

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3976742号

(P3976742)

(45) 発行日 平成19年9月19日(2007.9.19)

(24) 登録日 平成19年6月29日(2007.6.29)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
請求項の数 4 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-53795 (P2004-53795)	(73) 特許権者	390013837 江守商事株式会社
(22) 出願日	平成16年2月27日(2004.2.27)		福井県福井市毛矢1丁目6番23号
(65) 公開番号	特開2005-237328 (P2005-237328A)	(73) 特許権者	504145320 国立大学法人福井大学
(43) 公開日	平成17年9月8日(2005.9.8)		福井県福井市文京3丁目9番1号
審査請求日	平成16年2月27日(2004.2.27)	(73) 特許権者	591222245 国立感染症研究所長
			東京都新宿区戸山一丁目23番1号
		(73) 特許権者	503104900 財団法人 ふくい産業支援センター
			福井県坂井市丸岡町熊堂3-7-1-16
		(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターフェロンアルファを誘導する免疫刺激オリゴヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記塩基配列：

GGGGGGGGGACGATCGTCG (配列番号：7)

から成る免疫刺激オリゴヌクレオチド。

【請求項2】

請求項1に記載の、配列番号7の塩基配列から成る免疫刺激オリゴヌクレオチドを有効成分として含む医薬。

【請求項3】

請求項1に記載の、配列番号7の塩基配列から成る免疫刺激オリゴヌクレオチドを有効成分とし、さらに免疫調節因子を含む医薬。 10

【請求項4】

前記免疫調節因子が抗原又はアジュバントである、請求項2又は3に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、従来のCpG DNAが有するインターフェロンアルファ (IFN-) 誘導活性よりも十倍以上強力な誘導活性を有するオリゴヌクレオチドの配列に関するものである。

【背景技術】

【0002】

細菌DNAの免疫刺激活性の発見と塩基配列：細菌DNAに出現頻度の高い、メチル化されていないシトシン・グアニンジヌクレオチド（5'-CpG-3'）を含む特定の塩基配列（CpG DNA）はToll-Like Receptor 9（TLR9）に認識されて哺乳動物の免疫系を活性化し、Th1免疫反応を誘導する。この概念の成立は、Tokunaga / Yamamotoらによる、BCGのDNA画分がI型インターフェロン（IFN）の産生とそれによって誘導されるNK細胞の活性化を惹起し、抗腫瘍効果を示すとの報告（Tokunaga T., et al. J. Natl. Cancer. Inst.72:955-62(1984)）に端を発する。

【0003】

一連の研究において彼らは、活性のある配列として細菌DNAに出現頻度の高いパリンδροーム型CpG DNAを同定した（Yamamoto S., et al. J. Immunol.148:4072-6(1992)）。その後いくつかのグループからマウスやヒトB細胞に対する大腸菌DNA や非アンチセンスDNAによる免疫刺激活性が示され、非メチル化CpGを有しその両端に特定の塩基が配置された5'-PuPuCpGPyPy-3'がマウスB細胞活性化モチーフとしてKriegら（Krieg AM., et al. Nature.374:546-9(1995)）により報告された。免疫刺激活性を示すCpG DNAには他にもユニークな配列が提示されているが、現在のところIFN誘導型、B細胞活性化型、その混合型に大別される（Verthelyi D., et al. Trends Immunol.24:519-22(2003)）。

【0004】

マウスNK細胞を活性化する塩基配列について：Tokunaga / Yamamotoのグループは、活性のある塩基配列を特定するためBCG蛋白をコードするcDNAから一定の長さの塩基配列を無作為に選び合成した。30鎖長塩基5'-ACCGATNNNNNGCCGGTGACGGCACCACG-3'（Nは相補的塩基対）について検討した結果、NK活性の亢進にはNの部分がCpGを含み、片側の連続した3塩基にその相補的塩基が続いてパリンδροーム構造をなすことが重要と考えた（Yamamoto S., et al. J. Immunol.148:4072-6(1992)）。

【0005】

KriegらはマウスB細胞活性化モチーフPuPuCpGPyPy（特にGACGTTが強力）にもNK活性亢進作用がある事から、NK細胞の活性化にとって重要な配列は非メチル化CpGであり、次に特定の塩基が結合することが必要であるが、そのモチーフがパリンδροーム配列をとる必要はないと考えた（Krieg AM., et al. Nature.374:546-9(1995)；Ballas ZK., et al. J. Immunol.157:1840-5(1996)）。Boggsらは、CpGジヌクレオチドは必要であるがそれだけではNK細胞を活性化できず、CpGを囲む特定の塩基と背景配列およびそのチオール化やメチル化等の修飾形態がCpG DNAのNK細胞活性化を規定すると報告している（Boggs RL., et al. Antisense & Nucleic Acid Drug Development7:461-71(1997)）。例えば、CpG DNAをチオール化するとNK細胞活性化作用は減弱する。

【0006】

また、活性モチーフのCpGをメチル化するとNK活性は低下する。ただし、モチーフの塩基配列によってはCpGをメチル化しても活性が保たれていることもある。この場合、CpG DNAの全てのシトシンをメチル化すると活性は完全に失われる。これまでに報告されたNK活性亢進作用のあるCpG DNAは、そのモチーフがパリンδροームやPuPuCpGPyPyに限定されず、非メチル化CpGを中心にその外側に特定の塩基配列を配して6鎖長で構成されていることから、CpG DNAによるNK活性の亢進は、活性モチーフとその背景配列を含む全塩基配列およびその修飾形態によって構築される高次構造によって誘導されると考えられる。

【0007】

マウスNK細胞がCpG DNAに反応するには活性化される必要がある：Yamamotoらは、CpG DNAによるNK活性の亢進は、NK細胞以外の細胞により産生されたType-I IFNを介していることを示した（Yamamoto S., et al. J. Immunol.148:4072-6(1992)）。Klinmanらは、CpG DNAで誘導されるマウス脾細胞のIFN- γ 産生細胞はNK細胞であるが、そのIFN- γ 産生はIL-12抗体で阻止されることを報告している（Klinman DM., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.93:2879-83(1996)）。Halpernらは、細菌DNAやCpG DNAが単球/マクロファージを刺激してIL-12やTNF- α の産生を誘導し、その結果、非付着細胞からIFN- γ が産生されることを示した（Halpern MD., et al. Cellular Immunol.167:72-8(1996)）。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

Ballasらは、NK細胞はIL-12、IFN- γ 、及びTNF- α の存在下でCpG DNAに反応してNK活性が亢進することを示した。ChaceらもNK細胞の活性化はマクロファージ依存性であり、NK細胞はIL-12で活性化されると細菌DNAに対する反応性を獲得してIFN- γ 産生が増幅されると報告している (Ballas ZK., et al. J. Immunol. 157:1840-5(1996))。これらの結果より、活性化されていないマウスNK細胞はCpG DNAに反応できないが、CpG DNA刺激単球/マクロファージに由来するサイトカインの刺激を受けると活性化され、CpG DNA反応性を獲得すると考えられる。

【 0 0 0 9 】

CpG DNAによるヒトNK細胞の活性化： CpG DNAの作用はマウスの免疫系では顕著に現れるが、ヒトの系では概して反応性が低い。しかし、BCG DNAの宿主免疫介在性抗腫瘍活性は1980年代に報告されており、in vivo 及びin vitroいずれの系においてもNK活性が亢進する。一方、ヒト末梢血単核球 (PBMC) は、CpG DNA刺激によってIFN- γ やIL-12, IL-18を産生し、IL-12刺激を介してIFN- γ 産生が誘導される (Bohle B., et al. Eur. J. Immunol. 29:2344-53(1999))。これらの結果は、ヒトにおいてもマウスと同様に、樹状細胞や単球/マクロファージがCpG DNAによるNK細胞の活性化にかかわっていることを示唆している。

10

【 0 0 1 0 】

Ihoらは、ヒト単核球をBCG DNAで刺激してもIL-12の産生が顕著に誘導されないことから、ヒトではCpG DNAの作用機構や活性配列がマウスと異なっていると想定した。実際に、マウスにおいて活性があると報告されているPuPuCpGPyPy型CpG DNAのうち、B細胞を活性化する#1643 (gagaacgctcgaccttcgat)、IFN- γ を誘導する#1618 (tccatgacgttccttgatgct)、NK細胞を活性化するアンチセンスDNA#1758 (tctcccagcgtgcgccat)、及びヒトB細胞を活性化する#2105 (ttgcttccatcttctcgtc) についてIFN- γ 産生を指標にNK細胞の活性化を検討したが、いずれの配列も精製したヒトNK (CD56⁺) 細胞を活性化することはなかった。

20

【 0 0 1 1 】

そこでBCG蛋白をコードするcDNAのうち、特定の6鎖長CpGパリンδροーム (NNNNNN) を含む30鎖長DNA (Iho S., et al. J. Immunol. 163:3642-52(1999))、accgatNNNNN gccggtgacggcaccacg、10種について検討したところ、そのうち7種にIFN- γ 誘導活性を認めた。次に、ヒトNK細胞の活性化に有効でないマウスB細胞活性化モチーフaacgctとaacgtcを、ヒトNK細胞を活性化したCpG DNAの背景配列に挿入して、accgataacgctgccggtgacggcaccacgとaccgataaacgctgccggtgacggcaccacg (アンダーラインで示す配列を挿入) を合成し検討したが、活性は認められなかった。このことから、CpG DNAがNK細胞に認識されるには、CpG DNAの活性モチーフがパリンδροーム構造をとる必要があると考えた。

30

【 0 0 1 2 】

しかし、同一配列においてもIFN- γ 産生量がドナー間で変動し、至適配列にも個人差があったので、活性の弱いaccgatcgatcggccggtgacggcaccacgについて、アンダーラインのパリンδροーム部CGATCGの両側にそれぞれ12鎖のGを付加し (g12CGA) 検討した。Gを付加した理由は、ポリGは細胞親和性が高いうえDNAの高次構造を安定化させるからである。予想どおり、G付加によりCGATCGのIFN- γ 誘導活性は上昇した。さらに強い活性を有する配列を求めて検討したところ、g12CGAのパリンδροーム部を10塩基に反復伸長し、側鎖のそれぞれに10鎖のGを付加した全長30鎖のg10GACGA (GGGGGGGGGACGATCGGGGGGGGG) に、より強い活性が認められた。

40

【 0 0 1 3 】

G10GACGAは1999年当時報告されていたヒトNK細胞活性化配列のなかでは最も強い活性を有する配列である。後述するように、NK細胞は活性化されると高いCpG DNA反応性を示すが、G10GACGAによるIFN- γ の誘導は、抗IFN- γ 抗体などで非NK細胞由来サイトカインを中和しても消失しないので、ヒトNK細胞はCpG DNAに反応する能力を備えていると考えられる。G10GACGAにより産生されたIFN- γ はオートクライン反応によりNK活性を亢進し、CD69

50

、HLA-ABCの発現を誘導する。

【0014】

活性化ヒトNK細胞のCpG DNA反応性：活性化されたNK細胞は、活性化されていないNK細胞に比べてCpG DNA反応性が高い (Iho S., et al. J. Immunol.163:3642-52(1999))。これは、非刺激NK細胞ではCpG DNAレセプターであるTLR9の発現が弱いことと一致している (Krug A., et al. J.Immunol.31:2154-63(2001))。しかし、NK細胞の活性化によりTLR9が誘導されるという報告はなく、活性化によってCpG DNA反応性が亢進するメカニズムは不明である。また、IL-2で活性化したNK細胞は非パリンδροーム型CpG DNAにも反応する (Iho S., et al. J. Immunol.163:3642-52(1999)) ので、CpG DNAの配列選択性についても検討が必要とされる。

10

【0015】

ヒトNK細胞とマウスNK細胞のCpG DNA反応性の違い：ヒトNK細胞は活性化されてなくともCpG DNAに反応するが、マウスNK細胞は活性化されなければCpG DNAに反応しない。この反応性の違いについてはよくわかっていない。Ballasらは、5'-と3'-の両側にGの繰り返し配列を有するCpGパリンδροーム (Ballas ZK., et al. J.Immunol.157:1840-5(1996)) について検討したが、純化したマウスNK細胞やヒトNK細胞のいずれも活性化できなかった。Krugらの#2216 (Krug A., et al. J.Immunol.31:2154-63(2001)) は、GACGATCGTCを有するがヒトNK細胞を活性化しない。我々のg10GACGAとBallas / KrugらのCpG DNAの違いは、付加されたポリGの数とその修飾である。前者は非修飾型で、後者は一部がチオール化されている。

20

【0016】

DNAのチオール化はDNase抵抗性を高めるが、DNA結合蛋白との相互作用が弱められるため免疫刺激活性の低下を招く。従って、チオール修飾がNK細胞のCpG 反応性を低下させている可能性がある。一方、ポリGを背景配列にもつ非修飾型CpGパリンδροームでもgggggggggggggaacgttgggggggggggggのように活性のないものがある (Iho S., et al. J. Immunol. 163:3642-52(1999))。パリンδροーム塩基の配列や長さも重要な要素と考えられる。後にヒトの細胞はマウス活性化モチーフに低反応性であることが報告されており、霊長類においてもCpG DNAに対する反応性が、ヒト・チンパンジー・サル間で異なることが判った事から、現在ではCpG DNA反応性には種差があるとのコンセンサスが得られている (Hartmann G., et al. J. Immunol.164:1617-24(2000))。さらにCpG DNA配列には細胞選択性があることも明らかになってきている (Verthelyi D., et al. Trends Immunol.24:519-22(2003))。

30

【0017】

CpG DNAの細胞内取り込みとTLR9による認識：最近の研究で、CpG DNAはTLR9のリガンドであることが明らかにされた (Hemmi H., et al. Nature408:740-5(2000))。共焦点顕微鏡による観察では、CpG DNAの細胞膜への結合および細胞内取り込みに配列特異性はないが、CpG DNAはエンドゾームにTLR9と共に局在することが認められている。従って、CpG DNAはエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれ、エンドゾーム膜に存在するTLR9により認識されると考えられている。CpG DNAが生物活性を示すにはエンドゾームで何らかの修飾を受けることが必要である。CpG DNAが細胞に取り込まれてTLR9に認識される過程、およびTLR9下流のシグナル伝達には複数分子の共同作業が必要であると考えられており、研究が進められている。

40

【0018】

CpG DNAのシグナル伝達：CpG DNAの細胞内取り込みはCpG非特異的に行われるが、TLR9による認識から生物活性の発現にいたる過程はCpG特異的である。TLR9を強く発現する細胞はヒト末梢血では主にB細胞や形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells:PD C) である (Hornung V., et al. J.Immunol.168:4531-7(2002))。CpG DNA刺激B細胞においてはp38とJNKの活性化が非常に早い時期に起こり、転写因子AP-1のDNA結合能が増加し関連遺伝子の転写が亢進する (Hartmann G., et al. J. Immunol.164:944-52(2000))。

【0019】

50

PDCでは、CpG DNAはエンドサイトーシスによって取り込まれることによりTLR9に認識され、p38 MAPKの活性化をもたらす。続いてSTAT1がリン酸化され、STAT2、IRF-9と共にISGF3を形成する。これによってIRF-7遺伝子の転写が亢進し、産生されたIRF-7がIFN- γ 遺伝子の転写を誘導し、IFN- γ が産生される。さらに、細胞外に分泌されたIFN- γ がフィードバックしてJAK-STAT経路を刺激することにより大量のIFN- γ が産生される (Takauji R., et al. J. Leukoc. Biol.72:1011-1019(2002))。

【0020】

ポリG付加パリンドロームCpG DNAの重要性：CpG DNAは、CpGジヌクレオチドを含む最低6鎖の塩基が中心となって標的細胞に認識されるが、その活性は中心配列のみでなく、それを取り囲む塩基（背景塩基）の僅かな違いによって、大きく異なってくる。PDCに直接IFN- γ の産生を誘導し、さらにオートクライン反応により大量のIFN- γ を産生させるには、CpG DNAの中心配列がパリンドローム構造をとることが重要である。次に、その長さや位置、および両側塩基の種類が活性を左右する要因としてあげられる。実際に、中心配列“GACGATCGTC”に細胞膜親和性の高いGを連続して付加すると高い活性が誘導される。

【0021】

一方、ポリGそのものはマウス脾細胞ではIFN- γ 産生を抑制する (Halpern MD., et al. Immunopharmacology 29:47-52(1995)) ことから、Gの付加は活性の消失・抑制にも影響することが懸念される。このことは、見方を変えれば、パリンドローム配列とGの付加様式を変えることでCpG DNA活性が調節でき、特定のサイトカインを選択的に誘導するCpG DNAが開発できる可能性を示している。実際、ポリG付加パリンドロームCpG DNAはPBMCにおいてIFN- γ やIFN- β 産生を強く誘導するが、IL-12やIL-6は誘導しない。この配列はその後の研究でDまたはAタイプオリゴと呼ばれることになり、Kuramoto/Ihoらが1992年 (Kuramoto E., et al. Jpn. J. Cancer Res. 83:1128-31(1992)) と1999年に報告したG10GACGAはこのタイプに含まれる。

【0022】

連続的グアニンで構成されるDNA配列は、ポリG配列やG-カルテットと呼ばれており、CpG DNAの細胞内取り込みを増大させる。従って、ポリG付加パリンドロームCpG DNAでは、パリンドローム塩基配列により二重鎖重複領域が形成され、その末尾に付加されたポリGが、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗性を高め、DNAの高次構造を安定化させることにより活性発現が効率よく行われると考えられる。実際、ポリGを導入したCpG パリンドロームDNAはIFN- γ やCXCL10誘導活性が高い。従って、Th1免疫反応が効率的に誘導されることが考えられ、癌、アレルギー、及び感染症治療への有用性が期待できる。動物実験では、通常、チオール修飾CpG DNAが用いられるが、致命的な副作用をもたらすことが報告されている。これらのことから、安全で効果の高いTh1免疫刺激活性を有する非修飾型のポリG付加パリンドロームCpG DNAを開発することが重要である。

【0023】

【特許文献1】公表特許公報(A)2002-510644

【特許文献2】公表特許公報(A)2002-517156

【0024】

【非特許文献1】Tokunaga T., et al. J. Natl. Cancer. Inst.72:955-62(1984)

【非特許文献2】Yamamoto S., et al. J. Immunol.148:4072-6(1992)

【非特許文献3】Krieg AM., et al. Nature.374:546-9(1995)

【非特許文献4】Verthelyi D., et al. Trends Immunol.24:519-22(2003)

【非特許文献5】Ballas ZK., et al. J. Immunol.157:1840-5(1996)

【非特許文献6】Boggs RL., et al. Antisense & Nucleic Acid Drug Development7:461-71(1997)

【非特許文献7】Klinman DM., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.93:2879-83(1996)

【非特許文献8】Halpern MD., et al. Cellular Immunol.167:72-8(1996)

【非特許文献9】Bohle B., et al. Eur. J. Immunol.29:2344-53(1999)

【0025】

10

20

30

40

50

- 【非特許文献10】 Iho S., et al. J. Immunol.163:3642-52(1999)
 【非特許文献11】 Krug A., et al. J. Immunol.31:2154-63(2001)
 【非特許文献12】 Hornung V., et al. J. Immunol.168:4531-7(2002)
 【非特許文献13】 Hartmann G., et al. J. Immunol.164:1617-24(2000)
 【非特許文献14】 Hemmi H., et al. Nature408:740-5(2000)
 【非特許文献15】 Hartmann G., et al. J. Immunol.164:944-52(2000)
 【非特許文献16】 Takauji R., et al. J. Leukoc. Biol.72:1011-1019(2002)
 【非特許文献17】 Halpern MD., et al. Immunopharmacology 29:47-52(1995)
 【非特許文献18】 Kuramoto E., et al. Jpn. J. Cancer Res.83:1128-31(1992)

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

非修飾型オリゴヌクレオチドはヌクレアーゼ分解に対する抵抗性が弱い。しかし、DNase抵抗性を高めたチオール修飾CpG DNAをマウスへ投与すると致命的な副作用をもたらす。本発明は、副作用が少なく臨床応用の可能性を有する強力なTh1免疫刺激活性を有する非修飾型CpG DNAを提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0027】

本発明者らは、上記の問題につき検討を行っていたところ、5'-Gm-GACGATCGTC-Gn-3' (m=1~3, n=9~7及びm=7~9, n=3~1, m+n=10)の一般式で示される非修飾型塩基配列を有する免疫刺激オリゴヌクレオチド組成物が、強力なIFN-誘導活性を有することを見出した。そのなかでも特に、G9-GACGATCGTC-G1やG1-GACGATCGTC-G9並びにG9-CACGATCGTG-G1が、強力なIFN-誘導活性を有することを見出した。

20

【0028】

本発明は、デカマーの自己相補的パリンδροーム配列(5'-GACGATCGTC-3')を基本骨格とするCpG DNAに関して、10個までの最適な長さのポリGをCpG DNAの5'末端及び3'末端に導入することにより、従来のCpG DNAよりも強力なTh1免疫増強作用を有する非修飾型CpG DNAの配列を見出した。

【0029】

ヒトにおいては、PDCによるIFN-とIP-10の産生はTh1免疫反応の要となっていることが示唆されている。発明者らは、CpG DNAはPDCにp38 MAPK活性化を起こし、その結果IFN-とIP-10が誘導されることを見出した。細胞外に分泌したIFN-はPDCにフィードバックしてさらに大量のIFN-とIP-10が産生される。従って、CpG DNA活性のスクリーニングには精製PDCを対象とすることが望ましいが、PDCは免疫担当細胞のなかでは僅少集団であるため、対象細胞とするには課題解決の手段として適当でない。CpG DNAレセプターであるTLR9はヒト末梢血では主にPDCとB細胞に発現しているが、CpG DNA配列には細胞選択性があり、ポリG付加パリンδροームCpG DNAはPDCに作用するがB細胞には作用しない。この特性を利用すると、PDCを含むPBMCを用いてCpG DNA活性を調査することによって、ポリG付加パリンδροームCpG DNAの活性評価が可能となる。PBMCを対象とすると、生体に近い環境で活性を評価できる利点もある。また、CpG DNAによるIFN-の産生はIP-10の産生を伴うので、PBMCのIFN-誘導活性を測定することでTh1免疫誘導型CpG DNA配列の同定が可能になる。よって、本発明ではPBMCにIFN-産生を強く誘導するCpG DNAを課題解決の手段とした。

30

40

【0030】

従って、本発明は、一般式5'-Gm-GACGATCGTC-Gn-3'又は5'-Gm-CACGATCGTG-Gn-3'(式中、m及びnはそれぞれ独立に1~9の整数であり、そしてm+n=10である)で示され、下記塩基配列:

GGACGATCGTCGGGGGGGG (配列番号: 1)

GGGACGATCGTCGGGGGGGG (配列番号: 2)

GGGGACGATCGTCGGGGGGGG (配列番号: 3)

50

GGGGGGGACGATCGTCGGGG (配列番号 : 4)

GGGGGGGACGATCGTCGGGG (配列番号 : 5)

GGGGGGGGGACGATCGTCGG (配列番号 : 6)

GGGGGGGGGACGATCGTCG (配列番号 : 7)

GGGGGGGGGCACGATCGTGG (配列番号 : 8)

の何れかから成る免疫刺激オリゴヌクレオチドを提供する。

GGGGGGGGGACGATCGTCG (配列番号 : 7) から成るオリゴヌクレオチドが特に好ましい。

【 0 0 3 1 】

本発明はまた、配列番号 1 ~ 8 の何れかの塩基配列から成る免疫刺激オリゴヌクレオチドを有効成分として含む医薬を提供する。本発明は特に、配列番号 7 の塩基配列から成る免疫刺激オリゴヌクレオチドを有効成分として含む医薬を提供する。

本発明はまた、配列番号 1 ~ 8 の何れかの塩基から成る免疫刺激オリゴヌクレオチドを有効成分とし、さらに免疫調節因子を含んでなる医薬を提供する。本発明は特に、配列番号 7 の塩基配列から成る免疫刺激オリゴヌクレオチドを有効成分とし、さらに免疫調節因子を含む医薬を提供する。前記免疫調節因子は、例えば抗原又はアジュバントである。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 2 】

本発明の中心配列であるデカヌクレオチド GACGATCGTC はパリンδροーム配列をとる。この中心配列が PDC に発現する TLR9 に認識されることによって、シグナルが惹起・伝達され、その結果、IFN- γ が誘導される。その際、5' 末端と 3' 末端のポリ G 部分と中心配列からなる高次構造が TLR9 リガンドとしての CpG DNA 活性を既定すると考えられる。従って、中心塩基 (GACGATCGTC) とその両末端に最適な長さのポリ G が導入された全塩基配列が、本発明の最も重要な部分である。

【 0 0 3 3 】

本発明は、CpG DNA を生体に投与することにより Th1 型免疫応答が誘導されるため、抗腫瘍免疫賦活剤や感染症・癌ワクチンアジュバント、および抗アレルギー剤として利用できる。

CpG DNA が被験体に投与されると抗原非特異的な自然免疫が活性化される。その後、一定期間後に抗原を投与すると、抗原特異的 Th1 免疫が強く誘導される。これらの抗原は、当該分野の公知の物質、即ち、細胞、細胞抽出物、蛋白質、ペプチド、ポリサッカライド、ポリサッカライド結合体、脂質、糖脂質、炭水化物、デオキシリボ核酸、リボ核酸、ウイルス抽出物、ウイルス、細菌、真菌、寄生生物、およびアレルギー、または抗原をコードする核酸であり、実施形態により任意に選択される。

【 0 0 3 4 】

感染性疾患の予防・治療においては、抗原は、感染性細菌、感染性ウイルス及び感染性真菌などの病原微生物由来であり、アレルギー疾患の予防・治療にはアレルギーである。被験体は、これらの抗原に対して能動的に暴露される。抗原は、コロイド分散系により送達され得る。このコロイド分散系は、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ及び脂質ベースの系からなる群より選択される。脂質ベースの系は、好ましくは水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリポソームからなる群より選択される。

別の方法として、CpG DNA は、抗原ならびに免疫調節因子 (サイトカイン、ケモカイン などを含むがこれらに限定されない) あるいは他のアジュバントと組み合わせて投与され得る。

【 0 0 3 5 】

被験体は、脊椎動物である。好ましくは、被験体はヒトである。しかし、いくつかの実施形態において、被験体は非ヒト脊椎動物である。この脊椎動物非ヒト動物は、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、霊長類、魚類、ラット、モルモット、マウスから選択される。

本発明の特有の配列を有する CpG DNA は、現在までに報告されている非修飾型 CpG 含有ヌクレオチドに比べて、IFN- γ の産生を 10 倍以上強力に誘導することを発見した事に基づい

10

20

30

40

50

ている。このIFN- γ の強力な誘導は、後に続く免疫サーキットの活性化をもたらし、結果としてTh1型免疫応答を誘導し活性化するという利点がある。

【0036】

CpG DNA投与の結果として生じるTh1型サイトカインの誘導は、細胞性免疫応答の増強（例えば、NK細胞、細胞障害性キラー細胞、Th1ヘルパー及び記憶細胞により行われるもの）を生じる。これらの応答は、ウイルス、真菌、原生動物、寄生虫および細菌感染、アレルギー疾患、結核ならびに腫瘍に対する防御的または治療的ワクチン接種において特に有益である。CpG DNAは、粘膜投与によっても利用可能である。用語「サイトカイン」は、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-3など）、インターフェロン（IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ など）、エリスロポエチン、コロニー刺激因子（例えば、G-CSF、M-CSF、GM-CSF）、及びTNF- α である。用語「アジュバント」は、免疫原性物質に添加した場合に、この混合物に暴露されたレシピエントの宿主免疫応答を非特異的に促進または増強する物質をいう。

【0037】

CpG DNAが免疫系の活性化を誘導することによって抗原特異的な免疫応答を増強することは当該分野において周知であり、多くの疾患の予防・治療に対して利用することが可能である。

本明細書中で使用される「抗原」は、免疫応答を引き起こし得る分子である。抗原としては以下に挙げられるがそれらに限定されない：細胞、細胞抽出物、多糖、多糖結合体、脂質、糖脂質、炭水化物、ペプチド、蛋白質、ウイルス、及びウイルス抽出物。用語：抗原は、宿主免疫系により外来であるとして認識される任意の型の分子である。抗原としては、癌抗原、微生物抗原及びアレルゲンが挙げられるがこれらに限定されない。

【0038】

本発明のCpG DNAは、癌抗原に対する特異的な免疫応答を刺激することにより癌を治療することに有用である。本明細書中で使用されるような「癌抗原」は、腫瘍または癌細胞の表面に会合する化合物（例えば、ペプチド）であり、そしてこの化合物が、抗原提示細胞上に発現された場合、免疫応答が引き起こされる。癌抗原としては、腫瘍または癌の免疫原性部分、腫瘍全体もしくは癌全体が挙げられる。このような抗原は、単離され得るか、または組換え的にもしくは当該分野で公知の他の手段によって調製され得る。癌または腫瘍は、以下を含むがそれらに限定されない：肝臓癌、胆肝癌、脳癌、乳癌、頸部癌、絨毛癌、結腸癌、子宮体癌、食道癌、胃癌、表皮内新生物、リンパ腫、肺癌、黒色腫、神経芽腫、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、肉腫、皮膚癌、精巣癌、甲状腺癌及び腎臓癌ならびに他の癌腫及び肉腫。

【0039】

本発明のCpG DNAはまた、感染性疾患を治療するために有用である。感染性疾患は、本明細書中で使用される場合、病原性微生物の体内への侵入または常在菌の異常増殖から生じる疾患である。CpG DNAを使用して、微生物の抗原に対するT細胞応答またはB細胞応答を活性化し得る抗原特異的な免疫応答を刺激する。本方法は、抗原が微生物に特異であることを除いて、上記の腫瘍に対する方法と同様に施行される。「微生物抗原」は、本明細書中で使用される場合、微生物の抗原であり、そして感染性ウイルス、感染性細菌及び感染性真菌を含むがこれらに限定されない。

【0040】

本発明のCpG DNAはまた、アレルギー疾患の予防・治療に有用である。この場合は、抗原がアレルゲンに特異的であるということを除いて、腫瘍免疫治療及び感染性疾患の処置について上記した方法で達成される。現在、アレルギー疾患は一般に、低用量の抗原の注射、引き続いて用量を増加し、高用量の抗原を注射して治療される。この手順は、記憶免疫応答を生じ、さらなるアレルギー反応を防止すると考えられている。「アレルゲン」とは、感受性のある被験体においてアレルギー応答を誘起し得る物質（抗原）をいう。

【0041】

「アレルギー」とは、物質（アレルゲン）に対する後天性過敏症のことをいう。アレル

10

20

30

40

50

ギー疾患は、湿疹、アレルギー性鼻炎またはアレルギー性コリーザ、枯草熱、気管支喘息、じんま疹および食物アレルギー、ならびに他のアトピー性状態を含むが、これらに限定されない。アレルギー疾患は、Th2型免疫応答によって媒介されるので、CpG DNAは、被験体における免疫応答をTh2優位の状態からTh1優位の状態へ変化させることにより、アレルギーを治療または予防し得る。

【0042】

「被験体」とは、ヒトまたはイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、霊長類、魚、ラット及びマウスを含むが、これらに限定されない。特にニワトリ以外の鳥類としては、メンドリ、七面鳥、アヒル、ガチョウ、ウズラ及びキジも含まれる。養殖魚類のワクチン接種は、免疫によって長期間の感染防御を提供し得る唯一の予防法である。魚類の免疫系は、哺乳動物のB細胞及びT細胞のリンパ球サブクラスに類似した役割を有するリンパ球サブクラスを有する。

10

【0043】

被験体は抗原に暴露される。本明細書で使用される場合、用語「暴露される」とは、生体内で、被験体を抗原と接触させる能動的な工程または被験体を抗原と受動的に接触させる工程のいずれかをいう。被験体を抗原に能動的暴露するための方法は、当該分野において周知である。一般に、抗原は、全身的または局所的に任意の手段（例えば、静脈内、筋肉内、経口、経皮、粘膜、鼻腔内、気管内、皮内または皮下投与）によって被験体に直接的に投与される。CpG DNAは単独または抗原と組み合わせて定期的に投与され得る。抗原は単独で、またはキャリアを伴って、被験体の免疫系に送達され得る。例えば、「コロイド分散系」としては、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ及び脂質に基づく系（水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含む）が挙げられる。本発明の好ましいコロイド系は、リポソームである。

20

【0044】

抗原が、この抗原をコードする核酸分子において被験体に送達され、その結果、この抗原が生体内で発現されるに違いないことが想像される。その抗原をコードする核酸は、真核生物細胞内で発現を指向する遺伝子発現配列に、作動可能に連結される。「遺伝子発現配列」は、抗原をコードする核酸の効率的な転写及び翻訳を促進する、任意の調節ヌクレオチド配列（例えば、プロモーター配列、またはプロモーター-エンハンサーの組み合わせ）である。一般的に遺伝子発現配列は、必要に応じて、それぞれ転写及び翻訳の開始に関与する非転写配列及び非翻訳配列（例えば、TATAボックス、キャップ配列、CAAT配列など）を含む。

30

【0045】

抗原をコードする核酸は、単独で、またはベクターと共に、免疫系に送達され得る。最も広範な意味で、「ベクター」とは、免疫系の細胞、好ましくは抗原提示細胞（APC）への抗原をコードする核酸の移行を促進し、その結果、その抗原がAPCの表面上で発現され、他の免疫担当細胞へ提示され得るための任意の運び屋である。ベクターは必要に応じて、遺伝子発現配列とCpG DNA配列を含む。

【0046】

CpG DNAは、被験体に直接投与され得るか、または核酸送達複合体と共に投与され得る。「核酸送達複合体」は、標的細胞（例えば、樹状細胞表面）に対してより高い親和性結合を生じる分子と結合した（例えば、そこにイオン結合するか、もしくは共有結合する、またはその内部にカプセル化される）核酸分子を意味する。核酸送達複合体の例としては、ステロール（例えば、コレステロール）、脂質（例えば、カチオン性脂質またはリポソーム）、または標的細胞特異的結合因子（例えば、標的細胞特異的レセプターによって認識されるリガンド）と結合した核酸分子が挙げられる。

40

【0047】

「パリンδροーム配列は」、逆転した反復配列（すなわち、ABCDEE' D' C' B' A' のような配列であり、ここではA及びA'は、相補的な塩基対を形成し得る塩基である）を意味する。一般に核酸分子は、生体内では非常に分解を受けやすいと考えられるが、本発明の

50

CpG DNAの塩基配列は、パリンドローム配列を含む為、非常に安定であると思われる。つまり、二重鎖DNAが生体内で非常に安定なように、本発明のCpG DNAの一部がパリンドローム配列をとることによって、同一分子内及び分子間で相補的塩基対が二重鎖を形成し得る。これによって、エキソヌクレアーゼやエンドヌクレアーゼを介した生体内での分解に対して耐性を獲得することによって、CpG DNAの構造を安定化させると考えられる。

【0048】

APCには、樹状細胞（未成熟樹状細胞および樹状細胞前駆体）、並びに抗原を取り込みそして発現し得る成熟樹状細胞がある。

治療に使用するためには、適切な有効量のCpG DNAを適切な剤形（CpG DNA単独または核酸複合体など）で標的細胞（例えばPDC）に取り込まれるように任意の様式により被験体に投与し得る。好ましい投与経路は、経口、経皮（皮下、皮内、静脈内、腹腔内、筋肉内など）、経鼻、気管内および粘膜が挙げられるが、これらに限定されない。

CpG DNAの「有効量」とは、生物学的効果（IFN- γ を主とするサイトカインの産生など）が認識されるのに必要かつ十分な量をいう。投与されるCpG DNAの有効量は、適用される疾患及びその状態、被験体の大きさなどに依存して変化し得る。

【0049】

本発明の有用なCpG DNAは、GGACGATCGTCGGGGGGGG（配列番号：1）、GGGACGATCGTCGGGGGGGG（配列番号：2）、GGGGACGATCGTCGGGGGGGG（配列番号：3）、GGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG（配列番号：4）、GGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG（配列番号：5）、GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG（配列番号：6）、GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG（配列番号：7）及びGGGGGGGGGCACGATCGTCGGGGGGGGGG（配列番号：8）の何れかから成る免疫刺激オリゴヌクレオチドが挙げられ、特にGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG（配列番号：7）から成るオリゴヌクレオチドが挙げられる。本発明のCpG DNAの有効量は、血中のIFN- γ 及び各種サイトカイン量を測定して決定する。1ナノグラム/kg～100ミリグラム/kgの範囲の容量（投与方法に依存する）が有効であると考えられる。

【0050】

本発明の処方物は、薬学的に受容可能な溶液で投与される。この溶液は、慣用的には、薬学的に受容可能な濃度の塩、緩衝化剤、保存剤、キャリア、アジュバント、及び必要に応じて他の治療用成分を含み得る。

【0051】

このCpG DNA及び抗原は、それ自体で（生の）、または薬学的に受容可能な塩の形態で投与され得る。医薬において使用される場合、塩は、薬学的に受容可能であるべきであり、以下の酸から調整される塩が挙げられるが、それらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン 2 スルホン酸、及びベンゼンスルホン酸。また、これらの塩は、カルボン酸基のアルカリ金属塩またはアルカリ土類塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、またはカルシウム塩）として調整され得る。

【0052】

適切な緩衝化剤には、以下が挙げられる：酢酸及びその塩、クエン酸及びその塩、ホウ酸及びその塩、ならびにリン酸及びその塩。適切な保存剤には、ベンザルコニウムクロリド、クロロブタノール、パラベン、ならびにチメロサルが挙げられる。

【0053】

本発明の薬学的組成物は、有効量のCpG DNA及び抗原（必要に応じて、薬学的に受容可能なキャリア中に含まれる）を含む。用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、ヒトまたは他の脊椎動物への投与に適切である固体または液体のフィラー、希釈剤、またはカプセル化物質を意味する。用語「キャリア」は、適用を容易にするために活性成分と組み合わせられる天然または合成の有機または無機成分を示す。薬学的組成物の成分はまた、薬学的効率を実質的に低減する相互作用が存在しないような様式で、本発明のCpG DNAと混合され得る。本発明において、有用なCpG DNAは、1つより多くのCpG DNAまたは抗原の混合物

10

20

30

40

50

で送達され得る。混合物は、いくつかのCpG DNAまたは抗原からなり得る。

【0054】

種々の投与経路が使用可能である。投与様式は、当然の事ながら、選択されるCpG DNAまたは抗原、処置対象の状態、及び治療効力のために必要とされる投与量に依存する。本発明を臨床的におよび実験的に実施する為の最良の方法は、医学的に受容可能である任意の投与様式を使用することである。

本発明はさらに、以下の実施例によって例示され、これらの実施例は、決して限定解釈されるべきではない。

【実施例】

【0055】

実験に使用したPBMCは次のようにして得た。インフォームド・コンセントを得た健常成人末梢血のバフィーコートパーコール (Pharmacia) 比重液 (比重1.077) に重層後、遠心分離 (1,800 rpm、20 min) を行ない、PBMC (末梢血単核細胞) を分離した。生理食塩水で洗浄後10% FCS-RPMIに浮遊させ、細胞濃度を $2 \sim 4 \times 10^6 / \text{mL}$ に調整したPBMCを48-ウエル培養プレートに分注し、種々濃度のCpG-DNAとともに5% CO₂ インキュベーターで18~24時間培養した。培養終了後、遠心分離 (5,000rpm, 3 min) により培養上清を回収した。この培養上清について、IFN- γ 、IFN- β 、IL-12、TNF- α 、IL-10、IL-4の濃度をELISA Kit (BioSources社) を用いて測定した。CpG-DNAは、ホスホロアミダイド法を用いて合成し、その後、固相担体から切り出し、脱保護を行い、最後にゲルろ過による精製を施した (北海道システムサイエンス社に依頼)。使用した器具、試薬はエンドトキシンフリーである。

【0056】

実施例 1.

G付加の場所と数の検討 (GO-GACGA-Gn) : GACGATCGTCをコアシーケンスとして、3'末端のみにGを1~10個 (n) 付加して下記 (表1) の配列を合成し、これをPBMCに5 μ M加えて培養した。

【0057】

【表1】

表1

塩基配列	配列略記号
GACGATCGTCG	GO-GACGA-G1
GACGATCGTCGG	GO-GACGA-G2
GACGATCGTCGGG	GO-GACGA-G3
GACGATCGTCGGGG	GO-GACGA-G4
GACGATCGTCGGGGG	GO-GACGA-G5
GACGATCGTCGGGGGG	GO-GACGA-G6
GACGATCGTCGGGGGGG	GO-GACGA-G7
GACGATCGTCGGGGGGGG	GO-GACGA-G8
GACGATCGTCGGGGGGGGG	GO-GACGA-G9
GACGATCGTCGGGGGGGGGG	GO-GACGA-G10

【0058】

得られた培養上清についてIFN- γ の定量を行った結果、図1のような結果が得られた。3鎖までのG付加GACGATCGTCにはIFN- γ 産生の誘導活性は認められず、4鎖以上のG付加により活性が誘導された。

【0059】

実施例 2.

G付加の場所と数の検討 (Gm-GACGA-G0) : 5'末端のみにGを5~10個(m)付加して下記(表2)の配列を合成し、PBMCに5 μ M添加し培養した。

【0060】

【表2】

表2

塩基配列	配列略記号
GGGGGGACGATCGTC	G5-GACGA-G0
GGGGGGGACGATCGTC	G6-GACGA-G0
GGGGGGGGACGATCGTC	G7-GACGA-G0
GGGGGGGGGACGATCGTC	G8-GACGA-G0
GGGGGGGGGGACGATCGTC	G9-GACGA-G0
GGGGGGGGGGGACGATCGTC	G10-GACGA-G0

10

【0061】

得られた培養上清についてIFN- γ の定量を行った結果、図2のような結果が得られた。5から6個のG付加ではIFN- γ 産生誘導効果が薄く、少なくとも7個以上のGが必要とされた。8個または9個のG付加でIFN- γ 産生はピークに達した。

20

【0062】

実施例3.

G付加の場所と数の検討 (Gm-GACGA-G10) : 実施例1と2を比較すると、5'末端側への付加に比べて3'末端側へのG付加は、少ない数のGで活性を誘導できるので、IFN- γ 誘導効率が高いと推定される。次に、3'末端のGの数を10に固定して5'末端側のG数mが0~5および10の配列を合成し(表3)、PBMCに5 μ M加えて培養した。

【0063】

【表3】

表3

塩基配列	配列略記号
GACGATCGTCGGGGGGGGGG	G0-GACGA-G10
GGACGATCGTCGGGGGGGGGG	G1-GACGA-G10
GGGACGATCGTCGGGGGGGGGG	G2-GACGA-G10
GGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG	G3-GACGA-G10
GGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG	G4-GACGA-G10
GGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG	G5-GACGA-G10
GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG	G10-GACGA-G10

30

【0064】

得られた培養上清についてIFN- γ の定量を行った結果、図3のような結果が得られた。3'末端側に10鎖のGを配置した場合には、5'末端側にGを1~2鎖付加するだけでIFN- γ 誘導活性が上昇した。しかし、その効果はGの数に比例せず、3鎖以上のG付加ではIFN- γ 誘導活性が低下する傾向が認められた。

【0065】

実施例4.

IFN- γ とIL-10産生の相関 : 実施例1~3で検討した配列について、IFN- γ とIL-10の産生量を測定し、相関関係を調査した(図4~6)。IL-10には免疫抑制作用があるので、

40

50

その産生をできるだけ低く抑えた状態で IFN- α の産生を亢進する配列を見出す事を目的とした。3'末端側に10鎖のGを配置して5'末端にGを付加すると、IFN- α 誘導活性の上昇に比例してIL-10誘導活性も上昇し、両者に相関性が認められる(図6)ため、目的の配列としてはあまり好ましくない。しかし、GO-GACGA-Gn型(図4)やGm-GACGA-GO型(図5)については明確な相関関係が得られず、特にGm-GACGA-GO型ではG付加によるIFN- α 誘導活性の亢進が、IL-10の産生をbasal level近くに保ったままで認められたことから、この配列パターンを検討することによりIFN- α のみを誘導できるような好ましい配列の同定も可能であると考えた(図5)。

【0066】

実施例5.

塩基数の決定：実施例1～3の検討結果より、GACGATCGTCに高いIFN- α 誘導活性をもたらすにはGを3'末端側または5'末端側に8～10個置くほうがよいが、IL-10の産生を抑えるには5'末端側に偏在させるとよいと考えた。また、活性の誘導に必要なCpG DNAの総塩基数は約20個が至適であった(下記表4)。

【0067】

【表4】

表4

高い IFN- α 産生能力を有する CpG-DNA

塩基配列	最適な G 数 (m, n)	CpG-DNA 総塩基数
GO-GACGATCGTC-Gn	n = 8 ~ 10	18 ~ 20
Gm-GACGATCGTC-GO	m = 8 ~ 10	18 ~ 20
Gm-GACGATCGTC-G10	m = 1 ~ 2	21 ~ 22

【0068】

上記の結論に基づき、総塩基数を20個に固定してポリG付加パルンドロームCpG DNAのIFN- α 誘導活性を調査した。

【0069】

実施例6.

Gm-GACGATCGTC-GnにおけるIFN- α の誘導：5'末端のGの数mと3'末端のGの数nの合計数を10に固定したGm-GACGATCGTC-Gn (m + n = 10) のオリゴヌクレオチド11種類(下記表5)を合成し、PBMCに5 μ M加えて培養した。

【0070】

10

20

30

【表5】

表5

塩基配列	Gの数 (m+n=10)
GACGATCGTCGGGGGGGGG	m=0, n=10
GGACGATCGTCGGGGGGGG	m=1, n=9
GGGACGATCGTCGGGGGGG	m=2, n=8
GGGGACGATCGTCGGGGGG	m=3, n=7
GGGGGACGATCGTCGGGGG	m=4, n=6
GGGGGGACGATCGTCGGGG	m=5, n=5
GGGGGGGACGATCGTCGGG	m=6, n=4
GGGGGGGGACGATCGTCGG	m=7, n=3
GGGGGGGGGACGATCGTCG	m=8, n=2
GGGGGGGGGGACGATCGTC	m=9, n=1
GGGGGGGGGGGACGATCGTC	m=10, n=0

10

【0071】

その結果、 $m = 1 \sim 3$ ($n = 9 \sim 7$) 及び $m = 6 \sim 9$ ($n = 4 \sim 1$) で、多量の IFN- γ の産生が誘導された。しかし、 $m = 4$ ($n = 6$) 及び $m = 5$ ($n = 5$) では、IFN- γ の産生は著しく減少した(図7)。

20

【0072】

実施例7.

Gm-GACGATCGTC-Gn における TNF- α の誘導：実施例6と同様な配列で示される Gm-GACGA-Gn ($m + n = 10$) のオリゴヌクレオチド10種類 ($m = 0 \sim 9$) について、PBMCに5 μ M加えて培養した上清中の TNF- α 産生量を測定した(図8)。各配列における TNF- α の産生は、IFN- γ の産生と同じパターンを示し、両者の活性には緩やかな相関性が認められた。

【0073】

実施例8.

用量と活性の関係からみた活性強度の調査(1)：Gm-GACGA-Gn ($m + n = 10$) で示されるオリゴヌクレオチドの活性強度を調べるために、PBMCに添加する濃度を0.01~5 μ Mの5段階で比較した(図9)。その結果、 $m = 7$ ($n = 3$) 及び $m = 1$ ($n = 9$) の時に、非常に強い IFN- γ の産生が認められた。それに対して、 $m = 4$ ($n = 6$) 及び $m = 10, n = 10$ の場合は活性が低かった。

30

【0074】

実施例9.

用量と活性の関係からみた活性強度の調査(2)：実施例8で調査した Gm-GACGA-Gn ($m + n = 10$) で示されるオリゴヌクレオチドの活性強度を詳細に調べるために、 $m = 7, 8, 9$ (n はそれぞれ3, 2, 1) について調査した(図10)。その結果、 $m = 9$ ($n = 1$) のオリゴヌクレオチドに最大の IFN- γ 誘導活性が認められた。

40

【0075】

実施例10.

広範囲の用量における検討：次に、Gm-GACGA-Gn ($m + n = 10$) で示されるオリゴヌクレオチドの IFN- γ 誘導活性が、CpG-DNAの低濃度領域及び高濃度領域においてどのように変化するのかを詳しく調査した。PBMCに添加する濃度0.05~10 μ Mの6段階について調査した(図11)。その結果、 $m = 9$ ($n = 1$) の CpG-DNAは、その他のオリゴヌクレオチドではほとんど IFN- γ 産生を誘導しない0.1 μ M濃度でも誘導活性を示した。1 μ M濃度で最大活性を示し、10 μ Mまで活性を維持した。

【0076】

50

実施例 11.

パリンドローム中心塩基配列の重要性：以上に示したように、中心配列GACGATCGTCの両末端ポリGについて検討した結果、5'末端側に9鎖、3'末端側に1鎖のGを付加したG9-GACGA-G1に強いIFN-誘導活性が得られたが、このようなGの配置が中心配列の異なるCpGパリンドロームにおいても同様に認められるか否かについて、下記(表6)に示すACAACGTTGTを対象に調査した(図12, 13)。G付加はm=9(n=1), m=5(n=5), m=1(n=9), m=10(n=10)の4通り行った。

【0077】

【表6】

表6

塩基配列	配列略記号
GGACGATCGTCGGGGGGGGG	G1-GACGA-G9
GACAACGTTGTGGGGGGGGG	G1-ACAAC-G9
GGGGGGACGATCGTCGGGGG	G5-GACGA-G5
GGGGGACAACGTTGTGGGGG	G5-ACAAC-G5
GGGGGGGGGACGATCGTCG	G9-GACGA-G1
GGGGGGGGGACAACGTTGTG	G9-ACAAC-G1
GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG	G10-GACGA-G10
GGGGGGGGGGACAACGTTGTGGGGGGGGG	G10-ACAAC-G10

10

20

【0078】

GACGATCGTCにGを付加した場合、上に述べてきたように、m=9(n=1) > m=1(n=9) > m=10(n=10) > m=5(n=5)の順で活性が高かった(図12)。ACAACGTTGTにGを付加した場合、付加する場所と活性亢進の関係はGACGATCGTCと同じパターンであったが、活性はGACGATCGTCに比べて著しく低いことが示された(図13)。従って、ポリGの付加はパリンドロームCpG DNAの活性の亢進に非常に重要であるが、活性発現に一番寄与している部位は、パリンドロームCpG DNAの中心配列である。

30

【0079】

具体的に説明すると、図12及び13に示すように、G9-GACGA-G1及びG1-GACGA-G9では強いIFN-誘導活性が認められ、前の実施例8~10で示された結果が再現された。また、中心配列が異なるACAACに対して、ポリG配列を導入したG10-ACAAC-G10ではほとんどIFN-誘導活性は認められなかったが(図12、図13)、G9-ACAAC-G1では、発明者らが従来より使用しているG10-GACGA-G1と同程度のIFN-誘導活性が認められた(図12)。さらに、GACGATCGTCを中心配列に用いた場合、G9-GACGA-G1とG1-GACGA-G9ではIFN-誘導活性に著しい差が認められた(図12, 13)が、ACAACGTTGTを中心配列に用いた場合には、G9-ACAAC-G1とG1-ACAAC-G9との間には大きな差は認められなかった(図13)。

40

【0080】

これらの事より、最適な条件でGを付加すると、CpG DNAの免疫刺激活性の強化に有効であると考えられる。しかし、CpG DNAが本来の免疫刺激活性に一番寄与している部位は、CpG DNAの中心となるパリンドローム部分の塩基配列である。本発明の最も重要な部分は、中心配列として5'-GACGATCGTC-3'を使用している事と、中心配列両末端に最適な長さの非修飾(ジエステル型)Gを導入したことである。最終的には、CpG DNAの全塩基数20個の配列が免疫刺激活性には重要である。我々がここで免疫刺激活性としてIFN-の誘導を検討した中では、G9-GACGATCGTC-G1の塩基配列が最も強力な活性を有する配列であった。

【0081】

実施例 12.

GACGATCGTCの変異型の検討：最後に、下記(表7)に示すようにG9-GACGA-G1のパリン

50

ドローーム部分 (GACGATCGTC) の塩基配列を一部分変化させることにより、IFN- γ 誘導活性がどのように変わるのかを検討した (図14)。パリンドローーム構造を維持した状態で、CGをGCに置換 (GAGCATGCTC) すると活性が消失した。また、ATをAAに置換 (GACGAACGTC) またはATをTTに置換 (GACGTTGCTC) して中央先端部分が非パリンドローーム構造になると、IFN- γ 誘導活性が消失した。さらに、CpGパリンドローーム構造は維持されるが中央先端塩基の順序がATからTAに変わる (GACGTACGTC) だけでも、免疫刺激活性がほとんど失われることが確認された。CpGパリンドローームの5'末端側のGをCに、3'末端側のCをGに置換した配列 (CACGATCGTG) では、高濃度ではG9-GACGATCGTC-G1と同等の活性を有するが、0.1~0.2 μ M濃度ではIFN- γ の産生量は30~40%に低下した。

【0082】

【表7】

10

表7

CpG DNAの種類	配列略記号	CpG DNAを1 μ M作用させた時のIFN- α 産生量 (pg/mL)
GGGGGGGGGACGATCGTCG	(G9-GACGA-G1)	8,060
GGGGGGGGGAGCATGCTCG	(G9-GAGCA-G1)	119
GGGGGGGGGACGTACGTCG	(G9-GACGT-G1)	135
GGGGGGGGGACGAACGTCG	(G9-GACGAA-G1)	56
GGGGGGGGGACGTTGTCG	(G9-GACGTT-G1)	49
GGGGGGGGGCACGATCGTGG	(G9-CACGA-G1)	7,050

20

【0083】

実施例13.

G9-GACGA-G1のTh1型サイトカインとTh2型サイトカインの産生：G9-GACGA-G1の活性がTh1免疫の誘導に優位で働いているか否かを調査するため、IFN- γ 以外にTh1型免疫の指標となるIL-12とIFN- γ 及びTh2型免疫の指標となるIL-4の産生を測定した。下記 (表8) に示す各CpG DNAについて、PBMCに1 μ M添加した時に得られた培養上清中のサイトカイン産生量を調査した。

30

【0084】

【表 8】

表 8

実験 1 (pg/mL)			
塩基配列	Th1 型サイトカイン		Th2 型サイトカイン
	IL-12	IFN- γ	IL-4
G1-GACGA-G9	33.9	17.4	検出限界以下
G5-GACGA-G5	26.7	9.5	同上
G9-GACGA-G1	44.2	12.9	同上
G10-GACGA-G10	20.7	16.9	同上

実験 2 (pg/mL)			
塩基配列	Th1 型サイトカイン		Th2 型サイトカイン
	IL-12	IFN- γ	IL-4
G1-GACGA-G9	16.5	14.1	検出限界以下
G9-GACGA-G1	23.1	14.5	同上

【 0 0 8 5 】

上記(表 8)に示すように、2回の実験結果より、Th1型サイトカインとして、骨髄系樹状細胞やマクロファージ様細胞から分泌される IL-12 は、いずれの配列でも誘導されたが、G1-GACGA-G9 に比べて G9-GACGA-G1 でより強く誘導された。IFN- γ の産生も認められたが、G1-GACGA-G9 と G9-GACGA-G1 の間に差はなかった。Th2 型サイトカインとして、IL-4 を測定したが、いずれのサンプルも検出限界以下であった。この結果より、G9-GACGA-G1 や G1-GACGA-G9 は、IL-4 に代表される Th2 型サイトカインの産生を誘導せずに、IFN- γ 、IL-12 などの Th1 型サイトカインの産生を誘導するため、生体を Th1 免疫優位の状態にできると考えられる。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 8 6 】

本発明のオリゴヌクレオチドは、末梢血単核細胞に作用して、投与された被験体の免疫系を刺激活性化して、インターフェロン- γ の産生を強力に誘導することができる。また、IL-12 や IFN- γ などの Th1 免疫応答を増強することができる。したがって、結核や肝炎などのワクチンアジュバントとして有用性があり、また、ウイルス・細菌・真菌などの感染症、及びアレルギー疾患の予防・治療や癌治療に対して利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 7 】

【図 1】図 1 は、実施例 1 において、3'末端への G 付加の数 (G0-GACGA-Gn) を検討した結果を示すグラフである。

【図 2】図 2 は、実施例 2 において、5'末端への G 付加の数 (Gm-GACGA-G0) を検討した結果を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、実施例 3 において、3'末端 G の数を 10 に固定し、5'末端への G 付加の数 (Gm-GACGA-G10) を検討した結果を示すグラフである。

【図 4】図 4 は、実施例 4 において、G0-GACGA-Gn の IFN- γ と IL-10 産生の相関性について検討した結果を示すグラフである。

【図 5】図 5 は、実施例 4 において、Gm-GACGA-G0 の IFN- γ と IL-10 産生の相関性について検討した結果を示すグラフである。

【図 6】図 6 は、実施例 4 において、Gm-GACGA-G10 の IFN- γ と IL-10 産生の相関性について検討した結果を示すグラフである。

【図7】図7は、実施例6において、IFN- α の誘導に対する、G付加の場所と数(Gm-GACGA-Gn)の効果を検討した結果を示すグラフである。

【図8】図8は、実施例7において、TNF- α の誘導に対する、G付加の場所と数(Gm-GACGA-Gn)の効果を検討した結果を示すグラフである。

【図9】図9は、実施例8における、用量と活性の関係から見た活性強度の調査(1)(Gm-GACGA-Gn)の結果を示すグラフである。

【図10】図10は、実施例9における、用量と活性の関係から見た活性強度の調査(2)(Gm-GACGA-Gn)の結果を示すグラフである。

【図11】図11は、実施例10における、広範囲の用量を検討した結果を示すグラフである。

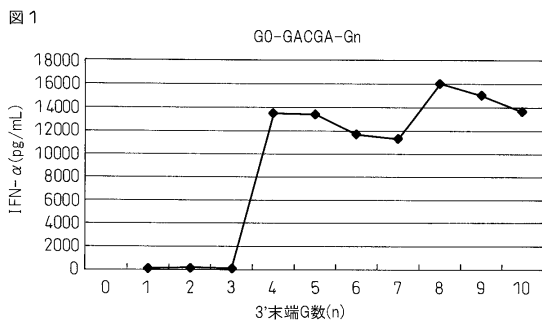
10

【図12】図12は、実施例11における、G9-GACGA-G1のパリンドローム配列の重要性についての検討(1)した結果を示すグラフである。

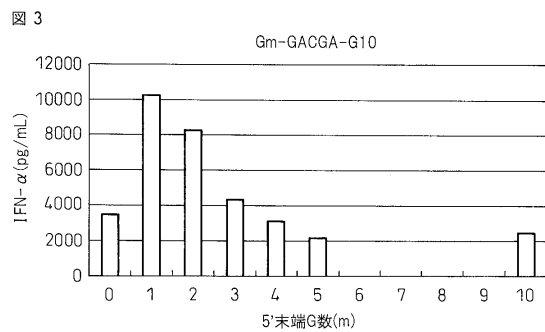
【図13】図13は、実施例11における、G9-GACGA-G1のパリンドローム配列の重要性についての検討(2)した結果を示すグラフである。

【図14】図14は、実施例12における、GACGATCGTCの変異型の検討を行なった結果を示すグラフである。

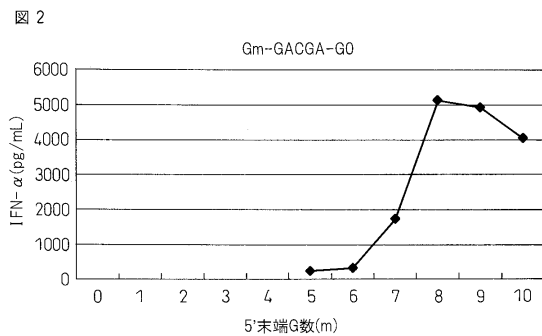
【図1】



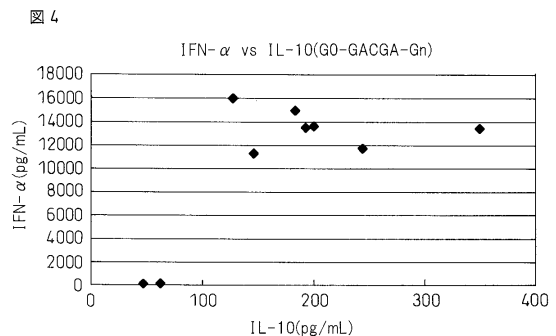
【図3】



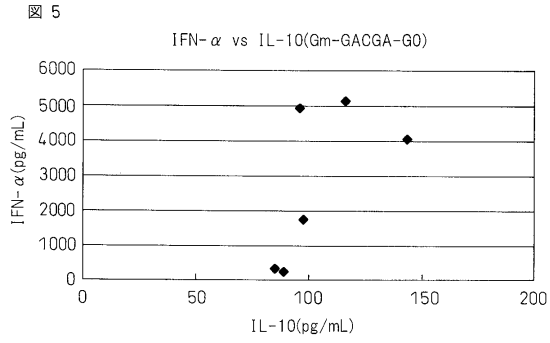
【図2】



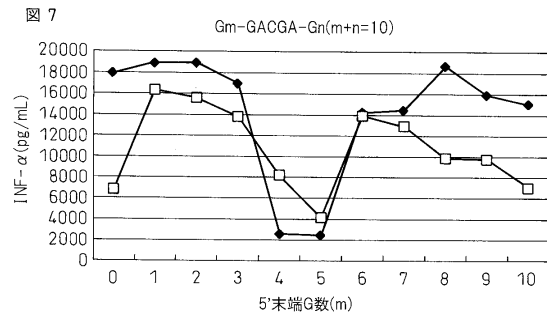
【図4】



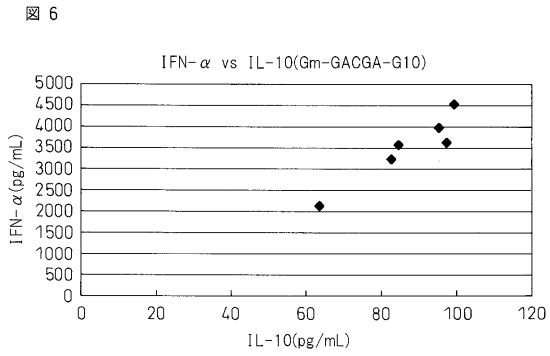
【 図 5 】



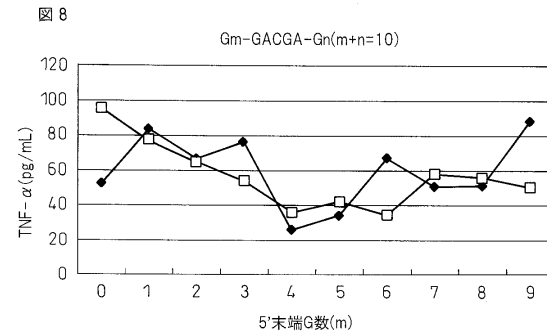
【 図 7 】



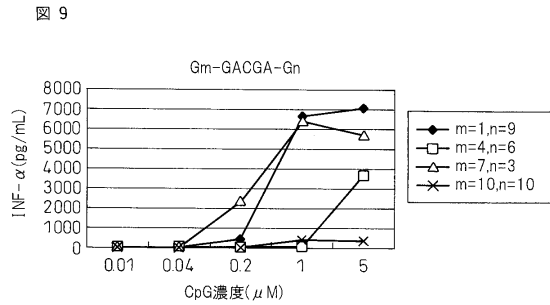
【 図 6 】



【 図 8 】

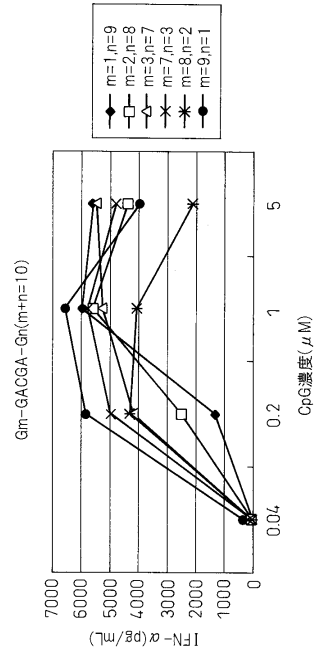


【 図 9 】

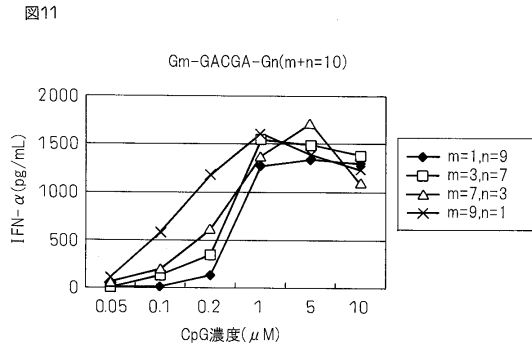


【 図 10 】

図 10

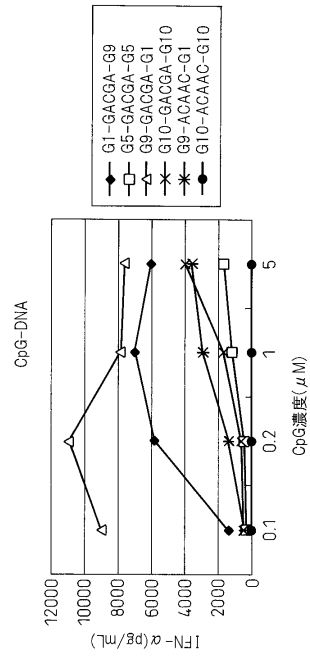


【 図 1 1 】



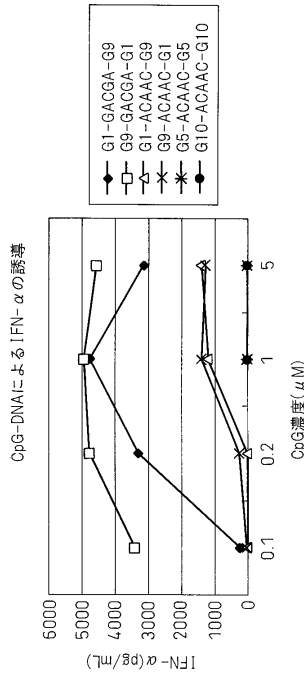
【 図 1 2 】

図12



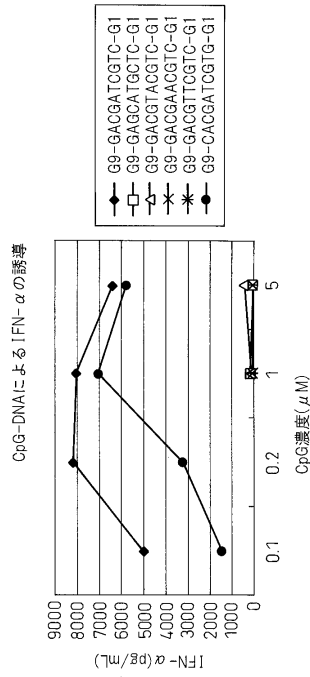
【 図 1 3 】

図13



【 図 1 4 】

図14



【配列表】

0003976742000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/06 (2006.01)		A 6 1 P 31/06	
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 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)		A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 7

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬

(74)代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 北川 治和

福井県坂井郡丸岡町長崎14-28

(72)発明者 伊保 澄子

福井県坂井郡丸岡町新鳴鹿2-100

(72)発明者 松木 孝澄

福井県福井市手寄2-6-3

(72)発明者 山本 三郎

東京都小金井市中町4-1-18

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第2004/000351(WO, A1)

国際公開第03/024481(WO, A1)

国際公開第03/024480(WO, A1)

国際公開第2004/100965(WO, A1)

国際公開第2004/084939(WO, A1)

国際公開第2004/085635(WO, A1)

国際公開第2004/084940(WO, A1)

Jpn J Cancer Res 83(11) p.1128-1131 (1992)

J Immunol 163(7) p.3642-3652 (1999)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

CA(STN)

JMEDPlus(JDream2)