

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成 18 年 1 月 5 日 (2006.1.5)

【公表番号】特表 2003-526628 (P2003-526628A)

【公表日】平成 15 年 9 月 9 日 (2003.9.9)

【出願番号】特願 2001-517689 (P2001-517689)

【国際特許分類】

A 6 1 K 31/712 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/18 (2006.01)

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

C 0 7 H 21/04 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 31/712

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 31/18

A 6 1 P 37/06

C 0 7 H 21/04 B

C 1 2 N 15/00 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成 17 年 7 月 1 日 (2005.7.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 6】\_\_C p G ジヌクレオチドの 5' 側に隣接した位置に 2' 置換ヌクレオシドを含み、少なくとも一つのヌクレオシドが 2' - O - メチルリボヌクレオシドではなく、ヒト免疫不全ウイルス 1 型の g a g または r e v 遺伝子に相補的ではない、免疫刺激作用の低減した C p G 含有オリゴヌクレオチド。\_\_

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 1 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1 6】 H a - r a s またはヒト免疫不全ウイルス 1 型の g a g または r e v 遺伝子に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドではない、C p G 含有オリゴヌクレオチドの免疫刺激作用を増大させる方法であって、該オリゴヌクレオチド中の C p G ジヌクレオチドの 5' 側の 1 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5' 側の 2 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5' 側の 3 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5' 側の 4 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5' 側の 5 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5' 側の 6 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3' 側の 2 つのヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3' 側の 3 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3' 側の 4 番目のヌクレオシド、\_\_C p G ジヌクレオチドの 3' 側の 5 番目のヌクレオシド、\_\_C p G ジヌクレオチドの 3' 側の 6 番目のヌクレオシド、\_\_およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた位置にて 2' 置換ヌクレオシドを導入することを含む方法。

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1 8】 免疫刺激作用の増大した C p G 含有オリゴヌクレオチドであって、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 1 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 2 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 3 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 4 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 5 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 6 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 2 つのヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 3 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 4 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 5 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 6 番目のヌクレオシド、およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた位置にて 2 '置換ヌクレオシドを含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

## 【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 2 2】 哺乳動物において免疫応答を誘発する方法であって、哺乳動物に C p G 含有オリゴヌクレオチドを投与することを含み、その際、該オリゴヌクレオチドは、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 1 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 2 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 3 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 4 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 5 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 5 '側の 6 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 2 つのヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 3 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 4 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 5 番目のヌクレオシド、C p G ジヌクレオチドの 3 '側の 6 番目のヌクレオシド、およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた位置にて 2 '置換ヌクレオシドを含み、H a - r a s またはヒト免疫不全ウイルス 1 型の g a g または r e v 遺伝子に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドではないことを特徴とする、方法。

## 【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 6】

さらに最近では、何人かの研究者が疾患の治療に対するアンチセンス法の有効性を示している。Crooke (Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 8: vii-viii) は、サイトメガロウイルスによって誘発されたヒトの網膜炎の治療に対するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの市場売上の承認が得られたことを開示している。残念なことに、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの使用は当初予想されていたよりも複雑なものとなっていった。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによって引き起こされるある種の作用は、予想されるアンチセンスのメカニズムでは説明できなかった。たとえば、McIntyreら (Antisense Res. Dev. 3: 309-322 (1993)) は、「センス」のホスホロチオエートオリゴヌクレオチドが特定の免疫刺激を引き起こすことを教示している。この副作用や他の副作用は、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの概念を複雑なものにしている。Zhaoら (Biochemical Pharmacology 51: 173-182 (1996)) は、2 つの C p G 含有オリゴヌクレオチド [一つは H I V - 1 からの g a g 遺伝子に相補的なものであり (

## 【化 1】

5'-CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT-3'

(配列番号 1))、他は HIV - 1 の rev 遺伝子に相補的なものである (

## 【化 2】

5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC-3'

(配列番号 2)) ] によって媒体される免疫刺激を開示している。

## 【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

第四の側面において、本発明は、Ha-rasまたはヒト免疫不全ウイルス1型の gag または rev 遺伝子に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドではない CpG 含有オリゴヌクレオチドの免疫刺激作用を増大させる方法を提供する。本発明のこの側面による方法は、オリゴヌクレオチド中の CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 1 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 2 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 3 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 4 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 5 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 6 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 2 つのヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 3 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 4 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 5 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 6 番目のヌクレオシド、およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた位置にて 2' 置換ヌクレオチドを導入することを含む。ある好ましい態様において、該オリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドではない。別の態様では該オリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。

## 【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

第五の側面において、本発明は、免疫刺激作用の増大した CpG 含有オリゴヌクレオチドを提供する。該オリゴヌクレオチドは、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 1 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 2 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 3 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 4 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 5 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 5' 側の 6 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 2 つのヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 3 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 4 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 5 番目のヌクレオシド、CpG ジヌクレオチドの 3' 側の 6 番目のヌクレオシド、およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた位置にて 2' 置換ヌクレオチドを含み、Ha-rasまたはヒト免疫不全ウイルス1型の gag または rev 遺伝子に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドではない。ある好ましい態様において、該オリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドではない。

## 【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0014】

第六の側面において、本発明は、哺乳動物において免疫応答を誘発する方法を提供する。該方法は、哺乳動物にCpG含有オリゴヌクレオチドを投与することを含み、その際、該オリゴヌクレオチドは、CpGジヌクレオチドの5'側の1番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の2番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の3番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の4番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の5番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の6番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の2つのヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の3番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の4番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の5番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の6番目のヌクレオシド、およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた位置にて2'置換ヌクレオシドを含み、Ha-rasまたはヒト免疫不全ウイルス1型のgagまたはrev遺伝子に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドではないことを特徴とする。ある好ましい態様において、該オリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドではない。

## 【手続補正9】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0024

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0024】

第四の側面において、本発明は、Ha-rasまたはヒト免疫不全ウイルス1型のgagまたはrev遺伝子に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドではない、免疫刺激モチーフ（たとえば、CpG）含有オリゴヌクレオチドの免疫刺激作用を増大させる方法を提供する。本発明のこの側面による方法は、オリゴヌクレオチド中のCpGジヌクレオチドの5'側の1番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の2番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の3番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の4番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の5番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の6番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の2つのヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の3番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の4番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の5番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの3'側の6番目のヌクレオシド、およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた位置にて2'置換ヌクレオシドを導入することを含む。ある好ましい態様において、該オリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドではない。

## 【手続補正10】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0025

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0025】

本発明のこの側面による方法は、合成プロセスでCpGジヌクレオチドの導入直後のサイクルに適切な2'置換モノマーシンソンを用いさえすれば、よく知られた合成法のいずれにおいても都合よく行うことができる。好ましいモノマーとしては、ホスホルアミダイト、ホスホトリエステルおよびH-ホスホネートが挙げられる。それゆえ、本発明の目的のためには、「オリゴヌクレオチド中のCpGジヌクレオチドの5'側の1番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の2番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の3番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の4番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の5番目のヌクレオシド、CpGジヌクレオチドの5'側の

の6番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の2つのヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の3番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の4番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の5番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の6番目のヌクレオシド、およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた位置にて2'置換ヌクレオシドを導入する」とは、単にそのような位置に2'置換ヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドを合成することを意味する。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

第五の側面において、本発明は、免疫刺激作用の増大した免疫刺激モチーフ（たとえば、C p G）含有オリゴヌクレオチドを提供する。該オリゴヌクレオチドは、C p Gジヌクレオチドの5'側の1番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの5'側の2番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの5'側の3番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの5'側の4番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの5'側の5番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの5'側の6番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の2つのヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の3番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の4番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の5番目のヌクレオシド、C p Gジヌクレオチドの3'側の6番目のヌクレオシド、およびこれらの組み合わせよりなる群から選ばれた位置にて2'置換ヌクレオシドを含み、H a - r a sまたはヒト免疫不全ウイルス1型のg a gまたはr e v遺伝子に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドではない。ある好ましい態様において、該オリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドではない。本発明の第四、第五および第六の側面による好ましいオリゴヌクレオチドは、長さが約6～約50ヌクレオチドであり、安定性を向上させるため修飾したヌクレオチド間結合、修飾した塩基または修飾した糖をさらに含んでよい。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

下記実施例は本発明のある種の好ましい態様をさらに説明することを意図するものであって、本発明の範囲を制限することを意図するものではない。

#### 実施例1

##### インビトロでの免疫刺激作用の変調

C p Gモチーフを含有するP S - オリゴの化学修飾の位置の影響を調べるため、本発明者らは2つのオリゴヌクレオチドを選んだ。オリゴ1は一つのC p Gモチーフを含み、オリゴ15は2つのC p Gモチーフを含む。これら2つのオリゴはいずれも以前に調べられており、免疫刺激性であることが示されている。本試験においてオリゴヌクレオチドの免疫刺激活性を評価するため、本発明者らはマウスの脾臓細胞増殖アッセイを用いた。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

表1：オリゴデオキシヌクレオチドホスホロチオエートおよび修飾部位

【表 1】

オリゴ No.	配 列 & 修 飾 (5'-3')	配列番号
1	TCCATGACGTTCCCTGATGC	3
2	TCCAT <u>G</u> ACGTTCCCTGATGC	3
3	TCCA <u>U</u> GACGTTCCCTGATGC	4
4	TCCA <u>A</u> UGACGTTCCCTGATGC	4
5	TCC <u>C</u> ATGACGTTCCCTGATGC	3
6	TCCATGACG <u>U</u> UCCTGATGC	5
7	TCCATGACGT <u>U</u> CCTGATGC	6
8	TCCATGACGTTCC <u>C</u> TGATGC	3
9	TCCATGACGTTCC <u>C</u> UGATGC	7
10	TCCATGACGTTCC <u>U</u> GATGC	7
11	TCCATGACGTTCCCT <u>G</u> ATGC	3
12	TCC <u>A</u> TGACGTTCC <u>C</u> UGATGC	7
13	TCCATGACGTTCCCTG <u>A</u> UGC	8
14	TCC <u>A</u> TGACGTTCCCTG <u>A</u> UGC	8
15	TCCATGACGTTCCCTGACGTT	9
16	TCCA <u>U</u> GACGTTCCCTGACGTT	10
17	TCCATGACGTTCC <u>C</u> UGACGTT	11
18	TCCA <u>U</u> GACGTTCC <u>C</u> UGACGTT	12

