

(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2005-519990

(P2005-519990A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 Z N A D	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/4745	A 6 1 K 39/395 E	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/708	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 39/395 R	4 C O 8 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 39/395 S	4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 158 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-502925 (P2004-502925)	(71) 出願人	500533466
(86) (22) 出願日	平成14年10月15日 (2002.10.15)		ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ ファウンデーション
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月12日 (2004.4.12)		アメリカ合衆国, アイオワ 52242- 5000, アイオワ シティ, オークデイル キャンパス 100 #214 ティ ーアイシー, オークデイル リサーチ キ ャンパス
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/033051	(71) 出願人	502102051
(87) 国際公開番号	W02003/094836		コーリー ファーマシューティカル ゲー ムベーパー
(87) 国際公開日	平成15年11月20日 (2003.11.20)		ドイツ国 デー-40764 ランゲンフ ェルト, エリザベス-ゼルベルト-シュ トラーセ 9
(31) 優先権主張番号	60/329, 208		
(32) 優先日	平成13年10月12日 (2001.10.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イミダゾキノリン化合物を用いて免疫応答を増強するための方法および産物

(57) 【要約】

本発明は、別の治療剤と組み合わせたイミダゾキノリン薬剤の投与を含む。薬物の組み合わせは、相乗作用量または種々の投薬量で、種々の時間スケジュールで投与され得る。本発明はまた、薬物の組み合わせに関係するキットおよび組成物に関する。この組み合わせは、A D C Cの増大、免疫応答および/または患者の刺激ならびに特定の障害の処置のために使用され得る。また、本発明は、被験体において抗原特異的免疫応答を誘導するための方法であって、抗原、イミダゾキノリン、および免疫刺激性核酸を、抗原特異的免疫応答を誘導するのに有効な量、被験体に投与する工程を包含する方法も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における抗体依存性細胞傷害性を刺激する方法であって、該方法は、抗体と、イミダゾキノリン薬剤およびC8置換グアノシンからなる群から選択される薬剤とを、抗体依存性細胞傷害性を刺激する処置を必要とする被験体における抗体依存性細胞傷害性を刺激するのに有効な量、該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

前記薬剤が、イミダゾキノリン薬剤である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記被験体にC8置換グアノシンを投与する工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記被験体にポリアルギニンを投与する工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記被験体に免疫刺激性核酸をさらに投与する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記免疫刺激性核酸が、CpG核酸およびポリG核酸からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記免疫刺激性核酸が、ポリT核酸、トリッチ核酸、TG核酸、CpI核酸およびメチル化CpG核酸からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫刺激性核酸が、ホスホロチオエート改変およびペプチド改変からなる群から選択される骨格改変を有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記免疫刺激性核酸が、キメラである骨格を有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体が、抗癌抗体、抗ウイルス抗体、抗細菌抗体、抗真菌抗体、抗アレルギー抗体、および抗自己抗原抗体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 11】

前記被験体が、喘息/アレルギー、感染性疾患、癌および疣贅からなる群から選択される障害を有するかまたは有する危険性がある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記イミダゾキノリン薬剤が、前記抗体の前に投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記イミダゾキノリン薬剤が、イミダゾキノリンアミンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記イミダゾキノリン薬剤が、Imiquimod/R-837およびS-28463/R-848からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 15】

前記抗体依存性細胞傷害性を刺激するのに有効な量が、相乗作用量である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

被験体における免疫応答を調節するための方法であって、該方法は、免疫刺激性核酸と、イミダゾキノリン薬剤およびC8置換グアノシンからなる群から選択される薬剤とを、該免疫応答を調節するのに有効な量、免疫応答を調節する処置を必要とする被験体に投与する工程を包含する、方法。 50

- 【請求項 17】
前記薬剤が、イミダゾキノリン薬剤である、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 18】
前記被験体に C8 置換グアノシンを投与する工程をさらに包含する、請求項 17 に記載の方法。
- 【請求項 19】
前記免疫応答が、Th1 免疫応答である、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 20】
前記免疫応答が、抗体依存性細胞傷害性である、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 21】 10
前記免疫応答が、先天性免疫応答である、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 22】
前記免疫刺激性核酸が、CpG 核酸およびポリ G 核酸からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 23】
前記免疫刺激性核酸が、ポリ T 核酸、トリッチ核酸、TG 核酸、CpI 核酸およびメチル化 CpG 核酸からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 24】
前記免疫刺激性核酸が、ホスホロチオエート改変およびペプチド改変からなる群から選択される骨格改変を有する、請求項 16 に記載の方法。 20
- 【請求項 25】
前記免疫刺激性核酸が、キメラ骨格を有する、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 26】
前記イミダゾキノリン薬剤が、イミダゾキノリンアミンである、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 27】
前記イミダゾキノリン薬剤が、Imiquimod/R-837 および S-28463/R-848 からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 28】
前記免疫応答が、局所的免疫応答である、請求項 16 に記載の方法。 30
- 【請求項 29】
前記免疫応答が、粘膜免疫応答である、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 30】
前記免疫応答が、全身性免疫応答である、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 31】
前記薬剤が、前記免疫刺激性核酸より前に投与される、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 32】
前記免疫応答を調節するのに有効な量が、相乗作用量である、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 33】 40
前記被験体にポリアルギニンを投与する工程をさらに包含する、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 34】
前記被験体に C8 置換グアノシンを投与する工程をさらに包含する、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 35】
前記被験体に障害特異的医薬を投与する工程をさらに包含する、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 36】 50
前記障害特異的医薬が、癌薬、喘息/アレルギー薬、感染性疾患薬、および疣贅薬から

なる群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記癌薬が、化学療法剤、免疫療法剤、および癌ワクチンからなる群から選択される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記喘息 / アレルギー薬が、ステロイド、免疫調節剤、抗炎症剤、気管支拡張剤、ロイコトリエン調節剤、 β_2 アゴニスト、および抗コリン作用剤からなる群から選択される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記抗微生物薬が、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、および抗寄生生物剤からなる群から選択される、請求項 36 に記載の方法。 10

【請求項 40】

前記被験体を抗原に曝露する工程をさらに包含し、前記免疫応答が、抗原特異的免疫応答である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 41】

前記抗原が、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生生物抗原、および真菌抗原からなる群から選択される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記被験体が、感染性疾患を有するかまたは感染性疾患を発症する危険性を有する、請求項 16 に記載の方法。 20

【請求項 43】

前記被験体が、癌を有するかまたは癌を発症する危険性を有する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 44】

前記被験体が、喘息 / アレルギーを有するかまたは喘息 / アレルギーを発症する危険性を有する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 45】

前記被験体が、免疫無防備状態の被験体である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 46】

前記被験体が、高齢者であるか乳児である、請求項 16 に記載の方法。 30

【請求項 47】

イミダゾキノリン薬剤および免疫刺激性核酸を含有する、組成物。

【請求項 48】

ポリアルギニンをさらに含有する、請求項 47 に記載の組成物。

【請求項 49】

抗原をさらに含有する、請求項 47 に記載の組成物。

【請求項 50】

C8 置換グアノシンをさらに含有する、請求項 47 に記載の組成物。

【請求項 51】

前記免疫刺激性核酸が、CpG 核酸である、請求項 47 に記載の組成物。 40

【請求項 52】

前記免疫刺激性核酸が、ポリG 核酸である、請求項 51 に記載の組成物。

【請求項 53】

前記免疫刺激性核酸が、Tリッチ核酸である、請求項 47 に記載の組成物。

【請求項 54】

イミダゾキノリン薬剤および抗体を含有する、組成物。

【請求項 55】

さらにポリアルギニンを含有する、請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 56】

さらに免疫刺激性核酸を含有する、請求項 55 に記載の組成物。 50

- 【請求項 57】
さらに C8 置換グアノシンを含有する、請求項 54 に記載の組成物。
- 【請求項 58】
イミダゾキノリン薬剤および障害特異的医薬を含有する、組成物。
- 【請求項 59】
前記障害特異的医薬が、喘息ノアレルギー薬、癌薬、および抗微生物薬からなる群から選択される、請求項 58 に記載の組成物。
- 【請求項 60】
さらにポリアルギニンを含有する、請求項 58 に記載の組成物。
- 【請求項 61】 10
さらに免疫刺激性核酸を含有する、請求項 58 に記載の組成物。
- 【請求項 62】
さらに C8 置換グアノシンを含有する、請求項 58 に記載の組成物。
- 【請求項 63】
前記喘息ノアレルギー薬が、ステロイド、免疫調節剤、抗炎症剤、気管支拡張薬、ロイコトリエン調節剤、 β 2 アゴニスト、および抗コリン作用薬からなる群から選択される、請求項 59 に記載の組成物。
- 【請求項 64】 20
前記癌薬が、化学療法剤、免疫療法剤、および癌ワクチンからなる群から選択される、請求項 59 に記載の組成物。
- 【請求項 65】
前記抗微生物薬が、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、および抗寄生虫剤からなる群から選択される、請求項 59 に記載の組成物。
- 【請求項 66】
被験体において抗原特異的免疫応答を誘導するための方法であって、該方法は、抗原、イミダゾキノリン、および免疫刺激性核酸を、抗原特異的免疫応答を誘導するのに有効な量、被験体に投与する工程を包含する、方法。
- 【請求項 67】 30
前記抗原が、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生生物抗原、および真菌抗原からなる群から選択される、請求項 66 に記載の方法。
- 【請求項 68】
試験化合物の Toll 様レセプター (TLR) シグナル伝達活性を、イミダゾキノリンの TLR シグナル伝達活性と比較するためのスクリーニング方法であって、該方法は：
Toll 様レセプター 7 (TLR7) および Toll 様レセプター 8 (TLR8) からなる群から選択される機能性 TLR を、参照イミダゾキノリンと接触させ、TLR シグナル伝達経路によって媒介される参照応答を検出する工程；
TLR7 および TLR8 からなる群から選択される機能性 TLR を、試験化合物と接触させ、TLR シグナル伝達経路によって媒介される試験応答を検出する工程；ならびに、
該試験応答を該参照応答と比較し、該試験化合物の TLR シグナル伝達活性を該イミダゾキノリンの TLR シグナル伝達活性と比較する工程、 40
を包含する、方法。
- 【請求項 69】
前記機能性 TLR が、TLR8 である、請求項 68 に記載の方法。
- 【請求項 70】
前記機能性 TLR が、TLR7 である、請求項 68 に記載の方法。
- 【請求項 71】
前記機能性 TLR を、前記参照イミダゾキノリンおよび前記試験化合物と独立に接触させる、請求項 68 に記載の方法。
- 【請求項 72】 50
前記スクリーニング方法が、イミダゾキノリン類似物を同定するための方法であり、こ

ここで前記試験応答が前記参照応答と類似している場合、該試験化合物がイミダゾキノリン類似物である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記機能性 T L R を、前記参照イミダゾキノリンおよび前記試験化合物と同時に接触させて、T L R シグナル伝達経路によって媒介される試験 - 参照応答を生じさせ、ここで該試験 - 参照応答が前記参照応答に対して比較され得る、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記スクリーニング方法が、イミダゾキノリンアゴニストを同定するための方法であり、ここで前記試験 - 参照応答が前記参照応答より大きい場合、前記試験化合物がイミダゾキノリンアゴニストである、請求項 7 3 に記載の方法。

10

【請求項 7 5】

前記スクリーニング方法が、イミダゾキノリンアンタゴニストを同定するための方法であり、ここで前記試験 - 参照応答が前記参照応答より小さい場合、前記試験化合物がイミダゾキノリンアンタゴニストである、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記機能性 T L R が、細胞内で発現される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記細胞が、機能性 T L R 8 を天然に発現する単離された哺乳動物細胞である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記細胞が、インターロイキン 8 (I L - 8)、インターロイキン 1 2 の p 4 0 サブユニット (I L - 1 2 p 4 0)、核因子 B - ルシフェラーゼ (N F - B - l u c)、インターロイキン 1 2 - ルシフェラーゼの p 4 0 サブユニット (I L - 1 2 p 4 0 - l u c)、および腫瘍壊死因子 - ルシフェラーゼ (T N F - l u c) からなる群から選択されるレポーター構築物をコードする単離された核酸を含む発現ベクターを含む、請求項 7 7 に記載の方法。

20

【請求項 7 9】

前記機能性 T L R が、無細胞系の一部である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記機能性 T L R が、別の T L R との複合体の一部である、請求項 6 8 に記載の方法。

30

【請求項 8 1】

前記機能性 T L R が、骨髄分化因子 8 8 (M y D 8 8)、I L - 1 レセプター関与キナーゼ (I R A K)、腫瘍壊死因子レセプター関与因子 6 (T R A F 6)、I B、N F - B、ならびにこれらの機能性ホモログおよび誘導体からなる群から選択される非 T L R タンパク質との複合体の一部である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記参照イミダゾキノリンが、R - 8 4 8 (R e s i q u i m o d) である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記参照イミダゾキノリンが、R - 8 4 7 (I m i q u i m o d) である、請求項 6 8

40

【請求項 8 4】

前記試験化合物が、核酸分子でない、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記試験化合物が、ポリペプチドである、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記試験化合物が、R - 8 4 8 または R - 8 4 7 以外のイミダゾキノリンである、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記試験化合物が、化合物のコンビナトリアルライブラリーの一部である、請求項 6 8

50

に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(発明の背景)

癌は、2番目に多い死因であり、米国では、死者4人のうちの1人がこれに起因する。1997年には、肺癌、乳癌、前立腺癌、結腸直腸癌および卵巣癌と新たに診断された数は推計約200万人であった。米国で絶えず増え続ける高齢集団に起因して、癌の発生率はますます増え続けると予想することが合理的である。

【0002】

喘息は、米国だけで1400~1500万人に罹患している慢性炎症性疾患である。

【0003】

感染性疾患は、世界中での主な死因の1つである。米国単独では、感染性疾患に起因した死亡率は、1980年と1992年との間で58%上昇した。この時期の間に、感染性疾患と戦う抗感染治療の使用は、有意に増大しており、そして現在、1年間に数百万ドルの産業である。抗感染薬剤の使用におけるこれらの増加を用いてさえ、感染性疾患の処置および予防は、世界中の医学界に対する挑戦のままである。

【0004】

種々の免疫刺激核酸の免疫刺激能力は、充分に実証されている。それらの性質および組成物および投与に依存して、免疫刺激核酸は、Tヘルパー1 (Th1) 応答を誘導し得、Tヘルパー2 (Th2) 応答を抑制し得、そしていくつかの場合には、Th2 応答を誘導し得る。

【0005】

イミダゾキノリン薬剤は、Bリンパ球を活性化する能力、インターフェロン (IFN -) 産生を誘導する能力、ならびに腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン1 (IL - 1) およびインターロイキン6 (IL - 6) をアップレギュレートする能力を含め、免疫調節活性を保有することが同様に報告されている。ウイルス感染および腫瘍の処置におけるイミダゾキノリン薬剤の有用性もまた示唆されている。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、イミダゾキノリン薬剤を他の治療薬剤 (例えば、抗体、免疫刺激核酸、抗原、C8置換グアノシド、および障害特異的医薬) とともに用いた場合、いくつかの予想外でかつ改善された結果が観察されるという知見に部分的に基づく。例えば、イミダゾキノリン薬剤と他の治療薬剤との組み合わせの効力は、いずれかの化合物単独での使用と比較して大いに改善される。

【0007】

この結果は、部分的に、驚くべきである。なぜなら、イミダゾキノリン薬剤および他の治療薬剤は、いくつかの例では、異なった機構によって作用し、相乗作用様式で他方の効力を改善するとはかならずしも予想されないからである。

【0008】

1つの局面では、本発明は、被験体における抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を刺激するための方法を提供する。この方法は、抗体と、イミダゾキノリン薬剤およびC8 - 置換グアノシンからなる群より選択される薬剤とを、被験体における抗体依存性細胞傷害性を刺激するに有効な量で、このような処置を必要とする被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態では、抗体依存性細胞傷害性を刺激するに有効な量は、相乗作用量である。

【0009】

1つの実施形態では、このイミダゾキノリン薬剤は、この抗体の前に投与される。別の

10

20

30

40

50

実施形態では、この抗体は、抗癌抗体、抗ウイルス抗体、抗細菌抗体、抗真菌抗体、抗アレルギー抗体、および抗自己抗原抗体からなる群より選択される。関連の実施形態では、この被験体は、喘息/アレルギー、感染性疾患、癌および疣贅からなる群より選択される障害を有するかまたはこれらの障害を有する危険性がある。

【0010】

以下の実施形態は、本発明のこの局面および他の局面に適用される。

【0011】

1つの実施形態では、この薬剤は、イミダゾキノリン薬剤である。別の実施形態では、イミダゾキノリン薬剤およびC8-置換グアノシンは両方とも、この被験体に投与される。C8-置換グアノシドは、8-メルカプトグアノシン、8-プロモグアノシン、8-メチルグアノシン、8-オキソ-7,8-ジヒドログアノシン、C8-アリアルアミノ-2'-デオキシグアノシン、C8-プロピニル-グアノシン、C8-およびN7-置換グアノシリンボヌクレオシド(例えば、7-アリル-8-オキソグアノシン(ロキソリピン(loxoribine))および7-メチル-8-オキソグアノシン、8-アミノグアノシン、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン、および8-ヒドロキシグアノシンからなる群より選択され得る。

10

【0012】

イミダゾキノリン薬剤がこの被験体に投与されるいくつかの実施形態では、この被験体には、ポリ-アルギニンがさらに投与される。他の実施形態では、インターフェロン(例えば、Intron A)がこの被験体に投与される。

20

【0013】

1つの実施形態では、このイミダゾキノリン薬剤は、イミダゾキノリンアミンである。別の実施形態では、このイミダゾキノリン薬剤は、Imiquimod/R-837、S-28463/R-848(Resiquimod)、イミダゾキノリンアミン、イミダゾピリジンアミン、6,7-縮合シクロアルキルイミダゾピリジンアミン、1,2架橋イミダゾキノリンアミン、および4-アミノ-2エトキシメチル-、-ジメチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-エタノールからなる群より選択される。

【0014】

さらに他の実施形態では、この方法は、免疫刺激核酸をこの被験体に投与する工程をさらに包含する。特定の実施形態では、この薬剤は、免疫刺激核酸の前に投与される。この免疫刺激核酸は、CpG核酸およびポリ-G核酸からなる群より選択され得る。特定の実施形態では、この免疫刺激核酸は、ポリ-T核酸、トリッチ核酸、TG核酸、CpI核酸およびメチル化CpG核酸からなる群より選択される。いくつかの実施形態では、この免疫刺激核酸は、骨格改変を有する。この骨格改変は、ホスホロチオエート改変およびペプチド改変(例えば、モルホリノ骨格改変)からなる群より選択され得るが、このようには限定されない。1つの実施形態では、この免疫刺激核酸は、キメラである骨格を有する。さらに別の実施形態では、この免疫刺激核酸は、CpGモチーフもトリッチモチーフもポリGモチーフも含まない核酸である。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート改変骨格を有する免疫刺激核酸は、CpGモチーフも、トリッチモチーフもポリGモチーフも含まない。この免疫刺激核酸は、Th1免疫応答を刺激する核酸であり得る。いくつかの実施形態では、Th1免疫応答を刺激する免疫刺激核酸は、CpG核酸ではない。他の実施形態では、Th1免疫応答を刺激する免疫刺激核酸は、トリッチ核酸ではない。

30

40

【0015】

別の実施形態では、この方法は、この被験体を抗原に曝露する工程をさらに包含する。この抗原は、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生生物抗原、および真菌抗原からなる群より選択され得る。

【0016】

別の局面では、本発明は、被験体における免疫応答を調節するために提供する。この方法は、免疫刺激核酸と、イミダゾキノリン薬剤およびC8-置換グアノシンからなる群より選択される薬剤とを、免疫応答を調節するに有効な量で、このような処置を必要とする

50

被験体に投与する工程を包含する。1つの実施形態では、免疫応答を調節するに有用な量は、相乗作用量である。重要な実施形態では、このイミダゾキノリン薬剤は、この免疫刺激核酸の前に投与される。特定の実施形態では、この免疫刺激核酸は、C p G 核酸である。他の実施形態では、この免疫刺激核酸は、(# 2 0 0 6) T C G T C G T T T T G T C G T T T T G T C G T T (配列番号 1) のヌクレオチド配列を有する。

【 0 0 1 7 】

1つの実施形態では、免疫応答を調節することは、T h 1 免疫応答を誘導することを意味する。別の実施形態では、この免疫応答は、T h 1 免疫応答である。別の実施形態では、この免疫応答は、抗体依存性細胞障害性を含む。別の実施形態では、この免疫応答は、先天免疫応答である。いくつかの実施形態では、この免疫応答は、局所免疫応答であり、一方、他の実施形態では、この免疫応答は、全身免疫応答である。特定の実施形態では、この免疫応答は、粘膜免疫応答である。

10

【 0 0 1 8 】

本発明のこの実施形態および他の実施形態では、この方法はさらに、障害特異的医薬をこの被験体に投与する工程を包含する。この障害特異的医薬は、癌医薬、喘息 / アレルギー医薬、感染性疾患医薬、および疣贅医薬からなる群より選択され得る。この抗微生物医薬は、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、および抗寄生生物剤からなる群より選択され得る。この癌医薬は、化学療法剤、免疫治療剤および癌ワクチンからなる群より選択され得る。この喘息 / アレルギー医薬は、ステロイド、免疫調節因子、抗炎症剤、気管支拡張剤、ロイコトリエン調節剤、 β_2 アゴニスト、および抗コリン作用剤からなる群より選択され得る。

20

【 0 0 1 9 】

本発明のこの局面および他の局面では、この方法は、障害を有するかまたは障害を有する危険性がある被験体における障害を処置または予防するための方法である。この障害は、感染性疾患、癌および喘息またはアレルギーからなる群より選択され得る。この被験体は、免疫無防備状態の被験体であり得る。他の実施形態では、この被験体は、老人または乳児である。

【 0 0 2 0 】

本発明はさらに、組成物およびキットを提供する。1つの局面では、本発明は、イミダゾキノリン薬剤および免疫刺激核酸を含む組成物を提供する。1つの実施形態では、この免疫刺激核酸は、C p G 核酸である。重要な実施形態では、この免疫刺激核酸は、ヌクレオチド配列 (# 2 0 0 6) T C G T C G T T T T G T C G T T T T G T C G T T (配列番号 1) を有する。

30

【 0 0 2 1 】

本発明は、別の局面において、イミダゾキノリン薬剤および抗体を含む別の組成物を提供する。1つの実施形態では、この組成物は、免疫刺激核酸をさらに含む。

【 0 0 2 2 】

さらに別の局面では、本発明は、イミダゾキノリン薬剤および障害特異的医薬を含む組成物を提供する。この障害特異的医薬は、喘息 / アレルギー医薬、癌医薬、および抗微生物医薬からなる群より選択され得る。1つの実施形態では、この障害特異的医薬は、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、および抗寄生生物剤からなる群より選択される抗微生物医薬である。別の実施形態では、この障害特異的医薬は、化学療法剤、免疫治療剤および癌ワクチンからなる群より選択される癌医薬である。さらに別の実施形態では、この障害特異的医薬は、ステロイド、免疫調節因子、抗炎症剤、気管支拡張剤、ロイコトリエン調節剤、 β_2 アゴニスト、および抗コリン作用剤からなる群より選択される喘息 / アレルギー医薬である。1種以上の医薬が被験体に投与され得る。この組成物は、免疫刺激核酸をさらに含み得る。

40

【 0 0 2 3 】

この組成物は、ポリ - アルギニンをさらに含み得る。他の実施形態では、この組成物は、抗原をさらに含む。なお別の実施形態では、この組成物はさらに、C 8 - 置換グアノシ

50

ンを含む。好ましい実施形態では、この組成物は、イミダゾキノリン薬剤、免疫刺激核酸、抗原およびポリ-アルギニンを含む。必要に応じて、この後者の組成物はまた、C8-置換グアノシンを含み得る。

【0024】

別の局面では、本発明は、イミダゾキノリン薬剤と治療薬剤とを同時投与することによって障害（例えば、感染性疾患、癌または喘息/アレルギー）を有する被験体を予防的または治療的に処置するために必要とされる治療薬剤の投薬量を変更するための方法を提供する。この治療薬剤は、抗体、抗原、免疫刺激核酸、C8-置換グアノシン、および障害特異的医薬からなる群より選択され得るが、このようには限定されない。本発明は、このような処置の必要がある被験体に投与され得る治療薬剤の用量を増大させるための方法を提供する。この方法は、通常は副作用を誘導する用量の治療薬剤を、このような処置の必要がある被験体に投与する工程、およびこの副作用を阻害するに有効な量のイミダゾキノリン薬剤をこの被験体に投与する工程を包含する。一例として、この治療薬剤が障害特異的医薬（例えば、抗癌治療（例えば、癌医薬））である場合、通常の副作用としては、骨髄抑制および微生物感染が挙げられる。従って、1つの実施形態では、この副作用は骨髄抑制であり、別の実施形態では、この副作用は微生物感染である。なお別の実施形態では、この副作用は、有害なアレルギー反応である。

10

【0025】

別の局面では、本発明は、被験体に投与され得る治療薬剤の用量を低下させるための方法を提供する。この方法は、治療投薬量未満の治療薬剤およびイミダゾキノリン薬剤を、このような処置を必要とする被験体に投与する工程を包含し、ここで、この治療投薬量未満の治療薬剤およびイミダゾキノリン薬剤の組み合わせは、治療結果を生じる。この方法は、必要とされる治療薬剤の量の低下に起因したより低いコスト、およびこの治療薬剤に起因した副作用を誘導する可能性の低下（使用される用量がより低いことによる）を含めて、いくつかの利点を提供する。

20

【0026】

他の局面によれば、本発明は、異なる投与スケジュールにおいてイミダゾキノリン薬剤および治療薬剤を投与することによって、障害を有するかまたは障害を有する危険性のある被験体を処置するための方法を包含する。1つの局面では、本発明は、このような処置を必要とする被験体に有効量のイミダゾキノリン薬剤を投与し、続いてこの被験体に治療薬剤を投与することによって、被験体を処置するための方法である。関連の局面では、この方法は、治療薬剤を被験体に投与し、続いてイミダゾキノリン薬剤を投与する工程を包含する。1つの実施形態では、このイミダゾキノリン薬剤は、慣用的スケジュールで投与される。この慣用スケジュールは、1日1回のスケジュール、1週間に1回のスケジュール、1ヶ月に1回のスケジュール、2ヶ月に1回のスケジュール、四半期に1回のスケジュール、および半年に1回のスケジュールからなる群より選択され得る。別の実施形態では、このイミダゾキノリン薬剤は、可変スケジュールで投与される。このイミダゾキノリン薬剤は、持続放出ビヒクル中で投与され得る。

30

【0027】

他の局面では、本発明は、いくらかの症候軽減を提供するに有効な量の治療薬剤を、このような処置を必要とする被験体に投与し、続いてイミダゾキノリン薬剤をこの被験体に投与することによって、障害を有する被験体を処置するための方法である。いくつかの実施形態では、このイミダゾキノリン薬剤は、免疫応答をアップレギュレート、増強または活性化するために有効な量で投与される。いくつかの実施形態では、このイミダゾキノリン薬剤は、この免疫応答をTh1免疫応答に再度導くに有効な量で投与される。さらに他の実施形態では、複数のイミダゾキノリン薬剤が投与される。

40

【0028】

別の局面では、本発明は、このような処置の必要がある被験体に、イミダゾキノリン薬剤および治療薬剤を投与することによって、障害を有するかまたは障害を発症する危険性のある被験体を処置するための方法を提供し、ここで、このイミダゾキノリン薬剤は全身

50

投与され、そしてこの治療薬剤は局所投与される。

【0029】

なお別の局面では、本発明は、被験体に慣用的スケジュールにてイミダゾキノリン薬剤および治療薬剤を投与することによって、障害を有するかまたは障害を発症する危険性を有する被験体を処置するための方法を提供する。他の実施形態では、このイミダゾキノリン薬剤および/またはこの治療薬剤は、2以上の用量で投与される。あるいは、このイミダゾキノリン薬剤は、不定期に（例えば、症状開始時に）投与され得る。

【0030】

別の局面によれば、本発明は、試験化合物のToll様レセプター（TLR）シグナル伝達活性を、イミダゾキノリンのTLRシグナル伝達活性と比較するためのスクリーニング方法を提供する。この方法は、Toll様レセプター7（TLR7）およびToll様レセプター8（TLR8）からなる群より選択される機能的TLRを、参照イミダゾキノリンと接触させる工程、ならびにTLRシグナル伝達経路によって媒介される参照応答を検出する工程；TLR7およびTLR8からなる群より選択される機能的TLRを、試験化合物と接触させる工程、ならびにTLRシグナル伝達経路によって媒介される試験応答を検出する工程；ならびにこの試験応答を、参照応答と比較して、試験化合物のTLRシグナル伝達活性とイミダゾキノリンのTLRシグナル伝達活性とを比較する工程を包含する。好ましい実施形態では、この機能的TLRはTLR8である。別の好ましい実施形態では、この機能的TLRはTLR7である。

【0031】

特定の実施形態では、この機能的TLRを、参照イミダゾキノリンおよび試験化合物と独立して接触させる。好ましい実施形態では、このスクリーニング方法は、イミダゾキノリン模倣物を同定するための方法であり、ここで、この試験応答が参照応答に類似する場合、この試験化合物は、イミダゾキノリン模倣物である。

【0032】

特定の他の実施形態では、この機能的TLRを、同時に参照イミダゾキノリンおよび試験化合物と接触させて、TLRシグナル伝達経路によって媒介される試験-参照応答を生じさせる；この試験-参照応答は、参照応答と比較され得る。好ましい実施形態では、このスクリーニング方法は、イミダゾキノリンアゴニストを同定するための方法であり、ここで、この試験-参照応答がこの参照応答よりも大きい場合、この試験化合物は、イミダゾキノリンアゴニストである。好ましい実施形態では、このスクリーニング方法は、イミダゾキノリンアンタゴニストを同定するための方法であり、ここで、この試験-参照応答がこの参照応答よりも小さい場合、この試験化合物は、イミダゾキノリンアンタゴニストである。

【0033】

特定の実施形態では、この機能的TLRは、細胞中で発現される。好ましくは、この細胞は、機能的TLR8を天然で発現する、単離された哺乳動物細胞である。別の好ましい実施形態では、この細胞は、機能的TLR7を天然で発現する、単離された哺乳動物細胞である。この方法の実施を容易にするために、特定の実施形態では、機能的TLR7または機能的TLR8を発現する細胞は、レポーター構築物をコードする、インターロイキン8（IL-8）、インターロイキン12のp40サブユニット（IL-12 p40）、核因子B-ルシフェラーゼ（NF-B-luc）、インターロイキン12のp40サブユニット-ルシフェラーゼ（IL-12 p40-luc）、および腫瘍壊死因子-ルシフェラーゼ（TNF-luc）からなる群より選択される単離された核酸を含む発現ベクターを含む。

【0034】

特定の他の実施形態では、この機能的TLRは、無細胞系的一部分である。

【0035】

いくつかの実施形態では、この機能的TLRは、別のTLRとの複合体的一部分であり、この別のTLRとしては、例えば、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR

10

20

30

40

50

5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、またはTLR10が挙げられる。この複合体は、2以上のTLRを含み得る。

【0036】

特定の実施形態では、この機能的TLRは、非TLRタンパク質との複合体の一部であり、この非TLRタンパク質は、骨髄分化因子88(MyD88)、IL-1レセプター関連キナーゼ(IRAK)、腫瘍壊死因子レセプター関連因子6(TRAF6)、I κ B、NEB、ならびにそれらの機能的ホモログおよび誘導体からなる群より選択される。

【0037】

好ましい実施形態では、この参照イミダゾキノリンはR-848(Resiquimod)である。別の好ましい実施形態では、この参照イミダゾキノリンはR-847(Imiquimod)である。 10

【0038】

特定の実施形態では、この試験化合物は、核酸分子ではない。例えば、1つの実施形態では、この試験化合物はポリペプチドである。好ましい実施形態では、この試験化合物は、R-848でもR-847でもないイミダゾキノリンである。

【0039】

特定の実施形態では、この試験化合物は、化合物のコンビナトリアルライブラリーの一部である。

【0040】

本発明の限定の各々は、本発明の種々の実施形態を包含し得る。それゆえ、任意の1つの要素または要素の組み合わせを含む本発明の限定の各々が、本発明の各局面に含まれることが認識される。 20

【0041】

本発明を可能にするために図面が必要とされないことが理解されるべきである。

【0042】

(配列表の簡単な説明)

配列番号1は、免疫刺激性CpG核酸のヌクレオチド配列(#2006)である。

【0043】

配列番号2は、免疫刺激性Tリッチ核酸のヌクレオチド配列(#2183)である。 30

【0044】

配列番号3は、コントロール非CpG核酸のヌクレオチド配列(#1982)である。

【0045】

配列番号4は、免疫刺激性CpG核酸のヌクレオチド配列(#8954)である。

【0046】

配列番号5は、ネガティブコントロール核酸のヌクレオチド配列(#5177)である。

【0047】

配列番号6は、ヒトTLR9 cDNAのヌクレオチド配列(GenBank登録番号AF245704)である。 40

【0048】

配列番号7は、ヒトTLR9タンパク質のアミノ酸配列(GenBank登録番号AAF78037)である。

【0049】

配列番号8は、マウスTLR9 cDNAのヌクレオチド配列(GenBank登録番号AF348140)である。

【0050】

配列番号9は、マウスTLR9タンパク質のアミノ酸配列(GenBank登録番号AAK29625)である。

【0051】

配列番号 10 は、コントロール G p C 核酸のヌクレオチド配列 (# 2 0 0 6 - G C) である。

【 0 0 5 2 】

配列番号 11 は、メチル化 C p G 核酸のヌクレオチド配列 (# 2 0 0 6 (メチル化)) である。

【 0 0 5 3 】

配列番号 12 は、免疫刺激性核酸のヌクレオチド配列 (# 1 6 6 8) である。

【 0 0 5 4 】

配列番号 13 は、G p C 核酸のヌクレオチド配列 (# 1 6 6 8 - G C) である。

【 0 0 5 5 】

配列番号 14 は、メチル化 C p G 核酸のヌクレオチド配列 (# 1 6 6 8 (メチル化)) である。

【 0 0 5 6 】

配列番号 15 は、ヒト T L R 7 c D N A を増幅するために使用される第一のプライマーのヌクレオチド配列である。

【 0 0 5 7 】

配列番号 16 は、ヒト T L R 7 c D N A を増幅するために使用される第二のプライマーのヌクレオチド配列である。

【 0 0 5 8 】

配列番号 17 は、ヒト T L R 7 c D N A のヌクレオチド配列である。

【 0 0 5 9 】

配列番号 18 は、ヒト T L R 7 タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 0 】

配列番号 19 は、マウス T L R 7 c D N A を増幅するために使用される第一のプライマーのヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 1 】

配列番号 20 は、マウス T L R 7 c D N A を増幅するために使用される第二のプライマーのヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 2 】

配列番号 21 は、マウス T L R 7 c D N A のヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 3 】

配列番号 22 は、マウス T L R 7 c D N A のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 4 】

配列番号 23 は、ヒト T L R 8 c D N A を増幅するために使用される第一のプライマーのヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 5 】

配列番号 24 は、ヒト T L R 8 c D N A を増幅するために使用される第二のプライマーのヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 6 】

配列番号 25 は、ヒト T L R 8 c D N A のヌクレオチド配列である。

【 0 0 6 7 】

配列番号 26 は、ヒト T L R 8 c D N A のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 8 】

配列番号 27 は、GenBank 登録番号 A F 2 4 6 9 7 1 に対応するヒト T L R 8 における N 末端挿入のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 9 】

配列番号 28 は、マウス T L R 8 c D N A を増幅するために使用される第一のプライマーのヌクレオチド配列である。

【 0 0 7 0 】

配列番号 29 は、マウス T L R 8 c D N A を増幅するために使用される第二のプライ

10

20

30

40

50

マーのヌクレオチド配列である。

【0071】

配列番号30は、マウスTLR8 cDNAのヌクレオチド配列である。

【0072】

配列番号31は、マウスTLR8タンパク質のアミノ酸配列である。

【0073】

(発明の詳細な説明)

本発明は、イミダゾキノリン薬剤および抗体を被験体に投与することによって、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)が増強されるという驚くべき発見に一部基づく。従って、1つの局面において、本発明は、ADCCの全身性活性化を誘導するのに十分な用量のイミダゾキノリン薬剤を用いて、ヒトおよび動物を処置するための方法を提供する。いかなる特定の理論によっても拘束されることを意図しないが、イミダゾキノリン薬剤は、Fcレセプターの発現をアップレギュレートすることによって、ならびに単球およびマクロファージのようなエフェクター細胞の機能的活性を改善することによって、全身性ADCCを増強すると仮定される。治療抗体が、イミダゾキノリン薬剤とともに被験体に同時投与される場合、その増強されたADCC活性によって、治療効果は劇的に向上される。

10

【0074】

イミダゾキノリンは、数種のサイトカイン(インターフェロン(例えば、IFN-およびIFN-)、TNF-および数種のインターロイキン(例えば、IL-1、IL-6およびIL-12)を含む)の発現を誘導すると考えられている、免疫応答変更薬剤である。イミダゾキノリンは、IgG2aレベルの増加を誘導するその能力によって一部証明されているように、Th1免疫応答を刺激し得る。イミダゾキノリン薬剤はまた、報告によると、Th2サイトカイン(例えば、IL-4、IL-5、およびIL-13)の産生を阻害し得る。イミダゾキノリンによって誘導される数種のサイトカインは、マクロファージおよび樹状細胞によって産生される。イミダゾキノリンのうちの数種は、NK細胞溶解活性を増強し、そしてB細胞増幅およびB細胞分化を刺激し、それによって抗体産生および抗体分泌を誘導することが報告されている。

20

【0075】

本明細書中で使用される場合、イミダゾキノリン薬剤は、イミダゾキノリンアミン、イミダゾピリジンアミン、6,7-縮合シクロアルキルイミダゾピリジンアミン、および1,2架橋イミダゾキノリンアミンを含む。これらの化合物は、以下に記載されている：米国特許第4689338号、同第4929624号、同第5238944号、同第5266575号、同第5268376号、同第5346905号、同第5352784号、同第5389640号、同第5395937号、同第5494916号、同第5482936号、同第5525612号、同第6039969号、および同第6110929。イミダゾキノリン薬剤の特定の種としては、以下が挙げられる：R-848(S-28463)；4-アミノ-2エトキシメチル-ジメチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-エタノール；および1-(2-メチルプロピル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン(R-837またはImiquimod)。Imiquimodは、いぼ(例えば、性器いぼおよび肛門いぼ)の局所的処置において現在使用されており、そしてまた、基底細胞癌の局所的処置においても試験されている。

30

40

【0076】

本発明において有用な抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、マウス抗体、ヒト抗体、キメラマウス-ヒト抗体などが挙げられる。いくつかの実施形態において、抗体フラグメントが使用され得るが、但し、このようなフラグメントは、Fc部分と少なくとも1つのFab部分との両方を保有する。

【0077】

いくつかの実施形態において、イミダゾキノリンは、抗体と同時に投与されるが、他の実施形態において、イミダゾキノリンは、抗体投与の前または抗体投与の後に投与される。抗体の投与前に送達される場合、イミダゾキノリン薬剤は、抗体の投与の1日前、2日

50

前、3日前、4日前、5日前、6日前、7日前またはそれより前に投与され得る。抗体の投与後に投与される場合、イミダゾキノリン薬剤は、抗体の投与の1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、7日後、またはそれより後に投与され得る。いくつかの好ましい実施形態において、イミダゾキノリン薬剤は、抗体がイミダゾキノリン薬剤の投与前に投与されるか投与後に投与されるかに関わらず、この抗体の投与から48時間以内、36時間以内、24時間以内、12時間以内、6時間以内、または4時間以内に投与される。

【0078】

本発明において有用な治療抗体は、微生物抗原（例えば、細菌抗原、ウイルス抗原または真菌抗原）、癌関連抗原または腫瘍関連抗原、および自己抗原に特異的であり得る。好ましい抗体は、細胞上または細胞内に存在する抗原を認識しかつこの抗原に結合する抗体である。適切な抗体の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：RituxanTM（リツキシマブ、抗CD20抗体）、Herceptin（トラスツズマブ（trastuzumab））、Quadremet、Panorex、IDEC-Y2B8、BEC2、C225、Oncolymp、SMART M195、ATRAGEN、Ovarex、Bexxar、LDP-03、ior t6、MDX-210、MDX-11、MDX-22、OV103、3622W94、抗VEGF、Zenapax、MDX-220、MDX-447、MELIMMUNE-2、MELIMMUNE-1、CEACIDE、Pretarget、NovoMAb-G2、TNT、Gliomab-H、GNI-250、EMD-72000、LymphoCide、CMA676、Monopharm-C、4B5、ior egf.r3、ior c5、BABS、抗FLK-2、MDX-260、ANA Ab、SMART 1D10 Ab、SMART AB L 364 Ab、CC49（mAb B72.3）、ImmurAIT-CEA、抗IL-4抗体、抗IL-5抗体、抗IL-9抗体、抗Ig抗体、抗IgE抗体、血清由来B型肝炎抗体、組換えB型肝炎抗体など。

【0079】

本発明のために同様に有用な他の抗体としては、以下が挙げられる：アレンツズマブ（alem tuzumab）（B細胞慢性リンパ球性白血病）、ゲンツズマブオゾガミシン（gem tuzumab ozogamicin）（CD33+急性骨髄性白血病）、hP67.6（CD33+急性骨髄性白血病）、インフリキシマブ（infliximab）（炎症性腸疾患および慢性関節リウマチ）、エタネルセプト（etanercept）（慢性関節リウマチ）、トシツモマブ、MDX-210、オレゴボマブ（oregovo mab）、抗EGFレセプターmAb、MDX-447、抗組織因子タンパク質（TF）、（Sunol）；ior-c5、c5、エドレコロマブ（edrecolomab）、イブリツモマブ（ibrutumomab tiuxetan）、ガングリオシドGD3エピトープの抗イディオタイプmAb模倣物、抗HLA-Dr10 mAb、抗CD33ヒト化mAb、抗CD52 humAb、抗CD1 mAb（ior t6）、MDX-22、セロゴバブ（celogovab）、抗17-1A mAb、ベバシツマブ（bevacizumab）、ダシリツマブ（daclicizumab）、抗TAG-72（MDX-220）、高分子量プロテオグリカンの抗イディオタイプmAb模倣物（I-Mel-1）、高分子量プロテオグリカンの抗イディオタイプmAb模倣物（I-Mel-2）、抗CEA Ab、hmAbH11、抗DNAまたはDNA関連タンパク質（ヒストン）mAb、Gliomab-H mAb、GNI-250 mAb、抗CD22、CMA676）、GD2ガングリオシドに対する抗イディオタイプヒトmAb、ior egf/r3、抗ior c2糖タンパク質mAb、ior c5、抗FLK-2/FLT-3 mAb、抗GD-2二特異的mAb、抗核自己抗体、抗HLA-DR Ab、抗CEA mAb、パリビズマブ（palivizumab）、ベバシズマブ（bevacizumab）、アレンツズマブ（alem tuzumab）、BlyS-mAb、抗VEGF2、抗Trailレセプター；B3 mAb、mAb BR96、乳癌；ならびにAbx-Cbl mAb。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

以下のような抗体もまた含まれており、これら全てが、市販されている：

- アポトーシス抗体：BAX抗体：抗ヒトBax抗体（モノクローナル）、抗ヒトBax抗体（ポリクローナル）、抗マウスBax抗体（モノクローナル）、抗マウスBax抗体（ポリクローナル）；Fas/Fasリガンド抗体：抗ヒトFas/Fasリガンド抗体、抗マウスFas/Fasリガンド抗体グランザイム抗体グランザイムB抗体；BCL抗体：抗シトクロムC抗体、抗ヒトBCL抗体（モノクローナル）、抗ヒトbcl抗体（ポリクローナル）、抗マウスbcl抗体（モノクローナル）、抗マウスbcl抗体（ポリクローナル）；
- 雑多アポトーシス抗体：抗TRADD、TRAIL、TRAF3抗体抗ヒトFas/Fasリガンド抗体抗マウスFas/Fasリガンド抗体； 10
- 雑多アポトーシス関連抗体：BIM抗体：抗ヒト、マウスbim抗体（ポリクローナル）、抗ヒト、マウスbim抗体（モノクローナル）；
- PARP抗体：抗ヒトPARP抗体（モノクローナル）抗ヒトPARP抗体（ポリクローナル）抗マウスPARP抗体；
- カスパーゼ抗体：抗ヒトカスパーゼ抗体（モノクローナル）、抗マウスカスパーゼ抗体；
- 抗CD抗体：抗CD29、PL18-5 PanVera、抗CD29、PL4-3 PanVera、抗CD41a、PT25-2 PanVera、抗CD42b、PL52-4 PanVera、抗CD42b、GUR20-5 PanVera、抗CD42b、WGA-3 PanVera抗CD43、1D4 PanVera、抗CD46、MCP75-6 PanVera、抗CD61、PL11-7 PanVera、抗CD61、PL8-5 PanVera、抗CD62/P-selectin、PL7-6 PanVera、抗CD62/P-selectin、WGA-1 PanVera、抗CD154、5F3 PanVera； 20
- ヒトケモカイン抗体：ヒトCNTF抗体、ヒトエオタキシン（Human Eotaxin）抗体、ヒト上皮好中球活性化ペプチド-78、ヒトエキソダス（Human Exoduss）抗体、ヒトGRO抗体、ヒトHCC-1抗体、ヒトI-309抗体、ヒトIP-10抗体、ヒトI-TAC抗体、ヒトLIF抗体、ヒト肝臓発現ケモカイン抗体、ヒトリンホタキシン（Human Lymphotaxin）抗体、ヒトMCP抗体、ヒトMIP抗体、IFN-抗体によって誘導されるヒトモノカイン、ヒトNAP-2抗体、ヒトNP-1抗体、ヒト血小板因子-4抗体、ヒトRANTES抗体、ヒトSDF抗体、ヒトTECK抗体； 30
- マウスケモカイン抗体：ヒトB細胞誘引マウスケモカイン抗体、ケモカイン-1抗体、マウスエオタキシン抗体、マウスエキソダス抗体、マウスGCP-2抗体、マウスKC抗体、マウスMCP抗体、マウスMIP抗体、マウスRANTES抗体、ラットケモカイン抗体、ラットケモカイン抗体、ラットCNTF抗体、ラットGRO抗体、ラットMCP抗体、ラットMIP抗体、ラットRANTES抗体；
- サイトカイン/サイトカインレセプター抗体：ヒトビオチン化サイトカイン/サイトカインレセプター抗体、ヒトIFN抗体、ヒトIL抗体、ヒトレプチン抗体、ヒトオンコスタチン抗体、ヒトTNF抗体、ヒトTNFレセプターファミリー抗体、マウスビオチン化サイトカイン/サイトカインレセプター抗体、マウスIFN抗体、マウスIL抗体、マウスTNF抗体、マウスTNFレセプター抗体； 40
- ラットサイトカイン/サイトカインレセプター抗体：ラットビオチン化サイトカイン/サイトカインレセプター抗体、ラットIFN抗体、ラットIL抗体、ラットTNF抗体；
- ECM抗体：コラーゲン/プロコラーゲン、ラミニン、コラーゲン（ヒト）、ラミニン（ヒト）、プロコラーゲン（ヒト）、ビトロネクチン/ビトロネクチンレセプター、ビトロネクチン（ヒト）、ビトロネクチンレセプター（ヒト）、フィブロネクチン/フィブロネクチンレセプター、フィブロネクチン（ヒト）、フィブロネクチンレセプター（ヒト）；
- 増殖因子抗体：ヒト増殖因子抗体、マウス増殖因子抗体、ブタ増殖因子抗体；
- 雑多な抗体：バキュロウイルス抗体、カドヘリン抗体、相補抗体、Clq抗体、フォン・ 50

ビルプラント因子抗体、Cre抗体、HIV抗体、インフルエンザ抗体、ヒトレプチン抗体、マウスレプチン抗体、マウスCTLA-4抗体、P450抗体、RNAポリメラーゼ抗体；

神経生物的(Neurobio)抗体：アミロイド抗体、GFAP抗体、ヒトNGF抗体、ヒトNT-3抗体、ヒトNT-4抗体。

【0081】

なお別の抗体が、本発明において使用され得、これらとしては、MSRS Catalog of Primary Antibodies, and Linscott's Directoryのような参考文献において列挙されている抗体が挙げられる。

【0082】

イミダゾキノリン薬剤はまた、正常な免疫グロブリン療法および過剰免疫グロブリン療法とともに使用され得る。正常な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そしてプールされた抗体産物を利用する。このプールされた産物は、感染性病原体(例えば、細菌、ウイルス(例えば、A型肝炎ウイルス)、パルボウイルス、エンテロウイルス、真菌および寄生生物)の抗原のような広範囲の抗原に対して低い力価の抗体を含む。過剰免疫グロブリン療法は、特定の抗原に対して高い力価の抗体を有する個体の血清から調製された抗体を利用する。過剰免疫グロブリンの例としては、以下が挙げられる：帯状ヘルペス免疫グロブリン(免疫無防備状態の子供および新生児における水痘を予防するのに有用である)、ヒト狂犬病免疫グロブリン(狂犬病の動物に噛まれた被験体の曝露後予防において有用である)、B型肝炎免疫グロブリン(B型肝炎ウイルスの予防において、特に、ウイルスに曝された被験体において有用である)、およびRSV免疫グロブリン(シンシチウム(syncytial)ウイルス感染の処置において有用である)。

【0083】

数種の市販の抗癌抗体が、それらの商業的供給業者とともに以下で列挙される。

【0084】

【表1】

開発中または市場の癌免疫療法		
販売業者	商品名(総称)	効能
IDEC/Genentech, Inc./Hoffmann-LaRoche (米国において癌を処置するために許可された最初のモノクローナル抗体)	Rituxan™ (リツキシマブ、Mabthera) (IDEC-C2B8, キメラマウス/ヒト抗CD20 MAb)	非ホジキンリンパ腫
Genentech/Hoffmann-La Roche	Herceptin, 抗-Her2 hMAb	胸部/卵巣
Cytogen Corp.	Quadramet (CYT-424)放射線療法剤	骨転移
Centocor/Glaxo/Ajinomoto	Panorex® (17-1A) (マウスモノクローナル抗体)	結腸直腸用のアジュバント療法(Dukes-C)
Centocor/Ajinomoto	Panorex® (17-1A) (キメラマウスモノクローナル抗体)	脾臓、肺、胸部、卵巣
IDEC	IDEC-Y2B8 (Yttrium-90で標識されたマウス抗CD20 MAb)	非ホジキンリンパ腫

10

20

30

40

ImClone Systems	BEC2 (抗イディオタイプMAb, GD ₃ エピトープを模倣する)(BCGを含む)	小細胞肺
ImClone Systems	C225 上皮増殖因子レセプターに対するキメラモノクローナル抗体 (EGFr)	腎臓細胞
Techniclone International/Alpha Therapeutics	Oncolym (131ヨウ素に連結する Lym-1モノクローナル抗体)	非ホジキンリンパ腫
Protein Design Labs	SMART M195 Ab, ヒト化	急性骨髄性白血病
Techniclone Corporation/Cambridge Antibody Technology	¹³¹ I LYM-1 (Oncolym™)	非ホジキンリンパ腫
Aronex Pharmaceuticals, Inc.	ATRAGEN®	急性前骨髄球性白血病
ImClone Systems	C225 (キメラ抗 EGFrモノクローナル抗体)+ シスプラチンまたは放射線	頭部および頸部の癌、非小細胞肺癌
Altarex, Canada	Ovarex (B43.13, 抗イディオタイプ CA125, マウスMAb)	卵巣
Coulter Pharma (臨床結果は、陽性であるが、薬物は、有意な骨髄毒性に関連している)	Bexxar (¹³¹ I で標識される抗 CD20 MAb)	非ホジキンリンパ腫
Aronex Pharmaceuticals, Inc.	ATRAGEN®	カポージー肉腫
IDEC Pharmaceuticals Corp./Genentech	Rituxan™ (CD20に対するMAb) pan-B Ab (化学療法と組み合わせて)	B細胞リンパ腫
LeukoSite/Ilex Oncology	LDP-03, 白血球抗原 CAMPATH に対する huMAb	慢性リンパ球性白血病 (CLL)
Center of Molecular Immunology	ior t6 (抗 CD6, マウス MAb) CTCL	癌
Medarex/Novartis	MDX-210 (ヒト化抗-HER-2二特異的抗体)	胸部、卵巣
Medarex/Novartis	MDX-210 (ヒト化抗-HER-2二特異的抗体)	前立腺、非小細胞肺、膵臓、胸部
Medarex	MDX-11 (相補活性化レセプター (CAR) モノクローナル抗体)	急性骨髄性白血病 (AML)
Medarex/Novartis	MDX-210 (ヒト化抗-HER-2二特異的抗体)	腎臓および結腸
Medarex	MDX-11 (相補活性化レセプター (CAR) モノクローナル抗体)	急性骨髄性白血病 (AML) におけるエキソピボ骨髄パージ
Medarex	MDX-22 (ヒト化二特異的抗体、MAb-結合体) (相補カスケードアクチベーター)	急性骨髄性白血病
Cytogen	OV103 (Yttrium-90 標識化抗体)	卵巣
Cytogen	OV103 (Yttrium-90 標識化抗体)	前立腺
Aronex Pharmaceuticals, Inc.	ATRAGEN®	非ホジキンリンパ腫
Glaxo Wellcome plc	腺癌における EGP40 (17-1A) 汎癌 (pancarcinoma) 抗原に結合する 3622W94 MAb	非小細胞肺、前立腺 (アジュバント)

10

20

30

40

Genentech	Anti-VEGF, RhuMAB (新脈管形成を阻害する)	肺、胸部、前立腺、結腸直腸
Protein Design Labs	Zenapax (SMART 抗 Tac (IL-2 レセプター) Ab, ヒト化)	白血病、リンパ腫
Protein Design Labs	SMART M195 Ab, ヒト化	急性前骨髄球性白血病
ImClone Systems	C225 (キメラ抗EGFrモノクローナル 抗体)+タキソール	胸部
ImClone Systems (RPR から許可された)	C225 (キメラ抗EGFrモノクローナル 抗体)+ドキシソルピシン	前立腺
ImClone Systems	C225 (キメラ抗EGFrモノクローナル 抗体)+アドリアマイシン	前立腺
ImClone Systems	BEC2 (抗イデオタイプMAb、 GD ₃ エピトープを模倣する)	黒色腫
Medarex	MDX-210 (ヒト化抗HER-2 二特異的抗体)	癌
Medarex	MDX-220 (TAG-72を発現する腫瘍に二特異的)	肺、結腸、前立腺、卵 巣、子宮内膜、膵臓お よび胃
Medarex/Novartis	MDX-210 (ヒト化抗HER-2 二特異的抗体)	前立腺
Medarex/Merck KgaA	MDX-447 (ヒト化抗EGFレセプター 二特異的抗体)	EGFレセプター癌 (頭頸部、前立腺、肺、 膀胱、頸部、卵巣)
Medarex/Novartis	MDX-210 (ヒト化抗HER-2 二特異的抗体)	種々の癌、特に胸部に対 する、GCSFとの組み 合わせ療法
IDEC	MELIMMUNE-2 (マウス モノクローナル抗体治療ワクチン)	黒色腫
IDEC	MELIMMUNE-1 (マウス モノクローナル抗体治療ワクチン)	黒色腫
Immunomedics, Inc.	CEACIDE™ (I-131)	結腸直腸および他
NeoRx	Pretarget™ 放射活性抗体	非ホジキンB細胞リンパ 腫
Novopharm Biotech, Inc.	NovoMAb-G2 (汎癌特異的 Ab)	癌
Techniclone Corporation/ Cambridge Antibody Technology	TNT (ヒストン抗原に対するキメラMAb)	脳
Techniclone International/ Cambridge Antibody Technology	TNT (ヒストン抗原に対するキメラMAb)	脳
Novopharm	Gliomab-H (モノクローナル抗体-ヒト化Abs)	脳、黒色腫、神経芽細胞 腫
Genetics Institute/AHP	GNI-250 Mab	結腸直腸
Merck KgaA	EMD-72000(キメラEGFアンタゴニスト)	癌
Immunomedics	LymphoCide (ヒト化LL2抗体)	非ホジキンB細胞リン パ腫
Immunex/AHP	CMA 676 (モノクローナル抗体結合体)	急性骨髄性白血病

10

20

30

40

Novopharm Biotech, Inc.	Monopharm-C	結腸、肺、膵臓
Novopharm Biotech, Inc.	4B5 抗イディオタイプ Ab	黒色腫、小細胞肺
Center of Molecular Immunology	ior egf/r3 (抗 EGF-R ヒト化 Ab)	放射性免疫療法
Center of Molecular Immunology	ior c5 (結腸直腸用マウス MAb) 放射性免疫療法用	結腸直腸
Creative BioMolecules/ Chiron	BABS (生合成抗体結合部位) タンパク質	乳癌
ImClone Systems/Chugai	FLK-2 (胎児肝臓キナーゼ 2 に対するモノクローナル抗体 (FLK-2))	腫瘍関連新脈管形成
ImmunoGen, Inc.	ヒト化 MAb/ 小薬物結合体	小細胞肺
Medarex, Inc.	MDX-260 二特異的、標的 GD-2	黒色腫、神経膠腫、神経芽腫
Procyon Biopharma, Inc.	ANA Ab	癌
Protein Design Labs	SMART 1D10 Ab	B細胞リンパ腫
Protein Design Labs/Novartis	SMART ABL 364 Ab	胸部、肺、結腸
Immunomedics, Inc.	ImmuRAIT-CEA	結腸直腸

10

20

【 0 0 8 5 】

本発明は、イミダゾキノリン薬剤および治療剤を投与することによって、いずれかの化合物単独の投与を超える予測不可能な利点を与えられるという驚くべき発見に、一部基づく。免疫刺激性核酸、C8置換グアノシン、抗原、および障害特異的医薬を治療剤として使用することが、特に重要である。1つの重要な実施形態において、イミダゾキノリン薬剤、免疫刺激性核酸、抗原およびアルギニンリッチなポリマー（例えば、ポリアルギニン）、ならびに必要に応じて、C8置換グアノシンを含有する組成物が、本発明の免疫調節方法において使用される。

【 0 0 8 6 】

イミダゾキノリン剤はまた、免疫応答をTh1免疫応答に向け直すために有用である。免疫応答をTh1免疫応答へ向け直すことは、（例えば、Th1サイトカイン（IL-12、IFN- およびGM-CSFを含む）を産生するために単球細胞および他の細胞を誘導することによって）核酸に反応して産生されたサイトカインのレベルを測定することによって評価され得る。免疫応答のTh1反応への向け直しまたは再バランス（rebalance）は、喘息の処置または予防のために特に有用である。例えば、喘息を処置するための有効量は、喘息に関連するTh2型免疫応答を、Th1型免疫応答に向け直すために有用な量であり得る。Th2サイトカイン（特に、IL-4およびIL-5）は、喘息被験体の気道で上昇する。これらのサイトカインは、喘息炎症反応（IGEアイソタイプ切換え、好酸球走化性および活性化ならびに肥満細胞増殖を含む）の重要な局面を促進する。Th1サイトカイン（特に、IFN- およびIL-12）は、Th2クローンの形成およびTh2サイトカインの産生を抑制し得る。本発明のイミダゾキノリン剤は、Th1サイトカインの増加をもたらし、これは、免疫系を再バランスし、優勢なTh2免疫応答と関連する有害な影響を阻害または減少する。Th2をTh1免疫応答へ向け直すことは、Th1サイトカインおよびTh2サイトカインのバランスのとれた発現を生じ得るか、またはTh2サイトカインより多くのTh1サイトカインの誘導を生じ得る。

30

40

【 0 0 8 7 】

本発明はまた、イミダゾキノリン剤を使用して、抗原非特異的な生得の免疫活性化および感染チャレンジに対する幅広いスペクトルの耐性を誘導する方法を含む。本明細書中で使用される場合、用語、抗原非特異的な生得の免疫活性化とは、B細胞以外の免疫細胞の活性化をいい、例えば、NK細胞、T細胞または抗原非依存的な様式で反応し得る他の免

50

疫細胞、あるいはこれらの細胞の組合せの活性化を含み得る。免疫細胞が、活性形態にあり、そして任意の侵入化合物または微生物に対する応答に対してプライムされるので、感染チャレンジに対する幅広いスペクトルの耐性が誘導される。細胞は、特定の抗原に対して特異的にプライムされる必要はない。これは、細菌戦および他の上記の環境（例えば、旅行者）において有用である。

【0088】

特定のイミダゾキノリン剤の刺激指数は、種々の免疫細胞アッセイにおいて試験され得る。好ましくは、B細胞増殖に関するイミダゾキノリン剤の刺激指数は、少なくとも約5、好ましくは、少なくとも約10、より好ましくは、少なくとも約15、そして最も好ましくは少なくとも約20であり、これは、マウスB細胞培養における³Hウリジンの取り込みによって決定され、これは、免疫刺激核酸に関して、米国特許第6,207,646 B1号および同第6,239,116 B1号に詳細に記載されるように、37°Cで20時間、20 μMの核酸と接触され、1 μCiの³Hウリジンでパルスされ；そして4時間後に収集され、計数される。例えば、インビボで使用するために、イミダゾキノリン剤は、免疫応答（例えば、抗体産生）を効率的に誘導し得ることが重要である。

10

【0089】

現在、特定の障害（例えば、癌）についてのいくつかの処置プロトコルが、IFN- γ の使用を求める。1つの実施形態において、本発明の方法は、特定の障害の処置におけるIFN- γ （IFN- γ ）治療の使用の代わりとして、イミダゾキノリン剤を使用する。イミダゾキノリン剤は、IFN- γ を内生的に生成するために使用され得る。なお他の実施形態において、イミダゾキノリン剤は、IFN- γ とともに投与され得る。いくつかの実施形態において、本発明の治療剤または障害特異的医薬はまた、イミダゾキノリン剤およびIFN- γ とともに被験体に投与され得る。

20

【0090】

本発明は、本発明の方法においてイミダゾキノリン剤の代わりにまたはイミダゾキノリン剤とともにのいずれかでの、C8置換グアノシンの投与を包含する。C8-置換グアノシンは、ナチュラルキラー（NK）細胞およびマクロファージの両方を活性化することが公知である。C8位置において、臭素またはチオール基のいずれかで置換されたグアニンリボヌクレオチドは、B細胞マイトジェンであり、B細胞分化因子として作用し得る（Feldbushら、1985 J. Immunol. 134:3204；Goodman 1986 J. Immunol. 136:3335）。これらの化合物は、NK細胞活性化についてのIL-2要件を低下させることが報告されている。C8置換グアノシンのNK増強活性およびLAK増強活性は、IFN- γ の誘導に起因するようである（Thompson, R. A.ら、1990. 上で引用される）。C8置換グアノシンの例としては、限定しないが、8-メルカプトグアノシン、8-プロモグアノシン、8-メチルグアノシン、8-オキソ-7,8-ジヒドロジェングアノシン、8-アリールアミノ-2'-デオキシグアノシン、C8-プロピニル-グアノシン、C8-およびN7-置換グアニンリボヌクレオチド（例えば、7-アリル-8-オキソグアノシン（ロキソリビン（loxoribine））および7-メチル-8-オキソグアノシン）、8-アミノグアノシン、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン、および8-ヒドロキシグアノシンが挙げられる。8-メルカプトグアノシンおよび8-プロモグアノシンはまた、MHC制限CTLの産生に対するサイトカイン要件を置換し得（Feldbush 1985、上に引用される）、マウスNK活性を増強し得（Kooら、1988. J. Immunol. 140:3249）、そしてマウスLAK産生の誘導において、IL-2と共同し得る（Thompsonら、1990. J. Immunol. 145:3524）。本発明のいくつかの重要な実施形態において、C8置換グアノシンは、ADCCを含む免疫応答を誘導または増強するために、イミダゾキノリン剤とともにまたはイミダゾキノリン剤の代わりに使用され得る。

30

40

【0091】

本発明の特定の方法および組成物は、ポリアルギニンの投与または追加を含む。本明細

50

書中で使用される場合、ポリアルギニンは、アルギニンモノマーの相同なポリマーである。ポリアルギニンは、種々の長さであり得、ペプチド骨格を有し得るが、このように制限されない。他の実施形態において、アルギニンリッチなポリマーはまた、アルギニンの同種ポリマーの代わりに使用され得る。アルギニンリッチなポリマーは、少なくとも2個の連続したアルギニン、少なくとも3個の連続したアルギニン、少なくとも4個の連続したアルギニン、および少なくとも5個の連続したアルギニンを有するポリマーであり得るか、あるいはそのモノマーの少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%がアルギニン残基であるポリマーであり得る。従って、ポリアルギニンがまたアルギニンリッチなポリマーであることが理解されるべきである。アルギニンの正電荷に起因して、アルギニンリッチなポリマー（ポリアルギニンを含む）は、いくつかのイミダゾキノリン剤および免疫刺激核酸に関連する負電荷を中和するように作用する。

10

【0092】

「免疫刺激核酸」は、本明細書中で使用される場合、免疫刺激モチーフまたは免疫応答を誘導する骨格を含む任意の核酸である。免疫応答は、限定しないが、Th1型免疫応答またはTh2型免疫応答として特徴付けられ得る。このような免疫応答は、活性化免疫細胞によって惹起されるサイトカインおよび抗体産生プロファイルによって規定される。1つの好ましい実施形態において、pan活性化免疫刺激核酸（例えば、#2006（TCGTCGTTTGTCTTTGTCGTT））は、本発明の方法におけるイミダゾキノリン剤と組み合わせて使用される。

20

【0093】

ヘルパー（CD4⁺）T細胞は、他の免疫系細胞（他のT細胞を含む）に対して作用する可溶性因子の産生を介して哺乳動物の免疫応答を調節する。ヘルパーCD4⁺、およびいくつかの場合、CD8⁺、T細胞は、それらのサイトカイン産生プロファイルに依存して、マウス系およびヒト系の両方においてTh1細胞およびTh2細胞（ならびにCD8⁺の場合、Tc1細胞およびTc2細胞）として特徴付けられる（Romagnani, 1991, Immunol Today 12:256-257, Mosmann, 1989, Annu Rev Immunol, 7:145-173）。Th1細胞は、インターロイキン2（IL-2）、IL-12、腫瘍壊死因子（TNF）およびインターフェロン（IFN-）を産生し、そしてそれらは、主に、細胞媒介免疫（例えば、遅延型過感受性）を担う。免疫刺激核酸の投与によって誘導されるサイトカインは、主に、TH1クラスのサイトカインである。Th1応答に関連するこの型の抗体は、一般的に、より保護性である。なぜなら、これらは、高度な中和およびオプソニン化能力を有するからである。Th2細胞は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、およびIL-13を産生し、そして主に、体液性免疫応答に最適な補助を提供することに関与する（例えば、IgEおよびIgG4抗体アイソタイプ切換）（Mosmann, 1989, Annu Rev Immunol, 7:145-173）。Th2応答は、主に、感染に対してあまり保護的でない効果を有する抗体を含む。

30

【0094】

用語「核酸」および「オリゴヌクレオチド」は、リン酸基および交換可能な有機塩基に連結された複数のヌクレオチド（すなわち、糖（例えば、リボースまたはデオキシリボース）を含む分子）を意味するように相互交換可能に使用され、これらの塩基は、置換ピリミジン（例えば、シトシン（C）、チミジン（T）、またはウラシル（U））、あるいは置換プリン（例えば、アデニン（A）またはグアニン（G））のいずれかである。本明細書中で使用される場合、この用語は、オリゴヌクレオチドおよびオリゴデオキシリボヌクレオチドをいう。この用語はまた、ポリヌクレオチド（すなわち、ポリヌクレオチドからリン酸を除いた）および任意の他の塩基含有ポリマーを含む。核酸分子は、既存の核酸供給源（例えば、ゲノムDNAまたはcDNA）から得られ得るが、好ましくは、合成（例えば、核酸合成によって作製される）である。

40

【0095】

50

免疫刺激核酸は、CpG、ポリ-G、ポリ-T、TG、メチル化CpG、CpI、およびトリッチモチーフのような免疫刺激モチーフを有し得る。本発明のいくつかの実施形態において、識別可能なモチーフを有するか否かに関わらず、任意の核酸が、免疫応答を調節するために、併用療法において使用され得る。免疫刺激骨格としては、限定しないが、リン酸改変骨格（例えば、ホスホロチオエート骨格）が挙げられる。免疫刺激核酸は、先行技術において広範囲に記載されており、これらの核酸の簡単な要旨が以下に提示される。

【0096】

いくつかの実施形態において、CpG免疫刺激核酸は、本発明の方法において使用される。CpG免疫刺激核酸は、CGジヌクレオチド、メチル化されてないC残基を含む核酸である。免疫調節に対するCpG核酸の効果は、米国特許第6,194,388 B1号、同第6,207,646 B1号、同第6,239,116 B1号および同第6,218,371 B1号、ならびに公開特許出願、例えば、PCT/US98/03678、PCT/US98/10408、PCT/US98/04703、およびPCT/US99/09863に広範囲に記載されている。これらの特許および特許出願の各々の全内容は、本明細書によって、参考として援用される。

10

【0097】

用語、CpG核酸またはCpGオリゴヌクレオチドは、本明細書中で使用される場合、他に示さない限り、免疫刺激CpG核酸をいう。免疫刺激核酸全体が、非メチル化であり得るか、または一部が、非メチル化であり得るが、少なくとも5'CG3'のCが、非メチル化でなければならない。

20

【0098】

本発明のCpG核酸配列は、上記に幅広く開示されるもの、ならびに発行された米国特許第6,207,646 B1号および同第6,239,116 B1号に開示されるものが挙げられる。

【0099】

本発明の他の実施形態において、非CpG免疫刺激核酸が使用される。非CpG免疫刺激核酸は、その配列においてCpGモチーフを有さない核酸、またはメチル化C残基を含むCpGを有する核酸のいずれかである。いくつかの例において、CpGモチーフを欠くキメラオリゴヌクレオチドは、免疫刺激性であり、CpGオリゴヌクレオチドと同じ多くの予防的活性および治療的活性を有する。非CpG免疫刺激核酸は、それらの配列、送達の様式、およびそれらが投与される用量に依存して、Th1免疫応答またはTh2免疫応答を誘導し得る。

30

【0100】

標的化剤として本発明において有用な他の免疫刺激核酸は、Pyリッチ核酸である。pyリッチ核酸は、CpGモチーフが存在するか否かに関わらず、CpGオリゴヌクレオチドに対して類似の免疫刺激特性を有する。Pyリッチ核酸は、トリッチ免疫刺激核酸またはクリッチ免疫刺激核酸である。

【0101】

重要なサブセットの非CpG免疫刺激核酸は、トリッチ免疫刺激核酸である。本発明のトリッチ免疫刺激核酸としては、公開されたPCT特許出願PCT/US00/26383に開示されるものが挙げられ、この内容全体が、本明細書中において参考として援用される。いくつかの実施形態において、トリッチ核酸24塩基長が使用される。トリッチ核酸は、少なくとも1つのポリTを含み、そして/または25%より多いTヌクレオチド残基のヌクレオチド組成を有する核酸である。ポリT配列を有する核酸は、列内に少なくとも4つのTを含む（例えば、5'TTTT3'）。好ましくは、トリッチ核酸としては、1つより多くのポリT配列を含む。好ましい実施形態において、トリッチ核酸は、2個、3個、4個などのポリT配列を有し得る（例えば、#2006(TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT)（配列番号1））。本発明に従って開示される最も高度に免疫刺激性のトリッチオリゴヌクレオチドのうちの1つが、全体的に、T又

40

50

クレオチド残基から構成される核酸である（例えば、オリゴヌクレオチド# 2183 (TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT) (配列番号2)）。本発明に従う他のトリッチ核酸は、25%より高いTヌクレオチド残基のヌクレオチド組成を有するが、必ずしもポリT配列を含まない。これらのトリッチ核酸において、Tヌクレオチド残基は、他の型のヌクレオチド残基（すなわち、G、C、およびA）によって互いから分離され得る。いくつかの実施形態において、トリッチ核酸は、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、および99%より高いTヌクレオチド残基（およびそれらの間の全ての整数%）のヌクレオチド組成を有する。好ましくは、トリッチ核酸は、少なくとも1つのポリT配列および25%より高いTヌクレオチド残基のヌクレオチド組成を有する。

10

【0102】

Cリッチ核酸は、少なくとも1つまたは好ましくは、少なくとも2つのポリC領域を有するか、または、少なくとも50%のCヌクレオチドから構成される核酸分子である。ポリC領域は、列に少なくとも4つのC残基がある。従って、ポリC領域は、式5' C C C C 3' によって包含される。いくつかの実施形態において、ポリC領域が、式5' C C C C C C 3' を有することが好ましい。本発明に従って、他のCリッチ核酸は、50%より高いCヌクレオチド残基のヌクレオチド組成を有するが、必ずしもポリC配列を含まない。これらのCリッチ核酸において、Cヌクレオチド残基は、他のタイプのヌクレオチド残基（すなわち、G、T、およびA）によって互いから分離され得る。いくつかの実施形態において、Cリッチ核酸は、60%、70%、80%、90%、および99%より高いCヌクレオチド残基（およびそれらの間の全ての整数%）のヌクレオチド組成を有する。好ましくは、Cリッチ核酸は、少なくとも1つのポリC配列および50%より高いTヌクレオチド残基のヌクレオチド組成を有し、いくつかの実施形態において、トリッチでもある。

20

【0103】

TG核酸はまた、免疫系を調節するために本発明のイミダゾキノリン剤とともに使用され得る。適切なTG核酸は、公開されたPCT特許出願PCT/US00/26383に記載される。本明細書中で使用される場合、「TG核酸」は、少なくとも1つのTpGジヌクレオチド（チミジン-グアニンジヌクレオチド配列、すなわち、「TG DNA」または5'チミジン、続いて3'グアノシンを含み、リン酸結合によって連結されるDNA）を含む核酸であり、免疫系の成分を活性化する。

30

【0104】

15~25ヌクレオチド長の長さの範囲のTG核酸が、増加した免疫刺激を示し得ることが示されている。従って、1つの局面において、本発明は、15~27ヌクレオチド長であるオリゴヌクレオチド（すなわち、15ヌクレオチド長、16ヌクレオチド長、17ヌクレオチド長、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、21ヌクレオチド長、22ヌクレオチド長、23ヌクレオチド長、24ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、26ヌクレオチド長、または27ヌクレオチド長であるヌクレオチド）を提供し、これは、トリッチ核酸であり得るか、またはTG核酸であり得るか、またはトリッチ核酸およびTGリッチ核酸の両方であり得る。好ましくは、TGオリゴヌクレオチドは、15~25ヌクレオチドの大きさの範囲である。

40

【0105】

別の重要なサブセットの非CpG免疫刺激核酸は、ポリG免疫刺激核酸である。種々の参考文献 (Pisetsky and Reich, 1993 Mol. Biol. Reports, 18: 217-221; Krieger and Herz, 1994, Ann. Rev. Biochem., 63: 601-637; Macayaら, 1993, PNAS, 90: 3745-3749; Wyattら, 1994, PNAS, 91: 1356-1360; Rando and Hogan, 1998, In Applied Antisense Oligonucleotide Technology, ed. Krieg and Stein, p. 335-352; およびKimuraら, 199

50

4, J. Biochem. 116, 991-994が挙げられる)もまた、ポリG核酸の免疫刺激特性を記載する。本発明に従って、ポリG含有ヌクレオドは、細菌感染、ウイルス感染、および真菌感染を処置および予防するのに有用であり、これによって、癌患者の処置に対するこれらの感染の影響を最小限にするために使用され得る。

【0106】

ポリG核酸は、好ましくは、以下の式：



を有する核酸であり、ここで、 X_1 、 X_2 、 X_3 、および X_4 は、ヌクレオチドである。好ましい実施形態において、 X_3 および X_4 のうち少なくとも1つは、Gである。他の実施形態において、 X_3 および X_4 の両方が、Gである。なお他の実施形態において、好ましい式は、 $5' G G G N G G G 3'$ 、または $5' G G G N G G G N G G G 3'$ であり、ここで、Nは、0個~20個の間のヌクレオチドを表す。他の実施形態において、ポリG核酸は、非メチル化CGジヌクレオチドを含まない。他の実施形態において、ポリG核酸は、少なくとも1つの非メチル化CGジヌクレオチドを含む。

10

【0107】

本発明の免疫刺激核酸はまた、CpG、ポリG、またはトリッチモチーフを有さない核酸であり得る。

【0108】

免疫刺激核酸へのポリAテールの付加は、核酸の活性を増強し得る。高度に免疫刺激性のCpG核酸(TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT)(配列番号1)が、ポリAテール(A A A A A A)またはポリTテール(T T T T T T)の付加で改変され、得られるオリゴヌクレオチドは、免疫刺激活性を増加したことを発見した。ポリAテールおよびポリTテールが、オリゴヌクレオチドの免疫刺激特性を増加する能力は、非常に類似する。上記の高度に免疫原性のCpG核酸は、トリッチオリゴヌクレオチドである。ポリAテールおよびポリTテールがトリッチではない核酸に添加される場合、核酸の免疫刺激能力に対してより有意な影響を有するようである。ポリTテールが、すでに高度にトリッチである核酸に付加されたので、ポリT付加の免疫刺激特性は、いくぶん希釈されたが、完全ではない。この発見は、ポリA領域の使用について重要な意味を有する。従って、いくつかの実施形態において、免疫刺激核酸は、ポリA領域を含み、他の実施形態において、免疫刺激核酸は、ポリA領域を含まない。

20

30

【0109】

例示的な免疫刺激核酸配列としては、米国非仮特許出願番号09/669,187号(2000年9月25日に出願された)、および対応する公開されたPCT特許出願PCT/US00/26383に記載および列挙される免疫刺激配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【0110】

免疫刺激核酸は、二本鎖であり得るかまたは一本鎖であり得る。一般的に、二本鎖分子は、インピボにおいてより安定であるが、一本鎖分子は、増加した免疫活性を有する。従って、本発明のいくつかの局面において、核酸が一本鎖であることが好ましく、そして他の局面において、核酸が二本鎖であることが好ましい。特定の実施形態において、核酸が一本鎖である場合、二次構造および三次構造を(例えば、折り畳むことによって、またはその長さの全体にわたってまたは選択されたセグメントにおいてハイブリダイズすることによって)形成し得る。従って、このような核酸の一次構造は、一本鎖であり得るが、その高次構造は、二本鎖または三本鎖であり得る。

40

【0111】

細胞への取り込みを促進するために、免疫刺激核酸は、好ましくは、6~100塩基長の範囲である。しかし、6ヌクレオチドより大きい任意のサイズの核酸(さらに大きなkbの長さ)は、十分な免疫刺激モチーフが存在する場合、本発明に従って、免疫応答を誘導し得る。好ましくは、免疫刺激核酸は、大きさが、8ヌクレオチドと100ヌクレオチドとの間の範囲、いくつかの実施形態において、8ヌクレオチドと50ヌクレオチドとの

50

間の範囲、または8ヌクレオチドと30ヌクレオチドとの間の範囲である。

【0112】

改変骨格（例えば、ホスホロチオエート骨格）を有する核酸はまた、免疫刺激核酸のクラスに入る。Hutchersonらに対する米国特許第5,723,335号および同第5,663,153号および関連するPCT公報W095/26204は、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドアナログを使用する免疫刺激を記載する。これらの特許は、ホスホロチオエート骨格が、非配列特異的様式で免疫応答を刺激する能力を記載する。

【0113】

免疫刺激核酸が核酸ベクター（例えば、抗原をコードするベクター）とともに投与される場合、免疫刺激核酸の骨格は、ホスホジエステルおよびホスホロチオエート（または他のリン酸改変）のキメラ組合せであることが好ましい。これは、細胞によるプラスミドベクターの取り込みが、完全なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの存在によって妨害されるからである。従って、ベクターおよびオリゴヌクレオチドの両方が、被験体に送達される場合、オリゴヌクレオチドがキメラまたはホスホロチオエートを有すること、およびプラスミドが、それを細胞に直接送達するビヒクルと会合し、これによって細胞取り込みの必要性を避けることが好ましい。このようなビヒクルは、当該分野で公知であり、例えば、リボソームおよび遺伝子銃が挙げられる。

【0114】

用語、核酸およびオリゴヌクレオチドはまた、置換または改変を有する核酸またはオリゴヌクレオチド（例えば、塩基および/または糖において）を含む。例えば、これらは、3'位におけるヒドロキシル基以外かつ5'位におけるリン酸基以外の低分子量有機基に共有結合された骨格糖を有する核酸を含む。従って、改変核酸は、2'-O-アルキル化リボース基を含み得る。さらに、改変核酸は、リボースの代わりに、アラビノースのような糖を含み得る。従って、核酸は、骨格組成において異種であり得、これによって、例えば、ペプチド核酸（核酸塩基を有するアミノ酸骨格を有する）と一緒に連結されたポリマーの任意の可能な組合せを含む。いくつかの実施形態において、核酸は、骨格組成において均一である。核酸はまた、置換されたプリンおよびピリミジン（例えば、C-5プロピン改変塩基）を含む（Wagnerら, Nature Biotechnology 14:840-844, 1996）。プリンおよびピリミジンとしては、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン、5-メチルシトシン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、ならびに天然に存在する核酸塩基および非天然の核酸塩基（置換および非置換の芳香族部分）が挙げられるが、これらに限定されない。他のこのような改変は、当業者に周知である。

【0115】

本発明における使用について、本発明の核酸は、当該分野で周知の多数の手順のいずれかを使用して、デノボ合成され得る。例えば、-シアノエチルホスホルアミダイト法（Beaucage, S.L.およびCaruthers, M.H., Tet. Let. 22:1859, 1981）；ヌクレオシドHホスホネート法（Gareggら, Tet. Let. 27:4051-4054, 1986；Froehlerら, Nucl. Acid. Res. 14:5399-5407, 1986；Gareggら, Tet. Let. 27:4055-4058, 1986, Gaffneyら, Tet. Let. 29:2619-2622, 1988）。これらの化学は、種々の市販の自動化核酸合成機によって実施され得る。これらの核酸は、合成核酸と称される。あるいは、これらの核酸は、大スケールで、プラスミド中で生成され得（Sambrook, T.ら, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989）、そしてより小さい小片に分離され得るか、またはその全体が投与され得る。核酸は、公知の技術（例えば、制限酵素、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを使用する技術）を使用して、現存の核酸配列（例えば、ゲノムDNAまたはcDNA）から調製され得る。この様式で調製された核酸は、単離された核酸と称される。単離された核酸と

10

20

30

40

50

は、一般に、天然で通常会合している成分から分離されている核酸をいう。例として、単離された核酸は、細胞から、核から、ミトコンドリアからまたはクロマチンから分離された核酸であり得る。用語「核酸」は、合成核酸および単離された核酸の両方を包含する。

【0116】

インピボにおける使用について、核酸は、必要に応じて、分解に対して比較的耐性であり得る（すなわち、安定化されている）。「安定化された核酸分子」とは、インピボの分解（例えば、エキソヌクLEASEまたはエンドヌクLEASEによる）に対して比較的耐性である核酸分子を意味するべきである。安定化は、長さまたは二次構造の関数であり得る。数十～数百 kb 長の核酸は、インピボの分解に対して比較的耐性である。より短い核酸に付いて、二次構造は、この効果を安定化し、そして増加し得る。例えば、核酸の 3' 末端が、上流領域に対する自己相補性を有し、その結果、この 3' 末端が、折り畳まれて、一連の幹ループ構造を形成する場合、この核酸は、安定化され、従って、より大きな活性を示す。

10

【0117】

あるいは、核酸の安定化は、リン酸骨格の改変によって達成され得る。本発明の好ましい安定化された核酸は、改変された骨格を有する。核酸骨格の改変は、インピボで投与された場合、核酸の活性の増加を提供することが示されている。改変された骨格の 1 つのタイプは、リン酸骨格の改変である。オリゴヌクレオチドの 5' 末端における少なくとも 2 つのホスホロチオエート結合および 3' 末端における複数の（好ましくは 5 個の）ホスホロチオエート結合を、免疫刺激核酸に含めることは、いくつかの場合において、最大の活性を提供し得、かつこの核酸を、細胞内エキソヌクLEASEおよびエンドヌクLEASEによる分解から保護し得る。他の改変された核酸としては、ホスホジエステル改変核酸、ホスホジエステルとホスホロチオエート核酸との組合せ、アルキルホスホネートおよびアリールホスホネート、アルキルホスホロチオエートおよびアリールホスホロチオエート、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、p-エトキシ、モルホリノ、ならびにそれらの組合せが挙げられる。ホスホロチオエート結合を有する核酸は、最大の活性を提供し、そして細胞内エキソヌクLEASEおよびエンドヌクLEASE、ならびにそれらの組合せによる分解から核酸を保護する。これらの組合せおよび免疫細胞に対するこれらの特定の効果の各々は、発行された米国特許第 6,207,646 B 1 および同第 6,239,116 B 1（これらの内容全体は本明細書中で参考として援用される）において、CpG 核酸に関してより詳細に考察されている。これらの改変された核酸は、増大したヌクLEASE耐性、増加した細胞取込み、増加したタンパク質結合および/または変化した細胞内局在化に起因して、より大きな刺激活性を示し得る。

20

30

【0118】

本発明の組成物は、必要に応じて、キメラオリゴヌクレオチドであり得る。このキメラオリゴヌクレオチドは、式： $5' Y_1 N_1 Z N_2 Y_2 3'$ を有するオリゴヌクレオチドである。 Y_1 および Y_2 は、1 と 10 との間のヌクレオチドを有する核酸分子である。 Y_1 および Y_2 の各々は、少なくとも 1 つの改変されたヌクレオチド間結合を含む。これらのキメラオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 2 つのヌクレオチドは、骨格改変を含むので、これらの核酸は、「安定化された免疫刺激核酸」の 1 つのタイプの例である。キメラオリゴヌクレオチドに関して、 Y_1 および Y_2 は、互いに独立しているとみなされる。これは、 Y_1 および Y_2 の各々が、同じ分子中で互いに異なる配列および異なる骨格結合を有しても有さなくても良いことを意味する。これらの配列は、異なるが、いくつかの場合において、 Y_1 および Y_2 は、1 つのポリ-G 配列を有する。ポリ G 配列とは、少なくとも 3 個の連続した G をいう。他の実施形態において、このポリ G 配列とは、少なくとも 4、5、6、7 または 8 個の連続した G をいう。他の実施形態において、 Y_1 および Y_2 は、TCGTCG、TCGTCGT または TCGTCGTT であり得る。 Y_1 および Y_2 はまた、ポリ C 配列、ポリ T 配列またはポリ A 配列を有し得る。いくつかの実施形態において、 Y_1 および/または Y_2 は、3 個と 8 個との間のヌクレオチドを有する。 N_1 および N_2 は、 $N_1 Z N_2$ が、合計少なくとも 6 個のヌクレオチドを有する限り、0 と 5 との間の

40

50

ヌクレオチドを有する。N₁ Z N₂ のヌクレオチドは、ホスホジエステル骨格を有し、改変された骨格を有する核酸を含まない。Zは、免疫刺激核酸モチーフであるが、CGは含まない。例えば、Zは、例えば、TTTTモチーフを含むトリッチな配列の核酸、または配列の塩基の50%がTである配列であり得るか、またはZは、TG配列であり得る。

【0119】

式Y₁ N₁ Z N₂ Y₂ の中心ヌクレオチド(N₁ Z N₂)は、ホスホジエステルヌクレオチド間結合を有し、そしてY₁ およびY₂ は、少なくとも1つの改変されたヌクレオチド間結合を有するが、1つより多い改変されたヌクレオチド間結合を有しても、全ての改変されたヌクレオチド間結合を有してもよい。好ましい実施形態において、Y₁ および/またはY₂ は、少なくとも2個、または2個と5個との間の改変されたヌクレオチド間結合を有するか、またはY₁ が、2つの改変されたヌクレオチド間結合を有し、かつY₂ が、5個の改変されたヌクレオチド間結合を有するか、またはY₁ が、5個の改変されたヌクレオチド間結合を有し、かつY₂ が、2個の改変されたヌクレオチド間結合を有する。いくつかの実施形態において、これらの改変されたヌクレオチド間結合は、改変されたホスホロチオエート結合、改変されたホスホロジチオエート結合または改変されたp-エトキシ結合である。

10

【0120】

ホスホロチオエートのような改変された骨格は、ホスホロアミデート化学またはH-ホスホネート化学のいずれかを使用する自動化技術を使用して、合成され得る。アリールホスホネートおよびアルキルホスホネートが、例えば、米国特許第4,469,863号に記載されるようにして作製され得；そしてアルキルホスホトリエステル(ここで、荷電した酸素部分は、米国特許第5,023,243号および欧州特許番号第092,574号に記載されるようにして、アルキル化される)は、市販の試薬を使用して、自動化固相合成によって調製され得る。他のDNA骨格の改変および置換を作製する方法が、記載されている(Uhlmann, E. および Peyman, A. Chem. Rev. 90: 544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1: 165, 1990)。

20

【0121】

他の安定化された核酸としては、以下が挙げられる：非イオン性DNAアナログ(例えば、アルキルホスフェートおよびアリールホスフェート(ここで、荷電したホスホネート酸素は、アルキル基またはアリール基で置換されている))、ホスホジエステルおよびアルキルホスホトリエステル(ここで、荷電した酸素部分がアルキル化される)。いずれかの末端または両方の末端にジオール(例えば、テトラエチレングリコールまたはヘキサエチレングリコール)を含む核酸もまた、ヌクレアーゼ分解に対して実質的に耐性であることが示された。

30

【0122】

免疫刺激モチーフを含むホスホロチオエート核酸およびホスホジエステル核酸の両方は、免疫細胞中で活性である。しかし、免疫刺激核酸に特異的な効果を引き起こすために必要な濃度に基づいて、このヌクレアーゼ耐性ホスホロチオエート骨格免疫刺激核酸は、ホスホジエステル骨格免疫刺激核酸よりも強力である。例えば、2 μg/mlのホスホロチオエートは、90 μg/mlのホスホホジエステルと同じ免疫刺激を生じることが示された。

40

【0123】

本発明に従って有用な別のタイプの改変された骨格は、ペプチド核酸である。この骨格は、アミノエチルグリシンから構成され、そしてDNA特性を提供する塩基を支持する。この骨格は、いずれのホスフェートも含まず、従って、必要に応じて正味の電荷を有さないかもしれない。電荷を有さないことにより、より強力なDNA-DNA結合が可能となる。なぜなら、2つの鎖の間の電荷反発力が存在しないからである。さらに、この骨格は、メチレン基を有するので、オリゴヌクレオチドは、酵素/プロテアーゼ耐性である。ペプチド核酸は、種々の商業的供給源(例えば、Perkin Elmer)から購入され

50

得るか、またはデノボ合成され得る。

【0124】

別のクラスの骨格改変としては、2'-O-メチルリボヌクレオシド(2-Ome)が挙げられる。これらのタイプの置換は、従来技術で、特に、それらの免疫刺激特性に関して、広く記載されている(Zhaoら、Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1999, 9:24:3453. Zhaoらは、2'-Ome改変を核酸に調製する方法を記載する。

【0125】

本発明の核酸分子は、天然に存在するかまたは合成のプリン複素環式塩基およびピリミジン複素環式塩基、ならびに改変された骨格を含み得る。プリン複素環式塩基またはピリミジン複素環式塩基としては、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、ウラシルおよびイノシンが挙げられるが、これらに限定されない。他の例示的な複素環式塩基は、Meriganらに発行された米国特許第3,687,808号に開示される。用語「プリン」もしくは「ピリミジン」、または「塩基」は、天然に存在するかまたは合成の両方のプリン、ピリミジンまたは塩基をいうために、本明細書中で使用される。

10

【0126】

本発明に従って有用な骨格改変を有する免疫刺激核酸は、いくつかの実施形態において、Sキラル免疫刺激核酸またはRキラル免疫刺激核酸である。「Sキラル免疫刺激核酸」は、本明細書中で使用される場合、少なくとも2つのヌクレオチドがキラル中心を形成する骨格改変を有し、かつ複数のキラル中心がSキラリティーを有する免疫刺激核酸である。 「Rキラル免疫刺激核酸」は、本明細書中で使用される場合、少なくとも2つのヌクレオチドがキラル中心を形成する骨格改変を有し、複数のキラル中心がRキラリティーを有する免疫刺激核酸である。この骨格改変は、キラル中心を形成する任意のタイプの改変であり得る。この改変としては、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、2'-Omeおよびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0127】

キラル免疫刺激核酸は、骨格改変を有する核酸内に少なくとも2つのヌクレオチドを有さなければならない。しかし、この核酸中のヌクレオチドの全てまたはほとんどが、改変された骨格を有し得る。改変された骨格(キラル中心と呼ばれる)を有するヌクレオチドの中で、複数のヌクレオチドが、単一のキラリティー(SまたはR)を有する。「複数」とは、本明細書中で使用される場合、75%より多い量をいう。従って、キラル中心のほとんどは、複数のキラル中心がSキラリティーまたはRキラリティーを有する限り、SキラリティーまたはRキラリティーを有し得る。いくつかの実施形態において、キラル中心の少なくとも80%、85%、90%、95%または100%が、SキラリティーまたはRキラリティーを有する。他の実施形態において、ヌクレオチドの少なくとも80%、85%、90%、95%または100%が、骨格改変を有する。

30

【0128】

Sキラル免疫刺激核酸およびRキラル免疫刺激核酸は、キラル純粋なオリゴヌクレオチドを生成するための当該分野で公知の任意の方法によって、調製され得る。Stecらは、オキサチアホスホランを使用して立体純粋な(stereopure)ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドを生成するための方法を教示している。Stec WJら(1995) J Am Chem Soc 117:12019。キラル純粋なオリゴヌクレオチドを作製するための他の方法は、ISIS Pharmaceuticalsのような会社により記載されている。立体純粋なオリゴヌクレオチドを作製するための方法を開示している米国特許としては、5883237、5837856、5599797、5512668、5856465、5359052、5506212、5521302および5212295が挙げられ、これらの各々は、その全体が本明細書中で参考として援用される。

40

【0129】

50

プロフィール、配列、骨格改変および生物学的効果において異なり得るかまたは異なり得ない1つ以上の免疫刺激核酸が、被験体に投与され得る。例として、CpG核酸およびTリッチな核酸が、イミダゾキノリン剤と共に単一の被験体に投与され得る。別の例において、ヌクレオチド配列が異なる複数のCpG核酸もまた、イミダゾキノリン剤と共に被験体に投与され得る。

【0130】

免疫刺激核酸は、プラスミドベクターの形態で被験体に送達され得る。いくつかの実施形態において、1つのプラスミドベクターは、免疫刺激核酸ならびに障害特異的医薬および/または抗原をコードする核酸(いずれかが核酸によりコードされ得る場合)の両方を含み得る。さらに他の実施形態において、プラスミドは、免疫応答の刺激または調節に関するタンパク質またはポリペプチド(例えば、IFN-、CD80など)をコードし得る。免疫刺激核酸は、プラスミドのコード配列中に存在し得るが、これらの位置は、それほど制限されていない。他の実施形態において、別個のプラスミドが使用され得る。さらに他の実施形態において、プラスミドは使用され得ない。

10

【0131】

イミダゾキノリン剤、抗原、免疫刺激核酸、抗体、C8リッチなグアノシンおよびアルギニンを多く含むポリマーを含有する、本明細書中で記載される治療剤は、本発明の方法で使用される場合、それらの置換基の間を共有結合する必要性なく、物理的に結合され得る。あるいは、この治療剤はまた、以下に記載されるように、連結分子を使用して、直接的または間接的のいずれかで、種々の組み合わせで結合体化され得る。

20

【0132】

使用され得る適切な連結分子の例としては、二官能性架橋剤分子が挙げられる。この二官能性架橋剤分子は、結合体化される分子の性質に依存して、ホモ二官能性(homobifunctional)であってもヘテロ二官能性(heterobifunctional)であってもよい。ホモ二官能性架橋剤は、2つの同一の反応性基を有する。ヘテロ二官能性架橋剤は、連続した結合体化反応を可能にする2つの異なる反応性基を有するとして定義される。種々のタイプの市販の架橋剤は、以下の基の1つ以上と反応性である: 1級アミン、2級アミン、スルフヒドリル、カルボキシル、カルボニルおよび糖。アミン特異的架橋剤の例は、ビス(スルホスクシンイミジル)スベラート、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン、ジスクシンイミジルスベラート、ジスクシンイミジルトータレート、ジメチルアジピメート・2HCl、ジメチルピメリジデート・2HCl、ジメチルスベリミデート・2HCl、およびエチレングリコールビス-[スクシンイミジル-[スクシネート]]である。スルフヒドリル基に反応性の架橋剤としては、ビスマレイミドヘキサン、1,4-ジ-[3'-(2'-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ブタン、1-[p-アジドサリチルアミド]-4-[ヨードアセトアミド]ブタン、およびN-[4-(p-アジドサリチルアミド)ブチル]-3'-[2'-ピリジルジチオ]プロピオンアミドが挙げられる。糖と優先的に反応性の架橋剤としては、アジドベンゾイルヒドラジンが挙げられる。カルボキシル基と優先的に反応性の架橋剤としては、4-[p-アジドサリチルアミド]ブチルアミンが挙げられる。アミンおよびスルフヒドリルと反応するヘテロ二官能性架橋剤としては、N-スクシンイミジル-3-[2'-ピリジルジチオ]プロピオネート、スクシンイミジル[4-ヨードアセチル]アミノベンゾエート、スクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、スルホスクシンイミジル6-[3-[2'-ピリジルジチオ]プロピオンアミド]ヘキサノエート、およびスルホスクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレートが挙げられる。カルボキシル基およびアミン基と反応するヘテロ二官能性架橋剤としては、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリドが挙げられる。糖およびスルフヒドリルと反応するヘテロ二官能性架橋剤としては、4-[N-マレイミドメチル]-シクロヘキサン-1-カルボキシルヒドラジド・2HCl、4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド・2H

30

40

50

C1、および3-[2-ピリジルジチオ]プロピオニルヒドラジドが挙げられる。これらの架橋剤は、ビス[-4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィドおよびグルタルアルデヒドである。アミノ基またはチオール基は、二官能性架橋剤分子の結合点を提供するように、合成核酸分子の任意のヌクレオチドにおいて付加され得る。この核酸分子は、結合体化コンピテント試薬(例えば、Uni-Link Amino Modifier、3'-DMT-C6-アミン-ON CPG、Amino Modifier II、N-TFA-C6-Amino Modifier、C6-Thio Modifier、C6-Disulfide PhosphoramiditeおよびC6-Disulfide CPG(Clontech, Palo Alto, CA))を組み込んで合成される。

10

【0133】

本発明のいくつかの局面において、イミダゾキノリン剤と本明細書中で記載される他の剤との組合せは、障害を有するかまたは障害を発症する危険性のある(すなわち、障害を有する危険性のある)被験体の予防および処置において有用である。一般に、本明細書中で提供される方法により予防および/または処置される障害は、刺激された免疫応答から恩恵を受ける障害である。重要な実施形態において、本発明の方法および組成物により標的化される障害としては、癌、感染性疾患ならびに喘息およびアレルギーが挙げられる。この障害はまた、疣贅であり得る。

【0134】

本発明は、特定の障害(例えば、感染性疾患、癌、喘息、アレルギーおよび疣贅により特徴付けられる障害)を発症する危険性のある被験体、およびこのような障害を有する被験体を処置することを意図する。本明細書中で使用される場合、用語処置する(treat)、処置された(treated)または処置(treating)は、本明細書中で記載される障害の1つに関して使用される場合、被験体が障害を発症する可能性を軽減する予防的処置、および被験体が障害を発症した後に、この障害を軽減もしくは排除するか、またはこの障害が悪化するのを防止する処置をいう。危険性のある被験体とは、通常の危険性よりも高い障害を発症する危険性を有する被験体として定義される。この通常の危険性は、一般に、障害を有さず、かつ障害を発症する危険性を有さない正常な個体集団の危険性である。

20

【0135】

従って、本発明の予防方法において、処置される被験体としては、感染性疾患を発症する危険性のある被験体、癌を発症する危険性のある被験体、および喘息またはアレルギーを発症する危険性のある被験体が挙げられる。障害を発症する危険性のある被験体とは、一般に、平均的な集団よりも、障害を有する可能性が高い被験体をいう。

30

【0136】

被験体とは、ヒトまたは動物(イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、げっ歯類(例えば、ラットおよびマウス)、霊長類(例えば、サル)、ならびに魚および養殖魚(例えば、フィンフィッシュ(例えば、サケ))および甲殻類(例えば、エビおよびホタテ貝)を含むが、これらに限定されない)を意味するべきである。治療方法または予防方法に適切な被験体としては、脊椎動物種および無脊椎動物種が挙げられる。被験体は、家庭用のペット(例えば、イヌ、ネコ、魚など)、農業用の牧畜動物(例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ニワトリなど)、研究用動物(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)、動物園の動物(例えば、ライオン、キリンなど)であり得るが、このように限定されない。本明細書中に記載される実施形態の多くは、ヒト障害に関するが、本発明はまた、他の非ヒト脊椎動物を処置するために有用である。非ヒト脊椎動物はまた、本明細書中に記載されるイミダゾキノリン剤で処置され得る。

40

【0137】

「感染性疾患」とは、本明細書中で使用される場合、感染性生物による、皮相的、経口的または全身的な宿主の侵入から生じる障害をいう。感染性生物としては、細菌、ウイルス、真菌および寄生生物が挙げられる。従って、「感染性疾患」としては、細菌感染、ウ

50

ウイルス感染、真菌感染および寄生生物感染が挙げられる。

【0138】

細菌は、二分裂によって無性生殖的に増殖する単細胞生物である。これらは、その形態学、染色反応、栄養要件および代謝要件、抗原構造、化学組成および遺伝子相同性に基づいて、分類および命名される。細菌は、その形態学的形態に基づいて、3つの群：球状体（球菌）、線形杆状体（杆菌）および湾曲またはらせんの杆状体（ビブリオ、キャンピロバクター、スピリルムおよびスピロヘータ）に分類され得る。細菌は、より一般的には、その染色反応に基づいて、2種類の生物（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、形態学研究で一般的に行われる染色方法をいう。グラム陽性生物は、染色手順後に染色されたままであり、深紫色を示す。グラム陰性生物は、染色を保持しないが、対比染色を取込み、従って、ピンク色を示す。米国非仮特許出願第09/801,839号（2001年3月8日出願）は、多数の細菌を列挙し、本発明はこれらの感染を予防および処置することを意図する。

10

【0139】

ウイルスは、一般的にアミノ酸コアおよびタンパク質被覆を含むが、独立して生存しない生物である、小さな感染性因子である。ウイルスはまた、タンパク質を欠く感染性核酸の形態をとり得る。ウイルスは、このウイルスが複製し得る生きた細胞の非存在下では、生存し得ない。ウイルスは、エンドサイトーシスまたはDNA（ファージ）の直接感染のいずれかによって、特定の生きた細胞に侵入し、そして増殖し、疾患を生じる。次いで、増殖したウイルスは、放出され、さらなる細胞を感染させる。あるウイルスは、DNA含有ウイルスであり、あるウイルスは、RNA含有ウイルスである。

20

【0140】

ウイルスとしては、エンテロウイルス（*interovirus*）（ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルスのようなピコルナウイルス科が挙げられるが、これに限定されない）、ロタウイルス、アデノウイルス、肝炎ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0141】

ヒトおよび非ヒト脊椎動物の両方の感染性ウイルスとしては、レトロウイルス、RNAウイルスおよびDNAウイルスが挙げられる。この群のレトロウイルスとしては、単純レトロウイルスおよび複雑レトロウイルスの両方を含む。単純レトロウイルスとしては、亜群のB型レトロウイルス、C型レトロウイルスおよびD型レトロウイルスが挙げられる。

30

【0142】

米国非仮特許出願第09/801,839号（2001年3月8日出願）は、多数のウイルスを列挙し、本発明は、このウイルスの感染を予防および処置することを意図する。

【0143】

真菌および真核生物は、このうちの数種しか脊椎哺乳動物における感染を引き起こさない。真菌は、真核生物なので、これらは、サイズ、構造的構成、ライフサイクルおよび増殖機構において、原核生物細菌とは有意に異なる。真菌は、一般に、形態学的特徴、生殖様式および培養特性に基づいて分類される、真菌は、被験体において異なるタイプの疾患を（例えば、真菌抗原の吸入後の呼吸性アレルギー、毒性基質（例えば、毒キノコにより産生されるアマトキシシンおよびフェロトキシシン、ならびにアスペルギルス種により産生されるアフラトキシシン）の摂取に起因する真菌中毒）引き起こし得るが、全ての真菌が、感染性疾患を引き起こすわけではない。

40

【0144】

感染性真菌は、全身または表在的な感染を引き起こし得る。初生の全身感染は正常な健康被験体において生じ得、日和見感染は免疫無防備状態被験体において最も頻繁に見出される。初生の全身感染を引き起こす最も一般的な真菌性因子としては、*blastomycetes*、*coccidioides*、および*histoplasma*が挙げられる。免疫無防備状態被験体または免疫抑制被験体において日和見感染を引き起こす一般の真菌としては、*candida albicans*、*cryptococcus neoform*

50

ans、および種々の *aspergillus* 種が挙げられるが、これらに限定されない。全身性真菌感染は、内部器官の侵襲性感染である。生物は、通常、肺、胃腸管、または静脈内系統を通じて身体に侵入する。これらの感染のタイプは、初生の病原性真菌または日和見真菌によって引き起こされ得る。

【0145】

表在性真菌感染は、内部組織の侵襲のない外部表面における真菌の増殖を包含する。代表的な表在性真菌感染としては、皮膚、毛髪、または爪を包含する皮膚真菌感染が挙げられる。

【0146】

真菌感染と関連した疾患としては、アスペルギルス症、プラストミセス症、カンジダ症 (*camdidia is*)、クロモプラストミコーシス、コクシジオイデス真菌症、クリプトコックス症、真菌類眼感染症、真菌類毛髪感染症、真菌類爪感染症、真菌類皮膚感染症、ヒストプラズマ症、口ボ真菌症、菌腫、耳真菌症、パラコクシジオイドミコーシス、ペニシリウム症 (*penicilliosis, marneffeii*)、フェオフィホ真菌症、リノスポリジウム症、スポトリクス症、および接合真菌症が挙げられる。

【0147】

米国（非暫定）特許出願番号第09/306,281号（2001年3月8日出願）は多くの真菌を列挙しており、それらの感染は、本発明が予防および処置を意図するものである。

【0148】

寄生生物は、生存するために他の生物に依存し、そしてそれらの生活周期を継続するために別の生物に侵入、または感染しなければならない生物である。感染された生物（すなわち、宿主）は、寄生生物に、栄養摂取および居住環境の両方を提供する。その最も広範な意味では、用語「寄生生物」は、全ての感染性因子（すなわち、細菌、ウイルス、真菌、原生動物類、および蠕虫）を含み得るが、一般的に言えば、この用語は、もっぱら原生動物類、蠕虫、および外寄生節足動物（例えば、マダニ、ダニなど）を指すために使用される。原生動物類は、特に血液、腸管、または組織の細胞外基質中において、細胞内および細胞外の両方で複製し得る単細胞生物である。蠕虫は、ほとんど常に細胞外である（例外は、*Trichinella spp.* である）多細胞生物である。蠕虫は、通常、複製するために、一次宿主からの退去および二次宿主への伝播を必要とする。これらの上述の分類に対して、外寄生節足動物は、宿主身体の外部表面と寄生関係を形成する。

【0149】

寄生生物は、細胞内寄生生物および偏性細胞内寄生生物を含む。寄生生物の例としては、*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium ovale*、*Plasmodium malariae*、*Plasmodium vivax*、*Plasmodium knowlesi*、*Babesia microti*、*Babesia divergens*、*Trypanosoma cruzi*、*Toxoplasma gondii*、*Trichinella spiralis*、*Leishmania major*、*Leishmania donovani*、*Leishmania braziliensis* および *Leishmania tropica*、*Trypanosoma gambiense*、*Trypanosoma rhodesiense*、および *Schistosoma mansoni* が挙げられるが、これらに限定されない。

【0150】

米国（非暫定）特許出願番号第09/306,281号（1999年5月6日出願）は、多数の他の寄生生物を列挙し、それらの感染は、本発明が予防および処置を意図するものである。

【0151】

他の医学的に関連した微生物は、文献に包括的に記載されている（例えば、C. G. A. Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983（その全体の内容は、本明細書を

10

20

30

40

50

参照することによって援用される)を参照のこと)。前述の列举の各々は、例示であり、限定を意図しない。

【0152】

いくつかの局面において、本発明はまた、プリオンが疾患の進行に関係している疾患(例えば、ウシの海綿状脳症(すなわち、狂牛病)または動物におけるスクラピー感染、またはヒトにおけるクロイツフェルト-ヤコブ病のような)を処置することを意図する。

【0153】

いくつかの重要な実施形態において、本発明の方法は、感染症(例えば、小痘(smallpox)または炭疽感染)を処置または予防することが意図される。

【0154】

感染性疾患を有する被験体は、感染性生物に曝露され、そして身体内に急性または慢性の検出可能なレベルの生物を有する被験体である。感染性生物への曝露は、一般に、被験体の外部表面(例えば、皮膚または粘膜)と共に生じ、かつ/または、感染性生物による被験体の外部表面の貫入をいう。

【0155】

感染性疾患を発症する危険性のある被験体は、感染の原因となる病原体への曝露の危険性が通常よりも高い被験体である。例えば、危険性のある被験体は、特定のタイプの感染性因子が見出される区域に旅行する予定のある被験体であり得、あるいはそれは、生活様式もしくは医療手順を通じて、感染性生物を含み得る体液に、または直接的に生物に曝露される被験体、または感染性生物が同定されている区域で生活している被験体であり得る。感染性疾患を発症する危険性のある被験体はまた、医療機関が特定の感染性生物に対するワクチン接種を推奨する一般の集団を含む。

【0156】

感染症を発症する危険性のある被験体としては、微生物(例えば、インフルエンザ)への曝露の通常危険性を有するが、本発明の処置の間、活発な疾患を有さない被験体、ならびに特定の微生物に曝露する医学的要因または環境要因のために感染性疾患を発症する特定の危険性を有すると考えられる被験体が挙げられる。

【0157】

癌は、制御されない細胞増殖(すなわち、分裂)が関係する疾患である。癌細胞の制御されない増殖に寄与する既知の機構のいくつかとしては、増殖因子の独立、ゲノム変異の検出不全、および不適切な細胞シグナル伝達が挙げられる。癌細胞が正常な増殖制御を無視できることにより、増大した増殖速度が生じ得る。癌の原因は堅固には確立されていないが、癌に寄与するか、または少なくとも被験体に素因を与えるいくつかの要因が知られている。このような要因としては、特定の遺伝子変異(例えば、乳癌についてのBRCA遺伝子変異、結腸癌についてのAPC)、疑わしい癌原因因子または発癌物質(例えば、アスベスト、UV照射)への曝露、および特定の癌(例えば、乳癌)についての家族的素質が挙げられる。

【0158】

癌は、悪性または非悪性の癌であり得る。癌または腫瘍としては、胆道癌;脳癌;乳癌;子宮頸癌;絨毛癌;結腸癌;子宮内膜癌;食道癌;胃癌;上皮内新生物;リンパ腫;肝臓癌;肺癌(例えば、小細胞および非小細胞);黒色腫;神経芽細胞腫;口腔癌;卵巣癌;脾臓癌;前立腺癌;直腸癌;肉腫;皮膚癌;精巣癌;甲状腺癌;および腎臓癌、ならびに他の癌腫および肉腫が挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態では、癌は、毛様細胞性白血病;慢性骨髄性白血病;皮膚T細胞白血病;多発性骨髄腫;濾胞性リンパ腫;悪性黒色腫;扁平上皮癌;腎細胞癌;前立腺癌腫;膀胱細胞癌、または結腸癌腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【0159】

癌を有する被験体は、検出可能な癌性細胞を有する被験体である。

【0160】

癌を発症する危険性のある被験体は、癌を発症する確率が正常よりも高い被験体である。

10

20

30

40

50

これらの被験体としては、例えば、癌を発症する確率がより高いことと関連していることが示されている遺伝子異常を有する被験体、癌への家族的素質を有する被験体、癌原因因子（すなわち、発癌物質）（例えば、タバコ、アスベスト、または他の化学毒素）に曝露された被験体、および癌について以前治療され、そして見かけ上の寛解傾向にある被験体が挙げられる。

【0161】

「アレルギー」とは、物質（アレルゲン）に対する後天性の過敏性を指す。アレルギー状態としては、湿疹、アレルギー性鼻炎、または鼻感冒、枯草熱、結膜炎、気管支喘息、蕁麻疹（urticaria）（蕁麻疹（hives））および食物アレルギー、ならびに他のアトピー性状態（アトピー性皮膚炎；アナフィラキシー；薬物アレルギー；血管性水腫；およびアレルギー性結膜炎が挙げられるが、これらに限定されない。イヌにおけるアレルギー性疾患としては、季節性皮膚炎；多年生皮膚炎；鼻炎；結膜炎；アレルギー性喘息；および薬物反応が挙げられるが、これらに限定されない。ネコにおけるアレルギー性疾患としては、皮膚炎および呼吸障害および食物アレルゲンが挙げられるが、これらに限定されない。ウマにおけるアレルギー性疾患としては、呼吸障害（例えば、「ウマの慢性肺気腫（heaves）」）および皮膚炎が挙げられるが、これらに限定されない。非ヒト霊長類におけるアレルギー性疾患としては、アレルギー性喘息およびアレルギー性皮膚炎が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0162】

アレルギーは、アレルゲンに対する特定のクラスの免疫グロブリン（IgE）からの抗体の産生と関連した疾患である。一般的な空気アレルゲンに対するIgE媒介応答の発達もまた、喘息の発達に対する素因を示す要因である。アレルゲンが、好塩基球（血液中を循環する）または肥満細胞（固形組織じゅうに分散される）の表面上でFc IgEレセプターに結合される特定のIgEに遭遇すると、これらの細胞が活性化されるようになり、メディエーター（例えば、ヒスタミン、スクロトニン、および脂質メディエーター）の産生および放出を生じる。アレルギー性疾患としては、鼻炎（枯草熱）喘息、蕁麻疹、およびアトピー性皮膚炎が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0163】

アレルギーを有する被験体は、アレルゲンに応答してアレルギー反応を現在経験しているか、または以前に経験した被験体である。

30

【0164】

アレルギーまたは喘息を発症する危険性のある被験体は、過去においてアレルギーまたは喘息を有するとして同定されたが、現時点では活発な疾患を受けていない被験体、ならびに遺伝的要因または環境要因のために喘息またはアレルギーを発症する危険性があると考えられる被験体である。アレルギーまたは喘息を発症する危険性のある被験体としては、また、アレルゲンへの曝露の危険性を有する被験体または喘息を発症する危険性のある被験体（すなわち、以前に喘息発作を受けたか、または喘息発作に対する素因を有するもの）が挙げられ得る。例えば、危険性のある被験体は、特定のタイプのアレルゲンまたは喘息イニシエーターが見出される区域に旅行する予定のある被験体であり得るか、あるいはそれは、アレルゲンが同定されている区域で生活している任意の被験体ですらあり得る。被験体が特定の抗原に対するアレルギー応答を発症する、および被験体が抗原に曝露され得る（すなわち、花粉期の間）場合、その被験体は、抗原に対する曝露の危険性がある。

40

【0165】

近年、アレルギー性疾患は、一般に、少用量の抗原の注入後、続く増大する投薬量の抗原によって処置される。この手順は、アレルゲンに対する寛容化を誘導し、さらなるアレルギー反応を予防すると考えられている。しかし、これらの方法は、有効であるためには数年かかり得、そして副作用（例えば、アナフィラキシーショック）の危険性を伴う。本発明の方法は、これらの問題を回避する。

【0166】

50

アレルギーは、一般に、有害なアレルゲンに対する I g E 抗体生成により引き起こされる。イミダゾキノリン剤の全身または粘膜投与によって誘導されるサイトカインは、主に、T h 1 (例は、I L - 1 2、I F N - 、および I F N - である)と呼ばれるクラスに属し、そしてこれらは、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を誘導する。T h 1 応答と関連した抗体のタイプは、一般に、それらが高い中和能およびオプソニン化能を有するので、より防御的である。免疫応答の他の主要なタイプ (I L - 4 サイトカイン、I L - 5 サイトカインおよび I L - 1 0 サイトカインの産生と関連した) は、T h 2 免疫応答と称される。T h 2 応答は、主に抗体が関与し、そしてこれらは、感染に対してやや防御効果が低く、そしていくつかの T h 2 アイソタイプ (例えば、I g E) は、アレルギーと関連している。一般に、アレルギー疾患は、T h 2 型免疫応答によって媒介されるようである。一方、T h 1 応答は感染に対して最良の応答を提供するが、過剰の T h 1 応答は自己免疫疾患と関連する。イミダゾキノリン剤が被験体における免疫応答を T h 1 応答 (これは、アレルギー反応に対して防御的である) にシフトする能力に基づいて、イミダゾキノリン剤の免疫応答を誘導するのに有効な用量が、アレルギーを処置または予防するために被験体に投与され得る。

10

【0167】

アレルギー反応を引き起こす分子の総称はアレルゲンである。多数種のアレルゲンが存在する。アレルギー反応は、I g E タイプの組織感作免疫グロブリンが外来アレルゲンと反応した場合に生じる。I g E 抗体は、肥満細胞および/または好塩基球に結合され、そしてこれらの分化した細胞は、抗体分子の末端を架橋するアレルゲンによってそうするよう刺激された場合に、アレルギー反応の化学メディエーター (血管作用性アミン) を放出する。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、ヒトにおけるアレルギー反応の最もよく知られたメディエーターに属する。ヒスタミンおよび他の血管作用性アミンは、通常、肥満細胞および好塩基性白血球中に貯蔵される。肥満細胞は、動物組織じゅうに分散され、そして好塩基球は、血管系内を循環する。これらの細胞は、I g E 結合が関与する特殊化された順序の事象がその放出を引き起こすように生じない限り、細胞内でヒスタミンを製造して貯蔵する。

20

【0168】

アレルギー反応の症状は、I g E が抗原と反応する身体内の位置に依存して変動する。その反応が呼吸上皮に沿って生じる場合、その症状は、くしゃみ反応、咳反応、および喘息反応である。食物アレルギーの場合のように消化管で相互作用が生じる場合、腹痛および下痢が一般的である。例えば、蜂に刺された後の全身反応は、重篤であり得、そしてしばしば生命を脅かし得る。

30

【0169】

遅延型過敏性 (I V 型アレルギー反応としても知られる) は、炎症または免疫反応の出現までアレルギー被験体への抗原の侵襲から少なくとも 1 2 時間の遅延期間があることによって特徴付けられるアレルギー反応である。アレルギー状態における個体の T リンパ球 (感作 T リンパ球) は、抗原と反応し、T リンパ球にリンホカイン (マクロファージ遊走阻害因子 (M I F)、マクロファージ活性化因子 (M A F)、マイトジェン因子 (M F)、皮膚反応性因子 (S R F)、走化因子、新血管新生促進因子など) (これらは、炎症メディエーターとして機能する) を放出させ、そしてこれらのリンホカインの生物学的活性は、局所的に出現するリンパ球および他の炎症性免疫細胞の直接的および間接的な効果と共に、I V 型アレルギー反応を生じる。遅延型アレルギー反応としては、ツベルクリン型反応、同種移植片拒絶反応、細胞依存型防御反応、接触皮膚炎過敏反応などが挙げられ、これらは、ステロイド剤によって最も強く抑制されることが知られている。従って、ステロイド剤は、遅延型アレルギー反応によって引き起こされる疾患に対して有効である。しかし、現在使用されている濃度でのステロイド剤の長期使用は、ステロイド依存として知られる深刻な副作用に至り得る。本発明の方法は、投与されるべき用量をより低く、少なくすることによってこれらの問題のいくつかを解決する。

40

【0170】

50

即時型過敏反応（またはアナフィラキシー応答）は、非常に迅速に（すなわち、原因アレルゲンへの患者の曝露の数秒または数分以内に）発症するアレルギー反応形態であり、そしてそれは、Bリンパ球によって作製されるIgE抗体によって媒介される。非アレルギー患者においては、臨床関連のIgE抗体は存在しない；しかし、アレルギー疾患を罹患する患者においては、IgE抗体は、皮膚、リンパ器官中で、眼、鼻、および口腔の膜において、ならびに気道および腸において豊富である肥満細胞を感作することによって即時型過敏反応を媒介する。

【0171】

肥満細胞は、IgEに対する表面レセプターを有し、アレルギー罹患患者中のIgE抗体は、それらに結合される。上記で簡潔に説明したように、結合型IgEが適切なアレルゲンによって続いて接触された場合、肥満細胞は、生物活性メディエーターと呼ばれる種々の物質（例えば、ヒスタミン）を脱顆粒し、そして周囲組織に放出するようにされる。即時型過敏反応を代表する臨床症状（すなわち、気道または腸における平滑筋の収縮、小血管の拡張ならびに水および血漿タンパク質に対するそれらの浸透性の増加、濃粘液の分泌、ならびに皮膚において、赤色化、腫脹、および、かゆみまたは疼痛を生じる神経終末の刺激）を担うのは、これらの物質の生物学的活性である。

【0172】

イミダゾキノリン剤は、特に他の治療剤（例えば、炎症誘発性サイトカインのレベルを調節するために使用される治療剤）と合わせて使用される場合、アレルギー状態および非アレルギー状態（例えば、喘息）の処置において、有意な治療効用を有する。Th2サイトカイン（特にIL-4およびIL-5）は、喘息被験体の気道において増大する。これらのサイトカインは、喘息性炎症応答（IgEアイソトープ転換、好酸球走化性および活性化、ならびに肥満細胞増殖を含む）の重要な局面を促進する。Th1サイトカイン（特にIFN- γ およびIL-12）は、Th2クローンの形成およびTh2サイトカインの産生を抑制し得る。喘息とは、炎症、気道の狭小化、および吸入された薬剤に対する気道の反応性の増大によって特徴付けられる呼吸系の障害をいう。喘息は、絶対的にではないが、頻繁に、アトピー性症状またはアレルギー性症状を伴う。喘息およびアレルギーに関連した本発明の前述の局面のいくつかにおいては、本発明のイミダゾキノリン剤は、直接に被験体の肺に投与されない。

【0173】

喘息の症状は、喘鳴、息切れ、および胸苦しさ、および咳の再発的な発症を含み、これらは気道収縮から生じる。喘息と関連した気道炎症は、多数の生理的变化（例えば、気道上皮の裸出、基底膜の下のコラーゲン沈着、浮腫、肥満細胞活性化、炎症細胞浸潤（好中球、好酸球、およびリンパ球を含む）の観察によって検出され得る。気道炎症の結果として、喘息患者は、しばしば、気道過敏応答性、通気制限、呼吸症状、および疾患慢性を受け得る。通気制限は、急性気管支収縮、気道浮腫、粘液栓形成、および気道再造型を含み、これらの特徴は、しばしば気管支閉塞に至る。喘息のいくつかの場合においては、基底膜下線維症が生じ得、これは、肺機能の持続的な異常に至る。

【0174】

過去数年にわたる研究は、同様に、喘息が、炎症細胞、メディエーター、ならびに気道に常在する他の細胞および組織間の複雑な相互作用から生じるようであることを明らかにした。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、喘息に関連した炎症プロセスにおいて重要な役割を果たす（Djukanovicら、Am. Rev. Respir. Dis. ; 142 : 434 - 457 ; 1990）。これらの細胞は、予め形成されたメディエーターおよび新たに合成されたメディエーター（これらは、局所組織において直接または間接に作用し得る）の分泌を通じて、気道機能に影響し得ると考えられている。Tリンパ球の亜集団（Th2）が、選択的サイトカインの放出による気道におけるアレルギー性炎症の調節、および疾患慢性の樹立において、重要な役割を果たすこともまた認識されている（Robinsonら、N. Engl. J. Med. ; 326 : 298 - 304 ; 1992）。

10

20

30

40

50

【0175】

喘息は、異なる発達段階で生じる複雑な障害であり、そして急性、亜急性、または慢性の症状の度合いに基づいて分類され得る。急性炎症応答は、気道への早期の細胞補充と関連する。亜急性炎症応答には、細胞の補充ならびにより持続した炎症パターンを引き起こす常在細胞の活性化が関与する。慢性炎症応答は、不変レベルの細胞傷害および進行中の修復プロセスによって特徴付けられ、これは、気道において永続的な異常を生じ得る。

【0176】

「喘息を有する被験体」は、炎症、気道の狭小化、および吸入された薬剤に対する気道の反応性の増大によって特徴付けられる呼吸系の障害を有する被験体である。喘息は、絶対的にはないが、頻繁に、アトピー性症状またはアレルギー性症状を伴う。本明細書中で使用される「イニシエーター」は、喘息を引き起こす組成物または環境状態をいう。イニシエーターとしては、アレルゲン、低温、運動、ウイルス感染、SO₂が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0177】

別の局面においては、本発明は、低応答性(hypo-responsive)被験体において障害を処置または予防するための方法を提供する。本明細書中で使用されるように、低応答性被験体とは、障害の処置または予防に対して向けられる処置に以前応答しなかった被験体、またはこのような処置に応答しない危険性を有する被験体である。

【0178】

低応答性である他の被験体としては、障害特有の医薬に不応である被験体が挙げられる。本明細書中で使用されるように、用語「不応」は、処置が生じにくいこと、または処置を生じ得ないことを意味する。このような被験体は、これまで医薬に応答しなかった被験体(すなわち、非応答者である被験体)であり得るか、またはあるいは、それらは、一時は医薬に応答したが、その時以来、それに対して不応性になった被験体であり得る。いくつかの実施形態においては、被験体は、医薬のサブセットに対して不応である被験体である。医薬のサブセットは、少なくとも1つの医薬である。いくつかの実施形態においては、サブセットとは、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の医薬をいう。

20

【0179】

他の実施形態においては、低応答性被験体は、以前に障害の処置または予防に向けられた処置に応答したかしなかったかに関わらず、老年の被験体である。老年被験体は、このような処置に以前に応答した被験体ですら、この処置の将来的な投与に応答しない危険性があると考えられる。同様に、新生児の被験体もまた、障害の処置または予防に向けられた処置に応答しない危険性があると考えられる。重要な実施形態においては、障害は、喘息またはアレルギーである。

30

【0180】

いくつかの局面においては、本発明の方法は、イミダゾキノリン剤の投与の前、その投与と同時に、その投与後に、抗原で処置される被験体を曝露する工程を包含する。

【0181】

本明細書中で使用されるように、用語「～に曝露される」とは、抗原と被験体とを接触させる能動的な工程、またはインピボで被験体を抗原に受動的に曝露することのいずれかをいう。被験体を抗原に能動的に曝露するための方法は、当該分野で周知である。一般に、抗原は、静脈内投与、皮内投与、経口投与、経皮投与、粘膜投与、鼻内投与、気管内投与、または皮下投与のような任意の手段によって、直接に被験体に投与される。抗原は、全身または局所に投与され得る。抗原およびイミダゾキノリン剤を投与するための方法は、以下により詳細に記載される。

40

【0182】

被験体は、抗原が身体内で免疫細胞に曝露するのに有効になる場合、抗原に受動的に曝露される。被験体は、例えば、身体への外来病原体の侵入によって、またはその表面に外来抗原を発現する腫瘍細胞の発生によって、抗原に受動的に曝露され得る。

【0183】

50

被験体が抗原に受動的に曝露される方法は、イミダゾキノリン剤の投与のタイミングに特に依存し得る。例えば、癌または感染性疾患またはアレルギーもしくは喘息応答を発生する危険性のある被験体において、被験体は、その危険性が最も高いとき（すなわち、アレルギーの季節の間、または癌原因因子への曝露の後）、定期的にイミダゾキノリン剤が投与され得る。さらに、イミダゾキノリン剤は、感染性因子に曝露する危険性のある外地に旅行する前に、旅行者に投与され得る。同様に、イミダゾキノリン剤は、被験体が曝露されたとき、またそのようなことがあれば、抗原に対する全身免疫応答または粘膜免疫応答を誘導する生物戦争（*bio warfare*）に曝露される危険性のある兵士または市民に投与され得る。

【0184】

ある場合においては、イミダゾキノリン剤と共に抗原を投与することが望ましく、そして他の場合においては、いかなる抗原も送達されない。抗原は、免疫応答を惹起し得る分子である。用語抗原は、広範には、宿主系によって異物であるとして認識される任意のタイプの分子を含む。抗原としては、細菌抗原、癌抗原、およびアレルギーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0185】

抗原としては、細胞、細胞抽出物、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、多糖、多糖結合体、多糖および他の分子のペプチドおよび非ペプチド模倣物、低分子、脂質、糖脂質、および炭水化物が挙げられるが、これらに限定されない。多くの抗原は、本質的には、タンパク質またはポリペプチドである。これは、一般に、タンパク質およびポリペプチドが炭水化物または脂肪よりも抗原性であるためである。

【0186】

本明細書中で使用されるような用語、実質的に精製されたとは、天然にはそれに付随している他のタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質を実質的に含まないポリペプチドをいう。当業者は、タンパク質精製のための標準的な技術を使用して、ウイルス性または細菌性ポリペプチドを精製し得る。実質的に純粋なポリペプチドは、しばしば、非還元ポリアクリルアミドゲル上に1つの主要なバンドを生じる。部分的にグリコシル化されたポリペプチドまたはいくつかの開始コドンを持つポリペプチドの場合、非還元ポリアクリルアミドゲル上にいくつかのバンドが存在し得るが、これらは、そのポリペプチドについての特有のパターンを形成する。ウイルス性または細菌性ポリペプチドの純度はまた、アミノ末端アミノ酸配列分析によって決定され得る。核酸ベクターによってコードされない他のタイプの抗原（例えば、多糖、低分子、模倣物など）は、上述され、そして本発明内に含まれる。

【0187】

本明細書中で使用される細菌性抗原は、微生物の抗原であり、そしてこれらとしては、ウイルス、細菌、寄生生物、および真菌が挙げられるが、これらに制限されない。このような抗原は、インタクトな生物、ならびに天然の単離物およびそれらのフラグメントまたは誘導體、およびまた、天然微生物抗原に同一であるかまたは類似し、かつその微生物に対して特異的な免疫応答を誘導する合成化合物を含む。化合物は、天然微生物抗原に対する免疫応答（体液性および/または細胞性）を誘導する場合、天然微生物抗原に類似である。このような抗原は、当該分野において慣用的に使用され、当業者に周知である。

【0188】

細菌病原体のポリペプチドとしては、*Aeromonis salmonicida*の鉄制御外膜タンパク質（*IROMP*）、外膜タンパク質（*OMP*）、およびAタンパク質（これは、せつ腫症を引き起こす）、*Renibacterium salmoninarum*のp57タンパク質（これは、細菌性腎疾患（*BKD*）を引き起こす）、*Yersinia*の主要表面関連抗原（*msa*）、表面発現細胞毒素（*mpr*）、表面発現溶血素（*ish*）、および鞭毛性抗原；*Pasteurellosis*の細胞外タンパク質（*ECP*）、鉄制御外膜タンパク質（*IROMP*）および構造タンパク質；*Vibriosis anguillarum*および*V. ordalii*の*OMP*および鞭毛性タンバ

10

20

30

40

50

ク質；Edward siellosis ictaluriiおよびE. tardaの鞭毛性タンパク質、OMPタンパク質、aroA、およびpurA；ならびにIchthyophthiriusの表面抗原；ならびにCytophaga columnariの構造タンパク質および制御タンパク質；ならびにRickettsiaの構造タンパク質および制御タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0189】

寄生生物病原体のポリペプチドとしては、Ichthyophthiriusの表面抗原が挙げられるが、これに限定されない。

【0190】

イミダゾキノリン剤とともに使用され得る他の微生物抗原は、米国（非暫定）特許出願番号第09/801,839号（2001年3月8日出願）に提供される。 10

【0191】

本明細書中で使用されるような癌抗原は、腫瘍または癌細胞表面と関連し、そしてMHC分子の背景において抗原提示細胞の表面で発現された場合に免疫応答を惹起し得る、化合物（例えば、ペプチドまたはタンパク質）である。癌抗原は、癌細胞の粗抽出物を調製する（例えば、Cohenら、1994, Cancer Research, 54:1055に記載のように）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、または公知の抗原の新規合成により、癌細胞から調製され得る。癌抗原は、組換え発現された抗原、その免疫原性部分、または腫瘍全体または癌全体を含むが、それらに限定されない。このような抗原は、組換えまたは当該分野で公知の任意の他の手段によって単離または調製され得る。 20

【0192】

用語「癌抗原」および「腫瘍抗原」は、相互に交換可能に使用され、そしてこれらは、癌細胞によって示差的に発現され、それによって癌細胞を標的するために利用され得る抗原をいう。癌抗原は、見かけ上腫瘍に特異的な免疫応答を潜在的に刺激し得る抗原である。これらの抗原のいくつかは、正常細胞によって、必ずしも発現されないが、コードされている。これらの抗原は、正常細胞において通常サイレントである（すなわち、発現されない）抗原、特定の分化時期でのみ発現される抗原、および一時的に発現される抗原（例えば、胚性抗原および胎児性抗原）として特徴付けられ得る。他の癌抗原は、変異型細胞遺伝子（例えば、癌遺伝子（例えば、活性型ras癌遺伝子）、抑制遺伝子（例えば、変異型p53）、内部欠失または染色体転位から生じる融合タンパク質）によってコードされる。なお他の癌抗原は、ウイルス遺伝子（例えば、RNA腫瘍ウイルスおよびDNA腫瘍ウイルスが保持した遺伝子）によってコードされ得る。腫瘍抗原の例としては、以下が挙げられる：MAGE、MAER-1/Melan-A、gp100、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPPIV）、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）-C017-1A/GA733、癌胎児抗原（CEA）ならびにその免疫原性エピトープCAP-1およびCAP-2、etv6、am11、前立腺特異抗原（PSA）ならびにその免疫原性エピトープPSA-1、PSA-2およびPSA-3、前立腺特異膜抗原（PSMA）、T細胞レセプター/CD3-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、-フェトプロテイン、E-カドヘリン、-カテニン、-カテニンおよび-カテニン、p120ctn、gp100^{Pme1} 30 40 50

117、PRAME、NY-ESO-1、cd27、腺腫様結腸ポリポーシスタンパク質 (APC)、ホドリン、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2ガングリオシドおよびGD2ガングリオシド、ウイルス産物 (例えば、ヒトパピローマウイルススタンパク質)、腫瘍抗原のSmadファミリー、Imp-1、P1A、EBVにコードされる核抗原 (EBNA) - 1、脳グリコ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。

【0193】

癌または腫瘍、およびこのような腫瘍に関連する腫瘍抗原としては (排他的ではないが)、以下が挙げられる: 急性リンパ芽球性白血病 (etv6; am11; シクロフィリンb)、B細胞リンパ腫 (Ig-イディオタイプ)、神経膠腫 (E-カドヘリン; -カテニン; -カテニン; p120ctn)、膀胱癌 (p21ras)、胆管癌 (p21ras)、乳癌 (MUCファミリー; HER2/neu; c-erbB-2)、頸部の癌 (p53; p21ras)、結腸癌 (p21ras; HER2/neu; c-erbB-2; MUCファミリー)、結腸直腸癌 (結腸直腸関連抗原 (CRC) - C017-1A/GA733; APC)、絨毛癌 (CEA)、上皮細胞癌 (シクロフィリンb)、胃癌 (HER2/neu; c-erbB-2; ga733糖タンパク質)、肝細胞癌 (-フェトプロテイン)、ホジキンリンパ腫 (Imp-1; EBNA-1)、肺癌 (CEA; MAGE-3; NY-ESO-1)、リンパ系細胞由来白血病 (シクロフィリンb)、黒色腫 (p15タンパク質、gp75、腫瘍胎児抗原、GM2ガングリオシドおよびGD2ガングリオシド)、骨髄腫 (MUCファミリー; p21ras)、非小細胞肺癌 (HER2/neu; c-erbB-2)、鼻咽頭癌 (Imp-1; EBNA-1)、卵巣癌 (MUCファミリー; HER2/neu; c-erbB-2)、前立腺癌 (前立腺特異抗原 (PSA) ならびにその免疫原性エピトープ PSA-1、PSA-2およびPSA-3; PSMA; HER2/neu; c-erbB-2)、膵臓癌 (p21ras; MUCファミリー; HER2/neu; c-erbB-2; ga733糖タンパク質)、腎臓 (HER2/neu; c-erbB-2)、頸部および食道の扁平上皮癌 (ヒトパピローマウイルススタンパク質のようなウイルス産物)、精巣癌 (NY-ESO-1)、T細胞白血病 (HTLV-1エピトープ)、ならびに黒色腫 (Melan-A/MART-1; cd27; MAGE-3; p21ras; gp100^{Pmel117})。 10 20 30

【0194】

MHCクラスI分子およびMHCクラスII分子のいずれかまたは両方に結合する腫瘍抗原の例は、当該分野において公知である。これらの抗原および他の抗原は、PCT出願PCT/US98/18601に開示されている。

【0195】

イミダゾキノリン薬剤と一緒に使用され得る他の癌抗原は、2001年3月5日に出願された、米国特許出願番号09/800,266に提供されている。

【0196】

「アレルゲン」とは、本明細書中において使用される場合、IgEの産生によって特徴付けられる免疫応答を引き起こし得る分子である。アレルゲンとは、感受性の被験体において、アレルギー応答または喘息応答を誘導し得る物質である。従って、本発明の文脈において、用語アレルゲンとは、IgE抗体によって媒介されるアレルギー応答を誘発し得る抗原の特定の型を意味する。本発明の方法および調製物は、このようなアレルゲン、およびアレルゲンのフラグメントまたはアレルゲンとして働くハプテンの、広範なクラスにわたる。アレルゲンの列挙は膨大であり、そして花粉、昆虫毒液、動物ふけ埃、真菌孢子および薬物 (例えば、ペニシリン) を含み得る。 40

【0197】

イミダゾキノリン薬剤と一緒に使用され得る他のアレルゲンは、2001年2月2日に出願された、米国特許出願番号09/776,479に提供されている。

【0198】

抗原は、核酸ベクターによってコードされる抗原であり得るか、または核酸ベクター中にコードされないかかもしれない。前者の場合において、この核酸ベクターは、被験体に投与され、そしてこの抗原は、インビボで発現される。後者の場合において、この抗原は、被験体に直接投与され得る。核酸ベクター中にコードされない抗原とは、本明細書中において使用される場合、核酸ではない任意の型の抗原をいう。例えば、本発明のいくつかの局面において、核酸ベクター中にコードされない抗原は、ペプチドまたはポリペプチドである。ペプチド抗原またはポリペプチド抗原の一次アミノ酸配列の少しの改変はまた、改変されていない対応ポリペプチドと比較して、実質的に等価な抗原活性を有するポリペプチドを生じ得る。このような改変は、部位特異的変異誘発によってのように故意であり得るか、または自発的であり得る。これらの改変によって産生されるポリペプチドの全ては、抗原性がなお存在する限り、本明細書中に包含される。ペプチドまたはポリペプチドは、例えば、ウイルス由来であり得る。本発明において有用な抗原は、全長タンパク質またはポリペプチドの小さなペプチドフラグメントから全長形態までの範囲の、任意の長さであり得る。例えば、抗原は、5アミノ酸残基長未満、8アミノ酸残基長未満、10アミノ酸残基長未満、15アミノ酸残基長未満、20アミノ酸残基長未満、30アミノ酸残基長未満、50アミノ酸残基長未満、70アミノ酸残基長未満、100アミノ酸残基長未満、またはより多くのアミノ酸残基長であり得、但し、本発明のイミダゾキノリン薬剤および/または他の薬剤と組み合わせて使用される場合に、特異的免疫応答を刺激する。

10

【0199】

抗原をコードする核酸は、真核生物細胞において抗原核酸の発現を指向する遺伝子発現配列に、作動可能に連結される。遺伝子発現配列は、任意の調節ヌクレオチド配列であり得、例えば、プロモーター配列またはプロモーター-エンハンサーの組み合わせであり、これは、それが作動可能に連結された抗原核酸の効率的な転写および翻訳を容易にする。遺伝子発現配列は、例えば、哺乳動物プロモーターまたはウイルスプロモーター（例えば、構成プロモーターまたは誘導性プロモーター）であり得る。構成哺乳動物プロモーターとしては、以下の遺伝子に対するプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、b-アクチンプロモーターおよび他の構成プロモーター。真核生物細胞において構成的に機能する、例示的なウイルスプロモーターとしては、例えば、以下が挙げられる：サイトメガロウイルス（CMV）、シミアンウイルス（例えば、SV40）、パピローマウイルス、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ラウス肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血球ウイルスおよび他のレトロウイルスの長い末端反復（LTR）、ならびに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター由来のプロモーター。他の構成プロモーターは、当業者に公知である。本発明の遺伝子発現配列として有用なプロモーターはまた、誘導性プロモーターを含む。誘導性プロモーターは、誘導薬剤の存在下で発現される。例えば、メタロチオネインプロモーターは、特定の金属イオンの存在下で、転写および翻訳を促進するように誘導される。他の誘導性プロモーターは、当業者に公知である。

20

30

【0200】

一般に、遺伝子発現配列は、必然的に、5'非転写配列および5'非翻訳配列を含むべきであり、これらは、それぞれ転写および翻訳の開始に関与し、例えば、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などである。特に、このような5'非転写配列は、プロモーター領域を含み、この領域は、作動可能に結合した抗原核酸の転写制御のためのプロモーター領域を含む。遺伝子発現配列は、必要に応じて、望ましいように、エンハンサー配列または上流アクチベーター配列を含む。

40

【0201】

抗原核酸は、遺伝子発現配列に作動可能に連結される。本明細書中において使用される場合、抗原核酸配列および遺伝子発現配列は、これらが、抗原コード配列の発現あるいは転写および/または翻訳を、遺伝子発現配列の影響下または制御下に置く様式で共有結合する場合に、作動可能に連結されるといわれる。2つのDNA配列は、5'遺伝子発現配

50

列におけるプロモーターの誘導が、抗原配列の転写を生じ、そして2つのDNA配列間の結合の性質が：(1)フレームシフト変異の導入を生じない、(2)プロモーター領域が抗原配列の転写を指向する能力を妨害しない、または(3)対応するRNA転写産物がタンパク質に翻訳される能力を妨害しない場合に、作動可能に連結されているといわれる。従って、遺伝子発現配列は、得られる転写産物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳されるように、遺伝子発現配列が抗原核酸配列の転写をもたらし得る場合に、この抗原核酸配列に作動可能に連結される。

【0202】

本発明の抗原核酸は、単独でかまたはベクターと組み合わせて、免疫系に送達され得る。この最も広い意味において、ベクターとは、抗原が免疫細胞の表面に発現および提示され得るように、抗原核酸の、免疫系の細胞への移入を容易にし得る任意のビヒクルである。ベクターは、一般に、ベクターの非存在下で生じる分解の程度に対して減少した分解で、核酸を免疫細胞に運ぶ。ベクターは、必要に応じて、上記遺伝子発現配列を含み、免疫細胞において抗原核酸の発現を増強する。一般に、本発明において有用なベクターとしては、プラズミド、ファージミド、ウイルス、抗原核酸配列の挿入または組み込みによって操作されたウイルス表面または細菌表面由来の他のビヒクルが挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスベクターは、ベクターの好ましい型であり、そして以下のウイルス由来の核酸配列が挙げられるが、これらに限定されない：レトロウイルス(例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス、Harvey Maus 肉腫ウイルス、Maus 乳腺癌ウイルス、および Raus 肉腫ウイルス)；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス；SV40型ウイルス；ポリオウイルス；エプスタイン-バーウイルス；パピローマウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；ならびにRNAウイルス(例えば、レトロウイルス)。名称を列挙しないが当該分野において公知の他のベクターを、容易に使用し得る。

【0203】

好ましいウイルスベクターは、非必須遺伝子が目的の遺伝子で置き換えられている、非細胞障害性真核生物ウイルスに基づく。非細胞障害性ウイルスとしては、レトロウイルスが挙げられ、その生活環は、ゲノムRNAからDNAへの逆転写、引き続く宿主細胞DNAへのプロウイルス取り込みを包含する。レトロウイルスは、ヒト遺伝子療法試行が認められている。最も有用なものは、複製欠損であるレトロウイルスである(すなわち、所望のタンパク質の合成を指向し得るが、感染性粒子の製造が不可能である)。このような遺伝子的に変更されたレトロウイルス発現ベクターは、インビボでの遺伝子の高効率の形質導入のための、一般的な有用性を有する。複製欠損レトロウイルスを産生するための標準的なプロトコル(外因性遺伝材料の、プラスミドへの取り込み、プラスミドでのパッケージング細胞株の形質転換、パッケージング細胞株による組換えレトロウイルスの産生、組織培養培地からのウイルス粒子の収集、およびウイルス粒子での標的細胞の感染の工程を包含する)は、Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual W.H. Freeman C.O., New York (1990) および Murray, E.J. Methods in Molecular Biology, 第7巻, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991) に提供される。

【0204】

特定の適用のための好ましいウイルスは、アデノ随伴ウイルス(二本鎖DNAウイルス)である。アデノ随伴ウイルスは、複製欠損になるように操作され得、そして広範な細胞型および種を感染し得る。これはさらに、以下のような利点を有する：熱および脂質溶媒に対する安定性；様々な系統の細胞(造血細胞が挙げられる)における高い形質導入頻度；および重複感染阻害の欠如、従って、複数のシリーズの形質導入を可能にすること。報告されるように、野生型アデノ随伴ウイルスは、ヒト細胞DNA内への取り込み部位に対していくらか優先を示し、これによって、挿入変異誘発の可能性およびレトロウイルス感染に特徴的な挿入遺伝子発現の多様性を最小にする。さらに、野生型アデノ随伴ウイルス

感染は、選択的圧力の非存在下で、組織培養において100継代を超えて持ち越され、アデノ随伴ウイルスゲノムの取り込みは、比較的安定な事象であることを示唆する。アデノ随伴ウイルスはまた、染色体外の様式で機能し得る。レプリカーゼタンパク質を欠く組換えアデノ随伴ウイルスは、明らかに、この取り込み配列特異性を欠く。

【0205】

他のベクターとしては、プラスミドベクターが挙げられる。プラスミドベクターは、当該分野において広範に記載されており、そして当業者に周知である。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照のこと。最近数年において、プラスミドベクターは、宿主ゲノム中の複製および宿主ゲノム内への取り込みが不可能であることに起因して、インピボで遺伝子を細胞に送達するために特に有利であることが見出された。しかし、これらのプラスミドは、宿主細胞と適合性のプロモーターを有するので、このプラスミド中に作動可能にコードされる遺伝子からペプチドを発現し得る。通常使用されるプラスミドのいくつかとしては、pBR322、pUC18、pUC19、pRC/CMV、SV40、およびpBlueScriptが挙げられる。他のプラスミドが、当業者に周知である。さらに、プラスミドは、制限酵素およびライゲーション反応を使用して、特定のDNAフラグメントを除去および付加することによって、あつらえて設計され得る。

【0206】

プラスミドを保有する遺伝子は、細菌を使用して免疫系に送達され得ることが、最近発見された。Salmonellaのような細菌の改変形態は、プラスミドでトランスフェクトされ得、そして送達ビヒクルとして使用され得る。細菌送達ビヒクルは、宿主被験体に、経口投与され得るか、または他の投与手段によって投与され得る。細菌は、プラスミドを、おそらく腸障壁を通過することによって、免疫細胞（例えば、B細胞、樹状細胞）に送達する。高レベルの免疫保護が、この方法論を使用して確立されている。このような送達方法は、抗原、イミダゾキノリン薬剤および/または他の治療剤の全身送達を利用する本発明の局面に有用である。

【0207】

本発明のいくつかの局面において、イミダゾキノリン薬剤は、治療剤（例えば、障害特異的医薬）と共に投与される。本明細書中において使用される場合、障害特異的医薬とは、障害の処置または予防において主として使用される治療または薬剤である。1つの局面において、イミダゾキノリン薬剤は、被験体に、抗菌剤と共に投与され得る。抗菌剤とは、本明細書中において使用される場合、感染性生物を殺傷または阻害し得る、天然に存在する化合物または合成化合物をいう。本発明に従って有用な抗菌剤の型は、被験体が感染されるかまたは感染される危険のある生物の型に依存する。

【0208】

1つの局面において、本発明は、障害を処置または予防する方法を提供する。この方法は、このような処置を必要とする被験体に、障害を予防または処置するための有効量での、イミダゾキノリン薬剤と障害特異的医薬との相乗的な組み合わせの投与に関する。

【0209】

1つの局面において、イミダゾキノリン薬剤とこのような障害特異的処置医薬との組み合わせは、これらの高い用量で通常経験されるのと同じように多くの副作用もなく、より高い用量の障害特異的医薬の投与を可能にする。別の局面において、イミダゾキノリン薬剤と障害特異的医薬との組み合わせは、いずれかの化合物の低い、準治療的(sub-therapeutic)用量の投与を可能にするが、より高い効果は、このような低い用量を使用して他に達成される。1つの例として、イミダゾキノリン薬剤と医薬との組み合わせを投与することによって、この医薬が単独では治療的利益を提供しない用量（すなわち、準治療的用量）で投与されるとしても、有効な応答を達成することを可能にする。別の例として、イミダゾキノリン薬剤が、単独では治療的利益を提供しない用量で投与されるとしても、組み合わせの投与は、応答を達成する。

10

20

30

40

50

【0210】

イミダゾキノリン薬剤はまた、固定されたスケジュールまたは互いに異なる時間的關係で投与され得る。種々の組み合わせは、免疫応答の調節あるいは障害を予防するまたは処置する先行技術の方法を超えて、特に、正常な組織に対する減少した非特異的毒性に関して、多くの利点を有する。

【0211】

本発明は、障害の予防および/または処置に有用な相乗効果を提供するために、障害特異的医薬を伴うイミダゾキノリン薬剤の投与を包含する。イミダゾキノリン薬剤の有益な効果は、これらの薬剤によるTh1免疫応答の調節および刺激に一部起因する。本発明のイミダゾキノリンは、以下に挙げられるが、これらに限定されない多数の機構を介して相乗応答を提供し得る：癌治療の最中またはその後の造血回復(hemopoietic recovery)の刺激、抗微生物感染活性、免疫細胞および非免疫細胞による(医薬の性質に依存する)障害特異的医薬の取り込みの増強、ならびに一般的にアレルゲンおよびより具体的には医薬に対するアレルギー応答の阻害または予防。

10

【0212】

イミダゾキノリン薬剤は、細菌感染、真菌感染、寄生生物感染およびウイルス感染に対する防御機構を増強するように機能する。免疫無防備状態の癌患者におけるこのような感染の予防および制御は、疾患の処置および管理における主な挑戦である。このような感染は、通常、癌患者の処置の過程を不利に遅延し得るかまたは改変し得る。核酸によって刺激された細胞性免疫応答および体液性免疫応答は、侵入してくる病原体に対する身体自身の天然の防御システムを示す。イミダゾキノリン薬剤は、微生物感染の除去において最も有効であることが公知の生得的免疫の活性化を通してこの機能を行う。生得的免疫の増強が、特に、増加したIFN-生産および増加したNK細胞活性(これらの両方が微生物感染の処置に有効である)を介して生じる。イミダゾキノリン薬剤はまた、抗体依存性細胞傷害の増強によって機能する。後者の機構は、核酸の持続性効果を提供し、それによって、投薬レジームを減少し、コンプライアンスおよび維持療法を改善し、緊急の状況を減少し;そして生活の質を改善する。癌患者における一般的な日和見感染のいくつかの例は、以下によって引き起こされる: *Listeria monocytogenes*、*Pneumocystis carinii*、サイトメガロウイルス、*Mycobacterium tuberculosis*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Haemophilus influenzae*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Nocardia*、*Candida*、*Aspergillus*および疱疹ウイルス(例えば、単純疱疹ウイルス)。

20

30

【0213】

癌の処置が行なわれている被験体は、投与される癌医薬処方物に対する有害なアレルギー反応を経験する場合が時々ある。この反応は、癌医薬自体に対して、または癌医薬処方物内に含まれる他の物質(例えば、処方物内のキャリア物質、安定剤または滅菌剤)に対して、特異的であり得る。投与の際に、しばしばアレルギー反応の引き金となる医薬の例は、タキソールの処方物である。反応は、このような医薬の使用をより所望でなくするので、最低限、アレルギー反応を避けるために、治療的用量未満の医薬の投与の原因になり得る。本発明は、イミダゾキノリン薬剤の投与によってこのような有害な反応を避けるための方法を提供する。アレルギー反応の完全な減少または除去はまた、治療的用量よりも多い、または少なくとも現在投与される用量よりも多い用量での障害特異的医薬の投与を可能にし得る。

40

【0214】

本発明のイミダゾキノリン薬剤はまた、輸血を受けている被験体における有害なアレルギー反応の調節に有用である。癌の処置を受けている被験体は、しばしば、赤血球および/または血小板を輸血する必要がある。他からのこれらの細胞型の不完全な分離またはこ

50

これらの血液産物のドナーとレシピエントとの間の副組織適合性の遺伝子型の違いのいずれかに起因して、注入された被験体は、輸血に対する急性のアレルギー反応を経験し得る。主にTh2型応答であるこの反応に対抗するために、患者は、抗ヒスタミンのようなアレルギー薬剤を投与される。イミダゾキノリン薬剤は、Th1応答を誘発するので、被験体は、他に生じ得るTh2アレルギー反応を予防または減少するために、輸血の前または同時にイミダゾキノリン薬剤を投与され得る。

【0215】

喘息/アレルギー医薬と組合わされる場合、イミダゾキノリン薬剤は、喘息およびアレルギーの処置のための単独の各組成物を超える多くの利点を有する。イミダゾキノリン薬剤は、いくつかの局面において、気道炎症および気管支痙攣 (bronchial spasm) を生じ得るTh2型免疫応答 (IL-4、IGE生産、ヒスタミン放出) を同時に抑制することによって、および/または無害の抗体および細胞応答を促進するTh1型免疫応答 (IFN- およびIL-12生産) を誘導することによって機能する。これは、過敏反応が発生することを安全にかつ効果的に予防し、それによって症状を除去する身体の内側の環境を創造する。

10

【0216】

本発明の方法に使用される場合、イミダゾキノリン薬剤は、気管支高反応性、気管支収縮、気管支閉塞、気道炎症およびアトピーを除去/減少し得 (これは、喘息制御を改善し、肺機能を正常化し、不可逆的な気道損傷を予防する)、そしてまた、運動、冷たく乾燥した空気およびSO₂に対する急性応答を阻害し得る。イミダゾキノリン薬剤は、持続性の効果を提供し、従って、投薬レジームを減少し、コンプライアンスおよび維持療法を改善し、緊急の状況を減少し;そして生活の質を改善する。これらの化合物はまた、有用である。なぜならこれらは初期の抗感染活性 (感染のエピソードの減少をもたらし、さらに高反応性免疫応答を減少する) を提供するからである。このことは、子供または免疫無防備状態の被験体のような被験体において特にあてはまる。さらに、イミダゾキノリン薬剤の使用は、より単純でかつより安全な送達を提供し、そして使用されるべき薬剤をより少なくすることによって、高感受性反応を悪化させ得る吸入器の使用を減少/除去する。

20

【0217】

抗微生物剤としては、限定されないが以下が挙げられる: 抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤および抗寄生生物剤。「抗感染剤」、「抗菌剤」、「抗ウイルス剤」、「抗真菌剤」、「抗寄生生物剤」および「殺寄生生物薬」のような句は、当業者に十分に確立された意味を有し、そして標準の医療用テキストに定義される。抗微生物剤は、細菌を殺傷するかまたは阻害し、そして抗生物質ならびに類似の機能を有する他の合成化合物または天然の化合物を含む。抗生物質は、細胞 (例えば、微生物) による二次代謝物として生成される低分子量分子である。一般的に、抗生物質は、微生物に対して特異的であり、そして宿主細胞に存在しない、1つ以上の細菌性機能または構造を妨害する。天然の供給原から単離され得るかまたは合成され得る抗ウイルス剤は、ウイルスを殺傷するかまたは阻害するのに有用である。抗真菌剤を使用して、表在性の真菌感染ならびに日和見性感染および原発性の全身性真菌感染 (primary systemic fungal infection) を処置する。抗寄生生物剤は、寄生生物を殺傷するかまたは阻害する。

30

40

【0218】

抗感染治療での問題の1つは、抗感染剤で処置される宿主に生じる副作用である。例えば、多くの抗感染剤は、広域スペクトルの微生物を殺傷し得るかまたは阻害し得、そして種の特定の型に対して特異的でない。これらの型の抗感染剤を用いた処置は、宿主中の生きた通常の微生物叢ならびに感染性の微生物の殺傷を生じる。微生物叢は、感染性病原体と競合しそしてそれらに対するバリアとして機能するので、微生物叢の損失は、疾患の合併症をもたらし得、そして他の病原体による感染に対して宿主を感染しやすくする。他の副作用は、非微生物細胞または宿主の組織上のこれらの化学実体の特異的または非特異的効果の結果として生じ得る。

【0219】

50

抗感染剤の広範の使用での別の問題は、微生物の抗生物質耐性株の発生である。すでに、バンコマイシン耐性 *enterococci* 株、ペニシリン耐性 *pneumococci* 株、多剤耐性 *S. aureus* 株、および多剤耐性 *tuberculosis* 株発生し、そして主な臨床的問題になっている。抗感染剤の広範の使用は、細菌の多くの抗生物質耐性株を生成するようである。結果として、新しい抗感染戦略は、これらの微生物と戦うために必要である。

【0220】

抗菌剤の大きなクラスが、抗生物質である。広範の細菌を殺傷するかまたは阻害するのに効果的な抗生物質は、広域スペクトルの抗生物質という。抗生物質の他の型は、グラム陽性またはグラム陰性のクラスの細菌に対して優勢に効果的である。抗生物質のこれらの型は、狭いスペクトルの抗生物質という。単一の生物または疾患に対して有効であり、そして他の型の細菌に対して有効でない他の抗生物質は、限定されたスペクトルの抗生物質という。

10

【0221】

抗菌剤は、時々、それらの主な作用様式に基づいて分類される。一般的に、抗菌剤は、細胞壁合成インヒビター、細胞膜インヒビター、タンパク質合成インヒビター、核酸合成インヒビターまたは機能的インヒビターおよび競合的インヒビターである。細胞壁合成インヒビターは、細胞壁合成のプロセス、および一般的に、細菌ペプチドグリカンの合成における工程を阻害する。細胞壁合成インヒビターとしては、 β -ラクタム抗生物質、天然のペニシリン、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挙げられる。

20

【0222】

β -ラクタムは、ペプチドグリカン合成の最後の工程を阻害する4員の β -ラクタム環を含む抗生物質である。penicilliumによって生成された β -ラクタム抗生物質は、天然のペニシリン（例えば、ペニシリンGまたはペニシリンV）である。天然のペニシリンは、狭いスペクトルの活性を有し、そして一般的に *Streptococcus*、*Gonococcus* および *Staphylococcus* に対して有効である。グラム陽性菌に対してもまた有効である天然のペニシリンの他の型としては、ペニシリンF、ペニシリンX、ペニシリンKおよびペニシリンOが挙げられる。

30

【0223】

半合成ペニシリンは、一般的に、カビによって生成された分子6-アミノペニシラン酸の改変体である。6-アミノペニシラン酸は、側鎖の付加によって改変され得、これにより天然のペニシリンよりも広域スペクトルの活性または種々の他の有利な特性を有するペニシリンが生成される。半合成ペニシリンのいくつかの型は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して広域スペクトルを有するが、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としては、アンピシリン、カルペニシリン、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挙げられる。半合成ペニシリンの他の型は、グラム陽性菌に対して狭い活性を有するが、ペニシリナーゼによって不活性化されないような開発された特性を有する。これらとしては、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挙げられる。広域スペクトルの半合成ペニシリンのいくつかは、 β -ラクタマーゼインヒビター（例えば、クラブラン酸 (clavulamic) およびスルバクタム）と組み合わせて使用され得る。 β -ラクタマーゼインヒビターは、抗菌作用を有さないが、これらはペニシリナーゼを阻害するように機能し、従って、分解から半合成ペニシリンを保護する。

40

【0224】

天然および半合成の両方のペニシリンに関連する重篤な副作用の1つは、ペニシリンアレルギーである。ペニシリンアレルギーは非常に重篤であり、そして急速に死亡を引き起こし得る。ペニシリンに対してアレルギー性である被験体において、 β -ラクタム分子は、IgE媒介炎症性応答を開始する血清タンパク質に結合する。炎症性応答は、アナフィラキシーおよびおそらく死をもたらす。

50

【0225】

-ラクタム抗生物質の別の型は、セファロsporin (cephalosporin) である。これらは、細菌性 -ラクタマーゼによる分解に感受性であり、従って、以前から単独では有効でない。しかし、セファロsporinはペニシリナーゼに耐性である。これらは、種々のグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して有効である。セファロsporinとして以下が挙げられるが、これらに限定されない：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、セファクロール、セファゾリン、セフロキシム (cefuroxime)、セフォキシチン、セフォタキシム、セフスロジン (cef sulod in)、セフェトメット (cef et am et)、セフィキシム (cef ix ime)、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフトジジムおよびモキサラクタム。

10

【0226】

バシトラシンは、細胞壁合成を阻害する抗生物質の別のクラスである。バシトラシンは、グラム陽性菌に対して有効であるが、その使用は、一般的にその高い毒性に起因して局所的な投与に限定される。より低い有効用量のバシトラシンは、この化合物が本発明のイミダゾキノリン薬剤と共に投与される場合に使用され得るので、この化合物は、全身に使用され得、そして毒性を減少する。

【0227】

カルバペネム (carbapenem) は、別の広域スペクトルの -ラクタム抗生物質であり、細胞壁合成を阻害し得る。カルバペネムの例としてはイミペネムが挙げられるが、これらに限定されない。モノバクタムはまた、広域スペクトルの -ラクタム抗生物質であり、そしてこれにはユーズトレオナム (euztreonam) が挙げられる。streptomycetesによって生成される抗生物質 (バンコマイシン) はまた、細胞膜合成を阻害することによってグラム陽性菌に対して有効である。

20

【0228】

抗菌剤の別のクラスは、細胞膜インヒビターである抗菌剤である。これらの化合物は、細菌性膜の構造を乱すか、またはその機能を阻害する。細胞膜インヒビターである抗菌剤の1つの問題は、細菌および真核生物の膜におけるリン脂質の類似性に起因して、これらが真核生物細胞ならびに細菌において効果を生じ得ることである。従って、これらの化合物は、これらの化合物を全身に使用されることを許容するのに十分に特異的であることは稀であり、そして局所的投与のための高い用量での使用を防止する。

30

【0229】

臨床的な細胞膜インヒビターの1つは、ポリミキシンである。ポリミキシンは、グラム陰性菌に対して主に有効であり、そして一般的に、低い毒性の抗生物質に耐性である重篤なPseudomonas感染またはPseudomonas感染において使用される。この化合物の全身投与に関連する重篤な副作用としては、腎臓および他の器官に対する損傷が挙げられる。

【0230】

他の細胞膜インヒビターとしては、アンホテリシンBおよびナイスタチンが挙げられ、これらはまた、それぞれ全身性真菌感染およびCandida酵母感染の処置に主に使用される抗真菌剤である。イミダゾールは、細胞膜インヒビターである抗生物質の別のクラスである。イミダゾールは、細菌剤 (bacterial agent) ならびに抗真菌剤として使用される (例えば、酵母感染、皮膚糸状菌 (dermatophytic) 感染、および全身性真菌感染の処置のために使用される)。イミダゾールとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：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。

40

【0231】

多くの抗菌剤は、タンパク質合成インヒビターである。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のを防止し、従って、細菌の細胞増殖または機能の阻害あるいは細胞死を引き起こす。転写をブロックする抗菌剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：リファンピンおよびエタンブトール。酵素RNAポリメラー

50

ぜを阻害するリファンピンは、広域スペクトル活性を有し、そしてグラム陽性菌およびグラム陰性菌ならびに *Mycobacterium tuberculosis* に対して有効である。エタンブールは、*Mycobacterium tuberculosis* に対して有効である。

【0232】

転写をブロックする抗菌剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：テトラサイクリン、クロラムフェニコール、マクロライド系抗生物質（例えば、エリスロマイシン）およびアミノ配糖体（例えば、ストレプトマイシン）。

【0233】

アミノ配糖体は、細菌 *Streptomyces* によって生成される抗生物質のクラスである（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、アミルカシン、ゲンタマイシン）。アミノ配糖体は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌によって引き起こされる広範な種々の細菌感染に対して使用されている。ストレプトマイシンは、結核症の処置における主な薬物として広範に使用されている。ゲンタマイシンは、多くの株のグラム陽性菌およびグラム陰性菌（*Pseudomonas* 感染を含む）に対して、特にトブラマイシンと組み合わせて使用される。カナマイシンは、多くのグラム陽性菌（ペニシリン耐性 *Staphylococci* を含む）に対して使用される。臨床的に使用が限定されたアミノ配糖体の副作用の1つは、効力に必要な投薬量での、長期の使用は、腎臓機能を損なうことが示され、そして聴覚消失症をもたらす聴神経に対する損傷を引き起こす。

【0234】

翻訳インヒビターの抗菌剤の別の型は、テトラサイクリンである。テトラサイクリンは、広域スペクトルである抗生物質のクラスであり、そして広範のグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して有効である。テトラサイクリンの例としては、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挙げられる。これらは、多くの型の細菌の処置に重要であるが、ライム病の処置において特に重要である。これらの低い毒性および最小の直接的な副作用の結果として、テトラサイクリンは、医学界によって乱用されそして誤用されており問題をもたらしている。例えば、これらの乱用は、耐性の広範な発達をもたらす。本発明のイミダゾキノリン薬剤と組み合わせて使用される場合、これらの問題は、最小化され得、そしてテトラサイクリンは、多くの細菌の広域スペクトルの処置について有効に使用され得る。

【0235】

抗菌剤（例えば、マクロライド）は、50Sリボソームサブユニットに可逆的に結合し、そしてペプチジルトランスフェラーゼによるタンパク質の伸長を阻害するか、または細菌性リボソームからの荷物を持っていない（uncharged）いないtRNAの放出を阻止するか、あるいは両方を行う。これら化合物としては、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挙げられる。エリスロマイシンは、ほとんどのグラム陽性菌、*Neisseria*、*Legionella* および *Haemophilus* に対して活性であるが、*Enterobacteriaceae* に対して活性ではない。タンパク質合成の間、ペプチド結合形成をブロックするリンコマイシンおよびクリンダマイシンは、グラム陽性菌に対して使用される。

【0236】

翻訳インヒビターの別の型は、クロラムフェニコールである。クロラムフェニコールは、70Sリボソームを結合して細菌性酵素のペプチジルトランスフェラーゼを阻害し、それによって、タンパク質合成の間、ポリペプチド鎖の成長を阻止する。クロラムフェニコールに関連する重篤な副作用の1つは、再生不良性貧血である。再生不良性貧血は、患者の小さい割合（1/50,000）において細菌を処置するために有効なクロラムフェニコールの用量で発症する。かつて高く処方された抗生物質であるクロラムフェニコールは、貧血から死を引き起こすとして現在では滅多に使用されない。その有効性に起因にして、生命を危うくする状況（例えば、腸チフス）において、未だに使用される。イミダゾキノリン薬剤とクロラムフェニコールとを組み合わせることによって、これらの化合物は、抗

10

20

30

40

50

菌剤として再び使用され得る。なぜなら、イミダゾキノリン薬剤は、使用されるべきクロラムフェニコールの低い用量（副作用を発症しない用量）を可能にするからである。

【0237】

いくつかの抗菌剤は、核酸の合成または機能を破壊する（例えば、DNAまたはRNAに結合し、その結果これらのメッセージを読み得ない）。これらとして、以下が挙げられるが、これらに限定されない：キノロン類およびコトリモキサゾール、合成化学物質およびリファマイシンの両方、天然または半合成化学物質。キノロン類は、DNAジャイレース（この酵素は、これらの環状DNAを生成するために細菌に必要である）を阻害することによって細菌のDNA複製をブロックする。これらは広域スペクトルであり、そして例として、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（temafloxacin）が挙げられる。ナリジクス酸は、DNAジャイレース酵素（トポイソメラーゼ）（これはDNA複製に必須であり、スーパーコイルが緩和され、そして再形成されるのを可能にする）に結合し、DNAジャイレース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、低部尿路感染症（UTI）の処置においてである。なぜなら、いくつかの型のグラム陰性菌（例えば、UTIの一般的な原因である*E. coli*、*Enterobacter aerogenes*、*K. pneumoniae*および*Proteus*種）に対して有効であるからである。コトリモキサゾールは、スルファメトキサゾールおよびトリメトプリムの組み合わせであり、DNAヌクレオチドを作製するのに必要な葉酸の細菌性合成をブロックする。リファンピシンは、グラム陽性菌（*Mycobacterium tuberculosis*および*Neisseria meningitidis*によって引き起こされた髄膜炎を含む）およびいくつかのグラム陰性菌に対して活性であるリファマイシンの誘導体である。リファンピシンは、ポリメラーゼのサブユニットに結合し、そしてポリメラーゼを活性化するのに必要な第1のヌクレオチドの付加をブロックし、それによってmRNA合成をブロックする。

10

20

【0238】

抗菌剤の別のクラスは、細菌性酵素の競合的インヒビターとして機能する化合物である。これらの競合的インヒビターは、細菌性の増殖因子にほぼ全てが構造的に類似し、そして結合について競合するが、細胞中で代謝機能を行なわない。これらの化合物としては、スルホンアミド、およびなおより高くかつ広範の抗菌活性を有するスルホンアミドの化学的に改変された形態が挙げられる。スルホンアミド（例えば、ガントリシン（gantrisin）およびトリメトプリム）は、*Streptococcus pneumoniae*、 β -溶血性*streptococci*および*E. coli*の処置に有用であり、*E. coli*によって引き起こされた無併発性のUTIの処置、および髄膜炎菌性髄膜炎の処置に使用されている。

30

【0239】

本発明の方法および組成物に使用され得る他の抗菌剤は、米国（非暫定）特許出願第09/801,839（2001年3月8日に出願された）に列挙される。

【0240】

抗ウイルス剤は、ウイルスによる細胞の感染または細胞内でのウイルスの複製を予防する化合物である。抗菌薬物よりも少ない多数の抗ウイルス剤が存在する。これは、ウイルス複製のプロセスが、宿主細胞内のDNA複製に非常に密接に関連しているため、非特異的抗ウイルス剤が、しばしば宿主に対して毒性であることに起因する。抗ウイルス剤によって遮断または阻害され得る、ウイルス感染のプロセス内のいくつかの段階が存在する。これらの段階としては、以下が挙げられる：宿主細胞へのウイルスの結合（免疫グロブリンまたは結合ペプチド）、ウイルスの脱外被（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）、ウイルスのRNAまたはDNAの複製（例えば、ヌクレオシドアナログ）、新規ウイルスタンパク質の成熟（例えば、プロテアーゼインヒビター）ならびにウイルスの出芽および放出。

40

【0241】

別のカテゴリーの抗ウイルス剤は、ヌクレオチドアナログである。ヌクレオチドアナロ

50

グは、ヌクレオチドに類似するが、不完全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、合成化合物である。一旦ヌクレオチドアナログが細胞中に入ると、これらは、リン酸化されて、ウイルスのDNAまたはRNA中への取り込みについて正常なヌクレオチドと競合する形態の三リン酸を生成する。一旦ヌクレオチドアナログの三リン酸形態が成長する核酸鎖に取り込まれると、これは、ウイルスポリメラーゼとの不可逆的な会合を引き起こし、従って、鎖の終結を引き起こす。ヌクレオチドアナログとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アシクロビル（単純疱疹ウイルスおよび水痘-帯状疱疹ウイルスの処置に使用される）、ガンシクロビル（サイトメガロウイルスの処置に有用である）、イドクスウリジン、リバピリン（RSウイルスの処置に有用である）、ジデオキシイノシン、ジデオキシシチジンおよびジドブジン（アジドチミジン）。

10

【0242】

別のクラスの抗ウイルス剤は、インターフェロンのようなサイトカインである。インターフェロンは、ウイルス感染細胞ならびに免疫細胞によって分泌されるサイトカインである。インターフェロンは、感染細胞に隣接する細胞上の特異的レセプターに結合し、ウイルスによる感染から細胞を保護する細胞内の変化を引き起こすことによって、機能する。

インターフェロンおよびインターフェロンは、感染細胞の表面上でのクラスIおよびクラスIIのMHC分子の発現を誘導し、宿主免疫細胞認識についての抗原提示の増大を生じる。インターフェロンおよびインターフェロンは、組換え形態として入手可能であり、そして慢性のB型肝炎感染およびC型肝炎感染の処置のために使用されてきた。抗ウイルス治療について有効な投薬量にて、インターフェロンは、重篤な副作用（例えば、熱、倦怠感および体重減少）を有する。

20

【0243】

免疫グロブリン治療剤は、ウイルス感染の予防に使用される。ウイルス感染についての免疫グロブリン治療剤は、細菌感染とは異なる。なぜなら、抗原特異的であるのではなく、免疫グロブリン治療剤は、細胞外ビリオンに結合し、そしてこれらのビリオンがウイルス感染に対して感受性の細胞に結合および侵入することを予防することによって機能するからである。この治療剤は、宿主中に抗体が存在する期間にわたるウイルス感染の予防のために有用である。一般に、2つの型の免疫グロブリン治療剤（正常免疫グロブリン治療剤および超免疫グロブリン治療剤）が存在する。正常免疫グロブリン治療剤は、正常な血液ドナーの血清から調製され、そしてプールされる抗体産物を利用する。このプールされた産物は、広範なヒトウイルス（例えば、A型肝炎ウイルス、パルボウイルス、エンテロウイルス（特に新生児における））に対する、低力価の抗体を含む。超免疫グロブリン治療剤は、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利用する。次いで、これらの抗体を、特定のウイルスに対して使用する。超免疫グロブリンの例としては、帯状ヘルペス免疫グロブリン（免疫無防備状態の小児および新生児における水痘の予防のために有用である）、ヒト狂犬病免疫グロブリン（狂犬病動物に噛み付かれた被験体の曝露後予防において有用である）、B型肝炎免疫グロブリン（特にウイルスに曝露された被験体における、B型肝炎ウイルスの予防において有用である）、およびRSV免疫グロブリン（RSウイルス感染の処置において有用である）が挙げられる。

30

【0244】

別の型の免疫グロブリン治療剤は、能動免疫法である。これは、ウイルス表面タンパク質に対する抗体または抗体フラグメントの投与を包含する。B型肝炎の能動免疫のために利用可能な2つの型のワクチンとしては、血清由来のB型肝炎抗体および組換えB型肝炎抗体が挙げられる。両方とも、HBsAgから調製される。これらの抗体は、B型肝炎ウイルスによる感染の危険性が高い被験体（例えば、医療従事者、慢性キャリアの性的パートナーおよび乳児）に、3回の用量で投与される。

40

【0245】

免疫グロブリン治療剤とのイミダゾキノリン薬剤の併用はまた、本明細書中に考察されるように、イミダゾキノリン薬剤がADCCを増強する能力を介して、利益を提供する。

【0246】

50

本発明の方法および組成物において使用され得る他の抗ウイルス剤は、米国特許出願番号 09 / 801 , 839 (2001年3月8日出願) に列挙される。

【 0 2 4 7 】

抗真菌剤は、感染性真菌の処置および予防のために有用である。抗真菌剤は、しばしば、その作用機構によって分類される。いくつかの抗真菌剤は、グルコース合成を阻害することによって、細胞壁インヒビターとして機能する。他の抗真菌剤は、膜の完全性を不安定化することによって機能する。

【 0 2 4 8 】

抗真菌剤は、感染性真菌の処置および予防のために有用である。抗真菌剤は、しばしば、その作用機構によって分類される。いくつかの抗真菌剤は、グルコースシンターゼを阻害することによって、細胞壁インヒビターとして機能する。これらとしては、バシウンギン (b a s i u n g i n) / E C B が挙げられるが、これらに限定されない。他の抗真菌剤は、膜の完全性を不安定化することによって機能する。これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イミダゾール類 (例えば、クロトリマゾール、セルタコナゾール (s e r t a c o n z o l e)、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ポリコナゾール (v o r i c o n a c o l e))、ならびに F K 463、アンホテリシン B、B A Y 38 - 9502、M K 991、プラディマイン (p r a d i m i c i n)、U K 292、プテナフィンおよびテルピナフィン。他の抗真菌剤は、キチンを分解すること (例えば、キチナーゼ) または免疫抑制 (501 クリーム) によって機能する。

【 0 2 4 9 】

本発明の方法および組成物において使用され得る他の抗真菌剤は、米国特許出願番号 09 / 801 , 839 (2001年3月8日出願) に列挙される。

【 0 2 5 0 】

本発明の方法および組成物において使用され得る抗寄生生物剤は、米国特許出願番号 09 / 306 , 281 (1999年5月6日出願) に列挙される。

【 0 2 5 1 】

イミダゾキノリン薬剤はまた、抗癌治療と組み合わせて投与され得る。抗癌治療は、癌医薬、放射線および外科的手順を含む。本明細書中で使用する場合、用語「癌医薬」は、癌を処置する目的で被験体に投与される薬剤をいう。癌の処置のための種々の型の医薬は、本明細書中に記載される。本明細書の目的のために、癌医薬は、化学療法剤、免疫治療剤、癌ワクチン、ホルモン療法剤および生物学的応答調節剤として、分類される。

【 0 2 5 2 】

癌は、最近、手術、放射線療法および化学療法を含む種々の様式を使用して処置されている。処置様式の選択は、癌の型、位置および散在度に依存する。例えば、手術および放射線療法は、固形の十分に規定された腫瘍塊の場合により適切であり得、そして非固形腫瘍癌 (例えば、白血病およびリンパ腫) の場合には、あまり実用的ではないかもしれない。手術および放射線療法の利点の1つは、治療の影響を一定の程度まで制御する能力、従って、身体中の正常組織に対する毒性を制限する能力である。しかし、手術および放射線療法の後には、しばしば、任意の残留癌細胞または放射線耐性癌細胞に対して保護するために、化学療法が行われる。化学療法はまた、白血病およびリンパ腫のような散在性の癌、ならびに転移について、最も適切な処置である。

【 0 2 5 3 】

化学療法とは、癌細胞を攻撃するために、化学的薬剤および/または生物学的薬剤を使用する治療をいう。局在化される手術とも放射線とも異なり、化学療法は、一般に、全身様式で投与され、従って、正常組織に対する毒性が、主要な考慮事項である。多くの化学療法剤が、それらの増殖プロファイルに基づいて癌細胞を標的化するので、通常増殖的な組織 (例えば、胃腸管および骨髄) もまた、化学療法剤の影響に感受性である。化学療法剤の主要な副作用の1つは、正常な造血前駆体の死から生じる骨髄抑制 (貧血、抗中球減少症および血小板減少症を含む) である。

10

20

30

40

50

【0254】

多くの化学療法剤が、癌の処置のために開発されてきた。しかし、全ての腫瘍が化学療法剤に応答するわけではなく、化学療法剤に対して最初に応答性であった腫瘍といえども、耐性を生じ得る。結果として、有効な抗癌薬物についての探索は、より少ない非特異的毒性を有する、さらにより有効な薬剤を見出すための試みにおいて、過熱している。

【0255】

癌医薬は、種々の方法で機能する。いくつかの癌医薬は、腫瘍細胞に特異的な生理学的機構を標的化することによって、作用する。例としては、癌において変異している特定の遺伝子およびそれらの遺伝子産物（すなわち、主にタンパク質）の標的化が挙げられる。このような遺伝子としては、癌遺伝子（例えば、Ras、Her2、bc1-2）、癌抑制遺伝子（例えば、EGF、p53、Rb）および細胞周期標的（例えば、CDK4、p21、テロメラーゼ）が挙げられるが、これらに限定されない。癌医薬は、代替的に、癌細胞において変更されているシグナル伝達経路および分子機構を標的化し得る。これらの細胞表面上に発現されるエピトープを介した癌細胞の標的化は、モノクローナル抗体の使用によって達成される。後者の型の癌医薬は、一般に、本明細書中で免疫療法剤といわれる。

10

【0256】

他の癌医薬は、癌細胞以外の細胞を標的化する。例えば、いくつかの医薬は、腫瘍細胞を攻撃するために、免疫系をプライムする（例えば、癌ワクチン）。なお他の医薬（新脈管形成インヒビターと称される）は、固形腫瘍の血液供給を攻撃することによって機能する。ほとんどの悪性癌は、転移できる（すなわち、原発性腫瘍部位を出て、遠位の組織に播種し、それにより、二次的腫瘍を形成する）ので、この転移を妨害する医薬もまた、癌の処置において有用である。新脈管形成媒介物質としては、塩基性FGF、VEGF、アンジオポエチン、アンジオスタチン、エンドスタチン、TNF、TNF-470、トロンスポンジン-1、血小板因子4、CAIおよびインテグリンファミリーのタンパク質の特定のメンバーが挙げられる。この型の医薬の1つのカテゴリーは、メタロプロテイナーゼインヒビターであり、これは、原発性腫瘍部位を出て、そして別の組織へと管外遊出するために癌細胞によって使用される酵素を阻害する。

20

【0257】

いくつかの癌細胞は抗原性であり、従って、免疫系によって標的化され得る。1つの局面において、イミダゾキノリン薬剤および癌医薬（特に、癌免疫療法剤として分類されるもの）の併用投与は、癌抗原に対する特異的免疫応答を刺激するために有用である。

30

【0258】

免疫系の第一の機能は、腫瘍形成前に新生物細胞を検出および排除することである、というのが、免疫監視機構の理論である。この理論の基本的原理は、癌細胞が正常細胞とは抗原的に異なり、従って、免疫学的に非適合性の同種移植片の拒絶を引き起こす免疫応答と類似の免疫応答を誘発する、ということである。研究により、腫瘍細胞が、それらの抗原の発現において、質的にかまたは量的にかのいずれかで異なることが確認されている。例えば、「腫瘍特異的抗原」は、腫瘍細胞に特異的に関連するが、正常細胞には関連しない抗原である。腫瘍特異的抗原の例は、DNAウイルスまたはRNAウイルスによって誘導された腫瘍中のウイルス抗原である。「腫瘍関連」抗原は、腫瘍細胞および正常細胞の両方に存在するが、腫瘍細胞においては異なる量または異なる形態で存在する。このような抗原の例は、腫瘍胎児性抗原（例えば、癌胎児性抗原）、分化抗原（例えば、T抗原およびTn抗原）、ならびに癌遺伝子産物（例えば、HER/neu）である。

40

【0259】

腫瘍標的をインビトロおよびインビボで殺傷し得る異なる型の細胞が同定されている：ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、細胞溶解性Tリンパ球（CTL）、リンホカイン活性化キラー細胞（LAK）および活性化マクロファージ。NK細胞は、特定の抗原に対して前もって感作されることなく、腫瘍細胞を殺傷し得、そしてその活性は、標的細胞上の主要組織適合性複合体（MHC）によってコードされるクラスI抗原の存在を必要としな

50

い。NK細胞は、新生腫瘍の制御および転移性増殖の制御に関与すると考えられる。NK細胞とは対照的に、CTLは、腫瘍抗原に対して感作された後、かつ標的抗原がMHCクラスIをまた発現する腫瘍細胞上で発現される場合にのみ、腫瘍細胞を殺傷し得る。CTLは、移植された腫瘍およびDNAウイルスによって引き起こされた腫瘍の拒絶における、エフェクター細胞であると考えられる。LAK細胞は、NK集団およびCTL集団とは別個のヌルリンパ球のサブセットである。活性化マクロファージは、抗原依存的でも一旦活性化されたMHC拘束でもない様式で、腫瘍細胞を殺傷し得る。活性化マクロファージは、これらが浸潤する腫瘍の増殖速度を低下させると考えられる。インビボアッセイにより、他の免疫機構（例えば、抗体依存的、細胞媒介性細胞傷害性反応および抗体+補体による溶解）が同定されている。しかし、これらの免疫エフェクター機構は、インビボのNK、CTL、LAKおよびマクロファージの機能ほどには、インビボでそれほど重要ではないと考えられる（総説については、Piessens, W. F. および David, J. 「Tumor Immunology」、Scientific American Medicine、Vol. 2、Scientific American Books, N. Y.、pp. 1 - 13、1996を参照のこと）。

10

【0260】

免疫療法の目的は、確立された腫瘍に対する患者の免疫応答を増大させることである。免疫療法の1つの方法は、アジュバントの使用である。微生物（例えば、カルメット-گران杆菌）由来のアジュバント物質は、免疫応答を高め、そして動物において腫瘍に対する耐性を増強する。

20

【0261】

免疫療法剤は、癌抗原に特異的に結合するかまたは癌抗原を特異的に認識する抗体または抗体フラグメントに由来する医薬である。抗体ベースの免疫療法剤は、癌細胞の細胞表面に結合することによって機能し、それによって、癌細胞を攻撃するように、内因性の免疫系を刺激し得る。抗原ベースの治療剤が機能する別の方法は、癌細胞に対して毒性物質を特異的に標的化するための送達系としてである。抗体は、通常、毒素（例えば、リシン（例えば、トウゴマ由来）、カリキアマイシン（calicheamicin）およびメイタンシノイド（maytansinoid））、放射性同位体（例えば、ヨウ素-131およびイットリウム-90）、化学療法剤（本明細書中に記載されるような）または生物学的応答調節因子に、結合体化される。この方法で、毒性物質は、癌の領域で濃縮され得、そして正常細胞に対する非特異的毒性が最小化され得る。癌抗原に特異的な抗体の使用に加えて、血管系に結合する抗体（例えば、内皮細胞に結合する抗体）もまた、本発明において有用である。これは、一般に、固形腫瘍が、生存するために新たに形成された血管に依存し、従って、ほとんどの腫瘍が、新たな血管の増殖を補強および刺激し得るからである。結果として、多くの癌医薬の1つの戦略は、腫瘍および/またはこのような血管を支持する結合組織（または間質）に供給する血管を攻撃することである。

30

【0262】

モノクローナル抗体のような免疫療法剤と組み合わせたイミダゾキノリン薬剤の使用は、ADCCの有意な増強（上記で考察されたような）、ナチュラルキラー（NK）細胞の活性化、およびIFN レベルの増大を含む多数の機構によって、長期生存率を増大させ得る。イミダゾキノリン薬剤は、モノクローナル抗体と組み合わせて使用される場合、生物学的結果を達成するために必要な抗体の用量を減少させるように働く。

40

【0263】

癌ワクチンは、癌細胞に対する内因性免疫応答を刺激することが意図される医薬である。現在製造されているワクチンは、体液性免疫系（すなわち、抗体依存的免疫応答）を主に活性化する。現在開発中の他のワクチンは、腫瘍細胞を殺傷し得る細胞傷害性Tリンパ球を含む細胞媒介性免疫系を活性化することに焦点を当てている。癌ワクチンは、一般に、抗原提示細胞（例えば、マクロファージおよび樹状細胞）および/または他の免疫細胞（例えば、T細胞、B細胞およびNK細胞）の両方に対する癌抗原の提示を増強する。

【0264】

50

癌ワクチンは、以下に考察するような、いくつかの形態の1つを取り得るが、それらの目的は、抗原提示細胞（APC）によるこのような抗原の内因性プロセッシングおよびMHCクラスI分子との関連での細胞表面での最終的な抗原提示を促進するために、癌抗原および/または癌関連抗原をAPCに送達することである。1つの形態の癌ワクチンは、被験体から取り出され、エクスピボで処理され、次いで被験体において全細胞として再導入された癌細胞の調製物である、全細胞ワクチンである。腫瘍細胞の溶解物もまた、免疫応答を誘発するための癌ワクチンとして使用され得る。別の形態の癌ワクチンは、T細胞を活性化するために、癌特異的小タンパク質または癌関連小タンパク質を使用する、ペプチドワクチンである。癌関連タンパク質は、癌細胞によって排他的に発現されるわけではないタンパク質である（すなわち、他の正常細胞は、これらの抗原をなお発現し得る）。しかし、癌関連抗原の発現は、一般に、特定の型の癌と一貫してアップレギュレートされる。なお別の型の癌ワクチンは、癌抗原または癌関連抗原にインビトロで曝露された全樹状細胞を含む、樹状細胞ワクチンである。樹状細胞の溶解物または膜画分もまた、癌ワクチンとして使用され得る。樹状細胞ワクチンは、抗原提示細胞を直接活性化することができる。他の癌ワクチンとしては、ガングリオシドワクチン、ヒートショックタンパク質ワクチン、ウイルスワクチンおよび細菌ワクチン、ならびに核酸ワクチンが挙げられる。

10

【0265】

癌ワクチンと組み合わせたイミダゾキノリン薬剤の使用は、NK細胞および内因性樹状細胞を活性化すること、ならびにIFNレベルを増大することに加えて、改善された抗原特異的な体液性免疫応答および細胞媒介性免疫応答を提供する。この増強は、同じ有益な効果を達成するために使用される抗原用量が減少したワクチンを可能にする。いくつかの例において、癌ワクチンは、アジュバント（例えば、上記のような）と共に使用され得る。

20

【0266】

他のワクチンは、インビトロで癌抗原に曝露され、抗原をプロセッシングし、そして他の免疫系細胞への有効な抗原提示のために、MHC分子に関してその細胞表面に癌抗原を提示し得る、樹状細胞（DC）の形態を取る。1実施形態において、イミダゾキノリン薬剤およびDCワクチンは、被験体への再注入の際に混合される。あるいは、このイミダゾキノリン薬剤は、ワクチンの（例えば、培養物中での）インビトロ調製、DCの成熟または活性化において使用され得る。特に、単球DC（mDC）は、イミダゾキノリン薬剤の併用使用から利益を受け得る。CDの混合集団（すなわち、プラズマ細胞DC（pDC）およびmDCの組み合わせ）を使用する場合、相乗効果もまた想定される。

30

【0267】

このイミダゾキノリン薬剤は、樹状細胞ベースの癌ワクチンと組み合わせて、本発明の1局面において使用される。樹状細胞は、専門の抗原提示細胞である。樹状細胞は、抗原を提示することにより、そしてそれらの局所的環境においてLPSのような微生物分子を検出するパターン認識レセプターの発現を介して、生得的な免疫系と獲得性の免疫系との間にリンクを形成する。樹状細胞は、樹状細胞が曝露される可溶性の特定の抗原を、効率的に内在化し、プロセッシングし、そして提示する。抗原を内在化および提示するプロセスは、主要組織適合性複合体（MHC）および同時刺激分子の発現の迅速なアップレギュレーション、サイトカインの産生、ならびにリンパ器官（ここで、樹状細胞は、T細胞の活性化に関与すると考えられる）への移動を引き起こす。

40

【0268】

本明細書中で使用される場合、化学療法剤は、免疫療法剤または癌ワクチンのカテゴリーに入らない、全ての他の形態の癌医薬を包含する。本明細書中で使用される場合、化学療法剤は、化学的薬剤および生物学的薬剤の両方を包含する。これらの薬剤は、癌細胞が継続的な生存のために依存する細胞活性を阻害するように機能する。化学療法剤のカテゴリーとしては、アルキル化剤/アルカロイド剤、代謝拮抗物質、ホルモンまたはホルモンアナログ、および多様な抗新生物薬物が挙げられる。これらの薬剤のうち全てではないにしてもほとんどが、癌細胞に対して直接的に毒性であり、そして免疫刺激を必要としない

50

。化学療法剤およびイミダゾキノリン薬剤の併用投与は、化学療法剤の最大耐用量を増大させる。

【0269】

本発明の方法および組成物において使用され得る癌医薬のさらなる例は、米国特許出願番号09/800,266(2001年3月5日出願)に列挙される。

【0270】

イミダゾキノリン薬剤はまた、喘息医薬またはアレルギー医薬と組み合わせて投与され得る。「喘息医薬/アレルギー医薬」は、本明細書中で使用される場合、症状を低減するか、喘息反応もしくはアレルギー反応を阻害するか、またはアレルギー反応もしくは喘息反応の発生を予防する、重要な組成物である。喘息およびアレルギーの処置のための種々の型の医薬は、Guidelines For The DiagnosisおよびManagement of Asthma, Expert Panel Report 2, NIH Publication No. 97/4051、1997年7月19日に記載され、これらの全内容は、本明細書中で参考として援用される。NIHの刊行物に記載されるような医薬の概要は、以下に示される。ほとんどの実施形態において、喘息医薬/アレルギー医薬は、ある程度まで、喘息およびアレルギーの両方を処置するために有用である。

10

【0271】

喘息の処置のための薬物は、一般的に、2つのカテゴリー(迅速緩和(quick-relief)薬物および長期制御薬物)に分けられる。喘息患者は、持続性の喘息の制御を達成および持続するために、毎日の長期制御薬物を行う。長期制御薬物としては、炎症性因子(例えば、コルチコステロイド、クロモリン(chromolyn)ナトリウムおよびメダクロミル(medacromil));長期作用性気管支拡張薬(例えば、長期作用性 β_2 アンタゴニストおよびメチルキサンチン);およびロイコトリエン改変因子が挙げられる。迅速緩和薬物としては、短期作用性 β_2 アゴニスト、抗コリン作用薬、および全身性コルチコステロイドが挙げられる。これらの薬物の各々に関連する多くの副作用が存在し、そしてこれらの薬物単独またはその組み合わせは、どれも喘息を予防または完全に処置することはできない。

20

【0272】

喘息用医薬としては、PDE-4インヒビター、気管支拡張薬/ β_2 アゴニスト、K⁺チャンネルオープナー、VLA-4アンタゴニスト、ニューロキンアンタゴニスト、TXA₂合成インヒビター、キサントニン(Xanthanine)、アラキドン酸アンタゴニスト、5リポキゲナーゼインヒビター、トロンボキシン(Thromboxin)A₂レセプターアンタゴニスト、トロンボキサンA₂アンタゴニスト、5-リポックス(lipox)活性化タンパク質のインヒビター、およびプロテアーゼインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0273】

気管支拡張薬/ β_2 アゴニストは、気管支拡張および平滑筋弛緩を引き起こす化合物のクラスである。気管支拡張薬/ β_2 アゴニストとしては、サルメテロール(salmeterol)、サルブタモール、アブテロール、テルブタリン、D2522/フォルモテロール(formoterol)、フェノテロール、ビトルテロール、ピルブエロール(pirbuero1)メチルキサンチンおよびオルシプレナリンが挙げられるが、これらに限定されない。長期作用性 β_2 アゴニストおよび気管支拡張薬は、炎症性治療に加えて、症状の長期予防のために用いられる化合物である。長期作用性 β_2 アゴニストとしては、サルメテロールおよびアルブテロールが挙げられるが、これらに限定されない。これらの化合物は、通常、コルチコステロイドと組み合わせて用いられ、一般的には、任意の炎症治療を伴わずに使用される。これらは、頻脈、骨格筋振せん、低カリウム血症、および過剰容量におけるQTc間隔の延長のような副作用に関連する。

40

【0274】

メチルキサンチン(例えば、テオフィリンを含む)は、症状の長期制御および予防のた

50

めに用いられてきた。これらの化合物は、ホスホジエステラーゼ阻害および可能性としてのアデノシン拮抗作用から生じる気管支拡張を引き起こす。容量関連性急性毒性は、これらの型の化合物について、特に問題である。結果として、慣用的な血清濃度は、毒性について考慮するためにモニターされなくてはならず、このことは、代謝のクリアランスにおける個々の差異から生じる治療の範囲を狭める。副作用としては、頻脈、悪心および嘔吐、頻拍性不整脈、中枢神経系刺激、頭痛、発作、吐血、高血糖症および低カリウム血症が挙げられる。短期作用性₂アゴニストとしては、アルブテロール、ピトルテロール、ピリブテロールおよびテルブタリンが挙げられるが、これらに限定されない。短期作用性₂アゴニストの投与に関連するいくつかの有害な影響としては、頻脈、骨格筋振せん、低カリウム血症、増加した乳酸、頭痛、および高血糖症が挙げられる。

10

【0275】

アレルギーを処置または予防するための従来の方法は、抗ヒスタミン療法または脱感作療法の使用に関連していた。アレルギー反応の化学的メディエーターの影響をブロックする抗ヒスタミンおよび他の薬物は、アレルギー症状の重篤度を調節することを助けるが、アレルギー反応を予防せず、そして次のアレルギー反応に対する効果を有さない。脱感作療法は、通常、皮下注射により、少量のアレルゲンを与えて、アレルゲンに対するIgG型応答を誘導することによって実施される。IgG抗体の存在は、IgE抗体の誘導から生じるメディエーター産生の中和を補助すると考えられている。最初に、被験体は、非常に低容量のアレルゲンを用いて処置されて、重篤な反応が誘導されることを防ぎ、そして容量を、徐々に増加させる。被験体に、アレルギー反応を引き起こす化合物を実際に投与され、重篤なアレルギー反応が生じ得るので、この型の治療は、危険である。

20

【0276】

アレルギー用医薬としては、抗ヒスタミン、ステロイド、およびプロスタグランジン誘導因子が挙げられるが、これらに限定されない。抗ヒスタミンは、肥満細胞または抗塩基球により放出されるヒスタミンを中和する化合物である。これらの化合物は、当該分野において周知であり、そして一般的に、アレルギーの処置のために用いられる。抗ヒスタミンとしては、ロラチジン (loratidine)、セチリジン (cetirizine)、ブクリジン、セテリジンアナログ、フェキソフェナジン、テルフェナジン、デスロラタジン、ノルアステミゾール、エピナスチン、エバスチン、アステミゾール、レボカバスチン、アゼラスチン、トラアニラスト (tranilast)、テルフェナジン、ミゾラスチン (mizolastine)、タスチン (betastastine)、CS 560、およびHSR609が挙げられるが、これらに限定されない。プロスタグランジン誘導因子は、プロスタグランジン活性を誘導する化合物である。プロスタグランジンは、平滑筋弛緩を調節することにより機能する。プロスタグランジン誘導因子としては、S-5751が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0277】

イミダゾキノリン薬剤の組み合わせにおいて有用である喘息/アレルギー用医薬もまた、ステロイドおよび免疫調節薬を含む。ステロイドとしては、ベクロメタゾン、フルチカゾン (fluticasone)、トラムシノロン (tramcinolone)、ブデソニド (budesonide)、コルチコステロイド、およびブデソニドが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0278】

コルチコステロイドとしては、ジプロピオン酸ベクロメタゾン (beclomethasone dipropionate)、ブデソニド、フルニソリド、フルチカオゾン (fluticasone)、プロピオネート、およびトリアムシノロンアセトニド (triamcinolone acetate) が挙げられるが、これらに限定されない。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、通常、吸入形態において喘息/アレルギーの処置のために用いられない。なぜなら、デキサメタゾンは、高度に吸収され、そのデキサメタゾンが、有効な容量で長期間の抑制的な副作用を有するからである。しかし、ドキサメタゾンは、イミダゾキノリン薬剤と組み合わせ

50

て投与される場合、副作用を軽減するような低用量で投与され得るので、本発明に従い、喘息/アレルギーの処置のために用いられ得る。さらに、イミダゾキノリン薬剤は、より高濃度でのデキサメタゾンの副作用を軽減するために投与され得る。コルチコステロイドに関連するいくつかの副作用としては、咳、発声障害、鷲口瘡（カンジダ症）、およびより高い用量では、全身性の作用（例えば、副腎抑制、骨粗鬆症、成長抑制、皮膚が薄くなること（*skin thinning*）、および容易に挫傷すること）が挙げられる（*Barnes & Peterson, Am. Rev. Respir. Dis.*; 148: S1-S26, 1993; および *Kamadaら, Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 153: 1739~48, 1996）。

【0279】

全身性コルチコステロイドとしては、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロンおよびプレドニゾンが挙げられるが、これらに限定されない。コルチコステロイドは、グルコース代謝の可逆性の異常、食欲の増加、流体遺残、体重増加、気分の変化、高血圧、消化性潰瘍、およびまれに大腿の無菌壊死に関連する。これらの化合物は、不適切に制御された持続性喘息における炎症反応の短期間（3~10日間）の予防に有用である。これはまた、重篤な持続性喘息における症状の長期間の予防においても、炎症を抑制および制御しそして実質上逆転させるように機能する。長期間の使用に関連するいくつかの副作用としては、副腎軸（*adrenal axis*）抑制、成長抑制、皮膚が薄くなること、高血圧、糖尿病、クッシング症候群、白内障、筋肉の虚弱化、およびまれな例において、減損した免疫機能が挙げられる。これらの型の化合物が、これらの最小限の有効な用量で用いられることが推奨されている（喘息の診断と管理のためのガイドライン；専門委員会報告；NIH公報No. 97-4051；1997年7月）。

【0280】

免疫調節薬としては、抗炎症性因子、ロイコトリエンアンタゴニスト、IL-4ムテイン、可溶性IL-4レセプター、免疫抑制剤（例えば、寛容化ペプチドワクチン）、抗IL-4抗体、IL-4アンタゴニスト、抗IL-5抗体、可溶性IL-13レセプターFc融合タンパク質、抗IL-9抗体、CCR3アンタゴニスト、CCR5アンタゴニスト、VLA-4インヒビター、およびIGEのダウンレギュレーターからなる群が挙げられるが、これらに限定されない。

【0281】

ロイコトリエン調節薬は、しばしば、中程度の持続性喘息における症状の長期制御および予防のために用いられる。ロイコトリエン調節薬は、LT_D-4レセプターおよびLT_E-4レセプターについて選択的に競合することによってロイコトリエンレセプターアンタゴニストとして機能する。これらの化合物としては、ザフィルルーカスト錠剤およびジロウトン（*zileuton*）錠剤が挙げられるが、これらに限定されない。ジロウトン錠剤は、5-リンボキシゲナーゼインヒビターとして機能する。これらの薬物は、肝臓酵素の上昇およびいくつかの場合における可逆性肝炎および高ビリルビン血症に関連していた。ロイコトリエンは、肥満細胞、好酸球、および好塩基球から放出される生化学的メディエーターであり、これは、気道平滑筋の収縮を引き起こし、そして血管浸透性、粘液分泌を増加させ、そして喘息を有する患者の気道において炎症性細胞を活性化する。

【0282】

他の免疫調節薬としては、免疫調節特性を有することが示されている神経ペプチドが挙げられる。機能的な研究は、例えば、物質Pが、特異的レセプター媒介性の機構により、リンパ球の機能に影響を及ぼし得ることを示した。物質Pはまた、粘膜肥満細胞由来のアラキドン酸誘導性メディエーターの産生を刺激することによって、別個の即時型過敏応答を調節することが示されている（*J. McGilliesら, Substance P and Immunoregulation, Fed. Proc.* 46: 196-9 (1987)）。物質Pは、1931年にVon EulerおよびGaddumにより最初に同定された神経ペプチドである。特定の組織抽出物中の同定されていない抑制物質（*J. Physiol. (London)* 72: 74-87 (1931)）。そのアミノ酸配列

10

20

30

40

50

(Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (配列番号1))が、1971年にChangらにより報告されている。物質Pのアミノ酸配列、Nature (London) New Biol. 232: 86-87 (1971)。物質Pのフラグメントの免疫調節活性は、Siemi onら、Immunoregulatory Activity of Substance P Fragments、Molec. Immunol. 27: 887-890 (1990)により研究されている。

【0283】

別のクラスの化合物は、IgEのダウンレギュレーターである。これらの化合物としては、IgEレセプターに結合し、それにより抗原特異的IgEの結合を防ぐ能力を有するペプチドまたは他の分子が挙げられる。別の型のIgEのダウンレギュレーターは、ヒトIgE分子のIgEレセプター結合領域に対して指向されるモノクローナル抗体である。従って、1つの型のIgEのダウンレギュレーターは、抗IgE抗体または抗IgE抗体フラグメントである。抗IgEは、Genentechにより開発されている。当業者は、同じ機能を有する結合ペプチドの機能的に活性な抗体フラグメントを調製し得る。1つの型のIgEダウンレギュレーターは、細胞表面上でのFcレセプターへのIgE抗体の結合をブロックし得、かつIgEがすでに結合している結合部位からIgEを除去し得るポリペプチドである。

10

【0284】

IgEのダウンレギュレーターに関連する1つの問題は、多くの分子が、ネイティブIgE分子とそのレセプターとの間の非常に強力な相互作用に対応するレセプターに対する結合強度を有さないことである。この強度を有する分子は、非可逆的にレセプターに結合する傾向にある。しかし、このような物質は、体内の他の構造的に類似する分子に共有結合し、そしてそれらの分子をブロックし得るので、これらの物質は、相対的に毒性である。この文脈において、IgEレセプターの鎖がより大きい遺伝子ファミリーに属すること(すなわち、ここで、複数の異なるIgG Fcレセプターが含まれる)が目的である。これらのレセプターは、細菌感染に対する身体の防御のために絶対的に重要である。共有結合について活性化された分子は、さらに、しばしば、比較的不安定であり、従って、これらは、恐らく、1日に複数回投与し、そして肥満細胞および好塩基球上のIgEレセプターの連続的に再生するプールを完全にブロックすることを可能にするために、相対的に高濃度でなくてはならない。

20

30

【0285】

これらの型の喘息/アレルギー用医薬は、しばしば、長期制御薬物または迅速緩和薬物として分類される。長期制御薬物としては、コルチコステロイド(グルコステロイドともいわれる)、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、クロモリンナトリウム、ネドクロミル、長期作用性₂アゴニスト、メチルキサンチン、およびロイコトリエン調節薬のような化合物が挙げられる。迅速緩和薬物は、アレルギー応答または喘息応答から生じる症状の迅速緩和を提供するために有用である。迅速緩和薬物としては、短期作用性₂アゴニスト、抗コリン作用薬および全身性コルチコステロイドが挙げられる。

【0286】

クロモリンナトリウムおよびメドクロミルは、運動から生じる初期の喘息の症状アレルギーから生じるアレルギー症状を予防するための長期制御薬物として用いられる。これらの化合物は、クロリドチャネル機能を妨害することによってアレルギーに対する初期および後期の反応をブロックすると考えられる。これらはまた、肥満細胞膜を安定化し、そして好塩基球および上皮細胞からのメディエーターの活性化および放出を阻害する。4週間~6週間の期間の投与が、一般的に、最大限の利益を達成するために必要とされる。

40

【0287】

抗コリン作用薬は、一般的に、急性気管支痙攣の緩和のために用いられる。これらの化合物は、ムスカリン様コリン作用性レセプターの競合的阻害により機能すると考えられている。抗コリン作用薬としては、イプラトロピウム(ipratropium)プロミ

50

ドが挙げられるが、これらに限定されない。これらの化合物は、コリン作用媒介性気管支痙攣のみを逆転させ、そして抗原に対する任意の反応を調節しない。副作用としては、口腔および呼吸器の分泌物の乾燥、何人かの個体における増加した喘息、目に噴霧した場合の霞んだ視野が挙げられる。

【0288】

標準的な喘息/アレルギー用医薬に加えて、喘息/アレルギーを処置するための他の方法が、単独でかまたは確立された医薬と組み合わせてかのいずれかで用いられた。アレルギーを緩和するための、1つの好ましいが、しばしば不可能な方法は、アレルゲンまたはイニシエーターの除去である。アレルギー性疾患を処置するために現在用いられている別の方法としては、アレルゲンに対する寛容を誘導して、そしてさらなるアレルギー反応を防ぐための漸増用量のアレルゲンの注射が挙げられる。

10

【0289】

アレルゲン注射療法(アレルゲン免疫療法)は、アレルギー性鼻炎の重篤度を軽減することが知られている。この処置は、異なる形態の抗体、「ブロッキング抗体」と称される保護抗体の産生を含むことが理論付けられている(Cooke, R Aら、Serologic Evidence of Immunity with Coexisting Sensitization in a Type of Human Allergy, Exp. Med. 62:733(1935)。アレルギーを処置するための他の試みとしては、患者において免疫応答を引き起こすための抗原の能力は変化しないが、一方でアレルギー反応を引き起こすその能力が実質的に変更されるように、その抗原を化学的に改変することが挙げられる。

20

【0290】

しかし、これらの方法は、有効となるまで数年かかり得、そして過敏性ショックのような副作用の危険性に関連する。アレルゲンと組み合わせたイミダゾキノリン薬剤および喘息/アレルギー医薬の使用は、多くの副作用などを避ける。本発明の方法および組成物において用いられ得る他の喘息/アレルギー用医薬は、2001年2月2日に出願された米国特許非仮出願番号09/776,479に列挙される。

【0291】

イミダゾキノリン薬剤は、なお他の治療薬(例えば、免疫応答を増強するためのアジュバント)と組み合わせられ得る。このイミダゾキノリン薬剤および他の治療薬は、同時に かまたは経時的に投与され得る。他の治療薬が同時に投与される場合、これらは、同じ処方物中または別個の処方物中で投与され得るが、同時に投与される。他の治療薬は、他の治療薬およびイミダゾキノリン薬剤の投与が時間的に別々である場合、互いに、そしてイミダゾキノリン薬剤と連続的に投与される。これらの化合物の投与の間の時間の間隔は、数分でも、それより長くてもよい。他の治療薬としては、アジュバント、サイトカイン、抗体、抗原などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0292】

イミダゾキノリン薬剤は、全身性免疫応答を誘導するためのアジュバントとして有用である。従って、いずれもが、抗原に曝される被験体に送達されて、抗原に対する増強された免疫応答を発生させ得る。

40

【0293】

イミダゾキノリン薬剤に加えて、本発明の組成物はまた、非核酸アジュバントと共に投与され得る。非核酸アジュバントは、体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答を刺激し得る、本明細書中で記載されるイミダゾキノリン薬剤を除く任意の分子または化合物である。非核酸アジュバントとしては、例えば、貯蔵効果を引き起こすアジュバント、免疫刺激アジュバント、および貯蔵効果を引き起こしかつ免疫系を刺激するアジュバントが挙げられる。

【0294】

本明細書中で使用される貯蔵効果を生じさせるアジュバントは、体内に徐放され、従って、抗原への免疫細胞の曝露を延長する抗原を引き起こすアジュバントである。このクラ

50

スのアジュバントとしては、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）；乳濁液ベースの処方物（鉱油、非鉱油、油中水乳濁液または水中油乳濁液、Seppic ISAシリーズのMontanideアジュバント（例えば、Montanide ISA 720、Air Liquide、Paris、France）のような水中油乳濁液）が挙げられる）；MF-59（Span 85およびTween 80で安定化した水中スクアレン乳濁液；Chiron Corporation、Emeryville、CA）；およびPROVAX（安定化界面活性剤およびミセル形成剤を含む水中油乳濁液；IDEC, Pharmaceuticals Corporation、San Diego、CA）；ポリアルギニンまたはポリリジンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0295】

免疫刺激アジュバントは、免疫系細胞の活性化を引き起こすアジュバントである。例えば、それは、免疫細胞に、サイトカインを産生および分泌させ得る。このクラスのアジュバントとしては、Q.saponariaツリー（tree）の樹皮から精製されるサポニン（例えば、QS21）（HPLC分別における21番目のピークにおいて溶出する糖脂質；Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, MA）；ポリ[ジ（カルボキシレート（carbocylato）フェノキシ）ホスファジン（phosphazene）（PCPPポリマー；Virus Research Institute、USA）；リポ多糖の誘導體（例えば、モノホスホリル脂質A（MPL；Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT）、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；OM Pharma SA、Meyrin、Switzerland）；およびリーシュマニア伸長因子（精製リーシュマニアタンパク質；Corixa Corporation、Seattle、WA）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0296】

貯蔵効果をなし、かつ免疫系を刺激するアジュバントは、上で同定される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としては、ISCOMS（混合サポニン、脂質を含み、そして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複合体）；CSL、Melbourne、Australia）；SB-AS2（SmithKline Beechamアジュバントシステム番号2（これは、MPLおよびQS21を含む水中油乳濁液である）；SmithKline Beecham Biologicals [SBB], Rixensart, Belgium）；SB-AS4（SmithKline Beechamアジュバントシステム番号4（これは、ミョウバンおよびMPLを含む）；SBB、Belgium）；ミセル形成非イオン性ブロックコポリマー（例えば、CRL 1005（これらは、ポリオキシエチレン鎖に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）；およびSyntex Adjuvant Formulation（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乳濁液；Syntex Chemicals, Inc., Boulder, CO）。

30

40

【0297】

イミダゾキノロン因子はまた、粘膜アジュバントとして有用である。

【0298】

他の粘膜アジュバント（核酸粘膜アジュバントおよび非核酸粘膜アジュバントを含む）はまた、イミダゾキノリン薬剤と共に投与され得る。本明細書中で使用される非核酸粘膜アジュバントは、抗原と共に粘膜表面に投与された場合、被験体において粘膜性免疫応答を誘導し得る、免疫刺激核酸以外のアジュバントである。粘膜アジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：細菌毒素（例えば、コレラ毒素（CT）、CT誘導體（CT Bサブユニット（CTB）（Wuら、1998、Tochikuboraら、1998）；CTD53（ValからAsp）（Fontanaら、1995）；C

50

TK97 (ValからLys) (Fontanaら、1995); CTK104 (TyrからLys) (Fontanaら、1995); CTD53/K63 (ValからAsp、SerからLys) (Fontanaら、1995); CTH54 (ArgからHis) (Fontanaら、1995); CTN107 (HisからAsn) (Fontanaら、1995); CTE114 (SerからGlu) (Fontanaら、1995); CTE112K (GluからLys) (Yamamotoら、1997a); CTS61F (SerからPhe) (Yamamotoら、1997a, 1997b); CTS106 (ProからLys) (Douceら、1997, Fontanaら、1995); およびCTK63 (SerからLys) (Douceら、1997, Fontanaら、1995)が挙げられるがこれらに限定されない)、閉鎖毒素(zot)、Escherichia coli非耐熱性エンテロトキシン、非耐熱性毒素(LT)、LT誘導体(LT Bサブユニット(LTB)) (Verweijら、1998); LT7K (ArgからLys) (Komaseら、1998, Douceら、1995); LT61F (SerからPhe) (Komaseら、1998); LT112K (GluからLys) (Komaseら、1998); LT118E (GlyからGlu) (Komaseら、1998); LT146E (ArgからGlu) (Komaseら、1998); LT192G (ArgからGly) (Komaseら、1998); LTK63 (SerからLys) (Marchettiら、1998, Douceら、1997, 1998, Di Tommasoら、1996); およびLTR72 (AlaからArg) (Giulianira、1998)が挙げられるが、これらに限定されない)、百日咳毒素(PT) (Lyckeら、1992, Spangler BD、1992, FreytagおよびClements、1999, Robertsら、1995, Wilsonら、1995) (PT-9K/129G (Robertsら、1995, Cropleyら、1995)を含む); 毒素誘導体(以下を参照のこと) (Holmgrenら、1993, Verweijら、1998, Rappuoliら、1995, FreytagおよびClements、1999); 脂質A誘導体(例えば、モノホスホリル脂質A (MPL) (Sasakiら、1998, Vancottら、1998); ムラミルジペプチド(MDP)誘導体(Fukushimaら、1996, Ogawaら、1989, Michalekら、1983, Morisakiら、1983); 細菌外膜タンパク質(例えば、Borrelia burgdorferiの外側表面(outer surface)プロテインA (OspA)リポタンパク質、Neisseria meningitidisの外膜タンパク質) (Marinaraら、1999, Van de Vergら、1996); 水中油乳濁液(例えば、MF59) (Barchfieldら、1999, Verschoorら、1999, O'Hagan、1998); アルミニウム塩(Isakara、1998, 1999); およびサポニン(例えば、QS21) Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, MA) (Sasakiら、1998, MacNealら、1998)、ISCOMS、MF-59 (Span 85およびTween 80で安定化した水中スクアレン乳濁液; Chiron Corporation, Emeryville, CA); the Seppic ISAシリーズのMontanideアジュバント(例えば、Montanide ISA 720; Air Liquide, Paris, France); PROVAX (安定化界面活性剤およびミセル形成因子を含む水中油乳濁液; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, CA); Syntexアジュバント処方物(SAF; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, CO); ポリ[ジ(カルボキシレートフェノキシ)ホスファジン(PCPPポリマー; Virus Research Institute, USA)およびリーシュマニア伸長因子(Corixa Corporation, Seattle, WA)。

【0299】

免疫応答はまた、イミダゾキノリン薬剤を伴う、サイトカイン(Bueler & Mulligan、1996; Chowら、1997; Geisslerら、1997; I 50

w a s a k i ら、1997 ; K i m ら、1997) または B - 7 同時刺激分子 (I w a s a k i ら、1997 ; T s u j i ら、1997) の同時投与または同時線形発現誘導により増加または増強され得る。これらのサイトカインは、イミダゾキノリン薬剤と共に直接的に投与され得るか、またはサイトカインがインピボで発現され得るようにサイトカインをコードする核酸ベクターの形態で投与され得る。1つの実施形態において、サイトカインは、プラスミド発現ベクターの形態で投与される。用語サイトカインは、ナノモラー濃度からピコモラー濃度で体液性調節因子として作用し、そして正常な状態または病理学的状態のいずれにおいても、個々の細胞および組織の機能的活性を調節する種々の群の可溶性タンパク質およびペプチドについての属名として用いられる。これらのタンパク質はまた、細胞間の相互作用を直接的に媒介し、そして細胞外環境において生じるプロセスを調節する。サイトカインの例としては、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 10、I L - 12、I L - 15、I L - 18、顆粒状マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、顆粒状コロニー刺激因子 (G - C S F)、I F N - 、I F N - 、腫瘍壊死因子 (T N F)、トランスフォーミング増殖因子 (T G F -)、F L T - 3 リガンド、および C D 40 リガンドが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0300】

本発明の組成物および方法を使用して、免疫応答を調節し得る。免疫応答を調節する能力によって、免疫系調節を介して罹患され得る特定の障害の予防および/または処置が可能になる。

20

【0301】

障害後の処置は、その障害および/またはそれに関連する症状を低減、緩和もしくは完全に排除し、または障害が悪化することを防止することを目的として開始する。障害前の被験体の処置は、障害が発生する危険性を低下させる目的で開始(すなわち、予防的処置)する。本明細書で使用される場合、用語「防止する」は、障害が発生する危険性のある患者の予防的処置(被験体が障害が発生する可能性における減少を生じる)、およびすでに確立された障害のさらなる発生の阻害をいう。

【0302】

本明細書で提供される教示と組合わせて、種々の活性化化合物を選択し、そして因子(例えば、潜在能力、相対バイオアベイラビリティ、患者の体重、有害な副作用の重症度および好ましい投与様式)に重み付けすることによって、有効な予防レジメンまたは治療処置レジメンが、計画され得、このレジメンは、実質的な毒性を引き起こさず、そしてなお、特定の被験体を処置するのに全体として有効である。任意の特定の適用についての有効量は、処置される疾患または状態、投与される特定のイミダゾキノリン薬剤または他の治療的薬剤(例えば、免疫刺激核酸の場合において、核酸の型(すなわち、C p G 核酸)、核酸における非メチル化 C p G モチーフの数またはそれらの位置、オリゴヌクレオチドに対する骨格の改変の度合いなど)、被験体の大きさ、または疾患もしくは状態の重症度のよう因子に依存して変化し得る。当業者は、過度の実験を必要とすることなく、特定のイミダゾキノリン薬剤および/または他の治療的薬剤の有効量を経験的に決定し得る。

30

【0303】

用語、イミダゾキノリン薬剤の「有効量」は、所望の生物学的作用を実現するのに必要な、または十分な量をいう。一般的に、イミダゾキノリン薬剤の有効量は、免疫系の活性化を引き起こし、抗原特異的免疫応答の発生を潜在的に生じるのに必要量である。幾つかの実施形態において、イミダゾキノリン薬剤は、T h 1 免疫応答または一般的な免疫応答を刺激または誘導するのに有効な量で投与される。T h 1 免疫応答を刺激するのに有効な量は、1以上のT h 1 型サイトカイン(例えば、インターロイキン2 (I L - 2)、I L - 12、腫瘍壊死因子 (T N F) およびインターフェロン (I F N) の産生、および/または1以上のT h 1 型抗体の産生を刺激する量として規定され得る。

40

【0304】

本明細書に記載される化合物の被験体用量は、代表的に、約 0 . 1 μ g ~ 10 , 000

50

mg、より代表的には、約1 μ g/日~8000mg、および最も代表的には、約10 μ g~100 μ gの範囲である。被験体の体重の点で述べると、代表的な投薬量は、約0.1 μ g~20mg/kg/日、より代表的には、約1~10mg/kg/日、ならびに最も代表的には、約1~5mg/kg/日の範囲である。

【0305】

イミダゾキノリン薬剤は、それらの潜在能力を大きく変化させ、そうして、本明細書に記載される方法において使用される用量は、数オーダーの幅で変化し得、おそらく、使用される他の治療的薬剤および所望の治療効果に依存する。例としては、以前に記載された化合物S-28463 (Tomaira, Antiviral Res. 28:253, 1995) は、約0.1~1.0mg/kgの間の用量で投与された場合、ヒトの被験体において、ADCCを誘導するのに有効である。S-28463 (Resiquimod) は、Imiquimodの増強されたバージョンであるので、このクラス内の他の薬剤は、免疫刺激については能力がより低くあり得るが、それにもかかわらず、治療的薬剤としては依然として有用であり、そして、おそらくより有用である。あるいは、他のイミダゾキノリン薬剤は、S-28463より数オーダーの幅で能力を上回り得る。

10

【0306】

イミダゾキノリン薬剤が、他の治療的薬剤または特別な送達ビヒクルと組み合わせて投与される場合、先天性の免疫応答を誘導し、または、ADCCを増加させ、あるいは、抗原特異的免疫応答を誘導するという目的について、非経口送達のための本明細書に記載される化合物の用量は、代表的に、1投与あたり約0.1 μ g~10mgの範囲であり、その適用に依存して、この用量は、1日に1回、週に1回、または月に1回の割合で与えられ得、そして、これらの時間の間の他の量であり得る。より代表的には、これらの目的のための非経口用量は、1投与あたり約10 μ g~5mgの範囲であり、そして、最も代表的には、約100 μ g~1mgの範囲であり、1日間隔か、または1週間間隔で、2回~4回で投与される。しかし、幾つかの実施形態において、これらの目的のための非経口用量は、上記の代表的な用量より、5~10,000倍高い範囲で使用され得る。

20

【0307】

本発明の幾つかの局面に従って、有効量は、合わせられるか、または、同時投与された場合に、相乗的応答を生じるイミダゾキノリン薬剤の量、および、別の治療的薬剤(例えば、抗体、抗原、免疫刺激核酸または障害に特異的な医薬品)の量である。相乗的な量は、イミダゾキノリン薬剤および他の治療的薬剤単独の個々の効果の合計よりも高い応答を生成する量である。

30

【0308】

例としては、イミダゾキノリン薬剤および癌用医薬品の相乗的な組み合わせは、各々の成分(すなわち、薬剤および医薬品)を別個に使用して達成され得る組み合わせられた生物学的作用よりも高い生物学的作用を提供する。生物学的作用は、癌から生じる症状の緩和または完全な排除であり得る。別の実施形態において、生物学的作用は、癌の完全な廃棄であり、このことは、例えば、腫瘍の非存在、または癌細胞のない生検もしくは血液塗沫によって証明される。

【0309】

別の例としては、イミダゾキノリン薬剤および喘息医薬品/アレルギー医薬品の有効量は、アレゲンまたは開始因子に応答して、IGEの発生を防止するか、またはIGEレベルの減少を引き起こすか、あるいは、Th1応答の転換を引き起こすのに必要な量である。他の実施形態において、生理学的な結果は、Th2サイトカイン(例えば、IL-4およびIL-5)からTh1サイトカイン(例えば、IFNおよびIL-12)への転換である。

40

【0310】

イミダゾキノリン薬剤の有効量を決定するために、インビトロでの刺激アッセイ使用により決定され得る。イミダゾキノリン薬剤の刺激係数は、以前に試験された免疫刺激酸の刺激係数に匹敵し得る。刺激係数を使用して、特定の被験体に対する特定のイミダゾキノ

50

リン薬剤の有効量を決定し得、そしてこの投薬量を上方または下方に調節し、被験体における所望のレベルを達成し得る。イミダゾキノリン薬剤の有効量はまた、動物モデル、またはイミダゾキノリン薬剤を使用するヒトでの臨床試験から、そして、類似の薬理学的活性（例えば、免疫刺激核酸およびアジュバント（例えば、ワクチン化目的のためのLTおよび他の抗原））を示すことが知られている化合物について、決定され得る。

【0311】

幾つかの例において、イミダゾキノリン薬剤または他の治療的薬剤のいずれかの部分治療的用量、またはそれら両方の部分治療的用量は、障害を有するか、または障害を発生する危険性のある被験体の処置において使用される。例として、2つのクラスの薬物が、一緒に使用される場合、医薬品は、部分治療的用量で投与され得、そして、依然として所望の治療的結果を生成し得ることが、本発明に従って発見されている。本明細書で使用される場合、「部分治療的用量 (sub-therapeutic dose)」とは、他の薬剤の非存在下において投与された場合、被験体において治療的結果を生成する用量より低い用量をいう。特定の医薬品の治療的用量は、医薬の分野では周知であり、これらの用量は、参考文献（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、1990）；ならびに、手引きとして医療専門家によって依存されている他の多くの医療の参考文献において広く記載されている。イミダゾキノリン薬剤の治療的用量はまた、当該分野において記載されており、そして、被験体の治療的用量を同定するための方法は、本明細書においてより詳細に記載される。

10

【0312】

他の局面において、本発明の方法は、副作用を誘導することなく、高用量の障害特異的医薬品を被験体に投与する工程を包含する。従来は、医薬品が、高用量で投与された場合、上記でより詳細に論じられたように、ならびに、医学文献において論じられるように、種々の副作用が生じ得る。これらの副作用の結果として、医薬品は、このような高用量では投与されず、もはや治療の利益はもたらされない。本発明に従って、従来では副作用を引き起こすような高用量の医薬品が、その被験体がまた、イミダゾキノリン薬剤を受けている限り、副作用を引き起こすことなく投与されることが、発見された。医薬品によって引き起こされた従来の副作用の型および程度は、使用される特定の医薬品に依存する。

20

【0313】

イミダゾキノリン薬剤の投与は、抗体の投与より前、投与と同時に、あるいは投与後に実施され得る。イミダゾキノリン薬剤が、抗体より前に投与される場合、代表的には、投与の間に1~7日のインターバルをおく。イミダゾキノリン薬剤が、抗体に続いて投与される場合は、代表的には、投与の間に2~3日のインターバルをおく。

30

【0314】

本発明の実施形態において、イミダゾキノリン薬剤が定期スケジュールで投与される。他の治療剤（抗体、抗原、免疫刺激性核酸および障害特異的医薬を含む）もまた、定期スケジュールで投与されるが、代替的には、症状が生じた場合に投与され得る。

【0315】

本明細書中で使用される場合、「定期スケジュール」は、予め決定された、指定された期間のことをいう。この定期スケジュールは、スケジュールが予め決定される限り、長さが同一であるかまたは異なる期間を包含し得る。例えば、この定期スケジュールは、1日毎、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、1週毎、1月毎かまたはその間の設定された任意の数の日または週、2月毎、3月毎、4月毎、5月毎、6月毎、7月毎、8月毎、9月毎、10月毎、11月毎、12月毎、などでの投与を包含し得る。あるいは、この予め決定された定期スケジュールは、最初の週は日毎に、その後数ヶ月間は月毎に、そして次いで、その後は3月毎での投与を包含し得る。任意の特定の組み合わせは、適切なスケジュールが、特定の日での投与を包含することを前もって決定されている限り、その定期スケジュールによってカバーされる。

40

【0316】

障害を発症する危険性のある被験体に向けられる特定の方法において、イミダゾキノリ

50

ン薬剤および障害特異的医薬の投与のタイミングはまた、特に重要であり得る。例えば、癌に対する遺伝的素因を有する被験体において、このイミダゾキノリン薬剤および癌医薬は、好ましくは、免疫療法または癌医薬の形態であり、定期的に被験体に投与され得る。

【0317】

本発明のいくつかの局面において、このイミダゾキノリン薬剤は、喘息またはアレルギー事象を予防するために、喘息またはアレルギー事象を予測して、被験体に投与される。この喘息またはアレルギー事象は、以下であり得るが、これらに限定する必要はない：喘息発作、季節性アレルギー性鼻炎（例えば、枯草熱、花粉、ブタクサ過敏症）または通年性アレルギー性鼻炎（例えば、本明細書中に記載されるようなアレルゲンのようなアレルゲンに対する過敏症）。いくつかの例において、このイミダゾキノリン薬剤は、喘息またはアレルギー事象の実質的に前に、投与される。本明細書中で使用される場合、「実質的に前」とは、喘息またはアレルギー事象の、少なくとも6ヶ月、少なくとも5ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも1ヶ月、少なくとも3週間、少なくとも2週間、少なくとも1週間、少なくとも5日間、または少なくとも2日間前のことを意味する。

10

【0318】

同様に、喘息/アレルギー医薬は、喘息またはアレルギー事象の直前（例えば、喘息またはアレルギー事象の、48時間以内、24時間以内、12時間以内、6時間以内、4時間以内、3時間以内、2時間以内、1時間以内、30分または10分以内）、喘息またはアレルギー事象と実質的に同時に（例えば、被験体が、アレルゲンと接触しているかまたは喘息またはアレルギー症状を経験している間）、または喘息またはアレルギー事象後に投与され得る。

20

【0319】

本発明の組成物は、特定の組織もしくは細胞型に送達され得るかまたは免疫系に送達され得るかあるいはその両方であり得る。その最も広範な意味において、「ベクター」は、その組成物の標的細胞への輸送を容易にし得る任意のビヒクルである。このベクターは、一般的には、ベクターの非存在を生じる分解の程度に対して減少された分解を伴って、イミダゾキノリン薬剤、抗体、抗原、免疫刺激性核酸および/または障害特異的医薬を標的細胞に輸送する。

【0320】

一般に、本発明において有用なベクターは、以下の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/物理的ベクター。生物学的ベクターおよび化学的/物理的ベクターは、本発明の治療剤の送達および/または取りこみに有用である。

30

【0321】

ほとんどの生物学的ベクターは、核酸の送達に使用され、イミダゾキノリン薬剤および免疫刺激性核酸である標的薬剤の送達に最も適切である。

【0322】

本明細書中で議論される生物学的ベクターに加えて、化学的/物理的ベクターを使用して、イミダゾキノリン薬剤および標的薬剤、抗体、抗原、および障害特異的医薬が送達され得る。本明細書中で使用される場合、「化学的/物理的ベクター」は、細菌学的供給源またはウイルス供給源由来の分子以外の、天然分子または合成分子をいい、核酸および/または癌医薬を送達し得る。

40

【0323】

本発明の好ましい化学的/物理的ベクターは、コロイド分散系である。コロイド分散系としては、脂質ベースの系（水中油系エマルジョンを含む）、ミセル、混合ミセル、およびリポソームが挙げられる。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、人工膜脈管であり、この人工膜脈管は、インピボまたはインピトロの送達ベクターとして有用である。大単層脈管（large unilamellar vesicle）（LUV）は、大きい高分子をカプセル化し得る、0.2~4.0 μmの範囲のサイズであ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

50

内にカプセル化され得、そして生物学的に活性な形態で、細胞に送達され得る (Fraleyら、Trends Biochem. Sci.、(1981)6:77)。

【0324】

リポソームは、リポソームを特定のリガンド(例えば、モノクローナル抗体、糖、糖脂質またはタンパク質)にカップリングすることによって、特定の組織に対して標的化され得る。免疫細胞にリポソームを標的化するのに有用であり得るリガンドとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない:免疫細胞特異的レセプターと相互作用するインタクトな分子または分子のフラグメント、および免疫細胞の細胞表面マーカーと相互作用する分子(例えば、抗体)。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され得る。なお他の実施形態において、このリポソームは、先に議論された免疫治療抗体のうちの1つにこのリポソームをカップリングさせることによって、癌に標的され得る。さらに、このベクターは、核標的ペプチドにカップリングされ得、このベクターを宿主細胞の核に指向させる。

10

【0325】

トランスフェクションのための脂質処方物は、例えば、EFFECTENETM(特殊なDNA凝縮エンハンサーを有する非リポソーム脂質)およびSUPERFECTTM(新規の作用 dendrimer 技術(acting dendrimeric technology))として、QIAGENから市販されている。

【0326】

リポソームは、例えば、例えば、LIPOFECTINTTMおよびLIPOFECTACETMとしてGibco BRLから市販されており、これらは、N-[1-(2,3ジオレイルオキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)およびジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド(DDAB)のようなカチオン性脂質から形成される。リポソームの作成方法は当該分野において公知であり、多くの刊行物に記載されている。リポソームはまた、Gregoriadis、G.、Trends in Biotechnology、(1985)3:235-241にも総説されている。

20

【0327】

1つの実施形態において、このビヒクルは、生体適合性の微粒子またはインプラントであり、哺乳動物レシピエントへの移植または投与のために適切である。本発明の方法に従って有用である、例示的な生体侵食性(bioerodible)インプラントは、PCT国際出願番号PCT/US/03307(公開番号W095/24929、表題「Polymeric Gene Delivery System」に記載される。PCT/US/0307は、適切なプロモーターの制御下で外来性遺伝子を含むための、生体適合性(好ましくは生分解性)のポリマーマトリクスを記載する。このポリマーマトリクスを使用して、被験体へのイミダゾキノリン薬剤および/または癌医薬の持続性放出が達成され得る。

30

【0328】

このポリマーマトリクスは、好ましくは、ミクロスフェアのような微粒子(ここで、このイミダゾキノリン薬剤および/または他の治療剤は、固体ポリマーマトリクス全体に分散される)またはマイクロカプセル(ここで、イミダゾキノリン薬剤および/または他の治療剤は、ポリマー殻のコア内に貯蔵される)の形態である。イミダゾキノリン薬および/または他の治療剤を含有するためのポリマーマトリクスの他の形態としては、フィルム、被膜、ゲル、インプラント、およびステントが挙げられる。ポリマーマトリクスデバイスのサイズおよび組成は、マトリクスが導入される組織中で好ましい放出動力学を生じるように選択される。ポリマーマトリクスのサイズは、使用される送達方法(典型的には、組織への注入またはエアロゾルによる鼻および/または肺領域への懸濁液の投与)に従って、さらに選択される。好ましくは、エアロゾル経路が使用される場合、ポリマーマトリクスおよび核酸および/または他の治療薬は、界面活性剤ビヒクル内に包含される。この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、また生体接着性である

40

50

物質から形成されるように選択され、このマトリクスが持続性の損傷を有する鼻および/または肺表面に投与される場合の移送の効率をさらに高め得る。このマトリクス組成物はまた、分解しないようにというよりはむしろ、延長された時間にわたる拡散によって放出されるように選択され得る。いくつかの好ましい実施形態において、このイミダゾキノリン薬剤は、インプラントを介して被験体に投与されるが、一方、他の治療剤は、急性的に投与される。送達（例えば、経口送達または粘膜送達）に適切な生体適合性マイクロスフェアは、Chickeringら、Biotech. And Bioeng、(1996) 52:96-101およびMathiowitzら、Nature、(1997) 386:410-414およびPCT特許出願W097/03702に開示される。

【0329】

非生分解性ポリマーマトリクスおよび生分解性ポリマーマトリクスの両方を使用して、イミダゾキノリン薬剤および/または他の治療剤を被験体に送達し得る。生体分解性マトリクスが好ましい。このようなポリマーは、天然ポリマーまたは合成ポリマーであり得る。このポリマーは、所望される放出期間（一般的には、数時間～1年間またはより長く）に基づいて選択される。典型的には、数時間と3～12ヶ月間との間の範囲の期間にわたる放出が最も望ましい（特に、イミダゾキノリン薬剤にとって）。このポリマーは、必要に応じて、水中でその重量の約90%まで吸収し得るヒドロゲルの形態であり、さらに、必要に応じて、多価イオンまたは他のポリマーと架橋される。

【0330】

特に目的の生体接着性ポリマーとしては、H. S. Sawhney、C. P. PathakおよびJ. A. Hubell、Macromolecules、(1993) 26:581-587（この教示は、本明細書中に援用される）に記載される生体侵食性（bioerodible）ヒドロゲルである、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン（glutin）、ポリ無水物、ポリアクリル酸、アルギナート、キトサン、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）、およびポリ（オクタデシルアクリレート）が挙げられる。

【0331】

治療剤が核酸である場合、圧縮剤（compaction agent）の使用もまた、所望され得る。圧縮剤はまた、単独でかまたは生物学的ベクターもしくは化学的/物理的ベクターと組み合わせて使用され得る。「圧縮剤」は、本明細書中で使用される場合、ヒストンのような薬剤を意味し、これは、核酸上の負電荷を中和し、その結果微細顆粒中への核酸の圧縮を可能にする。核酸の圧縮は、標的細胞による核酸の取りこみを容易にする。圧縮剤は、単独で（すなわち、細胞によってより効率的に取りこまれる形態で核酸を送達するために）使用され得るかまたは、より好ましくは、1つ以上の上記のベクターと組み合わせて使用され得る。

【0332】

核酸の取りこみを容易にするために使用され得る他の例示的な組成物としては、（例えば、標的細胞染色体内の所定の位置への核酸の組みこみのために）リン酸カルシウムおよび細胞内輸送の他の化学メディエーター、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が挙げられる。

【0333】

この化合物は、単独で（例えば、生理食塩水または緩衝液中）または当該分野で公知の任意の送達ベクターを使用して投与され得る。例えば、以下の送達ビヒクルが記載されている：ココレイト（cochleate）（Gould-Fogeriteら、1994、1996）；Emulsome（Vancottら、1998、Lowellら、1997）；ISCOM（Mowatら、1993、Carlssonら、1991、Huraら、1998、Moreinら、1999）；リポソーム（Childersら、199

10

20

30

40

50

9、Michalekら、1989、1992、de Haan 1995a、1995b)；生存細菌ベクター(例えば、Salmonella、Escherichia coli、Bacillus calmatte-guerin、Shigella、Lactobacillus)(Honeら、1996、Pouwelsら、1998、Chattfieldら、1993、Stoverら、1991、Nugentら、1998)；生存ウイルスベクター(例えば、Vaccinia、adenovirus、Herpes Simplex)(Gallichanら、1993、1995、Mossら、1996、Nugentら、1998、Flexnerら、1988、Morrowら、1999)；マイクロスフェア(Guptaら、1998、Jonesら、1996、Malloyら、1994、Mooreら、1995、O'Haganら、1994、Eldridgeら、1989)；核酸ワクチン(Fynanら、1993、Kulcllinら、1997、Sasakiら、1998、Okadaら、1997、Ishiiら、1997)；ポリマー(例えば、カルボキシメチルセルロース、キトサン)(Hamajimaら、1998、Jabbal-Gillら、1998)；ポリマー環(Wyattら、1998)；プロテオソーム(Vancottら、1998、Lowellら、1988、1996、1997)；フッ化ナトリウム(Hashiら、1998)；トランスジェニック植物(Taclcetら、1998、Masonら、1998、Haqら、1995)；ピロゾーム(Gluckら、1992、Mengiardira、1995、Cryzら、1998)；およびウイルス様粒子(Jiangら、1999、Leiblら、1998)。

【0334】

本発明の処方物は、薬学的に受容可能な溶液で投与され、この溶液は、通常、薬学的に受容可能な濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適合性(compatible)キャリア、アジュバント、および必要に応じて他の治療成分を含み得る。

【0335】

薬学的に受容可能なキャリアという用語は、1種以上の適合性の固体もしくは液体充填材、希釈剤もしくはカプセル化物質を意味し、これらは、ヒトまたは他の脊椎動物に投与するために適切である。キャリアという用語は、有機成分または無機成分を示し、天然または合成であり、活性成分と合わせられて、適用を容易にする。薬学的組成物の成分はまた、本発明の化合物と、および互いに、所望の薬学的効果を実質的に損なう相互作用が存在しないような様式で混合され得る。

【0336】

本発明において有用なイミダゾキノリン薬剤は、さらなるアジュバント、他の治療剤、または抗原と混合して送達され得る。混合物は、イミダゾキノリン薬剤またはいくつかの抗原もしくは他の治療剤に加えて、いくつかのアジュバンドからなり得る。

【0337】

イミダゾキノリン剤および他の化合物は、医薬を投与するための任意の通常の経路によって投与され得る。多様な投与経路が利用可能である。選択された特定の様式は、当然、選択された特定のアジュバントまたは抗原、処置される特定の状態および治療効果のために必要とされる投薬量に依存する。本発明の方法は、一般的に、医学的に受容可能な任意の投与様式を使用して実施され得、これは、臨床的に受け入れられない有害な効果を引き起こすことなく効果的な免疫応答レベルを生じる任意の様式を意味する。好ましい投与様式が、本明細書中で議論される。治療における使用について、有効量のイミダゾキノリン剤が、所望される表面(例えば、粘膜、全身)にこの薬剤を送達する任意の様式によって被験体に投与され得る。

【0338】

本発明の薬学的組成物を投与することは、当業者に公知の任意の手段によって達成され得る。好ましい投与経路としては、経口、非経口、筋肉内、鼻腔内、気管内、吸入、眼内、腔内、および直腸内が挙げられるが、これらに限定されない。喘息またはアレルギーの処置または予防のために、このような組成物は、好ましくは、吸入、摂取または全身経路

によって投与される。全身経路には、経口および非経口が含まれる。いくつかの実施形態では、主として喘息患者における炎症部位である肺への直接的な送達という理由から、吸入医薬が好ましい。いくつかの種類の定量吸入器は、吸入による投与のために一般的に使用される。これらの種類のデバイスとしては、定量吸入器 (MDI)、呼吸作動式 MDI (breath-actuated 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、およびネブライザーが挙げられる。

【0339】

経口投与のために、この化合物 (すなわち、イミダゾキノリン剤、イミダゾキノリン抗原、イミダゾキノリン抗体、および他の治療剤) は、この活性化合物と、当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアとの組み合わせによって容易に処方され得る。処置される被験体による経口摂取のために、このようなキャリアによって、本発明の化合物は、錠剤、10 ピル、糖剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液として処方することが可能になる。経口用途のための薬学的調製物は、固形賦形剤として得られ得、所望ならば、必要に応じて、得られた混合物を粉碎して、適切な助剤を添加した後で顆粒の混合物を処理し、錠剤または糖剤コアを得る。適切な賦形剤は、特に、糖のような充填剤であり、これらとしては、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトール; セル10 ロース調製物 (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、ヒドロキシプロプ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) が挙げられる。所望であれば、崩壊剤 (例えば、架橋化ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムのようなその塩) が添加20 され得る。必要に応じて、これらの経口処方物はまた、体内の酸性状態を中和するために生理食塩水または緩衝液中に処方され得るか、あるいはどのようなキャリアも含まずに投与され得る。

【0340】

糖剤コアは適切なコーティングを提供する。この目的のために、濃縮された糖溶液が使用され得、これらは必要に応じて、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル (carbopol gel)、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剤または溶剤混合物を含み得る。染料または色素は、活性化合物投与量の異なる組み合わせを識別または特徴付けるために、30 錠剤または糖剤に添加され得る。

【0341】

経口的に使用され得る薬学的調製物としては、ゼラチンで作られた押し込み合せカプセル (push-fit capsule)、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) で作られたソフト密閉カプセルが挙げられる。押し込み合せカプセルは、充填剤 (例えば、ラクトース)、結合剤 (例えば、デンプン)、および/または潤滑剤 (例えば、タルクもしくはステアリン酸マグネシウム)、そして必要に応じて安定化剤との混合物中に活性成分を含み得る。ソフトカプセルにおいて、活性化合物は、適切な液体 (例えば、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコール) 中に溶解または懸濁され得る。さらに、安定化剤が添加され得る。経口投与用に処方された30 ミクロスフィアもまた使用され得る。このようなミクロスフィアは、当該分野で十分に定義されている。経口投与用の全ての処方物は、このような投与にとって適切な投薬量であるべきである。

【0342】

口腔投与のために、この組成物は、従来の様式で処方された錠剤または舐剤の形態をとり得る。

【0343】

吸入による投与のために、本発明の従う使用のための組成物は、適切なプロペラント (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メタン、二酸化炭素もしくは他の適切なガス) を使用して、圧縮パックもしくはネブラ40 50

イザーからエアロゾルスプレーの形態で都合よく送達され得る。圧縮エアロゾルの場合において、投薬単位は、定量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。カプセルおよびカートリッジ（例えば、吸入器または吹入器において使用するためのゼラチン）は、化合物の粉末混合物および適切な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプン）を含むように処方され得る。

【0344】

化合物を全身に送達することが望ましい場合、これらの化合物は、注入（*injection*）（例えば、ポラス注入もしくは連続注入（*infusion*））による非経口投与のために処方され得る。注入用の処方物は、保存剤を添加して、単位投薬形態（例えば、アンプル）または複数用量の容器が提供され得る。これらの組成物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクル中で懸濁液、溶液またはエマルジョンのような形態をとり得、そして懸濁剤、安定化剤および/もしくは分散剤のような処方剤を含み得る。

10

【0345】

非経口投与のための薬学的処方物は、水溶性形態で活性化合物の水溶液を含む。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注入懸濁液として調製され得る。適切な脂溶性溶媒またはビヒクルとしては、脂肪油（例えば、ゴマ油）、合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリド）、またはリポソームが挙げられる。水性注入懸濁液は、懸濁液の粘度を高める物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、もしくはデキストラン）を含み得る。必要に応じて、この懸濁液はまた、適切な安定化剤または化合物の溶解性を高めて高濃度溶液の調製を可能にする薬剤を含み得る。

20

【0346】

あるいは、これらの活性化合物は、使用の前に、適切なビヒクル（例えば、発熱物質を含まない滅菌水）とともに構成するための粉末形態であり得る。

【0347】

これらの化合物はまた、座剤もしくは保持性浣腸（*retention enema*）のような直腸用組成物もしくは腔用組成物において、例えば、ココアバターもしくは他のグリセリドのような従来の座剤基剤を含んで処方され得る。

【0348】

上記の処方物に加えて、これらの化合物はまた、貯蔵調製物として処方され得る。このような長期作用性処方物は、適切なポリマー物質もしくは疎水性物質（例えば、受容可能な油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂を用いて処方されるか、あるいは溶けにくい誘導體（例えば、溶けにくい塩として）として処方され得る。

30

【0349】

薬学的組成物はまた、適切な固形またはゲル相のキャリアまたは賦形剤を含み得る。このようなキャリアまたは賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、デンプン、セルロース誘導體、ゼラチン、およびポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0350】

適切な液体または固形の薬学的調製物形態は、例えば、吸入用の水溶液もしくは生理食塩水、マイクロカプセル化した渦巻き型（*encochleated*）のコートされた微細な金粒子、リポソーム中に含まれる形態、霧状エアロゾル、皮膚に移植するためのペレット、または引っ搔いて皮膚に入れるための乾燥した鋭い形状が挙げられるが、これらに限定されない。これらの薬学的組成物はまた、顆粒、粉末、錠剤、コートされた錠剤、（マイクロ）カプセル、座剤、シロップ、エマルジョン、懸濁剤、クリーム、点滴剤または活性化合物の遅延性放出を伴う調製剤が挙げられ、調製賦形剤ならびに添加剤および/または助剤（例えば、崩壊剤、結合剤、コーティング剤、膨張剤、潤滑剤、風味剤、甘味剤もしくは可溶化剤）が、上記のように慣習的に使用される。薬学的組成物は、種々の薬物送達系における使用に適している。薬物送達の方法の簡単な総説については、*Langner, Science* 249: 1527~1533, 1990（これは、本明細書中に参

40

50

考としてその全体が援用される)を参照のこと。

【0351】

イミダゾキノリン薬剤および必要に応じて他の治療剤および/または抗原は、それ自体で(ニートで)、または薬学的に受容可能な塩の形態で投与され得る。医薬において使用される場合、塩は、薬学的に受容可能であるべきであるが、薬学的に受容可能でない塩は、その薬学的に受容可能な塩を調製するために都合よく使用され得る。このような塩としては、以下の酸から調製される塩が挙げられるが、これらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸。また、このような塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類塩(例えば、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として調製され得る。

10

【0352】

適切な緩衝剤としては、以下が挙げられる：酢酸および塩(1~2% w/v)；クエン酸および塩(1~3% w/v)；ホウ酸および塩(0.5~2.5% w/v)；ならびにリン酸および塩(0.8~2% w/v)。適切な保存剤としては、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)が挙げられる。

【0353】

組成物は、単位投与形態で都合よく与えられ得、そして薬学分野で周知の任意の方法により調製され得る。全ての方法は、化合物を、1つ以上の補助的成分を構成するキャリアと配合させる工程を包含する。一般的に、組成物は、均一にかつ完全に化合物を液体キャリア、微粉化された固形キャリア、またはその両方と配合し、ついで必要な場合にその生成物を成形することにより調整される。液体用量単位は、バイアルまたはアンプルである。固形用量単位は、錠剤、カプセルおよび座剤である。患者の処置のために、化合物の活性、投与様式、免疫の目的(すなわち、予防的または治療的)、障害の性質および重篤度、患者の年齢および体重に依存して、種々の用量が必要であり得る。所定の用量の投与は、個々の用量単位の形態または他の数個のより小さな用量単位の形態の両方で単回投与により実施され得る。数週間または数ヶ月の特定の間隔での用量の複数回投与は、抗原特異的応答を増加させる(boost)するためには通常である。

20

30

【0354】

他の送達系としては、経時放出、遅延放出または持続性放出の送達系が挙げられ得る。このような系は、化合物の繰り返し投与を回避し得、被験体および医師の利便性を増大する。多くの型の放出送達系が、当業者に利用可能で公知である。これらとしては、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、ポリヒドロキシ酪酸、およびポリアンヒドリドのようなポリマーベースの系が挙げられる。薬物を含む前述のポリマーのミクロカプセルは、例えば、米国特許第5,075,109号に記載される。送達系はまた、以下の非ポリマー系を含む：ステロール類(例えば、コレステロール)、コレステロールエステルおよび脂肪酸または中性脂肪(例えば、モノグリセリド、ジグリセリド、およびトリグリセリド)を含む脂質類；ヒドロゲル放出系；シラスチック(sylastic)系；ペプチドベースの系；ワックスコーティング；従来の結合剤および賦形剤を使用した圧縮錠剤；部分的に融合したインプラントなど。具体例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：(a)侵食性の系(本発明の薬剤は、米国特許第4,452,775号、同第4,675,189号、および同第5,736,152号に記載されるようなマトリックス内に含まれる形態である)、ならびに(b)拡散系(活性成分が、制御された速度でポリマーから浸透する)(例えば、米国特許第3,854,480号、同第5,133,974号および同第5,407,686号に記載されるもの)。さらに、ポンプベースのハードウェア送達系が使用され得、これらのいくつかは、移植用に適合される。

40

50

【0355】

本発明の他の局面において、組成物が提供される。この組成物は、薬学的に受容可能なキャリア中に処方されたイミダゾキノリン薬剤および別の治療的因子を含み、これらは、この組成物中に有効量で存在する。

【0356】

他の局面において、本発明は、キットに関する。本発明の1つのキットは、イミダゾキノリン薬剤を含む持続性放出ビヒクル、および別の治療剤を収容する容器、および化合物の投与のタイミングに関する指示書を備える。持続性放出ビヒクルは、そのビヒクル中に含まれる化合物をゆっくりと放出する任意のデバイスという先行技術の意味に従って、本明細書中で使用される。

【0357】

この容器は、全ての医薬を一緒に収容する単一の容器であり得るか、または医薬の個々の投薬量を収容する複数の容器もしくはチャンバ（例えば、プリスターパック）であり得る。このキットはまた、医薬の投与のタイミングに関する指示書を有する。この指示書は、被験体が適切な時間に医薬を摂取するように指示する。例えば、医薬の送達に適切な時間は、症状が発生するときであり得る。あるいは、医薬の投与に適切な時間は、月一度または年一度のような定期的なスケジュールであり得る。

【0358】

本発明の別のキットは、イミダゾキノリン薬剤を収容する少なくとも1つの容器および別の治療剤を収容する少なくとも1つの容器、および被験体における相乗免疫応答を誘導するための有効量で組成物を投与するための指示書を備える。このキットにおける指示書は、相乗免疫応答を生じる量の化合物を摂取するように被験体を指示し得る。薬物は、相乗免疫応答を生じるために十分近い時間で投与される限り、同時でも別々に投与されてもよい。

【0359】

R - 848 (Resiquimod) および R - 847 (Imiquimod) は、抗ウイルス活性および抗腫瘍活性を有することが示された免疫応答変更因子のクラスである、イミダゾキノリンのファミリーに属する。Imiquimod は、ヒトパピローマウイルス (HPV) 関連性器いぼの処置に関して既に臨床的に承認されている。R - 848 および R - 847 は、サイトカイン (IFN - 、IL - 12 および IFN - を含む) の強力な誘発因子である。CpG ODN 2006 のように、これらは、Th2 応答を阻害しながら、Th1 媒介免疫応答を増強する。R - 848 および CpG ODN の両方が、マクロファージおよび DC を活性化して、多くの同じサイトカインを分泌させる。しかし、R - 848 および CpG ODN は、マウスにおける研究で示されたように、異なる速度論および相対量でほとんど同じサイトカインを誘発する。Vasilakos JP ら (2000) Cell Immunol 204: 64 - 74。本発明者らは、ここで、R - 848 が CpG ODN 2006 よりも実質的に多く、プロ炎症性サイトカイン (TNF - および IL - 6) を PBMC において誘導することを示した。

【0360】

R - 848 活性化および CpG ODN 活性化の機構は、異なるようである。クロロキンは、CpG ODN 2006 の効果を完全になくし得るが、クロロキンは、R - 848 媒介シグナル伝達を低下させ得るが、なくすことはないようである。CpG ODN 2006 が、2つの細胞型 (B細胞および pDC) を直接活性化することが示されている。Krug A ら (2001) (未公開の知見)。Ahonen らの研究により、R - 848 が、mDC を直接活性化し得ることが明らかとなった。Ahonen CL ら (1999) Cell Immunol 197: 62 - 72。

【0361】

R - 848 および CpG - ODN の両方が、NF - B 活性化を刺激するが、活性化の機構は異なるようである。CpG - ODN は、Toll 様レセプター 9 (hTLR9) を活性化する。Hemmi H ら (2000) Nature 408: 740 - 5 ; B

10

20

30

40

50

auer Sら(2001) Proc Natl Acad Sci USA 98: 9237-42。TLR9は、病原体由来のリガンドの認識に関して先天免疫のメディエーターとして機能する免疫レセプターのファミリーに属する。現在まで、10種のTLRタンパク質が公知である。種々のTLRの全部ではないが一部のリガンドも特徴付けされる。例えば、リポポリサッカリド(LPS)(グラム陰性細菌の構成要素)は、TLR4により認識される。Chow JCら(1999) J Biol Chem 274: 10689-92。全ての公知のTLRタンパク質の発現パターンは複雑である。hTLR1は、遍在して発現されるが、hTLR2、hTLR4およびhTLR5は、単球、多形核食細胞および樹状細胞中に存在する。Muzio Mら(2000) J Leukoc Biol 67: 450-6。G. Hartmannのグループにおいてなされた研究(Krug Aら(2001); Homung Vら(2001)、両方とも未公開の知見)は、hTLR7およびhTLR9が、B細胞およびpDC中に存在するが、mDCは、hTLR7およびhTLR8を発現するがhTLR9を発現しないことを示した。しかし、ヒトTLR8は、pDCにおいて発現されないようである。

10

20

30

40

50

【0362】

本発明の1局面によれば、出願人らは、ヒト胚腎細胞におけるR-848媒介NF- κ B活性化が、ヒトToll様レセプターファミリーであるhTLR8のメンバーにより媒介されることが発見された。293T細胞は、R-848に应答してhTLR8 cDNA発現ベクター活性化NF- κ Bシグナル伝達で一時的にトランスフェクトされるが、CpG-ODNではトランスフェクトされない。hTLR8による活性化は、用量依存性様式でR-848により変化することが観察された。

【0363】

出願人はまた、hTLR7 cDNA発現ベクターと一過性にトランスフェクトした293T細胞が、R-848と接触した場合、NF- κ Bシグナル伝達の活性化を観察した。TLR8を有する状態と対照的に、TLR7による活性化は、濃度依存性であることが観察され、(1)hTLR7がhTLR8よりR-848になおより感受性であり得、そして(2)試験された濃度は、hTLR7シグナル伝達を飽和するのに十分であったことを示唆する。CpG ODN 2006によるNK-B活性化は、hTLR9によって媒介されるが、R-848は、hTLR9を単独で発現する細胞中で任意のNF- κ Bシグナル伝達を活性化しないと考えられた。hTLR8を発現する293T細胞はまた、R-848に应答してIL-8を生成した。

【0364】

イミダゾキノリンR-848についてのレセプターとしてTLR8およびTLR7の出願人による同定は、本明細書中に記載のスクリーニング方法についての基礎の一部を形成する。本発明のスクリーニング方法は、TLR8またはTLR7によるイミダゾキノリンの結合がTLR媒介シグナル伝達活性に生じる事実を利用する。イミダゾキノリンのTLR7またはTLR8のシグナル伝達活性は、試験化合物のTLRシグナル伝達活性が本明細書中に記載される種々のスクリーニングアッセイにおいて比較され得る基準応答として使用され得る。

【0365】

特定のスクリーニングアッセイの基礎は、機能的TLR(例えば、TLR7、TLR8、またはTLR9)の存在である。機能的TLRは、TLRリガンドとの相互作用に应答してシグナルを誘導し得る全長TLRポリペプチドまたはそのフラグメントである。例えば、TLR4および他のTLRは、細胞質Toll/IL-1レセプター(TIR)相同性ドメインを有する。このドメインは、TIRドメインの同種の相互作用によってTLR4と相互作用するアダプタタンパク質(MyD88)上の類似のドメインと連絡する。次の相互作用は、それぞれの「デスドメイン(death domain)」を介して、アダプタとキナーゼとの間に存在する。次いで、キナーゼは腫瘍壊死因子(TNF)レセプター関連因子-6(TRAF6)と相互作用する。Medzhitov Rら、Mol Cell 2: 253(1998); Kopp EBら、Curr Opin Immu

no1 11:15 (1999)。TRAF6の後、2つの一連のキナーゼ活性化工程が、インヒビタータンパク質I Bのリン酸化およびNF- Bからのその解離をもたらす。第1のキナーゼは、NF- B誘導キナーゼに対する、NIKとして公知のマイトジェン活性化キナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)である。このキナーゼの標的は、2つの鎖で作製される別のキナーゼであり、I Bキナーゼ(IKK)およびI Bキナーゼ(IKK)と呼ばれ、これらは一緒になって、I Bをリン酸化するIKK:IKKのヘテロダイマーを形成する。NF- Bは、核に転移し、それらのプロモーターおよびエンハンサー(例えば、インターロイキン-1(IL-1)、IL-6、IL-8、IL-12のサブユニットp40ならびに同時刺激分子CD80および同時刺激分子CD86をコードする)におけるB結合部位を有する遺伝子を活性化する。

10

【0366】

いくつかの実例において、機能的TLRは、細胞によって自然に発現される。別の実例において、機能的TLRの発現は、TLRを他に欠失するか、またはTLRの認識リガンドに対する応答を欠失する細胞または細胞株に、種特異的TLRの導入または再構成を含み得、適切なリガンドとの接触に応答して、TLR/IL-1Rシグナル伝達経路を活性化し得る細胞または細胞株を生じる。TLR9または免疫刺激核酸応答を欠失する細胞株の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:293線維芽細胞(ATCC CRL-1573)、MonoMac-6、THP-1、U937、CHOおよび任意のTLR9ノックアウト。細胞または細胞株への種特異的TLRの導入は、遺伝子発現配列に作動可能に連結されるTLRコード核酸配列を用いて、細胞または細胞株の一過性または安定性トランスフェクションによって好ましくは達成される。

20

【0367】

機能的TLR(TLR7、TLR8、およびTLR9を含む)はヒトTLRに限定されないが、ヒト供給源または非ヒト供給源に由来するTLRを含み得る。非ヒト供給源の例として以下が挙げられるが、これらに限定されない:マウス、ウシ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタおよびウマ。他の種としては、ニワトリおよび魚(例えば、養殖魚)が挙げられる。

【0368】

機能的TLR(TLR7、TLR8、およびTLR9を含む)はまた、ネイティブなTLRポリペプチドに限定されない。特定の実施形態において、TLRは、例えば、細胞外ドメインおよび細胞質ドメインが異なる種由来のTLRポリペプチドに由来する、キメラTLRであり得る。上記のこのようなキメラTLRポリペプチドとしては、例えば、ヒトTLR細胞外ドメインおよびマウスTLR細胞質ドメイン(各ドメインは、各種の対応するTLR7、TLR8またはTLR9に由来する)が挙げられ得る。代替の実施形態において、このようなキメラTLRポリペプチドとしては、異なるTLRスプライス改変体またはアロタイプで作製されたキメラが挙げられ得る。ISNA模倣物、アゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングする目的のために有用な他のキメラTLRポリペプチドは、第1の型のTLR(例えば、TLR9)および第1の型のTLRとして同じ種または別の種の別のTLR(例えば、TLR7またはTLR8)で作製されたキメラポリペプチドが挙げられ得る。TLR7ポリペプチド、TLR8ポリペプチドまたはTLR9ポリペプチドに由来する少なくとも1つのこのようなドメインを提供する2つ以上のポリペプチド(例えば、全て異なるポリペプチド供給源に由来する細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン)に由来する配列を取り込むキメラポリペプチドもまた意図される。さらなる例として、1つのTLR9の細胞外ドメイン、別のTLR9の細胞内ドメインおよびルシフェラーゼ、GFPなどのような非TLRレポーターを含むような構築物もまた意図される。当業者は、このようなキメラTLRポリペプチドをコードするDNA配列の設計および生成の方法を認識する。

30

40

【0369】

スクリーニングアッセイは、TLR/IL-1Rシグナル伝達経路またはTLRシグナル伝達活性をアッセイするのに適切な他のアッセイのいずれかに基づく任意の多数の可能

50

性のある読み出しシステムを有し得る。好ましい実施形態において、スクリーニングアッセイのための読み出しは、ネイティブの遺伝子、あるいは、同時トランスフェクションされたレポーター遺伝子構成物またはそうでなければ同時導入されたレポーター遺伝子構成物の使用に基づき、これらは、TLR/IL-1Rシグナル伝達系路(MyD88、TRAF6、p38、および/またはERKを含む)に反応する(Hacker Hら、EMBO J 18:6973~6982(1999))。これらの経路は、Bキナーゼ複合体およびc-Jun N末端キナーゼを含むキナーゼを活性化する。従って、このアッセイに特に有用なレポーター遺伝子およびレポーター遺伝子構成物としては、NF-Bに対して感受性のあるプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子が挙げられ得る。このようなプロモーターの例としては、NF-B、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12p40、CD80、CD86、およびTNFに対するプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。TLR7感受性プロモーター、TLR8感受性プロモーター、またはTLR9感受性プロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子としては、酵素(例えば、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)など)、生物発光マーカー(例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP、米国特許第5,491,084号)など)、表面発現分子(例えば、CD25)、および分泌分子(例えば、IL-8、IL-12p40、TNF)が挙げられ得るが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、レポーターは、IL-8、TNF、NF-B-ルシフェラーゼ(NF-B-luc; Hacker Hら、EMBO J 18:6973~6982(1999))、IL-12p40-luc(Murphy TLら、Mol Cell Biol 15:5258~5267(1995))、およびTNF-luc(Hacker Hら、EMBO J 18:6973~6982(1999))から選択される。酵素活性読み出しに依存するアッセイにおいて、基質は、アッセイの部分として供給され得、そして検出としては、化学ルミネセンス、蛍光、発色現象、放射性標識の組み込み、薬物耐性、または酵素活性の他のマーカーを挙げられ得る。分子の表面発現に依存するアッセイについて、検出は、FACS分析または機能的アッセイを用いて達成され得る。分泌分子は、酵素結合免疫吸着剤アッセイ(ELISA)またはバイオアッセイを用いてアッセイされ得る。多数のこのような読み出しシステムが、当該分野で周知であり、そして、市販されている。

【0370】

上記のように、1つの局面において、本発明は、TLRシグナル伝達活性または試験化合物を、参照イミダゾキノリンの対応するTLRシグナル伝達活性に対して比較するためのスクリーニング方法を提供する。一般的に、この方法は、TLR7およびTLR8からなる群より選択される機能的TLRと、参照イミダゾキノリンとを接触させる工程、およびTLRシグナル伝達系路によって媒介される参照応答を検出する工程；TLR7およびTLR8からなる群より選択される機能的TLRと、試験化合物とを接触させる工程、およびTLRシグナル伝達系路によって媒介される試験応答を検出する工程；ならびに、試験応答と参照応答とを比較して、試験化合物のTLRシグナル伝達活性とイミダゾキノリンとを比較する工程、を包含する。試験化合物および参照イミダゾキノリンが、TLRに独立して接触するアッセイを使用し、イミダゾキノリン模倣体である試験化合物を同定し得る。試験化合物および参照イミダゾキノリンが、TLRに同時に接触するアッセイを使用して、イミダゾキノリンアゴニストおよびイミダゾキノリンアンタゴニストである試験化合物を同定し得る。

【0371】

本明細書で使用されるようなイミダゾキノリン模倣体は、TLRシグナル伝達系路によって媒介される応答を引き起こす化合物である。本明細書で使用される場合、用語「TLRシグナル伝達系路によって媒介される応答」は、イミダゾキノリン-TLR相互作用の特徴である応答をいう。本明細書で示されるように、イミダゾキノリン-TLR相互作用の特徴である応答としては、イミダゾキノリン特異的プロモーター(例えば、NF-B

プロモーター)の制御下での遺伝子の誘導、Th1サイトカインレベルにおける増加などが挙げられる。NF- κ Bプロモーターの制御下の遺伝子は、NF- κ Bプロモーターを天然で含む遺伝子であり得るか、または、NF- κ Bプロモーターが挿入された構築体中の遺伝子であり得る。NF- κ Bプロモーターを天然に含む遺伝子としては、IL-8、IL-12p40、NF- κ B-luc、IL-12p40-luc、およびTNF-lucが挙げられるが、これらに限定されない。Th1サイトカインレベルにおける増加は、イミダゾキノリン-TLR相互作用の別の測定特徴である。Th1サイトカインレベルにおける増加は、イミダゾキノリン-TLR相互作用に応答した、Th1サイトカインの増加した産生または増加した安定性または増加した分泌から生じる。Th1サイトカインとしては、IL-2、IFN- γ 、およびIL-12が挙げられるが、これらに限定されない。イミダゾキノリン-TLR相互作用の特徴である他の応答としては、Th2サイトカインレベルにおける減少が挙げられるが、これに限定されない。Th2サイトカインとしては、IL-4、IL-5、IL-10、およびIL-13が挙げられるが、これらに限定されない。

【0372】

イミダゾキノリン-TLR相互作用の特徴である応答は、直接的な応答または間接的な応答であり得る。直接的な応答は、イミダゾキノリン-TLR相互作用の結果として直接的に生じる応答である。間接的な応答は、それが生じる前の他のパラメータの変更を包含する応答である。

【0373】

本明細書で使用されるようなイミダゾキノリンアゴニストは、TLRシグナル伝達系路によって媒介されるイミダゾキノリンに対する増強された応答を引き起こす化合物である。従って、本明細書で使用されるようなイミダゾキノリンアゴニストは、参照イミダゾキノリンによって通常誘導される免疫応答の少なくとも1つの局面における増加を引き起こす化合物である。例えば、イミダゾキノリンによって通常誘導される免疫応答は特に、イミダゾキノリンに応答したTLR7媒介シグナル伝達またはTLR8媒介シグナル伝達を含む。幾つかの実施形態において、イミダゾキノリンアゴニストは、TLR7またはTLR8への結合についてイミダゾキノリンと競合する。他の実施形態において、イミダゾキノリンアゴニストは、イミダゾキノリンと結合するための部位とは区別されるTLR7またはTLR8上の部位に結合する。なお他の実施形態において、イミダゾキノリンアゴニストは、別の分子、またはTLR7もしくはTLR8と区別される経路を介して作用する。

【0374】

本明細書で使用されるイミダゾキノリンアンタゴニストは、TLRシグナル伝達系路によって媒介されるイミダゾキノリンに対する減少した応答を引き起こす化合物である。従って、本明細書で使用されるイミダゾキノリンアンタゴニストは、参照イミダゾキノリンによって通常誘導される免疫応答の少なくとも1つの局面における減少を引き起こす化合物である。例えば、イミダゾキノリンによって通常誘導される免疫応答は、イミダゾキノリンに応答したTLR7媒介シグナル伝達またはTLR8媒介シグナル伝達を特に含む。幾つかの実施形態において、イミダゾキノリンアンタゴニストは、TLR7またはTLR8への結合についてイミダゾキノリンと競合する。他の実施形態において、イミダゾキノリンアンタゴニストは、イミダゾキノリンと結合するための部位とは区別されるTLR7またはTLR8上の部位に結合する。なお他の実施形態において、イミダゾキノリンアンタゴニストは、別の分子、またはTLR7もしくはTLR8とは区別される経路を介して作用する。

【0375】

試験化合物のTLRシグナル伝達活性と、イミダゾキノリンのシグナル伝達活性とを比較するスクリーニング方法は、試験化合物の非存在下において、参照イミダゾキノリンが、免疫応答の少なくとも1つの局面を誘導し得る条件下で、少なくとも1つの試験化合物と、TLR7またはTLR8から選択される機能的TLRとを接触させる工程を包含する

。機能的 TLR は、細胞によって発現され得るか、または、TLR は、無細胞系の部分であり得る。機能的 TLR を発現する細胞は、TLR を天然に発現する細胞であるか、または、TLR 発現ベクターを導入された細胞であるかのいずれかであり、あるいは、TLR が細胞によって発現されることを可能にする様式で TLR を発現し、そして、TLR のシグナル伝達部分によってシグナル伝達を通常可能にする条件化でシグナルを伝達するように操作された細胞である。上記のように、TLR は、ネイティブの TLR であり得るか、または、そのフラグメントもしくは変異体であり得る。これらの方法に従って、試験化合物は、参照イミダゾキノリンと機能的 TLR または TLR 発現細胞とを接触させるより前に、接触させるより後に、または接触と同時に機能的 TLR または TLR 発現細胞と接触される。機能的 TLR または TLR 発現細胞の応答は、試験化合物の非存在下における同じ条件下で生じる対応する応答により測定され、そして比較される。応答が適切な場合、試験化合物の非存在下における応答は、同時制御または履歴制御として決定され得る。このような応答の例としては、TLR シグナル伝達系路、サイトカインの分泌、細胞増殖、および細胞活性化を通じて媒介される応答が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、応答の測定は、IL - 8 分泌の検出（例えば、ELISA によって）を包含する。別の好ましい実施形態において、応答の測定は、ルシフェラーゼ活性（例えば、NF - B - luc、IL - 12 p40 - luc、または TNF - luc）の検出を包含する。

【0376】

試験化合物としては、ペプチド核酸（PNA）、抗体、ポリペプチド、炭水化物、脂質、ホルモン、ならびに低分子（特に、R - 484 および R - 487 以外のイミダゾキノリン）が挙げられ得るが、これらに限定されない。試験化合物は、参照イミダゾキノリンの改変体をさらに含み得る。試験化合物は、化合物のコンビナトリアルライブラリーのメンバーとして生成され得る。

【0377】

好ましい実施形態において、試験化合物、試験核酸分子、試験イミダゾキノリン、および候補薬理学的薬剤をスクリーニングする方法は、例えば、アレイを基礎とするアッセイ系および少なくとも 1 つの自動化工程または半自動化工程を組み込むことによって、大きいスケールで、そして高スループットで実行され得る。例えば、このアッセイは、細胞が、個々のウェルに分配される複数ウェルプレートを使用して設定され得、そして、試薬は、複数ウェルプレートの形状に適した複数ウェル送達システムを使用して、系統的な様式にて添加される。高スループットスクリーニングアッセイにおける使用において適切な、手動複数ウェル送達デバイスおよび自動複数ウェル送達デバイスは、当業者により周知である。各ウェルまたは各アレイ要素は、1 対 1 の様式で、特定の試験状態（例えば、試験化合物）に対してマッピングされ得る。読み出しはまた、好ましくは、複数プレート読み出しデバイスなどを使用して、この複数ウェルアレイにおいて実行され得る。このようなデバイスの例は、当該分野において周知であり、市販のものを通じて入手可能である。サンプル操作および試薬操作は、自動化され、10 個、100 個、1,000 個、または 100 万個の並列アッセイを、1 日に、または 1 週間で実行し得るように、スクリーニングアッセイのスループット能力をさらに増強し得る。完全自動化システムは、合成化合物のコンビナトリアルライブラリーの生成および分析のような適用について、当該分野で公知である。例えば、米国特許第 5,443,791 号および同第 5,708,158 号を参照のこと。

【実施例】

【0378】

（方法）

他に示されている場合を除いて、以下の一般的な方法を使用した。

【0379】

トランスフェクションのために使用する細胞は、293T（ヒト胎児腎臓細胞、T 抗原トランスフェクションされた）または 293 - TLR9 - luc（安定なトランスフェク

ション体、ヒトTLR9レセプターを発現し、そしてゲノムNF- Bルシフェラーゼカセットを含むヒト胎児腎臓細胞)であった。

【0380】

トランスフェクションを、6ウェルプレートにおいて実施した。細胞を、DMEM+10%FCS中の 4×10^5 /ウェルでトランスフェクションする前に、1日プレートに置いた。トランスフェクションを、製造者の指示書に従って、カチオン性脂質(EFFECTENETM 試薬、QIAGEN)を用い、1ウェルあたり1 μ gのDNAおよび10 μ lのEFFECTENETMを用いて、実施した。

【0381】

構築物: TLRまたはcDNAをpcDNA3.1へクローン化させた。NF- B活性化は、5 \times NF- Bルシフェラーゼ構築物(Stratagene)を用いることによって測定した。トランスフェクション効率は、-ガラクトシダーゼ(-gal)レポーター構築物(p-galコントロール、Clontech)を用いることによって測定した。 10

【0382】

刺激を、トランスフェクション後24時間行った。細胞の培地を1mlにまで低下させ(培地変化を伴わずに)、そして、細胞を、示された量のR-848、LPS、ODN8954、2006およびIL-1で16時間刺激した。

【0383】

細胞抽出物を、凍結融解方法を使用して、100 μ lのレポーター溶解緩衝液中で細胞を溶解させることによって調製した。NF- B刺激を、ルシフェラーゼ活性(Promega)を介して測定した。全てのデータを-gal発現に対して正規化した。刺激係数は、ODNの添加を伴わない培地のルシフェラーゼ活性に対する基準ルシフェラーゼにおいて計算した。 20

【0384】

(実施例1. R-848は、hTLR9媒介NF- B活性化を刺激しない)

R-848は、免疫調節特性を有するので、この実験により、R-848媒介免疫応答が、hTLR-9依存性が否かを試験した。hTLR9およびNF- Bレポーター構築物を用いてトランスフェクトされた細胞安定性(293-TLR-Luc細胞)を、IL-1、CpG ODN2006を用い、コントロール非CpG ODN1982(5' TCCAGGACTTCTCTCAGGT3'、配列番号3)、または増加する量のR-848と共に、16時間インキュベートした。NF- B活性を、ルシフェラーゼ活性の測定により決定した。結果を図1に示す。活性は、培地コントロールにおけるルシフェラーゼ活性と比較して、X倍活性化と与えられる。1~12 μ g/mlの濃度範囲でのCpG-ODN2006が、NF- B活性化を10~30倍刺激し、一方、5 μ g/mlのR-848は、NF- B活性化をもたらさなかった。 30

【0385】

(実施例2. R-848による293T細胞におけるNF- Bの活性化は、TLR8およびTLR7を介して媒介される)

NF- Bルシフェラーゼレポーター構築物を用いて安定にトランスフェクションされた293T細胞を、全長hTLR2、全長hTLR7、全長hTLR8および全長hTLR9をコードするプラスミド(pcDNA3.1構築物)を用いて一時的にトランスフェクションした。全てのトランスフェクションを、-ガラクトシダーゼ活性に対して正規化した。トランスフェクションに続いて24時間、細胞を、R-848、LPS、CpG ODN8954(5' GGGGACGACGTCGTGGGGGG3'、配列番号4)、CpG-ODN2006、またはIL-1を用いて刺激し、次いで、刺激後16時間でルシフェラーゼ活性についてアッセイした。各実験を、同様の結果を伴って、少なくとも2回行った。 40

【0386】

図2Aに示されるように、R-848は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子のNF- 50

B依存性転写を2.5～4.5倍に刺激した。ポジティブコントロールIL-1は、TLR依存性様式において、NF- κ Bルシフェラーゼレポーター遺伝子を活性化した。hTLR9のトランスフェクションについてのポジティブコントロールは、NF- κ B活性化を3倍刺激した2006の添加物であった。R-848に対する応答をまた、hTLR7を用いてトランスフェクションした細胞において見出した。LPSもCpG ODN8954も、hTLR7またはhTLR8を活性するようではなかった。さらなるコントロールとして、hTLR2トランスフェクションされた293T細胞を(Chowらによってなされた早期の研究と同様に)、LPSによって活性化した。Chow J Cら、(1999) J Biol Chem 274:10689～92。

【0387】

図2Bは、R-848の濃度に対して用量依存性様式で変化する、hTLR8媒介NF- κ B活性化を示す。細胞を、トランスフェクション後24時間刺激し、16時間後にルシフェラーゼ活性についてアッセイした。R-848の量を増化させることによって(1～10 μ g/ml)、1.8倍～4.7倍の刺激範囲の増加を生じた。対照的に、R-848媒介hTLR7活性は、この範囲においては濃度依存性であるようではなく、このことは、hTLRシグナル伝達は、試験された濃度のR-848で飽和であることを示唆する。同様の結果を、ろ過によって精製されたR-848について得た。

【0388】

R-848媒介活性化におけるhTLR8の役割を確認するために、安定にトランスフェクションされた293-TLR9-Luc細胞を、hTLR-cDNA構築物を用いてトランスフェクションし、そして、ルシフェラーゼ活性を決定した。293-TLR9-Luc細胞は、hTLR9オープンリーディングフレームおよびNF- κ Bルシフェラーゼカセットのゲノムコピーを含む。実験を、二連で行い、そして、TLR9を構成的に発現するという理由で、CpG ODN2006をポジティブコントロールとして使用した。図3Aに示されるように、hTLR8を発現する構築物を用いてトランスフェクションされた細胞は、R-848に反応するNF- κ B活性化をもたらした。対照的に、空のベクターを有する細胞またはhTLR7を発現する構築物は、この実験において、R-848に反応するNF- κ B活性化をもたらさなかった。

【0389】

上記(図2)の一時的トランスフェクション実験の結果と同様に、観測された応答は、R-848濃度依存性であった。2.5 μ g/mlのR-848を用いた刺激により、活性化において5倍の増加が生じ、一方、10 μ g/mlのR-848を用いた刺激は、活性の10倍の増加を生じた。hTLR9を構造的に発現するという理由で、これらの実験におけるポジティブコントロールは、6 μ g/mlのCpG ODN2006を用いた刺激であった。これらの実験において、hTLR7は、予想外に、R-848刺激に対しては不活性であるようであった。全てのトランスフェクション実験において、hTLR2およびhTLR6をまた、試験したが、これらのいずれもが、R-848に対する応答を示さなかった。図1にすでに示したように、hTLR9は、R-848とは反応しなかった。これは、pcDNA(空のベクター)単独での293-TLR-Lucのトランスフェクションが、いかなる活性化をも生じなかったためである。

【0390】

なお他の実験において、R-848とCpG ODNとを組み合わせた効果を、TLR9を発現する細胞、および、TLR7またはTLR8のいずれかに対して試験した。(図3Bを参照のこと)。同時刺激を、hTLR9およびhTLR7(各組の第1のバー)、または、hTLR9およびhTLR8(各組の第2のバー)を用いてトランスフェクションした293-TLR9-Luc細胞におけるNF- κ B活性化によって測定した。上記のように、R-848に対する応答における活性化は、hTLR9およびhTLR8を同時発現する細胞において濃度依存性であった。hTLR7およびhTLR9を発現する細胞は、R-848に対する応答において活性化されなかった。R-848およびCpG ODN#2006の添加物により、hTLR8におけるいずれかの化合物単独では、より

10

20

30

40

50

高い活性化レベルを生じたが、hTLR7発現細胞では生じなかった。

【0391】

(実施例3. R-848は、hTLR8の存在下においてIL-8を誘導する)

CpG ODNは、hTLR9を用いてトランスフェクションされた293細胞において、IL-8産生を誘導し得ることが公知である。Bauerら、(2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:9237~42。同様のことが、この実験において観測され、ここで、hTLR8を用いてトランスフェクションされた293T細胞を、R-848を用いて刺激した。細胞を、トランスフェクションの24時間後、R-848、LPS、ODN8954、またはIL-1を用いて刺激した。上澄みを、刺激後16時間で回収し、そして上澄み中のIL-8の量を、ELISA(OptEIA, Becton-Dickinson)によって決定した。図4に示されるように、10 μ g/mlのR-848を用いた、hTLR8トランスフェクションされた293T細胞の刺激により、刺激の16時間後に、1600pg/mlのIL-8より多く生じた。hTLR7を用いたトランスフェクションは、バックグラウンドと比較して、IL-8産生のわずかな増加をしか生じなかった。

【0392】

(実施例4. R-848は、IFN γ を誘導する)

R-848は、単球誘導された樹状細胞(mDC)において、IFN γ を産生することが記載されており、一方、CpG ODNは、プラズマ細胞様樹状細胞(pDC)由来のIFN γ の分泌を誘導すると記載されている(Krugら、(2001) Eur J Immunol 31:2154~63)。この実験において、mDCおよびpDCを含む、非分画ヒトPBMCを、種々の濃度のR-848(0.01~1.0 μ g/ml)、種々の濃度のCpG ODN2006(0.2~3.0 μ g/ml)、種々の濃度のネガティブコントロールODN5177(5' TCCGCCCTGTGACATGCATT3' ; 配列番号5 ; 0.2~3.0 μ g/ml)、Staphylococcal enterotoxin B(SEB、50ng/ml)、または培地単独の存在下で、48時間インキュベートし、次いで、上澄み中のIFN γ の濃度を、ELISAによって測定した。R-848は、B型CpG ODN2006より、ヒトPBMCのインキュベーションに対して、より高い量のIFN γ を誘導した(図5A)。

【0393】

図5Bにおいて、IFN γ 分泌に対するR-848とCpG ODN(例えば、2006番)とを組み合わせた効果が、示される。3人の異なるドナーからのヒトPBMCを、誘導された濃度のODNおよびR-848を別個か、または一緒かのいずれかを用いて、48時間インキュベートした。上澄み回収し、そして、IFN γ をELISAによって測定した。データは、平均サイトカイン量を示す。このデータは、IFN γ 分泌の用量依存性ネガティブ効果が、R-848と一緒に、特定のCpG ODNを使用することによって生じることを示唆する。

【0394】

(実施例5. R-848は、IP-10およびIFN γ を誘導する)

この実験により、Th1サイトカインIFN γ ならびにTh1関連ケモカインIP-10(IFN γ 誘導的タンパク質)の誘導を調査した。3人のドナーからの非分画ヒトPBMCを、種々の濃度のR-848(0.01~1.0 μ g/ml)、種々の濃度のCpG ODN2006(0.2~3.0 μ g/ml)、種々の濃度のネガティブコントロールODN5177(0.2~3.0 μ g/ml)、SEB(50ng/ml)、または培地単独の存在下において、48時間インキュベートし、次いで、上澄み中のIP-10およびIFN γ の濃度をELISAによって測定した。CpG ODN2006は、R-848と比較して、同様の量のIP-10を誘導したがネガティブコントロールODN5177は誘導しなかった(図6A)。同様の結果を、IFN γ について得た(示さず)。

【0395】

図6Bに、IP-10分泌に対する、R-848とCpG ODN(例えば、#200

6) とを組み合わせた効果が、示される。3人の異なるドナーからのヒトPBM Cを、誘導された濃度のODNおよびR-848を別個か、または一緒かのいずれかを用いて、48時間インキュベートした。上澄み回収し、そして、IP-10をELISAによって測定した。データは、平均サイトカイン量を示す。このデータは、IP-10分泌の用量依存性ネガティブ効果が、R-848と一緒に、特定のCpG ODNを使用することによって生じることを示唆する。

【0396】

(実施例6 . R-848は、CpG ODNよりも強力な炎症促進性サイトカインの誘導物質である)

CpG ODNは、低量ではあるが有意な量の炎症促進性サイトカイン(例えば、TNF- α およびIL-6)を誘導することが記載されている。3人のドナー由来の未分画ヒトPBM Cを、種々の濃度のR-848(0.01~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、種々の濃度のCpG ODN 2006(0.4~4.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、SEB(50 ng/ml)または培地単独の存在下で48時間インキュベートし、その後、上清中のTNF- α 濃度およびIL-6濃度をELISAにより測定した。R-848は、非常に大量のTNF- α を誘導する際(図7A)そして大量のIL-6を誘導する際にも(図9)、どのCpG ODNよりもかなり強力であった。この特徴は、CpG ODNの活性およびイミダゾキノリンの活性の有意な差異を示す。

【0397】

図7Bにおいて、TNF- α 分泌に対するR-848とCpG ODN(例えば、#2006)とを組み合わせた効果が、示される。2人の異なるドナー由来のヒトPBM Cを、示される濃度のODNおよびR-848(個別または一緒のいずれかで)とともに16時間インキュベートした。上清を採取し、TNF- α をELISAにより測定した。データは、平均サイトカイン量を示す。このデータは、CpG ODNおよびR-848の両方とのインキュベーション後に分泌されたTNF- α の量としての相乗的応答が、いずれかの化合物単独により分泌された相加量よりも大きいことを示唆する。

【0398】

(実施例7 . R-848は、IL-10を誘導する)

IL-10は、免疫刺激の負の推定調節因子を示し、そしてIL-10は、Th1サイトカインIFN- γ およびIL-12の生成をアンタゴナイズすると広範に考えられている。3人のドナー由来の未分画ヒトPBM Cを、種々の濃度のR-848(0.01~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、種々の濃度のCpG ODN 2006(0.4~4.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、SEB(50 ng/ml)または培地単独の存在下で48時間インキュベートし、その後、上清中のIL-10濃度をELISAにより測定した。R-848は、CpG ODN 2006よりも多量のIL-10を誘導した(図8A)。

【0399】

図8Bにおいて、IL-10分泌に対するR-848とCpG ODN(例えば、#2006)とを組み合わせた効果が、示される。2人の異なるドナー由来のヒトPBM Cを、示される濃度のODNおよびR-848(個別または一緒のいずれかで)とともに48時間インキュベートした。上清を採取し、IL-10をELISAにより測定した。データは、平均サイトカイン量を示す。このデータは、CpG ODNおよびR-848の両方とのインキュベーション後に分泌されたIL-10の量としての相乗的応答が、いずれかの化合物単独により分泌された相加量よりも大きいことを示唆する。

【0400】

(実施例8 . R-848ではなくB型CpG ODNは、クロロキンにより完全に阻害され得る)

Vasilakosらは、R-848の活性が、クロロキン(エンドソーム成熟をブロックする化合物)により阻害され得ないことを、報告した。Vasilakos JP(2000) Cell Immunol 204:64~74。ヒトPBM C(n=3)を、種々の濃度のR-848(0.05~0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、種々の濃度のCpG O 50

DN2006 (0.8 ~ 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、SEB (50 ng/ml) または培地単独とともに24時間培養した。さらに、PBMCを、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ クロロキンの存在下でR-848またはODNとともにインキュベートした。上清中のIL-6をELISAにより測定した。クロロキンは、B型CpG ODN (これは、TLR9と相互作用する) の活性のうちの90%を超える活性をブロックした。TLR9は、細胞間発現のみを有すると考えられる。これらの結果は、Vasilakosらの報告とは対照的に、R-848の活性が、R-848濃度に依存して、クロロキンにより強力に (しかし、完全にではなく) 阻害され得る (図9) ことを示す。同様の結果が、B細胞活性についても得られた (示さず)。

【0401】

(実施例9.293線維芽細胞においてシグナル伝達するTLR9の再構築)

マウスTLR9およびヒトTLR9をクローニングする方法が、2001年9月17日出願の係属中の米国特許出願番号09/954,987と、公開されたPCT出願PCT/US01/29229とに記載されており、この2つの出願の内容が、参考として援用される。pT-Advベクター (Clontechより得た) 中にあるヒトTLR9 cDNA (配列番号6、GenBank登録番号AF245704) およびマウスTLR9 cDNA (配列番号8、GenBank登録番号AF348140) を、EcoRI部位を使用することによって、Invitrogenから得た発現ベクターpcDNA3.1(-) 中に個別にクローニングした。「機能獲得」アッセイを使用して、CpG-DNA非応答性ヒト293線維芽細胞 (ATCC、CRL-1573) においてシグナル伝達するヒトTLR9 (hTLR9) およびマウスTLR9 (mTLR9) を再構築することが可能であった。上記の発現ベクターを、リン酸カルシウム法を使用して293線維芽細胞中にトランスフェクトした。ヒトTLR9のアミノ酸配列は、配列番号7 (GenBank登録番号AAF78037) として提供される。マウスTLR9のアミノ酸配列は、配列番号9 (GenBank登録番号AAK29625) として提供される。

【0402】

NF- κ B活性化は、IL-1/TLRシグナル伝達経路の要である (Medzhitovら (1998) Mol Cell 2:253~258 (1998); Muzioら (1998) J Exp Med 187:2097~101) ので、細胞を、hTLR9でトランスフェクトしたが、またはhTLR9と、NF- κ B駆動ルシフェラーゼレポーター構築物とで同時トランスフェクトした。ヒト線維芽細胞293細胞を、hTLR9と6倍NF- κ B-ルシフェラーゼレポータープラスミド (NF- κ B-luc、Patrick Baeuerle, Munich, Germanyにより好意により提供された腎臓) とで一過性トランスフェクトした (図10A) が、またはhTLR9単独で一過性トランスフェクトした (図10B)。CpG-ODN (2006、2 μM 、TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT、配列番号1)、GpC-ODN (2006-GC、2 μM 、TGCTGCTTTTTGTGCTTTTTGTGCTT、配列番号10)、LPS (100 ng/ml) または培地による刺激の後、ルシフェラーゼ読出しによってNF- κ B活性化をモニターした (8時間、図10A) が、またはELISAによりIL-8産生をモニターした (48時間、図10B)。結果は、3回の独立実験を代表する。図10は、hTLR9を発現する細胞がCpG-DNAに応答したがLPSには応答しなかったことを示す。

【0403】

図11は、mTLR9のトランスフェクションについて同じ原理を示す。ヒト線維芽細胞293細胞を、mTLR9およびNF- κ B-luc構築物で一過性トランスフェクトした (図11)。IL-8産生について、類似するデータが得られた (示さず)。従って、293細胞におけるTLR9の発現 (ヒトまたはマウス) は、LPS応答のhTLR4再構築と類似するCpG-DNA刺激についての機能獲得を生じる。

【0404】

ヒトTLR9を発現する安定なクローン、マウスTLR9を発現する安定なクローン、

10

20

30

40

50

またはいずれかのTLR9とNF- κ B-Lucレポータープラスミドとを発現する安定なクローンを作製するために、293細胞を、16 μ gのDNAを用いて10cmプレート中(2 \times 10⁶細胞/プレート)でトランスフェクトし、そして0.7mg/ml G418(PAA Laboratories GmbH, Coelbe, Germany)を用いて選択した。クローンを、例えば、図12に示されるように、RT-PCRによってTLR9発現について試験した。これらのクローンをまた、ODNによる刺激後のIL-8産生またはNF- κ B-ルシフェラーゼ活性についてスクリーニングした。4種の異なる型のクローンを作製した。

【0405】

293-hTLR9-Luc: ヒトTLR9および6倍NF- κ B-ルシフェラーゼレポーターを発現する 10

293-mTLR9-Luc: マウスTLR9および6倍NF- κ B-ルシフェラーゼレポーターを発現する

293-hTLR9: ヒトTLR9を発現する

293-mTLR9: マウスTLR9を発現する。

【0406】

図13は、CpG-ODN(2006、2 μ M)、GpC-ODN(2006-GC、2 μ M)、Me-CpG-ODN(メチル化2006、2 μ M; TZGTZGT TTTGTZGT TTTGTZGT T、Z=5-メチルシチジン、配列番号11)、LPS(100ng/ml)または培地による刺激後の、安定293-hTLR9-Lucクローンの 20
 応答性を示し、これらは、NF- κ B活性化をモニターすることにより測定した。同様の結果が、安定クローン293-hTLR9を用いてIL-8産生を使用して得られた。293-mTLR9-Lucを、CpG-ODN(1668、2 μ M; TCCATGACGTTCTCTGATGCT、配列番号12)、GpC-ODN(1668-GC、2 μ M; TCCATGAGCTTCTCTGATGCT、配列番号13)、Me-CpG-ODN(メチル化1668、2 μ M; TCCATGAZGT TCTCTGATGCT、Z=5-メチルシチジン、配列番号14)、LPS(100ng/ml)または培地を用いて刺激し、NF- κ B活性化をモニターすることにより測定した(図14)。同様の結果が、安定クローン293-mTLR9を用いてIL-8産生を使用して得られた。結果は、少なくとも2つの独立実験を代表する。これらの結果は、CpG-DNA非応答性細胞株が、TLR9により安定に遺伝的に相補されて、モチーフ特異的様式でCpG-DNAに対して応答性になり得ることを示す。これらの結果を、複数の種においてTLR9により駆動される先天性免疫応答について最適ナリガンドのスクリーニングのために使用し得る。

【0407】

(実施例10. ヒトTLR7のクローニング方法)

GenBankデータベース中の2つの登録番号AF245702およびAF240467は、ヒトTLR7についてのDNA配列を記載する。ヒトTLR7についての発現ベクターを作製するために、ヒトTLR7 cDNAを、ヒト末梢単核血球(PBMC)から生成したcDNAから、プライマー5'-CACCTCTCATGCTCTGCTCTCTTC-3'(配列番号15)および5'-GCTAGACC GTTTCTCTTGAACACCTG-3'(配列番号16)を使用することにより増幅した。そのフラグメントを、pGEM-T Easyベクター(Promega)中にクローニングし、制限酵素NotIを用いて切断し、そしてNotI消化pCDNA3.1発現ベクター(Invitrogen)中に連結した。その挿入物を完全に配列決定し、タンパク質へと翻訳した。hTLR7についてのcDNA配列を、配列番号17として提供する。そのオープンリーディングフレームは、塩基124にて開始し、塩基3273にて終了し、1049アミノ酸(配列番号18、表6)のタンパク質をコードする。

【0408】

クローン化したhTLR7 cDNAのタンパク質配列は、GenBank登録番号AF240467の下に記載される配列と一致する。GenBank登録番号AF2457 50

02の下に寄託された配列は、725位(L H)および738位(L P)に2つのアミノ酸変化を含む。

【0409】

(実施例11. マウスTLR7のクローニング方法)

t f a s t aを使用してマウスESTデータベースとヒトTLR7タンパク質配列とをアライメントすると、マウスEST配列BB116163、AA266744、BB210780およびAA276879との4つのヒットを生じた。マウスTLR7 cDNAの5'末端および3'末端を増幅するためのRACE-PCRにおける使用のために、AA266744配列に結合する2つのプライマーを設計した。このRACE PCRのために使用したライブラリーは、Clontechから市販されるマウス脾臓marathon-ready cDNAであった。この方法により得た長さ3000bpの5'フラグメントを、Promega pGEM-T Easyベクター中にクローニングした。5'末端の配列決定の後、さらなるプライマーを、完全マウスTLR7 cDNAの増幅のために設計した。その5'末端のためのプライマーを、5'RACE産物の配列から得、一方、その3'末端のためのプライマーを、マウスEST配列aa266744から選択した。

10

【0410】

3回の独立したPCR反応を、マウスマクロファージRAW264.7(ATCC TIB-71) cDNAをテンプレートとして使用し、プライマー5'-CTCCTCCA C C A G A C C T C T T G A T T C C - 3' (配列番号19)および5'-C A A G G C A T G T C C T A G G T G G T G A C A T T C - 3' (配列番号20)を用いて始動した。生じた増幅産物を、pGEM-T Easyベクター中にクローニングし、完全に配列決定した(配列番号21)。mTLR7のオープンリーディングフレームは、塩基49にて開始し、塩基3201にて終了し、1050アミノ酸(配列番号22)のタンパク質をコードする。マウスTLR7 cDNAのための発現ベクターを作製するために、pGEM-T Easyベクター+mTLR7挿入物をNotIで切断し、そのフラグメントを単離し、そしてNotI消化したpCDNA3.1発現ベクター(Invitrogen)中に連結した。

20

【0411】

(実施例12. ヒトTLR8のクローニング方法)

GenBankデータベース中の2つの登録番号AF245703およびAF246971は、ヒトTLR8についてのDNA配列を記載する。ヒトTLR8についての発現ベクターを作製するために、ヒトTLR8 cDNAを、ヒト末梢単核血球(PBMC)から生成したcDNAから、プライマー5'-CTGCGCTGCTGCAAGTTACGG A A T G - 3' (配列番号23)および5'-G C G C G A A A T C A T G A C T T A A C G T C A G - 3' (配列番号24)を使用することにより増幅した。そのフラグメントを、pGEM-T Easyベクター(Promega)中にクローニングし、制限酵素NotIを用いて切断し、そしてNotI消化pCDNA3.1発現ベクター(Invitrogen)中に連結した。その挿入物を完全に配列決定し、タンパク質へと翻訳した。hTLR8についてのcDNA配列を、配列番号25として提供する。そのオープンリーディングフレームは、塩基83にて開始し、塩基3208にて終了し、1041アミノ酸(配列番号26)のタンパク質をコードする。

30

40

【0412】

クローン化したhTLR8 cDNAのタンパク質配列は、GenBank登録番号AF245703の下に記載される配列と一致する。GenBank登録番号AF246971の下に寄託された配列は、N末端に15アミノ酸(MKESSLQNSSCSLGKETKK; 配列番号27)の挿入を含み、217位(P S)、266位(L P)および867位(V I)に3つの単一アミノ酸変化を含む。

【0413】

(実施例13. マウスTLR8のクローニング方法)

50

t f a s t a を使用してマウス E S T データベースとヒト T L R 8 タンパク質配列とをアライメントすると、マウス E S T 配列 B F 1 3 5 6 5 6 との 1 つのヒットを生じた。マウス T L R 8 c D N A の 5 ' 末端および 3 ' 末端を増幅するための R A C E - P C R における使用のために、B F 1 3 5 6 5 6 配列に結合する 2 つのプライマーを設計した。この R A C E P C R のために使用したライブラリーは、C l o n t e c h から市販されるマウス脾臓 m a r a t h o n - r e a d y c D N A であった。この方法により得た長さ 2 9 0 0 b p の 5 ' フラグメントおよび長さ 2 9 0 0 b p の 3 ' フラグメントを、P r o m e g a p G E M - T E a s y ベクター中にクローニングした。各フラグメントの 5 ' 末端および 3 ' 末端の配列決定の後、m T L R 8 の部分配列を取得し、それにより、完全マウス T L R 8 c D N A の増幅のためのプライマー設計が可能になった。

10

【0414】

3 回の独立した P C R 反応を、プライマー 5 ' - G A G A G A A A C A A A C G T T T T A C C T T C - 3 ' (配列番号 2 8) および 5 ' - G A T G G C A G A G T C G T G A C T T C C C - 3 ' (配列番号 2 9) を用い、C l o n t e c h から得たマウス脾臓 c D N A をテンプレートとして使用して始動した。生じた増幅産物を、p G E M - T E a s y ベクター中にクローニングし、完全に配列決定し、タンパク質へと翻訳し、ヒト T L R 8 タンパク質配列 (G e n B a n k 登録番号 A F 2 4 5 7 0 3) とアライメントした。m T L R 8 についての c D N A 配列を、配列番号 3 0 として提供される。T L R 8 のオープンリーディングフレームは、塩基 5 9 にて開始し、塩基 3 1 5 7 にて終了し、1 0 3 2 アミノ酸 (配列番号 3 1) のタンパク質をコードする。マウス T L R 8 c D N A のための発現ベクターを作製するために、m T L R 8 挿入物を含む p G E M - T E a s y ベクターを N o t I で切断し、そのフラグメントを単離し、そして N o t I 消化した p C D N A 3 . 1 発現ベクター (I n v i t r o g e n) 中に連結した。

20

【0415】

(実施例 1 4 . T L R 8 を発現する一過性トランスフェクタントおよび T L R 7 を発現する一過性トランスフェクタント)

クローン化したヒト T L R 7 c D N A およびヒト T L R 8 c D N A を、N o t I 部位を使用して、I n v i t r o g e n から得た発現ベクター p c D N A 3 . 1 (-) 中にクローニングした。「機能獲得」アッセイを使用して、h T L R 7 発現ベクターおよび h T L R 8 発現ベクターを、リン酸カルシウム法を使用して、ヒト 2 9 3 線維芽細胞 (A T C C 、 C R L - 1 5 7 3) 中で一過性発現させた。C p G - O D N (2 0 0 6 または 1 6 6 8 、 2 μ M) または L P S (1 0 0 n g / m l) による刺激後の I L - 8 産生によって、活性化をモニターした。使用したどの刺激も、h T L R 7 または h T L R 8 のいずれかでトランスフェクトした 2 9 3 細胞を活性化しなかった。

30

【0416】

(実施例 1 5 . C p G O D N および R - 8 4 8 のインビボ比較)

C p G O D N (例えば、# 7 9 0 9) とイミダゾキノリン化合物 (例えば、R - 8 4 8) とを、抗原特異的免疫応答を増強する能力について比較した。イミダゾキノリン化合物である I m i q u i m o d (R - 8 4 7) および R e s i q u i m o d (R - 8 4 8) は、局所的に活性化免疫応答改変因子であることが示され、そして培養ヒト血液単核細胞における I F N - γ 、I F N - β 、T N F - α および I L - 1 2 の産生を誘導することが示された。これらはまた、抗ウイルス特性および抗腫瘍特性の両方を保有することも示された。V a s i l a k o s ら (2 0 0 0) による最近の研究は、R - 8 4 8 が強力な T h 1 偏向アジュバントであること、そして C p G O D N と同様に、R - 8 4 8 がミョウバンにより確立された T h 2 偏向免疫応答を再指向し得ることを示した。この研究は、C p G O D N (7 9 0 9) および R - 8 4 8 を、ワクチンアジュバントとして可能な使用について比較することを目的とし、そしてこの 2 つのアジュバントを比較することによってより強力な免疫応答を得ることが可能な否かを決定するためであった。この研究は、モデル抗原として H B s A g を使用し、抗原特異的体液 (すなわち、抗体) 媒介性免疫応答および抗原特異的細胞媒介 (すなわち、C T L、I F N - γ 分泌) 免疫応答の両方の増強を

40

50

評価した。

【0417】

(核酸およびイミダゾキノリン化合物) CpG ODN 7909 (GMP量)および非CpGコントロールODN 2137を使用した。全てのODNを、pH 8.0にて内毒素を含まない滅菌TE (OmniPer (登録商標); EM Science, Gibbstown, NJ)中に再懸濁し、そして無菌条件下で貯蔵および取扱いをして、微生物および内毒素の両方の混入を防いだ。R-848は、GL合成 (Boston, MA)により製造された。このR-848を、10% DMSOを含むTE緩衝液 (pH 8.0)中に溶解した。アッセイ用のODNおよびR-848の希釈は、pH 7.2にて内毒素を含まない滅菌したPBS (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)中で実行した。 10

【0418】

(動物) 雌BALB/cマウス(6~8週齢)を全ての実験のために使用した。動物は、Charles River Canada (Quebec, Canada)から購入した。その動物を、Ottawa Hospital Research Institute, Civic Siteの動物管理施設の微小単離器中に収容した。

【0419】

(マウスの免疫) BALB/cマウス(n=10匹/群)に、1 μ gのHBsAgサブタイプアジュバント(International Enzymes, CA)単独で免疫したが、またはCpG ODN 7909 (10 μ g)、コントロールODN 2137 (10 μ g)、R-848 (0.1 μ g、1.0 μ g、10 μ gまたは20 μ g)もしくはR-848 (20 μ g)+ODN (10 μ g)の組み合わせと組み合わせて、免疫した。一次免疫の4週間後に動物から採血し、そしてブーストした。この時点で、各グループからの5匹の動物を安楽死させ、CTLアッセイのために脾臓を取り出した。ブーストの2週間後にもまた、動物から採血した。 20

【0420】

(抗体応答の測定) HBsAg (抗HB)に特異的な抗体(全IgG、IgG1およびIgG2a)を検出し、終点希釈ELISAアッセイにより定量した。この終点希釈ELISAアッセイは、個々の動物由来のサンプルに対して三連で実施した。Davisら、J. Immunol 160:870 (1998)。終点力価を、カットオフ値0.05の非免疫血漿の吸光度値(OD450)より2倍大きな吸光度値(OD450)を生じる最も高い血漿希釈として定義した。これらを、群平均力価 \pm 標準平均誤差として報告した。 30

【0421】

(CTL応答の評価) CTLアッセイを、以前に記載されたように実施した。McCluskieら、J. Immunol. 161:4463 (1998)。簡単に述べると、脾臓を免疫後4週間目に取り出した。その脾臓を、10%胎仔ウシ血清(Life Technologies)とペニシリン-ストレプトマイシン溶液(それぞれ最終濃度1000U/mlおよび1mg/ml; Sigma, Irvine, UK)と 5×10^{-5} M β -メルカプトエタノール(Sigma) (Complete RPMI 1640)とを補充したRPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY)組織培養培地中にホモジナイズし、単一細胞懸濁物にした。脾細胞懸濁物(3×10^6 細胞/ml)中のHBsAg特異的リンパ球を、HBsAgを発現するマウス細胞株(p815-S)とともにインキュベートすることによって5日間再刺激した。再刺激後、HBsAgを発現する細胞をその脾細胞が死滅させる能力を、 51 Cr放出アッセイを使用することによって測定した。その結果を、種々のエフェクター:標的(E:T)比での特異的溶解%として表す。 40

【0422】

(サイトカイン分泌プロフィール) サイトカイン分泌プロフィールを、免疫した動物からの脾細胞を抗原で再刺激した後に測定した。脾細胞懸濁物を調製し、そしてそれを、 50

2%正常マウス血清 (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada) とペニシリン - ストレプトマイシン溶液 (それぞれ最終濃度 1000 U/ml および 1 mg/ml; Sigma, Irvine, UK) と 5×10^{-5} M -メルカプトエタノール (Sigma) (Complete RPMI 1640) とを補充した RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) 組織培養培地中に、最終濃度 5×10^6 細胞/ml に調整した。脾細胞懸濁物を、96 ウェル U 底組織培養プレート (100 μ l / ウェル) 上に、完全 RPMI 1640 中にて適切な濃度まで希釈した各刺激物質 100 μ l とともにプレATINGした。使用した刺激物質は、5 μ g/ml および 2.5 μ g/ml の HbsAg であった。コンカナバリン A (10 μ g/ml, Sigma) をポジティブコントロールとして使用し、培地単独を用いて培養した細胞を、ネガティブコントロールとして使用した。各脾細胞サンプルを三連でプレATINGし、そしてその細胞を、37 °C にて 48 時間および 72 時間、加湿した 5% CO₂ インキュベーター中でインキュベートした。そのインキュベーション時間の最後に、96 ウェルプレートを 1200 rpm にて 5 分間遠心分離し、そして細胞上清を収集し、アッセイするまで -80 °C で保存した。市販のアッセイキット (マウス IL-4 OptEIA および マウス IFN- γ OptEIA; Phamingen, Mississauga, ON) を製造業者の指示に従って使用して、48 時間目 (IL-4) および 72 時間目 (IFN- γ) にて得た培養上清中のサイトカインレベルをアッセイした。

10

【0423】

20

(統計分析) InStat プログラム (Graph, PAD Software, San Diego) を使用して統計分析を実施した。群間の統計的差異を、生データまたは変換済みデータ (異分散集団について、log₁₀) に関する、スチューデント t 検定 (2つの群について) によってか、または 1 因子 ANOVA の後の Turkey 検定 (3つ以上の群について) によって、決定した。

【0424】

(結果)

CpG ODN および R-848 を、インビボで抗原 (例えば、HbsAg) に対する細胞傷害性 T リンパ球応答を増強する能力について、一緒にかまたは個々にかのいずれかで試験した。CTL 活性を、プライミングの 4 週間後に測定した。R-848 は、抗原単独を超える CTL 応答を増強し得たが、R-848 は、CpG ODN (例えば、#7909) 程度には有効ではなかった。R-848 と CpG ODN との一緒の組み合わせは、少なくとも相加効果を生じた。抗原単独を超える CTL 応答の増強が、コントロール ODN 単独またはコントロール ODN と R-848 とを使用して観察された。(図 15 を参照のこと)。図 15 のデータを、図 16 においてエフェクター対標的比の関数としてプロットする。

30

【0425】

CpG ODN および R-848 を、インビボで抗原 (例えば、HbsAg) に対する抗体応答を増強する能力について、一緒にかまたは個々にかのいずれかで試験した。抗 HbsAg 抗体レベルを、プライミングの 4 週間後に測定した。CpG ODN および R-848 または CpG ODN のいずれかの存在下での抗体応答は、同様であった。

40

【0426】

図 18 において、抗体アイソタイプの分布が示される。抗原単独はより高い IgG1 抗体レベルを生成した (コントロール ODN + 抗原が同様に生成した) 一方で、R-848 が存在するか否かに関わらず、CpG ODN はより高い IgG2a 抗体レベルを生成した。R-848 は、抗原単独応答と比較して、IgG2a レベルを上昇させ IgG1 レベルを減少させるようであった。より高い IgG2A / IgG1 比が、より高用量の R-848 を使用して (例えば、0.01 μ g と 0.1 μ g と 10.0 μ g とを比較して)、プライミングの 6 週間後に観察された (データは示さず)。

【0427】

50

免疫した動物由来の脾細胞を、IFN- (Th1様)およびIL-4 (Th2様)サイトカインの抗原特異的分泌についてアッセイした。IL-4は、どの脾細胞培養物からも検出されなかった。しかし、CpG ODN 7909をアジュバントとして使用してHbsAgで免疫した動物からの脾細胞は、高レベルのIFN-分泌を誘導した(データは示さず)。

【0428】

図19において、抗原(例えば、HbsAg)に対する抗体応答の増強に対するR-848、モンタニドISA 720およびCpG ODNの効果と、比較する。6~8週齢のBALB/cマウスを、1μg HbsAg単独でか、または漸増用量のR-848、10μg CpG ODN、70:30(v/v)の抗原:モンタニドISA 720、モンダニドおよびCpG ODN、またはモンタニドおよびR-848と組み合わせて免疫した。抗HbsAgレベルを、プライミングの4週間後およびブーストの2週間後(すなわち、プライミングの6週間後)に測定した。モンタニドISA 720は、CpG ODN効果を増強しないようであった。R-848の存在は、モンタニドISA 720応答を増強しないようであった。

10

【0429】

図20において、抗原(例えば、HbsAg)に対するCTL応答の増強に対するR-848、モンタニドISA 720およびCpG ODNの効果と、比較する。6~8週齢のBALB/cマウスを、1μg HbsAg単独でか、または漸増用量のR-848、10μg CpG ODN、70:30(v/v)の抗原:モンタニドISA 720、モンダニドおよびCpG ODN、またはモンタニドおよびR-848と組み合わせて免疫した。CTLレベルを、プライミングの4週間後に測定した。モンタニドISA 720応答が、R-848の存在下で減少された。モンタニドISA 720は、CpG ODN応答をわずかに増強した。

20

【0430】

最近の研究により、イミダゾキノリン化合物であるR-848およびR-847は、Toll様レセプター7および8(TLR7およびTLR8)を介して免疫系の細胞を活性化することが示された。Junkら、Nat. Immunol. 3:499(2002)。CpG ODNは、TLR9を介して作用することが示されている。Takeshitaら、J. Immunol. 167:3555(2001);Chuangら、J. Leukoc Biol 71:538(2002)。ヒトにおいて、TLR7およびTLR9は、プラズマ細胞様樹状細胞(PDC)上に局在化され、一方TLR8は、単球由来樹状細胞(MDC)上に局在化される。

30

【0431】

TLR8が欠損していると報告されたマウスにおいて、TLR7およびTLR9の両方が、同じ細胞型上に同時局在化する。これは、R-848およびCpG ODNがマウス系において組み合わせアジュバントとして使用された場合に観察される相加効果を説明し得る。R-848およびCpG ODNが組み合わせアジュバントとして使用された場合に、ヒトにおいて、TLR7、TLR8およびTLR9の機能性が原因で、相乗的活性が予期される。さらに、R-848は、ヒトにおいてより強力なアジュバントであり得る。なぜなら、TLR7およびTLR8の両方が、ヒト細胞において完全に機能性であるからである。

40

【0432】

(等価物)

上記の記載は、当業者が本発明を実施可能であると十分であると考えられる。本発明は、提供される実施例によって範囲が限定されない。なぜなら、本実施例は、本発明の1局面の一例示として意図され、機能的に等価な他の実施形態が、本発明の範囲内にある。本明細書中に示されそして記載されるものに加えて本発明の種々の改変が、上記記載から当業者には明らかになり、そしてそれらの改変は、添付の特許請求の範囲内に入る。本発明の利点および目的は、本発明の各実施形態により必ずしも包含されない。

50

【0433】

本願において記載される全ての参考文献、特許および特許刊行物は、その全体が本明細書により参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【0434】

【図1】図1は、CpG ODN 2006によるが、R-848にはよらない、NF- κ BのhTLR9媒介活性化を示す棒グラフである。

【図2A】図2Aは、種々のhTLR発現ベクターで一過性にトランスフェクトした293T細胞の、R-848、LPS、コントロールODN 8954、IL-1、およびCpG ODN 2006への曝露に応じての刺激指数を示す棒グラフである。細胞をトランスフェクションの24時間後に刺激し、そして16時間後にルシフェラーゼ活性についてアッセイした。 10

【図2B】図2Bは、種々のTLR発現構築物で一過性にトランスフェクトした293T細胞のR-848の用量依存性応答を示す棒グラフである。

【図3A】図3Aは、TLR9と、hTLR7またはhTLR8のいずれかとを同時発現する293-TLR9-Luc細胞のR-848に対する応答を示す棒グラフである。

【図3B】図3Bは、hTLR9と、hTLR7またはhTLR8のいずれかとを同時発現する293-TLR9-LUC細胞の、個別または一緒のいずれかのR-848およびCpG ODNに対する応答を示す棒グラフである。

【図4】図4は、異なるTLR構築物で一過性にトランスフェクトした293T細胞中でのIL-8産生を示す棒グラフである。 20

【図5A】図5Aは、CpG ODNまたはR-848とともにインキュベートした際の、ヒトPBMCによるIFN- γ 分泌を示す棒グラフである。

【図5B】図5Bは、個別かまたは一緒のいずれかのCpG ODNおよびR-848とともにインキュベートした後のヒトPBMCによるIFN- γ 分泌を示す棒グラフである。

【図6A】図6Aは、CpG ODNまたはR-848とともにインキュベートした際のヒトPBMCによるIP-10分泌を示す棒グラフである。

【図6B】図6Bは、個別かまたは一緒のいずれかのCpG ODNおよびR-848とともにインキュベートした後のヒトPBMCによるIP-10分泌を示す棒グラフである。

【図7A】図7Aは、CpG ODNまたはR-848とともにインキュベートした際のヒトPBMCによるTNF- α 分泌を示す棒グラフである。 30

【図7B】図7Bは、個別かまたは一緒のいずれかのCpG ODNおよびR-848とともにインキュベートした後のヒトPBMCによるTNF- α 分泌を示す棒グラフである。

【図8A】図8Aは、CpG ODNまたはR-848とともにインキュベートした際のヒトPBMCによるIL-10分泌を示す棒グラフである。

【図8B】図8Bは、個別かまたは一緒のいずれかのCpG ODNおよびR-848とともにインキュベートした後のヒトPBMCによるIP-10分泌を示す棒グラフである。

【図9】図9は、ヒトPBMCによるIL-6分泌が、クロロキンによって部分的に阻害され得ることを示す棒グラフである。

【図10A】図10は、ヒトTLR9でトランスフェクトされた293線維芽細胞によって、種々の刺激(CpG-ODN、GpC-ODN、LPS、および培地を含む)への曝露に応じて産生される、(A)NF- κ Bの誘導、および(B)IL-8の量を示す一対の棒グラフである。 40

【図10B】図10は、ヒトTLR9でトランスフェクトされた293線維芽細胞によって、種々の刺激(CpG-ODN、GpC-ODN、LPS、および培地を含む)への曝露に応じて産生される、(A)NF- κ Bの誘導、および(B)IL-8の量を示す一対の棒グラフである。

【図11】図11は、マウスTLR9でトランスフェクトした293線維芽細胞によって、種々の刺激(CpG-ODN、メチル化CpG-ODN(Me-CpG-ODN)、GpC-ODN、LPS、および培地を含む)への曝露に応じて産生されるNF- κ Bの誘 50

導を示す、棒グラフである。

【図12】図12は、トランスフェクトされていないコントロール293細胞、mTLR9でトランスフェクトされた293細胞(293-mTLR9)、およびhTLR9でトランスフェクトされた293細胞(293-hTLR9)における、マウスのTLR9(mTLR9)、ヒトTLR9(hTLR9)、およびグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)についての逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)アッセイの結果を示す、一連のゲル画像である。

【図13】図13は、安定にトランスフェクトされた293-hTLR9細胞における、種々の刺激によるNF- κ Bの誘導程度を示すグラフである。

【図14】図14は、安定にトランスフェクトされた293-mTLR9細胞における、種々の刺激によるNF- κ Bの誘導程度を示すグラフである。

10

【図15】図15は、CpG核酸およびR-848が、マウスモデルにおいて抗原(例えば、HBsAg)に対する細胞溶解性Tリンパ球応答を増強する能力を比較する棒グラフである。

【図16】図16は、CpG核酸およびR-848が、マウスモデルにおいて抗原(例えば、HBsAg)に対する細胞溶解性Tリンパ球応答を増強する能力を、エフェクター対標識の比の関数として示すグラフである。

【図17】図17は、CpG核酸およびR-848が、マウスモデルにおいて抗原(例えば、HBsAg)に対する抗体応答を増強する能力を比較する棒グラフである。

【図18】図18は、CpG核酸およびR-848が、マウスモデルにおいて抗原(例えば、HBsAg)に対するIgG1抗体応答およびIgG2a抗体応答を増強する能力を比較する棒グラフである。

20

【図19】図19は、CpG核酸、R-848およびMontanide ISA 720が、マウスモデルにおいて抗原(例えば、HBsAg)に対する抗体応答を増強する能力を比較する棒グラフである。

【図20】図20は、CpG核酸、R-848およびMontanide ISA 720が、マウスモデルにおいて抗原(例えば、HBsAg)に対する細胞溶解性Tリンパ球応答を増強する能力を比較する棒グラフである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> University of Iowa Research Foundation
Coley Pharmaceutical GmbH
Coley Pharmaceutical Group, Inc.

<120> METHODS AND PRODUCTS FOR ENHANCING IMMUNE RESPONSES USING
IMIDAZOQUINOLINE COMPOUNDS 10

<130> C01039.70065.WO

<140> Unknown

<141> 2002-10-15

<150> 60/329,208

<151> 2001-10-12 20

<160> 35

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA 30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 1
tcgctcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 2 40

<211> 24
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 2
 tttttttttt tttttttttt tttt

24

10

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 3
 tccaggactt ctctcaggtt

20

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 4
 ggggacgacg tcgtgggggg g

21

30

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>
<223> Synthetic

<400> 5
tccgcctgtg acatgcatt

19

<210> 6

<211> 3352

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 6
aggetggtat aaaaatetta cttcctctat totctgagcc gctgctgccc ctgtgggaag 60
ggacctcgag tgtgaagcat ccttcctctgt agctgctgtc cagtctgccc gccagacctt 120
ctggagaagc ccctgcccc cagcatgggt ttctgcccga gcgccctgca cccgctgtct 180
ctcctggtgc aggccatcat gctggccatg accctggccc tgggtacctt gcctgccttc 240
ctacctgtg agctccagcc ccacggcctg gtgaaactgca actggctggt cctgaaagtct 300
gtgccccact tctccatggc agcaccctgt ggcaatgtca ccagcctttc cttgtcctcc 360
aaccgcatcc accacctcca tgattctgac tttgccacc tgcaccagcct ggggcatctc 420
aacctcaagt ggaactgccc gccggttggc ctccagccca tgcacttccc ctgccacatg 480
accatcgagc ccagcacctt cttggtctgt cccaccctgg aagagctaaa cctgagctac 540
aacaacatca tgactgtgct tgcgctgccc aaatccctca tatcctgtc cctcagccat 600
accaacatcc tgatgctaga ctctgccagc ctccgcccgc tgcattgccct gcgcttccta 660
ttcatggacg gcaactgtta ttacaagaac cctgcaggc aggcaactgga ggtggccccg 720
ggtgccctcc ttggcctggg caacctcacc cacctgtcac tcaagtacaa caacctcact 780
gtggtgcccc gcaacctgac ttccagcctg gactatctgc tgttgtccta caaccgcatc 840
gtcaaactgg cgcctgagga cctggccaat ctgaccgccc tgcgtgtgct cgatgtgggc 900
ggaaattgcc gccgctgcca ccacgctccc aacctctgca tggagtgccc tcgtcacttc 960
ccccagctac atcccgatac cttcagccac ctgagccgtc ttgaaggcct ggtggtgaag 1020
gacagtcttc tctcctggct gaatgccagt tggttccgtg ggctgggaaa cctccgagtg 1080
ctggacctga gtgagaactt cctctacaaa tgcactacta aaaccaaggc cttccagggc 1140
ctaacacagc tgcgcaagct taacctgtcc ttcaattacc aaaagagggt gtcccttgcc 1200
cacctgtctc tggccccttc cttcgggagc ctggctgccc tgaaggagct ggacatgcac 1260
ggcatctctt tccgctcact cgatgagacc acgctccggc cactggcccc cctgcccattg 1320

20

30

40

ctccagactc tgcgtctgca gatgaacttc atcaaccagg cccagctcgg catcttcagg 1380
gccttccctg gcctgcgcta cgtggacctg tcggacaacc gcatcagcgg agcttcggag 1440
ctgacagcca ccatggggga ggcagatgga ggggagaagg tctggctgca gcctggggac 1500
cttgctccgg ccccagtgga cactcccagc tetgaagact tcaggcccaa ctgcagcaac 1560
ctcaacttca ccttggatct gtcacggaac aacctggtga cctgcagcc ggagatgttt 1620
gcccagctct cgcacctgca gtgcctgcgc ctgagccaca actgcatctc gcaggcagtc 1680
aatggctccc agttcctgcc gctgaccggt ctgcagggtc tagacctgtc ccgcaataag 1740
ctggacctct accacgagca ctcatcaccg gagctaccgc gactggaggc cctggacctc 1800
agctacaaca gccagccctt tggcatgcag ggcgtgggcc acaacttcag cttcgtggct 1860
cacctgcgca ccctgcgcca cctcagcctg gcccaacaaca acatccacag ccaagtgtcc 1920
cagcagctct gcagtacgtc gctgcgggcc ctggacttca gcggcaatgc actgggcat 1980
atgtgggccc agggagacct ctatctgcac ttcttccaag gcctgagcgg tttgatctgg 2040
ctggacttgt ccagaaccg cctgcacacc ctctgcccc aaacctgcg caacctccc 2100
aagagcctac aggtgctgcg tctccgtgac aattacctgg ccttctttaa gtggtggagc 2160
ctccacttcc tgccaaaact ggaagtctc gacctggcag gaaaccggct gaaggccctg 2220
accaatggca gcctgcctgc tggcaccggc ctccggaggc tggatgtcag ctgcaacagc 2280
atcagcttcg tggcccccgg ctctctttcc aaggccaagg agctgcgaga gctcaacctt 2340
agcccaacg ccctcaagac agtggaccac tctcggtttg ggcccctggc gagtgcctg 2400
caaatactag atgtaagcgc caacctctg cactgcgcct gtggggcggc ctttatggac 2460
ttcctgctgg aggtgcaggc tgccgtgccc ggtctgcca gccgggtgaa gtgtggcagt 2520
ccgggccagc tccagggcct cagcatcttt gcacaggacc tgcgcctctg cctggatgag 2580
gccctctcct gggactgttt cgcctctctg ctgctggctg tggctctggg cctgggtgtg 2640
cccattctgc atcacctctg tggctgggac ctctggtacl gcttccacct gtgcctggcc 2700
tggcttccct ggcgggggcg gcaaagtggg cgagatgagg atgccctgcc ctacgatgcc 2760
ttcgtggtct tcgacaaaac gcagagcgca gtggcagact ggggtgtaca cgagcttcgg 2820
gggcagctgg aggagtgcgc tgggcgctgg gcactccgcc tgtgcctgga ggaacgcgac 2880
tggctgcctg gcaaaaacct ctttgagaac ctgtgggctc cggctctatg cagccgcaag 2940
acgctgtttg tgctggccca caaggaccgg gtcagtggtc tcttgccgcg cagcttctctg 3000
ctggcccagc agcgcctgct ggaggaccgc aaggacgtcg tggctgctgg gatcctgagc 3060
cctgacggcc gccgctcccg ctacgtgcgg ctgcgccagc gcctctgccc ccagagtgtc 3120

10

20

30

40

ctcctctggc cccaccagcc cagtggtcag cgcagcttct gggcccagct gggcatggcc
 3180

ctgaccaggg acaaccacca cttctataac cggaacttct gccagggacc cacggccgaa 3240

tagccgtgag ccggaatcct gcacgggtgcc acctccacac tcacctcacc tctgctgcc 3300

tggtctgacc ctcccctgct cgctccctc accccacacc tgacacagag ca 3352

<210> 7

<211> 1032

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 7

Met Gly Phe Cys Arg Ser Ala Leu His Pro Leu Ser Leu Leu Val Gln
 1 5 10 15

Ala Ile Met Leu Ala Met Thr Leu Ala Leu Gly Thr Leu Pro Ala Phe
 20 25 30

Leu Pro Cys Glu Leu Gln Pro His Gly Leu Val Asn Cys Asn Trp Leu
 35 40 45

Phe Leu Lys Ser Val Pro His Phe Ser Met Ala Ala Pro Arg Gly Asn
 50 55 60

Val Thr Ser Leu Ser Leu Ser Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asp
 65 70 75 80

Ser Asp Phe Ala His Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asn Leu Lys Trp
 85 90 95

Asn Cys Pro Pro Val Gly Leu Ser Pro Met His Phe Pro Cys His Met
 100 105 110

Thr Ile Glu Pro Ser Thr Phe Leu Ala Val Pro Thr Leu Glu Glu Leu
 115 120 125

Asn Leu Ser Tyr Asn Asn Ile Met Thr Val Pro Ala Leu Pro Lys Ser
 130 135 140

Leu Ile Ser Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Met Leu Asp Ser
 145 150 155 160

20

30

40

Ala Ser Leu Ala Gly Leu His Ala Leu Arg Phe Leu Phe Met Asp Gly
165 170 175

Asn Cys Tyr Tyr Lys Asn Pro Cys Arg Gln Ala Leu Glu Val Ala Pro
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Gly Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Ser Leu Lys Tyr
195 200 205

Asn Asn Leu Thr Val Val Pro Arg Asn Leu Pro Ser Ser Leu Glu Tyr
210 215 220

Leu Leu Leu Ser Tyr Asn Arg Ile Val Lys Leu Ala Pro Glu Asp Leu
225 230 235 240

Ala Asn Leu Thr Ala Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg
245 250 255

Arg Cys Asp His Ala Pro Asn Pro Cys Met Glu Cys Pro Arg His Phe
260 265 270

Pro Gln Leu His Pro Asp Thr Phe Ser His Leu Ser Arg Leu Glu Gly
275 280 285

Leu Val Leu Lys Asp Ser Ser Leu Ser Trp Leu Asn Ala Ser Trp Phe
290 295 300

Arg Gly Leu Gly Asn Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Ile Thr Lys Thr Lys Ala Phe Gln Gly Leu Thr Gln Leu
325 330 335

Arg Lys Leu Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Gln Lys Arg Val Ser Phe Ala
340 345 350

His Leu Ser Leu Ala Pro Ser Phe Gly Ser Leu Val Ala Leu Lys Glu
355 360 365

Leu Asp Met His Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asp Glu Thr Thr Leu
370 375 380

Arg Pro Leu Ala Arg Leu Pro Met Leu Gln Thr Leu Arg Leu Gln Met
385 390 395 400

10

20

30

Asn Phe Ile Asn Gln Ala Gln Leu Gly Ile Phe Arg Ala Phe Pro Gly
 405 410 415

Leu Arg Tyr Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Ala Ser Glu
 420 425 430

Leu Thr Ala Thr Met Gly Glu Ala Asp Gly Gly Glu Lys Val Trp Leu
 435 440 445

Gln Pro Gly Asp Leu Ala Pro Ala Pro Val Asp Thr Pro Ser Ser Glu
 450 455 460

Asp Phe Arg Pro Asn Cys Ser Thr Leu Asn Phe Thr Leu Asp Leu Ser
 465 470 475 480

Arg Asn Asn Leu Val Thr Val Gln Pro Glu Met Phe Ala Gln Leu Ser
 485 490 495

His Leu Gln Cys Leu Arg Leu Ser His Asn Cys Ile Ser Gln Ala Val
 500 505 510

Asn Gly Ser Gln Phe Leu Pro Leu Thr Gly Leu Gln Val Leu Asp Leu
 515 520 525

Ser Arg Asn Lys Leu Asp Leu Tyr His Glu His Ser Phe Thr Glu Leu
 530 535 540

Pro Arg Leu Glu Ala Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Ser Gln Pro Phe Gly
 545 550 555 560

Met Gln Gly Val Gly His Asn Phe Ser Phe Val Ala His Leu Arg Thr
 565 570 575

Leu Arg His Leu Ser Leu Ala His Asn Asn Ile His Ser Gln Val Ser
 580 585 590

Gln Gln Leu Cys Ser Thr Ser Leu Arg Ala Leu Asp Phe Ser Gly Asn
 595 600 605

Ala Leu Gly His Met Trp Ala Glu Gly Asp Leu Tyr Leu His Phe Phe
 610 615 620

Gln Gly Leu Ser Gly Leu Ile Trp Leu Asp Leu Ser Gln Asn Arg Leu
 625 630 635 640

His Thr Leu Leu Pro Gln Thr Leu Arg Asn Leu Pro Lys Ser Leu Gln

10

20

30

40

Glu Cys Arg Gly Arg Trp Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp
900 905 910

Trp Leu Pro Gly Lys Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Val Tyr
915 920 925

Gly Ser Arg Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser
930 935 940

Gly Leu Leu Arg Ala Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu
945 950 955 960

Asp Arg Lys Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Ser Pro Asp Gly Arg
965 970 975

Arg Ser Arg Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val
980 985 990

Leu Leu Trp Pro His Gln Pro Ser Gly Gln Arg Ser Phe Trp Ala Gln
995 1000 1005

Leu Gly Met Ala Leu Thr Arg Asp Asn His His Phe Tyr Asn Arg
1010 1015 1020

Asn Phe Cys Gln Gly Pro Thr Ala Glu
1025 1030

<210> 8

<211> 3200

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8
 tgtcagaggg agcctcggga gaatcctcca tctcccaaca tggttctccg togaaggact 60
 ctgcaccctt tgtcctctct ggtacaggct gcagtgctgg ctgagactct ggccctgggt 120
 accctgcctg ccttctacc ctgtgagctg aagcctcatg gcctggtgga ctgcaattgg 180
 ctgttctga agtctgtacc ccgtttctct gcggcagcat cctgctccaa catcaccctg 240
 ctctccttga tctccaaccg tatccaccac ctgcacaact ccgacttctt ccacctgtcc 300
 aacctgcggc agctgaacct caagtggaac tgtccaccca ctggccttag cccctgcac 360

10

20

30

ttctcttgcc acatgacat tgagcccaga accttcctgg ctatgcgtac actggaggag
 420
 ctgaaactga gctataatgg taccaccact gtgccccgac tggccagctc cctggatgaat 480
 ctgagcctga gccacaccaa catcctgggt ctagatgcta acagcctcgc cggcctatac 540
 agcctgcgcg ttctcttcat ggacgggaac tgctactaca agaacccttg cacaggagcg 600
 gtgaaggatga ccccaggcgc cctcctgggc ctgagcaatc tcacctatct gtctctgaag 660
 tataacaacc tcacaaagggt gccccgcaa ctgccccca gctggagta cctcctgggtg 720
 tcctataacc tcattgtcaa gctggggcct gaagacctgg ccaatctgac ctcccttcga 780
 gtacttgatg tgggtgggaa ttgctgctgc tggcaccatg ccccaatcc ctgtatagaa 840
 tgtggccaaa agtcctcca cctgcacct gagaccttc atcacctgag ccctctggaa 900
 ggcctggctg tgaaggacag ctctctccat aactgaact ctctcctgggt ccaaggctctg 960
 gtcaacctct cgggtctgga cctaagcgag aactttctct atgaaagcat caaccacacc 1020
 aatgcctttc agaacctaac ccgctgcgc aagctcaacc tgtccttcaa ttaccgcaag 1080
 aaggatctct ttgcccgcct ccacctggca agttccttca agaacctgggt gtcactgcag 1140
 gagctgaaca tgaacggcat cttcttcgcg tcgctcaaca agtacacgct cagatggctg 1200
 gccgatctgc caaaactcca cactctgcat cttcaaatga acttcatcaa ccaggcacag 1260
 ctgagcatct ttggtacct ccgagccctt cgctttgtgg acttgcaga caatcgcctc 1320
 agtgggcctt caacgctgtc agaagccacc cctgaagagg cagatgatgc agagcaggag 1380
 gagctgttgt ctgoggatcc tcaccagct ccaactgagca cccctgcttc taagaacttc 1440
 atggacaggt gtaagaactt caagttcacc atggacctgt ctcggaacaa cctgggtgact 1500
 atcaagccag agatgtttgt caatctctca cgcctccagt gtcttagcct gagccacaac 1560
 tccattgca cagctgtcaa tggctctcag ttctgcccgc tgactaatct gcaggctgctg 1620
 gacctgtccc ataaacaaact ggactgttac cactggaaat cgttcagtga gctaccacag 1680
 ttgcaggccc tggacctgag ctacaacagc cagcccttca gcatgaagggt tataggccac 1740
 aatttcagtt ttgtggccca tctgtccatg ctacacagcc ttagcctggc acacaatgac 1800
 attcataccc gtgtgtcttc acatctcaac agcaactcag tgaggtttct tgacttcagc 1860
 ggcaacggta tgggcgcgat gtgggatgag gggggccttt atctccattt ctccaaggc 1920
 ctgagtggcc tgctgaagct ggacctgtct caaataacc tgcatatct cgggccccag 1980
 aaccttgaca acctcccaa gagcctgaag ctgctgagcc tccgagacaa ctacctatct 2040
 ttctttaact ggaccagtct gtcttctctg cccaacctgg aagtcctaga cctggcaggc 2100
 aaccagctaa aggcctgac caatggcacc ctgcctaag gcacctcct ccagaaactg 2160

10

20

30

40

Phe Leu Lys Ser Val Pro Arg Phe Ser Ala Ala Ala Ser Cys Ser Asn
50 55 60

Ile Thr Arg Leu Ser Leu Ile Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asn
65 70 75 80

Ser Asp Phe Val His Leu Ser Asn Leu Arg Gln Leu Asn Leu Lys Trp
85 90 95

Asn Cys Pro Pro Thr Gly Leu Ser Pro Leu His Phe Ser Cys His Met
100 105 110

10

Thr Ile Glu Pro Arg Thr Phe Leu Ala Met Arg Thr Leu Glu Glu Leu
115 120 125

Asn Leu Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Thr Val Pro Arg Leu Pro Ser Ser
130 135 140

Leu Val Asn Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Val Leu Asp Ala
145 150 155 160

Asn Ser Leu Ala Gly Leu Tyr Ser Leu Arg Val Leu Phe Met Asp Gly
165 170 175

20

Asn Cys Tyr Tyr Lys Asn Pro Cys Thr Gly Ala Val Lys Val Thr Pro
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Gly Leu Ser Asn Leu Thr His Leu Ser Leu Lys Tyr
195 200 205

Asn Asn Leu Thr Lys Val Pro Arg Gln Leu Pro Pro Ser Leu Glu Tyr
210 215 220

Leu Leu Val Ser Tyr Asn Leu Ile Val Lys Leu Gly Pro Glu Asp Leu
225 230 235 240

30

Ala Asn Leu Thr Ser Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg
245 250 255

Arg Cys Asp His Ala Pro Asn Pro Cys Ile Glu Cys Gly Gln Lys Ser
260 265 270

Leu His Leu His Pro Glu Thr Phe His His Leu Ser His Leu Glu Gly
275 280 285

Leu Val Leu Lys Asp Ser Ser Leu His Thr Leu Asn Ser Ser Trp Phe
 290 295 300

Gln Gly Leu Val Asn Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu
 305 310 315 320

Tyr Glu Ser Ile Asn His Thr Asn Ala Phe Gln Asn Leu Thr Arg Leu
 325 330 335

Arg Lys Leu Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Arg Lys Lys Val Ser Phe Ala
 340 345 350

Arg Leu His Leu Ala Ser Ser Phe Lys Asn Leu Val Ser Leu Gln Glu
 355 360 365

Leu Asn Met Asn Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asn Lys Tyr Thr Leu
 370 375 380

Arg Trp Leu Ala Asp Leu Pro Lys Leu His Thr Leu His Leu Gln Met
 385 390 395 400

Asn Phe Ile Asn Gln Ala Gln Leu Ser Ile Phe Gly Thr Phe Arg Ala
 405 410 415

Leu Arg Phe Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Pro Ser Thr
 420 425 430

Leu Ser Glu Ala Thr Pro Glu Glu Ala Asp Asp Ala Glu Gln Glu Glu
 435 440 445

Leu Leu Ser Ala Asp Pro His Pro Ala Pro Leu Ser Thr Pro Ala Ser
 450 455 460

Lys Asn Phe Met Asp Arg Cys Lys Asn Phe Lys Phe Thr Met Asp Leu
 465 470 475 480

Ser Arg Asn Asn Leu Val Thr Ile Lys Pro Glu Met Phe Val Asn Leu
 485 490 495

Ser Arg Leu Gln Cys Leu Ser Leu Ser His Asn Ser Ile Ala Gln Ala
 500 505 510

Val Asn Gly Ser Gln Phe Leu Pro Leu Thr Asn Leu Gln Val Leu Asp
 515 520 525

Leu Ser His Asn Lys Leu Asp Leu Tyr His Trp Lys Ser Phe Ser Glu

10

20

30

40

Leu Ala Asn Gly Val Lys Cys Gly Ser Pro Gly Gln Leu Gln Gly Arg
785 790 795 800

Ser Ile Phe Ala Gln Asp Leu Arg Leu Cys Leu Asp Glu Val Leu Ser
805 810 815

Trp Asp Cys Phe Gly Leu Ser Leu Leu Ala Val Ala Val Gly Met Val
820 825 830

Val Pro Ile Leu His His Leu Cys Gly Trp Asp Val Trp Tyr Cys Phe
835 840 845

His Leu Cys Leu Ala Trp Leu Pro Leu Leu Ala Arg Ser Arg Arg Ser
850 855 860

Ala Gln Ala Leu Pro Tyr Asp Ala Phe Val Val Phe Asp Lys Ala Gln
865 870 875 880

Ser Ala Val Ala Asp Trp Val Tyr Asn Glu Leu Arg Val Arg Leu Glu
885 890 895

Glu Arg Arg Gly Arg Arg Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Asp Arg Asp
900 905 910

Trp Leu Pro Gly Gln Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Ile Tyr
915 920 925

Gly Ser Arg Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser
930 935 940

Gly Leu Leu Arg Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu
945 950 955 960

Asp Arg Lys Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Arg Pro Asp Ala His
965 970 975

Arg Ser Arg Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val
980 985 990

Leu Phe Trp Pro Gln Gln Pro Asn Gly Gln Gly Gly Phe Trp Ala Gln
995 1000 1005

Leu Ser Thr Ala Leu Thr Arg Asp Asn Arg His Phe Tyr Asn Gln
1010 1015 1020

10

20

30

Asn Phe Cys Arg Gly Pro Thr Ala Glu
1025 1030

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Synthetic

<400> 10

tgctgctttt gtgcttttgt gctt

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n is 5-methylcytidine

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n is 5-methylcytidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)
<223> n is 5-methylcytidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> n is 5-methylcytidine

10

<400> 11
tngtngtttt gtngttttgt ngtt

24

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Synthetic

<400> 12
tccatgacgt tcctgatgct

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Synthetic

<400> 13
tccatgagct tcctgatgct

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n is 5-methylcytidine

10

<400> 14
tccatgangt tctgatgct

20

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 15
cacctctcat gctctgctct cttc

24

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16
gctagaccgt ttccttgaac acctg

25

<210> 17

<211> 3373

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<220>

40

<221> CDS
<222> (124)..(3273)

<223>

<400> 17

agctggctag cgtttaaacg ggcctctag actcgagcgg ccgcgaattc actagtgatt 60

cacctctcat gctctgctct cttcaaccag acctctacat tccattttgg aagaagacta 120

aaa atg gtg ttt cca atg tgg aca ctg aag aga caa att ctt atc ctt 168
Met Val Phe Pro Met Trp Thr Leu Lys Arg Gln Ile Leu Ile Leu 10
1 5 10 15

ttt aac ata atc cta att tcc aaa ctc ctt ggg gct aga tgg ttt cct 216
Phe Asn Ile Ile Leu Ile Ser Lys Leu Leu Gly Ala Arg Trp Phe Pro 30
20 25 30

aaa act ctg ccc tgt gat gtc act ctg gat gtt cca aag aac cat gtg 264
Lys Thr Leu Pro Cys Asp Val Thr Leu Asp Val Pro Lys Asn His Val 45
35 40

atc gtg gac tgc aca gac aag cat ttg aca gaa att cct gga ggt att 312
Ile Val Asp Cys Thr Asp Lys His Leu Thr Glu Ile Pro Gly Gly Ile 60
50 55 60

ccc acg aac acc acg aac ctc acc ctc acc att aac cac ata cca gac 360
Pro Thr Asn Thr Thr Asn Leu Thr Leu Thr Ile Asn His Ile Pro Asp 75
65 70

atc tcc cca gcg tcc ttt cac aga ctg gac cat ctg gta gag atc gat 408
Ile Ser Pro Ala Ser Phe His Arg Leu Asp His Leu Val Glu Ile Asp 95
80 85 90

ttc aga tgc aac tgt gta cct att cca ctg ggg tca aaa aac aac atg 456
Phe Arg Cys Asn Cys Val Pro Ile Pro Leu Gly Ser Lys Asn Asn Met 110
100 105 110

tgc atc aag agg ctg cag att aaa ccc aga agc ttt agt gga ctc act 504
Cys Ile Lys Arg Leu Gln Ile Lys Pro Arg Ser Phe Ser Gly Leu Thr 125
115 120

tat tta aaa tcc ctt tac ctg gat gga aac cag cta cta gag ata ccg 552
Tyr Leu Lys Ser Leu Tyr Leu Asp Gly Asn Gln Leu Leu Glu Ile Pro 140
130 135 140

cag ggc ctc ccg cct agc tta cag ctt ctc agc ctt gag gcc aac aac 600
Gln Gly Leu Pro Pro Ser Leu Gln Leu Leu Ser Leu Glu Ala Asn Asn 155
145 150

atc ttt tcc atc aga aaa gag aat cta aca gaa ctg gcc aac ata gaa 648
Ile Phe Ser Ile Arg Lys Glu Asn Leu Thr Glu Leu Ala Asn Ile Glu 175
160 165 170

ata ctc tac ctg ggc caa aac tgt tat tat cga aat cct tgt tat gtt 696
Ile Leu Tyr Leu Gly Gln Asn Cys Tyr Tyr Arg Asn Pro Cys Tyr Val 190
180 185

tca tat tca ata gag aaa gat gcc ttc cta aac ttg aca aag tta aaa 744

10

20

30

40

Ser Tyr Ser Ile Glu Lys Asp Ala Phe Leu Asn Leu Thr Lys Leu Lys		
195	200	205
gtg ctc tcc ctg aaa gat aac aat gtc aca gcc gtc cct act gtt ttg	792	
Val Leu Ser Leu Lys Asp Asn Asn Val Thr Ala Val Pro Thr Val Leu		
210	215	220
cca tct act tta aca gaa cta tat ctc tac aac aac atg att gca aaa	840	
Pro Ser Thr Leu Thr Glu Leu Tyr Leu Tyr Asn Asn Met Ile Ala Lys		
225	230	235
atc caa gaa gat gat ttt aat aac ctc aac caa tta caa att ctt gac	888	
Ile Gln Glu Asp Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gln Leu Gln Ile Leu Asp		
240	245	250
cta agt gga aat tgc cct cgt tgt tat aat gcc cca ttt cct tgt gcg	936	
Leu Ser Gly Asn Cys Pro Arg Cys Tyr Asn Ala Pro Phe Pro Cys Ala		
	260	265
ccg tgt aaa aat aat tct ccc cta cag atc cct gta aat gct ttt gat	984	
Pro Cys Lys Asn Asn Ser Pro Leu Gln Ile Pro Val Asn Ala Phe Asp		
	275	280
gcg ctg aca gaa tta aaa gtt tta cgt cta cac agt aac tct ctt cag	1032	
Ala Leu Thr Glu Leu Lys Val Leu Arg Leu His Ser Asn Ser Leu Gln		
	290	295
cat gtg ccc cca aga tgg ttt aag aac atc aac aaa ctc cag gaa ctg	1080	
His Val Pro Pro Arg Trp Phe Lys Asn Ile Asn Lys Leu Gln Glu Leu		
	305	310
gat ctg tcc caa aac ttc ttg gcc aaa gaa att ggg gat gct aaa ttt	1128	
Asp Leu Ser Gln Asn Phe Leu Ala Lys Glu Ile Gly Asp Ala Lys Phe		
	320	325
ctg cat ttt ctc ccc agc ctc atc caa ttg gat ctg tct ttc aat ttt	1176	
Leu His Phe Leu Pro Ser Leu Ile Gln Leu Asp Leu Ser Phe Asn Phe		
	340	345
gaa ctt cag gtc tat cgt gca tct atg aat cta tca caa gca ttt tct	1224	
Glu Leu Gln Val Tyr Arg Ala Ser Met Asn Leu Ser Gln Ala Phe Ser		
	355	360
tca ctg aaa agc ctg aaa att ctg cgg atc aga gga tat gtc ttt aaa	1272	
Ser Leu Lys Ser Leu Lys Ile Leu Arg Ile Arg Gly Tyr Val Phe Lys		
	370	375
gag ttg aaa agc ttt aac ctc tcg cca tta cat aat ctt caa aat ctt	1320	
Glu Leu Lys Ser Phe Asn Leu Ser Pro Leu His Asn Leu Gln Asn Leu		
	385	390
gaa gtt ctt gat ctt ggc act aac ttt ata aaa att gct aac ctc agc	1368	
Glu Val Leu Asp Leu Gly Thr Asn Phe Ile Lys Ile Ala Asn Leu Ser		
	400	405
atg ttt aaa caa ttt aaa aga ctg aaa gtc ata gat ctt tca gtg aat	1416	
Met Phe Lys Gln Phe Lys Arg Leu Lys Val Ile Asp Leu Ser Val Asn		
	420	425
aaa ata tca cct tca gga gat tca agt gaa gtt ggc ttc tgc tca aat	1464	
Lys Ile Ser Pro Ser Gly Asp Ser Ser Glu Val Gly Phe Cys Ser Asn		

10

20

30

40

435	440	445		
gcc aga act tct gta gaa agt tat gaa ccc cag gtc ctg gaa caa tta			1512	
Ala Arg Thr Ser Val Glu Ser Tyr Glu Pro Gln Val Leu Glu Gln Leu				
450	455	460		
cat tat ttc aga tat gat aag tat gca agg agt tgc aga ttc aaa aac			1560	
His Tyr Phe Arg Tyr Asp Lys Tyr Ala Arg Ser Cys Arg Phe Lys Asn				
465	470	475		
aaa gag gct tct ttc atg tct gtt aat gaa agc tgc tac aag tat ggg			1608	
Lys Glu Ala Ser Phe Met Ser Val Asn Glu Ser Cys Tyr Lys Tyr Gly				
480	485	490	495	
cag acc ttg gat cta agt aaa aat agt ata ttt ttt gtc aag tcc tct			1656	10
Gln Thr Leu Asp Leu Ser Lys Asn Ser Ile Phe Phe Val Lys Ser Ser				
500	505	510		
gat ttt cag cat ctt tct ttc ctc aaa tgc ctg aat ctg tca gga aat			1704	
Asp Phe Gln His Leu Ser Phe Leu Lys Cys Leu Asn Leu Ser Gly Asn				
515	520	525		
ctc att agc caa act ctt aat ggc agt gaa ttc caa cct tta gca gag			1752	
Leu Ile Ser Gln Thr Leu Asn Gly Ser Glu Phe Gln Pro Leu Ala Glu				
530	535	540		
ctg aga tat ttg gac ttc tcc aac aac cgg ctt gat tta ctc cat tca			1800	
Leu Arg Tyr Leu Asp Phe Ser Asn Asn Arg Leu Asp Leu Leu His Ser				
545	550	555		
aca gca ttt gaa gag ctt cac aaa ctg gaa gtt ctg gat ata agc agt			1848	20
Thr Ala Phe Glu Glu Leu His Lys Leu Glu Val Leu Asp Ile Ser Ser				
560	565	570	575	
aat agc cat tat ttt caa tca gaa gga att act cat atg cta aac ttt			1896	
Asn Ser His Tyr Phe Gln Ser Glu Gly Ile Thr His Met Leu Asn Phe				
580	585	590		
acc aag aac cta aag gtt ctg cag aaa ctg atg atg aac gac aat gac			1944	
Thr Lys Asn Leu Lys Val Leu Gln Lys Leu Met Met Asn Asp Asn Asp				
595	600	605		
atc tct tcc tcc acc agc agg acc atg gag agt gag tct ctt aga act			1992	
Ile Ser Ser Ser Thr Ser Arg Thr Met Glu Ser Glu Ser Leu Arg Thr				
610	615	620		30
ctg gaa ttc aga gga aat cac tta gat gtt tta tgg aga gaa ggt gat			2040	
Leu Glu Phe Arg Gly Asn His Leu Asp Val Leu Trp Arg Glu Gly Asp				
625	630	635		
aac aga tac tta caa tta ttc aag aat ctg cta aaa tta gag gaa tta			2088	
Asn Arg Tyr Leu Gln Leu Phe Lys Asn Leu Leu Lys Leu Glu Glu Leu				
640	645	650	655	
gac atc tct aaa aat tcc cta agt ttc ttg cct tct gga gtt ttt gat			2136	
Asp Ile Ser Lys Asn Ser Leu Ser Phe Leu Pro Ser Gly Val Phe Asp				
660	665	670		
ggg atg cct cca aat cta aag aat ctc tct ttg gcc aaa aat ggg ctc			2184	
Gly Met Pro Pro Asn Leu Lys Asn Leu Ser Leu Ala Lys Asn Gly Leu				
675	680	685		40

aaa tct ttc agt tgg aag aaa ctc cag tgt cta aag aac ctg gaa act	2232
Lys Ser Phe Ser Trp Lys Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asn Leu Glu Thr	
690 695 700	
ttg gac ctc agc cac aac caa ctg acc act gtc cct gag aga tta tcc	2280
Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Thr Thr Val Pro Glu Arg Leu Ser	
705 710 715	
aac tgt tcc aga agc ctc aag aat ctg att ctt aag aat aat caa atc	2328
Asn Cys Ser Arg Ser Leu Lys Asn Leu Ile Leu Lys Asn Asn Gln Ile	
720 725 730 735	
agg agt ctg acg aag tat ttt cta caa gat gcc ttc cag ttg cga tat	2376
Arg Ser Leu Thr Lys Tyr Phe Leu Gln Asp Ala Phe Gln Leu Arg Tyr	
740 745 750	10
ctg gat ctc agc tca aat aaa atc cag atg atc caa aag acc agc ttc	2424
Leu Asp Leu Ser Ser Asn Lys Ile Gln Met Ile Gln Lys Thr Ser Phe	
755 760 765	
cca gaa aat gtc ctc aac aat ctg aag atg ttg ctt ttg cat cat aat	2472
Pro Glu Asn Val Leu Asn Asn Leu Lys Met Leu Leu Leu His His Asn	
770 775 780	
egg ttt ctg tgc acc tgt gat gct gtg tgg ttt gtc tgg tgg gtt aac	2520
Arg Phe Leu Cys Thr Cys Asp Ala Val Trp Phe Val Trp Trp Val Asn	
785 790 795	
cat acg gag gtg act att cct tac ctg gcc aca gat gtg act tgt gtg	2568
His Thr Glu Val Thr Ile Pro Tyr Leu Ala Thr Asp Val Thr Cys Val	
800 805 810 815	20
ggg cca gga gca cac aag ggc caa agt gtg atc tcc ctg gat ctg tac	2616
Gly Pro Gly Ala His Lys Gly Gln Ser Val Ile Ser Leu Asp Leu Tyr	
820 825 830	
acc tgt gag tta gat ctg act aac ctg att ctg ttc tca ctt tcc ata	2664
Thr Cys Glu Leu Asp Leu Thr Asn Leu Ile Leu Phe Ser Leu Ser Ile	
835 840 845	
tct gta tct ctc ttt ctc atg gtg atg atg aca gca agt cac ctc tat	2712
Ser Val Ser Leu Phe Leu Met Val Met Met Thr Ala Ser His Leu Tyr	
850 855 860	
ttc tgg gat gtg tgg tat att tac cat ttc tgt aag gcc aag ata aag	2760
Phe Trp Asp Val Trp Tyr Ile Tyr His Phe Cys Lys Ala Lys Ile Lys	
865 870 875	30
ggg tat cag cgt cta ata tca cca gac tgt tgc tat gat gct ttt att	2808
Gly Tyr Gln Arg Leu Ile Ser Pro Asp Cys Cys Tyr Asp Ala Phe Ile	
880 885 890 895	
gtg tat gac act aaa gac cca gct gtg acc gag tgg gtt ttg gct gag	2856
Val Tyr Asp Thr Lys Asp Pro Ala Val Thr Glu Trp Val Leu Ala Glu	
900 905 910	
ctg gtg gcc aaa ctg gaa gac cca aga gag aaa cat ttt aat tta tgt	2904
Leu Val Ala Lys Leu Glu Asp Pro Arg Glu Lys His Phe Asn Leu Cys	
915 920 925	40

ctc gag gaa agg gac tgg tta cca ggg cag cca gtt ctg gaa aac ctt 2952
 Leu Glu Glu Arg Asp Trp Leu Pro Gly Gln Pro Val Leu Glu Asn Leu
 930 935 940

tcc cag agc ata cag ctt agc aaa aag aca gtg ttt gtg atg aca gac 3000
 Ser Gln Ser Ile Gln Leu Ser Lys Lys Thr Val Phe Val Met Thr Asp
 945 950 955

aag tat gca aag act gaa aat ttt aag ata gca ttt tac ttg tcc cat 3048
 Lys Tyr Ala Lys Thr Glu Asn Phe Lys Ile Ala Phe Tyr Leu Ser His
 960 965 970 975

cag agg ctc atg gat gaa aaa gtt gat gtg att atc ttg ata ttt ctt 3096
 Gln Arg Leu Met Asp Glu Lys Val Asp Val Ile Ile Leu Ile Phe Leu
 980 985 990

gag aag cct ttt cag aag tcc aag ttc ctc cag ctc cgg aaa agg ctc 3144
 Glu Lys Pro Phe Gln Lys Ser Lys Phe Leu Gln Leu Arg Lys Arg Leu
 995 1000 1005

tgt ggg agt tct gtc ctt gag tgg cca aca aac ccg caa gct cac 3189
 Cys Gly Ser Ser Val Leu Glu Trp Pro Thr Asn Pro Gln Ala His
 1010 1015 1020

cca tac ttc tgg cag tgt cta aag aac gcc ctg gcc aca gac aat 3234
 Pro Tyr Phe Trp Gln Cys Leu Lys Asn Ala Leu Ala Thr Asp Asn
 1025 1030 1035

cat gtg gcc tat agt cag gtg ttc aag gaa acg gtc tag aatcgaattc 3283
 His Val Ala Tyr Ser Gln Val Phe Lys Glu Thr Val
 1040 1045

ccgcggccgc cactgtgctg gatattctgca gaattccacc aactggact agtggatccg 3343

agctcgggtac caagcttaag tttaaaccgc 3373

10

20

<210> 18

<211> 1049

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 18

Met Val Phe Pro Met Trp Thr Leu Lys Arg Gln Ile Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Asn Ile Ile Leu Ile Ser Lys Leu Leu Gly Ala Arg Trp Phe Pro Lys
 20 25 30

Thr Leu Pro Cys Asp Val Thr Leu Asp Val Pro Lys Asn His Val Ile
 35 40 45

40

Val Asp Cys Thr Asp Lys His Leu Thr Glu Ile Pro Gly Gly Ile Pro
 50 55 60

Thr Asn Thr Thr Asn Leu Thr Leu Thr Ile Asn His Ile Pro Asp Ile
 65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Phe His Arg Leu Asp His Leu Val Glu Ile Asp Phe
 85 90 95

Arg Cys Asn Cys Val Pro Ile Pro Leu Gly Ser Lys Asn Asn Met Cys
 100 105 110

Ile Lys Arg Leu Gln Ile Lys Pro Arg Ser Phe Ser Gly Leu Thr Tyr
 115 120 125

Leu Lys Ser Leu Tyr Leu Asp Gly Asn Gln Leu Leu Glu Ile Pro Gln
 130 135 140

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Gln Leu Leu Ser Leu Glu Ala Asn Asn Ile
 145 150 155 160

Phe Ser Ile Arg Lys Glu Asn Leu Thr Glu Leu Ala Asn Ile Glu Ile
 165 170 175

Leu Tyr Leu Gly Gln Asn Cys Tyr Tyr Arg Asn Pro Cys Tyr Val Ser
 180 185 190

Tyr Ser Ile Glu Lys Asp Ala Phe Leu Asn Leu Thr Lys Leu Lys Val
 195 200 205

Leu Ser Leu Lys Asp Asn Asn Val Thr Ala Val Pro Thr Val Leu Pro
 210 215 220

Ser Thr Leu Thr Glu Leu Tyr Leu Tyr Asn Asn Met Ile Ala Lys Ile
 225 230 235 240

Gln Glu Asp Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gln Leu Gln Ile Leu Asp Leu
 245 250 255

Ser Gly Asn Cys Pro Arg Cys Tyr Asn Ala Pro Phe Pro Cys Ala Pro
 260 265 270

Cys Lys Asn Asn Ser Pro Leu Gln Ile Pro Val Asn Ala Phe Asp Ala
 275 280 285

10

20

30

40

Leu Thr Glu Leu Lys Val Leu Arg Leu His Ser Asn Ser Leu Gln His
290 295 300

Val Pro Pro Arg Trp Phe Lys Asn Ile Asn Lys Leu Gln Glu Leu Asp
305 310 315 320

Leu Ser Gln Asn Phe Leu Ala Lys Glu Ile Gly Asp Ala Lys Phe Leu
325 330 335

His Phe Leu Pro Ser Leu Ile Gln Leu Asp Leu Ser Phe Asn Phe Glu
340 345 350

10

Leu Gln Val Tyr Arg Ala Ser Met Asn Leu Ser Gln Ala Phe Ser Ser
355 360 365

Leu Lys Ser Leu Lys Ile Leu Arg Ile Arg Gly Tyr Val Phe Lys Glu
370 375 380

Leu Lys Ser Phe Asn Leu Ser Pro Leu His Asn Leu Gln Asn Leu Glu
385 390 395 400

Val Leu Asp Leu Gly Thr Asn Phe Ile Lys Ile Ala Asn Leu Ser Met
405 410 415

20

Phe Lys Gln Phe Lys Arg Leu Lys Val Ile Asp Leu Ser Val Asn Lys
420 425 430

Ile Ser Pro Ser Gly Asp Ser Ser Glu Val Gly Phe Cys Ser Asn Ala
435 440 445

Arg Thr Ser Val Glu Ser Tyr Glu Pro Gln Val Leu Glu Gln Leu His
450 455 460

Tyr Phe Arg Tyr Asp Lys Tyr Ala Arg Ser Cys Arg Phe Lys Asn Lys
465 470 475 480

30

Glu Ala Ser Phe Met Ser Val Asn Glu Ser Cys Tyr Lys Tyr Gly Gln
485 490 495

Thr Leu Asp Leu Ser Lys Asn Ser Ile Phe Phe Val Lys Ser Ser Asp
500 505 510

Phe Gln His Leu Ser Phe Leu Lys Cys Leu Asn Leu Ser Gly Asn Leu
515 520 525

Ile Ser Gln Thr Leu Asn Gly Ser Glu Phe Gln Pro Leu Ala Glu Leu
40

40

Phe Leu Cys Thr Cys Asp Ala Val Trp Phe Val Trp Trp Val Asn His
785 790 795 800

Thr Glu Val Thr Ile Pro Tyr Leu Ala Thr Asp Val Thr Cys Val Gly
805 810 815

Pro Gly Ala His Lys Gly Gln Ser Val Ile Ser Leu Asp Leu Tyr Thr
820 825 830

Cys Glu Leu Asp Leu Thr Asn Leu Ile Leu Phe Ser Leu Ser Ile Ser
835 840 845

Val Ser Leu Phe Leu Met Val Met Met Thr Ala Ser His Leu Tyr Phe
850 855 860

Trp Asp Val Trp Tyr Ile Tyr His Phe Cys Lys Ala Lys Ile Lys Gly
865 870 875 880

Tyr Gln Arg Leu Ile Ser Pro Asp Cys Cys Tyr Asp Ala Phe Ile Val
885 890 895

Tyr Asp Thr Lys Asp Pro Ala Val Thr Glu Trp Val Leu Ala Glu Leu
900 905 910

Val Ala Lys Leu Glu Asp Pro Arg Glu Lys His Phe Asn Leu Cys Leu
915 920 925

Glu Glu Arg Asp Trp Leu Pro Gly Gln Pro Val Leu Glu Asn Leu Ser
930 935 940

Gln Ser Ile Gln Leu Ser Lys Lys Thr Val Phe Val Met Thr Asp Lys
945 950 955 960

Tyr Ala Lys Thr Glu Asn Phe Lys Ile Ala Phe Tyr Leu Ser His Gln
965 970 975

Arg Leu Met Asp Glu Lys Val Asp Val Ile Ile Leu Ile Phe Leu Glu
980 985 990

Lys Pro Phe Gln Lys Ser Lys Phe Leu Gln Leu Arg Lys Arg Leu Cys
995 1000 1005

Gly Ser Ser Val Leu Glu Trp Pro Thr Asn Pro Gln Ala His Pro
1010 1015 1020

10

20

30

40

Tyr Phe Trp Gln Cys Leu Lys Asn Ala Leu Ala Thr Asp Asn His
 1025 1030 1035

Val Ala Tyr Ser Gln Val Phe Lys Glu Thr Val
 1040 1045

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Mus musculus

10

<400> 19

ctcctccacc agacctcttg attcc

25

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

20

<400> 20

caaggcatgt cctaggtggt gacattc

27

<210> 21

<211> 3243

<212> DNA

<213> Mus musculus

30

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(3201)

<223>

<400> 21

attctcctcc accagacctc ttgattccat ttigaaagaa aactgaaa atg gtg ttt
 Met Val Phe
 1

57

40

tcg atg tgg aca cgg aag aga caa att ttg atc ttt tta aat atg ctc 105
 Ser Met Trp Thr Arg Lys Arg Gln Ile Leu Ile Phe Leu Asn Met Leu
 5 10 15
 tta gtt tct aga gtc ttt ggg ttt cga tgg ttt cct aaa act cta cct 153
 Leu Val Ser Arg Val Phe Gly Phe Arg Trp Phe Pro Lys Thr Leu Pro
 20 25 30 35
 tgt gaa gtt aaa gta aat atc cca gag gcc cat gtg atc gtg gac tgc 201
 Cys Glu Val Lys Val Asn Ile Pro Glu Ala His Val Ile Val Asp Cys
 40 45 50
 aca gac aag cat ttg aca gaa atc cct gag gcc att ccc act aac acc 249
 Thr Asp Lys His Leu Thr Glu Ile Pro Glu Gly Ile Pro Thr Asn Thr
 55 60 65
 acc aat ctt acc ctt acc atc aac cac ata cca agc atc tct cca gat 297
 Thr Asn Leu Thr Leu Thr Ile Asn His Ile Pro Ser Ile Ser Pro Asp
 70 75 80
 tcc ttc cgt agg ctg aac cat ctg gaa gaa atc gat tta aga tgc aat 345
 Ser Phe Arg Arg Leu Asn His Leu Glu Glu Ile Asp Leu Arg Cys Asn
 85 90 95
 tgt gta cct gtt cta ctg ggg tcc aaa gcc aat gtg tgt acc aag agg 393
 Cys Val Pro Val Leu Leu Gly Ser Lys Ala Asn Val Cys Thr Lys Arg
 100 105 110 115
 ctg cag att aga cct gga agc ttt agt gga ctc tct gac tta aaa gcc 441
 Leu Gln Ile Arg Pro Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ser Asp Leu Lys Ala
 120 125 130
 ctt tac ctg gat gga aac caa ctt ctg gag ata cca cag gat ctg cca 489
 Leu Tyr Leu Asp Gly Asn Gln Leu Leu Glu Ile Pro Gln Asp Leu Pro
 135 140 145
 tcc agc tta cat ctt ctg agc ctt gag gct aac aac atc ttc tcc atc 537
 Ser Ser Leu His Leu Leu Ser Leu Glu Ala Asn Asn Ile Phe Ser Ile
 150 155 160
 acg aag gag aat cta aca gaa ctg gtc aac att gaa aca ctc tac ctg 585
 Thr Lys Glu Asn Leu Thr Glu Leu Val Asn Ile Glu Thr Leu Tyr Leu
 165 170 175
 ggt caa aac tgt tat tat cga aat cct tgc aat gtt tcc tat tct att 633
 Gly Gln Asn Cys Tyr Tyr Arg Asn Pro Cys Asn Val Ser Tyr Ser Ile
 180 185 190 195
 gaa aaa gat gct ttc cta gtt atg aga aat ttg aag gtt ctc tca cta 681
 Glu Lys Asp Ala Phe Leu Val Met Arg Asn Leu Lys Val Leu Ser Leu
 200 205 210
 aaa gat aac aat gtc aca gct gtc ccc acc act ttg cca cct aat tta 729
 Lys Asp Asn Asn Val Thr Ala Val Pro Thr Thr Leu Pro Pro Asn Leu
 215 220 225
 cta gag ctc tat ctt tat aac aat atc att aag aaa atc caa gaa aat 777
 Leu Glu Leu Tyr Leu Tyr Asn Asn Ile Ile Lys Lys Ile Gln Glu Asn
 230 235 240

10

20

30

40

gat ttt aat aac ctc aat gag ttg caa gtt ctt gac cta agt gga aat	825	
Asp Phe Asn Asn Leu Asn Glu Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Gly Asn		
245 250 255		
tgk cct cga tgt tat aat gtc cca tat ccg tgt aca ccg tgt gaa aat	873	
Cys Pro Arg Cys Tyr Asn Val Pro Tyr Pro Cys Thr Pro Cys Glu Asn		
260 265 270 275		
aat tcc ccc tta cag atc cat gac aat gct ttc aat tca ttg aca gaa	921	
Asn Ser Pro Leu Gln Ile His Asp Asn Ala Phe Asn Ser Leu Thr Glu		
280 285 290		
tta aaa gtt tta cgt tta cac agt aat tct ctt cag cat gtg ccc cca	969	
Leu Lys Val Leu Arg Leu His Ser Asn Ser Leu Gln His Val Pro Pro		10
295 300 305		
aca tgg ttt aaa aac atg aga aac ctc cag gaa cta gac ctc tcc caa	1017	
Thr Trp Phe Lys Asn Met Arg Asn Leu Gln Glu Leu Asp Leu Ser Gln		
310 315 320		
aac tac ttg gcc aga gaa att gag gag gcc aaa ttt ttg cat ttt ctt	1065	
Asn Tyr Leu Ala Arg Glu Ile Glu Glu Ala Lys Phe Leu His Phe Leu		
325 330 335		
ccc aac ctt gtt gag ttg gat ttt tct ttc aat tat gag ctg cag gtc	1113	
Pro Asn Leu Val Glu Leu Asp Phe Ser Phe Asn Tyr Glu Leu Gln Val		
340 345 350 355		
tac cat gca tct ata act tta cca cat tca ctc tct tca ttg gaa aac	1161	
Tyr His Ala Ser Ile Thr Leu Pro His Ser Leu Ser Ser Leu Glu Asn		20
360 365 370		
ttg aaa att ctg cgt gtc aag ggg tat gtc ttt aaa gag ctg aaa aac	1209	
Leu Lys Ile Leu Arg Val Lys Gly Tyr Val Phe Lys Glu Leu Lys Asn		
375 380 385		
tcc agt ctt tct gta ttg cac aag ctt ccc agg ctg gaa gtt ctt gac	1257	
Ser Ser Leu Ser Val Leu His Lys Leu Pro Arg Leu Glu Val Leu Asp		
390 395 400		
ctt ggc act aac ttc ata aaa att gct gac ctc aac ata ttc aaa cat	1305	
Leu Gly Thr Asn Phe Ile Lys Ile Ala Asp Leu Asn Ile Phe Lys His		
405 410 415		
ttt gaa aac ctc aaa ctc ata gac ctt tca gtg aat aag ata tct cct	1353	
Phe Glu Asn Leu Lys Leu Ile Asp Leu Ser Val Asn Lys Ile Ser Pro		30
420 425 430 435		
tca gaa gag tca aga gaa gtt ggc ttt tgt cct aat gct caa act tct	1401	
Ser Glu Glu Ser Arg Glu Val Gly Phe Cys Pro Asn Ala Gln Thr Ser		
440 445 450		
gta gac cgt cat ggg ccc cag gtc ctt gag gcc tta cac tat ttc cga	1449	
Val Asp Arg His Gly Pro Gln Val Leu Glu Ala Leu His Tyr Phe Arg		
455 460 465		
tac gat gaa tat gca cgg agc tgc agg ttc aaa aac aaa gag cca cct	1497	
Tyr Asp Glu Tyr Ala Arg Ser Cys Arg Phe Lys Asn Lys Glu Pro Pro		
470 475 480		
tct ttc ttg cct ttg aat gca gac tgc cac ata tat ggg cag acc tta	1545	40

725	730	735		
aca aaa tat ttt cta gaa gat gct ttg caa ttg cgc tat cta gac atc Thr Lys Tyr Phe Leu Glu Asp Ala Leu Gln Leu Arg Tyr Leu Asp Ile 740 745 750 755			2313	
agt tca aat aaa atc cag gtc att cag aag act agc ttc cca gaa aat Ser Ser Asn Lys Ile Gln Val Ile Gln Lys Thr Ser Phe Pro Glu Asn 760 765 770			2361	
gtc ctc aac aat ctg gag atg ttg gtt tta cat cac aat cgc ttt ctt Val Leu Asn Asn Leu Glu Met Leu Val Leu His His Asn Arg Phe Leu 775 780 785			2409	
tgc aac tgt gat gct gtg tgg ttt gtc tgg tgg gtt aac cat aca gat Cys Asn Cys Asp Ala Val Trp Phe Val Trp Trp Val Asn His Thr Asp 790 795 800			2457	10
ggt act att cca tac ctg gcc act gat gtg act tgt gta ggt cca gga Val Thr Ile Pro Tyr Leu Ala Thr Asp Val Thr Cys Val Gly Pro Gly 805 810 815			2505	
gca cac aaa ggt caa agt gtc ata tcc ctt gat ctg tat acg tgt gag Ala His Lys Gly Gln Ser Val Ile Ser Leu Asp Leu Tyr Thr Cys Glu 820 825 830 835			2553	
tta gat ctc aca aac ctg att ctg ttc tca gtt tcc ata tca tca gtc Leu Asp Leu Thr Asn Leu Ile Leu Phe Ser Val Ser Ile Ser Ser Val 840 845 850			2601	
ctc ttt ctt atg gta gtt atg aca aca agt cac ctc ttt ttc tgg gat Leu Phe Leu Met Val Val Met Thr Thr Ser His Leu Phe Phe Trp Asp 855 860 865			2649	20
atg tgg tac att tat tat ttt tgg aaa gca aag ata aag ggg tat cag Met Trp Tyr Ile Tyr Tyr Phe Trp Lys Ala Lys Ile Lys Gly Tyr Gln 870 875 880			2697	
cat ctg caa tcc atg gag tct tgt tat gat gct ttt att gtg tat gac His Leu Gln Ser Met Glu Ser Cys Tyr Asp Ala Phe Ile Val Tyr Asp 885 890 895			2745	
act aaa aac tca gct gtg aca gaa tgg gtt ttg cag gag ctg gtg gca Thr Lys Asn Ser Ala Val Thr Glu Trp Val Leu Gln Glu Leu Val Ala 900 905 910 915			2793	30
aaa ttg gaa gat cca aga gaa aaa cac ttc aat ttg tgt cta gaa gaa Lys Leu Glu Asp Pro Arg Glu Lys His Phe Asn Leu Cys Leu Glu Glu 920 925 930			2841	
aga gac tgg cta cca gga cag cca gtt cta gaa aac ctt tcc cag agc Arg Asp Trp Leu Pro Gly Gln Pro Val Leu Glu Asn Leu Ser Gln Ser 935 940 945			2889	
ata cag ctc agc aaa aag aca gtg ttt gtg atg aca cag aaa tat gct Ile Gln Leu Ser Lys Lys Thr Val Phe Val Met Thr Gln Lys Tyr Ala 950 955 960			2937	
aag act gag agt ttt aag atg gca ttt tat ttg tct cat cag agg ctc Lys Thr Glu Ser Phe Lys Met Ala Phe Tyr Leu Ser His Gln Arg Leu 965 970 975			2985	40

ctg gat gaa aaa gtg gat gtg att atc ttg ata ttc ttg gaa aag cct 3033
 Leu Asp Glu Lys Val Asp Val Ile Ile Leu Ile Phe Leu Glu Lys Pro
 980 985 990 995
 ctt cag aag tct aag ttt ctt cag ctc agg aag aga ctc tgc agg 3078
 Leu Gln Lys Ser Lys Phe Leu Gln Leu Arg Lys Arg Leu Cys Arg
 1000 1005 1010
 agc tct gtc ctt gag tgg cct gca aat cca cag gct cac cca tac 3123
 Ser Ser Val Leu Glu Trp Pro Ala Asn Pro Gln Ala His Pro Tyr
 1015 1020 1025
 ttc tgg cag tgc ctg aaa aat gcc ctg acc aca gac aat cat gtg 3168
 Phe Trp Gln Cys Leu Lys Asn Ala Leu Thr Thr Asp Asn His Val
 1030 1035 1040
 gct tat agt caa atg ttc aag gaa aca gtc tag ctctctgaag 3211
 Ala Tyr Ser Gln Met Phe Lys Glu Thr Val
 1045 1050
 aatgtcacca cctaggacat gccttgaatc ga 3243

<210> 22

<211> 1050

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Met Val Phe Ser Met Trp Thr Arg Lys Arg Gln Ile Leu Ile Phe Leu
 1 5 10 15

Asn Met Leu Leu Val Ser Arg Val Phe Gly Phe Arg Trp Phe Pro Lys
 20 25 30

Thr Leu Pro Cys Glu Val Lys Val Asn Ile Pro Glu Ala His Val Ile
 35 40 45

Val Asp Cys Thr Asp Lys His Leu Thr Glu Ile Pro Glu Gly Ile Pro
 50 55 60

Thr Asn Thr Thr Asn Leu Thr Leu Thr Ile Asn His Ile Pro Ser Ile
 65 70 75 80

Ser Pro Asp Ser Phe Arg Arg Leu Asn His Leu Glu Glu Ile Asp Leu
 85 90 95

Arg Cys Asn Cys Val Pro Val Leu Leu Gly Ser Lys Ala Asn Val Cys

10

20

30

40

Leu Gln Val Tyr His Ala Ser Ile Thr Leu Pro His Ser Leu Ser Ser
355 360 365

Leu Glu Asn Leu Lys Ile Leu Arg Val Lys Gly Tyr Val Phe Lys Glu
370 375 380

Leu Lys Asn Ser Ser Leu Ser Val Leu His Lys Leu Pro Arg Leu Glu
385 390 395 400

Val Leu Asp Leu Gly Thr Asn Phe Ile Lys Ile Ala Asp Leu Asn Ile
405 410 415

Phe Lys His Phe Glu Asn Leu Lys Leu Ile Asp Leu Ser Val Asn Lys
420 425 430

Ile Ser Pro Ser Glu Glu Ser Arg Glu Val Gly Phe Cys Pro Asn Ala
435 440 445

Gln Thr Ser Val Asp Arg His Gly Pro Gln Val Leu Glu Ala Leu His
450 455 460

Tyr Phe Arg Tyr Asp Glu Tyr Ala Arg Ser Cys Arg Phe Lys Asn Lys
465 470 475 480

Glu Pro Pro Ser Phe Leu Pro Leu Asn Ala Asp Cys His Ile Tyr Gly
485 490 495

Gln Thr Leu Asp Leu Ser Arg Asn Asn Ile Phe Phe Ile Lys Pro Ser
500 505 510

Asp Phe Gln His Leu Ser Phe Leu Lys Cys Leu Asn Leu Ser Gly Asn
515 520 525

Thr Ile Gly Gln Thr Leu Asn Gly Ser Glu Leu Trp Pro Leu Arg Glu
530 535 540

Leu Arg Tyr Leu Asp Phe Ser Asn Asn Arg Leu Asp Leu Leu Tyr Ser
545 550 555 560

Thr Ala Phe Glu Glu Leu Gln Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Ser Ser
565 570 575

Asn Ser His Tyr Phe Gln Ala Glu Gly Ile Thr His Met Leu Asn Phe
580 585 590

10

20

30

Thr Lys Lys Leu Arg Leu Leu Asp Lys Leu Met Met Asn Asp Asn Asp
 595 600 605

Ile Ser Thr Ser Ala Ser Arg Thr Met Glu Ser Asp Ser Leu Arg Ile
 610 615 620

Leu Glu Phe Arg Gly Asn His Leu Asp Val Leu Trp Arg Ala Gly Asp
 625 630 635 640

Asn Arg Tyr Leu Asp Phe Phe Lys Asn Leu Phe Asn Leu Glu Val Leu
 645 650 655

Asp Ile Ser Arg Asn Ser Leu Asn Ser Leu Pro Pro Glu Val Phe Glu
 660 665 670

Gly Met Pro Pro Asn Leu Lys Asn Leu Ser Leu Ala Lys Asn Gly Leu
 675 680 685

Lys Ser Phe Phe Trp Asp Arg Leu Gln Leu Leu Lys His Leu Glu Ile
 690 695 700

Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Thr Lys Val Pro Glu Arg Leu Ala
 705 710 715 720

Asn Cys Ser Lys Ser Leu Thr Thr Leu Ile Leu Lys His Asn Gln Ile
 725 730 735

Arg Gln Leu Thr Lys Tyr Phe Leu Glu Asp Ala Leu Gln Leu Arg Tyr
 740 745 750

Leu Asp Ile Ser Ser Asn Lys Ile Gln Val Ile Gln Lys Thr Ser Phe
 755 760 765

Pro Glu Asn Val Leu Asn Asn Leu Glu Met Leu Val Leu His His Asn
 770 775 780

Arg Phe Leu Cys Asn Cys Asp Ala Val Trp Phe Val Trp Trp Val Asn
 785 790 795 800

His Thr Asp Val Thr Ile Pro Tyr Leu Ala Thr Asp Val Thr Cys Val
 805 810 815

Gly Pro Gly Ala His Lys Gly Gln Ser Val Ile Ser Leu Asp Leu Tyr
 820 825 830

10

20

30

Thr Cys Glu Leu Asp Leu Thr Asn Leu Ile Leu Phe Ser Val Ser Ile
835 840 845

Ser Ser Val Leu Phe Leu Met Val Val Met Thr Thr Ser His Leu Phe
850 855 860

Phe Trp Asp Met Trp Tyr Ile Tyr Tyr Phe Trp Lys Ala Lys Ile Lys
865 870 875 880

Gly Tyr Gln His Leu Gln Ser Met Glu Ser Cys Tyr Asp Ala Phe Ile
885 890 895

Val Tyr Asp Thr Lys Asn Ser Ala Val Thr Glu Trp Val Leu Gln Glu
900 905 910

Leu Val Ala Lys Leu Glu Asp Pro Arg Glu Lys His Phe Asn Leu Cys
915 920 925

Leu Glu Glu Arg Asp Trp Leu Pro Gly Gln Pro Val Leu Glu Asn Leu
930 935 940

Ser Gln Ser Ile Gln Leu Ser Lys Lys Thr Val Phe Val Met Thr Gln
945 950 955 960

Lys Tyr Ala Lys Thr Glu Ser Phe Lys Met Ala Phe Tyr Leu Ser His
965 970 975

Gln Arg Leu Leu Asp Glu Lys Val Asp Val Ile Ile Leu Ile Phe Leu
980 985 990

Glu Lys Pro Leu Gln Lys Ser Lys Phe Leu Gln Leu Arg Lys Arg Leu
995 1000 1005

Cys Arg Ser Ser Val Leu Glu Trp Pro Ala Asn Pro Gln Ala His
1010 1015 1020

Pro Tyr Phe Trp Gln Cys Leu Lys Asn Ala Leu Thr Thr Asp Asn
1025 1030 1035

His Val Ala Tyr Ser Gln Met Phe Lys Glu Thr Val
1040 1045 1050

<210> 23

<211> 25

10

20

30

40

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 23
ctgcgctgct gcaagttacg gaatg 25

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 24
gcgcgaaatc atgacttaac gtcag 25

<210> 25

<211> 3310

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> CDS

<222> (83)..(3208)

<223>

<400> 25
gctcccggcc gccatggcgg ccgcgggaat tcgattctgc gctgctgcaa gttacggaat 60 30
gaaaaattag aacaacagaa ac atg gaa aac atg ttc ctt cag tcg tca atg 112
Met Glu Asn Met Phe Leu Gln Ser Ser Met
1 5 10
ctg acc tgc att ttc ctg cta ata tct ggt tcc tgt gag tta tgc gcc 160
Leu Thr Cys Ile Phe Leu Leu Ile Ser Gly Ser Cys Glu Leu Cys Ala
15 20 25
gaa gaa aat ttt tct aga agc tat cct tgt gat gag aaa aag caa aat 208
Glu Glu Asn Phe Ser Arg Ser Tyr Pro Cys Asp Glu Lys Lys Gln Asn
30 35 40
gac tca gtt att gca gag tgc agc aat cgt cga cta cag gaa gtt ccc 256
Asp Ser Val Ile Ala Glu Cys Ser Asn Arg Arg Leu Gln Glu Val Pro
45 50 55 40

caa acg gtg ggc aaa tat gtg aca gaa cta gac ctg tct gat aat ttc 304
 Gln Thr Val Gly Lys Tyr Val Thr Glu Leu Asp Leu Ser Asp Asn Phe
 60 65 70

atc aca cac ata acg aat gaa tca ttt caa ggg ctg caa aat ctc act 352
 Ile Thr His Ile Thr Asn Glu Ser Phe Gln Gly Leu Gln Asn Leu Thr
 75 80 85 90

aaa ata aat cta aac cac aac ccc aat gta cag cac cag aac gga aat 400
 Lys Ile Asn Leu Asn His Asn Pro Asn Val Gln His Gln Asn Gly Asn
 95 100 105

ccc ggt ata caa tca aat ggc ttg aat atc aca gac ggg gca ttc ctc 448
 Pro Gly Ile Gln Ser Asn Gly Leu Asn Ile Thr Asp Gly Ala Phe Leu
 110 115 120

aac cta aaa aac cta agg gag tta ctg ctt gaa gac aac cag tta ccc 496
 Asn Leu Lys Asn Leu Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Asn Gln Leu Pro
 125 130 135

caa ata ccc tct ggt ttg cca gag tct ttg aca gaa ctt agt cta att 544
 Gln Ile Pro Ser Gly Leu Pro Glu Ser Leu Thr Glu Leu Ser Leu Ile
 140 145 150

caa aac aat ata tac aac ata act aaa gag ggc att tca aga ctt ata 592
 Gln Asn Asn Ile Tyr Asn Ile Thr Lys Glu Gly Ile Ser Arg Leu Ile
 155 160 165 170

aac ttg aaa aat ctc tat ttg gcc tgg aac tgc tat ttt aac aaa gtt 640
 Asn Leu Lys Asn Leu Tyr Leu Ala Trp Asn Cys Tyr Phe Asn Lys Val
 175 180 185

tgc gag aaa act aac ata gaa gat gga gta ttt gaa acg ctg aca aat 688
 Cys Glu Lys Thr Asn Ile Glu Asp Gly Val Phe Glu Thr Leu Thr Asn
 190 195 200

ttg gag ttg cta tca cta tct ttc aat tct ctt tca cac gtg cca ccc 736
 Leu Glu Leu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ser Leu Ser His Val Pro Pro
 205 210 215

aaa ctg cca agc tcc cta cgc aaa ctt ttt ctg agc aac acc cag atc 784
 Lys Leu Pro Ser Ser Leu Arg Lys Leu Phe Leu Ser Asn Thr Gln Ile
 220 225 230

aaa tac att agt gaa gaa gat ttc aag gga ttg ata aat tta aca tta 832
 Lys Tyr Ile Ser Glu Glu Asp Phe Lys Gly Leu Ile Asn Leu Thr Leu
 235 240 245 250

cta gat tta agc ggg aac tgt ccg agg tgc ttc aat gcc cca ttt cca 880
 Leu Asp Leu Ser Gly Asn Cys Pro Arg Cys Phe Asn Ala Pro Phe Pro
 255 260 265

tgc gtg cct tgt gat ggt ggt gct tca att aat ata gat cgt ttt gct 928
 Cys Val Pro Cys Asp Gly Gly Ala Ser Ile Asn Ile Asp Arg Phe Ala
 270 275 280

ttt caa aac ttg acc caa ctt cga tac cta aac ctc tct agc act tcc 976
 Phe Gln Asn Leu Thr Gln Leu Arg Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Thr Ser
 285 290 295

10

20

30

40

ctc agg aag att aat gct gcc tgg ttt	aaa aat atg cct cat ctg aag	1024	
Leu Arg Lys Ile Asn Ala Ala Trp Phe Lys Asn Met Pro His Leu Lys			
300	305 310		
gtg ctg gat ctt gaa ttc aac tat tta gtg gga gaa ata gcc tct ggg		1072	
Val Leu Asp Leu Glu Phe Asn Tyr Leu Val Gly Glu Ile Ala Ser Gly			
315	320 325 330		
gca ttt tta acg atg ctg ccc cgc tta gaa ata ctt gac ttg tct ttt		1120	
Ala Phe Leu Thr Met Leu Pro Arg Leu Glu Ile Leu Asp Leu Ser Phe			
	335 340 345		
aac tat ata aag ggg agt tat cca cag cat att aat att tcc aga aac		1168	
Asn Tyr Ile Lys Gly Ser Tyr Pro Gln His Ile Asn Ile Ser Arg Asn			10
	350 355 360		
ttc tct aaa ctt ttg tct cta cgg gca ttg cat tta aga ggt tat gtg		1216	
Phe Ser Lys Leu Leu Ser Leu Arg Ala Leu His Leu Arg Gly Tyr Val			
	365 370 375		
ttc cag gaa ctc aga gaa gat gat ttc cag ccc ctg atg cag ctt cca		1264	
Phe Gln Glu Leu Arg Glu Asp Asp Phe Gln Pro Leu Met Gln Leu Pro			
	380 385 390		
aac tta tcg act atc aac ttg ggt att aat ttt att aag caa atc gat		1312	
Asn Leu Ser Thr Ile Asn Leu Gly Ile Asn Phe Ile Lys Gln Ile Asp			
	395 400 405 410		
ttc aaa ctt ttc caa aat ttc tcc aat ctg gaa att att tac ttg tca		1360	
Phe Lys Leu Phe Gln Asn Phe Ser Asn Leu Glu Ile Ile Tyr Leu Ser			20
	415 420 425		
gaa aac aga ata tca ccg ttg gta aaa gat acc cgg cag agt tat gca		1408	
Glu Asn Arg Ile Ser Pro Leu Val Lys Asp Thr Arg Gln Ser Tyr Ala			
	430 435 440		
aat agt tcc tct ttt caa cgt cat atc cgg aaa cga cgc tca aca gat		1456	
Asn Ser Ser Ser Phe Gln Arg His Ile Arg Lys Arg Arg Ser Thr Asp			
	445 450 455		
ttt gag ttt gac cca cat tcg aac ttt tat cat ttc acc cgt cct tta		1504	
Phe Glu Phe Asp Pro His Ser Asn Phe Tyr His Phe Thr Arg Pro Leu			
	460 465 470		
ata aag cca caa tgt gct gct tat gga aaa gcc tta gat tta agc ctc		1552	
Ile Lys Pro Gln Cys Ala Ala Tyr Gly Lys Ala Leu Asp Leu Ser Leu			30
	475 480 485 490		
aac agt att ttc ttc att ggg cca aac caa ttt gaa aat ctt cct gac		1600	
Asn Ser Ile Phe Phe Ile Gly Pro Asn Gln Phe Glu Asn Leu Pro Asp			
	495 500 505		
att gcc tgt tta aat ctg tct gca aat agc aat gct caa gtg tta agt		1648	
Ile Ala Cys Leu Asn Leu Ser Ala Asn Ser Asn Ala Gln Val Leu Ser			
	510 515 520		
gga act gaa ttt tca gcc att cct cat gtc aaa tat ttg gat ttg aca		1696	
Gly Thr Glu Phe Ser Ala Ile Pro His Val Lys Tyr Leu Asp Leu Thr			
	525 530 535		
aac aat aga cta gac ttt gat aat gct agt gct ctt act gaa ttg tcc		1744	40

Asn	Asn	Arg	Leu	Asp	Phe	Asp	Asn	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Glu	Leu	Ser	
540						545				550						
gac	ttg	gaa	gtt	cta	gat	ctc	agc	tat	aat	tca	cac	tat	ttc	aga	ata	1792
Asp	Leu	Glu	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Tyr	Asn	Ser	His	Tyr	Phe	Arg	Ile	
555					560					565					570	
gca	ggc	gta	aca	cat	cat	cta	gaa	ttt	att	caa	aat	ttc	aca	aat	cta	1840
Ala	Gly	Val	Thr	His	His	Leu	Glu	Phe	Ile	Gln	Asn	Phe	Thr	Asn	Leu	
				575					580					585		
aaa	gtt	tta	aac	ttg	agc	cac	aac	aac	att	tat	act	tta	aca	gat	aag	1888
Lys	Val	Leu	Asn	Leu	Ser	His	Asn	Asn	Ile	Tyr	Thr	Leu	Thr	Asp	Lys	
			590					595					600			
tat	aac	ctg	gaa	agc	aag	tcc	ctg	gta	gaa	tta	gtt	ttc	agt	ggc	aat	1936
Tyr	Asn	Leu	Glu	Ser	Lys	Ser	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Phe	Ser	Gly	Asn	
		605					610					615				
cgc	ctt	gac	att	ttg	tgg	aat	gat	gat	gac	aac	agg	tat	atc	tcc	att	1984
Arg	Leu	Asp	Ile	Leu	Trp	Asn	Asp	Asp	Asp	Asn	Arg	Tyr	Ile	Ser	Ile	
		620				625					630					
ttc	aaa	ggt	ctc	aag	aat	ctg	aca	cgt	ctg	gat	tta	tcc	ctt	aat	agg	2032
Phe	Lys	Gly	Leu	Lys	Asn	Leu	Thr	Arg	Leu	Asp	Leu	Ser	Leu	Asn	Arg	
635					640					645					650	
ctg	aag	cac	atc	cca	aat	gaa	gca	ttc	ctt	aat	ttg	cca	gcg	agt	ctc	2080
Leu	Lys	His	Ile	Pro	Asn	Glu	Ala	Phe	Leu	Asn	Leu	Pro	Ala	Ser	Leu	
				655					660					665		
act	gaa	cta	cat	ata	aat	gat	aat	atg	tta	aag	ttt	ttt	aac	tgg	aca	2128
Thr	Glu	Leu	His	Ile	Asn	Asp	Asn	Met	Leu	Lys	Phe	Phe	Asn	Trp	Thr	
			670					675					680			
tta	ctc	cag	cag	ttt	cct	cgt	ctc	gag	ttg	ctt	gac	tta	cgt	gga	aac	2176
Leu	Leu	Ser	Gln	Phe	Pro	Arg	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Leu	Arg	Gly	Asn	
		685					690						695			
aaa	cta	ctc	ttt	tta	act	gat	agc	cta	tct	gac	ttt	aca	tct	tcc	ctt	2224
Lys	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Asp	Ser	Leu	Ser	Asp	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	
	700					705					710					
cgg	aca	ctg	ctg	ctg	agt	cat	aac	agg	att	tcc	cac	cta	ccc	tct	ggc	2272
Arg	Thr	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Asn	Arg	Ile	Ser	His	Leu	Pro	Ser	Gly	
	715				720					725					730	
ttt	ctt	tct	gaa	gtc	agt	agt	ctg	aag	cac	ctc	gat	tta	agt	tcc	aat	2320
Phe	Leu	Ser	Glu	Val	Ser	Ser	Leu	Lys	His	Leu	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn	
				735					740					745		
ctg	cta	aaa	aca	atc	aac	aaa	tcc	gca	ctt	gaa	act	aag	acc	acc	acc	2368
Leu	Leu	Lys	Thr	Ile	Asn	Lys	Ser	Ala	Leu	Glu	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	
			750					755						760		
aaa	tta	tct	atg	ttg	gaa	cta	cac	gga	aac	ccc	ttt	gaa	tgc	acc	tgt	2416
Lys	Leu	Ser	Met	Leu	Glu	Leu	His	Gly	Asn	Pro	Phe	Glu	Cys	Thr	Cys	
		765					770					775				
gac	att	gga	gat	ttc	cga	aga	tgg	atg	gat	gaa	cat	ctg	aat	gtc	aaa	2464
Asp	Ile	Gly	Asp	Phe	Arg	Arg	Trp	Met	Asp	Glu	His	Leu	Asn	Val	Lys	

10

20

30

40

780	785	790		
att ccc aga ctg gta gat gtc att tgt gcc agt cct ggg gat caa aga Ile Pro Arg Leu Val Asp Val Ile Cys Ala Ser Pro Gly Asp Gln Arg 795 800 805 810			2512	
ggg aag agt att gtg agt ctg gag cta aca act tgt gtt tca gat gtc Gly Lys Ser Ile Val Ser Leu Glu Leu Thr Thr Cys Val Ser Asp Val 815 820 825			2560	
act gca gtg ata tta ttt ttc ttc acg ttc ttt atc acc acc atg gtt Thr Ala Val Ile Leu Phe Phe Phe Thr Phe Phe Ile Thr Thr Met Val 830 835 840			2608	
atg ttg gct gcc ctg gct cac cat ttg ttt tac tgg gat gtt tgg ttt Met Leu Ala Ala Leu Ala His His Leu Phe Tyr Trp Asp Val Trp Phe 845 850 855			2656	10
ata tat aat gtg tgt tta gct aag gta aaa ggc tac agg tct ctt tcc Ile Tyr Asn Val Cys Leu Ala Lys Val Lys Gly Tyr Arg Ser Leu Ser 860 865 870			2704	
aca tcc caa act ttc tat gat gct tac att tct tat gac acc aaa gac Thr Ser Gln Thr Phe Tyr Asp Ala Tyr Ile Ser Tyr Asp Thr Lys Asp 875 880 885 890			2752	
gcc tct gtt act gac tgg gtg ata aat gag ctg cgc tac cac ctt gaa Ala Ser Val Thr Asp Trp Val Ile Asn Glu Leu Arg Tyr His Leu Glu 895 900 905			2800	20
gag agc cga gac aaa aac gtt ctc ctt tgt cta gag gag agg gat tgg Glu Ser Arg Asp Lys Asn Val Leu Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp Trp 910 915 920			2848	
gac ccg gga ttg gcc atc atc gac aac ctc atg cag agc atc aac caa Asp Pro Gly Leu Ala Ile Ile Asp Asn Leu Met Gln Ser Ile Asn Gln 925 930 935			2896	
agc aag aaa aca gta ttt gtt tta acc aaa aaa tat gca aaa agc tgg Ser Lys Lys Thr Val Phe Val Leu Thr Lys Lys Tyr Ala Lys Ser Trp 940 945 950			2944	
aac ttt aaa aca gct ttt tac ttg gct ttg cag agg cta atg gat gag Asn Phe Lys Thr Ala Phe Tyr Leu Ala Leu Gln Arg Leu Met Asp Glu 955 960 965 970			2992	30
aac atg gat gtg att ata ttt atc ctg ctg gag cca gtg tta cag cat Asn Met Asp Val Ile Ile Phe Ile Leu Leu Glu Pro Val Leu Gln His 975 980 985			3040	
tct cag tat ttg agg cta cgg cag cgg atc tgt aag agc tcc atc ctc Ser Gln Tyr Leu Arg Leu Arg Gln Arg Ile Cys Lys Ser Ser Ile Leu 990 995 1000			3088	
cag tgg cct gac aac ccg aag gca gaa ggc ttg ttt tgg caa act Gln Trp Pro Asp Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu Phe Trp Gln Thr 1005 1010 1015			3133	
ctg aga aat gtg gtc ttg act gaa aat gat tca cgg tat aac aat Leu Arg Asn Val Val Leu Thr Glu Asn Asp Ser Arg Tyr Asn Asn 1020 1025 1030			3178	40

atg tat gtc gat tcc att aag caa tac taa ctgacgttaa gtcattgattt 3228
 Met Tyr Val Asp Ser Ile Lys Gln Tyr
 1035 1040

cgcgcaatca ctagtgaatt cgcgcccgcc tgcaggtcga ccatatggga gagctcccaa 3288

cgcgttggat gcatagcttg ag 3310

<210> 26

<211> 1041

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Glu Asn Met Phe Leu Gln Ser Ser Met Leu Thr Cys Ile Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Ile Ser Gly Ser Cys Glu Leu Cys Ala Glu Glu Asn Phe Ser Arg
 20 25 30

Ser Tyr Pro Cys Asp Glu Lys Lys Gln Asn Asp Ser Val Ile Ala Glu
 35 40 45

Cys Ser Asn Arg Arg Leu Gln Glu Val Pro Gln Thr Val Gly Lys Tyr
 50 55 60

Val Thr Glu Leu Asp Leu Ser Asp Asn Phe Ile Thr His Ile Thr Asn
 65 70 75 80

Glu Ser Phe Gln Gly Leu Gln Asn Leu Thr Lys Ile Asn Leu Asn His
 85 90 95

Asn Pro Asn Val Gln His Gln Asn Gly Asn Pro Gly Ile Gln Ser Asn
 100 105 110

Gly Leu Asn Ile Thr Asp Gly Ala Phe Leu Asn Leu Lys Asn Leu Arg
 115 120 125

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Asn Gln Leu Pro Gln Ile Pro Ser Gly Leu
 130 135 140

Pro Glu Ser Leu Thr Glu Leu Ser Leu Ile Gln Asn Asn Ile Tyr Asn
 145 150 155 160

10

20

30

40

Ile Thr Lys Glu Gly Ile Ser Arg Leu Ile Asn Leu Lys Asn Leu Tyr
 165 170 175

Leu Ala Trp Asn Cys Tyr Phe Asn Lys Val Cys Glu Lys Thr Asn Ile
 180 185 190

Glu Asp Gly Val Phe Glu Thr Leu Thr Asn Leu Glu Leu Leu Ser Leu
 195 200 205

Ser Phe Asn Ser Leu Ser His Val Pro Pro Lys Leu Pro Ser Ser Leu
 210 215 220

10

Arg Lys Leu Phe Leu Ser Asn Thr Gln Ile Lys Tyr Ile Ser Glu Glu
 225 230 235 240

Asp Phe Lys Gly Leu Ile Asn Leu Thr Leu Leu Asp Leu Ser Gly Asn
 245 250 255

Cys Pro Arg Cys Phe Asn Ala Pro Phe Pro Cys Val Pro Cys Asp Gly
 260 265 270

Gly Ala Ser Ile Asn Ile Asp Arg Phe Ala Phe Gln Asn Leu Thr Gln
 275 280 285

20

Leu Arg Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Thr Ser Leu Arg Lys Ile Asn Ala
 290 295 300

Ala Trp Phe Lys Asn Met Pro His Leu Lys Val Leu Asp Leu Glu Phe
 305 310 315 320

Asn Tyr Leu Val Gly Glu Ile Ala Ser Gly Ala Phe Leu Thr Met Leu
 325 330 335

Pro Arg Leu Glu Ile Leu Asp Leu Ser Phe Asn Tyr Ile Lys Gly Ser
 340 345 350

30

Tyr Pro Gln His Ile Asn Ile Ser Arg Asn Phe Ser Lys Leu Leu Ser
 355 360 365

Leu Arg Ala Leu His Leu Arg Gly Tyr Val Phe Gln Glu Leu Arg Glu
 370 375 380

Asp Asp Phe Gln Pro Leu Met Gln Leu Pro Asn Leu Ser Thr Ile Asn
 385 390 395 400

40

Leu Gly Ile Asn Phe Ile Lys Gln Ile Asp Phe Lys Leu Phe Gln Asn
 405 410 415

Phe Ser Asn Leu Glu Ile Ile Tyr Leu Ser Glu Asn Arg Ile Ser Pro
 420 425 430

Leu Val Lys Asp Thr Arg Gln Ser Tyr Ala Asn Ser Ser Ser Phe Gln
 435 440 445

Arg His Ile Arg Lys Arg Arg Ser Thr Asp Phe Glu Phe Asp Pro His
 450 455 460

Ser Asn Phe Tyr His Phe Thr Arg Pro Leu Ile Lys Pro Gln Cys Ala
 465 470 475 480

Ala Tyr Gly Lys Ala Leu Asp Leu Ser Leu Asn Ser Ile Phe Phe Ile
 485 490 495

Gly Pro Asn Gln Phe Glu Asn Leu Pro Asp Ile Ala Cys Leu Asn Leu
 500 505 510

Ser Ala Asn Ser Asn Ala Gln Val Leu Ser Gly Thr Glu Phe Ser Ala
 515 520 525

Ile Pro His Val Lys Tyr Leu Asp Leu Thr Asn Asn Arg Leu Asp Phe
 530 535 540

Asp Asn Ala Ser Ala Leu Thr Glu Leu Ser Asp Leu Glu Val Leu Asp
 545 550 555 560

Leu Ser Tyr Asn Ser His Tyr Phe Arg Ile Ala Gly Val Thr His His
 565 570 575

Leu Glu Phe Ile Gln Asn Phe Thr Asn Leu Lys Val Leu Asn Leu Ser
 580 585 590

His Asn Asn Ile Tyr Thr Leu Thr Asp Lys Tyr Asn Leu Glu Ser Lys
 595 600 605

Ser Leu Val Glu Leu Val Phe Ser Gly Asn Arg Leu Asp Ile Leu Trp
 610 615 620

Asn Asp Asp Asp Asn Arg Tyr Ile Ser Ile Phe Lys Gly Leu Lys Asn
 625 630 635 640

10

20

30

Leu Thr Arg Leu Asp Leu Ser Leu Asn Arg Leu Lys His Ile Pro Asn
645 650 655

Glu Ala Phe Leu Asn Leu Pro Ala Ser Leu Thr Glu Leu His Ile Asn
660 665 670

Asp Asn Met Leu Lys Phe Phe Asn Trp Thr Leu Leu Gln Gln Phe Pro
675 680 685

Arg Leu Glu Leu Leu Asp Leu Arg Gly Asn Lys Leu Leu Phe Leu Thr
690 695 700

Asp Ser Leu Ser Asp Phe Thr Ser Ser Leu Arg Thr Leu Leu Leu Ser
705 710 715 720

His Asn Arg Ile Ser His Leu Pro Ser Gly Phe Leu Ser Glu Val Ser
725 730 735

Ser Leu Lys His Leu Asp Leu Ser Ser Asn Leu Leu Lys Thr Ile Asn
740 745 750

Lys Ser Ala Leu Glu Thr Lys Thr Thr Thr Lys Leu Ser Met Leu Glu
755 760 765

Leu His Gly Asn Pro Phe Glu Cys Thr Cys Asp Ile Gly Asp Phe Arg
770 775 780

Arg Trp Met Asp Glu His Leu Asn Val Lys Ile Pro Arg Leu Val Asp
785 790 795 800

Val Ile Cys Ala Ser Pro Gly Asp Gln Arg Gly Lys Ser Ile Val Ser
805 810 815

Leu Glu Leu Thr Thr Cys Val Ser Asp Val Thr Ala Val Ile Leu Phe
820 825 830

Phe Phe Thr Phe Phe Ile Thr Thr Met Val Met Leu Ala Ala Leu Ala
835 840 845

His His Leu Phe Tyr Trp Asp Val Trp Phe Ile Tyr Asn Val Cys Leu
850 855 860

Ala Lys Val Lys Gly Tyr Arg Ser Leu Ser Thr Ser Gln Thr Phe Tyr
865 870 875 880

Asp Ala Tyr Ile Ser Tyr Asp Thr Lys Asp Ala Ser Val Thr Asp Trp
885 890 895 900

10

20

30

40

885

890

895

Val Ile Asn Glu Leu Arg Tyr His Leu Glu Glu Ser Arg Asp Lys Asn
900 905 910

Val Leu Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp Trp Asp Pro Gly Leu Ala Ile
915 920 925

Ile Asp Asn Leu Met Gln Ser Ile Asn Gln Ser Lys Lys Thr Val Phe
930 935 940

Val Leu Thr Lys Lys Tyr Ala Lys Ser Trp Asn Phe Lys Thr Ala Phe
945 950 955 960

Tyr Leu Ala Leu Gln Arg Leu Met Asp Glu Asn Met Asp Val Ile Ile
965 970 975

Phe Ile Leu Leu Glu Pro Val Leu Gln His Ser Gln Tyr Leu Arg Leu
980 985 990

Arg Gln Arg Ile Cys Lys Ser Ser Ile Leu Gln Trp Pro Asp Asn Pro
995 1000 1005

Lys Ala Glu Gly Leu Phe Trp Gln Thr Leu Arg Asn Val Val Leu
1010 1015 1020

Thr Glu Asn Asp Ser Arg Tyr Asn Asn Met Tyr Val Asp Ser Ile
1025 1030 1035

Lys Gln Tyr
1040

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Lys Glu Ser Ser Leu Gln Asn Ser Ser Cys Ser Leu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Thr Lys Lys

10

20

30

40

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 28

gagagaaaca aacgttttac cttc

24

<210> 29

10

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 29

gatggcagag tcgtgacttc cc

22

<210> 30

20

<211> 3220

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(3157)

<223>

30

<400> 30

attcagagtt ggatgtaag agagaaacaa acgttttacc ttcctttgtc tatagaac

58

atg gaa aac atg ccc cct cag tca tgg att ctg acg tgc ttt tgt ctg

106

Met Glu Asn Met Pro Pro Gln Ser Trp Ile Leu Thr Cys Phe Cys Leu

1 5 10 15

ctg tcc tct gga acc agt gcc atc ttc cat aaa gcg aac tat tcc aga

154

Leu Ser Ser Gly Thr Ser Ala Ile Phe His Lys Ala Asn Tyr Ser Arg

20 25 30

40

agc tat cct tgt gac gag ata agg cac aac tcc ctt gtg att gca gaa	202	
Ser Tyr Pro Cys Asp Glu Ile Arg His Asn Ser Leu Val Ile Ala Glu		
35 40 45		
tgc aac cat cgt caa ctg cat gaa gtt ccc caa act ata ggc aag tat	250	
Cys Asn His Arg Gln Leu His Glu Val Pro Gln Thr Ile Gly Lys Tyr		
50 55 60		
gtg aca aac ata gac ttg tca gac aat gcc att aca cat ata acg aaa	298	
Val Thr Asn Ile Asp Leu Ser Asp Asn Ala Ile Thr His Ile Thr Lys		
65 70 75 80		
gag tcc ttt caa aag ctg caa aac ctc act aaa atc gat ctg aac cac	346	10
Glu Ser Phe Gln Lys Leu Gln Asn Leu Thr Lys Ile Asp Leu Asn His		
85 90 95		
aat gcc aaa caa cag cac cca aat gaa aat aaa aat ggt atg aat att	394	
Asn Ala Lys Gln Gln His Pro Asn Glu Asn Lys Asn Gly Met Asn Ile		
100 105 110		
aca gaa ggg gca ctt ctc agc cta aga aat cta aca gtt tta ctg ctg	442	
Thr Glu Gly Ala Leu Leu Ser Leu Arg Asn Leu Thr Val Leu Leu Leu		
115 120 125		
gaa gac aac cag tta tat act ata cct gct ggg ttg cct gag tct ttg	490	
Glu Asp Asn Gln Leu Tyr Thr Ile Pro Ala Gly Leu Pro Glu Ser Leu		
130 135 140		
aaa gaa ctt agc cta att caa aac aat ata ttt cag gta act aaa aac	538	20
Lys Glu Leu Ser Leu Ile Gln Asn Asn Ile Phe Gln Val Thr Lys Asn		
145 150 155 160		
aac act ttt ggg ctt agg aac ttg gaa aga ctc tat ttg ggc tgg aac	586	
Asn Thr Phe Gly Leu Arg Asn Leu Glu Arg Leu Tyr Leu Gly Trp Asn		
165 170 175		
tgc tat ttt aaa tgt aat caa acc ttt aag gta gaa gat ggg gca ttt	634	
Cys Tyr Phe Lys Cys Asn Gln Thr Phe Lys Val Glu Asp Gly Ala Phe		
180 185 190		
aaa aat ctt ata cac ttg aag gta ctc tca tta tct ttc aat aac ctt	682	
Lys Asn Leu Ile His Leu Lys Val Leu Ser Leu Ser Phe Asn Asn Leu		
195 200 205		
ttc tat gtg ccc ccc aaa cta cca agt tct cta agg aaa ctt ttt ctg	730	30
Phe Tyr Val Pro Pro Lys Leu Pro Ser Ser Leu Arg Lys Leu Phe Leu		
210 215 220		
agt aat gcc aaa atc atg aac atc act cag gaa gac ttc aaa gga ctg	778	
Ser Asn Ala Lys Ile Met Asn Ile Thr Gln Glu Asp Phe Lys Gly Leu		
225 230 235 240		
gaa aat tta aca tta cta gat ctg agt gga aac tgt cca agg tgt tac	826	
Glu Asn Leu Thr Leu Leu Asp Leu Ser Gly Asn Cys Pro Arg Cys Tyr		
245 250 255		
aat gct cca ttt cct tgc aca cct tgc aag gaa aac tca tcc atc cac	874	
Asn Ala Pro Phe Pro Cys Thr Pro Cys Lys Glu Asn Ser Ser Ile His		
260 265 270		
ata cat cct ctg gct ttt caa agt ctc acc caa ctt ctc tat cta aac	922	40

515	520	525		
acc aac aac aga cta gac ttt gat gat aac aat gct ttc agt gat ctt Thr Asn Asn Arg Leu Asp Phe Asp Asp Asn Asn Ala Phe Ser Asp Leu 530 535 540			1690	
cac gat cta gaa gtg ctg gac ctg agc cac aat gca cac tat ttc agt His Asp Leu Glu Val Leu Asp Leu Ser His Asn Ala His Tyr Phe Ser 545 550 555 560			1738	
ata gca ggg gta acg cac cgt cta gga ttt atc cag aac tta ata aac Ile Ala Gly Val Thr His Arg Leu Gly Phe Ile Gln Asn Leu Ile Asn 565 570 575			1786	
ctc agg gtg tta aac ctg agc cac aat ggc att tac acc ctc aca gag Leu Arg Val Leu Asn Leu Ser His Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Glu 580 585 590			1834	10
gaa agt gag ctg aaa agc atc tca ctg aaa gaa ttg gtt ttc agt gga Glu Ser Glu Leu Lys Ser Ile Leu Lys Glu Leu Val Phe Ser Gly 595 600 605			1882	
aat cgt ctt gac cat ttg tgg aat gca aat gat ggc aaa tac tgg tcc Asn Arg Leu Asp His Leu Trp Asn Ala Asn Asp Gly Lys Tyr Trp Ser 610 615 620			1930	
att ttt aaa agt ctc cag aat ttg ata cgc ctg gac tta tca tac aat Ile Phe Lys Ser Leu Gln Asn Leu Ile Arg Leu Asp Leu Ser Tyr Asn 625 630 635 640			1978	20
aac ctt caa caa atc cca aat gga gca ttc ctc aat ttg cct cag agc Asn Leu Gln Gln Ile Pro Asn Gly Ala Phe Leu Asn Leu Pro Gln Ser 645 650 655			2026	
ctc caa gag tta ctt atc agt ggt aac aaa tta cgt ttc ttt aat tgg Leu Gln Glu Leu Leu Ile Ser Gly Asn Lys Leu Arg Phe Phe Asn Trp 660 665 670			2074	
aca tta ctc cag tat ttt cct cac ctt cac ttg ctg gat tta tcg aga Thr Leu Leu Gln Tyr Phe Pro His Leu His Leu Leu Asp Leu Ser Arg 675 680 685			2122	
aat gag ctg tat ttt cta ccc aat tgc cta tct aag ttt gca cat tcc Asn Glu Leu Tyr Phe Leu Pro Asn Cys Leu Ser Lys Phe Ala His Ser 690 695 700			2170	30
ctg gag aca ctg cta ctg agc cat aat cat ttc tct cac cta ccc tct Leu Glu Thr Leu Leu Leu Ser His Asn His Phe Ser His Leu Pro Ser 705 710 715 720			2218	
ggc ttc ctc tcc gaa gcc agg aat ctg gtg cac ctg gat cta agt ttc Gly Phe Leu Ser Glu Ala Arg Asn Leu Val His Leu Asp Leu Ser Phe 725 730 735			2266	
aac aca ata aag atg atc aat aaa tcc tcc ctg caa acc aag atg aaa Asn Thr Ile Lys Met Ile Asn Lys Ser Ser Leu Gln Thr Lys Met Lys 740 745 750			2314	
acg aac ttg tct att ctg gag cta cat ggg aac tat ttt gac tgc acg Thr Asn Leu Ser Ile Leu Glu Leu His Gly Asn Tyr Phe Asp Cys Thr 755 760 765			2362	40

tgt gac ata agt gat ttt cga agc tgg cta gat gaa aat ctg aat atc Cys Asp Ile Ser Asp Phe Arg Ser Trp Leu Asp Glu Asn Leu Asn Ile 770 775 780	2410	
aca att cct aaa ttg gta aat gtt ata tgt tcc aat cct ggg gat caa Thr Ile Pro Lys Leu Val Asn Val Ile Cys Ser Asn Pro Gly Asp Gln 785 790 795 800	2458	
aaa tca aag agt atc atg agc cta gat ctc acg act tgt gta tcg gat Lys Ser Lys Ser Ile Met Ser Leu Asp Leu Thr Thr Cys Val Ser Asp 805 810 815	2506	
acc act gca gct gtc ctg ttt ttc ctc aca ttc ctt acc acc tcc atg Thr Thr Ala Ala Val Leu Phe Phe Leu Thr Phe Leu Thr Thr Ser Met 820 825 830	2554	10
ggt atg ttg gct gct ctg gtt cac cac ctg ttt tac tgg gat gtt tgg Val Met Leu Ala Ala Leu Val His His Leu Phe Tyr Trp Asp Val Trp 835 840 845	2602	
ttt atc tat cac atg tgc tct gct aag tta aaa ggc tac agg act tca Phe Ile Tyr His Met Cys Ser Ala Lys Leu Lys Gly Tyr Arg Thr Ser 850 855 860	2650	
tcc aca tcc caa act ttc tat gat gct tat att tct tat gac acc aaa Ser Thr Ser Gln Thr Phe Tyr Asp Ala Tyr Ile Ser Tyr Asp Thr Lys 865 870 875 880	2698	
gat gca tct gtt act gac tgg gta atc aat gaa ctg cgc tac cac ctt Asp Ala Ser Val Thr Asp Trp Val Ile Asn Glu Leu Arg Tyr His Leu 885 890 895	2746	20
gaa gag agt gaa gac aaa agt gtc ctc ctt tgt tta gag gag agg gat Glu Glu Ser Glu Asp Lys Ser Val Leu Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp 900 905 910	2794	
tgg gat cca gga tta ccc atc att gat aac ctc atg cag agc ata aac Trp Asp Pro Gly Leu Pro Ile Ile Asp Asn Leu Met Gln Ser Ile Asn 915 920 925	2842	
cag agc aag aaa aca atc ttt gtt tta acc aag aaa tat gcc aag agc Gln Ser Lys Lys Thr Ile Phe Val Leu Thr Lys Lys Tyr Ala Lys Ser 930 935 940	2890	
tgg aac ttt aaa aca gct ttc tac ttg gcc ttg cag agg cta atg gat Trp Asn Phe Lys Thr Ala Phe Tyr Leu Ala Leu Gln Arg Leu Met Asp 945 950 955 960	2938	30
gag aac atg gat gtg att att ttc atc ctc ctg gaa cca gtg tta cag Glu Asn Met Asp Val Ile Ile Phe Ile Leu Leu Glu Pro Val Leu Gln 965 970 975	2986	
tac tca cag tac ctg agg ctt cgg cag agg atc tgt aag agc tcc atc Tyr Ser Gln Tyr Leu Arg Leu Arg Gln Arg Ile Cys Lys Ser Ser Ile 980 985 990	3034	
ctc cag tgg ccc aac aat ccc aaa gca gaa aac ttg ttt tgg caa agt Leu Gln Trp Pro Asn Asn Pro Lys Ala Glu Asn Leu Phe Trp Gln Ser 995 1000 1005	3082	40

ctg aaa aat gtg gtc ttg act gaa aat gat tca cgg tat gac gat
 3127
 Leu Lys Asn Val Val Leu Thr Glu Asn Asp Ser Arg Tyr Asp Asp
 1010 1015 1020
 ttg tac att gat tcc att agg caa tac tag tgatgggaag tcacgactct 3177
 Leu Tyr Ile Asp Ser Ile Arg Gln Tyr
 1025 1030
 gccatcataa aaacacacag cttctcctta caatgaaccg aat 3220

<210> 31 10
 <211> 1032
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 31

Met Glu Asn Met Pro Pro Gln Ser Trp Ile Leu Thr Cys Phe Cys Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Gly Thr Ser Ala Ile Phe His Lys Ala Asn Tyr Ser Arg 20
 20 25 30
 Ser Tyr Pro Cys Asp Glu Ile Arg His Asn Ser Leu Val Ile Ala Glu
 35 40 45
 Cys Asn His Arg Gln Leu His Glu Val Pro Gln Thr Ile Gly Lys Tyr
 50 55 60
 Val Thr Asn Ile Asp Leu Ser Asp Asn Ala Ile Thr His Ile Thr Lys
 65 70 75 80
 Glu Ser Phe Gln Lys Leu Gln Asn Leu Thr Lys Ile Asp Leu Asn His 30
 85 90 95
 Asn Ala Lys Gln Gln His Pro Asn Glu Asn Lys Asn Gly Met Asn Ile
 100 105 110
 Thr Glu Gly Ala Leu Leu Ser Leu Arg Asn Leu Thr Val Leu Leu Leu
 115 120 125
 Glu Asp Asn Gln Leu Tyr Thr Ile Pro Ala Gly Leu Pro Glu Ser Leu
 130 135 140

40

Lys Glu Leu Ser Leu Ile Gln Asn Asn Ile Phe Gln Val Thr Lys Asn
 145 150 155 160

Asn Thr Phe Gly Leu Arg Asn Leu Glu Arg Leu Tyr Leu Gly Trp Asn
 165 170 175

Cys Tyr Phe Lys Cys Asn Gln Thr Phe Lys Val Glu Asp Gly Ala Phe
 180 185 190

Lys Asn Leu Ile His Leu Lys Val Leu Ser Leu Ser Phe Asn Asn Leu
 195 200 205

10

Phe Tyr Val Pro Pro Lys Leu Pro Ser Ser Leu Arg Lys Leu Phe Leu
 210 215 220

Ser Asn Ala Lys Ile Met Asn Ile Thr Gln Glu Asp Phe Lys Gly Leu
 225 230 235 240

Glu Asn Leu Thr Leu Leu Asp Leu Ser Gly Asn Cys Pro Arg Cys Tyr
 245 250 255

Asn Ala Pro Phe Pro Cys Thr Pro Cys Lys Glu Asn Ser Ser Ile His
 260 265 270

20

Ile His Pro Leu Ala Phe Gln Ser Leu Thr Gln Leu Leu Tyr Leu Asn
 275 280 285

Leu Ser Ser Thr Ser Leu Arg Thr Ile Pro Ser Thr Trp Phe Glu Asn
 290 295 300

Leu Ser Asn Leu Lys Glu Leu His Leu Glu Phe Asn Tyr Leu Val Gln
 305 310 315 320

Glu Ile Ala Ser Gly Ala Phe Leu Thr Lys Leu Pro Ser Leu Gln Ile
 325 330 335

30

Leu Asp Leu Ser Phe Asn Phe Gln Tyr Lys Glu Tyr Leu Gln Phe Ile
 340 345 350

Asn Ile Ser Ser Asn Phe Ser Lys Leu Arg Ser Leu Lys Lys Leu His
 355 360 365

Leu Arg Gly Tyr Val Phe Arg Glu Leu Lys Lys Lys His Phe Glu His
 370 375 380

Leu Gln Ser Leu Pro Asn Leu Ala Thr Ile Asn Leu Gly Ile Asn Phe

40

Asp Ala Ser Val Thr Asp Trp Val Ile Asn Glu Leu Arg Tyr His Leu
 885 890 895

Glu Glu Ser Glu Asp Lys Ser Val Leu Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp
 900 905 910

Trp Asp Pro Gly Leu Pro Ile Ile Asp Asn Leu Met Gln Ser Ile Asn
 915 920 925

Gln Ser Lys Lys Thr Ile Phe Val Leu Thr Lys Lys Tyr Ala Lys Ser
 930 935 940 10

Trp Asn Phe Lys Thr Ala Phe Tyr Leu Ala Leu Gln Arg Leu Met Asp
 945 950 955 960

Glu Asn Met Asp Val Ile Ile Phe Ile Leu Leu Glu Pro Val Leu Gln
 965 970 975

Tyr Ser Gln Tyr Leu Arg Leu Arg Gln Arg Ile Cys Lys Ser Ser Ile
 980 985 990

Leu Gln Trp Pro Asn Asn Pro Lys Ala Glu Asn Leu Phe Trp Gln Ser
 995 1000 1005 20

Leu Lys Asn Val Val Leu Thr Glu Asn Asp Ser Arg Tyr Asp Asp
 1010 1015 1020

Leu Tyr Ile Asp Ser Ile Arg Gln Tyr
 1025 1030

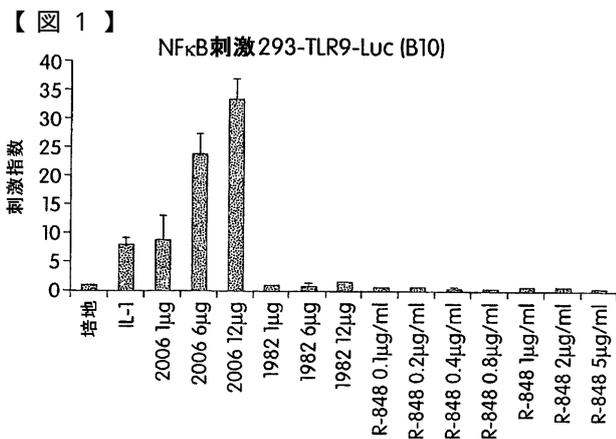


Fig. 1

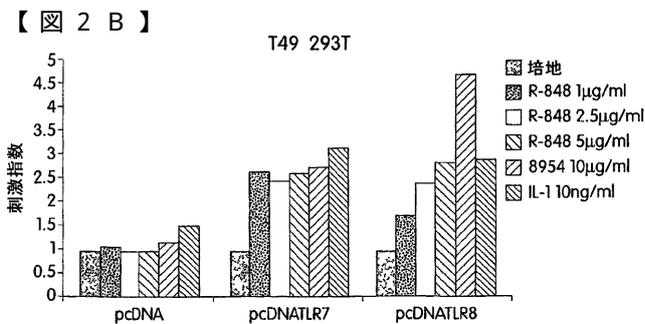


Fig. 2B

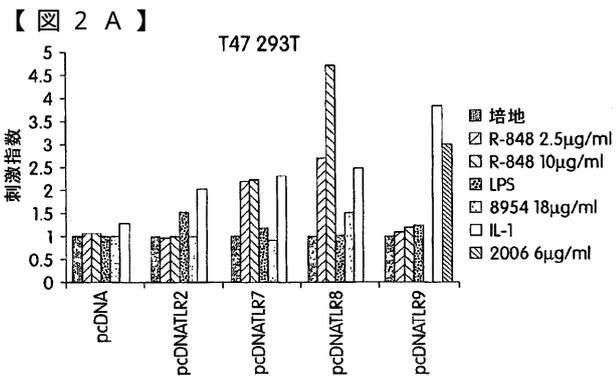


Fig. 2A

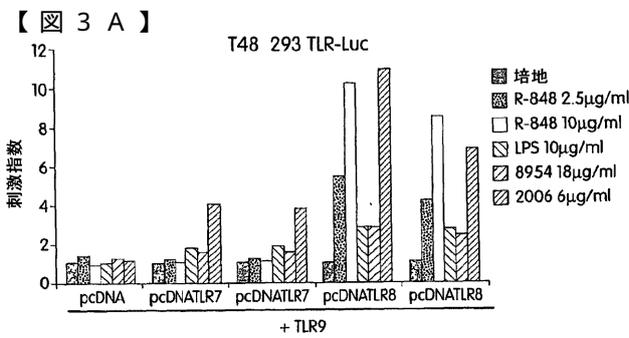


Fig. 3A

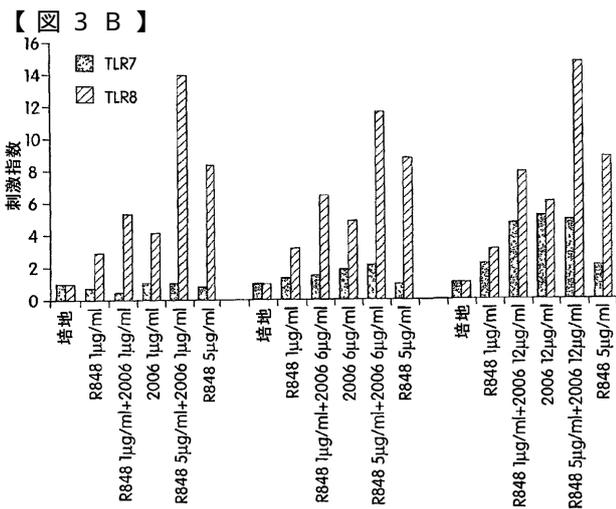


Fig. 3B

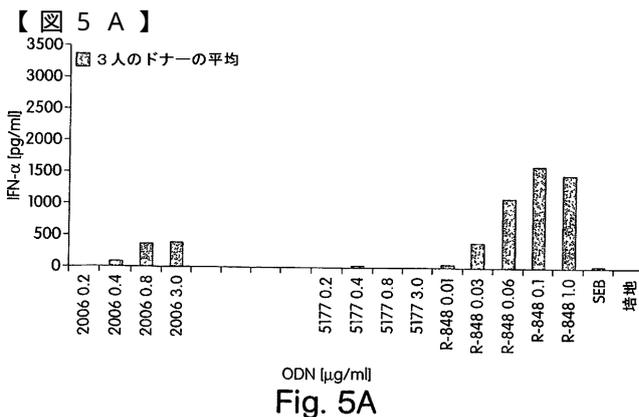


Fig. 5A

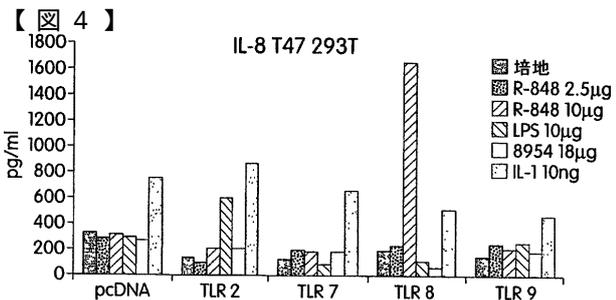


Fig. 4

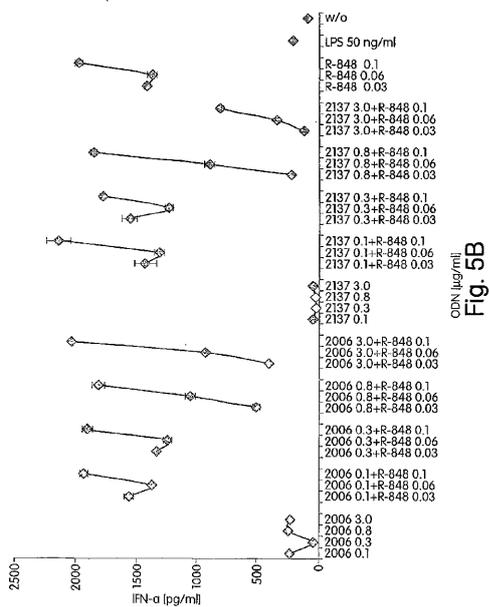


Fig. 5B

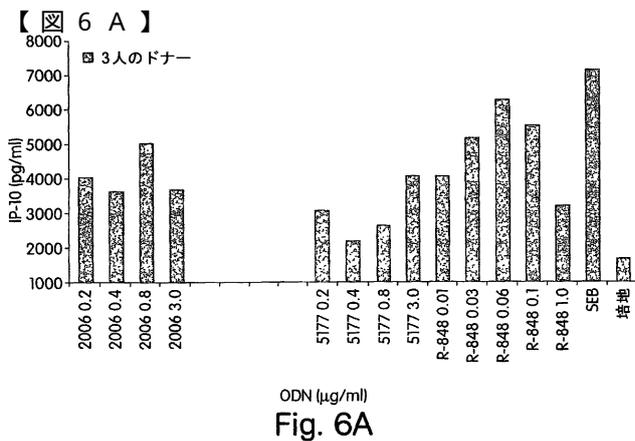


Fig. 6A

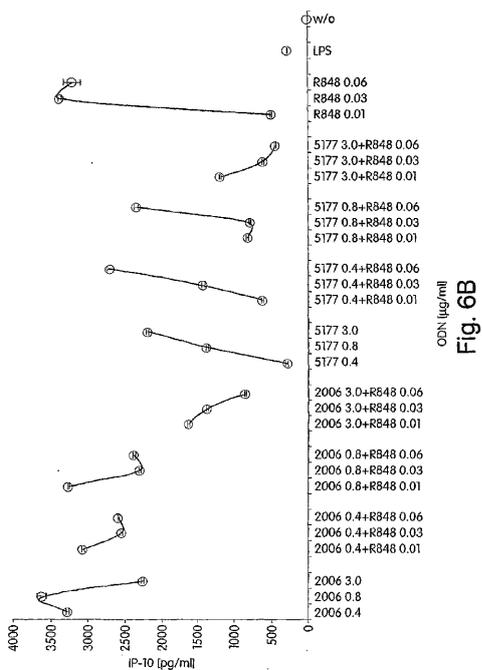


Fig. 6B

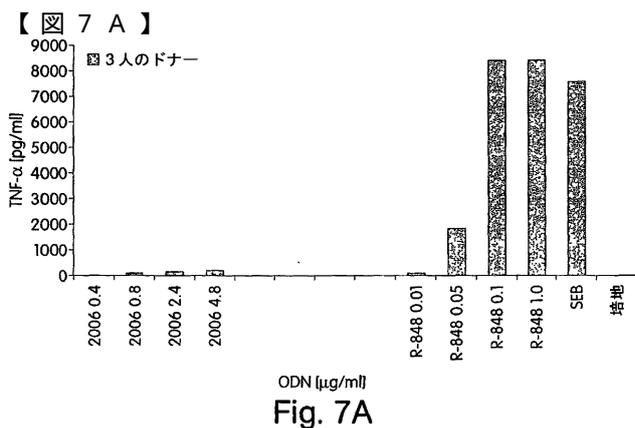


Fig. 7A

【 7 B 】

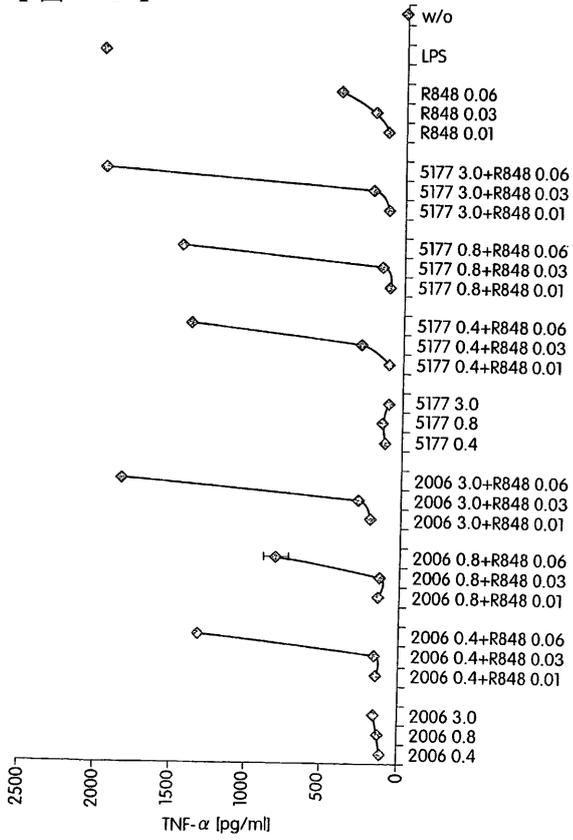


Fig. 7B

【 8 A 】

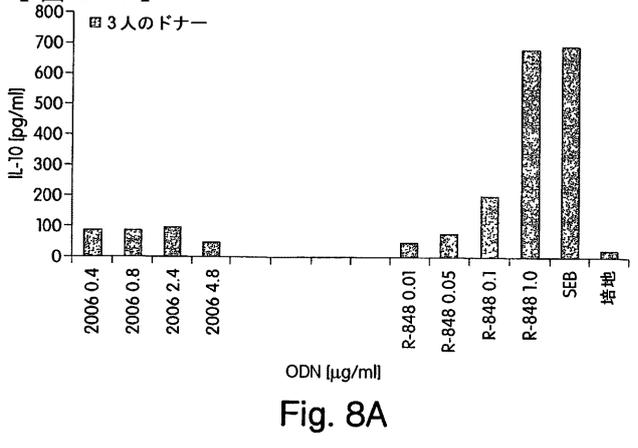


Fig. 8A

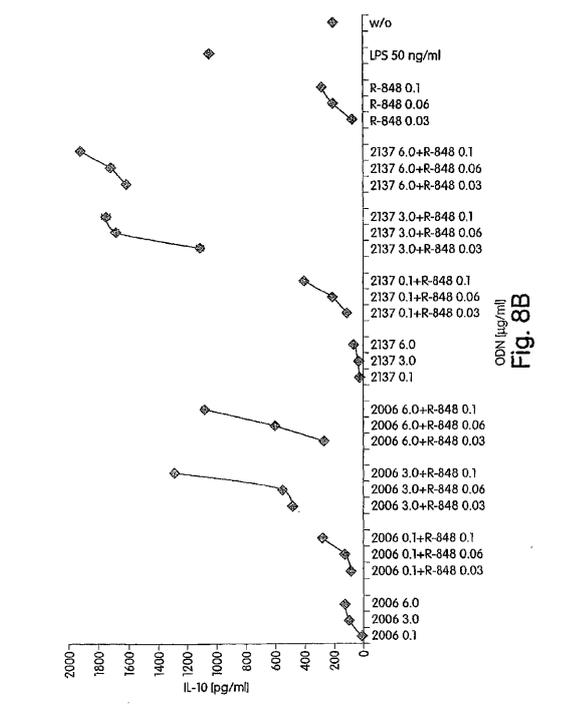


Fig. 8B

【 9 】

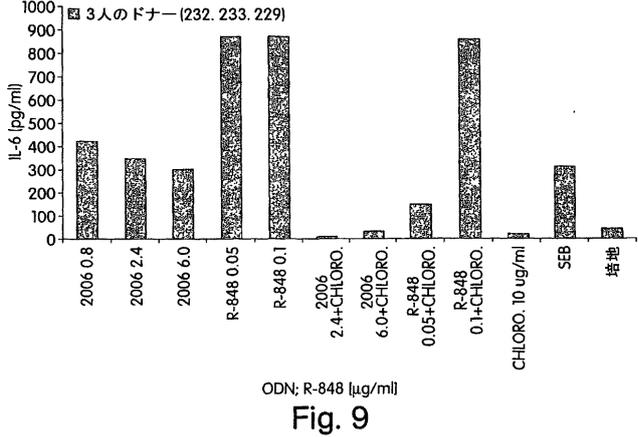


Fig. 9

【 図 1 0 A 】

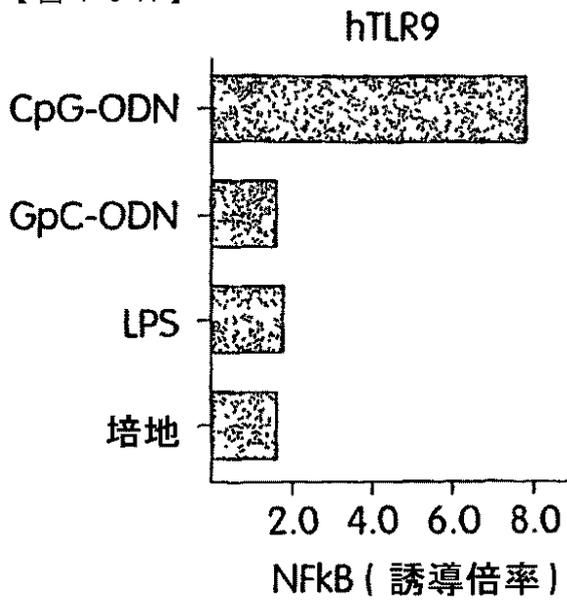


Fig. 10A

【 図 1 0 B 】

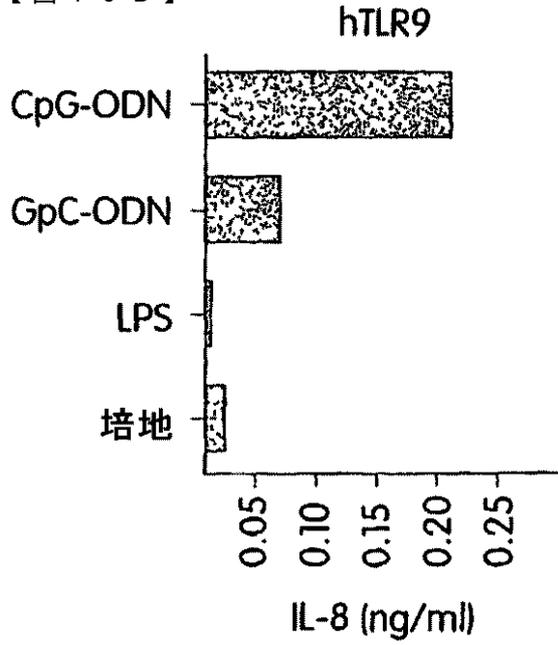


Fig. 10B

【 図 1 1 】

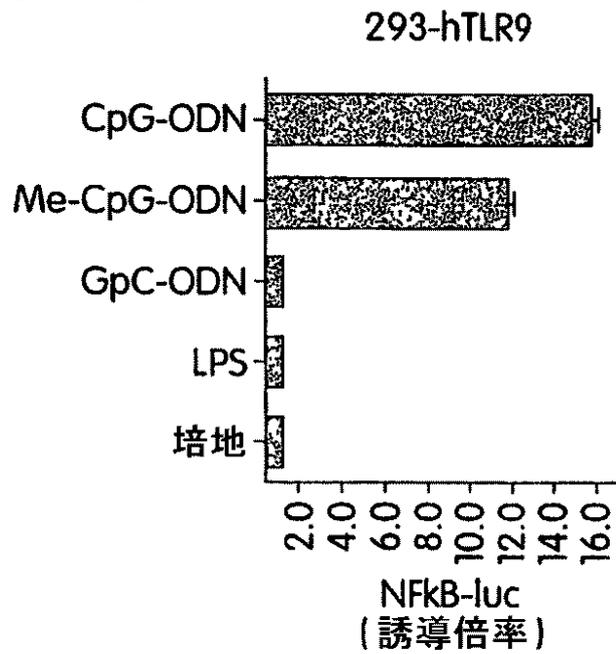


Fig. 11

【 図 1 2 】

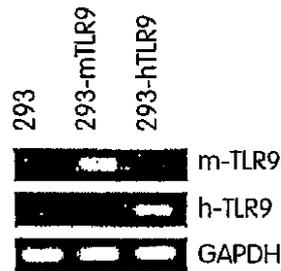


Fig. 12

【 図 1 3 】

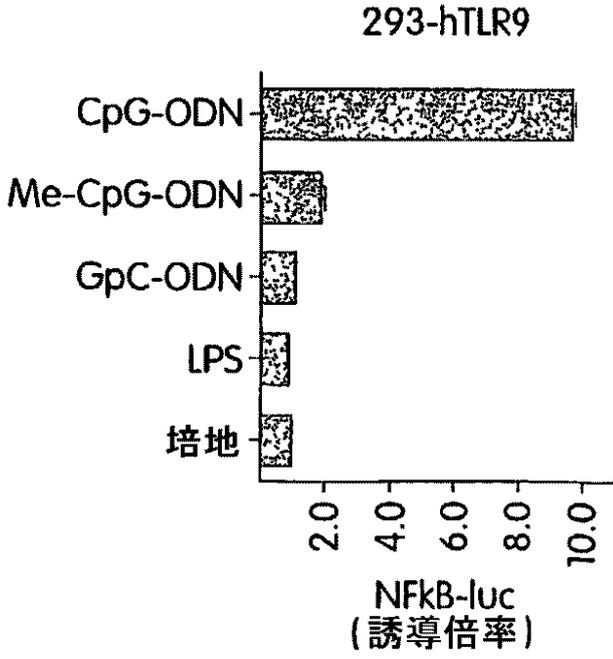


Fig. 13

【 図 1 4 】

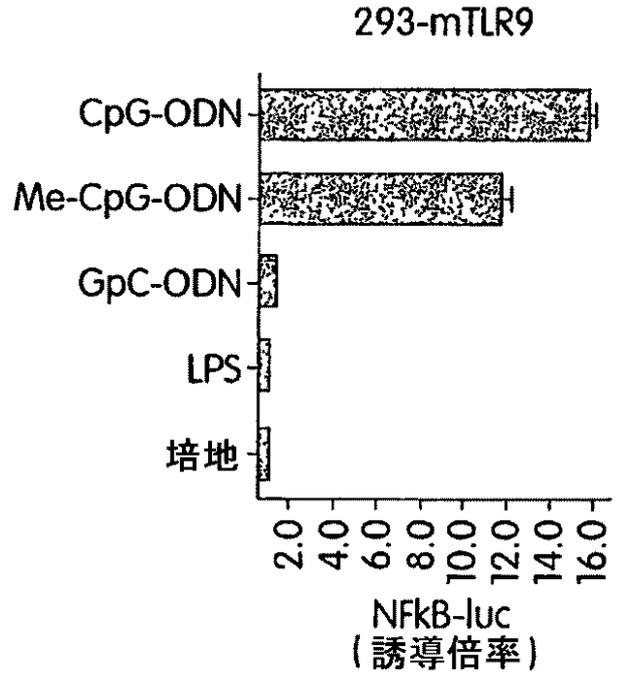


Fig. 14

【 図 1 5 】

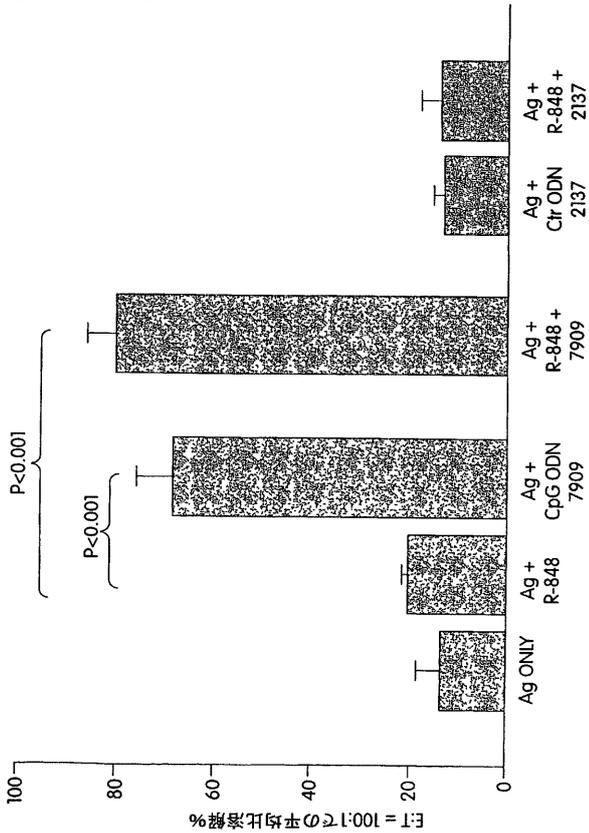


Fig. 15

【 図 1 6 】

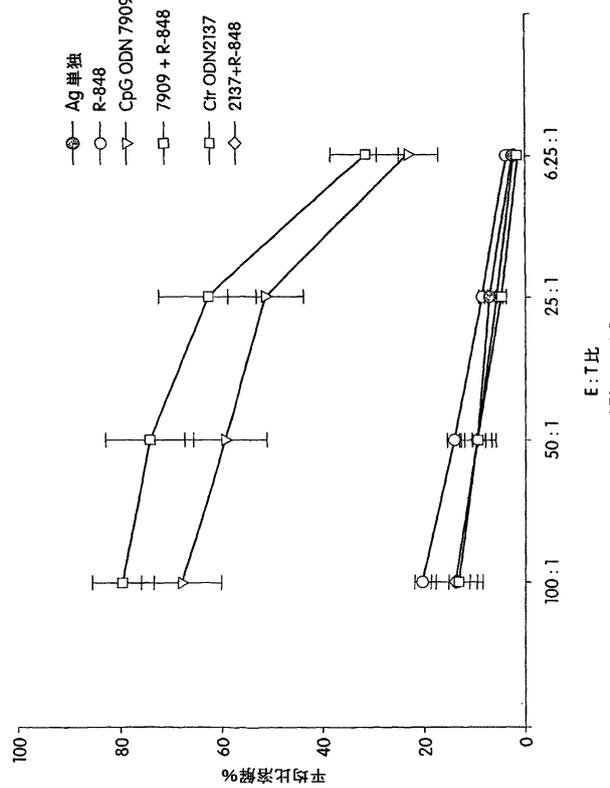


Fig. 16

【 図 17 】

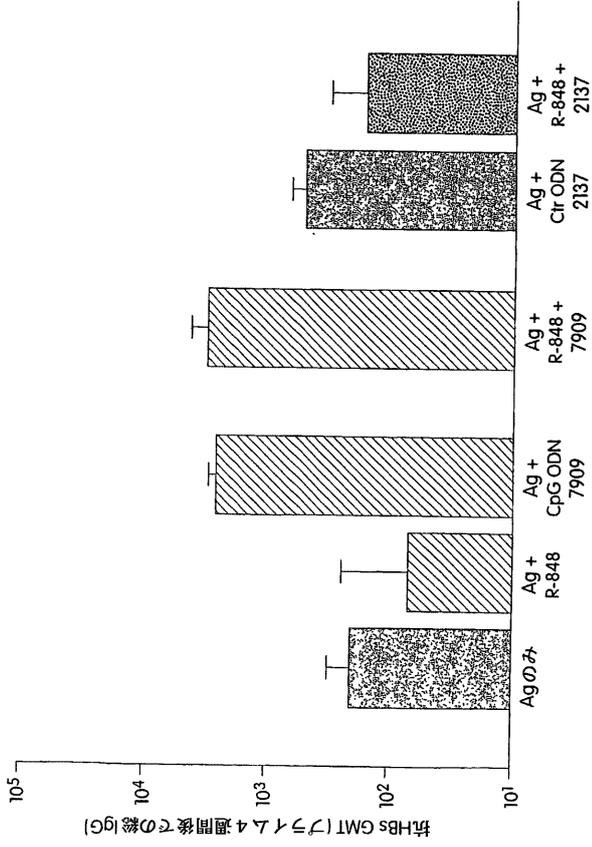


Fig. 17

【 図 18 】

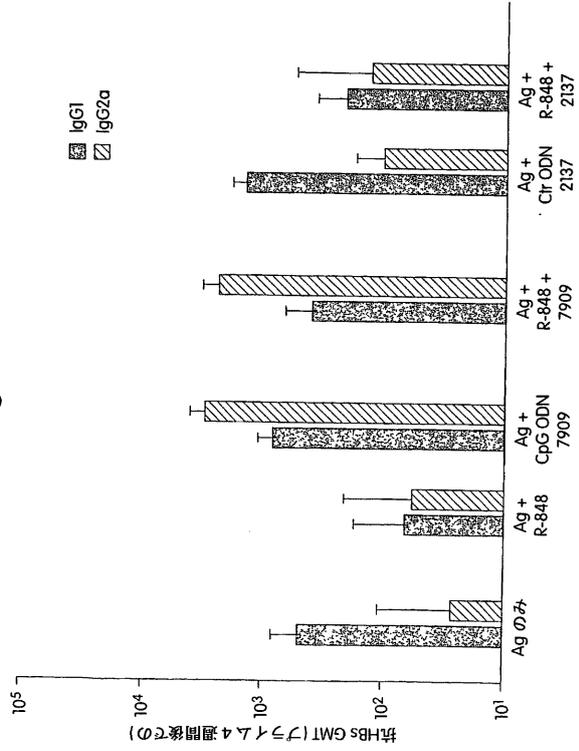


Fig. 18

【 図 19 】

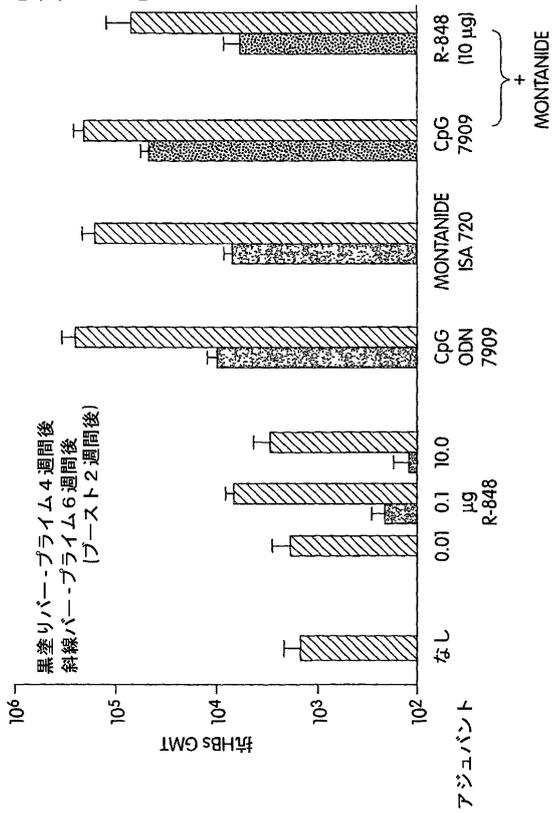


Fig. 19

【 図 20 】

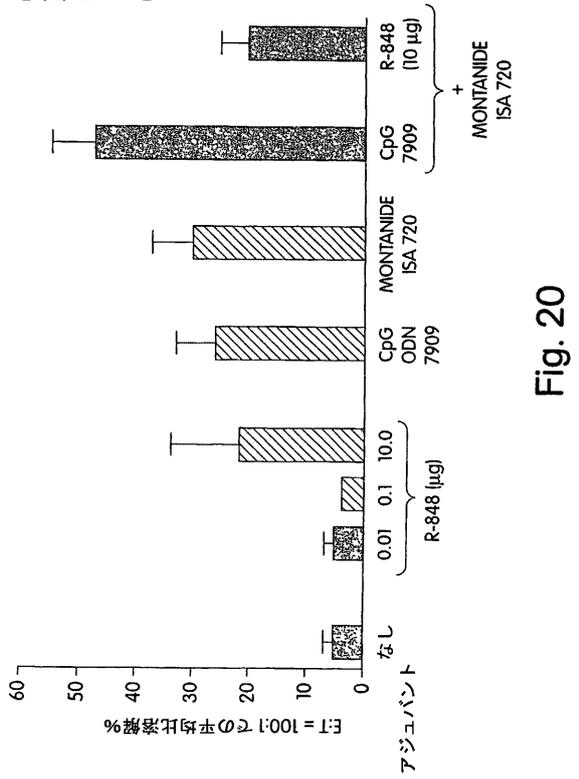


Fig. 20

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/33051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC(7) : A61K 31/70, 31/44 US CL : 514/44, 45, 291, 292, 293			
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. : 514/44, 45, 291, 292, 293			
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) Please See Continuation Sheet			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	THOMPSON, RA et al., Lymphokine-activated killer (LAK) cells. V. 8-Mercaptoguanosine as an IL-2-sparing agent in LAK generation. 15 November 1990 Journal of Immunology Vol. 145, pages 3524-3531, see pages 3524, 3528, column 1, first full paragraph, and discussion.	1 and 14	
A	US 6,207,646 bB1 (KRIEG et al.) 27 March 2001 (27.03.2001), see columns 1- 3, 33, and 34.	1- 87	
X,P	MOISAN, J, et al., Clearance of Infection with Mycobacterium bovis BCG in Mice Is Enhanced by Treatment with S28463 (R-848), and Its Efficiency Depends on Expression of Wild-Type Nramp1 (Resistance Allele). November 2001 Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 45, pages 3059-3064, see pages 3059 and 3060, column 1.	1, 14, and 15	
X, P ---	HIROAKI, H et al., Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway 2002 Nature Immunology Vol. 3, pages 196 - 200, see abstract, FIG. 1, and FIG. 3, page 199, column 2, middle.	68, 70- 87 ----- 69	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents:		"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	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
07 March 2004 (07.03.2004)		12 JUL 2004	
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 Myron G. Hill Telephone No. 703-308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/33051

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST- USPAT, PGPUB, EPO, JPO, Derwent
CS sub., imidazoquinoline, ADCC, CpG, immunostimulatory nucleic acid

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 31/4745	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 31/708	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 31/00	
C 1 2 N 15/09	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 Q 1/02	A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/15	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/50	C 1 2 Q 1/02	
	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z
	C 1 2 N 15/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71) 出願人 500523962

コーリー ファーマシューティカル グループ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 8 1, ウェルズリー, ウォスター ストリート
 9 3, スイート 1 0 1

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74) 代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 クリーク, アルトゥル, エム.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 8 1, ウェルズリー, ウィンディング リバー
 ロード 1 7 3

(72) 発明者 シェッター, クリスチャン

ドイツ国 4 0 7 2 3 ヒルデン, エルクハウスホーフ 3 5

(72) 発明者 ブラッツラー, ロベルト, エル.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 4 2, コンコルド, バーンズ ヒル ロード 8
 4

(72) 発明者 フォルマー, イェルク

ドイツ国 4 0 5 9 1 デュッセルドルフ, コールラウシュヴェーク 2 4

(72) 発明者 パウアー, シュテファン

ドイツ国 8 0 6 3 7 ミュンヘン, ヴァイゼンハウスシュトラッセ 1 3

(72) 発明者 ユルク, マリオン

ドイツ 4 0 5 9 7 デュッセルドルフ, シュタインクリッペンシュトラッセ 3

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB01 FB03
4B024 AA01 AA11 BA63 DA02 FA10 HA11
4B063 QA20 QQ41 QQ61 QQ79 QQ96 QR59 QR66 QR77 QR80 QS05
QS36 QS38 QX02
4C084 AA02 AA13 AA22 BA44 MA02 NA05 NA14 ZA59 ZB13 ZB26
ZB31 ZC75
4C085 AA13 AA14 BA07 BA51 BB01 EE03
4C086 AA01 AA02 CB05 MA03 MA04 NA05 NA14 ZA59 ZB13 ZB26
ZB31 ZC75
4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 NA13 NA14 ZA59 ZB13 ZB26 ZB31
ZC75