

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2015年7月23日(23.07.2015)



(10) 国際公開番号  
WO 2015/108048 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 39/39 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01) C12N 15/117 (2010.01)  
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/050718
- (22) 国際出願日: 2015年1月14日(14.01.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2014-005510 2014年1月15日(15.01.2014) JP
- (71) 出願人: 株式会社新日本科学(SHIN NIPPON BIO-MEDICAL LABORATORIES, LTD.) [JP/JP]; 〒8911394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町2438番地 Kagoshima (JP). 株式会社 Wave Life Sciences Japan(WAVE LIFE SCIENCES JAPAN) [JP/JP]; 〒8911394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町2438番地 Kagoshima (JP).
- (72) 発明者: 玄番 岳践(GEMBA Takefumi); 〒8911394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町2438番地 株式会社新日本科学内 Kagoshima (JP). 永田 良一
- (74) 代理人: 廣瀬 隆行(HIROSE Takayuki); 〒1040042 東京都中央区入船3-8-7 ザ・ロワイヤルビル3階 廣瀬国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー

[続葉有]

(54) Title: CHIRAL NUCLEIC ACID ADJUVANT HAVING ANTITUMOR EFFECT AND ANTITUMOR AGENT

(54) 発明の名称: 抗腫瘍作用を有するキラル核酸アジュバンド及び抗腫瘍剤

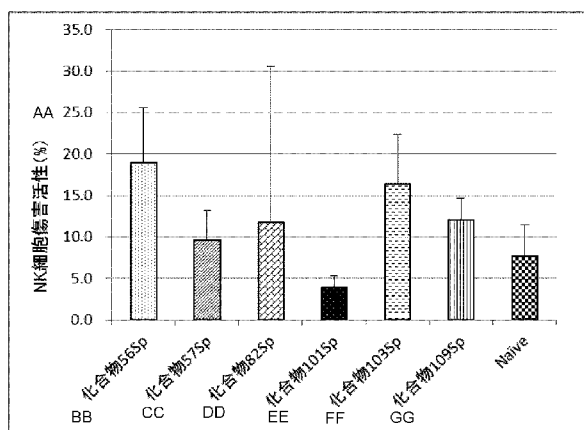


FIG. 1:  
 AA Cytotoxic activity on NK cells (%)  
 BB Compound 56Sp  
 CC Compound 57Sp  
 DD Compound 82Sp  
 EE Compound 101Sp  
 FF Compound 103Sp  
 GG Compound 109Sp

(57) Abstract: [Problem] To provide a chiral nucleic acid adjuvant having an antitumor effect and an antitumor agent. [Solution] An adjuvant comprising an oligonucleotide consisting of 14-32 nucleotides and containing 2-4 CpG motifs, said CpG motifs being a sequence represented by 5'-X<sub>1</sub>CpGX<sub>2</sub>-3', wherein: a phosphorothioate (PS)-bonded nucleic acid base is connected to the 3' side of at least two CpG motifs, while PS-bonded S-form nucleic acid bases are located at the 5'- and 3'-ends; and the aforesaid oligonucleotide contains at least one base that is not PS-modified. An antitumor agent comprising the aforesaid adjuvant.

(57) 要約: 【解決課題】 抗腫瘍作用を有するキラル核酸アジュバンド及び抗腫瘍剤を提供する。 【解決手段】 5'-X<sub>1</sub>CpGX<sub>2</sub>-3'からなる配列であるCpGモチーフを2~4個含む14~32ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含むアジュバンドであって、少なくとも2つのCpGモチーフの3'側にホスホロチオエート(PS)結合された核酸塩基が接続され、5'末端及び3'末端は、PS結合されたS型の核酸塩基であり、前記オリゴヌクレオチドは、PS修飾されていない塩基を少なくともひとつ以上含むアジュバンド。そのアジュバンドを含む抗腫瘍剤。

WO 2015/108048 A1

ロシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー  
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,  
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

## 明 細 書

発明の名称：

抗腫瘍作用を有するキラル核酸アジュバンド及び抗腫瘍剤

### 技術分野

[0001] 本発明はC p Gオリゴヌクレオチドを用いた抗腫瘍作用を有するキラル核酸アジュバンド及び抗腫瘍剤（腫瘍の治療剤又は予防剤）に関する。より詳しく説明すると、本発明は、P S構造とP O構造とを有するC p Gオリゴヌクレオチドを含む抗腫瘍剤用のアジュバンドなどに関する。

### 背景技術

[0002] 特表2002-513763号公報（特許文献1）、特表2002-514397号公報（特許文献2）、及び特表2002-521489号公報（特許文献3）には、C p Gオリゴヌクレオチド及びその製造方法が開示されている。

[0003] 特表2010-504750号公報（特許文献4）には、C p Gモチーフの外側に親油性置換ヌクレオチド類似体を有するオリゴヌクレオチドがインターフェロン- $\alpha$ （IFN- $\alpha$ ）産生を惹起する点が開示されている。

[0004] 下記非特許文献1には、三量体のC p GオリゴヌクレオチドのS型立体異性体がMAPKシグナルを促進する旨が開示されている。

[0005] 下記非特許文献2には、全ての配列部分にホスホロチオエートが導入され、全ての配列部分がS型立体異性体であるPF-3512676（配列番号119）が開示されている。天然のオリゴ核酸は生体内で容易に分解される。一方、オリゴ核酸のリン酸ジエステル結合（P O結合）をリン酸チオエステル結合（P S結合）に替えたP S修飾体は、生体内で分解されにくいという特色を有する。

[0006] 下記非特許文献3は、C p Gオリゴヌクレオチド（C p G配列を有するオリゴヌクレオチド）がトル様受容体（TLR9）を介してTh1免疫経路を活性化することを開示する。C p Gオリゴヌクレオチドは、A - c l a s s

～C-classの3種類に分類される。A-classに分類されるCpGオリゴヌクレオチドは、3'および5'-末端の1～4塩基のリン酸結合部位がリン酸チオエステル結合（PS結合）されており、強いIFN- $\alpha$ 産生誘導能を示すものの、B細胞増殖に対する作用は弱い。B及びC-classに分類されるCpGオリゴヌクレオチドは、全てのリン酸結合部位がS化されており、B細胞増殖作用は強いものの、IFN- $\alpha$ 産生能はそれほど強くない。なお、天然型のリン酸ジエステル結合（PO結合）を有するCpGオリゴヌクレオチドは、生体内で速やかに分解される。

[0007] 下記非特許文献4は、A-classおよびB-classのCpGオリゴヌクレオチドの抗腫瘍作用について報告している。どちらのclassのCpGオリゴヌクレオチドもがん抗原と併用投与することにより抗腫瘍作用を示したが、オリゴヌクレオチド単独の投与では全く効果を示さない。また、作用を発現するためには生体内での分解を防ぐためにリポソーム製剤として投与する必要がある。

[0008] 下記特許文献5は、アジュバンドを含む腫瘍治療用薬剤組成物を開示する。下記特許文献6は、CpGオリゴヌクレオチドからなるアジュバンドを含み、オリゴヌクレオチドを有効成分として含む腫瘍の治療剤を開示する。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0009] 特許文献1：特表2002-513763号公報  
特許文献2：特表2002-514397号公報  
特許文献3：特表2002-521489号公報  
特許文献4：特表2010-504750号公報  
特許文献5：特許3044009号公報  
特許文献6：特許4977035号公報

### 非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Authur M. Krieg et al. OLIGO NUCLEOTIDES 13： pp. 491-499 (2003)

非特許文献2: Clin Cancer Res. 2008 Jul 15; 14(14):4532-42.

非特許文献3: Krieg, AM., J Clin Invest (2007) 117:1184-1194

非特許文献4: Pedro Berraondo et al. Cancer Res 67: pp. 8847-8855 (2007)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0011] 例えば、非特許文献2に開示されたCpGオリゴヌクレオチドは、全ての配列にホスホロチオエート（PS結合）が導入される。このため非特許文献2に開示されたCpGオリゴヌクレオチドは炎症を惹起する場合や、毒性反応を誘発する場合があるという問題があった。一方、非特許文献2に開示されたCpGオリゴヌクレオチドのホスホロチオエート骨格修飾を除くと、ヌクレオチドの安定性が下がるという問題がある。さらに、天然型のCpGオリゴヌクレオチドも、生体内で速やかに分解されるという問題がある。

[0012] 特許文献5及び6に開示される腫瘍の治療剤において、アジュバンドとして抗腫瘍作用の強いものを用いれば、腫瘍の治療効果を高めることができるし、さらに化学療法剤やがん抗原ワクチンなどの有効成分が効かない患者に対してもアジュバンドにより腫瘍の治療効果を発揮できる可能性がある。

[0013] そこで、本発明は、安定性に優れ抗腫瘍作用を有するCpGオリゴヌクレオチドを含むアジュバンドを提供することを目的とする。

[0014] 次に、本発明は、安定性に優れたCpGオリゴヌクレオチドを含む抗腫瘍剤を提供することを目的とする。特に、本発明は、安定性に優れたCpGオリゴヌクレオチドを含む抗腫瘍剤用のアジュバンドを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0015] 本発明は、基本的には、オリゴ核酸の立体構造を制御することにより、オリゴ核酸の生体内での安定性を高め、これにより全ての配列にPS結合を導

入しなくても、生体内で安定なオリゴヌクレオチドを提供できるという知見に基づく。このオリゴヌクレオチドは、全ての配列にはP S結合修飾がなされていないため、生体親和性に優れる。そして、本発明のオリゴヌクレオチドは、後述する実施例で実証されたとおり、抗腫瘍作用をも有する。

[0016] 本発明の第1の側面は、抗腫瘍剤用アジュバンドに関する。このアジュバンドは、 $5' - X_1 C p G X_2 - 3'$  からなる配列であるC p Gモチーフを2～4個含む14～32ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。

ここで、上記のC p Gは、リン酸骨格修飾を有さない非メチル化C p Gである。また、 $X_1$ は、A又はTであり、 $X_2$ は、A又はTである。

そして、オリゴヌクレオチドは、少なくとも2つのC p Gモチーフの3'側にホスホロチオエート結合された核酸塩基が接続される。5'末端及び3'末端は、ホスホロチオエート(P S)結合されたS型の核酸塩基である。オリゴヌクレオチドは、P S修飾されていない塩基を少なくともひとつ以上含む。P S修飾されていない塩基は、上記したC p Gモチーフ以外の部分にも存在することが好ましい。

[0017] 抗腫瘍剤用アジュバンドは、抗腫瘍剤に用いられるアジュバンドである。

[0018] 本発明のアジュバンドの好ましい例は、 $X_1$ がAであり、 $X_2$ がTのものである。そして、P S結合を有する核酸塩基は、P S結合された第1のS化Tである。すなわち、本発明のアジュバンドは、少なくとも2つのC p Gモチーフの3'側にP S結合により核酸塩基が接続される。その好ましい例は、 $5' - A C p G T - 3'$ に隣接して、 $T^{SP}$  ( $T^{SP}$ は、P S結合が存在するT)が存在するものである。

[0019] 本発明のアジュバンドのさらに好ましい例は、第1のS化Tに隣接してさらに第2のS化Tが存在するもの ( $5' - A C p G T T^{SP} T^{SP} - 3'$ ) であり、さらに第2のS化Tに隣接して第3のS化Tが存在するもの ( $5' - A C p G T T^{SP} T^{SP} T^{SP} - 3'$ ) も好ましい。

[0020] 本発明のアジュバンドは、5'末端に隣接する塩基が、S型立体配座を有するP S結合された核酸塩基であるものが好ましい。さらに、本発明のアジ

ユバンドは、3'末端に隣接する塩基がS型立体配座を有するPS結合された核酸塩基であるものが好ましい。

[0021] 本発明の好ましいアジュバンドは、配列番号4, 6, 26, 33, 42, 43, 49~51, 56~58, 60~63, 74, 78~80, 82, 83, 85~96, 98, 99, 101~106, 108, 109, 111~118のいずれかで示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含むものである。

[0022] すなわち、本発明のオリゴヌクレオチドは、以下のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチドであることが好ましい。

[0023] [表1-1]

配列番号	配列 (5'→3')
4	T*C*AACGTT*T*C*AACGTT*T*T*G*G
6	T*C*AACGTT*T*C*AACGTT*G*G*G*G
26	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
33	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGG*G*G*G*G
42	G*G*GACGATATCGTCG*G*G*G*G*G
43	G*G*GACGACGTCGTCG*G*G*G*G*G
47	G*G*GACGCGCGTCG*G*G*G*G*G*G
49	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*A*C*G*G*G
50	T*C*GACGTTTTGACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
51	T*C*GACGTTTTGACGTTTTGACGGG
56	T*C*GACGT*T*GACGT*T*G*A*C*G*G*G
57	T*C*ATCGATATCGA*T*G*A*C*G*G*G
58	T*C*GACGTTGACGT*T*G*A*C*G*G*G
60	T*C*GACGTT*T*T*GACGT*T*T*G*G*G*G*G
61	T*C*GACGTT*T*T*GACGT*T*T*G*A*G*G*G*G
62	T*C*GACGTT*T*T*GACGT*T*T*G*T*G*G*G*G
63	T*C*G*ACGTTGACGTTGACGGG
74	T*C*G*ACGTT*T*T*G*ACGTT*T*T*G*ACG*G*G
78	T*C*G*ACGTTT*T*G*ACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
79	T*C*G*ACGTT*T*T*A*ACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G
80	T*C*G*ACGTTT*T*AACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G
82	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGA*T*G*G*G
83	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATC*G*G*G
85	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G

[0024]

[表1-2]

86	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*A*T*C*G*G*G
87	T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G
88	T*C*ATCGATATCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G
89	TCATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G
90	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*A*T
91	T*C*G*ACGTTGACGTTGACGTTGGG
92	T*C*G*ACGTTGACGTTGACGGG
93	T*C*A*TCGAT*T*T*A*TCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G
94	T*C*A*TCGAT*A*TCGAT*G*ACGT*T*T*G*G*G
95	T*C*G*ACGTTTACGTTT*G*A*C*G*G*G
96	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G
98	G*G*G*ACGAC*G*TCGT*G*G*G*G*G
99	G*G*G*ACGAC*G*TCGT*G*G*G*G*G
101	T*C*G*ACGAC*G*TCGTCT*T*T*G*G*G
102	T*A*G*ACGAC*G*TCGTCT*T*T*G*G*G
103	T*T*G*ACGAC*G*TCGTCA*A*A*G*G*G
104	T*C*G*ACG*G*ACG*G*TCGTCT*T*T*G*G*G
105	T*C*G*ACG*G*ACG*G*TCGTCT*A*G*G*G*G
106	T*C*ATCGATATCGATT*T*T*G*G*G
108	T*C*G*ACG*G*ACG*G*TCGTCT*G*G*G*G
109	T*C*G*ACG*G*ACG*G*TCGTCT*T*G*A*C*G*G*G
111	T*T*ATCGATATCGATA*T*C*G*A*T*G*G*G
112	T*T*ATCGATATCGATT*T*A*A*A*G*G*G
113	T*C*ATCGATTTATCGATTTGACGTT
114	T*C*ATCGA*T*ATCGA*T*G*A*C*G*G*G*G
115	T*C*ATCGATATCGATGGG
116	T*C*G*TCGTT*G*TCGT*T*G*A*C*G*G*G
117	T*C*G*TCGTT*T*T*G*TCGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
118	T*C*G*TCGTT*G*TCGTT*G*A*C*G*A*C*G*G*G

[0025] 上記において\*は、硫黄原子によるリン酸骨格修飾による立体異性体を示す。上記の各配列における\*のうち少なくとも1箇所は、S型の立体配座を有するものである。

[0026] 本発明の好ましいオリゴヌクレオチドは、配列番号56, 57, 82, 103, 又は109で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであるか、配列番号56, 57, 82, 103, 又は109で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから1又は2個の塩基が欠失、置換、付加又は挿入された配列からなるオリゴヌクレオチドであって、抗腫瘍作用を有するオリゴヌクレオチドである。

[0027] 本発明の第2の側面は、上記したアジュバンドを含む、抗腫瘍剤に関する。この抗腫瘍剤は、先に説明したオリゴヌクレオチドを有効成分として含む。



ものであってもよい。また、この抗腫瘍剤は、公知の有効成分とあわせて本発明のアジュバンドが含まれるものであってもよい。その場合、本発明のオリゴヌクレオチドが抗腫瘍作用を有するため、有効成分と相乗効果を発揮する場合や、有効成分では有効に免疫誘導が活性化されない患者に対しても、アジュバンドが免疫誘導を活性化させることができる。

### 発明の効果

[0028] 本発明は、安定性に優れた抗腫瘍作用を有するCpGオリゴヌクレオチドを含むアジュバンドを提供できる。

[0029] 本発明は、安定性に優れたCpGオリゴヌクレオチドを含む抗腫瘍剤に用いられるアジュバンドを提供できる。

### 図面の簡単な説明

[0030] [図1]図1は、キラル核酸アジュバンドにおけるマウスNK細胞活性を示す図である。

[図2]図2は、マウス担癌モデルにおけるキラルアジュバンドの主要増殖抑制作用を示すための腫瘍体積を示すグラフである。

[図3]図3は、マウス担癌モデルにおけるキラルアジュバンドの主要増殖抑制作用を示すための腫瘍体積を示すグラフである。

[図4]図4は、マウス担癌モデルにおける生存率に関するグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0031] 以下、本発明を実施するための形態について説明する。本発明は、以下に説明する形態に限定されるものではなく、以下の形態から当業者が自明な範囲で適宜修正したものも含む。

[0032] 「オリゴヌクレオチド」または「オリゴ」は、複数のヌクレオチド（すなわち、ホスフェート基および置換可能な有機塩基（置換ピリミジン（例えば、シトシン（C）、チミン（T）またはウラシル（U））あるいは置換プリン（例えば、アデニン（A）またはグアニン（G））のいずれかである）に結合した糖（例えば、リボースまたはデオキシリボース）を含む分子）を意味する。本明細書において用いられるように、用語「オリゴヌクレオチド」

は、オリゴリボヌクレオチド (ORN) およびオリゴデオキシリボヌクレオチド (ODN) の両方を意味する。用語「オリゴヌクレオチド」はまた、オリゴヌクレオシド (すなわち、ホスフェートを含まないオリゴヌクレオチド) および任意の他の有機塩基含有ポリマーを包含する。オリゴヌクレオチドは、既存の核酸源 (例えば、ゲノムまたは cDNA) から得られ得るが、好ましくは合成である (例えば、オリゴヌクレオチド合成により産生される)。

[0033] CpG は、リン酸骨格修飾を有さない非メチル化 CpG を示す。C は 2' -デオキシシチジンである。G は 2' -デオキシグアノシンである。p はホスホジエステルからなるヌクレオシド間結合である。

[0034] このオリゴヌクレオチドは、 $5' - X_1 C p G X_2 - 3'$  からなる CpG モチーフ以外の部分にリン酸骨格修飾を有しても良い。一方、全てのヌクレオチド間のリン酸骨格がホスホロチオエート骨格修飾を有するものは先に説明した問題があるため、たとえば、リン酸骨格のうち 20% 以上 95% 以下において酸素原子が硫黄原子に置換されるものが好ましく、30% 以上 95% 以下でも、20% 以上 90% 以下でも、40% 以上 95% 以下でも、40% 以上 90% 以下でも、40% 以上 80% 以下でも、50% 以上 95% 以下でも、50% 以上 90% 以下でも、50% 以上 80% 以下でも、60% 以上 95% 以下でもよい。

[0035] 本発明のオリゴヌクレオチドは、以下の配列のいずれかを含むか、以下のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチドであることが好ましい。

[0036]

[表2-1]

配列番号	配列 (5'→3')
4	T*C*AACGTT*T*C*AACGTT*T*T*G*G
6	T*C*AACGTT*T*C*AACGTT*G*G*G*G
26	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
33	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGG*G*G*G*G
42	G*G*GACGATATCGTCG*G*G*G*G*G
43	G*G*GACGACGTCGTCG*G*G*G*G*G
49	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*A*C*G*G*G
50	T*C*GACGTTTTGACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
51	T*C*GACGTTTTGACGTTTTGACGGG
56	T*C*GACGTT*T*GACGT*T*G*A*C*G*G*G
57	T*C*ATCGATATCGA*T*G*A*C*G*G*G
58	T*C*GACGTTGACGT*T*G*A*C*G*G*G
60	T*C*GACGTT*T*T*GACGT*T*T*T*G*G*G*G*G
61	T*C*GACGTT*T*T*GACGT*T*T*T*G*A*G*G*G*G*G
62	T*C*GACGTT*T*T*GACGT*T*T*T*G*T*G*G*G*G
63	T*C*G*ACGTTGACGTTGACGGG
78	T*C*G*ACGTTT*T*G*ACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
79	T*C*G*ACGTT*T*T*T*A*ACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G
80	T*C*G*ACGTTT*T*AACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G
82	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGA*T*G*G*G
83	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*AT*C*G*G*G
85	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G

[0037] [表2-2]

86	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*A*T*C*G*G*G
87	T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G
88	T*C*ATCGATATCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G
89	TCATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G
90	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*A*T
91	T*C*GACGTTGACGTTGACGTTGGG
92	T*C*G*ACGTTGACGTTGACGGG
93	T*C*A*TCGAT*T*T*A*TCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G
94	T*C*A*TCGAT*A*TCGAT*G*ACGT*T*T*G*G*G
95	T*C*GACGTTTACGTTT*G*A*C*G*G*G
96	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G
98	G*G*GACGAC*G*TCGTCG*G*G*G*G
99	G*G*GACGACGTCGTCG*G*G*G*G
101	T*C*GACGACGTCGTCCT*T*T*G*G*G
102	T*A*GACGACGTCGTCCT*T*T*G*G*G
103	T*T*GACGACGTCGTC*A*A*G*G*G
104	T*C*GACGTAGACGTCCT*T*T*G*G*G
105	T*C*GACGTAGACGTTT*A*G*G*G*G
106	T*C*ATCGATATCGATT*T*T*G*G*G
108	T*C*GACGTAGACGATCGATGGG
109	T*C*GACGAC*T*T*GACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G
111	T*T*ATCGATATCGATA*T*C*G*A*T*G*G*G
112	T*T*ATCGATATCGATT*T*A*A*G*G*G
113	T*C*ATCGATTTATCGATTTGACGTT
114	T*C*ATCGA*T*ATCGA*T*G*A*C*G*G*G*G
115	T*C*ATCGATATCGATGGG
116	T*C*GTCGTTGTCGT*T*G*A*C*G*G*G
117	T*C*G*TCGTT*T*T*G*TCGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
118	T*C*GTCGTTGTCGTTG*A*C*G*A*C*G*G*G

[0038] 上記式中\*は、リン酸骨格修飾による立体異性体を示す。上記式中 5' -

$X_1C_pGX_2-3'$  に対応する部位のCGは、リン酸骨格修飾を有さない非メチル化CGを意味する。リン酸骨格修飾の例は、ホスホロチオエート骨格修飾、ホスホロジチオエート骨格修飾、又はホスホロアミデート骨格修飾である。これらの中では、ホスホロチオエート骨格修飾が好ましい。ホスホロチオエート骨格修飾は、隣接するヌクレオチド間のリン酸ジエステル結合を構成するリン原子に結合している2個の非架橋酸素原子のうちの1個を硫黄原子に変換することを意味する。上記それぞれの式における少なくとも1つの\*は、S型の立体異性体である。ここでS型とは、上記したとおり、酸素原子の代わりに導入された原子又は基を硫黄原子とした場合に、S型の立体配座を有するものを意味する。

[0039] 本発明のオリゴヌクレオチドは、上記したいずれかのものであって、CGモチーフ以外の部分の少なくともひとつの部位に存在するリン酸骨格修飾は、ホスホロチオエートを含むオリゴヌクレオチドが好ましい。すなわち、先に説明したとおり、CG以外の部位においても、ホスホロチオエート骨格修飾を有するものが好ましい。この場合、先に説明したとおりS型の立体配座を有するものが好ましい。もっとも、本発明では、全ての配列間がホスホロチオエート骨格修飾されているのではなく、少なくとも1つ以上ホスホロチオエート骨格修飾が成されていない部分を有するものが好ましい。

[0040] ヌクレオチドの合成方法

ヌクレオチドの合成方法は公知である。よって、本発明のヌクレオチドは公知の方法に従って製造できる。本発明のヌクレオチドは、例えば特許4580870号、又は国際公開2010/064146号パンフレットに開示された方法を採用できる。

[0041] ヌクレオチドの合成の上記とは別の例は、特許4942646号公報に開示される方法や、米国特許第5912332号明細書に開示されている方法である。後者は、固体支持体付着リンカーを平行合成に使用するか、又は制御細孔ガラス (controlled pore glass) 支持体に付着させたリン酸塩などの、汎用的な固体支持体を使用する。

[0042] また、ヌクレオチドは、例えば、特許4383534号公報に開示された方法により製造できる。例えば、 $\beta$ -シアノエチルホスホロアミダイト法 (Beaucage SLおよびCaruthers MH (1981) Tetrahedron Lett 22:1859); およびヌクレオシドH-ホスホネート法 (Gareggら (1986) Tetrahedron Lett 27:4051-4; Froehlerら (1986) Nucleic Acid Res 14:5399-407; Gareggら (1986) Tetrahedron Lett 27:4055-8; Gaffneyら (1988) Tetrahedron Lett 29:2619-22) を使用して、新規に合成され得る。これらの化学物質は、市場において入手可能な種々の自動核酸合成機によって実施され得る。これらの核酸は、合成核酸と呼ばれる。あるいは、本発明の核酸を、プラスミド中にて大規模に生成することができる (Sambrook Tら, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989を参照のこと)。本発明の核酸は、そしてより小さい片へと分離され得るか、または全体として投与され得る。核酸は、公知技術 (例えば、制限酵素, エキソヌクレアーゼ, またはエンドヌクレアーゼを使用する技術) を使用して、既存の核酸配列 (例えば、ゲノム配列またはcDNA配列) から調製され得る。このようにして調製された核酸は、単離された核酸と呼ばれる。単離された核酸とは、一般的には、天然で通常関連している成分から分離された核酸を指す。例として、単離された核酸は、細胞から分離された核酸, 核から分離された核酸, ミトコンドリアから分離された核酸, またはクロマチンから分離された核酸であり得る。本発明の組み合わせモチーフ核酸は、合成した組み合わせモチーフ核酸および単離された組み合わせモチーフ核酸の両方を包含する。

[0043] インビボでの用途の為に、この組み合わせモチーフオリゴヌクレオチドは、必要に応じて、分解に対して比較的耐性を有する (例えば、安定化されて

いる)ものが好ましい。「安定化された核酸分子」とは、インビボでの分解(例えば、エキソヌクラーゼまたはエンドヌクラーゼ)に対して比較的耐性である、核酸分子を意味する。核酸安定化は、リン酸骨格改変を介して達成され得る。本発明の好ましい安定化された核酸は、改変された骨格を有する。この核酸骨格の改変は、インビボで投与された場合のこの組み合わせモチーフオリゴヌクレオチドの活性の増加を提供する。いくつかの場合、ホスホロチオエート結合を有する組み合わせモチーフオリゴヌクレオチドは、最大の活性を提供し、そして細胞内エキソヌクラーゼおよび細胞内エンドヌクラーゼによる分解からその核酸を保護する。他の改変された核酸としては、改変されたホスホジエステル核酸、ホスホジエステル核酸とホスホロチオエート核酸の組み合わせ(すなわち、キメラ)、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、p-エトキシ、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

[0044] 改変された骨格(例えば、ホスホロチオエート)は、ホスホロアミデート化またはH-ホスホネート化のいずれかを使用する自動技術を使用して、合成され得る。アリールーホスホネートおよびアルキルーホスホネートは、例えば、米国特許第米国特許4,469,863号に記載されるようにして、生成され得る;そしてアルキルホスホトリエステル(米国特許第5,023,243号および欧州特許第092,574号に記載されるように、荷電した酸素部分が、アルキル化されている)は、市販の試薬を使用して、自動固相合成によって調製され得る。他のDNA骨格の改変および置換を行うための方法は、公開されている(例えば、Uhlmann E and Peyman A (1990) Chem Rev 90:544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1:165を参照)。

[0045] 合成により得られたオリゴヌクレオチドは、公知の方法により精製すればよい。例えば、逆相HPLCにより精製し、脱保護し、脱塩し、透析する。このようにして、本発明のオリゴヌクレオチドを単離精製できる。

[0046] 本発明は、上記したいずれかのオリゴヌクレオチドを含む組成物をも提供する。この組成物は、医薬用組成物である。そして、この組成物は、上記したいずれかのオリゴヌクレオチドを有効量含むとともに、公知の担体を適宜含んでも良い。担体は、水、アルコールといった溶媒であってもよい。また、担体は、任意の賦形剤、希釈剤、充てん剤、塩、緩衝剤、安定剤、可溶化剤、脂質、または医薬組成物への使用のために当該技術分野でよく知られているその他の物質であってもよい。

[0047] 抗腫瘍剤用アジュバンドは、抗腫瘍剤に用いられるアジュバンドである。抗腫瘍剤は、免疫誘導剤、免疫活性化剤ともよばれ、ある抗原に対するサイトカイン等を分泌する免疫細胞を誘導するための剤を意味する。そして、「抗腫瘍作用」とは、生体内でインターフェロン等のサイトカインを分泌する免疫細胞を誘導する能力を意味する。抗腫瘍剤の例は、各種の癌に関する免疫の誘導を活性化させるための剤である。本発明は、癌の治療剤や予防剤をも提供する。抗腫瘍剤は、上記したアジュバンドに加えて抗腫瘍作用のある成分を有効成分として含んでもよいし、上記したアジュバンドに含まれるオリゴヌクレオチドを有効成分として含んでもよい。

[0048] オリゴヌクレオチドが抗腫瘍作用を有するか否かは、例えば公知のエリスポットアッセイ等を用いて確認することができる。具体的には、例えば抗腫瘍作用を評価すべきオリゴヌクレオチドを投与した生体から末梢血単核球等の細胞を得て、該細胞を該オリゴヌクレオチドと共存培養し、該細胞からのサイトカイン産生量を、特異抗体を用いて測定することにより、該細胞中の免疫細胞数を測定することができるので、これにより抗腫瘍作用を評価することができる

[0049] 抗腫瘍剤における腫瘍には公知の腫瘍が含まれる。腫瘍の例は、長骨のアダマンチノーマ、腺腫、エナメル上皮腫、星状細胞腫、胆管癌、膀胱癌、骨癌、骨髄癌、脳腫瘍、乳癌、気管支原性肺癌、頸部癌、子宮頸癌、軟骨腫、絨毛癌、結腸癌、結腸直腸癌、嚢胞腺癌、胎生癌、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、線維腫、濾胞性胸腺腫、胆嚢癌、胃癌、膠芽腫、神経膠腫、頭頸部癌

、心臓の癌、肝細胞癌、腹膜内腔における癌、腸の癌、腎臓の癌腫、喉頭癌、脂肪腫、肝癌、肺癌、リンパ節の癌、リンパ管の癌、悪性神経膠腫、中皮腫 (mesothelioma)、髄膜腫 (meningioma)、髄様癌、筋腫、神経芽腫、非小細胞気管支原性／肺癌、食道癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、乳頭癌、乳頭腺癌、乳頭 (papillary) 胸腺腫、クロム親和性細胞腫、前立腺癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、尿管癌、脂腺癌、セミノーマ、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟部組織癌、脾臓癌、扁平上皮癌、胃癌、奇形腫、睾丸癌、精巣癌、胸腺腫、甲状腺癌、甲状腺腫瘍および子宮体癌である。

[0050] 本発明は、上記したいずれかのオリゴヌクレオチドを含むワクチンアジュバンドをも提供する。ワクチンアジュバンドは、必要に応じて、薬学的に許容される担体を含んでも良い。特許第4126252号は、オリゴヌクレオチドを含むワクチンアジュバンドを開示する。本発明のオリゴヌクレオチドを含むワクチンアジュバンドも、この公報に開示された要素を適宜含むことができる。

[0051] 本発明のオリゴヌクレオチドは、薬学的に受容可能なキャリア中の薬学的組成物として処方され得る。このオリゴヌクレオチドは、被験体に直接投与され得るか、または核酸送達複合体と組み合わせて投与され得る。核酸送達複合体とは、標的化手段（例えば、標的細胞（例えば、B細胞表面）へのより高親和性の結合および／または標的細胞による細胞取り込みの増加を生じる分子）と会合（例えば、イオン性結合もしくは共有結合、またはその手段にカプセル化）された、核酸分子を意味する。核酸送達複合体の例は、ステロール（例えば、コレステロール）と会合した核酸、脂質（例えば、カチオン性脂質、ピロゾーム、またはリポソーム）と会合した核酸、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り認識されるリガンド）と会合した核酸である。好ましい複合体は、その標的細胞によるインターナリゼーションの前の有意な脱カップリングを防ぐために十分にインビボで安定であり得る。しかし、その複合体は、その核酸が機能的形態で放



出されるように、その細胞中で適切な条件下で切断可能である。

[0052] このオリゴヌクレオチドおよび／または抗原および／または他の治療剤は、単独で（例えば、生理食塩水もしくは緩衝液中）で投与され得るか、または当該分野で公知の任意の送達ベシクル（ビヒクル）を使用して投与され得る。

[0053] 粘膜送達もしくは腫瘍局所送達のための本明細書中に記載される化合物の被験体用量は、代表的には、 $0.1 \mu\text{g}$ ／投与～ $10 \text{mg}$ ／投与の範囲であり、これは、その適用が毎日、毎週、または毎月投与、およびその間の他の任意の時間にされ得るかに依存する。より代表的には、粘膜用量または局所用量は、 $10 \mu\text{g}$ ／投与～ $5 \text{mg}$ ／投与の範囲であり、最も代表的には、 $100 \mu\text{g}$ ／投与～ $1 \text{mg}$ ／投与であり、2回の投与～4回の投与が、数日間または数週間の間隔を空けられる。より代表的には、用量は、 $1 \mu\text{g}$ ／投与～ $10 \text{mg}$ ／投与の範囲であり、最も代表的には、 $10 \mu\text{g}$ ／投与～ $1 \text{mg}$ ／投与の範囲であり、毎日または毎週投与される。抗腫瘍作用を誘導するために非経口送達のための本明細書中に記載の化合物の被験体用量（は、代表的には、ワクチンアジュバントまたは免疫刺激適用のための有効粘膜用量の5倍～10,000倍多く、より代表的には10倍～1,000倍多く、最も代表的には20倍～100倍多い。このオリゴヌクレオチドが他の治療剤と組み合わせで、もしくは特殊な送達ビヒクル中で投与される場合に、非経口送達のための本明細書中に記載される化合物の用量は、代表的には、約 $0.1 \mu\text{g}$ ／投与～ $10 \text{mg}$ ／投与の範囲であり、これは、その適用が毎日、毎週、または毎月投与、およびその間の他の任意の時間にされ得るかに依存する。より代表的には、これらの目的のための非経口用量は、約 $10 \mu\text{g}$ ／投与～ $5 \text{mg}$ ／投与の範囲であり、最も代表的には、約 $100 \mu\text{g}$ ／投与～ $1 \text{mg}$ ／投与であり、2回の投与～4回の投与が、数日間または数週間の間隔を空けられる。しかし、いくつかの実施形態において、これらの目的のための非経口用量は、上記の代表的用量よりも5倍～10,000倍多い範囲で使用され得る。

[0054] 本明細書中で使用される場合、「有効（な）量」とは、所望される生物学的効果を実現するために必要であるかまたは十分である量を指す。例えば、疾患を処置するために有効な量のキラル核酸は、その疾患を処置するのに必要な量である。本明細書中に提供される教示と組み合わせると、種々の活性化化合物および重み付け因子（例えば、効力、相対的バイオアベイラビリティ、患者の体重、有害な副作用の重篤度、および好ましい投与様式）を選択することによって、実質的な毒性を引き起こさないが特定の被験体を処置するに完全に有効である、有効な予防処置レジメンもしくは有効な治療処置レジメンが計画され得る。任意の特定の適用のための有効量は、処置される疾患もしくは状態、投与される特定のオリゴヌクレオチド、抗原、被験体の大きさ、またはその疾患もしくは状態の重篤度のような要因に依存して、変化し得る。当業者は、特定のオリゴヌクレオチドおよび／または抗原および／または他の治療剤の有効量を、過度の実験を必要とすることなく経験的に決定し得る。

[0055] 本明細書中に記載される任意の化合物について、その治療上有効な量は、動物モデルからまず決定され得る。治療上有効な用量はまた、ヒトにおいて試験された（ヒト臨床試験が開始された）CpGオリゴヌクレオチドについてのヒトデータから、および同様の薬理的活性を示すことが公知である化合物（例えば、他の粘膜アジュバント（例えば、LTおよびワクチン接種用の他の抗原））について粘膜投与もしくは局所投与についてのデータから、決定され得る。より高用量が、非経口投与のために必要である。適用される用量は、投与される化合物の相対的バイオアベイラビリティおよび効力に基づいて、調整され得る。その用量を、上記の方法および他の方法に基づいて最大効力を達成するように調整することは、当該分野で周知であり、当業者の能力の範囲内に十分に存在する。

[0056] 本発明の処方物は、薬学的に受容可能な溶液中で投与され、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、適合性キャリア、アジュバント、および必要に応じて他の治療成分を含み得る。

[0057] 治療における使用のために、有効量のこのオリゴヌクレオチドが、所望される表面（例えば、腫瘍病巣、粘膜表面、全身表面）にその核酸を送達する任意の様式によって、被験体に投与され得る。本発明の薬学的組成物を投与することは、当業者に公知の任意の手段によって達成され得る。好ましい投与経路としては、経口経路、非経口経路、筋肉内経路、皮下経路、皮内経路、鼻内経路、気管内経路、吸入経路、眼内経路、舌下経路、膣内経路、および直腸経路が挙げられるが、これらに限定されない。

[0058] 経口投与のために、この化合物（すなわち、オリゴヌクレオチド、抗原、および他の治療剤）は、その活性化化合物を、当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせることによって、容易に処方され得る。そのようなキャリアは、本発明の化合物が、標的とされる被験体による経口摂取のための錠剤、ピル、糖剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして処方されることを可能にする。経口用途のための薬学的調製物は、必要に応じて、望まれる場合は適切な助剤を添加した後に、生じた混合物を粉碎し、その顆粒混合物を処理して錠剤コアまたは糖剤コアを得ることによって、固体賦形剤として入手され得る。適切な賦形剤は、特に、充填剤（例えば、糖（ラクトース、スクロース、マンニトール、もしくはソルビトールが挙げられる）；セルロース調製物（例えば、トウモロコシスターチ、コムギスターチ、イネスターチ、ジャガイモスターチ、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム）、および／またはポリビニルピロリドン（PVP））である。望まれる場合、崩壊剤（例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（例えば、アルギン酸ナトリウム））が、添加され得る。必要に応じて、その経口処方物はまた、内部酸性状態を中和するための生理食塩水もしくは緩衝液中で処方され得るか、またはいかなるキャリアも含まずに投与され得る。

[0059] 糖剤コアは、適切なコーティングを備える。この目的のために、濃縮糖溶液が、使用され得、これは、必要に応じて、アラビアゴム、タルク、ポリビ

ニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒もしくは溶媒混合物を含み得る。染料または色素が、異なる活性化合物用量の組み合わせを同定または特徴付けるために、錠剤または糖剤コーティングに添加され得る。

[0060] 経口的に使用され得る薬学的調製物の例は、ゼラチンから作製されたカプセル、およびゼラチンと可塑剤（例えば、グリセロールまたはソルビトール）から作製された軟らかい密封カプセルである。このカプセルは、充填剤（例えば、ラクトース）、結合剤（例えば、スターチ）、および／または滑沢剤（例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウム）、および必要に応じて安定化剤と混合して、活性成分を含み得る。この軟らかいカプセルにおいて、活性化合物は、適切な液体（例えば、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコール）中に溶解または懸濁され得る。さらに、安定化剤が添加され得る。経口投与のために処方されたマイクロスフェアもまた、使用され得る。このようなマイクロスフェアは、当該分野で十分に規定されている。経口投与のためのすべての処方物は、このような投与に適切な投与量である。

[0061] 経口投与のために、この組成物は、従来の様式で処方された、錠剤またはロゼンジの形態を採り得る。

[0062] 吸入による投与のために、本発明に従う使用のための化合物は、加圧パックまたは噴霧器からエアロゾル噴霧提示の形態で、適切な推進剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体）を使用して、従来のように送達され得る。加圧エアロゾルの場合、その投与単位は、計量した量を送達するための弁を提供することによって、決定され得る。吸入器または注入器において使用するための例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジが、その化合物と適切な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはスターチ）との粉末混合物を含んで、処方され得る。

[0063] この化合物は、全身送達することが望ましい場合に、注入（例えば、ボー

ラス注入または連続注入)による非経口投与のために処方され得る。注入のための処方物は、単位投与形態で(例えば、アンプル中かまたは多用量容器にて)、添加された保存剤とともに提示され得る。その組成物は、油状ビヒクルもしくは水性ビヒクル中の懸濁物、溶液、またはエマルジョンのような形態を採り得、そして処方剤(例えば、懸濁剤、安定化剤、および/もしくは分散剤)を含み得る。

[0064] 非経口投与のための薬学的処方物としては、水溶性形態のその活性化合物の水溶性溶液が挙げられる。さらに、その活性化合物の懸濁物が、適切な油状注入懸濁物として調製され得る。適切な親油性溶媒または親油性ビヒクルとしては、脂肪油(例えば、ゴマ油)または合成脂肪酸エステル(例えば、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリド)、またはリポソームが挙げられる。水性注入懸濁物は、その懸濁物の粘度を増加する物質(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン)を含み得る。必要に応じて、その懸濁物はまた、非常に濃縮された溶液の調製を可能にするために、適切な安定化剤またはその化合物の溶解度を増加する薬剤を含み得る。

[0065] あるいは、その活性化合物は、適切なビヒクル(例えば、発熱物質を含まない滅菌した水)を用いて使用前に構成するための、散剤形態であり得る。

[0066] この化合物はまた、直腸組成物または腔内組成物(例えば、(例えば、従来の坐剤基剤(例えば、ココアバターまたは他のグリセリド)を含む)坐剤または貯留浣腸)の状態でも処方され得る。

[0067] 上記の処方物に加えて、この化合物はまた、デポー(depot)調製物として処方され得る。そのような長期作用処方物は、適切なポリマー物質もしくは疎水性物質を用いて(例えば、受容可能な油中のエマルジョンとして)か、またはイオン交換樹脂を用いてか、または溶解性が乏しい誘導体(例えば、溶解性が乏しい塩)として、処方され得る。

[0068] この薬学的組成物はまた、適切な固相もしくはゲル相の、キャリアもしくは賦形剤を含み得る。そのようなキャリアまたは賦形剤の例としては、炭酸

カルシウム，リン酸カルシウム，種々の糖，スターチ，セルロース誘導体，ゼラチン，およびポリマー（例えば，ポリエチレングリコール）が挙げられるが，これらに限定されない。

[0069] 適切な液体薬学的調製物形態または固体薬学的調製物形態は，例えば，マイクロカプセル化されるか，キレート化されるか，微視的金粒子上にコーティングされるか，リポソーム中に含まれるか，噴霧されるエアロゾル中に含まれるか，皮膚への移植用のペレット中に含まれるか，または皮膚中を引っ掻く鋭い物体上に乾燥された，吸入用の水性溶液もしくは生理食塩水溶液である。この薬学的組成物はまた，活性化化合物を長期放出する，顆粒，散剤，錠剤，コーティングした錠剤，（マイクロ）カプセル剤，坐剤，シロップ剤，エマルジョン，懸濁剤，クリーム，ドロップ，または調製物を含み，その調製物において，賦形剤および添加剤および／もしくは補助剤（例えば，崩壊剤，結合剤，コーティング剤，甘味剤，滑沢剤，矯味矯臭剤，甘味料，または可溶化剤）が，上記のように慣用的に使用される。この薬学的組成物は，種々の薬物送達系における使用のために適切である。薬物送達のための方法の簡単な概説について，Langer (1990) Science 249 : 1527-33（これは，本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

[0070] このオリゴヌクレオチドおよび必要に応じて他の治療剤および／または抗原は，それ自体が（そのまま）投与され得るか，または薬学的に受容可能な塩の形態で投与され得る。薬物中で使用される場合，その塩は，薬学的に受容可能であるべきであるが，薬学的に受容可能ではない塩が，その薬学的に受容可能な塩を調製するために簡便に使用され得る。そのような塩としては，以下の酸から調製された塩が挙げられるが，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，およびベンゼンスルホン酸。また，そのような塩は，アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩（例えば

、カルボン酸基のナトリウム塩、カリウム塩、もしくはカルシウム塩)として調製され得る。

[0071] 適切な緩衝化剤としては、酢酸および塩(1~2%w/v);クエン酸および塩(1~3%w/v);ホウ酸および塩(0.5~2.5%w/v);およびリン酸および塩(0.8~2%w/v)が挙げられる。適切な保存剤としては、塩化ベンザルコニウム(0.003~0.03%w/v);クロロブタノール(0.3~0.9%w/v);パラベン類(0.01~0.25%w/v)、およびチメロサル(0.004~0.02%w/v)が挙げられる。

[0072] 本発明の薬学的組成物は、有効量のオリゴヌクレオチド、そして必要に応じて抗原および/または他の薬剤を、必要に応じて薬学的に受容可能なキャリア中に含んでもよい。用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、ヒトまたは他の脊椎動物への投与に適切な、1つ以上の適合性の、固体もしくは液体の、充填剤、希釈剤、もしくはカプセル化剤を意味する。用語「キャリア」とは、活性成分がその適用を容易にするために合わせられる、天然もしくは合成の、有機成分もしくは無機成分を示す。その薬学的組成物の成分はまた、相互作用が存在しない様式で、本発明の化合物と、および互いと、混合可能である。

[0073] 本発明の薬学的組成物は、被験体の処置のために、その化合物の活性、投与様式、その免疫の目的(すなわち、予防免疫または治療免疫)、その障害の性質および重篤度、患者の年齢および体重に依存して、異なる用量が必要であり得る。所定の用量の投与は、個々の投与単位での単回投与によってか、またはより少量のいくつかの投与単位で、実行され得る。

[0074] 他の送達系としては、時間放出(time-release)系、遅延放出(delayed release)系、または徐放(sustained release)系が挙げられ得る。そのような系は、その化合物の反復投与を回避し得、被験体および医師に対する簡便性を増加し得る。多くの型の放出送達系が、利用可能であり、そして当業者にとって公知である。そ

れらとしては、ポリマーベースの系（例えば、ポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸、およびポリ無水物が挙げられる。薬物を含む上記ポリマーのマイクロカプセルが、例えば、米国特許第5,075,109号に記載される。送達系としてはまた、非ポリマー系も挙げられ、これは、脂質（ステロール（例えば、コレステロール、コレステロールエステル）、および脂肪酸もしくは天然脂肪（例えば、モノグリセリド、ジグリセリド、およびトリグリセリド）が挙げられる）；ヒドロゲル放出系；シラスティック（s i l a s t i c）系；ペプチドベースの系；ロウコーティング；従来の結合剤および賦形剤を使用する圧縮錠剤；部分融合した移植体などである。特定の例としては、（a）本発明の薬剤がマトリックス中にある形態で含まれる、侵食系（米国特許第4,452,775号、同第4,675,189号および同第5,736,152号に記載される系）；ならびに（b）ポリマーから制御された速度で活性成分が浸透する、拡散系（米国特許第3,854,480号、同第5,133,974号および同第5,407,686号に記載される）が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、ポンプベースのハードウェア送達系が使用され得、そのうちのいくつかは、移植のために適合される。

[0075] 本発明は、以下の実施例によってさらに例証される。以下の実施例は、いかようにも、さらなる限定として解釈されるべきではない。本明細書全体を通して引用された文献の全ての内容は本明細書に組み込まれる。

### 実施例 1

[0076] キラルC p Gオリゴ核酸の合成

C p Gオリゴ核酸（m i x体）

ホスホロアミダイト法を用いて合成し、HPLCにて精製したオリゴ核酸（M i x体）をジーンデザイン社から購入した。

[0077] 立体制御C p Gオリゴ核酸の合成

核酸の鎖長延長を以下の（i）～（iv）のステップを繰返すことにより行



なった。

(i) 3% DCA (ジクロロ酢酸) /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15秒),

(ii) 縮合 (0.1M モノマーのMeCN溶液 (下記参照) と1M PhIMT (1-フェニルイミダゾリウムトリフラート) のMeCN溶液の1:1混合溶液, 5分)

(iii) キャップ化 (0.5M  $\text{CF}_3\text{COIm}$  のTHF溶液と1M DMAN (1,8-ビスジメチルアミノナフタレン) のTHF溶液の1:1混合液, 30秒),

(iv) 硫化 (0.1M DDTTのMeCN用液, 90秒) もしくは酸化 (0.02M  $\text{I}_2$  の $\text{H}_2\text{O}$ -ピリジン (Pyridine) -THF溶液, 15秒)。

[0078] 鎖長延長後, 固相担体を1.5mLマイクロチューブに回収し, 濃アンモニア水 (1.2 mL, 55°C, 48時間) で処理した。固相担体をろ別し, ろ液を減圧乾燥後, 水 (1.0 mL) に溶かし, 逆相HPLCにより分取・精製することでオリゴマーを得た。

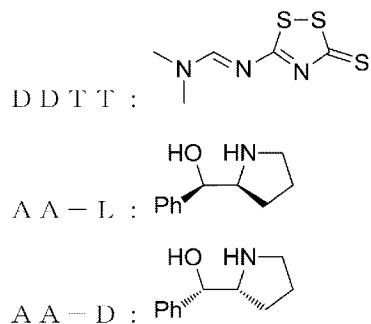
[0079] 0.1M モノマーのMeCN溶液調整法 (Rp-Thの場合)

チミジル酸H-ホスホネート (phosphonate) モノエステル (25マイクロmol) を脱水ピリジン, 脱水トルエンで共沸乾燥後, MeCN-CMP (N-シアノメチルピロリジン) 混合液 (9:1, v/v; 250  $\mu\text{L}$ ) に溶かした。溶液に $\text{Ph}_3\text{PCl}_2$  (62.5マイクロmol) を加え10分間攪拌し, 続いてAA-L (30マイクロmol; Sp体の場合はAA-D) を加えさらに10分間攪拌することで, モノマー溶液を調整した。

[0080] 上記の説明において, DDTT, AA-L及びAA-Dは, それぞれ以下の化合物の略称である。得られたオリゴ核酸を表1に示す。

[0081]

[化1]



[0082] [表3]

表1 実施例1で得られたオリゴ核酸

配列番号	配列
1	T*C*GTCGTT*T*T*GTCGTT*T*T*GTCGGG
2	G*G*GTCGTT*T*T*GTCGTT*T*T*GTCGGG
3	T*C*AACGTT*T*C*AACGTT*T*T
4	T*C*AACGTT*T*C*AACGTT*T*T*GG
5	T*C*AACGTT*T*C*AACGTT*G*G
6	T*C*AACGTT*T*C*AACGTT*G*G*G*G
7	T*C*AACGTT*T*T*AACGTT*T*T*AACGGG
8	T*C*AACGTT*T*A*ACGTT*T*T
9	T*C*AACGT*TAACGTT*T*T
10	T*C*AACGTT*T*A*AACGTT*T*A*AACGGG
11	T*C*AACGTTAACGTTAACGGG
12	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGGG
13	TsCsGACGTTsTsTsGACGTTsTsTsGACGGG
14	TrCrGACGTTTrTrTrGACGTTTrTrTrGACGGG
15	G*G*GACGT*T*T*TGACGT*T*T*TGACGGGG
16	T*C*GACGT*T*T*TGACGT*T*T*TGACGT*T*T*TGACGGG
17	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACGGG
18	TsCsGACGTsTsGACGTsTsGACGGG
19	TrCrGACGTTrTrGACGTTrTrGACGGG
20	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACGT*T*GACGGG
21	T*C*GACGTT*T*A*AACGTT*T*A*AACGTT*T*A*AACGGG
22	T*C*GACGTT*T*A*AACGTT*T*A*GACGTT*T*A*AACGGG
23	T*C*GACGTTAACGTTAACGTTAACGGG
24	GGGACGTT*T*A*AACGTCTAGACGGG
25	T*C*GACGT*ACGT*ACGT*ACGGG
26	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*A*A*C*G*G*G
27	TsCsGACGTTsTsTsGACGTTsTsTsGsAsCsGsGsG
28	TrCrGACGTTTrTrTrGACGTTTrTrTrGrArCrGrGrG
29	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGG*G*G

[0083] [表4]

30	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGT*G*G
31	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGTG*G*G
32	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
33	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGG*G*G*G
34	TsCsGACGTTsTsTsGACGTTsTsTsGACGGsGsGsGsG
35	TrCrGACGTTTrTrTrGACGTTTrTrTrGACGGrGrGrGrG
36	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACG*G*G*G*G
37	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACGTG*G*G
38	G*G*T*G*C*ATCGAT*G*C*A*G*G*G*G*G*G
39	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGGG
40	G*G*T*G*C*GACGAT*G*C*A*G*G*G*G*G*G
41	G*G*G*G*GACGATCGTCGGG*G*G*G
42	G*G*GACGATATCGTCG*G*G*G*G*G
43	G*G*GACGACGTCGTCG*G*G*G*G*G
44	GsGsGACGACGTCGTCGsGsGsGsGsG
45	GrGrGACGACGTCGTCGrGrGrGrGrG
46	G*G*GGGACGATCGTCG*G*G*G*G*G
47	G*G*GACGCGGTCG*G*G*G*G*G*G
48	G*G*G*G*TCGTTG*G*G*G

[0084]

[表5-1]

配列番号	配列
49	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*A*C*G*G*G
50	T*C*GACGTTTTGACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
51	T*C*GACGTTTTGACGTTTT*G*A*C*G*G*G
52	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACGG*G
53	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACG*G*G
54	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACGG*G*G
55	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACT*G
56	T*C*GACGT*T*GACGT*T*G*A*C*G*G*G
57	T*C*GACGTTGACGT*T*G*A*C*G*G*G
58	T*C*ATCGATATCGA*T*G*A*C*G*G*G
59	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACG*G*G*G
60	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*G*G*G*G
61	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*A*G*G*G*G
62	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*T*G*G*G*G
63	T*C*G*ACGTT*G*ACGTT*G*A*C*G*G*G
64	C*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACG*G*G
65	T*C*GACGTT*T*A*GACGTT*T*A*GACG*G*G
66	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACG*A*A
67	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACG*T*T
68	T*C*AACGTT*T*T*AACGTT*T*T*GACG*G*G
69	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GGG
70	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*GACGTTGG
71	T*C*GACGTT*GACGTT*G*G*G
72	T*C*GACGTT*T*T*G*ACGTT*T*T*G*ACG*G*G
73	T*C*G*A*CGTT*T*T*G*ACGTTTTGACGGG
74	T*C*G*ACGTT*T*T*G*ACGTT*T*T*G*ACG*G*G
75	T*C*GACGTA*GACGTA*GACG*G*G
76	T*A*GACGAT*T*C*GTCGTC*T*A*GACG*G*G
77	T*A*GACGA*C*GTCGT*A*GACG*G*G
78	T*C*G*ACGTTT*T*G*ACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
79	T*C*G*ACGTT*T*T*T*A*ACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G

[0085] [表5-2]

80	T*C*G*ACGTTT*T*AACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G
81	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*GACG*G*G
82	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGA*T*G*G*G
83	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*AT*C*G*G*G
84	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCG*G*G
85	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G
86	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*A*T*C*G*G*G
87	T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G
88	T*C*ATCGATATCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G
89	TCATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G
90	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*A*T
91	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACGT*T*G*G*G
92	T*C*G*ACGT*T*G*ACGT*T*G*A*C*G*G*G
93	T*C*A*TCGAT*T*T*A*TCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G
94	T*C*A*TCGAT*A*TCGAT*G*ACGT*T*T*G*G*G
95	T*C*GACGTTT*GACGTTT*G*A*C*G*G*G
96	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G
97	G*G*GACGATATCGTCG*G*G*G*G*G
98	G*G*GACGAC*G*TCGTCG*G*G*G*G*G
99	G*G*GACGACGTCGTCG*G*G*G*G*G
100	T*C*GACGACGTCGTCG*G*G*G*G*G

[0086] [表5-3]

101	T*C*GACGACGTCGTCT*T*T*G*G*G
102	T*A*GACGACGTCGTCT*T*T*G*G*G
103	T*T*GACGACGTCGTCA*A*A*G*G*G
104	T*C*GACGTAGACGCTCT*T*T*G*G*G
105	T*C*GACGTAGACGTTT*A*G*G*G*G
106	T*C*ATCGATATCGATT*T*T*G*G*G
107	T*T*ATCGATATCGATA*A*A*G*G*G
108	T*C*GACGTAGACGATCGA*T*G*G*G
109	T*C*GACGAC*T*T*GACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G
110	T*C*GACGAC*T*T*GTCGTC*T*T*G*A*C*G*G*G
111	T*T*ATCGATATCGATA*T*C*G*A*T*G*G*G
112	T*T*ATCGATATCGATT*T*A*A*A*G*G*G
113	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*T*T
114	T*C*ATCGA*T*ATCGA*T*G*A*C*G*G*G*G
115	T*C*ATCGAT*ATCGA*T*G*G*G
116	T*C*GTCGTTGTCGT*T*G*A*C*G*G*G
117	T*C*G*TCGTT*T*T*G*TCGTT*T*T*G*A*C*G*G*G
118	T*C*GTCGTTGTCGTTG*A*C*G*A*C*G*G*G
119	T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T

[0087] 表中配列番号119で示されるオリゴヌクレオチドは、公知の化合物（化合物119）である。

[0088] 表1中、\*は、S型及びP型がランダムに導入されたホスホロチオエート骨格修飾を示す。表中、sは、S型のホスホロチオエート骨格修飾が導入されることを示す。表中、rは、R型のホスホロチオエート骨格修飾が導入されることを示す。

**実施例 2**

[0089] サル末梢血単核球（PBMC）におけるIFN-α産生誘導

Bウイルス陰性カニクイザル血液（株式会社新日本科学から購入）をハンクス平衡塩（Hanks' Balanced Salt Solution）で3倍希釈し、フィコール・パック・プラス（Ficoll-Plus PLUS）比重液に重層後、遠心分離（2,600 rpm, 30 min）を行い、末梢血単核球（PBMC）画分を採取した。PBMCをRPMI培地（+1% ペニシリン・ストレプトマイシン）で洗浄した後、RPMI培地（+10% FBS, 1% ペニシリン・ストレプトマイシン）に細胞濃度が $3 \times 10^6$  cells/mLとなるように調製した。その後、96ウェルU底プレートに播種し、種々のオリゴ核酸（オリゴDNA：DOTAP 1：3.2混合物）とともに5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで17～24時間培養した。培養終了後

、遠心分離(500 rpm, 5 min)により、培養上清を回収した。培養上清中のIFN-アルファの濃度をエライザキット (ELISA Kit) (PBL社)を用いて測定した。

[0090] 測定結果を表2及び表3に示す。表2は、配列番号1～48で示されるオリゴヌクレオチドに関する実験により得られた、本発明のオリゴヌクレオチドのサル末梢血単核球 (PBMC) におけるIFN-アルファ産生誘導作用を示す。

[0091] [表6]

表2 本発明のオリゴヌクレオチドのサル末梢血単核球 (PBMC) におけるIFN-アルファ産生誘導作用

配列番号	IFN- $\alpha$ (pg/mL)	
	平均	$\pm$ SE
4	2151	1259.46
6	1767	1176.08
26	2404	306.42
33	850	417.75
42	1214	532.80
43	3776	1429.12
47	297	132.99

[0092] 表3は、配列番号49～118で示されるオリゴヌクレオチドに関する実験により得られた、本発明のオリゴヌクレオチドのサル末梢血単核球 (PBMC) におけるIFN-アルファ産生誘導作用を示す。表3は、配列番号119で示される塩基配列 (tcgtcgtttttgctcgtttttgcttt) を有するヌクレオチド (従来のヌクレオチド：化合物119) との相対値を用いて示したものである。

[0093]

[表7-1]

表3 本発明のオリゴヌクレオチドのサル末梢血単核球（PBMC）におけるIFN- $\alpha$ ルファ産生誘導作用

配列番号	配列（S部分を*を挿入）	Ratio	±SE	個体数
49	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*A*C*G*G*G	195	40	4
50	T*C*GACGTTTTGACGTT*T*T*G*A*C*G*G*G	241	32	4
51	T*C*GACGTTTTGACGTTTT*G*A*C*G*G*G	265	52	3
56	T*C*GACGT*T*GACGT*T*G*A*C*G*G*G	210	59	6
57	T*C*GACGTTGACGT*T*G*A*C*G*G*G	269	71	3
58	T*C*ATCGATATCGA*T*G*A*C*G*G*G	255	42	4
60	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*G*G*G*G	123	38	5
61	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*A*G*G*G*G	123	30	5
62	T*C*GACGTT*T*T*GACGTT*T*T*G*T*G*G*G*G	117	17	5
63	T*C*G*ACGTT*G*ACGTT*G*A*C*G*G*G	155	29	3
78	T*C*G*ACGTTT*T*G*ACGTTT*T*T*G*A*C*G*G*G	98	6	3
79	T*C*G*ACGTTT*T*T*A*ACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G	142	26	3
80	T*C*G*ACGTTT*T*AACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G	223	22	3
82	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGA*T*G*G*G	263	38	4
83	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATC*G*G*G	308	53	4
85	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G	170	21	4
86	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*A*T*C*G*G*G	170	25	4
87	T*T*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G	208	86	3
88	T*C*ATCGATATCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G	288	135	3
89	TCATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G	279	45	3
90	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*A*T	374	205	3
91	T*C*GACGT*T*GACGT*T*GACGT*T*G*G*G	135	41	5
92	T*C*G*ACGT*T*G*ACGT*T*G*A*C*G*G*G	97	25	3
93	T*C*A*TCGAT*T*T*A*TCGAT*T*T*G*A*C*G*G*G	109	34	3
94	T*C*A*TCGAT*A*TCGAT*G*ACGT*T*T*G*G*G	103	7	2
95	T*C*GACGTTTGACGTTT*G*A*C*G*G*G	222	37	4
96	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*A*T*C*G*G*G	129	35	3
98	G*G*GACGAC*G*TCGTCG*G*G*G*G	138	107	3
99	G*G*GACGACGTCGTCG*G*G*G	230	87	4

[0094] [表7-2]

101	T*C*GACGACGTCGTCT*T*T*G*G*G	404	52	3
102	T*A*GACGACGTCGTCT*T*T*G*G*G	387	126	3
103	T*T*GACGACGTCGTCA*A*A*G*G*G	302	64	5
104	T*C*GACGTAGACGTCT*T*T*G*G*G	354	75	4
105	T*C*GACGTAGACGTTT*A*G*G*G	297	65	4
106	T*C*ATCGATATCGATT*T*T*G*G*G	224	26	4
108	T*C*GACGTAGACGATCGA*T*G*G*G	370	70	4
109	T*C*GACGAC*T*T*GACGAC*T*T*G*A*C*G*G*G	235	76	3
111	T*T*ATCGATATCGATA*T*C*G*A*T*G*G*G	200	8	4
112	T*T*ATCGATATCGATT*T*A*A*A*G*G*G	257	40	4
113	T*C*ATCGAT*T*T*ATCGAT*T*T*G*A*C*G*T*T	209	27	4
114	T*C*ATCGA*T*ATCGA*T*G*A*C*G*G*G	155	37	3
115	T*C*ATCGAT*ATCGA*T*G*G*G	95	12	2
116	T*C*GTCGTTGTCGT*T*G*A*C*G*G*G	235	23	4
117	T*C*G*TCGTT*T*T*G*TCGTT*T*T*G*A*C*G*G*G	177	61	4
118	T*C*GTCGTTGTCGTTG*A*C*G*A*C*G*G*G	88	14	4

[0095] [比較例1]

配列番号119で示される塩基配列を有するヌクレオチド（従来のヌクレ

オチド：化合物 119) について実施例 2 と同様に実験を行い、IFN- $\alpha$  の濃度を測定した。その結果を表 4 に示す。

[0096] [表8]

表 4

IFN $\alpha$ (ng/ml.)	
52.2	6.2

### 実施例 3

[0097] マウス脾臓細胞に対する増殖作用

実験方法

マウス脾臓細胞単離

脾臓細胞単離には 10~13 週齢の BALB/c AnNCrI CrIj マウス (日本チャールス・リバー株式会社から購入) から採取した脾臓を用いた。採取した脾臓を、滅菌 PBS 内でニードルを用いて粉碎し細胞懸濁液を 70  $\mu$ m のセルストレーナーに通して回収した。遠心分離後、赤血球溶解液を添加し赤血球を取り除き、PBS で洗浄したものをマウス脾臓細胞として測定に用いた。

[0098] 脾臓細胞増殖測定 (BrdU アッセイ)

マウス脾臓細胞をアッセイ培地：RPMI + 10% FBS + 100 IU/mL ペニシリン + 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを用いて  $1 \times 10^5$  cells/mL の濃度に調製し 96 ウェル平底プレートに 50  $\mu$ L/well ずつ播種した。RPMI 培地で最終濃度の 2 倍濃度に希釈した種々の化合物を 50  $\mu$ L/well ずつ添加して 20~24 時間培養した。培養後、製造業者の指示書に従い、Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) キット (Roche Diagnostics) を用いて細胞増殖測定を実施した。その結果を表 5 に示す。

[0099]



[表9-1]

表 5 細胞増殖測定結果

配列番号	BrdU
4	13%
6	18%
26	106%
33	11%
42	17%
43	27%
47	159%
49	12%
50	26%
51	27%
56	14%
57	17%
58	7%
60	90%
61	108%
62	130%
63	53%
78	272%
79	250%

[0100] [表9-2]

80	66%
82	8%
83	8%
85	10%
86	9%
87	8%
88	6%
89	9%
90	15%
91	13%
92	12%
93	8%
94	8%
95	21%
96	8%
98	19%
99	9%
101	13%
102	5%
103	5%
104	14%
105	3%
106	17%
108	8%
109	4%
111	15%
112	8%
113	8%
114	3%
115	8%
116	4%
117	58%
118	11%

## [0101] 実験結果

結果は対照化合物（化合物119）の値を100%として表示した。いずれの化合物もマウス脾臓細胞の増殖を誘導した。

## 実施例 4

[0102] サル末梢血単核球（PBMC）におけるサイトカイン産生プロファイル  
Bウイルス陰性カニクイザル血液（株式会社新日本科学から購入）をハンクス平衡塩（Hanks' Balanced Salt Solution）で2倍希釈し、フィコール・パックプラス（Ficoll-Plus）比重液に重層後、遠心分離（2,600 rpm, 30分）を行い、末梢血単核球（PBMC）画分を採取した。PBMCを洗浄用培地：RPMI+100 IU/mLペニシリン+100 µg/mLストレプトマイシンで洗浄した後、アッセイ培地：RPMI+10%FBS+100 IU/mLペニシリン+100 µg/mLストレプトマイシンに細胞濃度が $3 \times 10^6$  cells/mLとなるように調製した。その後、96ウェルU底プレートに播種し、種々の化合物（CpG ODN：DOTAP 1：3.2混合物）と共に5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで16~20時間培養した。培養終了後、遠心分離（500 rpm, 5分）し培養上清を回収した。培養上清中のサイトカインプロファイルは、Milliplex MAP Kit Non-Human Primate Cytokine Magnetic Beads Panel（Merck）を用いてIFN-γ, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12/23(p40), IL-8, TNF-αの7種のサイトカインを測定した。

## [0103] 実験結果

サイトカインの結果は対照化合物（化合物119）の値を100%として表示した。いずれの化合物もサル末梢血単核球に対して、Th1サイトカイン（IFN-γ）および抗腫瘍サイトカイン（TNF-α）に対して強い産生誘導作用を示したが、Th2サイトカインであるIL-4に対しては影響を及ぼさなかった（表6）。

## [0104]

[表10-1]

表6 本発明のオリゴヌクレオチドのサイトカインプロファイル

配列番号	IFN- $\gamma$	IL-12(p40)	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-4	IL-8	IL-10
4	120	72	45	56	L	245	22
6	15	47	22	33	L	55	20
26	102	52	49	58	L	191	51
33	54	58	32	40	L	97	38
42	40	54	31	42	L	87	45
43	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-
49	63	65	62	65	L	201	52
50	3	109	113	74	L		296
51	19	50	54	74	L	123	74
56	223	77	83	53	L	157	21
57	97	76	84	57	L	49	45
58	26	40	34	42	L	73	39
60	91	38	163	75	L	189	46
61	276	50	56	49	L	106	31
62	418	48	83	55	L	137	44
63	37	57	53	75	L	127	50
78	147	117	161	135	L	1194	48
79	62	71	95	128	L	320	213
80	68	57	53	90	L	124	143
82	40	113	128	97	L	143	54
83	50	46	51	60	L	377	38
85	88	57	60	67	L	292	49

[0105] [表10-2]

86	71	54	48	60	L	131	41
87	16	31	20	36	41	20	27
88	15	54	36	69	L	81	70
89	41	60	34	68	L	75	50
90	44	83	59	89	L	114	55
91	31	43	34	47	L	90	43
92	24	50	22	31	L	43	29
93	38	64	40	63	L	77	66
94	13	43	30	49	L	30	59
95	65	32	31	48	L	103	27
96	79	65	71	55	L	275	40
98	20	45	62	48	L	53	28
99	82	75	101	51	L	193	22
101	11.5	L	L	46.3	L	151.1	40.1
102	8.2	L	L	42.1	L	128.6	53.9
103	36	45	32	45	52	97	28
104	34	32	23	43	L	87	28
105	116	68	52	60	L	241	44
106	18	44	25	38	L	41	34
108	80	55	35	74	L	59	64
109	29	42	37	55	L	141	41
111	18	45	30	42	L	56	38
112	12	34	20	37	L	48	26
113	96	76	71	74	L	104	35
114	10	53	23	34	L	93	24
115	24	36	23	33	L	197	21
116	26	45	23	42	50	69	22
117	124	72	82	68	45	197	64
118	59	44	22	38	L	105	21

L: 定量限界以下

## 実施例 5

## [0106] マウスNK細胞における細胞傷害活性

## 化合物の投与

C57BL/6Jマウス（日本チャールス・リバー株式会社から購入）に、種々のオリゴ核酸を（ $20\mu\text{g}/\text{Body}$ ）を腹腔内に単回投与した。投与前、投与後1及び4時間後、剖検時（投与後約24時間）に採血を実施し採取した血清をサイトカイン測定に用いた。

## [0107] ナチュラルキラー（NK）細胞の細胞傷害活性測定

## マウス脾臓細胞単離

脾臓細胞単離には8週齢のC57BL/6Jマウス（日本チャールス・リバー株式会社から購入）から採取した脾臓を用いた。採取した脾臓を、滅菌PBS内でニードルを用いて粉碎し細胞懸濁液を $70\mu\text{m}$ のセルストレーナーに通して回収した。遠心後、赤血球溶解液を添加し赤血球を取り除き、PBSで洗浄したものをマウス脾臓細胞としてアッセイに用いた。

## [0108] 細胞傷害活性測定

細胞傷害活性測定は、エフェクター細胞にマウス脾臓細胞、ターゲット細胞にYAC-1を用いて実施した。ターゲット細胞をカルセインで染色し、エフェクター細胞によって傷害されたターゲット細胞から放出されるカルセインの蛍光強度を測定した。細胞傷害活性は以下の式で算出した。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = (\text{Test} - \text{Background-Spontaneous}) / (\text{Maximum Release} - \text{Background-Spontaneous})$$

## [0109] Calcein-AMによるターゲット細胞の染色

$1.5 \times 10^6$  cellsのターゲット細胞を2.5 mLの増殖培地：RPMI+RPMI+100IU/mLペニシリン+100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンに懸濁し、1mg/mL Calcein-AM solutionを25 $\mu\text{L}$ 添加した。2~3回転倒混和にて混合し、15分間5%CO<sub>2</sub>インキュベーターでインキュベーションする工程を2回繰り返した。その後、遠

心分離（1100rpm, 5分, 室温）し, 上清を除去して増殖培地で $2 \times 10^5$  cells/mLに調製し, ターゲット細胞溶液とした。

[0110] エフェクター細胞の調製

単離したマウス脾臓細胞を増殖培地で $1 \times 10^7$  cells/mLに調製し, エフェクター細胞溶液とした。

[0111] 細胞の播き込み

ターゲット細胞溶液とエフェクター細胞溶液を96well U底プレートに以下の組成で細胞を播き込み, 4時間5%CO<sub>2</sub>インキュベーターでインキュベーションし培養上清の蛍光強度を測定した。

[0112] [表11]

プレート組成				
組成	Background	Spontaneous	Maximum Release	Test (E:T=100:1)
増殖培地 (μL)	150	100	50	-
0.1%Triton 溶液(μL)	-	-	50	-
ターゲット細胞 (μL)	-	50	50	50
エフェクター細胞 (μL)	-	-	-	100

[0113] Background: 増殖培地の蛍光強度

Spontaneous: ターゲット細胞が自然に放出するカルセイン蛍光強度

Maximum Release: ターゲット細胞をTritonで傷害した際に放出するカルセイン蛍光強度

Test: エフェクター細胞によりターゲット細胞が傷害され放出されるカルセイン蛍光強度

[0114] 実験結果

実験結果を図1に示す。図1は, NK細胞活性を示す図である。図1では, 左から化合物56, 57, 82, 101, 103, 又は109及び立体異性が無処置のものを示す。化合物56, 57, 82, 103および109のS<sub>p</sub>型立体異性体は無処置(Naive)と比較して, NK細胞活性が增強されていた(図1)。

実施例 6

## [0115] マウス担癌モデルにおける腫瘍増殖に対する作用

## 実験方法

## 担癌モデルの作製および化合物の投与

7週齢のC3H/Heマウスの皮下に $3 \times 10^6$ 個のFM3A細胞を接種し、担癌マウスを作製した。細胞接種から14日目に腫瘍体積を測定し、その腫瘍内に本化合物投与液（ $30 \mu\text{g}$ /個体）または生理食塩水（対照群）を投与した。

## [0116] 腫瘍体積の測定

化合物投与-11, -7, -4, -1, 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28, 29日目に1回、腫瘍径を電子ノギスで測定し、下記の計算式に従い腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times [\text{短径 (mm)}]^2 / 2$$

## [0117] 実験結果

実験結果を図2に示す。図2は腫瘍体積を示すグラフである。データは、左から生理食塩水、化合物78（S型）、化合物78と同じ配列を有し、化合物78のSp型の立体異性体部分の一部がRp型の立体異性体に置き換わったSp型及びRp型の混合物、比較対象としての化合物119を示す。化合物78投与群では、生理食塩水および対照化合物投与群と比較して腫瘍体積が縮小した。さらに、化合物78を用いて立体異性体の作用を比較検討すると、Sp立体異性体は立体混合体（Mix）に比べて顕著な腫瘍増殖抑制作用を示した。

## 実施例 7

## [0118] マウス担癌モデルにおける腫瘍増殖に対する作用

## 実験方法

## 担癌モデルの作製および化合物の投与

6週齢のC57BL/6Jマウスの皮下に $2 \times 10^5$ 個のB16F10細胞および本化合物（化合物78）投与液（ $30 \mu\text{g}$ /個体）を接種し、担癌マウスを作製した。対照群には、生理食塩水もしくは陽性対照ヌクレオチド（

化合物 119) 投与液 (30  $\mu\text{g}/\text{個体}$ ) を投与した。

[0119] 腫瘍体積の測定

化合物投与 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28, 30, 32, 34 日目に 1 回, 腫瘍径を電子ノギスで測定し, 下記の計算式に従い腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times [\text{短径 (mm)}]^2 / 2$$

[0120] 生存率の算出

化合物投与開始日 (0 日目) から, 剖検日 (34 日目) まで飼および一般状態の観察を実施した。腫瘍体積の測定にて腫瘍径が 20 mm (腫瘍体積として 4000  $\text{mm}^3$ ) を超えた動物は瀕死と判断し, 速やかに剖検して死亡例として扱った。生存率は下記の計算式に従い算出した。

$$\text{生存率 (\%)} = \text{死亡例 (匹)} / \text{生存例 (匹)} \times 100$$

[0121] 実験結果

化合物 78 投与群では, 生理食塩水と比較して腫瘍の増殖速度が顕著に低下した。さらに, 化合物 78 を用いて立体異性体の作用を比較検討すると, Sp 立体異性体は立体混合体 (Mix) あるいは陽性対照ヌクレオチド (化合物 119) に比べて明らかな腫瘍増殖抑制作用を示した (図 3)。

[0122] 生存率に対しても, 本化合物 (化合物 78 及び化合物 78 Sp 型立体異性体) 及び陽性対照ヌクレオチド (化合物 119) 投与群は生理食塩水と比較して顕著に高い生存率を示し, 化合物 78 を用いて立体異性体の作用を比較検討すると, Sp 立体異性体は立体混合体 (Mix) に比べて明らかな生存率の向上を示した (図 4)。

**産業上の利用可能性**

[0123] 本発明は, 製薬産業において利用されうる。

## 請求の範囲

- [請求項1] 5' - X<sub>1</sub> C p G X<sub>2</sub> - 3' からなる配列である C p G モチーフを 2 ~ 4 個含む 1 4 ~ 3 2 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む アジュバンドであって、
- 前記 C p G は、リン酸骨格修飾を有さない非メチル化 C p G であり、
- 前記 X<sub>1</sub> は、A 又は T であり、
- 前記 X<sub>2</sub> は、A 又は T であり、
- 少なくとも 2 つの C p G モチーフの 3' 側にホスホロチオエート ( P S ) 結合された核酸塩基が接続され、
- 5' 末端及び 3' 末端は、P S 結合された S 型の核酸塩基であり、
- 前記オリゴヌクレオチドは、P S 修飾されていない塩基を少なくともひとつ以上含む、
- 抗腫瘍剤用アジュバンド。
- [請求項2] 請求項 1 に記載のアジュバンドであって、
- 前記 X<sub>1</sub> は、A であり、
- 前記 X<sub>2</sub> は、T であり、
- 前記ホスホロチオエート結合された核酸塩基は、P S 結合された第 1 の S 化 T である、
- アジュバンド。
- [請求項3] 請求項 2 に記載のアジュバンドであって、
- 前記第 1 の S 化 T の 3' 側に P S 結合された第 2 の S 化 T を含み、
- 5' 末端に隣接する塩基は、P S 結合された S 型の核酸塩基であり、
- 3' 末端に隣接する塩基は、P S 結合された S 型の核酸塩基である、
- アジュバンド。
- [請求項4] 請求項 1 に記載のアジュバンドであって、



前記オリゴヌクレオチドは、配列番号4, 6, 26, 33, 42, 43, 49~51, 56~58, 60~63, 74, 78~80, 82, 83, 85~96, 98, 99, 101~106, 108, 109, 111~118から選択されるいずれかの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、

アジュバンド。

[請求項5]

請求項1に記載のアジュバンドであって、

前記オリゴヌクレオチドは、

配列番号56, 57, 82, 103, 又は109で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであるか、

配列番号56, 57, 82, 103, 又は109で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドから1又は2個の塩基が欠失, 置換, 付加又は挿入された配列からなるオリゴヌクレオチドであって, 抗腫瘍作用を有するオリゴヌクレオチドである、

アジュバンド。

[請求項6]

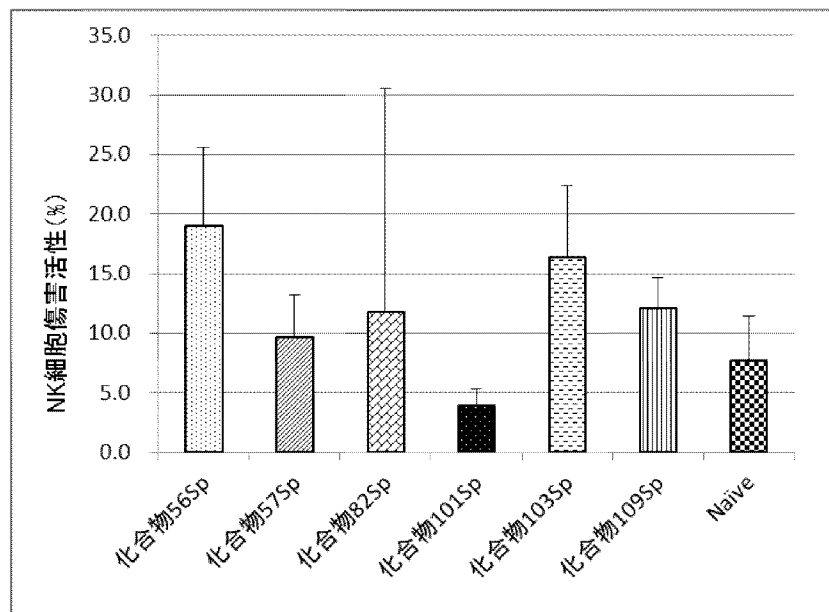
請求項1~5のいずれかに記載のアジュバンドを含む, 抗腫瘍剤。

[請求項7]

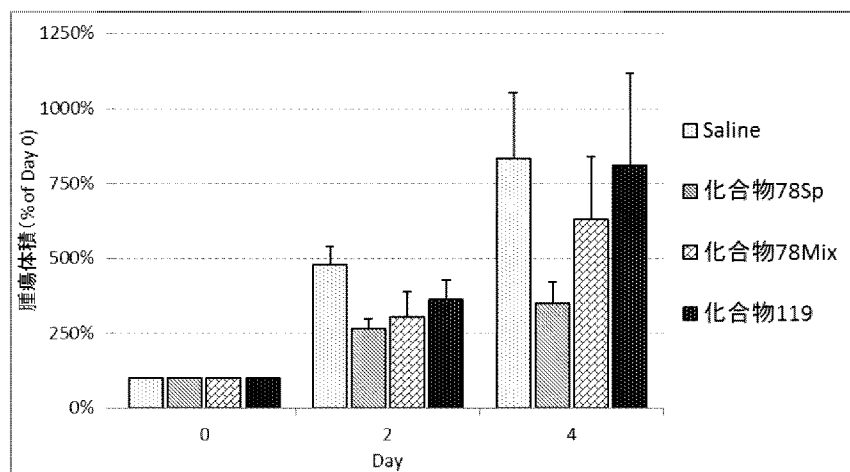
請求項1~5のいずれかに記載のアジュバンドを含み、

前記オリゴヌクレオチドを有効成分として含む, 抗腫瘍剤。

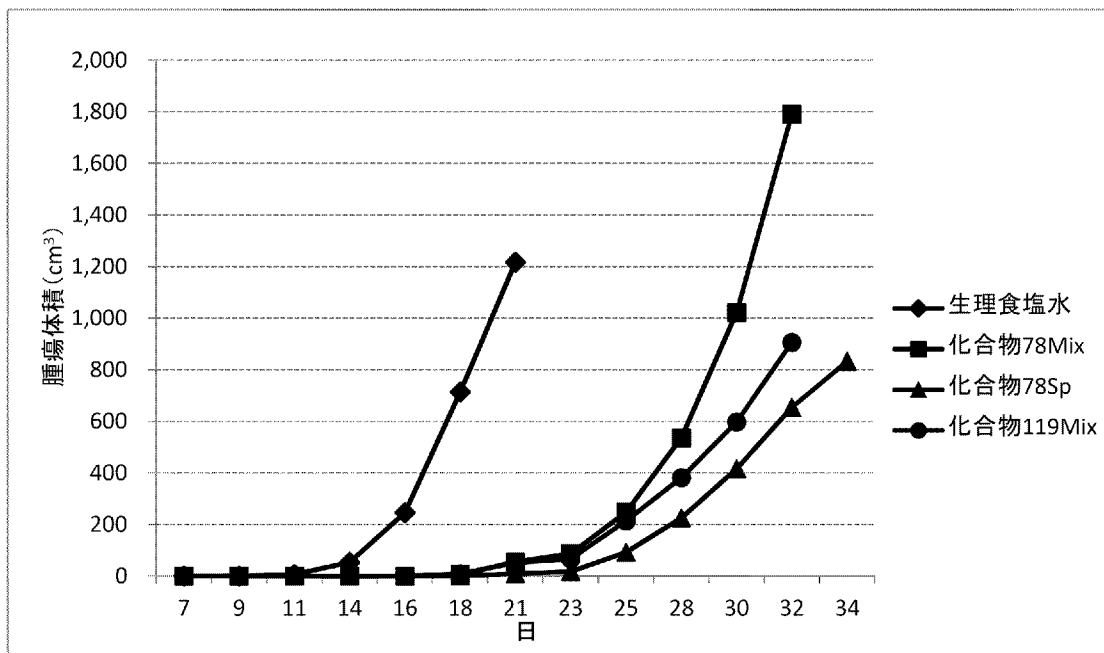
[図1]



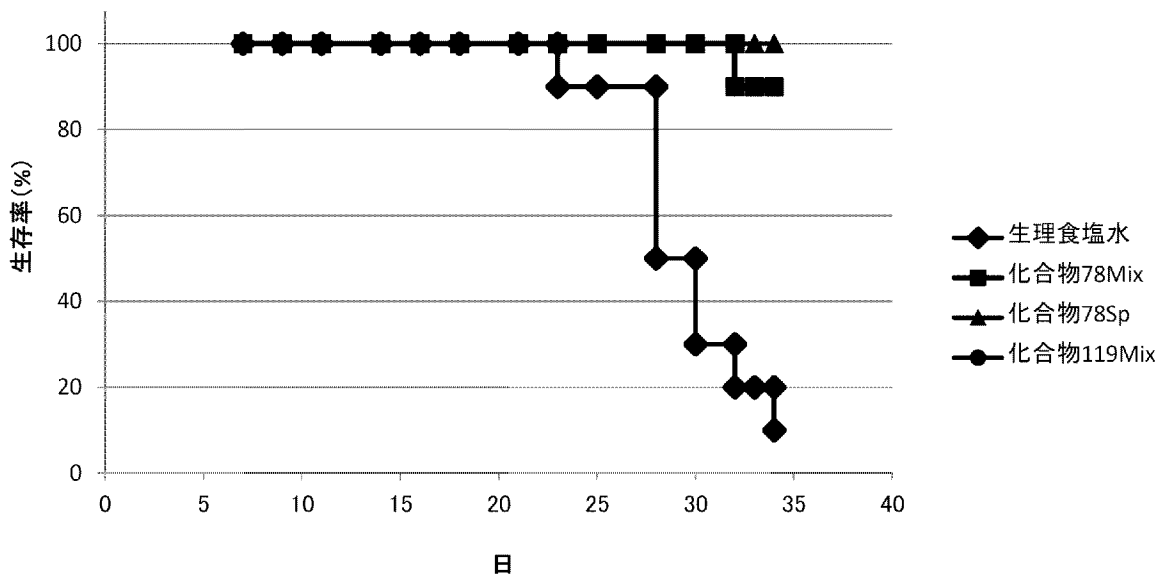
[図2]



[圖3]



[圖4]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2015/050718

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
A61K39/39(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,  
A61P37/04(2006.01)i, C12N15/117(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61K39/39, A61K31/7088, A61P35/00, A61P37/04, C12N15/117

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-501787 A (Kwon, Hyung-Joo), 24 January 2008 (24.01.2008), claims 1, 7; paragraphs [0005], [0009] & US 2008/0249291 A1 & WO 2006/080596 A1 & EP 1841777 A1 & CA 2549423 A & KR 10-2009-0096560 A	1-7
Y	JP 2008-502713 A (Bio Clue & Solution Co., Ltd.), 31 January 2008 (31.01.2008), claims 1, 6; table 1 & US 2009/0062224 A1 & WO 2006/049454 A1 & EP 1807094 A1 & KR 10-2006-0040417 A & CN 1938035 A	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 07 April 2015 (07.04.15)	Date of mailing of the international search report 21 April 2015 (21.04.15)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/050718

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-528027 A (Coley Pharmaceutical GmbH), 06 August 2009 (06.08.2009), claim 1; paragraph [0089]; SEQ ID NO:33 & US 2008/0045473 A1 & WO 2007/095316 A2 & EP 1991678 A2	1-7
Y	JP 2001-503267 A (University of Iowa Research Foundation), 13 March 2001 (13.03.2001), claims 1, 8, 10, 13 & US 6207646 B1 & WO 1998/018810 A1 & EP 948510 A1 & KR 10-2000-0052994 A	1-7
Y	JP 2003-510290 A (Coley Pharmaceutical Group, Inc.), 18 March 2003 (18.03.2003), claims 1, 19; SEQ ID NO:14 & US 2005/0169888 A1 & US 6949520 B1 & WO 2001/022990 A2 & EP 1220684 A2	1-7
Y	JP 10-506265 A (The University of Iowa Research Foundation), 23 June 1998 (23.06.1998), claims 1, 6, 9 & US 6207646 B1 & US 2003/0050261 A1 & WO 1996/002555 A1 & EP 772619 A1 & KR 10-2000-0052994 A & CN 1235609 A	1-7
Y	JP 2002-521489 A (University of Iowa Research Foundation), 16 July 2002 (16.07.2002), claim 1; table 1; paragraphs [0028], [0044] & WO 2000/006588 A1 & EP 1100807 A1	1-7
Y	KWON, Hyung-Joo et al., NF- $\kappa$ B-dependent regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ gene expression by CpG-oligodeoxynucleotides, Biochemical and Biophysical Research Communication, 2003, Vol.311, p.129-138, Table1	1-7
Y	BARTZ, H. et al., Poly-guanosine strings improve cellular uptake and stimulatory activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in human leukocytes, Vaccine, 2004, Vol.23, p.148-155, Table1	1-7
Y	YU, Dong et al., Accessible 5'-end of CpG- containing phosphorothioate oligodeoxynucleotides is essential for immunostimulatory activity, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, Vol.10, p.2585-2588, oligo no.1	1-7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/050718

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KURAMOTO, Y. et al., Mannosylated cationic liposomes/CpG DNA complex for the treatment of hepatic metastasis after intravenous administration in mice, Journal of Pharmaceutical Science, 2009, Vol.98, No.3, p.1193-1197, page 1194, right column, 1st paragraph	1-7
Y	KAUR, H. et al., Activation of natural killer-like YT-INDY cells by oligodeoxynucleotides and binding by homologous pattern recognition proteins, Scandinavian Journal of Immunology, 2005, Vol.62, p.361-370, Table1, CpG, page 361, right column	1-7
Y	YU, Dong et al., Stereo-enriched phosphorothioate oligodeoxynucleotides: Synthesis, biophysical and biological properties, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2000, Vol.8, p.275-284, abstract	1-7
Y	HARTMANN, G. et al., Delineation of a CpG Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide of activating primate immune responses in vitro and in vivo, The Journal of Immunology, 2000, Vol.164, No.3, p.1617-1624, ODN1826	1-7
Y	HARTMANN, B. et al., Sequence effects on energetic and structural properties of phosphorothioate DNA: a molecular modelling study, Nucleic Acid Research, 1999, Vol.27, No.16, p.3342-3347, abstract	1-7
P,X	WO 2014/10718 A1 (Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.), 16 January 2014 (16.01.2014), entire text (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A61K39/39(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, C12N15/117(2010.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A61K39/39, A61K31/7088, A61P35/00, A61P37/04, C12N15/117		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2008-501787 A (クウォン, ヒュン-ジョ) 2008.01.24, 請求項 1, 請求項 7, 段落【0005】、【0009】 & US 2008/0249291 A1 & WO 2006/080596 A1 & EP 1841777 A1 & CA 2549423 A & KR 10-2009-0096560 A	1-7
Y	JP 2008-502713 A (バイオ・クルー・アンド・ソリューション・カンパニー・リミテッド) 2008.01.31, 請求項 1, 6, 表 1 & US 2009/0062224 A1 & WO 2006/049454 A1 & EP 1807094 A1 & KR 10-2006-0040417 A & CN 1938035 A	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07.04.2015	国際調査報告の発送日 21.04.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 井上 明子 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 3230

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2009-528027 A (コーリー ファーマシューティカル ゲーエム ベーパー) 2009.08.06, 請求項1, 段落【0089】, 配列33等 & US 2008/0045473 A1 & WO 2007/095316 A2 & EP 1991678 A2	1-7
Y	JP 2001-503267 A (ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ フ ァウンデーション) 2001.03.13, 請求項1, 8, 10, 13 & US 6207646 B1 & WO 1998/018810 A1 & EP 948510 A1 & KR 10-2000-0052994 A	1-7
Y	JP 2003-510290 A (コーリー ファーマシューティカル グループ, インコーポレイテッド) 2003.03.18, 請求項1, 請求項19, 配列 番号14等 & US 2005/0169888 A1 & US 6949520 B1 & WO 2001/022990 A2 & EP 1220684 A2	1-7
Y	JP 10-506265 A (ザ ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ ファウンデーション) 1998.06.23, 請求項1, 6, 9 & US 6207646 B1 & US 2003/0050261 A1 & WO 1996/002555 A1 & EP 772619 A1 & KR 10-2000-0052994 A & CN 1235609 A	1-7
Y	JP 2002-521489 A (ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ フ ァウンデーション) 2002.07.16, 請求項1, 表1, 段落【0028】 【0044】 & WO 2000/006588 A1 & EP 1100807 A1	1-7
Y	KWON, Hyung-Joo et al., NF- $\kappa$ B-dependent regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ gene expression by CpG-oligodeoxynucleotides, Biochemical and Biophysical Research Communication, 2003, Vol.311, p.129-138, Table1	1-7
Y	BARTZ, H. et al., Poly-guanosine strings improve cellular uptake and stimulatory activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in human leukocytes, Vaccine, 2004, Vol.23, p.148-155, Table1	1-7
Y	YU, Dong et al., Accessible 5'-end of CpG-containing phosphorothioate oligodeoxynucleotides is essential for immunostimulatory activity, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, Vol.10, p.2585-2588, oligo no.1	1-7
Y	KURAMOTO, Y. et al., Mannosylated cationic liposomes/CpG DNA complex for the treatment of hepatic metastasis after intravenous administration in mice, Journal of Pharmaceutical Science, 2009, Vol.98, No.3, p.1193-1197, p.1194 右欄第1段落	1-7



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KAUR, H. et al., Activation of natural killer-like YT-INDY cells by oligodeoxynucleotides and binding by homologous pattern recognition proteins, Scandinavian Journal of Immunology, 2005, Vol. 62, p. 361-370, Table1 の CpG, p. 361 の右欄	1 - 7
Y	YU, Dong et al., Stereo-enriched phosphorothioate oligodeoxynucleotides: Synthesis, biophysical and biological properties, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2000, Vol. 8, p. 275-284, abstract	1 - 7
Y	HARTMANN, G. et al., Delineation of a CpG Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide of activating primate immune responses in vitro and in vivo, The Journal of Immunology, 2000, Vol. 164, No. 3, p. 1617-1624, ODN1826	1 - 7
Y	HARTMANN, B. et al., Sequence effects on energetic and structural properties of phosphorothioate DNA: a molecular modelling study, Nucleic Acid Research, 1999, Vol. 27, No. 16, p. 3342-3347, abstract	1 - 7
P X	WO 2014/10718 A1 (株式会社新日本科学) 2014.01.16, 全文 (ファミリーなし)	1 - 7