

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5721441号
(P5721441)

(45) 発行日 平成27年5月20日(2015.5.20)

(24) 登録日 平成27年4月3日(2015.4.3)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	15/117	(2010.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A J
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	

請求項の数 12 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-544630 (P2010-544630)	(73) 特許権者	509014386
(86) (22) 出願日	平成21年1月28日 (2009.1.28)		キュアバック ゲーエムベーハー
(65) 公表番号	特表2011-510640 (P2011-510640A)		CUREVAC GMBH
(43) 公表日	平成23年4月7日 (2011.4.7)		ドイツ連邦共和国, 72076 テュービンゲン, パウル-エアリッヒ-シュトラッセ 15
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/000546		Paul-Ehrlich-Str. 15
(87) 国際公開番号	W02009/095226		, 72076 Tuebingen, Germany
(87) 国際公開日	平成21年8月6日 (2009.8.6)	(74) 代理人	100107515
審査請求日	平成23年1月18日 (2011.1.18)		弁理士 廣田 浩一
(31) 優先権主張番号	08001827.8	(74) 代理人	100107733
(32) 優先日	平成20年1月31日 (2008.1.31)		弁理士 流 良広
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100115347
			弁理士 松田 奈緒子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫賦活剤／アジュバントとしての式 (1) (NuGIxmGnNv) aで表される核酸分子及びその誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 117、118 又は 119 で表されるヌクレオチド配列からなること、又は配列番号 117、118 又は 119 で表されるヌクレオチド配列を含むことを特徴とする RNA 分子。

【請求項 2】

薬剤として使用するための請求項 1 に記載の RNA 分子。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の RNA 分子と、薬学的に許容される担体と、を含有する医薬組成物。

【請求項 4】

補助物質、添加剤、及びアジュバントの少なくともいずれかを更に含有する請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

少なくとも 1 種の薬学的活性成分を更に含む請求項 3 から 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 6】

少なくとも 1 種の薬学的活性成分が、ペプチド、タンパク質、核酸、治療上有効な分子量 5,000 未満の低分子量有機化合物、治療上有効な分子量 5,000 未満の低分子量無機化合物、糖、抗原、抗体、病原体、弱毒化病原体、不活化病原体、細胞、細胞断片、細胞画分、及び他の治療剤からなる群から選択された請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

少なくとも1種の薬学的活性成分が、脂質とポリカチオン性ペプチドを含むポリカチオン性化合物との少なくともいずれかと複合体化することによってトランスフェクション性が向上するようにされた請求項5から6のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 8】

医薬組成物がワクチンである請求項3から7のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 9】

癌疾患、及び感染性疾患のいずれかの治療用薬剤を調製するための請求項1に記載のRNA分子の使用。

【請求項 10】

前記癌疾患が、乳頭腫ウイルス誘導性癌腫、ヘルペスウイルス誘導性腫瘍、B型肝炎誘導性腫瘍、HTLV-1誘導性リンパ腫、及びHTLV-2誘導性リンパ腫を含むウイルス誘導性腫瘍；頭/頸部腫瘍；咽頭癌；喉頭癌；頭蓋咽頭腫；まぶた腫瘍；舌癌；神経膠腫；乏突起膠腫；神経鞘腫；網膜芽腫；髄膜腫；下垂体腫瘍；脳腫瘍；グリア芽腫；星状細胞腫；髄芽腫；脳転移；聴神経腫/聴神経鞘腫；甲状腺癌腫；甲状腺腫瘍；肺癌；肺癌腫；Schneeberger病；気管支癌腫；胃腸腫瘍；食道癌；食道癌腫瘍；胃癌；腸癌；小腸腫瘍；結腸癌腫；直腸癌腫；肝臓癌；ヘパトーム；肝転移；膵臓癌腫；膵臓癌；胆嚢癌；肛門癌腫；膀胱癌；尿道癌；腎癌腫；腎癌；精巣癌；陰茎癌；前立腺癌；前立腺腫瘍；外陰癌；膣癌；子宮癌；体癌腫(corpora carcinoma)；子宮内膜癌腫；子宮頸癌腫；子宮頸癌；卵巣腫瘍；卵巣癌；乳癌腫；乳癌；黒色腫；基底細胞腫；棘細胞腫；いぼ合併症；骨癌；軟組織腫瘍/肉腫；形質細胞腫；急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、及び慢性リンパ性白血病(PLL)を含む白血病；ホジキン症候群、非ホジキンリンパ腫、パーキッツリンパ腫、及び菌状息肉腫を含むリンパ腫；腺癌腫；胸腺腫；類癌腫；及びCUP症候群から選択される請求項9の使用。

【請求項 11】

前記感染性疾患が、インフルエンザ、マラリア、SARS、黄熱、エイズ、髄膜炎、尖圭コンジローマ、中空いぼ(hollow warts)、デング熱、三日熱、エボラウイルス、風邪、初夏髄膜脳炎(FSME)、流感、帯状疱疹、肝炎、単純ヘルペスI型、単純ヘルペスII型、眼部帯状疱疹、日本脳炎、ラッサ熱、マールブルグウイルス、麻疹、口蹄疫、単核症、耳下腺炎、ノーウォークウイルス感染、ファイファー腺熱、疱疹、ポリオ、仮性ク룹、第五病、狂犬病、いぼ、西ナイル熱、水痘、巨細胞ウイルス(CMV)等を含むウイルス感染症；

流産、炭疽病、虫垂炎、ライムボレリア症、ボツリヌス中毒、カンピロバクター、トラコーマクラミジア、コレラ、ジフテリア、鼠径肉芽腫、喉頭蓋炎、発疹チフス、ガス壊疽、淋病、野兔病、ヘリコバクターピロリ、百日咳、鼠径リンパ肉芽腫、骨髄炎、レジオネラ症、ハンセン病、リステリア症、肺炎、細菌性髄膜炎、中耳炎、マイコプラズマ・ホミニス、新生児敗血症、水痘、パラチフス、ベスト、ライター症候群、ロッキー山紅斑熱、サルモネラ菌パラチフス、サルモネラ菌発疹チフス、猩紅熱、梅毒、破傷風、ツツガムシ病、結核、発疹チフス、膣炎、軟性下疳等を含む細菌感染症；

アメーバ症、ビルハルツ住血吸虫症、シャーガス病、水虫、酵母菌斑(yeast fungus spots)、疥癬、マラリア、オンコセルカ症、真菌症、トキソプラズマ症、トリコモナス症、トリパノソーマ症、内臓リーシュマニア症、おしめ/おむつ皮膚炎、住血吸虫症、魚類中毒症、カンジダ症、皮膚リーシュマニア症、ランブル鞭毛虫症、眠り病を含む寄生虫、原生動物、及び真菌のいずれかによって発症する感染症；及び

魚類条虫(fish tapeworm)、キツネ条虫、イヌ条虫、シラミ、ウシ条虫、ブタ条虫、又は微小条虫(miniature tapeworm)を含むエキノコックス属によって発症する感染性疾患から選択される請求項9の使用。

【請求項 12】

請求項1に記載のRNA分子或いは請求項3から8のいずれかに記載の医薬組成物と、

10

20

30

40

50

前記RNA分子或いは前記医薬組成物の投与及び用量に関する情報を記載した使用説明書とを備えるキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫賦活剤/アジュバントとしての一般式(I)： $(N_u G_l X_m G_n N_v)_a$ で表される核酸分子及びその誘導体と、任意的に更なるアジュバントを含む、前記核酸分子及びその誘導体を含有する組成物とに関する。本発明は更に、免疫賦活剤としての上記式(I)で表される核酸分子及びその誘導体の少なくともいづれかと、任意的に例えば抗原剤等の少なくとも1種の更なる薬学的活性成分と、を含有する医薬組成物及びワクチンのいづれかに関する。本発明はまた、癌疾患、感染性疾患、アレルギー、及び自己免疫疾患等を治療するための医薬組成物及びワクチンのいづれかの使用に関する。本発明は更に、該疾患を治療するための医薬組成物を調製における、一般式(I)： $(N_u G_l X_m G_n N_v)_a$ で表される核酸分子及びその誘導体の少なくともいづれかの使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

従来のワクチン接種及び遺伝子ワクチンの両方において、軽度であるが故に頻繁に経験される不適切な免疫反応が、治療される生物及び接種される生物のいづれかにおいて引き起こされるという問題が頻繁に生じている。この理由により、所謂アジュバント、即ち例えば抗原に対する免疫反応をターゲティングされた方法で増大させるか影響を与えることができる物質及び組成物のいづれかが、ワクチン及び薬学的活性成分に添加されることが多い。例えば、一部の注入可能な医薬活性成分の有効性は、活性成分のホスト細胞系への放出、及び任意的に該活性成分のホスト細胞への取り込みに影響を与えることができるアジュバントと該活性成分とを組み合わせることにより著しく改善され得ることが知られている。この方法では、一定間隔で多数回少用量を定期的に投与するのに相当する効果を得ることが可能である。用語「アジュバント」は通常、この状況では、免疫原及び他の薬学的活性成分の少なくともいづれかに対する担体及び補助物質のいづれかとして機能する化合物或いは組成物を指す。典型的には、用語「アジュバント」は広義で解釈され、対象となるアジュバントに組み込まれた抗原或いは該アジュバントと同時投与された抗原の免疫原性を増大させることができる、広範囲に亘る物質及び戦略のいづれかを指す。アジュバントは更に、これらに限定されるものではないが、免疫増強剤、抗原送達系、及び更にはこれらの組み合わせに分類することができる。

20

30

【0003】

例えば、フロイントアジュバント、金属酸化物(水酸化アルミニウム等)、アルミニウム(alum)、無機キレート剤、無機キレート剤の塩類、各種パラフィン様油、合成樹脂、アルギネート、ムコイド、多糖化合物、カゼイン塩、並びに例えばフィブリン誘導体等の血液及び血餅の少なくともいづれかから単離された化合物等の多数の化合物及び組成物が、当該技術分野においてアジュバントとして提案されている。しかし、該アジュバントはほとんどの場合、例えば投与部位における皮膚のかぶれ及び炎症等の不所望の副作用を生じさせる。場合によっては、毒性副作用、具体的には組織の壊死さえも見られる。ほとんどの場合これら既知のアジュバントはB細胞のみを活性化するため、細胞性免疫反応を適切に刺激するものではない。

40

【0004】

例えばゼラチン等の動物から単離された化合物は一般に免疫賦活を目的とするアジュバントとして好適ではない。該化合物は、通常対象となるホスト生物及びホスト細胞のいづれかに対して負の作用を示さないが、典型的には注入部位からホスト生物及びホスト生物のいづれかへの移動が速すぎるため、例えば任意的にアジュバントと共に注入される活性成分の遅延放出等の一般にアジュバントにとって望ましい性質はほとんど得られない。かかる急速な分布は、場合によってはタンニン及び他の(無機)化合物によって弱められる

50

こともある。しかし、かかる追加化合物の代謝及びその体内における位置は十分説明されてない。従って、この場合も、これら化合物は壊死組織片に蓄積するため、例えば腎臓細胞、肝臓細胞、及び脾臓細胞の少なくともいずれかの濾過機構にかなりの程度干渉すると見なすのが合理的である。また、非経口投与されたときに膨潤するゼラチンの性質は、例えば特に投与部位における膨潤等のインビボ条件下における不快な副作用、及び病感を導く場合がある。

【0005】

例えばフィブリン誘導体等の血液及び血餅の少なくともいずれかから単離された化合物の場合、典型的には免疫賦活効果が示されている。しかし、これら化合物のほとんどは、アジュバントとして投与されたとき、免疫系に対する副作用のため（必要な免疫原性と並行して生じる）アジュバントの目的に対して好適ではない。例えばこれら化合物の多くはアレルギー性であると分類され、場合によっては所望の程度を遥かに超える免疫系の過剰反応を導く。従って、これら化合物は同様に、上述の理由により免疫賦活のためのアジュバントとして好適ではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、本発明の第1の目的は、好ましくは他の生物学的活性化合物と組み合わせて投与された場合、具体的には免疫調節化合物と共に投与された場合、より好ましくは抗原等の適応性免疫系を特異的に刺激する化合物と組み合わせて投与された場合、アジュバントとして作用し自然免疫系を刺激する免疫賦活剤を提供することである。

【0007】

この状況では、（非特異的）免疫賦活効果はまた、例えば細菌 CpG - DNA 配列（これは遺伝情報として機能するだけではない）による非特異的（即ち、自然）免疫反応を誘発するために、直接核酸を用いることにより生じる場合もあることが知られている。例えば DNA は、非特異的免疫反応の発生において重要な役割を果たしていることが知られている。例えば細菌 DNA は、マクロファージ及び樹状細胞等の免疫細胞に警告するため、また保護的 Th1 極性化 T 細胞免疫反応を促進するための「危険」信号として作用することが知られている。免疫賦活作用は非メチル化 CG（核酸）モチーフの存在に起因すると思われ、従ってかかる CpG - DNA は免疫賦活剤として提案されている（米国特許第 5,663,153 号明細書）。CpG - DNA は、自然免疫系の因子を直接活性化して共刺激分子及び炎症促進サイトカインをアップレギュレートする。DNA のこの免疫賦活性はまた、ホスホロチオエート修飾により安定化されている DNA オリゴヌクレオチドによっても得られる場合がある（米国特許第 6,239,116 号明細書を参照）。かかる免疫賦活 DNA はまた、更なる免疫賦活化合物と組み合わせてもよい。例えば米国特許第 6,406,705 号明細書は、CpG オリゴデオキシリボヌクレオチドと非核酸化合物との相乗的組み合わせを含有して、自然免疫系に対して賦活効果を及ぼす免疫賦活組成物を開示している。

【0008】

しかし、非特異的免疫反応を生じさせるための DNA の使用は、幾つかの観点からあまり有利ではない場合がある。DNA はインビボで比較的緩徐にしか分解されないため、免疫賦活（外来）DNA を用いると抗 DNA 抗体が形成される恐れがあり、これはマウスの動物モデルで確認されている（Gilkeson et al., J. Clin. Invest. 1995, 95: 1398-1402）。従って、生物内に（外来）DNA が残留性すると免疫系の過活性化を導く恐れがあり、マウスではこの過活性化によって脾腫が生じることが知られている（Montheith et al., Anticancer Drug Res. 1997, 12(5): 421-432）。更に（外来）DNA は、ホストゲノムと相互作用し、特にホストゲノムに組み込まれることにより突然変異を生じさせる場合がある。例えば導入された（外来）DNA のインタクトな遺伝子への挿入が生じる場合があり、これは内因性遺伝子の機能に支障をきたす、或いは完全に失わせるこ

10

20

30

40

50

とさえもある突然変異を表す。かかる組み込み現象の結果として、細胞に必須である酵素系が破壊される場合がある。このように変化した細胞が変性状態に変換されるリスクもある。かかる変換は、例えば(外来)DNAが組み込まれることにより細胞成長の制御に重要な遺伝子が変化した場合に生じる恐れがある。従ってこれまでに知られているプロセスでは、免疫賦活剤として(外来)DNAを用いるとき癌形成の潜在的リスクを考慮しなければならない。

【0009】

従って自然免疫系の(非特異的)反応を誘発するための化合物として特異的RNA分子を用いることは、一般的により有利である。この状況では、免疫系の一部としての自然免疫系は大部分の生物においてホストを防御するための優位な系であり、例えば炎症、補体系、及び細胞障壁を含む体液性障壁及び化学的障壁等の障壁を含む。更に自然免疫系は、Toll様受容体(TLR)ファミリーのメンバー等のパターン認識受容体或いは病原体関連分子パターン受容体(PAMP受容体)と呼ばれる少数の受容体に基づいている(例えば、Trinchieri and Sher, Nature reviews, Immunology, Volume 7, March 2007)。かかるTLRは、細胞外環境或いはエンドソームの内腔のリガンドを認識する膜貫通タンパク質である。リガンドとの結合に続いて、それらは細胞質性アダプタンパク質を介してシグナルを伝達し、該シグナルがホスト防御反応を誘発し、抗微生物ペプチド、炎症促進ケモカイン、炎症促進サイトカイン、抗ウイルス性サイトカイン等を生成させる(例えば、Meylan, E., J. Tschopp, et al. (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response." Nature 442 (7098): 39-44)。

【0010】

これまでに少なくとも10個のToll様受容体(TLR)のメンバーがヒトで同定され、マウスでは13個が同定されている(作用機序に関して部分的に同定されたものである)。ヒトでは、これらToll様受容体(TLR)としては、TLR1-TLR2(既知のリガンド: トリアシルリポペプチド)、TLR1-TLR6(既知のリガンド: ジアシシルリポペプチド)、TLR2(既知のリガンド: ペプチドグリカン)、TLR3(既知のリガンド: dsRNA)、TLR4(既知のリガンド: グラム陰性菌のLPS(リポ多糖))、TLR5(既知のリガンド: 細菌のフラジェリン(1及び複数のいずれか))、TLR7/8(既知のリガンド: イミダゾキノリン、グアノシン(グアニン)類似体、及びssRNA)、TLR9(既知のリガンド: 細菌、ウイルス、及び原生動物のCpG DNA、並びにマラリア色素ヘモゾイン(ヘモグロビンの消化産物))、及びTLR10が挙げられる。微生物病原体の認識後、これらTLRは典型的には炎症性サイトカイン(例えば、TNF-、IL-6、IL-1-、及びIL-12)、I型インターフェロン(IFN- 及び複数のIFN-)、及びケモカインを誘導する、細胞内シグナル伝達経路を誘発する(Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." Cell Death Differ 13 (5): 816-25)。

【0011】

この状況では、RNAは幾つかの理由により有利である。例えば今日知られているように、また上述したように、ssRNAはTLR-7/TLR-8受容体に結合することができ、dsDNAはTLR受容体に結合することによって免疫賦活効果を発揮することができる。更に、免疫賦活剤としてのRNAは、典型的にはDNAよりもインピボにおける半減期が実質的に短く、それによってDNAの上述の欠点を避けられる。それにも関わらず、当該技術分野において免疫賦活剤として知られているこれら特異的RNA分子の使用は幾つかの制限を受けている。例えば、これまでに当該技術分野で開示されている特異的RNA配列は、インピボでは限定された免疫賦活能しか示さない。従って免疫賦活のためのRNA量を増加させる必要がある場合があるため、投与されるRNAの量の増加によりコストが増加するかどうかに関わらず、例えば投与部位におけるかぶれ及び炎症等の上に

10

20

30

40

50

一般的に記載したほとんどの不所望の副作用のリスクを伴い、これは期間が限定されている場合でさえも当てはまる可能性がある。また大量の免疫賦活剤を投与するときには毒性副作用を考慮しなければならない。

【0012】

更なる制限は、既知の免疫賦活RNA分子により、リンパ球、ナチュラルキラー細胞、及びマクロファージにおける、抗ウイルス活性、抗増殖剤、及び細胞傷害活性の重要な誘導因子であるI型インターフェロン（例えば、IFN α 及びIFN β ）がそれ程誘導されないことである。

【0013】

既知の免疫賦活dsRNA分子は、例えばポリA：U及びポリI：Cである。しかし、これら免疫賦活dsRNA分子の問題点は長さが決まっていないことであり、これにより予測不可能な分子構造、延いては凝集が導かれる場合がある。かかる凝集は更に、血管の閉塞及び注入部位における過度な免疫賦活等の不所望の副作用を導く場合がある。これに加えて、分子構造が予測不可能であると、可変製品パラメータにより適切な品質制御ができないため日常的な実験操作及び製造作業において問題である。ここでは、長さ及び構造が決まっており、アジュバントとして好適である決まった核酸分子が医薬用途に好適である。

10

【0014】

これまでに示したRNAの成功例にも関わらず、患者の自然免疫系の免疫反応を自力で生じさせ得る改善された免疫賦活剤に対する継続的必要性が存し、またそれに対する関心が高まっている。従って、本発明の第2の目的は、患者の自然免疫系を活性化することにより、非特異的免疫反応を生じさせる免疫賦活剤を提供することである。

20

【発明の効果】

【0015】

本発明の目的は共に、以下の遺伝子式（I）で表される核酸分子の提供により解決される。これら本発明の核酸分子は、自然免疫系を活性化させることにより非特異的免疫反応を誘発する。該核酸分子は更にアジュバントとして（例えば、ワクチンの成分として）、適応免疫系を特異的に活性化する第2の化合物の免疫賦活活性を補助することができる。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、式（I）：
 $(N_u G_l X_m G_n N_v)_a$
 の核酸（分子）であって、

30

式中、

Gは、グアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、グアノシン（グアニン）類似体及びウリジン（ウラシル）類似体のいずれか、好ましくはグアノシン（グアニン）及びその類似体のいずれかであり；

Xは、グアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、シチジン（シトシン）、及びこれらヌクレオチド（ヌクレオシド）の類似体のいずれか、好ましくはウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかであり；

40

Nは、約4核酸～50核酸、好ましくは約4核酸～40核酸、より好ましくは約4核酸～30核酸、或いは4核酸～20核酸の長さを有する核酸配列であって、各Nは独立して、グアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、シチジン（シトシン）、及びこれらヌクレオチド（ヌクレオシド）の類似体のいずれかから選択され；

aは、1～20の整数、好ましくは1～15の整数、最も好ましくは1～10の整数であり；

lは、1～40の整数であって、

lが1である場合、Gはグアノシン（グアニン）及びその類似体のいずれかであり、

lが1超である場合、これらヌクレオチド（ヌクレオシド）の少なくとも50%が、

50

【0019】

本発明に係る式(I)で表される分子 $(N_u G_1 X_m G_n N_v)_a$ は、典型的には任意のDNA及びRNAのいずれかの形態であってもよい核酸分子であって、好ましくは、これらに限定されるものではないが、環状DNA、線状DNA、環状RNA、及び線状RNAのいずれか、単鎖DNA、二本鎖DNA、単鎖RNA、及び二本鎖RNAのいずれか(2本の単鎖DNA及び2本の単鎖RNAのいずれかの非共有的会合の結果DNA及びRNAのいずれかと見なすことができる)、或いは部分的二本鎖DNA及び部分的二本鎖RNAのいずれか(典型的には、長い単鎖DNA分子及び単鎖RNA分子のいずれかと少なくとも1本の短い単鎖DNA分子及び単鎖RNA分子のいずれかにより形成されるか、或いは長さの略等しい少なくとも2本の単鎖DNA分子及び単鎖RNA分子により形成され、この場合1以上の単鎖DNA分子及び単鎖RNA分子のいずれかが、1以上の他の単鎖DNA分子及び単鎖RNA分子のいずれかと部分的に相補的であり、従ってその領域で二本鎖RNAを形成する)であり、例えば(部分的)二本鎖DNA及び(部分的)二本鎖RNAのいずれかの領域と混合された、(部分的)単鎖DNA及び(部分的)単鎖RNAのいずれかである。好ましくは本発明に係る式(I)の核酸分子は、単鎖DNA、二本鎖DNA、単鎖RNA、及び二本鎖RNAのいずれか、より好ましくは部分的二本鎖DNA及び部分的二本鎖RNAのいずれかの形態であってもよい。また本発明に係る式(I)で表される核酸分子は、単鎖核酸分子と二本鎖DNA及び二本鎖RNAのいずれかとの混合物の形態であることが好ましい。

10

【0020】

本発明に係る式(I)で表される核酸分子 $(N_u G_1 X_m G_n N_v)_a$ が部分二本鎖核酸分子である場合、かかる(部分的に二本鎖である)式(I)(或いは、以下に定義する式(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれか)に係る本発明の核酸分子は、単鎖RNAに対するPAMP(病原体関連分子パターン)受容体(TLR-7及びTLR-8)、及び二本鎖RNAに対するPAMP受容体(TLR-3、RIG-I、及びMDA-5)に対応する(address)ことにより、治療される患者の自然免疫反応を正に刺激することができるため特に有利である。受容体TLR-3、TLR-7、及びTLR-8はエンドソームに位置し、エンドソームに取り込まれたRNAにより活性化される。対照的に、RIG-I及びMDA-5は細胞質性受容体であり、細胞質に直接取り込まれた、或いはエンドソームから放出された(エンドソーム放出或いはエンドソーム脱出)RNAにより活性化される。従って、式(I)で表される任意の部分的に二本鎖である本発明の核酸分子 $(N_u G_1 X_m G_n N_v)_a$ (或いは、式(I)(並びに以下に定義する式(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb))に係る(部分的に二本鎖である)本発明の核酸分子)は、免疫賦活の様々なシグナル伝達カスケードを活性化することができ、それによって自然免疫反応を導くか、或いは自然免疫反応を著しく増強する。

20

30

【0021】

本発明に係る式(I)の構造 $(N_u G_1 X_m G_n N_v)_a$ は、コア構造としてのエレメント $G_1 X_m G_n$ と、境界エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれかを更に含み、エレメント $N_u G_1 X_m G_n N_v$ 全体は、整数aにより規定される数繰り返し(即ち、少なくとも1回)存在してもよい。この状況において発明者らは、本発明に係る式(I)の分子、即ち上で定義した構造 $(N_u G_1 X_m G_n N_v)_a$ を有する分子が、コア構造 $G_1 X_m G_n$ の投与と比較したとき、IFNの放出増加により具体的に示される患者の自然免疫反応の増強を導くことを驚くべきことに見出した。更に、上記コア構造 $G_1 X_m G_n$ を含む分子は、式(I)で定義した反復エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれかに隣接するとき、細菌内で著しく多量に増幅され得る。当該技術分野において既知である固相合成法(典型的には特定の大きさの核酸分子に限定される)に代えてインピトロ転写法を用いることにより、上で定義した式(I)の構造 $(N_u G_1 X_m G_n N_v)_a$ を有する分子を調製するときこの分子設計は特に有利である。

40

【0022】

50

本発明に係る式 (I) のコア構造 $G_1 X_m G_n$ は、以下でより厳密に定義される。

【 0 0 2 3 】

本発明に係る式 (I) で表される核酸分子中の G は、ヌクレオチド及びデオキシヌクレオチドのいずれかであるか、或いはヌクレオシドを含み、ここでヌクレオチド (ヌクレオシド) は、グアノシン (グアニン)、ウリジン (ウラシル)、及びこれらの類似体のいずれかであり、より好ましくはグアノシン (グアニン) 及びその類似体のいずれかである。これに関連して、グアノシン (グアニン) 類似体及びウリジン (ウラシル) ヌクレオチド (ヌクレオシド) 類似体は、天然に存在するヌクレオチド (ヌクレオシド) であるグアノシン (グアニン) 及びウリジン (ウラシル) の天然には存在しない変異体であると定義される。従って、グアノシン (グアニン) 類似体及びウリジン (ウラシル) 類似体のいずれかは、典型的には天然には存在しない官能基或いは構成成分で化学的に誘導体化されたヌクレオチド (ヌクレオシド) であり、好ましくは天然に存在するグアノシン (グアニン) ヌクレオチド及びウリジン (ウラシル) ヌクレオチドのいずれかに付加、修飾、及び欠失のいずれかが施されているものである、或いは天然に存在するグアノシン (グアニン) ヌクレオチド及びウリジン (ウラシル) ヌクレオチドのいずれかの天然に存在する官能基或いは構成成分が置換されているものである。従って、天然に存在するグアノシン (グアニン) 及びウリジン (ウラシル) ヌクレオチドのいずれかの各官能基或いは構成成分、即ち塩基部分、糖 (リボース) 部分、任意の天然に存在する官能側基、及びオリゴヌクレオチド骨格を形成しているリン酸部分の少なくともいずれかに修飾或いは欠失が施されていてもよい。リン酸部分は、例えば、ホスホロアミダート、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホネート等に置換されていてもよいが、本発明の状況では天然に存在するリン酸ジエステル骨格が更に好ましい。更に糖 (リボース) 部分はデオキシリボースから選択され、具体的には核酸は糖 (リボース) 部分がデオキシリボースから選択される上で定義した RNA である。

【 0 0 2 4 】

従って、グアノシン (グアニン) 類似体及びウリジン (ウラシル) 類似体のいずれかとしては、如何なる限定を意味するものでもないが、例えばアセチル化、メチル化、ヒドロキシ化等により化学的に変化している、任意の天然に存在するグアノシン (グアニン) 及びウリジン (ウラシル) のいずれか、或いは天然に存在しないグアノシン (グアニン) 及びウリジン (ウラシル) のいずれかが挙げられ、例えば、1 - メチル - グアノシン (グアニン)、2 - メチル - グアノシン (グアニン)、2, 2 - ジメチル - グアノシン (グアニン)、7 - メチル - グアノシン (グアニン)、ジヒドロ - ウリジン (ウラシル)、4 - チオ - ウリジン (ウラシル)、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオ - ウリジン (ウラシル)、5 - (カルボキシ - ヒドロキシメチル) - ウリジン (ウラシル)、5 - フルオロ - ウリジン (ウラシル)、5 - プロモ - ウリジン (ウラシル)、5 - カルボキシメチルアミノメチル - ウリジン (ウラシル)、5 - メチル - 2 - チオ - ウリジン (ウラシル)、N - ウリジン (ウラシル) - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、5 - メチルアミノメチル - ウリジン (ウラシル)、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオ - ウリジン (ウラシル)、5' - メトキシカルボニルメチル - ウリジン (ウラシル)、5 - メトキシ - ウリジン (ウラシル)、ウリジン (ウラシル) - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウリジン (ウラシル) - 5 - オキシ酢酸 (v) を含む。該類似体の調製は、例えば米国特許第 4, 373, 071 号明細書、同第 4, 401, 796 号明細書、同第 4, 415, 732 号明細書、同第 4, 458, 066 号明細書、同第 4, 500, 707 号明細書、同第 4, 668, 777 号明細書、同第 4, 973, 679 号明細書、同第 5, 047, 524 号明細書、同第 5, 132, 418 号明細書、同第 5, 153, 319 号明細書、同第 5, 262, 530 号明細書、及び同第 5, 700, 642 号明細書から当業者に既知であり、これら開示は参照することにより全体を本願に援用する。上記類似体の場合、以下の少なくともいずれかである類似体が特に好ましい：

本発明に係る式 (I) の核酸分子の免疫原性を増加させる類似体、及び施されている更なる修飾に干渉しない類似体。

グアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、及びこれらの類似体のいずれかのうち少なくとも1種がコア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれかに存在していてもよく、任意的にコア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれかのヌクレオチドの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或いは更には100%が、天然に存在するグアノシン（グアニン）、天然に存在するウリジン（ウラシル）、及びこれらの類似体（或いは本明細書に定義されるこれらの類似体の性質を示すもの）である。コア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれかは、天然に存在するグアノシン（グアニン）及び天然に存在するウリジン（ウラシル）の少なくともいずれかの少なくとも1種の類似体を含むことが好ましい。これらコア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれかのヌクレオチド（ヌクレオシド）が全て類似体であることが最も好ましい（同じ種類のヌクレオチド（ヌクレオシド）に対して同一の類似体であることが最も好ましいが（例えば、全てのグアノシン（グアニン）ヌクレオチドが、1-メチル-グアノシン（グアニン）として提供される）、類似体の種類は異なってもよい（例えば、少なくとも2種の異なるグアノシン類似体が天然に存在するグアノシンヌクレオチドに置き換わる）。

【0025】

本発明に係る式（I）で表される核酸分子中のコア構造エレメント G （ G_1 及び G_n の少なくともいずれか）のヌクレオチド（ヌクレオシド）の数は、1及び n により規定される。1及び n は、互いに独立してそれぞれ1~100、1~90、1~80、1~70、1~60、好ましくは1~50、更により好ましくは1~40、更により好ましくは1~30の整数であり、これらの範囲の下限は1であってもよいが、これに代えて2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、或いは更に大きくてもよい。各整数について、1及び n の少なくともいずれかが1である場合、 G はグアノシン（グアニン）及びその類似体のいずれかであり、1及び n の少なくともいずれかが1超である場合、コア構造エレメント G （ G_1 及び G_n の少なくともいずれか）の少なくとも50%、より好ましくは少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、或いは更には100%のヌクレオチド（ヌクレオシド）が、グアノシン（グアニン）及びその類似体のいずれかであることが好ましい。例えば、如何なる限定を意味するものでもないが、1及び n の少なくともいずれかが4である場合、 G_1 及び G_n の少なくともいずれかは、例えばGUGU、GGUU、UGUG、UUGG、GUUG、GGGU、GGUG、GUGG、UGGG、及びGGGGのいずれか等であってもよく、1及び n の少なくともいずれかが5である場合、 G_1 及び G_n の少なくともいずれかは、例えばGGGUU、GGUGU、GUGGU、UGGGU、UGGUG、UGUGG、UUGGG、GUGUG、GGGGU、GGGUG、GGUGG、GUGGG、UGGGG、及びGGGGGのいずれか等であってもよい。本発明に係る式（I）で表される核酸分子中の X_m に直接隣接するコア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれかのヌクレオチド（ヌクレオシド）は、ウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかではないことが好ましい。本発明に係る式（I）で表される核酸分子中の X_m に直接隣接するコア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれかのヌクレオチド（ヌクレオシド）は、少なくとも1個のグアノシン（グアニン）及びその類似体のいずれかであることがより好ましく、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、更には20個、或いはそれ以上のグアノシン（グアニン）及びその類似体のいずれかの配列であることがより好ましい。これに加えて、本発明に係る式（I）の核酸分子中の N 、例えば N_u 及び N_v の少なくともいずれか（或いは、以下に定義する N_{w_1} 及び N_{w_2} のいずれか）に直接隣接するコア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれかのヌクレオチドは、ウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかではないことが好ましい。本発明に係る式（I）の核酸分子中の N 、例えば N_u 及び N_v の少なくともいずれか（或いは、以下に定義する N_{w_1} 及び N_{w_2} のいずれか）に直接隣接するコア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれか

10

20

30

40

50

のヌクレオチドは、少なくとも1個のグアノシン(グアニン)及びその類似体のいずれかであることがより好ましく、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、更には20個、或いはそれ以上のグアノシン(グアニン)及びその類似体のいずれかの配列であることがより好ましい。

【0026】

本願において用語「同一性」は、配列をリファレンス配列と比較することにより決定される同一性の百分率を意味する。例えば、2つの核酸配列の同一性の百分率を決定するために、後に配列を比較できるようにするために、先ず互いに対して配列を整列させてもよい(アラインメント)。この目的のために、例えば第1の核酸配列の配列にギャップを入れてもよく、ヌクレオチドを第2の核酸配列の対応する位置と比較してもよい。第1の核酸配列中のある位置のヌクレオチドが第2の配列中の対応する位置のヌクレオチドと同じである場合、2つの配列はその位置において同一である。2つの配列間の同一性の百分率は、配列中のヌクレオチドが同一である位置の数を、配列中の全てのヌクレオチドの数で除した数の関数である。例えば確定した長さを有するリファレンス核酸と比較したときの特定の核酸に対する特定の配列同一性を想定した場合、この同一性の百分率は、リファレンス核酸に対して相対的に示される。それ故、例えば100ヌクレオチドの長さを有するリファレンス核酸配列と50%の配列同一性を有する核酸配列について考えると、その核酸配列は、リファレンス核酸配列中の長さ50ヌクレオチドのあるセクションと完全に同一である、長さ50ヌクレオチドの核酸配列を意味する場合がある。しかし、その長さ全体に亘ってリファレンス核酸配列と50%の同一性を有する(即ち、この場合50%の核酸が同一である)、長さ100ヌクレオチドの核酸配列を意味する場合もある。或いは、その核酸配列は、核酸配列中の長さ100ヌクレオチドのあるセクションにおいて、長さ100ヌクレオチドのリファレンス核酸配列と完全に同一である、長さ200ヌクレオチド核酸配列である場合もある。他の核酸配列は、自然にこれらの基準を等しく満たす。

【0027】

2つの配列の同一性の百分率の決定は、数学アルゴリズムを用いて実施してもよい。2つの配列を比較するために用いることができる数学アルゴリズムの好ましいが非限定的な例は、Karlin et al. (1993), PNAS USA, 90: 5873-5877に記載されているアルゴリズムである。該アルゴリズムはNB LASTプログラムに組み込まれており、該プログラムを用いて本発明の配列と所望の同一性を有する配列を同定することができる。上記のようなギャップ入りアラインメントを得るために、Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res, 25: 3389-3402に記載されている「Gapped BLAST」を用いることができる。BLAST及びGapped BLASTプログラムを用いるとき、特定のプログラム(例えば、NB LAST)のデフォルトパラメータを用いてもよい。配列は更に、gap open penaltyが-12(ギャップの最初のゼロに対するペナルティ)であり、且つgap extension penaltyが-4(ギャップ中のそれぞれの連続するゼロに対するペナルティ)であるデフォルト(BL O S U M 6 2)マトリックス(-4から+11の値)を用いて、「Genetic Computing Group」製GAP(global alignment program)のバージョン9を用いてアラインメントをとってもよい。アラインメント後、請求の配列中の核酸の百分率として一致数を表すことにより同一性の百分率を算出する。2つの核酸配列の同一性の百分率を決定するために記載した方法を、適切なプログラムを用いてアミノ酸配列に対応させて適用してもよい。

【0028】

同様に式(I)については、上記の通りl及びnの少なくともいずれかが1超である場合、コア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれかの少なくとも60%、70%、80%、90%、或いは更には100%のヌクレオチド(ヌクレオシド)が、グアノシン(グアニン)及びその類似体のいずれかであることが好ましい。コア構造エレメント G_1 及び G_n の少なくともいずれか中の、グアノシン(グアニン)及びその類似体のいずれ

10

20

30

40

50

か以外のヌクレオチド（ヌクレオシド）は（グアノシン（グアニン）がこれらヌクレオチド（ヌクレオシド）の100%未満を構成している場合）、上記定義の通りウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかであってもよい。

【0029】

本発明に係る式（I）で表される核酸分子中のX、具体的にはX_mもまたコア構造エレメントであり、ヌクレオチド及びデオキシヌクレオチドのいずれかであるか、或いはヌクレオシドを含み、ここでヌクレオチド（ヌクレオシド）は、典型的にはグアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、シチジン（シトシン）、及びこれらの類似体のいずれかから選択され、好ましくはウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかである。これに関連して、ヌクレオチド（ヌクレオシド）類似体は、天然に存在するヌクレオチド（ヌクレオシド）の天然には存在しない変異体であると定義される。従って類似体は、天然に存在するヌクレオチド（ヌクレオシド）に付加及び欠失のいずれかが施されている、或いはヌクレオチド（ヌクレオシド）の天然に存在する官能基が置換されている、天然には存在しない官能基を含む化学的に誘導体化されたヌクレオチド（ヌクレオシド）であることが好ましい。従って、天然に存在するヌクレオチドの各部分、即ち塩基部分、糖（リボース及びデオキシヌクレオチドのいずれか）部分、及びオリゴヌクレオチド骨格を形成しているリン酸部分の少なくともいずれかは修飾されていてもよい。リン酸部分は、例えば、ホスホロアミダート、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホネート等に置換されていてもよいが、天然に存在するリン酸ジエステル骨格が更に好ましい。本発明の核酸分子が少なくとも1個の類似体を含む場合、全ての「X」ヌクレオチドの好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、更により好ましくは少なくとも90%が、本明細書で定義する類似体の性質を示してもよい。コア構造エレメント「X_m」内の特定のヌクレオチド種を置換している類似体は同一であってもよい（例えば、コア構造エレメント「X_m」内に存在する全てのシチジン（シトシン）ヌクレオチド（ヌクレオシド）が、特定のシチジン（シトシン）類似体、例えば、2-チオ-シチジン（シトシン）により形成される）か、或いは特定のヌクレオチド（ヌクレオシド）について異なってもよい（例えば、少なくとも2種の異なるシチジン（シトシン）類似体コア構造エレメント「X_m」内に含有されている）。

【0030】

グアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、シチジン（シトシン）の類似体としては、如何なる限定を意味するものでもないが、例えばアセチル化、メチル化、ヒドロキシ化等により化学的に変化している、任意の天然に存在するグアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、及びシチジン（シトシン）のいずれか、或いは天然に存在しないグアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、及びシチジン（シトシン）のいずれかが挙げられ、例えば、1-メチル-アデノシン（アデニン）、2-メチル-アデノシン（アデニン）、2-メチルチオ-N6-イソペンテニル-アデノシン（アデニン）、N6-メチル-アデノシン（アデニン）、N6-イソペンテニル-アデノシン（アデニン）、2-チオ-シチジン（シトシン）、3-メチル-シチジン（シトシン）、4-アセチル-シチジン（シトシン）、2,6-ジアミノプリン、1-メチル-グアノシン（グアニン）、2-メチル-グアノシン（グアニン）、2,2-ジメチル-グアノシン（グアニン）、7-メチル-グアノシン（グアニン）、イノシン、1-メチル-イノシン、ジヒドロ-ウリジン（ウラシル）、4-チオ-ウリジン（ウラシル）、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオ-ウリジン（ウラシル）、5-(カルボキシヒドロキシメチル)-ウリジン（ウラシル）、5-フルオロ-ウリジン（ウラシル）、5-プロモ-ウリジン（ウラシル）、5-カルボキシメチルアミノメチル-ウリジン（ウラシル）、5-メチル-2-チオ-ウリジン（ウラシル）、N-ウリジン（ウラシル）-5-オキシ酢酸メチルエステル、5-メチルアミノメチル-ウリジ

ン（ウラシル）、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオ - ウリジン（ウラシル）、5' - メトキシカルボニルメチル - ウリジン（ウラシル）、5 - メトキシ - ウリジン（ウラシル）、ウリジン（ウラシル） - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウリジン（ウラシル） - 5 - オキシ酢酸（v）、キュエオシン、ベータ - D - マンノシル - キュエオシン、ワイブトキシシン（*wybutoxosine*）、及びイオシンを含む。該類似体の調製は、例えば、米国特許第 4, 373, 071 号明細書、同第 4, 401, 796 号明細書、同第 4, 415, 732 号明細書、同第 4, 458, 066 号明細書、同第 4, 500, 707 号明細書、同第 4, 668, 777 号明細書、同第 4, 973, 679 号明細書、同第 5, 047, 524 号明細書、同第 5, 132, 418 号明細書、同第 5, 153, 319 号明細書、同第 5, 262, 530 号明細書、及び同第 5, 700, 642 号明細書から当業者に既知である。上記類似体の場合、以下の少なくともいずれかであるヌクレオチド（ヌクレオシド）の類似体が特に好ましい：

本発明に係る式（I）で表される核酸分子の免疫原性を増加させる類似体、及び施されている更なる修飾に干渉しない類似体。

【0031】

本発明に係る式（I）で表される核酸分子中のコア構造エレメント X の数は、m により規定される。m は整数であり、典型的には少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、20 ~ 30、30 ~ 40、40 ~ 50、50 ~ 60、60 ~ 70、70 ~ 80、80 ~ 90、90 ~ 100、100 ~ 150、150 ~ 200、或いは更にはこれ以上であり、ここで m が 3 である場合 X はウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかであり、m が 3 超である場合少なくとも 3 以上の直接隣接するウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかが、上記式（I）のエレメント X 中に存在する。かかる少なくとも 3 以上の直接隣接するウリジン（ウラシル）の配列は、本願に関連して「単調（*monotonic*）ウリジン（ウラシル）配列」と称される。単調ウリジン（ウラシル）配列は、典型的には少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、20 ~ 30、30 ~ 40、40 ~ 50、50 ~ 60、60 ~ 70、70 ~ 80、80 ~ 90、90 ~ 100、100 ~ 150、150 ~ 200 の長さのウリジン（ウラシル）、或いは任意的に上記定義のようなウリジン（ウラシル）の類似体を有する。該単調ウリジン（ウラシル）配列は、本発明に係る式（I）の核酸分子のコア構造エレメント X 中に少なくとも 1 つ存在する。それ故、例えば少なくとも 3 以上のウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかを有する、1、2、3、4、5、或いはそれ以上の単調ウリジン（ウラシル）配列が存在することが可能であり、この単調ウリジン（ウラシル）配列は、コア構造エレメント X において、少なくとも 1 個、好ましくは 2、3、4、5、或いはそれ以上のグアノシン（グアニン）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、シチジン（シトシン）、及びこれらの類似体のいずれかにより遮断されていてもよい。例えば、m が 3 である場合、 X_m は UUU である。m が 4 である場合、 X_m は、例えば、如何なる限定を意味するものでもないが、UUUA、UUUG、UUUC、UUUU、AUUU、GUUU、及び CUUU のいずれかであってもよい。n = 10 の場合、 X_m は、例えば、如何なる限定を意味するものでもないが、UUUAAUUUUC、UUUUGUUUU、UUUGUUUUUU、UUUUUUUUUU 等であってもよい。本発明に係る式（I）の核酸分子の G_1 及び G_n のいずれかに隣接する X_m のヌクレオチドは、ウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかを含むことが好ましい。m が 3 超である場合、典型的には X_m のヌクレオチドの少なくとも 50%、好ましくは少なくとも 60%、70%、80%、90%、或いは更には 100% が、上記定義のようなウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかである。 X_m 中のウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれか以外のヌクレオチド（ヌクレオシド）は（配列 X_m 中のウリジン（ウラシル）が 100% 未満である場合）、上記定義の通りグアノシン（グアニン）、ウリジン（ウラシル）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、シチジン（シトシン）、及びこれらの類似体のいずれかである。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

上記式 (I) に係る本発明の核酸分子はまた境界エレメント N を含む。境界エレメント N は、典型的には約 4 ヌクレオチド (ヌクレオシド) ~ 5 0 ヌクレオチド (ヌクレオシド)、好ましくは約 4 ヌクレオチド (ヌクレオシド) ~ 4 0 ヌクレオチド (ヌクレオシド)、より好ましくは約 4 ヌクレオチド (ヌクレオシド) ~ 3 0 ヌクレオチド (ヌクレオシド)、更により好ましくは約 4 ヌクレオチド (ヌクレオシド) ~ 2 0 ヌクレオチド (ヌクレオシド) の長さの核酸配列であり、これらの範囲の下限は 4 に代えて 5、6、7、8、9、10 或いはそれ以上であってもよい。各 N のヌクレオチド (ヌクレオシド) は独立して、グアノシン (グアニン)、ウリジン (ウラシル)、アデノシン (アデニン)、チミジン (チミン)、シチジン (シトシン)、及びこれらの類似体の少なくともいずれかから選択されることが好ましい。換言すれば、本発明に係る式 (I) の核酸分子中の境界エレメント N は、(任意の (ランダムな) 配列であってもよい) 当該技術分野において入手可能な配列であってもよく、各 N は独立して、グアノシン (グアニン)、ウリジン (ウラシル)、アデノシン (アデニン)、チミジン (チミン)、シチジン (シトシン)、及びこれらヌクレオチド (ヌクレオシド) の類似体の少なくともいずれか、或いはこれらヌクレオチド (ヌクレオシド) のホモポリマーから選択され、提供されるそれぞれの場合において、かかる配列は、上記定義により約 4 ヌクレオチド (ヌクレオシド) ~ 5 0 ヌクレオチド (ヌクレオシド)、好ましくは約 4 ヌクレオチド (ヌクレオシド) ~ 4 0 ヌクレオチド (ヌクレオシド)、より好ましくは約 4 ヌクレオチド (ヌクレオシド) ~ 3 0 ヌクレオチド (ヌクレオシド)、更により好ましくは約 4 ヌクレオチド (ヌクレオシド) ~ 3 0 ヌクレオチド (ヌクレオシド) 或いは約 4 ヌクレオチド (ヌクレオシド) ~ 2 0 ヌクレオチド (ヌクレオシド) の長さを有する。

【 0 0 3 3 】

特定の実施形態によれば、N は上記定義の範囲内の核酸配列であってもよく、該配列は、直接隣接する位置において上で定義した通り典型的には 2 個以下の同一ヌクレオチド (ヌクレオシド) を含む (即ち、「a a」、「c c」、「u u」、「g g」、及びこれらの類似体の少なくともいずれかの配列)、即ち該配列は典型的には、アデノシン (アデニン)、シチジン (シトシン)、ウリジン (ウラシル)、グアノシン (グアニン)、及びこれらの類似体の少なくともいずれかから選択される 3 個以上の同一ヌクレオチド (ヌクレオシド) 配列を含まず、かかる配列を含まない、即ち直接隣接する位置において、上記定義のような同一ヌクレオチド (ヌクレオシド) が存在しないことがより好ましい。これに加えて或いはこれに代えて、N は上記定義の範囲内の核酸配列であって、該配列が典型的には、好ましくは約 0 % ~ 5 0 %、5 % ~ 4 5 %、或いは 1 0 % ~ 4 0 %、より好ましくは約 1 5 % ~ 3 5 %、更により好ましくは約 2 0 % ~ 3 0 %、最も好ましくは約 2 5 % の含量のアデノシン (アデニン) 及びその類似体のいずれか; 好ましくは約 0 % ~ 5 0 %、5 % ~ 4 5 %、或いは 1 0 % ~ 4 0 %、より好ましくは約 1 5 % ~ 3 5 %、更により好ましくは約 2 0 % ~ 3 0 %、最も好ましくは約 2 5 % の含量のウリジン (ウラシル) 及びその類似体のいずれか; 好ましくは約 0 % ~ 5 0 %、5 % ~ 4 5 %、或いは 1 0 % ~ 4 0 %、より好ましくは約 1 5 % ~ 3 5 %、更により好ましくは約 2 0 % ~ 3 0 %、最も好ましくは約 2 5 % の含量のシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれか; 好ましくは約 0 % ~ 5 0 %、5 % ~ 4 5 %、或いは 1 0 % ~ 4 0 %、より好ましくは約 1 5 % ~ 3 5 %、更により好ましくは約 2 0 % ~ 3 0 %、最も好ましくは約 2 5 % の含量のグアノシン (グアニン) 及びその類似体のいずれかを含む配列であってもよい。N は上記定義の範囲内の核酸配列であって、該配列が典型的には、それぞれ約 2 5 % のアデノシン (アデニン)、グアノシン (グアニン)、シチジン (シトシン)、及びウリジン (ウラシル) 含量を含む配列であってもよいことが最も好ましい。かかる N の配列の例としては、例えば、a g c u、a g u c、a u g c、a c g u、g c u a、g c a u、g a c u、g u c a、c u a g、c a u g、c a g u、c g a u、u a g c、u a c g、u c g a、u c a g、a g c u、g c u a、g c a u c a u g、c a g u u c g a 等が挙げられる。

【 0 0 3 4 】

10

20

30

40

50

本発明に係る式 (I) で表される核酸分子中の境界エレメント N の数、即ちその反復数は、整数 u 及び v の少なくともいずれかにより規定される。従って本発明に係る式 (I) の核酸分子中の N は、(反復) 境界エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれか (式中、u 及び v の少なくともいずれかは、互いに独立して、0 ~ 100 或いは 1 ~ 100、より好ましくは 0 ~ 50 或いは 1 ~ 50、更により好ましくは 0 ~ 40 或いは 1 ~ 40、最も好ましくは 0 ~ 30 或いは 1 ~ 30、例えば、0 ~ 5、0 ~ 10、0 ~ 20、0 ~ 25、0 ~ 30、1 ~ 5、1 ~ 10、1 ~ 20、1 ~ 25、1 ~ 30、5 ~ 10、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 25、或いは 25 ~ 30 の整数であつてもよい) として存在してもよい。少なくとも 1 個の (反復) 境界エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれかが式 (I) 中に存在してもよい、即ち u 及び v のいずれかが 0 ではないことがより好ましく、(反復) 境界エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれかの両方が存在することがより好ましく、更により好ましくは上記定義の通りである。

10

【 0035】

これに加えて、コア構造エレメントと境界エレメントとを組み合わせたエレメント $N_u G_1 X_m G_n N_v$ は、上で定義した式 (I) ($N_u G_1 X_m G_n N_v$)_a で表される本発明の分子に係る反復エレメントとして存在してもよく、ここで式 (I) で表される複合エレメント ($N_u G_1 X_m G_n N_v$)_a の反復数は整数 a により規定される。好ましくは、a は、約 1 ~ 100、1 ~ 50、1 ~ 20 の整数であり、より好ましくは約 1 ~ 15 の整数であり、最も好ましくは約 1 ~ 10 の整数である。この状況において、反復エレメント $N_u G_1 X_m G_n N_v$ は、互いに同じであっても、異なつていてもよい。

20

【 0036】

特に好ましい実施形態によれば、上で定義した式 (I) ($N_u G_1 X_m G_n N_v$)_a で表される本発明の核酸分子はコア構造 $G_1 X_m G_n$ を含み、前記コア構造は以下の配列番号 1 ~ 80 で表される核酸配列のうち少なくとも 1 種から選択されることが好ましい：

- G G U U U U U U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 1) ;
- G G G G G U U U U U U U U U U U U U G G G G G (配列番号 2) ;
- G G G G G U G G G G G (配列番号 3) ;
- G U G U G U G U G U G U G U G U G U G U G U G U (配列番号 4) ;
- G G U U G G U U G G U G G U U G G U U G G U U (配列番号 5) ;
- G G G G G G G G G U U U G G G G G G G G (配列番号 6) ;
- G G G G G G G G G U U U U G G G G G G G G (配列番号 7) ;
- G G G G G G G U U U U U U G G G G G G G (配列番号 8) ;
- G G G G G G G U U U U U U U G G G G G G (配列番号 9) ;
- G G G G G G U U U U U U U U U G G G G G G (配列番号 10) ;
- G G G G G G U U U U U U U U U U G G G G G (配列番号 11) ;
- G G G G G G U U U U U U U U U U U G G G G (配列番号 12) ;
- G G G G G U U U U U U U U U U U U U G G G G (配列番号 13) ;
- G G G G G U U U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 14) ;
- G G G G U U U U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 15) ;
- G G G G U U U U U U U U U U U U U U U U G G (配列番号 16) ;
- G G U U U U U U U U U U U U U U U U U U G G (配列番号 17) ;
- G U G (配列番号 18) ;
- G G G G G G G G G G G U U U G G G G G G G G G (配列番号 19) ;
- G G G G G G G G G U U U U G G G G G G G G G (配列番号 20) ;
- G G G G G G G G G U U U U U G G G G G G G G (配列番号 21) ;
- G G G G G G G G G U U U U U U G G G G G G G (配列番号 22) ;
- G G G G G G G U U U U U U U U G G G G G G G (配列番号 23) ;

30

40

50

- G G G G G G U U U U U U U U U G G G G G G (配列番号 2 4) ;
- G G G G G G U U U U U U U U U G G G G G G (配列番号 2 5) ;
- G G G G G G U U U U U U U U U U G G G G G (配列番号 2 6) ;
- G G G G G G U U U U U U U U U U U G G G G (配列番号 2 7) ;
- G G G G G U U U U U U U U U U U U G G G G (配列番号 2 8) ;
- G G G G G U U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 2 9) ;
- G G G U U U U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 3 0) ;
- G G U U U U U U U U U U U U U U U U U G G (配列番号 3 1) ;
- G G G G G G G G G G G U U U G G G G G G G G G G (配列番号 3 2) ;
- G G G G G G G G G G U U U U G G G G G G G G G G (配列番号 3 3) ;
- G G G G G G G G G U U U U U U G G G G G G G G G G (配列番号 3 4) ;
- G G G G G G G G G U U U U U U U G G G G G G G G G (配列番号 3 5) ;
- G G G G G G G G U U U U U U U U G G G G G G G G G (配列番号 3 6) ;
- G G G G G G G G U U U U U U U U U G G G G G G G G (配列番号 3 7) ;
- G G G G G G G G U U U U U U U U U U G G G G G G G (配列番号 3 8) ;
- G G G G G G G U U U U U U U U U U U G G G G G G G (配列番号 3 9) ;
- G G G G G G G U U U U U U U U U U U U G G G G G G (配列番号 4 0) ;
- G G G G G G U U U U U U U U U U U U U U G G G G G (配列番号 4 1) ;
- G G G G G G U U U U U U U U U U U U U U U G G G G (配列番号 4 2) ;
- G G G G U U U U U U U U U U U U U U U U U U G G G G (配列番号 4 3) ;
- G G G U G G G (配列番号 4 4) ;
- G U G (配列番号 4 5) ;
- G G U G G (配列番号 4 6) ;
- G G G U G G G (配列番号 4 7) ;
- G G G G U G G G (配列番号 4 8) ;
- G G G G G U G G G G (配列番号 4 9) ;
- G G G G G G U G G G G G (配列番号 5 0) ;
- G G G G G G G U G G G G G G (配列番号 5 1) ;
- G G G G G G G G U G G G G G G G (配列番号 5 2) ;
- G G G G G G G G G U G G G G G G G G (配列番号 5 3) ;
- G G U U U G G (配列番号 5 4) ;
- G G U U U U G G (配列番号 5 5) ;
- G G U U U U U G G (配列番号 5 6) ;
- G G U U U U U U G G (配列番号 5 7) ;
- G G U U U U U U U G G (配列番号 5 8) ;
- G G U U U U U U U U G G (配列番号 5 9) ;
- G G U U U U U U U U U G G (配列番号 6 0) ;
- G G U U U U U U U U U U G G (配列番号 6 1) ;
- G G U U U U U U U U U U U G G (配列番号 6 2) ;
- G G U U U U U U U U U U U U G G (配列番号 6 3) ;
- G G U U U U U U U U U U U U U G G (配列番号 6 4) ;

10

20

30

40

50

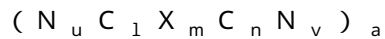
- G G U U U U U U U U U U U U U U U G G (配列番号 6 5) ;
- G G U U U U U U U U U U U U U U U G G (配列番号 6 6) ;
- G G G U U U G G G (配列番号 6 7) ;
- G G G U U U U G G G (配列番号 6 8) ;
- G G G U U U U U G G G (配列番号 6 9) ;
- G G G U U U U U U G G G (配列番号 7 0) ;
- G G G U U U U U U U G G G (配列番号 7 1) ;
- G G G U U U U U U U U G G G (配列番号 7 2) ;
- G G G U U U U U U U U U G G G (配列番号 7 3) ;
- G G G U U U U U U U U U U G G G (配列番号 7 4) ;
- G G G U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 7 5) ;
- G G G U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 7 6) ;
- G G G U U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 7 7) ;
- G G G U U U U U U U U U U U U U U U G G G U U U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 7 8) ;
- G G G U U U U U U U U U U U U U U U U U G G G G G G U U U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 7 9) ;
- G G G U U U G G G U U U G G G U U U G G G U U U G G G U U U G G G U U U G G G U U U G G G U U U G G G U U U G G G (配列番号 8 0) 。

10

【 0 0 3 7 】

20

別の特に好ましい実施形態によれば、本発明の根底にある問題は、式 (I a)



に係る代替核酸分子により解決することができる：

式中、

C は、シチジン (シトシン)、ウリジン (ウラシル)、シチジン (シトシン) 類似体、及びウリジン (ウラシル) 類似体のいずれか、好ましくはシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれかであり；

X は、グアノシン (グアニン)、ウリジン (ウラシル)、アデノシン (アデニン)、チミジン (チミン)、シチジン (シトシン)、及び上記ヌクレオチド (ヌクレオシド) の類似体のいずれか、好ましくはウリジン (ウラシル) 及びその類似体のいずれかであり、

30

N は互いに独立して、約 4 核酸 ~ 5 0 核酸、好ましくは約 4 核酸 ~ 4 0 核酸、より好ましくは約 4 核酸 ~ 3 0 核酸、或いは 4 核酸 ~ 2 0 核酸の長さを有する核酸配列であって、各 N は独立して、グアノシン (グアニン)、ウリジン (ウラシル)、アデノシン (アデニン)、チミジン (チミン)、シチジン (シトシン)、及びこれらヌクレオチド (ヌクレオシド) の類似体のいずれかから選択され、

a は、 1 ~ 2 0 の整数、好ましくは 1 ~ 1 5 の整数、最も好ましくは 1 ~ 1 0 の整数であり、

l は、 1 ~ 4 0 の整数であって、

l が 1 である場合、C はシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれかであり、

l が 1 超である場合、これらヌクレオチド (ヌクレオシド) の少なくとも 5 0 % がシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれかであり、

40

m は、整数であり且つ少なくとも 3 であって、

m が 3 である場合、X はウリジン (ウラシル) 及びその類似体のいずれかであり、

m が 3 超である場合、ウリジン (ウラシル) 及びウリジン (ウラシル) の類似体のいずれかが少なくとも 3 個連続して存在し、

n は、 1 ~ 4 0 の整数であって、

n が 1 である場合、C はシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれかであり、

n が 1 超である場合、これらヌクレオチド (ヌクレオシド) の少なくとも 5 0 % がシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれかであり、

u、v は、互いに独立して 0 ~ 5 0 の整数であって、好ましくは

50

u が 0 である場合、v は 1 以上であるか、或いは
v が 0 である場合、u は 1 以上であり、

本発明に係る式 (I a) の核酸分子は、少なくとも 5 0 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 1 0 0 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 1 5 0 ヌクレオチド、更により好ましくは少なくとも 2 0 0 ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも 2 5 0 ヌクレオチドの長さを有する。

【 0 0 3 8 】

式 (I a) では、エレメント N (即ち、 N_u 及び N_v) 及び X (X_m) に関する上記定義のいずれか、特に上で定義したコア構造、並びに整数 a、l、m、n、u、及び v を、式 (I a) の対応するエレメントに同様に適用するが、式 (I a) ではコア構造は $C_l X_m C_n$ により定義される。境界エレメント N_u 及び N_v の定義は、上記 N_u 及び N_v に関する定義と同一である。

【 0 0 3 9 】

より具体的には、本発明に係る式 (I a) で表される核酸分子中の C は、ヌクレオチド及びデオキシヌクレオチドのいずれかであるか、或いはヌクレオシドを含み、ここでヌクレオチド (ヌクレオシド) は典型的には、シチジン (シトシン)、ウリジン (ウラシル) 及びこれらの類似体のいずれかである。これに関連して、シチジン (シトシン) ヌクレオチド類似体及びウリジン (ウラシル) ヌクレオチド類似体のいずれかは、天然に存在するシチジン (シトシン) ヌクレオチド及びウリジン (ウラシル) ヌクレオチドのいずれかの、天然には存在しない変異体であると定義される。従って、シチジン (シトシン) 類似体及びウリジン (ウラシル) 類似体のいずれかは、天然には存在しない官能基で化学的に誘導体化されたヌクレオチド (ヌクレオシド) であり、前記ヌクレオチド (ヌクレオシド) は、天然に存在するシチジン (シトシン) ヌクレオチド (ヌクレオシド) 及びウリジン (ウラシル) ヌクレオチド (ヌクレオシド) のいずれかに付加或いは欠失が施されている、或いはシチジン (シトシン) ヌクレオチド (ヌクレオシド) 及びウリジン (ウラシル) ヌクレオチド (ヌクレオシド) のいずれかの天然に存在する官能基が置換されていることが好ましい。従って、天然に存在するシチジン (シトシン) ヌクレオチド及びウリジン (ウラシル) ヌクレオチドのいずれかの各構成成分、即ち塩基部分、糖 (リボース) 部分、及びオリゴヌクレオチド骨格を形成しているリン酸部分の少なくともいずれかに修飾が施されていてもよい。リン酸部分は、例えば、ホスホロアミダート、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホネート等に置換されていてもよく、天然に存在するリン酸ジエステルが更に好ましい。

【 0 0 4 0 】

従って、シチジン (シトシン) 類似体及びウリジン (ウラシル) 類似体のいずれかとしては、如何なる限定を意味するものでもないが、例えばアセチル化、メチル化、ヒドロキシ化等により化学的に変化している、任意の天然に存在するシチジン (シトシン) 及びウリジン (ウラシル) のいずれか、或いは天然には存在しないシチジン (シトシン) 及びウリジン (ウラシル) のいずれかが挙げられ、例えば、2 - チオ - シチジン (シトシン)、3 - メチル - シチジン (シトシン)、4 - アセチル - シチジン (シトシン)、ジヒドロ - ウリジン (ウラシル)、4 - チオ - ウリジン (ウラシル)、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオ - ウリジン (ウラシル)、5 - (カルボキシ - ヒドロキシメチル) - ウリジン (ウラシル)、5 - フルオロ - ウリジン (ウラシル)、5 - プロモ - ウリジン (ウラシル)、5 - カルボキシメチルアミノメチル - ウリジン (ウラシル)、5 - メチル - 2 - チオ - ウリジン (ウラシル)、N - ウリジン (ウラシル) - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、5 - メチルアミノメチル - ウリジン (ウラシル)、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオ - ウリジン (ウラシル)、5' - メトキシカルボニルメチル - ウリジン (ウラシル)、5 - メトキシ - ウリジン (ウラシル)、ウリジン (ウラシル) - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウリジン (ウラシル) - 5 - オキシ酢酸 (v) を含む。該類似体の調製は、例えば米国特許第 4, 373, 071 号明細書、同第 4, 401, 796 号明細書、同第 4, 415, 732 号明細書、同第 4, 458, 066 号明細書、同第 4, 500, 70

10

20

30

40

50

18個、19個、更には20個、或いはそれ以上のシチジン（シトシン）及びその類似体のいずれかの配列であることがより好ましい。これに加えて、本発明に係る式（I a）で表される核酸分子中のN、例えば N_u 及び N_v の少なくともいずれか（或いは、以下に定義する N_{w1} 及び N_{w2} のいずれか）に直接隣接するコア構造エレメント C_1 及び C_n の少なくともいずれかのヌクレオチドは、ウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかではないことが好ましい。本発明に係る式（I a）で表される核酸分子中のN、例えば N_u 及び N_v の少なくともいずれか（或いは、以下に定義する N_{w1} 及び N_{w2} のいずれか）に直接隣接するコア構造エレメント C_1 及び C_n の少なくともいずれかのヌクレオチドは、少なくとも1個のシチジン（シトシン）及びその類似体のいずれかであることがより好ましく、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、更には20個、或いはそれ以上のシチジン（シトシン）及びその類似体のいずれかの配列であることがより好ましい。同様に式（I a）については、上記の通りl及びnの少なくともいずれかが1超である場合、コア構造エレメント C_1 及び C_n の少なくともいずれかの少なくとも60%、70%、80%、90%、或いは更には100%のヌクレオチド（ヌクレオシド）が、シチジン（シトシン）及びその類似体のいずれかであることが好ましい。コア構造エレメント C_1 及び C_n の少なくともいずれか中の、シチジン（シトシン）及びその類似体のいずれか以外のヌクレオチド（ヌクレオシド）は（シチジン（シトシン）がこれらヌクレオチド（ヌクレオシド）の100%未満を構成している場合）、上で定義した通りウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかであってもよい。

【0042】

式（I a）に係る本発明の核酸分子中の更なるコア構造エレメントとしてのX、具体的には X_m は、好ましくは式（I）について上で定義した通りである。本発明に係る式（I a）で表される核酸分子中のコア構造エレメントXの数はmにより規定される。mは整数であり、典型的には少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、20~30、30~40、40~50、50~60、60~70、70~80、80~90、90~100、100~150、150~200、或いは更にはこれ以上であり、ここでmが3である場合、Xはウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかであり、mが3超である場合、少なくとも3以上の直接隣接するウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかが、上記式（I a）のエレメントX中に存在する。かかる少なくとも3以上の直接隣接するウリジン（ウラシル）の配列は、本願に関連して「単調ウリジン（ウラシル）配列」と称される。単調ウリジン（ウラシル）配列は、典型的には少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、20~30、30~40、40~50、50~60、60~70、70~80、80~90、90~100、100~150、150~200の長さのウリジン（ウラシル）、或いは任意的に上記定義のようなウリジン（ウラシル）の類似体を有する。該単調ウリジン（ウラシル）配列は、本発明に係る式（I a）の核酸分子のコア構造エレメントX中に少なくとも1つ存在する。それ故例えば少なくとも3以上のウリジン（ウラシル）及びその類似体のいずれかを有する1、2、3、4、5、或いはそれ以上の単調ウリジン（ウラシル）配列が存在することが可能であり、該単調ウリジン（ウラシル）配列は、コア構造エレメントXにおいて、少なくとも1、好ましくは2、3、4、5、或いはそれ以上のグアノシン（グアニン）、アデノシン（アデニン）、チミジン（チミン）、シチジン（シトシン）、及びこれらの類似体のいずれかにより遮断されていてもよい。例えば、mが3である場合 X_m はUUUである。mが4である場合、 X_m は例えば如何なる限定を意味するものでもないが、UUUA、UUUG、UUUC、UUUU、AUUU、GUUU、及びCUUU等のいずれかであってもよい。n=10の場合、 X_m は例えば如何なる限定を意味するものでもないが、UUUAAUUUUC、UUUUGUUUA、UUUGUUUGUU、UUGUUUUGUU、UUUUUUUUUU等であってもよい。本発明に係る式（I a）で表される核酸分子の C_1 及び C_n のいずれかに隣接する X_m のヌクレオチド（ヌクレオシド）は、ウリジン（ウ

10

20

30

40

50

ラシル)及びその類似体のいずれかを含むことが好ましい。mが3超である場合、典型的には上で定義した通り、 X_m のヌクレオチドの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%、或いは更には100%がウリジン(ウラシル)及びその類似体のいずれかである。 X_m 中のウリジン(ウラシル)及びその類似体のいずれか以外のヌクレオチド(ヌクレオシド)は(配列 X_m 中のウリジン(ウラシル)が100%未満である場合)、上で定義した通りグアノシン(グアニン)、ウリジン(ウラシル)、アデノシン(アデニン)、チミジン(チミン)、シチジン(シトシン)、及びこれらの類似体のいずれかであってもよい。

【0043】

同様に、上記式(Ia)に係る本発明の核酸分子は、境界エレメントN、具体的には N_u 及び N_v の少なくともいずれかを含むし、前記境界エレメントN、具体的には N_u 及び N_v の少なくともいずれか、並びに整数x及びyは上記で定義した通りである。

10

【0044】

エレメント $N_u C_1 X_m C_n N_v$ は、上で式定義した(Ia)($N_u C_1 X_m C_n N_v$)_aで表される本発明の核酸分子に係る反復エレメントとして存在してもよく、式(Ia)($N_u C_1 X_m C_n N_v$)_aのエレメントの反復数は整数aにより規定される。aは、好ましくは約1~100、1~50、1~20の整数であり、より好ましくは約1~15の整数であり、最も好ましくは約1~10の整数である。この状況において反復エレメント $N_u C_1 X_m C_n N_v$ は、互いに同じであっても異なってもよい。

【0045】

20

特に好ましい実施形態によれば、上で定義した式(Ia)($N_u C_1 X_m C_n N_v$)_aで表される本発明の分子は、以下の配列番号81~83で表される核酸配列の少なくとも1つから選択されることが好ましいコア構造 $C_1 X_m C_n$ を含む：

- C C C U U U U U U U U U U U U U U C C C U U U U U U U U U U U U U U C C C U U U U U U U U U U U U U U C C C (配列番号81)

- C C C U U U C C C U U U C C C U U U C C C U U U C C C U U U C C C U U U C C C U U U C C C U U U C C C (配列番号82)

- C C C U U U U U U U U U U U U U U U U C C C C C C U U U U U U U U U U U U U U C C C (配列番号83)。

【0046】

30

式(I)(或いは(Ia))に係る本発明の核酸分子、特にその各単一反復エレメント $N_u G_1 X_m G_n N_v$ (或いは $N_u C_1 X_m C_n N_v$)は、一般に式(I)について定義した通り、単鎖核酸分子、二本鎖核酸分子、及び部分的二本鎖核酸分子等のいずれかであってもよい。

【0047】

式(I)(或いは(Ia))に係る本発明の核酸分子が単鎖核酸分子である場合、配列は典型的にはその長さ全体に亘って単鎖である。

【0048】

同様に、式(I)(或いは(Ia))に係る本発明の核酸分子が二本鎖核酸分子である場合、配列は典型的にはその長さ全体に亘って二本鎖である。

40

【0049】

式(I)(或いは(Ia))に係る本発明の核酸分子が部分的二本鎖核酸分子である場合、式(I)(或いは(Ia))で表される核酸分子の核酸配列は、コア構造 $G_1 X_m G_n$ (或いは $C_1 X_m C_n$)外の領域では単鎖であり前記コア構造領域内では二本鎖であってもよく、コア構造 $G_1 X_m G_n$ (或いは $C_1 X_m C_n$)は、上で定義した配列番号1~83で表される核酸配列の少なくとも1種から選択されることが好ましい。更により好ましくは、式(I)(或いは(Ia))のコア構造 $G_1 X_m G_n$ (或いは $C_1 X_m C_n$)は、ポリウリジン(ウラシル)配列が存在するかかるコア構造領域内において二本鎖であってもよく、最も好ましくは、ポリウリジン(ウラシル)配列全体に亘って、或いはその少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、及び99%のいずれかに亘

50

って二本鎖であってもよい。

【0050】

これに代えて或いはこれに加えて、式(I)及び(Ia)のいずれかに係る本発明の核酸分子が部分的二本鎖核酸分子である場合、上で定義した式(I)及び(Ia)のいずれかに係る本発明の核酸分子の他の部分(コア構造 $G_1 X_m G_n$ 以外の部分)が二本鎖であってもよい。例えば、式(I)及び(Ia)のいずれかの核酸分子の核酸配列は、コア構造 $G_1 X_m G_n$ (或いは $C_1 X_m C_n$)外の領域、例えば境界エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれかで二本鎖であり、前記コア構造の領域内では単鎖であってもよく、コア構造 $G_1 X_m G_n$ (或いは $C_1 X_m C_n$)は、上で定義した配列番号1~83で表される核酸配列の少なくとも1種から選択されることが好ましい。例えば境界エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれかのうち少なくとも1つは二本鎖であってもよく、一方式(I)及び(Ia)のいずれかの残りのエレメント、例えばコア構造 $G_1 X_m G_n$ 及び他のエレメントの少なくともいずれかは単鎖のままであってもよい。

10

【0051】

これに代えて或いはこれに加えて、式(I)に係る本発明の核酸分子は、式(I)及び式(Ia)のいずれかに係る単鎖核酸分子と、式(I)及び式(Ia)のいずれかに係る単鎖核酸分子と、式(I)(或いは(Ia))のいずれかに係る(部分的)二本鎖核酸分子との混合物から選択されてもよく、好ましくは、約1:10~10:1の混合比、より好ましくは、1:3~3:1の混合比の混合物から選択される。

20

【0052】

極めて特に好ましい実施形態によれば、式(I)に係る本発明の核酸分子は、例えば以下の配列で表される核酸配列のいずれかから選択することができる：

配列番号84：

UAGCGAAGCU CUUGGACCUA GG UUUUU UUUUU UUU
 UU GGG UGCGUUCUA GAAGUACACG、

配列番号85：

UAGCGAAGCU CUUGGACCUA GG UUUUU UUUUU UUU
 UU GGG UGCGUUCUA GAAGUACACG、
 AUCGCUUCGA GAACCUUGGAU CC AAAAA AAAAA AAA
 AA CCC ACGCAAGGAU CUUCAUGUGC、

30

配列番号114(R820:(N₁₀₀)₂):

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCA AUGCCCGCACAUUGAG
 GAAACCGAGUUGCAUAUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUA
 GGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCACUCCAGG
 AUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGU
 CGUCAGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAA
 AGCAGUUAGAUGUUACACUCUAUUAGAUC、

配列番号115(R719:(N₁₀₀)₅):

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCA AUGCCCGCACAUUGAG
 GAAACCGAGUUGCAUAUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUA
 GGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCACUCCAGG
 AUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGU
 CGUCAGUUGACCAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAA
 AGCAGUUAGAUGUUACACUCUAUUAGAUCUCGGAUUACAG
 CUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGUCUAAGUACCGA
 GUGUGCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAAACGAACGGCUC
 UCCUCUUAAGACUGCAGCGUAAGUGCGGAUCUGGGGAUCA
 AAUUAUCUGACUGCCUGGAUUACCCUCGGACAUAUAACCUU
 GUAGCACGCGUGUUGCUGUAUAGGUGACCACGCCACUCG
 AGUAGACCAGCUCUCUUAUGUCCGGACAAUGAUAGGAGGC

40

50

CGGUCAAUCUACUUCUGGCUAGUUAAGAUAAGGCUGCACCG
GACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAG、

配列番号116 (R720 : (N₁₀₀)₁₀) :

GGGAGAAAGCUC AAGCUUGGAGCAAUGCCCCGCACA UUGAG
GAAACCGAGUUGCAUAUCUCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUA
GGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCACUCCAGG
AUC CGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGU
CGUCAGUUGAC CAGUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAA
AGCAGUUAGAU GUUACACUCUAUUAGAUCUCGGAUUAACAG
CUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGCUCUAAGUACCGA
GUGUGCCCCAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUC
UCCUCUUAAGACUGCAGCGUAAGUGCGGAUCUGGGGAUCA
AAUUAACUGACUGCCUGGAUUAACCUCGGACAUAUAACCUU
GUAGCACGCGUGUUGCUGUAUAGGUGACCAACGCCCACUCG
AGUAGACCAGCUCUCUUAAGUCCGGACA AUGAUAGGAGGCG
CGGUCAAUCUACUUCUGGCUAGUUAAGAUAAGGCUGCACCG
GACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAGAGCUACGCAGGUU
CGCAAUAAAAGCGUUGAUUAAGUGUGCAUAGAACAGACCU
UUAUUCGGUGAAACGCCAGAAUGCUAAA UUCCAAUAACUC
UUC CCAAACGCGUACGGCCGAAGACGCGCGCUUAUCUUG
UGUACGUUCUCGCACAUGGAAGAAUCAGCGGGCAUGGUGG
UAGGGCAAUAGGGGAGCUGGGUAGCAGCGAAAAAGGGCCC
CUGCGCACGUAGCUUCGCUGUUCGUCUGAAACAACCCGGC
AUC CGUUGUAGCGAUCCCGUUAUCAGUGUUAUUCUUGUGC
GCACUAAGAUUCAUGGUGUAGUCGACAUAACAGCGUCUU
GGCAGAUUCUGGUCACGUGCCCUAUGCCCGGGCUUGUGCC
UCUCAGGUGCACAGCGAUACUUAAGCCUUC AAGGUACUC
GACGUGGGUACCGAUUCGUGACACUUCCUAAGAUUAUUC
ACUGUGUUAAGCCCCGCACCCGCCGACCUAAACUGGUCCA
GUAUACGC AUUCGCUGAGCGGAUCGAUAAUAAAAGCUUGA
AUU、

10

20

30

配列番号117 (R821 : (N₄₀U₂₀N₄₀)₂) :

GGGAGAAAGCUC AAGCUUAUCC AAGUAGGCUGGUCACCUG
UACAACGUAGCCGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGA
CCGUCUCAAGGUCCAAGUUAAGUCUGCCUAUAAAGGUGCGG
AUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUCU
CCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAAGUAAAUGCGUCUAC
UGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGCC CAGAU、

配列番号118 (Seq. R722 : (N₄₀U₂₀N₄₀)₅) :

GGGAGAAAGCUC AAGCUUAUCC AAGUAGGCUGGUCACCUG
UACAACGUAGCCGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGA
CCGUCUCAAGGUCCAAGUUAAGUCUGCCUAUAAAGGUGCGG
AUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUCU
CCCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAAGUAAAUGCGUCUAC
UGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGCC CAGAUUCUUCGACCAACA
GUGCAUAUAGUAGUCAUCGAGGGUCCCUUUUUUUUUUUUU
UUUUUUUUUUUGGCC CAGUUCUGAGACUUCGCUAGAGACU
ACAGUUAACAGCUGCAGUAGUAACCAACUGCGGCUAUUGCAG
GAAAUCCCGUUCAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCGC
UCACUAUGAUUAAGAACCAGGUGGAGUGUCAUCUGCUCUCG

40

50

A G G U C U C A C G A G A G C G C U C G A U A C A G U C C U U G G A A G A A U C
 U G U G C G A C G A U C A C A G A G A
 A C U U C U A U U C A U G C A G G U C U G C U C U A、或いは
 配列番号 119 (R723 : (N₄₀U₂₀N₄₀)₁₀) :
 G G G A G A A A G C U C A A G C U U A U C C A A G U A G G C U G G U C A C C U G
 U A C A A C G U A G C C G G U A U G A
 C C G U C U C A A G G U C C A A G U U A G U C U G C C U A U A A A G G U G C G G
 A U C C A C A G C U G A U G A A A G A C U U G U G C G G U A C G G U U A A U C U
 C C C C U A G U A A A U G C G U C U A C
 U G A A U C C A G C G A U G A U G C U G G C C C A G A U C U U C G A C C A C A A 10
 G U G C A U A U A G U A G U C A U C G A G G G U C G C C U U U U U U U U U U U U
 U U U U U U U U U U U G G C C C A G U U C U G A G A C U U C G C U A G A G A C U
 A C A G U U A C A G C U G C A G U A G U A A C C A C U G C G G C U A U U G C A G
 G A A A U C C C G U U C A G G U C C G C
 U C A C U A U G A U U A A G A A C C A G G U G G A G U G U C A C U G C U C U C G
 A G G U C U C A C G A G A G C G C U C G A U A C A G U C C U U G G A A G A A U C
 U G U G C G A C G A U C A C A G A G A
 A C U U C U A U U C A U G C A G G U C U G C U C U A G A A C G A A C U G A C C U
 G A C G C C U G A A C U U A U G A G C G U G C G U A U U U U U U U U U U U U U U U
 U U U U U U U U U C C U C C A A C A A A U G U C G A U C A A U A G C U G G G C 20
 U G U U G G A G A C G C G U C A G C A A A U G C C G U G G C U C C A U A G G A C
 G U G U A G A C U U C U A U C C C G G G
 A C C A C A A A U A A U A U U C U U G C U U G G U U G G G C G C A A G G G C C C
 C G U A U C A G G U C A U A A A C G G G U A C A U G U U G C A C A G G C U C C U
 U C G C U G A G U U A U U C C G G U C
 U C A A A A G A C G G C A G A C G U C A G U C G A C A A C A C G G U C U A A A G
 C A G U G C U A C A A U C U G C C G U G U U C G U G U U U U U U U U U U U U U U U
 U U U U U U G U G A A C C U A C A C G G C G U G C A C U G U A G U U C G C A A U
 U C A U A G G G U A C C G G C U C A G A G U U A U G C C U U G G U U G A A A A C
 U G C C C A G C A U A C U C A U A U U C C 30
 C A U G C U A A G C A A G G G A U G C C G C G A G U C A U G U U A A G C U U G A
 A U U。

【0053】

別の極めて特に好ましい実施形態によれば、式(Ia)に係る本発明の核酸分子は、以下の配列で表される核酸配列のいずれかから選択することができる：

U A G C G A A G C U C U U G G A C C U A C C U U U U U U U U U U U U U U U
 U U C C C U G C G U U C C U A G A A G U A C A C G (配列番号86)、
 或いは
 U A G C G A A G C U C U U G G A C C U A C C U U U U U U U U U U U
 A U C G C U U C G A G A A C C U G G A U G G A A A A A A A A A 40

U U U U U C C C U G C G U U C C U A G A A G U A C A C G
 A A A A A G G G A C G C A A G G A U C U U C A U G U G C
 (配列番号87)。

【0054】

ある好ましい実施形態によれば、上で定義した式(I)(或いは(Ia))に係る本発明の核酸分子は、ポリ(X)配列(修飾エレメント)で修飾されていてもよい。該本発明の核酸分子は、例えば式(II)：

ポリ(X)_s(N_uG₁X_mG_nN_v)_aポリ(X)_t
 に係る核酸分子を含んでいてもよく、

10

20

30

40

50

前記本発明に係る式 (I I) の核酸分子は、同様に少なくとも 5 0 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 1 0 0 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 1 5 0 ヌクレオチド、更により好ましくは少なくとも 2 0 0 ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも 2 5 0 ヌクレオチドの長さを有する。

【 0 0 5 5 】

本発明の式 (I I) に係る核酸分子では、エレメント G 、 X 、及び N 、具体的にはコア構造 $G_1 X_m G_n$ 、エレメント N_u 及び N_v 、並びに整数 a 、 l 、 m 、 n 、 u 、及び v は、式 (I) について上で定義した通りである。本発明の状況では、式 (I I) に係る本発明の核酸分子の修飾エレメントポリ (X)、具体的にはポリ (X)_s 及びポリ (X)_t の少なくともいずれかは、典型的には単鎖核酸配列、二本鎖核酸配列、及び部分的二本鎖核酸配列、例えば一般に上で定義した通りの DNA 配列及び RNA 配列のいずれかである。好ましくは、修飾エレメントポリ (X)、具体的にはポリ (X)_s 及びポリ (X)_t の少なくともいずれかは、核酸のホモポリマー配列であり、ここで X は任意のヌクレオチド及びデオキシヌクレオチドのいずれかであってもよく、式 (I) 及び式 (I a) のいずれかに係る本発明の核酸分子の X について上で定義した通りのヌクレオチドを含んでいてもよい。好ましくは、 X は、各ポリ (X)、具体的にはポリ (X)_s 及びポリ (X)_t の少なくともいずれかについて独立に、ヌクレオチド及びデオキシヌクレオチドのいずれかから選択してもよく、ヌクレオチドを含んでいてもよい。該ヌクレオチド (ヌクレオチド) は、グアノシン (グアニン)、ウリジン (ウラシル)、アデノシン (アデニン)、チミジン (チミン)、シチジン (シトシン)、イノシン、及びこれらヌクレオチドの類似体から選択され、例えば、シチジン (シトシン) の単鎖配列 (ポリ (C))、グアノシン (グアニン) の単鎖配列 (ポリ (G))、アデノシン (アデニン) の単鎖配列 (ポリ (A))、ウリジン (ウラシル) の単鎖配列 (ポリ (U))、イノシンの単鎖配列 (ポリ (I))、イノシン及びシチジン (シトシン) のホモポリマー二本鎖配列 (ポリ ($I : C$))、及びアデノシン (アデニン) 及びウリジン (ウラシル) のホモポリマー二本鎖配列 (ポリ ($A : U$)) のいずれか等から選択される。該ホモポリマー配列、具体的にはポリ ($I : C$) 及びポリ ($A : U$) の少なくともいずれかは、その鎖のいずれかを介して、例えばポリ - C 配列、ポリ - G 配列、ポリ - I 配列、ポリ - A 配列、及びポリ - U 配列のいずれかを用いて、式 (I I) に係る核酸分子の配列 ($N_u G_1 X_m G_n N_v$)_a に結合していてもよい。本発明の式 (I I) の核酸分子の修飾エレメントポリ (X)、具体的にはポリ (X)_s 及びポリ (X)_t の少なくともいずれかの長さは、整数 s 及び t の少なくともいずれかにより規定され、前記 s 及び t の少なくともいずれかは互いに独立して、約 5 ~ 1 0 0 の整数、好ましくは約 5 ~ 7 0 の整数、より好ましくは約 5 ~ 5 0 の整数、更により好ましくは約 5 ~ 3 0 の整数、最も好ましくは約 5 ~ 2 0 の整数であってもよい。

【 0 0 5 6 】

特に好ましい実施形態によれば、上で定義した式 (I I) に係る核酸分子は、具体的には例えば式 (I I a) :

ポリ (X) ($N_u G_1 X_m G_n N_v$)_a

に係る核酸分子、及び式 (I I b) :

ポリ (X) ($N_u G_1 X_m G_n N_v$)_a ポリ (X)

に係る核酸分子を含んでいてもよく、

本発明に係る式 (I I a) 及び式 (I I b) のいずれかで表される核酸分子は同様に、少なくとも 5 0 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 1 0 0 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 1 5 0 ヌクレオチド、更により好ましくは少なくとも 2 0 0 ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも 2 5 0 ヌクレオチドの長さを有する。同様に他の定義も全て上記式 (I I) 及び式 (I) のいずれかについて記載したものを適用する。同様に前記式 (I I)、(I I a)、及び (I I b) は、式 (I b) に係る式に基づいて、即ちコア構造 $C_1 X_m C_n$ の導入に基づいて定義してもよい。

【 0 0 5 7 】

式 (I I)、式 (I I a)、及び式 (I I b) の少なくともいずれかに係る本発明の核

10

20

30

40

50

酸分子中のポリ(X)は、上で定義したポリ(X)から選択することがより好ましく、ポリ(I:C)及びポリ(A:U)の少なくともいずれかから選択することがより好ましい。これら修飾エレメントポリ(X)、具体的にはポリ(I:C)及びポリ(A:U)の少なくともいずれかは、その鎖のいずれかを介して、例えばポリ-C配列、ポリ-G配列、ポリ-I配列、ポリ-A配列、及びポリ-U配列のいずれかを用いて、式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかに係る配列に結合していてもよい。

【0058】

式(I)及び式(Ia)のいずれかについての上記定義と同様に、式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子は、上記で定義した通りの、単鎖核酸分子、二本鎖核酸分子、及び部分的二本鎖核酸分子のいずれかであ

10

【0059】

式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子が単鎖核酸分子である場合、配列は典型的にはその長さ全体に亘って単鎖である。

【0060】

同様に式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子が二本鎖核酸分子である場合、配列は典型的にはその長さ全体に亘って二本鎖である。

【0061】

式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子が部分的二本鎖核酸分子である場合、式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかの核酸分子の核酸配列は、コア構造 $G_1 X_m G_n$ 領域外では単鎖であり、前記コア構造領域内では二本鎖であってもよく、前記コア構造 $G_1 X_m G_n$ は、上で定義した配列番号1~80、及び配列番号81~83で表される核酸配列のいずれかの配列の少なくとも1種から選択されることが好ましい。更により好ましくは、式(I) (或いは(Ia))のコア構造 $G_1 X_m G_n$ (或いは $C_1 X_m C_n$)は、ポリウリジン(ウラシル)配列が存在しているコア構造の該領域内で二本鎖であってもよく、最も好ましくは、ポリウリジン(ウラシル)配列全体、或いはポリウリジン(ウラシル)配列の少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%、及び99%のいずれかに亘って二本鎖であってもよい。

20

30

【0062】

これに代えて或いはこれに加えて、式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子が部分的二本鎖核酸分子である場合、他の部分(上記定義のような式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子の他の部分(コア構造 $G_1 X_m G_n$ 以外の部分)は、二本鎖であってもよい。例えば、式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかの核酸分子の核酸配列は、コア構造 $G_1 X_m G_n$ の領域外、例えば境界エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれか、並びに例えば、ポリ(X)_s及びポリ(X)_tの少なくともいずれか等(例えば、ポリ(I:C)配列及びポリ(A:U)配列等)の修飾エレメントポリ(X)の少なくともいずれかにおいて二本鎖であってもよく、例えば前記コア構造の領域内において単鎖であってもよく、前記コア構造 $G_1 X_m G_n$ は、上で定義した配列番号1~83で表される核酸配列の少なくとも1種から選択されることが好ましい。例えば境界エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれかのうち少なくとも1種と、例えばポリ(X)_s及びポリ(X)_t等の修飾エレメントポリ(X)の少なくとも1種との少なくともいずれかは二本鎖であってもよく、一方式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかの残りのエレメント、例えばコア構造 $G_1 X_m G_n$ 及び他のエレメントの少なくともいずれかは単鎖のままであってもよい。

40

【0063】

これに代えて或いはこれに加えて、式(II)、式(IIa)、及び式(IIb)の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子は、式(II)、式(IIa)、及び式(II

50

b) の少なくともいずれかに係る単鎖核酸分子と、式 (I I)、式 (I I a)、及び式 (I I b) の少なくともいずれかに係る (部分的) 二本鎖核酸分子との混合物から選択されてもよく、好ましくは、約 1 : 1 0 ~ 1 0 : 1 の混合比、より好ましくは、1 : 3 ~ 3 : 1 の混合比の混合物から選択される。

【 0 0 6 4 】

特に好ましい実施形態によれば、式 (I I)、式 (I I a)、及び式 (I I b) の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子は、例えば以下の配列のいずれかから選択することができる :

- C G G U U U U U U U U U U U U U U U U U G G G (配列番号 8 8) 10

- C G G U U U U U U U U U I U U U U U U G G G (配列番号 8 9)

- C G G U U U U U U U U U A A A A A A A A A A U U U U U U G G G (配列番号 9 0) 20
A A A A A

- C G G U U U U U U U U U G G G G G G G G G G G G G G G G G G C C A A A A A A A A A U U U U U U G G G (配列番号 9 1)
A A A A A C C C

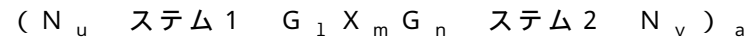
- C U A G C G A A G C U C U U G G A C C U A G G U U U U U U U U U U U U U U G G G U G C G U U C C U A G A A G U A C A C G (配列番号 9 2) 30

- C G G U U U U U U U U U G G G G G G G G G G G G G G G G G G C C A A A A A A A A A U U U U U U G G G U G C G U U C C U A G A A G U A C A C G U A G A A A A A C C C A C G C A A G G A U C U U C A U G U G C A U C C G A A G C U C U U G G A C C U A (配列番号 9 3) G C U U C G A G A A C C U G G A U 40

- C G G U U U U U U U U U C C A A A A A A A A A U U U U U U G G G U G C G U U C C U A G A A G U A C A C G U A G A A A A A C C C A C G C A A G G A U C U U C A U G U G C A U C C G A A G C U C U U G G A C C U A (配列番号 9 4) G C U U C G A G A A C C U G G A U。 50

【 0 0 6 5 】

更なる好ましい実施形態によれば、上で定義した式 (I) (或いは (I a)) に係る本発明の核酸分子は、ステム及びステムループのいずれかを挿入することにより修飾されていてもよく、例えば式 (I I I a) :



に係る核酸分子、及び式 (I I I b) :



に係る核酸分子のいずれかが得られ、ここで本発明に係る式 (I I I a) 及び式 (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、少なくとも 100ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 150ヌクレオチド、更により好ましくは少なくとも 200ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも 250ヌクレオチドの長さを有する。同様に前記式 (I I I a) 及び式 (I I I b) は、式 (I b) に係る式、即ちコア構造 $C_1 X_m C_n$ の導入に基づいて定義してもよい。

【 0 0 6 6 】

具体的には、式 (I I I a) 及び式 (I I I b) の少なくともいずれかで表される本発明の核酸分子は、上で定義した式 (I) の変異体を表す。式 (I I I a) 及び式 (I I I b) の少なくともいずれかに係る核酸分子では、コア構造 $G_1 X_m G_n$ に隣接している境界エレメント N 、即ち N_u 及び N_v の少なくともいずれかは、好ましくは単一ステムループエレメントであるステム 1 及びステム 2 からなる、少なくとも 1 つのステム構造及びステムループ構造のいずれかにより更に拡大される。上で定義した式 (I I I a) 及び式 (I I I b) の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子では、エレメント G 、 X 、及び N 、具体的にはコア構造 $G_1 X_m G_n$ と、整数 a 、 l 、 m 、 n 、 u 、及び v は上で定義した通りである。より好ましくは、整数 a は 1 である。任意的に、 u 及び v の少なくともいずれかは 0 であってもよい。これに加えて、ステムループエレメントであるステム 1 及びステム 2 に隣接しているエレメント N_{w_1} 及び N_{w_2} は更なる境界エレメントを表し、前記エレメント N_{w_1} 及び N_{w_2} については上の境界エレメント N_u 及び N_v の少なくともいずれかに関する部分で定義されている。具体的には、一般に境界エレメント N は上記式 (I) 中の N について上で定義した通りであり、整数 w_1 及び w_2 は互いに独立して選択され、整数 u 及び v の少なくともいずれかについて式 (I) で定義した通りである。

【 0 0 6 7 】

この状況では、ステム構造或いはステムループ構造は、単鎖 DNA、或いはより一般的には単鎖 RNA 中に存在し得る分子内塩基対合である。該構造はまた、ヘアピン或いはヘアピンループとしても知られている。該構造は、同一分子の 2 つの領域、例えばステムループエレメントであるステム 1 及びステム 2 (通常、核酸配列中のパンドローム配列エレメントである) が互いに塩基対を形成するときを生じ、これは不對ループ (不對ループで終結する二重らせん) をもたらす。その結果、不對ループは典型的にはステム 1 及びステム 2 のいずれかの配列と全く或いはほとんど相同性を示さないため、これらステムループエレメントのいずれかと塩基対を形成することができない核酸分子の領域を表す。得られるロリポップ形状構造は、多くの RNA 二次構造の鍵となる構成要素である。従ってステムループ構造の形成は得られるらせん体及びループ領域の安定性に依存し、ここで第 1 の必要条件は、典型的には折り重ねて対合した二重らせん体を形成することができる配列の存在である。対合したステムループエレメントの安定性は、長さ、それが含有している不一致或いはバルジの数 (少数の不一致は典型的には、特に長いらせん体においては耐容可能である)、及び対合領域の塩基組成のいずれかにより決定される。例えばかかる配列中ではグアノシン (グアニン) とシチジン (シトシン) との対合が特に好ましい場合があり、その理由は、該対合が 3 つの水素結合を有し、アデノシン (アデニン) - ウリジン (ウラシル) 対合 (水素結合を 2 つしか有しない) と比べてより安定であるためである。従って RNA では、2 つの水素結合を有するグアノシン (グアニン) - ウリジン (ウラシル) 対合が好ましい場合もある。ループの安定性はまたステムループ構造の形成に影響を与える。3 塩基長未満の「ループ」 (即ち、ステムループエレメントであるステム 1 及びステム 2 を含まないループのみ) は、立体的にそれ程好ましくない。しかし、ステム、即ち

10

20

30

40

50

(明確な)ループは示さないがステム1とステム2との間に単なる不對領域を示す構造を含んでいてもよい。本発明の状況では、最適なループの長さは、約4塩基~100塩基長、より好ましくは4塩基~50塩基長、更には4塩基~30塩基長、或いは更には4塩基~20塩基長である傾向がある。

【0068】

従って、式(IIIa)及び式(IIIb)の少なくともいずれかに係る核酸分子の状況では、ステムループエレメントであるステム1及びステム2は、典型的には1つのステム構造或いはステムループ構造の一部を表し、前記ステム構造或いはステムループ構造は、ステムループエレメントであるステム1及びステム2により形成され得、これらステムループエレメント間に位置する配列によりループが形成され得る。ステム構造或いはステムループ構造は、塩基対合領域においてらせん体の形状を有していてもよい。各ステムループエレメントであるステム1及びステム2は、好ましくは上で定義した核酸分子であり、より好ましくはRNAであり、最も好ましくは単鎖RNAであり、ここではコア構造エレメントXについて上で定義した任意のヌクレオチド(ヌクレオシド)及びその類似体のいずれかを、ステム1及びステム2の少なくともいずれかのヌクレオチド(ヌクレオシド)として用いることができる。これに加えて、ステムループエレメントであるステム1は、ステムループエレメントであるステム2のパリンドローム配列を表す。それ故両方の配列は、互いに塩基対を形成することができ、それによってステム構造或いはステムループ構造の基礎を共に形成することが好ましい。

【0069】

それ故、ステムループエレメントであるステム1及びステム2のいずれかは、任意の核酸配列から選択される対であってもよいが、但しステムループエレメントであるステム1及びステム2のいずれかは互いにパリンドロームである、即ち、一方の配列が他方の(相補的)配列を逆から読んだものに等しい、或いは逆から読んだとき他方の配列と少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%の相同性を示す。かかるパリンドローム配列であるステム1及びステム2は、アデノシン(アデニン)、グアノシン(グアニン)、シチジン(シトシン)、ウリジン(ウラシル)、チミジン(チミン)、及び本明細書で定義したこれらの類似体のいずれかから選択される、約5核酸~50核酸、より好ましくは約5核酸~40核酸、最も好ましくは約5核酸~30核酸の長さを有する核酸配列によりそれぞれ形成することができる。

【0070】

ステムループエレメントであるステム1及びステム2の例示的な配列としては、例えば

a) ステム1

UAGCGAAGCUCUUGGACCUA (配列番号95)

ステム2

UAGGUCCAAGAGCUUCGCUA (配列番号96)

b) ステム1

UAGGUCCAAGAGCUUCGCUA (配列番号96)

ステム2

UAGCGAAGCUCUUGGACCUA (配列番号95)

c) ステム1

GCCGCGGGCCG (配列番号97)

ステム2

CGGCCCGCGGC (配列番号98)

c) ステム1

CGGCCCGCGGC (配列番号98)

ステム2

GCCGCGGGCCG (配列番号97)

e) ステム1

10

20

30

40

50

G A C A C G G U G C (配列番号 9 9)
 ステム 2
 G C A C C G U G C A (配列番号 1 0 0)
 f) ステム 1
 G C A C C G U G C A (配列番号 1 0 0)
 ステム 2
 G A C A C G G U G C (配列番号 9 9)
 g) ステム 1
 A C C U A G G U (配列番号 1 0 1)
 ステム 2
 A C C U A G G U (配列番号 1 0 1)
 h) ステム 1
 U G G A U C C A (配列番号 1 0 2)
 ステム 2
 U G G A U C C A (配列番号 1 0 2)
 i) ステム 1
 C C U G C (配列番号 1 0 3)
 ステム 2
 G C A G G (配列番号 1 0 4)
 j) ステム 1
 G C A G G (配列番号 1 0 5)
 ステム 2
 C C U G C (配列番号 1 0 6)

10

等が挙げられる。

【 0 0 7 1 】

第 1 の代替方法によれば、コア構造 $G_1 X_m G_n$ はステムループ構造内に位置していてもよい、即ちコア構造 $G_1 X_m G_n$ は、ステムループエレメントであるステム 1 及びステム 2 間に位置してもよく、ループを形成することが好ましい。かかる核酸配列は、上で定義した組成 $(N_u \text{ ステム 1 } G_1 X_m G_n \text{ ステム 2 } N_v)_a$ を有する式 (I I a) に類似している。u 及び v の少なくともいずれかが 0 であり、a が 1 である場合、式 (I I a) は特定の核酸分子「ステム 1 $G_1 X_m G_n$ ステム 2」(これも本発明に組み込まれている)をもたらす場合がある。

30

【 0 0 7 2 】

別の代替方法によれば、コア構造 $G_1 X_m G_n$ は、ステムループ構造外に位置していてもよく、この場合同様に、ステムループエレメントであるステム 1 及びステム 2 は、ある配列、好ましくは境界エレメント N、例えば N_{w_1} 及び N_{w_2} のいずれかにより互いに分離されていてもよく、前記配列は、次いでステムループエレメントであるステム 1 及びステム 2 が塩基対合するとループ構造を形成することができる。これに加えて、コア構造 $G_1 X_m G_n$ に隣接しているステムループエレメント 1 及び 1 の少なくともいずれかは、更なる境界エレメント、例えば N_{w_1} 及び N_{w_2} のいずれかによりコア構造 $G_1 X_m G_n$ から分離されていてもよい。本発明によれば、かかる核酸分子は、上で定義した組成 $(N_u G_1 X_m G_n N_v)_a \text{ ステム 1 } N_{w_1} \text{ ステム 2 } N_{w_2}$ を有する式 (I I I b) に類似している。

40

【 0 0 7 3 】

式 (I I I a) 及び式 (I I I b) の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子は、単鎖核酸分子、及び部分的二本鎖核酸分子のいずれかであってもよい。

【 0 0 7 4 】

式 (I I I a) 及び式 (I I I b) の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子が単鎖核酸分子である場合、該配列は典型的にはその長さ全体に亘って単鎖である。

【 0 0 7 5 】

50

式 (I I I a) 及び式 (I I I b) の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子が、部分的二本鎖核酸分子である場合、式 (I I I a) 及び式 (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、好ましくは、ステムループエレメントであるステム 1 及びステム 2 の領域内においても、コア構造 $G_1 X_m G_n$ により形成されるループ、或いは任意の他のエレメント、例えば N_{w_1} 及び N_{w_2} のいずれかにより形成されるループの領域内においても単鎖であってよい。ステムループエレメントである、ステム 1 及びステム 2 外に位置するエレメント、並びにコア構造 $G_1 X_m G_n$ により形成されるループ、或いは任意の他のエレメント、例えば N_{w_1} 及び N_{w_2} のいずれかにより形成されるループの領域内に位置するエレメントは、互いに独立して単鎖であって二本鎖であってよい。

【 0 0 7 6 】

これに代えて或いはこれに加えて、式 (I I I a) 及び式 (I I I b) のいずれかに係る本発明の核酸分子は、式 (I I I a) 及び式 (I I I b) のいずれかに係る単鎖核酸分子と、式 (I I I a) 及び式 (I I I b) のいずれかに係る (部分的) 二本鎖核酸分子との混合物から選択されてもよく、好ましくは、約 1 : 10 ~ 10 : 1 の混合比、より好ましくは、1 : 3 ~ 3 : 1 の混合比の混合物から選択される。

【 0 0 7 7 】

極めて特に好ましい実施形態によれば、式 (I I I a) 及び式 (I I I b) の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子はそれぞれ、例えば以下の配列のいずれかから選択することができる：

- U A G C G A A G C U C U U G G A C C U A G G U U U U U U U U U U U U
 U U U G G G U A G G U C C A A G A G C U U C G C U A (配列番号 1 0 7)
 - U A G C G A A G C U C U U G G A C C U A G G U U U U U U U U U U U U
 U U U G G G U G C G U U C C U A G A A G U A C A C G G C C G C G G G C C
G U G C G U U C C U A G A A G U A C A C G C G G C C C G C G G C U G C G
 U U C C U A G A A G U A C A C G (配列番号 1 0 8)

(下線部はステム 1 及びステム 2 であり、G G U U U U U U U U U U U U U U U U G G G はコア構造 $G_1 X_m G_n$ である)。

【 0 0 7 8 】

上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、例えば固相合成法等の合成法、及びインビトロ転写反応等のインビトロ法を含む、当該技術分野において既知である方法のいずれかを用いて調製することができる。インビトロ転写を本発明の核酸分子の調製に用いることが好ましい。驚くべきことに本発明の発明者らが見出したところによると、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、インビトロ転写により調製したとき、合成法により調製された本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子に比べて、5' - リン酸に起因して自然免疫系を更に強く賦活することが示されている。かかる自然免疫系の賦活は、これに限定されるものではないが、受容体 R I G - 1 の活性化に寄与する。従って、インビトロ転写反応により調製された場合の、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子が特に好ましい。

【 0 0 7 9 】

上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、典型的には「安定化オリゴヌクレオチド」として提供される、即ちインビトロにおける (例えば、エキソヌクレアーゼ或いはエンドヌクレアーゼによる) 分解に対して耐性を有するオリゴヌクレオチド、或いはオリゴデオキシリボヌクレオチドとして提供される。該安定化は、例えば上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、

10

20

30

40

50

(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の修飾リン酸骨格により影響を受ける場合がある。これに関連して用いられることがヌクレオチドは、ホスホロチオエート修飾リン酸骨格を含むことが好ましく、リン酸骨格中に含まれているリン酸酸素のうち少なくとも1つが硫黄原子に置換されているリン酸骨格を含むことがより好ましい。他の安定化オリゴヌクレオチドとしては非イオン性類似体が挙げられ、例えば、荷電リン酸酸素がアルキル基及びアリール基のいずれかに置換されているアルキルホスホネート及びアリールホスホネート、或いは荷電酸素残基がアルキル化型で存在しているホスホジエステル及びアルキルホスホトリエステル等である。しかし、天然に存在するホスホジエステル骨格が更に好ましい。

【 0 0 8 0 】

上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は同様に安定化されていてもよい。上述の通り、原則として任意の核酸、例えば DNA 及び RNA のいずれかを、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子に用いることができる。しかし、安全性の観点から該核酸分子には RNA を使用することが好ましい。具体的には、RNA はトランスフェクトされた細胞のゲノムに安定的に組み込まれるリスクを有しない。これに加えて、RNA はインビボにおいて実質的に容易に分解される。同様に、これまでに抗 RNA 抗体は検出されていない、これは恐らく RNA のインビボにおける半減期が DNA に比べて比較的短いためである。DNA に比べて、RNA は溶液中における安定性がかなり低く、これは特に実質的に RNA 分解酵素、所謂 RNase (リボヌクレアーゼ) が原因である。ほんの僅かなりボヌクレアーゼが混入した場合でさえも、溶液中の RNA を完全に分解するのに十分である。かかる RNase の混入は一般的に、特別な処理、具体的にはジエチルピロカルボネート (DEPC) による処理でしか除去できない。従って、細胞の細胞質中において天然に生じる mRNA の分解は非常に細かく制御されている。これに関連する多くのメカニズムが先行技術で知られている。従って末端構造は典型的にはインビボにおける mRNA に対して非常に重要である。天然に存在する mRNA の 5' 末端には通常所謂「キャップ構造」(修飾グアノシン (グアニン) ヌクレオチド) が存在し、3' 末端には最高 200 個のアデノシン (アデニン) ヌクレオチド (所謂ポリ - A テール) が存在する。

【 0 0 8 1 】

従って、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、特に (m) RNA として提供される場合、所謂「5' キャップ」構造の付加により RNase による分解に対して安定化させてもよい。これに関連して、5' キャップ構造としては、m7G (5') ppp (5' (A , G (5') ppp (5') A 及び G (5') ppp (5') G のいずれかが特に好ましい。しかし該修飾は、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の 5' 末端に既に導入されている修飾、例えば脂質修飾が存在しない場合、或いは該修飾が、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される (修飾されていない、或いは化学的に修飾されている) 核酸分子の免疫原性に干渉しない場合にのみ導入される。

【 0 0 8 2 】

これに代えて、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の 3' 末端は、特に RNA として提供される場合、少なくとも 50 個のアデノシンリボヌクレオチド、好ましくは少なくとも 70 個のアデノシンリボヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 100 個のアデノシンリボヌクレオチド、特に好ましくは少なくとも 200 個のアデノシン (アデニン) リボヌクレオチドの配列により修飾されてもよい (所謂「ポ

10

20

30

40

50

リ - A テール」)。具体的には、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a)、(I I I b)、(I I I I a) 及び (I I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、特に RNA が (m) RNA の形態である場合、典型的には約 10 個 ~ 200 個のアデノシンヌクレオチド、好ましくは約 10 個 ~ 100 個のアデノシンヌクレオチド、より好ましくは約 20 個 ~ 100 個のアデノシンヌクレオチド、或いは更により好ましくは約 40 個 ~ 80 個のアデノシンヌクレオチドのポリ - A テールを 3' 末端に備えていてもよい。

【 0083 】

更に、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の 3' 末端は、特に RNA として提供される場合、少なくとも 50 個のシチジンリボヌクレオチド、好ましくは少なくとも 70 個のシチジンリボヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 100 個のシチジンリボヌクレオチド、特に好ましくは少なくとも 200 個のシチジンリボヌクレオチドの配列により修飾されていてもよい (所謂「ポリ - C テール」)。具体的には、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、特に RNA が (m) RNA の形態である場合、典型的には約 10 個 ~ 200 個のシチジンヌクレオチド、好ましくは約 10 個 ~ 100 個のシチジンヌクレオチド、より好ましくは約 20 個 ~ 70 個のシチジンヌクレオチド、更により好ましくは約 20 個 ~ 60 個のシチジンヌクレオチド、或いは更には 10 個 ~ 40 個のシチジンヌクレオチドのポリ - C テールを 3' 末端に備えていてもよい。

【 0084 】

同様にこの場合においても、該修飾 (「ポリ - A テール」及び「ポリ - C テール」の少なくともいずれか) は、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の 3' 末端に既に導入されている修飾、例えば脂質修飾が存在しない場合、或いは該修飾が上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される (修飾されていない、或いは化学的に修飾されている) 核酸分子の免疫原性に干渉しない場合にのみ導入され得る。

【 0085 】

上述の修飾、即ち「5' キャップ」構造の挿入、或いは 3' 末端における「ポリ - A テール」及び「ポリ - C テール」の少なくともいずれかの挿入は、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子のインピボにおける早発性分解を妨げることにより、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子をインピボで安定化させる。

【 0086 】

具体的な実施形態によれば、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、脂質修飾を含んでいてもよい。本発明に係る脂質修飾核酸分子は、典型的には上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子と、本発明に係る核酸分子と共有結合している少なくとも 1 つのリンカーと、それぞれのリンカーと共有結合している少なくとも 1 つの脂質とを含む。或いは、本発明に係る脂質修飾核酸分子は、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される (少なくとも 1 個の) 核酸分子と、本発明に係る核酸分子と (リンカー無しで) 共有結合している少なくとも 1 個の (二官能性) 脂質とを含む。第 3 の代替方法によれば、本発明に係る脂質修飾核酸

10

20

30

40

50

分子は、上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子と、本発明に係る核酸分子と共有結合している少なくとも1個のリンカーと、それぞれのリンカーと共有結合している少なくとも1個の脂質と、本発明に係る核酸分子と(リンカー無しで)共有結合している少なくとも1個の(二官能性)脂質とを含む。

【0087】

本発明に係る脂質修飾核酸分子中に含まれている脂質は典型的には、それ自体生物学的活性を有する脂質及び脂溶性残基のいずれかであることが好ましい。該脂質としては好ましくは、例えばビタミン(例えばRRR- α -トコフェロール(かつてのD- α -トコフェロール)、L- α -トコフェロール、ラセミ体D,L- α -トコフェロール、ビタミンEコハク酸塩(VES)を含む α -トコフェロール(ビタミンE))、ビタミンA及びその誘導体(例えば、レチノイン酸、レチノール)、ビタミンD及びその誘導体(例えば、ビタミンD及びそのエルゴステロール前駆体)、ビタミンE及びその誘導体、ビタミンK及びその誘導体(例えば、ビタミンK及び関連するキノリン化合物或いはフィトール化合物)、或いは胆汁酸等のステロイド(例えばコール酸、デオキシコール酸、デヒドロコール酸、コルチゾン、ジゴキシゲニン、テストステロン、コレステロール、及びチオコレステロールのいずれか)等の天然物質及び天然化合物のいずれかが挙げられる。本発明の範囲内の更なる脂質及び脂溶性残基のいずれかとしては、如何なる限定を意味するものでもないが、ポリアルキレングリコール(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533)、例えばC₁~C₂₀アルカン化合物、C₁~C₂₀アルケン化合物、或いはC₁~C₂₀アルカノール化合物等の脂肪族基、例えばドデカンジオール、ヘキサデカノール、或いはウンデシル残基等(Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10, 111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinaarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49)、例えばホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール、スフィンゴ脂質、セレブロシド、ガングリオシド、及びトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート等のリン脂質(Manocharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777)、例えばポリエチレングリコール(PEG)等のポリアミン或いはポリアルキレングリコール(Manocharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969)、ヘキサエチレングリコール(HEG)、パルミチン或いはパルミチル残基(Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229)、オクタデシルアミン或いはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール残基(Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923)、ろう、テルペン、脂環式炭化水素、飽和脂肪酸残基、一価不飽和脂肪酸残基、及び多価不飽和脂肪酸残基のいずれかが等が挙げられる。

【0088】

脂質と、上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子との間の結合は、原則として以下の少なくともいずれかで生じ得る：

任意のヌクレオチド、

本発明の核酸分子の任意のヌクレオチドの塩基部分或いは糖部分、

3'末端及び5'末端の少なくともいずれか、並びに

上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子のリン酸骨格。

本発明によれば、本発明に係る核酸分子の3'末端及び5'末端の少なくともいずれかにおける末端脂質修飾が特に好ましい。末端修飾は配列内修飾に対して多数の利点を有する。一方配列内修飾はハイブリダイゼーション挙動に影響を与える場合があり、これは立体的に嵩高い(demanding)残基の場合には悪影響を有する恐れがある。他方末端のみ修飾されている本発明に係る脂質修飾核酸分子の合成調製の場合、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の合成は、大量に入手可能な市販モノマーを用いて実施することができ、先行技術で知られている合成プロトコルを用いることができる。

【0089】

第1の好ましい実施形態によれば、本発明に係る核酸分子と、用いられる少なくとも1個の脂質との間の結合は、(上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子と共有結合している)「リンカー」を介して生じる。本発明の範囲内のリンカーは典型的には、例えばヒドロキシ基、アミノ基、アルコキシ基等から選択される、少なくとも2個、任意的に3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、10個~20個、20個~30個、或いはそれ以上の反応基を有する。1個の反応基は、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される上記核酸分子、例えばRNAオリゴヌクレオチドを結合させるよう機能することが好ましい。この反応基は、保護されている形態で、例えばDMT基(塩化ジメトキシトリチル)として、Fmoc基として、MMT(モノメトキシトリチル)基として、TFA(トリフルオロ酢酸)基として存在し得る。更に硫黄基はジスルフィドにより保護されていてもよく(例えば、3-チオプロパノール等のアルキルチオール等)、活性化成分により保護されていてもよい(2-チオピリジン等)。1以上の更なる反応基は、本発明によれば1以上の脂質を共有結合させるために機能する。従って第1の実施形態によれば、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子は、共有結合しているリンカーを介して、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子1個当たり、好ましくは少なくとも1個の脂質、例えば1個、2個、3個、4個、5個、5個~10個、10個~20個、20個~30個、或いはそれ以上の脂質(1及び複数のいずれか)、特に好ましくは少なくとも3個~8個、或いはそれ以上の脂質(1及び複数のいずれか)に結合することができる。結合している脂質はそれによって、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の異なる位置で互いから離れて結合することができるか、或いは上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の1箇所以上において複合体の形態で存在することができる。リンカーの追加反応基を、担体物質、例えば固相への直接結合及び間接(切断可能な)結合に用いることができる。本発明に係る好ましいリンカーは、例えば、グリコール、グリセロール、グリセロール誘導体、2-アミノブチル-1,3-プロパンジオール、2-アミノブチル-1,3-プロパンジオール誘導体/骨格、ピロリジンリンカー或いはピロリジン含有有機分子(特に3'末端における修飾のため)等である。グリセロール及びグリセロール誘導体(C₃アンカー)、或いは2-アミノブチル-1,3-プロパンジオール誘導体/骨格(C₇アンカー)をリンカーとして本発明に従って用いることが特に好ましい。脂質修飾がエーテル結合を介して導入されるとき、アンカーとしてグリセロール誘導体(C₃アンカー)を用いることが特に好ましい。脂質修飾が例えばアミド結合及びウレタン結合のいずれかを介して導入される場合、例えば2-アミノブチル-1,3-プロパンジオール骨格(C₇アンカー)が好ましい。これに関連して、リンカーと、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(

10

20

30

40

50

II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される核酸分子との間に形成される結合の性質は、アミダイト化学物質の状態及び化学的性質に適合するものであることが好ましく、即ち酸に対して不安定ではなく塩基に対して不安定でもないことが好ましい。合成的に容易に得ることができ、核酸合成プロセスのアンモニア性切断により加水分解されない結合が特に好ましい。好適な結合は、原則として全ての相応に好適な結合であり、好ましくはエステル結合、アミド結合、ウレタン結合、及びエーテル結合である。出発物質（合成工程がわずか数段階である）を容易に入手可能であることに加えて、酵素的加水分解に対する生物学的安定性が比較的高いため、エーテル結合が特に好ましい。

【0090】

第2の好ましい実施形態によれば、上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される（少なくとも1個の）核酸分子は、少なくとも1個の上記（二官能性）脂質に直接結合する、即ち上記リンカーを使用しない。この場合本発明に従って使用される（二官能性）脂質は、好ましくは少なくとも2個の反応基、或いは任意的に3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或いはそれ以上の反応基を含み、第1の反応基は、本明細書に記載する担体物質に脂質を直接或いは間接的に結合させるよう機能し、少なくとも1個の更なる反応基は、上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される核酸分子と結合するよう機能する。第2の実施形態によれば、上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される核酸分子は、上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される核酸分子1個当たり、好ましくは少なくとも1個の脂質（リンカー無しで直接結合）、例えば1個、2個、3個、4個、5個、5個～10個、10個～20個、20個～30個、或いはそれ以上の脂質（1及び複数のいずれか）、特に好ましくは少なくとも3個～8個或いはそれ以上の脂質（1及び複数のいずれか）に結合することができる。結合している脂質は、上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される核酸分子の異なる位置で互いから離れて結合することができるか、或いは上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される核酸分子の1箇所以上において複合体の形態で存在することができる。或いは上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される核酸分子の少なくとも1個、例えば任意的に上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、10個～20個、20個～30個、或いはそれ以上は、第2の実施形態に従って前記核酸分子の反応基を介して上記のように脂質に結合することができる。この第2の実施形態で用いることができる脂質としては、特に好ましくはカップリングを可能にする（好ましくは末端で、或いは任意的に分子内で）（二官能性）脂質、例えばポリエチレングリコール(PEG)及びその誘導体、ヘキサエチレングリコール(HEG)及びその誘導体、アルカンジオール、アミノアルカン、チオアルカノール等が挙げられる。（二官能性）脂質と、上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表される核酸分子との間の結合の性質は、上記の通り、第1の好ましい実施形態に記載した性質であることが好ましい。

【0091】

第3の実施形態によれば、上で定義した本発明に係る式(I)、(I a)、(II)、(II a)、(II b)、(III a)及び(III b)の少なくともいずれかで表され

10

20

30

40

50

る核酸分子と、上記少なくとも1個の脂質との間の結合は、同時に上述の実施形態の両方を介して生じる場合がある。例えば上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子は、核酸分子のある位置ではリンカーを介して少なくとも1個の脂質に結合することができ(第1の実施形態に類似)、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の異なる位置ではリンカーを使用することなしに少なくとも1個の脂質に直接結合することができる(第2の実施形態に類似)。例えば、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端では、上記少なくとも1個の脂質はリンカーを介して核酸と共有結合することができ、本発明に係る核酸分子の5'末端では、上記脂質はリンカーを用いることなしに核酸と共有結合することができる。或いは、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の5'末端では、上記少なくとも1個の脂質はリンカーを介して核酸分子に共有結合することができ、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端では、上記脂質はリンカーを用いることなしに核酸と共有結合することができる。同様に共有結合は上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の末端だけでなく上記のように分子内で生じる場合もあり、例えば3'末端と分子内、5'末端と分子内、3'末端と5'末端と分子内、分子内のみ等で生じる場合がある。

【0092】

上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子は、種々のプロセスにより脂質修飾し得ることが好ましい。脂質修飾は、原則として、上で定義した通り、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の任意の位置に導入することができ、該位置は例えば以下の少なくともいずれかである：

上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端及び5'末端の少なくともいずれか、或いはリン酸骨格、並びに

上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の任意のヌクレオチドの任意の塩基及び糖のいずれか。

本発明によれば、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端及び5'末端の少なくともいずれかにおける末端脂質修飾が特に好ましい。かかる末端化学修飾を用いて、本発明に従って多数の様々な誘導体化された核酸を得ることが可能である。上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表されるかかる脂質修飾核酸分子を調製するプロセスは、脂質修飾の位置に応じて選択されること好ましい。

【0093】

例えば、脂質修飾が上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端で生じる場合、脂質修飾は、典型的には、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の調製前或いは調製後に実施される。上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の調製は、核酸の直接合成に

10

20

30

40

50

より、或いは任意的に予め合成されている核酸及び他の源から単離されたサンプル由来の核酸のいずれかを付加することにより実施することができる。

【0094】

第1の代替方法によれば、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子は、典型的には核酸合成に関する先行技術で知られているプロセスを用いて、脂質を導入する前に直接合成される。この目的のために出発ヌクレオチド(ヌクレオシド)は、例えばカップリング分子(例えばスクシニル残基)を介して固相に結合していることが好ましく、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子は、例えばアミダイト化学プロセスにより合成されることが好ましい。次いで上記リンカーは、リンカーの第1の反応基を介して上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端に結合することが好ましい。次いで上記脂質は、リンカーの第2の反応基を介してリンカーと共有結合することができる。或いはリンカーは、脂質と共有結合した後上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端に結合してもよい。この場合必要なのは、リンカーの第1の反応基と上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端との結合のみである。上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の合成後、或いは脂質の結合後、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子を固相から分離し、脱保護してもよい。合成が溶液中で実施される場合、本発明にかかる脂質修飾核酸分子の合成後(及び任意的に担体物質からの分離後)に、未反応の反応物質、溶媒及び不所望の二次生成物を除去するための洗浄工程及び精製工程を実施してもよい。

【0095】

更なる代替方法によれば、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される3'末端が脂質修飾されている核酸分子は、リンカーの反応基へ脂質を導入した後に合成されるか、或いは予め合成されている上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子のようにリンカーの反応基に結合している。この目的のために上記リンカーの第1の反応基は上記脂質と反応することができる。次いで好ましくは第2の工程では、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子が後に反応基に結合することを可能にするために、リンカーの第2の反応基は、酸安定性保護基、例えばDMT、Fmoc等を備える。次いでリンカーはリンカーの第3の反応基を介して固相に直接或いは間接的に結合することができる。例えばリンカー及び固相の両方に共有結合することができる(カップリング)分子を介した間接的結合も可能である。かかる(カップリング)分子は、例えば以下に記載するようなスクシニル残基等である。リンカーの第3の反応基における保護基の除去、及びその時接近可能である反応基における上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の結合或いは合成が通常行われる。最後に、本発明に係る脂質修飾核酸分子は、典型的には、担体物質から切断される(また核酸の保護基が任意的に除去される)。しかし任意的に、好ましくは以下に記載する工程の1つに従って、式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される本発明に係るカップリン

10

20

30

40

50

グしている核酸分子の3'末端に、更なる脂質を結合させることができる。

【0096】

この上記代替方法の変形によれば、上記リンカーは第1の反応基を介して固相に直接或いは間接的に結合することができる。次いで酸安定性保護基がリンカーの第2の反応基に結合する。保護基が第2の反応基に結合した後、上記脂質がリンカーの第3の反応基に結合することができる。同様に次いでリンカーの第3の反応基における保護基の除去と、その時接近可能である反応基における上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の結合或いは合成と、本発明に係る脂質修飾核酸分子の担体物質からの切断(及び任意的に核酸の保護基の除去)が実施されること好ましい。

10

【0097】

上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端脂質修飾の特に好ましい実施形態によれば、該本発明に係る脂質修飾核酸分子は、グリセロール基本物質に基づく3個の反応基を有し(三官能性化合物)(C₃アンカー)、一官能性脂質(例えばパルミチル残基、コレステロール、及びトコフェロールのいずれか等)を有するリンカーを介して合成することができる。リンカーの合成の出発物質として例えば、 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}$ - イソプロピリデン-グリセロール(ケタール保護基を含むグリセロール)を用いることができ、これは先ず水素化ナトリウムでアルコレートに変換され、Williams合成において臭化ヘキサデシル及び脂質と反応して、対応するエーテルを形成することが好ましい。或いは、例えば、 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}$ - イソプロピリデン-グリセロールのトシレートを形成し、前記トシレートと脂質の反応基(例えば酸性プロトン)を反応させて対応するエーテルを形成する等の様々な方法により、第1の工程でエーテル結合させることができる。第2の工程では、酸、例えば酢酸、希塩酸等でケタール保護基を除去し、次いで塩化ジメトキシトリチル(DMT-C1)によりジオールの一級ヒドロキシ基を選択的に保護することができる。最後の工程では、触媒としてDMA Pを用いて先行工程で得られた生成物と無水コハク酸とを反応させてコハク酸塩を形成することが好ましい。例えば脂質としてパルミチル残基及びトコフェロールのいずれかを結合させる場合、かかるリンカーが特に好適である。

20

【0098】

別の代替方法によれば、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の3'末端の脂質修飾は、上記リンカーを用いることなしに、例えばポリエチレングリコール(PEG)或いはヘキサエチレングリコール(HEG)等の(二官能性)脂質を用いて行われる。該二官能性脂質は典型的には上記2個の官能基を有し、該二官能性脂質の一方の末端は、本明細書に記載されているように例えば上記塩基不安定性スクシニルアンカー等の(カップリング)分子を介して担体物質に結合でき、二官能性脂質の他の末端において上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子が合成することが好ましい(E. Bayer, M. Maier, K. Bleicher, H. - J. Gaus, Z. Naturforsch. 50b (1995) 671)。上で用いた第3の官能化及びリンカーを省略することにより、本発明に係る脂質修飾核酸分子の合成は簡略化される。調製では、本発明に従って用いられる二官能性脂質(例えばポリエチレングリコール)を、典型的には保護基(例えばDMT)で先ず一置換する。第2の工程では、通常無水コハク酸及びDMA P触媒を用いて、反応基が保護されている脂質のエステル化を行い、コハク酸塩を形成する。次いで第3の工程では、二官能性脂質を担体物質にカップリングし、脱保護し、次いで第4の工程で以下に記載するプロセスに従って上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子を合成する。次いで、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、

30

40

50

(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される合成核酸分子の脱保護、及び脂質修飾核酸の担体物質からの切断を任意的に実施する。

【 0 0 9 9 】

別の好ましい実施形態によれば、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の脂質修飾は核酸分子の 5' 末端で行われる。従って脂質修飾は典型的には、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の提供後、或いは合成後に実施される。上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の提供は、上記の通り、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の直接合成を介して、或いは予め合成されている上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の付加により実施することができる。上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の合成は、上記方法と同様に先行技術で知られている核酸合成プロセスに従って行われることが好ましく、ホスホロアミダイトプロセスに従って行われることがより好ましい。

10

【 0 1 0 0 】

特に好ましい実施形態によれば、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の脂質修飾は、核酸を合成するためのホスホロアミダイトプロセスに従って特別に修飾されているホスホロアミダイトにより本発明に係る核酸分子の 5' 末端で行われる。該アミダイトは合成によってかなり簡単に得ることができるが、従来最後のモノマーとして市販の核酸及び予め合成されている核酸のいずれかにカップリングしている。これらの反応は、反応速度がかなり早く、カップリング率が非常に高いことにより識別される。修飾アミダイトの合成は、ホスホロアミダイト、例えば - シアノエチル - モノクロロホスホロアミダイト (亜リン酸モノ - (2 - シアノエチルエステル) - ジイソプロピル - アミドクロリド) と、好適な溶媒 (例えば純ジクロロメタン) に溶解している上で定義した脂質のアルコール、例えばトコフェロール、コレステロール、ヘキサデカノール、DMT - PEG 等の脂質アルコールとの反応により行われることが好ましい。同様に D I P E A を酸受容体として反応溶液に添加することが好ましい。

20

30

【 0 1 0 1 】

本発明に係る 5' 末端が脂質修飾されている核酸分子の合成で用いるこれらホスホロアミダイトは、加水分解に対して比較的耐性があり、(合成前に) シリカゲルを用いてクロマトグラフィーで精製してもよい。この目的のために、少量の弱塩基 (例えばトリエチルアミン等) を典型的には溶出剤に添加して、アミダイトの分解を防ぐ。カップリング率の低下を避けるために、この塩基を生成物から再度完全に除去することが重要である。塩基の除去は、例えば単に真空中で乾燥させることにより実施できるが、ペンタンを用いて *t e r t* - ブチルメチルエーテルから塩基を沈殿させることによってホスホロアミダイトを精製することが好ましい。用いられる脂質修飾アミダイトが非常に高い粘度を有する場合、例えば粘性油の形態で存在する場合、高速カラムクロマトグラフィーを実施してもよく、これにより塩基としてのトリエチルアミンを分配することが可能になる。しかし PEG 修飾アミダイトの場合、それが酸不安定性 D M T 保護基を含むため、かかる精製は典型的には実施されない。

40

【 0 1 0 2 】

脂質修飾ホスホロアミダイトの、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の 5' 末端へのカップリング反応では、用いられるアミダイトが十分溶

50

解できる溶媒を使用することが好ましい。例えば本発明に従って用いられるアミダイトの脂溶性が高いため、該アミダイトのアセトニトリルに対する溶解度が限定される場合がある。典型的に用いられる溶媒としてのアセトニトリルは別として、塩素化炭化水素溶液、例えば0.1Mの(純)ジクロロメタン溶液をカップリング反応で用いることが好ましい。しかしジクロロメタンを使用するには、合成サイクルの標準的なプロトコルを一部変更する必要がある。例えば自動合成装置のパイプ内及び担体物質上にアミダイトが沈着するのを避けるために、実際のカップリング工程及び送風乾燥の前後にアミダイトが接触する全てのバルブ及びパイプを(純)ジクロロメタンで洗い流す。

【0103】

脂質修飾アミダイトを用いる場合、典型的には、先行技術で従来用いられているアミダイトのカップリング率に相当する高いカップリング率が得られる。脂質修飾アミダイトの反応速度は、一般により緩徐に進行する。この理由のために、脂質修飾アミダイトを用いるとき、標準的なプロトコルに比べてカップリング時間を(著しく)延長することが好ましい。当業者は該カップリング時間を容易に決定することができる。カップリング後のキャッピング工程は省略することができるため、同様に必要に応じて同一の脂質修飾アミダイトを用いて更なる合成サイクルを実施し、反応全体の収率を増加させることが可能である。この場合、例えばDMT-PEG等のDMT修飾脂質の場合、脱トリチル化工程が通常実施される。

【0104】

本発明に係る5'末端が脂質修飾されている核酸分子の合成では、亜リン酸トリエステル(これを介して脂質が上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子に結合している)を浸硫剤により酸化してもよい。この目的のためにできる限り完全にホスホトリエステルを酸化させる浸硫剤を用いることが好ましい。さもなければ、例えば立体上の理由により、アンモニア性切断及びMONの脱保護後、浸硫反応の進行が不十分であり少量の生成物しか得られない恐れがある、或いは全く生成物が得られない恐れもある。この現象は修飾の種類、用いられる浸硫剤、及び浸硫条件に依存する。それ故ヨウ素を用いて酸化を行うことが好ましい。結果として、ホスホジエステル結合が導入されるが、脂質残基が近接しているため該結合はヌクレアーゼにより基質として認識されないと予想される。

【0105】

脂質修飾では、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子に含まれているリンカー及び(二官能性)脂質のいずれか、或いは任意的に上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子自体を、以下に記載するように担体物質に直接或いは間接的にカップリングさせてもよい。直接カップリングは担体物質と直接カップリングされることが好ましいが、担体物質への間接的カップリングは、典型的には更なる(カップリング)分子を介して実施される。担体物質へのカップリングにより形成される結合は、リンカー或いは二官能性脂質との(切断可能な)共有結合、及び固相との(切断可能な)共有結合の少なくともいずれかである。(カップリング)分子として好適な化合物は、例えばジカルボン酸、例えばスクシニル残基(=スクシニルアンカー)、オキサリル残基(=オキサリルアンカー)等である。例えばアミノアルキル残基(例えば、アミノプロピル残基及びアミノヘキサニル残基のいずれか)と同様に遊離アミノ官能基を有する、リンカー、(二官能性)脂質、或いは任意的に上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子は、フタルイミドリンカーを介して担体物質に結合することができる。チオールを含有しているリンカー、(二官能性)脂質、或いは任意的に上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子は、担体

10

20

30

40

50

物質にジスルフィド結合することができる。本発明に関連して、好適な担体物質は具体的にはCPG、Tentagel（登録商標）、アミノ官能化PS-PEG（Tentagel（登録商標）S-NH₂）等の固相であり、Tentagel（登録商標）或いはアミノ官能化PS-PEG（Tentagel（登録商標）S-NH₂）が好ましい。具体的な実施形態によれば、担体物質へのカップリングでは、例えば記載されているリンカーのコハク酸塩、或いは本発明に従って用いられる二官能性脂質をカップリングさせることが可能であり、カップリング試薬としてTBTU/NMM（1H-ベンゾトリアゾール-1-イル-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート/N-メチルホルホリン）を用いて、アミノ官能化PS-PEG（Tentagel（登録商標）S-NH₂）にカップリングさせることが好ましい。従来用いられている1マイクロモル単位の大きさのPS-PEG担体物質の場合、典型的には50 μmol/g ~ 100 μmol/gをロードすることにより最良の結果が得られる（E. Bayer, K. Bleicher, M. Maier Z. Naturforsch. 50b (1995) 1096）。しかし、本発明に従ってヌクレオチドを大量に合成すべき場合、担体物質のロード量はできる限り多いことが好ましい（100 μmol以上）。本発明によれば、該プロセスからも同様に良好なカップリング率が得られる（M. Gerster, M. Maier, N. Clausen, J. Schewitz, E. Bayer Z. Naturforsch. 52b (1997) 110）。例えば最高138 μmol/g、或いは任意的にそれ以上をロードした樹脂等の担体物質を用いて良好な合成収率を得ることができる。上記リンカー或いは二官能性脂質のカップリング率は約100%であるため、担体物質のロード量はこれら化合物の化学量論を用いて比較的正確に調整できる。切断されたDMT保護基の分光学的定量によりロード量をモニタすることが好ましい（実験の部分を参照）。担体物質上に尚も存在する残りのアミノ官能基を、無水酢酸でキャッピングしてもよい。キャッピングは、通常担体物質の負荷後に実施されるが、核酸合成中に、例えばDNA合成装置内で直接実施してもよい。誘導体化PS-PEG担体物質上における脂質修飾核酸の合成では、物質の特徴的な性質を考慮に入れた、Tentagel（登録商標）に対して特別に開発された合成サイクルを用いることが好ましい（E. Bayer, M. Maier, K. Bleicher, H.-J. Gaus Z. Naturforsch. 50b (1995) 671, E. Bayer, K. Bleicher, M. Maier Z. Naturforsch. 50b (1995) 1096.）。標準的なプロトコルと比べて好ましい変化としては、

- ・カップリング工程、キャッピング工程、及び酸化工程における反応時間の延長、
- ・脱トリチル化工程数の増加、
- ・各工程後の洗浄工程の延長、
- ・通常アミダイトプロセス中に（亜リン酸トリエステルを酸化するために）必要な酸化工程後における、微量ヨウ素を除去するためのアスコルビン酸含有洗浄溶液（ジオキサン/水 = 9 : 1 中 0.1 M）の使用、

が挙げられる。

【0106】

修飾の性質は、合成サイクルの個々の工程に影響を与える場合があることに留意すべきである。例えば、PEG₁₅₀₀-誘導体化担体物質の場合、観察される反応速度がかなり緩徐であるため、脱トリチル化工程を更に延長し、加えてカップリング時間を延長する必要がある。かかる変化及び適応は当業者の標準的な能力の範囲内であり、本開示の状況において如何なるときでも実施することができる。このように修正されている反応サイクルを用いて、脂質修飾ホスホロジエステル及びホスホロチオエートの両方を合成することができる。アミダイトと本発明に従って用いられるリンカー或いは二官能性脂質とのカップリング率は、脂質残基により低下せず、従来値（97% ~ 99%）に相当する。かかる3'末端の修飾が用いられるときも、5'誘導体化、並びに例えば塩基、糖、及びリン酸骨格のいずれかに更なる修飾が導入される可能性は保持される。

【0107】

上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される化学的に修飾されていない核酸、或いは (化学的に) 修飾されている核酸、例えば脂質修飾核酸分子としての、上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、例えばこれらに限定されるものではないが、カチオン性ポリマー (好ましくは、ポリリジン及びポリアルギニンのいずれか等のポリカチオン性ポリマー)、カチオンペプチド、カチオン性ポリペプチド、カチオン性脂質、カチオン性リポフェクタント (lipofectant)、ヒストン、ヌクレオリン、プロタミン、オリゴフェクタミン、スペラミン、スペルミジン、カチオン性多糖類 (具体的にはキトサン)、TDM、MDP、ムラミルジペプチド、ブルロニクス、及びこれらの誘導体のうち1種の少なくともいずれか等と、上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子の複合体を形成することにより同様に安定化させることができる。ヒストン及びプロタミンは自然界でDNAを小型化する (compact) カチオン性タンパク質である。従って該タンパク質は、転写されていないDNA及び特定のウイルスのDNAのインピボにおける縮合に必要である。本発明の状況で用いて上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子と複合体を形成することができるヒストンとして、より具体的にはヒストンH1、H2a、H3、及びH4を挙げることができる。しかしプロタミン (プロタミンP1及びP2のいずれか)、或いはプロタミンのカチオン性部分配列が特に好ましい。本発明の状況では、該化合物はプロタミンP1及びP2のいずれかに由来するペプチド配列により有利に表すことができ、より正確には (カチオン性) 配列 (SRSRYRQRQRSRRRRRR (配列番号109) 及びRRRLHRIRRRQRHRSRKRKRR (配列番号110) のいずれかに対応する。上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子と複合体を形成するのに好適な他の化合物は、これらに限定されるものではないが、本明細書で定義するアジュバント化合物から選択することができる。

【0108】

この状況では、「複合体を形成する」とは、例えば核酸分子と安定化化合物との間に非共有結合性複合体を形成することにより、上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子が、上で定義した化合物、例えばカチオン性ポリマー、カチオン性ペプチド、及びポリペプチドのいずれか等の安定化化合物に結合することを意味する。本明細書において「非共有結合性」は、核酸分子と安定化化合物との可逆的会合がこれら分子の非共有結合性相互作用により形成されることを意味し、該分子は共有結合以外の電子の数種の相互作用により、例えばファンデルワールス力 (即ち両方の分子の非特異的引力から生じる弱い静電気引力) により会合される。上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子と安定化化合物との会合は、前記複合体の解離と平衡状態にある。如何なる理論に縛られるものでもないが、この平衡は、細胞内では上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子と安定化化合物が解離した状態にシフトしていると予想される。

【0109】

実施形態によれば、上で定義した本発明に係る式 (I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa) 及び (IIIb) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、如何なる他の薬学的活性成分もなしに投与される場合、免疫賦活剤であってもよく、或いは薬学的活性成分と共に投与される場合、アジュバントとして用いてもよく、例えば薬学的活性成分とアジュバント成分との両方を含有する組成物 (例えば、特異的抗原

10

20

30

40

50

と、アジュバントとしての上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子とを含有するワクチン組成物)として用いられる。

【 0 1 1 0 】

「免疫賦活剤」としての上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子は、非抗原特異的免疫反応(自然免疫系により提供される)を、好ましくは免疫賦活的方法で誘発することができることが好ましい。免疫反応は、一般に種々の方法でもたらされ得る。好適な免疫反応にとって重要な要因は、様々なT細胞亜集団を賦活することである。Tリンパ球は、典型的には2種の亜集団、T-ヘルパー1 (T h 1) 細胞及びT-ヘルパー2 (T h 2) 細胞に分化し、免疫系は該細胞を用いて細胞内 (T h 1) 病原体及び細胞外 (T h 2) 病原体(例えば、抗原)を破壊することができる。2種のT h 細胞集団は、該集団が産生するエフェクタタンパク質(サイトカイン)のパターンが異なる。従ってT h 1 細胞は、マクロファージ及び細胞傷害性T細胞の活性化により細胞性免疫反応を補助する。他方、T h 2 細胞は、B細胞の形質細胞への変換を刺激し抗体(抗原に対する)を形成することにより体液性免疫反応を促進する。それ故T h 1 / T h 2 比は、免疫反応において非常に重要である。本発明に関連して、免疫反応のT h 1 / T h 2 比は、好ましくは免疫賦活剤、即ち上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子により、細胞性反応、即ちT h 1 反応の方向に変位し、主に細胞性免疫反応は該反応によって誘導される。上で定義した通り本発明の核酸分子は単独で非特異的免疫反応を発揮し、これによって核酸分子を(別の薬学的活性成分を添加することなしに)免疫賦活剤として用いることが可能になる。別の薬学的活性成分、好ましくは特異的免疫賦活成分と共に投与される場合、本発明の核酸分子は、他の薬学的活性成分により誘発される特異的免疫反応を支持するアジュバントとして機能する。

【 0 1 1 1 】

本発明はまた、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される少なくとも1種の本発明の核酸分子と、任意的に(適合性)薬学的に許容される担体、更なる補助物質、添加剤及びアジュバントの少なくともいずれかと、を含有する医薬組成物(本発明の組成物の第1の実施形態)に関する。更に本発明は、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される少なくとも1種の核酸分子、例えば1種、2種、3種、4種、6種、7種、或いはそれ以上の核酸分子と、薬学的活性成分と、任意的に薬学的に許容される担体、更なる補助物質、添加剤及びアジュバントの少なくともいずれかと、を含有する医薬組成物(本発明の組成物の第2の実施形態)に関する。

【 0 1 1 2 】

本発明に係る医薬組成物は、典型的には上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される少なくとも1種の核酸分子、或いはその1種、2種、3種、4種、6種、7種、或いはそれ以上の核酸分子を安全且つ有効量含む。本明細書で使用するとき、「安全且つ有効量」は、症状の正方向の変化(p o s i t i v e m o d i f i c a t i o n) を著しく誘導して、例えば腫瘍、自己免疫疾患、アレルギー、或いは感染性疾患等を治療するのに十分である、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の組成物中における各々の量或いは全ての量を意味する。しかし同時に「安全且つ有効量」は、重篤な副作用を避ける、即ち利益とリスクとの合理的関係を可能にするのに十分少ない量である。これらの限界の決定は、典型的には合理的な医学的判断の範囲内である。上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子に関して、

「安全且つ有効量」という表現は、過剰な免疫反応を誘導しない、或いは免疫反応を損なうことがないが、好ましくは該免疫反応が測定可能な濃度を下回らない方法で免疫反応を賦活するのに好適である量を意味することが好ましい。上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の「安全且つ有効量」は、治療される具体的な症状に関連して、また治療される患者の年齢、健康状態、症状の重篤度、治療期間、同時に行われる治療の性質、用いられる具体的な薬学的に許容される担体の性質、及び類似の要因に関連して変化し、これは主治医の知識及び経験の範囲内で行われる。本発明に係る医薬組成物は、本発明に従ってヒトの医療目的のために、また獣医学的目的のために用いることができる。

10

【 0 1 1 3 】

第 1 の実施形態によれば、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される上記核酸分子は、単独で免疫賦活剤であってもよい (如何なる他の薬学的活性成分の添加もなしに)。これは具体的には、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子が脂質修飾を含む場合に当てはまる (h o l d)。脂質は、本発明の核酸分子の免疫賦活性を更に増強することができるか、或いは治療活性分子、例えば上記ビタミン或いはステロイド、例えば α -トコフェロール (ビタミン E)、D - α -トコフェロール、L - α -トコフェロール、D , L - α -トコフェロール、ビタミン E コハク酸塩 (V E S)、ビタミン A 及びその誘導體、ビタミン D 及びその誘導體、ビタミン K 及びその誘導體等を良く形成することができる。

20

【 0 1 1 4 】

本発明の第 2 の実施形態に係る医薬組成物は、(上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される少なくとも 1 種の核酸分子に加えて) 少なくとも 1 種の追加的な薬学的活性成分を含有していてもよい。これに関連して、薬学的活性成分は、特定の適応症、好ましくは癌疾患、自己免疫疾患、アレルギー、或いは感染性疾患に対する治療効果を有する化合物である。該化合物としては、如何なる限定を意味するものでもないが、ペプチド、タンパク質、核酸、(治療活性) 低分子量有機化合物 (分子量 5 , 0 0 0 未満、好ましくは 1 , 0 0 0 未満)、(治療活性) 低分子量無機化合物 (分子量 5 , 0 0 0 未満、好ましくは 1 , 0 0 0 未満)、糖、抗原、抗体、先行技術で既に知られている治療剤、抗原性細胞、抗原性細胞断片、細胞画分、修飾病原体 (ウイルス、細菌等)、弱毒化病原体 (ウイルス、細菌等)、及び不活化 (例えば化学的に或いは放射線により) 病原体 (ウイルス、細菌等) 等が挙げられる。

30

【 0 1 1 5 】

(本発明に係る組成物の) 第 2 の実施形態の第 1 の代替方法によれば、医薬組成物に含まれている薬学的活性成分は免疫調節成分であり、好ましくは免疫賦活成分である。最も好ましくは薬学的活性成分は抗原及び免疫原のいずれかである。「抗原」及び「免疫原」は、抗体の形成及び細胞性免疫反応の少なくともいずれか、即ち特異的 (アジュバントではない) 免疫反応の活性化を生じさせ得る任意の構造であると理解される。従って本発明によれば用語「抗原」及び「免疫原」は同義的に用いられる。抗原の例は、ペプチド、ポリペプチド即ちタンパク質、細胞、細胞抽出物、多糖類、複合多糖類、脂質、糖脂質、及び炭水化物である。例えば腫瘍抗原、動物抗原、植物抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原生動物抗原、自己免疫抗原、或いはアレルギーも抗原として考慮される。腫瘍細胞の表面抗原、及びウイルス、細菌、真菌、或いは原生動物の病原体の表面抗原 (特に分泌型) が好ましい。無論抗原は、例えば本発明に係るワクチン中に存在していてもよく、また好適な担体にカップリングしているハプテンとして存在していてもよい。他の抗原性成分、例えば (上記) 不活化病原体或いは弱毒化病原体を同様に用いてもよい。

40

【 0 1 1 6 】

50

抗原性(ポリ)ペプチドとしては、腫瘍抗原等の全ての既知の抗原性ペプチドが挙げられる。腫瘍抗原の具体例は、特に腫瘍特異的の表面抗原(TSSA)、例えば5T4、707-AP、9D7、AFP、AlbZIP HPG1、-5--1-インテグリン、-5--6-インテグリン、-アクチニン-4/m、-メチルアシル-補酵素Aラセマーゼ、ART-4、ARTC1/m、B7H4、BAGE-1、BCL-2、bcr/abl、-カテニン/m、BING-4、BRCA1/m、BRCA2/m、CA15-3/CA27-29、CA19-9、CA72-4、CA125、カルレチキュリン、CAMEL、CASP-8/m、カテプシンB、カテプシンL、CD19、CD20、CD22、CD25、CDE30、CD33、CD4、CD52、CD55、CD56、CD80、CDC27/m、CDK4/m、CDKN2A/m、CEA、CLCA2、CML28、CML66、COA-1/m、コアクトシン(coactosin)様タンパク質、コラーゲン(collagen)XXIII、COX-2、CT-9/BRD6、Cten、サイクリンB1、サイクリンD1、cyp-B、CYPB1、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EFTUD2/m、EGFR、ELF2/m、EMMPRIN、EpCam、EphA2、EphA3、ErbB3、ETV6-AML1、EZH2、FGF-5、FN、Frau-1、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE7b、GAGE-8、GDEP、GnT-V、gp100、GPC3、GPNMB/m、HAGE、HAST-2、ヘプシン、Her2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A*0201-R17I、HLA-A11/m、HLA-A2/m、HNE、ホメオボックスNKX3.1、HOM-TES-14/SCP-1、HOM-TES-85、HPV-E6、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT、iCE、IGF-1R、IL-13Ra2、IL-2R、IL-5、未成熟ラミニン受容体、カリクレイン-2、カリクレイン-4、Ki67、KIAA0205、KIAA0205/m、KK-LC-1、K-Ras/m、LAGE-A1、LDLR-FUT、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-B10、MAGE-B16、MAGE-B17、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-D1、MAGE-D2、MAGE-D4、MAGE-E1、MAGE-E2、MAGE-F1、MAGE-H1、MAGEL2、マンマグロビンA、MART-1/melan-A、MART-2、MART-2/m、マトリックスタンパク質22、MC1R、M-CSF、ME1/m、メソテリン、MG50/PXDN、MMP11、MN/CAIX-抗原、MRP-3、MUC-1、MUC-2、MUM-1/m、MUM-2/m、MUM-3/m、ミオシンクラスI/m、NA88-A、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V、Neo-PAP、Neo-PAP/m、NFYC/m、NGEP、NMP22、NPM/ALK、N-Ras/m、NSE、NY-ESO-1、NY-ESO-B、OA1、OFA-iLRP、OGT、OGT/m、OS-9、OS-9/m、オステオカルシン、オステオポンチン、p15、p190 minor bcr-abl、p53、p53/m、PAGE-4、PAI-1、PAI-2、PART-1、PATE、PDEF、Pim-1-キナーゼ、Pin-1、Pml/PAR、POTE、PRAME、PRDX5/m、タンパク質、プロテアーゼ-3、PSA、PSCA、PSGR、PSM、PSMA、PTPRK/m、RAGE-1、RBAF600/m、RHAMM/CD168、RU1、RU2、S-100、SAGE、SART-1、SART-2、SART-3、SCC、SIRT2/m、Sp17、SSX-1、SSX-2/HOM-MEL-40、SSX-4、STAMP-1、STEAP、サバイピン、サバイピン-2B、SYT-SSX-1、SYT-SSX-2、TA-90、TAG-72、TARP、TEL-AML1、TGF、TGFRII、TGM-4、TPI/m、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2/6b、TRP/INT2、TRP-p8、チロシナーゼ、UPA、VEGF、VEGFR-2/FLK-1、及びWT1である。例えば血管新生に関与し、細胞

10

20

30

40

50

外マトリックス構造に影響を及ぼすことが知られている腫瘍抗原等の任意のクラスの腫瘍抗原が、本発明の目的に好適である。腫瘍抗原は、タンパク質及びペプチド抗原のいずれかとして、或いは腫瘍抗原及びそのエピトープのいずれか（好ましくは上記腫瘍抗原）をコードしている mRNA 及び DNA のいずれかとして、医薬組成物に提供されてもよい。

【0117】

（（アジュバントとしての）本発明の核酸分子及び追加的な薬学的活性成分を含有している本発明に係る組成物の）第2の実施形態の第2の代替方法によれば、薬学的活性成分は抗体である。これに関連して、如何なる治療に好適な抗体を用いてもよい。本発明に従って、癌疾患或いは感染性疾患において重要な役割を果たす抗原、タンパク質及び核酸のいずれかに対する抗体、例えば細胞表面タンパク質、腫瘍抑制遺伝子、腫瘍抑制遺伝子阻害剤、成長因子、伸長因子、アポトーシス関連タンパク質、腫瘍抗原、或いは上述の抗原等に対する抗体が特に好ましい。

10

【0118】

第2の実施形態の第3の代替方法によれば、本発明に係る医薬組成物中に含有されている薬学的活性成分は核酸分子である。該核酸分子は単鎖であっても二本鎖であってもよく、ホモ二本鎖であってもヘテロ二本鎖であってもよく、線状であっても環状であってもよい。医薬組成物中に薬学的活性成分として含有されている核酸分子の長さは限定されず、天然に存在する核酸配列のいずれか、その補体、或いはその断片を含んでいてもよい。同様に、これに関連して用いられる核酸分子は、部分的に或いは全体的に合成されていてもよい。例えば該核酸分子は、（治療に関連するタンパク質をコードしている核酸分子、及び免疫反応を生じさせることができる核酸分子の少なくともいずれか、例えば抗原、或いは抗原をコードしている核酸分子を含んでいてもよい。本明細書において抗原は、上述の抗原であることが好ましい。

20

【0119】

本発明に係る医薬組成物中に薬学的活性成分として含有されている核酸分子は、mRNA であることが好ましい。該 mRNA は、本発明に係る医薬組成物にネイキッド（naked）形態で添加されてもよく、例えばエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼの少なくともいずれかによるインビボにおける核酸分子の分解を低減或いは防止する安定化形態で添加されてもよい。

【0120】

例えば、本発明に係る医薬組成物中に薬学的活性成分として含有されている mRNA は、上で定義した5'キャップにより安定化されてもよく、これに代えて或いはこれに加えて少なくとも50ヌクレオチド、好ましくは少なくとも70ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも100ヌクレオチド、特に好ましくは少なくとも200ヌクレオチドの長さの3'末端におけるポリ-Aテール及びポリ-Cテールの少なくともいずれかにより安定化されてもよい。既に言及したように末端構造はインビボにおいて極めて重要である。RNA はこれら末端構造を介して mRNA として認識され、分解が制御されている。しかしこれに加えて、RNA を安定化させる或いは不安定化させる更なるプロセスが存在する。これらのプロセスの多くは未だに知られていないが、RNA とタンパク質との間の相互作用が該プロセスにとって決定的な役割を果たしていると思われることが多い。例えば「mRNA サーベイランス系」について最近報告されており（Hellerin and Parker, Ann. Rev. Genet., 1999, 33: 229~260）、該文献によると不完全 mRNA 或いはノンセンス（non-sense）mRNA は、サイトゾルにおける特定のフィードバックタンパク質相互作用により認識され、分解を受けやすくなるが、これらのプロセスの大部分はエキソヌクレアーゼにより行われている。

30

40

【0121】

本発明に係る医薬組成物中に薬学的活性成分として含有されている mRNA の安定化は、同様にカチオン性化合物（具体的にはポリカチオン化合物、例えばポリ（カチオン性）ペプチド或いはポリ（カチオン性）タンパク質）と mRNA との会合、複合体化、及び結合のいずれかにより実施することができる。具体的には、ポリカチオン性（核酸結合）タ

50

ンパク質としてプロタミン、ヌクレオリン、スペルミン、及びスペルミジンのいずれかを使用することが特に有効である。更に、ポリ-L-リジン及びヒストンのいずれか等の他のカチオン性ペプチド或いはカチオン性タンパク質の使用も同様に可能である。mRNAを安定化させるこの手順は、欧州特許出願公開第1083232号明細書に記載されており、該明細書の開示はその全文を参照することにより本明細書に援用する。薬学的活性成分として存在するmRNAを安定化させるために用いることができる更に好ましいカチオン性物質としては、アジュバントに関連して本明細書に開示されるカチオン性化合物が挙げられ、該化合物は本発明の核酸分子のデポー及び送達に好適であり、例えばカチオン性多糖類（例えばキトサン、ポリブレン、ポリエチレンイミン（PEI）、及びポリ-L-リジン（PLL）のいずれか等）等である。アジュバント形態の式（I）、（Ia）、（II）、（IIa）、（IIb）、（IIIa）及び（IIIb）の少なくともいずれかで表される脂質修飾核酸分子の細胞透過性の改善における作用とは別に（この作用は既に有利であることが示されている）、mRNAとカチオン性化合物（例えば脂質系複合体化剤としてのオリゴフェクタミン等のカチオン性タンパク質或いはカチオン性脂質）との会合或いは複合体化は、薬学的活性成分として存在しているmRNAの治療される細胞への移動、或いは治療される生物への移動を増加させることが好ましい。複合体化による本発明の核酸分子に対する安定化効果（同様にmRNAの安定化にも該当する）に関しても本明細書の開示で言及する。

10

【0122】

本発明に係る医薬組成物中の薬学的活性成分としてのmRNAを安定化させるための別のアプローチは、所謂不安定化配列エレメント（DSE）の除去する或いは変化させることによりmRNAの配列をターゲティングして変化させることである。シグナルタンパク質は、特に真核生物のmRNAに存在するこれら不安定化配列エレメント（DSE）に結合し、インピボにおけるmRNAの酵素的分解を制御することができる。それ故、更に薬学的活性成分として存在しているmRNAを安定化させるために、野生型mRNAの対応する領域と比べて1以上の変化をもたらし、その結果不安定化配列エレメントをなくすことが好ましい。無論本発明に従ってmRNAから非翻訳領域（3'-UTR及び5'-UTRの少なくともいずれか）に任意的に存在するDSEを排除することも同様に好ましい。上記DSEの例はAUリッチ配列（「AURES」）であり、該配列は多数の不安定mRNAの3'-UTRセクションに存在する（Caput et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670~1674）。それ故、薬学的活性成分として用いられているmRNAは、如何なる該不安定化配列をも含有しないように野生型mRNAと比べて修飾されることが好ましい。これはまた存在する可能性のあるエンドヌクレアーゼにより認識される配列モチーフ、例えば配列GAACAAG（トランスフェリン受容体をコードしている遺伝子の3'-UTRセグメント中に含まれている）にも当てはまる（Binder et al., EMBO J. 1994, 13: 1969~1980）。該配列モチーフもまた、本発明に係る脂質修飾核酸分子から排除されることが好ましい。

20

30

【0123】

本発明に係る医薬組成物中における薬学的活性成分としてのmRNAは、例えばリボソーム結合部位（Kozak配列：GCCGCCACCAUGG（配列番号111）、AUGは開始コドンを形成する）にリボソームを有効に結合させる方法で、（望ましい場合のある）効率的に翻訳させるために更に修飾されてもよい。これに関連して、該位置の周辺でA/U含量を増加させることによりリボソームのmRNAへの効率的結合が可能になることが既に示されている。

40

【0124】

更に、1以上の所謂IRES（内部リボソーム侵入部位（1及び複数のいずれか））（配列）を薬学的活性成分として用いられているmRNAに導入することも可能である。従って、IRESはリボソーム結合部位として機能することができるだけでなく、リボソームによって互いに独立して翻訳される複数のペプチド或いはポリペプチドをコードしてい

50

る mRNA (「マルチシストロン mRNA」) を提供するよう機能することもできる。本発明に従って用いることができる IRES 配列の例は、ピコルナウイルス (例えば FMDV)、ペストウイルス (CFPV)、ポリオウイルス (PV)、脳心筋炎ウイルス (ECMV)、口蹄疫ウイルス (FMDV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、通常 (conventional) ブタコレラウイルス (CSFV)、マウス白斑病ウイルス (MLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、或いはコオロギ麻痺ウイルス (CrPV) に由来するものである。

【0125】

本発明に係る医薬組成物中に薬学的活性成分として任意的に用いられている mRNA は、サイトゾルにおける mRNA の半減期を延長することができる 5' 非翻訳領域安定化配列及び 3' 非翻訳領域安定化配列を同様に含んでいてもよい。これら安定化配列は、ウイルス、細菌、及び真核生物中に存在する生体が本来有する配列と 100% の配列相同性を示してもよいが、部分的に或いは全体的に合成配列であってもよい。本発明で用いることができる安定化配列の例として、例えばヒト或いはアフリカツメガエルの - グロビン遺伝子の非翻訳領域 (UTR) に言及してもよい。安定化配列の別の例は、一般式 (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC (配列番号 112) を有する配列であり、該配列は - グロビン、- (I) - コラーゲン、15 - リボキシゲナーゼ、及びチロシンヒドロキシラーゼをコードしている非常に安定な mRNA の 3' - UTR に含まれている (Holcik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 ~ 2414 を参照)。無論該安定化配列は、個別に、互いに組み合わせて、或いは当業者に既知である他の安定化配列と組み合わせて用いることができる。

【0126】

最終的に所望の翻訳産物を更に増加させるために、薬学的活性成分として用いられている mRNA は、対応する野生型 mRNA と比べて以下の変更を行うことができ、該修正は代替方法として存在してもよく、互いに組み合わせてもよい。他方、あるペプチド及びポリペプチドのいずれかをコードしている変更されている mRNA の領域の G/C 含量は、前記ペプチド及びポリペプチドのいずれかをコードしている野生型 mRNA のコード領域の G/C 含量より多い場合があるが、コードされているアミノ酸配列は野生型と比べて変化していない。この変更は、mRNA の効率的翻訳にとって該 mRNA の安定性が重要であるという事実に基づいている。各種ヌクレオチドの組成及び配列は mRNA の安定性について大きな比重を占めている。具体的には、G (グアノシン (グアニン)) / C (シチジン (シトシン)) 含量の多い配列は、A (アデノシン (アデニン)) / U (ウリジン (ウラシル)) 含量の多い配列より安定である。従って本発明によれば、翻訳されたアミノ酸配列を保持しながら、より多くの G/C ヌクレオチドを含有するように野生型 mRNA と比べてコドンを変更する。幾つかのコドンが同種のアミノ酸をコードしているため (遺伝子コードの縮重)、安定性に有利なコドンを選択することができる (代替コドンの使用)。mRNA によりコードされているアミノ酸には依存せず、野生型 mRNA と比べた mRNA 配列の変更については様々な可能性が考えられる。G 及び C ヌクレオチドのいずれかのみを含有しているコドンによりコードされているアミノ酸の場合、コドンの変更は必要ない。従ってプロリン (CCC 及び CCG のいずれか)、アルギニン (CGC 及び CGG のいずれか)、アラニン (GCC 及び GCG のいずれか)、及びグリシン (GGC 及び GGG) のコドンは、A 及び U のいずれも存在しないため如何なる変化も必要としない。以下の場合では、A 及び U ヌクレオチドの少なくともいずれかを含有しているコドンを、同種のアミノ酸をコードしているが A 及び U ヌクレオチドの少なくともいずれかを含有していない異なるコドンに置換することにより変更している。例は、Pro のコドンを CCU 或いは CCA から CCC 或いは CCG に変更してもよく、Arg のコドンを CGU、CGA、AGA 或いは AGG から CGC 或いは CGG に変更してもよく、Ala のコドンを GCU 或いは GCA から GCC 或いは GCG に変更してもよく、Gly のコドンを GGU 或いは GGA から GGC 或いは GGG に変更してもよい。他の場合には、A 及び U ヌクレ

10

20

30

40

50

オチドをコドンから除去することはできないが、含有されているA及びUヌクレオチドの少なくともいずれかの数がより少ないコドンを使用することにより、A及びU含量を低減することが可能である。例えば、PheのコドンをUUUからUUCに変更してもよく、LeuのコドンをUUA、CUU或いはCUAからCUC或いはCUGに変更してもよく、SerのコドンをUCU、UCA或いはAGUからUCC、UCG或いはAGCに変更してもよく、TyrのコドンをUAUからUACに変更してもよく、終止コドンUAAをUAG或いはUGAに変更してもよく、CysのコドンをUGUからUGCに変更してもよく、HisのコドンをCAUからCACに変更してもよく、GlnのコドンをCAAからCAGに変更してもよく、IleのコドンをAUU或いはAUAからAUCに変更してもよく、ThrのコドンをACU或いはACAからACC或いはACGに変更してもよく、AsnのコドンをAAUからAACに変更してもよく、LysのコドンをAAAからAAGに変更してもよく、ValのコドンをGUU或いはGUAからGUC或いはGUGに変更してもよく、AspのコドンをGAUからGACに変更してもよく、GluのコドンをGAAからGAGに変更してもよい。他方、Met(AUG)及びTrp(UGG)のコドンの場合は、変更できる配列が存在しない。無論、上に列挙した置換は個別に用いることができるだけでなく、オリジナル配列と比べて、変更されるmRNAのG/C含量を増加させるための全ての可能な組み合わせで用いることもできる。従って、例えばオリジナル(野生型)配列中に存在するThrの全てのコドンをACC(或いはACG)に変更することができる。しかし、上記可能な置換の組み合わせ、例えばThrをコードしているオリジナル配列の全てのコドンのACC(或いはACG)への置換、及び元来Serをコードしている全てのコドンのUCC(或いはUCG及びAGCのいずれか)への置換；Ileをコードしているオリジナル配列の全てのコドンのAUCへの置換、元来Lysをコードしている全てのコドンのAAGへの置換、及び元来Tyrをコードしている全てのコドンのUACへの置換；Valをコードしているオリジナル配列の全てのコドンのGUC(或いはGUG)への置換、元来Gluをコードしている全てのコドンのGAGへの置換、元来Alaをコードしている全てのコドンのGCC(或いはGCG)への置換、及び元来Argをコードしている全てのコドンのCGC(或いはCGG)への置換；Valをコードしているオリジナル配列の全てのコドンのGUC(或いはGUG)への置換、元来Gluをコードしている全てのコドンのGAGへの置換、元来Alaをコードしている全てのコドンのGCC(或いはGCG)への置換、元来Glyをコードしている全てのコドンのGGC(或いはGGG)への置換、及び元来Asnをコードしている全てのコドンのAACへの置換；Valをコードしているオリジナル配列の全てのコドンのGUC(或いはGUG)への置換、元来Pheをコードしている全てのコドンのUUCへの置換、元来Cysをコードしている全てのコドンのUGCへの置換、元来Leuをコードしている全てのコドンのCUG(或いはCUC)への置換、元来Glnをコードしている全てのコドンのCAGへの置換、及び元来Proをコードしている全てのコドンのCCC(或いはCCG)への置換等を用いることが好ましい。該ペプチド及びポリペプチドのいずれかをコードしているmRNAの領域(或いは互いの任意的に存在する更なるセクション)のG/C含量は、対応するペプチド及びポリペプチドのいずれかをコードしている野生型mRNAのコード領域のG/C含量と比べて、好ましくは少なくとも7%ポイント、より好ましくは少なくとも15%ポイント、特に好ましくは少なくとも20%ポイント増加し、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも90%である。これに関連して、上のように変更されたmRNAのG/C含量は野生型配列と比べて最大限増加させることが特に好ましい。

【0127】

医薬組成物において薬学的活性成分として用いられるmRNAの更に好ましい変更は、翻訳効率がtRNAの細胞内における存在頻度が異なることによって決定されるという知見に基づいている。従って所謂「希少(rare)」コドンがRNA配列中に数多く存在する場合、比較的「頻出する」tRNAをコードしているコドンが存在する場合よりも対応するmRNAの翻訳効率は著しく低い。従って本発明によれば薬学的活性成分として用

10

20

30

40

50

いられている mRNA のコード領域は、野生型 mRNA の対応する領域に比べて、細胞内において比較的希少である tRNA をコードしている野生型配列の少なくとも 1 種のコドンを、該比較的希少である tRNA と同種アミノ酸を運搬する、細胞内において比較的頻出する tRNA をコードしているコドンに置換される方法で変更される。この変更を用いて RNA 配列は、頻出する tRNA を利用可能なコドンが導入されるよう変更される。どの tRNA が細胞内において比較的頻出するのか、また対照的にどの tRNA が比較的希少なのかは当業者に知られている。例えば、Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666 を参照。この変更を用いて、本発明に従って、細胞内において比較的希少である tRNA をコードしている野生型配列の全

10

すべてのコドンを、該比較的希少である tRNA と同種のアミノ酸を運搬する、細胞内において比較的頻出する tRNA をコードしているコドンに置換することが可能である。mRNA のコード領域によりコードされている抗原性ペプチド及びポリペプチドのいずれか（1 及び複数のいずれか）のアミノ酸配列を変化させることなしに、上記 mRNA 中のシーケンシャルな G/C 含量増加（特に最大限）を「頻出」コドンと組み合わせることが特に好ましい。G/C リッチな/最適化された mRNA によりコードし得る好ましい抗原は上に列挙した抗原である。

【0128】

（本発明の組成物の）第 2 の実施形態の第 4 の代替方法によれば、本発明に係る医薬組成物中に薬学的活性成分として含有されている核酸分子は dsRNA、好ましくは siRNA である。dsRNA 或いは siRNA は、RNA 干渉現象に関連して特に興味深い。

20

RNA 干渉現象は免疫学的研究の過程で注目された。近年では、RNA に基づく防御機構が発見されており、この機構は菌界、植物界、及び動物界のいずれにも存在し、「ゲノムの免疫系」として作用する。該系は、元来互いに独立して様々な種で報告され（最初は線虫）、後にそのプロセスの根底にある機構が同一であることが同定できた。従って植物における RNA 媒介性ウイルス耐性、植物における PTGS（転写後ジーンサイレンシング）、及び真核生物における RNA 干渉は共通の手順に基づいている。RNA 干渉（RNAi）のインビトロ技術は二本鎖 RNA 分子（dsRNA）に基づいており、この分子は遺伝子発現の配列特異的抑制を誘発する（Zamore (2001) Nat. Struct. Biol. 9: 746-750; Sharp (2001) Genes Dev. 5: 485-490; Hannon (2002) Nature 41: 244-251）。哺乳類

30

細胞に長い dsRNA をトランスフェクトすると、タンパク質キナーゼ R 及び Rnase L が活性化されて、例えばインターフェロン応答等の非特異的作用が生じる（Stark et al. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67: 227-264; He and Katze (2002) Viral Immunol. 15: 95-119）。より短い、例えば 21 塩基～23 塩基長の所謂 siRNA（低分子干渉 RNA）を用いるとこれら非特異的作用を避けられる。その理由は、非特異的作用が 30 bp より短い siRNA には誘発されないためである（Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494-498）。近年 dsRNA 分子はインビボでも用いられている（McCaffrey et al. (2002), Nature 418: 38-39; Xia et al. (2002), Nature Biotech. 20

40

: 1006-1010; Brummelkamp et al. (2002), Cancer Cell 2: 243-247）。

【0129】

従って、最終的に本発明に係る医薬組成物中で薬学的活性成分として用いられる二本鎖 RNA（dsRNA）は、一般構造 5' - (N₁₇₋₂₉) - 3'（式中、N は任意の塩基であり、ヌクレオチドを表す）を有する配列を含むことが好ましい。該一般構造は、リボヌクレオチドから構成されている巨大分子を有する二本鎖 RNA から構成されており、該リボヌクレオチドは五炭糖（リボース或いはデオキシリボース）、有機塩基、及びリン酸塩を含む。ここで RNA 中の有機塩基は、プリン塩基であるアデノシン（アデニン）（A）及びグアノシン（グアニン）（G）と、ピリミジン塩基であるシチジン（シトシン）

50

(C)及びウリジン(ウラシル)(U)とを含む。最終的に本発明に係る医薬組成物中で薬学的活性成分として用いられるdsRNAは、かかるヌクレオチド或いは配向構造を有するヌクレオチド類似体を含む。本発明に係る薬学的活性成分として用いられるdsRNAは、一般構造5'-(N₁₉₋₂₅)-3'(式中、Nは任意の塩基である)を有することが好ましく、5'-(N₁₉₋₂₄)-3'(式中、Nは任意の塩基である)を有することがより好ましく、5'-(N₂₁₋₂₃)-3'(式中、Nは任意の塩基である)を有することが更により好ましい。薬学的活性成分として用いられるdsRNAのヌクレオチドの好ましくは少なくとも90%、より好ましくは95%、特に好ましくは100%が、(薬学的活性成分として)上に記載した(治療に関連する)タンパク質或いは抗原の(m)RNA配列のあるセクションと相補的である。90%相補的とは、本発明に従って用いられるdsRNAの長さが例えば20ヌクレオチドである場合、(m)RNA中の対応するセクションと相補的ではないヌクレオチドが2ヌクレオチド以下であることを意味する。しかし、本発明に係る医薬組成物中で任意的に用いられている二本鎖RNAの配列は、上に薬学的活性成分として記載したタンパク質或いは抗原の(m)RNA中のあるセクションと、その一般構造において完全に相補的であることが好ましい。

10

【0130】

原則として(m)RNAのコード領域中に存在する17塩基対~29塩基対、好ましくは19塩基対~25塩基対の長さを有する全てのセクションが、最終的に本発明に係る医薬組成物中で薬学的活性成分として用いられるdsRNAの標的配列として機能し得る。同様に薬学的活性成分として用いられるdsRNAはまたコード領域に存在しない(薬学的活性成分として)上に記載した(治療に関連する)タンパク質或いは抗原のヌクレオチド配列を対象とすることもできるため、特に(m)RNAの5'非コード領域、例えば制御機能を有する(m)RNAの非コード領域のヌクレオチド配列を対象とすることもできる。従って上に記載したタンパク質或いは抗原の薬学的活性成分として用いられるdsRNAの標的配列は、(m)RNAの翻訳領域、(m)RNAの非翻訳領域、及び調節エレメントの領域の少なくともいずれかに存在し得る。本発明に係る医薬組成物中で薬学的活性成分として用いられるdsRNAの標的配列はまた、非翻訳配列と翻訳配列とにまたがって存在することができ、具体的には標的配列は(m)RNAのコード領域の開始トリプレットの少なくとも1ヌクレオチド上流を含んでいてもよい。

20

【0131】

最終的に本発明に係る医薬組成物中で薬学的活性成分として用いられるdsRNA中に修飾ヌクレオチドが存在することが好ましい場合もある。表現「修飾ヌクレオチド」は、本発明によれば対象とするヌクレオチドが化学的に修飾されていることを意味する。当業者は「化学的修飾」という表現により、修飾ヌクレオチドが1以上の原子或いは原子団の置換、付加、或いは除去により天然に存在するヌクレオチドと比べて変化していることを理解する。本発明に従って用いられるdsRNA中の少なくとも1個の修飾ヌクレオチドは、一方では安定性のために機能し、他方では解離を防ぐために機能する。本発明に従って用いられるdsRNA中の好ましくは2個~10個、より好ましくは2個~5個のヌクレオチドが修飾されている。二本鎖構造のdsRNAのヌクレオチドの少なくとも1個の2'-ヒドロキシ基が、化学基、好ましくは2'-アミノ基或いは2'-メチル基によって置換されていることが有利である。二本鎖構造のうち少なくとも1本の鎖における少なくとも1個のヌクレオチドが、化学的に修飾されている糖環、好ましくは2'-O、4'-C-メチレン架橋により化学的に修飾されている糖環を有する所謂「ロックトヌクレオチド」であってもよい。本発明に従って用いられるdsRNAのうち幾つかのヌクレオチドがロックトヌクレオチドであることが有利である。更に、本発明に従って用いられるdsRNAの骨格を修飾することにより、その早発性分解を防ぐことができる。これに関連してホスホロチオエート、2'-O-メチル-RNA、LNA、LNA/DNAギャップマー等の形態に修飾されており、それによりインビボにおける半減期の長いdsRNAが特に好ましい。

30

40

【0132】

50

細胞内における分解或いは個々の鎖への解離に対抗するため、特にヌクレアーゼによる早発性分解を避けるために、本発明に係る医薬組成物中で薬学的活性成分として用いられる二本鎖RNA (dsRNA)の末端は修飾されていることが好ましい場合がある。dsRNAの個々の鎖の通常は不所望である解離は、特に低濃度のdsRNA及び短鎖長dsRNAのいずれかをを用いたときに生じる。該解離を特に有効に阻害するために、本発明に従って用いられるdsRNAの二本鎖構造の(ヌクレオチド対の作用による)結合力(cohesion)は、少なくとも1個、好ましくは1超の化学的結合(1及び複数のいずれか)により増加し得る。解離の減少している本発明に係る医薬組成物中で薬学的活性成分として用いられるdsRNAは、細胞内、生体内(インビボ)、或いはエキソビボにおける酵素的分解及び化学的分解に対する安定性が増しており、従って半減期が長い。本発明に従って用いられるdsRNAの細胞内における早発性分解を防ぐための更なる可能な方法は、鎖の各末端にヘアピンループ(1及び複数のいずれか)を形成することからなる。従って具体的な実施形態では、本発明に係る医薬組成物中で用いられるdsRNAは解離速度を緩徐にするためにヘアピン構造を有する。かかる構造では、ループ構造は5'末端及び3'末端の少なくともいずれかに形成されることが好ましい。かかるループ構造は水素結合を有さず、従って典型的にはヌクレオチド対間に相補性は存在しない。典型的にはかかるループは、少なくとも5、好ましくは少なくとも7ヌクレオチドの長さを有し、その方法で本発明に従って用いられるdsRNAの2本の相補的個別鎖を結合させる。鎖の解離を防ぐために、本発明に従って用いられるdsRNAの2本の鎖のヌクレオチドは同様に、例えば任意的に修飾されているヌクレオチドにより塩基間の水素架橋結合能を高めることにより、水素架橋結合を強化するよう修飾されることが好ましい場合がある。結果として鎖間相互作用の安定性が増し、dsRNAはRNaseによる攻撃から保護される。

10

20

【0133】

特に好ましい実施形態によれば、本発明に係る医薬組成物中で薬学的活性成分として用いられるdsRNAは、上記タンパク質或いは抗原の(m)RNAを対象とする。その結果用いられるdsRNAは、細胞内の上記タンパク質或いは抗原の翻訳を少なくとも50%、より好ましくは60%、更により好ましくは70%、最も好ましくは少なくとも90%抑制することが好ましい。即ち細胞は、天然に存在する(本発明に従って用いられるdsRNAで処理することなしに)細胞内濃度の半分以下の上記タンパク質或いは抗原を含有することが好ましい。本発明に従って用いられるdsRNA分子を添加した後の細胞内におけるこれらタンパク質或いは抗原の翻訳抑制は、該分子により引き起こされるRNA干渉現象に基づいている。RNA干渉現象を誘発する、本発明に従って用いられるdsRNA、所謂siRNAは、上記タンパク質或いは抗原の(m)RNAに結合することができる。本発明に従って用いられるdsRNAにより細胞内で誘発される翻訳抑制の測定或いは実証は、ノーザンプロットにより、定量リアルタイムPCRにより、或いは上記タンパク質或いは抗原に対する特異的抗体を用いてタンパク質レベルで行うことができる。最終的に本発明に係る医薬組成物中で薬学的活性成分として用いられるdsRNA、及び対応するsiRNAは、当業者に既知であるプロセスにより調製することができる。

30

【0134】

本発明の(第1の実施形態或いは第2の実施形態に係る)医薬組成物は、典型的には(適合性)薬学的に許容される担体を含む。本明細書で用いられる「(適合性)薬学的に許容される担体」という表現は、組成物の液体基剤或いは非液体基剤を含むことが好ましい。本明細書で使用する「適合性」という用語は、通常の使用条件下で組成物の薬学的有効性を実質的に低下させる相互作用が生じないように、薬学的活性成分、免疫賦活剤或いはアジュバントとしての本発明の核酸分子、及び別の成分と、医薬組成物の成分を混合できることを意味する。無論薬学的に許容される担体は、治療されるヒトへの投与に好適であるよう十分高純度且つ十分低毒性でなければならない。

40

【0135】

組成物が液体形態で提供される場合、薬学的に許容される担体は、典型的には1以上の

50

(適合性)薬学的に許容される液体担体を含む。組成物は、(適合性)薬学的に許容される液体担体として、例えば発熱物質を含まない水、等張生理食塩水、緩衝(水)溶液(例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液等)、緩衝溶液、植物油(例えばラッカセイ油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、及びカカオ脂等)、ポリオール(例えばポリプロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコール等)、アルギン酸等を含んでいてもよい。特に本発明の医薬組成物を注入する場合、ナトリウム塩、好ましくは少なくとも50 mMのナトリウム塩、カルシウム塩、好ましくは少なくとも0.01 mMのカルシウム塩、及び任意的にカリウム塩、好ましくは少なくとも3 mMのカリウム塩を含有している緩衝液、好ましくは緩衝水溶液を用いてもよい。好ましい実施形態によれば、ナトリウム塩、カルシウム塩、及び任意的にカリウム塩は、それらのハロゲン化物形態、例えば塩化物、ヨウ化物、或いは臭化物として存在してもよく、それらの水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩、及び硫酸塩のいずれか等の形態で存在してもよい。これらに限定されるものではないが、ナトリウム塩の例としては、例えばNaCl、NaI、NaBr、Na₂CO₃、NaHCO₃、Na₂SO₄が挙げられ、任意のカリウム塩の例としては、例えばKCl、KI、KBr、K₂CO₃、KHCO₃、K₂SO₄が挙げられ、カルシウム塩の例としては、例えばCaCl₂、CaI₂、CaBr₂、CaCO₃、CaSO₄、Ca(OH)₂が挙げられる。更に、上述のカチオンの有機アニオンを緩衝液中に含有していてもよい。より好ましい実施形態によれば、上で定義した注入用途に好適な緩衝液は、塩化ナトリウム(NaCl)、塩化カルシウム(CaCl₂)、及び任意的に塩化カリウム(KCl)から選択される塩を含有していてもよく、この緩衝液中には塩化物に加えて更なるアニオンが存在していてもよい。典型的には、注入用緩衝液中の塩は、少なくとも50 mMの塩化ナトリウム(NaCl)、少なくとも3 mMの塩化カリウム(KCl)、及び少なくとも0.01 mMの塩化カルシウム(CaCl₂)という濃度で存在する。注入用緩衝液は、特定のレファレンス媒体に対して高張、等張、或いは低張であってもよく、即ち該緩衝液は特定のレファレンス媒体よりも高い塩含量、同一の塩含量、或いは低い塩含量を有していてもよく、浸透作用或いは他の濃度効果による細胞の損傷を導かない濃度の上述の塩を用いることが好ましい。レファレンス媒体は、例えば「インピボ」法では血液、リンパ液、細胞質液、或いは他の体液等の生体内に存在する液体であるか、或いは一般的な緩衝液及び液体のいずれか等の「インピトロ」法でレファレンス媒体として用いることができる液体である。かかる一般的な緩衝液或いは液体は当業者に既知である。乳酸加リンゲル液が液体基剤として特に好ましい。

【0136】

組成物が固体形態で提供される場合、薬学的に許容される担体は、典型的には1以上の(適合性)薬学的に許容される固体担体を含む。組成物は、(適合性)薬学的に許容される固体担体として例えば1以上の適合性固体充填剤、適合性液体充填剤、或いは希釈剤を含んでいてもよく、或いはカプセル化されている化合物を同様に用いてもよく、該化合物がヒトへの投与に好適である。かかる(適合性)薬学的に許容される固体担体の幾つかの例は、例えばラクトース、グルコース、及びスクロース糖の糖；例えばコーンスターチ或いはバレイショデンプン等のデンプン；例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、酢酸セルロース等のセルロース及びセルロース誘導體；粉末化トラガカン；モルト；ゼラチン；獣脂；例えばステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム等の固体流動促進剤；硫酸カルシウム等である。

【0137】

(適合性)薬学的に許容される担体は、原則として本発明に係る医薬組成物が投与される方法に応じて選択される。本発明に係る医薬組成物は、例えば全身に投与されてもよい。投与経路としては、例えば経口、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液包内、基質内、クモ膜下腔内、肝臓内、病巣内、頭蓋内、経皮、皮内、肺内、腹腔内、手根内、動脈内、及び舌下への局所経路、並びに鼻腔内経路の少なくともいずれかが挙げられる。用いられる医薬組成物の好適な量は、動物モデルを用いたルーチンな実験により決定できる。かかるモデルとしては、如何なる限定を意味するものでもないが、ウサギ、ヒツジ、マウス、

ラット、イヌ、及び非ヒト霊長類モデルが挙げられる。注入に好ましい単位剤形としては、水、生理学的食塩水、或いはこれらの混合物の滅菌溶液が挙げられる。かかる溶液のpHは約7.4に調整すべきである。注入に好適な担体としては、ヒドロゲル、制御放出用デバイス、遅延放出用デバイス、ポリ乳酸、及びコラーゲン基質が挙げられる。局所適用に好適な薬学的に許容される担体としては、ローション、クリーム、ゲル等を使用するのに好適な担体が挙げられる。化合物が経口投与される場合、錠剤、カプセル剤等が好ましい単位剤形である。経口投与に用いることができる単位剤形を調製するための薬学的に許容される担体は先行技術で周知である。該担体は、本発明の目的にとって重要ではない味、コスト、及び保存性等の二次的な検討事項に応じて選択され、当業者であれば容易に行うことができる。

10

【0138】

免疫原性を更に高めるために、本発明に係る医薬組成物は1以上の補助物質を更に含有していてもよい。それによって上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子と、上記医薬組成物中に任意的に更に含有されている補助物質と(最終的には薬学的活性成分と)の相乗効果が得られることが好ましい。補助物質の様々な種類によって、相乗効果についての様々な機序が考えられ得る。例えば樹状細胞(DC)を成熟させる化合物、例えばリポ多糖類、TNF-、或いはCD40リガンドが、好適な補助物質の第1のクラスを形成する。一般に「危険信号」(LPS、GP96等)、或いはGM-CSF等のサイトカインのような方法で免疫系に影響を及ぼす任意の剤を補助物質として用いることが可能であり、それにより本発明に係る免疫賦活アジュバントにより生じる免疫反応をターゲティングされた方法で増強すること及び影響を与えることの少なくともいずれかである可能になる。特に好ましい補助物質は、免疫反応を促進する、モノカイン、リンホカイン、インターロイキン、或いはケモカイン等のサイトカインであり、例えばIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、INF-、IFN-、INF-、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、LT-、TNF-、hGH等の成長因子

20

30

【0139】

本発明に係る医薬組成物中に含まれていてもよい更なる添加剤は、例えばTween(登録商標)等の乳化剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム等の湿潤剤、着色剤、風味付与剤、薬学的担体、錠剤形成剤、安定剤、抗酸化剤、防腐剤である。

【0140】

本発明に係る医薬組成物(第1の実施形態(薬学的活性成分を含まない)及び第2の実施形態(薬学的活性成分を含む))はまた、アジュバントを更に含有していてもよい。従って、免疫賦活剤として或いはアジュバントとしての(本発明の医薬組成物の第2の実施形態の場合)上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子は、更なる免疫賦活剤/アジュバントと組み合わせてもよい。本発明の範囲内ではこれらの目的に好適な剤/アジュバントは、具体的には本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される(修飾されている、或いは修飾されていない)核酸分子の生物学的性質(1及び複数のいずれか)を(1以上の機序により)増強する化合物である、即ち具体的には本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の免疫賦活作用を強化する化合物である。本発明に従って用いることができる剤/アジュバントの例としては、如何なる限定を意味するものでもないが、例えばプロタミン、ヌクレオリン、スベルミン、スベルミジン等

40

50

の上記安定化カチオン性ペプチド及びポリペプチドのいずれか、カチオン性多糖類、特に
 キトサン、TDM、MDP、ムラミルジペプチド、プルロニクス、アルミニウム溶液 (a
 l u m s o l u t i o n)、水酸化アルミニウム、ADJUMER (商標) (ポリホス
 ファゼン); リン酸アルミニウムゲル; 藻類由来のグルカン; アルガムリン; 水酸化アル
 ミニウムゲル (アルム); タンパク質高吸着性水酸化アルミニウムゲル; 低粘度水酸化アル
 ミニウムゲル; AF及びSPTのいずれか (スクアラン (5%), Tween 80 (0
 . 2%), Pluronic L121 (1.25%), リン酸緩衝生理食塩水のエマル
 ション、pH7.4); AVRIDINE (商標) (プロパンジアミン); BAY R1
 005 (商標) ((N-(2-デオキシ-2-L-ロイシルアミノ-b-D-グルコピラ
 ノシル)-N-オクタデシルデカノイル-アミドヒドロアセテート); CALCITR
 IOL (商標) (1,25-ジヒドロキシ-ビタミンD3); リン酸カルシウムゲル; C
 APTM (リン酸カルシウムナノ粒子); コレラホロトキシン、コレラ毒素-A1-タン
 パク質-A-D-フラグメント融合タンパク質、前記コレラ毒素のサブユニットB; CR
 L 1005 (ブロックコポリマーP1205); サイトカイン含有リポソーム; DDA
 (ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド); DHEA (デヒドロエピアンドロス
 テロン); DMP C (ジミリストイルホスファチジルコリン); DMP G (ジミリスト
 イルホスファチジルグリセロール); DOC/アルム複合体 (デオキシコール酸ナトリウ
 ム塩); フロイント完全アジュバント; フロイント不完全アジュバント; ガンマイヌリン
 ; Gerbuアジュバント ((i) N-アセチルグルコサミニル-(P1-4)-N-ア
 セチルムラミル-L-アラニル-D-グルタミン(GMDP)と、(ii)ジメチルジオ
 クタデシルアンモニウムクロリド(DDA)と、(iii)亜鉛-Lプロリン塩複合体
 (ZnPro-8)との混合物; GM-CSF); GMDP(N-アセチルグルコサミニ
 ル-(b1-4)-N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン); イミ
 キモド(1-(2-メチプロピル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミ
 ン); ImmTher (商標) (N-アセチルグルコサミニル-N-アセチルムラミル-
 L-Ala-D-イソGlu-L-Ala-グリセロールジパルミテート); DRV (脱
 水-再水和小胞から調製された免疫リポソーム); インターフェロン- ; インターロイ
 キン-1 ; インターロイキン-2 ; インターロイキン-7 ; インターロイキン12 ; I
 SCOMS (商標) (「免疫賦活複合体」); IS COPREP 7.0.3. (商標
); リポソーム; LOXORIBINE (商標) (7-アリル-8-オキソグアノシン)
 ; LT経口アジュバント (大腸菌に対して不安定なエンテロトキシン-プロトキシン);
 任意の組成のマイクロスフィア及び微粒子; MF59 (商標); (スクアレン-水エマルシ
 ョン); MONTANIDE ISA 51 (商標) (精製不完全フロイントアジュバント);
 MONTANIDE ISA 720 (商標) (代謝可能なオイルアジュバント)
 ; MPL (商標) (3-Q-デサシル-4'-モノホスホリルリポドA); MTP-PE
 及びMTP-PEリポソーム ((N-アセチル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-
 L-アラニン-2-(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-(ヒドロキシホス
 ホリルオキシ))エチルアミド, ナトリウム塩); MURAMETIDE (商標) (N
 a c - M u r - L - A l a - D - G l n - O C H ₃); MURAPALMITINE (商
 標) 及びD-MURAPALMITINE (商標) (N a c - M u r - L - T h r - D -
 イソGln-sn-グリセロールジパルミトイル); NAGO (ノイラミニダーゼ-ガラ
 クトースオキシダーゼ); 任意の組成のナノスフェア及びナノ粒子のいずれか; NISV
 (非イオン界面活性剤小胞); PLEURAN (商標) (-グルカン); PLGA、P
 GA、及びPLA (乳酸とグリコール酸とのコポリマー、乳酸ホモポリマー、及びグリコ
 ール酸ホモポリマー; ミクロスフィア及びナノスフェア); PLURONIC L121
 (商標); PMMA (ポリメチルメタクリレート); PODDS (商標) (プロテノイ
 ドマイクロスフィア); ポリエチレンカルバメート誘導体; ポリ-rA: ポリ-rU (ポリ
 アデニル酸-ポリウリジル酸複合体); ポリソルベート80 (Tween 80); タンパ
 ク質コキレート (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON (商標) (QS-21); Quil-A (Quil-A
 50

サポニン) ; S - 28463 (4 - アミノ - o t e c - ジメチル - 2 - エトキシメチル - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] キノリン - 1 - エタノール) ; S A F - 1 (商標) (「S y n t e x 社のアジュバント製剤」) ; センダイプロテオリポソーム及びセンダイ含有脂質マトリックス ; S p a n - 85 (ソルビタントリオレート) ; S p e c o l (M a r c o l 52、S p a n - 85、及びT w e e n 85のエマルジョン) ; スクアレン或いは R o b a n e (登録商標) (2, 6, 10, 15, 19, 23 - ヘキサメチルテトラコサン、及び2, 6, 10, 15, 19, 23 - ヘキサメチル - 2, 6, 10, 14, 18, 22 - テトラコサヘキサン) ; ステアリルチロシン (オクタデシルチロシン塩酸塩) ; T h e r a m i d (登録商標) (N - アセチルグルコサミニル - N - アセチルムラミル - L - A l a - D - イソG l u - L - A l a - ジパルミトキシプロピルアミド) ; トレオニル - M D P (T e r m u r t i d e (商標) 或いは [t h r 1] - M D P ; N - アセチルムラミル - L - トレオニル - D - イソグルタミン) ; T y 粒子 (T y - V L P 或いはウイルス様粒子) ; W a l t e r - R e e d リポソーム (水酸化アルミニウム上に吸着されているリポドAを含んでいるリポソーム) 等が挙げられる。P a m 3 C y s 等のリポペプチドも同様に、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される本発明の核酸分子と免疫賦活アジュバントの形態で組み合わせるのに特に好適である (D e r e s e t a l . , N a t u r e 1989, 342 : 561 - 564 参照)。

【0141】

上述のアジュバントは、デポー及び送達に好適なアジュバント、同時賦活に好適なアジュバント、拮抗剤として好適なアジュバント等を含む幾つかのクラスに分類することができる。デポー及び送達に好適な好ましいアジュバントとしては、例えば A d j u - p h o s、A l h y d r o g e l、R e h y d r a g e l 等のアルミニウム塩類、C F A、S A F、I F A、M F 59、P r o v a x、T i t e r M a x、M o n t a n i d e、V a x f e c t i n 等のエマルジョン、O p t i v a x (C R L 1005)、L 121、P o l o a x m e r 4010) 等のコポリマー、S t e a l t h 等のリポソーム、B I O R A L 等のコキレート (c o c h l e a t e)、Q S 21、Q u i l A、I s c o m a t r i x、I S C O M 等の植物由来のアジュバントを挙げることができる。同時賦活に好適な好ましいアジュバントとしては、例えば T o m a t i n e、P L G、P M M、イヌリン等の生体高分子、R o m u r t i d e、D E T O X、M P L、C W S、マンノース、C p G 7909、I S S - 1018、I C 31、イミダゾキノリン、A m p l i g e n、R i b i 529、I M O x i n e、I R I V、V L P、コレラ毒素、熱不安定性毒素、P a m 3 C y s、フラゲリン、G P I アンカー、L N F P I I I / L e w i s X、抗微生物ペプチド、U C - 1 V 150、R S V 融合タンパク質、c d i G M P 等の微生物由来のアジュバントを挙げることができる。拮抗剤として好適な好ましいアジュバントは、例えば C G R P 神経ペプチド等を挙げることができる。

【0142】

デポー及び送達に好適なアジュバントとしてはプロタミン、ヌクレオリン、スベルミン、スベルミジン、及び他のカチオン性ペプチド或いはカチオン性タンパク質のいずれかを含むカチオン性化合物或いはポリカチオン性化合物、例えばポリ - L - リジン (P L L)、ポリアルギニン、塩基性ポリペプチド、H I V 結合ペプチド、T a t、H I V - 1 T a t (H I V)、T a t 由来ペプチド、P e n e t r a t i n、V P 22 由来ペプチド或いは類似ペプチドを含む細胞透過性ペプチド (C P P)、H S V V P 22 (単純ヘルペス)、M A P、K A L A、或いはタンパク質伝達ドメイン (P T D)、P p T 620、プロリンリッチペプチド、アルギニンリッチペプチド、リジンリッチペプチド、M P G - ペプチド (1 及び複数のいずれか)、P e p - 1、L - オリゴマー、カルシトニンペプチド (1 及び複数のいずれか)、アンテナペディア由来ペプチド (特にショウジョウバエのアンテナペディア由来)、p A n t p、p I s 1、F G F、ラクトフェリン、T r a n s p o r t a n、B u f o r i n - 2、B a c 715 - 24、S y n B、S y n B (1)、p V E C、h C T - 由来ペプチド、S A P、プロタミン、スベルミン、スベルミジン、或い

10

20

30

40

50

はヒストンが特に好ましい。これに加えて、好ましいカチオン性タンパク質、ポリカチオン性タンパク質、カチオン性ペプチド、或いはポリカチオン性ペプチドは、以下の全式を有する以下のタンパク質及びペプチドのいずれかから選択することができる： $(Arg)_1; (Lys)_m; (His)_n; (Orn)_o; (Xaa)_x$ （式中、 $l+m+n+o+x$ は8~15であり、 $l, m, n,$ 及び o は互いに独立して0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或いは15から選択される任意の数であつてもよいが、但し Arg, Lys, His 及び Orn の総含量は該オリゴペプチドの全アミノ酸の少なくとも50%であり、 Xaa は Arg, Lys, His 或いは Orn を除くネイティブ（天然に存在する）アミノ酸及び非ネイティブアミノ酸から選択される任意のアミノ酸であつてもよく、 x は0、1、2、3、或いは4から選択される任意の数であつてもよいが、但し Xaa の総含量は該オリゴペプチドの全アミノ酸の50%を超えない）。この状況において特に好ましいオリゴアルギニンは、例えば $Arg_7, Arg_8, Arg_9, Arg_7, H_3R_9, R_9H_3, H_3R_9H_3, YSSR_9SSY, (RKH)_4, Y(RKH)_2R$ 等である。アジュバントとして用いることができる更に好ましいカチオン性化合物或いはポリカチオン性化合物としては、カチオン性多糖類、例えばキトサン、ポリブレン、カチオン性ポリマー、例えばポリエチレンイミン（PEI）、カチオン性脂質、例えばDOTMA： $[1-(2,3-シオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N$ -トリメチルアンモニウムクロリド、DMRIE、ジ-C14-アミジン、DOTIM、SAINT、DC-Chol、BGTC、CTAP、DOPC、DODAP、DOP、E：ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、DOSPA、DODAB、DOIC、DMEPC、DOGS：ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン、DIMRI：ジミリスト-オキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、DOTAP：ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン、DC-6-14：O,O-ジテトラデカノイル-N-(トリメチルアンモニオアセチル)ジエタノールアミンクロリド、CLIP1： $rac-[2,3-ジオクタデシルオキシプロピル](2-ヒドロキシエチル)-ジメチルアンモニウムクロリド$ 、CLIP6： $rac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピル-オキシメチルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウム$ 、CLIP9： $rac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピル-オキシスクシニルオキシ)エチル]-トリメチルアンモニウム$ 、オリゴフェクタミン、或いはカチオン性ポリマー及びポリカチオン性ポリマーのいずれか、例えば -アミノ酸ポリマー或いは逆(reversed)ポリアミド等の修飾ポリアミノ酸、PVP（ポリ(N-エチル-4-ビニルピリジニウムブロミド)）等の修飾ポリエチレン、pDMAEMA（ポリ(ジメチルアミノエチルメチルアクリレート)）等の修飾アクリレート、pAMAM（ポリ(アミドアミン)）等の修飾アミドアミン、ジアミン末端修飾1,4ブタンジオールジアクリレート-co-5-アミノ-1-ペンタノールポリマー等の修飾ポリベータアミノエステル(PBAE)、ポリプロピルアミン dendrimer 或いは pAMAM 系 dendrimer 等の dendrimer、PEI：ポリ(エチレンイミン)、ポリ(プロピレンイミン)等のポリイミン(1及び複数のいずれか)、ポリアリルアミン、シクロデキストリン系ポリマー、デキストラン系ポリマー、キトサン等の糖骨格系ポリマー、PMOXA-PDMSコポリマー等のシラン骨格系ポリマー、1以上のカチオン性ブロック(例えば上記カチオン性ポリマーから(og)選択される)と、1以上の親水性ブロック或いは疎水性ブロック(例えばポリエチレングリコール)との組み合わせからなるブロックポリマー等が挙げることができる。上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかに係る本発明の核酸分子と、カチオン性化合物或いはポリカチオン性化合物との会合或いは複合体化は、核酸分子にアジュバント特性をもたらし、且つ複合体化により核酸分子に安定化効果を付与することが好ましい。本発明の核酸分子を安定化する手順は一般に欧州特許出願公開第1083232号に記載されており、この開示はその全文を参照することにより本発明に援用する。カチオン性化合物或いはポリカチオン性化合物としては、上で定義したプロタミン、ヌクレオリン、スベルミン、スベルミジン、オリゴアルギニンからなる群から選択される化合

10

20

30

40

50

物が特に好ましく、例えば Arg_7 、 Arg_8 、 Arg_9 、 Arg_7 、 H_3R_9 、 R_9H_3 、 $H_3R_9H_3$ 、 $YSSR_9SSY$ 、 $(RKH)_4$ 、 $Y(RKH)_2R$ 等である。

【0143】

同時賦活効果を有し得るアジュバントとしては、式 (IV) : $G_1 X_m G_n$ (式中、G はグアノシン (グアニン)、ウリジン (ウラシル)、グアノシン (グアニン) 類似体、及びウリジン (ウラシル) 類似体のいずれかであり; X は、グアノシン (グアニン)、ウリジン (ウラシル)、アデノシン (アデニン)、チミジン (チミン)、シチジン (シトシン)、及び上記ヌクレオチド (ヌクレオシド) の類似体のいずれかであり; 1 は 1 ~ 40 の整数であって、1 が 1 である場合 G はグアノシン (グアニン) 及びその類似体のいずれかであり、1 が 1 超である場合ヌクレオチド (ヌクレオシド) の少なくとも 50% がグアノシン (グアニン) 及びその類似体のいずれかであり; m は整数であり且つ少なくとも 3 であって、m が 3 である場合 X はウリジン (ウラシル) 及びその類似体のいずれかであり、m が 3 超である場合ウリジン (ウラシル) 及びウリジン (ウラシル) の類似体のいずれかが少なくとも 3 個連続して存在し; n は 1 ~ 40 の整数であって、n が 1 である場合 G はグアノシン (グアニン) 及びその類似体のいずれかであり、n が 1 超である場合ヌクレオチド (ヌクレオシド) の少なくとも 50% がグアノシン (グアニン) 及びその類似体のいずれかである) で表される核酸分子、

或いは式 (V) : $C_1 X_m C_n$ (式中、C は、シチジン (シトシン)、ウリジン (ウラシル)、シチジン (シトシン) 類似体、及びウリジン (ウラシル) 類似体のいずれかであり; X は、グアノシン (グアニン)、ウリジン (ウラシル)、アデノシン (アデニン)、チミジン (チミン)、シチジン (シトシン)、及び上記ヌクレオチド (ヌクレオシド) の類似体のいずれかであり; 1 は 1 ~ 40 の整数であって、1 が 1 である場合 C はシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれかであり、1 が 1 超である場合ヌクレオチド (ヌクレオシド) の少なくとも 50% がシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれかであり; m は整数であり且つ少なくとも 3 であって、m が 3 である場合 X はウリジン (ウラシル) 及びその類似体のいずれかであり、m が 3 超である場合ウリジン (ウラシル) 及びウリジン (ウラシル) の類似体のいずれかが少なくとも 3 個連続して存在し; n は 1 ~ 40 の整数であって、n が 1 である場合、C はシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれかであり、n が 1 超である場合ヌクレオチド (ヌクレオシド) の少なくとも 50% がシチジン (シトシン) 及びその類似体のいずれかである) で表される核酸分子が挙げられる。

【0144】

Toll様受容体: TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12、或いはTLR13への結合親和性(リガンドとしての)により免疫賦活性であることが知られている任意の化合物は、更なる成分として好適に用いられ、本発明の医薬組成物中の本発明の核酸分子により誘導される免疫反応を更に賦活することができる。

【0145】

本発明の医薬組成物に添加し得る別のクラスの化合物は、CpG核酸、具体的にはCpG-RNA或いはCpG-DNAである。CpG-RNA或いはCpG-DNAは、単鎖CpG-DNA(ssCpG-DNA)、二本鎖CpG-DNA(dsDNA)、単鎖CpG-RNA(ssCpG-RNA)、或いは二本鎖CpG-RNA(dsCpG-RNA)であってもよい。CpG核酸は、CpG-RNAの形態であることが好ましく、単鎖CpG-RNA(ssCpG-RNA)の形態であることがより好ましい。CpG核酸は、少なくとも1以上の(マイトジェニック)シチジン(シトシン)/グアニンジヌクレオチド配列(1及び複数のいずれか)(CpGモチーフ(1及び複数のいずれか))を含むことが好ましい。第1の好ましい代替方法によれば、これら配列に含まれる少なくとも1個のCpGモチーフ、即ちCpGモチーフのC(シチジン(シトシン))及びG(グアニン)はメチル化されていない。これら配列に任意的に含まれている全ての更なるシチジン(シトシン)或いはグアニンは、メチル化されていてもよく、メチル化されていなくてもよい。しかし更なる好ましい代替方法によれば、CpGモチーフのC(シチジン(シトシン)

)) 及び G (グアニン) は、メチル化型で存在してもよい。

【 0 1 4 6 】

特に好ましい実施形態によれば、本発明に係る医薬組成物はワクチンとして提供されてもよい。本発明に係るワクチンは、典型的には本発明に係る医薬組成物を含む (該医薬組成物に一致する) 。本発明に係る該ワクチンの組成物は、ワクチン組成物に組み込まれている薬学的活性成分の具体的なクラスにより特徴付けられる。典型的には薬学的活性成分は、特定の抗原に対する特異的 (適応) 免疫反応を惹起する免疫賦活物質である。惹起された特異的 (適応) 免疫反応により、被験体が特定の病原体或いは特定の腫瘍に対する免疫反応 (能動モード或いは受動モードにより惹起される) を生じさせることが可能になる。

10

【 0 1 4 7 】

本発明の医薬組成物特に本発明のワクチンは、投与される方法により具体的に特徴付けられる。典型的には本発明の医薬組成物特にワクチンは、全身投与されることが好ましい。該本発明の医薬組成物 / ワクチンの投与経路としては、典型的には経口、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液包内、基質内、クモ膜下腔内、肝臓内、病巣内、頭蓋内、経皮、皮内、肺内、腹腔内、手根内、動脈内、及び舌下への局所経路、並びに鼻腔内経路の少なくともいずれかが挙げられる。或いは本発明のワクチン及び医薬組成物のいずれかは、皮内、皮下、筋肉内経路により投与してもよい。従って組成物 / ワクチンは、一般に医薬組成物について上で定義した液体形態或いは固体形態で処方されることが好ましい。本発明に係るワクチンに組み込まれることが好ましい場合のある更なる補助物質 (上で定義した通り) は、特にワクチンにおいて免疫原性を更に高めることができる。本発明に係るワクチン中の薬学的活性成分の免疫原性及び他の性質に応じて、上で定義した該補助物質の 1 以上を選択することが有利である。

20

【 0 1 4 8 】

本発明の更に好ましい対象によれば、本発明に係る医薬組成物、特に好ましくは本発明のワクチンは、以下の実施例に述べる適応症の治療に用いられる。本発明に係る医薬組成物、特に好ましくは本発明のワクチンを用いて、例えば様々な病理的に免疫反応が存在しないことに関連する疾患及び症状のいずれか、或いは治療の見地から免疫反応を必要とする、好ましくは免疫反応の増大を必要とする疾患及び症状のいずれかを治療することが可能であり、該疾患及び症状のいずれかは、例えば腫瘍特異的疾患、病原体特異的疾患、感染性疾患等、或いは (過度の) 免疫反応の T H 1 優先免疫反応へのシフト、及び過度の免疫反応 (例えばアレルギー或いは自己免疫疾患) に苦しむ患者の脱感作の少なくともいずれかにより治療できる疾患である。本発明に係る医薬組成物による該免疫反応の発生、或いは既に存在しているが任意的に不十分である免疫反応の増大は、該医薬組成物の非抗原特異的免疫反応を誘発する能力に実質的に基づいている。好適な免疫反応にとって重要な因子は、様々な T 細胞亜集団を賦活することである。T リンパ球は、典型的には 2 種の亜集団、T - ヘルパー 1 (T h 1) 細胞及び T - ヘルパー 2 (T h 2) 細胞に分化し、免疫系は該細胞を用いて細胞内 (T h 1) 病原体及び細胞外 (T h 2) 病原体 (例えば、抗原) を破壊することができる。2 種の T h 細胞集団は、該集団が産生するエフェクタタンパク質 (サイトカイン) のパターンが異なる。従って T h 1 細胞は、マクロファージ及び細胞傷害性 T 細胞の活性化により細胞性免疫反応を補助する。他方、T h 2 細胞は、B 細胞の形質細胞への変換を刺激し抗体 (抗原に対する) を形成することにより体液性免疫反応を促進する。それ故 T h 1 / T h 2 比は、免疫反応において非常に重要である。本発明に関連して、免疫反応の T h 1 / T h 2 比は、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される少なくとも 1 種の核酸分子 (例えば 1、2、3、4、6、7、或いはそれ以上の核酸分子) を含有している本発明に係る医薬組成物により、細胞性反応、即ち T h 1 反応の方向に変位することが好ましく、主に細胞性免疫反応は該反応によって誘導される。この変位及び優先のみにより、或いは T H 1 免疫反応の発生のみによってさえも、上記適応症を有効に治療することが可能である。従って、本発明に係る本医薬組成物或い

30

40

50

はワクチンを用いて、腫瘍特異的免疫反応或いは病原体特異的免疫反応を誘発することが好ましい。該本発明に係る医薬組成物或いはワクチンは、抗原提示細胞（APC）の免疫反応を増大させるために用いられ得ることが特に好ましい。本発明に係る医薬組成物或いはワクチンは、癌或いは腫瘍疾患の治療に用い得ることが同様に特に好ましく、該癌或いは腫瘍疾患は好ましくは、結腸癌腫、黒色腫、腎癌腫、リンパ腫、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、胃腸腫瘍、肺癌腫、神経膠腫、甲状腺腫瘍、乳癌腫、前立腺腫瘍、ヘパトーム、各種ウイルス誘導性腫瘍（例えば、乳頭腫ウイルス誘導性癌腫（例えば子宮頸癌腫）、腺癌腫、ヘルペスウイルス誘導性腫瘍（例えばパーキットリンパ腫、EBV誘導性B細胞リンパ腫）、B型肝炎誘導性腫瘍（肝細胞癌腫）、HTLV-1誘導性リンパ腫、HTLV-2誘導性リンパ腫、聴神経腫/聴神経鞘腫、子宮頸癌、肺癌、咽頭癌、肛門癌腫、グリア芽腫、リンパ腫、直腸癌、星状細胞腫、脳腫瘍、胃癌、網膜芽腫、基底細胞腫、脳転移、髄芽腫、腔癌、膵臓癌、精巣癌、メラノーマ、甲状腺癌腫、膀胱癌、ホジキン症候群、髄膜腫、Schneeberger病、気管支癌腫、下垂体腫瘍、菌状息肉腫、食道癌、乳癌、類癌腫、神経鞘腫、棘細胞腫、パーキットリンパ腫、喉頭癌、腎癌、胸腺腫、体癌腫（corpus carcinoma）、骨癌、非ホジキンリンパ腫、尿道癌、CUP症候群、頭/頸部腫瘍、乏突起膠腫、外陰癌、腸癌、結腸癌、食道癌腫瘍、いぼ合併症、小腸腫瘍、頭蓋咽頭腫、卵巣癌、軟組織腫瘍/肉腫、卵巣癌、肝臓癌、膵臓癌腫、子宮頸癌腫、子宮内膜癌腫、肝転移、陰茎癌、舌癌、胆嚢癌、白血病、形質細胞腫、子宮癌、まぶた腫瘍、及び前立腺癌等から選択される。脂質修飾核酸において用いられる脂質、或いは組成物中の薬学的活性成分として用いられる脂質が α -トコフェロール（ビタミンE）、D- α -トコフェロール、L- α -トコフェロール、D, L- α -トコフェロール、及びビタミンEコハク酸塩（VES）である場合、 α -トコフェロール（ビタミンE）は毒性が弱く、強力な抗腫瘍活性を示し（A. Bendich, L. J. Machlin *Am. J. Clin. Nutr.* 48 (1988) 612）、これにより癌治療において非常に奨励されているため特に好ましい。腫瘍細胞の増殖阻害について、或いは腫瘍細胞上における細胞傷害活性についての説明として特に2種類の機序が知られている。一方は、ビタミンEは強力な抗酸化剤であり、優れたラジカル受容体であるというものであり（C. Borek *Ann. NY Acad. Sci.* 570 (1990) 417）、他方は、ビタミンEは免疫反応賦活により腫瘍成長を予防することができるというものである（G. Shklar, J. Schwartz, D. P. Trickler, S. Reid *J. Oral Pathol. Med.* 19 (1990) 60）。更に最近の報告では、腫瘍細胞中の腫瘍抑制遺伝子p53の発現（口腔扁平上皮癌（oral squamous cancer）と、ビタミンEコハク酸塩（VES）処理との間に関連があることが更に見出されている（J. Schwartz, G. Shklar, D. Trickler *Oral Oncol. Europ. J. Cancer* 29B (1993) 313）。ビタミンEコハク酸塩（VES）処理によって、腫瘍抑制剤として作用する野生型p53の産生刺激と、腫瘍形成活性を生じさせる変異型p53の減少の両方を観察することができた。興味深いことにVESのこれら腫瘍細胞に対する生物学的活性は2つの観点で用量依存的である：生理学的用量（0.001~50 $\mu\text{mol/L}$ ）では細胞増殖の増加が観察され、薬理的用量（100~154 $\mu\text{mol/L}$ ）では細胞増殖が阻害される。これは細胞培養物において示されている（T. M. A. Elattar, A. S. Virji *Anticancer Res.* 19 (1999) 365）。またVES処理により各種乳癌細胞株においてアポトーシスを誘導することも可能であった（W. Yu, K. Israel, Q. Y. Liao, C. M. Aldaz, B. G. Sanders, K. Kline *Cancer Res.* 59 (1999) 953）。アポトーシス誘導は、FasリガンドとFas受容体との相互作用を介して開始される。対応する細胞株においてかかる機序が観察されたことはそれまでなかったため、この研究結果は特に強調すべきである。芳香環のメチル基の数及び位置が異なる様々なビタミンE異性体が存在する。報告されている研究では、天然に存在するビタミンEのうち最も生物学的活性の

10

20

30

40

50

高い形態である - トコフェロールが用いられていた。ビタミンE分子は3つの光学活性中心を有しているため様々な立体異性体が生じる。天然型ビタミンEは、RRR - トコフェロール(かつてのD - トコフェロール)であるが、ラセミ体(D, L - トコフェロール)が現在主に用いられている。ビタミンEの上記形態は全て同様に本発明の範囲内である脂質に含まれる。

【0149】

上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される少なくとも1種の核酸分子、或いは本発明に係る医薬組成物は、感染性疾患の治療に用いられることが同様に特に好ましい。如何なる限定を意味するものでもないが、該感染性疾患は、インフルエンザ、マラリア、SARS、黄熱、エイズ、ライムボレリア症、リーシュマニア症、炭疽病、髄膜炎、ウイルス感染症(例えば、エイズ、尖圭コンジローマ、中空いぼ(hollow warts)、デング熱、三日熱、エボラウイルス、風邪、初夏髄膜脳炎(FSME)、インフルエンザ、带状疱疹、肝炎、単純ヘルペスI型、単純ヘルペスII型、眼部带状疱疹、インフルエンザ、日本脳炎、ラッサ熱、マールブルグウイルス、麻疹、口蹄疫、単核症、耳下腺炎、ノーウォークウイルス感染、ファイファー腺熱、疱疹、ポリオ(幼年期跛行(lameness))、仮性ク룹、第五病、狂犬病、いぼ、西ナイル熱、水痘、巨細胞ウイルス(CMV)等)、細菌感染症(例えば、流産(前立腺炎症)、炭疽病、虫垂炎、ボレリア症、ボツリヌス中毒、カンピロバクター、トラコーマクラミジア(尿道の炎症、結膜炎)、コレラ、ジフテリア、鼠径肉芽腫、喉頭蓋炎、発疹チフス、ガス壊疽、淋病、野兔病、ヘリコバクターピロリ、百日咳、鼠径リンパ肉芽腫、骨髄炎、レジオネラ症、ハンセン病、リステリア症、肺炎、髄膜炎、細菌性髄膜炎、炭疽病、中耳炎、マイコプラズマ・ホミニス、新生児敗血症(絨毛羊膜炎)、水痘、パラチフス、ペスト、ライター症候群、ロッキー山紅斑熱、サルモネラ菌パラチフス、サルモネラ菌発疹チフス、猩紅熱、梅毒、破傷風、トリッパー、ツツガムシ病、結核、発疹チフス、膣炎、軟性下疳等)、寄生虫、原生動物、及び真菌のいずれかによって発症する感染症(例えば、アメーバ症、ビルハルツ住血吸虫症、シャーガス病、水虫、酵母菌斑(yeast fungus spots)、疥癬、マラリア、オンコセルカ症(眼オンコセルカ症)、真菌症、トキソプラズマ症、トリコモナス症、トリパノソーマ症(眠り病)、内臓リーシュマニア症、おしめ/おむつ皮膚炎、住血吸虫症、魚類中毒症(シガテラ中毒)、カンジダ症、皮膚リーシュマニア症、ラムブル鞭毛虫症(ジアルジア鞭毛虫症)、眠り病、エキノコックス属によって発症する感染性疾患、魚類条虫(fish tapeworm)、キツネ条虫、イヌ条虫、シラミ、ウシ条虫、ブタ条虫、及び微小条虫(miniature tapeworm)から選択されることが好ましい。

【0150】

従って、上で定義した本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される少なくとも1種の核酸分子、或いは本発明に係る医薬組成物は、アレルギー疾病或いは疾患の治療用薬剤の調製に用いることができる。アレルギーは、特定の外来抗原或いはアレルゲンに対する異常な後天性免疫学的過敏症を典型的に伴う症状である。アレルギーは、通常該抗原或いはアレルゲンに対する局所炎症反応或いは全身炎症反応をもたらす、体内において該アレルゲンに対する免疫を導く。この状況においてアレルゲンとしては、例えば草、花粉、カビ、薬剤、或いは多数の環境的誘発因子等が挙げられる。理論に縛られるものでもないが、アレルギーの発現には幾つかの異なる疾患機序が関与していると考えられている。P. Gell及びR. Coombsによる分類表に従うと「アレルギー」という用語は、古典的なIgE機構により引き起こされるI型過敏症に限定されている。I型過敏症はIgEにより肥満細胞及び好塩基球が過度に活性化されることを特徴とし、この過度の活性化によって、鼻水のような軽い症状から、命を脅かすアナフィラキシーショック及び死に至る可能性のある全身性免疫反応をもたらされる。周知のアレルギーの種類としては、これらに限定されるものではないが、アレルギー性喘息(鼻粘膜の腫脹を引き起こす)、アレル

10

20

30

40

50

ギー性結膜炎（充血及び結膜の掻痒感を引き起こす）、アレルギー性鼻炎（「花粉症」）、アナフィラキシー、血管浮腫、アトピー性皮膚炎（湿疹）、蕁麻疹、好酸球増加症、呼吸器アレルギー、昆虫咬傷アレルギー、皮膚アレルギー（湿疹、蕁麻疹等の様々な発疹及び（接触性）皮膚炎等を引き起こし、それらを含む）、食物アレルギー、及び薬物アレルギーが挙げられる。本発明に関連して、上で定義した本発明に係る式（I）、（Ia）、（II）、（IIa）、（IIb）、（IIIa）及び（IIIb）の少なくともいずれかで表される本発明の核酸分子と組み合わせて、アレルゲン（例えばネコアレルゲン、ホコリアレルゲン、ダニ抗原、植物抗原（例えばカバノキ抗原）等に由来するアレルゲン）をタンパク質或いは該タンパク質アレルゲンをコードしているmRNA（或いはDNA）として含有している医薬組成物或いはワクチンが提供される。本発明の医薬組成物は、（過度の）免疫応答をより強いTH1応答へ移行させることより不所望のIGE応答を抑制するか或いは弱めることができる。

10

【0151】

同様に上で定義した本発明に係る式（I）、（Ia）、（II）、（IIa）、（IIb）、（IIIa）及び（IIIb）の少なくともいずれかで表される本発明の少なくとも1種の核酸分子、或いは本発明の薬学的活性成分は、自己免疫疾患の治療用薬剤の調製に同様に用いることができる。自己免疫疾患は、各疾患の主要な臨床病理学的特徴によって、全身性自己免疫疾患、臓器特異的自己免疫疾患、及び局所性自己免疫疾患のいずれかに大別することができる。自己免疫疾患は、全身性症候群（SLE、シェーグレン症候群、強皮症、関節リウマチ及び多発性筋炎が挙げられる）或いは局所性症候群（内分泌学的症候群（DM1型、橋本甲状腺炎、アジソン病等）、皮膚科学的症候群（尋常性天疱瘡）、血液学的症候群（自己免疫性溶血性貧血）、神経的症候群（多発性硬化症）であってもよい）のカテゴリーに分類してもよく、体組織の任意の限局性腫瘍を実質的に含んでもよい。治療される自己免疫疾患は、I型自己免疫疾患、II型自己免疫疾患、III型自己免疫疾患、及びIV型自己免疫疾患のいずれかからなる群から選択してもよく、例えば多発性硬化症（MS）、関節リウマチ、糖尿病、I型糖尿病（真性糖尿病）、全身性エリテマトーデス症（SLE）、慢性多発性関節炎、バセドー氏病、自己免疫性慢性肝炎、潰瘍性大腸炎、I型アレルギー疾患、II型アレルギー疾患、III型アレルギー疾患、IV型アレルギー疾患、線維筋痛、脱毛症、ペヒテレフ病、クローン病、重症筋無力症、神経皮膚炎、リウマチ性多発筋痛症、進行性全身性硬化症（PSS）、乾癬、ライター症候群、リウマチ性関節炎、乾癬、脈管炎等、或いはII型糖尿病等である。なぜ免疫系が自己抗原に対する免疫反応を誘導するのかに関する正確な機序は今までのところ解明されていないが、因果関係についていくつかの知見が存する。それによると、自己反応はT細胞のバイパスが原因である可能性がある。正常な免疫系はT細胞によるB細胞の活性化を必要とし、その後B細胞が抗体を大量に産生し得る。このT細胞についての要件は、超抗原を産生する生物による感染等の稀な場合にはバイパスされることがあり、前記超抗原とはB細胞のポリクローナルな活性化を開始することができ、或いは非特異的方式でT細胞の受容体のサブユニットの1つに直接結合することによりT細胞のポリクローナルな活性化さえも開始することができる抗原である。別の説明によれば、分子擬態による自己免疫疾患が考えられる。外因性抗原は、特定の宿主抗原と類似の構造を共有していることがあるため、該外因性抗原（自己抗原を擬態している）に対して産生された任意の抗体も、理論上は宿主抗原に結合し免疫応答を増強することができる。分子擬態の最も印象的な形態はグループAのベータ-溶血連鎖球菌において観察されているものであるが、それは該菌がヒトの心筋と抗原を共有しておりリウマチ熱の心臓症状に関与しているためである。従って本発明は、自己抗原（タンパク質として、或いは自己抗原タンパク質をコードしているmRNA及びDNAのいずれかとして）と、典型的に免疫系を脱感作させることができる本発明の核酸分子とを含有している医薬組成物を提供することができる。

20

30

40

【0152】

本発明はまた、上記適応症を治療するため、例えば、上述の腫瘍、自己免疫疾患、アレルギー、及び感染性疾患を治療するための本発明に係る医薬組成物或いは本発明に係るワ

50

クチンの調製における、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される少なくとも 1 種の本発明の核酸分子の使用に関する。或いは、本発明は、上記腫瘍或いは感染性疾患を治療するための、上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される少なくとも 1 種の核酸分子の (治療的) 使用に関する。

【 0 1 5 3 】

同様に本発明はキット、例えば複数のパーツからなるキットであって、各パーツが本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される少なくとも 1 種の核酸分子、本発明に係る医薬組成物、並びに本発明に係るワクチンの少なくともいずれかと、任意的に上で定義した本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される少なくとも 1 種の核酸分子、本発明に係る医薬組成物、並びに本発明に係るワクチンの少なくともいずれかの投与及び用量に関する情報を記載した使用説明書とを備えるキットに関する。

10

【 0 1 5 4 】

医薬として有効な量の本発明に係る核酸分子を、それを必要としている患者に投与することによる、癌疾患、感染性疾患、自己免疫疾患、及びアレルギーからなる群から選択される疾病或いは疾患の治療方法。

【 実施例 】

20

【 0 1 5 5 】

以下の実施例は本発明を更に説明することを意図する。該実施例は本発明の対象を該実施例に限定することを意図するものではない。

【 0 1 5 6 】

1 . 本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される例示的な核酸分子の合成

ホスホロアミダイト法 (chemistry) を用いて自動固相合成により、本発明に係る一般式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される核酸分子の例として、RNA オリゴヌクレオチドを調製した (配列番号 8 4 ~ 8 5 (式 (I))、配列番号 8 6 ~ 8 7 (式 (I a))、配列番号 8 8 ~ 9 4 (式 (I I)、(I I a)、及び (I I b))、及び配列番号 1 0 7 ~ 1 0 8 (式 (I I I a) 及び (I I I b)) を含む)。いずれも場合もヌクレオチドの RNA 特異的 2' - ヒドロキシル基を T B D M S 保護基で保護した。ホスホロチオエートの合成では、酸化に B e a u c a g e 試薬を用いた。メチルアミンを用いて担体物質の切断及び塩基不安定性保護基の切断を行い、トリエチルアミンヒドロフルオリドを作用させて T B D M S 保護基を切断した。

30

【 0 1 5 7 】

粗生成物を H P L C、イオン対クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、或いは上記 2 種の方法の組み合わせにより精製し、脱塩し、乾燥させた。生成物の純度及び正確な塩基組成を質量分析により測定した。

40

【 0 1 5 8 】

代替法によれば、本発明の配列を有する DNA ベクター或いはオリゴヌクレオチド配列に基づくインビトロ翻訳により上記配列を調製した。

【 0 1 5 9 】

2 . 本発明に係る式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される例示的な核酸分子のインビトロ免疫賦活

a) マウス B D M C (骨髄由来樹状細胞) を刺激するために、オリゴフェクタミン 3 μ L と F C S 不含 I M D M 培地 (B i o W h i t t a k e r、カタログ番号 B E 1 2 - 7 2 2 F) 3 0 μ L とを混合し、室温で 5 分間インキュベートした。RNA 形態である配列番

50

号84~94及び配列番号107~108で表される核酸配列を有する核酸分子(1実験につきそれぞれの種類の核酸分子を用いた)6 μ gをFCS不含IMDM培地60 μ Lと混合し、オリゴフェクタミン/IMDMと混合し、室温で20分間インキュベートした。次いでこの混合物(33 μ L)を、FCS不含IMDM培地200 μ L中に200,000個のマウスBDMCを含む96ウェルマイクロタイター培養プレートのウェル内で一晚培養した。4時間後20%FCS含有IMDM100 μ Lを添加し、16時間共培養し、上清を除去し、サイトカインELISAによりインターロイキン-6(IL-6)及びインターロイキン-12(IL-12)について試験した。プロタミンと複合体化された免疫賦活作用を有する - ガラクトシダーゼ(LacZ)の非キャッピング野生型mRNAを用いて上記配列と同様にして比較試験を行った。

10

【0160】

RNAとして存在している本発明に係る一般式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子、具体的には配列番号84~94及び配列番号107~108で表される本発明に係る配列が、固有免疫反応を賦活する優れた免疫賦活性を有することを示すことができた。

【0161】

b) フィコール密度勾配法を用い、X-VIVO-15培地(BioWhittaker、カタログ番号BE04-418Q)中で一晚培養することによりヒトPBMCを得た。該培地はRNA形態である本発明に係る一般式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子、具体的には配列番号84~94及び配列番号107~108で表される核酸配列を有する本発明に係る核酸分子の存在下(10 μ g/mL)で(1実験につきそれぞれの種類の核酸分子を用いた)1%のグルタミン及び1%のペニシリンを含有していた。

20

【0162】

賦活のために、オリゴフェクタミン3 μ LをX-VIVO-15培地(BioWhittaker、カタログ番号BE04-418Q)30 μ Lと混合し、室温で5分間インキュベートした。RNA形態の本発明に係る一般式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子、具体的には配列番号84~94及び配列番号107~108で表される核酸配列を有する核酸分子(1実験につきそれぞれの種類の核酸分子を用いた)6 μ gをX-VIVO-15培地(BioWhittaker、カタログ番号BE04-418Q)60 μ Lと混合し、オリゴフェクタミン/X-VIVO-15培地と混合し、室温で20分間インキュベートした。次いでこの混合物(33 μ L)を、FCS不含IMDM培地(BioWhittaker、カタログ番号BE04-418Q)200 μ L中に200,000個のマウスBDMCを含む96ウェルマイクロタイター培養プレートのウェル内で一晚培養した。16時間共培養した後、上清を除去し、サイトカインELISAによりインターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-12(IL-12)、及びTNFについて試験した。免疫賦活オリゴRNA40(5'-GCCCGUCUGUUGUGUGACUC-3'、配列番号113)を用いて本発明に係る配列(上記)と同様にして比較試験を行った。

30

40

【0163】

RNA形態の本発明の核酸分子、具体的には上で定義した本発明に係る一般式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される本発明に係る配列が優れた免疫賦活性を有することを示すことができた。

【0164】

3. 本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される例示的な核酸分子のインビトロ免疫賦活-アジュバントとしての使用

実験0日目及び10日目に、BALB/cマウス(1群当たり5匹)に - ガラクトシ

50

ダーゼタンパク質及びアジュバント（本明細書で定義）を注入した。20日目にマウスを屠殺し、ELISAを用いた - ガラクトシダーゼタンパク質に対する抗体試験に血清を使用した。上記インビトロ培養と同様にしてIL-6、IL-12、及びTNF 値を測定した。

【0165】

4. 式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子の形態の本発明に係るアジュバントによるヒト細胞の刺激

a) アジュバント形態の上で定義した本発明に係る一般式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される核酸分子、具体的には配列番号84~94及び配列番号107~108で表される核酸配列を有する核酸分子(1実験につきそれぞれの種類の核酸分子を用いた)の免疫原性を測定するために、ヒト細胞と共培養した。この目的のために、例えば2mMのL-グルタミン(BioWhittaker)、10U/mLのペニシリン(BioWhittaker)、及び10µg/mLのストレプトマイシンで富化したX-VIVO-15培地(BioWhittaker、カタログ番号BE04-418Q)中で、10µg/mLのRNA(-ガラクトシダーゼをコードしているmRNA)及び任意的に10µg/mLのプロタミンとヒトPBMC細胞とを16時間共培養した。上清を除去し、IL-6及びTNF の放出をELISAを用いて分析した。

10

【0166】

b) 更なる実験では、本発明に係る式(I)、(Ia)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIIa)及び(IIIb)の少なくともいずれかで表される本発明の核酸分子(配列番号84~94及び配列番号107~108、1実験につきそれぞれの種類の核酸分子を用いた、上記)と本発明に従って用いられるアジュバントで刺激した後、ヒトPBMC細胞によるTNF の放出を測定した。

20

【0167】

この目的のために、2mMのL-グルタミン(BioWhittaker)、10U/mLのペニシリン(BioWhittaker)、及び10µg/mLのストレプトマイシンで富化したX-VIVO-15培地(BioWhittaker)中で、10µg/mLの前記本発明の核酸分子とヒトPBMC細胞とを16時間共培養した。

30

【0168】

5. ヒトPBMCにおけるTNF 及びIFN の分泌

この実験では、上で定義した式(I)に係る本発明の核酸分子のうち数種、即ち配列番号114~119で表されるmRNA配列を有する核酸分子とDOTAP(Roche)とを配合した。

【0169】

この実験で用いた本発明の核酸配列は、
 配列番号114(R820/(N100)₂);
 配列番号115(R719/(N100)₅);
 配列番号116(R720/(N100)₁₀);
 配列番号117(R821/(N40T20N40)₂);
 配列番号118(R722/(N40T20N40)₅);及び
 配列番号119(R723/(N40T20N40)₁₀)
 であった。

40

【0170】

次いで8µg/mL及び12µg/mLの濃度のDOTAPを配合したRNAでヒトPBMCを20時間刺激した。次いでmatched-pairedELISAを用いて上清のTNF 及びIFN 分泌について調べた。

【0171】

この実験では、フィコール密度勾配法を用い、X-VIVO-15培地(BioWhi

50

t t a k e r、カタログ番号 B E 0 4 - 4 1 8 Q) 中で 2 0 時間培養することによりヒト P B M C を得た。該培地は、それぞれ I F N 或いは T N F を刺激するために $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ 或いは $4 \mu\text{g} / \text{mL}$ の上記核酸分子の存在下で 1 % のグルタミン及び 1 % のペニシリンを含有していた。配合及び刺激のために、 $3 \mu\text{g}$ 或いは $6 \mu\text{g}$ の R N A - H B S 緩衝液を、 $18 \mu\text{g}$ の N - [1 - (2 , 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル] - N , N , N トリメチルアンモニウムメチルスルフェート (D O T A P) (R o c h e D i a g n o s t i c s、カタログ番号 1 1 8 1 1 1 7 7 0 0 1) - H B S 緩衝液を収容しているバイアル瓶に移し、混合物を数回穏やかにピペティングすることにより注意深く混合した。トランスフェクション用混合物を 1 5 分間 $15 \sim 25$ でインキュベートした。次いで 1 体積 (v o l u m e) の D O T A P / 核酸分子混合物を 7 . 3 体積の X - V i v o 培地

10

で静かに希釈した。次いでこの混合物 ($100 \mu\text{L}$) を、X - V I V O - 1 5 培地 (B i o W h i t t a k e r、カタログ番号 B E 0 4 - 4 1 8 Q) $100 \mu\text{L}$ 中に 2×10^5 個の P B M C を含む 9 6 ウェルマイクロタイター培養プレートのウェル内で一晚培養した。2 0 時間、共にインキュベートした後、上清を除去し、サイトカイン E L I S A により I F N 及び T N F について試験した。免疫賦活オリゴ $G_2 U_{20} G_2$ (ホスホロチオエートで修飾されている)、ポリ (U) (S i g m a , T a u f k i r c h e n , G e r m a n y)、及びオリゴ U_{21} (ホスホジエステル) を用いて本発明に係る配列 (上記) と同様に比較試験を行った。

【 0 1 7 2 】

結果を図 1 及び図 2 に示す。図 1 は、D O T A P を配合した R N A の T N F 誘導能を示す。P B M C を 2×10^5 / ウェル / $200 \mu\text{L}$ (培地) の密度で播種し、D O T A P ($12 \mu\text{g} / \text{mL}$) を配合した R N A ($4 \mu\text{g} / \text{mL}$) で 2 0 時間刺激した。次いで無細胞上清を用いて I F N - E L I S A を行った。図 2 は、D O T A P を配合した R N A の T N F 誘導能を示す。P B M C を 2×10^5 / ウェル / $200 \mu\text{L}$ (培地) の密度で播種し、D O T A P ($12 \mu\text{g} / \text{mL}$) を配合した R N A ($2 \mu\text{g} / \text{mL}$) で 2 0 時間刺激した。次いで無細胞上清を用いて I F N - E L I S A を行った。

20

【 0 1 7 3 】

図 1 及び図 2 から分かるように、T N F 及び I F N の分泌は、対照配列である $G_2 U_{20} G_2$ (ホスホロチオエートで修飾されている)、P o l y (U) (S i g m a , T a u f k i r c h e n , G e r m a n y)、及びオリゴ U_{21} (ホスホジエステル) に

30

比べて、式 (I) に係る本発明の核酸分子により共に著しく誘導され、上で定義した式 (I) に係る配列番号 1 1 4 ~ 1 1 9 で表される本発明の核酸分子に係る m R N A 配列、即ち配列番号 1 1 4 ~ 1 1 9 で表される m R N A 配列 (配列番号 1 1 4 (R 8 2 0 / (N 1 0 0) ₂)、配列番号 1 1 5 (R 7 1 9 / (N 1 0 0) ₅)、配列番号 1 1 6 (R 7 2 0 / (N 1 0 0) ₁₀)、配列番号 1 1 7 (R 8 2 1 / (N 4 0 T 2 0 N 4 0) ₂)、配列番号 1 1 8 (R 7 2 2 / (N 4 0 T 2 0 N 4 0) ₅)、及び配列番号 1 1 9 (R 7 2 3 / (N 4 0 T 2 0 N 4 0) ₁₀)) によって特に著しく誘導された。

【 0 1 7 4 】

本発明の利点

本発明に係る一般式 (I)、(I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b) の少なくともいずれかで表される本発明の核酸分子は、治療される患者の固有免疫系を賦活するための免疫賦活剤として用いることができる。この免疫賦活特性は、例えば脂質修飾或いは追加的アジュバントの添加等、本発明の核酸分子に対する固有免疫反応を活発に賦活する化合物として当該技術分野において既知である他の化合物の添加により増強することができる。上で定義した本発明の核酸分子、具体的には構造 ($N_u G_1 X_m G_n N_v$) _a を有する式 (I) に係る核酸分子及びその誘導体のいずれかは、例えば大腸菌等の細菌において著しく速やかに増幅される。式 (I) の本発明の核酸分子 ($N_v G_1 X_m G_n N_u$) _a 及びその誘導体のいずれかが部分的二本鎖核酸分子、及び単鎖核酸分子と二本鎖核酸分子との混合物のいずれかである場合更により有利である。その理由は、該式 (I) (或いは式 (I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I

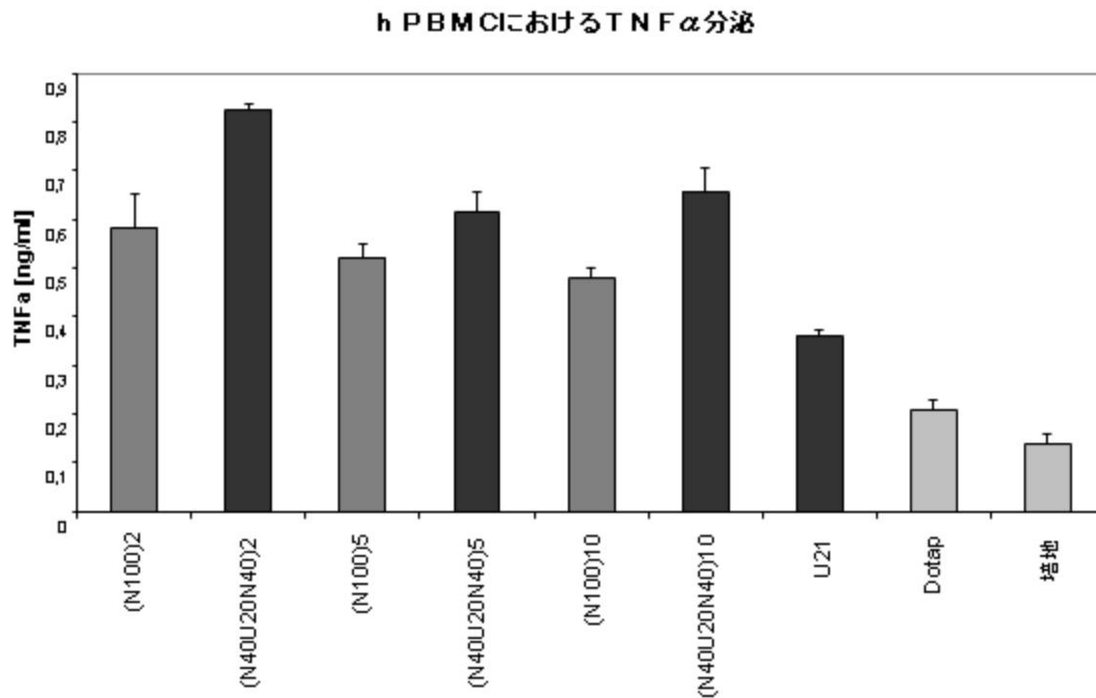
40

50

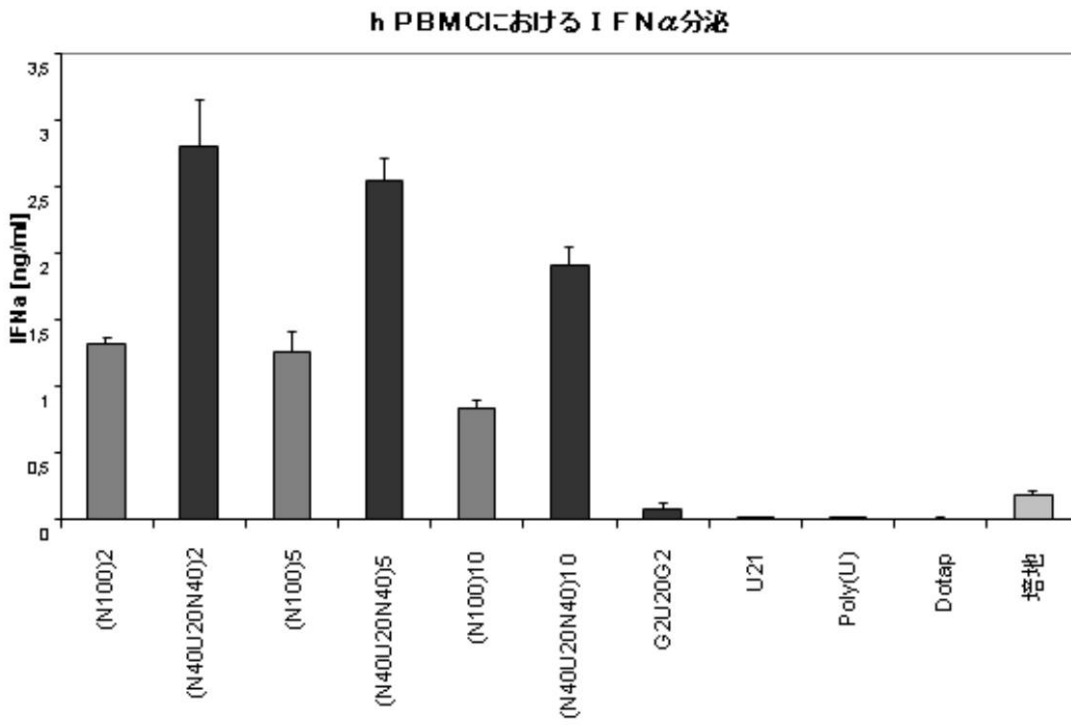
a) 及び (I I I b) の少なくともいずれか) に係る本発明の (部分的二本鎖) 核酸分子は、単鎖 RNA に対する PAMP (病原体関連分子パターン) 受容体 (TLR - 7 及び TLR - 8)、及び二本鎖 RNA に対する PAMP 受容体 (TLR - 3、RIG - I、及び MDA - 5) に対応することにより、治療される患者の自然免疫反応を正に刺激することができるためである。受容体 TLR - 3、TLR - 7、及び TLR - 8 はエンドソームに位置し、エンドソームに取り込まれた RNA により活性化される。対照的に RIG - I 及び MDA - 5 は細胞質性受容体であり、細胞質に直接取り込まれた、或いはエンドソームから放出された (エンドソーム放出或いはエンドソーム脱出) RNA により活性化される。従って、式 (I) の本発明の部分的二本鎖核酸分子 ($N_u G_l X_m G_n N_v$)_a (或いは、その誘導体、例えば以下に定義する式 (I a)、(I I)、(I I a)、(I I b)、(I I I a) 及び (I I I b)) に係る本発明の (部分的二本鎖) 核酸分子) は、免疫賦活の様々なシグナル伝達カスケードを活性化することができ、それによって自然免疫反応を導くか、或いは自然免疫反応を著しく増強する。本発明の更なる利点は、固有免疫系を賦活するのに好ましい抗ウイルス性サイトカイン IFN を著しく誘導することである。それほど重要視されていないことが多いが、一般的に認められている免疫賦活核酸分子 (例えばポリ A : U 及びポリ I : C) は構造が不確定であり、そのために調節が限定される。

10

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

[0005721441000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16
A 6 1 P	31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P	31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20
A 6 1 P	31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/22
A 6 1 P	33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00
A 6 1 P	33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02
A 6 1 P	33/04 (2006.01)	A 6 1 P 33/04
A 6 1 P	33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06
A 6 1 P	33/10 (2006.01)	A 6 1 P 33/10
A 6 1 P	33/12 (2006.01)	A 6 1 P 33/12
A 6 1 P	33/14 (2006.01)	A 6 1 P 33/14

(74)代理人 100136858

弁理士 池田 浩

(72)発明者 トーマス・クランプス

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 2 テュービンゲン エバートシュトラッセ 5 1

(72)発明者 ツェーンケ・フォス

ドイツ連邦共和国 6 9 2 1 1 ドッセンハイム プラタネンヴェーク 1

(72)発明者 ヨッヘン・プロプスト

ドイツ連邦共和国 7 2 6 4 9 ヴォルフシュルレーゲン キリヒーホフレンデルン 1 9

(72)発明者 イングマル・ヘル

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 2 テュービンゲン シャルロットテンシュトラッセ 1 6

審査官 北田 祐介

(56)参考文献 特表2007-526253(JP,A)

国際公開第2007/051303(WO,A1)

Science, 2004年, 第303巻, 1526-1529ページ

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

A 6 1 K 3 1 / 7 1 0 5

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

P u b M e d