

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-522101

(P2006-522101A)

(43) 公表日 平成18年9月28日(2006.9.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 5 7
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	4 C 0 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-507070 (P2006-507070)	(71) 出願人	500092491 デューク・ユニバーシティー アメリカ合衆国、ノース・カロライナ州 27708-0083 ダーハム、ピー・ オー・ボックス 90083、オフィス・ オブ・ライセンシング・アンド・ベンチャ ーズ
(86) (22) 出願日	平成16年3月12日 (2004. 3. 12)	(74) 代理人	110000187 特許業務法人ウィンテック
(85) 翻訳文提出日	平成17年11月2日 (2005. 11. 2)	(72) 発明者	ギルボア, エリ アメリカ合衆国、ノース・カロライナ州 27708-0083 ダーハム、ピー・ オー・ボックス 90083、オフィス・ オブ・サイエンス・アンド・テクノロジー 、デューク・ユニバーシティー内 最終頁に続く
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/007405		
(87) 国際公開番号	W02004/081021		
(87) 国際公開日	平成16年9月23日 (2004. 9. 23)		
(31) 優先権主張番号	60/453, 831		
(32) 優先日	平成15年3月12日 (2003. 3. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド類似体

(57) 【要約】

本発明は、一般的には、アプタマーを用いて免疫系を調節する方法に関し、とりわけ、C T L A - 4 機能を阻害する方法及びかかる方法に使用するのに適したアプタマーに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C T L A - 4、C D 4 0、4 - 1 B B、O X 4 0 又は T G F 受容体に結合するアプタマーの免疫機能調節に十分な量を哺乳動物に投与することからなる、前記哺乳動物における免疫機能を調節する方法。

【請求項 2】

前記哺乳動物が癌罹患者である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記罹患者がヒトである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記罹患者が抗原特異的免疫療法を受けているものである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記アプタマーの投与が前記免疫療法を増強する請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アプタマーが C T L A - 4 に結合する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記アプタマーが C D 2 8 に結合しない請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記アプタマーが C T L A - 4 の種間同族体の保存されたエピトープに特異的である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記アプタマーが D e l 6 0 である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記アプタマーがヌクレアーゼによる分解に対して抵抗性である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記アプタマーが、2'-アミノ、2'-フルオロ又は2'-O-アルキルヌクレオチドからなる群から選ばれた修飾ヌクレオチドを含んでいる請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記アプタマーが3'キャップを有している請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記アプタマーがポリエチレングリコール部分を含んでいる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記アプタマーがリポソームに結合されている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記アプタマーがマルチマーとして存在している請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

i) 核酸の候補混合物を調製し、
ii) 前記混合物を C T L A - 4 と接触させ、その場合に、前記混合物中に存在し、前記候補混合物に比して C T L A - 4 に対する親和性の高い核酸を前記候補混合物の残余から分割分離できるものであり、そして、
iii) C T L A - 4 に対する親和性の高い前記核酸を前記候補混合物の残余から分割分離することからなる、C T L A - 4 アプタマーの同定確認方法。

【請求項 17】

さらに、工程 (i) と (ii) との間に、前記候補混合物を C D 2 8 と接触させ、前記候補混合物に比して C D 2 8 に対し高い親和性をもつ核酸を前記候補混合物から分割分離することを包含する請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

C T L A - 4 機能を阻害するアプタマーを同定確認する方法であって、前記アプタマーの存在下及び不存在下に T 細胞増殖を評価し、前記アプタマーの存在下での T 細胞増殖の

10

20

30

40

50

増強をもってCTLA-4機能の障害の指標とする方法。

【請求項19】

CTLA-4に結合するアプタマー。

【請求項20】

前記アプタマーがDel 60又はM9-14Del 55である請求項19に記載のアプタマー。

【請求項21】

請求項19のアプタマーと担体とを含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

この出願は、2003年3月12日に提出された国内出願第60/453,831号の優先権を主張するものであり、その出願の全内容を引用によってここに挿入する。

【0002】

本発明は、一般的には、アプタマーを用いて免疫系を調節する方法に関し、特に、CTLA-4の機能を障害する方法及び係る方法に使用するのに適したアプタマーに関する。

【背景技術】

【0003】

T細胞活性化における重要な事象は、T細胞受容体(TCR)と抗原提示細胞(APC)表面のMHC-ペプチド複合体との間の相互作用である。完全な活性化には、第二の共刺激シグナルが必要なことが、1980年代半ばに明らかになった。CD28は、静止細胞ならびに活性T細胞の表面で発現される主要な共刺激分子であり、B7-1及びB7-2は、樹状細胞、活性化された単球/マクロファージなどのプロAPC表面で発現されるCD28の主な対抗(カウンター)受容体である(非特許文献1~3)。

20

【0004】

T細胞活性化過程では、IL-2 mRNAの転写及び安定性の調節によるIL-2の産生に、CD28を介してのシグナル伝達(共刺激)が必要である。T細胞活性化の強力な共刺激因子ではあるが、CD28機能は、とくに強い又は持続性の抗原(Ag)特異的シグナルが得られる状況下では、必ずしも要求されない(非特許文献4及び5)。

【0005】

30

CTLA-4は、共通のリガンドB7-1及びB7-2への結合に関与するモチーフ及びMYPPYを含めて、CD28とかなりの相同性を共有する第二の共刺激分子である(非特許文献6)。CD28とは異なり、CTLA-4の発現は、T細胞が活性化されるときに誘発され、CTLA-4が、CD28よりも50-2000倍高い親和性をもつB7リガンドに結合する(非特許文献7)。CTLA-4は、T細胞活性化の負の調節因子である(非特許文献8~11に総説されている)。最初の証拠は、一価抗CTLA-4抗体(Ab)とのCTLA-4を介してのシグナル伝達がAg依存性(及びCD28依存性)のT細胞増殖を増強することを示したインビトロの研究から得られた(非特許文献12及び13)。CTLA-4の障害機能の説得力ある証拠は、CTLA-4欠損マウスが致命的なリンパ増殖性疾患にかかるという観察から得られた(非特許文献14及び15)。

40

【0006】

CTLA-4はCD4+及びCD8+の両方のT細胞表面で活性化されるが、インビボでは、CD4 T細胞媒介障害については、CD4+ T細胞が一次標的であると思われる(非特許文献16及び17)。CD4+ CD25+調節性T細胞(Treg)は、構成的にCTLA-4を発現する(非特許文献18及び19)。しかし、Treg上のCTLA-4の機能上の役割は、現在のところ、論議の的となっている(非特許文献20~23)。ノックアウトマウスにはCTLA-4が遺伝的に存在しない(非特許文献24及び25)ことから、又は、正常マウスでのCTLA-4機能のAb介在性遮断(非特許文献26)が大量のリンパ球増殖と関連していることから、CTLA-4の生理学的機能は、末梢性トレランスを維持すること、すなわち自己反応性T細胞の活性化を阻止し、及び/又はそ

50

れら細胞の増大を減弱させることであると考えられる。これが、自己反応性T細胞又はTreg細胞の表面で発現されたCTLA-4によって媒介されるのか、両者の組合せによるのかは、明瞭ではない。

【0007】

インビトロにおいて、CTLA-4遮断がT細胞の応答を増強する能力によって発現されるT細胞活性化に対するCTLA-4の阻害的役割ならびにCTLA-4欠損マウスで見られる強度のT細胞増殖を考慮すれば、インビボでのCTLA-4機能の一過性阻害が腫瘍免疫を増強できるかどうかを調べることは、もっともなことであった。マウス腫瘍モデルを用いたいくつかの研究が、実際に、インビボでのCTLA-4の遮断が抗腫瘍T細胞依存性免疫を増強することを示し、Ag特異性ポリクローナルT細胞応答を減弱させる上でのCTLA-4の一役割を支持するさらなる証拠を提供している。これらの研究においては、一過性のCTLA-4遮断が、マウスを抗CTLA-4モノクローナル抗体で処置することによって達成された。

10

【0008】

マウスを抗CTLA-4Abで処置すると、免疫原性の移植腫瘍が拒絶されるに至るが、免疫原性の弱い又はそれをもたない腫瘍に対しては効果がない、又はほとんどないことが、まず示された(非特許文献27及び28)。前もって株化された腫瘍を含めての非免疫原性腫瘍の拒絶は、CTLA-4遮断をワクチン接種(非特許文献29~31)又は低用量化学療法(非特許文献32)と、いずれの処置も単独では有効でないような条件下で組合せれば、達成できた。これらの観察は、インビボでのCTLA-4遮断が、CTLA-4により送達される阻害シグナルの遮断によって、T細胞のAg依存性活性化及び/又は増大を容易ならしめるという見解を補強する。

20

【0009】

興味あることに、最近の一研究が、CD4+CD25+調節T細胞の両者の同時除去(抗CD25Abを用いての)とCTLA-4遮断(抗CTLA-4Abを用いての)とが、相乗的抗腫瘍作用をもつことを示し、CTLA-4介在性免疫抑制が、CD4+CD25+調節T細胞とは異なる細胞及び経路によって媒介されることを示唆している(非特許文献33)。いくつかの場合には、ワクチン接種と組合せての抗CTLA-4Abによるマウスの処置が、局部的皮膚色素脱失の形の弱い自己免疫発現と関連した(非特許文献34~37)。このことは、CTLA-4欠損マウスで見られるところと異なることなく、腫瘍ワクチンで発現される組織特異性抗原に向けられる自己反応性T細胞の活性化を表しているのかもしれない(非特許文献38及び39)。

30

【0010】

アプタマーは、高親和性の一本鎖核酸リガンドであり、各々が所与の標的分子に特異的であり、反復的インビトロ選択手法を用いたコンビナトリアルケミストリーのプロセスによって単離することができる。かかるインビトロ選択へのアプローチの概観を図1に示す(SELLEX(指数的濃縮によるリガンドの系統的進化)と呼ばれる)(非特許文献40及び41)。SELLEXは、強力な精製法であり、きわめて稀な結合活性(1011中の1ないし1013中の1の頻度の)を大きなコンビナトリアルライブラリーからアフィニティー精製によって単離することができる。

40

【0011】

このインビトロ選択プロセスの出発点は、通常は20-40のランダム化された位置を含んだ一本鎖核酸(RNA、DNA又は修飾RNA)からなるコンビナトリアルライブラリーである。ランダム化によって、きわめて多様な可能な配列が創り出される(たとえば、40のランダム化された位置での4種のヌクレオチドは、理論上の可能性として440又は1024の異なる配列を与える)。短い一本鎖核酸はそれらの配列によって規定される柔軟性のあまりない構造をとるので、かかるライブラリーは、莫大な数の分子形状又は立体配座を含んでいる。ある所与の標的タンパク質に対する高親和性核酸リガンドを単離するためには、出発核酸ライブラリー(実際面では、1014~1015の異なる配列)を、関心の対象であるタンパク質とともにインキュベートする。特定のタンパク質への結

50

合を可能ならしめる立体配座をとる核酸分子を、次に、採用した条件下で前記タンパク質に結合できないライブラリー中の他の配列から分割分離する。

【0012】

次に、結合した配列を前記タンパク質から取り外し、逆転写及びPCR（RNAを基礎としたライブラリーの場合）又はPCRのみ（DNAを基礎としたライブラリーの場合）によって増幅して、標的タンパク質に結合する配列が濃縮され、複雑度の減じたライブラリーを生じさせる。このライブラリーを、次に、インビトロで転写させ（RNAを基礎としたライブラリーの場合）、又はその鎖を分離し（DNAライブラリーの場合）、次回の選択に用いるための分子を生成させる。典型的には厳密性を増しながら行われる数回（普通8 - 12回）の選択ののち、選択されたリガンドを配列決定し、標的タンパク質に対する親和性及びインビトロで標的タンパク質の活性を阻害する能力について評価する。

10

【0013】

SELEXで単離されたアプタマーは、顕著な親和性及び特異性を示すことができる。成功裏に行われたならば、選択されたリガンドは強固に結合し、典型的な解離定数は低ピコモル（ 1×10^{-12} M）から低ナノモル（ 1×10^{-9} M）までの範囲内にある。インビトロ選択手法が改良されるのに伴い、標的に対してナノモル未満の親和性をもつアプタマーの生成が益々ありふれたこととなってきている。これらの親和性は、モノクローナル抗体と抗原との間の相互作用について測定されるものと類似している。しかし、アプタマー - 標的タンパク質について測定される解離定数は真の親和性であるので、それらは、より正確には、Fab断片のそれらが標的とする抗原に対する親和性に比されるものである。概して、標的タンパク質に対するアプタマーの親和性は、Fab断片とそれらの標的抗原との間の相互作用に典型的なものよりも強い（非特許文献42）。

20

【0014】

高親和性の核酸 - タンパク質間相互作用には、前記核酸と前記タンパク質の両者がもつ官能基の間の特異的相補的接触が必要である。タンパク質 - アプタマー相互作用を媒介する相補的接触部位の特異的な三次元配列は、他のタンパク質では反復されそうにはないので、アプタマーは、それらの標的に対して一般的に特異的である。2種の関連標的（ヒト及びブタトロンピン（非特許文献43）など）の間での選択ラウンドの「トグリング（切替え）」によって、それらの関連標的の共通のモチーフに結合する交差反応性アプタマーを単離することができる。

30

【0015】

【特許文献1】米国特許第5,475,096号明細書

【特許文献2】米国特許第5,270,163号明細書

【特許文献3】米国特許第5,707,796号明細書

【特許文献4】米国特許第5,763,177号明細書

【特許文献5】米国特許第5,580,737号明細書

【特許文献6】米国特許第5,567,588号明細書

【特許文献7】米国特許第6,171,795号明細書

【特許文献8】WO02/096926

【0016】

【非特許文献1】Chambers et al, Immunity 7(6):885-895(1997)

【非特許文献2】Alegre et al, Nature Reviews Immunology 1:220-228(2001)

【非特許文献3】Salomon and Bluestone, Annu. Rev. Immunol. 19:225-252(2001)

【非特許文献4】Teh and Teh, Cell. Immunol. 179(1):74-83(1997)

【非特許文献5】Kundig et al, Immunity 5(1):41-52(1996)

【非特許文献6】Linsley et al, Immunity 1(9):793-801(1994)

【非特許文献7】Brunet et al, Nature 328(6127):267-270(1987)

【非特許文献8】Alegre et al, Nature Reviews Immunology 1:220-228(2001)

【非特許文献9】Salomon and Bluestone, Ann. Rev. Immunol. 19:225-252(2001)

【非特許文献10】Chambers et al, Immunity, 7(6):885-895(1997)

40

50

- 【非特許文献 1 1】Egen and Nat. Immunol. 3(7):611-618(2002)
- 【非特許文献 1 2】Krummel and Allison, J. Exp. Med. 182(2):459-465(1995)
- 【非特許文献 1 3】Walrus et al, Immunity 1(5):405-413(1994)
- 【非特許文献 1 4】Waterhouse et al, Science 270(5238):985-988(1995)
- 【非特許文献 1 5】Tivol et al, Immunity 3(5):541-547(1995)
- 【非特許文献 1 6】Chambers et al, Immunity 7(6):885-895(1997)
- 【非特許文献 1 7】Bachmann et al, J. Immunol. 160(1):95-100(1998)
- 【非特許文献 1 8】Read et al, J. Exp. Med. 192 [2] :295-302(2000)
- 【非特許文献 1 9】Takahashi et al, J. Exp. Med. 192(2):303-310(2000)
- 【非特許文献 2 0】Read et al, J. Exp. Med. 192(2):295-302(2000) 10
- 【非特許文献 2 1】Takahashi et al, J. Exp. Med. 192(2):303-310(2000)
- 【非特許文献 2 2】Levings et al, J. Exp. Med. 193(11):1295-1302(2001)
- 【非特許文献 2 3】Jonuleit et al, J. Exp. Med. 193(11):1285-1294(2001)
- 【非特許文献 2 4】Waterhouse et al, Science 270(5238):985-988(1995)
- 【非特許文献 2 5】Tivol et al, Immunity 3(5):541-547(1995)
- 【 0 0 1 7 】
- 【非特許文献 2 6】Takahashi et al, J. Exp. Med. 192(2):303-310(2000)
- 【非特許文献 2 7】Yang et al, Cancer Res. 57(18):4036-4041(1997)
- 【非特許文献 2 8】Leach et al, Science 271(5256):1734-1736(1996)
- 【非特許文献 2 9】Hurwitz et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17):10067-10071(1 20
998)
- 【非特許文献 3 0】Hurwitz et al, Cancer Res. 60(9):2444-2448(2000)
- 【非特許文献 3 1】van Elsas et al, J. Exp. Med. 190(3):355-366(1999)
- 【非特許文献 3 2】Mokyr et al, Cancer Res. 58(23):5301-5304(1998)
- 【非特許文献 3 3】Sutmuller et al, J. Exp. Med. 194(6):823-832(2001)
- 【非特許文献 3 4】Hurwitz et al, Cancer Res. 60(9):2444-2448(2000)
- 【非特許文献 3 5】van Elsas et al, J. Exp. Med. 190(3):355-366(1999)
- 【非特許文献 3 6】Sutmuller et al, J. Exp. Med. 194(6):823-832(2001)
- 【非特許文献 3 7】van Elsas et al, J. Exp. Med. 194(4):481-489(2001)
- 【非特許文献 3 8】Waterhouse et al, Science 270(5238):985-988(1995) 30
- 【非特許文献 3 9】Tivol et al, Immunity 3(5):541-547(1995)
- 【非特許文献 4 0】Ellington and Szostak, Nature 346(6287):818-822(1990)
- 【非特許文献 4 1】Tuerk and Gold, Science 249(4968):505-510(1990)
- 【非特許文献 4 2】Gold et al, Annu. Rev. Biochem. 64:763-797(1995)
- 【非特許文献 4 3】White et al, Mol. Ther. 4(6):567-573(2001)
- 【非特許文献 4 4】Beigelman et al, J. Biol. Chem. 270(43):25702-25708(1995)
- 【非特許文献 4 5】Pieken et al, Science 253(5017):314-317(1991)
- 【非特許文献 4 6】Aurup et al, Biochemistry 31(40):9636-9641(1992)
- 【非特許文献 4 7】Jellinek et al, Biochemistry 34(36):11363-11372(1995)
- 【非特許文献 4 8】Beigelman et al, J. Biol. Chem. 270(43):25702-25708(1995) 40
- 【非特許文献 4 9】Tucker et al, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 732(1):203-
212(1999)
- 【非特許文献 5 0】Willis et al, Bioconjug. Chem. 9(5):573-582(1998)
- 【 0 0 1 8 】
- 【非特許文献 5 1】Lee and Sullenger, Nat. Biotechnol. 15(1):41-45(1997)
- 【非特許文献 5 2】Lee and Sullenger, J. Exp. Med. 194(2):315-324(1996)
- 【非特許文献 5 3】Gold, J. Biol. Chem. 270(23):13581-13584(1995)
- 【非特許文献 5 4】Altman et al, Science 274:94-96(1996)
- 【非特許文献 5 5】Rusconi et al, Thromb. Haemost. 84(5):841-848(2000)
- 【非特許文献 5 6】Doudna et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(6):2355-2359(1995) 50

- 【非特許文献 57】 Rusconi et al, Thromb. Haemost. 84(5):841-848(2000)
- 【非特許文献 58】 Conrad et al, J. Biol. Chem. 269(51):32051-32054(1994)
- 【非特許文献 59】 Rusconi et al, Thromb. Haemost. 84(5):841-848(2000)
- 【非特許文献 60】 White et al, Mol. Ther. 5(6):567-573(2001)
- 【非特許文献 61】 Davis et al, Methods Enzymol. 267:302-314(1996)
- 【非特許文献 62】 Mathews et al, J. Mol. Biol. 288(5):911-940(1999)
- 【非特許文献 63】 White et al, Mol. Ther. 4(6):567-573(2001)
- 【非特許文献 64】 Rusconi et al, Thromb. Haemost. 84(5):841-848(2000)
- 【非特許文献 65】 Krummel and Allison, J. Exp. Med. 182(2):459-465(1995)
- 【非特許文献 66】 Walunas et al, Immunity 1(5):405-413(1994) 10
- 【非特許文献 67】 Linsley et al, J. Exp. Med. 176(6):1595-1604(1992)
- 【非特許文献 68】 Wang et al, Scand. J. Immunol. 54(5):453-458(2001)
- 【非特許文献 69】 Lindsten et al, J. Immunol. 151(7):3489-3499(1993)
- 【非特許文献 70】 Porgador et al, J. Immunogenet. 16(4)-5:291-303(1989)
- 【非特許文献 71】 Lee et al, New Biol. 4(1):66-74(1992)
- 【非特許文献 72】 Ellington and Szostak, Nature 346 [6287] :818-822(1990)
- 【非特許文献 73】 Chambers et al, Immunity 7(6):885-895(1997)
- 【非特許文献 74】 Alegre et al, Nature Reviews Immunology 1:220-228(2001)
- 【非特許文献 75】 Salomon and Bluestone, Annu. Rev. Immunol. 19:225-252(2001)
- 【 0 0 1 9 】 20
- 【非特許文献 76】 Hulwitz et al, Proc. Natul. Acad. Sci. USA 95(17):10067-10071(1998)
- 【非特許文献 77】 Hulwitz et al, Cancer Res. 60(9):2444-2448(2000)
- 【非特許文献 78】 van Elsas et al, J. Exp. Med. 190(3):355-366(1999)
- 【非特許文献 79】 Porgador et al, J. Immunogenet. 16(4)-5:291-303(1989)
- 【非特許文献 80】 Nair et al, Nat. Med. 6(9):1011-1017(2000)
- 【非特許文献 81】 Kim et al, Science 266(5193):2011-2015(1994)
- 【非特許文献 82】 Shay and Bacchetti, Eur. J. Cancer 33(5):787-791(1997)
- 【非特許文献 83】 Hicke et al, J. Clin. Invest. 106:923(2000)
- 【非特許文献 84】 Tucker et al, J. Chrom. B. Biomed. Sci. Appl. 732:203(1999) 30
- 【非特許文献 85】 Watson et al, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10:63(2000)
- 【非特許文献 86】 Altman et al, Science 274:94-96(1996)
- 【非特許文献 87】 Shchepinov et al, Nucleic Acids Res. 25:4447(1997)
- 【非特許文献 88】 Beier and Hoheisel, Nucleic Acids Res. 27:1970(1999)
- 【非特許文献 89】 Ringquist et al, Cytometry 33:394(1998)
- 【非特許文献 90】 Davis et al, Nucleic Acids Res. 26:3915(1998)
- 【非特許文献 91】 Crothers et al, Immunochemistry 9:341(1972)
- 【非特許文献 92】 Kaufman et al, Cancer Res. 52:4157(1992)
- 【発明の開示】
- 【発明が解決しようとする課題】 40
- 【 0 0 2 0 】
- 本発明は、アプタマーを用いて免疫機能を調節する方法及びかかる方法に用いるのに適したアプタマーを提供する。本発明のアプタマーは、たとえば A g 特異的免疫療法のための有用な補助手段となりうる。
- 【課題を解決するための手段】
- 【 0 0 2 1 】
- 本発明は、一般的には、アプタマーを用いて免疫系を調節する方法に関する。より詳しくは、本発明は、C T L A - 4 機能を阻害する方法及びかかる方法に適したアプタマーに関する。
- 【 0 0 2 2 】 50

本発明の諸々の目的及び利点は、以下の説明から明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

図1はSELEXプロトコルの概念的図である。

【0024】

図2はCTLA-4の場合の正及び負のSELEXの概念的図である。RNAライブラリーをまずCD28とともにインキュベートし、このタンパク質に結合するRNA類を捨てる。この予備処理を通過したライブラリーをつぎにCTLA-4とともにインキュベートし、それに結合するRNA類を選択し、増幅する。各回の選択ごとにこのプロセスを反復し、最終的にCTLA-4とCD28とを区別する高親和性アプタマー類を単離する。

10

【0025】

図3はヒト及びマウスCTLA-4に対するTOGGLE SELEXの概念的図である。#1回では、RNAライブラリーをマウス及びヒトCTLA-4双方とともにインキュベートし、いずれかのタンパク質に結合しうるRNAリガンド類を単離し、増幅する。以後の「偶数」回の選択では、ライブラリーをヒトCTLA-4とともにインキュベートし、「奇数」回では、マウスCTLA-4とともにインキュベートして、両タンパク質に存在する保存領域に結合しうるアプタマー類を単離する。

【0026】

図4及び図5はCTLA-4結合性アプタマーのインビトロ機能分析結果を示す図である。図4は個々のCTLA-4結合性アプタマーによるCTLA-4機能の阻害結果を示す。9回目の選択後に残ったアプタマープールからの個々のアプタマーをクローン化し、配列決定した(M9-1、M9-2など)。選択されたプールのうちのいくつかの構成員は、括弧内に示したとおり、1回よりも多く提示された。クローン化されたアプタマーを、インビトロで、CTLA-4機能阻害について試験した。それらのアプタマーは、陽性対照として用いた抗CTLA-4 Ab結合部位の推定モル濃度に相当する200nM及び400nMの2つの濃度で使用した。CTLA-4機能の阻害は、イソタイプ対照Abに比しての抗CTLA-4 Abの存在下でのT細胞増殖の増大として反映される。アプタマーM9-8、M9-9及びM9-14は、用量応答的にCTLA-4機能を阻害したが、M9-15はしなかった。

20

【0027】

図5はM9-9アプタマー及び3'末端からの除去欠失によって導かれた35nt長の裁端短小化体Del60によるCTLA-4機能の阻害効果(右図)及び提案されるCTLA-4結合部位を示すDel60アプタマーのコンピュータシミュレーションによる二次構造を示す(左図)。

30

【0028】

図6はDel60アプタマーによるインビトロでのCTLA-4機能の阻害結果を示す図である。CTLA-4阻害についてのインビトロ機能検定は、図4に示したようにして行われた。未結合Del60アプタマー及びDel60/scram対照アプタマー(Del60のスクランブル配列)。さらなる特異性試験では、Del60アプタマーを、表示どおり、mCTLA-4/Fc又はヒトIgGとともにプレインキュベートし、次に、プロテインGを用いて、磁気ビーズに結合させて、T細胞増殖反応に用いた。

40

【0029】

図7はCTLA-4結合性Del60アプタマー処置マウスにおける腫瘍増殖阻害結果を示す図である。C57BL/6マウスの左側腹に、PBSを注射するか、又はB16/F10.9黒色腫細胞を移植し、移植から1、3及び6日後に右側腹から、照射したGM-CSF発現性B16/F10.9腫瘍細胞によって免疫化した。腫瘍移植から3及び6日後に、表示どおりに抗体又はアプタマーを腹腔内投与した。各処置群で5匹のマウスを使用した。個々の(ドット)及び平均の(柱)腫瘍サイズが示されている。使用アプタマーは上記Del60であり、やはりインビトロでCTLA-4機能を阻害したM9-14(図4)から導かれた裁端アプタマーDel55及び他の選択実験で得られたインビトロ

50

アッセイでCTLA-4を阻害しなかったM8G-28アプタマーを使用した。

【0030】

図8はCTLA-4アプタマーによるTERT免疫療法の結果を示す図である。C57BL/6マウスの左側腹に、PBSを注射するか、又はB16/F10.9黒色腫細胞を移植し、腫瘍細胞移植から2、9及び16日後に、アクチン又はTERT mRNA導入DCにより免疫化した。表示したとおりに、De160 CTLA-4結合性アプタマー又は対照De160/SCRAMを、各免疫化に続く3及び6日後に、TERT免疫化マウスに投与した。各処置群に5匹のマウスを使用した。腫瘍移植から21日後の個々の(ドット)及び平均の(柱)腫瘍サイズが示されている。

【0031】

本発明は、一般的には、核酸リガンド、又はアプタマー、を用いて、免疫機能を調節する方法に関する。本発明に従えば、CTLA-4、CD40、4-1BB、OX40、及びTGF受容体を包含する(ただし、これらに限定されるものではない)標的特異的アプタマーを使用して、免疫系を操作することができる。

【0032】

好ましい一具体化態様にあつては、本発明は、癌免疫療法の一方法に関する。この方法に従えば、負のレギュレーター、たとえばCTLA-4の作用を阻害するアプタマーを用いて、ワクチン誘発抗腫瘍免疫応答を増強することができる。前記アプタマーはCTLA-4に結合するが、CD28には結合しないことが有利である。

【0033】

本発明で使用するのに適したアプタマーは、たとえば、SELEX法(たとえば、特許文献1~8で引用されている他の同様の特許参照)を用いて単離することができる。正負の選択体系を用いることによって、非標的分子、たとえばCTLA-4が意図する標的である場合のCD28、に対するアプタマーの結合の可能性を減じることができる。「Toogle SELEX」(非特許文献43)を用いて、同一標的の種間同族体(たとえばヒトCTLA-4とそのマウスでの同族体)と交差反応するアプタマーを単離することができる。かかる交差反応性アプタマーは、たとえば、インビボ動物モデルにおけるアプタマーの機能及び毒性を評価するのに使用できる。

【0034】

たとえばヒトCTLA-4を標的とするアプタマーの単離に当っては、修飾ヌクレオチドを含有するRNAライブラリーを用いて、たとえばヌクレアーゼ分解に抵抗性のアプタマーを得ることができる。アプタマーの血漿安定性は、リボヌクレオチドを、たとえば2'-アミノ、2'-フルオロ又は2'-O-アルキルヌクレオチドで置換することによって増大させることができる(非特許文献44及び45)。これらの置換基を含有する修飾RNAオリゴヌクレオチドは、5~15時間の範囲内のインビトロ半減期をもち得る。

【0035】

さらに、2'-アミノ又は2'-フルオロCTP及びUTPはインビトロ転写によって容易にRNA中へ組入れることができるので、選択プロセスの最初に、これらのバックボーン修飾をコンビナトリアルライブラリーに導入することができる(非特許文献46及び47)。アプタマーの3'末端のキャッピングによって、それをエキソヌクレアーゼ分解から保護することができる(非特許文献48)。エンドヌクレアーゼ分解に対する抵抗性は、リボース及びデオキシリボースヌクレオチドを、O-メチル修飾ヌクレオチド又は種々の非ヌクレオチドリンカーなどの修飾ヌクレオチドでさらに置換することによって、さらに増大させることができる。アプタマーのクリアランス速度は、その有効分子サイズを増大させることによって、たとえば種々の分子量のポリエチレングリコール(PEG)部分又はコレステロールなどの疎水性基の部位特異的付加あるいはリポソーム表面へのアプタマーの付着によって、合理的に変えることができる(非特許文献49及び50)。このように、本発明のアプタマーは、数分間ないし数日間のインビボ半減期をもつように調製することができる。(非特許文献51~53及び特許文献8に記載されている修飾法も参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0036】

アビディティ（結合活性）及び生物活性も、アプタマーの多量体誘導体を生成させることによって増強できる（非特許文献54）。

【0037】

以下は、例示のために示すものである。固定された配列が隣接する約20 - 40ヌクレオチドのランダム配列領域を含むRNAライブラリーは、たとえば、合成DNA鋳型のインビトロ転写によって生成させることができる（非特許文献55及び56）。たとえばヒトCTLA-4を認識するが、非標的分子、たとえばヒトCD28には結合しないRNAアプタマーを同定、単離するためには、図2に記載されているものごとき正負SELEXプロセスを用いることができる。ランダム化RNAライブラリー（～10¹⁵の異なる分子）をスクリーニングして、たとえばCTLA-4/Fc融合タンパク質の形のヒトCTLA-4タンパク質に結合するRNAを得ることができる。たとえばCD28にも結合するRNAを削除するために、そのRNAライブラリーを、たとえばヒトCD28/Fc融合タンパク質とともにプレインキュベートすることができる。CD28タンパク質に結合するRNAは、たとえば、CD28/Fc融合タンパク質-RNA複合体を、たとえばプロテインG被覆セファロースビーズによって沈殿させることによって、除去できる。

10

【0038】

かかるプロセスは、たとえばプロテインG被覆ビーズ、Fc及びCD28に結合するプールからRNAをあらかじめ除去するのにも役立つ。この予備処理を通過したRNAプールは、次に、たとえばヒトCTLA-4/Fc融合タンパク質とともにインキュベートし、このタンパク質に結合するRNAを、たとえばプロテインGビーズによる沈殿及びたとえばフェノール抽出による溶出によって回収できる。溶出されたRNAは、つぎに逆転写することができ、生じたcDNAはPCR増幅してDNA鋳型を生成させることができ、これらの鋳型は、インビトロ転写によって、次の選択のためのRNAを産生することができる。

20

【0039】

かかる選択を約8 - 14回用いて、高い親和性及び特異性でヒトCTLA-4/Fc融合タンパク質に結合するRNA分子を生じさせることができる。これらのRNA分子の配列及びそれらのヒトCTLA-4、CD28及びヒトFcに対する親和性は、たとえばBiacore又はニトロセルロースフィルター結合法（非特許文献57）によって求めることができる。

30

【0040】

RNAアプタマー-タンパク質平衡解離定数（K_d）は、たとえば二重フィルター、ニトロセルロースフィルター結合法（非特許文献58及び59）を用いて求めることができる。簡潔に、かつ例示のためのみに言えば、³²P-末端標識RNAアプタマー（<0.1 nM）をある濃度範囲の個々のタンパク質とともにインキュベートすることができる。RNA-タンパク質複合体は、たとえば混合物をニトロセルロースフィルターに通すことによって、遊離RNAから分離できる。結合及び遊離RNAは、たとえばりん光発光分析によって定量でき、それらのデータは、RNAアプタマー-タンパク質相互作用についてのK_dを求めるのに適している。高ピコモル～低ナノモルの範囲内のK_dで標的（たとえばヒトCTLA-4）に結合するが、非標的分子（たとえばヒトCD28又はFc）には、もとのRNAライブラリーがそれらの分子に結合するよりも強固には結合しないアプタマーを単離するのが有利である。

40

【0041】

上で示したように、「toggle SELEX」は、標的、たとえばCTLA-4の種間同族体（たとえばヒトとマウス）上の保存エピトープを認識するアプタマーを同定するのに利用できる（非特許文献60）。かかる交差反応性アプタマーを単離するためには、たとえば、図3に示したように、ヒト及びマウスCTLA-4/Fcタンパク質を用いて交互に選択を行うことができる。1回目のインビトロ選択では、出発RNAライブラリーを、たとえば、ヒト及びマウスの両CTLA-4/Fcとともにインキュベートすることがで

50

きる。

【0042】

いずれかのタンパク質に結合するRNAを、たとえば、プロテインGビーズによる沈殿によって回収し、次の選択のために増幅することができる。2回目の選択では、濃縮されたライブラリーを、たとえば、ヒトCTLA-4/Fcのみとともにインキュベートし、結合したRNAを回収して、ヒトCTLA-4/Fcの表面に結合する構成員がさらに濃縮されたRNAライブラリーを製出することができる。3回目の選択では、このヒトCTLA-4富化ライブラリーをマウスCTLA-4/Fcとともにインキュベートして、前記マウスタンパク質に結合するRNAのサブセット(亜集団)を回収することができる。前記マウスタンパク質に結合しないRNAは廃棄することができる。

10

【0043】

この例では、生じたRNAライブラリーでは、ヒトCTLA-4タンパク質とマウスのそれとの間に保存されている構造モチーフに結合するRNAが濃縮されている。およそ8-14回のtoggle SELEXによって、ヒト及びマウスの両CTLA-4タンパク質に結合するRNAアプタマーが得られると期待できる。toggle SELEXの過程の間に、正負の選択を上述のようにして実施できる。このアプローチを用いて、低ナノモル~高ピコモルの範囲内のKdでヒト及びマウスCTLA-4の双方に結合するが、もとのRNAライブラリーよりも緊密にヒト及びマウスCD28と結合することはないアプタマーを単離することができる。上記のアプローチを他の標的タンパク質にも適用可能なことは了解されるであろう。

20

【0044】

その後の裁端研究は、標的、たとえばCTLA-4に結合する、長さがたとえば約50ヌクレオチド未満のアプタマーを同定するのに利用できる。変異誘発研究を利用して、標的(たとえばCTLA-4)に結合しないが、野生型アプタマーに配列がきわめて近似している対照アプタマーを生じさせることができる。かかる変異アプタマーは、インビトロ及びインビボ研究における陰性対照として役立つ。

【0045】

裁端及び変異誘発研究は、標準的手法を用いて実施できる。しかしながら、例示目的のために、以下を記述する。裁端及び変異体アプタマーを生じさせるには、上記のもののようなアプローチを用いて単離したアプタマーを、たとえば、以前に記載されているように(非特許文献61)、RNA配列アラインメント(非特許文献62)及び先に述べたRNAフォールディングアルゴリズム(非特許文献59)を利用して、ファミリーに分類することができる。分類ができると、共変動分析を採用して、各ファミリーにおいてアプタマーがどのように折りたたまれるかの最初の二次構造モデルを創り出すことができる。

30

【0046】

このモデルを、アプタマーの折りたたみを妨害すると予想できる特異的突然変異ならびにその構造を回復させると期待できる補償突然変異を生じさせることによって、検定することができる。さらに、その作業モデルにおいて折りたたみに重要ではないアプタマー領域を欠失させて、これらのアプタマー変異体のすべての標的(たとえばCTLA-4)との結合能力を上記のようにして評価することができる。さらに、あるアプタマーファミリー内で高度に保存されている配列中での1つ又はごく少数のみの変異を含むアプタマー誘導体を生成させ、試験して、標的へのアプタマーの結合にとって重要なヌクレオチドを同定することができる。

40

【0047】

上記のものなどのアプローチを用いて選択したアプタマーを、標的との結合についてのそれらの既知リガンドとの競合能力に基づいてさらに選択することができる。CTLA-4の場合には、たとえばB7との競合能力に基づいてアプタマーを選抜することができる(非特許文献63及び64)。簡単に、ただし単に例として、説明すると、痕跡量の³²P標識アプタマーを、CTLA-4と、アプタマーの約半分が前記タンパク質と結合するのを可能ならしめる条件下で、インキュベートすることができる。

50

【0048】

さらに、B7-1タンパク質を増量しながら添加して、CTLA-4との結合についてB7が当前記アプタマーと競合するかどうかを明らかにすることができる。結合反応混合物は、次に、ニトロセルロース/ナイロンの2フィルター系を通過させて、CTLA-4に結合したアプタマーを未結合アプタマーから分離することができる。フィルター上の放射能は、たとえばりん光発光分析を用いて定量することができ、データは、B7との競合についての k_i を求めるのに使用できる。

【0049】

上記のものなどのアプローチを用いて選択したアプタマーは、インビトロアッセイ法を用いて活性を試験することができる。たとえば、マウス及び/又はヒトCTLA-4との結合のために選択したアプタマーは、インビトロでCTLA-4の機能を阻害するそれらの能力について試験できる。CTLA-4機能の阻害は、たとえば、インビトロ増殖アッセイで測定できる。読み出された情報は、たとえば、 α -CTLA-4（非特許文献65及び66）やCTLA-4結合性アプタマー（図4及び5）などのCTLA-4阻害剤の存在下の α -CD3及び α -CD28による最適以下の多クローン性活性化の条件下でのT細胞増殖の増強であり得る。

【0050】

CTLA-4の阻害によるT細胞増殖増強は、最適以下の条件下で検出できるので、ヒトT細胞の増強された増殖を検出するのに必要なヒト α -CD3及び α -CD28ならびに α -CTLA-4の濃度は、実験的に求めることができる。インキュベーション時間を求めるには、当前記細胞を、たとえば、採集に先立ち14~18時間の間 3 H-チミジンで短時間標識して、ある時間経過の間に採集することができる。マウスT細胞と同様に、hCTLA-4発現は2~3日後にピークに達するが、ヒトT細胞上では、少なくとも5日間は発現が高度のままであり、延長されたインキュベーション時間が有利になる可能性がある（非特許文献67及び68）。

【0051】

マウスでは、 α -CTLA-4介在性増殖増強は、休止T細胞上では検出できないCTLA-4発現の上方制御（アップレギュレーション）によって生起する。しかし、ヒトT細胞は検出可能なCTLA-4発現を有しており、これは活性化されるとき上方制御される（非特許文献68及び69）。これを説明するためには、培養中のさまざまな時点で α -CTLA-4を添加すればよい。各条件についての反復実験を用いて、分裂細胞の割合の培養ごとの変動を推定し、極小化することができる。

【0052】

ヒトCTLA-4発現を上方制御する他の方法は、ヒトT細胞に対して用量依存的に機能するIL-2とともにインキュベートすることである（非特許文献68）。IL-2の濃度及びインキュベーション時間は、実験的に検定して、 α -CTLA-4抗体による増殖増強の条件を求めることができる。IL-2の存在がT細胞増殖に対する α -CTLA-4の影響を減少させるならば、 α -CTLA-4の添加に先立って、培養を洗って、このサイトカインを除去することができる。

【0053】

アプタマー（たとえばCTLA-4を標的とするアプタマー）の段階希釈液を、CTLA-4の場合には α -CTLA-4抗体（たとえば）の最適濃度の場合と同等数の結合部位を与える濃度より上及び下の濃度範囲にわたって試験することができる。T細胞増殖の増強がCTLA-4機能の阻害によるものであることを確認するために、2種類の対照を使用することができる：

- a) 対照オリゴヌクレオチド(ODD)であって、CTLA-4に結合しない類似の塩基組成をもつもの(スクランブルODN)を陰性対照として使用でき、
- b) アプタマー候補を、たとえばhCTLA-4/Fc又は対照Igとともにプレインキュベートして、T細胞培養への添加に先立って前記アプタマーを除去することができる。これは図6に示したとおりである。

10

20

30

40

50

【0054】

増強がFc：アプタマー相互作用よりもCTLA-4：アプタマー相互作用によるものであれば、CTLA-4介在性増殖増強は、マウスアプタマーの場合に見られたように、hCTLA-4/Fcで予備除去するとなくなるが、対照Igではそうならない(図6)。たとえば、CTLA-4と同等以下の濃度で同等レベルまで増殖を一貫して増強するアプタマーが、さらに試験するための好ましい候補である。最低濃度でCTLA-4を阻害するアプタマーは、さらに裁断して、CTLA-4結合及びCTLA-4機能阻害について再試験することができる。

【0055】

B16/F10.9黒色腫モデルを用いて、アプタマー及びそれらの誘導体の毒性を評価し、雌性C57BL/マウスでの腫瘍増殖を阻止又は遅延させるアプタマーの能力を試験することができる(非特許文献70)(図6及び7参照)。マウスは、TERTmRNA導入DCにより免疫化して、アプタマーの抗腫瘍免疫性増強能を、たとえば図8に記載したようにして、求めることができる。この治療モデルのストリンジェンシーは、移植腫瘍細胞の用量あるいは腫瘍細胞移植と免疫療法/アプタマー投与開始との間隔によって調節することができる。これにより、ますます有効なアプタマー及びそれらの誘導体を評価することが可能になる。

10

【0056】

強力な抗腫瘍応答を示す選択されたアプタマーによって処置されたマウスは、自己免疫徴候について調べることができる。制御不全となったリンパ球増殖についてスクリーニングを行うために、免疫化マウスを定期的に屠殺して、詳細な病理学的検討及び血液免疫組織化学的検討に付すことができる。

20

【0057】

本発明のアプタマーを含有する医薬として有用な組成物は、医薬として許容しうる担体、希釈剤又は賦形剤を用いて、当業界で認められている手法により処方することができる。かかる担体及び処方の例は、"Remington's Pharmaceutical Sciences"(レミントンの薬学)中に見出すことができる。アプタマーは、たとえば液剤、クリーム剤、ゲル剤、軟膏剤又はスプレー剤として処方できる。アプタマーは、丸剤、カプセル剤、錠剤又は坐剤などの投与単位剤形中に存在することができる。それが適当な場合には、それらの組成物を滅菌することができる。それらの組成物は、本発明のアプタマーを1種より多く含有していてもよい。

30

【0058】

本発明のアプタマー又はそれを含有する組成物の投与方法は、当前記アプタマー、患者及び求める効果に応じて異なりうる。かかる投与方法の例としては、非経口的、静脈内、皮内、脊髄内、筋肉内、皮下、局所、経皮パッチ、直腸、膺又は尿道座剤による、腹腔内、経皮、鼻内噴霧、外科的埋入、外科的体内塗布、注入ポンプ又はカテーテル経路が挙げられる。前記アプタマー又はそれを含有する組成物は、植込剤、大型丸剤、微粒子、小球体、ナノ粒子又はナノ球体などの徐放性処方投与することができる。製剤処方の標準的情報については、Ansel et al, "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System"(医薬品剤形と薬物送達システム)、第6版、ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス(1995)を参照されたい。

40

【0059】

本発明のアプタマーは、剤形に適合した方法で、治療上の有効量を投与することができる。投与すべき量は、前記アプタマー、処置すべき対象、前記対象の身体の有効成分利用能力及び所望する治療効果の度合いに応じて異なりうる。投与を要するアプタマーの最適量は、当業者ならば容易に決定することができる。一般に、当前記組成物は、体重に合わせた用量で、たとえば体重1kg当り約1µgから体重1kg当り約100mgまで、好ましくは体重1kg当り1mgから体重1kg当り50mgまでの用量で、投与することができる。

【0060】

50

本発明のアプタマー、とりわけCTLA-4を標的とするアプタマーは、ヒト及びヒト以外の哺乳動物の双方においてワクチンにより惹起された抗腫瘍反応を増強するためのAg特異的免疫療法への有用な補助手段となる。

【0061】

本発明のいくつかの側面を、以下の非限定的な実施例において、より詳細に記述することができる。

【実施例1】

【0062】

CTLA-4の機能を阻害するヌクレアーゼ抵抗性RNAアプタマーの単離を、CTLA-4結合アプタマー単離のためのSELEXプロトコール(非特許文献71及び72)を用いて実行した。簡単に言えば、 $>10^{14}$ のユニークRNA分子からなるライブラリーを生ぜしめた。このとき、各分子は、選択したRNA種をその後の諸ラウンドでの選択のための増幅のために使用する定常配列に隣接する40nt長のランダム領域からなる。RNAーゼ抵抗性を増すために、2'-フルオロ修飾ピリミジン類を、転写の間に分子内へ組み込んだ。そのRNAライブラリーをマウスCTLA-4/ヒトFc融合タンパク質(mCTLA-4/Fc)とともにインキュベートし、結合したRNAをニトロセルロースフィルター結合によって未結合RNAから分割し、次の選択に付した。

【0063】

2回ごとの選択ののち、フィルター結合アッセイを用いてRNAのmCTLA-4/Fcに対する親和性をチェックして、選択の進行をモニターした。親和性の増大は選択が進行していることを示す。CD28及びヒトIgG(huIgG)結合親和性を時々測定して、特異性を追跡した。選択を9ラウンド実施した。その時点でそれ以上の親和性増大は認められなかった。そのCTLA-4結合性アプタマープールは、それら2種の分子の間のかなりの相同性(非特許文献73~75)にもかかわらず、CD28への結合を示さなかった。

【0064】

第9ラウンドからの増幅生成物のクローニング及び配列決定により、配列の多様性が限られていることが明らかとなり、8種のユニーク配列が複数回再提示され(図4)、選択がほぼ終点にあることが示された。各配列を代表する構成員を、インビトロアッセイでCTLA-4阻害について試験した。このアッセイでは、以前に記載されているとおり(非特許文献65及び66)、精製T細胞を、前述の条件で、抗CD3及び抗CD28Abとともにインキュベートして、刺激し、増殖させる。T細胞増殖を抑制するCTLA-4の機能に一致して、抗CTLA-4Abとのインキュベーションは、T細胞増殖増強をきたしたが、イソタイプ対照Abとのそれではそうはならなかった。数種のRNA種が、抗CTLA-4抗体と同等以上にCTLA-4機能を阻害した(図4:M9-8、M9-9及びM9-14)。その一方、他のRNA種は、それらがCTLA-4に結合したという事実にもかかわらず、CTLA-4を阻害しなかった。

【0065】

アプタマーM9-9を、それが図4に示されているように一貫してもっとも強力なCTLA-4阻害剤であることに基づいて、さらなる研究のために選択した。CTLA-4結合性アプタマーのインビボ検討を容易にするために、M9-9アプタマーの欠失誘導体を生成させ、CTLA-4結合性及びインビトロでのCTLA-4機能阻害能について試験した。mCTLA-4/Fcに結合し、CTLA-4機能を阻害した最小の機能性M9-9アプタマーは、Del60と名付けた35nt長の裁端体であった(図5)。Del60のコンピュータシミュレーションによって得られた二次構造は、ステムループ構造がCTLA-4に対する結合部位を構成していることを示唆している(図5)。

【0066】

Del60アプタマーによるCTLA-4機能の阻害の特異性を、図6に示す。まず、Del60は、制限条件下でT細胞増殖を増強するが、対照アプタマーはそれをしない。第二に、T細胞培養への添加に先立って、Del60アプタマーをmCTLA-4

10

20

30

40

50

／Fcとブレインキュベートすると、アプタマーの増強作用がなくなったが、huIgGとではなくなり、De160は、mCTLA-4／FcのFc部分にはなく、CTLA-4に結合することによって、その作用を伝達することが示された。

【0067】

マウスでの研究によって、抗体介在性CTLA-4阻害を、いずれの処置も単独では有効ではないような条件下で、ワクチン接種と併用すれば、腫瘍の拒絶を達成できることが示されている（非特許文献76～78）。腫瘍増殖に対するCTLA-4結合性アプタマーの影響能は、最初、以前の研究（非特許文献76～78）で用いられた免疫原性の弱いB16／F10.9黒色腫モデル（非特許文献79）で試験した。

【0068】

図7に示した実験では、マウスにB16／F10.9腫瘍細胞を移植し、移植から1、3及び6日後に、模擬としてPBSにより免疫化し、あるいは、照射したGM-CSF分泌性B16／F10.9（F10.9-GM）腫瘍細胞により免疫化した。腫瘍移植から3及び6日後に、F10.9-GM免疫化群には抗体又はアプタマーをi.p.注射した。模擬免疫化PBS群にはその注射は行わなかった。この実験では、照射F10.9-GM細胞による免疫化は腫瘍細胞に対して認めうるほどの作用を示さなかった（F10.9-GM細胞ワクチンを与えなかったPBS群を、イソタイプ対照Abで処置した免疫化群と比較されたい）。照射GM-CSF分泌性B16／F10.9でマウスを免疫化することにより誘発される弱い免疫反応は、測定できるほどに腫瘍増殖に影響するには充分でなかったと考えられる。

【0069】

先に報告されているように、抗CTLA-4Abで処置した免疫化マウスは、腫瘍増殖の有意な遅延を示したが、イソタイプ対照Abではそうではなかった（van Elsas,1999 #23;Hurwitz,1998 #21;Hurwitz,2000 #22）。インビトロでCTLA-4機能を阻害した2種のアプタマー、De160及びやはりインビトロでCTLA-4機能を阻害するM9-14の裁端体であるM9-14De155は、抗CTLA-4Ab処置マウスで見られるのに匹敵する程度まで腫瘍増殖を阻害したが、インビトロでCTLA-4に結合するがCTLA-4機能を阻害しないM8G-28は阻害しなかった。それゆえ、この実験は、CTLA-4結合性アプタマーはインビボで生物活性をもつということを証明するものである。

【0070】

先に、マウステロメラーゼのタンパク質サブユニット、テロメラーゼ逆トランスクリプターゼ（TERT）に対して、TERT mRNA導入同系骨髄由来樹状細胞（DC）を用いて、マウスを免疫化すると、予防的抗腫瘍免疫が生じることが示されている（非特許文献80）。TERTに対する免疫療法の魅力ある特徴は、それがほとんど（>80%）の腫瘍で過剰発現されること（非特許文献81及び82）であり、それゆえ、免疫療法の共通の標的の実例となることである。さらに、驚くほどのことではないが、TERTは正常な遺伝子産物であるから、それは弱い抗原であり、すなわちTERTに対する免疫化により刺激された抗腫瘍反応は弱かった（非特許文献80）。

【0071】

免疫化の治療効果を増強するためには、腫瘍により発現される追加の抗原を標的にすること及び／又は抗TERT免疫化を他の処置と組合せることが有用であろうと推測された。ここで、CTLA-4結合性アプタマーによるマウスの処置がTERTに対する免疫化の治療上の有用性を増強するかどうかを試験した。図8に示したように、TERT mRNA導入DCによる担がん動物の処置は、きわめて弱い腫瘍抑制効果を示し、以前の観察（非特許文献80と一致していた。しかし、インビトロでやはりCTLA-4機能を阻害することが示された（図6及び7）CTLA-4結合性アプタマー（De160）によってもマウスを処置するときには、腫瘍抑制が有意に増強された。しかし、非機能性非CTLA-4結合性対照アプタマー（De160／SCRAM）で処置した場合には、増強はなかった。この観察は、SELEX法によって単離されたCTLA-4結合性アプタマ

10

20

30

40

50

ーが生物活性を示すという結論を支持する追加の証拠を提供するものである。

【実施例 2】

【0072】

ヒトCTLA-4に結合し、これに拮抗するアプタマーを、それらをインビボ安定性、循環血中半減期及びヒトCTLA-4に対するアビディティが増大するように修飾することによって、阻害剤としての活性を最適化することができる。いずれの場合にも、アプタマーは、合成後の化学的方法によって修飾できて、所望の性質をもつ誘導体を生じることができる合成化合物であるという事実を利用できる。

【0073】

安定性の増強。 2'-フルオロピリミジン含有CTLA-4アプタマーをインビボでのヌクレアーゼ分解に対してより抵抗性を与えるために、それらをできるだけ多くの2'-ヒドロキシ(2'-OH)プリンを(機能分析によるCTLA-4結合親和性確保における有意の損失なしに)糖部分に2'-O-メチル(2'-Ome)を含む修飾プリンヌクレオチドによって置換することにより、さらに修飾することができる。かかる置換基は、先に、インビボでのアプタマーのヌクレアーゼに対する安定性を一層増強することが示されている(総説については、非特許文献83参照)。

10

【0074】

残念ながら、2'-Omeプリン類は、インビボ転写の間にT7RNAポリメラーゼがそれらをあまりよく利用しないため、SELEXの間にRNA中に組み込むことが困難である。すなわち、かかる修飾は、同定、裁断及び有効性確認ののち、CTLA-4アプタマーに組み込むことができる。2'-Ome含有オリゴヌクレオチドの合成は、現在では標準的実務であり、かかる化合物が商業的に入手可能である。2'-OHプリンの多数を2'-Omeで置換して、インビボでのヌクレアーゼ分解に対して高度に抵抗性の修飾されたCTLA-4特異性アプタマーを生成させようと思われる(非特許文献83)。

20

【0075】

CTLA-4結合性を失うことなくどのプリンを置換できるかを知るために、アプタマーの二次構造の作業モデルを利用できる。まず、アプタマーを構造ドメイン(たとえば種々のステム及びループ)に分割することができる。次に、各ドメインについて2'-Omeを含むように修飾された所与のドメインに各プリン残基を含むアプタマー誘導体を合成することができる。次に、これらの修飾アプタマーを結合性研究で試験して、かかる置換がアプタマー-CTLA-4結合に影響するかどうかを知ることができる。ある特定のドメイン(単数又は複数)が全2'-Ome置換を許容しない(結合の大きい低下に至る)ならば、そのドメイン内のどのヌクレオチド(単数又は複数)を2'-Ome置換できないかを、単一2'-Ome置換誘導体類の生成及び検討によって知ることができる。このようにして、2'-Omeで修飾可能なプリン及びそれができないものを容易に同定できる。最後に、許容される極大数の2'-Omeを含むCTLA-4アプタマーを生成させて、生化学的、細胞及びインビボでの研究で試験することができる。

30

【0076】

生体利用率の増強。アプタマーのインビボでの生体利用率を増強するために、アプタマーの末端へのコレステロール部分又は40kDaのポリエチレングリコール(PEG)の付加が、動物試験においてこれらの分子の循環血中半減期を有意に向上させようことが示されている(非特許文献84及び85)。かかる合成後修飾なしのアプタマーは、腎臓によって速やかに取り除かれるために、それらの循環血中半減期は10分間の範囲内である(非特許文献84及び85)。これに対し、コレステロール又はPEGを含有するアプタマーは、IV投与後4-12時間の範囲内の半減期で循環する(非特許文献84及び85)。

40

【0077】

これらの化合物の循環血中半減期の増大は、アプタマーがCTLA-4に結合する機会を拡げることによりインビボでの改善されたアプタマー効率をもたらすことができる。CTLA-4アプタマーのインビボ循環半減期を増大させるために、コレステロール又は4

50

0 k D a の P E G 部分をアプタマーに付加することができる。これらの部分は、6 炭素原子のリンカーを介してアプタマーの 5' 末端に付加させることができる。生じたアプタマー誘導体は、C T L A - 4 に結合し、その機能を阻害するそれらの能力を検定することができる。このようにして凝固因子 I X a に特異的なアプタマーにコレステロール及び P E G 部分を付加しても、I X a 因子に結合して、その活性を阻害するアプタマーの能力に有意の影響を与えないことが証明されている。

【0078】

このアプタマー (R e g 1) へのコレステロールの付加は、ブタへの静脈内投与後に前記アプタマーの循環血中半減期を有意に増大させた。未修飾アプタマーの循環血中半減期はおよそ 10 分間であるが、コレステロール修飾アプタマーは 3 時間より長い半減期で循環する。P E G 修飾アプタマーは I V 投与後に 12 時間の範囲内の半減期で循環しうることが証明されている (非特許文献 84 及び 85)。コレステロール又は 40 k D a P E G の付加がアプタマーの C T L A - 4 への結合を有意に減少させるならば、アプタマーの 3' 末端へのコレステロール及び P E G の付加と同様にして、他の長さのリンカーをアプタマーへの付加について検討することができる。かかる 3' 末端付加のための化学は、5' 末端付加ほどには発展しておらず、したがって、5' 末端の修飾が好ましい。最後に、コレステロール又は P E G の付加を許容する C T L A - 4 アプタマー誘導体を、細胞を基礎とした活性アッセイ及びインビボの活性アッセイでスクリーニングすることができる。

10

【0079】

四量体の多量体を生成させて、それらの C T L A - 4 に対するアビディティ及びインビボ生物活性を増強することができる (非特許文献 86)。例として、以下に 3 つのカテゴリーを記述する：

20

【0080】

i) 二価アプタマー合成。

Ringquist と Parma (Cytochemistry 33:394(1998)) は、分岐 3' - 3' 結合 C P G 支持体 (Glen Research, Sterling, バージニア州) から開始する固相ホスホロアミダイトカップリング化学を用いた L - セレクチンに対する二価版のアプタマーの合成を記載している。この方法を用いて、アプタマー単位の 3' 末端が対称性リンカーによって連結された二価版のアプタマーを生成させることができる。この方法によって、さまざまな原子長のスペーサー (たとえば、3、6、9 又は 18 原子スペーサー) を C P G とアプタマーの 3' 残基との間に標準的ホスホロアミダイトリンカー及びカップリング化学を用いて組み込むことにより前記スペーサーを含ませることによって、アプタマーユニット間の距離を容易に変えることができる。この方法は有効性が確認されており、二価アプタマーの制御された生成を可能ならしめることができる。この方法の限界は、3' 連結二価アプタマーのみを合成できるだけであり、全収率がカップリング工程の数のゆえに低いかもしれないということである。

30

【0081】

ii) 三価及び四価アプタマー合成。

デンドリマーホスホロアミダイト (非特許文献 87) (Glen Research, Sterling, V A) を用いて、三価及び四価形態を生成させることができる。デンドリマーホスホロアミダイトシントンは、本質的には、このシントンのオリゴヌクレオチドへの付加が、使用したシントンに応じて、追加的オリゴヌクレオチド合成又は付加のための 2 - 3 部位を製出するから、単量体オリゴヌクレオチドの結合価を増大させるのに使用できるビルディングブロックである。この合成戦略は、多価 P C R プライマー、ハイブリダイゼーションプローブなどの作成に使用されており (非特許文献 87) 及びその中の参照)、容易に多価アプタマーの合成に転用できる。簡単に述べれば、現在行われているように逆向きデオキシチミジン C P G から合成したアプタマーを、対称性の二倍性又は三倍性デンドリマーホスホロアミダイトの 5' 残基に結合させて、アプタマー付加のためのそれぞれ 2 又は 3 箇所の追加の部位を製出させることができる。次に、デンドリマーからのアプタマーの段階的合成によって追加のユニットを付加させて、使用したデンドリマーに応じてそれぞれ三価又

40

50

は四価のアプタマーを製出させる。

【0082】

別法として、d A - 5' - C E ホスホロアミダイトを前記デンドリマーに結合させ、次に、この部位への先に合成したアプタマーユニット（その5' D M T をなお含有している）の5'末端の5' - 5'結合を介してのカップリングによって前記デンドリマーに追加のユニットを付加させて、それぞれの5'末端で結合された三価又は四価アプタマーを製出することができる。この後者の戦略には、完全合成アプタマーをデンドリマーに付加させるという利点があり、それゆえ、より純度の高い製品をより高い収率で得ることができる。上述のとおり、個々のアプタマーユニットの間隔は、アプタマーユニットとデンドリマーの付加部位との間に種々原子数のスペーサーを介在させることによって調整できる。これらのスキームのうちでは、後者がより純粋な製品をより高い収率で生じるように思われる。精製した全長アプタマーを用いて、最終の多価生成物を組み立てるからである。

10

【0083】

iii) 二ないし五価アプタマー合成。

非特許文献88は、多価核酸プローブの生成のための屈曲可能なポリアミンリンカーの合成を記載している。本質的には、この化学を用い、制御されたやり方で、オリゴヌクレオチド用の2ないしN箇所の付加部位（所定のリンカー間隔で隔てられた）を含む屈曲可能なリンカー系を、単純な連結化学によって製出することができる。このアプローチを用いて、二ないし五価形態を生成させることができる。簡単に述べれば、2、3、4又は5つの第一級アミン付加部位をもつリンカーを、記述されているようにして（非特許文献88）合成できる。次に、このリンカーに、先に合成したアプタマーの5'ヒドロキシルをリンカーのアミノ基にジスクシンイミジルカーボネート又はジスクシンイミジルオキサレート活性化剤として用いて結合させることによって、アプタマーユニットを付加することができる。上記の方法によるのと同様に、この場合にはリンカー上のアミノ基間隔を増すか、又は、合成の間にアプタマーの5'末端にさまざまな長さのスペーサーを付加させることによって、アプタマーユニット間隔を変えることができる。生じたアプタマーは、それらの5'末端で連結させることができる。ここでも、最終の多価生成物の組立てに全長アプタマーを使用するので、この方法は、純度の高い最終製品を生じることができる。

20

30

【0084】

多価アプタマーの特性決定。

多価アプタマー誘導体の合成に用いた方法とは関係なく、アプタマーユニットの数及びこれらのユニットによって生じた親和性の変化を決定することが、予備的研究で見られたように、多価アプタマーの増強された能力の原因となる基礎機構の理解にとって重要な意味をもち得る。アプタマー形態の価数は、Maldi-TOF質量分析法によりそのアプタマー形態の分子量を測定することによって容易に確認でき、これは、トランスジェノミック（Transgenomic）での標準的品質管理工程である。多価形態の親和性は、フローサイトメトリーによって決定することができ、蛍光標識版のアプタマー及びビーズ固定CTLA-4を用いることができる（非特許文献89及び90）。

40

【0085】

このアッセイフォーマットは、滴定及び競合による解離定数の測定ならびに種々のアプタマー形態の会合速度及び解離速度の測定を可能にする。価数の増加は、ビーズ固定化（及び細胞表面）CTLA-4へのアプタマーの親和性の増大ならびに滞留時間の延長に導くことができる。多価アプタマー形態の各アプタマーユニットの活性は、直接には求められないが、リガンド親和性の期待される増大をリガンド価数の関数として予測できる強力な理論的基礎がある（非特許文献91及び92）。ビーズ固定化CTLA-4に対するこれらの形態の測定された親和性をリガンド価数に基づく親和性の予期される増大と比較すると、アプタマーユニットのいくつが実質的なCTLA-4結合活性を維持しているかを推定することが可能となり、それを用いて、どの形態をインビトロ及びインビボの活性ア

50

ッセイでさらに試験すべきかを決定することができる。

【0086】

上で引用したすべての文献の全体を引用によりここに挿入するものである。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】SELEXプロトコルの概念図である。

【図2】CTLA-4の場合の正及び負のSELEXの概念図である。

【図3】ヒト及びマウスCTLA-4に対するTOGGLE SELEXの概念的図である。

【図4】個々のCTLA-4結合性アプタマーによるCTLA-4機能の阻害結果を示す図である。 10

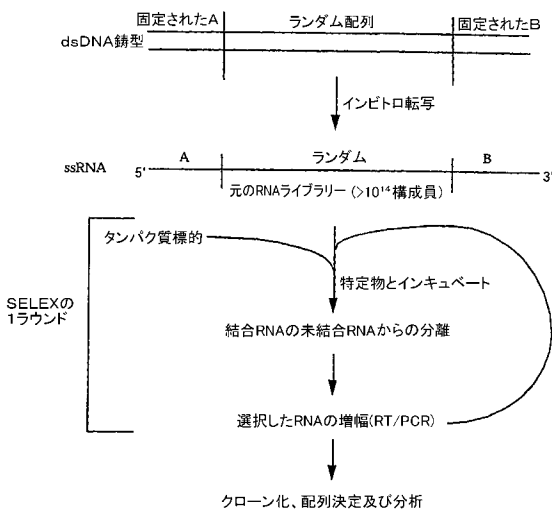
【図5】M9-9アプタマー及び3'末端からの除去欠失によって導かれた35nt長の裁端短小化体De160によるCTLA-4機能の阻害結果(右図)及び提案されるCTLA-4結合部位を示すDe160アプタマーのコンピュータシミュレーションによる二次構造を示す(左図)図である。

【図6】De160アプタマーによるインビトロでのCTLA-4機能の阻害を示す図である。

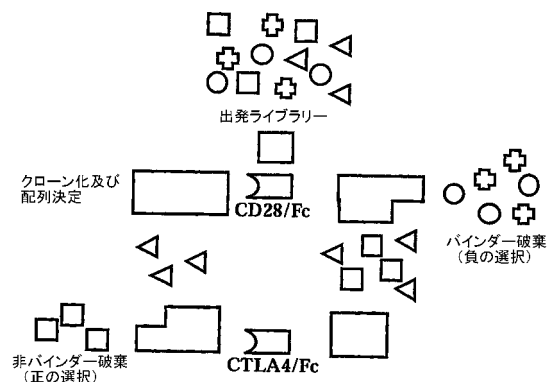
【図7】CTLA-4結合性De160アプタマー処置マウスにおける腫瘍増殖阻害を示す図である。

【図8】CTLA-4アプタマーによるTERT免疫療法の結果を示す図である。 20

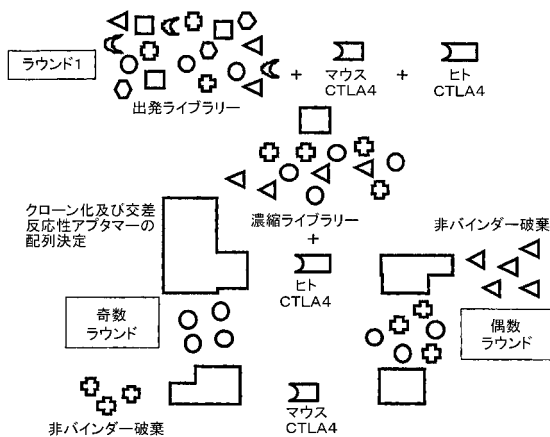
【図1】



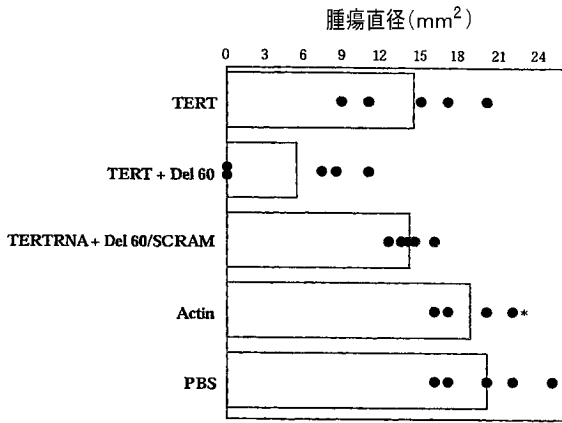
【図2】



【図3】



【 図 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/07405

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : CO7H 21/04; A61K 48/00		
US CL : 536/24.5; 514/44		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/24.5; 514/44		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORDEIRO M.F. Novel antisense oligonucleotides targeting TGF-beta inhibit in vivo scarring and improve surgical outcome. Gene Therapy. 2003, Vol.10, pages 59-71, especially page 60 paragraph 3.	1
---		-----
Y		1
X	NOCENTINI G. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. Pro. natl. Acad. Sci. June 1997, Vol.94, pages 6216-6221, especially page 6219.	1
---		-----
Y		1
E	PLUVINET R. RNAi-mediated silencing of DC40 prevents leukocyte adhesion on CD154-activated endothelial cells. Blood. 1 December 2004, Vol.104, pages 3642-3646.	1
A	WEINBERG A.D. Blocking OX-40/OX-40 Ligand in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. Journal of Immunology. 1999, Vol.162, pages 1818-1826	1
X	TAM R.C. Oligonucleotide-mediated Inhibition of CD28 Expression Induces human T Cell hyperresponsiveness and manifest impaired contact hypersensitivity in mice. Journal of Immunology. 1999, Vol 158, pages 200-208.	1-8, 10-19, 21
---		-----
Y		1-8, 10-19, 21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 February 2005 (19.02.2005)		21 MAR 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Kimberly Chong Telephone No. 571-272-0564

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US04/07405

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LINSLEY, P.S. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. <i>J. Exp. Med.</i> December 1992, vol.176, pages 1595-1604.	1-8, 10-19, 21
Y	CERCHIA L. Nucleic acid aptamers in cancer medicine. <i>FEBS.</i> 28 August 2002, Vol.528, pages 12-16.	1-8, 10-19, 21
Y	EATON, B.E. Post-SELEX Combinatorial Optimization of Aptamers. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry.</i> 1997, Vol.5, pages 1087-1096.	1-8, 10-19, 21
Y	WHITE, R. Generation of Species Cross-reactive Aptamers Using "Toggle" Selcx. <i>Molecular Therapy.</i> December 2001, Vol.4, pages 567-573.	16-20, 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/07405

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

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
No SEQ ID provided to search specific aptamers instantly claimed.
2. Claims Nos.: 9 and 20
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	G 0 1 N 33/566	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
C 0 7 H 21/02 (2006.01)	C 0 7 H 21/02	

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

(72) 発明者 サントゥーリ - マロット, サンドラ

アメリカ合衆国、ノース・カロライナ州 27708-0083 ダーハム、ピー・オー・ボックス 90083、オフィス・オブ・サイエンス・アンド・テクノロジー、デューク・ユニバーシティー内

(72) 発明者 サレンジャー, ブルース エー.

アメリカ合衆国、ノース・カロライナ州 27708-0083 ダーハム、ピー・オー・ボックス 90083、オフィス・オブ・サイエンス・アンド・テクノロジー、デューク・ユニバーシティー内

(72) 発明者 ルスコニ, クリストファー ピー.

アメリカ合衆国、ノース・カロライナ州 27708-0083 ダーハム、ピー・オー・ボックス 90083、オフィス・オブ・サイエンス・アンド・テクノロジー、デューク・ユニバーシティー内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA20 HA17
 4B063 QA01 QA18 QQ52 QR35 QR48 QR51 QS33
 4C057 BB02 CC02 CC04 DD02 MM01 MM02
 4C076 AA19 BB11 CC07 CC27 EE59 FF11
 4C084 AA17 MA24 MA66 NA14 ZB07 ZB09 ZB26 ZC75
 4C086 AA01 AA02 BC42 BC43 CB07 DA38 EA17 EA18 MA01 MA02
 MA04 MA05 MA24 MA66 NA14 ZB07 ZB09 ZB26 ZC75

專利名称(译)	寡核苷酸类似物		
公开(公告)号	JP2006522101A	公开(公告)日	2006-09-28
申请号	JP2006507070	申请日	2004-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	杜克大学		
申请(专利权)人(译)	杜克大学		
[标]发明人	ギルボアエリ サントウーリマロットサンドラ サレンジャーブルースエー ルスコニクリストファーピー		
发明人	ギルボア,エリ サントウーリ-マロット,サンドラ サレンジャー,ブルース エー. ルスコニ,クリストファー ピー.		
IPC分类号	A61K31/7088 A61K45/00 C12N15/09 C12Q1/68 A61K31/712 A61P35/00 A61K9/127 A61P37/04 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/566 A61K47/48 C07H21/02 A61K38/00 C07H21/00 C12N15/10 C12N15/115		
CPC分类号	A61K38/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07H21/00 C12N15/1048 C12N15/115 C12N2310/321 C12N2310/322 C12N2310/351 C12N2310/3515 C12N2310/3521		
FI分类号	A61K31/7088 A61K45/00.ZNA C12N15/00.A C12Q1/68.A A61K31/712 A61P35/00 A61K9/127 A61P37/04 A61P43/00.121 G01N33/53.M G01N33/566 A61K47/48 C07H21/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA20 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ52 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QS33 4C057/BB02 4C057/CC02 4C057/CC04 4C057/DD02 4C057/MM01 4C057/MM02 4C076/AA19 4C076/BB11 4C076/CC07 4C076/CC27 4C076/EE59 4C076/FF11 4C084/AA17 4C084/MA24 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB07 4C084/ZB09 4C084/ZB26 4C084/ZC75 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC42 4C086/BC43 4C086/CB07 4C086/DA38 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA05 4C086/MA24 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB07 4C086/ZB09 4C086/ZB26 4C086/ZC75		
優先权	60/453831 2003-03-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

总体上，本发明涉及使用适体来调节免疫系统的方法，并且涉及抑制 CTLR-4功能的方法以及适用于这种方法的适体。

【 図 2 】

