(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2018-135367
(P2018-135367A)
(43)公開日　平成30年8月30日(2018.8.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 31/7084	***(2006.01)***	A61K	31/7084	ZNA	4B065
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00		4C076
A61P 37/04	***(2006.01)***	A61P	37/04		4C084
A61P 35/02	***(2006.01)***	A61P	35/02		4C085
A61K 39/02	***(2006.01)***	A61K	39/02		4C086

審査請求 有　請求項の数 20　ＯＬ　（全 67 頁）　最終頁に続く

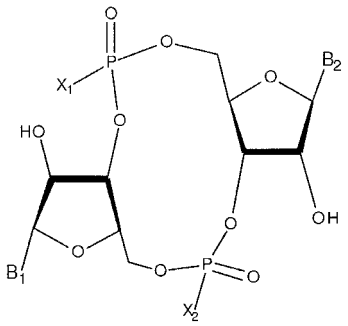
(21)出願番号　特願2018-84405(P2018-84405)
(22)出願日　平成30年4月25日(2018.4.25)
(62)分割の表示　特願2015-548023(P2015-548023)の分割
原出願日　平成25年12月13日(2013.12.13)
(31)優先権主張番号　61/737,006
(32)優先日　平成24年12月13日(2012.12.13)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/790,514
(32)優先日　平成25年3月15日(2013.3.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　515111543
アデュロ　バイオテック，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９４７１０，バークリー，７４０　ハインツ　アベニュー
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡　亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田　直
(74)代理人　100191086
弁理士　高橋　香元

最終頁に続く

(54)【発明の名称】明確な立体化学を有する環状プリンジヌクレオチドを含む組成物ならびにそれらの調製および使用方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ＳＴＩＮＧ（インターフェロン遺伝子刺激因子）として知られている、最近発見された細胞質受容体を介してＤＣ（樹状細胞）を活性化する、環状－ジ－ヌクレオチド（ＣＤＮ）免疫刺激剤の提供。
【解決手段】ＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１（ＴＡＮＫ結合キナーゼ）活性化を誘導する１つ以上の環状プリンジヌクレオチドまたはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩を含む組成物であって、前記組成物中に存在する前記環状プリンジヌクレオチドは実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマー、またはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩であり、前記環状プリンジヌクレオチドは好ましくはチオリン酸環状プリンジヌクレオチドである、組成物。
【選択図】図１



$X_1 = X_2 = O^-$,
$X_1 = X_2 = S^-$,
又は　$X_1 = O^-, X_2 = S^-$

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１活性化を誘導する１つ以上の環状プリンジヌクレオチドまたはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩を含む組成物であって、前記組成物中に存在する前記環状プリンジヌクレオチドは実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマー、またはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩であり、前記環状プリンジヌクレオチドは好ましくはチオリン酸環状プリンジヌクレオチドである、組成物。
【請求項２】
さらに、薬学的に許容される賦形剤を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
さらに、１つ以上の所定の抗原に対する免疫応答を刺激するように選択された１つ以上のワクチンを含む、請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
前記ワクチン（複数可）は、下記：対象となる抗原、精製抗原、抗原を発現および／または分泌するように組換え操作された生ウイルスまたは細菌送達ベクター、抗原がロードされたまたは抗原をコードする核酸を含む組成物でトランスフェクトされた細胞を含む抗原提示細胞（ＡＰＣ）ベクター、リポソーム抗原送達ビヒクル、または抗原をコードするネイキッド核酸ベクターを含む不活性化または弱毒化細菌またはウイルスを含む、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
前記ワクチン（複数可）はＧＭ－ＣＳＦ、ＣＣＬ２０、ＣＣＬ３、ＩＬ－１２ｐ７０、ＦＬＴ－３リガンドの１つ以上を発現し、分泌する不活性化腫瘍細胞を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項６】
さらに、１つ以上のアジュバント、脂質、二重層間架橋多重膜小胞、生分解性ポリ（Ｄ，Ｌ－乳酸の－コ－グリコール酸）［ＰＬＧＡ］系またはポリ無水物系ナノ粒子または微小粒子、およびナノポーラス粒子担持脂質二重層、ＣＴＬＡ－４およびＰＤ－１経路アンタゴニスト、ＰＤ－１経路遮断薬、自然免疫を誘導する不活性化細菌（例えば、不活性化または弱毒化リステリア・モノサイトゲネス）、トール様受容体（ＴＬＲ）、（ＮＯＤ）様受容体（ＮＬＲ）、レチノイン酸誘導性遺伝子（ＲＩＧ）－Ｉ様受容体（ＲＬＲ）、Ｃ型レクチン受容体（ＣＬＲ）を介して自然免疫活性化を媒介する組成物、病原体関連分子パターン（「ＰＡＭＰ」）、または化学療法薬を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項７】
前記１つ以上のチオリン酸環状プリンジヌクレオチドは、ｃ－ジ－ＡＭＰチオリン酸、ｃ－ジ－ＧＭＰチオリン酸、ｃ－ジ－ＩＭＰチオリン酸、ｃ－ＡＭＰ－ＧＭＰチオリン酸、ｃ－ＡＭＰ－ＩＭＰチオリン酸、およびｃ－ＧＭＰ－ＩＭＰチオリン酸；それらの組み合わせ；それらのプロドラッグ；および／またはそれらの薬学的に許容される塩からなる群より選択される、実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐチオリン酸ジアステレオマーを含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項８】
前記チオリン酸環状プリンジヌクレオチドは１つ以上の脂質と共に製剤化される、請求項１～９のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項９】
前記１つ以上の脂質はジギトニンを含む、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記１つ以上の脂質はリポソームを形成する、請求項８に記載の組成物。
【請求項１１】
前記１つ以上のチオリン酸環状プリンジヌクレオチドはナノ粒子として製剤化される、

請求項１－１０の１つに記載の組成物。
【請求項１２】
さらに、１つ以上のアジュバントを含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１３】
前記１つ以上のアジュバントはＣｐＧおよび／またはモノホスホリルリピドＡを含む、請求項１２に記載の組成物。
【請求項１４】
請求項１～１３のいずれか１項に記載の組成物を個体に非経口的に投与することを含む、個体において癌に対する免疫応答を誘導する方法。
【請求項１５】
前記組成物は不活性化腫瘍細胞または個体の癌に型対応する異なる腫瘍細胞の混合物を含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記腫瘍細胞は下記：結腸直腸癌細胞、気道消化管扁平上皮癌細胞、肺癌細胞、脳癌細胞、肝臓癌細胞、胃癌細胞、肉腫細胞、白血病細胞、リンパ腫細胞、多発性骨髄腫細胞、卵巣癌細胞、子宮癌細胞、乳癌細胞、メラノーマ細胞、前立腺癌細胞、膵がん細胞、および腎がん細胞からなる群より選択される、請求項１４または１５の１つに記載の方法。
【請求項１７】
請求項１～１３のいずれか１項に記載の組成物を個体に非経口的に投与することを含む、個体において病原体に対する免疫応答を誘導する方法。
【請求項１８】
ＳＴＩＮＧに結合する１つ以上のチオリン酸環状プリンジヌクレオチドを個体に非経口的に投与することを含む、個体においてＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１活性化を誘導する方法であって、前記組成物中に存在する前記チオリン酸環状プリンジヌクレオチドは実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマーである、方法。
【請求項１９】
前記１つ以上のチオリン酸環状プリンジヌクレオチドは、ｃ－ジ－ＡＭＰチオリン酸、ｃ－ジ－ＧＭＰチオリン酸、ｃ－ジ－ＩＭＰチオリン酸、ｃ－ＡＭＰ－ＧＭＰチオリン酸、ｃ－ＡＭＰ－ＩＭＰチオリン酸、およびｃ－ＧＭＰ－ＩＭＰチオリン酸、またはそれらの組み合わせからなる群より選択される、実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマーを含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記チオリン酸環状プリンジヌクレオチドは１つ以上の脂質と共に製剤化される、請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記１つ以上の脂質はジギトニンを含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記１つ以上の脂質はリポソームを形成する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２３】
さらに、１つ以上のアジュバントを含む、請求項１８～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記１つ以上のアジュバントはＣｐＧおよび／またはモノホスホリルリピドＡを含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
さらに、１つ以上のワクチンを患者に投与することを含み、前記ワクチン（複数可）は、１つ以上の抗原を発現する病原体に対する免疫応答を刺激するように選択された１つ以上の抗原を含む、請求項１８～２４のいずれか１項に記載の方法、。
【請求項２６】

前記ワクチン（複数可）は、下記：対象となる抗原、精製抗原、抗原を発現および／または分泌するように組換え操作された生ウイルスまたは細菌送達ベクター、抗原がロードされたまたは抗原をコードする核酸を含む組成物でトランスフェクトされた細胞を含む抗原提示細胞（ＡＰＣ）ベクター、リポソーム抗原送達ビヒクル、または抗原をコードするネイキッド核酸ベクターを含む不活性化または弱毒化細菌またはウイルスを含む、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記１つ以上のチオリン酸環状プリンジヌクレオチドはナノ粒子として製剤化される、請求項１８～２６のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２８】

癌の治療において使用するための請求項１～１３のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２９】

病原体に対する免疫応答の誘導において使用するための請求項１～１３のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項３０】

個体におけるＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１活性化の誘導において使用するための請求項１～１３のいずれか１項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本出願は、２０１２年１２月１３日に出願された米国特許仮出願６１／７３７，００６号、および２０１３年３月１５日に出願された米国特許仮出願６１／７９０，５１４号（その各々は、全ての表、図および特許請求の範囲全てを含むその全体が本明細書に組み込まれる）の優先権を主張する。

【背景技術】

【０００２】

発明の背景の下記記載は、読み手が本発明を理解するのを助けるために提供されるにすぎず、本発明の先行技術を説明するまたは構成することを認めるものではない。

【０００３】

ヒト免疫系は、一般に、「自然免疫」および「適応免疫」と呼ばれる２つの戦闘に分けることができる。免疫系の先天性戦闘は主に、多くの可溶性因子、例えば補体系およびケモカイン／サイトカイン系；ならびに多くの特殊細胞型、例えばマスト細胞、マクロファージ、樹状細胞（ＤＣ）、およびナチュラルキラー細胞を介する初期炎症反応に関与する。対照的に、適応免疫戦闘は、抗原に対する免疫記憶において重要な役割を果たすＣＤ８＋およびＣＤ４＋　Ｔ細胞応答と共に、遅延性の長期にわたる抗体応答を含む。免疫系の第３の戦闘は、γδＴ細胞および制限されたＴ細胞受容体レパートリーを有するＴ細胞、例えばＮＫＴ細胞およびＭＡＩＴ細胞を含むものとして同定され得る。

【０００４】

抗原への有効な免疫応答では、抗原提示細胞（ＡＰＣ）は抗原を適正なＭＨＣ状況において処理し、Ｔ細胞に提示しなければならず、これにより、その後、細胞傷害性およびヘルパーＴ細胞のＴ細胞刺激のいずれかが得られる。抗原提示後、ＡＰＣおよびＴ細胞の両方上で同時刺激分子の成功した相互作用が起こるはずであり、活性化は中断されるであろう。ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－１２は多くの腫瘍モデルにおいて有効な炎症促進性分子として機能する。例えば、ＧＭ－ＣＳＦにより、骨髄前駆細胞は増殖し、樹状細胞（ＤＣ）に分化するように誘導されるが、Ｔ細胞の活性化に必要な有効な抗原提示細胞へのそれらの成熟を活性化するには追加のシグナルが必要である。有効な免疫療法への障壁には、適切な大きさおよび機能の細胞傷害性ＣＤ８　Ｔ細胞の誘導を制限する可能性のある標的抗原への寛容性、生成されたＴ細胞の悪性細胞部位への輸送の悪さ、および誘導されたＴ細胞応答の持続の悪さが含まれる。

【０００５】

腫瘍－細胞デブリを貪食するＤＣは、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）提示のための材料を処理し、同時刺激分子の発現を上方制御し、局所リンパ節に移動し、腫瘍特異的リンパ球を刺激する。この経路では腫瘍関連抗原に反応するＣＤ４＋およびＣＤ８＋　Ｔ細胞の増殖および活性化が得られる。実際、そのような細胞は、頻繁に患者の血液、リンパ組織、および悪性病変において検出することができる。

【０００６】

免疫チェックポイント阻害薬または他の療法との組み合わせにより治療的ワクチン接種－直接または間接のいずれか－の効力を増強する、併用療法レジメンと一緒の免疫－回避の基礎となるメカニズムの新たな知見は有効な抗腫瘍免疫を誘導するワクチンの開発の基礎として機能してきた。ＣＤＮ環状－ジ－ＡＭＰ（リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）により産生）およびその類似体環状－ジ－ＧＭＰ（レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）により産生）は、宿主細胞によりＰＡＭＰ（病原体関連分子パターン）として認識され、これは、ＳＴＩＮＧとして知られているＰＲＲ（病原体認識受容体）に結合する。ＳＴＩＮＧは宿主哺乳類細胞の細胞質中のアダプタータンパク質であり、これはＴＡＮＫ結合キナーゼ（ＴＢＫ１）‐ＩＲＦ３シグナル伝達軸を活性化し、ＩＦＮ－βおよび自然免疫を強く活性化する他のＩＲＦ－３依存性遺伝子産物の誘導が得られる。現在、ＳＴＩＮＧは宿主サイトゾル監視経路の一構成要素であり、これは細胞内病原体による感染を感知し、これに応答して、ＩＦＮ－βの生成を誘導し、抗原特異的ＣＤ４およびＣＤ８　Ｔ細胞の両方ならびに病原体－特異抗体からなる適応性保護病原体特異的免疫応答の発現が得られることが認識されている。環状プリンジヌクレオチドの例は、例えば、米国特許第７，７０９４５８号および７，５９２，３２６号；ＷＯ２００７／０５４２７９号；およびＹａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｉｏｏｒｇ．　Ｍｅｄ．　Ｃｈｅｍ　Ｌｅｔｔ．　１８：　５６３１　（２００８）（各々が、これによって参照により組み込まれる）で少し詳しく記載される。

【０００７】

従来の治療アプローチに対して難治性となり得る癌などの疾患を治療する免疫学的戦略に対する改善された組成物および方法が依然として必要である。

【発明の概要】

【０００８】

本発明の目的は、ＳＴＩＮＧ（インターフェロン遺伝子刺激因子）として知られている最近発見された細胞質受容体を介してＤＣを活性化する、新規の高い活性の環状－ジ－ヌクレオチド（ＣＤＮ）免疫刺激剤を提供することである。特に、本発明のＣＤＮは、ＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１活性化を誘導する１つ以上の環状プリンジヌクレオチドを含む組成物の形態で提供され、ここで、組成物中に存在する環状プリンジヌクレオチドは実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐ立体異性体であり、特に実質的に純粋なＲｐ，Ｒｐ、またはＲｐＳｐ　ＣＤＮチオリン酸ジアステレオマーである。

【０００９】

第１の態様では、本発明は１つ以上の環状プリンジヌクレオチドを含む組成物を提供し、ここで、組成物中に存在する環状プリンジヌクレオチドは実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマー、またはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩である。これらの組成物は、ＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１活性化を誘導し、１つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含んでもよく、本明細書で記載されるアジュバントとしての用途を見出し得る。以下で記載される環状プリンジヌクレオチドのチオリン酸誘導体が特に好ましい。

【００１０】

それらのアジュバントとしての役割では、ある一定の実施形態では、本組成物はワクチン（複数可）を使用する治療的または予防的戦略においてアジュバントとして使用することができる。よって、実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマー、またはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩は、１つ以上の所定の抗原に対する

免疫応答を刺激するように選択された１つ以上のワクチンと共に使用することができる。本発明の実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマー、またはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩は、そのようなワクチンと一緒に、またはこれに加えて提供することができる。

【００１１】

そのようなワクチン（複数可）は下記を含む不活性化もしくは弱毒化細菌またはウイルスを含むことができる：対象となる抗原、精製抗原、抗原を発現および／または分泌するように組換え操作された生ウイルスまたは細菌送達ベクター、抗原がロードされたまたは抗原をコードする核酸を含む組成物でトランスフェクトされた細胞を含む抗原提示細胞（ＡＰＣ）ベクター、リポソーム抗原送達ビヒクル、または抗原をコードするネイキッド核酸ベクター。このリストは、制限することを意味しない。例として、そのようなワクチン（複数可）はまた、ＧＭ－ＣＳＦ、ＣＣＬ２０、ＣＣＬ３、ＩＬ－１２ｐ７０、ＦＬＴ－３リガンドの１つ以上を発現し、分泌する不活性化腫瘍細胞を含み得る。

【００１２】

本発明の組成物は治療の必要な個体に、様々な非経口および非経口でない経路により、薬学的に許容される担体、アジュバントおよびビヒクルを含む製剤で投与され得る。好ましい経路は非経口であり、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内、くも膜下腔内および硬膜外投与の１つ以上が挙げられるが、それらに限定されない。皮下投与による投与が特に好ましい。好ましい医薬組成物は、水性または水中油エマルジョンとして製剤化される。

【００１３】

本発明の組成物は、１つ以上の追加の薬学的に活性な構成成分、例えばアジュバント、ジギトニンなどの脂質、リポソーム、ＣＴＬＡ－４およびＰＤ－１経路アンタゴニスト、ＰＤ－１経路遮断薬、自然免疫を誘導する不活性化細菌（例えば、不活性化または弱毒化リステリア・モノサイトゲネス）、トール様受容体（ＴＬＲ）、（ＮＯＤ）様受容体（ＮＬＲ）、レチノイン酸誘導性遺伝子に基づく（ＲＩＧ）－Ｉ様受容体（ＲＬＲ）、Ｃ型レクチン受容体（ＣＬＲ）を介して自然免疫活性化を媒介する組成物、病原体関連分子パターン（「ＰＡＭＰ」）、化学療法薬、などを含むことができ、またはこれらと共に投与することができる。

【００１４】

以下で記載されるように、１つ以上の脂質と共に製剤化された環状プリンジヌクレオチドは改善された特性、例えば改善された樹状細胞活性化活性を示すことができる。よって、本発明はまた、１つ以上のＣＤＮおよび１つ以上の脂質を含む組成物に関する。ある一定の好ましい実施形態では、１つ以上のＣＤＮは、ジギトニン、リポソーム製剤、および／または水中油エマルジョンと共に製剤化される。請求項１－５の１つに記載の組成物は、さらに、ＣＴＬＡ－４アンタゴニストおよびＴＬＲ－４アゴニストの１つ以上を含む。

【００１５】

好ましい実施形態では、１つ以上のチオリン酸環状プリンジヌクレオチドはｃ－ジ－ＡＭＰチオリン酸、ｃ－ジ－ＧＭＰチオリン酸、ｃ－ジ－ＩＭＰチオリン酸、ｃ－ＡＭＰ－ＧＭＰチオリン酸、ｃ－ＡＭＰ－ＩＭＰチオリン酸、およびｃ－ＧＭＰ－ＩＭＰチオリン酸、またはそれらの組み合わせ（そのプロドラッグおよび薬学的に許容される塩を含む）からなる群より選択される、実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐチオリン酸ジアステレオマーを含む。

【００１６】

関連する態様では、本発明は、個体において免疫応答を誘導する、刺激する、または補助する方法に関する。これらの方法は、個体に１つ以上の環状プリンジヌクレオチドを含む組成物を投与することを含み、ここで、組成物中に存在するチオリン酸環状プリンジヌクレオチドは、個体への、実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマー、またはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩である。好ましい投与経路は非経口である。上述のように、そのような環状プリンジヌクレオチドのチオリン酸誘導体が特に好ましい。

【００１７】
ある一定の実施形態では、方法は癌治療の方法である。例として、本発明の実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマー、またはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩は当技術分野で知られている１つ以上の癌ワクチン組成物と一緒に、またはこれに加えて提供され得る。そのような治療を受ける患者は下記からなる群より選択され癌を患う可能性がある：結腸直腸癌細胞、気道消化管扁平上皮癌、肺癌、脳癌、肝臓癌、胃癌、肉腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、卵巣癌、子宮癌、乳癌、メラノーマ、前立腺癌、膵がん、および腎がん。他の実施形態では、方法は病原体への免疫応答を誘導する、刺激する、または補助する方法である。

【００１８】
さらに他の関連する態様では、本発明は、個体においてＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１活性化を誘導する方法に関し、ＳＴＩＮＧに結合する１つ以上の環状プリンジヌクレオチドを個体に投与することを含み、ここで、組成物中に存在する環状プリンジヌクレオチドは、個体への実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマー、またはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩である。好ましい投与経路は非経口である。上述のように、そのような環状プリンジヌクレオチドのチオリン酸誘導体が特に好ましい。

【００１９】
本明細書で記載される方法は、癌抗原を発現する癌細胞を除去するまたは死滅させるために哺乳類に投与される一次療法の前、またはその後に、哺乳類に、有効量の本発明の実質的に純粋なＣＤＮ、またはそのプロドラッグもしくは薬学的に許容される塩を投与することを含むことができる。本発明の組成物はネオアジュバント療法として提供してもよいが；しかしながら、好ましい実施形態では、本発明の組成物は、一次療法後に投与される。様々な実施形態では、一次療法は癌細胞を哺乳類から除去する外科手術、哺乳類における癌細胞を死滅させる放射線療法、または外科手術および放射線療法の両方を含む。

【００２０】
他の実施形態では、本明細書で記載される方法は、Ｔｈ１のＴｈ２免疫へのシフトが臨床的有益性を与える障害の治療のために、哺乳類に有効量の、本発明の実質的に純粋なＣＤＮを投与することを含むことができる。細胞性免疫（ＣＭＩ）は、サイトカインＩＬ－２、インターフェロン（ＩＦＮ）－γおよび腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－αを産生するＴＨ１　ＣＤ４＋　Ｔリンパ球と関連する。対照的に、液性免疫はＩＬ－４、ＩＬ－６およびＩＬ－１０を産生するＴＨ２　ＣＤ４＋　Ｔリンパ球と関連する。ＴＨ１応答に向かう免疫偏向は典型的には、細胞傷害性Ｔ細胞リンパ球（ＣＴＬ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージおよび単球の活性化を生成させる。一般に、Ｔｈ１応答は、細胞内病原体（宿主細胞内にいるウイルスおよび細菌）および腫瘍に対してより有効であり、一方、Ｔｈ２応答は細胞外細菌、蠕虫を含む寄生虫および毒素に対してより有効である。加えて、自然免疫の活性化は、ヘルパーＴ１および２型（Ｔｈ１／Ｔｈ２）免疫系バランスを正常化し、免疫グロブリン（Ｉｇ）Ｅ依存性アレルギーおよびアレルギー性喘息を引き起こすＴｈ２型応答の過剰反応を抑制することが予想される。

【図面の簡単な説明】

【００２１】
【図１】ＣＤＮの一般構造を示す。
【図２】ｃ－ジ－ＧＭＰ（化合物１１Ａ）およびｃ－ジ－ＡＭＰ（化合物１０Ａ）の構造を示す。
【図３】Ｒｐ，Ｒｐ－ｃ－ジ－ＧＭＰ－チオリン酸（化合物１１Ｂ）およびＲｐ，Ｒｐ－ｃ－ジ－ＡＭＰ－チオリン酸（化合物１０Ｂ）の構造を示す。
【図４】Ｒｐ，Ｓｐ－ｃ－ジ－ＧＭＰ－チオリン酸（化合物１１Ｃ）およびＲｐ，Ｓｐ－ｃ－ジ－ＡＭＰ－チオリン酸（化合物１０Ｃ）の構造を示す。
【図５】Ｓｐ，Ｓｐ－ｃ－ジ－ＧＭＰ－チオリン酸およびＳｐ，Ｓｐ－ｃ－ジ－ＡＭＰ－チオリン酸の構造を示す。
【図６】ｃ－ジ－ＡＭＰおよびｃ－ジ－ＡＭＰ－チオリン酸のための合成スキームを示す

。
【図７】親ＣＤＮおよび対応するジチオ誘導体分子のジアステレオマーによる抗原提示細胞におけるＩＦＮ－β誘導を示す。
【図８】ヘビ毒ホスホジエステラーゼによる処置後のＣＤＮジアステレオマーによる抗原提示細胞におけるＩＦＮ－β誘導を示す。
【図９】ＣＤＮ処置と併用したワクチン接種後１０日での、ＰＢＭＣにおいて測定したＯＶＡ特異的ＣＤ４およびＣＤ８　Ｔ細胞応答を示す。
【図１０】ＣＤＮ処置と併用したワクチン接種後の、ＰＢＭＣにおいて測定したＳＩＶｇａｇ特異的ＣＤ４およびＣＤ８　Ｔ細胞応答を示す。
【図１１】リステリア－ＯＶＡ誘発マウスモデルにおけるＣＤＮにより誘導された保護を示す。
【図１２】マウス前立腺癌モデルにおいて、ＧＶＡＸと共に製剤化されたＣＤＮにより誘導された抗腫瘍効力を示す。
【図１３】本発明のＣＤＮの２’－Ｏ－置換プロドラッグ類似体を示す。
【図１４】本発明のＣＤＮのＯ－またはＳ－置換プロドラッグ類似体の合成を示す。
【図１５】ｃ－ジ－ＧＭＰのモノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰプロドラッグ形態の投与後のヒト単球細胞株におけるＩＦＮ－β誘導を示す。
【図１６】ｃ－ジ－ＧＭＰのモノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰプロドラッグ形態を用いたワクチン接種後のＯＶＡ特異的ＣＤ８　Ｔ細胞応答を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２２】
本発明は、新規の高い活性の環状－ジ－ヌクレオチド（ＣＤＮ）免疫刺激剤の使用に関し、これは、ＤＣを、ＳＴＩＮＧ（インターフェロン遺伝子刺激因子）として知られている最近発見された細胞質受容体を介して活性化する。特に、本発明のＣＤＮは、１つ以上の環状プリンジヌクレオチドを含む組成物の形態で提供され、ＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１活性化を誘導し、ここで、組成物中に存在する環状プリンジヌクレオチドは実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐ立体異性体、および特に実質的に純粋なＲｐ，Ｒｐ、またはＲｐＳｐＣＤＮチオリン酸ジアステレオマーである。
【００２３】
アジュバントの設計および開発についての最近の洞察は、病原体関連分子パターンとして知られている保存された微生物の構造が宿主細胞パターン認識受容体（ＰＲＲ）により感知され、下流シグナル伝達カスケードを始動させ、サイトカインおよびケモカインを誘導し、特異的適応免疫応答が開始されるという基礎的理解により情報が与えられる。自然免疫系が微生物のＰＡＭＰ補体とどのように関与するかは侵入病原体が疾患を引き起こさないように闘うのに適切な適応応答の構築を方向付ける。アジュバント設計の目的は、望ましい応答を開始するために指定されたＰＲＲに特異的な明確なＰＡＭＰまたは合成分子を選択することである。モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）およびＣｐＧなどのアジュバントはトール様受容体（ＴＬＲ）、膜貫通ＰＲＲのクラス（ＭｙＤ８８およびＴｒｉｆアダプター分子を介してシグナル伝達し、ＮＦ－ｋＢ依存性炎症性サイトカインの誘導を媒介する）により認識されるＰＡＭＰである。ＭＰＬ（ＴＬＲ－４アゴニスト）およびＣｐＧ（ＴＬＲ－９アゴニスト）は臨床的に進歩したアジュバントであり、ＦＤＡにより承認された、または承認待ちのワクチンの構成成分である。細胞表面（例えば、ＴＬＲ－４）およびエンドソーム（例えば、ＣｐＧ）上に存在するＴＬＲは、細胞外および液胞病原体を感知するが、ウイルスおよび細胞内細菌を含む複数の病原体の生産的増殖サイクルがサイトゾルで起こる。細胞外、液胞、およびサイトゾルＰＲＲの区画化により、自然免疫系は、サイトゾルをモニタすることにより病原性および非病原性微生物の間で区別するという仮説が導かれた。ＰＲＲに特異的なアゴニストは細胞内病原体に対する防御免疫の構築を開始し、ワクチン設計に関連するサイトゾル監視経路を含むことは、当業者には明らかであるはずである。これらの同じ標的リガンドは悪性腫瘍を標的にする有効なワクチンの開発においてまた必須であり、腫瘍特異的ＣＤ４＋およびＣＤ８＋　Ｔ細胞を必要とする

ことを知っているであろう。
【００２４】
サイトゾル監視経路（ＣＳＰ）の活性化は細胞内病原体に対する防御免疫の構築に不可欠である。ＣＳＰは細菌、ウイルス、および病原虫を検出し、ＴＡＮＫ結合キナーゼ（ＴＢＫ－１）／ＩＲＦ－３シグナル伝達軸の活性化ならびにＩＦＮ－βおよび他の同時制御遺伝子の誘導に導く。ウイルスおよび細菌核酸はどちらもこの経路を活性化し、ＩＦＮ－βの誘導はＭｙＤ８８およびＴｒｉｆ非依存性である。Ｉ型インターフェロンはしばしば、主として宿主抗ウイルス応答であると考えられるが、ＩＦＮ－βの誘導は、細胞内細菌、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｍ）に感染したマクロファージにおけるサイトゾル増殖の指標である。マウスリステリア症モデルにおけるよく知られた二分は、野生型Ｌｍは、マウスを細菌誘発から保護する強力なＣＤ４およびＣＤ８　Ｔ細胞免疫を刺激するが、リステリオリジンＯ（ＬＬＯ）欠失Ｌｍのワクチン接種は、機能性Ｔ細胞を誘発せず、または防御免疫を誘導しないことである。この違いは機能性Ｔ細胞に媒介される防御免疫を誘発するには、宿主細胞遺伝子の発現およびＬｍによるサイトゾルアクセスが必要とされるという証拠となる。感染宿主細胞におけるＩＦＮ－βのレベルは、Ｌｍ多剤排出ポンプ（ＭＤＲ）により制御され、これは、構造的に関係のない小分子（抗生物質を含む）を分泌する。ＩＦＮ－βはファゴリソソームに限定されるＬｍＬＬＯ変異体に感染した宿主細胞においては誘導されない。ＩＦＮ－βの正常レベルが、全てのＴＬＲ媒介シグナル伝達が欠損した感染したＭｙＤ８８$^{-/-}$Ｔｒｉｆ$^{-/-}$マクロファージにおいて誘導される。これらのデータは、野生型Ｌｍの感染に応じて、ＬｍはＴＬＲに結合するが、宿主細胞ＣＳＰがＩＦＮ－βの誘導と相関する防御免疫の構築には必要であることを証明する。
【００２５】
「環状－ジ－ヌクレオチド」（「ＣＤＮ」）という用語は、本明細書では、２つのプリンヌクレオチド間の２’－５’および／または３’－５’リン酸ジエステル結合を含む分子のクラスを示す。これは２’－５’－２’，５’、２’－５’－３’５’、および３’，５’－３’，５’結合を含む。ＣＤＮは、２つのサイトゾルＰＲＲ、ＤＤＸ４１およびＳＴＩＮＧの直接結合を介して、サイトゾル監視経路を活性化する。Ｌｍおよび他の細胞内細菌による感染に対するＩ型インターフェロン応答はｃ－ジ－ＡＭＰまたはその関連環状ジヌクレオチド（ＣＤＮ）、ｃ－ジ－ＧＭＰの分泌、およびその、ＤＤＸ４１およびＤＥＡＤ（アスパラギン酸－グルタミン酸－アラニン－アスパラギン酸）ボックスヘリカーゼならびにＳＴＩＮＧ（インターフェロン遺伝子刺激因子）、サイトゾル監視経路の最近規定された受容体への直接結合に起因する。ＣＤＮはほとんどの細菌により発現されるセカンドメッセンジャーであり、運動性およびバイオフィルムの形成を含む多様なプロセスを制御する。ＣＤＮは高い親和性でＤＤＸ４１に結合し、ＳＴＩＮＧアダプタータンパク質と複合体を形成し、ＴＢＫ１／ＩＲＦ３シグナル経路の活性化、ならびにＩＦＮ－βおよび他のＩＲＦ－３依存性遺伝子産物（自然免疫を強く活性化する）の誘導が得られる。
【００２６】
天然ＣＤＮ分子は、前記天然ＣＤＮ分子を含むワクチン製剤を摂取した宿主細胞、例えば抗原提示細胞中に存在するホスホジエステラーゼによる分解に感受性がある。規定されるアジュバントの効力は、そのような分解により減少される可能性があり、というのも、アジュバントがその規定されたＰＲＲ標的に結合し、活性化することができないからである。アジュバント効力の低下は、例えば自然免疫の指標分子（例えば、ＩＦＮ－β）の誘導された発現量の低下により測定することができ、これは、測定された抗原特異的免疫応答の大きさにより規定されるより弱いワクチン効力と相関する。
【００２７】
本発明では、ｃ－ジ－ＡＭＰおよびｃ－ジ－ＧＭＰのジチオ－二リン酸誘導体が提供される。ｃ－ジ－ＡＭＰおよびｃ－ジ－ＧＭＰ分子の前記ジチオ－二リン酸誘導体のための合成プロセスにより、ｃ－ジ－ＡＭＰおよびｃ－ジ－ＧＭＰ分子のＲｐ，Ｒｐ、Ｓｐ，ＳｐおよびＲｐ，Ｓｐジチオ－二リン酸誘導体を含むジアステレオマーの混合物が得られる。ｃ－ジ－ＧＭＰのＲｐ，ＲｐおよびＲｐ，Ｓｐジチオ－二リン酸誘導体を含むジアステ

レオマーの前記混合物は、マウスに鼻腔内経路により投与されると、炎症細胞を気管支肺胞空間中にリクルートし、活性化させたことが以前示されている。しかしながら、ｃ－ジ－ＧＭＰのこのそのようなジチオ－二リン酸誘導体が、免疫応答の刺激に関して、親ｃ－ジ－ＧＭＰ分子と比べて利点を提供したという証拠はなく、事実、そのようなジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰ調製物は親ｃ－ジ－ＧＭＰ分子と比べて同様の、または弱い効力しか有さなかった。

【００２８】

定義

「投与」は、本明細書で、ヒト、哺乳類、哺乳類被験体、動物、獣医学被験体、プラセボ被験体、研究被験体、実験被験体、細胞、組織、器官、または生物流体に関して使用される場合、限定はされないが、外因性リガンド、試薬、プラセボ、小分子、医薬品、治療薬、診断薬、または組成物の被験体、細胞、組織、器官、または生物流体、などへの接触を示す。「投与」は、例えば、治療、薬物動態、診断、研究、プラセボ、および実験的方法を示すことができる。細胞の処置は、試薬の細胞への接触、ならびに試薬の流体への接触を含み、ここで、流体は細胞と接触される。「投与」はまた、例えば、細胞の、試薬、診断、結合組成物による、または別の細胞による、インビトロおよびエクスビボ処置を含む。「一緒に投与され」により、２つ以上の薬剤が組成物単一組成物として投与されることが暗示されることが意味されない。単一組成物としての投与は、本発明により企図されるが、そのような薬剤は、単一被験体に別々の投与として送達することができ、これは同じかまたは異なる時間であってもよく、これは同じかまたは異なる投与経路によってもよい。

【００２９】

リガンドおよび受容体に関する「アゴニスト」は、受容体を刺激する分子、分子の組み合わせ、複合体、または試薬の組み合わせを含む。例えば、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）のアゴニストはＧＭ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦの変異タンパク質または誘導体、ＧＭ－ＣＳＦのペプチド模倣物、ＧＭ－ＣＳＦの生物学的機能を模倣する小分子、またはＧＭ－ＣＳＦ受容体を刺激する抗体を含むことができる。

【００３０】

リガンドおよび受容体に関する「アンタゴニスト」は、受容体を阻害する、相殺する、下方制御する、および／または脱感作する分子、分子の組み合わせ、または複合体を含む。「アンタゴニスト」は受容体の恒常的活性を阻害する任意の試薬を含む。恒常的活性は、リガンド／受容体相互作用がない場合に明らかなものである。「アンタゴニスト」はまた、受容体の刺激された（または制御された）活性を阻害する、または防止する任意の試薬を含む。例として、ＧＭ－ＣＳＦ受容体のアンタゴニストとしては、いかなる制限も意味しないが、リガンド（ＧＭ－ＣＳＦ）に結合し、これが受容体に結合するのを防止する抗体、または受容体に結合し、リガンドが受容体に結合することを防止する抗体が挙げられ、あるいはこの場合、抗体は、不活性高次構造の受容体をロックする。

【００３１】

本明細書では、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に関する「類似体」または「誘導体」は、オリジナルのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質と同様のまたは同一の機能を有するが、オリジナルのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の同様のまたは同一のアミノ酸配列または構造を必ずしも含まない別のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を示す。類似体は、好ましくは下記の少なくとも１つを満たす：（ａ）オリジナルのアミノ酸配列と少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質性薬剤（ｂ）ストリンジェント条件下で、オリジナルのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされたタンパク質性薬剤；ならびに（ｃ）オリジナルのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

と少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９９％同一であるヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質性薬剤。

【００３２】

「抗原提示細胞」（ＡＰＣ）は、抗原をＴ細胞に提示するために使用される免疫系の細胞である。ＡＰＣとしては樹状細胞、単球、マクロファージ、辺縁帯Ｋｕｐｆｆｅｒ細胞、ミクログリア、Ｌａｎｇｅｒｈａｎｓ細胞、Ｔ細胞、およびＢ細胞が挙げられる。樹状細胞は少なくとも２つの系列で起こる。第１の系列はｐｒｅ－ＤＣ１、骨髄ＤＣ１、および成熟ＤＣ１を含む。第２の系列は$CD34^{+}CD45RA^{-}$初期前駆体多能性細胞、$CD34^{+}CD45RA^{+}$細胞、$CD34^{+}CD45RA^{+}CD4^{+}$ ＩＬ－３Ｒα^{+} ｐｒｏ－ＤＣ２細胞、$CD4^{+}CD11c^{-}$形質細胞様ｐｒｅ－ＤＣ２細胞、リンパヒトＤＣ２形質細胞様誘導ＤＣ２、および成熟ＤＣ２を含む。

【００３３】

「弱毒化」および「弱毒化された」は、宿主への毒性を低減させるように改変された細菌、ウイルス、寄生虫、感染生物、プリオン、腫瘍細胞、感染生物における遺伝子、などを含む。宿主はヒトまたは動物宿主、あるいは器官、組織、または細胞とすることができる。細菌は、非限定的例を挙げれば、宿主細胞への結合を低減させるように、１つの宿主細胞から別の宿主細胞への伝播を低減させるように、細胞外増殖を低減させるように、または宿主細胞内での細胞内増殖を低減させるように弱毒化することができる。弱毒化は、例えば、毒性の１つまたは複数の証拠、LD_{50}、器官からのクリアランス速度、または競合指標（例えば、Ａｕｅｒｂｕｃｈ，　ｅｔ　ａｌ．　（２００１）　Ｉｎｆｅｃｔ．　Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　６９：５９５３－５９５７を参照されたい）を測定することにより評価することができる。一般に、弱毒化により、LD_{50}および／またはクリアランス速度が少なくとも２５％；より一般には少なくとも５０％；最も一般には少なくとも１００％（２倍）；普通、少なくとも５倍；より普通に、少なくとも１０倍；最も普通に少なくとも５０倍；しばしば、少なくとも１００倍；よりしばしば、少なくとも５００倍；最もしばしば、少なくとも１０００倍；通常少なくとも５０００倍；より通常、少なくとも１０，０００倍；最も通常、少なくとも５０，０００倍；最もしばしば少なくとも１００，０００倍だけ増加する。

【００３４】

「精製された」および「単離された」は、組成物中に存在する種のうち、特定の種が少なくとも５０重量％を占める、よりしばしば、少なくとも６０重量％を占める、典型的に少なくとも７０重量％を占める、より典型的に少なくとも７５重量％を占める、最も典型的に少なくとも８０重量％を占める、通常少なくとも８５重量％を占める、より通常少なくとも９０重量％を占める、最も通常少なくとも９５重量％を占める、慣習的に少なくとも９８重量％、あるいはそれ以上を占めることを意味する。水、緩衝剤、塩、洗浄剤、還元剤、プロテアーゼ阻害剤、安定剤（アルブミンなどの添加されたタンパク質を含む）、および賦形剤の重量は、一般に純度の決定には使用されない。

【００３５】

「特定的に」または「選択的に」結合するは、リガンド／受容体、核酸／相補的核酸、抗体／抗原、または他の結合対（例えば、サイトカイン対サイトカイン受容体）（それぞれ、一般に本明細書では「標的生体分子」または「標的」と呼ばれる）に関する場合、タンパク質および他の生物製剤の不均一集団における標的の存在に関連する結合反応を示す。特異的結合は、例えば、結合化合物、核酸リガンド、抗体、または、企図された方法の抗体の抗原結合部位から誘導された結合組成物がその標的に、非標的分子との親和性よりも、しばしば少なくとも２５％超、よりしばしば少なくとも５０％超、最もしばしば少なくとも１００％（２倍）超、普通少なくとも１０倍超、より普通少なくとも２０倍超、最も普通少なくとも１００倍超である親和性で結合することを意味することができる。

【００３６】
「リガンド」は標的生体分子に結合する小分子、核酸、ペプチド、ポリペプチド、糖、多糖、グリカン、糖タンパク質、糖脂質、またはそれらの組み合わせを示す。そのようなリガンドは、受容体のアゴニストまたはアンタゴニストであってもよいが、リガンドはまた、アゴニストまたはアンタゴニストではない、アゴニストまたはアンタゴニスト特性を有さない結合剤を含む。リガンドのその同族標的に対する特異的結合はしばしば、「親和性」の観点から表される。好ましい実施形態では、本発明のリガンドは、約$10^{4}M^{-1}$～約$10^{8}M^{-1}$の間の親和性で結合する。親和性は$K_d = k_{off} / k_{on}$として計算される（k_{off}は解離速度定数であり、K_{on}は会合速度定数であり、K_dは平衡定数である）。

【００３７】
親和性は様々な濃度（ｃ）での標識リガンドの結合割合（ｒ）を測定することにより、平衡で決定することができる。データはＳｃａｔｃｈａｒｄ式を使用してグラフ化される：ｒ／ｃ＝Ｋ（ｎ－ｒ）：ここで、ｒ＝平衡での、結合リガンドのモル／受容体のモル；ｃ＝平衡での遊離リガンド濃度；Ｋ＝平衡会合定数；およびｎ＝リガンド結合部位の数／受容体分子である。グラフ分析により、ｒ／ｃは、Ｙ軸上に、Ｘ軸上のｒに対してプロットされ、よって、Ｓｃａｔｃｈａｒｄプロットが作成される。Ｓｃａｔｃｈａｒｄ分析による親和性測定は当技術分野でよく知られている。例えば、ｖａｎ Ｅｒｐ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ １２：４２５－４３，１９９１；Ｎｅｌｓｏｎ ａｎｄ Ｇｒｉｓｗｏｌｄ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｐｒｏｇｒａｍｓ Ｂｉｏｍｅｄ．２７：６５－８，１９８８を参照されたい。別の場合、親和性は等温滴定熱量測定（ＩＴＣ）により測定することができる。典型的なＩＴＣ実験では、リガンドの溶液はその同族標的の溶液中に滴定される。それらの相互作用で放出された熱（ΔＨ）が時間と共にモニタされる。連続量のリガンドがＩＴＣセル中に滴定されるので、吸収または放出された熱の量は結合の量に正比例する。システムが飽和に到達した時に、熱シグナルは希釈の熱のみが観察されるまで減少する。結合曲線がその後、セル中のリガンドおよび結合パートナーの比に対する、各注入からの熱のプロットから得られる。結合曲線は適切な結合モデルを用いて分析され、K_B、ｎおよびΔＨが決定される。$K_B = 1 / K_d$に留意されたい。

【００３８】
「被験体」という用語は、本明細書ではヒトまたは非ヒト生物を示す。よって、本明細書で記載される方法および組成物はヒトおよび獣医疾患の両方に適用可能である。ある一定の実施形態では、被験体は「患者」すなわち、疾患または病状のために医療を受ける生きたヒトである。これは、病態の徴候のために調査されている明確な疾病を有さない人間を含む。本発明の組成物および方法により標的とされる特定の癌の既存の診断を有する被験体が好ましい。本明細書で記載される組成物を用いた治療に対して好ましい癌としては下記が挙げられるが、それらに限定されない：前立腺癌、腎がん、メラノーマ、膵臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸癌、頭頸部癌、肺癌および乳癌。

【００３９】
「治療的有効量」は、患者利益を示す、すなわち、治療される病状の症状の減少、防止または寛解を引き起こすのに十分な試薬または医薬組成物の量として規定される。薬剤または医薬組成物が診断薬を含む場合、「診断的に有効な量」は、シグナル、画像、または他の診断パラメータを生成させるのに十分な量として規定される。医薬製剤の有効量は個体の感受性の程度、個体の年齢、性別、および体重、ならびに個体の特異体質応答などの因子により変動するであろう。「有効量」は、限定はされないが、医学的状態または障害の症状または徴候またはその原因となる過程を寛解、逆転、緩和、防止、または診断することができる量を含む。明確にまたは文脈により別記されない限り、「有効量」は、病状を寛解するのに十分な最小量に限定されない。

【００４０】
「治療」または「治療すること」（病状または疾患に関して）は、有益なまたは所望の

結果、例えば、好ましくは臨床結果を得るためのアプローチである。この発明の目的上、疾患に関する有益なまたは所望の結果としては、下記の１つ以上が挙げられるが、それらに限定されない：疾患の防止、疾患と関連する病状の改善、疾患の治癒、疾患の重症度の低減、疾患の進行の遅延、疾患に関連する１つ以上の症状の軽減、疾患を患うものの生活の質の増加、および／または生存時間延長。同様に、この発明の目的上、病状に関する有益なまたは所望の結果としては下記の１つ以上が挙げられるが、それらに限定されない：病状の防止、病状の改善、病状の治癒、病状の重症度の低減、病状の進行の遅延、病状に関連する１つ以上の症状の軽減、病状を患うものの生活の質の増加、および／または生存時間延長。例えば、本明細書で記載される組成物が癌の治療のために使用される実施形態では、有益なまたは所望の結果としては下記の１つ以上が挙げられるが、それらに限定されない：新生物または癌性細胞の増殖（または破壊）、癌において見出される新生物細胞の転移の低減、腫瘍のサイズの縮小、癌に起因する症状の減少、癌を患うものの生活の質の増加、疾患を治療するために要求される他の医薬品の用量の減少、癌の進行の遅延、および／または癌を有する患者の生存時間延長。文脈によって、被験体の「治療」は、例えば、被験体が試薬の投与により寛解されることが予期される障害を含む状況において、被験体は治療を必要としていることを意味することができる。

【００４１】

「精製された」および「単離された」は、ポリペプチドに関する場合、ポリペプチドが、実質的に、これと本質的に関連する他の生体高分子なしで存在することを意味する。「精製された」という用語は、本明細書では、存在するポリペプチドのうち、同定されたポリペプチドがしばしば少なくとも５０重量％を占める、よりしばしば少なくとも６０重量％を占める、典型的に少なくとも７０重量％を占める、より典型的に少なくとも７５重量％を占める、最も典型的に少なくとも８０重量％を占める、通常少なくとも８５重量％を占める、より通常少なくとも９０重量％を占める、最も通常少なくとも９５重量％を占める、および慣習的に少なくとも９８重量％、あるいはそれ以上を占めることを意味する。水、緩衝剤、塩、洗浄剤、還元剤、プロテアーゼ阻害剤、安定剤（アルブミンなどの添加されたタンパク質を含む）、および賦形剤、ならびに１０００未満の分子量を有する分子の重量は、一般にポリペプチド純度の決定には使用されない。例えば、Ｃｏｖａｃｃｉらに発行された米国特許第６，０９０，６１１号における純度の記載を参照されたい。

【００４２】

「ペプチド」は短いアミノ酸配列を示し、ここで、アミノ酸は互いに、ペプチド結合により連結される。ペプチドは遊離であってもよく、または別の部分、例えば巨大分子、脂質、オリゴまたは多糖、および／またはポリペプチドに結合されてもよい。ペプチドがポリペプチド鎖中に組み込まれる場合、「ペプチド」という用語は依然として特定的に短いアミノ酸配列を示すために使用され得る。「ペプチド」はペプチド結合またはいくつかの他の型の結合により、別の部分に連結され得る。ペプチドは少なくとも２つのアミノ酸長であり、一般に約２５アミノ酸長未満であり、最大長は習慣または文脈の関数である。「ペプチド」および「オリゴペプチド」という用語は同じ意味で使用され得る。

【００４３】

「タンパク質」は一般にポリペプチド鎖を含むアミノ酸配列を示す。タンパク質はまた、ポリペプチドの三次元構造を示し得る。「変性タンパク質」は、いくらかの残留三次元構造を有する部分的に変性されたポリペプチド、あるいは、本質的にランダムな三次元構造、すなわち、全体的に変性されたものを示す。発明は、例えば、グリコシル化、リン酸化、硫酸化、ジスルフィド結合形成、脱アミド、異性化、シグナルまたはリーダー配列プロセシングにおける切断点、共有および非供給結合補助因子、酸化バリアント、などを含む、ポリペプチドバリアントの試薬、およびこれの使用方法を含む。ジスルフィド結合されたタンパク質の形成は記載されている（例えば、Ｗｏｙｃｅｃｈｏｗｓｋｙ ａｎｄ Ｒａｉｎｅｓ （２０００） Ｃｕｒｒ． Ｏｐｉｎ． Ｃｈｅｍ． Ｂｉｏｌ． ４：５３３－５３９； Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ， ｅｔ ａｌ． （１９９５） Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． １３：１８－２３を参照されたい）。

【００４４】
「組換え」は、例えば、核酸、細胞、動物、ウイルス、プラスミド、ベクター、などに関して使用される場合、外因性の非天然核酸の導入、天然核酸の変化による、または組換え核酸、細胞、ウイルス、プラスミド、またはベクターからの全体または一部での誘導による改変を示す。組換えタンパク質は、例えば、組換え核酸、ウイルス、プラスミド、ベクター、などから誘導されたタンパク質を示す。「組換え細菌」はゲノムが組換え方法、例えば、突然変異、欠失、挿入、および／または再編成により操作された細菌を含む。「組換え細菌」はまた、組換えゲノム外核酸、例えば、プラスミドまたは第２の染色体を含むように改変された細菌、あるいは既存のゲノム外核酸が変化した細菌を含む。
【００４５】
「試料」は、ヒト、動物由来の試料、プラセボ、または研究試料、例えば、細胞、組織、器官、流体、ガス、エアロゾル、スラリー、コロイド、または凝固材料を示す。「試料」は、例えば、ヒトまたは動物から除去されずにインビボで試験することができ、あるいは、これはインビトロで試験することができる。試料は、例えば、組織学的方法による処理後に試験することができる。「試料」はまた、例えば、細胞を含む流体または組織試料、あるいは流体または組織試料から分離された細胞を示す。「試料」はまた、ヒトまたは動物から新たに採取された細胞、組織、器官、または流体、あるいは処理もしくは貯蔵された細胞、組織、器官、または流体を示し得る。
【００４６】
「ワクチン」は予防ワクチンを含む。ワクチンはまた、治療ワクチン、例えば、ワクチンにより提供される抗原またはエピトープと関連する病状または障害を含む哺乳類に投与されるワクチンを含む。
【００４７】
「抗体」という用語は、本明細書では、抗原またはエピトープに特異的に結合することができる、１つまたは複数の免疫グロブリン遺伝子、またはその断片から誘導され、これをモデルとし、またはこれにより実質的にコードされるペプチドまたはポリペプチドを示す。例えば、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｗ．Ｅ．Ｐａｕｌ，ｅｄ．，Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９９３）；Ｗｉｌｓｏｎ（１９９４；Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １７５：２６７－２７３；Ｙａｒｍｕｓｈ（１９９２）Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２５：８５－９７を参照されたい。抗体という用語は、抗原結合部分、すなわち、「抗原結合部位」（例えば、断片、サブ配列、相補性決定領域（ＣＤＲ））（抗原に結合する能力を保持する）を含み、下記が挙げられる：（ｉ）Ｆａｂフラグメント、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬおよびＣＨ１ドメインからなる一価フラグメント；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合された２つのＦａｂ断片を含む二価フラグメント；（ｉｉｉ）ＶＨおよびＣＨ１ドメインからなるＦｄフラグメント；（ｉｖ）抗体の単一アームのＶＬおよびＶＨドメインからなるＦｖフラグメント、（ｖ）ｄＡｂフラグメント（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４－５４６）（ＶＨドメインから構成される）；ならびに（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）。単鎖抗体もまた、参照により「抗体」という用語に含まれる。
【００４８】
環状プリンジヌクレオチド
本明細書で記載されるように、本発明は、ＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１活性化を誘導する、立体化学的に精製された環状プリンジヌクレオチド、ならびにそれらの調製および使用方法に関する。
【００４９】
原核生物ならびに真核生物細胞は細胞シグナル伝達ならびに細胞内および細胞間情報伝達のために、様々な小分子を使用する。ｃＧＭＰ、ｃＡＭＰ、などのような環状ヌクレオチドは、原核および真核生物細胞において制御および開始活性を有することが知られてい

る。真核生物細胞とは異なり、原核生物細胞はまた、環状プリンジヌクレオチドを制御分子として使用する。原核生物では、２つのＧＴＰ分子の縮合は酵素ジグアニル酸シクラーゼ（ＤＧＣ）により触媒され、ｃ－ジＧＭＰが得られ、これは細菌において重要な制御因子を表す。

【００５０】

最近の研究では、環状ジＧＭＰまたはその類似体などのＣＤＮはまた、患者において免疫または炎症反応を刺激または増強させることができる、あるいは哺乳類においてアジュバントとして機能することにより、ワクチンへの免疫応答を増強させることができることが示唆される。病原体由来ＤＮＡのサイトゾル検出は、ＴＡＮＫ結合キナーゼ１（ＴＢＫ１）およびその下流転写因子、ＩＦＮ－制御因子３（ＩＲＦ３）を介するシグナル伝達を必要とする。ＳＴＩＮＧ（ＩＦＮ遺伝子刺激因子；ＭＩＴＡ、ＥＲＩＳ、ＭＰＹＳおよびＴＭＥＭ１７３としても知られている）と呼ばれる膜貫通タンパク質はこれらの環状プリンジヌクレオチドのためのシグナル伝達受容体として機能し、ＴＢＫ１－ＩＲＦ３シグナル伝達軸の刺激およびＳＴＩＮＧ依存性Ｉ型インターフェロン応答を引き起こす。例えば、図１を参照されたい。Ｂｕｒｄｅｔｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４７８：５１５－１８，２０１１は、ＳＴＩＮＧは環状ジグアニル酸一リン酸に直接結合するが、他の無関係のヌクレオチドまたは核酸には結合しないことを証明する。

【００５１】

ワクチン製剤の目的は、典型的には、対象となる抗原を有する病原体、腫瘍細胞、などに迅速に反応するメモリーＴ細胞および／またはＢ細胞の十分な集団を生成させることができる、抗原およびアジュバントの組み合わせを提供することである。本発明は、１つ以上の環状プリンジヌクレオチドを含むアジュバント組成物を提供するための方法（ここで、組成物中に存在する環状プリンジヌクレオチドは実質的に純粋なＲｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジアステレオマーである）、その製造方法、ならびに動物において免疫応答を刺激するためのその使用方法に関する。

【００５２】

好ましい環状プリンジヌクレオチドとしては下記が挙げられるが、それらに限定されない：ｃ－ジ－ＡＭＰ、ｃ－ジ－ＧＭＰ、ｃ－ジ－ＩＭＰ、ｃ－ＡＭＰ－ＧＭＰ、ｃ－ＡＭＰ－ＩＭＰ、およびｃ－ＧＭＰ－ＩＭＰ、およびその類似体、例えば、限定はされないが、ホスホロチオエート類似体（本明細書では、「チオリン酸」と呼ばれる）。ＣＤＮチオリン酸の一般構造は、図１で提供される。この図では、Ｂ１およびＢ２は塩基部分を表す。ホスホロチオエートは非架橋酸素の１つが硫黄により置換された標準ヌクレオチドのバリアントである。ヌクレオチド間結合の硫化はエンドおよびエクソヌクレアーゼ、例えば５’→３’および３’→５’ＤＮＡ ＰＯＬ １エキソヌクレアーゼ、ヌクレアーゼＳ１およびＰ１、ＲＮａｓｅ、血清ヌクレアーゼおよびヘビ毒ホスホジエステラーゼの作用を劇的に低減させる。加えて、脂質二重層を通過する可能性が増加する。

【００５３】

ホスホロチオエート結合は本質的にキラルである。当業者であれば、この構造におけるリン酸は、それぞれまたはＳ型で存在し得ることを認識するであろう。よって、Ｒｐ，Ｒｐ、Ｓｐ，Ｓｐ、およびＲｐ，Ｓｐ型が可能である。それぞれの場合において、これらの分子の実質的に純粋なＲｐ，ＲｐおよびＲｐ，Ｓｐジアステレオマーが好ましい。そのようなＣＤＮチオリン酸分子の例は、本明細書の図２－６に示され、これらの図は、Ｒｐ，Ｒｐ－ｃ－ジ－アデノシン一リン酸；Ｒｐ，Ｓｐ－ｃ－ジ－アデノシン一リン酸；Ｒｐ，Ｒｐ－ｃ－ジ－グアノシン一リン酸およびＲｐ，Ｓｐ－ｃ－ジ－グアノシン一リン酸のチオリン酸形態を示す。これらの図では、リン酸中心の立体化学は、必要に応じて、ＲまたはＳとして示される。

【００５４】

好ましい環状プリンジヌクレオチドはまた、ＣＤＮの２’－Ｏ－置換基形態、および特にＣＤＮチオリン酸を含む。さらなる安定性およびバイオアベイラビリティは、リボース部分の２’－ＯＨの置換により提供することができる。そのような２’－Ｏ－置換類似体

の例は図１１に示される。本明細書で受け入れられる置換基としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル（－Ｃ（Ｏ）$Ｒ_{aa}$）、カルボキシル（－Ｃ（Ｏ）Ｏ－$Ｒ_{aa}$）、脂肪族基、脂環式基ｓ、アルコキシ、置換オキシ（－Ｏ－$Ｒ_{aa}$）、アリール、アラルキル、複素環式ラジカル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、アミノ（－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{cc}$））、イミノ（＝Ｎ$Ｒ_{bb}$）、アミド（－Ｃ（Ｏ）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒｃ_{C}$）または－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（Ｏ）$Ｒ_{aa}$）、アジド（－$Ｎ_{3}$）、ニトロ（－$ＮＯ_{2}$）、シアノ（－ＣＮ）、カルバミド（－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{cc}$）または－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（Ｏ）Ｏ$Ｒ_{aa}$）、ウレイド（－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（Ｏ）－Ｎ（Ｒｂｂ）（Ｒｃｃ））、チオウレイド（－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（Ｓ）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{cc}$））、グアニジニル（－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（＝Ｎ$Ｒ_{bb}$）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{cc}$））、アミジニル（－Ｃ（＝Ｎ$Ｒ_{bb}$）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒｃ_{C}$）または－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（＝Ｎ$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{aa}$））、チオール（－Ｓ$Ｒ_{bb}$）、スルフィニル（－Ｓ（Ｏ）$Ｒ_{bb}$）、スルホニル（－Ｓ（Ｏ）$_{2}Ｒ_{b}$）およびスルホンアミジル（－Ｓ（Ｏ）$_{2}$Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒｃ_{C}$）または－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｓ（Ｏ）$_{2}Ｒ_{bb}$）。ここで各$Ｒ_{aa}$、$Ｒ_{bb}$および$Ｒ_{cC}$は、独立して、Ｈ、任意で結合された化学官能基またはさらなる置換基であり、好ましいリストは限定はされないが下記を含む：Ｈ、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂肪族、アルコキシ、アシル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、脂環式、複素環式およびヘテロアリールアルキル。本明細書で記載される化合物内の選択された置換基は、再帰的程度まで存在する。

【００５５】

さらに他の好ましい環状プリンジヌクレオチドはまたＣＤＮのＳ－置換形態、特にＣＤＮチオリン酸を含み、これらは便宜的に、改善されたバイオアベイラビリティを有するプロドラッグを提供することができる。「プロドラッグ」という用語は本明細書では、企図された化合物の修飾を示し、ここで、修飾化合物は体内で、酵素または非酵素反応を介して、変換され（例えば、標的細胞または標的器官内で）未修飾形態に戻される。ある一定の実施形態では、１つのリボース上のヒドロキシルはプロドラッグ脱離基を含む。プロドラッグは、薬物の物理化学、生物薬剤、および薬物動態特性を改変することができる。従来のプロドラッグは、インビボで受ける変換により活性化され、活性薬物を形成する薬物として分類される。プロドラッグ開発のための理由は典型的に、親薬物と関連する低い水溶解度、化学的不安定性、低い経口バイオアベイラビリティ、血液脳関門透過の欠如、および高い初回通過代謝である。好適なプロドラッグ部分は、例えば、“Ｐｒｏｄｒｕｇｓ ａｎｄ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，” Ｊ．Ｒａｕｔｉｃｏ，Ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，２０１１に記載される。

【００５６】

そのようなプロドラッグ類似体の一例は図１２に示される。改善された親油性を有するこのプロドラッグ形態は、標的生物中に存在するエステラーゼの作用により切断されて活性形態にすることができる。本明細書で受け入れられる置換基としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル（－Ｃ（Ｏ）$Ｒ_{aa}$）、カルボキシル（－Ｃ（Ｏ）Ｏ－$Ｒ_{aa}$）、脂肪族基、脂環式基、アルコキシ、置換オキシ（－Ｏ－$Ｒ_{aa}$）、アリール、アラルキル、複素環式ラジカル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、アミノ（－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{cc}$））、イミノ（＝Ｎ$Ｒ_{bb}$）、アミド（－Ｃ（Ｏ）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒｃ_{C}$）または－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（Ｏ）$Ｒ_{aa}$）、アジド（－$Ｎ_{3}$）、ニトロ（－$ＮＯ_{2}$）、シアノ（－ＣＮ）、カルバミド（－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{cc}$）または－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（Ｏ）Ｏ$Ｒ_{aa}$）、ウレイド（－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（Ｏ）－Ｎ（Ｒｂｂ）（Ｒｃｃ））、チオウレイド（－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（Ｓ）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{cc}$））、グアニジニル（－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（＝Ｎ$Ｒ_{bb}$）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{cc}$））、アミジニル（－Ｃ（＝Ｎ$Ｒ_{bb}$）Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒｃ_{C}$）または－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｃ（＝Ｎ$Ｒ_{bb}$）（$Ｒ_{aa}$））、チオール（－Ｓ$Ｒ_{bb}$）、スルフィニル（－Ｓ（Ｏ）$Ｒ_{bb}$）、スルホニル（－Ｓ（Ｏ）$_{2}Ｒ_{b}$）およびスルホンアミジル（－Ｓ（Ｏ）$_{2}$Ｎ（$Ｒ_{bb}$）（$Ｒｃ_{C}$）または－Ｎ（$Ｒ_{bb}$）Ｓ（Ｏ）$_{2}$

R_{bb}）。ここで、各R_{aa}、R_{bb}およびR_{cC}は独立して、Ｈ、任意で結合された化学官能基またはさらなる置換基であり、好ましいリストは、限定はされないが下記を含む：Ｈ、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂肪族、アルコキシ、アシル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、脂環式、複素環式およびヘテロアリールアルキル。本明細書で記載される化合物内の選択された置換基は、再帰的程度まで存在する。好ましい置換基としては、メチル、イソプロピルおよびｔ－ブチルが挙げられる。ヌクレオチドのプロドラッグ形態は当技術分野で知られている。例えば、Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｐｒｏｄｒｕｇｓ ｆｏｒ ＨＣＶ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｓｏｆｉａ，Ｍ．Ｊ．，Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｃｈｅｍ ａｎｄＣｈｅｍｏｔｈｅｒ．，２０１１，２２：２３－４９；Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ，Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ，ａｎｄ Ｎｏｎ－Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｃ ＶｉｒｕｓＮＳ５Ｂ ＲＮＡ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ＲＮＡ－Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ，Ｓｏｆｉａ，Ｍ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２０１２，５５：２４８１－２５３１を参照されたい。

【００５７】

「アルキル」という用語は本明細書では、最大２４個までの炭素原子を含む飽和直鎖または分枝炭化水素ラジカルを示す。アルキル基の例としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソプロピル、ｎ－ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシルなど。アルキル基は典型的には１～約２４個の炭素原子、より典型的には１～約１２個の炭素原子を含み、１～約６個の炭素原子がより好ましい。「低級アルキル」という用語は本明細書では１～約６個の炭素原子を含む。アルキル基は本明細書では任意で１つ以上のさらなる置換基を含んでもよい。

【００５８】

「アルケニル」という用語は本明細書では、最大２４個までの炭素原子を含み、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含む、直鎖または分枝炭化水素鎖ラジカルを示す。アルケニル基の例としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：エテニル、プロペニル、ブテニル、１－メチル－２－ブテン－１－イル、ジエン、例えば１，３－ブタジエンなど。アルケニル基は典型的には２～約２４個の炭素原子、より典型的に２～約１２個の炭素原子を含み、２～約６個の炭素原子がより好ましい。アルケニル基は本明細書では、任意で１つ以上のさらなる置換基を含んでもよい。

【００５９】

「アルキニル」という用語は、本明細書では、最大２４個までの炭素原子を含み、少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を有する直鎖または分枝炭化水素ラジカルを示す。アルキニル基の例としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：エチニル、１－プロピニル、１－ブチニル、など。アルキニル基は典型的には２～約２４個の炭素原子、より典型的には２～約１２個の炭素原子を含み、２～約６個の炭素原子がより好ましい。アルキニル基は本明細書では、任意で１つ以上のさらなる置換基を含んでもよい。

【００６０】

「アシル」という用語は本明細書では、有機酸からのヒドロキシル基の除去により形成されたラジカルを示し、一般式－Ｃ（Ｏ）－Ｘを有し、ここで、Ｘは典型的には脂肪族、脂環式または芳香族である。例としては下記が挙げられる：脂肪族カルボニル、芳香族カルボニル、脂肪族スルホニル、芳香族スルフィニル、脂肪族スルフィニル、芳香族リン酸、脂肪族リン酸など。アシル基は本明細書では任意でさらなる置換基を含んでもよい。

【００６１】

「脂環式」という用語は、環状環系を示し、ここで、環は脂肪族である。環系は１つ以上の環を含むことができ、ここで少なくとも１つの環は脂肪族である。好ましい脂環式は約５～約９個の炭素原子を環内に有する環を含む。脂環式は本明細書では任意でさらなる置換基を含んでもよい。

【００６２】

「脂肪族」という用語は本明細書では、最大２４個までの炭素原子を含む直鎖または分

枝炭化水素ラジカルを示し、ここで、任意の２つの炭素原子間の飽和は単、二重または三重結合である。脂肪族基は好ましくは１～約２４個の炭素原子、より典型的には１～約１２個の炭素原子を含み、１～約６個の炭素原子がより好ましい。脂肪族基の直鎖または分枝鎖は、１つ以上のヘテロ原子（窒素、酸素、硫黄およびリンを含む）で中断されてもよい。ヘテロ原子により中断されたそのような脂肪族基としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：ポリアルコキシ、例えばポリアルキレングリコール、ポリアミン、およびポリイミン。脂肪族基は本明細書では任意でさらなる置換基を含んでもよい。

【００６３】

「アルコキシ」という用語は本明細書では、アルキル基と酸素原子の間で形成されるラジカルを示し、ここで、酸素原子はアルコキシ基を親分子に付着させるために使用される。アルコキシ基の例としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ｎ－ブトキシ、ｓｅｃ－ブトキシ、ｔｅｒｔ－ブトキシ、ｎ－ペントキシ、ネオペントキシ、ｎ－ヘキソキシなど。アルコキシ基は本明細書では任意でさらなる置換基を含んでもよい。

【００６４】

「アミノアルキル」という用語は本明細書では、アミノ置換Ｃ＼－Ｃｎアルキルラジカルを示す。ラジカルのアルキル部分は、親分子と共有結合を形成する。アミノ基は任意の位置に配置することができ、アミノアルキル基は、アルキルおよび／またはアミノ部分でさらなる置換基で置換することができる。

【００６５】

「アラルキル」および「アリールアルキル」という用語は本明細書では、Ｃ＼－Ｃｎアルキルラジカルに共有結合された芳香族基を示す。得られたアラルキル（またはアリールアルキル）基のアルキルラジカル部分は親分子と共有結合を形成する。例としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：ベンジル、フェネチルなど。アラルキル基は本明細書では、任意で、ラジカル基を形成するアルキル、アリールまたは両方の基に付着された、さらなる置換基を含んでもよい。

【００６６】

「アリール」および「芳香族」という用語は本明細書では、１つ以上の芳香環を有する単または多環式炭素環状環系ラジカルを示す。アリール基の例としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、イデニル（ｉｄｅｎｙｌ）など。好ましいアリール環系は約５～約２０個の炭素原子を１つ以上の環内に有する。アリール基は本明細書では任意でさらなる置換基を含んでもよい。

【００６７】

「ハロ」および「ハロゲン」という用語は、本明細書では、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素から選択される原子を示す。

【００６８】

「ヘテロアリール」および「ヘテロ芳香族」という用語は本明細書では、単または多環芳香環、環系または縮合環系を含むラジカルを示し、ここで環の少なくとも１つは芳香族であり、１つ以上のヘテロ原子を含む。ヘテロアリールはまた、縮合環の１つ以上がヘテロ原子を含まない系を含む縮合環系を含むことを意味する。ヘテロアリール基は典型的には、硫黄、窒素または酸素から選択される１つの環原子を含む。ヘテロアリール基の例としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、チオフェニル、フラニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、キノキサリニルなど。ヘテロアリールラジカルは直接または連結部分、例えば脂肪族基またはヘテロ原子を介して親分子に付着させることができる。ヘテロアリール基は、本明細書では任意でさらなる置換基を含んでもよい。

【００６９】

「ヘテロアリールアルキル」という用語は、本明細書では、さらに共有結合されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルラジカルを含む、前に規定されたヘテロアリール基を示す。得られたヘテロアリールアルキル基のアルキルラジカル部分は、親分子と共有結合を形成することができる。例としては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：ピリジニルメチル、ピリミジニルエチル、ナフチリジニルプロピルなど。ヘテロアリールアルキル基は、本明細書では、ヘテロアリールまたはアルキル部分の１つまたは両方上に任意でさらなる置換基を含んでもよい。

【００７０】

上述のように、好ましい環状プリンジヌクレオチドはまた、ＣＤＮのプロドラッグ形態、特にＣＤＮチオリン酸を含む。プロドラッグは薬物の物理化学、生物薬剤、および薬物動態特性を改変することができる。従来のプロドラッグは、インビボで受ける変換により活性化され、活性薬物を形成する薬物として分類される。プロドラッグ開発のための理由は典型的に、親薬物と関連する低い水溶解度、化学的不安定性、低い経口バイオアベイラビリティ、血液脳関門透過の欠如、および高い初回通過代謝である。好適なプロドラッグ部分は、例えば、“Ｐｒｏｄｒｕｇｓ ａｎｄ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，” Ｊ．Ｒａｕｔｉｃｏ，Ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，２０１１に記載される。

【００７１】

環状プリンジヌクレオチドに関して本明細書で使用される「実質的に純粋な」という用語は、上記図で示されるキラル中心での他の可能な立体化学に関し少なくとも７５％純粋である、Ｒｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐ形態を示す。例として、「実質的に純粋なＲｐ，Ｒｐｃ－ジ－ＧＭＰチオリン酸」は、ｃ－ジ－ＧＭＰチオリン酸のＲｐ，ＳｐおよびＳｐ，Ｓｐ型に関しては少なくとも７５％純粋であろう。好ましい実施形態では、実質的に純粋な環状プリンジヌクレオチドは少なくとも８５％純粋、少なくとも９０％純粋、少なくとも９５％純粋、少なくとも９７％純粋、および少なくとも９９％純粋である。発明の実質的に純粋な環状プリンジヌクレオチド調製物は「立体化学的に純粋」であるが、これは、これらのキラル中心で特定の立体化学を有する調製物内の全てのＣＤＮが、そうでなければ同一であることを意味しない。例えば、実質的に純粋な環状プリンジヌクレオチド調製物はＲｐ，Ｒｐ　ｃ－ジ－ＧＭＰチオリン酸およびＲｐ，Ｒｐ　ｃ－ジ－ＡＭＰチオリン酸の組み合わせを含んでもよく、依然として実質的に純粋な環状プリンジヌクレオチド調製物であり得る。そのような調製物はまた、以下で記載される、患者治療に有利な他の構成成分を含んでもよく、ただし、調製物内の全てのＣＤＮはこれらのキラル中心で特定の立体化学を有する。

【００７２】

本明細書で記載されるＣＤＮ組成物は、宿主に、単独でまたは薬学的に許容される賦形剤と組み合わされて、適切な免疫応答を誘導し、改変し、または刺激するのに十分な量で投与することができる。免疫応答は、限定はされないが、特異的免疫応答、非特異的免疫応答、特異的および非特異的応答の両方、自然応答、一次免疫応答、適応免疫、二次免疫応答、メモリー免疫応答、免疫細胞活性化、免疫細胞増殖、免疫細胞分化、およびサイトカイン発現を含むことができる。ある一定の実施形態では、ＣＤＮ組成物は、下記を含む１つ以上の追加の組成物と併用して投与される：１つ以上の所定の抗原に対する免疫応答を刺激するように意図されたワクチン；アジュバント；ＣＴＬＡ－４およびＰＤ－１経路アンタゴニスト、脂質、リポソーム、化学療法薬、免疫調節細胞株、など。

【００７３】

ＣＤＮ組成物は追加の治療または予防組成物の前、後および／またはこれと一緒に投与され得る。これらとしては下記が挙げられるが、それらに限定はされない：Ｂ７同時刺激分子、インターロイキン－２、インターフェロン－γ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＣＴＬＡ－４アンタゴニスト、ＯＸ－４０／ＯＸ－４０リガンド、ＣＤ４０／ＣＤ４０リガンド、サルグラモスチム、レバミソール、ワクチニアウイルス、カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）、リポソーム、ミョウバン、フロイント完全または不完全アジュバント、解毒エンドトキシン

、鉱物油、界面活性物質、例えばリポレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、および油または炭化水素エマルジョン。抗体応答に対して細胞傷害性Ｔ細胞応答を優先的に刺激するＴ細胞免疫応答を誘導するためのキャリアが好ましいが、両方の型の応答を刺激するものも同様に使用することができる。薬剤がポリペプチドである場合、ポリペプチド自体またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与することができる。キャリアは細胞、例えば抗原提示細胞（ＡＰＣ）または樹状細胞であり得る。抗原提示細胞はマクロファージ、樹状細胞およびＢ細胞などの細胞型を含む。他のプロフェッショナル抗原提示細胞は、単球、辺縁帯Ｋｕｐｆｆｅｒ細胞、ミクログリア、Ｌａｎｇｅｒｈａｎｓ細胞、指状嵌入樹状細胞、濾胞樹状細胞、およびＴ細胞を含む。通性抗原提示細胞も使用することができる。通性抗原提示細胞の例としては、下記が挙げられる：アストロサイト、濾胞細胞、内皮および線維芽細胞。キャリアはポリペプチドを発現するため、または後にワクチン接種した個体の細胞で発現されるポリヌクレオチドを送達するために変換された細菌細胞であり得る。水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムなどのアジュバントは、免疫応答を誘発する、増強する、または延長するワクチンの能力を増加させるために追加することができる。追加の材料、例えばサイトカイン、ケモカイン、および、ＣｐＧのような細菌核酸配列、トール様受容体（ＴＬＲ）９アゴニストならびにＴＬＲ２、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９のための追加のアゴニスト（リポタンパク質、ＬＰＳ、モノホスホリルリピドＡ、リポテイコ酸、イミキモド、レシキモドを含み、別々に、または記載される組成物と組み合わせて使用される）もまた潜在的なアジュバントである。アジュバントの他の代表例は、キラヤ・サポナリアおよびコリネバクテリウム・パルバムの樹皮から精製された均質サポニンを含む合成アジュバントＱＳ－２１を含む（ＭｃＣｕｎｅ ｅｔ ａｌ．, Ｃａｎｃｅｒ, １９７９; ４３：１６１９）。アジュバントは最適化を受けることが理解されるであろう。言い換えれば、当業者は、使用するための最高のアジュバントを決定するためにルーチン実験に、従事することができる。

【００７４】

追加の治療薬との同時投与のための方法は当技術分野でよく知られている（Ｈａｒｄｍａｎ, ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．）（２００１）Ｇｏｏｄｍａｎ ａｎｄ Ｇｉｌｍａｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ, １０ｔｈ ｅｄ., ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, ＮＹ; Ｐｏｏｌｅ ａｎｄ Ｐｅｔｅｒｓｏｎ（ｅｄｓ．）（２００１）Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ｆｏｒ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ, Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ, Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ, Ｐｈｉｌａ., ＰＡ; Ｃｈａｂｎｅｒ ａｎｄ Ｌｏｎｇｏ（ｅｄｓ．）（２００１）Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ, Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ, Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ, Ｐｈｉｌａ., ＰＡ）。

【００７５】

アジュバント

以上で記載される環状プリンジヌクレオチド（複数可）に加えて、本発明の組成物はさらに１つ以上の追加の物質を含むことができ、これらは、それらのアジュバント性質のために、不活性化腫瘍細胞（複数可）上に存在する癌抗原に応答するように免疫系を刺激するように作用することができる。そのようなアジュバントとしては下記が挙げられるが、それらに限定されない：脂質、リポソーム、自然免疫を誘導する不活性化細菌（例えば、不活性化または弱毒化リステリア・モノサイトゲネス）、トール様受容体（ＴＬＲ）、（ＮＯＤ）様受容体（ＮＬＲ）、レチノイン酸誘導性遺伝子（ＲＩＧ）－Ｉ様受容体（ＲＬＲ）、および／またはＣ型レクチン受容体（ＣＬＲ）を介する自然免疫活性化を媒介する組成物。ＰＡＭＰの例としては、下記が挙げられる：リポタンパク質、リポポリペプチド、ペプチドグリカン、ザイモサン、リポ多糖、ナイセリアポリン、フラゲリン、プロフィリン、ガラクトセラミド、ムラミルジペプチド。ペプチドグリカン、リポタンパク質およ

びリポテイコ酸はグラム陽性の細胞壁構成成分である。リポ多糖はほとんどの細菌により発現され、ＭＰＬは１つの例である。フラゲリンは病原性および共生細菌により分泌される細菌鞭毛の構造成分を示す。α－ガラクトシルセラミド（α－ＧａｌＣｅｒ）はナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞の活性化因子である。ムラミルジペプチドは全ての細菌に共通の生理活性ペプチドグリカンモチーフである。このリストは制限することを意味しない。好ましいアジュバント組成物は以下で記載される。

【００７６】

ＣＴＬＡ－４およびＰＤ－１経路アンタゴニスト

ＣＴＬＡ－４は適応免疫応答の重要な負の制御因子であると考えられる。活性化されたＴ細胞はＣＴＬＡ－４（ＣＤ２８よりも高い親和性で、抗原提示細胞上のＣＤ８０およびＣＤ８６に結合する）を上方制御し、よってＴ細胞刺激、ＩＬ－２遺伝子発現およびＴ細胞増殖を阻害する。ＣＴＬＡ４遮断の抗腫瘍効果が、結腸癌腫、転移性前立腺癌、および転移性メラノーマのマウスモデルにおいて観察されている。

【００７７】

イピリムマブ（Ｙｅｒｖｏｙ（商標））およびトレメリムマブはヒトＣＴＬＡ４に結合し、そのＣＤ８０およびＣＤ８６との相互作用を防止するヒト化モノクローナル抗体である。イピリムマブおよびトレメリムマブを使用する第Ｉおよび第ＩＩ相研究は癌患者における臨床活性を証明している。同様の戦略により標的とされ得る他の負の免疫制御因子としては下記が挙げられる：プログラム細胞死１、ＢおよびＴリンパ球アテニュエータ、トランスフォーミング増殖因子ベータβ、インターロイキン－１０、および血管内皮増殖因子。

【００７８】

ＰＤ－１は活性化されたＴ細胞上に発現される、適応免疫応答の別の負の制御因子である。ＰＤ－１はＢ７－Ｈ１およびＢ７－ＤＣに結合し、ＰＤ－１の結合はＴ細胞活性化を抑制する。抗腫瘍効果が、ＰＤ－１経路遮断により証明されている。ＢＭＳ－９３６５５８、ＭＫ３４７５、ＣＴ－０１１、ＡＭＰ－２２４およびＭＤＸ－１１０６は文献において、本発明において用途が見出され得るＰＤ－１経路遮断薬の例であることが報告されている。

【００７９】

ＴＬＲアゴニスト

「トール様受容体」という用語（または「ＴＬＲ」）は、本明細書では、微生物産物を感知し、および／または適応免疫応答を開始させるトール様受容体ファミリーのタンパク質のメンバーまたはそのフラグメントを示す。１つの実施形態では、ＴＬＲは樹状細胞（ＤＣ）を活性化する。トール様受容体（ＴＬＲ）は微生物病原体を認識する自然免疫系のセンサとして最初に同定された、パターン認識受容体のファミリーである。ＴＬＲはロイシンリッチリピートの外部ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ＴＩＲ（トール／ＩＬ－１Ｒ）ドメインを含む保存膜貫通分子のファミリーを含む。ＴＬＲは、しばしば「ＰＡＭＰ」（病原体関連分子パターン）と呼ばれる、微生物中の独特な構造を認識する。ＴＬＲに結合するリガンドは、炎症および免疫に関与する因子の生成を誘導する細胞内シグナル経路のカスケードを利用する。

【００８０】

ヒトでは、１０のＴＬＲが同定されている。細胞の表面上で発現されるＴＬＲとしては、ＴＬＲ－１、－２、－４、－５、および－６が挙げられるが、ＴＬＲ－３、－７／８、および－９はＥＲコンパートメントを用いて発現される。ヒト樹状細胞サブセットは独特なＴＬＲ発現パターンに基づいて同定することができる。例として、骨髄またはＤＣの「従来の」サブセット（ｍＤＣ）は、刺激されると、ＴＬＲ１‐８を発現し、一連の活性化マーカー（例えばＣＤ８０、ＣＤ８６、ＭＨＣクラスＩおよびＩＩ、ＣＣＲ７）、炎症促進性サイトカイン、およびケモカインが産生される。この刺激の結果および得られた発現は、抗原特異的ＣＤ４＋およびＣＤ８＋　Ｔ細胞プライミングとなる。これらのＤＣは抗原を取り込み、それらを適切な形態でＴ細胞に提示する、増強された能力を獲得する。対

照的に、ＤＣの形質細胞様サブセット（ｐＤＣ）は、活性化によりＴＬＲ７およびＴＬＲ９のみを発現し、ＮＫ細胞ならびにＴ細胞の活性化が得られる。瀕死腫瘍細胞はＤＣ機能に悪影響を及ぼすを可能性があるので、ＤＣのＴＬＲアゴニストによる活性化は、癌の治療への免疫療法アプローチにおいて抗腫瘍免疫を刺激するのに有益であり得ることが示唆されている。放射線および化学療法を使用した乳癌の成功した治療はＴＬＲ４活性化を必要とすることも示唆されている。

【００８１】

当技術分野で知られており、本発明で用途が見出されるＴＬＲアゴニストとしては下記が挙げられるが、それらに限定されない：

Ｐａｍ３Ｃｙｓ、ＴＬＲ－１／２アゴニスト；

ＣＦＡ、ＴＬＲ－２アゴニスト；

ＭＡＬＰ２、ＴＬＲ－２アゴニスト；

Ｐａｍ２Ｃｙｓ、ＴＬＲ－２アゴニスト；

ＦＳＬ－１、ＴＬＲ－２アゴニスト；

Ｈｉｂ－ＯＭＰＣ、ＴＬＲ－２アゴニスト；

ポリリボシニック：ポリリボシチジック酸（ｐｏｌｙｒｉｂｏｓｉｎｉｃ：ｐｏｌｙｒｉｂｏｃｙｔｉｄｉｃ　ａｃｉｄ）（Ｐｏｌｙ　Ｉ：Ｃ）、ＴＬＲ－３アゴニスト；

ポリアデノシン－ポリウリジル酸（ｐｏｌｙ　ＡＵ）、ＴＬＲ－３アゴニスト；

ポリ－Ｌ－リジンおよびカルボキシメチルセルロースで安定化されたポリイノシン－ポリシチジル酸（Ｈｉｌｔｏｎｏｌ（登録商標））、ＴＬＲ－３アゴニスト；

モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）、ＴＬＲ－４アゴニスト；

ＬＰＳ、ＴＬＲ－４アゴニスト；

細菌フラゲリン、ＴＬＲ－５アゴニスト；

シアリル－Ｔｎ（ＳＴｎ）、多くのヒト癌細胞上のＭＵＣ１ムチンと関連する炭水化物およびＴＬＲ－４アゴニスト；

イミキモド、ＴＬＲ－７アゴニスト；

レシキモド、ＴＬＲ－７／８アゴニスト；

ロキソリビン、ＴＬＲ－７／８アゴニスト；ならびに

非メチル化ＣｐＧジヌクレオチド（ＣｐＧ－ＯＤＮ）、ＴＬＲ－９アゴニスト。

【００８２】

それらのアジュバント品質のために、ＴＬＲアゴニストは好ましくは他のワクチン、アジュバントおよび／または免疫調節剤と組み合わせて使用され、様々な組み合わせで組み合わされ得る。よって、ある一定の実施形態では、ＳＴＩＮＧに結合し、ＳＴＩＮＧ依存性ＴＢＫ１活性化を誘導する環状プリンジヌクレオチドならびに不活性化腫瘍細胞（樹状細胞誘導、リクルートメントおよび／または成熟を刺激する１つ以上のサイトカインを発現し、分泌する）は、本明細書で記載されるように、治療目的で１つ以上のＴＬＲアゴニストと共に一緒に投与され得る。

【００８３】

脂質およびリポソーム

リポソームは１つ（「単層」）またはそれ以上（「多重膜」）の層のリン脂質から形成された小胞である。リン脂質基本単位の両親媒性のために、リポソームは典型的には親水性外面を示し、親水性コアを封入する親水性層を含む。親水性／疎水性構成成分の組み込みにおけるリポソームの多用途性、それらの無毒性、生分解性、生体適合性、アジュバント活性、細胞免疫の誘導、徐放およびマクロファージによる迅速取り込みの特性はこれらを抗原の送達のための魅力的な候補にしている。

【００８４】

ＷＯ２０１０／１０４８３３号（参照によりその全体で本明細書に組み込まれる）はリポソーム調製物を記載し、これは下記を含む：

ａ）水性ビヒクル；

ｂ）下記を含むリポソーム

（ｉ）ジミリストイルホスファチジルコリン（「ＤＭＰＣ」）、
（ｉｉ）ジミリストイルホスファチジルグリセロール（「ＤＭＰＧ」）、ジミリストイルトリメチルアンモニウムプロパン（「ＤＭＴＡＰ」）、またはＤＭＰＧおよびＤＭＴＡＰの両方、
ならびに
（ｉｉｉ）少なくとも１つのステロール誘導体；ならびに
ｃ）前記少なくとも１つステロール誘導体の１％～１００％に共有結合された１つ以上の免疫原性ポリペプチド（複数可）または炭水化物（複数可）。

【００８５】

そのようなリポソーム製剤は、本明細書では、ＶｅｓｉＶａｘ（登録商標）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｅｘｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）と呼ばれ、以上で言及される我々の「免疫原性ポリペプチド（複数可）または炭水化物（複数可）」と共に、またはこれなしで、１つ以上の追加の構成成分、例えばペプチドグリカン、リポペプチド、リポ多糖、モノホスホリルリピドＡ、リポテイコ酸、レシキモド、イミキモド、フラゲリン、非メチル化ＣｐＧモチーフを含むオリゴヌクレオチド、βガラクトシルセラミド、ムラミルジペプチド、オールトランスレチノイン酸、二本鎖ウイルスＲＮＡ、ヒートショックタンパク質、ジオクタデシルジメチルアンモニウムブロミド、カチオン性界面活性剤、トール様受容体アゴニスト、ジミリストイルトリメチルアンモニウムプロパン、およびｎｏｄ様受容体アゴニストを含むことができる。便宜的に、これらのリポソーム製剤は、本発明による１つ以上の環状プリンジヌクレオチドを送達するために使用することができる。

【００８６】

その上、以上で記載されるリポソーム製剤は「ステロイド誘導体」を、免疫原性ポリペプチドまたは炭水化物をリポソームに付着させるためのアンカーとして使用するが、ステロイドは単に、コレステロールなどの非結合ステロイドとして提供され得る。

【００８７】

脂質混合物からリポソームを調製するための好適な方法は当技術分野でよく知られている。例えば、Ｂａｓｕ ＆ Ｂａｓｕ，Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，２００２；Ｇｒｅｇｏｒｉａｄｉｓ，Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＩｎｆｏｒｍａＨｅａｌｔｈＣａｒｅ，２００６を参照されたい。好ましい方法としては、その中で記載される押出加工、均質化、および超音波処理法が挙げられる。本発明で使用するためのリポソームを調製するための例示的な方法は、脂質混合物を乾燥させること、続いて水性ビヒクル中での水和およびリポソームを形成させるための超音波処理を含み、ＷＯ２０１０／１０４８３３号に記載される。

【００８８】

ある一定の実施形態では、特定の平均サイズ範囲内のリポソームが提供される。リポソームサイズは、例えば、リポソームを含む水性ビヒクルの、予め選択された細孔サイズを有する膜を通す押出加工および膜を通って流れる材料の収集により選択することができる。好ましい実施形態では、リポソームは実質的に５０～５００ｎｍの間の直径、より好ましくは実質的に５０～２００ｎｍの間の直径、および最も好ましくは実質的に５０～１５０ｎｍの間の直径を有するように選択される。「実質的に」という用語は、本明細書では、この状況では、リポソームの少なくとも７５％、より好ましくは８０％、および最も好ましくは少なくとも９０％が指定された範囲内にあることを意味する。

【００８９】

本発明において用途が見出され得る他の脂質および脂質様アジュバントとしては下記が挙げられる：水中油（ｏ／ｗ）エマルジョン（例えば、Ｍｕｄｅｒｈｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔ．Ｓｃｉ．８８：１３３２‐９，１９９９を参照されたい）、ＶｅｓｉＶａｘ（登録商標）ＴＬＲ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｅｘｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）、ジギトニン（例えば、米国特許５，６９８，４３２号を参照されたい）、

およびグルコピラノシル脂質（例えば、米国特許出願２０１００３１０６０２号を参照されたい）。

【００９０】

化学療法薬

追加の実施形態では、方法はさらに、被験体に有効量の１つ以上の化学療法薬を、追加の治療として投与することを含む。ある一定の実施形態では、１つ以上の化学療法薬は下記から選択される：酢酸アビラテロン、アルトレタミン、アンヒドロビンブラスチン、アウリスタチン、ベキサロテン、ビカルタミド、ＢＭＳ１８４４７６、２，３，４，５，６－ペンタフルオロ－Ｎ－（３－フルオロ－４－メトキシフェニル）ベンゼンスルホンアミド、ブレオマイシン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｌ－バリル－Ｌ－バリル－Ｎ－メチル－Ｌ－バリル－Ｌ－プロリ－１－Ｌプロリン－ｔ－ブチルアミド、カケクチン、セマドチン、クロランブシル、シクロホスファミド、３’，４’－ジデヒドロ－４’－デオキシ－８’－ノルビン－カロイコブラスチン、ドセタキソール、ドセタキセル、シクロホスファミド、カルボプラチン、カルムスチン、シスプラチン、クリプトフィシン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デシタビンドラスタチン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、エトポシド、５－フルオロウラシル、フィナステリド、フルタミド、ヒドロキシ尿素およびヒドロキシ尿素タキサン、イホスファミド、リアロゾール、ロニダミン、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、ＭＤＶ３１００、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、メルファラン、イセチオン酸ミボブリン、リゾキシン、セルテネフ、ストレプトゾシン、マイトマイシン、メトトレキサート、タキサン、ニルタミド、オナプリストン、パクリタキセル、プレドニムスチン、プロカルバジン、ＲＰＲ１０９８８１、リン酸ストラムスチン（ｓｔｒａｍｕｓｔｉｎｅ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ）、タモキシフェン、タソネルミン、タキソール、トレチノイン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン硫酸塩、およびビンフルニン。

【００９１】

免疫調節細胞株

「不活性化腫瘍細胞」により、細胞の分裂を防止するように処理された腫瘍細胞（患者にとって「自己」または「同種」のいずれか）が意味される。本発明の目的上、そのような細胞はそれらの免疫原性およびそれらの代謝活性を保存する。そのような腫瘍細胞は、癌療法の一部として患者内で発現される導入遺伝子を発現するように遺伝子改変される。よって、発明の組成物またはワクチンは治療を受けている患者にとって自己または同種であり、最も好ましくは患者を苦しめるのと同じ一般型の腫瘍細胞である新生物（例えば、腫瘍）細胞を含む。例えば、メラノーマを患う患者は典型的にはメラノーマ由来の遺伝子改変細胞が投与されるであろう。本発明において使用するための、腫瘍細胞を不活性化するための方法、例えば照射の使用は、当技術分野でよく知られている。

【００９２】

本発明の不活性化腫瘍細胞は患者に１つ以上の同時刺激分子または薬剤と一緒に投与される。好ましい同時刺激剤は１つ以上のサイトカインを含み、これは樹状細胞誘導、リクルートメント、および／または成熟を刺激する。そのような同時刺激剤を評価するための方法は文献でよく知られている。ＤＣの誘導および成熟は、典型的にはある一定の膜分子、例えばＣＤ８０およびＣＤ８６の発現の増加、および／または刺激後の炎症促進性サイトカイン、例えばＩＬ－１２およびＩ型インターフェロンの分泌により評価される。

【００９３】

好ましい実施形態では、不活性化腫瘍細胞はそれ自体、樹状細胞誘導、リクルートメント、および／または成熟を刺激する１つ以上のサイトカインを発現および分泌するように改変される。本発明は、例示的に、ＧＭ－ＣＳＦの使用に関して記載される。よって、例として、腫瘍細胞は米国特許第５，６３７，４８３号、５，９０４，９２０号、６，２７７，３６８号および６，３５０，４４５号、ならびに米国特許公報第２０１００１５０９４６号（その各々が明確に、参照により本明細書に組み込まれる）において記載されるように、ＧＭ－ＣＳＦをコードする導入遺伝子を発現し得る。膵臓癌の治療のための、一種

のＧＭ－ＣＳＦ発現遺伝子改変癌細胞または「サイトカイン発現細胞ワクチン」が米国特許第６，０３３，６７４号および５，９８５，２９０号（その両方が明確に参照により本明細書に組み込まれる）に記載される。

【００９４】

ＧＭ－ＣＳＦの代わりに、またはこれと一緒に、そのような不活性化腫瘍細胞および／またはバイスタンダー細胞により発現され得る他の好適なサイトカインとしては、ＣＤ４０リガンド、ＩＬ－１２、ＣＣＬ３、ＣＣＬ２０、およびＣＣＬ２１の１つ以上が挙げられるが、それらに限定されない。このリストは制限することを意味しない。

【００９５】

被験体に投与される不活性化腫瘍細胞は１つ以上の対象となるサイトカインを発現することが好ましいが、腫瘍細胞株は樹状細胞誘導、リクルートメント、および／または成熟を刺激する１つ以上のサイトカインを発現および分泌する不活性化バイスタンダー細胞株を伴う可能性がある。バイスタンダー細胞株は、樹状細胞誘導、リクルートメント、および／または成熟を刺激するサイトカインを全て提供することができ、または不活性化腫瘍細胞により発現および分泌される、樹状細胞誘導、リクルートメント、および／または成熟を刺激するサイトカインを補充することができる。例として、免疫調節サイトカイン発現バイスタンダー細胞株は、米国特許第６，４６４，９７３号および８，０１２，４６９号、Ｄｅｓｓｕｒｅａｕｌｔ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｓｕｒｇ．Ｏｎｃｏｌ．１４：８６９－８４，２００７、およびＥａｇｅｒ ａｎｄ Ｎｅｍｕｎａｉｔｉｓ，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１２：１８－２７，２００５（その各々が明確に、参照により本明細書に組み込まれる）において開示される。

【００９６】

「顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）ポリペプチド」により、免疫調節活性を有し、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＡ５２１２２．１と少なくとも約８５％アミノ酸配列同一性を有するサイトカインまたはそのフラグメントが意味される。

【００９７】

ワクチン

ある一定の実施形態では、ＣＤＮ組成物は、１つ以上の所定の抗原に対する免疫応答を刺激するように意図された１つ以上のワクチンと併用して投与される。発明において用途を見出し得る標的抗原の例は下記表で列挙される。標的抗原はまた、表で列挙される抗原の免疫学的に活性な部分を含むフラグメントまたは融合ポリペプチドであってもよい。このリストは制限することを意味しない。

【表１】

表 1. 抗原.

抗原	参照
腫瘍抗原	
メソテリン	GenBank Acc. No. NM_005823; U40434; NM_013404; BC003512 (例えば、Hassan, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:3937-3942; Muminova, et al. (2004) BMC Cancer 4:19; Iacobuzio-Donahue, et al. (2003) Cancer Res. 63:8614-8622 も参照されたい)。
ウィルムス腫瘍-1 関連タンパク質(Wt-1)、アイソフォーム A;アイソフォーム B;アイソフォーム C;アイソフォーム D を含む	WT-1 アイソフォーム A (GenBank Acc. No. NM_000378; NP_000369)。WT-1 アイソフォーム B (GenBank Acc. No. NM_024424; NP_077742)。WT-1 アイソフォーム C (GenBank Acc. No. NM_024425; NP_077743)。WT-1 アイソフォーム D (GenBank Acc. No. NM_024426; NP_077744)。
角質層キモトリプシン酵素(SCCE)、およびそのバリアント	GenBank Acc. No. NM_005046; NM_139277; AF332583。例えば、Bondurant, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:3446-3454; Santin, et al. (2004) Gynecol. Oncol. 94:283-288; Shigemasa, et al. (2001) Int. J. Gynecol. Cancer 11:454-461; Sepehr, et al. (2001) Oncogene 20:7368-7374 も参照されたい。
MHC クラス I 鎖関連タンパク質 A(MICA);MHC クラス I 鎖関連タンパク質 A(MICB)	例えば、Groh, et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:6461-6466; GenBank Acc. No. NM_000247; BC_016929; AY750850;NM_005931 を参照されたい。
ガストリンおよびガストリン由来ペプチド;ガストリン/CCK-2 受容体(CCK-B としても知られている)	Harris, et al. (2004) Cancer Res. 64:5624-5631; Gilliam, et al. (2004) Eur. J. Surg. Oncol. 30:536-543; Laheru and Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467。
グリピカン-3(例えば、肝細胞癌およびメラノーマの抗原)	GenBank Acc. No. NM_004484。Nakatsura, et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 306:16-25; Capurro, et al. (2003) Gasteroenterol. 125:89-97; Nakatsura, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:6612-6621)。
コアクトシン様タンパク質	Nakatsura, et al. (2002) Eur. J. Immunol. 32:826-836; Laheru and Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467。
前立腺幹細胞抗原(PSCA)	GenBank Acc. No. AF043498; AR026974; AR302232 (例えば、Argani, et al. (2001) Cancer Res. 61:4320-4324; Christiansen, et al. (2003) Prostate 55:9-19; Fuessel, et al. (2003) 23:221-228 も参照されたい)。

前立腺酸性ホファターゼ(PAP);前立腺特異的抗原(PSA);PSM;PSMA.	Small, et al. (2000) J. Clin. Oncol. 18:3894-3903; Altwein and Luboldt (1999) Urol. Int. 63:62-71; Chan, et al. (1999) Prostate 41:99-109; Ito, et al. (2005) Cancer 103:242-250; Schmittgen, et al. (2003) Int. J. Cancer 107:323-329; Millon, et al. (1999) Eur. Urol. 36:278-285。
前立腺の6回膜貫通上皮抗原(STEAP)	例えば、Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442; GenBank Acc. No. NM_018234; NM_001008410; NM_182915; NM_024636; NM_012449; BC011802を参照されたい。
前立腺がん腫瘍抗原-1(PCTA-1).	例えば、Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442; GenBank Acc. No. L78132を参照されたい。
前立腺腫瘍誘発遺伝子-1(PTI-1).	例えば、Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442)を参照されたい。
Gタンパク質共役型受容体への相同性を有する前立腺特異的遺伝子	例えば、Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442)を参照されたい。
プロスターゼ(Prostase)(アントロゲン(antrogen)制御されるセリンプロテアーゼ)	例えば、Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442; GenBank Acc. No. BC096178; BC096176; BC096175を参照されたい。
プロテイナーゼ3	GenBank Acc. No. X55668。
癌-精巣抗原、例えば、NY-ESO-1;SCP-1;SSX-1; SSX-2; SSX-4; GAGE、CT7; CT8; CT10; MAGE-1; MAGE-2; MAGE-3; MAGE-4; MAGE-6; LAGE-1.	GenBank Acc. No. NM_001327 (NY-ESO-1)(例えば、Li, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:1809-1814; Chen, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 101(25):9363-9368; Kubuschok, et al. (2004) Int. J. Cancer. 109:568-575; Scanlan, et al. (2004) Cancer Immun. 4:1; Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047; Scanlan, et al. (2000) Cancer Lett. 150:155-164; Dalerba, et al. (2001) Int. J. Cancer 93:85-90; Ries, et al. (2005) Int. J. Oncol. 26:817-824も参照されたい。
MAGE-A1、MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-A10; MAGE-A12; GAGE-3/6; NT-SAR-35; BAGE; CA125	Otte, et al. (2001) Cancer Res. 61:6682-6687; Lee, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2651-2656; Sarcevic, et al. (2003) Oncology 64:443-449; Lin, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:5708-5716。
GAGE-1; GAGE-2; GAGE-3; GAGE-4; GAGE-5; GAGE-6; GAGE-7; GAGE-8; GAGE-65; GAGE-11; GAGE-13; GAGE-7B.	De Backer, et al. (1999) Cancer Res. 59:3157-3165; Scarcella, et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:335-341。
HIP1R; LMNA; KIAA1416; Seb4D; KNSL6; TRIP4; MBD2; HCAC5; MAGEA3.	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047。

DAMファミリーの遺伝子、例えば、DAM-1;DAM-6.	Fleishhauer, et al. (1998) Cancer Res. 58:2969-2972。
RCAS1	Enjoji, et al. (2004) Dig. Dis. Sci. 49:1654-1656。
RU2	Van Den Eynde, et al. (1999) J. Exp. Med. 190:1793-1800。
CAMEL	Slager, et al. (2004) J. Immunol. 172:5095-5102; Slager, et al. (2004) Cancer Gene Ther. 11:227-236。
結腸癌関連抗原、例えば、NY-CO-8; NY-CO-9; NY-CO-13; NY-CO-16; NY-CO-20; NY-CO-38; NY-CO-45; NY-CO-9/HDAC5; NY-CO-41/MBD2; NY-CO-42/TRIP4; NY-CO-95/KIAA1416; KNSL6; seb4D	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047。
N-アセチルグルコサミニル-トランスフェラーゼV(GnT-V)	Dosaka-Akita, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:1773-1779。
伸長因子2変異型(ELF2M)	Renkvist, et al. (2001) Cancer Immunol Immunother. 50:3-15。
HOM-MEL-40/SSX2	Neumann, et al. (2004) Int. J. Cancer 112:661-668; Scanlan, et al. (2000) Cancer Lett. 150:155-164。
BRDT	Scanlan, et al. (2000) Cancer Lett. 150:155-164。
SAGE; HAGE	Sasaki, et al. (2003) Eur. J. Surg. Oncol. 29:900-903。
RAGE	例えば、Li, et al. (2004) Am. J. Pathol. 164:1389-1397; Shirasawa, et al. (2004) Genes to Cells 9:165-174を参照されたい。
MUM-1(メラノーマ扁在突然変異);MUM-2;MUM-2Arg-Gly 突然変異;MUM-3	Gueguen, et al. (1998) J. Immunol. 160:6188-6194; Hirose, et al. (2005) Int. J. Hematol. 81:48-57; Baurain, et al. (2000) J. Immunol. 164:6057-6066; Chiari, et al. (1999) Cancer Res. 59:5785-5792。
メラノーマのLDLR/FUT融合タンパク質抗原	Wang, et al. (1999) J. Exp. Med. 189:1659-1667。
腎臓癌抗原のNY-RENシリーズ	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047; Scanlan, et al. (1999) Cancer Res. 83:456-464。
乳癌抗原のNY-BRシリーズ、例えば、NY-BR-62; NY-BR-75; NY-BR-85; NY-BR-62; NY-BR-85	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047; Scanlan, et al. (2001) Cancer Immunity 1:4。

BRCA-1; BRCA-2	Stolier, et al. (2004) Breast J. 10:475-480; Nicoletto, et al. (2001) Cancer Treat Rev. 27:295-304。
DEK/CAN 融合タンパク質	Von Lindern, et al. (1992) Mol. Cell. Biol. 12:1687-1697。
Ras、例えば、野生型 ras、コドン 12、13、59、または 61 での突然変異を有する ras、例えば、突然変異 G12C; G12D; G12R; G12S; G12V; G13D; A59T; Q61H. K-RAS; H-RAS; N-RAS	GenBank Acc. No. P01112; P01116; M54969; M54968; P01111; P01112; K00654。例えば、GenBank Acc. No. M26261; M34904; K01519; K01520; BC006499; NM_006270; NM_002890; NM_004985; NM_033360; NM_176795; NM_005343 も参照されたい。
BRAF(RAF のアイソフォーム)	Tannapfel, et al. (2005) Am. J. Clin. Pathol. 123:256-2601; Tsao and Sober (2005) Dermatol. Clin. 23:323-333。
メラノーマ抗原、HST-2 メラノーマ細胞抗原を含む	GenBank Acc. No. NM_206956; NM_206955; NM_206954; NM_206953; NM_006115; NM_005367; NM_004988; AY148486; U10340; U10339; M77481。例えば、Suzuki, et al. (1999) J. Immunol. 163:2783-2791 を参照されたい。
サバイビン	GenBank Acc. No. AB028869; U75285 (例えば、Tsuruma, et al. (2004) J. Translational Med. 2:19 (11 pages); Pisarev, et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:6523-6533; Siegel, et al. (2003) Br. J. Haematol. 122:911-914; Andersen, et al. (2002) Histol. Histopathol. 17:669-675 も参照されたい)。
MDM-2	NM_002392; NM_006878 (例えば、Mayo, et al. (1997) Cancer Res. 57:5013-5016; Demidenko and Blagosklonny (2004) Cancer Res. 64:3653-3660 も参照されたい)。
メチル-CpG-結合タンパク質 (MeCP2;MBD2)	Muller, et al. (2003) Br. J. Cancer 89:1934-1939; Fang, et al. (2004) World J. Gastreenterol. 10:3394-3398。
NA88-A	Moreau-Aubry、*et al.* (2000) J. Exp. Med. 191:1617-1624.
ヒストンデアセチラーゼ (HDAC)、例えば、HDAC5	Waltregny, et al. (2004) Eur. J. Histochem. 48:273-290; Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047。
シクロフィリン B (Cyp-B)	Tamura, et al. (2001) Jpn. J. Cancer Res. 92:762-767。
CA 15-3; CA 27.29.	Clinton, et al. (2003) Biomed. Sci. Instrum. 39:408-414。
ヒートショックタンパク質 Hsp70	Faure, et al. (2004) Int. J. Cancer 108:863-870。

GAGE/PAGE ファミリー、例えば、PAGE-1; PAGE-2; PAGE-3; PAGE-4; XAGE-1; XAGE-2; XAGE-3.	Brinkmann, et al. (1999) Cancer Res. 59:1445-1448。
MAGE-A、B、C、およびDファミリー。MAGE-B5; MAGE-B6; MAGE-C2; MAGE-C3; MAGE-3; MAGE-6	Lucas, et al. (2000) Int. J. Cancer 87:55-60; Scanlan, et al. (2001) Cancer Immun. 1:4。
キネシン 2; TATA 要素調節因子 (TATA element modulatory factor) 1; 腫瘍タンパク質 D53; NY	Scanlan, et al. (2001) Cancer Immun. 30:1-4。
αフェトプロテイン(AFP)	Grimm, et al. (2000) Gastroenterol. 119:1104-1112。
SART1; SART2; SART3; ART4.	Kumamuru, et al. (2004) Int. J. Cancer 108:686-695; Sasatomi, et al. (2002) Cancer 94:1636-1641; Matsumoto, et al. (1998) Jpn. J. Cancer Res. 89:1292-1295; Tanaka, et al. (2000) Jpn. J. Cancer Res. 91:1177-1184。
メラノーマの優先発現抗原(PRAME).	Matsushita, et al. (2003) Leuk. Lymphoma 44:439-444; Oberthuer, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:4307-4313。
癌胎児性抗原(CEA)、CAP1-6Dエンハンサーアゴニストペプチド	GenBank Acc. No. M29540; E03352; X98311; M17303 (例えば、Zaremba (1997) Cancer Res. 57:4570-4577; Sarobe, et al. (2004) Curr. Cancer Drug Targets 4:443-454; Tsang, et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3:2439-2449; Fong, et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:8809-8814 も参照されたい)。
HER-2/neu	Disis, et al. (2004) J. Clin. Immunol. 24:571-578; Disis and Cheever (1997) Adv. Cancer Res. 71:343-371。
Cdk4;cdk6;p16(INK4);Rb タンパク質	Ghazizadeh, et al. (2005) Respiration 72:68-73; Ericson, et al. (2003) Mol. Cancer Res. 1:654-664。
TEL;AML1;TEL/AML1	Stams, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:2974-2980。
テロメラーゼ(TERT)	Nair, et al. (2000) Nat. Med. 6:1011-1017。
707-AP	Takahashi, et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3:1363-1370。
アネキシン、例えば、アネキシンII	Zimmerman, et al. (2004) Virchows Arch. 445:368-374。
BCR/ABL;BCR/ABLp210;BCR/ABLp190;CML-66;CML-28	Cobaldda, et al. (2000) Blood 95:1007-1013; Hakansson, et al. (2004) Leukemia 18:538-547; Schwartz, et al. (2003) Semin. Hematol. 40:87-96; Lim, et al. (1999) Int. J. Mol. Med. 4:665-667。
BCL2;BLC6;CD10 タンパク質	Iqbal, et al. (2004) Am. J. Pathol. 165:159-166。
CDC27(これはメラノーマ抗原である)	Wang, et al. (1999) Science 284:1351-1354。
精子タンパク質17(SP17);14-3-3-	Arora, et al. (2005) Mol. Carcinog. 42:97-108。

ζ;MEMD;KIAA0471;TC21.	
チロシナーゼ関連タンパク質1および2(TRP-1およびTRP-2)	GenBank Acc. No. NM_001922。(例えば、Bronte, et al. (2000) Cancer Res. 60:253-258も参照されたい)。
Gp100/pmel-17.	GenBank Acc. No. AH003567; U31798; U31799;U31807; U31799 (例えば、Bronte, et al. (2000) Cancer Res. 60:253-258も参照されたい)。
TARP	例えば、Clifton, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:10166-10171; Virok, et al. (2005) Infection Immunity 73:1939-1946を参照されたい。
チロシナーゼ関連タンパク質1および2(TRP-1およびTRP-2)	GenBank Acc. No. NM_001922 (例えば、Bronte, et al. (2000) Cancer Res. 60:253-258も参照されたい)。
メラノコルチン1受容体(MC1R);MAGE-3;gp100;チロシナーゼ;ドパクロムトートメラーゼ(TRP-2);MART-1.	Salazar-Onfray, et al. (1997) Cancer Res. 57:4348-4355; Reynolds, et al. (1998) J. Immunol. 161:6970-6976; Chang, et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:1021-1032。
MUC-1; MUC-2.	例えば、Davies, et al. (1994) Cancer Lett. 82:179-184; Gambus, et al. (1995) Int. J. Cancer 60:146-148; McCool, et al. (1999) Biochem. J. 341:593-600を参照されたい。
Spas-1	Allisonらの米国公開特許出願第20020150588号。
CASP-8;FLICE;MACH	Mandruzzato, et al. (1997) J. Exp. Med. 186:785-793。
CEACAM6;CAP-1	Duxbury, et al. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun. 317:837-843; Morse, et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:1331-1338。
HMGB1(DNA結合タンパク質およびサイトカイン)	Brezniceanu, et al. (2003) FASEB J. 17:1295-1297。
ETV6/AML1	Codrington, et al. (2000) Br. J. Haematol. 111:1071-1079。
大腸腺腫症(APC)の変異および野生型形態;βカテニン;c-met;p53;E-カドヘリン;シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)	Clements, et al. (2003) Clin. Colorectal Cancer 3:113-120; Gulmann, et al. (2003) Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 11:230-237; Jungck, et al. (2004) Int. J. Colorectal. Dis. 19:438-445; Wang, et al. (2004) J. Surg. Res. 120:242-248; Abutaily, et al. (2003) J. Pathol. 201:355-362; Liang, et al. (2004) Br. J. Surg. 91:355-361; Shirakawa, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:4342-4348。
mABG250が結合した腎細胞癌抗原	Mulders, et al. (2003) Urol. Clin. North Am. 30:455-465; Steffens, et al. (1999) Anticancer Res. 19:1197-1200。
EphA2	例えば、米国特許公開第2005/0281783 A1号; Genbankアクセッション番号NM_004431(ヒト); Genbankアクセッション番号NM_010139(マウス); Genbankアクセッション番号

	AB038986（ニワトリ、部分配列）；GenBank アクセッション番号 NP_004422、AAH37166、および AAA53375（ヒト）；GenBank アクセッション番号 NP_034269（マウス）、AAH06954（マウス）、XP_345597（ラット）、および BAB63910（ニワトリ）を参照されたい。
EGFRvIII	例えば、WO/2012/068360 号を参照されたい
フランシセラ・ツラレンシス抗原	
フランシセラ・ツラレンシス A および B	下記の全ゲノム：亜種 Schu S4 (GenBank Acc. No. AJ749949)；亜種 Schu 4 (GenBank Acc. No. NC_006570)。外膜タンパク質(43kDa) Bevanger, et al. (1988) J. Clin. Microbiol. 27:922-926; Porsch-Ozcurumez, et al. (2004) Clin. Diagnostic. Lab. Immunol. 11:1008-1015)。F. ツラレンシスの抗原構成成分は、例えば、80 抗原、例として 10kDa および 60kDa シャペロン(Havlasova, et al. (2002) Proteomics 2:857-86)、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、RNA-結合タンパク質 Hfq、シャペロン ClpB(Havlasova, et al. (2005) Proteomics 5:2090-2103)を含む。例えば、Oyston and Quarry (2005) Antonie Van Leeuwenhoek 87:277-281; Isherwood, et al. (2005) Adv. Drug Deliv. Rev. 57:1403-1414; Biagini, et al. (2005) Anal. Bioanal. Chem. 382:1027-1034 も参照されたい。
マラリア抗原	
スポロゾイト周囲タンパク質(CSP)；SSP2；HEP17；熱帯熱マラリア原虫において見出される Exp-1 オルソログ；および LSA-1	例えば、Haddad, et al. (2004) Infection Immunity 72:1594-1602; Hoffman, et al. (1997) Vaccine 15:842-845; Oliveira-Ferreira and Daniel-Ribeiro (2001) Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 96:221-227 を参照されたい。CSP(例えば、GenBank Acc. No. AB121024 を参照されたい)。SSP2(例えば、GenBank Acc. No. AF249739 を参照されたい)。LSA-1(例えば、GenBank Acc. No. Z30319 を参照されたい)。
リング感染した赤血球表面タンパク質（Ring-infected erythrocyte survace protein)(RESA)；メロゾイト表面タンパク質 2(MSP2)；Spf66；メロゾイト表面タンパク質 1(MSP1)；195A；BVp42.	例えば、Stirnadel, et al. (2000) Int. J. Epidemiol. 29:579-586; Krzych, et al. (1995) J. Immunol. 155:4072-4077 を参照されたい。Good, et al. (2004) Immunol. Rev. 201:254-267; Good, et al. (2004) Ann. Rev. Immunol. 23:69-99 も参照されたい。MSP2（例えば、GenBank Acc. No. X96399; X96397 を参照された)。MSP1（例えば、GenBank Acc. No. X03371 を参照されたい)。RESA（例えば、GenBank Acc. No. X05181; X05182 を参照されたい)。
頂端膜抗原 1(AMA1)	例えば、Gupta, et al. (2005) Protein Expr. Purif. 41:186-198. AMA1 を参照されたい(例えば、GenBank Acc. No. A`13; AJ494905; AJ490565 を参照されたい)。
ウイルスおよびウイルス抗原	
A 型肝炎	例えば、GenBank Acc. No. NC_001489; AY644670; X83302; K02990; M14707。

B型肝炎	全ゲノム(例えば、GenBank Acc. No. AB214516; NC_003977; AB205192; AB205191; AB205190; AJ748098; AB198079; AB198078; AB198076; AB074756を参照されたい)。
C型肝炎	全ゲノム(例えば、GenBank Acc. No. NC_004102; AJ238800; AJ238799; AJ132997; AJ132996; AJ000009; D84263 を参照されたい)。
D型肝炎	例えば、GenBank Acc. No. NC_001653; AB118847; AY261457。
ヒトパピローマウイルス、全ての200+サブタイプ(16の群に分類)、例えば高リスクサブタイプ16、18、30、31、33、45を含む	例えば、Trimble, et al. (2003) Vaccine 21:4036-4042; Kim, et al. (2004) Gene Ther. 11:1011-1018; Simon, et al. (2003) Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 109:219-223; Jung, et al. (2004) J. Microbiol. 42:255-266; Damasus-Awatai and Freeman-Wang (2003) Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 15:473-477; Jansen and Shaw (2004) Annu. Rev. Med. 55:319-331; Roden and Wu (2003) Expert Rev. Vaccines 2:495-516; de Villiers, et al. (2004) Virology 324:17-24; Hussain and Paterson (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:577-586; Molijn, et al. (2005) J. Clin. Virol. 32 (Suppl. 1) S43-S51 を参照されたい。GenBank Acc. No. AY686584; AY686583; AY686582; NC_006169; NC_006168; NC_006164; NC_001355; NC_001349; NC_005351; NC_001596)。
ヒトTリンパ球向性ウイルス(HTLV)IおよびII型、下記を含む:HTLVI型サブタイプ普遍種、中部アフリカ、およびAustro-Melanesian、ならびにHTLVII型サブタイプIia、Iib、Iic、およびIid.	例えば、Capdepont, et al. (2005) AIDS Res. Hum. Retrovirus 21:28-42; Bhigjee, et al. (1999) AIDS Res. Hum. Restrovirus 15:1229-1233; Vandamme, et al. (1998) J. Virol. 72:4327-4340; Vallejo, et al. (1996) J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 13:384-391 を参照されたい。HTLVI型(例えば、GenBank Acc. No. AY563954; AY563953を参照されたい。HTLV II型(例えば、GenBank Acc. No. L03561; Y13051; AF139382を参照されたい)。
コロナビリダエ、下記を含む:コロナウイルス、例えばSARS-コロナウイルス(SARS-CoV)、およびトロウイルス	例えば、Brian and Baric (2005) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 287:1-30; Gonzalez, et al. (2003) Arch. Virol. 148:2207-2235; Smits, et al. (2003) J. Virol. 77:9567-9577; Jamieson, et al. (1998) J. Infect. Dis. 178:1263-1269 (GenBank Acc. Nos. AY348314; NC_004718; AY394850)を参照されたい。
風疹ウイルス.	GenBank Acc. No. NC_001545; AF435866。
ムンプスウイルス、遺伝子型A、C、D、G、H、およびIを含む	例えば、Orvell, eta l. (2002) J. Gen. Virol. 83:2489-2496を参照されたい。例えば、GenBank Acc. No. AY681495; NC_002200; AY685921; AF201473を参照されたい。
コクサッキーウイルスA、血清型1、11、13、15、17、18、19、20、21、22、および24を含む(ヒトエンテロウイルスC;HEV-Cとしても知られている)	例えば、Brown, et al. (2003) J. Virol. 77:8973-8984を参照されたい。GenBank Acc. No. AY421768; AY790926: X67706。
コクサッキーウイルスB、サブタイプ1-6を含む	例えば、Ahn, et al. (2005) J. Med. Virol. 75:290-294; Patel, et al. (2004) J. Virol. Methods 120:167-172; Rezig, et al. (2004) J. Med. Virol. 72:268-274 を参照

	されたい。GenBank Acc. No. X05690。
ヒトエンテロウイルス、下記を含む：例えば、ヒトエンテロウイルスA(HEV-A、CAV2～CAV8、CAV10、CAV12、CAV14、CAV16、およびEV71)ならびにHEV-B(CAV9、CBV1～CBV6、E1～E7、E9、E11～E21、E24～E27、E29～E33、およびEV69ならびにE73)、ならびにHEV	例えば、Oberste, et al. (2004) J. Virol. 78:855-867を参照されたい。ヒトエンテロウイルスA (GenBank Acc. No. NC_001612)；ヒトエンテロウイルスB (NC_001472)；ヒトエンテロウイルスC (NC_001428)；ヒトエンテロウイルスD (NC_001430)。サルエンテロウイルスA (GenBank Acc. No. NC_003988)。
ポリオウイルス、PV1、PV2、およびPV3を含む	例えば、He, et al. (2003) J. Virol. 77:4827-4835; Hahsido, et al. (1999) Microbiol. Immunol. 43:73-77を参照されたい。GenBank Acc. No. AJ132961 (1型)；AY278550 (2型)；X04468 (3型)。
ウイルス性脳炎ウイルス、下記を含む：ウマ脳炎、ベネズエラウマ脳炎(VEE)(サブタイプIA、IB、IC、ID、IIIC、IIIDを含む)、東部ウマ脳炎(EEE)、西部ウマ脳炎(WEE)、セントルイス脳炎、マレー渓谷(オーストラリア)脳炎、日本脳炎、およびダニ媒介性脳炎	例えば、Hoke (2005) Mil. Med. 170:92-105; Estrada-Franco, et al. (2004) Emerg. Infect. Dis. 10:2113-2121; Das, et al. (2004) Antiviral Res. 64:85-92; Aguilar, et al. (2004) Emerg. Infect. Dis. 10:880-888; Weaver, et al. (2004) Arch. Virol. Suppl. 18:43-64; Weaver, et al. (2004) Annu. Rev. Entomol. 49:141-174を参照されたい。東部ウマ脳炎(GenBank Acc. No. NC_003899; AY722102)；西部ウマ脳炎(NC_003908)。
ヒトヘルペスウイルス、下記を含む：サイトメガロウイルス(CMV)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、ヒトヘルペスウイルス-1(HHV-1)、HHV-2、HHV-3、HHV-4、HHV-5、HHV-6、HHV-7、HHV-8、ヘルペスBウイルス、単純ヘルペスウイルス1および2型(HSV-1、HSV-2)、および水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)	例えば、Studahl, et al. (2000) Scand. J. Infect. Dis. 32:237-248; Padilla, et al. (2003) J. Med. Virol. 70 (Suppl. 1) S103-S110; Jainkittivong and Langlais (1998) Oral Surg. Oral Med. 85:399-403を参照されたい。GenBank No. NC_001806 (ヘルペスウイルス1)；NC_001798 (ヘルペスウイルス2)；X04370およびNC_001348 (ヘルペスウイルス3)；NC_001345 (ヘルペスウイルス4)；NC_001347 (ヘルペスウイルス5)；X83413およびNC_000898 (ヘルペスウイルス6)；NC_001716 (ヘルペスウイルス7)。 ヒトヘルペスウイルス6および7型(HHV-6; HHV-7)が、例えば、Padilla, et al. (2003) J. Med. Virol. 70 (Suppl. 1)S103-S110により開示される。ヒトヘルペスウイルス8(HHV-8)(サブタイプA-Eを含む)が、例えば、Treurnicht, et al. (2002) J. Med. Virul. 66:235-240において開示される。
HIV-1、下記を含む：グループM(サブタイプA～Jを含む)およびグループO(任意の識別可能なサブタイプを含む)(HIV-2、サブタイプA-Eを含む	例えば、Smith, et al. (1998) J. Med. Virol. 56:264-268を参照されたい。例えば、GenBank Acc. No. DQ054367; NC_001802; AY968312; DQ011180; DQ011179; DQ011178; DQ011177; AY588971; AY588970; AY781127; AY781126; AY970950; AY970949; AY970948; X61240; AJ006287; AJ508597；およびAJ508596も参照されたい。

エプスタイン・バーウイルス(EBV)、サブタイプAおよびBを含む	例えば、Peh, et al. (2002) Pathology 34:446-450を参照されたい。エプスタイン・バーウイルス株 B95-8(GenBank Acc. No. V01555)。
レオウイルス、下記を含む：血清型および株1、2、および3、1型Lang、2型Jones、および3型Dearing	例えば、Barthold, et al. (1993) Lab. Anim. Sci. 43:425-430; Roner, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:12362-12366; Kedl, et al. (1995) J. Virol. 69:552-559を参照されたい。GenBank Acc. No. K02739（σ-3遺伝子表面タンパク質)。
サイトメガロウイルス(CMV)サブタイプはCMVサブタイプI-VIIを含む	例えば、Chern, et al. (1998) J. Infect. Dis. 178:1149-1153; Vilas Boas, et al. (2003) J. Med. Virol. 71:404-407; Trincado, et al. (2000) J. Med. Virol. 61:481-487を参照されたい。GenBank Acc. No. X17403。
ライノウイルス、全ての血清型を含む	ヒトライノウイルス2 (GenBank Acc. No. X02316)；ヒトライノウイルスB(GenBank Acc. No. NC_001490)；ヒトライノウイルス89(GenBank Acc. No. NC_001617)；ヒトライノウイルス39(GenBank Acc. No. AY751783)。
アデノウイルス、全ての血清型を含む	AY803294; NC_004001; AC_000019; AC_000018; AC_000017; AC_000015; AC_000008; AC_000007; AC_000006; AC_000005; AY737798; AY737797;NC_003266; NC_002067; AY594256; AY594254; AY875648; AJ854486; AY163756; AY594255; AY594253; NC_001460; NC_001405; AY598970; AY458656; AY487947; NC_001454; AF534906; AY45969; AY128640; L19443; AY339865; AF532578.
フィロウイルス、下記を含む：マールブルグウイルスおよびエボラウイルス、およびエボラ-スーダン(EBO-S)、エボラ-ザイール(EBO-Z)、およびエボラ-レストン(EBO-R)などの株。	例えば、Geisbert and Jahrling (1995) Virus Res. 39:129-150; Hutchinson, et al. (2001) J. Med. Virol. 65:561-566を参照されたい。マールブルグウイルス(例えば、GenBank Acc. No. NC_001608を参照されたい)。エボラウイルス(例えば、GenBank Acc. No. NC_006432; AY769362; NC_002549; AF272001; AF086833を参照されたい)。
アレナウイルス、下記を含む：リンパ性脈絡髄膜炎(LCM)ウイルス、ラッサウイルス、フニンウイルス、およびマチュポウイルス	フニンウイルス、セグメントS(GenBank Acc. No. NC_005081)；フニンウイルス、セグメントL(GenBank Acc. No. NC_005080)。
狂犬病ウイルス	例えば、GenBank Acc. No. NC_001542; AY956319; AY705373; AF499686; AB128149; AB085828; AB009663を参照されたい。
アルボウイルス、下記を含む：ウエストナイルウイルス、デングウイルス1～4、コロラドダニ熱ウイルス、シンドビスウイルス、トガウイルス、フラビウイルス科、ブニヤウイルス、レオウイルス、ラブドウイルス、オルトミクソウイルス、など	デングウイルス1型(例えば、GenBank Acc. No. AB195673; AY762084を参照されたい)。デングウイルス2型(例えば、GenBank Acc. No. NC_001474; AY702040; AY702039; AY702037を参照されたい)。デングウイルス3型(例えば、GenBank Acc. No. AY923865; AT858043を参照されたい)。デングウイルス4型(例えば、GenBank Acc. No. AY947539; AY947539; AF326573を参照されたい)。シンドビスウイルス(例えば、GenBank Acc. No. NC_001547; AF429428; J02363; AF103728

	を参照されたい)。ウエストナイルウイルス(例えば、GenBank Acc. No. NC_001563; AY603654 を参照されたい)。
ポックスウイルス、下記を含む：オルソポックスウイルス(痘瘡ウイルス、サル痘ウイルス、ワクチニアウイルス、牛痘ウイルス)、ヤタポックスウイルス(タナ痘ウイルス、ヤバサル腫瘍ウイルス)、パラポックスウイルス、およびモルシポックスウイルス	痘瘡ウイルス(例えば、GenBank Acc. No. NC_001611; Y16780; X72086; X69198 を参照されたい)。
黄熱	例えば、GenBank Acc. No. NC_002031; AY640589; X03700 を参照されたい。
ハンタウイルス、下記を含む：血清型ハンタン(HTN)、ソウル(SEO)、ドブラバ(DOB)、シンノンブル(SN)、プーマラ(PUU)、およびドブラバ様サーレマ(SAAV)	例えば、Elgh, et al. (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1122-1130; Sjolander, et al. (2002) Epidemiol. Infect. 128:99-103; Zeier, et al. (2005) Virus Genes 30:157-180 を参照されたい。GenBank Acc. No. NC_005222 および NC_005219 (ハンタウイルス)。例えば、GenBank Acc. No. NC_005218; NC_005222; NC_005219 も参照されたい。
フラビウイルス、下記を含むデングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、および黄熱ウイルス	例えば、Mukhopadhyay, et al. (2005) Nature Rev. Microbiol. 3:13-22 を参照されたい。GenBank Acc. Nos NC_001474 および AY702040 (デング)。GenBank Acc. No. NC_001563 および AY603654。
麻疹ウイルス	例えば、GenBank Acc. No. AB040874 および AY486084 を参照されたい。
ヒトパラインフルエンザウイルス(HPV)、HPV1-56 型を含む	ヒトパラインフルエンザウイルス 2(例えば、GenBank Acc. No. AB176531; NC003443 を参照されたい)。ヒトパラインフルエンザウイルス 3(例えば、GenBank Acc. No. NC_001796 を参照されたい)。
インフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス A、B、およびC型を含む	インフルエンザヌクレオカプシド(例えば、GenBank Acc. No. AY626145 を参照されたい)。インフルエンザ赤血球凝集素(例えば、GenBank Acc. No. AY627885; AY555153 を参照されたい)。インフルエンザノイラミニダーゼ(例えば、GenBank Acc. No. AY555151; AY577316 を参照されたい)。インフルエンザマトリクスタンパク質 2(例えば、GenBank Acc. No. AY626144 を参照されたい)。インフルエンザ塩基性タンパク質 1(例えば、GenBank Acc. No. AY627897 を参照されたい)。インフルエンザポリメラーゼ酸性タンパク質 (例えば、GenBank Acc. No. AY627896 を参照されたい)。インフルエンザ核タンパク質(例えば、GenBank Acc. Nno. AY627895 を参照されたい)。
インフルエンザ A ウイルスサブタイプ、例えば、ブタウイルス(SIV):H1N1 インフルエンザ A およびブタインフルエンザウイルス	H1N1 の赤血球凝集素(GenBank Acc. No. S67220)。インフルエンザ A ウイルス マトリクスタンパク質 (GenBank Acc. No. AY700216)。インフルエンザウイルス A H5H1 核タンパク質(GenBank Acc. No. AY646426)。H1N1 赤血球凝集素 (GenBank Acc. No. D00837)。GenBank Acc. No. BD006058; BD006055; BD006052 もまた、参照されたい。例えば、

	Wentworth, et al. (1994) J. Virol. 68:2051-2058; Wells, et al. (1991) J.A.M.A. 265:478-481も参照されたい。
呼吸器多核体ウイルス(RSV)、サブグループAおよびサブグループBを含む	呼吸器多核体ウイルス(RSV)(例えば、GenBank Acc. No. AY353550; NC_001803; NC001781を参照されたい)。
ロタウイルス、下記を含む:ヒトロタウイルスA～E、ウシロタウイルス、アカゲザルロタウイルス、およびヒト-RVV再集合	ヒトロタウイルスCセグメント8(GenBank Acc. No. AJ549087);ヒトロタウイルスG9株外側カプシドタンパク質(例えば、GenBank Acc. No. DQ056300を参照されたい);ヒトロタウイルスB株非構造タンパク質4(例えば、GenBank Acc. No. AY548957を参照されたい);ヒトロタウイルスA株主内側カプシドタンパク質(例えば、GenBank Acc. No. AY601554を参照されたい)。
ポリオーマウイルス、下記を不含む:サルウイルス40(SV40)、JCウイルス(JCV)およびBKウイルス(BKV)。	例えば、Engels, et al. (2004) J. Infect. Dis. 190:2065-2069; Vilchez and Butel (2004) Clin. Microbiol. Rev. 17:495-508; Shivapurkar, et al. (2004) Cancer Res. 64:3757-3760; Carbone, et al. (2003) Oncogene 2:5173-5180; Barbanti-Brodano, et al. (2004) Virology 318:1-9)を参照されたい。(例えば、GenBank Acc. No. NC_001669; AF168994; AY271817; AY271816; AY120890; AF345344; AF332562におけるSV40全ゲノム)。
コルティウイルス、コロラドダニ熱ウイルス、Eyachウイルスを含む	Attoui, et al. (1998) J. Gen. Virol. 79:2481-2489。Eyachウイルスのセグメント(例えば、GenBank Acc. No. AF282475; AF282472; AF282473; AF282478; AF282476; NC_003707; NC_003702; NC_003703; NC_003704; NC_003705; NC_003696; NC_003697; NC_003698; NC_003699; NC_003701; NC_003706; NC_003700; AF282471; AF282477を参照されたい)。
カリシウイルス、ゲノグループノーウォーク、スノーマウンティングループ(SMA)、およびサッポロを含む	スノーマウンティンウイルス(例えば、GenBank Acc. No. AY134748を参照されたい)。
パルボウイルス科、ディペンドウイルス、パルボウイルス(パルボウイルスB19を含む)、およびエリスロウイルスを含む	例えば、Brown (2004) Dev. Biol. (Basel) 118:71-77; Alvarez-Lafuente, et al. (2005) Ann. Rheum. Dis. 64:780-782; Ziyaeyan, et al. (2005) Jpn. J. Infect. Dis. 58:95-97; Kaufman, et al. (2005) Virology 332:189-198を参照されたい。

【００９８】

好適な抗原が当技術分野で知られている他の生物としては下記が挙げられるが、それらに限定されない：クラミジア・トラコマチス、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ａ群Ｓｔｒｅｐ）、ストレプトコッカス・アガラクチア（Ｂ群Ｓｔｒｅｐ）、ストレプトコッカス・ニューモニエ、スタフィロコッカス・アウレウス、大腸菌、ヘモフィルス・インフルエンザエ、髄膜炎菌、ナイセリア・ゴノレア、ビブリオ・コレラエ、サルモネラ種（チフス、チフィリウムを含む）、エンテリカ（ヘリコバクター・ピロリシゲラ・フレックスネリおよび他のＤ群シゲラ種を含む）、バークホルデリア・マレイ、バークホルデリア・シュードマレイ、肺炎桿菌、クロストリジウム種（Ｃ．ディフィシルを含む）、ビブリオ・パラヘモリチカスおよびＶ．バルニフィカス。このリストは制限することを意味しない。

【００９９】

医薬組成物

「医薬」という用語は、本明細書では疾患の治癒、治療、または防止において使用することが意図される化学物質を示し、処方または一般用医薬品として米国食品医薬品局（ま

たは、その非米国等価物）による承認プロセスを受ける。そのような組成物の製剤および投与のための技術に関する詳細は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ，Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ）およびＮｉｅｌｌｏｕｄ ａｎｄ Ｍａｒｔｉ－Ｍｅｓｔｒｅｓ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｍｕｌｓｉｏｎｓ ａｎｄ Ｓｕｓｐｅｎｓｉｏｎｓ：２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）において見出され得る。

【０１００】

この開示の目的上、医薬組成物は様々な手段により、例えば経口的に、非経口的に、吸入スプレーにより、局所的に、または直腸に、薬学的に許容される担体、アジュバントおよびビヒクルを含む製剤中で投与され得る。非経口という用語は、本明細書では、様々な注入技術を用いた、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内、くも膜下腔内および硬膜外注射を含むが、それらに限定されない。動脈内および静脈内注射は、本明細書では、カテーテルを介する投与を含む。冠動脈内ステントおよび冠動脈内リザーバを介する投与もまた、企図される。経口という用語は、本明細書では、経口摂取、あるいは舌下または頬側経路による送達を含むが、それらに限定されない。経口投与は流体飲料、エネルギーバー、ならびに丸薬製剤を含む。

【０１０１】

医薬組成物は意図された投与方法に好適な任意の形態としてもよい。経口用途のために使用される場合、例えば、錠剤、トローチ、ロゼンジ、水性または油性懸濁液、分散性粉末または顆粒、エマルジョン、ハードまたはソフトカプセル、シロップまたはエリキシル剤が調製され得る。経口用途のために意図される組成物は、医薬組成物の製造のために当技術分野で知られている任意の方法により調製することができ、そのような組成物は、美味調製物を提供するために、甘味剤、香味剤、着色剤および保存剤を含む１つ以上の薬剤を含み得る。錠剤の製造に好適な無毒性の薬学的に許容される賦形剤との混合物中に薬物化合物を含む錠剤が許容される。これらの賦形剤は、例えば、下記とすることができる：不活性希釈剤、例えば炭酸カルシウムまたはナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはナトリウム；顆粒化および崩壊剤、例えばトウモロコシデンプン、またはアルギン酸；結合剤、例えばデンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム；および潤滑剤；例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク。錠剤は未コートであってもよく、または公知の技術、例えば腸溶コーティング、結腸コーティング、またはマイクロカプセル化によりコートしてもよく、胃腸管内での崩壊および吸着が遅延され、および／または長期間にわたる持続作用が提供される。例えば、時間遅延材料、例えばモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルは単独で、またはワックスと組み合わせて使用され得る。

【０１０２】

経口用途のための製剤はまた、薬物化合物は不活性固体希釈剤、例えばリン酸カルシウムまたはカオリンと混合されたハードゼラチンカプセルとして、または活性成分が水または油媒質、例えばピーナッツ油、液体パラフィンまたはオリーブ油と混合されたソフトゼラチンカプセルとして提供され得る。

【０１０３】

医薬組成物は水性懸濁液の製造に好適な賦形剤と混合された水性懸濁液として製剤化され得る。そのような賦形剤としては下記が挙げられる：懸濁剤、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガントガムおよびアカシアゴム、ならびに分散または湿潤剤、例えば天然起源のホスファチド（例えば、レシチン）、アルキレンオキシドの脂肪酸との縮合生成物（例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン）、エチレンオキシドの長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、エチレンオキシドの脂肪酸およびヘキシトール無水物由来の部分エステルとの縮合生成物（例えば、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン）。水性懸濁液

はまた、１つ以上の保存剤、例えばｐ－ヒドロキシ安息香酸エチルまたはｎ－プロピル、１つ以上の着色剤、１つ以上の香味剤および１つ以上の甘味剤、例えばスクロースまたはサッカリンを含み得る。

【０１０４】

油懸濁液は、活性成分を植物油、例えばラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油またはココナツ油、あるいは鉱物油例えば液体パラフィン中に懸濁させることにより製剤化することができる。経口懸濁液は増粘剤、例えば蜜ろう、ハードパラフィンまたはセチルアルコールを含み得る。甘味剤、例えば上記で明記されるもの、および香味剤は、美味経口調製物を提供するために添加され得る。これらの組成物は、アスコルビン酸などの抗酸化剤の添加により保存され得る。

【０１０５】

水の添加による水性懸濁液の調製に好適な、本開示の分散性粉末および顆粒は、分散または湿潤剤、懸濁剤、および１つ以上の保存剤と混合された活性成分を提供する。好適な分散または湿潤剤および懸濁剤は、上記で開示されたものにより例示される。追加の賦形剤、例えば甘味、香味および着色剤もまた、存在し得る。

【０１０６】

本開示の医薬組成物はまた、水中油エマルジョンの形態であってもよい。油性相は植物油、例えばオリーブ油またはラッカセイ油、鉱物油、例えば液体パラフィン、またはこれらの混合物であってもよい。好適な乳化剤としては下記が挙げられる：天然起源のゴム、例えばアカシアゴムおよびトラガントガム、天然起源のホスファチド、例えばダイズレシチン、脂肪酸およびヘキシトール無水物由来のエステルまたは部分エステル、例えばモノオレイン酸ソルビタン、ならびにこれらの部分エステルのエチレンオキシドとの縮合生成物、例えばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン。エマルジョンはまた、甘味および香味剤を含み得る。

【０１０７】

シロップおよびエリキシル剤は甘味剤、例えばグリセロール、ソルビトールまたはスクロースと共に製剤化され得る。そのような製剤はまた、粘滑剤、保存剤、香味料または着色剤を含み得る。

【０１０８】

本開示の医薬組成物は、無菌注射調製物、例えば無菌注射水性または油性懸濁液の形態とすることができる。この懸濁液は、それらの好適な分散または湿潤剤および懸濁剤（以上で言及されている）を用いて公知の技術により製剤化され得る。無菌注射調製物はまた、無毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌注射溶液または懸濁液、例えば１，３－ブタン－ジオール中の溶液とすることができ、あるいは凍結乾燥粉末として調製することができる。使用され得る許容されるビヒクルおよび溶媒は水、リンガー液および等張塩化ナトリウム溶液である。加えて、無菌固定油は従来、溶媒または懸濁媒質として使用され得る。このために、合成モノまたはジグリセリドを含む任意の無刺激性固定油が使用され得る。加えて、オレイン酸などの脂肪酸は同様に注射剤の調製において使用され得る。

【０１０９】

単一剤形を生成させるために、担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、治療される宿主および特定の投与方法によって変動するであろう。例えば、ヒトへの経口投与のために意図される持続放出型製剤は、適切な好都合な量の担体材料（総組成物の約５～約９５％で変動するであろう）と配合されたおよそ２０～５００ｍｇの活性材料を含むことができる。投与のために容易に測定可能な量を提供する医薬組成物が調製されることが好ましい。典型的には、全身投与される有効量は約０．１ｍｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇであり、多くの因子（例えば、被験体（例えば、ヒトなどの哺乳類）の年齢および体重、治療を必要とする正確な病状およびその重症度、投与経路を含む）に依存し、最終的に付き添い医師または獣医師の裁量によるであろう。しかしながら、任意の特定の患者のための特定の用量レベルは、下記を含む様々な因子に依存するであろうことが理解され

るであろう：使用される特定の化合物の活性、治療される個体の年齢、体重、全体的な健康、性別および食餌；投与の時間および経路；排泄速度；前に投与された他の薬物；ならびに治療を受けている特定の病状の重症度（当業者により、よく理解される）。

【０１１０】

上述のように、経口投与に好適な本開示の製剤は、別々のユニット、例えばカプセル、カシェ剤または錠剤（それぞれ、所定の量の活性成分を、粉末または顆粒として含む）として；水性または非水性液体中の溶液として、または懸濁液として、または水中油液体エマルジョンもしくは油中水液体エマルジョンとして提示され得る。医薬組成物はまた、ボーラス、舐剤またはペーストとして投与され得る。

【０１１１】

錠剤は、圧縮または成型により、任意で１つ以上の補助材料成分を用いて製造させることができる。圧縮錠は好適な機械において、任意で、バインダ（例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルエチルセルロース）、潤滑剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えば、デンプングリコール酸ナトリウム、架橋ポビドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）界面活性または分散剤と混合された、自由流動形態の活性成分、例えば粉末または顆粒を圧縮することにより調製され得る。成形錠剤は、好適な機械において、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を用いて製造させることができる。錠剤は任意でコートまたは分割させることができ、および、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを、所望の放出プロファイルを提供するように様々な割合で使用して、その中の活性成分の持続または制御放出を提供するように製剤化させることができる。錠剤は任意で、腸溶または結腸コーティングと共に提供することができ、胃以外の腸の部分で放出される。これは特に、そのような化合物が酸加水分解を受ける場合、式１の化合物を用いると有利である。

【０１１２】

口内の局所投与に好適な製剤としては下記が挙げられる：活性成分を香味ベース、通常スクロースおよびアラビアゴムまたはトラガント中に含むロゼンジ；活性成分を不活性ベース、例えばゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアラビアゴム中に含むトローチ；ならびに、活性成分を好適な液体担体中に含む口腔洗浄薬。

【０１１３】

直腸投与のための製剤は、例えばカカオバターまたはサリシレートを含む好適なベースを有する坐薬として提供され得る。

【０１１４】

腟内投与に好適な製剤は、活性成分に加えて、当技術分野で適切であることが知られている担体を含むペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォームまたはスプレー製剤として提供され得る。

【０１１５】

非経口投与に好適な製剤は、下記を含む：抗酸化剤、緩衝剤、静菌薬および製剤を対象レシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る水性および非水性等張滅菌注射溶液；ならびに、懸濁剤および増粘剤を含み得る、水性および非水性無菌懸濁液。製剤は単位用量または複数回用量密閉容器、例えば、アンプルおよびバイアル中で提供されてもよく、使用直前に、注射剤用の無菌液体担体、例えば水の添加のみが必要となる、凍結乾燥（凍結乾燥した）状態で保存されてもよい。注射溶液および懸濁液は前に記載されている種類の無菌粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。

【０１１６】

本明細書では、薬学的に許容される塩としては下記が挙げられるが、それらに限定されない：酢酸塩、ピリジン、アンモニウム、ピペラジン、ジエチルアミン、ニコチンアミド、ギ酸、尿素、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、リチウム、桂皮酸、メチルアミノ、メタンスルホン酸、ピクリン酸、酒石酸、トリエチルアミノ、ジメチルアミノ、およびトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン。追加の薬学的に許容される塩は、当業者に知られている。

【０１１７】
特定の患者に対する有効量は、治療される病状、患者の健康全般、投与の経路および用量ならびに副作用の重症度などの因子によって変動し得る。治療および診断の方法のためのガイダンスが入手可能である（例えば、Ｍａｙｎａｒｄ，ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ａ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ ＳＯＰｓ ｆｏｒ Ｇｏｏｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｉｎｔｅｒｐｈａｒｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ；Ｄｅｎｔ（２００１）Ｇｏｏｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ａｎｄ Ｇｏｏｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｕｒｃｈ Ｐｕｂｌ．，Ｌｏｎｄｏｎ，ＵＫを参照されたい）。

【０１１８】
有効量は単回投与で与えられてもよいが、単回投与に制限されない。よって、投与は２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上の医薬組成物の投与とすることができる。１回を超える医薬組成物の投与が本方法において行われる場合、投与は、１分、２分、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上の分の時間間隔だけ、約１時間、２時間、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間、などの間隔だけ空けることができる。時間との関連で、「約」という用語は、±３０分以内の任意の時間間隔を意味する。投与はまた、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、１５日、１６日、１７日、１８日、１９日、２０日、２１日、およびそれらの組み合わせの時間間隔だけ空けることができる。発明は、時間が均等に空けられた投与間隔に制限されず、均等でない間隔での投与を含む。

【０１１９】
例えば、１回／週、２回／週、３回／週、４回／週、５回／週、６回／週、７回／週、２週毎に１回、３週毎に１回、４週毎に１回、５週毎に１回、などの投与スケジュールが、本発明で使用可能である。投与スケジュールは、例えば、１週、２週、３週、４週、５週、６週、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月、７ヶ月、８ヶ月、９ヶ月、１０ヶ月、１１ヶ月、および１２ヶ月の総期間の間の投与を含む。

【０１２０】
上記投与スケジュールのサイクルが提供される。サイクルは約、例えば、７日毎；１４日毎；２１日毎；２８日毎；３５日毎；４２日；４９日毎；５６日毎；６３日毎；７０日毎；などに繰り返すことができる。投与のない間隔がサイクル間で起こる可能性があり、ここで、間隔は約、例えば、７日；１４日；２１日；２８日；３５日；４２日；４９日；５６日；６３日；７０日；などとすることができる。この状況では、「約」という用語は、±１日、±２日、±３日、±４日、±５日、±６日、または±７日を意味する。

【０１２１】
追加の治療薬との同時投与のための方法は当技術分野でよく知られている（Ｈａｒｄｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．）（２００１）Ｇｏｏｄｍａｎ ａｎｄ Ｇｉｌｍａｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，１０ｔｈ ｅｄ．，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ；Ｐｏｏｌｅ ａｎｄ Ｐｅｔｅｒｓｏｎ（ｅｄｓ．）（２００１）Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ｆｏｒ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａ．，ＰＡ；Ｃｈａｂｎｅｒ ａｎｄ Ｌｏｎｇｏ（ｅｄｓ．）（２００１）Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａ．，ＰＡ）。

【０１２２】
述べたように、本発明の組成物は好ましくは、非経口または経腸送達のための医薬組成物として製剤化される。動物への投与のための典型的な医薬組成物は、薬学的に許容され

るビヒクル、例えば水溶液、無毒性賦形剤、例えば塩、保存剤、緩衝剤などを含む。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１５ｔｈ Ｅｄ．，Ｅａｓｔｏｎ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，ｐｐ １４０５－１４１２ ａｎｄ １４６１－ １４８７ （１９７５）；Ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｆｏｒｍｕｌａｒｙ ＸＩＶ，１４ｔｈ Ｅｄ．，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ （１９７５）を参照されたい。非水溶媒の例はプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。水性担体としては下記が挙げられる：水、アルコール／水溶液、生理食塩水、非経口ビヒクル、例えば塩化ナトリウム、Ｒｉｎｇｅｒデキストロース、など。静脈内ビヒクルは、流体および栄養分補充薬を含む。保存剤は抗菌薬、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスを含む。医薬組成物の様々な構成成分のｐＨおよび正確な濃度は、当技術分野における日常的な技能により調整される。

【０１２３】

特定のワクチンの反復投与（相同ブースティング）は体液性応答をブーストするのに有効であることが証明されている。そのようなアプローチは、細胞免疫をブーストするのに有効ではない可能性があり、というのも、ベクターへの前の免疫が強い抗原提示および適切な炎症シグナルの生成を損なう傾向があるからである。この問題を回避するための１つのアプローチは異なる抗原－送達系を使用するワクチンの連続投与である（異種ブースティング）。異種ブースティングレジメンでは、少なくとも１つのプライムまたはブースト送達は、本明細書で記載される不活性化腫瘍細胞／環状プリンジヌクレオチド組成物の送達を含む。レジメンの異種アームは１つ以上の下記戦略を使用する抗原の送達を含み得る：

対象となる抗原を含む不活性化または弱毒化細菌またはウイルス（いくつかの変性条件で処理され、病原性侵襲を開始するのに無効または非効率的とされた粒子である）；

精製抗原（病原体または病原体を含む組織試料の細胞培養から精製された、典型的には自然に生成された抗原、またはその組換えバージョンである）；

被験体の宿主細胞において抗原を発現および／または分泌するように組換え操作された、生ウイルスまたは細菌送達ベクター。これらの戦略は、（例えば、遺伝子操作により）ウイルスまたは細菌ベクターを弱毒化し、非病原性および無毒性することに依存する；

抗原提示細胞（ＡＰＣ）ベクター、例えば樹状細胞（ＤＣ）ベクター（抗原がロードされた、または抗原をコードする核酸を含む組成物でトランスフェクトされた細胞を含む）（例えば、去勢抵抗性転移性前立腺癌の治療のためのＰｒｏｖｅｎｇｅ（登録商標）（Ｄｅｎｄｒｅｏｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ））；

リポソーム抗原送達ビヒクル；ならびに

ネイキッドＤＮＡベクターおよびネイキッドＲＮＡベクター（遺伝子銃、電気穿孔、細菌ゴースト、ミクロスフェア、微小粒子、リポソーム、ポリカチオンナノ粒子、などにより投与され得る）。

【０１２４】

プライムワクチンおよびブーストワクチンは、下記経路のいずれか一つまたは組み合わせにより投与することができる。１つの態様では、プライムワクチンおよびブーストワクチンは同じ経路により投与される。別の態様では、プライムワクチンおよびブーストワクチンは異なる経路により投与される「異なる経路」という用語は、身体上の異なる部位、例えば、口腔、非口腔、腸内、非経口、直腸、節内（リンパ節）、静脈内、動脈、皮下、筋肉内、腫瘍内、腫瘍周囲、腫瘍内、注入、粘膜、経鼻、脳脊髄空間または脳脊髄液中、などである部位、ならびに異なる様式、例えば、経口、静脈内、および筋肉内による、を含むが、これに限定されない。

【０１２５】

有効量のプライムまたはブーストワクチンは単回投与で与えてもよいが、単回投与に制限されない。よって、投与は２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３

、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上の、ワクチンの投与とすることができる。１を超えるワクチンの投与の場合、投与は、１分、２分、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上の分の時間間隔だけ、約１時間、２時間、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間、などの間隔だけ、空けることができる。時間との関連で、「約」という用語は、±３０分以内の任意の時間間隔を意味する。投与はまた、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、１５日、１６日、１７日、１８日、１９日、２０日、２１日、およびそれらの組み合わせの時間間隔だけ空けることができる。発明は、時間が均等に空けられた投与間隔に制限されず、均等でない間隔での投与を含み、例えば、非限定的例を提供すると、プライミングスケジュールは、１日、４日、７日、および２５日での投与から構成される。

【０１２６】

参考文献

1 Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N. & Friede, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. Trends in immunology 30, 23-32, doi:10.1016/j.it.2008.09.006 (2009).

2 Dubensky, T. W., Jr. & Reed, S. G. Adjuvants for cancer vaccines. Seminars in immunology 22, 155-161, doi:10.1016/j.smim.2010.04.007 (2010).

3 Kastenmuller, K. et al. Protective T cell immunity in mice following protein-TLR7/8 agonist-conjugate immunization requires aggregation, type I IFN, and multiple DC subsets. The Journal of clinical investigation 121, 1782-1796, doi:10.1172/JCI45416 (2011).

4 Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. Immunity 33, 492-503, doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002 (2010).

5 Burdette, D. L. et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. Nature 478, 515-518, doi:10.1038/nature10429 (2011).

6 Woodward, J. J., Iavarone, A. T. & Portnoy, D. A. c-di-AMP secreted by intracellular Listeria monocytogenes activates a host type I interferon response. Science 328, 1703-1705, doi:10.1126/science.1189801 (2010).

7 Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. Nature 455, 674-678, doi:10.1038/nature07317 (2008).

8 McWhirter, S. M. et al. A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. The Journal of experimental medicine 206, 1899-1911, doi:10.1084/jem.20082874 (2009).

9 Bahjat, K. S. et al. (2005).

10 Bahjat, K. S. et al. Cytosolic Entry Controls CD8+-T-Cell Potency during Bacterial Infection. Infection and immunity 74, 6387-6397 (2006).

11 Crimmins, G. T. et al. Listeria monocytogenes multidrug resistance transporters activate a cytosolic surveillance pathway of innate immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2008).

12 O'Riordan, M., Yi, C. H., Gonzales, R., Lee, K. D. & Portnoy, D. A. Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 13861-13866 (2002).

13 Schwartz, K. T. et al. Hyperinduction of host beta interferon by a Listeria monocytogenes strain naturally overexpressing the multidrug efflux pump MdrT. Infection and immunity 80, 1537-1545, doi:10.1128/IAI.06286-11 (2012).

14 Davies, B. W., Bogard, R. W., Young, T. S. & Mekalanos, J. J. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for V. cholerae virulence. Cell 149, 358-370, doi:10.1016/j.cell.2012.01.053 (2012).
15 Witte, C. E. et al. Innate immune pathways triggered by Listeria monocytogenes and their role in the induction of cell-mediated immunity. Advances in immunology 113, 135-156, doi:10.1016/B978-0-12-394590-7.00002-6 (2012).
16 Desmet, C. J. & Ishii, K. J. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. Nature reviews. Immunology 12, 479-491, doi:10.1038/nri3247 (2012).
17 Rappuoli, R., Mandl, C. W., Black, S. & De Gregorio, E. Vaccines for the twenty-first century society. Nature reviews. Immunology 11, 865-872, doi:10.1038/nri3085 (2011).
18 Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science 327, 291-295, doi:10.1126/science.1183021 (2010).
19 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nature immunology 11, 373-384, doi:10.1038/ni.1863 (2010).
20 Einstein, M. H. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. Human vaccines 5, 705-719 (2009).
21 Ahmed, S. S., Plotkin, S. A., Black, S. & Coffman, R. L. Assessing the safety of adjuvanted vaccines. Science translational medicine 3, 93rv92, doi:10.1126/scitranslmed.3002302 (2011).
22 Vance, R. E., Isberg, R. R. & Portnoy, D. A. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. Cell host & microbe 6, 10-21, doi:10.1016/j.chom.2009.06.007 (2009).
23 Barber, G. N. STING-dependent signaling. Nature immunology 12, 929-930, doi:10.1038/ni.2118 (2011).
24 Leber, J. H. et al. Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. PLoS pathogens 4, e6 (2008).
25 Jin, L. et al. MPYS is required for IFN response factor 3 activation and type I IFN production in the response of cultured phagocytes to bacterial second messengers cyclic-di-AMP and cyclic-di-GMP. J Immunol 187, 2595-2601, doi:10.4049/jimmunol.1100088 (2011).
26 Lauvau, G. et al. Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. Science 294, 1735-1739 (2001).
27 Bahjat, K. S. et al. Suppression of cell-mediated immunity following recognition of phagosome-confined bacteria. PLoS pathogens 5, e1000568, doi:10.1371/journal.ppat.1000568 (2009).
28 Tamayo, R., Pratt, J. T. & Camilli, A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. Annual review of microbiology 61, 131-148, doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093426 (2007).
29 Sauer, J. D. et al. The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to Listeria monocytogenes and cyclic dinucleotides. Infection and immunity 79, 688-694, doi:10.1128/IAI.00999-10 (2011).
30 Barber, G. N. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. Immunological reviews 243, 99-108, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01051.x (2011).
31 Tanaka, Y. & Chen, Z. J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. Science signaling 5, ra20, doi:10.1126/s

cisignal.2002521 (2012).
32 Ebensen, T. et al. Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant. Vaccine 29, 5210-5220, doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.026 (2011).
33 Ebensen, T. et al. The bacterial second messenger cyclic diGMP exhibits potent adjuvant properties. Vaccine 25, 1464-1469, doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.033 (2007).
34 Ebensen, T., Schulze, K., Riese, P., Morr, M. & Guzman, C. A. The bacterial second messenger cdiGMP exhibits promising activity as a mucosal adjuvant. Clinical and vaccine immunology : CVI 14, 952-958, doi:10.1128/CVI.00119-07 (2007).
35 Libanova, R. et al. The member of the cyclic di-nucleotide family bis-(3', 5')-cyclic dimeric inosine monophosphate exerts potent activity as mucosal adjuvant. Vaccine 28, 2249-2258, doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.045 (2010).
36 Madhun, A. S. et al. Intranasal c-di-GMP-adjuvanted plant-derived H5 influenza vaccine induces multifunctional Th1 CD4+ cells and strong mucosal and systemic antibody responses in mice. Vaccine 29, 4973-4982, doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.094 (2011).
37 Hu, D. L. et al. c-di-GMP as a vaccine adjuvant enhances protection against systemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection. Vaccine 27, 4867-4873, doi:10.1016/j.vaccine.2009.04.053 (2009).
38 Karaolis, D. K. et al. Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. Infection and immunity 75, 4942-4950, doi:10.1128/IAI.01762-06 (2007).
39 Ogunniyi, A. D. et al. c-di-GMP is an effective immunomodulator and vaccine adjuvant against pneumococcal infection. Vaccine 26, 4676-4685, doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.099 (2008).
40 Karaolis, D. K. et al. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. J Immunol 178, 2171-2181 (2007).
41 Wille-Reece, U. et al. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. The Journal of experimental medicine 203, 1249-1258 (2006).
42 Adler-Moore, J. et al. Characterization of the murine Th2 response to immunization with liposomal M2e influenza vaccine. Vaccine 29, 4460-4468, doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.040 (2011).
43 Fujii, G., Ernst, W. & Adler-Moore, J. The VesiVax system: a method for rapid vaccine development. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 13, 1968-1980 (2008).
44 Gaffney, B. L., Veliath, E., Zhao, J. & Jones, R. A. One-flask syntheses of c-di-GMP and the [Rp,Rp] and [Rp,Sp] thiophosphate analogues. Organic letters 12, 3269-3271, doi:10.1021/ol101236b (2010).
45 Zhang, Z., Gaffney, B. L. & Jones, R. A. c-di-GMP displays a monovalent metal ion-dependent polymorphism. Journal of the American Chemical Society 126, 16700-16701, doi:10.1021/ja0449832 (2004).
46 Suzuki, N., Oyama, K.-i. & Tsukamoto, M. Practical Synthesis of Cyclic Bis(3′-5′)diadenylic Acid (c-di-AMP). Chemistry Letters 40, 1113-1114, doi:10.1246/cl.2011.1113 (2011).
47 Hyodo, M., Sato, Y. & Hayakawa, Y. Synthesis of cyclic bis(3′-5′)diguanylic acid (c-di-GMP) analogs. Tetrahedron 62, 3089-3094, doi:10.1016/j.tet.2006.01.025 (2006).

48 Yan, H., Wang, X., KuoLee, R. & Chen, W. Synthesis and immunostimulatory properties of the phosphorothioate analogues of cdiGMP. Bioorganic & medicinal chemistry letters 18, 5631-5634, doi:10.1016/j.bmcl.2008.08.088 (2008).
49 Ross, P. et al. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. The Journal of biological chemistry 265, 18933-18943 (1990).
50 Grajkowski, A., Cieslak, J., Gapeev, A., Schindler, C. & Beaucage, S. L. Convenient synthesis of a propargylated cyclic (3'-5') diguanylic acid and its "click" conjugation to a biotinylated azide. Bioconjugate chemistry 21, 2147-2152, doi:10.1021/bc1003857 (2010).
51 Zhao, J., Veliath, E., Kim, S., Gaffney, B. L. & Jones, R. A. Thiophosphate analogs of c-di-GMP: impact on polymorphism. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids 28, 352-378, doi:10.1080/15257770903044523 (2009).
52 Battistini, C., Fustinoni, S., Brasca, M. & Borghi, D. Stereoselective synthesis of cyclic dinucleiotide phosphorothioates. Tetrahedron, 1115-1132 (1993).
53 Hayakawa, Y. A facile synthesis of cyclic bis(3′→5′)diguanylic acid. Tetrahedron 59, 6465-6471, doi:10.1016/s0040-4020(03)01045-7 (2003).
54 Coughlin, J. E. et al. Orally bioavailable anti-HBV dinucleotide acyloxyalkyl prodrugs. Bioorganic & medicinal chemistry letters 20, 1783-1786, doi:10.1016/j.bmcl.2010.01.010 (2010).
55 Ouyang, S. et al. Structural Analysis of the STING Adaptor Protein Reveals a Hydrophobic Dimer Interface and Mode of Cyclic di-GMP Binding. Immunity, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.019 (2012).
56 Baldwin, S. L. et al. The importance of adjuvant formulation in the development of a tuberculosis vaccine. J Immunol 188, 2189-2197, doi:10.4049/jimmunol.1102696 (2012).
57 Lee, A. W. et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. Vaccine 20 Suppl 4, A8-A22 (2002).
58 Lubong Sabado, R. et al. In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4 T cells in acute HIV-1 infection. PloS one 4, e4256, doi:10.1371/journal.pone.0004256 (2009).
59 Skoberne, M. et al. KBMA Listeria monocytogenes is an effective vector for DC-mediated induction of antitumor immunity. The Journal of clinical investigation (2008).
60 Jin, L. et al. Identification and characterization of a loss-of-function human MPYS variant. Genes and immunity 12, 263-269, doi:10.1038/gene.2010.75 (2011).
61 Schmidt, N. W. et al. Memory CD8 T cell responses exceeding a large but definable threshold provide long-term immunity to malaria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 14017-14022 (2008).
62 Pham, N. L. et al. Exploiting cross-priming to generate protective CD8 T-cell immunity rapidly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 12198-12203, doi:10.1073/pnas.1004661107 (2010).
63 Badovinac, V. P., Messingham, K. A., Jabbari, A., Haring, J. S. & Harty, J. T. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic

-cell vaccination. Nature medicine 11, 748-756 (2005).
64 Harty, J. T. & Badovinac, V. P. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. Nature reviews. Immunology 8, 107-119 (2008).
65 Coler, R. N. et al. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. PloS one 6, e16333, doi:10.1371/journal.pone.0016333 (2011).
66 Singh, S., Briles, W. E., Lupiani, B. & Collisson, E. W. Avian influenza viral nucleocapsid and hemagglutinin proteins induce chicken CD8+ memory T lymphocytes. Virology 399, 231-238, doi:10.1016/j.virol.2009.12.029 (2010).
67 Singh, S. et al. Non-replicating adenovirus vectors expressing avian influenza virus hemagglutinin and nucleocapsid proteins induce chicken specific effector, memory and effector memory CD8(+) T lymphocytes. Virology 405, 62-69, doi:10.1016/j.virol.2010.05.002 (2010).
68 Tewari, K. et al. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. Vaccine 28, 7256-7266, doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.098 (2010).
69 Wille-Reece, U. et al. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 15190-15194, doi:10.1073/pnas.0507484102 (2005).
70 Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. Nature reviews. Immunology 8, 247-258 (2008).
71 Wille-Reece, U., Wu, C. Y., Flynn, B. J., Kedl, R. M. & Seder, R. A. Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+ T cell responses. J Immunol 174, 7676-7683 (2005).
72 Jones et al., US20120178710.

【０１２７】

実施例

下記実施例は本発明を説明するのに役にたつ。これらの実施例は、決して本発明の範囲を制限するように意図されない。

実施例１．一般的方法

【０１２８】

溶液相オリゴヌクレオチド合成のためのに好適な無水溶媒および試薬を購入し、乾燥アルゴンまたは窒素下で、無水技術を用いて取り扱った。アミダイトカップリング反応および環化を無水アセトニトリルまたはピリジン中、乾燥アルゴンまたは窒素下で実施した。乾燥ピリジン中での全ての反応のための開始材料を、ピリジンからの濃縮により（３回）乾燥させた。分取シリカゲルフラッシュクロマトグラフィーをＦｌｕｋａ６０Å高純度グレードまたはＭｅｒｃｋ　Ｇｒａｄｅ　９３８５シリカを使用し、ジクロロメタン中のメタノールの勾配を用いて実施した。分析ＨＰＬＣを２５４ｎｍでモニタするＰｒｏＳｔａｒ３３０フォトダイオードアレイ検出器を備えたＶａｒｉａｎ　ＰｒｏＳｔａｒ　２１０　ＨＰＬＣシステム上で、Ｖａｒｉａｎ　Ｍｉｃｒｏｓｏｒｂ　１００－１０　C_{18}　２５０×４．６ｍｍカラム上にて、１０ｍＭ　ＴＥＡＡおよびアセトニトリルの勾配を用いて、１．０ｍｌ／分流速で実施した。分取ＨＰＬＣを、２５４ｎｍでモニタするＳＰＤ－２０Ａ　ＵＶ／Ｖｉｓ検出器が取り付けられたＳｈｉｍａｄｚｕ分取ＬＣ２０－ＡＰ　ＨＰＬＣシステム上で、Ｖａｒｉａｎ　Ｍｉｃｒｏｓｏｒｂ　６０－８　Ｃ－１８　４１．６×２５０ｍｍカラムにて、１０ｍＭ　ＴＥＡＡおよびアセトニトリルの勾配を用いて流速５０ｍｌ／分で実施した。Ｃ－１８　Ｓｅｐ－Ｐａｋ（Ｗａｔｅｒｓ）を使用した固相

抽出を、約３％（ｗｔ／ｗｔ）のローディングで実施した。ＬＣ／ＭＳ（ＥＳＩ／ＡＰＣＩ）をＰＤＡ、ＭＳ、およびＥＬＳＤ検出を備えたシングル四重極Ｓｈｉｍａｄｚｕ ２０１０ＥＶ機器上で、Ｓｈｉｍａｄｚｕ ＬＣ２０Ｄ分析ＨＰＬＣを用いて取得した。高分解能ＦＴ－ＩＣＲ質量スペクトルをコネティカット州ニューヘーブンのＹａｌｅ大学のＷＭ Ｋｅｃｋ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから入手した。^{1}Ｈおよび^{31}ＰＮＭＲスペクトルを、Ｂｒｕｋｅｒ ４００ＭＨｚまたはＶａｒｉａｎ Ｉｎｏｖａ ５００ＭＨｚ分光計のいずれかで獲得した。^{31}Ｐ ＮＭＲはＤ２Ｏ中のジオキサンを間接的に参照した。

【０１２９】

ＨＰＬＣ精製環状ジヌクレオチドおよび誘導体の割当を表１でまとめて示し、詳細に実施例において記載する。

【表２】

表１：

トリエチルアンモニウム塩（１０ａ、１０ｂ、１０ｃ、１１ａ、１１ｂ、１１ｃ、１２、１３）の２５℃での、逆相ＨＰＬＣの保持時間（分）および^{31}Ｐ化学シフト（ｐｐｍ）

化合物	保持時間	^{31}P δ
c-ジ-AMP 10a	8.2 *	-1.74
ジチオ [Rp,Sp] c-ジ-AMP 10c	12.1 *	54.54, 54.84, 55.92 (統合比率 1.0 : 0.9 : 0.1)
ジチオ [Rp,Rp] c-ジ-AMP 10b	14.4 *	54.41
c-ジ-GMP 11a	6.9 *	-1.24
ジチオ [Rp,Sp] c-ジ-GMP 11c	11.0 *	54.77, 56.00 (統合比率 1 : 1)
ジチオ [Rp,Rp] c-ジ-GMP 11b	13.2 *	54.87
C_{14}-acyl-c-ジ-GMP 12	13.7 $	-1.37, -2.06 (統合比率 1 : 1)
C_{14}-acyl- ジチオ [Rp,Rp] c-di-GMP 13	15.3 $	56.46, 56.66 (統合比率 1 : 1)

*HPLC 勾配 ： ２０分にわたり、１ｍｌ／分流速で、１０ｍＭ ＴＥＡＡ中２～２０％のCH_3CN

$HPLC 勾配 ：２０分にわたり、１ｍｌ／分流速で、１０ｍＭ ＴＥＡＡ中２～８０％のCH_3 ＣＮ

【０１３０】

実施例２．１０ａの合成

環状－ジ－ＡＭＰの下記合成を概略的に図６において説明するが、これはＧａｆｆｎｅｙら（Ｏｎｅ－ｆｌａｓｋ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｃ－ｄｉ－ＧＭＰ ａｎｄ ｔｈｅ ［Ｒｐ，Ｒｐ］ ａｎｄ ［Ｒｐ，Ｓｐ］ ｔｈｉｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ ａｎａｌｏｇｕｅｓ．Ｏｒｇａｎｉｃ Ｌｅｔｔｅｒｓ １２，３２６９－３２７１（２０１０））により報告されている環状－ジ－ＧＭＰの合成の改変である。

【０１３１】

ａ）５’－ＤＭＴ－３’－Ｈ－ホスホネート４を得るための、１の２－クロロ－５，６－ベンゾ－１，３，２－ジオキサホスホリン－４－オン（２）によるホスフィチル化およびＣＨ２Ｃｌ２／ヘキサン（１：１）による固体－液体抽出

【０１３２】

１（３．９４ｇ、５ｍｍｏｌ）を含む１５ｍｌの無水ジオキサンおよび５ｍｌの乾燥ピリジンの溶液に、５．６ｍｌ（７．０ｍｍｏｌ）の、２－クロロ－５，６－ベンゾ－１，３，２－ジオキサホスホリン－４－オン（２）のジオキサン中の１．２５Ｍ原液を撹拌しながら添加した。１５ｍｉｎ後、反応を、１ｍｌの水で停止させ、混合物を１０ｍｌの０．２５Ｍ ＮａＨＣＯ３中に注ぎ入れ、続いて酢酸エチルで抽出（３×１５ｍｌ）した。有機相を乾燥させ（Ｎａ２ＳＯ４）、濃縮し、３．８ｇを得た。固体を１００ｍｌのＣＨ２Ｃｌ２／ヘキサン（１：１）でトリチュレートし、濾過し、残留固体を乾燥させ、微細

白色粉末（３．５ｇ）を得、これをＴＬＣ上で１スポットとして、５％ＣＨ３ＯＨを含む、０．５％トリエチルアミン含有ＣＨ２Ｃｌ２で溶離させ移動させた（Ｒｆ＝０．１）。

【０１３３】

ｂ）シリカゲル（ＮａＨＳＯ４－ＳｉＯ２）に吸収された重硫酸ナトリウムによる脱トリチル化および５’－ＯＨ－３’－Ｈ－ホスホネート（５）の沈殿

４（１．７４ｇ、２ｍｍｏｌ）を含む８５ｍｌのジクロロメタンおよび０．０７２ｍｌの水（４ｍｍｏｌｅ）の溶液に０．５５ｇのＮａＨＳＯ４－ＳｉＯ２（２．４ｍｍｏｌ H^+／ｇｒ　ＮａＨＳＯ４－ＳｉＯ２）を添加した。反応は室温で３５分撹拌した後完了した（１０％ＭｅＯＨを含む０．５％ＴＥＡ含有ＣＨ２Ｃｌ２でのＴＬＣ）。ＮａＨＳＯ４－ＳｉＯ２を濾過により除去し、ＣＨ２Ｃｌ２で洗浄した（３×５ｍｌ）。１００ｍｌのヘキサン：トルエン（１：１）を添加し、５分間ボルテックスし、溶媒をデカントした（２回繰り返した）。蒸発により０．９２ｇの５を固体として得た。分析ＨＰＬＣは、９６．４％の純度を示した。ネガティブモードのＬＣ／ＭＳにより、ｍ／ｚ（Ｍ－１）５４８．２を確認した（$C_{23}H_{31}N_5O_7PSi^-$に対して計算：５４８．２）。

【０１３４】

ｃ）カップリング、酸化および脱トリチル化

ＤＭＴ－ｒＡ（ｂｚ）－βＣＥ－ＴＢＤＭＳ－ホスホラミダイト（３）（３．５ｇ、３．６ｍｍｏｌｅ）を３回２０ｍｌの乾燥アセトニトリルを用いて共蒸発させ、最後に約１０ｍｌ体積を残し、これに、１０の３Åモレキュラーシーブを添加した。溶液を乾燥アルゴン下で放置した。

【０１３５】

１．６ｇのＨ－ホスホネート（５）を３回、無水ＣＨ３ＣＮから蒸発させ、最後に１００ｍｌを残した。この溶液を乾燥ホスホラミダイト溶液にシリンジを介して添加し、続いて１．４ｇのピリジニウムトリフルオロアセタート（３×２０ｍｌ、無水ピリジンから蒸発させることにより乾燥させた）を添加した。２０ｍｉｎ後、３ｍｌの５．５Ｍ　ｔｅｒｔ－ブチルヒドロペルオキシドを添加し、３０ｍｉｎ間撹拌した。氷浴中で冷却した後、０．３ｇのＮａＨＳＯ３を含む１ｍｌの水を添加し、混合物を、５ｍｉｎ間撹拌した。溶媒をその後蒸発させ、残渣を２０ｍｌ（CH_2Cl_2／ＭｅＯＨ、９８：２）に入れた。シーブを濾過して除去し、溶媒を８１ｍｌのCH_2Cl_2に変えた。$NaHSO_4$－SiO_2（５１３ｍｇ）および水（６５マイクロリットル）を添加し、反応物を、４０ｍｉｎ間撹拌した。混合物をセライトを通して濾過し、パッドを、CH_2Cl_2で洗浄し、濾液を蒸発させ、粗７ａを得た。ネガティブモードのＬＣ／ＭＳにより、ｍ／ｚ（Ｍ－１）１１４８．５を確認した（$C_{49}H_{64}N_{11}O_{14}P_2Si_2^-$に対して計算：１１４８．３７。

【０１３６】

ｄ）直線二量体（７ａ）の環化および酸化は８ａを与える

粗７ａ（蒸発により無水ピリジンから乾燥、最終蒸発後１００ｍｌを残す）にＤＭＯＣＰ（１．９ｇ、１０．１５ｍｍｏｌ）を添加した。１２分後、反応を、水（２．３ｇ）で停止させ、続いて、直ちに、ヨウ素（０．９６ｇ、３．７８ｍｍｏｌ）を添加した。反応混合物を、０．６ｇのＮａＨＳＯ３を含む４００ｍｌの水に注ぎ入れた。５ｍｉｎ撹拌した後、１１．２ｇのＮａＨＣＯ３を少しずつ添加し、溶液を５ｍｉｎ間撹拌した。混合物を２回、５００ｍｌ酢酸エチル／エーテル（３：２）を用いて分配させた。有機層を合わせ、乾燥させ（Na_2SO_4）、蒸発させた。トルエン（３×１０ｍｌ）を添加し蒸発させ、残留ピリジンを除去し、２．３７ｇの８ａを黄褐色固体として得た。ネガティブモードのＬＣ／ＭＳにより、ｍ／ｚ（Ｍ－１）１１４６．６を確認した（$C_{49}H_{62}N_{11}O_{14}P_2Si_2^-$に対して計算：１１４６．４。

【０１３７】

ｅ）濃水酸化アンモニウムによる粗８ａの脱保護は粗９ａを与え、ｐｒｅｐＨＰＬＣは９ａを純粋形態で与える

６００ｍｇの８ａを含む２００ｍｌ厚肉ガラス圧力管に、４０ｍｌのメタノールおよび

４０ｍｌ濃アンモニア水を添加し、得られた混合物を５０℃で１６ｈｒ撹拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、残渣を酢酸エチルで洗浄し（３×１０ｍｌ）、５１０ｍｇの粗９ａを得た。

【０１３８】

１０２ｍｇ部の粗９ａを含む４ｍｌの２０％ＣＨ３ＣＮを有する１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウムをｐｒｅｐＨＰＬＣカラムに適用し、水中のアセトニトリルの勾配および１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウム（２０－＞５０％ＣＨ３ＣＮ、２０分にわたり、５０ｍｌ／分流速）を用いて溶離した。純粋９ａを含むＨＰＬＣフラクションをプールし、蒸発させて、ＣＨ３ＣＮを除去し、凍結乾燥し、残りの水および揮発性緩衝液を除去し、３２ｍｇの純粋９ａをビス－トリエチルアンモニウム塩として得た。ネガティブモードのＬＣ／ＭＳにより、ｍ／ｚ（Ｍ－１）８８５．５を確認した（$C_{32}H_{51}N_{10}O_{12}P_2Si_2^-$に対して計算：８８５．３。（下記ｃ－ジ－ＧＭＰおよびジチオ－ｃ－ジ－ＧＭＰシリーズにおいて記載される最後の工程まで、ｐｒｅｐＨＰＬＣ精製を延期することも可能であった）。

【０１３９】

ｆ）トリエチルアミン三フッ化水素酸塩による９ａのＴＢＳ基の脱保護、ＴＥＡＢによる中和、およびＣ－１８　Ｓｅｐ－Ｐａｋによる固相抽出は純粋１０ａをビス－トリエチルアンモニウム塩として与える

２０ｍｇの９ａに０．２５ｍｌのトリエチルアミン三フッ化水素酸塩を添加した。混合物を、４８ｈ振盪機上に置き、この時点で、１００マイクロリットルの１Ｍ重炭酸トリエチルアンモニウムで中和した１０マイクロリットル試料の分析ＨＰＬＣは、開始材料の消費および単一の新規生成物の出現を示した。反応混合物をその後、１滴ずつ撹拌しながら、１０×体積の冷却された１Ｍ重炭酸トリエチルアンモニウムに添加した。中和溶液をその後、Ｗａｔｅｒｓ　Ｃ－１８　Ｓｅｐ－Ｐａｋにロードし、カラムを６体積の１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウムで洗浄した後、生成物を、ＣＨ３ＣＮ：酢酸トリエチルアンモニウム（１：１）で溶離させた。ＣＨ３ＣＮを、ロトエバポレーション（ｒｏｔｏｅｖａｐｏｒａｔｉｏｎ）により除去し、水性試料を乾燥するまで凍結乾燥し、１４ｍｇの１０ａをビス－トリエチルアンモニウム塩としてを得た。ネガティブモードの１０ａのＨＲＭＳはｍ／ｚ（Ｍ－Ｈ）６５７．０９８５を確認する（$C_{20}H_{23}N_{10}O_{12}P_2^-$に対して計算：６５７．０９７８）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O）　４５℃　δ（ｐｐｍ）　８．３４（ｓ，２Ｈ）、８．１１（ｓ，２Ｈ）、６．１５（ｓ，２Ｈ）、４．３４（ｍ，４Ｈ）、４．１５（ｍ，２Ｈ）、３．７７（ｍ，２Ｈ）、３．１９（ｑ，Ｊ＝７Ｈｚ）、１．２７（ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ）。^{31}Ｐ　ＮＭＲ（Ｄ２Ｏ）　２５℃。δ（ｐｐｍ）　－１．７４。

【０１４０】

実施例３．１０ｂおよび１０ｃの合成

下記合成を、概略的に、図６において説明する。

【０１４１】

ａ）市販のＤＭＴ－ｒＡ（ｂｚ）－βＣＥ－ＴＢＤＭＳ－ホスホラミダイト（３）の加水分解、β脱離、および得られた５’－ＤＭＴ－３’－Ｈ－ホスホネート（４）のシリカクロマトグラフィー：

ＤＭＴ－ｒＡ（ｂｚ）－βＣＥ－ＴＢＤＭＳ－ホスホラミダイト（３）（１１ｇ、１１．１ｍｍｏｌｅ）を含む５０ｍｌのアセトニトリルの溶液に水（０．３６ｍｌ、２０ｍｍｏｌｅ、１．８ｅｑｕｉｖ）およびピリジニウムトリフルオロアセタート（２．３ｇ、１１．９ｍｍｏｌｅ、１．０７ｅｑｕｉｖ）を添加した。混合物を５分室温で撹拌した後、ｔｅｒｔ－ブチルアミン（５０ｍｌ）を添加し、撹拌を、さらに１０分続けた。混合物をその後濃縮してフォームとし、これをジクロロメタンに入れ、シリカゲルカラムに適用し、ジクロロメタン中５％～１０％ＭｅＯＨの勾配を用いて溶離した。所望の生成物を含むカラムフラクションをプールし、濃縮し、５’－ＤＭＴ－３’－Ｈ－ホスホネート（４）をフォーム（６．６８ｇ、７．８ｍｍｏｌｅ、７０％収率）として得た。

【０１４２】
ｂ）５’－ＯＨ－３’－Ｈ－ホスホネート（５）の脱トリチル化および沈殿：
４（６．６８ｇ、７．８ｍｍｏｌ）を含む６０ｍｌのジクロロメタンおよび１．４ｍｌの水（７８ｍｍｏｌｅ、１０ｅｑｕｉｖ）の溶液に、１００ｍｌ部の６％ジクロロ酢酸を含むジクロロメタン（７３ｍｍｏｌｅ、９．３５ｅｑｕｉｖ）を添加した。室温で１０分撹拌した後、ピリジン（１１．２ｍｌ、１３９ｍｍｏｌｅ、１．９ｅｑｕｉｖ、ＤＣＡに基づく）を添加し、酸を反応停止させ、混合物を濃縮して、５を黄色／オレンジガラスとして得た。ガラスを約２０ｍｌのジクロロメタンに入れ、１滴ずつ撹拌しながら５００ｍｌの７：３ヘキサン：ジエチルエーテルに添加し、所望の５’－ＯＨ－３’－Ｈ－ホスホネート（５）を沈殿させた。上清をデカントして沈殿物から除去し（その大部分は、フラスコの壁にくっついたガムを形成した）、減圧下で乾燥させ、顆粒状スラリーを形成させた。このスラリーを３回、４０ｍｌの乾燥アセトニトリルを用いて蒸発させ、最後に約１２ｍｌを残した。

【０１４３】
ｃ）ホスホラミダイト（３）を含むアセトニトリルの乾燥溶液の調製、５’－ＯＨ－３’－Ｈ－ホスホネート５）とのカップリング、および直線二量体チオリン酸（６ｂ）への硫化、および７ｂへの脱トリチル化
ＤＭＴ－ｒＡ（ｂｚ）－βＣＥ－ＴＢＤＭＳ－ホスホラミダイト（３）（９．０８ｇ、９．３６ｍｍｏｌｅ、１．２ｅｑｕｉｖ、Ｈ－ホスホネート（５）に基づく）を３回、４０ｍｌの乾燥アセトニトリルを用いて共蒸発させ、最後に約２０ｍｌの体積を残し、これに、１０の３Åモレキュラーシーブを添加した。溶液を乾燥アルゴン下で放置した。

【０１４４】
ホスホラミダイト（３）の溶液に５（ｂから）を、撹拌しながら乾燥アルゴン下で添加した。１０分室温で撹拌した後、反応混合物の半分（ジチオ類似体への変換のため）をアルゴン下で第２の反応容器に移し、３－（（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノメチリデン）アミノ－３Ｈ－１，２，４－ジチアゾール－５－チオン（０．８８ｇ、４．２９ｍｍｏｌ、１．１当量）を添加した。３０ｍｉｎ室温で撹拌した後、－２０℃のフリーザーに入れることにより、反応を中止させた。フリーザー内で＞４８ｈ保存する間、黄色沈殿物が溶液から分離した。混合物を濾過し、濾液を濃縮しフォーム（３．９ｇ）とし、５０ｍｌのＣＨ２Ｃｌ２に溶解し、１００μｌの水で、続いてすぐに、８００ｍｇのＮａＨＳＯ４－シリカで処理した。混合物を３０ｍｉｎ室温で撹拌し、濾過し、シリカを除去した。６０ｍｌのヘキサンをその後、濾液に添加し、下相を溶液から油により分離した。油を分離させ、蒸発させ、３．１ｇの粗７ｂを得た。

【０１４５】
ｄ）直線二量体（７ｂ）の環化、硫化、およびシリカクロマトグラフィーは、８ｂおよび８ｃの混合物を与える
７ｂ（３．０５ｇ、２．６ｍｍｏｌ）を無水ピリジンから蒸発させ（２００ｍｌピリジンを添加し回転蒸発させ（ｒｏｔｏｅｖａｐｏｒａｔｅｄ）、１２０ｍｌを残した）、続いて、ＤＭＯＣＰ（１．６８ｇ、９．１ｍｍｏｌ、３．５ｅｑｕｉｖ）を添加した。１２分後、反応を、水（１．６３ｇ、９１ｍｍｏｌ）で停止させ、続いて直ちに、０．６７５ｇ（３．０ｍｍｏｌ、１．２ｅｑｕｉｖ）の３－Ｈ－１，２－ベンゾジチオール－３－オンを添加した。反応混合物を、５００ｍｌの０．２５Ｍ重炭酸ナトリウムに注ぎ入れ、その後、２×５００ｍｌ酢酸エチル／ジエチルエーテル（３：２）を用いて抽出した。有機層を合わせ、乾燥させ（Ｎａ２ＳＯ４）、真空下で蒸発させた。トルエン（３×１０ｍｌ）を添加し、蒸発させ、残留ピリジンを除去した。残渣を、シリカカラムに適用し、ＣＨ２Ｃｌ２中の０～１０％のＣＨ３ＯＨの勾配を用いて溶離し、主にジアステレオマー８ｂおよび８ｃを含む、合計１．４７ｇを得た。

【０１４６】
ｅ）８ｂおよび８ｃの混合物の濃水酸化アンモニウムを用いた脱保護は９ｂおよび９ｃを与え、ｐｒｅｐＨＰＬＣによる分離は９ｂおよび９ｃを純粋形態で与える

ガラス圧力管内の、２３０ｍｇの８ｂおよび８ｃの混合物に、１６ｍｌのメタノールを添加し、続いて１６ｍｌの濃アンモニア水を添加し、得られた混合物を５０℃で１６ｈｒ撹拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、残渣を酢酸エチルで洗浄し（３×１０ｍｌ）、２１０ｍｇの９ｂおよび９ｃの粗混合物を得た。９ｂ／９ｃ混合物に対するネガティブモードのＬＣ／ＭＳはｍ／ｚ（Ｍ－１）９１７を確認した（$C_{32}H_{51}N_{10}O_{10}P_2S_2Si_2^-$に対して計算：９１７．２。

【０１４７】

９ｂ／９ｃの混合物のｐｒｅｐＨＰＬＣによる分離．１０５ｍｇ部の、９ｂおよび９ｃの粗混合物を含む４ｍｌの３０％ＣＨ３ＣＮを含む１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウムを、ｐｒｅｐＨＰＬＣカラムに適用し、アセトニトリルおよび１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウムの勾配（３０－＞５０％ＣＨ３ＣＮ、２０分にわたり、５０ｍｌ／分流速）を用いて溶離した。純粋９ｂを含むＨＰＬＣフラクションを、純粋９ｃを含むものから分離した。プールしたフラクションを蒸発させて、ＣＨ３ＣＮを除去し、凍結乾燥し、残りの水および揮発性緩衝液を除去し、１８ｍｇの９ｂおよび１４ｍｇの９ｃをビス－トリエチルアンモニウム塩として得た。

【０１４８】

ｆ）トリエチルアミン三フッ化水素酸塩を用いた９ｂのＴＢＳ基の脱保護、ＴＥＡＢを用いた中和、およびＣ－１８　Ｓｅｐ－Ｐａｋを用いた固相抽出（ＳＰＥ）は、純粋１０ｂをビス－トリエチルアンモニウム塩として与える

８ｍｇの９ｂに、０．４ｍｌのトリエチルアミン三フッ化水素酸塩を添加した。混合物を、１６ｈ振盪機上に置き、この時点で、１００マイクロリットルの１Ｍ重炭酸トリエチルアンモニウム（ＴＥＡＢ）で中和した５マイクロリットル試料の分析ＨＰＬＣは開始材料の消費および単一の新規生成物の出現を示した。反応混合物をその後、１滴ずつ撹拌しながら、約１０×体積の冷却された１Ｍ重炭酸トリエチルアンモニウムに添加した。中和溶液をその後、Ｗａｔｅｒｓ　Ｃ－１８　Ｓｅｐ－Ｐａｋにロードし、カラムを６体積の１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウムで洗浄した後、生成物を、ＣＨ３ＣＮ：１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウム（１：５）で溶離させた。ＣＨ３ＣＮを、ロトエバポレーションにより除去し、水性試料を乾燥するまで凍結乾燥し、６ｍｇの１０ｂをビス－トリエチルアンモニウム塩として得た。ネガティブモードの１０ｂのＨＲＭＳは、ｍ／ｚ（Ｍ－Ｈ）６８９．０５２６を確認する（$C_{20}H_{23}N_{10}O_{10}P_2S_2^-$に対して計算：６８９．０５２１）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O）　３５℃　δ８．３９（ｓ，２Ｈ）、δ８．１６（ｓ，２Ｈ）、δ６．１６（ｓ，２Ｈ）、δ４．９７－５．０３（ｍ，２Ｈ）、δ４．７８（ｍ，２Ｈ）、δ４．５０－４．５５（ｍ，４Ｈ）、δ４．０４－４．０８（ｍ，２Ｈ）、δ３．２０（ｑ，ｊ＝７Ｈｚ）、δ１．２７（ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ）。^{31}Ｐ　ＮＭＲ（Ｄ２Ｏ）　２５℃。δ（ｐｐｍ）５４．４１。

【０１４９】

ｇ）トリエチルアミン三フッ化水素酸塩を用いた９ｃのＴＢＳ基の脱保護、ＴＥＡＢを用いた中和、およびＣ－１８　Ｓｅｐ－Ｐａｋを用いた固相抽出は純粋１０ｃをビス－トリエチルアンモニウム塩として与える

６ｍｇの９ｃに、０．３ｍｌにトリエチルアミン三フッ化水素酸塩を添加した。混合物を、１６ｈ振盪機上に置き、（ｆ）におけるような少ないアリコートの精密検査は、開始材料の消費および単一の新規生成物の出現を示した。反応混合物をその後、１滴ずつ撹拌しながら約１０×体積の冷却された１Ｍ重炭酸トリエチルアンモニウムに添加した。中和溶液をその後、Ｗａｔｅｒｓ　Ｃ－１８　Ｓｅｐ－Ｐａｋにロードし、カラムを６体積の１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウムで洗浄した後、生成物を、ＣＨ３ＣＮ：１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウム（１：５）で溶離させた。ＣＨ３ＣＮを、ロトエバポレーションにより除去し、水性試料を乾燥するまで凍結乾燥し、４ｍｇの１０ｃをビス－トリエチルアンモニウム塩として得た。ネガティブモードの１０ｃのＨＲＭＳはｍ／ｚ（Ｍ－Ｈ）６８９．０５２４を確認する（$C_{20}H_{23}N_{10}O_{10}P_2S_2^-$に対して計算：６８９．０５２１）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O）　３５℃　δ（ｐｐｍ）８．５０（ｓ，２Ｈ）

、δ８．３７（ｓ，２Ｈ）、δ８．２０（ｓ，２Ｈ）、δ８．１０（ｓ，２Ｈ）、δ６．１７（ｓ，２Ｈ）、δ６．１４（ｓ，２Ｈ）、δ５．０６－５．０７（ｍ，２Ｈ）、δ４．９６－５．０２（ｍ，２Ｈ）、δ４．８７－４．９３（ｍ，２Ｈ）、δ４．７５（ｍ，２Ｈ）、δ４．３４－４．５６（ｍ、１０Ｈ）、δ３．９８－４．１３（ｍ，２Ｈ）、δ３．２０（ｑ，Ｊ＝７Ｈｚ）、δ１．２７（ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ）。^{31}Ｐ　ＮＭＲ（Ｄ２Ｏ）　２５℃。δ（ｐｐｍ）５４．５４、５４．８４、５５．９２（ｍｉｎｏｒ）。

【０１５０】

実施例４．（１１ａ）、（１１ｂ）および（１１ｃ）の合成

１１ａ、１１ｂおよび１１ｃをＧａｆｆｎｅｙらにより記載されるように、生物学的試験のために≧９７％の純度を達成するために、再結晶の代わりに、最終生成物のｐｒｅｐＨＰＬＣ精製（下記に例示）を追加して、合成した。あるいは、ｐｒｅｐＨＰＬＣ精製は、図６、実施例２および３におけるアデノシンシリーズに対して記載される環化および脱保護工程後に実施することができる。

【０１５１】

１１ａ

１００ｍｇ部の１１ａを含む３ｍｌの１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウムを、ｐｒｅｐＨＰＬＣカラムに適用し、水中のアセトニトリルの勾配および１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウム（０％～１０％のＣＨ３ＣＮ勾配、２２分にわたり、５０ｍｌ／分流速）を使用して溶離した。純粋１１ａを含むＨＰＬＣフラクションをプールし、ＣＨ３ＣＮを、ロトエバポレーションにより除去し、残りの水性試料を乾燥するまで凍結乾燥し、４０ｍｇの純粋１１ａをビス－トリエチルアンモニウム塩として得た。ネガティブモードの１１ａのＨＲＭＳはｍ／ｚ（Ｍ－Ｈ）６８９．０８９３である（$C_{20}H_{23}N_{10}O_{14}P_2^-$に対して計算：６８９．０８７６）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O）　４５℃　δ（ｐｐｍ）　８．０５（ｓ，２Ｈ）、５．９８（ｓ，２Ｈ）、４．９０（ｍ，２Ｈ）、　４．７６（ｍ，２Ｈ）、４．４１（ｍ，２Ｈ）、４．３３（ｍ，２Ｈ）、４．０９（ｍ，２Ｈ）、３．１９（ｑ，Ｊ＝７Ｈｚ，６Ｈ）、１．２８（ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ，９Ｈ）。３１Ｐ　ＮＭＲ（Ｄ２Ｏ）　２５℃。δ（ｐｐｍ）－１．２４。

【０１５２】

１１ｂ

１００ｍｇ部の濃縮１１ｂを含む３ｍｌの６％ＣＨ３ＣＮの１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウムを、ｐｒｅｐＨＰＬＣカラムに適用し、水中のアセトニトリルの勾配および１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウム（６％～１８％ＣＨ３ＣＮ勾配、２２分にわたり、５０ｍｌ／分流速）を使用して溶離した。純粋１１ｂを含むＨＰＬＣフラクションをプールし、ＣＨ３ＣＮを、ロトエバポレーションにより除去し、残りの水性試料を乾燥するまで凍結乾燥し、４０ｍｇ（４０％収率）の純粋１１ｂをビス－トリエチルアンモニウム塩として得た。ネガティブモードの１１ｂのＨＲＭＳはｍ／ｚ（Ｍ－Ｈ）７２１．０４４６を確認した（$C_{20}H_{23}N_{10}O_{12}P_2S_2^-$に対して計算：７２１．０４１９）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O）　４５℃　δ８．０５（ｓ，２Ｈ）、５．９８（ｓ，２Ｈ）、５．０３（ｍ，２Ｈ）、４．７７（ｍ，４Ｈ）、４．１０（ｍ，２Ｈ）、４．０８（ｍ，２Ｈ）、３．１９（ｑ，ｊ＝７Ｈｚ，６Ｈ）、１．２８（ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ，９Ｈ）。^{31}Ｐ　ＮＭＲ（Ｄ２Ｏ）　２５℃。δ　５４．８７。

１１ｃ

【０１５３】

６０ｍｇの濃縮１１ｃを含む３ｍｌの６％ＣＨ３ＣＮの１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウムを、ｐｒｅｐＨＰＬＣカラムに適用し、水中のアセトニトリルの勾配および１０ｍＭ酢酸トリエチルアンモニウム（６％～１８％ＣＨ３ＣＮ勾配、２２分にわたり、５０ｍｌ／分流速）を用いて溶離した。純粋１１ｃを含むＨＰＬＣフラクションをプールし、ＣＨ３ＣＮを、ロトエバポレーションにより除去し、残りの水性試料を乾燥するまで凍結乾燥し、３０ｍｇ（５０％収率）の純粋１１ｃをビス－トリエチルアンモニウム塩として得た。ネガティブモードの１１ｃのＨＲＭＳはｍ／ｚ（Ｍ－２Ｈ）３６０．０１７１を確認

した（$C_{20}H_{22}N_{10}O_{12}P_2S_2^{-2}$に対して計算：３６０．０１７３）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O）　５５℃　δ（ｐｐｍ）８．１３（ｓ，２Ｈ）、８．０３（ｓ，２Ｈ）、５．９７（ｍ，２Ｈ）、５．０６－５．１２（ｂｒ，４Ｈ）、４．９８－５．００（ｍ，２Ｈ）、４．８１－４．８３（ｍ，２Ｈ）、４．０４－４．０８（ｍ，４Ｈ）、３．２０（ｑ，ｊ＝７Ｈｚ）、１．２７（ｔ，Ｊ＝７Ｈｚ）。３１Ｐ　ＮＭＲ（Ｄ２Ｏ）　２５℃。δ（ｐｐｍ）５４．７７、５６．００。

【０１５４】

実施例５．ＣＤＮによるインターフェロン誘導

アジュバント効力の特徴として、非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰ分子に対するＲｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰ誘導体分子の各々により誘導された抗原提示細胞におけるＩＦＮ－βの相対レベルを決定するために、１×１０^{5}ＤＣ２．４細胞、マウス由来Ｈ－２ｂ制限マウス樹状細胞株を、５、２０、および１００μＭのｃ－ジ－ＧＭＰ、Ｒｐ，ＲｐおよびＲｐ、またはＳｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰ、ならびにｃ－ジ－ＡＭＰ、Ｒｐ，ＲｐまたはＲｐ，Ｓｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＡＭＰ分子またはＨＢＳＳと共に３０分３７℃、５％ＣＯ２を用いてインキュベートした。３０分後、細胞を洗浄し、１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ培地に置き換えた。誘導されたＩＦＮ－のレベルを測定するために、各試料からの細胞培養流体を４時間後に収集し、１０μＬをＲＰＭＩ培地＋１０％ＦＢＳで培養した５×１０^{4}Ｌ９２９－ＩＳＲＥルシフェラーゼレポーター細胞に添加した。ＩＦＮ－β産生の相対レベルを４時間のインキュベーション後の相対発光量（ＲＬＵ）を測定することにより決定した。

【０１５５】

図７に示されるように、Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰおよびＲｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＡＭＰジアステレオマーは、ｃ－ジ－ＧＭＰまたはｃ－ジ－ＡＭＰ非修飾環状ジヌクレオチド分子のいずれかよりも著しく高いレベルのＩＦＮ－βを誘導した。さらに、Ｒｐ，Ｓｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰおよびＲｐ，Ｓｐジチオｃ－ジ－ＡＭＰジアステレオマーにより誘導されたＩＦＮ－βのレベルは、Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰおよびＲｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＡＭＰジアステレオマーの両方、ならびに天然ｃ－ジ－ＧＭＰおよびｃ－ジ－ＡＭＰ分子により誘導されたレベルよりも低かった。これらの結果より、Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰおよびＲｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＡＭＰジアステレオマーの精製調製物は、非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰおよびｃ－ジ－ＡＭＰ分子ならびにＲｐ，Ｓｐジチオ誘導体より大きく自然免疫応答を活性化することが証明される。ｃ－ジ－ＧＭＰおよびｃ－ジ－ＡＭＰの両方のＲｐ，Ｓｐチオ誘導体は、自然免疫応答を不十分にしか活性化しなかった。アジュバントのために好ましい実施形態は、それらの自然免疫応答の活性化増加の特性のために、Ｒｐ，Ｒｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰまたはＲｐ，Ｒｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＡＭＰ環状ジヌクレオチドであることは、当業者には明らかであろう。これは、Ｒｐ，Ｓｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰまたはＲｐ，Ｓｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＡＭＰのいずれかまたはｃ－ジ－ＧＭＰもしくはｃ－ジ－ＡＭＰ分子と比べた、誘導されたＩＦＮ－β発現の大きさにより示される。

【０１５６】

実施例６．ホスホジエステラーゼによるＣＤＮの分解

非修飾天然ｃ－ジ－ＧＭＰおよびｃ－ジ－ＡＭＰと比べて、Ｒｐ，Ｒｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰおよびｃ－ジ－ＡＭＰ誘導体の効力が増加した１つのメカニズムは、ジチオ修飾誘導体の宿主細胞ホスホジエステラーゼによる分解に対する抵抗性である可能性がある。このメカニズムのための試験として、Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰ、非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰおよびまたＲｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＡＭＰおよびｃ－ジ－ＡＭＰ分子を１ｍｇのヘビ毒ホスホジエステラーゼ（ＳＶＰＤ）と共に、およびこれなしで一晩３７℃でインキュベートした。このインキュベーション期間後、反応におけるＳＶＰＤ酵素を不活性化させ、１００℃で１０分のインキュベーションにより除去し、試料をその後、１４，０００ｒｐｍで５分遠心分離した。ＩＦＮ－β発現のレベルにより測定される、試料の自然免疫を活性化する相対能力を試験するために、１×１０^{5}ＤＣ２．４細胞を１００μ

ＭのＲｐ，ＲｐジチオＲ二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰおよびｃ－ジ－ＡＭＰ誘導体ならびに非修飾天然ｃ－ジ－ＧＭＰおよびｃ－ジ－ＡＭＰと共にインキュベートし、これらの環状ジヌクレオチド調製物と共に、３０分、３７℃で、５％ＣＯ２を用いてインキュベートした試料から処理した。３０分後、細胞を洗浄し、１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ培地に置き換え、さらに４ｈｒインキュベートした。培養流体をその後、収集し、１０μＬのこれらの流体を１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ培地で増殖させた５×１０４　Ｌ９２９－ＩＳＲＥルシフェラーゼレポーター細胞に添加した。ＩＦＮ－β発現の相対レベルを、レポーター細胞株における４時間インキュベーション後に相対発光量（ＲＬＵ）を測定することにより決定した。

【０１５７】

図８に示されるように、Ｒｐ，ＲｐジチオＲ二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰ（「ＲＲ－ＣＤＧ」）またはＲｐ，ＲｐジチオＲ二リン酸ｃ－ジ－ＡＭＰ（「ＲＲ－ＣＤＡ」）を含む細胞におけるＩＦＮ－β発現のレベルは、環状ジヌクレオチドがＳＶＰＤと共にインキュベートされたかどうかに関係なく等価であった。対照的に、ＩＦＮ－β発現のレベルは、この酵素と共にインキュベートしなかったｃ－ジ－ＧＭＰまたはｃ－ジ－ＡＭＰを含む培養物と比べて、前にＳＶＰＤとインキュベートしたｃ－ジ－ＧＭＰ（「ＣＤＧ」）またはｃ－ジ－ＡＭＰ（「ＣＤＡ」）を含む培養物において著しく低かった。さらに、ＳＶＰＤと共にインキュベートしなかった環状ジヌクレオチドを含む培養物において、ＩＦＮ－β発現のレベルは、ｃ－ジ－ＧＭＰまたはｃ－ジ－ＡＭＰと比べて、Ｒｐ，ＲｐジチオＲ二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰまたはＲｐ，ＲｐジチオＲ二リン酸ｃ－ジ－ＡＭＰを用いると大きくなった。これらのデータはさらに、Ｒｐ，ＲｐジチオＲ二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰまたはＲｐ，ＲｐジチオＲ二リン酸ｃ－ジ－ＡＭＰの効力がｃ－ジ－ＧＭＰまたはｃ－ジ－ＡＭＰと比べて増加することを支援する。

【０１５８】

実施例７．ＣＤＮによる免疫応答誘導

非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰ分子に対して、Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰの増強されたインビボ免疫原性を試験するために、ＯＶＡ特異的ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答を、ＣＤＮ処置と併用したワクチン接種後１０日に、ＰＢＭＣにおいて測定した。ワクチンを、１０μｇのＯＶＡタンパク質（ＥｎｄｏＦｉｔ　ＯＶＡ、ＩｎＶｉｖｏｇｅｎ）およびＡｄｄａｖａｘ（２％スクアレン最終）を、２５μｇまたは５μｇの環状ジヌクレオチドのいずれかと組み合わせて、１００μＬの総体積として調製した。５匹の雌Ｃ５７ＢＬ／６マウス（Ｈ－２ｂ）のグループを１回皮下（ｓ．ｃ）で尾の付け根にて、ワクチン調製物で免疫化し、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）コンパートメントにおけるＯＶＡ特異的ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答を、エリスポット分析により、１０日後に決定した。同齢無処置Ｃ５７ＢＬ／６マウスから単離された、1×10^{5}　ＰＢＭＣおよび1×10^{5}脾細胞フィーダー細胞を刺激せず、または、１μＭのＭＨＣクラスＩＩペプチド（ＯＶＡ２６５－２８０　ＴＥＷＴＳＳＮＶＭＥＥＲＫＩＫＶ）またはＭＨＣクラスＩ（ＯＶＡ２５７－２６４　ＳＩＩＮＦＥＫＬ）ペプチドで、一晩刺激し、前に記載したように、ＩＦＮ－γスポット形成細胞を測定した。

【０１５９】

図９に示されるように、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋ＯＶＡ特異的Ｔ細胞応答は、同じ量の環状ジヌクレオチドアジュバントを含む製剤において、非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰと比べて、Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰを含むワクチンで免疫化したマウスにおいて、大きさが大きかった。さらに、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の大きさは、５μｇまたは２５μｇのいずれかの非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰを含むワクチン製剤で免疫化したマウスと比べて、５μｇのＲｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰを含むワクチン製剤で免疫化したマウスにおいて大きくなった。

【０１６０】

実施例８．ＣＤＮによるＴ細胞応答誘導

さらに非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰ分子に対するＲｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰの免疫原性

を評価するために、ＳＩＶ　ｇａｇ特異的ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答を測定した。５匹のＣ５７ＢＬ／６マウス／グループを、皮下で２回、２％スクアレン含有水中で１０μｇのＳＩＶ　ｇａｇタンパク質と共に製剤化された、１μｇのＲｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰまたは生理食塩水対照のいずれかで免疫化した。ワクチン接種は２０日離し、脾臓を、第２のワクチン接種後６日に収集した。ＳＩＶ　ｇａｇ特異的ＣＤ８（ＡＬ１１、ＳＩＶ　$gag_{312-322}$、Ａ）およびＣＤ４（ＤＤ１３、ＳＩＶ　$gag_{300-312}$、Ｂ）Ｔ細胞エピトープに対する免疫応答をＩＦＮγエリスポットアッセイにより測定した。プレートを走査し、スポット形成細胞（ＳＦＣ）／ウェルを、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ分析計（ＣＴＬ）を用いて数え上げた。

【０１６１】

図１０に示されるように、ＲＲｃ－ジ－ＧＭＰで免疫化された動物は生理食塩水対照を受けた動物に比べ、著しく高いＳＩＶ　ｇａｇ特異的ＣＤ８およびＣＤ４Ｔ細胞応答を誘導した。これらの結果より、ＲＲｃ－ジ－ＧＭＰ誘導体を有するワクチン製剤はＳＩＶ　ｇａｇ特異的ＣＤ４およびＣＤ８Ｔ細胞応答をインビボで誘導することができることが証明される。当業者は、Ｒｐ，ＲｐジチオリンＲｐｃ－ジ－ＧＭＰまたはＲｐ，ＲｐジチオリンＲｐｃ－ジ－ＡＭＰを含むワクチン製剤が好ましいことを認識するであろう。というのも、そのような、環状ジヌクレオチドは、より高い大きさの、ワクチンにより誘導される免疫応答、また、比較的低い用量レベルのアジュバントでのより高い大きさの、ワクチンにより誘導される免疫応答により示される効力の増加を有するからである。

【０１６２】

実施例９．ＣＤＮによる防御免疫の誘導

非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰに対して、Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰにより誘導される増強された免疫原性および付随する防御免疫を確立するために、ＯＶＡ特異的ＣＤ８Ｔ細胞応答をＰＢＭＣにおいて測定し、防御免疫を致死的細菌誘発に対して評価した。ワクチンを、１０μｇのＯＶＡタンパク質（ＥｎｄｏＦｉｔ　ＯＶＡ、ＩｎＶｉｖｏｇｅｎ）およびＡｄｄａｖａｘ（２％スクアレン最終）を、２５μｇの環状ジヌクレオチドと組み合わせることにより、１００μＬの総体積として調製した。５匹の雌Ｃ５７ＢＬ／６マウス（$H-2^{b}$）のグループを２回皮下（ｓ．ｃ）で尾の付け根にて、ワクチン調製物で免疫化した。プライム免疫化とブースト免疫化の間の間隔を３６日とした。ＰＢＭＣにおけるOVA_{257}特異的ＣＤ８Ｔ細胞応答のメモリーおよび拡大相の両方の大きさを、細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）分析により、ブーストワクチン接種後２７日および２Ｘ致死量（LD_{50}）用量（1×10^{5}コロニー形成単位；ＣＦＵ）のＯＶＡ発現野生型リステリア・モノサイトゲネス（ＷＴＬｍ－ＯＶＡ）による誘発後３日の両方で定量した。ＩＣＳ分析では、試験マウス由来の1×10^{5}ＰＢＭＣを、同齢無処置Ｃ５７ＢＬ／６マウスから単離された1×10^{5}脾細胞フィーダー細胞と合わせ、刺激せず、または１μＭのＭＨＣクラスＩペプチド（$OVA_{257-264}$　ＳＩＩＮＦＥＫＬ）で５ｈｒ、ブレフェルジンＡの存在下で刺激し、ＩＦＮ－γ産生を、フローサイトメトリーにより、ＢＤ　ＦＡＣＳＶｅｒｓｅで測定した。

【０１６３】

図１１Ａに示されるように、Ｒｐ，Ｒｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰをアジュバントとするワクチンで免疫化したマウスは、非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰをアジュバントとするワクチンで免疫化したマウスと比べて、より高い大きさのＯＶＡ特異的ＣＤ８　Ｔ細胞メモリーを生成させた。Ｒｐ，Ｒｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰをアジュバントとするワクチンを用いた免疫化により誘導されたＯＶＡ特異的メモリーＣＤ８　Ｔ細胞は、非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰをアジュバントとするワクチンで免疫化したマウスにおけるＯＶＡ特異的メモリーＣＤ８Ｔ細胞の拡大のレベルと比べて、同族ＯＶＡ抗原を発現する病原体を用いた誘発後、より高い大きさまで拡大した。図１１Ｂにおいて示されるＦＡＣＳプロットは、ＯＶＡ特異的ＣＤ８　Ｔ細胞メモリーは、Ｒｐ，Ｒｐジチオ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰをアジュバントとするワクチンで免疫化したマウス由来のＰＢＭＣにおける総ＣＤ８Ｔ細胞集団の３０％に達したことを証明する。有効な免疫化のための究極の判断基準は、ワク

チン候補が毒性病原体によるその後の誘発対する保護を与えることができるかどうかを試験することである。Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰおよび非修飾ｃ－ジ－ＧＭＰをアジュバントとするワクチンの相対的な有効性を試験するために、マウスを、２Ｘ　ＬＤ$_{50}$用量（１×１０^{5}ＣＦＵ）のＯＶＡ発現野生型リステリア・モノサイトゲネス（ＷＴ　Ｌｍ－ＯＶＡ）の静脈内注射により、ブースト免疫化後２７日に誘発した。３日後、防御免疫を、ＷＴ　Ｌｍ－ＯＶＡ誘発後３日に、試験マウスから収集した脾臓のホモジネートの希釈物をブレインハートインフュージョン寒天培地に蒔き、一晩、３７℃でインキュベーションした後にコロニー数を定量することにより決定した。図１１Ｃは、Ｒｐ，ＲｐジチオＯ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰをアジュバントとするワクチンによるマウスの免疫化は、毒性病原体誘発に対し完全な保護（検出限界未満、ＬＯＤ）を与えたことを示す。アジュバントに対する好ましい実施形態は、それらの著明なワクチン効力を与える特性のために、Ｒｐ，ＲｐジチオＯ－二リン酸ｃ－ジ－ＧＭＰまたはＲｐ，ＲｐジチオＯ－二リン酸ｃ－ジ－ＡＭＰ環状ジヌクレオチドであることは、当業者には明らかであろう。これは、同族抗原による誘発で拡大し、毒性病原体誘発に対し完全な保護を提供する、高い大きさのＣＤ８Ｔ細胞メモリープールの誘導により示される。

【０１６４】

実施例１０．ＣＤＮによる有効な抗腫瘍免疫の誘導

Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＡＭＰおよび非修飾ｃ－ジ－ＡＭＰ誘導体の相対的なインビボ抗腫瘍効力を前立腺癌の皮下マウスモデルで評価した。誘導体分子をＧＭ－ＣＳＦ（ＧＶＡＸ）を発現する１×１０^{6}照射全ＴＲＡＭＰ－Ｃ２マウス前立腺腫瘍細胞と共に製剤化した。５匹の雄Ｃ５７ＢＬ／６マウスのグループに、１×１０^{5}ＴＲＡＭＰ－Ｃ２腫瘍細胞を、皮下、足蹠において移植した。腫瘍移植後４および１１日に、マウスに皮下、側腹部においてＧＶＡＸのみ、またはＲＲ－ＣＤＡまたはＣＤＡと共に製剤化したＧＶＡＸをワクチン接種し、ＨＢＳＳ対照と比較した。腫瘍増殖を、ノギスによりモニタし、腫瘍体積を計算した。

【０１６５】

図１２に示されるように、腫瘍移植後５２日までに、ＧＶＡＸ＋ＲＲ－ＣＤＡでワクチン接種したマウスは、ＨＢＳＳ対照と比べて著しい腫瘍増殖阻害を証明し、ＧＶＡＸのみまたは非修飾ｃ－ジ－ＡＭＰ誘導体と製剤化したＧＶＡＸと比べて抗腫瘍効力が増加した。これらのデータは、マウス前立腺癌モデルにおいて、非修飾ｃ－ジ－ＡＭＰ分子と比べてＲｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＡＭＰ誘導体分子の抗腫瘍効力が増加することを証明する。

【０１６６】

実施例１１．ＣＤＮのプロドラッグ形態

プロドラッグ戦略は細胞または送達リポソームの二重層への分配を促進するための魅力的な方法を提供する。Ｃ－１２～Ｃ－１８カルボン酸によるｃ－ジ－ＧＭＰ、ｃ－ジ－ＡＭＰおよびジチオ－類似体のリボース２’－ＯＨのアシル化は、有益なプロドラッグとして機能することができるであろう。２つの例が図１３で示され、実施例で説明される。

【０１６７】

（ａ）１１ａからのモノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰ１２の合成

１１ａのビストリエチルアミン塩（８ｍｇ、９．０マイクロモル）に０．３ｍｌのＤＭＦ、３０マイクロリットルのピリジンおよび１５ｍｇの無水ミリスチン酸（３４マイクロモル）を添加した。反応混合物を室温で４８ｈ撹拌し、その後、６０℃で０．５ｈ加熱した。主生成物１２の質量を、ネガティブモードのＬＣ／ＭＳにより確認し、ｍ／ｚ（Ｍ－１）８８９であった（$C_{34}H_{49}N_{10}O_{15}P_{2}^{-}$に対して計算：８９９．３）。蒸発後、残渣を、３０％ＣＨ３ＣＮを含む１０ｍＭ　ＴＥＡＡに入れ、濾過し、２０ｍｍ　ｐｒｅｐＣ－１８　ＨＰＬＣカラム上で、勾配溶離（３０～６０％ＣＨ３ＣＮを含む１０ｍＭ　ＴＥＡＡ、２０ｍｉｎにわたり、２０ｍｌ／分の流速）を用いて精製した。所望の生成物を含むフラクションを合わせ、回転蒸発させ、凍結乾燥し、３ｍｇのモノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰ（１２）を得た。ネガティブモードの１２のＨＲＭＳはｍ／ｚ（Ｍ－２）４４９．１３８９を確認する（$C_{34}H_{48}N_{10}O_{15}P_{2}^{-2}$に対

して計算：４４９．１３９３）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＤＭＳＯ＋１％　Ｄ２Ｏ）　２５℃　δ（ｐｐｍ）７．９８（ｓ，２Ｈ）、５．９８（ｓ，１Ｈ）、５．７３（ｄ，１Ｈ），５．６６（ｓ，１Ｈ）、４．７４（ｄ，２Ｈ）、４．５４（ｓ，１Ｈ）、４．２３（ｓ，１Ｈ）、３．８１－３．９９（ｂｒ，４Ｈ）、２．５５（ｓ，２Ｈ）、１．４４（ｓ，２Ｈ）、０．８５（ｔ，３Ｈ）。（純粋ＤＭＳＯ中における１０．６１、７．３３および６．５５のＮＭＲピークは１％$Ｄ_{2}$Ｏの添加で交換された）。ミリストイル基のメチレンはＤＭＳＯおよび高磁場酢酸トリエチルアンモニウムピークにより不明瞭であった。ＮＭＲは２’－ＯＨでのモノアシル化と一致する。^{31}Ｐ　ＮＭＲ（$Ｄ_{2}$Ｏ）２５℃。δ（ｐｐｍ）－１．３７、－２．０６。

【０１６８】

（ｂ）１１ｂからのモノ－２’－Ｏ－ミリストイル［Ｒｐ，Ｒｐ］ジチオリン酸ｃ－ジ－ＧＭＰ（１３）の合成

１１ｂのビストリエチルアミン塩（１２ｍｇ、１３．０マイクロモル）に、０．３ｍｌのＤＭＦ、３０マイクロリットルのピリジン、１５ｍｇの無水ミリスチン酸（３４マイクロモル）および触媒ＤＭＡＰを添加した。反応混合物を室温で２４ｈ撹拌し、その後、６０℃で２ｈ加熱した。溶媒をロトエバポレーションにより除去し、残渣を５０％ＭｅＯＨを含む１０ｍＭ　ＴＥＡＡに入れ、濾過し、２０ｍｍ　ｐｒｅｐ　Ｃ－１８　ＨＰＬＣカラム上で精製した（５０％ＭｅＯＨを含む１０ｍＭ　ＴＥＡＡの均一濃度で５ｍｉｎ、続いて、１００％ＭｅＯＨまでの勾配で１０ｍｉｎ、その後、１００％ＭｅＯＨで１０ｍｉｎ）。所望の生成物がメタノールシステムにおいて遅くに溶離した。所望の生成物を含むフラクションを合わせ、回転蒸発させ、その後、凍結乾燥し、４ｍｇのモノ－２’－Ｏ－ミリストイル［Ｒｐ，Ｒｐ］ジチオリン酸ｃ－ジ－ＧＭＰ（１３）を得た。ネガティブモードの１３のＨＲＭＳはｍ／ｚ（Ｍ－２）４６５．１１４８を確認する（$Ｃ_{34}Ｈ_{48}Ｎ_{10}Ｏ_{13}Ｐ_{2}Ｓ_{2}^{-2}$に対して計算：４６５．１１６５）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（ＤＭＳＯ＋１％　$Ｄ_{2}$Ｏ）　２５℃　δ（ｐｐｍ）８．０１（ｓ，２Ｈ）、５．９７（ｄ，１Ｈ）、５．７３（ｄ，２Ｈ）、５．７１（ｍ，２Ｈ）、５．００（ｍ，１Ｈ）、４．８５（ｍ，１Ｈ）、４．５６（ｍ，１Ｈ）、４．１０－４．１８（ｍ，４Ｈ）、３．９７（ｍ，２Ｈ）、３．８４－３．８７（ｍ，１Ｈ）、３．１６（ｓ，１Ｈ）、３．０５（ｄ，２Ｈ）、１．４７（ｂｒ，２Ｈ）、０．８５（ｔ，３Ｈ）。（純粋ＤＭＳＯ中における１０．６０、７．５３、６．９０および６．６３のＮＭＲピークは、１％$Ｄ_{2}$Ｏの添加で交換された）。ミリストイル基のメチレンはＤＭＳＯおよび高磁場酢酸トリエチルアンモニウムピークにより不明瞭であった。ＮＭＲは２’－ＯＨでのモノアシル化と一致する。^{31}Ｐ　ＮＭＲ（$ＣＤ_{3}$ＯＤ）２５℃。δ（ｐｐｍ）５６．６６、５５．４６。

【０１６９】

それぞれ、ＣＤＮチオリン酸およびリン酸上の硫黄または酸素のアシルオキシアルキル誘導体化を使用する同様のプロドラッグアプローチもまた使用され得る。図１４におけるアシルオキシアルキル構造は、ＨＩＶおよびＨＢＶ感染を治療するために使用されるアデホビル、有効なヌクレオシド類似体プロドラッグに類似する。１度細胞内では、細胞内エステラーゼは２’－ＯＨまたはリン酸（チオリン酸）上に存在するアシルまたはアシルオキシアルキル基を切断し、非誘導環状ジヌクレオチドを再生させるであろう。

【０１７０】

実施例１２．ＣＤＮプロドラッグの薬理活性

自然免疫応答を活性化させるｃ－ジ－ＧＭＰのプロドラッグ形態の相対的な効力を決定するために、ヒト単球細胞株において誘導されたＩＦＮ－βの相対的なレベルを評価した。これらの実験では、４×１０５　ＴＨＰ１－Ｂｌｕｅヒト単球をＩＲＦ－誘導性分泌胚性アルカリホスファターゼレポーター遺伝子（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ）でトランスフェクトし、１００μＭのｃ－ジ－ＧＭＰ、モノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰまたはＨＢＳＳと共に３０分、３７℃で、５％ＣＯ２を用いてインキュベートした。３０分後、細胞を洗浄し、９６ウェルディッシュにおいて、１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ培地中に蒔き、３７℃で、５％ＣＯ２を用いてインキュベートした。各試料由来の細胞培養上清を４

時間後に収集した。１０μＬの細胞培養上清を、ＱＵＡＮＴＩ－Ｂｌｕｅ試薬（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ）に添加し、１５－３０分インキュベートした。６５５ｎｍでの吸光度を、モデル６８０分光光度計（ＢｉｏＲａｄ）を用いて測定した。

【０１７１】

図１５に示されるように、モノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰ（「モノ－２’－Ｏ－ミリストイルＣＤＧ」）誘導体は、ヒト単球細胞株において、ｃ－ジ－ＧＭＰ非修飾環状ジヌクレオチド分子より、およびバックグラウンド（ＨＢＳＳ）レベルより、著しく高いレベルのＩＦＮ－βを誘導した。加えて、これらのデータはヒト単球細胞株では、Ｒｐ，Ｓｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰおよびｃ－ジ－ＧＭＰ非修飾分子よりも優れた、Ｒｐ，Ｒｐジチオｃ－ジ－ＧＭＰ誘導体分子の誘導を証明する。これらの結果より、モノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰ誘導体の精製調製物は、ヒト細胞株において自然免疫応答を活性化することができることが証明される。

【０１７２】

実施例１３．ＣＤＮプロドラッグによる免疫応答の誘導

モノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰ（「モノ－２’－Ｏ－ミリストイルＣＤＧ」）誘導体のインビボ免疫応答を誘導する能力を評価するために、ＯＶＡ特異的ＣＤ８Ｔ細胞応答を脾細胞において、ＣＤＮ処置と併用した第２のワクチン接種後７日に測定した。ＯＶＡ特異的免疫応答を刺激するモノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰの能力を試験するために、ワクチンを１０μｇのＯＶＡタンパク質（ＥｎｄｏＦｉｔ　ＯＶＡ、Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ）およびＡｄｄａｖａｘ（２％スクアレン最終）を、０（対照）または５μｇのモノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰ誘導体（「モノ－２’－Ｏ－ミリストイルＣＤＧ」）と組み合わせることにより、１００μＬの総体積として調製した。５匹の雌Ｃ５７ＢＬ／６マウス（Ｈ－２ｂ）のグループを２回皮下（ｓ．ｃ）で尾の付け根にて、ワクチン調製物で免疫化し、脾臓におけるＯＶＡ特異的ＣＤ８＋　Ｔ細胞応答を７日後に細胞内サイトカイン染色により決定した。１×１０６脾細胞を刺激せず、または１μＭのＭＨＣクラスＩ（ＯＶＡ２５７－２６４　ＳＩＩＮＦＥＫＬ；ＳＬ８）ペプチドで一晩刺激し、ＩＦＮ－γ産生を、フローサイトメーターによりＢＤ　ＦＡＣＳＶｅｒｓｅで測定した。

【０１７３】

図１６に示されるように、モノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰ誘導体を含むワクチンは、対照ワクチンに比べより大きな免疫応答を誘導した。これらの結果より、モノ－２’－Ｏ－ミリストイルｃ－ジ－ＧＭＰ誘導体を含むワクチンは、動物モデルにおいて非常に強力な適応免疫応答を刺激することができることが証明される。

【０１７４】

当業者は、本発明が目的を実施する、ならびに言及される結果および利点ならびにそれらに固有のものを得るためにうまく適合されることを容易に認識する。本明細書で提供される実施例は、好ましい実施形態を表し、例示であり、発明の範囲を制限することは意図されない。

【０１７５】

発明はその適用において、下記説明で明記され、または図で示された構成の詳細および構成成分の配列に制限されないことが理解されるべきである。発明は記載されるそれらの実施形態に加えて、様々な様式で、実行され、実施され得る。また、本明細書ならびに要約書で使用される表現および専門用語は、説明目的のためのものであり、制限するものと見なすべきではないことが理解されるべきである。

【０１７６】

そのようなものとして、当業者であれば、本開示が基本とする概念は、本発明のいくつかの目的を実施するための他の構造、方法およびシステムの設計のための基本として、容易に使用することができることを認識するであろう。よって、特許請求の範囲は、それらが、本発明の精神および範囲から逸脱しない限り、そのような等価な構成を含むものとして見なされるべきであることが重要である。

【０１７７】
発明について、当業者がこれを製造し、使用するために、十分詳しく、記載し、例示してきたが、様々な代案、改変および改善が本発明の精神および範囲から逸脱せずに明らかとなるはずである。本明細書で提供される実施例は好ましい実施形態を表し、例示であり、発明の範囲を制限することは意図されない。当業者はその中の改変および他の使用を思いつくであろう。これらの改変は発明の精神に含まれ、特許請求の範囲により規定される。

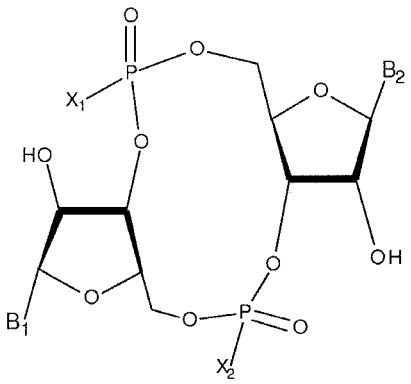
【０１７８】
様々な置換および改変が、本明細書で開示される発明において、本発明の範囲および精神から逸脱せずに実施され得ることは、当業者には容易に明らかになるであろう。

【０１７９】
本明細書で言及される全ての特許および出版物は発明が属する分野の当業者のレベルを示す。全ての特許および刊行物は、各個々の刊行物が特定的に、かつ個々に参照により組み込まれることが示されるのと同じ程度まで、本明細書で参照により組み込まれる。

【０１８０】
本明細書で例示的に記載される発明は適切に、特定的に本明細書で開示されない任意の１つまたは複数の要素、１つまたは複数の制限なしで実施され得る。よって、例えば、本明細書における各々の場合において、「を含む」、「本質的に、から構成される」および「からなる」という用語のいずれも、他の２つの用語のいずれかに置き換えることができる。使用された用語および表現は、説明用語として使用され、制限するものではなく、そのような用語および表現の使用は図示され、記載された特徴またはその一部のいずれの等価物も排除することを意図せず、様々な改変が、特許請求された発明の範囲内で可能であることが認識される。よって、本発明を、好ましい実施形態および任意的な特徴により特定的に開示してきたが、当業者は本明細書で開示される概念の改変および変更に頼ることができ、そのような改変および変更は添付の特許請求の範囲により規定されるこの発明の範囲内にあると考えられることが理解されるべきである。

【０１８１】
他の実施形態は、下記特許請求の範囲内で説明される。

【図１】

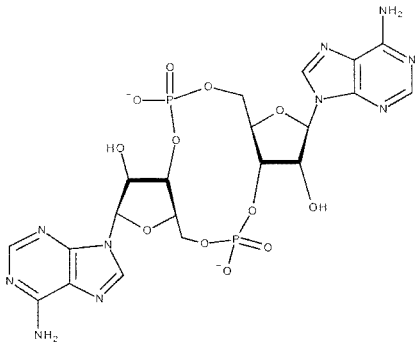


$X_1 = X_2 = O^-$,

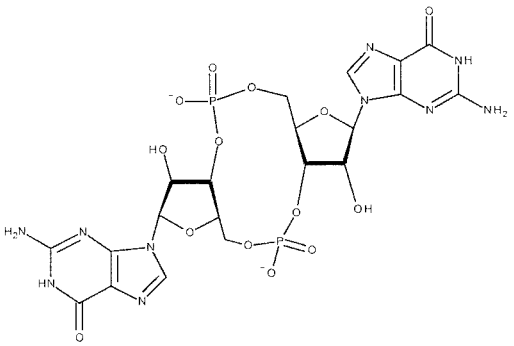
$X_1 = X_2 = S^-$,

又は $X_1 = O^-, X_2 = S^-$

【図２】

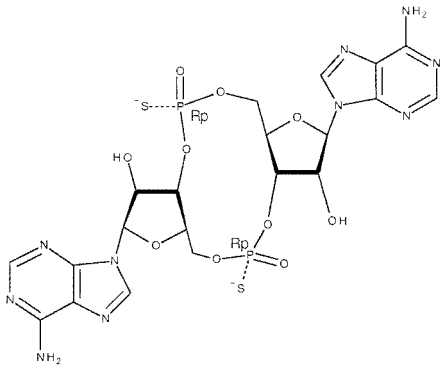


10a

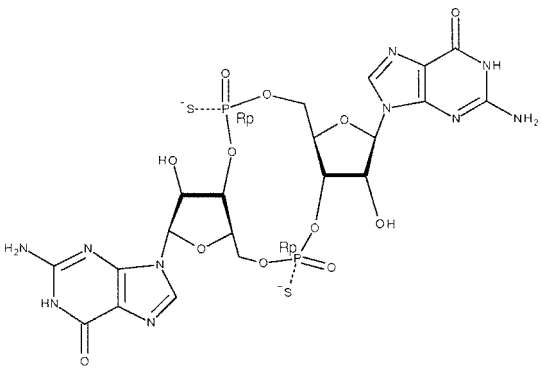


11a

【図３】

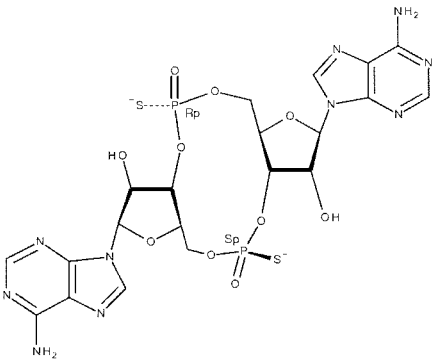


10b

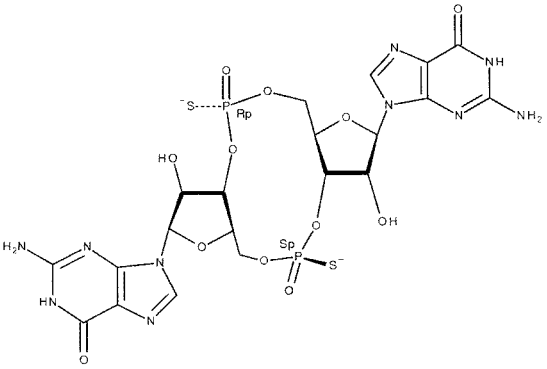


11b

【図４】

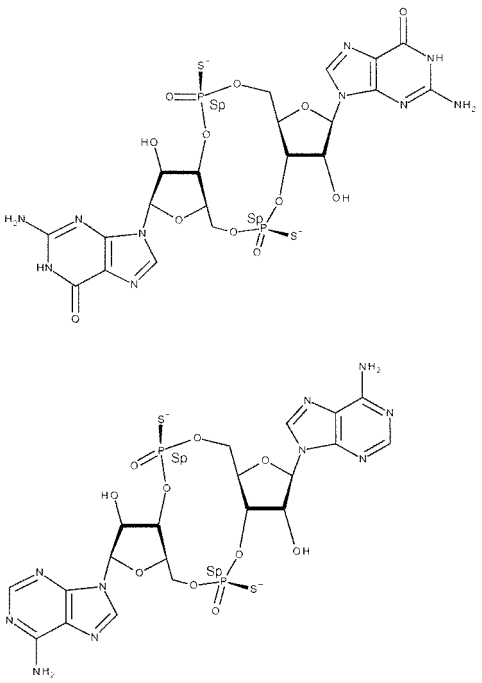


10c

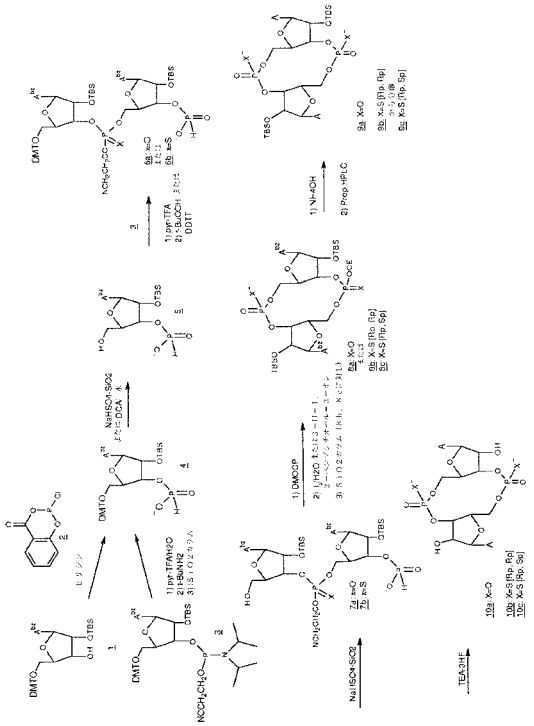


11c

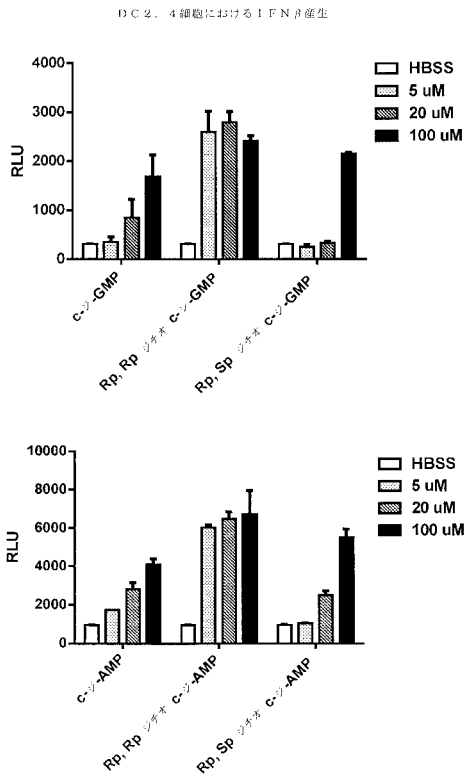
【図５】



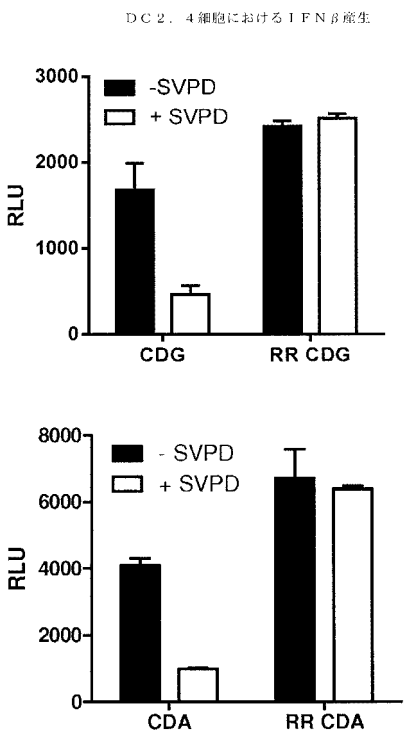
【図６】



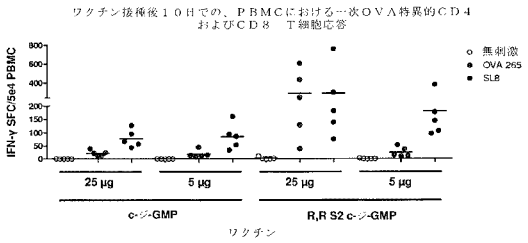
【図７】


ＤＣ２．４細胞におけるＩＦＮβ産生
4000
3000
2000
1000
0
RLU
HBSS
5 uM
20 uM
100 uM
c-ジ-GMP
Rp, Rp ジチオ c-ジ-GMP
Rp, Sp ジチオ c-ジ-GMP
10000
8000
6000
4000
2000
0
RLU
HBSS
5 uM
20 uM
100 uM
c-ジ-AMP
Rp, Rp ジチオ c-ジ-AMP
Rp, Sp ジチオ c-ジ-AMP

【図８】


ＤＣ２．４細胞におけるＩＦＮβ産生
3000
2000
1000
0
RLU
-SVPD
+ SVPD
CDG
RR CDG
8000
6000
4000
2000
0
RLU
- SVPD
+ SVPD
CDA
RR CDA

【図９】



【図１０】

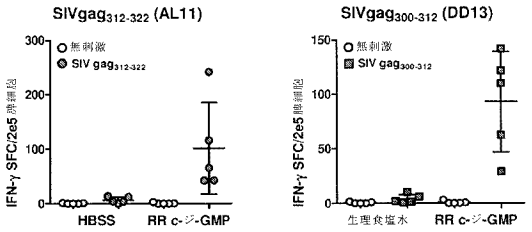


図１０Ａ　　図１０Ｂ

【図１１】

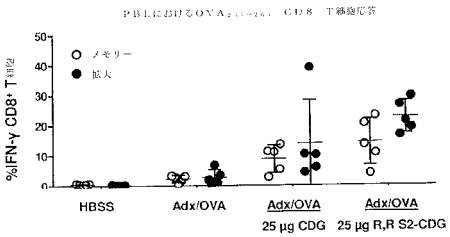


図１１Ａ

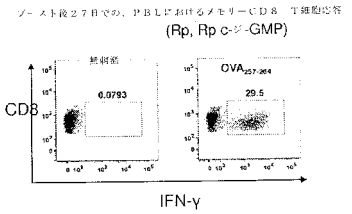


図１１Ｂ

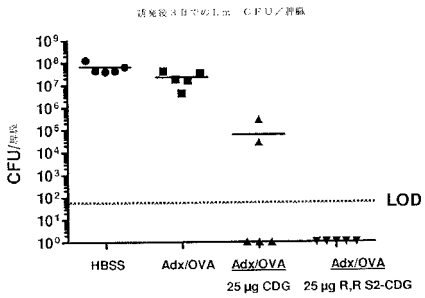
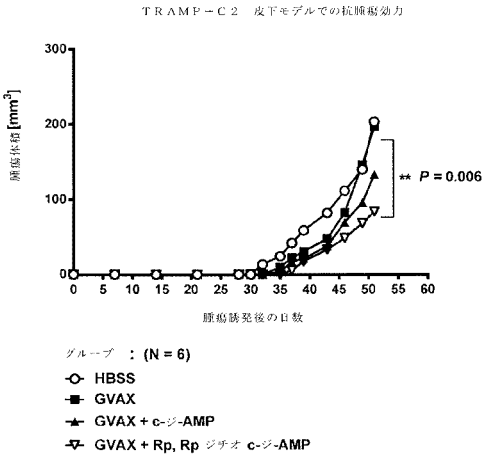
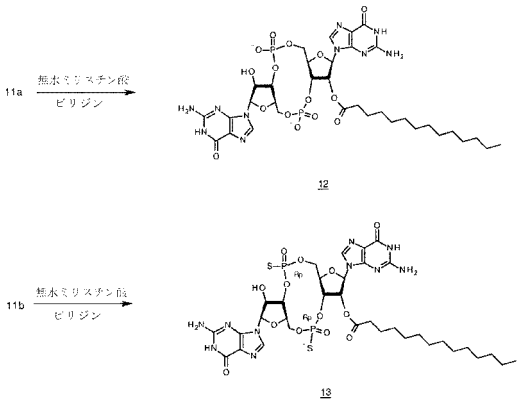


図１１Ｃ

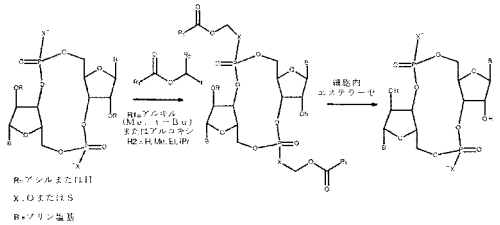
【図１２】



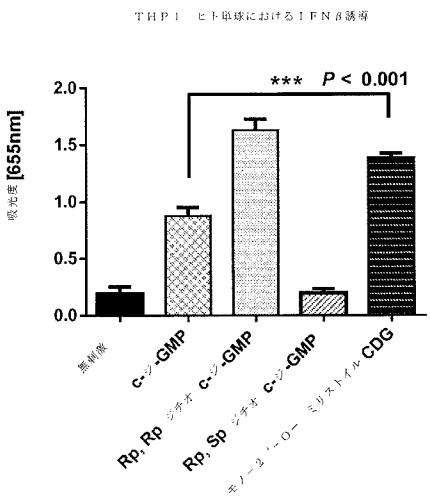
【図１３】



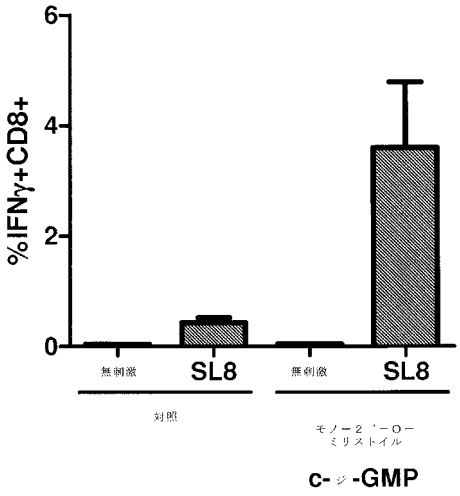
【図１４】



【図１５】



【図１６】



【手続補正書】
【提出日】平成30年5月21日(2018.5.21)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌または感染症の処置に使用するための医薬の製造における、実質的に純粋なＲｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドまたはその薬学的に許容される塩の使用。
【請求項２】
前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル（－Ｃ（Ｏ）R_{aa}）、カルボキシル（－Ｃ（Ｏ）Ｏ－R_{aa}）、脂肪族基、脂環式基、アルコキシ、置換オキシ（－Ｏ－R_{aa}）、アリール、アラルキル、複素環式ラジカル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、アミノ（－Ｎ（R_{bb}）（R_{cc}））、イミノ（＝ＮR_{bb}）、アミド（－Ｃ（Ｏ）Ｎ（R_{bb}）（R_{cc}）または－Ｎ（R_{bb}）Ｃ（Ｏ）R_{aa}）、アジド（－N_3）、ニトロ（－NO_2）、シアノ（－ＣＮ）、カルバミド（－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（R_{bb}）（R_{cc}）または－Ｎ（R_{bb}）Ｃ（Ｏ）ＯR_{aa}）、ウレイド（－Ｎ（R_{bb}）Ｃ（Ｏ）－Ｎ（R_{bb}）（R_{cc}））、チオウレイド（－Ｎ（R_{bb}）Ｃ（Ｓ）Ｎ（R_{bb}）（R_{cc}））、グアニジニル（－Ｎ（R_{bb}）Ｃ（＝ＮR_{bb}）Ｎ（R_{bb}）（R_{cc}））、アミジニル（－Ｃ（＝ＮR_{bb}）Ｎ（R_{bb}）（R_{cc}）または－Ｎ（R_{bb}）Ｃ（＝ＮR_{bb}）（R_{aa}））、チオール（－ＳR_{bb}）、スルフィニル（－Ｓ（Ｏ）R_{bb}）、スルホニル（－Ｓ（Ｏ）$_2R_{bb}$）およびスルホンアミジル（－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｎ（R_{bb}）（R_{cc}）ま

たは－Ｎ（Ｒｂｂ）Ｓ（Ｏ）２Ｒｂｂ）からなる群より選択される２’－置換基を含み、各Ｒａａ、各Ｒｂｂおよび各Ｒｃｃは、独立して、Ｈ、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂肪族、アルコキシ、アシル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、脂環式、複素環式またはヘテロアリールアルキルである、請求項１に記載の使用。

【請求項３】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素からなる群より選択される２’－置換基を含む、請求項２に記載の使用。

【請求項４】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－フッ素を含む、請求項３に記載の使用。

【請求項５】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－アルキニルを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項６】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－カルボキシルを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項７】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－アミドを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項８】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－ニトロを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項９】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－アジドを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項１０】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－シアノを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項１１】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－カルバミドを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項１２】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－チオールを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項１３】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－スルホニルを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項１４】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが２’－スルホンアミジルを含む、請求項２に記載の使用。

【請求項１５】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが１種以上の脂質と共に製剤化される、請求項１～１４のいずれか１項に記載の使用。

【請求項１６】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドがジギトニンと共に製剤化される、請求項１～１４のいずれか１項に記載の使用。

【請求項１７】

前記１種以上の脂質はリポソームを形成する、請求項１５に記載の使用。

【請求項１８】

前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドが１種以上のアジュバントと共に

製剤化される、請求項１～１７のいずれか１項に記載の使用。
【請求項１９】
前記１種以上のアジュバントはＣｐＧおよび／またはモノホスホリルリピドＡを含む、請求項１８に記載の使用。
【請求項２０】
前記Ｒｐ，Ｒｐチオリン酸環状プリンジヌクレオチドがナノ粒子として製剤化される、請求項１～１４のいずれか１項に記載の使用。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	***39/12***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/12		４Ｃ０８７
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｈ０４５
A61K	***45/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	45/00		
A61K	***9/127***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	9/127		
A61K	***47/44***	***(2017.01)***	Ａ６１Ｋ	47/44		
A61K	***47/28***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/28		
A61K	***35/13***	***(2015.01)***	Ａ６１Ｋ	35/13		
C07K	*14/74*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/74		
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		
C12N	*7/04*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/04		
C12N	*5/09*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/09		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		

(72)発明者　ダベンスキー，ジュニア，トーマス，ダブリュー．
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９４７０５，バークレー，２５　タングルウッド　ロード
(72)発明者　カンネ，デービッド，ビー．
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９４９２５，コーテ　マデラ，５　フライング　クラウド　コース
(72)発明者　レオン，メレディス，ライ　リン
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９４６１１，オークランド，６６１５　サロニ　ドライブ
(72)発明者　レメンズ，エドワード，エミール
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９４５９７，ウォールナット　クリーク，３４　アイアン　ホース　レーン
(72)発明者　グリックマン，ローラ，ヒックス
アメリカ合衆国，カリフォルニア州　９４６１１，オークランド，３６　ライダル　コート

Ｆターム(参考)
4B065 AA01X AA90X AA90Y AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA45
4C076 AA01 AA17 AA19 AA22 AA29 AA36 AA53 BB01 BB11 BB22 BB29 BB30 CC27 DD70 EE52 FF04 FF05 FF06 FF09 FF16 FF43
4C084 AA19 AA27 MA02 MA17 MA22 MA23 MA24 MA31 MA35 MA37 MA43 MA52 MA55 MA63 MA66 NA05 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC751
4C085 AA03 BA07 BA51 BB01 CC07 CC08 DD86 EE01 EE03 EE06 FF24 GG01 GG08
4C086 AA01 AA02 EA18 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MA17 MA22 MA23 MA24 MA31 MA35 MA37 MA43 MA52 MA55 MA56 MA57 MA60 MA66 NA05 NA14 NA15 ZB09 ZB26 ZB27 ZC19 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB64 BB65 MA02 MA17 MA22 MA23 MA24 MA35 MA37 MA43 MA52 MA55 MA60 MA66 NA05 ZB09 ZB26 ZB27 ZC75
4H045 AA30 BA15 BA16 CA40 DA50 EA20 EA50