

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006 年 4 月 6 日 (06.04.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/035939 A1

(51) 国際特許分類:

C07H 21/02 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61P 33/02 (2006.01)
A61K 31/7115 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)

(30) 優先権データ:

特願2004-287102 2004 年 9 月 30 日 (30.09.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学
学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒
5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 Osaka (JP). 東
レ株式会社 (Toray Industries, Inc.) [JP/JP]; 〒1038666
東京都中央区日本橋室町 2 丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 成見 英樹
(NARUMI, Hideki) [JP/JP]; 〒2480034 神奈川県鎌
倉市津西 2 丁目 2 番 2 6 号 A 1 Kanagawa (JP). 金
田 明仁 (KANEDA, Akihito) [JP/JP]; 〒2480031 神
奈川県鎌倉市鎌倉山 3 丁目 2 0 番 1 号 東レ鎌倉
山寮 5 0 2 号 Kanagawa (JP). 深尾 和正 (FUKAO,
Kazumasa) [JP/JP]; 〒2790004 千葉県浦安市猫実 2 丁

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/018148

(22) 国際出願日: 2005 年 9 月 30 日 (30.09.2005)

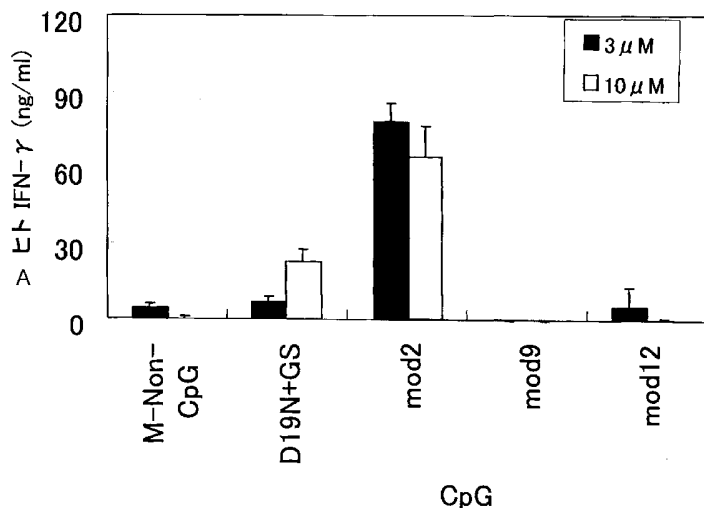
(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

/ 続葉有 /

(54) Title: IMMUNE STIMULATING OLIGONUCLEOTIDE AND USE THEREOF IN PHARMACEUTICAL

(54) 発明の名称: 免疫刺激オリゴヌクレオチドおよびその医薬用途



A HUMAN IFN-γ (ng/ml)

(57) Abstract: A novel immune stimulating oligonucleotide having the activity of inducing strong immune responses; a pharmaceutical product comprising this immune stimulating oligonucleotide; and use thereof. This immune stimulating oligonucleotide, for example, consists of an oligonucleotide having the sequence of gggtccgatcggcagggggg. This oligonucleotide can be used as an active ingredient of pharmaceuticals, such as a preventive or therapeutic agent for allergoses. As this immune stimulating oligonucleotide has a strong immune stimulating activity, the use thereof renders it promising to attain enhanced treating, preventive and remedial effects and to through reduction of administration frequency, attain side effect suppression and QOL remedy.

(57) 要約: 強い免疫応答の誘導活性を示す新規な免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよびこの免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含む医薬品とその用途が開示されている。本発明の免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、例えば gggtccgatcggcagggggg のような配列を有するオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、アレルギー疾患の治療又は予防剤等の医

/ 続葉有 /



WO 2006/035939 A1



目 1 0 番 5 1 号 東レ第一浦安寮 2 0 1 号 Chiba (JP).
審良 静男 (AKIRA, Shizuo) [JP/JP]; 〒5690036 大阪府
高槻市辻子 1 丁目 7 番 1 6 号 Osaka (JP).

(74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒
1020072 東京都千代田区飯田橋 4 丁目 5 番 1 2 号 岩
田ビル 6 階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

薬の有効成分として用いられる。免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、強い免疫刺激活性を有するため、本発明を
用いることにより高い治療、予防、改善効果が得られること、更に、投与回数低減による副作用低下、QOL改善が
期待される。

明 細 書

免疫刺激オリゴヌクレオチドおよびその医薬用途

技術分野

- [0001] 本発明は、免疫刺激オリゴヌクレオチド配列およびそのオリゴヌクレオチドを含む治療剤に関する。

背景技術

- [0002] 悪性腫瘍、感染症、免疫不全疾患あるいは自己免疫疾患に対する免疫調節型治療剤としては、各種の細菌製剤、多糖、レバミゾールなどの種々の合成低分子化合物、またはインターフェロンなどの種々のサイトカインなどが用いられ、または研究されている。しかしながらこれらの治療剤の効果は必ずしも十分なものではなく、いずれも様々な副作用を呈する。このためさらに効果の高く副作用の少ない治療剤が求められている。
- [0003] いくつかのポリヌクレオチドが生体応答調節作用を持つことが知られている。その代表的な例としてはRNAであるPoly(I:C)が挙げられる。Poly(I:C)は、IFN産生の強力なインデューサーであり、そしてマクロファージのアクチベーターおよびNK活性のインデューサーである。Poly(I:C)を腫瘍治療に用いる研究が行われたが、発熱等の副作用を有するため現在までに治療薬として実用化されるに至っていない。
- [0004] また、特定のタイプの細菌性DNAが免疫応答を刺激することが示されている。細菌性DNAは、マクロファージおよびナチュラルキラー(NK)細胞によるサイトカイン産生を誘導する。細菌性DNAの細胞活性化は、非メチル化されたCpGジヌクレオチド(以下CpGと記す)を中心に含む短い配列によるとされている。マウス脾細胞のNK細胞活性を増強する活性について試験された場合、3'-AACGCT-5'、3'-AGCGCT-5'、3'-GACGTC-5'の6塩基を含む配列が最も免疫刺激活性が強い(非特許文献1)。
- [0005] 細菌性DNAがマクロファージを刺激して、IL-12およびTNF- α の産生を誘導することも報告されている。これらのサイトカインは、さらに脾細胞からIFN- γ の産生を誘導することが知られている。また、細菌性DNAまたはCpGを含む免疫刺激オリゴヌクレオチドのいずれかによる脾細胞のin vitro処理は、IL-6、IL-12、IFN- γ の産生を誘導

することが報告されている(非特許文献2)。これらの結果は、CpG含有配列がTh1型の免疫応答を誘導する能力を有することを示している。

[0006] このような性質、すなわちNK細胞活性の増強またはTh1型の免疫応答の誘導を示すCpG含有免疫刺激オリゴヌクレオチドの配列として既に幾つかのタイプが見い出されており、多数の報告がある。例としては、ある種のCpGを含むパリンドローム構造を有するポリデオキシヌクレオチドの配列が徳永らによって見い出されており、この配列はマウスにおいて免疫応答の誘導活性を示すことが報告されている(特許文献1)。また、他のタイプの免疫刺激オリゴヌクレオチド配列および特性も報告されている(特許文献2、特許文献3、特許文献4、非特許文献3、非特許文献4)。

[0007] このようなオリゴヌクレオチドの活性増強を目的とした研究も行われている。徳永らは、CpGを含むパリンドローム外の配列にデオキシグアニル酸の繰り返し構造(ポリG配列)を付加することによって、免疫応答の誘導が増強されることを見い出している(非特許文献5)。また、天然に存在するホスホジエステルヌクレオチドは細胞内および細胞培地中において様々な核酸分解活性によって分解されやすい。そのため、核酸分解活性の攻撃標的であるヌクレオチド間のホスホジエステル結合を置換することによる安定化、さらにその結果としての活性増加の検討が行われている。頻繁に用いられている置換方法としては、ホスホロチオエートへの置換である。Klinmanらの研究では、免疫刺激オリゴヌクレオチドのパリンドローム外のG配列をホスホチロオエート修飾することにより、免疫応答の誘導が増強されることを示している(非特許文献6)。ヒトの免疫応答を誘導する公知のCpG含有配列としては、D-Type及びK-typeの免疫刺激オリゴヌクレオチドがある(特許文献5、非特許文献6)。D-Typeの免疫オリゴヌクレオチドは、TypeIインターフェロンの産生を誘導し、また、ヒトNK細胞を活性化させ、K-typeはB細胞を活性化することが知られている。また、B細胞活性化を測定した研究では、5'-プリン、プリンもしくはピリミジン、CpG、プリンもしくはピリミジン、ピリミジン-3'の6塩基を含む配列が最も活性が強いことが示されている(特許文献6、特許文献7、非特許文献7)。

[0008] Th1型の免疫応答の誘導を示す免疫刺激オリゴヌクレオチドを利用した治療法が研究されている。例えば、抗原と免疫刺激ヌクレオチドの結合体、あるいはそれに類す

る近接体を投与方法が見い出されている。結合体の投与によって、特定の抗原に対するTh2型免疫応答を抑制しながら同じ抗原に対するTh1型免疫応答を増強されることが示されている。このような処置は、アレルギー、腫瘍、自己免疫疾患などの疾患に有効であることが述べられている(特許文献8及び9)。

[0009] 近年の研究において、Toll様受容体(TLR)と呼ばれる受容体が見い出されている。哺乳類におけるTLRファミリーの役割は、細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体として先天的な免疫認識に関わっていると考えられている。また、TLRファミリーはNF- κ Bの活性化、TypeIインターフェロンの産生を誘導することが知られている。非メチル化CpGを含む細菌性DNAの受容体はTLR9であることがTLR9ノックアウトマウスを用いた研究において見い出されている。(特許文献10、非特許文献8)その後の研究において、ヒトTLR9とマウスTLR9を活性化する最適なCpG配列が異なることが示され、種特異性があることが明らかにされた。(非特許文献9)ヒトで免疫刺激活性を示す配列においてヒト以外の種への交差性が低いということは、免疫刺激オリゴヌクレオチドを医薬品として開発する際に大きな障害となる。すなわち、ヒトでの臨床試験の前に必須である免疫刺激オリゴヌクレオチド含有医薬品の動物を用いた非臨床試験において、治療効果の確認および毒性作用の早期発見が困難となる。したがって、免疫刺激オリゴヌクレオチドがヒトにおいて高い免疫刺激活性を示し、且つヒト以外の種に交差性を示すことは重要である。

[0010] 免疫刺激オリゴヌクレオチドを用いた治療法において、使用する免疫刺激オリゴヌクレオチドの活性の強さは非常に重要である。in vitroにおいて強い免疫刺激活性、即ちTh1サイトカイン産生を誘導するオリゴヌクレオチドを動物へ処置することによりTh1型の強い免疫応答を誘導し、感染症やアレルギー症に有効であることが示されている。したがって、in vitroで示す免疫刺激活性の強さはin vivoにおける免疫応答誘導効果と相関性を示すことは明らかである(特許文献8、非特許文献10)。また、免疫刺激オリゴヌクレオチドの活性に依存して、投与量、投与回数を減らすことが可能となり、その結果、毒性作用が発生する可能性の低下、また、QOLを上昇させる可能性が極めて高い。

[0011] 以上のことから、ヒトにおいて、既に見出されている上述の免疫刺激配列と比較して

、高い免疫刺激活性を示し、さらにヒト以外の種に活性を示す配列を見出すことは、産業利用上、非常に有用であり、有益性が極めて高い。

[0012] 特許文献1:特開平4-352724

特許文献2:WO2004/058179

特許文献3:WO2005/014611

特許文献4:CN1498895

特許文献5:WO00/61151

特許文献6:特表平10-506265

特許文献7:特表2001-503267

特許文献8:特表2002-517156

特許文献9:特表2002-500159

特許文献10:特開2002-34565

非特許文献1:Yamamoto ら J. Immunol. 1992 148:4072-4076

非特許文献2:Klinman ら Proc. Natl. Acad. Sci. 1996 93:2879-2883

非特許文献3:Klinman ら Immunological review 2004 199:201-216

非特許文献4:Li Dong ら ARTHRITIS & RHEUMATISM 2004 50(5):1686-1689

非特許文献5:Tokunaga ら J. Biochem. 116:991-994

非特許文献6:Klinman ら J. Immunol. 2001 166:2372-2377

非特許文献7:Krieg ら Nature 374:546-549

非特許文献8:Hemmi ら Nature 2000 408:740-745

非特許文献9:Bauer ら PNAS 2001 98(16):92379242

非特許文献10:Tighe ら J. Allergy. Clin. Immunol. 2000 106(1 Pt 1):124-134

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明が解決しようとしている課題は、強い免疫応答の誘導活性を示す新規な免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよびこの免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含む医薬品とその用途を提供することである。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らはこの課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、徳永らが示しているCpGを含む6塩基から構成されるパリンドロームの5'-および3'-末端にある種の塩基配列を付加したオリゴヌクレオチドの中に、高い免疫刺激活性を示すオリゴヌクレオチドを見出し、本発明を完成するに至った。

[0015] すなわち、本発明は、配列番号1に示される塩基配列、又は該塩基配列において1個ないし数個の塩基が置換し、欠失し及び／若しくは挿入された塩基配列を含み、免疫刺激活性を有する、オリゴヌクレオチドを提供する。さらに、本発明は、配列番号1に示される塩基配列、又は該塩基配列において1個ないし4個の塩基が置換し、欠失し及び／若しくは挿入された塩基配列を含み、ヒトおよびマウスに対して免疫刺激活性を有する、オリゴヌクレオチドを提供する。さらに、本発明は、上記本発明のオリゴヌクレオチドの全てまたは一部のリン酸結合、リボース糖部及び／又は塩基部が修飾され、強い免疫刺激活性を有するオリゴヌクレオチド誘導体を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体又はオリゴヌクレオチド複合体を有効成分として含有する医薬を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体又はオリゴヌクレオチド複合体を有効成分として含有するアレルギー疾患の治療又は予防剤を提供する。上記本発明のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体又はオリゴヌクレオチド複合体をアジュバントとして含有するワクチンを提供する。さらに、本発明は、上記本発明のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体又はオリゴヌクレオチド複合体の有効量を投与することを含む、アレルギー疾患の治療又は予防方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体又はオリゴヌクレオチド複合体のアレルギー疾患の治療又は予防剤の製造のための使用を提供する。

発明の効果

[0016] 本発明で提供される免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、強い免疫刺激活性を有するため、本発明を用いることにより高い治療、予防、改善効果が得られること、更に、投与回数低減による副作用低下、QOL改善が期待される。さらに、ヒト以外の種に対して免疫刺激活性を示すため、動物を用いた非臨床試験によってヒトに対する効果を

予測することが容易である。したがって、本発明が提供する免疫刺激ヌクレオチドおよびその使用は、医薬品および産業上の利用において、有益性および有用性の高いことが期待される。

発明を実施するための最良の形態

- [0017] 本発明の免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列表の配列番号1で示される塩基配列を含み、強い免疫刺激活性を有するものである。さらに本発明は配列番号1で示される配列を含み、ヒト及びマウスに対して免疫刺激活性を有するものである。実施例において具体的に示される通り、配列番号1で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、ヒトに対する強い免疫刺激活性を有し、さらにマウスに対しても免疫刺激活性を示すことが確認された。
- [0018] 配列番号1で示される塩基配列において、1個ないし数個の塩基が置換し、欠失及び／若しくは挿入された塩基配列を含むものであって、免疫刺激活性を有する、好ましくはヒト及びマウスに対して免疫刺激活性を有するオリゴヌクレオチドは本発明の範囲に含まれる。このような置換、欠失及び／又は挿入の塩基数は、好ましくは4個以下、さらに好ましくは3個以下、さらに好ましくは2個以下、さらに好ましくは1個以下である。このようなオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列表中の配列番号4乃至18で示される配列を含むものであり、特に配列番号4乃至18で示される配列から成るオリゴヌクレオチドである。実施例において具体的に示される通り、配列番号4乃至18で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドが強い免疫刺激活性を有することが確認された。なお、配列番号14では、配列番号1における3'末端から3個の塩基が欠失しているが配列番号1と同等な免疫刺激活性を有しているので、3'末端の3個の塩基の欠失は免疫刺激活性に影響を与えない。なお、本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号1で示される塩基配列又は上記した置換、欠失及び／又は挿入配列のみから成っていてもよいし、あるいは、該塩基配列を含んでいれば、免疫刺激活性を有する限り、他の塩基配列がさらに結合されていてもよい。また、更に核酸以外の分子が結合されていてもよい。オリゴヌクレオチドのサイズは、ヒトに対して免疫刺激活性を有する限り特に限定されないが、好ましくは20塩基ないし50塩基、さらに好ましくは20塩基ないし25塩基である。

[0019] 免疫刺激オリゴヌクレオチドが免疫刺激活性を有するとは、ヒトにおいては平均的な反応性を有するヒト検体の末梢血単核球(PBMC)、マウスにおいては骨髄由来樹状細胞(BMDC)からのサイトカイン産生を誘導する作用のことを示し、本発明においてはヒト末梢血単核球において免疫刺激オリゴヌクレオチド処置によりインターフェロン- γ (以下IFN- γ) 及びインターフェロン- α (以下IFN- α)、マウス骨髄由来樹状細胞において免疫刺激オリゴヌクレオチド処置によりインターロイキン-12p40 (以下IL-12p40) の産生誘導を指標とした活性を示している。免疫刺激活性は、好ましくは、ヒト末梢血単核球においては10 μ M以下の免疫刺激オリゴヌクレオチド処置により20 ng/ml以上のインターフェロン- γ (以下IFN- γ)、マウス骨髄由来樹状細胞においては1 μ M以下の免疫刺激オリゴヌクレオチド処置により40ng/ml以上のインターロイキン-12p40 (以下IL-12p40) を誘導し得るものである。より好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドの免疫刺激活性は、配列番号1から成るオリゴヌクレオチドが示す、ヒト末梢血単核球において免疫刺激オリゴヌクレオチド処置によりインターフェロン- α (以下IFN- α) の産生誘導が、1 μ Mの用量において、配列番号1の塩基配列から成る20塩基のオリゴヌクレオチドによる産生誘導の80%以上、さらに好ましくは90%以上を示すものである。また、本発明において、いくつかの免疫刺激オリゴヌクレオチド配列の活性を比較する時に用いる強い免疫刺激活性とは、上記細胞に免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置した場合に他よりも低濃度において多量のサイトカインを誘導することをいう。

[0020] 本発明の免疫刺激オリゴヌクレオチドによるPBMCのサイトカイン産生誘導の有無を確認する手段として、PBMCからのインターフェロン- γ および α のin vitroでの誘導評価試験が挙げられる。具体的方法を以下に示す。ヒト血液からHistopaque 1077を用いた密度勾配遠心を2000rpm, 室温で25分間行い PBMCを単離する。単離したPBMCを10%FCS入りRPMI1640培地で1ml当たり 4.0×10^6 個の細胞が含まれるように調製後、U底の96穴マイクロプレートに1ウェルあたり 4.0×10^5 個の細胞を播き、同時にCpG-ODNを存在下で24時間、または7日間刺激し、それぞれ培養上清を回収する。IFN α の産生量は24時間の刺激終了後、IFN γ の産生量は7日間の刺激終了後に回収した培養上清を用いてELISA法にて定量する。

- [0021] 本発明の免疫刺激オリゴヌクレオチドによるマウス骨髄由来樹状細胞のサイトカイン産生誘導の有無を確認する手段として、マウス樹状細胞における免疫刺激オリゴヌクレオチドのサイトカイン(IL-12p40)のin vitroでの誘導評価試験が挙げられる。具体的方法を以下に示す。オス10-25週齢のCL57BL/6Nマウスの大腿骨・脛骨より骨髄細胞を取得し、10ng/ml murine GM-CSF を含む10%FCS入りRPMI1640培地で培養する。2日毎の培地交換により、主に顆粒球からなる浮遊細胞を除去しながら6日間培養し、樹状前駆細胞から未成熟樹状細胞(imDC)に分化させる。6日間培養した後、imDCをピペッティングにより回収し、平底の96穴プレートに1ウェル当たり 2.0×10^5 個の細胞となるように播き、CpG-ODNで2日間刺激する。刺激終了後、培養上清中に放出されたTh1反応由来のサイトカインであるIL-12p40の量をELISAにて定量する。
- [0022] 本発明はまた、上記配列の全てまたは一部のリン酸結合、リボース糖部および塩基部を修飾した免疫刺激オリゴヌクレオチドを含む。好適な実施形態としては、上記の修飾がホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド化である。さらに好適な実施形態としては、5'-及び3'-末端の一部または全ての連続するG配列のヌクレオチド残基間がホスホロチオエート修飾されている。
- [0023] 本発明の免疫刺激オリゴヌクレオチドは従来の技術及び核酸合成装置で合成できる。これらの合成方法は酵素的な方法、化学的方法、本発明の配列より長い配列の分解を含むが、必ずしもこれに限定されるものではない。また、修飾されたオリゴヌクレオチドも従来の技術において合成される。例えば、オリゴヌクレオチドホスホルアミデートを硫黄で処理することにより、ホスホロチオエート修飾されたオリゴヌクレオチドが得られるが、必ずしもこれに限定されるものではない。これらのオリゴヌクレオチドの合成技術、修飾技術は本明細中に引用されている特許文献、非特許文献においても用いられており、その他にも多数の報告が確認される公知の技術である。
- [0024] 上記した本発明の免疫刺激性オリゴヌクレオチド又は上記したその誘導体は、医薬としての使用を目的としたオリゴヌクレオチド複合体の形態にあってもよい。複合体とは、該免疫刺激オリゴヌクレオチド又はその誘導体と他の物質との混合物および結合体、該免疫刺激オリゴヌクレオチドを取り込ませたリポソームおよびナノスフィアがあ

げられるが、必ずしもこれに限定されるものではない。好適な実施形態としては、上記の複合体がオリゴヌクレオチド又はその誘導体を埋封したリポソームである。埋封とは、リポソームの脂質膜表面との結合、脂質膜中への取り込み、あるいはリポソームの内腔への取り込みを指し示す。

[0025] リポソームを構成する脂質としては、リポソームを構成するために知られている任意の常用の脂質を単独で又は複数組合せて使用することができる。例えば、天然物、例えば卵黄、大豆、又はその他の動植物から得られる脂質、これらの脂質を水素添加によって不飽和度を低下したものを使用することができる。具体的には、例えば、ステロール類(例えばコレステロール)、ホスファチジルエタノールアミン類(例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン)、ホスファチジルコリン類(例えばジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン)、ホスファチジルセリン類(例えばジパルミトイルホスファチジルセリン、ジステアロイルホスファチジルセリン)、ホスファチジン酸類(例えばジパルミトイルホスファチジン酸、ジステアロイルホスファチジン酸)等があげられる。リポソームの作製は公知の方法を用いる。ボルテックス法および超音波法が一般的であるが、そのほかにエタノール注入法、エーテル法および逆相蒸発法などが適用でき、これらを組合せて使用することもできる。例えば、ボルテックス法および超音波法においては、所定の脂質を有機溶剤、例えばメタノール、エタノール、クロロホルム又はこれらの混合物、例えばメタノールとクロロホルムとの混合物に溶解した後、該有機溶剤を蒸発除去することにより脂質の薄層を得る。この際、上記した脂質を様々な組み合わせ、濃度比率で有機溶剤に溶解することにより、多様なリポソームを製造することが可能である。次に、この脂質の薄層に水性媒体を加えてボルテックス処理又は超音波処理することによりリポソームが形成される。この際に、上記水性媒体にリポソーム内へ埋封する物質を混入、例えば溶解又は懸濁させておくことにより、物質をリポソームに埋封することができる。水性媒体に溶解する埋封物質の濃度は、特に限定はされないが、タンパク質においては $37.5\ \mu\text{g}\sim 375\text{mg/ml}$ 、核酸においては $0.5\ \mu\text{g}\sim 5000\ \mu\text{g/ml}$ であることが好ましい。以下にリポソームの具体的な製造方法を示す。10 mMのジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)のクロロホルム・メタノール(2:1, V

／V)溶液(以下、C／M溶液と略す)と10mMのコレステロール(Chol)のC／M溶液を1:1の割合に混ぜて、クロロホルムを加えて通常合計3mlにし、10mlの梨型フラスコに取り、エバポレーターに梨型フラスコを接続させ、40℃で減圧下、C／M溶液を蒸発除去する。フラスコの底に薄い脂質膜ができるが、これにクロロホルムを加えて膜を一旦溶かした後に、再度溶媒を蒸発除去する。この操作をさらに2～3回繰り返すと、脂質の薄膜ができる。デシケーターにフラスコを1時間以上入れて完全に溶媒を除き、脂質フィルムとする。次にリポソームの調製は作製した脂質フィルムにスギ花粉抗原Cry j 1 (3.75mg/ml) 及び本発明である配列番号1のオリゴヌクレオチド誘導体 (10 μ M、およそ30 μ g/ml) の混合溶液を加え、ボルテックスをかけて水和する。これはmultilamella vesicle (多重層) タイプのリポソームである。このリポソーム懸濁液にPBS (リン酸緩衝液) を加え、整粒器を使用して加圧下で整粒し、リポソームの粒径をそろえる。埋封されなかった抗原、オリゴヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチド誘導体は、リポソーム液にPBSを加えて15, 000rpm にて遠心し、上清除去することを3回繰り返すことで除き、沈殿物を目的のリポソームとして用いる。実施例にて具体的に示す通り、ボルテックス法により本発明のオリゴヌクレオチド及び抗原を埋封したリポソームをマウスに処置すると、IgE増加が抑制されることを確認した。

- [0026] 上記本発明のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体、上記本発明のオリゴヌクレオチド複合体は、各種用途の医薬として用いることができる。実施形態の好適な適応症としては、アレルギー疾患があげられるが、必ずしもこれに限定されるものではない。アレルギー疾患とは、花粉、ダニ、犬、猫などの動物、食物、ハウスダストなどに由来する抗原物質を起因とし、鼻炎、結膜炎、皮膚炎、喘息などの炎症を症状とする疾患であるが、さらに好適な実施形態としては、上記アレルギー疾患が花粉アレルギー症である。花粉アレルギーとは特にスギ花粉由来の蛋白を抗原とするアレルギーを指すが、ヒノキ、シラカバ、ハンノキ、ブタクサ、ヨモギ、カモガヤなどの他の花粉由来物質が抗原であっても良い。実施例において具体的に示される通り、抗原及び本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を埋封したリポソームをスギ花粉抗原感作マウスに処置することにより、スギ花粉アレルギー発症の主要因である血清中IgEの増加を抑制することを確認した。この試験方法は、スギ花粉以外の抗原を用いて試

験することが可能である。また、実施例と同様の方法を用いて喘息などのアレルギーを誘発し、誘発抗原とは異なる抗原を処置することにより、治療効果が得られることが確認されている。したがって、上記本発明のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体、または上記本発明のオリゴヌクレオチド複合体が各種アレルギーに対して高い治療効果を示すことが示唆される。

[0027] また、上記医薬は、本発明のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体、または上記本発明のオリゴヌクレオチド複合体をアジュバントとして含む、ワクチンであっても良い。ワクチンの使用可能な疾患は感染症、悪性腫瘍、及びアレルギー症である。感染症とはウィルス、細菌、真菌、及び原虫等を原因として発症する疾患である。また、悪性腫瘍とは、脳、肺（例えば小細胞および非小細胞）、卵巣、乳房、前立腺、結腸などの腫瘍であるが、必ずしもこれに限定されるものではない。通常、ワクチンとは、患者に投与し、免疫反応を活性化する、感染性因子、感染因子のある部分、腫瘍組織特異的に発現する因子、または動植物由来の因子を含む抗原性懸濁液または溶液をいう。ワクチンを構成する抗原性部分は、タンパク質、ペプチド、脂質、多糖、核酸のどれであっても良い。好ましい実施形態としては、特に限定はされないが、本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体、もしくはオリゴヌクレオチド複合体と上記ワクチンの混合液である。また、本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体と上記ワクチンの抗原性部分との複合体であってもよい。例としては、ワクチンの抗原性部分と本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体を埋封したリポソームがあげられ、上記したリポソームの製造方法を用いて作製することができる。

[0028] このような医薬として用いる場合、投与経路は、特に限定されないが、皮下注射、皮内注射、静脈内注射、筋肉内注射、患部組織への注入、経鼻投与、経眼投与等、経咽頭投与、経肺投与、経皮投与、舌下投与などが好ましい。また、投与量は、患者の症状、治療目的、投与経路等により適宜選択されるが、通常、成人1日当り、オリゴヌクレオチド量として、 $0.1\text{ pmol} \sim 10\text{ }\mu\text{ mol}$ 、好ましくは $1\text{ pmol} \sim 1\text{ }\mu\text{ mol}$ 程度である。アジュバントとして使用する場合の投与量も、投与目的、投与経路等により適宜選択されるが、通常、上記と同程度の投与量でよい。また、オリゴヌクレオチド又はその誘導体

は、通常、採用される剤形を製剤する周知の製剤方法により製剤される。

[0029] 以下に本発明を、実施例をもって詳細に説明する。なお、以下の説明文中で使用されている免疫刺激オリゴヌクレオチドの配列の略号および特性は、配列表に記載されている。また、実施例中に記載されている公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドの配列、略号および特性は表1に示した。

[0030] [表1-1]

公知の免疫刺激オリゴヌクレオチド (ODN)			
ODN略号	配列番号	引用特許文献又は非特許文献	修飾
D19N+GS	配列番号19	W000/61151 配列番号72*	5'および3'末端のG配列間をホスホロチオエート修飾
D35	配列番号19	W000/61151 配列番号72*	5'および3'末端の2つのG配列間のみホスホロチオエート修飾
1018	配列番号20	特表2002-517156 配列番号2* 特表2002-500159 配列番号19*	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾
A151	配列番号21	ARTHRITIS & RHEUMATISM 2004 50(5):1686-1689	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾
K3	配列番号22	W000/61151 配列番号20* The Journal of Immunology 2001 166:2372-2377	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾
T1	配列番号23	特開平4-352724 配列番号1*	リン酸骨格修飾していない
T1S	配列番号23	特開平4-352724 配列番号1	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾
T8	配列番号24	特開平4-352724 配列番号8*	リン酸骨格修飾していない
T8S	配列番号24	特開平4-352724 配列番号8*	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾

[0031] [表1-2]

ODN略号	配列番号	引用特許文献又は非特許文献	修飾
-------	------	---------------	----

T15	配列番号25	特開平4-352724	配列番号15*	リン酸骨格修飾していない
T15S	配列番号25	特開平4-352724	配列番号15*	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾
T49	配列番号26	特開平4-352724	配列番号49*	リン酸骨格修飾していない
T49S	配列番号26	特開平4-352724	配列番号49*	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾
I1	配列番号27	特表平10-506265	配列番号1*	5'および3'末端のG配列間をホスホロチオエート修飾
I2	配列番号28	特表平10-506265	配列番号2*	リン酸骨格修飾していない
I2S	配列番号28	特表平10-506265	配列番号2*	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾
I14	配列番号29	特表平10-506265	配列番号14*	リン酸骨格修飾していない
I14S	配列番号29	特表平10-506265	配列番号14*	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾
DVAX-5	配列番号30	CN1498895	配列番号5*	リン酸骨格修飾していない
DVAX-5S	配列番号30	WO 2005/014611	配列番号4*	全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾
M-non-CpG	配列番号31	Nature 2000 408:740-745		全てのヌクレオチド残基間をホスホロチオエート修飾

*:文献中の配列番号

実施例 1

[0032] パリンドローム配列両末端のホスホロチオエート修飾されたG配列を含む免疫刺激オリゴヌクレオチドの、ヒトPBMCにおけるサイトカイン産生の誘導活性、及びD19N+GSとの活性比較

徳永らが示しているパリンドローム配列(特開平4-352724、配列3および15)を含むパリンドローム配列の両末端に、ホスホロチオエート修飾されたG配列を含むヌクレオチド配列を付加した免疫誘導オリゴヌクレオチド、mod2(配列番号1)、mod9(配列番号2)、およびmod12(配列番号3)を構築した。そしてこれらの配列のヒトPBMCにおけるサイトカイン産生の誘導活性のスクリーニング、さらに公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドであるD19N+GSとの免疫刺激活性の比較を行った。

[0033] ヒトPBMCにD19N+GS、mod2、9および12を各々処置したところ、mod2の配列は3 μ M以上の処置においてIFN- γ 産生を誘導し、M-non-CpG、D19N+GS、mod9及びmod12と比較してサイトカイン誘導活性が高かった。(図1)。

[0034] また、D19N+GSおよびmod2について、IFN- α 産生の誘導活性のスクリーニングを行った。その結果、これらのオリゴヌクレオチド (3 μ M) をPBMCに処置すると、D19N+GSは3ng/ml前後の産生量であった。それに対して、mod2を処置すると30ng/ml以上の産生量が確認され、D19N+GSと比較して、PBMCからのIFN- α の産生誘導能が顕著に高かった。(図2)。

したがって、これらの結果から、オリゴヌクレオチド配列mod2が公知配列D19N+GSよりも強い免疫刺激活性を有することが確認された。

さらに、mod9及びmod12の活性が低いことから、徳永らの配列の末端にG配列を含むヌクレオチド配列を付加することが、必ずしもヒトにおける活性の増加に結びつかないことが示され、本発明であるmod2のような免疫刺激活性の高い配列は、容易に類推できない発明であることが示された。

実施例 2

[0035] 免疫刺激オリゴヌクレオチドmod2、T1、T8、T15及びT49の、ヒトPBMCにおけるサイトカイン産生誘導効果の比較

徳永らが示している免疫刺激オリゴヌクレオチド配列において強い活性を有する配列(T1及びT8)及びmod2に含まれる6塩基(CGATCG)を有する配列(T15及びT49)とmod2の免疫刺激活性について、ヒトPBMCを用いたスクリーニングにより活性の比較を行った。

[0036] その結果、mod2の1 μ M処置によりIFN- α 産生の誘導が確認された。T1、T8、T15及びT49においてはIFN- α の誘導は弱く、これらの配列をリン酸骨格修飾した配列(T1S、T8S、T15S及びT49S)においても同様の結果であった(図3)。また、上記のオリゴヌクレオチドのIFN- γ 産生誘導活性を確認した結果、IFN- α と同様の傾向が確認された(図4)。

[0037] 従って、本発明のオリゴヌクレオチドであるmod2の免疫刺激活性は、徳永らが示しているオリゴヌクレオチドT1、T8、T15及びT49よりも強い活性を有することが確認された。

実施例 3

[0038] 免疫刺激オリゴヌクレオチドmod2、K3及び1018の、ヒトPBMCにおけるサイトカイン産

生誘導活性の比較

WO00/61151において示されているオリゴヌクレオチド配列(K3)、特表2002-517156

及び特表2002-500159において示されているオリゴヌクレオチド配列(1018)と、本発明のmod2の免疫刺激活性について、ヒトPBMCを用いたスクリーニングにより活性比較を行った。

[0039] ヒトPBMCにmod2を500nM処置した結果、IFN- α 産生誘導が確認されたが、K3及び1018処置によるIFN- α 産生の誘導はほとんど確認できなかった(図5)。

[0040] 以上の結果から、本発明のオリゴヌクレオチドmod2の免疫刺激活性は、WO00/61151において示されている配列K3及び特表2002-517156、特表2002-500159において示されている1018よりも強いことが確認された。

実施例 4

[0041] 免疫刺激オリゴヌクレオチドmod2、I1、I2、I2S、I14及びI14Sの、ヒトPBMCにおけるサイトカイン産生誘導活性の比較

特表平10-506265において示され、強い免疫刺激活性を有するとされているオリゴヌクレオチド配列(I1、I2、I2S、I14及びI14S)と本発明のmod2の免疫刺激活性について、ヒトPBMCを用いたスクリーニングにより活性比較を行った。

[0042] ヒトPBMCにmod2を処置した結果、100nM以上の処置によりIFN- α 産生誘導が確認された。I2及びI14のIFN- α 産生の誘導はほとんど確認できず、これらの配列にリン酸骨格修飾した配列についても同様の結果であった。また、配列の両末端にリン酸骨格修飾されたG配列を有するI1は、300nM以上の処置によりIFN- α の産生誘導が確認されたが、その産生量はmod2には及ばなかった(図6)。

[0043] 以上の結果から、本発明のオリゴヌクレオチドmod2の免疫刺激活性は、特表平10-506265において示されている配列I1、I2、I2S、I14及びI14Sよりも強いことが確認された。

実施例 5

[0044] 免疫刺激オリゴヌクレオチドmod2及びDVAX-5の、ヒトPBMCにおけるサイトカイン産生誘導活性の比較

CN1498895において示され、mod2と同じ徳永らの6塩基配列(CGATCG)を含む免疫刺激オリゴヌクレオチド(DVAX-5)と本発明のmod2の免疫刺激活性について、ヒトPBMCを用いたスクリーニングにより活性比較を行った。

[0045] ヒトPBMCにmod2を処置した結果、100nMの処置によりIFN- α 産生誘導が確認された。DVAX-5のIFN- α 産生の誘導はほとんど確認できず、この配列をリン酸骨格修飾した配列DVAX-5SはIFN- α 産生の誘導が見られたが、その産生量はmod2よりも低かった。(図7)。

[0046] 以上の結果から、本発明のオリゴヌクレオチドmod2の免疫刺激活性は、CN1498895に示されている配列DVAX-5よりも強いことが確認された。

実施例 6

[0047] パリンドローム配列両末端のホスホロチオエート修飾されたG配列を含む免疫刺激オリゴヌクレオチドの、マウスBMDCにおけるサイトカイン産生の誘導活性及びD19N+GSとの活性比較

実施例1において使用した免疫刺激オリゴヌクレオチドmod2、および免疫刺激ヌクレオチドD19N+GSをマウスBMDCに処置し、マウスにおける免疫刺激活性のスクリーニングによる活性の比較を行った。

[0048] マウスBMDCに上記のオリゴヌクレオチドを各々処置したところ、mod2の1 μ M処置において、IL-12p40産生の誘導活性がD19N+GSと比較して高いことを確認し、5 μ Mではさらに活性が上昇した。また、実施例1と同様、M-non-CpG、mod9及びmod12の免疫刺激活性は低いことを確認した。(図8)

[0049] したがって、mod2がヒトだけでなくマウスに対しても免疫刺激活性を示し、実施例1と同様、本発明の免疫刺激オリゴヌクレオチドがD19N+GSよりも免疫刺激活性が高く、さらに容易に類推できない発明であることが、マウスにおいても示された。

実施例 7

[0050] 免疫刺激オリゴヌクレオチドmod2の配列に塩基を置換、欠失および挿入した配列のサイトカイン産生誘導効果

本発明のオリゴヌクレオチドmod2の配列に1塩基を挿入(mod19:配列番号4、mod21:配列番号6、mod22:配列番号7)、2塩基を挿入(mod20:配列番号5、mod23:配列

番号8)、1塩基を置換(mod24:配列番号9、mod25:配列番号10)、2塩基を置換(mod26:配列番号11、mod29:配列番号15、mod37:配列番号16、mod38:配列番号17、mod39:配列番号18)、1塩基を欠失(mod27:配列番号12、mod28:配列番号13)、および3塩基を欠失(3'末端の3塩基を欠失(ただし、さらに5'末端に4塩基を付加)。Mod33:配列番号14)し、さらに末端G配列間をホスホロチオエート修飾した配列を合成し、ヒトPBMCを用いて上記配列の免疫刺激活性のスクリーニングを行った。

[0051] ヒトPBMCに上記配列1 μ Mを処置した結果、各処置によりIFN- α 産生の誘導が確認され、その産生量はmod2と比較して同程度であった(図9)。また、上記配列0.3及び1 μ Mを処置した結果、各濃度の処置によりIFN- γ の産生が確認され、IFN- α と同様、その産生量はmod2と比較して同程度であった(図10)。

[0052] 従って、本発明のオリゴヌクレオチドであるmod2配列の塩基を置換、挿入、及び欠失しても、mod2と同等の活性が維持されることが確認された。

実施例 8

[0053] スギ花粉抗原感作マウスにおける抗原およびオリゴヌクレオチド共封入リポソーム処置のIgE増加抑制効果1

mod2またはD35をスギ花粉抗原Cry j 1と共にリポソームへ封入し、投与抗原蛋白量が1 μ gとなるようにマウスへ1週間隔で3回皮内投与した。最後の皮内投与から1週間後、抗原とアラム(説明)混合液の腹腔内投与(1週間隔2回、投与抗原蛋白量10 μ g)により強制的にIgEを増加させた。抗原アラム投与からさらに2週間後、各個体の血清中総IgE量をELISA法にて測定し、各種CpG・抗原封入リポソームのIgE増加抑制効果を観察した。

[0054] Mod2共封入リポソーム処置群は、D35または1018共封入リポソーム処置群と比較して、血清中IgE量が低い値を示した。したがって、mod2はin vitroだけでなく、in vivoにおいても免疫刺激活性を示し、公知の配列であるD35および1018よりも強い活性を示すことが確認された。(図11)また、上記した配列のin vitro及びin vivoの活性が相関していることから、サイトカイン産生誘導評価試験において強い免疫刺激活性を示すことは、臨床での有用性すなわち高い治療効果に結びつくことを確認した。

実施例 9

[0055] スギ花粉抗原感作マウスにおける抗原およびオリゴヌクレオチド共封入リポソーム処置のIgE増加抑制効果2

mod2、A151またはK3をスギ花粉抗原Cry j 1と共にリポソームへ封入し、実施例4と同様の方法により各種CpG・抗原封入リポソームのIgE増加抑制効果を観察した。

[0056] Mod2共封入リポソーム処置群は、A151またはK3共封入リポソーム処置群と比較して、血清中IgE量が低い値を示し、その値はマウスで強い活性を示すM-CpG共封入リポソームと同程度の値であることを確認した。したがって、実施例4と同様、mod2は公知の配列であるA151またはK3よりも強い活性を示し、in vivoにおいて強い免疫刺激活性を有することが確認された。(図12)

実施例 10

[0057] ヒトPBMCを用いたD35およびmod2のIgE産生抑制評価

ヒトPBMC(4×10^5 細胞/well)をIL-4 (10 ng/mL)と抗CD40抗体 (100 ng/mL)で共刺激して、14日間培養すると、IgE産生が誘導される。この系を用いてIgE産生誘導の刺激と同時に各種CpG-ODN (0.3および1.0 μ M)を添加し、14日間後の培養上清中のIgE濃度をELISA法により測定した。その結果、各CpG-ODN濃度依存的にIgE産生を抑制する傾向であった。0.3 μ Mの処置において、mod2は顕著にIgE産生を抑制し、D35と比較して、in vitroにおけるIgE産生抑制活性が高いことを確認した。したがって、本発明の免疫オリゴヌクレオチドは公知の配列であるD35よりもヒトにおけるIgE産生抑制活性が高いことが確認された。(図13)

図面の簡単な説明

[0058] [図1]本発明および公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したヒトPBMCにおけるIFN- γ 産生量の結果を示す図である。

[図2]本発明および公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したヒトPBMCにおけるIFN- α 産生量の結果を示す図である。

[図3]本発明および公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したヒトPBMCにおけるIFN- α 産生量の結果を示す図である。

[図4]本発明および公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したヒトPBMCにおけるIFN- γ 産生量の結果を示す図である。

[図5]本発明および公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したヒトPBMCにおけるIFN- α 産生量の結果を示す図である。

[図6]本発明および公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したヒトPBMCにおけるIFN- α 産生量の結果を示す図である。

[図7]本発明および公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したヒトPBMCにおけるIFN- α 産生量の結果を示す図である。

[図8]本発明および公知の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したマウスBMDCにおけるIL-12p40産生量の結果を示す図である。

[図9]本発明の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したヒトPBMCにおけるIFN- α 産生量の結果を示す図である。

[図10]本発明の免疫刺激オリゴヌクレオチドを処置したヒトPBMCにおけるIFN- γ 産生量の結果を示す図である。

[図11]本発明および公知の免疫オリゴヌクレオチドとスギ花粉抗原Cry j 1を共封入したリポソームをスギ花粉抗原感作マウスに処置した時の血清中IgE増加抑制効果を示す図である。

[図12]本発明および公知の免疫オリゴヌクレオチドとスギ花粉抗原Cry j 1を共封入したリポソームをスギ花粉抗原感作マウスに処置した時の血清中IgE増加抑制効果を示す図である。

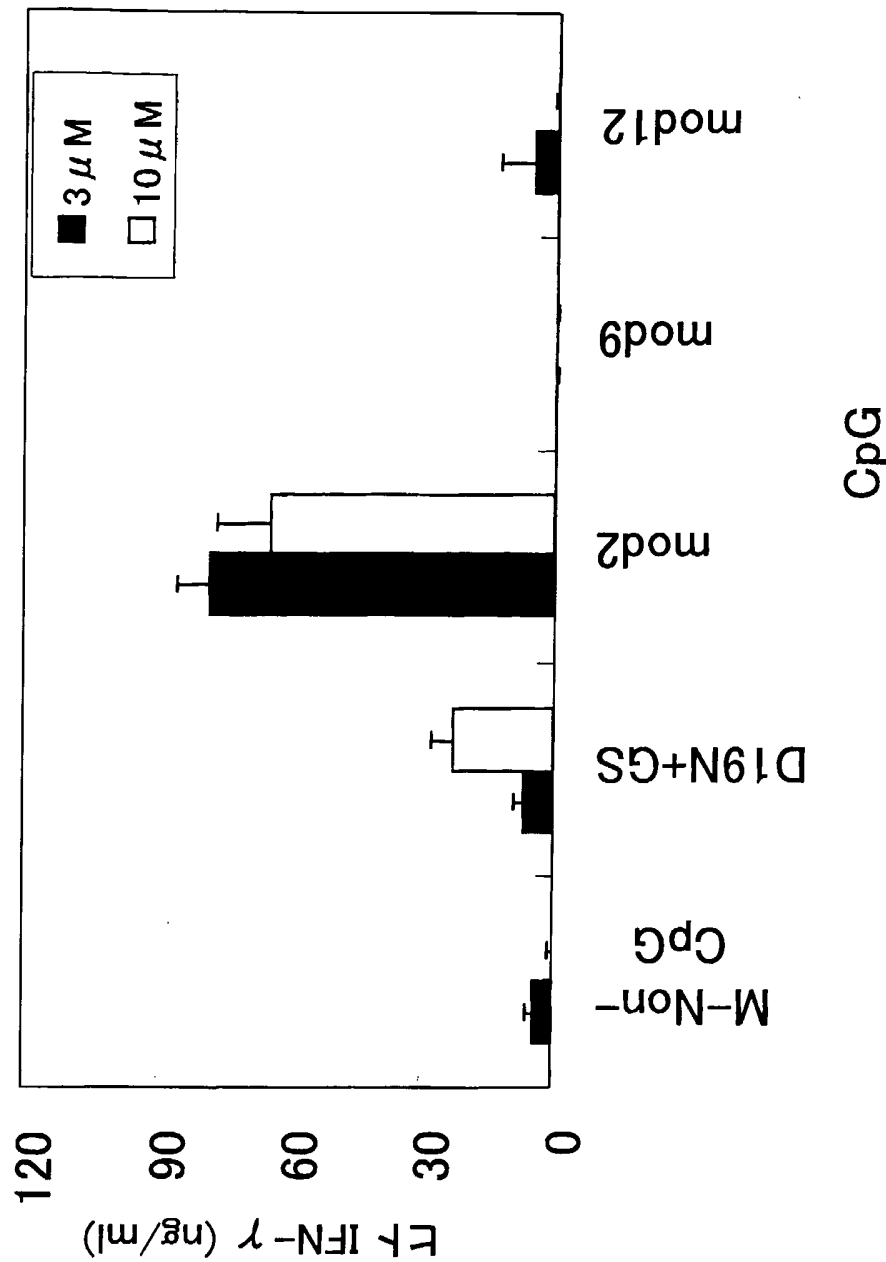
[図13]本発明および公知の免疫刺激オリゴヌクレオチド(終濃度0.3および1.0 μ M)と共に抗CD40抗体(0.1 μ g/ml)とIL-4(20 ng/ml)を処置したヒトPBMCのIgE産生量の結果を示す図である。

請求の範囲

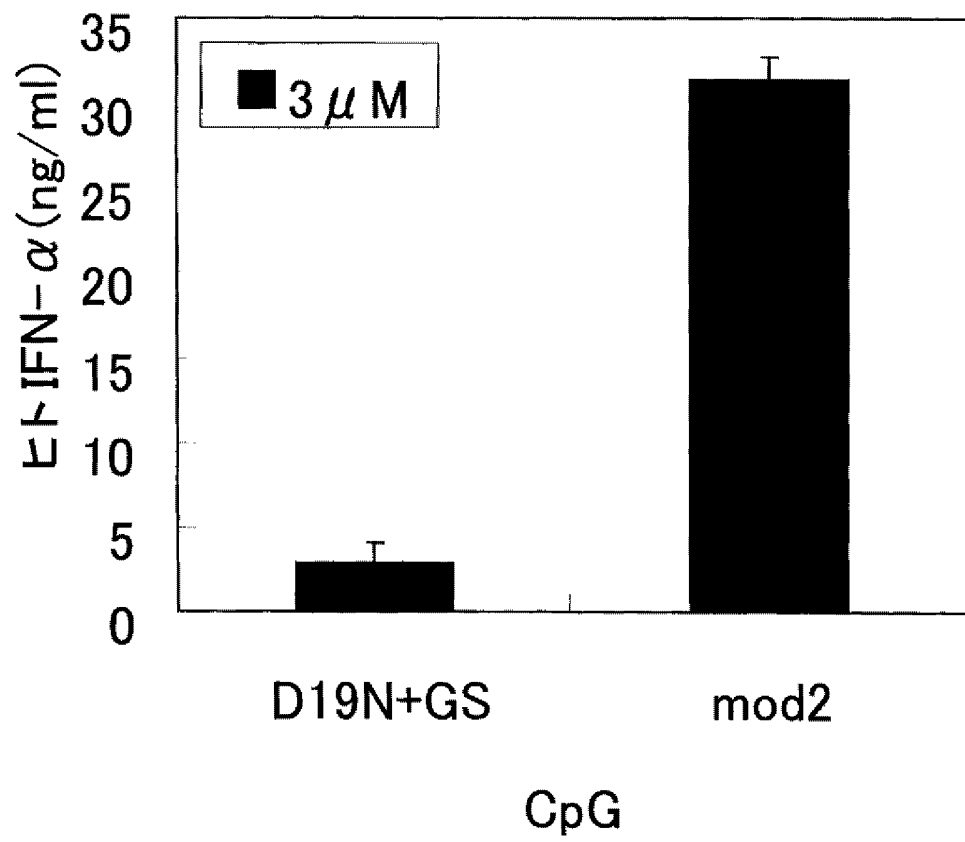
- [1] 配列番号1に示される塩基配列、又は該塩基配列において1個乃至数個の塩基が置換し、欠失し及び／若しくは挿入された塩基配列を含み、免疫刺激活性を有するオリゴヌクレオチド。
- [2] 配列番号1に示される塩基配列、又は該塩基配列において1個乃至4個の塩基が置換し、欠失し及び／若しくは挿入された塩基配列を含み、免疫刺激活性を有する請求項1記載のオリゴヌクレオチド。
- [3] 配列番号1に示される塩基配列、又は該塩基配列において1個乃至3個の塩基が置換し、欠失し及び／若しくは挿入された塩基配列を含み、免疫刺激活性を有する請求項2記載のオリゴヌクレオチド。
- [4] 配列番号1に示される塩基配列、又は該塩基配列において1個又は2個の塩基が置換し、欠失し及び／若しくは挿入された塩基配列を含み、免疫刺激活性を有する請求項3記載のオリゴヌクレオチド。
- [5] ヒト及びマウスに対して免疫刺激活性を示す、請求項1ないし4のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。
- [6] 配列番号4乃至18のいずれかの配列を含む請求項1記載のオリゴヌクレオチド。
- [7] 請求項1乃至6のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドの全て、あるいは一部のリン酸結合、リボース糖部及び／又は塩基部が修飾され、免疫刺激活性を有するオリゴヌクレオチド誘導体。
- [8] 前記修飾が、ホスホジエステル結合を有するオリゴヌクレオチドのリン酸基部の酸素原子を硫黄原子で置換したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド化である請求項7に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。
- [9] 5'-及び／又は3'-末端の連続するG配列のヌクレオチド残基間がホスホロチオエート修飾されている、請求項8に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。
- [10] 請求項1乃至9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド誘導体を含む、オリゴヌクレオチド複合体。
- [11] 前記オリゴヌクレオチド複合体が、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド誘導体を埋封したリポソームである、請求項10に記載のオリゴヌクレオチド複合体。

- [12] 請求項1乃至9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体、又は請求項10若しくは11に記載のオリゴヌクレオチド複合体を有効成分として含有する医薬。
- [13] 請求項1乃至9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体、又は請求項10若しくは11に記載のオリゴヌクレオチド複合体を有効成分として含有する、アレルギー疾患の治療又は予防剤。
- [14] 前記アレルギー疾患が花粉アレルギー症である、請求項13に記載の治療又は予防剤。
- [15] 請求項1乃至9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体、又は請求項10若しくは11に記載のオリゴヌクレオチド複合体をアジュバントとして含むワクチン。
- [16] 請求項1乃至9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体、又は請求項10若しくは11に記載のオリゴヌクレオチド複合体の有効量を投与することを含む、アレルギー疾患の治療又は予防方法。
- [17] 前記アレルギー疾患が花粉アレルギー症である、請求項16に記載の方法。
- [18] 請求項1乃至9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体、又は請求項10若しくは11に記載のオリゴヌクレオチド複合体のアレルギー疾患の治療又は予防剤の製造のための使用。
- [19] 前記アレルギー疾患が花粉アレルギー症である、請求項18に記載の使用。

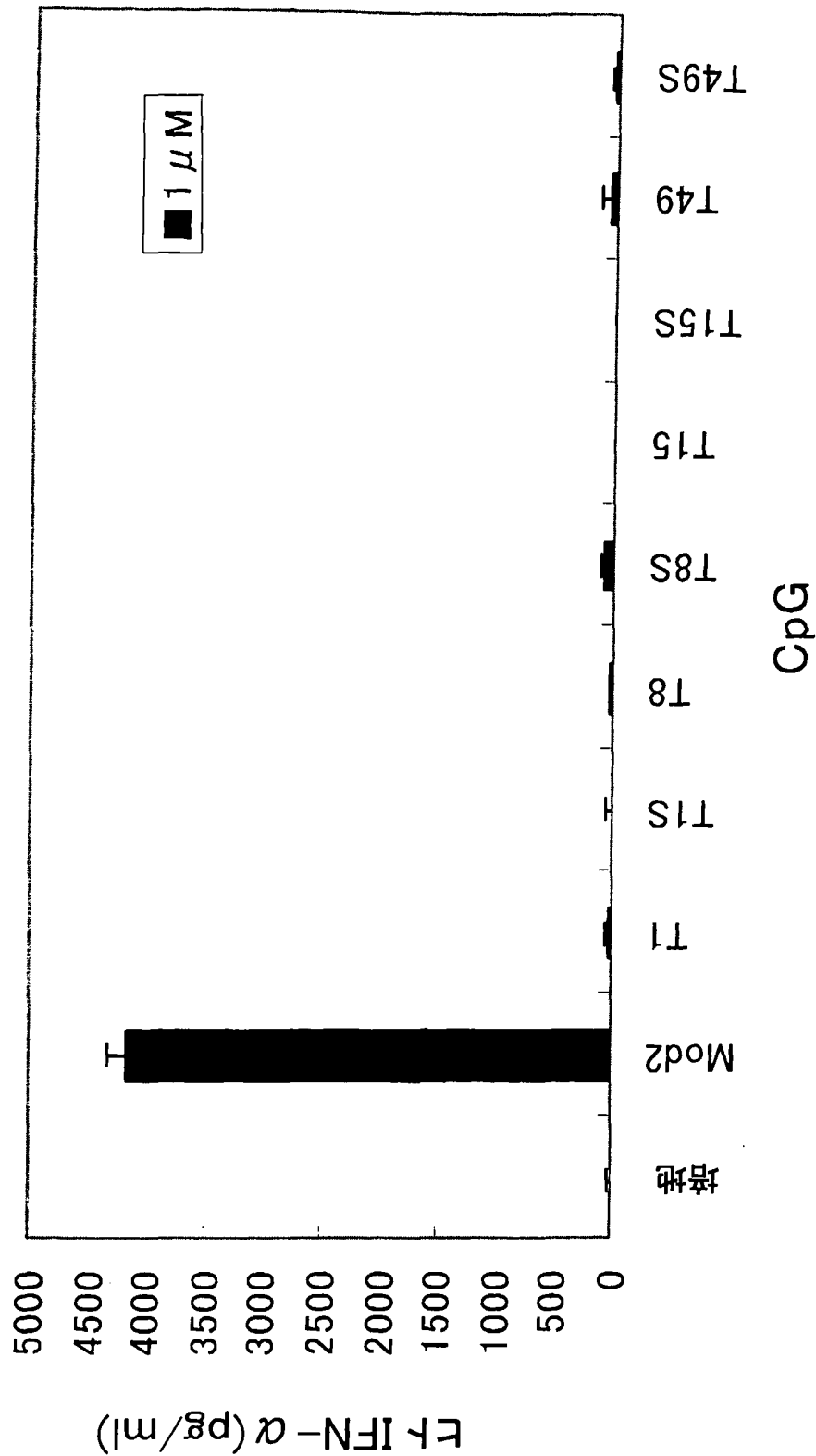
[図 1]



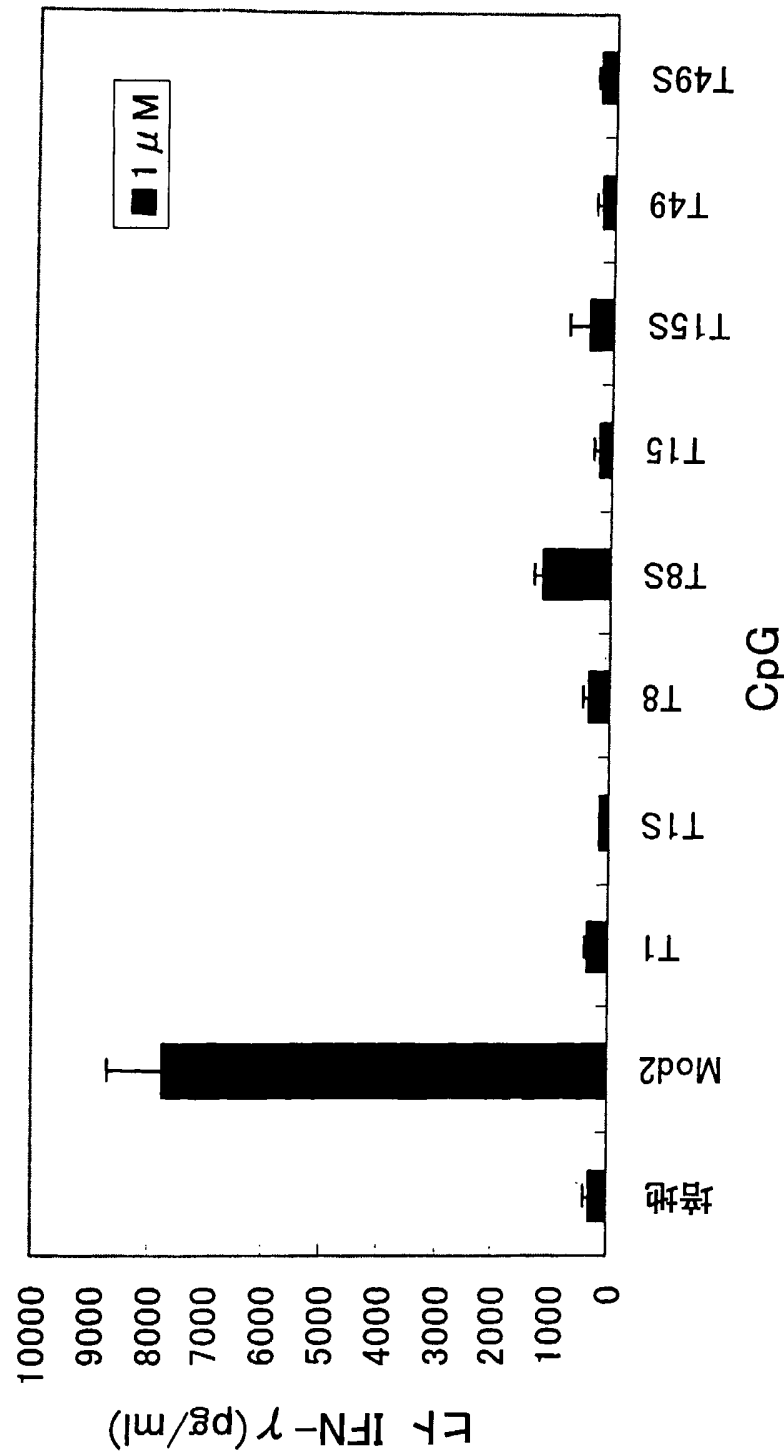
[図2]



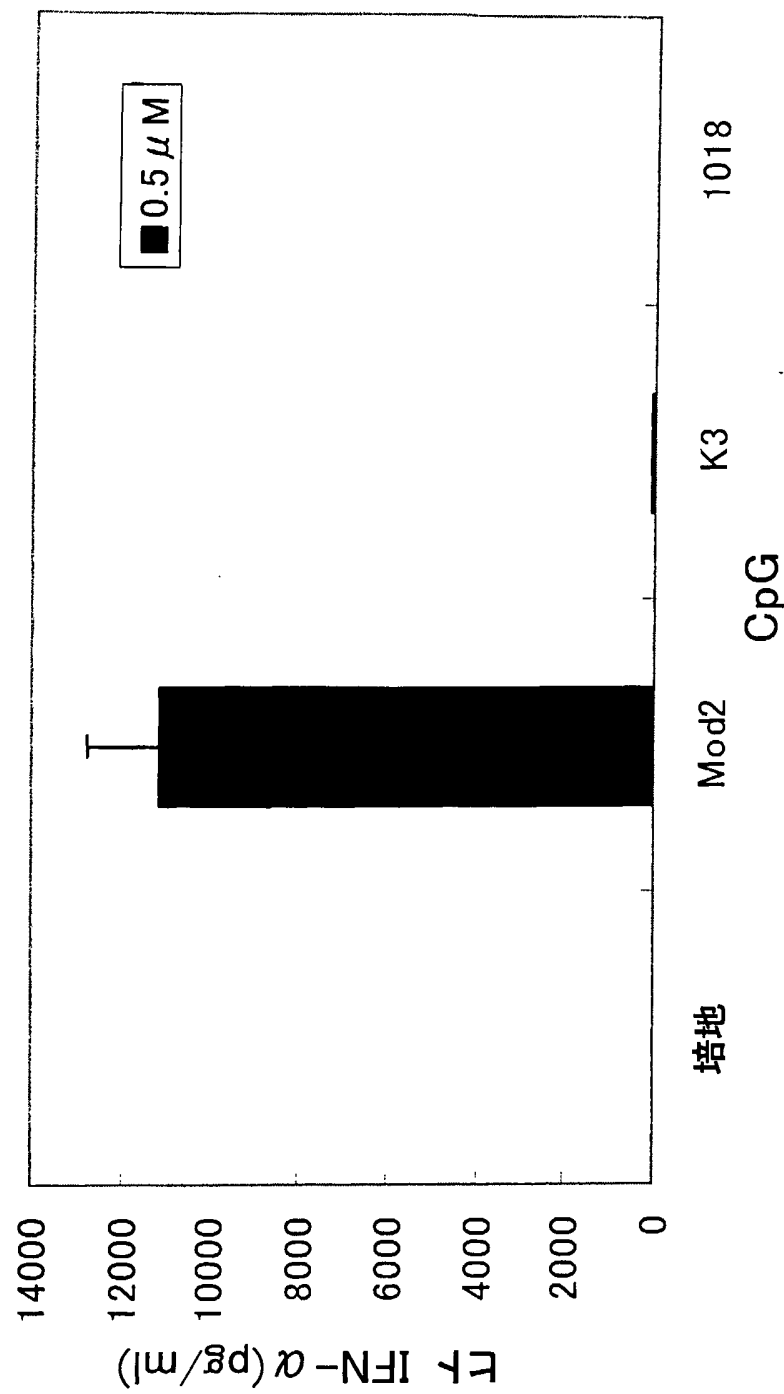
[図 3]



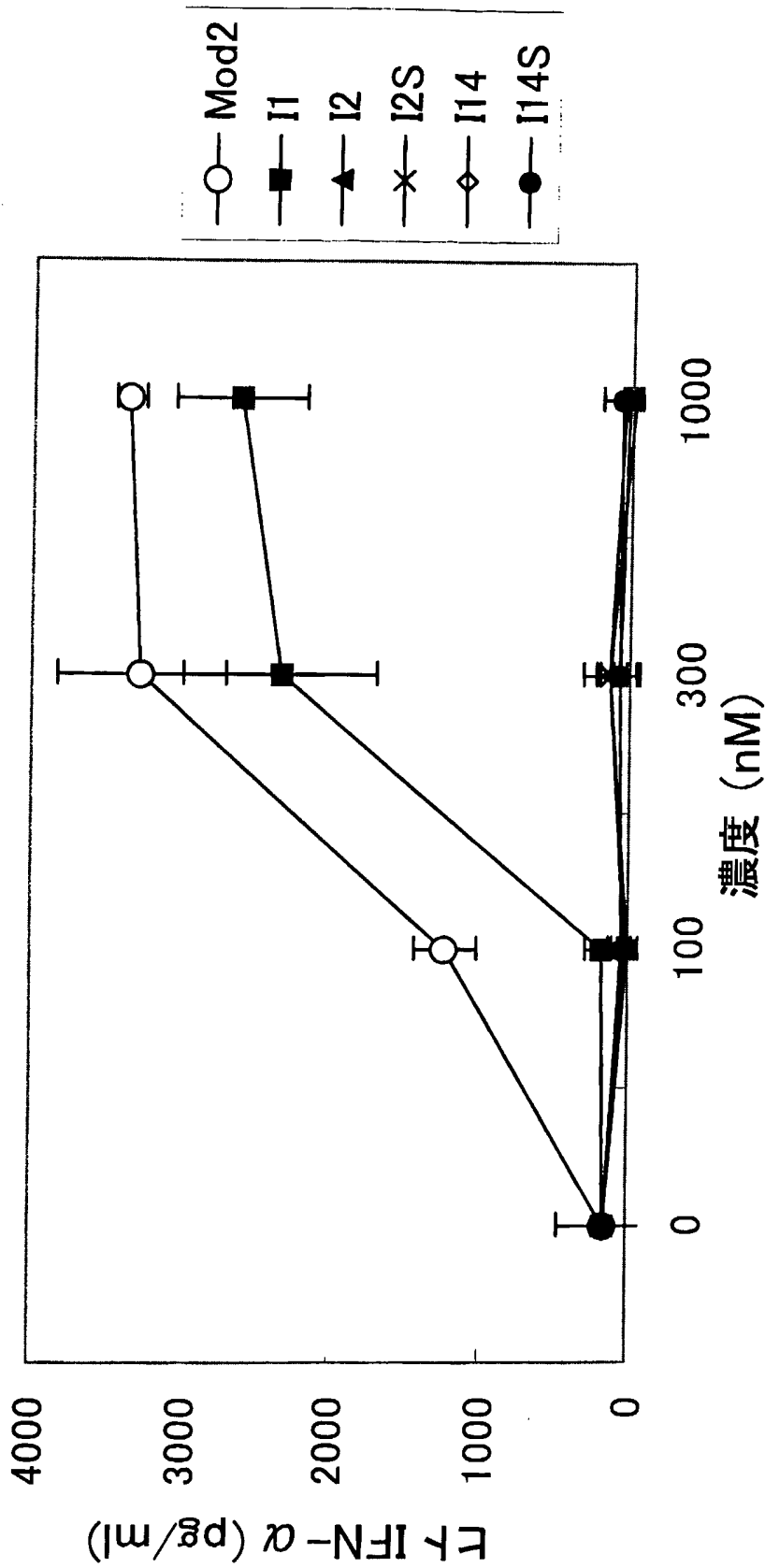
[図 4]



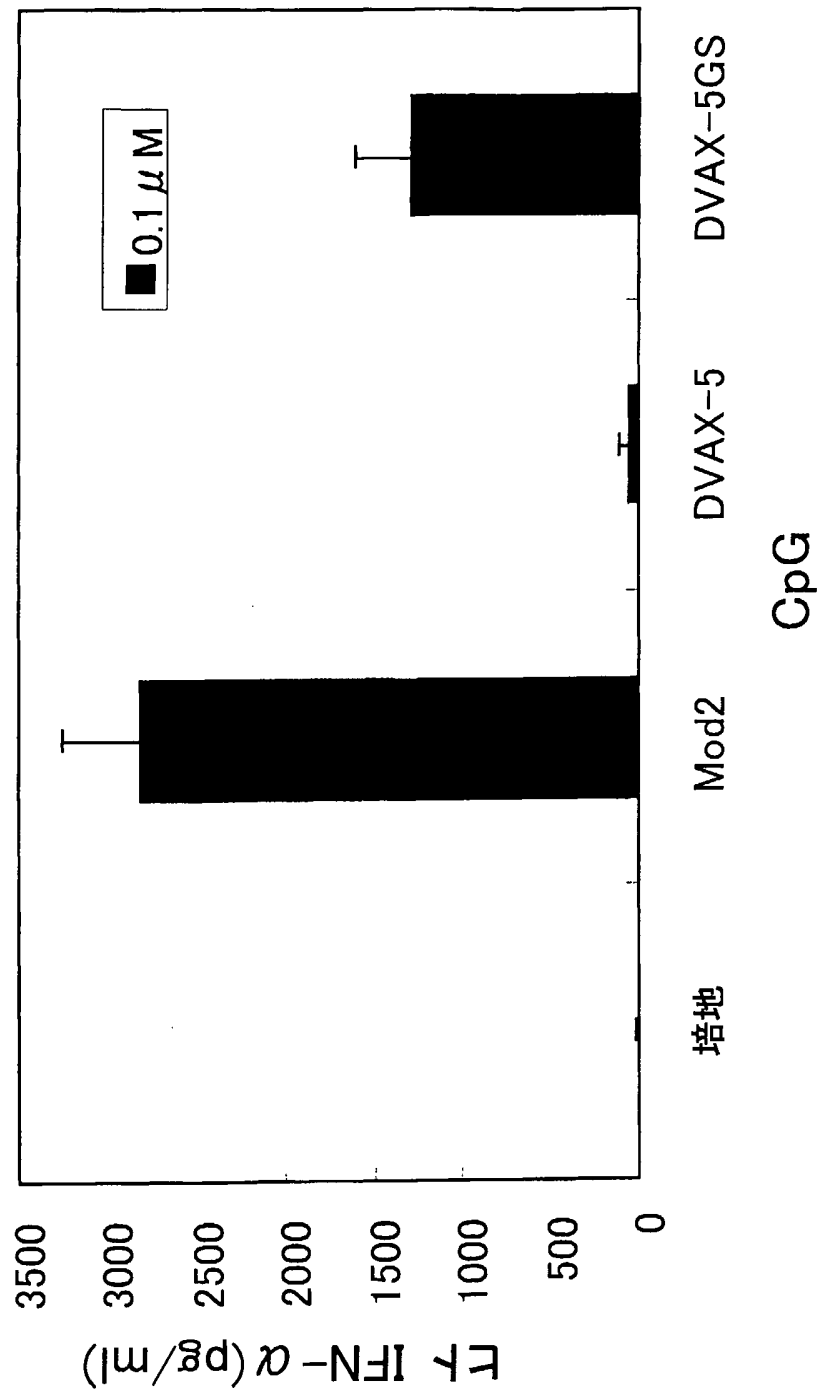
[図 5]



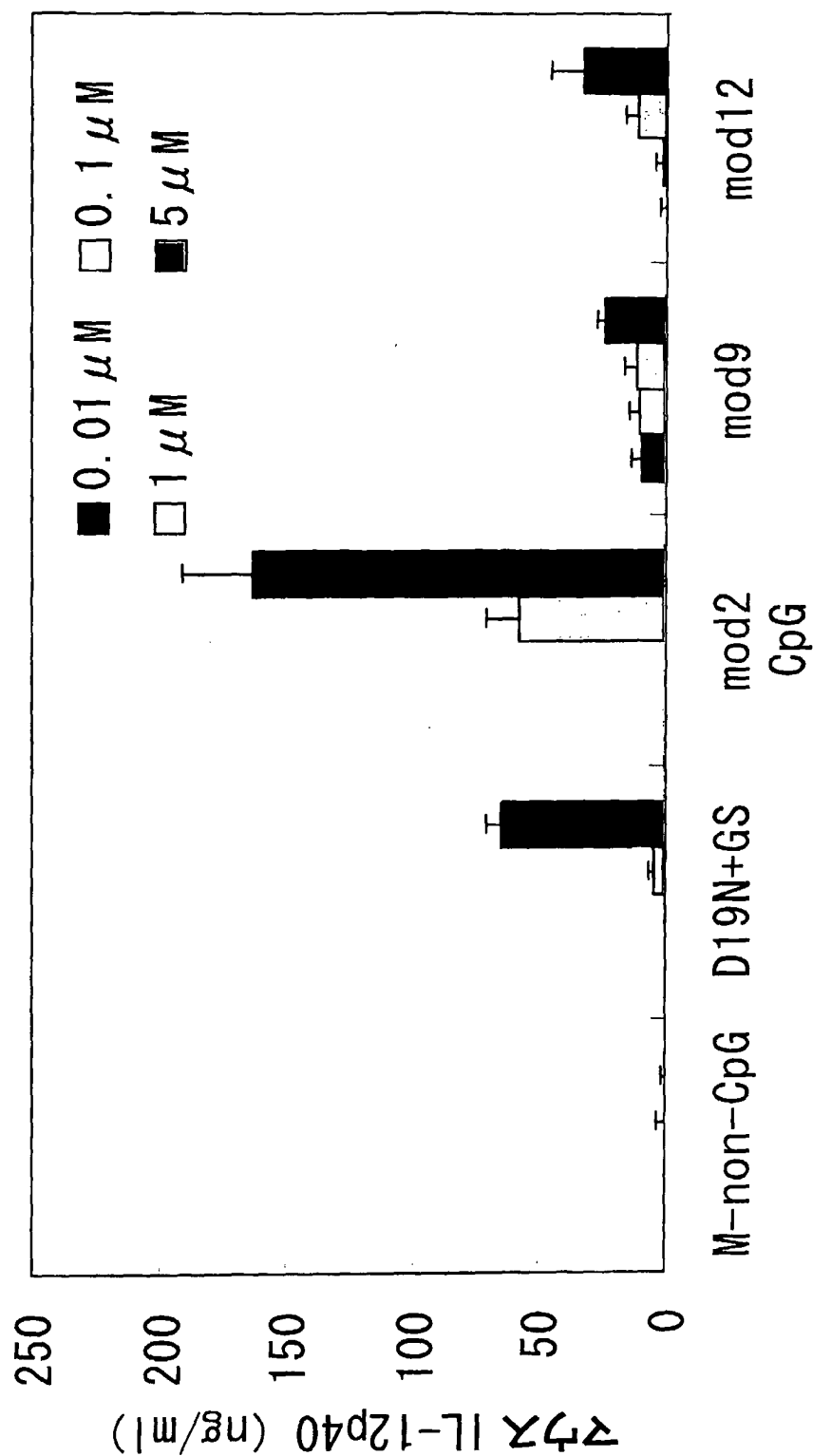
[図 6]

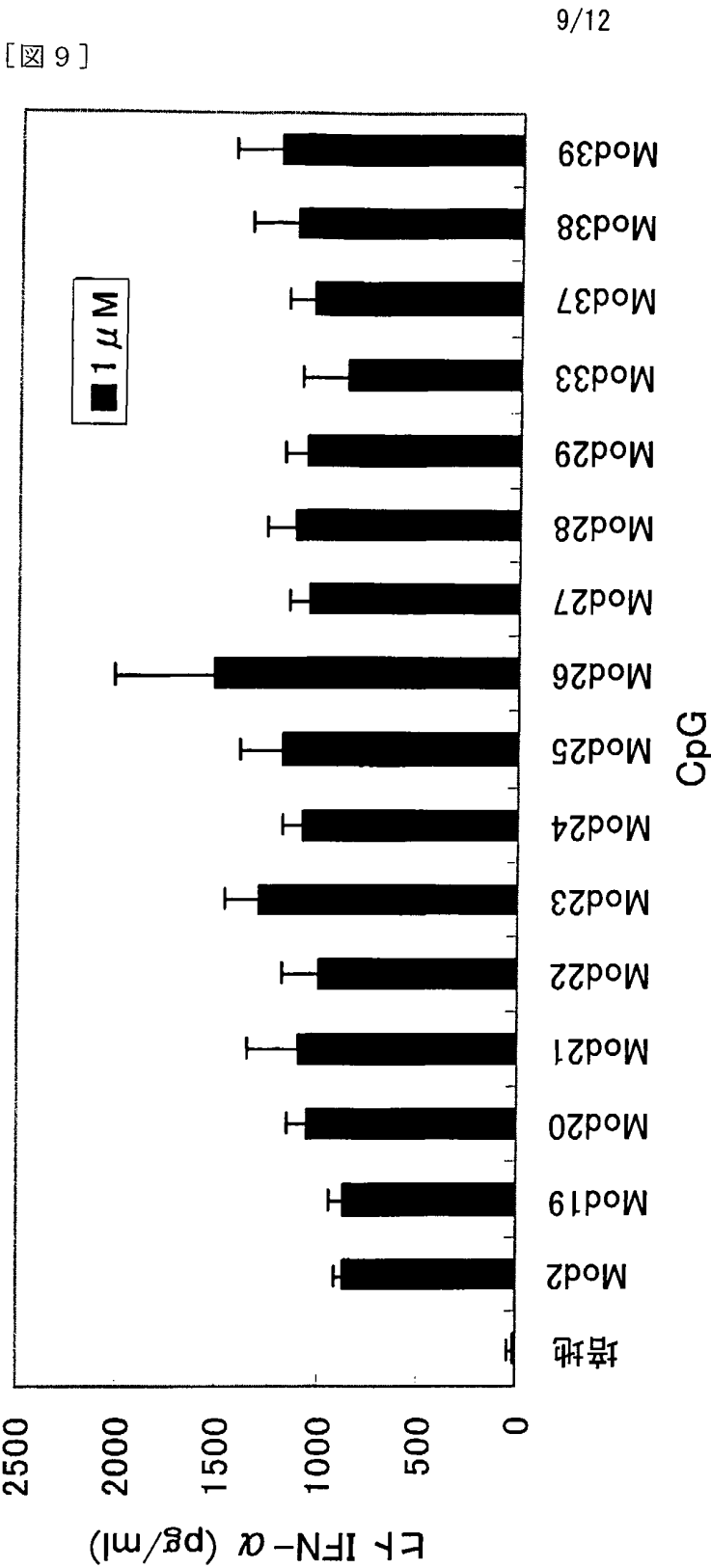


[図 7]



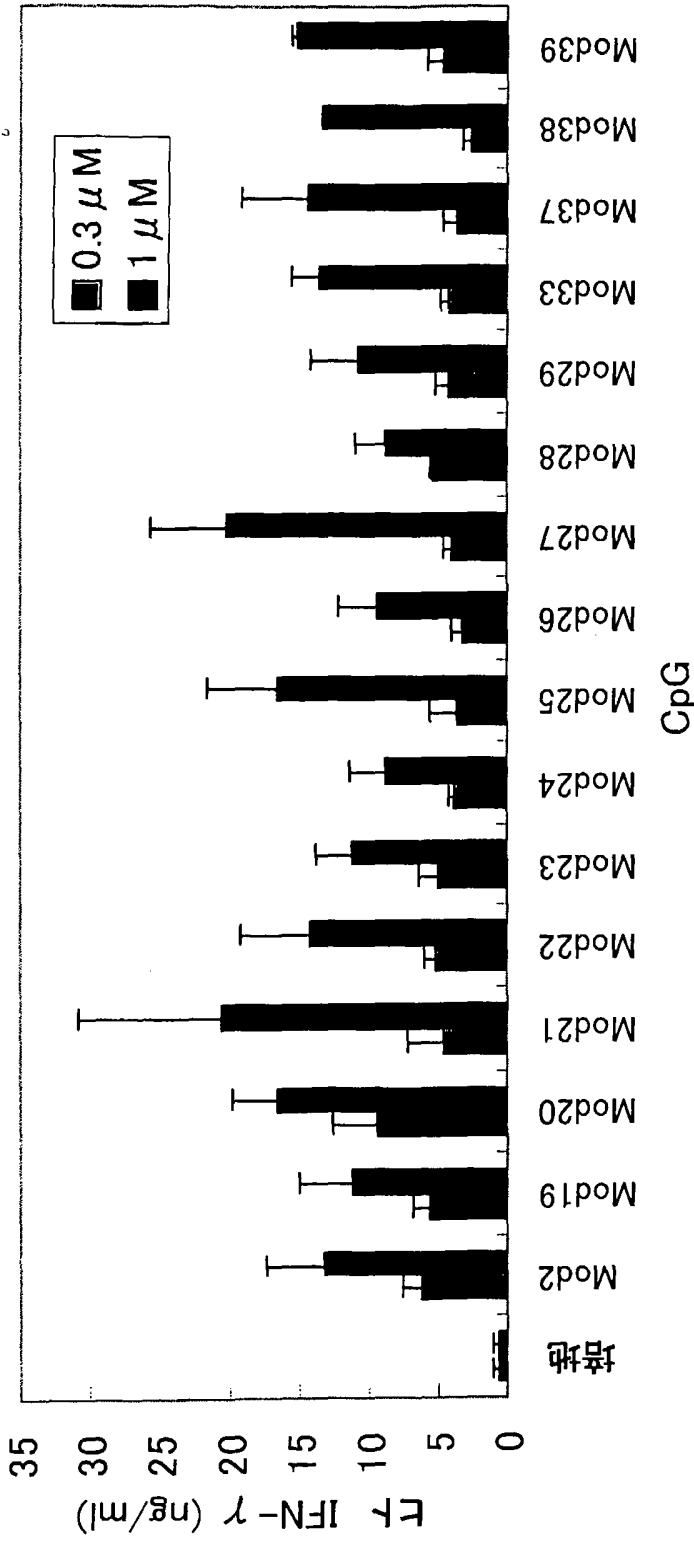
[図 8]



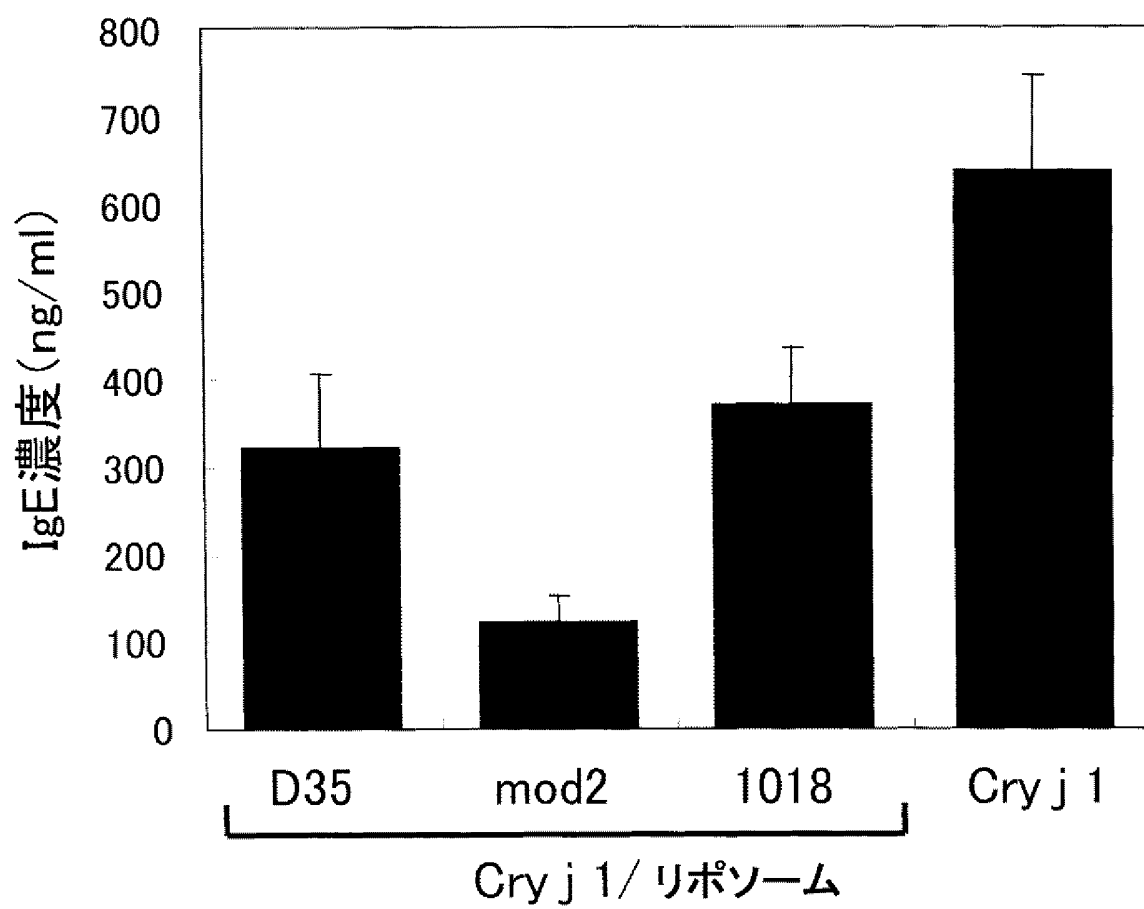


10/12

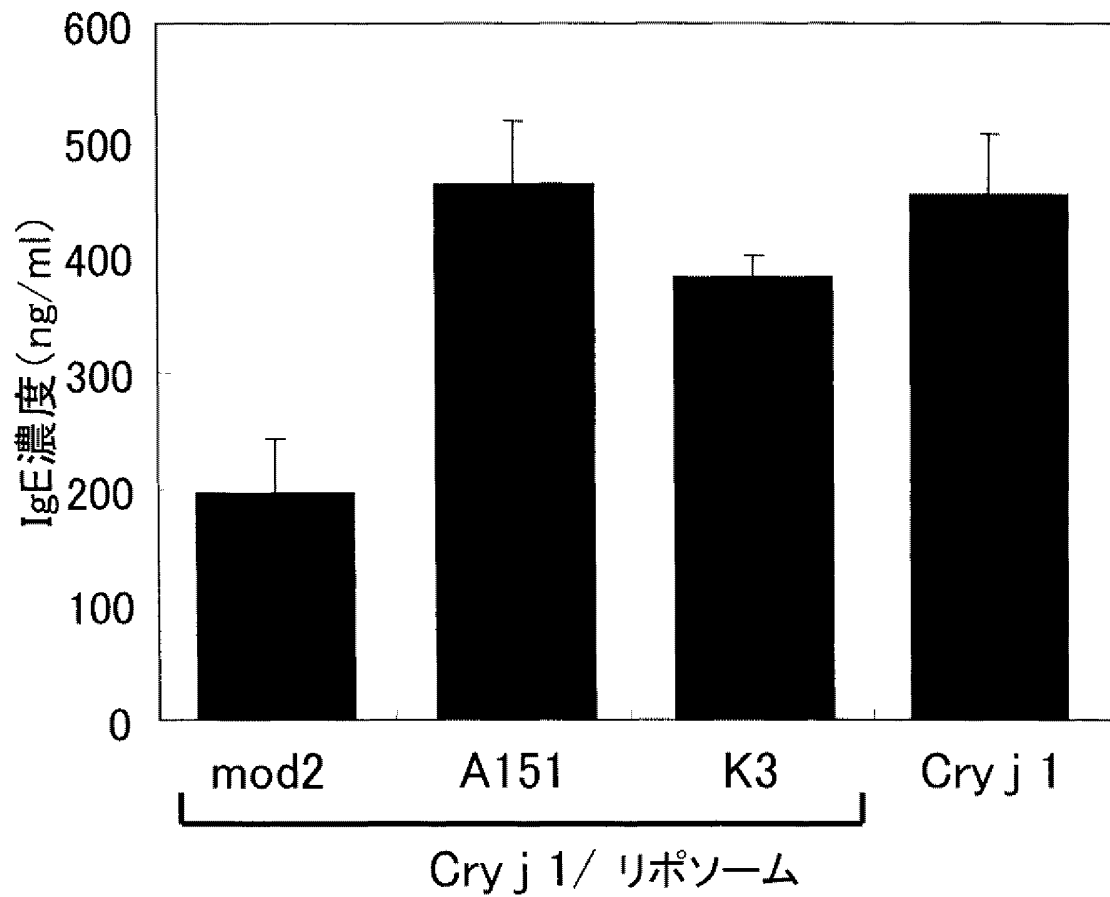
[図 10]



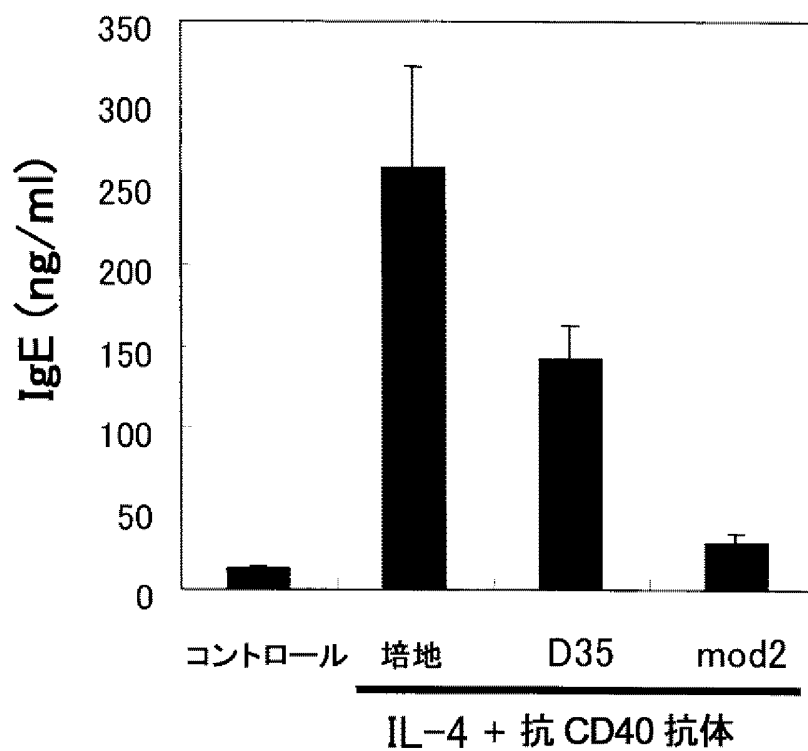
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H21/02 (2006.01), **A61K31/7088** (2006.01), **A61K9/127** (2006.01), **A61K31/7115** (2006.01), **A61K31/712** (2006.01), **A61K31/7125** (2006.01), **A61P31/00** (2006.01), **A61P31/04** (2006.01), **A61P31/10** (2006.01), **A61P31/12** (2006.01),

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)

C07H21/02 (2006.01), **A61K31/7088** (2006.01), **A61K9/127** (2006.01), **A61K31/7115** (2006.01), **A61K31/712** (2006.01), **A61K31/7125** (2006.01), **A61P31/00** (2006.01), **A61P31/04** (2006.01), **A61P31/10** (2006.01), **A61P31/12** (2006.01),

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho

Jitsuyo Shinan Toroku Koho

Kokai Jitsuyo Shinan Koho

Toroku Jitsuyo Shinan Koho

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2003-510290 A (Coley Pharmaceutical Group, Inc.), 18 March, 2003 (18.03.03), Particularly, sequence No.16, 35 & WO 01/22990 A2 & EP 1220684 A	1-12, 15/ 13-14, 18-19
Y	Meritet J.F. et al., Effect of oromucosal administration of IFN-alpha on allergic sensitization and the hypersensitive inflammatory response in animals sensitized to ragweed pollen. J. Interferon Cytokine Res., 2001, 21(8), p.583-93	13-14, 18-19
A	WO 2004/058179 A2 (DYNAVAX TECHNOLOGIES), 15 July, 2004 (15.07.04), Full text (Family: none)	1-15, 18-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 October, 2005 (26.10.05)

Date of mailing of the international search report
08 November, 2005 (08.11.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018148

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-500159 A (The Regents of the University of California), 08 January, 2002 (08.01.02), Full text & WO 99/11275 A2 & EP 1009413 A2 & US 6498148 B1 & US 2003/0092663 A1	1-15, 18-19
A	JP 2002-517156 A (DYNAVAX TECHNOLOGIES CORP.), 11 June, 2002 (11.06.02), Full text & WO 98/55495 A2 & EP 986572 A2 & EP 1374894 A2	1-15, 18-19
A	JP 2001-503267 A (University of Iowa Research Foundation), 13 March, 2001 (13.03.01), Full text & WO 98/18810 A1 & JP 2003-286174 A & JP 2004-41224 A & EP 948510 A1 & US 2004/0132685 A1 & US 2003/0050261 A1 & US 2004/0147468 A1 & US 2005/0032736 A1 & US 2005/0054602 A1 & US 2005/0059625 A1 & US 2005/0070491 A1 & US 2005/0123523 A1 & US 2005/0171047 A1	1-15, 18-19
A	JP 10-506265 A (University of Iowa Research Foundation), 23 June, 1998 (23.06.98), Full text & WO 96/02555 A1 & EP 772619 A1 & EP 1167377 A2 & EP 1167378 A2 & EP 1167379 A2 & JP 2003-144184 A & JP 2004-24261 A & JP 2004-43466 A & JP 2004-215670 A	1-15, 18-19
A	JP 4-352724 A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 07 December, 1992 (07.12.92), Full text & EP 468520 A	1-15, 18-19
A	Kimura Y. et al., Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN. J.Biochem., 1994, 116(5), p.991-4	1-15, 18-19
A	Verthelyi D. et al., Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. J.Immunol., 2001, 166(4), p.2372-7	1-15, 18-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018148

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61P33/02 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), A61P37/02 (2006.01), A61P37/04 (2006.01), A61P37/08 (2006.01), C12N15/11 (2006.01)

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

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

A61P33/02 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), A61P37/02 (2006.01), A61P37/04 (2006.01), A61P37/08 (2006.01), C12N15/11 (2006.01)

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018148

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 16-17

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 16 to 17 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. ⁷ C07H21/02 (2006.01), A61K31/7088 (2006.01), A61K9/127 (2006.01), A61K31/7115 (2006.01), A61K31/712 (2006.01), A61K31/7125 (2006.01), A61P31/00 (2006.01), A61P31/04 (2006.01), A61P31/10 (2006.01), A61P31/12 (2006.01), A61P33/02 (2006.01), A61P35/00 (2006.01) (特別ページに続く。)			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. ⁷ C07H21/02 (2006.01), A61K31/7088 (2006.01), A61K9/127 (2006.01), A61K31/7115 (2006.01), A61K31/712 (2006.01), A61K31/7125 (2006.01), A61P31/00 (2006.01), A61P31/04 (2006.01), A61P31/10 (2006.01), A61P31/12 (2006.01), A61P33/02 (2006.01), A61P35/00 (2006.01) (特別ページに続く。)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報		1922-1996年	
日本国公開実用新案公報		1971-2005年	
日本国実用新案登録公報		1996-2005年	
日本国登録実用新案公報		1994-2005年	
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/Y	JP 2003-510290 A (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) 2003.03.18 特に, 配列番号 16, 35 & WO 01/22990 A2 & EP 1220684 A	1-12, 15 /13-14, 18-19	
Y	Meritet J.F. et al., Effect of oromucosal administration of IFN-alpha on allergic sensitization and the hypersensitive inflammatory response in animals sensitized to ragweed pollen. J. Interferon Cytokine Res., 2001, 21(8), p. 583-93	13-14, 18-19	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 26.10.2005		国際調査報告の発送日 08.11.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 渡邊 潤也	4 B 3131
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2004/058179 A2 (DYNAVAX TECHNOLOGIES) 2004. 07. 15 全文(ファミリーなし)	1-15, 18-19
A	JP 2002-500159 A(ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア)2002. 01. 08 全文 & WO 99/11275 A2 & EP 1009413 A2 & US 6498148 B1 & US 2003/0092663 A1	1-15, 18-19
A	JP 2002-517156 A(ダイナバックス テクノロジーズ コーポレイシ ョン)2002. 06. 11 全文 & WO 98/55495 A2 & EP 986572 A2 & EP 1374894 A2	1-15, 18-19
A	JP 2001-503267 A(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)2001. 03. 13 全文 & WO 98/18810 A1 & JP 2003-286174 A & JP 2004-41224 A & EP 948510 A1 & US 2004/0132685 A1 & US 2003/0050261 A1 & US 2004/0147468 A1 & US 2005/0032736 A1 & US 2005/0054602 A1 & US 2005/0059625 A1 & US 2005/0070491 A1 & US 2005/0123523 A1 & US 2005/0171047 A1	1-15, 18-19
A	JP 10-506265 A(ザ 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)1998. 06. 23 全文 & WO 96/02555 A1 & EP 772619 A1 & EP 1167377 A2 & EP 1167378 A2 & EP 1167379 A2 & JP 2003-144184 A & JP 2004-24261 A & JP 2004-43466 A & JP 2004-215670 A	1-15, 18-19
A	JP 4-352724 A(三井東圧化学株式会社)1992. 12. 07 全文 & EP 468520 A	1-15, 18-19
A	Kimura Y. et al., Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN. J. Biochem., 1994, 116(5), p. 991-4	1-15, 18-19
A	Verthelyi D. et al., Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. J. Immunol., 2001, 166(4), p. 2372-7	1-15, 18-19

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT規則(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲16-17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲16-17は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

＜発明の属する分野の分類の続き＞

A61P37/02 (2006.01) , **A61P37/04** (2006.01), **A61P37/08** (2006.01) , **C12N15/11** (2006.01)

＜調査を行った最小限資料の続き＞

A61P37/02 (2006.01) , **A61P37/04** (2006.01), **A61P37/08** (2006.01) , **C12N15/11** (2006.01)