

(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2010-512421

(P2010-512421A)

(43) 公表日 平成22年4月22日(2010.4.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 31/7125 (2006.01)	A 61K 31/7125	4 B 02 4
C07H 21/04 (2006.01)	C 07H 21/04	Z 4 C 05 7
A61P 43/00 (2006.01)	A 61P 43/00	1 1 1 4 C 08 5
A61K 39/39 (2006.01)	A 61K 39/39	4 C 08 6
A61K 39/00 (2006.01)	A 61K 39/00	H

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-541545 (P2009-541545)	(71) 出願人	398032717 イデラ ファーマシューティカルズ イン コーポレイテッド I d e r a P h a r m a c e u t i c a l s , I n c . アメリカ合衆国O 2 1 3 9マサチューセッ ツ州ケンブリッジ、シドニー・ストリート 1 6 7 番
(86) (22) 出願日	平成19年12月12日 (2007.12.12)	(74) 代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
(85) 翻訳文提出日	平成21年8月11日 (2009.8.11)	(72) 発明者	カンディマラ, エカンバー, アール. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 1 1 7 2 、サウスバロ、キャンドルウッド レーン 6
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/087182		
(87) 國際公開番号	W02008/073959		
(87) 國際公開日	平成20年6月19日 (2008.6.19)		
(31) 優先権主張番号	60/869,604		
(32) 優先日	平成18年12月12日 (2006.12.12)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T L R 9 の合成アゴニスト

(57) 【要約】

本発明は、T L R 9 のアゴニストとしての相互作用を通して、特異な免疫反応プロファイルを個別に提供する、新規なオリゴヌクレオチドベースの化合物を提供する。本発明による T L R 9 アゴニストは、特異的でユニークな化学修飾を特徴とし、これによりその特徴的な免疫反応活性化プロファイルが提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 ~ 92 として表 I に示されるオリゴヌクレオチドを有する TLR9 アゴニストであって、ヌクレオシド間結合が、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、前記 TLR9 アゴニスト。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の TLR9 アゴニストを含み、さらに生理学的に許容し得る担体を含む、組成物。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の組成物を含み、さらに抗体を含む、ワクチン。

10

【請求項 4】

脊椎動物において TLR9 媒介性免疫反応を引き起こすための方法であって、脊椎動物に対し、請求項 1 に記載の TLR9 アゴニストの有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 5】

脊椎動物において TLR9 媒介性免疫反応を引き起こすための方法であって、脊椎動物に対し、請求項 2 に記載の組成物の有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 6】

疾病または疾患有する患者を治療的に処置するための方法であって、患者に対し、請求項 1 に記載の TLR9 アゴニストの治療有効量を投与することを含む、前記方法。

20

【請求項 7】

疾病または疾患有する患者を治療的に処置するための方法であって、患者に対し、請求項 2 に記載の組成物の治療有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 8】

疾病または疾患有する患者を治療的に処置するための方法であって、患者に対し、請求項 3 に記載のワクチンの治療有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 9】

疾病または疾患有かりやすい患者において該疾病または疾患有するための方法であって、患者に対し、請求項 1 に記載の TLR9 アゴニストの予防有効量を投与することを含む、前記方法。

30

【請求項 10】

疾病または疾患有かりやすい患者において該疾病または疾患有するための方法であって、患者に対し、請求項 2 に記載の組成物の予防有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 11】

疾病または疾患有かりやすい患者において該疾病または疾患有するための方法であって、患者に対し、請求項 3 に記載のワクチンの予防有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 12】

疾病または疾患が、癌、自己免疫疾患、気道炎症、炎症性疾患、感染症、アレルギー、ぜん息、および病原体により引き起こされる疾患有する群から選択される、請求項 4 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本出願は、出願日 2006 年 12 月 12 日の米国仮出願番号第 60/869,604 号の利益を主張し、その内容全体を本明細書に参照として組み入れる。

【0002】**発明の背景****発明の分野**

50

本発明は、トール様受容体（T L R）媒介性免疫反応の調整に有用な合成化学組成物に関する。特に、本発明は、ユニークなサイトカインおよびケモカインプロファイルを生成する、トール様受容体9（T L R 9）のアゴニストに関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

関連技術の概要

トール様受容体（T L R）は免疫系の多くの細胞に存在し、先天性免疫反応に関連することが示されている（Hornung, V. et al., (2002) *J. Immunol.* 168:4531-4537）。脊椎動物において、このファミリーはT L R 1 ~ T L R 11と呼ばれる11種のタンパク質からなり、それらは、細菌、真菌、寄生虫、およびウイルスからの病原体関連分子パターンを認識することが知られている（Poltorak, a. et al. (1998) *Science* 282:2085-2088 ; Underhill, D.M., et al. (1999) *Nature* 401:811-815 ; Hayashi, F. et. al (2001) *Nature* 410:1099-1103 ; Zhang, D. et al. (2004) *Science* 303:1522-1526 ; Meier, A. et al. (2003) *Cell. Microbiol.* 5:561-570 ; Campos, M.A. et al. (2001) *J. Immunol.* 167 : 416-423 ; Hoebe, K. et al. (2003) *Nature* 424: 743-748 ; Lund, J. (2003) *J. Exp. Med.* 198:513-520 ; Heil, F. et al. (2004) *Science* 303:1526-1529 ; Diebold, S.S., et al. (2004) *Science* 303:1529-1531 ; Hornung, V. et al. (2004) *J. Immunol.* 173:5935-5943）。

【0 0 0 4】

T L R は、哺乳類が異質分子を認識しそれに対する免疫反応を開始する鍵となる手段であり、また先天性免疫反応と適応的免疫反応を結びつける手段も提供する（Akira, S. et al. (2001) *Nature Immunol.* 2:675-680 ; Medzhitov, R. (2001) *Nature Rev. Immunol.* 1:135-145）。いくつかのT L R は細胞表面に存在し、細胞外の病原体を検出してこれに対する反応を開始し、他のT L R は細胞内に存在し、細胞内の病原体を検出してこれに対する反応を開始する。

【0 0 0 5】

T L R は、細菌D N A および合成オリゴヌクレオチド内の非メチル化C p G モチーフを認識することが知られている（Hemmi, H. et al. (2000) *Nature* 408:740-745）。C p G 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの他の修飾も、T L R 9 を介した免疫反応のモジュレーターとして作用するそれらの能力に、影響を及ぼし得る（例えば、Zhao et al ., *Biochem. Pharmacol.* (1996) 51:173-182 ; Zhao et al. (1996) *Biochem Pharmacol.* 52:1537-1544 ; Zhao et al. (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:495-502 ; Zhao et al (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:3453-3458 ; Zhao et al. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 2585-2588 ; Yu, D. et al. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:2263-2267 ; およびKandimalla, E. et al. (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813を参照のこと）。天然に存在するT L R 9 のアゴニストは、抗腫瘍活性（例えば腫瘍増殖および血管形成）を產生し、効果的な抗癌反応（例えば抗白血病）をもたらすことが示されている（Smith, J.B. and Wickstrom, E. (1998) *J. Natl. Cancer Inst.* 90:1146-1154）。さらに、T L R 9 アゴニストは、他の既知の抗腫瘍化合物（例えばセツキシマブ、イリノテカン）と相乗的に作用することが示されている（Vincenzo, D., et al. (2006) *Clin. Cancer Res.* 12(1):577-583）。

【0 0 0 6】

あるT L R 9 アゴニストは、コアC p R ジヌクレオチドを含有する3' - 3' 結合D N A 構造から構成され、ここでR は修飾グアノシン（米国特許出願第10/279,684号）である。さらに、特定の化学修飾が、免疫反応の特異な調整をもたらす特定のオリゴヌクレオチド類似体（analogue）の調製を可能とする。特に、構造活性関連研究により、免疫反応の特異的調整を誘発する合成モチーフおよび新規なD N A ベースの化合物の同定が可能となり、これらの調整は、非メチル化C p G ジヌクレオチドにより引き起こされるものとは異なる。（Kandimalla, E. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102:6925-6930. 50

Kandimalla, E. et al. (2003) Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 100:14303-14308 ; Cong, Y. et al. (2003) Biochem Biophys Res. Commun. 310:1133-1139 ; Kandimalla, E. et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 306:948-953 ; Kandimalla, E. et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2393-2400 ; Yu, D. et al. (2003) Bioorg. Med. Chem. 11:459-464 ; Bhagat, L. et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 300:853-861 ; Yu, D. et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30:4460-4469 ; Yu, D. et al. (2002) J. Med. Chem. 45:4540-4548. Yu, D. et al. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 297:83-90 ; Kandimalla, E. et al. (2002) Bioconjug. Chem. 13:966-974 ; Yu, D. et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30:1613-1619 ; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:2803-2808 ; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2263-2267 ; Kandimalla, E. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813 ; Yu, D. et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:2585-2588 ; Putta, M. et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34:3231-3238)。 10

【0007】

本発明者らは、驚くべきことに、コア CpR ジヌクレオチドに隣接する配列へのユニークな修飾が、*in vitro* および *in vivo* で特異なサイトカインおよびケモカインプロファイルを生成する、新規な TLR9 アゴニストを產生することを発見した。CpR 含有オリゴヌクレオチドに対するサイトカインおよびケモカイン反応を「カスタム調整」するこの能力は、種々の疾病状態を、疾病特異的かつさらに患者特異的な様式で、予防および / または処置する能力の提供を約束する。したがって、かかるカスタム調整された反応を提供する、新規なオリゴヌクレオチド類似体化合物に対する必要性が存在する。 20

【発明の概要】

【0008】

発明の概要

本発明は、TLR9 のアゴニストとしての相互作用を通して、特異な免疫反応プロファイルを個別に提供する、新規なオリゴヌクレオチドベースの化合物を提供する。本発明による TLR9 アゴニストは、特異的でユニークな化学修飾を特徴とし、これによりその特徴的な免疫反応活性化プロファイルが提供される。

本発明による TLR9 アゴニストは、種々の細胞型において、ならびに種々の *in vitro* および *in vivo* 実験モデルにおいて免疫反応を誘発し、各アゴニストは特異な免疫反応プロファイルを提供する。そのためこれらは、免疫系の研究のため、またヒトおよびマウスなどの種々の動物種の免疫系を比較するためのツールとして有用である。本発明による TLR9 アゴニストはまた、種々の疾病的予防および / または処置において、それのみで、他の薬剤と組み合わせて、またはワクチンとして用いる抗体用のアジュバントとして、有用である。 30

したがって、第 1 の側面において、本発明は、オリゴヌクレオチドベースの TLR9 のアゴニストを提供する。

第 2 の側面において、本発明は、本発明によるオリゴヌクレオチドベースの TLR9 アゴニスト（「化合物」）および生理学的に許容し得る担体を含む、組成物を提供する。

【0009】

第 3 の側面において、本発明はワクチンを提供する。この側面によるワクチンは、本発明による組成物を含み、さらに抗体を含む。 40

第 4 の側面において、本発明は、脊椎動物において TLR9 媒介性免疫反応を引き起こすための方法を提供し、かかる方法は、脊椎動物に対し、本発明による化合物、組成物またはワクチンを投与することを含む。

第 5 の側面において、本発明は、疾病または疾患を有する患者を治療的に処置するための方法を提供し、かかる方法は、患者に対し、本発明による化合物、組成物またはワクチンを投与することを含む。

第 6 の側面において、本発明は、疾病または疾患を防ぐための方法を提供し、かかる方法は、患者に対し、本発明による化合物、組成物またはワクチンを投与することを含む。

【0010】

50

20

30

40

50

好ましい態様の詳細な説明

本発明は、T L R 9 のアゴニストとしての相互作用を通して、特異な免疫反応プロファイルを個別に提供する、新規なオリゴヌクレオチドベースの化合物を提供する。本発明によるT L R 9 アゴニストは、ユニークな化学修飾を特徴とし、これによりその特徴的な免疫反応活性化プロファイルが提供される。本明細書に引用された全ての刊行物は、当業者のレベルを反映しており、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。これら参考文献と本明細書との間のいかなる不一致も、後者を支持するように解決されるべきである。

本発明によるT L R 9 アゴニストは、種々の細胞型において、ならびに種々のin vitroおよびin vivo実験モデルにおいて免疫反応を誘発し、各アゴニストは特異な免疫反応プロファイルを提供する。そのためこれらは、免疫系の研究のため、またヒトおよびマウスなどの種々の動物種の免疫系を比較するためのツールとして有用である。本発明によるT L R 9 アゴニストはまた、種々の疾病的予防および/または処置において、それのみで、他の薬剤と組み合わせて、またはワクチンとして用いる抗体用のアジュバントとして、有用である。

10

【0011】

本発明によるいくつかのT L R 9 アゴニストを、下の表Iに示す。この表において、オリゴヌクレオチドベースのT L R 9 アゴニストは全て、別に指示のある場合を除き、ホスホロチオエート(PS)結合を有する。別に指示のある場合を除き、全てのヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドである。しかし当業者は、ホスホジエステル(PO)結合、またはPS結合とPO結合の組み合わせも用いることができることを、認識する。

20

【0012】

【表1】

表I

配列番号 /オリゴ番号	配列および修飾
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'
3	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'
6	5'-TAGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CGTAT-5'
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCCTG ₁ CTGGT-5'
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGCT-5'
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X-G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'

30

【0013】

【表2】

12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X-G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'	
14	5'-TCAGACG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CAGACT-5'	
15	5'-TCTGACG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CAGTCT-5'	
16	5'-CAGACG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CAGAC-5'	
17	5'-TCTGACG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CAGTCT-5'	
18	5'-TCTGACGTTGT-X-TGTTG ₁ CAGTCT-5'	10
19	5'-TAGACG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CAGAT-5'	
20	5'-TGGACG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CAGGT-5'	
21	5'-TAGACGTTGTA-X-ATGTTG ₁ CAGAT-5'	
22	5'-TAGACG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CAGAT-5'	
23	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	
29	5'-TAGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CGTAT-5'	
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	20
31	5'-TAGTCG ₂ TGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	
37	5'-TCTGTCGTTCT-Y-TCTTGCTGTCT-5'	
38	5'-TCTGACG ₁ TTCT-Y-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	
39	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -Y-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	
40	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-Y-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	30
41	5'-TCAGTC ₁ GTTAG-Y-GATTGC ₁ TGACT-5'	
42	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-Y-TCTTG ₁ TGTCT-5'	
43	5'-TCGTTGL-Y-LGTTGCT-5'	
44	5'-TCGTTGM-Y-MGTTGCT-5'	
45	5'-TCG ₁ TTGM-Y-MGTTG ₁ CT-5'	
46	5'-TCGTTGM-X-MGTTGCT-5'	
47	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -M-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	
48	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -M-GACAG ₁ CTGTCT-5'	
49	[(5'-TCTGACG ₁ TTCT) ₂ Y] ₂ Y	
50	5'-TCTGTCG ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ CTGTCT-5'	40
51	5'-TCTGACG ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ CAGTCT-5'	
52	5'-TCTGTC ₁ G ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ C ₁ TGTCT-5'	
53	5'-TCTGACGTTCT-Z-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	
54	5'-TCTGACG ₁ TTCT-Z-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	
55	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-Z-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	
56	5'-TCTGACG ₁ TTCT-S-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	

【表3】

57	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-S-TCTTG ₁ CTGTCT-5'
58	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -S-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'
59	5'-TCAGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGACT-5'
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>o</u> -X- <u>o</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'
61	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>o</u> -X- <u>o</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'
62	5'-TCTGTCG ₂ TTCU-X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'
63	5'-CTGTCG ₂ TTCUC-X-CU <u>CTTG₂</u> CTGTC-5'
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X-G <u>CTTG₁</u> CAAG ₁ CT-5'
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG-L-G<u>ACAG₁</u>CTGTCT-5'</u>
66	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>o</u> -X- <u>o</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'
67	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>o</u> -X- <u>o</u> U <u>o</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'
68	5'-TCTGTCG ₂ TTCU-X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'
69	5'-CTGTCG ₂ TTCUC-X-CU <u>CTTG₂</u> CTGCTC-5'
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X-G <u>CTTG₁</u> CAAG ₁ CT-5'
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG-L-G<u>ACAG₁</u>CTGTCT-5'</u>
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'
73	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>AC</u> -X-CATTG ₁ CTGACT-5'
76	5'-TCAoGToCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CoTGoACT-5'
77	5'- <u>U</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACU-5'
78	5'-TCAGTCG ₁ TTAoC-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ CoTGTAT-5'
80	5'-TCTGToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'
81	5'-TAGoToCG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ CoToGTAT-5'
82	5'-TCG ₂ oToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'
83	5'-TCG ₂ AoToCG ₂ AoTCG ₂ -X-G ₂ CToAoG ₂ CoToAG ₂ CT-5'
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'
85	5'-TCT'GoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'
87	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'
91	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'

G_1 =7-デアザ-dG; G_2 =AraG; G_3 = N^1 -Me-dG; C_1 =1-(2'-デオキシ- β -D-リボフラハル)-2-オキソ-7-デアザ-8-メチル-プリン; U/C/G/A=2'-O-メチルリボヌクレオチド; o =ホスホジエステル結合; X=グリセロール; Y=1,3,5-ペンタントリオール; L=1,3-プロパンジオール; M=1,5-ペンタンジオール; Z=cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリオール; S=3-Me-1,3,5-ペンタントリオール

10

20

30

40

【0015】

表Iからの例示のTLR9アゴニストを、例2の記載のようにして、TLR9を発現するHEK293細胞において免疫刺激活性について試験した。下の表II(a)、II(b)、II(c)およびII(d)は、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、投与後24時間においてそれらのTLR9媒介性NF-B活性化プロファイルを変化させることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、NF-B活性化を増加または減少できることを示す。

【0016】

50

【表4】

表II(a): TLR9を発現するHEK293細胞におけるNF- κ B活性化プロファイル

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでの NF- κ B活性の 倍数変化 \pm SD
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	13.94 \pm 0.33
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	6.76 \pm 0.12
3	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	10.45 \pm 0.13
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	7.84 \pm 0.02
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	9.45 \pm 1.31
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTG ₁ CGTAT-5'	6.95 \pm 0.05
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	5.02 \pm 0.13
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	2.75 \pm 0.46
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	12.59 \pm 0.26
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	13.24 \pm 1.58
14	5'-TCAGACG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CAGACT-5'	14.32 \pm 0.19
15	5'-TCTGACG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CAGTCT-5'	12.19 \pm 0.94
16	5'-CAGACG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CAGAC-5'	16.42 \pm 0.44
17	5'-TCTGACG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CAGTCT-5'	16.49 \pm 1.13
18	5'-TCTGACG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CAGTCT-5'	14.63 \pm 0.03
19	5'-TAGACG ₁ TTTTT-X-TTTTG ₁ CAGAT-5'	16.06 \pm 0.71
20	5'-TGGACG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CAGGT-5'	13.28 \pm 0.42
21	5'-TAGACG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CAGAT-5'	11.75 \pm 0.42
22	5'-TAGACG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CAGAT-5'	13.70 \pm 0.21
培地		1 \pm 0.07

10

20

30

40

【0017】

【表5】

表 II(b): TLR9を発現するHEK293細胞におけるNF- κ B活性化プロファイル

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでの NF- κ B活性の 倍数変化 \pm SD
37	5'-TCTGTCGTTCT-Y-TCTTGCTGTCT-5'	11.35
38	5'-TCTGACG ₁ TTCT-Y-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	11.51
50	5'-TCTGTCG ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ CTGTCT-5'	12.32
52	5'-TCTGTCG ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ CTGTCT-5'	9.40
57	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-S-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	11.05
	PBS	1.00

10

20

30

【0018】

【表6】

表 II(c): TLR9を発現するHEK293細胞におけるNF- κ B活性化プロファイル

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでの NF- κ B活性の 倍数変化 \pm SD
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Uo</u> -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	11.2 \pm 0.06
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>Co</u> <u>Uo</u> -X-o <u>Uo</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	9.5 \pm 0.06
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	6.6 \pm 0.04
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTC-5'	14.6 \pm 0.09
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	32.1 \pm 0.6
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	23.7 \pm 0.2
PBS		1 \pm 0.03

【0019】

【表7】

表II(d): TLR9を発現するHEK293細胞におけるNF- κ B活性化プロファイル

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでの NF- κ B活性の 倍数変化 \pm SD
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	3.81 \pm 0.14
73	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	5.47 \pm 0.17
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	9.46 \pm 1.35; 9.18 \pm 0.09
75	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	5.08 \pm 0.58; 6.91 \pm 1.52
77	5'-UCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACU-5'	5.33 \pm 0.25; 4.85 \pm 0.46
78	5'-TCAGTCG ₁ TTAoC-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	7.63 \pm 0.54; 10.79 \pm 0.9
79	5'-TAGToCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CoTGTAT-5'	5.63 \pm 1.46; 5.75 \pm 0.45
80	5'-TCTGToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	9.60 \pm 1.39; 9.75 \pm 0.25
81	5'-TAGoToCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CoToGTAT-5'	5.63 \pm 0.46; 6.22 \pm 0.12
82	5'-TCG ₂ oToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	9.71 \pm 0.75; 12.59 \pm 0.3
83	5'-TCG ₂ AoToCG ₂ oAoTCG ₂ -X-G ₂ CToAoG ₂ CoToAG ₂ CT-5'	7.24 \pm 0.42
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	8.92 \pm 0.88; 10.33 \pm 0.2; 12.16 \pm 1.5
85	5'-TCTGToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	9.13 \pm 1.25; 8.05 \pm 0.39; 11.34 \pm 0.3
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	11.61 \pm 0.6
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	9.61 \pm 0.14; 9.32 \pm 0.20
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	2.57 \pm 0.28
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	9.65 \pm 1.78; 9.57 \pm 0.18
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	5.67 \pm 0.25; 7.25 \pm 1.23
培地		1.0 \pm 0.17; 1 \pm 0.25; 1.0 \pm 0.02; 1.0 \pm 0.11

10

20

30

40

【0020】

表Iからの例示のTLR9アゴニストを、例3の記載のようにして、C57BL/6マウス脾臓細胞IL-12アッセイにおいて免疫刺激活性について試験した。下の表II (a)、II (b) およびII (c) に示す結果は、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、投与後24時間の脾臓細胞におけるTLR9媒介性IL-12活性化プロファイルを変化させること、および、この活性化プロファイルは、化学修飾に依存して用量依存性となり得ることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、IL-12活性化を増加または減少できることを示す。

50

【0021】

【表8】

表 III(a): C57BL/6マウス脾臓細胞培養物におけるIL-12分泌の誘発

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	IL-12 (pg/m ₊ SD)	
		1 μg/mlにて	3 μg/mlにて
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	733±5	638±14
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	919±8	660±8
3	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	500±26	634±49
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	822±9	516±7
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	636±6	369±4
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTG ₁ CGTAT-5'	857±0	115±0
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	61±0	357±16
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	253±10	120±13
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	743±33	553±12
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	714±0	913±12
14	5'-TCAGACG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CAGACT-5'	1654±64	1592±27
15	5'-TCTGACG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CAGTCT-5'	1299±2	1257±8
16	5'-CAGACG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CAGAC-5'	1152±11	1134±0
17	5'-TCTGACG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CAGTCT-5'	1370±4	1015±7
18	5'-TCTGACG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CAGTCT-5'	1140±16	816±4
19	5'-TAGACG ₁ TTTTT-X-TTTTG ₁ CAGAT-5'	1215±32	719±3
20	5'-TGGACG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CAGGT-5'	814±9	645±40
21	5'-TAGACG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CAGAT-5'	835±34	750±16
22	5'-TAGACG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CAGAT-5'	1211±26	898±24
培地		154±1	154±1

10

20

30

40

【0022】

【表9】

表 III(b): C57BL/6マウス脾臓細胞培養物におけるIL-12分泌の誘発

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	IL-12 (pg/ml±SD)	
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	932±18	892±2
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	771±6	604±6
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	835±4	905±4
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	571±11	502±2
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	567±0	698±77
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ CGTAT-5'	975±24	656±33
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTT G ₂ CTGGT-5'	426±16	393±1
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	568±23	575±14
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	960±2	647±13
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	659±10	1014±1
34	5'-TC G ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	1044±66	1109±32
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	1406±36	968±4
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	912±3	1035±11
培地		190±4	

10

20

30

【0023】

【表10】

表 III(c): C57BL/6マウス脾臓細胞培養物におけるIL-12分泌の誘発

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	IL-12 (pg/ml±SD)
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	988±224
73	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	504±76
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	906±47
75	5'-TCAGTCG ₁ <u>TTAC</u> -X-CATTG ₁ CTGACT-5'	473±67
77	5'- <u>UC</u> AGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>U</u> -5'	265±19
78	5'-TCAGTCG ₁ TTAoC-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	833±63
79	5'-TAGToCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CoTGTAT-5'	380±54
80	5'-TCTGToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	1502±162
81	5'-TAGoToCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CoToGTAT-5'	370±47
82	5'-TCG ₂ oToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	1599±156
83	5'-TCG ₂ AoToCG ₂ oAoTCG ₂ -X-G ₂ CToAoG ₂ CoToAG ₂ CT-5'	1203±109
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	838±61
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	589±45
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1603±167
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1643±40
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	450±50
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1393±9
92	5'- <u>TC</u> AGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	383±23
培地		82±4, 168±15

10

20

30

40

【0024】

表 I からの例示の TLR9 アゴニストを、例 3 の記載のようにして、C57BL/6マウス脾臓細胞 IL-6 アッセイにおいて免疫刺激活性について試験した。下の表 IV (a)、IV (b) および IV (c) に示す結果は、3' - 3' 結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、投与後 24 時間の脾臓細胞における TLR9 媒介性 IL-6 活性化プロファイルを変化させること、および、この活性化プロファイルは、化学修飾に依存して用量依存性となり得ることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3' - 3' 結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、IL-6 活性化を増加または減少できることを示す。

【0025】

【表11】

表 IV(a): C57BL/6マウス脾臓細胞培養物におけるIL-6分泌の誘発

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	IL-6 (pg/ml±SD)	
		1 µg/mlにて	3 µg/mlにて
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	2436±93	6282±138
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	1812±95	5758±55
3	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	1650±63	3349±46
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	707±59	7018±3
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	1302±56	5874±83
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTG ₁ CGTAT-5'	1025±93	1677±12
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	453±8	3068±3
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	914±74	1147±30
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	3570±21	12114±86
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	77±0	1657±17
14	5'-TCAGACG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CAGACT-5'	2605±15	7206±16
15	5'-TCTGACG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CAGTCT-5'	1705±28	6538±63
16	5'-CAGACG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CAGAC-5'	1081±20	3765±18
17	5'-TCTGACG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CAGTCT-5'	1711±32	8386±33
18	5'-TCTGACG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CAGTCT-5'	1725±0	7340±142
19	5'-TAGACG ₁ TTTTT-X-TTTTG ₁ CAGAT-5'	984±16	3312±22
20	5'-TGGACG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CAGGT-5'	515±77	1828±22
21	5'-TAGACG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CAGAT-5'	221±5	1539±9
22	5'-TAGACG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CAGAT-5'	1593±19	6960±81
培地		0±0	0±0

10

20

30

40

【0026】

【表12】

表IV(b): C57BL/6マウス脾臓細胞培養物におけるIL-6分泌の誘発(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾(5'-3')	IL-6 (pg/ml±SD)	
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	8276±35	11634±83
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	5428±106	11860±154
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	6389±15	12402±77
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	3977±89	8058±46
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	4333±59	10555±49
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ CGTAT-5'	3380±24	9348±90
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	2452±45	4028±15
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	2574±45	6426±40
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	6432±4	10872±413
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	6136±24	10408±7
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	7840±61	15642±56
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	8004±141	15174±54
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	5590±259	14788±441
培地		346±0	

10

20

30

【0027】

【表13】

表IV(c): C57BL/6マウス脾臓細胞培養物におけるIL-6分泌の誘発(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾(5'-3')	IL-6 (pg/ml±SD)
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	8388±1609
73	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	4198±1602
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	18828±1448
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>AC</u> -X-CATTG ₁ CTGACT-5'	3689±109
77	5'- <u>UC</u> AGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACU-5'	91±12
78	5'-TCAGTCG ₁ TTAoC-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	22047±8443
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ CoTGTAT-5'	1234±508
80	5'-TCTGToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	14025±369
81	5'-TAGoToCG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ CoToGTAT-5'	373±61
82	5'-TCG ₂ oToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	86355±4638
83	5'-TCG ₂ AoToCG ₂ oAoTCG ₂ -X-G ₂ CToAoG ₂ CoToAG ₂ CT-5'	10871±1996
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	30346±1670
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	113±11
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	15654±470
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	16317±659
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	1259±215
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	13864±344
92	5'- <u>TC</u> AGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	2171±186
培地		51±3; 60±1

10

20

30

40

【0028】

表Iからの例示のTLR9アゴニストを、例4の記載のようにして、ヒトB細胞増殖アッセイにおいて免疫刺激活性について試験した。下の表V(a)、V(b)、V(c)、V(d)およびV(e)に示す結果は、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、TLR9媒介性B細胞増殖活性を変化させること、および、この活性化プロファイルは、化学修飾に依存して用量依存性となり得ることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、B細胞増殖を調節できることを示す。

【0029】

【表14】

V(a): ヒトB細胞増殖アッセイ

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	[³ H]-T (cpm+SD)	
		1 μg/ml にて	3 μg/ml にて
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	9170±5038	7556±3260
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	9907±4299	9405±3319
3	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	7594±4088	7094±1526
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	13130±6721	12343±4336
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	11990±5511	12102±5618
6	5'-TAGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CGTAT-5'	13676±3676	14223±6073
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	7286±2800	7007±1424
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	7858±2877	8757±3733
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	7834±2397	6840±2158
培地		559±355	559±355

10

20

【0030】

【表15】

表V(b): ヒトB細胞増殖アッセイ

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	[³ H]-T (cpm±SD)	
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	12015±2721	22634±7474
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	12033±1502	28048±14380
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	8738±2957	23675±11455
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	17623±4158	24309±7340
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	13631±1735	18438±3212
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ CGTAT-5'	12051±5367	19867±9831
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	17206±8474	18061±9703
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	21600±10694	22746±13411
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	15827±8603	26722±16455
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	19269±14059	21945±11281
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X- G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	11228±4499	17990±7547
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X- TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	13364±2570	22787±3265
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X- G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	14071±3313	31519±2373
培地		634±166	

10

20

30

【0031】

【表16】

表V(c): ヒトB細胞増殖アッセイ

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	[³ H]-T (cpm±SD)	
38	5'-TCTGACG ₁ TTCT-Y-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	4714±1043	4535±1269
39	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -Y-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	3664±219	7556±1615
40	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-Y-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	4346±453	6093±2052
41	5'-TCAGTCGTTAG-Y-GATTGCTGACT-5'	3585±495	4371±1380
42	5'-TCTGTCGTTCT-Y-TCTTGCTGTCT-5'	5607±1163	5202±1980
43	5'-TCGTTGL-Y-LGTTGCT-5'	3302±359	4767±737
47	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -M-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	6010±1951	6469±3332
48	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -M-GACAG ₁ CTGTCT-5'	3507±768	4351±2101
	PBS	545±237	

10

20

【0032】

【表17】

表V(d): ヒトB細胞増殖アッセイ

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	1 µg/mlでの 増殖指数
60	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> _o -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	28.4
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> _o <u>U</u> _o -X-o <u>U</u> _o CTTG ₁ CTGTCT-5'	31.3
62	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>C</u> _o -X-U <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	42.6
63	5'-CTGTCG ₂ TT <u>C</u> _o <u>U</u> _o -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTC-5'	41.5
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> _o -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	45.6
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	23.8
培地		1

30

40

【0033】

【表18】

表V(e): ヒトB細胞増殖アッセイ

配列番号/ オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	1 µg/mlでの 増殖指数
66	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Uo</u> -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	13582±1296
67	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Co</u> <u>Uo</u> -X-o <u>Uo</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	19250±1860
68	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	24809±3983
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	21125±2056
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	20306±6796
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> ₁ -L- <u>GACAG</u> ₁ CTGTCT-5'	11547±631
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	16603±2124
73	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	9787±1290
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	16934±2628
80	5'-TCTGToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	16347±980; 18093±3142
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	14546±2616
85	5'-TCTGToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	10051±1376
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	18297±1246
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	12128±2106; 16534±1037
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	10749±1191
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	11357±692; 22666±54
91	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	
培地		621±215

10

20

30

40

【0034】

表Iからの例示のTLR9アゴニストを、例3の記載のようにして、IL-1R₊、IL-6、IL-10およびIL-12についてのヒトPBM_CおよびB細胞アッセイにおいて、免疫刺激活性について試験した。下の表VI(a)、VI(b)、VI(c)、VI(d)、VI(e)、VI(f)、VI(g)、およびVI(h)に示す結果は、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、ヒトPBM_CにおいてこれらのTLR9媒介性IL-1R₊、IL-6、IL-10および/またはIL-12活性化プロファイルを変化させることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、IL-1R₊、IL-6、IL-10およびIL-12活性化を増加または減少できることを示す。

【0035】

【表19】

表VI(a): IL-1R α 、IL-6およびIL-12についてのヒトPBMCアッセイ

配列番号 /オリゴ 番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/ml での IL-1R α (pg/ml)	10 μ g/ml での IL-6 (pg/ml)	10 μ g/ml での IL-12 (pg/ml)
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	1331	1035	116.5
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	599.5	630	56.5
3	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	1133	867.5	76
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	926	994	81
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	874.5	813.5	69
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTG ₁ CGTAT-5'	921	958	90.5
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	1365	1110.5	101.5
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	744	1048.5	75.5
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	1239	1084.5	104.5
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1727	1415.5	145
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X- G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'	2905.5	2099.5	197.5
12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X- TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	2965	1985.3	192.7
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X- G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'	3584.5	2543.5	300.5
培地		187	36	21

10

20

30

【0036】

【表20】

表VI(b): IL-1R α 、IL-6およびIL-12についてのヒトPBMCアッセイ

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/ml での IL-1R α (pg/ml)	10 μ g/ml での IL-6 (pg/ml)	10 μ g/ml での IL-12 (pg/ml)
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	10537.8	340.8	350.7
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	14850.4	413.6	456.1
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	9440.6	335.0	304.4
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	13014.5	499.0	421.9
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	10270.2	363.2	323.0
29	5'-TAGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CGTAT-5'	11644.7	421.2	362.3
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	10528.9	465.7	339.2
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	19086.4	554.6	551.3
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	15514.6	434.8	462.9
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	22655.8	551.9	598.6
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	20375.5	456.3	596.3
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	17750.6	383.5	521.9
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	23576.8	428.0	706.3
培地		799.5	15.7	47.7

10

20

30

【0037】

【表21】

表VI(c) : IL-6についてのヒトPBMCアッセイ(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 µg/mlでの IL-6 (pg/ml±SD)
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> ₀ -X- <u>o</u> <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	423±1
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> ₀ <u>U</u> ₀ -X- <u>o</u> <u>U</u> ₀ <u>C</u> TTG ₁ CTGTCT-5'	938±14
62	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>CU</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	497±4
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>CU</u> CTTG ₂ CTGTC-5'	409±2
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	474±0
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>CG</u> ₁ -L- <u>GACAG</u> ₁ CTGTCT-5'	626±3
培地		0±0

10

20

【0038】

【表22】

表VI(d) : IL-6についてのヒトPBMCアッセイ(24時間)

配列番号/ オリゴ番号	配列および修飾(5'-3')	10 µg/mlでの IL-6 (pg/ml±SD)
66	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> _o -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	135.63
67	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>Co</u> <u>U</u> _o -X-o <u>U</u> o <u>U</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	117.98
68	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>CU</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	300.79
69	5'-CTGTCG ₂ TT <u>UC</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	151.84
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	268.71
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	364.23
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>AC</u> -X- <u>C</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	722.58
77	5'- <u>U</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>U</u> -5'	615.21
78	5'-TCAGTCG ₁ TTAoC-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	449.96
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoTGTAT-5'	658.10
80	5'-TCTGToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	490.37
81	5'-TAGoToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'	668.52
82	5'-TCG ₂ oToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	614.15
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	603.68; 351.00
85	5'-TCTGToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	387.97; 464.58
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	440.25
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	446.67
92	5'- <u>T</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTG <u>ACT</u> -5'	605.79
培地		7.12; 3.59

10

20

30

40

【0039】

【表23】

表VI(e) : IL-10についてのヒトPBMCアッセイ(24時間)

配列番号/ オリゴ番号	配列および修飾(5'-3')	10 µg/mlでの IL-10 (pg/ml±SD)
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Uo</u> -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	44±6
61	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Co</u> <u>Uo</u> -X-o <u>Uo</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	50±6
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>CU</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	42±2
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>CU</u> CTTG ₂ CTGTC-5'	55±2
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	11±2
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>GACAG</u> ₁ CTGTCT-5'	26±2
培地		18±0

10

20

【0040】

【表24】

表VI(f) : IL-12についてのヒトPBMCアッセイ(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 µg/mlでのIL-12 (pg/ml±SD)
66	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Uo</u> -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	284.03
67	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>Co</u> <u>Uo</u> -X-o <u>Uo</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	296.62
68	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	502.12
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> C-X- <u>C</u> U <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	531.48
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	729.32
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	810.12
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>AC</u> -X- <u>C</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	1678.61
77	5'- <u>U</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>U</u> -5'	1500.97
78	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>Ao</u> C-X- <u>Co</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	927.15
79	5'-TAG <u>o</u> CG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ <u>Co</u> TGTAT-5'	1013.11
80	5'-TCTG <u>o</u> CG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ <u>Co</u> TGTCT-5'	1498.64
81	5'-TAG <u>o</u> CG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ <u>Co</u> ToGTAT-5'	1019.68
82	5'-TCG ₂ <u>o</u> CG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ <u>Co</u> AG ₂ <u>Co</u> ToG ₂ CT-5'	1220.94
84	5'-TCAG <u>o</u> CG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ <u>Co</u> TGACT-5'	1450.24, 1604.88
85	5'-TCT <u>o</u> CG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ <u>Co</u> ToGTCT-5'	879.09, 1498.64
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TT <u>L</u> -Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1463.20
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TT <u>L</u> -X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1417.50
92	5'- <u>T</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTG <u>ACT</u> -5'	1602.41
培地		54.36, 196.06; 511.18

10

20

30

40

【0041】

【表25】

表VI(g): ヒトB細胞培養物中のIL-6の誘発(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾(5'-3')	10 µg/mlでのIL-6(pg/ml±SD)
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> _o -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	359±7
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>Co</u> <u>U</u> _o -X-o <u>U</u> _o <u>C</u> TTG ₁ CTGTCT-5'	570±37
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	333±3
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> _C -X- <u>C</u> TTG ₂ CTGTC-5'	593±8
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>U</u> _G -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	503±28
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>U</u> _G -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	481±13
培地		91±0

10

20

【0042】

【表26】

表VI(h): ヒトB細胞培養物中のIL-10の誘発(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾(5'-3')	10 µg/mlでのIL-10(pg/ml±SD)
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> _o -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	188±0
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>Co</u> <u>U</u> _o -X-o <u>U</u> _o <u>C</u> TTG ₁ CTGTCT-5'	286±3
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	223±10
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> _C -X- <u>C</u> TTG ₂ CTGTC-5'	201±2
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>U</u> _G -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	268±0
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>U</u> _G -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	212±1
培地		86±5

30

40

【0043】

表Iからの例示のTLR9アゴニストを、例3の記載のようにして、IFN- β 、MIP-1 α およびMIP-1 β についてのヒトPBMCアッセイにおいて、免疫刺激活性について試験した。下の表VII(a)およびVII(b)に示す結果は、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、ヒトPBMCにおいてこれらのTLR9媒介性IFN- β 、MIP-1 α および/またはMIP-1 β 活性化プロファイルを変化させることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、IFN- β 、MIP-1 α およびMIP-1 β 活性化を増加または減少できることを示す。

50

【0044】

【表27】

表VII(a): IFN- γ 、MIP-1 α および MIP- β についてのヒト PBMCアッセイ

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/ml での IFN- γ (pg/ml)	10 μ g/ml での MIP-1 α (pg/ml)	10 μ g/ml での MIP- β (pg/ml)
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	86	28	1108
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	38.5	11	568.5
3	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	29	8.5	465.5
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	31.5	14	648.5
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	52.5	12	679
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTG ₁ CGTAT-5'	66.5	15.5	799
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	68.5	17	889.5
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	77	20	1174
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	93.5	26.5	1240.5
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	59.5	29.5	1007
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X-G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'	5237.5	83	2931.5
12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	2199.7	24.7	2363
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X-G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'	5619.5	173	2479
培地		40	6	187

10

20

30

【0045】

【表28】

表VII(b): IFN- γ 、MIP-1 α および MIP- β についてのヒトPBMCアッセイ

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/ml での IFN- γ (pg/ml)	10 μ g/ml での MIP-1 α (pg/ml)	10 μ g/ml での MIP- β (pg/ml)
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	11.29	84.49	1373.07
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	14.44	90.61	1557.81
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	11.29	84.49	1337.00
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	13.66	109.05	1746.19
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	12.08	87.58	1337.01
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ CGTAT-5'	12.87	82.12	1428.54
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	11.29	105.04	1839.64
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	13.66	113.18	1995.04
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	12.08	107.78	1603.54
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	13.66	150.26	2785.79
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	13.66	195.82	3966.88
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	10.50	134.83	2878.33
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	8.11	107.78	2343.94
培地		3.25	6.11	149.2

10

20

30

【0046】

表Iからの例示のTLR9アゴニストを、例3の記載のようにして、MCP-1およびIFN- γ についてのヒトPBMCアッセイにおいて、免疫刺激活性について試験した。下の表VII (a) およびVII (b) に示す結果は、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、ヒトPBMCにおいてこれらのTLR9媒介性MCP-1および/またはIFN- γ 活性化プロファイルを変化させることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、MCP-1およびIFN- γ 活性化を増加または減少できることを示す。

40

【0047】

【表29】

表VIII(a): MCP-1およびIFN- α についてのヒトPBMCアッセイ

配列番号/ オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでの MCP-1 (pg/ml)	10 μ g/mlでの IFN- α (pg/ml)
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	3774.5	86
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	841	38.5
3	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	3503	29
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	2514	31.5
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	2134.5	52.5
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTG ₁ CGTAT-5'	2154	66.5
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	4201.5	68.5
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	3620	77
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	4885	935
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	2672	59.5
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X-G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'	6793	5237.5
12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	6251	2199.7
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X-G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'	6686	5619.5
培地		534	40

10

20

30

【0048】

【表30】

表VIII(b): MCP-1およびIFN- α についてのヒトPBMCアッセイ

配列番号/オリゴ番号	配列および修飾(5'-3')	10 μ g/mlでのMCP-1(pg/ml)	10 μ g/mlでのIFN- α (pg/ml)
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	12480.44	62.03
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	50410.30	18.07
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	3982.45	42.09
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	53685.37	13.28
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	6116.14	46.03
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTG ₂ CGTAT-5'	26435.31	38.08
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	12012.62	30.38
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	53166.41	26.16
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	36199.26	67.03
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	42397.84	31.4
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	62106.60	83.69
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	41760.82	29.94
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	25530.72	942.37
培地		267.37	0

10

20

30

【0049】

表Iからの例示のTLR9アゴニストを、例3の記載のようにして、IFN- α 、IL-6およびIL-12についてのヒトPBMCおよびpDCアッセイにおいて、免疫刺激活性について試験した。下の表IX(a)、IX(b)、IX(c)、IX(d)、IX(e)、IX(f)およびIX(g)に示す結果は、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、ヒトPBMCおよびpDCにおいて、それらのTLR9媒介性IFN- α 活性化プロファイルを変化させることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、IFN- α 、IL-6およびIL-12活性化を増加または減少できることを示す。

【0050】

40

【表31】

表IX(a): IFN- α についてのヒトPBMCアッセイ

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでのIFN- α (pg/ml)
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	142.5
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X-G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'	8065.5
12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	7270.5
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X-G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'	8437
培地		109.5

10

【0051】

【表32】

表IX(b): IFN- α についてのヒトPBMCアッセイ(24時間)^a

20

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでのIFN- α (pg/ml \pm SD)
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Uo</u> -X- <u>oU</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	257.5 \pm 539.4
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>Co</u> <u>Uo</u> -X- <u>oUo</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	39.0 \pm 88.5
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	84.4 \pm 143.2
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>CU</u> CTTG ₂ CTGTC-5'	34.0 \pm 37.1
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAA ₁ CT-5'	1165 \pm 704.7
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>CG</u> -L- <u>GACAG</u> ₁ CTGTCT-5'	2494.3 \pm 1880.1
培地		22.2 \pm 39.8

30

^a: データは10人の提供者の平均である。

【0052】

40

【表33】

表IX(c): IFN- α についてのヒトPBMCアッセイ(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでの IFN- α (pg/ml)
68	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	53.42
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> C-X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGCTC-5'	56.30
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	622.25
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	1823.24
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>AC</u> -X- <u>C</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	97.42
77	5'- <u>U</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>U</u> -5'	92.64
78	5'-TCAGTCG ₁ TTAoC-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	86.38
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoTGTAT-5'	86.38
80	5'-TCTGToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	66.13
81	5'-TAGoToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'	92.10
82	5'-TCG ₂ oToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	65.86
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	86.38; 761.92
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	98.37; 592.17
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	958.92
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	710.90
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	92.64
培地		32.9, 64.8, 14.5

10

20

30

【0053】

【表34】

表 IX(d): IFN- α についてのヒトpDCアッセイ(24時間)^a

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでの IFN- α (pg/ml \pm SD)
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Uo</u> -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	1509.5 \pm 2612.7
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>Co</u> <u>Uo</u> -X-o <u>Uo</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	1598.9 \pm 3727.2
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	3415.6 \pm 3903.6
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>UC</u> CTTG ₂ CTGTC-5'	2180.1 \pm 3882.0
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	32956.8 \pm 2639.9
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	47746.2 \pm 53192.1
培地		106.6 \pm 156.5

^a: データは10人の提供者の平均である。

10

20

30

40

【0054】

【表35】

表 IX(e): IFN- α についてのヒトpDCアッセイ(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	10 μ g/mlでの IFN- α (pg/ml \pm SD)
67	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>Co</u> <u>Uo</u> -X-o <u>Uo</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	174.81
68	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	900.94
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>UC</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	475.64
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	4813.76
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG₁-L-<u>G</u>ACAG₁CTGTCT-5'</u>	15494.15
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	1934.09
73	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	2978.9

【表36】

74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	57697.2
75	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	8171
77	5'- <u>UCAGTCG₁TTAC-X-CATTG₁CTGACU</u> -5'	598.6
78	5'-TCAGTCG ₁ TTAoC-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	4245.4
79	5'-TAGToCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CoTGTAT-5'	2807.2
80	5'-TCTGToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	6133.96
81	5'-TAGoToCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CoToGTAT-5'	1028.1
82	5'-TCG ₂ oToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	17873.5
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	190.42.1
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	11673.4
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	10408.2
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	14783.3
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	6819.14
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	14515.1
92	5'- <u>TCAGTCG₁TTAC-X-CATTG₁CTGACT</u> -5'	307.8
培地		32.9; 0; 0.105

10

20

30

【0055】

【表 3 7】

表 IX(f): IL-6についてのヒトpDCアッセイ(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	IL-6 (pg/ml) 10 µg/ml
66	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Uo</u> -X-o <u>UC</u> TTG ₁ CTGCTC-5'	2384.36
67	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>Co</u> <u>Uo</u> -X-o <u>Uo</u> CTT <u>G</u> ₁ CTGCTC-5'	1405.14
68	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTT <u>G</u> ₂ CTGCTC-5'	2851.75
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>CU</u> CTT <u>G</u> ₂ CTGCTC-5'	1598.06
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTT <u>G</u> ₁ CAAG ₁ CT-5'	1625.8
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>GACAG</u> ₁ CTGTCT-5'	1648.17
80	5'-TCTG <u>CG</u> ₂ TTGT-X-TGTT <u>G</u> ₂ <u>Co</u> TGTCT-5'	13805.44
84	5'-TCAG <u>CG</u> ₂ TTAC-S-CATT <u>G</u> ₂ <u>Co</u> TGACT-5'	19405.66
85	5'-TCT <u>CG</u> ₂ TAG-Z-GATT <u>G</u> ₂ <u>Co</u> ToGTCT-5'	17253.59
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTT <u>G</u> ₁ CTG ₁ CT-5'	9277.99
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTT <u>G</u> ₁ CTG ₁ CT-5'	5092.34
培地		1847.09; 1918.47

10

20

30

【0 0 5 6】

【表 3 8】

表 IX(g): IL-12についてのヒトpDCアッセイ(24時間)

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	IL-12 (pg/ml) 10 μ g/ml
66	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> _o -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	624.29
67	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> _o <u>U</u> _o -X-o <u>U</u> _o CTTG ₁ CTGCTC-5'	492.13
68	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	724.53
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> _C -X- <u>C</u> U <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	895.07
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	369.77
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	567.95
80	5'-TCTGToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	1498.64
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	1604.88
85	5'-TCTGToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	1498.64
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1463.20
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1417.50
培地		349.26; 397.1

10

20

30

【0057】

表 I からの例示の T L R 9 アゴニストを、例 3 の記載のようにして、マウス脾臓細胞培養物中でのそれらの IL - 12 および IL - 6 の誘発について試験した。下の表 X (a) および X (b) に示す結果は、3' - 3' 結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、脾臓細胞においてそれらの T L R 9 媒介性 IL - 6 および / または IL - 12 活性化プロファイルを変化させること、およびこの活性化プロファイルは、化学修飾に依存して用量依存性となり得ることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3' - 3' 結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、IL - 6 および IL - 12 活性化を増加または減少できることを示す。

【0058】

【表39】

表X(a): マウス脾臓細胞培養物におけるIL-12およびIL-6分泌の誘発

配列番号 / オリゴ番号	配列	IL-6 (pg/ml±SD)		IL-12 (pg/ml±SD)	
		1 μg/ml にて	3 μg/ml にて	1 μg/ml にて	3 μg/ml にて
38	5'-TCTGACG ₁ TTCT-Y-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	8354±32	24508±86	909±17	876±89
39	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -Y-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	3371±102	15012±25	621±12	517±19
40	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-Y-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	361±4	4072±1	451±13	279±0
41	5'-TCAGTCGTTAG-Y-GATTGCTGACT-5'	2496±69	17796±3	856±12	626±6
42	5'-TCTGTCGTTCT-Y-TCTTGCTGTCT-5'	8034±95	22124±57	659±7	455±18
43	5'-TCGTTGL-Y-LGTTGCT-5'	3127±22	14412±32	532±11	536±27
47	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -M-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	2685±29	15663±35	957±2	566±18
48	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -M-GACAG ₁ CTGTCT-5'	3199±69	17016±11	792±3	528±2
	PBS	0.00	0.00	87±16	87±16

10

20

【0059】

【表40】

表X(b): マウス脾臓細胞培養物におけるIL-12およびIL-6分泌の誘発

配列番号 / オリゴ番号	配列および修飾 (5'-3')	1 μg/ml での IL-12 (pg/ml±SD)	1 μg/ml での IL-6 (pg/ml±SD)
60	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> _o -X- <u>o</u> <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	4066±47	78±14
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> _o <u>U</u> _o -X- <u>o</u> <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	2438±81	164±21
62	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>C</u> _U -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	1782±67	120±36
63	5'-CTGTCG ₂ TT <u>C</u> _U -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTC-5'	2496±105	215±19
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> _U -X- <u>U</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	64796±60	3776±25
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> _U -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	8245±244	3776±46
培地		921±60	38±0

30

40

【0060】

表Iからの例示のTLR9アゴニストを、例3の記載のようにして、ヒトPBM C培養物中でのそれらのIL-1R、IL-6およびIL-12p40p70の誘発について試験した。下の表X Iに示す結果は、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾が、ヒトPBM CにおいてそれらのTLR9媒介性IL-1R、IL-6およびIL-12p40p70活性化プロファイルを変化させることを実証する。より一般的には、これらのデータは、3'-3'結合オリゴヌクレオチドへの特異的化学修飾を用いて、IL-1R、IL-6およびIL-12p40p70活性化を増加または減少できることを示す。

50

【0061】

【表41】

表 XI: ヒトPBMCにおけるIL-1R α 、IL-6およびIL-12p40p70

配列番号 / オリゴ番号	配列	IL-1R α	IL-6	IL-12p40p70
43	5'-TCGTTGL-Y-LGTTGCT-5'	1595.5	1079.5	160.5
44	5'-TCGTTGM-Y-MGTTGCT-5'	1775.0	931.5	148.0
45	5'-TCG ₁ TTGM-Y-MGTTG ₁ CT-5'	954.0	1235.5	71.0
46	5'-TCGTTGM-X-MGTTGCT-5'	1550.0	800.0	127.0
	PBS	187.0	36.0	21.0

【0062】

上記したように、本発明は、第1の側面において、オリゴヌクレオチドベースのTLR9合成アゴニストを提供する。塩基、糖、リンケージ、またはリンカーに対する一定の化学修飾に基づき、TLR9のアゴニストは、接触可能5'末端を保持しつつ、他のTLR9アゴニスト分子と会合し重複した場合に、増加した安定性を有することができる。

第2の側面において、本発明は、本発明によるオリゴヌクレオチドベースのTLR9アゴニスト（「化合物」）および生理学的に許容し得る担体を含む、組成物を提供する。用語「生理学的に許容し得る」とは、一般に、化合物の有効性を損なうことなく、細胞、細胞培養物、組織または生物などの生体システムと適合的である物質をいう。

【0063】

本明細書において、用語「担体」は、任意の賦形剤、希釈剤、增量剤、塩、緩衝液、安定化剤、可溶化剤、オイル、脂質、脂質含有ベシクル、ミクロスフェア、リポソームカプセル剤または生理学的に許容し得る製剤において用いるための当該分野でよく知られた他の材料を包含する。担体、賦形剤または希釈剤の特性は、特定の適用に対する投与経路に依存することが理解される。これらの材料を含む、生理学的に許容し得る製剤の調製は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990に記載されている。

活性化合物は、生理学的に許容し得る担体または希釈剤中に、処置される患者に重篤な毒性効果を及ぼすことなく、予防的または治療的に有効な量で患者に送達されるのに十分な量で、含有される。用語「有効量」または「十分な量」は、一般に、有益な結果などの所望の生物学的效果を及ぼすのに十分な量をいう。したがって、「有効量」または「十分な量」は、投与される状況に依存する。生理学的に許容し得る誘導体の有効な用量範囲は、送達される親化合物の重量に基づき算出することができる。誘導体それ自体が活性を示す場合は、有効用量は誘導体の重量を用いて、または当業者に既知の他の手段により、上記のようにして推定可能である。

【0064】

第3の側面において、本発明はワクチンを提供する。この側面によるワクチンは、本発明の組成物を含み、さらに抗体を含む。抗体とは、特異的免疫反応を誘発する分子である。かかる抗体は、限定することなく、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物および複合体またはこれらの任意のものの組合せを含む。抗体は、天然または合成であってよく、一般にその抗体に特異的な免疫反応を誘発する。任意のかかる抗体は、随意に免疫原性タンパク質に結合してもよく、その例は例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、コレラ毒素Bサブユニット、または任意の他の免疫原性担体タンパク質である。

本発明によるワクチンはさらに、任意の過剰な既知のアジュバントをさらに含んでよく、その例は限定なく、フロイント完全アジュバント、KLH、モノホスホリル脂質A（M

10

20

30

40

50

P L)、ミヨウバン、および Q S - 2 1 を含むサポニン、イミキモド、R 8 4 8、またはこれらの組合せを含む。

【 0 0 6 5 】

第 4 の側面において、本発明は、脊椎動物において T L R 9 媒介性免疫反応を引き起こすための方法を提供し、かかる方法は、脊椎動物に対し、本発明による化合物、組成物またはワクチンを投与することを含む。いくつかの態様において、脊椎動物は哺乳類である。本発明の目的のために、用語「哺乳類」は、ヒトおよび動物を含むことを特に意図する。好ましい態様において、化合物、組成物またはワクチンは、免疫刺激を必要とする脊椎動物に投与される。

【 0 0 6 6 】

本発明のこの側面による方法において、本発明の化合物、組成物またはワクチンの投与は任意の好適な経路により行うことができ、これには、限定することなく、非経口、経口、腫瘍内、舌下、経皮、局所、経鼻、エアロゾル、眼内、気管内、直腸内、粘膜、膣、あるいは遺伝子銃、経皮パッチまたは点眼もしくは口腔洗浄の形態によるものを含む。化合物、組成物またはワクチンの投与は、既知の手順を用いて、疾病的症状または代理マークを低減するのに有効な用量と期間で、行うことができる。全身投与の場合、化合物、組成物またはワクチンは、本発明の化合物の約 0 . 0 0 0 1 マイクロモル～約 1 0 マイクロモルの血中レベルを達成するのに十分な用量で投与するのが好ましい。局所投与の場合、これよりはるかに低い濃度が有効であり得、またはるかに高い濃度が重篤な毒性効果なしに耐容され得る。好ましくは、本発明による化合物の総用量は 1 日約 0 . 0 0 1 m g / 患者～1 日約 2 0 0 m g / 体重 1 k g までの範囲である。本発明の 1 または 2 種以上の治療組成物の治療有効量を、同時に、または連続して、個体に対して 1 つの処置エピソードとして投与することが望ましい場合もある。

【 0 0 6 7 】

ある好ましい態様においては、本発明の化合物、組成物またはワクチンは他の剤と組み合わせて投与され、これらの剤は限定することなく、抗体、細胞毒性剤、アレルゲン、抗生物質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、S i R N A、アプタマー、リボザイム、標的治療物 (targeted therapies)、ペプチド、タンパク質、遺伝子治療ベクター、D N A ワクチン、および / または免疫反応の特異性もしくは強さを増強するためのアジュvantを含む。

本発明のこの側面の目的のために、「と組み合わせて」の用語は、患者の疾病または疾患を処置する過程において、本発明の化合物、組成物またはワクチンおよび / または他の剤を、同時投与ならびに、数時間、数日間または数週間の時間的間隔をあけた順序での投与を含む任意の順序で、投与することを意味する。かかる組合せ処置はまた、本発明の化合物、組成物またはワクチンおよび / または他の剤の、単回の投与より多数の投与も含んでよい。本発明の化合物、組成物またはワクチンおよび / または他の剤の投与は、同一または異なる経路であってよい。

【 0 0 6 8 】

本発明のこの側面による方法は、ヒトまたは動物の疾病的予防的または治療的処置に有用である。例えば、本方法は、小児および獣医学の用途に有用である。本方法はまた、免疫系のモデル研究にも有用である。

第 5 の側面において、本発明は、疾病または疾患を有する患者を治療的に処置するための方法を提供し、かかる方法は、患者に対し、本発明による化合物、組成物またはワクチンを投与することを含む。種々の態様において、処置される疾患または疾患は、癌、自己免疫疾患、感染症、気道炎症、炎症性疾患、アレルギー、ぜん息、または病原体もしくはアレルゲンにより引き起こされる疾患である。病原体は例えば、細菌、寄生生物、真菌、ウィルス、ウイルロイド、およびプリオントを含む。投与は、本発明の第 4 の側面において記載されたようにして実施する。

【 0 0 6 9 】

用語「処置」は、一般に、症状の緩和、または疾病的進行を遅らせるかまたは改善する

10

20

30

40

50

ことを含み得る、有益な、または所望の結果を得ることを意図したアプローチをいう。

本発明の目的のために、用語「アレルギー」は、一般に、炎症を特徴とする不適切な免疫反応をいい、限定はしないが、食品アレルギーおよび呼吸アレルギーを含む。用語「気道炎症」はぜん息を含むが、これに限定はされない。本明細書において用いる用語「自己免疫疾患」は、「自己」要素（例えばタンパク質）が免疫系による攻撃を受ける疾患をいう。かかる用語は、自己免疫性ぜん息を含む。用語「癌」は、限定することなく、異常または無制御的な細胞増殖および／または分裂により引き起こされる、任意の悪性の増殖または腫瘍を含む。癌は、ヒトおよび／または動物において起こり、任意のおよび全ての組織において生じ得る。本発明を用いて癌を有する患者を処置することは、本発明の化合物、組成物またはワクチンを投与して、異常または無制御的な細胞増殖および／または分裂に影響を及ぼすことを含んでよい。

【0070】

第6の側面において、本発明は、疾病または疾患を防ぐための方法を提供し、かかる方法は、患者に対し、本発明による化合物、組成物またはワクチンを投与することを含む。種々の態様において、予防される疾病または疾患は、癌、自己免疫疾患、気道炎症、炎症性疾患、感染症、アレルギー、ぜん息、または病原体により引き起こされる疾患である。病原体は、限定することなく、細菌、寄生生物、真菌、ウィルス、ウイルトイド、およびブリオンを含む。投与は、本発明の第4の側面において記載されたようにして実施する。

【0071】

本発明の任意の方法において、本発明の化合物、組成物またはワクチンは、疾病または状態を予防または処置するのに有用であり、かつ本発明の化合物、組成物またはワクチンの免疫刺激効果を低減させないような他の剤と組み合わせて、投与することができる。本発明の任意の方法において、疾病または状態を予防または処置するのに有用な剤は、限定することなく、ワクチン、抗原、抗体、細胞毒性剤、アレルゲン、抗生物質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、T L Rアゴニスト、ペプチド、タンパク質、遺伝子治療ベクター、D N Aワクチン、および／または免疫反応の特異性もしくは強さを増強するためのアジュバント、または、共刺激性分子であって、例えばサイトカイン、ケモカイン、タンパク質リガンド、トランス活性化因子、ペプチド、および修飾アミノ酸を含むペプチドなどを含む。例えば、癌の予防および／または処置において、本発明の化合物、組成物またはワクチンを、化学治療化合物またはモノクローナル抗体と組み合わせて投与できることが意図される。代替的に、剤は、抗原またはアレルゲンをコードするD N Aベクターを含むことができる。これらの態様において、本発明の化合物、組成物またはワクチンは、アジュバントとして様々な作用でき、および／または、直接免疫調節効果をもたらすことができる。

以下の例は、本発明の一定の好ましい実施例をさらに説明することを意図し、本発明の範囲を多少でも限定することを意図するものではない。

【0072】

例1：

オリゴヌクレオチド、ペンタン-1,3,5-トリオールリンカー、ペンタン-1,5-ジオールリンカーおよびc i s - 1,3,5-シクロヘキサントリオールリンカーの合成ならびにC P Gおよびオリゴプレップ固体支持体の機能化

対照ポアガラス誘導体化3-メチル-1,3,5-ペンタントリオールリンカー(5)を、市販の3-メチル-1,3,5-トリオール(1)からスキーム1に示すようにして実現した。初めに、ビス-D M T保護アルコール(2)を、(1)から、D M A Pの存在下でD M T C 1で処理することにより、十分な産量で調製した。C P G誘導体化の従来法は、おそらく立体化学的效果による、(2)の3-ヒドロキシルにおけるスクシニル化産物の低い産量のために不可能であった。しかし、C P G誘導体化リンカー(5)は、コハク酸塩(3)(スキーム1)を作製する必要性を排除した次の代替アプローチにより調製した。この経路において、初めに、C P Gビーズを室温でジクロロメタン(D C M)中の3%トリクロロ酢酸(T C A)で処理することにより活性化して、C P G表面で反応性ア

10

20

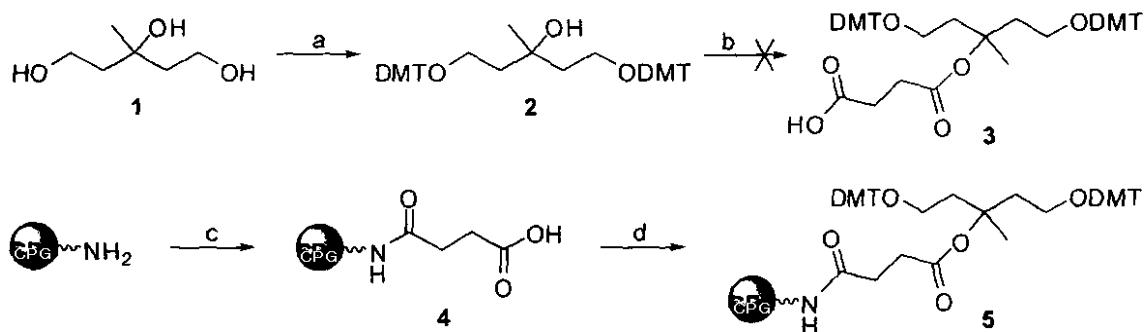
30

40

50

ミノ基の最大数を遊離化した。活性化 CPG ビーズを次に、DMAP の存在下で無水コハク酸で誘導体化して、CPG ビーズ (4) を得た。最後に、CPG 誘導体化リンカー (5) を、CPG (4) のカルボン酸基を用いて、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (DEC) / DMAP の存在下で (2) を縮合することにより得た。誘導体化の後、残留カルボン酸基を、ペンタクロロフェノールによるキャッピング反応により除去した。

【化 1】



スキーム 1 . 3 - メチル - 1 , 3 , 5 - ペンタントリオールリンカーの合成および CPG の誘導体化。試薬および条件 : a) DMTCl 、 DMAP 、ピリジン、 0 ~ 室温 ; b) 20 無水コハク酸、 DMAP 、ピリジン ; c) (i) DCM 中 3 % TCA ; (ii) 無水コハク酸、 DMAP 、ピリジン ; d) (i) (2) 、 DMAP 、 TEA 、 DEC 、ピリジン ; (ii) ペンタクロロフェノール。

【0073】

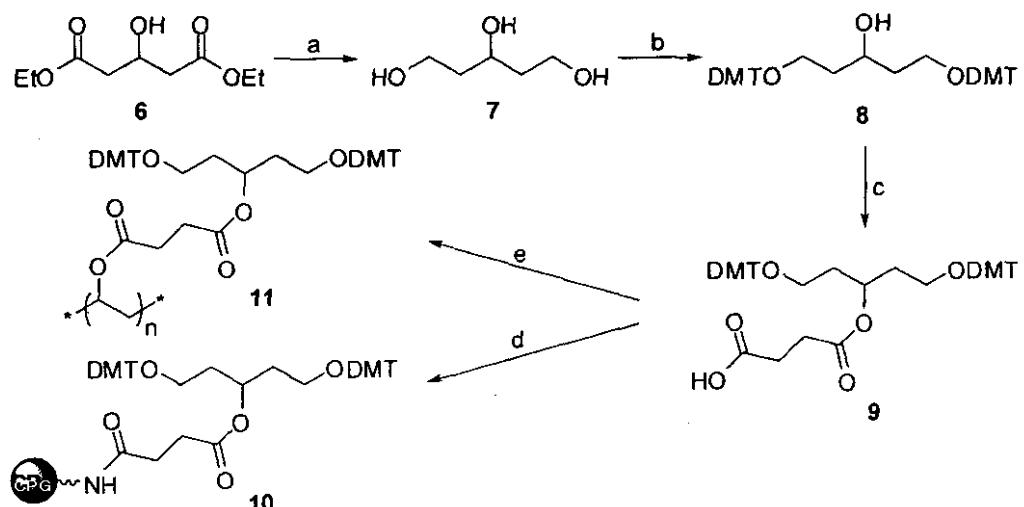
1 , 3 , 5 - ペンタントリオールリンカー誘導体化 CPG (10) およびオリゴプレップ (11) を、市販の 3 - ヒドロキシグルタル酸ジエチル (6) から出発して調製した (スキーム 2)。LiAlH₄ による (6) の還元により、定量的産量の 1 , 3 , 5 - ペンタントリオール (7) を産生した。トリオール (7) を次に DMAP の存在下で DMTCl により選択的に保護して、ビス - DMT 保護アルコール (8) を得て、これを次にコハク酸塩に正常に変換する ; これは、 DMAP の存在下で無水コハク酸で処理することにより、固体支持体上にそのまま負荷することができる。ピリジン / アセトニトリル混合物中 DIC / DMAP の存在下で、定量的負荷産量で (9) を CPG に結合することができる (10)。一方、上記のプロトコルは、PVA 固体支持体であるオリゴプレップ 250 の機能化においては、非常に少ない負荷産量を与えた。しかし、アセトニトリル中の TBTU / DMAP の存在下では、定量的負荷産量が実現された (11)。負荷はそれぞれ、CPG (10) 上に約 ~ 40 μmol / g 、およびオリゴプレップ 250 (11) 支持体上に約 ~ 125 μmol / g で維持され、これは、ヌクレオチド結合効率および最終収率を増加させる。

10

20

30

【化2】



10

20

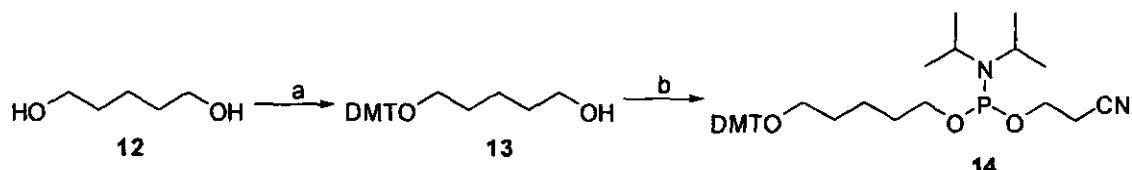
30

スキーム2. 1, 3, 5-ペントントリオールリンカーの合成ならびにCPGおよびオリゴプレップ固体支持体の誘導体化。試薬および条件: a) LiAlH₄、THF、0~室温; b) DMTCl、DMAP、ピリジン、0~室温; c) 無水コハク酸、DMAP、ピリジン; d) LC-AA-CPG、DMAP、DIIC、ピリジン、アセトニトリル; e) オリゴプレップ250、DMAP、TBTH、アセトニトリル。

【0074】

C5リンカー機能化支持体(10)および(11)は、同一配列のイムノマーを作製するのに理想的である。非同一配列のイムノマーもまた、我々の研究において強力な免疫刺激活性を示した。例えば(14)(スキーム3)などの適切に保護されたC5リンカーは、非同一配列のイムノマーを作製するために必要である。市販の1,5-ペントンジオールのヒドロキシル基の1つを、DMTにより選択的に保護し、続いて2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイトによるリン酸化により、必要なC5リンカー(14)を得た(スキーム3)。

【化3】



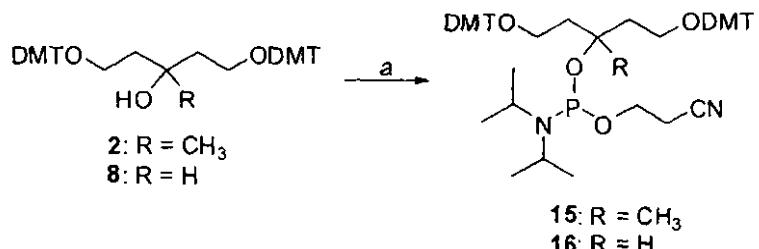
スキーム3. ペントンジオールホスホラミダイトの合成。試薬および条件: a) DMTCl、DMAP、ピリジン、-10~室温; b) DIPEA、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト、NMI、DCM、0~室温。

【0075】

我々はまた、強力な合成免疫調節モチーフとしてのCpG DNAデンドリマーの設計および開発にも注目した。CpG DNAデンドリマーを作製するためには、適切に保護されたリンカーであるホスホラミダイトは必須である。C5リンカーホスホラミダイト(15)および(16)を、それぞれジ-DMTアルコール(2)および(8)から、スキーム4に示すように、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイトによるリン酸化により調製した。

40

【化4】

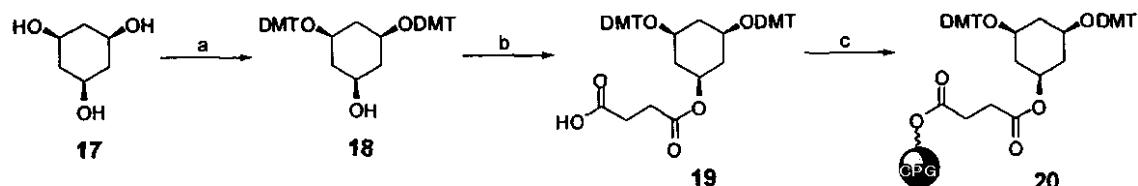


スキーム4. ペンタントリオールホスホラミダイトの合成。試薬および条件：a) D I P E A、2 - シアノエチル N , N - ジイソプロピルクロロホスホラミダイト、N M I、D C M、0 ~ 室温。 10

【0076】

C P G で誘導体化した c i s - シクロヘキサントリオールリンカー (2 0) を、スキーム5に示すようにして実現した。ビス - D M T 保護 c i s - 1 , 3 , 5 - シクロヘキサントリオール (1 8) を、市販の c i s - 1 , 3 , 5 - シクロヘキサントリオール (1 7) から実現した。続く、非保護ヒドロキシル (1 8) の D M A P の存在下における無水コハク酸によるスクシニル化により、所望のビス - D M T コハク酸塩 (1 9) を 7 8 % の収率で得た。C P G のコハク酸塩 (1 9) による誘導体化を、定量的産量 ((2 0) 、 4 0 μ m o l / g) で、ピリジン / アセトニトリル混合物中の D I C / D M A P の存在下にて実現した。 20

【化5】



スキーム5. c i s - シクロヘキサン - 1 , 3 , 5 - トリオールリンカーの合成およびC P G 固体支持体の誘導体化。試薬および条件：a) D M T C l 、 D M A P 、ピリジン、0 ~ 室温；b) 無水コハク酸、 D M A P 、ピリジン、室温；c) L C A A - C P G 、 D M A P 、 D I C 、ピリジン、アセトニトリル。 30

【0077】

3 - ヒドロキシグルタル酸ジエチル、水素化アルミニウムリチウム (L i A l H ₄) 、 4 , 4 - ジメトキシトリチルクロリド (D M T C l) 、 4 - ジメチルアミノピリジン (D M A P) 、無水コハク酸、 O - (ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (T B T U) 、 N , N ' - ジイソプロピルカルボジイミド (D I C) 、 N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N ' - エチルカルボジイミドヒドロクロリド (D E C) 、トリクロロ酢酸 (T C A) 、 N - メチルイミダゾール (N M I) 、トリエチルアミン (T E A) 、ジイソプロピルエチルアミン (D I P E A) などの試薬、ならびにピリジン、ジクロロメタン (D C M) およびテトラヒドロフラン (T H F) などの溶媒は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から入手し、別に言及されない限りさらなる精製なしで用いた。長鎖アルキルアミン制御ポアガラス (C P G ; 1 2 0 ~ 2 0 0 メッシュ、 5 0 0 、 9 0 ~ 1 2 0 μ m o l / g N H ₂ 基) は CPG Inc (Lincoln Park, NJ) から入手し、オリゴプレップ 2 5 0 は Merck KGaA (Germany) から入手した。キャップA (無水酢酸 / 2 , 6 - ルチジン / T H F 、 1 : 1 : 8) およびキャップB (N - メチルイミダゾール / T H F 、 1 6 : 8 4) 試薬は、Applied Biosystems (Foster City, CA) から入手した。全ての反応は、使用前に少なくとも 3 時間 1 2 0 のオーブンで乾燥させたガラス容器内で行った。 T L C は、アルミニウムシートを被覆しているシリカ 40

ゲル 60 F₂₅₄ 上で実施され、UV光またはSigma-Aldrich (St. Louis, MO)からの5%リンモリブデン酸(PMA)溶液により視覚化した。クトマトグラフィ用の、酢酸エチル(EtOAc)、ヘキサン、DCM、メタノール、t-ブチルメチルエーテルなどの溶媒は、J.T. Bakerから入手し、精製なしで用いた。フラッショカラムクロマトグラフィは、EMD Chemicals (Gibbstown, NJ)から入手したシリカゲル60(メッシュサイズ: 0.040~0.063mm & 230~400メッシュASTM)を用いて行った。NMRスペクトルは、Varian 400MHz Unity Inova装置上で行った。化学シフト(δ)はTMSに対するppmで表示し、全ての結合定数(J)はHzで表示した。

【0078】

1,5-ビス-ジメトキシリチルオキシ-3-メチル-ペンタン-3-オール(2):
ピリジン(25mL)中のDMTC1(3.6g, 10.5mmol, 2.1当量)を、乾燥ピリジン(25mL)中の3-メチル-1,3,5-ペンタンチオール((1)、0.7g, 5mmol)およびDMAP(0.24g)の氷冷(0)の攪拌溶液に、窒素雰囲気下で1滴ずつ加えた。反応混合物をゆっくりと室温に到達させ(~4時間)、一晩攪拌を続けた。TLC(0.5%TEAを含有するヘキサン/t-ブチルメチルエーテル、2:1)により、反応の完了を示した。ピリジンを回転蒸発乾固し(rotoevaporate to dryness)、残留物を酢酸エチル(250mL)に溶解し、水(2×100mL)、飽和NH₄Cl溶液(2×100mL)、ブライン(2×100mL)および水(2×100mL)で続いて洗浄した。酢酸エチルの層を無水MgSO₄上で乾燥し、回転蒸発乾固した。残留物を、0.5%トリエチルアミンを含有するヘキサン/t-ブチルメチルエーテル(3:1)を用いたシリカゲルフラッショカラムクロマトグラフィにより精製し、ビス-DMT産物(2)を白色の泡状物質として得た(2.9g, 78%)。

【化6】

¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz): δ1.56 (s, 3H-CH₃), 1.74-1.79 (m, 4H, -CH₂CHCH₂-), 3.19-3.26 (m, 4H, 1 & 5-CH₂-), 3.78 (d, 12H, -OCH₃), 6.82 (dd, J=8.8, 8H, Ar-H), 7.16-7.40 (m, 18H, Ar-H).

【0079】

ビス-DMT-3-メチル-ペンタントリオール誘導体化CPG(5)の調製: LCAA-CPG(5g)を3%TCA(50mL)に加え、ゆっくりと室温で3時間攪拌した。CPGをろ過し、TEA/DIPEAの9:1混合物(50mL)で、続いてDCM(5×100mL)で洗浄した。活性化CPGを高真空下で1時間乾燥した。ピリジン(30mL)中の無水コハク酸(1g, 10mmol)およびDMAP(0.2g)溶液を上記CPG(5g)に加え、スラリーを室温で24時間振盪した。溶液をろ別し、CPGをピリジン(2×25mL)で、続いてDCM(5×25mL)で洗浄し、高真空下で2時間乾燥して、CPGのコハク酸誘導体(4)を得た。乾燥ピリジン(10mL)中のジ-DMT-3-メチル-ペンタントリオール(2)(87mg)、DMAP(30mg)、TEA(100μL)およびDEC(0.4g)の溶液を、CPG(4)に加え、室温で15時間振盪した。ペンタクロロフェノール(0.14g)を上記混合物に加え、さらに15時間振盪した。溶液をろ別し、CPGをピリジン(2×25mL)で、続いてDCM(5×25mL)で完全に洗浄し、デシケータ中高真空下で一晩乾燥して、ジ-DMT-3-メチル-ペンタントリオール誘導体化CPG(5)を得た。負荷量は、CPGの小部分をDCM中3%TCAで処理して決定し、DMT含量(37μmol/g)を498mmでの吸収の測定により定量した。

【0080】

ペンタン-1,3,5-トリオール(7)の合成: THF(100mL)中の3-ヒドロキシグルタル酸ジエチル((6)、25g, 122.4mmol)をTHF(400mL)中の1MのLiAlH₄溶液に、0のアルゴン雰囲気下で、激しく攪拌しつつ1滴ずつ加えた。添加の後、反応混合物を室温に到達させ(~4時間)、一晩攪拌した。反応混合物を-78に冷却し(アセトン/乾燥冰浴)、飽和NH₄Cl溶液(50mL)の1

10

20

20

30

40

50

滴ずつの添加により急冷して、白色の沈殿物を得た。反応混合物を別の 500 mL の THF で希釈し、白色沈殿物をセライトを通してろ過した。沈殿物を沸騰 THF (250 mL) で処理してろ過した。あわせた有機相を無水 MgSO₄ 上で乾燥し、溶媒を回転蒸発により除去した。残留物を、DCM / EtOAc / メタノール (6 : 3 : 1) を用いたシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィにより精製して、トリオール (7) (11.4 g, 95.5 mmol, 78%) を無色の油として得た。

【化7】

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 1.39-1.54 (m, 4H, -CH₂CH(OH)CH₂-), 3.47 (t, *J* = 6.6, 4H, 1 & 5-CH₂-), 3.61-3.68 (m, 1H, -CH(OH)-) and 4.23 (bs, 3H, 1,3 & 5-OH).

10

【0081】

1,5-ビス-[(4,4,-ジメトキシフェニル)-フェニルメトキシ]-ペンタン-3-オール (8) : ピリジン (100 mL) 中の DMTCl (16.6 g, 49 mmol, 2.1 当量) を、乾燥ピリジン (50 mL) 中のペンタントリオール (7) (2.8 g, 23 mmol) および DMAP (2.85 g, 1 当量) の氷冷 (0) の攪拌溶液に、アルゴン雰囲気下で 1 滴ずつ加えた。反応混合物をゆっくりと室温に到達させ (~4 時間)、一晩攪拌を続けた。TLC (0.5% TEA 含有のヘキサン / EtOAc, 3 : 1) により、反応の完了を示した。ピリジンを回転蒸発乾固し、残留物を DCM (500 mL) に溶解し、水 (500 mL)、飽和 NH₄Cl 溶液 (50 mL)、ブライン (50 mL) および水 (2 × 500 mL) で継いで洗浄した。DCM 層を無水 MgSO₄ 上で乾燥し、回転蒸発乾固した。残留物を、0.5% TEA 含有ヘキサン / EtOAc (3 : 1) を用いたシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィにより精製して、ビス-DMT アルコール (8) を白色発泡体として得た (12.1 g, 16.7 mmol, 72%)。

20

【化8】

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.65-1.81 (m, 4H, -CH₂CHCH₂-), 3.16-3.31 (m, 4H, DMTO-CH₂-), 3.78 (s, 12H, -OCH₃), 3.95-4.01 (m, 1H, -CH-), 6.81 (d, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.17-7.42 (m, 18H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 37.22, 55.38, 61.81, 69.58, 86.54, 113.27, 126.88, 128.01, 128.26, 130.15, 136.44, 145.16, 158.55.

30

【0082】

3(1,5-O-ジメトキシトリチルペンタントリオール)コハク酸 (9) : ビス-DMT アルコール (8) (12 g, 16.6 mmol) および DMAP (4.04 g, 33.2 mmol) を、乾燥ピリジン (150 mL) に溶解し、無水コハク酸 (3.31 g, 33.2 mmol) を一部ずつ室温で、激しく攪拌しつつ加えた。反応混合物を一晩攪拌し、ピリジンを回転蒸発乾固した。残留物を DCM (500 mL) に溶解し、氷冷の 10% クエン酸溶液 (2 × 500 mL) および水 (2 × 500 mL) で継いで洗浄した。DCM 層を無水 MgSO₄ 上で乾燥し、回転蒸発装置を用いて 50 mL の容積に濃縮し、0.5% TEA 含有の DCM 中 0.2% メタノールを用いたシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィにより精製して、コハク酸塩の純粋トリエチルアンモニウム塩 (9) を白色発泡体として得た (11.4 g, 13.8 mmol, 83%)。

40

【化9】

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.20 (t, *J* = 7.6, 9H, -N(CH₂CH₃)₃), 1.80-1.85 (m, 4H, -CH₂CHCH₂-), 2.40 (s, 4H, -COCH₂CH₂CO-), 2.90 (q, 6H, -N(CH₂CH₃)₃), 3.03-3.11 (m, 4H, 1 & 5-CH₂-), 3.78 (s, 12H, -OCH₃), 5.20-5.26 (m, 1H, -CH-), 6.81 (d, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.17-7.42 (m, 18H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 9.09, 30.94, 31.77, 34.45, 45.08, 52.92, 55.32, 59.73, 69.73, 86.00, 113.12, 126.71, 127.85, 128.32, 130.11, 136.54, 145.22, 158.40, 173.07 および 177.71.

50

【0083】

ビス - D M T ペンタントリオール負荷 C P G (1 0) の調製 : ピリジン / アセトニトリルの 1 : 6 混合物 (1 0 5 m L) 中のコハク酸塩 (9) (0 . 8 3 g, 1 m m o l) 、 D M A P (0 . 4 g, 3 . 3 m m o l) および D I C (5 m L) の溶液を、 C P G (2 5 g) に加え、スラリーを 2 4 時間振盪した。溶液をろ別し、 C P G を、 5 % ピリジン含有アセトニトリル (1 0 0 m L) およびアセトニトリル (2 5 0 m L) で洗浄した。キャップ A (A B I 、 8 9 m L) およびキャップ B (A B I 、 1 0 0 m L) 溶液を、 C P G 支持体に加え、 4 時間振盪した。溶液をろ別し、 C P G を、 5 % ピリジン含有アセトニトリル (2 × 1 0 0 m L) で、 続いてアセトニトリル (2 × 2 5 0 m L) で洗浄し、 高真空下で 3 0 分間乾燥した。 5 % ピリジン含有アセトニトリル (1 5 0 m L) 中の T B D M S C 1 (5 . 6 g) およびイミダゾール (1 . 4 g) の溶液を C P G に加え、 4 時間振盪した。溶液をろ別し、 C P G を、 5 % ピリジン含有アセトニトリル (3 × 1 0 0 m L) および D C M (4 × 2 5 0 m L) で続いて洗浄し、 デシケータ中の高真空下で一晩乾燥して、 乾燥 C P G 支持体 (1 0) を得た。負荷量は、 C P G の小部分を D C M 中 3 % T C A で処理して決定し、 D M T 含量 (4 0 μ m o l / g) を 4 9 8 m m での吸収の測定により定量した。

10

【0084】

ビス - D M T ペンタントリオール負荷オリゴプレップ 2 5 0 (1 1) の調製 : オリゴプレップ 2 5 0 (アセトニトリル中で予め膨張させる) を、 ペプチド合成容器に取り、 無水アセトニトリル (3 × 1 0 0 m L) で洗浄した。コハク酸塩 (9) (1 . 7 5 2 g, 2 . 1 2 5 m m o l) 、 D M A P (1 . 8 2 g, 1 4 . 8 7 m m o l) 、 T B T U (3 . 4 1 g 、 1 0 . 6 2 m m o l) およびアセトニトリル (1 0 0 m L) をオリゴプレップ 2 5 0 に加え、スラリーを 4 時間振盪した。溶液をろ別し、 オリゴプレップを、 1 % T E A 含有アセトニトリル (2 × 1 0 0 m L) およびアセトニトリル (5 × 1 0 0 m L) で洗浄した。キャップ A (5 0 m L : N M I / ピリジン / アセトニトリル = 2 : 3 : 5) およびキャップ B (5 0 m L : 無水酢酸 / アセトニトリル = 1 : 4) 溶液を、 固体支持体に加え、 6 時間振盪した。溶液をろ別し、 固体支持体をアセトニトリル (2 × 1 0 0 m L) で洗浄し、 キャッピング反応をもう一度繰り返した。溶液をろ別し、 固体支持体を、 1 % T E A 含有アセトニトリル (3 × 1 0 0 m L) で、 続いてアセトニトリル (5 × 1 0 0 m L) で洗浄し、 デシケータ中の高真空下で 2 4 時間乾燥して、 乾燥オリゴプレップ 2 5 0 支持体 (1 1) (2 6 . 4 g) を得た。負荷量は、 オリゴプレップの小部分を D C M 中 3 % T C A で処理して決定し、 D M T 含量 (1 3 8 μ m o l / g) を 4 9 8 m m での吸収の測定により定量した。

20

【0085】

5 - ジメトキシリチルオキシ - ペンタン - 1 - オール (1 3) : ペンタンジオール (1 2) (1 2 . 5 g, 1 2 0 m m o l) および D M A P (1 4 . 6 g, 1 2 0 m m o l) を乾燥ピリジン (1 0 0 m L) に溶解し、 - 1 0 に冷却し、 アルゴン雰囲気下に維持した。ピリジン (1 5 0 m L) 中の D M T C 1 (3 7 . 3 g, 1 1 0 m m o l 、 0 . 9 2 当量) を、 激しく攪拌しつつ 1 滴ずつ加えた。反応混合物をゆっくりと室温に到達させ (~ 4 時間) 、 一晩攪拌を続けた。ピリジンを回転蒸発乾固し、 残留物を D C M (5 0 0 m L) に溶解し、 水 (2 5 0 m L) 、 飽和 N H 4 C 1 溶液 (2 × 2 5 0 m L) 、 ブライン (2 5 0 m L) および水 (2 × 2 5 0 m L) で続いて洗浄した。 D C M 層を無水 M g S O 4 上で乾燥し、 回転蒸発乾固した。残留物を、 0 . 5 % T E A を含む 3 : 1 のヘキサン / E t O A c を用いたシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィにより精製して、 モノ - D M T 保護アルコール (1 3) を無色のシロップとして得た (2 8 . 2 g, 5 8 %) 。

30

40

【化10】

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.39-1.47 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂OH), 1.49-1.56 (m, 2H, DMTO-CH₂CH₂-), 1.60-1.68 (m, 2H, -CH₂CH₂OH), 3.06 (t, 2H, *J* = 6.2, DMTO-CH₂-), 3.60 (t, 2H, *J* = 6.3, -CH₂OH), 3.77 (s, 12H, -OCH₃), 6.82 (d, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.17-7.45 (m, 18H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 22.84, 30.14, 32.92, 55.51, 63.21, 63.57, 85.98, 113.26, 126.87, 128.00, 128.46, 130.30, 136.96, 145.65 および 158.57.

【0086】

10

5-ジメトキシリチルオキシ-ペンタン-1-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピル)ホスホラミダイト(14)：無水DCM(500mL)中の氷冷した(13)の溶液(20.32g、50mmol)に、窒素雰囲気下で、DIPSEA(26.12mL、150mmol)を激しく攪拌しつつ加えた。次に2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト(14.2g、60mmol)を1滴ずつ加え、続いてNMI(4mL、50mmol)を加えた。反応混合物をゆっくりと~4時間で室温に到達させ、一晩攪拌を続けた。0.5%TEAを含む3:1のヘキサン/EtOAcでのTLCにより、反応の完了を示した。反応混合物を追加の500mLのDCMで希釈し、飽和水性NaHCO₃(1×500mL)、ブライン(2×500mL)および水(1×500mL)で続いて洗浄した。有機相を無水MgSO₄上で乾燥し、ろ過し、回転蒸発乾固した。残留物を、0.5%TEAを含む3:1のヘキサン/EtOAc混合物を用いたシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィにより精製して、(13)を無色の粘性液体として得た(22.3g、74%)。

20

【化11】

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.15 (t, 12H, *J* = 7.6, (Me₂CH)₂N-), 1.37-1.45 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂OP-), 1.52-1.64 (m, 4H, DMTO-CH₂CH₂CH₂CH₂-), 2.55 (t, 2H, *J* = 6.2, -CH₂CN), 3.01 (t, 2H, *J* = 6.5, -CH₂CH₂CN), 3.49-3.64 (m, 4H, DMTO-CH₂ and -CH₂OP-), 3.73 (s, 12H, -OCH₃), 3.71-3.81 (m, 2H, (Me₂CH)₂N-), 6.77 (d, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.13-7.41 (m, 18H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 20.56, 20.63, 23.08, 24.82, 24.89, 24.96, 30.05, 31.40, 43.15, 43.27, 55.44, 58.47, 58.66, 63.52, 63.92, 85.89, 113.20, 117.97, 126.81, 127.94, 128.42, 130.25, 136.92, 145.65 および 158.53. ³¹P-NMR: δ 145.07.

30

【0087】

30

ホスホラミダイト(15)および(16)の合成：(14)について記載したような一般の方法を用いて合成。化合物(15) - 白色発泡体、収率69%。

【化12】

40

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.89 (d, 6H, *J* = 7, (Me₂CH)₂N-), 1.05 (d, 6H, *J* = 6.4, (Me₂CH)₂N-), 1.25 (s, 3H, -CH₃), 1.88-1.99 (m, 4H, -CH₂CHCH₂-), 2.40 (t, 2H, *J* = 6.4, -CH₂CN), 3.10-3.21 (m, 2H, -OCH₂CH₂CN), 3.30-3.40 (m, 2H, Me₂CH)₂N-), 3.43-3.60 (m, 4H, DMTO-CH₂-), 3.77 (d, 12H, -OCH₃), 6.79 (dd, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.17-7.42 (m, 18H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 20.39, 24.27, 24.72, 43.03, 55.38, 57.73, 60.23, 77.96, 78.04, 86.28, 113.15, 118.01, 126.74, 127.89, 128.31, 129.31, 130.18, 136.80, 139.62, 145.47, 158.44. ³¹P-NMR: δ 135.93.

40

化合物(16) - 白色発泡体、収率79%。

【化13】

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.00 (d, 6H, *J* = 6.4, (Me₂CH)₂N-), 1.10 (d, 6H, *J* = 6.7, (Me₂CH)₂N-), 1.73-1.99 (m, 4H, DMTO-CH₂CH₂CHCH₂-), 2.36 (t, 2H, *J* = 6.6, -CH₂CN), 3.14 (t, 2H, *J* = 6.5, -CH₂CH₂CN), 3.37-3.60 (m, 6H, DMTO-CH₂- and Me₂CH)₂N-), 3.77 (d, 12H, -OCH₃), 4.14-4.22 (m, 1H, -CHOP-), 6.78 (dd, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.17-7.42 (m, 18H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 20.38, 24.56, 24.88, 36.82, 43.08, 55.43, 58.39, 60.45, 69.88, 86.09, 113.18, 117.88, 126.81, 127.93, 128.36, 130.20, 136.77, 137.59, 145.47, 158.49. ³¹P-NMR: δ 145.20.

10

【0088】

c i s - 3 , 5 - ビス - ジメトキシトリチルオキシ - シクロヘキサン - 1 - オール (18) : c i s - 1 , 3 , 5 - シクロヘキサントリオール無水物 (5 . 0 5 g, 3 0 m m o l) をピリジン (1 0 0 m L) に溶解し、回転蒸発乾固し、高真空化で 4 8 時間乾燥して、無水 c i s - 1 , 3 , 5 - シクロヘキサントリオール (4 . 0 5 g, 3 0 . 6 m m o l) を得た。上記無水シクロヘキサントリオールおよび D M A P (7 . 3 3 g, 6 0 m m o l) を乾燥ピリジン (1 0 0 m L) に溶解し、氷浴中で冷却し、窒素雰囲気下に維持した。乾燥ピリジン (1 5 0 m L) 中の D M T C 1 (2 0 . 4 g, 6 0 m m o l , 2 当量) を、上記溶液に激しく攪拌しつつ 1 滴ずつ加えた。反応混合物をゆっくりと室温に到達させ (~ 4 時間)、2 4 時間攪拌を続けた。0 . 5 % T E A を含む 2 : 1 のヘキサン / E t O A c 混合物中の T L C は、いくつかの出発物質の存在を示した。反応混合物をさらに 5 時間 6 0 で攪拌し、ピリジンを回転蒸発乾固した。残留物を D C M (5 0 0 m L) に溶解し、水 (5 0 0 m L) 、飽和 N H₄ C l 溶液 (5 0 0 m L) 、ブライン (5 0 0 m L) および水 (2 × 5 0 0 m L) で続いて洗浄した。D C M 層を無水 M g S O₄ 上で乾燥し、回転蒸発乾固した。残留物を、0 . 5 % T E A を含む 3 : 1 のヘキサン / E t O A c を用いたシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィにより精製して、ビス - D M T 産物 (1 8) を白色固体として得た (8 . 4 g, 3 8 %)。

20

【化14】

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.04-1.13 (m, 3H, 2,4 & 6-CH₂-), 1.24-1.28 (m, 3H, 2,4 & 6-CH₂-), 1.66 (d, 1H, 1-OH), 2.84-2.93 (m, 1H, -CH-OH), 3.10-3.18 (m, 2H, 3 & 5-CH-), 3.78 (d, 12H, -OCH₃), 6.78 (d, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.16-7.42 (m, 18H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 41.42, 42.67, 55.37, 66.16, 67.91, 86.28, 113.12, 126.83, 127.81, 128.53, 130.41, 137.39, 146.29, 158.53.

30

【0089】

1 (3 , 5 - ビス - ジメトキシトリチル - c i s - シクロヘキサントリオール) コハク酸 (1 9) : ビス - D M T - シクロヘキサントリオール (1 8) (4 . 0 5 g, 5 . 5 m m o l) および D M A P (1 . 3 4 g, 1 0 . 1 m m o l) を乾燥ピリジン (5 0 m L) に溶解し、無水コハク酸 (1 . 1 g, 1 0 . 1 m m o l) を、室温で激しく攪拌しつつ 1 部ずつ加えた。反応混合物を室温で 4 8 時間攪拌し、2 % メタノールおよび 0 . 5 % T E A を含む D C M 中の T L C が、出発物質が完全に消えたことを示した。ピリジンを回転蒸発乾固し、残留物を D C M (2 5 0 m L) に溶解し、氷冷の 1 0 % クエン酸溶液 (2 × 2 5 0 m L) および水 (2 × 2 5 0 m L) で続いて洗浄した。D C M 層を無水 M g S O₄ 上で乾燥し、回転蒸発装置で 5 0 m L 容積に濃縮し、0 . 5 % T E A 含有の D C M 中 0 . 2 % メタノールを用いたシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィにより精製して、コハク酸塩の純粹トリエチルアンモニウム塩 (1 9) を白色発泡体として得た (3 . 5 8 g, 7 8 %)。

40

50

【化15】

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.17 (t, *J* = 7.6, 9H, -N(CH₂CH₃)₃), 1.17 - 1.25 (m, 2H, 4-CH₂-), 1.36 - 1.51 (m, 4H, 2 & 6 - CH₂-), 2.37 - 2.47 (m, 4H, -OCH₂CH₂CN), 2.86 (q, 6H, -N(CH₂CH₃)₃), 2.99 - 3.10 (m, 2H, 3 & 5 -CH-), 3.78 (d, 12H, -OCH₃), 3.98 - 4.08 (m, 1H, 1-CH-), 6.76 (dd, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.15 - 7.37 (m, 18H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 9.38, 31.16, 31.96, 39.02, 41.76, 45.18, 55.37, 67.68, 86.24, 113.12, 126.79, 127.77, 128.42, 130.33, 130.38, 137.15, 137.26, 146.28, 158.54, 172.58 および 178.16.

10

【0090】

ビス-D M T シクロヘキサントリオール誘導体化 C P G (20) の調製：ピリジン / アセトニトリルの 1 : 7.5 混合物 (85 mL) 中の、コハク酸塩 (19) (0.78 g, 0.93 mmol)、D M A P (0.38 g, 2.8 mmol) および D I C (3 mL) の溶液を、C P G (22.5 g) に加え、スラリーを 24 時間攪拌した。溶液をろ別し、C P G を、5% ピリジン含有アセトニトリル (2 × 100 mL) およびアセトニトリル (3 × 100 mL) で洗浄した。キャップ A (A B I、80 mL) およびキャップ B (A B I、90 mL) 溶液を C P G 支持体に加え、4 時間振盪した。溶液をろ別し、C P G を 5% ピリジン含有アセトニトリル (2 × 100 mL) で洗浄し、続いてアセトニトリル (2 × 250 mL) で洗浄し、高真空下で 30 分間乾燥した。5% ピリジン (100 mL) を含むアセトニトリル中の、T B D M S C 1 (2.5 g) およびイミダゾール (0.75 g) の溶液を C P G に加え、5 時間振盪した。溶液をろ別し、C P G を、5% ピリジン含有アセトニトリル (3 × 100 mL) および D C M (4 × 100 mL) で続いて洗浄し、デシケータ中高真空下で一晩乾燥して、乾燥 C P G 支持体 (20) を得た。負荷量は、C P G の小部分を D C M 中の 3% T C A で処理して決定し、D M T 含量 (40 μmol/g) を 498 mm での吸収の測定により定量した。

20

【0091】

例 2 :

マウス T L R 9 を発現する H E K 2 9 3 細胞中の、表 I からの例示のオリゴによる、細胞培養条件および試薬、サイトカイン誘発

30

マウス T L R 9 を安定して発現する H E K 2 9 3 細胞 (Invitrogen, San Diego, CA) を、48 ウエルプレート内、10% 熱不活性化 F B S を補足した D M E M で 250 μl / ウエルにて、5% C O₂ インキュベーターにおいて培養した。80% の細胞密集度で、培養物を一時的に、400 ng / ml の S E A P (ヒト胎性アルカリホスファターゼの分泌形態) レポータープラスミド (pNifty2-Seap (Invitrogen)) を用いて、培養培地中の 4 μl / ml のリポフェクタミン (Invitrogen, Carlsbad, CA) の存在下でトランスフェクトした。プラスミド D N A およびリポフェクタミンを別々に無血清培地に希釈し、室温で 5 分間インキュベーションした。インキュベーション後、希釈 D N A およびリポフェクタミンを混合し、混合物を室温で 20 分間インキュベーションした。100 ng のプラスミド D N A および 1 μl のリポフェクタミンを含む、D N A / リポフェクタミン混合物のアリコート 25 μl を、細胞培養プレートの各ウェルに加え、培養を 4 時間続けた。

40

トランスフェクションの後、培地を新鮮な培養培地で置き換える、表 I からの例示のオリゴを培養物中に加え、培養を 24 時間続けた。オリゴ処理の最後に、30 μl の培養物上清を各処理から取り出し、製造業者のプロトコル (Invitrogen) に従う S E A P アッセイに用いた。簡潔に述べると、培養物上清を、リン酸 n - ニトロフィニイル基質でインキュベーションし、生成された黄色の物質を、プレートリーダーにより 405 nm にて測定した (Putta M R et al., Nucleic Acid Res., 2006, 34: 3231-8)。

【0092】

例 3 :

ヒト P B M C 、 p D C 、およびマウス脾臓細胞中の、表 I からの例示のオリゴによるサイ

50

トカイン誘発ヒトPBM C 単離

新しく収集した健康なボランティアの血液 (CBR Laboratories, Boston, MA) からの末梢血単核細胞 (PBM C) を、フィコール密度勾配遠心分離法 (Histopaque-107, Sigma) により単離した。

ヒトpDC 単離

pDC は、製造業者の指示書に従って、B D C A 4 細胞単離キット (Miltenyi Biotec) を用いる陽性選択により、PBM C から単離した。

マウス脾臓細胞単離

4 ~ 8 週齢の C 5 7 B L / 6 マウスからの脾臓細胞を、Zhao, Q. et al, (Biochem Pharmacol. 51:173-182(1996) および Branda R.F., et al. (Biochem Pharmacol. 45:2037-2043(1993) による記載のように、RPMI 完全培地中で培養した。全てのその他の培養試薬は、Mediatech (Gaithersburg, MD) から購入した。 10

【0093】

サイトカインELISA

ヒトPBM C またはマウス脾臓細胞を、48 ウェルプレートに 5×10^6 細胞 / ml でプレートした。ヒトpDC を、96 ウェルディッシュに 1×10^6 細胞 / ml でプレートした。D PBS (pH 7.4; Mediatech) 中に溶解した表 I の例示のオリゴを、細胞培養物に加えた。細胞を次に 37 °C で 24 時間インキュベーションし、上清を Luminex Multiplex 用または ELISA アッセイ用に収集した。ある実験においては、IL-1 、 IL-6 および / または IL-12 のレベルを、サンドイッチ ELISA で測定した。サイトカイン抗体および標準を含む必要な試薬は、PharMingen から購入した。 20

サイトカインLuminex Multiplex

ある実験においては、培養物上清中の IL-1R 、 IL-6 、 IL-10 、 IL-12 、 IFN- 、 IFN- 、 MIP-1 、 MIP- 、 MCP-1 および IL-12 p40 p70 のレベルを、 Luminex Multiplex アッセイにより測定した；これは、 Luminex 100 装置上で Biosource 製ヒトマルチプレクスサイトカインアッセイキットを用いて実施し、データを Applied Cytometry Systems (Sacramento, CA) が供給する StarStation ソフトウェアを用いて解析した。 30

【0094】

例 4 :

表 I からの例示のオリゴの存在下でのヒト B 細胞増殖アッセイ

ヒト B 細胞を、 PBM C から、製造業者の指示に従って CD19 Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を用いた陽性選択により単離した。

アッセイに用いた培養培地は、1.5 mM のグルタミンを補った RPMI 1640 培地、1 mM のビルビン酸ナトリウム、0.1 mM の非必須アミノ酸、50 μM の 2 - メルカプトエタノール、100 IU / ml のペニシリン - ストレプトマイシン混合物および 10 % の熱非活性化ウシ胎仔血清からなる。

全体で 1 ml 当たり 0.5×10^6 の B 細胞を、96 ウェルの平底プレートで、表 I からの例示のオリゴの異なる濃度で、トリプリケートで、全 72 時間刺激した。66 時間後、細胞を、1 ウェル当たり、20 μl の RPMI 1640 培地 (血清なし) 中の 0.75 μCi の [H^3] - チミジン (1 Ci = 37 GBq ; Perkin Elmer Life Sciences) でパルスし、6 ~ 8 時間後に収穫した。次にプレートを細胞収穫器により収穫し、放射性混入物を標準の液体シンチレーション技術により決定した。いくつかのケースでは、対応する [H^3] - T (cpm) を増殖指数に変換し、これを用いて報告した。 40

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/87182
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A01N 43/04(2006.01);A61K 31/70(2006.01);C07H 21/04(2006.01);C12Q 1/68(2006.01)		
USPC: 536/23.1,24.5;514/44;435/6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.1, 24.5; 514/44; 435/6		
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.
Y	SUZUKI et al., Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity. Cancer Research, December 2004, Vol. 64, pages 8754-8760, see the entire document.	1-12
Y	US 2003/0138413 A1 (VICARI et al) 24 June 2003 (24.06.2003), pages 4-11 and claims 1, 9-31.	1-12
Y	US 2006/0241076 A1 (UFILMAN et al) 26 October 2006 (26.10.2006), pages 4-22, 26-27, 30-32 and claims 1-22, 26-34, 58, 82, 88, 90-91, 95, 99, 101, 103.	1-12
Y	COOPER et al., CPG7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotides, as adjuvant to Engerix-B(R) HBV vaccine in healthy adults: A double-blind phase I/II study. Journal of Clinical Immunology, November 2004, Vol 24, No. 6, pages 693-701, see the entire document.	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex
Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent 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 "A" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 07 July 2008 (07.07.2008)		Date of mailing of the international search report 22 AUG 2008
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. (571) 273-3203		Authorized officer J. E. Angel/ Primary Examiner, AU1635, for: DANA SHIN Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/87182
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT.		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KADIMALLA et al., Immunomodulatory oligonucleotides containing a cytosine-phosphate-2'-deoxy-7-deazaguanosine motif as potent Toll-like receptor 9 agonists. PNAS, May 2005, Vol 102, No. 19, pages 6925-6930, see the entire document.	1-12
Y	KRIEG, A.M., Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. Nature Reviews Drug Discovery, June 2006, Vol 5, pages 471-484, see the entire document.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US07/87182

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
Medline, Biosis, Embase, SciSearch, CA, EAST
search terms: TLR9, agonist, oligonucleotide, phosphorothioate, antigen, vaccine, treat, cancer, immune, inflammatory

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
C 1 2 N 15/117 (2010.01)	A 6 1 P 37/04	
	C 1 2 N 15/00 Z N A J	

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

(72) 発明者 レッディー, マリカージュナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01803、バーリントン、アーボリータム ウェイ 8
24

(72) 発明者 ユ, ドン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01581、ウェストバロ、インディアン ポンド ロード 25

(72) 発明者 バガット, ラクシュミ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01702、フラミンハム、ユニット 605、ウースター ストリート 1550

(72) 発明者 ワン, ダキン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01730、ベッドフォード、セルフリッジ ロード 7

(72) 発明者 アグラワル, サディール
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01545、シューズベリー、ランプライター ドライブ 61

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA05 HA17
4C057 AA18 MM02 MM04
4C085 AA03 AA38 BA01 BB01 BB03 CC31 EE01 EE06 FF14
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14 ZA59
ZB07 ZB09 ZB11 ZB13 ZB32 ZC75