

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7145579号

(P7145579)

(45)発行日 令和4年10月3日(2022.10.3)

(24)登録日 令和4年9月22日(2022.9.22)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/711 (2006.01)

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 K 31/713

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 47/42 (2017.01)

A 6 1 K 47/42

請求項の数 12 (全158頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-564340(P2018-564340)

(86)(22)出願日 平成29年6月9日(2017.6.9)

(65)公表番号 特表2019-517553(P2019-517553
A)

(43)公表日 令和1年6月24日(2019.6.24)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/064059

(87)国際公開番号 WO2017/212009

(87)国際公開日 平成29年12月14日(2017.12.14)

審査請求日 令和2年6月2日(2020.6.2)

(31)優先権主張番号 PCT/EP2016/063226

(32)優先日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 509014386

キュアバック アーゲー

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービ

ンゲン フリードリッヒ - ミエッシャー

- シュトラッセ 15

Friedrich - Miescher

- Strasse 15, 7 2 0 7 6 T

uebingen, Germany

(74)代理人 100133503

弁理士 関口 一哉

(72)発明者 バウムホフ, パトリック

ドイツ連邦共和国 7 2 1 4 4 ドゥスリ

ンゲン, エアレンシュトラッセ 28

(72)発明者 テーレ, カロリン

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 0 テュービ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸カーゴ用のハイブリッド担体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) カチオン性のペプチドまたはポリマー；

(b) カチオン性のまたは永久的にカチオン性のリピド化合物；および

(c) 核酸化合物

を含む組成物であって、

前記リピド化合物が、式 I I a：

- N (R ₁) - C H ₂ - C H (R ₅) - R ₂ (式 I I a)

で表される同一の基を3つ含み、

ここで、

- R ₁ は、水素であり、- R ₂ は、線状の C ₆、C ₈ または C ₁₀ アルキルまたは分枝状の飽和または不飽和の C ₆ ~ C ₁₆ ヒドロカルビル鎖から選択され、- R ₃ および R ₄ は C ₁ ~ C ₄ - アルキルから選択され、- R ₅ は水素またはヒドロキシルであり、

前記カチオン性のペプチドまたはポリマーが、ジスルフィド結合を形成し得る少なくとも1個の - S H 基を有する少なくとも1つのカチオン性部分 P またはそのジスルフィド結合型多量体を含む化合物であり、ここで、部分 P は、

- 7 ~ 30 個のアミノ酸で構成されており、前記少なくとも1個の - S H 基が C y s 残基によりもたらされたものであるペプチド部分であって、前記ペプチド部分が2つの末

端部を有し、ここで、

- 前記 C y s 残基が、前記末端部のうちの 1 つもしくはその付近に位置するか；または
 - 前記ペプチド部分が少なくとも 2 個の C y s 残基を含み、前記 C y s 残基のうちの少なくとも 1 つが前記末端部の各々もしくはその付近に位置する、ペプチド部分

；あるいは

- 任意選択で修飾されているポリアクリレート、キトサン、ポリエチレンジイミン、ポリアミン、ポリアミノエステルもしくはポリアミドアミンまたはその任意のコポリマーから選択されるポリマー部分

であり、；および

前記カチオン性のペプチドまたはポリマーが、式



(式中

P は上記に規定のものであり；

P³ は任意選択であり；

P¹ および P³ は独立して選択され、各々は、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリ - N - (2 - ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド、ポリ - 2 - (メタクリロイルオキシ) エチルホスホリルコリン、ポリ (ヒドロキシアルキル L - アスパラギン)、ポリ (2 - (メタクリロイルオキシ) エチルホスホリルコリン)、ヒドロキシエチルデンプンまたはポリ (ヒドロキシアルキル L - グルタミン) から選択される線状または分枝状の親水性ポリマー鎖を表し、ここで、前記ポリマー鎖は約 1 k D a ~ 約 1 0 0 k D a の分子量を示すものであり、P¹ および P³ の各々は部分 P とジスルフィド結合によって連結されており；

L¹ および L² は任意選択のリガンドであり、R G D、R G D ペプチド、トランスフェリン、葉酸根、シグナルペプチドもしくはシグナル配列、局在化シグナルもしくは配列、核局在化シグナルもしくは配列 (N L S)、抗体、細胞膜透過ペプチド、例えば W E A K L A K A L A K A L A K H L A K A L A K A L K A C E A、T A T、受容体のリガンド、サイトカイン、ホルモン、増殖因子、小分子、糖類、マンノース、ガラクトース、n - アセチルガラクトサミン、合成リガンド、受容体の小分子作動薬、阻害薬もしくは拮抗薬または R G D ペプチド模倣アナログから独立して選択され；

n は、1 ~ 約 5 0 から選択される整数、好ましくは 2、3、4 もしくは 5 ~ 約 1 0 または 2、3 もしくは 4 ~ 約 9 の範囲の整数、例えば 6 または 7 であり； n が 1 より大きい場合、各部分 P は別の部分 P とジスルフィド結合によって連結されている）による化合物であり、

約 0 . 1 ~ 約 2 0 または約 0 . 2 ~ 約 1 5 または約 2 ~ 約 1 5 または約 2 ~ 約 1 2 の N / P 比を有しており、ここで、前記 N / P 比は、前記核酸化合物のリン酸基に対する前記カチオン性のペプチドまたはポリマーの塩基性基の窒素原子のモル比と定義される、組成物。

【請求項 2】

前記核酸化合物に対する前記カチオン性のペプチドまたはポリマーの重量比が少なくとも約 1 であり、前記核酸化合物に対する前記リピド化合物の割合が約 1 5 n m o l 以下 / μ g である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記カチオン性のペプチドまたはポリマーに対する前記リピド化合物の重量比が約 1 : 5 0 より大きくない、および / または前記カチオン性のペプチドまたはポリマーに対する前記リピド化合物の割合が約 2 n m o l 以下 / μ g である、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4】

2 種類以上の異なる種のカチオン性のペプチドおよび / またはポリマーを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記核酸化合物が、

10

20

30

40

50

- 任意選択でプラスミド、オリゴデゾキシヌクレオチド、ゲノムDNA、DNAプライマー、DNAプローブ、免疫賦活性DNA、アプタマーまたはその任意の組合せから選択される化学修飾型および非修飾型のDNA、一本鎖もしくは二本鎖のDNA、コードもしくは非コードDNA、および/または

- 任意選択でメッセンジャーRNA (mRNA)、オリゴリボヌクレオチド、ウイルスRNA、レプリコンRNA、トランスファーRNA (tRNA)、リボソームRNA (rRNA)、免疫賦活性RNA (isRNA)、マイクロRNA、低分子干渉RNA (siRNA)、核内低分子RNA (snRNA)、低分子ヘアピン型RNA (shRNA) もしくはリボスイッチ、RNAアプタマー、RNAデコイ、アンチセンスRNA、リボザイムまたはその任意の組合せから選択される化学修飾型および非修飾型のRNA、一本鎖もしくは二本鎖のRNA、コードもしくは非コードRNA

10

から選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】

標的化剤、細胞膜透過剤およびステルス性薬剤から独立して選択される1種類以上の化合物をさらに含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項7】

前記カチオン性のまたは永久的にカチオン性のリピド化合物が、

(a) 3-C12、

(b) 3-C12-OH、または

(c) 任意選択で薬学的に許容され得るアニオンを含んでもよい3-C12-OH-catt、

20

のいずれかである、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項8】

請求項1～7に記載の組成物を含むナノ粒子。

【請求項9】

医薬としての使用するための、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物または請求項8に記載のナノ粒子。

【請求項10】

請求項9に記載の組成物またはナノ粒子であって、前記使用が、がんまたは腫瘍疾患、感染性疾患、好ましくは(ウイルスによる、細菌による、または原生動物学的)感染性疾患、自己免疫疾患、アレルギーまたはアレルギー性疾患、単因子遺伝性疾患、すなわち、(遺伝性)疾患、または遺伝病一般、遺伝的に継承された背景を有し、典型的には明確な遺伝子欠陥によって引き起こされてメンデルの法則に従って継承される疾患、心血管疾患、ニューロン病、呼吸器系の疾患、消化器系の疾患、皮膚の疾患、筋骨格系障害、結合組織の障害、新生物、免疫不全症、内分泌疾患、栄養上の疾患および代謝病、目の疾患、耳の疾患ならびにペプチドまたはタンパク質の欠損と関連している疾患から選択される疾患の予防、処置および/または寛解を含む、ナノ粒子または組成物。

30

【請求項11】

前記ナノ粒子または前記組成物が接眼送達によって、好ましくは硝子体内、房内、結膜下、網膜下、テノン嚢下、球後、経表面および/または後強膜近傍投与によって、さらに好ましくは毛様筋内に投与される、請求項9または10のいずれか1項に記載された使用のための、請求項8に記載のナノ粒子、または請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

40

【請求項12】

眼において、その投与によりmRNAによってコードされたタンパク質が発現および/または活性化されるようにタンパク質をコードするmRNAを含む、請求項11に記載された使用のための請求項8に記載のナノ粒子、または請求項1～7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】

50

【 0 0 0 1 】

発明の背景

本発明は、薬物療法、疾患の抑制および薬物送達の分野におけるものである。本発明は、特に、特定の型の活性成分を、それを必要とする被験体に送達するのに有用な担体に関する。より詳しくは、本発明は、生存生物内の標的に、例えば標的器官、組織または細胞に生物学的バリアを超えて送達することが難しい生物活性化合物であるかかる活性成分の送達に関する。治療上、大きな価値があると同時に生物学的標的に送達することが困難なかかる生物活性化合物の例としては、核酸ベースのワクチンおよび治療薬が挙げられる。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

種々の疾患は、今日では、ペプチド - 、タンパク質 - および核酸 - ベースの薬物の投与を伴う処置、特に核酸での細胞または組織のトランスフェクションを必要とする。ペプチド - 、タンパク質 - および核酸 - ベースの薬物の最大の治療的潜在性は、そのサイズおよび電荷により哺乳動物細胞の原形質膜を超える能力が限定的であることによって大きく障害され、細胞への到達が不良となり、治療有効性が不十分となっている。今日、このハードルは、バイオ医薬品の開発および多くの生物製剤商業的成功のための主要課題である（例えば、Foerg and Merkle, Journal of Pharmaceutical Sciences (www.interscience.wiley.comでオンライン公開), 2008, 97(1): 144 - 62 参照)。

【 0 0 0 3 】

一部の疾患または障害では、遺伝子療法アプローチが例えば、欠陥性の変異型アレルを機能性のもので置き換える遺伝性疾患の場合において、遺伝子での細胞または組織のトランスフェクションおよび該細胞のDNA内への該遺伝子の挿入を必要とするかかる処置の具体的な一形態として開発されている。しかしながら、個体の細胞内への核酸または遺伝子の導入または挿入は、遺伝子療法の有意な治療効果を得るために絶対に必要ではあるが依然として今日の大きな課題である。

【 0 0 0 4 】

個体の細胞内への核酸または遺伝子の成功裡の導入を達成するため、いくつかの異なるハードルを越えなければならない。核酸の輸送は典型的には、核酸と細胞膜との会合、続くエンドソームによる取込みによって行われる。エンドソーム内では、導入された核酸がサイトゾルから隔離されている。発現がサイトゾル内で起こると、この核酸はエンドソームから離脱しなければならない。この核酸は、エンドソームがリソソームと融合する前にエンドソームを離れていないと、通常、エンドソームの内容物となり、分解される運命となる。あるいはまた、エンドソームが細胞膜と融合し、その内容物が細胞外培地中に戻ることになる場合もあり得る。したがって、核酸の効率的な導入のためには、トランスフェクション自体の効率に加えてエンドソーム脱出が最も重要な工程の1つであると思われる。これまでに、このような問題に対処するいろいろなアプローチがある。しかしながら、今日まですべての面において完全に成功裡のアプローチはこれまで存在しない。

【 0 0 0 5 】

当該技術分野で今日使用されているトランスフェクション剤としては典型的には、ナノ粒子またはマイクロ粒子に合成され得る種々の型のペプチド、ポリマー、脂質、ならびに他の担体化合物が挙げられる（例えば、Gao, X., K. S. Kim, et al. (2007), AAPS J 9(1): E92 - 104 参照）。このようなトランスフェクション剤おほとんどは、インビトロ反応でのみ成功裡に使用されている。生体動物の細胞を核酸でトランスフェクトする場合、さらなる要件を満たす必要がある。一例として、核酸と担体の複合体は生理学的塩溶液中で凝集に対して安定でなければならない。さらに、宿主の補体系の一部のものと相互作用するものであってはならない。さらに、複合体は、遍在するヌクレアーゼによる早期細胞外分解から核酸を保護するものでなければならない。遺伝子療法用途には、さらに、担体が適応免疫系によって認識されないこと（免疫原性）および非特異的サイトカインストームを刺激しないこと（急性免疫応答）が非常に重要

10

20

30

40

50

である (Gao, Kim et al., (2007, 上掲); Martin, M. E. and K. G. Rice (2007), AAPS J 9 (1): E18 - 29; および Foerg and Merkle, (2008, 上掲) 参照)。

【0006】

Foerg and Merkle (2008, 上掲) には、ペプチド - 、タンパク質および核酸 - ベースの薬物の治療的潜在性が論考されている。彼らの解析によれば、このような薬物の最大の治療的潜在性は、哺乳動物細胞の原形質膜を超える能力が限定的であることによって高頻度に障害され、細胞への到達が不良となり、治療有効性が不十分となっている。今日、このハードルは、バイオ医薬品の開発および多くの生物製剤商業的成功のための主要課題である。

10

【0007】

これとの関連において、Gao et al. (Gao et al. The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 9) から、治療用遺伝子を、適正な遺伝子発現が行われ得る選択された細胞に送達する方法の開発における遺伝子療法のための主な課題がわかる。しかしながら、細胞または組織内への遺伝子送達、特に核酸の成功裡の導入は簡単ではなく、典型的には多くの要素に依存する。成功裡の送達、例えば、細胞または組織内への核酸または遺伝子の送達のためには、多くの障壁を解決しなければならない。Gao et al. (2007) によれば、理想的な遺伝子送達方法は、3つの主要な基準: (1) 細胞間マトリックス中のヌクレアーゼによる分解に対して導入遺伝子を保護すべきであること、(2) 導入遺伝子は原形質膜を超えて運ばれるべきであること、および (3) 有害な効果を有してはならないことを満たす必要がある。

20

【0008】

典型的には、核酸での細胞のトランスフェクションは、ウイルスベクターもしくは非ウイルスベクターまたは担体を用いて行われる。成功裡の送達のためには、このようなウイルスベクターまたは非ウイルスベクターは、上記の障壁を解決できるものでなければならない。今日利用可能なほとんどの成功裡の遺伝子療法戦略は、ウイルスベクター、例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスおよびヘルペスウイルスの使用に依存している。ウイルスベクターは、高効率での遺伝子導入および長期間の遺伝子発現の可能性を媒介することができ、3つの基準の2つを満足している。しかしながら、遺伝子療法の臨床試験でカバーされていない急性免疫応答、免疫原性および挿入変異誘発により、一般に使用されている一部のウイルスベクターに関して深刻な安全性の懸念が生じている。

30

【0009】

この問題の解決は非ウイルスベクターの使用に見られ得る。非ウイルスベクターはウイルスベクターほど効率的ではないが、遺伝子療法においてより安全な代替法を提供するために多くの非ウイルスベクターが開発されている。非ウイルスの遺伝子送達の方法では、物理的 (担体なしの遺伝子送達) および化学的アプローチ (合成ベクターに基づいた遺伝子送達) の使用が検討されている。物理的アプローチとしては、通常、注射針を使用する単純な注射、エレクトロポレーション、遺伝子銃、超音波および流体力学的送達が挙げられる。これらのアプローチの一部のものでは、細胞膜を透過して細胞内遺伝子導入を助長する物理的な力が使用される。化学的アプローチでは典型的には、合成化合物または天然に存在する化合物、例えばカチオン性脂質またはカチオン性のポリマーが、細胞内に導入遺伝子を送達するための担体として使用される。種々の非ウイルスの遺伝子送達系の基礎科学および応用においてかなりの進歩がみられるが、大部分の非ウイルスアプローチは依然として、特にインビボ遺伝子送達のためにはウイルスベクターよりも効率性が低い (例えば、Gao et al. The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 9 参照)。

40

【0010】

ここ10年で、物理的合成または化学的ライゲーションからいわゆる細胞膜透過ペプチド (CPP) (また、タンパク質 - 形質導入ドメイン (PTD) とも表記される) への結

50

果と思われる核酸の細胞送達における実質的な改善のための魅力的な展望が発表されている (Foerg and Merkle (2008, 上掲) 参照)。CPP は、哺乳動物細胞の原形質膜を超えることができ、したがって細胞への薬物送達のための前例のない機会をもたらす得る 10 ~ 約 30 個のアミノ酸の短鎖ペプチド配列である。このようなペプチドはほぼすべてが一連のカチオン性アミノ酸を、低 pH で α -ヘリックスを形成する配列との組合せで含むものである。インビボで pH がプロトンポンプによって連続的に低下すると、通常、該ペプチドのコンホメーションの変化が急速に開始される。このヘリックスモチーフがエンドソームの膜内への挿入を媒介し、その内容物の細胞質内への放出をもたらす (Foerg and Merkle, (2008, 上掲); および Vives, E., P. Brodin, et al. (1997); A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. J Biol Chem 272 (25): 16010 - 7 参照)。このような利点にもかかわらず、CPP 媒介性薬物送達に対する大きな障害は、上皮および内皮の酵素的バリアとの接触またはその通過時における多くの場合で急速な該ペプチドの代謝クリアランスにあると考えられる。その結果、CPP の代謝安定性は、細胞内バイオアベイラビリティのための重要な生物薬剤学的要素である。しかしながら、一方においてそのカーゴを標的に、代謝的に切断される前に運ぶのに十分に安定であるが、他方において蓄積されて毒性レベルに達し得る前に組織から一掃され得る CPP は当該技術分野において入手可能ではない。

【0011】

例えば遺伝子療法のために細胞内にカーゴ分子を送達するための当該技術分野におけるさらなるアプローチの一例は、他の型のペプチドリガンドの使用を含むものである (Martin および Rice 参照 (Martin および Rice, The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 3) 参照)。かかるペプチドリガンドは、より大きなタンパク質から採用された短鎖配列であって受容体認識のために必要とされる必須アミノ酸群であるもの、例えば、がん細胞を標的化するために使用される EGF ペプチドであり得る。他のペプチドリガンドも同定されており、レシチン様酸化型 LDL 受容体 (LOX-1) を標的化するために使用されるリガンドが挙げられる。内皮細胞内での LOX-1 の上方調節は、機能不全状態、例えば高血圧およびアテローム性動脈硬化と関連している。しかしながら、かかるペプチドリガンドは、そのカーゴ分子に複合体化または接着では連結され得ず、典型的には細胞内で細胞毒性効果を示す共有結合、例えば架橋剤を必要とするため、多くの遺伝子療法アプローチで適したものではない。

【0012】

また、合成ベクターも、例えば遺伝子療法の目的のために細胞内にカーゴ分子を送達するために使用され得る。しかしながら、多くの合成ベクターの主な不都合点の 1 つはウイルスベクターと比べてトランスフェクション効率が不良であることであり、さらなる臨床開発を可能にするために有意な改善が必要とされる。インビトロおよびインビボの両方において核酸導入を制限するいくつかの障壁が特定されており、生理学的条件におけるベクターの細胞内送達不良、毒性および不安定性が挙げられる (例えば、Read, M. L., K. H. Bremner, et al. (2003): Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. J Gene Med 5 (3): 232 - 45 参照)。

【0013】

遺伝子療法における具体的なアプローチの一例では、カチオン性またはカチオン化可能な脂質が使用される。しかしながら、多くのカチオン性またはカチオン化可能な脂質は細胞培養において優れたトランスフェクション活性を示すが、ほとんどは血清の存在下では性能が良好ではなく、インビボで活性なものは少数のみである。血液、上皮内層の粘液または組織マトリックス中に存在し、負電荷を有し、多くの場合両親媒性である圧倒的な量

のタンパク質および多糖にリポフレックスが曝露されると、サイズ、表面電荷および脂質組成の劇的な変化が起こる。インビボで投与されると、リポフレックスは、負電荷を有する血液成分と相互作用して大きな凝集体を形成する傾向にあり、この凝集体は、循環赤血球の表面上に吸収され得、厚い粘液層内にトラップされるか、または微小血管系内で閉鎖され、これらが遠位の位置の意図された標的細胞に到達することが妨げられる。さらに、リポフレックスに関する毒性が観察されている。症状としては、とりわけ炎症性サイトカインの誘導が挙げられる。ヒトでは、種々の度合の有害な炎症反応、例えば流感様症状が、リポフレックスを投与された被験体にみとめられた。したがって、リポフレックスがヒトにおいて、特に、反復投与が必要とされる場合に安全に使用され得るかどうかに関しては疑わしいようである。

10

【 0 0 1 4 】

遺伝子療法におけるさらなるアプローチの一例では、カチオン性またはカチオン化可能なポリマーが使用される。かかるポリマーは、負電荷を有する核酸をしっかりと複合体化して凝縮させ得るため、核酸の送達に効率的であることがわかった。したがって、いくつかのカチオン性またはカチオン化可能なポリマーが、インビトロおよびインビボでの遺伝子送達のための担体として検討されている。このようなものとしては、ポリエチレンイミン (P E I)、ポリアミドアミンおよびポリプロピルアミンデンドリマー、ポリアリルアミン、カチオン性のデキストラン、キトサン、種々のタンパク質およびペプチドが挙げられる。ほとんどのカチオン性またはカチオン化可能なポリマーは、DNAを小粒子に凝縮させ、細胞表面上のアニオン性部位との電荷 - 電荷相互作用によりエンドサイトーシスによる細胞内取込みを助長する機能を共通して有するが、そのトランスフェクション活性および毒性は劇的に異なる。興味深いことに、カチオン性またはカチオン化可能なポリマーは、分子量の増大に伴い、負電荷を有する核酸カーゴの複合体化がより強力になるため、より良好なトランスフェクション効率を示す。しかしながら、分子量の増大はまた、そのポリマーの毒性の上昇をもたらす。P E I は、おそらく最も活性で最も研究されている遺伝子送達用ポリマーであるが、トランスフェクション試薬としてのその主な欠点はその非生分解性の性質および毒性に関することである。さらに、高分子量ポリマーによって形成されたポリプレックスが生理学的条件下で改善された安定性を示す場合であっても、データでは、かかるポリマーがベクターの荷卸し (u n p a c k i n g) を妨害する場合があります。得ることが示されている。例えば、19および36個のアミノ酸残基のポリ (L - リシン) (P L L) は、180個の残基の P L L よりも速やかにDNAから解離し、短期遺伝子発現の有意な向上をもたらすことが示された。DNAを受容体媒介性遺伝子送達において活性な構造にコンパクト化するためには最低6 ~ 8個のカチオン性アミノ酸長が必要とされる。しかしながら、短鎖ポリカチオンで形成されたポリプレックスは生理学的条件下で不安定であり、典型的には生理学的塩溶液中に急速に凝集する。このマイナスの影響を解決するため、Read et al. (Read , M . L . , K . H . B r e m n e r , e t a l . (2 0 0 3) : V e c t o r s b a s e d o n r e d u c i b l e p o l y c a t i o n s f a c i l i t a t e i n t r a c e l l u l a r r e l e a s e o f n u c l e i c a c i d s . J G e n e M e d 5 (3) : 2 3 2 - 4 5 ; および Read , M . L . , S . S i n g h , e t a l . (2 0 0 5) : A v e r s a t i l e r e d u c i b l e p o l y c a t i o n - b a s e d s y s t e m f o r e f f i c i e n t d e l i v e r y o f a b r o a d r a n g e o f n u c l e i c a c i d s . N u c l e i c A c i d s R e s 3 3 (9) : e 8 6 参 照) により、細胞内環境によって切断されて核酸の放出を助長し得るペプチド C y s - L y s 1 0 - C y s の酸化的重縮合によって調製される線状の還元性ポリカチオン (R P C) を主体とする新しい型の合成ベクターが開発された。彼らは、R P C によって形成されたポリプレックスが還元条件によって不安定化され、DNAおよびmRNAの効率的な放出が可能になることを示すことができた。また、R P C の切断によってポリカチオン毒性も低分子量ペプチドと同等のレベルまで低減された。Read et al. (2 0 0 3 , 上掲) のこのアプローチの不都合点は、トランスフェクション効率を十分なレベルまで向

20

30

40

50

上させるために、エンドソーム溶解剤クロロキンまたはカチオン性脂質DOTAPがさらに必要であることであった。結果として、Read et al. (2005, 上掲)は、エンドソーム緩衝能を有することが知られているヒスチジン残基をRPC内に含めた。彼らは、ヒスチジンリッチRPCが細胞内還元性環境によって切断され、エンドソーム溶解剤クロロキンを必要とすることなく、広範な核酸、例えばプラスミドDNA、mRNAおよびsiRNA分子の効率的な細胞質送達が可能であることを示すことができた。

【0015】

Read et al. (2005, 上掲)では、ヒスチジンリッチRPCがそのままインビボ用途に使用できかどうかは評価されなかった。彼らの研究では、細胞取込みを制限するポリプレックスに対する血清タンパク質の結合によって生じ得るヒスチジン残基が遺伝子導入を向上させる能力がマスキングされることを回避するためにトランスフェクションが血清の非存在下で行われた。予備実験では、ヒスチジンリッチRPCポリプレックスのトランスフェクション特性が血清タンパク質の存在に影響され得ることが示されており、GFP陽性細胞では10% FCS (ウシ胎仔血清) 中において50%の低下が観察されている。インビボ用途のために、彼らは、親水性ポリマーであるポリ-[N-(2ヒドロキシ-プロピル)メタクリルアミド]での修飾を提案している。したがって、Read et al. (2005, 上掲)では、ポリプレックスの凝集および血清タンパク質に対するポリカチオン性タンパク質の結合の抑制が達成されなかった。さらに、大過剰のポリマー(これは高いN/P比を特徴とする)のため、核酸と複合体形成する場合に強力な複合体が形成され、これは、塩誘導性凝集および血清内容物との相互作用(オプソニン化)の傾向が強いためインビボでの有用性は限定的にすぎない。さらに、このような複合体は、遺伝子療法の目的で使用した場合、急性免疫応答を刺激する場合があります。Neither did Read et al. (2003, 上掲)は、この刊行物に示したRPCベースの複合体のインビボデータを示している。このような強力なRPCベースの複合体は、真皮内への局所投与後、完全に不活性になることがわかっている。さらに、Read et al. (2005, 上掲)では、核酸カーゴの完全な複合体化を確実にするためにできるだけ長い鎖長を有する高分子量ポリマーの生成(「段階成長重合」)を誘導するため、ストリンジェントな酸化条件(30% DMSO)が使用された。

【0016】

Read et al. と同様のアプローチにおいて、McKenzie et al. (McKenzie, D. L., K. Y. Kwok, et al. (2000), J Biol Chem 275(14): 9970-7, McKenzie, D. L., E. Smiley, et al. (2000), Bioconjug Chem 11(6): 901-9およびUS 6,770,740 B1)により、高分子量ポリカチオンで観察される毒性を低下させる目的で複数のシステインを短鎖合成ペプチド内に挿入することによって、遺伝子送達剤としての自己架橋性ペプチドが開発された。DNAの複合体化のため、自己架橋性ペプチドをDNAと混合し、ペプチド間ジスルフィド結合の誘導と並行してDNAカーゴの複合体化を行った。インビボ遺伝子送達アプローチのため、彼らは、自己架橋性ペプチドを、各末端から遠位の部位で該ペプチドに作動可能に結合させるステルス性の(stealth)薬剤(例えば、ポリエチレングリコール)または標的化剤で誘導体化することを提案している。さらなるアプローチの一例では、同じ著者により、DNAペプチド縮合物のマスキング、およびそれによる血液成分との相互作用の低減の目的のために、還元性または非還元性の結合によるポリエチレングリコールでの非架橋性ペプチドCWK18の誘導体化が開発された(Kwok, K. Y., D. L. McKenzie, et al. (1999). "Formulation of highly soluble poly(ethylene glycol)-peptide DNA condensates." J Pharm Sci 88(10): 996-1003.)。

【0017】

上記のことを要約すると、上記に例示した現在の先行技術は種々の不都合点をもっている。Read et al. (2003, 上掲)またはMcKenzie et al. (

10

20

30

40

50

2000 IおよびII, 上掲ならびにUS 6, 770, 740 B1) に報告された自己架橋性ペプチドの具体的な不都合点の1つは、形成される粒子の表面上の高い正電荷に関するものである。この電荷のため、該粒子は、このような粒子がインビボで高い塩濃度には供されると凝集に対して高い不安定性を示す。しかしながら、かかる塩濃度は、インビボで細胞内または細胞外の培地中に典型的に存在する。さらに、高い正電荷を有する複合体は強いオプソニン化傾向を示す。これにより、マクロファージによる取込みの向上、および分解による複合体の高速不活化がもたらされる。特に、このような複合体が免疫系の細胞によって取り込まれると、一般的には、下流でいろいろなサイトカインの刺激がもたらされる。しかしながら、自然免疫系のこの非特異的活性化は、このような系の大変な不都合点であり、特に、急性免疫応答(サイトカインストーム)が厳格に回避されるべきであるいくつかの態様の遺伝子療法の目的のためには回避されるべきである。さらに、生物学的系では、正電荷を有する複合体は、細胞外マトリックスまたは血清の負電荷を有する成分に容易に結合し得る、または固定化され得る。また、複合体内の核酸の放出が早すぎる場合があり、導入効率および複合体のインビボ半減期の低下がもたらされる場合があり得る。さらに、インビボ遺伝子送達に好都合であるステルス性薬剤、例えばポリエチレングリコール(PEG)での担体の可逆的誘導体化は、ペプチドモノマーでのみ可能であったが、自己架橋性ペプチド、もっと言うと規定のポリマー鎖長を有する高分子担体で可能ではなかった。特に、かかる可逆的誘導体化は、架橋型のカチオン性ペプチド担体の末端部では可能ではなかった。さらに、先行技術では、長いポリマー鎖を有するか、または自己架橋性ペプチドからなる不明確なポリマー鎖長を有する高分子量ポリマーのみが報告されており、これは、残念ながら、そのカーゴのコンパクト化が細胞内でのカーゴの放出が限定的であるような程度である。極端に不明確なポリマー鎖長は、RPCを主体とする医薬の規制機関による承認に関してさらに問題となる。かかる承認のための必須条件は、医薬のどの調製物も同じ組成、同じ構造および同じ特性を有することである。これは、先行技術のRPCを主体とする複合体では確保され得ない。さらに、先行技術において提供されるRPCベースのポリマーまたは複合体は、その不明確な構造またはポリマー鎖長のため特性評価することが困難である。

10

20

【0018】

結果として、遺伝子療法および他の治療用途の目的のための核酸のコンパクト化と安定化の両方を可能にし、良好なトランスフェクション活性を核酸カーゴの良好な放出(特にインビボで)との組合せで示し、例えば自己架橋性ポリマーによる可逆的ステルス性および核酸の可逆的複合体化の組合せによる毒性が低いか、またはさらには無い一般的に適用可能な方法または担体は今日まで提示されていない。したがって、当該技術分野において、遺伝子導入の目的のための改善された担体であって、そのカーゴが代謝的に切断される前に標的に運ばれるのに十分に安定であるとともに、それでもなお、蓄積されて毒性レベルに達し得る前に組織から一掃される担体が提供される必要性が依然として存在している。

30

【0019】

したがって、本発明の基礎をなす目的は、特に治療用途または予防用途のための核酸の送達のための担体であって、核酸をコンパクト化することができ、そのインビトロでのいろいろな細胞株内への効率的な導入が可能であるが、インビボのトランスフェクションもまた可能にする担体を提供することである。細胞による取込みはエンドソーム経路によって行われるため、かかる担体または複合体化剤はまた、エンドソームからの核酸の効率的な放出を可能にするか、またはもたらすものであるのがよい。さらなる目的は、核酸と複合体化したら凝集に対する抵抗性を示す担体を提供することである。またさらなる目的は、核酸カーゴに対して血清含有培地に対する向上した安定性をもたらすことである。別の目的は、強力な急性免疫反応がない効率的なインビボ活性を可能にすることである。さらなる目的は、例えば本明細書において上記のような、核酸送達のための既知の担体の任意の不都合点または制限を解決することである。本発明が対処するさらなる目的は、以下の説明、実施例および本特許の特許請求の範囲に基づいて明らかとなる。

40

これらの目的は、本特許の特許請求の範囲に示される本発明の主題によって解決される。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0020】

【文献】米国特許第6,770,740B1号明細書

【非特許文献】

【0021】

(非特許文献1) Foerg and Merkle, Journal of Pharmaceutical Sciences (www.interscience.wiley.comでオンライン公開), 2008, 97(1): 144-62

(非特許文献2) Gao, X., K.S. Kim, et al. (2007), AAPS J 9(1): E92-104 10

(非特許文献3) Martin, M.E. and K.G. Rice (2007), AAPS J 9(1): E18-29

(非特許文献4) Gao et al. The AAPS Journal 2007; 9(1) Article 9

(非特許文献5) Vives, E., P. Brodin, et al. (1997); A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. J Biol Chem 272(25): 16010-7 20

(非特許文献6) MartinおよびRice, The AAPS Journal 2007; 9(1) Article 3)

(非特許文献7) Read, M.L., K.H. Bremner, et al. (2003): Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. J Gene Med 5(3): 232-45

(非特許文献8) Read, M.L., S. Singh, et al. (2005): A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids. Nucleic Acids Res 33(9): e86 30

(非特許文献9) McKenzie, D.L., K.Y. Kwok, et al. (2000), J Biol Chem 275(14): 9970-7

(非特許文献10) McKenzie, D.L., E. Smiley, et al. (2000), Bioconjug Chem 11(6): 901-9

(非特許文献12) Kwok, K.Y., D.L. McKenzie, et al. (1999). "Formulation of highly soluble poly(ethylene glycol)-peptide DNA condensates." J Pharm Sci 88(10): 996-1003

【発明の概要】

【0022】

第1の態様において、本発明により、カチオン性のペプチドまたはポリマー、カチオン性のリピドイド(lipidoid)化合物および核酸化合物を含む組成物を提供する。該リピドイド化合物は好ましくは、2個以上のカチオン性窒素原子および少なくとも2つの親油性尾部を含む化合物である。多くの慣用的なカチオン性脂質とは対照的に、該リピドイド化合物は、加水分解性連結基、特に、加水分解性のエステル、アミドまたはカルバメート基を含む連結基がないものであり得る。該リピドイドのカチオン性窒素原子はカチオン化可能もしくは永久的にカチオン性であり得るか、または両方の型のカチオン性窒素が該化合物中に存在し得る。

【0023】

一実施形態では、該リピドイド化合物が、式I

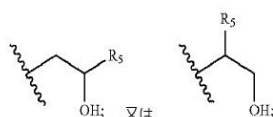
40

50

$$\text{R}_A-\text{N}(\text{R}_A)-\left(\text{CH}_2\right)_x-\text{N}(\text{R}_A)-\left(\text{CH}_2\right)_y-\text{R}_A$$

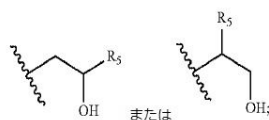
による化合物であり、

10



20

(化)



【 0 0 2 4 】

30

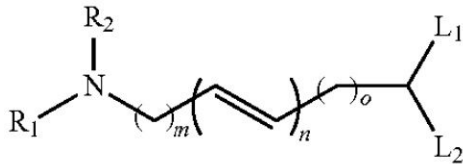
別の実施形態では、該リポイドが、式 I I a および / または式 I I b :

$$-N^+(R_3)(R_4)-CH_2-CH(R_5)-R_2 \text{ (式 I I b)}$$

40

さらなる一実施形態では、該リポイドが、式 I I I

50



(式 III)

による化合物であり、

式中、 R_1 および R_2 は各々、水素、任意選択で置換されている飽和または不飽和の $C_1 \sim C_{20}$ ヒドロカルビルおよび任意選択で置換されている飽和または不飽和の $C_6 \sim C_{20}$ アシルからなる群より独立して選択され； L_1 および L_2 は各々、任意選択で置換されている飽和または不飽和の $C_1 \sim C_{30}$ ヒドロカルビルから独立して選択され； m および o は各々、ゼロおよび任意の正の整数からなる群より独立して選択され； n は任意の正の整数である。本発明の一部の実施形態では、 R_1 、 R_2 、 L_1 および/または L_2 は各々、独立してPEG部分であるか、またはPEG部分で置換されている。

【0027】

該カチオン性のペプチドまたはポリマーは、例えば、Arg、Lys、Hisおよび/またはOrnから選択される塩基性アミノ酸を含むか、または該アミノ酸を主体とするオリゴ-またはポリペプチドであり得る。あるいはまた、これは、アミノ酸ではないモノマー単位、例えばカチオン性の多糖、ポリイミンまたはポリアクリレートを主体とするポリマーであってもよい。

【0028】

該核酸化合物は、例えば、化学修飾型および非修飾型のDNA、一本鎖もしくは二本鎖のDNA、コードもしくは非コードDNAから選択され得、任意選択で、プラスミド、(短鎖)オリゴデオキシヌクレオチド(すなわち、(短鎖)DNAオリゴヌクレオチド)、ゲノムDNA、DNAプライマー、DNAプローブ、免疫賦活性DNA、アプタマーまたはその任意の組合せから選択され得る。択一的または付加的に、かかる核酸分子は、例えば任意のPNA(ペプチド核酸)から選択され得る。さらに択一的または付加的に、また、特に好ましい一実施形態によれば、該核酸は、化学修飾型および非修飾型のRNA、一本鎖もしくは二本鎖のRNA、コードもしくは非コードRNAから選択され、任意選択で、メッセンジャーRNA(mRNA)、(短鎖)オリゴリボヌクレオチド(すなわち、(短鎖)RNAオリゴヌクレオチド)、ウイルスRNA、レプリコンRNA、トランスファーRNA(tRNA)、リボソームRNA(rRNA)、免疫賦活性RNA(isRNA)、マイクロRNA、低分子干渉RNA(siRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、もしくはリボスイッチ、RNAアプタマー、RNAデコイ、アンチセンスRNA、リボザイムまたはその任意の組合せから選択される。好ましくは、該複合体の核酸分子はRNAである。より好ましくは、該複合体の核酸分子は(線状の)一本鎖RNA、さらにより好ましくはmRNAまたは免疫賦活性RNAである。

【0029】

該組成物は、さらに、リポイドの含有量がカチオン性のペプチドもしくはポリマーの量または核酸の量と比べて相対的に少ないことを特徴とするものであり得る。一実施形態では、核酸化合物に対するカチオン性のペプチドまたはポリマーの重量比が少なくとも約1であり、核酸化合物に対するリポイドの割合が約15nmol以下/ μ gである。別の実施形態では、カチオン性のペプチドまたはポリマーに対するリポイドの重量比が約1:50より大きくない、および/またはカチオン性のペプチドまたはポリマーに対するリポイドの割合が約2nmol以下/ μ gである。

【0030】

さらなる一態様では、本発明により、該カチオン性のペプチドまたはポリマー、該リポイドおよび該核酸化合物を含む、例えば複合体の形態のナノ粒子を提供する。

【 0 0 3 1 】

さらなる一態様では、本発明により、かかるナノ粒子または複数のかかるナノ粒子を含む組成物を提供する。該組成物は、例えば、滅菌された液状分散体または滅菌された固形組成物として、例えば、水性液状担体を用いて再構成するための粉末剤または凍結乾燥形態として製剤化され得る。

【 0 0 3 2 】

またさらなる一態様では、本発明により、上記に規定した組成物を調製するためのキットを提供する。例えば、キットは、該カチオン性のペプチドまたはポリマーおよび/または該リピドイドを含む第1のキット構成要素；または該核酸化合物を含む第2のキット構成要素を備えたものであり得る。

10

【 0 0 3 3 】

またさらなる一態様では、本発明は、上記の任意の態様による組成物、ナノ粒子またはキットの医学的使用に関するものである。医学的使用には、例えば、がんまたは腫瘍疾患、感染性疾患、好ましくは（ウイルスによる、細菌による、または原生動物学的）感染性疾患、自己免疫疾患、アレルギーまたはアレルギー性疾患、単因子遺伝性（*monogenic*）疾患、すなわち、（遺伝性）疾患、または遺伝病一般、遺伝的に継承された背景を有し、典型的には明確な遺伝子欠陥によって引き起こされてメンデルの法則に従って継承される疾患、心血管疾患、ニューロン病、呼吸器系の疾患、消化器系の疾患、皮膚の疾患、筋骨格系障害、結合組織の障害、新生物、免疫不全症、内分泌疾患、栄養上の疾患および代謝病、目の疾患、耳の疾患ならびにペプチドまたはタンパク質の欠損と関連している疾患から選択される疾患の予防、処置および/または寛解が含まれ得る。

20

【 0 0 3 4 】

本発明は、生物学的に活性なカーゴ物質、例えば核酸の特定の組織または標的細胞への送達、カチオン性のペプチドまたはポリマーとリピドイドを合わせたビヒクルを使用することで、該カーゴ物質が細胞によって有効に取り込まれるとともに、通常リピドイドに伴う毒性が実質的に低減されることにより実質的に改善され得るという知見に基づいたものである。

【 0 0 3 5 】

本発明のさらなる目的、態様、有用な実施形態、用途、有益な効果および利点は、以下の詳細説明、実施例および特許請求の範囲に基づいて明らかとなる。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 6 】

【図1A】図1Aは、インビトロでのS o l 8 筋肉細胞における本発明のポリマー - 脂質またはポリマー - リピドイド製剤のトランスフェクション効率に対する効果を示す。トランスフェクション実験はすべて三連で、G p L u c m R N A（配列番号：12）をカーゴとして用いて行った。さらに、陰性対照（バッファー、パッシブパルシング）も含めている。本発明のポリマー - 脂質またはポリマー - リピドイドトランスフェクション試薬に加えて、ポリマーのみを比較のために、トランスフェクション試薬の使用なしの純粋なG p L u c m R N A（本明細書においてR 2 8 5 1とも表示）とともに使用した。

【図1B】図1Bは、インビトロでのS o l 8 筋肉細胞における本発明のポリマー - 脂質またはポリマー - リピドイド製剤のトランスフェクション効率に対する効果を示す。トランスフェクション実験はすべて三連で、G p L u c m R N A（配列番号：12）をカーゴとして用いて行った。さらに、陰性対照（バッファー、パッシブパルシング）も含めている。本発明のポリマー - 脂質またはポリマー - リピドイドトランスフェクション試薬に加えて、ポリマーのみを比較のために、トランスフェクション試薬の使用なしの純粋なG p L u c m R N A（本明細書においてR 2 8 5 1とも表示）とともに使用した。

40

【図1C】図1Cは、インビトロでのS o l 8 筋肉細胞における本発明のポリマー - 脂質またはポリマー - リピドイド製剤のトランスフェクション効率に対する効果を示す。トランスフェクション実験はすべて三連で、G p L u c m R N A（配列番号：12）をカーゴとして用いて行った。さらに、陰性対照（バッファー、パッシブパルシング）も含めて

50

いる。本発明のポリマー - 脂質またはポリマー - リピドイドトランスフェクション試薬に加えて、ポリマーのみを比較のために、トランスフェクション試薬の使用なしの純粋な G p L u c m R N A (本明細書において R 2 8 5 1 と表示) とともに使用した。

【図 2 A】同様に、図 2 A は、インビトロでの H e p G 2 細胞における m R N A の本発明のポリマー - リピドイド製剤のトランスフェクション効率に対する効果を示す。特に、カチオン化可能な 3 - C 1 2 および 3 - C 1 2 - O H ならびに永久的にカチオン性の 3 - C 1 2 - O H - c a t を比較した。さらなる詳細については実施例 3 を参照されたい。

【図 2 B】同様に、図 2 B は、インビトロでの H e p G 2 細胞における m R N A の本発明のポリマー - リピドイド製剤のトランスフェクション効率に対する効果を示す。特に、カチオン化可能な 3 - C 1 2 および 3 - C 1 2 - O H ならびに永久的にカチオン性の 3 - C 1 2 - O H - c a t を比較した。さらなる詳細については実施例 3 を参照されたい。

10

【図 3】図 3 は、いろいろなポリマー - 脂質またはリピドイド複合体化 G p L u c m R N A での処理後のヒト末梢血単核細胞 (P B M C) におけるサイトカインインターフェロン (I N F a) のインビトロ放出を示す。さらなる詳細については実施例 4 を参照されたい。

【図 4】図 4 は、本発明のポリマー - 脂質またはポリマー - リピドイド製剤の網膜下注射後 2 4 時間目の、ラットの目への P p L u c m R N A (配列番号: 1 9) の網膜下注射の走査レーザー検眼鏡 (S L O) 解析の結果を示し、相対発光量 (R L U) で表示している。注射レジメンおよびさらなる詳細については実施例 5 を参照されたい。

【図 5】図 5 は、H A - m R N A の本発明のポリマー - リピドイド製剤を用いた H A - m R N A (R 2 5 6 4 , 配列番号: 1 7) または「裸の」H A - m R N A 単独での B a l b / c マウス (n = 8) の筋肉内ワクチン接種後に誘導された H A タンパク質 (ヘマグルチニン) に対する抗体の力価を示す。各点は個々の動物を表し、横線は中央値を表す。さらなる詳細については実施例 6 を参照されたい。

20

【図 6】図 6 は、非 C V C M / P B 8 3 ポリマーを用いた m R N A 構築物 R 2 8 5 1 でトランスフェクトした A 5 4 9 細胞における G p L u c タンパク質発現を示す。

【図 7 A】図 7 A は、非 C V C M / P B 8 3 ポリマーを用いた m R N A 構築物 R 2 8 5 1 でトランスフェクトした B H K 細胞および分化 S o l 8 細胞における G p L u c タンパク質発現を示す。

【図 7 B】図 7 B は、非 C V C M / P B 8 3 ポリマーを用いた m R N A 構築物 R 2 8 5 1 でトランスフェクトした B H K 細胞および分化 S o l 8 細胞における G p L u c タンパク質発現を示す。

30

【図 7 C】図 7 C は、非 C V C M / P B 8 3 ポリマーを用いた m R N A 構築物 R 2 2 4 4 でトランスフェクトした H e L a 細胞における P p L u c タンパク質発現を示す。

【図 8】図 8 は、m R N A 構築物 R 2 8 5 1 でトランスフェクトした H e p G 2 細胞における G p L u c タンパク質発現を示す。

【図 9】図 9 は、硝子体内注射の際の P p L u c タンパク質発現を示す。

【図 1 0】図 1 0 は、いろいろなポリマー / 脂質組成物を用いて製剤化した m R N A 構築物 R 2 8 5 1 でトランスフェクトした A 5 4 9 細胞における G p L u c タンパク質発現を示す。

40

【図 1 1 A】図 1 1 A は、ペグ化脂質を用いて製剤化した m R N A 構築物 R 2 8 5 1 でトランスフェクトした A 5 4 9 細胞における G p L u c タンパク質発現を示す。

【図 1 1 B】図 1 1 B は、ペグ化脂質を用いて製剤化した m R N A 構築物 R 2 8 5 1 でトランスフェクトした A 5 4 9 細胞における G p L u c タンパク質発現を示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 7】

発明の詳細な説明

特に定義していない限り、または具体的な状況においてそうでないことが必要とされない限り、本明細書で用いる技術用語はすべて、該当する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

50

【0038】

本文中においてそうでないことが示されていない、または必要とされない限り、“comprise(～を含む)”、“comprises”および“comprising”という語ならびに類似表現は、本説明および特許請求の範囲において包含的および包括的な意味で、“including、but not limited to(限定されないが、～を含む)”と解釈されたい。

【0039】

表現「一実施形態(“one embodiment”、“an embodiment”)」、「具体的な一実施形態」などは、特定の特色、特性もしくは特徴、または特色、特性もしくは特徴の特定の群もしくは組合せ(それぞれの表現の組合せで言及されている場合)が本発明の実施形態の少なくとも1つに存在していることを意味する。本説明全体の種々の箇所におけるこのような表現の存在は必ずしも同じ実施形態に言及しているのではない。さらに、該特定の特色、特性または特徴は、1つ以上の実施形態において任意の適当な様式で合わされていてもよい。

10

【0040】

単数形“a”、“an”および“the”は、本文中にそうでないことを明示していない限り、複数に対する言及を包含していると理解されたい。

【0041】

数に関するパーセンテージは、それぞれの対象物の総数に対するものであると理解されたい。他の場合では、本文中に特に記載のない限り、パーセンテージは重量基準のパーセンテージ(wt.-%)であると理解されたい。

20

【0042】

第1の態様において、本発明により、カチオン性のペプチドまたはポリマー、カチオン性のリピド化合物および核酸化合物を含む組成物を提供する。

【0043】

本発明との関連において、「組成物」は、明記された成分が、任意選択で任意のさらなる構成成分とともに組み込まれたものであり得る任意の型の組成物をいう。したがって、組成物は、乾燥組成物、例えば粉末もしくは顆粒、または固形単位、例えば凍結乾燥形態もしくは錠剤であり得る。あるいはまた、組成物は液状形態であってもよく、各構成成分が、溶解または分散された(例えば、懸濁もしくは乳化された)形態で独立して組み込まれたものであり得る。好ましい実施形態の一例では、組成物は、滅菌された固形組成物、例えば、水性液状担体を用いて再構成するための粉末剤または凍結乾燥形態として製剤化される。また、かかる製剤は、以下にさらに詳細に説明する核酸カーゴを含むバージョンの組成物にも好ましい。

30

【0044】

本明細書で用いる場合、「化合物」は、本質的に同じ化学構造および特性を有する分子からなる物質である化学物質を意味する。より小さい分子化合物では、該分子は典型的には、原子組成および構造的配置に関して同一である。高分子化合物またはポリマー化合物では、化合物の分子は非常に類似しているが、必ずしもそのすべてが同一というわけではない。例えば、50個のモノマー単位からなると表記されているポリマーセグメントは、例えば48個または53個のモノマー単位を有する個々の分子もまた含むものであり得る。

40

【0045】

本明細書で用いる場合、ペプチドは、ペプチド結合またはアミド結合によって連結された複数のアミノ酸モノマーを含む化合物である。また、ペプチドのサイズに応じて、これはオリゴペプチドまたはポリペプチドと称される場合もあり得る。原則的に、タンパク質はポリペプチドでもある。

【0046】

ポリマーは、本発明との関連において、分子が複数の反復サブユニットで構成された化合物である。ポリマーは、異なるサブユニットを主体とするもの、例えばコポリマーであってもよい。

50

【 0 0 4 7 】

リピドイド化合物（単にリピドイドとも称する）は脂質様化合物、すなわち脂質様の物性を有する両親媒性化合物である。リピドイド化合物は好ましくは、2個以上のカチオン性窒素原子および少なくとも2つの親油性尾部を含む化合物である。多くの慣用的なカチオン性脂質とは対照的に、該リピドイド化合物は、加水分解性連結基、特に、加水分解性のエステル、アミドまたはカルバメート基を含む連結基がないものであり得る。該リピドイドのカチオン性窒素原子はカチオン化可能もしくは永久的にカチオン性であり得るか、または両方の型のカチオン性窒素が該化合物中に存在し得る。

【 0 0 4 8 】

具体的な状況から異なる意味が明白でない限り、用語「カチオン性の」は、それぞれの構造が、永久的であるか、または永久的ではないが特定の条件、例えばpHに応答するかのいずれかの正電荷を有することを意味する。したがって、用語「カチオン性の」は「永久的にカチオン性の」および「カチオン化可能な」の両方を包含している。

10

【 0 0 4 9 】

本明細書で用いる場合、「永久的にカチオン性の」は、それぞれの化合物または基もしくは原子が、その環境の任意のpH値または水素イオン活性において正電荷を有することを意味する。典型的には、正電荷は第4級窒素原子の存在の結果によるものである。化合物が複数のかかる正電荷を担持している場合、これを永久的にポリカチオン性（これは永久的にカチオン性のサブカテゴリーである）と称する場合があり得る。

【 0 0 5 0 】

これとの関連において、接頭語「ポリ - 」は、化合物内のそれぞれの特性を有する複数の原子または基をいう。丸括弧内に記載の場合、複数の存在は任意選択である。例えば、（ポリ）カチオン性はカチオン性および/またはポリカチオン性を意味する。しかしながら、接頭語がないことは、例えば複数を排除していると解釈されるべきでない。例えば、ポリカチオン性化合物とはカチオン性化合物でもあり、これに言及している場合があり得る。

20

【 0 0 5 1 】

「カチオン化可能な」とは、化合物または基もしくは原子が、その環境の低pHにおいては正電荷を有し、高pHにおいては電荷を有しないことを意味する。また、pH値が測定できない非水性環境では、カチオン化可能な化合物、基または原子は、高水素イオン濃度において正電荷を有し、水素イオンが低濃度または低活性では電荷を有しない。これは、カチオン化可能またはポリカチオン化可能な化合物の個々の特性、特に、それぞれのカチオン化可能な基または原子の pK_a （このときのpHまたは水素イオン濃度において、該基または原子は荷電または非荷電である）に依存する。希薄水性環境では、正電荷を有するカチオン化可能な化合物、基または原子の割合が、当業者によく知られたいわゆるヘンダーソン・ハッセルバルヒの式を用いて推定され得る。

30

【 0 0 5 2 】

例えば、化合物または部分がカチオン化可能である場合、これは、約1～9、好ましくは4～9、5～8またはさらには6～8のpH値、より好ましくは9未満、8未満、7未満のpH値、最も好ましくは生理学的pH値、例えば約7.3～7.4、すなわち生理学的条件下、特にインビボ細胞の生理学的塩条件下において正電荷を有することが好ましい。

40

【 0 0 5 3 】

具体的な状況から異なる意味が明白でない限り、「カチオン化されている」とは、典型的には、カチオン化可能な構造が、例えば中性の生理学的環境における塩基性アミノ酸、例えばアルギニンの場合のように、実際に正電荷を有しているという状態であることを意味する。

【 0 0 5 4 】

少なくとも1つのカチオン性部分Pを含むカチオン性化合物のジスルフィド結合型多量体の場合のような、化合物の「多量体」は、第1の化合物の少なくとも2つの単位を含み、その多量体である化合物であると理解されたい。これは、第1の化合物がすでに複数の

50

反復単位を含むものであるか否かに無関係である。

【 0 0 5 5 】

- S H 基はスルフヒドリル基を意味する。

【 0 0 5 6 】

本発明は、リピドイドとカチオン性のペプチドまたはポリマーの組合せが複合体形成および細胞内への核酸の送達において、予想外の度合の耐容性で非常に有効であるという知見に基づいたものである。より詳しくは、本発明者らは、かかる組合せが、細胞内にカーゴを送達するための有効性に関して担体成分（すなわち、リピドイドおよびポリマーまたはペプチド）の相加効果を示すが、毒性に関しては相加効果が全くないか、驚くほどほんの少しであることを見出した。

【 0 0 5 7 】

好都合には、該カチオン性のペプチドまたはポリマーは、そのペプチドまたはポリマー含有量をかなり多様にすることが可能であり、したがって、その生物学的／生化学的特性をかなり容易にモジュレートする可能であり、例えば、種々の型のカチオン性の、またはカチオン化可能なペプチド、タンパク質またはポリマーを組み込むことが可能であり、任意選択で他の成分、例えば他のアミノ酸成分が付加される。

【 0 0 5 8 】

また、さらに少ない量の該リピドイド（該カチオン性のペプチドもしくはポリマーの量に対して、および／または該核酸化合物に対して）で、該組成物の望ましくない効果または毒性を実質的に増大させることなく核酸カーゴの細胞送達を向上させることが可能であるという観察結果は非常に驚くべきことである。本発明は、例えばRNAの送達および細胞のトランスフェクションに提案されている、リポフレックスまたは脂質ナノ粒子に使用される脂質の典型的な量の約0.1～約10%という少ない量で実施され得る。理論に拘束されることを望まないが、本発明者らは、リピドイドがこのような少量であることが本発明の組成物の高い耐容性を得るのに極めて重要であったと思っている。

【 0 0 5 9 】

該カチオン性のペプチドまたはポリマーは、アミノ酸であってもそうでなくてもよいモノマー単位を主体とする任意の永久的にカチオン性の、またはカチオン化可能な化合物であり得る。該カチオン性のペプチドまたはポリマーは、例えば、核酸化合物と複合体を形成する能力を有することが一般に知られているカチオン性のペプチドまたはポリマーから選択され得る。

【 0 0 6 0 】

一実施形態では、該カチオン性のペプチドまたはポリマーは、プロタミン、ヌクレオリン、オリゴ-またはポリリシン、オリゴ-またはポリアルギニン、細胞膜透過ペプチド、キメラCPP、トランスポータン、MPGペプチド、HIV結合ペプチド、Tat、HIV-1 Tat、Tat由来ペプチド、ペネトラチンファミリーの構成員、ペネトラチン、Antennapedia由来ペプチド、pAntp、pIsl、抗菌薬由来CPP、ブフォリン-2、Bac715-24、SynB、SynB(1)、pVEC、hCT由来ペプチド、SAP、MAP、KALA、PpTG20、FGF、ラクトフェリン、ヒストン、VP22、VP22由来ペプチド、HSV、タンパク質形質導入ドメイン、PpT620、プロリンリッチペプチド、アルギニンリッチペプチド、リシンリッチペプチド、Pep-1、カルシトニンペプチド、-アミノ酸、逆(reversed)ポリアミド、ポリ(N-エチル-4-ビニルピリジニウムプロミド)、ポリ(ジメチルアミノエチルメチルアクリレート)、ポリ(アミドアミン)、ポリアミノエステル、ジアミン修飾型1,4-ブタンジオールジアクリレート-コ-5-アミノ-1-ペンタノールポリマー、ポリプロピルアミンデンドリマー、pAMAMベースのデンドリマー、ポリイミン、ポリ(エチレンジイミン)、ポリ(プロピレンジイミン)、ポリアリルアミン、1,5-ジメチル-1,5-ジアザウンデカメチレンポリメトプロミド、臭化ヘキサジメトリン、カチオン性多糖、カチオン性のシクロデキストリンベースのポリマー、カチオン性のデキストランベースのポリマー、キトサン、シラン主鎖ベースのポリマー、PMOXA-PDMSコポ

10

20

30

40

50

リマー、１つ以上のカチオン性ブロックと１つ以上の中性ブロックのブロックコポリマーから選択される。

【００６１】

一実施形態では、該カチオン性のペプチドまたはポリマーは天然ペプチドから選択される。天然とは、ペプチドが自然によって、すなわち生存生物によって産生されるものであることを意味する。また、もちろん、天然ペプチドは化学合成されたものであってもよいものの、それは、天然に存在しているペプチドである。任意選択で、天然ペプチドは化学修飾されていてもよい。

【００６２】

本発明の組成物に選択される天然のカチオン性ペプチドは、例えば細胞膜透過ペプチド（ＣＰＰ）群の構成員であり得る。多くのＣＰＰは、塩基性アミノ酸リッチ、例えばリシンまたはアルギニンリッチのアミノ酸組成を有する。

10

【００６３】

一実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、ＴＡＴ由来ペプチド（ＴＡＴは「転写のトランス活性化因子」を意味する）のシステイン無含有バージョンの群のもの、例えばＴＡＴまたはＨＩＶ_１-ＴＡＴ、Ｔａｔ-ＡＩＥドット（dot）、ＴＡＴ（４７～５７）、ＴＡＴ（４９～５７）、ＴＡＴ（４８～６０）、Ｒ９-ＴＡＴ、Ｔａｔ-ＧＦＰ-Ｔａｔ、Ｔａｔ-ＧＦＰ、６Ｈｉｓ-ＴＡＴ-Ａｉｎｐ１、６Ｈｉｓ-ＴＡＴ-ＧＦＰ、６×Ｈｉｓ-ＴＡＴ-ＳＯＤ、ＴＡＴ-ゲロニン（gelonin）、ｐＴａｔ、ＥＧＦＰ-ＴＡＴ、Ｔａｔ-Ｄｅｘ、Ｔａｔ-ＰＣＰ、Ｐ４２-ＴＡＴである。

20

【００６４】

別の実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、antennapedia由来ペプチド群のもの（ペネトラチンファミリーまたはpAntpとしても知られている）、例えばpAntp₄₃₋₅₈である。

【００６５】

さらなる一実施形態では、細胞膜透過ペプチドは、hCT由来ペプチド、例えばhCT₉₋₃₂、hCT₁₂₋₃₂、hCT₁₅₋₃₂、hCT₁₈₋₃₂、hCT₂₁₋₃₂から選択される。潜在的に対象のさらなる細胞膜透過ペプチド群は、ヒストン群、例えばH2AまたはH4である。

【００６６】

さらなる一実施形態によれば、細胞膜透過ペプチドは抗菌薬由来カチオン性ＣＰＰ、例えばブフォリン-２、マガイニンII、セクロピン、アンドロピン、モリシン、セラトトキシン、メリチン、ボンピニン、ブレビニン-１、エスクレチン、CAP18、LL37、Bac715-24/BAC715-24、Bac1-7、Bac1-15、Bac1-17、Bac1-24、Bac5-24、Bac7-24、Bac9-24、Bac11-24、Bac13-24、Bac15-24、SynB1、SynB3、SynB5、デルマセプチンS4、アバエシン、アピダエシン、プロフェニンまたはインドリシジンである。

30

【００６７】

任意選択で、ＣＰＰは、トランスポータンファミリーのシステイン無含有構成員である。

40

【００６８】

任意選択で、ＣＰＰはキメラペプチドまたは合成修飾ペプチド、例えばMPGペプチドファミリーの構成員、例えばMPG-NLS、EGFP-MPG、MPG、MPG；またはピオチニル-ペネトラチン、PAF26、PAF95、PAF96、CRGDK、P28、RALAペプチド、RTAT-ELPBC、GST-(HE)12EFG5-TAT、FabRev1-Tat、G3R6TAT、MAP、Pep-1、ppTG、ppTG1、ppTG20、EGFP-ppTG20；またはMPG、KLA-TAT（４７～５７）もしくはTatLK15である。

【００６９】

別の実施形態によれば、該カチオン性のペプチドまたはポリマーは、天然に存在してい

50

ることが知られていない合成ペプチドまたはオリゴ - もしくはポリ (アミノ酸) からなる群のものである。好ましい合成ペプチドは、2 ~ 約 50 個のアミノ酸残基またはより好ましくは約 5 ~ 約 30 個のアミノ酸残基で構成されており、塩基性アミノ酸リッチ、例えばアルギニン、リシン、ヒスチジン、および/またはオルニチンリッチである化合物である。好ましくは、該カチオン性のペプチドのアミノ酸残基の少なくとも約 50 % が該塩基性アミノ酸である。

【0070】

任意選択で、該カチオン性のペプチドは完全に、または大部分が特定の 1 種類の塩基性アミノ酸で構成されたもの、例えば約 5 ~ 約 30 個の Arg、Lys、His または Orn のセグメント、例えば

Arg5、Arg6、Arg7、Arg8、Arg9、Arg10、Arg11、Arg12、Arg13、Arg14、Arg15~30; Lys5、Lys6、Lys7、Lys8、Lys9、Lys10、Lys11、Lys12、Lys13、Lys14、Lys15~30; His5、His6、His7、His8、His9、His10、His11、His12、His13、His14、His15~30; または Orn5、Orn6、Orn7、Orn8、Orn9、Orn10、Orn11、Orn12、Orn13、Orn14、Orn15~30

である。

【0071】

他の有用なペプチドは、以下の例の場合のような、2 種類以上の異なる塩基性アミノ酸で構成されたものであり、この例は、配列組成を示すことを意図しており、アミノ酸残基が存在する特定の順序を指定するものではない：

Arg(4~29)Lys1、Arg(4~29)His1、Arg(4~29)Orn1、Lys(4~29)His1、Lys(4~29)Orn1、His(4~29)Orn1、Arg(3~28)Lys2、Arg(3~28)His2、Arg(3~28)Orn2、Lys(3~28)His2、Lys(3~28)Orn2、His(3~28)Orn2、Arg(2~27)Lys3、Arg(2~27)His3、Arg(2~27)Orn3、Lys(2~27)His3、Lys(2~27)Orn3、His(2~27)Orn3、Arg(1~26)Lys4、Arg(1~26)His4、Arg(1~26)Orn4、Lys(1~26)His4、Lys(1~26)Orn4、His(1~26)Orn4、Arg(3~28)Lys1His1、Arg(3~28)Lys1Orn1、Arg(3~28)His1Orn1、Arg1Lys(3~28)His1、Arg1Lys(3~28)Orn1、Lys(3~28)His1Orn1、Arg1Lys1His(3~28)、Arg1His(3~28)Orn1、Lys1His(3~28)Orn1;

Arg(2~27)Lys2His1、Arg(2~27)Lys1His2、Arg(2~27)Lys2Orn1、Arg(2~27)Lys1Orn2、Arg(2~27)His2Orn1、Arg(2~27)His1Orn2、Arg2Lys(2~27)His1、Arg1Lys(2~27)His2、Arg2Lys(2~27)Orn1、Arg1Lys(2~27)Orn2、Lys(2~27)His2Orn1、Lys(2~27)His1Orn2、Arg2Lys1His(2~27)、Arg1Lys2His(2~27)、Arg2His(2~27)Orn1、Arg1His(2~27)Orn2、Lys2His(2~27)Orn1、Lys1His(2~27)Orn2;

Arg(1~26)Lys3His1、Arg(1~26)Lys2His2、Arg(1~26)Lys1His3、Arg(1~26)Lys3Orn1、Arg(1~26)Lys2Orn2、Arg(1~26)Lys1Orn3、Arg(1~26)His3Orn1、Arg(1~26)His2Orn2、Arg(1~26)His1Orn3、Arg3Lys(1~26)His1、Arg2Lys(1~26)His2、Arg1Lys(1~26)His3、Arg3Lys(1~26)Orn1、Arg2Lys(1~26)Orn2、Arg1Lys(1~26)Orn3、Lys(1~26)His3Orn1、Lys(1~26)His2Orn2、Lys(1~26)His1Orn3、Arg3Lys1His(1~26)、Arg2Lys2His(1~26)、Arg1Lys3His(1~26)、Arg3His(1~26)Orn1、Arg2His(1~26)Orn2、Arg1His(1~26)Orn3、Lys3His(1~26)Orn1、Lys2His(1~26)Orn2、Lys1His(1~26)Orn3;

Arg(2~27)Lys1His1Orn1、Arg1Lys(2~27)His1Orn1、Arg1Lys1His(2~27)Orn1、Arg1Lys1His1Orn(2~27);

Arg(1~26)Lys2His1Orn1、Arg(1~26)Lys1His2Orn1、Arg(1~26)Lys1His1Orn2、Arg2Lys(1~26)His1Orn1、Arg1Lys(1~26)His2Orn1、Arg1Lys(1~26)His1Orn2、Arg2Lys1His(1~26)Orn1、Arg1Lys2His(1~26)Orn1、Arg1Lys1His(1~26)Orn2、Arg2Lys1His1Orn(1~26)、Arg1Lys2His1Orn(1~26)、Arg1Lys1His2Orn(1~26)。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

さらに、該カチオン性のペプチド内に、1個以上の親水性アミノ酸残基を該塩基性アミノ酸とともに組み込むことが有用であり得る。この目的に有用な親水性アミノ酸の中でも、電荷を有しない極性側鎖を有するもの、特にThr、Ser、Asnおよび/またはGlnが好ましい。かかるアミノ酸またはこのようなアミノ酸リッチの配列の組み込みにより、核酸カーゴに対するより柔軟な結合が可能になる。これにより、核酸カーゴのより有効なコンパクト化がもたらされ得、したがって、ヌクレアーゼおよび不要な脱コンパクト化に対するより良好な保護がもたらされ得る。また、担体全体において低カチオン性電荷を示す担体を提供することが可能になり、この状況では、所望の場合または必要に応じて、より良好に調整された結合特性が可能になる。

10

【 0 0 7 3 】

該カチオン性部に組み込まれる有用な部分配列の例としては、以下のもの：Ser - Thr、Thr - Ser、Ser - Ser、Thr - Thr、Ser - Thr - Ser、Thr - Ser - Thr、Ser - Ser - Ser、Thr - Thr - Thr、Ser - Thr - Ser - Thr、Thr - Ser - Thr - Ser、Ser - Ser - Ser - Ser、Thr - Thr - Thr - Thr、Gln - Asn、Asn - Gln、Gln - Gln、Asn - Asn、Gln - Asn - Gln、Asn - Gln - Asn、Gln - Gln - Gln、Asn - Asn - Asn、Gln - Asn - Gln - Asn、Asn - Gln - Asn - Gln、Gln - Gln - Gln - Gln、Asn - Asn - Asn - Asn、Ser - Asn、Asn - Ser、Ser - Ser、Asn - Asn、Ser - Asn - Ser、Asn - Ser - Asn、Ser - Ser - Ser、Asn - Asn - Asn、Ser - Asn - Ser - Asn、Asn - Ser - Asn - Ser、Ser - Ser - Ser、またはAsn - Asn - Asn - Asnなどが挙げられる。かかる配列は、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15回またはさらにはそれ以上の回数反復されていてもよく、互いに適切に結合されていてもよい。

20

【 0 0 7 4 】

任意選択で、親水性アミノ酸リッチの配列に、Ser、ThrおよびAsnの長鎖配列の構造切断体としての機能を果たし得る少なくとも1個のプロリンを含めてもよい。また、2個、3個またはそれ以上のプロリンを、特に長鎖配列に組み込んでよい。

30

【 0 0 7 5 】

さらに、該カチオン性のペプチド内に、1個以上の親油性アミノ酸、特に、Leu、Val、Ile、Ala、および/またはMetを組み込むことが有用であり得る。かかる親油性アミノ酸は、該カチオン性のペプチドと核酸カーゴが結合したら形成される複合体に関与できるものであり得る。

【 0 0 7 6 】

親油性アミノ酸の使用により、該核酸のより強いコンパクト化が可能になる。これは、該親油性アミノ酸と該核酸カーゴの特定の相互作用によって該担体（1種類または複数種）と該カーゴ間で形成される複合体のさらなる安定性がもたらされることによるものであり得る。この安定化は、ポリマー鎖同士の非共有結合性会合または架橋と同様であり得る。特に、水性環境では、この型の相互作用は典型的には強力であり、有意な効果をもたらす。

40

【 0 0 7 7 】

有用な部分配列の例としては、Leu - Val、Val - Leu、Leu - Leu、Val - Val、Leu - Val - Leu、Val - Leu - Val、Leu - Leu - Leu、Val - Val - Val、Leu - Val - Leu - Val、Val - Leu - Val - Leu、Leu - Leu - Leu - Leu、Val - Val - Val - Val、Ile - Ala、Ala - Ile、Ile - Ile、Ala - Ala、Ile - Ala - Ile、Ala - Ile - Ala、Ile - Ile - Ile、Ala - Ala - Ala、Ile - Ala - Ile - Ala、Ala - Ile - Ala - Ile、Ile - Ile - I

50

l e - I l e、A l a - A l a - A l a - A l a、M e t - A l a、A l a - M e t、M e t - M e t、A l a - A l a、M e t - A l a - M e t、A l a - M e t - A l a、M e t - M e t - M e t、A l a - A l a - A l a、M e t - A l a - M e t - A l a、A l a - M e t - A l a - M e t、またはM e t - M e t - M e t - M e tなどが挙げられる。かかる配列は、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15回またはそれ以上の回数反復されていてもよく、互いに結合されていてもよい。任意選択で、親油性アミノ酸リッチの配列に、L e u、V a l、I l e、A l aおよび/またはM e tの長鎖配列の構造切断体としての機能を果たし得る少なくとも1個のプロリンを含めてもよい。また、2個、3個またはそれ以上のプロリンを、特に長鎖配列に組み込んでもよい。

10

【0078】

該カチオン性のペプチドの特性は、その配列内に非天然アミノ酸を含めることにより、または該ペプチドの化学修飾によってさらにモジュレートされ得る。例えば、特定の化学基が導入され得る。かかる基は例えば、例えば、アミド形成（例えば、カルボン酸、スルホン酸、アミンなどとの反応による）によって、マイケル付加（例えば、マレインイミド（maleinimide）部分、
、不飽和（unsaturated）カルボニルなどを使用）によって、クリックケミストリー（例えば、アジドもしくはアルキンを使用）によって、アルケン/アルキンのメタセシス（metathesis）（例えば、アルケンもしくはアルキンを使用）、イミンもしくはヒドロゾン（hydrozone）の形成（アルデヒドもしくはケトン、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、アミンを使用）、複合体

20

【0079】

別の実施形態では、該カチオン性のペプチドまたはポリマーは、天然、合成または半合成のポリマーから選択される。好ましくは、該ポリマーは、約0.5 kDa～約20 kDa、例えば、それぞれ約0.5 kDa～約11.5 kDa、または約1 kDa～約10 kDa、または約0.1 kDa～約8 kDa、または約0.1 kDa～約6 kDa、または約0.1 kDa～約5 kDa、または約0.5 kDa～約5 kDa、または約0.3 kDa～約20 kDa、または約0.3 kDa～約10 kDa、または約0.4 kDa～約10 kDa、または約0.5 kDa～約10 kDa、または約0.5 kDa～約7.5 kDa、または約0.5 kDa～約4 kDa、または約0.5 kDa～約3 kDa、または約0.67 kDa～約2.7 kDaの分子量を示すものである。

30

【0080】

一実施形態では、該カチオン性のポリマーは任意選択で修飾されているポリアクリレート、キトサン、ポリエチレンイミン、ポリアミン、ポリアミノエステルもしくはポリアミドアミンまたはその任意のコポリマーである。

【0081】

具体的な好ましいカチオン性のポリマーとしては、例えば、修飾ポリアミノ酸、例えば - アミノ酸 - ポリマーもしくは逆ポリアミド；修飾ポリエチレン、例えば（ポリ（N - エチル - 4 - ビニルピリジニウムプロミド））（PEVP）など；修飾アクリレート、例えば（ポリ（ジメチルアミノエチルメチルアクリレート））（pDMAEMA）など；修飾アミドアミン、例えば（ポリ（アミドアミン））（pAMAM）など；修飾ポリ アミノエステル（PBAE）、例えばジアミン末端修飾1,4ブタンジオールジアクリレート - コ - 5 - アミノ - 1 - ペンタノールポリマーなど；デンドリマー、例えばポリプロピルアミンデンドリマーもしくはpAMAMベースのデンドリマーなど；ポリイミン（1種類もしくは複数種）、例えばポリ（エチレンイミン）（PEIあるいはpEI）、ポリ（プロピレンイミン）など；ポリアリルアミン、（1,5 - ジメチル - 1,5 - ジアザウンデ

40

50

カメチレンポリメトブロミド、または臭化ヘキサジメトリンが挙げられる。

【 0 0 8 2 】

また、カチオン性多糖、すなわち、糖主鎖ベースのポリマー、例えばシクロデキストリンベースのポリマー、デキストランベースのポリマー、キトサンなど；シラン主鎖ベースのポリマー、例えば P M O X A - P D M S コポリマーなど；ならびに 1 個以上のカチオン性ブロック（例えば、上記のカチオン性のポリマーから選択されるもの）と 1 個以上の親水性または疎水性のブロック（例えば、ポリエチレングリコール）の組合せからなるブロックポリマーも好ましい。

【 0 0 8 3 】

好ましい実施形態の一例では、該カチオン性のペプチドまたはポリマーは、ジスルフィド結合を形成し得る少なくとも 1 個の - S H 基を有する少なくとも 1 つのカチオン性部分 P またはそのジスルフィド結合型多量体を含むカチオン性化合物であり、ここで、部分 P は、約 0 . 5 k D a ~ 約 3 0 k D a の分子量を有するポリマー部分または約 3 ~ 約 1 0 0 個のアミノ酸で構成されたペプチド部分（ここで、該ペプチド部分のアミノ酸の総数の少なくとも 1 0 % はアルギニン（ A r g ）、リシン（ L y s ）、ヒスチジン（ H i s ）および / またはオルニチン（ O r n ）から選択される塩基性アミノ酸である）のいずれかである。

10

【 0 0 8 4 】

一実施形態では、該カチオン性化合物のカチオン性部分 P は 3 ~ 1 0 0 個のアミノ酸で構成されたペプチド部分であり、ここで、該ペプチド部分のアミノ酸の総数の少なくとも 1 0 % は、 A r g 、 L y s 、 H i s および / または O r n から選択される塩基性アミノ酸である。かかるペプチドの例は例えば W O 2 0 1 2 / 0 1 3 3 2 6 に開示されており、その開示内容はその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【 0 0 8 5 】

これとの関連において、「塩基性アミノ酸」は生理学的環境においてカチオン化されるアミノ酸、あるいは、より厳密には、その分子の大部分が、比較的中性 p H、例えば細胞外体液の生理学的 p H で正味の正電荷を有するアミノ酸である。これは A r g 、 L y s 、 H i s および O r n の場合である。

【 0 0 8 6 】

P がペプチド部分である場合、P の「ジスルフィド結合型多量体」は、少なくとも 2 分子のペプチド P 間の少なくとも 1 つのジスルフィド結合の形成の結果、生じるペプチドまたはタンパク質を意味する。例えば、2 分子のペプチド P は、例えば長鎖のペプチド鎖を形成するために 1 つのジスルフィド結合によって連結させてもよく；または例えば、ジスルフィド結合の形成に関与する - S H 基の位置に応じて環式ペプチド、長鎖ペプチド鎖またはさらに別の構造を形成するために 2 つのジスルフィド結合によって連結させてもよい。また、2 つより多くのペプチド P によるジスルフィド結合型多量体は、P の性質および形成されたジスルフィド結合に応じて種々の異なる形状を有し得る。組成物が 2 種類以上の異なるペプチド P を含む場合、該多量体は、同一の分子間または異なる分子間のジスルフィド結合の結果、生じるものとなり得る。

30

【 0 0 8 7 】

好ましくは、部分 P として選択されるペプチド部分は、約 3 ~ 約 5 0 個のアミノ酸、より好ましくは約 7 ~ 約 3 0 個のアミノ酸または約 3 ~ 約 2 5 個のアミノ酸の長さを有するものである。また、約 3 ~ 約 2 0 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 2 0 個のアミノ酸、または約 7 ~ 約 3 0 個のアミノ酸、または約 6 ~ 約 1 8 個のアミノ酸、または約 7 ~ 約 1 7 個のアミノ酸、例えば約 5 ~ 約 1 5 個のアミノ酸の範囲の長さも好ましい。

40

【 0 0 8 8 】

典型的には、部分 P として選択されるペプチド部分は、約 0 . 3 k D a ~ 約 5 0 k D a 、特に、約 0 . 5 k D a ~ 約 3 0 k D a 、または約 0 . 6 k D a ~ 約 1 0 k D a 、または約 0 . 8 k D a ~ 約 5 k D a 、例えば約 1 k D a ~ 約 3 k D a の範囲の分子量を有するものである。

50

【 0 0 8 9 】

かかるペプチド部分の - S H 基 (1 個または複数) は、 P であるペプチド配列内の任意のアミノ酸残基の化学修飾によって、アミノ酸ではないがスルフヒドリル基を含む構造単位の組込みによって、および / またはかかる - S H 基を含む 1 個以上のアミノ酸、例えばシステイン (C y s) によってもたらされ得る。好ましい実施形態の一例では、 P であるペプチド部分の - S H 基のうちの少なくとも 1 個が C y s によってもたらされる。別の実施形態では、 P の実質的にすべての - S H 基が C y s 残基によってもたらされる。例えば、 P は、 C y s によってもたらされた 1 個の - S H 基を含むものであってもよく、ともに C y s によってもたらされた 2 個の - S H 基を備えているものであってもよい。

【 0 0 9 0 】

好ましいさらなる一実施形態では、部分 P は、 7 ~ 3 0 個のアミノ酸で構成されており、該少なくとも 1 個の - S H 基が C y s 残基によりもたらされたものであるペプチド部分である。また、この実施形態において、 1 個または 2 個の - S H 基を含み、その - S H 基の各々が C y s によってもたらされたものであるペプチド部分も好ましい。さらに、かかるペプチド部分は、例えば線状ペプチド配列の場合のように 2 つの末端部を有するものであってもよく、 C y s 残基が該末端部のうちの 1 つまたはその付近に位置し得る。また、 2 つの末端部および少なくとも 2 個の C y s 残基を有し、該 C y s 残基のうちの少なくとも 1 つが該末端部の各々もしくはその付近に位置するかかるペプチド部分も好ましい。

【 0 0 9 1 】

P として選択されるペプチド部分内の塩基性アミノ酸の含有量は該ペプチド配列のアミノ酸の総数の少なくとも 1 0 %、好ましくはそれより多い、例えば、それぞれ少なくとも約 2 0 %、または少なくとも約 3 0 %、または少なくとも約 4 0 %、または少なくとも約 5 0 %、または少なくとも約 6 0 %、または少なくとも約 7 0 % である。また、塩基性アミノ酸の含有量は、ペプチドの長さに鑑みて、該ペプチドは典型的には、ジスルフィド結合を形成し得る - S H 基を有する少なくとも 1 個、より好ましくは少なくとも 2 個の残基、例えばシステイン残基または例えば - S H 基を有するように修飾された他のアミノ酸の組込みも必要とするということを考慮して選択され得る。好ましい実施形態の一例では、該ペプチド内の塩基性アミノ酸の数は、該ペプチドのアミノ酸の総数より 2 ~ 5 個少ない、特に、該アミノ酸総数より 2 ~ 4 個少ない、例えば P のアミノ酸総数より 2 個または 3 個少ない。特定の一実施形態では、該ペプチドは、 2 個の C y s と、それ以外は塩基性アミノ酸のみで構成されている。

【 0 0 9 2 】

P として選択されるペプチド部分は、塩基性アミノ酸リッチである既知のペプチドまたはタンパク質に由来するコア配列を含むものであってもよい。これとの関連において、「由来する」とは、 P が、由来する該既知のペプチドには存在しないさらなるアミノ酸、例えば、ジスルフィド結合の形成能に必要とされるもの、例えば C y s を含んでもよいことを意味する。塩基性アミノ酸リッチのかかる既知のペプチドの例としては、プロタミン、ヌクレオリン、スペルミンまたはスペルミジン、オリゴ - またはポリ - L - リシン (P L L)、塩基性ポリペプチド、オリゴ - またはポリアルギニン、細胞膜透過ペプチド (C P P)、キメラ C P P、例えばトランスポータン、または M P G ペプチド、 H I V 結合ペプチド、 T a t、 H I V - 1 T a t (H I V)、 T a t 由来ペプチド、ペネトラチンファミリーの構成員、例えば、ペネトラチン、 A n t e n n a p e d i a 由来ペプチド (特に、 D r o s o p h i l a a n t e n n a p e d i a のもの)、 p A n t p、 p I s l など、抗菌薬由来 C P P、例えば、ブフォリン - 2、 B a c 7 1 5 - 2 4、 S y n B、 S y n B (1)、 p V E C、 h C T 由来ペプチド、 S A P、 P p T G 2 0、 F G F、ラクトフェリン、ヒストン、 V P 2 2 由来またはアナログペプチド、 H S V、 V P 2 2 (単純ヘルペス)、 M A P、 K A L A またはタンパク質形質導入ドメイン (P T D、 P p T 6 2 0、プロリンリッチペプチド、アルギニンリッチペプチド、リシンリッチペプチド、 P e p - 1、 L - オリゴマー、カルシトニンペプチド (1 種類もしくは複数種) が挙げられる。

【 0 0 9 3 】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態の一部のものでは、Pとして選択されるペプチド部分が、完全に、または大部分が特定の1種類の塩基性アミノ酸で構成されたコア配列、例えば約5～約30個のArg、Lys、HisまたはOrnのセグメント、例えば

Arg₅, Arg₆, Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₁₀, Arg₁₁, Arg₁₂, Arg₁₃, Arg₁₄, Arg_{15~30}; Lys₅, Lys₆, Lys₇, Lys₈, Lys₉, Lys₁₀, Lys₁₁, Lys₁₂, Lys₁₃, Lys₁₄, Lys_{15~30}; His₅, His₆, His₇, His₈, His₉, His₁₀, His₁₁, His₁₂, His₁₃, His₁₄, His_{15~30}; または Orn₅, Orn₆, Orn₇, Orn₈, Orn₉, Orn₁₀, Orn₁₁, Orn₁₂, Orn₁₃, Orn₁₄, Orn_{15~30}

を含むものである。

【0094】

表現「コア配列」は、1個以上のさらなるアミノ酸、特に-SH基を示すアミノ酸、例えばシステインがそれぞれのコア配列外のペプチド内に存在していてもよいことを意味する。他の有用なコア配列は、以下の例の場合のような、2種類以上の異なる塩基性アミノ酸で構成されたものであり、この例は、配列組成を示すことを意図しており、アミノ酸が存在する特定の順序を指定するものではない：

Arg(4~29)Lys₁, Arg(4~29)His₁, Arg(4~29)Orn₁, Lys(4~29)His₁, Lys(4~29)Orn₁, His(4~29)Orn₁, Arg(3~28)Lys₂, Arg(3~28)His₂, Arg(3~28)Orn₂, Lys(3~28)His₂, Lys(3~28)Orn₂, His(3~28)Orn₂, Arg(2~27)Lys₃, Arg(2~27)His₃, Arg(2~27)Orn₃, Lys(2~27)His₃, Lys(2~27)Orn₃, His(2~27)Orn₃, Arg(1~26)Lys₄, Arg(1~26)His₄, Arg(1~26)Orn₄, Lys(1~26)His₄, Lys(1~26)Orn₄, His(1~26)Orn₄, Arg(3~28)Lys₁His₁, Arg(3~28)Lys₁Orn₁, Arg(3~28)His₁Orn₁, Arg₁Lys(3~28)His₁, Arg₁Lys(3~28)Orn₁, Lys(3~28)His₁Orn₁, Arg₁Lys₁His(3~28), Arg₁His(3~28)Orn₁, Lys₁His(3~28)Orn₁;

Arg(2~27)Lys₂His₁, Arg(2~27)Lys₁His₂, Arg(2~27)Lys₂Orn₁, Arg(2~27)Lys₁Orn₂, Arg(2~27)His₂Orn₁, Arg(2~27)His₁Orn₂, Arg₂Lys(2~27)His₁, Arg₁Lys(2~27)His₂, Arg₂Lys(2~27)Orn₁, Arg₁Lys(2~27)Orn₂, Lys(2~27)His₂Orn₁, Lys(2~27)His₁Orn₂, Arg₂Lys₁His(2~27), Arg₁Lys₂His(2~27), Arg₂His(2~27)Orn₁, Arg₁His(2~27)Orn₂, Lys₂His(2~27)Orn₁, Lys₁His(2~27)Orn₂;

Arg(1~26)Lys₃His₁, Arg(1~26)Lys₂His₂, Arg(1~26)Lys₁His₃, Arg(1~26)Lys₃Orn₁, Arg(1~26)Lys₂Orn₂, Arg(1~26)Lys₁Orn₃, Arg(1~26)His₃Orn₁, Arg(1~26)His₂Orn₂, Arg(1~26)His₁Orn₃, Arg₃Lys(1~26)His₁, Arg₂Lys(1~26)His₂, Arg₁Lys(1~26)His₃, Arg₃Lys(1~26)Orn₁, Arg₂Lys(1~26)Orn₂, Arg₁Lys(1~26)Orn₃, Lys(1~26)His₃Orn₁, Lys(1~26)His₂Orn₂, Lys(1~26)His₁Orn₃, Arg₃Lys₁His(1~26), Arg₂Lys₂His(1~26), Arg₁Lys₃His(1~26), Arg₃His(1~26)Orn₁, Arg₂His(1~26)Orn₂, Arg₁His(1~26)Orn₃, Lys₃His(1~26)Orn₁, Lys₂His(1~26)Orn₂, Lys₁His(1~26)Orn₃;

Arg(2~27)Lys₁His₁Orn₁, Arg₁Lys(2~27)His₁Orn₁, Arg₁Lys₁His(2~27)Orn₁, Arg₁Lys₁His₁Orn(2~27);

Arg(1~26)Lys₂His₁Orn₁, Arg(1~26)Lys₁His₂Orn₁, Arg(1~26)Lys₁His₁Orn₂, Arg₂Lys(1~26)His₁Orn₁, Arg₁Lys(1~26)His₂Orn₁, Arg₁Lys(1~26)His₁Orn₂, Arg₂Lys₁His(1~26)Orn₁, Arg₁Lys₂His(1~26)Orn₁, Arg₁Lys₁His(1~26)Orn₂, Arg₂Lys₁His₁Orn(1~26), Arg₁Lys₂His₁Orn(1~26), Arg₁Lys₁His₂Orn(1~26)。

【0095】

記載のように、これらはコア配列であり、かかるペプチド性部分Pの完全ペプチド配列に、さらに、ジスルフィド結合を形成し得る少なくとも1個の-SH基を含めてもよい。Cysは、かかる-SH基を担持しているペプチド内の好ましい部分の一例である。したがって、上記に示したコア配列は好ましくは少なくとも1個のCys、例えば1個または

10

20

30

40

50

2 個の C y s をさらに含むペプチド部分の一部であり、ここで、該 1 個または 2 個の C y s 残基は、該末端部のうちの 1 つまたはそれぞれ該ペプチドの各末端部に位置している。部分 P として選択されるかかる特に好ましい配列としては、以下のもの：

1 個の末端 C y s 残基を有する配列：C y s A r g₅、C y s A r g₆、C y s A r g₇、C y s A r g₈、C y s A r g₉、C y s A r g₁₀、C y s A r g₁₁、C y s A r g₁₂、C y s A r g₁₃、C y s A r g₁₄、C y s A r g₁₅、C y s A r g₁₆、C y s A r g₁₇、C y s A r g₁₈、C y s A r g₁₉、C y s A r g₂₀、C y s A r g_{21~30}；C y s L y s₅、C y s L y s₆、C y s L y s₇、C y s L y s₈、C y s L y s₉、C y s L y s₁₀、C y s L y s₁₁、C y s L y s₁₂、C y s L y s₁₃、C y s L y s₁₄、C y s L y s₁₅、C y s L y s₁₆、C y s L y s₁₇、C y s L y s₁₈、C y s L y s₁₉、C y s L y s₂₀、C y s L y s_{21~30}；C y s H i s₅、C y s H i s₆、C y s H i s₇、C y s H i s₈、C y s H i s₉、C y s H i s₁₀、C y s H i s₁₁、C y s H i s₁₂、C y s H i s₁₃、C y s H i s₁₄、C y s H i s₁₅、C y s H i s₁₆、C y s H i s₁₇、C y s H i s₁₈、C y s H i s₁₉、C y s H i s₂₀、C y s H i s_{21~30}；C y s O r n₅、C y s O r n₆、C y s O r n₇、C y s O r n₈、C y s O r n₉、C y s O r n₁₀、C y s O r n₁₁、C y s O r n₁₂、C y s O r n₁₃、C y s O r n₁₄、C y s O r n₁₅、C y s O r n₁₆、C y s O r n₁₇、C y s O r n₁₈、C y s O r n₁₉、C y s O r n₂₀、C y s O r n_{21~30}。

2 個の末端 C y s 残基を有する配列：C y s A r g₅C y s、C y s A r g₆C y s、C y s A r g₇C y s、C y s A r g₈C y s、C y s A r g₉C y s、C y s A r g₁₀C y s、C y s A r g₁₁C y s、C y s A r g₁₂C y s、C y s A r g₁₃C y s、C y s A r g₁₄C y s、C y s A r g₁₅C y s、C y s A r g₁₆C y s、C y s A r g₁₇C y s、C y s A r g₁₈C y s、C y s A r g₁₉C y s、C y s A r g₂₀C y s、C y s A r g_{21~30}C y s；C y s L y s₅C y s、C y s L y s₆C y s、C y s L y s₇C y s、C y s L y s₈C y s、C y s L y s₉C y s、C y s L y s₁₀C y s、C y s L y s₁₁C y s、C y s L y s₁₂C y s、C y s L y s₁₃C y s、C y s L y s₁₄C y s、C y s L y s₁₅C y s、C y s L y s₁₆C y s、C y s L y s₁₇C y s、C y s L y s₁₈C y s、C y s L y s₁₉C y s、C y s L y s₂₀C y s、C y s L y s_{21~30}C y s；C y s H i s₅C y s、C y s H i s₆C y s、C y s H i s₇C y s、C y s H i s₈C y s、C y s H i s₉C y s、C y s H i s₁₀C y s、C y s H i s₁₁C y s、C y s H i s₁₂C y s、C y s H i s₁₃C y s、C y s H i s₁₄C y s、C y s H i s₁₅C y s、C y s H i s₁₆C y s、C y s H i s₁₇C y s、C y s H i s₁₈C y s、C y s H i s₁₉C y s、C y s H i s₂₀C y s、C y s H i s_{21~30}C y s；C y s O r n₅C y s、C y s O r n₆C y s、C y s O r n₇C y s、C y s O r n₈C y s、C y s O r n₉C y s、C y s O r n₁₀C y s、C y s O r n₁₁C y s、C y s O r n₁₂C y s、C y s O r n₁₃C y s、C y s O r n₁₄C y s、C y s O r n₁₅C y s、C y s O r n₁₆C y s、C y s O r n₁₇C y s、C y s O r n₁₈C y s、C y s O r n₁₉C y s、C y s O r n₂₀C y s、C y s O r n_{21~30}C y s が挙げられる。

10

20

【0096】

もちろん、P として選択される異なるペプチド部分を有する上記のような 2 種類以上の異なるカチオン性化合物を組成物に含めること、またはペプチド部分 P を後述する式 I の化合物と結合させることも本発明の範囲に含まれる。

30

【0097】

さらに、組成物にカチオン性のペプチド部分 P を、P の規定に含まれないが、担体系の、または本発明の組成物をカーゴ物質、例えば核酸と結合させると形成される複合体の物理的、化学的または生物学的特性をモジュレートするのに有用であり得る 1 種類以上の他のペプチドとの組合せで含めてもよい。P の規定に従わないかかる他のペプチド配列は、部分 P を含むカチオン性化合物の一部分もしくはそのジスルフィド結合型多量体の一部分であり得るか、または別個の化合物として本発明の組成物に組み込まれ得る。かかる別個の化合物もまた、例えば、カチオン性部分 P を含むカチオン性化合物とジスルフィド結合を形成し得る 1 個以上の - S H 基を含むものであることが好ましい。

40

【0098】

例えば、1 個以上の芳香族アミノ酸、例えば T r p、T y r または P h e を含むペプチドを組み込むことが有用であり得る。もちろん、芳香族アミノ酸を部分 P 自体に組み込んでもよい。あるいはまた、かかる芳香族アミノ酸を組成物中に、他のペプチドであるが例えば別の成分と、例えばカチオン性部分 P を含む該カチオン性化合物とジスルフィド結合を形成し得る 1 個以上の - S H 基を含むペプチドの形態で組み込んでもよい。この様式では、芳香族アミノ酸もまた、該担体組成物を核酸カーゴと結合させると形成される複合体に關与する。

【0099】

50

芳香族アミノ酸の組込みにより、該アミノ酸（１個または複数）の芳香族構造と該核酸の塩基との相互作用による該担体と核酸カーゴとのさらなる結合が可能になり、これはより安定な複合体に寄与し得る。この結合は、カチオン性基またはカチオン化基と該核酸のリン酸主鎖との相互作用とは異なる。芳香族アミノ酸と核酸の塩基間の相互作用は、例えば、インターカレーションによって、または副溝もしくは主溝への結合によって起こり得る。これは、インビボの細胞外マトリックス中に主にみられるアニオン性複合体形成パートナー（例えば、ヘパリン、ヒアルロン酸）による脱コンパクト化の傾向はなく、また、塩効果に対する感受性も低い。

【 0 1 0 0 】

一部の具体的な実施形態では、組成物は、芳香族アミノ酸リッチであるか、または実質的に芳香族アミノ酸で構成されたコア配列を含む１種類以上のペプチドを含むものである。かかるペプチド内の芳香族アミノ酸は、同一であっても互いに異なってもよい。コア配列は好ましくは、ジスルフィド結合の形成能を付与する - S H 基を含む１つまたは、より好ましくは２つの部分、例えば C y s にフランキングされている

【 0 1 0 1 】

有用なコア配列の例としては、T r p - T y r、T y r - T r p、T r p - T r p、T y r - T y r、T r p - T y r - T r p、T y r - T r p - T y r、T r p - T r p - T r p、T y r - T y r - T y r、T r p - T y r - T r p - T y r、T y r - T r p - T y r - T r p、T r p - T r p - T r p - T r p、P h e - T y r、T y r - P h e、P h e - P h e、P h e - T y r - P h e、T y r - P h e - T y r、P h e - P h e - P h e、P h e - T y r - P h e - T y r、T y r - P h e - T y r - P h e、P h e - P h e - P h e、P h e - T r p、T r p - P h e、P h e - P h e、P h e - T r p - P h e、T r p - P h e - T r p、P h e - T r p - P h e - T r p、T r p - P h e - T r p - P h e、および T y r - T y r - T y r - T y r などが挙げられる。かかる配列は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１３、１４、１５回またはさらにはそれ以上の回数反復されていてもよい。また、該配列が互いに適切に結合されていてもよい。

【 0 1 0 2 】

同じく末端 C y s 残基を含む完全ペプチド配列の例は、例えば：

C y s - T y r、C y s - T r p、C y s - T r p - T y r、C y s - T y r - T r p、C y s - T r p - T r p、C y s - T y r - T y r、C y s - T r p - T y r - T r p、C y s - T y r - T r p - T y r、C y s - T r p - T r p - T r p、C y s - T y r - T r p - T y r - T r p、C y s - T r p - T r p - T r p - T r p、C y s - T y r - T y r - T y r - T y r、C y s - P h e、C y s - P h e - T y r、C y s - T y r - P h e、C y s - P h e - P h e、C y s - T y r - T y r、C y s - P h e - T y r - P h e、C y s - T y r - P h e - T y r、C y s - P h e - P h e - P h e、C y s - T y r - T y r - T y r、C y s - P h e - T y r - P h e - T y r、C y s - T y r - P h e - T y r - P h e、または C y s - P h e - P h e - P h e - P h e、C y s - P h e - T r p、C y s - T r p - P h e、C y s - P h e - P h e、C y s - P h e - T r p - P h e、C y s - T r p - P h e - T r p、C y s - P h e - T r p - P h e - T r p、C y s - T r p - P h e - T r p - P h e；

C y s - T y r - C y s、C y s - T r p - C y s、C y s - T r p - T y r - C y s、C y s - T y r - T r p - C y s、C y s - T r p - T r p - C y s、C y s - T y r - T y r - C y s、C y s - T r p - T y r - T r p - C y s、C y s - T y r - T r p - T y r - C y s、C y s - T r p - T r p - T r p - C y s、C y s - T y r - T y r - T y r - C y s、C y s - T r p - T y r - T r p - T y r - C y s、C y s - T y r - T r p - T y r - T r p - C y s、C y s - T r p - T r p - T r p - T r p - C y s、C y s - T y r - T y r - T y r - T y r - C y s、C y s - P h e - C y s、C y s - P h e - T y r - C y s、C y s - T y r - P h e - C y s、C y s - P h e - P h e

- C y s、C y s - T y r - T y r - C y s、C y s - P h e - T y r - P h e - C y s、C y s - T y r - P h e - T y r - C y s、C y s - P h e - P h e - P h e - C y s、C y s - T y r - T y r - T y r - C y s、C y s - P h e - T y r - P h e - T y r - C y s、C y s - T y r - P h e - T y r - P h e - C y s、またはC y s - P h e - P h e - P h e - P h e - C y s、C y s - P h e - T r p - C y s、C y s - T r p - P h e - C y s、C y s - P h e - P h e - C y s、C y s - P h e - T r p - P h e - C y s、C y s - T r p - P h e - T r p - C y s、C y s - P h e - T r p - P h e - T r p - C y s、C y s - T r p - P h e - T r p - P h e - C y sなどである。また、各C y sは、遊離 - S H - 部分を担持している修飾アミノ酸または化学物質化合物で置き換えられていてもよい。また、該配列、特に2個の末端C y s残基を有するものの組合せ、または例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15回もしくはさらにはそれ以上の回数の反復体であるペプチドを使用してもよい。

10

【0103】

さらに、芳香族アミノ酸リッチのかかるペプチドに、T r p、T y rおよびP h eの長鎖配列の構造切断体としての機能を果たし得る少なくとも1個のプロリンを含有させてもよい。芳香族アミノ酸配列の長さに応じて、2個、3個またはそれ以上のプロリンを組み込むことが好ましかろう。

【0104】

さらに、本発明の組成物中に、1個以上の親水性アミノ酸を含むペプチドを、ペプチド部分Pを含む該カチオン性化合物とともに組み込むことが有用であり得る。もちろん、親水性アミノ酸をペプチド部分P自体に組み込んでよい。あるいはまた、かかるアミノ酸を組成物中に、この場合も同じく1個以上の - S H基またはジスルフィド結合を含み、該担体組成物を核酸カーゴと結合させると形成される複合体（例えば、該複合体の特性を修飾するため）に関与できるものであり得る他のペプチドの形態で組み込んでよい。

20

【0105】

この目的に有用な親水性アミノ酸の中でも、電荷を有しない極性側鎖を有するもの、特にT h r、S e r、A s nおよび/またはG l nが好ましい。かかるアミノ酸またはこのようなアミノ酸リッチの配列の組込みにより、核酸カーゴに対するより柔軟な結合が可能になる。これにより、核酸カーゴのより有効なコンパクト化がもたらされ得、したがって、ヌクレアーゼおよび不要な脱コンパクト化に対するより良好な保護がもたらされ得る。また、担体全体において低カチオン性電荷を示す担体を提供することが可能になり、この状況では、所望の場合または必要に応じて、より良好に調整された結合特性が可能になる。

30

【0106】

有用なコア配列の例としては、同一かまたは異なる親水性アミノ酸を主体とする配列、例えば以下のもの：S e r - T h r、T h r - S e r、S e r - S e r、T h r - T h r、S e r - T h r - S e r、T h r - S e r - T h r、S e r - S e r - S e r、T h r - T h r - T h r、S e r - T h r - S e r - T h r、T h r - S e r - T h r - S e r、S e r - S e r - S e r - S e r、T h r - T h r - T h r - T h r、G l n - A s n、A s n - G l n、G l n - G l n、A s n - A s n、G l n - A s n - G l n、A s n - G l n - A s n、G l n - G l n - G l n、A s n - A s n - A s n、G l n - A s n - G l n - A s n、A s n - G l n - A s n - G l n、G l n - G l n - G l n - G l n、A s n - A s n - A s n - A s n、S e r - A s n、A s n - S e r、S e r - S e r、A s n - A s n、S e r - A s n - S e r、A s n - S e r - A s n、S e r - S e r - S e r、A s n - A s n - A s n、S e r - A s n - S e r - A s n、A s n - S e r - A s n - S e r、S e r - S e r - S e r - S e r、またはA s n - A s n - A s n - A s nなどが挙げられる。この場合も、かかる配列は、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15回またはさらにはそれ以上の回数反復されていてもよく、互いに適切に結合されていてもよい。さらに、コア配列は好ましくは、- S H基を含むかまたはジスルフィド結合を形成するジスルフィド結合の形成能を付与する1個または2個の残基、例えばC y sにフランキングされている。

40

50

【0107】

同じくかかる末端Cys残基を含む完全ペプチド配列の例はCys-Thr-Cys、Cys-Ser-Cys、Cys-Ser-Thr-Cys、Cys-Thr-Ser-Cys、Cys-Ser-Ser-Cys、Cys-Thr-Thr-Cys、Cys-Ser-Thr-Ser-Cys、Cys-Thr-Ser-Thr-Cys、Cys-Ser-Ser-Ser-Cys、Cys-Thr-Thr-Thr-Cys、Cys-Ser-Thr-Ser-Thr-Cys、Cys-Thr-Ser-Thr-Ser-Cys、Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys、Cys-Thr-Thr-Thr-Thr-Cys、Cys-Asn-Cys、Cys-Gln-Cys、Cys-Gln-Asn-Cys、Cys-Asn-Gln-Cys、Cys-Gln-Gln-Cys、Cys-Asn-Asn-Cys、Cys-Gln-Asn-Gln-Cys、Cys-Asn-Gln-Asn-Cys、Cys-Gln-Gln-Gln-Cys、Cys-Asn-Asn-Asn-Cys、Cys-Gln-Asn-Gln-Asn-Cys、Cys-Asn-Gln-Asn-Gln-Cys、Cys-Gln-Gln-Gln-Gln-Cys、Cys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cys、Cys-Asn-Cys、Cys-Ser-Cys、Cys-Ser-Asn-Cys、Cys-Asn-Ser-Cys、Cys-Ser-Ser-Cys、Cys-Asn-Asn-Cys、Cys-Ser-Asn-Ser-Cys、Cys-Asn-Ser-Asn-Cys、Cys-Ser-Ser-Ser-Cys、Cys-Asn-Asn-Asn-Cys、Cys-Ser-Asn-Ser-Asn-Cys、Cys-Asn-Ser-Asn-Ser-Cys、Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys、またはCys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cysなどである。また、各Cysは、ジスルフィド結合に關与する遊離-SH-部分またはイオウ原子を担持している修飾アミノ酸または化学物質化合物で置き換えられていてもよい。該配列は、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15回またはさらにはそれ以上の回数反復されていてもよく、互いに結合されていてもよい。

10

20

【0108】

任意選択で、親水性アミノ酸リッチの配列に、Ser、ThrおよびAsnの長鎖配列の構造切断体としての機能を果たし得る少なくとも1個のプロリンを含めてもよい。また、2個、3個またはそれ以上のプロリンを、特に長鎖配列に組み込んでもよい。

30

【0109】

さらに、本発明の組成物中に、1個以上の親油性アミノ酸、特に、Leu、Val、Ile、Ala、および/またはMetを含むペプチドを、ペプチド部分Pを含む該カチオン性化合物とともに組み込むことが有用であり得る。かかる親油性アミノ酸をペプチド部分P自体に組み込んでもよい。あるいはまた、該アミノ酸を組成物中に、この場合も同じく1個以上の-SH基またはジスルフィド結合を含み、該担体組成物を核酸カーゴと結合させると形成される複合体に關与できるものであり得る他のペプチドの形態で組み込んでもよい。

【0110】

親油性アミノ酸の使用により、該核酸のより強いコンパクト化が可能になる。これは、該親油性アミノ酸と該核酸カーゴの特定の相互作用によって該担体(1種類または複数種)と該カーゴ間で形成される複合体のさらなる安定性がもたらされることによるものであり得る。この安定化は、ポリマー鎖同士の非共有結合性会合または架橋と同様であり得る。特に、水性環境では、この型の相互作用は典型的には強力であり、有意な効果をもたらす。

40

【0111】

有用なコア配列の例としては、同一かまたは異なる親油性アミノ酸を主体とする配列、例えばLeu-Val、Val-Leu、Leu-Leu、Val-Val、Leu-Val-Leu、Val-Leu-Val、Leu-Leu-Leu、Val-Val-Val、Leu-Val-Leu-Val、Val-Leu-Val-Leu、Leu-L

50

e u - L e u - L e u、V a l - V a l - V a l - V a l、I l e - A l a、A l a - I l e、I l e - I l e、A l a - A l a、I l e - A l a - I l e、A l a - I l e - A l a、I l e - I l e - I l e、A l a - A l a - A l a、I l e - A l a - I l e - A l a、A l a - I l e - A l a - I l e、I l e - I l e - I l e - I l e、A l a - A l a - A l a - A l a、M e t - A l a、A l a - M e t、M e t - M e t、A l a - A l a、M e t - A l a - M e t、A l a - M e t - A l a、M e t - M e t - M e t、A l a - A l a - A l a、M e t - A l a - M e t - A l a、A l a - M e t - A l a - M e t、またはM e t - M e t - M e t - M e tなどが挙げられる。かかる配列は、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15回またはそれ以上の回数反復されていてもよく、互いに結合されていてもよい。さらに、コア配列は好ましくは、ジスルフィド結合に関与する-SH基またはイオウ原子を含む1個または2個の残基、例えばCysにフランキングされている。

10

【0112】

同じくかかる末端Cys残基を含む完全ペプチド配列の例はCys - Val - Cys、Cys - Leu - Cys、Cys - Leu - Val - Cys、Cys - Val - Leu - Cys、Cys - Leu - Leu - Cys、Cys - Val - Val - Cys、Cys - Leu - Val - Leu - Cys、Cys - Val - Leu - Val - Cys、Cys - Leu - Leu - Leu - Cys、Cys - Val - Val - Val - Cys、Cys - Leu - Val - Leu - Val - Cys、Cys - Val - Leu - Val - Leu - Cys、Cys - Leu - Leu - Leu - Leu - Cys、Cys - Val - Val - Val - Val - Cys、Cys - Ala - Cys、Cys - Ile - Cys、Cys - Ile - Ala - Cys、Cys - Ala - Ile - Cys、Cys - Ile - Ile - Cys、Cys - Ala - Ala - Cys、Cys - Ile - Ala - Ile - Cys、Cys - Ala - Ile - Ala - Cys、Cys - Ile - Ile - Ile - Cys、Cys - Ala - Ala - Ala - Cys、Cys - Ile - Ala - Ile - Ala - Cys、Cys - Ala - Ile - Ala - Ile - Cys、Cys - Ile - Ile - Ile - Ile - Cys、またはCys - Ala - Ala - Ala - Ala - Cys、Cys - Met - Cys、Cys - Met - Ala - Cys、Cys - Ala - Met - Cys、Cys - Met - Met - Cys、Cys - Ala - Ala - Cys、Cys - Met - Ala - Met - Cys、Cys - Ala - Met - Ala - Cys、Cys - Met - Met - Met - Cys、Cys - Ala - Ala - Ala - Cys、Cys - Met - Ala - Met - Ala - Cys、Cys - Ala - Met - Ala - Met - Cys、Cys - Met - Met - Met - Met - Cys、またはCys - Ala - Ala - Ala - Ala - Cysなどである。また、各Cysは、遊離-SH-基を担持しているかまたはかかる-SH基に由来するジスルフィド結合に関与する修飾アミノ酸または化学物質化合物で置き換えられていてもよい。かかる配列は、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15回またはそれ以上の回数反復されていてもよく、互いに結合されていてもよい。

20

30

【0113】

任意選択で、親油性アミノ酸リッチの配列に、Leu、Val、Ile、Alaおよび/またはMetの長鎖配列の構造切断体としての機能を果たし得る少なくとも1個のプロリンを含めてもよい。また、2個、3個またはそれ以上のプロリンを、特に長鎖配列に組み込んでよい。

40

【0114】

任意選択で、ペプチド部分Pに機能性ペプチド配列を含めてもよい。択一的または付加的に、機能性ペプチドを本発明の組成物中に、ペプチド部分Pを含む該カチオン性化合物とともに、任意選択で、例えばジスルフィド結合に関与する1個以上の-SH基またはイオウ原子を示すように修飾した後に組み込んでよい。あるいはまた、かかる機能性ペプチド配列を別の担体成分、例えばペプチドPに、該機能性ペプチド配列が低pH値、例えば生理学的pH値で離脱または放出することを可能にする酸不安定性結合によって、好ま

50

しくは担体成分の側鎖によって結合させてもよい。

【0115】

該機能性ペプチドまたはペプチド配列はシグナルペプチドもしくはシグナル配列、局在化シグナルもしくは配列、核局在化シグナルもしくは配列（NLS）、抗体、細胞膜透過ペプチド、（例えば、TAT）などであり得るか、またはこれらに由来するものであり得る。

【0116】

これとの関連において、シグナルペプチド、局在化シグナルもしくは配列または核局在化シグナルもしくは配列（NLS）は、担体 - カーゴ複合体を特定の標的細胞（例えば、肝細胞もしくは抗原提示細胞）または亜細胞構造に指向するために使用され得、特定の標的、例えば細胞内、核内、エンドソーム区画内、ミトコンドリアマトリックス、原形質膜、ゴルジ装置、核、細胞質および細胞骨格、小胞体などへのトランスローカリゼーション（translocation）を可能にするものであり得る。シグナル配列または核局在化シグナルは、本明細書に定義した任意の核酸、特にRNAまたはDNA、より好ましくはshRNAまたはpDNAの例えば核内への輸送のために使用され得る。核局在化配列としては、例えば、KDEL、DDEL、DEEL、QEDL、RDEL、GQNLSTSN、PKKKRKV、PQKKIKS、QPKKP、RKKR、RKKRRQRRRAHQ、RQARRNRNRRWRERQR、MPLTRRRRPAASQALAPPTP、GAALTILV、またはGAALTLLGが挙げられ得る。エンドソーム区画用の局在化配列の一例はMDDQRDLISNNEQLPである。ミトコンドリアマトリックス用の例示的な局在化配列はMLFNLRLXXLNNAAFRHGHNFMRNFRCGQPLXである。原形質膜用の局在化配列としては、例えば、GCVCSNP、GQTVTTPL、GQELSQHE、GNSPSYNP、GVSGSKGQ、GQTTITTPPL、GQTLTTPL、GQIFSRSA、GQIHGLSP、GARASVLS、およびGCTLSAEEが挙げられる。小胞体および核用の局在化配列としては、GAQVSSQKおよびGAQLSRNTが挙げられる。ゴルジ装置、核、細胞質および細胞骨格用の局在化配列としてはGNAAAAKKが挙げられる。細胞質および細胞骨格用の局在化配列としてはGNEASYPLが挙げられる。原形質膜および細胞骨格用の局在化配列としてはGSSKSKPKが挙げられる。分泌シグナルペプチド配列の例としては、古典的または非古典的MHC - 配列（例えば、MHC IおよびII分子のシグナル配列、例えば、MHCクラスI分子HLA - A*0201のシグナル配列）が挙げられる。また、有用なペプチドに、サイトカインまたは免疫グロブリンのシグナル配列、例えば免疫グロブリンまたは抗体のインバリアント鎖のシグナル配列；Lamp1、タパシン、Erp57、カルレチキュリン、カルネキシン、他の膜結合タンパク質、または小胞体（ER）もしくはエンドソーム - リソソーム区画と結合しているタンパク質のシグナル配列を組み込んでよい。特に好ましいはMHCクラスI分子HLA - A*0201のシグナル配列である。

【0117】

ペプチド部分Pの特性は、その配列内に非天然アミノ酸を含めることにより、または該ペプチドの化学修飾によってさらにモジュレートされ得る。例えば、特定の化学基が導入され得る。かかる基は例えば、例えば、アミド形成（例えば、カルボン酸、スルホン酸、アミンなどとの反応による）によって、マイケル付加（例えば、マレインイミド部分、不飽和カルボニルなどを使用）によって、クリックケミストリー（例えば、アジドもしくはアルキンを使用）によって、アルケン/アルキンのメタセシス（例えば、アルケンもしくはアルキンを使用）、イミンもしくはヒドロゾンの形成（アルデヒドもしくはケトン、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、アミンを使用）、複合体化反応（アビジン、ビオチン、プロテインGなどを使用）あるいは S_N -型置換反応（例えば、ハロゲンアルカン、チオール、アルコール、アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、スルホン酸エステル、オキシホスホニウム塩との）を可能にする成分またはさらなる成分の結合に使用され得る他の化学部分によってさらなる成分またはリガンドの結合が可能となるように選択され得る。

【 0 1 1 8 】

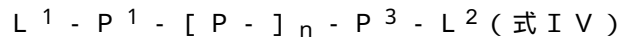
ペプチド部分 P を有するカチオン性化合物を含む本発明の組成物の具体的な利点のうちの 1 つは、かかるペプチド部分が容易に設計され得、特定の治療目的または用途と関連する具体的なニーズに適合させ得るということである。例えば、特定のカーゴ、例えば核酸構築物との複合体を形成するために必要とされる正電荷の量は、該ペプチド配列内の塩基性アミノ酸の含有量を変更することにより最適化され得る。同時に、生分解性および耐容性を最適化するために該ペプチドの長さが変更され得る。

【 0 1 1 9 】

発明者らは、該ペプチド分子が、核酸カーゴとの複合体の形成も可能にする条件下で互いに容易にジスルフィド結合を形成することを見出した。特定のインビボ条件下、例えば、例えばサイトゾル G S H が存在する典型的なサイトゾル環境では、このジスルフィド結合が還元されてより小さいペプチド単位がもたらされ、これはほとんどの細胞により、まず小さいオリゴペプチドに、最終的にアミノ酸に容易に代謝される。上記のような大きなオリゴペプチドの場合であっても有意な毒性はみられていない。

【 0 1 2 0 】

別の好ましい実施形態では、部分 P を含むカチオン性化合物が、式 I V



による化合物であり、

式中、P は上記に規定したとおりである、すなわち、P は、約 0 . 5 k D a ~ 約 3 0 k D a の分子量を有するポリマー部分または 3 ~ 1 0 0 個のアミノ酸で構成されたペプチド部分のいずれかであり、ここで、該ペプチド部分のアミノ酸の総数の少なくとも 1 0 % は、A r g、L y s、H i s および / または O r n から選択される塩基性アミノ酸である。P³ は任意選択である。P¹ および P³ (存在する場合) は独立して選択され、各々は、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリ - N - (2 - ヒドロキシプロピル) メタクリルアミド、ポリ - 2 - (メタクリロイルオキシ) エチルホスホリルコリン、ポリ (ヒドロキシアルキル L - アスパラギン)、ポリ (2 - (メタクリロイルオキシ) エチルホスホリルコリン)、ヒドロキシエチルデンプンまたはポリ (ヒドロキシアルキル L - グルタミン) から選択される線状または分枝状の親水性ポリマー鎖を表し、ここで、該ポリマー鎖は約 1 k D a ~ 約 1 0 0 k D a の分子量を示すものであり、P¹ および P³ の各々は部分 P とジスルフィド結合によって連結されている。L¹ および L² は任意選択のリガンドであり、R G D、R G D ペプチド、トランスフェリン、葉酸根、シグナルペプチドもしくはシグナル配列、局在化シグナルもしくは配列、核局在化シグナルもしくは配列 (N L S)、抗体、細胞膜透過ペプチド、例えば W E A K L A K A L A K A L A K H L A K A L A K A L K A C E A、T A T、受容体のリガンド、サイトカイン、ホルモン、増殖因子、小分子、糖類、マンノース、ガラクトース、n - アセチルガラクトサミン、合成リガンド、受容体の小分子作動薬、阻害薬もしくは拮抗薬または R G D ペプチド模倣アナログから独立して選択される。

【 0 1 2 1 】

さらに、式 I V の n は、1 ~ 約 5 0 から選択される整数、好ましくは 2、3、4 もしくは 5 ~ 約 1 0 または 2、3 もしくは 4 ~ 約 9 の範囲の整数、例えば 6 または 7 である ; ただし、n が 1 より大きい場合、各部分 P は別の部分 P とジスルフィド結合によって連結されているものとする。また、2 ~ 約 2 0 の範囲から、または約 4 ~ 約 1 0、例えば約 4、5、6、7、8、9 もしくは 1 0 からの n の選択も好ましい。

【 0 1 2 2 】

任意選択のセグメント L₁、L₂ または P₃ に対する言及はいずれも、それぞれのセグメントが存在する任意選択の実施形態に適用可能であると解釈されたい。

【 0 1 2 3 】

式 I V から明白なように、それぞれのカチオン性化合物は、それぞれ少なくとも成分または部分 P、P¹ および P³ 間にジスルフィド結合ならびに任意選択で、部分 P 内および / または P¹ および L¹ および / または P³ および L³ 間にさらなるジスルフィド結合を含

む。このジスルフィド結合は、残基、例えばCys、または化学修飾アミノ酸または還元型形態において-SH基を担持する他の残基に由来するものであり得る-SH基に由来する。

【0124】

また、任意選択で、さらなる成分、例えばアミノ酸成分、例えば抗原のエピトープ、抗原、抗体、細胞膜透過ペプチド（例えば、TAT）、リガンドなどに結合させるために1個以上のさらなる-SH基またはジスルフィド結合を該化合物中に存在させてもよい。

【0125】

式IIによる化合物およびその調製方法のさらなる例は、例えばWO2011/026641に開示されており、その開示内容はその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0126】

本発明を実施するための式IVによる化合物の使用は高い多用途性という利点と関連している。さらに、式IIを主体とする実施形態は、例えば、遺伝子療法または他の治療用途の目的のための核酸の効率的なトランスフェクションの目的のために核酸を活性損なうことなく、特に、いろいろな細胞株の核酸でのインビトロでの効率的なトランスフェクションの目的のために、また、インビボでのトランスフェクションの目的のためにも効率的にコンパクト化するために、ポリマー鎖の長さを規定すること、および所望の特性の異なる短鎖ポリマーを1つのポリマーに結合することが可能である。該担体分子はさらに、細胞に対して毒性ではなく、その核酸カーゴの効率的な放出をもたらすものである。最後に、これは、特に分子の末端部に対する親水性ポリマー鎖（例えば、PEG）の可逆的付加による凝集に対して改善された抵抗性を示すものであり、これによってさらに、血清含有培地に対する核酸カーゴの安定性の向上が付与され、免疫系による高分子担体とカーゴの複合体の認識または血清内容物との他の望まない相互作用が抑制される。サイトゾル内では、セグメントP¹およびP³によって得られる「コーティング」が細胞の還元条件下で容易に除去される。また、この効果も、サイトゾル内での核酸カーゴの放出を促進させる。

20

【0127】

上記に規定したように、リガンドL¹およびL²が式IVによる化合物中に任意選択で含まれ得る。これらは、例えば、カーゴ、例えば複合体化核酸を特定の細胞内に指向するために使用され得る。これらは互いに独立して選択され得る。潜在的に好適なリガンドの例としては、RGD、トランスフェリン、葉酸根、シグナルペプチドまたはシグナル配列、局在化シグナルまたは配列、核局在化シグナルまたは配列（NLS）、抗体、細胞膜透過ペプチド、（例えば、TAT）、受容体のリガンド（例えば、サイトカイン、ホルモン、増殖因子など）、小分子（例えば、マンノースもしくはガラクトースなどの糖類または合成リガンド）、受容体の小分子作動薬、阻害薬または拮抗薬（例えば、RGDペプチド模倣アナログ）などが挙げられる。

30

【0128】

好ましいリガンドの一例としては、WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKACEA（KALAとも称される）およびN-アセチルガラクトサミン（Galnac）が挙げられる。また、この状況において、細胞膜上にマンノース受容体を担持している抗原提示細胞を標的化するためのリガンドとしてのマンノースも好ましい。好ましいさらなる一実施形態では、任意選択のリガンドとしてのガラクトースが肝細胞を標的化するために使用され得る。

40

【0129】

かかるリガンドL¹およびL²は成分P¹および/またはP³に、可逆的ジスルフィド結合または任意の他の可能な化学結合によって、例えば、3-チオプロピオン酸もしくは2-イミノチオラン（トラウト試薬）の結合によって、アミド形成（例えば、カルボン酸、スルホン酸、アミンなど）によって、マイケル付加（例えば、マレインイミド部分、不飽和カルボニルなど）によって、クリックケミストリー（例えば、アジドもしくはアルキン）によって、アルケン/アルキンのメタセシス（例えば、アルケンもしくはアルキン）、イミンもしくはヒドロゾンの形成（アルデヒドもしくはケトン、ヒドラジン、ヒドロキシ

50

ルアミン、アミン)、複合体化反応(アビジン、ビオチン、プロテインG)あるいは S_N -型置換反応(例えば、ハロゲンアルカン、チオール、アルコール、アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、スルホン酸エステル、オキシホスホニウム塩)を可能にする成分またはさらなる成分の結合に使用され得る他の化学部分によって結合され得る。

【0130】

上記に規定したように、成分 P^1 および P^3 は独立して選択され、各々は、成分Pとのジスルフィド結合に関与する少なくとも1個のイオウ原子を含有している線状または分枝状の親水性ポリマー鎖を表す。 P^1 および P^3 の各々のポリマー鎖は、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ-N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリ-2-(メタクリロイルオキシ)エチルホスホリルコリン、ポリ(ヒドロキシアルキルL-アスパラギン)、ポリ(2-(メタクリロイルオキシ)エチルホスホリルコリン)、ヒドロキシエチルデンプンまたはポリ(ヒドロキシアルキルL-グルタミン)から独立して選択される。 P^1 および P^3 の各々は約1kDa~約100kDaの分子量を示すものである。

10

【0131】

P^1 および/または P^3 のポリマー鎖の分子量は、好ましくは約1kDa~約75kDaまたは約5kDa~約50kDa、さらにより好ましくは約5kDa~約25kDaである。別の好ましいものによれば、 P^1 および/または P^3 は、約5kDa~約25kDaの任意選択で修飾されているポリエチレングリコール鎖である。

【0132】

ジスルフィド結合を可能にするイオウ原子は、親水性ポリマー鎖 P^1 および P^3 の各々に、内部システインまたはその還元型形態および式IVの化合物内への組み込み前において-SH部分を担持している任意のさらなる(修飾型)アミノ酸もしくは部分によって供給され得る。

20

【0133】

あるいはまた、親水性ポリマー鎖 P^1 および/または P^3 は、-SH部分で、好ましくは-SH部分を担持している化合物との化学反応によって、親水性ポリマー P^1 および P^3 の各々が式IVの化合物への組み込み前に少なくとも1個のかかる-SH部分を担持するように修飾されたポリマーに由来するものであり得る。-SH部分を担持しているかかる化合物は、例えば、(さらなる)システインまたは-SH部分を担持している任意のさらなる(修飾型)アミノ酸であり得る。

30

【0134】

また、かかる化合物は、-SH部分を含むか、または親水性ポリマー鎖 P^1 および P^3 への-SH部分の導入を可能にする任意の非アミノ化合物または部分であり得る。かかる非アミノ化合物は P^1 および/または P^3 に、化学反応または化合物の結合によって、例えば、3-チオプロピオン酸もしくはチオイモラン(thioimolane)(トラウト試薬)の結合によって、アミド形成(例えば、カルボン酸、スルホン酸、アミンなど)によって、マイケル付加(例えば、マレインイミド部分、不飽和カルボニルなど)によって、クリックケミストリー(例えば、アジドもしくはアルキン)によって、アルケン/アルキンのメタセシス(例えば、アルケンもしくはアルキン)、イミンもしくはヒドロゾンの形成(アルデヒドもしくはケトン、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、アミン)、複合体化反応(アビジン、ビオチン、プロテインG)あるいは S_N -型置換反応(例えば、ハロゲンアルカン、チオール、アルコール、アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、スルホン酸エステル、オキシホスホニウム塩)を可能にする成分またはさらなる成分の結合に使用され得る他の化学部分によって結合され得る。この状況における特に好ましいPEG誘導体は-メトキシ-メルカプトポリ(エチレングリコール)である。各場合で、例えばシステインまたは任意のさらなる(修飾型)アミノ酸もしくは化合物の、ジスルフィド結合に関与するイオウ原子は、 P^1 および P^3 の末端部に存在していてもよく、任意の内部位置に存在していてもよい。一実施形態では、 P^1 および P^3 の各々は、一方の末端部に少なくとも1つのジスルフィド結合と、本明細書に規定したさらなる成分、例えばリガンド、アミノ酸成分(AA)_x、抗体、細胞膜透過ペプチド(例えば、TAT)などをさら

40

50

に結合させるために使用され得る少なくとも 1 個のさらなる - S H 基またはジスルフィド結合とを示すものである。

【 0 1 3 5 】

好ましいさらなる一実施形態によれば、親水性ポリマー鎖 P^1 および P^3 の各々はまた、本明細書に規定したさらなる成分、例えばリガンド、アミノ酸成分 (A A)_x などの結合を、例えば、アミド形成 (例えば、カルボン酸、スルホン酸、アミンなど) によって、マイケル付加 (例えば、マレインイミド部分、不飽和カルボニルなど) によって、クリックケミストリー (例えば、アジドもしくはアルキン) によって、アルケン/アルキンのメタセシス (例えば、アルケンもしくはアルキン)、イミンもしくはヒドロゾンの形成 (アルデヒドもしくはケトン、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、アミン)、複合体化反応 (アビジン、ビオチン、プロテイン G) あるいは S_N -型置換反応 (例えば、ハロゲンアルカン、チオール、アルコール、アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、スルホン酸エステル、オキシホスホニウム塩) を可能にする成分によって、またはさらなる成分の結合のために使用され得る他の化学基によって結合することを可能にする少なくとも 1 個のさらなる官能基も含むものであり得る。

10

【 0 1 3 6 】

上記に規定したように、式 I V の化合物における P は、約 0 . 5 k D a ~ 約 3 0 k D a の分子量を有するポリマー部分または 3 ~ 1 0 0 個のアミノ酸で構成されたペプチド部分であり、ここで、該ペプチド部分のアミノ酸の総数の少なくとも 1 0 % は、A r g、L y s、H i s および / または O r n から選択される塩基性アミノ酸である。P がペプチド部分である場合、P 一般との関連において上記のものと同じ好ましいものが同様に適用される; また、- S H 基に関する好ましいものを式 I I の化合物のかかる - S H 基に由来するジスルフィド結合に適用するのがよい。

20

【 0 1 3 7 】

例えば、式 I V の化合物における P として選択されるペプチド部分は好ましくは約 3 ~ 約 5 0 個のアミノ酸、より好ましくは約 7 ~ 約 3 0 個のアミノ酸または約 3 ~ 約 2 5 個のアミノ酸の長さを有するものである。また、約 3 ~ 約 2 0 個のアミノ酸、または約 5 ~ 約 2 0 個のアミノ酸、または約 7 ~ 約 3 0 個のアミノ酸、または約 6 ~ 約 1 8 個のアミノ酸、または約 7 ~ 約 1 7 個のアミノ酸、例えば約 5 ~ 約 1 5 個のアミノ酸の範囲の長さも好ましい。式 I I のペプチド部分 P は、約 0 . 3 k D a ~ 約 5 0 k D a、特に、約 0 . 5 k D a ~ 約 3 0 k D a、または約 0 . 6 k D a ~ 約 1 0 k D a、または約 0 . 8 k D a ~ 約 5 k D a、例えば約 1 k D a ~ 約 3 k D a の範囲の分子量を有するものであることがさらに好ましい。

30

【 0 1 3 8 】

さらに、式 I V における P として選択されるペプチド部分内の塩基性アミノ酸の含有量は該ペプチド配列のアミノ酸の総数の少なくとも 1 0 %、好ましくはそれより多い、例えば、それぞれ少なくとも約 2 0 %、または少なくとも約 3 0 %、または少なくとも約 4 0 %、または少なくとも約 5 0 %、または少なくとも約 6 0 %、または少なくとも約 7 0 % である。

【 0 1 3 9 】

40

好ましい実施形態の一部のものでは、式 I V の化合物における P として選択されるペプチド部分は、完全に、または大部分が特定の 1 種類の塩基性アミノ酸で構成されたもの、例えば約 5 ~ 約 3 0 個の A r g、L y s、H i s または O r n のセグメントであり、1 個または 2 個の末端 C y s 残基にフランキングされていてもよいコア配列を含む。式 I V のかかる好ましいバージョンのペプチド部分 P の例としては :

1個の末端Cys残基を有するPの配列：CysArg5、CysArg6、CysArg7、CysArg8、CysArg9、CysArg10、CysArg11、CysArg12、CysArg13、CysArg14、CysArg15、CysArg16、CysArg17、CysArg18、CysArg19、CysArg20、CysArg21~30；CysLys5、CysLys6、CysLys7、CysLys8、CysLys9、CysLys10、CysLys11、CysLys12、CysLys13、CysLys14、CysLys15、CysLys16、CysLys17、CysLys18、CysLys19、CysLys20、CysLys21~30；CysHis5、CysHis6、CysHis7、CysHis8、CysHis9、CysHis10、CysHis11、CysHis12、CysHis13、CysHis14、CysHis15、CysHis16、CysHis17、CysHis18、CysHis19、CysHis20、CysHis21~30；CysOrn5、CysOrn6、CysOrn7、CysOrn8、CysOrn9、CysOrn10、CysOrn11、CysOrn12、CysOrn13、CysOrn14、CysOrn15、CysOrn16、CysOrn17、CysOrn18、CysOrn19、CysOrn20、CysOrn21~30。

10

2個の末端Cys残基を有するPの配列：CysArg5Cys、CysArg6Cys、CysArg7Cys、CysArg8Cys、CysArg9Cys、CysArg10Cys、CysArg11Cys、CysArg12Cys、CysArg13Cys、CysArg14Cys、CysArg15Cys、CysArg16Cys、CysArg17Cys、CysArg18Cys、CysArg19Cys、CysArg20Cys、CysArg21~30Cys；CysLys5Cys、CysLys6Cys、CysLys7Cys、CysLys8Cys、CysLys9Cys、CysLys10Cys、CysLys11Cys、CysLys12Cys、CysLys13Cys、CysLys14Cys、CysLys15Cys、CysLys16Cys、CysLys17Cys、CysLys18Cys、CysLys19Cys、CysLys20Cys、CysLys21~30Cys；CysHis5Cys、CysHis6Cys、CysHis7Cys、CysHis8Cys、CysHis9Cys、CysHis10Cys、CysHis11Cys、CysHis12Cys、CysHis13Cys、CysHis14Cys、CysHis15Cys、CysHis16Cys、CysHis17Cys、CysHis18Cys、CysHis19Cys、CysHis20Cys、CysHis21~30Cys；CysOrn5Cys、CysOrn6Cys、CysOrn7Cys、CysOrn8Cys、CysOrn9Cys、CysOrn10Cys、CysOrn11Cys、CysOrn12Cys、CysOrn13Cys、CysOrn14Cys、CysOrn15Cys、CysOrn16Cys、CysOrn17Cys、CysOrn18Cys、CysOrn19Cys、CysOrn20Cys、CysOrn21~30Cys
が挙げられる。

20

【0140】

あるいはまた、式IVにおける部分Pに有用なペプチド配列は、以下の例の場合のような、2種類以上の異なる塩基性アミノ酸で構成されたものであり、この例は、配列組成を示すことを意図しており、塩基性アミノ酸が存在する特定の順序を指定するものではないが、Cys残基は末端位置に存在する：

30

CysArg(4~29)Lys1、CysArg(4~29)His1、CysArg(4~29)Orn1、CysLys(4~29)His1、CysLys(4~29)Orn1、CysHis(4~29)Orn1、CysArg(3~28)Lys2、CysArg(3~28)His2、CysArg(3~28)Orn2、CysLys(3~28)His2、CysLys(3~28)Orn2、CysHis(3~28)Orn2、CysArg(2~27)Lys3、CysArg(2~27)His3、CysArg(2~27)Orn3、CysLys(2~27)His3、CysLys(2~27)Orn3、CysHis(2~27)Orn3、CysArg(1~26)Lys4、CysArg(1~26)His4、CysArg(1~26)Orn4、CysLys(1~26)His4、CysLys(1~26)Orn4、CysHis(1~26)Orn4、CysArg(3~28)Lys1Orn1、CysArg(3~28)His1Orn1、CysArg1Lys(3~28)His1、CysArg1Lys(3~28)Orn1、CysLys(3~28)His1Orn1、CysArg1Lys1His(3~28)、CysArg1His(3~28)Orn1、CysLys1His(3~28)Orn1；

40

CysArg(2~27)Lys2His1、CysArg(2~27)Lys1His2、CysArg(2~27)Lys2Orn1、CysArg(2~27)Lys1Orn2、CysArg(2~27)His2Orn1、CysArg(2~27)His1Orn2、CysArg2Lys(2~27)His1、CysArg1Lys(2~27)His2、CysArg2Lys(2~27)Orn1、CysArg1Lys(2~27)Orn2、CysLys(2~27)His2Orn1、CysLys(2~27)His1Orn2、CysArg2Lys1His(2~27)、CysArg1Lys2His(2~27)、CysArg2His(2~27)Orn1、CysArg1His(2~27)Orn2、CysLys2His(2~27)Orn1、CysLys1His(2~27)Orn2；

50

CysArg_(1~26)Lys₃His₁, CysArg_(1~26)Lys₂His₂, CysArg_(1~26)Lys₁His₃, CysArg_(1~26)Lys₃Orn₁, CysArg_(1~26)Lys₂Orn₂, CysArg_(1~26)Lys₁Orn₃, CysArg_(1~26)His₃Orn₁, CysArg_(1~26)His₂Orn₂, CysArg_(1~26)His₁Orn₃, CysArg₃Lys_(1~26)His₁, CysArg₂Lys_(1~26)His₂, CysArg₁Lys_(1~26)His₃, CysArg₃Lys_(1~26)Orn₁, CysArg₂Lys_(1~26)Orn₂, CysArg₁Lys_(1~26)Orn₃, CysLys_(1~26)His₃Orn₁, CysLys_(1~26)His₂Orn₂, CysLys_(1~26)His₁Orn₃, CysArg₃Lys₁His_(1~26), CysArg₂Lys₂His_(1~26), CysArg₁Lys₃His_(1~26), CysArg₃His_(1~26)Orn₁, CysArg₂His_(1~26)Orn₂, CysArg₁His_(1~26)Orn₃, CysLys₃His_(1~26)Orn₁, CysLys₂His_(1~26)Orn₂, CysLys₁His_(1~26)Orn₃;

CysArg_(2~27)Lys₁His₁Orn₁, CysArg₁Lys_(2~27)His₁Orn₁, CysArg₁Lys₁His_(2~27)Orn₁, CysArg₁Lys₁His₁Orn_(2~27), CysArg_(1~26)Lys₂His₁Orn₁, CysArg_(1~26)Lys₁His₂Orn₁, CysArg_(1~26)Lys₁His₁Orn₂, CysArg₂Lys_(1~26)His₁Orn₁, CysArg₁Lys_(1~26)His₂Orn₁, CysArg₁Lys_(1~26)His₁Orn₂, CysArg₂Lys₁His_(1~26)Orn₁, CysArg₁Lys₂His_(1~26)Orn₁, CysArg₁Lys₁His_(1~26)Orn₂, CysArg₂Lys₁His₁Orn_(1~26), CysArg₁Lys₂His₁Orn_(1~26), CysArg₁Lys₁His₂Orn_(1~26);

10

CysArg_(4~29)Lys₁Cys, CysArg_(4~29)His₁Cys, CysArg_(4~29)Orn₁Cys, CysLys_(4~29)His₁Cys, CysLys_(4~29)Orn₁Cys, CysHis_(4~29)Orn₁Cys, CysArg_(3~28)Lys₂Cys, CysArg_(3~28)His₂Cys, CysArg_(3~28)Orn₂Cys, CysLys_(3~28)His₂Cys, CysLys_(3~28)Orn₂Cys, CysHis_(3~28)Orn₂Cys, CysArg_(2~27)Lys₃Cys, CysArg_(2~27)His₃Cys, CysArg_(2~27)Orn₃Cys, CysLys_(2~27)His₃Cys, CysLys_(2~27)Orn₃Cys, CysHis_(2~27)Orn₃Cys, CysArg_(1~26)Lys₄Cys, CysArg_(1~26)His₄Cys, CysArg_(1~26)Orn₄Cys, CysLys_(1~26)His₄Cys, CysLys_(1~26)Orn₄Cys, CysHis_(1~26)Orn₄Cys, CysArg_(3~28)Lys₁His₁Cys, CysArg_(3~28)Lys₁Orn₁Cys, CysArg_(3~28)His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys_(3~28)His₁Cys, CysArg₁Lys_(3~28)Orn₁Cys, CysLys_(3~28)His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His_(3~28)Cys, CysArg₁His_(3~28)Orn₁Cys, CysLys₁His_(3~28)Orn₁Cys;

20

CysArg_(2~27)Lys₂His₁Cys, CysArg_(2~27)Lys₁His₂Cys, CysArg_(2~27)Lys₂Orn₁Cys, CysArg_(2~27)Lys₁Orn₂Cys, CysArg_(2~27)His₂Orn₁Cys, CysArg_(2~27)His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys_(2~27)His₁Cys, CysArg₁Lys_(2~27)His₂Cys, CysArg₂Lys_(2~27)Orn₁Cys, CysArg₁Lys_(2~27)Orn₂Cys, CysLys_(2~27)His₂Orn₁Cys, CysLys_(2~27)His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His_(2~27)Cys, CysArg₁Lys₂His_(2~27)Cys, CysArg₂His_(2~27)Orn₁Cys, CysArg₁His_(2~27)Orn₂Cys, CysLys₂His_(2~27)Orn₁Cys, CysLys₁His_(2~27)Orn₂Cys;

30

40

50

CysArg_(1~26)Lys₃His₁Cys、CysArg_(1~26)Lys₂His₂Cys、CysArg_(1~26)Lys₁His₃Cys、CysArg_(1~26)Lys₃Orn₁Cys、CysArg_(1~26)Lys₂Orn₂Cys、CysArg_(1~26)Lys₁Orn₃Cys、CysArg_(1~26)His₃Orn₁Cys、CysArg_(1~26)His₂Orn₂Cys、CysArg_(1~26)His₁Orn₃Cys、CysArg₃Lys_(1~26)His₁Cys、CysArg₂Lys_(1~26)His₂Cys、CysArg₁Lys_(1~26)His₃Cys、CysArg₃Lys_(1~26)Orn₁Cys、CysArg₂Lys_(1~26)Orn₂Cys、CysArg₁Lys_(1~26)Orn₃Cys、CysLys_(1~26)His₃Orn₁Cys、CysLys_(1~26)His₂Orn₂Cys、CysLys_(1~26)His₁Orn₃Cys、CysArg₃Lys₁His_(1~26)Cys、CysArg₂Lys₂His_(1~26)Cys、CysArg₁Lys₃His_(1~26)Cys、CysArg₃His_(1~26)Orn₁Cys、CysArg₂His_(1~26)Orn₂Cys、CysArg₁His_(1~26)Orn₃Cys、CysLys₃His_(1~26)Orn₁Cys、CysLys₂His_(1~26)Orn₂Cys、CysLys₁His_(1~26)Orn₃Cys；

CysArg_(2~27)Lys₁His₁Orn₁Cys、CysArg₁Lys_(2~27)His₁Orn₁Cys、CysArg₁Lys₁His_(2~27)Orn₁Cys、CysArg₁Lys₁His_(2~27)Orn₁Cys、CysArg_(1~26)Lys₂His₁Orn₁Cys、CysArg_(1~26)Lys₁His₂Orn₁Cys、CysArg_(1~26)Lys₁His₁Orn₂Cys、CysArg₂Lys_(1~26)His₁Orn₁Cys、CysArg₁Lys_(1~26)His₂Orn₁Cys、CysArg₁Lys_(1~26)His₁Orn₂Cys、CysArg₂Lys₁His_(1~26)Orn₁Cys、CysArg₁Lys₂His_(1~26)Orn₁Cys、CysArg₁Lys₁His_(1~26)Orn₂Cys、CysArg₂Lys₁His₁Orn_(1~26)Cys、CysArg₁Lys₂His₁Orn_(1~26)Cys、CysArg₁Lys₁His₂Orn_(1~26)Cys。

10

【0141】

さらに、式IVにおけるペプチド部分Pに、さらに詳細に上記の1個以上の芳香族アミノ酸、特に、Trp、TyrまたはPheを含めてもよい。任意選択で、芳香族アミノ酸リッチのペプチド配列に、Trp、TyrおよびPheの長鎖配列の構造切断体としての機能を果たし得る少なくとも1個のプロリンをさらに含有させてもよい。芳香族アミノ酸配列の長さに応じて、2個、3個またはそれ以上のプロリンを組み込むことが好ましかろう。

20

【0142】

任意選択で、式IVにおける部分Pで、ペプチド配列が選択される場合、かかる配列に、特に電荷を有しない極性側鎖を有するもの、例えばThr、Ser、Asnおよび/またはGlnから選択される1個以上の親水性アミノ酸をさらに含有させてもよい。P一般へのかかるアミノ酸の組込みに関する上記のより詳細な説明を参照されたい。同じことが、部分P内への親油性アミノ酸、特に、Leu、Val、Ile、Ala、および/またはMetの組込み、ならびにPの他の修飾（あれば）に適用される。

30

【0143】

あるいはまた、式IVによるカチオン性化合物は、約0.5kDa~約30kDaの分子量を有するポリマー部分である部分Pを含むものであってもよい。また、この場合、上記のポリマー部分Pについて一般的に記載した選択肢および好ましいものを、Pが式IVの化合物の一部であるこの具体的な場合に提供するのがよい。

【0144】

この場合も、この場合のPが、いくつかの単位のPを含む、および/またはP¹およびP³と連結され、-SH基に由来するジスルフィド結合によって連結された多量体形態で存在するため、この場合のPには-SH基そのものは含まれ得ず、式IVに示されたような酸化型形態である。

40

【0145】

記載のように、Pは、任意選択で修飾されているポリアクリレート、キトサン、ポリエチレンイミン、ポリアミン、ポリアミノエステルもしくはポリアミドアミンまたはその任意のコポリマーであり得る。

【0146】

好ましくは、Pに選択されるポリマー部分は、約0.5kDa~約20kDa、例えば、それぞれ約0.5kDa~約11.5kDa、または約1kDa~約10kDa、または約0.1kDa~約8kDa、または約0.1kDa~約6kDa、または約0.1k

50

D a ~ 約 5 k D a、または約 0 . 5 k D a ~ 約 5 k D a、または約 0 . 3 k D a ~ 約 2 0 k D a、または約 0 . 3 k D a ~ 約 1 0 k D a、または約 0 . 4 k D a ~ 約 1 0 k D a、または約 0 . 5 k D a ~ 約 1 0 k D a、または約 0 . 5 k D a ~ 約 7 . 5 k D a、または約 0 . 5 k D a ~ 約 4 k D a、または約 0 . 5 k D a ~ 約 3 k D a、または約 0 . 6 7 k D a ~ 約 2 . 7 k D a の分子量を示すものである。

【 0 1 4 7 】

P に選択される好ましいポリマー部分としては、例えば、修飾ポリアミノ酸、例えば - アミノ酸 - ポリマーもしくは逆ポリアミド；修飾ポリエチレン、例えば（ポリ（N - エチル - 4 - ビニルピリジニウムブロミド））（P E V P）など；修飾アクリレート、例えば（ポリ（ジメチルアミノエチルメチルアクリレート））（p D M A E M A）など；修飾アミドアミン、例えば（ポリ（アミドアミン））（p A M A M）など；修飾ポリ アミノエステル（P B A E）、例えばジアミン末端修飾 1, 4 ブタンジオールジアクリレート - コ - 5 - アミノ - 1 - ペンタノールポリマーなど；デンドリマー、例えばポリプロピルアミンデンドリマーもしくは p A M A M ベースのデンドリマーなど；ポリイミン（1 種類もしくは複数種）、例えばポリ（エチレンイミン）（P E I あるいは p E I）、ポリ（プロピレンイミン）など；ポリアリルアミン、（1, 5 - ジメチル - 1, 5 - ジアザウンデカメチレンポリメトブロミド、または臭化ヘキサジメトリン（P o l y b r e n e（登録商標））が挙げられる。

10

【 0 1 4 8 】

また、カチオン性多糖、すなわち、糖主鎖ベースのポリマー、例えばシクロデキストリンベースのポリマー、デキストランベースのポリマー、キトサンなど；シラン主鎖ベースのポリマー、例えば P M O X A - P D M S コポリマーなど；ならびに 1 個以上のカチオン性ブロック（例えば、上記のカチオン性のポリマーから選択されるもの）と 1 個以上の親水性または疎水性のブロック（例えば、ポリエチレングリコール）の組合せからなるブロックポリマーも好ましい。

20

【 0 1 4 9 】

一実施形態では、少なくとも 1 つのカチオン性部分 P を含むカチオン性化合物が、式 I V a

$$L^1 - P^1 - \{ [P -]_a [(AA)_x -]_b \} P^3 - L^2 \quad (\text{式 I V a})$$

による化合物であり、

30

式中

P、P¹、P³、L¹ および L² は上記に規定のものであり；

(AA)_x はアミノ酸 (AA) 成分であり、ここで、x は 1 ~ 約 1 0 0 から選択される整数であり；

a および b は、a + b の和が 2 ~ 約 5 0 の範囲となるように 1 ~ 約 4 9 から独立して選択される整数であり；

部分 [P -] および [(AA)_x -] は、部分式 { [P -]_a [(AA)_x -]_b } 内において任意の順に配列され得；

P、P¹、P³ および (AA)_x の各々は隣りの各 P、P¹、P³ および (AA)_x にジスルフィド結合によって連結されている。

40

【 0 1 5 0 】

この場合も、式 I V との関連において P、P¹、P³、L¹ および L² について先に記載の選択肢および好ましいものが、この実施形態に同様に適用可能である。式 I V a は式 I V と、化合物のコア領域内の該 1 つ以上の部分 P との組合せで 1 つ以上のペプチド配列 (AA)_x をさらに含んでいるという点で異なっている。

【 0 1 5 1 】

個々の各 (AA)_x 単位は独立して選択され得るとともに、単位内の各アミノ酸であり得る。特定の非塩基性アミノ酸、例えば 1 個以上の芳香族アミノ酸、特に、T r p、T y r、および / または P h e；あるいは 1 個以上の親水性アミノ酸、特に、T h r、S e r、A s n および / または G l n；あるいは親油性アミノ酸、特に、L e u、V a l、I l

50

e、Ala、および/またはMetを導入するために1つ以上の(AA)_x単位を使用してもよい。そのため、上記のように、(AA)_x単位による組込みは、ペプチド配列P自体へのそれぞれのアミノ酸の導入の択一法である。式IVaによる(AA)_x単位として別個に組み込む場合、このような(AA)_x単位の各々は隣の各P、P¹、P³および(AA)_x部分にジスルフィド結合によって連結され、このジスルフィド結合は、好ましい実施形態の一例では、上記のような末端Cys残基を伴うものである。

【0152】

好ましくは、(AA)_x部分1つあたりのアミノ酸の数は約2～約50または約3～約50、より好ましくは約7～約30または約3～約25である。また、約3～約20個のアミノ酸、または約5～約20個のアミノ酸、または約7～約30個のアミノ酸、または約6～約18個のアミノ酸、または約7～約17個のアミノ酸、例えば約5～約15個のアミノ酸の範囲の長さも好ましい。

10

【0153】

式IVaにおけるPがペプチド部分である場合、成分{[P-]_a[(AA)_x-]_b}中のカチオン性のアミノ酸の含有量は少なくとも10%、20%または30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%または60%であることが好ましい。任意選択で、これは約50±10%、60±10%、70±10%、または80±10%である。これとの関連において、成分{[P-]_a[(AA)_x-]_b}全体の全アミノ酸の含有量(すなわち、数)を100%と規定する。

【0154】

20

式IVaにおける部分Pがポリマー鎖である場合、本明細書において定義した(生理学的)pHでの成分{[P-]_a[(AA)_x-]_b}中におけるカチオン性電荷の含有量は、好ましくは50%より多い、例えば少なくとも60%、70%、80%、90%またはさらには95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%であり、あるいは約50%超～100%の範囲、または約60%～約100%、または前述の値の任意の2つで形成される範囲であってもよい、ただし、成分{[P-]_a[(AA)_x-]_b}全体における本明細書において定義した(生理学的)pHでの全電荷、例えば正電荷と負電荷の含有量は100%であるものとする。

【0155】

さらなる一実施形態では、少なくとも1つのカチオン性部分Pを含むカチオン性化合物が、以下の式IVbまたはIVc:

30

$$L^1 - [(AA^1)_{x1} -]_{z1} P^1 - [P -]_n - P^3 - [(AA^2)_{x2}]_{z2} - L^2$$
(式IVb)または

$$L^1 - [(AA^1)_{x1} -]_{z1} P^1 - \{ [P -]_a [(AA)_x -]_b \} - P^3 - [(AA^2)_{x2}]_{z2} - L^2$$
(式IVc)

のうちの1つによる化合物であり、

式中、P、P¹、P³、(AA)_x、L¹およびL²は上記に規定のものであり；

(AA¹)_{x1}および(AA²)_{x2}はアミノ酸(AA)成分であり、ここで、アミノ酸AA¹およびAA²はAAと、および/または互いに同じであっても異なってもよく、x₁およびx₂は、1～約100から独立して選択される整数であり； z₁およびz₂は、1～約30から独立して選択される整数であり；

40

部分[P-]および[(AA)_x-]は、部分式{[P-]_a[(AA)_x-]_b}内において任意の順に配列され得；

P、P¹、P³、(AA)_x、(AA¹)_{x1}または(AA²)_{x2}はいずれも、隣のP、P¹、P³、(AA)_x、(AA¹)_{x1}、(AA²)_{x2}、L¹および/またはL²にジスルフィド結合によって連結され得る。

【0156】

この場合も、式IVおよび式IVaとの関連においてP、P¹、P³、L¹、L²および(AA)_xならびにaおよびbについて先に記載の選択肢および好ましいものが、式IVbおよびIVcによるカチオン性化合物でのこのような実施形態に同様に適用可能である

50

。また、 x について先に記載の好ましいものが x_1 および x_2 に適用される。式ⅠⅤbは式ⅠⅤaと、アミノ酸成分 $(AA)_x$ が、アミノ酸成分 $(AA^1)_{x_1}$ および $(AA^2)_{x_2}$ （これらも同じく、単位1つあたり1～約100個のアミノ酸および分子1つあたり1～約30単位の独立して選択される反復アミノ酸単位と規定される）で置き換えられており；分子のコア部分またはその付近に位置するのではなく、 $(AA^1)_{x_1}$ および $(AA^2)_{x_2}$ が、コア外であって、それぞれ P^1 と任意選択の成分 L^1 の間および P^3 と任意選択の成分 L^2 の間に位置するという点で異なっており、該分子構築物の物理的および生物学的特性のモジュレーションがもたらされる。式ⅠⅤcによる化合物では、アミノ酸成分が、式ⅠⅤaの場合のように分子のコア領域内および式ⅠⅤbの場合のように2つの末端部の方にも両方に存在する。

10

【0157】

整数 z_1 および z_2 は、1～約30、より好ましくはそれぞれ約1～約20、または1～約15、または1～約10の範囲から選択される。

【0158】

一実施形態では、組成物は2種類以上の異なる種のカチオン性のペプチドおよび/またはポリマーを含むものである。この実施形態では、カチオン性のペプチドおよび/またはポリマーの各々は個々に選択され得、ここで、上記のすべての選択肢および好ましいものが各選択に適用される。

【0159】

記載のように、カチオン性のリポイド化合物（単にリポイドとも称する）は脂質様化合物、すなわち脂質様の物性を有する両親媒性化合物である。

20

【0160】

一実施形態では、該リポイドが、少なくとも2個のカチオン性窒素原子および少なくとも2つの親油性尾部を含む化合物である。本明細書で用いる場合、「尾部」は、少なくとも4個、より好ましくは少なくとも6個の炭素原子の鎖または鎖様構造、例えば任意選択で置換されているヒドロカルビル、アシルまたはアシルオキシアルキル鎖である、分子の一部分の構造である。親油性尾部である任意選択で置換されているヒドロカルビル、アシルまたはアシルオキシアルキル鎖は、カチオン性窒素原子と直接連結されていてもよい。

【0161】

30

具体的な一実施形態では、該リポイドが、各々がカチオン性窒素原子と直接連結されている2つの同一の親油性尾部を含む化合物である。別の具体的な実施形態では、該リポイドが、各尾部がカチオン性窒素原子と直接連結されている3つの同一の親油性尾部を含む化合物である。さらなる具体的な一実施形態では、該リポイドが、各尾部がカチオン性窒素原子と直接連結されている4つ以上の同一の親油性尾部を含む化合物である。このような実施形態の各々において、該リポイドは任意選択で、親油性尾部に連結されていないさらなる窒素原子を含むものであってもよい。かかるリポイドもまた、オリゴアミンのカチオン性の窒素に結合されているかまたは該窒素のうちのいくつかに結合されている親油性尾部を有する該オリゴアミンに由来するカチオン性の主鎖を有する化合物であると理解され得る。

40

【0162】

親油性尾部が置換されているヒドロカルビル（例えば、アルキル）鎖である場合、置換基は、例えばメチルまたはヒドロキシルであり得る。

【0163】

任意選択で置換されているヒドロカルビル鎖は、例えばアルキルに似た飽和型であってもよく、不飽和、すなわちアルケニルまたはアルキニル（各々は、任意選択で1つ、2つ、3つまたはそれ以上の炭素-炭素二重結合および/または三重結合を有する）であってもよい。尾部構造がアシルまたはアシルオキシアルキル基であるか、または該基を含むものである場合、このようなものもまた、尾部の炭化水素セグメント内に1つ、2つまたはそれ以上の炭素-炭素二重結合および/または三重結合を含むものであってもよい。

50

【 0 1 6 4 】

一実施形態では、該リピドイド化合物は加水分解性連結基、例えばエステル、アミドまたはカルバメート基がないものである。本明細書で用いる場合、連結基は、該リピドイド分子の親油性尾部をカチオン性窒素原子を含む該親水性領域に連結する基である。核酸を細胞に送達し、トランスフェクションを向上させるための担体または薬剤として提案されている慣用的なカチオン性脂質は多くの場合、典型的ではないにしても、かかるリンカーまたは連結基を示すものであり、これらは、ほとんどの場合、加水分解性および/または酵素的切断性である。特に、エステル基を有するリンカー、また、アミド基またはカルバメート基を有するリンカーも提案されており、これらはすべて、インビボで加水分解性切断および/または酵素的切断を受け易い。

10

【 0 1 6 5 】

本明細書で用いる場合、加水分解性とは、生体液（例えば、間質液）中、インビボ条件下で数秒以内、数分以内、数時間以内または数日以内に認識可能な度合の加水分解が起こること；好ましくは、それぞれの化合物または基が7日後以内またはさらには2日後以内に少なくとも50%まで加水分解されることを意味する。

【 0 1 6 6 】

本発明の一部の実施形態では、該リピドイド化合物がPEG部分を含む。

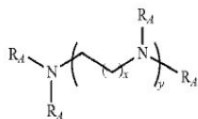
【 0 1 6 7 】

前記のように、該リピドイド化合物はカチオン性であり、これは、カチオン化可能であるか、または永久的にカチオン性であることを意味する。一実施形態では、該リピドイドがカチオン化可能である、すなわち、1個以上のカチオン化可能な窒素原子を含むが、永久的にカチオン性の窒素原子は含んでいない。別の実施形態では、該リピドイドのカチオン性窒素原子のうちの少なくとも1個が永久的にカチオン性である。任意選択で、該リピドイドは、2個の永久的にカチオン性の窒素原子、3個の永久的にカチオン性の窒素原子、またはさらには4個以上の永久的にカチオン性の窒素原子を含むものである。

20

【 0 1 6 8 】

さらなる一実施形態では、該リピドイド化合物が、式 I (化)



30

(式 I)

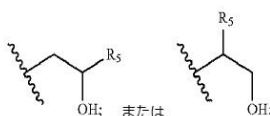
による化合物またはその薬学的に許容され得る塩である。

【 0 1 6 9 】

式 I において、各存在の R_A は、独立して、非置換の環式もしくは非環式の分枝もしくは非分枝状の C_{1-20} 脂肪族；置換もしくは非置換の環式もしくは非環式の分枝もしくは非分枝状の C_{1-20} ヘテロ脂肪族；置換もしくは非置換のアリール；置換もしくは非置換のヘテロアリール；

40

(化)

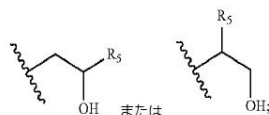


であり、

ここで、 R_A のうちの少なくとも1つが

(化)

50



である。

【 0 1 7 0 】

さらに、各存在の R_5 は、独立して、非置換の環式もしくは非環式の分枝もしくは非分枝状の $C_{8 \sim 16}$ 脂肪族；置換もしくは非置換のアリール；または置換もしくは非置換のヘテロアリールである。さらに、各存在の x は $1 \sim 10$ の整数であり、各存在の y は $1 \sim 10$ の整数である。本発明の一部の実施形態では、 R_A または R_5 が PEG - 部分であるか、または PEG - 部分で置換されている。

10

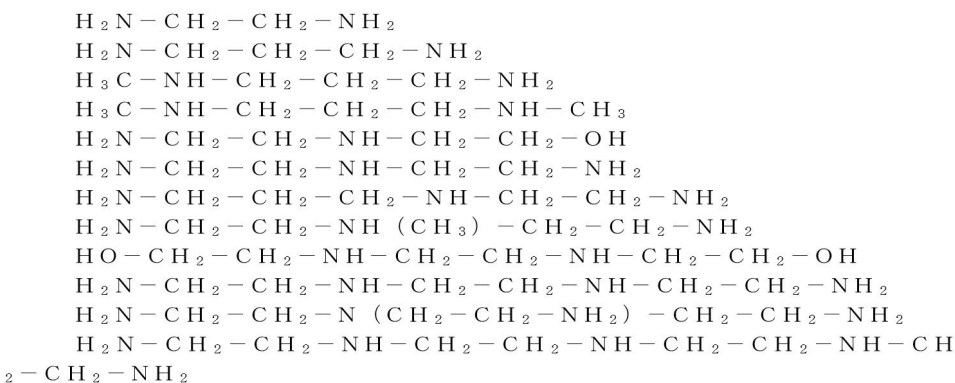
【 0 1 7 1 】

任意選択で、 R_5 は、少なくとも 1 つの存在が、またはさらには各存在が $C_8 \sim C_{16}$ アルキルである。好ましい実施形態の一例によれば、少なくとも 1 つの x は、1 または 2 から選択され、任意選択ですべての存在の x が 1 または 2 である。さらに、少なくとも 1 つの y は、1 または 2 から選択され、任意選択ですべての存在の y が 1 または 2 である。さらなる一実施形態では、すべての存在の R_5 が $C_8 \sim C_{16}$ アルキルであり、すべての存在の x が 1 または 2 であり、すべての存在の y が 1 または 2 である。

20

【 0 1 7 2 】

一部の実施形態では、かかるリポイドは、オリゴアミンとエポキシド末端脂肪族化合物を高温で、例えば $80 \sim 95$ にて溶媒の非存在下で反応させることにより調製され得る。かかるリポイド化合物は、該アミンと疎水性の脂肪族尾部によるエポキシドの開環によって生じる親水性部分を含む。好ましくは、該オリゴアミンは $2 \sim 5$ 個の窒素原子を含むものである。中でも、好ましいオリゴアミンは、限定されないが：



30

である。

【 0 1 7 3 】

本発明の一部の実施形態では、オリゴアミンベースのリポイドは任意選択で、PEG 部分で置換されている。

40

【 0 1 7 4 】

中でも、好ましいエポキシド末端脂肪族化合物は、限定されないが 2 - アルキルオキシランであり、該アルキルはブチル、ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシルまたはオクタデシルである。任意選択で、該アルキル基は、アルキル側鎖、例えばメチル、エチル、プロピルまたはイソプロピル側鎖をさらに示すものであってもよい。さらに、2 - アルキルオキシランのアルキル基はまた、1 個以上のヘテロ原子、例えば酸素も含むものであってもよい。さらに、エポキシド末端脂肪族化合物は 1 つ以上の炭素 - 炭素二重または三重結合を含むものであってもよい。

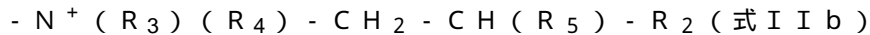
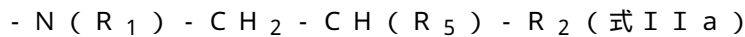
【 0 1 7 5 】

50

かかるリピドイド化合物の調製に関するさらなる手引きについてはUS 8 9 6 9 3 5 3を参照されたく、その開示内容はその全体が本明細書に組み込まれる。

【0176】

さらなる一実施形態によれば、この場合、該リピドイド化合物が、式II aおよび/または式II b:



の2つまたは3つの部分を含み、

ここで、式II aまたは式II bの個々の各部分について独立して、 R_1 は、水素または $C_1 \sim C_4$ -アルキルから選択され； R_2 は、線状または分枝状の飽和または不飽和の $C_6 \sim C_{16}$ ヒドロカルビル鎖から選択され； R_3 および R_4 は、 $C_1 \sim C_4$ -アルキルから選択され、 R_5 は水素またはヒドロキシルである。任意選択で、一部の実施形態では、式II aおよび/またはII bの各部分は個々に、PEG部分で置換されていてもよく、そうでなくてもよい。

【0177】

R_1 は、各存在について同じであっても異なってもよい。一実施形態では、特に R_1 が水素またはメチルである場合、これは各存在について同じである。また、 R_3 および R_4 も各存在について同じであってもよく；例えば、すべての場合の R_3 および R_4 がメチルであり得る。

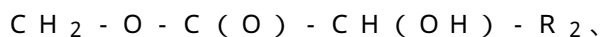
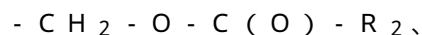
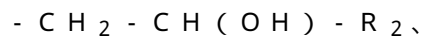
【0178】

またさらなる一実施形態では、該リピドイド化合物が、式中の R_1 が水素であり、 R_2 が線状または分枝状の $C_6 \sim C_{16}$ アルキル鎖であり、 R_3 および R_4 がメチルであり、 R_5 がヒドロキシルである式II aおよび/または式II bの3つの同一の部分を含む化合物である。例えば、式II aによる化合物は、オリゴアミン主鎖

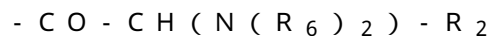


を主体とするものであり得、

ここで、3つの第1級アミノ基の各々について、水素原子のうちの1個は



および/または



で置換されており、

R_2 は線状または分枝状の $C_6 \sim C_{16}$ アルキル、特に、線状の C_6 、 C_8 、 C_{10} または C_{12} アルキルであり、各 R_6 は独立してHまたは CH_3 であり得る。式II bによる化合物は、同じオリゴアミン主鎖と同じ置換基 $-CH_2-CH(OH)-R_2$ を主体とするものであり得るが、加えて2つのメチル基を有し、その窒素原子の各々にも置換基 $-CH_2-CH(OH)-R_2$ が結合している。この場合も、 R_2 は線状または分枝状の $C_6 \sim C_{16}$ アルキル、特に、線状の C_6 、 C_8 、 C_{10} または C_{12} アルキルである。

【0179】

任意選択で、この場合、3つの第1級アミノ基の各々について、水素原子のうちの1個がPEG部分で置換されているか、またはPEG化されている。

【0180】

具体的な一実施形態では、永久的にカチオン性のリピドイドが、式IX:

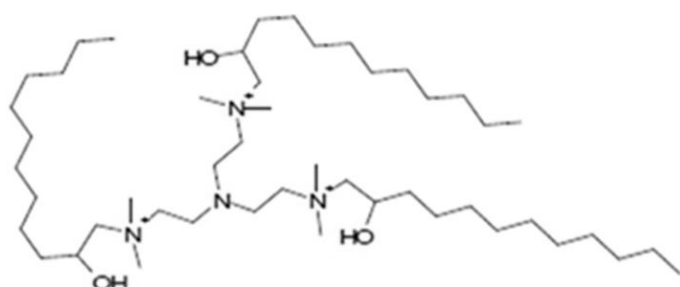
(化)

10

20

30

40

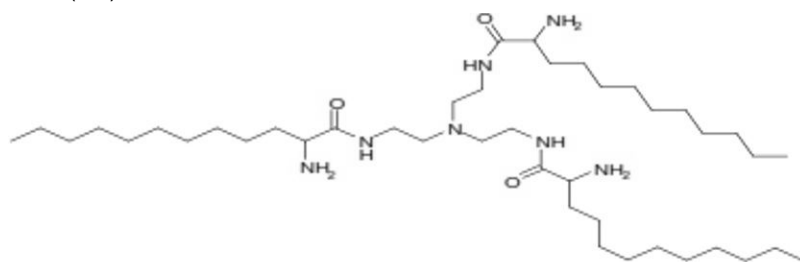


に示すカチオンと、さらに任意選択でアニオン、好ましくは上記のアニオンを含む化合物である。該化合物は、まず、式：

$$\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$$
のオリゴアミンを、非分枝飽和型の末端 C_{12} アルキルエポキシドと反応させた後、活性型メチル、例えばヨウ化メチルで4級化することにより調製され得る。本発明の一態様は、この化合物自体（その任意の塩を含む）に関するものである。

【0181】

本発明のさらなる具体的な一実施形態では、該リピドイドが、式X：
(化)



による化合物である。

【0182】

任意選択で、該リピドイド化合物は、式中の第1級アミンが各々、独立して、メチルで1回または2回置換されている式Xによるリピドイド化合物である。特定の好ましい一実施形態では、該リピドイド化合物が、式Xa：

(化)

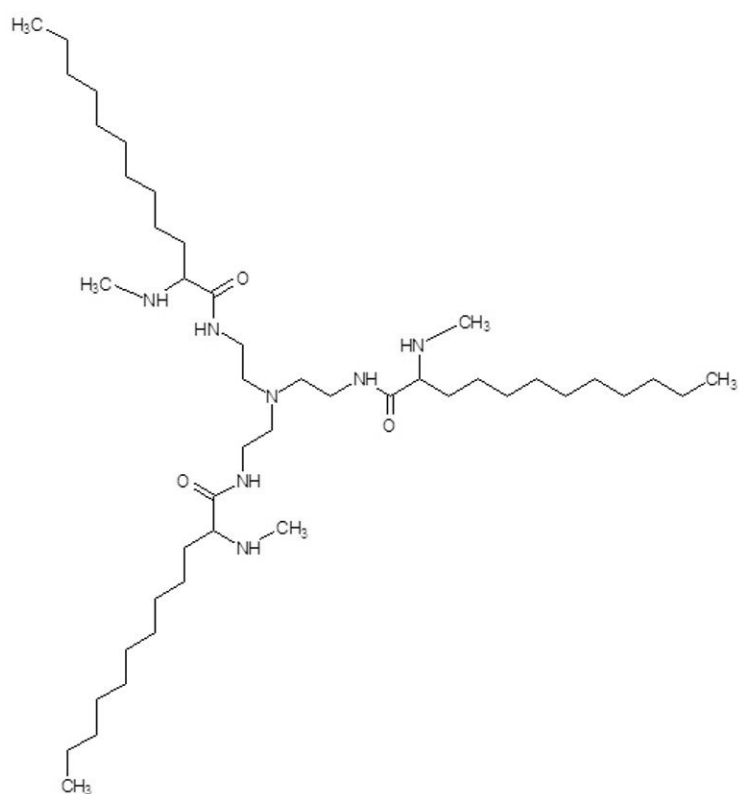
10

20

30

40

50



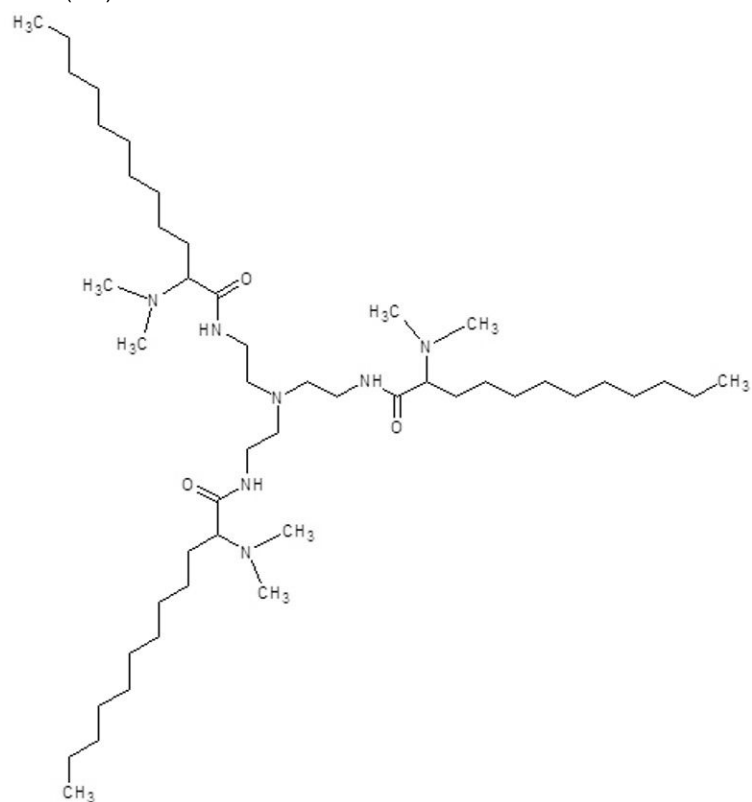
10

20

による化合物である。

【 0 1 8 3 】

本発明の特定の好ましいさらなる一実施形態では、該リポイド化合物が、式 X b :
(化)



30

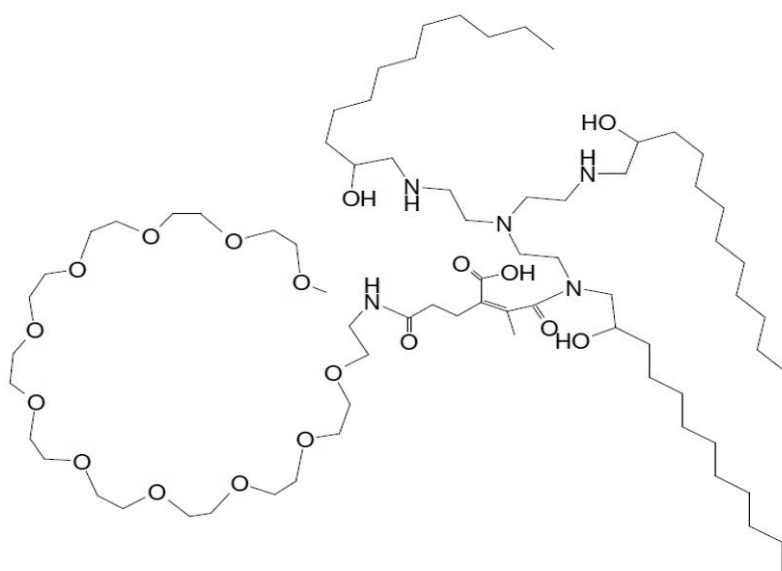
40

による化合物である。

【 0 1 8 4 】

50

特定の好ましい一実施形態では、該リピドイド化合物が、構造：
(化)



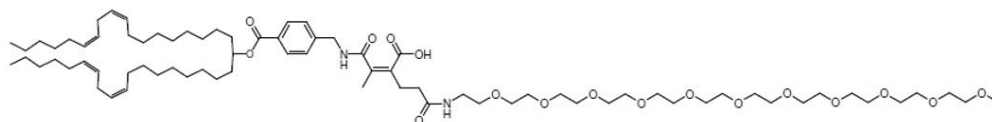
10

を含む化合物である。

20

【 0 1 8 5 】

本発明の好ましいさらなる一実施形態では、該リピドイド化合物が、構造：
(化)

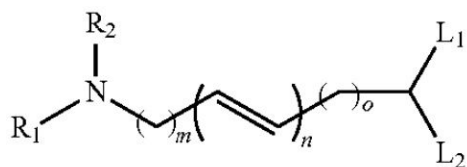


を含む化合物である。

30

【 0 1 8 6 】

さらなる一実施形態では、該リピドイド化合物が、式 I I I
(化)



(式 I I I)

による化合物であり、

40

式中、 R_1 および R_2 は各々、水素、任意選択で置換されている飽和または不飽和の $C_1 \sim C_{20}$ ヒドロカルビルおよび任意選択で置換されている飽和または不飽和の $C_6 \sim C_{20}$ アシルからなる群より独立して選択される。さらに、 L_1 および L_2 は各々、任意選択で置換されている飽和または不飽和の $C_1 \sim C_{30}$ ヒドロカルビルから独立して選択され； m および o は各々、ゼロおよび任意の正の整数からなる群より独立して選択され； n は任意の正の整数である。一部の実施形態では、式 I または I I によるリピドイドが P E G 化されている。他の実施形態では、式 I I I によるリピドイドが P E G 化されている。他の実施形態では、一般的なカチオン性またはイオン化性の脂質が P E G 化されている。一部の実施形態では、P E G 中のエチレングリコール部分の数が 5 ~ 9、10 ~ 20、21 ~ 30、31 ~ 40、41 ~ 50 もしくはそれ以上であるか、または P E G 部分が P E G 200

50

～PEG10000から選択される。好ましくはPEG部分がPEG500～PEG2000から選択される。他の実施形態では、分枝状のY字形または 形であるPEGポリマーが使用される。

【0187】

好ましい実施形態の一例では、式IIIのリピドイドの R_1 および R_2 がともに $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、より好ましくは $C_1 \sim C_6$ アルキル、特にメチル、エチル、プロピルまたはイソプロピルである。例えば、 R_1 と R_2 の両方がメチルであり得る。さらに、 n は、好ましくは約5以下、特に約2以下、例えば1である。さらに、 o は好ましくは0または1から選択され、 m は好ましくは1～6の範囲、例えば1、2、3、4、5または6から選択される。

10

【0188】

さらなる一実施形態では、 L_1 および L_2 は各々、不飽和の $C_6 \sim C_{22}$ ヒドロカルビルから、特に $C_{10} \sim C_{22}$ ヒドロカルビルから独立して選択される。中でも、好ましいヒドロカルビルは、14、16、18、20または22個の炭素原子を有する線状の -6および -9不飽和炭化水素鎖である。

【0189】

また、式中の R_1 および R_2 がともにメチルであり、 m が3または4であり、 n が1であり、 o が0または1であり、 L_1 および L_2 が、16または18個の炭素原子を有する同一の線状の -6および -9不飽和炭化水素鎖である式IIIのリピドイドも好ましい。一部の実施形態では、 R_1 、 R_2 、 L_1 または L_2 のうちの少なくとも1つがPEG部分であり得るか、またはPEG部分で置換されたものであり得る。

20

【0190】

さらなる一実施形態では、該リピドイドが、 n が0である場合を除く上記に規定した式IIIによる化合物である。

【0191】

任意選択で、該組成物は、各々が上記のように独立して選択される2種類以上のリピドイドを含むものであるか；またはリピドイドと別のカチオン性脂質の組合せを含むものであってもよい。

【0192】

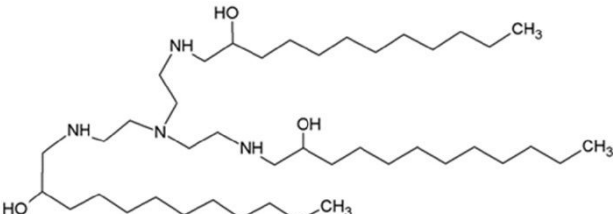
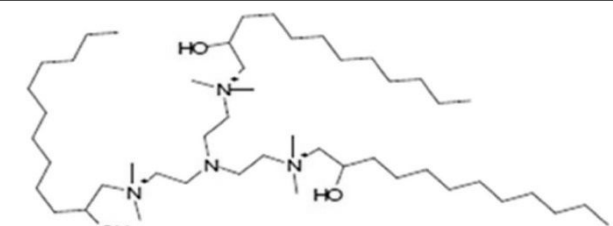
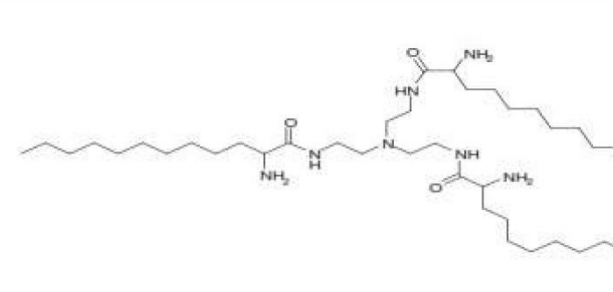
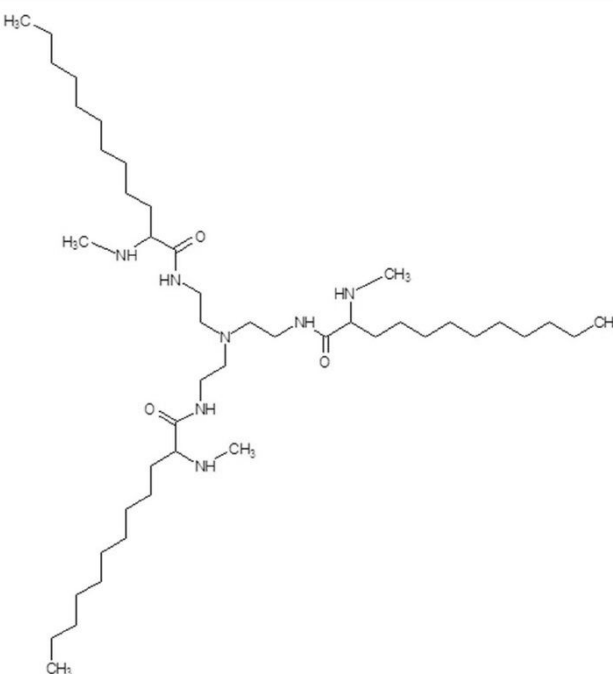
一実施形態では、該組成物は、上記に規定したリピドイド以外の脂質が実質的にないものであるか；または請求項のうちの1つに規定したものの以外の脂質が実質的にないものである。実際、これは、核酸の有効な送達に関して該リピドイドの特性および好都合な効果の恩恵があるが、上記に規定したようなカチオン性ではなく、かつリポフレックスまたは脂質ナノ粒子、例えば両性イオンのホスホ脂質またはステロイド、例えばコレステロールを調製するために多くの場合で使用される他の脂質（これは、場合によってはヘルパー脂質と称される）の存在を必要としないことは本発明の具体的な利点の1つである。したがって、該組成物には中性もしくは両性イオンの脂質がないこと；またはステロイド、例えばコレステロールがないことは本発明の好ましい実施形態の一例である。

30

【0193】

これらに限定されないが、以下のリピドイド構造を本発明において使用した：

40

3-C12-OH	
3-C12-OH-cat	
3-C12-アミド	
3-C12-アミドモノメチル	

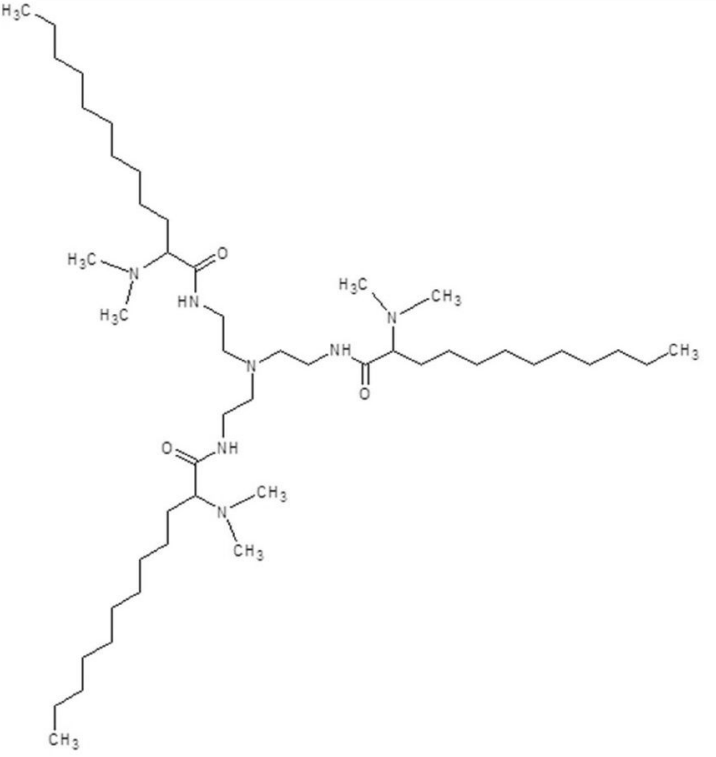
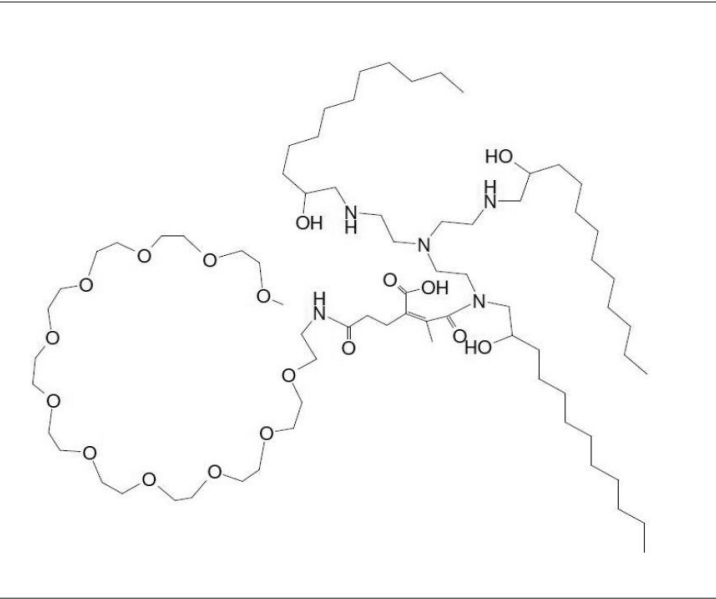
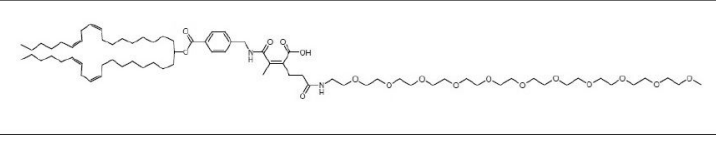
10

20

30

40

50

3-C12-アミドジメチル	 <p>Chemical structure of 3-C12-アミドジメチル (3-C12-amidodimethyl). The structure shows a central nitrogen atom connected to three amide groups. Each amide group consists of a carbonyl group (C=O) and a nitrogen atom (N) which is dimethylated (N(CH₃)₂). The carbonyl groups are connected to long alkyl chains, with one chain explicitly labeled as H₃C- and another as -CH₃.</p>
RevPEG(10)-3-C12-OH	 <p>Chemical structure of RevPEG(10)-3-C12-OH. The structure shows a central nitrogen atom connected to three amide groups. Each amide group consists of a carbonyl group (C=O) and a nitrogen atom (N) which is dimethylated (N(CH₃)₂). The carbonyl groups are connected to long alkyl chains, with one chain explicitly labeled as H₃C- and another as -CH₃.</p>
RevPEG(10)-DLin-pAbenzoic	 <p>Chemical structure of RevPEG(10)-DLin-pAbenzoic. The structure shows a central nitrogen atom connected to three amide groups. Each amide group consists of a carbonyl group (C=O) and a nitrogen atom (N) which is dimethylated (N(CH₃)₂). The carbonyl groups are connected to long alkyl chains, with one chain explicitly labeled as H₃C- and another as -CH₃.</p>

10

20

30

40

50

3 C 1 2 アミド-TMA c a t .	<p>Chemical structure of 3 C 1 2 アミド-TMA cat. (5). The structure shows a central nitrogen atom bonded to two long alkyl chains (octadecyl groups) and a central nitrogen atom. The central nitrogen atom is also bonded to two long alkyl chains (octadecyl groups) and a central nitrogen atom. The structure is labeled with a large number 5.</p>
3 C 1 2 アミド-DMA	<p>Chemical structure of 3 C 1 2 アミド-DMA (4). The structure shows a central nitrogen atom bonded to two long alkyl chains (octadecyl groups) and a central nitrogen atom. The central nitrogen atom is also bonded to two long alkyl chains (octadecyl groups) and a central nitrogen atom. The structure is labeled with a large number 4.</p>
3 C 1 2 アミド-NH ₂	<p>Chemical structure of 3 C 1 2 アミド-NH₂. The structure shows a central nitrogen atom bonded to two long alkyl chains (octadecyl groups) and a central nitrogen atom. The central nitrogen atom is also bonded to two long alkyl chains (octadecyl groups) and a central nitrogen atom. The structure is labeled with a large number 3.</p>
3 C 1 2 アミド-OH	<p>Chemical structure of 3 C 1 2 アミド-OH. The structure shows a central nitrogen atom bonded to two long alkyl chains (octadecyl groups) and a central nitrogen atom. The central nitrogen atom is also bonded to two long alkyl chains (octadecyl groups) and a central nitrogen atom. The structure is labeled with a large number 4.</p>

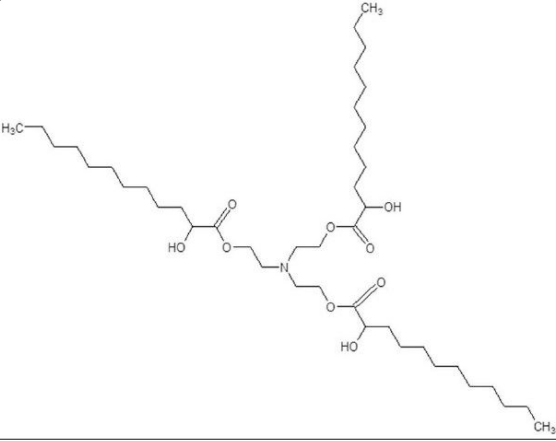
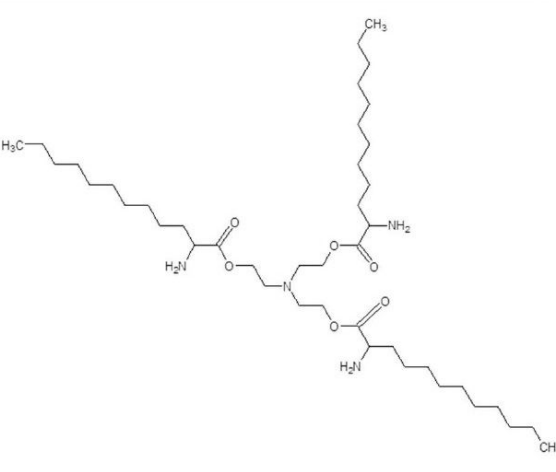
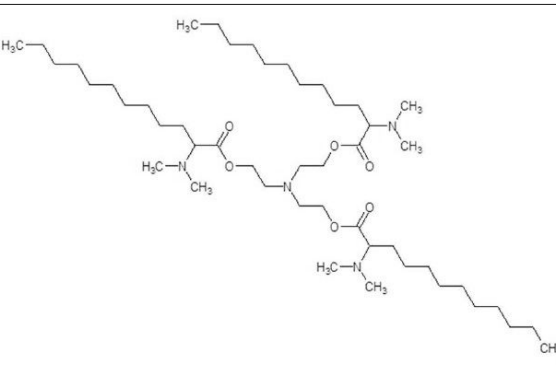
10

20

30

40

50

3 C 1 2 エステル-OH	 <p>The structure shows a central nitrogen atom bonded to three ethyl chains. Each ethyl chain is part of an ester linkage to a 1-hydroxy-2-octyl group. The octyl chains are labeled with H₃C- at the start and -CH₃ at the end. The hydroxyl groups are labeled -OH.</p>
3 C 1 2 エステル-アミン	 <p>The structure is similar to the first one, but the hydroxyl groups are replaced by primary amine groups labeled -NH₂. The octyl chains are labeled with H₃C- at the start and -CH₃ at the end.</p>
3 C 1 2 エステル-DMA	 <p>The structure is similar to the first one, but the hydroxyl groups are replaced by dimethylamino groups labeled -N(CH₃)₂. The octyl chains are labeled with H₃C- at the start and -CH₃ at the end.</p>

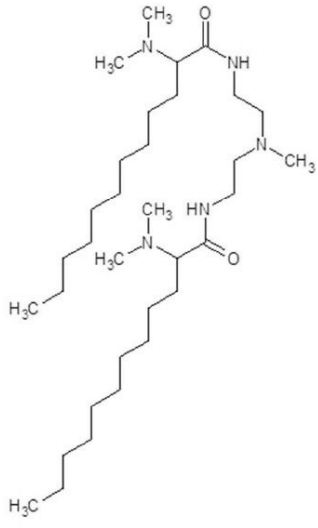
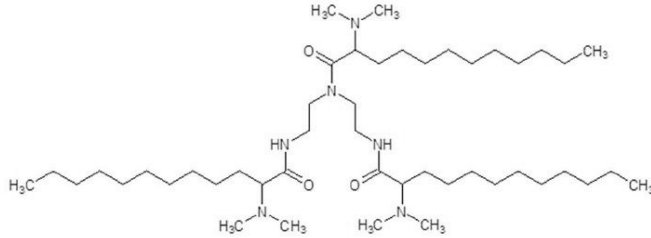
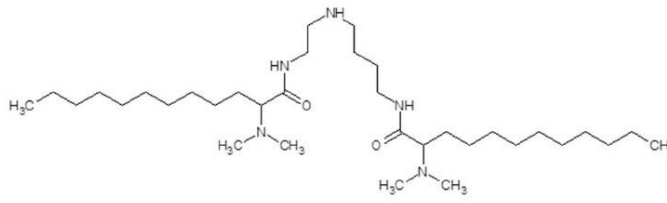
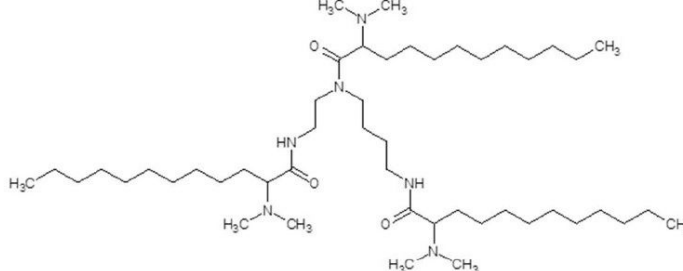
10

20

30

40

50

2 C 1 2 アミドーDMA		10
3 C 1 2 - l i n - アミドーDMA		20
2 C 1 2 - s p e r m - アミドーDMA		
3 C 1 2 - s p e r m - アミドーDMA		30

【 0 1 9 4 】

本発明の組成物中または後述する本発明のナノ粒子（１個または複数）中に含まれる生物学的に活性なカーゴ物質は好ましくは核酸化合物または核酸複合体である。該組成物中に含まれる核酸化合物は任意の型の核酸または核酸誘導体であり得る。好ましい実施形態の一部のものでは、核酸化合物が、化学修飾型および非修飾型のDNA、一本鎖もしくは二本鎖のDNA、コードもしくは非コードDNAから選択され、任意選択で、プラスミド、（短鎖）オリゴデゾキシヌクレオチド（すなわち、（短鎖）DNAオリゴヌクレオチド）、ゲノムDNA、DNAプライマー、DNAプローブ、免疫賦活性DNA、アプタマーまたはその任意の組合せから選択される。択一的または付加的に、かかる核酸分子は、例えば任意のPNA（ペプチド核酸）から選択され得る。さらに択一的または付加的に、また、特に好ましい一実施形態によれば、該核酸は、化学修飾型および非修飾型のRNA、一本鎖もしくは二本鎖のRNA、コードもしくは非コードRNAから選択され、任意選択で、メッセンジャーRNA（mRNA）、（短鎖）オリゴリボヌクレオチド（すなわ

40

50

ち、(短鎖)RNAオリゴヌクレオチド)、ウイルスRNA、レプリコンRNA、トランスファーRNA(tRNA)、リボソームRNA(rRNA)、免疫賦活性RNA(isRNA)、マイクロRNA、低分子干渉RNA(siRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)もしくはリボスイッチ、RNAアプタマー、RNAデコイ、アンチセンスRNA、リボザイムまたはその任意の組合せから選択される。好ましくは、該複合体の核酸分子はRNAである。より好ましくは、該複合体の核酸分子は(線状の)一本鎖RNA、さらにより好ましくはmRNAまたは免疫賦活性RNAである。

【0195】

任意選択で、生物学的に活性なカーゴ物質は1種類より多くの核酸化合物の組合せである。

10

【0196】

異なる角度から説明すると、該核酸は一本鎖または二本鎖の核酸化合物または核酸複合体であり得る。厳密に言えば、二本鎖の核酸はまた、非共有結合によるこれらの会合によって核酸複合体を形成する2つの核酸化合物(すなわち、2つの逆平行の鎖)が合わさったものとみなすこともできよう。しかしながら、一般的な技術的専門用語と同様に、二本鎖の核酸はまた、1つの化合物または分子として記載している場合もあり得る。また、該核酸は、少なくとも部分的に自己相補的な2つの鎖を含む部分的に二本鎖または部分的に一本鎖の核酸であってもよい。かかる部分的に二本鎖または部分的に一本鎖の核酸分子は典型的には、長い一本鎖の核酸分子と短い一本鎖の核酸分子によって形成されるか、または長さがほぼ等しい2本の一本鎖の核酸分子によって形成され、この場合では、一方の一本鎖の核酸分子が一部において他方の一本鎖の核酸分子に相補的であり、したがって、両者がこの領域で二本鎖の核酸分子を形成する、すなわち、部分的に二本鎖または部分的に一本鎖の核酸(分子)となる。好ましくは、核酸化合物は一本鎖の核酸である。さらに、核酸化合物は環状の核酸であっても線状の核酸であってもよく、好ましくは線状の核酸であり得る。

20

【0197】

任意選択で、該核酸は人工核酸であってもよい。「人工核酸分子」または「人工核酸」は典型的には、天然に存在しない核酸分子、例えばDNAまたはRNAであると理解され得る。換言すると、人工核酸分子は非天然核酸分子と理解され得る。かかる核酸分子は、その個々の配列(これは天然に存在しない)のため、および/またはヌクレオチドの天然に存在しない他の修飾、例えば構造の修飾のため非天然であり得る。人工核酸分子は、DNA分子、RNA分子またはDNA部分とRNA部分を含むハイブリッド分子であり得る。典型的には、人工核酸分子は、遺伝子工学的的方法によって所望の人工ヌクレオチド配列(異種配列)に対応するように設計および/または作製され得る。これとの関連において、人工配列は通常、天然に存在しないものであり得る配列である、すなわち、野生型配列と少なくとも1個のヌクレオチドが異なるものである。用語「野生型」は、天然に存在する配列と理解され得る。さらに、用語「人工核酸分子」は、「1個の分子」を意味することに限定されず、典型的には、同一の分子の集合体を包含していると理解されたい。したがって、これは、アリコートに含まれた複数の同一の分子に関するものであり得る。

30

40

【0198】

さらなる一実施形態では、本明細書において規定した配列(タンパク質、またはそれぞれ核酸)は、前記配列(タンパク質、またはそれぞれ核酸)と少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する配列(タンパク質、またはそれぞれ核酸)を含むもの、または該配列からなるものである。

【0199】

2種類以上の異なる核酸の組合せは、例えば、抗体の重鎖をコードしている核酸(例えば、RNA)ならびに同じ抗体の軽鎖をコードしている核酸を含む組成物の場合に有用で

50

あり得る。別の例は、C R I S P R / C a s 系 (C R I S P R : クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート ; C a s : C R I S P R 関連タンパク質) と称される生物体の免疫系の部分に影響を及ぼすための 2 種類以上の核酸の組合せである。

【 0 2 0 0 】

またさらなる一例は、本発明の組成物またはナノ粒子中におけるガイド RNA (g R N A) とコード核酸の組合せである。

【 0 2 0 1 】

コード核酸

該核酸は、限定されないが、例えば、治療活性なタンパク質またはペプチドから選択され得る、例えば、抗原、例えば、腫瘍抗原、病原性抗原 (例えば、動物抗原、ウイルス抗原、原生動物抗原、細菌抗原から選択される)、アレルギー性抗原、自己免疫抗原もしくはさらなる抗原、アレルゲン、抗体、免疫賦活性のタンパク質またはペプチド、抗原特異的 T 細胞受容体、あるいは特定の (治療) 用途に適した任意の他のタンパク質またはペプチドから選択され得るタンパク質またはペプチドをコードしているものであり得、ここで、コード核酸は細胞、組織または生物体に輸送され得、その後、そのタンパク質がこの細胞、組織または生物体内で発現され得る。

【 0 2 0 2 】

バイシストロニックな核酸または RNA およびマルチシストロニックな (m u l t i c i s t r o n i c) 核酸または RNA : バイシストロニックまたはマルチシストロニックな核酸または RNA は典型的には、典型的には 2 つ (バイシストロニック) またはそれ以上 (マルチシストロニックな) のコード領域を有するものであり得る核酸または RNA、好ましくは mRNA である。この状況におけるコード領域は、ペプチドまたはタンパク質に翻訳可能なコドンの配列である。

【 0 2 0 3 】

本発明の一部の特定の実施形態によれば、該核酸はモノ - 、バイ - またはマルチシストロニックなもの、好ましくは本明細書に規定したものである。バイ - またはマルチシストロニックな核酸分子内のコード配列は好ましくは、相違する本明細書に規定したタンパク質もしくはペプチドまたはその断片もしくはバリエーションをコードするものである。好ましくは、2 種類以上のタンパク質またはペプチドをコードしているコード配列は、バイ - またはマルチシストロニックな核酸内において、少なくとも 1 つの I R E S (内部リボソーム進入部位) 配列 (以下に規定する) によって隔離されているのがよい。したがって、用語「2 種類以上のタンパク質またはペプチドをコードしている」とは、限定されないが、バイ - またはさらにはマルチシストロニックな核酸が、例えば、少なくとも 2、3、4、5、6 種類もしくはそれ以上の (好ましくは、異なる) タンパク質もしくはペプチドおよび / または本明細書に示した定義の範囲内のタンパク質もしくはペプチドあるいはその断片もしくはバリエーションをコードしているものであり得ることを意味し得る。より好ましくは、限定されないが、バイ - またはさらにはマルチシストロニックな核酸は、例えば、少なくとも 2、3、4、5、6 種類もしくはそれ以上の (好ましくは、異なる) 本明細書に規定したタンパク質もしくはペプチドあるいは本明細書に規定したその断片もしくはバリエーションをコードしているものであり得る。これとの関連において、上記に規定したいわゆる I R E S (内部リボソーム進入部位) 配列は、単独のリボソーム結合部位として機能を果たすものであってもよいが、また、リボソームによって互いに独立して翻訳されるいくつかのタンパク質またはペプチドをコードしている上記に規定したバイ - またはさらにはマルチシストロニックな核酸をもたらすのに有用なものであってもよい。本明細書に従って使用され得る I R E S 配列の例は、ピコルナウイルス (例えば、F M D V)、ペスチウイルス (C F F V)、ポリオウイルス (P V)、脳心筋炎ウイルス (E C M V)、口蹄疫ウイルス (F M D V)、C 型肝炎ウイルス (H C V)、豚コレラウイルス (C S F V)、マウス白斑ウイルス (M L V)、サル免疫不全ウイルス (S I V) またはコオロギ麻痺ウイルス (C r P V) に由来のものである。

【 0 2 0 4 】

10

20

30

40

50

さらなる一実施形態によれば、本発明による核酸配列の該少なくとも1つのコード配列は、アミノ酸リンカー配列で連結された、またはアミノ酸リンカー配列なしの本明細書に規定した少なくとも2、3、4、5、6、7、8種類およびそれ以上のタンパク質もしくはペプチド（またはその断片および誘導体）をコードしているものであり得、ここで、前記リンカー配列には、剛直なリンカー、柔軟なリンカー、切断性のリンカー（例えば、自己切断性ペプチド）またはその組合せが包含され得る。この場合、該タンパク質またはペプチドは同一かまたは異なるかまたはその組合せであり得る。特定のタンパク質またはペプチドの組合せが、本明細書において説明した少なくとも2種類のタンパク質またはペプチドをコードしている前記核酸（本明細書において「多抗原-構築物/核酸」とも称する）にコードされ得る。

10

【0205】

本発明との関連において、多価（“polyvalent”またはさらには“multivalent”）核酸混合物を得るために、コード配列のある特定の組合せ（例えば、少なくとも2種類の異なるタンパク質を含む）は、モノ-、バイ-およびマルチシストロニックな核酸および/または多抗原-構築物/核酸の任意の組合せによって作製され得ることに注意されたい。

【0206】

特定の好ましい態様では、コードされたペプチドまたはタンパク質は、ヒト、ウイルス、細菌、原生動物のタンパク質またはペプチドから選択される。

【0207】

20

a) 治療活性なタンパク質

本発明との関連において、治療活性なタンパク質またはペプチドは、本発明のナノ粒子中に含まれる核酸にコードされ得る。治療活性なタンパク質は本明細書において、治療に対して効果を有するか、疾患、好ましくは本明細書に規定したものを予防的に抑制もしくは治療的に処置するか、または個体が必要とするタンパク質、例えば、個体の生体で生成されない、もしくはは不十分な量でしか生成されない天然タンパク質もしくはは修飾された天然タンパク質であるタンパク質と定義する。該タンパク質は、当業者に知られた任意の天然に存在する、または合成的に設計された組換えもしくはは単離タンパク質から選択され得る。これらに限定されないが、治療活性なタンパク質には、細胞内でのシグナル伝達を刺激または阻害し得るタンパク質、例えば、サイトカイン、リンホカイン、モノカイン、増殖因子、受容体、シグナル伝達分子、転写因子など；抗凝固因子；アンチトロンピン；抗アレルギー性タンパク質；アポトーシス因子またはアポトーシス関連タンパク質、治療用の活性酵素および任意の後天性疾患または任意の遺伝性疾患と関連している任意のタンパク質が包含され得る。

30

【0208】

b) 抗原

該核酸は択一的に、抗原をコードしているものであってもよい。本発明によれば、用語「抗原」は、免疫系によって認識され、例えば適応免疫応答の一部として抗体または抗原特異的T細胞の形成によって抗原特異的免疫応答を誘発し得る物質をいう。これとの関連において、抗原のエピトープ、抗原性断片または抗原性ペプチドであるタンパク質は、特に、それぞれB細胞、抗体またはT細胞によって認識され得るB細胞およびT細胞のエピトープを意味する。

40

【0209】

本発明との関連において、該核酸にコードされた抗原は典型的には、上記の定義に含まれる任意の抗原、抗原のエピトープまたは抗原性ペプチドであり、好ましくは、タンパク質抗原およびペプチド抗原、例えば、腫瘍抗原、アレルギー性抗原、自己免疫の自己抗原、病原性抗原などである。特に、抗原は、宿主生物体（例えば、ヒト被験体）自体とは別の生物体に由来するもの、例えばウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原生動物抗原、動物抗原、アレルギー性抗原などであり得る。アレルギー性抗原は、アレルギー抗原またはアレルゲンとも称され、典型的には、ヒト被験体においてアレルギーを引き起こし得る抗

50

原である。

【0210】

あるいはまた、該核酸にコードされた抗原は、宿主自体に由来するものであり得る。かかる抗原の例としては、腫瘍抗原、自己抗原（“self-antigen”またはauto-antigen）、例えば自己免疫の自己抗原が挙げられるが、元々は宿主生物体以外の細胞に由来するが、宿主生物体、組織または細胞内部で、例えばプロテアーゼによる分解または他の型の代謝によって断片化または分解された本明細書に規定した（非自己）抗原も包含される。

【0211】

本発明との関連において同じく好ましい抗原クラスの1つは腫瘍抗原のものである。中でも、好ましい腫瘍抗原は、腫瘍細胞の表面上に位置するものである。また、腫瘍抗原は、正常細胞と比べて腫瘍細胞において過剰発現されているタンパク質であってもよい。さらに、腫瘍抗原にはまた、それ自体は腫瘍細胞でないか、または元々は腫瘍細胞でなかった細胞内で発現され、腫瘍に付随する抗原も包含される。例えば、腫瘍に供給される血管の形成または再形成と関連している抗原、特に、血管新生に付随するもの、例えばVEGFまたはbFGFなどの増殖因子もまた対象である。また、腫瘍に付随する抗原としては、典型的には腫瘍が埋め込まれた細胞または組織に由来する抗原が挙げられる。さらに、一部の特定の他のタンパク質またはペプチドは、腫瘍が発生した患者の体液中に（過剰）発現され、高濃度で存在している場合があり得る。このような物質は、免疫応答を誘導しないという点で、厳密に言えば抗原ではないけれども、腫瘍抗原または腫瘍関連抗原とも称される。

【0212】

腫瘍抗原は、さらに腫瘍特異的抗原（TSA）と腫瘍関連抗原（TAA）に分けられ得る。TSAは、腫瘍細胞によってのみ提示され、健常細胞には提示されないものであり得る。これは、典型的には腫瘍特異的変異により生じる。TAAは、より一般的にみられ、通常、腫瘍細胞と健常細胞の両方によって産生される。これらの抗原は免疫系によって認識され、抗原提示細胞が細胞傷害性T細胞によって破壊され得る。さらに、腫瘍抗原は腫瘍の表面上に、例えば変異した受容体の形態で存在している場合もあり得る。この場合、これは、抗体によっても認識され得る。

【0213】

コードされた抗原がアレルゲンである場合、かかる抗原は、例えば動物、植物、カビ、真菌、細菌などの任意の供給源の抗原から選択され得る。植物由来アレルゲンは、例えば花粉由来のアレルゲンであり得る。この場合も、該ナノ粒子中に組み込まれる核酸は、天然抗原またはその断片もしくはエピトープをコードしているものであり得る。

【0214】

c) 抗体

さらなる一実施形態によれば、核酸化合物は抗体または抗体断片をコードしているものである。該抗体またはその断片は、(i)一本鎖抗体、(ii)一本鎖抗体の断片、(iii)多鎖抗体および(iv)多鎖抗体の断片からなる群より選択される。

【0215】

一般に、抗体は、ともに可変ドメインと定常ドメインを有する軽鎖および重鎖からなる。軽鎖は、N末端側の可変ドメインV_LとC末端側の定常ドメインC_Lからなる。対照的に、例えばIgG抗体の重鎖は、N末端側の可変ドメインV_Hと3つの定常ドメインC_{H1}、C_{H2}およびC_{H3}で構成されている。

【0216】

好ましい実施形態の一例では、抗体は完全長抗体から選択される。かかる抗体は、任意の組換え産生された抗体または天然に存在する抗体、特に、治療目的、診断目的もしくは科学目的に適した抗体、または疾患、例えば免疫疾患もしくはがんに関連している抗体であり得る。用語「抗体」は、その最も広い意味で用いており、具体的にはモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体（例えば、アゴニスト抗体、アンタゴニスト抗体、および

10

20

30

40

50

ブロック抗体または中和抗体)ならびにポリエピトープ特異性を有する抗体種を包含している。抗体は、任意のクラスの抗体、例えばIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgE抗体に属するものであり得る。さらに、抗体は、宿主生物体の免疫処置によって生じる抗体、またはその組換え操作されたバージョン、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、イントラボディに似ているものであってもよい。

【0217】

さらに、核酸化合物はまた、抗体断片、抗体のバリエーション、付加体または誘導体、例えば単鎖可変断片、ダイアボディまたはトリアボディをコードしているものであってもよい。抗体断片は好ましくは、上記の型の抗体のFab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fabc、pFc'、FdおよびFv断片から選択される。一般に、抗体断片は当該技術分野で知られているものである。例えば、Fab(“fragment, antigen binding”)断片は、重鎖および軽鎖の各々の1つの定常ドメインと1つの可変ドメインで構成されている。この2つの可変ドメインが、特異的抗原上のエピトープに結合する。この2つの鎖はジスルフィド結合によって連結されている。例えばscFv(“single chain variable fragment”)断片は典型的には、軽鎖および重鎖の可変ドメインからなるものである。これらのドメインは人工の結合、一般的にはポリペプチド結合、例えば15~25個のグリシン、プロリンおよび/またはセリン残基で構成されたペプチドによって連結されている。

10

【0218】

一実施形態では、生物学的に活性なカーゴ物質が少なくとも2種類の相違するRNAの組合せを含むものであって、RNAのうちの1種類が抗体またはその断片の重鎖をコードしており、別のRNAが該抗体またはその断片の対応する軽鎖をコードしているものである。

20

【0219】

さらなる一実施形態では、生物学的に活性なカーゴ物質が少なくとも2種類の相違するRNAの組合せを含むものであって、RNAのうちの1種類が抗体またはその断片の重鎖可変領域をコードしており、別のRNAが該抗体またはその断片の対応する軽鎖可変領域をコードしているものである。

【0220】

さらに、該抗体または抗体断片のいろいろな鎖がマルチシストロニック核酸(ポリシストロニック核酸とも称される)にコードされていることが好ましい。あるいはまた、いろいろな系統の抗体または抗体断片がいくつかのモノシストロニック核酸にコードされている。

30

【0221】

さらなる一実施形態によれば、本発明は、生物学的に活性なカーゴ物質の調製のための少なくとも1つの核酸分子の使用を含む。1つより多くの核酸分子が使用される場合、複合体化核酸分子は異なるものであり得る、すなわち、それにより少なくとも2つ相違する(複合体化)核酸分子の混合物が形成されている。

【0222】

一実施形態では、生物学的に活性なカーゴ物質は
(i)CRISPR関連タンパク質をコードしている核酸分子;および/または
(ii)1種類以上のガイドRNA配列(1つもしくは複数)
を含むものである。

40

【0223】

用語「CRISPR関連タンパク質」には、限定されないが、CAS9(CRISPR-Associated Protein 9)、CSY4、dCAS9、およびdCAS9-エフェクタードメイン(アクチベーターおよび/またはインヒビタードメイン)融合タンパク質が包含される。CRISPR関連タンパク質は、任意の数の種、例えば限定されないが、Streptococcus pyogenes、Listeria innocua、およびStreptococcus thermophilusに由来するもの

50

であり得る。

【0224】

用語「ガイドRNA (gRNA)」は、「人工ガイドRNA」、「短鎖ガイドRNA」、「低分子ガイドRNA」または「sgRNA」とも称され、転写開始部位の上流の目的遺伝子の5' UTRの一方の鎖に相補的な典型的には20~25ヌクレオチド長の配列を含むRNAを示す。sgRNAの設計の説明は、例えばMali et al., 2013, Science 339: 823-826をみるとよい。人工sgRNAは目的遺伝子を標的化し、人工ポリヌクレオチドにコードされたCRISPR関連タンパク質が目的遺伝子、例えば、転写のモジュレーションが所望される遺伝子と相互作用するように指向する。目的遺伝子は用途に応じて選択される。

10

【0225】

一実施形態では、本発明の組成物中またはナノ粒子(1個もしくは複数)中に含まれた1つの本発明の核酸分子が、前記CRISPR関連タンパク質と同時に前記ガイドRNA(1つまたは複数)をコードしている1つの核酸分子を含む。

【0226】

さらなる一実施形態では、生物学的に活性なカーゴ物質は、1つより多くの核酸分子の組合せを含むものである。別の実施形態では、1つより多くの本発明の核酸分子が、CRISPR関連タンパク質および前記ガイドRNA(1つまたは複数)をコードしている前記核酸分子を含む。この場合、生物学的に活性なカーゴ物質は、Cas9タンパク質と標的の特異的gRNAの両方を発現する2つの相違するRNAを含むものである。

20

【0227】

siRNA

好ましいさらなる一実施形態では、本発明のナノ粒子中に組み込まれる核酸化合物が、dsRNA、好ましくはsiRNAの形態である。dsRNAまたはsiRNAは、特にRNA干渉の現象との関連において重要である。RNA干渉(RNAi)のインビトロ手法は、遺伝子発現の配列特異的抑制を誘発する二本鎖RNA分子(dsRNA)に基づいたものである(Zamore(2001)Nat. Struct. Biol. 9: 746-750; Sharp(2001)Genes Dev. 5: 485-490; Hannon(2002)Nature 41: 244-251)。長鎖dsRNAでの哺乳動物細胞のトランスフェクションでは、プロテインキナーゼRおよびRnase Lの活性化によって非特異的効果、例えばインターフェロン応答などがもたらされる(Stark et al.(1998)Annu. Rev. Biochem. 67: 227-264; He and Katze(2002)Viral Immunol. 15: 95-119)。このような非特異的効果は、30bpより短いsiRNAでは誘発されないため、この非特異的効果は、短鎖の、例えば21~23量体のいわゆるsiRNA(低分子干渉RNA)を使用すると回避される(Elbashir et al.(2001)Nature 411: 494-498)。

30

【0228】

該核酸は、例えば、約17~約29塩基対、好ましくは約19~約25塩基対の長さを有する二本鎖RNA(dsRNA)であり得る。dsRNAは、本明細書において前述した治療的に意義のあるタンパク質または抗原の核酸配列セクション(コードセクションまたは非コードセクションのどちらか、好ましくはコードセクション)と好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば100%(dsRNAのヌクレオチドに関して)相補的なものである。90%相補的とは、ある長さ、例えば20個のヌクレオチドのdsRNAで、これには、それぞれのタンパク質をコードしているmRNAの対応するセクションとの相補性を有しないヌクレオチドが2個より多く含まれていないことを意味する。また、その配列が本明細書において前述した治療的に意義のあるタンパク質または抗原の核酸セクションと完全に相補的な二本鎖RNAも好ましい。

40

【0229】

一実施形態では、dsRNAは、一般構造5'-(N_{17~29})-3'、好ましくは一般

50

構造 $5' - (N_{9 \sim 25}) - 3'$ 、または $5' - (1N_9 \sim 24) - 3'$ 、または $5' - (2N_1 \sim 23) - 3'$ を有するものであり、ここで、それぞれ、各 N はヌクレオチドであり、該ヌクレオチド配列は、本明細書において前述した治療的に意義のあるタンパク質または抗原に対応する mRNA セクションに相補的である。原則的に、該 mRNA のコード領域内に存在する $17 \sim 29$ 、好ましくは $19 \sim 25$ 塩基対の長さを有するあらゆるセクションが本明細書における dsRNA の標的配列として有用であり得る。同様に、核酸として使用される dsRNA はまた、コード領域内に存在するものではない、特に、例えば該 mRNA の $5'$ 非コード領域内の、本明細書において先に（活性成分として）記載した（治療的に意義のある）タンパク質または抗原のヌクレオチド配列に対して指向されるもの、したがって、調節機能を有する mRNA の非コード領域に対して指向されるものであってもよい。したがって、核酸として使用される dsRNA の標的配列は、該 mRNA の翻訳領域および非翻訳領域内および / または本明細書において前述したタンパク質または抗原の制御エレメント領域内に存在するものであり得る。また、核酸として使用される dsRNA の標的配列は、非翻訳配列と翻訳配列の重複領域に存在するものであってもよく；特に、標的配列は、該 mRNA のコード領域の開始トリプレットの上流の少なくとも 1 個のヌクレオチドを含むものであり得る。

【0230】

免疫賦活性核酸

a) 免疫賦活性 CpG 核酸

別の実施形態によれば、本発明のナノ粒子中に組み込まれる核酸は免疫賦活性 CpG 核酸、特に、好ましくは自然免疫応答を誘導する CpG - RNA または CpG - DNA である。潜在的に好適な免疫賦活性 CpG 核酸の例としては、限定されないが、一本鎖 CpG - DNA (ss CpG - DNA)、二本鎖 CpG - DNA (dsDNA)、一本鎖 CpG - RNA (ss CpG - RNA) および二本鎖 CpG - RNA (ds CpG - RNA) が挙げられる。好ましくは、CpG 核酸は CpG - RNA、特に一本鎖 CpG - RNA (ss CpG - RNA) である。ヌクレオチドまたは塩基対に関する CpG 核酸の好ましい長さは、siRNA について上記のような好ましいものと同様である。好ましくは、CpG モチーフは非メチル化型である。

【0231】

b) 免疫賦活性 RNA (isRNA)

さらなる択一例によれば、生物学的に活性なカーゴ物質として本発明のナノ粒子中に組み込まれる核酸は免疫賦活性 RNA (isRNA) の形態であり得、これは好ましくは自然免疫応答を惹起するものである。

【0232】

かかる isRNA は二本鎖 RNA、一本鎖 RNA、または部分的に二本鎖の RNA、または短鎖 RNA オリゴヌクレオチドであり得る。好ましい実施形態の一例では、これは一本鎖 RNA である。

【0233】

さらに、isRNA は環状であっても線状であってもよい。好ましい実施形態の一例では、線状 isRNA、例えば線状一本鎖 RNA または長鎖一本鎖 RNA が使用される。

【0234】

さらに、isRNA はコード RNA であっても非コード RNA であってもよい。好ましい実施形態の一例によれば、非コード RNA、例えば非コード一本鎖 RNA、非コード線状 RNA、非コード線状一本鎖 RNA、または非コード長鎖線状一本鎖 RNA が isRNA として使用される。

【0235】

好ましいさらなる一実施形態によれば、isRNA は、インビトロ転写された RNA の場合のように、その $5'$ 末端に三リン酸部を担持しているものである。この好ましいものは、前述の型のすべての線状 isRNA に適用される。

【0236】

10

20

30

40

50

この場合も、本発明による生物学的に活性なカーゴ物質として使用される *isRNA* は、天然に存在するものであれ合成であれ、自然免疫応答を誘導し得る、および/または抗原によって誘導された適応免疫応答を増強もしくは補助し得る任意の型またはクラスの *RNA* から選択され得る。

【0237】

これとの関連において、免疫応答は種々の様式で起こり得る。好適な適応免疫応答のための実質的な要素は一部の特定の *T* 細胞亜集団の刺激である。*T* リンパ球は、典型的には2つの亜集団 *T* - ヘルパー 1 (*Th1*) 細胞と *T* - ヘルパー 2 (*Th2*) 細胞に分けられ、これらによって免疫系が細胞内 (*Th1*) および細胞外 (*Th2*) 病原体、例えば抗原を破壊し得る。この2つの *Th* 細胞集団は、これらが産生するエフェクタータンパク質 (サイトカイン) のパターンが異なっている。したがって、*Th1* 細胞は、マクロファージおよび細胞傷害性 *T* 細胞の活性化によって細胞性免疫応答を補助する。他方、*Th2* 細胞は、形質細胞への変換のための *B* 細胞の刺激によって、および抗体 (例えば、抗原に対する) の形成によって体液性免疫応答を促進させる。したがって、*Th1* / *Th2* 比は適応免疫応答の誘導および維持において非常に重要である。

【0238】

本発明との関連において、適応免疫応答の *Th1* / *Th2* 比は細胞性応答 (*Th1* 応答) の方にシフトさせる、すなわち、細胞性免疫応答を誘導または向上させることが好ましい。例えば、適応免疫応答を補助し得る自然免疫系は、*toll* 様受容体 (*TLR*) のリガンドによって賦活され得る。*TLR* は、哺乳動物において病原体関連分子パターン (*PAMP*) を認識し、自然免疫において極めて重要な役割を果たす高度に保存されたパターン認識受容体 (*PRR*) ポリペプチドファミリーである。現在、少なくとも13個のファミリー構成員が同定されており、*toll* 様受容体 *TLR1*、*TLR2*、*TLR3*、*TLR4*、*TLR5*、*TLR6*、*TLR7*、*TLR8*、*TLR9*、*TLR10*、*TLR11*、*TLR12* および *TLR13* と表記される。さらに、いくつかの特異的 *TLR* リガンドも同定されている。非メチル化型細菌 *DNA* およびその合成アナログ (*CpG DNA*) が *TLR9* のリガンドであることがわかった (Hemmi H et al. (2000) *Nature* 408: 740 - 5; Bauer S et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9237 - 42)。さらに、ある特定の *TLR* のリガンドはある特定の核酸分子を含んでいること、およびある特定の型の *RNA* は配列非依存的様式または配列依存的様式で免疫賦活性であり、このような種々の免疫賦活性 *RNA* は *TLR3*、*TLR7* もしくは *TLR8* または細胞内受容体、例えば *RIG-I*、*MDA-5*などを刺激するものであり得ることが報告されている。Lipford et al. により、ある特定の *G*、*U* 含有オリゴリボヌクレオチドが *TLR7* および *TLR8* を介して作用することにより免疫賦活性となることが調べられた (WO 03 / 086280 参照)。Lipford et al. によって報告されたこの免疫賦活性 *G*、*U* 含有オリゴリボヌクレオチドは、*RNA* 供給源、例えばリボソーム *RNA*、トランスファー *RNA*、メッセンジャー *RNA* およびウイルス *RNA* から誘導可能であると考えられた。

【0239】

したがって、本発明との関連において使用される *isRNA* は、免疫賦活性であることが知られた任意の *RNA* 配列、例えば限定されないが、*TLR*、例えばマウスファミリー構成員の *TLR1* ~ *TLR13*、もしくはより好ましくはヒトファミリー構成員の *TLR1* ~ *TLR10* から選択される *TLR*、特に、*TLR7* もしくは *TLR8* のリガンド; または *RNA* の細胞内受容体、例えば *RIG-I* もしくは *MDA-5* (例えば、Meylan, E., Tschopp, J. (2006): *Toll-like receptors and RNA helicases: Two parallel ways to trigger antiviral responses. Mol. Cell* 22, 561 - 569 参照) のリガンドである *RNA* 配列および/または該リガンドをコードしている *RNA* 配列を含むものであり得る。

【0240】

10

20

30

40

50

限定されないが、i s R N Aとしては、リボソームR N A (r R N A)、トランスファ－R N A (t R N A)、メッセンジャーR N A (m R N A)およびウイルスR N A (v R N A)が挙げられ得る。これは、約5 0 0 0個までのヌクレオチド、例えば、それぞれ約5 ~ 約5 0 0 0個のヌクレオチド、または約5 ~ 約1 0 0 0個、または約5 0 0 ~ 約5 0 0 0個、または約5 ~ 約5 0 0個、または約5 ~ 約2 5 0個、または約5 ~ 約1 0 0個、または約5 ~ 約5 0またはまたは約5 ~ 約3 0個のヌクレオチドを含むものであり得る。

【0 2 4 1】

この実施形態のさらに好ましい一態様によれば、i s R N Aは、式VまたはV Iの核酸を含むもの、または該核酸からなるものであり：

(N_u G₁ X_m G_n N_v)_a (式V)

10

式中：

Gはグアノシン(グアニン)、ウリジン(ウラシル)またはグアノシン(グアニン)もしくはウリジン(ウラシル)のアナログ、好ましくは、グアノシン(グアニン)またはそのアナログであり；

Xはグアノシン(グアニン)、ウリジン(ウラシル)、アデノシン(アデニン)、チミジン(チミン)、シチジン(シトシン)またはこれらのヌクレオチド(ヌクレオシド)のアナログ、好ましくは、ウリジン(ウラシル)またはそのアナログであり；

Nは、約4 ~ 5 0個、好ましくは約4 ~ 4 0個、より好ましくは約4 ~ 3 0個または4 ~ 2 0個の核酸の長さを有する核酸配列であり、各Nは独立して、グアノシン(グアニン)、ウリジン(ウラシル)、アデノシン(アデニン)、チミジン(チミン)、シチジン(シトシン)またはこれらのヌクレオチド(ヌクレオシド)のアナログから選択され；

20

aは、1 ~ 2 0、好ましくは1 ~ 1 5、最も好ましくは1 ~ 1 0の整数であり；

1は、1 ~ 4 0の整数であり、

ここで、1 = 1である場合、Gはグアノシン(グアニン)またはそのアナログであり、1 > 1である場合、これらのヌクレオチド(ヌクレオシド)の少なくとも5 0 %がグアノシン(グアニン)またはそのアナログであり；

mは整数であり、少なくとも3であり；ここで、m = 3である場合、Xはウリジン(ウラシル)またはそのアナログであり、m > 3である場合、少なくとも3個連続のウリジン(ウラシル)またはウリジン(ウラシル)のアナログが存在し；

nは、1 ~ 4 0の整数であり、ここで、n = 1である場合、Gはグアノシン(グアニン)またはそのアナログであり、n > 1である場合、これらのヌクレオチド(ヌクレオシド)の少なくとも5 0 %がグアノシン(グアニン)またはそのアナログであり；

30

u、vは互いに独立して0 ~ 5 0の整数であり、ここで、好ましくは、u = 0である場合、v = 1であるか、またはv = 0である場合、u = 1であり；

ここで、式Vの核酸分子は、少なくとも5 0個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも1 0 0個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも1 5 0個のヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも2 0 0個のヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも2 5 0個のヌクレオチドの長さを有するものである；

(N_u C₁ X_m C_n N_v)_a (式V I)

式中：

40

Cはシチジン(シトシン)、ウリジン(ウラシル)またはシチジン(シトシン)もしくはウリジン(ウラシル)のアナログ、好ましくは、シチジン(シトシン)またはそのアナログであり；

Xはグアノシン(グアニン)、ウリジン(ウラシル)、アデノシン(アデニン)、チミジン(チミン)、シチジン(シトシン)または上記のヌクレオチド(ヌクレオシド)のアナログ、好ましくは、ウリジン(ウラシル)またはそのアナログであり；

Nは各々、約4 ~ 5 0個、好ましくは約4 ~ 4 0個、より好ましくは約4 ~ 3 0個または4 ~ 2 0個の核酸の長さを有する核酸配列であり、各Nは、グアノシン(グアニン)、ウリジン(ウラシル)、アデノシン(アデニン)、チミジン(チミン)、シチジン(シトシン)またはこれらのヌクレオチド(ヌクレオシド)のアナログから独立して選択され；

50

a は、1 ~ 20、好ましくは1 ~ 15、最も好ましくは1 ~ 10の整数であり；

l は、1 ~ 40の整数であり、ここで、l = 1である場合、Cはシチジン（シトシン）またはそのアナログであり、l > 1である場合、これらのヌクレオチド（ヌクレオシド）の少なくとも50%がシチジン（シトシン）またはそのアナログであり；

mは整数であり、少なくとも3であり；ここで、m = 3である場合、Xはウリジン（ウラシル）またはそのアナログであり、m > 3である場合、少なくとも3個連続のウリジン（ウラシル）またはウリジン（ウラシル）のアナログが存在し；

n は、1 ~ 40の整数であり、ここで、n = 1である場合、Cはシチジン（シトシン）またはそのアナログであり、n > 1である場合、これらのヌクレオチド（ヌクレオシド）の少なくとも50%がシチジン（シトシン）またはそのアナログであり；

u、v は互いに独立して0 ~ 50の整数であり、ここで、好ましくは、u = 0である場合、v = 1であるか、またはv = 0である場合、u = 1であり；

ここで、式V Iの核酸分子は、少なくとも50個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも100個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも150個のヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも200個のヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも250個のヌクレオチドの長さを有するものである。

【0242】

式V Iに関して、エレメントN（すなわち、N_uとN_v）およびX（X_m）、特に、上記に規定したコア構造、ならびに整数a、l、m、n、uおよびvについて上記に示した定義はいずれも、式Vのエレメントに相応して同様に適用され、ここで、式V Iにおいてコア構造はC_lX_mC_nと規定される。隣接するエレメントN_uとN_vの定義は、N_uとN_vについて上記に示した定義と同一である。

【0243】

この実施形態の非常に特に好ましい一態様によれば、式Vによる核酸分子は、例えば、以下のいずれかの配列から選択され得る：

UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUCCUAGAAGUAC
ACG（配列番号：1）

UAGCGAAGCUCUUGGACCUAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGGUGCGUCCUAGAAGUAC
ACGAUCGCUUCGAGAACCUGGAUCCAAAAA AAAAAA AACCACGCAAGGAUCUUA
UGUGC（配列番号：2）

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUGCAUAUC
UCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCACUC
CCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGUCGUCAGUUGACCA
GUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUACACUCUAUUAGAUC（
配列番号：3）

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUGCAUAUC
UCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCACUC
CCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGUCGUCAGUUGACCA
GUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUACACUCUAUUAGAUCU
CGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGCUCUAAGUACCGAGUGUGCC
CAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCUCCUCUUAAGACUGCAGCGUAAGUGC
GGAAUCUGGGGAUCAAUUAACUGACUGCCUGGAUUACCCUCGGACAUUAUACCUUGU
AGCACGCUGUUGCUGUAUAGGUGACCAACGCCACUCGAGUAGACCAGCUCUCUUAAGU
CCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGGUCAAUCUACUUCUGGCUAGUUAAGAAUAGGCUGC
ACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAG（配列番号：4）

GGGAGAAAGCUCAAGCUUGGAGCAAUGCCCGCACAUUGAGGAAACCGAGUUGCAUAUC
UCAGAGUAUUGGCCCCCGUGUAGGUUAUUCUUGACAGACAGUGGAGCUUAUUCACUC
CCAGGAUCCGAGUCGCAUACUACGGUACUGGUGACAGACCUAGGUCGUCAGUUGACCA
GUCCGCCACUAGACGUGAGUCCGUCAAAGCAGUUAGAUGUUACACUCUAUUAGAUCU
CGGAUUACAGCUGGAAGGAGCAGGAGUAGUGUUCUUGCUCUAAGUACCGAGUGUGCC

10

20

30

40

50

CAAUACCCGAUCAGCUUAUUAACGAACGGCUCCUCCUCUUAGACUGCAGCGUAAGUGC
GGAAUCUGGGGAUCAAAUACUGACUGCCUGGAUUACCCUCGGACAUUAACCUUGU
AGCACGCUGUUGCUGUAUAGGUGACCAACGCCCACUCGAGUAGACCAGCUCUCUUAGU
CCGGACAAUGAUAGGAGGCGCGGUCAAUCUACUUCUGGCUAGUUAAGAAUAGGCUGC
ACCGACCUCUAUAAGUAGCGUGUCCUCUAGAGCUACGCAGGUUCGCAAUAAAAGCGUU
GAUUAGUGUGCAUAGAACAGACCUCUUAUUCGGUGAAACGCCAGAAUGCUAAAUUC
AAUAACUCUUCCAAACGCGUACGGCCGAAGACGCGCGCUUAUCUUGUGUACGUUCU
CGCACAUGGAAGAAUCAGCGGGCAUGGUGGUAGGGCAAUAGGGGAGCUGGGUAGCAGC
GAAAAAGGGCCCCUGCGCACGUAGCUUCGCGUUCGUCUGAAACAACCCGGCAUCCGU
UGUAGCGAUCCCGUUAUCAGUGUUAUUCUUGUGCGCACUAAGAUUCAUGGUGUAGUC
GACAAUAACAGCGUCUUGGCAGAUUCUGGUCACGUGCCCUAUGCCCGGGCUUGUGCCU
CUCAGGUGCACAGCGAUACUUAAGCCUUAAGGUACUCGACGUGGGUACCGAUUCGU
GACACUCCUAAGAUUAUCCACUGUGUUAAGCCCCGCACCGCCGACCUAACUGGUCC
AAUGUAUACGCAUUCGCGUGAGCGGAUCGAUAAUAAAAGCUUGAAUU (配列番号 : 5)
GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAACGUAGCCGGUAUU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCUAUAAAG
UGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUCUCCCCUUUUUUUU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGCCCAGAUC
(配列番号 : 6)

10

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAACGUAGCCGGUAUU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCUAUAAAG
UGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUCUCCCCUUUUUUUU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGCCCAGAUC
UUCGACCACAAGUGCAUAUAGUAGUCAUCGAGGGUCGCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
UUUUUUGGCCCAGUUCUGAGACUUCGCUAGAGACUACAGUUACAGCUGCAGUAGUAAC
CACUGCGGCUAUUGCAGGAAAUCCCGUUCAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGC
UCACUAUGAUUAAGAACCAGGUGGAGUGUCACUGCUCUCGAGGUCUCACGAGAGCGCU
CGAUACAGUCCUUGGAAGAAUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGCGACGAUCAC
AGAGAACUUCUAUUAUGCAGGUCUGCUCUAG (配列番号 : 7)

20

GGGAGAAAGCUCAAGCUUAUCCAAGUAGGCUGGUCACCUGUACAACGUAGCCGGUAUU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGACCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCUAUAAAG
UGCGGAUCCACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUAUCUCCCCUUUUUUUU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUAGUAAAUGCGUCUACUGAAUCCAGCGAUGAUGCUGGCCCAGAUC
UUCGACCACAAGUGCAUAUAGUAGUCAUCGAGGGUCGCCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
UUUUUUGGCCCAGUUCUGAGACUUCGCUAGAGACUACAGUUACAGCUGCAGUAGUAAC
CACUGCGGCUAUUGCAGGAAAUCCCGUUCAGGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCGC
UCACUAUGAUUAAGAACCAGGUGGAGUGUCACUGCUCUCGAGGUCUCACGAGAGCGCU
CGAUACAGUCCUUGGAAGAAUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGUGCGACGAUCAC
AGAGAACUUCUAUUAUGCAGGUCUGCUCUAGAACGAACUGACCUGACGCCUGAACU
UAUGAGCGUGCGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCUCCCAACAAUGUCGAU
CAAUAGCUGGGCUGUUGGAGACGCGUCAGCAAUAGCCGUGGCUCCAUAGGACGUGUAG
ACUUCUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCCCGGGACCACAAUAAUUCUUGCUU
GGUUGGGCGCAAGGGCCCCGUUCAGGUCAUAAACGGGUACAUGUUGCACAGGCUCUU
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUCGCGUGAGUUAUUCGGUCUCAAAAGACGGCAGACG
UCAGUCGACAACAGGUCUAAAGCAGUGCUACAACUGCCGUGUUCGUGUUUUUUUU
UUUUUUUUUUUUUGUGAACCUACACGGCGUGCACUGUAGUUCGCAAUUCAUAGGGUAC
CGGCUCAGAGUUAUGCCUUGGUUGAAACUGCCCAGCAUACUUUUUUUUUUUUUUUUUU
UUUUCAUAAUCCCAUGCUAAGCAAGGGAUGCCGCGAGUCAUGUUAAGCUUGAAUU (配列番号 : 8)

30

40

【 0 2 4 4 】

50

別の非常に特に好ましい実施形態によれば、式ⅤⅠによる核酸分子は、例えば、以下のいずれかの配列から選択され得る：

UAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUUUCCUGCGUCCUAGAAGUACA
CG（配列番号：9）

または

UAGCGAAGCUCUUGGACCUACCUUUUUUUUUUUUUUUUCCUGCGUCCUAGAAGUAC
ACGAUCGCUUCGAGAACCUGGAUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGACGCAAGGAUCUUC
UGUGC（配列番号：10）

【0245】

さらなる一実施形態では、本発明による生物学的に活性なカーゴ物質として使用される核酸化合物は化学修飾された核酸の形態であるか、または安定化された核酸、好ましくは安定化されたRNAもしくはDNA、例えば、エキソ-またはエンドヌクレアーゼによるインピボ分解本質的に抵抗性であるRNAである。

10

【0246】

化学修飾：

核酸に関する用語「修飾（1つまたは複数）」、「化学修飾（1つまたは複数）」、「修飾された」などは、本明細書で用いる場合、主鎖修飾ならびに糖鎖修飾または塩基修飾を含む化学修飾を示し得る。それぞれの修飾産物は、例えば「修飾核酸」または「化学修飾核酸」と称され得る。

【0247】

本発明との関連における主鎖修飾は、核酸化合物、好ましくはmRNAに含まれているヌクレオチドの主鎖のリン酸基が化学修飾される修飾である。糖鎖修飾は、核酸のヌクレオチドの糖鎖の化学修飾である。さらに、本発明との関連における塩基修飾は、人工核酸、好ましくはmRNAのヌクレオチドの塩基部分の化学修飾である。これとの関連において、ヌクレオチドアナログまたは修飾体は好ましくは、転写および/または翻訳に適用可能なヌクレオチドアナログから選択される。

20

【0248】

糖鎖修飾：

前記のように、ヌクレオシドおよびヌクレオチドは糖鎖部分において修飾され得る。例えば、2'-ヒドロキシル基(OH)は、いくつかのいろいろな「オキシ」または「デオキシ」置換基で修飾され得るか、または置き換えられ得る。「オキシ」-2'-ヒドロキシル基修飾の例としては、限定されないが、アルコキシまたはアリアルオキシ(-OR、例えば、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアルもしくは糖鎖)；ポリエチレングリコール(PEG)、-O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR；「ロックド」核酸(LNA)、これは、2'-ヒドロキシルが、例えばメチレン架橋によって同じリボース糖鎖の4'-炭素に連結されている；およびアミノ基(-O-アミノ、ここで、アミノ基、例えばNR₂は、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノもしくはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノであり得る)またはアミノアルコキシが挙げられる。

30

40

【0249】

「デオキシ」修飾は、水素、アミノ(例えば、NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、ジヘテロアリアルアミノもしくはアミノ酸)を含むものであるか；またはアミノ基が糖鎖にリンカーを介して結合され得るものであり、ここで、該リンカーは1個以上の原子C、NおよびOを含むものである。

【0250】

また、糖鎖基は、リボースの対応する炭素のものと反対の立体化学配置を有する1個以上の炭素を含有しているものであってもよい。したがって、人工核酸、好ましくはmRNAは、例えば糖鎖としてアラビノースを含有しているヌクレオチドを含むものであり得る。

50

【 0 2 5 1 】

主鎖修飾

核酸化合物の主鎖のリン酸基は、1個以上の酸素原子を異なる置換基で置き換えることにより修飾され得る。さらに、修飾されたヌクレオシドおよびヌクレオチドは、本明細書に記載の修飾リン酸基での非修飾リン酸基部分の全置換を含むものであってもよい。修飾リン酸基の例としては、限定されないが、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、ハイドロジェンホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネートおよびホスホトリエステルが挙げられる。ホスホロジチオエートは、両方にイオウで置き換えられた非連結性酸素を有する。また、リン酸基リンカーが、窒素（架橋型ホスホロアミデート）、イオウ（架橋型ホスホロチオエート）および炭素（架橋型メチレン - ホスホネート）での連結性酸素の置き換えによって修飾されていてもよい。

10

【 0 2 5 2 】

塩基修飾：

任意選択で、修飾は核酸化合物の核酸塩基部分に関するものであってもよい。核酸、例えばRNAにみられる核酸塩基の例としては、限定されないが、アデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルが挙げられる。例えば、本明細書に記載のヌクレオシドおよびヌクレオチドは主溝表面上が化学修飾されたものであり得る。一部の実施形態では、主溝の化学修飾は、アミノ基、チオール基、アルキル基またはハロ基を含むものであり得る。

【 0 2 5 3 】

本発明の特に好ましい実施形態では、塩基修飾は、2 - アミノ - 6 - クロロプリンリボシド - 5' - 三リン酸、2 - アミノプリン - リボシド - 5' - 三リン酸；2 - アミノアデノシン - 5' - 三リン酸、2' - アミノ - 2' - デオキシシチジン - 三リン酸、2 - チオシチジン - 5' - 三リン酸、2 - チオウリジン - 5' - 三リン酸、2' - フルオロチミジン - 5' - 三リン酸、2' - O - メチルイノシン - 5' - 三リン酸、4 - チオウリジン - 5' - 三リン酸、5 - アミノアリルシチジン - 5' - 三リン酸、5 - アミノアリルウリジン - 5' - 三リン酸、5 - ブロモシチジン - 5' - 三リン酸、5 - ブロモウリジン - 5' - 三リン酸、5 - ブロモ - 2' - デオキシシチジン - 5' - 三リン酸、5 - ブロモ - 2' - デオキシウリジン - 5' - 三リン酸、5 - ヨードシチジン - 5' - 三リン酸、5 - ヨード - 2' - デオキシシチジン - 5' - 三リン酸、5 - ヨードウリジン - 5' - 三リン酸、5 - ヨード - 2' - デオキシウリジン - 5' - 三リン酸、5 - メチルシチジン - 5' - 三リン酸、5 - メチルウリジン - 5' - 三リン酸、5 - プロピニル - 2' - デオキシシチジン - 5' - 三リン酸、5 - プロピニル - 2' - デオキシウリジン - 5' - 三リン酸、6 - アザシチジン - 5' - 三リン酸、6 - アザウリジン - 5' - 三リン酸、6 - クロロプリンリボシド - 5' - 三リン酸、7 - デアザアデノシン - 5' - 三リン酸、7 - デアザグアノシン - 5' - 三リン酸、8 - アザアデノシン - 5' - 三リン酸、8 - アジドアデノシン - 5' - 三リン酸、ベンゾイミダゾール - リボシド - 5' - 三リン酸、N1 - メチルアデノシン - 5' - 三リン酸、N1 - メチルグアノシン - 5' - 三リン酸、N6 - メチルアデノシン - 5' - 三リン酸、O6 - メチルグアノシン - 5' - 三リン酸、プソイドウリジン - 5' - 三リン酸、またはピューロマイシン - 5' - 三リン酸、キサントシン - 5' - 三リン酸から選択される。ヌクレオチドに対して特に好ましいものは、5 - メチルシチジン - 5' - 三リン酸、7 - デアザグアノシン - 5' - 三リン酸、5 - ブロモシチジン - 5' - 三リン酸、およびプソイドウリジン - 5' - 三リン酸からなる塩基修飾型ヌクレオチドの群から選択される塩基修飾が示される。

20

30

40

【 0 2 5 4 】

一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドとしては、プリン - 4 - オンリボヌクレオシド、5 - アザ - ウリジン、2 - チオ - 5 - アザ - ウリジン、2 - チオウリジン、4 - チオ - プソイドウリジン、2 - チオ - プソイドウリジン、5 - ヒドロキシウリジン、3 - メチルウリジン、5 - カルボキシメチル - ウリジン、1 - カルボキシメチル - プソイドウリジン、5 - プロピニル - ウリジン、1 - プロピニル - プソイドウリジン、5 - タウリノメチルウリジン、1 - タウリノメチル - プソイドウリジン、5 - タウリノメチル - 2 - チオ -

50

ウリジン、1 - タウリノメチル - 4 - チオ - ウリジン、5 - メチル - ウリジン、1 - メチル - プソイドウリジン、4 - チオ - 1 - メチル - プソイドウリジン、2 - チオ - 1 - メチル - プソイドウリジン、1 - メチル - 1 - デアザ - プソイドウリジン、2 - チオ - 1 - メチル - 1 - デアザ - プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、2 - チオ - ジヒドロウリジン、2 - チオ - ジヒドロプソイドウリジン、2 - メトキシウリジン、2 - メトキシ - 4 - チオ - ウリジン、4 - メトキシ - プソイドウリジン、および 4 - メトキシ - 2 - チオ - プソイドウリジンが挙げられる。

【0255】

一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドとしては、5 - アザ - シチジン、プソイドイソシチジン、3 - メチル - シチジン、N4 - アセチルシチジン、5 - ホルミルシチジン、N4 - メチルシチジン、5 - ヒドロキシメチルシチジン、1 - メチル - プソイドイソシチジン、ピロロ - シチジン、ピロロ - プソイドイソシチジン、2 - チオ - シチジン、2 - チオ - 5 - メチル - シチジン、4 - チオ - プソイドイソシチジン、4 - チオ - 1 - メチル - プソイドイソシチジン、4 - チオ - 1 - メチル - 1 - デアザ - プソイドイソシチジン、1 - メチル - 1 - デアザ - プソイドイソシチジン、ゼブラリン、5 - アザ - ゼブラリン、5 - メチル - ゼブラリン、5 - アザ - 2 - チオ - ゼブラリン、2 - チオ - ゼブラリン、2 - メトキシ - シチジン、2 - メトキシ - 5 - メチル - シチジン、4 - メトキシ - プソイドイソシチジン、および 4 - メトキシ - 1 - メチル - プソイドイソシチジンが挙げられる。

【0256】

他の実施形態では、修飾ヌクレオシドとしては、2 - アミノプリン、2、6 - ジアミノプリン、7 - デアザ - アデニン、7 - デアザ - 8 - アザ - アデニン、7 - デアザ - 2 - アミノプリン、7 - デアザ - 8 - アザ - 2 - アミノプリン、7 - デアザ - 2、6 - ジアミノプリン、7 - デアザ - 8 - アザ - 2、6 - ジアミノプリン、1 - メチルアデノシン、N6 - メチルアデノシン、N6 - イソペンテニルアデノシン、N6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、2 - メチルチオ - N6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、N6 - グリシニルカルバモイルアデノシン、N6 - トレオニルカルバモイルアデノシン、2 - メチルチオ - N6 - トレオニルカルバモイルアデノシン、N6、N6 - ジメチルアデノシン、7 - メチルアデニン、2 - メチルチオ - アデニン、および 2 - メトキシ - アデニンが挙げられる。

【0257】

他の実施形態では、修飾ヌクレオシドとしては、イノシン、1 - メチル - イノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7 - デアザ - グアノシン、7 - デアザ - 8 - アザ - グアノシン、6 - チオ - グアノシン、6 - チオ - 7 - デアザ - グアノシン、6 - チオ - 7 - デアザ - 8 - アザ - グアノシン、7 - メチル - グアノシン、6 - チオ - 7 - メチル - グアノシン、7 - メチルイノシン、6 - メトキシ - グアノシン、1 - メチルグアノシン、N2 - メチルグアノシン、N2、N2 - ジメチルグアノシン、8 - オキソ - グアノシン、7 - メチル - 8 - オキソ - グアノシン、1 - メチル - 6 - チオ - グアノシン、N2 - メチル - 6 - チオ - グアノシン、および N2、N2 - ジメチル - 6 - チオ - グアノシンが挙げられる。

【0258】

一部の実施形態では、ヌクレオチドは、主溝表面が修飾され得、ウラシルの C - 5 の水素をメチル基またはハロ基で置き換えることを含むものであり得る。

【0259】

具体的な実施形態では、修飾ヌクレオシドは 5' - O - (1 - チオリン酸) - アデノシン、5' - O - (1 - チオリン酸) - シチジン、5' - O - (1 - チオリン酸) - グアノシン、5' - O - (1 - チオリン酸) - ウリジンまたは 5' - O - (1 - チオリン酸) - プソイドウリジンである。

【0260】

さらなる具体的な実施形態では、修飾された核酸化合物、好ましくは mRNA は、6 - アザ - シチジン、2 - チオ - シチジン、 - チオ - シチジン、プソイド - イソ - シチジン、5 - アミノアリル - ウリジン、5 - ヨード - ウリジン、N1 - メチル - プソイドウリジ

10

20

30

40

50

ン、5, 6 - ジヒドロウリジン、 - チオ - ウリジン、4 - チオ - ウリジン、6 - アザ - ウリジン、5 - ヒドロキシ - ウリジン、デオキシ - チミジン、5 - メチル - ウリジン、ピロロ - シチジン、イノシン、 - チオ - グアノシン、6 - メチル - グアノシン、5 - メチル - シチジン (cytidine)、8 - オキソ - グアノシン、7 - デアザ - グアノシン、N1 - メチル - アデノシン、2 - アミノ - 6 - クロロ - プリン、N6 - メチル - 2 - アミノ - プリン、プソイド - イソ - シチジン、6 - クロロ - プリン、N6 - メチル - アデノシン、 - チオ - アデノシン、8 - アジド - アデノシン、7 - デアザ - アデノシンから選択されるヌクレオシド修飾を含むものであり得る。

【0261】

一実施形態では、該核酸は脂質修飾を示すものである。本明細書に規定したかかる脂質修飾型の核酸またはRNAは典型的には、該核酸またはRNAと共有結合により連結された少なくとも1つのリンカーと、それぞれのリンカーと共有結合により連結された少なくとも1つの脂質とをさらに含むものである。あるいはまた、脂質修飾型核酸は、本明細書に規定した少なくとも1個の核酸と、該核酸と共有結合により連結された（リンカーなしで）少なくとも1つの（二官能性の）脂質とを含むものである。第3の択一例によれば、脂質修飾型核酸は、本明細書に規定した核酸分子と、該RNAと共有結合により連結された少なくとも1つのリンカーと、それぞれのリンカーと共有結合により連結された少なくとも1つの脂質を含み、該核酸と共有結合により連結された（リンカーなしで）少なくとも1つの（二官能性の）脂質もまた含むものである。これとの関連において、脂質修飾は線状の核酸配列の末端部に存在することが特に好ましい。

【0262】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、本明細書に規定した修飾核酸配列、特に、本明細書に規定した修飾RNAは、いわゆる「5' キャップ」構造の付加によって修飾され得、該構造は好ましくは、本明細書に記載の核酸を安定化させるものである。5' - キャップは、一般的には成熟RNAの5' 末端を「キャップする」実体、典型的には、修飾ヌクレオチド実体である。5' - キャップは典型的には修飾ヌクレオチドによって、特にグアニンヌクレオチドの誘導体によって形成され得る。好ましくは、5' - キャップは5' 末端に5' - 5' - 三リン酸結合によって連結される。5' - キャップはメチル化型、例えばm7GpppNであり得、ここで、Nは、5' - キャップを担持している核酸の5' 末端ヌクレオチド、典型的にはRNAの5' 末端である。m7GpppNは5' - キャップ構造であり、これは、ポリメラーゼIIによって転写されるRNAに天然に存在し、したがって、好ましくは、これとの関連における修飾RNA中に含まれる修飾とはみなされない。したがって、本発明の修飾RNA配列は、5' - キャップとしてm7GpppNを含んでいてもよいが、さらに該修飾RNA配列は、典型的には、本明細書に規定した少なくとも1つのさらなる修飾を含むものである。

【0263】

5' キャップ構造のさらなる例としては、グリセリル、逆位 (inverted) デオキシ脱塩基残基 (部分)、4', 5' メチレンヌクレオチド、1 - (- D - エリスロフラノシル) ヌクレオチド、4' - チオヌクレオチド、炭素環式のヌクレオチド、1, 5 - アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、L - ヌクレオチド、 - ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、トレオ - ペントフラノシルヌクレオチド、非環式の3', 4' - セコヌクレオチド、非環式の3, 4 - ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環式の3, 5 - ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3' - 3' - 逆位ヌクレオチド部分、3' - 3' - 逆位脱塩基部分、3' - 2' - 逆位ヌクレオチド部分、3' - 2' - 逆位脱塩基部分、1, 4 - ブタンジオールホスフェート、3' - ホスホルアミデート、ヘキシルホスフェート、アミノヘキシルホスフェート、3' - ホスフェート、3' - ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、または架橋性もしくは非架橋性のメチルホスホネート部分が挙げられる。このような修飾型5' - キャップ構造は、これとの関連における少なくとも1つの修飾とみなされる。

【0264】

特に好ましい修飾型5' - キャップ構造は、キャップ1 (m7Gの隣接するヌクレオチド

のリボースのメチル化)、キャップ2(m7Gの下流の2つ目のヌクレオチドのリボースのさらなるメチル化)、キャップ3(m7Gの下流の3つ目のヌクレオチドのリボースのさらなるメチル化)、キャップ4(m7Gの下流の4つ目のヌクレオチドのリボースのメチル化)、ARCA(抗逆キャップアナログ、修飾ARCA(例えば、ホスホチオエート修飾ARCA)、イノシン、N1-メチル-グアノシン、2'-フルオロ-グアノシン、7-デアザ-グアノシン、8-オキソ-グアノシン、2-アミノ-グアノシン、LNA-グアノシン、および2-アジド-グアノシンである。したがって、本発明によるRNAは、好ましくは5'-キャップ構造を含むものである。

【0265】

好ましい一実施形態では、5'-キャップ構造は共転写により、本明細書に規定したキャップ-アナログを本明細書に規定したRNAインビトロ転写反応において用いて付加される。別の実施形態では、5'-キャップ構造は酵素的キャッピングによって、キャッピング酵素(例えば、ワクシニアウイルスキャッピング酵素)を用いて付加される。

10

【0266】

任意選択で、エキソ-またはエンドヌクレアーゼによるインビボ分解に本質的に抵抗性であるmRNAである核酸が選択され得る。かかる安定化は、例えば、主鎖のリン酸基を化学修飾することによって行われ得る。糖鎖または塩基の修飾をさらに使用してもよい。また、mRNAを、いわゆる「5'キャップ」構造を付加することによって、RNaseによる分解に対して安定化させてもよい。これとの関連において特に好ましいものは、5'キャップ構造としてのG(5')ppp(5')Gまたはm7G(5')ppp(5')N(Nは20A、G、CまたはUである)が示される。別の例によれば、該mRNAは3'末端に、典型的には約10~約200個のアデノシンヌクレオチド、好ましくは約10~約100個のアデノシンヌクレオチド、もしくは約20~約100個のアデノシンヌクレオチドまたはさらには約40~約80個のアデノシンヌクレオチドのポリ-A尾部を示すものであり得る。さらなる一例によれば、該mRNAは3'末端に、典型的には約10~約200個のシトシンヌクレオチド、好ましくは約10~約100個のシトシンヌクレオチド、もしくは約20~約70個のシトシンヌクレオチド、もしくは約20~約60個またはさらには約10~約40個のシトシンヌクレオチドのポリ-C尾部を有するものであり得る。

【0267】

別の実施形態によれば、本発明の核酸配列は、該核酸配列のグアノシン/シトシン(G/C)含有量を修正することにより修正され、したがって安定化され得る。

30

【0268】

本発明の特に好ましい一実施形態では、本発明の核酸配列のコード配列のG/C含有量が、それぞれの野生型核酸配列、すなわち非修正核酸のコード配列のG/C含有量と比べて修正される、特に増大される。該核酸にコードされたアミノ酸配列は好ましくは、それぞれの野生型核酸にコードされたアミノ酸配列と比べて修正されていない。本発明の核酸配列のこの修正は、任意の核酸領域の該配列、特に、任意のRNA領域の該配列が翻訳されることが、該核酸、特に該RNAの効率的な翻訳に重要であるという事実に基づいたものである。したがって、核酸の組成および種々のヌクレオチドの配列が重要である。特に、RNAの場合、高いG(グアノシン)/C(シトシン)含有量を有する配列の方が、高いA(アデノシン)/U(ウラシル)含有量を有する配列より安定である。したがって、本発明によれば、該核酸のコドンは、高いG/Cヌクレオチド量を含むように、それぞれの野生型核酸と比べてさまざまであるが翻訳されるアミノ酸配列は保持されている。いくつかのコドンが1つの同じアミノ酸をコードしているという事実(いわゆる遺伝コードの縮重)との関連において、この安定性のための最も好都合なコドンが決定され得る(いわゆる択一的(alternative)コドン使用頻度)。該核酸にコードされたアミノ酸に応じて、該核酸配列には、その野生型配列に対する種々の修正の可能性が存在する。

40

【0269】

以下の修正がRNA分子に適用され得るが、DNA分子にも振り替え可能であり得る：排他的にGまたはCヌクレオチドを含むコドンにコードされているアミノ酸の場合、該コ

50

ドンの修正は必要ない。したがって、P r oのコードン（C C CまたはC C G）、A r gのコードン（C G CまたはC G G）、A l aのコードン（G C CまたはG C G）およびG l yのコードン（G G CまたはG G G）は、AまたはUが存在しないため修正を必要としない。対照的に、Aおよび/またはUヌクレオチドを含むコードンは、同じアミノ酸をコードしているがAおよび/またはUを含んでいない他のコードンでの置換によって修正され得る。このようなものの例は：P r oのコードンがC C UまたはC C AからC C CまたはC C Gに修正され得る；A r gのコードンがC G UまたはC G AまたはA G AまたはA G GからC G CまたはC G Gに修正され得る；A l aのコードンがG C UまたはG C AからG C CまたはG C Gに修正され得る；G l yのコードンがG G UまたはG G AからG G CまたはG G Gに修正され得ることである。他の場合では、AまたはUヌクレオチドをそのコードンから消失させることはできないが、しかしながら、AおよびUの含有量を、少ない含有量でAおよび/またはUヌクレオチドを含むコードンを使用することによって減らすことが可能である。このようなものの例は：P h eのコードンがU U UからU U Cに修正され得る；L e uのコードンがU U A、U U G、C U UまたはC U AからC U CまたはC U Gに修正され得る；S e rのコードンがU C UまたはU C AまたはA G UからU C C、U C GまたはA G Cに修正され得る；T y rのコードンがU A UからU A Cに修正され得る；C y sのコードンがU G UからU G Cに修正され得る；H i sのコードンがC A UからC A Cに修正され得る；G l nのコードンがC A AからC A Gに修正され得る；I l eのコードンがA U UまたはA U AからA U Cに修正され得る；T h rのコードンがA C UまたはA C AからA C CまたはA C Gに修正され得る；A s nのコードンがA A UからA A Cに修正され得る；L y sのコードンがA A AからA A Gに修正され得る；V a lのコードンがG U UまたはG U AからG U CまたはG U Gに修正され得る；A s pのコードンがG A UからG A Cに修正され得る；G l uのコードンがG A AからG A Gに修正され得る；終止コードンU A AがU A GまたはU G Aに修正され得ることである。他方において、M e t（A U G）およびT r p（U G G）のコードンの場合は、配列修正の可能性はない。上記に羅列した置換は、個々に、または考えられ得るあらゆる組合せのいずれかで、本発明のRNA配列のG / C含有量を、その具体的な野生型RNA（すなわち、元の配列）と比べて増大させるために使用され得る。したがって、例えば、野生型配列に存在しているT h rのすべてのコードンがA C C（またはA C G）に修正され得る。しかしながら、好ましくは、例えば、上記の置換の可能性の組合せ：

- 元の配列（野生型RNA）のT h rをコードしているすべてのコードンをA C C（またはA C G）に置換および
- S e rをコードしている元々のすべてのコードンをU C C（またはU C GまたはA G C）に置換；元の配列のI l eをコードしているすべてのコードンをA U Cに置換および
- L y sをコードしている元々のすべてのコードンをA A Gに置換および
- T y rをコードしている元々のすべてのコードンをU A Cに置換；元の配列のV a lをコードしているすべてのコードンをG U C（またはG U G）に置換および
- G l uをコードしている元々のすべてのコードンをG A Gに置換および
- A l aをコードしている元々のすべてのコードンをG C C（またはG C G）に置換および
- A r gをコードしている元々のすべてのコードンをC G C（またはC G G）に置換；元の配列のV a lをコードしているすべてのコードンをG U C（またはG U G）に置換および
- G l uをコードしている元々のすべてのコードンをG A Gに置換および
- A l aをコードしている元々のすべてのコードンをG C C（またはG C G）に置換および
- G l yをコードしている元々のすべてのコードンをG G C（またはG G G）に置換および
- A s nをコードしている元々のすべてのコードンをA A Cに置換；元の配列のV a lをコードしているすべてのコードンをG U C（またはG U G）に置換および
- P h eをコードしている元々のすべてのコードンをU U Cに置換および
- C y sをコードしている元々のすべてのコードンをU G Cに置換および
- L e uをコードしている元々のすべてのコードンをC U G（またはC U C）に置換および
- G l nをコードしている元々のすべてのコードンをC A Gに置換および
- P r oをコードしている元々のすべてのコードンをC C C（またはC C G）に置換；など

10

20

30

40

50

が使用される。

【 0 2 7 0 】

具体的な一実施形態によれば、本明細書に規定したペプチドまたはタンパク質またはその断片もしくはバリエーションをコードしている領域内あるいは野生型RNA配列の配列全体の置換可能なコドンの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%、95%またはさらには100%が置換され、それにより前記配列のG/C含有量を増大させる。これとの関連において、本発明のRNA配列のG/C含有量、好ましくは、本発明によるRNA配列の該少なくとも1つのコード配列のG/C含有量を、野生型配列と比べて最大限（すなわち、置換可能なコドンの100%）まで増大させることが特に好ましい。本発明によれば、本発明のRNA配列の好ましい修正のさらなる一例は、翻訳効率もまた、細胞内におけるtRNAの存在頻度の差によって決定されるという所見に基づくものである。したがって、いわゆる「レアコドン」が高い程度で本発明のRNA配列内に存在する場合、対応する修正RNA配列は、比較的「高頻度の」tRNAをコードしているコドンが存在している場合よりも有意に不十分な度合で翻訳される。本発明によれば、本発明の修正RNA配列では、本明細書に規定したペプチドまたはタンパク質またはその断片もしくはバリエーションをコードしている領域が、野生型RNA配列の対応する領域と比べて、細胞内において比較的レアなtRNAをコードしている野生型配列の少なくとも1つのコドンが、細胞において比較的高頻度であるtRNAをコードしており、比較的レアな該tRNAと同じアミノ酸を担持しているコドンで交換されているように修正されている。この修正により、本発明のRNAの配列は、高頻度に存在するtRNAを利用可能にするコドンが挿入されるように修正される。換言すると、本発明によれば、この修正により、細胞内において比較的レアなtRNAをコードしている野生型配列のすべてのコドンを、各場合で細胞において比較的高頻度であるtRNAをコードしており、各場合で比較的レアな該tRNAと同じアミノ酸を担持しているコドンで交換することができる。細胞において比較的高頻度に存在しているtRNAおよび対照的に、比較的レアな存在であるtRNAは当業者に知られている；例えば、Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666を参照のこと。具体的なアミノ酸に使用され、tRNAが最も高頻度に存在するコドン、例えば、tRNAに使用され、(ヒト)細胞において最も高頻度に存在しているGlyコドンが特に好ましい。本発明によれば、本発明の修正RNA配列において増大させた、特に最大限にした逐次G/C含有量を、該RNA配列のコード配列にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を修飾しない「高頻度の」コドンと関連づけることが特に好ましい。この好ましい実施形態により、特に効率的に翻訳および安定化された(修正された)本発明のRNA配列を提供することが可能になる。上記の本発明の修正RNA配列(高G/C含有量；tRNAの交換)の判定は、WO 02/098443(その開示内容は、その全範囲が本発明に含まれる)に説明されたコンピュータプログラムを用いて行われ得る。このコンピュータプログラムを使用し、任意の所望のRNA配列のヌクレオチド配列が、最大G/C含有量をもたらされるような遺伝コードまたはその縮重の性質の補助を伴って、細胞において可能な限り高頻度に存在するtRNAをコードしており、修正RNA配列にコードされているアミノ酸配列が好ましくは非修正配列と比べて修正されていないコドンの使用との組合せで修正され得る。あるいはまた、G/C含有量のみまたはコドン使用頻度のみを元の配列と比べて修正することも可能である。また、Visual Basic 6.0(使用される開発環境: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 with Service pack 3)のソースコードもWO 02/098443に記載されている。本発明の好ましいさらなる一実施形態では、本発明のRNA配列のリボソーム結合部位の環境内におけるA/U含有量が、そのそれぞれの野生型RNAのリボソーム結合部位の環境内のA/U含有量と比べて高い。この修正(リボソーム結合部位周囲の高A/U含有量)により、該RNAに対するリボソーム結合の効率が増大する。リボソーム結合部位(例えば、Kozak配列)に対するリボソームの有効な結合は

10

20

30

40

50

さらに、該RNAの効率的な翻訳という効果を有する。本発明のさらなる一実施形態によれば、本発明のRNA配列は、潜在的に不安定性の配列エレメントに関して修正され得る。特に、このRNA配列のコード配列および/または5'および/または3'非翻訳領域が、それぞれの野生型RNAと比べて不安定性の配列エレメントを含まず、修正RNA配列のコードされたアミノ酸配列が好ましくはそれぞれの野生型RNAと比べて修飾されないように修正され得る。例えば、真核生物のRNAの配列には不安定性の配列エレメント(DSE)が存在し、これにシグナルタンパク質が結合してRNAのインビボでの酵素的分解を調節することが知られている。したがって、修正RNA配列の、任意選択で、本明細書に規定した少なくとも1種類のペプチドもしくはタンパク質またはその断片もしくはバリエーションをコードしている領域内の該配列のさらなる安定化のため、野生型RNAの対応する領域と比べて1つ以上のかかる修正が行われ得、その結果、不安定性の配列エレメントが含まれなくなる、または実質的に含まれなくなる。本発明によれば、非翻訳領域(3'-および/または5'-UTR)内に存在するDSEもまた、かかる修正によって本発明のRNA配列から消失させることができる。かかる不安定性の配列は、例えば、数多くの不安定なRNAの3'-UTRセクションに存在するAURICH配列(AURES)である(Caputo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670-1674)。したがって、本発明のRNA配列は好ましくは、それぞれの野生型RNAと比べて、本発明のRNA配列がかかる不安定性の配列を含まないように修正される。これは、可能なエンドヌクレアーゼによって認識される配列モチーフ、例えば、トランスフェリン受容体をコードしている遺伝子の3'-UTRセグメント内に含まれた配列GAACAAG(Binder et al., EMBO J. 1994, 13: 1969~1980)にもまた適用される。このような配列モチーフもまた、好ましくは本発明のRNA配列から除去される。

【0271】

別の好ましい実施形態によれば、本発明との関連において使用されるmRNAは、好ましくはそのコード領域内においてG/C含有量の修正を有し、これは、該G/C含有量が、その対応する野生型mRNAのコード領域のG/C含有量と比べて、好ましくは、コードされたアミノ酸配列が変更されることなく修正されている、特に増大されていることを意味する。例えば、コード領域のG/C含有量は、本明細書に記載の抗原、抗原性タンパク質もしくは抗原性ペプチドまたはその断片もしくはバリエーションをコードしている野生型mRNAのものと比べて少なくとも7%または少なくとも15%または少なくとも20%増大され得る。具体的な一実施形態によれば、コード領域内または配列全体の置換可能なコドンの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%または80%、例えば90%以上、95%以上、またはさらには100%が、G/C含有量を増大させるために置換される。これとの関連において、100%の置換とは、コード領域の本質的にすべての置換可能なコドンが置換されていることを意味し、これは本発明の好ましい実施形態の一例である。別の好ましい実施形態では、コード領域が、細胞内において比較的レアなtRNAをコードしている野生型配列の少なくとも1つのコドンが、細胞において比較的高頻度であるtRNAをコードしているが比較的レアな該tRNAと同じアミノ酸をコードしているコドンで交換されているように修正されたmRNAが使用される。細胞において比較的レアな存在であるtRNAまたは高頻度に存在しているtRNAは当業者に知られている；例えば、Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666を参照のこと。具体的なアミノ酸について最も高頻度に存在しているtRNAが特に好ましい。

【0272】

別の実施形態によれば、本発明の核酸配列は、該配列をヒトコドン使用頻度に適合させることにより修正され、したがって安定化され得る。

【0273】

本発明によれば、本発明の核酸配列の好ましい修正のさらなる一例は、同じアミノ酸をコードしているコドンは、典型的には異なる頻度で存在しているという所見に基づくもの

である。本発明によれば、本発明の修正核酸配列では、本明細書に規定したコード配列が好ましくは、それぞれの野生型核酸の対応するコード配列と比べて、同じアミノ酸をコードしているコドンの頻度が、例えば表 B に示すようなヒトコドン使用頻度に従う該コドンの天然に存在する頻度に相当するように修正されている。

【 0 2 7 4 】

例えば、本発明による核酸配列の該少なくとも 1 つのコード配列にコードされたアミノ酸配列内に存在するアミノ酸アラニン (A l a) の場合、野生型コード配列を、好ましくは、コドン「 G C C 」を 0 . 4 0 の頻度で使用し、コドン「 G C T 」を 0 . 2 8 の頻度で使用し、コドン「 G C A 」を 0 . 2 2 の頻度で使用し、コドン「 G C G 」を 0 . 1 0 の頻度で使用するという様式で適合させるなどである (表 B 参照) 。

【 0 2 7 5 】

表：ヒトコドン使用頻度の表

アミノ酸	コドン	割合	／1000
A l a	G C G	0 . 1 0	7 . 4
A l a	G C A	0 . 2 2	15 . 8
A l a	G C T	0 . 2 8	18 . 5
A l a	G C C *	0 . 4 0	27 . 7
C y s	T G T	0 . 4 2	10 . 6
C y s	T G C *	0 . 5 8	12 . 6
A s p	G A T	0 . 4 4	21 . 8
A s p	G A C *	0 . 5 6	25 . 1
G l u	G A G *	0 . 5 9	39 . 6
G l u	G A A	0 . 4 1	29 . 0
P h e	T T T	0 . 4 3	17 . 6
P h e	T T C *	0 . 5 7	20 . 3
G l y	G G G	0 . 2 3	16 . 5
G l y	G G A	0 . 2 6	16 . 5
G l y	G G T	0 . 1 8	10 . 8
G l y	G G C *	0 . 3 3	22 . 2
H i s	C A T	0 . 4 1	10 . 9
H i s	C A C *	0 . 5 9	15 . 1
I l e	A T A	0 . 1 4	7 . 5
I l e	A T T	0 . 3 5	16 . 0
I l e	A T C *	0 . 5 2	20 . 8
L y s	A A G *	0 . 6 0	31 . 9
L y s	A A A	0 . 4 0	24 . 4
L e u	T T G	0 . 1 2	12 . 9
L e u	T T A	0 . 0 6	7 . 7
L e u	C T G *	0 . 4 3	39 . 6
L e u	C T A	0 . 0 7	7 . 2
L e u	C T T	0 . 1 2	13 . 2
L e u	C T C	0 . 2 0	19 . 6
M e t	A T G *	1	22 . 0
A s n	A A T	0 . 4 4	17 . 0
A s n	A A C *	0 . 5 6	19 . 1
P r o	C C G	0 . 1 1	6 . 9
P r o	C C A	0 . 2 7	16 . 9
P r o	C C T	0 . 2 9	17 . 5
P r o	C C C *	0 . 3 3	19 . 8
G l n	C A G *	0 . 7 3	34 . 2
G l n	C A A	0 . 2 7	12 . 3
A r g	A G G	0 . 2 2	12 . 0
A r g	A G A *	0 . 2 1	12 . 1
A r g	C G G	0 . 1 9	11 . 4
A r g	C G A	0 . 1 0	6 . 2

アミノ酸	コドン	割合	／1000
A r g	C G T	0 . 0 9	4 . 5
A r g	C G C	0 . 1 9	10 . 4
S e r	A G T	0 . 1 4	12 . 1
S e r	A G C *	0 . 2 5	19 . 5
S e r	T C G	0 . 0 6	4 . 4
S e r	T C A	0 . 1 5	12 . 2
S e r	T C T	0 . 1 8	15 . 2
S e r	T C C	0 . 2 3	17 . 7
T h r	A C G	0 . 1 2	6 . 1
T h r	A C A	0 . 2 7	15 . 1
T h r	A C T	0 . 2 3	13 . 1
T h r	A C C *	0 . 3 8	18 . 9
V a l	G T G *	0 . 4 8	28 . 1
V a l	G T A	0 . 1 0	7 . 1
V a l	G T T	0 . 1 7	11 . 0
V a l	G T C	0 . 2 5	14 . 5
T r p	T G G *	1	13 . 2
T y r	T A T	0 . 4 2	12 . 2
T y r	T A C *	0 . 5 8	15 . 3
終止	T G A *	0 . 6 1	1 . 6
終止	T A G	0 . 1 7	0 . 8
終止	T A A	0 . 2 2	1 . 0

10

20

30

40

50

*：最も高頻度のコドン

【0276】

上記のように、本発明によれば、細胞内において比較的レアな tRNA をコードしている野生型配列のすべてのコドンが、細胞内において比較的高頻度の tRNA をコードしており、各場合で比較的レアな該 tRNA と同じアミノ酸を担持しているコドンで交換されていることが好ましい。したがって、コードされた各アミノ酸について最も高頻度のコドンが使用されることが特に好ましい（表 B 参照，最も高頻度のコドンにアスタリスクを表示している）。かかる最適化手順によってコドン適合度指数（CAI）が上がり、最終的に CAI が最大限となる。本発明との関連において、高いかまたは最大限の CAI を有する配列を、典型的には「コドン最適化」配列および／または CAI 増大および／または最大化配列と称する。好ましい一実施形態によれば、本発明の核酸配列は少なくとも 1 つのコード配列を含み、該コード配列／配列が本明細書に記載のようにコドン最適化されている。より好ましくは、該少なくとも 1 つのコード配列のコドン適合度指数（CAI）は少なくとも 0.5、少なくとも 0.8、少なくとも 0.9 または少なくとも 0.95 である。最も好ましくは、該少なくとも 1 つのコード配列のコドン適合度指数（CAI）は 1 である。

10

【0277】

例えば、本発明による核酸配列の該少なくとも 1 つのコード配列にコードされたアミノ酸配列内に存在するアミノ酸アラニン（Ala）の場合、野生型コード配列を、前記アミノ酸またはアミノ酸 システイン（Cys）について最も高頻度のヒトコドン「GCC」を常に使用するという様式で適合させる、野生型配列を、前記アミノ酸について最も高頻度のヒトコドン「TGC」を常に使用するという様式で適合させるなどである。

20

【0278】

別の実施形態によれば、本発明の核酸配列は、該核酸配列の、好ましくは該核酸配列のコード配列の、より好ましくは RNA 配列のコード配列のシトシン（C）含有量を修正すること、好ましくは増大させることにより修正され得る。

【0279】

本発明の特に好ましい一実施形態では、本発明の核酸配列のコード配列の C 含有量は、それぞれの野生型核酸、すなわち非修正核酸のコード配列の C 含有量と比べて修正される、好ましくは増大される。本発明の核酸配列の該少なくとも 1 つのコード配列にコードされたアミノ酸配列は好ましくは、それぞれの野生型核酸にコードされたアミノ酸配列と比べて修飾されていない。

30

【0280】

本発明の好ましい一実施形態では、修正核酸、特に、修正 RNA 配列は、理論的に可能な最大シトシン含有量の少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70% もしくは 80%、または少なくとも 90% またはさらには最大シトシン含有量が達成されるように修正される。

【0281】

好ましいさらなる実施形態では、「シトシン含有量最適化可能」である標的核酸、特に修正 RNA の野生型配列のコドンの少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% またはさらには 100% が、野生型配列に存在するものより高いシトシン含有量を有するコドンで置き換えられている。

40

【0282】

好ましいさらなる一実施形態では、野生型コード配列のコドンのいくつかをさらに、細胞において比較的レアな tRNA のコドンが、細胞において比較的高頻度の tRNA のコドンで交換されるように修飾してもよいが、置換される比較的高頻度の tRNA のコドンは、元の野生型コドンの比較的レアな該 tRNA と同じアミノ酸を担持しているものとする。好ましくは、比較的レアな tRNA のコドンのすべてが、細胞において比較的高頻度の tRNA のコドンで置き換えられるが、シトシンを全く含まないコドンに排他的にコードされたアミノ酸をコードしているコドン、または各々、同じ数のシトシンを含む 2 つの

50

コドンにコードされたグルタミン (G l n) のコドンは除く。

【 0 2 8 3 】

本発明の好ましいさらなる一実施形態では、修正標的核酸、好ましくは該 RNA は、理論的に可能な最大シトシン含有量の少なくとも 8 0 %、または少なくとも 9 0 % またはさらには最大シトシン含有量が、細胞において比較的高頻度の tRNA をコードしているコドンによって達成されるように修正され、この場合、そのアミノ酸配列は変化なしである。

【 0 2 8 4 】

遺伝コードに天然に存在する縮重のため、具体的なアミノ酸は 1 つより多くのコドンにコードされ得る。したがって、天然に存在する 2 0 種類のアミノ酸のうち 1 8 種類が、1 つより多くのコドン (T r y p と M e t は例外である)、例えば、2 つのコドン (例えば、C y s、A s p、G l u)、3 つのコドン (例えば、I l e)、4 つのコドン (例えば、A l、G l y、P r o) または 6 つのコドン (例えば、L e u、A r g、S e r) にコードされている。しかしながら、同じアミノ酸をコードしているすべてのコドンがインビボ条件下において同じ頻度で使用されるわけではない。個々の各生物体に応じて、典型的なコドン使用頻度プロファイルが確立されている。

【 0 2 8 5 】

用語「シトシン含有量最適化可能コドン」は、本発明との関連において用いる場合、同じアミノ酸をコードしている他のコドンより少ないシトシン含有量を示すコドンをいう。したがって、同じアミノ酸をコードしているコドンであって、コドン内においてより多いシトシン数を示す別のコドンで置き換えられ得る野生型コドンはいずれも、シトシン最適化可能 (C 最適化可能) とみなされる。野生型コード配列内の特定の C 最適化コドンによる C 最適化可能な野生型コドンのかかる置換はいずれも、その全 C 含有量を増大させ、C 富化修正核酸配列に反映される。好ましい一実施形態によれば、本発明の核酸配列、特に RNA 配列、好ましくは本発明の核酸配列の該少なくとも 1 つのコード配列は、潜在的に C 最適化可能すべてのコドンについて C 最適化コドンを含む C 最大限化 RNA 配列を含むもの、または該配列からなるものである。したがって、理論的に置き換え可能な C 最適化可能コドンの 1 0 0 % またはすべてが、好ましくはコード配列の全長にわたって C 最適化コドンで置き換えられている。

【 0 2 8 6 】

これとの関連において、シトシン含有量最適化可能コドンは、同じアミノ酸をコードしている他のコドンより少ないシトシン数を含むコドンである。

【 0 2 8 7 】

コドン G C G、G C A、G C U はいずれもアミノ酸 A l a をコードしており、これらは、同じアミノ酸をコードしているコドン G C C で交換され得る、および / または

C y s をコードしているコドン U G U は、同じアミノ酸をコードしているコドン U G C で交換され得る、および / または

A s p をコードしているコドン G A U は、同じアミノ酸をコードしているコドン G A C で交換され得る、および / または

P h e をコードしているコドン U U U は、同じアミノ酸をコードしているコドン U U C で交換され得る、および / または

G l y をコードしているコドン G G G、G G A、G G U はいずれも、同じアミノ酸をコードしているコドン G G C で交換され得る、および / または

H i s をコードしているコドン C A U は、同じアミノ酸をコードしているコドン C A C で交換され得る、および / または

I l e をコードしているコドン A U A、A U U はいずれも、コドン A U C で交換され得る、および / または

L e u をコードしているコドン U U G、U U A、C U G、C U A、C U U はいずれも、同じアミノ酸をコードしているコドン C U C で交換され得る、および / または

A s n をコードしているコドン A A U は、同じアミノ酸をコードしているコドン A A C で交換され得る、および / または

10

20

30

40

50

ProをコードしているコドンCCG、CCA、CCUはいずれも、同じアミノ酸をコードしているコドンCCCで交換され得る、および/または

ArgをコードしているコドンAGG、AGA、CGG、CGA、CGUはいずれも、同じアミノ酸をコードしているコдонCGCで交換され得る、および/または

SerをコードしているコドンAGU、AGC、UCG、UCA、UCUはいずれも、同じアミノ酸をコードしているコドンUCCで交換され得る、および/または

ThrをコードしているコドンACG、ACA、ACUはいずれも、同じアミノ酸をコードしているコドンACCで交換され得る、および/または

ValをコードしているコドンGUG、GUA、GUUはいずれも、同じアミノ酸をコードしているコドンGUCで交換され得る、および/または

TyrをコードしているコドンUAUは、同じアミノ酸をコードしているコドンUACで交換され得る。

【0288】

上記の場合のいずれにおいても、シトシン数は、交換されたコドン1つあたり1個増加する。コード配列のすべての非C最適化コドン(C最適化可能コドンに相当)の交換によりC最大限化コード配列がもたらされる。本発明との関連において、本発明によるRNA配列の該少なくとも1つのコード配列内の非C最適化コドンの少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%がC最適化コドンで置き換えられる。

【0289】

一部のアミノ酸ではC最適化コドンで置き換えられるC最適化可能コドンのパーセンテージが70%未満であるが他のアミノ酸では置き換えられるコドンのパーセンテージが70%より高く、C最適化の全体としてのパーセンテージが、コード配列のすべてのC最適化可能な野生型コドンの少なくとも70%を満たしているということが好ましい場合があり得る。

【0290】

好ましくは、本発明のC最適化RNA配列では、任意の所与のアミノ酸のC最適化可能な野生型コドンの少なくとも50%がC最適化コドンで置き換えられる、例えば、任意の修正C富化RNA配列は好ましくは、上記のアミノ酸Ala、Cys、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、ValおよびTyrのいずれか1つをコードしているC最適化可能な野生型コドン位置に少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%のC最適化コドンを含む。

【0291】

これとの関連において、シトシン含有量最適化可能ではないが少なくとも2つのコドンにコードされているアミノ酸をコードしているコドンは、なんらさらなる選択プロセスを伴わずに使用され得る。しかしながら、細胞、例えばヒト細胞において比較的レアなtRNAをコードしている野生型配列のコドンは、細胞において比較的高頻度のtRNAをコードしているコドンで交換され得、この場合、どちらも同じアミノ酸をコードしている。したがって、Gluをコードしている比較的レアなコドンGAAは、同じアミノ酸をコードしている比較的高頻度のコドンGAGで交換され得る、および/または

Lysをコードしている比較的レアなコドンAAAは、同じアミノ酸をコードしている比較的高頻度のコドンAAGで交換され得る、および/または

Glnをコードしている比較的レアなコドンCAAは、同じアミノ酸をコードしている比較的高頻度のコдонCAGで交換され得る。

【0292】

これとの関連において、各々、唯一のコドンにコードされているアミノ酸Met(AUG)およびTrp(UGG)は変化なしである。終止コドンはシトシン含有量最適化されないが、比較的レアな終止コドンアンバー、オーカー(UAA、UAG)は、比較的高頻度の終止コドンオパール(UGA)で交換され得る。

【0293】

上記に羅列した1つの置換は、修正核酸配列のシトシン含有量を野生型核酸配列と比べて最適化するために個々に、ならびに考えられ得るあらゆる組合せで使用され得る。

【0294】

したがって、本明細書に規定した該少なくとも1つのコード配列は、それぞれの野生型核酸のコード配列と比べて、アミノ酸が少なくとも2つまたはそれ以上のコドンにコードされており、該コドンのうちの1つはさらに1個のシトシンを含み、かかるコドンは、さらに1個のシトシンを含む最適化コドンで交換されてもよく、ここで、該アミノ酸は好ましくは野生型配列と比べて改変されないというような様式で変更され得る。

【0295】

好ましいさらなる一実施形態によれば、本発明の核酸配列、特にRNA配列は3'末端に、典型的には約10~200個のアデノシンヌクレオチド、好ましくは約10~100個のアデノシンヌクレオチド、より好ましくは約40~80個のアデノシンヌクレオチドまたはさらにより好ましくは約50~70個のアデノシンヌクレオチドのポリ-A尾部を含むものであり得る。

10

【0296】

好ましくは、本発明のRNA配列内のポリ(A)配列は、RNAのインビトロ転写によるDNA鋳型に由来するものである。あるいはまた、ポリ(A)配列は、必ずしもDNA前駆体からの転写を伴わない一般的な化学合成法によってインビトロで得られるものであってもよい。さらに、ポリ(A)配列またはポリ(A)尾部を、当該技術分野で知られた市販のポリアデニル化キットおよび対応するプロトコルを用いた本発明によるRNAの酵素的ポリアデニル化によって作製してもよい。

20

【0297】

あるいはまた、本明細書に記載のRNAは、任意選択でポリアデニル化シグナルを含むものであってもよく、ポリアデニル化シグナルは本明細書において、特定のタンパク質因子(例えば、切断ポリアデニル化特異性因子(CPSF)、切断刺激因子(CstF)、切断因子IおよびII(CFIおよびCFII)、ポリ(A)ポリメラーゼ(PAP))によってポリアデニル化が(転写された)RNAに伝達されるシグナルと定義する。これとの関連において、NN(U/T)AAAコンセンサス配列を含むコンセンサスポリアデニル化シグナルが好ましい。特に好ましい一態様では、ポリアデニル化シグナルは、以下の配列: AA(U/T)AAAまたはA(U/T)(U/T)AAAのうちの1つを含むものである(ここで、ウリジンは通常、RNAに存在し、チミジンは通常、DNAに存在する)。

30

【0298】

好ましいさらなる一実施形態によれば、本発明の核酸配列、特にRNA配列は3'末端に、典型的には約10~200個のシトシンヌクレオチド、好ましくは約10~100個のシトシンヌクレオチド、より好ましくは約20~70個のシトシンヌクレオチドまたはさらにより好ましくは約20~60個またはさらには10~40個のシトシンヌクレオチドのポリ(C)尾部を含むものであり得る。好ましくは、本発明のRNA配列内のポリ(C)配列は、RNAのインビトロ転写によるDNA鋳型に由来するものである。

【0299】

好ましい一実施形態では、本発明による核酸配列、特にRNA配列は少なくとも1つの5'-または3'-UTRエレメントを含む。これとの関連において、UTRエレメントは、天然に存在する任意の遺伝子の5'-もしくは3'-UTRに由来する核酸配列または遺伝子の5'-もしくは3'-UTRの断片、ホモログもしくはバリエーションに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。好ましくは、本明細書に従って使用される5'-または3'-UTRエレメントは、本発明のRNA配列の該少なくとも1つのコード配列に対して異種である。天然に存在する遺伝子に由来する5'-または3'-UTRエレメントが好ましいとはいえ、合成的に操作されたUTRエレメントもまた、本発明との関連において使用され得る。

40

【0300】

50

用語「3' UTRエレメント」は典型的には、3' UTRまたは3' UTRのバリエーションに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである核酸配列をいう。本発明の意味における3' UTRエレメントは、核酸分子、特にRNAまたはDNA、好ましくはmRNAの3' UTRを表すものであり得る。したがって、本発明の意味において、好ましくは、3' UTRエレメントは、RNA、好ましくはmRNAの3' UTRであり得るか、またはRNAの3' UTRの転写鋳型であり得る。したがって、3' UTRエレメントは、好ましくは、RNAの3' UTR、好ましくは、mRNA、例えば遺伝子操作されたベクター構築物の転写によって得られるmRNAの3' UTRに対応する核酸配列である。好ましくは、3' UTRエレメントは、3' UTRの機能を果たすもの、または3' UTRの機能を果たす配列をコードしているものである。

10

【0301】

好ましくは、該少なくとも1つの3' UTRエレメントは、脊索動物遺伝子、好ましくは脊椎動物遺伝子、より好ましくは哺乳動物遺伝子、最も好ましくはヒト遺伝子の3' UTRに由来する核酸配列、または脊索動物遺伝子、好ましくは脊椎動物遺伝子、より好ましくは哺乳動物遺伝子、最も好ましくはヒト遺伝子の3' UTRのバリエーションに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。

【0302】

好ましくは、本発明の核酸配列、特にRNA配列は、半減期の向上を伴うRNA（これにより安定なRNAをもたらす）に関する遺伝子から誘導可能であり得る3' UTRエレメント、例えば、以下に規定し、説明する3' UTRエレメントを含むものである。好ましくは、3' UTRエレメントは、好ましくは安定なRNAをコードしている遺伝子の3' UTRに由来する核酸配列、または前記遺伝子のホモログ、断片もしくはバリエーションに由来する核酸配列である。

20

【0303】

特に好ましい一実施形態では、3' UTRエレメントは、アルブミン遺伝子、 α -グロビン遺伝子、 β -グロビン遺伝子、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子、リポキシゲナーゼ遺伝子、およびコラーゲン遺伝子、例えばコラーゲン1(I)遺伝子からなる群より選択される遺伝子の3' UTRに由来する核酸配列、またはアルブミン遺伝子、 α -グロビン遺伝子、 β -グロビン遺伝子、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子、リポキシゲナーゼ遺伝子、およびコラーゲン遺伝子、例えばコラーゲン1(I)遺伝子（特許出願WO 2013/143700（その開示は引用により本明細書に組み込まれる）の配列番号：1369~1390によるもの）からなる群より選択される遺伝子の3' UTRのバリエーションに由来する核酸配列、またはそのホモログ、断片もしくはバリエーションに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。特に好ましい一実施形態では、3' UTRエレメントは、アルブミン遺伝子、好ましくは脊椎動物のアルブミン遺伝子、より好ましくは哺乳動物のアルブミン遺伝子、最も好ましくはヒトアルブミン遺伝子の3' UTRに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。

30

【0304】

これとの関連において、本発明によるRNA配列は、特許出願WO 2013/143700の配列番号：1369~1390による核酸に由来する対応RNA配列を含む3'-UTRエレメントまたはその断片、ホモログもしくはバリエーションを含むことが特に好ましい。

40

【0305】

別の特に好ましい実施形態では、3' UTRエレメントは、 α -または β -グロビン遺伝子、好ましくは脊椎動物の α -または β -グロビン遺伝子、より好ましくは哺乳動物の α -または β -グロビン遺伝子、最も好ましくはヒトの α -または β -グロビン遺伝子の3' UTRに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。

【0306】

用語「[...] 遺伝子の3' UTRに由来する核酸配列」は、好ましくは、[...] 遺伝子の3' UTR配列またはその一部分を主体とする核酸配列、例えばアルブミン遺伝子、 α -グロビン遺伝子、 β -グロビン遺伝子、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子、リポキシゲナー

50

ゼ遺伝子、もしくはコラーゲン 遺伝子、例えばコラーゲン 1 (I) 遺伝子の 3 ' U T R 、好ましくはアルブミン遺伝子の 3 ' U T R またはその一部分を主体とする核酸配列を示す。この用語は、遺伝子の 3 ' U T R 配列全体、すなわち完全長の 3 ' U T R 配列に相当する配列、および遺伝子、例えばアルブミン遺伝子、 - グロビン遺伝子、 - グロビン遺伝子、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子、リボキシゲナーゼ遺伝子、またはコラーゲン 遺伝子、例えばコラーゲン 1 (I) 遺伝子の 3 ' U T R 配列の断片、好ましくはアルブミン遺伝子の 3 ' U T R 配列の断片に相当する配列を包含している。

【 0 3 0 7 】

用語「 [...] 遺伝子の 3 ' U T R のバリエーションに由来する核酸配列」は、好ましくは、遺伝子の 3 ' U T R 配列のバリエーションを主体とする核酸配列、例えばアルブミン遺伝子、 - グロビン遺伝子、 - グロビン遺伝子、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子、リボキシゲナーゼ遺伝子、もしくはコラーゲン 遺伝子、例えばコラーゲン 1 (I) 遺伝子の 3 ' U T R のバリエーションを主体とする核酸配列、または上記のその一部分を主体とする核酸配列を示す。この用語は、遺伝子の 3 ' U T R のバリエーションの配列全体、すなわち、遺伝子の完全長のバリエーション 3 ' U T R 配列に相当する配列、および遺伝子のバリエーション 3 ' U T R 配列の断片に相当する配列を包含している。この状況における断片は、好ましくは、完全長バリエーション 3 ' U T R 内の連続ヌクレオチド鎖であって完全長バリエーション 3 ' U T R の少なくとも 2 0 %、好ましくは少なくとも 3 0 %、より好ましくは少なくとも 4 0 %、より好ましくは少なくとも 5 0 %、さらにより好ましくは少なくとも 6 0 %、さらにより好ましくは少なくとも 7 0 %、さらにより好ましくは少なくとも 8 0 %、最も好ましくは少なくとも 9 0 % である連続ヌクレオチド鎖に相当する連続ヌクレオチド鎖からなるものである。バリエーションのかかる断片は、本発明の意味において、好ましくは本明細書に記載のバリエーションの機能性断片である。

【 0 3 0 8 】

好ましい一実施形態によれば、本発明による核酸配列、特に R N A 配列は、5 ' - キャップ構造および / または少なくとも 1 つの 3 ' - 非翻訳領域エレメント (3 ' - U T R エレメント) (好ましくは、本明細書に規定したもの) を含む。より好ましくは、該 R N A は、本明細書に規定した 5 ' - U T R エレメントをさらに含む。

【 0 3 0 9 】

特に好ましい一実施形態では、該 R N A 配列は好ましくは、5 ' - から 3 ' - の方向に：

- a .) 5 ' - C A P 構造、好ましくは m 7 G p p p N ；
- b .) 目的のタンパク質もしくは目的のペプチドまたはその断片もしくはバリエーションに由来する少なくとも 1 種類の抗原性ペプチドもしくはタンパク質、またはその断片もしくはバリエーションをコードしている少なくとも 1 つのコード配列、
- c .) グロビン遺伝子、そのホモログ、断片またはバリエーションに由来する核酸配列を含む、または該核酸配列からなる 3 ' - U T R エレメント；
- d .) 任意選択で、ポリ (A) 配列、好ましくは 6 4 個のアデノシンを含むもの；
- e .) 任意選択で、ポリ (C) 配列、好ましくは 3 0 個のシトシンを含むものを含む。

【 0 3 1 0 】

特に好ましい一実施形態では、該少なくとも 1 種類の核酸配列、特に R N A 配列は、少なくとも 1 つの 5 ' - 非翻訳領域エレメント (5 ' - U T R エレメント) を含む。好ましくは、該少なくとも 1 つの 5 ' - U T R エレメントは、T O P 遺伝子の 5 ' - U T R に由来する核酸配列または T O P 遺伝子の 5 ' - U T R の断片、ホモログもしくはバリエーションに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。

【 0 3 1 1 】

5 ' - U T R エレメントは、上記に規定した T O P - モチーフまたは 5 ' - T O P を含まないものであることが特に好ましい。

【 0 3 1 2 】

一部の実施形態では、T O P 遺伝子の 5 ' - U T R に由来する 5 ' - U T R エレメントの

核酸配列が、その 3' 末端において、由来する遺伝子または RNA の開始コドン（例えば、A（U/T）G）の 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 位上流に位置するヌクレオチドで終結している。したがって、5' - UTR エLEMENT は、いずれのタンパク質コード配列部分も含まないものである。したがって、好ましくは、該少なくとも 1 種類の核酸配列、特に RNA 配列の 1 つだけのタンパク質コード部分が該コード配列によってもたらされる。

【0313】

TOP 遺伝子の 5' - UTR に由来する核酸配列は好ましくは、真核生物の TOP 遺伝子、好ましくは植物または動物の TOP 遺伝子、より好ましくは脊索動物の TOP 遺伝子、さらにより好ましくは脊椎動物の TOP 遺伝子、最も好ましくは哺乳動物の TOP 遺伝子、例えばヒト TOP 遺伝子に由来するものである。

10

【0314】

例えば、5' - UTR エLEMENT は好ましくは、特許出願 WO 2013 / 143700（その開示は引用により本明細書に組み込まれる）の配列番号：1 ~ 1363、配列番号：1395、配列番号：1421 および配列番号：1422 からなる群、特許出願 WO 2013 / 143700 の配列番号：1 ~ 1363、配列番号：1395、配列番号：1421 および配列番号：1422 のホモログ、そのバリエーション、または好ましくは対応する RNA 配列より選択される核酸配列に由来する核酸配列を含む、または該核酸配列からなる 5' - UTR エLEMENT から選択される。用語「特許出願 WO 2013 / 143700 の配列番号：1 ~ 1363、配列番号：1395、配列番号：1421 および配列番号：1422 のホモログ」は、人間以外の種の配列であって、特許出願 WO 2013 / 143700 の配列番号：1 ~ 1363、配列番号：1395、配列番号 1421 および配列番号：1422 による配列に相同なものをいう。

20

【0315】

好ましい一実施形態では、本発明による核酸配列、特に RNA 配列の 5' - UTR エLEMENT は、特許出願 WO 2013 / 143700 の配列番号：1 ~ 1363、配列番号：1395、配列番号：1421 および配列番号：1422、特許出願 WO 2013 / 143700 の配列番号：1 ~ 1363、配列番号：1395、配列番号：1421 および配列番号：1422 のホモログ、そのバリエーション、または対応する RNA 配列から選択される核酸配列の 5 位のヌクレオチド（すなわち、配列内の 5 位に位置するヌクレオチド）から開始コドン（該配列の 3' 末端に位置する）のすぐ 5' 側のヌクレオチド位置、例えば、ATG 配列のすぐ 5' 側のヌクレオチド位置までに存在している核酸配列に由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。5' UTR エLEMENT が、特許出願 WO 2013 / 143700 の配列番号：1 ~ 1363、配列番号：1395、配列番号：1421 および配列番号：1422、特許出願 WO 2013 / 143700 の配列番号：1 ~ 1363、配列番号：1395、配列番号：1421 および配列番号：1422 のホモログ、そのバリエーション、または対応する RNA 配列から選択される核酸配列の 5' - TOP のすぐ 3' 側のヌクレオチド位置から開始コドン（該配列の 3' 末端に位置する）のすぐ 5' 側のヌクレオチド位置、例えば、ATG 配列のすぐ 5' 側のヌクレオチド位置までに存在している核酸配列に由来するものであることが特に好ましい。

30

40

【0316】

特に好ましい一実施形態では、5' - UTR エLEMENT は、リボソームタンパク質をコードしている TOP 遺伝子の 5' - UTR に由来する核酸配列、またはリボソームタンパク質をコードしている TOP 遺伝子の 5' - UTR のバリエーションに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。例えば、5' - UTR エLEMENT は、特許出願 WO 2013 / 143700 の配列番号：67、170、193、244、259、554、650、675、700、721、913、1016、1063、1120、1138 および 1284 ~ 1360 のいずれかによる核酸配列の 5' - UTR、対応する RNA 配列、そのホモログ、または本明細書に記載のそのバリエーション、好ましくは 5' - TOP モチーフがないものに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。上

50

記のように、5 位から A T G (これは配列の 3' 末端に位置する) のすぐ 5' 側のヌクレオチドまでに存在している配列が前記配列の 5' - U T R に相当する。

【0317】

好ましくは、5' - U T R エLEMENT は、リボソーム大サブユニット (Large) タンパク質 (RPL) をコードしている T O P 遺伝子の 5' - U T R に由来する核酸配列またはリボソーム大サブユニットタンパク質 (RPL) をコードしている T O P 遺伝子の 5' - U T R のホモログもしくはバリエーションに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。例えば、5' - U T R エLEMENT は、特許出願 W O 2 0 1 3 / 1 4 3 7 0 0 の配列番号：67、259、1284 ~ 1318、1344、1346、1348 ~ 1354、1357、1358、1421 および 1422 のいずれかによる核酸配列の 5' - U T R、対応する R N A 配列、そのホモログ、または本明細書に記載のそのバリエーション、好ましくは 5' - T O P モチーフがないものに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである。

10

【0318】

特に好ましい一実施形態では、5' - U T R エLEMENT は、リボソームタンパク質大サブユニット 32 遺伝子の 5' - U T R、好ましくは脊椎動物のリボソームタンパク質大サブユニット 32 (L32) 遺伝子、より好ましくは哺乳動物のリボソームタンパク質大サブユニット 32 (L32) 遺伝子、最も好ましくはヒトリボソームタンパク質大サブユニット 32 (L32) 遺伝子に由来する核酸配列、またはリボソームタンパク質大サブユニット 32 遺伝子の 5' U T R のバリエーション、好ましくは脊椎動物のリボソームタンパク質大サブユニット 32 (L32) 遺伝子、より好ましくは哺乳動物のリボソームタンパク質大サブユニット 32 (L32) 遺伝子、最も好ましくはヒトリボソームタンパク質大サブユニット 32 (L32) 遺伝子に由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものであり、ここで、好ましくは、5' - U T R エLEMENT は前記遺伝子 5' - T O P を含まないものである。

20

【0319】

したがって、特に好ましい一実施形態では、5' - U T R エLEMENT は、配列番号：13 (5' 末端のオリゴピリミジントラクトがないヒトリボソームタンパク質大サブユニット 32 の 5' - U T R : G G C G C T G C C T A C G G A G G T G G C A G C C A T C T C C T T C T C G G C A T C ; 特許出願 W O 2 0 1 3 / 1 4 3 7 0 0 の配列番号 1368 に対応) による核酸配列と、または好ましくは対応する R N A 配列と少なくとも約 40%、好ましくは少なくとも約 50%、好ましくは少なくとも約 60%、好ましくは少なくとも約 70%、より好ましくは少なくとも約 80%、より好ましくは少なくとも約 90%、さらにより好ましくは少なくとも約 95%、さらにより好ましくは少なくとも約 99% の同一性を有する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものであるか、あるいはここで、該少なくとも 1 つの 5' U T R エLEMENT は、上記の配列の核酸配列と少なくとも約 40%、好ましくは少なくとも約 50%、好ましくは少なくとも約 60%、好ましくは少なくとも約 70%、より好ましくは少なくとも約 80%、より好ましくは少なくとも約 90%、さらにより好ましくは少なくとも約 95%、さらにより好ましくは少なくとも約 99% の同一性を有する核酸配列の断片を含むもの、または該断片からなるものであり、好ましくは、該断片は上記のようなもの、すなわち、完全長 5' U T R の少なくとも 20% などである連続ヌクレオチド鎖である。好ましくは、該断片は、少なくとも約 20 個以上のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約 30 個以上のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約 40 個以上のヌクレオチドの長さを示すものである。好ましくは、該断片は本明細書に記載の機能性断片である。

30

40

【0320】

一部の実施形態では、本発明による R N A 配列は、R P S A、R P S 2、R P S 3、R P S 3 A、R P S 4、R P S 5、R P S 6、R P S 7、R P S 8、R P S 9、R P S 10、R P S 11、R P S 12、R P S 13、R P S 14、R P S 15、R P S 15 A、R P S 16、R P S 17、R P S 18、R P S 19、R P S 20、R P S 21、R P S 23、

50

R P S 2 4、R P S 2 5、R P S 2 6、R P S 2 7、R P S 2 7 A、R P S 2 8、R P S 2 9、R P S 3 0、R P L 3、R P L 4、R P L 5、R P L 6、R P L 7、R P L 7 A、R P L 8、R P L 9、R P L 1 0、R P L 1 0 A、R P L 1 1、R P L 1 2、R P L 1 3、R P L 1 3 A、R P L 1 4、R P L 1 5、R P L 1 7、R P L 1 8、R P L 1 8 A、R P L 1 9、R P L 2 1、R P L 2 2、R P L 2 3、R P L 2 3 A、R P L 2 4、R P L 2 6、R P L 2 7、R P L 2 7 A、R P L 2 8、R P L 2 9、R P L 3 0、R P L 3 1、R P L 3 2、R P L 3 4、R P L 3 5、R P L 3 5 A、R P L 3 6、R P L 3 6 A、R P L 3 7、R P L 3 7 A、R P L 3 8、R P L 3 9、R P L 4 0、R P L 4 1、R P L P 0、R P L P 1、R P L P 2、R P L P 3、R P L P 0、R P L P 1、R P L P 2、E E F 1 A 1、E E F 1 B 2、E E F 1 D、E E F 1 G、E E F 2、E I F 3 E、E I F 3 F、E I F 3 H、E I F 2 S 3、E I F 3 C、E I F 3 K、E I F 3 E I P、E I F 4 A 2、P A B P C 1、H N R N P A 1、T P T 1、T U B B 1、U B A 5 2、N P M 1、A T P 5 G 2、G N B 2 L 1、N M E 2、U Q C R B、またはそのホモログもしくはバリエーションから選択される脊椎動物のT O P 遺伝子、例えば哺乳動物、例えばヒトのT O P 遺伝子の5' - U T R に由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである5' - U T R エlementを含み、ここで好ましくは、5' - U T R エlementはT O P - モチーフまたは前記遺伝子の5' - T O P を含まないものであり、任意選択で、5' - U T R エlementは、その5' 末端において、5' 末端のオリゴピリミジントラクト (T O P) の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10位下流に位置するヌクレオチドで始まり、さらに、任意選択で、T O P 遺伝子の5' - U T R に由来する5' U T R エlementは、その3' 末端において、由来する遺伝子の開始コドン (A (U / T) G) の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10位上流に位置するヌクレオチドで終結している。

【0321】

特に好ましいさらなる実施形態では、5' - U T R エlementは、リボソームタンパク質大サブユニット32 遺伝子 (R P L 3 2)、リボソームタンパク質大サブユニット35 遺伝子 (R P L 3 5)、リボソームタンパク質大サブユニット21 遺伝子 (R P L 2 1)、A T P 合成酵素、H + 輸送ミトコンドリアF 1 複合体、サブユニット1、心筋 (A T P 5 A 1) 遺伝子、ヒドロキシステロイド (17 -) デヒドロゲナーゼ遺伝子 (H S D 1 7 B 4)、アンドロゲン誘導性1 遺伝子 (A I G 1)、シトクロムc オキシダーゼサブユニットV I c 遺伝子 (C O X 6 C)、もしくはN - アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ (酸性セラミダーゼ) 1 遺伝子 (A S A H 1) またはそのバリエーション、好ましくは脊椎動物のリボソームタンパク質大サブユニット32 遺伝子 (R P L 3 2)、脊椎動物のリボソームタンパク質大サブユニット35 遺伝子 (R P L 3 5)、脊椎動物のリボソームタンパク質大サブユニット21 遺伝子 (R P L 2 1)、脊椎動物のA T P 合成酵素、H + 輸送ミトコンドリアF 1 複合体、サブユニット1、心筋 (A T P 5 A 1) 遺伝子、脊椎動物のヒドロキシステロイド (17 -) デヒドロゲナーゼ遺伝子 (H S D 1 7 B 4)、脊椎動物のアンドロゲン誘導性1 遺伝子 (A I G 1)、脊椎動物のシトクロムc オキシダーゼサブユニットV I c 遺伝子 (C O X 6 C)、もしくは脊椎動物のN - アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ (酸性セラミダーゼ) 1 遺伝子 (A S A H 1) またはそのバリエーション、より好ましくは哺乳動物のリボソームタンパク質大サブユニット32 遺伝子 (R P L 3 2)、リボソームタンパク質大サブユニット35 遺伝子 (R P L 3 5)、リボソームタンパク質大サブユニット21 遺伝子 (R P L 2 1)、哺乳動物のA T P 合成酵素、H + 輸送ミトコンドリアF 1 複合体、サブユニット1、心筋 (A T P 5 A 1) 遺伝子、哺乳動物のヒドロキシステロイド (17 -) デヒドロゲナーゼ遺伝子 (H S D 1 7 B 4)、哺乳動物のアンドロゲン誘導性1 遺伝子 (A I G 1)、哺乳動物のシトクロムc オキシダーゼサブユニットV I c 遺伝子 (C O X 6 C)、もしくは哺乳動物のN - アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ (酸性セラミダーゼ) 1 遺伝子 (A S A H 1) またはそのバリエーション、最も好ましくはヒトリボソームタンパク質大サブユニット32 遺伝子 (R P L 3 2)、ヒトリボソームタンパク質大サブユニット35 遺伝子 (R P L 3 5)、ヒトリボソームタンパク質大サブユニット21 遺伝子 (R P L 2 1)、ヒトA T P 合成酵素、H + 輸

送ミトコンドリアF 1 複合体、 サブユニット 1、 心筋 (A T P 5 A 1) 遺伝子、 ヒトヒドロキシステロイド (1 7 -) デヒドロゲナーゼ遺伝子 (H S D 1 7 B 4)、 ヒトアンドロゲン誘導性 1 遺伝子 (A I G 1)、 ヒトシトクロム c オキシダーゼサブユニット V I c 遺伝子 (C O X 6 C)、 もしくはヒト N - アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ (酸性セラミダーゼ) 1 遺伝子 (A S A H 1) またはそのバリエーションの 5 ' - U T R に由来する核酸配列を含むもの、 または該核酸配列からなるものであり、 ここで、 好ましくは、 5 ' U T R エLEMENT は前記遺伝子の 5 ' T O P を含まないものである。

【 0 3 2 2 】

したがって、特に好ましい一実施形態では、 5 ' - U T R エLEMENT は、特許出願 W O 2 0 1 3 / 1 4 3 7 0 0 の配列番号： 1 4 1 2 ~ 1 4 2 0 による核酸配列または対応する R N A 配列と少なくとも約 4 0 %、 好ましくは少なくとも約 5 0 %、 好ましくは少なくとも約 6 0 %、 好ましくは少なくとも約 7 0 %、 より好ましくは少なくとも約 8 0 %、 より好ましくは少なくとも約 9 0 %、 さらにより好ましくは少なくとも約 9 5 %、 さらにより好ましくは少なくとも約 9 9 % の同一性を有する核酸配列を含むもの、 または該核酸配列からなるものであるか、あるいはここで、該少なくとも 1 つの 5 ' U T R エLEMENT は、特許出願 W O 2 0 1 3 / 1 4 3 7 0 0 の配列番号： 1 4 1 2 ~ 1 4 2 0 による核酸配列と少なくとも約 4 0 %、 好ましくは少なくとも約 5 0 %、 好ましくは少なくとも約 6 0 %、 好ましくは少なくとも約 7 0 %、 より好ましくは少なくとも約 8 0 %、 より好ましくは少なくとも約 9 0 %、 さらにより好ましくは少なくとも約 9 5 %、 さらにより好ましくは少なくとも約 9 9 % の同一性を有する核酸配列の断片を含むもの、 または該断片からなるものであり、ここで、好ましくは、該断片は上記のようなもの、すなわち、完全長 5 ' U T R の少なくとも 2 0 % などである連続ヌクレオチド鎖である。好ましくは、該断片は、少なくとも約 2 0 個以上のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約 3 0 個以上のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約 4 0 個以上のヌクレオチドの長さを示すものである。好ましくは、該断片は本明細書に記載の機能性断片である。

【 0 3 2 3 】

したがって、特に好ましい一実施形態では、 5 ' - U T R エLEMENT は、配列番号： 1 4 (5 ' 末端のオリゴピリミジントラクトがない A T P 5 A 1 の 5 ' - U T R : G C G G C T C G G C C A T T T T G T C C C A G T C A G T C C G G A G G C T G C G G C T G C A G A A G T A C C G C C T G C G G A G T A A C T G C A A A G ; 特許出願 W O 2 0 1 3 / 1 4 3 7 0 0 の配列番号： 1 4 1 4 に対応) による核酸配列と、または好ましくは対応する R N A 配列と少なくとも約 4 0 %、 好ましくは少なくとも約 5 0 %、 好ましくは少なくとも約 6 0 %、 好ましくは少なくとも約 7 0 %、 より好ましくは少なくとも約 8 0 %、 より好ましくは少なくとも約 9 0 %、 さらにより好ましくは少なくとも約 9 5 %、 さらにより好ましくは少なくとも約 9 9 % の同一性を有する核酸配列を含むもの、 または該核酸配列からなるものであるか、あるいはここで、該少なくとも 1 つの 5 ' U T R エLEMENT は、上記の核酸配列と少なくとも約 4 0 %、 好ましくは少なくとも約 5 0 %、 好ましくは少なくとも約 6 0 %、 好ましくは少なくとも約 7 0 %、 より好ましくは少なくとも約 8 0 %、 より好ましくは少なくとも約 9 0 %、 さらにより好ましくは少なくとも約 9 5 %、 さらにより好ましくは少なくとも約 9 9 % の同一性を有する核酸配列の断片を含むもの、 または該断片からなるものであり、好ましくは、該断片は上記のようなもの、すなわち、完全長 5 ' U T R の少なくとも 2 0 % などである連続ヌクレオチド鎖である。好ましくは、該断片は、少なくとも約 2 0 個以上のヌクレオチド、好ましくは少なくとも約 3 0 個以上のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約 4 0 個以上のヌクレオチドの長さを示すものである。好ましくは、該断片は本明細書に記載の機能性断片である。

【 0 3 2 4 】

好ましくは、該少なくとも 1 つの 5 ' - U T R エLEMENT と該少なくとも 1 つの 3 ' U T R エLEMENT が、上記の該少なくとも 1 つの R N A 配列からのタンパク質生成を増大させるために相乗的に作用する。

【 0 3 2 5 】

10

20

30

40

50

特に好ましい一実施形態によれば、本発明によるRNA配列は、好ましくは、5' - から3' - の方向に：

- a.) 5' - キャップ構造、好ましくはm7GpppN；
- b.) TOP遺伝子、そのホモログ、断片またはバリエーションの5' - UTRに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである5' - UTRエレメント；
- c.) 目的のタンパク質もしくは目的のペプチドまたはその断片もしくはバリエーションに由来する少なくとも1種類の抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードしている少なくとも1つのコード配列、
- d.) 安定なRNA、そのホモログ、断片またはバリエーションをもたらす遺伝子に由来する核酸配列を含む、または該核酸配列からなる3' - UTRエレメント；
- e.) 任意選択で、ポリ(A)配列 好ましくは、64個のアデノシンを含むもの；および
- f.) 任意選択で、ポリ(C)配列、好ましくは30個のシトシンを含むものを含む。

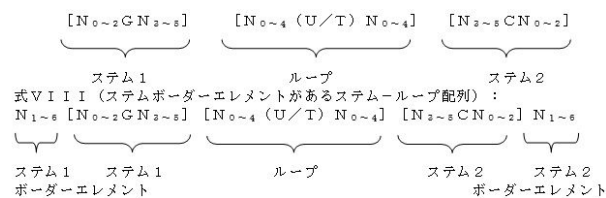
【0326】

特に好ましい一実施形態では、本発明に従って使用される核酸配列、特にRNA配列はヒストンステム - ループ配列 / 構造を含むものである。かかるヒストンステム - ループ配列は好ましくは、WO2012/019780（その開示内容は引用により本明細書に組み込まれる）に開示されたヒストンステム - ループ配列から選択される。

【0327】

本発明での使用に適するヒストンステム - ループ配列は好ましくは、以下の式VIIまたはVIIの少なくとも1種類から選択される：

式VII（ステムボーダーエレメント（bordering element）がないステム - ループ配列）：



式中：

ステム1またはステム2のボーダーエレメント $N_{1 \sim 6}$ は、1～6個、好ましくは2～6個、より好ましくは2～5個、さらにより好ましくは3～5個、最も好ましくは4～5個または5個のNの連続した配列であり、ここで、各Nは、他のものと独立して、A、U、T、GおよびCから選択されるヌクレオチドまたはそのヌクレオチドアナログから選択され；

ステム1 $[N_{0 \sim 2}GN_{3 \sim 5}]$ はエレメントステム2に逆相補的または部分的に逆相補的であり、5～7個のヌクレオチドの連続した配列であり；

$N_{0 \sim 2}$ は、0～2個、好ましくは0～1個、より好ましくは1個のNの連続した配列であり、各Nは、他のものと独立して、A、U、T、GおよびCから選択されるヌクレオチドまたはそのヌクレオチドアナログから選択され；

$N_{3 \sim 5}$ は、3～5個、好ましくは4～5個、より好ましくは4個のNの連続した配列であり、各Nは、他のものと独立して、A、U、T、GおよびCから選択されるヌクレオチドまたはそのヌクレオチドアナログから選択され、

Gはグアノシンまたはそのアナログであり、任意選択でシチジンまたはそのアナログで置き換えられていてもよい、ただし、ステム2内のその相補ヌクレオチドのシチジンはグアノシンで置き換えられるものとし；

ループ配列 $[N_{0 \sim 4}(U/T)N_{0 \sim 4}]$ は、エレメントステム1とステム2の間に位置し、3～5個のヌクレオチド、より好ましくは4個のヌクレオチドの連続した配列であり；

10

20

30

40

50

各 $N_0 \sim 4$ は他のものと独立して、0 ~ 4 個、好ましくは 1 ~ 3 個、より好ましくは 1 ~ 2 個の N の連続した配列であり、各 N は、他のものと独立して、 A 、 U 、 T 、 G および C から選択されるヌクレオチドまたはそのヌクレオチドアナログから選択され；

U/T は、ウリジンまたは任意選択でチミジンを表し；

ステム 2 [$N_3 \sim 5$ $C N_0 \sim 2$] はエレメントステム 1 に逆相補的または部分的に逆相補的であり、5 ~ 7 個のヌクレオチドの連続した配列であり；

$N_3 \sim 5$ は、3 ~ 5 個、好ましくは 4 ~ 5 個、より好ましくは 4 個の N の連続した配列であり、各 N は、他のものと独立して、 A 、 U 、 T 、 G および C から選択されるヌクレオチドまたはそのヌクレオチドアナログから選択され；

$N_0 \sim 2$ は、0 ~ 2 個、好ましくは 0 ~ 1 個、より好ましくは 1 個の N の連続した配列であり、各 N は、他のものと独立して、 A 、 U 、 T 、 G もしくは C から選択されるヌクレオチドまたはそのヌクレオチドアナログから選択され；

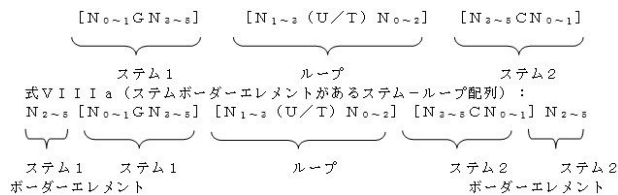
C はシチジンまたはそのアナログであり、任意選択でグアノシンまたはそのアナログで置き換えられていてもよい、ただし、ステム 1 内のその相補ヌクレオチドのグアノシンはシチジンで置き換えられるものとし；

ステム 1 およびステム 2 は、互いに塩基対合して逆相補配列を形成し得るものであり、この場合、塩基対合はステム 1 とステム 2 間で、例えば、ヌクレオチド A と U/T または G と C のワトソン - クリック型塩基対合または非ワトソン - クリック型塩基対合、例えば、ゆらぎ塩基対合、逆ワトソン - クリック型塩基対合、フーグスティーン型塩基対合、逆フーグスティーン型塩基対合によって起こり得、あるいは互いに塩基対合して部分的に逆相補配列を形成し得るものであり、この場合、不完全な塩基対合はステム 1 とステム 2 間で、一方のステム内の 1 個以上の塩基は他方のステムの逆相補配列内に相補塩基を有していないことに基づいて起こり得る。

【0328】

好ましいさらなる一実施形態によれば、該核酸配列、特に RNA 配列は、以下の特定の式 $VII a$ または $VII I a$ の少なくとも 1 種類による少なくとも 1 つのヒストンステム - ループ配列を含むものであり得る：

式 $VII a$ (ステムボーダーエレメントがないステム - ループ配列)：

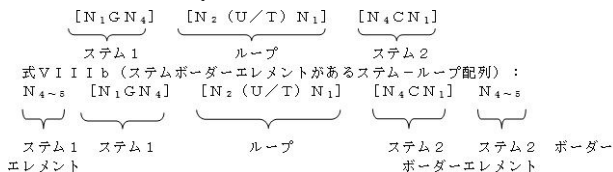


式中、 N 、 C 、 G 、 T および U は上記に規定したとおりである。

【0329】

さらなるより特に好ましい一実施形態によれば、該少なくとも 1 つの核酸、好ましくは該少なくとも 1 つの RNA は、以下の特定の式 $VII b$ または $VII I b$ の少なくとも 1 種類による少なくとも 1 つのヒストンステム - ループ配列を含むものであり得る：

式 $VII b$ (ステムボーダーエレメントがないステム - ループ配列)：



式中、 N 、 C 、 G 、 T および U は上記に規定したとおりである。

【0330】

特に好ましいヒストンステム - ループ配列の一例は配列 $C A A A G G C T C T T T T C A G A G C C A C C A$ (配列番号：15 によるもの) またはより好ましくは、対応する R

NA配列 C A A A G G C U C U U U C A G A G C C A C C A (配列番号: 16によるもの)である。

【0331】

上記の任意の修飾は、本発明の核酸配列、特にDNAおよび/またはRNA配列に、さらに、本発明との関連において使用される任意のDNAまたはRNAに適用され得、適切な場合または必要な場合は、互いに任意の組合せで組み合わせられ得るが、このような修飾の組合せはそれぞれの核酸配列において互いに干渉しないものであるものとする。当業者は、しかるべく選択を行うことができよう。

【0332】

本明細書に規定した少なくとも1つのコード配列を含む本発明による核酸配列、特に本発明によるRNA配列は、好ましくは5' UTRおよび/または3' UTRを含むものであり得、好ましくは少なくとも1つのヒストンステム-ループを含む。本発明によるRNA配列の3' UTRは、好ましくは、本明細書に規定したポリ(A)および/またはポリ(C)配列もまた含む。3' UTRのこのシングルエレメントはその内部に、本発明のRNA配列の配列全長に沿って5'から3'まで任意の順序で存在し得る。また、本明細書に記載のさらなるエレメント、例えば本明細書に規定した安定化配列(例えば、グロビン遺伝子のUTRに由来)、IRES配列などを含めてもよい。また、該エレメントの各々を、本発明によるRNA配列内において少なくとも1回(特に、ジ-またはマルチシストロニックな構築物にて)、好ましくは2回以上反復させてもよい。一例として、該シングルエレメントは本発明による核酸配列内、特にRNA配列内に以下の順序で存在させ得る:

5' - コード配列 - ヒストンステム - ループ - ポリ(A) / (C) 配列 - 3' ; または
5' - コード配列 - ポリ(A) / (C) 配列 - ヒストンステム - ループ - 3' ; または
5' - コード配列 - ヒストンステム - ループ - ポリアデニル化シグナル - 3' ; または
5' - コード配列 - ポリアデニル化シグナル - ヒストンステム - ループ - 3' ; または
5' - コード配列 - ヒストンステム - ループ - ヒストンステム - ループ - ポリ(A) / (C) 配列 - 3' ; または

5' - コード配列 - ヒストンステム - ループ - ヒストンステム - ループ - ポリアデニル化シグナル - 3' ; または

5' - コード配列 - 安定化配列 - ポリ(A) / (C) 配列 - ヒストンステム - ループ - 3' ; または

5' - コード配列 - 安定化配列 - ポリ(A) / (C) 配列 - ポリ(A) / (C) 配列 - ヒストンステム - ループ - 3' ; など。

【0333】

さらなる一実施形態によれば、本発明において使用される核酸配列、特にRNA配列は、好ましくは、以下の構造エレメント: 5' - および/または3' - 非翻訳領域エレメント(UTRエレメント)、特に、5' - UTRエレメント(これは好ましくは、TOP遺伝子の5' - UTRまたはその断片、ホモログもしくはそのバリエーションに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである)、あるいは5' - および/または3' - UTRエレメント(これは好ましくは、安定なRNAをもたず遺伝子またはそのホモログ、断片もしくはバリエーションから誘導可能なものであり得る); ヒストン - ステム - ループ構造、好ましくはその3' 非翻訳領域内にヒストン - ステム - ループ; 5' - キャップ構造; ポリ - A 尾部; またはポリ(C)配列のうちの少なくとも1つを含むものである。

【0334】

特に好ましい一実施形態では、該核酸配列、特にRNA配列は、好ましくは、5' - から3' - の方向に:

a.) 5' - CAP 構造、好ましくはm7GpppN;

b.) 少なくとも1種類の目的の抗原性ペプチドもしくは目的のタンパク質またはその断片もしくはバリエーションをコードしている少なくとも1つのコード配列、

c.) グロビン遺伝子、そのホモログ、断片またはバリエーションに由来する核酸配列を含む、または該核酸配列からなる3' - UTRエレメント;

10

20

30

40

50

d.) 任意選択で、ポリ(A)配列、好ましくは64個のアデノシンを含むもの；
 e.) 任意選択で、ポリ(C)配列、好ましくは30個のシトシンを含むもの；および
 f.) 任意選択で、ヒストンステム-ループ、好ましくは、配列番号：16によるRNA配列を含むものを含む。

【0335】

別の特に好ましい実施形態によれば、本発明に従って使用される核酸配列、特にRNA配列は、好ましくは、5' - から3' - の方向に：

- a.) 5' - CAP構造、好ましくはm7GpppN；
- b.) TOP遺伝子、そのホモログ、断片またはバリエーションの5' - UTRに由来する核酸配列を含むもの、または該核酸配列からなるものである5' - UTRエレメント；
- c.) 少なくとも1種類の目的の抗原性ペプチドもしくは目的のタンパク質またはその断片もしくはバリエーションをコードしている少なくとも1つのコード配列、
- d.) 安定なRNAをもたらず遺伝子に由来する核酸配列を含む、または該核酸配列からなる3' - UTRエレメント；
- e.) 任意選択で、ポリ(A)配列 好ましくは、64個のアデノシンを含むもの；
- f.) 任意選択で、ポリ(C)配列、好ましくは30個のシトシンを含むもの；および任意選択で、ヒストンステム-ループ、好ましくは、配列番号：16によるRNA配列を含むもの

【0336】

本明細書に従って使用される核酸は、当該技術分野で知られた任意の方法によって、例えば、例えば固相合成などの合成方法、ならびにインビトロ法、例えばインビトロ転写反応またはインビボ反応、例えば細菌内でのDNAプラスミドのインビボ増殖によって調製され得る。

【0337】

別の好ましい実施形態によれば、該核酸は、コード核酸、好ましくはmRNAの形態であり、これは付加的または択一的に分泌シグナルペプチドをコードしている。かかるシグナルペプチドは、典型的には約15～30個のアミノ酸の長さを示すものであり、好ましくは、コードされたペプチドのN末端に位置するが、これに限定されない。本明細書に規定したシグナルペプチドは、好ましくは、コードされたタンパク質またはペプチドの特定の細胞領域または特定の細胞区画内への、例えば細胞表面、小胞体(ER)またはエンドソーム-リソソーム区画への輸送を可能にするものである。

【0338】

該核酸にコードされたタンパク質またはペプチドは、天然に存在するタンパク質の断片またはバリエーションであってもよい。かかる断片またはバリエーションは典型的には、上記のタンパク質もしくはペプチドまたはそのコード核酸配列の配列のうちの1つに関して野生型配列全体と、核酸レベルまたはアミノ酸レベルのいずれかで少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、等しくより好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%またはさらには97%の配列同一性を有する配列を含むものであり得る。

【0339】

タンパク質またはペプチドの「断片」は、本発明との関連において、アミノ酸配列またはそのコード核酸配列に関して、天然タンパク質またはそのコード核酸配列のアミノ酸配列と比べてN末端部、C末端部および/または配列内部において切断型の本明細書に規定したタンパク質またはペプチドの配列を含むものであり得る。かかる切断は、アミノ酸レベルまたは核酸レベルのいずれかで起こるものであり得る。したがって、かかる断片に関する配列同一性は、タンパク質もしくはペプチド全体に言及している場合またはコード核酸配列全体に言及している場合があり得る。同じことが核酸にも相応に適用される。

【0340】

タンパク質またはペプチドのかかる断片は約6～約20個またはそれ以上のアミノ酸の配列を含むものであり得、このようなものとしては、プロセッシングされてMHCクラスII分子によって提示される、好ましくは約8～約10個のアミノ酸、例えば8、9もしくは10個（またはさらには6、7、11もしくは12個のアミノ酸）の長さを有する断片、ならびにプロセッシングされて、MHCクラスII分子によって提示される、好ましくは約13個以上のアミノ酸、例えば、13、14、15、16、17、18、19、20個またはさらにはそれ以上のアミノ酸の長さを有する断片が挙げられ、ここで、このような断片はアミノ酸配列の任意の部分から選択され得る。このような断片は、典型的にはT細胞によって該ペプチド断片とMHC分子からなる複合体の形態で認識される、すなわち、該断片は典型的にはその天然形態では認識されない。

10

【0341】

また、タンパク質またはペプチドの該断片は、該タンパク質またはペプチドのエピトープを含むものであってもよい。エピトープ（「抗原決定基」とも称される）は、本発明との関連において、典型的には、天然のタンパク質またはペプチドの外部表面上に位置し、好ましくは5～15個のアミノ酸を有し、より好ましくは5～12個のアミノ酸、6～9個のアミノ酸を有し、その天然形態で抗体またはB細胞受容体によって認識され得る断片である。かかるエピトープはさらに、かかるタンパク質またはペプチドの本明細書に記載の任意のバリエーションから選択され得る。これとの関連において、抗原決定基は立体構造型エピトープであっても不連続（discontinuous）エピトープであってもよく、エピトープはタンパク質またはペプチドのセグメントで構成されており、このようなセグメントは、該タンパク質またはペプチドのアミノ酸配列内では不連続であるが一体となって3次元構造になるかまたは連続もしくは線状のエピトープ（これは、1本のポリペプチド鎖で構成される）になる。

20

【0342】

本明細書に規定したタンパク質またはペプチドの「バリエーション」は、コードアミノ酸配列が変更されるように該タンパク質またはペプチドをコードしているヌクレオチドが置き換えられた核酸にコードされ得る。それにより、1つ以上の変異、例えば1個以上の置換、挿入および/または欠失されたアミノ酸を有するタンパク質またはペプチドが作製される。好ましくは、このような断片および/またはバリエーションは、完全長の天然タンパク質と比べて同じ生物学的機能または特異的活性、例えば特異的抗原性特性を有するものである。

30

【0343】

一実施形態では、核酸化合物に対するカチオン性のペプチドまたはポリマーの重量比は少なくとも約1である。例えば、これは約1～約20、または約1～約15、例えば約 2 ± 1 、 3 ± 1 、 4 ± 1 、 5 ± 1 、 6 ± 1 、 7 ± 1 、 8 ± 1 、 9 ± 1 、 10 ± 1 、 11 ± 1 、 12 ± 1 、 13 ± 1 、 14 ± 1 の範囲であり得る。

【0344】

核酸化合物1 μg あたりのカチオン性のリポイドのnmolで表示すると、この量は好ましくは約40nmol以下/ μg である。別の実施形態では、この比は約15nmol以下/ μg 、特に10nmol以下/ μg である。一部の具体的な実施形態では、該量はさらにもっと少なく、例えば約2nmol以下/ μg 、または約1.5nmol以下/ μg 、またはさらには約1nmol以下/ μg 、例えば、それぞれ約0.05～約2nmol/ μg 、または約0.1～約1.5nmol/ μg 、または約0.25～約1.0nmol/ μg 、または約0.3～約0.8nmol/ μg 、例えば約0.4nmol/ μg の範囲である。

40

【0345】

一実施形態では、核酸化合物に対するカチオン性のペプチドまたはポリマーの重量比が少なくとも約1である、および/または核酸化合物に対するリポイドの割合が約15nmol以下/ μg である

50

【0346】

リピドイドの量は、核酸カーゴに比べて相対的に少ないだけでなく、カチオン性のペプチドまたはポリマーに対しても相対的に少ない。カチオン性のペプチドまたはポリマーに対するリピドイドの重量比は約1:10より大きくないか、またはそれぞれ約1:20、もしくは1:30、もしくは1:40より大きくないことが一般的に好ましい。別の好ましい実施形態では、それぞれの比が約1:50より大きくない、および/または該核酸に対するリピドイドの割合が約2 nmol以下/μgである。

【0347】

また、該組成物はN/P比によって特性評価され得、N/P比は、本発明によれば、カーゴとして使用される核酸化合物のリン酸基(「P」)に対するカチオン性のペプチドまたはポリマーの塩基性基の窒素原子(「N」)のモル比と定義される；文脈から異なるN/P比が意図されていることが明白でない限り。一実施形態では、約0.1~約20または約0.2~約15または約2~約15または約2~約12のN/P比。

10

【0348】

N/P比は、例えば、1 μgのRNAには典型的には約3 nmolのリン酸残基が含まれていることに基づいて計算され得るが、RNAは塩基の統計的分布を示すものであるものとする。ペプチドまたはポリマーの「N」値は、その分子量、または該ペプチドまたはポリマーが分子量分布を有する場合はその平均分子量と、カチオン性基もしくはカチオン化可能基の相対的含有量に基づいて計算され得る。好ましいさらなる一実施形態では、N/P比は約0.2~約15の範囲、またはそれぞれ約0.2~約13、もしくは約0.3~約12、もしくは約0.5~約10、もしくは約0.6~約8の範囲である。

20

【0349】

一実施形態では、約2~約15または約2~約12の範囲のN/P比が選択される。かかるN/P比を示す本発明による組成物が、該組成物の静脈内投与を含む使用に特に好適である。

【0350】

上記のように、本発明の組成物中ならびにナノ粒子(1個または複数)中のリピドイドの量は典型的には、カーゴとしての核酸用の慣用的な脂質ベースの担体中よりもずっと少ない。

【0351】

理論的には、リピドイドの量はまた、N/P比でも表示され得る。この場合、「N」はリピドイドの塩基性基のモル数を表し、一方、「P」は、カーゴとして使用される核酸のリン酸基を示す。本発明の組成物において、したがって本発明のナノ粒子においてもまた、このリピドイド関連N/P比は好ましくは約3以下、特に約2以下である。また、1以下、例えばそれぞれ約0.01~約1、または約0.02~約0.8、または約0.05~約0.6、または約0.1~約0.5の範囲のリピドイド関連N/P比も好ましい。

30

【0352】

本発明の組成物に、さらなる構成成分、例えば1種類以上の不活性成分、補助剤または賦形剤を含めてもよい。一実施形態では、該組成物は、標的化剤、細胞膜透過剤およびステルス性(stealth)薬剤から独立して選択される1種類以上の化合物を含むものである。

40

【0353】

本明細書で用いる場合、標的化剤は、標的、例えば標的細胞の表面もしくは該表面上に位置する標的または細胞内標的に対して親和性を有する化合物である。例えば、標的化剤は、抗体、抗体断片、または目的の標的に対して親和性を有する小分子薬剤であり得る。任意選択で、かかる薬剤を該カチオン性のペプチドまたはポリマー内に組み込んでもよい。他の場合では、かかる薬剤が該組成物中に、なんらの担体化合物との共有結合なしのさらなる構成成分として組み込まれ得る。

【0354】

同じことが、任意選択の細胞膜透過薬剤および/またはステルス性薬剤にも適用される。

50

本明細書で用いる場合、細胞膜透過剤には、細胞膜透過ペプチド（CPP）、ならびに同様の生物学的または生体模倣的機能を有する、すなわち細胞内へのカーゴの取込みを助長するための任意の他の化合物が包含される。ステルス性薬剤は、本発明との関連において、カーゴ分子または粒子に結合すると、例えば静脈内注射または輸注によって注射された被験体の血流中で長時間の循環時間をもたらす化合物または物質を意味する。ステルス性薬剤の一例はペグ化脂質であり、その脂質ドメインは、例えばリピドイドの疎水性基と相互作用することによってナノ粒子に対するアンカーとしての機能を果たし得、一方、そのポリエチレングリコール（PEG）ドメインは「ステルス」特性を付与し得る。この特性は、カーゴ物質が血流中で循環中において被験体の免疫系との相互作用の低減を示すことを意味し、これは、典型的には、血液からの消失半減期の延長ならびに免疫原性および抗原性の低減と関連する。

10

【0355】

有用なペグ化脂質の例としては、1 - （モノメトキシ - ポリエチレングリコール） - 2 , 3 - ジミリスチルグリセロール（PEG - DMG）、N - [（メトキシポリ（エチレングリコール）₂₀₀₀）カルバモイル] - 1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - アミン（PEG - C - DMA）、または1 , 2 - ジアシアル（diacyal） - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ（ポリエチレングリコール）] が挙げられ；後者の場合、アシルは、例えばミリストイル、パルミトイル、ステアロイルまたはオレオイルは意味し得、ポリエチレングリコールは典型的には、ポリエチレングリコール - 350 ~ ポリエチレングリコール - 5000、特に、ポリエチレングリコール - 750、ポリエチレングリコール - 1000、ポリエチレングリコール - 2000、およびポリエチレングリコール - 3000である。

20

【0356】

本発明の組成物において、構成成分、すなわち、カチオン性のペプチドまたはポリマー、リピドイドおよび核酸化合物を1個以上のナノ粒子中に組み込んでもよい。換言すると、該組成物は、該カチオン性のペプチドまたはポリマー、該リピドイドおよび該核酸化合物を含む1個以上のナノ粒子を含むものであり得る。あるいはまた、該組成物は、少なくとも該カチオン性のペプチドまたはポリマーと該核酸化合物を含む1個以上のナノ粒子を含むものであり得る。このような実施形態では、各構成成分は、上記のように選択され得、これらの特色に関してあらゆる選択肢および好ましいものが包含される。

30

【0357】

典型的には、かかるナノ粒子は、該カチオン性のペプチドまたはポリマーおよび任意選択でまた該リピドイドを核酸化合物と合わせると、これらが一体となって担体-カーゴ複合体（以下にさらに詳細に説明する）を形成し得ることで形成される。しかしながら、2つの成分、すなわち、該ポリマーまたはペプチドと核酸化合物が相互作用して、例えばナノ粒子に似たコロイド状構造を形成するが、該リピドイドはかかる複合体またはナノ粒子中に組み込まれないか、または十分に組み込まれないこともまた考えられ得る。

【0358】

「ナノ粒子」は、本明細書で用いる場合、任意の構造または形態構造を有するサブミクロン粒子である。サブミクロン粒子はまた、コロイドまたはコロイド状と称される場合もあり得る。ナノ粒子のベースとなる材料に関して、およびその構造または形態構造に関して、ナノ粒子は、ナノ粒子の具体的な型の考えられ得る表記を数例挙げると、例えば、ナノカプセル、小胞、リポソーム、脂質ナノ粒子、ミセル、架橋ミセル、リポフレックス、ポリフレックス、混合型またはハイブリッド型の複合体と分類され得る。

40

【0359】

この態様によれば、本発明はまた、上記に規定したナノ粒子自体、ならびに複数のかかるナノ粒子、特に、複数の該好ましいナノ粒子（以下に、より詳細に説明する）に関するものである。

【0360】

好ましい実施形態の一例では、ナノ粒子は、該核酸化合物ならびに該カチオン性のペプ

50

チドまたはポリマーおよび/または該リピドイドによって形成された複合体を含むものである。さらなる具体的な一実施形態では、ナノ粒子は本質的にこれらの構成成分 (a)、(b) および (c) からなるものである。また別の具体的な実施形態では、ナノ粒子は、本質的に (a) 1 種類以上のカチオン性のペプチドおよび/またはポリマー；(b) 1 種類以上のリピドイド；(c) 1 種類以上の核酸化合物；ならびに任意選択で、(d) 標的化剤、細胞膜透過剤およびステルス性薬剤から独立して選択される 1 種類以上の化合物からなるものである。この場合も同様に、このような実施形態では、個々の構成成分に関して上記に記載した選択肢および好ましいものが十分に適用可能である。

【0361】

好ましい実施形態の一例では、本発明のナノ粒子 (1 個または複数) は、該カチオン性のペプチドまたはポリマーと該カチオン性のリピドイドの複合体；または該カチオン性のペプチドまたはポリマーおよび/または該カチオン性のリピドイドと該核酸化合物の複合体を含むものである。換言すると、ナノ粒子は複合体を含むものであってもよく、またはさらには実質的に複合体であってもよく、該複合体は

(a) 該カチオン性のペプチドまたはポリマー；

(b) 該カチオン性のリピドイド；および/または

(c) 該核酸化合物

のうちの任意の 2 つの構成員、または 3 つのすべての構成員で構成されたものであり得る。

【0362】

「複合体」は、本明細書で用いる場合、分子がより大きな単位に会合し、共有結合性の化学結合より弱い力で一体に保持されたものである。かかる複合体はまた、会合複合体とも称され得る。複合体を一体に保持する力は、多くの場合、水素結合 (“hydrogen bond”) (“hydrogen bridge” としても知られている)、ロンドン力および/または双極子誘引である。脂質またはリピドイドと核酸を含む複合体は多くの場合、リポフレックスと称され、ポリマーと核酸の複合体はポリプレックスとして知られている。

【0363】

本発明により提供されるカチオン性のペプチドまたはポリマーとリピドイドの両方の存在下では、該核酸は、リポフレックスの特徴とポリプレックスの特徴を同時に有するハイブリッド型複合体を形成し得る。理論に拘束されることを望まないが、本発明者らは、かかるハイブリッドの複合体は、本発明の組成物またはナノ粒子において形成された場合、カーゴとさまざまな型の担体間 (カーゴ分子のさまざまなドメインまたは領域を含む) の種々の型の相互作用を兼ね備えるという点で特に安定となり得ると思っている。他方において、また、核酸化合物の複合体化は、本発明を実施した場合、主にカチオン性のペプチドまたはタンパク質によってなされること (特に、比較的少量のリピドイドしか使用しない場合)、およびリピドイドの存在は、複合体が生体細胞に取り込まれたらその運命に大きく影響することもあり得ると考える。いずれの場合も、本発明はなんら理論に限定されず、本明細書に規定した 2 つ以上の構成成分で形成される複合体はいずれも、本発明による複合体であると理解されたい。

【0364】

好ましい実施形態の一例では、本発明のナノ粒子は実質的に、上記に規定したカーゴ-担体複合体からなるものである。この具体的な状況において、表現「実質的に～からなる」とは、例えば、ナノ粒子中の微量の補助物質、例えば溶媒、共溶媒、界面活性剤、等張化剤などの存在を排除すると理解されるべきでない。

【0365】

あるいはまた、本発明の組成物中のナノ粒子の少なくとも約 50 wt.-%、またはそれぞれ、その少なくとも 60 wt.-%、その少なくとも 70 wt.-%、その少なくとも 80 wt.-%、その少なくとも 85 wt.-%、その少なくとも 90 wt.-%、もしくはその少なくとも 95 wt.-% が、該カチオン性のペプチドまたはポリマー、該リピドイド、および該生物学的に活性なカーゴ物質からなるものである。

【0366】

本発明との関連において、「生物学的に活性なカーゴ物質」は一般的に、所望の生物学的効果、例えば薬理学的効果、例えば、任意の型の予防効果、治療効果、診断効果または寛解効果を得るために被験体または被験体の器官、組織もしくは細胞に、製剤、担体、ベクターまたは媒体によって送達されることが意図された化合物または化合物の混合物もしくは組合せをいう。生物学的に活性なカーゴ物質の送達は、かかる物質を含む製剤品を投与することが目的であるが、製剤、または担体、ベクターもしくは媒体（これも、場合によっては生物学的に活性とみなされる場合もあり得る）は主に、該カーゴ物質を送達するための手段である。異なる意味が文脈から明白でない限り、表現「生物学的に活性なカーゴ物質」、「生物学的に活性な化合物」、「カーゴ物質」、「カーゴ」などは同義的に用

10

【0367】

「担体」または「ビヒクル」は、本明細書で用いる場合、一般的に、製剤の一部であって、生物学的に活性な化合物または物質の送達を補助するか、可能にするか、または改善する任意の化合物、構築物または物質を意味し得る。これは、生物学的に実質的に不活性であってもよく、被験体の組織、細胞または垂細胞成分と実質的に相互作用するという点で生物学的に活性であってもよく、例えば生物学的に活性なカーゴ物質の取込みを向上させるものであってもよい。本発明との関連において、これらの用語は、該リピドイド、該カチオン性のペプチドまたはポリマー、または両者の組合せもしくは混合物にもまた適用される。

20

【0368】

「製剤」は、これに組み込まれて製剤によって投与される生物学的に活性な化合物に関して、少なくとも1種類の生物学的に活性な化合物および1種類の賦形剤、担体、ビヒクルまたは他の補助物質を含むその組成および製造方法の点で薬学的に許容され得る任意の製剤品である。

【0369】

記載のように、本発明の組成物に、上記のようなさらなる構成成分、例えば標的化剤、細胞膜透過剤およびステルス性薬剤から独立して選択される1種類以上の化合物を含めてもよい。このようなさらなる構成成分はいずれも、任意選択でナノ粒子（1個または複数）中に組み込まれ得る。

30

【0370】

本明細書で用いる場合、標的化剤は、標的、例えば標的細胞の表面もしくは該表面上に位置する標的または細胞内標的に対して親和性を有する化合物である。例えば、標的化剤は、抗体、抗体断片、または目的の標的に対して親和性を有する小分子薬剤であり得る。部分Pまたはそのジスルフィド結合型多量体を有する化合物との関連において論考したように、かかる薬剤は任意選択でかかる化合物内に組み込まれ得る。他の場合では、かかる薬剤はナノ粒子中に、なんらの担体化合物との共有結合なしのさらなる構成成分として組み込まれ得る。

40

【0371】

同じことが、任意選択の細胞膜透過薬剤および/またはステルス性薬剤にも適用される。本明細書で用いる場合、細胞膜透過剤には、上記に規定した細胞膜透過ペプチド（C P P）、ならびに同様の生物学的または生体模倣的機能を有する、すなわち細胞内へのカーゴの取込みを助長するための任意の他の化合物が包含される。ステルス性薬剤は、本発明との関連において、カチオン性のリピドイド、部分Pまたはそのジスルフィド結合型多量体を含む化合物および該核酸カーゴを含むナノ粒子中に組み込まれると、該ナノ粒子が例えば静脈内注射または輸注注射された被験体の血流中で該ナノ粒子の長時間の循環時間をもたらす化合物または物質を意味する。ステルス性薬剤の一例はペグ化脂質であり、その

50

脂質ドメインは、例えばリポイドの疎水性基と相互作用することによってナノ粒子に対するアンカーとしての機能を果たし得、一方、そのポリエチレングリコール（PEG）ドメインは該ナノ粒子に「ステルス」特性を付与し得る。この特性は、該ナノ粒子が血流中で循環中において被験体の免疫系との相互作用の低減を示すことを意味し、これは、典型的には、血液からの該ナノ粒子の消失半減期の延長ならびに免疫原性および抗原性の低減と関連する。

【0372】

有用なベグ化脂質の例としては、1 - (モノメトキシ - ポリエチレングリコール) - 2 , 3 - ジミリスチルグリセロール (PEG - DMG)、N - [(メトキシポリ (エチレングリコール) ₂₀₀₀) カルバモイル] - 1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - アミン (PEG - C - DMA)、または1 , 2 - ジアシアル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン - N - [メトキシ (ポリエチレングリコール)] が挙げられ；後者の場合、アシルは、例えばミリストイル、パルミトイル、ステアロイルまたはオレオイルは意味し得、ポリエチレングリコールは典型的には、ポリエチレングリコール - 350 ~ ポリエチレングリコール - 5000、特に、ポリエチレングリコール - 750、ポリエチレングリコール - 1000、ポリエチレングリコール - 2000、およびポリエチレングリコール - 3000である。

【0373】

他の中性脂質は、通常、本発明の組成物中またはナノ粒子（1個もしくは複数）中に組み込まなくてよい。これは本発明のさらなる利点の1つであり、（典型的には、かなりの量でさえある）いわゆるヘルパー脂質の組み込みを必要とする、核酸（nucleic acid）カーゴの複合体化および送達に適した既知のほとんどの脂質担体系とは対照的である。本明細書で用いる場合、ヘルパー脂質は、核酸との組合せでの脂質ナノ粒子の安定性に寄与し得る非カチオン性またはカチオン化可能な（両性イオン性でない限り）ホスホ脂質またはステロイドである。したがって、本発明のナノ粒子ならびに組成物にかかるヘルパー脂質が含まれていないことは本発明の好ましい実施形態の一例である。

【0374】

該ナノ粒子は、動的レーザー散乱による測定時、約1 , 000 nm以下の流体力学的直径を有するものである。より好ましくは、その流体力学的直径は約800 nm以下、例えば約30 nm ~ 約800 nmの範囲である。他の好ましい実施形態では、流体力学的直径が、それぞれ約50 nm ~ 約300 nmまたは約60 nm ~ 約250 nm、約60 nm ~ 約150 nmまたは約60 nm ~ 約120 nmの範囲である。これらは個々のナノ粒子の好ましい直径であるが、これは、本発明の組成物における他の直径のナノ粒子の存在を排除するものではない。しかしながら、本発明は好ましくは、多くの（またはさらにはほとんどの）ナノ粒子がかかる直径を示す組成物を用いて実施される。

【0375】

さらに、複数のかかるナノ粒子を含む本発明による組成物はまた、動的レーザー散乱によって測定される平均流体力学的直径によっても特性評価され得、これもまた、好ましくは800 nm以下、例えば約30 nm ~ 約800 nmの範囲である。流体力学的直径との関連において、「平均」は、キュムラント平均としても知られるZ平均であると理解されたい。明らかに、動的レーザー散乱による測定もまた、適切な分散剤を用いて適切な希釈度で、使用される分析機器について製造業者の推奨に従って実施されなければならない。特に好ましいのは、それぞれ約50 nm ~ 約300 nmまたは約60 nm ~ 約250 nm、約60 nm ~ 約150 nmまたは約60 nm ~ 約120 nmの範囲の平均流体力学的直径である。

【0376】

該ナノ粒子はさらに界面動電位によっても特性評価され得、これはゼータ電位によって表示され得る。好ましい実施形態において、ゼータ電位は、それぞれ約0 mV ~ 約50 mVまたは約0 mV ~ 約10 mVの範囲である。他の好ましい実施形態では、ゼータ電位がプラス、すなわち0 mVより高いがそれぞれ50 mV以下、または40 mV、または30

mV、または20mV、または10mVである。

【0377】

さらなる実施形態では、ゼータ電位が、それぞれ約0mV～約-50mVまたは約0mV～約-10mVの範囲である。別の実施形態では、ゼータ電位がマイナス、すなわち0mVより低い、それぞれ-50mV以上、または-40mV、または-30mV、または-20mV、または-10mVである。

【0378】

別の実施形態では、ゼータ電位が、1未満のN/P比を有する粒子（局所投与に特に好適）について0mV～-50mVの範囲である。さらなる一実施形態では、ゼータ電位が、1より大きいN/P比を有する粒子（静脈内または他の血管内適用に特に好適）について0mV～+50mVの範囲である。

10

【0379】

カチオン性部分Pまたはそのジスルフィド結合型多量体を含むカチオン性化合物の量は、核酸カーゴの量を考慮して選択するのがよい。好ましい実施形態の一例では、この量は、例えば約0.1～約20の範囲のN/P比が得られるように選択される。これとの関連において、N/P比は、カーゴとして使用される核酸のリン酸基（「P」）に対する部分Pまたはそのジスルフィド結合型多量体を含む化合物の塩基性窒素含有基の窒素原子（「N」）のモル比と定義される。N/P比は、例えば、1μgのRNAには典型的には約3nmolのリン酸残基が含まれていることに基づいて計算され得るが、RNAは、塩基の統計的分布を示すものであるものとする。ペプチドまたはポリマーの「N」値は、その分子量、または該ペプチドまたはポリマーが分子量分布を有する場合はその平均分子量と、カチオン性基もしくはカチオン化可能基の相対的含有量に基づいて計算され得る。好ましいさらなる一実施形態では、N/P比は約0.2～約15の範囲、またはそれぞれ約0.2～約13、もしくは約0.3～約12、もしくは約0.5～約10、もしくは約0.6～約8の範囲である。

20

【0380】

一実施形態では、約2～約15または約2～約12の範囲のN/P比が選択される。かかるN/P比を示す本発明による組成物が、該組成物の静脈内投与を含む使用に特に好適である。

【0381】

30

上記のように、本発明の組成物中ならびにナノ粒子（1個または複数）中のカチオン性のリピドイドの量は典型的には、カーゴとしての核酸用の慣用的なリピドイドベースの担体中よりもずっと少ない。本発明は、例えばRNAの送達および細胞のトランスフェクションに提案されている、リボフレックスまたはリピドイドナノ粒子に使用されるリピドイドの典型的な量の約0.1～約10%という少ない量で実施され得る。理論に拘束されることを望まないが、本発明者らは、リピドイドがこのような少量であることが本発明の組成物の高い耐容性を得るのに極めて重要であったと思っている。

【0382】

リピドイドの量はまた、N/P比でも表示され得る。この場合、「N」はカチオン性のリピドイドの塩基性基のモル数を表し、一方、「P」は、カーゴとして使用される核酸のリン酸基を示す。本発明の組成物において、したがって本発明のナノ粒子においてもまた、このリピドイド関連N/P比は好ましくは約3以下、特に約2以下である。また、それぞれ約0.016～約0.650、または約0.032～約0.484、または約0.080～約0.323、または約0.968～約0.258、例えば約0.129の範囲のリピドイド関連N/P比も好ましい。

40

【0383】

カチオン性のリピドイドの量は、カーゴに対して相対的に少ないだけでなく、ペプチドまたはポリマー担体、すなわち部分Pまたはその該多量体を含む化合物の量に対しても相対的に少ない。部分Pまたはそのジスルフィド結合型多量体を含む化合物に対するカチオン性のリピドイドの重量比は約1:10より大きくない、またはそれぞれ約1:20、も

50

しくは1：30、もしくは1：40より大きくないことが一般的に好ましい。別の好ましい実施形態では、それぞれの比が約1：50より大きくない。

【0384】

該ナノ粒子は、(i) 1種類以上のカチオン性のペプチドおよび/またはポリマー；(ii) 上記に規定した1種類以上のリピドイド、任意選択で適切な溶媒（例えば、エタノール、DMSO）に溶解させる；ならびに(iii) 1種類以上の核酸化合物を合わせる工程を含み、合わせることが、例えばナノ粒子または複数のナノ粒子の形成を可能にするための水性液の存在下で行われる方法によって調製され得る。これらの異なる薬剤の良好な混合を可能にするため、リピドイドを、核酸との混合前に、該カチオン性の複合体化パートナーと混合してもよい。混合は適当な混合デバイス（例えば、T型もしくはY型を用いる層流の組合せ；マイクロ流路デバイスまたは単に攪拌溶液に添加すること）によって行われ得る。

10

【0385】

該カチオン性のペプチドまたはポリマー、該リピドイド、カーゴとしての核酸化合物および/または1種類以上の不活性成分を含む本発明の組成物、ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物、特に、上記のナノ粒子を含む組成物は、好ましくは、例えば、被験体、特に動物またはヒト被験体への投与に適するように製剤化および加工処理される。好ましくは、組成物は滅菌されている。

【0386】

これに関して、該組成物は医薬組成物とも称され得る。これは、該組成物または該ナノ粒子の構成成分および他の特色に関して本明細書に記載の任意の選択肢および好ましいものに適用され得る一般的な好ましいものである。換言すると、本発明はまた、例えば、核酸化合物が少なくとも1種類のペプチドまたはタンパク質をコードしているコード核酸である本明細書に規定した医薬組成物に関するものである。例えば、コード核酸は、治療活性なタンパク質または抗原をコードしているものであり得る。本発明はさらに、コード核酸が少なくとも1種類の抗原をコードしているかかる医薬組成物を含むワクチンに関するものである。これとの関連において、ワクチンは医薬組成物からなるものであってもよく、医薬組成物を他の構成成分とともに含むものであってもよい。

20

【0387】

本発明の医薬組成物、ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物は、経口、非経口、吸入スプレーによって、経表面、経直腸、経鼻、口腔内、経腔で、または埋込み型リザーバによって投与され得る。非経口という用語は、本明細書で用いる場合、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、肝内、病巣内、頭蓋内、経皮、皮内、肺内、腹腔内、心臓内、動脈内および舌下への注射または輸注手法を包含している。一部の実施形態では、本発明の医薬組成物、ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物は接眼送達によって投与され得る。具体的な一実施形態では、本発明の医薬組成物、ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物は網膜下または硝子体内注射によって投与される。好ましい一実施形態では、本発明の医薬組成物、ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物は硝子体内注射によって投与される。別の好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物 ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物は網膜下注射によって投与される。

30

40

【0388】

また、本発明は、眼の疾患、障害または病的状態に苦しんでいるか、またはこれらに易罹患性の被験体を処置するために使用され得る。本明細書で用いる場合、「眼の疾患、障害または病的状態」は、目および/または視力が悪くなる疾患、障害または病的状態をいう。一部の実施形態では、眼の疾患、障害または病的状態は、目または視力と関連している解剖学的部分におけるタンパク質欠損症または機能障害によって引き起こされ得るものである。例示的な眼の疾患、障害または病的状態としては、限定されないが、加齢黄斑変性症（AMD）、色素性ブドウ膜炎（PU）、網膜静脈分枝閉塞症（BRVO）、網膜中心静脈閉塞症（CRVO）、糖尿病黄斑浮腫（DME）、嚢胞様黄斑浮腫（CME）、ブドウ膜炎（uveitis）黄斑浮腫（UME）、サイトメガロウイルス（CMV）網膜

50

炎、眼内炎、炎症、緑内障、黄斑変性、強膜炎、網脈絡膜炎 (c h o r i o t e t i n i t i s) およびブドウ膜炎が挙げられる。

【 0 3 8 9 】

種々の実施形態において、本発明は、本明細書に記載の任意の眼の疾患、障害または病的状態において欠損しているタンパク質をコードしている m R N A を送達するために使用され得る。

【 0 3 9 0 】

好ましくは、本発明の医薬組成物、ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物は非経口注射によって、より好ましくは皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、肝内、病巣内、頭蓋内、経皮、皮内、肺内、腹腔内、心臓内、動脈内、硝子体内、網膜下、房内、結膜下、テノン嚢下、球後、経表面および/または後強膜近傍 (p o s t e r i o r j u x t a s c l e r a l) 投与、毛様筋内への投与または舌下注射によって、あるいは輸注手法によって投与され得る。特に好ましいは皮内注射および筋肉内注射である。本発明の医薬組成物の滅菌された注射用形態は水性または油性の懸濁剤であり得る。このような懸濁剤は、当該技術分野で知られた手法に従って、適当な分散化剤または湿潤剤および懸濁化剤を用いて製剤化され得る。

10

【 0 3 9 1 】

また、本発明の医薬組成物、本明細書に規定したナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物を、任意の経口に許容され得る投薬形態、例えば限定されないが、カプセル剤、錠剤、水性懸濁剤または液剤で経口投与してもよい。

20

【 0 3 9 2 】

また、本発明の医薬組成物、ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物を特に、処置標的が経表面適用によって容易に到達可能な領域または器官を含む場合、例えば、皮膚の疾患または任意の他の到達可能な上皮組織の疾患などの場合、経表面投与してもよい。好適な経表面製剤は、このような領域または器官の各々に対して容易に調製される。経表面適用のためには、本発明の医薬組成物は、1種類以上の担体中に懸濁または溶解させた本明細書に規定した核酸を含む適当な軟膏に製剤化され得る。

【 0 3 9 3 】

本発明の医薬組成物、ナノ粒子またはナノ粒子を含む組成物は典型的には、本発明の医薬組成物の成分、特に、本明細書に規定した核酸配列 (1 つまたは複数) を「安全で有効な量」で含むものである。本明細書で用いる場合、「安全で有効な量」は、本明細書に規定した疾患または障害のプラスの改良を有意に誘導するのに十分な本明細書に規定した核酸配列 (1 つまたは複数) 自体の量を意味する。しかしながら、同時に、「安全で有効な量」は、深刻な副作用が回避されるのに、おおよそ利点とリスクの理にかなった関係が可能であるのに十分に少ない量である。このような限界値の決定は典型的には、理にかなった医学的判断の範囲内である。

30

【 0 3 9 4 】

したがって、本発明によるワクチンは、本明細書に記載の (医薬) 組成物と同じ成分を主体とするものである。その範囲において、本明細書において提供する (医薬) 組成物の説明が参照され得る。好ましくは、本発明によるワクチンは、本明細書に規定した少なくとも1種類の核酸配列を含む少なくとも1種類の核酸および薬学的に許容され得る担体を含むものである。諸実施形態において、ワクチンが1種類より多くの核酸、特に1種類より多くの m R N A 配列 (例えば、複数の本発明による R N A 配列、ここで、各々は、好ましくは相違する抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードしている) を含むものである場合、ワクチンは、物理的に分離された形態で提供され得、個別の投与工程によって投与され得る。本発明によるワクチンは、特に、m R N A 配列が1つの組成物によって提供される場合、本明細書に記載の (医薬) 組成物に相当し得る。しかしながら、本発明のワクチンはまた、物理的に分離された状態で提供してもよい。例えば、諸実施形態において、ワクチンが1種類より多くの m R N A 配列 / 種を含むものである場合、このような R N A 種を、各々が相違する抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードしている少なくとも1種類

40

50

の mRNA 種 / 配列 (例えば、3 種類の相違する mRNA 種 / 配列) が各々に含まれ得る。例えば 2、3、4、5 または 6 種類の個別の組成物が提供されるように提供してもよく、これらは合わせてもよく合わせなくてもよい。また、本発明のワクチンは、各組成物が少なくとも 1 種類の本明細書に規定した抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードしている少なくとも 1 種類の mRNA を含むものである少なくとも 2 種類の相違する組成物の組合せであってもよい。あるいはまた、ワクチンは、各々が本明細書に規定した抗原性ペプチドまたはタンパク質のうちの 1 種類をコードしている少なくとも 1 種類の mRNA、好ましくは少なくとも 2、3、4、5、6 種類またはそれ以上の mRNA の組合せとして提供され得る。このようなワクチンは、使用前に合わせて 1 つの組成物を提供してもよく、本明細書に規定した任意の抗原性ペプチドまたはタンパク質をコードしている相違する mRNA 配列 / 種を投与するために 1 回より多くの投与が必要とされるように使用してもよい。ワクチンが、本明細書に規定した抗原の組合せをコードしている少なくとも 1 種類の mRNA 配列、典型的には少なくとも 2 種類の mRNA 配列を含むものである場合、これは、例えば、1 回の投与 (すべての mRNA 種 / 配列を合わせる) によって、少なくとも 2 回の個別の投与によって投与され得る。したがって、個別の実体 (1 種類の mRNA 種を含むもの) または合わせた実体 (1 種類より多くの mRNA 種を含むもの) として提供される、本明細書に規定した少なくとも 1 種類の抗原性ペプチドもしくはタンパク質または抗原の任意の組合せ (および任意選択で、さらなる抗原) をコードしているモノ -、バイ - またはマルチシストロニックな mRNA の任意の組合せが本発明によるワクチンであると理解されたい。

【0395】

本発明による (医薬) 組成物と同様、ワクチンの実体は、液状およびまたは乾燥 (例えば、凍結乾燥) 形態で提供され得る。これは、さらなる成分、特に、その医薬品としての使用を可能にするさらなる成分を含むものであってもよい。ワクチンまたは (医薬) 組成物は、例えば、薬学的に許容され得る担体および / またはさらなる補助物質および添加剤をさらに含むものであり得る。

【0396】

ワクチンまたは (医薬) 組成物は典型的には、本明細書に規定した抗原性ペプチドもしくはタンパク質またはその断片もしくはバリエーションあるいは抗原 (好ましくは、本明細書に規定したものの) の組合せをコードしている本明細書に規定した本発明による核酸、特に mRNA を安全で有効な量で含むものである。本明細書で用いる場合、「安全で有効な量」は、がんまたはがんに関連する疾患もしくは障害のプラスの改良を有意に誘導するのに十分な mRNA の量を意味する。しかしながら、同時に、「安全で有効な量」は、深刻な副作用が回避されるのに、すなわち利点とリスクの理にかなった関係が可能であるのに十分に少ない量である。このような限界値の決定は典型的には、理にかなった医学的判断の範囲内である。本発明のワクチンまたは (医薬) 組成物に関して、表現「安全で有効な量」は好ましくは、適応免疫系を、過度または有害な免疫反応がもたらされないが、また好ましくはかかる免疫反応が測定可能レベル未満にならないような様式で賦活するのに適した mRNA (したがって、コードされた抗原) の量を意味する。本明細書に規定した (医薬) 組成物またはワクチンの mRNA のかかる「安全で有効な量」はさらに、mRNA、例えば、モノシストロニック、バイ - またはさらにはマルチシストロニックな mRNA の型に依存して選択され得、それは、バイ - またはさらにはマルチシストロニックな mRNA では等量モノシストロニックな mRNA の使用より有意に高いコードされた抗原 (1 種類または複数種) の発現がもたらされ得るからである。上記に規定した (医薬) 組成物またはワクチンの mRNA の「安全で有効な量」はさらに、処置対象の具体的な病的状態、また、処置対象の患者の年齢および体調、病的状態の重症度、処置の持続期間、付随する治療の性質、使用される具体的な薬学的に許容され得る担体の性質、ならびに同様の要素 (担当医の知識と経験の範囲内) と関連してさまざまである。本発明によるワクチンまたは組成物は、ヒトに対して、また獣医学目的のために、医薬組成物またはワクチンとして本発明に従って使用され得る。

【0397】

好ましい一実施形態では、本発明による（医薬）組成物、ワクチンまたはパーツキットの核酸、特にmRNAは凍結乾燥形態で提供される。好ましくは、凍結乾燥されたmRNAは、投与前に適当なバッファー（好都合には水性担体を主体とするもの）中で、例えば、乳酸加リンゲル液（これが好ましい）、リンゲル液、リン酸バッファー溶液中で再構成される。好ましい一実施形態では、本発明による（医薬）組成物、ワクチンまたはパーツキットは少なくとも1、2、3、4、5、6種類またはそれ以上のmRNA、好ましくは、凍結乾燥形態で個別に提供され（任意選択で少なくとも1種類のさらなる添加剤と一緒に）、（モノシストロニックな）mRNAの各々の個々の投与が可能となるように使用前に適当なバッファー（例えば、Ringer-Lactate solution）中で好ましくは個別に再構成されるmRNAを含むものである。

10

【0398】

本発明によるワクチンまたは（医薬）組成物には典型的には薬学的に許容され得る担体が含まれ得る。表現「薬学的に許容され得る担体」は、本明細書で用いる場合、好ましくは本発明のワクチンの液状または非液状の基剤を包含している。本発明のワクチンが液状形態で提供される場合、担体は水、典型的にはパイロジェンフリー水；等張性生理食塩水または緩衝（水性）溶液、例えば、リン酸塩、クエン酸塩などの緩衝溶液である。特に、本発明のワクチンの注射のためには、水または、ナトリウム塩、好ましくは少なくとも50 mMのナトリウム塩、カルシウム塩、好ましくは少なくとも0,01 mMのカルシウム塩、および任意選択でカリウム塩、好ましくは少なくとも3 mMのカリウム塩を含有している好ましくはバッファー、より好ましくは水性バッファーが使用され得る。好ましい一実施形態によれば、ナトリウム塩、カルシウム塩および任意選択でカリウム塩はそのハロゲン化物、例えば塩化物、ヨウ化物または臭化物の形態、その水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩または硫酸塩の形態などで存在させ得る。限定されないが、ナトリウム塩の例としては、例えばNaCl、NaI、NaBr、Na₂CO₃、NaHCO₃、Na₂SO₄が挙げられ、任意選択のカリウム塩の例としては、例えばKCl、KI、KBr、K₂CO₃、KHCO₃、K₂SO₄が挙げられ、カルシウム塩の例としては、例えばCaCl₂、CaI₂、CaBr₂、CaCO₃、CaSO₄、Ca(OH)₂が挙げられる。さらに、上記のカチオンの有機アニオンをバッファー中に含めてもよい。より好ましい一実施形態によれば、上記に規定した注射目的に適したバッファーは、塩化ナトリウム（NaCl）30、塩化カルシウム（CaCl₂）および任意選択で塩化カリウム（KCl）から選択される塩を含むものであり得、ここで、該塩化物に加えてさらなるアニオンを存在させてもよい。また、CaCl₂をKClなどの別の塩で置き換えてもよい。典型的には、注射用バッファー中の塩は、塩化ナトリウム（NaCl）では少なくとも50 mM、塩化カリウム（KCl）では少なくとも3 mMおよび塩化カルシウム（CaCl₂）では少なくとも0,01 mMの濃度で存在させる。注射用バッファーは、具体的な関連媒体（reference medium）に対して高張性であっても等張性であっても低張性であってもよい、すなわち、該バッファーは、具体的な関連媒体と比べて高い塩含有量を有するものであっても、同一の塩含有量を有するものであっても、低い塩含有量を有するものであってもよく、この場合、好ましくは、浸透作用または他の濃度効果による細胞の損傷をもたらさないかかる濃度の前述の塩が使用され得る。関連媒体は、例えば、「インピボ」法では、存在する液体、例えば血液、リンパ液、サイトゾル液または他の体液、あるいは例えば、「インピトロ」法において関連媒体として使用され得る液体、例えば一般的なバッファーまたは液体である。かかる一般的なバッファーまたは液体は当業者に知られている。乳酸加リンゲル液が液状基剤として特に好ましい。

20

30

40

【0399】

しかしながら、人に対する投与に適した1種類以上の適合性の固形または液状の充填剤もしくは希釈剤またはカプセル封入用化合物も同様に使用され得る。用語「適合性の」とは、本明細書で用いる場合、本発明のワクチンの構成成分が本明細書に規定した本発明による核酸、特にmRNAと、相互作用が起こらないような、典型的な使用条件下で本発明

50

のワクチンの医薬としての有効性が実質的に低減され得ないであろう様式で混合され得ることを意味する。薬学的に許容され得る担体、充填剤および希釈剤はもちろん、処置対象の人に対する投与に適したものとなるのに十分に高い純度および十分に低い毒性を有するものでなければならない。薬学的に許容され得る担体、充填剤またはその構成成分として使用され得る化合物の一例は糖類、例えばラクトース、グルコース、トレハロースおよびスクロースなど；デンプン、例えばコーンスターチまたはイモデンプンなど；デキストロース；セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、酢酸セルロースなど；粉末化トラガカント；モルト；ゼラチン；獣脂；固形流動促進剤、例えばステアリン酸、ステアリン酸マグネシウムなど；硫酸カルシウム；植物油、例えばラッカセイ油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびカカオ油など；ポリオール、例えばポリプロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなど；アルギン酸である。

10

【0400】

薬学的に許容され得る担体の選択は、原則的には、本発明による医薬組成物またはワクチンが投与される様式によって決定される。組成物またはワクチンは、例えば全身投与または局所投与され得る。全身投与のための経路としては一般的には、例えば経皮、経口、非経口経路、例えば皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内および腹腔内注射、眼内、硝子体内、網膜下、房内、結膜下、テノン嚢下、球後、経表面および／または後強膜近傍投与、毛様筋内への投与および／または鼻腔内投与経路が挙げられる。局所投与のための経路としては一般的には例えば経表面投与経路が挙げられるが、皮内、経皮、皮下もしくは筋肉内注射または病巣内、頭蓋内、肺内、心臓内および舌下注射もまた挙げられる。より好ましくは、本発明による組成物またはワクチンは皮内、皮下または筋肉内経路、好ましくは注射（これは無針注射および／または針注射であり得る）によって投与され得る。したがって、組成物／ワクチンは、好ましくは、液状形態または固形形態に製剤化される。投与すべき本発明によるワクチンまたは組成物の適当な量は、常套的な実験によって、例えば動物モデルを使用することによって決定され得る。かかるモデルとしては、なんら限定を示唆するものではないが、ウサギ、ヒツジ、マウス、ラット、イヌおよび非ヒト霊長類モデルが挙げられる。注射用の好ましい単位用量形態としては、水、生理食塩水またはその混合物の滅菌溶液が挙げられる。かかる溶液のpHは約7.4に調整するのがよい。注射用の好適な担体としては、ハイドロゲル、制御放出または遅延放出のためのデバイス、ポリ乳酸およびコラーゲンマトリックスが挙げられる。経表面適用のための好適な薬学的に許容され得る担体としては、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤などにおける使用に適したものが挙げられる。本発明の組成物またはワクチンを経口投与する場合、錠剤、カプセル剤などが好ましい単位用量形態である。経口投与に使用され得る単位用量形態の調製のための薬学的に許容され得る担体は先行技術においてよく知られている。その選択は、二次的考慮事項、例えば味、コストおよび貯蔵性（これらは本発明の目的に重要ではない）に依存し、当業者は難なく行うことができる。

20

30

【0401】

本発明のワクチンまたは組成物は、免疫原性をさらに高めるために1種類以上の補助物質をさらに含むものであってもよい。好ましくはこれにより、本発明の組成物中に含める核酸と補助物質（これは、任意選択で上記の本発明のワクチンまたは組成物と共製剤化され得る（または個別に製剤化され得る））の相乗作用が得られる。補助物質の種々の型に応じて、種々の機構がこの点において役割を果たし得る。

40

【0402】

本発明のワクチンまたは組成物中に含められ得るさらなる添加剤は乳化剤、例えばTweenなど；湿潤剤、例えばラウリル硫酸ナトリウムなど；着色剤；味覚付与剤、医薬用担体；錠剤形成剤；安定剤；抗酸化剤；保存料である。

【0403】

また、本発明のワクチンまたは組成物にさらに、ヒトToll様受容体TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TL

50

R 1 0 に対する結合親和性（リガンドとして）のため、またはマウス T o l l 様受容体 T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 1 0、T L R 1 1、T L R 1 2 もしくは T L R 1 3 に対する結合親和性（リガンドとして）のため免疫賦活性であることが知られている任意のさらなる化合物を含めてもよい。

【 0 4 0 4 】

これとの関連において本発明のワクチンまたは組成物に添加され得る別の種類の化合物は、C p G 核酸、特に C p G - R N A または C p G - D N A であり得る。C p G - R N A または C p G - D N A は一本鎖 C p G - D N A (s s C p G - D N A)、二本鎖 C p G - D N A (d s D N A)、一本鎖 C p G - R N A (s s C p G - R N A) または二本鎖 C p G - R N A (d s C p G - R N A) であり得る。C p G 核酸は好ましくは、C p G - R N A の形態、より好ましくは一本鎖 C p G - R N A (s s C p G - R N A) の形態である。C p G 核酸は好ましくは、少なくとも 1 つまたはそれ以上の（細胞分裂促進性の）シトシン / グアニンジヌクレオチド配列（C p G モチーフ）を含むものである。第 1 の好ましい択一例によれば、このような配列に含められる少なくとも 1 つの C p G モチーフ、すなわち、C p G モチーフの C（シトシン）および G（グアニン）は非メチル化型である。このような配列に任意選択で含められるさらなるシトシンまたはグアニンはすべて、メチル化型または非メチル化型のいずれかであり得る。しかしながら、好ましいさらなる択一例によれば、C p G モチーフの C（シトシン）および G（グアニン）はまた、メチル化形態で存在していてもよい。

【 0 4 0 5 】

本明細書で用いる場合、用語「本発明の組成物」は、少なくとも 1 種類の人工核酸を含む本発明の組成物を示し得る。同様に、用語「本発明のワクチン」は、これとの関連において用いる場合、人工核酸を主体とする、すなわち、少なくとも 1 種類の人工核酸を含むものであるか、または前記人工核酸を含む本発明の組成物を含むものである本発明のワクチンを示し得る。

【 0 4 0 6 】

該組成物を既製の注射用製剤として設計してもよい。例えば、該組成物は、注射に適した滅菌された液状剤として製剤化され得る。この場合、該組成物は、好ましくは、約 4 ~ 約 9、またはより好ましくは約 4 . 5 ~ 約 8 . 5 の範囲の p H を有する滅菌された水性液剤またはナノ粒子の滅菌された水性懸濁剤として提供され得る。かかる液状組成物の重量オスモル濃度は好ましくは約 1 5 0 ~ 約 5 0 0 m O s m o l / k g、より好ましくは約 2 0 0 ~ 約 4 0 0 m O s m o l / k g である。また、該組成物が静脈内注射される場合、p H は約 4 . 5 ~ 約 8、または約 5 ~ 約 7 . 5 の範囲であり得；重量オスモル濃度は、この場合では好ましくは、それぞれ約 2 2 0 ~ 約 3 5 0 m O s m o l / k g、または約 2 5 0 ~ 約 3 3 0 m O s m o l / k g の範囲で選択され得る。

【 0 4 0 7 】

あるいはまた、該組成物を、使用前に希釈またはさらには再構成を必要とする濃縮形態として製剤化してもよい。例えば、該組成物は液状濃縮物の形態であり得、これは、水性溶媒または希釈剤での希釈を必要とする水性および/または有機系の液状製剤であり得る。液状濃縮物が有機溶媒を含むものである場合、かかる溶媒は好ましくは、比較的毒性が低い水混和性の有機溶媒、例えばエタノールまたはプロピレングリコールから選択される。

【 0 4 0 8 】

好ましい実施形態の一例では、本発明の組成物は、例えば注射に適した液状製剤を得るために液状担体で再構成するための乾燥製剤として提供される。特に、乾燥製剤は、水性液状担体を用いて再構成するための滅菌された粉末剤または凍結乾燥形態であり得る。

【 0 4 0 9 】

性能、安定性または耐容性を最適化するため、該組成物に任意選択で、必要とされる、または有用な医薬用賦形剤を含めてもよい。潜在的に有用な賦形剤としては、酸、塩基、浸透物質、抗酸化剤、安定剤、界面活性剤、共力剤、着色剤、増粘剤、増量剤、および（

必要な場合は)保存料が挙げられる。

【0410】

また、本発明は、本明細書に規定した本発明の組成物の構成成分を備えたキット、特にパーツキットに関するものである。換言すると、本発明により、任意のかかる組成物を調製するためのキットを提供する。本発明の医薬組成物は、例えばキットの1つまたは異なるパーツに存在させ得、該キットが、該カチオン性のペプチドまたはポリマーおよび/または該リピド化合物を含む第1のキット構成要素と、該核酸化合物を含む第2のキット構成要素を備えたものである。

【0411】

例えば、第1のキット構成要素は、滅菌された固形組成物、例えば凍結乾燥形態もしくは粉末剤として、または滅菌された液状組成物として提供され得る。該カチオン性のペプチドまたはポリマーおよび/または該リピドに加えて、第1のキット構成要素は、上記の1種類以上の不活性成分を備えていてもよい。同様に、第2のキット構成要素も、例えば、滅菌された固形または液状の組成物として製剤化され得、また、該核酸化合物に加えて1種類以上のさらなる不活性成分も含んでいてもよい。本発明の組成物は、この2つの構成要素の内容物を合わせ、任意選択で混合することにより得られる。任意選択で、該リピドを、第1のキット構成要素内に該カチオン性のペプチドまたはポリマーと一緒にではなく、第3のキット構成要素内に収容してもよい。

【0412】

あるいはまた、同じく本発明の範囲に含まれるが、少なくとも1種類のカチオン性のペプチドまたはポリマー、少なくとも1種類のリピド、および少なくとも1種類の核酸化合物もしくは少なくとも1種類の核酸配列または該核酸配列を含むワクチン(例えば、滅菌された固形もしくは液状の製剤として製剤化されたもの)を備えた第1のキット構成要素であって、任意選択で、本明細書に規定した少なくとも1種類の他の成分、例えば医薬用担体またはビヒクルを備えた第1のキット構成要素;ならびに例えば上記の本発明の組成物を得るために第1のキット構成要素の内容物を溶解または分散させるための液状担体を備えた第2のキット構成要素を備えたキットを提供する。この場合も、該キット構成要素は好ましくは、固形であれ液状であれ、滅菌された形態で提供され、その各々は、1種類以上のさらなる賦形剤または不活性成分を備えていてもよい。

【0413】

キットまたはパーツキットが複数の核酸配列を備えたものである場合、キットの1つの構成要素は、該キットに含められる核酸配列のうちの1種類だけを含むものであっても、いくつかを含むものであっても、すべてを含むものであってもよい。択一的な実施形態では、各構成要素がキットのパーツを構成するように1種類ごとの/各核酸配列がキットの異なる/個別の構成要素に含められ得る。また、1種類より多くの核酸を第1の構成要素にキットのパーツとして含め、一方、1つ以上の他の(第2、第3などの)構成要素(該キットの1つ以上の他のパーツを提供する)のいずれかに、1種類または1種類より多くの核酸(これは、第1の構成要素と同一であっても部分的に同一であっても異なってもよい)を含めてもよい。

【0414】

任意選択で、上記の任意のキット構成要素は、固形形態であれ液状形態であれ濃縮物であるように製剤化され、生体適合性または生理学的に相容性の液状担体(これは、任意選択でキットのパーツではない場合があり得る)、例えば滅菌された生理食塩水溶液、滅菌されたバッファー、または注射用薬物の液状希釈剤として高頻度に使用される他の溶液で希釈されるように設計され得る。

【0415】

この注射用製剤との関連において、表現「液状担体」は典型的には、生理学的に許容され得る組成、pHおよび重量オスモル濃度を有する相容性が良好な水性注射用液状組成物を意味する。

【0416】

キットまたはパーツキットにさらに、核酸配列、本発明の医薬組成物または任意のその構成要素もしくはパーツ（例えば、キットがパーツキットとして準備される場合）の投与および投薬量に関する情報を有する技術的使用説明書を含めてもよい。

【0417】

上記のナノ粒子、キットおよび組成物は、核酸カーゴを生体細胞に送達するため、例えば該核酸で該細胞をトランスフェクトするために特に有用である。これは、科学研究目的、診断用途または治療に有用であり得る。好ましい実施形態の一例では、該ナノ粒子（1個もしくは複数）該組成物は医薬として使用される。

【0418】

本明細書で用いる場合、「医薬」は、疾患もしくは病的状態の予防、抑制、処置、治療、待期療法、寛解、マネージメント、改善、遅延、安定化または再発もしくは拡張の抑制もしくは遅延、例えば、疾患もしくは病的状態の任意の症状の抑制、処置もしくは寛解に有用な任意の化合物、物質、組成物または製剤を意味する。

10

【0419】

診断薬または医薬としてのインピボでの使用に適するようにするため、本発明の組成物は液状形態で提供され得、ここで、各構成成分は、溶解形態または分散形態（例えば、懸濁形態もしくは乳化）で独立して組み込まれ得る。例えば、該組成物は、被験体に対して注射による投与に適した滅菌された水性液剤の形態であり得る。別の好ましい実施形態では、該組成物は、水性液状担体を用いて再構成するための滅菌された固形組成物、例えば滅菌された粉末剤または凍結乾燥形態として製剤化される。

20

【0420】

好ましいさらなる一実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子（1個もしくは複数）および/または組成物は、ペプチドまたはタンパク質の欠損症と関連している疾患の予防、処置および/または寛解において使用される。したがって、本発明はまた、ペプチドまたはタンパク質の欠損症と関連している疾患の予防、処置および/または寛解のための医薬の製造のための該ナノ粒子（1個もしくは複数）および/または該組成物の使用に関するものである。さらに、本発明により、ペプチドまたはタンパク質の欠損症と関連している疾患または病的状態のリスクがあるか、またはこれに罹患している被験体の処置方法であって、該ナノ粒子（1個もしくは複数）および/または該組成物を該被験体に投与することを含む方法を提供する。

30

【0421】

本発明によりさらに、本明細書に記載の人工核酸、少なくとも1種類の人工核酸を含む本発明の組成物、本発明のポリペプチド、少なくとも1種類の本発明のポリペプチドを含む本発明の組成物もしくは本発明のワクチンまたはこれらを備えたキットのいくつかの用途および使用を提供する。特に、本発明の（医薬）組成物（1種類もしくは複数種）または本発明のワクチンは、ヒトに対して、また獣医学目的のために、好ましくはヒトの医療目的のために、一般的には医薬組成物として、またはワクチンとして使用され得る。

【0422】

さらなる一態様では、本発明により、例えばウイルス感染の予防的処置（曝露前の予防もしくは曝露後の予防）および/または治療的処置の方法における使用のための本明細書に記載の人工核酸、少なくとも1種類の人工核酸を含む本発明の組成物、本発明のポリペプチド、少なくとも1種類の本発明のポリペプチドを含む本発明の組成物、本発明のワクチンまたは本発明のキットもしくはパーツキットを提供する。その結果、さらなる一態様では、本発明は、本明細書に開示の人工核酸、少なくとも1種類の人工核酸を含む本発明の組成物、本明細書に記載の本発明のポリペプチド、少なくとも1種類の本発明のポリペプチドを含む本発明の組成物、本明細書に規定した本発明のワクチンまたは本発明のキットもしくはパーツキットの医薬としての最初の医学的使用に関するものである。特に、本発明により、医薬の調製のための、本明細書に規定した少なくとも1種類の、例えばウイルスのタンパク質もしくはペプチドまたは本明細書に記載のその断片もしくはバリエーションを含む少なくとも1種類のポリペプチドをコードしている少なくとも1つのコード領域を

40

50

含む人工核酸の使用を提供する。

【0423】

別の態様によれば、本発明は、例えばウイルスによる感染または感染に関連する疾患もしくは障害の処置のための、本明細書に開示の人工核酸、少なくとも1種類の本明細書に開示の人工核酸を含む本発明の組成物、本明細書に記載の本発明のポリペプチド、少なくとも1種類の本発明のポリペプチドを含む本発明の組成物、本発明のワクチンまたは本発明のキットもしくはパーツキットの2回目の医学的使用に関するものである。

【0424】

本発明の組成物または本発明のワクチン、特に、少なくとも1種類の本明細書に開示の人工核酸を含む本発明の組成物、本明細書に記載の本発明のポリペプチドまたは少なくとも1種類の本発明のポリペプチドを含む本発明の組成物は、例えば、全身投与または局所投与され得る。全身投与のための経路としては一般的には、例えば経皮、経口、非経口経路、例えば皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内および腹腔内注射、房内、結膜下、テノン嚢下、球後、経表面および/または後強膜近傍投与、毛様筋内への投与および/または鼻腔内投与経路が挙げられる。局所投与のための経路としては一般的には例えば経表面投与経路が挙げられるが、皮内、経皮、皮下もしくは筋肉内注射または病巣内、頭蓋内、肺内、心臓内および舌下注射もまた挙げられる。より好ましくは、ワクチンは皮内、皮下または筋肉内経路によって投与され得る。したがって、本発明のワクチンは、好ましくは液状（または場合によっては固形）形態に製剤化される。好ましくは、本発明のワクチンは慣用的な針注射または無針ジェット式注射によって投与され得る。好ましい一実施形態では、本発明のワクチンまたは組成物は、本明細書に規定したジェット式注射によって好ましくは筋肉内または皮内に、より好ましくは皮内に投与され得る。

【0425】

好ましい一実施形態では、単回用量の該人工核酸、組成物またはワクチンには特定の量の本明細書に開示の人工核酸が含まれる。好ましくは、該人工核酸は、少なくとも40 μ g / 用量の量で、好ましくは40 ~ 700 μ g / 用量の量で、より好ましくは80 ~ 400 μ g / 用量の量で提供される。より詳しくは、慣用的な針を使用することにより好ましく行われる皮内注射の場合、単回用量に含められる本発明の人工核酸の量は典型的には、少なくとも200 μ g、好ましくは200 μ g ~ 1,000 μ g、より好ましくは300 μ g ~ 850 μ g、さらにより好ましくは300 μ g ~ 700 μ gである。ジェット式注射（例えば、Tropis デバイスを使用）によって好ましくは行われる皮内注射の場合では、単回用量に含められる該人工核酸の量は典型的には、少なくとも80 μ g、好ましくは80 μ g ~ 700 μ g、より好ましくは80 μ g ~ 400 μ gである。さらに、慣用的な針を使用することにより、またはジェット式注射によって好ましく行われる筋肉内注射の場合、単回用量に含められる該人工核酸の量は典型的には、少なくとも80 μ g、好ましくは80 μ g ~ 1,000 μ g、より好ましくは80 μ g ~ 850 μ g、さらにより好ましくは80 μ g ~ 700 μ gである。

【0426】

例えばウイルス感染の処置または予防のための免疫処置プロトコル、すなわち、例えばウイルスに対する被験体の免疫処置は、典型的には一連の単回用量または単回投薬量の本発明の組成物または本発明のワクチンを含む。単回投薬量は、本明細書で用いる場合、それぞれ初回 / 最初の用量、2回目の用量または以降の任意の用量（これは、好ましくは免疫反応を「追加刺激」するために投与される）をいう。

【0427】

好ましい一実施形態によれば、本明細書に開示の人工核酸、少なくとも1種類の本明細書に開示の人工核酸を含む本発明の組成物、本明細書に記載の本発明のポリペプチド、少なくとも1種類の本発明のポリペプチドを含む本発明の組成物、本発明のワクチンまたは本発明のキットもしくはパーツキットは、処置または予防における使用のため、好ましくは、例えばウイルス感染または関連する障害もしくは疾患の処置または予防における使用のために提供され、ここで、該処置または予防は、活性なさらなる医薬成分の投与を含む

。より好ましくは、本発明の人工核酸を主体とする本発明のワクチンまたは組成物の場合、ポリペプチドが活性なさらなる医薬成分として共投与され得る。例えば、本明細書に記載の少なくとも１種類の、例えばウイルスのタンパク質もしくはペプチドまたはその断片もしくはバリエーションが、免疫応答を誘導または向上させるために共投与され得る。同様に、本明細書に記載の本発明のポリペプチドを主体とする本発明のワクチンまたは組成物の場合、本明細書に記載の人工核酸が活性なさらなる医薬成分として共投与され得る。例えば、本明細書に記載の少なくとも１種類のポリペプチドをコードしている本明細書に記載の人工核酸が、免疫応答を誘導または向上させるために共投与され得る。

【 0 4 2 8 】

本発明のワクチンまたは組成物のさらなる成分は、免疫グロブリン、好ましくは I g G、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、ポリクローナル血清（１種類または複数種）など、最も好ましくは、例えばウイルスに指向される免疫グロブリンから選択され得る免疫療法剤であり得る。好ましくは、かかるさらなる免疫療法剤は、ペプチド／タンパク質として提供され得るか、または、核酸に、好ましくは D N A または R N A、より好ましくは m R N A にコードされ得る。かかる免疫療法剤により、本発明の人工核酸または本発明のポリペプチドによって誘発される能動ワクチン接種に加えて受動ワクチン接種をもたらすことが可能になる。

【 0 4 2 9 】

さらなる一態様では、本発明により、障害を処置または予防する方法であって、該障害が好ましくは、例えばウイルスによる感染または例えばウイルスによる感染に関連する障害であり、該処置または予防を必要とする被験体に、本明細書に開示の人工核酸、少なくとも１種類の本明細書に開示の人工核酸を含む本発明の組成物、本明細書に記載の本発明のポリペプチド、少なくとも１種類の本発明のポリペプチドを含む本発明の組成物、本発明のワクチンまたは本発明のキットもしくはパーツキットを投与することを含む方法を提供する。

【 0 4 3 0 】

特に、かかる方法は好ましくは：

a) 本明細書に開示の人工核酸、少なくとも１種類の本明細書に開示の人工核酸を含む本発明の組成物、本明細書に記載の本発明のポリペプチド、少なくとも１種類の本発明のポリペプチドを含む本発明の組成物、本発明のワクチンまたは本発明のキットもしくはパーツキットを準備する工程；

b) 本明細書に開示の人工核酸、少なくとも１種類の本明細書に開示の人工核酸を含む本発明の組成物、本明細書に記載の本発明のポリペプチド、少なくとも１種類の本発明のポリペプチドを含む本発明の組成物、本発明のワクチンまたは本発明のキットもしくはパーツキットを組織または生物体に適用または投与する工程；

c) 任意選択で、例えばウイルスに対する免疫グロブリン（ I g G ）を投与する工程を含むものであり得る。

【 0 4 3 1 】

また、さらなる一態様によれば、本発明により、例えば少なくとも１種類のウイルスを含む少なくとも１種類のポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーションの発現のための方法であって、好ましくは以下の工程：

a) 例えば少なくとも１種類のウイルスを含む少なくとも１種類のポリペプチドまたはその断片もしくはバリエーション（好ましくは、本明細書に規定したもの）をコードしている少なくとも１つのコード領域を含む本発明の人工核酸、あるいは前記人工核酸を含む組成物を準備する工程；および

b) 本発明の人工核酸または前記人工核酸を含む本発明の組成物を発現系に、例えば無細胞発現系、細胞（例えば、発現宿主細胞もしくは体細胞）、組織または生物体に適用または投与する工程を含む方法を提供する。

【 0 4 3 2 】

10

20

30

40

50

該方法は、検査、研究、診断、ペプチドもしくはタンパク質の商業的生産および／または治療目的のために適用され得る。これとの関連において、典型的には、本明細書に規定した本発明の人工核酸または本明細書に規定した本発明の組成物もしくはワクチンの調製後、これは典型的には、無細胞発現系、細胞（例えば、発現宿主細胞もしくは体細胞）、組織または生物体に、例えば、裸の形態もしくは複合体の形態で、または本明細書に記載の（医薬）組成物もしくはワクチンとして、好ましくは、トランスフェクションによって、または本明細書に記載の任意の投与様式を使用することにより適用または投与される。該方法は、インビトロ、インビボまたはエキソビボで行われ得る。さらに、該方法は特定の疾患の処置の状況において、特に感染性疾患または関連障害の処置において行われ得る。

【0433】

これとの関連において、インビトロは、本明細書において、本明細書に規定した本発明の人工核酸または本明細書に規定した本発明の組成物もしくはワクチンでの生物体の外部での培養細胞のトランスフェクションまたは形質導入と定義し；インビボは、本明細書において、本発明のmRNAまたは本発明の組成物を生物体または個体の全身に適用することによる、本発明の人工核酸または本発明の組成物もしくはワクチンでの細胞のトランスフェクションまたは形質導入と定義し、エキソビボは、本明細書において、本発明の人工核酸または本発明の組成物もしくはワクチンでの生物体または個体の外部での細胞のトランスフェクションまたは形質導入、およびその後の、トランスフェクトされた該細胞の該生物体または個体への適用と定義する。

【0434】

同様に、別の態様によれば、本発明によりまた、好ましくは診断目的もしくは治療目的のため、例えば、コードされたウイルスの抗原性ペプチドまたはタンパク質の発現のための、例えば、本明細書に規定した本発明の人工核酸または本明細書に規定した本発明の組成物もしくはワクチンを、例えば無細胞発現系、細胞（例えば、発現宿主細胞もしくは体細胞）、組織または生物体に適用または投与することによる、本明細書に規定した本発明の人工核酸または本明細書に規定した本発明の組成物もしくはワクチンの使用を提供する。該使用は、（診断）検査、研究、診断、ペプチドもしくはタンパク質の商業的生産および／または治療目的のために適用され得る。これとの関連において、典型的には、本明細書に規定した本発明の人工核酸または本明細書に規定した本発明の組成物もしくはワクチンの調製後、これは典型的には、無細胞発現系、細胞（例えば、発現宿主細胞もしくは体細胞）、組織または生物体に、好ましくは、裸の形態もしくは複合体の形態で、または本明細書に記載の（医薬）組成物もしくはワクチンとして、好ましくは、トランスフェクションによって、または本明細書に記載の任意の投与様式を使用することにより適用または投与される。該使用は、インビトロ、インビボまたはエキソビボで行われ得る。さらに、該使用は特定の疾患の処置の状況において、特に、例えばウイルス感染または関連障害の処置において行われ得る。

【0435】

特に好ましい一実施形態では、本発明により、本明細書に規定した使用のための、好ましくは医薬としての使用のための、処置もしくは予防、好ましくは例えばウイルス感染もしくは関連障害の処置もしくは予防における使用のための、またはワクチンとしての使用のための人工核酸、本発明の組成物または本発明のワクチンを提供する。

【0436】

該組成物またはワクチンは慣用的な針注射または無針ジェット式注射によって、例えば、腫瘍組織に隣接および／または近接して投与され得る。好ましい一実施形態では、本発明の組成物または本発明の医薬組成物はジェット式注射によって投与される。ジェット式注射は、本発明の組成物および任意選択で適当なさらなる賦形剤を含む液をオリフィスに通し、かくして哺乳動物の皮膚に浸透し得る高圧の超微細な液流を生じさせる無針注射方法をいう。原理的には、この液流が皮膚に穴を形成し、この穴から液流が標的組織、例えば腫瘍組織内に押し込まれる。したがって、ジェット式注射は、例えば本発明の組成物の腫瘍内適用に使用され得る。

【 0 4 3 7 】

他の実施形態では、本発明の組成物または本発明の医薬組成物は、経口、非経口、吸入スプレーによって、経表面、経直腸、経鼻、口腔内、経膈で、または埋込み型リザーバによって投与され得る。非経口という用語は、本明細書で用いる場合、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、リンパ節内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、肝内、病巣内、頭蓋内、経皮、皮内、肺内、腹腔内、心臓内、動脈内、房内、結膜下、テノン嚢下、球後、経表面および／または後強膜近傍投与、毛様筋内への投与および舌下への注射または輸注手法を包含している。

【 0 4 3 8 】

特に好ましいさらなる投与経路は皮内注射および筋肉内注射である。

10

【 0 4 3 9 】

にもかかわらず、本発明の医薬組成物に、該医薬組成物の投与およびその成分の取込みを助長するためのさらなる成分を含めてもよい。かかるさらなる成分は、適切な担体またはビヒクル、抗菌剤および／または抗ウイルス剤であり得る。

【 0 4 4 0 】

本発明の医薬組成物のさらなる成分は、免疫グロブリン、好ましくはIgG、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、ポリクローナル血清（１種類または複数種）などから選択され得る免疫療法剤であり得る。好ましくは、かかるさらなる免疫療法剤は、ペプチド／タンパク質として提供され得るか、または、核酸に、好ましくはDNAまたはRNA、より好ましくはmRNAにコードされ得る。

20

【 0 4 4 1 】

本発明の医薬組成物は典型的には、本発明の医薬組成物の成分、特に、本明細書に規定したRNA分子（１種類または複数種）を「安全で有効な量」で含むものである。本明細書で用いる場合、「安全で有効な量」は、例えば腫瘍またはがん疾患のプラスの改良を有意に誘導するのに十分な本明細書に規定したRNA分子（１種類または複数種）自体の量を意味する。しかしながら、同時に、「安全で有効な量」は、深刻な副作用が回避されるのに、および利点とリスクの理にかなった関係が可能であるのに十分に少ない量である。このような限界値の決定は典型的には、理にかなった医学的判断の範囲内である。

【 0 4 4 2 】

本発明の医薬組成物は、ヒトに対して、また獣医学目的のために、好ましくはヒトの医療目的のために、一般的には医薬組成物として使用され得る。

30

【 0 4 4 3 】

本発明によりさらに、本明細書に規定した核酸配列、複数の本明細書に規定した核酸配列を含む本発明の組成物、本明細書に規定した核酸配列を含む本発明の医薬組成物またはこれらを備えたキットのいくつかの用途および使用を提供する。

【 0 4 4 4 】

具体的な一態様によれば、本発明は、本明細書に規定した核酸配列または複数の本明細書に規定した核酸配列を含む本発明の組成物の医薬としての、特に遺伝子療法における、好ましくは本明細書に規定した疾患の処置のための最初の医学的使用に関するものである。

【 0 4 4 5 】

40

別の態様によれば、本発明は、本明細書に規定した核酸配列または複数の本明細書に規定した核酸配列を含む本発明の組成物の本明細書に規定した疾患の処置のための２回目の医学的使用に関するもの、好ましくは、本明細書に規定した核酸配列、複数の本明細書に規定した核酸配列を含む本発明の組成物、該核酸配列を含む医薬組成物またはこれらを備えたキットの本明細書に規定した疾患の予防、処置および／または寛解のための医薬の調製のための使用に関するものである。好ましくは、医薬組成物は、それを必要とする患者にこの目的のために使用されるか、または投与される。

【 0 4 4 6 】

好ましくは、本明細書に記載の疾患は好ましくは、感染性疾患、新生物（例えば、がんまたは腫瘍疾患）、血液および血液形成器官の疾患、内分泌疾患、栄養上の疾患および代

50

謝病、神経系の疾患、循環系の疾患、呼吸器系の疾患、消化器系の疾患、皮膚および皮下組織の疾患、筋骨格系および結合組織の疾患、ならびに泌尿生殖器系の疾患から選択される。

【0447】

これとの関連において、特に好ましいのは：1 p 3 6 欠失症候群；1 8 p 欠失症候群；2 1 - 水酸化酵素欠損症；4 5 , X (ターナー症候群)；4 7 , X X , + 2 1 (ダウン症候群)；4 7 , X X X (トリプルX症候群)；4 7 , X X Y (クラインフェルター症候群)；4 7 , X Y , + 2 1 (ダウン症候群)；4 7 , X Y Y 症候群；5 - A L A 脱水素酵素欠損性ポルフィリン症 (A L A 脱水素酵素欠損症)；5 - アミノレブリン酸脱水素酵素欠損ポルフィリン症 (A L A 脱水素酵素欠損症)；5 p 欠失症候群 (ネコなき) 5 p - 症候群 (ネコなき)；A - T (毛細血管拡張性運動失調症)；A A T (- 1 アンチトリプシン欠乏症)；先天性両側精管欠損症 (A b s e n c e o f v a s d e f e r e n s (c o n g e n i t a l b i l a t e r a l a b s e n c e o f v a s d e f e r e n s))；無精管 (A b s e n t v a s a) (先天性両側精管欠損症)；無セルロプラスミン血症；A C G 2 (軟骨無形成症 I I 型)；A C H (軟骨形成不全症)；軟骨無形成 I I 型；軟骨形成不全症；酸性 - グルコシダーゼ欠損症 (ゴーシェ病 1 型)；尖頭合指症 (アペール) (アペール症候群)；尖頭合指症，V 型 (ファイファー症候群)；尖頭症 (アペール症候群)；急性脳性ゴーシェ病 (ゴーシェ病 2 型)；急性間欠性ポルフィリン症；A C Y 2 欠損症 (カナパン病)；A D (アルツハイマー病)；アデレード型頭蓋骨縫合早期癒合症 (M u e n k e 症候群)；腺腫様多発結腸ポリープ (家族性大腸腺腫症)；結腸の大腸腺腫症 (家族性大腸腺腫症)；A D P (A L A 脱水素酵素欠損症)；アデニココハク酸リアーゼ欠損症；副腎障害 (2 1 - 水酸化酵素欠損症)；副腎性器症候群 (2 1 - 水酸化酵素欠損症)；副腎脳白質ジストロフィー；A I P (急性間欠性ポルフィリン症)；A I S (アンドロゲン不応症)；A K U (アルカプトン尿症)；A L A 脱水素酵素ポルフィリン症 (A L A 脱水素酵素欠損症)；A L A - D ポルフィリン症 (A L A 脱水素酵素欠損症)；A L A 脱水素酵素欠損症；アルカプトン尿症 (A l c a p t o n u r i a) (アルカプトン尿症 (a l k a p t o n u r i a))；アレキサンダー病；アルカプトン尿症；アルカプトン尿症性組織黒変症 (アルカプトン尿症)； - 1 アンチトリプシン欠乏症； - 1 プロテイナーゼ阻害薬 (- 1 アンチトリプシン欠乏症)； - 1 関連気腫 (- 1 アンチトリプシン欠乏症)； - ガラクトシダーゼ A 欠損症 (ファブリー病)；A L S (筋萎縮性側索硬化症)；アルストレム症候群；A L X (アレキサンダー病)；アルツハイマー病；エナメル質形成不全症；アミノレブリン酸脱水素酵素欠損症 (A L A 脱水素酵素欠損症)；アミノアシラーゼ 2 欠損症 (カナパン病)；筋萎縮性側索硬化症；アンダーソン - ファブリー病 (ファブリー病)；アンドロゲン不応症；貧血；貧血，遺伝性鉄芽球性 (X 連鎖性鉄芽球性貧血)；貧血，伴性低色素性鉄芽球性 (X 連鎖性鉄芽球性貧血)；貧血，脾性，家族性 (ゴーシェ病)；アンジェルマン症候群；びまん性体部被角血管腫 (ファブリー病)；角化血管腫，びまん性 (ファブリー病)；網膜血管腫 (フォン・ヒッペル・リンドウ病)；A N H 1 (X 連鎖性鉄芽球性貧血)；A P C レジスタンス、ライデン型 (第 V 因子ライデン血栓性素因)；アペール症候群；A R 欠損症 (アンドロゲン不応症)；A R - C M T 2 e e (シャルコー・マリー・トゥース病，2 型)；クモ指症 (マルファン症候群)；A R N S H L (非症候性難聴，常染色体劣性)；関節眼症，遺伝性進行性 (スティックラー症候群 C O L 2 A 1)；先天性多発関節弛緩症 (エーラス・ダンロス症候群，関節弛緩型)；A S (アンジェルマン症候群)；A s p 欠損症 (カナパン病)；A s p a 欠損症 (カナパン病)；アスパルトアシラーゼ欠損症 (カナパン病)；毛細血管拡張性運動失調症；自閉症 - 認知症 - 運動失調 - 手の合目的使用の喪失 (A u t i s m - D e m e n t i a - A t a x i a - L o s s o f P u r p o s e f u l H a n d U s e) 症候群 (レット症候群)；常染色体優性若年性 A L S (筋萎縮性側索硬化症，4 型)；常染色体優性オピッツ G / B B B 症候群 (2 2 q 1 1 . 2 欠失症候群)；常染色体劣性形態の若年性 A L S 3 型 (筋萎縮性側索硬化症 (2 型))；常染色体劣性非症候性聴力損失 (非症候性難聴，常染色体劣性)；常染色体劣性感音聴覚障害および甲状腺腫 (

10

20

30

40

50

ペンドレッド症候群) ; A x D (アレキサンダー病) ; A y e r z a 症候群 (原発性肺高
 血圧症) ; ヘキソサミニダーゼ G M 2 ガングリオシドーシスの B 異型 (サンドホッフ病)
 ; B A N F (神経線維腫症 2) ; B e a r e - S t e v e n s o n c u t i s g y r a
 t a 症候群 ; 良性発作性頭位眩暈症 (地中海熱, 家族性) ; ペンジャミン症候群 ; サラ
 セミア ; B H 4 欠損症 (テトラヒドロピオプテリン欠損症) ; 両側性の聴神経梢腫神経線
 維腫症 (神経線維腫症 2) ; ピオチニダーゼ欠損症 ; 膀胱がん ; 出血性障害 (第 V 因子ラ
 イデン血栓性素因) ; プロッホ・サルツバーガー症候群 (色素失調症) ; ブルーム症候群
 ; 骨疾患 ; 骨髄疾患 (X 連鎖性鉄芽球性貧血) ; ボンネビー・ウルリッヒ症候群 (ターナ
 ー症候群) ; ボンネビル病 (結節硬化症) ; ボンネビル母斑症 (結節硬化症) ; 脳の疾患
 (プリオン病) ; 乳がん ; パート・ホッグ・デュベ症候群 ; 骨粗鬆症 (B r i t t l e
 b o n e d i s e a s e) (骨形成不全症) ; 幅広母指 (B r o a d T h u m b - H a
 l l u x) 症候群 (ルピンシュタイン・テイビ症候群) ; 青銅色糖尿病 (ヘモクロマトー
 シス) ; 青銅色肝硬変 (ヘモクロマトーシス) ; 球脊髄型筋萎縮症、X 連鎖性 (ケネディ
 病) ; ピュルガー・グリユッツ症候群 (リポタンパク質リパーゼ欠損症, 家族性) ; C A
 D A S I L ; C G D 慢性肉芽腫症 ; 屈曲肢異形成症 ; カナバン病 ; がん ; がん家系症候
 群 (遺伝性非ポリポーシス結腸直腸がん) ; 乳房のがん (乳がん) ; 膀胱のがん (膀胱が
 ん) ; カルボキシラーゼ欠損症、多発性、遅発型 (ピオチニダーゼ欠損症) ; 心筋症 (ヌ
 ーナン症候群) ; ネコ鳴き (C a t c r y) 症候群 (ネコなき (C r i d u c h a t
)) ; C A V D (先天性両側精管欠損症) ; C a y l o r c a r d i o f a c i a l 症
 候群 (2 2 q 1 1 . 2 欠失症候群) ; C B A V D (先天性両側精管欠損症) ; セリアック
 病 ; C E P (先天性骨髄性ポルフィリン症) ; セラミダーゼトリエキソシダーゼ欠損症 (フ
 アブリー病) ; 小脳網膜 (C e r e b e l l o r e t i n a l) 血管腫症, 家族性 (フ
 オン・ヒッペル・リンドウ病) ; 皮質下梗塞および白質脳症を伴う脳動脈症 (C A D A
 S I L) ; 皮質下梗塞および白質脳症を伴う脳の常染色体優性動脈症 (C A D A S I L)
 ; 脳の硬化症 (結節硬化症) ; 脳萎縮症性高アンモニア血症 (レット症候群) ; セレブロ
 シドリポイド症候群 (ゴーシェ病) ; C F (嚢胞性線維症) ; C H (先天性甲状腺機能低
 下症) ; シャルコー病 (筋萎縮性側索硬化症) ; シャルコー・マリー・トゥース病 ; 軟骨
 發育不全症 (軟骨形成不全症) ; 軟骨形成異常症候群 (軟骨形成不全症) ; 感音難聴を伴
 う軟骨形成異常症 (耳脊椎巨大骨端異形成症) ; 軟骨形成不全 (軟骨無形成症, I I 型)
 ; コレオアテトシス自傷 - 高尿酸血 (C h o r e o a t h e t o s i s s e l f - m
 u t i l a t i o n h y p e r u r i c e m i a) 症候群 (レッシュ・ナイハン症候群)
 ; 古典的ガラクトース血症 (ガラクトース血症) ; 古典的エーラス・ダンロス症候群 (エ
 ーラス・ダンロス症候群 古典的型) ; 古典的フェニルケトン尿症 (フェニルケトン尿
 症) ; 軟口蓋裂 (C l e f t l i p a n d p a l a t e) (スティックラー症候群)
 ; 致死性骨異形成症を伴うクローバ形頭蓋 (致死性骨異形成症 2 型) ; C L S (コフィン
 ・ローリー症候群) ; C M T (シャルコー・マリー・トゥース病) ; コケイン症候群 ; コ
 フィン・ローリー症候群 ; コラーゲン異常症, I I 型および X I 型 ; 結腸がん, 家族性非
 ポリポーシス (遺伝性非ポリポーシス結腸直腸がん) ; 結腸がん, 家族性 (家族性大腸腺
 腫症) ; 結腸直腸がん ; H P R T 完全欠損症 (レッシュ・ナイハン症候群) ; ヒボキサン
 チン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ完全欠損症 (レッシュ・ナイハン症候
 群) ; 圧迫性神経障害 (圧迫性麻痺になりやすい遺伝性神経障害) ; 先天性副腎皮質過形
 成 (2 1 - 水酸化酵素欠損症) ; 先天性両側精管欠損症 (輸精管の先天的欠損) ; 先天性
 骨髄性ポルフィリン症 ; 先天性心臓疾患 ; 先天性髄鞘形成不全 (シャルコー・マリー・ト
 ウース病 1 型 / シャルコー・マリー・トゥース病 4 型) ; 先天性甲状腺機能低下症 ; 先天
 性メトヘモグロビン血症 (m e t h e m o g l o b i n e m i a) (メトヘモグロビン血
 症, (C o n g e n i t a l m e t h a e m o g l o b i n a e m i a)) ; 先天性骨
 硬化症 (軟骨形成不全症) ; 先天性鉄芽球性貧血 (X 連鎖性鉄芽球性貧血) ; 結合組織病
 ; 円錐動脈幹異常顔貌症候群 (2 2 q 1 1 . 2 欠失症候群) ; クーリー貧血 (サラセミ
 ア) ; 銅蓄積症 (ウィルソン病) ; 銅輸送異常症 (メンケス病) ; コプロポルフィリン症
 , 遺伝性 (遺伝性コプロポルフィリン症) ; コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ欠損

10

20

30

40

50

症（遺伝性コプロポルフィリン症）；カウデン症候群；CPO欠損症（遺伝性コプロポルフィリン症）；CPRO欠損症（遺伝性コプロポルフィリン症）；CPX欠損症（遺伝性コプロポルフィリン症）；頭蓋顔面関節異常（クルゾン症候群）；頭蓋顔面異骨症（クルゾン症候群）；クレチン症（先天性甲状腺機能低下症）；クロイツフェルト・ヤコブ病（プリオン病）；ネコなき（クローン病，線維性狭窄性）；クルゾン症候群；黒色表皮症を伴うクルゾン症候群（クルゾン外骨格（Crouzonodermoskeletal）症候群）；クルゾン外骨格症候群；CS（コケイン症候群）（カウデン症候群）；クルシュマン・バッテン・スタイナー症候群（筋強直性ジストロフィー）；Beare - Stevensonのcutis gyrate症候群（Beare - Stevenson cutis gyrate症候群）；染色体変異障害（Disorder Mutation Chromosome）；D - グリセリン酸デヒドロゲナーゼ欠損症（高シュウ酸尿症，原発性）；まだらの骨幹端症候群（脊椎骨端骨幹端異形成症，Strudwick型）；DAT - アルツハイマー型認知症（アルツハイマー病）；遺伝性高カルシウム尿症（デント病）；DBMD（筋ジストロフィー，デュシェンヌ型およびベッカー型）；甲状腺腫を伴う難聴（ペンドレッド症候群）；難聴 - 網膜炎色素変性症候群（アッシャー症候群）；欠損系疾患、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（フェニルケトン尿症）；変性性神経疾患；ド・グルーシー症候群1（ド・グルーシー症候群）；デジュリーヌ・ソッタス症候群（シャルコー・マリー・トゥース病）； - アミノレブリン酸脱水素酵素欠損ポルフィリン症（ALA脱水素酵素欠損症）；認知症（CADASIL）；ミエリン形成不全性（demyelinating）白質ジストロフィー（アレキサンダー病）；エーラス・ダンロス症候群皮膚脆弱型（エーラス・ダンロス症候群皮膚脆弱型）；皮膚脆弱型（エーラス・ダンロス症候群皮膚脆弱型型）；发育障害；dHMN（筋萎縮性側索硬化（4型））；dHMN - V（遠位型脊髄筋萎縮症，V型）；DHT R欠損症（アンドロゲン不応症）；びまん性グロバイド体（Globoid Body）硬化症（クラッペ病）；ディ・ジョージ症候群；ジヒドロテストステロン受容体欠損症（アンドロゲン不応症）；遠位型脊髄筋萎縮症，V型；DM1（筋強直性ジストロフィー1型）；DM2（筋強直性ジストロフィー2型）；ダウン症候群；DSMAV（遠位型脊髄筋萎縮症，V型）；DSN（シャルコー・マリー・トゥース病4型）；DSS（シャルコー・マリー・トゥース病，4型）；デュシェンヌ型ノベッカー型筋ジストロフィー（筋ジストロフィー，デュシェンヌ型およびベッカー型）；小人，軟骨無形成症性（軟骨形成不全症）；小人，致死性骨（致死性骨異形成症）；小人症；小人症 - 網膜萎縮症 - 難聴症候群（コケイン症候群）；ミエリン形成不全性白質ジストロフィー（アレキサンダー病）；筋緊張性異栄養症（筋強直性ジストロフィー）；網膜色素変性症異栄養症 - 異骨症候群（アッシャー症候群）；若年性家族性アルツハイマー病（E OFAD）（アルツハイマー病）；EDS（エーラス・ダンロス症候群）；エーラス・ダンロス症候群；エクマン - ロブスタイン病（骨形成不全症）；絞扼性末梢神経障害（圧迫性麻痺になりやすい遺伝性神経障害）；エピロイア（結節硬化症）；EPP（骨髄性プロトポルフィリン症）；赤芽球性貧血（サラセミア）；エリスロヘパティック（Erythrohepatic）プロトポルフィリン症（骨髄性プロトポルフィリン症）；赤血球5 - アミノレブリン酸合成酵素欠損症（X連鎖性鉄芽球性貧血）；骨髄性ポルフィリン症（先天性骨髄性ポルフィリン症）；骨髄性プロトポルフィリン症；骨髄性ウロポルフィリン症（先天性骨髄性ポルフィリン症）；目のがん（網膜芽腫FA - フリードライヒ失調症）；ファブリー病；顔面の損傷および障害；第V因子ライデン血栓性素因；FALS（筋萎縮性側索硬化症）；家族性聴神経腫（神経線維腫症II型）；家族性大腸腺腫症；家族性アルツハイマー病（FAD）（アルツハイマー病）；家族性筋萎縮性側索硬化症（筋萎縮性側索硬化症）；家族性自律神経障害；家族性脂肪誘導性高トリグリセリド血症（リポタンパク質リパーゼ欠損症，家族性）；家族性ヘモクロマトーシス（ヘモクロマトーシス）；家族性LPL欠損症（リポタンパク質リパーゼ欠損症，家族性）；家族性非ポリポーシス結腸がん（遺伝性非ポリポーシス結腸直腸がん）；家族性発作性多発性漿膜炎（地中海熱，家族性）；家族性PCT（晩発性皮膚ポルフィリン症）；家族性圧脆弱性神経障害（圧迫性麻痺になりやすい遺伝

性神経障害)；家族性原発性肺高血圧症(FPPH)(原発性肺高血圧症)；家族性ターナー症候群(ヌーナン症候群)；家族性血管性白質脳症(CADASIL)；FAP(家族性大腸腺腫症)；FD(家族性自律神経障害)；女性の仮性ターナー症候群(ヌーナン症候群)；鉄付加酵素欠損症(骨髄性プロトポルフィリン症)；フェロポルチン病(ヘモクロマトーシス4型)；発熱(地中海熱，家族性)；FG症候群；FGFR3関連頭蓋骨癒合症(Muenke症候群)；星状細胞のフィブリノイド変性(アレキサンダー病)；脾臓線維嚢胞性の疾患(嚢胞性線維症)；FMF(地中海熱，家族性)；Folling病(フェニルケトン尿症)；fra(X)症候群(脆弱X症候群)；脆弱X症候群；骨脆弱症(骨形成不全症)；FRAXA症候群(脆弱X症候群)；FRDA(フリードライヒ失調症)；フリードライヒ失調症(フリードライヒ失調症)；フリードライヒ失調症；FXS(脆弱X症候群)；G6PD欠損症；ガラクトキナーゼ欠損疾患(ガラクトース血症)；ガラクトース-1-リン酸ウリジル-トランスフェラーゼ欠損疾患(ガラクトース血症)；ガラクトース血症；ガラクトシルセラミダーゼ欠損疾患(クラッペ病)；ガラクトシルセラミドリピドーシス(クラッペ病)；ガラクトシルセレブロシダーゼ欠損症(クラッペ病)；ガラクトシルスフィンゴシンリピドーシス(クラッペ病)；GALC欠損症(クラッペ病)；GALT欠損症(ガラクトース血症)；ゴーシェ病；ゴーシェ様疾患(仮性ゴーシェ病)；GBA欠損症(ゴーシェ病1型)；GD(ゴーシェ病)；遺伝性脳障害；遺伝性気腫(-1アンチトリプシン欠乏症)；遺伝性ヘモクロマトーシス(ヘモクロマトーシス)；巨細胞性肝炎，新生児(新生児ヘモクロマトーシス)；GLA欠損症(ファブリー病)；膠芽細胞腫，網膜(網膜芽腫)；神経膠腫，網膜(網膜芽腫)；グロボイド細胞白質ジストロフィー(GCL、GLD)(クラッペ病)；グロボイド細胞白質脳症(クラッペ病)；グルコセレブロシダーゼ欠損症(ゴーシェ病)；グルコセレブロシドーシス(ゴーシェ病)；グルコシルセレブロシドリピドーシス(ゴーシェ病)；グルコシルセラミダーゼ欠損症(ゴーシェ病)；グルコシルセラミド-グルコシダーゼ欠損症(ゴーシェ病)；グルコシルセラミドリピドーシス(ゴーシェ病)；グリセリン酸性尿症(高シュウ酸尿症，原発性)；グリシン脳症(非ケトーシス型高グリシン血症)；グリコール酸尿症(高シュウ酸尿症，原発性)；GM2ガングリオシドーシス，1型(テイ・サックス病)；甲状腺腫-難聴症候群(ペンドレッド症候群)；グレーフェ-アッシャー症候群(アッシャー症候群)；Gronblad-Strandberg症候群(弾性線維性仮性黄色腫)；ガンサー型ポルフィリン症(先天性骨髄性ポルフィリン症)；ガンサー病(先天性骨髄性ポルフィリン症)；ヘモクロマトーシス(ヘモクロマトーシス)；ハルグレン症候群(アッシャー症候群)；道化師様魚鱗癬；HbS疾患(鎌状赤血球貧血)；HCH(軟骨低形成症)；HCP(遺伝性コプロポルフィリン症)；頭部および脳の奇形；聴覚障害および難聴；小児の聴力問題；HEF2A(ヘモクロマトーシス2型)；HEF2B(ヘモクロマトーシス2型)；ヘマトポルフィリン症(ポルフィリン症)；ヘム合成酵素欠損症(骨髄性プロトポルフィリン症)；ヘモクロマトーシス(ヘモクロマトーシス)；ヘモクロマトーシス；ヘモグロビンM疾患(メトヘモグロビン血症-グロビン型)；ヘモグロビンS疾患(鎌状赤血球貧血)；血友病；HEP(肝造血性ポルフィリン症)；肝AGT欠損症(高シュウ酸尿症，原発性)；肝造血性ポルフィリン症；肝レンズ核変性症候群(ウィルソン病)；遺伝性関節眼症(スティックラー症候群)；遺伝性コプロポルフィリン症；遺伝性ジストピア性(dystopic)リピドーシス(ファブリー病)；遺伝性ヘモクロマトーシス(HHC)(ヘモクロマトーシス)；遺伝性封入体ミオパチー(骨格筋再生)；遺伝性鉄負荷性(-loading)貧血(X連鎖性鉄芽球性貧血)；遺伝性運動感覚神経障害(シャルコー・マリー・トゥース病)；遺伝性運動神経障害(neuronopathy)(脊髄筋萎縮症)；遺伝性運動神経障害、V型(遠位型脊髄筋萎縮症，V型)；遺伝性多発性外骨腫(Multiple Exostoses)；遺伝性非ポリポーシス結腸直腸がん；遺伝性間欠熱症候群(地中海熱，家族性)；遺伝性結腸ポリポーシス(家族性大腸腺腫症)；遺伝性肺気腫(-1アンチトリプシン欠乏症)；活性化プロテインCに対する遺伝性耐性(第V因子ライデン血栓性素因)；遺伝性感覚性自律神経性神経障害III型(家族性自律神経障害)；遺伝性痙攣性対麻痺(乳児発症性

10

20

30

40

50

上行性 (i n f a n t i l e - o n s e t a s c e n d i n g) 遺伝性痙攣性麻痺) ;
 遺伝性脊髄性運動失調症 (フリードライヒ失調症) ; 遺伝性脊髄性硬化症 (フリードライ
 ヒ失調症) ; H e r r i c k 貧血 (鎌状赤血球貧血) ; ヘテロ接合性 O S M E D (ワイゼ
 ンバッハー・ツヴェイミューラー症候群) ; ヘテロ接合性耳脊椎巨大骨端異形成症 (ワイ
 ゼンバッハー・ツヴェイミューラー症候群) ; H e x A 欠損症 (テイ・サックス病) ; ヘ
 キソサミニダーゼ A 欠損症 (テイ・サックス病) ; ヘキソサミニダーゼ - サブユニット
 欠損症 (バリアント B) (テイ・サックス病) ; H F E 関連ヘモクロマトーシス (ヘモ
 クロマトーシス) ; H G P S (早老症) ; ヒッペル・リンドウ病 (フォン・ヒッペル・リ
 ンドウ病) ; H L A H (ヘモクロマトーシス) ; H M N V (遠位型脊髄筋萎縮症 , V 型
) ; H M S N (シャルコー・マリー・トゥース病) ; H N P C C (遺伝性非ポリポーシス
 結腸直腸がん) ; H N P P (圧迫性麻痺になりやすい遺伝性神経障害) ; ホモシスチン尿
 症 ; ホモシスチン尿症オキシダーゼ欠損症 (アルカプトン尿症) ; ホモシスチン尿症尿症
 (アルカプトン尿症) ; ホモ接合性晩発性皮膚ポルフィリン症 (肝造血性ポルフィリン症
) ; H P 1 (高シュウ酸尿症 , 原発性) ; H P 2 (高シュウ酸尿症 , 原発性) ; H P A (高
 フェニルアラニン血症) ; H P R T - ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトラン
 スフェラーゼ欠損症 (レッシュ・ナイハン症候群) ; H S A N I I I 型 (家族性自律神経
 障害) ; H S A N 3 (家族性自律神経障害) ; H S N - I I I (家族性自律神経障害) ;
 ヒト皮膚脆弱型 (エーラス・ダンロス症候群皮膚脆弱型) ; ハンチントン病 ; ハッチン
 ソン・ギルフォード・プロジェリア症候群 (早老症) ; アンドロゲン過多症 , 非古典型、
 2 1 - 水酸化酵素欠損症 (2 1 - 水酸化酵素欠損症) によるもの ; 高乳糜血症 , 家族性 (20
 リポタンパク質リパーゼ欠損症 , 家族性) ; ケトアシドーシスおよび白血球減少を伴う高
 グリシン血症 (プロピオン酸血症) ; 高脂血症 I 型 (リポタンパク質リパーゼ欠損症 , 家
 族性) ; 高シュウ酸尿症 , 原発性 ; 高フェニルアラニン血症 (高フェニルアラニン血症)
 ; 高フェニルアラニン血症 ; 軟骨低異形成症 (軟骨低形成症) ; 軟骨低発生症 ; 軟骨低形
 成症 ; 低色素性貧血 (X 連鎖性鉄芽球性貧血) ; 低銅血症 , 先天性 ; メンケス症候群) ;
 ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (t r a n s f e r s e) (H P R T
) 欠損症 (レッシュ・ナイハン症候群) ; I A H S P (乳児発症性上行性遺伝性痙攣性麻
 痺) ; 特発性ヘモクロマトーシス (ヘモクロマトーシス , 3 型) ; 特発性新生児ヘモクロ
 マトーシス (ヘモクロマトーシス , 新生児) ; 特発性肺高血圧症 (原発性肺高血圧症) ;
 免疫系障害 (X 連鎖性重症複合型免疫不全) ; 色素失調症 ; 乳児期脳性ゴーシェ病 (ゴー
 シェ病 2 型) ; 乳児期ゴーシェ病 (ゴーシェ病 2 型) ; 乳児発症性上行性遺伝性痙攣性麻
 痺 ; 不妊症 ; 遺伝性気腫 (- 1 アンチトリプシン欠乏症) ; 遺伝性ヒト感染性海綿状脳
 症 (プリオン病) ; 圧迫性麻痺に対する遺伝性傾向 (圧迫性麻痺になりやすい遺伝性神経
 障害) ; I n s l e y - A s t l e y 症候群 (耳脊椎巨大骨端異形成症) ; 間欠性急性ポ
 ルフィリン症候群 (急性間欠性ポルフィリン症) ; 腸ポリープ症 - 皮膚色素沈着症候群
 (ポイツ・ジェガース症候群) ; I P (色素失調症) ; 鉄貯蔵障害 (ヘモクロマトーシス
) ; 二動原体同腕 1 5 (i d i c 1 5) ; 孤立性 (I s o l a t e d) 難聴 (非症候性難
 聴) ; ジャクソン・ワイス症候群 ; J H (ヘモクロマトーシス 2 型) ; ジュベール症候群
 ; J P L S (若年性原発性側索硬化症) ; 若年性筋萎縮性側索硬化症 (筋萎縮性側索硬化
 症 (2 型) ; 若年性痛風・舞蹈病アテトーゼ・精神遅滞症候群 (レッシュ・ナイハン症候
 群) ; 若年性高尿酸血症症候群 (レッシュ・ナイハン症候群) ; J W S (ジャクソン・ワ
 イス症候群) ; K D (X 連鎖性球脊髄性筋萎縮) ; ケネディ疾患 (X 連鎖性球脊髄性筋萎
 縮) ; ケネディ球脊髄性筋萎縮症 (X 連鎖性球脊髄性筋萎縮) ; ケラシン (K e r a s i n)
 組織球増殖症 (ゴーシェ病) ; ケラシンリポイドーシス (ゴーシェ病) ; ケラシン蓄
 積症 (ゴーシェ病) ; ケトーシス型グリシン血症 (プロピオン酸血症) ; ケトーシス型高
 グリシン血症 (プロピオン酸血症) ; 腎臓疾患 (高シュウ酸尿症 , 原発性) ; クラインフ
 ェルター症候群 ; クラインフェルター症候群 ; クニースト異形成症 ; クラッペ病 ; ラクナ
 型認知症 (C A D A S I L) ; ランガー・サルディーノ軟骨無形成症 (軟骨無形成症 , I I
 型) ; ランガー・サルディーノ異形成症 (軟骨無形成症 , I I 型) ; 遅発型アルツハイ
 マー病 (アルツハイマー病 2 型) ; 遅発型家族性アルツハイマー病 (A D 2) (アルツハ

10

20

30

40

50

イマー病2型)；遅発型クラッペ病(L O K D)(クラッペ病)；学習障害(学習能力障害)；黒子症，口囲(ポイツ・ジェガース症候群)；レッシュ・ナイハン症候群；白質ジストロフィ；ローゼンタール線維を伴う白質ジストロフィー(アレキサンダー病)；白質ジストロフィ，海綿状(カナパン病)；L F S(リ・フラウメニ症候群)；リ・フラウメニ症候群；リパーゼD欠損症(リポタンパク質リパーゼ欠損症，家族性)；L I P D欠損症(リポタンパク質リパーゼ欠損症，家族性)；リピドーシス，セレブロシド(ゴーシェ病)；リピドーシス，ガングリオシド，乳児期(テイ・サックス病)；リポイド組織球増殖症(ケラシン型)(ゴーシェ病)；リポタンパク質リパーゼ欠損症，家族性；肝臓疾患(ガラクトース血症)；ルー・ゲーリッグ病(筋萎縮性側索硬化症)；ルイ・パー症候群(毛細血管拡張性運動失調症)；リンチ症候群(遺伝性非ポリポーシス結腸直腸がん)；リシル・ヒドロキシラーゼ欠損症(エーラス・ダンロス症候群，脊椎後弯側弯症型)；マシャド・ジョセフ病(脊髄小脳失調3型)；男性の乳がん(乳がん)；男性の性機能障害；男性のターナー症候群(ヌーナン症候群)；乳房の悪性新生物(乳がん)；乳房の悪性腫瘍(乳がん)；膀胱の悪性腫瘍(膀胱がん)；乳(m a m m a r y)癌がん(乳(b r e a s t)がん)；マルファン症候群15；マーカーX症候群(脆弱X症候群)；マーティン・ベル症候群(脆弱X症候群)；マッキューン・オルブライト症候群；M c L e o d症候群；M E D N I K；地中海貧血(サラセミア)；地中海熱，家族性；巨大骨端小人症(耳脊椎巨大骨端異形成症)；M e n k e a症候群(メンケス症候群)；メンケス症候群；骨軟骨異常を伴う精神遅滞(コフィン・ローリー症候群)；代謝障害；迦及性小人症，I I型(クニースト異形成症)；変容性骨異形成症I I型クニースト異形成症)；メトヘモグロビン血症，- グロビン型；メチルメチルマロン酸血症；M F S(マルファン症候群)；M H A M(カウデン症候群)；M K(メンケス症候群)；ミクロ症候群；小頭症；M M A(メチルメチルマロン酸血症)；M N K(メンケス症候群)；モノソミー1 p 3 6症候群(1 p 3 6欠失症候群)；モノソミーX(ターナー症候群)；運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症(筋萎縮性側索硬化症)；運動障害；モワット・ウィルソン症候群；ムコ多糖症(M P S I)；ムコビシドーシス(嚢胞性線維症)；M u e n k e症候群；多発脳梗塞性認知症(C A D A S I L)；複合カルボキシラーゼ欠損症、遅発型(ピオチニダーゼ欠損症)；多発性過誤腫症候群(カウデン症候群)；多発性神経線維腫症(神経線維腫症)；筋ジストロフィー；筋ジストロフィー，デュシェンヌ型およびベッカー型；筋緊張症委縮(M y o t o n i a a t r o p h i c a)(筋強直性ジストロフィー)；筋緊張症ジストロフィー(M y o t o n i a d y s t r o p h i c a)(筋強直性ジストロフィー)；筋強直性ジストロフィー；粘液水腫，先天性(先天性甲状腺機能低下症)；N a n c e - I n s l e y症候群(耳脊椎巨大骨端異形成症)；N a n c e - S w e e n e y軟骨異形成症(耳脊椎巨大骨端異形成症)；N B I A 1(パントテン酸キナーゼ関連神経変性)；ニール・ディングウォール症候群(コケイン症候群)；神経芽細胞腫，網膜(網膜芽腫)；脳の鉄蓄積を伴う神経変性1型(パントテン酸キナーゼ関連神経変性)；神経線維腫症I型；神経線維腫症II型；神経系の疾患；神経筋障害；神経障害，遠位型遺伝性運動、V型(遠位型脊髄筋萎縮症V型)；神経障害，遠位型遺伝性運動，錘体路に特色を有する(筋萎縮性側索硬化症(4型)；N F(神経線維腫症)；ニーマン・ピック(ニーマン・ピック病)；ノアク症候群(ファイファー症候群)；非ケトーシス型高グリシン血症(グリシン脳症)；非神経障害性(n e u r o n o p a t h i c)ゴーシェ病(ゴーシェ病1型)；非フェニルケトン尿症性高フェニルアラニン血症(テトラヒドロピオプテリン欠損症)；非症候性難聴；ヌーナン症候群；ノルボットニアンゴーシェ病(ゴーシェ病3型)；組織褐変症(アルカプトン尿症)；アルカプトン尿性関節炎(アルカプトン尿症)；O I(骨形成不全症)；O S M E D(耳脊椎巨大骨端異形成症)；骨形成不全症；骨脆症(O s t e o p s a t h y r o s i s)(骨形成不全症)；骨硬化症，先天性(軟骨形成不全症)；耳・脊椎・巨大骨端異形成症(耳脊椎巨大骨端異形成症)；耳脊椎巨大骨端異形成症；シュウ酸症(高シュウ酸尿症，原発性)；シュウ酸尿症，原発性(高シュウ酸尿症，原発性)；パントテン酸キナーゼ関連神経変性；パトウ症候群(トリソミー13)；P B G D欠損症(急性間欠性ポルフィリン症)；P C C

10

20

30

40

50

欠損症（プロピオン酸血症）；P C T（晩発性皮膚ポルフィリン症）；P D M（筋強直性ジストロフィー 2 型）；ペンドレッド症候群；周期性疾患（地中海熱，家族性）；周期性腹膜炎（地中海熱，家族性）；ペリオロフィシャル（P e r i o r i f i c i a l）黒子症候群（ポイツ・ジェガース症候群）；末梢神経障害（家族性自律神経障害）；末梢神経線維腫症（神経線維腫症 1）；腓骨筋委縮症（シャルコー・マリー・トゥース病）；ペルオキシソームアラニン：グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ欠損症（高シュウ酸尿症，原発性）；ポイツ・ジェガース症候群；ファイファー症候群；フェニルアラニンヒドロキシラーゼ欠損疾患（フェニルケトン尿症）；フェニルケトン尿症；褐色細胞腫（フォン・ヒッペル・リンドウ病）；胎児性軟骨異形成症を伴うピエール・ロバン症候群（ワイゼンバッハー・ツヴェイミューラー症候群）；色素沈着性肝硬変（ヘモクロマトーシス）；P J S（ポイツ・ジェガース症候群）；P K A N（パントテン酸キナーゼ関連神経変性）；P K U（フェニルケトン尿症）；鉛性（P l u m b o）ポルフィリン症（A L A 欠損ポルフィリン症）；P M A（シャルコー・マリー・トゥース病）；多発性線維性骨形成異常（マッキューン・オルブライト症候群）；結腸ポリポーシス（家族性大腸腺腫症）；ポリポーシス，過誤腫性，腸（ポイツ・ジェガース症候群）；ポリポーシス，腸，I I（ポイツ・ジェガース症候群）；ポリプ/スポット（p o l y p s - a n d - s p o t s）症候群（ポイツ・ジェガース症候群）；ポルホビリノゲン合成酵素欠損症（A L A 欠損ポルフィリン症）；ポルフィリン症；ポルフィリン障害（ポルフィリン症）；P P H（原発性肺高血圧症）；P P O X 欠損症（異型ポルフィリン症）；ブラダー・ラーブハルト・ウィリ症候群（ブラダー・ウィリ症候群）；ブラダー・ウィリ症候群；初老期および老人性認知症（アルツハイマー病）；原発性ヘモクロマトーシス（ヘモクロマトーシス）；原発性高尿酸血症症候群（レッシュ・ナイハン症候群）；原発性肺高血圧症；原発性老人性変性性認知症（アルツハイマー病）；プリオン疾患；プロコラーゲン型 E D S V I I、変異型（エーラス・ダンロス症候群，関節弛緩型）；早老症（ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群）；早老症様症候群（コケイン症候群）；早老症性小体症（p r o g e r o i d n a n i s m）（コケイン症候群）；進行性舞蹈病、慢性遺伝性（ハンチントン）（ハンチントン病）；進行性筋委縮症（脊髄筋萎縮症）；正常強膜を有する進行性変形性骨形成不全症（骨形成不全症 I I I 型）；P R O M M（筋強直性ジストロフィー 2 型）；プロピオン酸血症（p r o p i o n i c a c a d e m i a）；プロピオニル・C o A カルボキシラーゼ欠損症（プロピオン酸血症）；プロテイン C 欠損症；プロテイン S 欠損症；プロトポルフィリン症（骨髄性プロトポルフィリン症）；プロトポルフィリンノーゲンオキシダーゼ欠損症（異型ポルフィリン症）；近位型筋強直性ジストロフィー（筋強直性ジストロフィー 2 型）；近位型筋強直性ミオパチー（筋強直性ジストロフィー 2 型）；仮性ゴーシェ病；仮性ウルリッヒ・ターナー症候群（ヌーナン症候群）；弾性線維性仮性黄色腫；プシコシンリピドーシス（クラッベ病）；肺動脈性高血圧症（原発性肺高血圧症）；肺高血圧症（原発性肺高血圧症）；P W S（ブラダー・ウィリ症候群）；P X E - 弾性線維性仮性黄色腫（弾性線維性仮性黄色腫）；R b（網膜芽腫）；レックリングハウゼン病、神経（神経線維腫症 1）；再発性多発性漿膜炎（地中海熱，家族性）；網膜障害；網膜色素変性症 - 難聴症候群（アッシャー症候群）；網膜芽腫；レット症候群；R F A L S 3 型（筋萎縮性側索硬化症（2 型））；リッカー症候群（筋強直性ジストロフィー 2 型）；リレイ・デイ症候群（家族性自律神経障害）；ルーシー・レヴィー症候群（シャルコー・マリー・トゥース病）；R S T S（ルビンシュタイン・テイビ症候群）；R T S（レット症候群）（ルビンシュタイン・テイビ症候群）；R T T（レット症候群）；ルビンシュタイン・テイビ症候群；S a c k - B a r a b a s 症候群（エーラス・ダンロス症候群，血管型）；S A D D A N；リ・フラウメニの肉腫ファミリー症候群（リ・フラウメニ症候群）；肉腫、乳房、白血病および副腎（S B L A）症候群（リ・フラウメニ症候群）；S B L A 症候群（リ・フラウメニ症候群）；S B M A（X 連鎖性球脊髄性筋萎縮）；S C D（鎌状赤血球貧血）；シュワン細胞腫，聴覚，両側性（神経線維腫症 2）；S C I D X 1（X 連鎖性重症複合型免疫不全）；結節性硬化症（結節硬化症）；S D A T（アルツハイマー病）；S E D，先天性（脊椎骨端異形成症，先天性）；S E D S t r u d w

10

20

30

40

50

ick (脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型); SEDc (脊椎骨端異形成症, 先天性); SEMD, Strudwick型 (脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型); 老人性認知症 (アルツハイマー病2型); 発達の遅れおよび黒色表皮症を伴う重度軟骨形成不全症 (SADDAN); シュプリンツェン症候群 (22q11.2欠失症候群); 鎌状赤血球貧血; 骨格/皮膚/脳症候群 (SADDAN); 皮膚色素沈着障害; SMA (脊髄筋萎縮症); SMED, Strudwick型 (脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型); SMED, I型 (脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型); スミス・レムリ・オピッツ症候群; 南アフリカ遺伝性ポルフィリン症 (異型ポルフィリン症); 痙攣性麻痺、乳児発症性上行性 (乳児発症性上行性遺伝性痙攣性麻痺); 言語およびコミュニケーション障害; スフィンゴリピドーシス、テイ・サックス (テイ・サックス病); 球脊髄性筋萎縮症; 脊髄筋萎縮症; 脊髄筋萎縮症, 遠位型V型 (遠位型脊髄筋萎縮症V型); 脊髄筋萎縮症, 遠位型, 主に上肢 (遠位型脊髄筋萎縮症V型); 脊髄小脳失調; 脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型; 脊椎骨端異形成症, 先天性; 脊椎骨端異形成症 (コラーゲン異常症, I型およびXI型); 脊椎骨端骨幹端 (spondylometaphyseal) 異形成症, 先天性, Strudwick型 (脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型); 脊椎骨端骨幹 (spondylometaphyseal) 端異形成症 (SMD) (脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型); 脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型 (脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型); 中枢神経系の海綿状変性 (カナバン病); 脳の海綿状変性 (カナバン病); 幼年期の白質の海綿状変性 (カナバン病); 散発性原発性肺高血圧症 (原発性肺高血圧症); SSB症候群 (SADDAN); 針金様毛髪症候群 (メンクス症候群); スタイナート病 (筋強直性ジストロフィー); スタイナート筋強直性ジストロフィー症候群 (筋強直性ジストロフィー); ステックラー症候群; 卒中 (CADASIL); Strudwick症候群 (脊椎骨端骨幹端異形成症, Strudwick型); 亜急性神経障害性ゴーシェ病 (ゴーシェ病3型); スウェーデンの遺伝性ポルフィリン症 (急性間欠性ポルフィリン症); スウェーデンのポルフィリン症 (急性間欠性ポルフィリン症); スイスチーズ様軟骨異形成症 (クニースト異形成症); テイ・サックス 疾患; TD - 致死性骨異形成症 (致死性骨異形成症); まっすぐ大腿骨およびクローバー葉様頭蓋骨を伴うTD (致死性骨異形成症2型); 毛細血管拡張症, 小脳 - 眼皮 (毛細血管拡張性運動失調症); 睾丸性女性化症候群 (アンドロゲン不応症); テトラヒドロピオプテリン欠損症; TFM - 睾丸性女性化症候群 (アンドロゲン不応症); 中等症サラセミア (サラセミア); サラセミアメジャー (サラセミア); 致死性骨異形成症; 真性糖尿病および感音難聴を伴うチアミン応答性巨赤芽球性貧血; 活性化プロテインCの補因子の欠損による栓友病, ライデン型 (第V因子ライデン血栓性素因); 甲状腺疾患; ソーセージ様ニューロパチー (圧迫性麻痺になりやすい遺伝性神経障害); HPR完全欠損症 (レッシュ・ナイハン症候群); ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ完全欠損症 (レッシュ・ナイハン症候群); トウレット症候群; 伝染性認知症 (プリオン病); 伝染性海綿状脳症 (プリオン病); トリーチャー・コリンズ症候群; トリアス (Trias) 骨脆弱症 (骨形成不全症I型); トリプルX症候群; トリプロ (Tripl o) X症候群 (トリプルX症候群); トリソミー21 (ダウン症候群); トリソミーX (トリプルX症候群); Troissier - Hanot - Chauffard症候群 (ヘモクロマトーシス); TS (ターナー症候群); TSD (テイ・サックス病); TSE (プリオン病); 結節 (tuberose) 硬化症 (結節 (tuberous) 硬化症); 結節硬化症; ターナー症候群; X染色体を有する女性のターナー症候群 (ヌーナン症候群); ターナー表現型, 正常核型 (ヌーナン症候群); ターナー症候群 (ターナー症候群); ターナー様症候群 (ヌーナン症候群); 2型ゴーシェ病 (ゴーシェ病2型); 3型ゴーシェ病 (ゴーシェ病3型); UDP - ガラクトース - 4 - エピメラーゼ欠損疾患 (ガラクトース血症); UDP グルコース 4 - エピメラーゼ欠損疾患 (ガラクトース血症); UDP グルコースヘキソース - 1 - リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ欠損症 (ガラクトース血症); ウルリッヒ・ヌーナン症候群 (ヌーナン症候群); ウルリッヒ・ターナー症候群

10

20

30

40

50

(ターナー症候群) ; 未分化 (Undifferentiated) 難聴 (非症候性難聴) ; UPS 欠損症 (急性間欠性ポルフィリン症) ; 膀胱 (Urinary bladder) がん (膀胱 (bladder) がん) ; UROD 欠損症 (晩発性皮膚ポルフィリン症) ; ウロポルフィリノーゲンデカルボキシラーゼ欠損症 (晩発性皮膚ポルフィリン症) ; ウロポルフィリノーゲン合成酵素欠損症 (急性間欠性ポルフィリン症) ; UROS 欠損症 (先天性骨髄性ポルフィリン症) ; アッシャー症候群 ; UTPヘキソース - 1 - リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ欠損症 (ガラクトース血症) ; フォンボゲル・ベルトラン症候群 (カナバン病) ; バンデルヘーベ症候群 (骨形成不全症 I 型) ; 異型ポルフィリン症 ; Velocardiofacial 症候群 (22q11.2 欠失症候群) ; VHL 症候群 (フォン・ヒッペル・リンドウ病) ; 視力障害および盲目症 (アルストレム症候群) ; フォンボゲル・ベルトラン病 (カナバン病) ; フォン・ヒッペル・リンドウ病 ; Von Recklenhausen - Applebaum 病 (ヘモクロマトーシス) ; フォンレックリングハウゼン病 (神経線維腫症 1) ; VP (異型ポルフィリン症) ; Vrolik 病 (骨形成不全症) ; ワールデンブルグ症候群 ; Warburg Sjögren 症候群 (ミクロ症候群) ; WD (ウィルソン病) ; ワイゼンバッハー・ツヴェイミューラー症候群 ; ウィルソン病 ; ウィルソン病 (ウィルソン病) ; ウォルフ・ヒルシュホーン症候群 ; ウォルフ周期性疾患 (地中海熱, 家族性) ; WZS (ワイゼンバッハー・ツヴェイミューラー症候群) ; 色素性乾皮症 ; X連鎖性精神遅滞および巨精巣症 (脆弱 X 症候群) ; X連鎖性原発性高尿酸血症 (レッシュ・ナイハン症候群) ; X連鎖性重症複合型免疫不全 ; X連鎖性鉄芽球性貧血 ; X連鎖性球脊髄性筋萎縮 (ケネディ病) ; X連鎖性の尿の酸性尿症の酵素の欠損 (レッシュ・ナイハン症候群) ; X - SCID (X連鎖性重症複合型免疫不全) ; XLSA (X連鎖性鉄芽球性貧血) ; XSCID (X連鎖性重症複合型免疫不全) ; XXX 症候群 (トリプル X 症候群) ; XXXX 症候群 (48, XXXX) ; XXXXX 症候群 (49, XXXXX) ; XXY 症候群 (クラインフェルター症候群) ; XXY トリソミー (クラインフェルター症候群) ; XYY, 核型 (47, XYY 症候群) ; XYY 症候群 (47, XYY 症候群) ; ならびに YY 症候群 (47, XYY 症候群) から選択される遺伝性疾患である。

10

20

【0448】

さらに好ましい一態様では、本明細書に規定した核酸配列または複数の本明細書に規定した核酸配列を含む本発明の組成物は、医薬組成物の調製のため、特に本明細書に規定した目的のための、好ましくは本明細書に規定した疾患の処置での遺伝子療法における使用のための医薬組成物の調製のために使用され得る。

30

【0449】

本発明の医薬組成物はさらに、遺伝子療法において、特に、疾患または障害 (好ましくは本明細書に規定したもの) の処置における遺伝子療法において使用され得る。

【0450】

本発明によりさらに、本明細書に規定した本発明の RNA を含む組成物または医薬組成物またはワクチンまたはキットまたはパーツキットのいくつかの用途および使用を提供する。一実施形態では、該組成物または医薬組成物またはキットまたはパーツキットは、医薬として、すなわち腫瘍またはがん疾患の処置のために使用され得る。これとの関連において、処置は好ましくは腫瘍内適用によって、特に腫瘍組織内への注射によって行われる。別の態様によれば、本発明は、上記のような該 RNA を含む組成物または医薬組成物またはワクチンまたはキットまたはパーツキットの 2 回目 の医学的使用に関するものであり、この場合、この主題は、医薬の調製のため、特に腫瘍またはがん疾患の処置の処置のための腫瘍内適用 (投与) のための医薬の調製のために使用される。

40

【0451】

好ましくは、本明細書に記載の疾患は腫瘍またはがん疾患から選択され、腫瘍またはがん疾患としては好ましくは、例えば、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性 (myeloid) 白血病、副腎皮質癌、AIDS 関連がん、AIDS 関連リンパ腫、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、基底細胞癌、胆管がん、膀胱がん、骨のがん、骨肉腫 / 悪性線維性組

50

織球腫、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、小脳星状細胞腫、脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、上衣細胞腫、髄芽細胞腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、視覚伝導路および視床下部の神経膠腫、乳がん、気管支腺腫／カルチノイド、バーキットリンパ腫、小児カルチノイド腫瘍、消化管カルチノイド腫瘍、原発不明癌、原発性中枢神経系リンパ腫、小児小脳星状細胞腫、小児脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、子宮頸がん、小児がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性（myelogenous）白血病、慢性脊髄増殖性障害、結腸がん、皮膚T細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞性腫瘍、子宮内膜がん、上衣細胞腫、食道がん、ユーイング腫瘍ファミリーのユーイング肉腫、小児頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼内黒色腫、網膜芽腫、胆嚢がん、胃（Gastric（Stomach））がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、頭蓋外、性腺外または卵巣胚細胞腫瘍、妊娠性トロホプラスト腫瘍、脳幹の神経膠腫、小児脳星状細胞腫、小児視覚伝導路および視床下部の神経膠腫、胃カルチノイド、ヘアリー細胞白血病、頭頸部癌がん、心臓のがん、肝細胞（肝臓）がん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、小児視床下部および視覚伝導路の神経膠腫、眼内黒色腫、島細胞癌（エンドクリン、膵臓）、カボジ肉腫、腎臓がん（腎細胞がん）、喉頭がん、白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、ヘアリー細胞白血病、口唇および口腔がん、脂肪肉腫、肝臓がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、バーキットリンパ腫、皮膚T - Cellリンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、原発性の中枢神経系のリンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、骨の悪性線維性組織球腫／骨肉腫、小児髄芽細胞腫、黒色腫、眼内（目の）黒色腫、メルケル細胞癌、成人の悪性中皮腫、小児中皮腫、原発不明の口内がんを伴う首の転移性扁平上皮がん、小児多発性内分泌腺腫症候群、多発性骨髄腫／形質細胞腫、菌状息肉症、骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、慢性骨髄性白血病、成人の急性骨髄性白血病、小児急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫（骨髄のがん）、慢性骨髄増殖性障害、鼻腔および副鼻腔のがん、鼻咽腔癌、神経芽細胞腫、口腔がん、口腔咽頭がん、骨肉腫／骨の悪性線維性組織球腫、卵巣がん、卵巣上皮がん（表面の上皮 - 間質腫瘍）、卵巣の生殖細胞腫瘍、卵巣の低悪性度腫瘍、膵がん、島細胞膵がん、副鼻腔および鼻腔のがん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体星状細胞腫、松果体胚細胞腫、小児松果体芽細胞腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍、下垂体腺腫、形質細胞腫／多発性骨髄腫、胸膜肺芽細胞腫、原発性の中枢神経系のリンパ腫、前立腺がん、直腸がん、腎細胞癌（腎臓がん）、腎盂および尿管のがん、網膜芽腫、小児横紋筋肉腫、唾液腺がん、ユーイング腫瘍ファミリーの肉腫、カボジ肉腫、軟部組織肉腫、子宮肉腫、セザリー症候群、皮膚がん（非黒色腫）、皮膚がん（黒色腫）、メルケル細胞皮膚癌、小腸のがん、扁平上皮癌、原発不明の首の転移性扁平上皮、小児テント上原始神経外胚葉腫瘍、精巣がん、喉のがん、小児胸腺腫、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺がん、小児甲状腺がん、腎盂および尿管の移行細胞がん、妊娠性絨毛腫瘍、尿道がん、子宮内膜の子宮がん、子宮肉腫、膣がん、小児視覚伝導路および視床下部の神経膠腫、外陰がん、ワルデンストレームマクログロブリン血症、ならびに小児ウィルムス腫瘍（腎臓がん）が挙げられる。

【0452】

腫瘍内投与に適した腫瘍またはがんの特に好ましい例は前立腺がん、肺がん、乳がん、脳のがん、頭頸部がん、甲状腺がん、結腸がん、胃がん、肝臓がん、膵臓がん、卵巣がん、皮膚がん、膀胱、子宮および頸部である。

【0453】

具体的な一実施形態によれば、医薬は患者に、単回用量または数回の用量として投与され得る。一部の特定の実施形態では、医薬は患者に単回用量として投与した後、2回目の用量、後に任意選択でさらには3回目、4回目（またはそれ以上）の後続用量などで投与され得る。

【0454】

好ましくは、本発明の組成物は、少なくとも40 μgのRNA／用量の量で提供される。より詳しくは、単回用量に含まれるmRNAの量は典型的には、少なくとも200 μ

10

20

30

40

50

g、好ましくは200 μg ~ 1,000 μg、より好ましくは300 μg ~ 850 μg、さらにより好ましくは300 μg ~ 700 μgである。

【0455】

別の実施形態では、本発明の組成物のヌクレオチド酸分子、好ましくはmRNA分子は、少なくとも1種類の抗原の少なくとも1つのエピトープをコードしているものである。本発明の好ましい実施形態では、該少なくとも1種類の抗原は、感染性疾患と関連している病原体に由来する抗原、アレルギーと関連している抗原、自己免疫疾患と関連している抗原、およびがんまたは腫瘍疾患と関連している抗原、あるいは前記抗原の断片、バリエーションおよび/または誘導体からなる群より選択される。

【0456】

好ましくは、該少なくとも1種類の抗原は、病原体に由来するもの、好ましくはウイルス系、細菌系、真菌系または原生動物系の病原体、好ましくは：狂犬病ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、B型肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス(hPV)、炭疽菌、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、デングウイルス、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、黄熱病ウイルス、ヒト型結核菌、プラスモジウム、黄色ブドウ球菌、クラミジア・トラコマチス、サイトメガロウイルス(CMV)およびB型肝炎ウイルス(HBV)からなるリストから選択される病原体に由来するものである。

【0457】

これとの関連において、本発明の組成物のmRNAは、病原性抗原またはその断片、バリエーションもしくは誘導体の少なくとも1つのエピトープを含むタンパク質またはペプチドをコードしているものであり得る。かかる病原性抗原は、被験体、特に哺乳動物の被験体、より特別にはヒトによる免疫学的反応を誘発させる病原性生物体に由来するもの、特に細菌系、ウイルス系または原生動物系(multicellular)の病原性生物体に由来するものである。より詳しくは、病原性抗原は好ましくは、ウイルスまたは細菌または原生動物生物体の表面に存在する表面抗原、例えば、タンパク質(またはタンパク質断片、例えば表面抗原の外側部分)である。

【0458】

病原性抗原は、ペプチドまたはタンパク質抗原は、好ましくは感染性疾患と関連している病原体に由来するものであり、これは好ましくは、病原体 *Acinetobacter baumannii*、アナプラズマ属、*Anaplasma phagocytophilum*、*Ancylostoma braziliense*、*Ancylostoma duodenale*、*Arcanobacterium haemolyticum*、*Ascaris lumbricoides*、アスペルギルス属、アストロウイルス科、バベシア属、炭疽菌、*Bacillus cereus*、*Bartonella henselae*、BKウイルス、*Blastocystis hominis*、*Blastomyces dermatitidis*、*Bordetella pertussis*、*Borrelia burgdorferi*、ボレリア属、ボレリア属の種、ブルセラ属、*Brugia malayi*、ブニヤウイルス科、*Burkholderia cepacia* および他のバークホルデリア種、*Burkholderia mallei*、*Burkholderia pseudomallei*、カルシウイルス科、カンピロバクター属、*Candida albicans*、カンジダ属の種、クラミジア・トラコマチス、*Chlamydomydia pneumoniae*、*Chlamydomydia psittaci*、CJDプリオン、*Clonorchis sinensis*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium perfringens*、クロストリジウム属の種、*Clostridium tetani*、コクシジオイデス属の種、コロナウイルス、*Corynebacterium diphtheriae*、*Coxiella burnetii*、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、*Cryptococcus neoformans*、クリプトスポリジウム属、サイトメガロウイル

10

20

30

40

50

ス (CMV)、デングウイルス (DEN - 1、DEN - 2、DEN - 3 および DEN - 4)、*Dientamoeba fragilis*、エボラウイルス (EBOV)、エキノ
 コックス属、*Ehrlichia chaffeensis*、*Ehrlichia ewingii*、エールリヒア属、*Entamoeba histolytica*、エンテロコ
 ッカス属、エンテロウイルス属、エンテロウイルス、主にコクサッキー A 群ウイルスおよび
 エンテロウイルス 71 (EV71)、エピデルモフィトン属の種、エプスタイン・バー
 ルウイルス (EBV)、大腸菌 O157:H7、O111 および O104:H4、*Fasciola hepatica* および *Fasciola gigantica*、FFI プリ
 オン、フィラリア上科、フラビウイルス、*Francisella tularensis*、フゾバクテリウム属、*Geotrichum candidum*、*Giardia in*
ntestinalis、顎口虫属の種、GSS プリオン、グアナリトウイルス、*Haemophilus ducreyi*、*Haemophilus influenzae*、*He*
licobacter pylori、ヘニパウイルス (ヘンドラウイルス ニパウイルス)、A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、D
 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス 1 および 2 (HSV - 1 およ
 び HSV - 2)、*Histoplasma capsulatum*、HIV (ヒト免疫不
 全ウイルス)、*Hortaea werneckii*、ヒトボカウイルス (HBoV)、
 ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV - 6) および ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV - 7)、
 ヒトメタニューモウイルス (hMPV)、ヒトパピローマウイルス (HPV)、ヒトパラ
 インフルエンザウイルス (HPIV)、日本脳炎ウイルス、JC ウイルス、フニンウイル
 ス、*Kingella kingae*、*Klebsiella granulomatis*、*Kuru prion*、ラッサウイルス、*Legionella pneumophil*
a、リーシュマニア属、レプトスピラ属、*Listeria monocytogene*
s、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、マチュポウイルス、マラセジア属の種
 、マールブルグウイルス、麻疹ウイルス、*Metagonimus yokagawai*、*Microsporidia phylum*、伝染性軟属腫ウイルス (MCV)、ムン
 プスウイルス、*Mycobacterium leprae* および *Mycobacter*
ium lepromatosis、ヒト型結核菌、*Mycobacterium ulc*
erans、*Mycoplasma pneumoniae*、*Naegleria fow*
leri、*Necator americanus*、*Neisseria gonorrh*
oeae、*Neisseria meningitidis*、*Nocardia aste*
roides、ノカルジア属の種、*Onchocerca volvulus*、*Orie*
ntia tsutsugamushi、オルトミクソウイルス科 (インフルエンザ)、
Paracoccidioides brasiliensis、肺吸虫属の種、*Par*
agonimus westermani、パルボウイルス B19、パスツレラ属、プラ
 スモジウム属、*Pneumocystis jirovecii*、ポリオウイルス、狂犬
 病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、ライノウイルス属、ライノウイルス、*R*
ickettsia akari、リケッチア属、*Rickettsia prowaze*
kii、*Rickettsia rickettsii*、*Rickettsia typh*
i、リフトバレー熱ウイルス、ロタウイルス、風疹ウイルス、サビアウイルス、サルモネ
 ラ属、*Sarcoptes scabiei*、SARS コロナウイルス、住血吸虫属、シ
 ゲラ属、シンノンブルウイルス、ハンタウイルス、*Sporothrix schenc*
kii、ブドウ球菌属、ブドウ球菌属、*Streptococcus agalacti*
ae、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus*
pyogenes、*Strongyloides stercoralis*、テニア属、
Taenia solium、ダニ媒介脳炎ウイルス (TBEV)、*Toxocara c*
anis または *Toxocara cati*、*Toxoplasma gondii*、*Tr*
eponema pallidum、*Trichinella spiralis*、*Tri*
chomonas vaginalis、白癬菌属の種、*Trichuris trichi*
ura、*Trypanosoma brucei*、*Trypanosoma cruzi*、

10

20

30

40

50

Ureaplasma urealyticum、水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)、水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)、*Variola major*または*Variola minor*、vCJDプリオン、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、*Vibrio cholerae*、西ナイルウイルス、西部馬脳炎ウイルス、*Wuchereria bancrofti*、黄熱病ウイルス、*Yersinia enterocolitica*、*Yersinia pestis*および*Yersinia pseudotuberculosis*に由来する抗原から選択される。

【0459】

さらに、病原性抗原(感染性疾患と関連している病原体に由来する抗原)は好ましくは、以下の抗原: 外膜タンパク質A OmpA、バイオフィーム結合タンパク質Bap、輸送タンパク質MucK(*Acinetobacter baumannii*、アシネトバクター感染症); いろいろな表面糖タンパク質VSG、微小管結合タンパク質MAP15、トランス-シアリダーゼTSA(*Trypanosoma brucei*、アフリカ睡眠病(*African trypanosomiasis*)); HIV p24抗原、HIVエンベロープタンパク質(Gp120、Gp41、Gp160)、ポリプロテインGAG、ネガティブ因子タンパク質Nef、転写のトランス活性化因子Tat(HIV(ヒト免疫不全ウイルス)、AIDS(後天性免疫不全症候群)); ガラクトース阻害性接着タンパク質GIAp、29kDa抗原Eh29、Gal/GalNAcレクチン、タンパク質CRT、125kDaの免疫優性抗原、タンパク質M17、アドヘシンADH112、タンパク質STIRP(*Entamoeba histolytica*、アメーバ症); 主要表面タンパク質1~5(MSP1a、MSP1b、MSP2、MSP3、MSP4、MSP5)、IV型セクレオション(secretion)系タンパク質(VirB2、VirB7、VirB11、VirD4)(アナプラズマ属、アナプラズマ病); 防御抗原PA、浮腫因子EF、致死性因子(facotor)LF、S層相同タンパク質SLH(炭疽菌、炭疽); アクラノリシン(acranolysin)、ホスホリパーゼD、コラーゲン結合タンパク質CbpA(*Arcanobacterium haemolyticum*、*Arcanobacterium haemolyticum*感染症); ヌクレオカプシドタンパク質NP、糖タンパク質前駆体GPC、糖タンパク質GP1、糖タンパク質GP2(フニンウイルス、アルゼンチン出血熱); キチン-タンパク質層タンパク質、14kDaの表面抗原A14、主要精子タンパク質MSP、MSP重合組織化タンパク質MPOP、MSP線維タンパク質2 MFP2、MSP重合活性化キナーゼMPAK、ABA-1様タンパク質ALB、タンパク質ABA-1、クチクリン(cuticulin)CUT-1(*Ascaris lumbricoides*、回虫症); 41kDaのアレルゲンAsp v13、アレルゲンAsp f3、主要分生子表面タンパク質rodlet A、プロテアーゼPep1p、GPI-アンカー型タンパク質Gel1p、GPI-アンカー型タンパク質Crf1p(アスペルギルス属、アスペルギルス症); ファミリーVP26タンパク質、VP29タンパク質(アストロウイルス科、アストロウイルス感染症); 桿小体結合タンパク質1 RAP-1、メロゾイト表面抗原MSA-1、MSA-2(a1、a2、b、c)、12D3、11C5、21B4、P29、バリアント赤血球表面抗原VESA1、頂端側膜抗原1 AMA-1(バベシア属、バベシア症); ヘモシアニン、エンテロトキシンC、PXO1-51、グリコール酸オキシダーゼ、ABC-トランスポーター、ペニシリン結合(-binding)タンパク質、亜鉛輸送体ファミリータンパク質、プソイドウリジン合成酵素Rsu、プラスミド複製タンパク質RepX、オリゴエンドペプチダーゼF、プロファージ膜タンパク質、タンパク質HemK、鞭毛抗原H、28.5kDaの細胞表面抗原(*Bacillus cereus*、*Bacillus cereus*感染症); 後期T抗原LT、小分子T抗原、カプシドタンパク質VP1、カプシドタンパク質VP2(BKウイルス、BKウイルス感染症); 29kDa-タンパク質、カスパーゼ-3様抗原、糖タンパク質(*Blastocystis hominis*、*Blastocystis hominis*感染症); 酵母表面アドヘシンWI-1(*Blastomyces dermatitidis*、ブラストミセス症

10

20

30

40

50

) ; 核タンパク質N、ポリメラーゼL、マトリックスタンパク質Z、糖タンパク質GP (マチュポウイルス、ポリビア出血熱) ; 外部表面タンパク質A O s p A、外部表面タンパク質O s p B、外部表面タンパク質O s p C、デコリン結合タンパク質A D b p A、デコリン結合タンパク質B D b p B、鞭毛フィラメント41kDaのコアタンパク質F l a、塩基性膜タンパク質A前駆体B m p A (免疫優性抗原P39)、外部表面22kDaのリポタンパク質前駆体 (抗原I P L A 7)、いろいろな表面リポタンパク質v l s E (ボレリア属、ボレリア感染症) ; ボツリヌス神経毒B o N T / A 1、B o N T / A 2、B o N T / A 3、B o N T / B、B o N T / C、B o N T / D、B o N T / E、B o N T / F、B o N T / G、組換えのボツリヌス毒素FのH cドメインF H c (C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m、ボツリヌス症 (および乳児ボツリヌス症)) ; ヌクレオカプシド、糖タンパク質前駆体 (サビアウイルス、ブラジル出血熱) ; 銅/亜鉛スーパーオキシド・ジスムターゼS o d C、バクテリオフェリチンB f r、50Sリボソームタンパク質R p l L、O m p A様膜貫通ドメイン含有タンパク質O m p 31、免疫原性の39kDaのタンパク質M5 P39、亜鉛ABCトランスポーターペリプラスム亜鉛結合タンパク質z n u A、ペリプラスム免疫原性タンパク質B p 26、30Sリボソームタンパク質S12 R p s L、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼG a p、25kDaの外膜免疫原性タンパク質前駆体O m p 25、浸潤タンパク質B l a l B、誘発因子T i g、分子シャペロンD n a K、推定ペプチジル-プロリルシス-トランスイソメラーゼS u r A、リポタンパク質O m p 19、外膜タンパク質M o t Y O m p 16、保存された外膜タンパク質D15、リンゴ酸デヒドロゲナーゼM d h、IV型分泌系 (T4SS) の成分V i r J、機能不明のリポタンパク質B A B 1_0187 (ブルセラ属、ブルセラ症) ; ABCトランスポーターファミリーの構成員 (L o l C、O p p AおよびP o t F)、推定リポタンパク質放出系膜貫通タンパク質L o l C / E、フラジェリンF l i C、B u r k h o l d e r i a細胞内運動性A B i m A、細菌の伸長因子-T u E F - T u、17kDaのO m p A様タンパク質、b o a Aコードタンパク質、b o a Bコードタンパク質 (B u r k h o l d e r i a c e p a c i aおよび他のバークホルデリア種、バークホルデリア感染症) ; ミコリル-トランスフェラーゼA g 85 A、熱ショックタンパク質H s p 65、タンパク質T B 10.4、19kDa抗原、タンパク質P s t S 3、熱ショックタンパク質H s p 70 (M y c o b a c t e r i u m u l c e r a n s、ブルーリ潰瘍) ; ノロウイルスメジャーおよびマイナーウイルスカプシドタンパク質V P 1およびV P 2、ゲノムポリプロテイン、サポウイルスカプシドタンパク質V P 1、タンパク質V p 3、ゲノム (g e o m e) ポリプロテイン (カルシウイルス科、カリシウイルス感染 (ノロウイルスおよびサポウイルス)) ; 主要外膜タンパク質P o r A、フラジェリンF l a A、表面抗原C j a A、フィブロネクチン結合タンパク質C a d F、アスパラギン酸/グルタミン酸結合ABCトランスポータータンパク質P e b 1 A、タンパク質F s p A 1、タンパク質F s p A 2 (カンピロバクター属、カンピロバクター症) ; 解糖酵素エノラーゼ、分泌型アスパルチルプロテイナーゼS A P 1-10、グリコホスファチジルイノシトール (G P I) 結合細胞壁タンパク質、タンパク質H y R₁、補体受容体3関連タンパク質C R₃-R P、アドヘシンA l s 3 p、熱ショックタンパク質90kDaのh s p 90、細胞表面疎水性タンパク質C S H (通常、C a n d i d a a l b i c a n sおよび他のカンジダ種、カンジダ症) ; 17-kDa抗原、タンパク質P 26、三量体の自己輸送体アドヘシンT A A、バルトネラ属のアドヘシンA B a d A、多様に発現される外膜タンパク質V o m p s、タンパク質P a p 3、タンパク質H b p A、エンベロープ結合プロテアーゼH t r A、タンパク質O M P 89、タンパク質G r o E L、タンパク質L a l B、タンパク質O M P 43、ジヒドロリポアミドスクシニルトランスフェラーゼS u c B (B a r t o n e l l a h e n s e l a e、猫ひっかき病) ; 無べん毛型表面タンパク質-2、無べん毛型特異的表面タンパク質S S P 4、クルジバイン、トランス-シアリダーゼT S、トリボマスチゴート表面糖タンパク質T S A - 1、補体調節タンパク質C R P - 10、タンパク質G 4、タンパク質G 2、パラキソネマルロッド (p a r a x o n e m a l r o d) タンパク質P A R₂、パラフラジェラー (p a r a f l a g e l

10

20

30

40

50

lar) ロッド成分 PaR₁、ムチン結合表面タンパク質 MPSP (*Trypanosoma cruzi*、シャーガス病 (*American trypanosomiasis*)) ; エンベロープ糖タンパク質 (gB、gC、gE、gH、gI、gK、gL) (水痘・带状疱疹ウイルス (VZV)、水痘) ; 主要外膜タンパク質 MOMP、おそらく外膜タンパク質 PMP C、外膜複合体タンパク質 B Omc B、熱ショックタンパク質 Hsp 60 HSP 10、タンパク質 Inc A、III 型分泌系由来タンパク質、リボヌクレオチドレダクターゼ短鎖タンパク質 Nrd B、プラスミドタンパク質 Pgp 3、クラミジア外部タンパク質 N Cop N、抗原 CT 5 2 1、抗原 CT 4 2 5、抗原 CT 0 4 3、抗原 TC 0 0 5 2、抗原 TC 0 1 8 9、抗原 TC 0 5 8 2、抗原 TC 0 6 6 0、抗原 TC 0 7 2 6、抗原 TC 0 8 1 6、抗原 TC 0 8 2 8 (クラミジア・トラコマチス、クラミジア感染症) ; 10
 低カルシウム応答タンパク質 E LCr E、クラミジア外部タンパク質 N Cop N、セリン/トレオニン - プロテインキナーゼ Pkn D、アシル - 担体 - タンパク質 S - マロニルトランスフェラーゼ Fab D、一本鎖 DNA 結合タンパク質 Ssb、主要外膜タンパク質 MOMP、外膜タンパク質 2 Omp 2、多形膜タンパク質ファミリー (Pmp 1、Pmp 2、Pmp 3、Pmp 4、Pmp 5、Pmp 6、Pmp 7、Pmp 8、Pmp 9、Pmp 10、Pmp 11、Pmp 12、Pmp 13、Pmp 14、Pmp 15、Pmp 16、Pmp 17、Pmp 18、Pmp 19、Pmp 20、Pmp 21) (*Chlamydomonada pneumoniae*、*Chlamydomonada pneumoniae* 感染症) ; コレラ毒素 B CTB、毒素共調節ピリン A Tcp A、毒素共調節ピリン Tcp F、毒素 共調節線毛生合成タンパク質 F Tcp F、コレラエンテロトキシンサブユニット A、コレラエンテロトキシンサブユニット B、熱安定性エンテロトキシン ST、マンノース感受性ヘマグルチニン MSHA、外膜タンパク質 U Porin ompU、Porin g B タンパク質、多形膜タンパク質 - D (*Vibrio cholerae*、コレラ) ; プロピオニル - CoA カルボキシラーゼ PCC、14 - 3 - 3 タンパク質、プロヒビチン、システインプロテアーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、ゲルゾリン、カテプシン L プロテイナーゼ Cat L、テグメントタンパク質 20 . 8 kDa の TP 20 . 8、テグメントタンパク質 31 . 8 kDa の TP 31 . 8、リゾホスファチジン酸ホスファターゼ LPAP、(*Clonorchis sinensis*、肝吸虫症) ; 表面層タンパク質 SL P、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ抗原 GDH、毒素 A、毒素 B、システインプロテアーゼ Cwp 8 4、システインプロテアーゼ Cwp 1 3、システインプロテアーゼ Cwp 1 9、細胞壁タンパク質 Cwp V、鞭毛タンパク質 Fli C、鞭毛タンパク質 Fli D (*Clostridium difficile*、*Clostridium difficile* 感染症) ; ライノウイルス : カプシドタンパク質 VP 1、VP 2、VP 3、VP 4 ; コロナウイルス : スパイクタンパク質 S、エンベロープタンパク質 E、膜タンパク質 M、ヌクレオカプシドタンパク質 N (通常、ライノウイルスおよびコロナウイルス、一般的な風邪 (急性ウイルス性鼻咽頭炎 ; 急性鼻感冒)) ; プリオンタンパク質 Prp (*CJD* プリオン、クロイツフェルト・ヤコブ病 (*CJD*)) ; エンベロープタンパク質 Gc、エンベロープタンパク質 Gn、ヌクレオカプシドタンパク質 (クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、クリミア・コンゴ出血熱 (*CHHF*)) ; ビルレンス関連 DEAD - box RNA ヘリカーゼ VAD 1、ガラクトキシロマンナン - タンパク質 Gal XM、グルクロンオキシロマンナン GXM、マンノタンパク質 MP (*Cryptococcus neoformans*、クリプトコッカス症) ; 酸性リボソームタンパク質 P 2 Cp P 2、ムチン抗原 Muc 1、Muc 2、Muc 3 Muc 4、Muc 5、Muc 6、Muc 7、表面接着タンパク質 CP 2 0、表面接着タンパク質 CP 2 3、表面タンパク質 CP 1 2、表面タンパク質 CP 2 1、表面タンパク質 CP 4 0、表面タンパク質 CP 6 0、表面タンパク質 CP 1 5、表面結合糖ペプチド gp 4 0、表面結合糖ペプチド gp 1 5、オーシスト壁タンパク質 AB、プロフィリン PRF、アピラーゼ (クリプトスポリジウム属、クリプトスポリジウム症) ; 脂肪酸およびレチノール結合タンパク質 - 1 FAR - 1、組織阻害薬のメタロプロテイナーゼ TIMP (TMP)、システインプロテイナーゼ ACE Y - 1、システイン

10

20

30

40

50

プロテイナーゼ A C C P - 1、表面抗原 A c - 16、分泌型タンパク質 2 A S P - 2、
 メタロプロテアーゼ 1 M T P - 1、アスパルチルプロテアーゼ阻害薬 A P I - 1、表面
 結合抗原 S A A - 1、成人特異的分泌型第 X a 因子セリンプロテアーゼ阻害薬 抗凝固因
 子 A P、カテプシン D 様アスパラギン酸プロテアーゼ A R R - 1 (通常、*Ancylos-
 toma braziliense*; 他の多くの寄生虫、*Cutaneous larva*
migrans (C L M)) ; カテプシン L 様プロテアーゼ、53 / 25 - kDa 抗原、
 8 kDa ファミリー構成員、わずかなトリプシン様活性を有する囊尾虫タンパク質 T s A
 g 5、六鉤幼虫タンパク質 T S O L 18、六鉤幼虫タンパク質 T S O L 45 - 1 A、乳酸
 デヒドロゲナーゼ A L D H A、乳酸デヒドロゲナーゼ B L D H B (*Taenia so-*
lium、囊尾虫症) ; p p 65 抗原、膜タンパク質 p p 15、カプシド - 近位型テグメ
 ントタンパク質 p p 150、タンパク質 M 45、DNA ポリメラーゼ U L 54、ヘリカ
 ーゼ U L 105、糖タンパク質 g M、糖タンパク質 g N、糖 (g l c o) タンパク質 H、
 糖タンパク質 B g B、タンパク質 U L 83、タンパク質 U L 94、タンパク質 U L 99
 (サイトメガロウイルス (C M V)、サイトメガロウイルス感染症) ; カプシドタンパク
 質 C、プレ膜タンパク質 p r M、膜タンパク質 M、エンベロープタンパク質 E (ドメイン
 I、ドメイン I I、ドメイン I I)、タンパク質 N S 1、タンパク質 N S 2 A、タンパク
 質 N S 2 B、タンパク質 N S 3、タンパク質 N S 4 A、タンパク質 2 K、タンパク質 N S
 4 B、タンパク質 N S 5 (デングウイルス (D E N - 1、D E N - 2、D E N - 3 および
 D E N - 4) - フラビウイルス、デング熱) ; 39 kDa のタンパク質 (*Dientam-*
oeba fragilis、二核アメーバ症) ; ジフテリア毒素前駆体 T o x、ジフテ
 リア毒素 D T、ピリン特異的ソルターゼ S r t A、シャフトピリンタンパク質 S p a A、
 チップピリンタンパク質 S p a C、マイナーピリンタンパク質 S p a B、表面結合タンパ
 ク質 D I P 1281 (*Corynebacterium diphtheriae*、ジフテ
 リア) ; 糖タンパク質 G P、核タンパク質 N P、マイナーマトリックスタンパク質 V P 2
 4、メジャーマトリックスタンパク質 V P 40、転写アクチベーター V P 30、ポリメ
 ラーゼ補因子 V P 35、RNA ポリメラーゼ L (エボラウイルス (E B O V)、エボラ出
 血熱) ; プリオンタンパク質 (v C J D プリオン、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (v C J D、n v C J D)) ; U v r A B C 系タンパク質 B、タンパク質 F l p 1、タンパ
 ク質 F l p 2、タンパク質 F l p 3、タンパク質 T a d A、ヘモグロビン受容体 H g b A
 、外膜タンパク質 T d h A、タンパク質 C p s R A、調節因子 C p x R、タンパク質 S a
 p A、18 kDa 抗原、外膜タンパク質 N c a A、タンパク質 L s p A、タンパク質 L s
 p A 1、タンパク質 L s p A 2、タンパク質 L s p B、外膜成分 D s r A、l e c t i n
 D l t A、リボタンパク質 H l p、主要外膜タンパク質 O M P、外膜タンパク質 O m p A
 2 (*Haemophilus ducreyi*、軟性下疳) ; アスパルチルプロテアーゼ 1
 P e p 1、ホスホリパーゼ B P L B、 - マンノシダーゼ 1 A M N 1、グルカノシルト
 ランスフェラーゼ G E L 1、ウレアーゼ U R E、ペルオキシソームマトリックスタンパ
 ク質 P m p 1、プロリンリッチ抗原 P r a、ヒト (h u m a l) T 細胞反応性 (r e a t i
 v e) タンパク質 T c r P (*Coccidioides immitis* および *Cocc-*
idioides posadasii、コクシジオイデス症) ; アレルゲン T r i r
 2、熱ショックタンパク質 60 H s p 60、真菌アクチン A c t、抗原 T r i r 2、抗
 原 T r i r 4、抗原 T r i t 1、タンパク質 I V、グリセロール - 3 - リン酸デヒドロ
 ゲナーゼ G p d 1、オスモセンサー (o s m o s e n s o r) H w S h o 1 A、オスモセ
 ンサー H w S h o 1 B、ヒスチジンキナーゼ H w H h k 7 B、アレルゲン M a l a s 1
 、アレルゲン M a l a s 11、チオレドキシン T r x M a l a s 13、アレルゲ
 ン M a l a f、アレルゲン M a l a s (通常、白癬菌属の種、エピデルモフィトン属の
 種、マラセジア属の種、*Hortaea werneckii*、*Dermatophyt-*
osis) ; タンパク質 E G 95、タンパク質 E G 10、タンパク質 E G 18、タンパク
 質 E g A 31、タンパク質 E M 18、抗原 E P C 1、抗原 B、抗原 5、タンパク質 P 29
 、タンパク質 14 - 3 - 3、8 kDa のタンパク質、ミオフィリン (m y o p h i l i n
)、熱ショックタンパク質 20 H S P 20、糖タンパク質 G P - 89、脂肪酸結合タン

10

20

30

40

50

パク質 F A P B (エキノコックス属、エキノコックス症) ; 主要表面タンパク質 2 M S P 2、主要表面タンパク質 4 M S P 4、M S P バリアント S G V 1、M S P バリアント S G V 2、外膜タンパク質 O M P、外膜 (m e m b r a n d e) タンパク質 19 O M P - 19、主要抗原性タンパク質 M A P 1、主要抗原性タンパク質 M A P 1 - 2、主要抗原性タンパク質 M A P 1 B、主要抗原性タンパク質 M A P 1 ~ 3、E r u m 2 5 1 0 コードタンパク質、タンパク質 G r o E L、タンパク質 G r o E S、30 - k D a の主要外膜タンパク質、G E 100 k D a のタンパク質、G E 130 k D a のタンパク質、G E 160 k D a のタンパク質 (エールリヒア属、エールリヒア症) ; 分泌型抗原 S a g A、s a g A 様タンパク質 S a l A および S a l B、コラーゲンアドヘシン S c m、表面タンパク質 F m s 1 (E b p A (f m)、F m s 5 (E b p B (f m)、F m s 9 (E p b C (f m) および F m s 10、タンパク質 E b p C (f m)、96 k D a の免疫防御糖タンパク質 G 1 (エンテロコッカス属、エンテロコッカス感染症) ; ゲノムポリプロテイン、ポリメラーゼ 3 D、ウイルスカプシドタンパク質 V P 1、ウイルスカプシドタンパク質 V P 2、ウイルスカプシドタンパク質 V P 3、ウイルスカプシドタンパク質 V P 4、プロテアーゼ 2 A、プロテアーゼ 3 C (エンテロウイルス属、エンテロウイルス感染症) ; 外膜タンパク質 O M、60 k D a の外膜タンパク質、細胞表面抗原 O m p A、細胞表面抗原 O m p B (s c a 5)、134 k D a の外膜タンパク質、31 k D a の外膜タンパク質、29.5 k D a の外膜タンパク質、細胞表面タンパク質 S C A 4、細胞表面タンパク質 A d r 1 (R P 8 2 7)、細胞表面タンパク質 A d r 2 (R P 8 2 8)、細胞表面タンパク質 S C A 1、浸潤タンパク質 i n v A、細胞分裂タンパク質 f t s、分泌タンパク質 s e c 0 ファミリー、ビルレンスタンパク質 v i r B、t l y A、t l y C、パーブリン様タンパク質 P l p、プレタンパク質トランスロカーゼ S e c A、120 k D a の表面タンパク質抗原 S P A、138 k D の複合体抗原、主要 100 - k D タンパク質 (タンパク質 I)、細胞質内タンパク質 D、防御表面タンパク質抗原 S P A (R i c k e t t s i a p r o w a z e k i i、発疹チフス) ; エプスタイン・バー核抗原 (E B N A - 1、E B N A - 2、E B N A - 3 A、E B N A - 3 B、E B N A - 3 C、E B N A - リーダータンパク質 (E B N A - L P))、潜在膜タンパク質 (L M P - 1、L M P - 2 A、L M P - 2 B)、初期抗原 E B V - E A、膜抗原 E B V - M A、ウイルスカプシド抗原 E B V - V C A、アルカリヌクレアーゼ E B V - A N、糖タンパク質 H、糖タンパク質 g p 350、糖タンパク質 g p 110、糖タンパク質 g p 42、糖タンパク質 g H g L、糖タンパク質 g B (エプスタイン・バーウイルス (E B V)、エプスタイン・バーウイルス感染性単核球症) ; カプシドタンパク質 V P 2、カプシドタンパク質 V P 1、主要タンパク質 N S 1 (パルボウイルス B 19、伝染性紅斑 (第5病)) ; p p 65 抗原、糖タンパク質 105、主要カプシドタンパク質、エンベロープ糖タンパク質 H、タンパク質 U 51 (ヒトヘルペスウイルス 6 (H H V - 6) およびヒトヘルペスウイルス 7 (H H V - 7)、突発性発疹) ; チオレドキシン - グルタチオンレダクターゼ T G R、カテプシン L 1 および L 2、K u n i t z 型タンパク質 K T M、ロイシンアミノペプチダーゼ L A P、システインプロテイナーゼ F a s 2、サポニン様タンパク質 - 2 S A P - 2、チオレドキシンペルオキシダーゼ T P x、P r x - 1、P r x - 2、カテプシン 1 システインプロテイナーゼ C L 3、プロテアーゼカテプシン L C L 1、ホスホグリセリン酸キナーゼ P G K、27 k D a の分泌タンパク質、60 k D a のタンパク質 H S P 35、グルタチオントランスフェラーゼ G S T、28.5 k D a のテグメント a l 抗原 28.5 k D a の T A、カテプシン B 3 プロテアーゼ C a t B 3、I 型シスタチンステフィン (s t e f i n) - 1、カテプシン L 5、カテプシン L 1 g およびカテプシン B、脂肪酸結合タンパク質 F A B P、ロイシンアミノペプチダーゼ L A P (F a s c i o l a h e p a t i c a および F a s c i o l a g i g a n t i c a、肝蛭症) ; プリオンタンパク質 (F F I プリオン、致死性家族性不眠症 (F F I)) ; 毒液アレルゲンホモログ様タンパク質 V A L - 1、豊富な幼虫の (a b u n d a n t l a r v a l) 転写物 A L T - 1、豊富な幼虫の転写物 A L T - 2、チオレドキシンペルオキシダーゼ T P X、スズメバチアレルゲンホモログ V A H、チオレドキシン (t h i o r d o x i n) ペルオキシダーゼ 2 T P X - 2、抗原性

10

20

30

40

50

タンパク質 S X P (ペプチド N、N 1、N 2 および N 3)、活性化結合タンパク質 - 1
 A S P - 1、チオレドキシン T R X、トランスグルタミナーゼ B m T G A、グルタチオン
 - S - トランスフェラーゼ G S T、ミオシン、スズメバチアレゲンホモログ V A H、1
 7 5 k D a のコラーゲナーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ G A P
 D H、クチクラコラーゲン C o l - 4、分泌型幼虫酸性タンパク質 S L A P s、キチナー
 ゼ C H I - 1、マルトース結合タンパク質 M B P、解糖酵素フルクトース - 1, 6 - ビス
 リン酸アルドラーゼ F b a、トロポミオシン T M Y - 1、線虫特異的遺伝子産物 O v B 2
 0、オンコシスタチン C P I - 2、C o x - 2 (フィラリア上科、フィラリア症); ホス
 ホリパーゼ C P L C、熱不安定性エンテロトキシン B、毒素成分 I b、タンパク質 C
 P E 1 2 8 1、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ、伸長因子 G E F - G
 、パーフリンゴリジン O P f o、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ G
 a p C、フルクトース - ビスリン酸アルドラーゼ A l f 2、c l o s t r i d i u m p
 e r f r i n g e n s エンテロトキシン C P E、毒素 A T、トキソイド A T d、
 トキソイド E T d、タンパク質 H P、大細胞毒素 T p e
 L、エンド - N - アセチルグルコサミニダーゼ N a g l u、ホスホグリセロムターゼ
 P g m (C l o s t r i d i u m p e r f r i n g e n s、C l o s t r i d i u m p
 e r f r i n g e n s による食中毒); ロイコトキシン l k t A、接着 F a d A、外膜タ
 ンパク質 R a d D、高分子量アルギニン結合タンパク質 (フゾバクテリウム属、フゾバク
 テリウム感染症); ホスホリパーゼ C P L C、熱不安定性エンテロトキシン B、毒素
 成分 I b、タンパク質 C P E 1 2 8 1、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ
 、伸長因子 G E F - G、パーフリンゴリジン O P f o、グリセルアルデヒド - 3 - リン
 酸デヒドロゲナーゼ G a p C、フルクトース - ビスリン酸アルドラーゼ A l f 2、c l o
 s t r i d i u m p e r f r i n g e n s エンテロトキシン C P E、毒素 A T、ト
 キソイド A T d、トキソイド E T d、タンパク質 H P、大細胞毒素 T p e L、エンド
 - N - アセチルグルコサミニダーゼ N a g l u、ホスホグリセロムターゼ P g m (通
 常、C l o s t r i d i u m p e r f r i n g e n s; 他のクロストリジウム種、ガス
 壊疽 (C l o s t r i d i a l m y o n e c r o s i s)); リパーゼ A、リパーゼ B
 、ペルオキシダーゼ D e c 1 (G e o t r i c h u m c a n d i d u m、ゲオトリウム
 症); プリオンタンパク質 (G S S プリオン、ゲルストマン・ストロイスラー・シャイン
 カー症候群 (G S S)); 嚢胞壁タンパク質 C W P 1、C W P 2、C W P 3、バリエント
 表面タンパク質 V S P、V S P 1、V S P 2、V S P 3、V S P 4、V S P 5、V S P 6
 、5 6 k D a 抗原、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ P F O R、アルコール
 デヒドロゲナーゼ E A D H E、- ジアルジン (g i a r d i n)、8 - ジアルジ
 ン、1 - ギアルジン (g u i a r d i n)、- ジアルジン、システインプロテアーゼ
 、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ G S T、アルギニンデイミナーゼ A D I、フル
 クトース - 1, 6 - ビスホスファトアルドラーゼ F B A、G i a r d i a t r o p h o
 z o i t e 抗原 G T A (G T A 1、G T A 2)、オルニチンカルボキシルトランスフェ
 ラーゼ O C T、筋線維 (s t r i a t e d f i b e r) - アセンブリン (a s s e b l i n)
 様タンパク質 S A L P、ウリジンホスホリル様タンパク質 U P L、- チュープリ
 ン、- チュープリン (G i a r d i a i n t e s t i n a i s、ランブル鞭毛虫症);
 A B C トランスポーターファミリーの構成員 (L o l C、O p p A および P o t F)、推
 定リポタンパク質放出系膜貫通タンパク質 L o l C / E、フラジェリン F l i C、B u r
 k h o l d e r i a 細胞内運動性 A B i m A、細菌の伸長因子 - T u E F - T u、1 7
 k D a の O m p A 様タンパク質、b o a A コードタンパク質 (B u r k h o l d e r i a
 m a l l e i、鼻疽); シクロフィリン C y P、2 4 k D a の第 3 期幼虫タンパク質 (p
 r o t i e n) G S 2 4、排出 - 分泌産物 E S P (4 0、8 0、1 2 0 および 2 0 8 k D
 a) (G n a t h o s t o m a s p i n i g e r u m および G n a t h o s t o m a h
 i s p i d u m、顎口虫症); ピリントタンパク質、マイナーピリン結合サブユニット p i l
 C、主要ピリンサブユニットおよびバリエント p i l E、p i l S、相変異タンパク質
 p o r A、P o r i n B P o r B、タンパク質 T r a D、ナイセリア菌外膜抗原 H . 8

10

20

30

40

50

、70 kDa 抗原、主要外膜タンパク質 P I、外膜タンパク質 P 1 A および P 1 B、W 抗原、表面タンパク質 A N s p A、トランスフェリン結合タンパク質 T b p A、トランスフェリン結合タンパク質 T b p B、P B P 2、m t r R コードタンパク質、p o n A コードタンパク質、膜パーミアーゼ F b p B C、F b p A B C タンパク質系、L b p A B タンパク質、外膜タンパク質 O p a、外膜輸送体 F e t A、鉄抑制調節因子 M p e R (*Neisseria gonorrhoeae*、淋病)；外膜タンパク質 A O m p A、外膜タンパク質 C O m p C、外膜タンパク質 K 1 7 O m p K 1 7 (*Klebsiella granulomatis*、峯径部肉芽腫(ドノヴァン症))；フィブロネクチン結合タンパク質 S f b、フィブロネクチン/フィブリノゲン結合タンパク質 F B P 5 4、フィブロネクチン結合タンパク質 F b a A、M タンパク質 1 型 E m m 1、M タンパク質型 6 E m m 6、免疫グロブリン結合タンパク質 3 5 S i b 3 5、表面タンパク質 R 2 8 S p R 2 8、スーパーオキシド・ジスムターゼ S O D、C 5 a ペプチダーゼ S c p A、抗原 I / I I A g I / I I、アドヘシン A s p A、G 関連 2 - マクログロブリン結合タンパク質 G R A B、表面細胞繊維タンパク質 M 5 (*Streptococcus pyogenes*、A 群連鎖球菌感染症)；C タンパク質 抗原、アルギニンデヒミナーゼタンパク質、アドヘシン B i b A、1 0 5 k D A のタンパク質 B P S、表面抗原 c、表面抗原 R、表面抗原 X、トリプシン抵抗性タンパク質 R 1、トリプシン抵抗性タンパク質 R 3、トリプシン抵抗性タンパク質 R 4、表面免疫原性タンパク質 S i p、表面タンパク質 R i b、ロイシンリッチリピートタンパク質 L r r G、セリンリッチリピートタンパク質 S r r - 2、C タンパク質 - 抗原 B c a、抗原 B a g、表面抗原、様タンパク質 A L P 1、様タンパク質 A L P 5 表面抗原、様タンパク質 A L P 2、様タンパク質 A L P 3、様タンパク質 A L P 4、C タンパク質 B a c (*Streptococcus agalactiae*、B 群連鎖球菌感染症)；トランスフェリン結合タンパク質 2 T b p 2、ホスファターゼ P 4、外膜タンパク質 P 6、ペプチドグリカン関連リポタンパク質 P a 1、タンパク質 D、タンパク質 E、接着および浸透タンパク質 H a p、外膜タンパク質 2 6 O m p 2 6、外膜タンパク質 P 5 (フィンブリリン)、外膜タンパク質 D 1 5、外膜タンパク質 O m p P 2、5' -ヌクレオチダーゼ N u c A、外膜タンパク質 P 1、外膜タンパク質 P 2、外膜リポタンパク質 P c p、リポタンパク質 E、外膜タンパク質 P 4、フクロ (*fuculo*) キナーゼ F u c K、[C u , Z n] - スーパーオキシド・ジスムターゼ S o d C、プロテアーゼ H t r A、タンパク質 O 1 4 5、 - ガラクトシルセラミド (*Haemophilus influenzae*、インフルエンザ菌感染症)；ポリメラーゼ 3 D、ウイルスカプシドタンパク質 V P 1、ウイルスカプシドタンパク質 V P 2、ウイルスカプシドタンパク質 V P 3、ウイルスカプシドタンパク質 V P 4、プロテアーゼ 2 A、プロテアーゼ 3 C (エンテロウイルス、主にコクサッキー A 群ウイルスおよびエンテロウイルス 7 1 (E V 7 1)、手、口蹄疫 (H F M D))；RNA ポリメラーゼ L、タンパク質 L、糖タンパク質 G n、糖タンパク質 G c、ヌクレオカプシドタンパク質 S、エンペロープ糖タンパク質 G 1、核タンパク質 N P、タンパク質 N、ポリプロテイン M (シンノブルウイルス、ハンタウイルス、ハンタウイルス肺症候群 (H P S))；熱ショックタンパク質 H s p A、熱ショックタンパク質 H s p B、クエン酸合成酵素 G l t A、タンパク質 U r e B、熱ショックタンパク質 H s p 6 0、好中球活性化タンパク質 N A P、カタラーゼ K a t A、液胞化細胞毒素 V a c A、ウレアーゼ U r e A、ウレアーゼ U r e b、タンパク質 C p n 1 0、タンパク質 g r o E S、熱ショックタンパク質 H s p 1 0、タンパク質 M o p B、細胞毒性関連 1 0 k D a のタンパク質 C A G、3 6 k D a 抗原、 - ラクタマーゼ H c p A、B e t a - ラクタマーゼ H c p B (*Helicobacter pylori*、ピロリ菌感染症)；膜内在性タンパク質、凝集傾向タンパク質、O - 抗原、毒素抗原 S t x 2 B、毒素抗原 S t x 1 B、接着抗原断片 I n t 2 8、タンパク質 E s p A、タンパク質 E s p B、インチミン、タンパク質 T i r、タンパク質 I n t C 3 0 0、タンパク質 E a e (大腸菌 O 1 5 7 : H 7、O 1 1 1 および O 1 0 4 : H 4、溶血性尿毒症症候群 (H U S))；RNA ポリメラーゼ L、タンパク質 L、糖タンパク質 G n、糖タンパク質 G c、ヌクレオカプシドタンパク質 S、エンペロープ糖タンパク質 G 1、

10

20

30

40

50

核タンパク質NP、タンパク質N、ポリプロテインM（ブニヤウイルス科、腎症候性出血熱（HFRS））；糖タンパク質G、マトリックスタンパク質M、核タンパク質N、融合タンパク質F、ポリメラーゼL、タンパク質W、タンパク質C、ホスホタンパク質p、非構造タンパク質V（ヘニパウイルス（ヘンドラウイルスニパウイルス）、ヘニパウイルス感染症）；ポリプロテイン、糖タンパク質（glycoprotein）Gp2、A型肝炎表面抗原HBsAg、タンパク質2A、ウイルスタンパク質VP1、ウイルスタンパク質VP2、ウイルスタンパク質VP3、ウイルスタンパク質VP4、タンパク質P1B、タンパク質P2A、タンパク質P3AB、タンパク質P3D（A型肝炎ウイルス、A型肝炎）；B型肝炎表面抗原HBsAg、B型肝炎コア抗原HbcAg、ポリメラーゼ、タンパク質Hbx、preS2ミドル（middle）表面タンパク質、表面タンパク質L、ラージ（large）Sタンパク質、ウイルスタンパク質VP1、ウイルスタンパク質VP2、ウイルスタンパク質VP3、ウイルスタンパク質VP4（B型肝炎ウイルス（HBV）、B型肝炎）；エンベロープ糖タンパク質E1 gp32 gp35、エンベロープ糖タンパク質E2 NS1 gp68 gp70、カプシドタンパク質C、コアタンパク質Core、ポリプロテイン、ウイルスタンパク質VP1、ウイルスタンパク質VP2、ウイルスタンパク質VP3、ウイルスタンパク質VP4、抗原G、タンパク質NS3、タンパク質NS5A、（C型肝炎ウイルス、C型肝炎）；ウイルスタンパク質VP1、ウイルスタンパク質VP2、ウイルスタンパク質VP3、ウイルスタンパク質VP4、ラージ肝炎抗原、スモール（small）肝炎抗原（D型肝炎ウイルス、D型肝炎）；ウイルスタンパク質VP1、ウイルスタンパク質VP2、ウイルスタンパク質VP3、ウイルスタンパク質VP4、カプシドタンパク質E2（E型肝炎ウイルス、E型肝炎）；糖タンパク質UL1、ウラシル-DNAグリコシラーゼUL2、タンパク質UL3、タンパク質UL4、DNA複製タンパク質UL5、門脈タンパク質UL6、ビリオン成熟タンパク質UL7、DNAヘリカーゼUL8、複製起点結合タンパク質UL9、糖タンパク質MUL10、タンパク質UL11、アルカリexonukleaseUL12、セリン-トレオニンプロテインキナーゼUL13、テグメントタンパク質UL14、ターミナーゼUL15、テグメントタンパク質UL16、タンパク質UL17、カプシドタンパク質VP23UL18、主要カプシドタンパク質VP5UL19、膜タンパク質UL20、テグメントタンパク質UL21、Glycoタンパク質H（UL22）、チミジンキナーゼUL23、タンパク質UL24、タンパク質UL25、カプシドタンパク質P40（UL26、VP24、VP22A）、糖タンパク質B（UL27）、ICP18.5タンパク質（UL28）、主要DNA結合タンパク質ICP8（UL29）、DNAポリメラーゼUL30、核マトリックスタンパク質UL31、エンベロープ糖タンパク質UL32、タンパク質UL33、inner核膜タンパク質UL34、カプシドタンパク質VP26（UL35）、ラージテグメントタンパク質UL36、カプシドアセンブリタンパク質UL37、VP19Cタンパク質（UL38）、リボヌクレオチドレダクターゼ（大サブユニットサブユニット）UL39、リボヌクレオチドレダクターゼ（小サブユニット）UL40、テグメントタンパク質/ビリオン宿主シャットオフVHSタンパク質（UL41）、DNAポリメラーゼプロセスィビリティ（processivity）因子UL42、膜タンパク質UL43、糖タンパク質C（UL44）、膜タンパク質UL45、テグメントタンパク質VP11/12（UL46）、テグメントタンパク質VP13/14（UL47）、ビリオン成熟タンパク質VP16（UL48、-TIF）、エンベロープタンパク質UL49、dUTPジホスファターゼUL50、テグメントタンパク質UL51、DNAヘリカーゼ/プライマーゼ複合体タンパク質UL52、糖タンパク質K（UL53）、転写調節タンパク質IE63（ICP27、UL54）、タンパク質UL55、タンパク質UL56、ウイルスの複製タンパク質ICP22（IE68、US1）、タンパク質US2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼUS3、糖タンパク質G（US4）、糖タンパク質J（US5）、糖タンパク質D（US6）、糖タンパク質I（US7）、糖タンパク質E（US8）、テグメントタンパク質US9、カプシド/テグメントタンパク質US10、Vmw21タンパク質（US11）、ICP47タンパク

10

20

30

40

50

質 (I E 1 2、U S 1 2)、主要転写アクチベーター I C P 4 (I E 1 7 5、R S 1)、E 3 ユビキチンリガーゼ I C P 0 (I E 1 1 0)、潜伏期間関連タンパク質 1 L R P 1、潜伏期間関連タンパク質 2 L R P 2、ニューロビルレンス因子 R L₁ (I C P 3 4 . 5)、潜伏期間結合転写物 L A T (単純ヘルペスウイルス 1 および 2 (H S V - 1 および H S V - 2)、単純ヘルペス)；熱ショックタンパク質 H s p 6 0、細胞表面タンパク質 H 1 C、ジペプチジルペプチダーゼ I V 型 D p p I V、M 抗原、7 0 k D a のタンパク質、1 7 k D a のヒストン様タンパク質 (H i s t o p l a s m a c a p s u l a t u m、ヒストプラスマ症)；脂肪酸およびレチノール結合タンパク質 - 1 F A R - 1、組織阻害薬のメタロプロテイナーゼ T I M P (T M P)、システインプロテイナーゼ A C E Y - 1、システインプロテイナーゼ A C C P - 1、表面抗原 A c - 1 6、分泌型タンパク質 2 A S P - 2、メタロプロテアーゼ 1 M T P - 1、アスパルチルプロテアーゼ阻害薬 A P I - 1、表面結合抗原 S A A - 1、表面結合抗原 S A A - 2、成人特異的分泌型第 X a 因子、セリンプロテアーゼ阻害薬抗凝固因子 A P、カテプシン D 様アスパラギン酸プロテアーゼ A R R - 1、グルタチオン S - トランスフェラーゼ G S T、アスパラギン酸プロテアーゼ A P R - 1、アセチルコリンエステラーゼ A C h E (A n c y l o s t o m a d u o d e n a l e および N e c a t o r a m e r i c a n u s、鉤虫感染症)；タンパク質 N S 1、タンパク質 N P 1、タンパク質 V P 1、タンパク質 V P 2、タンパク質 V P 3 (ヒトボカウイルス (H B o V)、ヒトボカウイルス感染症)；主要表面タンパク質 2 M S P 2、主要表面タンパク質 4 M S P 4、M S P バリエーション S G V 1、M S P バリエーション S G V 2、外膜タンパク質 O M P、外膜 (m e m b r a n d e) タンパク質 1 9 O M P - 1 9、主要抗原性タンパク質 M A P 1、主要抗原性タンパク質 M A P 1 - 2、主要抗原性タンパク質 M A P 1 B、主要抗原性タンパク質 M A P 1 ~ 3、E r u m 2 5 1 0 コードタンパク質、タンパク質 G r o E L、タンパク質 G r o E S、3 0 - k D a の主要外膜タンパク質、G E 1 0 0 k D a のタンパク質、G E 1 3 0 k D a のタンパク質、G E 1 6 0 k D a のタンパク質 (E h r l i c h i a e w i n g i i、ヒトのエールリッヒ症)；主要表面タンパク質 1 ~ 5 (M S P 1 a、M S P 1 b、M S P 2、M S P 3、M S P 4、M S P 5)、I V 型分泌 (s e c r e o t i o n) 系タンパク質 V i r B 2、V i r B 7、V i r B 1 1、V i r D 4 (A n a p l a s m a p h a g o c y t o p h i l u m、ヒト顆粒球アナプラズマ症 (H G A))；タンパク質 N S 1、スモール疎水性タンパク質 N S 2、S H タンパク質、融合タンパク質 F、糖タンパク質 G、マトリックスタンパク質 M、マトリックスタンパク質 M 2 - 1、マトリックスタンパク質 M 2 - 2、ホスホタンパク質 P、核タンパク質 N、ポリメラーゼ L (ヒトメタニューモウイルス (h M P V)、ヒトメタニューモウイルス感染症)；主要表面タンパク質 2 M S P 2、主要表面タンパク質 4 M S P 4、M S P バリエーション S G V 1、M S P バリエーション S G V 2、外膜タンパク質 O M P、外膜 (m e m b r a n d e) タンパク質 1 9 O M P - 1 9、主要抗原性タンパク質 M A P 1、主要抗原性タンパク質 M A P 1 - 2、主要抗原性タンパク質 M A P 1 B、主要抗原性タンパク質 M A P 1 ~ 3、E r u m 2 5 1 0 コードタンパク質、タンパク質 G r o E L、タンパク質 G r o E S、3 0 - k D a の主要外膜タンパク質、G E 1 0 0 k D a のタンパク質、G E 1 3 0 k D a のタンパク質、G E 1 6 0 k D a のタンパク質 (E h r l i c h i a c h a f f e e n s i s、ヒト単球性エーリキア症)；複製タンパク質 E 1、調節タンパク質 E 2、タンパク質 E 3、タンパク質 E 4、タンパク質 E 5、タンパク質 E 6、タンパク質 E 7、タンパク質 E 8、主要カプシドタンパク質 L 1、マイナーカプシドタンパク質 L 2 (ヒトパピローマウイルス (H P V)、ヒトパピローマウイルス (H P V) 感染症)；融合タンパク質 F、ヘマグルチニン - ノイラミニダーゼ H N、糖タンパク質 G、マトリックスタンパク質 M、ホスホタンパク質 P、核タンパク質 N、ポリメラーゼ L (ヒトパラインフルエンザウイルス (H P I V)、ヒトパラインフルエンザウイルス感染症)；血球凝集素 (H A)、ノイラミニダーゼ (N A)、N u c l e o タンパク質 (N P)、M 1 タンパク質、M 2 タンパク質、N S 1 タンパク質、N S 2 タンパク質 (N E P タンパク質：核輸送タンパク質)、P A タンパク質、P B 1 タンパク質 (ポリメラーゼ塩基性 1 タンパク質)、P B 1 - F 2 タンパク質および P B 2 タ

10

20

30

40

50

ンパク質（オルトミクソウイルス科、インフルエンザウイルス（流感））；ゲノムポリプロテイン、タンパク質E、タンパク質M、カプシドタンパク質C（日本脳炎ウイルス、日本脳炎）；RTX毒素、IV型線毛、主要線毛サブユニットPilA、調節転写因子PilSおよびPilR、タンパク質54、外膜タンパク質（Kingella kingae、Kingella kingae感染症）；プリオンタンパク質（Kuru prion、クールー病）；核タンパク質N、ポリメラーゼL、マトリックスタンパク質Z、糖タンパク質GP（ラッサウイルス、ラッサ熱）；ペプチドグリカン関連リポタンパク質PAL、60kDaのシャペロニンCpn60（groEL、HspB）、IV型ピリンPilE、外膜タンパク質MIP、主要外膜タンパク質MompS、亜鉛メタロプロテインナーゼMSP（Legionella pneumophila、レジオネラ症（在郷軍人病、ポンティアック熱））；P4ヌクレアーゼ、タンパク質WD、リボヌクレオチドレダクターゼM2、表面膜糖タンパク質Pg46、システインプロテインナーゼCP、グルコース調節型タンパク質78GRP-78、病期（stage）特異的S抗原様タンパク質A2、ATPaseF1、-チューブリン、熱ショックタンパク質70Hsp70、KMP-11、糖タンパク質GP63、タンパク質BT1、ヌクレオシドヒドラーゼNH、細胞表面タンパク質B1、リボソームタンパク質P1様タンパク質P1、ステロール24-c-メチルトランスフェラーゼSMT、LACKタンパク質、ヒストンH1、SPB1タンパク質、チオール特異的抗酸化因子TSA、タンパク質抗原ST11、シグナルペプチダーゼSP、ヒストンH2B、表面抗原PSA-2、システインプロテインナーゼbCpb（リーシュマニア属、リーシュマニア症）；主要膜タンパク質I、セリンリッ

チ抗原-45kDa、10kDaのカペロニン（caperonin）GroES、HSPkDa抗原、アミノ-オキソノナン酸合成酵素AONS、タンパク質レコンビナーゼARecA、アセチル-ノプロピオニル-補酵素Aカルボキシラーゼ、アラニンラセマーゼ、60kDaのシャペロニン2、ESAT-6様タンパク質EcxB（L-ESAT-6）、タンパク質Lsr2、タンパク質ML0276、ヘパリン結合ヘماغルチニンHBHA、熱ショックタンパク質65Hsp65、mycP1またはML0041コードタンパク質、htrA2またはML0176コードタンパク質、htrA4またはML2659コードタンパク質、gcpまたはML0379コードタンパク質、clpCまたはML0235コードタンパク質（Mycobacterium lepraeおよびMycobacterium lepromatosis、らい病）；外膜タンパク質LipL32、膜タンパク質LIC10258、膜タンパク質LP30、膜タンパク質LIC12238、Ompa様タンパク質Lsa66、表面タンパク質LigA、表面タンパク質LigB、主要外膜タンパク質OmpL1、外膜タンパク質LipL41、タンパク質LigAni、表面タンパク質LcpA、接着タンパク質LipL53、外膜タンパク質UpL32、表面タンパク質Lsa63、フラジェリンFlaB1、膜（membran）リポタンパク質LipL21、膜タンパク質pL40、レプトスピラ表面アドヘシンLsa27、外膜タンパク質OmpL36、外膜タンパク質OmpL37、外膜タンパク質OmpL47、外膜タンパク質OmpL54、アシルトランスフェラーゼLpxA（レプトスピラ属、レプトスピラ症）；リステリオリシンO前駆体Hly（LLO）、浸潤結合タンパク質Iap（P60）、リステリオリシン調節タンパク質PrfA、亜鉛メタロプロ

テインナーゼMpl、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼCPLC（PlcA、PlcB）、O-アセチルトランスフェラーゼOat、ABC-トランスポーターパーミアーゼIm.G_1771、接着タンパク質LAP、LAP受容体Hsp60、アドヘシンLapB、溶血素リステリオリシンO LLO、タンパク質ActA、インターナリンA InlA、タンパク質InlB（Listeria monocytogenes、リステリア症）；外部表面タンパク質AospA、外部表面タンパク質OspB、外部表面タンパク質OspC、デコリン結合タンパク質A DbpA、デコリン結合タンパク質B DbpB、鞭毛フィラメント41kDaのコアタンパク質Fla、塩基性膜タンパク質ABmpA（免疫優性抗原P39）、外部表面22kDaのリポタンパク質前駆体（抗原IPLA7）、いろいろな表面リポタンパク質vlsE（通常、Borre

10

20

30

40

50

liaburgdorferi および他のボレリア種、ライム疾患（ライムボレリア症）；毒液アレルゲンホモログ様タンパク質VAL-1、豊富な幼虫の転写物ALT-1、豊富な幼虫の転写物ALT-2、チオレドキシンペルオキシダーゼTPX、スズメバチアレルゲンホモログVAH、チオレドキシン(thiorodoxin)ペルオキシダーゼ2TPX-2、抗原性タンパク質SXP（ペプチドN、N1、N2およびN3）、活性化結合タンパク質-1ASP-1、チオレドキシンTRX、トランスグルタミナーゼBmTGA、グルタチオン-S-トランスフェラーゼGST、ミオシン、スズメバチアレルゲンホモログVAH、175kDaのコラーゲナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼGAPDH、クチクラコラーゲンCol-4、分泌型幼虫酸性タンパク質SLAP、キチナーゼCHI-1、マルトース結合タンパク質MBP、解糖酵素フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼFba、トロポミオシンTMY-1、線虫特異的遺伝子産物OvB20、オンコシスチンCPI-2、タンパク質Cox-2（*Wuchereria bancrofti* および *Brugia malayi*、リンパ系フィリリア症（象皮病））；糖タンパク質GP、マトリックスタンパク質Z、ポリメラーゼL、核タンパク質N（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）、リンパ球性脈絡髄膜炎）；トロンボスポンジン関連無名タンパク質TRAP、SSP2 スポロゾイト表面タンパク質2、頂端側膜抗原1AMA1、桿小体膜抗原RMA1、酸性塩基性リピート抗原ABRA、細胞通過タンパク質PF、タンパク質Pvs25、メロゾイト表面タンパク質1MSP-1、メロゾイト表面タンパク質2MSP-2、リング感染（ring-infected）赤血球表面抗原RESALiver 病期

（stage）抗原3LSA-3、タンパク質Eba-175、セリンリピート抗原5SERA-5、スポロゾイト周囲タンパク質CS、メロゾイト表面タンパク質3MSP3、メロゾイト表面タンパク質8MSP8、エノラーゼPF10、肝細胞赤血球タンパク質17kDaのHEP17、赤血球膜タンパク質1EMP1、タンパク質Kメロゾイト表面タンパク質4/5MSP4/5、熱ショックタンパク質Hsp90、グルタミン酸リッチタンパク質GLURP、メロゾイト表面タンパク質4MSP-4、タンパク質STARP、スポロゾイト周囲タンパク質関連抗原前駆体CRA（プラスモジウム属、マラリア）；核タンパク質N、膜結合タンパク質VP24、マイナー核タンパク質VP30、ポリメラーゼ補因子VP35、ポリメラーゼL、マトリックスタンパク質VP40、エンベローブ糖タンパク質GP（マールブルグウイルス、マールブルグ出血熱（MHF））；タンパク質C、マトリックスタンパク質M、ホスホタンパク質P、非構造タンパク質V、ヘマグルチニン糖タンパク質H、ポリメラーゼL、核タンパク質N、融合タンパク質F（麻疹ウイルス、麻疹）；ABCトランスポーターファミリーの構成員（LolC、OppAおよびPotF）、推定リポタンパク質放出系膜貫通タンパク質LolC/E、フラジェリンFlIC、バークホルデリア細胞内運動性ABImA、細菌の伸長因子-TuEF-Tu、17kDaのOmpA様タンパク質、boaAコードタンパク質、boaBコードタンパク質（*Burkholderia pseudomallei*、類鼻疽（Whitmore's 病））；ピリンタンパク質、マイナーピリン結合サブユニットpilC、主要ピリンサブユニットおよびバリエーションpilE、pilS、相変異タンパク質porA、PorinB PorB、タンパク質TraD、ナイセリア菌外膜抗原H.8、70kDa抗原、主要外膜タンパク質PI、外膜タンパク質PlAおよびPlB、W抗原、表面タンパク質ANspA、トランスフェリン結合タンパク質TbpA、トランスフェリン結合タンパク質TbpB、PBP2、mtrRコードタンパク質、ponAコードタンパク質、膜パーミアーゼFbpBC、FbpABCタンパク質系、LbpABタンパク質、外膜タンパク質Opa、外膜輸送体FetA、鉄抑制調節因子MpeR、因子H結合タンパク質fHbp、アドヘシンNadA、タンパク質NhbA、リプレッサFarR（*Neisseria meningitidis*、髄膜炎疾患）；66kDaのタンパク質、22kDaのタンパク質（通常、*Metagonimus yokagawai*、メタゴニムス症）；極管タンパク質（*Glugea* の34、75および170kDa、エンセファリトゾーン属の35、55および150kDa）、キネシン関連タンパク質、

10

20

30

40

50

RNAポリメラーゼII最大サブユニット、同様のot膜内在性タンパク質YIPA、抗サイレンシングタンパク質1、熱ショック転写因子HSF、タンパク質キナーゼ、チミジンキナーゼ、NOP-2様核小体タンパク質(Microsporidia phylum、Microsporidiosis); CASP8およびFADD様アポトシス調製因子、グルタチオンペルオキシダーゼGPX1、RNAヘリカーゼNPH-II NPH2、Poly(A)ポリメラーゼ触媒サブユニットPAPL、主要エンベロープタンパク質P43K、初期転写因子70kDaのサブユニットVETFS、初期転写因子82kDaのサブユニットVETFL、メタロエンドペプチダーゼG1-型、ヌクレオシド triホスファターゼI NPH1、複製タンパク質A28様MC134L、RNAポリメラーゼ(polymease)7kDaのサブユニットRPO7(伝染性軟属腫ウイルス(MCV)、伝染性軟属腫(MC)); マトリックスタンパク質M、ホスホタンパク質P/V、スモール疎水性タンパク質SH、核タンパク質N、タンパク質V、融合糖タンパク質F、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼHN、RNAポリメラーゼL(ムンプスウイルス、流行性耳下腺炎); 外膜タンパク質OM、細胞表面抗原OmpA、細胞表面抗原OmpB(sca5)、細胞表面タンパク質SCA4、細胞表面タンパク質SCA1、細胞質内タンパク質D、結晶性表面層タンパク質SLP、防御表面タンパク質抗原SPA(Rickettsia typhi、発疹熱(Murine typhus(Endemic typhus))); アドヘシンP1、接着P30、タンパク質p116、タンパク質P40、細胞骨格タンパク質HMW1、細胞骨格タンパク質HMW2、細胞骨格タンパク質HMW3、MPN152コードタンパク質、MPN426コードタンパク質、MPN456コードタンパク質、MPN-500コードタンパク質(Mycoplasma pneumoniae、Mycoplasma pneumonia); NocA、鉄依存性調節タンパク質、VapA、VapD、VapF、VapG、カゼイン溶解性(caseinololytic)プロテアーゼ、フィラメント先端(filament tip)関連43kDaのタンパク質、タンパク質P24、タンパク質P61、15kDaのタンパク質、56kDaのタンパク質(通常、Nocardia asteroidesおよび他のノカルジア種、ノカルジア症); 毒液アレルゲンホモログ様タンパク質VAL-1、豊富な幼虫の転写物ALT-1、豊富な幼虫の転写物ALT-2、チオレドキシンペルオキシダーゼTPX、スズメバチアレルゲンホモログVAH、チオレドキシンペルオキシダーゼ2 TPX-2、抗原性タンパク質SXP(ペプチドN、N1、N2およびN3)、活性化結合タンパク質-1 ASP-1、チオレドキシンTRX、トランスグルタミナーゼBmTGA、グルタチオン-S-トランスフェラーゼGST、ミオシン、スズメバチアレルゲンホモログVAH、175kDaのコラーゲナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼGAPDH、クチクラコラーゲンCol-4、分泌型幼虫酸性タンパク質SLAP、キチナーゼCHI-1、マルトース結合タンパク質MBP、解糖酵素フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼFba、トロポミオシンTMY-1、線虫特異的遺伝子産物OvB20、オンコシスタチンCPI-2、Cox-2(Onchocerca volvulus、回旋糸状虫症(河川盲目症)); 43kDaの分泌型糖タンパク質、糖タンパク質gp0、糖タンパク質gp75、抗原Pb27、抗原Pb40、熱ショックタンパク質Hsp65、熱ショックタンパク質Hsp70、熱ショックタンパク質Hsp90、タンパク質P10、トリオースリン酸イソメラーゼTPI、N-アセチル-グルコサミン結合レクチンParacoccin、28kDaのタンパク質Pb28(Paracoccidioides brasiliensis、パラコキシジオイデス症(南アメリカブラストミセス症)); 28kDaのクルジパイン様システインプロテアーゼPw28CCP(通常、Paragonimus westermaniおよび他の肺吸虫属の種、肺吸虫症); 外膜タンパク質OmpH、外膜タンパク質Omp28、タンパク質PM1539、タンパク質PM0355、タンパク質PM1417、修復タンパク質MutL、タンパク質BcbC、タンパク質(prtein)PM0305、ギ酸デヒドロゲナーゼ-N、タンパク質PM0698、タンパク質PM1422、DNAジャイレース、リポタンパク質PlpE、接着性タンパク質Cp39、ヘム獲得系受容体HasR、

10

20

30

40

50

39 kDaの莢膜タンパク質、鉄調節型OMP IROMP、外膜タンパク質OmpA 87、線毛タンパク質Ptf、線毛サブユニットタンパク質PtfA、トランスフェリン結合タンパク質Tbp1、エステラーゼ酵素MesA、*Pasteurella multocida*毒素PMT、接着性タンパク質Cp39（パスツレラ属、パスツレラ症）；“糸状ヘマグルチニンFhaB、アデニル酸シクラーゼCyaA、百日咳毒素サブユニット4前駆体PtxD、パータクチン前駆体Prn、毒素サブユニット1 PtxA、タンパク質Cpn60、タンパク質brkA、百日咳毒素サブユニット2前駆体PtxB、百日咳毒素サブユニット3前駆体PtxC、百日咳毒素サブユニット5前駆体PtxE、パータクチンPrn、タンパク質Fim2、タンパク質Fim3；”（*Bordetella pertussis*、百日咳（ゼーゼーいう咳））；“F1カプセル抗原、ビルレンス関連V抗原、分泌型エフェクタータンパク質LcrV、V抗原、外膜プロテアーゼPla、分泌型エフェクタータンパク質YopD、推定分泌型タンパク質 - チロシンホスファターゼYopH、針複合体大サブユニットYscF、タンパク質キナーゼYopO、推定自己輸送体タンパク質YapF、内膜ABC - トランスポーターYbtQ（Irp7）、推定糖結合タンパク質YPO0612、熱ショックタンパク質90 HtpG、推定スルファターゼタンパク質YdeN、外膜リボタンパク質担体タンパク質LolA、分泌 シャペロンYerA、推定リボタンパク質YPO0420、ヘモシアニンアクチベータータンパク質HpmB、ペスチシン（*pesticin*）/エルシニアバクチン外膜受容体 Psn、分泌型エフェクタータンパク質YopE、分泌型エフェクタータンパク質YopF、分泌型エフェクタータンパク質YopK、外膜タンパク質YopN、外膜タンパク質YopM、コアギュラーゼ/フィブリノリジン前駆体Pla；”（*Yersinia pestis*、疫病）；タンパク質PhpA、表面アドヘシンPsaA、ニューモリシンPly、ATP依存的プロテアーゼClp、リボ酸 - タンパク質リガーゼLplA、細胞壁表面アンカー型タンパク質psrP、ソルターゼSrtA、グルタミル - tRNA合成酵素GltX、コリン結合タンパク質ACbpA、肺炎球菌表面タンパク質APspA、肺炎球菌表面タンパク質C PspC、6 - ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼGnd、鉄結合タンパク質PiaA、ムレインヒドラーゼLytB、プロテオン（*proteon*）LytC、プロテアーゼA1（*Streptococcus pneumoniae*、肺炎球菌感染症）；主要表面タンパク質B、ケキシン様プロテアーゼKEX1、タンパク質A12、55 kDa抗原P55、主要表面糖タンパク質Msg（*Pneumocystis jirovecii*、*Pneumocystis pneumonia*（PCP））；ゲノムポリプロテイン、ポリメラーゼ3D、ウイルスカプシドタンパク質VP1、ウイルスカプシドタンパク質VP2、ウイルスカプシドタンパク質VP3、ウイルスカプシドタンパク質VP4、プロテアーゼ2A、プロテアーゼ3C（ポリオウイルス、灰白髄炎）；タンパク質Nfa1、エキセンジン - 3、分泌リパーゼ、カテプシンB様プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、カテプシン、ペルオキシレドキシン、タンパク質Cry1Ac（通常、*Naegleria fowleri*、原発性アメーバ髄膜脳炎（PAM））；アグノ（*agno*）タンパク質、ラージT抗原、スモールT抗原、主要カプシドタンパク質VP1、マイナーカプシドタンパク質Vp2（JCウイルス、進行性多病巣性白質脳症）；低カルシウム応答タンパク質ELCrE、クラミジア外部タンパク質NCopN、セリン/トレオニン - プロテインキナーゼPknD、アシル - 担体 - タンパク質S - マロニルトランスフェラーゼFabD、一本鎖DNA結合タンパク質Ssb、主要外膜タンパク質MOMP、外膜タンパク質2 Omp2、多形膜タンパク質ファミリー（Pmp1、Pmp2、Pmp3、Pmp4、Pmp5、Pmp6、Pmp7、Pmp8、Pmp9、Pmp10、Pmp11、Pmp12、Pmp13、Pmp14、Pmp15、Pmp16、Pmp17、Pmp18、Pmp19、Pmp20、Pmp21）（*Chlamydomonas psittaci*、オウム病）；外膜タンパク質P1、熱ショックタンパク質BHspB、ペプチドABCトランスポーター、GTP結合タンパク質、タンパク質IcmB、リボヌクレアーゼR、ホスファタス（*phosphatase*）SixA、タンパク質DsbD、外膜タンパク質TolC、DNA結合タンパク質

10

20

30

40

50

PhoB、ATPase DotB、熱ショックタンパク質B HspB、膜タンパク質Com1、28kDaのタンパク質、DNA-3-メチルアデニングリコシダーゼI、外膜(pouter)タンパク質OmpH、外膜タンパク質AdaA、グリシン切断型T-タンパク質(Coxiella burnetii、Q熱)；核タンパク質N、ラージ構造タンパク質L、ホスホ(phospho)タンパク質P、マトリックスタンパク質M、糖タンパク質G(狂犬病ウイルス、狂犬病)；融合タンパク質F、核タンパク質N、マトリックスタンパク質M、マトリックスタンパク質M2-1、マトリックスタンパク質M2-2、ホスホタンパク質P、スモール疎水性タンパク質SH、主要表面糖タンパク質G、ポリメラーゼL、非構造タンパク質1 NS1、非構造タンパク質2 NS2(呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、呼吸器合胞体ウイルス感染症)；ゲノムポリプロテイン、ポリメラーゼ3D、ウイルスカプシドタンパク質VP1、ウイルスカプシドタンパク質VP2、ウイルスカプシドタンパク質VP3、ウイルスカプシドタンパク質VP4、プロテアーゼ2A、プロテアーゼ3C(ライノウイルス、ライノウイルス感染症)；外膜タンパク質OM、細胞表面抗原OmpA、細胞表面抗原OmpB(sca5)、細胞表面タンパク質SCA4、細胞表面タンパク質SCA1、タンパク質PS120、細胞質内タンパク質D、防御表面タンパク質抗原SPA(リケッチア属、リケッチア感染症)；外膜タンパク質OM、細胞表面抗原OmpA、細胞表面抗原OmpB(sca5)、細胞表面タンパク質SCA4、細胞表面タンパク質SCA1、細胞質内タンパク質D(Rickettsia akari、小水疱性リケッチア症)；エンベロープ糖タンパク質GP、ポリメラーゼL、核タンパク質N、非構造タンパク質NSS(リフトバレー熱ウイルス、リフトバレー熱(RVF))；外膜タンパク質OM、細胞表面抗原OmpA、細胞表面抗原OmpB(sca5)、細胞表面タンパク質SCA4、細胞表面タンパク質SCA1、細胞質内タンパク質D(Rickettsia rickettsii、ロッキー山紅斑熱(RMSF))；“非構造タンパク質6 NS6、非構造タンパク質2 NS2、中間カプシドタンパク質VP6、内部カプシドタンパク質VP2、非構造タンパク質3 NS3、RNA指向RNAポリメラーゼL、タンパク質VP3、非構造タンパク質1 NS1、非構造タンパク質5 NS5、外側カプシド糖タンパク質VP7、非構造糖タンパク質4 NS4、外側カプシドタンパク質VP4”(ロタウイルス、ロタウイルス感染症)；ポリプロテインP200、糖タンパク質E1、糖タンパク質E2、タンパク質NS2、カプシドタンパク質C(風疹ウイルス、風疹)；シャペロニンGroEL(MopA)、イノシトールリン酸ホスファターゼSopB、熱ショックタンパク質HslU、シャペロンタンパク質DnaJ、タンパク質TviB、タンパク質Iron、フラジェリンFliC、浸潤タンパク質SipC、糖タンパク質gp43、外膜タンパク質LamB、外膜タンパク質PagC、外膜タンパク質TolC、外膜タンパク質NmpC、外膜タンパク質FadL、輸送タンパク質SadA、トランスフェラーゼWgaP、エフェクタータンパク質SifA、SteC、SseL、SseJおよびSseF(サルモネラ属、サルモネラ症)、タンパク質14、非構造タンパク質NS7b、非構造タンパク質NS8a、タンパク質9b、タンパク質3a、核タンパク質N、非構造タンパク質NS3b、非構造タンパク質NS6、タンパク質7a、非構造タンパク質NS8b、膜タンパク質M、エンベロープスモール膜タンパク質EsM、レプリカーゼポリプロテイン1a、スパイク糖タンパク質S、レプリカーゼポリプロテイン1ab；(SARSコロナウイルス、SARS(重度急性呼吸器症候群))；セリンプロテアーゼ、A典型的なヒゼンダニ(Sarcoptes)抗原1 ASA1、グルタチオンS-トランスフェラーゼGST、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、apオリボタンパク質(Sarcoptes scabiei、Scabies)；グルタチオンS-トランスフェラーゼGST、パラミオシン、ヘモグロビナーゼ(hemoglobinase)SM32、主要卵抗原、14kDaの脂肪酸結合タンパク質Sm14、主要幼虫表面抗原P37、22,6kDaのテグメントa1抗原、カルパインCANP、三リン酸イソメラーゼTim、表面タンパク質9B、外側カプシドタンパク質VP2、23kDaの膜内在性タンパク質Sm23、Cu/Zn-スーパーオキシド・ジスムターゼ、糖タンパク質Gp、ミオシン(住血吸虫属、住血吸虫症(ビルハルツ住血吸虫症))

10

20

30

40

50

; 60 kDaのシャペロニン、56 kDaの型特異的抗原、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ、4 - ヒドロキシ安息香酸オクタプレニルトランスフェラーゼ (*Orientia tsutsugamushi*、草原熱) ; デヒドロゲナーゼ *GuaB*、浸潤タンパク質 *Spa32*、インバシン *IpaA*、インバシン *IpaB*、インバシン *IpaC*、インバシン *IpaD*、インバシン *IpaH*、インバシン *IpaJ* (シグラ属、細菌性赤痢 (*Shigellosis* (*Bacillary dysentery*))) ; タンパク質 *P53*、ビリオンタンパク質 *US10* ホモログ、転写調節因子 *IE63*、転写トランスアクチベーター *IE62*、プロテアーゼ *P33*、トランス誘導性因子 74 kDa のタンパク質、デオキシウリジン 5' - 三リン酸ヌクレオチドヒドロラーゼ、転写トランスアクチベーター *IE4*、膜タンパク質 *UL43* ホモログ、核ホスホタンパク質 *UL3* ホモログ、核タンパク質 *UL4* ホモログ、複製起点結合タンパク質、膜タンパク質 2、ホスホタンパク質 32、タンパク質 57、DNAポリメラーゼプロセスビリティ因子、門脈タンパク質 54、DNAプライマーゼ、テグメントタンパク質 *UL14* ホモログ、テグメントタンパク質 *UL21* ホモログ、テグメントタンパク質 *UL55* ホモログ、トリパートイル (*tripartite*) ターミナーゼサブユニット *UL33* ホモログ、トリパートイルターミナーゼサブユニット *UL15* ホモログ、カプシド結合タンパク質 44、ビリオンパッケージタンパク質 43 (水痘・帯状疱疹ウイルス (*VZV*))、*Shingles* (*Herpes zoster*)) ; 切断型 3 - ヒドロキシ - 5 - エンステロイドデヒドロゲナーゼホモログ、ビリオン膜タンパク質 *A13*、タンパク質 *A19*、タンパク質 *A31*、切断型タンパク質 *A35* ホモログ、タンパク質 *A37* . 5 ホモログ、タンパク質 *A47*、タンパク質 *A49*、タンパク質 *A51*、セマフォリン様タンパク質 *A43*、セリンプロテイナーゼ阻害薬 1、セリンプロテイナーゼ阻害薬 2、セリンプロテイナーゼ阻害薬 3、タンパク質 *A6*、タンパク質 *B15*、タンパク質 *C1*、タンパク質 *C5*、タンパク質 *C6*、タンパク質 *F7*、タンパク質 *F8*、タンパク質 *F9*、タンパク質 *F11*、タンパク質 *F14*、タンパク質 *F15*、タンパク質 *F16* (*Varicola major* または *Varicola minor*、天然痘 (痘瘡)) ; アドヘシン / 糖タンパク質 *gp70*、プロテアーゼ (*Sporothrix schenckii*、スポロトリウム症) ; ヘム鉄結合タンパク質 *IsdB*、コラーゲンアドヘシン *Cna*、克蘭プリング因子 *AClfA*、タンパク質 *MecA*、フィブロンネクチン結合タンパク質 *A FnbA*、エンテロトキシン型 *A EntA*、エンテロトキシン型 *B EntB*、エンテロトキシン型 *C EntC1*、エンテロトキシン型 *C EntC2*、エンテロトキシン型 *D EntD*、エンテロトキシン型 *E EntE*、毒素性ショック症候群毒素 - 1 *TSSST-1*、スタフィロキナーゼ、ペニシリン結合タンパク質 *2a PBP2a (MecA)*、分泌抗原 *SssA* (ブドウ球菌属、ブドウ球菌食中毒) ; ヘム鉄結合タンパク質 *IsdB*、コラーゲンアドヘシン *Cna*、克蘭プリング因子 *AClfA*、タンパク質 *MecA*、フィブロンネクチン結合タンパク質 *A FnbA*、エンテロトキシン型 *A EntA*、エンテロトキシン型 *B EntB*、エンテロトキシン型 *C EntC1*、エンテロトキシン型 *C EntC2*、エンテロトキシン型 *D EntD*、エンテロトキシン型 *E EntE*、毒素性ショック症候群毒素 - 1 *TSSST-1*、スタフィロキナーゼ、ペニシリン結合タンパク質 *2a PBP2a (MecA)*、分泌抗原 *SssA* (ブドウ球菌属 例えば、*aureus*、ブドウ球菌感染症) ; 抗原 *Ss-IR*、抗原 *NI E*、ストロンギラストアチン (*strongylastacin*)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase *Sseat-6*、トロポミシン (*tropomysin*) *SsTmy-1*、タンパク質 *LEC-5*、41 kDa の α 抗原 *P5*、41 kDa の幼虫タンパク質、31 kDa の幼虫タンパク質、28 kDa の幼虫タンパク質 (*Strongyloides stercoralis*、*Strongyloidiasis*) ; グリセロホスホジエステラースホジエステラーゼ *GlpQ (Gpd)*、外膜タンパク質 *TmpB*、タンパク質 *Tp92*、抗原 *TpF1*、リピートタンパク質 *Tpr*、リピートタンパク質 *F TprF*、リピートタンパク質 *G TprG*、リピートタンパク質 *I TprI*、リピートタンパク質 *J TprJ*、リピートタンパク質 *K TprK*、トレボネーマ膜タンパク質 *A TmpA*、リポタンパク質、15 kDa の *Tpp15*、47 kDa の膜抗原、ミニフェリチン *TpF1*、ア

10

20

30

40

50

ドヘシンTp0751、リボタンパク質TP0136、タンパク質TpN17、タンパク質TpN47、外膜タンパク質TP0136、外膜タンパク質TP0155、外膜タンパク質TP0326、外膜タンパク質TP0483、外膜タンパク質TP0956 (*Treponema pallidum*、梅毒) ; *Cathepsin L* 様プロテアーゼ、53 / 25 - kDa 抗原、8 kDa ファミリー構成員、わずかなトリプシン様活性を有する嚢尾虫タンパク質TsAg5、六鉤幼虫タンパク質TSOL18、六鉤幼虫タンパク質TSOL45 - 1A、乳酸デヒドロゲナーゼA LDHA、乳酸デヒドロゲナーゼB LDHB (テニア属、テニア症) ; 破傷風毒素TetX、破傷風毒素C TTC、140 kDa のS層タンパク質、フラボタンパク質 - サブユニット CT3、ホスホリパーゼ (レシチナーゼ)、ホスホ担体タンパク質HPr (*Clostridium tetani*、破傷風 (Lockjaw)) ; ゲノムポリプロテイン、タンパク質E、タンパク質M、カプシドタンパク質C (ダニ媒介脳炎ウイルス (TBEV)、ダニ媒介脳炎) ; 58 - kDa 抗原、68 - kDa 抗原、トキソカラ属幼虫排出 - 分泌抗原TES、32 kDa の糖タンパク質、糖タンパク質TES - 70、糖タンパク質GP31、排出 - 分泌抗原TCES - 57、腸周囲抗原Pe、可溶性抽出物抗原Ex、排出 / 分泌幼虫抗原ES、抗原TES - 120、ポリプロテインアレルゲンTBA - 1、カテプシンL様システインプロテアーゼc - cpl - 1、26 kDa のタンパク質 (*Toxocara canis* または *Toxocara cati*、トクソカリアシス (*Ocular Larva Migrans* (OLM) および *Visceral Larva Migrans* (VLM))) ; 短系タンパク質 (MIC1、MIC2、MIC3、MIC4、MIC5、MIC6、MIC7、MIC8)、桿小体タンパク質Rop2、桿小体タンパク質 (Rop1、Rop2、Rop3、Rop4、Rop5、Rop6、Rop7、Rop16、Rjop17)、タンパク質SR1、表面抗原P22、主要抗原p24、主要表面抗原p30、高密度顆粒タンパク質 (GRA1、GRA2、GRA3、GRA4、GRA5、GRA6、GRA7、GRA8、GRA9、GRA10)、28 kDa 抗原、表面抗原SAG1、SAG2 関連抗原、ヌクレオシド - トリホスファターゼ1、ヌクレオシド - トリホスファターゼ2、タンパク質Stt3、HesB様ドメイン含有タンパク質、ロンボイド (rhomboid) 様プロテアーゼ5、トキシメプシン (toxomepsin) 1 (*Toxoplasma gondii*、トキシプラズマ症) ; 43 kDa の分泌型糖タンパク質、53 kDa の分泌型糖タンパク質、パラミオシン、抗原Ts21、抗原Ts87、抗原p46000、TSL - 1 抗原、カベオリン - 1 CAV - 1、49 kDa の生まれたばかりの幼虫の抗原、プロサポニンホモログ、セリンプロテアーゼ、セリンプロテイナーゼ阻害薬、45 kDa の糖タンパク質Gp45 (*Trichinella spiralis*、*Trichinellosis*) ; Myb様転写因子 (Myb1、Myb2、Myb3)、接着タンパク質AP23、接着タンパク質AP33、アドヘシタンパク質AP33 - 3、アドヘシンAP51、アドヘシンAP65、接着タンパク質AP65 - 1、 - アクチニン、キネシン結合タンパク質、テネウリン (teneurin)、62 kDa プロテイナーゼ、スブチリシン様セリンプロテアーゼSUB1、システインプロテイナーゼ遺伝子3 CP3、 - エノラーゼEno1、システインプロテイナーゼCP30、熱ショックタンパク質 (Hsp70、Hsp60)、免疫原性タンパク質P270、(*Trichomonas vaginalis*、トリコモナス症) ; - チュープリン、47 kDa のタンパク質、分泌白血球様プロテイナーゼ - 1 SL P - 1、50 kDa のタンパク質TT50、17 kDa 抗原、43 / 47 kDa のタンパク質 (*Trichuris trichiura*、鞭虫症 (鞭虫感染症)) ; タンパク質ESAT - 6 (EsxA)、10 kDa の濾液 (filtrate) 抗原EsxB、分泌型抗原85 - B FBPB、フィブロネクチン結合タンパク質A FbpA (Ag85A)、セリンプロテアーゼPepA、PPEファミリータンパク質PPE18、フィブロネクチン結合タンパク質D FbpD、免疫原性タンパク質MPT64、分泌型タンパク質MPT51、カタラーゼ - ペルオキシダーゼ - ペルオキシニトリターゼ (peroxynitritase) T KATG、ペリプラスムリン酸結合リボタンパク質PSTS3 (P

10

20

30

40

50

B P - 3、P h o s - 1)、鉄調節型ヘパリン結合ヘマグルチニンH b h a、P P E ファミリータンパク質P P E 1 4、P P E ファミリータンパク質P P E 6 8、タンパク質M t b 7 2 F、タンパク質A p a、免疫原性タンパク質M P T 6 3、ペリプラスムリン酸結合リポタンパク質P S T S 1 (P B P - 1)、分子シャペロンD n a K、細胞表面リポタンパク質M p t 8 3、リポタンパク質P 2 3、リン酸輸送系パーミアーゼタンパク質p s t A、1 4 k D a 抗原、フィブロンネクチン結合タンパク質C F b p C 1、アラニンデヒドロゲナーゼT B 4 3、グルタミン合成酵素1、E S X - 1 タンパク質、タンパク質C F P 1 0、T B 1 0 . 4 タンパク質、タンパク質M P T 8 3、タンパク質M T B 1 2、タンパク質M T B 8、R p f 様タンパク質、タンパク質M T B 3 2、タンパク質M T B 3 9、クリスタリン、熱ショックタンパク質H S P 6 5、タンパク質P S T - S (通常、ヒト型結核菌、結核) ; 外膜タンパク質F o b A、外膜タンパク質F o b B、細胞内成長座 (g r o w t h l o c u s) l g l C 1、細胞内成長座I g l C 2、アミノトランスフェラーゼW b t 1、シャペロニンG r o E L、1 7 k D a の主要膜タンパク質T U L 4、リポタンパク質L p n A、キチナーゼファミリー1 8 タンパク質、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、N i f 3 ファミリータンパク質、I V 型線毛グリコシル化タンパク質、外膜タンパク質t o l C、F A D 結合ファミリータンパク質、I V 型ピリン多量体外膜タンパク質、2 成分センサータンパク質K d p D、シャペロンタンパク質D n a K、タンパク質T o l Q (F r a n c i s e l l a t u l a r e n s i s、野兔病) ; “ M B 抗原、ウレアーゼ、タンパク質G y r A、タンパク質G y r B、タンパク質P a r C、タンパク質P a r E、脂質関連膜タンパク質L A M P、チミジンキナーゼT K、ホスホリパーゼP L - A 1、ホスホリパーゼP L - A 2、ホスホリパーゼP L - C、表面 - 発現させ、9 6 k D a の抗原 ; ” (U r e a p l a s m a u r e a l y t i c u m、U r e a p l a s m a u r e a l y t i c u m 感染症) ; 非構造ポリプロテイン、構造ポリプロテイン、カプシドタンパク質C P、タンパク質E 1、タンパク質E 2、タンパク質E 3、プロテアーゼP 1、プロテアーゼP 2、プロテアーゼP 3 (ベネズエラ馬脳炎ウイルス、ベネズエラ馬脳炎) ; 糖タンパク質G P、マトリックスタンパク質Z、ポリメラーゼL、核タンパク質N (グアナリトウイルス、ベネズエラ出血熱) ; ポリプロテイン、タンパク質E、タンパク質M、カプシドタンパク質C、プロテアーゼN S 3、タンパク質N S 1、タンパク質N S 2 A、タンパク質A S 2 B、プロテイン (b r o t e i n) N S 4 A、タンパク質N S 4 B、タンパク質N S 5 (西ナイルウイルス、西ナイル熱) ; カプシドタンパク質C P、タンパク質E 1、タンパク質E 2、タンパク質E 3、プロテアーゼP 2 (西部馬脳炎ウイルス、西部馬脳炎) ; ゲノムポリプロテイン、タンパク質E、タンパク質M、カプシドタンパク質C、プロテアーゼN S 3、タンパク質N S 1、タンパク質N S 2 A、タンパク質A S 2 B、タンパク質N S 4 A、タンパク質N S 4 B、タンパク質N S 5 (黄熱病ウイルス、黄熱病) ; 推定Y o p 標的化タンパク質Y o b B、エフェクタータンパク質Y o p D、エフェクタータンパク質Y o p E、タンパク質Y o p H、エフェクタータンパク質Y o p J、タンパク質トランスロケーションタンパク質Y o p K、エフェクタータンパク質Y o p T、タンパク質Y p k A、鞭毛生合成タンパク質F l h A、ペプチダーゼM 4 8、カリウム流出系K e f A、転写調節因子 (r e g u l a t o e r) R o v A、アドヘシンI f p、トランスロケータタンパク質 (p o r t e i n) L c r V、タンパク質P c r V、インバシンI n v、外膜タンパク質O m p F 様ポリリン、アドヘシンY a d A、タンパク質キナーゼC、ホスホリパーゼC 1、タンパク質P s a A、マンノシルトランスフェラーゼ様タンパク質W b y K、タンパク質Y s c U、抗原Y P M a (Y e r s i n i a p s e u d o t u b e r c u l o s i s、仮性結核菌感染症) ; エフェクタータンパク質Y o p B、6 0 k D a のシャペロニン、タンパク質W b c P、チロシン - タンパク質ホスファターゼY o p H、タンパク質Y o p Q、エンテロトキシン、ガラクトシドパーミアーゼ、レダクターゼ (r e d u c t a a s e) N r d E、タンパク質Y a s N、インバシンI n v、アドヘシンY a d A、外膜ポリリン F O m p F、タンパク質U s p A 1、タンパク質E i b A、タンパク質H i a、細胞表面タンパク質A i l、シャペロンS y c D、タンパク質L c r D、タンパク質L c r G、タンパク質L c r V、タンパク質S y c E、タンパク質Y o p E

10

20

30

40

50

、調節因子タンパク質 T y e A、タンパク質 Y o p M、タンパク質 Y o p N、タンパク質 Y o p O、タンパク質 Y o p T、タンパク質 Y o p D、プロテアーゼ C l p P、タンパク質 M y f A、タンパク質 F i l A、およびタンパク質 P s a A (Y e r s i n i a e n t e r o c o l i t i c a、エルシニア症) (括弧内は、抗原 (1種類または複数種) が由来する具体的な病原体または病原体の科および該病原体が関連している感染性疾患である) から選択され得る。

【0460】

特に好ましい実施形態では、病原性抗原は

a) H I V p 2 4 抗原、H I V エンベロープタンパク質 (G p 1 2 0、G p 4 1、G p 1 6 0)、ポリタンパク質 G A G、ネガティブ因子タンパク質 N e f、転写のトランス活性化因子 T a t (感染性疾患が H I V、好ましくはヒト免疫不全ウイルスによる感染である場合)、

10

b) 主要外膜タンパク質 M O M P、おそらく外膜タンパク質 P M P C、外膜複合体タンパク質 B O m c B、熱ショックタンパク質 H s p 6 0 H S P 1 0、タンパク質 I n c A、I I I 型分泌系由来のタンパク質、リボヌクレオチドレダクターゼ短鎖タンパク質 N r d B、プラスミドタンパク質 P g p 3、クラミジア外部タンパク質 N C o p N、抗原 C T 5 2 1、抗原 C T 4 2 5、抗原 C T 0 4 3、抗原 T C 0 0 5 2、抗原 T C 0 1 8 9、抗原 T C 0 5 8 2、抗原 T C 0 6 6 0、抗原 T C 0 7 2 6、抗原 T C 0 8 1 6、抗原 T C 0 8 2 8 (感染性疾患がクラミジア・トラコマチスによる感染である場合)、

c) p p 6 5 抗原、膜タンパク質 p p 1 5、カプシド - 近位型テグメントタンパク質 p p 1 5 0、タンパク質 M 4 5、DNA ポリメラーゼ U L 5 4、ヘリカーゼ U L 1 0 5、糖タンパク質 g M、糖タンパク質 g N、糖 (g l c o) タンパク質 H、糖タンパク質 B g B、タンパク質 U L 8 3、タンパク質 U L 9 4、タンパク質 U L 9 9 (感染性疾患がサイトメガロウイルス感染、好ましくはサイトメガロウイルス (C M V) による感染である場合) ;

20

d) カプシドタンパク質 C、プレ膜タンパク質 p r M、膜タンパク質 M、エンベロープタンパク質 E (ドメイン I、ドメイン I I、ドメイン I I I)、タンパク質 N S 1、タンパク質 N S 2 A、タンパク質 N S 2 B、タンパク質 N S 3、タンパク質 N S 4 A、タンパク質 2 K、タンパク質 N S 4 B、タンパク質 N S 5 (感染性疾患がデング熱、好ましくはデングウイルス (D E N - 1、D E N - 2、D E N - 3 および D E N - 4) - フラビウイルスによる感染である場合) ;

30

e) B 型肝炎表面抗原 H B s A g、B 型肝炎コア抗原 H b c A g、ポリメラーゼ、タンパク質 H b x、p r e S 2 ミドル表面タンパク質、表面タンパク質 L、ラージ S タンパク質、ウイルスタンパク質 V P 1、ウイルスタンパク質 V P 2、ウイルスタンパク質 V P 3、ウイルスタンパク質 V P 4 (感染性疾患が B 型肝炎、好ましくは B 型肝炎ウイルス (H B V) による感染である場合) ;

f) 複製タンパク質 E 1、調節タンパク質 E 2、タンパク質 E 3、タンパク質 E 4、タンパク質 E 5、タンパク質 E 6、タンパク質 E 7、タンパク質 E 8、主要カプシドタンパク質 L 1、マイナーカプシドタンパク質 L 2 (感染性疾患が、ヒトパピローマウイルス (H P V) 感染、好ましくはヒトパピローマウイルス (H P V) による感染である場合) ;

40

g) 融合タンパク質 F、ヘマグルチニン - ノイラミニダーゼ H N、糖タンパク質 G、マトリックスタンパク質 M、ホスホタンパク質 P、核タンパク質 N、ポリメラーゼ L (感染性疾患が、ヒトパラインフルエンザウイルス感染、好ましくはヒトパラインフルエンザウイルス (H P I V) による感染である場合) ;

h) 血球凝集素 (H A)、ノイラミニダーゼ (N A)、N u c l e o タンパク質 (N P)、M 1 タンパク質、M 2 タンパク質、N S 1 タンパク質、N S 2 タンパク質 (N E P タンパク質 : 核輸送タンパク質)、P A タンパク質、P B 1 タンパク質 (ポリメラーゼ塩基性 1 タンパク質)、P B 1 - F 2 タンパク質および P B 2 タンパク質 (オルトミクソウイルス科、インフルエンザウイルス (流感)) ;

i) 核タンパク質 N、ラージ構造タンパク質 L、ホスホタンパク質 P、マトリックスタ

50

ンパク質M、糖タンパク質G（感染性疾患が狂犬病、好ましくは狂犬病ウイルスによる感染である場合）；

j）融合タンパク質F、核タンパク質N、マトリックスタンパク質M、マトリックスタンパク質M2-1、マトリックスタンパク質M2-2、ホスホタンパク質P、スモール疎水性タンパク質SH、主要表面糖タンパク質G、ポリメラーゼL、非構造タンパク質1NS1、非構造タンパク質2NS2（感染性疾患が呼吸器合胞体ウイルス感染、好ましくは呼吸器合胞体ウイルス（RSV）による感染である場合）；

k）分泌抗原SssA（ブドウ球菌属、ブドウ球菌食中毒）；分泌抗原SssA（ブドウ球菌属 例えば、aureus、ブドウ球菌感染症）；分子シャペロンDnaK、細胞表面リポタンパク質Mpt83、リポタンパク質P23、リン酸輸送系パーミアーゼタンパク質pstA、14kDa抗原、フィブロネクチン結合タンパク質CFbpC1、アラニンデヒドロゲナーゼTB43、グルタミン合成酵素1、ESX-1タンパク質、タンパク質CFP10、TB10.4タンパク質、タンパク質MPT83、タンパク質MTB12、タンパク質MTB8、Rpf様タンパク質、タンパク質MTB32、タンパク質MTB39、クリスタリン、熱ショックタンパク質HSP65、タンパク質PST-S（感染性疾患が結核、好ましくはヒト型結核菌による感染である場合）；

またはゲノムポリプロテイン、タンパク質E、タンパク質M、カプシドタンパク質C、プロテアーゼNS3、タンパク質NS1、タンパク質NS2A、タンパク質AS2B、タンパク質NS4A、タンパク質NS4B、タンパク質NS5（感染性疾患が黄熱病、好ましくは（preferably）黄熱病ウイルスによる感染である場合）から選択される。

【0461】

実施例

以下の実施例は、本発明のさらなる実例を示すことを意図したものである。この実施例は例示にすぎず、本発明の主題の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

【0462】

実施例1：本発明による組成物の調製

以下の実施例のため、Gaussia princepsルシフェラーゼ（GpLuc）をコードしているDNA配列を調製し、後続のRNAのインビトロ転写反応に使用した。得られたmRNA構築物を、さらなるインビトロ実験およびインビボ実験に使用した。GpLucおよびPpLucのそれぞれのアミノ酸配列およびmRNA配列ならびに調製工程の詳細を以下に示す。

GpLuc, アミノ酸配列（配列番号：11）：

MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDLDADRGKLP GK KLP LEVLKEM
EANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFK
DLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKG
AGGD

GpLuc, mRNA配列（配列番号：12）、また、本明細書においてR2851と表示する：

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCGAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGGG
CGUGAAGGUCCUGUUCGCCCUCAUCUGCAUCGCCGUGGCGGAGGCCAAGCCCACCGAG
AACAAACGAGGACUUAACAUCGUGGCGGUGCGCCAGCAACUUCGCCACCACGGACCUGG
ACGCGGACCGGGGGAAGCUGCCGGGCAAGAAGCUCCCCUGGAGGUGCUGAAGGAGAU
GGAGGCCAACGCCCGCAAGGCCGGUGCACCCGGGGCUGCCUCAUCUGCCUGUCCAC
AUCAAGUGCACCCCCAAGAUGAAGAAGUUAUCCCCGGGCGCUGCCACACCUACGAGG
GCGACAAGGAGAGCGCGCAGGGCGGGAUCGGCGAGGCCAUCGUGGACAUCCCGGAGAU
CCCCGGGUUCAAGGACCUGGAGCCCAUGGAGCAGUUAUCGCCCAGGUCGACCUCUGC
GUGGACUGCACGACCGGCGUGCCUGAAGGGGCGUGGCCAACGUGCAGUGCUCCGACCUC
UGAAGAAGUGGUGGCCCGAGCGGUGCGCCACCUUCGCGAGCAAGAUCAGGGGCCAGGU
CGACAAGAUAAGGGCGCCGGGGGCGACUGAGGACUAGUGCAUCACAUUUAAAAGCAU

CUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCaucuc
UUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUUUU
AAUCAUUUUUGCCUCUUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGA
UCUAAA
AAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUUA
GAGCCACCAGAAUU

P p L u c , アミノ酸配列 (配列番号 : 18) :

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVDITYAEYFEMS
VRLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSNSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELNSMGI
SQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKIIIMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDF
VPESFDRDKTIALIMNSSGSTGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPF
HHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKY
DLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEGDDKPGAVGKV
VPFFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIA
YWDEDEHFFIVDRCLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAV
VVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLRGGVVVFDEVKGLTGKLDARKIREILIKAKK
GGKIAV

10

P p L u c , mRNA配列 (配列番号 : 19) :

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCGAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUGAGGAUGG
AGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGCGCCCUUCUACCCGCGUGGAGGACGGGAC
CGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCUGGUGCCGGGCACGAUC
GCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGAGUACUUCGAGAUGA
GCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAACCACCGGAUCGU
GGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUAUGCCGGUGCUGGGCGCCCUUUAUC
GGCGUGGCCGUCGCCCCGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCUGAACAGCA
UGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAAGAUCU
GAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUAUCAUUAUGGACAGCAAGACC
GACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCCGGGCU
UCAACGAGUACGACUUCGUCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUGAU
CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUGCCGCACCGGACC
GCCUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUAUCCCGG
ACACCGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCU
GGGCUACCUCUUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUG
UUCUGCGGAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUGCGGACCCUGU
UCAGCUUCUUCGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGA
GAUCGCCAGCGGGGGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGG
UUCACCUCCCGGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCC
UGAUCACCCCCGAGGGGGACGACAAGCCGGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCGUUCU
CGAGGCCAAGGUGGUGGACCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACAGCGGGGC
GAGCUGUGCGUGCGGGGGCCGAUGAUAUGAGCGGCUACGUGAACAACCCGGAGGCCA
CCAACGCCCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGA
CGAGGACGAGCACUUCUUAUCGUCGACCGGCUGAAGUCGUGAUAAGUACAAGGGC
UACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGAGAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCG
ACGCCGGCGUGGCCGGGCGUGCCGGACGACGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGU
GGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGAGAAGGAGAUCGUCGACUACGUGGCCAGC
CAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGGCGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCGA
AGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAUCGCGAGAUCCUGAUAAGGCCAA
GAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAAGACUAGUGCAUCAUUAUAAAGCAUCUCAGCC
UACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCaucucUUUUUU
UUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUUUAUCAUU

20

30

40

50

UUGCCUCUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAA
 AAA
 AAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUUCAGAGCCAC
 CAGAAUU

【0463】

DNAおよびmRNA構築物の調製：

Gaussia princepsルシフェラーゼをコードしているDNA配列を、安定化のためにGC最適化配列を導入することによってDNA配列をコードしている野生型を修飾することにより調製した。配列を誘導型pUC19ベクター内に導入し、リボソームの5' TOP UTRである32L4-5'-UTR(32L4)に由来する安定化UTR 10
 配列およびアルブミン7に由来する3' UTRを含むように修飾し、ヒストンステム-ループ配列、3'-末端部の64個のアデノシン鎖(ポリ-A-尾部)および3'-末端部の30個のシトシン鎖(ポリ-C-尾部)をコード配列の3'側に導入した。この配列は以下の配列エレメント：ガウシアルシフェラーゼをコードしているコード配列；リボソームの5' TOP UTRである32L4-5'-UTR(32L4)に由来する安定化配列；3'-末端部の64個のアデノシン(ポリ-A-尾部)；5個のヌクレオチド、3'-末端部の30個のシトシン(ポリ-C-尾部)および5個のさらなるヌクレオチドを含む。

【0464】

R2851は、この状況において言及している場合、64個のアデニレートを含むポリ(A)-配列、続いて5個のヌクレオチド、続いて30個のシチジレート(cytidy late) 20
 を含むポリ(C)-配列およびヒストンステム-ループ配列、続いてさらに5個のヌクレオチドを含む、Gaussia princepsルシフェラーゼをコードしているGC富化mRNA配列に似たものである。

【0465】

RNAのインビトロ転写：

それぞれのDNAプラスミドを酵素的に線状化し、DNA依存性T7 RNAポリメラーゼを用いて、ヌクレオチド混合物の存在下、それぞれのバッファー条件下でインビトロ転写した。キャップアナログ(m7GpppG)をヌクレオチド混合物に添加することにより、GpLuc mRNAを共転写によってキャッピングした。

【0466】

mRNA構築物の精製：

得られたmRNA構築物を、Pure Messenger(登録商標)(CureVac, Tübingen, Germany; WO2008/077592A1)を用いて精製し、さらなる実験に使用した。

【0467】

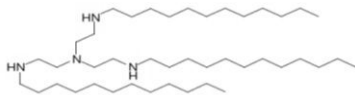
カチオン性のペプチド/ポリマーの調製

ジスルフィド結合型ポリエチレングリコール/ペプチドコンジュゲートであるPB83を以下のようにして調製した。20mgの量のペプチド(CHHHHHHRRRRH HHH HHH C-NH₂) TFA塩を2mLのホウ酸バッファー(pH 8.5)に溶解させ、室温でおよそ18時間撹拌した。次いで、N-メチルピロリドンに溶解させた12.6mg 40
 のPEG-SH 5000(Sunbright)をペプチド溶液に添加し、ホウ酸バッファー(pH 8.5)を用いて3mLまでフィルアップした。室温で18時間のインキュベーション後、反応混合物を精製し、セントリコン手段(MWCO 10kDa)によって濃縮し、水で洗浄し、凍結乾燥させた。凍結乾燥後、凍結乾燥物をELGA 水に溶解させ、濃度を10mg/mLに調整した。得られたポリエチレングリコール/ペプチドポリマー(HO-PEG 5000-S-(S-CHHHHHHRRRRH HHH HHH C-S-)7-S-PEG 5000-OHをさらなる製剤化実験に使用し、以下、本明細書においてPB83と称する。

【0468】

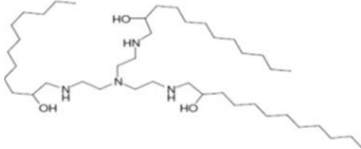
リピドイドの調製

リピドイド
(化)



3 - C 1 2

および
(化)



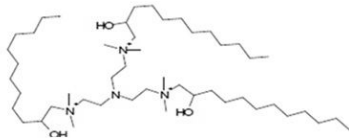
3 - C 1 2 - O H

を調製した。リピドイド3 - C 1 2 は、トリス (2 - アミノエチル) アミンの活性型ラウリン (C 1 2) 酸誘導体でのアシル化後、アミドの還元によって得られ得る。あるいはまた、これは、対応するアルデヒドでの還元的アミノ化により調製され得る。リピドイド3 - C 1 2 - O H は、Love et al. , pp. 1864 - 1869 , P N A S , v o l . 107 (2010) , no. 5 (化合物 C 12 - 110 参照) による同じオリゴアミンでの末端 C 1 2 アルキルエポキシドの付加によって調製される。

【 0 4 6 9 】

式 I X :

(化)



(式 I X)

によるカチオンを含むリピドイド3 - C 1 2 - O H - c a t を3 - C 1 2 - O H から、活性型メチル基、例えばヨウ化メチルとの反応によって調製した。

【 0 4 7 0 】

ポリマー - リピドイド複合体化 m R N A のナノ粒子を有する組成物の調製 :

まず、乳酸加リンゲルバッファー (R i L a ; 択一的に、例えば生理食塩水 (N a C l) または P B S バッファーを使用してもよい)、それぞれの量のリピドイド、およびそれぞれの量のポリマー (P B 8 3) を混合し、リピドイドとペプチドまたはポリマーを含む組成物を調製した。次いで、この担体組成物を使用し、m R N A をそれぞれの量のポリマー - リピドイド担体と混合して例えばリピドイド、ポリマーおよび m R N A 間での複合体の形成を可能にするために室温で10分間のインキュベーション期間を設けることにより、該 m R N A を有するナノ粒子を合成した。次いで、このナノ粒子を、さらなるインビトロ実験およびインビボ実験に使用した。これとの関連における関連パラメータはリピドイドの量と種類、ポリマーの量と種類、および N / P 比である。

【 0 4 7 1 】

得られたポリマー - リピドイド複合体化 m R N A 粒子の完全性を特性評価するため、R N A アガロースゲルシフトアッセイを行った。また、サイズ測定を行ない、得られたナノ粒子が一様なサイズプロファイルを有するかどうかを評価した。

【 0 4 7 2 】

R N A ゲルシフトアッセイのため、慣用的な R N A アガロースゲルを調製し、それぞれのポリマー - リピドイド複合体化 m R N A 粒子をロードした。ゲルバンドを、バイオイメ

10

20

30

40

50

ージングシステムを用いて可視化した。試験したすべてのポリマー-リポイド複合体化mRNAを解析し、それぞれの条件下で安定であることが測定された(データ示さず)。

【0473】

粒径の測定のため、ポリマー-リポイド複合体化mRNAを含む試料を乳酸加リンゲル液(択一的に、生理食塩水)中で最終容量50 μ Lまで希釈した。サイズ測定は、Zetasizer(登録商標)デバイスを用いて行った。

【0474】

ゲルシフトアッセイおよび粒径解析の結果により、得られたポリマー-リポイド-mRNA複合体は、広範なポリマー-対-リポイド比にわたって安定で一様であることが示された。

【実施例2】

【0475】

実施例2:インビトロでのSOL8筋肉細胞のトランスフェクション効率に対するいろいろなポリマー-リポイド製剤の効果

この実施例は、分化SOL8細胞において陽性対照および陰性対照と比較した、GpLuc mRNA(配列番号:12)を含む種々の本発明による組成物のトランスフェクション効率を示す。図1A~1Cからわかるように、少量であってもリポイド(すなわち、3-C12および3-C12-OH)をカチオン性のポリマー-ペプチドコンジュゲート(PB83)に添加すると、トランスフェクション効率の顕著な増大がもたらされることがわかった。

【0476】

SOL8細胞のトランスフェクション:

SOL8は、Daubaset al.によって、正常C3Hマウスの脚から採取したヒラメ筋の一次培養物から単離された筋原性細胞株である。0.2mLの容量のSOL8細胞(20000細胞)を96ウェルガラス底プレート(コラーゲンでコートしたSoftwell Hydrogel, 弾性E=12kPa)内に1日目に播種した。各ウェルから培地を除去した後、100 μ L DMEM培地(2%のウマ血清を含む)を各ウェルに添加した。その後、2日目に、SOL8細胞を、実施例1)に従って調製したポリマー-リポイド複体の100 μ Lのトランスフェクションミックス(三連)およびそれぞれの対照(三連)でトランスフェクトし、細胞を37 $^{\circ}$ Cおよび5%CO₂で120分間インキュベートした。インキュベーション後、150 μ Lの培地を、10%のウシ胎仔血清を補給した150 μ Lの新鮮DMEM培地と交換した。トランスフェクション後24時間目、すなわち3日目、各ウェルの10 μ Lの上清みを抽出し、さらなる発光解析に使用した。解析は後述するようにして行った。カーゴでの成功裡のトランスフェクションにより、ルシフェラーゼタンパク質の翻訳およびGpルシフェラーゼタンパク質の細胞培養上清み中への分泌がもたらされる。

【0477】

発光解析のため、10 μ Lの容量の上清みを、GpLuc測定のために96ウェルプレートに移した。次いで、セレンテラジン標準溶液(100 μ M)を、5mMのNaCl(pH7.2)を補給した49mLのリン酸緩衝生理食塩水中で調製した(1mLのセレンテラジン標準原液(EtOH中4.72mM)。100 μ Lの容量のセレンテラジン標準溶液をGpLucの基質として使用し、5秒後に市販のマイクロプレートリーダーで測定した。

【実施例3】

【0478】

実施例3:インビトロでのHePG2細胞のトランスフェクション効率に対するいろいろなポリマー-リポイド製剤の効果

この実施例は、HePG2細胞において陽性対照および陰性対照と比較した、GpLuc mRNAを含む種々の本発明による組成物のトランスフェクション効率を示す。図2Aおよび2Bからわかるように、少量であってもリポイド(3-C12; 3-C12-

10

20

30

40

50

OH、または3 - C 1 2 - OH - c a t) をカチオン性のポリマー - ペプチドコンジュゲート (P B 8 3) に添加すると、トランスフェクション効率の顕著な増大がもたらされることがわかった。

【 0 4 7 9 】

実験は、S o l 8 細胞ではなくH e p G 2 細胞をトランスフェクトしたこと以外は、先の実施例に記載のようにして行った。0 . 2 m L の容量のH e p G 2 細胞 (1 0 0 0 0 細胞) を9 6 ウェル組織培養プレート内に播種した。各ウェルから培地を除去した後、1 0 0 μ L のR P M I 1 6 4 0 培地 (1 % のペニシリンと1 % のストレプトマイシン、1 % のL - グルタミンを含む) を各ウェルに添加した。その後、H e p G 2 細胞を、ポリマー - リピドイドmRNA複合体の1 0 0 μ L のトランスフェクションミックス (三連) およびそれぞれの対照 (三連) でトランスフェクトし、細胞を3 7 °C および5 % C O ₂ で9 0 分間インキュベートした。インキュベーション後、1 5 0 μ L の培地を、1 0 % のウシ胎仔血清を補給した1 5 0 μ L の新鮮R P M I 1 6 4 0 培地と交換した。トランスフェクション後2 4 時間目、各ウェルの1 0 μ L の上清みを抽出し、さらなる発光解析に使用した。

10

【実施例4】

【 0 4 8 0 】

実施例4：ヒトP B M C でのインビトロサイトカイン刺激

この実施例では、本発明のナノ粒子によって誘発される免疫系の内因性賦活を評価した。免疫賦活に対する本発明の製剤の影響を評価するため、サイトカインのインターフェロン (I N F α) および腫瘍壊死因子 (T N F α) の放出を、いろいろなポリマー - 脂質複合体化G p L u c m R N A で処理後のヒト末梢血単核細胞 (P B M C) において測定した。

20

【 0 4 8 1 】

健常ドナーの末梢血由来のヒト末梢血単核細胞 (P B M C) を、F i c o l l 勾配を用いて単離し、続いて1 \times P B S (リン酸緩衝生理食塩水) で洗浄した。単離した細胞を9 6 ウェルマイクロタイタープレート上に播種した (2 \times 1 0 5 細胞 / ウェル) 。P B M C を2 4 時間、1 0 μ L のそれぞれのポリマー - リピドイド複合体化mRNA粒子 (実施例1 に従って調製) または特定の対照 (例えば、裸のRNA、乳酸加リンゲルバッファー、C p G 2 2 1 6 、R N A a d j u v a n t (登録商標)) とともにX - V I V O 1 5 培地 (L o n z a) 中で三連にてインキュベートした。P B M C 刺激に対する免疫賦活効果を、ヒトI N F α を検出する特異的抗体を用いてサイトカイン産生を検出することによって測定した。

30

【 0 4 8 2 】

E L I S A マイクロタイタープレート (N u n c M a x i s o r b) を一晩 (o / n) 、特異的サイトカイン抗体をさらに含めた結合バッファー (0 . 0 2 % N a N ₃ , 1 5 m M N a ₂ C O ₃ , 1 5 m M N a H C O ₃ , p H 9 . 7) とともにインキュベートした。次いで細胞を、1 % のB S A (ウシ血清 アルブミン) を含む1 \times P B S でブロックした。細胞上清みを添加し、3 7 °C で4 時間インキュベートした。続いて、マイクロタイタープレートを、0 . 0 5 % のT w e e n - 2 0 を含む1 \times P B S で洗浄し、次いで、ビオチン標識二次抗体 (B D P h a r m i n g e n , H e i d e l b e r g , G e r m a n y) とともにインキュベートした。ストレプトアビジンカップリングホースラディッシュペルオキシダーゼをプレートに添加した。次いでプレートを、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を含む1 \times P B S で再度洗浄し、A B T S (2 , 2 ' - アジノ - ビス (3 - エチル - ベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸) を基質として添加した。4 0 5 n m における吸光度 (O D 4 0 5) を、組換えサイトカイン (B D P h a r m i n g e n , H e i d e l b e r g , G e r m a n y) での標準曲線を用いて、T e c a n (C r a i l s h e i m , G e r m a n y) 製のS u n r i s e E L I S A - R e a d e r で測定することによりサイトカイン量を調べた。並行して、細胞培養上清み中のG p L u c 濃度も調べた。

40

【 0 4 8 3 】

50

その結果、図 3 からわかるように、試験した組成物はヒト P B M C におけるサイトカインの分泌を刺激せず、本発明のナノ粒子は、C p G オリゴデオキシヌクレオチドなどの強力な陽性対照の非存在下において免疫系を内因的に賦活させる可能性が非常にごくわずかであることが示された。

【実施例 5】

【0484】

実施例 5：ルシフェラーゼ - m R N A の網膜下注射後 24 時間目のラットの目の走査レーザー検眼鏡 (S L O) 解析

m R N A 複合体を、P p L u c m R N A (配列番号：19) とカチオン性のポリマー - 脂質またはリピドイド溶液 (例えば、M C 3 - c a t または 3 - C 1 2 - O H) をいろいろな仕込み比率で混合することにより調製した。リンゲルバッファーで処置した動物を対照として使用した。凍結乾燥製剤をリンゲルバッファーで再水和させた。最終 m R N A 濃度を $2.5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ にした。2 回用量の $2 \mu\text{l}$ を各目に注射した。1 群あたり 4 つの目 (2 匹のラット) を処置した。処置後 24 時間目、非侵襲的走査レーザー検眼鏡 (S L O) を用いて網膜を画像撮影した (データ示さず)。ルシフェリン溶液をラットの尾静脈内に注射し、2 分間のインキュベーション時間後、目を少なくとも 10 分間解析した。この時間中、ラットにさらにルシフェリン溶液を、鼻で吸わせて投与した。詳細な解析のため、次いで動物を致死させ、その目を取り出して凍結させた。続いて、目の試料をトランスフェクションレベルについて解析した。この目的のため、これらの目を T i s s u e L y s e r で機械的に破壊し、溶解させた。各試料のルシフェラーゼ活性をルミノメーターでアッセイした。

【0485】

ルシフェラーゼ - m R N A (P p L u c m R N A) の網膜下注射の結果を図 4 に示し、相対発光量 (R L U) で表示する。

【実施例 6】

【0486】

実施例 6：マウスの筋肉内ワクチン接種後の体液性および細胞性免疫応答の誘導

D N A および m R N A 構築物の調製

この実施例のため、A 型インフルエンザウイルス (A / N e t h e r l a n d s / 6 0 2 / 2 0 0 9 (H 1 N 1)) のヘマグルチニン (H A) タンパク質をコードしている D N A 配列を調製し、後続のインビトロ転写反応に使用した。それぞれの m R N A 配列ならびにワクチン接種レジメンに関するさらなる詳細を以下に示す。

A 型インフルエンザウイルス (A / N e t h e r l a n d s / 6 0 2 / 2 0 0 9 (H 1 N 1)) のヘマグルチニン (H A) タンパク質をコードしている G / C 富化 m R N A 配列 R 2 5 6 4 (配列番号 17) :

```
GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCGAGCCAUUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGAA
GGCCAUCCUGGUGGUCCUCCUGUACACCUUCGCCACCGCGAACGCCGACACGCUGUGC
AUCGGCUACCCACGCCAACACAGCACCGACACCGUGGACACCGUGCUCGAGAAGAACG
UCACGGUGACCCACUCCGUGAACCGUGCUGGAGGACAAGCACAAACGGGAAGCUCUGCAA
GCUGCGGGGCGUCGCCCGCUGCACCUCGGGAAGUGCAACAUCGCCGGGCGUGGAUCCUG
GGGAACCCGGAGUGCGAGAGCCUGUCCACCGCGAGCUCCUGGAGCUACAUCGUGGAGA
CCUCCAGCUCCGACAACGGCACGUGCUACCCCGGCGACUUCAUCGACUACGAGGAGCU
CCGCGAGCAGCUGAGCUCCGUGAGCUCCUUCGAGCGGUUCGAGAUCUCCCCAAGACC
AGCUCCUGGCCCAACACGACAGCAACAAGGGGGGUCACCGCCGCCUGCCCGCACGCCG
GCGCGAAGUCCUUCUACAAGAACCUGAUCUGGCUUGUGAAGAAGGGGAACAGCUACCC
CAAGCUGUCCAAGAGCUACAUAACGACAAGGGCAAGGAGGUGCUGGUCCUCUGGGGG
AUCCACCACCCAGCACCUCCGCCGACCAGCAGAGCCUGUACCAGAACGCCGACGCCU
ACGUGUUCGUGGGCUCCAGCCGCUACUCCAAGAAGUUCAAGCCCGAGAUCGCCAUCCG
GCCGAAGGUCCGCGACCAGGAGGGCCGGAUGAACUACUACUGGACGCUGGUGGAGCCC
GGGGACAAGAUAACCUUCGAGGCGACCGGCAACCUCGUGGUCCCCCGCUACGCCUUCG
```

CCAUGGAGCGGAACGCCGGGAGCGGCAUCAUCAUCUCCGACACCCCCGUGCACGACUG
 CAACACGACCUGCCAGACCCCGAAGGGCGCAUCAACACCAGCCUGCCCUUCCAGAAC
 AUCCACCCCAUCACGAUCGGGAAGUGCCCCAAGUACGUGAAGUCCACCAAGCUGCGCC
 UCGCGACCGGCCUGCGGAACGUCCCGAGCAUCCAGUCCCGCGGGCUGUUCGGCGCCAU
 CGCCGGGUUCAUCGAGGGCGGCUGGACCGGGAUGGUGGACGGCUGGUACGGGUACCCAC
 CACCAGAACGAGCAGGGCAGCGGGUACGCCGCCGACCUCAGUCCACGCAGAACGCGA
 UCGACGAGAUACCAACAAGGUGAACAGCGUCAUCGAGAAGAUGAACACCCAGUUCAC
 CGCCGUGGGCAAGGAGUUAACCACCUGGAGAAGCGGAUCGAGAACCUGAACAAAGAAG
 GUCGACGACGGCUUCCUCGACAUCUGGACGUACAACGCCGAGCUGCUGGUGCUCUCCUGG
 AGAACGAGCGCACCCUGGACUACCACGACUCCAACGUGAAGAACCUCUACGAGAAGGU
 CCGGAGCCAGCUGAAGAACAACGCCAAGGAGAUCCGGGAACGGCUGCUUCGAGUUCUAC
 CACAAGUGCGACAACACCUGCAUGGAGUCCGUGAAGAACGGGACCUACGACUACCCCA
 AGUACAGCGAGGAGGCCAAGCUGAACCGCGAGGAGAUCCGACGGCGUGAAGCUCGAGUC
 CACGCGGAUCUACCAGAUCCUGGCGAUUCUACAGCACCGUCGCCAGCUCUCCUGGUGCUC
 GUGGUCAGCCUGGGGGCCAUCUCCUUCUGGAUGUGCAGCAACGGCUCCUUGCAGUGCC
 GCAUCUGCAUCUGACCACUAGUGCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGA
 AUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUCUCUUUUUUCUUUUUCGUUGG
 UGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCUUUUAUCAUUUUUGCCUCUUU
 UCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAUGCAUCCC
 CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUUCAGAGCCACCAGAAUU

10

20

【0487】

第1の調製法に従い、上記のmRNAをコードしているDNA配列を調製した。構築物R2564（配列番号：17）を、リボソームタンパク質32Lに由来する5'-TOP-UTRを導入し、安定化のためにGC最適化配列を導入した後、アルブミン-3'-UTRに由来する安定化配列、64個のアデノシン鎖（ポリ（A）-配列）、30個のシトシン鎖（ポリ（C）-配列）およびヒストンステムループを導入することによって野生型コード配列を修飾することにより調製した。

【0488】

ワクチンの調製

30

「裸の」mRNA R2564を、乳酸加リンゲル液（RiLa）中にて投与した。裸のmRNA R2564とPB83および3-C12-OHとの共製剤を、すべての成分を投与前に直接混合することにより作製した。

【0489】

免疫処置

Balb/cマウス（n=8/群）に、10μgのHA-mRNA（R2564，配列番号：17，「裸の」HA-mRNA）単独またはPB83 N/P 0.7, 0.4 3-C12-OHと共製剤化した10μgのHA-mRNAのいずれかで、0日目に筋肉内（左脛骨筋）ワクチン接種し、25日目に追加刺激した；以下の表1参照。表中、表示した量（単位：μg）は、該核酸分子そのものの質量を示す。

40

【0490】

【表1】

群	処置	RNA用量	経路（容量）	マウスの数
1	RiLaバップアー	10μg	i. m. （25μL）	8
2	裸のHA-mRNA	10μg	i. m. （25μL）	8
4	R2564 PB83 N/P 0.7, 0.4 3-C12-OH	10μg	i. m. （25μL）	8

表1：実験設定

【0491】

50

25日目、すべての動物に追加刺激の注射を行った。機能性の体液性応答の誘導を40日目に、血液試料を採取し、血清の赤血球凝集抑制（HI）抗体価（以下の表2参照）（これは一般的に、インフルエンザウイルス感染に対する免疫防御のサロゲートマーカーとして使用される）を調べることにより解析した。1：40以上のHI価が典型的には防御の賦与とみなされる。乳酸加リンゲルバッファー（RiLa）処置マウスを陰性対照として使用した。

【0492】

【表2】

日 目	処置	試料採取
d 0	初回免疫	
d 25	追加免疫	
d 40	終了	血液 + 脾臓の採取

10

表2：ワクチン接種スケジュール

【0493】

赤血球凝集抑制アッセイ

赤血球凝集抑制（HI）アッセイのため、マウス血清を熱不活化し（56℃，30分間）、カオリンとともにインキュベートし、ニワトリ赤血球（CRBC）（ともに、Labor Dr. Merck & Kollegen, Ochsenhausen, Germany）に予備吸着させた。HIアッセイのため、前処理した血清の50μLの2倍希釈液を4赤血球凝集価（HAU）の不活化A/California/57/2009（NIBSC, Pottermers Bar, UK）とともに45分間インキュベートし、50μLの0.5%CRBCを添加した。

20

【0494】

結果：

図5においてわかるように、PB83 N/P 0.7、0.4 3-C12-OH-製剤でワクチン接種したマウスはすべて、1：40のHI価を示した。図5はさらに、HA-mRNA（R2564）とPB83および3-C12-OHを主体とするポリマー-リピド担体とを含む製剤での筋肉内ワクチン接種では、HAタンパク質に対してHA-mRNA（R2564）単独でのワクチン接種と比べて高い抗体価が誘導されることを示す。

30

【実施例7】

【0495】

実施例7：

A549細胞におけるいろいろな脂質との組合せでの他のポリマーのトランスフェクション効率

この実施例では、A549細胞（ヒト肺癌細胞株）における、いろいろな脂質との組合せでのPB83以外のポリマーのトランスフェクション効率に対する効果の評価を記載する。このため、ポリカチオン性ブロックポリマーSunbright AS50-DT-A（日油株式会社，東京）をmRNAの効率的な送達のために使用した。トランスフェクション効率の読み出し情報として、Gaussia princepsルシフェラーゼGpLuc mRNAをカーゴとして使用した。カーゴでの成功裡のトランスフェクションにより、ルシフェラーゼタンパク質の翻訳およびルシフェラーゼタンパク質の細胞培養上清中への分泌がもたらされる。

40

【0496】

したがって、A549細胞を24ウェルプレート内に、75000細胞/ウェルの密度で細胞培養培地（Gibco（ThermoFisher）Ham's F-12K（Kaighn's）培地，10%ウシ胎仔血清（FBS），1%のL-グルタミン，1%のペニシリン/ストレプトマイシン）中に播種した。A549細胞を二連で、後述するようにしていろいろな担体-脂質製剤およびGpLucコードmRNA（配列番号：12；R28

50

51) でトランスフェクトした。陰性対照として、PB83担体なしのGpLucコードmRNAを使用した。ルシフェラーゼ発現を24時間後に定量した。#

【0497】

【表3】

番号	ポリマー	脂質	mRNA	
1	10 μ l Sunbright [10g/l] (40 μ lの HEPES [10mM] 中)	なし	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) 47.5 μ l HEPES [10mM]	無血清培地で 1mlまでにする 200 μ l 添加/ ウェル
2	8 μ l Sunbright [10g/l] (42 μ lの NaCl [0.9%] 中)	なし	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) 47.5 μ l NaCl [0.9%]	
3	8 μ l Sunbright [10g/l] (42 μ lの NaCl [0.9%] 中)	1 μ l 3-C12-OH [100 μ mol/ ml]	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) 47.5 μ l NaCl [0.9%]	
6	10 μ l Sunbright [10g/l] (40 μ lの HEPES [10mM] 中)	1 μ l DDAB [100 μ mol/ ml]	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) 47.5 μ l HEPES [10mM]	

10

表3：トランスフェクション条件

【0498】

結果：

図6は、GpLucタンパク質が、非PB83ポリマーを用いてmRNA構築物R2851でトランスフェクトしたA549細胞において発現したこと、および試験した脂質の添加ありの製剤は、脂質の添加なしのSunbrightポリマー対照と比べた場合、より効率的であったことを示す。これは、カチオン性のポリマー系を使用した場合に、mRNAと非常に少量の脂質の組合せによりトランスフェクション効率を高めることができたことを示す。

20

【0499】

実施例7：BHK細胞におけるいろいろな脂質との組合せでの他のポリマーのトランスフェクション効率

この実施例では、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞およびSol8(ハツカネズミの骨格筋)細胞における、いろいろな脂質との組合せでのPB83以外のポリマーのトランスフェクション効率に対する効果の評価を記載する。このため、分子

- GH5R4H5GC-S-S-CGH5R4H5G(「Inlay-ダイマー」；S-Sは、この単位がシステインS-S結合によって共有結合されていることを示す；Intavis Bioanalytical Instruments AG, Germany/Cologne)；

30

- K(EEEKK)₃SGGGGH5R4H5GC-S-S-CGH5R4H5GGGS(KKEEE)₃K(「(KKEEE)₃K-ダイマー」；S-Sは、この単位がシステインS-S結合によって共有結合されていることを示す；Intavis Bioanalytical Instruments AG, Germany/Cologne)；

- ポリカチオン性の線状多糖キトサン95/50(「キトサン」，CAS 9012-76-4；Intavis Bioanalytical Instruments AG, Germany/Cologne)；

40

- (R₁₂C)-(CR₁₂C)-(R₁₂C)(「トリマー」；R₁₂C単位とCR₁₂C単位はシステインS-S結合によって共有結合されている；Intavis Bioanalytical Instruments AG, Germany/Cologne)；

- R₁₂C-PEG5000(「R₁₂C-PEG」)；および

- (R₁₂CW)₂(この2つのR₁₂CW-単位はシステインS-S結合によって共有結合されている)

をmRNAの送達のために使用した。トランスフェクション効率の読み出し情報として、Gaussia princepsルシフェラーゼGpLuc mRNAをカーゴとして使用した。カーゴでの成功裡のトランスフェクションにより、ルシフェラーゼタンパク質の

50

翻訳およびルシフェラーゼタンパク質の細胞培養上清み中への分泌がもたらされる。

【 0 5 0 0 】

したがって、B H K細胞では、細胞を96ウェルプレート内に、10000細胞/ウェルの密度で細胞培養培地(RPMI, 10%のFCS, 1%のL-グルタミン, 1%のペニシリン/ストレプトマイシン)中に播種した。B H K細胞を二連で、後述するようにしているいろいろな担体-脂質製剤およびG p L u cコードmRNA(配列番号: 12; R 2 8 5 1)でトランスフェクトした。陰性対照として、P B 8 3担体なしのG p L u cコードmRNAを使用した。ルシフェラーゼ発現をトランスフェクション後24時間目に定量した。

【 0 5 0 1 】

したがって、S o l 8(分化)細胞では、細胞をトランスフェクションの7日前に、96ウェルプレート内に、10000細胞/ウェルの密度で細胞培養培地(DMEM, 1%のペニシリン/ストレプトマイシン, 1%のL-グルタミン, 1%のFCS)中に播種した。播種の1日後に培地を除去し、1%のFCSを含有しているDMEMを細胞に添加した。播種後3日目、細胞の培地を交換した(DMEM, 1%のFCS)。8日目、S o l 8細胞を三連で、後述するようにしているいろいろな担体-脂質製剤およびG p L u cコードmRNA(配列番号: 12; R 2 8 5 1)でトランスフェクトした。陰性対照として、C V C M/P B 8 3担体なしのG p L u cコードmRNAを使用した。ルシフェラーゼ発現をトランスフェクション後24時間目に定量した。

【 0 5 0 2 】

したがって、H e L a細胞では、細胞を96ウェルプレート内に、10000細胞/ウェルの密度で細胞培養培地(RPMI, 10%FCS, 1%のL-グルタミン, 1%のペニシリン/ストレプトマイシン)中に播種した。H e L a細胞を二連で、後述するようにしているいろいろな担体-脂質製剤および2μgのP p L u cコードmRNA(配列番号: 19; R 2 2 4 4; 以下の表参照)でトランスフェクトした。陰性対照として、P B 8 3担体なしのP p L u cコードmRNAを使用した。ルシフェラーゼ発現をトランスフェクション後24時間目に定量した。

【 0 5 0 3 】

【表4】

CVC Mの型	水	(R ₁ +CW) ₂ (4g/l)	MCS		20% トレハロース
			1:100 1μmol/ml	1:10 10μmol/ml	
CR12 0.8; 0.1 MCS	158.8μl	3.2μl	3μl		75μl
CR12 0.8; 0.3 MCS	152.8μl	3.2μl	9μl		75μl
CR12 0.8; 1.0 MCS	158.8μl	3.2μl		3μl	75μl

表4：トランスフェクション条件

【 0 5 0 4 】

結果：

図7Aおよび7Bは、G p L u cタンパク質が、非P B 8 3ポリマーを用いてmRNA構築物R 2 8 5 1でトランスフェクトしたB H K細胞および分化S o l 8細胞において発現したこと、および試験した脂質の添加ありの製剤は、それぞれの脂質の添加なしのポリマー対照と比べた場合、より効率的であったことを示す。図7Cは、P p L u cタンパク質がH e L a細胞において発現したことを示す。これは、カチオン性のポリマー系を使用した場合に、mRNAと非常に少量の脂質の組合せによりトランスフェクション効率を高めることができたことを示す。

【実施例8】

【 0 5 0 5 】

実施例8：3-C 1 2-アミド脂質との組合せでの他のポリマーのトランスフェクション効率

この実施例では、FCSなしでのH e p G 2細胞における、いろいろなポリマー-脂質

製剤のトランスフェクション効率に対する効果の評価を記載する。トランスフェクション効率の読み出し情報として、*G a u s s i a p r i n c e p s* ルシフェラーゼ *G p L u c m R N A* をカーゴとして使用した。カーゴでの成功裡のトランスフェクションにより、ルシフェラーゼタンパク質の翻訳およびルシフェラーゼタンパク質の細胞培養上清中への分泌がもたらされる。

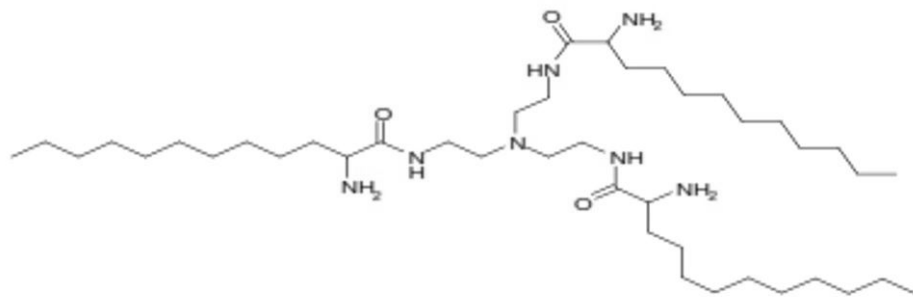
【 0 5 0 6 】

したがって、*H e p G 2* 細胞を 2 4 ウェルプレート内に、1 0 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で細胞培養培地 (2 5 m M H E P E S 5 0 0 m l , 1 0 % F C S , 1 % の L - グルタミン , 1 % のペニシリン / ストレプトマイシン ; *L o n z a G r o u p A G B E 1 2 - 1 1 5 F / 6 M B 2 0 5* ; *B a s e l / S w i t z e r l a n d* を含む *R P M I 1 6 4 0*) 中に播種した。*H e p G 2* 細胞を二連で、後述するようにしていろいろな担体 - 脂質製剤および 0 . 7 の N / P 比を有する *G p L u c* コード mRNA (配列番号 : 1 2 ; R 2 8 5 1) でトランスフェクトした。陰性対照として、*C V C M / P B 8 3* 担体なしの *G p L u c* コード mRNA を使用した。ルシフェラーゼ発現を 2 4 時間後に定量した。

【 0 5 0 7 】

3 - C 1 2 - アミド (式 X)

(化)



3 - C 1 2 - アミドモノメチル誘導体 (式 X a)

(化)

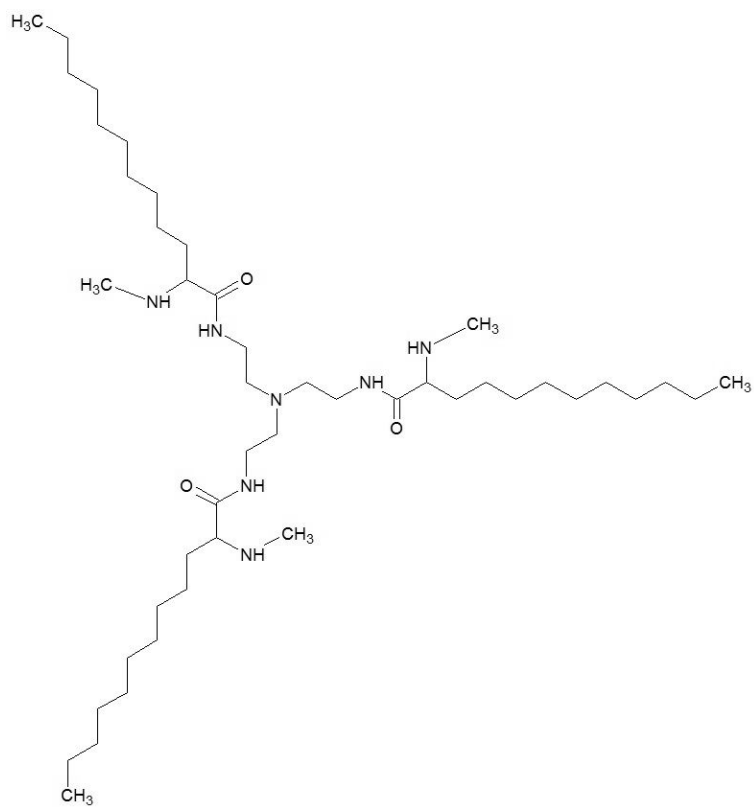
10

20

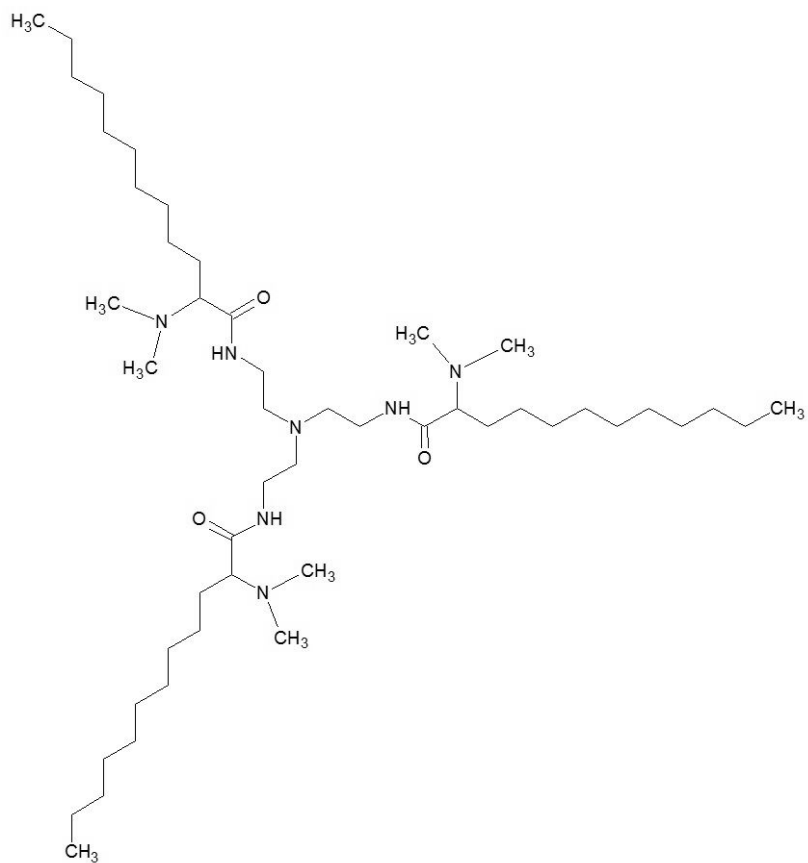
30

40

50



3 - C 1 2 - アミドジ - メチル誘導体 (式 X b)
(化)



【表 5】

	担体	脂質	N/P
条件 1	CVCM/PB83	なし	0.7
条件 2	CVCM/PB83	3-C12-OH	0.7
条件 3	CVCM/PB83	3-C12-アミド	0.7

表 5：トランスフェクション条件：

【0509】

結果：

図 8 は、GpLuc タンパク質が、mRNA 構築物 R2851 でトランスフェクトした Hep G2 細胞において発現したこと、および試験した脂質の添加ありの製剤は、脂質の添加なしの対照と比べた場合、非常に効率的であったことを示す。これは、mRNA と非常に少量の脂質の組合せによりトランスフェクション効率を高めることができたことを示す。

10

【実施例 9】

【0510】

実施例 9：硝子体内送達の際のいろいろな脂質との組合せでの他のポリマーのトランスフェクション効率

この実施例では、接眼送達を行った場合の、いろいろなポリマー - 脂質製剤のトランスフェクション効率に対する効果の評価を記載する。トランスフェクション効率の読み出し情報として、Photinus pyralis ルシフェラーゼ PpLuc mRNA をカージオとして使用した。カージオでの成功裡のトランスフェクションにより、ルシフェラーゼタンパク質の翻訳およびルシフェラーゼタンパク質の細胞培養上清中への分泌がもたらされる。

20

【0511】

mRNA 複合体を、PpLuc mRNA (配列番号：19 R2244) とカチオン性のポリマー - 脂質溶液を同じ仕込み比率で混合することにより調製した。製剤をリンゲルバッファー中で、以下のスキームに従って最終 mRNA 濃度を $2 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ にして調製した。

【0512】

製剤 1 (PpLuc mRNA R2244)
20 ml の mRNA ($5 \text{ g} / \text{l}$) + 25 ml の水 + 5 ml の $10 \times \text{RiLa}$
50 ml 中 100 mg の mRNA にする ($2 \text{ mg} / \text{ml}$ に相当)

30

【0513】

製剤 2 (PpLuc mRNA R2244, PB83 N/P 0.7, 0.4 3-C12-OH 中)
20 ml の CVCM (PB83, $10 \text{ g} / \text{l}$) + 0.4 ml の 3-C12-OH ($100 \mu\text{mol} / \text{ml}$) + 4.5 ml の水 + 5 ml の $10 \times \text{RiLa}$
20 ml の mRNA (R2244 - ルシフェラーゼ; $5 \text{ g} / \text{l}$) に添加
50 ml 中 100 mg の mRNA にする ($2 \text{ mg} / \text{ml}$ に相当)

【0514】

$5 \mu\text{l}$ を各目に (硝子体内) 注射した。群あたり 4 つの目を処置した。リンゲルバッファー中で調製した非製剤化 mRNA で処置した動物を対照として使用した。処置後 24 時間目、動物を致死させ、その目を取り出して凍結させた。続いて、目の試料をトランスフェクションレベルについて解析した。この目的のため、これらの目を Tissue Lysate で機械的に破壊し、溶解させた。各試料のルシフェラーゼ活性をルミノメーターでアッセイした。ルシフェラーゼ活性の結果を相対発光量 (RLU) で表示する。

40

【0515】

結果：

図 9 は、硝子体内注射の際に PpLuc タンパク質が発現したこと、および試験した脂質の添加ありの製剤は、脂質の添加なしの対照と比べた場合、非常に効率的であったこと

50

を示す。これは、mRNAと非常に少量の脂質の組合せにより硝子体内でトランスフェクション効率を高めることができたことを示す。

【実施例 10】

【0516】

実施例 10：A549細胞におけるいろいろなポリマー - 脂質の組合せのトランスフェクション効率

この実施例では、A549細胞（ヒト肺癌細胞株）における、いろいろなポリマー - 脂質製剤のトランスフェクション効率に対する効果の評価を記載する。トランスフェクション効率の読み出し情報として、Gaussia princepsルシフェラーゼGpLuc mRNAをカーゴとして使用した。カーゴでの成功裡のトランスフェクションにより、ルシフェラーゼタンパク質の翻訳およびルシフェラーゼタンパク質の細胞培養上清み中への分泌がもたらされる。

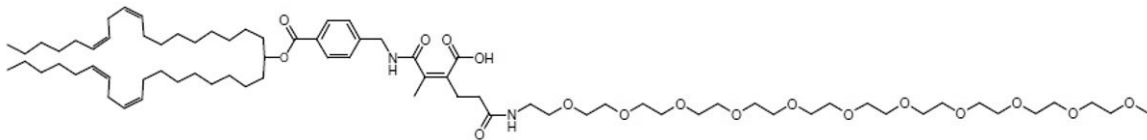
【0517】

したがって、A549細胞を24ウェルプレート内に、75000細胞/ウェルの密度で細胞培養培地（Gibco（ThermoFisher）Ham's F-12K（Kaighn's）培地，10%ウシ胎仔血清（FBS），1%のL-グルタミン，1%のペニシリン/ストレプトマイシン）中に播種した。A549細胞を二連で、後述するようにしていろいろな担体 - 脂質製剤およびGpLucコードmRNA（配列番号：12；R2851）でトランスフェクトした。陰性対照として、CVCN/PB83担体なしのGpLucコードmRNAを使用した。ルシフェラーゼ発現を24時間後に定量した。

【0518】

この実際の実施例では、カチオン性脂質DDAB（ジメチルジオクタデシルアンモニウム；CAS番号3700-67-2；Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA）を使用した：

(化)



【0519】

【表 6】

	工程1 (CVCNを添加/ PB83を水で調製)	工程2 (バッファー またはmRNAを 添加)	工程3 (バッファー またはmRNAを 添加)	工程4 (フィルアップ および分注)
条件1 (脂質なし)	30μl CVCN [1μg/μl, 水中で希釈]	20μl RiLa	2.5μl mRNA (1μg/μl)	無血清培地で 1mlまでにする 200μl 添加/ウェル
条件2	30μl CVCN [1μg/μl, 水中で希釈] + 1μl DDAB(1μmol/ml)	20μl RiLa	2.5μl mRNA (1μg/μl)	
条件3	30μl CVCN [1μg/μl, 水中で希釈] + 1μl DDAB(1μmol/ml)	2.5μl mRNA (1μg/μl)	20μl RiLa	
条件4	30μl CVCN [1μg/μl, 水中で希釈] + 1μl DDAB(1μmol/ml)	10μl RiLa	2.5μl mRNA (1μg/μl) (10μl RiLa中)	
条件5	30μl CVCN [1μg/μl, 水中で希釈] + 1μl 3-C12-OH(1:100)	20μl RiLa	2.5μl mRNA (1μg/μl)	

表 6：トランスフェクション条件：

【0520】

結果：

図10は、GpLucタンパク質が、mRNA構築物R2851でトランスフェクトしたA549細胞において発現したこと、および試験した脂質の添加ありの製剤は、脂質の添加なしの対照と比べた場合、非常に効率的であったことを示す。これは、mRNAと非

常に少量の脂質の組合せによりトランスフェクション効率を高めることができたことを示す。

【実施例 11】

【0521】

実施例 11：A549 細胞におけるいろいろなポリマー - PEG - 脂質の組合せのトランスフェクション効率

この実施例では、A549 細胞（ヒト肺癌細胞株）における、いろいろなポリマー - 脂質製剤のトランスフェクション効率に対する効果の評価を記載する。トランスフェクション効率の読み出し情報として、Gaussia princeps ルシフェラーゼ GpLuc mRNA をカーゴとして使用した。カーゴでの成功裡のトランスフェクションにより、ルシフェラーゼタンパク質の翻訳およびルシフェラーゼタンパク質の細胞培養上清中への分泌がもたらされる。

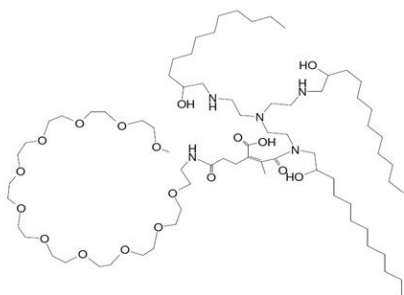
【0522】

したがって、A549 細胞を 24 ウェルプレート内に、75000 細胞 / ウェルの密度で細胞培養培地（Gibco (ThermoFisher) Ham's F-12K (Kaighn's) 培地，10% ウシ胎仔血清（FBS），1% の L - グルタミン，1% のペニシリン / ストレプトマイシン）中に播種した。A549 細胞を二連で、後述するようにしていろいろな担体 - 脂質製剤および GpLuc コード mRNA（配列番号：12；R2851）でトランスフェクトした。陰性対照として、CVCM / PB83 担体なしの GpLuc コード mRNA を使用した。ルシフェラーゼ発現を 24 時間後に定量した。

【0523】

この実際の実施例では、(R12CW)₂ を担体ポリマーとして使用し（2つの R12CW - 単位はシステイン S - S 結合によって共有結合）、ペグ化 3 - C12 - OH 脂質（ChiroBlock, Bitterfeld - Wolfen, Germany）を使用した：

(化)



【0524】

【表 7】

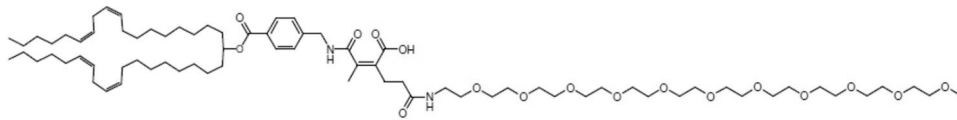
	担体	脂質	mRNA	N/P	
条件 1	15 μl (R12CW) ₂ [0.25g/l]	なし	2.5 μl GpLuc mRNA [5g/l]	0.7	+ 200 μl Rila 無血清培地で 1ml まで フィルアップ 200 μl 添加 / ウェル
条件 2	なし	5 μl ペグ化 3 - C12 - OH [100 μmol/ml]	2.5 μl GpLuc mRNA [5g/l]	0.7	
条件 3	15 μl (R12CW) ₂ [0.25g/l]	5 μl ペグ化 3 - C12 - OH [100 μmol/ml]	2.5 μl GpLuc mRNA [5g/l]	0.7	

表 7：トランスフェクション条件

【0525】

第 2 部では、(R12CW)₂ を担体ポリマーとして使用し（2つの R12CW - 単位は

システイン S - S 結合によって共有結合)、
(化)



(ChiroBlock, Bitterfeld-Wolfen, Germany) を使用した：

【0526】

【表8】

	担体	脂質	mRNA	N/P	
条件4	45 μ l (R1: CW) \pm [0.25 g/l]	なし	2.5 μ l Gpluc mRNA [5 g/l]	0.7	+ 20 μ l RiLa
条件5	なし	5 μ l ペグ化脂質 [100 μ mol/ml]	2.5 μ l Gpluc mRNA [5 g/l]	0.7	無血清培地で 1mlまで フィルアップ
条件6	45 μ l (R1: CW) \pm [0.25 g/l]	5 μ l ペグ化脂質 [100 μ mol/ml]	2.5 μ l Gpluc mRNA [5 g/l]	0.7	200 μ l 添加/ウェル

表8：トランスフェクション条件：

【0527】

結果：

図11Aおよび11Bは、GpLucタンパク質が、mRNA構築物R2851でトランスフェクトしたA549細胞において発現したこと、および試験したペグ化脂質の添加ありの製剤は、脂質の添加なしの対照と比べた場合、非常に効率的であったことを示す。これは、mRNAと非常に少量のペグ化脂質の組合せによりトランスフェクション効率を高めることができたことを示す。

10

20

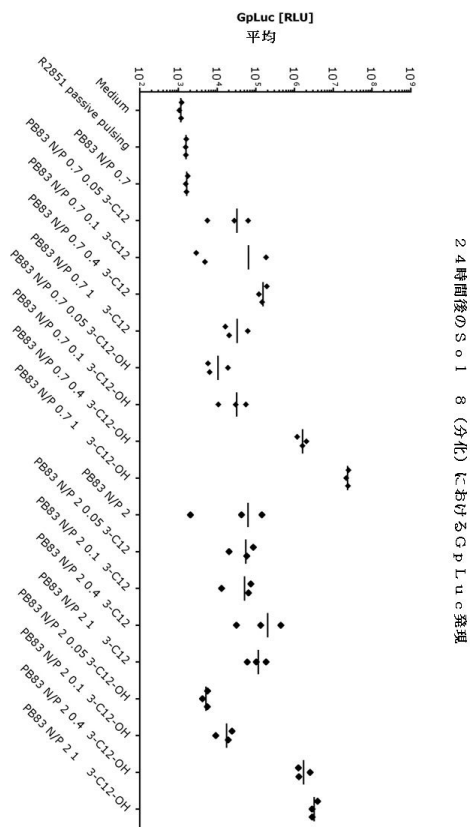
30

40

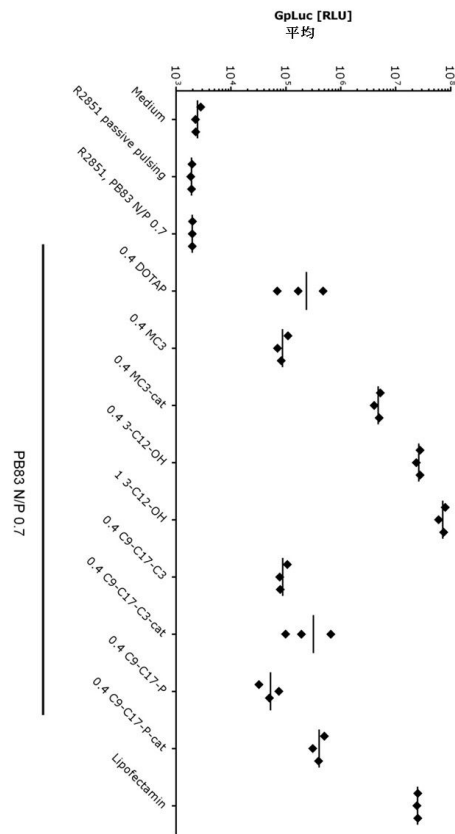
50

【図面】

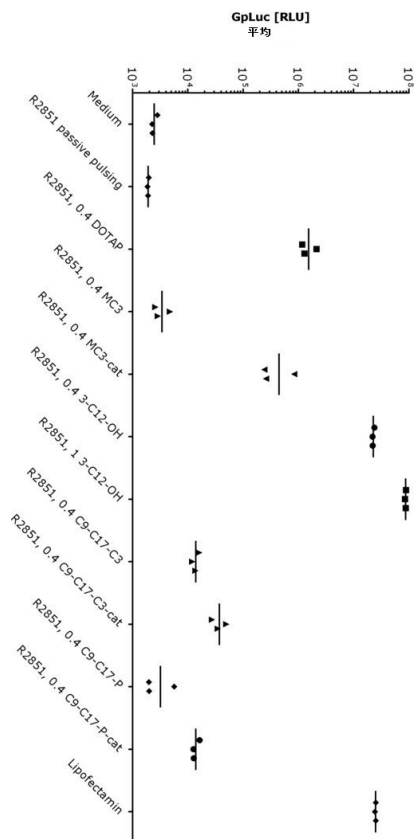
【図 1 A】



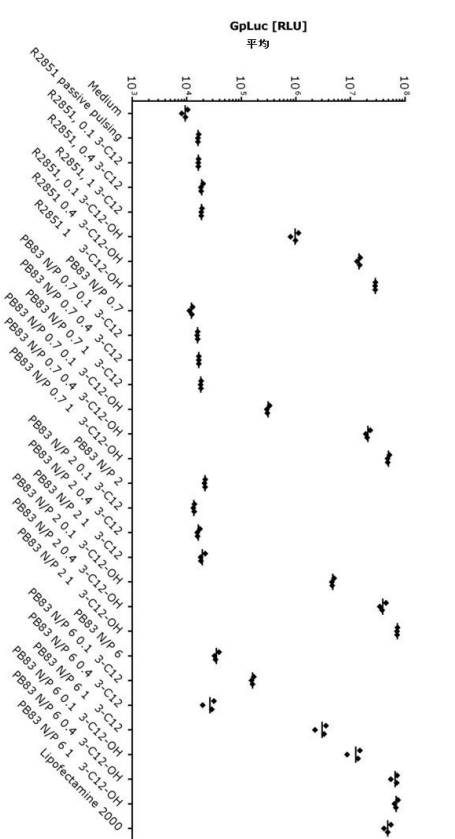
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 2 A】



10

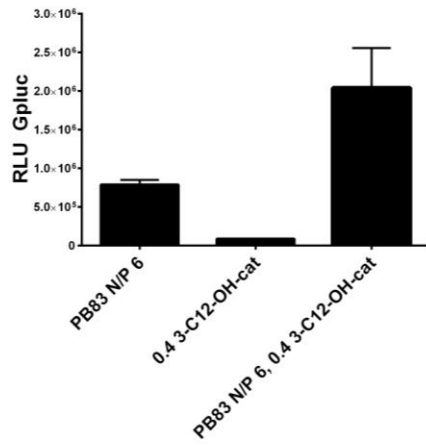
20

30

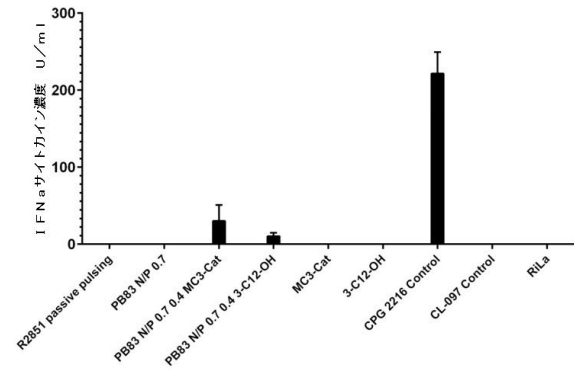
40

50

【 図 2 B 】

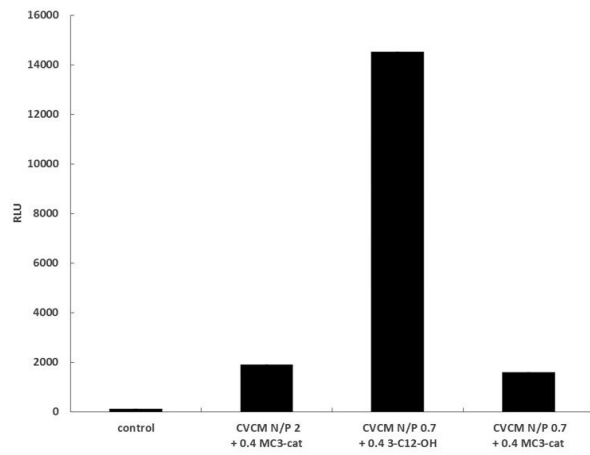


【 図 3 】

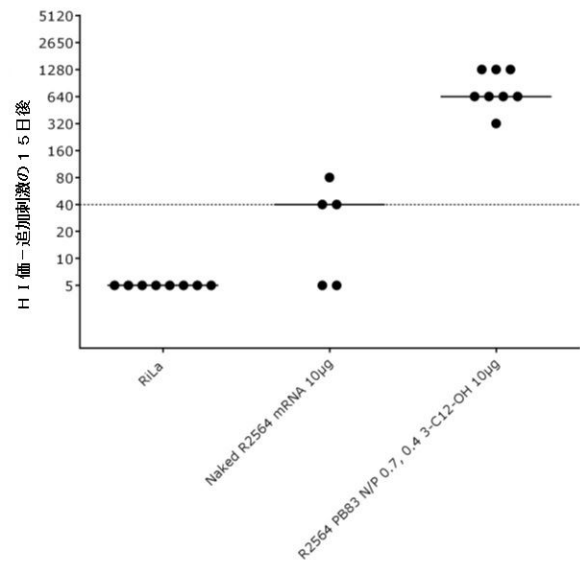


10

【 図 4 】



【 図 5 】



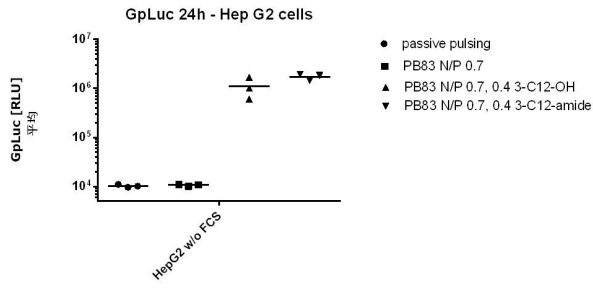
20

30

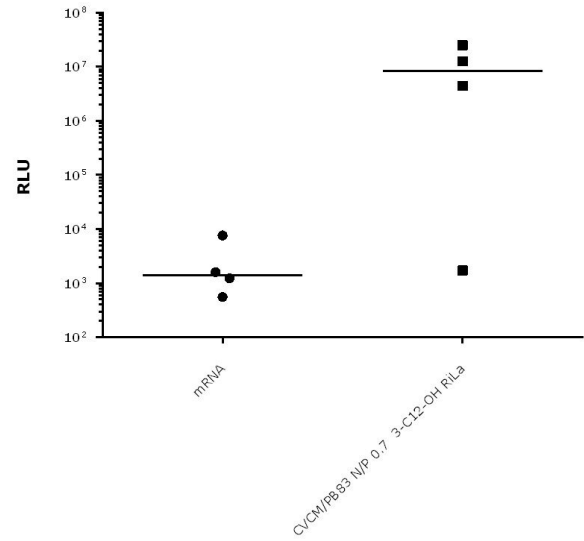
40

50

【 図 8 】

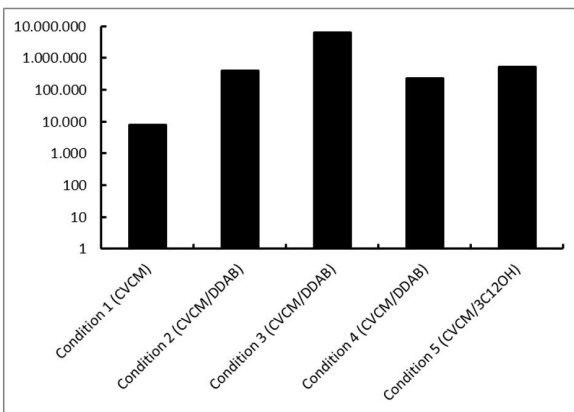


【 図 9 】

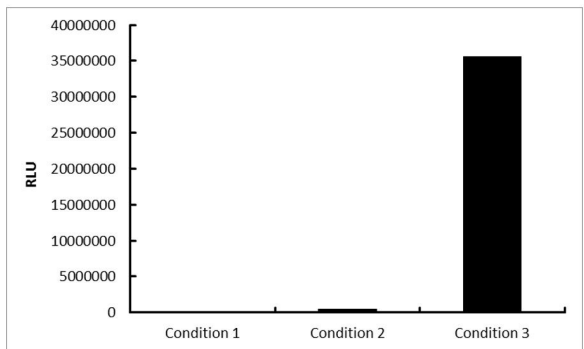


10

【 図 1 0 】



【 図 1 1 A 】



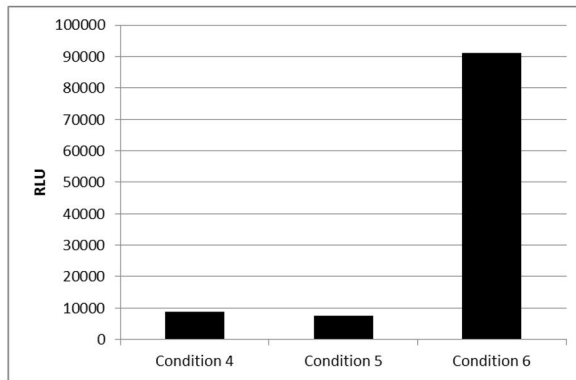
20

30

40

50

【図 11B】



10

【配列表】

0007145579000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/34	(2017.01)	A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K	9/19
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	33/00
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/00
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/02
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	27/16

ンゲン，ヘレンベルガー シュトラセ 5 3

(72)発明者 ライマン，ヨアンナ

ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービンゲン，ケーゼンバッハシュトラセ 1 8

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 1 5 6 7 4 (J P , A)

特表 2 0 1 2 - 5 0 8 2 3 5 (J P , A)

KIM BIEONG-KIL , HOMODIMERIC SV40 NLS PEPTIDE FORMED BY DISULFIDE BOND AS E
NHANCER FOR GENE DELIVERY , BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS , 201
2年07月20日 , VOL:22 , PAGE(S):5415 - 5418 , <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.051>HARDY JOHN G , SYNERGISTIC EFFECTS ON GENE DELIVERY--CO-FORMULATION OF SMA
LL DISULFIDE-LINKED DENDRITIC 以下備考 , ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY ,
英国 , THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY , 2009年02月21日 , VOL:7 , PAGE(S):789 - 7
93 , <http://dx.doi.org/10.1039/B818469K> , POLYCATIONS WITH LIPOFECTAMINE 2000
Bioconjugate Chemistry , 2013年 , Vol.24 , p.1543-1551

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 3 8 / 0 2

A 6 1 K 3 1 / 7 1 1

A 6 1 K 3 1 / 7 1 3

A 6 1 K 3 1 / 7 1 0 5

A 6 1 K 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0