

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5908477号  
(P5908477)

(45) 発行日 平成28年4月26日 (2016. 4. 26)

(24) 登録日 平成28年4月1日 (2016. 4. 1)

(51) Int. Cl.

F 1

<b>A 6 1 K</b>	<b>31/7105</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>31/7105</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>9/127</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>9/127</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/18</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>47/18</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>31/00</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/04</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>31/04</b>

請求項の数 10 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-526211 (P2013-526211)  
 (86) (22) 出願日 平成23年8月31日 (2011. 8. 31)  
 (65) 公表番号 特表2014-505007 (P2014-505007A)  
 (43) 公表日 平成26年2月27日 (2014. 2. 27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/050100  
 (87) 国際公開番号 W02012/031046  
 (87) 国際公開日 平成24年3月8日 (2012. 3. 8)  
 審査請求日 平成26年8月29日 (2014. 8. 29)  
 (31) 優先権主張番号 61/378, 833  
 (32) 優先日 平成22年8月31日 (2010. 8. 31)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504389991  
 ノバルティス アーゲー  
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ  
 35  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (72) 発明者 ジアール, アンドリュウ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946  
 62-8097, エメリービル, ピー  
 オー ボックス 8097, ノバルティ  
 ス バクシンズ アンド ダイアグノステ  
 イックス, インコーポレーテッド 気付

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質をコードするRNAのリボソームによる送達に適した脂質

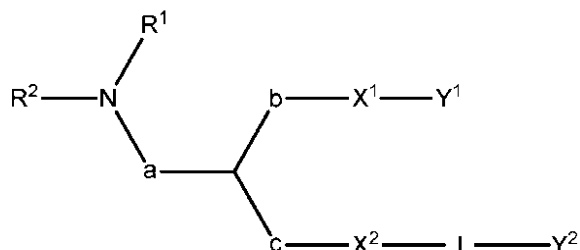
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチド免疫原をコードするRNA分子の中に被包しているリボソームであって、こ  
 こで該リボソームは、少なくとも1種の式(I)の化合物を含み、ここで

式(I)は、以下：

【化 4 0】



10

であり、ここで：

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置  
 換された、C<sub>3-20</sub>-ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub>-ヘテロシクロアルケニル、  
 C<sub>3-20</sub>-ヘテロシクロアルキニルもしくはC<sub>5-20</sub>-ヘテロアリール基を形成し；  
 a は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

20

$b$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $c$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $X^1$  は、O もしくは S であり；  
 $X^2$  は、O もしくは S であり；  
 $Y^1$  は、必要に応じて置換された、 $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルもしくは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；  
 $L$  は、存在しないか、もしくは  $-(L^a)_d - (L^b)_e - (L^c)_f -$  であり、ここで  
 $L^a$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；  
 $L^b$  は、必要に応じて置換された、 $C_{6-14}$  アリーレンもしくは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；  
 $L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；  
 $d$  は、0 もしくは 1 であり；  
 $e$  は、0 もしくは 1 であり；  
 $f$  は、0 もしくは 1 であり；そして  
 $Y^2$  は、必要に応じて置換されたステロイドである、  
 リポソーム。

10

20

#### 【請求項 2】

請求項 1 に記載のリポソームであって、80 nm ~ 160 nm の範囲の直径を有する、リポソーム。

#### 【請求項 3】

前記 RNA 分子は、自己複製 RNA 分子である、請求項 1 または 2 に記載のリポソーム。

#### 【請求項 4】

前記自己複製 RNA 分子は、

(i) RNA を該自己複製 RNA 分子から転写し得る RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ、および

(ii) 前記目的のポリペプチドをコードする、請求項 3 に記載のリポソーム。

30

#### 【請求項 5】

前記 RNA 分子は、2 個のオープンリーディングフレームを有し、該 2 個のオープンリーディングフレームのうちの第 1 のものは、アルファウイルスレプリカーゼをコードし、該 2 個のオープンリーディングフレームのうちの第 2 のものは、前記目的のポリペプチドをコードする、請求項 4 に記載のリポソーム。

#### 【請求項 6】

前記 RNA 分子は、9000 ~ 12000 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のリポソーム。

#### 【請求項 7】

前記免疫原は、細菌、ウイルス、真菌もしくは寄生生物に対してインビボで免疫応答を誘発し得る、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のリポソーム。

40

#### 【請求項 8】

前記免疫原は、RS ウイルス糖タンパク質 F に対してインビボで免疫応答を誘発し得る、請求項 7 に記載のリポソーム。

#### 【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のリポソームを含む、薬学的組成物。

#### 【請求項 10】

脊椎動物における防御免疫応答を惹起するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のリポソームを含む組成物または請求項 9 に記載の薬学的組成物。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2010年8月31日に出願された米国仮出願第61/378,833号の利益を主張し、上記米国仮出願の全容は、全ての目的のために、参考として本明細書に援用される。

## 【0002】

(技術分野)

本発明は、動物へのRNAの非ウイルス性送達分野にある。

## 【背景技術】

10

## 【0003】

(背景技術)

コードされたタンパク質のインビボ発現のための核酸の送達は、遺伝子治療および免疫化の両方のために有用である。良好な送達についての種々のアプローチが試されてきた(DNAもしくはRNAの使用、ウイルス性もしくは非ウイルス性送達ビヒクル(もしくはさらに送達ビヒクルなし(「裸の」ワクチンにおいて))の使用、複製もしくは非複製ベクターの使用、またはウイルス性もしくは非ウイルス性ベクターの使用が挙げられる)。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

20

コードされたタンパク質のインビボ発現に関して、動物に核酸を送達するためのさらなる改善された方法が、未だに必要である。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

(発明の開示)

本発明によれば、RNAは、リボソーム内に被包されて送達される。上記RNAは、目的のポリペプチドをコードする。上記リボソームは、式(I)の化合物および式(XI)の化合物からなる群より選択される少なくとも1種の化合物を含む。これらリボソームは、インビボ発現のために、RNAを効率的に送達し得る。本発明は、免疫化のために特に有用であり、ここで、コードされたポリペプチドは、免疫原である。

30

## 【0006】

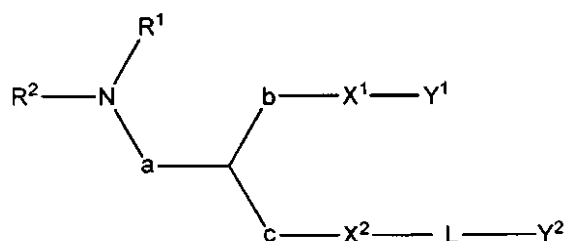
従って、本発明は、目的のポリペプチドをコードするRNAを中に被包しているリボソームを提供し、ここで上記リボソームは、式(I)の化合物および式(XI)の化合物からなる群より選択される少なくとも1種の化合物を含む。

## 【0007】

式(I)は、以下：

## 【0008】

## 【化1】



40

であり、ここで：

$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基を形成し；

50

$a$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $b$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $c$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $X^1$  は、 $O$  もしくは  $S$  であり；  
 $X^2$  は、 $O$  もしくは  $S$  であり；  
 $Y^1$  は、必要に応じて置換された、 $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、  
 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルもしくは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；  
 $L$  は、存在しないか、もしくは  $-(L^a)_d - (L^b)_e - (L^c)_f -$  であり、ここで  
 $L^a$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンも  
 しくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；  
 $L^b$  は、必要に応じて置換された、 $C_{6-14}$  アリーレンもしくは  $C_{5-13}$  ヘテロアリー  
 レンであり；  
 $L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンも  
 しくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；  
 $d$  は、 $0$  もしくは  $1$  であり；  
 $e$  は、 $0$  もしくは  $1$  であり；そして  
 $f$  は、 $0$  もしくは  $1$  であり；そして  
 $Y^2$  は、必要に応じて置換されたステロイドである。

10

20

## 【0009】

式 (XI) は、以下：



であり、ここで

$R^a$  は、 $N$ 末端アルキルアミドであり；

$z$  は、 $2 \sim 10$  の整数であり；

各  $AA$  は、アミノ酸であり、ここで、少なくとも1個のヒスチジンおよび少なくとも1個のカチオン性アミノ酸が存在することを条件とし；

$R^b$  は、 $-H$  もしくは  $-NH_2$  である。

## 【0010】

30

本発明はまた、RNA含有リボソームを調製するためのプロセスを提供し、上記プロセスは、RNAと、式 (I) の化合物および式 (XI) の化合物からなる群より選択される化合物とを、上記化合物が、上記RNAの中に被包しているリボソームを形成するような条件下で混合する工程を包含する。上記RNAおよび上記化合物は、他の化合物（例えば、さらなる脂質）の存在下で混合され得、他の化合物はまた、上記リボソームに組み込まれる。

## 【0011】

(リボソーム)

本発明は、ポリペプチドをコードするRNAの中に被包しているリボソームを利用する。従って、上記RNAは、任意の外部の媒体から分離している（天然ウイルスにおけるのと同様）。上記リボソーム内への被包は、RNAをRNase消化から保護することが見いだされた。上記リボソームは、いくつかの外部RNAを（例えば、それらの表面上に）含み得るが、上記RNAのうちの少なくとも半分（および理想的には、そのうちの全て）は、上記リボソームのコア中に被包される。リボソーム内での被包は、例えば、参考文献1に開示される脂質/RNA複合体とは異なる（ここでRNAは、予め形成されたりボソームと混合される）。

40

## 【0012】

種々の両親媒性脂質は、水性環境中で二重層を形成して、リボソームとして、RNA含有水性コアを被包し得る。これら脂質は、アニオン性、カチオン性、もしくは両性イオン性の親水性頭部 (head group) を有し得る。アニオン性リン脂質からのリボソ

50

ームの形成は、1960年代にさかのぼり、カチオン性リポソーム形成脂質は、1990年代から研究されてきた。あるリン脂質はアニオン性であるのに対して、他のものは両性イオン性であり、そして他のものはカチオン性である。リン脂質の適切なクラスとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、およびホスファチジルグリセロール。そしていくつかの有用なリン脂質は、表1に列挙される。先行技術における有用なカチオン性脂質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)、1,2-ジステアerylオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DSDMA)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DODMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DlindMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLenDMA)。両性イオン性脂質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アシル両性イオン性脂質およびエーテル両性イオン性脂質。有用な両性イオン性脂質の例は、以下である：DPPC、DOPC、DSPC、ドデシルホスホコリン、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、および1,2-ジフィタノイル(diphytanyl)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPyPE)。本発明のリポソーム中の脂質は、飽和であってもよいし、不飽和であってもよい。リポソームを調製するための少なくとも1種の不飽和脂質の使用が好ましい。不飽和脂質が2つのテールを有する場合、両方のテールが不飽和であり得、またはそれは、1つの飽和テールおよび1つの不飽和テールを有し得る。脂質は、例えば、RV05におけるように、1つのテールにステロイド基を含み得る。

#### 【0013】

本発明のリポソームは、単一の脂質から、またはより通常には、脂質の混合物から形成され得る。混合物は、(i)カチオン性脂質の混合物、(ii)アニオン性脂質とカチオン性脂質との混合物、(iii)両性イオン性脂質とカチオン性脂質との混合物、または(vii)アニオン性脂質と、カチオン性脂質と、両性イオン性脂質との混合物を含み得る。同様に、混合物は、飽和脂質および不飽和脂質の両方を含み得る。脂質の混合物が使用される場合、上記混合物中の成分の脂質の全てが、両親媒性である必要はない(例えば、1種以上の両親媒性脂質が、コレステロールと混合され得る)。

#### 【0014】

本発明のリポソームは、式(I)の少なくとも1種の化合物および/もしくは式(XI)の少なくとも1種の化合物を含む。好ましい本発明のリポソームは、式(I)のカチオン性脂質を含む。実施例において示されるように、このようなリポソームは、タンパク質発現のためのRNAのインビボ送達のために特に有用である。他の好ましい本発明のリポソームは、式(XI)のリボペプチドを含む。リポソームは、式(I)のリポソームおよび式(XI)のリボペプチドの両方を含み得るが、通常は、カチオン性化合物のこれら2つのクラスのうちの一方のみを含み得る。

#### 【0015】

本発明のリポソームが脂質の混合物から形成される場合、式(I)もしくは式(XI)を有する脂質の割合は、好ましくは、脂質の全量のうちの20~80%(例えば、30~70%、もしくは40~60%)であるべきである。例えば、有用なリポソームは、以下に示され、ここで、全脂質のうちの40%もしくは60%が、式(I)の脂質である。その残りは、例えば、コレステロール(例えば、35~50%コレステロール)および/もしくはDMG(必要に応じて、PEG化される)および/もしくはDSPCから構成され得る。このような混合物は以下で使用される。これらパーセンテージの値は、モルパーセンテージである。

#### 【0016】

リポソームは、両親媒性脂質を含み得、その親水性部分は、PEG化される(すなわち、ポリエチレングリコールの共有結合によって改変される)。この改変は、上記リポソ

10

20

30

40

50

ムの安定化を増大させ得、かつ非特異的吸着を妨げ得る。例えば、脂質は、参考文献 2 および 3 に開示されるもののような技術を使用して、PEG に結合体化され得る。有用な PEG 化脂質としては、PEG-DMG、および参考文献 8 の式 (XI) の脂質が挙げられる。PEG は、上記リポソームに、都合の良い薬物動態特性を付与し得るコーティングを提供する。種々の長さの PEG が使用され得る (例えば、0.5 ~ 8 kDa)。

#### 【0017】

本発明のリポソームを形成するための有用な脂質の混合物は、以下を含む：式 (I) のカチオン性脂質；コレステロール；および PEG 化脂質、例えば、PEG-DMG、すなわち、PEG 結合体化 1, 2 - ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)]。この混合物はまた、中性の両性イオン性脂質、例えば、DSPC (1, 2 - ジアステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン) もしくは DPyPE を含み得る。これら (および他の) 混合物は、以下の実施例において使用される。

10

#### 【0018】

リポソームは、通常、3つの群に分けられる：多層小胞 (MLV)；小さな単層小胞 (SUV)；および大きな単層小胞 (LUV)。MLV は、各小胞において複数の二重層を有し、いくつかの別個の水性区画を形成する。SUV および LUV は、水性コアを被包する単一の二重層を有する；SUV は、代表的には、直径 50 nm を有し、LUV は、直径 > 50 nm を有する。本発明のリポソームは、理想的には、60 ~ 180 nm の範囲、好ましくは、80 ~ 160 nm の範囲の直径を有する LUV である。

20

#### 【0019】

本発明のリポソームは、複数のリポソームを含む組成物の一部であり得、上記複数の中のリポソームは、ある範囲の直径を有し得る。異なる直径を有するリポソームの集団を含む組成物に関して：(i) 上記リポソームの数で少なくとも 80% は、60 ~ 180 nm の範囲、および好ましくは、80 ~ 160 nm の範囲の直径を有するべきであり、そして/または (ii) 上記集団の平均直径 (強度で、例えば、Z 平均) は、理想的には、60 ~ 180 nm の範囲、および好ましくは、80 ~ 160 nm の範囲にある。上記複数において直径は、理想的には、多分散性指数 < 0.2 を有するはずである。参考文献 1 のリポソーム/RNA 複合体は、600 ~ 800 nm の範囲の直径、および高い多分散性を有すると予測される。集団における直径は、動的光散乱を使用して測定され得る。

30

#### 【0020】

適切なリポソームを調製するための技術は、当該分野で周知である (例えば、参考文献 4 ~ 6 を参照のこと)。1つの有用な方法は、参考文献 7 に記載され、(i) 脂質のエタノール性溶液、(ii) 核酸の水性溶液、および (iii) 緩衝液を混合する工程、続く、混合、平衡化、希釈および精製を包含する。好ましい本発明のリポソームは、この混合プロセスによって得られ得る。

#### 【0021】

所望の直径を有するリポソームを得るために、混合は、RNA 水性溶液の 2つの供給ストリームが 1つの混合ゾーンにおいて、脂質のエタノール性溶液の 1つのストリームと、全て同じ流量において、例えば、以下に記載されるとおりのマイクロ流体チャネルにおいて合わされるプロセスを使用して行われ得る。

40

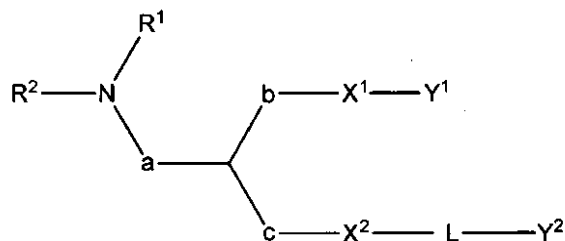
#### 【0022】

(式 (I))

式 (I) のカチオン性脂質は、以下のとおりである：

#### 【0023】

## 【化 2】



ここで：

$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは  $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基を形成し；  
 $a$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $b$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $c$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；

$X^1$  は、O もしくは S であり；

$X^2$  は、O もしくは S であり；

$Y^1$  は、必要に応じて置換された、 $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルもしくは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

$L$  は、存在しないか、もしくは  $-(L^a)_d - (L^b)_e - (L^c)_f -$  であり、ここで  $L^a$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、必要に応じて置換された、 $C_{6-14}$  アリーレンもしくは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$d$  は、0 もしくは 1 であり；

$e$  は、0 もしくは 1 であり；そして

$f$  は、0 もしくは 1 であり；そして

$Y^2$  は、必要に応じて置換されたステロイドである。

## 【0024】

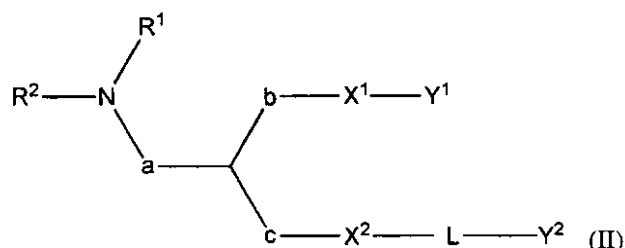
従って、 $R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、三級アミンを有する環式の「頭部」を形成する。これらの化合物は、参考文献 8（その完全な内容が、本明細書に参考として援用される）により詳細に記載される。

## 【0025】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式 (II)：

## 【0026】

## 【化 3】



を有し、ここで：

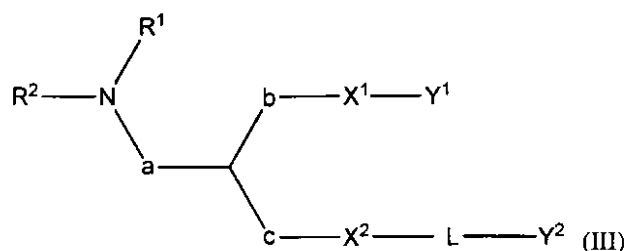
$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは  $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基を形成し；  
 $a$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $b$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $c$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_{1-4}$  アルキレンであり；  
 $X^1$  は、O もしくは S であり；  
 $X^2$  は、O もしくは S であり；  
 $Y^1$  は、必要に応じて置換された、 $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルもしくは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；  
 $L$  は、 $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$  であり、ここで  
 $L^a$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；  
 $L^b$  は、必要に応じて置換された、 $C_{6-14}$  アリーレンもしくは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；  
 $L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；  
 $d$  は、0 もしくは 1 であり；  
 $e$  は、0 もしくは 1 であり；そして  
 $f$  は、0 もしくは 1 であり；  
 ここで、 $L$  は 1 個以上のヘテロ原子を含むことを条件とし、そして  
 $Y^2$  は、必要に応じて置換されたステロイドである。

【0027】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式 (III)：

【0028】

【化4】



を有し、ここで：

$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは  $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基を形成し；  
 $a$  は、メチレンであり；  
 $b$  は、メチレンであり；  
 $c$  は存在せず；  
 $X^1$  は、O もしくは S であり；  
 $X^2$  は、O もしくは S であり；  
 $Y^1$  は、必要に応じて置換された、 $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルもしくは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；  
 $L$  は、 $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$  であり、ここで  
 $L^a$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンも



しくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、必要に応じて置換された、 $C_{6-14}$  アリーレンもしくは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

d は、0 もしくは 1 であり；

e は、0 もしくは 1 であり；そして

f は、0 もしくは 1 であり；そして

$Y^2$  は、必要に応じて置換されたステロイドである。

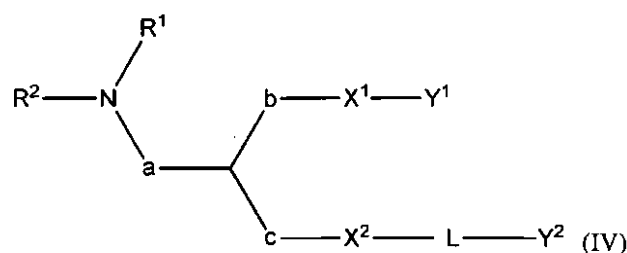
10

【0029】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式 (IV)：

【0030】

【化5】



20

を有し、ここで：

$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$  - ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  - ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  - ヘテロシクロアルキニルもしくは  $C_{5-20}$  - ヘテロアリール基を形成し；

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は、存在せず；

$X^1$  は、O もしくは S であり；

30

$X^2$  は、O もしくは S であり；

$Y^1$  は、必要に応じて置換された、 $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルもしくは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

L は、 $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$  であり、ここで

$L^a$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、必要に応じて置換された、 $C_{6-14}$  アリーレンもしくは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

40

d は、0 もしくは 1 であり；

e は、0 もしくは 1 であり；そして

f は、0 もしくは 1 であり；

ここで、L は 1 個以上のヘテロ原子を含むことを条件とし、そして

$Y^2$  は、必要に応じて置換されたステロイドである。

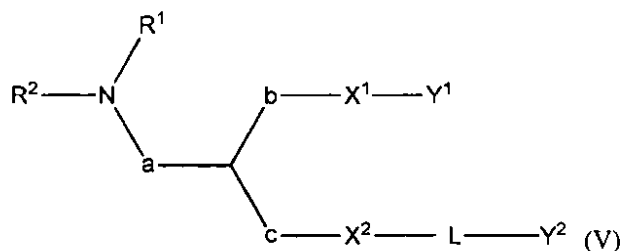
【0031】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式 (V)：

【0032】

50

## 【化6】



を有し、ここで：

$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは  $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基を形成し；

$a$  は、メチレンであり；

$b$  は、メチレンであり；

$c$  は存在せず；

$X^1$  は、O であり；

$X^2$  は、O であり；

$Y^1$  は、必要に応じて置換された、 $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルもしくは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

$L$  は、 $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$  であり、ここで

$L^a$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、必要に応じて置換された、 $C_{6-14}$  アリーレンもしくは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$d$  は、0 もしくは 1 であり；

$e$  は、0 もしくは 1 であり；そして

$f$  は、0 もしくは 1 であり；

ここで、 $L$  は 1 個以上のヘテロ原子を含むことを条件とし、そして

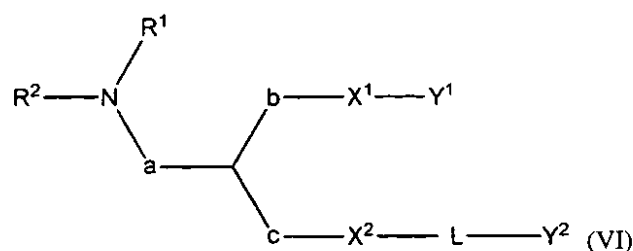
$Y^2$  は、必要に応じて置換されたステロイドである。

## 【0033】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式 (VI)：

## 【0034】

## 【化7】



を有し、ここで：

$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは  $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基を形成し；

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は存在せず；

X<sup>1</sup> は、O であり；

X<sup>2</sup> は、O であり；

Y<sup>1</sup> は、必要に応じて置換された、C<sub>10-30</sub> アルケニル、C<sub>10-30</sub> アルキニル、

C<sub>10-30</sub> ヘテロアルケニルもしくは C<sub>10-30</sub> ヘテロアルキニルであり；

L は、-L<sup>c</sup>- であり、ここで L<sup>c</sup> は、必要に応じて置換された、C<sub>1-15</sub> ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub> ヘテロアルケニレンもしくは C<sub>1-15</sub> ヘテロアルキニレンであり；

そして

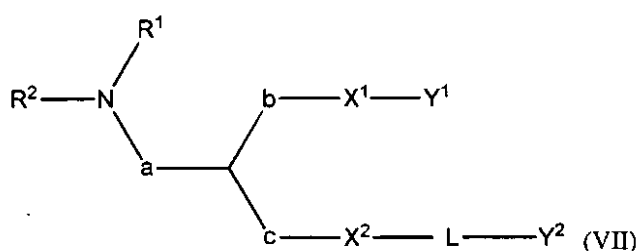
Y<sup>2</sup> は、必要に応じて置換されたステロイドである。

【0035】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式 (VII)：

【0036】

【化 8】



を有し、ここで：

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、C<sub>3-20</sub> - ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub> - ヘテロシクロアルケニル、

C<sub>3-20</sub> - ヘテロシクロアルキニルもしくは C<sub>5-20</sub> - ヘテロアリール基を形成し；

a は、メチレンであり；

b は、メチレンであり；

c は存在せず；

X<sup>1</sup> は、O であり；

X<sup>2</sup> は、O であり；

Y<sup>1</sup> は、必要に応じて置換された C<sub>16-22</sub> アルケニル基であり；

L は、-L<sup>c</sup>- であり、ここで L<sup>c</sup> は、必要に応じて置換された、C<sub>1-15</sub> ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub> ヘテロアルケニレンもしくは C<sub>1-15</sub> ヘテロアルキニレンであり；

そして

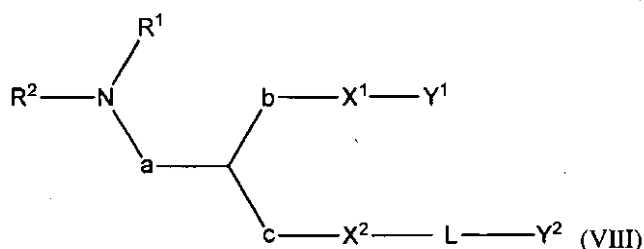
Y<sup>2</sup> は、必要に応じて置換されたステロイドである。

【0037】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式 (VIII)：

【0038】

【化 9】



を有し、ここで：

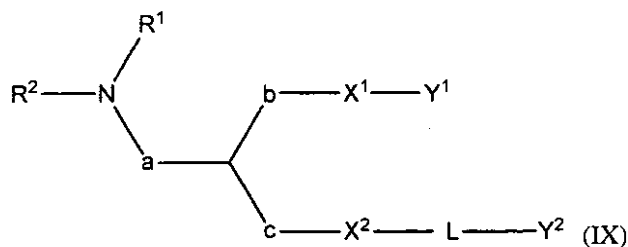
$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは  $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基を形成し；  
 $a$  は、メチレンであり；  
 $b$  は、メチレンであり；  
 $c$  は存在せず；  
 $X^1$  は、O であり；  
 $X^2$  は、O であり  
 $Y^1$  は、必要に応じて置換された  $C_{16-22}$  アルケニル基であり；  
 $L$  は、 $-L^c-$  であり、ここで  $L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；  
 そして  
 $Y^2$  は、A ステロイド環の 3 位においてヒドロキシ基を介して繋がれたコレステロールであり、上記ヒドロキシ基の水素原子は、存在しない。

【0039】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式 (IX)：

【0040】

【化10】



を有し、ここで：

$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは  $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基を形成し；  
 $a$  は、メチレンであり；  
 $b$  は、メチレンであり；  
 $c$  は存在せず；  
 $X^1$  は、O もしくは S であり；  
 $X^2$  は、O もしくは S であり；  
 $Y^1$  は、必要に応じて置換された、 $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルもしくは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；  
 $L$  は、 $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$  であり、ここで  
 $L^a$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；  
 $L^b$  は、必要に応じて置換された、 $C_{6-14}$  アリーレンもしくは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；  
 $L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；  
 $d$  は、0 もしくは 1 であり；  
 $e$  は、0 もしくは 1 であり；そして  
 $f$  は、0 もしくは 1 であり；  
 ここで、 $L$  は 1 個以上のヘテロ原子を含むことを条件とし、

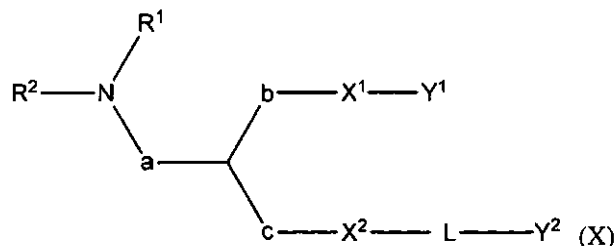
$Y^2$  は、必要に応じて置換されたステロイドであり；そして  
上記化合物の  $pK_a$  は、約 5.9 ~ 約 7 である。

【0041】

いくつかの実施形態において、式 (I) の化合物は、式 (X)：

【0042】

【化11】



を有し、ここで：

$R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒に、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは  $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基を形成し；

$a$  は、メチレンであり；

$b$  は、メチレンであり；

$c$  は存在せず；

$X^1$  は、O もしくは S であり；

$X^2$  は、O もしくは S であり；

$Y^1$  は、必要に応じて置換された、 $C_{10-30}$  アルケニル、 $C_{10-30}$  アルキニル、 $C_{10-30}$  ヘテロアルケニルもしくは  $C_{10-30}$  ヘテロアルキニルであり；

$L$  は、 $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$  であり、ここで

$L^a$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$L^b$  は、必要に応じて置換された、 $C_{6-14}$  アリーレンもしくは  $C_{5-13}$  ヘテロアリーレンであり；

$L^c$  は、必要に応じて置換された、 $C_{1-15}$  アルキレン、 $C_{1-15}$  アルケニレン、 $C_{1-15}$  アルキニレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルキレン、 $C_{1-15}$  ヘテロアルケニレンもしくは  $C_{1-15}$  ヘテロアルキニレンであり；

$d$  は、0 もしくは 1 であり；

$e$  は、0 もしくは 1 であり；そして

$f$  は、0 もしくは 1 であり；

ここで、 $L$  は 1 個以上のヘテロ原子を含むことを条件とし、

$Y^2$  は、必要に応じて置換されたステロイドであり；そして  
上記化合物の  $pK_a$  は、約 4.5 ~ 約 6.2 である。

【0043】

( $a$ 、 $b$  および  $c$ )

一実施形態において、 $a$  は、必要に応じて置換された  $C_{1-2}$  アルキレンである。さらなる実施形態において、 $a$  は、必要に応じて置換された  $C_1$  アルキレンである。

【0044】

一実施形態において、 $b$  は、必要に応じて置換された  $C_{0-2}$  アルキレンである。さらなる実施形態において、 $b$  は、必要に応じて置換された  $C_1$  アルキレンである。

【0045】

一実施形態において、 $c$  は、存在しないか、もしくは必要に応じて置換された  $C_1$  アルキレンである。さらなる実施形態において、 $c$  は存在しない。

## 【 0 0 4 6 】

－実施形態において、a、bおよびcは、存在する場合、置換されない。

## 【 0 0 4 7 】

( 頭 部 )

－実施形態において、 $R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒に  
なって、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$  - ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  - ヘ  
テロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$  - ヘテロシクロアルキニル基、 $C_5$  - ヘテロアリール  
もしくは  $C_6$  - ヘテロアリール基を形成する。－実施形態において、 $R^1$  および  $R^2$  は、  
 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒に、必要に応じて置換された、 $C_{3-20}$   
0 - ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$  - ヘテロシクロアルケニルもしくは  $C_{3-20}$  -  
ヘテロシクロアルキニル基を形成する。さらなる実施形態において、 $R^1$  および  $R^2$  は、  
 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒に、必要に応じて置換された  $C_{3-20}$   
- ヘテロシクロアルキル基を形成する。

10

## 【 0 0 4 8 】

－実施形態において、 $R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒に  
なって、必要に応じて置換された  $C_{5-16}$  基を形成する。さらなる実施形態において、  
 $R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒に、必要に応じて置  
換された  $C_{5-12}$  基を形成する。さらなる実施形態において、 $R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$   
および  $R^2$  が結合する窒素原子と一緒に、必要に応じて置換された  $C_5$  基、 $C_6$  基  
もしくは  $C_7$  基を形成する。さらなる実施形態において、 $R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  
 $R^2$  が結合する窒素原子と一緒に、必要に応じて置換された  $C_5$  基もしくは  $C_6$  基  
を形成する。

20

## 【 0 0 4 9 】

本発明の好ましい実施形態のうちの1つにおいて、 $R^1$  および  $R^2$  は、 $R^1$  および  $R^2$   
が結合する窒素原子と一緒に、少なくとも1個の酸素原子を含む種を形成する。

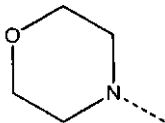
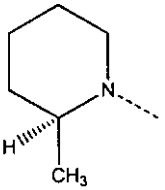
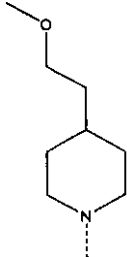
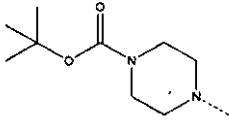
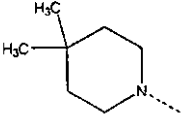
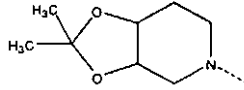
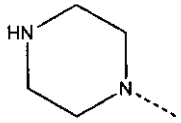
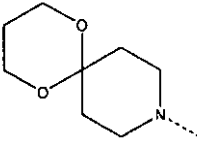
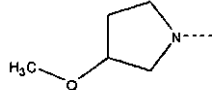
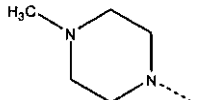

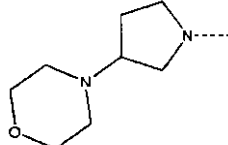
## 【 0 0 5 0 】

－実施形態において、結合する窒素原子と一緒にになった  $R^1$  および  $R^2$  は、表1に提供  
されるように、 $H^1 \sim H^{48}$  から選択される。

## 【 0 0 5 1 】

【表 1 - 1】

表1- H<sup>1</sup>～H<sup>48</sup>と称される部分

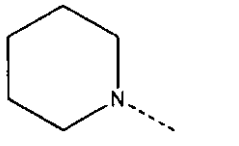
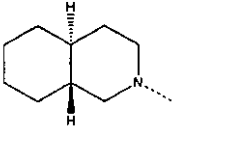
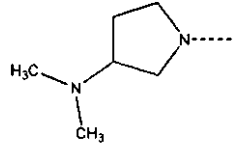
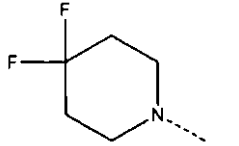
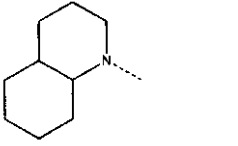
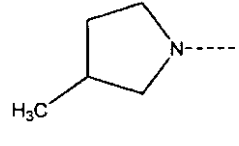
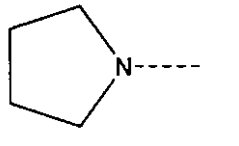
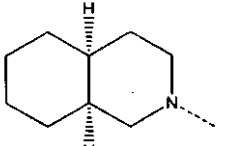
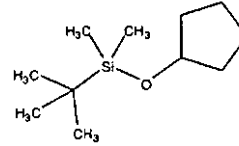
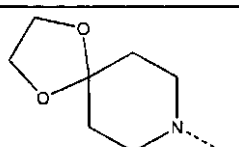
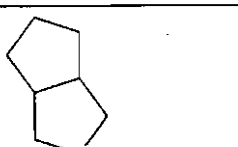
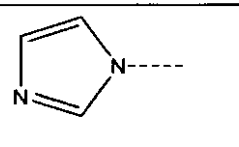
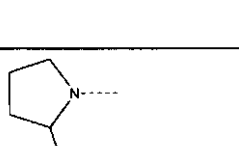
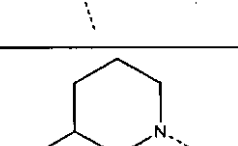
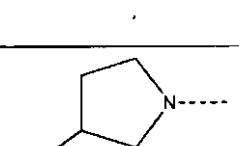
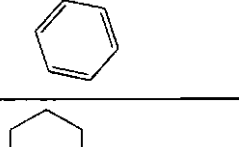

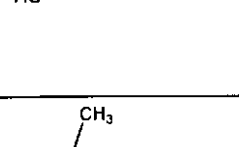
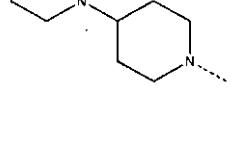
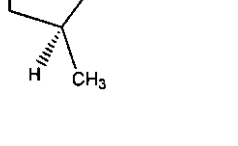
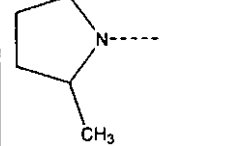
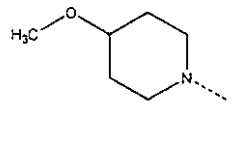
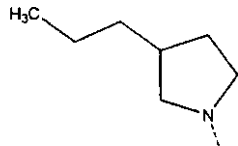
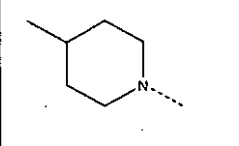
	構造		構造		構造
H <sup>1</sup>		H <sup>17</sup>		H <sup>33</sup>	
H <sup>2</sup>		H <sup>18</sup>		H <sup>34</sup>	
H <sup>3</sup>		H <sup>19</sup>		H <sup>35</sup>	
H <sup>4</sup>		H <sup>20</sup>		H <sup>36</sup>	

【 0 0 5 2 】

10

20

【表 1 - 2】

H <sup>5</sup>		H <sup>21</sup>		H <sup>37</sup>	
H <sup>6</sup>		H <sup>22</sup>		H <sup>38</sup>	
H <sup>7</sup>		H <sup>23</sup>		H <sup>39</sup>	
H <sup>8</sup>		H <sup>24</sup>		H <sup>40</sup>	
H <sup>9</sup>		H <sup>25</sup>		H <sup>41</sup>	
H <sup>10</sup>		H <sup>26</sup>		H <sup>42</sup>	
H <sup>11</sup>		H <sup>27</sup>		H <sup>43</sup>	
H <sup>12</sup>		H <sup>28</sup>		H <sup>44</sup>	



【表 1 - 3】

H <sup>13</sup>		H <sup>29</sup>		H <sup>45</sup>	
H <sup>14</sup>		H <sup>30</sup>		H <sup>46</sup>	
H <sup>15</sup>		H <sup>31</sup>		H <sup>47</sup>	
H <sup>16</sup>		H <sup>32</sup>		H <sup>48</sup>	

(X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup>)

一実施形態において、X<sup>1</sup> は、O である。別の実施形態において、X<sup>2</sup> は、O である。さらなる実施形態において、X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> はともに、O である。

【0054】

(リンカー)

好ましい実施形態において、L は、少なくとも 1 個のヘテロ原子を含む。これは、X<sup>2</sup> と Y<sup>2</sup> との間の直接連結を提供する鎖が、少なくとも 1 個のヘテロ原子を有すること、言い換えると、L 上の置換基におけるいかなるヘテロ原子も、これらの目的に関して、数に入れられないことを意味する。さらなる実施形態において、L は、少なくとも 1 個の O 原子を含む。

【0055】

一実施形態において、L は、少なくとも 2 個のヘテロ原子を含む。さらなる実施形態において、L は、少なくとも 2 個の O 原子を含む。

【0056】

一実施形態において、L<sup>c</sup> は、必要に応じて置換された、C<sub>1-15</sub> アルキレンもしくは C<sub>1-15</sub> ヘテロアルキレンである。一実施形態において、L<sup>c</sup> は、必要に応じて置換された、C<sub>1-15</sub> アルキレンもしくは C<sub>1-15</sub> ヘテロアルキレンであり、d および e は、ともに 0 である。

【0057】

一実施形態において、L<sup>c</sup> は、式 L<sup>c-i</sup> ~ L<sup>c-xxxiii</sup> のうちの 1 個から選択される。一実施形態において、L<sup>c</sup> は、式 L<sup>c-i</sup> ~ L<sup>c-xxxiii</sup> のうちの 1 個から選択され、d および e は、ともに 0 である。

【0058】

10

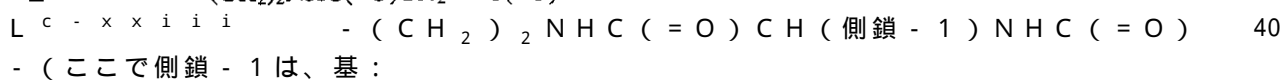
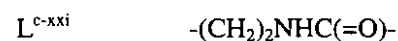
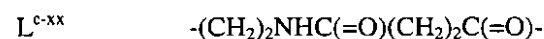
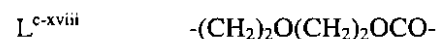
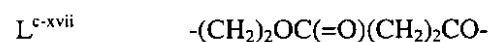
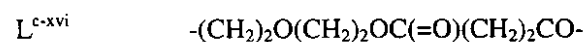
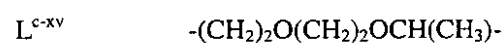
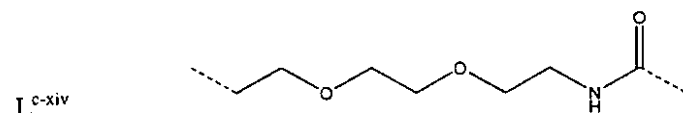
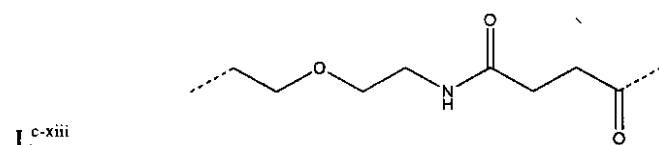
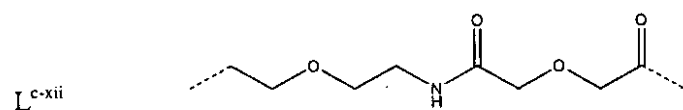
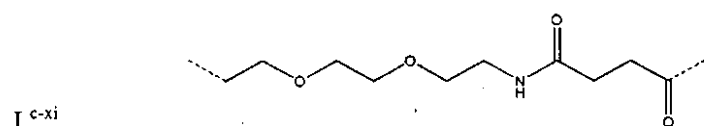
20

30

40

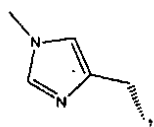
## 【化 1 2】

$L^{c-i}$	$-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$
$L^{c-ii}$	$-(CH_2)_4-$
$L^{c-iii}$	$-CO(CH_2)_2CO-$
$L^{c-iv}$	$-CO-$
$L^{c-v}$	$-COCH_2OCH_2CO-$
$L^{c-vi}$	$-(CH_2)_2O(CH_2)_2NHCO-$
$L^{c-vii}$	$-(CH_2)_3O(CH_2)_3-$
$L^{c-viii}$	$-(CH_2)_2-$
$L^{c-ix}$	$-(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2-$
$L^{c-x}$	$-(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2-$



## 【0059】

## 【化 1 3】



を表し、上記破線は、分子の残りへの結合を表す)。

## 【0060】

$L$  が少なくとも 1 個のヘテロ原子を含む基が好ましいので、 $L^c$  は、好ましくは、 $L^c$  50

- i、 $L^c - v \sim L^c - v i i$  および  $L^c - i x \sim L^c - x x i i i$  から選択される。

【0061】

一実施形態において、 $L^c$  は、必要に応じて置換された  $C_{1-15}$  ヘテロアルキレンである。

【0062】

一実施形態において、 $L^c$  は、必要に応じて置換された  $C_{1-11}$  基である。さらなる実施形態において、 $L^c$  は、必要に応じて置換された  $C_{1-9}$  基である。さらなる実施形態において、 $L^c$  は、必要に応じて置換された  $C_{3-8}$  基である。さらなる実施形態において、 $L^c$  は、必要に応じて置換された  $C_{4-7}$  基である。さらなる実施形態において、 $L^c$  は、必要に応じて置換された  $C_5$ 、 $C_6$  もしくは  $C_7$  基である。

10

【0063】

好ましい実施形態において、d は、0 であり；e は、0 であり、f は、1 である。好ましい実施形態において、d は、0 であり；e は、0 であり、f は、1 であり、 $L^c$  は、上記に示される鎖長内において、ヘテロアルキレンである。

【0064】

( $Y^1$ )

一実施形態において、 $Y^1$  は、 $C_{12-28}$  基である。さらなる実施形態において、 $Y^1$  は、 $C_{14-26}$  基である。さらなる実施形態において、 $Y^1$  は、 $C_{16-24}$  基である。さらなる実施形態において、 $Y^1$  は、 $C_{16-22}$  基である。さらなる実施形態において、上記  $Y^1$  鎖は、18、19、20 もしくは 21 個の原子長である。

20

【0065】

上記に示される炭素範囲内で、 $Y^1$  は、好ましくは、アルケニルもしくはヘテロアルケニルである。

【0066】

一実施形態において、 $Y^1$  は、少なくとも 1 個のアルケン基を有する。さらなる実施形態において、 $Y^1$  は、1 個、2 個もしくは 3 個のアルケン基を有する。

【0067】

一実施形態において、 $Y^1$  は、- 3 位においてアルケン基を有する。別の実施形態において、 $Y^1$  は、- 6 位においてアルケン基を有する。別の実施形態において、 $Y^1$  は、- 9 位においてアルケン基を有する。さらなる実施形態において、 $Y^1$  は、- 3 位、- 6 位および - 9 位のうちの 2 カ所もしくは 3 カ所においてアルケン基を有する。一実施形態において、 $Y^1$  は、- 6 位および - 9 位において不飽和である。別の実施形態において、 $Y^1$  は、- 3 位、- 6 位および - 9 位において不飽和である。一実施形態において、 $Y^1$  は、- 9 位において不飽和である。

30

【0068】

一実施形態において、 $Y^1$  は、少なくとも 1 個の *cis* 不飽和アルケン基を有する。さらなる実施形態において、 $Y^1$  は、少なくとも 2 個の *cis* 不飽和アルケン基を有する。さらなる実施形態において、 $Y^1$  は、少なくとも 3 個の *cis* 不飽和アルケン基を有する。上記少なくとも 1 個の *cis* 不飽和アルケン基は、- 3 位、- 6 位および - 9 位のうちの 1 カ所、2 カ所もしくは 3 カ所に存在し得る。脂質鎖における不飽和は、Mac Lachlan et al., Journal of Controlled Release 107 (2005) 276-287 において考察されている。

40

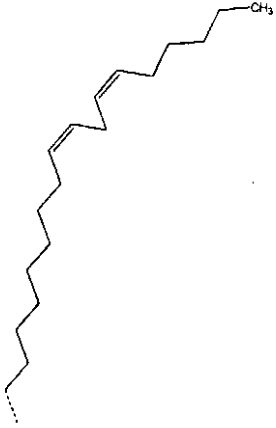
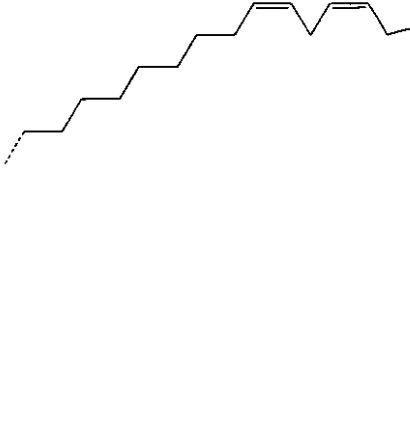
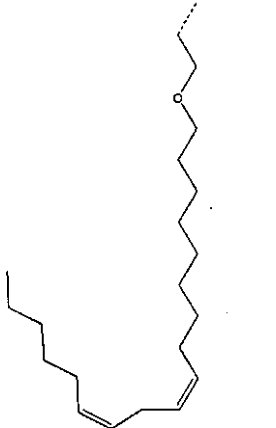
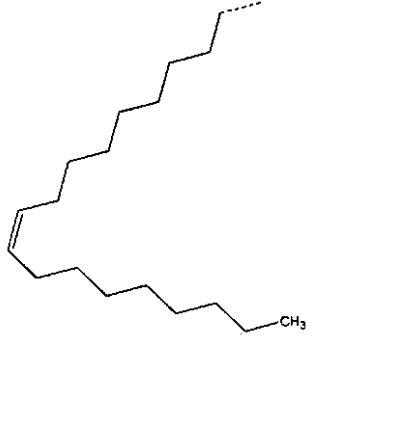
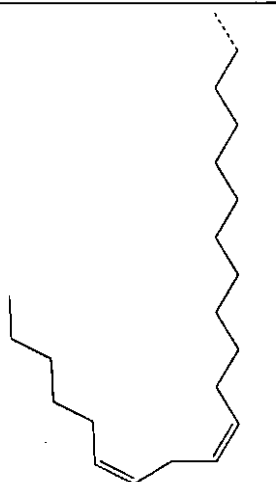
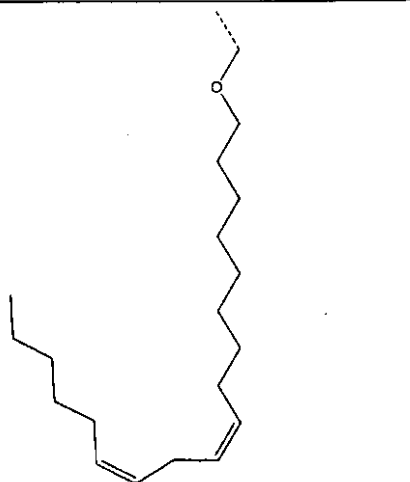
【0069】

一実施形態において、 $Y^1$  は、表 2 に提供されるように、 $Y^1 - i \sim Y^1 - v i$  から選択される。

【0070】

【表 2】

表2.  $Y^{1-i} \sim Y^{1-vi}$ と称されるY1関連部分

名称	構造	名称	構造
$Y^{1-i}$		$Y^{1-ii}$	
名称	構造	名称	構造
$Y^{1-iii}$		$Y^{1-iv}$	
名称	構造	名称	構造
$Y^{1-v}$		$Y^{1-vi}$	

(Y<sup>2</sup>)

一実施形態において、Y<sup>2</sup>は、必要に応じて置換されたステロイド上の酸素原子を介して、Lに連結される。さらなる実施形態において、Y<sup>2</sup>は、Aステロイド環の3位上の酸素原子を介してLに連結される。さらなる実施形態において、Y<sup>2</sup>は、Aステロイド環の

10

20

30

40

50

3 位におけるヒドロキシ基の水素原子が除去されたステロールである（および L への連結は、上記ヒドロキシ基の酸素原子を介する）。

【 0 0 7 1 】

一実施形態において、上記ステロールは、以下からなる群より選択される：アナステロール (annasterol)；アベナステロール； $\beta$ -シトステロール；ブラシカステロール；カルシフェロール；カンペステロール；カリノステロール (chalinossterol)；キナステロール (chinasterol)；コレスタノール；コレステロール；コプロスタノール；シクロアルテノール；デヒドロコレステロール；デスモステロール；ジヒドロカルシフェロール；ジヒドロコレステロール；ジヒドロエルゴステロール；ジノステロール；エピコレステロール；エルゴステロール；フコステロール；ヘキサヒドロルミステロール；ヘキサオール；ヒドロキシコレステロール；ラノステロール；ルミステロール；パルケオール；ポリフェラステロール；サリンゴステロール；シトスタノール；シトステロール；スチグマスタノール；スチグマステロール；ウエインベルステロール；チモステロール；ステロール胆汁酸（例えば、コール酸；ケノデオキシコール酸；グリココール酸；タウロコール酸；デオキシコール酸、およびリトコール酸）；ならびにこれらの塩。

10

【 0 0 7 2 】

さらなる実施形態において、上記ステロールは、コレステロールである。

【 0 0 7 3 】

(pKa)

20

脂質の pKa は、上記脂質のうちの 50 % が荷電される pH であり、上記脂質が完全に荷電される点と、上記脂質が完全に荷電されない点との間の中間点にある。それは、種々の方法において測定され得るが、好ましくは、以下で開示される方法を使用して測定される。上記 pKa は、代表的には、他の脂質も含む混合物の状況における脂質ではなく（例えば、参考文献 2 において行われるとおりではなく（ここでは、個々の脂質ではなく SNAIP の pKa を調べている））、単独の脂質について測定されるべきである。

【 0 0 7 4 】

脂質の pKa は、以下の技術を使用して、標準的な温度および圧力において、水の中で測定される：

・エタノール中の脂質の 2 mM 溶液を、脂質を秤量し、エタノール中に溶解することによって調製する。エタノール：メタノール 9：1 中の蛍光プローブトルエンニトロスルホン酸 (TNS) の 0.3 mM 溶液を、まず、メタノール中の TNS の 3 mM 溶液を作製し、次いで、エタノールで 0.3 mM へと希釈することによって調製する。

30

【 0 0 7 5 】

・濃度 20 mM、25 mM、20 mM および 150 mM において、それぞれ、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムを含む水性緩衝液を調製する。上記緩衝液を 8 つに分け、その pH を、12 N HCl もしくは 6 N NaOH のいずれかで、4.44 ~ 4.52、5.27、6.15 ~ 6.21、6.57、7.10 ~ 7.20、7.72 ~ 7.80、8.27 ~ 8.33 および 10.47 ~ 11.12 へと調節した。2 mM 脂質溶液 400  $\mu$ L および 0.3 mM TNS 溶液 800  $\mu$ L を混合する。

40

【 0 0 7 6 】

・7.5  $\mu$ L のプローブ / 脂質ミックスを、1 mL 96 ウェルプレートにおいて、242.5  $\mu$ L の緩衝液に添加する。これは、8 つ全ての緩衝液で行う。混合の後、100  $\mu$ L の各プローブ / 脂質 / 緩衝液混合物を、250  $\mu$ L の黒い透明底の 96 ウェルプレート（例えば、モデル COSTAR 3904, Corning）に移す。

【 0 0 7 7 】

・各プローブ / 脂質 / 緩衝液混合物の蛍光を（例えば、SpectraMax M5 分光光度計および SoftMax pro 5.2 ソフトウェアで、322 nm 励起、431 nm 発光（オートカットオフ 420 nm））測定する。

50

## 【 0 0 7 8 】

・測定後、上記 96 ウェルプレートの中のウェルのバックグラウンド蛍光値を、各ブロープ / 脂質 / 緩衝液混合物から差し引く。次いで、上記蛍光強度値を、最低 pH における値に対して正規化する。次いで、上記正規化した蛍光強度を、pH に対してプロットし、最良適合の線を提供する。

## 【 0 0 7 9 】

・正規化した蛍光強度が 0.5 に等しい、最良適合の線上の点を見いだす。0.5 に等しい正規化した蛍光強度に対応する pH が見いだされ、上記脂質の pKa とみなされる。

## 【 0 0 8 0 】

最良の免疫学的結果は、5.0 ~ 7.6 の範囲の pKa を有する脂質で認められる。この pKa 範囲内で、好ましい脂質は、5.5 ~ 6.7 の pKa (例えば、5.6 ~ 6.8、5.6 ~ 6.3、5.6 ~ 6.0、5.5 ~ 6.2、もしくは 5.7 ~ 5.9) を有する。

10

## 【 0 0 8 1 】

(式 (I) の具体的化合物)

本発明で有用な式 (I) の具体的化合物は、参考文献 8 において開示される。例えば、上記化合物は、

## 【 0 0 8 2 】

## 【 化 1 4 】

E0024, E0014, E0052, E0118, E0083, E0011, E0008, E0025,

20

E0026, E0069, E0076, E0077, E0078, E0085 もしくは E0088

であり得る。上記化合物は、「RV03」~「RV12」リポソームにおいて、もしくは「RV15」リポソームにおいて使用された、以下で示される脂質であり得る。好ましい化合物は、E0026、E0069 および E0078 である。好ましい化合物は、「RV05」、「RV08」および「RV09」リポソームにおいて使用された、以下で示される脂質である。

## 【 0 0 8 3 】

代替の実施形態において、本発明のリポソームは、式 (I) の化合物を使用するのではなく、化合物「RV02」(以下で示される構造)を使用する。この置換を除いて、RV02 含有リポソームの全ての他の局面は、本明細書中の他の箇所で記載されるとおりである。

30

## 【 0 0 8 4 】

(式 (XI) )

式 (XI) の化合物は、N 末端アルキルアミドおよび 2 ~ 10 個のアミノ酸を含むカチオン性リポペプチドである。式 (XI) は、



であり、ここで

R<sup>a</sup> は、N - 末端アルキルアミドであり、

z は、2 ~ 10 の整数であり；

40

各 AA は、アミノ酸であり、ここで、少なくとも 1 個のヒスチジンおよび少なくとも 1 個のカチオン性アミノ酸が存在することを条件とし；

R<sup>b</sup> は、- H、- OH もしくは - NH<sub>2</sub> である。

## 【 0 0 8 5 】

上記 R<sup>a</sup> 部分は、式 R<sup>c</sup> - C(O) - NR<sup>d</sup> - を有し、ここで R<sup>c</sup> は、C<sub>2</sub> ~ C<sub>24</sub> アルキルであり、R<sup>d</sup> は、- H もしくは C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキルである。適切な R<sup>c</sup> 基としては、ラウリル (「Lau」; C<sub>12</sub>) およびパルミトイル (「Pal」; C<sub>16</sub>) が挙げられる。

## 【 0 0 8 6 】

上記 R<sup>a</sup> 部分のアミドは、2 ~ 10 アミノ酸 (例えば、3 ~ 8 アミノ酸) のオリゴペプ

50

チド鎖に結合される。この鎖は、少なくとも1個（例えば、1個、2個、3個、4個もしくは5個）のヒスチジンを含む。それはまた、少なくとも1個のカチオン性アミノ酸（例えば、少なくとも1個のアルギニン、リジンもしくはオルニチン残基）を含む。少なくとも1個のリジンの包含が好ましく、理想的には、2個もしくは3個のリジンの包含が好ましい。ヒスチジンは、その側鎖が弱塩基性であり、生理学的 pH において主に非イオン化状態であるが、エンドソームの弱酸性環境において高度にプロトン化されるので、含まれる。カチオン性アミノ酸（例えば、リジンもしくはアルギニン）は、中性 pH において上記リポペプチド上に単位正電荷を提供する。有用なオリゴペプチドは、アミノ酸配列 - C - K<sub>i</sub> - H<sub>j</sub> - を有する：i は、1、2もしくは3であり；そして j は、1、2、3、4もしくは5である。

【0087】

上記オリゴペプチド鎖のC末端は、-COOHとして残り得るか、または代わりにアミドを形成し得る。

【0088】

式(XI)の化合物は、それらのアルキル鎖、それらのアミノ酸配列、およびそれらのC末端基の点から記載され得る。例えば、上記リポペプチド「Lau-(C-K-H-H)-NH<sub>2</sub>」は、N末端ラウリル鎖、次いで、システイン、次いで、リジン、次いで2個のヒスチジン、およびC末端アミンを有する。従って、式(XI)の適切なリポペプチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

【0089】

【化15】

Lau-(C-K-K-H)-NH<sub>2</sub>, Pal-

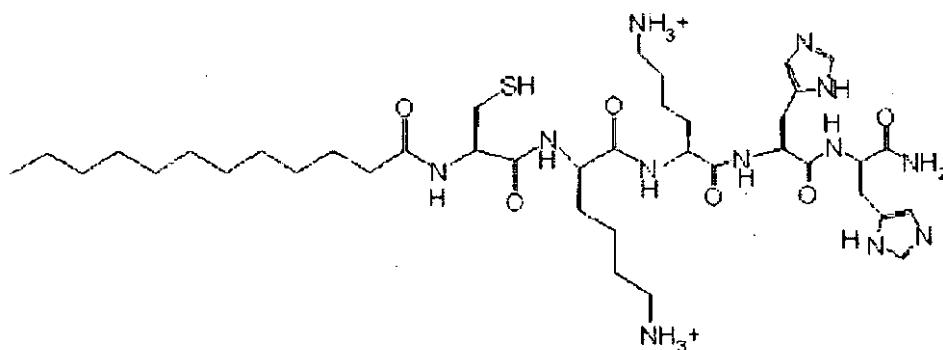
(C-K-H-H)-NH<sub>2</sub>, Pal-(C-K-K-H-H)-NH<sub>2</sub>, Pal-(C-K-K-H-H-H)-NH<sub>2</sub>, Pal-(C-K-K-H-H-H-H)-NH<sub>2</sub>,

Pal-(C-K-K-H-H-H-H-H)-NH<sub>2</sub>, Pal-(C-K-K-K-H-H)-NH<sub>2</sub> および Pal-(C-K-K-K-H-H-H)-NH<sub>2</sub>.

これらおよび他の化合物は、参考文献9に開示され、以下を含む：

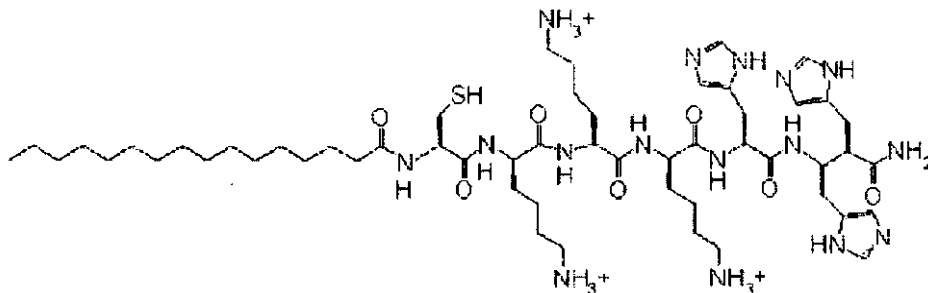
【0090】

【化16】



【0091】

【化17】



(RNA)

本発明のリボソームは、ポリペプチドをコードするRNA分子（参考文献2におけるような、siRNAとは異なる）を含む。上記粒子のインピボ投与後、RNAは、上記粒子から放出され、上記ポリペプチドをインサイチュで提供するように、細胞の中で翻訳される。

【0092】

上記RNAは、プラス鎖であるので、任意の介在複製工程（例えば、逆転写）を必要とすることなく、細胞によって翻訳され得る。それは、免疫細胞によって発現されるTLR7レセプターにも結合し得、それによって、免疫化目的に有用なアジュバント効果を開始する。

【0093】

好ましいプラス鎖RNAは、自己複製性である。自己複製RNA分子（レプリコン）は、いかなるタンパク質もなしに脊椎動物細胞に送達される場合に、それ自体からの転写によって（それ自体から生成するアンチセンスコピーを介して）、複数の娘RNAの生成をもたらし得る。自己複製RNA分子は、従って、代表的には、細胞への送達後に直接翻訳され得るプラス鎖分子であり、そしてこの翻訳は、RNA依存性RNAポリメラーゼを提供し、これは次に、上記送達されたRNAからアンチセンスおよびセンス両方の転写物を生成する。従って、上記送達されるRNAは、複数の娘RNAの生成をもたらす。これら娘RNA、ならびに同一線状の（collinear）サブゲノム転写物は、コードされた目的のポリペプチドのインサイチュ発現を提供するようにそれら自体が翻訳されてもよいし、上記送達されたRNAと同じセンスを有するさらなる転写物を提供するように転写されてもよい（これは、翻訳されて上記目的のポリペプチドのインサイチュ発現を提供する）。この一連の転写の全体的な結果は、上記導入されるレプリコンRNAの非常に多くの増幅であり、よって上記コードされた目的のポリペプチドは、上記細胞の主な生成物になる。

【0094】

自己複製を達成するための1つの適した系は、アルファウイルススペースのRNAレプリコンを使用することである。これらプラス鎖レプリコンは、細胞への送達後に翻訳されて、レプリカーゼ（もしくはレプリカーゼ-転写酵素）をもたらす。上記レプリカーゼは、ポリプロテインとして翻訳され、これは、上記プラス鎖の送達されたRNAのゲノムマイナス鎖コピーを作り出す複製複合体を提供するように自己切断する。これらマイナス鎖転写物は、それ自体、転写されて、上記プラス鎖親RNAのさらなるコピーを与え得、さらに、上記目的のポリペプチドをコードするサブゲノム転写物を与え得る。上記サブゲノム転写物の翻訳は、従って、上記感染細胞による上記ポリペプチドのインサイチュ発現をもたらす。適切なアルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスなどに由来するレプリカーゼを使用し得る。変異型もしくは野生型のウイルス配列が使用され得、例えば、VEEVの弱毒化TC83変異型は、レプリコンにおいて使用されてきた[10]。

【0095】

好ましい自己複製RNA分子は、従って、（i）RNAを上記自己複製RNA分子から転写し得るRNA依存性RNAポリメラーゼ、および（ii）目的のポリペプチドをコードする。上記ポリメラーゼは、例えば、アルファウイルスタンパク質nsP1、nsP2、nsP3およびnsP4のうちの1種以上を含む、アルファウイルスレプリカーゼであり得る。

【0096】

天然のアルファウイルスゲノムは、上記非構造的レプリカーゼポリプロテインに加えて、構造的ポリオンタンパク質をコードするのに対して、本発明の自己複製RNA分子は、アルファウイルス構造タンパク質をコードしないことが好ましい。従って、好ましい自己複製RNAは、細胞においてそれ自体のゲノムRNAコピーの生成をもたらし得るが、RNA含有ピリオンの生成をもたらさない。これらピリオンを生成できないことは、野生型アルファウイルスとは異なり、上記自己複製RNA分子が、感染性形態として永続できな

10

20

30

40

50



いことを意味する。野生型ウイルスとして永続するために必要な上記アルファウイルス構造タンパク質は、本発明の自己複製RNAにおいて存在せず、上記目的のポリペプチドをコードする遺伝子によってそれらの場所が占められている。その結果、上記サブゲノム転写物は、上記構造的アルファウイルスビリオンタンパク質ではなく、そのポリペプチドをコードする。

【0097】

従って、本発明で有用な自己複製RNA分子は、2個のオープンリーディングフレームを有し得る。第1の(5')オープンリーディングフレームは、レプリカーゼをコードする；第2の(3')オープンリーディングフレームは、目的のポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、上記RNAは、例えば、さらなる目的のポリペプチド(以下を参照のこと)をコードするかもしれないしくはアクセサリポリペプチドをコードするために、さらなる(例えば、下流の)オープンリーディングフレームを有し得る。

10

【0098】

自己複製RNA分子は、コードされたレプリカーゼと適合性である5'配列を有し得る。

【0099】

自己複製RNA分子は、種々の長さを有し得るが、それらは、代表的には、5000~25000ヌクレオチド長(例えば、8000~15000ヌクレオチド、もしくは9000~12000ヌクレオチド)である。従って、上記RNAは、siRNA送達において認められるものより長い。

20

【0100】

本発明で有用なRNA分子は、5'キャップ(例えば、7-メチルグアノシン)を有し得る。このキャップは、上記RNAのインビボ翻訳を増強し得る。

【0101】

本発明で有用なRNA分子の5'ヌクレオチドは、5'トリホスフェート基を有し得る。キャップされたRNAにおいて、これは、5'から5'への架橋を介して、7-メチルグアノシンに連結され得る。5'トリホスフェートは、RIG-I結合を増強し得るので、アジュバント効果を促進し得る。

【0102】

RNA分子は、3'ポリ-Aテールを有し得る。それはまた、その3'末端付近にポリ-Aポリメラーゼ認識配列(例えば、AAUAAA)を含み得る。

30

【0103】

本発明で有用なRNA分子は、代表的には、一本鎖である。一本鎖RNAは、一般に、TLR7、TLR8、RNAヘリカーゼおよび/もしくはPKRへの結合によって、アジュバント効果を開始し得る。二本鎖形態において送達されるRNA(dsRNA)は、TLR3に結合し得、このレセプターはまた、一本鎖RNAの複製の間もしくは一本鎖RNAの二次構造内のいずれかで形成されるdsRNAによって誘発され得る。

【0104】

本発明で有用RNA分子は、便宜上、インビトロ転写(IVT)によって調製され得る。IVTは、細菌においてプラスミド形態において作られ、増やされたか、または合成で作製された(例えば、遺伝子合成および/もしくはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)操作法によって)(cDNA)テンプレートを使用し得る。例えば、DNA依存性RNAポリメラーゼ(例えば、バクテリオファージT7、T3もしくはSP6 RNAポリメラーゼ)は、DNAテンプレートからRNAを転写するために使用され得る。適切なキャッピングおよびポリA付加反応は、必要時に使用され得る(しかし、上記レプリコンのポリAは、通常、上記DNAテンプレート内にコードされる)。これらRNAポリメラーゼは、転写される5'ヌクレオチドについてストリンジントな要件を有し得、いくつかの実施形態において、これらの要件は、上記IVT転写RNAが、自己がコードするレプリカーゼの基質として効率的に機能し得ることを確実にするために、上記コードされたレプリカーゼの要件とマッチしなければならない。

40

50

## 【 0 1 0 5 】

参考文献 11 において考察されるように、上記自己複製 RNA は、( 任意の 5' キャップ構造に加えて ) 改変された核酸塩基を有する 1 個以上のヌクレオチドを含み得る。従って、上記 RNA は、以下を含み得る： m5C ( 5 - メチルシチジン )、m5U ( 5 - メチルウリジン )、m6A ( N6 - メチルアデノシン )、s2U ( 2 - チオウリジン )、Um ( 2' - O - メチルウリジン )、m1A ( 1 - メチルアデノシン )；m2A ( 2 - メチルアデノシン )；Am ( 2' - O - メチルアデノシン )；ms2m6A ( 2 - メチルチオ - N6 - メチルアデノシン )；i6A ( N6 - イソペンテニルアデノシン )；ms2i6A ( 2 - メチルチオ - N6 イソペンテニルアデノシン )；io6A ( N6 - ( cis - ヒドロキシイソペンテニル ) アデノシン )；ms2io6A ( 2 - メチルチオ - N6 - ( cis - ヒドロキシイソペンテニル ) アデノシン )；g6A ( N6 - グリシニルカルバモイルアデノシン )；t6A ( N6 - スレオニルカルバモイルアデノシン )；ms2t6A ( 2 - メチルチオ - N6 - スレオニルカルバモイルアデノシン )；m6t6A ( N6 - メチル - N6 - スレオニルカルバモイルアデノシン )；hn6A ( N6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン )；ms2hn6A ( 2 - メチルチオ - N6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン )；Ar(p) ( 2' - O - リボシルアデノシン ( ホスフェート ) )；I ( イノシン )；m1I ( 1 - メチルイノシン )；m'I ( 1, 2' - O - ジメチルイノシン )；m3C ( 3 - メチルシチジン )；Cm ( 2T - O - メチルシチジン )；s2C ( 2 - チオシチジン )；ac4C ( N4 - アセチルシチジン )；f5C ( 5 - ホルミル ( f o n n y l ) シチジン )；m5Cm ( 5, 2 - O - ジメチルシチジン )；ac4Cm ( N4 アセチル 2T O メチルシチジン )；k2C ( リシジン )；m1G ( 1 - メチルグアノシン )；m2G ( N2 - メチルグアノシン )；m7G ( 7 - メチルグアノシン )；Gm ( 2' - O - メチルグアノシン )；m22G ( N2, N2 - ジメチルグアノシン )；m2Gm ( N2, 2' - O - ジメチルグアノシン )；m22Gm ( N2, N2, 2' - O - トリメチルグアノシン )；Gr(p) ( 2' - O - リボシルグアノシン ( ホスフェート ) )；yW ( ワイブトシン )；o2yW ( ペルオキシワイブトシン )；OHyW ( ヒドロキシワイブトシン )；OHyW\* ( 改変未満 ( u n d e r m o d i f i e d ) ヒドロキシワイブトシン )；imG ( ワイオシン )；mimG ( メチルグアノシン )；Q ( キューオシン )；oQ ( エポキシキューオシン )；galQ ( ガラクトシル ( g a l t a c t o s y l ) - キューオシン )；manQ ( マンノシル - キューオシン )；preQo ( 7 - シアノ - 7 - デアザグアノシン )；preQi ( 7 - アミノメチル - 7 - デアザグアノシン )；G\* ( アルカエオシン ( a r c h a e o s i n e ) )；D ( ジヒドロウリジン )；m5Um ( 5, 2' - O - ジメチルウリジン )；s4U ( 4 - チオウリジン )；m5s2U ( 5 - メチル - 2 - チオウリジン )；s2Um ( 2 - チオ - 2' - O - メチルウリジン )；acp3U ( 3 - ( 3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル ) ウリジン )；ho5U ( 5 - ヒドロキシウリジン )；mo5U ( 5 - メトキシウリジン )；cmo5U ( ウリジン 5 - オキシ酢酸 )；mcmo5U ( ウリジン 5 - オキシ酢酸メチルエステル )；chm5U ( 5 - ( カルボキシヒドロキシメチル ) ウリジン )；mchm5U ( 5 - ( カルボキシヒドロキシメチル ) ウリジンメチルエステル )；mcm5U ( 5 - メトキシカルボニルメチルウリジン )；mcm5Um ( S - メトキシカルボニルメチル - 2 - O - メチルウリジン ( m e t h y l u r i c j i n e ) )；mcm5s2U ( 5 - メトキシカルボニルメチル - 2 - チオウリジン )；nm5s2U ( 5 - アミノメチル - 2 - チオウリジン )；mn5U ( 5 - メチルアミノメチルウリジン )；mn5s2U ( 5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウリジン )；mn5se2U ( 5 - メチルアミノメチル - 2 - セレノウリジン )；ncm5U ( 5 - カルバモイルメチルウリジン )；ncm5Um ( 5 - カルバモイルメチル - 2' - O - メチルウリジン )；cmnm5U ( 5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン )；cnmnm5Um ( 5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - L - O メチルウリジン )；cmnm5s2U ( 5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン )；m62A ( N6, N6 - ジメチルアデノシン )；Tm ( 2' - O - メチルイノシン )；m4C ( N4 - メチルシチジン )；m4Cm ( N4, 2 - O - ジメチルシチジ

10

20

30

40

50

ン) ; h m 5 C ( 5 - ヒドロキシメチルシチジン ) ; m 3 U ( 3 - メチルウリジン ) ; c m 5 U ( 5 - カルボキシメチルウリジン ) ; m 6 A m ( N 6 , T - O - ジメチルアデノシン ) ; r n 6 2 A m ( N 6 , N 6 , O - 2 - トリメチルアデノシン ) ; m 2 ' 7 G ( N 2 , 7 - ジメチルグアノシン ) ; m 2 ' 2 ' 7 G ( N 2 , N 2 , 7 - トリメチルグアノシン ) ; m 3 U m ( 3 , 2 T - O - ジメチルウリジン ) ; m 5 D ( 5 - メチルジヒドロウリジン ) ; f 5 C m ( 5 - ホルミル - 2 ' - O - メチルシチジン ) ; m 1 G m ( 1 , 2 ' - O - ジメチルグアノシン ) ; m ' A m ( ( 1 , 2 - O - ジメチルアデノシン ) イリノメチルウリジン ) ; t m 5 s 2 U ( S - タウリノメチル - 2 - チオウリジン ) ; i m G - 1 4 ( 4 - デメチルグアノシン ) ; i m G 2 ( イソグアノシン ) ; もしくは a c 6 A ( N 6 - アセチルアデノシン )、ヒポキサンチン、イノシン、8 - オキソ - アデニン、7 - 置換されたその誘導体、ジヒドロウラシル、シュードウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - アミノウラシル、5 - ( C 1 - C 6 ) - アルキルウラシル、5 - メチルウラシル、5 - ( C 2 - C 6 ) - アルケニルウラシル、5 - ( C 2 - C 6 ) - アルキニルウラシル、5 - ( ヒドロキシメチル ) ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - ヒドロキシシトシン、5 - ( C 1 - C 6 ) - アルキルシトシン、5 - メチルシトシン、5 - ( C 2 - C 6 ) - アルケニルシトシン、5 - ( C 2 - C 6 ) - アルキニルシトシン、5 - クロロシトシン、5 - フルオロシトシン、5 - プロモシトシン、N 2 - ジメチルグアニン、7 - デアザグアニン、8 - アザグアニン、7 - デアザ - 7 - 置換グアニン、7 - デアザ - 7 - ( C 2 - C 6 ) アルキニルグアニン、7 - デアザ - 8 - 置換グアニン、8 - ヒドロキシグアニン、6 - チオグアニン、8 - オキソグアニン、2 - アミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、2 , 4 - ジアミノプリン、2 , 6 - ジアミノプリン、8 - アザプリン、置換された7 - デアザプリン、7 - デアザ - 7 - 置換プリン、7 - デアザ - 8 - 置換プリン、または無塩基ヌクレオチド。例えば、自己複製RNAは、1つ以上の改変されたピリミジン核酸塩基(例えば、シュードウリジンおよび/もしくは5 - メチルシトシン残基)を含み得る。しかし、いくつかの実施形態において、上記RNAは、改変された核酸塩基を含まず、改変されたヌクレオチドを含まなくてもよい(すなわち、上記RNA中のヌクレオチドのすべては、標準的なA、C、GおよびUというリボヌクレオチドである(任意の5'キャップ構造を除く。これは、7' - メチルグアノシンを含み得る))。他の実施形態において、上記RNAは、7' - メチルグアノシンを含む5'キャップを含み得、最初の1個、2個もしくは3個の5'リボヌクレオチドは、リボースの2'位においてメチル化され得る。

#### 【0106】

本発明で使用されるRNAは、理想的には、ヌクレオチド間にホスホジエステル結合のみを含むが、いくつかの実施形態において、それは、ホスホロアミデート結合、ホスホロチオエート結合、および/もしくはメチルホスホネート結合を含み得る。

#### 【0107】

理想的には、リボソームは、10より少ない種の異なるRNA(例えば、5種、4種、3種、もしくは2種の異なる種)を含み；最も好ましくは、リボソームは、単一のRNA種を含み、すなわち、上記リボソーム中の全てのRNA分子は、同じ配列および同じ長さを有する。

#### 【0108】

リボソーム1つあたりのRNAの量は、変動し得る。リボソーム1つあたりの個々の自己複製RNA分子の数は、代表的には、リボソーム1つあたり 50(例えば、リボソーム1つあたり < 20、< 10、< 5、もしくは1 ~ 4)である。

#### 【0109】

(コードされた目的のポリペプチド)

本発明で使用されるRNA分子は、目的のポリペプチドをコードする。上記リボソームの投与後に、上記RNAは、インピボで翻訳され、得られたタンパク質は、その所望の効果を発揮し得る(例えば、それは、レシピエントにおいて免疫応答を誘発し得るか、または目的の機能(例えば、酵素活性)を提供し得る)。

## 【0110】

上記RNA分子は、単一の目的のポリペプチドもしくは複数のポリペプチドをコードし得る。複数のポリペプチドは、単一のポリペプチド（融合ポリペプチド）として、もしくは別個のポリペプチドとして、提示され得る。ポリペプチドが、レプリコンから別個のポリペプチドとして発現される場合、これらのうちの1種以上は、上流のIRESもしくはさらなるウイルスプロモーターエレメントと共に提供され得る。あるいは、複数のポリペプチドは、短い自己触媒性プロテアーゼ（例えば、口蹄疫ウイルス2Aタンパク質）に融合された個々のポリペプチドをコードするポリプロテインから、またはインティンとして発現され得る。

## 【0111】

10

参考文献1および12とは異なり、上記RNAは、有用なインビボ機能を有するポリペプチドをコードする。不確かさを避けるために、本発明は、ホタルルシフェラーゼをコードするか、または*E. coli* - ガラクトシダーゼの融合タンパク質をコードするか、または緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードするRNAを含まない。このようなポリペプチドは、マーカーとして有用であり得るが、本発明は、有用な治療応答もしくは免疫学的応答を提供し得るポリペプチドのインビボ発現のためのRNAの送達に関する。また、上記RNAは、全マウス胸腺RNAではない。

## 【0112】

（免疫原）

いくつかの実施形態において、上記RNAは、ポリペプチド免疫原をコードする。上記リポソームの投与後に、上記RNAは、インビボで翻訳され、上記免疫原は、レシピエントにおいて免疫応答を誘発し得る。上記免疫原は、細菌、ウイルス、真菌もしくは寄生生物に対して（または、いくつかの実施形態において、アレルゲンに対して；および他の実施形態においては、腫瘍抗原に対して）免疫応答を誘発し得る。上記免疫応答は、抗体応答（通常は、IgGを含む）および/もしくは細胞媒介性免疫応答を含み得る。上記ポリペプチド免疫原は、代表的には、その対応する細菌、ウイルス、真菌もしくは寄生生物（またはアレルゲンもしくは腫瘍）のポリペプチドを認識する免疫応答を誘発するが、いくつかの実施形態において、上記ポリペプチドは、細菌、ウイルス、真菌もしくは寄生生物のサッカリドを認識する免疫応答を誘発するミモトープとして作用し得る。上記免疫原は、代表的には、表面ポリペプチド（例えば、アドヘシン、ヘマグルチニン、エンベロープ糖タンパク質、スパイク糖タンパク質など）である。

20

30

## 【0113】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、これら細菌のうちの1種に対して免疫応答を誘発する：

*Neisseria meningitidis*：有用な免疫原としては、膜タンパク質、例えば、アドヘシン、オートトランスポーター、毒素、鉄獲得タンパク質、およびH因子結合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。3種の有用なポリペプチドの組み合わせが、参考文献13に開示される。

## 【0114】

*Streptococcus pneumoniae*：有用なポリペプチド免疫原は、参考文献14に開示される。これらとしては、RrgB線毛サブユニット、-N-アセチル-ヘキソサミニダーゼ前駆体（spr0057）、spr0096、一般的なストレスタンパク質（general stress protein）GSP-781（spr2021、SP2216）、セリン/スレオニンキナーゼStkP（SP1732）、および肺炎球菌表面アドヘシンPsaAが挙げられるが、これらに限定されない。

40

## 【0115】

*Streptococcus pyogenes*：有用な免疫原としては、参考文献15および16に開示されるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0116】

*Moraxella catarrhalis*

50

*Bordetella pertussis* : 有用な百日咳免疫原としては、百日咳毒素もしくはトキシド (PT)、線維状ヘマグルチニン (FHA)、ペルタクチン、ならびに凝集原 2 および 3 が挙げられるが、これらに限定されない。

【0117】

*Staphylococcus aureus* : 有用な免疫原としては、参考文献 17 に開示されるポリペプチド (例えば、溶血素、esxA、esxB、フェリクロム結合タンパク質 (sta006) および / もしくは sta011 リポプロテイン) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0118】

*Clostridium tetani* : 代表的な免疫原は、破傷風トキシドである。 10

【0119】

*Corynebacterium diphtheriae* : 代表的な免疫原は、ジフテリアトキシドである。

【0120】

*Haemophilus influenzae* : 有用な免疫原としては、参考文献 18 および 19 に開示されるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

*Pseudomonas aeruginosa*  
*Streptococcus agalactiae* : 有用な免疫原としては、参考文献 15 に開示されるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。 20

【0122】

*Chlamydia trachomatis* : 有用な免疫原としては、PepA、LcrE、ArtJ、DnaK、CT398、OmpH 様、L7/L12、OmcA、AtoS、CT547、Eno、HtrA および MurG (例えば、参考文献 20 に開示されるとおり) が挙げられるが、これらに限定されない。LcrE [21] および HtrA [22] は、2 つの好ましい免疫原である。

【0123】

*Chlamydia pneumoniae* : 有用な免疫原としては、参考文献 23 に開示されるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。 30

【0124】

*Helicobacter pylori* : 有用な免疫原としては、CagA、VacA、NAP、および / もしくはウレアーゼ [24] が挙げられるが、これらに限定されない。

【0125】

*Escherichia coli* : 有用な免疫原としては、腸毒素産生性 *E. coli* (ETEC)、腸管凝集性 *E. coli* (EAggEC)、分散接着性 (diffusely adhering) *E. coli* (DAEC)、腸病原性 *E. coli* (EPEC)、腸管外病原性 *E. coli* (ExPEC) および / もしくは腸管出血性 *E. coli* (EHEC) に由来する免疫原が挙げられるが、これらに限定されない。ExPEC 株 40 としては、尿路病原性 *E. coli* (UPEC) および髄膜炎 / 敗血症関連 *E. coli* (MNEC) が挙げられる。有用な UPEC ポリペプチド免疫原は、参考文献 25 および 26 に開示される。有用な MNEC 免疫原は、参考文献 27 に開示される。いくつかの *E. coli* タイプに有用な免疫原は、AcfD である [28]。

【0126】

*Bacillus anthracis*  
*Yersinia pestis* : 有用な免疫原としては、参考文献 29 および 30 に開示されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0127】

## 【化 1 8】

*Staphylococcus epidermis**Clostridium perfringens* もしくは *Clostridium botulinums**Legionella pneumophila**Coxiella burnetii**Brucella*, 例えば *B.abortus*, *B.canis*, *B.melitensis*, *B.neotomae*, *B.ovis*, *B.suis*, *B.pinnipediae*.*Francisella*, 例えば *F.novicida*, *F.philomiragia*, *F.tularensis*.

10

*Neisseria gonorrhoeae**Treponema pallidum**Haemophilus ducreyi**Enterococcus faecalis* もしくは *Enterococcus faecium**Staphylococcus saprophyticus**Yersinia enterocolitica**Mycobacterium tuberculosis*

20

*Rickettsia**Listeria monocytogenes**Vibrio cholerae**Salmonella typhi**Borrelia burgdorferi**Porphyromonas gingivalis**Klebsiella*

30

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、これらウイルスのうちの1種に対して免疫応答を誘発する：

オルソミクソウイルス：有用な免疫原は、インフルエンザA、BもしくはCウイルスに由来し得る（例えば、ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼもしくはマトリクスM2タンパク質）。上記免疫原がインフルエンザAウイルスヘマグルチニンである場合、それは、任意のサブタイプ（例えば、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15もしくはH16）に由来し得る。

## 【0128】

パラミクソウイルス科のウイルス：ウイルス免疫原としては、肺炎ウイルス（例えば、RSウイルス、RSV）、ルブラウイルス（例えば、ムンプスウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、パラインフルエンザ・ウイルス）、メタニューモウイルスおよびモルビリウイルス（例えば、麻疹ウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

40

## 【0129】

ポックスウイルス科：ウイルス免疫原としては、オルトポックスウイルス（例えば、真正痘瘡（大痘瘡および小痘瘡が挙げられるが、これらに限定されない））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0130】

ピコルナウイルス：ウイルス免疫原としては、ピコルナウイルス（例えば、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパルナウイルス、カルジオウイルスおよびアフトウイルス）

50

に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、上記エンテロウイルスは、ポリオウイルス（例えば、1型、2型、および/もしくは3型のポリオウイルス）である。別の実施形態において、上記エンテロウイルスは、E V 7 1エンテロウイルスである。別の実施形態において、上記エンテロウイルスは、コクサッキーAもしくはBウイルスである。

【0131】

ブンヤウイルス：ウイルス免疫原としては、オルソブンヤウイルス（例えば、カリフォルニア脳炎ウイルス）、フレボウイルス（例えば、リフトバレー熱ウイルス）、もしくはナイロウイルス（例えば、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0132】

ヘパルナウイルス：ウイルス免疫原としては、ヘパルナウイルス（例えば、A型肝炎ウイルス（HAV））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0133】

フィロウイルス：ウイルス免疫原としては、フィロウイルス（例えば、エボラウイルス（ザイルエボラウイルス、アイボリーコーストエボラウイルス、レストンエボラウイルスもしくはスーダンエボラウイルスを含む））またはマールブルグウイルスに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0134】

トガウイルス：ウイルス免疫原としては、トガウイルス（例えば、ルビウイルス、アルファウイルス、もしくはアルテリウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。これは、風疹ウイルスを含む。

20

【0135】

フラビウイルス：ウイルス免疫原としては、フラビウイルス（例えば、ダニ媒介脳炎（TBE）ウイルス、デング（1、2、3もしくは4型）ウイルス、黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、キャサヌール森林ウイルス、ウエストナイル脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ロシア春夏脳炎ウイルス、ポワッサン脳炎ウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0136】

ペスチウイルス：ウイルス免疫原としては、ペスチウイルス（例えば、牛ウイルス性下痢（BVDV）、豚コレラ（CSFV）もしくはボウダ病（BDV））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0137】

ヘパドナウイルス：ウイルス免疫原としては、ヘパドナウイルス（例えば、B型肝炎ウイルス）に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。組成物は、B型肝炎ウイルス表面抗原（HBsAg）を含み得る。

【0138】

他の肝炎ウイルス：組成物は、C型肝炎ウイルス、デルタ型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、もしくはG型肝炎ウイルスに由来する免疫原を含み得る。

【0139】

ラブドウイルス：ウイルス免疫原としては、ラブドウイルス（例えば、リッサウイルス（例えば、狂犬病ウイルス）およびベシクロウイルス（VSV））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0140】

カリシウイルス科：ウイルス免疫原としては、カリシウイルス科（例えば、ノーウォークウイルス（ノロウイルス）、およびノーウォーク様ウイルス（例えば、ハワイウイルスおよびスノーマウンテンウイルス））に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0141】

コロナウイルス：ウイルス免疫原は、SARSコロナウイルス、トリ伝染性気管支炎（

50

IBV)、マウス肝炎ウイルス(MHV)、およびブタ伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。上記コロナウイルス免疫原は、スパイクポリペプチドであり得る。

【0142】

レトロウイルス：ウイルス免疫原としては、オンコウイルス、レンチウイルス(例えば、HIV-1もしくはHIV-2)またはスプマウイルスに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0143】

レオウイルス：ウイルス免疫原としては、オルトレオウイルス、ロタウイルス、オルビウイルス、もしくはコルチウイルスに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0144】

パルボウイルス：ウイルス免疫原としては、パルボウイルスB19に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0145】

ヘルペスウイルス：ウイルス免疫原としては、ヒトヘルペスウイルス(例えば、例示に過ぎないが、単純ヘルペスウイルス(HSV)(例えば、HSV1型および2型)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、エプスタイン・バー・ウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス6(HHV6)、ヒトヘルペスウイルス7(HHV7)、およびヒトヘルペスウイルス8(HHV8))に由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0146】

パポバウイルス：ウイルス免疫原としては、パピローマウイルスおよびポリオーマウイルスに由来するものが挙げられるが、これらに限定されない。上記(ヒト)パピローマウイルスは、血清型1、2、4、5、6、8、11、13、16、18、31、33、35、39、41、42、47、51、57、58、63もしくは65のもの(例えば、血清型6、11、16および/もしくは18のうちの1種以上に由来する)であり得る。

【0147】

アデノウイルス：ウイルス免疫原としては、アデノウイルス血清型36(Ad-36)に由来するものが挙げられる。

30

【0148】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、魚類に感染するウイルス(例えば：伝染性サケ貧血ウイルス(ISAV)、サケ脾臓病ウイルス(SPDV)、伝染性脾臓壊死ウイルス(IPNV)、アメリカナマズウイルス(CCV)、魚類リンホシスチス病ウイルス(FLDV)、伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)、コイヘルペスウイルス、サケピコルナ様ウイルス(大西洋サケピコルナ様ウイルスとしても公知)、ヤマメウイルス(LSV)、大西洋サケロタウイルス(ASR)、マスイチゴ病ウイルス(TSD)、銀ザケ腫瘍ウイルス(CSTV)、もしくはウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV))に対する免疫応答を誘発する。

【0149】

真菌免疫原は、皮膚糸状菌類(Dermatophytes)(以下が挙げられる：

40

【0150】



## 【化 19】

*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouini*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. album, var. discoides, var. ochraceum, *Trichophyton violaceum*, および/もしくは *Trichophyton faviforme*; または *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitaniae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondi*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Microsporidia*, *Encephalitozoon* spp., *Septata intestinalis* および *Enterocytozoon bieneusi*; それほど一般的でないものは *Brachiola* spp., *Microsporidium* spp., *Nosema* spp., *Pleistophora* spp., *Trachipleistophora* spp., *Vittaforma* spp *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigelii*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffei*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp, *Mortierella* spp, *Cunninghamella* spp, *Saksenaea* spp., *Alternaria* spp, *Curvularia* spp, *Helminthosporium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Monolinia* spp, *Rhizoctonia* spp, *Paecilomyces* spp, *Pithomyces* spp, および *Cladosporium* spp. である)

10

20

に由来し得る。

## 【0151】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、*Plasmodium* 属（例えば、*P. falciparum*、*P. vivax*、*P. malariae* もしくは *P. ovale*）に由来する寄生生物に対する免疫応答を誘発する。従って、本発明は、マラリアに対して免疫化するために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記免疫原は、*Caligidae* 科に由来する寄生生物、特に、*Lepeophtheirus* 属および *Caligus* 属に由来する寄生生物（例えば、*Lepeophtheirus salmonis* もしくは *Caligus rogercresseyi* のようなフナムシ）に対する免疫応答を誘発する。

30

## 【0152】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、以下に対する免疫応答を誘発する：花粉アレルゲン（樹木花粉、草本花粉、雑草の花粉、および草の花粉のアレルゲン）；昆虫もしくは蛛形類のアレルゲン（吸入、唾液および毒液のアレルゲン、例えば、ダニアレルゲン、ゴキブリアレルゲンおよび小虫アレルゲン、膜翅類毒液アレルゲン（*hymenoptera venom allergen*））；動物の毛およびふけのアレルゲン（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ラット、マウスなどに由来する）；ならびに食物アレルゲン（例えば、グリアジン）。樹木、草および草本に由来する重要な花粉アレルゲンは、*Fagales*、*Oleales*、*Pinales* の分類学上の目およびスズカケノキ科（*platanaceae*）（カバノキ（*Betula*））、ハンノキ（*Alnus*）、ハシバミ（*Corylus*）、シデ（*Carpinus*）およびオリーブ（*Olea*）、シーダー（*Cryptomeria* および *Juniperus*）、プラタナス（*Platanus*）が挙げられるが、これらに限定されない）、*Poales* の目（属 *Lolium*、*Ph*

40

50

leum、Poa、Cynodon、Dactylis、Holcus、Phalaris、Secale、およびSorghumの草が挙げられる)、AsteralesおよびUrticalesの目(属Ambrosia、Artemisia、およびParietariaの草本が挙げられる)から由来するそのようなものである。他の重要な吸入アレルゲンは、属DermatophagoideesおよびEuroglyphusのチリダニ類、コナダニ類(storage mite)(例えば、Lepidoglyphys、GlycyphagusおよびTyrophagus)、ゴキブリ、小虫およびノミに由来するもの(例えば、Blatella、Periplaneta、ChironomusおよびCtenocephalides)、ならびに哺乳動物(例えば、ネコ、イヌおよびウマ)に由来するもの、毒液のアレルゲン(刺咬昆虫(stinging or biting insect)に由来するようなもの、例えば、Hymenopteraの分類学上の目(蜂(Apidae)、スズメバチ(Vespidae)、およびアリ(Formicoidae)が挙げられる)が挙げられる)に由来するものである。

#### 【0153】

いくつかの実施形態において、上記免疫原は、以下から選択される腫瘍抗原である：(a)がん-精巣(cancer-testis)抗原、例えば、NY-ESO-1、SSX2、SCP1ならびにRAGE、BAGE、GAGEおよびMAGEファミリーのポリペプチド(例えば、GAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、およびMAGE-12)、これらは、例えば、黒色腫、肺、頭頸部、NSCLC、乳房、胃腸、および膀胱の腫瘍に対処するために使用され得る；(b)変異した抗原、例えば、p53(種々の固形腫瘍(例えば、結腸直腸がん、肺がん、頭頸部がん)と関連)、p21/Ras(例えば、黒色腫、膵臓がんおよび結腸直腸がんと関連)、CDK4(例えば、黒色腫と関連)、MUM1(例えば、黒色腫と関連)、カスパーゼ-8(例えば、頭頸部がんと関連)、CIA0205(例えば、膀胱がんと関連)、HLA-A2-R1701、-カテニン(例えば、黒色腫と関連)、TCR(例えば、T細胞非ホジキンリンパ腫と関連)、BCR-ab1(例えば、慢性骨髄性白血病と関連)、トリオースホスフェートイソメラーゼ、KIA0205、CDC-27、およびLDLR-FUT；(c)過剰発現された抗原、例えば、ガレクチン4(例えば、結腸直腸がんと関連)、ガレクチン9(例えば、ホジキン病と関連)、プロテインナーゼ3(例えば、慢性骨髄性白血病と関連)、WT1(例えば、種々の白血病と関連)、炭酸脱水酵素(例えば、腎がんに関連)、アルドラーゼA(例えば、肺がんに関連)、PRAME(例えば、黒色腫と関連)、HER-2/neu(例えば、乳がん、結腸がん、肺がんおよび卵巣がんに関連)、マンマグロビン、-フェトプロテイン(例えば、肝がんに関連)、KSA(例えば、結腸直腸がんに関連)、ガストリン(例えば、膵臓がんおよび胃がんに関連)、テロメラーゼ触媒タンパク質、MUC-1(例えば、乳がんおよび卵巣がんに関連)、G-250(例えば、腎細胞がんに関連)、p53(例えば、乳がん、結腸がんに関連)、ならびにがん胎児性抗原(例えば、乳がん、肺がん、および胃腸管のがん(例えば、結腸直腸がん)と関連)；(d)共通抗原(shared antigen)、例えば、黒色腫-メラノサイト分化抗原、例えば、MART-1/MelanA、gp100、MC1R、メラノサイト刺激ホルモンレセプター、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質-1/TRP1およびチロシナーゼ関連タンパク質-2/TRP2(例えば、黒色腫と関連)；(e)前立腺関連抗原(例えば、PAP、PSA、PSMA、PSH-P1、PSM-P1、PSM-P2(例えば、前立腺がんに関連))；(f)イムノグロブリンイディオタイプ(例えば、骨髄腫およびB細胞リンパ腫と関連)。特定の実施形態において、腫瘍免疫原としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：p15、Hom/Mel-40、H-Ras、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、エプスタイン・バー・ウイルス抗原、EBNA、ヒトパピローマウイルス(HPV)抗原(E6およびE7を含む)、B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスの抗原、ヒトTリンパ球向性ウイルス抗原、

#### 【0154】

## 【化 2 0】

TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, ベータ-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90

(Mac-2 結合タンパク質/シクロフィリンC 関連タンパク質)、TAA16、TAG72、TLP、TPS など。

## 【0155】

10

(遺伝子治療)

いくつかの実施形態において、上記RNAは、遺伝子治療の状況において有用であるポリペプチドをコードする。このコードされるタンパク質は、RNAが自己複製する能力に関してコードされる任意のポリペプチドに加えて、提供される。従って、上記RNAは、酵素(例えば、RNAに結合しない酵素)、サイトカイン、膜貫通レセプター、イオンチャネル、ホルモン、血液タンパク質、もしくは抗体をコードし得る。上記RNAは、好ましくは、これらカテゴリーの中のヒトポリペプチドをコードする。

## 【0156】

目的の酵素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ。

20

## 【0157】

目的のサイトカインとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：インターロイキン1；インターロイキン2；インターロイキン4；インターロイキン6；インターロイキン7；インターロイキン12；インターロイキン17；GM-CSF；G-CSF；TNF-；インターフェロン；インターフェロン；インターフェロン；およびセクレトニューリン(secretoneurin)。

## 【0158】

目的のレセプターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：レプチンレセプター；低密度リポタンパク質レセプター；骨形態形成タンパク質タイプ2レセプター；TNFレセプター；ゴナドトロピン放出ホルモンレセプター；ドパミンレセプター；ソマトスタチンレセプター；ビタミンDレセプター；ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーターレセプター；トランスフェリンレセプターなど。

30

## 【0159】

目的のイオンチャネルとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：HCN2；HCN4；CFTR；Maxi-Kチャネルのサブユニット；KCNQ2；KCNQ3；およびKv1.5。

## 【0160】

目的のホルモンとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：絨毛性ゴナドトロピン；コルチコトロピン；エリスロポエチン；グルカゴン；IGF-1；オキシトシン；血小板由来増殖因子；カルシトニン；卵胞刺激ホルモン；黄体形成ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；インスリン；ゴナドトロピン放出ホルモン；バソプレシン；ソマトスタチン；プロラクチン；副腎皮質刺激ホルモン；抗利尿ホルモン；甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン；オクトレオチド；ヒト成長ホルモン；リラキシン；成長ホルモン放出ホルモン；副甲状腺ホルモン；カルシトリオール(calcitriol)；カルシフェロール；心房性ナトリウム利尿ペプチド；ガストリン；セクレチン；コレシストキニン；レプチン；神経ペプチドY；グレリン；アンギオテンシノーゲン；ドパミン；およびトロンボポエチン。ホルモンが、活性に複数のポリペプチドサブユニットを要する場合、上記RNAは、このようなサブユニットのうちの1個以上をコードし得る。例えば、上記RNAは、卵胞刺激ホルモンのサブユニットおよび/もしくはサブユニットをコードし得る。

40

## 【0161】

50

目的の血液タンパク質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ヘモグロビン；フィブリノゲン；第ⅤⅠⅠ因子；第ⅤⅠⅠa因子；第ⅤⅠⅠⅠ因子；第ⅠⅩ因子；フィブリノゲン；トロンビン；フォンビルブラント因子。

#### 【0162】

（薬学的組成物）

本発明のリボソームは、種々の疾患に対して被験体を免疫化するための薬学的組成物中の成分として有用である。これらの組成物は、代表的には、上記リボソームに加えて、薬学的に受容可能なキャリアを含む。薬学的に受容可能なキャリアの詳細な考察は、参考文献31において入手可能である。

#### 【0163】

本発明の薬学的組成物は、1種以上の低分子免疫強化因子を含み得る。例えば、上記組成物は、TLR2アゴニスト（例えば、Pam3CSK4）、TLR4アゴニスト（例えば、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート（例えば、E6020））、TLR7アゴニスト（例えば、イミキモド）、TLR8アゴニスト（例えば、レシキモド）および/もしくはTLR9アゴニスト（例えば、IC31）を含み得る。任意のこのようなアゴニストは、理想的には、分子量<2000Daを有する。いくつかの実施形態において、このようなアゴニストもまた、リボソーム内に上記RNAと共に被包されるが、他の実施形態において、それらは、被包されない。

#### 【0164】

本発明の薬学的組成物は、上記リボソームを、ただの水（plain water）（例えば、w.f.i.）もしくは緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、ホウ酸緩衝液、コハク酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、もしくはクエン酸緩衝液）中に含み得る。緩衝塩は、代表的には、5~20mM範囲において含まれる。

#### 【0165】

本発明の薬学的組成物は、5.0~9.5（例えば、6.0~8.0）のpHを有し得る。

#### 【0166】

本発明の組成物は、張度を与えるために、ナトリウム塩（例えば、塩化ナトリウム）を含み得る。10±2mg/ml NaClの濃度が代表的である（例えば、約9mg/ml）。

#### 【0167】

本発明の組成物は、金属イオンキレート化剤を含み得る。これらは、ホスホジエステル加水分解を加速し得るイオンを除去することによって、RNA安定性を延長し得る。従って、組成物は、EDTA、EGTA、BAPTA、ペンテト酸などのうちの1種以上を含み得る。このようなキレート化剤は、代表的には、10~500μM（例えば、0.1mM）で存在する。クエン酸塩（例えば、クエン酸ナトリウム）はまた、キレート化剤として作用し得るのと同時に、有利なことには、緩衝化活性も提供し得る。

#### 【0168】

本発明の薬学的組成物は、200mOsm/kg~400mOsm/kg（例えば、240~360mOsm/kg、もしくは290~310mOsm/kg）の重量オスモル濃度を有し得る。

#### 【0169】

本発明の薬学的組成物は、1種以上の保存剤（例えば、チオメルサールもしくは2-フェノキシエタノール）を含み得る。水銀非含有組成物が好ましく、保存剤非含有ワクチンが調製され得る。

#### 【0170】

本発明の薬学的組成物は、好ましくは、無菌である。

#### 【0171】

本発明の薬学的組成物は、好ましくは、非発熱性である（例えば、1用量あたり<1 EU（エンドトキシンユニット、標準尺度）、および好ましくは、1用量あたり<0.1

10

20

30

40

50

E Uを含む)。

【0172】

本発明の薬学的組成物は、好ましくは、グルテンを含まない。

【0173】

本発明の薬学的組成物は、単位用量形態において調製され得る。いくつかの実施形態において、単位用量は、0.1 ~ 1.0 ml (例えば、約0.5 ml)の容積を有し得る。

【0174】

上記組成物は、注射物として調製され得る(溶液もしくは懸濁物のいずれかとして)。上記組成物は、微細スプレーを使用する、肺投与(例えば、吸入器による)のために調製され得る。上記組成物は、鼻、耳もしくは眼への投与(例えば、スプレーもしくは滴剤として)のために調製され得る。筋肉内投与のための注射物が、代表的である。

10

【0175】

組成物は、免疫学的に有効量のリポソーム、ならびに任意の他の成分(必要であれば)を含む。「免疫学的に有効な量」とは、個体への投与量が、単一用量においてもしくはシリーズのうちの一部としてのいずれかで、処置もしくは予防に有効であることを意味する。この量は、処置されるべき個体の健康状態および身体的状態、処置されるべき個体の年齢、分類学上の群(例えば、非ヒト霊長類、霊長類など)、上記個体が抗体を合成する免疫系の能力、所望される防御の程度、ワクチンの処方、その処置している医師の医学的状況の評価、および他の関連因子に依存して変動する。上記量は、慣用的な治験を通じて決定され得る比較的広い範囲に入ると予測される。本発明の組成物のリポソームおよびRNA含有量は、一般に、1用量あたりのRNAの量に関して表される。好ましい用量は、100 µg RNA (例えば、10 ~ 100 µg (例えば、約10 µg、25 µg、50 µg、75 µg もしくは100 µg))を有するが、発現は、遙かに低いレベル、例えば、1 µg / 用量、100 ng / 用量、10 ng / 用量、1 ng / 用量などにおいてみられ得る。

20

【0176】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物を含む送達デバイス(例えば、シリンジ、ネブライザ、噴霧器、吸入器、皮膚パッチなど)を提供する。このデバイスは、上記組成物を脊椎動物被験体に投与するために使用され得る。

【0177】

本発明のリポソームは、リポソームを含まない。

30

【0178】

(処置方法および医学的使用)

参考文献12において開示される粒子とは対照的に、本発明のリポソームおよび薬学的組成物は、目的の免疫原に対する免疫応答を誘発するために、もしくは遺伝子治療のために、インビボでの使用に関する。

【0179】

本発明は、脊椎動物における免疫応答を惹起するための方法を提供し、上記方法は、本発明のリポソームもしくは薬学的組成物の有効量を投与する工程を包含する。上記免疫応答は、好ましくは、防御的であり、好ましくは、抗体および/もしくは細胞媒介性免疫を伴う。上記方法は、ブースター応答を惹起し得る。

40

【0180】

本発明はまた、脊椎動物における免疫応答を惹起するための方法において使用するための、本発明のリポソームもしくは薬学的組成物を提供する。

【0181】

本発明はまた、脊椎動物における遺伝子治療の方法において使用するための、本発明のリポソームもしくは薬学的組成物を提供する。

【0182】

本発明はまた、脊椎動物における免疫応答を惹起するための医薬の製造における本発明のリポソームの使用を提供する。

50

## 【0183】

これら使用および方法により上記脊椎動物における免疫応答を惹起することによって、上記脊椎動物は、上記で考察されるように、種々の疾患および／もしくは感染から（例えば、細菌疾患および／もしくはウイルス疾患から）防御され得る。上記リポソームおよび組成物は、免疫原性であり、より好ましくは、ワクチン組成物である。本発明に従うワクチンは、予防的である（すなわち、感染を妨ぐ）か、もしくは治療的である（すなわち、感染を処置する）のいずれかであり得るが、代表的には、予防的である。

## 【0184】

上記脊椎動物は、好ましくは、哺乳動物、例えば、ヒトもしくは大型の獣医学的哺乳動物（例えば、ウマ、ウシ、シカ、ヤギ、ブタ）である。上記ワクチンが予防的使用のためのものである場合、上記ヒトは、好ましくは、小児（例えば、幼児もしくは乳児）またはティーンエイジャーである；上記ワクチンが治療的使用のためのものである場合、上記ヒトは、好ましくは、ティーンエイジャーもしくは成人である。小児用に意図されたワクチンはまた、例えば、安全性、投与量、免疫原性などを評価するために、成人に投与され得る。

## 【0185】

本発明に従って調製されるワクチンは、小児および成人の両方を処置するために使用され得る。従って、ヒト患者は、1歳未満、5歳未満、1～5歳、5～15歳、15～55歳、もしくは少なくとも55歳であってもよい。上記ワクチンを受けるのに好ましい患者は、高齢者（例えば、50歳、60歳、および好ましくは、65歳）、若年者（例えば、5歳）、入院患者、ヘルスケアワーカー、軍従事者、および軍職員、妊婦、慢性疾患患者、もしくは免疫不全患者である。しかし、上記ワクチンは、これらの群にのみ適切であるわけではなく、より一般に、集団において使用され得る。

## 【0186】

本発明の組成物は、一般に、患者に直接投与される。直接送達は、非経口注射によって達成され得る（例えば、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮内、もしくは組織の間隙空間に；参考文献1とは異なり、舌内（*intraglossal*）注射は、代表的には、本発明で使用されない）。代替の送達経路としては、直腸、経口（例えば、錠剤、スプレー）、口内、舌下、膣、局所、経真皮（*transdermal*）もしくは経皮（*transcutaneous*）、鼻内、眼、耳、肺もしくは他の粘膜投与が挙げられる。皮内および筋肉内投与は、2つの好ましい経路である。注射は、針を介してであってもよい（例えば、皮下針）が、針なしの注射が、代わりに使用され得る。代表的な筋肉内用量は、0.5 ml である。

## 【0187】

本発明は、全身免疫および／もしくは粘膜免疫を誘発するために、好ましくは、増強された全身免疫および／もしくは粘膜免疫を誘発するために、使用され得る。

## 【0188】

投与量は、単一用量スケジュールもしくは複数用量スケジュールによってであり得る。複数用量は、一次免疫スケジュールにおいて、および／もしくはブースター免疫スケジュールにおいて使用され得る。複数用量スケジュールにおいて、種々の用量が、同じ経路もしくは異なる経路（例えば、非経口の一次と粘膜のブースト、粘膜の一次と非経口のブーストなど）によって与えられ得る。複数用量は、代表的には、少なくとも1週間間隔を空けて（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間など）投与される。一実施形態において、複数用量は、生後約6週間、10週間、および14週間で（例えば、世界保健機関の *Expanded Program on Immunisation*（「EPI」）においてしばしば使用されるように、6週齢、10週齢および14週齢において）投与され得る。代替の実施形態において、2回の一次用量が、約2ヶ月間隔を空けて（例えば、約7週間、8週間もしくは9週間間隔を空けて）投与され、続いて、1回以上のブースター用量が、2回目の一次用量の約6ヶ月から1年後に（例えば、2回目の一次用量の約6ヶ月後、8ヶ月後、10ヶ月後

もしくは12ヶ月後)投与される。さらなる実施形態において、3回の一次用量が、約2ヶ月間間隔を空けて(例えば、約7週間、8週間もしくは9週間間隔を空けて)投与され、続いて、1回以上のブースター用量が、3回目の一次用量の約6ヶ月後から1年後に(例えば、3回目の一次用量の約6ヶ月後、8ヶ月後、10ヶ月後もしくは12ヶ月後)投与される。

【0189】

(化学用語および定義)

(ハロ)

用語「ハロゲン」(もしくは「ハロ」)は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素を含む。

【0190】

(アルキル、アルキレン、アルケニル、アルキニル、シクロアルキルなど)

用語「アルキル」、「アルキレン」、「アルケニル」および「アルキニル」とは、直鎖および分枝鎖の両方の非環式形態に言及するために本明細書で使用される。その環式類似体は、シクロアルキルなどといわれる。

【0191】

用語「アルキル」は、一価の直鎖状もしくは分枝状の、飽和非環式ヒドロカルビル基を含む。一実施形態において、アルキルは、 $C_{1-10}$ アルキルであり、別の実施形態において、 $C_{1-6}$ アルキルであり、別の実施形態において、 $C_{1-4}$ アルキル(例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピルもしくは*t*-ブチル基)である。

【0192】

用語「シクロアルキル」は、一価で飽和の環式ヒドロカルビル基を含む。一実施形態において、シクロアルキルは、 $C_{3-10}$ シクロアルキルであり、別の実施形態において、 $C_{3-6}$ シクロアルキル(例えば、シクロペンチルおよびシクロヘキシル)である。

【0193】

用語「アルコキシ」は、アルキル-O-を意味する。

【0194】

用語「アルケニル」は、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有し、そして一実施形態において、炭素-炭素三重結合を有さない、一価で、直鎖状もしくは分枝状の、不飽和の非環式ヒドロカルビル基を含む。一実施形態において、アルケニルは、 $C_{2-10}$ アルケニルであり、別の実施形態において、 $C_{2-6}$ アルケニルであり、別の実施形態において、 $C_{2-4}$ アルケニルである。

【0195】

用語「シクロアルケニル」は、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有し、そして一実施形態において、炭素-炭素三重結合を有さない、一価の、部分不飽和の環式ヒドロカルビル基を含む。一実施形態において、シクロアルケニルは、 $C_{3-10}$ シクロアルケニルであり、別の実施形態において、 $C_{5-10}$ シクロアルケニル(例えば、シクロヘキセニルもしくはベンゾシクロヘキシル)である。

【0196】

用語「アルキニル」は、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有し、そして一実施形態において、炭素-炭素二重結合を有さない、一価の、直鎖状もしくは分枝状の、不飽和の非環式ヒドロカルビル基を含む。一実施形態において、アルキニルは、 $C_{2-10}$ アルキニルであり、別の実施形態において、 $C_{2-6}$ アルキニルであり、別の実施形態において、 $C_{2-4}$ アルキニルである。

【0197】

用語「シクロアルキニル」は、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有し、そして一実施形態において、炭素-炭素二重結合を有さない、一価の、部分不飽和の環式ヒドロカルビル基を含む。一実施形態において、シクロアルキニルは、 $C_{3-10}$ シクロアルケニルであり、別の実施形態において、 $C_{5-10}$ シクロアルキニルである。

【0198】

用語「アルキレン」は、二価の、直鎖状もしくは分枝状の、飽和非環式ヒドロカルビル

10

20

30

40

50

基を含む。一実施形態において、アルキレンは、 $C_{1-10}$ アルキレンであり、別の実施形態において、 $C_{1-6}$ アルキレンであり、別の実施形態において、 $C_{1-4}$ アルキレン（例えば、メチレン、エチレン、*n*-プロピレン、*i*-プロピレンもしくは*t*-ブチレン基）である。

#### 【0199】

用語「アルケニレン」は、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有し、そして一実施形態において、炭素-炭素三重結合を有さない、二価の、直鎖状もしくは分枝状の、不飽和非環式ヒドロカルビル基を含む。一実施形態において、アルケニレンは、 $C_{2-10}$ アルケニレンであり、別の実施形態において、 $C_{2-6}$ アルケニレンであり、別の実施形態において、 $C_{2-4}$ アルケニレンである。

10

#### 【0200】

用語「アルキニレン」は、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有し、そして一実施形態において、炭素-炭素二重結合を有さない、二価の、直鎖状もしくは分枝状の不飽和非環式ヒドロカルビル基を含む。一実施形態において、アルキニレンは、 $C_{2-10}$ アルキニレンであり、別の実施形態において、 $C_{2-6}$ アルキニレンであり、別の実施形態において、 $C_{2-4}$ アルキニレンである。

#### 【0201】

（ヘテロアルキルなど）

用語「ヘテロアルキル」は、最大6個までの炭素原子、一実施形態においては、最大5個までの炭素原子、別の実施形態においては、最大4個までの炭素原子、別の実施形態においては、最大3個までの炭素原子、別の実施形態においては、最大2個までの炭素原子、別の実施形態においては、1個の炭素原子が、 $O$ 、 $S(O)_q$ 、 $N$ 、 $P(O)_r$ もしくは $Si$ （そして好ましくは、 $O$ 、 $S(O)_q$ もしくは $N$ ）で独立して各々置換されているが、アルキル炭素原子のうちの少なくとも1個は残っている、アルキル基を含む。上記ヘテロアルキル基は、 $C$ 連結もしくはヘテロ連結され得る。すなわち、上記ヘテロアルキル基は、炭素原子を介して、または $O$ 、 $S(O)_q$ 、 $N$ 、 $P(O)_r$ もしくは $Si$ を介して、分子の残りに連結され得る。

20

#### 【0202】

用語「ヘテロシクロアルキル」は、最大6個までの炭素原子、一実施形態においては、最大5個までの炭素原子、別の実施形態においては、最大4個までの炭素原子、別の実施形態においては、最大3個までの炭素原子、別の実施形態においては、最大2個までの炭素原子、別の実施形態においては、1個の炭素原子が、 $O$ 、 $S(O)_q$ もしくは $N$ で各々独立して置換されているが、シクロアルキル炭素原子のうちの少なくとも1個は残っている、シクロアルキル基を含む。ヘテロシクロアルキル基の例としては、以下が挙げられる：オキシラニル、チアラニル、アジリジニル、オキセタニル、チアタニル、アゼチジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフェニル、ピロリジニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジニル、1,4-ジオキサニル、1,4-オキサチアニル、モルホリニル、1,4-ジチアニル、ピペラジニル、1,4-アザチアニル、オキセパニル、チエパニル、アゼパニル、1,4-ジオキセパニル、1,4-オキサチエパニル、1,4-オキサアゼパニル、1,4-ジチエパニル、1,4-チエアゼパニルおよび1,4-ジアゼパニル。上記ヘテロシクロアルキル基は、 $C$ 連結されてもよいし、 $N$ 連結されてもよい。すなわち、上記ヘテロシクロアルキル基は、炭素原子を介して、もしくは窒素原子を介して、分子の残りに連結され得る。

30

40

#### 【0203】

用語「ヘテロアルケニル」は、最大3個までの炭素原子、一実施形態においては、最大2個までの炭素原子、別の実施形態においては、1個の炭素原子が、 $O$ 、 $S(O)_q$ もしくは $N$ で各々独立して置換されているが、アルケニル炭素原子のうちの少なくとも1個は残っている、アルケニル基を含む。上記ヘテロアルケニル基は、 $C$ 連結されてもよいし、ヘテロ連結されてもよい。すなわち、上記ヘテロアルケニル基は、炭素原子を介して、または $O$ 、 $S(O)_q$ もしくは $N$ を介して、分子の残りに連結され得る。

50



## 【0204】

用語「ヘテロシクロアルケニル」は、最大3個までの炭素原子、一実施形態においては、最大2個までの炭素原子、別の実施形態においては、1個の炭素原子が、O、S(O)<sub>q</sub>もしくはNで各々独立して置換されているが、シクロアルケニル炭素原子のうちの少なくとも1個は残っている、シクロアルケニル基を含む。ヘテロシクロアルケニル基の例としては、以下が挙げられる：3,4-ジヒドロ-2H-ピラニル、5-6-ジヒドロ-2H-ピラニル、2H-ピラニル、1,2,3,4-テトラヒドロピリジニルおよび1,2,5,6-テトラヒドロピリジニル。上記ヘテロシクロアルケニル基は、C連結されてもよいし、N連結されてもよい。すなわち、上記ヘテロシクロアルケニル基は、炭素原子を介して、もしくは窒素原子を介して、分子の残りに連結され得る。

10

## 【0205】

用語「ヘテロアルキニル」は、最大3個までの炭素原子、一実施形態においては、最大2個までの炭素原子、別の実施形態においては、1個の炭素原子が、O、S(O)<sub>q</sub>もしくはNで各々独立して置換されているが、アルキニル炭素原子のうちの少なくとも1個は残っている、アルキニル基を含む。上記ヘテロアルキニル基は、C連結されてもよいし、ヘテロ連結されてもよい。すなわち、上記ヘテロアルキニル基は、炭素原子を介して、またはO、S(O)<sub>q</sub>もしくはNを介して、分子の残りに連結され得る。

## 【0206】

用語「ヘテロシクロアルキニル」は、最大3個までの炭素原子、一実施形態においては、最大2個までの炭素原子、別の実施形態においては、1個の炭素原子が、O、S(O)<sub>q</sub>もしくはNで各々独立して置換されているが、シクロアルキニル炭素原子のうちの少なくとも1個は残っている、シクロアルキニル基を含む。上記ヘテロシクロアルケニル基は、C連結されてもよいし、N連結されてもよい。すなわち、上記ヘテロシクロアルケニル基は、炭素原子を介して、もしくは窒素原子を介して、分子の残りに連結され得る。

20

## 【0207】

用語「ヘテロアルキレン」は、最大3個までの炭素原子、一実施形態において、最大2個までの炭素原子、別の実施形態において、1個の炭素原子が、O、S(O)<sub>q</sub>もしくはNで各々独立して置換されているが、アルキレン炭素原子のうちの少なくとも1個は残っている、アルキレン基を含む。

## 【0208】

用語「ヘテロアルケニレン」は、最大3個までの炭素原子、一実施形態においては、最大2個までの炭素原子、別の実施形態においては、1個の炭素原子が、O、S(O)<sub>q</sub>もしくはNで各々独立して置換されているが、アルケニレン炭素原子のうちの少なくとも1個は残っている、アルケニレン基を含む。

30

## 【0209】

用語「ヘテロアルキニレン」は、最大3個までの炭素原子、一実施形態においては、最大2個までの炭素原子、別の実施形態においては、1個の炭素原子が、O、S(O)<sub>q</sub>もしくはNで各々独立して置換されているが、アルキニレン炭素原子のうちの少なくとも1個は残っている、アルキニレン基を含む。

## 【0210】

(アリール)

用語「アリール」は、一価の芳香族環式ヒドロカルビル基（例えば、フェニルもしくはナフチル（例えば、1-ナフチルもしくは2-ナフチル））を含む。一般に、上記アリール基は、単環式もしくは多環式の縮合環芳香族基であり得る。好ましいアリールは、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アリールである。

40

## 【0211】

アリール基の他の例は、アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、クリセン、コロネン、フルオランテン、フルオレン、a s - インダセン、s - インダセン、インデン、ナフタレン、オバレン、ペリレン、フェナレン、フェナントレン、ピセン、プレイアデン、ピレン、ピラントレンおよびルピセンの一価誘

50

導体である。

【0212】

用語「アリーールアルキル」は、アリーール基（例えば、ベンジル）で置換されたアルキルを意味する。

【0213】

用語「アリーレン」は、二価の芳香族環式ヒドロカルビル基（例えば、フェニレン）を含む。一般に、上記アリーレン基は、単環式もしくは多環式の縮合環芳香族基であり得る。好ましいアリーレンは、 $C_6 - C_{14}$ アリーレンである。アリーレン基の他の例は、アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、クリセン、コロネン、フルオランテン、フルオレン、 $as$ -インダセン、 $s$ -インダセン、インデン、ナフタレン、オパレン、ペリレン、フェナレン、フェナントレン、ピセン、ブレイアデン、ピレン、ピラントレンおよびルビセンの二価誘導体である。

10

【0214】

（ヘテロアリーール）

用語「ヘテロアリーール」は、 $O$ 、 $S$ 、 $N$ および $NR^N$ から独立して選択される1個以上のヘテロ原子を追加的に含む、一価ヘテロ芳香族の環式ヒドロカルビル基であって、ここで $R^N$ は、以下に定義される（および一実施形態においては、 $H$ もしくはアルキル（例えば、 $C_{1-6}$ アルキル）である）。

【0215】

一般に、上記ヘテロアリーール基は、単環式もしくは多環式（例えば、二環式）縮合環ヘテロ芳香族基であり得る。一実施形態において、ヘテロアリーール基は、5～13個の環員（好ましくは、5～10員）、ならびに $O$ 、 $S$ 、 $N$ および $NR^N$ から独立して選択される1個、2個、3個もしくは4個の環ヘテロ原子を含む。一実施形態において、ヘテロアリーール基は、5員、6員、9員もしくは10員、例えば、5員の単環式、6員の単環式、9員の縮合二環式環もしくは10員の縮合二環式環であり得る。

20

【0216】

単環式ヘテロ芳香族基は、5～6環員、ならびに $O$ 、 $S$ 、 $N$ もしくは $NR^N$ から選択される1個、2個、3個もしくは4個のヘテロ原子を含むヘテロ芳香族基を包含する。

【0217】

一実施形態において、5員の単環式ヘテロアリーール基は、 $-NR^N-$ 基、 $-O-$ 原子もしくは $-S-$ 原子である1個の環員、および必要に応じて、 $=N-$ 原子である1～3個の環員（例えば、1個もしくは2個の環員）を含む（ここで上記5個の環員のうちの残りは、炭素原子である）。

30

【0218】

5員の単環式ヘテロアリーール基の例は、ピロリル、フラニル、チオフェニル、ピラゾリル、イミダゾリル、イソオキサゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1,2,3-オキサジアゾリル、1,2,4-オキサジアゾリル、1,2,5-オキサジアゾリル、1,3,4-オキサジアゾリル、1,3,4-チアジアゾリル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、1,3,5-トリアジニル、1,2,4-トリアジニル、1,2,3-トリアジニルおよびテトラゾリルである。

40

【0219】

6員の単環式ヘテロアリーール基の例は、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニルおよびピラジニルである。

【0220】

一実施形態において、6員の単環式ヘテロアリーール基は、 $=N-$ 原子である1個もしくは2個の環員を含む（ここで上記6個の環員のうちの残りは、炭素原子である）。

【0221】

二環式のヘテロ芳香族基としては、9～13個の環員および $O$ 、 $S$ 、 $N$ もしくは $NR^N$ から選択される1個、2個、3個もしくは4個以上のヘテロ原子を含む縮合環のヘテロ芳

50

香族基が挙げられる。

【0222】

一実施形態において、9員の二環式ヘテロアリール基は、 $-NR^N$ -基、 $-O$ -原子もしくは $-S$ -原子である1個の環員、および必要に応じて、 $=N$ -原子である1～3個の環員（例えば、1個もしくは2個の環員）を含む（ここで上記9個の環員のうちの残りは、炭素原子である）。

【0223】

9員の縮合環の二環式ヘテロアリール基の例は、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、インドリル、ベンゾイミダゾリル、インダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ピロロ[2, 3-b]ピリジニル、ピロロ[2, 3-c]ピリジニル、ピロロ[3, 2-c]ピリジニル、ピロロ[3, 2-b]ピリジニル、イミダゾ[4, 5-b]ピリジニル、イミダゾ[4, 5-c]ピリジニル、ピラゾロ[4, 3-d]ピリジニル、ピラゾロ[4, 3-c]ピリジニル、ピラゾロ[3, 4-c]ピリジニル、ピラゾロ[3, 4-b]ピリジニル、イソインドリル、インダゾリル、プリニル、インドリニル、イミダゾ[1, 2-a]ピリジニル、イミダゾ[1, 5-a]ピリジニル、ピラゾロ[1, 2-a]ピリジニル、ピロロ[1, 2-b]ピリダジニルおよびイミダゾ[1, 2-c]ピリミジニルである。

【0224】

一実施形態において、10員の二環式ヘテロアリール基は、 $=N$ -原子である1～3個の環員を含む（ここで上記10個の環員のうちの残りは、炭素原子である）。

【0225】

10員の縮合環の二環式ヘテロアリール基の例は、キノリニル、イソキノリニル、シンノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、フタラジニル、1, 6-ナフチリジニル、1, 7-ナフチリジニル、1, 8-ナフチリジニル、1, 5-ナフチリジニル、2, 6-ナフチリジニル、2, 7-ナフチリジニル、ピリド[3, 2-d]ピリミジニル、ピリド[4, 3-d]ピリミジニル、ピリド[3, 4-d]ピリミジニル、ピリド[2, 3-d]ピリミジニル、ピリド[2, 3-b]ピラジニル、ピリド[3, 4-b]ピラジニル、ピリミド[5, 4-d]ピリミジニル、ピラジノ[2, 3-b]ピラジニルおよびピリミド[4, 5-d]ピリミジニルである。

【0226】

用語「ヘテロアリールアルキル」とは、ヘテロアリール基で置換されたアルキルを意味する。

【0227】

用語「ヘテロアリーレン」は、 $O$ 、 $S$ 、 $N$ および $NR^N$ から独立して選択される1個以上のヘテロ原子を追加的に含む、二価のヘテロ芳香族の環式ヒドロカルビル基を含み、ここで $R^N$ は、以下で定義される（および一実施形態においては、 $H$ もしくはアルキル（例えば、 $C_1 - C_6$ アルキル）である）。一般に、上記ヘテロアリーレン基は、単環式もしくは多環式（例えば、二環式）縮合環ヘテロ芳香族基であり得る。一実施形態において、ヘテロアリーレン基は、5～13個の環員（好ましくは、5～10員）、ならびに $O$ 、 $S$ 、 $N$ および $NR^N$ から独立して選択される1個、2個、3個もしくは4個の環ヘテロ原子を含む。一実施形態において、ヘテロアリーレン基は、5員、6員、9員もしくは10員、例えば、5員の単環式、6員の単環式、9員の縮合環二環式もしくは10員の縮合環二環式であり得る。用語「ヘテロアリーレン」は、上記で考察されるヘテロアリール基の各々の二価の誘導体を含む。

【0228】

用語「アリール」、「芳香族」、「ヘテロアリール」および「ヘテロ芳香族」はまた、部分的に還元されている基を含む。従って、例えば、「ヘテロアリール」は、環のうちの1個が、飽和環へと還元された縮合種（例えば、1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1, 8-ナフチリジン-2-イル）を含む。

【0229】

（存在しない基）

式 (I) 中の基 a、b もしくは c が「存在しない」場合、単結合が代わりに存在すること、すなわち、基 a、b もしくは c のうちのいずれかの側にある 2 個の基が、互いに直接結合されることを意味する。

【0230】

(一般)

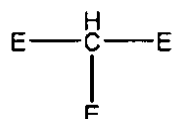
別段明示的に示されなければ、基の組み合わせが、1 個の部分として本明細書で言及される場合 (例えば、アリアルキル)、その最後に言及される基は、上記部分を分子の残りに結合する原子を含む。

【0231】

O、S(O)<sub>q</sub>、N もしくは P(O)<sub>r</sub> で置換されているアルキル基もしくは他の基の炭素原子に対して言及がなされる場合、

【0232】

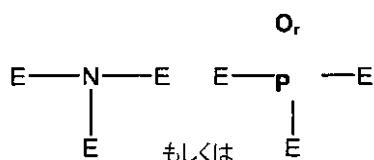
【化21】



が、

【0233】

【化22】



(ここで E は、H ではない場合がある)

によって置換されているか；

-CH= が、-N= もしくは -P(O)<sub>r</sub>= によって置換されているか；

C-H が、N もしくは P(O)<sub>r</sub> によって置換されているか；または

-CH<sub>2</sub>- が、-O-、-S(O)<sub>q</sub>-、-NR<sup>N</sup>- もしくは -P(O)<sub>r</sub>R<sup>N</sup>- によって置換されていることが意図され、ここで R<sup>N</sup> は、H、あるいは必要に応じて置換された、C<sub>1-6</sub> アルキル、C<sub>1-6</sub> ヘテロアルキル、C<sub>3-6</sub> シクロアルキル、C<sub>3-6</sub> ヘテロシクロアルキル、C<sub>2-6</sub> アルケニル、C<sub>2-6</sub> ヘテロアルケニル、C<sub>3-6</sub> シクロアルケニル、C<sub>3-6</sub> ヘテロシクロアルケニル、フェニル、または 5 個もしくは 6 個の環員を含むヘテロアリアルである。R<sup>N</sup> は、好ましくは、H、C<sub>1-6</sub> アルキルもしくは C<sub>3-6</sub> シクロアルキルである。

【0234】

q は、独立して、0、1 もしくは 2 である。一実施形態において、q は、0 である。

【0235】

r は、独立して、0 もしくは 1 である。一実施形態において、r は、0 である。

【0236】

Si で置換されている炭素原子に対して言及がなされる場合、上記炭素原子が、ケイ素原子で交換されているが、他の点で、結合は同じままであることが意図される。従って、例えば、-CH<sub>2</sub>- は、-SiH<sub>2</sub>- で置換され；-CH= は、-SiH= で置換され；そして C-H は、Si-H で置換される。

【0237】

明瞭にするために、上記のヘテロ原子含有基 (例えば、ヘテロアルキルなど) に関して、炭素原子の数が与えられる場合 (例えば、C<sub>3-6</sub> ヘテロアルキル)、3 ~ 6 個の鎖炭素原子のうちの 1 個以上が、O、S(O)<sub>q</sub> もしくは N で置換されている C<sub>3-6</sub> アルキルに基づく基が意図される。よって、C<sub>3-6</sub> ヘテロアルキル基は、例えば、3 ~ 6 個末

10

20

30

40

50

満の鎖炭素原子を含む。別の例として、ピリジル基は、これが5個の炭素原子を含むとしても、 $C_6$ ヘテロアリール基として分類される。

#### 【0238】

(置換)

本発明の化合物の基(例えば、アルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アルケニル、シクロアルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、ヘテロアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロシクロアルケニル、ヘテロアルキニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンアリール、アリールアルキル、アリールヘテロアルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキルもしくはヘテロアリールヘテロアルキル基など)は、置換されていてもよいし、置換されていなくてもよく、一実施形態においては、置換されていない。代表的には、置換は、置換基での水素原子の観念上の置換(もしくは $=O$ による置換の場合には、2個の水素原子)を含む。

10

#### 【0239】

置換される場合、一般に、各基には、1~5個の置換基が存在し、一実施形態においては、1~3個の置換基、一実施形態においては、1個もしくは2個の置換基、一実施形態においては、1個の置換基が存在する。一実施形態は、同じ原子上に1個超の置換基を含む(例えば、アセタール基)。

#### 【0240】

一実施形態において、上記置換基は、独立して、 $Sub^1$ もしくは $Sub^2$ (一実施形態においては、 $Sub^2$ )であり、ここで：

20

$Sub^1$ は、独立して、ハロゲン、トリハロメチル、トリハロエチル、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-N^+(R^S)_2O^-$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R^S$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SOR^S$ 、 $-SO_2R^S$ 、 $-SO_3R^S$ 、 $-OC(=O)OR^S$ 、 $-C(=O)H$ 、 $-C(=O)R^S$ 、 $-OC(=O)R^S$ 、 $=O$ 、 $-NR^S_2$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)NR^S_2$ 、 $-N(R^S)C(=O)OR^S$ 、 $-N(R^S)C(=O)NR^S_2$ 、 $-OC(=O)NR^S_2$ 、 $-N(R^S)C(=O)R^S$ 、 $-C(=S)NR^S_2$ 、 $-NR^SC(=S)R^S$ 、 $-SO_2NR^S_2$ 、 $-NR^SSO_2R^S$ 、 $-N(R^S)C(=S)NR^S_2$ 、 $-N(R^S)SO_2NR^S_2$ 、 $-R^S$ もしくは $-Z^SR^S$ であり、ここで；

$Z^S$ は、独立して、 $O$ 、 $S$ もしくは $NR^S$ であり；

$R^S$ は、独立して、 $H$ 、または $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $-(Alk^a)_f$ 、 $-C_{3-6}$ シクロアルキル、 $-(Alk^a)_f$ 、 $-C_{3-6}$ ヘテロシクロアルキル、 $C_{2-6}$ アルケニル、 $C_{2-6}$ ヘテロアルケニル、 $-(Alk^a)_f$ 、 $-C_{3-6}$ シクロアルケニル、 $-(Alk^a)_f$ 、 $-C_{3-6}$ ヘテロシクロアルケニル、 $C_{2-6}$ アルキニル、 $C_{2-6}$ ヘテロアルキニル、 $-(Alk^a)_f$ 、 $-C_{6-14}$ アリール、 $-(Alk^a)_f$ 、 $-C_{6-14}$ アリールもしくは $-(Alk^a)_f$ ヘテロアリール(ここでヘテロアリールは、5~13個の環員を含む)であり、ここで

30

$f$ は、0もしくは1であり；

$Alk^a$ は、 $C_{1-6}$ アルキレンもしくは $C_{1-6}$ ヘテロアルキレンであり；そして

$R^S$ は、1~3個の置換基 $Sub^2$ によってそれ自体が必要に応じて置換され(一実施形態においては、置換されていない)；

40

$Sub^2$ は、独立して、ハロゲン、トリハロメチル、トリハロエチル、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-N^+(C_{1-6}アルキル)_2O^-$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2C_{1-6}アルキル$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SOC_{1-6}アルキル$ 、 $-SO_2C_{1-6}アルキル$ 、 $-SO_3C_{1-6}アルキル$ 、 $-OC(=O)OC_{1-6}アルキル$ 、 $-C(=O)H$ 、 $-C(=O)C_{1-6}アルキル$ 、 $-OC(=O)C_{1-6}アルキル$ 、 $=O$ 、 $-N(C_{1-6}アルキル)_2$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-C(=O)N(C_{1-6}アルキル)_2$ 、 $-N(C_{1-6}アルキル)C(=O)O(C_{1-6}アルキル)$ 、 $-N(C_{1-6}アルキル)C(=O)N(C_{1-6}アルキル)_2$ 、 $-OC(=O)N(C_{1-6}アルキル)_2$ 、 $-N(C_{1-6}アルキル)C(=O)C_{1-6}アルキル$ 、 $-C(=S)N(C_{1-6}アルキル)_2$ 、 $-N(C_{1-6}アルキル)C(=S)C_{1-6}アルキル$ 、 $-SO_2N(C_{1-6}アルキル)_2$ 、 $-N(C_{1-6}アル$

50

キル)  $\text{SO}_2\text{C}_{1-6}$  アルキル、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ アルキル})\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ アルキル})_2$ 、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ アルキル})\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ アルキル})_2$ 、 $-\text{C}_{1-6}$  アルキル、 $-\text{C}_{1-6}$  ヘテロアルキル、 $-\text{C}_{3-6}$  シクロアルキル、 $-\text{C}_{3-6}$  ヘテロシクロアルキル、 $-\text{C}_{2-6}$  アルケニル、 $-\text{C}_{2-6}$  ヘテロアルケニル、 $-\text{C}_{3-6}$  シクロアルケニル、 $-\text{C}_{3-6}$  ヘテロシクロアルケニル、 $-\text{C}_{2-6}$  アルキニル、 $-\text{C}_{2-6}$  ヘテロアルキニル、 $-\text{C}_{6-14}$  アリール、 $-\text{C}_{5-13}$  ヘテロアリール、 $-\text{Z}^t - \text{C}_{1-6}$  アルキル、 $-\text{Z}^t - \text{C}_{3-6}$  シクロアルキル、 $-\text{Z}^t - \text{C}_{2-6}$  アルケニル、 $-\text{Z}^t - \text{C}_{3-6}$  シクロアルケニル、もしくは  $-\text{Z}^t - \text{C}_{2-6}$  アルキニルであり；そして  $\text{Z}^t$  は、独立して、O、S、NH もしくは  $\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ アルキル})$  である。

#### 【0241】

$\text{Sub}^1$  における  $\text{R}^s$  は、1 ~ 3 個の置換基  $\text{Sub}^2$  によって必要に応じて置換され得る一方、 $\text{Sub}^2$  は、置換されない。しかし、一実施形態において、 $\text{R}^s$  は、置換されない。

#### 【0242】

一実施形態において、 $\text{R}^s$  は、H もしくは  $\text{C}_{1-6}$  アルキル (1 ~ 3 個の置換基  $\text{Sub}^2$  で必要に応じて置換される) である。

#### 【0243】

一実施形態において、 $\text{Sub}^2$  は、独立して、ハロゲン、トリハロメチル、トリハロエチル、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}^+(\text{C}_{1-6} \text{ アルキル})_2\text{O}^-$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SOC}_{1-6}$  アルキル、 $-\text{SO}_2\text{C}_{1-6}$  アルキル、 $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-6}$  アルキル、 $=\text{O}$ 、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ アルキル})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}_{1-6}$  アルキル、 $-\text{C}_{3-6}$  シクロアルキル、 $-\text{C}_{3-6}$  ヘテロシクロアルキル、 $-\text{Z}^t - \text{C}_{1-6}$  アルキル もしくは  $-\text{Z}^t - \text{C}_{3-6}$  シクロアルキル である。

#### 【0244】

一実施形態において、置換される基が非環式 (例えば、アルキル、ヘテロアルキル、アルケニル など) である場合、 $\text{Sub}^1$  は、 $-\text{R}^s$  ではなく、 $\text{Sub}^2$  は、 $-\text{C}_{1-6}$  アルキル、 $-\text{C}_{1-6}$  ヘテロアルキル、 $-\text{C}_{2-6}$  アルケニル、 $-\text{C}_{2-6}$  ヘテロアルケニル、 $-\text{C}_{2-6}$  アルキニル、 $-\text{C}_{2-6}$  ヘテロアルキニル ではない。

#### 【0245】

$\text{Sub}^2$  以外の基が、置換されてもよい少なくとも 2 個の位置を有する場合、上記基は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレン もしくは ヘテロアルキニレン 鎖 (一実施形態において、1 ~ 6 個の原子、さらなる実施形態においては、3 ~ 6 個の原子、およびさらなる実施形態においては、3 個もしくは 4 個の原子を含む) の両方の末端によって置換されて、環式部分を形成してもよい。その鎖は、1 ~ 3 個の置換基  $\text{Sub}^2$  で必要に応じて置換される。一実施形態において、その鎖は、置換されない。従って、用語、必要に応じて置換された、「シクロアルキル」、「シクロアルケニル」、「シクロアルキニル」、「ヘテロシクロアルキル」、「ヘテロシクロアルケニル」、「ヘテロシクロアルキニル」、「アリール」および「ヘテロアリール」は、縮合種を含む。例えば、「必要に応じて置換されたシクロアルキル」は、2 個のシクロアルキル環が縮合している種を含み、「必要に応じて置換されたヘテロアリール」は、ヘテロシクロアルキル環が上記芳香族環に縮合されている種を含む (例えば、5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 8 - ナフチリジン - 2 - イル)。

#### 【0246】

$\text{Sub}^2$  以外の基が、2 回置換され得る原子を有する場合、その原子は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレン もしくは ヘテロアルキニレン 鎖 (一実施形態においては、2 ~ 8 個の原子、さらなる実施形態においては、3 ~ 6 個の原子、およびさらなる実施形態においては、4 個もしくは 5 個の原子を含む) の両方の末端によって置換されて、環式部分を形成し得る。その鎖は、1 ~ 3 個の置換基  $\text{Sub}^2$  によって必要に応じて置換される。一実施形態において、その鎖は、置換されない。従って、用語、必要に応じて置換された、「シクロアルキル」、「シクロアルケニル

10

20

30

40

50

「シクロアルキニル」、「ヘテロシクロアルキル」、「ヘテロシクロアルケニル」、「ヘテロシクロアルキニル」、「アリール」および「ヘテロアリール」は、スピロ種を含む。

# 【0247】

明瞭さのために、基がヘテロ原子を含む場合、置換基は、上記ヘテロ原子に結合され得る。従って、例えば、「必要に応じて置換されたヘテロアルキル」は、 $-CH_2-N(Sub^1)-CH_2-$ 、 $-CH(Sub^1)-NH-CH_2-$  および  $-CH(Sub^1)-N(Sub^1)-CH_2-$  などを含む。

# 【0248】

(修飾語句(modifier)の用語)

10

列挙の前に修飾語句が置かれている場合、上記修飾語句は、上記列挙中の項目の各々に適用されると理解されるべきであると解釈される。例えば、語句「必要に応じて改変された、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル、 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニルもしくは $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基」とは、上記列挙中の4つの項目の各々、すなわち、上記 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキル基、上記 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルケニル基、上記 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニル基および上記 $C_{5-20}$ -ヘテロアリール基が、必要に応じて置換されていてもよいことを意味する。

# 【0249】

第1の修飾語句によって基が特徴付けられ、続いて、後ろで、同じ基が、続く修飾語句によって特徴付けられる場合、上記基は、両方の修飾語句によって同時に特徴付けられることが意味される。例えば、基が、「 $C_{3-20}$ -ヘテロシクロアルキニル」(第1の修飾語句)基として記載され、その後、同じ基が、「 $C_{5-16}$ 」(続く修飾語句)基として記載される場合、 $C_{5-16}$ ヘテロシクロアルキニル基であることが意味される。

20

# 【0250】

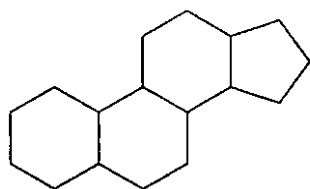
(ステロイド)

本明細書で使用される場合、用語「ステロイド」とは、以下の構造を含む任意の基に言及する(その構造は、「ステロイド骨格」として本明細書で言及される)。

# 【0251】

## 【化23】

30

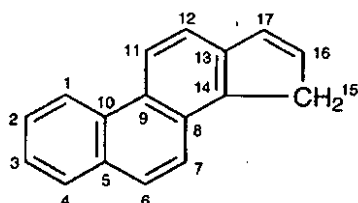


単に例示目的で、ステロイド骨格を、完全飽和として上記で描いた。しかし、用語ステロイドはまた、上記ステロイド骨格中に不飽和が存在する場合を包含すると解釈される。例えば、用語ステロイドは、完全不飽和(マンキュード)基本骨格を含む基を包含する(15H-シクロペンタ[a]フェナントレン)。

40

# 【0252】

## 【化24】



50

用語ステロイドはまた、部分不飽和ステロイド骨格を含む基を包含する。

【 0 2 5 3 】

用語ステロイドはまた、上記ステロイド骨格の「seco」誘導体、すなわち、開環がもたらされた基；それぞれ、環縮小および環拡大を伴う上記ステロイド骨格の「ノル」および「ホモ」誘導体（D. Hellwinkel, Systemic Nomenclature of Organic Chemistry, Springer 発行, 2001, ISBN: 3-540-41138-0, 「seco」については203ページ、ならびに「ノル」および「ホモ」については204ページを参照のこと）を包含する。しかし、一実施形態において、このようなseco誘導体は、用語「ステロイド」によっては包含されない。別の実施形態において、このようなノル誘導体は、用語「ステロイド」によっては包含されない。別の実施形態において、このようなホモ誘導体は、用語「ステロイド」によっては包含されない。従って、一実施形態において、このようなseco、ノルおよびホモ誘導体は、用語「ステロイド」によっては包含されない。

【 0 2 5 4 】

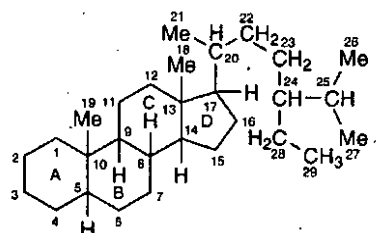
用語ステロイドはまた、ステロイド骨格と表示された構造における炭素原子のうちの1個以上が、ヘテロ原子によって置換されている場合を包含する。1つのこのような実施形態において、最大6個までの炭素原子、一実施形態においては、最大5個までの炭素原子、別の実施形態においては、最大4個までの炭素原子、別の実施形態において、最大3個までの炭素原子、別の実施形態において、最大2個までの炭素原子、別の実施形態においては、1個の炭素原子は、各々、 $O$ 、 $S(O)_q$ 、 $N$ 、 $P(O)_r$  もしくは  $Si$ （および好ましくは、 $O$ 、 $S(O)_q$  もしくは  $N$ ）によって独立して置換されている。しかし、一実施形態において、用語「ステロイド」は、上記「ステロイド基本骨格」が、ヘテロ原子を含まない種を包含する。

【 0 2 5 5 】

ステロイド環系は、以下に示される慣例に従って番号づけられる。

【 0 2 5 6 】

## 【化 2 5】



用語ステロイドは、ステロール、ステロイドホルモン、胆汁酸および胆汁酸塩を包含する。ステロールは、A 環の 3 位においてヒドロキシル基を有する任意のステロイドである。

【 0 2 5 7 】

( 不飽和 )

標準的使用によれば、  
 - 3 位とは、鎖の（メチル）末端からの 3 番目の結合に言及する；  
 - 6 位とは、鎖の（メチル）末端からの 6 番目の結合に言及し、  
 - 9 位は、鎖の（メチル）末端からの 9 番目の結合に言及する。

【 0 2 5 8 】

(一般)

本発明の粒子は、別段示されなければ、化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学の、当該分野の技術内の従来の方法を使用する。このような技術は、文献中に十分に説明されている。例えば、参考文献 32 ~ 38 などを参照のこと。

【 0 2 5 9 】

用語「含む (comprising)」は、「含む (including)」ならびに「からなる (consisting)」を包含し、例えば、Xを「含む (compris



ing)」組成物は、Xから専らなってもよいし、何かさらなるものを含んでいてもよい(例えば、X + Y)。

【0260】

数値xに関して用語「約」とは、選択的であり、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0261】

語句「実質的に」とは、「完全に」を排除せず、例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まない場合もある。必要な場合、語句「実質的に」は、本発明の定義から省略され得る。

【0262】

電荷、カチオン、アニオン、両性性イオンなどへの言及は、pH7において取り扱われる。

10

【0263】

TLR3は、Toll様レセプター3である。これは、先天免疫系において重要な役割を果たす一回膜貫通レセプターである。既知のTLR3アゴニストは、ポリ(I:C)を含む。「TLR3」は、このレセプターをコードする遺伝子の承認されたHGNC名であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:11849である。ヒトTLR3遺伝子のRefSeq配列は、GI:2459625である。

【0264】

TLR7は、Toll様レセプター7である。これは、先天免疫系において重要な役割を果たす一回膜貫通レセプターである。既知のTLR7アゴニストは、例えば、イミキモドを含む。「TLR7」は、このレセプターをコードする遺伝子の承認されたHGNC名であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:15631である。ヒトTLR7遺伝子のRefSeq配列は、GI:67944638である。

20

【0265】

TLR8は、Toll様レセプター8である。これは、先天免疫系において重要な役割を果たす一回膜貫通レセプターである。既知のTLR8アゴニストは、例えば、レシキモドを含む。「TLR8」は、このレセプターをコードする遺伝子の承認されたHGNC名であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:15632である。ヒトTLR8遺伝子のRefSeq配列は、GI:20302165である。

【0266】

30

RIG-I様レセプター(「RLR」)ファミリーは、先天免疫系において重要な役割を果たす種々のRNAヘリカーゼを含む[39]。RLR-1(RIG-Iもしくはレチノイン酸誘導性遺伝子Iとしても公知)は、そのN末端付近にある2つのカスパーゼリクルートドメインを有する。上記RLR-1ヘリカーゼをコードする遺伝子の承認されたHGNC名は、「DDX58」(DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド58(DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58)について)であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:19102である。ヒトRLR-1遺伝子のRefSeq配列は、GI:77732514である。RLR-2(MDA5もしくは黒色腫分化関連遺伝子5(melanoma differentiation-associated gene 5)としても公知)はまた、そのN末端付近にある2つのカスパーゼリクルートドメインを有する。RLR-2ヘリカーゼをコードする遺伝子の承認されたHGNC名は、「IFIH1」(ヘリカーゼCドメイン1で誘導されるインターフェロン(interferon induced with helicase C domain 1)について)であり、特有のHGNC IDは、HGNC:18873である。ヒトRLR-2遺伝子のRefSeq配列は、GI:27886567である。RLR-3(LGP2もしくは遺伝学および生理学研究室2(laboratory of genetics and physiology 2)としても公知)は、カスパーゼリクルートドメインを有さない。RLR-3ヘリカーゼをコードする遺伝子の承認されたHGNC名は、「DHX58」(DEXH(Asp-Glu-X-His)ボックスポリペプチド58について)であり、特有のH

40

50

GNC IDは、HGNC:29517である。ヒトRLR-3遺伝子のRefSeq配列は、GI:149408121である。

【0267】

PKRは、二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼである。これは、先天的免疫系において重要な役割を果たす。「EIF2AK2」(真核生物翻訳開始因子2-キナーゼ2 (eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2))について)は、この酵素をコードする遺伝子の承認されたHGNC名であり、その特有のHGNC IDは、HGNC:9437である。ヒトPKR遺伝子のRefSeq配列は、GI:208431825である。

【図面の簡単な説明】

10

【0268】

【図1】図1は、染色されたRNAを有するゲルを示す。レーンは、(1)マーカー、(2)裸のレプリコン、(3)RNase処理後のレプリコン、(4)リボソームに被包されたレプリコン、(5)RNase処理後のリボソーム、(6)RNaseで処理し、次いで、フェノール/クロロホルム抽出に供したリボソーム、を示す。

【図2】図2は、リボソームの電子顕微鏡写真である。

【図3】図3は、様々なカチオン性脂質を用いたリボソームにおいてRNAを送達した後、6日目でのタンパク質発現(相対光単位、RLUとして)を示す。

【図4】図4は、染色されたRNAを有するゲルを示す。レーンは、(1)マーカー、(2)裸のレプリコン、(3)リボソームに被包されたレプリコン、(4)RNaseで処理し、次いで、フェノール/クロロホルム抽出に供したリボソームを示す。

20

【図5】図5は、ビリオンパッケージングされたレプリコン(四角)として、裸のRNA(菱形)として、もしくはリボソーム中(+ = 0.1 μg, x = 1 μg)においてRNAを送達した後、1日目、3日目および6日目でのタンパク質発現を示す。

【図6】図6は、リボソーム被包RNAの4種の異なる用量を送達した後、1日目、3日目および6日目でのタンパク質発現を示す。

【図7】図7は、ビリオンパッケージングされたレプリコン(VRPもしくはVSRP)、1 μg 裸のRNA、および1 μg リボソーム被包RNAを与えられた動物における抗F IgG力価を示す。

【図8】図8は、VRP、1 μg 裸のRNA、および0.1 gもしくは1 μgのリボソーム被包RNAを与えられた動物における抗F IgG力価を示す。

30

【図9】図9は、VRP、または0.1 gもしくは1 μgのリボソーム被包RNAのいずれかを与えられた動物における中和抗体力価を示す。

【図10】図10は、裸のRNA(丸)、リボソーム被包RNA(三角および四角)、またはリボプレックス(lipoplex)(逆三角)としてレプリコンを送達した後の発現レベルを示す。

【図11】図11は、レプリコンを裸のRNAとして(0.01~1 μg)、リボソーム被包RNAとして(0.01~10 μg)、またはビリオンとしてパッケージングされたものとして(VRP、10<sup>6</sup> 感染単位もしくはIU)、送達した後のF特異的IgG力価(2回目の用量後2週間)を示す。

40

【図12】図12は、レプリコンを裸のRNAとして(1 μg)、リボソーム被包RNAとして(0.1もしくは1 μg)、またはビリオンとしてパッケージングされたものとして(VRP、10<sup>6</sup> IU)、送達した後のF特異的IgG力価(丸)およびPRNT力価(四角)を示す。ナイーブマウスの力価もまた、示す。実線は、幾何平均を示す。

【図13】図13は、2回目の用量の4週間後、Fタンパク質中の主要なエピトープを表す合成ペプチドで再刺激した後の細胞内サイトカイン生成を示す。y軸は、CD8+CD4-の%サイトカイン+を示す。

【図14】図14は、0日目および21日目での雌ウシの免疫化後63日間にわたる、F特異的IgG力価(平均log<sub>10</sub>力価±標準偏差)を示す。

【発明を実施するための形態】

50

## 【 0 2 6 9 】

( 発明を実施するための態様 )

( R N A レプリコン )

種々のレプリコンは、以下で使用される。一般に、これらは、ベネズエラウマ脳炎ウイルス ( V E E V ) に由来する非構造タンパク質、シンドビス・ウイルス由来のパッケージングシグナル、およびシンドビス・ウイルスもしくは V E E V 変異体に由来する 3 ' U T R を有するハイブリッドアルファウイルスゲノムに基づく。上記レプリコンは、約 1 0 k b 長であり、ポリ A テールを有する。

## 【 0 2 7 0 】

アルファウイルスレプリコンをコードするプラスミド DNA ( 名称 : p T 7 - m V E E V - F L . R S V F もしくは A 3 1 7 ; p T 7 - m V E E V - S E A P もしくは A 3 0 6 ; p S P 6 - V C R - G F P もしくは A 5 0 ) を、インビボでの RNA 合成のテンプレートとして供した。上記レプリコンは、RNA 複製に必要とされるアルファウイルス遺伝的エレメントを含むが、粒子アセンブリに必要な遺伝子産物をコードするエレメントを欠いている ; 構造タンパク質は、代わりに、目的のタンパク質 ( レポーター ( 例えば、S E A P もしくは G F P ) または免疫原 ( 例えば、全長 R S V F タンパク質 ) のいずれか ) によって置き換えられるので、上記レプリコンは、感染性粒子の生成を誘導できない。上記アルファウイルス c D N A の上流にあるバクテリオファージ ( T 7 もしくは S P 6 ) プロモーターは、インビトロで上記レプリコン RNA の合成を促進し、上記ポリ ( A ) テールの直ぐ下流にあるデルタ型肝炎ウイルス ( H D V ) リボザイムは、その自己切断活性を介して正確な 3 ' 末端を生成する。

## 【 0 2 7 1 】

適切な制限エンドヌクレアーゼで上記 H D V リボザイムの下流で上記プラスミド DNA を直線状にした後に、ランオフ転写物 ( r u n - o f f t r a n s c r i p t ) を、T 7 もしくは S P 6 バクテリオファージ由来 DNA 依存性 RNA ポリメラーゼを使用して、インビトロで合成した。転写を、製造業者 ( A m b i o n ) によって提供される指示書に従って、ヌクレオシドトリホスフェート ( A T P 、 C T P 、 G T P および U T P ) の各々の 7 . 5 m M ( T 7 RNA ポリメラーゼ ) もしくは 5 m M ( S P 6 RNA ポリメラーゼ ) の存在下で、3 7 °C において 2 時間にわたって行った。転写の後、上記テンプレート DNA を、T U R B O D N a s e ( A m b i o n ) で消化した。上記レプリコン RNA を、L i C l で沈殿させ、ヌクレアーゼ非含有水中で再構成した。キャップのない RNA を、S c r i p t C a p m 7 G キャッピングシステム ( E p i c e n t r e B i o t e c h n o l o g i e s ) を使用して、ユーザーマニュアルに概説されるとおり、ワクシニアキャッピング酵素 ( V C E ) で転写後にキャップした ; このようにキャップしたレプリコンに、「 v 」の接頭文字を付ける ( 例えば、v A 3 1 7 は、V C E によってキャップされた A 3 1 7 レプリコンである ) 。転写後キャップされた RNA を、L i C l で沈殿させ、ヌクレアーゼ非含有水中で再構成した。上記 RNA サンプルの濃度を、O D <sub>260nm</sub> を測定することによって決定した。上記インビトロ転写物の完全性を、変性アガロースゲル電気泳動によって確認した。

## 【 0 2 7 2 】

( D l i n D M A ベースのリボソームにおける被包 )

R N A を、実質的に、参考文献 7 および 4 0 の方法によって作製したリボソーム中に被包した。上記リボソームを、1 0 % D S P C ( 両性イオン性 ) 、4 0 % D l i n D M A ( カチオン性 ) 、4 8 % コレステロールおよび 2 % P E G 結合体化 D M G ( 2 k D a P E G ) から作製した。これら割合は、総リボソーム中の % モルに言及する。

## 【 0 2 7 3 】

D l i n D M A ( 1 , 2 - ジリノレイルオキシ - N , N - ジメチル - 3 - アミノプロパン ) を、参考文献 2 の手順を使用して合成した。D S P C ( 1 , 2 - ジアステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン ) を、G e n z y m e から購入した。コレステロールを、S i g m a - A l d r i c h から得た。P E G 結合体化 D M G ( 1 , 2 - ジミリスト

10

20

30

40

50

イル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール), アンモニウム塩)、DOTAP (1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン, 塩化物塩) および DC - chol (3 - [N - (N', N' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル] コレステロールヒドロクロリド) は、Avanti Polar Lipids からであった。

#### 【0274】

簡潔には、脂質をエタノール (2 mL) 中に溶解し、RNA レプリコンを、緩衝液 (2 mL, 100 mM クエン酸ナトリウム, pH 6) 中に溶解し、これらを 2 mL の緩衝液と混合し、続いて、1 時間平衡化させた。上記混合物を 6 mL の緩衝液で希釈し、次いで、濾過した。得られた生成物は、リボソームを含み、約 95 % の被包効率であった。図 2 は、これらの方法によって調製されるリボソームの例示的な電子顕微鏡写真である。これらリボソームは、全長 RSV F 抗原をコードする被包化 RNA を含む。1 つのバッチの動的光散乱は、平均直径 141 nm (強度による Z<sub>av</sub>) もしくは 78 nm (数で) を示した。

#### 【0275】

1 つの特定の被包の方法において、新鮮な脂質ストック溶液を、エタノール中で調製した。37 mg の DlinDMA、11.8 mg の DSPC、27.8 mg のコレステロールおよび 8.07 mg の PEG - 結合体化 DMG を秤量し、7.55 mL のエタノール中に溶解した。3 種の異なる結合体化 PEG を使用した: PEG - 1000、PEG - 2000、もしくは PEG - 3000。新たに調製した脂質ストック溶液を、37 において約 15 分間にわたって穏やかに振盪して、均質な混合物を形成した。次いで、226.7  $\mu$ L の上記ストックを、1.773 mL エタノールに添加して、作業脂質ストック溶液 2 mL を作製した。RNA の 2 mL 作業溶液をまた、100 mM クエン酸緩衝液 (pH 6) 中の約 1  $\mu$ g /  $\mu$ L のストック溶液から調製した。3 つの 20 mL ガラスバイアル (攪拌子有り) を、RNAse Away 溶液ですすぎ、使用前に多量の MilliQ 水で洗浄して、上記バイアルの RNAse の汚染を除去した。上記バイアルのうちの 1 つを、上記 RNA 作業溶液に使用し、他のものを脂質および RNA 混合物を集めるために使用した (後に記載されるとおり)。作業脂質溶液および RNA 溶液を、37 において 10 分間にわたって加熱し、その後、3 cc ルアーロックシリンジに入れた。2 mL クエン酸緩衝液 (pH 6) を、別の 3 cc シリンジに入れた。RNA および脂質を含むシリンジを、FEP チューブ (フッ素化エチレン - プロピレン; 使用したすべての FEP チューブは、2 mm 内径および 3 mm 外径を有した; Index Health Science から得た) を使用して、Tミキサー (PEEK<sup>TM</sup> 500  $\mu$ m ID 接合部) に接続した。上記 Tミキサーからの出口もまた、FEP チューブであった。上記クエン酸緩衝液を含む第 3 のシリンジを、別個の 1 つのチューブに接続した。次いで、すべてのシリンジを、流量 7 mL / 分においてシリンジポンプを使用して作動させた。上記チューブ出口を、20 mL ガラスバイアルに上記混合物を集めるように配置した (攪拌しながら)。上記攪拌子を取り出し、上記エタノール / 水性溶液を、室温へと 1 時間にわたって平衡化させた。上記混合物のうちの 4 mL を、5 cc シリンジに入れ、これを、FEP チューブの 1 つに接続し、別の 5 cc シリンジを、等しい長さの FEP チューブに接続し、等量の 100 mM クエン酸緩衝液 (pH 6) を入れた。上記 2 本のシリンジを、上記シリンジポンプを使用して 7 mL / 分の流量において作動させ、最終の混合物を、20 mL ガラスバイアルに集めた (攪拌しながら)。次に、第 2 の混合工程 (リボソーム) から集めた上記混合物を、Mustang Q 膜 (Pall Corporation から得られる、結合してアニオン性分子を除去するアニオン交換支持体) を通過させた。上記リボソームに関してこの膜を使用する前に、4 mL の 1 M NaOH、4 mL の 1 M NaCl および 10 mL の 100 mM クエン酸緩衝液 (pH 6) が、連続してこの膜を通過した。リボソームを、10 分間にわたって 37 において加温し、その後、上記膜を通過させた。次に、接線流濾過を使用することによって、リボソームを 2 mL に濃縮し、10 ~ 15 容積の 1 x PBS に対して透析し、その後、最終生成物を収集した。上記 TFF シス

10

20

30

40

50

テムおよび中空ファイバー濾過膜を、Spectrum Labs (Rancho Dominguez) から購入し、上記製造業者のガイドラインに従って使用した。100 kD 孔サイズカットオフおよび  $8 \text{ cm}^2$  表面積を有するポリスルホン中空ファイバー濾過膜を使用した。インビトロおよびインビボ実験に関しては、処方物を、1 × PBS で、必要とされる RNA 濃度へと希釈した。

#### 【0276】

被包された RNA のパーセンテージおよび RNA の濃度を、Quant-iT RiboGreen RNA 試薬キット (Invitrogen) によって、製造業者の指示書に従って決定した。上記キット中に提供されたリボソーム RNA 標準を使用して、標準曲線を作成した。リボソームを、1 × TE 緩衝液 (キットから) 中で、10 × もしくは 100 × に希釈し、その後、色素を添加した。別個に、リボソームを、0.5 % Triton X を含む 1 × TE 緩衝液中で 10 × もしくは 100 × に希釈し、その後、色素を添加した (上記リボソームを破壊するため。従って、総 RNA をアッセイするため)。その後、等量の色素を各溶液に添加し、次いで、色素添加後の約  $180 \mu\text{L}$  の各溶液を、二連において、96 ウェル組織培養プレートに入れた。蛍光 (励起  $485 \text{ nm}$ , 発光  $528 \text{ nm}$ ) を、マイクロプレートリーダーで読み取った。すべてのリボソーム処方物を、被包された RNA の量に基づいて、インビボで投与した。

#### 【0277】

より小さなリボソームを得るために、シリンジ/チューブ法は、脂質および RNA 溶液がマイクロ流体チップ上のチャネルにおいて混合される方法によって置き換えられた。エタノール中の新たな脂質ストック溶液を、調製した。37 mg の DlinDMA、11.8 mg の DSPC、27.8 mg のコレステロールおよび 8.07 mg の PEG-DMG を秤量し、7.55 mL のエタノール中に溶解した。上記新たに調製した脂質ストック溶液を、37 °C において約 15 分間にわたって穏やかに振盪して、均質な混合物を形成した。次いで、226.7  $\mu\text{L}$  の上記ストックを、1.773 mL エタノールに添加して、作業脂質ストック溶液 2 mL を作製した。RNA の 4 mL 作業溶液をまた、100 mM クエン酸緩衝液 (pH 6) 中約  $1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$  のストック溶液から調製した。4 本の 20 mL ガラスバイアル (撹拌子有り) を、RNase Away 溶液ですすぎ、使用前に多量の MilliQ 水で洗浄して、バイアルの RNase の汚染を除去した。上記バイアルのうちの 2 本を、上記 RNA 作業溶液 (各バイアル中 2 mL) のために使用し、他を、脂質および RNA 混合物を集めるために使用した。作業脂質溶液および RNA 溶液を、37 °C において 10 分間にわたって加熱し、その後、3 ccc ルアーロックシリンジに入れた。RNA および上記脂質を含むシリンジを、4 方向エッジコネクタを使用する PTFE チューブ (0.03 インチ ID × 1/16 インチ OD (Syrris)) を使用して、Mitosis Droplet 接合チップ (Syrris から得られるガラスマイクロ流体デバイス (部品番号 3000158)) に繋いだ。2 本の RNA ストリームおよび 1 本の脂質ストリームを、シリンジポンプによって作動させ、上記エタノール相および水相の混合を、上記チップの X 接合部 ( $100 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}$ ) において行った。3 本全てのストリームの流量を、1.5 mL / 分において維持したので、全ての水性の流量 対 エタノール性の流量の比は、2 : 1 であった。上記チューブの出口を、20 mL ガラスバイアルに上記混合物を集めるように配置した (撹拌しながら)。上記撹拌子を取り出し、上記エタノール/水性溶液を、室温へと 1 時間にわたって平衡化させた。次いで、上記混合物を、5 ccc シリンジに入れ、これを、PTFE チューブ (0.03 インチ ID × 1/16 インチ OD) の 1 つに接続し、別の 5 ccc シリンジを等しい長さの PTFE チューブに接続し、等量の 100 mM クエン酸緩衝液 (pH 6) を入れた。上記 2 本のシリンジを、シリンジポンプを使用して 3 mL / 分の流量において作動させ、最終混合物を、20 mL ガラスバイアルに集めた (撹拌しながら)。次に、リボソームを、TFF システムを使用して、2 mL へと濃縮し、10 ~ 15 容積の 1 × PBS に対して透析し、その後、最終生成物を収集した。100 kDa 孔サイズカットオフおよび  $20 \text{ cm}^2$  表面積を有する中空ファイバー濾過膜を使用した。インビトロ実験およびインビボ実験のために

、処方物を、 $1 \times \text{PBS}$ で、必要とされるRNA濃度へと希釈した。上記シリンジ/チューブ法を使用して、 $75 \mu\text{g}$  RNAで調製したリポソームは、Z平均直径 $148 \text{ nm}$ および多分散性指数 $0.122$ を有したのに対して、上記チップ混合は、Z平均直径 $97 \text{ nm}$ および多分散性指数 $0.086$ のリポソームを与えた。被包RNAの割合は、 $90\%$ から $87\%$ へとわずかに減少した。

#### 【0278】

リポソームにおける被包は、RNase消化からRNAを保護することを示した。実験では、 $3.8 \text{ MAU}$ のRNase A/ $\mu\text{g}$  RNAを使用し、30分間にわたって室温においてインキュベートした。RNaseを、プロテイナーゼKで、55℃において10分間にわたって不活性化した。次いで、サンプル 対  $25:24:1 \text{ v/v/v}$ 、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールの $1:1 \text{ v/v}$ 混合物を添加して、上記RNAを上記脂質から水相へと抽出した。サンプルを、数秒間にわたってボルテックスすることによって混合し、次いで、 $12 \text{ k RPM}$ における15分間にわたる遠心分離に置いた。上記水相（上記RNAを含む）を取り出し、上記RNAを分析するために使用した。ローディング前に（ $400 \text{ ng RNA/ウェル}$ ）、上記サンプルすべてを、ホルムアルデヒドローディング色素と共にインキュベートし、10分間にわたって65℃において変性させ、室温へと冷却した。Ambion Millenniumマーカースを使用し、上記RNA構築物の分子量を概算した。上記ゲルを、90Vにおいて泳動した。上記ゲルを、室温において1時間にわたって振盪することによって、製造業者のガイドラインに従って、水中の $0.1\% \text{ SYBRゴールド}$ を使用して染色した。図1は、被包の非存在下でRNaseがRNAを完全に消化することを示す（レーン3）。RNAは、被包後に検出不能であり（レーン4）、これらリポソームがRNaseで処理されても全く変化が認められない（レーン4）。RNase処理リポソームをフェノール抽出に供した後、消化されていないRNAが認められる（レーン6）。4℃において1週間後ですら、上記RNAを、いかなるフラグメント化もなしに認めることができた（図4，矢印）。インビボでのタンパク質発現は、4℃において6週間および1回の凍結融解サイクル後にも変化しなかった。従って、リポソーム被包RNAは安定である。

#### 【0279】

上記RNAのインビボ発現を評価するために、免疫原ではなく、レポーター酵素（SEAP；分泌型アルカリホスファターゼ）を、上記レプリコン中にコードさせた。発現レベルを、化学発光アルカリホスファターゼ基質を使用して、 $1 \times \text{Phosphatase-Light}$ 希釈緩衝液中で $1:4$ 希釈した血清中で測定した。8～10週齢BALB/cマウス（5匹/群）に、0日目に、 $0.1 \mu\text{g}$ もしくは $1 \mu\text{g}$  RNA用量で $50 \mu\text{l}$ /脚を筋肉内に注射した。同じベクターを、 $1 \mu\text{g}$ において上記リポソームなしで（RNase非含有 $1 \times \text{PBS}$ 中）も投与した。ビリオンパッケージングされたレプリコンもまた、試験した。本明細書で使用したビリオンパッケージングされたレプリコン（「VRP」と呼ぶ）を、参考文献41の方法によって得た。ここでアルファウイルスレプリコンは、変異VEEVに由来するか、またはシンドビスウイルスの3'UTRおよびシンドビスウイルスパッケージングシグナル（PS）を含むように操作されたVEEVのゲノムから得られるキメラであり、シンドビスウイルスキャプシドおよび糖タンパク質遺伝子をコードする欠損性ヘルパーRNAと共にBHK細胞へと共エレクトロポレーション（co-electroporation）することによってパッケージングした。

#### 【0280】

図5に示されるように、被包は、 $1 \mu\text{g}$ 用量においてSEAPレベルを約 $1/2$ 対数増大させ、6日目において、 $0.1 \mu\text{g}$  被包用量からの発現は、 $1 \mu\text{g}$  非被包用量で認められたレベルに匹敵した。3日目までに、発現レベルは、VRPで達成されたものを越えた（四角）。従って、発現は、裸のRNAコントロールと比較して、 $10 \times$ 低用量においてすら、上記RNAが上記リポソーム中に処方された場合に増大された。発現はまた、上記VRPコントロールと比較して高かったが、発現の動態は、非常に異なっていた（図5を参照のこと）。エレクトロポレーションを用いた上記RNAの送達は、上記裸のRN

Aコントロールと比較して増大した発現を生じたが、これらレベルは、リポソームでのものより低かった。

#### 【0281】

上記リポソーム群において認められる効果が、上記リポソーム成分にのみ起因するのか、または上記被包に関連するのかを評価するために、上記レプリコンを、被包形態（2つの異なる精製プロトコルで、 $0.1 \mu\text{g}$  RNA）において、または形成後に上記リポソームと混合して（非被包化「リポプレックス（lipoplex）」、 $0.1 \mu\text{g}$  RNA）、または裸のRNA（ $1 \mu\text{g}$ ）として投与した。図10は、上記リポプレックスが、最低レベルの発現を与えたことを示し、このことは、被包が、強力な発現に必須であることを示す。

10

#### 【0282】

さらなるSEAP実験から、インビボで明らかな用量応答が示された。発現は、 $1 \text{ ng}$ ほどのRNAの送達後にも認められた（図6）。被包レプリコンからの発現と裸のレプリコンからの発現とを比較するさらなる実験から、 $0.01 \mu\text{g}$  被包RNAは、 $1 \mu\text{g}$ の裸のRNAに等しいことが示された。RNAの $0.5 \mu\text{g}$ 用量において、上記被包物質は、6日目において12倍高い発現を与えた； $0.1 \mu\text{g}$ 用量レベルでは、6日目において24倍高かった。

#### 【0283】

上記群において平均レベルで調べるだけでなく、個々の動物もまた研究した。いくらかの動物は、裸のレプリコンに対して非応答者であったのに対して、被包は、非応答者を排除した。

20

#### 【0284】

さらなる実験では、DlindMAをDOTAP（「RV13」）で置換した。DOTAPリポソームは、裸のレプリコンより良好な発現を与えたが、それらは、DlindMAリポソームより劣っていた（1日目において2～3倍の差異）。

#### 【0285】

インビボでの免疫原性を評価するために、レプリコンを構築して、RSウイルス（RSV）に由来する全長Fタンパク質を発現させた。これを、裸（ $1 \mu\text{g}$ ）、リポソーム中に被包（ $0.1$ もしくは $1 \mu\text{g}$ ）、またはビリオン中でパッケージング（ $10^6$  IU；「VRP」）で、0日目および21日目に送達した。図7は、2回目の用量の2週間後の抗FのIgG力価を示す。上記リポソームは、明らかに免疫原性を増強する。図8は、2週間後の力価を示す。この時点までに、 $0.1 \mu\text{g}$ の上記被包RNAと、 $1 \mu\text{g}$ の上記被包RNAと、上記VRP群との間に統計学的差異は何らなかった。中和力価（60%のプラーク減少として測定、「PRNT60」）は、2回目の用量の2週間後に、これら3群において有意差はなかった（図9）。図12は、2回目の用量の4週間後のIgG力価およびPRNT力価の両方を示す。

30

#### 【0286】

図13は、上記RNAが堅調なCD8 T細胞応答を誘発することを確認する。

#### 【0287】

さらなる実験において、VRP、 $0.1 \mu\text{g}$  リポソーム被包RNA、もしくは $1 \mu\text{g}$  リポソーム被包RNAを与えられたマウスにおけるF特異的IgG力価を比較した。2回目の用量の後の種々の時点での力価比（VRP：リポソーム）は、以下のとおりであった：

40

#### 【0288】

#### 【数1】

	2 週間	4 週間	8 週間
0.1 $\mu\text{g}$	2.9	1.0	1.1
1 $\mu\text{g}$	2.3	0.9	0.9

50

従って、上記リポソーム被包RNAは、ビリオン送達で認められるのと本質的に同程度の免疫応答を誘導する。

#### 【0289】

さらなる実験から、優れたF特異的IgG応答が10μg用量で示され、これは、1μgおよび0.1μg用量についての応答と等しく、0.01μg用量ではより低い応答が示された。図11は、3種の異なる用量における裸の形態において、4種の異なる用量におけるリポソームにおいて、もしくはVRP(10<sup>6</sup> IU)として、上記レプリコンを与えられた動物におけるIgG力価を示す。1μg リポソーム被包RNAで認められた応答は、VRPと比較した場合に統計的に有意ではなかった(ANOVA)が、10μg リポソーム被包RNAで認められたより高い応答は、これらの群の両方と比較した場合、統計的に有意であった(p<0.05)。

10

#### 【0290】

さらなる研究から、上記0.1μgのリポソーム被包RNAは、0.1μgの送達されたDNAより遙かに高い抗F IgG応答を与え(2回目の用量の15日後)、さらに、エレクトロポレーション(Eigen<sup>TM</sup> DNA Delivery System, Inovio)によって送達された、上記F抗原をコードする20μg プラスミドDNAより免疫原性であることが確認された。

#### 【0291】

さらなる研究を、マウスの代わりにコットンラット(Sigmodon hispidus)において行った。1μg 用量において、リポソーム被包は、裸のRNAと比較して、F特異的IgG力価を8.3倍増大させ、中和力価(PRNT60として測定)を9.5倍増大させた。上記抗体応答の大きさは、5×10<sup>6</sup> IU VRPによって誘導されたものに等しかった。裸のRNAおよびリポソーム被包RNAはともに、上記コットンラットをRSVチャレンジ(1×10<sup>5</sup> プラーク形成単位)から保護することができ、肺のウイルス負荷を少なくとも3.5対数低下させた。被包は、上記低下を約2倍増大させた。

20

#### 【0292】

大型動物研究を、ウシにおいて行った。雌ウシを、リポソームの内部に処方した、全長RSV Fタンパク質をコードする66μgのレプリコンで、0日目および21日目に免疫化した。PBS単独を、陰性コントロールとして使用し、認可されたワクチンを、陽性コントロールとして使用した(Fort Dodge製の「Triangle 4」, 死滅ウイルスを含む)。図14は、第1の免疫化から始まって63日間の期間にわたる、F特異的IgG力価を示した。上記RNAレプリコンは、上記雌ウシにおいて免疫原性であったが、それは、上記認可されたワクチンより低い力価を与えた。全てのワクチン接種した雌ウシは、第2の用量の後にF特異的抗体を示し、力価は、上記第2の用量後の2~6週の期間、非常に安定であった(そして、上記RNAワクチンに関しては、特に安定であった)。

30

#### 【0293】

(代替のカチオン性脂質を使用するリポソームにおける被包)

DlinDMAを使用する代わりとして、参考文献8のカチオン性脂質を使用する。これらの脂質は、参考文献8において開示されるように合成され得る。

40

#### 【0294】

DlinDMAを使用して上記で形成される上記リポソームを、本明細書において、以降「RV01」シリーズという。上記DlinDMAを、以下に記載されるように、シリーズ「RV02」~「RV12」において種々のカチオン性脂質で置換した。各リポソームの2つの異なるタイプを、2% PEG2000-DMGと、(01)上記カチオン性脂質が40%、10% DSPC、および48% コレステロール、または(02)上記カチオン性脂質が60%および38% コレステロールのいずれかとを使用して形成した。従って、(01)リポソームと(02)リポソームの比較は、中性両性イオン性脂質の効果を示す。

50

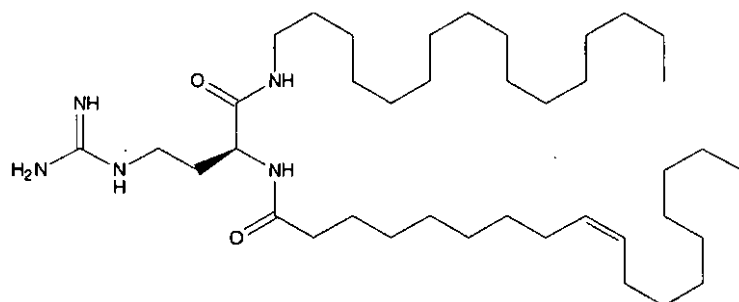


【 0 2 9 5 】

R V 0 2 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

【 0 2 9 6 】

【 化 2 6 】

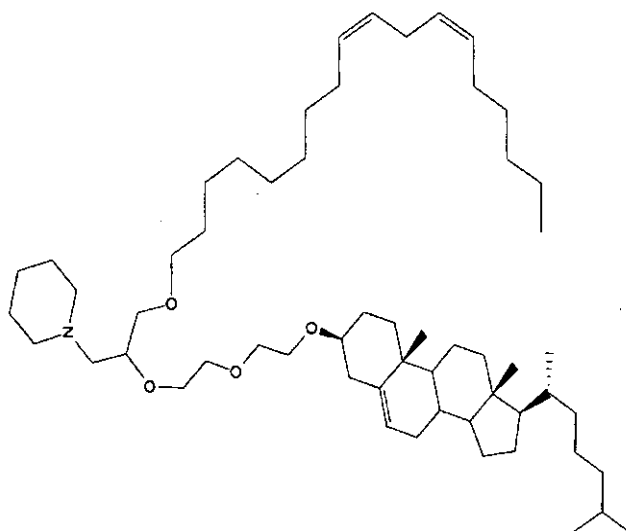


10

R V 0 3 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

【 0 2 9 7 】

【 化 2 7 】

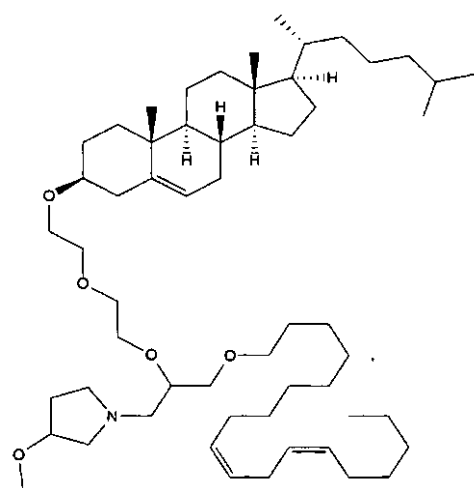


20

R V 0 4 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

【 0 2 9 8 】

【 化 2 8 】

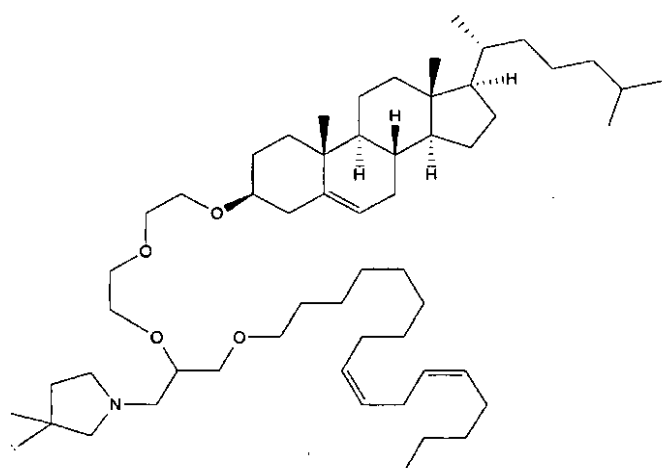


40

R V 0 5 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

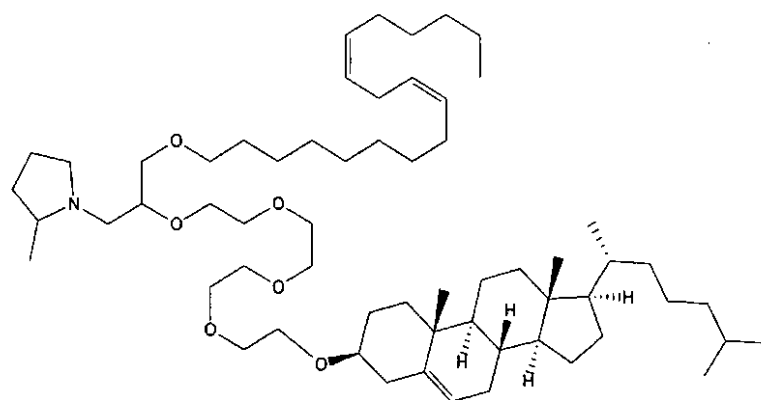
50

【化 2 9】



R V 0 6 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

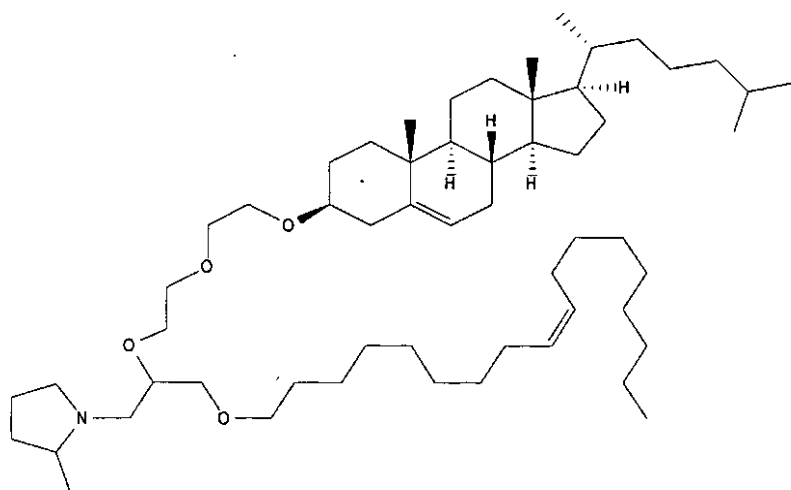
【化 3 0】



30

R V 0 7 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

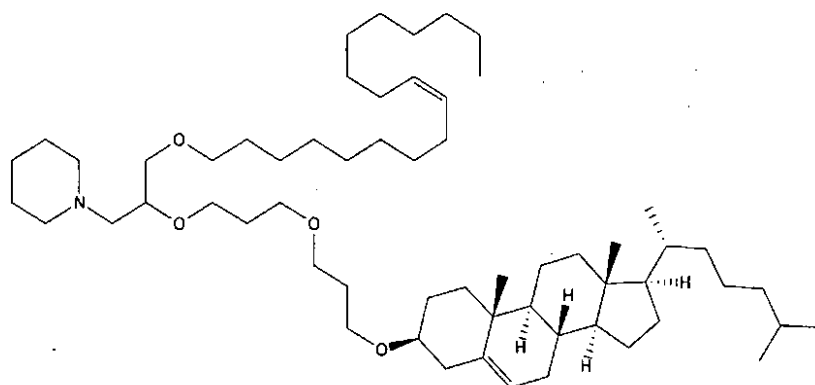
【化 3 1】



R V 0 8 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

50

【化 3 2】

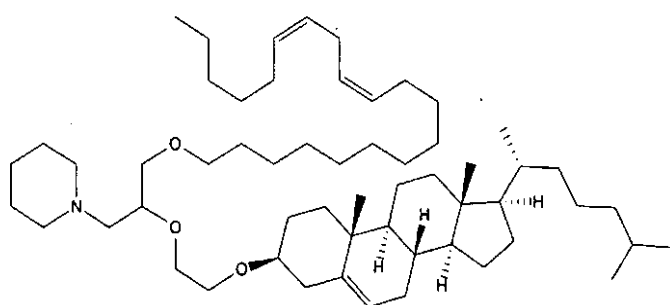


10

R V 0 9 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

【 0 3 0 3 】

【化 3 3】

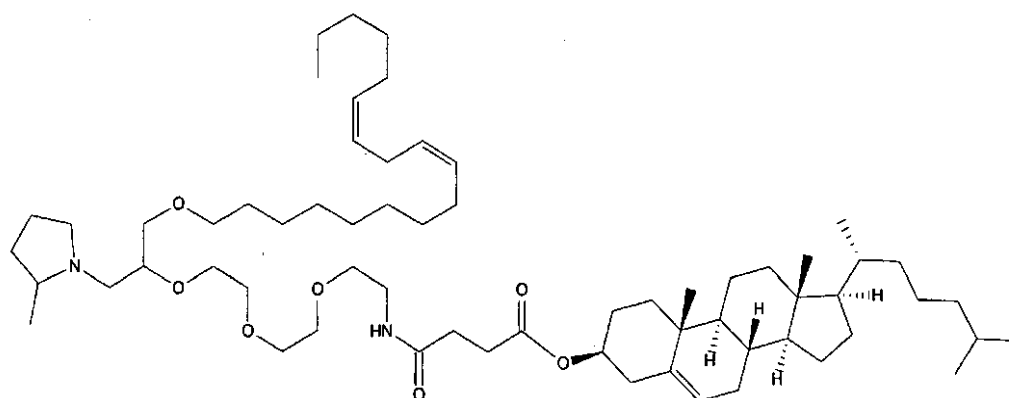


20

R V 1 0 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

【 0 3 0 4 】

【化 3 4】



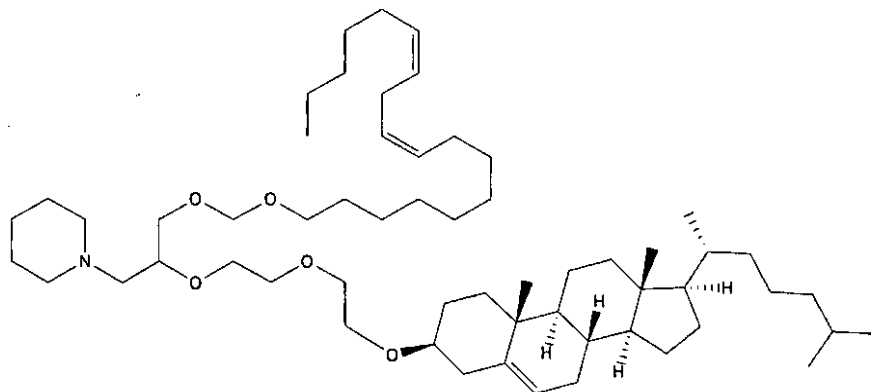
30

R V 1 1 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

【 0 3 0 5 】

40

【化 3 5】

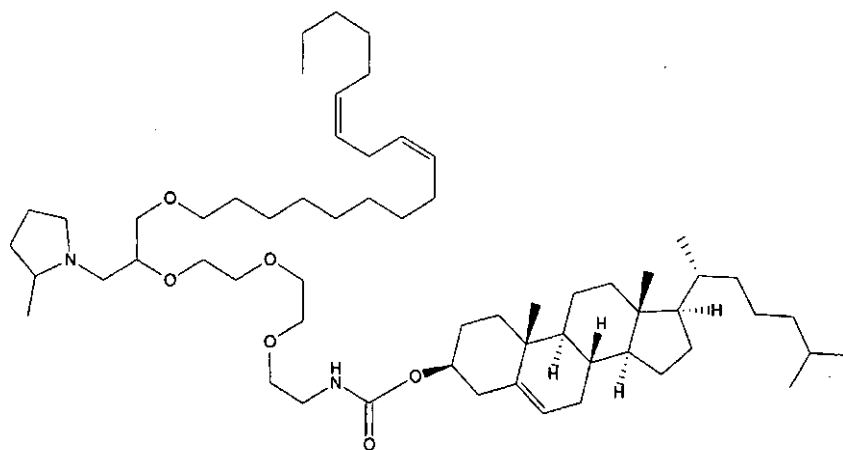


10

RV12 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

【0306】

【化 3 6】

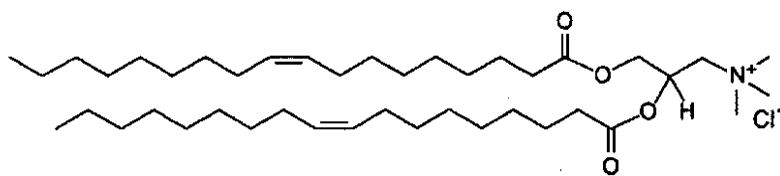


20

RV13 リポソームを、以下のカチオン性脂質（比較目的で、DOTAP）を使用して  
作製した：

【0307】

【化 3 7】



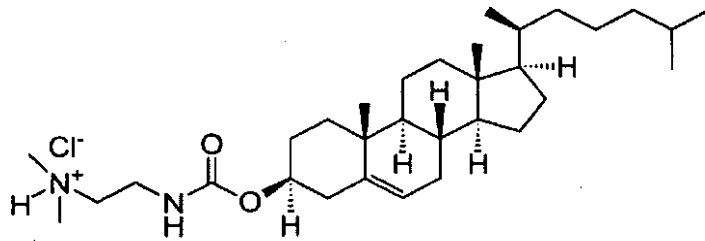
30

RV14 リポソームを、以下のカチオン性脂質（比較のために、DC-コレステロール）  
を使用して作製した：

【0308】

40

【化 3 8】

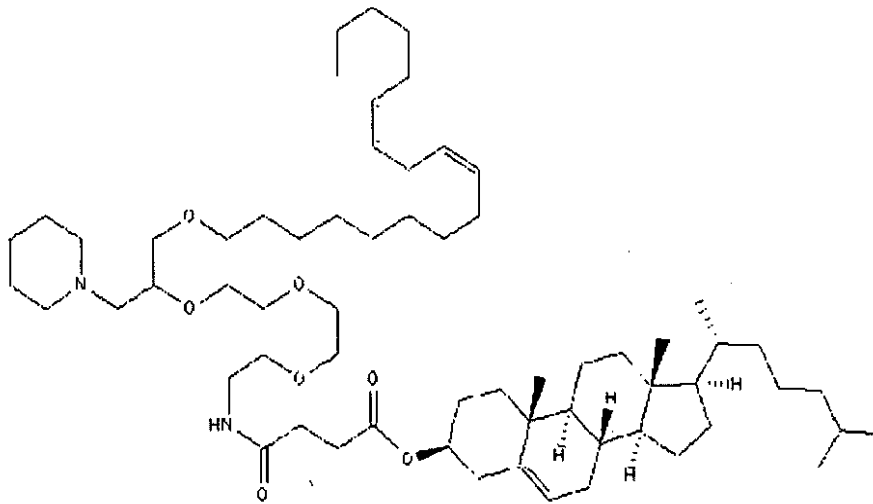


R V 1 5 リポソームを、以下のカチオン性脂質を使用して作製した：

10

【 0 3 0 9】

【化 3 9】



20

これらリポソームを、上記の S E A P レポーターで試験した。以下の表は、上記リポソームのサイズ（Z 平均および多分散性指数）、各リポソームにおける R N A 被包の % と共に、注射後 1 日目および 6 日目に検出された S E A P 活性を示す。S E A P 活性は、D 1 i n D M A、コレステロールおよび P E G - D M G から作製した「R V 0 1 ( 0 2 )」リポソームに対する比較である：

30

【 0 3 1 0】

## 【数 2】

RV	Zav (pdl)	% 被包	SEAP 1 日目	SEAP 6 日目
RV01 (01)	154.6 (0.131)	95.5	80.9	71.1
RV01 (02)	162.0 (0.134)	85.3	100	100
RV02 (01)	133.9 (0.185)	96.5	57	45.7
RV02 (02)	134.6 (0.082)	97.6	54.2	4.3
RV03 (01)	158.3 (0.212)	62.0	65.7	44.9
RV03 (02)	164.2 (0.145)	86	62.2	39.7
RV04 (01)	131.0 (0.145)	74.0	91	154.8
RV04 (02)	134.6 (0.117)	81.5	90.4	142.6
RV05 (01)	164.0 (0.162)	76.0	76.9	329.8
RV05 (02)	177.8 (0.117)	72.8	67.1	227.9
RV06 (01)	116.0 (0.180)	79.8	25.5	12.4
RV06 (02)	136.3 (0.164)	74.9	24.8	23.1
RV07 (01)	140.6 (0.184)	77	26.5	163.3
RV07 (02)	138.6 (0.122)	87	29.7	74.8
RV 08 (01)	176.7 (0.185)	50	76.5	187
RV08 (02)	199.5 (0.191)	46.3	82.4	329.8
RV09 (01)	165.3 (0.169)	72.2	65.1	453.9
RV09 (02)	179.5 (0.157)	65	68.5	658.2
RV10 (01)	129.7 (0.184)	78.4	113.4	47.8
RV10 (02)	147.6 (0.131)	80.9	78.2	10.4
RV11 (01)	129.2 (0.186)	71	113.6	242.2
RV11 (02)	139 (0.198)	75.2	71.8	187.2
RV12 (01)	135.7 (0.161)	78.8	65	10
RV12 (02)	158.3 (0.287)	69.4	78.8	8.2

図 3 は、6 日目において認められた S E A P 発現レベルを図示する。最良の結果は、R V 0 4、R V 0 5、R V 0 7、R V 0 8、R V 0 9、および R V 1 1 で認められた。

## 【0 3 1 1】

種々のこれらリポソームをまた、全長 R S V F タンパク質をコードするレプリコンを送達するために使用した。ある研究は、R V 0 1、R V 0 5 および R V 1 3 を比較した；最高の F 特異的血清 I g G 力価は R V 0 1 で認められ、最低のものは、R V 1 3 で認められた。別の研究は、R V 0 1、R V 0 2、R V 0 4 および R V 0 7 を比較した；最良の結果は、再び、R V 0 1 で認められ、R V 0 7 は、不十分にしか機能しなかった。別の研究は、R V 0 1、R V 0 3、R V 0 8、R V 0 9 および R V 1 4 を比較した；最良の結果は、R V 0 1 で再び認められ、R V 0 3 および R V 1 4 は、不十分にしか機能しなかった。別の研究は、R V 0 1、R V 1 0、R V 1 1 および R V 1 5 を比較した；最良の結果は、再び、R V 0 1 で認められた。全体として、最良の結果は、R V 0 1、R V 0 5、R V 0 8 および R V 0 9 で認められたのに対して、R V 1 3 ( D O T A P ) および R V 1 4 ( D C - コレステロール ) は、不十分であった。

## 【0 3 1 2】

従って、上記リポソームのうちの全てが、免疫応答を誘発するのに有効であるわけではなかった。しかし、一般に、最良の免疫学的効力は、上記リポソーム中のカチオン性脂質

が、5.0～7.6の範囲、特に、5.5～6.7の範囲、5.6～6.3、5.6～6.0、もしくは5.7～5.9のpKaを有する場合に認められることが観察された。

#### 【0313】

(BHK発現)

様々な脂質でのリポソームを、BHK細胞と共に一晩インキュベートし、タンパク質発現能力について評価した。RV05脂質でのベースラインから、発現を、10% 1,2-ジフィタノイル(diphytanyl)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE)を上記リポソームに添加することによって18xに増大させることができ、または10% 18:2(cis)ホスファチジルコリンを添加することによって10xに増大させることができた。一般に、インビボ研究は、不飽和脂質テールが、コードされた抗原に対して惹起されるIgG力価を増強する傾向にあることを示した。

#### 【0314】

(RSV免疫原性)

RSV Fタンパク質をコードするvA317自己複製レプリコンを、上記レプリコン(1μg)単独で、またはRV05でリポソームとして処方して、または(比較のために)RV01もしくはRV13でリポソームとして処方して、BALB/cマウス(1群あたり4匹もしくは8匹の動物)に、両側の筋肉内ワクチン接種(50μL/脚)によって、0日目および21日目に投与した。上記RV01リポソームは、RNAの量が異なることを除いて、40% DlinDMA、10% DSPC、48% コレステロールおよび2% PEG-DMGを有した。上記RV05リポソームは、40% RV05、10% DSPC、48% コレステロールおよび2% PEG-DMG、もしくは60% RV05、38% コレステロールおよび2% PEG-DMGのいずれかを有した。上記RV13リポソームは、40% DOTAP、10% DOPE、48% コレステロールおよび2% PEG-DMGを有した。上記リポソームを、種々の技術を使用して調製した。比較のために、同じRSV-F抗原を発現する裸のプラスミドDNA(20μg)を、エレクトロポレーションを使用して、もしくはRV01(10)リポソーム(0.1μg DNA)と共にのいずれかで送達した。4匹のマウスを、ナイーブコントロール群として使用した。

#### 【0315】

Z平均粒子直径および多分散性指数は、以下であった：

#### 【0316】

#### 【数3】

RV	Zav (nm)	pdl	調製物
RV01 (10)	158.6	0.088	(A)
RV01 (08)	156.8	0.144	(A)
RV01 (05)	136.5	0.136	(B)
RV01 (09)	153.2	0.067	(A)
RV01 (10)	134.7	0.147	(A)
RV05 (01)	148	0.127	(A)
RV05 (02)	177.2	0.136	(A)
RV13 (02)	128.3	0.179	(A)

血清を、14日目、36日目および49日目に抗体分析のために集めた。脾臓を、49日目に、T細胞分析のためにマウスから採取した。

#### 【0317】

F特異的血清IgG力価(GMT)は、以下のとおりであった：

#### 【0318】

## 【数 4】

RV	14 日目	36 日目
裸の DNA プラスミド	439	6712
裸の A317 RNA	78	2291
RV01 (10)	3020	26170
RV01 (08)	2326	9720
RV01 (05)	5352	54907
RV01 (09)	4428	51316
RV05 (01)	1356	5346
RV05 (02)	961	6915
RV01 (10) DNA	5	13
RV13 (02)	644	3616

10

サイトカイン陽性であり、かつ R S V F 5 1 - 6 6 ペプチドに対して特異的な T 細胞の割合は、以下のとおりであり、統計的に有意にゼロを上回る数字のみを示す：

【 0 3 1 9 】

## 【数 5】

20

RV	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN $\gamma$	IL2	IL5	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL2	IL5	TNF $\alpha$
裸の DNA プラスミド	0.04	0.07		0.10	0.57	0.29		0.66
裸の A317 RNA	0.04	0.05		0.08	0.57	0.23		0.67
RV01 (10)	0.07	0.10		0.13	1.30	0.59		1.32
RV01 (08)	0.02	0.04		0.06	0.46	0.30		0.51
RV01 (05)	0.08	0.12		0.15	1.90	0.68		1.94
RV01 (09)	0.06	0.08		0.09	1.62	0.67		1.71
RV05 (01)					0.06	0.04		0.19
RV05 (02)	0.05	0.07		0.11	0.64	0.35		0.69
RV01 (10) DNA				0.03				0.08
RV13 (02)	0.03	0.04		0.06	1.15	0.41		1.18

30

従って、上記リポソーム処方物は、増大した F 特異的 I g G 力価および T 細胞頻度によって決定される場合、上記裸の RNA コントロールと比較して免疫原性を顕著に増大した。リポソームとともに処方したか、またはエレクトロポレーションを使用して裸で送達されたプラスミド DNA は、リポソーム処方された自己複製 RNA より顕著に免疫原性が低かった。

40

【 0 3 2 0 】

( 様々なマウス系統における R S V 免疫原性 )

レプリコン「 v A 1 4 2 」は、R S V の全長野生型表面融合 ( F ) 糖タンパク質をコードするが、その融合ペプチドは欠失しており、その 3 ' 末端は、リボザイム媒介性切断によって形成される。これを、3 種の異なるマウス系統において試験した。

【 0 3 2 1 】

B A L B / c マウスに、0 日目および 2 2 日目に、両側の筋肉内ワクチン接種 ( 5 0  $\mu$  L / 脚 ) を与えた。動物を、8 つの試験群 ( 1 群あたり 5 匹の動物 ) およびナイーブコントロール ( 2 匹の動物 ) へと分けた：

群 1 には、裸のレプリコン ( 1  $\mu$  g ) を与えた。

50



群 2 には、40% D l i n D M A、10% D S P C、48% C h o l、2% P E G 結合体化 D M G を有するリポソーム「R V 0 1 ( 3 7 )」中で送達した1  $\mu$  g レプリコンを与えた。

群 3 には、群 2 と同じものを与えたが、0.1  $\mu$  g R N Aであった。

群 4 には、「R V 0 5 ( 1 1 )」リポソーム(40% R V 0 5 脂質、30% 18:2 P E ( D L o P E )、28% コレステロール、2% P E G - D M G)中、1  $\mu$  g レプリコンであった。

群 5 には、水酸化アルミニウムをアジュバント添加した5  $\mu$  g R S V - F サブユニットタンパク質を与えた。

群 6 は、ナイーブコントロール(2匹の動物)であった。

10

【0322】

血清を、14日目、35日目および49日目に、抗体分析のために集めた。F 特異的血清 I g G G M T は、以下であった：

【0323】

【数6】

日数	1	2	3	4	5	6
14	82	2463	1789	1171	1293	5
35	1538	34181	25605	13718	73809	5

20

35日目において、F 特異的 I g G 1 力価および I g G 2 a 力価 ( G M T ) は、以下のとおりであった：

【0324】

【数7】

IgG	1	2	3	4	5
IgG1	94	6238	4836	8288	78604
IgG2a	5386	77064	59084	14437	24

35日目および49日目のR S V 血清中和抗体力価は、以下のとおりであった(データは、2~5匹のマウスプール(1群あたり1プール)の60% プラーク減少中和力価である)：

30

【0325】

【数8】

日数	1	2	3	4	5	6
35	<20	143	20	32	111	<20
49	<20	139	<20	41	1009	<20

49日目に、T細胞分析のために脾臓を採取した。平均の正味F 特異的サイトカイン陽性T細胞頻度(C D 4 + もしくはC D 8 + )は、以下のとおりであった(これは、統計的に有意にゼロを上回った(C D 4 + についてはR S V ペプチドであるF 5 1 - 6 6、F 1 6 4 - 1 7 8、F 3 0 9 - 3 2 3、またはC D 8 + についてはペプチドF 8 5 - 9 3 およびF 2 4 9 - 2 5 8 に対して特異的)数字のみを示す)：

40

【0326】

## 【数 9】

群	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN $\gamma$	IL2	IL5	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL2	IL5	TNF $\alpha$
1	0.03	0.06		0.08	0.47	0.29		0.48
2	0.05	0.10		0.08	1.35	0.52		1.11
3	0.03	0.07		0.06	0.64	0.31		0.61
4	0.03	0.08		0.07	0.65	0.28		0.58
5		0.02			0.04	0.04		
6								

10

C 5 7 B L / 6 マウスを、同じように免疫化した。第 7 の群には、R S V の全長野生型表面融合糖タンパク質（融合ペプチド欠失）を発現する V R P（ $1 \times 10^6$  I U）を与えた。

## 【0 3 2 7】

血清を、1 4 日目、3 5 日目および 4 9 日目に、抗体分析のために集めた。F 特異的 I g G 力価（G M T）は、以下であった：

## 【0 3 2 8】

## 【数 1 0】

日数	1	2	3	4	5	6	7
14	1140	2133	1026	3045	2975	5	1101
35	1721	5532	3184	9525	39251	5	12139

20

3 5 日目において、F 特異的 I g G 1 力価および I g G 2 a 力価（G M T）は、以下のとおりであった：

## 【0 3 2 9】

## 【数 1 1】

IgG	1	2	3	4	5	6
IgG1	66	247	14	468	56258	79
IgG2a	2170	7685	5055	1573	35	14229

30

3 5 日目および 4 9 日目の R S V 血清中和抗体力価は、以下のとおりであった（データは、2 ~ 5 匹のマウスプール（1 群あたり 1 プール）の 6 0 % プラーク減少中和力価である）：

## 【0 3 3 0】

## 【数 1 2】

日数	1	2	3	4	5	6	7
35	<20	27	29	36	28	<20	<20
49	<20	44	30	36	33	<20	37

40

4 9 日目に、T 細胞分析のために脾臓を採取した。平均の正味 F 特異的サイトカイン陽性 T 細胞頻度（C D 8 +）は、以下のとおりであった（これは、統計的に有意にゼロを上回った（R S V ペプチド F 8 5 - 9 3 および F 2 4 9 - 2 5 8 に対して特異的）数字のみを示す）：

## 【0 3 3 1】

## 【数 1 3】

群	CD4-CD8+			
	IFN $\gamma$	IL2	IL5	TNF $\alpha$
1	0.42	0.13		0.37
2	1.21	0.37		1.02
3	1.01	0.26		0.77
4	2.13	0.70		1.77
5	0.10	0.05		
6				
7	2.83	0.72		2.26

C 3 H / H e Nマウスの9群を、同じようにして免疫化した。F 特異的 I g G 力価 ( G M T ) は、以下であった：

## 【 0 3 3 2】

## 【数 1 4】

日数	1	2	3	4	5	6	7
14	5	2049	1666	298	3519	5	806
35	152	27754	19008	3424	62297	5	17249

3 5 日目の F 特異的 I g G 1 力価および I g G 2 a 力価 ( G M T ) は、以下のとおりであった：

## 【 0 3 3 3】

## 【数 1 5】

IgG	1	2	3	4	5	6
IgG1	5	1323	170	136	83114	189
IgG2a	302	136941	78424	15667	3800	72727

3 5 日目および 4 9 日目の R S V 血清中和抗体力価は、以下のとおりであった：

## 【 0 3 3 4】

## 【数 1 6】

日数	1	2	3	4	5	6	7
35	<20	539	260	101	443	<20	595
49	<20	456	296	82	1148	<20	387

従って、異なる脂質 ( R V 0 1 および R V 0 5 ; p K a は、5 . 8 および 5 . 8 5 ) を、3 種の異なる近交系のマウス系統において試験した。B A L B / c および C 3 H 系統に関しては、R V 0 5 は、R V 0 1 よりも有効性が低かったが、B 6 系統においては、より有効であった。しかし、すべての場合において、上記リポソームは、並行して試験した 2 種のカチオン性ナノエマルジョンより有効であった。

## 【 0 3 3 5】

( コットンラット )

上記 v A 1 4 2 レプリコンをまた、以下から形成したリポソームを使用して、コットンラットにおいて試験した：

( a ) 4 0 % D l i n D M A 、 1 0 % D P S C 、 4 8 % コレステロールおよび 2 % P E G D M G 2 0 0 0 。

( b ) 4 0 % R V 0 5 、 3 0 % D L o P E ( 1 8 : 2 P E ) 、 2 8 % コレステロ

10

20

30

40

50

ールおよび2% PEG DMG 2000。

【0336】

コットンラット（1群あたり4～8匹の動物）に、以下を、0日目および21日目に筋肉内にワクチン接種した（一方の脚に100μL）：

群1 リボソーム（a）中に処方した自己複製RNA（vA142，0.1μg，RSV-F）

群2 リボソーム（b）中に処方した自己複製RNA（vA142，0.1μg，RSV-F）

群3 リボソーム（a）中に処方した自己複製RNA（vA142，1μg，RSV-F）

群4 リボソーム（b）中に処方した自己複製RNA（vA142，1μg，RSV-F）

群5 RSVの全長野生型表面F糖タンパク質を発現するVRP（ $1 \times 10^6$  IU）

群6 水酸化アルミニウムをアジュバント添加したRSV-Fサブユニットタンパク質ワクチン（5μg）

群7 ナイープコントロール（3匹の動物）。

【0337】

全てのコットンラット（群7を除く）に、49日目（第2のワクチン接種の4週間後）に5μg Fサブユニット+水酸化アルミニウムをワクチン接種した。

【0338】

0日目、21日目、35日目、49日目、64日目に、血清を、抗体分析のために集めた。

【0339】

F特異的血清IgG力価（GMT）は、以下のとおりであった：

【0340】

【数17】

群	21日目	35日目	49日目	64日目
1	112	1403	943	15123
2	49	1008	513	15308
3	558	3938	2383	16563
4	342	3207	2151	24494
5	1555	7448	4023	25777
6	8425	81297	54776	82911
7	5	5	5	5

RSV血清中和抗体力価は、以下のとおりであった：

【0341】

## 【数 18】

群	21 日目	35 日目	49 日目	64 日目
1	26	162	58	1772
2	27	371	163	2449
3	66	788	306	161
4	75	448	201	5733
5	137	2879	1029	1920
6	307	2570	1124	2897
7	10	—	—	10

10

従って、コットンラットに、RV01もしくはRV05で処方したvA142レプリコンをワクチン接種し、上記レプリコンを、2種の用量（1.0  $\mu$ gおよび0.1  $\mu$ g）において与えた。第1のレプリコンワクチン接種後、F特異的血清IgG力価は、RV05よりRV01で高かったが、中和力価は、ほぼ等しかった。全ての群における力価は、21日目に与えた同種の第2のワクチン接種によってブーストされた。上記第2のレプリコンワクチン接種の後、F特異的血清IgG力価は、再び、RV05よりRV01で高く、RSV中和力価は、概して同じ傾向をたどった。

## 【0342】

20

49日目におけるタンパク質ワクチン接種は、以前にタンパク質をワクチン接種したコットンラットにおける抗体力価をブーストしなかったが、RNAを以前にワクチン接種したコットンラットにおける力価の大きなブーストを提供した。上記力価（全IgGおよび中和）は、RV01を使用した場合より、RV05を使用した場合に、64日目に高かった。

## 【0343】

（vA317 RSVレプリコンを有する様々なカチオン性脂質）

さらなる実験から、4種の異なるカチオン性脂質（RV01、RV02、RV04およびRV07）を比較した。全てのリポソームは、2% PEG-DMG 2000を含んだが、残りの脂質組成は、異なった。組成および物理的特徴は、以下のとおりであった：

30

## 【0344】

## 【数 19】

名称	脂質 1	他の脂質	Zav 直径 (nm)	pdl	% 被包 <sup>n</sup>
A	RV01, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	158.6	0.088	90.7
B	RV02, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	146.8	0.084	97.5
C	RV04, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	136.7	0.165	67.3
D	RV04, 60%	38% コレステロール	176.3	0.157	55.2
E	RV07, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	144.9	0.204	82
F	RV07, 60%	38% コレステロール	124.1	0.195	80

40

免疫原性の比較のために、さらに、HT、SUVおよびMLVのリポソームを、RV01を用いて、同じ割合の同じ成分を使用して、拡張性がない（non-scalable）（が、より迅速である）製造法で、作製した。簡潔には、37mg/ml DLindMA、12mg/ml DSPC、28mg/ml コレステロール、および8mg/mlのPEG DMG 2000を含むエタノールストック溶液を作製した。上記ストック

50

溶液 100  $\mu$ l を、合計 1 ml のエタノール中に希釈した。リポソームを、150 ミリトル圧力において、30 分間にわたって、50 でロータリーエバポレーターを使用して、上記エタノール溶液を蒸発させることによって調製した。残余エタノールの蒸発を、上記サンプルを、凍結乾燥器の中に減圧下で一晩置いておくことによって確実にした。その脂質フィルムを水和させ、1.0 mL の濾過した脱イオン水を添加することによって分散させ、50 に置いて、上記脂質を MLV へと完全に懸濁させることを確実にした。上記 MLV からアリコートを取り出し、100% のパワーにおいて 5 分間にわたって 1 秒パルスで、プローブソニケーターで超音波処理して、SUV を形成した。両方の得られた溶液を、レプリコン RNA と複合体化した。上記 HT リポソームは、37 mg/ml DLinDMA、12 mg/ml DSPC、28 mg/ml コレステロール、および 8 mg/ml の PEG DMG 2000 を含むエタノールストック溶液を使用して作製した。上記ストック溶液 100  $\mu$ l を、エタノールで 400  $\mu$ l へと希釈した。得られたエタノール溶液を、40  $\mu$ g の RNA を含む 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.5) 600  $\mu$ l へと、絶えず攪拌しながら滴下した。得られた溶液を、10,000 MWCO 透析膜を使用して、4 L の PBS 緩衝液に対して一晩透析した。

#### 【0345】

BALB/c マウス (8 匹/群) に、0 日目および 21 日目に、裸のレプリコン (1  $\mu$ g) もしくは 0.1  $\mu$ g 被包化 RNA を両側の筋肉内ワクチン接種 (50  $\mu$ L/脚) で与えた。これら 2 種の注射の 2 週間後の F 特異的血清 IgG 力価 (GMT) は、以下のとおりであった：

#### 【0346】

#### 【数20】

リポソーム	14 日目	35 日目
裸の A317 RNA	111	469
A	1834	30519
B	1050	5681
C	430	4127
D	779	4693
E	586	6424
F	121	2568
HT	3878	19982
MLV	1381	49480
SUV	4158	37526

RV07 に関しては、DSPC が無いことによって、免疫原性の大きな低下が引き起こされた。

#### 【0347】

さらなる脂質 (RV01、RV03、RV08、RV09、RV14) を、同じようにして試験した：

#### 【0348】

## 【数 2 1】

名称	脂質 1	他の脂質	Zav 直径 (nm)	pdl	% 被包 <sup>n</sup>
G	RV01, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	158.6	0.088	90.7
H	RV03, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	150.3	0.188	83.1
I	RV03, 60%	38% コレステロール	161.1	0.239	68.4
J	RV08, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	191.1	0.227	51.7
K	RV08, 60%	38% コレステロール	214.2	0.208	43.1
L	RV09, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	161.6	0.209	64.5
M	RV09, 60%	38% コレステロール	170.7	0.121	82.4
N	RV14, 60%	30% DSPC	155.5	0.238	63.3
O	RV01, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	96.14	0.087	92

10

## 【 0 3 4 9 】

## 【数 2 2】

20

リポソーム	14 日目	35 日目
裸の A317 RNA	35	457
G	2421	10757
H	15	52
I	16	85
J	991	1921
K	7	610
L	1082	1421
M	146	286
N	27	212
O	4695	19773

30

リポソーム N ( D C - コレステロールあり ) は、不十分にしか機能せず、上記裸の R N A コントロールよりさらに低かった。対照的に、残りのカチオン性脂質は、有用な結果を与えた。リポソーム O を、リポソーム G とは異なる混合法 ( マイクロ流体チップ ) によって調製したところ、このより小さなリポソームは、ほぼ同じ被包化でより良好な結果を与えた。

40

## 【 0 3 5 0 】

さらなる脂質 ( R V 0 1、R V 1 0、R V 1 1、R V 1 5 ) を、同じようにして試験した：

## 【 0 3 5 1 】

## 【数 2 3】

名称	脂質 1	他の脂質	Zav 直径 (nm)	pdl	% 被包 <sup>n</sup>
P	RV01, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	158.6	0.088	90.7
Q	RV10, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	123.6	0.14	80.3
R	RV11, 40%	10% DSPC, 48% コレステロール	137.1	0.155	81
S	RV11, 60%	38% コレステロール	135.4	0.175	79.7
T	RV15, 40%	38% コレステロール	111	0.167	76.4

10

## 【0 3 5 2】

## 【数 2 4】

リポソーム	14 日目	35 日目
裸の A317 RNA	185	982
P	2787	27416
Q	24	161
R	633	1715
S	405	2733
T	761	2459

20

リポソーム Q を除いて、これらリポソームの各々は、上記コントロールより良好に機能した。上記リポソーム Q 中の RV10 脂質は、 $pK_a = 7.86$  を有する。これは、高すぎて、インビボでは有用でないように思われる。しかし、有用な  $pK_a$  範囲  $5.0 \sim 7.6$  内でも、結果は良好であったが、一方がアルキルテルおよび一方がステロイド含有テルを有する脂質はいずれも、RV01 ほど良好な結果を与えなかった。

30

## 【0 3 5 3】

さらなるリポソームを、RV05 で作製した。上記リポソームは全て、40% RV05 および 2% PEG 化脂質を有したが、残りの成分は異なった（しかし、コレステロールは常に含まれていた）。物理的特徴は、以下であった：

## 【0 3 5 4】

## 【数 2 5】

名称	PEG 化脂質	他の成分	Zav (nm)	pdl	% 被包 <sup>n</sup>
U	DMG	10% DSPC, 48% chol	102.2	0.12	76.81
V	コレステロール	10% DSPC, 46% chol, 2% $\alpha$ GC	103.7	0.107	72.58
W	DMG	10% DPyPE, 48% chol	99.6	0.115	78.34
X	DMG	10% 18:3 PC, 48% chol	130	0.14	87.92
Y	DMG	10% 18:2 PC, 48% chol	101.1	0.133	76.64
Z	DMG	30% 18:2 PC, 28% chol	134.3	0.158	57.76

40

 $\alpha$  GC =  $\alpha$  - ガラクトシルセラミド

BALB/c マウスを、前のように試験した：

## 【0 3 5 5】



## 【数 2 6】

注射	14 日目	35 日目
裸の RNA	321	915
U	551	955
V	342	2531
W	1127	3881
X	364	1741
Y	567	5679
Z	1251	5303

10

非対称脂質テール（アルキル＋コレステロール）を有するカチオン性脂質については、中性脂質を D S P C（飽和 C 1 8 脂質テール）から 1 8：2 もしくは 1 8：3 P C（テール 1 つにつき 2 個および 3 個の不飽和二重結合を有する）に変更したところ、全 I g G 力価が増大した。匹敵する結果が、D S P C を D P y P E で置き換えたことで観察された。

## 【0 3 5 6】

上記 R V 0 5 脂質での最終実験において、リポソームを、4 0 % R V 0 5、1 0 % 1 8：2 P C、4 0 % D P y P E、8 % コレステロールおよび 2 % P E G D M G 2 0 0 0 で作製した。これらリポソームは、Z a v 直径 1 2 4 . 7 n m、p d I 0 . 1 7 および R N A 被包 6 1 . 5 % を有した。これらを使用して、裸の R N A（1 μ g）もしくは R V 0 1 ベースのリポソーム（4 0 % D l i n D M A、1 0 % D P S C、4 8 % コレステロール、2 % P E G D M G 2 0 0 0）との比較において、前のように B A L B / c マウスにワクチン接種した（0 . 1 μ g R N A 用量）。F 特異的血清 I g G 力価（G M T）は、以下のとおりであった：

20

## 【0 3 5 7】

## 【数 2 7】

群	14 日目	35 日目
裸の RNA	28	721
RV01	2237	12407
RV05	703	1732

30

従って、上記 R V 0 5 リポソームは、裸の R N A より免疫原性であったが、R V 0 1 リポソームより免疫原性は低かった。

## 【0 3 5 8】

4 9 日目に、T 細胞分析のために、脾臓を採取した。平均の正味 F 特異的サイトカイン陽性 T 細胞頻度（C D 4 + もしくは C D 8 +）は、以下のとおりであった（統計的に有意にゼロを上回った数字のみを示す）（C D 4 + に関しては、R S V ペプチド F 5 1 - 6 6、F 1 6 4 - 1 7 8、F 3 0 9 - 3 2 3 に対して特異的、または C D 8 + に関しては、ペプチド F 8 5 - 9 3 および F 2 4 9 - 2 5 8 に対して特異的）：

40

## 【0 3 5 9】

## 【数 28】

群	CD4-CD8+				CD4-CD8+			
	IFN $\gamma$	IL2	IL5	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL2	IL5	TNF $\alpha$
裸	0.02	0.02	0.04		0.36	0.16		0.28
RV01	0.03	0.03	0.04		0.66	0.17		0.56
RV05	0.06	0.06	0.09		0.86	0.24		0.69

従って、T細胞応答の点では、RV05は、RV01より良好な結果を与えた。

10

## 【0360】

本発明は、例示によって記載されてきたに過ぎず、本発明の範囲および趣旨内に留まりながら、改変が行われ得ることは、理解される。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

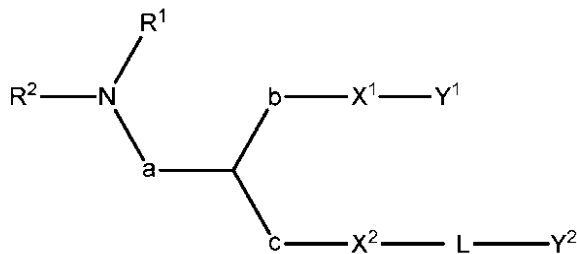
## (項目1)

目的のポリペプチドをコードするRNAを中に被包しているリポソームであって、ここで該リポソームは、式(I)の化合物および式(XI)の化合物からなる群より選択される少なくとも1種の化合物を含み、ここで

式(I)は、以下：

## 【化40】

20



であり、ここで：

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が結合する窒素原子と一緒にあって、必要に応じて置換された、C<sub>3-20</sub>-ヘテロシクロアルキル、C<sub>3-20</sub>-ヘテロシクロアルケニル、C<sub>3-20</sub>-ヘテロシクロアルキニルもしくはC<sub>5-20</sub>-ヘテロアリール基を形成し；

aは、存在しないか、もしくは必要に応じて置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

bは、存在しないか、もしくは必要に応じて置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

cは、存在しないか、もしくは必要に応じて置換されたC<sub>1-4</sub>アルキレンであり；

X<sup>1</sup>は、OもしくはSであり；

X<sup>2</sup>は、OもしくはSであり；

Y<sup>1</sup>は、必要に応じて置換された、C<sub>10-30</sub>アルケニル、C<sub>10-30</sub>アルキニル、C<sub>10-30</sub>ヘテロアルケニルもしくはC<sub>10-30</sub>ヘテロアルキニルであり；

40

Lは、存在しないか、もしくは-(L<sup>a</sup>)<sub>d</sub>-(L<sup>b</sup>)<sub>e</sub>-(L<sup>c</sup>)<sub>f</sub>-であり、ここでL<sup>a</sup>は、必要に応じて置換された、C<sub>1-15</sub>アルキレン、C<sub>1-15</sub>アルケニレン、C<sub>1-15</sub>アルキニレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルケニレンもしくはC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキニレンであり；

L<sup>b</sup>は、必要に応じて置換された、C<sub>6-14</sub>アリーレンもしくはC<sub>5-13</sub>ヘテロアリーレンであり；

L<sup>c</sup>は、必要に応じて置換された、C<sub>1-15</sub>アルキレン、C<sub>1-15</sub>アルケニレン、C<sub>1-15</sub>アルキニレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルキレン、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルケニレンもしくはC<sub>1-15</sub>ヘテロアルキニレンであり；

50

d は、0 もしくは 1 であり；

e は、0 もしくは 1 であり；

f は、0 もしくは 1 であり；そして

Y<sup>2</sup> は、必要に応じて置換されたステロイドであり、

式 (X I) は、

R<sup>a</sup> - (A A)<sub>z</sub> - R<sup>b</sup>

であり、ここで

R<sup>a</sup> は、N 末端アルキルアミドであり；

z は、2 ~ 10 の整数であり；

各 A A は、アミノ酸であり、ここで、少なくとも 1 個のヒスチジンが存在すること、およ  
び少なくとも 1 個のカチオン性アミノ酸が存在することを条件とし；

R<sup>b</sup> は、- H もしくは - NH<sub>2</sub> である、

リボソーム。

(項目 2)

項目 1 に記載のリボソームであって、80 nm ~ 160 nm の範囲の直径を有する、リボ  
ソーム。

(項目 3)

前記 RNA は、自己複製 RNA である、前述の項目のいずれかに記載のリボソーム。

(項目 4)

前記自己複製 RNA 分子は、

(i) RNA を該自己複製 RNA 分子から転写し得る RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ  
、および

(ii) 前記目的のポリペプチド

をコードする、項目 3 に記載のリボソーム。

(項目 5)

前記 RNA 分子は、2 個のオープンリーディングフレームを有し、該 2 個のオープンリー  
ディングフレームのうちの第 1 のものは、アルファウイルスレプリカーゼをコードし、該  
2 個のオープンリーディングフレームのうちの第 2 のものは、前記目的のポリペプチドを  
コードする、項目 4 に記載のリボソーム。

(項目 6)

前記 RNA 分子は、9000 ~ 12000 ヌクレオチド長である、前述の項目のいずれか  
に記載のリボソーム。

(項目 7)

前記目的のポリペプチドは、免疫原である、前述の項目のいずれかに記載のリボソーム。

(項目 8)

前記免疫原は、細菌、ウイルス、真菌もしくは寄生生物に対してインビボで免疫応答を誘  
発し得る、項目 7 に記載のリボソーム。

(項目 9)

前記免疫原は、RS ウイルス糖タンパク質 F に対してインビボで免疫応答を誘発し得る、  
項目 8 に記載のリボソーム。

(項目 10)

前述の項目のいずれかに記載のリボソームを含む、薬学的組成物。

(項目 11)

脊椎動物における防御免疫応答を惹起するための方法であって、該方法は、項目 1 ~ 9 に  
記載のリボソームまたは項目 10 に記載の薬学的組成物の有効量を、該脊椎動物に投与す  
る工程を包含する、方法。

【0361】

表 1：有用なリン脂質

DDPC            1, 2 - ジデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン

DEPA            1, 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート

DEPC	1, 2 - エルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
DEPE	1, 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	
DEPG	1, 2 - ジエルコイル - sn - グリセロ - 3 [ホスファチジル - rac - (1 - グリセロール . . . )]	
DLOPC	1, 2 - リノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
DLP A	1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート	
D L P C	1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
D L P E	1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	10
D L P G	1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 [ホスファチジル - rac - (1 - グリセロール . . . )]	
D L P S	1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン	
D M G	1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン	
D M P A	1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート	
D M P C	1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
D M P E	1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	
D M P G	1, 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 [ホスファチジル - rac - (1 - グリセロール . . . )]	20
D M P S	1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン	
D O P A	1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート	
D O P C	1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
D O P E	1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	
D O P G	1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 [ホスファチジル - rac - (1 - グリセロール . . . )]	
D O P S	1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン	
D P P A	1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート	30
D P P C	1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	
D P P E	1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	
D P P G	1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 [ホスファチジル - rac - (1 - グリセロール . . . )]	
D P P S	1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン	
D P y P E	1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン	
D S P A	1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート	
D S P C	1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルコリン	40
D S P E	1, 2 - ジステアロイル (D i o s t e a r p y l) - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルエタノールアミン	
D S P G	1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 [ホスファチジル - rac - (1 - グリセロール . . . )]	
D S P S	1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチジルセリン	
E P C	卵 - P C	
H E P C	水素化卵 P C	
H S P C	高純度水素化ダイズ P C	
H S P C	水素化ダイズ P C	
L Y S O P C	M Y R I S T I C 1 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファ	50

チジルコリン			
LYSOPC	PALMITIC	1 - パルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファ	
チジルコリン			
LYSOPC	STEARIC	1 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファ	
チジルコリン			
ミルクスフィンゴミエリン	MPPC	1 - ミリストイル , 2 - パルミトイル - sn - グリ	
セロ		3 - ホスファチジルコリン	
MSPC		1 - ミリストイル , 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファ	
チジルコリン			
PMP C		1 - パルミトイル , 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファ	10
チジルコリン			
POPC		1 - パルミトイル , 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチ	
ジルコリン			
POPE		1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチ	
ジルエタノールアミン			
POPG		1 , 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 [ ホスファチジル - rac	
		- ( 1 - グリセロール ) . . . ]	
PSPC		1 - パルミトイル , 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファ	
チジルコリン			
SMP C		1 - ステアロイル , 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファ	20
チジルコリン			
SOPC		1 - ステアロイル , 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファチ	
ジルコリン			
SPPC		1 - ステアロイル , 2 - パルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスファ	
チジルコリン			
【 0 3 6 2 】			

## 【 数 2 9 】

## 参考文献

- [1] Johanning *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res* 23:1495-1501.
- [2] Heyes *et al.* (2005) *J Controlled Release* 107:276-87.
- [3] WO2005/121348.
- [4] *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols.* (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X.
- [5] *Liposome Technology*, volumes I, II & III. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006.
- [6] *Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes).* (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002. 10
- [7] Jeffs *et al.* (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372.
- [8] WO2011/076807.
- [9] Tarwadi *et al.* (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:940-950.
- [10] WO2005/113782.
- [11] WO2011/005799.
- [12] El Ouahabi *et al.* (1996) *FEBS Letts* 380:108-12.
- [13] Giuliani *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29):10834-9. 20
- [14] WO2009/016515.
- [15] WO02/34771.
- [16] WO2005/032582.
- [17] WO2010/119343.
- [18] WO2006/110413.
- [19] WO2005/111066.
- [20] WO2005/002619.
- [21] WO2006/138004.
- [22] WO2009/109860. 30
- [23] WO02/02606.
- [24] WO03/018054.
- [25] WO2006/091517.
- [26] WO2008/020330.
- [27] WO2006/089264.
- [28] WO2009/104092.
- [29] WO2009/031043.
- [30] WO2007/049155.
- [31] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472. 40
- [32] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [33] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)

## 【 数 3 0 】

[34] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[35] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)

[36] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).

[37] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press)

[38] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)

[39] Yoneyama & Fujita (2007) *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18:545-51.

[40] Maurer *et al.* (2001) *Biophysical Journal*, 80: 2310-2326.

[41] Perri *et al.* (2003) *J Virol* 77:10394-10403.

10

## 【 図 1 】

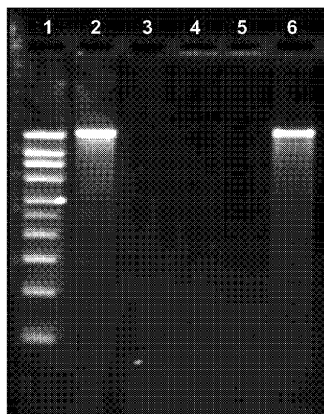


FIG. 1

## 【 図 3 】

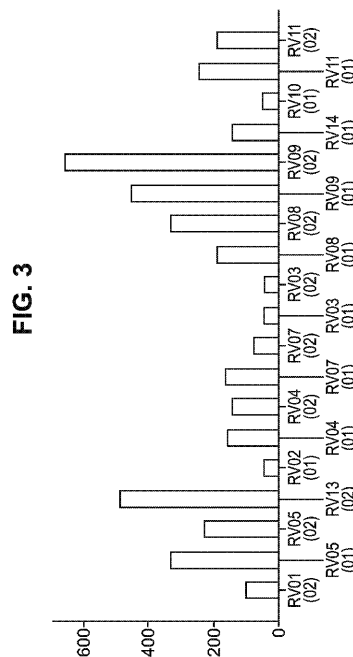
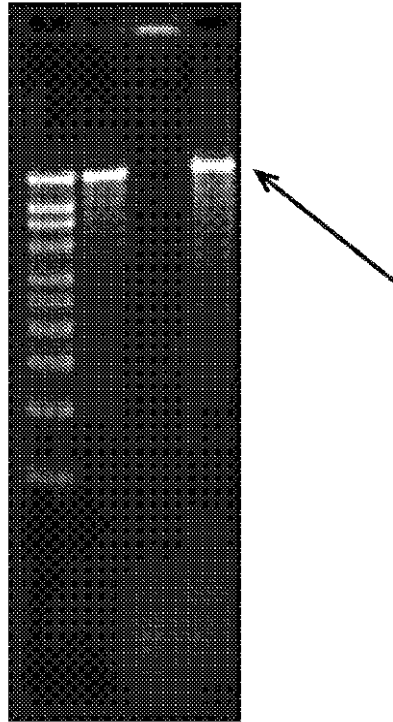


FIG. 3

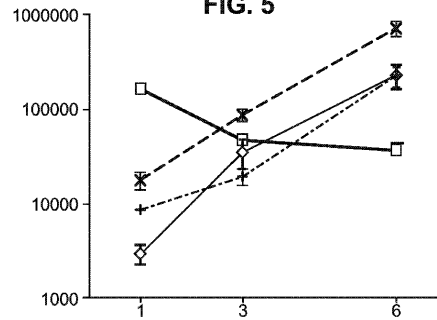
【 図 4 】

FIG. 4



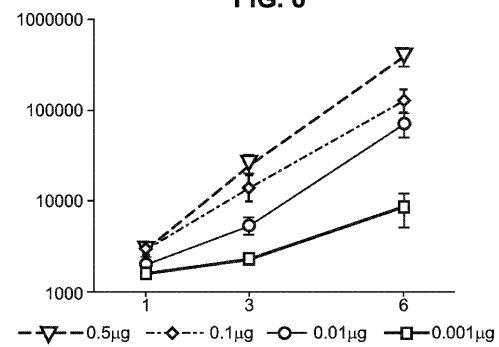
【 図 5 】

FIG. 5



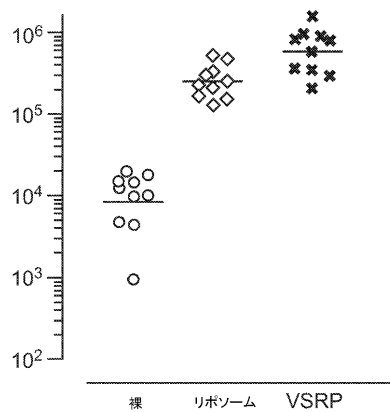
【 図 6 】

FIG. 6



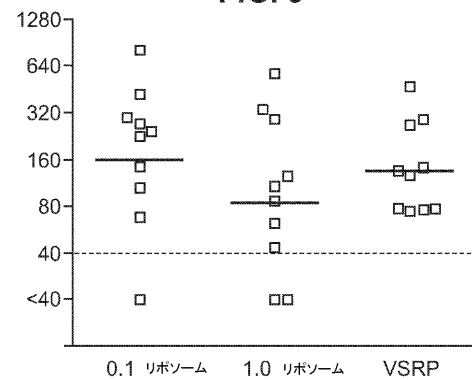
【 図 7 】

FIG. 7



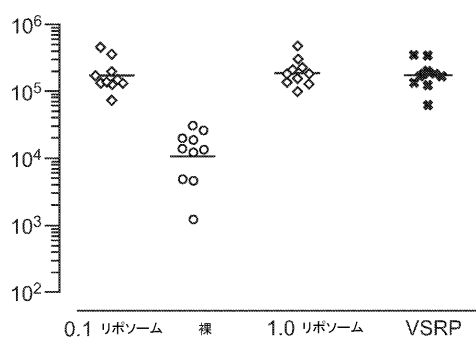
【 図 9 】

FIG. 9



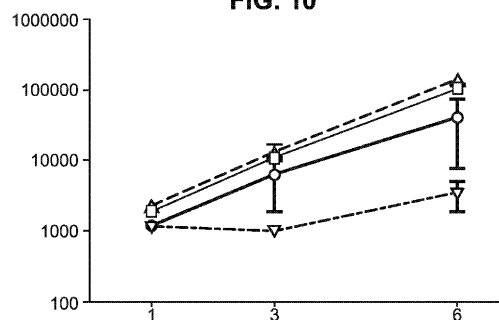
【 図 8 】

FIG. 8



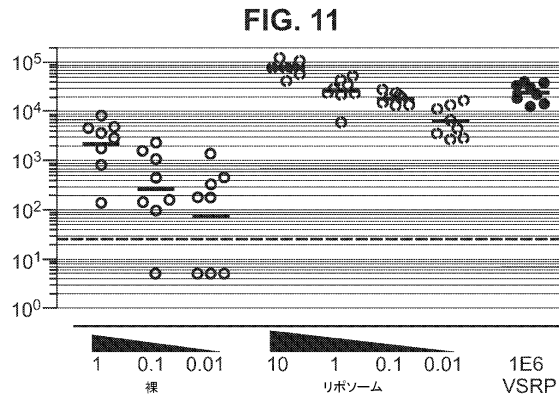
【 図 10 】

FIG. 10

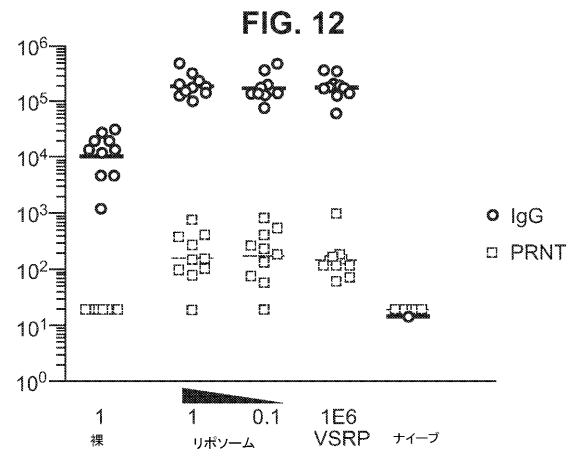




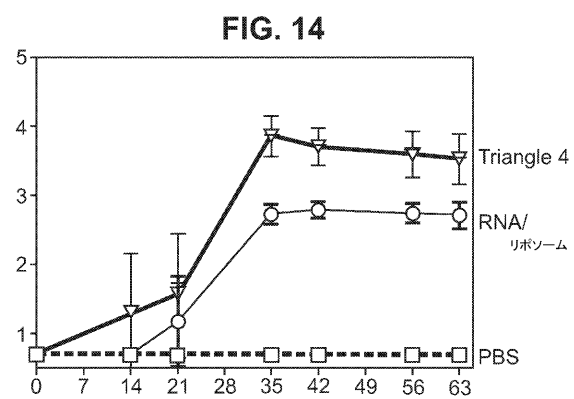
【図 1 1】



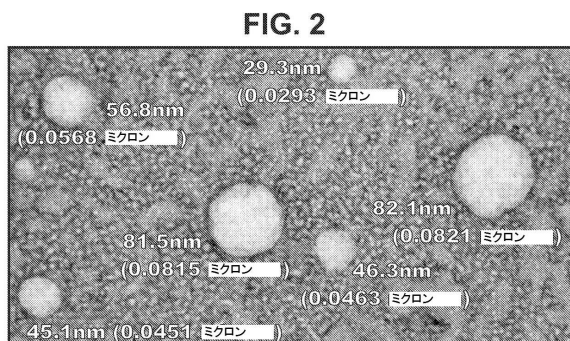
【図 1 2】



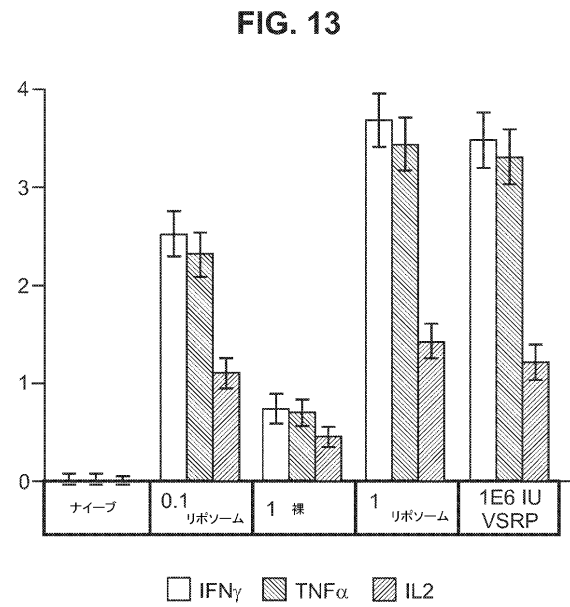
【図 1 4】



【図 2】



【図 1 3】



【配列表】

0005908477000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/10	(2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査官 澤田 浩平

- (56)参考文献 国際公開第2008/103276(WO, A1)  
 米国特許出願公開第2006/0240554(US, A1)  
 MARC T ABRAMS, MOLECULAR THERAPY, 英国, NATURE PUBLISHING GROUP, 2010年 1月 1日, V18 N1, P171-180  
 JINGTAO ZHANG, LANGMUIR, 米国, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2011年 1月 1日, V27 N5, P1907-1914  
 Sean C Semple et. al., NATURE BIOTECHNOLOGY, 2010年 2月, 28(2), p.172-178

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2 ,  
 A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 1 / 8 0 ,  
 A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4 ,  
 A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 8 / 0 0 ,  
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

P u b M e d