

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4847609号

(P4847609)

(45) 発行日 平成23年12月28日(2011.12.28)

(24) 登録日 平成23年10月21日(2011.10.21)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/117 (2010.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A J

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/10 (2006.01)

A 6 1 K 9/10

A 6 1 K 9/107 (2006.01)

A 6 1 K 9/107

A 6 1 K 9/14 (2006.01)

A 6 1 K 9/14

請求項の数 13 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-520640 (P2010-520640)
 (86) (22) 出願日 平成20年8月8日(2008.8.8)
 (65) 公表番号 特表2010-536739 (P2010-536739A)
 (43) 公表日 平成22年12月2日(2010.12.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2008/002104
 (87) 国際公開番号 W02009/022216
 (87) 国際公開日 平成21年2月19日(2009.2.19)
 審査請求日 平成22年10月25日(2010.10.25)
 (31) 優先権主張番号 60/964, 448
 (32) 優先日 平成19年8月13日(2007.8.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 508092912
 コーリー ファーマシューティカル ゲー
 エムペーハー
 ドイツ国 4 0 2 2 5 ドゥッセルドルフ
 , メロウィングーブラッツ 1 エー.
 (74) 代理人 100096666
 弁理士 室伏 良信
 (74) 代理人 100131934
 弁理士 ▲高▼橋 宏次
 (74) 代理人 100137040
 弁理士 宮澤 純子
 (74) 代理人 100133927
 弁理士 四本 能尚
 (74) 代理人 100147186
 弁理士 佐藤 真紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的な免疫修飾プロフィールを誘発する規定されたヌクレオチド間結合との関連における R N
 A 配列モチーフ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記から選ばれる、一本鎖免疫刺激性ポリマー

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 3) ;

A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 1 7) ;

A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 2 2) ;

A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 2 3) ;

[ここで、“ - ”はホスホジエステル骨格を示す]

と、

リポソーム、ノイソーム、リポプレックス、ポリプレックス、リポポリプレックス、油
 中水型エマルジョン、水中油型エマルジョン、水-油-水型複合エマルジョン、マイクロエ
 マルジョン、ナノエマルジョン、ミセル、デンドリマー、ピロソーム、ウイルス様粒子、
 ポリマーナノ粒子、またはポリマーマイクロ粒子である送達媒体とを含み、リポフェクチ
 ン(登録商標)を含まない組成物。

【請求項 2】

一本鎖免疫刺激性ポリマーに結合していても良い抗原を含む、請求項1に記載の組成物

。

【請求項 3】

一本鎖免疫刺激性ポリマーが、ヒポキサンチン、イノシン、8 - オキソアデニン、ジヒ
 ドロウラシル、偽ウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - アミノウラシル、5

10

20

- ($C_1 \sim C_6$) - アルキルウラシル、5 - メチルウラシル、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルケニルウラシル、5 - ($C_2 \sim C_6$) アルキニルウラシル、5 - (ヒドロキシメチル)ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - ヒドロキシシトシン、5 - ($C_1 \sim C_6$) - アルキルシトシン、5 - メチルシトシン、5 - ($C_2 \sim C_6$) アルケニルシトシン、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルキニルシトシン、5 - クロロシトシン、5 - フルオロシトシン、5 - プロモシトシン、2 - アミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、2, 4 - ジアミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、8 - アザプリン、置換7 - デアザプリン、7 - デアザ - 7 - 置換プリン、7 - デアザ - 8 - 置換プリン、水素 (脱塩基残基)、およびそのあらゆる組み合わせからなる群から選択される修飾核酸塩基を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

一本鎖免疫刺激性ポリマーが、当該ポリマー中に存在する -C-U-C-A- モチーフの外側に少なくとも1つの修飾核酸塩基をさらに含み、前記修飾核酸塩基が、ヒポキサンチン、イノシン、8 - オキソアデニン、ジヒドロウラシル、偽ウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - アミノウラシル、5 - ($C_1 \sim C_6$) - アルキルウラシル、5 - メチルウラシル、5 - ($C_2 \sim C_6$) アルケニルウラシル、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルキニルウラシル、5 - (ヒドロキシメチル)ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - ヒドロキシシトシン、5 - ($C_1 \sim C_6$) - アルキルシトシン、5 - メチルシトシン、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルケニルシトシン、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルキニルシトシン、5 - クロロシトシン、5 - フルオロシトシン、5 - プロモシトシン、2 - アミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、2, 4 - ジアミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、8 - アザプリン、置換7 - デアザプリン、7 - デアザ - 7 - 置換プリン、7 - デアザ - 8 - 置換プリン、水素 (脱塩基残基)、およびそのあらゆる組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

一本鎖免疫刺激性ポリマーに共有結合している親油性部分をさらに含み、前記親油性部分が、コレステリル、パルミチル、および脂肪酸からなる群から選択されてもよい、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

一本鎖免疫刺激性ポリマーが、TLR7、TLR8およびTLR9アゴニストの少なくとも一つと結合している、請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

インターフェロン (IFN-) を産生することができる免疫細胞を、下記から選ばれる一本鎖免疫刺激性ポリマー

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号3);
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号17);
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号22);
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号23);

[ここで、“-”はホスホジエステル骨格を示す]

と接触させることを含む方法であって、前記一本鎖免疫刺激性ポリマーが治療上相当なIFN- の産生の誘発に効果的な量のリポフェクチン (登録商標) を用いては製造されない方法。

【請求項8】

免疫細胞が一本鎖免疫刺激性ポリマーに応答して相当量の腫瘍壊死因子 (TNF-)、インターフェロン (IFN-) およびインターロイキン12 (IL-12) のいずれか1つあるいはそれ以上を産生しない、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

下記から選ばれる一本鎖免疫刺激性ポリマー

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号3);
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号17);
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号22);

A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 23);

[ここで、“-”はホスホジエステル骨格を示す]

であって、前記一本鎖免疫刺激性ポリマーは、癌または感染性疾患の治療のために用いられ、前記治療は抗原を投与することを含んでも良く、前記抗原が前記一本鎖免疫刺激性ポリマーに結合していても良い、一本鎖免疫刺激性ポリマー。

【請求項10】

下記から選ばれる一本鎖免疫刺激性ポリマー

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 3);

A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 17);

A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 22);

A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 23);

[ここで、“-”はホスホジエステル骨格を示す]

であって、対象におけるTh1様免疫応答を誘発するために用いられる、一本鎖免疫刺激性ポリマー。

【請求項11】

下記から選ばれる一本鎖免疫刺激性ポリマー

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 3);

A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 17);

A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 22);

A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 23);

[ここで、“-”はホスホジエステル骨格を示す]

の、アレルギー症状、癌または感染性疾患の治療用医薬の製造における使用。

【請求項12】

下記から選ばれる一本鎖免疫刺激性ポリマー

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 3);

A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 17);

A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 22);

A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 23);

[ここで、“-”はホスホジエステル骨格を示す]

の、対象におけるTh1様免疫応答を誘発するための医薬の製造における使用。

【請求項13】

下記から選ばれる一本鎖免疫刺激性ポリマー

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 3);

A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 17);

A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 22);

A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G (配列番号 23);

[ここで、“-”はホスホジエステル骨格を示す]

であって、アレルギー症状の治療のために用いられ、前記治療は抗原を投与することを含んでも良く、前記抗原が前記一本鎖免疫刺激性ポリマーに結合していても良い、一本鎖免疫刺激性ポリマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国特許法第119条(e)項に基づき、2007年8月13日に出願された、「特異的な免疫調節プロフィールを誘発する規定されたヌクレオチド間結合との関連における配列モチーフ」という発明の名称の米国仮特許出願第60/964,448号に対する優先権を主張するものであり、この出願は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれるものである。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

トール様受容体 (TLR) は、病原体関連分子パターン (PAMP) を認識し、哺乳動物における自然免疫において重要な役割を有する、高度に保存されたパターン認識受容体 (PRR) ポリペプチドのファミリーである。現在、TLR1~TLR10と呼ばれる、少なくとも10個のファミリーメンバーが同定されている。様々なTLRの細胞質ドメインは、トールインターロイキン1受容体 (TIR) ドメインに特徴を有する。Medzhitov Rら(1998年) Mol Cell 2: 253~8頁を参照されたい。TLRによる微生物の侵入の認識により、ショウジョウバエ属 (*drosophila*) および哺乳動物において進化的に保存されているシグナル伝達カスケードの活性化が引き起こされる。TIRドメイン含有アダプタータンパク質であるMyD88は、TLRと関連すること、ならびにインターロイキン1受容体関連キナーゼ (IRAK) および腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体関連因子6 (TRAF6) をTLRに動員することが報告されている。MyD88依存性のシグナル伝達経路は、免疫活性化および炎症性サイトカインの産生における重要なステップである、NF- κ B転写因子およびc-Jun NH₂末端キナーゼ (Jnk) マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) の活性化をもたらすと考えられている。概説については、Aderem Aら(2000年) Nature 406: 782~87頁、およびAkira Sら(2004年) Nat Rev Immunol 4: 499~511頁を参照されたい。

10

【0003】

多くの特異的なTLRリガンドが同定されている。TLR2のリガンドには、ペプチドグリカンおよびリポペプチドが含まれる。Yoshimura Aら(1999年) J Immunol 163: 1~5頁、Yoshimura Aら(1999年) J Immunol 163: 1~5頁、Aliprantis AOら(1999年) Science 285: 736~9頁を参照されたい。リポポリ多糖 (LPS) はTLR4のリガンドである。Poltorak A(1998年) Science 282: 2085~8頁、Hoshino Kら(1999年) J Immunol 162: 3749~52頁を参照されたい。細菌フラジェリンはTLR5のリガンドである。Hayashi Fら(2001年) Nature 410: 1099~1103頁を参照されたい。ペプチドグリカンは、TLR2だけではなくTLR6のリガンドでもあることが報告されている。Ozinsky Aら(2000年) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 13766~71頁、Takeuchi Oら(2001年) Int Immunol 13: 933~40頁を参照されたい。最近、特定の低分子量の合成化合物である、イミダゾキノリンのイミキモド (R-837) およびレシキモド (R-848) が、TLR7およびTLR8のリガンドであることが報告された。Hemmi Hら(2002年) Nat Immunol 3: 196~200頁、Jurk Mら(2002年) Nat Immunol 3: 499頁を参照されたい。

20

30

【0004】

メチル化していない細菌DNAおよびその合成類似体 (CpG DNA) がTLR9のリガンドであることの発見に始まって (Hemmi Hら(2000年) Nature 408: 740~5頁、Bauer Sら(2001年) Proc Natl Acad Sci U S A 98: 9237~42頁)、特定のTLRのリガンドが特定の核酸分子を含むことが報告されている。最近、特定のタイプのRNAが、配列非依存性の様式または配列依存性の様式で免疫刺激性であることが報告されている。さらに、これらの様々な免疫刺激性RNAが、TLR3、TLR7、およびTLR8を刺激することが報告されている。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は全体として、特定の免疫刺激性配列モチーフを含む免疫刺激性ポリマー、および、このような免疫刺激性ポリマーを含む関連する免疫刺激性組成物、ならびにこのよう

50

な免疫刺激性ポリマーおよび組成物を使用するための方法に関するものである。本発明のいくつかの態様において、免疫刺激性ポリマーは、免疫刺激性オリゴリボヌクレオチド (ORN) である。本発明の免疫刺激性ポリマーは、免疫応答の刺激または増強を必要とするあらゆる状況または用途において有用であり得る。以下に開示されるように、本発明の免疫刺激性ポリマーは、感染、癌、アレルギー、および喘息を含む様々な症状の治療において用いるための、アジュバント、ワクチン、および他の薬剤を含む医薬組成物の調製において特に有用である。したがって、特定の態様における本発明は、本発明の免疫刺激性ポリマーを含む組成物、およびそれらの使用方法に関するものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

以下にさらに詳細に開示されるように、本発明の免疫刺激性ポリマーは、少なくとも1つの配列依存性の免疫刺激性モチーフ配列を含むことに特徴を有する。配列依存性の免疫刺激性モチーフ配列およびこのようなモチーフを包含しているポリマーは、TLR7関連サイトカインインターフェロン (IFN-) の強力な誘導因子であることが開示される。

【0007】

本発明の1つの態様は、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを含む組成物であり、このポリマーはモチーフ $rC - rU - rC - rA$ の外側にUを有せず、このポリマーはホスホジエステル骨格を含み、 N_1 および N_2 の少なくとも1つは A_7 ではなく、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ は GCU CAA ではない。1つの実施形態における組成物は、送達媒体をさらに含み、この送達媒体は、リボソーム、ノイソーム、リポプレックス、ポリプレックス、リポポリプレックス、油中水型 (W/O) エマルジョン、水中油型 (O/W) エマルジョン、水-油-水型 (W/O/W) 複合エマルジョン、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョン、ミセル、デンドリマー、ピロソーム、ウイルス様粒子、ポリマーナノ粒子 (ナノスフェアもしくはナノカプセルなど)、またはポリマーマイクロ粒子 (マイクロスフェアもしくはマイクロカプセルなど) であり、この組成物はリポフェクチンを含まない。1つの実施形態において、 N_1 は少なくとも1つのAを含む。別の実施形態において、 N_1 は少なくとも1つのCを含む。さらに別の実施形態において、 N_1 は少なくとも1つのGを含む。さらに別の実施形態において、 N_1 は少なくとも1つのTを含む。1つの実施形態において、 N_2 は少なくとも1つのAを含む。別の実施形態において、 N_2 は少なくとも1つのCを含む。さらに別の実施形態において、 N_2 は少なくとも1つのGを含む。さらに別の実施形態において、 N_2 は少なくとも1つのTを含む。

【0008】

本発明の別の態様は、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ (X_2 および X_3 は互いに独立に、存在しないか、またはC、G、およびAからなるヌクレオチド群から選択されるヌクレオチドならびにそのヌクレオチド類似体であり、 N_3 および N_4 は互いに独立に、存在しないか、または1つもしくは複数のヌクレオチドである) を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを含む組成物であり、このポリマーは、ホスホジエステル骨格を含み、2つの A_7 モチーフを含まず、 $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ は GCU CAA でも UUAUCGU AX₁CUCAC (配列番号34) (X_1 はAまたはCである) でもない。1つの実施形態における組成物は、送達媒体をさらに含み、この送達媒体は、リボソーム、ノイソーム、リポプレックス、ポリプレックス、リポポリプレックス、油中水型 (W/O) エマルジョン、水中油型 (O/W) エマルジョン、水-油-水型 (W/O/W) 複合エマルジョン、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョン、ミセル、デンドリマー、ピロソーム、ウイルス様粒子、ポリマーナノ粒子 (ナノスフェアもしくはナノカプセルなど)、またはポリマーマイクロ粒子 (マイクロスフェアもしくはマイクロカプセルなど) であり、この組成物はリポフェクチンを含まない。1つの実施形態において、 X_2 はAである。1つの実施形態において、 X_2 はCである。別の実施形態において、 X_2 はGである。1つの実施形

10

20

30

40

50

態において、 X_3 は A である。別の実施形態において、 X_3 は C である。別の実施形態において、 X_3 は G である。1つの実施形態において、 N_3 は少なくとも1つの A を含む。別の実施形態において、 N_3 は少なくとも1つの C を含む。さらに別の実施形態において、 N_3 は少なくとも1つの G を含む。さらに別の実施形態において、 N_3 は少なくとも1つの U を含む。1つの実施形態において、 N_4 は少なくとも1つの A を含む。別の実施形態において、 N_4 は少なくとも1つの C を含む。別の実施形態において、 N_4 は少なくとも1つの G を含む。別の実施形態において、 N_4 は少なくとも1つの U を含む。

【0009】

前述した組成物は、ポリマーに対してさらなる要素または修飾を含み得る。例えば、1つの実施形態において、組成物はさらに抗原を含む。1つの実施形態において、抗原はポリマーに結合している。1つの実施形態において、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ モチーフまたは $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ モチーフは、ヒポキサンチン、イノシン、8 - オキソアデニン、その 7 - 置換誘導体、ジヒドロウラシル、偽ウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - アミノウラシル、5 - ($C_1 \sim C_6$) - アルキルウラシル、5 - メチルウラシル、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルケニルウラシル、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルキニルウラシル、5 - (ヒドロキシメチル)ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - ヒドロキシシトシン、5 - ($C_1 \sim C_6$) - アルキルシトシン、5 - メチルシトシン、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルケニルシトシン、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルキニルシトシン、5 - クロロシトシン、5 - フルオロシトシン、5 - ブロモシトシン、2 - アミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、2, 4 - ジアミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、8 - アザプリン、置換 7 - デアザプリン、7 - デアザ - 7 - 置換プリン、7 - デアザ - 8 - 置換プリン、水素 (脱塩基残基)、およびそのあらゆる組合せからなる群から選択される修飾核酸塩基を含む。別の実施形態において、ポリマーは、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ モチーフまたは $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ モチーフの外側に、少なくとも1つの修飾核酸塩基を含み、この修飾核酸塩基は、ヒポキサンチン、イノシン、8 - オキソアデニン、その 7 - 置換誘導体、ジヒドロウラシル、偽ウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - アミノウラシル、5 - ($C_1 \sim C_6$) - アルキルウラシル、5 - メチルウラシル、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルケニルウラシル、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルキニルウラシル、5 - (ヒドロキシメチル)ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - ヒドロキシシトシン、5 - ($C_1 \sim C_6$) - アルキルシトシン、5 - メチルシトシン、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルケニルシトシン、5 - ($C_2 \sim C_6$) - アルキニルシトシン、5 - クロロシトシン、5 - フルオロシトシン、5 - ブロモシトシン、 N^2 - ジメチルグアニン、7 - デアザグアニン、8 - アザグアニン、7 - デアザ - 7 - 置換グアニン、7 - デアザ - 7 - ($C_2 \sim C_6$) - アルキニルグアニン、7 - デアザ - 8 - 置換グアニン、8 - ヒドロキシグアニン、6 - チオグアニン、8 - オキソグアニン、2 - アミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、2, 4 - ジアミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、8 - アザプリン、置換 7 - デアザプリン、7 - デアザ - 7 - 置換プリン、7 - デアザ - 8 - 置換プリン、水素 (脱塩基残基)、およびそのあらゆる組合せからなる群から選択される。別の実施形態において、ポリマーは、ポリマーに共有結合している親油性部分をさらに含む。1つの実施形態において、親油性部分は、コレステリル、パルミチル、および脂肪酸アシルからなる群から選択される。別の実施形態において、ポリマーは CpG モチーフを含まない。さらに別の実施形態において、ポリマーは CCGAGCCGAGCUCACCC (配列番号 35) を含まない。1つの実施形態において、ポリマーは 4 から 20 単位長である。別の実施形態において、ポリマーは 10 から 25 単位長である。別の実施形態において、ポリマーは 15 から 19 単位長である。1つの実施形態において、ポリマーのそれぞれの単位はリボヌクレオチドである。別の実施形態において、ポリマーの単位はリボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの混合物である。別の実施形態において、デオキシリボヌクレオチドは、ポリマーの 5' 末端に TCG モチーフを含む。さらに別の実施形態において、ポリマーの少

10

20

30

40

50

なくとも1つの単位はアミノ酸である。1つの実施形態において、ポリマーはTLR9アゴニストに結合している。1つの実施形態において、TLR9アゴニストは小分子である。別の実施形態において、ポリマーはTLR7アゴニストに結合している。さらに別の実施形態において、ポリマーはTLR8アゴニストに結合している。

【0010】

本発明の別の態様は、IFN- γ を産生することができる免疫細胞を、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーと接触させることを含む方法であり、このポリマーは、モチーフ $rC - rU - rC - rA$ の外側にUを有せず、このポリマーはホスホジエステル骨格を含み、 N_1 および N_2 の少なくとも1つは A_7 ではなく、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ はGCUCAAでもUUAUCGUAX₁CUCAC(配列番号34)(X₁はAまたはCである)でもなく、このポリマーは、治療上相当なIFN- γ の産生の誘発に効果的な量のリポフェクチンを用いては製剤されない。1つの実施形態において、ポリマーは、免疫刺激性モチーフの外側に少なくとも1つの安定化結合を含む。別の実施形態において、ポリマーは、免疫刺激性モチーフの外側に1~5個の安定化結合を含む。1つの実施形態において、1つまたは複数の安定化結合は、5'末端および/または3'末端にある。

【0011】

本発明の別の態様は、IFN- γ を産生することができる免疫細胞を、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ (X₂およびX₃は互いに独立に、存在しないか、またはC、G、およびAからなるヌクレオチド群から選択されるヌクレオチドならびにそのヌクレオチド類似体であり、 N_3 および N_4 は互いに独立に、存在しないか、または1つもしくは複数のヌクレオチドである)を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーと接触させることを含む方法であり、このポリマーは、ホスホジエステル骨格を含み、2つの A_7 モチーフを含まず、 $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ はGCUCAAでもUUAUCGUAX₁CUCAC(配列番号34)(X₁はAまたはCである)でもなく、このポリマーは、治療上相当なIFN- γ の産生の誘発に効果的な量のリポフェクチンを用いては製剤されない。

【0012】

1つの実施形態において、前述した方法によっては、ポリマーに応答して相当量の腫瘍壊死因子(TNF- α)、インターフェロン(IFN- γ)、またはインターロイキン12(IL-12)を産生する免疫細胞は得られない。いくつかの実施形態において、ポリマーは上記のあらゆる組成物の形態で投与される。

【0013】

本発明の別の態様は、喘息の治療に効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを、喘息を有する対象に投与することを含む、喘息を治療するための方法であり、このポリマーは、モチーフ $rC - rU - rC - rA$ の外側にUを有せず、このポリマーはホスホジエステル骨格を含み、 N_1 および N_2 の少なくとも1つは A_7 ではなく、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ はGCUCAAでもUUAUCGUAX₁CUCAC(配列番号34)(X₁はAまたはCである)でもない。

【0014】

本発明の別の態様は、喘息の治療に効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ (X₂およびX₃は互いに独立に、存在しないか、またはC、G、およびAからなるヌクレオチド群から選択されるヌクレオチドならびにそのヌクレオチド類似体であり、 N_3 および N_4 は互いに独立に、存在しないか、または1つもしくは複数のヌクレオチドである)を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを、喘息を有する対象に投与することを含む、喘息を治療するための方法であり、このポリマーは、ホスホジエステル骨格を含み、2つの A_7 モチーフを含まず、 $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ はGCUCAAでもUUAUCGUAX₁CUCAC(配列番号34)(X₁はAまたはCである)でもない。

10

20

30

40

50

【0015】

1つの実施形態において、喘息を治療するための上記の方法のいずれかは、アレルゲンを対象に投与することをさらに含み得る。1つの実施形態において、ポリマーはアレルゲンに結合している。いくつかの実施形態において、ポリマーは、上記のあらゆる組成物の形態で投与される。

【0016】

本発明の別の態様は、アレルギー症状の治療に効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを、アレルギー症状を有する対象に投与することを含む、アレルギー症状を治療するための方法であり、このポリマーはモチーフ $rC - rU - rC - rA$ の外側にUを有せず、このポリマーはホスホジエステル骨格を含み、 N_1 および N_2 の少なくとも1つは A_7 ではなく、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ は $GCUCAA$ でも $UUAUCGUAX_1CUCAC$ (配列番号34) (X_1 はAまたはCである) でもない。

10

【0017】

本発明の別の態様は、アレルギー症状の治療に効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ (X_2 および X_3 は互いに独立に、存在しないか、またはC、G、およびAからなるヌクレオチド群から選択されるヌクレオチドならびにそのヌクレオチド類似体であり、 N_3 および N_4 は互いに独立に、存在しないか、または1つもしくは複数のヌクレオチドである) を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを、アレルギー症状を有する対象に投与することを含む、アレルギー症状を治療するための方法であり、このポリマーは、ホスホジエステル骨格を含み、2つの A_7 モチーフを含まず、 $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ は $GCUCAA$ でも $UUAUCGUAX_1CUCAC$ (配列番号34) (X_1 はAまたはCである) でもない。

20

【0018】

1つの実施形態において、上記のアレルギー症状を治療するための方法のいずれかは、アレルゲンを対象に投与することをさらに含み得る。1つの実施形態において、ポリマーはアレルゲンに結合している。いくつかの実施形態において、ポリマーは、上記のあらゆる組成物の形態で投与される。

【0019】

本発明の別の態様は、癌の治療に効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを、癌を有する対象に投与することを含む、癌を治療するための方法であり、このポリマーは、モチーフ $rC - rU - rC - rA$ の外側にUを有せず、このポリマーはホスホジエステル骨格を含み、 N_1 および N_2 の少なくとも1つは A_7 ではなく、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ は $GCUCAA$ でも $UUAUCGUAX_1CUCAC$ (配列番号34) (X_1 はAまたはCである) でもない。

30

【0020】

本発明の別の態様は、癌の治療に効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ (X_2 および X_3 は互いに独立に、存在しないか、またはC、G、およびAからなるヌクレオチド群から選択されるヌクレオチドならびにそのヌクレオチド類似体であり、 N_3 および N_4 は互いに独立に、存在しないか、または1つもしくは複数のヌクレオチドである) を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを、癌を有する対象に投与することを含む、癌を治療するための方法であり、このポリマーは、ホスホジエステル骨格を含み、2つの A_7 モチーフを含まず、 $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ は $GCUCAA$ でも $UUAUCGUAX_1CUCAC$ (配列番号34) (X_1 はAまたはCである) でもない。

40

【0021】

1つの実施形態において、上記の癌を治療するための方法のいずれかは、癌抗原を対象に投与することをさらに含み得る。1つの実施形態において、ポリマーは抗原に結合して

50

いる。他の実施形態において、この方法は、第2の癌治療薬を対象に投与することをさらに含む。1つの実施形態において、癌治療薬は、カルボプラチン、パクリタキセル、シスプラチン、5-フルオロウラシル、ドキソルビシン、タキソール、およびゲムシタビンの1つまたは複数である。いくつかの実施形態において、ポリマーは、上記のあらゆる組成物の形態で投与される。

【0022】

本発明の別の態様は、感染性疾患の治療に効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを、感染性疾患を有する対象に投与することを含む、感染性疾患を治療するための方法であり、このポリマーは、モチーフ $rC - rU - rC - rA$ の外側にUを有せず、このポリマーはホスホジエステル骨格を含み、 N_1 および N_2 の少なくとも1つは A_7 ではなく、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ は $GCUCAA$ でも $UUAUCGUAX_1CUCAC$ (配列番号34) (X_1 はAまたはCである) でもない。

10

【0023】

本発明の別の態様は、感染性疾患の治療に効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ (X_2 および X_3 は互いに独立に、存在しないか、またはC、G、およびAからなるヌクレオチド群から選択されるヌクレオチドならびにそのヌクレオチド類似体であり、 N_3 および N_4 は互いに独立に、存在しないか、または1つもしくは複数のヌクレオチドである) を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを、感染性疾患を有する対象に投与することを含む、感染性疾患を治療するための方法であり、このポリマーは、ホスホジエステル骨格を含み、2つの A_7 モチーフを含まず、 $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ は $GCUCAA$ でも $UUAUCGUAX_1CUCAC$ (配列番号34) (X_1 はAまたはCである) でもない。

20

【0024】

1つの実施形態において、上記の感染性疾患を治療するための方法のいずれかは、微生物抗原を対象に投与することをさらに含み得る。1つの実施形態において、ポリマーは抗原に結合している。いくつかの実施形態において、ポリマーは、上記のあらゆる組成物の形態で投与される。

【0025】

本発明の別の態様は、効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを対象に投与することを含む、対象における1型ヘルパーT細胞 ($Th1$) 様免疫応答を誘発するための方法であり、このポリマーはモチーフ $rC - rU - rC - rA$ の外側にUを有せず、このポリマーはホスホジエステル骨格を含み、 N_1 および N_2 の少なくとも1つは A_7 ではなく、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ は $GCUCAA$ でも $UUAUCGUAX_1CUCAC$ (配列番号34) (X_1 はAまたはCである) でもない。

30

【0026】

本発明の別の態様は、効果的な量の、免疫刺激性RNAモチーフ $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ (X_2 および X_3 は互いに独立に、存在しないか、またはC、G、およびAからなるヌクレオチド群から選択されるヌクレオチドならびにそのヌクレオチド類似体であり、 N_3 および N_4 は互いに独立に、存在しないか、または1つもしくは複数のヌクレオチドである) を含む4から100単位長の一本鎖ポリマーを対象に投与することを含む、対象における1型ヘルパーT細胞 ($Th1$) 様免疫応答を誘発するための方法であり、このポリマーは、ホスホジエステル骨格を含み、2つの A_7 モチーフを含まず、 $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ は $GCUCAA$ でも $UUAUCGUAX_1CUCAC$ (配列番号34) (X_1 はAまたはCである) でもない。

40

【0027】

1つの実施形態において、上記の $Th1$ 様免疫応答を誘発するための方法のいずれかは

50

、抗原を対象に投与することをさらに含み得る。1つの実施形態において、ポリマーは抗原に結合している。いくつかの実施形態において、ポリマーは、上記のあらゆる組成物の形態で投与される。

【0028】

本発明の用途は、以下の記載において説明されているかまたは図面において説明されている構築物の詳細および構成要素の配置に限定されるものではない。本発明は、他の実施形態であり得、様々な方途で実施され得る。また、本明細書において用いられる表現および用語は、説明を目的としたものであり、限定するものであると考えられるべきではない。本明細書における「含む(including)」、「含む(comprising)」、または「有する」、「含む(containing)」、「伴う(involve)」、およびその変形の使用は、その後列挙される事項およびその同等物、ならびにさらなる事項を包含することを意味する。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】細胞をオリゴリボヌクレオチド(ORN)と接触させた後の、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)におけるIFN- γ の産生の誘発を示すグラフである。ORN(開始濃度: $2\mu\text{M} + 50\mu\text{g/ml}$ のDOTAP(N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルファート))を、ヒトPBMCと共にインキュベートし、上清を、IFN- γ について、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって24時間後にアッセイした。陽性対照(CCGUCUGUUGUGUGACUC、配列番号1)および4つの試験配列(配列番号2~5、表1を参照されたい)を示す。3人のドナーの平均 \pm SEMを示す。y軸は、 pg/ml 単位のIFN- γ の濃度を示し、x軸は、 μM 単位の \log ORN濃度を示す。

【図2】ORNによるIFN- γ (図2A)およびIL-12p40(図2B)の誘発を示す2つのグラフである。TLR7/8関連サイトカインの両方を誘発することが知られているORN(配列番号1)、およびTLR8関連サイトカインよりもTLR7関連サイトカインを誘発したORN(配列番号3)を示す。ヒトPBMCをDOTAPの存在下でORNと共にインキュベートし($2\mu\text{M}$ のORNおよび $50\mu\text{g/ml}$ のDOTAP)、上清を、IFN- γ およびIL-12p40について、ELISAによって24時間後にアッセイした。3人のドナーの平均 \pm SEMを示す。y軸は、 pg/ml 単位のIFN- γ (図2A)およびIL-12p40(図2B)の濃度であり、x軸は、 μM 単位の \log ORN濃度を示す。

【図3】細胞をオリゴリボヌクレオチド(ORN)と接触させた後の、ヒトPBMCにおけるIFN- γ の産生の誘発を示すグラフである。ORN(開始濃度: $2\mu\text{M} + 25\mu\text{g/ml}$ のDOTAP)をヒトPBMCと共にインキュベートし、上清を、IFN- γ について、24時間後にELISAによってアッセイした。配列番号3ならびにわずかな配列変異を有する4つのORN(配列番号6、7、11、および12、表2を参照されたい)を示す。3人のドナーの平均 \pm SEMを示す。y軸は、 pg/ml 単位のIFN- γ の濃度を示し、x軸は、 μM 単位の \log ORN濃度を示す。

【図4】ORNによるIFN- γ (図4A)およびIL-12p40(図4B)の誘発を示す2つのグラフである。配列番号3およびわずかな配列変異を有する3つの他のORN(配列番号8~10、表3を参照されたい)を示す。ヒトPBMCをDOTAPの存在下でORNと共にインキュベートし($2\mu\text{M}$ のORNおよび $25\mu\text{g/ml}$ のDOTAP)、上清を、IFN- γ およびIL-12p40について、24時間後にELISAによってアッセイした。3人のドナーの平均 \pm SEMを示す。y軸は、 pg/ml 単位のIFN- γ (図4A)およびIL-12p40(図4B)の濃度であり、x軸は、 μM 単位の \log ORN濃度を示す。

【図5】ORNによるIFN- γ (図5A)およびIL-12p40(図5B)の誘発を示す2つのグラフである。配列番号3およびわずかな配列変異を有する3つの他のORN(配列番号13~15、表4を参照されたい)を示す。ヒトPBMCをDOTAPの存在

下でORNと共にインキュベートし(2 μ MのORNおよび25 μ g/mlのDOTAP)、上清を、IFN- γ およびIL-12p40について、24時間後にELISAによってアッセイした。3人のドナーの平均 \pm SEMを示す。y軸は、pg/ml単位のIFN- γ (図5A)およびIL-12p40(図5B)の濃度であり、x軸は、 μ M単位のlog ORN濃度を示す。

【図6】ORNによるIFN- γ (図6A)およびIL-12p40(図6B)の誘発を示す2つのグラフである。配列番号3およびわずかな配列変異を有する3つの他のORN(配列番号19~21、表5を参照されたい)を示す。ヒトPBMCをDOTAPの存在下でORNと共にインキュベートし(2 μ MのORNおよび25 μ g/mlのDOTAP)、上清を、IFN- γ およびIL-12p40について、24時間後にELISAによってアッセイした。3人のドナーの平均 \pm SEMを示す。y軸は、pg/ml単位のIFN- γ (図6A)およびIL-12p40(図6B)の濃度であり、x軸は、 μ M単位のlog ORN濃度を示す。

【図7】ORNによるIFN- γ (図7Aおよび7B)ならびにIL-12p40(図7Cおよび7D)の誘発を示す4つのグラフである。配列番号3およびわずかな配列変異を有する6つの他のORN(配列番号16~18および22~24、表3を参照されたい)を示す。ヒトPBMCをDOTAPの存在下でORNと共にインキュベートし(2 μ MのORNおよび25 μ g/mlのDOTAP)、上清を、IFN- γ およびIL-12p40について、24時間後にELISAによってアッセイした。3人のドナーの平均 \pm SEMを示す。y軸は、pg/ml単位のIFN- γ (図7Aおよび7B)ならびにIL-12p40(図7Cおよび7D)の濃度であり、x軸は、 μ M単位のlog ORN濃度を示す。

【図8】免疫刺激性のUCAモチーフを有するORN(GACACACACACUCACACACACACACA、配列番号27)によるインビトロでのサイトカインの誘発を比較する4つのグラフである。配列番号27は、十分なIL-12(図8A)、IL-6(図8B)、IL-2R(図8C)、またはIL-7(図8D)を誘発しない。結果を、陰性対照(GACACACACACACACACACACACACA、配列番号25)、Uに富んだ3'末端を有する、UCAを有さないORN(GACACACACACACACACACACACACUUU、配列番号26)、および陽性対照(UUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGU(全ホスホロチオエート)、配列番号28)と比較する。3人の健康な血液ドナーのヒトPBMCを、DOTAPの存在下で、最大2 μ MのORNと共に24時間インキュベートした。上清を回収し、サイトカインまたはケモカインの濃度をELISAによって測定した。y軸は、pg/ml単位のサイトカインまたはケモカインの濃度であり、x軸は、 μ M単位のlog ORN濃度を示す。

【図9】免疫刺激性のUCAモチーフを有するORN(配列番号27)によるインビトロでのサイトカインの誘発を比較する4つのグラフである。配列番号27は、十分なIL-10(図9A)、IL-15(図9B)、IL-12p40(図9C)、またはTNF- α (図9D)を誘発しない。結果を、陰性対照(配列番号25)、Uに富んだ3'末端を有する、UCAを有さないORN(配列番号26)、および陽性対照(配列番号28)と比較する。3人の健康な血液ドナーのヒトPBMCを、DOTAPの存在下で、最大2 μ MのORNと共に24時間インキュベートした。上清を回収し、サイトカインまたはケモカインの濃度をELISAによって測定した。y軸は、pg/ml単位のサイトカインまたはケモカインの濃度であり、x軸は、 μ M単位のlog ORN濃度を示す。

【図10】免疫刺激性のUCAモチーフを有するORN(配列番号27)によるインビトロでのサイトカインの誘発を比較する4つのグラフである。配列番号27は、十分なMIP-1 α (図10B)、IFN- γ (図10C)、またはMIP-1 β (図10D)を誘発しないが、IFN- γ (図10A)を誘発する。結果を、陰性対照(配列番号25)、Uに富んだ3'末端を有する、UCAを有さないORN(配列番号26)、および陽性対照(配列番号28)と比較する。3人の健康な血液ドナーのヒトPBMCを、DOTAPの存在下で、最大2 μ MのORNと共に24時間インキュベートした。上清を回収し、サ

10

20

30

40

50

イトカインまたはケモカインの濃度をELISAによって測定した。y軸は、pg/ml単位のサイトカインまたはケモカインの濃度であり、x軸は、 μ M単位のlog ORN濃度を示す。

【図11】免疫刺激性のUCAモチーフを有するORN（配列番号27）によるインビトロでのサイトカインの誘発を比較する3つのグラフである。配列番号27は、十分なMIG（図11C）を誘発しないが、IP-10（図11A）およびMCP-1（図11B）を誘発する。結果を、陰性対照（配列番号25）、Uに富んだ3'末端を有する、UCAを有さないORN（配列番号26）、および陽性対照（配列番号28）と比較する。3人の健康な血液ドナーのヒトPBMCを、DOTAPの存在下で、最大2 μ MのORNと共に24時間インキュベートした。上清を回収し、サイトカインまたはケモカインの濃度をELISAによって測定した。y軸は、pg/ml単位のサイトカインまたはケモカインの濃度であり、x軸は、 μ M単位のlog ORN濃度を示す。

10

【図12】免疫刺激性のUCAモチーフを有するORN（配列番号3）によるインビボでのサイトカインの誘発を比較する4つのグラフである。配列番号3は、3時間および24時間の時点の両方で、IFN- γ （図12AおよびC）ならびにIP-10（図12BおよびD）を誘発した。配列番号3の活性を、TLR7関連サイトカインおよびTLR8関連サイトカインの両方を誘発する2つのORN（GACACACACACACACACACACACAUU、配列番号30、およびUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAU（ホスホロチオエート骨格）、配列番号33）、ならびに主にTLR8関連サイトカインを誘発する2つのORN（UUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGUUGU（ホスホジエステル骨格）、配列番号31、およびUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAU（ホスホジエステル骨格）、配列番号32）の活性と比較した。x軸は、用いたORN（陰性対照としての生理食塩水およびDOTAPを含む）を示し、y軸は、pg/ml単位のサイトカイン濃度を示す。HBS、緩衝溶液。

20

【図13】免疫刺激性のUCAモチーフを有するORN（配列番号3）によるインビボでのサイトカインの誘発を比較する5つのグラフである。配列番号3は、3時間の時点で、相当量のTNF- α 、IL-2、IL-12、IL-6、またはIL-10（それぞれ図13A～E）を誘発しなかった。配列番号3の活性を、TLR7関連サイトカインおよびTLR8関連サイトカインの両方を誘発する2つのORN（配列番号30および配列番号33）、ならびに主にTLR8関連サイトカインを誘発する2つのORN（配列番号31および配列番号32）の活性と比較した。x軸は、用いたORN（陰性対照としての生理食塩水およびDOTAPを含む）を示し、y軸は、pg/ml単位のサイトカイン濃度を示す。HBS、緩衝溶液。

30

【図14】免疫刺激性のUCAモチーフを有するORN（配列番号3）によるインビボでの脾臓細胞の活性化を示す4つの棒グラフである。配列番号3は、脾臓のCD3⁺T細胞（図14AおよびB）ならびにDX5⁺B細胞（図14CおよびD）を活性化した。細胞を脾臓から単離し、FACS分析によって分離した。x軸は、用いたORN（陰性対照としての生理食塩水およびDOTAPを含む）を示し、y軸は、CD69⁺細胞（AおよびC）またはIL-12R⁺細胞（BおよびD）のパーセンテージを示す。HBS、緩衝溶液。

40

【図15】最大3つのUを有するがUCAモチーフは有さない他のORNと比較した、UCAモチーフ内に1つのUを有する、配列番号27を含む指定したORNによるIFN- γ の誘発を示すグラフである。y軸は、pg/ml単位のIFN- γ の濃度であり、x軸は、 μ M単位のlog ORN濃度を示す。

【図16】TLR9ノックアウトマウス（TLR9KO）、TLR7ノックアウトマウス（TLR7KO）、および対照C57BL/6マウスにおける、指定したORNまたはCpG ODN1826（配列番号34）に応答した、IFN- γ 、IP-10、IL-12、およびIL-6の誘発を示す4つの棒グラフである。HBS、緩衝溶液。

【図17】MyD88ノックアウトマウス（MyD88KO）および対照C57BL/6マウスにおける、IFN- γ およびIP-10の誘発を示す1対の棒グラフである。HB

50

S、緩衝溶液。

【発明を実施するための形態】

【0030】

T L R 7 および / または T L R 8 依存性の様式でヒトの免疫系を刺激すると考えられる免疫刺激性オリゴリボヌクレオチド (O R N) が記載されてきている。例えば、ポリ G 末端を有しない、G U に富んだモチーフおよび C U に富んだモチーフを含む O R N は、T L R 7 および T L R 8 に対して作用すると考えられる。ポリ G 末端を有しない、A U に富んだモチーフを有する O R N は、T L R 8 のみに対して作用すると考えられる。1 つまたは複数のポリ G モチーフが隣接する免疫刺激性 R N A モチーフを含む O R N は、T L R 7 を介して免疫応答を刺激するが T L R 8 を介しては刺激しないと考えられる。これらは、例えば D O T A P などの、陽イオン性リポソーム製剤の存在下で、大量の I F N - γ を産生する。I F N - γ 産生形質細胞様樹状細胞 (p D C) は T L R 7 を発現し、T L R 8 は発現しないため、この効果は T L R 7 介在性であると考えられる。他のサイトカイン、例えば T N F - α 、I L - 12、および I F N - γ の、観察された刺激は、T L R 8 介在性であると考えられる。例えば、単球は T L R 8 を発現するが T L R 7 は発現しないこと、および s s R N A の刺激に応じて T N F - α を分泌することが示されているため、単球の活性化は、直接的な T L R 8 介在性の効果である可能性が最も高い。最近では、異なる免疫プロファイルを有し、R N A 介在性の応答の活性化についての規定されたモチーフを有する O R N が同定されている。これらの O R N のいくつかは、ヒト P B M C による I F N - γ の産生を誘発しないが、かなりの量の T N F - α 、I L - 12、および I F N - γ を誘発し、これは、T L R 8 が刺激されるが T L R 7 はされないことを示す。

【0031】

本発明は、相当量の T L R 8 介在性の (すなわち、単球からの T N F - α などの、T L R 8 発現細胞により産生されるサイトカインの産生) 免疫活性化を誘発することなく、T L R 7 介在性と呼ばれる R N A 介在性の免疫応答 (p D C からの I F N - γ の産生など) を誘発し得る、特定の R N A モチーフを含むポリマーのクラスを明らかにすることを伴う。本明細書において用いる場合、「相当量」は、他の免疫刺激性の O R N により産生される量とは異なる量を意味する。「相当量の T L R 8 介在性の免疫活性化を誘発することなく」とは、誘発される T L R 活性化に関連する因子のレベルが、上述の、ポリ G 末端を有さない、G U に富んだモチーフおよび C U に富んだモチーフを含むものなどの O R N、または T L R 8 を刺激すると考えられる他の O R N によって誘発されるレベルと比較して、最小となるような免疫活性化を言う。したがって、本発明の O R N は、R N A の T L R 8 リガンドまたは T L R 7 / 8 リガンドに典型的なサイトカイン、例えば炎症性サイトカインである T N F - α 、I L - 6 をあまり誘発しない。いくつかの実施形態において、相当量は「かなりの量」である。本明細書において記載されるポリマーのクラスは、一本鎖であり、ホスホジエステル骨格を有し、かつ C U C A 配列を含む免疫刺激性 R N A モチーフを有する。

【0032】

このクラスは、T L R 7 様免疫応答のほぼ排他的な活性化の特徴である免疫プロファイルに関連する。例えば、図 4 に示されるように、本発明のポリマーである配列番号 3 は、D O T A P と共に製剤されると非常に多くの量の I F N - γ を誘発し、I L - 12 p 40 は顕著には誘発しない。逆に、類似の配列を有するが免疫刺激性の C U C A モチーフを有さないポリマーである配列番号 8 ~ 10 は、大量の I L - 12 p 40 を誘発した。

【0033】

新たな免疫刺激性モチーフは、ホスホジエステル骨格のみとの関係における場合に免疫刺激性であることが発見されている。興味深いことに、このモチーフを含む本発明の免疫刺激性ポリマーは、強力な I F N - γ の応答を生じさせるが、他の典型的なサイトカイン、例えば T L R 8 の刺激に反応して誘発されるサイトカインは刺激しないことが明らかになっている。したがって、本発明の 1 つの態様は、T L R 7 に関連するサイトカインを主に誘発し、ホスホジエステル骨格を有する、免疫刺激性モチーフを含む免疫刺激性ポリマ

ーである。

【0034】

本発明の1つの態様において、免疫刺激性RNAモチーフは $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ であり、このポリマーはモチーフ $rC - rU - rC - rA$ の外側にUを有せず、このポリマーはホスホジエステル骨格を含み、 N_1 および N_2 の少なくとも1つは $A_7(rA - rA - rA - rA - rA - rA - rA)$ ではなく、 $rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2$ はGCUCAAでもUUAUCGUAX₁CUCAC(配列番号34)(X₁はAまたはCである)でもない。いくつかの実施形態において、 N_1 は少なくとも1つのA、1つのC、または1つのGを含む。他の実施形態において、 N_1 は、例えばRNA:DNAキメラにおいて、少なくとも1つのTを含む。いくつかの実施形態において、 N_2 は少なくとも1つのA、1つのC、1つのG、または1つのTを含む。

10

【0035】

本発明の別の態様において、免疫刺激性RNAモチーフは $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ (X₂およびX₃は、存在しないか、またはC、G、およびAからなるヌクレオシドおよびヌクレオシド類似体の群から選択されるヌクレオチドであり、 N_3 および N_4 は、存在しないか、または1つもしくは複数のヌクレオチドである)であり、このポリマーは、ホスホジエステル骨格を含み、2つのA₇モチーフを含まず、 $rN_3 - rX_2 - rC - rU - rC - rA - rX_3 - rN_4$ はGCUCAAでもUUAUCGUAX₁CUCAC(配列番号34)(X₁はAまたはCである)でもない。本発明のいくつかの実施形態において、 N_3 および N_4 はそれぞれ独立に、少なくとも1つのA、C、G、またはUを含む。

20

【0036】

いくつかの実施形態において、免疫刺激性ポリマーは4から100単位長である。他の実施形態において、免疫刺激性ポリマーは4から20単位長である。他の実施形態において、免疫刺激性ポリマーは10から25単位長である。さらに他の実施形態において、免疫刺激性ポリマーは15から19単位長である。

【0037】

以下の実施例においてより詳細に論じられるように、免疫刺激性モチーフのCUC Aは、TLR7様免疫応答に重要であることが明らかになった。驚くべきことに、免疫刺激性の効果は、ホスホロチオエート骨格よりもホスホジエステル骨格に対して特異的であった。いくつかの実施形態において、本発明の免疫刺激性ポリマーは、2つ以上の免疫刺激性モチーフを有する。

30

【0038】

本発明の免疫刺激性ポリマーは一本鎖である。本発明の方法に従うと、ポリマーは、ヒト細胞におけるコード配列に相補的な配列を含むように設計されてはならず、したがって、アンチセンスORNまたはサイレンシングRNA(sRNA)であるとは考えられない。「相補的ではない」ポリマーは、標的細胞における1つの特定のコード領域と強力にハイブリダイズし得る配列を含まないものであり、例えば、このポリマーは、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズしない。したがって、特に、本発明において記載されるポリマーは、遺伝子サイレンシングに用いられる二本鎖分子と対照的に一本鎖であるため、相補的ではないポリマーの投与によって遺伝子サイレンシングは生じない。

40

【0039】

本発明のポリマーは、バックグラウンドと比較して、かなりの量のIFN- またはIFN- 関連分子を誘発する免疫応答を誘発する能力を有する。IFN- 関連分子は、サイトカイン、またはIFN- の発現に関連する因子である。これらの分子には、限定はしないが、MIP1- 、IP-10、およびMIP1- が含まれる。

【0040】

本発明は全体として、免疫刺激性RNAモチーフを含む免疫刺激性ポリマー、本発明の1つまたは複数の免疫刺激性ポリマーを含む免疫刺激性組成物、ならびに本発明の免疫刺激性ポリマーおよび免疫刺激性組成物を使用するための方法に関するものである。本明細

50

書において用いる場合、「RNA」という用語は、1つまたは複数の3'-5'ホスホジエステル結合によって共に共有結合している2つ以上のリボヌクレオチド(すなわち、リン酸基およびプリンまたはピリミジン核酸塩基(例えば、グアニン、アデニン、シトシン、またはウラシル)に結合しているリボース糖をそれぞれ含む分子)を言う。

【0041】

上述したように、RNAは、3'-5'ホスホジエステル結合を介して結合しているリボヌクレオチドのポリマーである。特定の実施形態において、本発明の免疫刺激性ポリマーはRNAである。他の実施形態において、本発明は、本発明の免疫刺激性RNAモチーフを含むキメラDNA:RNA分子を含む免疫刺激性組成物を提供する。本発明の1つの実施形態において、DNA:RNA分子のデオキシリボヌクレオチド残基は、ポリマーの5'末端にTCGモチーフを含む。1つの実施形態において、キメラDNA:RNA分子のDNA構成要素は、CpG核酸、すなわちTLR9アゴニストを含む。1つの実施形態において、キメラDNA:RNA分子のDNA部分およびRNA部分は、ヌクレオチド間のリン酸結合を介して共有結合している。別の実施形態において、キメラDNA:RNA分子のDNA部分およびRNA部分は、例えば非ヌクレオチドリinkerであるリンカーを介して共有結合している。

【0042】

別の実施形態において、ポリマーの少なくとも1つの単位はアミノ酸である。

【0043】

いくつかの実施形態において、本発明の免疫刺激性ポリマーは、CpG核酸ではないTLR9アゴニストに結合している。いくつかの実施形態において、本発明の免疫刺激性ポリマーは、TLR7アゴニストまたはTLR8アゴニストに結合している。アゴニストは、デオキシヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドであり得るか、または、アゴニストは、ペプチドもしくは小分子であり得る。免疫刺激性ポリマーは、アゴニストに直接的に結合し得るか、またはリンカーを介して結合し得る。

【0044】

本発明の免疫刺激性ポリマーは、天然のRNAおよびDNAと比較して、ヌクレオチド間ホスホジエステル結合、-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)を伴う、様々な化学的修飾および置換を包含し得る。化学的修飾の例は当業者に知られており、例えば、Uhlmann Eら(1990年)Chem Rev 90:543頁、「Protocols for Oligonucleotides and Analogs」Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques、S. Agrawal編、Humana Press、Totowa、USA 1993年、Crooke STら(1996年)Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107~129頁、およびHunziker Jら(1995年)Mod Synth Methods 7:331~417頁に記載されている。本発明に従ったオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の修飾を有し得、このそれぞれの修飾は、天然のDNAまたはRNAで構成される同一の配列のオリゴヌクレオチドと比較して、特定のヌクレオチド間ホスホジエステル結合に、および/または特定の-D-リボース単位に、および/または特定の天然のヌクレオチド塩基の位置にある。

【0045】

例えば、本発明は、1つまたは複数の修飾を含み得るオリゴヌクレオチドに関するものであり、このそれぞれの修飾は、

- a) 修飾されたヌクレオチド間結合による、ヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に位置するヌクレオチド間ホスホジエステル結合の置換、
- b) 脱リン酸結合による、ヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に位置するホスホジエステル結合の置換、
- c) 別の単位による、糖リン酸骨格からの糖リン酸単位の置換、

d) 修飾糖単位による、 α -D-リボース単位の置換、ならびに
 e) 修飾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
 から独立して選択される。

【0046】

オリゴヌクレオチドの化学的修飾のさらに詳細な例は以下の通りである。

【0047】

1つの実施形態において、ORNは少なくとも1つの安定化したヌクレオチド間結合を有し得る。典型的には、この結合は、5'末端または3'末端のいずれかにあるか、またはその付近にあり、免疫刺激性モチーフ内には存在しない。ヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に位置しているヌクレオチド間ホスホジエステル結合は、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合によって置換することができ、この修飾されたヌクレオチド間結合は、例えば、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、 NR^1R^2 -ホスホロアミデート結合、ボラノホスフェート結合、 α -ヒドロキシベンジルホスホネート結合、リン酸-($\text{C}_1\sim\text{C}_{21}$)-O-アルキルエステル結合、リン酸-[($\text{C}_6\sim\text{C}_{12}$)アリール-($\text{C}_1\sim\text{C}_{21}$)-O-アルキル]エステル結合、($\text{C}_1\sim\text{C}_8$)アルキルホスホネート結合、および/または($\text{C}_6\sim\text{C}_{12}$)アリールホスホネート結合、($\text{C}_7\sim\text{C}_{12}$)- α -ヒドロキシメチルアリール(例えば、WO95/01363において開示されている)から選択され、($\text{C}_6\sim\text{C}_{12}$)アリール、($\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$)アリール、および($\text{C}_6\sim\text{C}_{14}$)アリールは、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、ニトロ、シアノにより置換されていてもよく、 R^1 および R^2 は互いに独立して、水素、($\text{C}_1\sim\text{C}_{18}$)-アルキル、($\text{C}_6\sim\text{C}_{20}$)-アリール、($\text{C}_6\sim\text{C}_{14}$)-アリール-($\text{C}_1\sim\text{C}_8$)-アルキル、好ましくは水素、($\text{C}_1\sim\text{C}_8$)-アルキル、好ましくは($\text{C}_1\sim\text{C}_4$)-アルキルおよび/もしくはメトキシエチルによって置換されているか、または、 R^1 および R^2 は、それらを担持している窒素原子と共に、5~6員のヘテロ環を形成し、これは、O、S、およびNの群からのさらなるヘテロ原子をさらに含み得る。1つの実施形態において、ORNは1~5個の安定化結合を有する。

【0048】

脱リン酸結合によるホスホジエステル結合の置換は、ヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に位置しており(脱リン酸結合は、例えば、「Methods in Molecular Biology」第20巻、「Protocols for Oligonucleotides and Analogs」、S. Agrawal編、Humana Press、Totowa 1993年、第16章、355ff頁においてUhlmann EおよびPeyman Aによって記載されている)、この脱リン酸結合は、例えば、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/またはシリル基の脱リン酸結合から選択される。

【0049】

糖リン酸骨格からの糖リン酸単位(すなわち、糖リン酸単位を共に形成する α -D-リボースおよびヌクレオチド間ホスホジエステル結合)(すなわち、糖リン酸骨格は、糖リン酸単位から構成される)は、別の単位によって置換することができ、この他の単位は、例えば、「モルホリノ誘導体」オリゴマー(例えばStirchak EPら(1989年)Nucleic Acids Res 17:6129~41頁において記載されているような)の形成、すなわち、例えばモルホリノ誘導体単位による置換に適しているか、または、ポリアミド核酸(「PNA」、例えばNielsen PEら(1994年)Bioconj Chem 5:3~7頁において記載されているような)の形成、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に適している。

【0050】

α -リボース単位または α -D-2'-デオキシリボース単位は、修飾糖単位によって置換することができ、この修飾糖単位は、例えば、 α -D-リボース、 α -D-2'-デオ

10

20

30

40

50

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) アルキルリボースであり、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（例えば、Froehler J (1992年) Am Chem Soc 114: 8320 頁に記載されている）および/もしくは開鎖状の類似体（例えば、Vandendriescheら (1993年) Tetrahedron 49: 7223 頁に記載されている）、ならびに/または二環状糖類似体（例えば、Tarkov Mら (1993年) Helv Chim Acta 76: 481 頁に記載されている）である。

10

【0051】

核酸はまた、C - 5 プロピンピリミジンおよび7 - デアザ - 7 - 置換プリンの修飾塩基などの、置換されたプリンおよびピリミジンを含む。Wagner RWら (1996年) Nat Biotechnol 14: 840 ~ 4 頁を参照されたい。プリンおよびピリミジンは、限定はしないが、アデン、シトシン、グアニン、およびチミン、ならびに他の天然のおよび非天然の核酸塩基、置換されているおよび置換されていない芳香部分を含む。

【0052】

20

1つの実施形態において、本発明の免疫刺激性ポリマーは、免疫刺激性モチーフの外側に1つまたは複数の修飾核酸塩基、すなわちA、C、G、T、およびUの誘導体を含み得る。これらの修飾核酸塩基の特定の実施形態には、限定はしないが、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、および置換されていないかもしくは置換されている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、偽イソシトシン、縮合環系を有するシトシン類似体（例えば、N, N' - プロピレンシトシンもしくはフェノキサジン）、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）、チミン誘導体（例えば、2 - チオチミン、4 - チオチミン、6 - 置換チミン）、グアニン誘導体（7 - デアザグアニン、7 - デアザ - 7 - 置換グアニン（7 - デアザ - 7 - (C₂ ~ C₆) - アルキニルグアニンなど）、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）、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）、ならびに6 - チオグアニン）、または、アデニン誘導体（5 - アミノ - 3 - メチル - 3H, 6H - チアゾロ[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））が含まれる。塩基はまた、一般的な塩基（例えば、4 - メチルインドール、5 - ニトロインドール、3 - ニトロピロール、P塩基、およびK塩基）、芳香環系（例えば、ベンズイミダゾールもしく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）、芳香環系（例えば、フルオロベンゼンもしくはジフルオロベンゼン）、または水素原子（dSpacer）によって置換することができる。修飾U核酸塩基は、ジヒドロウラシル、偽ウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - アミノウラシル、5 - (C₁ ~ C₆) - アルキルウラシル、5 - メチルウラシル、5 - (C₂ ~ C₆) - アルケニルウラシル、5 - (C₂ ~ C₆) - アルキニルウラシル、5 - (ヒドロキシメチル)ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、または5 - プロモウラシルなどのウラシル誘導体である。前述の修飾核酸塩基およびその対応するヌクレオシドは市販されて

30

40

50

いる。この列挙は例示的なものであり、限定するものと解釈されるものではない。

【 0 0 5 3 】

本発明の組成物は、二次構造または高次構造を有するポリマーおよび有さないポリマーを包含する。例えば、1つの実施形態におけるポリマーは、ヌクレオシド、ヌクレオシド類似体、または、水素結合した少なくとも2つの隣接する塩基対によりもたらされる二次構造の形成が可能なヌクレオシドおよびヌクレオシド類似体の組合せの配列を含む。1つの実施形態において、水素結合した少なくとも2つの隣接する塩基対は、少なくとも3つの連続した塩基を2組伴う。伴う塩基の連続性は、いわゆるクランプを形成するために熱力学的に有利である。しかし、連続した塩基は、特に、GC含有量が高く、かつ/または配列が伸長している場合には、必要でない場合がある。典型的には、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、または16個の塩基対が存在する。1つの実施形態において、水素結合した塩基対は、標準的なワトソン・クリック塩基対、すなわちG-C、A-U、またはA-Tであり得る。他の実施形態において、水素結合した塩基対は、G-U、G-G、G-A、またはU-Uなどの標準的ではない塩基対であり得る。さらに他の実施形態において、水素結合した塩基対は、フーグスティーンまたは他の塩基対であり得る。

【 0 0 5 4 】

1つの実施形態において、二次構造はステムループ二次構造である。ステムループまたはヘアピン二次構造は、相補的なまたは少なくとも部分的に相補的な配列の間の、分子内の水素結合した塩基の対合を介して生じ得る。相補的なまたは少なくとも部分的に相補的な配列は、それぞれ、完全なまたは中断された逆方向反復配列である。例えば、 X_1 および X_1' 、 X_2 および X_2' 、ならびに X_3 および X_3' のそれぞれが、水素結合した塩基対を形成し得る、 $5' - X_1 - X_2 - X_3 \cdots X_3' - X_2' - X_1' - 3'$ により示される塩基配列を有するポリマーは、完全なまたは中断された逆方向反復を含み得、それ自体でフォールディングしてステムループ二次構造を形成する潜在能力を有する。 X_1 および X_1' 、 X_2 および X_2' 、ならびに X_3 および X_3' のそれぞれが、水素結合した塩基対を形成し得る、 $5' - X_1 - X_2 - X_3 \cdots X_3' - X_2' - X_1' - 3'$ により示される塩基配列を有するポリマーはまた、分子間の水素結合した塩基対を介して分子間複合体を形成する能力も有することを理解されたい。2つ以上の中断された反復が存在する場合、個別のポリマーはまた、相互作用して、二量体の分子間複合体だけではなく高次の分子間複合体または分子間構造を形成し得る。当業者には、1つのタイプの二次構造を別のものよりも形成しやすくするように条件および/または配列を選択し得ることが理解されよう。

【 0 0 5 5 】

1つの態様において、本発明は、本発明の免疫刺激性ポリマーと親油性部分とのコンジュゲートを提供する。特定の実施形態において、免疫刺激性ポリマーは、親油性部分に共有結合している。親油性部分は通常、遊離末端を有する免疫刺激性ORNの1つまたは複数の末端で生じるが、特定の実施形態においては、親油性の部分は免疫刺激性ポリマーのどこでも生じ得、したがって、免疫刺激性ORNが遊離末端を有している必要はない。1つの実施形態において、免疫刺激性ポリマーは3'末端を有し、親油性の部分はこの3'末端に共有結合している。親油基は通常、コレステロール、修飾コレステロール、コレステロール誘導体、還元コレステロール、置換コレステロール、コレスタン、C16アルキル鎖、胆汁酸、コール酸、タウロコール酸、デオキシコール酸塩、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、イソプレノイド、例えば、ステロイド、ビタミンEなどのビタミン、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル、ピレン、ポリフィリン、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン、ピオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、シアニン染料（例えば、Cy3またはCy5）、Hoechst 33258染料、ソラレン、またはイブuproフェンであり得る。特定の実施形態において、親油性部分は、コレステ

リル、パルミチル、および脂肪酸アシルから選択される。1つまたは複数のこのような親油性部分を本発明の免疫刺激性ORNに含めると、ORNがヌクレアーゼによる分解に対してさらに安定となると考えられている。本発明の単一の免疫刺激性ポリマー内に2つ以上の親油性部分が存在する場合、それぞれの親油性部分は、あらゆる他のものとは独立して選択され得る。

【0056】

1つの実施形態において、親油性基は、免疫刺激性ポリマーのヌクレオチドの2'位に付着している。親油性基は、免疫刺激性ポリマーのヌクレオチドのヘテロ環核酸塩基に、代替的にまたは追加で結合し得る。親油性部分は、あらゆる適切な直接的または間接的な結合を介して、免疫刺激性ポリマーに共有結合し得る。1つの実施形態において、結合は直接的であり、エステルまたはアミドである。1つの実施形態において、結合は間接的であり、スペーサー部分、例えば1つまたは複数の脱塩基ヌクレオチド残基、トリエチレングリコール(スペーサー9)もしくはヘキサエチレングリコール(スペーサー18)などのオリゴエチレングリコール、またはブタンジオールなどのアルカンジオールを含む。

【0057】

1つの実施形態において、本発明の免疫刺激性ポリマーは、陽イオン性脂質と組み合わせられる。1つの実施形態において、陽イオン性脂質は、DOTAP(N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルファート)である。DOTAPは、細胞内にポリマーを輸送し、エンドソーム区画に特異的に運搬すると考えられており、この区画において、DOTAPはpH依存性の様式でポリマーを放出し得る。エンドソーム区画に行くと、ポリマーは特定の細胞内TLRと相互作用し得、免疫応答の発生に関与するTLR介在性のシグナル伝達経路を引き起こす。エンドソーム区画への運搬を含む類似の特性を有する他の作用物質を、DOTAPの代わりに、またはそれに加えて用いることができる。他の脂質製剤には、例えば、EFFECTENE(登録商標)(特殊なDNA凝縮エンハンサーを有する非リボソーム性の脂質)およびSUPERFECT(登録商標)(新規な作用性デンドリマー技術)、SMARTICLES(登録商標)(細胞膜を通過すると正に荷電される荷電可逆性の粒子)、ならびに、脂質二重層を有する安定核酸脂質粒子(SNALP)が含まれる。リボソームは、例えばLIPOFECTIN(登録商標)およびLIPOFECTACE(商標)としてGibco BRLから市販されており、これらは、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルクロリド(DOTMA)およびジメチルジオクタデシルアンモニウムメチルスルファート(DDAB)などの陽イオン性脂質で形成されている。リボソームを作製するための方法は、当技術分野において周知であり、多くの刊行物において記載されている。リボソームはまた、Gregoriadis G(1985年) Trends Biotechnol 3:235~241頁によって概説されている。他の実施形態において、本発明の免疫刺激性ポリマーは、マイクロ粒子、シクロデキストリン、ナノ粒子、ノイソーム、デンドリマー、陽イオン性ポリペプチド、ピロソームおよびウイルス様粒子、またはISCOM(登録商標)と組み合わせられる。

【0058】

1つの実施形態において、本発明の免疫刺激性ポリマーは、一次構造および二次構造の両方を有する、共有結合で閉環されている亜鈴形状分子の形態である。以下に記載するように、1つの実施形態において、このような環状オリゴリボヌクレオチドは、介在する二本鎖セグメントにより連結されている2つの一本鎖ループを含む。1つの実施形態において、少なくとも1つの一本鎖ループは、本発明の免疫刺激性RNAモチーフを含む。他の、共有結合により閉環された本発明の亜鈴形状分子は、キメラDNA:RNA分子を含み、この分子において、例えば、二本鎖セグメントは少なくとも部分的にDNA(例えば、ホモ二量体dsDNAまたはヘテロ二量体DNA:RNAのいずれか)であり、少なくとも1つの一本鎖ループは、本発明の免疫刺激性RNAモチーフを含む。あるいは、キメラ分子の二本鎖セグメントはRNAである。

【0059】

特定の実施形態において、免疫刺激性ポリマーは単離されている。単離された分子は、十分に純粋な分子であり、かつ、天然でまたはその意図された使用にとってある程度実用的かつ適切なインピボ系において通常この分子と共に存在する他の物質を有さない分子である。とりわけ、免疫刺激性ポリマーは、十分に純粋であり、細胞の他の生物学的成分をほとんど有さず、それにより、例えば医薬調製物の産生において有用である。本発明の単離された免疫刺激性ポリマーは、医薬調製物において薬学的に許容できる担体と混合することができるため、免疫刺激性ポリマーは、調製物のわずかな重量パーセントのみを含み得る。それでもなお、免疫刺激性ポリマーは、生物系においてこのポリマーが関連している可能性がある物質から十分に分離されているという点で、十分に純粋である。

【0060】

本発明において用いるために、本発明の免疫刺激性ポリマーは、当技術分野において周知のあらゆる多くの手順を用いてデノボ合成することができるか、またはこれらの手順から派生したデノボ合成を行うことができる。例えば、
- シアノエチルホスホラミダイト法 (Beaucage SLら (1981年) Tetrahedron Lett 22: 1859頁)、
ヌクレオシドH - ホスホネート法 (Garegg Pら (1986年) Tetrahedron Lett 27: 4051~4頁、Froehler BCら (1986年) Nucl Acid Res 14: 5399~407頁、Garegg Pら (1986年) Tetrahedron Lett 27: 4055~8頁、Gaffney BLら (1988年) Tetrahedron Lett 29: 2619~22頁) である。これらの化学は、市販されている様々な自動核酸合成装置によって行うことができる。本発明に従って有用なさらなる合成方法は、Uhlmann Eら (1990年) Chem Rev 90: 544~84頁およびGoodchild J (1990年) Bioconjugate Chem 1: 165頁に記載されている。

【0061】

オリゴリボヌクレオチドの合成は、溶液内で、または固相担体上で行うことができる。溶液内では、ブロック結合反応 (二量体、三量体、四量体など) が好ましく、一方、固相合成は、好ましくは、単量体形成ブロックを用いた段階的なプロセスで行われる。ホスホトリエステルの法、H - ホスホネート法、およびホスホラミダイト法などの異なる化学が記載されている (Eckstein F (1991年) Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, IRL Press, Oxfordを参照されたい)。ホスホトリエステル法において、反応性リン基は酸化状態 + V であるが、より反応性のリン + III 誘導体が、ホスホラミダイトアプローチおよび H - ホスホネートアプローチに従った結合反応において用いられる。後者の2つのアプローチにおいて、リンは結合ステップの後に酸化され、安定な P (V) 誘導体となる。酸化剤がヨウ素 / 水 / 塩基である場合、ホスホジエステルが脱保護の後に得られる。逆に、酸化剤が Beaucage 試薬などの硫化剤である場合、ホスホロチオエートが脱保護の後に得られる。

【0062】

オリゴリボヌクレオチド合成のための効率的な方法は、Matteucci および Caruthers. Matteucci MDら (1981年) J Am Chem Soc 103: 3185 頁によってオリゴデオキシヌクレオチドについて最初に記載されたようなホスホラミダイト化学を用いた固体担体合成の組合せである。

【0063】

オリゴリボヌクレオチドの合成はオリゴデオキシヌクレオチドに類似しており、オリゴリボヌクレオチド内に存在する 2' - ヒドロキシ基が適切なヒドロキシ保護基によって保護されなくてはならないことが異なる。単量体は、例えば、RNA 単量体形成ブロック内の 2' - O - t - ブチルジメチルシリル (TBDM S) 基によって保護され得る。しかし、2' - O - トリイソプロピルシリルオキシメチル (TOM) 基 (TOM - Protecting - Group (商標)) を含む単量体を用いた RNA 合成は、TOM - Protecting - Group が TBDM S 基よりも低い立体障害を示すため、高い結合効率

をもたらすことが報告されている。T B D M S 保護基はフッ化物を用いて除去されるが、T O M 基については、エタノール/水におけるメチルアミンを室温で用いて、速い脱保護が達成される。オリゴ(リボ)ヌクレオチド合成において、3'末端から5'末端への鎖の伸長が好ましく、これは、3'-リン(III)基またはその活性化誘導体を有するリボヌクレオチド単位を、別のヌクレオチド単位の遊離5'-ヒドロキシ基に結合させることにより達成される。

【0064】

合成は、自動DNA/RNA合成装置を用いて都合良く実施することができる。これにより、合成装置の供給者により推奨される合成サイクルを用いることができる。リボヌクレオシドホスホラミダイト単量体では、結合時間は、デオキシヌクレオシド単量体と比較して長い(例えば400秒)。固体担体としては、プライマー担体PS200(Amersham)などの、500から1000の制御多孔性ガラス(CPG)担体または有機ポリマー担体を用いることができる。固体担体は通常、その3'末端を介して付着している5'-O-ジメトキシトリチル-N-6-ベンゾイルアデノシンなどの最初のヌクレオシドを含む。トリクロロ酢酸を用いて5'-O-ジメトキシトリチル基を切断した後、例えば5'-O-ジメトキシトリチル-N-保護-2'-O-tertブチルジメチルシリルヌクレオシド-3'-O-ホスホラミダイトを用いて鎖の伸長を行う。連続的な反復サイクルの後、完成したオリゴリボヌクレオチドを担体から切断し、縮合アンモニア/エタノール(3:1、v:v)を用いて30で24時間処理することにより、脱保護する。T B D M S 遮断基を、最後に、トリエチルアミン/HFを用いて切断する。粗オリゴリボヌクレオチドは、イオン交換高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、イオン対逆相HPLC、またはポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって精製することができ、質量分析によって特徴付けされる。

【0065】

5'-コンジュゲートの合成は、ライゲーションされる分子のホスホラミダイトを、固相合成における末端のヌクレオチドの5'-ヒドロキシ基に結合させることによって容易である。コレステロール、アクリジン、ピオチン、ソラレン、エチレングリコール、またはアミノアルキル残基などの、このようなリガンドの様々なホスホラミダイト誘導体は、市販されている。あるいは、アミノアルキル機能を固相合成の際に導入することができ、それにより、活性エステル、イソチオシアネート、またはヨードアセトアミドなどの活性化コンジュゲート分子による合成後の誘導体化が可能になる。

【0066】

3'末端のコンジュゲートの合成は、通常、例えば市販されているコレステロール誘導体固体担体などの、相応して修飾された固体担体を用いることによって達成される。しかし、コンジュゲーションはまた、ヌクレオチド間結合、核酸塩基、またはリボース残基、例えばリボースの2'位でも行うことができる。

【0067】

環状オリゴリボヌクレオチドでは、オリゴヌクレオチド鎖の伸長は、標準的なホスホラミダイト化学を用いて、ヌクレオチドPS固体担体(Glen Research)上で行うことができる。次に、環化反応を、ホスホトリエステル結合手順(Alazzouziら(1997年)Nucleosides Nucleotides 16:1513~14頁)を用いて、固体担体上で行う。水酸化アンモニウムを用いる最後の脱保護では、実質的には、溶液内に入る生成物のみが所望の環状オリゴヌクレオチドである。

【0068】

本発明の環状オリゴリボヌクレオチドには、RNAの閉環形態が含まれ、二本鎖RNAを有するかまたは有さない一本鎖RNAが含まれ得る。例えば、1つの実施形態において、環状オリゴリボヌクレオチドは二本鎖RNAを含み、介在する二本鎖セグメントにより接続される2つの一本鎖ループを有する亜鈴立体構造となる。共有結合により閉環された亜鈴形状のCpGオリゴデオキシヌクレオチドは、米国特許第6,849,725号に記載されている。別の実施形態において、環状オリゴリボヌクレオチドは二本鎖RNAを含

み、介在する二本鎖セグメントによって接続される3つ以上の一本鎖ループを有する立体構造となる。1つの実施形態において、免疫刺激性RNAモチーフは、1つまたは複数の一本鎖セグメント内に位置する。

【0069】

本発明の免疫刺激性ポリマーは、単独で、またはアジュバントなどの他の作用物質と組み合わせで有用である。本明細書において用いられるアジュバントとは、抗原に応答しての免疫細胞の活性化、例えば液性および/または細胞性免疫応答を増強する、抗原以外の物質を言う。アジュバントは、アクセサリ細胞の蓄積および/または活性化を促進して、抗原特異的な免疫応答を増強する。アジュバントは、ワクチン、すなわち抗原に対する防御免疫を誘発するために用いられる抗原含有組成物の有効性を増強するために用いられる。

10

【0070】

アジュバントは、2つの一般的なメカニズムを介して作用し得、所与のアジュバントまたはアジュバント製剤は、1つまたは両方のメカニズムによって作用し得る。第1のメカニズムは、抗原特異的な免疫応答が生じる細胞または部位への抗原の分布に物理的に影響することであり、これは、特定の領域もしくは細胞型を標的化するなど、抗原の生体内分布を変化させるか、または、抗原が体内で緩やかに放出されるように蓄積効果を生じさせ、それにより抗原への免疫細胞の曝露を長くする、送達媒体であり得る。

【0071】

このクラスのアジュバントには、限定はしないが、ミョウバン（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム）、鉱油または有機油から作製される油中水型または水中油型のエマルジョンを含むエマルジョンベースの製剤が含まれる。これらは、モンタニドISA720（Seppic、Air Liquide、Paris、France）、MF-59（Span85およびTween80で安定化した水中スクアレン型エマルジョン、Chiron Corporation、Emeryville、Calif.）、ならびにPROVAX（安定化性洗剤およびミセル形成剤、IDEC Pharmaceuticals Corporation、San Diego、Calif.）などの水中油型エマルジョンであり得る。これらはまた、モンタニドISA50（オレイン酸マンニドおよび鉱油の油性組成物、Seppic）またはモンタニドISA206（オレイン酸マンニドおよび鉱油の油性組成物、Seppic）などの油中水型エマルジョンであり得る。

20

30

【0072】

第2のアジュバントメカニズムは、免疫応答修飾物質または免疫刺激剤である。これらにより、良好な提示、認識、または抗原に対する応答に対して免疫細胞が活性化し、それにより抗原特異的な応答が、反応速度、強さ、表現型、または記憶について増強される。免疫応答修飾物質は、典型的には、ツール様受容体またはいくつかの他の非TLR経路の1つ（例えばRIG-I）などの特異的な受容体を介して作用するが、いくつかについての経路は依然として不明である。このクラスのアジュバントには、限定はしないが、キRAY・サボナリア（Q.saponaria）という木の樹皮から精製されるサポニン、例えばQS21（HPLC分画において21番目のピークで溶出される糖脂質、Antigenics, Inc.、Worcester、Mass.）、ポリ[ジ（カルボキシラトフェノキシ）ホスファゼン（PCPPポリマー、Virus Research Institute、USA）、Flt3リガンド、およびリーシュマニア（Leishmania）の伸長因子（精製されたリーシュマニア（Leishmania）タンパク質、Corixa Corporation、Seattle、Wash.）が含まれる。

40

【0073】

TLRを介して作用する多くのアジュバントが存在する。TLR4を介して作用するアジュバントには、リポポリ多糖の誘導体、例えば、モノホスホリル脂質A（MPL、Ribi ImmunoChem Research, Inc.、Hamilton、Mont.）およびムラミルジペプチド（MDP、Ribi）およびスレオニルムラミルジペプチド（t-MDP、Ribi）、OM-174（脂質Aに関連するグルコサミン二糖、O

50

M Pharma SA、Meyrin、Switzerland)が含まれる。フラジェリンは、TLR5を介して作用するアジュバントである。二本鎖RNAはTLR3を介して作用する。TLR7および/またはTLR8を介して作用するアジュバントには、一本鎖RNAまたはオリゴリボヌクレオチド(ORN)、ならびにイミダゾキノリンアミン(例えば、イミキモド、レシキモド、3M)を含む、TLRを認識および活性化する合成低分子量化合物が含まれる。TLR9を介して作用するアジュバントには、ウイルスもしくは細菌由来のDNA、またはCpG ODNなどの合成オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)が含まれる。

【0074】

物理的効果および免疫刺激効果の両方を有するアジュバントは、上記に同定した機能の両方を有する化合物である。このクラスのアジュバントには、限定はしないが、ISCOMS(混合されたサポニン、脂質を含み、抗原を保持し得る孔を有するウイルスサイズの粒子を形成する免疫刺激性複合体、CSL、Melbourne、Australia)、Pam3Cys、SB-AS2(MPLおよびQS21を含む水中油型エマルジョンであるSmithKline Beechamアジュバントシステム#2、SmithKline Beecham Biologicals[SBB]、Rixensart、Belgium)、SB-AS4(ミョウバンおよびMPLを含むSmithKline Beechamアジュバントシステム#4、SBB、Belgium)、CRL1005(これらはポリオキシエチレンの鎖が隣接する疎水性ポリオキシプロピレンの直鎖を含む、Vaxcel, Inc.、Norcross, Ga.)などのミセルを形成する非イオン性ブロックコポリマー、ならびにSyntexアジュバント製剤(SAF、Tween 80および非イオン性ブロックコポリマーを含む水中油型エマルジョン、Syntex Chemicals, Inc.、Boulder Colo.)、モンタニドIMS(例えば、IMS1312、可溶性免疫刺激剤と組み合わせられた水性ベースのナノ粒子、Spic)、ならびに以下に記載される多くの送達媒体が含まれる。

【0075】

また、本発明の免疫刺激性ポリマーと別のアジュバントとを含む組成物であって、この他のアジュバントが、キトサンなどの陽イオン性多糖、またはプロタミン、ポリエステル、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)などの陽イオン性ペプチド、または上記の1つもしくは複数からなるコポリマーである組成物も提供される。

【0076】

また、本発明の免疫刺激性ポリマーと別のアジュバントとを含む組成物であって、この他のアジュバントがサイトカインである組成物も提供される。1つの実施形態において、組成物は、本発明の免疫刺激性ポリマーとサイトカインとのコンジュゲートである。

【0077】

サイトカインは、炎症性反応および免疫反応を仲介する、多くのタイプの細胞により産生される可溶性タンパク質および糖タンパク質である。サイトカインは、免疫系の細胞間の連絡を仲介し、局所的におよび全身的に作用して、細胞を動員し、その細胞の機能および増殖を調節する。サイトカインのカテゴリーには、自然免疫のメディエーターおよび調節因子、適応免疫のメディエーターおよび調節因子、ならびに造血の刺激因子が含まれる。サイトカインには、インターロイキン(例えば、とりわけ、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、およびインターロイキン19~32(IL-19~IL-32))、ケモカイン(例えば、とりわけ、IP-10、RANTES、MIP-1、MIP-1、MIP-3、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、エオタキシン、ITAC、およびBCA-1)、ならびに、1型インターフェロン(例えば、IFN- およびIFN-)、2型インターフェロン(例えばIFN-)、腫瘍壊死因子- (TNF-)、形質転換成長因子- (TGF-)、およびGM-CSFやG-CSFやM-CSFを含む様々なコロニー刺激因子(CSF)を含む他のサイトカインが含まれる

。

【0078】

また、本発明の免疫刺激性ポリマーと免疫刺激性CpG核酸とを含む組成物も提供される。1つの実施形態において、組成物は、本発明の免疫刺激性ポリマーとCpG核酸とのコンジュゲート、例えばRNA：DNAコンジュゲートである。

【0079】

本明細書において用いられる免疫刺激性CpG核酸とは、CpGモチーフを含み、免疫系の細胞の活性化または増殖を刺激する、天然または合成のDNA配列を言う。免疫刺激性CpG核酸は、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号を含む、多くの特許、公開された特許出願、および他の刊行物において記載されている。1つの実施形態において、免疫刺激性CpG核酸は、6～100ヌクレオチド長のCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)である。1つの実施形態において、免疫刺激性CpG核酸は、8～40ヌクレオチド長のCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)である。

【0080】

いくつかの実施形態において、ポリマーはCGジヌクレオチドを含む。他の実施形態において、ポリマーはCGジヌクレオチドを含まない。

【0081】

免疫刺激性CpG核酸は、異なるクラスのCpG核酸を含む。1つのクラスは、B細胞の活性化について強力であるが、IFN- およびNK細胞の活性化を誘発する力は比較的弱く、このクラスはBクラスと呼ばれている。BクラスのCpG核酸は、典型的には完全に安定化されており、特定の好ましい塩基との関連においては、メチル化されていないCpGジヌクレオチドを含む。例えば、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号を参照されたい。別のクラスは、IFN- およびNK細胞の活性化の誘発について強力であるが、B細胞を刺激する力は比較的弱く、このクラスはAクラスと呼ばれている。AクラスのCpG核酸は、典型的には、少なくとも6個のヌクレオチドからなる回文ホスホジエステルCpGジヌクレオチド含有配列を有し、5'末端および3'末端のいずれかまたは両方に安定化ポリ-G配列を有する。例えば、公開された国際特許出願WO 01/22990を参照されたい。さらに別のクラスのCpG核酸はB細胞およびNK細胞を活性化し、IFN- を誘導し、このクラスはCクラスと呼ばれている。CクラスのCpG核酸は、最初の特徴として、典型的には完全に安定化されており、Bクラス型の配列およびGCに富んだ回文配列またはほぼ回文配列を含む。このクラスは公開された米国特許出願第2003/0148976号において記載されており、その全内容は参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0082】

免疫刺激性CpG核酸はまた、公開された米国特許出願第2003/0148976号において開示されているような、いわゆる軟性のおよび半軟性のCpG核酸を含み、前記出願の全内容は、参照することにより本明細書に組み込まれる。このような軟性のおよび半軟性の免疫刺激性CpG核酸は、ヌクレアーゼ耐性のおよびヌクレアーゼ感受性のヌクレオチド間結合の組合せを包含し、この組合せにおいて、異なるタイプの結合が特定のルールに従って位置している。

【0083】

1つの態様における本発明は、本発明の免疫刺激性ポリマーおよび抗原を含むワクチンを提供する。本明細書において用いられる「抗原」は、T細胞抗原受容体またはB細胞抗原受容体によって認識され得るあらゆる分子を言う。この用語は、宿主の免疫系によって異物と認識されるあらゆるタイプの分子を広く含む。抗原には通常、限定はしないが、細胞、細胞抽出物、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリ多糖、ポリ多糖コンジュゲ

ート、ポリ多糖および他の分子のペプチド模倣体および非ペプチド模倣体、小分子、脂質、糖脂質、ポリ多糖、炭水化物、ウイルスおよびウイルス抽出物、ならびに寄生体などの多細胞生物、ならびにアレルゲンが含まれる。タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドである抗原に関しては、このような抗原には、このような抗原をコードする核酸分子が含まれ得る。抗原には、より具体的には、限定はしないが、癌細胞および癌細胞内または癌細胞上で発現する分子を含む癌抗原、微生物および微生物内または微生物上で発現する分子を含む微生物抗原、アレルゲン、および、自己反応性T細胞などの他の疾患関連分子が含まれる。したがって、特定の実施形態における本発明は、癌、感染性疾患、アレルギー、中毒、異常にフォールディングしたタンパク質により生じる疾患、自己免疫疾患、およびコレステロール管理のためのワクチンを提供する。

10

【0084】

感染性疾患に対するワクチンは、予防的または治療的なものであり得る。ワクチンにおける抗原は、完全な生の（弱毒化された）もの、完全な死滅した／不活性化されたもの、組換えられた生の弱毒化されたもの、サブユニット精製されたもの、サブユニット組換えされたもの、またはペプチドであり得る。ワクチンはさらに、さらなるアジュバントまたはアジュバントの組合せを含み得る。さらなるアジュバントは、蓄積効果を有するもの（例えばミョウバン）を有するもの、および免疫修飾物質（例えば、別のTLRアゴニスト、もしくは非TLR経路を介して作用するもの）、または免疫刺激複合体（ISCOM（登録商標））などの、これらの効果の両方を有するアジュバントであり得る。アジュバントは、以下にさらに詳細に記載される。

20

【0085】

癌に対するワクチンもまた、予防的または治療的であり得る。癌抗原は、全細胞（個別のDCワクチン）、または1つもしくは複数のポリペプチドもしくはペプチドであり得る。これらは典型的には、キャリア分子に付着している。ワクチンはさらに、上記のようなさらなるアジュバントまたはアジュバントの組合せを含み得る。癌抗原は、以下にさらに詳細に記載される。

【0086】

アレルギーを治療するためのワクチンでは、抗原はアレルゲンまたはアレルゲンの一部である。アレルゲンは、送達媒体内に含まれ得るか、または送達媒体に付着し得る。アレルゲンは、免疫刺激性ポリマーに結合し得る。アレルゲンは、以下にさらに詳細に記載される。

30

【0087】

中毒を治療するためのワクチンは、例えばニコチン中毒、コカイン中毒、メタンフェタミン、またはヘロイン中毒の治療に有用であり得る。これらのケースにおける中毒性分子は、天然の分子またはハプテンである。中毒に対するワクチンに包含されるための「抗原」は、典型的には小分子であり、キャリアタンパク質もしくは他のキャリア粒子に結合し得るか、または、ウイルス様粒子内に包含され得る。

【0088】

異常にフォールディングしたタンパク質により生じる疾患を治療するためのワクチンは、感染性海綿状脳症（クロイツフェルト・ヤコブ病の変異型）などの疾患の治療に有用であり得る。このケースにおける「抗原」は、キャリアタンパク質または生の弱毒化されたベクターに付着し得るスクレイプープリオンである。アルツハイマー病に対するワクチンの1つの例は、例えば、 - アミロイドペプチドまたはタンパク質に標的化されたワクチンである。

40

【0089】

自己免疫疾患を治療するためのワクチンもまた提供される。これらのワクチンは、自己免疫細胞が認識する分子が同定されている自己免疫疾患の治療に有用であり得る。例えば、ミエリンに応答する自己反応性T細胞に対するワクチンは、多発性硬化症の治療に用いられる。

【0090】

50

心血管の疾患および症状の治療に有用なワクチンもまた提供される。ワクチンは、リポタンパク質、コレステロール、およびコレステロール代謝に関与する分子などの、疾患の病因に関与することが知られている分子を標的化し得る。コレステロールを管理するためのワクチンは、例えば、抗原としてコレステリルエステル転送タンパク質（CETP）を含む。CETPにより、抗アテローム生成性のアポA-I含有HDL粒子からアテローム生成性のアポB含有VLDLおよびLDLへのコレステロールの交換が容易になる。このようなワクチンは、高コレステロールを治療するため、またはアテローム性動脈硬化症の進行を遅らせるために用いることができる。ワクチンは、標的分子が知られている他の心血管の疾患および症状の治療に用いることができる。

【0091】

1つの態様における本発明は、対象にワクチン接種するための薬剤を調製するための、本発明の免疫刺激性ポリマーの使用を提供する。

【0092】

1つの態様における本発明は、ワクチンを調製するための方法を提供する。本方法は、抗原に深く関連する本発明の免疫刺激性ポリマーと、場合により、薬学的に許容できる担体とを置くステップを含む。

【0093】

いくつかの実施形態において、免疫刺激性ポリマーおよび抗原またはアレルゲンは結合している。抗原および免疫刺激性ポリマーは、直接的に結合し得るか、またはそれらは、リンカーによって間接的に結合し得る。

【0094】

本明細書において用いられる「微生物抗原」とは、微生物の抗原であり、限定はしないが、ウイルス、細菌、寄生体、および真菌を含む。このような抗原には、インタクトな微生物ならびにその天然の単離物および断片または誘導体と、さらに、天然の微生物抗原と同一または類似であり、その微生物に特異的な免疫応答を誘発する合成化合物とが含まれる。化合物は、天然の微生物抗原に対する免疫応答（液性および/または細胞性）を誘発する場合、天然の微生物抗原に類似である。このような抗原は、当技術分野において通常用いられており、当業者に周知である。

【0095】

ウイルスは、核酸からなる中心部およびタンパク質被膜を通常含む、小さな感染性作用物質であるが、独立して生存している生物ではない。ウイルスはまた、タンパク質を有さない感染性核酸の形態を取ることもできる。ウイルスは、ウイルスが複製し得る場所である生存細胞の不存在下では生存することができない。ウイルスは、エンドサイトーシスまたはDNAの直接的な注入（ファージ）を介して特定の生存細胞内に入り、増殖し、疾患を生じさせる。増殖したウイルスはその後放出され得、さらに別の細胞に感染し得る。いくつかのウイルスはDNA含有ウイルスであり、他のものはRNA含有ウイルスである。いくつかの態様において、本発明はまた、例えばウシ海綿状脳症（すなわち、狂牛病、BSE）もしくは動物におけるスクレイピー感染、またはヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病などの、プリオンが疾患の進行に関連している疾患を治療することを目的としている。

【0096】

ウイルスには、限定はしないが、エンテロウイルス（限定はしないが、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルスなどのピコルナウイルス（picornaviridae）科のウイルスを含む）、ロタウイルス、アデノウイルス、ならびにA型、B型、C型、D型、およびE型肝炎ウイルスなどの肝炎ウイルスが含まれる。ヒトにおいて見出されているウイルスの具体的な例には、限定はしないが、レトロウイルス科（Retroviridae）（例えば、HIV-1（HTLV-III、LAV、もしくはHTLV-III/LAV、またはHIV-IIIとも呼ばれる）などのヒト免疫不全ウイルス、および、HIV-LPなどの他の単離物）、ピコルナウイルス科（Picornaviridae）（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヒト

10

20

30

40

50

コクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス)、カルシウイルス科(Calciviridae)(例えば、胃腸炎を生じさせる株)、トガウイルス科(Togaviridae)(例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス)、フラビウイルス科(Flaviviridae)(例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス)、コロナウイルス科(Coronaviridae)(例えば、コロナウイルス)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)(例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス)、フィロウイルス科(Filoviridae)(例えば、エボラウイルス)、パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)(例えば、パラインフルエンザウイルス、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)、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)(例えば、インフルエンザウイルス)、ブニヤウイルス科(Bunyaviridae)(例えば、ハンターンウイルス、ブニヤウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス)、アレナウイルス科(Arenaviridae)(出血熱ウイルス)、レオウイルス科(Reoviridae)(例えば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス)、ビルナウイルス科(Birnaviridae)、ヘパドナウイルス科(Hepadnaviridae)(B型肝炎ウイルス)、パルボウイルス科(Parvoviridae)(パルボウイルス)、パポバウイルス科(Papovaviridae)(パピローマウイルス、ポリオマウイルス)、アデノウイルス科(Adenoviridae)(ほとんどのアデノウイルス)、ヘルペスウイルス科(Herpesviridae)(単純ヘルペスウイルス(HSV)1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)、ポックスウイルス科(Poxviridae)(天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス)、イリドウイルス科(Iridoviridae)(例えば、アフリカブタコレラウイルス)、ならびに、他のウイルスの急性咽頭気管気管支炎ウイルス、アルファウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ニバウイルス、ノーウォークウイルス、パピローマウイルス、パラインフルエンザウイルス、トリインフルエンザウイルス、SARSウイルス、ウエストナイルウイルスが含まれる。

【0097】

細菌は、二分裂により無性的に増殖する単細胞生物である。それらは分類され、それらの形態、染色反応、栄養要求および代謝要求、抗原構造、化学組成、ならびに遺伝子相同性に基いて名付けられる。細菌は、それらの形態学的形状、すなわち球状(球菌)、まっすぐな棒状(桿菌)、および湾曲したまたはねじれた棒状(ビブリオ、カンピロバクター、らせん菌、およびスピロヘータ)に基いて、3つの群に分類することができる。細菌はまた、より一般的には、それらの染色反応に基いて、2つの生物クラス、すなわちグラム陽性およびグラム陰性に特徴付けされる。グラムとは、微生物学研究所において一般に実施される染色方法を言う。グラム陽性生物は、染色手順の後に染色を保持し、深い紫色を呈する。グラム陰性生物は染色を保持しないが、対比染色され、ピンク色を呈する。

【0098】

感染性細菌には、限定はしないが、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌が含まれる。グラム陽性細菌には、限定はしないが、パストレラ(Pasteurella)種、ブドウ球菌(Staphylococci)種、および連鎖球菌(Streptococcus)種が含まれる。グラム陰性細菌には、限定はしないが、大腸菌(Escherichia coli)、シュードモナス(Pseudomonas)種、およびサルモネラ(Salmonella)種が含まれる。感染性細菌の具体的な例には、限定はしないが、ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)、ボレリア・ブルグドルフェリ(Borrelia burgdorferi)、レジオネラ・ニューモフィリア(Legionella pneumophila)、マイコバクテリア属(Mycobacteria spp)(例えば、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(M. tuberculosis)、マイコバクテリウム・アビウム(M. avium)、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ(M. intracellulare)、マ

イコバクテリウム・カンサシ (*M. kansasii*)、マイコバクテリウム・ゴルドナエ (*M. gordona*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、ナイセリア・ゴノレア (*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) (A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌)、連鎖球菌 (*Streptococcus*) (緑色群)、ストレプトコッカス・フェカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*)、連鎖球菌 (嫌気性種)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター属 (*Campylobacter* sp.)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus* sp.)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、バチルス・アンスラシス (*Bacillus anthracis*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* sp.)、ブタ丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、パストツレラ・マルトシダ (*Pasturella multocida*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides* sp.)、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)、モニリホルム連鎖桿菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、フランベジア・トレポネーマ (*Treponema pertenue*)、レプトスピラ (*Leptospira*)、リケッチア (*Rickettsia*)、およびアクチノマイセス・イスラエリ (*Actinomyces israelii*) が含まれる。

【0099】

寄生体は、生存するために他の生物に依存する生物であり、したがって、自らの生活環を継続するために別の生物に入らなくてはならないか、または感染しなくてはならない。感染された生物、すなわち宿主は、栄養および生息環境の両方を寄生体に提供する。寄生体という用語は、その最も広い意味において、全ての感染性作用物質 (すなわち、細菌、ウイルス、真菌、原虫、および蠕虫) を含み得、一般的に言えば、この用語は原虫、蠕虫、および外部寄生性の節足動物 (例えば、マダニ、ダニなど) のみを言うために用いられる。原虫は、細胞内および細胞外の両方で、とりわけ、血液、腸管、または組織の細胞外マトリクスにおいて複製し得る単細胞生物である。蠕虫は、ほとんどの場合に細胞外にいる多細胞生物である (例外は旋毛虫属 (*Trichinella* spp.))。蠕虫は通常、複製するために、一次宿主から出て、二次宿主内に伝染する必要がある。これらの前述のクラスとは異なり、外部寄生性の節足動物は、宿主の体の外部表面と寄生関係を形成する。

【0100】

寄生体には、細胞内寄生体および偏性細胞内寄生体が含まれる。寄生体の例には、限定はしないが、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、卵形マラリア原虫 (*Plasmodium ovale*)、四日熱マラリア原虫 (*Plasmodium malariae*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、二日熱マラリア原虫 (*Plasmodium knowlesi*)、ネズミバベシア (*Babesia microti*)、バベシア・ディバーゲンス (*Babesia divergens*)、クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*)、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*)、旋毛虫 (*Tri*

chinnella spiralis）、大形リーシュマニア (*Leishmania major*)、ドノバンリーシュマニア (*Leishmania donovani*)、ブラジルリーシュマニア (*Leishmania braziliensis*)、熱帯リーシュマニア (*Leishmania tropica*)、ガンビアトリパノソーマ (*Trypanosoma gambiense*)、ローデシアトリパノソーマ (*Trypanosoma rhodesiense*)、およびマンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) が含まれる。真菌は真核生物であり、そのうち脊椎哺乳動物における感染を生じさせるものはわずかである。真菌は真核生物であるため、それらは、サイズ、構造的構成、生活環、および増幅のメカニズムにおいて原核性細菌と著しく異なる。真菌は通常、形態上の特徴、生殖の様式、および培養上の特徴に基づいて分類される。真菌は、異なるタイプの疾患、例えば、真菌抗原の吸入による呼吸アレルギー、タマゴテングダケ (*Amanita phalloides*) の毒ならびに毒キノコにより産生されるファロトキシシンおよびアスペルギルス種により産生されるアフラトキシシンなどの毒性物質の摂取による真菌中毒を対象において生じさせ得るが、全ての真菌が感染性疾患を生じさせるわけではない。

10

【0101】

感染性真菌は、全身性または表在性感染を生じさせ得る。全身性の一次感染は、正常な健康な対象において生じ得、日和見感染は免疫不全の対象において最も頻繁に見られる。全身性の一次感染を生じさせる最も一般的な真菌作用物質には、ブラストミセス (*Blastomyces*)、コクシジオイデス (*Coccidioides*)、およびヒストプラズマ (*Histoplasma*) が含まれる。免疫不全のまたは免疫抑制された対象において日和見感染を生じさせる一般的な真菌には、限定はしないが、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、および様々なアスペルギルス (*Aspergillus*) 種が含まれる。全身性の真菌感染は、内部器官の侵襲性感染である。この生物は通常、肺、消化管、または静脈内カテーテルを介して身体に入る。これらのタイプの感染は、一次病原性の真菌または日和見性の真菌によって生じ得る。

20

【0102】

表在性真菌感染は、外部表面上での真菌の成長を伴い、内部組織の侵襲は伴わない。典型的な表在性真菌感染には、皮膚、頭髮、または爪を伴う皮膚の真菌感染が含まれる。

30

【0103】

真菌感染に関連する疾患には、アスペルギルス症、ブラストミセス症、カンジダ症、クロモブラストミコーシス、コクシジオイデス症、クリプトコッカス症、眼の真菌感染、頭髮、爪、および皮膚の真菌感染、ヒストプラズマ症、ロボミコーシス、菌腫、耳真菌症、パラコクシジオイデス症、播種性ペニシリウム・マルネフェイ (*Penicillium marneffei*)、フェオフィホ真菌症、リノスポリジウム症、スポロトリウム症、および接合菌症が含まれる。

【0104】

他の医学的に関連する微生物は、文献において広範囲にわたって記載されており、例えば、参照することによりその全内容が本明細書に組み込まれる、C. G. A. Thomas、*Medical Microbiology*、Bailliere Tindall、Great Britain 1983年を参照されたい。前述の列举のそれぞれは例示的なものであり、限定することを意図したものではない。

40

【0105】

本明細書において用いる場合、「癌抗原」および「腫瘍抗原」という用語は、腫瘍または癌細胞に関連し、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子との関連において抗原提示細胞の表面上に発現すると免疫応答を引き起こし得る、ペプチド、タンパク質、または糖タンパク質などの化合物を言うために、ほぼ同義で用いられる。癌抗原は、癌細胞によって差次的に発現され、それにより癌細胞の標的化に利用され得る。癌抗原は、腫瘍特異的であると考えられる免疫応答を刺激する可能性を有し得る抗原である。これらの抗原のい

50

くつかは正常な細胞によってコードされているが、発現している必要はない。これらの抗原は、正常な細胞において通常はサイレントである（すなわち発現していない）もの、分化の特定の段階においてのみ発現するもの、ならびに胚抗原および胎児性抗原など、一時的に発現するものとして特徴付けされ得る。他の癌抗原は、癌遺伝子（例えば、活性化した *ras* 癌遺伝子）、抑制遺伝子（例えば、突然変異 *p53*）、内部欠失または染色体転座により生じる融合タンパク質などの、突然変異細胞遺伝子によってコードされている。さらに他の癌抗原は、RNA および DNA 腫瘍ウイルス上に担持されているもののようなウイルス遺伝子によってコードされ得る。

【0106】

癌抗原は、例えば Cohen PA ら（1994年）Cancer Res、54: 1055～8頁において記載されているように癌細胞の粗抽出物を調製することにより、抗原を部分的に精製することにより、組換え技術により、または既知の抗原のデノボ合成により、癌細胞から調製することができる。癌抗原には、限定はしないが、組換えにより発現している抗原、腫瘍もしくは癌またはその細胞の免疫原性部分または全体が含まれる。このような抗原は、組換えにより、または当技術分野において知られているあらゆる他の手段によって、単離または調製することができる。

【0107】

腫瘍抗原の例には、MAGE、MART-1/Melan-A、gp100、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ADAbp）、シクロフィリンb、結腸直腸関連抗原（CRC）であるC017-1A/GA733、癌胎児性抗原（CEA）およびその免疫原性エピトープCAP-1およびCAP-2、etv6、aml1、前立腺特異的抗原（SPA）およびその免疫原性エピトープPSA-1、PSA-2、およびPSA-3、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、T細胞受容体/CD3-ゼータ鎖、腫瘍抗原のMAGEファミリー（例えば、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2（MAGE-B2）、MAGE-Xp3（MAGE-B3）、MAGE-Xp4（MAGE-B4）、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5）、腫瘍抗原のGAGEファミリー（例えば、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9）、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -フェトリクトン、E-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、および γ -カテニン、p120ctn、gp100^{Pmel11}、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫様ポリポーシスタンパク質（APC）、フォドリン、コネキシン37、Igイディオタイプ、p15、gp75、GM2およびGD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質などのウイルス産生物、腫瘍抗原のSmadファミリー、Imp-1、P1A、EBVコード核抗原（EBNA）-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2（HOM-MEL-40）、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1、およびCT-7、ならびにc-erbB-2が含まれる。この列挙は限定を意味するものではない。

【0108】

本明細書において用いられる「アレルゲン」は、IgEの産生を特徴とする免疫応答を引き起こし得る分子である。アレルゲンはまた、感受性を有する対象におけるアレルギー応答または喘息性の応答を誘発し得る物質である。したがって、本発明との関連において、アレルゲンという用語は、IgE抗体により仲介されるアレルギー応答を引き起こし得る、特定のタイプの抗原を意味する。

【0109】

アレルゲンの列挙は膨大であり、花粉、昆虫の毒、動物の鱗屑、真菌の孢子、および薬

10

20

30

40

50

剤（例えばペニシリン）を含み得る。天然の動物アレルゲンおよび植物アレルゲンの例には、イヌ属（イヌ（*Canis familiaris*））、ヒョウダニ属（例えば、コナヒョウダニ（*Dermatophagoides farinae*））、ネコ属（イエネコ（*Felis domesticus*））、ブタクサ属（ブタクサ（*Ambrosia artemisiifolia*））、ドクムギ属（例えば、ペレニアルライグラス（*Lolium perenne*）およびイタリアンライグラス（*Lolium multiflorum*））、スギ属（スギ（*Cryptomeria japonica*））、アルテルナリア属（アルテルナリア・アルテルナータ（*Alternaria alternata*））、ハンノキ属、アルヌス属（ハンノキ（*Alnus gultinosa*））、カバノキ属（ヨーロッパシラカンバ（*Betula verrucosa*））、コナラ属（ホワイトオーク（*Quercus alba*））、オリーブ属（オリーブ（*Olea europa*））、ヨモギ属（オオヨモギ（*Artemisia vulgaris*））、オオバコ属（例えばヘラオオバコ（*Plantago lanceolata*））、ヒカゲミズ属（例えば、ヒカゲミズ（*Parietaria officinalis*）およびカベイラクサ（*Parietaria judaica*））、チャバネゴキブリ属（例えばチャバネゴキブリ（*Blattella germanica*））、ミツバチ属（例えばアピス・ムルティフロルム（*Apis multiflorum*））、イトスギ属（例えば、ホソイトスギ（*Cupressus sempervirens*）、アリゾナイトスギ（*Cupressus arizonica*）、およびモントレーイトスギ（*Cupressus macrocarpa*））、ビャクシン属（例えば、ジュニペルス・サビノイデス（*Juniperus sabinoideis*）、エンピツビャクシン（*Juniperus virginiana*）、セイヨウネズ（*Juniperus communis*）、およびジュニペルス・アシェイ（*Juniperus ashei*））、クロベ属（例えばコノテガシワ（*Thuja orientalis*））、ヒノキ属（例えばヒノキ（*Chamaecyparis obtusa*））、ゴキブリ属（例えばワモンゴキブリ（*Periplaneta americana*））、カモジグサ属（例えばシバムギ（*Agropyron repens*））、ライムギ属（例えばライムギ（*Secale cereale*））、コムギ属（例えばコムギ（*Triticum aestivum*））、カモガヤ属（例えばオーチャードグラス（*Dactylis glomerata*））、ウシノケグサ属（例えばヒロハノウシノケグサ（*Festuca elatior*））、イチゴツナギ属（例えば、ナガハグサ（*Poa pratensis*）およびコイチゴツナギ（*Poa compressa*））、カラスムギ属（例えばエンバク（*Avena sativa*））、シラゲガヤ属（例えばシラゲガヤ（*Holcus lanatus*））、ハルガヤ属（例えばハルガヤ（*Anthoxanthum odoratum*））、オオカニツリ属（例えばリボンガヤ（*Arrhenatherum elatius*））、コヌカグサ属（例えばコヌカグサ（*Agrostis alba*））、アワガエリ属（例えばチモシー（*Phleum pratense*））、クサヨシ属（例えばクサヨシ（*Phalaris arundinacea*））、スズメノヒエ属（例えばアメリカスズメノヒエ（*Paspalum notatum*））、モロコシ属（例えばセイバンモロコシ（*Sorghum halepensis*））、ならびにスズメノチャヒキ属（例えばコスズメノチャヒキ（*Bromus inermis*））に特異的なタンパク質が含まれる。

【0110】

1つの態様における本発明は、本発明の免疫刺激性ポリマーと抗原とのコンジュゲートを提供する。1つの実施形態において、本発明の免疫刺激性ポリマーは、抗原に共有結合している。免疫刺激性ポリマーと抗原との間の共有結合は、免疫刺激性ポリマーおよび抗原がそのようにして結合している場合に各々の構成要素の測定可能な機能的活性を保持しているならば、あらゆる適切なタイプの共有結合であり得る。1つの実施形態において、共有結合は直接的なものである。別の実施形態において、共有結合は間接的なもの、例えばリンカー部分を介したものである。共有結合した免疫刺激性ポリマーおよび抗原は、細

10

20

30

40

50

胞内で処理されて、一方の細胞からもう一方の細胞へ放出され得る。この方途において、細胞へのいずれの構成要素の送達も、個別の調製物または個別の構成要素として投与された場合のその送達と比較して増強され得る。1つの実施形態において、抗原は抗原自体であり、すなわち、抗原は既に形成された抗原である。

【0111】

1つの態様において、本発明は、本発明の組成物を送達媒体と組み合わせて含む医薬組成物を提供する。様々な実施形態において、送達媒体は、陽イオン性脂質、リポソーム、渦巻状物、ピロソーム、免疫刺激複合体（ISCOM（登録商標））、マイクロ粒子、ミクロスフェア、ナノスフェア、単層ベシクル（LUV）、多層ベシクル、エマルソーム、陽イオン性ポリペプチド、リポブレックス、ポリブレックス、リボポリブレックス、油中水型（W/O）エマルジョン、水中油型（O/W）エマルジョン、水-油-水型（W/O/W）複合エマルジョン、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョン、ミセル、デンドリマー、ピロソーム、ウイルス様粒子、ポリマーナノ粒子（ナノスフェアもしくはナノカプセルなど）、ポリマーマイクロ粒子（ミクロスフェアもしくはマイクロカプセルなど）、キトサン、シクロデキストリン、ニオソーム、またはISCOM（登録商標）から選択され得、薬学的に許容できる担体から選択されてもよい。

【0112】

薬学的に許容できる担体を以下に論じる。本発明の医薬組成物は、抗原をさらに含んでもよい。もし存在する場合には抗原と共にある、本発明の組成物には、あらゆる適切な方法を用いて送達媒体との物理的関連が付与される。免疫刺激性組成物は、送達媒体内に含まれ得るか、または、溶媒に晒された送達媒体表面上に存在し得るかもしくはその表面と関連し得る。1つの実施形態において、免疫刺激性ポリマーは、溶媒に晒された送達媒体表面上に存在するか、またはその表面と関連し、抗原は、もし存在する場合は、送達媒体内に含まれる。別の実施形態において、免疫刺激性ポリマーおよび抗原の両方が、溶媒に晒された送達媒体表面上に存在するか、またはその表面と関連する。さらに別の実施形態において、抗原は、溶媒に晒された送達媒体表面上に存在するか、またはその表面と関連し、免疫刺激性ポリマーは送達媒体内に含まれる。さらに別の実施形態において、免疫刺激性ポリマーと、もし抗原が含まれる場合には抗原との両方が、送達媒体内に含まれる。

【0113】

本発明はまた、本発明の免疫刺激性組成物を使用するための方法を提供する。1つの態様において、本発明は、免疫細胞を活性化する方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法は、免疫細胞を効果的な量の本発明の組成物とインビトロまたはインビボで接触させて、免疫細胞を活性化するステップを含む。本発明の組成物は、抗原を含んでもよい。本明細書において用いられる「免疫細胞」とは、自然免疫応答または適応免疫応答に関与し得るあらゆる骨髄由来細胞を言う。免疫系の細胞には、限定はしないが、樹状細胞（DC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、マクロファージ、顆粒球、Bリンパ球、形質細胞、Tリンパ球、およびその前駆細胞が含まれる。1つの実施形態において、免疫細胞は、IFN- γ を産生することができる免疫細胞、例えば形質細胞様樹状細胞（pDC）である。いくつかの実施形態において、免疫細胞はTLR7発現細胞である。この発明との関連において、本方法は、治療上相当なIFN- γ の産生を誘発するために効果的な量のリポフェクチンを用いた製剤は含まない。1つの実施形態において、免疫細胞は、ポリマーに応答して治療上相当な量のTNF- α を産生しない。

【0114】

本明細書において用いる場合、「効果的な量」という用語は、所望の生物学的効果をもたらすのに必要なまたは十分な物質の量を言う。効果的な量は、単回投与で投与される量であり得るが、それに限定はされない。1つの実施形態において、本発明の組成物は、免疫細胞を活性化するために用いることができ、この活性化は、免疫細胞が、免疫応答と関連している活性化状態になることを誘発することによるものである。免疫細胞の活性化とは、免疫応答の誘発および増強の両方を言う。本明細書において用いる場合、「免疫応答

」という用語は、免疫細胞が増殖するか、エフェクター免疫機能を実行するか、または免疫応答に關与する遺伝子産物を産生するための活性化を反映する、自然免疫応答または適応免疫応答のあらゆる態様を言う。免疫応答に關与する遺伝子産物には、分泌生成物（例えば、抗体、サイトカイン、およびケモカイン）、ならびに、免疫機能の特徴である細胞内分子および細胞表面分子（例えば、分化（CD）抗原の特定の集団、転写因子、および遺伝子転写産物）が含まれる。「免疫応答」という用語は、単一の細胞または細胞集団に対して用いることができる。

【0115】

サイトカインの産生は、生物学的応答アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、細胞内蛍光活性化細胞選別（FACS）分析、および逆転写酵素／ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を含む、当技術分野において周知のいくつかの方法のいずれかによって評価することができる。1つの実施形態において、免疫応答はIFN- γ の産生を伴う。

10

【0116】

1つの実施形態において、免疫応答は、CD25、CD80、CD86、およびCD154などの免疫細胞活性化の細胞表面マーカーの上方調節を伴う。このようなマーカーの細胞表面発現を測定するための方法は、当技術分野において周知であり、FACS分析を含む。

【0117】

1つの実施形態において、細胞または細胞集団における免疫応答の測定では、細胞または細胞集団はTLR7を発現する。細胞はTLRを天然に発現し得るか、またはTLRについての適切な発現ベクターを細胞内に導入することにより、TLRを発現するように操作され得る。1つの実施形態において、細胞または細胞集団は、末梢血単核細胞（PBMC）として得られる。1つの実施形態において、細胞または細胞集団は、TLRを発現する細胞系として得られる。1つの実施形態において、細胞または細胞集団は、TLRを発現する一時的な形質転換体として得られる。1つの実施形態において、細胞または細胞集団は、TLRを発現する安定な形質転換体として得られる。

20

【0118】

また、細胞または細胞集団における免疫応答の測定において用いるために、TLRによる細胞内シグナル伝達に応答性のレポーター構築物を細胞または細胞集団内に導入すると都合が良い場合がある。1つの実施形態において、このようなレポーターは、NF- κ Bプロモーターの制御下に置かれた遺伝子である。1つの実施形態において、プロモーターの制御下に置かれた遺伝子はルシフェラーゼである。活性化の適切な条件下において、ルシフェラーゼレポーター構築物は発現しており、ルミノメーターを用いて定量的に測定することができる検出可能な光シグナルを発する。このようなレポーター構築物および他の適切なレポーター構築物は市販されている。

30

【0119】

本発明はまた、TLRの活性化を検出する、細胞を用いない方法の使用を包含する。

【0120】

特定の態様における本発明は、治療において用いるための組成物および方法に関するものである。本発明の免疫刺激性組成物は、単独で、または他の治療用作用物質と組み合わせて用いることができる。免疫刺激性組成物および他の治療用作用物質は、同時にまたは連続的に投与することができる。本発明の免疫刺激性組成物および他の治療用作用物質が同時に投与される場合、それらは同一のまたは別の製剤において投与され得るが、それらは同時に投与される。さらに、本発明の免疫刺激性組成物および他の治療用作用物質が同時に投与される場合、それらは同一のまたは別の投与経路を介して投与され得るが、それらは同時に投与される。本発明の免疫刺激性組成物の投与が他の治療用作用物質の投与と時間的に分かれている場合、本発明の免疫刺激性組成物および他の治療用作用物質は連続的に投与される。これらの化合物の投与の間の時間差は数分間であり得るか、またはさらに長い場合もある。1つの実施形態において、本発明の免疫刺激性組成物は、他の治療用

40

50

作用物質の投与の前に投与される。1つの実施形態において、本発明の免疫刺激性組成物は、他の治療用作用物質の投与の後に投与される。さらに、本発明の免疫刺激性組成物および他の治療用作用物質が連続的に投与される場合、それらは同一のまたは別の投与経路を介して投与され得る。他の治療用作用物質には、限定はしないが、アジュバント、抗原、ワクチン、ならびに、感染、癌、アレルギー、および喘息の治療に有用な薬剤が含まれる。

【0121】

1つの態様において、本発明は、対象にワクチン接種する方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法は、対象に抗原および本発明の組成物を投与するステップを含む。1つの実施形態において、抗原の投与には、抗原をコードする核酸の投与が含まれる。

10

【0122】

本明細書において用いられる「対象」とは、脊椎動物を言う。様々な実施形態において、対象は、ヒト、ヒト以外の霊長類動物、または他の哺乳動物である。特定の実施形態において、対象は、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、またはウマである。

【0123】

対象へのワクチン接種のための使用では、1つの実施形態における本発明の組成物は抗原を含む。抗原は本発明のポリマーから分離し得るか、またはこのポリマーに共有結合し得る。1つの実施形態において、本発明の組成物はそれ自体、抗原を含まない。この実施形態において、抗原は、本発明の組成物とは分離して、または本発明の組成物と共に、対象に投与され得る。分離した投与には、時間的な分離、位置もしくは投与経路における分離、または時間と位置もしくは投与経路との両方における分離が含まれる。本発明の組成物および抗原が時間的に分離して投与される場合、抗原は本発明の組成物の前または後に投与され得る。1つの実施形態において、抗原は、本発明の組成物の投与の48時間から4週間後に投与される。本方法はまた、抗原および組成物の初回投与の後に、抗原のみ、組成物のみ、または抗原および組成物を1回または複数回追加投与することを包含する。

20

【0124】

また、本発明の組成物を対象に投与することにより、対象が未知の抗原に今後遭遇するための準備をすることができるということも、本発明に包含されるものであり、この組成物は抗原を含まない。この実施形態に従って、対象の免疫系は、例えば環境的なまたは職業上の曝露により対象が後に遭遇する抗原に対するさらに強力な応答を備えるように準備される。このような方法は、例えば、微生物の作用物質に晒されると考えられる旅行者、医療従事者、および兵士に用いることができる。

30

【0125】

1つの態様において、本発明は、感染を有する対象を治療する方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法は、感染を有する対象に、効果的な量の本発明の組成物および感染治療薬を投与して、対象を治療するステップを含む。

【0126】

1つの態様において、本発明は、対象における感染を治療するための薬剤を調製するための、本発明の免疫刺激性ポリマーの使用を提供する。1つの態様において、本発明は、感染の治療に有用な組成物を提供する。この態様に従った組成物は、本発明の免疫刺激性ポリマーおよび感染治療薬を含む。

40

【0127】

本明細書において用いる場合、疾患または症状を有する対象に関して用いられる「治療する」という用語は、対象における疾患または症状の少なくとも1つの兆候または症候を予防するか、改善するか、または除去することを意味する。

【0128】

感染性疾患を有する対象は、感染性微生物による表面的な、局所的な、または全身性の、対象への侵入により生じる障害を有する対象である。感染性微生物は、上記のようなウイルス、細菌、真菌、または寄生体であり得る。

50

【 0 1 2 9 】

感染治療薬には、限定はしないが、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、および抗寄生体剤が含まれる。「抗感染剤」、「抗生物質」、「抗細菌剤」、「抗ウイルス剤」、「抗真菌剤」、「抗寄生体剤」、および「寄生体駆除剤」という用語は、当業者に意味が良く知られているものであり、標準的な医学書において定義されている。簡潔に述べると、抗細菌剤は細菌を殺すかまたは阻害し、抗生物質および類似の機能を有する他の合成または天然の化合物を含む。抗ウイルス剤は、天然源から単離され得るかまたは合成され得、ウイルスを殺すかまたは阻害するために有用である。抗真菌剤は、表在性の真菌感染ならびに真菌の日和見感染および全身性の一次感染を治療するために有用である。抗寄生体剤は、寄生体を殺すかまたは阻害する。多くの抗生物質は、微生物などの細胞によって二次代謝物として産生される低分子量の分子である。通常は、抗生物質は、微生物に特異的で宿主細胞内には存在しない1つまたは複数の機能または構造に干渉する。

10

【 0 1 3 0 】

抗感染療法の問題の1つは、抗感染性作用物質で治療された宿主において生じる副作用である。例えば、多くの抗感染性作用物質は、広範囲の微生物を殺すかまたは阻害し得、特定のタイプの種に特異的ではない。これらのタイプの抗感染性作用物質で治療すると、宿主内に生存している正常な微生物叢が感染性微生物と共に死滅する。微生物叢は感染性病原体と競合し、この病原体に対する防壁として機能するため、微生物叢の損失により疾患の合併症が生じ得、宿主が他の病原体に感染しやすくなり得る。他の副作用が、宿主の非微生物細胞または組織に対するこれらの化学物質の特異的なまたは非特異的な効果の結果生じ得る。

20

【 0 1 3 1 】

抗感染物質の広範な使用の別の問題は、微生物の抗生物質耐性株の出現である。既に、バンコマイシン耐性のエンテロコッカス (*enterococci*) 株、ペニシリン耐性の肺炎球菌 (*pneumococci*) 株、多剤耐性のスタフィロコッカス・アウレウス (*S. aureus*) 株、および多剤耐性のツベルクローシス (*tuberculosis*) 株が出現しており、主要な臨床上の問題となっている。抗感染物質の広範な使用は、細菌の多くの抗生物質耐性株を生じさせると考えられる。その結果、これらの微生物に対抗するための新たな抗感染戦略が必要となる。

【 0 1 3 2 】

広範囲の細菌を殺すかまたは阻害するために効果的な抗細菌抗生物質は、広域抗生物質と呼ばれる。他のタイプの抗細菌抗生物質は、グラム陽性またはグラム陰性のクラスの細菌に対して主に効果的である。これらのタイプの抗生物質は、狭域抗生物質と呼ばれる。単一の生物または疾患に対して効果的であり、他のタイプの細菌に対しては効果的ではない他の抗生物質は、限定域抗生物質と呼ばれる。

30

【 0 1 3 3 】

抗細菌剤は、それらの作用の主な様式に基づいて分類されることがある。通常は、抗細菌剤は、細胞壁合成阻害剤、細胞膜阻害剤、タンパク質合成阻害剤、核酸合成または核酸機能阻害剤、および競合的阻害剤である。細胞壁合成阻害剤は、細胞壁の合成のプロセスにおけるステップを阻害し、通常は、細菌のペプチドグリカンの合成におけるステップを阻害する。細胞壁合成阻害剤には、 β -ラクタム抗生物質、天然ペニシリン、半合成ペニシリン、アンピシリン、クラブラン酸、セファロスポリン、およびバシトラシンが含まれる。

40

【 0 1 3 4 】

β -ラクタムは、ペプチドグリカン合成の最後のステップを阻害する4員の β -ラクタム環を含む抗生物質である。 β -ラクタム抗生物質は、合成することができるかまたは天然であり得る。ペニシリウム (*penicillium*) により産生される β -ラクタム抗生物質は、ペニシリンGまたはペニシリンVなどの天然ペニシリンである。これらは、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*) の発酵によって産生される。天然のペニシリンは狭い範囲の活性を有し、通常は、連鎖球菌 (*Streptococcus*)

50

Streptococcus）、淋菌（*Gonococcus*）、およびブドウ球菌（*Staphylococcus*）に対して効果的である。グラム陽性細菌に対しても効果的である他のタイプの天然ペニシリンには、ペニシリンF、X、K、およびOが含まれる。

【0135】

半合成ペニシリンは、通常、カビにより産生される6-アミノペニシラン酸分子の修飾型である。6-アミノペニシラン酸は、側鎖の付加により修飾され得、それにより天然のペニシリンよりも広域な活性または様々な他の有利な特性を有するペニシリンが産生される。いくつかのタイプの半合成ペニシリンは、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対して広域であるが、ペニシリナーゼによって不活性化される。これらの半合成ペニシリンには、アンピシリン、カルベニシリン、オキサシリン、アズロシリン、メズロシリン、およびピペラシリンが含まれる。他のタイプの半合成ペニシリンはグラム陽性細菌に対して狭い活性を有するが、ペニシリナーゼにより不活性化されないという特性を獲得している。これらには、例えば、メチシリン、ジクロキサシリン、およびナフシリンが含まれる。広域な半合成ペニシリンのいくつかを、クラバン酸およびスルバクタムなどのβ-ラクタマーゼ阻害剤と組み合わせて用いることができる。β-ラクタマーゼ阻害剤は抗微生物作用を有さないが、それらはペニシリナーゼを阻害するように機能し、したがって半合成ペニシリンを分解から保護する。

10

【0136】

別のタイプのβ-ラクタム抗生物質はセファロスポリンである。それらは、細菌のβ-ラクタマーゼによる分解に対して感受性を有し、したがって、単独では常に効果的であるわけではない。しかし、セファロスポリンはペニシリナーゼに対して耐性である。それらは様々なグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対して効果的である。セファロスポリンには、限定はしないが、セファロチン、セファピリン、セファレキシン、セファマンドール、セファクロル、セファゾリン、セフロキシム、セフォキシチン、セフォタキシム、セフスロジン、セフェタメト、セフィキシム、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフトジジン、およびモキサラクタムが含まれる。

20

【0137】

バシトラシンは、膜の外側にムロペプチドサブユニットを送達する分子からのムロペプチドサブユニットまたはペプチドグリカンの放出を阻害することにより細胞壁の合成を阻害する、別のクラスの抗生物質である。バシトラシンはグラム陽性細菌に対して効果的であるが、それは毒性が強いため、その使用は通常、局部投与に限られる。

30

【0138】

カルバペネムは、細胞壁の合成を阻害することが可能な、別の広域β-ラクタム抗生物質である。カルバペネムの例には、限定はしないが、イミペネムが含まれる。モノバクタムもまた、広域β-ラクタム抗生物質であり、エズトレオナムを含む。ストレプトミセス（*Streptomyces*）により産生される抗生物質であるバンコマイシンもまた、細胞膜の合成を阻害することにより、グラム陽性細菌に対して効果的である。

【0139】

別のクラスの抗細菌剤は、細胞膜阻害剤である抗細菌剤である。これらの化合物は、細菌膜の構造を破壊するかまたは機能を阻害する。細胞膜阻害剤である抗細菌剤の1つの問題は、細菌および真核細胞の膜におけるリン脂質が類似しているため、この抗細菌剤が細菌と同様に真核細胞においても効果を発揮し得ることである。したがって、これらの化合物は、全身的に用いることを可能にするために十分に特異的であることは稀であり、局所投与での高用量の使用を妨げるものである。

40

【0140】

1つの臨床的に有用な細胞膜阻害剤はポリミキシンである。ポリミキシンは、膜のリン脂質に結合することにより、膜の機能に干渉する。ポリミキシンは主にグラム陰性細菌に対して効果的であり、通常、重度のシュードモナス（*Pseudomonas*）感染、または毒性の低い抗生物質に対して耐性であるシュードモナス（*Pseudomonas*）感染において用いられる。この化合物の全身投与に関連する重度の副作用には、腎臓および

50

他の器官に対するダメージが含まれる。

【 0 1 4 1 】

他の細胞膜阻害剤には、全身性の真菌感染およびカンジダ (*C a n d i d a*) 酵母の感染の治療において主に用いられる抗真菌剤であるアムホテリシン B およびナスタチンが含まれる。イミダゾールは、細胞膜阻害剤である別のクラスの抗生物質である。イミダゾールは、抗細菌剤および抗真菌剤として用いられ、例えば、酵母感染、皮膚糸状菌感染、および全身性の真菌感染の治療に用いられる。イミダゾールには、限定はしないが、クロトリマゾール、ミコナゾール、ケトコナゾール、イトラコナゾール、およびフルコナゾールが含まれる。

【 0 1 4 2 】

多くの抗細菌剤はタンパク質合成阻害剤である。これらの化合物は、細菌が構造タンパク質および酵素を合成することを妨げ、それにより細菌細胞の成長もしくは機能の阻害、または細胞死をもたらす。通常は、これらの化合物は、転写または翻訳のプロセスに干渉する。転写を遮断する抗細菌剤には、限定はしないが、リファンピシンおよびエタンブトールが含まれる。RNAポリメラーゼ酵素を阻害するリファンピシンは、広域な活性を有し、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌ならびにマイコバクテリウム・ツベルクローシス (*M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s*) に対して効果的である。エタンブトールは、マイコバクテリウム・ツベルクローシス (*M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s*) に対して効果的である。

【 0 1 4 3 】

翻訳を遮断する抗細菌剤は、細菌のリボソームに干渉して、mRNA がタンパク質に翻訳されるのを妨げる。通常は、このクラスの化合物には、限定はしないが、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、マクロライド (例えばエリスロマイシン)、およびアミノグリコシド (例えばストレプトマイシン) が含まれる。

【 0 1 4 4 】

アミノグリコシドは、例えばストレプトマイシン、カナマイシン、トブラマイシン、アミカシン、およびゲンタマイシンなどの、ストレプトミセス (*S t r e p t o m y c e s*) 細菌によって産生される、あるクラスの抗生物質である。アミノグリコシドは、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌によって生じる多種多様の細菌感染に対して用いられている。ストレプトマイシンは、ツベルクローシス (*t u b e r c u l o s i s*) の治療において第一次薬として広く用いられている。ゲンタマイシンは、シュードモナス (*P s e u d o m o n a s*) 感染を含むグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の多くの株に対して、とりわけトブラマイシンと組み合わせて用いられる。カナマイシンは、ペニシリン耐性のブドウ球菌 (*S t a p h y l o c o c c i*) を含む多くのグラム陽性細菌に対して用いられる。アミノグリコシドの、それらの臨床的な使用を制限している1つの副作用は、有効性に必須の用量では、長期の使用により腎臓の機能が損なわれ、聴神経へのダメージが生じて難聴となることが示されていることである。

【 0 1 4 5 】

別のタイプの翻訳阻害剤である抗細菌剤はテトラサイクリンである。テトラサイクリンは、広域であり様々なグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対して効果的である、あるクラスの抗生物質である。テトラサイクリンの例には、テトラサイクリン、ミノサイクリン、ドキシサイクリン、およびクロルテトラサイクリンが含まれる。それらは、多くのタイプの細菌の治療に重要であるが、ライム病の治療においてとりわけ重要である。テトラサイクリンは毒性が低く、直接的な副作用が最小であるため、それは医学界によって過剰使用および誤使用されており、問題が生じている。例えば、その過剰使用により、耐性が広く発生している。

【 0 1 4 6 】

マクロライドなどの抗細菌剤は50Sリボソームサブユニットに可逆的に結合し、ペプチジルトランスフェラーゼによりタンパク質の伸長を阻害するか、もしくは細菌のリボソームからの、チャージしていないtRNAの放出を妨げるか、またはその両方である。こ

10

20

30

40

50

これらの化合物には、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、クラリスロマイシン、オレ
アンドマイシン、およびアジスロマイシンが含まれる。エリスロマイシンは、ほとんどの
グラム陽性細菌、ナイセリア (Neisseria)、レジオネラ (Legionella)、およびヘモフィルス (Haemophilus) に対して活性であるが、腸内細菌
科 (Enterobacteriaceae) に対しては活性ではない。タンパク質合成
の際のペプチド結合の形成を遮断するリンコマイシンおよびクリンダマイシンは、グラム
陽性細菌に対して用いられる。

【0147】

別のタイプの翻訳阻害剤はクロラムフェニコールである。クロラムフェニコールは、7
0Sリボソームを結合して細菌酵素のペプチジルトランスフェラーゼを阻害し、それにより
タンパク質合成の際のポリペプチド鎖の成長を妨げる。クロラムフェニコールに関連す
る1つの深刻な副作用は、不良性貧血である。不良性貧血は、少ない割合 (1/5000
0) の患者における細菌の治療に効果的なクロラムフェニコールの用量で生じる。一時は
多く処方された抗生物質であるクロラムフェニコールは、貧血による死亡の結果、現在で
は滅多に使用されない。その有効性のため、クロラムフェニコールは生命に関わる状況 (例
えば腸チフス) において依然として用いられている。

【0148】

いくつかの抗細菌剤は核酸の合成または機能を混乱させ、例えば、DNAまたはRNA
に結合してそれらの情報が読み取られ得ないようにする。これらには、限定はしないが、
共に合成化学物質であるキノロンおよびコトリモキサゾール、ならびに天然または半合成
の化学物質であるリファマイシンが含まれる。キノロンは、細菌がそれらの環状DNAを
産生するために必要な酵素であるDNAジャイレースを阻害することにより、細菌DNA
の複製を遮断する。それらは広域であり、例には、ノルフロキサシン、シプロフロキサシ
ン、エノキサシン、ナリジクス酸、およびテマフロキサシンが含まれる。ナリジクス酸は
、DNA複製に必須のDNAジャイレース酵素 (トポイソメラーゼ) に結合し、超らせん
を解いて再形成し、DNAジャイレースの活性を阻害する、殺菌剤である。ナリジクス酸
の主な使用は、下部尿路感染症 (UTI) の治療におけるものであり、それは、ナリジク
ス酸が、UTIの一般的な原因である大腸菌 (E. coli)、エンテロバクター・アエ
ロゲネス (Enterobacter aerogenes)、肺炎桿菌 (K. pneumoniae)、およびプロテウス (Proteus) 種などのいくつかのタイプのグラム
陰性細菌に対して効果的であるためである。コトリモキサゾールは、DNAヌクレオチ
ドを作るために必要な葉酸の細菌による合成を遮断する、スルファメトキサゾールおよ
びトリメトプリムの組合せである。リファンピシンは、グラム陽性細菌 (マイコバクテリウ
ム・ツベルクローシス (Mycobacterium tuberculosis)、およびナイセリア・メニンギティ
ディス (Neisseria meningitidis) により生じる髄膜炎を含む) ならびにいくつかのグラム陰性細菌に対して活性なリファ
マイシンの誘導体である。リファンピシンはポリメラーゼの β -サブユニットに結合し、
ポリメラーゼの活性化に必要な最初のヌクレオチドの付加を遮断し、それによりmRNA
の合成を遮断する。

【0149】

別のクラスの抗細菌剤は、細菌酵素の競合的阻害剤として機能する化合物である。競合
的阻害剤は、ほとんど全ての構造が細菌の成長因子に類似しており、結合について競合す
るが、細胞において代謝機能は示さない。これらの化合物には、スルホンアミド、およ
びさらに強く広範な抗細菌活性を有する、化学的に修飾された形態のスルファニルアミド
が含まれる。スルホンアミド (例えば、ガントリシンおよびトリメトプリム) は、ストレ
プトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae)、
溶血連鎖球菌 (Streptococci)、および大腸菌 (E. coli) の治療に有
用であり、大腸菌 (E. coli) により生じる単純性尿路感染症 (UTI) の治療およ
び髄膜炎菌性髄膜炎の治療において用いられている。

【0150】

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のウイルスの複製を妨げる化合物である。ウイルス複製のプロセスが宿主細胞内でのDNA複製に緊密に関連しているために、非特異的な抗ウイルス剤は宿主に対して有毒であることが多いため、抗細菌薬よりも少ない抗ウイルス薬が多く存在する。ウイルス感染のプロセスにはいくつかの段階が存在し、これは抗ウイルス剤によって遮断または阻害することができる。これらの段階には、宿主細胞へのウイルスの付着（免疫グロブリンまたは結合ペプチド）、ウイルスの脱殻（例えばアマンタジン）、ウイルスmRNAの合成または翻訳（例えばインターフェロン）、ウイルスRNAまたはDNAの複製（例えばヌクレオシド類似体）、新たなウイルスタンパク質の成熟（例えばプロテアーゼ阻害剤）、ならびにウイルスの出芽および放出が含まれる。

10

【0151】

抗ウイルス剤の別のカテゴリーは、ヌクレオシド類似体である。ヌクレオシド類似体は、ヌクレオシドに類似の合成化合物であるが、それは不完全なまたは異常なデオキシリボース基またはリボース基を有する。ヌクレオシド類似体が細胞内にあると、それらはリン酸化して三リン酸形態を生じさせ、この三リン酸形態は、ウイルスDNAまたはRNA内への正常なヌクレオチドの組み込みに競合する。ヌクレオシド類似体の三リン酸形態が、成長している核酸鎖内に組み込まれると、ウイルスポリメラーゼとの不可逆的な関連が生じ、それにより連鎖が停止する。ヌクレオシド類似体には、限定はしないが、アシクロビル（単純ヘルペスウイルスおよび水痘帯状疱疹ウイルスの治療に用いられる）、ガンシクロビル（サイトメガロウイルスの治療に有用である）、イドクスウリジン、リバビリン（呼吸器合胞体ウイルスの治療に有用である）、ジデオキシイノシン、ジデオキシシチジン、ならびにジドブジン（アジドチミジン）が含まれる。

20

【0152】

別のクラスの抗ウイルス剤には、インターフェロンなどのサイトカインが含まれる。インターフェロンは、ウイルス感染した細胞および免疫細胞により分泌されるサイトカインである。インターフェロンは、感染細胞に隣接した細胞上の特異的受容体に結合することにより機能し、細胞を変化させて、その変化により、ウイルスによる感染から細胞を保護する。 - インターフェロンおよび - インターフェロンもまた、感染細胞の表面上でのクラスIおよびクラスII MHC分子の発現を誘発し、それにより、宿主の免疫細胞認識のための抗原提示を増大させる。 - インターフェロンおよび - インターフェロンは、組換え形態として利用可能であり、慢性B型肝炎およびC型肝炎の感染の治療に用いられている。抗ウイルス療法に効果的な用量で、インターフェロンは、熱、倦怠感、および体重減少などの重度の副作用を有する。

30

【0153】

免疫グロブリン療法は、ウイルス感染の予防に用いられる。ウイルス感染に対する免疫グロブリン療法は細菌感染とは異なり、それは、免疫グロブリン療法が、抗原特異的であるというよりもむしろ、細胞外ビリオンに結合して、ウイルス感染に感受性を有する細胞へのそのビリオンの付着およびその細胞内への進入を妨げることにより機能するためである。この治療法は、抗体が宿主内に存在している期間にわたりウイルス感染を予防するために有用である。通常、通常の免疫グロブリン療法および高力価免疫グロブリン療法という2つのタイプの免疫グロブリン療法が存在する。通常の免疫グロブリン療法は、正常な血液ドナーの血清から調製されプールされている抗体生成物を用いる。このプールされた生成物は、A型肝炎、パルボウイルス、エンテロウイルス（とりわけ新生児における）などの広範なヒトウイルスに対する低力価の抗体を含む。高力価免疫グロブリン療法は、特定のウイルスに対する高力価の抗体を有する個体の血清から調製される抗体を用いる。これらの抗体はその後、特定のウイルスに対して用いられる。高力価免疫グロブリンの例には、帯状疱疹免疫グロブリン（免疫不全の子供および新生児における水痘の予防に有用である）、ヒト狂犬病免疫グロブリン（狂犬病の動物に噛まれた対象の曝露後の予防において有用である）、B型肝炎免疫グロブリン（B型肝炎ウイルス、とりわけウイルスに晒された対象におけるB型肝炎ウイルスの予防において有用である）、ならびにRSV免疫グ

40

50

ロブリン（呼吸器合胞体ウイルス感染の治療において有用である）が含まれる。

【0154】

抗真菌剤は、感染性真菌の治療および予防に有用である。抗真菌剤は、それらの作用メカニズムによって分離されることがある。いくつかの抗真菌剤は、グルコース合成酵素を阻害することにより、細胞壁阻害剤として機能する。これらには、限定はしないが、バシウンギン／ECBが含まれる。他の抗真菌剤は、膜の完全性を不安定化させることにより機能する。これらには、限定はしないが、クロトリマゾール、セルタコンゾール、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、およびボリコナゾールなどのイミダゾール、ならびにFK463、アムホテリシンB、BAY38-9502、MK991、ブラジマイシン、UK292、ブテナフィン、およびテルビナフィンが含まれる。他の抗真菌剤は、キチンの破壊（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

【0155】

寄生体駆除剤は、直接的に寄生体を死滅させる作用物質である。このような化合物は、当技術分野において知られており、一般に市販されている。ヒトへの投与に有用な寄生体駆除剤の例には、限定はしないが、アルベンダゾール、アムホテリシンB、ベンズニダゾール、ピチオノール、クロロキンHC1、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、フロ酸ジロキサニド、エフロルニチン、フラゾリダオン、糖質コルチコイド、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、メラルソプロール、メトリフォネート、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、イセチオン酸ペンタミジン、ピペラジン、ブラジカンテル、リン酸プリマキン、プログアニル、パモ酸ピランテル、ピリメタンミンスルホンアミド、ピリメタンミンスルファドキシニ、キナクリンHC1、硫酸キニーネ、グルコン酸キニジン、スピラマイシン、スチボグルコン酸ナトリウム（アンチモニル酒石酸ナトリウム）、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、トリメトロプリム・スルファメトキサゾール、およびトリパルサミドが含まれる。

20

【0156】

ポリマーもまた、対象におけるTh2様免疫応答を抑制するために有用である。Th2型の免疫応答は、Th2サイトカインであるIL-4およびIL-5、ならびにIgEへの抗体アイソタイプスイッチを少なくとも部分的に特徴とする。したがって、Th2様免疫応答の抑制とは、Th2サイトカインの産生と他のTh2効果との低減を言う。ポリマーはまた、Th1様免疫応答を誘発するためにも用いることができる。Th1およびTh2免疫応答は相互に逆調節性であり、そのため、免疫応答がTh1型の免疫応答に偏ることにより、Th2型の免疫応答を予防または改善することができる。

30

【0157】

ポリマーは、自己免疫疾患の治療および予防に用いることができる。自己免疫疾患は、対象自身の抗体が宿主組織と反応し、またはその組織において免疫エフェクターT細胞が内因性の自己ペプチドに対して自己免疫性であり組織を破壊する、あるクラスの疾患である。したがって、免疫応答は、自己抗原と呼ばれる対象自身の抗原に対して備わる。自己免疫疾患には、限定はしないが、リウマチ性関節炎、クローン病、多発性硬化症、全身性エリトマトーデス（SLE）、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症（MG）、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、天疱瘡（例えば、尋常性天疱瘡）、バセドウ病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、抗コラーゲン抗体での強皮症、混合性結合組織疾患、多発性筋炎、悪性貧血、突発性アジソン病、自己免疫が関連する不妊、糸球体腎炎（例えば、半月体形成性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎）、水疱性類天疱瘡、シェーグレン症候群、インスリン耐性、および自己免疫性糖尿病が含まれる。

40

【0158】

自己抗原とは、正常な宿主組織の抗原を言う。正常な宿主組織は癌細胞を含まない。したがって、自己免疫疾患との関連における、自己抗原に対して備わる免疫応答は、望まし

50

くない免疫応答であり、正常な組織の破壊およびダメージの原因となるが、癌抗原に対して備わる免疫応答は望ましい免疫応答であり、腫瘍または癌の破壊に寄与する。したがって、自己免疫障害の治療を目的とする本発明のいくつかの態様において、ポリマーを自己抗原、特に自己免疫障害の標的である自己抗原と共に投与することは推奨されない。

【0159】

他の場合において、ポリマーは、低用量の自己抗原と共に送達され得る。多くの動物研究により、低用量の抗原を粘膜投与すると免疫低応答性または「免疫寛容」の状態となり得ることが示されている。活性なメカニズムは、 T_h1 から離れて主に T_h2 および T_h3 (すなわち、 $TGF-\beta$ 支配型の) 応答に偏ったサイトカイン介在性免疫であると考えられる。低用量の抗原送達を用いた活性な抑制はまた、自己免疫疾患、例えばリウマチ性関節炎および SLE の治療において非常に興味深い、関連のない免疫応答を抑制し得る (バースタンダー抑制)。バースタンダー抑制は、局所的な環境における T_h1 逆調節性の抑制サイトカインの分泌を伴い、この環境において、炎症性サイトカインおよび T_h1 サイトカインが抗原特異的または抗原非特異的な様式で放出される。本明細書において用いられる「免疫寛容」は、この現象を言うために用いられる。実際、経口免疫寛容は、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、実験的自己免疫性重症筋無力症、コラーゲン誘導関節炎 (CIA)、およびインスリン依存性糖尿病を含む、動物における多くの自己免疫疾患の治療において効果的である。これらのモデルにおいて、自己免疫疾患の予防および抑制は、抗原特異的な液性応答および細胞性応答の、 T_h1 応答から T_h2 / T_h3 応答への変換と関連している。

【0160】

本発明の組成物および方法は、単独で、または癌の治療に有用な他の作用物質および方法と組み合わせて用いることができる。1つの態様において、本発明は、癌を有する対象を治療する方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法は、癌を有する対象に、効果的な量の本発明の組成物を投与して、対象を治療するステップを含む。

【0161】

1つの態様において、本発明は、癌を有する対象を治療する方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法は、癌を有する対象に、効果的な量の本発明の組成物を投与し、かつ抗癌療法を施して、対象を治療するステップを含む。

【0162】

1つの態様において、本発明は、対象における癌を治療するための薬剤を調製するための、本発明の免疫刺激性ポリマーの使用を提供する。

【0163】

1つの態様において、本発明は、癌の治療に有用な組成物を提供する。この態様に従った組成物は、本発明の免疫刺激性ポリマーおよび癌治療薬を含む。

【0164】

癌を有する対象は、検出可能な癌細胞を有する対象である。癌は、悪性または非悪性の癌であり得る。本明細書において用いる「癌」とは、身体の器官および系統の正常な機能に干渉する、細胞の制御されていない成長を言う。それらの元の位置から移動し重要な器官に播種する癌は、最終的には、罹患した器官の機能低下を介して対象の死をもたらし得る。白血病などの造血性の癌は、対象における正常な造血区画を崩壊させ得、それにより、造血不全 (貧血、血小板減少症、および好中球減少症の形で) をもたらし、最終的には死をもたらす。

【0165】

転移は、原発性腫瘍から身体の他の部分へ癌細胞が播種されることにより生じる、原発性腫瘍の位置とは異なる癌細胞の領域である。原発性腫瘍塊の診断の際、対象は転移の存在について監視され得る。転移は、ほとんどの場合、特定の症候の監視に加え、磁気共鳴画像 (MRI) スキャン、コンピュータ断層撮影 (CT) スキャン、血液および血小板の計数、肝機能の研究、胸部 X 線スキャン、ならびに骨のスキャンを単独でまたは組み合わせて用いて検出される。

【 0 1 6 6 】

癌には、限定はしないが、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系（CNS）の癌、乳癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸の癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭部および頸部の癌、上皮内新生物、腎臓癌、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞性および非小細胞性）、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌（例えば、唇、舌、口、および咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、泌尿器系の癌、ならびに他の癌腫、腺癌、および肉腫が含まれる。

【 0 1 6 7 】

本発明の免疫刺激性組成物はまた、抗癌療法と組み合わせる投与することができる。抗癌療法には、癌治療薬、放射線、および外科手術が含まれる。本明細書において用いる場合、「癌治療薬」とは、癌を治療することを目的として対象に投与される作用物質を言う。本明細書において用いる場合、「癌を治療する」とは、癌の発生の予防、癌の症候の低減、および／または認められた癌の成長の阻害を含む。他の態様において、癌治療薬は、癌が発生する危険性を低減させることを目的として、癌が発生する危険性を有する対象に投与される。癌を治療するための様々なタイプの薬剤が本明細書において記載される。この特定を目的として、癌治療薬は、化学療法剤、免疫療法剤、癌ワクチン、ホルモン療法、および生物応答修飾物質として分類される。

【 0 1 6 8 】

化学療法剤は、メトトレキサート、ピンクリスチン、アドリアマイシン、シスプラチン、糖を含んでい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、プレオマイシン、ドキシソルピシン、ダカルバジン、タキソール、フラジリン、メグラミンGLA、バルルピシン、カルムスタインおよびポリフェルボサン、MMI270、BAY12-9566、RASファメシルトランスフェラーゼ阻害剤、ファメシルトランスフェラーゼ阻害剤、MMP、MTA/LY231514、LY264618/ロメテキソール、グラモレク、CI-994、TNP-470、ハイカムチン/トポテカン、PKC412、バルスポダール/PSC833、ノバントロン/ミトロキサントロン、メタレット/スラミン、パチマスタット、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、インセル/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN698、TA2516/マルミスタット、BB2516/マルミスタット、CDP845、D2163、PD183805、DX8951f、レモナールDP2202、FK317、ピシバニール/OK-432、AD32/バルルピシン、メタストロン/ストロンチウム誘導体、テモダール/テモゾロミド、エバセット/リボソームドキシソルピシン、ヨータキサン/パクリタキセル、タキソール/パクリタキセル、キセロード/カペシタピン、フルツロン/ドキシフルリジン、シクロパックス/経口パクリタキセル、経口タキソイド、SPU-077/シスプラチン、HMR1275/フラボピリドール、CP-358(774)/EGFR、CP-609(754)RAS癌遺伝子阻害剤、BMS-182751/経口プラチナ、UFT(テガフル/ウラシル)、エルガミソール/レバミソール、エニルラシル/776C85/5FUエンハンサー、カンプト/レバミソール、カンプトサル/イリノテカン、ツモデックス/ラリトレキセド、ロイスタチン/クラドリピン、パクセクス/パクリタキセル、ドキシル/リボソームドキシソルピシン、カエリクス/リボソームドキシソルピシン、フルダラ/フルダラビン、ファーマルピシン/エピルピシン、DepoCyt、ZD1839、LU79553/ビスナフタルイミド、LU103793/ドラスティン、カエチクス/リボソームドキシソルピシン、ジェムザール/ゲムシタピン、ZD0473/アノルメド、YM116、ヨードシード、CDK4およびCDK2阻害剤、PARP阻害剤、D4809/デキシフォサミド、イフェス/メスネクス/イフォサミド、ブモン/テニボシド、パラプラチン/カルボプラチン、プランチノール/シスプラチン、ベペシド/エトポシド、ZD9331、タキソテル/ドセタキセル、グアニンアラビノシドのプロドラッグ、タキサン類似体、ニトロソウ

10

20

30

40

50

レア、メルフェランおよびシクロホスファミドなどのアルキル化剤、アミノグルテチミド、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クロロムブシル、シタラピンHCl、ダクチノマイシン、ダウノルビシンHCl、リン酸エストラムスチンナトリウム、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、ヒドロキシウレア(ヒドロキシカルバミド)、イフォスファミド、インターフェロン-2a、-2b、酢酸ロイプロリド(LHRH放出因子類似体)、ロムスチン(CCNu)、メクロレタミンHCl(ナイトロジェンマスタード)、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HCl、オクトレオチド、プリカマイシン、プロカルバジンHCl、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、硫酸ビンブラスチン、アムサクリン(m-AMSA)、アザシチジン、エルスロポエチン、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、メチルグリオキサリビスグアニルヒドラゾン、MGBG)、ペントスタチン(2'-デオキシコホルマイシン)、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からなる群から選択することができるが、これに限定はされない。

10

【0169】

免疫療法剤は、3622W94、4B5、ANA Ab、抗FLK-2、抗VEGF、ATRAGEN、AVASTIN(ベバシズマブ、Genentech)、BABs、BEC2、BEXXAR(トシツモマブ、GlaxoSmithKline)、C225、CAMPATH(アレムツズマブ、Genzyme Corp.)、CEACIDE、CMA676、EMD-72000、ERBITUX(セツキシマブ、ImClone Systems, Inc.)、グリオマブ-H、GNI-250、HERCEPTIN(トラスツズマブ、Genentech)、IDEC-Y2B8、ImmuRAIT-CEA、iorc5、ior egf.r3、ior t6、LDP-03、LymphoCide、MDX-11、MDX-22、MDX-210、MDX-220、MDX-260、MDX-447、MELIMMUNE-1、MELIMMUNE-2、モノファームC、NovoMab-G2、オンコリム、OV103、オバレックス、パノレックス、プレターゲット、クアドラメット、リブタキシン、RITUXAN(リツキシマブ、Genentech)、SMART 1D10Ab、SMART ABL364Ab、SMART M195、TNT、およびZENAPAX(ダクリズマブ、Roche)からなる群から選択することができるが、これに限定はされない。

20

30

【0170】

癌ワクチンは、EGF、抗イディオタイプ癌ワクチン、Gp75抗原、GMK黒色腫ワクチン、MGVガングリオシド結合ワクチン、Her2/neu、オバレックス、M-Vax、O-Vax、L-Vax、STn-KHLセラトープ、BLP25(MUC-1)、リポソームイディオタイプワクチン、メラシン、ペプチド抗原ワクチン、毒素/抗原ワクチン、MVAに基づいたワクチン、PACIS、BCGワクチン、TA-HPV、TA-CIN、DISCウイルス、およびImmuCyst/TheraCysからなる群から選択することができるが、これに限定はされない。

【0171】

本発明の組成物および方法は、単独で、またはアレルギーの治療に有用な他の抗原および方法と組み合わせて用いることができる。1つの態様において、本発明は、アレルギー症状を有する対象を治療する方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法は、アレルギー症状を有する対象に、効果的な量の本発明の組成物を投与して、対象を治療するステップを含む。

40

【0172】

1つの態様において、本発明は、アレルギー症状を有する対象を治療する方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法は、アレルギー症状を有する対象に、効果的な量の本発明の組成物を投与し、かつ抗アレルギー療法を施して、対象を治療するステップを含む。

50

【 0 1 7 3 】

1つの態様において、本発明は、対象におけるアレルギー症状を治療するための薬剤を調製するための、本発明の免疫刺激性ポリマーの使用を提供する。

【 0 1 7 4 】

1つの態様において、本発明は、アレルギー症状の治療に有用な組成物を提供する。この態様に従った組成物は、本発明の免疫刺激性ポリマーおよびアレルギー治療薬を含む。

【 0 1 7 5 】

「アレルギー症状を有する対象」とは、アレルゲンに応答したアレルギー反応を現在有しているかまたは以前に有していた対象を言う。「アレルギー症状」または「アレルギー」とは、物質（アレルゲン）に対する後天的な過敏性を言う。アレルギー症状には、限定はしないが、湿疹、アレルギー性鼻炎またはコリーザ、花粉症、アレルギー性結膜炎、気管支喘息、じんましん、および食物アレルギー、アトピー性皮膚炎を含む他のアトピー性症状、アナフィラキシー、薬物アレルギー、ならびに血管性浮腫が含まれる。

【 0 1 7 6 】

アレルギーは典型的には、アレルゲンに対する、特定のクラスの免疫グロブリンである I g E からの抗体の産生と関連する、一過性の症状である。一般的な空気アレルゲンに対する I g E 介在性の応答の発生はまた、喘息の発生に対する傾向を示す因子である。アレルゲンが、好塩基球（血液内を循環している）または肥満細胞（固形組織全体に分散している）の表面上の I g E F c 受容体（F c R）に結合している特定の I g E に出会うと、細胞は活性化し、その結果、ヒスタミン、セロトニン、および脂質メディエーターなどのメディエーターが産生および放出される。

【 0 1 7 7 】

アレルギー反応は、I g E 型の組織感作免疫グロブリンが異物のアレルゲンと反応すると生じる。I g E 抗体は、肥満細胞および/または好塩基球に結合し、これらの特殊化した細胞は、抗体分子の末端を架橋するアレルゲンによって、アレルギー反応の化学メディエーター（血管作動性アミン）を放出するように刺激されると、そのような放出を行う。ヒスタミン、血小板活性化因子、アラキドン酸代謝物、およびセロトニンは、人間におけるアレルギー反応の最も知られているメディエーターの一部である。ヒスタミンおよび他の血管作動性アミンは、通常は肥満細胞および好塩基性リンパ球の中に貯蔵されている。肥満細胞は動物組織の全体にわたり分散しており、好塩基球は血管系の内部を循環する。これらの細胞は、I g E の結合を伴う一連の特殊化した事象が生じてヒスタミンの放出を引き起こさない限り、細胞内でヒスタミンを製造および貯蔵する。

【 0 1 7 8 】

アレルギー反応の症候は、I g E が抗原と反応する身体内の位置に応じて変化する。反応が気道上皮に沿って生じる場合、症候は通常、くしゃみ、咳、および喘息反応である。食物アレルギーのケースなどのように消化管において相互作用が生じる場合、腹部の痛みおよび下痢が一般的である。例えばアレルギー性の対象がハチに刺された後またはペニシリンを投与された後に生じる、全身性アレルギー反応は、重度であり得、生命に関わることも多い。

【 0 1 7 9 】

アレルギーは、T h 2 型の免疫応答と関連しており、この応答は、T h 2 サイトカインである I L - 4 および I L - 5、ならびに I g E への抗体アイソタイプスイッチを少なくとも部分的に特徴とする。本発明の免疫刺激性ポリマーは、免疫応答を T h 1 型の免疫応答に偏らせることが可能であるため、それ自体、アレルギー症状を有する対象を治療するために有用である。それに代わって、またはそれに加えて、本発明の免疫刺激性ポリマーは、アレルギー症状を有する対象を治療するためにアレルゲンと組み合わせて用いることができる。

【 0 1 8 0 】

本発明の免疫刺激性組成物はまた、抗アレルギー療法と組み合わせて投与することができる。アレルギーを治療または予防するための従来の方法は、アレルギー治療薬または脱

10

20

30

40

50

感作療法の使用を伴うものである。アレルギーを治療または予防するためのいくつかの開発中の治療法は、抗IgE抗体の中和の使用を含む。アレルギー反応の化学メディエーターの効果を遮断する抗ヒスタミンおよび他の薬剤は、アレルギー症候の重症度を調節するのに役立つが、アレルギー反応の予防はせず、その後のアレルギー応答に対する効果を有さない。脱感作療法は、低用量のアレルゲンを、通常は皮下注射によって投与することにより行い、それによりアレルゲンに対するIgG型の応答を誘発するものである。IgG抗体が存在すると、IgE抗体の誘発により生じるメディエーターの産生の中和が促進されると考えられている。最初は、対象は、重度の反応の誘発を避けるために非常に低用量のアレルゲンをを用いて治療され、用量は徐々に増大する。このタイプの治療法は、アレルギー反応を生じさせる化合物を対象が実際に投与され、重度のアレルギー反応が生じ得るため、危険である。

10

【0181】

アレルギー治療薬には、限定はしないが、抗ヒスタミン、コルチコステロイド、およびプロスタグランジン誘発剤が含まれる。抗ヒスタミンは、肥満細胞または好塩基球により放出されるヒスタミンに拮抗する化合物である。これらの化合物は、当技術分野において周知であり、アレルギーの治療に一般に用いられている。抗ヒスタミンには、限定はしないが、アクリバスチン、アステミゾール、アザタジン、アゼラスチン、ベータタスチン、ブロムフェニラミン、ブクリジン、セチリジン、セチリジン類似体、クロルフェニラミン、クレマスチン、CS560、シプロヘプタジン、デスロラタジン、デクスクロルフェニラミン、エバスチン、エピナスチン、フェキソフェナジン、HSR609、ヒドロキシジン、レボカバスチン、ロラチジン、メトスコボラミン、ミゾラスチン、ノルアステミゾール、フェニンダミン、プロメタジン、ピリラミン、テルフェナジン、およびトラニラストが含まれる。

20

【0182】

コルチコステロイドには、限定はしないが、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、ベクロメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、フルニソリド、フルチカゾンプロピオネート、およびトリアムシノロンが含まれる。デキサメタゾンは抗炎症性作用を有するコルチコステロイドであるが、これは高度に吸収され、効果的な用量で長期にわたる抑制性の副作用を有するため、吸入形態ではアレルギーまたは喘息の治療には通常は用いられない。しかし、デキサメタゾンは、本発明の組成物と組み合わせて投与すると低用量で投与でき、副作用を低減することができるため、アレルギーまたは喘息を治療するために本発明に従って用いることができる。コルチコステロイドの使用に関連する副作用の一部には、咳、発声困難、口腔がこう瘡（カンジダ症）が含まれ、高用量では、副腎抑制、耐糖能異常、骨粗しょう症、無腐性骨壊死、白内障形成、成長抑制、高血圧、筋力低下、皮膚のひ薄化、およびあざのできやすさなどの、全身性の影響が含まれる。BarnesおよびPeterson(1993年)Am Rev Respir Dis 148:S1~S26頁、ならびにKamada AKら(1996年)Am J Respir Crit Care Med 153:1739~48頁を参照されたい。

30

【0183】

本発明の組成物および方法は、単独で、または喘息の治療に有用な他の作用物質および方法と組み合わせて用いることができる。1つの態様において、本発明は、喘息を有する対象を治療する方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法は、喘息を有する対象に、効果的な量の本発明の組成物を投与して、対象を治療するステップを含む。1つの態様において、本発明は、喘息を有する対象を治療する方法を提供する。この態様に従った方法は、喘息を有する対象に、効果的な量の本発明の組成物を投与し、かつ抗喘息療法を施して、対象を治療するステップを含む。

40

【0184】

1つの態様において、本発明は、対象における喘息を治療するための薬剤を調製するための、本発明の免疫刺激性ポリマーの使用を提供する。1つの態様において、本発明は、喘息の治療に有用な組成物を提供する。この態様に従った組成物は、本発明の免疫刺激性

50

ポリマーおよび喘息治療薬を含む。

【0185】

本明細書において用いる「喘息」とは、気道の炎症および狭窄、ならびに吸入された作用物質に対する気道の反応性の増大を特徴とする、呼吸器系の障害を言う。喘息はしばしば、非排他的ではあるが、アトピー性症状またはアレルギー症状と関連する。喘息の症候には、気流閉塞により生じる、喘鳴、息切れ、胸部圧迫感、および咳の再発性の発作が含まれる。喘息に関連する気道の炎症は、気道上皮の露出、基底膜下でのコラーゲン蓄積、浮腫、肥満細胞の活性化、好中球、好酸球、およびリンパ球を含む炎症性細胞の浸潤などの、多くの生理学的変化の観察によって検出することができる。気道の炎症の結果、喘息の患者は、気道の高応答性、気流の制限、呼吸器の症候、および疾患の慢性化を有することが多い。気流の制限には、気管支閉塞をもたらすことが多い特徴である、急性気管支収縮、気道浮腫、粘液栓の形成、および気道の再構成が含まれる。喘息のいくつかのケースにおいて、副基底膜線維症が生じ得、それにより肺の機能において持続性の異常が生じる。

10

【0186】

過去数年間にわたる調査により、喘息は、炎症性細胞、メディエーター、ならびに気道に固有の他の細胞および組織の間の複雑な相互作用により生じると考えられることが明らかになっている。肥満細胞、好酸球、上皮細胞、マクロファージ、および活性化T細胞は全て、喘息に関連する炎症プロセスにおいて重要な役割を有する。Djukovic Rら(1990年) Am Rev Respir Dis 142:434~457頁を参照されたい。これらの細胞は、局所的な組織に直接的または間接的に作用し得る、事前に形成されたおよび新たに合成されたメディエーターの分泌を介して、気道の機能に影響し得ると考えられる。Tリンパ球の亜集団(Th2)が、選択的サイトカインの放出および疾患の慢性化の確立によって、気道におけるアレルギー性炎症の調節において重要な役割を有することも認められている。Robinson DSら(1992年) N Engl J Med 326:298~304頁を参照されたい。

20

【0187】

喘息は、発生における異なる段階で生じる複雑な障害であり、症候の程度に基づいて、急性、亜急性、または慢性として分類することができる。急性の炎症性応答は、気道への細胞の初期の動員に関連する。亜急性の炎症性応答は、細胞の動員、およびさらに持続性の炎症パターンを生じさせる固有の細胞の活性化を伴う。慢性の炎症性応答は、永続的な気道の異常をもたらす得る、持続性レベルの細胞ダメージおよび進行中の修復プロセスを特徴とする。「喘息を有する対象」は、気道の炎症および狭窄、ならびに吸入された作用物質に対する気道の反応性の増大を特徴とする、呼吸器系の障害を有する対象である。喘息の開始に関連する因子には、限定はしないが、アレルゲン、低温、運動、ウイルス感染、およびSO₂が含まれる。

30

【0188】

上述したように、喘息は、Th2サイトカインであるIL-4およびIL-5、ならびにIgEへの抗体アイソタイプスイッチを少なくとも部分的に特徴とする、Th2型の免疫応答に関連し得る。Th1およびTh2免疫応答は相互に逆調節性であり、そのため、免疫応答がTh1型の免疫応答に偏ることにより、アレルギーを含むTh2型の免疫応答を予防または改善することができる。したがって、本発明の修飾オリゴリボヌクレオチド類似体は、免疫応答をTh1型の免疫応答に偏らせることが可能であるため、それ自体、喘息を有する対象を治療するために有用である。それに代わって、またはそれに加えて、本発明の修飾オリゴリボヌクレオチド類似体は、喘息を有する対象を治療するためにアレルゲンと組み合わせる用いることができる。

40

【0189】

本発明の免疫刺激性組成物はまた、喘息療法と組み合わせる投与することができる。喘息を治療または予防するための従来の方法は、抗アレルギー療法(上述した)、および吸入性作用物質を含む多くの他の作用物質の使用を伴うものである。

50

【0190】

喘息の治療のための薬剤は、通常、急速緩和薬および長期管理薬の2つのカテゴリーに分けられる。喘息の患者は持続性喘息の管理を達成および維持するために、毎日、長期管理薬を接種する。長期管理薬には、コルチコステロイド、クロモグリク酸ナトリウム、およびネドクロミルなどの抗炎症性作用物質、長時間作用性 β_2 -アゴニストおよびメチルキサンチンなどの長期作用性気管支拡張剤、ならびにロイコトリエン修飾物質が含まれる。急速緩和薬には、短期作用性 β_2 -アゴニスト、抗コリン作動薬、および全身性コルチコステロイドが含まれる。これらの薬剤のそれぞれに関連する多くの副作用が存在し、単独のまたは組み合わせた薬剤のいずれも、喘息を予防するかまたは完全に治療することができない。

10

【0191】

喘息治療薬には、限定はしないが、PDE-4阻害剤、気管支拡張剤/ β_2 -アゴニスト、 K^+ チャネルオープナー、VLA-4アンタゴニスト、ニューロキンアンタゴニスト、トロンボキサナ2(TXA2)合成阻害剤、キサンチン、アラキドン酸アンタゴニスト、5リボキシゲナーゼ阻害剤、TXA2受容体アンタゴニスト、TXA2アンタゴニスト、5-リボックス活性化タンパク質の阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤が含まれる。

【0192】

気管支拡張剤/ β_2 -アゴニストは、気管支拡張または平滑筋の弛緩を生じさせる、あるクラスの化合物である。気管支拡張剤/ β_2 -アゴニストには、限定はしないが、サルメテロール、サルブタモール、アルブテロール、テルブタリン、D2522/ホルモテロール、フェノテロール、ピトルテロール、ビルブエロールメチルキサンチン、およびオルシブレナリンが含まれる。長期作用性 β_2 -アゴニストおよび気管支拡張剤は、抗炎症療法に加えて症候の長期の予防のために用いられる化合物である。長期作用性 β_2 -アゴニストには、限定はしないが、サルメテロールおよびアルブテロールが含まれる。これらの化合物は、通常はコルチコステロイドと組み合わせて用いられ、通常は、何らかの炎症療法を伴わずに用いられることはない。これらの化合物は、頻脈、骨格筋の震え、低カリウム症、および過剰投与におけるQTc間隔の延長などの副作用に関連するものである。

20

【0193】

例えばテオフィリンを含む、メチルキサンチンは、症候の長期の管理および予防のために用いられている。これらの化合物は、ホスホジエステラーゼの阻害およびおそらくはアデノシン拮抗作用により生じる気管支拡張を生じさせる。用量依存性の急性毒性は、これらのタイプの化合物で特に問題である。その結果、毒性、および個体ごとの代謝クリアランスの違いにより生じる狭い治療範囲を明らかにするために、通常は血清濃度を監視しなくてはならない。副作用には、頻脈、頻脈性不整脈、吐き気および嘔吐、中枢神経系の刺激、頭痛、発作、吐血、高血糖、ならびに低カリウム症が含まれる。短期作用性 β_2 -アゴニストには、限定はしないが、アルブテロール、ピトルテロール、ビルブテロール、およびテルブタリンが含まれる。短期作用性 β_2 -アゴニストの投与に関連する副作用の一部には、頻脈、骨格筋の震え、低カリウム症、乳酸の増加、頭痛、および高血糖が含まれる。

30

【0194】

クロモグリク酸ナトリウムおよびネドクロミルは、運動により生じる喘息症候またはアレルギーにより生じるアレルギー症候を主に予防するための長期管理薬として用いられる。これらの化合物は、塩化物チャネルの機能に干渉することによりアレルギーに対する初期および後期の反応を遮断すると考えられている。これらはまた、肥満細胞膜を安定化させ、メディエーターの活性化ならびに好イノシン細胞および上皮細胞からのメディエーターの放出を阻害する。通常、4から6週間の投与が、最大の効果を得るために必要である。

40

【0195】

抗コリン作動薬は、通常、急性気管支けいれんを緩和するために用いられる。これらの化合物は、ムスカリン性コリン作動性受容体の競合的阻害により機能すると考えられる。抗コリン作動薬には、限定はしないが、臭化イبراتロピウムが含まれる。これらの化合

50

物は、コリン作動的介在性の気管支けいれんのみを食い止め、抗原に対するいずれの反応も修飾しない。副作用には、口および呼吸器分泌物の渇き、いくつかの個体における喘鳴の増大、ならびに眼に吹きかけられた場合の視界のぼやけが含まれる。

【0196】

本発明の免疫刺激性ポリマーはまた、気道の再構成を治療するためにも有用であり得る。気道の再構成は、平滑筋細胞の増殖および/または気道における粘膜下層の肥厚により生じ、最終的には、気流の制限をもたらす気道の狭窄を生じさせる。本発明の免疫刺激性ポリマーは、さらなる再構成を予防し得、場合により、再構成のプロセスにより生じる組織の形成をさらに低減させる。

【0197】

本発明の免疫刺激性ポリマーはまた、樹状細胞の生存、分化、活性化、および成熟を改善するために有用である。免疫刺激性オリゴリボヌクレオチドは、樹状細胞の生存、分化、活性化、および成熟を促進する固有の能力を有する。

【0198】

本発明の免疫刺激性ポリマーはまた、ナチュラルキラー細胞の溶解活性および抗体依存性細胞毒性(ADCC)を増大させる。ADCCは、免疫刺激性ポリマーを、癌細胞などの細胞標的に特異的な抗体と組み合わせて用いて行うことができる。免疫刺激性ポリマーが抗体と組み合わされて対象に投与されると、対象の免疫系は、腫瘍細胞を殺すように誘発される。ADCC手順において有用な抗体には、体内の細胞と相互作用する抗体が含まれる。細胞標的に特異的なこのような抗体の多くは、当技術分野において記載されており、多くは市販されている。1つの実施形態において、抗体はIgG抗体である。

【0199】

特定の態様において、本発明は、エピトープの拡大を増強するための方法を提供する。本明細書において用いられる「エピトープの拡大」とは、最初の焦点である、自己タンパク質または異種タンパク質に対するドミナントエピトープ特異的な免疫応答から、そのタンパク質(分子内拡大)または他のタンパク質(分子間拡大)に対するサブドミナントエピトープおよび/または潜在性エピトープへの、エピトープの特異性の多様化を言う。エピトープの拡大により、複数のエピトープ特異的な免疫応答が生じる。

【0200】

免疫応答は、自己免疫疾患におけるように有害な、またはワクチン接種におけるように有益な、最初の拡大段階と、免疫系をホメオスタシスに戻し、記憶を生じさせる、その後の下方調節段階とからなる。エピトープの拡大は、両方の段階の重要な構成要素であり得る。腫瘍の形成におけるエピトープの拡大の増強は、対象の免疫系による、元の治療プロトコルに免疫系によって最初は認識されなかった、さらなる標的エピトープの決定を可能にし、一方で、腫瘍集団におけるエスケープ変異体の可能性を低減させ、それにより疾患の進行に作用する。

【0201】

本発明のオリゴリボヌクレオチドは、癌、ウイルス感染および細菌感染、ならびにアレルギーなどの治療上有利な適応症において、エピトープの拡大を促進するために有用であり得る。1つの実施形態における方法は、抗原を含むワクチンとアジュバントとを対象に投与し、その後、複数のエピトープ特異的な免疫応答を誘発するのに効果的な量の本発明の免疫刺激性ポリマーを対象に少なくとも2回投与するステップを含む。1つの実施形態における方法は、腫瘍抗原を含むワクチンとアジュバントとを対象に投与し、その後、複数のエピトープ特異的な免疫応答を誘発するのに効果的な量の本発明の免疫刺激性ポリマーを対象に少なくとも2回投与するステップを含む。1つの実施形態における方法は、対象における免疫系の抗原への曝露をもたらす治療プロトコルを適用し、その後、本発明の免疫刺激性オリゴリボヌクレオチドを少なくとも2回投与して、複数のエピトープ特異的な免疫応答を誘発すること、すなわちエピトープの拡大を促進することを伴う。様々な実施形態において、治療プロトコルは、手術、放射線、化学療法、他の癌治療薬、ワクチン、または癌ワクチンである。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 2 】

治療プロトコルは、その後の免疫刺激性療法に加えて、免疫刺激剤と組み合わせて実施することができる。例えば、治療プロトコルがワクチンである場合、それはアジュバントと組み合わせて投与することができる。ワクチンとアジュバントとの組合せは混合物であり得るか、または別個の投与、すなわち注射（すなわち同一のドレナージ領域）であり得る。投与は同時である必要はない。同時でない注射が用いられる場合、タイミングは、アジュバントの事前の注射と、その後のワクチン製剤の注射を伴い得る。

【 0 2 0 3 】

治療プロトコルが実施された後、免疫刺激性の単独療法が開始される。投与の、最適化された頻度、期間、および部位は、標的および他の因子に依存するが、例えば、6 カ月間から2 年間にわたる、1 カ月に1 回から2 カ月に1 回の投与であり得る。あるいは、投与は、毎日、1 週間に1 回、もしくは2 週間に1 回を基本としたものであり得るか、または投与は、1 日、1 週間、もしくは1 カ月の間に複数回行ってもよい。いくつかの場合において、投与期間は治療の長さに依存し得、例えば、投与期間は1 週間後、1 カ月後、1 年後、または数年後に終わるものであり得る。他の場合には、単独療法は、点滴を用いる場合のように連続的であり得る。免疫刺激剤は、標的に一般的なドレナージ領域に投与することができる。

10

【 0 2 0 4 】

治療における使用では、化合物の活性、投与の様式、免疫化の目的（すなわち、予防的か治療的か）、障害の性質および重症度、対象の年齢および体重に応じて、対象の治療に異なる用量が必要であり得る。所与の用量の投与は、個別の投与単位の形態での単回投与、またはより少ない用量のいくつかの単位の両方によって行うことができる。数週間または数カ月間の特定の期間をあけての複数回の投与は、抗原特異的免疫応答を高めるために一般的なものである。

20

【 0 2 0 5 】

本明細書において提供される教示と組み合わせて、様々な活性化化合物、ならびに有効性、相対的な生物学的利用能、患者の体重、副作用の重症度、および好ましい投与様式などの計量因子の間で選択することにより、大きな毒性を生じさせず、さらに特定の対象を治療するために完全に効果的である、効果的な予防的または治療的な処理のレジメンを計画することができる。あらゆる特定の適用のための効果的な量は、治療する疾患もしくは症状、投与する特定の治療作用物質、対象のサイズ、または疾患もしくは症状の重症度などの因子に応じて変化し得る。当業者は、不必要な実験を必要とすることなく、効果的な量の特定の核酸および/または他の治療作用物質を経験的に決定することができる。

30

【 0 2 0 6 】

本明細書において記載される化合物の対象用量は、典型的には約 0 . 1 μ g から 1 0 0 0 m g、より典型的には約 1 μ g / 日から 8 0 0 0 m g、最も典型的には約 1 0 μ g から 1 0 0 μ g の範囲である。対象の体重に関して言うと、典型的な用量は、約 0 . 1 μ g から 2 0 m g / k g / 日、より典型的には約 1 から 1 0 m g / k g / 日、そして最も典型的には約 1 から 5 m g / k g / 日の範囲である。

【 0 2 0 7 】

40

核酸および/または他の化合物を含む医薬組成物は、薬剤を投与するためのあらゆる適切な経路によって投与することができる。様々な投与経路が利用可能である。選択される特定の様式は、当然のことながら、選択される特定の1 つまたは複数の作用物質、治療する特定の症状、および治療上の有効性に必要な用量に依存する。本発明の方法は、一般的に言えば、医学的に許容できるあらゆる投与様式、すなわち臨床上許容できない副作用を生じさせることなく効果的なレベルの免疫応答を生じさせるあらゆる様式を用いて実施することができる。好ましい投与様式は本明細書において論じられる。治療における使用では、効果的な量の核酸および/または他の治療作用物質を、作用物質を所望の表面、例えば粘膜表面、全身の表面に送達するあらゆる様式によって、対象に投与することができる。

50

【0208】

本発明の医薬組成物の投与は、当業者に知られているあらゆる手段によって行うことができる。投与の経路には、限定はしないが、経口、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、舌下、気管内、吸入、皮下、眼、膣、および直腸が含まれる。喘息またはアレルギーの治療または予防では、このような化合物は好ましくは、吸入されるか、摂取されるか、または全身的な経路により投与される。全身的な経路には、経口および非経口が含まれる。吸入性薬剤は、主に喘息患者における炎症部位である肺に直接的に送達するため、いくつかの実施形態において好ましい。いくつかのタイプの装置が、吸入による投与のために通常用いられる。これらのタイプの装置には、定量吸入器(MDI)、呼吸作動型MDI、乾燥粉末吸入器(DPI)、MDIと組み合わせたスプレー/ホールディングチャンバー、および噴霧器が含まれる。

10

【0209】

本発明の治療用作用物質は、ベクターを用いて、特定の組織、細胞型に送達され得るか、もしくは免疫系に送達され得るか、またはその両方である。「ベクター」は、その最も広い意味において、標的細胞への組成物の運搬を容易にし得るあらゆる媒体である。ベクターは通常、免疫刺激性の核酸、抗体、抗原、および/または障害特異的な薬剤を、ベクターの不存在下において生じる分解の程度よりも分解を少なくして、標的細胞に運搬する。

【0210】

通常は、本発明において有用なベクターは、生物学的ベクターおよび化学的/物理学的ベクターの2つのクラスに分けられる。生物学的ベクターおよび化学的/物理学的ベクターは、本発明の治療用作用物質の送達および/または取り込みにおいて有用である。

20

【0211】

ほとんどの生物学的ベクターは、核酸の送達に用いられ、これは、免疫刺激性核酸であるかまたはその核酸を含む治療用作用物質の送達において最も適している。

【0212】

本明細書において論じられる生物学的ベクターに加え、化学的/物理学的ベクターを、免疫刺激性の核酸、抗体、抗原、および障害特異的な薬剤を含む治療用作用物質の送達に用いることができる。本明細書において用いる場合、「化学的/物理学的ベクター」とは、核酸および/または他の薬剤を送達し得る、細菌源またはウイルス源に由来するもの以外の天然または合成の分子を言う。

30

【0213】

本発明の好ましい化学的/物理学的ベクターは、コロイド分散系である。コロイド分散系には、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む、脂質に基づいた系が含まれる。本発明の好ましいコロイド系はリポソームである。リポソームは、インビボまたはインビトロで送達ベクターとして有用な、人工の膜の管である。0.2~4.0 μm のサイズ範囲である大きな単層ベシクル(LUV)が大きな巨大分子をカプセル化し得ることが示されている。RNA、DNA、およびインタクトなビリオンは水性の内部にカプセル化され得、生物学的に活性な形態で細胞に送達され得る。Fraleyら(1981年) Trends Biochem Sci 6:77頁を参照されたい。

40

【0214】

リポソームは、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、またはタンパク質などの特異的なリガンドにリポソームを結合することによって、特定の組織に標的化され得る。リポソームを免疫細胞に標的化させるために有用であり得るリガンドには、限定はしないが、免疫細胞に特異的な受容体および分子と相互作用する、インタクトなまたは断片状の分子、例えば、免疫細胞の細胞表面マーカーと相互作用する抗体が含まれる。このようなリガンドは、当業者に周知の結合アッセイによって容易に同定することができる。さらに他の実施形態において、リポソームは、これまでに論じられている免疫療法抗体の1つにリポソームを結合させることによって、癌に標的化することができる。さらに、ベクターは、宿主細胞の核にベクターを方向付ける、核を標的化するペプチドに結合することができる。

50

【0215】

トランスフェクションのための脂質製剤は、例えばEFFECTENE（商標）（特殊なDNA凝縮エンハンサーを有する非リポソーム性の脂質）およびSUPERFECT（商標）（新規な作用性デンドリマー技術）として、QIAGENにより市販されている。リポソームは、例えばLIPOFECTIN（商標）およびLIPOFECTACE（商標）としてGibco BRLから市販されており、これらは、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩酸塩（DOTMA）およびジメチルジオクタデシルアンモニウム硫酸塩（DDAB）などの陽イオン性脂質で形成されるものである。リポソームを作製するための方法は、当技術分野において周知であり、多くの刊行物において記載されている。リポソームはまた、Gregoria 10
dis G（1985年）Trends Biotechnol 3:235~241頁によって概説されている。

【0216】

とりわけN-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチル硫酸塩（DOTAP）を含む、特定の陽イオン性脂質は、本発明の修飾オリゴリボヌクレオチド類似体と組み合わせると特に有利であると考えられる。

【0217】

1つの実施形態において、媒体は、哺乳動物レシピエントへの移植または投与に適した、生体適合性のマイクロ粒子または移植片である。本方法に従って有用な、例示的な生体内分解性の移植片は、PCT国際出願第PCT/US/03307（「Polymeric Gene Delivery System」という名称の、公開番号WO95/24929に記載されている。PCT/US/03307は、適切なプロモーターの制御下で外来遺伝子を含ませるための、生体適合性の、好ましくは生物分解性のポリマーマトリクスを記載している。ポリマーマトリクスは、対象において治療用作用物質の持続放出を達成するために用いることができる。

【0218】

ポリマーマトリクスは、好ましくは、ミクロスフェア（この中で、核酸および/または他の治療用作用物質が固体ポリマーマトリクスの全体に分散している）またはマイクロカプセル（この中で、核酸および/または他の治療用作用物質が、ポリマー殻の中心に貯蔵されている）などのマイクロ粒子の形態である。治療用作用物質を含ませるための、他の形態のポリマーマトリクスには、フィルム、被覆、ゲル、移植片、およびステントが含まれる。ポリマーマトリクス装置のサイズおよび組成は、マトリクスが導入される組織における好ましい放出動態が得られるように選択される。ポリマーマトリクスのサイズはさらに、用いられる送達方法、典型的には組織内への注射、または鼻および/もしくは肺の領域内への噴霧による懸濁液の投与に従って選択される。好ましくは、噴霧経路が用いられる場合、ポリマーマトリクスならびに核酸および/または他の治療用作用物質は、界面活性剤の媒体に包含される。ポリマーマトリクス組成物は、好ましい分解速度を有するように、かつさらに生体接着性である材料で作製されるように選択して、損傷を受けている鼻および/または肺の表面にマトリクスが投与された場合の運搬の有効性をさらに増大させることができる。マトリクス組成物はまた、分解しないように、しかしそれ以上に、長時間にわたる拡散によって放出するように、選択することができる。いくつかの好ましい実施形態において、核酸は移植片を介して対象に投与されるが、他の治療用作用物質は急性に投与される。経口送達または粘膜送達などの送達に適した生体適合性のミクロスフェアは、Chickeringら（1996年）Biotech Bioeng 52:96~101頁、およびMathiowitz Eら（1997年）Nature 386:410~414頁、およびPCT特許出願WO97/03702において記載されている。

【0219】

非生物分解性および生物分解性のポリマーマトリクスの両方を、核酸および/または他の治療用作用物質を対象に送達するために用いることができる。生物分解性のマトリクス 50

が好ましい。このようなポリマーは、天然または合成のポリマーであり得る。ポリマーは、放出させたい期間に基づいて選択され、この期間は通常、数時間から１年程度、またはそれ以上である。典型的には、特に核酸作用物質では、数時間から３～１２カ月の範囲の期間にわたる放出が最も望ましい。ポリマーは、水中でその重量の最大約９０％を吸収し得るヒドロゲルの形態であってもよく、さらに、多価イオンまたは他のポリマーと架橋していてもよい。

【０２２０】

特別に興味深い生体接着性ポリマーには、その教示が本明細書に組み込まれる *Macromolecules* (1993年) 26: 581~587頁において H. S. Sawhney、C. P. Pathak、および J. A. Hubell によって記載されている、生体内分解性のヒドロゲルが含まれる。これらには、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ酸無水物、ポリアクリル酸、アルギン酸塩、キトサン、ポリ(メタクリル酸メチル)、ポリ(メタクリル酸エチル)、ポリ(メタクリル酸ブチル)、ポリ(メタクリル酸イソブチル)、ポリ(メタクリル酸ヘキシル)、ポリ(メタクリル酸イソデシル)、ポリ(メタクリル酸ラウリル)、ポリ(メタクリル酸フェニル)、ポリ(アクリル酸メチル)、ポリ(アクリル酸イソプロピル)、ポリ(アクリル酸イソブチル)、およびポリ(アクリル酸オクタデシル)が含まれる。

【０２２１】

治療作用物質が核酸である場合、圧縮剤の使用もまた望ましい場合がある。圧縮剤はまた、単独で、または生物学的ベクターもしくは化学的／物理学的ベクターと組み合わせる用いることができる。「圧縮剤」は、本明細書において用いる場合、核酸上の負の荷電を中和し、それにより核酸が細かい粒子に圧縮することを可能にする、ヒストンなどの作用物質を言う。核酸の圧縮により、標的細胞による核酸の取り込みが促進される。圧縮剤は、単独で用いる、すなわち、細胞によりさらに効果的に取り込まれる形態で核酸を送達することができるか、または、より好ましくは、１つもしくは複数の上記のベクターと組み合わせる用いることができる。

【０２２２】

核酸の取り込みを促進するために用いることができる他の例示的な組成物には、リン酸カルシウム、ならびに細胞内輸送の他の化学的メディエーター、マイクロインジェクション組成物、エレクトロポレーション組成物、および相同組換え組成物(例えば、標的細胞の染色体内の事前選択した位置に核酸を組み込むための)が含まれる。

【０２２３】

上述したように、本発明のポリマーは送達媒体と共に製剤される。例えば、渦巻状物、*Emulsomes* (登録商標)、*ISCOM* (登録商標)、生の細菌ベクター(例えば、サルモネラ(*Salmonella*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、カルメット・ゲラン桿菌(*Bacillus Calmette-Guerin*)、赤痢菌(*Shigella*)、乳酸菌(*Lactobacillus*))、生のウイルスベクター(例えば、ワクシニア、アデノウリウス、単純ヘルペス)、ミクロスフェア、核酸ワクチン、ポリマー(例えば、カルボキシメチルセルロース、キトサン)、ポリマー環、プロテオソーム、フッ化ナトリウム、トランスジェニック植物という送達媒体が記載されている。本発明のいくつかの実施形態において、送達媒体は、リボソーム、ニオソーム、リボプレックス、ポリプレックス、リボポリプレックス、油中水型(W/O)エマルジョン、水中油型(O/W)エマルジョン、水-油-水型(W/O/W)複合エマルジョン、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョン、ミセル、 dendrimer、ピロソーム、ウイルス様粒子、ナノスフェアもしくはナノカプセルなどのポリマーナノ粒子、ミクロスフェアもしくはマイクロカプセルなどのポリマーマイクロ粒子である。

【０２２４】

本発明の製剤は、薬学的に許容できる濃度の塩、緩衝剤、保存料、適合性担体、アジュバント、および場合によっては他の治療成分を通常含み得る、薬学的に許容できる溶液において投与される。いくつかの実施形態において、組成物は無菌である。

【 0 2 2 5 】

「薬学的に許容できる担体」という用語は、ヒトまたは他の脊椎動物への投与に適している、1つまたは複数の適合性の固体または溶液の充填剤、希釈剤、またはカプセル化物質を意味する。担体という用語は、天然または合成の有機または無機の成分を言い、利用を容易にするために活性成分がこれと組み合わせられる。医薬組成物の構成要素はまた、所望の薬学的有効性を実質的に損なう相互作用が生じないような様式で、本発明の化合物と、および互いに、混合することができる。

【 0 2 2 6 】

経口投与では、化合物（すなわち、核酸、抗原、抗体、および他の治療用作用物質）は、1つまたは複数の活性化合物を、当技術分野において周知の薬学的に許容できる担体と組み合わせることにより、容易に製剤することができる。このような担体により、本発明の化合物を、治療する対象による経口摂取のための、錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして製剤することが可能となる。経口使用のための医薬調製物は固体賦形剤として得ることができ、得られた混合物をすりつぶし、所望により、適切な助剤を添加した後に、顆粒の混合物を処理して、錠剤または糖衣錠の核を得てもよい。適切な賦形剤は、とりわけ、乳糖、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖などの充填剤、例えばトウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、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、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン（PVP）などのセルロース調製物である。所望であれば、架橋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などの、崩壊剤を加えることができる。経口製剤はまた、内部の酸性状態を中和するために生理食塩水もしくは緩衝液内に製剤してもよいが、または、いずれの担体も伴わずに投与してもよい。

【 0 2 2 7 】

糖衣錠の核には、適切な被覆が施される。この目的のために、濃縮した糖溶液を用いることができ、この糖溶液は、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒または溶媒混合物を含んでいてもよい。異なる組合せの活性化合物用量を同定するかまたは特徴付けるために、染料または顔料を錠剤または糖衣錠の被覆に加えることができる。

【 0 2 2 8 】

経口的に用いることができる医薬調製物には、ゼラチンで作られた押し込み型のカプセル、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で作られた、軟らかい、封止されたカプセルが含まれる。押し込み型のカプセルは、乳糖などの充填剤、デンプンなどの結合剤、および/またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤と混合した活性成分を含み得、この活性成分は、場合によっては安定剤と混合されていてもよい。軟らかいカプセルにおいて、活性化合物は、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などの適切な液体内に溶解または懸濁することができる。さらに、安定剤を加えることができる。経口投与のために製剤されたミクロスフェアも用いることができる。このようなミクロスフェアは、当技術分野において良く規定されている。経口投与のための全ての製剤は、このような投与に適した用量である。

【 0 2 2 9 】

口腔投与では、組成物は、従来の様式で製剤された錠剤またはトローチの形態を取り得る。

【 0 2 3 0 】

吸入による投与では、本発明に従って用いるための化合物は、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、または他の適切な気体を用いた、加圧されたパックまたは噴霧器からの噴霧スプレーの提示の形で都合良く送達され得る。加圧された噴霧のケースにおいて、用量単

10

20

30

40

50

位は、定量を送達するためのバルブを備えることにより決定することができる。吸入器または送気器において用いるための、例えばゼラチンのカプセルおよび薬包は、化合物の粉末混合物と乳糖またはデンプンなどの適切な粉末基剤とを含ませて製剤することができる。

【0231】

化合物は、それを全身的に送達することが望ましい場合には、注射による、例えばボーラス注射または持続注入による非経口投与のために製剤することができる。注射のための製剤は、単回投与の形態で、例えばアンプルまたは複数回投与の容器内に、追加の保存料と共に存在し得る。組成物は、懸濁液、溶液、または油性媒質もしくは水性媒質内のエマルジョンなどの形態を取り得、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの製剤用作用物質を含み得る。

10

【0232】

非経口投与のための医薬製剤には、水溶性形態の活性化合物の水性溶液が含まれる。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注射用懸濁液として調製することができる。適切な親油性の溶媒または媒体には、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームが含まれる。水性注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなどの、懸濁液の粘度を増大させる物質を含み得る。懸濁液はまた、適切な安定剤、または、高度に濃縮された溶液の調製を可能にするための、化合物の溶解度を増大させる作用物質を含んでいてもよい。

20

【0233】

あるいは、活性化合物は、使用する前に、適切な媒体、例えば発熱物質を有さない滅菌水で構成するために、粉末形態であり得る。

【0234】

化合物はまた、例えばココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を含む、坐剤または停留浣腸などの直腸または腔用の組成物に製剤することができる。

【0235】

これまでに記載した製剤に加え、化合物はまた、蓄積調製物として製剤することができる。このような長時間作用性の製剤は、適切なポリマー物質もしくは疎水性物質（例えば、許容できる油におけるエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂と共に製剤することができるか、あるいは、難溶性の誘導体、例えば難溶性の塩として製剤することができる。

30

【0236】

医薬組成物はまた、適切な固体またはゲル相の担体または賦形剤を含み得る。このような担体または賦形剤の例には、限定はしないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖、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などのポリマーが含まれる。

【0237】

適切な液体または固体の医薬調製物形態は、例えば、吸入のための水性もしくは生理食塩水、マイクロカプセル化されたもの、渦巻状にされたもの、微細な金粒子上に被覆されたもの、リポソーム内に含まれるもの、噴霧状にされたもの、エアロゾル、皮膚内への移植のためのペレット、または皮膚内に引っ搔くための鋭い物体上に乾燥させたものである。医薬組成物にはまた、顆粒、粉末、錠剤、被覆錠剤、（マイクロ）カプセル、坐剤、シロップ、エマルジョン、懸濁液、クリーム、ドロップ、または活性化合物を持続放出する調製物が含まれ、これらの調製物において、賦形剤、ならびに崩壊剤、結合剤、被覆剤、膨張剤、潤滑剤、香料、甘味料、または可溶化剤などの添加剤および/または助剤が、上述したように通常用いられる。医薬組成物は、様々な薬剤送達系における使用に適している。薬剤送達のための方法の簡単な概説については、Langer R (1990年) Science 249: 1527~1533頁を参照されたい。

40

【0238】

50

核酸ならびに場合によっては他の治療物質および／または抗原は、それ自体で（そのまま）または薬学的に許容できる塩の形態で投与することができる。薬剤において用いる場合、塩は薬学的に許容できるべきであるが、薬学的に許容できない塩を、その薬学的に許容できる塩を調製するために都合良く用いることができる。このような塩には、限定はしないが、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から調製される塩が含まれる。また、このような塩は、カルボン酸基のナトリウム塩、カリウム塩、またはカルシウム塩などのアルカリ金属またはアルカリ土類金属として調製することができる。

【0239】

適切な緩衝剤には、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）が含まれる。適切な保存料には、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）、およびチメロサル（0.004～0.02% w/v）が含まれる。

【0240】

組成物は、都合良く単位投与形態を有し得、薬学の分野において周知のあらゆる方法によって調製することができる。全ての方法は、化合物を1つまたは複数の副成分を構成する担体と組み合わせるステップを含む。通常、組成物は、化合物を、液体担体、微粉化した固体担体、またはその両方と均一におよび密接に組み合わせて、その後必要であれば生成物を成型することにより調製される。液体の投与単位は、バイアルまたはアンプルである。固体の投与単位は、錠剤、カプセル、および坐剤である。

【0241】

他の送達系には、徐放性放出、遅延放出、または持続放出の送達系が含まれ得る。このような系は、化合物の繰り返しの投与を避けることができ、対象および医師にとっての利便性が増す。多くのタイプの放出送達系が利用可能であり、当業者に知られている。それらには、ポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシブチル酸、およびポリ酸無水物などのポリマーに基づいた系が含まれる。薬剤を含む、前述のポリマーのマイクロカプセルは、例えば米国特許第5,075,109号に記載されている。送達系はまた、コレステロール、コレステロールエステル、および脂肪酸などのステロールを含むか、またはモノグリセリド、ジグリセリド、およびトリグリセリドなどの中性脂肪を含む脂質、ヒドロゲル放出系、シラスティック系、ペプチドに基づいた系、ワックス被覆、従来の結合剤および賦形剤を用いた圧縮錠剤、部分的に融合した移植片などである、非ポリマー系を含む。特定の例には、限定はしないが、(a)米国特許第4,452,775号、米国特許第4,675,189号、および米国特許第5,736,152号に記載されているものなどの、本発明の作用物質がマトリクス内の形態で含まれている浸食系、ならびに(b)米国特許第3,854,480号、米国特許第5,133,974号、および米国特許第5,407,686号に記載されているような、活性構成要素が制御された速度でポリマーから浸透する拡散系が含まれる。さらに、ポンプに基づくハードウェア送達系を用いることができ、そのいくつかは移植に適している。

【0242】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明されるが、この実施例はさらなる限定であると解釈されるものではない。本願の全体にわたり引用される全参考文献（論文の参考文献、特許、公開された特許出願、および同時継続特許出願を含む）の全内容は、参照することにより、本明細書に明確に組み込まれる。

【実施例】

【0243】

T L R 7 および T L R 8 は、一本鎖 R N A または短鎖オリゴリボヌクレオチド（O R N

10

20

30

40

50

）を認識する。TLRの一方または両方を発現する免疫細胞をインキュベートすると、サイトカインの産生が誘発される。2つの受容体の発現パターンが異なるため、TLR7介在性のシグナル伝達はヒトpDCによるIFN- γ の産生を刺激すると考えられるが、一方、TLR8の活性化は、IL-12、TNF- α 、およびIFN- α を産生するmDCおよび単球を主に活性化する。TLR8およびTLR7/8の活性を特異的に誘発するRNAモチーフの存在が明らかにされている。以下の実施例は、骨格特異的なさらなるモチーフの同定を示す。このRNAモチーフを含むポリマーが主にIFN- α を誘発することとは重要な発見であり、これは、十分なレベルの炎症性サイトカインを刺激しない強力な免疫刺激性モチーフを主張するものである。

【0244】

方法：

ELISAアッセイ：

ヒトPBMCを、DOTAPの存在下で連続希釈したORN（2 μ MのORNおよび25 μ g/mlのDOTAPで開始）と共にインキュベートし、上清を、IFN- α およびIL-12p40について24時間後にELISAによってアッセイした。3人のドナーの平均 \pm SEMを示す。

【0245】

サイトカインの検出：

ヒトPBMCを5 \times 10⁶個細胞/mlの濃度で再懸濁し、丸底の96ウェルプレートに加えた（250 μ l/ウェル）。PBMCを、DOTAPの存在下で連続希釈したORN（2 μ MのORNおよび25 μ g/mlのDOTAPで開始）と共にインキュベートし、培養上清（SN）を24時間後に回収した。SNは、すぐに用いない場合には、必要となるまで-20 $^{\circ}$ Cで保管した。

【0246】

SNにおけるサイトカインの量を、IL-12p40についての市販されているELISAキット（BD Biosciences、Heidelberg、Germanyから入手）を用いて、または市販されている抗体（PBL、New Brunswick、NJ、USA）を用いて開発したIFN- α についての社内のELISAを用いて評価した。

【0247】

サイトカインおよびケモカインの広範な組合せの分析のために、Bio-Rad（Munich、Germany）から入手したルミネックスシステムおよびBiosource（Solingen、Germany）から入手したマルチプレックスキットを用いる多重分析を行った。

【0248】

（実施例1）

TLR7介在性サイトカインを誘発するがTLR8介在性サイトカインは誘発しない免疫刺激性ポリマーの同定

4つのORNおよび1つの陽性対照を、IFN- α を誘発する能力について試験した（配列については表1を参照されたい）。ORNをヒトPBMCと共にインキュベートし、上清をIFN- α についてELISAによってアッセイした。配列番号3および配列番号5のORNは同一の塩基配列を有しているが、配列番号5はホスホロチオエート（PS）骨格を有する一方で、配列番号3はホスホジエステル（PO）骨格を有する。驚くべきことに、配列番号5はバックグラウンドレベルのIFN- α のみを誘発し、一方で配列番号3は、ホスホロチオエート骨格内にGUに富んだ最適化されたモチーフを有する、陽性対照のODNである配列番号1と同程度の、最大のIFN- α レベルを誘発した（図1）。これらのデータは、配列番号3および配列番号5のORN配列では、PO骨格がIFN- α の顕著な誘発を生じさせることを示唆するものであった。

【0249】

PO骨格を有する2つの他のORNである配列番号2および配列番号4もまた、IFN-

10

20

30

40

50

- を誘発する能力について試験し、それらが非常に低いレベルの I F N - のみを誘発することが示された。配列番号 2 および配列番号 3 の配列の比較により示されるように、1 つのウリジン (U) の存在により I F N - の誘発が劇的に増強された。ウリジンヌクレオチドは、特定の配列モチーフ内に組み込まれていた。配列番号 3 および配列番号 4 の比較により示されるように、このモチーフ内以外における 1 つの U の存在により、I F N - の産生が顕著に低減した。

【 0 2 5 0 】

配列番号 3 の O R N は I F N - の産生を主に誘発し (図 2 A も参照されたい) 、 T L R 7 介在性である可能性が最も高いが、I L - 1 2 (図 2 B) 、 T N F - (図示せず) 、または I F N - (図示せず) などの他の (T L R 8 介在性の) サイトカインはほとんど誘発しなかった。

【 0 2 5 1 】

【表 1】

表1

配列番号1	rC*rC*rG*rU*rC*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rG*rU*rG*rA*rC*rU*rC
配列番号2	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号4	rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rU-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA
配列番号5	rA*rA*rA*rC*rG*rC*rU*rC*rA*rG*rC*rC*rA*rA*rA*rG*rC*rA*rG

ORN骨格: 「-」はホスホジエステルを示し、「*」はホスホロチオエートを示す。

【 0 2 5 2 】

(実施例 2)

新たな免疫刺激性 R N A モチーフである C U C A の同定

最適な骨格特異的免疫刺激性モチーフを決定するために、O R N を設計し、I F N - を誘発する能力について試験した。これまでに同定された R N A モチーフとは異なり、新たなモチーフは、ホスホジエステル骨格を有する O R N に固有および特異的であると規定された (図 3) 。ヒト P B M C を O R N と共にインキュベートし、上清を E L I S A によって I F N - についてアッセイした。驚くほど短いモチーフである U C A が規定された。この配列内におけるアデニン塩基の存在の重要性が明らかにされた。配列番号 7 および配列番号 6 の比較 (表 2 を参照されたい) により、最適なモチーフが U C の 3 ' 側に 1 つの塩基を含むことが明らかにされた。配列番号 1 1 および配列番号 1 2 の比較により、ウリジンの 3 ' 側でのシチジンの重要性が確認された。

【 0 2 5 3 】

【表 2】

表2

配列番号3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号6	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rU-rC
配列番号7	rA-rC-rG-rC-rA-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rU-rC-rA-rG
配列番号11	rG-rC-rC-rA-rC-rC-rG-rA-rG-rC-rU-rG-rA-rA-rG-rG-rC-rA-rC-rC
配列番号12	rG-rC-rC-rA-rC-rC-rG-rA-rG-rC-rU-rC-rA-rA-rG-rG-rC-rA-rC-rC

【 0 2 5 4 】

提案された最小モチーフの中央の C を交換すると、これらの O R N との関連において、U G A (配列番号 8) および U A A (配列番号 9) のケースでは I F N - 誘発活性が喪失し、U U A (配列番号 1 0) のケースでは I F N - の応答が低減した (図 4 を参照さ

れたい)。配列番号10の低いIFN-誘発は、2つのUを含むモチーフGCUUの存在によるものである可能性が最も高い。

【0255】

モチーフ内にCを有さない3つのPORN(配列番号8、配列番号9、配列番号10)の全てが、その元となる、UCAモチーフを含む配列番号3よりもかなり高いレベルのIL-12を誘発したため、これらのORNによりまた、新たに規定された最小モチーフが、IFN-に偏った免疫応答の誘発に非常に特異的であることが明らかになった(表3を参照されたい)。

【0256】

【表3】

10

表3

配列番号3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号8	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rG-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号9	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rA-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号10	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rU-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

【0257】

20

配列変異のさらなる試験により、UCAモチーフのアデノシン部分がIFN-活性に重要であることを示すデータが得られた(図5、表4における配列)。ヒトPBMCをORNと共にインキュベートし、上清をELISAによってIFN-およびIL-12p40についてアッセイした。UCAモチーフ内のアデノシンをCまたはGで置換すると(配列番号13、配列番号14)、バックグラウンドレベルのIFN-のみを誘発するORNが得られた。配列番号15(UUU)は中程度の量のIFN-を誘発したが、配列番号3よりも少なかった。誘発は、さらなる配列UCUGの生成によるものである可能性が最も高い。ここでも、配列番号3によるIL-12の誘発は、配列番号14および配列番号15と比較して非常に低かった。

【0258】

30

【表4】

表4

配列番号3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号13	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rC-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号14	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rG-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号15	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rU-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

40

【0259】

最小モチーフを囲むさらなるヌクレオチドの必要性をさらに評価するため、UCAモチーフの3'および5'のヌクレオチド修飾を、IL-12の誘発活性に対するIFN-の誘発活性について試験した(表5に配列を示す)。図6において示すように、最小モチーフUCAの5'領域において、シチジンヌクレオチド(CUCA、配列番号3)またはウリジンヌクレオチド(UUCA、配列番号21)の存在のみによって、高いIFN-誘発特性を有するORNが得られた。しかし、UUCAモチーフは高いIFN-の産生および高いIL-12の産生の両方をもたらしたため、記載される、大量のIL-12p40を誘発することなく大量のIFN-を誘発するというORNの予想外の能力は、ウリジンがこの位置に存在しない場合にのみ見られた。

50

【 0 2 6 0 】

【表 5】

表5

配列番号3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号19	rA-rA-rA-rC-rG-rG-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号20	rA-rA-rA-rC-rG-rA-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号21	rA-rA-rA-rC-rG-rU-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

10

【 0 2 6 1 】

さらなる配列分析により、4merのモチーフCUC Aに隣接するヌクレオチド位置は重要ではないと考えられ、IFN- γ の産生を誘発するORNの能力に影響しないことが示された(表6)。しかし、図7において示すように、これらのヌクレオチドはIL-12の産生に影響した。CUC Aモチーフの5'側(図7A、配列番号22、23、および24)のヌクレオチドも、3'側(図7B、配列番号16、17、および18)のヌクレオチドも、IFN- γ 誘発活性に影響しないと考えられた。これらのヌクレオチドは、IL-12の誘発のみに影響すると考えられた。したがって、最適なTLR7特異的な誘発プロフィールのためには、これらの位置は、好ましくは、配列番号24および配列番号18におけるようなウリジンではなく、それはこれらのORNが比較的強いIL-12誘発能力を示したからである(図7Cおよび図7D)。

20

【 0 2 6 2 】

【表 6】

表6

配列番号3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号16	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rA-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号17	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rC-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号18	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rU-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号22	rA-rA-rA-rC-rA-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号23	rA-rA-rA-rC-rC-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
配列番号24	rA-rA-rA-rC-rU-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

30

【 0 2 6 3 】

(実施例3)

CUC Aモチーフを有するORNのサイトカインプロフィール

40

配列番号27(GACACACACACUCACACACACACA)の、CUC Aモチーフを有する免疫刺激性ORNを、広範なサイトカインを誘発する能力について試験した。配列番号27のORNのサイトカイン誘発を、陰性対照(GACACACACACACACACACACACA、配列番号25)、Uに富んだ3'末端を有する、UCAを有さないORN(GACACACACACACACACACACACACUUU、配列番号26)、および陽性対照(GACACACACACUCACACACACACACA、配列番号28)と比較した。3人の健康な血液ドナーのヒトPBMCを、DOTAPの存在下で連続希釈したORN(2 μ MのORNおよび25 μ g/mlのDOTAPで開始)と共に24時間インキュベートした。SNを回収し、様々なサイトカインおよびケモカインのサイトカイン濃度またはケモカイン濃度をELISAによって測定した。結果を図8~11に示す。

50

配列番号 27 は I F N - を誘発し、また、それほどではないが、I F N - 関連分子である I P - 10 および M C P - 1 を誘発した。

【 0 2 6 4 】

サイトカインおよびケモカインの多くの組合せを分析するために、ルミネックスシステムのマルチプレックスキットを用いる多重分析を行った。2 人のドナーを、ルミネックスデータのこの最初の非定量的評価において用いた。結果を以下の表 7 にまとめる。ここでも、配列番号 27 は I F N - および I P - 10 のみを誘発し、それほどではないが M I P - 1 を誘発した。

【 0 2 6 5 】

【表 7】

表7

	配列番号25	配列番号26	配列番号28	配列番号27	DOTAP
IL-1B	-	+	+++	-	-
IL-1Ra	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-
IL-2R	-	+	+++	-	-
IL-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-5	-	-	-		
IL-6	-	+	+++	-	-
IL-7	-	++	+++	-	+
IL-8	-	+	+	-	+
IL-10	-	-	+++	-	-
IL-12p40	-	-	+++	-	-
IL-13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-15	-	+	+++	-	-
IL-17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNF- α	-	-	+++	-	-
IFN- α	-	-	+++	++	-
IFN- γ	-	-	+++	-	-
GMCSF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MIP-1a	-	+	+++	-	-
MIP-1b	-	+	+++	-	-
IP-10	-	-	+	++	+
MIG	-	+	+++	-	-
エオタキシン	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ランテス	-	-	+	-	+
MCP-1	-	+	++	+	+

n.d.=検出せず

【 0 2 6 6 】

(実施例 4)

U C Aモチーフを有するO R NによるT h 1サイトカインおよびケモカインの十分な誘発

U C Aモチーフを有するO R Nを、サイトカインおよびケモカインの誘発についてイン
ビボで試験した。B A L B / cマウスを、それぞれ5頭からなる2つの群に分け、O R N
、D O T A P、または緩衝溶液(H B S)を静脈内投与した。第1群の動物を注射の3時
間後に採血し、適切なサイトカイン特異的E L I S Aを用いて、I P - 1 0、I F N -

10

20

30

40

50

の CpG ODN 1826 (配列番号 36)、あるいは陰性対照としての緩衝溶液 (HBS) を静脈内注射した。注射の 3 時間後に、血漿を回収し、適切なルミネックスおよび ELISA を用いて、IFN- γ 、IP-10、IL-12、および IL-6 について分析した。

【0272】

結果を図 16 に示す。TLR7 KO マウスは、配列番号 3、28、または 31 に応答して IFN- γ 、IP-10、IL-12、または IL-6 の誘発を基本的に示さなかったが、CpG ODN に応答してこれらの同一のサイトカインの強力な誘発を示した。逆に、TLR9 KO マウスは、配列番号 3、28、または 31 に応答して IFN- γ 、IP-10、IL-12、および IL-6 の様々な程度の誘発を示したが、CpG ODN に応答してこれらの同一のサイトカインの誘発は示さなかった。対照 C57BL/6 マウスは、配列番号 3、28、または 31 に応答して IFN- γ 、IP-10、IL-12、および IL-6 の様々な程度の誘発を示し、CpG ODN に応答してこれらの同一のサイトカインの強力な誘発を示した。

10

【0273】

(実施例 7)

インビボでのサイトカインの誘発は非常に MyD88 依存性である

この実験において、MyD88 欠損マウスは本発明の ORN に対して反応しないことが示された。C57BL/6 のバックグラウンドに戻し交配した MyD88 ノックアウト (MyD88 KO) マウスおよび C57BL/6 対照マウス (各群当たり $n = 4$) に、DOTAP (Sigma) 内において 1 : 2 の、100 μ g の選択した ORN (配列番号 3、28、もしくは 31) または陽性対照の CpG ODN 1826 (配列番号 36)、あるいは陰性対照としての緩衝溶液 (HBS) を静脈内注射した。注射の 3 時間後に、血漿を回収し、適切なルミネックスおよび ELISA を用いて、IFN- γ および IP-10 について分析した。

20

【0274】

結果を図 17 に示す。MyD88 KO マウスは、配列番号 3、28、または 31 に応答して IFN- γ または IP-10 の誘発を基本的に示さず、CpG ODN に応答しても同様であった。逆に、対照 C57BL/6 マウスは、配列番号 3、28、または 31、および CpG ODN に応答して IFN- γ および IP-10 の強力な誘発を示した。

30

【0275】

総括すると、新たな骨格特異的モチーフは、IFN- γ (TLR7 介在性である可能性が最も高い) の誘発に関与しており、IL-12、IFN- γ 、または TNF- α などの他の (TLR8 介在性である可能性が最も高い) サイトカインの活性化にはほとんど関与していないと規定された。これらの特性を決定する最小モチーフは rU-rC-rA である。骨格はホスホジエステルの。データに従った最適なモチーフは、N が C、A、G であるが U ではない、rN-rC-rU-rC-rA-rN である (最小の TLR8 介在性のサイトカイン応答について)。

【0276】

本発明の少なくとも 1 つの実施形態のいくつかの態様をこうして記載してきたが、様々な変更、修飾、および改良を当業者が行うことは容易であると理解されたい。このような変更、修飾、および改良は、本開示の一部となるものであり、本発明の趣旨および範囲内にあるものである。したがって、上記の記載および図面は例示的なものにすぎない。

40

【図 1】

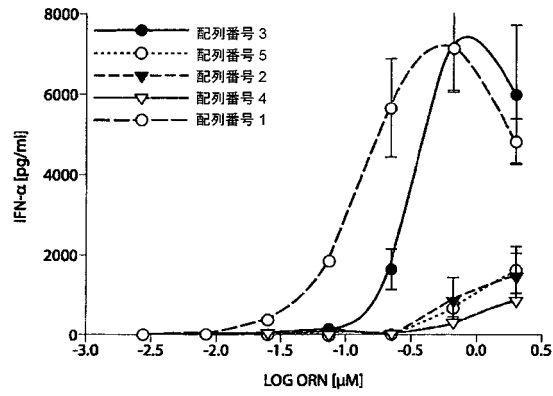


図 1

【図 2】

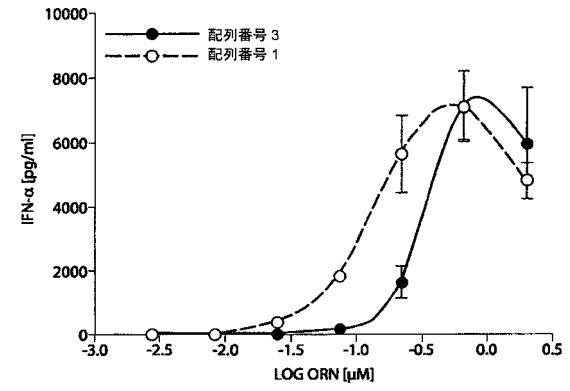


図 2A

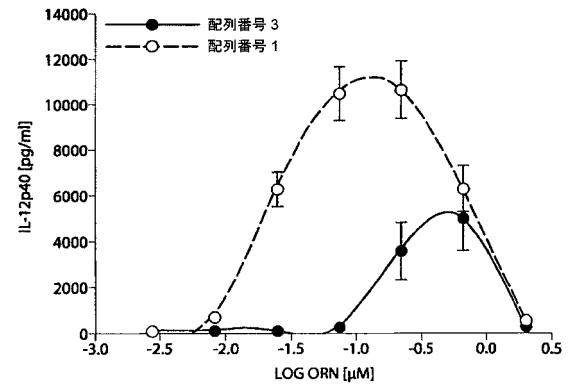


図 2B

【図 3】

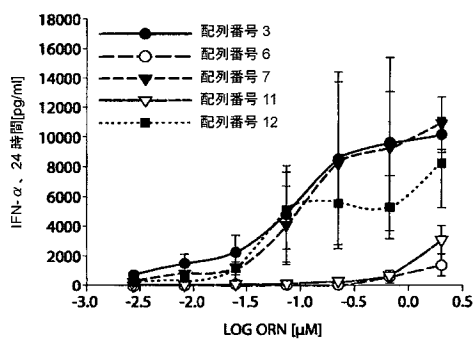


図 3

【図 4】

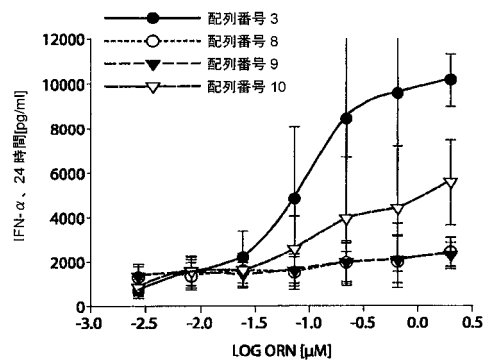


図 4A

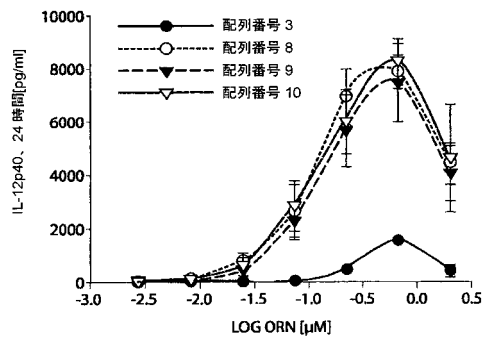


図 4B

【図 5】

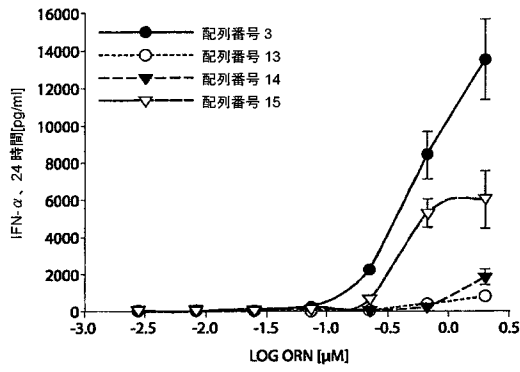


図 5A

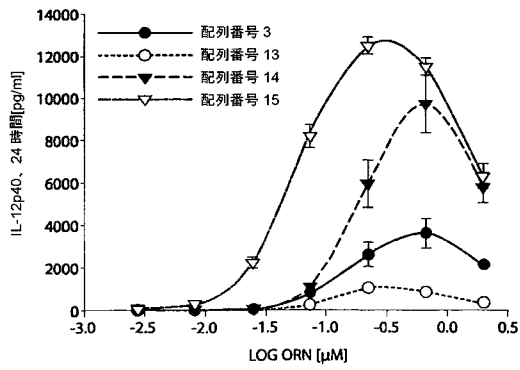


図 5B

【図 6】

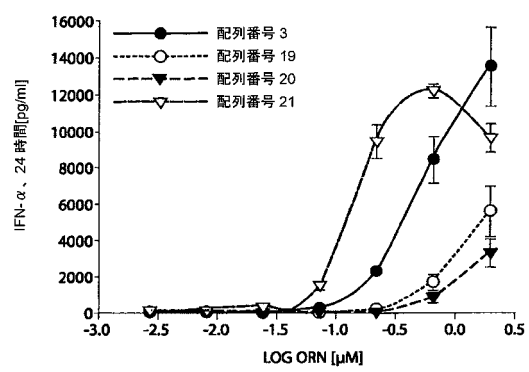


図 6A

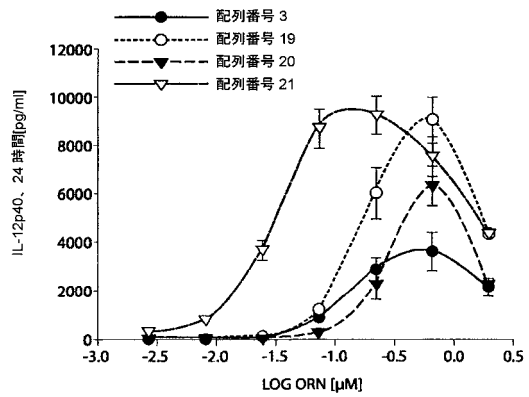


図 6B

【図 7 - 1】

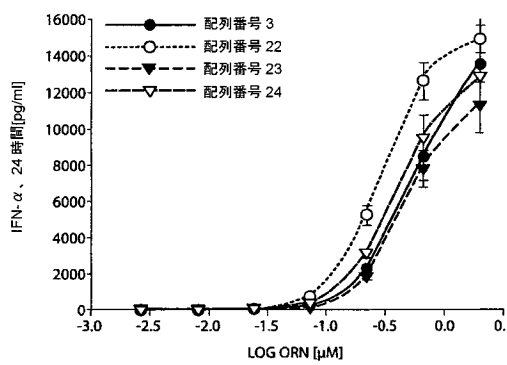


図 7A

【図 7 - 2】

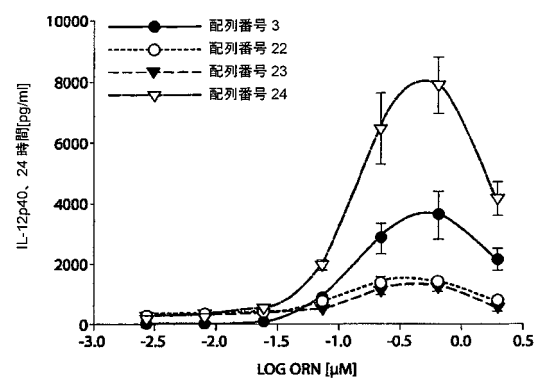


図 7C

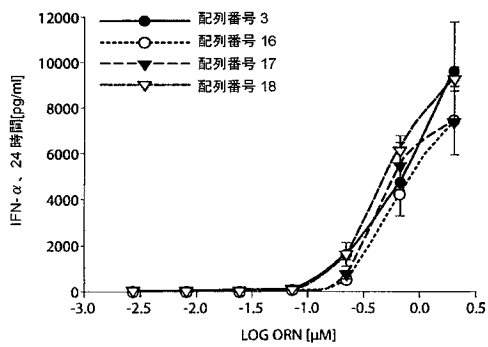


図 7B

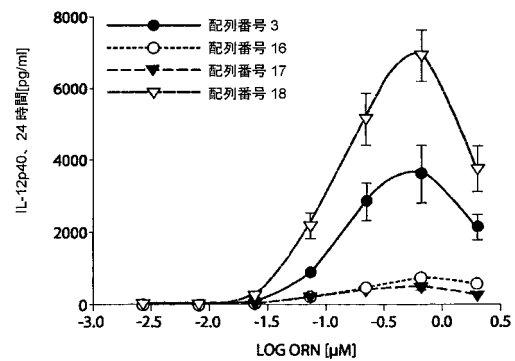


図 7D

【図 8 - 1】

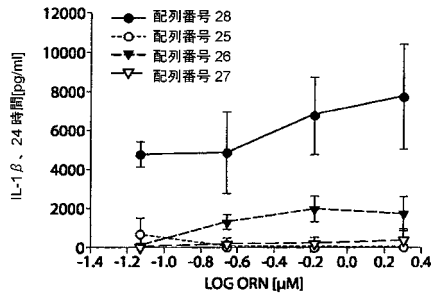


図 8A

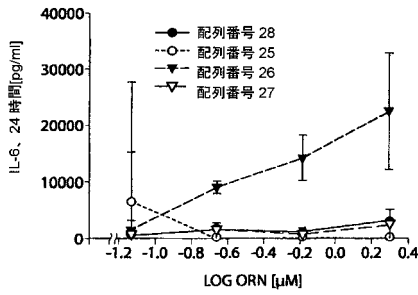


図 8B

【図 9 - 1】

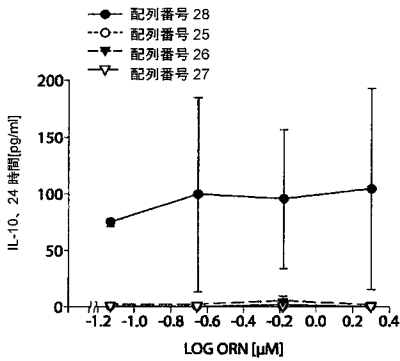


図 9A

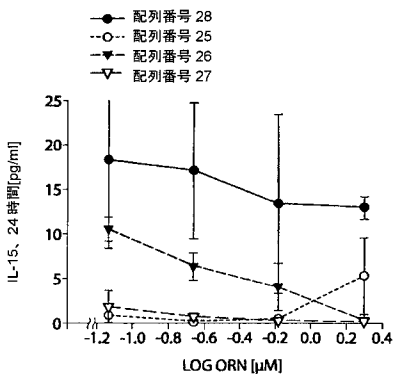


図 9B

【図 8 - 2】

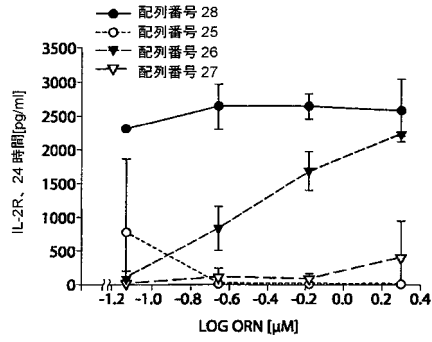


図 8C

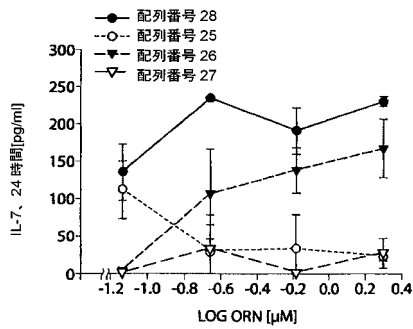


図 8D

【図 9 - 2】

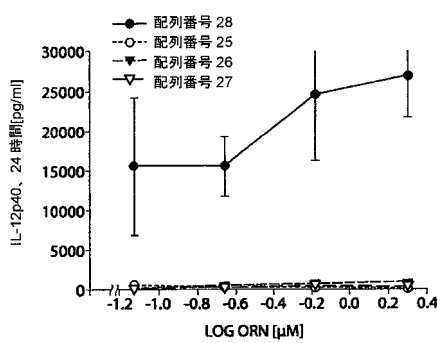


図 9C

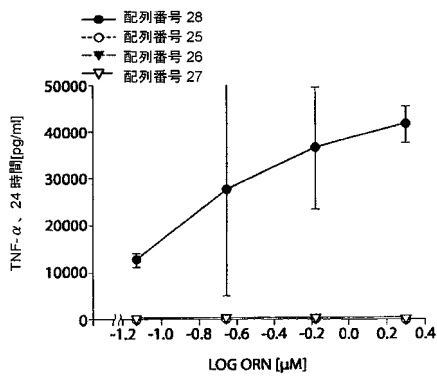


図 9D

【図 10 - 1】

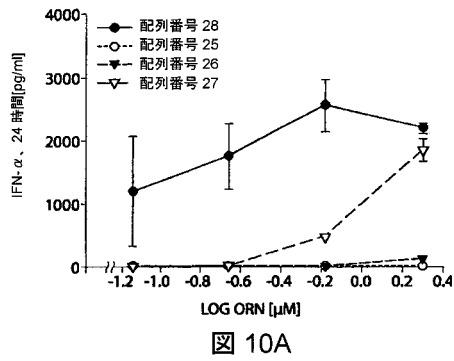


図 10A

【図 10 - 2】

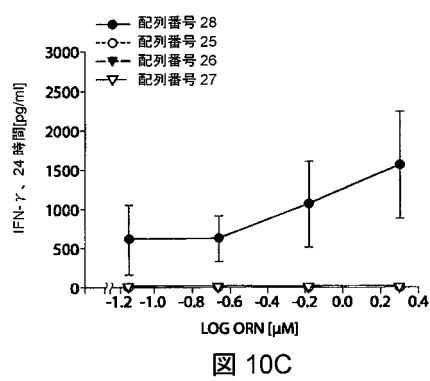


図 10C

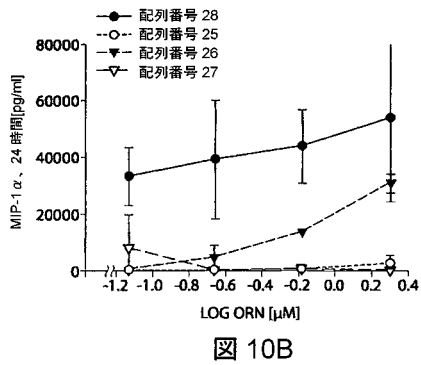


図 10B

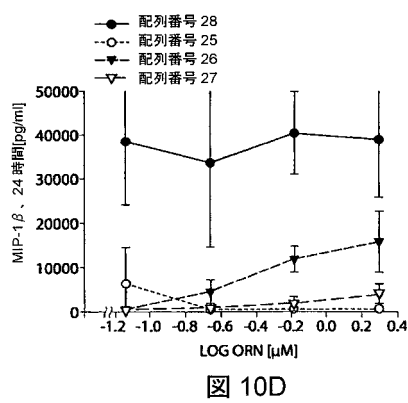


図 10D

【図 11 - 1】

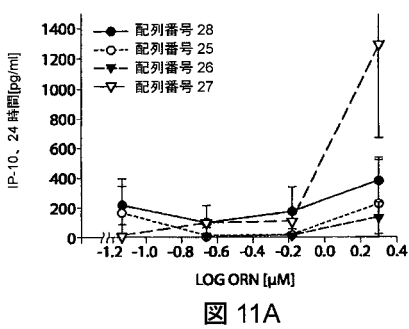


図 11A

【図 11 - 2】

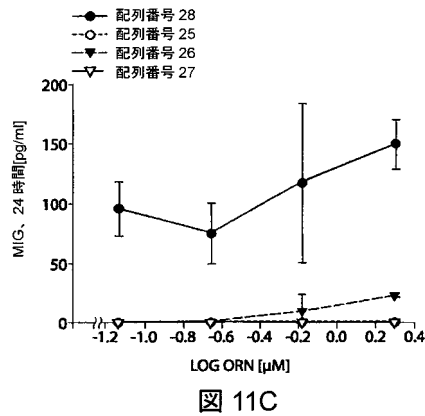


図 11C

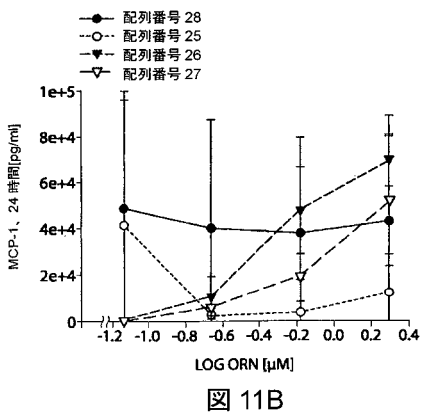


図 11B

【図 1 2 - 1】

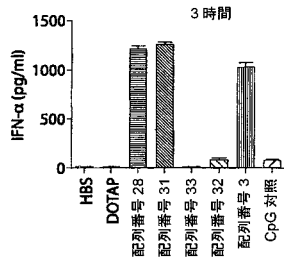


図 12A

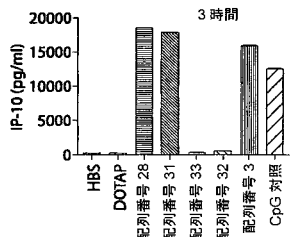


図 12B

【図 1 2 - 2】

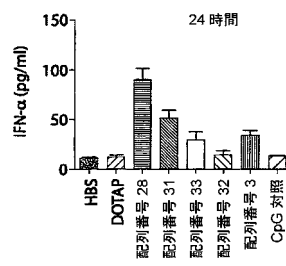


図 12C

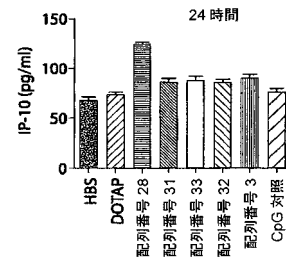


図 12D

【図 1 3 - 1】

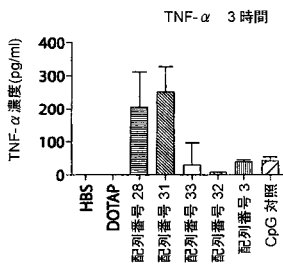


図 13A

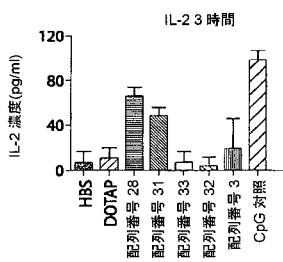


図 13B

【図 1 3 - 2】

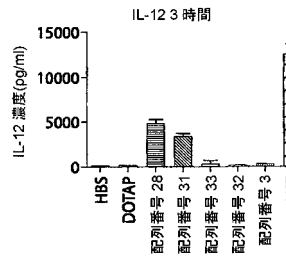


図 13C

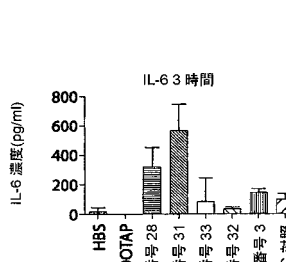


図 13D

【図 13 - 3】

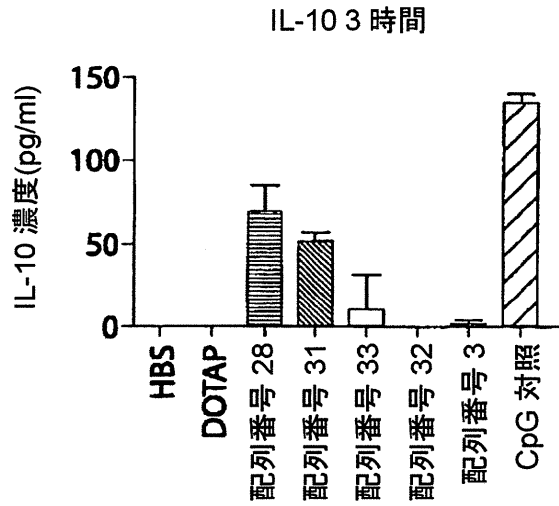


図 13E

【図 14 - 1】

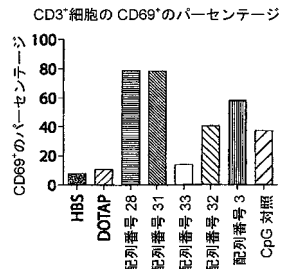


図 14A

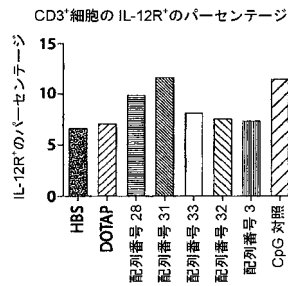


図 14B

【図 14 - 2】

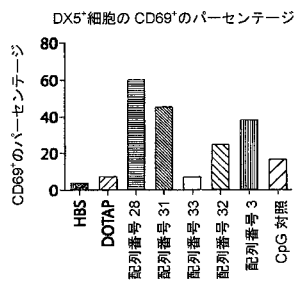


図 14C

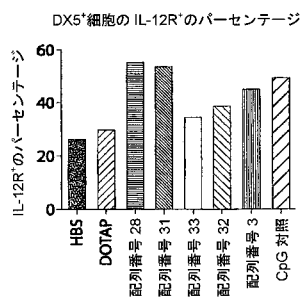


図 14D

【図 15】

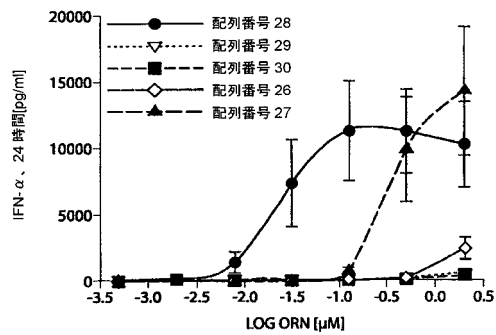


図 15

【図 16 - 1】

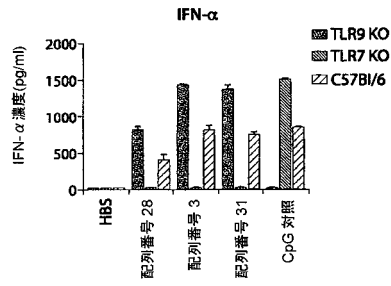


図 16A

【図 16 - 2】

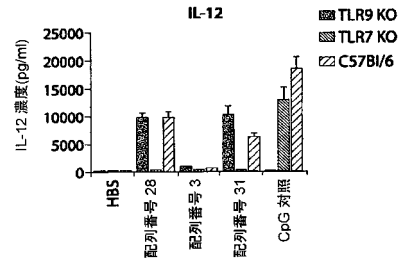


図 16C

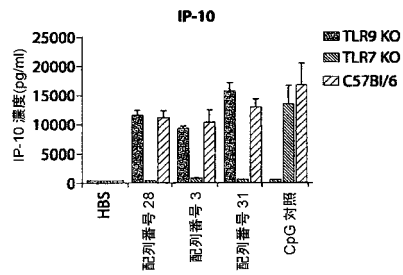


図 16B

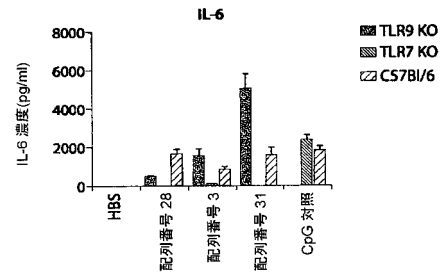


図 16D

【図 17】

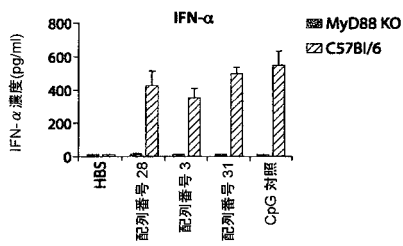


図 17A

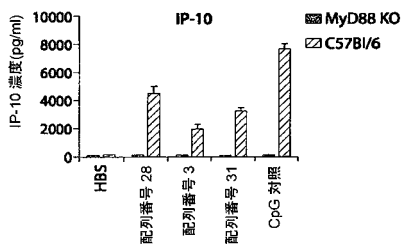


図 17B

【配列表】

0004847609000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	G
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)		A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)		A 6 1 K 31/7115	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)		A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)		A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M

(74)代理人 100174447

弁理士 龍田 美幸

(72)発明者 マリオン ジャーク

ドイツ国 4 0 2 2 5 ドゥッセルドルフ メロウインガープラッツ 1エー、 コーリー フ
ァーマシューティカル ゲーエムベハー内

(72)発明者 ジョーグ ハインズ ヴォルマー

ドイツ国 4 0 2 2 5 ドゥッセルドルフ メロウインガープラッツ 1エー、 コーリー フ
ァーマシューティカル ゲーエムベハー内

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 7 / 0 6 2 1 0 7 (WO, A 1)

特表2 0 0 5 - 5 0 2 3 3 8 (JP, A)

特表2 0 0 6 - 5 1 2 9 2 7 (JP, A)

国際公開第2 0 0 6 / 1 3 5 4 3 4 (WO, A 1)

特表2 0 0 7 - 5 2 6 2 5 3 (JP, A)

国際公開第2 0 0 4 / 0 0 4 7 4 3 (WO, A 1)

特表2 0 0 7 - 5 3 1 6 9 9 (JP, A)

国際公開第2 0 0 7 / 0 3 1 3 2 2 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC

C12N 15/00-15/90

DB名

CA/REGISTRY(STN)

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)

PubMed

WPI