにおいて、IMX とともに処方された CpG 7909 を受容した動物に関して、時間の関数として生存パーセントを示すグラフである。

20

【図 2 B】図 2 B は、NSCLC モデルにおいて、IMX とともに処方された CpG 7909 を受容した動物に関して、時間の関数として腫瘍体積を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、NSCLC モデルにおいて、タキソール (Taxol) と組み合わせた IMX とともに処方された CpG 7909 を受容した動物に関して、時間の関数として生存パーセントを示すグラフである。

【図 4】図 4 は、NSCLC モデルにおいて、タキソール (Taxol) と組み合わせた IMX とともに処方された CpG 7909 を受容した動物に関して、時間の関数として腫瘍体積を示すグラフである。

30

【図 1 A】

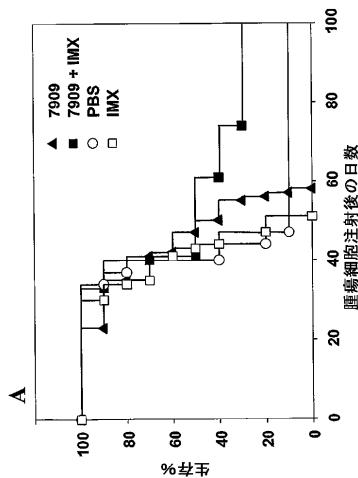


FIG. 1

【図 1 B】

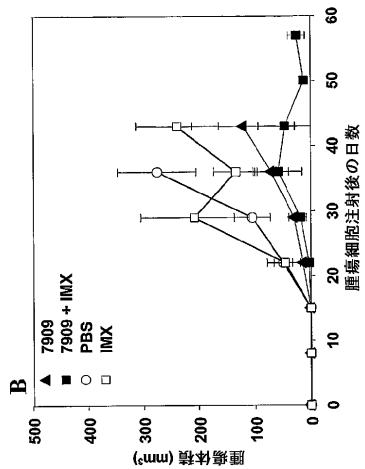


FIG. 1

【図 2 A】

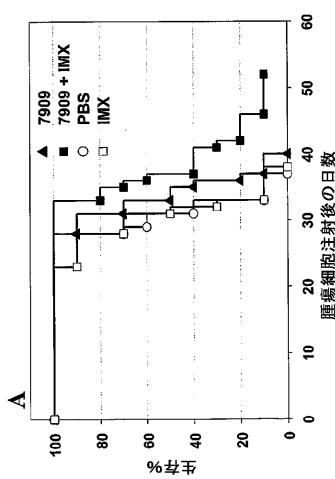


FIG. 2

【図 2 B】

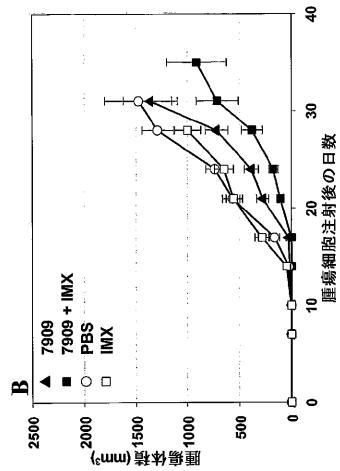
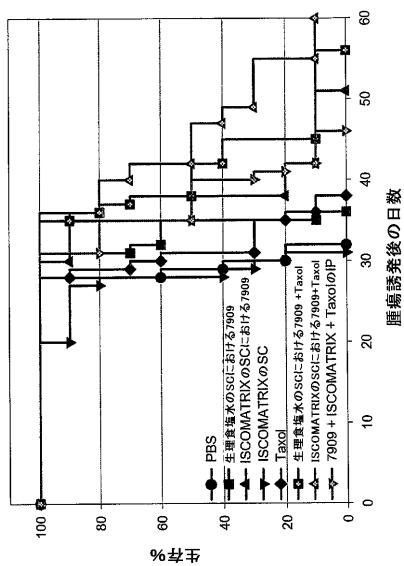


FIG. 2

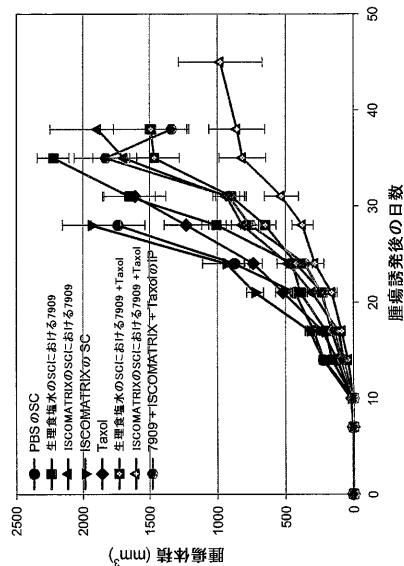
【図3】

FIG. 3



【図4】

FIG. 4



【配列表】

2008506683000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月26日(2007.7.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008506683000001.app

【国際調査報告】

60700360031



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/IB2005/004188

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K45/00 A61K31/7088 A61K31/337 A61P31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A61K A61P

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, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/62800 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; FRIEDE MARTIN [BE]; GARCON NATHALIE [B] 26 October 2000 (2000-10-26) abstract; sequence 4 example 5	53-74, 76-78, 82-90
A	—/—	75,79-81

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

 See patent family 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 doubt on priority (claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual compilation of the International search Date of mailing of the International search report

19 December 2006

28/12/2006

 Name and mailing address of the ISA/
 European Patent Office, P.O. 5018 Patentstaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vandenbogaerde, Ann

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

04. 6. 2007

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2005/004188

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WIEGEL B J ET AL: "CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 9, no. 8, 2003, pages 3105-3114, XP002990544 ISSN: 1078-0432 abstract page 3111, column 1, paragraph 2 page 3111, column 2, paragraph 1 page 3112, column 2, paragraph 1</p>	53-90

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2005/004188

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0062800	A2 26-10-2000	AT	276758 T	15-10-2004
		AU	764969 B2	04-09-2003
		AU	4114900 A	02-11-2000
		BR	0010612 A	13-02-2002
		CA	2370697 A1	26-10-2000
		CN	1372473 A	02-10-2002
		CZ	20013774 A3	13-03-2002
		DE	60014076 D1	28-10-2004
		DE	60014076 T2	13-10-2005
		EP	1187629 A2	20-03-2002
		ES	2228497 T3	16-04-2005
		HK	1044484 A1	29-07-2005
		HU	0200815 A2	28-08-2002
		JP	2002542203 T	10-12-2002
		NO	20015073 A	22-11-2001
		PL	351893 A1	30-06-2003
		PT	1187629 T	28-02-2005
		TR	200103018 T2	21-02-2002
		TW	232753 B	21-05-2005
		US	6544518 B1	08-04-2003

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 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	4 C 2 0 6
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 31/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/06	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 K 47/44 (2006.01)	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	
	A 6 1 K 39/395	N
	C 1 2 N 15/00	A

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

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 デービス, ヘザー エル.

カナダ国 ケ-0エ- 1ティ-0 オンタリオ, ダンロビン, バーロウ クレセント 30
90

(72) 発明者 マククラスキー, マイケル ジェイ.

カナダ国 ケ-1ケー 4ブイ3 オンタリオ, オタワ, カーウッド サークル 6

(72) 発明者 ドレーン, デブラ ピー.

オーストラリア国 3437, ブレンガロック, ムルカイ ロード 72

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA11 GA11 HA17

4C076 AA12 BB15 BB16 CC27 CC31 DD69A EE51A FF68
4C084 AA24 MA05 MA17 MA66 NA05 ZB262 ZB322 ZB332 ZB352 ZB372
4C085 AA13 AA14 BB36 CC03 EE01
4C086 AA01 AA02 BA02 BC43 DA32 EA17 HA12 HA28 MA02 MA05
MA17 MA66 NA05 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZB37
4C206 AA01 AA02 JB16 MA02 MA05 MA37 MA86 NA05 ZB26 ZB32
ZB33 ZB35 ZB37