

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5872685号
(P5872685)

(45) 発行日 平成28年3月1日(2016.3.1)

(24) 登録日 平成28年1月22日(2016.1.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 15/117 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 J
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02

請求項の数 10 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-511898 (P2014-511898)	(73) 特許権者	510000976
(86) (22) 出願日	平成24年5月25日 (2012.5.25)		インターベット インターナショナル ベー. フェー.
(65) 公表番号	特表2014-516534 (P2014-516534A)		オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35
(43) 公表日	平成26年7月17日 (2014.7.17)	(74) 代理人	100146318
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/059800		弁理士 岩瀬 吉和
(87) 国際公開番号	W02012/160184	(74) 代理人	100114188
(87) 国際公開日	平成24年11月29日 (2012.11.29)		弁理士 小野 誠
審査請求日	平成26年2月4日 (2014.2.4)	(74) 代理人	100119253
(31) 優先権主張番号	11167605.2		弁理士 金山 賢教
(32) 優先日	平成23年5月26日 (2011.5.26)	(74) 代理人	100124855
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 坪倉 道明
(31) 優先権主張番号	61/490,387		
(32) 優先日	平成23年5月26日 (2011.5.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫刺激性オリゴデオキシヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式



を有し、式中、

x = 3 から 20 ;

z = 0 から 10 ;

n = 2 から 100 ;

である、免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド、またはその医薬的に許容可能な塩。

【請求項2】

x = 3 から 10 ;

z < 5 ;

n = 3 から 18 ;

であることを特徴とする、請求項1に記載の免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項3】

${}^5' [G]_x$ および ${}^3' [G]_z$ ヌクレオチドがホスホロチオエート結合を有し、他のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合を有する、請求項1または請求項2に記載のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 4】

前記オリゴデオキシヌクレオチドが、担体またはハプテンに結合されている、請求項 1 から請求項 3 の何れかに記載のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 1 から請求項 3 の何れかに記載のオリゴデオキシヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 6】

感染症を防ぐまたは感染症と闘うためのワクチンであって、前記ワクチンは、

免疫刺激量の、請求項 1 から請求項 4 の何れかに記載のオリゴデオキシヌクレオチドおよび免疫学的量の抗原成分若しくは抗原成分をコードするポリヌクレオチド、および/または

請求項 5 に記載のベクターおよび免疫学的量の抗原成分もしくは抗原成分をコードするポリヌクレオチド、ならびに

医薬的に許容可能な担体を含むことを特徴とするワクチン。

【請求項 7】

前記抗原成分が、野生型の形態で家禽類に対する病原性を有するウイルスまたは微生物であるか、このウイルスまたは微生物に由来することを特徴とする、請求項 6 に記載のワクチン。

【請求項 8】

前記ウイルスまたは微生物が、伝染性気管支炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、伝染性ファブリキウスのう病（ガンボロ）、ニワトリ貧血エージェント、トリレオウイルス、マイコプラズマ・ガリセプティカム（*Mycoplasma gallisepticum*）、シチメンチョウ鼻気管炎ウイルス、ヘモフィルス・パラガリナルム（*Haemophilus paragallinarum*）（コリーザ）、ニワトリボックスウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、産卵低下症候群ウイルス、感染性咽頭気管炎ウイルス、シチメンチョウのヘルペスウイルス、アイメリア属種、オルニソバクテリウム・ライノトラキア（*Ornithobacterium rhinotracheale*）、パストレラ・ムルトシダ（*Pasteurella multocida*）、マイコプラズマ・シノピエ（*Mycoplasma synoviae*）、サルモネラ（*Salmonella*）属種および大腸菌（*E. coli*）からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載のワクチン。

【請求項 9】

薬剤として使用するための、請求項 1 から請求項 4 の何れかに記載の免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド、または請求項 5 に記載のベクター。

【請求項 10】

家禽類において感染症を防ぐまたは感染症と闘うために使用するための、請求項 1 から請求項 4 の何れかに記載の免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド、または請求項 5 に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫刺激性オリゴデオキシヌクレオチド、このようなオリゴデオキシヌクレオチドを含むベクターおよびワクチン、薬剤としてのこれらの使用、感染症を防ぐまたは感染症と闘う際のこれらの使用、ならびにこのようなオリゴデオキシヌクレオチドの検出方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

過去 20 年の間に、免疫系科学において、脊椎動物の免疫系は、病原体の独特な特性に対する受容体介在性認識を介して、微生物感染を検出し、かつ迅速な免疫活性化を誘発するメカニズムを有することが明らかとなっており、これがいわゆる、同系（*cognate*）宿主病原体認識受容体（*PRR*）と相互作用する病原体関連分子パターン（*PA*

10

20

30

40

50

MP)である(非特許文献1、非特許文献2)。

【0003】

ある種の型の病原体デオキシリボ核酸(DNA)が、これらPAMPの間で共通していることが現在明らかである。1995年に、細菌DNA中の非メチル化CpGモチーフが、マウスのB細胞活性化を誘発することが報告された(非特許文献3)。この研究により初めて、細菌免疫刺激性非メチル化CpG含有DNAの特異的認識と、哺乳類のDNAにおける以前に認識されたCpGの抑制および広範なCpGメチル化との関連が生み出された。最も有効なB細胞刺激性非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)は、配列要素GACGTTを有することが示された。

【0004】

当該分野における次の先例となる論文は、大阪(日本)のアキラシズオ研究室によって発表された(非特許文献4)。遺伝子クローニングおよびマウスにおけるターゲット遺伝子ノックアウトアプローチによって、CpG-ODNに対するマウスの細胞反応が、Toll様受容体9(TLR9)によって媒介されることが明白に示された。その後、CpG-ODNは、主にNFカッパ-B経路を介したTLR9シグナリングのアゴニストであることが示された(非特許文献5)。その後10年のうちに、基本的な研究トピックおよび一般的な潜在的免疫療法用途について非常に数多くの研究が発表された(例えば、非特許文献6から非特許文献8の総説;非特許文献9から非特許文献15)。いくつかの総説記事が、CpG-ODNの抗感染用途(非特許文献16)、癌治療におけるTLR9アゴニストの利用(非特許文献17、非特許文献18)、喘息およびアレルギー治療のためのTLR9活性化(非特許文献19から非特許文献21)、ならびにワクチンアジュバント(非特許文献22から非特許文献27)に注目している。

【0005】

CpG ODNは、獣医学的用途、特にウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ニワトリおよび魚類における免疫刺激剤およびワクチンアジュバントとして記載および考察されている(非特許文献28から非特許文献33)。

【0006】

ニワトリにおける獣医学的利用の分野では、ニワトリをニューカッスル病から保護するための例えばワクチンでのCpGオリゴデオキシヌクレオチドの使用が記載されている(非特許文献34)。最近、ニワトリにおいて、TLR21が、CpGオリゴデオキシヌクレオチドの認識において、哺乳類のTLR9に対する機能的相同体としての機能を果たしていることが示された(非特許文献35)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. 2010. Science 327, 291-295.

【非特許文献2】Medzhitov R., Approaching the asymptote: 20 years later. 2009. Immunity 30, 766-775.

【非特許文献3】Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature 374, 546-549.

【非特許文献4】Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacte

10

20

30

40

50

rial DNA. Nature 408, 740 - 745.

【非特許文献5】Medzhitov R., 2001. CpG DNA: security code for host defense. Nat. Immunol. 2, 15 - 16.

【非特許文献6】Krieg A.M., 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu. Rev. Immunol. 20, 709 - 760.

【非特許文献7】Krieg A.M., 2003. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? Nat. Med. 9, 831 - 835.

10

【非特許文献8】Krieg A.M., 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. Nat. Rev. Drug Discov. 5, 471 - 484.

【非特許文献9】Klinman D.M., 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. Nat. Rev. Immunol. 4, 249 - 258.

【非特許文献10】Vollmer J., 2005. Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9. Expert Opin. Biol. Ther. 5, 673 - 682.

20

【非特許文献11】Wilson H.L., Dar A., Napper S.K., Marianela Lopez A., Babiuk L.A., Mutwiri G.K., 2006. Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides. Int. Rev. Immunol. 25, 183 - 213.

【非特許文献12】Kindrachuk J., Potter J., Wilson H.L., Griebel P., Babiuk L.A., Napper S., 2008. Activation and regulation of toll-like receptor 9: CpGs and beyond. Mini Rev. Med. Chem. 8, 590 - 600.

30

【非特許文献13】Dorn A., Kippenberger S., 2008. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. Curr. Opin. Mol. Ther. 10, 10 - 20.

【非特許文献14】Vollmer J., Krieg A.M., 2009. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. Adv. Drug Deliv. Rev. 61, 195 - 204.

【非特許文献15】Wilson K.D., de Jong S.D., Tam Y.K., 2009. Lipid-based delivery of CpG oligodeoxynucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. Adv. Drug Deliv. Rev. 61, 233 - 242.

40

【非特許文献16】Krieg A.M., 2007a. Anti-infective applications of toll-like receptor 9 agonists. Proc. Am. Thorac. Soc. 4, 289 - 294.

【非特許文献17】Krieg A.M., 2007b. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. J. Clin. Invest. 117, 1184 - 1194.

【非特許文献18】Weiner G.J., 2009. CpG oligodeoxy

50

nucleotide-based therapy of lymphoid malignancies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 263-267.

【非特許文献19】Kline J.N., 2007. Immunotherapy of asthma using CpG oligodeoxynucleotides. *Immunol. Res.* 39, 279-286.

【非特許文献20】Kline J.N., Krieg A.M., 2008. Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect.* 21, 434-439.

【非特許文献21】Fonseca D.E., Kline J.N., 2009. Use of CpG oligodeoxynucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 256-262.

10

【非特許文献22】Klinman D.M., Currie D., Gursel I., Verthelyi D., 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* 199, 201-216.

【非特許文献23】Klinman D.M., 2006. Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *Int. Rev. Immunol.* 25, 135-154.

20

【非特許文献24】Daubenberger C.A., 2007. TLR9 agonists as adjuvants for prophylactic and therapeutic vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9, 45-52.

【非特許文献25】Wagner H., 2009. The immunogenicity of CpG-antigen conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 243-247.

【非特許文献26】Mutwiri G., van Drunen Littel-vanden Hurk S., Babiuk L.A., 2009. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 226-232.

30

【非特許文献27】Klinman D.M., Klaschik S., Sato T., Tross D., 2009. CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 248-255.

【非特許文献28】Babiuk L.A., Gomis S., Hecker R., 2003. Molecular approaches to disease control. *Poult. Sci.* 82, 870-875.

40

【非特許文献29】Carrington A.C., Secombes C.J., 2006. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 87-101.

【非特許文献30】Griebel P.J., Brownlie R., Manuja A., Nichani A., Mookherjee N., Popowych Y., Mutwiri G., Hecker R., Babiuk L.A., 2005. Bovine toll-like receptor 9: a comparative analysis of molecular structure, function and expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.*

50

1.108, 11-16.

【非特許文献31】Mutwiri G., Pontarollo R., Babiuk S., Griebel P., van Drunen Littel-van den Hurk S., Mena A., Tsang C., Alcon V., Nichani A., Ioannou X., Gomis S., Townsend H., Hecker R., Potter A., Babiuk L.A., 2003. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 89-103.

【非特許文献32】Singh M., O'Hagan D.T., 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. Parasitol.* 33, 469-478.

【非特許文献33】Werling D., Jungi T.W., 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 1-12.

【非特許文献34】Linghua Zhangら, 2007. Vaccination with Newcastle disease vaccine and CpG oligodeoxynucleotides induces specific immunity and protection against Newcastle disease virus in SPF chicken. *Vet. Immun. And Immunopath.* 115, 216-222.

【非特許文献35】Brownlie, R., Zhu J., Allan B., Mutwiri G.K., Babiuk L.A., Potter A., Griebel P., 2009. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol. Immunol.* 46, 3163-3170.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

免疫調節剤としての特異的 CpG ODN の設計は、従来、完全にランダムなものであった。これは特に、非哺乳類 CpG ODN について当てはまる。その理由は多くの要因からなり：先ず第1に、ヒト TLR の免疫調節性 CpG モチーフと非ヒト TLR の免疫調節性 CpG モチーフとの相関関係について知識がなく、非哺乳類種については放っておかれていること；第2に、非常に低い濃度の CpG ODN の影響を選択的に試験できるほどノイズレベルの十分に低いバックグラウンドで利用可能な細胞系がないこと；さらに、利用可能な高スループットのスクリーニング法がなく、たとえあったとしても、非哺乳類種の免疫調節剤として、CpG ODN のインビボ有効性とインビトロ有効性との間に明白な相関関係がないこと、である。

【0009】

従って、高い免疫調節効果を有することで、低ドーズでも効果のある新規な CpG ODN が明らかに必要とされている。そして、CpG - 活性のインビトロ活性とインビボ活性との相関関係を示すという獣医学的目的のために、選択的かつ感度の良い CpG ODN 選択系が必要とされている。

【0010】

本発明の目的の1つは、このような新規の CpG ODN を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

この点で、本発明の一実施形態は、式

10

20

30

40

50

$5' [G]_x \{TCGTCG\}_n TCG [G]_z 3'$
 を有し、式中、 $n = 2$ から 100 、 $x = 3$ から 20 、および $z = 0$ から 10 である、免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド、およびその医薬的に許容可能な塩に関するものである。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】 p c D N A 3 . 1 (+) c h i T L R 2 1 の プ ラ ス ミ ド マ ッ プ である。

【図2】 種々の z e o / G 4 1 8 二重耐性クローン細胞系の S E A P 活性の概要である。

【図3】 種々の z e o / G 4 1 8 二重耐性クローン細胞系の S E A P 活性の概要である。

【図4】 種々の z e o / G 4 1 8 二重耐性クローン細胞系の S E A P 活性の概要である。

【図5】 種々の z e o / G 4 1 8 二重耐性クローン細胞系の S E A P 活性の概要である。

【図6】 リポータ細胞 (H E K 2 9 3 - p N i f t y 2 - c h i c k e n T L R 2 1) に おけるリポータ酵素 S E A P の有色産物量 (4 0 5 n m で吸光する) を誘導する際の、 X 2 3 - 4 から X 2 3 N - 2 7 の効果を示す図である。

【図7】 リポータ細胞 (H E K 2 9 3 - p N i f t y 2 - c h i c k e n T L R 2 1) に おけるリポータ酵素 S E A P の有色産物量 (4 0 5 n m で吸光する) を誘導する際の、 X 2 3 - 4 から X 2 3 N - 2 7 の効果を示す図である。

【図8】 リポータ細胞 (H E K 2 9 3 - p N i f t y 2 - c h i c k e n T L R 2 1) に おけるリポータ酵素 S E A P の有色産物量 (4 0 5 n m で吸光する) を誘導する際の、 X 2 3 - 4 から X 2 3 N - 2 7 の効果を示す図である。

【図9】 X 2 3 - 4 から X 2 3 N - 2 7 の E C ₅₀ 値 (ピコモル) を示す図である。

【図10】 X 4 - p e n t (標準コントロール)、X 2 3 - s i x、X 2 3 - n i n e - 3 4 5 5 および X 2 3 - n i n e - 3 4 5 1 の E C ₅₀ 値を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

「免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド」は、シグナル伝達カスケードの開始を刺激する非メチル化シチジン - リン酸 - グアノシンジヌクレオチド配列を含むオリゴデオキシヌクレオチドを指し、これにより転写因子 (N F - κ B またはインターフェロン調節因子 3 (I R F 3) 等) の活性化が導かれる。この活性化が今度は、炎症性サイトカインの発現および他細胞の活性化イベントをもたらす。N F - κ B 結合部位および N F - κ B によって影響される遺伝子発現は、とりわけ S c h i n d l e r および B a i c h w a l (1 9 9 4) によって説明されている。

【0014】

用語オリゴデオキシヌクレオチドは、デオキシヌクレオチドの短い核酸ポリマー (すなわち、リン酸基および交換可能な有機塩基と結合したデオキシリボースを多数含む分子) を意味する。このような有機塩基として、置換ピリミジンまたは置換プリンがある。例としてそれぞれ、シトシンおよびチミン、ならびにアデニンおよびグアニンがある。

【0015】

本発明に係るオリゴヌクレオチドは、修飾を含んでよい。このような修飾の例として、例えば、ヌクレオシドの 3 ' および / または 5 ' 末端に位置するリン酸ジエステルヌクレオシド間ブリッジにおける修飾がある。このような修飾はとりわけ、例えばホスホロチオエートまたはホスホロジチオエートによるリン酸ジエステルの置換えに関連する。

【0016】

他の修飾として例えば、デホスホブリッジによるホスホジエステルブリッジの置換えがある。デホスホブリッジの例として、メチルヒドロキシルアミン、ホルムアセタールおよびジメチレンスルホン基がある。

【0017】

さらに他の修飾として、天然のヌクレオシド塩基の、非天然のヌクレオシド塩基 (イノシン、5 - フルオロシトシン、7 - デアザ - 7 - 置換グアニン、7 - デアザ - 8 - 置換グアニン、2 - チオウラシル、ジヒドロウラシル、5 - プロモ - シトシン、6 - 置換シトシ

10

20

30

40

50

ン、N4 - 置換シトシン等) による置換えに関する修飾がある。

【0018】

また、他の修飾として、糖単位(- リボース糖または - D - 2' - リボース糖単位) の修飾糖単位(例えばL - 2' - デオキシリボースまたは2' - L - アラビノース等) による置換えに関する修飾がある。

【0019】

オリゴヌクレオチドのさらなる見識を与えるテキストとして、例えば「PCR Primer: A Laboratory Manual」(第2版, 2003, Carl W. Dieffenbach編, National Institute of Allergy and Infectious Diseases; Gabriela S. Dreksler, Uniformed Services University of the Health Sciences, Cold Spring Harbor Laboratory Press ISBN 978 - 087969654 - 2) がある。

10

【0020】

CpGモチーフを有する構造 $5' \{TCGTCG\}_n 3'$ が、本発明に係るODNの活性のある免疫刺激部分を表す。従って、本発明は、このいわゆる「バックボーン」を含む免疫刺激性オリゴデオキシヌクレオチドを提供する。

【0021】

本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドのバックボーンは、構造 $5' \{TCGTCG\}_n 3'$ が少なくとも2回、好ましくは3回存在しなければならないことがわかった。従って、nは少なくとも2であるべきである。また、nが増大すると、オリゴデオキシヌクレオチドの活性が増大することもわかった。この効果は、nが増大すると安定する。従って、基本的に、バックボーン構造の数nは少なくとも2であるべきである。好ましくは、nの範囲は3 ≤ n ≤ 100である。これは単に、合成配列がより長くなるほど製造がより困難になるという事実によるためである。実際には、好ましくはnの範囲は3 ≤ n ≤ 18である。より好ましくは、nの範囲は4 ≤ n ≤ 18であり、さらにより好ましくは、nの範囲は5 ≤ n ≤ 18であり、なおさらにより好ましくは、nの範囲は6 ≤ n ≤ 18である。

20

【0022】

本発明に係るCpG ODNの識別は、とりわけ、NF - B活性化の検出に現在使用されている検出系よりも選択的な検出系を用いることによって可能となった。Brownlieら(2009)は、NF - Bルシフェラーゼベースのリポータ系を記載している。他の系は例えば、IL - 8転写測定、サイトカイン分泌、またはNO分泌の検出に基づくものである。

30

【0023】

これに反し、本発明では、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)ベースの検出系を用いた。SEAPは、哺乳類の系におけるリポータ酵素である(Yangら, 1997)。この系は、驚くほど感度が良いことがわかっており、また、驚くべきことに、試験したCpG ODNのインビトロ活性とインビボ活性との間で密接な相関関係が与えられる。SEAP系は、基質としてパラ - ニトロフェニルリン酸(pNPP)と共に用いられた。

40

【0024】

既存の系に対する別の改善が、SEAP遺伝子を有するプラスミドの細胞内への導入および細胞内での安定した維持であった。これまで、全ての検出系が、リポータ遺伝子による細胞の一過性トランスフェクションを用いていた。これは、リポータ遺伝子の、細胞内への導入および細胞内での安定した維持によって初めて、ドーズ/応答曲線が作成され得たことによるものである。このような曲線は、種々のCpG ODN活性間で信頼できる比較がなされ得るとすれば、不可欠なものである。

【0025】

50

従って、本発明の実施例部において詳細に記載される方法および細胞系は、種々の CpG ODN間の信頼できる逐次比較を初めて可能にするものである。

【0026】

用いられる系のさらなる詳細が、実施例部に与えられている。

【0027】

構造^{5'} [G]_x {TCGTCG}_n TCG [G]_z^{3'} の5'末端のGの数が増大すると、CpG ODNの活性が増大することがわかった。x値は好ましくは少なくとも3であるべきであり、Gの数が増大して最大20Gになるまで、CpG ODNの活性が向上する。従って、より好ましくは、xは4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20である（進むにつれ好ましい順である）。 10

【0028】

また、構造^{5'} [G]_x {TCGTCG}_n TCG [G]_z^{3'} の3'末端のGの数が増大すると、CpG ODNの活性が（わずかに）減少することもわかった。z値は好ましくは10以下であるべきであり、Gの数が減少して0Gになるまで、CpG ODNの活性が向上する。従って、より好ましくは、zは9、8、7、6、5、4、3、2、1または0である（進むにつれ好ましい順である）。

【0029】

前述のように、ヌクレオシドの3'および/または5'末端に位置するリン酸ジエステルヌクレオシド間ブリッジにおける数種類の修飾が可能である。しかし、基本的には、合成方法により、通常一般的な2ヌクレオチド間の結合タイプは：リン酸ジエステル（PDE）結合およびホスホロチオエート（PTO）結合である。CpG ODNの安定性および免疫刺激効果を向上させるために、合成オリゴデオキシヌクレオチドの構成ブロックに通常ホスホロチオエートが与えられて、PTO結合が形成される。 20

【0030】

しかしながら、驚くべきことに、^{5'} [G]_x および ^{3'} [G]_z ヌクレオチドだけがPTO結合によって結合され、他のヌクレオチドがPDE結合によって結合されると、本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドの有効性がさらに増大することがわかった。（このような場合、^{5'} [G]_x と {TCGTCG}_n TCG [G]_z^{3'} との結合はPTOであり、^{5'} [G]_x {TCGTCG}_n TCG と [G]_z^{3'} との結合はPDEである。） 30

従って、本実施形態の別の好ましい形は、^{5'} [G]_x および ^{3'} [G]_z ヌクレオチドがホスホロチオエート結合を有し、他のヌクレオチドはリン酸ジエステル結合を有する本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドに関するものである。

【0031】

通常、インビトロ試験系およびインビボの双方において、CpGオリゴデオキシヌクレオチドは、ナノモルの量で活性がある。

【0032】

しかしながら、驚くべきことに、本発明に係るCpGオリゴデオキシヌクレオチドは、ピコモル（サブナノモル）の量でなお一層の活性がある；このEC₅₀は1nM未満である。 40

【0033】

オリゴデオキシヌクレオチドの最大半量濃度（EC₅₀）とは、リポータ細胞（HEK293-pNifty2-chickenTLR21またはHD11-pNifTy2Hyg）におけるリポータ酵素SEAP（の有色産物（405nmで吸光する）を生産する）量を誘導するのに必要なオリゴデオキシヌクレオチドの、最大半量酵素反応速度をもたらす量である。オリゴデオキシヌクレオチドのEC₅₀がこれらの細胞において1nM未満であるならば、ピコモル（サブナノモル）の量で活性があると考えられる。

【0034】

本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドを、反応性化学基を介して、担体またはハブ 50

テンに結合することは確実に可能である。このような結合により、組み合わせた分子の免疫刺激効果は増進する。

【 0 0 3 5 】

そのような成分の単なる例として、例えばジゴキシゲニン、アミノヘキシル、テキサスレッドおよびピオチンがある。好ましい担体またはハプテンは、3' - および 5' - 標識化テキサスレッドならびに 5' - 標識化ジゴキシゲニンである。オリゴデオキシヌクレオチドのハプテン / 担体への結合は、当該技術において周知である。

【 0 0 3 6 】

本発明の別の実施形態は、本発明に係る免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドを含むベクターに関するものである。このようなベクターは、核酸分子（プラスミド、ウイルス、バクテリオファージまたは分子生物学で用いられる他の任意のベクター等）であってよい。単なる例として、免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドを含むベクターは例えば、細菌中で増やされ得るプラスミド等の DNA 分子であってよい（本発明に係る免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドがクローン化されている）。このようなプラスミドは好ましくは活性な複製起源を有し、これにより大量のプラスミドが宿主内に存在することになる。このような細菌の大規模な増殖に続くプラスミドの単離が、本発明に係る免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドの合成生産の代替方法を提供する。

10

【 0 0 3 7 】

本発明の目的の 1 つは、感染症を防ぐまたは感染症と闘うためのワクチン中の良好な免疫刺激性成分として、抗原成分または抗原成分をコードする遺伝的情報と併せて用いられ得る新規の CpG ODN、および医薬的に許容可能な担体を提供することである。

20

【 0 0 3 8 】

通常、用語抗原成分は、ヒトまたは動物に投与された場合に、免疫応答を誘導、刺激または増進することができる少なくとも 1 つのエピトープを含む物質の組成物を指す。

【 0 0 3 9 】

抗原成分は、任意の種類抗原成分であってよいが、好ましくは、野生型の形態でヒトまたは動物に対する病原性を有する微生物またはウイルスに由来するものである。

【 0 0 4 0 】

抗原成分は、完全な病原体（好ましくは不活性化または弱毒化された形態である）、病原体の抽出物、または病原体の免疫原性タンパク質であってよい。

30

【 0 0 4 1 】

抗原成分が病原体の免疫原性タンパク質である場合、その免疫原性タンパク質は好ましくは、インビトロ培養細胞中で発現されて、インビトロ培養細胞から回収される。

【 0 0 4 2 】

従って、別の実施形態は、感染症を防ぐまたは感染症と闘うためのワクチンに関するものであり、前記ワクチンは、免疫刺激量の本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチド、および / または本発明に係るベクター、免疫原性量の抗原成分もしくは抗原成分をコードする遺伝的情報、ならびに医薬的に許容可能な担体を含むことを特徴とする。

【 0 0 4 3 】

当然、オリゴデオキシヌクレオチドの免疫刺激量と抗原成分の免疫原性量とは、相互に強く関連付けられる。本発明の利点の 1 つは、本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドの存在が、感染症を防ぐまたは感染症と闘うのに必要な抗原成分の量を少なくすることができることである。

40

【 0 0 4 4 】

感染症を防ぐまたは感染症と闘うのに必要な抗原成分の量は、抗原成分の免疫原性量と呼ばれる。

【 0 0 4 5 】

オリゴデオキシヌクレオチドの免疫刺激量は、抗原成分の免疫原性量（すなわち、感染症を防ぐまたは感染症と闘うのに必要な抗原成分の量）を減少させることができる量であ

50

る。

【0046】

そのため、基本的に、表現「オリゴデオキシヌクレオチドの免疫刺激量」および「免疫原性量」は、互いに関連させて見なければならない。

【0047】

勿論、ワクチンが、抗原成分をコードする遺伝的情報を含む場合、この遺伝的情報によって発現される抗原成分の量は、感染症を防ぐまたは感染症と闘うに十分であるべきであり；それはすなわち、免疫原性量でなければならない。

【0048】

本発明に係る非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドが免疫刺激性であるという事実は、これによりワクチン中の抗原成分の免疫学的有効性が増進されることを意味する。この理由で、本発明に係るワクチンは、多くの場合、本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドが存在しない場合よりも少ない抗原成分または抗原成分をコードする遺伝的情報を含むこととなる。従って、場合によっては、このような抗原成分は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドを加えなければ、免疫原性特性が低いことがあるので、所望の免疫原性レベルに達しないにもかかわらず、結局のところ多量に与えられなければならない。そのような場合、抗原成分は、通常の高い濃度で投与されるが、しかしながらここで所望のレベルの免疫原性を得るために本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドと共に与えられる。

10

【0049】

従って、本発明に係るオリゴヌクレオチドと共に投与される抗原成分または抗原成分をコードする遺伝的情報の量は、経験則として、オリゴヌクレオチドがない場合に与えられる量以下であろう。特異的ワクチンの製造に従事する当業者であれば、その特異的ワクチン量がわかるであろう。また、実施例は、例えば、（例えば3つの異なる不活化ウイルスワクチン（ニューカッスル病ウイルスワクチン、感染性気管支炎ウイルスワクチンおよびシチメンチョウ鼻気管支炎ワクチン）において）用いられる抗原分量についての十分なガイダンスを与えている。

20

【0050】

抗原成分または抗原成分をコードする遺伝的情報と共に投与される必要がある本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドの量は、選択されるオリゴデオキシヌクレオチドおよび抗原成分の双方に依存する。

30

【0051】

本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドの非常に適切な量は、通常1から100ナノモルの間で変化するであろう。非常に良好なインビボ結果は例えば、30のデオキシヌクレオチドの平均長さを有する、1から10 μ gの本発明のオリゴデオキシヌクレオチド（インビトロ試験においてナノモル範囲で活性があることが示された）で得られた。

【0052】

オリゴデオキシヌクレオチドが、ピコモル範囲で活性があるオリゴデオキシヌクレオチドの群から選ばれる場合、当業者は、1ナノモルより下、1ナノモルをずっと下回る量（すなわち、ピコモル量）を、ナノモル量を試験する前に試験する価値があるかもしれないということに気付くであろう。

40

【0053】

本発明に係るワクチンは、医薬的に許容可能な担体を含む。この担体の性質はとりわけ、投与経路に依存する。投与経路が経口経路または鼻腔内経路を介するものである場合、担体は、滅菌水、生理的塩類液またはバッファのような簡単なものであってよい。注射が好ましい経路である場合、担体は好ましくは等張性であるべきであり、かつ注射に適するようなpH制限を有するべきである。しかしながら、このような担体は当該技術において広く知られている。

【0054】

本発明に係るワクチンは、抗原成分または抗原成分をコードする遺伝的情報、および本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドに加えて、アジュバントを含んでよい。アジュバ

50

ントは一般に、非特異的な方法で宿主の免疫応答を増大させる物質である。

【0055】

多くのアジュバントが当該技術において適していることが知られている（フロイントの完全および不完全アジュバント、ビタミンE、非イオン性ブロックポリマーおよびポリアニオン、例えばデキストラン硫酸、carbopolおよびピラン、水酸化アラム（aluminum hydroxide）等）。また、多用されるのは、リン酸アラム、サポニン、植物油（トコフェロール等）および鉱油である。非常に有効なアジュバントは、水中油エマルジョンおよび特に油中水エマルジョンであり、さらに水中油アジュバントおよび油中水アジュバントとも呼ばれる。このようなエマルジョンは当該技術において周知である。従って、好ましくは、ワクチンは油中水アジュバントを含む。

10

【0056】

好ましくは、抗原成分は、野生型の形態で家禽類に対する病原性を有するウイルスまたは微生物であるか、このウイルスまたは微生物に由来する。

【0057】

より好ましくは、前記ウイルスまたは微生物は、伝染性気管支炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、伝染性ファブリキウスのう病（ガンボロ）、ニワトリ貧血症エージェント、トリレオウイルス、マイコプラズマ・ガリセプティカム（*Mycoplasma gallisepticum*）、シチメンチョウ鼻気管炎ウイルス、ヘモフィルス・パラガリナルム（*Haemophilus paragallinarum*）（コリーザ）、ニワトリポックスウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、産卵低下症候群ウイルス、感染性咽頭気管炎ウイルス、シチメンチョウのヘルペスウイルス、アイメリア属種、オルニソバクテリウム・ライノトラキア（*Ornithobacterium rhinotracheale*）（トリ感染症病原菌）、パストレラ・ムルトシダ（*Pasteurella multocida*）、マイコプラズマ・シノビエ（*Mycoplasma synoviae*）、サルモネラ（*Salmonella*）属種および大腸菌（*Escherichia coli*）からなる群から選択される。

20

【0058】

また、本発明の別の実施形態は、薬剤として使用するための本発明に係る免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドに関するものである。

【0059】

また、本発明の別の実施形態は、家禽類において感染症を防ぐまたは感染症と闘う際に使用するための本発明に係る免疫刺激性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドに関するものである。

30

【0060】

これまで、全ての検出系は、リポータ遺伝子による細胞の一過性トランスフェクションを用いていた。このような一過性の系では、CpG ODNの有効性の信頼できる逐次比較が可能ではない。前述したように、既存の系に対する主要な改善は、リポータ遺伝子を有するプラスミドの、細胞内への導入および細胞内での安定した維持であった。安定とは、何回かの細胞分裂周期の後にプラスミドが細胞中に存在したままであることを意味するものである。

40

【0061】

プラスミドの安定した維持が、1つまたは複数の選択剤（抵抗遺伝子がプラスミド上に存在することによる抗生物質等）の圧力下で細胞を増殖させることによって、頻繁に得られる。プラスミドを損失すると、プラスミドを失った細胞が死ぬこととなる。残りの生存細胞にはプラスミドがまだ存在することとなる。

【0062】

安定維持の別の方法として、線状化プラスミドによるトランスフェクションがある。このようなプラスミドは通常、細胞のゲノム中に統合されるので、安定して維持される。従って、本発明のさらに別の実施形態は、TLR21-受容体と、NF- κ Bリポータ遺伝子をコードするプラスミドとを含む細胞に関するものであり、プラスミドは細胞中に安

50

定して維持される。このような細胞は、C p G分子のスクリーニング、より具体的には本発明に係るC p G分子のスクリーニングにおいて使用するのに非常に適している。

【0063】

実施例は、細胞中に安定して維持され得る、リポータ遺伝子をコードするプラスミドを含むこのような細胞を得る方法について、十分なガイダンスを与えている。

【0064】

上でも言及したように、分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）に基づく検出系が、使用される検出系に非常に適していることが示された。

【0065】

従って、好ましくは、リポータ遺伝子は、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子である。

【0066】

基本的に、TLR21を有し、かつこれを発現する任意の細胞または細胞系（上述したように、NF- κ Bリポータ遺伝子、好ましくはSEAP遺伝子を有するプラスミドの導入、および好ましくはその安定した維持を可能とする）が、TLR21特異的C p G ODNを試験するのに適している。

【0067】

TLR21特異的C p G ODNを試験するのに適したそのような細胞系の好ましい例として、ニワトリ細胞系HD11がある。

【0068】

従って、好ましくは、検出系において使用するための細胞系は、リポータ遺伝子をコードする安定したプラスミドを含むHD11細胞系である。

【0069】

ニワトリ細胞系（HD11細胞系等）は、ニワトリTLRの全パネルを示す。これにより、ある種の条件において、ある種のバックグラウンド活性が生じ得る。

【0070】

従って、哺乳類細胞系のような非家禽類細胞系が、より好ましい細胞系である。このような哺乳類細胞系の例として、TLR21がクローン化されているHEK293細胞がある。このような細胞系は、TLR21活性化シグナルに対する選択性がより特異的である。

【0071】

従って、より好ましくは、検出系において使用するための細胞系は、安定して維持されるリポータ遺伝子を含み、かつTLR21がクローン化されている哺乳類細胞系HEK293である。

【0072】

本発明のさらに別の実施形態は、本発明に係る免疫刺激性オリゴデオキシヌクレオチドの検出方法に関するものであり、当該方法は、a)本発明に係るオリゴデオキシヌクレオチドを細胞に接触させるステップと、b)リポータ遺伝子の産物のレベルを検出するステップとを含む。

【0073】

この方法の好ましい形において、リポータ遺伝子の産物はSEAPである。

本実施形態のより好ましい形は、本発明に係る免疫刺激性オリゴデオキシヌクレオチドの検出方法に関するものであり、細胞は、ニワトリ細胞系HD11、またはニワトリTLR21がクローン化されているHEK293細胞系の細胞である。

【0074】

実施例

実施例1

ニワトリTLR21の遺伝子クローニングおよび非相同発現

ニワトリTLR研究における最近の進展により、TLR21が、鳥種において、哺乳類TLR9の機能的相同体であることが示唆されている（Keestra 2008、Br

10

20

30

40

50

ownliera 2009)。

【0075】

TLR21 遺伝子クローニングの概略

Genbank データベース配列 NM_001030558 に基づいて、プライマーペアを、ニワトリ TLR21 遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅用に合成した:

Ga - TLR21 - for 1

G A A G C T T (A C C) [A T G] A T G G A G A C A G C G G A G A A G G C

Ga - TLR21 - rev 1

G G C G G C C C G [C T A] C A T C T G T T T G T C T C C T T C C C T G

プライマーは、フランキング位置制限クローニング部位 (下線)、ならびにコザック配列 (丸括弧)、開始コドンおよび終止コドン (角括弧) を与えるように設計した。これらのプライマーおよびテンプレートとしてニワトリ脾臓総 RNA を用いて、RT-PCR を実行した。予想されるサイズ (約 3000 bp) の PCR 産物を、pCR2.1-Topo 内にクローン化し、5 つの独立したプラスミドクローン (P1、P2、P12、P13、P14) を配列決定した。

10

【0076】

用いたニワトリ TLR21 の DNA 配列。

【0077】

A A G C T T (A C C) [A T G] A T G G A G A C A G C G G A G A A G G C A T G G
C C C A G C A C C A G G A T G T G C C C C T C C C A C T G C T G T C C A C T C T
G G C T G C T G C T G C T G G T G A C A G T G A C A C T G A T G C C G A T G G T
G C A C C C G T A T G G C T T T C G C A A C T G C A T T G A G G A T G T C A A G
G C A C C T T T G T A C T T C C G C T G C A T C C A G C G C T T C C T G C A G T
C G C C G G C C C T G G C A G T G T C T G A C C T G C C A C C A C A T G C C A T
C G C G C T C A A T C T G T C A T A C A A C A A A A T G C G C T G C C T G C A G
C C C T C T G C C T T T G C C C A C C T G A C A C A G C T G C A T A C C C T G G
A C C T G A C C T A C A A C C T C C T G G A G A C C C T C T C C C C T G G T G C
C T T C A A T G G G C T G G G T G T G C T G G T G G T G C T G G A C C T G T C T
C A C A A C A A G C T G A C C A C A C T T G C T G A A G G G G T G T T C A A C A
G C T T G G G C A A C C T G T C C T C G C T G C A G G T A C A A C A T A A C C C
C C T C A G C A C G G T G T C A C C A A G T G C T C T G C T A C C C C T G G T C
A A C C T G C G C C G C C T G T C T C T A C G G G G C G G G C G G C T G A A T G
G G T T G G G G G C A G T G G C A G T G G C A G T G C A G G G C T T G G C A C A
G C T G G A G C T G T T G G A C C T A T G T G A A A A C A A C C T G A C A A C G
C T G G G G C C A G G C C C A C C G C T A C C G C C T C G C T G C T C A C C C
T G C A G C T G T G C A A C A A C T C G C T G A G G G A G T T A G C G G G G G G
C A G C C C G G A G A T G C T A T G G C A C G T G A A G A T A C T C G A C C T C
T C C T A C A A C A G T A T C T C A C A G G C G G A G G T C T T C A C C C A G C
T C C A C C T G C G C A A C A T C A G C C T G C T C C A C C T G A T C G G C A A
C C C C T T G G A T G T C T T C C A C C T G T T G G A C A T C T C T G A C A T C
C A A C C T C G C A G C C T G G A T T T C T C T G G G T T G G T G C T G G G G G
C T C A G G G G C T G G A T A A G G T G T G C C T G A G G C T G C A G G G T C C
C C A G G C C T T G C G G C G G C T G C A G C T A C A A C G C A A C G G G C T G
A A G G T G C T G C A T T G T A A T G C A C T G C A G T T G T G T C C T G T G C
T G A G A G A G C T G G A C C T G T C C T G G A A C C G G C T A C A G C A C G T
G G G C T G T G C C G G C C G G C T G C T G G G C A A G A A G C A G C G G G A G
A A G C T G G A A G T G C T G A C A G T G G A A C A C A A C C T G C T G A A G A
A A C T G C C G T C T T G C C T G G G G G C C A G G T G C T G C C T C G G C T
G T A C A A C A T T T C C T T C C G C T T T A A C C G C A T C C T G A C T G T T
G G G C C C C A A G C C T T T G C C T A C G C C C C G G C C C T G C A G G T G T

20

30

40

50

TGTGGCTCAATATTAACAGCCTGGTGTGGCTGGACAGGCA
GGCACTGTGGAGGCTGCACAACCTGACAGAGCTGCGCCTG
GACAACAACCTGCTGACCGACCTCTATCACAACTCCTTCA
TTGACCTCCACAGACTGCGCACCCCTCAACCTGCGCAACA
CCGTGTCTCCGTCCTCTTCTCTGGTGTCTTCCAGGGGCTG
GCTGAGCTGCAGACGCTGGATTTAGGGGGCAACAACCTTGC
GCCACCTGACTGCACAGTCACTGCAGGGGCTGCCCAAACT
GCGCAGGCTGTACCTGGACCGCAACAGATTGCTGGAGGTG
AGCAGCACTGTGTTGCGCCCAAGTGCAGGCTACCCCTGGGG
TGCTGGACCTGCGGGCCAAACAACCTGCAGTACATCTCACA
GTGGCTGCGCAAGCCGCCACCCTTCCGCAACCTGAGCAGC
CTGTACGACCTGAAGCTGCAGGCGCAGCAGCCCTATGGAC
TGAAGATGCTGCCTCACTACTTCTTCCAGGGCTTGGTGA
GCTGCAGCAGCTGTCGCTGTCACAGAACAATGCTGCGGTCC
ATCCCACCGGATGTCTTCGAGGACTTGGGCCAGCTGCGCT
CCCTGGCATTGGCTGACAGCAGCAATGGGCTGCATGACCT
GCCTGACGGCATCTTCAGAAACCTGGGCCAACCTGCGGTTC
CTGGACCTGGAGAATGCAGGGCTGCACCTCGCTCACTCTGG
AAGTCTTTCGGCAATCTCAGCCGGCTGCAGGTGCTGCACTT
GGCCAGAAACGAGCTGAAGACCTTCAATGACAGCGTTGCC
AGCCGGCTGTCCTCCTTGCCTACCTGGACCTGCGCAAGT
GTC CGCTCAGCTGCACCTGTGACAAACATGTGGCTGCAGGG
CTGGCTGAACAACAGCCGTGTGCAGGTTGTCTACCCCTAC
AACTACACCTGTGGCTCACAGCACAAATGCCTACATCCACA
GCTTTGACACACACGTCCTGCTTCTTGGACCTGGGGCTCTA
TCTCTTTGCTGGGACTGCACC GG CAGTGTGCTGCTGCTGCTG
GTGGTGCCGGTGGTGTACCACCGCGCCTACTGGAGGGCTGA
AGTACCACCTGGTACCTTCTGCGGTGCTGGGTCAACCAGCG
GTGGCGGGCGGGAGGAAAAGTGTACCTCTATGACAGCTTT
GTGTCCTACAAATTCAGCTGATGAAAGTTGGGTGTTGCAGA
AGCTGGTGCCCTGAGCTGGAGCACGGGTGCCCTTCCGCCCTCTG
CTTGCACCCACCGCGACTTCCAGCCGGGCCGCGAGCATCATT
GACAACAATTGTGGATGCTGTCTACAACAGCCGGAAGACGG
TGTGCGTGGTGAAGCCGCAGCTACCTGCGCAGCGAGTGGTG
CTCTCTAGAGGTGCAGTTGGCCAGCTACC GGCTGTTTGGAT
GAGCGGGCGTGACATCCTGGTACTGGTGTGCTGCTGGAGGACG
TGGGTGATGCTGAGCTGTCTGCCCTACCACCGCATGCGGGCG
GGTGCTGCTGCGGGCGCACCTACCTGCGCTGGCCCTCTTGAC
CCCGCAGCTCAGCCGCTCTTTTGGGCCACGGCTGAAGAGGG
CACTGAGGTGGGGAGAGGGAGGAGAGGAGGAGGAGGAGGA
AGGTTTGGGTGGAGGGACGGGAAGGCC CAGGGAGGAGAC
AAACAGATG [TAG] CGGCCGC

10

20

30

40

【0078】

p cDNA 3.1 (+) - Neo - ch i TLR 2 1によるHEK 293 - p N i f T y 2 - Z e o (クローン細胞系)のトランスフェクション

ヒト胚腎臓 (HEK) 細胞 293は、1970年代にウイルストランスフォーメーション (Grahamら, 1977)によって生み出されたものであり、現在、細胞系リポジトリ (ATCC等)を経由して、研究コミュニティが利用できるものである。

【0079】

p N i f t y 2は、NF B転写因子活性化 (多くの免疫刺激性作用 (そのなかでも、

50

T o l l 様受容体活性化)のホールマークである)の検出を可能にするプラスミドである。NF - B活性化に関する転写/翻訳に依存的なpN i f T y 2中のリポータ遺伝子は、分泌型アルカリホスファターゼ(S E A P)である。詳細は、このプラスミドを販売している企業(I n v i v o g e n)のデータシートに記載されている。pN i f t y 2によるトランスフォーメーション/トランスフェクションイベントを、細菌および哺乳類細胞の双方において、増殖培地へのゼオシンの添加により選択する。

【 0 0 8 0 】

HEK 2 9 3細胞を、標準的な方法(リポフェクション)によってpN i f T y 2によりトランスフェクトし、安定した細胞系を選択し、NF - B / S E A P軸の機能性を、ヒト腫瘍壊死因子 (S i g m a)による刺激によって確立した。刺激した細胞の培養上清中の分泌S E A Pを、発色基質p - ニトロフェニルホスフェート(p N P P、5 m M) (アルカリ性バッファ(5 0 m M N a H C O 3、p H 9 . 6、2 m M M g C l 2)中)を用いるマイクロタイタープレート比色アッセイによって判定した。発色($\lambda = 4 0 5 \text{ nm}$)を、マイクロタイタープレートリーダによって監視した。また、この読取りを用いて、高いシグナル対ノイズ比のクローン系を(限界希釈法によって)選択した。これらの選択したクローンの1つ(ダブ(d u b b e d)クローン11)を、ニワトリT L R 2 1を用いるさらなる研究に用いた。

10

【 0 0 8 1 】

p c D N A 3 . 1 (+) - n e oは、I n v i t r o g e nから購入した標準的な哺乳類発現ベクターである。このベクター内へのニワトリT L R 2 1遺伝子のサブクローニングを、P C Rによって導入したフランキング位置H i n d I I I (開始コドン)およびN o t I (終止コドン)部位を介して行った(図1参照)。

20

【 0 0 8 2 】

続いて、このプラスミドをクローンHEK 2 9 3 - p N i f t y 2 - z e o系内にトランスフェクトし(リポフェクション)、組換え細胞を、ゼオシンおよびG 4 1 8双方の増殖培地中への添加により選択した。生じたポリクローナル組換え細胞系の機能性を、O D N - X 4およびO D N - H E K 1 - P T Oによる培養物の刺激、ならびにS E A Pの検出によって評価した。続いて、優れたクローン系を、限界希釈法とその後の刺激およびS E A P検出とによって識別した。

【 0 0 8 3 】

S E A Pは、哺乳類系におけるリポータ酵素である(Y a n gら, 1 9 9 7)。S E A Pは、分泌型ヒト胚アルカリホスファターゼである。この主要な利点は、高い安定性および非常に高い特異的活性であり、これらにより検出の感度およびロバスト性が確実なものとなる。S E A P検出用のいくつかの基質が記載されているが、経済的かつロバストなp N P Pを選択した(その反応産物p - ニトロフェノレートが高い感度($4 0 5 = 1 8 5 0 0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)で検出されるからである)。発明者らの試験セットアップでは、カイネティックアッセイを実行する(より広い定量化ダイナミックレンジをもたらすからである)。

30

【 0 0 8 4 】

HEK 2 9 3 - p N i f T y 2 - Z e o細胞を、p c D N A 3 . 1 (+) - N e o - c h i T L R 2 1 (P v u Iで線状化した)によりトランスフェクトし、培地を3 5 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ゼオシンおよび6 0 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ G 4 1 8で補充することにより、ポリクローナル細胞系を選択した。O D N - X 4 (P D E)およびO D N - H E K 1 (P T O)により細胞を刺激することによって、機能性試験を実行した。分泌型アルカリホスファターゼ(S E A P)が、選択した細胞によって生産されたが、親HEK 2 9 3 - p N i f T y 2 - Z e o細胞系によっては生産されなかった。単一細胞クローニングを実行し、個々のクローンを、O D N - X 4 (P D E) (G G G G G G T T C G T T T T C G T T T T C G T T G G G G G)およびO D N - H E K 1 (P T O) (T C G T C G T T T T G T C G T T T G T C G T T)に対する反応性について分析した。

40

【 0 0 8 5 】

50

【 図 1 】

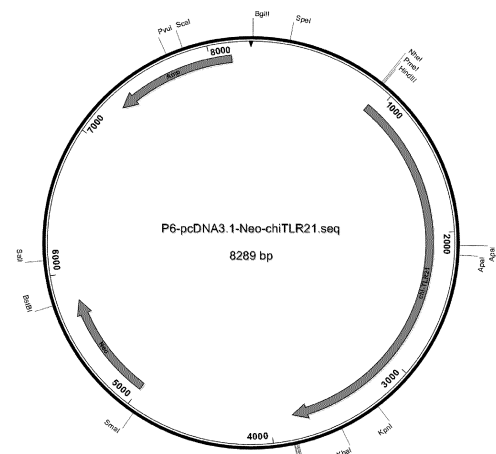


Figure 1

【 図 2 】

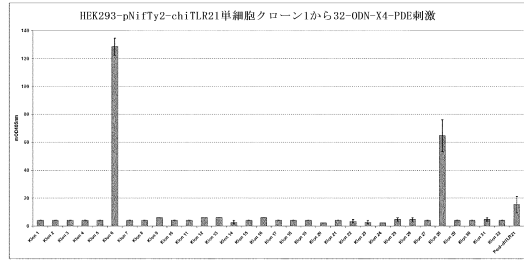


Figure 2

【 図 3 】

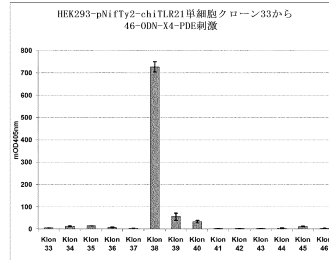


Figure 3

【 図 4 】

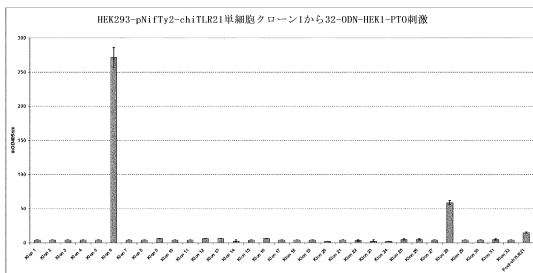


Figure 4

【 図 6 】

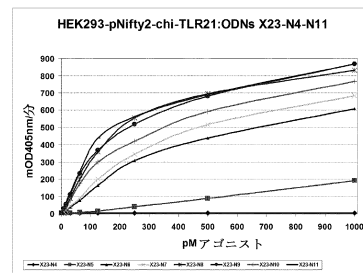


Figure 6

【 図 5 】

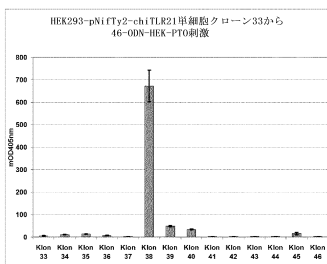


Figure 5

【 図 7 】

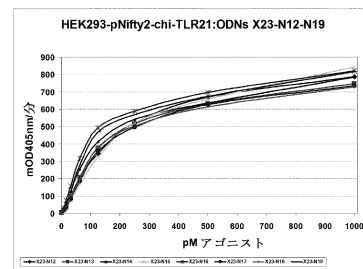


Figure 7

【 図 8 】

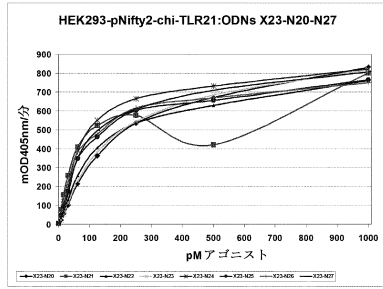


Figure 8

【 図 10 】

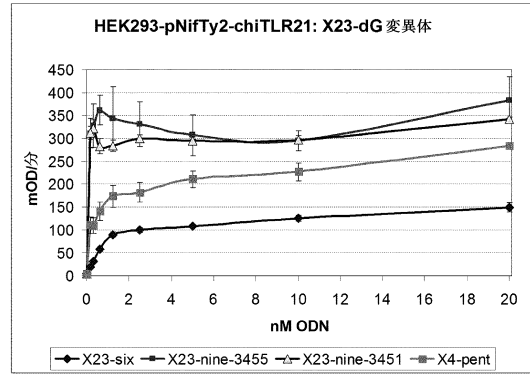


Figure 10

【 図 9 】

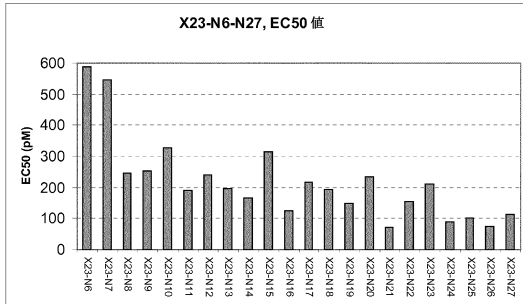


Figure 9

【 配列表 】

0005872685000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 39/12	(2006.01)	A 6 1 K 39/12
A 6 1 K 39/265	(2006.01)	A 6 1 K 39/265
A 6 1 K 39/17	(2006.01)	A 6 1 K 39/17
A 6 1 K 39/04	(2006.01)	A 6 1 K 39/04
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 39/112	(2006.01)	A 6 1 K 39/112
A 6 1 K 39/108	(2006.01)	A 6 1 K 39/108
A 6 1 K 31/711	(2006.01)	A 6 1 K 31/711
A 6 1 K 31/7125	(2006.01)	A 6 1 K 31/7125

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 230105223

弁護士 城山 康文

(72)発明者 シュリール, カルラ・クリステイナ

オランダ国、エヌエル - 5 8 3 1・アー・エヌ・ポツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラ
ート・3 5

(72)発明者 イルク, トーマス・シモン

ドイツ国、デー - 5 5 2 7 0・シユバベンハイム・ツア・プロブシュタイ・1

審査官 西村 亜希子

- (56)参考文献 国際公開第2006/079291(WO, A1)
 特表2009-542236(JP, A)
 国際公開第2010/067286(WO, A1)
 特表2005-517632(JP, A)
 特表2010-535248(JP, A)
 国際公開第2007/020017(WO, A1)
 国際公開第2010/021289(WO, A1)
 特表2005-532067(JP, A)
 米国特許出願公開第2004/0235774(US, A1)
 特表2006-512096(JP, A)
 米国特許出願公開第2003/0212028(US, A1)
 The Journal of Immunology, 2010年 5月, Vol.185, pp.460-467
 J. Poul. Sci., 2009年, Vol.46, pp.69-80
 Molecular Immunology, 2009年, Vol.46, pp.3163-3170
 Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 2001年, Vol.11, No.5, pp.333-340
 J. Immunol. Methods., 2010年, Vol.358, No.1-2, pp.93-103
 Infect. Immun., 2006年, Vol.74, No.2, pp.940-946
 Vet. Immunol. Immunopathol., 2007年, Vol.115, No.3-4, pp.216-222

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

A 6 1 K 3 1 / 7 1 1

A 6 1 K 3 1 / 7 1 2 5

A 6 1 K 3 9 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 0 2
A 6 1 K 3 9 / 0 4
A 6 1 K 3 9 / 1 0 8
A 6 1 K 3 9 / 1 1 2
A 6 1 K 3 9 / 1 2
A 6 1 K 3 9 / 1 7
A 6 1 K 3 9 / 2 6 5
A 6 1 K 4 8 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 1 1 7
C 1 2 Q 1 / 6 8

CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS/REGISTRY(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed