

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-192552

(P2005-192552A)

(43) 公開日 平成17年7月21日(2005.7.21)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 31/712
A 6 1 K 39/29
A 6 1 K 39/39
A 6 1 P 1/16

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 31/712
A 6 1 K 39/29
A 6 1 K 39/39
A 6 1 P 1/16

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 C 0 5 7
4 C 0 8 5
4 C 0 8 6

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-239699 (P2004-239699)
(22) 出願日 平成16年8月19日(2004.8.19)
(31) 優先権主張番号 2004-001161
(32) 優先日 平成16年1月8日(2004.1.8)
(33) 優先権主張国 韓国(KR)

(71) 出願人 503271947
ヨンセ ユニバーシティー
大韓民国 120-749 ソウル ソデ
ムン-グ シンチョン-ドン 134 ヨ
ンセ ユニバーシティー
(74) 代理人 100071755
弁理士 齊藤 武彦
(74) 代理人 100070530
弁理士 畑 泰之
(72) 発明者 キム スー キ
大韓民国 220-042 カンウォン-
ド ウォンジュ-シ ミョンニョン2-ド
ン クゴクドンボレックスアパートメント
903-103

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫調節能力の増加されたC p Gオリゴデオキシヌクレオチド変形体

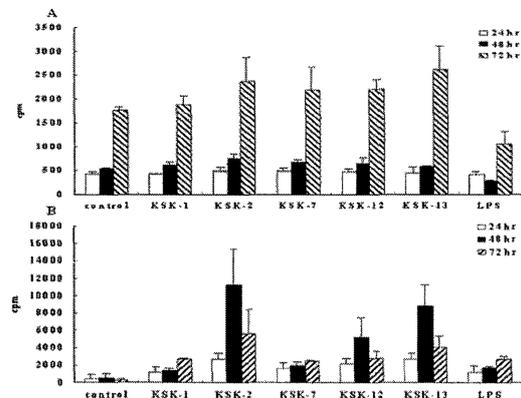
(57) 【要約】

【課題】脾臓細胞、大食細胞、末梢血液単核細胞などの免疫活性を向上させて、B型肝炎などの疾病に対する予防及び治療用ワクチン補助剤または抗癌剤として使用できる有用なC P G

ODN変形体及びこの用途を提供する。

【解決手段】免疫調節機能を有するC P Gオリゴデオキシヌクレオチド(Oligodeoxynucleotide、ODN)の3'末端にデオキシリボチミン(dT)の連続配列を結合させる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫活性を示し、CpGモチーフを有するフォスフォジエステルオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)において、ODNの3'末端にデオキシリボチミン(dioxymyribothimine、dT)の連続配列が結合されることを特徴とする、dTの修飾されたオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 2】

前記dTの連続配列が4~15個のヌクレオチド長さを有する、請求項1記載のdTの修飾されたオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 3】

前記ODNが脾臓細胞、大食細胞または末梢血液単核細胞の免疫活性を増進させる、請求項1記載のdTの修飾されたオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 4】

前記ODNが配列番号5で表される塩基配列である、請求項1乃至3のいずれか1項記載のdTの修飾されたオリゴデオキシヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項1に記載のdTの修飾されたオリゴヌクレオチドを有効成分として含むことを特徴とするワクチン補助剤。

【請求項 6】

他の抗原と共に追加的に使用される、請求項5記載のワクチン補助剤。

【請求項 7】

前記ワクチンがB型肝炎の予防または治療用のものである、請求項5または6記載のワクチン補助剤。

【請求項 8】

請求項1に記載のdTの修飾されたオリゴヌクレオチドを有効成分として含むことを特徴とする抗癌剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫調節能力の増加されたCpGオリゴデオキシヌクレオチド変形体に関するものであって、さらに詳細には、免疫調節能力を有するCpGオリゴデオキシヌクレオチド(Oligodeoxynucleotide、ODN)の3'末端にデオキシリボチミン(dT)の連続配列を結合することにより、脾臓細胞、大食細胞、末梢血液単核細胞などの免疫活性を向上させて、B型肝炎などの疾病に対する予防及び治療用ワクチン補助剤または抗癌剤として有用に使用できる、CpG ODN変形体及びこの用途に関するものである。

【背景技術】

【0002】

脊椎動物は、自分のDNA配列でCpGジヌクレオチドの発現を抑制するか、発現されたCpGジヌクレオチドのサイトシンをメチル化した(非特許文献1)。その反面、微生物のDNAでは、CpGジヌクレオチドは正常的な比率で発現されてメチル化されていないため、脊椎動物ではこのような差異を利用し微生物の感染を認知することができる。

【非特許文献1】Krieg, Ann. Rev. Immunol., 2002, 20, 709; McClelland & Ivvarie, Nucleic Acids Res. 1982, 23, 78

【0003】

このような微生物のDNAは、形態認識収容体(pattern recognition receptor)の一つであるtoll-like receptor 9(TLR9)を経由してこれを発現する樹状細胞やB細胞で認識をすることになり、究極的に宿主の固

10

20

30

40

50

有免疫体系 (innate

immune system) を活性化させる。固有免疫体系は、微生物や寄生虫などの感染に対する重要な防衛機制を有しているだけでなく、癌細胞の除去できる機能も有しているため、CpG

ODN を適切にデザインすることにより、免疫系の抗癌性を誘発できる抗癌性免疫補助剤を開発することができる。

【0004】

CpG ODN を利用した免疫体系の活性化に関する研究は、最近の数年間に集中的になされた。CpG

ODN は、CpG ジヌクレオチドを中心に 5' 末端と 3' 末端に少なくとも 4 個以上の塩基配列を有するが、この塩基配列により CpG ODN の免疫活性の特徴が決定される。 10

これを大きく K 型 ODN と D 型 ODN とに区分するが、K 型 ODN は、単核球と B 細胞を刺激し増殖させるか、免疫グロブリン M または IL-6 を分泌させる (非特許文献 2)。

D 型 ODN は、単核球を活性化して成熟した樹状細胞に分化させるか、ナチュラルキラー細胞を刺激し IL-6 を分泌させる (非特許文献 3) (非特許文献 4)。また、D 型 ODN は、B220⁺ 樹状細胞が IFN- γ を生産するようにして、TLR9⁺ B220⁺ 樹状細胞が IL-12 を生産するようにする。このような結果から、CpG

ODN が免疫細胞を刺激して免疫増進効果を奏する過程には、いくつかの経路が存在すると判断されている (非特許文献 5) (非特許文献 6)。

【非特許文献 2】Klinman et al., *Microbes Infect.*, 2002, 897-901 20

【非特許文献 3】Klinman et al., *Eur. J. Immunol.*, 2002, 32, 2617-22

【非特許文献 4】Gursel et al., *J. Leukoc. Biol.*, 71, 813-20, 2002。

【非特許文献 5】Hemmi et al., *J. Immunol.*, 2003, 170, 3059-3064;

【非特許文献 6】Kerkman et al., *J. Immunol.*, 2003, 170, 4465-4474。

【0005】 30

多くの研究チームが多様な形態の CpG ODN をデザインし免疫活性能力を試験した。これは主に、感染に対する免疫活性能力の活性化程度と抗癌免疫活性化程度に関するものである。CpG

ODN を用いた抗癌免疫に関する研究は、細胞性免疫と体液性免疫とに区分できて、細胞性免疫は、次の二つの方法により行われている。

【0006】

第 1 の方法は、樹状細胞の活性化を経由する免疫増進法である。癌細胞は、宿主の免疫監視体系を回避するために抗原提示能力を低める。そうすると、細胞毒性 T 細胞は、これが認知できなくなり癌細胞を除去することができない。これを克服するために、癌抗原の免疫原性の強い部分のペプチドを宿主に免疫させるが、この際、CpG

ODN を免疫補助剤と共に使用する方法である。この方法を使用することにより、抗原提示能力の優れた樹状細胞は、癌抗原のペプチドを受け入れて、CpG ODN により活性化されることにより、細胞毒性 T 細胞を活性化させることができる。活性化された細胞毒性 T 細胞は、効率的に癌細胞を除去することができる。この方法により、マウスから RMA (非特許文献 7) を除去する結果が得られた。このような免疫反応では、IFN- γ などが重要な作用をした。樹状細胞の活性化を経由する場合ではないが、ODN 2006

が B 細胞に直接作用し、B 細胞の抗原提示機能と、T 細胞との相互作用のできる補助刺激因子の発現とを増進させることにより、樹状細胞の作用と同様な原理で抗癌免疫を活性化させることもできる (非特許文献 8)。

【非特許文献 7】Stern et al., *J. Immunol.*, 2002, 168 50

, 6099 - 6105

【非特許文献8】Jahrsdorfer et al., J. Leukoc. Biol., 2001, 69, 81 - 88

【0007】

第2の方法は、ナチュラルキラー細胞の活性化を經由する免疫増進法である。癌抗原を外部から注入することにより樹状細胞が活性化され細胞毒性T細胞を活性化させることができるが、細胞毒性T細胞が細胞毒性を示すためには、癌細胞の表面のMHC class I 分子上に癌抗原の提示を必須とする。しかし、多くの場合、癌細胞の表面に癌抗原の提示の水準が、細胞毒性T細胞が細胞毒性を示すに十分な水準ではないため、樹状細胞の活性化による癌細胞除去方法は効率的ではない場合がある。この場合、細胞表面の癌抗原提示と無関係に細胞毒性を示すナチュラルキラー細胞の活性化は、この限界を克服できる方法となる。また、活性化されたナチュラルキラー細胞は、単核球または大食細胞を活性化させて、抗原非依存性免疫体系を活性化させる。この方法により、マウスで、ODN 1584はB16.F1黒色腫を、ODN 1826はEL4リンパ腫を軽減させた(非特許文献9)。また、マウスに、C26大腸癌を誘発してODN 1826を癌部位に直接注射した時、癌組織を軽減させたが、この場合は、ナチュラルキラー細胞の作用と共に他の免疫作用も必要な場合である(非特許文献10)。マウスから誘発された38C13

B細胞リンパ腫は、CpG ODNを単独処理した時誘発される免疫反応によっては除去できないが、38C13リンパ腫細胞の特異抗原に対する単クローン抗体を共に処理する場合は、ナチュラルキラー細胞が抗体依存性細胞毒性(antibody-dependent cell cytotoxicity)を発揮し、38C13リンパ腫を除去することができる(非特許文献11)。

【非特許文献9】Ballas et al., J. Immunol., 2001, 167, 4878 - 4886

【非特許文献10】Heckelsmiller et al., J. Immunol., 2002, 169, 3892 - 3899

【非特許文献11】Woodridge et al., Blood, 1997, 89, 2994 - 2998

【0008】

体液性免疫は、抗原またはこれに相応する物質と共にCpG ODNを免疫増進剤として使用することにより誘導できる。Trastuzumabとrituximabは、各々HER-2タンパク質を過発現する癌細胞と非ホキンスB細胞リンパ腫(non-Hodgkin's B cell lymphoma)に対し効果を示す商品化された単クローン抗体であるが、最近、CpG ODNと組合した時抗癌性免疫反応を増進させるかに対する臨床研究が進行中であり、この結果は、数年後報告できると予想される(非特許文献12)。

【非特許文献12】Jahrsdorferら, Sem. Oncol., 2003, 30, 476 - 482

【0009】

CpG ODNは、CpGジヌクレオチドを含む5'末端と3'末端の塩基配列によりその免疫活性能を示すが、CpG ODN自体は、生体に存在するDNA分子と構造上の差のない天然構造であるため、細胞毒性を示さない長所がある。しかし、天然構造であるため、生体内で分解されやすく、免疫活性能の半減期が短い欠点がある。これを克服するために、一回投与量を増やす方法があるが、これは経済的に好ましい方法ではない。従って、CpG ODNを合成する時、DNA分子の骨格であるフォスフォジエステル結合をフォスフォリチオエート結合に変形すると、CpG ODNの免疫活性効果が10~100倍増加する(非特許文献13)。しかし、この方法は、天然構造ではないことから現れる細胞毒性、

10

20

30

40

50

骨格変形により、本来の CpG

ODNの免疫活性能力の変化と免疫細胞の収容速度の変化を誘発する可能性があるため、全ての CpG ODNに適用できる方法であるかは、まだ確認されていない状態である。

【非特許文献13】Sester et al., J. Immunol., 2000, 165, 4165 - 4173

【0010】

CpG ODNは、種特異性があるため、実験動物を利用した研究で優れた免疫活性効果を奏した CpG

ODNがヒトにおいても対等な効果を示したとの報告はまだない。また、CpG ODNの作用機制はまだ知られていないため、免疫活性能力の優れた CpG ODNの開発に多くの困難がある。従って、まだ臨床実験段階まで至った CpG

ODNはなく、既存の CpG ODNより免疫刺激能力が優秀であるか、相対的に副作用のない CpG ODNの開発が必要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明者らは、前記のような点を勘案し鋭意研究した結果、免疫調節能力を有する CpG オリゴデオキシヌクレオチド (Oligodeoxynucleotide、ODN) の3'末端にデオキシリボチミン (dT) の連続配列を結合させることにより、脾臓細胞、大食細胞、末梢血液単核細胞などの免疫活性を向上させて、B型肝炎などの疾病に対する予防及び治療用のワクチン補助剤または抗癌剤として使用できる有用な CpG ODN変形体を開発し、本発明を完成した。

【0012】

従って、本発明は、免疫調節機能を有する CpG ODN変形体を提供することにその目的がある。

【0013】

また、本発明の他の目的は、前記 CpG ODN変形体を有効成分として含有するワクチン補助剤または抗癌剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、免疫活性を示し、CpGモチーフを有するフォスフォジエステルオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) において、ODNの3'末端にデオキシリボチミン (dT) の連続配列が結合された ODN変形体をその特徴とする。

【0015】

また、本発明は、前記 dT の連続配列が結合された CpG ODN をワクチン補助剤または抗癌剤として使用する用途を提供する

【0016】

以下、このような本発明をさらに詳細に説明する。

【0017】

本発明は、免疫調節能力を有する CpG オリゴデオキシヌクレオチド (Oligodeoxynucleotide、ODN) の3'末端にデオキシリボチミン (dT) の連続配列を結合させることにより、脾臓細胞、大食細胞、末梢血液単核細胞などの免疫活性を向上させて、B型肝炎などの疾病に対する予防及び治療用のワクチン補助剤または抗癌剤として使用できる有用な CpG ODN変形体及びこの用途に関するものである。

【0018】

本明細書で用語「ODN」は、免疫反応を活性化することのできる11~26ヌクレオチド長さのオリゴデオキシヌクレオチドを意味し、特に、用語「CpG ODN」は、免疫調節機能を示す CpGモチーフ (5' - purine purine CpG pyrimidine pyrimidine - 3') を有するオリゴデオキシヌク

10

20

30

40

50

レオチドを意味する。用語「d Tの連続配列」は、デオキシリボチミンが少なくとも4個以上連続的にフォスフォジエステル結合によりC p G ODNに連結された形態を意味する。

【0019】

本発明で使用したC p G ODNは、MetaBion社(ドイツ)に依頼して合成したが、塩基間の全てのフォスフォジエステル結合は、フォスフォロチオエート(phosphorothioate)結合により代替された。高性能液体クロマトグラフィーとNAP精製過程を経て純度を最大に維持した後、凍結乾燥された状態で供給を受けた。本発明で使用したC p G ODNの塩基配列を次の表1に示す。

10

【0020】

【表1】

名称	配列番号 (コード名)	塩基配列(5' to 3')
1982	1 (KSK-1)	TCCAGGACTTCTCTCAGGTT
1826	2 (KSK-2)	TCCATGACGTTCCCTGACGTT
2006fG6run	3 (KSK-7)	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGGG
2006	4 (KSK-12)	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006f	5 (KSK-13)	TCGTCGTTTTCGTCGTCGTTTT

20

【0021】

ODNの骨格は、天然のフォスフォジエステル結合をする場合、生体内の核酸分解酵素の攻撃を受けて分解されやすい。抗癌免疫活性能力を有するC p G ODNが生体内で適切な免疫学的効果を奏するためには、その投与量を増やすか、核酸分解酵素の攻撃が避けられる構造を有していなければならない。本発明が提供するC p G ODNは、骨格構造をフォスフォロチオエート結合にすることにより、核酸分解酵素の攻撃を避けて生体内での半減期を延長した。しかし、フォスフォロチオエート結合自体による非特異的免疫反応の誘発により、安全性に多くの問題を有している。これに対し、本発明者らがフォスフォロチオエート結合を有する50 μgのODNをアルミニウムヒドロキシドで処理して、CHO細胞由来の抗原 g D E 2 t と共にマウスに注射してみた結果、注射部位から肉芽腫及び壊死などの異常所見が発見されず、その安定性を確認することができた。

30

【0022】

本発明が提供するC p G ODNは、単核球を活性化してサイトカインを分泌し、究極的に抗癌免疫を活性化させる。抗癌免疫活性化C p G ODN候補が、U-937、RAW264.7、THP-1などのリンパ腫細胞株を利用する一次スクリーニングによって選択された。細胞株は、実質的に本発明が提供しようとするC p G ODNが目標とする一次細胞と異なる免疫反応を示す可能性があるため、これを確認するために、再びマウス脾臓細胞とマウス腹腔大食細胞をどのくらい活性化させるかを確認した。その結果、TNF-、IL-6、IL-12及びIFN- mRNA発現が他のC p G ODNに比べ最も多く増加して、大食細胞表面のMHC class IIとB7.2タンパク質の発現が増加する様相を示した。これにより、最終的にマウスの脾臓細胞とヒトの末梢血液単核球に含まれているナチュラルキラー細胞の活性

40

50

から、抗癌免疫活性化能力が優秀であることを確認することができた。

【0023】

従って、本発明により製造された CpG ODN は、ワクチン補助剤として有用に使用でき、特に B 型肝炎などの疾病に対する予防及び治療用ワクチン補助剤として利用できる。この際、免疫反応を誘導しようとする抗原と前記 ODN は、kg 当たり 50 ~ 5,000 μ g の量を 2 ~ 4 週の間隔で 2 ~ 3 回投与することが好ましい。また、抗原に対する ODN の比率は、5 : 1 ~ 4 : 1 であることが好ましい。抗原は、ヒトに使用できるワクチン補助剤であるアルミニウムヒドロキシドと共に、または単独で免疫できて、筋肉注射または皮下注射の方法により投与できる。

【発明の効果】

10

【0024】

以上説明したように、本発明による dT の連続配列が 3' 末端に結合された変形されたフォスフォジエステル CpG ODN は、高い Th - 1 免疫反応誘導活性を示すと共に、生体内で毒性を示さない安定性に優れており、効果的なワクチン補助剤として使用することができる。

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

実施例 1 : dT の連続配列が 3' 末端に結合された CpG ODN の製造

20

本発明で使用した CpG ODN は、MetaBion 社 (ドイツ) に依頼して合成したが、塩基間の全てのフォスフォジエステル結合は、フォスフォロチオエート結合により置換された。高性能液体クロマトグラフィーと N A P 精製過程を経て純度を最大に維持した後、凍結乾燥された状態で供給を受けた。本発明で使用した CpG ODN の塩基配列は、前記表 1 に示した。

【0026】

実施例 2 : CpG ODN がマウス脾臓細胞と大食細胞の増殖に及ぼす影響

本実験は、細胞株を利用した免疫活性化実験を通じて抗癌免疫活性化能力があると期待される CpG

ODN と、既に免疫活性能力が報告されている CpG ODN とを、各々マウスの脾臓細胞と腹腔大食細胞に処理した時、これら細胞の増殖を誘発するかどうかを確認するために、次のように実験した。

30

【0027】

B a l b / c マウスの腹腔に 1 . 5 m l の 3 % チオグリコレートを注射した。三日後、マウス腹腔を 2 % 牛胎児血清の含まれたリン酸塩緩衝液で洗滌して集めた。H B S S 緩衝液で 2 回洗滌した後、10% の牛胎児血清の含まれた D M E M 培地にマウス腹腔大食細胞を用意した。

【0028】

B a l b / c マウスから脾臓を摘出して単細胞単位に解体した後、2 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した。上層液を捨てて沈殿物に 0 . 8 4 % アンモニウムクロライドを加えて赤血球を溶解させた後、R P M I 1 6 4 0 で 2 回洗滌して脾臓細胞を用意した。

40

【0029】

用意した脾臓細胞と大食細胞から 5×10^4 個の細胞を取って、K S K - 1、K S K - 2、K S K - 7、K S K - 12 及び K S K - 13 を各々 0 . 6 μ g / m l ずつ、そして L P S を 0 . 1 μ g / m l ずつ 24、48、72 時間処理した後、これを再び [³H]チミジンが存在する R P M I 1 6 4 0 培地に 6 時間培養した。活性化された脾臓細胞は、増殖を通して [³H]チミジンを培地から得た。培地を捨てて脾臓細胞を [³H]チミジンのない培地で洗滌した後、放射能測定器を利用し、脾臓細胞によって得た [³H]チミジンの量を測定した。

【0030】

50

図1の(A)では、大食細胞の増殖を誘導するためにCpG ODNを72時間処理しなければならなかった。この中でKSK-13は、マウスの免疫活性を最もよく誘導すると知られているKSK-2を含む他のCpG ODNに比べ、高い増殖誘導能力を示し、対照群(非処理群)や非CpG ODNであるKSK-1に比べ、統計的に有意な増殖誘導能力を示した。

【0031】

また、図1の(B)に示すように、マウス脾臓細胞に対する増殖誘導効果は、大食細胞に対する他のCpG ODNの効果に比べ、目立つ結果を示した。脾臓細胞の増殖を誘導するためには、CpG ODNを48時間処理しなければならなかった。72時間 CpG ODNを処理した時は、増殖の程度が減少した。KSK-13の脾臓細胞増殖誘導能力は、マウスに効果的なKSK-2に比べ、平均値は多少低かったが、統計的に有意な差ではなかった。

10

【0032】

実施例3：CpG ODNがマウス腹腔大食細胞のTh1型サイトカインmRNA発現に及ぼす効果

本実施例では、マウス腹腔大食細胞の増殖を誘導することが確認されたKSK-13が、これら細胞で抗癌免疫に係わるサイトカインの分泌をどのくらい誘導するかを調べるために、次のような実験を行った。

【0033】

マウスの腹腔大食細胞は、前記実施例2と同様な方法により用意した。1×10⁶個の大食細胞を0.6 μg/ml CpG ODNで12時間処理した。処理された細胞からTRIzol(登録商標)試薬(Life Technology社、アメリカ)を使用しトータルRNAを分離して、吸光度を測定しトータルRNAの濃度を決定した。この中で1 μgを鋳型RNAとして、MMLV逆転写酵素(Promega社、アメリカ)を使用しcDNAを合成した。合成されたcDNAを鋳型DNAとして、次の表2のPCR条件によりTNF-、IL-6、IL-12そしてIFN-PCRを行った。

20

【0034】

【表2】

	TNF-α		IL-6		IL-12		IFN-γ	
	95℃, 5分	1 cycle	95℃, 5分	1 cycle	95℃, 5分	1 cycle	95℃, 5分	1 cycle
反応 条件	95℃, 50秒	30 cycle	95℃, 50秒	35 cycle	95℃, 60秒	30 cycle	95℃, 50秒	33 cycle
	53℃, 50秒		55℃, 60秒		65℃, 60秒		60℃, 50秒	
	72℃, 90秒		72℃, 90秒		72℃, 120秒		72℃, 90秒	
	72℃, 8分	1 cycle	72℃, 8分	1 cycle	68℃, 8分	1 cycle	72℃, 8分	1 cycle

30

40

50

【0035】

PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動を行って、各条件の反応で各々のサイトカインmRNAの発現を比較した。

【0036】

構造的発現タンパク質 (constitutively expressed protein) である β -アクチンPCRを行った時、全ての場合において一定量のPCR産物が増幅されることを確認して、本実施例で表れる各サイトカインPCR産物の濃さの差異は、cDNA準備過程で生じる差異ではないことを確認した。

【0037】

in vitroで、マウスの免疫細胞をよく活性化させるKSK-2と、KSK-13とは、TNF- α 、IL-6、IL-12 mRNAの発現を増加させた(図2)。このような差異は、in vivoでさらに大きいのが、これは、KSK-13が生体内条件でさらにその効果を発揮するとの証拠となる(図3)。

【0038】

実施例4：CpG ODNがマウス脾臓細胞のTh1型サイトカインmRNA発現に及ぼす効果

本実施例では、マウス脾臓細胞の増殖を誘導することが確認されたKSK-13が、これら細胞で抗癌免疫に係わるサイトカインの分泌をどのくらい誘導するかを調べるために、次のような実験を行った。

【0039】

マウスの脾臓細胞は、前記実施例2と同様な方法により用意した。1×10⁶個の脾臓細胞を0.6μg/ml CpG ODNで12時間処理した。処理された細胞からTRIzol(登録商標)試薬(Life Technology社、アメリカ)を使用しトータルRNAを分離して、吸光度を測定しトータルRNAノ濃度を決定した。この中の1μgを鋳型RNAとして、MMLV逆転写酵素(Promega社、アメリカ)を使用しcDNAを合成した。合成されたcDNAを鋳型DNAとして、上記表2のPCR条件によりTNF- α 、IL-6、IL-12そしてIFN- γ PCRを行った。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動に付して、各条件の反応で各々のサイトカインmRNAの発現を比較した。

【0040】

構造的発現タンパク質である β -アクチンPCRを行った時、全ての場合において一定量のPCR産物が増幅されることを確認して、本実施例で表れる各サイトカインPCR産物の濃さの差異は、cDNA準備過程で生じる差異ではないことを確認した。

【0041】

in vitroで、マウスの免疫細胞をよく活性化させるKSK-2と、KSK-13とは、TNF- α 、IL-6、IL-12 mRNAの発現を増加させた(図4)。このような差異は、in vivoでさらに大きいのが、これは、KSK-13が生体条件でさらにその効果を発揮するとの証拠となる(図5)。

【0042】

実施例5：CpG ODNがマウス腹腔大食細胞の信号伝達分子の発現に及ぼす効果

本実施例では、試験管内でマウス腹腔大食細胞を活性化させることが確認されたKSK-13が、生体内でも腹腔大食細胞を活性化させるかを確認するために、次のような実験を行った。

【0043】

CpG ODNを3%チオグリコレートと共にBalb/cマウスの腹腔に注射した。48時間後、前記実施例2と同様な方法により腹腔大食細胞を分離した。細胞をFITCが標識された抗B7.2単クローン抗体または抗MHC class II単クローン抗体で標識して、細胞分析機により分析した。図6及び7で、対照群は非処理群を示し、KSK-1、KSK-2、KSK-7、KSK-12、KS

10

20

30

40

50

K - 13は各々0.6 μg/mlを処理したことを示し、LPSは、0.1 μg/mlを処理したことを示す。

【0044】

B7.2分子は、大食細胞が活性化される時発現量が増加する補助刺激分子である。非処理群の場合、腹腔大食細胞のB7.2分子の発現は、基準範囲内で2.8%を示したが、本発明で提示するKSK-13は、14.2%を示した。この数値は、典型的なマウスCpG ODNであるKSK-2の16.3%や、ヒトCpG ODNであるKSK-12の17.3%に近接した活性化比率であり、非CpG ODNであるKSK-1の5.1%とは確実な差のある数値である(図6)。

【0045】

MHC class II分子は、大食細胞が抗原提示をするとき核心的な役割をする分子であり、B7.2分子と共に大食細胞が活性化されると発現量が増加した。非処理群の場合、腹腔大食細胞のMHC class II分子の発現は、基準範囲内で26.5%を示したが、本発明の提示するKSK-13は、33.7%を示した。この数値は、典型的なマウスCpG ODNであるKSK-2の35.8%や、ヒトCpG ODNであるKSK-12の30.2%に類似した活性化比率であり、非CpG ODNであるKSK-1の25.0%とは確実な差のある数値である(図7)。

【0046】

この実験結果から、KSK-13は、マウス生体内で腹腔大食細胞を活性化するということが確認できた。MHC class II分子とB7.2分子の発現増加は、腹腔大食細胞が抗原提示能力を活性化させたということを意味するため、KSK-13の免疫増強剤としての効力を立証する結果である。

【0047】

実施例6：マウス脾臓細胞の信号伝達分子の発現に及ぼすCpG ODNの効果

本実施例では、試験管内でマウス脾臓細胞を活性化させることが確認されたKSK-13が、生体内で脾臓細胞を活性化させるかを確認するために、次のような実験を行った。

【0048】

CpG ODNをBalb/cマウスの腹腔に注射した。48時間後、前記実施例2と同様な方法により脾臓細胞を分離した。細胞をFITCの標識された抗B7.2単クローン抗体または抗MHC class II単クローン抗体で標識して、細胞分析器により分析した。

【0049】

非処理群の場合、脾臓細胞のB7.2分子の発現は、基準範囲内で2.8%を示したが、本発明の提示するKSK-13は、8.6%を示した。この数値は、典型的なマウスCpG ODNであるKSK-2の12.13%よりは低い数値であるが、ヒトCpG ODNであるKSK-12の6.85%よりは高い数値であって、非CpG ODNであるKSK-1の3.31%とは確実な差のある数値である(図8)。

【0050】

また、非処理群の場合、脾臓細胞のMHC class II分子の発現は、基準範囲内で15.5%を示したが、本発明の提示するKSK-13は、22.8%を示した。この数値は、典型的なマウスCpG ODNであるKSK-2の23.6%に近接した数値であり、ヒトCpG ODNであるKSK-12の18.6%よりは高い活性化比率であって、非CpG ODNであるKSK-1の17.5%とは確実な差のある数値である(図9)。

【0051】

この実験結果から、KSK-13はマウス生体内で脾臓細胞を活性化ということが確認できた。MHC

class II分子とB7.2分子の発現増加は、脾臓細胞中のB細胞などの抗原提示

10

20

30

40

50

能力を活性化させたということの意味するため、KSK-13の免疫増強剤としての効力を立証する結果である。

【0052】

実施例7：マウスにB型肝炎表面抗原を免疫させる時のCpG ODNの効果

本実施例では、マウス脾臓細胞と腹腔大食細胞を活性化させることが確認されたKSK-13が、マウスにB型肝炎表面抗原を免疫させる時ワクチン補助剤としての効果を有するかを確認するために、次のような実験を行った。

【0053】

13個の実験群を構成して、各実験群当たり7匹のBalb/cマウスを割り当てた。各実験群のマウスは、2.5μgのB型肝炎表面抗原と次の表3に示したワクチン補助剤とを混合して下腹部に皮下注射した。一週間隔で2回、同じ方法で注射し、血液を採取した。採取した血液を使用し、間接酵素免疫測定法により抗B型肝炎表面抗原抗体の閾値を測定して、次の表3に示した。

【0054】

【表3】

実験群	補助剤	Anti-HBsAgAb (IgG)
1	抗原なし	0
2	補助剤なし	200
3	Alum	200
4	KSK-1	800
5	KSK-2	12,800
6	KSK-7	800
7	KSK-12	12,800
8	KSK-13	12,800
9	KSK-2+alum	3,200
10	KSK-12+alum	12,800
11	KSK-13+alum	51,200
12	CFA*	12,800
13	CFA+alum	3,200

【0055】

B型肝炎表面抗原のみを単独で免疫した場合、閾値が800であったが、KSK-1、KSK-12そしてKSK-13をワクチン補助剤として使用した場合は、閾値が12,800であって、16倍増加した。現在、臨床で使用しているalumと共に使用した場合、KSK-13の効果は、KSK-12より4倍高く、KSK-2より64倍高かった。KSK-13のワクチン補助剤としての効果は、CFA (Complete Freund's Adjuvant) を使用した場合と同一な閾値を示した。この結果から、KSK-13はワクチン補助剤として効果的であることが分かる。

【0056】

実施例8：マウス脾臓細胞の抗癌能力に及ぼすCpG ODNの効果

本実施例では、マウス脾臓細胞と腹腔大食細胞を活性化させることが確認されたKSK-13が、脾臓細胞に含まれたナチュラルキラー細胞の癌細胞除去能力を活性化させるかを確認するために、次のような実験を行った

【0057】

Balb/cマウスの腹腔にリン酸塩等張液(対照群)または10 μ gのKSK-2、KSK-12またはKSK-13を注射してから18時間後、マウスから脾臓を摘出して脾臓細胞を用意した。脾臓細胞を2時間培養容器で培養し吸着性細胞が培養容器に吸着されるようにした後、吸着されなかった細胞を新しい培養容器に移した。細胞をさらに1.0 μ g/mlの同じ種類のCpG ODNで2時間処理した後、5 \times 10³個の⁵¹Cr標識されたYAC-1細胞と共に図10及び11に示した比率で培養した。上層液を取ってガンマ計数器を使用し、溶出された⁵¹Crの量を測定した。

【0058】

図10は、マウスの脾臓細胞にあるナチュラルキラー細胞がKSK-13を処理することにより細胞毒性が増進されて、ナチュラルキラー細胞に敏感なYAC-1細胞を溶解させる程度を示したものである。非吸着性脾臓細胞(エフェクター細胞、E)とYAC-1細胞(標的細胞、T)の細胞数の比を100:1、50:1、25:1そして12:1で混合して培養した。対照群の場合、標的細胞の数に対するエフェクター細胞の数を12倍から100倍まで増加させたが、目的細胞の溶解は有意に起こらなかった。反面、KSK-13の場合、エフェクター細胞の数の比率が増えるにつれて、標的細胞の溶解が約3.5%まで増加した。この数値は、典型的なマウスCpG ODNであるKSK-2よりは低い数値であるが、ヒトCpG ODNであるKSK-12よりは高い数値である。

【0059】

図11は、人間末梢血液単核細胞がKSK-13を処理することにより細胞毒性が増進されて、ナチュラルキラー細胞に敏感なK562細胞を溶解させる程度を示したものである。ヒト末梢血液単核細胞は、次の方法により分離した。健康な志願者の血液をヘパリン処理された試験管に入れて、1,200gで10分間遠心分離した後、境界層部分を新しいチューブに回収した。同じ嵩の分離緩衝液(0.5%牛血清アルブミンと1mM EDTAが含まれたリン酸緩衝食塩水)で希釈した。同じ嵩のHistopaque-1077(Sigma社)を新しいチューブに入れて、その上に希釈された血液を慎重に載せた後、1,200gで30分間遠心分離した。境界層の末梢血液単核細胞を取って新しいチューブに入れて、分離緩衝液で再び懸濁し210gで5分間遠心分離して上層液を捨てた。この過程を3回繰り返した。

【0060】

用意された末梢血液単核細胞(エフェクター細胞、E)とK562細胞(標的細胞、T)の細胞数の比を50:1、25:1そして12:1で混合して培養した。対照群とKSK-13の場合、25:1の比率で混合して培養した時、KSK-13を処理した末梢血液単核細胞の中に含まれているナチュラルキラー細胞の細胞毒性は既に65%に達したが、対照群の場合は約9%程度に過ぎなかった。混合比率を50:1にしても25:1の場合とあまり大きく変わらない理由は、25:1の比率で既に十分な細胞毒性誘発効果を奏したからであると判断される。なお、図10及び11の結果から、KSK-13の免疫活性効率は、マウスだけではなく、ヒトにさらに効果的であることが分かる。

【0061】

実施例9：抗癌効果確認1) B16 黒色腫肺転移抑制効果

全てのB16黒色腫細胞を熱で非活性化させた10%の牛胎児血清の添加されたRPMI 1640で培養した後、2 \times 10⁵黒色腫細胞(0.2mlPBS)をマウスの側面尻

尾静脈に注射した。B 1 6 黒色腫細胞を転移させたマウス（無菌状態の生後 7 ~ 8 週の雌マウス C 5 7 B L / 6 ）を治療するために、治療用 C p G オリゴ核酸を各マウスに 1 0 μ g ずつ腹腔内（I . P . ）投与した（投与日：1、3、5、7、9日）（図 1 2 ）。

【 0 0 6 2 】

2) 癌細胞の微小転移抑制効果によるマウスの生存延長

各群当たり 6 匹ずつの C 5 7 B L / 6 マウスに E L 4 (T c e l l l y m p h o m a , 2×10^4) 細胞を静脈注射し癌細胞を接種して、1、3、5、7、9日目、C p G O D N (1 0 μ g / m o u s e) を腹腔注射した後、生存率を比較測定した。K S K - 1 3 の C p G

O D N の場合、6 匹のマウス全部の生存率が延長し、特に 2 匹は、6 0 日以後にも死亡せず生き続けられた。 10

【 0 0 6 3 】

そして、K S K - 1 3 の C p G O D N のみを利用し、マウスの数を増やして再度確認してみた結果、生存率の有意な延長を確認した（図 1 3 及び 1 4 ）。

【 0 0 6 4 】

3) C p G O D N により活性化された N K 細胞の細胞毒性能測定

ヒト末梢血液単核球細胞からネガティブセレクション (n e g a t i v e s e l e c t i o n) により単核球を除いた B、T、NK 細胞のみを使用して、マウスの脾臓細胞からは、非吸着性 (n o n - a d h e r e n t) 細胞のみを分離し、即ち、大食細胞を除いた細胞をエフェクター細胞として使用して、N K 細胞に選択的に作用する、ヒト末梢血液単核球細胞では K 5 2 3 腫瘍細胞を、マウスの脾臓細胞では Y A C - 1 を 標的細胞として使用し、N K 活性を ^{51}Cr release assay により測定して確認した（図 1 5 ）。

20

【 0 0 6 5 】

実施例 1 0 : 毒性試験

I C R マウス 6 匹に本発明の K S K - 1 3 を 0 . 5 m g ずつ筋肉注射（大殿筋または三角筋）の方法により投与した。一匹のマウスには 2 週間隔で 2 回、他の一匹のマウスには 2 週間隔で 2 回投与した後、一ヶ月の間をおいてから再び 2 週間隔で 3 回の投与を実施した。

【 0 0 6 6 】

最初免疫化してから 6 ヶ月間、疾病の有無、体重、体温などの身体検査、血液細胞の異常 (H a e m a t o l o g y) 、排泄物の異常 (u r i n a l y s i s) を観察したが、全て正常値を示した。

30

【 0 0 6 7 】

製造例 1 : ワクチン製造

注射用水に B 型肝炎表面抗原 1 m g 、本発明の d T の修飾されたオリゴデオキシヌクレオチド 1 0 m g 、アルミニウムヒドロキシド 1 m g 、チメロサル 0 . 0 1 w / v % 、緩衝剤として適量のリン酸二水素カリウムとリン酸水素ナトリウム、適量の塩化ナトリウム、そして酸度調整のために塩酸を適量加えて、ワクチンを製造した。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 6 8 】

【 図 1 】本発明による C p G O D N が B a l b / c マウス大食細胞 (A) と脾臓細胞 (B) の増殖を誘導するかどうかを *i n v i t r o* で確認したものである。

【 図 2 】本発明による C p G O D N が B a l b / c マウス腹腔大食細胞の T h 1 型サイトカイン mRNA 発現を誘導するかどうかを *i n v i t r o* で確認したものである。[M : マーカー ; 1 : C p G O D N 非処理群 ; 2 : 0 . 6 μ g / m l K S K - 1 処理 ; 3 : 0 . 6 μ g / m l K S K - 2 処理 ; 4 : 0 . 6 μ g / m l K S K - 7 処理 ; 5 : 0 . 6 μ g / m l K S K - 1 2 処理 ; 6 : 0 . 6 μ g / m l K S K - 1 3 処理 ; 7 : 0 . 1 μ g / m l L P S 処理]

【 図 3 】本発明による C P G O D N が B a l b / c マウス腹腔大食細胞の T h 1 型サイト

50

カインmRNA発現を誘導するかどうかを*in vivo*で確認したものである。[M: マーカー; 1: CpG ODN非処理群; 2: 0.6 μg/ml KSK-1処理; 3: 0.6 μg/ml KSK-2処理; 4: 0.6 μg/ml KSK-7処理; 5: 0.6 μg/ml KSK-12処理; 6: 0.6 μg/ml KSK-13処理; 7: 0.1 μg/ml LPS処理]

【図4】本発明によるCpG ODNがBalb/cマウス脾臓細胞のTh1型サイトカインmRNA発現を誘導するかどうかを*in vitro*で確認したものである。[M: マーカー; 1: CpG ODN非処理群; 2: 0.6 μg/ml KSK-1処理; 3: 0.6 μg/ml KSK-2処理; 4: 0.6 μg/ml 処理; 5: 0.6 μg/ml KSK-12処理; 6: 0.6 μg/ml KSK-13処理; 7: 0.1 μg/ml LPS処理]

10

【図5】本発明によるCpG ODNがBalb/cマウス脾臓細胞のTh1型サイトカインmRNA発現を誘導するかどうかを*in vivo*で確認したものである。[M: マーカー; 1: CpG ODN非処理群; 2: 0.6 μg/ml KSK-1処理; 3: 0.6 μg/ml KSK-2処理; 4: 0.6 μg/ml 処理; 5: 0.6 μg/ml KSK-12処理; 6: 0.6 μg/ml KSK-13処理; 7: 0.1 μg/ml LPS処理]

【図6】本発明によるCpG ODNがマウス腹腔大食細胞の信号伝達分子(costimulatory molecule)であるB7.2分子の発現を誘導するかどうかを確認したものである。

【図7】本発明によるCpG ODNがマウス腹腔大食細胞の信号伝達分子であるMHC Class Iの発現を誘導するかどうかを確認したものである。

20

【図8】本発明によるCpG ODNがマウス脾臓細胞の信号伝達分子であるB7.2分子の発現を誘導するかどうかを確認したものである。

【図9】本発明によるCpG ODNがマウス脾臓細胞の信号伝達分子であるMHC Class Iの発現を誘導するかどうかを確認したものである。

【図10】本発明によるCpG ODNでマウスの脾臓細胞を処理することにより、その中に含まれているナチュラルキラー細胞の細胞毒性が増進され、ナチュラルキラー細胞に敏感なYAC-1細胞を溶解させる程度を示したものである。

【図11】本発明によるCpG ODNでヒト末梢血液単核細胞を処理することにより、その中に含まれているナチュラルキラー細胞の細胞毒性が増進され、ナチュラルキラー細胞に敏感なK562細胞を溶解させる程度を示したものである。

30

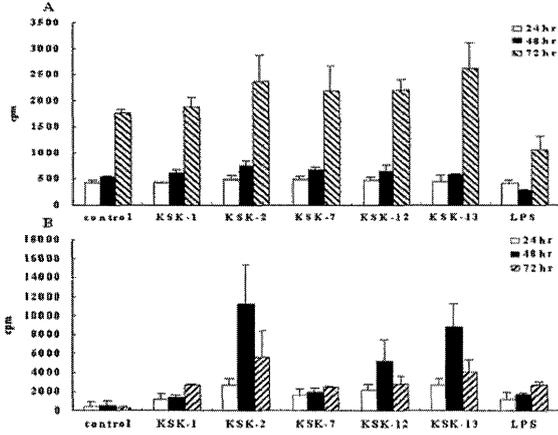
【図12】本発明によるCpG ODNのB16黒色腫肺転移抑制効果を示したものである。

【図13】C57BL/6マウスで様々なCpG ODNを利用して生存延長比較実験を行った結果を示したものである。

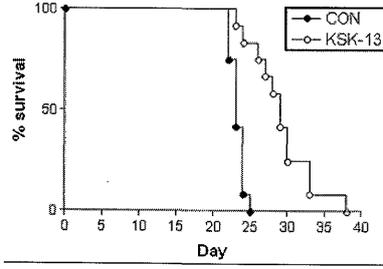
【図14】C57BL/6マウスで様々なCpG ODNを利用して生存延長比較実験を行った結果を示したものである。

【図15】本発明によるGpG ODNにより活性化されたNK細胞の細胞毒性能の測定結果を示したものである。

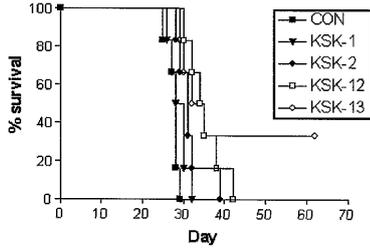
【 1 1 】



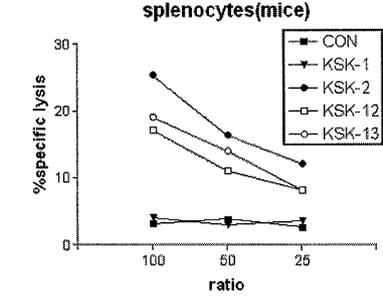
【 1 4 】



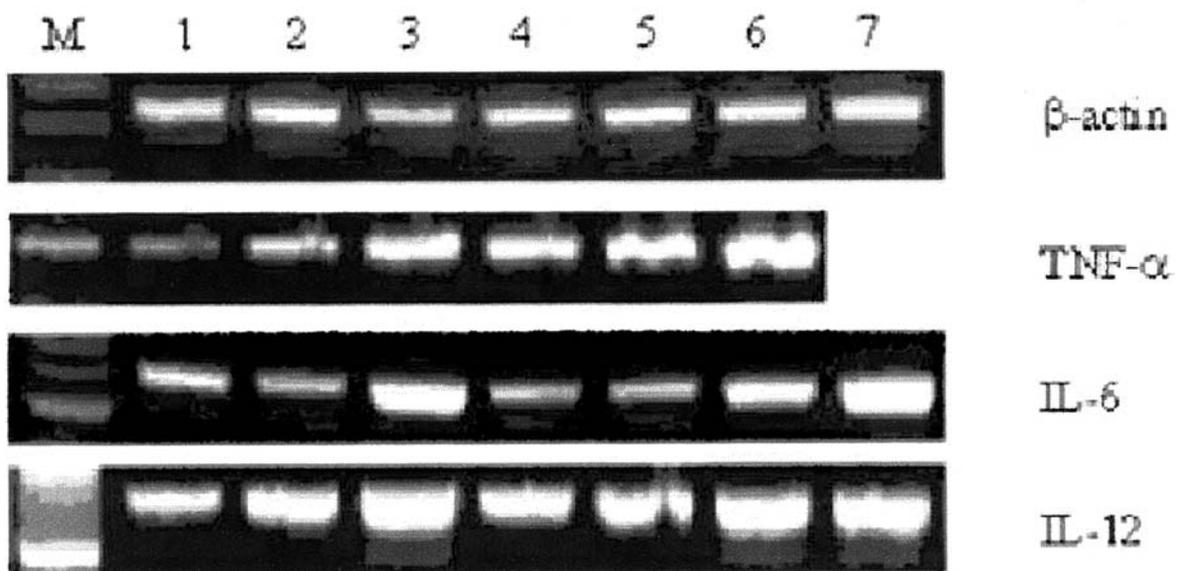
【 1 3 】



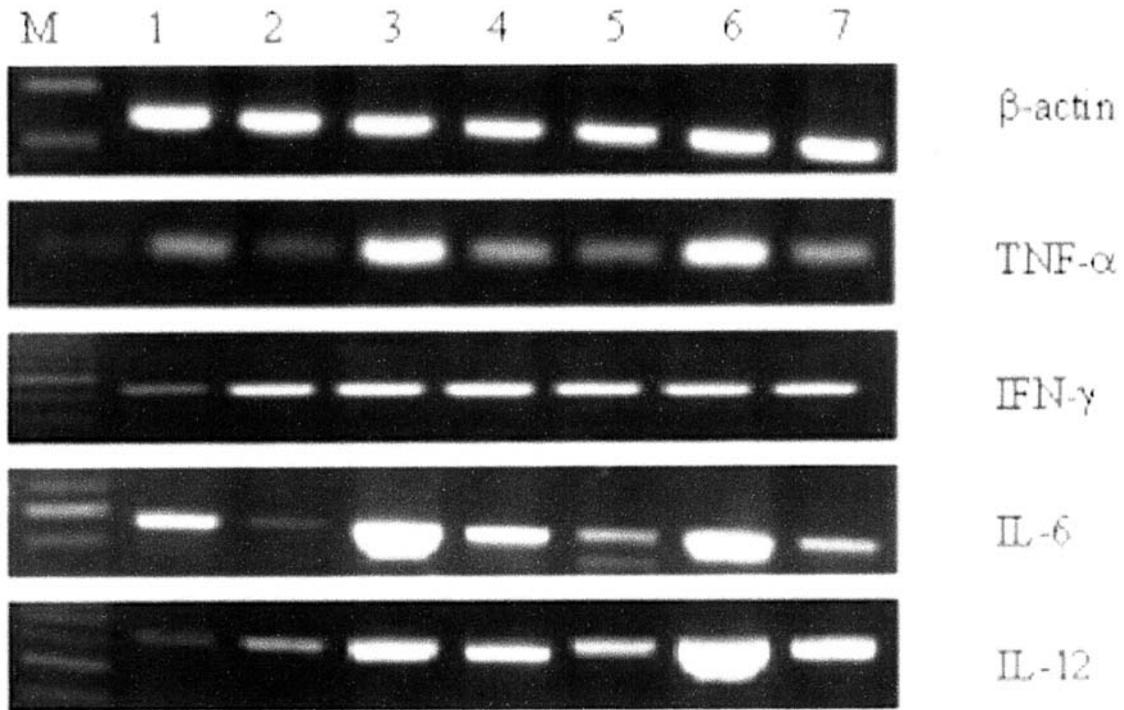
【 1 5 】



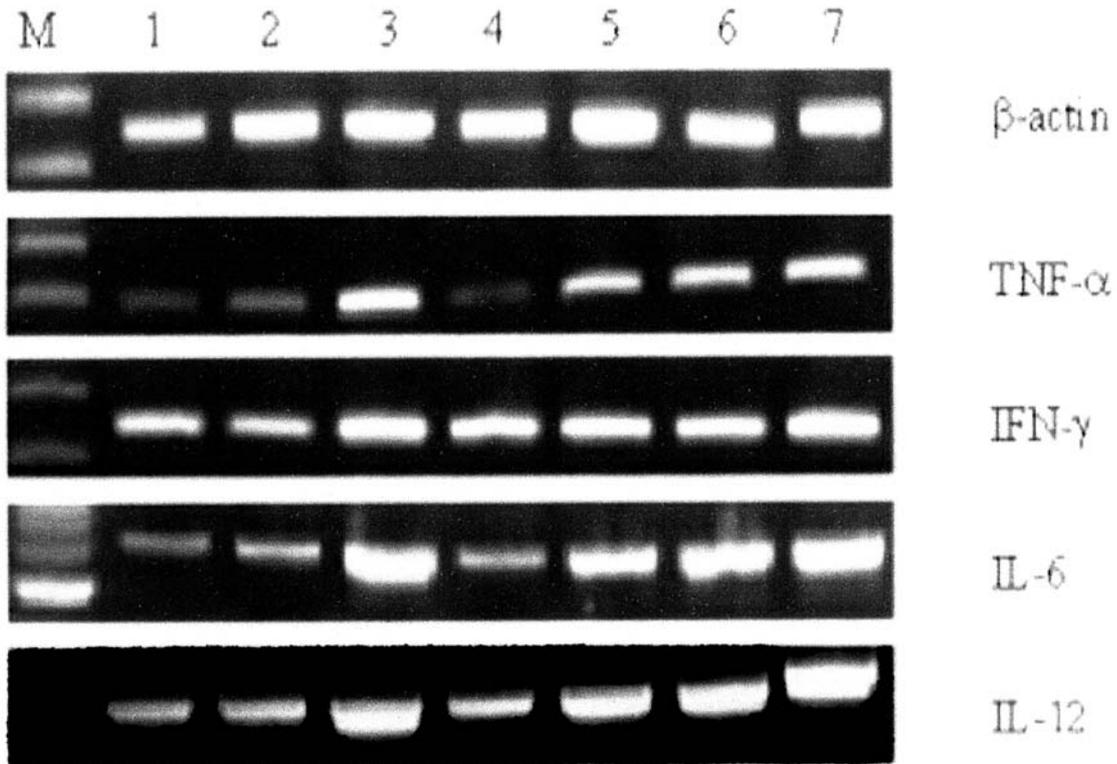
【 2 】



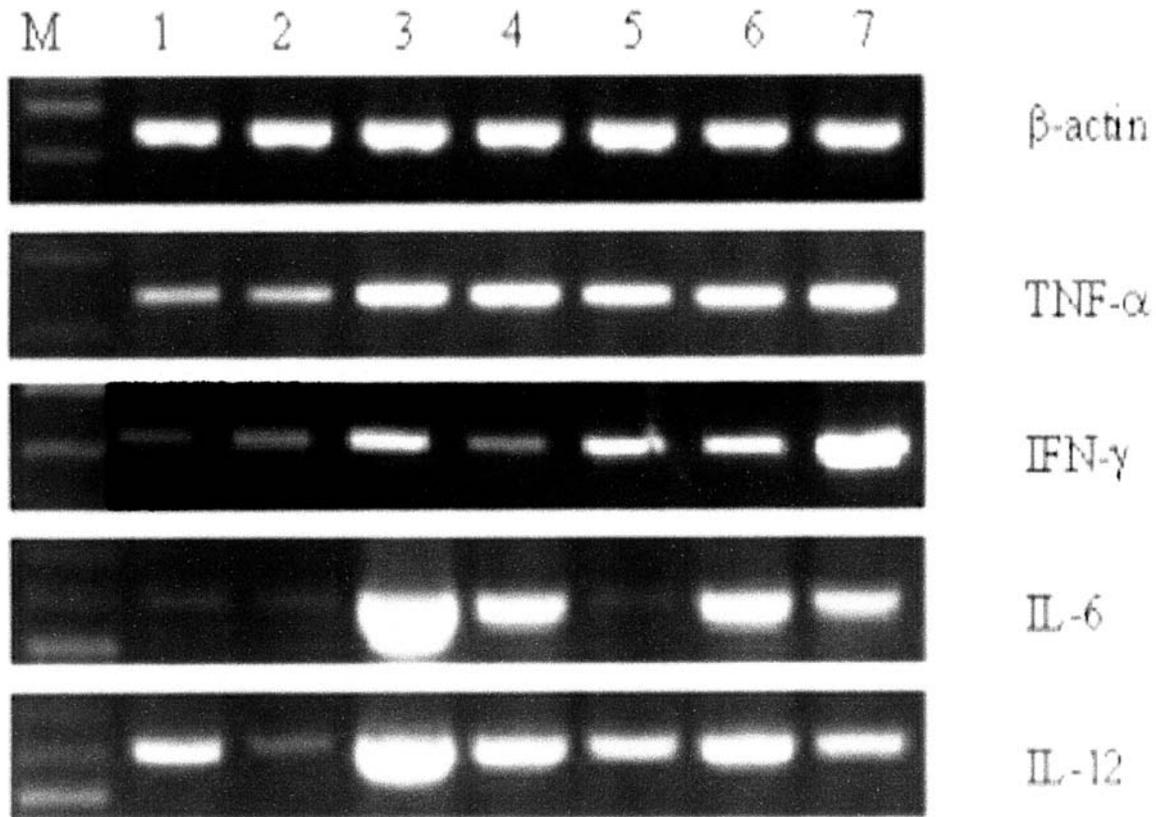
【 図 3 】



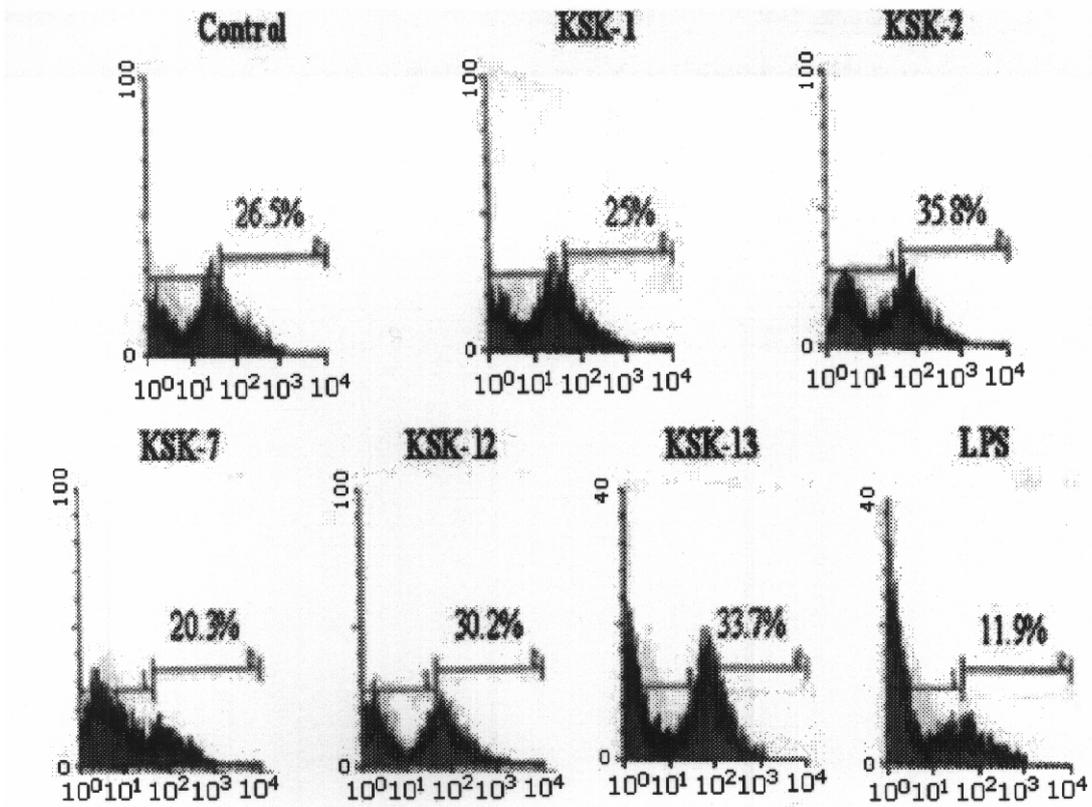
【 図 4 】



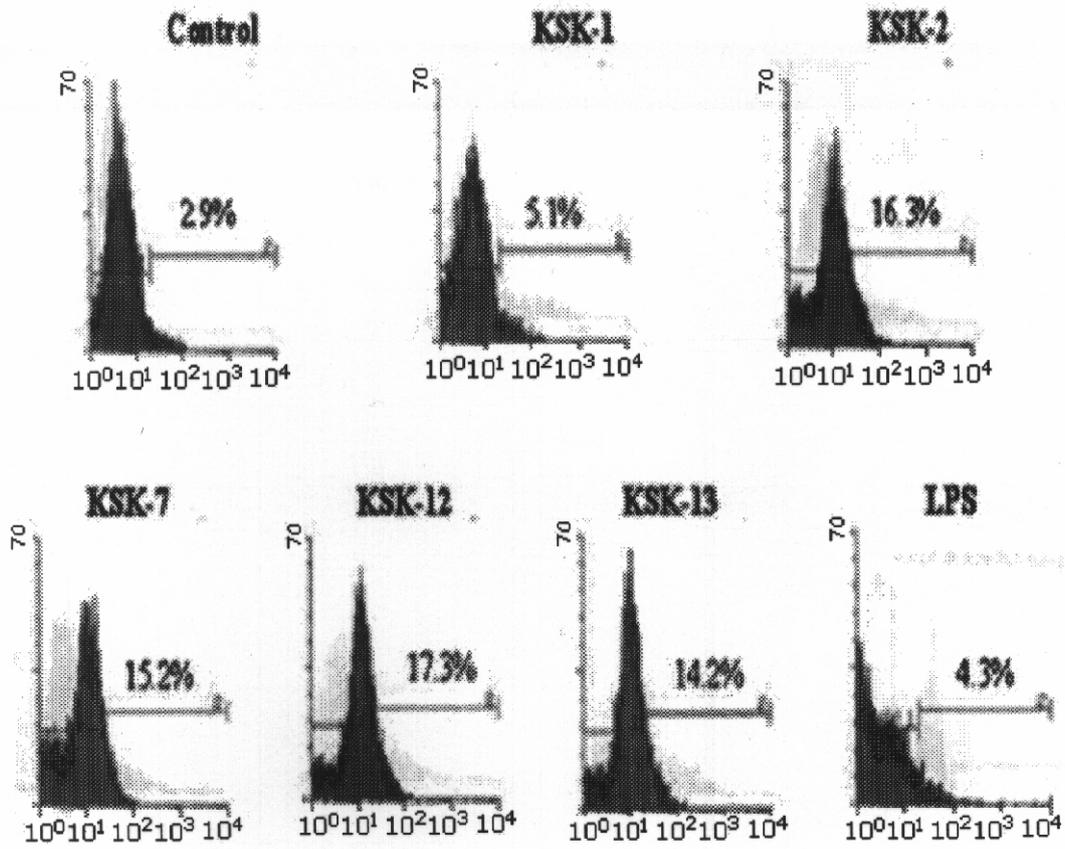
【 図 5 】



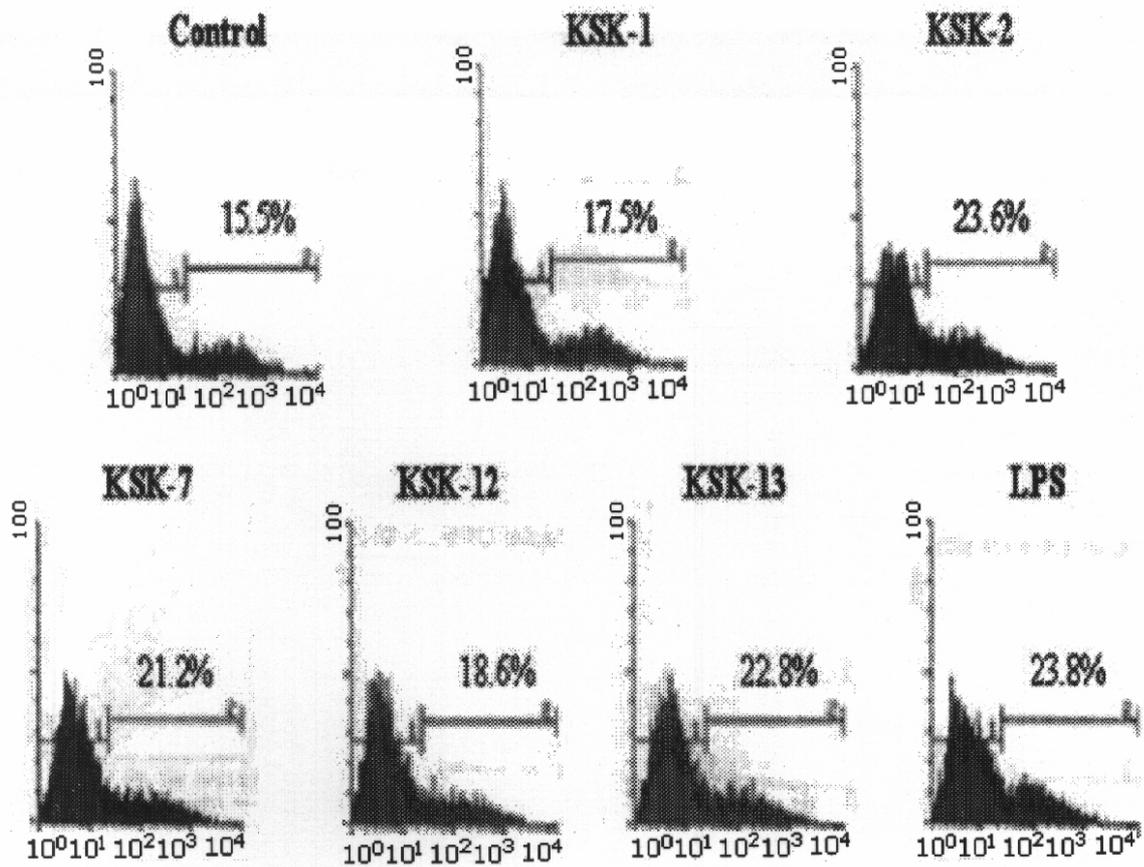
【 図 6 】



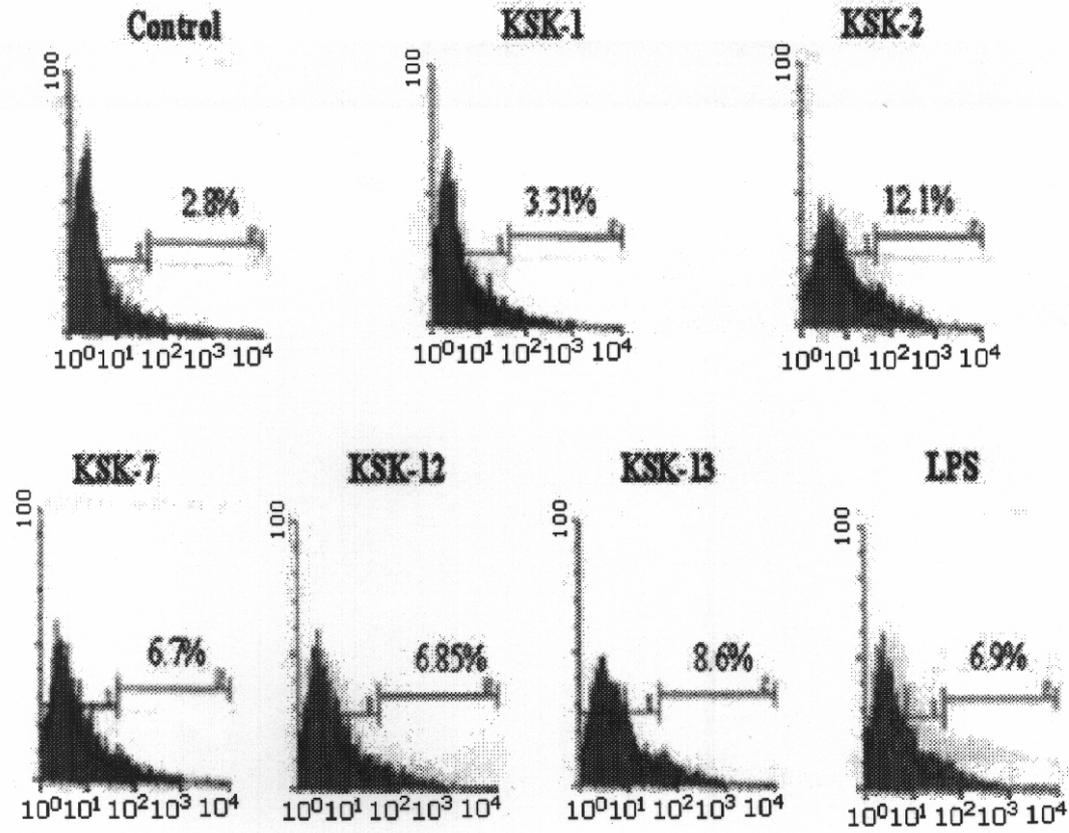
【 図 7 】



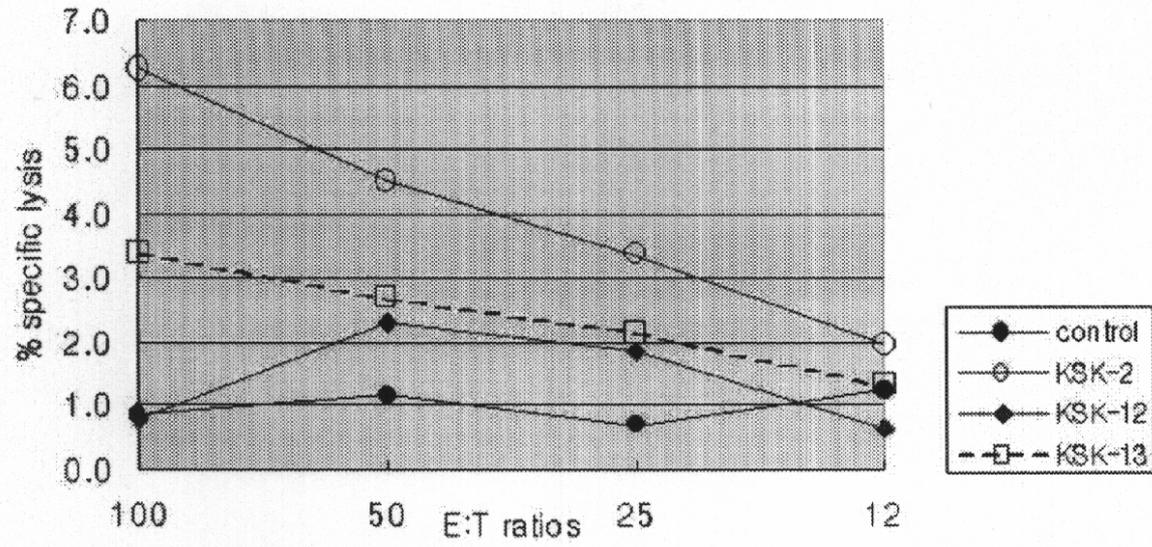
【 図 8 】



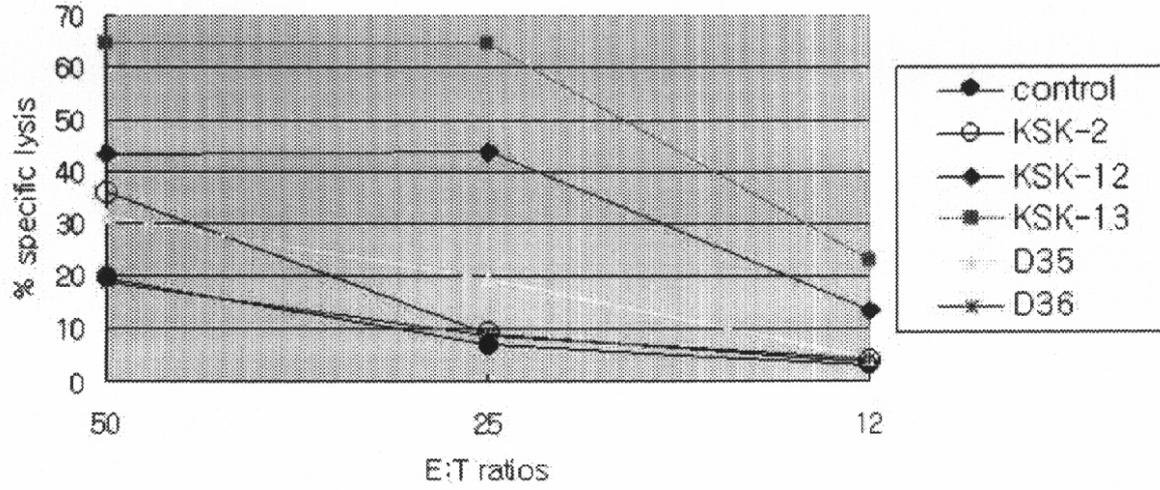
【 図 9 】



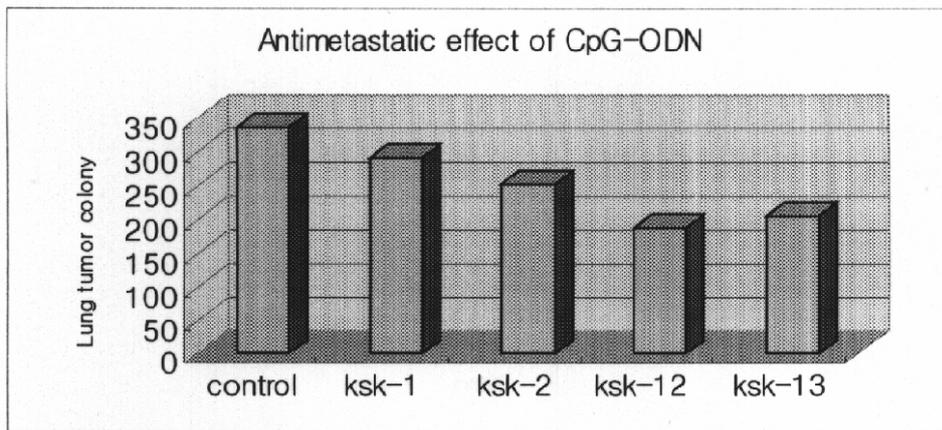
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

[2005192552000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 H 21/04	C 0 7 H 21/04	Z

(72)発明者 パク スン キュ
 大韓民国 440-320 キョンギ-ド スウォン-シ ジャンアン-グ ユルジョン-ドン
 ベクスルジュゴンアパートメント 573-604

(72)発明者 パク ス ジュン
 大韓民国 220-090 カンウォン-ド ウォンジュ-シ タング-ドン セキュン5チャア
 パートメント 504-409

(72)発明者 チョ ヒュン チュル
 大韓民国 220-952 カンウォン-ド ウォンジュ-シ ウサン-ドン 102-16

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01
 4C057 BB02 BB05 DD01 MM04
 4C085 AA03 AA38 BA89 CC04 CC05 DD22 DD23 EE06 FF12 FF17
 GG01
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA04 MA66 NA14 ZA75 ZB26 ZB33
 ZC61