

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-507131

(P2014-507131A)

(43) 公表日 平成26年3月27日(2014.3.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q 1/42	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/117 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 J	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-546705 (P2013-546705)	(71) 出願人	506196247 インターベツト・インターナショナル・ペー・ペー
(86) (22) 出願日	平成23年12月29日 (2011.12.29)		
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月26日 (2013.8.26)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/074211		オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35
(87) 国際公開番号	W02012/089800	(74) 代理人	100146318 弁理士 岩瀬 吉和
(87) 国際公開日	平成24年7月5日 (2012.7.5)		
(31) 優先権主張番号	10197435.0	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成22年12月30日 (2010.12.30)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(31) 優先権主張番号	61/430,301		
(32) 優先日	平成23年1月6日 (2011.1.6)	(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチド

(57) 【要約】

本発明は、免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチド、当該オリゴデオキシヌクレオチドを含むベクターおよびワクチン、薬剤としてのその使用、感染症予防または防止におけるその使用、当該オリゴデオキシヌクレオチドの検出方法ならびに当該方法において使用される細胞に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式、



[式中、

各々の N_1 は独立して C または G であり；

各々の N_2 は独立して C または G であり；

N_3 および N_4 が双方 C である組合せは除外するという条件で $N_3 = T$ 、C または G であり；

各々の N_4 および N_5 は独立して C または T であり；

$N_6 = A$ 、T、G または C であり；

$N_7 = A$ 、T、C または G であり；

$N_8 = A$ 、T、C または G であり；

$x = 3 \sim 10$ であり；

$z = 0 \sim 10$ であり；

$n = 2 \sim 100$ であり；

$p = 1 \sim 6$ または $N_4 = T$ であれば $1 \sim 25$ であり；

$q = 1 \sim 6$ または $N_5 = T$ であれば $1 \sim 25$ であり；

$r = 0 \sim 8$ または $N_7 = T$ であれば $1 \sim 25$ であり；

$s = 0 \sim 8$ または $N_8 = T$ であれば $1 \sim 25$ である、]

を有する免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドまたはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 2】

$N_6 = A$ 、T または C である請求項 1 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 3】

N_3 が T または G、および N_6 が Y である請求項 1 または 2 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 4】

N_3 、 N_4 、 N_5 および $N_6 = T$ である請求項 3 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 5】

N_3 、 N_4 および $N_5 = T$ ならびに $N_6 = C$ である請求項 1 または 2 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 6】

N_3 が G でありおよび $N_6 = T$ である請求項 1 または 2 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 7】

$N_5 = T$ および $N_6 = C$ である請求項 1 または 2 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 8】

$N_5 = C$ 、 $N_6 = C$ および $q = 1$ である請求項 1 または 2 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 9】

$N_4 = T$ および $N_5 = Y$ である請求項 1 または 2 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 10】

$N_4 = T$ および $N_5 = T$ である請求項 9 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 11】

x が $4 \sim 7$ であり、および $r = 0$ または N_7 が A または T である請求項 1 ~ 10 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 12】

$x = 6$ である請求項 11 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 13】

z が 0 ~ 6、および $s = 0$ または N_8 が A または T である請求項 1 ~ 12 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 14】

z が 0 ~ 3 である請求項 13 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 15】

N_1 が G である請求項 1 ~ 14 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 16】

N_2 が G である請求項 1 ~ 14 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 17】

n が 3 ~ 18 である請求項 1 ~ 16 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

10

【請求項 18】

n が 4 ~ 18 である請求項 1 ~ 16 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 19】

n が 5 ~ 18 である請求項 1 ~ 16 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 20】

n が 5 ~ 18 でありおよび x が 4 ~ 7 でありおよび z が 0 ~ 3 でありおよび $r = 0$ または N_7 が A または T であり、および $s = 0$ または N_8 が A または T である請求項 1 ~ 11 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 21】

N_1 および N_2 がホスホロチオエート結合を有しならびに他のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合を有する請求項 1 ~ 20 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

20

【請求項 22】

$N_7 = T$ および $N_8 = T$ である請求項 1 ~ 21 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 23】

$\{ N_3 [N_4]_p C G [N_5]_q N_6 \}_n$ がホモポリマーである請求項 1 ~ 22 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 24】

当該オリゴデオキシヌクレオチドが担体またはハプテンに結合している請求項 1 ~ 23 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

30

【請求項 25】

請求項 1 ~ 23 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 26】

当該ワクチンが免疫賦活性量の請求項 1 ~ 24 のいずれか一項の免疫賦活性量のオリゴデオキシヌクレオチドおよび / または請求項 25 のベクター、免疫学性量の抗原成分または抗原成分をコードする遺伝情報、ならびに薬学的に許容可能な担体を含むことを特徴とする、感染症の予防または防止用ワクチン。

【請求項 27】

前記抗原成分がその野生型形態において家禽に対し病原性であるウイルスまたは微生物であるかまたはそれに由来することを特徴とする請求項 26 のワクチン。

40

【請求項 28】

前記ウイルスまたは微生物が、伝染性気管支炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病（ガンボ口病）、ニワトリ貧血ウイルス、トリレオウイルス、トリ呼吸器感染症病原菌、七面鳥鼻気管炎ウイルス、トリ伝染性コリザ病原菌（鼻感冒）、水痘ウイルス、ニワトリ脳脊髄炎ウイルス、産卵低下症候群ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス、七面鳥ヘルペスウイルス、Eimeria 種、トリ感染症病原菌（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、出血性敗血症菌（パスツレラ・ムルトシダ）、トリ病原菌（マイコプラズマ・シノビエ）、Salmonella 種および大腸菌から成る群より選択されることを特徴とする請求項 27 のワクチン。

【請求項 29】

50

薬剤としての使用のための請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項の免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 3 0】

家禽の感染予防における使用のための請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項の免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 3 1】

T L R 2 1 受容体および N F B レポーター遺伝子をコードし、細胞中で安定して保持されるプラスミドを含む細胞。

【請求項 3 2】

前記レポーター遺伝子が分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項 3 1 の細胞。

【請求項 3 3】

前記細胞がニワトリ細胞株 H D 1 1 またはその中にニワトリ T L R 2 1 受容体遺伝子がクローンされた H E K 2 9 3 細胞株の細胞であることを特徴とする請求項 3 1 または 3 2 の細胞。

【請求項 3 4】

当該方法が、 a) オリゴデオキシヌクレオチドを請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項の細胞と接触させ、および b) レポーター遺伝の産物のレベルを検出する段階を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項の免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチドの検出方法。

【請求項 3 5】

レポーター遺伝子の産物が分泌型アルカリホスファターゼである請求項 3 4 の方法。

【請求項 3 6】

細胞がニワトリ細胞株 H D 1 1、またはその中にニワトリ T L R 2 1 受容体遺伝子がクローンされた H E K 2 9 3 細胞株の細胞であることを特徴とする請求項 3 4 または 3 5 の免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチドの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチド、当該オリゴデオキシヌクレオチドを含むベクターおよびワクチン、薬剤としてのその使用、感染症予防または防止におけるその使用、当該オリゴデオキシヌクレオチドの検出方法ならびに当該方法において使用される細胞に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

過去 2 0 年間に、免疫系科学において脊椎動物の免疫系は、いわゆる病原体関連分子パターン (P A M P) が同起源の宿主の病原体認識受容体 (P R R) と相互作用するという病原体特有の性質を受容体媒介的に認識することによって、微生物感染を検知して迅速な免疫活性化の引き金を引くための機序を有することが明らかとなった (I w a s a k i A、M e d z h i t o v R . 2 0 0 1 . S c i e n c e 3 2 7、2 9 1 - 2 9 5。M e d z h i t o v R . , 2 0 0 9 . I m m u n i t y 3 0、7 6 6 - 7 7 5)。

【0 0 0 3】

病原体のデオキシリボ核酸 (D N A) の一定の形態が当該 P A M P の一つであることは今や明らかである。1 9 9 5 年に細菌 D N A 中の非メチル化 C p G モチーフがマウス B 細胞の活性化の引き金を引くことが報告された (K r i e g ら、1 9 9 5 年)。この研究は、細菌の免疫賦活性非メチル化 C p G を含む D N A の特異的認識と、哺乳動物 D N A に広く存在する C p G メチル化はもちろん、以前に認知された C p G サプレッションとの間の関連を初めて引き起こした。最も有効な B 細胞刺激性非メチル化 C p G オリゴデオキシヌクレオチド (C p G を含む O D V) は、配列エレメント G A C G T T を有することが明らかにされた。

10

20

30

40

50

【0004】

当該分野における次の画期的な論文は、日本の大阪の審良静男・研究室によって発表された(辺見ら、2000年)。マウスにおける遺伝子クローニングおよび標的遺伝子ノックアウト法によってCpG ODNに対するマウスにおける細胞応答は、Toll様受容体9(TLR9)によって媒介されることが疑いの余地なく示された。その後CpG ODNは、主にNFκB経路によるTLR9のシグナル伝達に対するアゴニストであることが明らかにされた(Medzhitov 2001年)。次の10年間に、相当な数の研究が基礎研究トピックスおよび一般的に有望な免疫療法の応用に関して発表された(例えば、Krieg 2002年、2003年、2006年; Klinman 2004年、Vollmer 2005年、Wilsonら、2006年、Kindrachukら、2008年、DornおよびKippenberger 2008年、VollmerおよびKrieg 2009年、Wilsonら、2009年に概説されている)。いくつかの総説が、CpG ODNの抗感染応用(Krieg 2007年)、癌治療におけるTLR9アゴニストの使用(Krieg 2007年、Weiner 2009年)、喘息およびアレルギー治療用のTLR9活性化(Kline 2007年、KlineおよびKrieg 2008年、FonsecaおよびKline 2009年)ならびにワクチンアジュバントとしてのTLR9活性化(Klinmanら、2004年、Klinman 2006年、Daubenberger 2007年、Wagner 2009年、Mutwiriら、2009年、Klinmanら、2009年)に焦点を合わせている。

10

20

【0005】

CpGを含むODVは、獣医学上の応用において、特にウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ニワトリおよび魚において免疫賦活剤およびワクチンアジュバントとして記載され論じられている(Babiukら、2003年、CarringtonおよびSecombes 2006年、Griebelら、2005年、Mutwiriら、2003年、SinghおよびO'Hagan 2003年、WerlingおよびJungi 2003年)。

【0006】

ニワトリにおける獣医学上の使用分野において、例えばニューカッスル病に対しニワトリを保護するためのワクチンにおけるCpGオリゴデオキシヌクレオチドの使用が記載されている(Linghua 2007年)。

30

【0007】

最近ニワトリにおいて、TLR21はCpGオリゴデオキシヌクレオチドの認識において哺乳動物のTLR9の機能的ホモログとして作動することが明らかにされた(Brownlieら、2009年)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Babiuk L.A., Gomis S., Hecker R., 2003. Molecular approaches to disease control. *Poult. Sci.* 82, 870-875.

40

【非特許文献2】Brownlie, R., Zhu J., Allan B., Mutwiri G.K., Babiuk L.A., Potter A., Griebel P., 2009. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol. Immunol.* 46, 3163-3170

【非特許文献3】Carrington A.C., Secombes C.J., 2006. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 87-101.

【非特許文献4】Daubenberger C.A., 2007. TLR9 agonists as adjuvants for prophylactic and therapeutic vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9, 45-52.

【非特許文献5】Dorn A., Kippenberger S., 2008. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Curr. Opin. Mol*

50

. Ther. 10, 10-20.

【非特許文献6】Fonseca D.E., Kline J.N., 2009. Use of CpG oligodeoxynucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 256-262.

【非特許文献7】Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.

【非特許文献8】Griebel P.J., Brownlie R., Manuja A., Nichani A., Mookherjee N., Popowych Y., Mutwiri G., Hecker R., Babiuk L.A., 2005. Bovine toll-like receptor 9: a comparative analysis of molecular structure, function and expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 11-16. 10

【非特許文献9】Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.

【非特許文献10】Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. 2010. *Science* 327, 291-295.

【非特許文献11】Kestra A.M., 2008. Molecular dissection of the chicken Toll-like receptor repertoire. PhD thesis (Proefschrift), University of Utrecht, The Netherlands

【非特許文献12】Kline J.N., 2007. Immunotherapy of asthma using CpG oligodeoxynucleotides. *Immunol. Res.* 39, 279-286. 20

【非特許文献13】Kline J.N., Krieg A.M., 2008. Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect.* 21, 434-439.

【非特許文献14】Klinman D.M., 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 249-258.

【非特許文献15】Klinman D.M, Currie D., Gursel I., Verthelyi D., 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* 199, 201-216.

【非特許文献16】Klinman D.M., 2006. Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *Int. Rev. Immunol.* 25, 135-154. 30

【非特許文献17】Klinman D.M., Klaschik S., Sato T., Tross D., 2009. CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 248-255.

【非特許文献18】Kindrachuk J., Potter J., Wilson H.L., Griebel P., Babiuk L.A., Napper S., 2008. Activation and regulation of toll-like receptor 9: CpGs and beyond. *Mini Rev. Med. Chem.* 8, 590-600.

【非特許文献19】Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.

【非特許文献20】Krieg A.M., 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 709-760. 40

【非特許文献21】Krieg A.M., 2003. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat. Med.* 9, 831-835.

【非特許文献22】Krieg A.M., 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 471-484.

【非特許文献23】Krieg A.M., 2007a. Anti-infective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 289-294.

【非特許文献24】Krieg A.M., 2007b. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* 117, 1184-1194.

【非特許文献25】Linghua Zhang et al., 2007. Vaccination with Newcastle disease 50

vaccine and CpG oligodeoxynucleotides induces specific immunity and protection against Newcastle disease virus in SPF chicken. *Vet. Immun. And Immunopath.* 115, 216-222.

【非特許文献 2 4】Medzhitov R., 2001. CpG DNA: security code for host defense. *Nat. Immunol.* 2, 15-16.

【非特許文献 2 5】Medzhitov R., Approaching the asymptote: 20 years later. 2009. *Immunity* 30, 766-775)

【非特許文献 2 6】Mutwiri G., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A., 2009. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 226-232. 10

【非特許文献 2 7】Mutwiri G., Pontarollo R., Babiuk S., Griebel P., van Drunen Littel-van den Hurk S., Mena A., Tsang C., Alcon V., Nichani A., Ioannou X., Gomis S., Townsend H., Hecker R., Potter A., Babiuk L.A., 2003. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 89-103.

【非特許文献 2 8】Schindler, U., and Baichwal, V.R., 1994. *Moll. Cell. Biol.* 14: 5820-5831.

【非特許文献 2 9】Singh M., O'Hagan D.T., 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. Parasitol.* 33, 469-478.

【非特許文献 3 0】Vollmer J., 2005. Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 673-682. 20

【非特許文献 3 1】Vollmer J., Krieg A.M., 2009. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 195-204. Wagner H., 2009. The immunogenicity of CpG-antigen conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 243-247.

【非特許文献 3 2】Weiner G.J., 2009. CpG oligodeoxynucleotide-based therapy of lymphoid malignancies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 263-267.

【非特許文献 3 3】Werling D., Jungi T.W., 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 1-12. 30

【非特許文献 3 4】Wilson H.L., Dar A., Napper S.K., Marianela Lopez A., Babiuk L.A., Mutwiri G.K., 2006. Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides. *Int. Rev. Immunol.* 25, 183-213.

【非特許文献 3 5】Wilson K.D., de Jong S.D., Tam Y.K., 2009. Lipid-based delivery of CpG oligodeoxynucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 233-242.

【非特許文献 3 6】Yang, T.T., Sinai, P., Kitts, P.A., Kain, S.R., 1997. Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechniques* 23, 1110-1114.

【発明の概要】 40

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

免疫調節剤としての特異的 CpG を含む ODV の設計はこれまで極めて行き当たりばったりだった。これは非哺乳動物の CpG を含む ODV に関しては特にあてはまっている。これに対する理由には複数の要因があるが、まず第一に、ヒト TLR に対する免疫調節性 CpG モチーフと、非哺乳動物種は言うまでもなく非ヒトにおける TLR に対するそれとの間の相関性について知識が存在しない。第二に、極めて低濃度の CpG を含む ODV の効果を選択的に試験するために、ノイズレベルに対し十分に低いバックグラウンドを具備する利用可能な細胞系が存在しない。さらに、利用可能な高処理のスクリーニング法が存在せず、存在したとしても、非哺乳動物種における免疫調節剤としての CpG を含む OD 50

Vのインビボとインビトロでの効果の間の明確な相関性が存在しない。

【0010】

従って、高い免疫調節効果を有しそれ故に低用量で効果的な新規のCpGを含むODVの必要性がある。しかも、CpG活性のインビトロとインビボ活性の間の相関性を示す、獣医学上の目的のための選択的で鋭敏なCpGを含むODV選択系の必要性がある。

【0011】

それが当該新規CpGを含むODVを提供する本発明の目的の一つである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

この点で本発明の1実施態様は、一般式 ${}^5' [N_1]_x [N_7]_r \{ N_3 [N_4]_p C G [N_5]_q N_6 \}_n [N_8]_s [N_2]_z {}^3'$ を有し、ここで各々の N_1 は独立してCまたはGであり；各々の N_2 は独立してCまたはGであり； N_3 および N_4 が双方Cである組合せは除外するという条件で N_3 はT、CまたはGであり；各々の N_4 および N_5 は独立してCまたはTであり； $N_6 = A、T、G$ またはCであり； $N_7 = A、T、C$ またはGであり； $N_8 = A、T、C$ またはGであり； $x = 3 \sim 10$ であり； $z = 0 \sim 10$ であり； $n = 2 \sim 100$ であり； $p = 1 \sim 6$ 、または $N_4 = T$ であれば $1 \sim 25$ であり； $q = 1 \sim 6$ 、または $N_5 = T$ であれば $1 \sim 25$ であり； $r = 0 \sim 8$ 、または $N_7 = T$ および $s = 0 \sim 8$ であれば $1 \sim 25$ であり、または $N_8 = T$ であれば $1 \sim 25$ である、免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドまたは前記オリゴデオキシヌクレオチドの薬学的に許容可能な塩に関する。

10

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】pcDNA3.1(+)-chITLR21のプラスミド地図

【図2】種々のzeo/G418二重耐性クローン細胞株のSEAP活性の概要

【図3】種々のzeo/G418二重耐性クローン細胞株のSEAP活性の概要

【図4】種々のzeo/G418二重耐性クローン細胞株のSEAP活性の概要

【図5】種々のzeo/G418二重耐性クローン細胞株のSEAP活性の概要

【図6】HD11-pNifTyhygクローン細胞株に関する2000nMから始まる滴定試験

【図7】100nMから始まる滴定試験において得られたHEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chITLR21クローン細胞株の結果

30

【図8】2000nMから始まる滴定試験において得られたHD11-pNifTyhygクローン細胞株の結果

【図9】100nMから始まる滴定試験において得られたHEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chITLR21クローン細胞株の結果

【図10】2000nMから始まる滴定試験において得られたHD11-pNifTyhygクローン細胞株の結果

【図11】100nMから始まる滴定試験において得られたHEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chITLR21クローン細胞株の結果

【図12】100nMから始まる滴定試験において得られたHEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chITLR21クローン細胞株の結果

40

【図13】100nMから始まる滴定試験において得られたHEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chITLR21クローン細胞株の結果

【図14】100nMから始まる滴定試験において得られたHEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chITLR21クローン細胞株の結果

【図15】100nMから始まる滴定試験において得られたHEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chITLR21クローン細胞株の結果

【図16】50nMから始まる滴定試験において得られたHEK293-pNifTy2-pcDNA3.1-chITLR21クローン細胞株の結果

【図17】50nMから始まる滴定試験において得られたHEK293-pNifTy2

50

- p c D N A 3 . 1 c h i T L R 2 1 クローン細胞株の結果
- 【図 18】50 nM から始まる滴定試験において得られた H E K 2 9 3 X L p U N O h u T L R 9 p N i f T y 2 クローン細胞株の結果
- 【図 19】20 nM から始まる滴定試験において得られた H E K 2 9 3 p N i f T y 2 p c D N A 3 . 1 c h i T L R 2 1 クローン細胞株の結果
- 【図 20】25 nM から始まる滴定試験において得られた H E K 2 9 3 p N i f T y 2 p c D N A 3 . 1 c h i T L R 2 1 クローン細胞株の結果
- 【図 21】20 nM から始まる滴定試験において得られた H E K 2 9 3 p N i f T y 2 p c D N A 3 . 1 c h i T L R 2 1 クローン細胞株の結果
- 【図 22】20 nM から始まる滴定試験において得られた H E K 2 9 3 p N i f T y 2 p c D N A 3 . 1 c h i T L R 2 1 クローン細胞株の結果 10
- 【図 23】骨格の 3 量体に隣接する T 数の効果
- 【図 24】C G エレメントを「分離する」T 数の効果
- 【図 25】T T C G T T 繰り返し数の効果
- 【図 26】T T C G T T 繰り返し数の効果
- 【図 27】繰り返し三量体の型の効果
- 【図 28】T T C G T T 繰り返しの境界における T 残基数の効果
- 【図 29】O D N X 4 2 モチーフ数の効果
- 【図 30】O D N X 4 3 モチーフ数の効果
- 【図 31】O D N X 4 3 モチーフ数の効果 20
- 【図 32】O D N X 4 のさらなる変異型
- 【発明を実施するための形態】
- 【0014】
- 「免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド」とは、N F B またはインターフェロン制御因子 3 (I R F 3) 等の転写因子の活性化をもたらしてシグナル伝達カスケードの開始を刺激する、非メチル化シチジン リン酸-グアノシンジヌクレオチド配列を含むオリゴデオキシヌクレオチドを言う。炎症性サイトカインおよび他の細胞活性化事象の発現において次々に生じるのはこの活性化である。N F B 結合部位および N F B によって影響を受ける遺伝子発現は、S c h i n d l e r および B a i c h w a l (1 9 9 4 年) によって記載されている。 30
- 【0015】
- 用語オリゴデオキシヌクレオチドは、デオキシヌクレオチドの短い核酸ポリマー、換言すればリン酸基および交換可能な有機塩基に結合する多数のデオキシリボースを含む分子を意味する。当該有機塩基とは置換ピリミジンまたは置換プリンである。例は、それぞれシトシンおよびチミン、アデニンおよびグアニンである。
- 【0016】
- 本発明のオリゴデオキシヌクレオチドは修飾を含んでもよい。当該修飾の例は、例えばヌクレオシドの 3 ' および / または 5 ' 末端に位置するリン酸ジエステルヌクレオチド間架橋中の修飾である。当該修飾は、例えばホスホロチオエートまたはジチオリン酸によるリン酸ジエステルの置換に関連する。 40
- 【0017】
- 他の修飾は、例えばデホスホ架橋によるリン酸ジエステル架橋の置換である。デホスホ架橋の例は、メチルヒドロキシルアミン、ギ酸アセタールおよびジメチレンスルホン基である。
- 【0018】
- さらなる他の修飾は、非天然ヌクレオシド塩基、例えば 5 フルオロシトシン、7 デアザ 7 置換グアニン、7 デアザ 8 置換グアニン、2 チオウラシル、ジヒドロウラシル、5 プロモ シトシン、6 置換シトシン、N 4 置換シトシン等による天然ヌクレオシド塩基の置換に係る修飾である。
- 【0019】 50

また他の例としては、糖単位の置換、例えばL 2' デオキシリボースまたは2' L アラビノース等の修飾糖単位による リボース糖単位または D 2' リボース糖単位の置換に係する修飾である。

【0020】

オリゴデオキシヌクレオチドのより以上の識見を与えてくれる教科書は、例えば「PCR Primer: A Laboratory Manual (PCRプライマー: 実験マニュアル)」第2版、2003年、Carl W. Dieffenbach (アメリカ国立アレルギー・感染症研究所); Gabriela S. Dreksler (軍人保健科学大学) 編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ISBN 978 087969654 2である。

10

【0021】

CpGモチーフを保有する構造 $\{N_3 [N_4]_p CG [N_5]_q N_6\}_n$ は、本発明のODNの活性な免疫賦活性部を表す。それ故に本発明は、このいわゆる「骨格 (back bone)」を含む免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチドを提供する。

【0022】

本発明のオリゴデオキシヌクレオチドの骨格、構造 $\{N_3 [N_4]_p CG [N_5]_q N_6\}_n$ は少なくとも2回、好ましくは3回存在しなければならないことが見出された。それ故に、nは少なくとも2であるべきである。またnが増加すると、オリゴデオキシヌクレオチドの活性が増大することも見出された。この効果はnが増加するにつれ横ばいとなる。基本的に、骨格構造の数字nは、それ故に少なくとも2であるべきである。好ましくはnの範囲は3 n 100であるが、とって合成配列が長くなればなるほど合成するのがますます困難となるという事実がある。実際に好ましいのは、2 n 18の範囲である。より好ましいのは3 n 18の範囲であり、より一層好ましいのは4 n 18の範囲であり、さらなるより一層好ましいnの範囲は5 n 18の範囲である。

20

【0023】

本発明のCpGを含むODVの検出確認は、NF B活性化の検出用に現在使用されている系よりもより選択的な検出系を使用することによって可能となった。Brownlieら(2009年)はNF Bルシフェラーゼを含むレポーター系を記載している。他の系は、例えばIL 8転写産物の測定またはサイトカイン分泌またはNO分泌の検出に基づいている。

30

【0024】

これに反して本発明においては、分泌型アルカリホスファターゼに基づく検出系(SEAP)を使用した。SEAPは哺乳動物系におけるレポーター酵素である(Yangら、1997年)。この系は、驚くほど鋭敏でありしかも加えて驚くべきことに、試験したCpGを含むODVのインピトロ活性およびインピボ活性の間の緊密な相関性を提供することが分かった。SEAP系は基質としてパラニトロフェニルリン酸(pNPP)と共に使用した。

【0025】

現行系に関するもう一つの改善は、SEAP遺伝子を保有するプラスミドの細胞への導入と安定した保持だった。今まで、すべての検出系はレポーター遺伝子による細胞の一過性形質移入を使用した。今度初めて用量反応曲線を作成することができたのは、レポーター遺伝子の細胞への導入と安定した保持のためである。当該曲線は、種々のCpGを含むODV活性間で信頼できる比較をするために必須である。

40

【0026】

それ故に、実施例の欄において詳細に記載する本発明の方法および細胞株が、種々のCpGを含むODV間の信頼できる並行比較を行うことを初めて可能とする。

【0027】

使用した系のそれ以上の詳細は、実施例の欄に提示する。

【0028】

今や本発明の方法および細胞株により種々のCpGを含むODV間の信頼できる当該並

50

行比較が可能であるので、 $N_6 = A$ 、 T または C である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドは、 $N_6 = G$ よりも高い活性を有することが証明され得た。それ故に、この実施態様の好ましい形態において $N_6 = A$ 、 T または C である。

【0029】

同じ理由で、他の好ましい形態において N_3 は T または G ；および $N_6 = Y$ ($Y = C$ または T)である。

【0030】

この実施態様のより好ましい形態において、 N_3 、 N_4 、 N_5 および $N_6 = T$ である。

【0031】

この実施態様の他の好ましい形態は、 N_3 、 N_4 および $N_5 = T$ および $N_6 = C$ である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

10

【0032】

この実施態様のさらなる他の好ましい形態は、 N_3 が G であり $N_6 = T$ である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【0033】

この実施態様のさらなる他の好ましい形態は、 $N_5 = T$ および $N_6 = C$ である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【0034】

またこの実施態様の好ましい形態は、 $N_5 = C$ 、 $N_6 = C$ および $q = 1$ である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

20

【0035】

この実施態様の他の好ましい形態は、 $N_4 = Y$ および $N_5 = Y$ である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【0036】

この最後の実施態様のより好ましい形態は、 $N_4 = T$ および $N_5 = Y$ である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【0037】

この最後の実施態様のより一層好ましい形態は、 $N_4 = T$ および $N_5 = T$ である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【0038】

この実施態様の他の形態は、 x が4～7および $r = 0$ または N_7 が A または T である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

30

【0039】

この実施態様の好ましい形態は、 x が6および $r = 0$ または N_7 が A または T である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【0040】

この実施態様の他の形態は、 z が0～6および $s = 0$ または N_8 が A または T である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【0041】

この実施態様の好ましい形態は、 z が0～3および $s = 0$ または N_8 が A または T である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

40

【0042】

この実施態様のさらなる他の形態は、 N_1 が G である。

【0043】

この実施態様の好ましい形態は、 N_2 が G である。

【0044】

3' および5' 末端ヌクレオチドの双方の数に関し広い範囲が存在するとはいえ、双方の値に関して最適範囲が存在することが見出された。 $s = 0$ または N_8 が A または T であるならば、本発明のオリゴデオキシヌクレオチド骨格の3' フランキング領域を形成する $[N_2]$ ヌクレオチドの数は、好ましくは0と5ヌクレオチドの間、より好ましく

50

は 0 と 3 ヌクレオチドの間の範囲である。

【 0 0 4 5 】

また $r = 0$ または N_7 が A または T であるならば、本発明のオリゴデオキシヌクレオチド骨格の 5' フランキング領域を形成する $[N_1]$ ヌクレオチドの数は、4 と 7 ヌクレオチドの間の範囲において最適であることも見出された。

【 0 0 4 6 】

この実施態様の最も好ましい形態は、 $r = 0$ または N_7 が A または T であり、ならびに $s = 0$ または N_8 が A または T であり、ならびに $n = 5 \sim 18$ および $x = 4 \sim 7$ および $z = 0 \sim 3$ である。

【 0 0 4 7 】

上述の通り、ヌクレオチドの 3' および / または 5' 末端に位置するリン酸ジエステルのヌクレオチド間架橋における数種の修飾が実行可能である。しかし基本的に、2 のヌクレオチド間の一般的な通常の結合型は、合成の方法に依存してリン酸ジエステル結合 (PDE) およびホスホロチオエート (PTO) 結合である。CpG を含む ODV の安定性および免疫賦活効果を改善するために、合成オリゴデオキシヌクレオチドの構成要素にはホスホロチオエートが提供され、その結果 PTO 結合を形成する。

【 0 0 4 8 】

しかし驚いたことには、 $[N_1]$ ヌクレオチドおよび $[N_2]$ ヌクレオチドだけが PTO 結合で結合し、ならびに他のヌクレオチドが PDE 結合で結合しているときに、本発明のオリゴデオキシヌクレオチドの効力が強く増強されることが見出された。(その場合、 N_1 ないし N_7 結合 (GT) は PTO であり、一方で N_8 ないし N_2 (TG) 結合は PDE である。)

これは $[N_1]$ および $[N_2]$ ヌクレオチドが G であるときの特別な場合である。

【 0 0 4 9 】

それ故にこの実施態様の他の好ましい形態は、 N_1 および / または N_2 がホスホロチオエート結合を有して、他のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合を有する本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【 0 0 5 0 】

本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関して $N_7 = T$ および $N_8 = T$ であるとき、より一層効果的なオリゴデオキシヌクレオチドが得られることが見出された。

【 0 0 5 1 】

従って、この実施態様のさらなる他の好ましい形態は、 $N_7 = T$ および $N_8 = T$ である本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関する。この場合、 r および s は独立して 1 ~ 25 の間である。

【 0 0 5 2 】

本発明のオリゴデオキシヌクレオチド骨格、構造 $\{N_3 [N_4]_p CG [N_5]_q N_6\}_n$ はあらゆる n に対して同一である必要はない。これは本発明のオリゴデオキシヌクレオチドが、 $\{TTCGTT\} \{CTCGTG\} \{GTCGTA\}$ のようであり得ることを意味する。3 の異なる連続する異なる骨格のこのような系列は、ヘテロポリマーと表される。3 の同一の複製物の一続きはホモポリマーと呼ばれる。

【 0 0 5 3 】

好ましくは本発明のオリゴデオキシヌクレオチドは、ホモポリマー $\{N_3 [N_4]_p CG [N_5]_q N_6\}$ を含む。

【 0 0 5 4 】

本発明の CpG を含むオリゴデオキシヌクレオチドは、インビトロおよびインビボでの双方の試験系においてほとんどの場合ナノモル量で活性である。しかし本発明の CpG を含むオリゴデオキシヌクレオチドの幾つかは、ピコモル (ナノモル以下) 量でさえ活性であり、その EC50 (50% 有効濃度) は 1 nM 未満である。

【 0 0 5 5 】

オリゴデオキシヌクレオチドの最大半量効果濃度 (EC50) とは、レポーター細胞 (

10

20

30

40

50

HEK293 pNifTy2 ニワトリTLR21またはHD11 pNifTy2 Hyg)中の、最大半量吸収を与えるレポーター酵素SEAP(405nmに吸収をもつ着色産物を産生する)の量を誘導するのに必要であるオリゴデオキシヌクレオチドの量である。オリゴデオキシヌクレオチドのEC50がこれらの細胞中で1nM未満であれば、ピコモル(ナノモル以下)量で活性であると考えられる。

【0056】

以下に列挙する4の一般式の1と一致するほとんどのCpGを含むODNは、インビトロでナノモル量での効果の引き金を引くことが明らかとなった。

【0057】

- 1) $5' [G]_x \{TTCGTN_6\}_n [G]_z 3'$ ここで $N_6 = A$ または T 、 $n = 5 \sim 100$ 、 $x = 3 \sim 10$ 、 $z = 0 \sim 10$ 10
- 2) $5' [G]_x \{N_3TCGTC\}_n [G]_z 3'$ ここで $N_3 = G$ または T 、 $n = 5 \sim 100$ 、 $x = 3 \sim 10$ 、 $z = 0 \sim 10$
- 3) $5' [G]_x \{TTCGCC\}_n [G]_z 3'$ ここで $n = 5 \sim 100$ 、 $x = 3 \sim 10$ 、 $z = 0 \sim 10$
- 4) $5' [G]_x \{T[T]_p CG[T]_q T\}_n [G]_z 3'$ ここで $p = 1 \sim 10$ 、 $q = 1 \sim 10$ 、 $n = 5 \sim 100$ 、 $x = 3 \sim 10$ 、 $z = 0 \sim 10$

これら4の全ての式にとって、費用対効果の理由からnは好ましくは5~18の範囲である。xは4~9、5~8、6または7の範囲がその優先順位で好ましく、zは8、7、6、5、4、3、2、1または0がその優先順位で好ましい。該当する場合は、pは好ましくは1~5ならびにqは好ましくは1~5である。 20

【0058】

本発明のオリゴデオキシヌクレオチドを、反応性の化学基によって担体またはハプテンに結合することも可能である。当該結合は結合分子の免疫賦活作用を亢進する。

【0059】

当該成分の例にすぎないが、ジゴキシゲニン、アミノヘキシル、Texas redおよびビオチンがある。好ましい担体またはハプテンは、3' および5' 標識Texas redおよび5' 標識ジゴキシゲニンである。ハプテン/担体へのオリゴデオキシヌクレオチドの結合は当該分野において周知である。

【0060】

本発明の他の実施態様は、本発明の免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドを含むベクターに関する。当該ベクターは、例えばプラスミド、ウイルス、バクテリオファージまたは分子生物学において使用される任意の他のベクター等の核酸分子であり得る。単に例に過ぎないが、免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドを含むベクターはDNA分子、例えば、本発明の免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドがクローンされた、細菌中で増殖でき得るプラスミド等であり得る。当該プラスミドは好ましくは、多数のプラスミドが宿主中に存在することを招来する活性な複製起点を有する。その後プラスミドの単離へと続く大規模な当該細菌の増殖は、本発明の免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドの合成による生産の代替法を提供する。 30

【0061】

本発明の目的の一つは、抗原成分または抗原成分をコードする遺伝情報、ならびに薬学的に許容可能な担体と共に感染症を予防または防止するワクチン中の奏功する免疫賦活性成分として使用し得る、新規CpGを含むODVを提供することである。 40

【0062】

一般的に用語抗原成分とは、ヒトまたは動物に投与されたときに免疫応答を誘導、刺激または亢進し得る少なくとも1のエピトープを含む物質の組成物を言う。

【0063】

抗原成分は任意の種類抗原成分であってもよいが、好ましくは、その野生型の形態においてヒトまたは動物に対し病原性である微生物またはウイルス由来である。

【0064】

抗原成分は病原体の全体であり得るが、好ましくは不活化または弱毒化形態、病原体の抽出物または病原体の免疫原性タンパク質であり得る。

【0065】

抗原成分が病原体の免疫原性タンパク質であるならば、当該免疫原性タンパク質は好ましくはインビトロでの培養細胞において発現し同細胞から回収する。

【0066】

それ故に他の実施態様は、感染症を予防または防止するためのワクチンに関し、前記ワクチンは免疫賦活性量の本発明のオリゴデオキシヌクレオチドおよび/または本発明のベクター、免疫原性量の抗原成分または免疫成分をコードする遺伝情報、ならびに薬学的に許容可能な担体を含むことを特徴とする。

【0067】

もちろん、免疫賦活性量のオリゴデオキシヌクレオチドおよび免疫原性量の抗原成分は強く相互に関係している。本発明のオリゴデオキシヌクレオチドの存在が、感染症を予防または防止するために必要である抗原成分量を低下させ得ることは、本発明の利点の一つである。

【0068】

感染症を予防または防止するために必要である抗原成分量は、抗原成分の免疫原性量とも呼ばれる。

【0069】

オリゴデオキシヌクレオチドの免疫賦活性量とは、抗原成分の免疫原性量、即ち感染症を予防または防止するために必要である抗原成分量を減少させることのできる量である。

【0070】

それゆえ基本的に、「オリゴデオキシヌクレオチドの免疫賦活性量」および「免疫原性量」という表現は、互い同士の関係において検討されなくてはならない。

【0071】

言うまでもないが、ワクチンが抗原成分をコードする遺伝情報を含むならば、この遺伝情報によって発現される抗原成分量は、感染症を予防または防止するために十分であるべきであり、即ち免疫原性量でなければならない。

【0072】

本発明の非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドが免疫賦活性であるという事実は、それらがワクチン中の抗原成分の免疫学的効果を亢進することを意味する。その理由から本発明のワクチンは、本発明のオリゴデオキシヌクレオチドが存在しないとすればそうであろう場合よりも、多くの場合より少ない抗原成分または抗原成分をコードする遺伝情報を含むであろう。

【0073】

いくつかの場合には抗原成分それ自体が、免疫賦活性オリゴヌクレオチドの添加なしでは、非常に低い免疫原性の性質しか有さないために、望む免疫原性に達しないにもかかわらず大量に与えられなければならない。しかしながら今やこのような場合に、抗原成分は望むレベルの免疫原性を得るために本発明のオリゴデオキシヌクレオチドと共に、通常の高濃度で与えることができる。

【0074】

従って本発明のオリゴヌクレオチドと共に投与される抗原成分または抗原成分をコードする遺伝情報の量は、大ざっぱに言うとオリゴヌクレオチド非存在下で与えられる量と同等かまたは低いであろう。特定のワクチンの製造に関与する当業者は、その特定のワクチンに対するその量を知っているであろう。また実施例には、例えば異なる3の不活化ウイルスワクチン：ニューカッスル病ウイルスワクチン、伝染性気管支炎ウイルスワクチンおよび七面鳥鼻気管炎ワクチンにおいて使用される抗原成分量に関する豊富なガイダンスを提供する。

【0075】

抗原成分または抗原成分をコードする遺伝情報と共に投与される必要のある本発明のオ

10

20

30

40

50

リゴデオキシヌクレオチド量は、選択されたオリゴデオキシヌクレオチドおよび抗原成分の双方に依存する。

【0076】

本発明のオリゴデオキシヌクレオチドの非常に適した量は、通常1および100ナノモルの間で変動するであろう。例えば、平均長30デオキシヌクレオチドを有する1~10 μ gの本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに関し非常に良いインビボでの結果が得られ、それはインビトロ試験においてナノモル範囲で活性であることが明らかにされた。

【0077】

オリゴデオキシヌクレオチドがピコモル範囲で活性であるオリゴデオキシヌクレオチド群から選択されるならば、当業者はナノモル量で試験する前に1ナノモル未満の、おそらく1ナノモルに到底達しない量、即ちピコモル量を試験する価値があるであろうことを了解するであろう。

【0078】

本発明のワクチンは薬学的に許容可能な担体を含む。この担体の性質は投与経路に依存する。投与経路が経口または鼻腔内経路であるならば、担体は滅菌水、生理食塩水または緩衝液のように単純であり得るであろう。注射が好ましい経路であるならば、担体は好ましくは等張であり、しかもそれを注射に適化するpH制限を有するべきであろう。しかしながら当該担体は当該分野において広く知られている。

【0079】

本発明のワクチンは、抗原成分または抗原成分をコードする遺伝情報、および本発明のオリゴデオキシヌクレオチドに加えて、アジュバントを含んでもよい。アジュバントは一般的に、宿主の免疫応答を非特異的に追加免疫する物質である。

【0080】

多くのアジュバント、例えば完全および不完全フロイントアジュバント、ビタミンE、硫酸デキストラン等の非イオン性ブロックポリマーおよびポリアミン、カーボポールおよびピラン、水酸化アルミニウム等が適していることが当該分野で知られている。また、しばしばリン酸アルミニウム、サポニン、トコフェロール等の植物油および鉱物油が使用される。非常に効果的なアジュバントは、水中油型エマルジョンおよび特に油中水型エマルジョンであり、また水中油型アジュバントおよび油中水型アジュバントとも言う。

【0081】

好ましくは抗原成分は、その野生型の形態において家禽に対し病原性であるウイルスまたは微生物であるかまたはそれらに由来する。

【0082】

より好ましくは、前記のウイルスまたは微生物は、伝染性気管支炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病（ガンボロ病）、ニワトリ貧血ウイルス、トリレオウイルス、トリ呼吸器感染症病原菌、七面鳥鼻気管炎ウイルス、トリ伝染性コリザ病原菌（鼻感冒）、水痘ウイルス、ニワトリ脳脊髄炎ウイルス、産卵低下症候群ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス、七面鳥ヘルペスウイルス、Eimeria種、トリ感染症病原菌（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、出血性敗血症菌（パスツレラ・ムルトシダ）、トリ病原菌（マイコプラズマ・シノピエ）、Salmonella種および大腸菌から成る群より選択される。

【0083】

本発明のさらなる他の実施態様は、薬剤としての使用のための本発明の免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【0084】

本発明のさらなる他の実施態様は、家禽における感染症の予防または防止における使用のための本発明の免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドに関する。

【0085】

今まですべての検出系は、レポーター遺伝子による細胞の一過性の形質移入を使用していた。当該一過性の系は、CpGを含むODVの効果の信頼できる並行比較を可能としな

10

20

30

40

50

い。上述の通り、現行系にまさった主な改善は、レポーター遺伝子を保有するプラスミドの細胞中への導入および安定した保持だった。安定したとは、プラスミドが数回の細胞分裂周期後にも細胞中に依然として存在することを意味する。

【0086】

しばしばプラスミドの安定した保持は、プラスミド上にそれに対する耐性遺伝子が存在する抗生物質等の1または複数の選択剤の圧力下で細胞を増殖することによって得られる。プラスミドの消失は次にプラスミドを消失した細胞を死滅させるであろう。残った生細胞は、プラスミドをまだ内部に保持するであろう。

【0087】

従って本発明のさらなる他の実施態様は、TLR21 受容体およびNF B レポーター遺伝子をコードするプラスミドを含む細胞に関し、そのプラスミドは細胞中で安定して保持される。当該細胞はCpG分子のスクリーニング、より具体的には本発明のCpG分子のスクリーニングにおける使用に非常に適している。

10

【0088】

実施例は、細胞中に安定して保持され得るレポーター遺伝子をコードするプラスミドを含む当該細胞をいかにして得るかについて、豊富なガイダンスを提供する。

【0089】

また上述の通り、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)に基づく検出系は、使用する検出系に非常に適していることも示された。

【0090】

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

20

【0091】

基本的に、NF B レポーター遺伝子、上述の通り好ましくはSEAP遺伝子を保有するプラスミドの導入および好ましくは安定した保持を可能とし、TLR21を保有する任意の細胞または細胞株は、TLR21に特異的なCpGを含むODVの試験に適している。

【0092】

TLR21に特異的なCpGを含むODVを試験するための当該適した細胞株の好ましい例は、ニワトリ細胞株HD11である。

30

【0093】

それ故に好ましくは、検出系における使用のための細胞株は、レポーター遺伝子をコードする安定したプラスミド含むHD11細胞株である。

【0094】

HD11細胞株等のニワトリの細胞株は、ニワトリのTLRの全パネルを示す。このことが一定の条件下で一定のバックグラウンドアクティビティを引き起こすのかもしれない。

【0095】

それ故に、哺乳動物の細胞株等の非家禽細胞株がより好ましい細胞株である。当該哺乳動物の細胞株の例は、TLR21がクローン化されたHEK293細胞である。当該細胞株はTLR21の活性化シグナルに対しより特異的で選択的である。

40

【0096】

それ故により好ましくは、検出系における使用のための細胞株は、安定して保持されるレポーター遺伝子を含み、その中にTLR21が既にクローンされている哺乳動物の細胞株HEK293である。

【0097】

本発明のさらなる他の実施態様は、本発明の免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチドの検出法に関し、ここで当該方法は、a)本発明のオリゴデオキシヌクレオチドを細胞と接触させ、b)レポーター遺伝子の産物レベルを検出する段階を含む。

【0098】

50

この方法の好ましい形態において、レポーター遺伝子の産物はS E A Pである。

【0099】

この実施態様のより好ましい形態は、本発明の免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチドの検出法に関し、ここで細胞はニワトリの細胞株HD11、またはその中にニワトリTLR21が既にクローンされたHEK293細胞株の細胞である。

【実施例1】

【0100】

ニワトリTLR21の遺伝子クローニングおよび異種発現

最近のニワトリTLR研究の進歩は、TLR21は鳥類における哺乳動物のTLR9の機能的ホモログであることを示唆する (Keestra 2008年、Brownlieら、2009年)。

10

【0101】

TLR21 遺伝子クローニングの概要

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

【化1】

Ga-TLR21-for1

GAAGCTTACCATGATGGAGACAGCGGAGAAGGC

Ga-TLR21-rev1

GGCGGCCGCTACATCTGTTTGTCTCCTTCCCTG

20

【0102】

プライマーは、開始コドンおよび終止コドン (ボールド体) にフランキング制限クローニングサイト (下線) およびコザック配列 (イタリック体) を提供するように設計した。これらのプライマーおよび鋳型としてニワトリ脾臓全RNAを使用して逆転写PCR (RT-PCR) を実施した。所期サイズ (~3000bp) のPCR産物をpCR2.1 Topoにクローンし、それから5の独立したプラスミドクローン (P1、P2、P12、P13、P14) を配列決定した。

30

【0103】

使用したニワトリTLR21のDNA塩基配列

【化 2】

AAGCTTACC**ATG**ATGGAGACAGCGGAGAAGGCATGGCCAGCACCAGGATGTGCCCTCCCACTGCTGTCCACTCTGGC
 TGCTGCTGCTGGTGACAGTGACACTGATGCCGATGGTGCACCCGTATGGCTTTCGCAACTGCATTGAGGATGTCAAGGC
 ACCTTTGTA~~CTT~~CCGCTGCATCCAGCGCTTCTGCAGTGC~~CGG~~CCCTGGCAGTGTCTGACCTGCCACCACATGCCATC
 GCGCTCAATCTGTCAACAACAAAATGCGCTGCCTGCAGCCCTCTGCCTTTGCCACCTGACACAGCTGCATAACCTGG
 ACCTGACCTACAACCTCCTGGAGACCTCTCCCCTGGTGCCTTCAATGGGCTGGGTGTGCTGGTGGTGTGGACCTGTC
 TCACAACAAGCTGACCACACTTGTGAAGGGGTGTTCAACAGCTTGGGCAACCTGTCCTCGCTGCAGGTACAACATAAC
 CCCCTCAGCACGGTGTACCAAGTGTCTGCTACCCCTGGTCAACCTGCGCCGCCTGTCTACGGGGCGGGCGGCTGA
 ATGGGTTGGGGGCAGTGGCAGTGGCAGTGCAGGGCTTGGCACAGCTGGAGCTGTTGGACCTATGTGAAAAACAACCTGAC
 AACGCTGGGGCCAGGCCACCCTACCCGCCTCGCTGCTCACCTGCAGCTGTGCAACAACCTCGCTGAGGGAGTTAGCG
 GGGGCAGCCCGGAGATGCTATGGCACGTGAAGATACTGCACCTCTCCTACAACAGTATCTCACAGGCGGAGGTCTTCA
 CCCAGCTCCACCTGCGCAACATCAGCCTGCTCCACCTGATCGGCAACCCCTTGGATGTCTTCCACCTGTTGGACATCTC
 TGACATCCAACCTCGCAGCCTGGATTCTCTGGGTTGGTGTGGGGGCTCAGGGGCTGGATAAGGTGTGCCTGAGGCTG
 CAGGCTCCCCAGGCTTGGCGCGGCTGCAGCTACAACGCAACGGGCTGAAGGTGCTGCATTGTAATGCACTGCAGTTGT
 GTCTGTGCTGAGAGAGCTGGACCTGTCTGGAACCGGCTACAGCACGTGGGCTGTGCCGGCCGGCTGTGGCAAGAA
 GCAGCGGGAGAAGCTGGAAGTGTGACAGTGAACACAACCTGCTGAAGAACTGCCGTCTTGCCTGGGGGCCAGGTG
 CTGCCTCGGCTGTACAACATTTCTTCCGCTTTAACCGCATCTGACTGTTGGGCCCCAAGCCTTTGCCTACGCCCCGG
 CCCTGCAGGTGTTGTGGCTCAATATTAACAGCCTGGTGTGGCTGGACAGGCAGGCAGTGTGGAGGCTGCACAACCTGAC
 AGAGCTGCGCCTGGACAACAACCTGTGACCGACCTCTATACAACCTTTCATTGACCTCCACAGACTGCGCACCCCTC
 AACCTGCGCAACAACCGTGTCTCCGTCTCTTCTGCTGGTGTCTTCCAGGGGCTGGCTGAGCTGCAGACGCTGGATTTAG
 GGGGCAACAACCTTGGCCACCTGACTGCACAGTCACTGCAGGGGCTGCCAAACTGCGCAGGCTGTACCTGGACCGCAA
 CAGATTGCTGGAGGTGAGCAGCACTGTGTTCCGCCAGTGCAGGCTACCCTGGGGGTGCTGGACCTGCGGGCCAACAAC
 CTGCAGTACATCTCACAGTGGCTGCGCAAGCCGCCACCCTTCCGCAACCTGAGCAGCCTGTACGACCTGAAGCTGCAGG

10

20

CGCAGCAGCCCTATGGACTGAAGATGCTGCCTCACTACTTCTTCCAGGGCTTGGTGAGGCTGCAGCAGCTGTGCTGTC
 ACAGAACATGCTGCGGTCCATCCCACCGGATGTCTTCGAGGACTTGGGCCAGCTGCGCTCCCTGGCATTGGCTGACAGC
 AGCAATGGGCTGCATGACCTGCCTGACGGCATCTTCAGAAACCTGGGCAACCTGCGGTTCTGGACCTGGAGAATGCAG
 GGCTGCACTCGCTCACTCTGGAAGTCTTCGCAATCTCAGCCGGCTGCAGGTGCTGCACTTGGCCAGAAACGAGCTGAA
 GACCTTCAATGACAGCGTTGCCAGCCGGCTGTCTCCTTGGCTACCTGGACCTGCGCAAGTGTCCGCTCAGCTGCACC
 TGTGACAACATGTGGCTGCAGGGCTGGCTGAACAACAGCCGTGTGCAGGTTGTCTACCCCTACAACCTACACCTGTGGCT
 CACAGCACAAATGCCTACATCCACAGCTTTGACACACACGTCTGCTTCTTGGACCTGGGGCTCTATCTCTTTGCTGGGAC
 TGCACCGGCAGTGTGCTGCTGCTGGTGGTGCCGGTGGTGTACCACCGCGCTACTGGAGGCTGAAGTACCACTGGTAC
 CTTCTGCGGTGCTGGGTCAACCAGCGGTGGCGGGGAGGAAAAGTGTACCTCTATGACAGCTTTGTGTCTTACAATT
 CAGCTGATGAAAGTTGGGTGTTGCAGAAGCTGGTGCCTGAGCTGGAGCACGGTGCCTTCCGCTCTGCTTGCACCACCG
 CGACTTCCAGCCGGGCGCAGCATCATTGACAACATTGTGGATGCTGTCTACAACAGCCGGAAGACGGTGTGCGTGGTG
 AGCCGCAGCTACCTGCGCAGCGAGTGGTGTCTCTAGAGGTGCAGTTGGCCAGCTACCGGCTGTTGGATGAGCGGCGTG
 ACATCTGGTACTGGTGTGCTGCTGGAGGACGTGGGTGATGCTGAGCTGTCTGCCTACCACCGCATGCGGCGGGTGTGCTGCT
 GCGGGCGACCTACCTGCGCTGGCCTCTTGACCCCGCAGCTCAGCCGCTCTTTTGGGCACGGCTGAAGAGGGCACTGAGG
 TGGGGAGAGGGAGGAGAGGAGGAGGAAGAAGAAGGTTTGGGTGGAGGGACGGGAAGGCCAGGGAAGGAGACAAACAGA
 TG**TAGCGGCCGC**

30

40

【0104】

p c D N A 3 . 1 (+) N e o c h i T L R 2 1 による H E K 2 9 3 p N i f T y
 2 Z e o (ク ロ ー ン 細 胞 株) の 形 質 移 入

ヒト胎児腎 (H E K) 細胞 2 9 3 は 1 9 7 0 年代にウイルスによる形質転換によって樹

50

立され (Grahamら、1977年)、今ではATCC等の細胞株寄託機関経由で研究者たちに入手可能である。

【0105】

pNifty2は、多くの免疫賦活性作用、その中のToll様受容体活性化の特徴である、転写因子NF- κ Bの活性化の検出を可能とするプラスミドである。その転写/翻訳においてNF- κ B活性化に依存するpNifty2中のレポーター遺伝子は分泌型アルカリホスファターゼである(SEAP)。詳細はこのプラスミドの販売会社InvivoGenのデータシートに記載されている。pNifty2による形質転換/形質移入の現象は、増殖培地へのzeocin添加によって細菌細胞および哺乳動物細胞の双方において選択される。

10

【0106】

HEK293細胞を標準法(リポフェクション)によってpNifty2を用いて形質移入して、安定した細胞株を選択し、ヒト腫瘍壊死因子(Sigma)を用いた刺激によってNF- κ B/SEAP軸の機能性を確立した。刺激された細胞の培養上清中の分泌SEAPは、アルカリ性緩衝液(NaHCO₃ 50mM、pH9.6、MgCl₂ 2mM)中で発色基質p-ニトロフェニルリン酸(pNPP、5mM)を使用してマイクロタイタープレート比色分析法によって測定した。発色(λ = 405nm)をマイクロタイタープレートリーダーによって測定した。またこの読み出し値は、高信号雑音比を有するクローン細胞株を(限界希釈法によって)選択するためにも使用した。この選択クローンの一(クローン11と呼ぶ)をその後ニワトリTLR21に関する研究にさらに使用した。

20

【0107】

pcDNA3.1(+)-neoは、Invitrogenから購入した標準的な哺乳動物発現ベクターである。このベクターへのニワトリTLR21遺伝子のサブクローニングは、PCRによって導入されたフランキングHindIII(開始コドン)およびNotI(終止コドン)サイトにより行った(図1を参照)。

【0108】

このプラスミドは次にクローン細胞株HEK293-pNifty2-zeoに形質移入し(リポフェクション)、それから増殖培地へのzeocinおよびG418の双方の添加によって組換え細胞を選択した。生じたポリクローナル組換え細胞株の機能性は、ODN-X4およびODN-HEK1-PTOを用いた培地の刺激およびSEAPの検出によって評価した。次に優れたクローン細胞株はその後刺激およびSEAP検出を伴う限界希釈法によって同定した。

30

【0109】

SEAPは哺乳動物系におけるレポーター酵素である(Yangら、1997年)。SEAPは、ヒト胚性アルカリホスファターゼの分泌型である。その主な利点は、高い安定性および極めて高い比活性であり、それらは検出の感度および堅牢性を保証する。数個の基質がSEAPの検出用に記載されてきたが、その反応産物p-ニトロフェノールが高感度で検出されるので(λ = 405nm、 ϵ = 18500M⁻¹cm⁻¹)、経済的かつ堅牢なpNPPが選択された。発明者らの試験設定において、それらが定量のより広い動作範囲(ダイナミックレンジ)を提供するので、発明者らは動力的アッセイを実施する。

40

【0110】

HEK293-pNifty2-Zeo細胞は、pcDNA3.1(+)-Neo-clonalTLR21(PvuIIで直線化した)を用いて形質移入し、それから培地に350 μ g/mlのzeocinおよび600 μ g/mlのG418を補給することによってポリクローナル細胞株を選択した。機能試験は、ODN-X4(PDE)およびODN-HEK1(PTO)を用いて細胞を刺激することによって実施した。分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)は選択細胞によって産生されたが、親細胞株HEK293-pNifty2-Zeoによっては産生されなかった。シングルセルクローニングを実施し、それから個々のクローンは、ODN-X4(PDE)(GGGGGGTTCGTTTTTCG

50

T T T T C G T T G G G G G) および O D N H E K 1 (P T O) (T C G T C G T T T T G T C G T T T G T C G T T) に対するそれらの応答性に関し分析した。

【 0 1 1 1 】

z e o / G 4 1 8 の双方に耐性であるクローン細胞株 4 6 株の中 3 株だけが明確に O D N 刺激に対し応答性であったが、一方で細胞株の 3 ないし 4 株は弱いシグナルを示した。それ故に選択されたクローンの 8 5 % は機能的でなかった。

【 0 1 1 2 】

それ以降の全ての研究のためには、O D N X 4 (P D E) および O D N H E K 1 (P T O) の刺激に対する応答の最高の S E A P の読み出しシグナルを産生した、クローン細胞株 3 8 を使用した。

【 0 1 1 3 】

図 2 ~ 5 は、種々の z e o / G 4 1 8 二重耐性クローン細胞株の S E A P 活性の概要を示す。

【 実施例 2 】

【 0 1 1 4 】

N₃ ~ N₆ の性質の活性に関する影響の分析

以下の P D E 型 C p G O D V を試験した：

【 化 3 】

ODN-X1 GGGGGGGAC**CGT**CGAC**CGT**CGAC**CGT**CGGGGG (, マウス ')

ODN-X2 GGGGGGGT**CGT**TGT**CGT**TGT**CGT**TGGGGG (, ヒト ')

ODN-X3 GGGGGGAAC**CGT**TAA**CGT**TAA**CGT**TGGGGG

ODN-X4 GGGGGGT**CGT**TTTT**CGT**TTTT**CGT**TGGGGG

ODN-X5 GGGGGGAAC**CG**AAAA**CG**AAAA**CG**AAGGGGGG

ODN-X6 GGGGGGCG**CG**CGCG**CG**CGCG**CG**CGGGGGG

ODN-X7 GGGGGGT**CG**AATT**CG**AATT**CG**AAGGGGGG

【 0 1 1 5 】

さらに対照として、その P T O 型カウンターパートがヒト腫瘍治療における薬剤ノワクチン候補である O D N 2 0 0 6 (C p G 7 9 0 9) の P D E 型バージョンを正の対照として使用し、一方ではその G p C 型カウンターパートを負の対照として使用した (O D N 2 0 0 6 対照) 。

【 0 1 1 6 】

H D 1 1 p N i f T y h y g クローン細胞株に関して、2 0 0 0 n M から始まる滴定試験において得られた結果を図 6 に示す。

【 0 1 1 7 】

この試験に基づく活性順位は、O D N X 4 > O D N X 2 > O D N X 1 > > O D N 2 0 0 6 (P D E 型) である。

【 0 1 1 8 】

O D N X 3、O D N X 5、O D N X 6、O D N X 7、O D N 2 0 0 6 対照 (P D E 型) は不活性である。

【 0 1 1 9 】

10

20

30

40

50

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR2 1クローン細胞株
に関して、100nMから始まる滴定試験において得られた結果を図7に示す。

【0120】

この試験に基づく活性順位は、ODN X4 >> ODN X2である。

【0121】

ODN X1、ODN X3、ODN X5、ODN X6、ODN X7は不活性である。

【0122】

まとめるとこれらの試験より、典型的なマウス(ODN X1)およびヒト(ODN X2)ではなくPDE型CpGを含むODV X4が、ニワトリ細胞株HD11および異種ニワトリTLR2 1試験系の双方において最も効果的な試薬であることが証明された。

10

【実施例3】

【0123】

CpGモチーフに直に隣接するヌクレオチドの役割

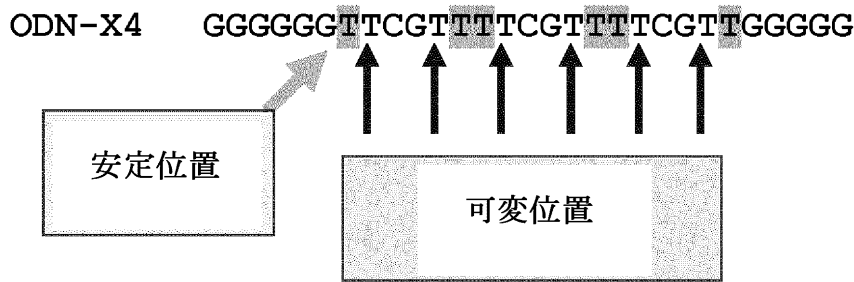
ニワトリHD11細胞および異種的に発現されたニワトリTLR2 1に対する異型の6塩基配列モチーフの活性を同定するために、CpGエレメントに直に隣接する位置が並び替えられた誘導体を作成した。

【0124】

(TNCGNT)₃モチーフを基礎とする。

【化4】

20



- ODN-Y1 GGGGGGTGCGGTTGCGGTTGCGGTGGGGG
- ODN-Y2 GGGGGGTACGGTTACGGTTACGGTGGGGG
- ODN-Y3 GGGGGGTTCGGTTTTCGGTTTTCGGTGGGGG
- ODN-Y4 GGGGGGTCCGGTTCGGTTCGGTGGGGG

- ODN-Y5 GGGGGGTGCGATTGCGATTGCGATGGGGG
- ODN-Y6 GGGGGGTACGATTACGATTACGATGGGGG
- ODN-Y7 GGGGGGTTCGATTTTCGATTTTCGATGGGGG
- ODN-Y8 GGGGGGTCCGATTCGATTCGATGGGGG

- ODN-Y9 GGGGGGTGCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
- ODN-Y10 GGGGGGTACGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
- ODN-Y11 GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
- ODN-Y12 GGGGGGTCCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG

- ODN-Y13 GGGGGGTGCGCTTTCGCTTTCGCTGGGGG
- ODN-Y14 GGGGGGTACGCTTTCGCTTTCGCTGGGGG
- ODN-Y15 GGGGGGTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTGGGGG
- ODN-Y16 GGGGGGTCCGCTTTCGCTTTCGCTGGGGG

30

40

【0125】

50

配列の並べ替えは一度ODN X4モチーフ(ODN Y11)に戻りつくことを指摘しておくべきであろう。

【0126】

HD11 pNifTyhygクローン細胞株に関して、2000nMから始まる滴定試験において得られた結果を図8に示す。

【0127】

HD11 pNifTyhygにおけるこの試験に基づく活性順位は、ODN Y11 (=ODN X4) > ODN Y15 > ODN Y12 > ODN Y9 > ODN Y3 > ODN Y16 > ODN Y7 ~ ODN Y6 ~ ODN Y10 ~ ODN Y14 > ODN Y8 ~ ODN Y5である。

10

【0128】

ODN Y1、ODN Y2、ODN Y4、ODN Y13は不活性である。

【0129】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21クローン細胞株に関して、100nMから始まる滴定試験において得られた結果を図9に示す。

【0130】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21におけるこの試験に基づく活性順位は、ODN Y11 (=ODN X4) >> ODN Y15 > ODN Y9 > ODN Y12 > ODN Y14 ~ ODN Y6 > ODN Y7 ~ ODN Y8 ~ ODN Y10 ~ ODN Y16 > ODN Y3 ~ ODN Y5である。

20

【0131】

ODN Y1、ODN Y2、ODN Y4、ODN Y13は不活性である。

【0132】

まとめると双方の試験系より、同様の結論が引き出され得る。即ちODN X4と同一であるODN Y11は、HD11マクロファージおよびニワトリTLR21を異種的に発現するHEK293細胞の最強の刺激物質として確認される。HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21クローン細胞株の識別力はHD11 pNifTyhygのそれよりも高いように思われる。

【実施例4】

【0133】

ODN X4中のTpCpGpTエレメントの3'側隣接位置の役割。

30

【0134】

ニワトリD11細胞および異種的に発現されたニワトリTLR21に対する好ましい6塩基配列モチーフをさらに同定するために、ODN X4中のTpCpGpTエレメントの3'側の隣接位置を並び替えた。

【0135】

(TTCGTN)₃モチーフを基礎とする。

【化5】

ODN-X4	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X41	GGGGGGTTCGTGTTTCGTGTTTCGTGGGGGG
ODN-X42	GGGGGGTTCGTATTCGTATTCGTAGGGGG
ODN-X43	GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTTCGGGGG

40

【0136】

HD11 pNifTyhygクローン細胞株に関して、2000nMから始まる滴定試験において得られた結果を図10に示す。

【0137】

HD11 pNifTyhygにおけるこの試験に基づく活性順位は、ODN X4 ~ ODN X43 > ODN X42 ~ ODN X41である。

50

【0138】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21クローン細胞株に関して、100nMから始まる滴定試験において得られた結果を図11に示す。

【0139】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21におけるこの試験に基づく活性順位は、ODN X43 >> ODN X4 ~ ODN X42 > DN X41である。

【実施例5】

【0140】

ODN X4中のTpCpGpTエレメントの5'側隣接位置の役割

10

ニワトリ細胞HD11に対するさらなる6塩基配列モチーフをさらに同定するために、ODN X4中のTpCpGpTエレメントの5'側の隣接位置を並び替えた。

【0141】

(NTCGTT)₃モチーフを基礎とする。

【化6】

```
ODN-X2      GGGGGGTCGTTGTCGTTGTCGTTGGGGG
ODN-X24     GGGGGGATCGTTATCGTTATCGTTGGGGG
ODN-X25     GGGGGGCTCGTTCTCGTTCTCGTTGGGGG
ODN-X26/4   GGGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
```

20

【0142】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21クローン細胞株に関して、100nMから始まる滴定試験において得られた結果を図12に示す。

【0143】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21におけるこの英検に基づく活性順位は、ODN X4 >> ODN X25 > ODN X2 > ODN X4である。

【実施例6】

30

【0144】

5' dG₆ (デオキシグアノシン)の短縮または削除の効果

ニワトリ細胞HD11および異種的に発現されたニワトリTLR21におけるPDE型ODN X4に対する構造活性相関(SAR)をさらに特性化するために、5' dG₆の短縮または削除の効果の研究した。

【化7】

```
ODN-X4      GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN1 GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN2 GGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN3 GGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN4 GGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN5 GTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-5MIN6 TTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
```

40

【0145】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21クローン細胞株に関して、100nMから始まる滴定試験において得られた結果を図13に示す。

【0146】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21におけるこの試

50

験に基づく活性順位は、ODN X4 > ODN X4 5' 1 > ODN X4 5' 2 > ODN X4 5' 3 > ODN X4 5' 4 > ODN X4 5' 6 ODN X4 5' 5である。

ODN X4 5' 4 ~ 6はこの濃度範囲では不活性である。

【実施例7】

【0147】

3' dG₆の短縮または削除の効果

ニワトリHD11細胞および異種的に発現されたニワトリTLR21におけるPDE型ODN X4に対する構造活性相関(SAR)をさらに特性化するために、3' dG₆の短縮または削除の効果を研究した。

10

【化8】

```
ODN-X4-3MIN1 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-3MIN1 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGG
ODN-X4-3MIN2 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGG
ODN-X4-3MIN3 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGG
ODN-X4-3MIN4 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTG
ODN-X4-3MIN5 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTT
```

20

【0148】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21クローン細胞株に関して、100nMから始まる滴定試験において得られた結果を図14に示す。

【0149】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21におけるこの試験に基づく活性順位は、ODN X4 5' 5 ODN X4 5' 4 ODN X4 5' 3 ODN X4 5' 2 > ODN X4 5' 1 > ODN X4である。

【0150】

3' dG₆および3' dG₅を欠くODN X4 minus Gは双方とも、この濃度範囲では不活性である。

30

【0151】

さらに、5' dG₆および3' dG₅でのGの付加が効力を有するかどうか研究した。

【化9】

```
ODN-X4 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
ODN-X4-plus1 GGGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGGG
ODN-X4-plus2 GGGGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGGGG
```

40

【0152】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21クローン細胞株に関して、100nMから始まる滴定試験において得られた結果を図15に示す。

【0153】

ODN X4の両側への1個のGの付加は、HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21における刺激活性に有益な効果も有害な効果も有さない一方で、2個のGの付加は低効力の分子を生じるように思われる。

【実施例8】

50

【0154】

ホスホロチオエート型 (PTO) アナログによるリン酸ジエステル (PDE) 結合の置換 CpG ODNの安定性および免疫賦活性の効力を改善するために、ホスホロチオエート型 (PTO) アナログによるリン酸ジエステル (PDE) 結合の置換を研究した。HD 11 pNi fTy hy gニワトリマクロファージおよび異種的に発現されたニワトリ TLR 21におけるPDE ODN X4に対する構造活性相関 (SAR) という観点をさらに特性づけるために、PTOによるすべてのPDE結合の置換 (ODN X4 PTO) の効果および5' dG₆ および3' dG₅ の連続配列だけにおけるPTOによるPDE結合の置換 (ODN X4 PTO Gonl y) の効果を研究した。

【0155】

HEK 293 pNi fTy 2 p cDNA 3.1 ch iTLR 21クローン細胞株に関して、50 nMから始まる滴定試験において得られた結果を図16に示す。

【0156】

この読み出し系において、X4 PDEに比較してX4 PTOの効力がより低いことが見出された。X4 PTO Gonl yは、HEK 293 pNi fTy 2 p cDNA 3.1 ch iTLR 21において親のX4 PDEよりも高い効力であることが証明された。

【0157】

インビトロでの効力順位は、ODN X4 PTO Gonl y > ODN X4 (PDE) > ODN X4 PTOである。

【実施例9】

【0158】

ODN X4 (PDE) の種特異性の研究

ODN X4 (PDE) の種特異性を研究するために、HEK 293 XL pUNO ヒトTLR 9細胞を購入し、その後pNi fTy 2を用いて形質移入し、文献のPTO CpGに対するそれらの応答性を確立し、機能細胞株を樹立し、それからその中の一つをHEK 293 pNi fTy 2 p cDNA 3.1 ch iTLR 21に関する比較試験に使用した。

【0159】

この比較試験においてODN X4 (PDE) に加えて、ヒトTLR 9に対し確立した高い効力を有するPTO ODN 2006 (= CpG 7909) および2007およびそれらのGpC対照カウンターパートを使用した。

【0160】

HEK 293 pNi fTy 2 p cDNA 3.1 ch iTLR 21クローン細胞株に関して、50 nMから始まる滴定試験において得られた結果を図17に示す。

【0161】

次の活性順位、ODN X4 (PDE) ~ PTO 2006 > PTO 2007が得られた。

【0162】

GpC対照のPTO ODN 2006および2007はここで考慮した濃度範囲において不活性だった。

【0163】

HEK 293 XL pUNO huTLR 9 pNi fTy 2クローン細胞株に関して、50 nMから始まる滴定試験において得られた結果を図18に示す。

【0164】

次の活性順位、PTO 2006 > PTO 2007が得られた。

【0165】

GpC対照のPTO ODN 2006および2007ならびにODN X4 (PDE) はここで考慮した濃度範囲において不活性だった。

【0166】

10

20

30

40

50

この結果は、ODN X4 (PDE) のニワトリ種特異性を確立した。

【実施例 10】

【0167】

TTCGTT 繰り返しの最適回数に関する研究

TTCGTT 繰り返しの最適回数を研究するために以下のコンストラクトを作成した。

【化 10】

- 1 X4-Sin GGGGGTTCGTTGGGGG
- 2 X4-Doub GGGGGTTCGTTTTCGTTGGGGG
- 3 X4-Trip GGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
- 4 X4-Quad GGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
- 5 X4-Pent GGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
- 6 X4-Hex GGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG

10

【0168】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21 クローン細胞株に関して、20 nM から始まる滴定試験において得られた結果を図 19 に示す。

【0169】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21 に対して、以下の刺激効力順位、X4 hex ~ X4 pent > X4 quad > X4 tip (= 「元の (classical)」 X4) が確認された。

20

【0170】

X4 doub および X4 sing はここで適用された試験濃度では不活性だった。

【実施例 11】

【0171】

分離する T 数の効果

CpG モチーフを分離する T の数の効果を研究するために、以下のコンストラクトを作成した。

【化 11】

- 1 X4-Li1 GGGGGTTCGTCGTCGTTGGGGG
- 2 X4-Li2 GGGGGTTCGTTTCGTTTCGTTGGGGG
- 3 X4-Li3 GGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
- 4 X4-Li4 GGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
- 5 X4-Li5 GGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG
- 6 X4-Li6 GGGGGTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTGGGGG

30

【0172】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21 クローン細胞株に関して、25 nM から始まる滴定試験において得られた結果を図 20 に示す。

【0173】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21 に対して、以下の賦活性の効力順位、X4 Li6 ~ X4 Li5 ~ X4 Li4 (= 「元の (classical)」 X4) > X4 Li3 > X4 Li2 ~ X4 Li1 が確認された。

40

【実施例 12】

【0174】

dG 連続配列の境界にある T 残基の最適回数に関する研究

dG 連続配列の境界にある T 残基の最適回数を研究するために、以下のコンストラクトを作成した。

【化12】

X4-Bo1 GGGGGGTCGTTTTTCGTTTTTCGTGGGGG
 X4-Bo2 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 X4-Bo3 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTGGGGG
 X4-Bo4 GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTGGGGG

【0175】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21クローン細胞株
 に関して、20nMから始まる滴定試験において得られた結果を図21に示す。

10

【0176】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21に対して、以下の刺激効力順位、X4 Bo4 ~ X4 Bo3 > X4 Bo2 (=「元の(classical) X4) > X4 Bo1が確認された。

【0177】

dG連続配列の境界にあるT残基の最適数をさらに研究するために、以下の(同一のおよびより長い)コンストラクトを作成しそれから(再)試験した。

【化13】

X4-Bo1 GGGGGGTCGTTTTTCGTTTTTCGTGGGGG
 X4-Bo2 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 X4-Bo3 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTGGGGG
 X4-Bo4 GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTGGGGG
 X4-Bo5 GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTGGGGG
 X4-Bo6 GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTGGGGG

20

【0178】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21クローン細胞株
 に関して、20nMから始まる滴定試験において得られた結果を図22に示す。

【0179】

HEK293 pNifTy2 pcDNA3.1 chITLR21に対して、以下の刺激効力順位、X4 Bo6 > X4 Bo5 > X4 Bo4 > X4 Bo3 > X4 Bo2 (=「元の(classical) X4) > X4 Bo1が確認された。

30

【実施例13】

【0180】

骨格の三量体と隣接するT数の効果のさらなる研究

骨格の三量体と隣接するTの最適数を研究するために、以下のコンストラクトを作成した。

【化 1 4】

X4-Bo1b	GGGGGGTCGTTTTTCGTTTTTCGTGGGGG	
X4-Bo2b	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTGGGGG	
X4-Bo3b	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTGGGGG	
X4-Bo4b	GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTGGGGG	
X4-Bo5b	GGGGGGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTGGGGG	10
X4-Bo6b	GGGGGGTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTGGGGG	
X4-Bo7	GGGGGGTTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTTGGGGG	
X4-Bo8	GGGGGGTTTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTTTTGGGGG	
X4-Bo9	GGGGGGTTTTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTTTTGGGGG	
X4-Bo10	GGGGGGTTTTTTTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTTTTTTGGGGG	20

【0 1 8 1】

最大刺激作用に関してもおよび「50%効果濃度」(=EC50)に関しても、X4 B o 5 からのTのさらなる付加によって引き起こされる増加はわずかであるか存在しない。それにもかかわらず、X4 B o 1 0 は未だに高活性である。従って、より以上のTの付加による効果は横ばいになると仮定して差し支えない。X4 B o 2 0、X4 B o 2 5 または X4 B o 3 0 へのコンストラクトでさえなお非常に適しているということが容易に予想し得る。図 2 3 を参照。

【実施例 1 4】

【0 1 8 2】
CGエレメントを「分離する」T数の効果のさらなる研究
CGエレメントを分離するTの最適数を研究するために、以下のコンストラクトを作成した。

【化 1 5】

X4-Li1b	GGGGGGTTCGTCGTCGTTGGGGG	
X4-Li2b	GGGGGGTTCGTTTCGTTTCGTTGGGGG	
X4-Li3b	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG	
X4-Li4b	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG	
X4-Li5b	GGGGGGTTCGTTTTTTCGTTTTTTCGTTGGGGG	
X4-Li6b	GGGGGGTTCGTTTTTTTCGTTTTTTCGTTGGGGG	
X4-Li7	GGGGGGTTCGTTTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTGGGGG	
X4-Li8	GGGGGGTTCGTTTTTTTTTTCGTTTTTTTTTCGTTGGGGG	
X4-Li9	GGGGGGTTCGTTTTTTTTTTCGTTTTTTTTTTCGTTGGGGG	
X4-Li10	GGGGGGTTCGTTTTTTTTTTCGTTTTTTTTTTCGTTGGGGG	40

【0 1 8 3】

既に検討した通り、X4 L i 1 および X4 L i 2 は考慮した濃度範囲 (< 2 0 n M) 50

）において不活性である。EC50はX4 Li3からX4 Li7ではそれほど変化しない一方で、達成可能な最大刺激作用はその順で増加するようと思われる。驚くべきことは、X4 Li7からX4 Li8でのEC50におけるジャンプであり、それはまた最大刺激作用における増加も伴う。X4 Li8、X4 Li9およびX4 Li10は、EC50および最大刺激作用に関しておよそ同等の効力である。にもかかわらず、X4 Li10はなお極めて有効である。従って、より以上のTの付加による効果は横ばいすると予想して差し支えない。X4 Li20、X4 Li25またはX4 Li30へのコンストラクトでさえなお非常に適しているということが容易に予想し得る。図24を参照。

【実施例15】

【0184】

TTCGTT繰り返し数の効果のさらなる研究

TTCGTT繰り返しの最適数を研究するために、以下のコンストラクトを作成した。

【化16】

X4-Sin-b GGGGGTTCGTTGGGGG
 X4-Doub-b GGGGGTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 X4-Trip-b GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 X4-Quad-b GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 X4-Pent-b GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 X4-Hex-b GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 X4-Hept
 GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG

X4-Oct

GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTT
 GGGGG

X4-Non

GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTT
 TTCGTTGGGGG

X4-Dec

GGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTT
 TTCGTTTTTCGTTGGGGG

【0185】

既に検討した通り、X4 singおよびX4 doubは考慮した濃度範囲(<20 nM)において不活性である。達成可能な最大刺激作用はX4 tripからX4 heptまで強く増加し、またその順でEC50も強く減少するようと思われる。特にX4 quadからX4 pentへのジャンプは顕著である。X heptからX4 decまでは、中程度にしかし連続的に、最大刺激作用は増加しEC50は減少する。従って、より以上の三量体の付加による効果は横ばいすると予想して差し支えない。X4 X、X4 XVまたはX4 XVIIへのコンストラクトでさえなお非常に適しているということが容易に予想し得る。しかしながら当該コンストラクトは、合成することがますます困難となるであろう。図25および26を参照。

【実施例16】

【0186】

繰り返し三量体の型の効果のさらなる研究

繰り返し三量体の最適型を研究するために、以下のコンストラクトを作成した。

10

20

30

40

【化 17】

X4 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
 X4-I GGGGGGTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTGGGGG
 X4-II GGGGGGTTTCGTTTTTTTTTCGTTTTTTTTTCGTTTTGGGGG
 X4-III GGGGGGTTTTTCGTTTTTTTTTTTCGTTTTTTTTTTTCGTTTTTTGGGGG

【0187】

刺激作用レベルが X4 tip ないし X4 I で、ないし X4 II / X4 III で強く増加する。そのうえ EC50 は、X4 から X4 I で強く減少し、それから X4 II で徐々に小さくなる。X4 III はなお高活性である。図 27 を参照。

10

【実施例 17】

【0188】

T T T C G T T T 繰り返しの効果のさらなる研究

T T C G T T T 繰り返しの境界での T 残基の最適数を研究するために、以下のコンストラクトを作成した。

【化 18】

X4-I-sing GGGGGGTTTCGTTTGGGGG
 X4-I-doub GGGGGGTTTCGTTTTTTTCGTTTGGGGG
 X4-I-trip GGGGGGTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTGGGGG
 X4-I-quad GGGGGGTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTGGGGG
 X4-I-pent
 GGGGGGTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTGGGGG
 X4-I-hex
 GGGGGGTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTTTTTTCGTTT
 GGGGG

20

【0189】

X4 系列におけると同様に、X4 I sing および X4 I doub は考慮した濃度範囲では不活性である (< 20 nM)。最初の効力のある ODN は X4 I であり、それから達成可能な最大刺激作用が X4 quad および X4 I pent / X4 I hex に関して増加する。EC50 は X4 I trip ~ X4 I hex に関して同じ桁 (低 nM) である。

30

【0190】

X4 I hex はなお高活性である。図 28 を参照。

【実施例 18】

【0191】

3 量体性の 6 量体 CG モチーフの 3' 隣接位置の研究

3 量体性の 6 量体 CG モチーフの最適の 3' 隣接位置を研究するために、以下のコンストラクトを作成した。

【化 19】

40

ODN-X4 GGGGGGTT TTTT TTTT TTGGGGG
 ODN-X41 GGGGGGTT TGT TGT TGT TGGGGG
 ODN-X42 GGGGGGTT TATT TATT TAGGGGG
 ODN-X43 GGGGGGTT TCTT TCTT TCGGGG

【0192】

EC₅₀ 算出: X4 : 61.6 nM
 X41 : 未検、 >> 100 nM

50

X 4 2 : 6 2 . 1 n M

X 4 3 : 3 . 3 n M

これら（および以前の）結果に基づくと、最大刺激作用および EC_{50} 値の双方に関して ODN X 4 3 は ODN X 4 より優れている。ODN X 4 2 は最大刺激作用に関してはやや低いが、 EC_{50} は ODN X 4 のそれと同等である。

【実施例 19】

【0193】

3 量体性の 6 量体 CG モチーフのさらなる研究 GTCGTC の同定

PDE ODN の効力を ODN X 2 に基づき探索するために、以下の ODN を 6 量体の 5' 末端および 3' 末端の修飾体として合成した。X 2、X 2 4、X 2 5 および X 2 6 / X 4 の結果は上述した。

10

【化 20】

ODN-X2 GGGGGGTCGTTGTCGTTGTCGTTGGGGG
 ODN-X21 GGGGGGTCGTGGTCGTGGTCGTGGGGGG
 ODN-X22 GGGGGGTCGTAGTCGTAGTCGTAGGGGG
 ODN-X23 GGGGGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGGGGG
 ODN-X24 GGGGGGATCGTTATCGTTATCGTTGGGGG
 ODN-X25 GGGGGGCTCGTTCTCGTTCTCGTTGGGGG
 ODN-X26/4 GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG

20

【0194】

X 2 1 および X 2 2 と同様に、X 2、X 2 4、X 2 5 は X 2 6 / X 4 と比べて活性が単に不十分かまたは不活性である。しかしながら X 2 3 は、X 2 6 / X 4 のそれより優れた予期しない高い活性を示した。

【0195】

EC_{50} 算出: X 2 3 : 3 . 1 n M
 X 4 : 6 1 . 6 n M

これらの（および以前の）結果に基づくと、ODN X 2 3 は最大刺激作用および EC_{50} 値の双方に関して ODN X 4 より優れている。

【実施例 20】

30

【0196】

ODN X 4 2 モチーフ数の効果

ODN X 4 2 は TTCGTA モチーフの三量体に基づいている。モチーフ数の効果を試験するために、1 から 6 までモチーフ数を研究した。

【化 21】

X42-sin GGGGGTTCGTAGGGGG
 X42-doub GGGGGTTCGTATTCGTAGGGGG
 X42-trip GGGGGTTCGTATTCGTATTCGTAGGGGG
 X42-quad GGGGGTTCGTATTCGTATTCGTATTCGTAGGGGG
 X42-pent GGGGGTTCGTATTCGTATTCGTATTCGTATTCGTAGGGGG

40

X42-hex GGGGGTTCGTATTCGTATTCGTATTCGTATTCGTATTCGTATTCGTAGGGGG

【0197】

ODN	X 4	motif	EC_{50}	n M
ODN	X 4	trip	4 0 . 6	n M
ODN	X 4	2 trip	3 3	n M
ODN	X 4	2 quad	3 . 1	n M
ODN	X 4	2 pent	0 . 8 4	n M
ODN	X 4	2 hex	0 . 3 7	n M

50

ODN X4 trip PTO Gonly 6.8 nM

先の試験で検討した通り、X4 tripおよびX42 tripの効力は同等である。X42系列におけるヘキサヌクレオチド繰り返し数を減少させることは、活性の損失をもたらすが(X42 sing、X42 doub)、一方で4、5および6までの数の増加は、最大シグナルおよびEC50におけるその順での増加をもたらし、X42 pentではピコモルの効力に達する。また驚くべきは、X42 quad以降のODNがODN X4 trip PTO Gonlyよりも優れているという事実である。

【0198】

n = 10、n = 15またはn = 18へのコンストラクトでさえなお非常に適していることは容易に想像し得る。しかしながら当該コンストラクトは、合成することがますます困難となるであろう。図29を参照。

10

【実施例21】

【0199】

ODN X43モチーフ数の効果

ODN 43はTTCGTCモチーフの三量体に基づいている。モチーフ数の効果を試験するために、1から6までモチーフ数を研究した。

【0200】

さらに、X43 trip ~ X43 hexのPTOG-only変異型を合成し試験した。

【化22】

20

```
X43-Sin      GGGGGGTTCGTCGGGGG
X43-Doub     GGGGGGTTCGTCTTCGTCGGGGG
X43-Trip     GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTCGGGGG
X43-Quad     GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCGGGGG
X43-Pent     GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCGGGGG
X43-Hex      GGGGGGTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCGGGGG
```

```
X43-Trip-PTOg      ggggggTTCGTCTTCGTCTTCGTCggggg
X43-Quad-PTOg      ggggggTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCggggg
X43-Pent-PTOg      ggggggTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCggggg
X43-Hex-PTOg       ggggggTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCTTCGTCggggg
```

30

【0201】

	EC ₅₀ [nM]
ODN-X4-trip	40,6
ODN-X43-trip	1,2
ODN-X43-quad	0,56
ODN-X43-pent	0,4
ODN-X43-hex	0,38
ODN-X43-trip-PTOG-only	1,12
ODN-X43-quad-PTOG-only	0,51
ODN-X43-pent-PTOG-only	0,32
ODN-X43-hex-PTO-Gonly	0,38
X4-PTOG-only	6,8

40

以前の試験で検討した通り、X43 tripの効力はX4 tripのそれより優れている。

50

【0202】

X43系列におけるヘキサヌクレオチド繰り返し数を減少させることは、活性の損失をもたらすが(X43 sing、X43 doub)、一方で数の4、5および6への増加はその順で最大シグナルおよびEC₅₀の増加をもたらし、X43 quadで既にピコモルの効力に達する。また驚くべきことは、X43 trip以降のすべてのX43 ODNがODN X4 trip PTO G onlyよりも優れているという事実である。

【0203】

X43 trip~X43 hexのPTOG onlyバージョンは、少なくとも純粋にリン酸ジエステル結合したODNバージョンと同程度に有効である。

10

【0204】

X43 hexおよびX43 hex PTOG onlyはなお高度に有効であり、換言すれば限界および/または最適になお到達していなかった。

【0205】

さらにn=10、n=15またはn=18へのコンストラクトさえなお非常に適していることは容易に予想され得る。しかしながら、当該コンストラクトは、合成することがますます困難となるであろう。図30および図31を参照。

【実施例22】

【0206】

ODN X4のさらなる変異型

20

PDE ODNの効力をODN X4に基づきさらに探索することを目的として、CpGエレメントの5'側および3'側のTTジヌクレオチドをGG、AAおよびCCそれぞれで置換してODNを合成した。

【化23】

X4-TT = TT-X4	GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG
X-GG	GGGGGGGGCGTTGGCGTTGGCGTTGGGGG
X-AA	GGGGGGAACGTTAACGTTAACGTTGGGGG
X-CC	GGGGGGCCCGTTCCCGTTCCCGTTGGGGG
GG-X	GGGGGGTTCGGGTTTCGGGTTTCGGGGGGGG
AA-X	GGGGGGTTCGAATTCGAATTCGAAGGGGG
CC-X	GGGGGGTTCGCCTTCGCCTTCGCCGGGGG

30

【0207】

HEK293 pNifTy2 chITLR21刺激試験において、X4 GG、X4 AA、X4 CC、GG XおよびAA Xは考慮した濃度範囲にわたり不活性であることが証明された。しかしながら、CC X (EC₅₀ = 6.94 nM)はX4 (EC₅₀ = 52.3 nM)のそれに対し7倍優れたEC₅₀活性を示し、しかもまたより高い最大刺激シグナルも示した。図32を参照。

【実施例23】

【0208】

本発明のCpGモチーフの動物試験

40

1 諸言

1.1 目的

W/O型エマルジョンと組み合わせた、最小限量の不活化NDVクローン30抗原と併用するTLR(Toll様受容体)が、生NDV Hedrts33/56の攻撃感染に対し保護を与えるかどうかを評価すること。

【0209】

1.2

2 材料と方法

2.1 試験の簡単な概略

50

隔離飼育器に収容した、3週齢のSPFホワイトレグホンニワトリの18群に、表1「群分けおよび投薬」に示す製剤の一つにより、右胸筋の筋肉内に1回だけワクチン接種した（筋肉内注射）。12羽の動物からなる各々の群から、10羽だけにワクチン接種し、残りの2羽は対照として役立てた。血液試料は、ワクチン接種一日前（ $T = 0$ ）に無作為に選びとった18羽の動物（各々の群から1羽）から、およびワクチン接種後の $T = 3$ 週間目に全群の全動物から採取した。ワクチン接種後の $T = 3$ 週間目の血液採取後に、全ニワトリは、ニワトリ当たり0.2mlの短潜伏期性のNDV株Herts33/56（ $10^6 \cdot 0 \text{ EID}_{50}$ ）を用いて右下肢筋に筋肉内（i.m.）経路により攻撃感染した。攻撃感染後の14日の期間、ニワトリはNDV感染の臨床エビデンスまたは致死率の発生に関し毎日点数化した。攻撃感染後の2週間目に、血液を全動物から採取し、その後動物を安息死させた。局所反応は肉眼的にしらべて点数化した。反応または病変が観察可能であるときは型通りの組織学用試料を採取した。

10

【0210】

2.2 試験材料

2.2.1

2.2.1.1 ワクチン：0.25% w/wの不活化NDVクローン30（W/O型エマルジョン中）

2.2.1.2 TLRリガンド：X4 PDE（Y11） Biolegio社製 オランダ

X4 PTO（Y11） TibMolBiol社製 ベルリン ドイツ

X4 PTO G only（Y11） TibMolBiol社製

2007 PTO（文献公知） TibMolBiol社製

2.2.1.3 CpG配列：

【化24】

X4-PDE（Y11）: GGGGGGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG（全PDE骨格）

X4-PTO（Y11）: gsgsgsgsgsgsTsTsCsgsTsTsTsTsCsgsTsTsTsTsCsgsTsTsgsgsgsgsgs（全PTO骨格）

X4-PTO-G-only（Y11）: gsgsgsgsgsgsTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTgsgsgsgsgs（PTOのg伸長）

2007-PTO: TsCsgsTsCsgsTsTsgsTsCsgsTsTsTsTsgsTsCsgsTsTs（全PTO骨格）

PTO = ホスホ（ロ）チオエート（「s」と表示）（=ヌクレアーゼ耐性）；

PDE = リン酸ジエステル（標準的オリゴ合成）

30

【表 1】

表 1 群分けおよび投薬

群	数	腹腔内投与No.	ワクチン	TLRリガンド	TLR
1	10	100132.1	0.25% w/w NDV W/O型エマルジョン	-- (PBS)	--
	2	--	--	--	--
2	10	100132.4	0.25% w/w NDV W/O型エマルジョン	1 µg/用量 X4-PDE (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	--
3	10	100132.5	0.25% w/w NDV W/O型エマルジョン	10 µg/用量 X4-PDE (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	--
4	10	100132.7	0.25% w/w NDV W/O型エマルジョン	1 µg/用量 X4-PTO (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	--
5	10	100132.8	0.25% w/w NDV W/O型エマルジョン	10 µg/用量 X4-PTO (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	--
6	10	100132.1 0	0.25% w/w NDV W/O型エマルジョン	1 µg/用量 X4-PTO-G-only (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	--
7	10	100132.1 1	0.25% w/w NDV W/O型エマルジョン	10 µg/用量 X4-PTO-G-only (Y11)	TLR21
	2	--	--	--	--
8	10	100132.1 3	0.25% w/w NDV W/O型エマルジョン	1 µg/用量 2007-PTO	TLR21
	2	--	--	--	--
9	10	100132.1 4	0.25% w/w NDV W/O型エマルジョン	10 µg/用量 2007-PTO	TLR21
	2	--	--	--	--

10

20

【 0 2 1 1 】

2. 2. 2 ワクチン調製

各々のTLRリガンドについて一定の希釈液を新たに作成し、0.5ml当たり1µgまたは10µgの用量となるように、終濃度2.5%v/vになるまでそれを[0.25%w/wNDVのW/O型エマルジョン]ワクチンに添加した。(ここで使用する試験ワクチンのワクチン総投与量は、8.06%w/vNDV感染卵尿膜腔液/W/O型エマルジョンを含む。)ワクチンへTLRリガンドを添加した後、ミニボルテックスを使用して激しく混合した。

30

【 0 2 1 2 】

(「不活化ニューカッスル病ウイルスの1/4用量」とは、オリゴデオキシヌクレオチドがない場合に、DNV感染から家禽を保護することのできる抗体力価を与えると知られた不活化NDVの最小限量の1/4を意味する。)

40

2. 3 ワクチン接種

各々の群の動物10羽に、3週齢で0.5mlのワクチンを用いて筋肉内注射で右胸筋に接種した。各々の群の残りの動物2羽は接種せずに対照として役立てた。

【 0 2 1 3 】

2. 4 攻撃感染

ワクチン接種後3週間目に、全18群の全12動物を、0.2mlの生NDV Hert s 33 / 65 (ニワトリ当たり $10^{6.0}$ EID₅₀)を用いて筋肉内注射経路により右下肢筋に攻撃感染した。

【 0 2 1 4 】

2. 5 血液試料

血清学用の血液は、ワクチン接種一日前に(T=0)無作為に選びとった18羽の動物

50

(各々の群から1羽)から、および一次接種後T = 3週間目に全動物から採取した。攻撃感染後2週間目の血液を、NDV攻撃感染に生き残った全ての残っている動物から採取した。

【0215】

2.6 HIアッセイ

NDV特異抗体の血清レベルは、赤血球凝集抑制(HI)アッセイによって測定した。血清の2段階希釈液をマイクロタイタープレート中で調製し、それからNDV抗原50μl中に8赤血球凝集単位を含む等容量と混合した。力価は、ニワトリの赤血球(緩衝食塩水中1%(v/v))の血球凝集を完全に抑制する最高希釈倍数の逆数で表した。試料は、1:2以上の希釈倍数における赤血球凝集抑制に対して陽性とみなした。

【0216】

3 結果

【表2】

GNEにおける0.25%(w/w)NDVクローン30				
		接種後3週間目*	↓	接種後5週間目 (=攻撃感染後2週間目*)
群	TLRリガンド	NDV平均HI力価 (2の対数)	保護ニワトリ%	NDV平均HI力価 (2の対数)
1	--	0.0±0.0	0%	--
2	1 μg/用量 X4-PDE (Y11)	1.5±1.7	40%	9.3±1.0
3	10 μg/dose X4-PDE (Y11)	4.3±1.9	70%	9.1±1.1
4	1 μg/用量 X4-PTO (Y11)	1.7±1.3	30%	8.7±0.6
5	10 μg/用量 X4-PTO (Y11)	2.3±2.2	40%	8.3±0.5
6	1 μg/用量 X4-PTO-G- only (Y11)	2.2±1.6	40%	9.3±1.0
7	10 μg/用量 X4-PTO-G- only (Y11)	5.0±1.5	90%	8.8±0.7
8	1 μg/用量 2007-PTO	2.5±1.6	60%	8.7±0.8
9	10 μg/用量 2007-PTO	3.3±2.1	70%	9.0±0.6

*: w k p v = 接種後経過週間 ; w k p c = 攻撃感染後経過週間

【0217】

NDVのHI力価:

結果から、またNDVのHI力価は保護と正確に相関することも明らかである。保護を誘導した各々のTLRリガンドに対し、最高のHI力価が、換言すれば用量当たり10μgで、最高の保護と相関することが見出された。対照的に、TLRリガンドの最も高い用量でHI力価は最も低かった。

【0218】

組織学および病理学

注射部位の肉眼観察による研究において、異なる群由来のトリの注射部位の間に肉眼観察による差異は認められなかった。これらの観察は、使用したTLRリガンドが安全であり、しかもそれらが例えば局所反応等の追加の副作用を誘発しなかったことを示している。

【0219】

保護 / 生存 :

結果から、NDVのW/O型エマルジョンだけを用いては保護が得られなかったことが明らかであり(群1)、一方いくつかの他の群においては20%ないし90%のトリが、0.25%(w/w)NDVクローン30W/O型エマルジョンへのTLRリガンドの付加により保護された。

【0220】

非ワクチン接種の対照ニワトリ(n=36)において保護は観察されなかった。

【実施例24】

【0221】

本発明のCpGモチーフのさらなる動物試験。

10

【0222】

1 諸言

1.1 目的

W/O型エマルジョン(鉱物油に基づいた油中水型エマルジョン)と組み合わせたX4 Pent PDEのニワトリにおける抗NDV、抗IBVおよび抗TRT抗体力価に及ぼす影響を評価すること。

【0223】

1.2 動機付け

本試験において発明者らは、W/O型エマルジョンと組み合わせた総用量の1/4の不活化NDV、IBVまたはTRT抗原へのX4 Pent PDEの付加が、NDVおよびTRTの総用量、またはIBVの半分の用量と比べたときに同等かより高い抗体力価を惹起することができるか否かを研究した。

20

【0224】

2 材料と方法

2.1 試験の簡単な概要

4週令のSPFホワイトレグホンニワトリの群(群当たりn=10)に、表2に示す製剤の一つにより右下肢筋に1回、筋肉内注射でワクチン接種した。血液試料は、ワクチン接種一日前(T=0)に無作為に選り出した20羽の動物から、およびワクチン接種後のT=4およびT=6週間目に全群の全動物から採取した。血清は、抗NDV、抗IBVおよび抗TRT抗体力価を測定するために使用した。

30

【0225】

2.2 試験材料

2.2.1 試験物質

2.2.1.1 抗原(不活化): NDVクローン30: ワクチン総用量は、NDV 感染卵/W/O型エマルジョンの8.06%w/v尿膜腔液を含む。

【0226】

IBV 249G: ワクチン総用量は、IB 感染卵/W/O型エマルジョンの30%w/v尿膜腔液を含む。

【0227】

TRT: 原生産単位。ワクチン総用量は100E.U./用量を含む。

40

【0228】

2.2.1.2 ワクチン: 表2を参照。

【0229】

2.2.1.3 免疫賦活剤:

【化25】

X4-Pent-PDE: 5'-

GGGGGGTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTGGGGG-3'

(Eurofins MWG Operon (Germany))

50

【0230】

2.2.2 ワクチン調製

X4 Pent PDE型TLRリガンドの予備希釈液を新たに作成し、ワクチン0.5ml当たり1μgまたは10μgの用量となるように、終濃度2.5%v/vまでワクチンに添加した。TLRリガンドの添加後にワクチンをミニボルテックスを使用して激しく混合した。

【0231】

2.3 ワクチン接種

各々の群由来の動物は、4周齢のときにワクチン0.5mlを用いて右下肢筋に筋肉内注射で接種した。

【0232】

2.4 血液試料

血清学用の血液試料は、ワクチン接種前(T=0)に無作為に選びとられた動物20羽からおよび一次接種後T=4週間目に全動物から採取した。

【0233】

2.5 抗体力価

2.5.1 NDVのHI アッセイ

NDV特異抗体の血清レベルは、赤血球凝集抑制(HI)アッセイによって測定した。血清の2段階希釈液をマイクロタイタープレート中で調製し、それからNDV抗原50μl中に8赤血球凝集素単位を含む等容量と混合した。力価は、ニワトリの赤血球(緩衝食塩水中1%(v/v))の血球凝集を完全に抑制する最高希釈倍数の逆数で表した。試料は、1:4以上の希釈倍数における赤血球凝集抑制に対して陽性とみなしたが、2の対数で示す。

【0234】

2.5.2 IBVのHI アッセイ

IB特異抗体力価の血清レベルは、赤血球凝集抑制(HI)アッセイによって測定した。血清の2段階希釈液をマイクロタイタープレート中で調製し、それからIBV D274抗原50μl中に8~16赤血球凝集素単位を含む等容量と混合した。力価は、ニワトリの赤血球(緩衝食塩水中1%(v/v))の血球凝集を完全に阻害する最高希釈倍数の逆数で表した。試料は、1:16以上の希釈倍数における赤血球凝集抑制に対して陽性とみなしたが、2の対数で示す。

【0235】

2.5.3 TRTのELISA

TRT特異抗体の血清レベルは、標準ELISAによって測定した。手短に言えば、1:200希釈TRT抗原材料の100μlをマイクロタイタープレートに被覆した。血清は1:100および1:800に予備希釈し、それからマイクロタイタープレートに添加した。血清力価は、5以上の力価で陽性とみなしたが、2の対数で示す。

【0236】

2.5.4 結論

表2の結果より以下のことが直ちに結論し得る。

【0237】

1) 1/4用量のNDVワクチンは、X4 Pent 10μgと共に投与されるとき、X4 Pent 無添加の総用量のNDVに匹敵する力価を与える。

【0238】

2) 1/4用量のNDV/IBV併用ワクチンは、X4 Pent 10μgと共に投与されるとき、X4 Pent 無添加の総用量のNDV/IBV併用ワクチンに匹敵するNDV力価およびIBV力価を与える。

【0239】

3) 1/4用量のTRTワクチンは、X4 Pent 10μgと共に投与されるとき、X4 Pent 無添加の総用量のTRTワクチンに匹敵する力価を与える。

10

20

30

40

50

【 0 2 4 0 】

3 結果

【表 2】
表 2

ワクチン(+LV - W/O型エマルジョン)				T = 4 週間目			T = 6 週間目		
NDV	IBV-249G	TRT	PAMP	NDV	IBV	TRT	NDV	IBV	TRT
全	--	--	--	9.3 ± 0.7	--	--	9.2 ± 0.8	--	--
--	1/2	--	--	--	9.3 ± 1.8	--	--	9.4 ± 0.7	--
全	1/2	--	--	9.2 ± 0.9	9.1 ± 1.5	--	8.6 ± 1.1	9.2 ± 0.8	--
1/4	--	--	10 µg X4-Pent	9.2 ± 1.0	--	--	8.8 ± 0.9	--	--
1/4	1/4	--	10 µg X4-Pent	9.5 ± 0.5	9.9 ± 2.0	--	9.0 ± 0.8	9.5 ± 0.5	--
--	--	full	--	--	--	11.7 ± 0.4	--	--	12.4 ± 0.3
--	--	1/4	10 µg X4-Pent	--	--	12.2 ± 0.4	--	--	12.3 ± 0.8
全 = 8.06% w/v	全 = 30.1% w/v	全 = 100 (エントトキシ単位)							

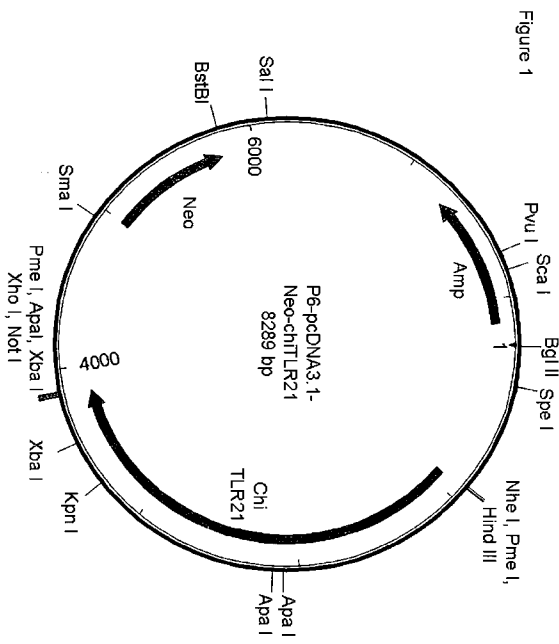
10

20

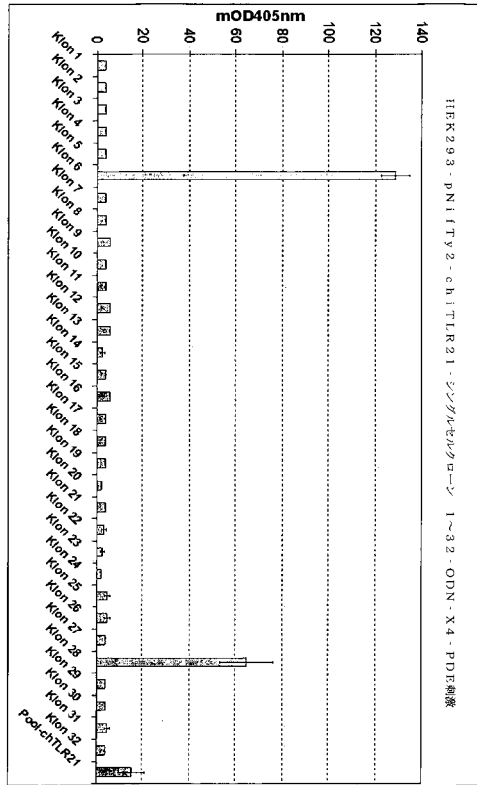
30

40

【 1 】



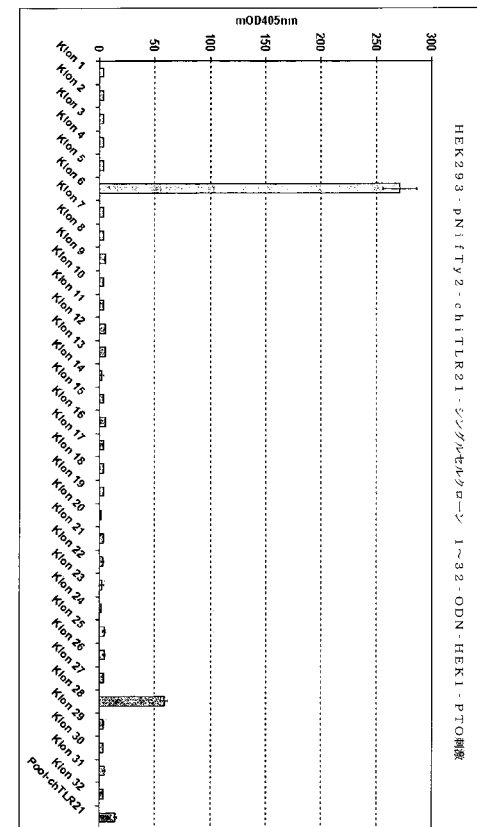
【 2 】



【 3 】



【 4 】



【 5 】

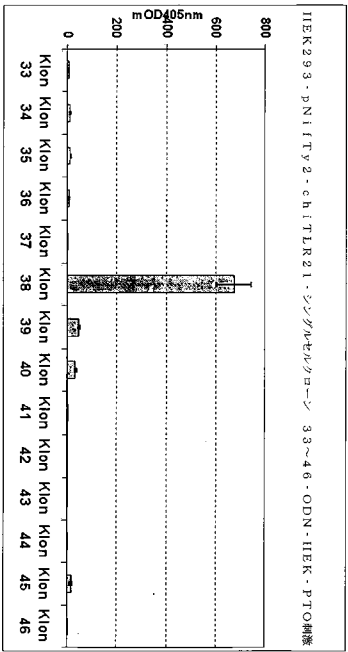


Figure 5

【 6 】

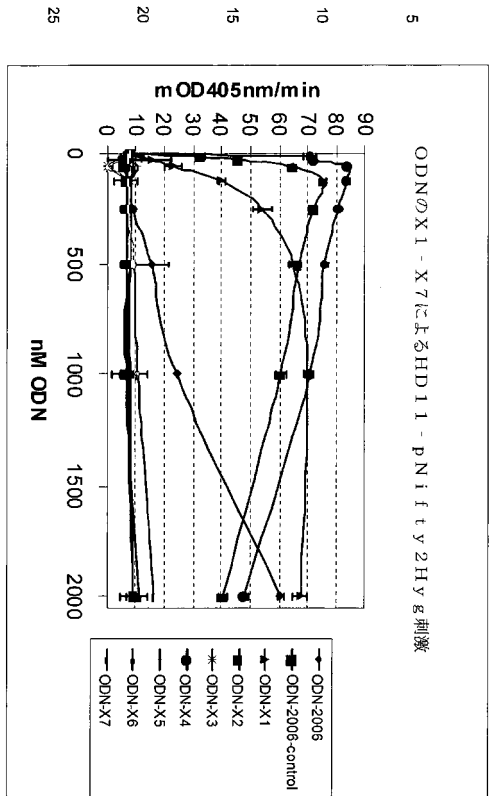


Figure 6

【 7 】

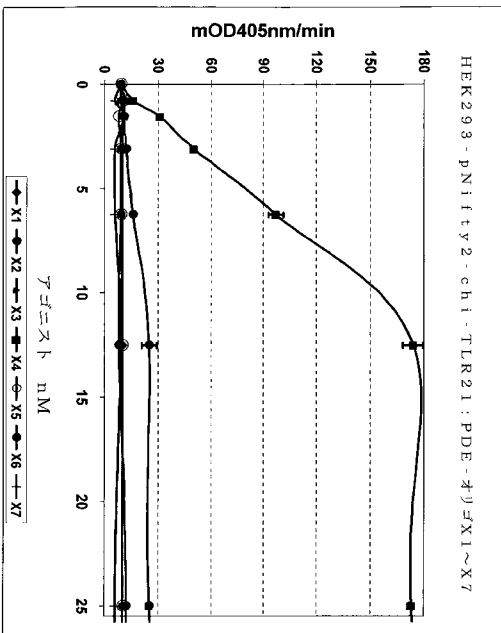


Figure 7

【 8 】

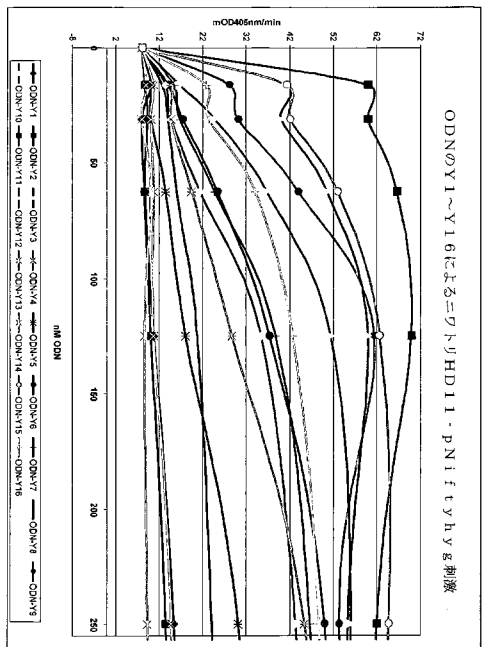


Figure 8

【 9 】

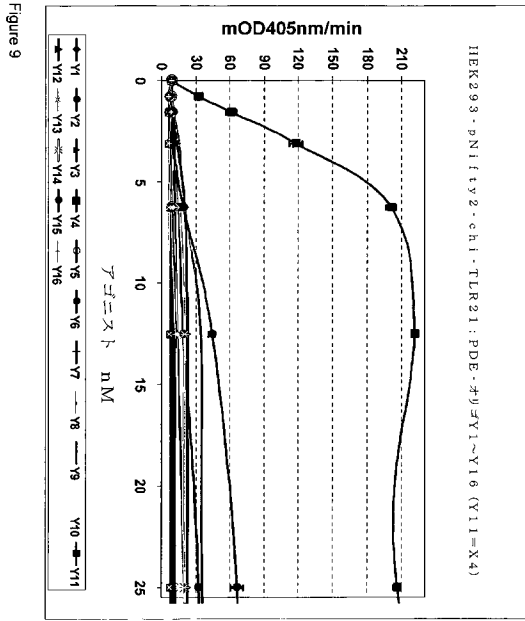


Figure 9

【 10 】

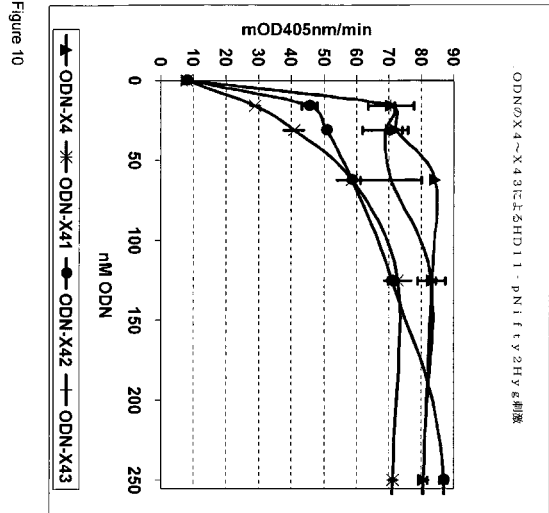


Figure 10

【 11 】

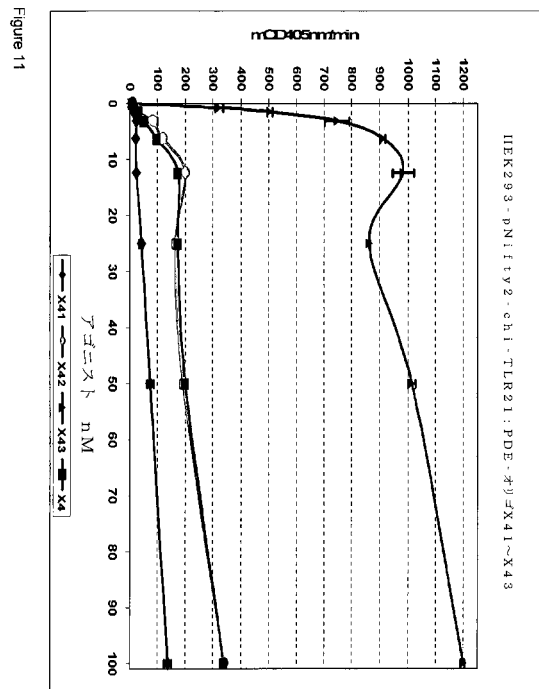


Figure 11

【 12 】

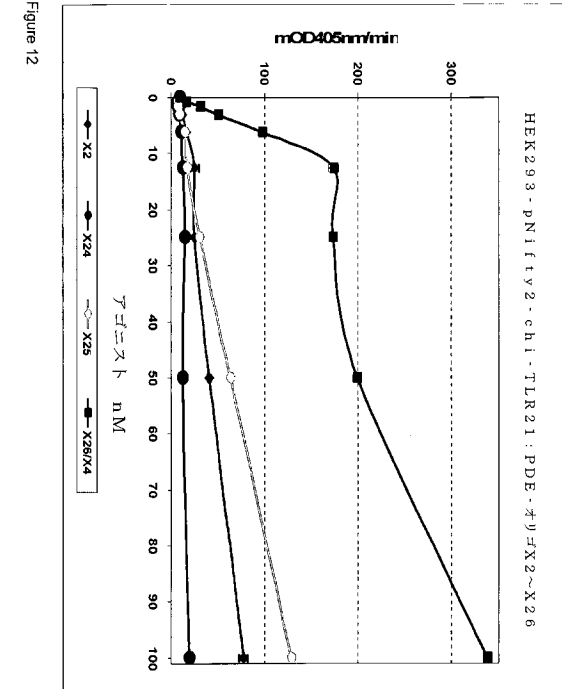
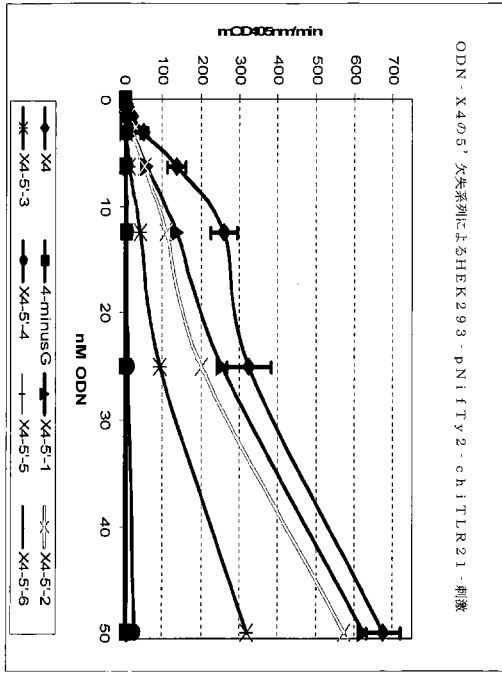


Figure 12

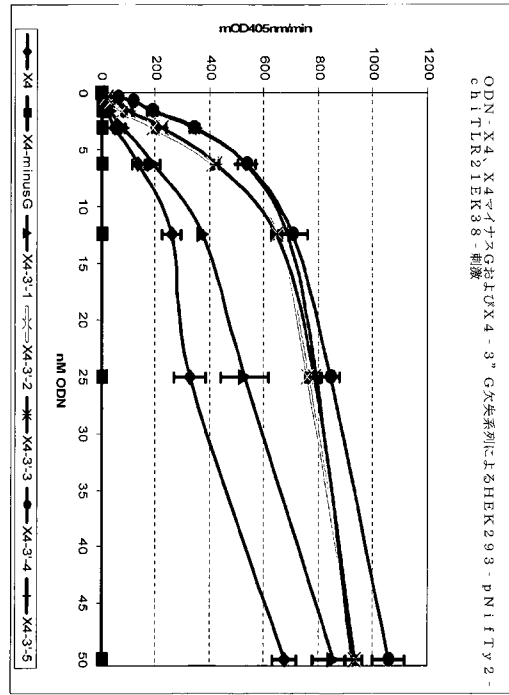
【 1 3 】

Figure 13



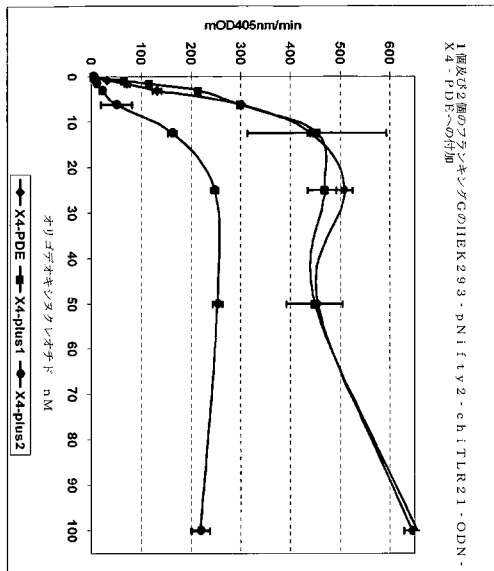
【 1 4 】

Figure 14



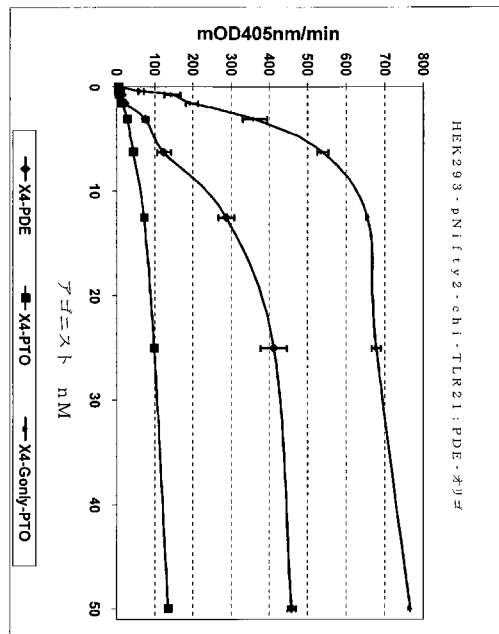
【 1 5 】

Figure 15



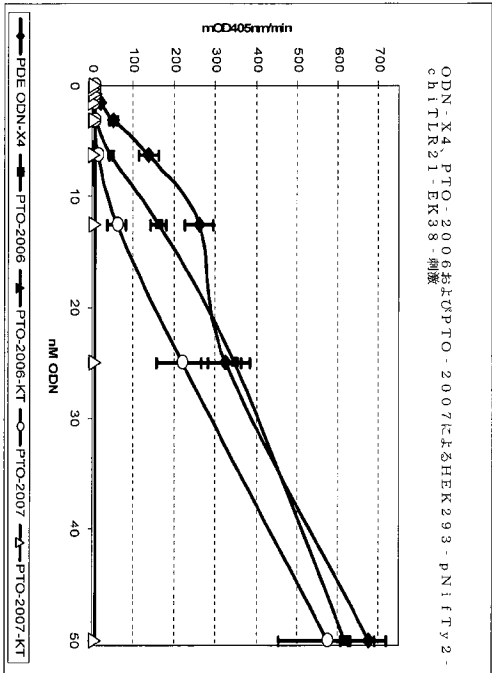
【 1 6 】

Figure 16



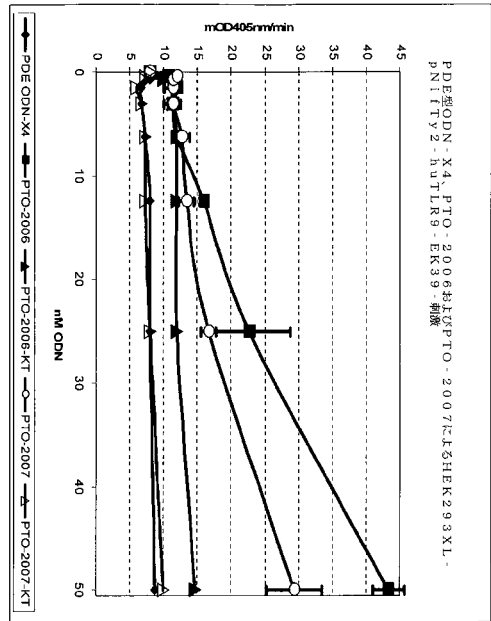
【 17 】

Figure 17



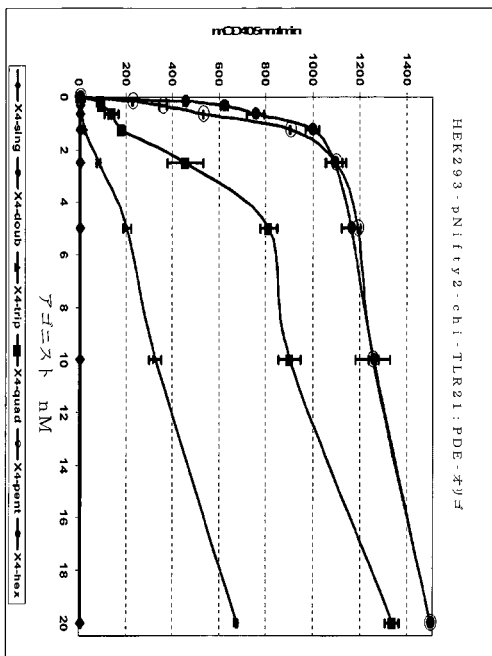
【 18 】

Figure 18



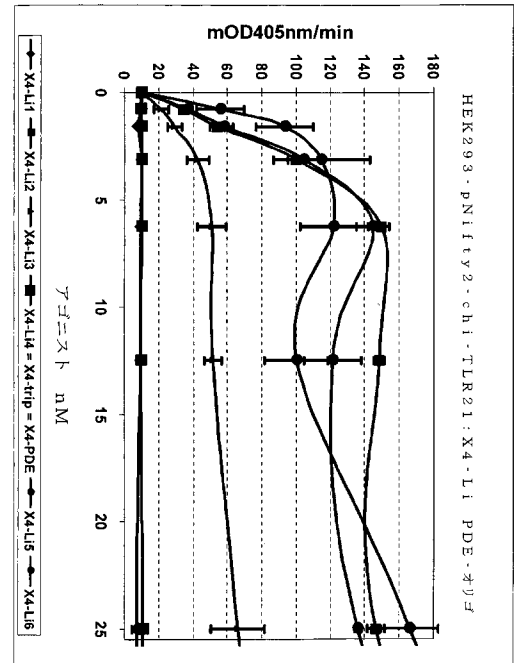
【 19 】

Figure 19



【 20 】

Figure 20



【 2 1 】

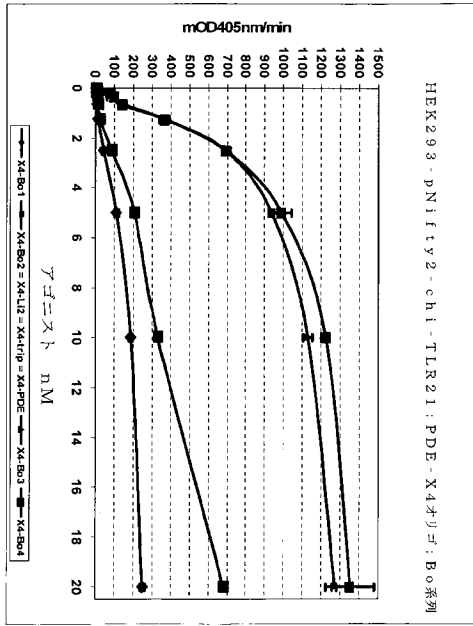


Figure 21

【 2 2 】

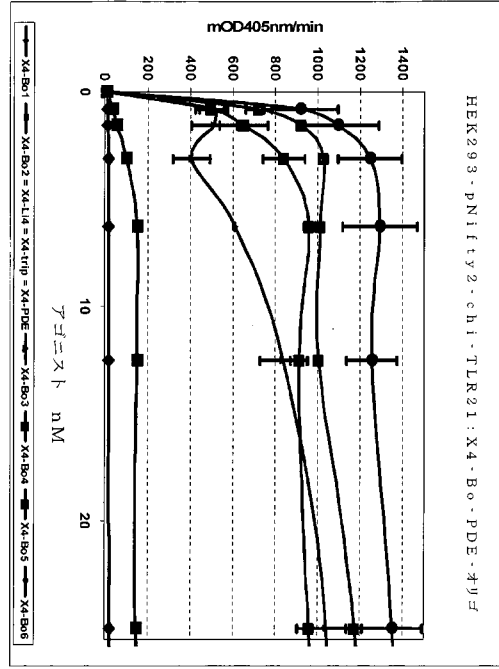


Figure 22

【 2 3 】

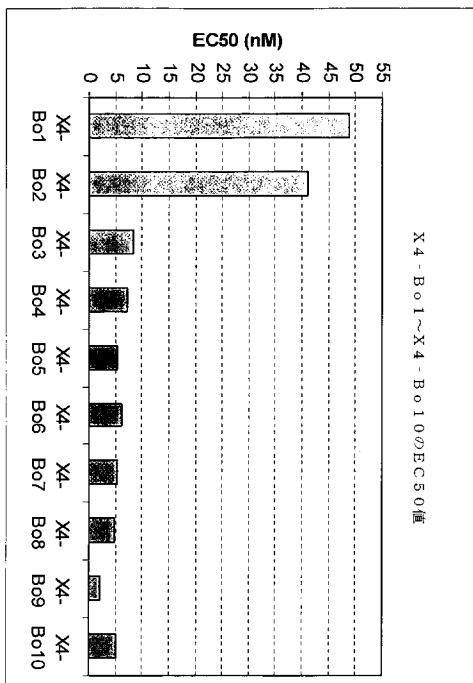


Figure 23

【 2 4 】

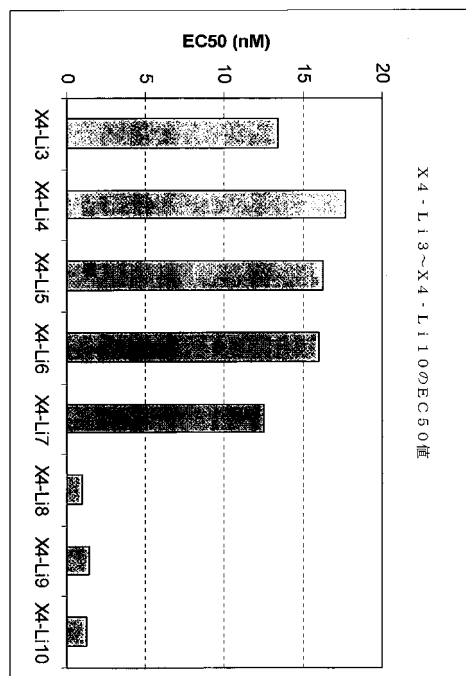
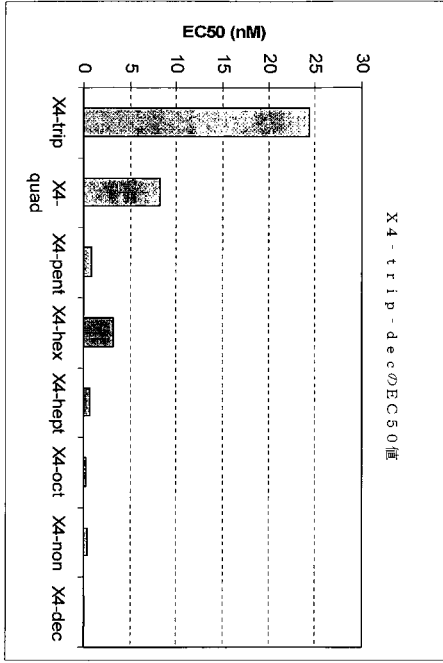


Figure 24

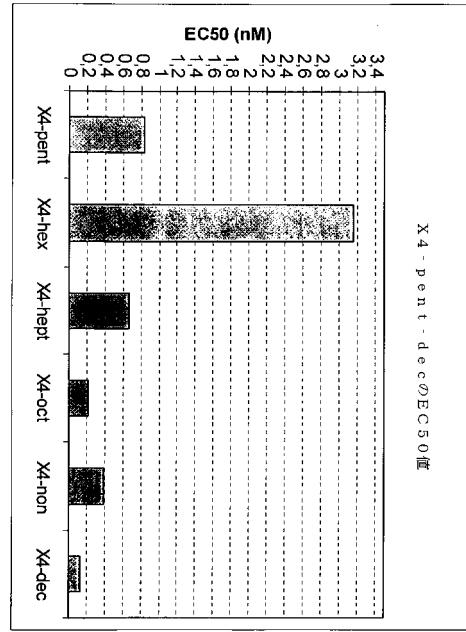
【 2 5 】

Figure 25



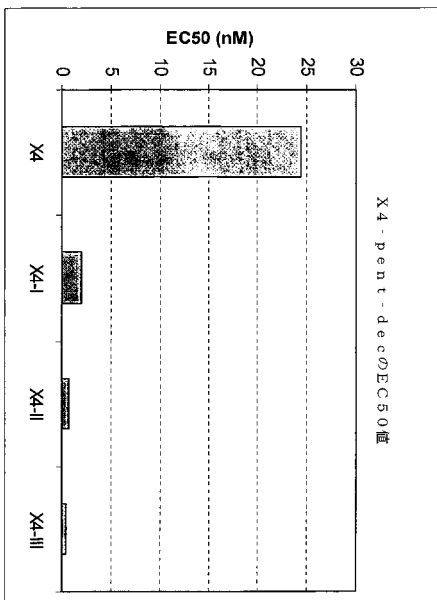
【 2 6 】

Figure 26



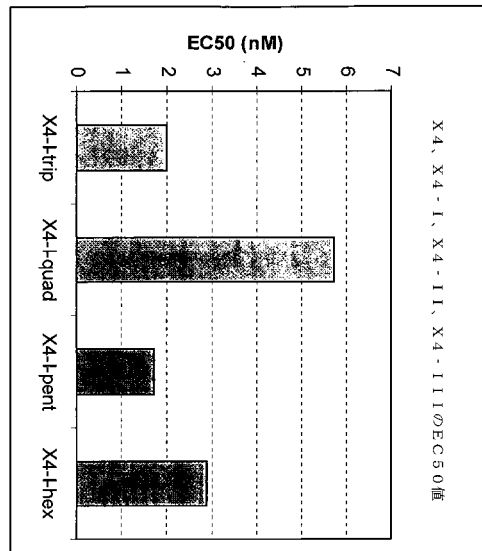
【 2 7 】

Figure 27



【 2 8 】

Figure 28



【配列表】

2014507131000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年8月26日(2013.8.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式、



[式中、

各々の N_1 は独立してCまたはGであり；各々の N_2 は独立してCまたはGであり； N_3 および N_4 が双方Cである組合せは除外するという条件で $N_3 = T$ 、CまたはGであり；各々の N_4 および N_5 は独立してCまたはTであり； $N_6 = A$ 、T、GまたはCであり； $N_7 = A$ 、T、CまたはGであり； $N_8 = A$ 、T、CまたはGであり； $x = 3 \sim 10$ であり； $z = 0 \sim 10$ であり； $n = 2 \sim 100$ であり； $p = 1 \sim 6$ または $N_4 = T$ であれば $1 \sim 25$ であり； $q = 1 \sim 6$ または $N_5 = T$ であれば $1 \sim 25$ であり； $r = 0 \sim 8$ または $N_7 = T$ であれば $1 \sim 25$ であり； $s = 0 \sim 8$ または $N_8 = T$ であれば $1 \sim 25$ である、]

を有する免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチドまたはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項2】

 $N_6 = A$ 、TまたはCである請求項1のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項3】

 N_3 がTまたはG、および N_6 がYである請求項1または2のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項4】

 N_3 、 N_4 、 N_5 および $N_6 = T$ である請求項3のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項5】

 N_3 、 N_4 および $N_5 = T$ ならびに $N_6 = C$ である請求項1または2のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項6】

 N_3 がGでありおよび $N_6 = T$ である請求項1または2のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項7】

 $N_5 = T$ および $N_6 = C$ である請求項1または2のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項8】

 $N_5 = C$ 、 $N_6 = C$ および $q = 1$ である請求項1または2のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項9】

$N_4 = T$ および $N_5 = Y$ である請求項 1 または 2 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 10】

$N_4 = T$ および $N_5 = T$ である請求項 9 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 11】

x が 4 ~ 7 であり、および $r = 0$ または N_7 が A または T である請求項 1 ~ 10 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 12】

$x = 6$ である請求項 11 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 13】

z が 0 ~ 6、および $s = 0$ または N_8 が A または T である請求項 1 ~ 12 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 14】

z が 0 ~ 3 である請求項 13 のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 15】

N_1 が G である請求項 1 ~ 14 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 16】

N_2 が G である請求項 1 ~ 14 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 17】

n が 3 ~ 18 である請求項 1 ~ 16 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 18】

n が 4 ~ 18 である請求項 1 ~ 16 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 19】

n が 5 ~ 18 である請求項 1 ~ 16 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 20】

n が 5 ~ 18 でありおよび x が 4 ~ 7 でありおよび z が 0 ~ 3 でありおよび $r = 0$ または N_7 が A または T であり、および $s = 0$ または N_8 が A または T である請求項 1 ~ 11 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 21】

N_1 および N_2 がホスホロチオエート結合を有しならびに他のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合を有する請求項 1 ~ 20 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 22】

$N_7 = T$ および $N_8 = T$ である請求項 1 ~ 21 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 23】

$\{N_3 [N_4]_p C G [N_5]_q N_6\}_n$ がホモポリマーである請求項 1 ~ 22 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 24】

当該オリゴデオキシヌクレオチドが担体またはハプテンに結合している請求項 1 ~ 23 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 23 のいずれか一項のオリゴデオキシヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 26】

当該ワクチンが免疫賦活性量の請求項 1 ~ 24 のいずれか一項の免疫賦活性量のオリゴデオキシヌクレオチドおよび / または請求項 25 のベクター、免疫学性量の抗原成分または抗原成分をコードする遺伝情報、ならびに薬学的に許容可能な担体を含むことを特徴とする、感染症の予防または防止用ワクチン。

【請求項 27】

前記抗原成分がその野生型形態において家禽に対し病原性であるウイルスまたは微生物であるかまたはそれに由来することを特徴とする請求項 26 のワクチン。

【請求項 28】

前記ウイルスまたは微生物が、伝染性気管支炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病（ガンボ口病）、ニワトリ貧血ウイルス、トリレオウイルス、トリ呼吸器感染症病原菌、七面鳥鼻気管炎ウイルス、トリ伝染性コリザ病原菌（鼻感冒）、水痘ウイルス、ニワトリ脳脊髄炎ウイルス、産卵低下症候群ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス、七面鳥ヘルペスウイルス、Eimeria種、トリ感染症病原菌（オルニソバクテリウム・ライノトラキア）、出血性敗血症菌（パスツレラ・ムルトシダ）、トリ病原菌（マイコプラズマ・シノピエ）、Salmonella種および大腸菌から成る群より選択されることを特徴とする請求項27のワクチン。

【請求項29】

薬剤としての使用のための請求項1～24のいずれか一項の免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項30】

家禽の感染予防における使用のための請求項1～24のいずれか一項の免疫賦活性非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項31】

TLR21受容体およびNF Bレポーター遺伝子をコードし、細胞中で安定して保持されるプラスミドを含む細胞。

【請求項32】

前記レポーター遺伝子が分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項31の細胞。

【請求項33】

前記細胞がニワトリ細胞株HD11またはその中にニワトリTLR21受容体遺伝子がクローンされたHEK293細胞株の細胞であることを特徴とする請求項31または32の細胞。

【請求項34】

当該方法が、a)オリゴデオキシヌクレオチドを請求項31～33のいずれか一項の細胞と接触させ、およびb)レポーター遺伝の産物のレベルを検出する段階を含むことを特徴とする、免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチドの検出方法。

【請求項35】

レポーター遺伝子の産物が分泌型アルカリホスファターゼである請求項34の方法。

【請求項36】

細胞がニワトリ細胞株HD11、またはその中にニワトリTLR21受容体遺伝子がクローンされたHEK293細胞株の細胞であることを特徴とする請求項34または35の免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチドの検出方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/074211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/117 C12N5/10 A61K39/39 C12Q1/68 ADD. A61K39/02 A61K39/12 A61P37/04		
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) C12N A61K C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, EMBL, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J D F LICCHESI ET AL: "Transcriptional regulation of Wnt inhibitory factor-1 by Miz-1/c-Myc", ONCOGENE, vol. 29, no. 44, 4 November 2010 (2010-11-04), pages 5923-5934, XP055012655, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2010.322 the whole document -/--	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "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 "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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 February 2012		10/04/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/074211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	-& Licchesi J D F et al.: "Supplementary Table 1", ONCOGENE, vol. 29, no. 44 9 August 2010 (2010-08-09), XP002664075, Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/onc/journal/v29/n44/extref/onc2010322x4.xls [retrieved on 2011-11-22] page 2 -----	1-4
Y	HAN Y ET AL: "Involvement of TLR21 in baculovirus-induced interleukin-12 gene expression in avian macrophage-like cell line HD11", VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 144, no. 1-2, 29 July 2010 (2010-07-29), pages 75-81, XP027067686, ISSN: 0378-1135, DOI: 10.1016/J.VETMIC.2009.11.001 [retrieved on 2009-11-06] the whole document -----	1-30, 34-36
Y	WO 03/015711 A2 (COLEY PHARM GROUP INC [US]; COLEY PHARM GMBH [DE]; UNIV IOWA RES FOUND) 27 February 2003 (2003-02-27) example 1 -----	1-30, 34-36
Y	WO 2008/142509 A2 (COLEY PHARM GROUP INC [US]; COLEY PHARM GMBH [DE]; KRIEG ARTHUR M [US]) 27 November 2008 (2008-11-27) example 1; table 2; sequence 25 -----	1-30, 34-36
A	BROWNLIE R ET AL: "Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 46, no. 15, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 3163-3170, XP026494546, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2009.06.002 [retrieved on 2009-07-01] the whole document ----- -/--	1-30, 34-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/074211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LINGHUA ET AL: "Vaccination with Newcastle disease vaccine and CpG oligodeoxynucleotides induces specific immunity and protection against Newcastle disease virus in SPF chicken", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 115, no. 3-4, 20 January 2007 (2007-01-20), pages 216-222, XP005736733, ISSN: 0165-2427, DOI: 10.1016/J.VETIMM.2006.10.017 the whole document	1-30, 34-36
A	WO 2010/125480 A1 (COLEY PHARM GROUP INC [US]; DAVIS HEATHER LYNN [CA]; KRIEG ARTHUR MERT) 4 November 2010 (2010-11-04) claims 1,6; sequence 5	1-30, 34-36
A	WO 2004/058179 A2 (DYNAVAX TECHNOLOGIES [US]; DINA DINO [US]; FEARON KAREN L [US]; MARSHA) 15 July 2004 (2004-07-15) the whole document	1-30, 34-36
A	O. MENARD ET AL: "Characterization of Immunostimulatory CpG-Rich Sequences from Different Bifidobacterium Species", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 76, no. 9, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 2846-2855, XP055012765, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.01714-09 table 2	1-30, 34-36
A	MARIJKE KEESTRA A ET AL: "Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 185, no. 1, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 460-467, XP002662230, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/JIMMUNOL.0901921 [retrieved on 2010-05-24] the whole document	1-30, 34-36
A	ARSHUD DAR ET AL: "Immunotherapeutic Potential of CpG Oligonucleotides in Chickens", THE JOURNAL OF POULTRY SCIENCE, vol. 46, no. 2, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 69-80, XP055012761, ISSN: 1346-7395, DOI: 10.2141/jpsa.46.69 the whole document	1-30, 34-36
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/074211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CEREN CIRACI ET AL: "Avian-specific TLRs and downstream effector responses to CpG-induction in chicken macrophages", DEVELOPMENTAL & COMPARATIVE IMMUNOLOGY, vol. 35, no. 3, 30 November 2010 (2010-11-30), pages 392-398, XP055012767, ISSN: 0145-305X, DOI: 10.1016/j.dci.2010.11.012 the whole document -----</p>	<p>1-30, 34-36</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/074211**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-30(completely); 34-36(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2011/ 074211

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-30(completely); 34-36(partially)

An immunostimulatory non-methylated oligodeoxynucleotide having the general formula
[N1]_x[N7]_r{N3[N4]_pCG[N5]_q[N6]_n[N8]_s[N2]_z
wherein each N1 is independently C or G; Each N2 is independently C or G; N3 = T, C or G, with the proviso that the combination wherein N3 and N4 are both C is excluded; Each N4 and N5 are independently C or T; N6 = A, T, G or C; N7 = A, T, C or G; Ns = A, T, C or G; x = 3-10; z = 0-10; n = 2-100; p = 1-6 or 1-25 if N4 = T; q = 1-6 or 1-25 if N5 = T; r = 0-8 or 1-25 if N7 = T; s = 0-8 or 1-25 if N8 = T; or a pharmaceutically acceptable salt thereof; related methods.

2. claims: 31-33(completely); 34-36(partially)

Cell comprising a TLR21-receptor and a plasmid encoding an NF-K B reporter gene, which plasmid is stably maintained in the cell; uses thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/074211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 03015711 A2	27-02-2003	AT 411054 T	15-10-2008		
		BR 0211962 A	19-04-2005		
		CA 2457485 A1	27-02-2003		
		CN 1604795 A	06-04-2005		
		DK 1446162 T3	08-12-2008		
		EP 1446162 A2	18-08-2004		
		ES 2314099 T3	16-03-2009		
		HK 1067547 A1	08-05-2009		
		IL 160157 A	30-11-2010		
		JP 4383534 B2	16-12-2009		
		JP 2005502338 A	27-01-2005		
		JP 2009028051 A	12-02-2009		
		MX PA04001458 A	17-02-2005		
		NZ 531194 A	23-02-2007		
		NZ 552377 A	29-08-2008		
		PT 1446162 E	27-01-2009		
		SI 1446162 T1	30-04-2009		
		WO 03015711 A2	27-02-2003		
		WO 2008142509 A2	27-11-2008	AR 066626 A1	02-09-2009
				AU 2008252577 A1	27-11-2008
CA 2687441 A1	27-11-2008				
CN 101678098 A	24-03-2010				
EP 2160199 A2	10-03-2010				
JP 2009035530 A	19-02-2009				
KR 20100010509 A	01-02-2010				
RU 2009142211 A	27-05-2011				
TW 200916115 A	16-04-2009				
US 2010285041 A1	11-11-2010				
WO 2008142509 A2	27-11-2008				
ZA 200908062 A	30-06-2010				
WO 2010125480 A1	04-11-2010			AU 2010243285 A1	27-10-2011
		CA 2757620 A1	04-11-2010		
		EP 2424562 A1	07-03-2012		
		JP 2010260849 A	18-11-2010		
		KR 20120005537 A	16-01-2012		
		US 2012052088 A1	01-03-2012		
		WO 2010125480 A1	04-11-2010		
WO 2004058179 A2	15-07-2004	AT 442376 T	15-09-2009		
		AT 544772 T	15-02-2012		
		AU 2003297483 A1	22-07-2004		
		CA 2511475 A1	15-07-2004		
		CN 1745089 A	08-03-2006		
		CN 101693890 A	14-04-2010		
		DK 1575977 T3	09-11-2009		
		DK 1992635 T3	05-03-2012		
		EP 1575977 A2	21-09-2005		
		EP 1992635 A1	19-11-2008		
		ES 2328807 T3	18-11-2009		
		JP 2006512096 A	13-04-2006		
		KR 20050089983 A	09-09-2005		
		NZ 541027 A	30-04-2008		
		PT 1575977 E	15-12-2009		
		SG 173219 A1	29-08-2011		
		SI 1575977 T1	29-01-2010		
		US 2006058254 A1	16-03-2006		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/074211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2004058179 A2	15-07-2004

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04 1 7 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74) 代理人 100129713
弁理士 重森 一輝

(74) 代理人 100137213
弁理士 安藤 健司

(74) 代理人 230105223
弁護士 城山 康文

(72) 発明者 スフリエル, カルラ・クリステイナ
オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5

(72) 発明者 イルグ, トーマス・ジモーン
ドイツ国、5 5 2 7 0・シユバベンハイム・ツア・プロプシユタイ・1

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA08 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11 HA11
4B063 QA01 QQ33
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA02 CA28 CA44
4C084 AA13 MA52 MA59 MA66 NA14 ZC612
4C085 AA03 CC40 EE01 EE03 GG01 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZC61

专利名称(译)	免疫刺激性寡脱氧核苷酸		
公开(公告)号	JP2014507131A	公开(公告)日	2014-03-27
申请号	JP2013546705	申请日	2011-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	英特维特国际股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Intabetsuto国米Nashiyo INTERNACIONAL - 基于 - 基于		
[标]发明人	スフリエルカルラクリステイナ イルグトーマスジモン		
发明人	スフリエル,カルラ・クリステイナ イルグ,トーマス・ジモン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/10 C12Q1/42 C12N15/117 A61K39/00 A61P31/04 A61K31/7088 A61K48/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/12 A61K39/39 A61K2039/552 A61K2039/55561 A61K2039/55566 A61P31/04 A61P37/04 C12N15/117 C12N2310/17 C12N2310/315 C12N2310/341 C12N2310/345 C12N2760/18134 C12N2760/18334 C12N2770/20034 A61K39/02 C07H21/04 C12N15/63 A61K39/17		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.102 C12Q1/42 C12N15/00.J A61K39/00.H A61P31/04.171 A61K31/7088 A61K48/00 G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA08 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024 /HA11 4B063/QA01 4B063/QQ33 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA28 4B065/CA44 4C084/AA13 4C084/MA52 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084 /ZC612 4C085/AA03 4C085/CC40 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZC61		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 安藤 健二		
优先权	2010197435 2010-12-30 EP 61/430301 2011-01-06 US		
其他公开文献	JP5876889B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及免疫刺激性寡脱氧核苷酸，包含这种寡脱氧核苷酸的载体和疫苗，它们作为药物的用途，它们在预防或对抗传染病中的用途，涉及检测这种寡脱氧核苷酸的方法和用于这些方法的细胞。