

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6120839号
(P6120839)

(45) 発行日 平成29年4月26日 (2017.4.26)

(24) 登録日 平成29年4月7日 (2017.4.7)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 9/107
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06
A 6 1 K 47/14 (2006.01)	A 6 1 K 47/14
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10

請求項の数 18 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-519088 (P2014-519088)	(73) 特許権者	504389991
(86) (22) 出願日	平成24年7月6日 (2012.7.6)		ノバルティス アーゲー
(65) 公表番号	特表2014-522841 (P2014-522841A)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
(43) 公表日	平成26年9月8日 (2014.9.8)		35
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/045845	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02013/006837		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成25年1月10日 (2013.1.10)	(74) 代理人	100113413
審査請求日	平成27年7月2日 (2015.7.2)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/585,641		
(32) 優先日	平成24年1月11日 (2012.1.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/505,109		
(32) 優先日	平成23年7月6日 (2011.7.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カチオン性水中油型エマルジョン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

連続水相中に分散された粒子を含む安定な水中油型エマルジョンであって、該粒子の平均直径が約 80 nm ~ 150 nm であり；該エマルジョンが油とカチオン性脂質とを含み、ここで：

(i) 油：脂質（モル：モル）の比が少なくとも約 8 : 1（モル：モル）であり；

(i i) 該エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が $2.58 \text{ mM} (1.8 \text{ mg/mL}) \sim 7.16 \text{ mM} (5 \text{ mg/mL})$ であり；および

(i i i) 該カチオン性脂質が 1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン (DOTAP) である、水中油型エマルジョン。

【請求項 2】

油：脂質（モル：モル）の比が約 10 : 1（モル：モル）～約 43 : 1（モル：モル）である、請求項 1 に記載の水中油型エマルジョン。

【請求項 3】

前記水中油型エマルジョンが約 0.2% ~ 約 8% (w/v) の油を含む、請求項 1 または 2 に記載の水中油型エマルジョン。

【請求項 4】

前記油がスクアレンまたはスクアランである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

【請求項 5】

10

20

前記粒子が、さらに界面活性剤を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

【請求項 6】

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、請求項 5 に記載の水中油型エマルジョン。

【請求項 7】

カチオン性水中油型エマルジョンが約 0.01% ~ 約 2.5% (v/v) の界面活性剤を含み、

該界面活性剤が SPAN 85 (ソルピタントリオレート)、Tween 80 (ポリソルベート 80) またはそれらの組合せである、請求項 5 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

10

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョンの調製方法であって、(a) 前記油を約 30 ~ 約 65 の温度まで加熱することによって、前記カチオン性脂質を該油に直接溶解させ、油相を形成すること；(b) 該エマルジョンの水相を提供すること；および(c) 該油相を該水相中に均質化によって分散させることを含む、方法。

【請求項 9】

安定なカチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した RNA 分子を含む組成物であって、該粒子が、25 で液相である油、およびカチオン性脂質を含み；ここで：

(i) 油：脂質 (モル：モル) の比が少なくとも約 8 : 1 (モル：モル) であり；

20

(ii) 該組成物中のカチオン性脂質の濃度が $2.58 \text{ mM} (1.8 \text{ mg/mL}) \sim 7.16 \text{ mM} (5 \text{ mg/mL})$ であり；および

(iii) 該カチオン性脂質が 1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン (DOTAP) である、組成物。

【請求項 10】

前記粒子の平均直径が約 80 nm ~ 150 nm である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記組成物の N/P 比が約 4 : 1 ~ 約 20 : 1 である、請求項 9 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

30

前記水中油型エマルジョンが約 0.1% ~ 約 5% (w/v) の油を含む、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記油がスクアレンまたはスクアランである、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した RNA 分子を含む組成物の調製方法であって：

(i) 請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョンを提供すること；

(ii) 該 RNA 分子を含む水性溶液を提供すること；および

(iii) (i) の該水中油型エマルジョンと (ii) の該水性溶液とを合わせ、それにより該組成物を調製することを含む、調製方法。

40

【請求項 15】

(i) の前記カチオン性水中油型エマルジョンと (ii) の RNA 溶液とを約 1 : 1 (v/v) の比で合わせる、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 RNA 分子を含む前記水性溶液が、スクロース、トレハロース、ソルビトール、デキストロースおよびそれらの組合せからなる群より選択される非イオン性張度調整剤を含む、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 RNA 分子が、2 つ以上の抗原をコードするポリシストロン性 RNA である、請求項

50

9に記載の組成物。

【請求項18】

被験体において免疫応答を生じさせるための、請求項9～13および17のいずれか1項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2011年7月6日に出願された米国仮出願第61/505,109号、2011年10月1日に出願された米国仮出願第61/545,936号および2012年1月1日に出願された米国仮出願第61/585,641号の利益を主張し、上記各特許出願の全内容は本明細書に参考として援用される。

【0002】

配列表

本出願は配列表を含み、当該配列表はASCII形式でEFS-Webによって提出し、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。前記ASCIIのコピー(2012年7月5日に作成)のファイル名はPAT54691.txtであり、424,203バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

核酸治療剤は、遺伝性障害から後天性状態の範囲の疾患、例えば、がん、感染性障害(AIDS)、心疾患、関節炎、および神経変性障害(例えば、パーキンソン病およびアルツハイマー病)などの処置に関して有望である。遺伝的欠損を修復するか、または外来遺伝子産物の発現を誘導するために機能遺伝子を送達することができるだけでなく、内在性遺伝子発現を阻害することによって、治療効果をもたらすために核酸を送達することもできる。遺伝子発現の阻害は、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、二本鎖RNA(例えば、siRNA、miRNA)、またはリボザイムによって媒介され得る。

【0004】

このような療法の重要なステップは、in vivoで細胞内に核酸分子を送達することである。しかし、核酸分子、特に、RNA分子のin vivo送達は、いくつかの技術的なハードルに直面する。第1に、細胞性ヌクレアーゼおよび血清ヌクレアーゼのために、in vivoで注入されるRNAの半減期は、わずか約70秒である(例えば、非特許文献1を参照)。化学修飾を使用することによって、注入されるRNAの安定性を増大させる努力が行われているが、化学的变化が細胞傷害作用を増大させるか、または機能を喪失もしくは低下させるいくつかの事例が存在する。一具体例では、細胞は、刻々とホスフェートがホスホロチオエートによって置換されるRNA二本鎖の投与に耐性ではない(非特許文献2)。したがって、治療応答を誘発するのに、in vivoで十分な量であるが、宿主に対して毒性ではない核酸分子(特に、RNA分子)を送達することができる送達システムを開発する必要がある。

【0005】

核酸ベースのワクチンは、ワクチン接種に対する魅力的な手法である。例えば、抗原をコードするプラスミドDNAの筋肉内(IM)免疫化は、細胞性免疫応答および体液性免疫応答を誘導し、チャレンジから保護することができる。DNAワクチンは、タンパク質抗原を使用する従来のワクチン、または弱毒化病原体に勝るある特定の利点を提供する。例えば、タンパク質ワクチンと比較した場合、DNAワクチンは、そのネイティブコンホメーションにおいて適切に折り畳まれた抗原を産生させ、細胞性免疫応答を生じさせることにおいてより有効となり得る。DNAワクチンにはまた、死滅病原体または弱毒化病原体に付随するいくつかの安全性問題がない。例えば、死滅ウイルス調製物は、残留性の生存ウイルスを含有する場合があります。弱毒化ウイルスは、病原性表現型に変異または復帰す

10

20

30

40

50

る場合がある。

【0006】

核酸ベースのワクチンの1つの限界は、非ヒト霊長類およびヒトにおいて強力な免疫応答を得るために大用量の核酸が一般に必要とされることである。したがって、核酸ベースのワクチンの効力を増強させるための送達システムおよびアジュバントが必要とされる。細胞内に核酸分子を導入するための様々な方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン (polybrene) トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、およびリポフェクションなどが開発されている。

【0007】

カチオン性脂質は、細胞内に遺伝子を送達するために、リポソームとして製剤化されている。さらに、細胞内にDNA分子を送達するためのカチオン性脂質エマルジョンが開発されている。例えば、非特許文献3を参照。

【0008】

非特許文献4は、DNAの送達システム/アジュバントとしてカチオン性サブミクロンエマルジョンを伴う手法を記載している。サブミクロンエマルジョン手法は、大規模に製造され、商業的に認可された製品Fluad (登録商標)の成分である強力な水中スクアレンアジュバントであるMF59に基づく。1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン (DOTAP) が、プラスミドDNAの細胞内送達を促進するのに使用された。

【0009】

非特許文献5には、ダイズ油およびカチオン性脂質としてDOTAPが使用されたカチオン性水中油型エマルジョンが開示されている。また、一部のエマルジョンにはコレステロール、DOPEおよび高分子脂質も含まれた。このエマルジョンは、最大90%までの血清の存在下でDNAの*in vitro*トランスフェクションの効率を増強させることが示された。エマルジョン粒子の平均サイズは181nm~344nmの範囲であり、エマルジョンをPBSバッファー中で希釈すると粒子サイズが増大した。

【0010】

非特許文献6および非特許文献7には、DNA分子の*in vitro*および*in vivo*でのトランスフェクション効率を増強させるために使用された様々な水中油型エマルジョンが開示されている。試験したカチオン性脂質の中ではDOTAPで、DNA送達のための最も安定で効率的なエマルジョンが形成された。試験した油の中では、スクアレン、軽質鉱油およびホホバ豆油で、小粒子を有する安定なエマルジョンが形成された。*in vitro*トランスフェクションの効率は、エマルジョンの安定性と相関していることが示された (例えば、100mg/mLのスクアレンと24mg/mLのDOTAPを配合したエマルジョンでは、高い*in vitro*トランスフェクション効率が示された)。エマルジョンは、まずカチオン性脂質を水と混合し、リポソーム懸濁液を (超音波処理によって) 形成することにより調製された。次いで、リポソームを油 (スクアレンなど) に添加し、混合物を超音波処理し、水中油型エマルジョンが形成された。

【0011】

抗原またはその誘導体をコードするRNA分子も、ワクチンとして使用することができる。RNAワクチンは、DNAワクチンと比較した場合、ある特定の利点を提供する。しかし、DNAベースのワクチンと比較して、RNAベースのワクチンに寄せられる関心は相対的に軽微である。RNAは、治療剤またはワクチンとして投与される場合、ヌクレアーゼによる分解に非常に感受性である。さらに、RNAは、細胞内に能動的に輸送されない。例えば、非特許文献8を参照。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Kurreck, Eur. J. Bioch. (2003年) 27

10

20

30

40

50

0 卷 : 1 6 2 8 ~ 4 4 頁

【非特許文献2】Harborthら、Antisense Nucleic Acid Drug Rev. (2003年)13巻(2号):83~105頁

【非特許文献3】Kimら、International Journal of Pharmaceutics、(2005年)295巻、35~45頁

【非特許文献4】Ottら、Journal of Controlled Release、2002年、79巻、1~5頁

【非特許文献5】Yiら、Pharmaceutical Research(2000)17巻、314~320頁

【非特許文献6】Kimら、Pharmaceutical Research(2001)18巻、54~60頁 10

【非特許文献7】Chungら、Journal of Controlled Release(2001)71巻、339~350頁

【非特許文献8】Vajdy, M.ら、Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines、Immunol Cell Biol、2004年、82巻(6号):617~27頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

20

したがって、核酸分子または他の負に荷電した分子の送達システムを提供する必要がある。送達システムは、核酸ベースのワクチン、特に、RNAベースのワクチンに有用である。

【課題を解決するための手段】

【0014】

発明の概要

本発明は、高濃度のカチオン性脂質を含んでおり、規定の油：脂質比を有するカチオン性水中油型エマルジョンに関する。油とカチオン性脂質とはエマルジョンの別々の成分であり、好ましくは、油はイオン性でない。該カチオン性脂質は、負に荷電した分子と相互作用し、それにより、該分子を該エマルジョン粒子につなぎ留めることができる。本明細書に記載されるカチオン性エマルジョンは、核酸分子などの負に荷電した分子(例えば、抗原をコードするRNA分子)の細胞への送達、および核酸ベースのワクチンの製剤化に有用である。

30

【0015】

一態様において、本発明は、連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンであって、該エマルジョンが：(a)前記粒子の平均直径が約80nm~180nmの直径であり；(b)該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含み、ここで(i)油：カチオン性脂質(モル：モル)の比が少なくとも約8：1(モル：モル)であり、(ii)前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約2.5mMである、(iii)ただし、該カチオン性脂質はDC-コレステロールではないことを特徴とする水中油型エマルジョンを提供する。好ましくは、該水中油型エマルジョンは安定なものである。いくつかの実施形態では、油：脂質(モル：モル)の比が約10：1(モル：モル)~約43：1(モル：モル)である。該水中油型エマルジョンは約0.2%~約8%(w/v)の油を含み得る。いくつかの実施形態では、油がスクアレレンまたはスクアランである。

40

【0016】

別の態様では、本発明は、連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンであって、該エマルジョンが：(a)前記粒子の平均直径が約80nm~180nmの直径であり；(b)該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含み、ここで(i)油：カチオン性脂質(モル：モル)の比が少なくとも約4：1(モル：モル)であり、(ii)前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約2.5mMであり、(iii)該油

50

が約 0.2% ~ 約 8% (w/v) 存在する；(iv) ただし、該カチオン性脂質は DC - コレステロールではないことを特徴とする水中油型エマルジョンを提供する。好ましくは、該水中油型エマルジョンは安定なものである。いくつかの実施形態では、油：脂質（モル：モル）の比が約 4：1（モル：モル）~ 約 43：1（モル：モル）である。いくつかの実施形態では、油がスクアレンまたはスクアランである。いくつかの実施形態では、該油が 0.6% ~ 4% (w/v) 存在する。いくつかの実施形態では、該油が約 1% ~ 約 3.2% (w/v) 存在する。

【0017】

この態様の水中油型エマルジョンに、さらに、非イオン性界面活性剤などの界面活性剤を含めてもよい。好ましくは、界面活性剤はポリエチレングリコール (PEG) - 脂質でない。界面活性剤は約 0.01% ~ 約 2.5% (w/v) の量で存在させ得る。いくつかの実施形態では、界面活性剤は SPAN 85 (ソルビタントリオレエート (Sorbitan Trioleate))、Tween 80 (ポリソルベート 80) またはそれらの組合せである。いくつかの実施形態では、該水中油型エマルジョンは、等しい量の SPAN 85 (ソルビタントリオレエート) と Tween 80 (ポリソルベート 80) を含む (例えば、各々、0.5% (w/v))。

10

【0018】

好ましくは、カチオン性脂質の頭部 (head group) は第 4 級アミンを含む。例えば、いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は：1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン (DOTAP)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (DOEPC)、N, N - ジオレオイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、および N - [1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ) プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) からなる群より選択される。

20

【0019】

いくつかの実施形態では、該エマルジョンは：(a) 該エマルジョン粒子の平均直径が約 80 nm ~ 180 nm の直径であり；(b) 該エマルジョンが油と DOTAP を含み、ここで (i) 油：DOTAP (モル：モル) の比が少なくとも約 8：1 (モル：モル) であり、(ii) 前記エマルジョン中の DOTAP の濃度が少なくとも約 2.58 mM (1.8 mg/mL) または約 2.58 mM (1.8 mg/mL) ~ 約 7.16 mM (5 mg/mL) であることを特徴とする。油はスクアレンまたはスクアランであり得る。

30

【0020】

いくつかの実施形態では、該エマルジョンは：(a) 該エマルジョン粒子の平均直径が約 80 nm ~ 180 nm の直径であり；(b) 該エマルジョンが油と DOTAP を含み、ここで (i) 油：DOTAP (モル：モル) の比が少なくとも約 4：1 (モル：モル) であり、(ii) 前記エマルジョン中の DOTAP の濃度が少なくとも約 2.58 mM (1.8 mg/mL) であり、(iii) 該油が約 0.2% ~ 約 8% (w/v) 存在することを特徴とする。いくつかの実施形態では、油がスクアレンまたはスクアランである。いくつかの実施形態では、DOTAP の濃度が約 2.58 mM (1.8 mg/mL) ~ 約 7.16 mM (5 mg/mL)。いくつかの実施形態では、該油が 0.6% ~ 4% (w/v) 存在する。いくつかの実施形態では、該油が約 1% ~ 約 3.2% (w/v) 存在する。

40

【0021】

また、本発明は、連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンの調製方法であって、該エマルジョンが：(a) 前記粒子の平均直径が約 80 nm ~ 180 nm の直径であり；(b) 該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含み、ここで (i) 油：カチオン性脂質 (モル：モル) の比が少なくとも約 8：1 (モル：モル) であり、(ii) 前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約 2.5 mM である、(iii) ただし、該カチオン性脂質は DC - コレステロールではないことを特徴とし、(a) カチオン性脂質を油に直接溶解させ、油相を形成すること；(b) エマルジョンの水相を提供すること；および (c) 該油相を該水相中に均質化によって分散させることを含む方法を提

50

供する。油は、油へのカチオン性脂質の溶解を助長させるため約30～約65の温度まで加熱され得る。また、油またはカチオン性脂質の顕著な分解がない限り、さらに高温を使用してもよい。

【0022】

また、本発明は、連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンの調製方法であって、該エマルジョンが：(a)前記粒子の平均直径が約80nm～180nmの直径であり；(b)該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含み、ここで(i)油：カチオン性脂質(モル：モル)の比が少なくとも約4：1(モル：モル)であり、(ii)前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約2.5mMであり、(iii)該油が約0.2%～約8%(w/v)存在する；(iv)ただし、該カチオン性脂質はDC-コレステロールではないことを特徴とし、(a)カチオン性脂質を油に直接溶解させ、油相を形成すること；(b)エマルジョンの水相を提供すること；および(c)該油相を該水相中に均質化によって分散させることを含む方法を提供する。油は、油へのカチオン性脂質の溶解を助長させるため約30～約65の温度まで加熱され得る。また、油またはカチオン性脂質の顕著な分解がない限り、さらに高温を使用してもよい。

10

【0023】

別の態様では、本発明は、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した核酸分子(好ましくは、RNA分子)を含む組成物であって、該粒子が、25で液相である油、およびカチオン性脂質を含み；(i)油：脂質(モル：モル)の比が少なくとも約8：1(モル：モル)であり；(ii)前記組成物中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約1.25mMである；(iii)ただし、該カチオン性脂質はDC-コレステロールでないものとする組成物を提供する。好ましくは、エマルジョン粒子の平均直径は約80nm～180nm、または約80nm～150nm、または約80nm～約130nmであり、該組成物のN/P比は少なくとも約4：1、または約4：1～約20：1、または約4：1～約15：1である。ある特定の実施形態では、油：脂質(モル：モル)の比が約10：1(モル：モル)～約43：1(モル：モル)である。該水中油型エマルジョンは約0.1%～約5%(w/v)の油を含み得る。いくつかの実施形態では、油がスクアレンまたはスクアランである。

20

【0024】

別の態様では、本発明は、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した核酸分子(好ましくは、RNA分子)を含む組成物であって、該粒子が、25で液相である油、およびカチオン性脂質を含むものであり；(i)油：脂質(モル：モル)の比が少なくとも約4：1(モル：モル)であり；(ii)前記組成物中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約1.25mMであり；(iii)該油が約0.1%～約4%(w/v)存在する；(iv)ただし、該カチオン性脂質はDC-コレステロールでない、組成物を提供する。好ましくは、エマルジョン粒子の平均直径は約80nm～180nm、または約80nm～150nm、または約80nm～約130nmであり、該組成物のN/P比は少なくとも約4：1、または約4：1～約20：1、または約4：1～約15：1である。ある特定の実施形態では、油：脂質(モル：モル)の比が約4：1(モル：モル)～約43：1(モル：モル)である。いくつかの実施形態では、油がスクアレンまたはスクアランである。いくつかの実施形態では、該油が0.6%～4%(w/v)存在する。いくつかの実施形態では、該油が約1%～約3.2%(w/v)存在する。

30

40

【0025】

この態様の水中油型エマルジョンに、さらに、非イオン性界面活性剤などの界面活性剤を含めてもよい。好ましくは、界面活性剤はポリエチレングリコール(PEG)-脂質でない。界面活性剤は、約0.005%～約1.25%(w/v)の量で存在させ得る。いくつかの実施形態では、界面活性剤がSPAN85(ソルピタントリオレート)、Tween80(ポリソルベート80)またはそれらの組合せである。いくつかの実施形態では、該水中油型エマルジョンは、等しい量のSPAN85(ソルピタントリオレート)とTween80(ポリソルベート80)を含む(例えば、各々、0.25%または0.

50

5% (w/v))。

【0026】

好ましくは、カチオン性脂質の頭部は第4級アミンを含む。例えば、いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は：1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニオ)プロパン (DOTAP)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (DOEPC)、N, N - ジオレオイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、および N - [1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ)プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) からなる群より選択される。

【0027】

いくつかの実施形態では、本発明は、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した核酸分子 (好ましくは、RNA分子) を含む組成物であって、該粒子が25で液相である油とDOTAPとを含み；(i) 油：DOTAP (モル：モル) の比が少なくとも約8：1 (モル：モル) であり；(ii) 前記組成物中のDOTAPの濃度が少なくとも約1.29 mM、または約1.29 mM (0.9 mg/mL) ~ 約3.58 mM (2.5 mg/mL) である組成物を提供する。油はスクアレンまたはスクアランであり得る。必要に応じて、N/P比は少なくとも4：1である。

10

【0028】

好ましい実施形態では、該組成物は (例えば、クエン酸バッファー、コハク酸バッファー、酢酸バッファーで) 緩衝化されており、約6.0 ~ 約8.0、好ましくは約6.2 ~ 約6.8のpHを有する。該組成物にさらに無機塩を含めてもよく、無機塩の濃度は好ましくは30 mM以下である。必要に応じて、該組成物はさらに非イオン性張度調整剤を含んでいてもよく、好ましくは等張性である。

20

【0029】

また、本発明は、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した核酸分子 (好ましくは、RNA分子) を含む組成物の調製方法であって：(i) 本明細書に記載されるとおりの水中油型エマルジョンを提供すること；(ii) 該RNA分子を含む水性溶液を提供すること；および(iii) (i) の水中油型エマルジョンと(ii) の水性溶液とを合わせ、それにより該組成物を調製することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、カチオン性水中油型エマルジョンとRNA溶液を約1：1 (v/v) の比で合わせる。RNA分子を含む該水性溶液は好ましくは (例えば、クエン酸バッファー、コハク酸バッファー、酢酸バッファーで) 緩衝化されており、無機塩 (例えば、NaCl) を含むことができ、該無機塩は好ましくは約20 mM以下で存在する。一実施形態において、RNA分子を含む該水性溶液は、2 mMのクエン酸バッファーと20 mMのNaClとを含む。必要に応じて、RNA分子を含む該水性溶液は、さらに非イオン性張度調整剤を含み、等張性である。一実施形態において、該水性溶液はさらに約560 mMのスクロースを含む。必要に応じて、RNA分子を含む該水性溶液はさらに、ポリマーまたは非イオン性界面活性剤、例えば、Pluronic (登録商標) F127を、約0.05% ~ 約20% (w/v) で含む。

30

【0030】

別の態様では、本発明は、連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンであって、該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含むものであり、前記粒子の平均直径が約80 nm ~ 180 nmであり、該油が0.6% ~ 4% (w/v) 存在し；前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約1.25 mMである、水中油型エマルジョンを提供する。好ましくは、該水中油型エマルジョンは安定なものである。いくつかの実施形態では、前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度は少なくとも約2.5 mMである。いくつかの実施形態では、油がスクアレンまたはスクアランである。

40

【0031】

この態様の水中油型エマルジョンに、さらに、非イオン性界面活性剤などの界面活性剤を含めてもよい。好ましくは、界面活性剤はポリエチレングリコール (PEG) - 脂質でない。界面活性剤は、約0.01% ~ 約2.5% (w/v) の量で存在させ得る。いくつ

50

かの実施形態では、界面活性剤がSPAN 85（ソルビタントリオレート）、Tween 80（ポリソルベート80）またはそれらの組合せである。いくつかの実施形態では、該水中油型エマルジョンは、等しい量のSPAN 85（ソルビタントリオレート）とTween 80（ポリソルベート80）を含む（例えば、各々、0.25%または0.5%（w/v））。

【0032】

好ましくは、カチオン性脂質の頭部は第4級アミンを含む。例えば、いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は：1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEP C)、N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、およびN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)からなる群より選択される。

10

【0033】

本発明は、連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した核酸分子（好ましくは、RNA分子）を含む組成物であって、該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含み、前記粒子の平均直径が約80nm~180nmであり、該油が0.6%~4%（w/v）存在し；前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約1.25mMである、組成物を提供する。好ましくは、該水中油型エマルジョンは安定なものである。いくつかの実施形態では、前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度は少なくとも約2.5mMである。いくつかの実施形態では、油はスクアレンまたはスクアランである。好ましくは、該組成物のN/P比は少なくとも約4:1である。

20

【0034】

好ましい実施形態では、該組成物は、（例えば、クエン酸バッファー、コハク酸バッファー、酢酸バッファーで）緩衝化されており、約6.0~約8.0、好ましくは約6.2~約6.8のpHを有する。該組成物にさらに無機塩を含めてもよく、無機塩の濃度は好ましくは30mM以下である。必要に応じて、該組成物はさらに非イオン性張度調整剤を含んでもよく、好ましくは等張性である。

【0035】

また、本発明は、被験体において免疫応答を生じさせる方法であって、本明細書に記載されるとおりの組成物を、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法に関する。好ましくは、単回投与で被験体に投与される（該組成物の一成分として）カチオン性脂質の量は約30mg以下である。特定の実施形態では、カチオン性脂質がDOTAPであり、単回投与で被験体に投与されるDOTAPの総量が約24mg以下または約4mg以下である。

30

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンであって、該粒子の平均直径が約80nm~180nmであり；該エマルジョンが油とカチオン性脂質とを含み、ここで

：

(i) 油：脂質（モル：モル）の比が少なくとも約8：1（モル：モル）であり；

40

(ii) 該エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約2.5mMであり；

および

(iii) 該カチオン性脂質がDC-コレステロールではない、水中油型エマルジョン

。

(項目2)

前記粒子の平均直径が約80nm~約150nmである、項目1に記載の水中油型エマル

ジョン。

(項目3)

前記粒子の平均直径が約80nm~約130nmである、項目1または2に記載の水中油

50

(項目4)

前記水中油型エマルジョンが安定である、項目1～3のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目5)

油：脂質（モル：モル）の比が約10：1（モル：モル）～約43：1（モル：モル）である、項目1～4のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目6)

前記水中油型エマルジョンが約0.2%～約8%（w/v）の油を含む、項目1～5のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目7)

前記油がスクアレンまたはスクアランである、項目1～6のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目8)

前記粒子が、さらに界面活性剤を含む、項目1～7のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目9)

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、項目8に記載の水中油型エマルジョン。

(項目10)

前記界面活性剤がポリエチレングリコール（PEG）-脂質でない、項目8または9に記載の水中油型エマルジョン。

(項目11)

カチオン性水中油型エマルジョンが約0.01%～約2.5%（v/v）の界面活性剤を含む、項目8～10のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目12)

前記界面活性剤がSPAN85（ソルビタントリオレート）、Tween80（ポリソルベート80）またはそれらの組合せである、項目8～11のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目13)

カチオン性水中油型エマルジョンが約0.5%（v/v）のTween80および約0.5%（v/v）のSPAN85を含む、項目12に記載の水中油型エマルジョン。

(項目14)

前記カチオン性脂質の頭部が第4級アミンを含む、項目1～13のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目15)

前記カチオン性脂質が：1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEPIC)、N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、およびN-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)からなる群より選択される、項目1～13のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目16)

前記カチオン性脂質がDOTAPである、項目15に記載の水中油型エマルジョン。

(項目17)

前記エマルジョン中のDOTAPの濃度が少なくとも約2.58mM(1.8mg/mL)である、項目16に記載の水中油型エマルジョン。

(項目18)

前記エマルジョン中のDOTAPの濃度が約2.58mM(1.8mg/mL)～約7.16mM(5mg/mL)である、項目16に記載の水中油型エマルジョン。

(項目19)

項目1～18のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョンの調製方法であって、(a)

10

20

30

40

50

前記カチオン性脂質を前記油に直接溶解させ、油相を形成すること；(b)該エマルジョンの水相を提供すること；および(c)該油相を該水相中に均質化によって分散させることを含む、方法。

(項目20)

ステップ(a)がさらに、前記油を約30～約65の温度まで加熱することを含む、項目19に記載の方法。

(項目21)

カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成したRNA分子を含む組成物であって、該粒子が、25で液相である油、およびカチオン性脂質を含み；ここで：

(i)油：脂質(モル：モル)の比が少なくとも約8：1(モル：モル)であり；

(ii)該組成物中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約1.25mMであり；および

(iii)該カチオン性脂質がDC-コレステロールではない、組成物。

(項目22)

前記粒子の平均直径が約80nm～180nmである、項目21に記載の組成物。

(項目23)

前記粒子の平均直径が約80nm～150nmである、項目21に記載の組成物。

(項目24)

前記粒子の平均直径が約80nm～約130nmである、項目21に記載の組成物。

(項目25)

前記組成物のN/P比が少なくとも約4：1である、項目21～24のいずれか1項に記載の組成物。

(項目26)

前記組成物のN/P比が約4：1～約20：1である、項目21～24のいずれか1項に記載の組成物。

(項目27)

前記組成物のN/P比が約4：1～約15：1である、項目21～24のいずれか1項に記載の組成物。

(項目28)

油：脂質(モル：モル)の比が約10：1(モル：モル)～約43：1(モル：モル)である、項目21～27のいずれか1項に記載の組成物。

(項目29)

前記水中油型エマルジョンが約0.1%～約5%(w/v)の油を含む、項目21～28のいずれか1項に記載の組成物。

(項目30)

前記油がスクアレンまたはスクアランである、項目29に記載の組成物。

(項目31)

前記粒子が、さらに界面活性剤を含む、項目21～30のいずれか1項に記載の組成物。

(項目32)

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、項目31に記載の組成物。

(項目33)

前記界面活性剤がポリエチレングリコール(PEG)-脂質ではない、項目31または32に記載の組成物。

(項目34)

前記カチオン性水中油型エマルジョンが約0.005%～約1.25%(v/v)の界面活性剤を含む、項目31～33のいずれか1項に記載の組成物。

(項目35)

前記界面活性剤がSPAN85(ソルビタントリオレート)、Tween80(ポリソルベート80)またはそれらの組合せである、項目31～33のいずれか1項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(項目36)

前記カチオン性水中油型エマルジョンが約0.25% (v/v)のTween80および約0.25% (v/v)のSPAN85を含む、項目35に記載の組成物。

(項目37)

前記カチオン性脂質の頭部が第4級アミンを含む、項目21~36のいずれか1項に記載の組成物。

(項目38)

前記カチオン性脂質が：1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEPIC)、N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、およびN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)からなる群より選択される、項目21~36のいずれか1項に記載の組成物。

10

(項目39)

前記カチオン性脂質がDOTAPである、項目38に記載の組成物。

(項目40)

前記組成物中のDOTAPの濃度が少なくとも約1.29mM(0.9mg/mL)である、項目39に記載の組成物。

(項目41)

前記組成物中のDOTAPの濃度が約1.29mM(0.9mg/mL)~約3.58mM(2.5mg/mL)である、項目39に記載の組成物。

20

(項目42)

前記RNA分子が、抗原をコードする自己複製RNA分子である、項目21~41のいずれか1項に記載の組成物。

(項目43)

前記自己複製RNAがアルファウイルス由来RNAレプリコンである、項目42に記載の組成物。

(項目44)

カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成したRNA分子を含む組成物の調製方法であって：

30

(i)項目1~18のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョンを提供すること；

(ii)該RNA分子を含む水性溶液を提供すること；および

(iii)(i)の該水中油型エマルジョンと(ii)の該水性溶液とを合わせ、それにより該組成物を調製することを含む、調製方法。

(項目45)

(i)の前記カチオン性水中油型エマルジョンと(ii)のRNA溶液とを約1:1(v/v)の比で合わせる、項目44に記載の方法。

(項目46)

前記RNA分子を含む前記水性溶液が塩を含む、項目44または45に記載の方法。

(項目47)

前記塩がNaClである、項目46に記載の方法。

40

(項目48)

前記水性溶液が約20mMのNaClを含む、項目47に記載の方法。

(項目49)

前記RNA分子を含む前記水性溶液がバッファーである、項目44~48のいずれか1項に記載の方法。

(項目50)

前記バッファーがクエン酸バッファーである、項目49に記載の方法。

(項目51)

前記バッファーが約2mMのクエン酸塩を含む、項目50に記載の方法。

50

(項目52)

前記RNA分子を含む前記水性溶液が非イオン性張度調整剤を含む、項目44～51のいずれか1項に記載の方法。

(項目53)

前記非イオン性張度調整剤が糖または糖アルコールである、項目52に記載の方法。

(項目54)

前記非イオン性張度調整剤が、スクロース、トレハロース、ソルビトール、デキストロースおよびそれらの組合せからなる群より選択される、項目53に記載の方法。

(項目55)

前記非イオン性張度調整剤がスクロースである、項目52に記載の方法。

10

(項目56)

前記水性溶液が約560mMのスクロースを含む、項目55に記載の方法。

(項目57)

前記RNA分子を含む前記水性溶液がポリマーを含む、項目44～56のいずれか1項に記載の方法。

(項目58)

前記ポリマーがPluronic(登録商標)F127である、項目57に記載の方法。

(項目59)

前記水性溶液が約0.05%～約20%(w/v)のポリマーを含む、項目57または58に記載の方法。

20

(項目60)

前記水性溶液が約1%(w/v)のPluronic(登録商標)F127を含む、項目57～59のいずれか1項に記載の方法。

(項目61)

連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンであって、該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含み、前記粒子の平均直径が約80nm～180nmであり、該油が0.6%～4%(w/v)存在し；前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約1.25mMである、水中油型エマルジョン。

(項目62)

前記水中油型エマルジョンが安定である、項目61に記載の水中油型エマルジョン。

30

(項目63)

前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約2.5mMである、項目61または62に記載の水中油型エマルジョン。

(項目64)

前記油がスクアレンまたはスクアランである、項目61～63のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目65)

前記粒子が、さらに界面活性剤を含む、項目61～64のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目66)

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、項目65に記載の水中油型エマルジョン。

40

(項目67)

前記界面活性剤がポリエチレングリコール(PEG)-脂質ではない、項目66に記載の水中油型エマルジョン。

(項目68)

前記カチオン性水中油型エマルジョンが約0.01%～約2.5%(v/v)の界面活性剤を含む、項目65～67のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目69)

前記界面活性剤がSPAN85(ソルビタントリオレート)、Tween80(ポリソ

50

ルベート 80) またはそれらの組合せである、項目 65 ~ 68 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 70)

前記カチオン性脂質の頭部が第 4 級アミンを含む、項目 61 ~ 69 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 71)

前記カチオン性脂質が：1, 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン (DOTAP)、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (DOEPC)、N, N - ジオレオイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、および N - [1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ) プロピル] - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) からなる群より選択される、項目 61 ~ 69 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

10

(項目 72)

前記カチオン性脂質が DOTAP である、項目 71 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 73)

項目 61 ~ 72 のいずれか 1 項に記載のカチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した RNA 分子を含む組成物。

(項目 74)

前記組成物の N / P 比が少なくとも約 4 : 1 である、項目 73 に記載の組成物。

(項目 75)

前記組成物の N / P 比が約 4 : 1 ~ 約 20 : 1 である、項目 73 に記載の組成物。

20

(項目 76)

前記組成物の N / P 比が約 4 : 1 ~ 約 15 : 1 である、項目 73 に記載の組成物。

(項目 77)

前記 RNA 分子が、抗原をコードする自己複製 RNA 分子である、項目 73 ~ 76 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 78)

前記自己複製 RNA がアルファウイルス由来 RNA レプリコンである、項目 77 に記載の組成物。

(項目 79)

前記エマルジョン粒子の平均直径が約 80 nm ~ 約 180 nm である、項目 73 ~ 78 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

(項目 80)

前記組成物が緩衝化されており、約 6.0 ~ 約 8.0 の pH を有する、項目 21 ~ 43 および 73 ~ 79 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 81)

前記組成物がさらに無機塩を含み、該無機塩の濃度が 30 mM 以下である、項目 21 ~ 43 および 73 ~ 80 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 82)

前記組成物がさらに非イオン性張度調整剤を含み、等張性である、項目 21 ~ 43 および 73 ~ 81 に記載の組成物。

40

(項目 83)

前記水中油型エマルジョンが安定である、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 84)

カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した RNA 分子を含む組成物であって：

(i) 項目 61 ~ 72 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョンを提供すること；

(ii) 該 RNA 分子を含む水性溶液を提供すること；および

(iii) (i) の該水中油型エマルジョンと (ii) の該水性溶液とを合わせ、それ

50

により該組成物を調製することを含むプロセスを用いて調製される、組成物。

(項目 8 5)

前記RNA分子が、2つ以上の抗原をコードするポリシストロン性RNAである、項目 2 1 ~ 4 3、7 3 ~ 8 2 および 8 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 8 6)

前記ポリシストロン性RNAがアルファウイルスレプリコンである、項目 8 5 に記載の組成物。

(項目 8 7)

前記アルファウイルスレプリコンが、第 1 の抗原をコードする第 1 のヌクレオチド配列および第 2 の抗原をコードする第 2 のヌクレオチド配列を含み、該第 1 のヌクレオチド配列および該第 2 のヌクレオチド配列が制御エレメントに作動可能に連結されている、項目 8 6 に記載の組成物。

10

(項目 8 8)

前記第 1 のヌクレオチド配列が第 1 の制御エレメントに作動可能に連結されており、該第 2 のヌクレオチド配列が第 2 の制御エレメントに作動可能に連結されている、項目 8 7 に記載の組成物。

(項目 8 9)

第 3 のタンパク質またはその断片をコードする第 3 のヌクレオチド配列をさらに含んでおり、該第 3 のヌクレオチド配列が制御エレメントに作動可能に連結されている、項目 8 7 または 8 8 に記載の組成物。

20

(項目 9 0)

前記第 3 のヌクレオチド配列が第 3 の制御エレメントに作動可能に連結されている、項目 8 9 に記載の組成物。

(項目 9 1)

第 4 のタンパク質またはその断片をコードする第 4 のヌクレオチド配列をさらに含んでおり、該第 4 のヌクレオチド配列が制御エレメントに作動可能に連結されている、項目 8 9 または 9 0 に記載の組成物。

(項目 9 2)

前記第 4 のヌクレオチド配列が第 4 の制御エレメントに作動可能に連結されている、項目 9 1 に記載の組成物。

30

(項目 9 3)

第 5 のタンパク質またはその断片をコードする第 5 のヌクレオチド配列をさらに含んでおり、該第 5 のヌクレオチド配列が制御エレメントに作動可能に連結されている、項目 9 1 または 9 2 に記載の組成物。

(項目 9 4)

前記第 5 のヌクレオチド配列が第 5 の制御エレメントに作動可能に連結されている、項目 9 3 に記載の組成物。

(項目 9 5)

前記制御エレメントが独立して、サブゲノムプロモーター、IRES およびウイルス 2 A 部位からなる群より選択される、項目 8 7 ~ 9 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

(項目 9 6)

被験体において免疫応答を生じさせる方法であって、項目 2 1 ~ 4 3、7 3 ~ 8 2 および 8 4 ~ 9 5 のいずれか 1 項に記載の組成物を、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

(項目 9 7)

単回投与で前記被験体に投与される前記カチオン性脂質の総量が約 3 0 m g 以下である、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 9 8)

単回投与で前記被験体に投与されるDOTAPの総量が約 2 4 m g 以下である、項目 9 6 に記載の方法。

50

(項目99)

単回投与で前記被験体に投与されるDOTAPの総量が約4mg以下である、項目96に記載の方法。

(項目100)

連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンであって、該粒子の平均直径が約80nm~180nmであり；該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含み、ここで：

(i) 油：脂質（モル：モル）の比が少なくとも約4：1（モル：モル）であり；

(ii) 該エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約2.5mMであり；

(iii) 該油が約0.2%~約8%（w/v）存在し；および

(iv) 該カチオン性脂質がDC-コレステロールではない、水中油型エマルジョン。

10

(項目101)

前記油が0.6%~4%（w/v）存在する、項目100に記載の水中油型エマルジョン。

(項目102)

前記油が約1%~約3.2%（w/v）存在する、項目100または101に記載の水中油型エマルジョン。

(項目103)

前記粒子の平均直径が約80nm~約150nmである、項目100~102のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目104)

前記粒子の平均直径が約80nm~約130nmである、項目100~103のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

20

(項目105)

前記水中油型エマルジョンが安定である、項目100~104のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目106)

油：脂質（モル：モル）の比が約4：1（モル：モル）~約43：1（モル：モル）である、項目100~105のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目107)

前記油がスクアレンまたはスクアランである、項目100~106のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

30

(項目108)

前記粒子が、さらに界面活性剤を含む、項目100~107のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目109)

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、項目108に記載の水中油型エマルジョン。

(項目110)

前記界面活性剤がポリエチレングリコール（PEG）-脂質ではない、項目108または109に記載の水中油型エマルジョン。

40

(項目111)

前記カチオン性水中油型エマルジョンが約0.01%~約2.5%（v/v）の界面活性剤を含む、項目108~110のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目112)

前記界面活性剤がSPAN85（ソルビタントリオレート）、Tween80（ポリソルベート80）またはそれらの組合せである、項目108~111のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目113)

前記カチオン性水中油型エマルジョンが約0.5%（v/v）のTween80および約0.5%（v/v）のSPAN85を含む、項目112に記載の水中油型エマルジョン。

50

(項目114)

前記カチオン性脂質の頭部が第4級アミンを含む、項目100～113のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目115)

前記カチオン性脂質が：1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEPIC)、N,N-ジオレオイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、およびN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)からなる群より選択される、項目100～113のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョン。

10

(項目116)

前記カチオン性脂質がDOTAPである、項目115に記載の水中油型エマルジョン。

(項目117)

前記エマルジョン中のDOTAPの濃度が少なくとも約2.58mM(1.8mg/mL)である、項目116に記載の水中油型エマルジョン。

(項目118)

前記エマルジョン中のDOTAPの濃度が約2.58mM(1.8mg/mL)～約7.16mM(5mg/mL)である、項目116に記載の水中油型エマルジョン。

(項目119)

項目100～118のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョンの調製方法であって、(a)前記カチオン性脂質を前記油に直接溶解させ、油相を形成すること；(b)該エマルジョンの水相を提供すること；および(c)該油相を該水相中に均質化によって分散させることを含む、方法。

20

(項目120)

ステップ(a)がさらに、前記油を約30～約65の温度まで加熱することを含む、項目119に記載の方法。

(項目121)

カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成したRNA分子を含む組成物であって、該粒子が、25で液相である油、およびカチオン性脂質を含み；ここで：

(i)油：脂質(モル：モル)の比が少なくとも約4：1(モル：モル)であり；

(ii)該組成物中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約1.25mMであり；および

30

(iii)該油が約0.1%～約4%(w/v)存在し；および

(iv)該カチオン性脂質がDC-コレステロールではない、組成物。

(項目122)

前記油が0.3%～2%(w/v)存在する、項目121に記載の組成物。

(項目123)

前記油が約0.5%～約1.6%(w/v)存在する、項目121または122に記載の水中油型エマルジョン。

(項目124)

前記粒子の平均直径が約80nm～180nmである、項目121～123のいずれか1項に記載の組成物。

40

(項目125)

前記粒子の平均直径が約80nm～150nmである、項目121～124のいずれか1項に記載の組成物。

(項目126)

前記粒子の平均直径が約80nm～約130nmである、項目121～125のいずれか1項に記載の組成物。

(項目127)

前記組成物のN/P比が少なくとも約4：1である、項目121～126のいずれか1項

50

に記載の組成物。

(項目 1 2 8)

前記組成物の N / P 比が約 4 : 1 ~ 約 2 0 : 1 である、項目 1 2 1 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 1 2 9)

前記組成物の N / P 比が約 4 : 1 ~ 約 1 5 : 1 である、項目 1 2 1 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 1 3 0)

油 : 脂質 (モル : モル) の比が約 4 : 1 (モル : モル) ~ 約 4 3 : 1 (モル : モル) である、項目 1 2 1 ~ 1 2 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

(項目 1 3 1)

前記油がスクアレンまたはスクアランである、項目 1 2 1 ~ 1 3 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 1 3 2)

前記粒子が、さらに界面活性剤を含む、項目 1 2 1 ~ 1 3 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 1 3 3)

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、項目 1 3 2 に記載の組成物。

(項目 1 3 4)

前記界面活性剤がポリエチレングリコール (P E G) - 脂質ではない、項目 1 3 2 または 1 3 3 に記載の組成物。

20

(項目 1 3 5)

前記カチオン性水中油型エマルジョンが約 0 . 0 0 5 % ~ 約 1 . 2 5 % (v / v) の界面活性剤を含む、項目 1 3 2 ~ 1 3 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 1 3 6)

前記界面活性剤が S P A N 8 5 (ソルビタントリオレート)、T w e e n 8 0 (ポリソルベート 8 0) またはそれらの組合せである、項目 1 3 2 ~ 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 1 3 7)

前記カチオン性水中油型エマルジョンが約 0 . 2 5 % (v / v) の T w e e n 8 0 および約 0 . 2 5 % (v / v) の S P A N 8 5 を含む、項目 1 3 6 に記載の組成物。

30

(項目 1 3 8)

前記カチオン性脂質の頭部が第 4 級アミンを含む、項目 1 2 1 ~ 1 3 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 1 3 9)

前記カチオン性脂質が : 1 , 2 - ジオレオイルオキシ - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン (D O T A P)、1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (D O E P C)、N , N - ジオレオイル - N , N - ジメチルアンモニウムクロリド (D O D A C)、および N - [1 - (2 , 3 - ジオレイルオキシ) プロピル] - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド (D O T M A) からなる群より選択される、項目 1 2 1 ~ 1 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

(項目 1 4 0)

前記カチオン性脂質が D O T A P である、項目 1 3 9 に記載の組成物。

(項目 1 4 1)

前記組成物中の D O T A P の濃度が少なくとも約 1 . 2 9 m M (0 . 9 m g / m L) である、項目 1 4 0 に記載の組成物。

(項目 1 4 2)

前記組成物中の D O T A P の濃度が約 1 . 2 9 m M (0 . 9 m g / m L) ~ 約 3 . 5 8 m M (2 . 5 m g / m L) である、項目 1 4 0 に記載の組成物。

(項目 1 4 3)

50

前記RNA分子が、抗原をコードする自己複製RNA分子である、項目121～142のいずれか1項に記載の組成物。

(項目144)

前記自己複製RNAがアルファウイルス由来RNAレプリコンである、項目143に記載の組成物。

(項目145)

カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成したRNA分子を含む組成物の調製方法であって：

(i) 項目100～118のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョンを提供すること；

(ii) 該RNA分子を含む水性溶液を提供すること；および

(iii) (i)の該水中油型エマルジョンと(ii)の該水性溶液とを合わせ、それにより該組成物を調製することを含む、方法。

(項目146)

(i)の前記カチオン性水中油型エマルジョンと(ii)のRNA溶液を約1：1(v/v)の比で合わせる、項目145に記載の方法。

(項目147)

前記油が約1%～約3.2%(w/v)存在する、項目61に記載の水中油型エマルジョン。

(項目148)

前記RNA分子が、2つ以上の抗原をコードするポリシストロン性RNAである、項目121～144のいずれか1項に記載の組成物。

(項目149)

前記ポリシストロン性RNAがアルファウイルスレプリコンである、項目148に記載の組成物。

(項目150)

前記アルファウイルスレプリコンが、第1の抗原をコードする第1のヌクレオチド配列および第2の抗原をコードする第2のヌクレオチド配列を含み、該第1のヌクレオチド配列および該第2のヌクレオチド配列が制御エレメントに作動可能に連結されている、項目149に記載の組成物。

(項目151)

前記第1のヌクレオチド配列が第1の制御エレメントに作動可能に連結されており、前記第2のヌクレオチド配列が第2の制御エレメントに作動可能に連結されている、項目150に記載の組成物。

(項目152)

第3のタンパク質またはその断片をコードする第3のヌクレオチド配列をさらに含んでおり、該第3のヌクレオチド配列が制御エレメントに作動可能に連結されている、項目150または151に記載の組成物。

(項目153)

前記第3のヌクレオチド配列が第3の制御エレメントに作動可能に連結されている、項目152に記載の組成物。

(項目154)

第4のタンパク質またはその断片をコードする第4のヌクレオチド配列をさらに含んでおり、該第4のヌクレオチド配列が制御エレメントに作動可能に連結されている、項目152または153に記載の組成物。

(項目155)

前記第4のヌクレオチド配列が第4の制御エレメントに作動可能に連結されている、項目154に記載の組成物。

(項目156)

第5のタンパク質またはその断片をコードする第5のヌクレオチド配列をさらに含んでお

10

20

30

40

50

り、該第5のヌクレオチド配列が制御エレメントに作動可能に連結されている、項目154または155に記載の組成物。

(項目157)

前記第5のヌクレオチド配列が第5の制御エレメントに作動可能に連結されている、項目156に記載の組成物。

(項目158)

前記制御エレメントが独立して、サブゲノムプロモーター、IRESおよびウイルス2A部位からなる群より選択される、項目150～157のいずれか1項に記載の組成物。

(項目159)

被験体において免疫応答を生じさせる方法であって、項目121～144のいずれか1項に記載の組成物を、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

10

(項目160)

単回投与で前記被験体に投与される前記カチオン性脂質の総量が約30mg以下である、項目159に記載の方法。

(項目161)

単回投与で前記被験体に投与されるDOTAPの総量が約24mg以下である、項目159に記載の方法。

(項目162)

単回投与で前記被験体に投与されるDOTAPの総量が約4mg以下である、項目159に記載の方法。

20

(項目163)

さらに抗酸化剤を含んでいる、項目1～18、21～43、61～83、85～95、100～118、121～144または147～158のいずれか1項に記載の水中油型エマルジョンまたは組成物。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、5つのCMVタンパク質をコードするペンタシストロン性RNAレプリコンA526、A527、A554、A555およびA556の模式図である。サブゲノムプロモーターを矢印で示しており、他の制御エレメントは表示している。

【図2】図2は、A527 RNAレプリコンでトランスフェクトされたBHKV細胞が、gH/gL/UL128/UL130/UL131五量体複合体を発現することを示す蛍光ヒストグラムである。細胞の染色は、該五量体複合体上に存在するコンフォメーションエピトープに結合する抗体を用いて行なった。

30

【図3】図3は模式図およびグラフである。模式図は、CMVのgHおよびgLをコードするピシストロン性RNAレプリコンA160およびA531～A537を示す。グラフは、該レプリコンを含むVRPで免疫化されたマウス由来の免疫血清の中和活性を示す。

【図4】図4は、VZVタンパク質をコードするモノシストロン性RNAレプリコンまたはVZVのgEおよびgI、またはgHおよびgLをコードするピシストロン性RNAレプリコンで免疫化されたマウス由来の免疫血清における抗VZVタンパク質抗体応答を示すグラフである。マウスは、CMF32を配合した7μgのRNAで免疫化した。

40

【発明を実施するための形態】

【0037】

発明の詳細な説明

1. 概論

本発明は、一般的に、高濃度のカチオン性脂質を含み、規定の油：カチオン性脂質比を有するカチオン性水中油型エマルジョンに関する。油とカチオン性脂質とはエマルジョンの別々の成分であり、好ましくは、油はイオン性でない。カチオン性脂質は、核酸などの負に荷電した分子と相互作用し、それにより、負に荷電した該分子を該エマルジョン粒子につなぎ留めることができる。本明細書に記載されるカチオン性エマルジョンは、核酸分子などの負に荷電した分子（例えば、タンパク質またはペプチド、低分子干渉RNA、自

50

己複製RNAなどをコードするRNA分子)の細胞への*in vivo*での送達、および核酸ベースのワクチンの製剤化に有用である。

【0038】

特に、本発明は、高濃度のカチオン性脂質を含み、規定の油：カチオン性脂質比を有する安定なカチオン性水中油型エマルジョンが成功裏に作製され得るという知見に基づいている。高濃度のカチオン性脂質を含むエマルジョンは、より多くの負に荷電した分子(RNA分子など)をエマルジョン粒子に配合することが可能であり、それにより送達の効率が增大する。特に、多くの治療薬、例えばワクチンでは、投与には体積が小さいこと(例えば、1用量あたり0.5mL)が好ましい。本明細書に記載されるとおりの高濃度のカチオン性脂質を含み、規定の油：カチオン性脂質比を有するエマルジョンは、指定の体積以内でより高い用量のRNAの送達が可能である。

10

【0039】

好ましい実施形態では、RNA分子を、該水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成させる。複合体を形成したRNA分子は安定化され、RNAase媒介性分解から保護され、遊離の(「裸の」)RNAと比べて、より効率的に細胞に取り込まれる。

【0040】

また、該RNAを送達してコードされたタンパク質の発現を誘導する場合、例えば、RNAワクチンの状況において、高濃度のカチオン性脂質を含むエマルジョンでは、エマルジョン粒子と複合体を形成したRNA分子の量を増大させることができる。より多くのRNA分子が宿主細胞に送達されると、より多量のコードされたタンパク質抗原が産生され、これにより次に、RNAワクチンの効力および免疫原性が増強される。最後に、コードされたタンパク質の免疫原性は、該エマルジョンのアジュバント効果により増強され得る。したがって、負に荷電した分子(例えば、抗原をコードするRNA分子)のより効率的な送達に加え、該カチオン性エマルジョンは、アジュバント活性によって免疫応答を増強させることもできる。例えば、本明細書において記載および例示しているように、RNA分子(呼吸器合胞体ウイルス(RSV)Fタンパク質をコードする)を高DOTAPEマルジョンと複合体を形成させた製剤では、RSVのマウスモデルおよびコットンラットモデルにおいて、低DOTAPEマルジョンと複合体を形成したRNA分子と比べて、より高い免疫応答が生じた。

20

【0041】

したがって、一態様において、本発明は、連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンであって、該エマルジョンが：(a)前記粒子の平均直径が約80nm~180nmであり；(b)該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含み、ここで(i)油：カチオン性脂質(モル：モル)の比が少なくとも約8：1(モル：モル)であり、(ii)前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約2.5mMであり、(iii)該カチオン性脂質がDC-コレステロールではないことを特徴とする水中油型エマルジョンを提供する。

30

【0042】

別の態様では、本発明は、連続水相中に分散された粒子を含む水中油型エマルジョンであって、該エマルジョンが：(a)前記粒子の平均直径が約80nm~180nmであり；(b)該エマルジョンが油とカチオン性脂質を含み、ここで(i)油：カチオン性脂質(モル：モル)の比が少なくとも約4：1(モル：モル)であり、(ii)前記エマルジョン中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約2.5mMであり、(iii)該油が約0.2%~約8%(w/v)存在する；(iv)ただし、該カチオン性脂質はDC-コレステロールではないことを特徴とする水中油型エマルジョンを提供する。

40

【0043】

該カチオン性エマルジョンに、さらに界面活性剤(例えば、Tween80、SPAN85またはそれらの組合せ)を含めてもよい。

【0044】

また、別の態様では、本発明は、高濃度のカチオン性脂質を含み、負に荷電した分子を

50

送達するために使用され得る、カチオン性水中油型エマルジョンのいくつかの特定の製剤を提供する。

【0045】

別の態様では、本発明は、(1)カチオン性脂質を油に直接溶解させ、油相を形成すること；(2)エマルジョンの水相を提供すること；および(3)該油相を(例えば、均質化によって)該水相に分散させることを含む、水中油型エマルジョンの調製方法を提供する。所望により、油は、油への脂質の溶解を助長させるため約30～約65の温度まで加熱され得る。好ましくは、油相における油：カチオン性脂質(モル：モル)の比は少なくとも約8：1(モル：モル)であり、あるいは、またはさらに、前記粒子の平均直径は約80nm～180nmである、および/または油相中のカチオン性脂質の濃度は少なくとも約5mMである。

10

【0046】

別の態様では、本発明は、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した負に荷電した分子(RNA分子など)を含む組成物の調製方法であって、(i)本明細書に記載されるとおりの水中油型エマルジョンを提供すること；(ii)該RNA分子を含む水性溶液を提供すること；および(iii)(ii)の水性溶液と(i)の水中油型エマルジョンを合わせ、それにより該組成物を調製することを含む方法を提供する。所望により、RNA分子を含む該水性溶液に、塩(例えば、NaCl)、バッファー(例えば、クエン酸バッファー)、非イオン性張度調整剤(例えば、スクロース、トレハロース、ソルビトールもしくはデキストロース)、ポリマー(例えば、Pluronic(登録商標)F127)またはその任意の組合せを含めてもよい。

20

【0047】

本発明のカチオン性エマルジョンは、核酸(例えば、RNA)などの負に荷電した分子を送達するのに使用することができる。組成物は、それを必要とする被験体に投与することによって、免疫応答を生じさせるか、または強化することができる。組成物は、誘導される免疫応答の有効性を増強するために、別の免疫原性分子、免疫原性組成物、またはワクチンとともに共送達(codeliver)することもできる。

【0048】

2. 定義

用語「約」は、本明細書において使用される場合、値の+/-5%を指す。

30

【0049】

本明細書において、「抗原」は、1つまたは複数のエピトープ(直鎖状、コンフォメーション、または両方のいずれか)を含有する分子を指す。

【0050】

「バッファー」は、溶液のpHの変化に抵抗する水性溶液を指す。

【0051】

本明細書において、「ヌクレオチド類似体」または「修飾ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの窒素塩基(例えば、シトシン(C)、チミン(T)もしくはウラシル(U)、アデニン(A)、またはグアニン(G))において、またはこの窒素塩基上に1つまたは複数の化学修飾(例えば、置換)を含有するヌクレオチドを指す。

40

【0052】

本明細書において使用される場合、エマルジョン「粒子」は、水中油型エマルジョンの水(連続)相中に懸濁された油滴を指す。該粒子はさらに、カチオン性の液体、および必要に応じてさらなる成分、例えば界面活性剤を含む。

【0053】

用語「ポリマー」は、一緒に結合されている個々の化学物質部分(同じであっても異なってもよい)からなる分子を指す。本明細書において、用語「ポリマー」は、末端間で結合されて直鎖状分子を形成している個々の化学物質部分、ならびに分岐(例えば、「マルチアーム」または「星形」)構造の形態で一緒に結合された個々の化学物質部分を指す。例示的なポリマーには、例えば、ポロキサマーが含まれる。ポロキサマーは、ポリオ

50

キシエチレン（ポリ（エチレンオキシド））の2本の親水性鎖が隣接するポリオキシプロピレン（ポリ（プロピレンオキシド））の中心の疎水性鎖を有する非イオン性トリブロックコポリマーである。

【0054】

本明細書において、「サッカリド」は、直鎖形態もしくは環形態での単糖、オリゴ糖、もしくは多糖、または糖鎖を形成するこれらの組合せを包含する。オリゴ糖は、2個以上の単糖残基を有するサッカリドである。サッカリドの例には、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、スクロース、およびトレハロースが含まれる。

【0055】

エマルジョンは、エマルジョン粒子が、4 で少なくとも1ヶ月間、好ましくは少なくとも2ヶ月間にわたって、顕著な密集も凝集もなく離れたままである場合、「安定」である。安定なエマルジョンの平均粒子直径（数平均直径）は、エマルジョンを4 で1ヶ月間、好ましくは2ヶ月間にわたって保存した場合に10%より大きく変化しない。

【0056】

用語「界面活性剤」は、専門用語であり、一般に、エネルギー的に水による溶媒和を選り好む親水性基（例えば、極性基）、および水によってあまり溶媒和にならない疎水性基の両方を有する任意の分子を指す。用語「非イオン性界面活性剤」は、当該技術分野で公知の用語であり、一般に、親水性基（例えば、極性基）が静電的に荷電していない界面活性剤分子を指す。

【0057】

エマルジョンの「ゼータ電位」は、エマルジョン粒子の電気泳動移動度によって決定される。単位電界での粒子の速度をその電気泳動移動度と称する。ゼータ電位はヘンリーの式：

【数1】

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

（式中、 U_E = 電気泳動移動度、 z = ゼータ電位、 ε = 誘電率、 η = 粘度および $f(ka)$ = ヘンリー関数）により電気泳動移動度と関連付けられる。ゼータ電位は、典型的には、電気泳動移動度装置、例えば、Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments Ltd, United Kingdom) を用いて測定される。

【0058】

3. カチオン性水中油型エマルジョン

本明細書に開示されるカチオン性水中油型エマルジョンは、一般に、エマルジョンを調製するのに使用される成分の濃度によって、当該技術分野で慣例的な様式で記述される。滅菌および他の下流プロセスを含めたエマルジョンを生成するプロセスの間に、少量の油（例えば、スクアレン）、カチオン性脂質（例えば、DOTAP）、または他の成分が失われる場合があり、最終生成物（例えば、投与の準備ができていないパッケージされ滅菌されたエマルジョン）中のこれらの成分の実際の濃度は、場合により、出発量よりわずかに低い場合があることが（最大約10%、最大約20%、最大約25%、または最大約35%）、当該技術分野において理解されている。

【0059】

本発明は一般に、高濃度のカチオン性脂質および規定された油：カチオン性脂質比を含むカチオン性水中油型エマルジョンに関する。エマルジョンは、RNA分子などの負に荷電した分子を細胞に送達するのに特に適している。カチオン性脂質は、例えば、静電気力、および疎水性/親水性相互作用を通じて負に荷電した分子と相互作用し、それによって、分子をエマルジョン粒子につなぎ留めることができる。本明細書に記載されるカチオン性エマルジョンは、負に荷電した分子、例えば、抗原をコードするRNA分子、または低

10

20

30

40

50

分子干渉RNAなどを、*in vivo*で細胞に送達するのに有用である。例えば、本明細書に記載されるカチオン性エマルジョンは、ワクチンとして、自己複製RNAを含めた1つまたは複数の抗原をコードするRNA分子を送達することについて利点をもたらす。

【0060】

エマルジョンの不連続 (discrete) 相 (または分散相) は油とカチオン性脂質とを含み、ここで、該カチオン性脂質は水 (連続) 相への該油の分散を助長させる。以下に記載するとおりの1つ以上の必要に応じた成分 (界面活性剤 (例えば、非イオン性界面活性剤) など) をエマルジョン中に存在させてもよい。

【0061】

水中油型エマルジョンの粒子は、1マイクロメートル以下の平均直径 (すなわち、数平均直径) を有する。カチオン性エマルジョンの平均粒子直径は、約180nm以下、約170nm以下、約160nm以下、約150nm以下、約140nm以下、約130nm以下、約120nm以下、約110nm以下、または約100nm以下、例えば、約80nm~180nm、約80nm~170nm、約80nm~160nm、約80nm~150nm、約80nm~140nm、約80nm~130nm、約80nm~120nm、約80nm~110nm、または約80nm~100nmであることが特に望ましい。特に好適な平均粒子直径は、約100nmまたは約100nm~約130nmである。

【0062】

エマルジョン粒子のサイズ (平均直径) は、油に対する界面活性剤の比 (比を高くすると、粒子サイズが減少する)、均質化の運転圧 (均質化の運転圧を上昇させると、一般的に、粒子サイズが低減する)、温度 (温度を上昇させると、粒子サイズが減少する) を変化させることによって、油のタイプによって、ある特定のタイプのバッファーを水相に含めることによって、および以下に詳細に記載される他のプロセスパラメータを変化させることによって、変更することができる。いくつかの場合には、エマルジョン粒子のサイズが、本明細書中に例示するように、RNA-エマルジョン複合体の免疫原性に影響する場合もある。

【0063】

本明細書に記載される水中油型エマルジョン粒子は、安定である。

【0064】

本明細書に記載されるエマルジョンの粒子は、負に荷電した分子と複合体を形成することができる。負に荷電した分子との複合体形成の前に、粒子の全正味電荷 (一般的にゼータ電位として測定される) は、正 (カチオン性) であるべきである。粒子の全正味電荷は、エマルジョン中のカチオン性脂質のタイプおよびカチオン性脂質の量、エマルジョン中の油の量 (例えば、油の百分率が高いと、一般的に、粒子の表面上の電荷が減少する) に応じて変化する場合があり、エマルジョン中に存在する任意の追加の成分 (例えば、界面活性剤 (複数可)) によっても影響され得る。複合体形成前の粒子のゼータ電位は、約50mV以下、約45mV以下、約40mV以下、約35mV以下、約30mV以下、約25mV以下、約20mV以下; 約5mV~約50mV、約10mV~約50mV、約10mV~約45mV、約10mV~約40mV、約10mV~約35mV、約10mV~約30mV、約10mV~約25mV、または約10mV~約20mVであることが好ましい。ゼータ電位は、(i) エマルジョンのpH、(ii) エマルジョンの伝導率 (例えば、塩分)、および(iii) エマルジョンの様々な成分 (ポリマー、非イオン性界面活性剤など) の濃度によって影響され得る。カチオン性水中油型エマルジョンのゼータ電位は、Malvern Nanoserries Zetasizer (Westborough, MA) を使用して測定される。試料は、水中で1:100に希釈され (粘度: 0.8872cp、RI: 1.330、誘電率: 78.5)、ポリスチレンラテックスキャピラリーセル (Malvern, Westborough, MA) に添加される。ゼータ電位は、2分の平衡時間とともに25 で測定され、Smoluchowskiモデル (F(Ka) 値 = 1.5) を使用して分析される。データは、mVで報告される。

【0065】

本発明の例示的なカチオン性エマルジョンを本明細書において「CMF32」と称する。CMF32の油はスクアレン（4.3% w/v）であり、カチオン性脂質はDOTAP（3.2 mg/mL）である。また、CMF32は界面活性剤SPAN85（0.5% v/vのソルビタントリオレート）およびTween80（ポリソルベート80；ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート；0.5% v/v）も含む。したがって、CMF32のエマルジョン粒子はスクアレン、SPAN85、Tween80およびDOTAPを含む。RNA分子はCMF32粒子と、4:1、6:1、8:1、10:1、12:1、および14:1のN/P比で効率的に複合体を形成することが示された。他の例示的なカチオン性エマルジョンとしては、例えば、本明細書において「CMF34」（4.3% w/vのスクアレン、0.5%のTween80、0.5%のSPAN85、および4.4 mg/mLのDOTAP）、「CMF35」（4.3% w/vのスクアレン、0.5%のTween80、0.5%のSPAN85、5.0 mg/mLのDOTAP）と称するエマルジョン、ならびに本明細書に記載される他のエマルジョンが挙げられる。

10

【0066】

本発明のある特定の例示的なカチオン性水中油型エマルジョンは、DOTAPおよびスクアレンを、それぞれ、2.1 mg/mL ~ 2.84 mg/mL（好ましくは、2.23 mg/mL ~ 2.71 mg/mL）、および30.92 mg/mL ~ 41.92 mg/mL（好ましくは、32.82 mg/mL ~ 約40.02 mg/mL）の濃度で含み、さらに等しい量のSPAN85およびTween80（例えば、各々、約0.5%）を含む。本発明の他の例示的なカチオン性水中油型エマルジョンは、DOTAPおよびスクアレン

20

【0067】

本発明の水中油型エマルジョンの個々の成分は、当該技術分野で公知であるが、このような組成物が、本明細書に記載される様式で組み合わせられたことはない。したがって、個々の成分は、好適な実施形態のために一般に、および少し詳しくの両方で以下に記載されているが、当該技術分野で周知であり、本明細書で使用される用語、例えば、油、界面活性剤などは、さらなる説明なしで、十分に当業者に周知である。さらに、エマルジョンの個々の成分の量の好適な範囲が提供されているが、特定のエマルジョンの成分の実際の比は、所望のサイズおよび物理的特性のエマルジョン粒子が適切に形成されるように調整される必要がある場合がある。例えば、特定の量の油が使用される場合（例えば、5% v/vの油）、界面活性剤の量は、安定なエマルジョンを形成するように水相中に油粒子を分散させるのに十分なレベルであるべきである。水相中に油を分散させるのに必要とされる界面活性剤の実際の量は、エマルジョンに使用される界面活性剤のタイプおよび油のタイプに依存し、油の量も、所望の粒子サイズによって変化する場合がある（これが、2つの相の間の表面積を変化させるので）。所望のエマルジョンの成分の実際の量および相対的な比率は、当業者によって容易に決定することができる。

30

40

【0068】

A. 油

カチオン性水中油型エマルジョンの粒子は、油を含む。

【0069】

油は好ましくは1以上で液相であり、かつ水に不混和性である。

【0070】

好ましくは、油は、代謝可能な無毒性の油であり、より好ましくは、それだけに限らないが、アルカン、アルケン、アルキン、ならびにこれらの対応する酸およびアルコール、これらのエーテルおよびエステル、ならびにこれらの混合物を含めた、約6 ~ 約30炭素原子のうちの1つである。油は、エマルジョンが投与されることになる被験体の体によっ

50

て代謝され得、被験体に毒性ではない任意の植物油、魚油、動物油、または合成的に調製された油とすることができる。被験体は、動物、一般的に、哺乳動物、好ましくは、ヒトとすることができる。

【0071】

ある特定の実施形態では、油は、25 で液相である。油は、25 で貯蔵される時、流体の特性を示す場合（固体および気体から区別され、明確な容積を有するが、明確な形状を有さない場合）、25 で液相である。しかし、エマルジョンは、任意の適切な温度で貯蔵および使用することができる。油は、4 で液相であることが好ましい。

【0072】

油は、任意の長鎖のアルカン、アルケン、もしくはアルキン、または遊離酸、その塩もしくはエステルとしてのこれらの酸誘導体もしくはアルコール誘導体、例えば、トリグリセリド、および1,2-プロパンジオールまたは同様のポリヒドロキシアルコールのエステルなどのモノエステル、またはジエステル、またはトリエステルなどとすることができる。アルコールは、一官能性酸または多官能性酸、例えば、酢酸、プロパン酸、クエン酸などを使用してアシル化することができる。油であり、本明細書に示される他の基準を満たす長鎖アルコールに由来するエーテルも使用することができる。

【0073】

個々のアルカン、アルケン、またはアルキンの部分、およびその酸誘導体またはアルコール誘導体は、一般に、約6～約30炭素原子を有することになる。この部分は、直鎖または分岐鎖の構造を有することができる。これは、完全に飽和していても、1つまたは複数の二重結合または三重結合を有していてもよい。モノエステルもしくはポリエステル、またはモノエーテルもしくはポリエーテルに基づく油が使用される場合、約6～約30炭素の制限は、個々の脂肪酸または脂肪アルコール部分に適用し、合計炭素数に適用しない。

【0074】

動物、魚、または植物の供給源からの任意の適切な油を使用することができる。植物油の供給源には、堅果、種子、および穀類が含まれ、適切な油には、ラッカセイ油、ダイズ油、ヤシ油、およびオリーブ油などが含まれる。他の適切な種子油として、サフラワー油、綿実油、ヒマワリ種子油、ゴマ種子油などが挙げられる。穀類の群では、トウモロコシ油、および他の穀物、例えば、コムギ、カラスムギ、ライムギ、イネ、テフ、ライコムギなどの油も使用することができる。植物油を得るための技術は、十分に開発されており、周知である。これらの油および他の同様の油の組成は、例えば、メルクインデックス、および食品原料、栄養食品技術 (source materials on foods, nutrition and food technology) に見出すことができる。

【0075】

グリセロールと1,2-プロパンジオールの約6～約10炭素の脂肪酸エステルは、種子油中に天然に存在しないが、堅果油および種子油から出発して、適切な材料の加水分解、分離、およびエステル化によって調製することができる。これらの製品は、PVO International, Inc., Chemical Specialties Division, 416 Division Street, Boonton, N.J. からNEOBEEESの名称で、およびその他で市販されている。

【0076】

動物油および動物性脂肪は、トリグリセリドとして存在し、魚または植物に由来する油より高い程度の飽和度を有するという事実のために、生理的温度で固相であることが多い。しかし、脂肪酸は、部分的または完全にトリグリセリドをけん化することによって動物性脂肪から得られ、このけん化は、遊離脂肪酸をもたらす。哺乳動物乳に由来する脂肪および油は、代謝可能であり、したがって、本発明の実施において使用することができる。動物供給源から純粋な油を得るのに必要な分離、精製、けん化、および他の手段の手順は、当該技術分野で周知である。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

ほとんどの魚は、容易に収集することができる代謝可能な油を含有する。例えば、タラ肝油、サメ肝油、および鯨ろうなどの鯨油は、本明細書で使用することができる魚油のいくつかを例示する。いくつかの分岐鎖油は、5炭素イソペン単位で生化学的に合成され、一般に、テルペノイドと呼ばれる。スクアレン(2, 6, 10, 15, 19, 23-ヘキサメチル-2, 6, 10, 14, 18, 22-テトラコサヘキサエン)は、分岐、不飽和のテルペノイドであり、本明細書で特に好適である。スクアレンの主要な供給源はサメ肝油であるが、アマランサス種子、米糠、コムギ胚芽、およびオリーブ油を含めた植物性油(plant oil)(主に植物油(vegetable oil))も適切な供給源である。スクアレンもまた、酵母または他の適切な微生物から入手することができる。いくつかの実施形態では、スクアレンは好ましくは非動物性供給源から、例えば、オリーブ、オリーブ油または酵母から入手される。スクアレンの飽和類似体であるスクアランも好適である。スクアレンおよびスクアランを含めた魚油は、商業的供給源から容易に入手可能であり、または当該技術分野で公知の方法によって得ることができる。

10

【 0 0 7 8 】

ある特定の実施形態では、油は、ヒマシ油、ヤシ油、トウモロコシ油、綿実油、月見草油、魚油、ホホバ油、ラード油、亜麻仁油、オリーブ油、ラッカセイ油、サフラワー油、ゴマ油、ダイズ油、スクアレン、スクアラン、ヒマワリ油およびコムギ胚芽油からなる群より選択される油を含む。例示的な実施形態では、油は、スクアレンまたはスクアランを含む。

20

【 0 0 7 9 】

エマルジョンの油成分は、約0.2%~約10%(v/v)の量で存在することができる。例えば、カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.2%~約10%(v/v)の油、約0.2%~約9%(v/v)の油、約0.2%~約8%(v/v)の油、約0.2%~約7%(v/v)の油、約0.2%~約6%(v/v)の油、約0.2%~約5%(v/v)の油、約0.3%~約10%(v/v)の油、約0.4%~約10%(v/v)の油、約0.5%~約10%(v/v)の油、約1%~約10%(v/v)の油、約2%~約10%(v/v)の油、約3%~約10%(v/v)の油、約4%~約10%(v/v)の油、約5%~約10%(v/v)の油、約0.2%~約10%(w/v)の油、約0.2%~約9%(w/v)の油、約0.2%~約8%(w/v)の油、約0.2%~約7%(w/v)の油、約0.2%~約6%(w/v)の油、約0.2%~約5%(w/v)の油、約0.2%~約4.3%(w/v)の油、約0.6%~約4%(w/v)の油、約0.7%~約4%(w/v)の油、約0.8%~約4%(w/v)の油、約0.9%~約4%(w/v)の油、約1.0%~約4%(w/v)の油、約0.6%~約3.5%(w/v)の油、約0.6%~約3%(w/v)の油、約0.5%(v/v)の油、約0.6%(v/v)の油、約0.7%(v/v)の油、約0.8%(v/v)の油、約0.9%(v/v)の油、約1%(v/v)の油、約1.5%(v/v)の油、約2%(v/v)の油、約2.5%(v/v)の油、約3%(v/v)の油、約3.5%(v/v)の油、約4%(v/v)の油、約5%(v/v)の油、約10%(v/v)の油、約0.5%(w/v)の油、約1%(w/v)の油、約1.5%(w/v)の油、約2%(w/v)の油、約2.5%(w/v)の油、約3%(w/v)の油、約3.5%(w/v)の油、約4%(w/v)の油、約4.3%(w/v)の油、約5%(w/v)の油、約5.5%(w/v)の油、約6%(w/v)の油、約6.5%(w/v)の油、約7%(w/v)の油、約7.5%(w/v)の油、または約8%(w/v)の油を含むことができる。

30

40

【 0 0 8 0 】

カチオン性水中油型エマルジョンはまた、約0.2%~約8%(v/v)の油、例えば、0.6%(w/v)~4%(w/v)、約1%(w/v)~約3.2%(w/v)、約1%(w/v)、約1.1%(w/v)、約1.2%(w/v)、約1.3%(w/v)、約1.4%(w/v)、約1.5%(w/v)、約1.6%(w/v)、約1.7%(w/v)、約1.8%(w/v)、約1.9%(w/v)、約2.0%(w/v)、約2

50

、1% (w/v)、約2.15% (w/v)、約2.2% (w/v)、約2.3% (w/v)、約2.4% (w/v)、約2.5% (w/v)、約2.6% (w/v)、約2.7% (w/v)、約2.8% (w/v)、約2.9% (w/v)、3.0% (w/v)、約3.1% (w/v)、約3.2% (w/v)、約3.3% (w/v)、約3.4% (w/v)、約3.5% (w/v)、約3.6% (w/v)、約3.7% (w/v)、約3.8% (w/v)、約3.9% (w/v)、または約4.0% (w/v)の油を含むことができる。

【0081】

例示的な実施形態では、カチオン性水中油型エマルジョンは、約5% (v/v)の油を含む。別の例示的な実施形態では、カチオン性水中油型エマルジョンは、約4.3% (w/v)のスクアレンを含む。他の例示的な実施形態では、カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.6% (w/v)~4% (w/v)のスクアレン、例えば、約1% (w/v)~約3.2% (w/v)のスクアレン、例えば、実施例において示すように、1.08% (w/v)、2.15% (w/v)または3.23% (w/v)のスクアレンを含む。

10

【0082】

上記に言及したように、上述した油の百分率は、エマルジョンを調製するのに使用される油の最初の量に基づいて決定される。最終生成物(例えば、投与の準備ができていないパッケージングされ滅菌されたエマルジョン)中の油の実際の濃度は、場合により、わずかに低い(場合によって、最大約10%、最大約20%、最大約25%または最大約35%低い)場合があることが、当該技術分野において理解されている。

20

【0083】

B. カチオン性脂質

本明細書に記載されるエマルジョン粒子は、カチオン性脂質を含み、これは、負に荷電した分子と相互作用し、それによって、分子をエマルジョン粒子につなぎ留めることができる。

【0084】

任意の適切なカチオン性脂質を使用することができる。一般に、カチオン性脂質は、生理的条件下で正に荷電した窒素原子を含有する。カチオン性脂質の頭部は、第3級アミンまたは好ましくは第4級アミンを含み得る。特定の適切なカチオン性脂質は、2つの飽和または不飽和の脂肪酸鎖(例えば、約10~約30個の炭素原子を有する側鎖)を含む。

30

【0085】

カチオン性脂質は、pH約12で、pH約11で、pH約10で、pH約9で、pH約8で、pH約7で、またはpH約6で、正電荷を有し得る。

【0086】

適切なカチオン性脂質として、塩化ベンザルコニウム(BAK)、塩化ベンゼトニウム、セトリマイド(これは、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ならびに場合により少量のドデシルトリメチルアンモニウムブロミドおよびヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドを含有する)、塩化セチルピリジニウム(CPC)、セチルトリメチルアンモニウムクロリド(CTAC)、第1級アミン、第2級アミン、それだけに限らないが、N,N',N'-ポリオキシエチレン(10)-N-タロウ-1,3-ジアミノプロパンを含めた第3級アミン、他の第4級アミン塩、例えば、それだけに限らないが、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ヘキサデシルトリメチル-アンモニウムブロミド、混合アルキル-トリメチル-アンモニウムブロミド、ベンジルジメチルドデシルアンモニウムクロリド、ベンジルジメチルヘキサデシル-アンモニウムクロリド、ベンジルトリメチルアンモニウムメトキシド、セチルジメチルエチルアンモニウムブロミド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)、メチルベンゼトニウムクロリド、塩化デカメトニウム、メチル混合トリアルキルアンモニウムクロリド、メチルトリオクチルアンモニウムクロリド、N,N-ジメチル-N-[2(2-メチル-4-(1,1,3,3テトラメチルブチル)-フェノキシ)-エトキシ]エチル]-ベンゼンメタ-ナミニウム(benzenemethanaminium)クロリド(DEBDA)、ジアル

40

50

キルジメチルアンモニウム塩、[1-(2,3-ジオレイルオキシ)-プロピル]-N, N, N, トリメチルアンモニウムクロリド、1,2-ジアシル-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(アシル基=ジミリストイル、ジパルミトイル、ジステアロイル、ジオレオイル)、1,2-ジアシル-3(ジメチルアンモニオ)プロパン(アシル基=ジミリストイル、ジパルミトイル、ジステアロイル、ジオレオイル)、1,2-ジオレオイル-3-(4'-トリメチル-アンモニオ)ブタノイル-sn-グリセロール、1,2-ジオレオイル3-スクシニル-sn-グリセロールコリンエステル、コレステリル(4'-トリメチルアンモニオ)ブタノエート、N-アルキルピリジニウム塩(例えば、臭化セチルピリジニウムおよび塩化セチルピリジニウム)、N-アルキルピペリジニウム塩、ジカチオン性ボラフォーム(bolaf orm)電解質(C₁₂Me₆; C₁₂Bu₆)、ジアルキルグリセチルホスホリルコリン、リゾレシチン、L-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、コレステロールヘミコハク酸コリンエステル、リポポリアミン、例えば、それだけに限らないが、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS)、ジパルミトイルホスファチジルエタノール-アミドスペルミン(DPPES)、リポポリ-L(またはD)-リシン(LPLL、LPDL)、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミンにコンジュゲートされたポリL(またはD)-リシン、ペンダントアミノ基を有するグルタミン酸ジドデシルエステル(C₁₂GluphC_nN⁺)、ペンダントアミノ基を有するグルタミン酸ジテトラデシルエステル(C₁₄Gluc_nN⁺)、コレステロールのカチオン性誘導体、例えば、それだけに限らないが、コレステリル-3-オキシスクシニアミドエチレントリメチルアンモニウム塩、コレステリル-3-オキシスクシニアミドエチレンジメチルアミン、コレステリル-3-カルボキシアミドエチレントリメチルアンモニウム塩、コレステリル-3-カルボキシアミドエチレンジメチルアミン、および3-[N-(N', N-ジメチルアミノエタンカルボモイル)コレステロール](DC-コレステロール)、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDA)、1,2-ジミリストイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、ジパルミトイル(C_{16:0})トリメチルアンモニウムプロパン(DPTAP)、ジステアロイルトリメチルアンモニウムプロパン(DSTAP)、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、N, N-ジオレオイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEP C)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)ならびにこれらの組合せが挙げられる。

【0087】

好適な実施形態では、カチオン性脂質は、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOEP C)、N, N-ジオレオイル-N, N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)およびN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)からなる群より選択される。特定の実施形態では、カチオン性脂質はDC-コレステロールではない。

【0088】

好ましくは、エマルジョン用を選択されるカチオン性脂質は、該エマルジョン用を選択される油に可溶性である。これにより、移動相への分散前に該脂質を該油に直接溶解させることにより、エマルジョンにおいて高いカチオン性脂質濃度を得ることが可能になる。特定の脂質がその油において可溶性であるか否かを判定し、それに応じて適切な油と脂質との組合せを選ぶことは、当該技術分野の知識の範囲内である。例えば、溶解度は、脂質および油の構造に基づいて予想することができる(例えば、脂質の溶解度は、そのテールの構造によって決定され得る)。例えば、1つまたは2つの不飽和脂肪酸鎖(例えば、オレオイルテールまたはリノリルテール)を有する脂質、例えば、DOTAP、DOEP C、DODAC、DOTMAなどは、スクアレンまたはスクアランにおいて可溶性である。

あるいは、溶解度は、所与の量の油中に溶解して飽和溶液を形成する脂質の量によって決定することができる。このような方法は当該技術分野で公知である。スクアレン中の例示的な飽和または不飽和の脂肪酸の溶解度は、実施例中にも提供される。好ましくは、油中の脂質の飽和濃度は、少なくとも約1 mg/ml、少なくとも約5 mg/ml、少なくとも約10 mg/ml、少なくとも約25 mg/ml、少なくとも約50 mg/mlまたは少なくとも約100 mg/mlである。

【0089】

好適には、負に荷電した分子と複合体化させる前のエマルジョン中のカチオン性脂質の濃度は、少なくとも約1.25 mM、少なくとも約1.5 mM、少なくとも約1.75 mM、少なくとも約2.0 mM、少なくとも約2.25 mM、少なくとも約2.5 mM、少なくとも約2.75 mM、少なくとも約3.0 mM、少なくとも約3.25 mM、少なくとも約3.5 mM、少なくとも約3.75 mM、少なくとも約4.0 mM、少なくとも約4.25 mM、少なくとも約4.5 mM、少なくとも約4.75 mM、少なくとも約5.0 mM、少なくとも約5.25 mM、少なくとも約5.5 mM、少なくとも約5.75 mM、少なくとも約6 mM、少なくとも約6.25 mM、少なくとも約6.5 mM、少なくとも約6.75 mM、少なくとも約7 mM、少なくとも約7.25 mM、少なくとも約7.5 mM、少なくとも約7.75 mM、少なくとも約8 mM、少なくとも約8.25 mM、少なくとも約8.5 mM、少なくとも約8.75 mM、少なくとも約9 mM、少なくとも約9.25 mM、少なくとも約9.5 mM、少なくとも約9.75 mMまたは少なくとも約10 mMである。

【0090】

特定の実施形態では、カチオン性脂質はDOTAPである。カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.8 mg/ml～約10 mg/mlのDOTAPを含み得る。例えば、カチオン性水中油型エマルジョンは、DOTAPを約1.7 mg/ml～約10 mg/ml、約1.8 mg/ml～約10 mg/ml、約2.0 mg/ml～約10 mg/ml、約2.2 mg/ml～約10 mg/ml、約2.4 mg/ml～約10 mg/ml、約2.6 mg/ml～約10 mg/ml、約2.8 mg/ml～約10 mg/ml、約3.0 mg/ml～約10 mg/ml、約3.2 mg/ml～約10 mg/ml、約3.4 mg/ml～約10 mg/ml、約3.6 mg/ml～約10 mg/ml、約4.0 mg/ml～約10 mg/ml、約4.4 mg/ml～約10 mg/ml、約4.8 mg/ml～約10 mg/ml、約5 mg/ml～約10 mg/ml、約1.7 mg/ml～約5 mg/ml、約1.8 mg/ml～約5 mg/ml、約1.8 mg/ml～約6 mg/ml、約1.8 mg/ml～約7 mg/ml、約1.8 mg/ml～約8 mg/ml、約1.8 mg/ml～約9 mg/ml、約1.7 mg/ml、約1.8 mg/ml、約2.0 mg/ml、約2.2 mg/ml、約2.4 mg/ml、約2.6 mg/ml、約2.8 mg/ml、約3.0 mg/ml、約3.2 mg/ml、約3.4 mg/ml、約3.6 mg/ml、約3.8 mg/ml、約4.0 mg/ml、約4.2 mg/ml、約4.4 mg/ml、約4.6 mg/ml、約4.8 mg/ml、約5.0 mg/ml、約5.2 mg/ml、約5.5 mg/ml、約6.0 mg/ml、少なくとも約0.8 mg/ml、少なくとも約0.85 mg/ml、少なくとも約0.9 mg/ml、少なくとも約1.0 mg/ml、少なくとも約1.1 mg/ml、少なくとも約1.2 mg/ml、少なくとも約1.3 mg/ml、少なくとも約1.4 mg/ml、少なくとも約1.5 mg/ml、少なくとも約1.6 mg/ml、少なくとも約1.7 mg/mlなどで含み得る。

【0091】

例示的な実施形態では、カチオン性水中油型エマルジョンは、約1.8 mg/ml～約5.0 mg/mlのDOTAPを含む。

【0092】

特定の実施形態では、カチオン性脂質はDOEPCである。カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.8 mg/ml～約10 mg/mlのDOEPCを含み得る。例えば、カチオン性水中油型エマルジョンは、DOEPCを、約1.7 mg/ml～約10 mg/ml

1、約1.8mg/ml～約10mg/ml、約2.0mg/ml～約10mg/ml、約2.2mg/ml～約10mg/ml、約2.4mg/ml～約10mg/ml、約2.6mg/ml～約10mg/ml、約2.8mg/ml～約10mg/ml、約3.0mg/ml～約10mg/ml、約3.2mg/ml～約10mg/ml、約3.4mg/ml～約10mg/ml、約3.6mg/ml～約10mg/ml、約4.0mg/ml～約10mg/ml、約4.4mg/ml～約10mg/ml、約4.8mg/ml～約10mg/ml、約5mg/ml～約10mg/ml、約1.7mg/ml～約5mg/ml、約1.8mg/ml～約5mg/ml、約1.8mg/ml～約6mg/ml、約1.8mg/ml～約7mg/ml、約1.8mg/ml～約8mg/ml、約1.8mg/ml～約9mg/ml、約1.7mg/ml、約1.8mg/ml、約2.0mg/ml、約2.2mg/ml、約2.4mg/ml、約2.6mg/ml、約2.8mg/ml、約3.0mg/ml、約3.2mg/ml、約3.4mg/ml、約3.6mg/ml、約3.8mg/ml、約4.0mg/ml、約4.2mg/ml、約4.4mg/ml、約4.6mg/ml、約4.8mg/ml、約5.0mg/ml、約5.2mg/ml、約5.5mg/ml、約6.0mg/ml、少なくとも約0.8mg/ml、少なくとも約0.85mg/ml、少なくとも約0.9mg/ml、少なくとも約1.0mg/ml、少なくとも約1.1mg/ml、少なくとも約1.2mg/ml、少なくとも約1.3mg/ml、少なくとも約1.4mg/ml、少なくとも約1.5mg/ml、少なくとも約1.6mg/ml、少なくとも約1.7mg/mlなどで含み得る。

10

【0093】

20

特定の実施形態では、カチオン性脂質はDODACである。カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.8mg/ml～約10mg/mlのDODACを含み得る。例えば、カチオン性水中油型エマルジョンは、DODACを約1.7mg/ml～約10mg/ml、約1.8mg/ml～約10mg/ml、約2.0mg/ml～約10mg/ml、約2.2mg/ml～約10mg/ml、約2.4mg/ml～約10mg/ml、約2.6mg/ml～約10mg/ml、約2.8mg/ml～約10mg/ml、約3.0mg/ml～約10mg/ml、約3.2mg/ml～約10mg/ml、約3.4mg/ml～約10mg/ml、約3.6mg/ml～約10mg/ml、約4.0mg/ml～約10mg/ml、約4.4mg/ml～約10mg/ml、約4.8mg/ml～約10mg/ml、約5mg/ml～約10mg/ml、約1.7mg/ml～約5mg/ml、約1.8mg/ml～約5mg/ml、約1.8mg/ml～約6mg/ml、約1.8mg/ml～約7mg/ml、約1.8mg/ml～約8mg/ml、約1.8mg/ml～約9mg/ml、約1.7mg/ml、約1.8mg/ml、約2.0mg/ml、約2.2mg/ml、約2.4mg/ml、約2.6mg/ml、約2.8mg/ml、約3.0mg/ml、約3.2mg/ml、約3.4mg/ml、約3.6mg/ml、約3.8mg/ml、約4.0mg/ml、約4.2mg/ml、約4.4mg/ml、約4.6mg/ml、約4.8mg/ml、約5.0mg/ml、約5.2mg/ml、約5.5mg/ml、約6.0mg/ml、少なくとも約0.8mg/ml、少なくとも約0.85mg/ml、少なくとも約0.9mg/ml、少なくとも約1.0mg/ml、少なくとも約1.1mg/ml、少なくとも約1.2mg/ml、少なくとも約1.3mg/ml、少なくとも約1.4mg/ml、少なくとも約1.5mg/ml、少なくとも約1.6mg/ml、少なくとも約1.7mg/mlなどで含み得る。

30

40

【0094】

特定の実施形態では、カチオン性脂質はDOTMAである。カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.8mg/ml～約10mg/mlのDOTMAを含み得る。例えば、カチオン性水中油型エマルジョンは、DOTMAを約1.7mg/ml～約10mg/ml、約1.8mg/ml～約10mg/ml、約2.0mg/ml～約10mg/ml、約2.2mg/ml～約10mg/ml、約2.4mg/ml～約10mg/ml、約2.6mg/ml～約10mg/ml、約2.8mg/ml～約10mg/ml、約3.0mg/ml～約10mg/ml、約3.2mg/ml～約10mg/ml、約3.4mg/ml

50

ml ~ 約 10 mg/ml、約 3.6 mg/ml ~ 約 10 mg/ml、約 4.0 mg/ml ~ 約 10 mg/ml、約 4.4 mg/ml ~ 約 10 mg/ml、約 4.8 mg/ml ~ 約 10 mg/ml、約 5 mg/ml ~ 約 10 mg/ml、約 1.7 mg/ml ~ 約 5 mg/ml、約 1.8 mg/ml ~ 約 5 mg/ml、約 1.8 mg/ml ~ 約 6 mg/ml、約 1.8 mg/ml ~ 約 7 mg/ml、約 1.8 mg/ml ~ 約 8 mg/ml、約 1.8 mg/ml ~ 約 9 mg/ml、約 1.7 mg/ml、約 1.8 mg/ml、約 2.0 mg/ml、約 2.2 mg/ml、約 2.4 mg/ml、約 2.6 mg/ml、約 2.8 mg/ml、約 3.0 mg/ml、約 3.2 mg/ml、約 3.4 mg/ml、約 3.6 mg/ml、約 3.8 mg/ml、約 4.0 mg/ml、約 4.2 mg/ml、約 4.4 mg/ml、約 4.6 mg/ml、約 4.8 mg/ml、約 5.0 mg/ml、約 5.2 mg/ml、約 5.5 mg/ml、約 6.0 mg/ml、少なくとも約 0.8 mg/ml、少なくとも約 0.85 mg/ml、少なくとも約 0.9 mg/ml、少なくとも約 1.0 mg/ml、少なくとも約 1.1 mg/ml、少なくとも約 1.2 mg/ml、少なくとも約 1.3 mg/ml、少なくとも約 1.4 mg/ml、少なくとも約 1.5 mg/ml、少なくとも約 1.6 mg/ml、少なくとも約 1.7 mg/ml などで含み得る。

10

【0095】

上記に言及したように、上述した脂質の濃度は、エマルジョンを調製するのに使用される脂質の最初の量に基づいて求められる。最終生成物（例えば、投与の準備ができているパッケージングされ滅菌されたエマルジョン）中の油の実際の濃度は、場合により、わずかに低い（場合によって、最大約 10%、最大約 20%、最大約 25% または最大約 35% 低い）場合があることが、当該技術分野において理解されている。

20

【0096】

C. 油対脂質の比

本発明のカチオン性水中油型エマルジョンは、規定の油：脂質の比を有する。例えば、エマルジョンの油：脂質（モル：モル）の比は、少なくとも約 8：1（モル：モル）、少なくとも約 8.5：1（モル：モル）、少なくとも約 9：1（モル：モル）、少なくとも約 9.5：1（モル：モル）、少なくとも約 10：1（モル：モル）、少なくとも約 10.5：1（モル：モル）、少なくとも約 11：1（モル：モル）、少なくとも約 11.5：1（モル：モル）、少なくとも約 12：1（モル：モル）、少なくとも約 12.5：1（モル：モル）、少なくとも約 13：1（モル：モル）、少なくとも約 13.5：1（モル：モル）、少なくとも約 14：1（モル：モル）、少なくとも約 14.5：1（モル：モル）、少なくとも約 15：1（モル：モル）、少なくとも約 15.5：1（モル：モル）、少なくとも約 16：1（モル：モル）、少なくとも約 16.5：1（モル：モル）、少なくとも約 17：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 50：1（モル：モル）、約 9：1（モル：モル）～約 50：1（モル：モル）、約 10：1（モル：モル）～約 50：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 49：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 48：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 47：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 46：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 45：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 44：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 42：1（モル：モル）、約 8：1（モル：モル）～約 41：1（モル：モル）、約 9：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）、約 10：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）、約 11：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）、約 12：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）、約 13：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）、約 14：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）、約 15：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）、約 16：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）、約 17：1（モル：モル）～約 43：1（モル：モル）などであり得る。

30

40

【0097】

所望の場合、エマルジョンの油：脂質（モル：モル）の比は、少なくとも約 4：1（モル：モル）、少なくとも約 4.2：1（モル：モル）、少なくとも約 4.5：1（モル：

50

モル)、少なくとも約5:1(モル:モル)、少なくとも約5.5:1(モル:モル)、
 少なくとも約6:1(モル:モル)、少なくとも約6.5:1(モル:モル)、7:1(モル:モル)、
 少なくとも約7.5:1(モル:モル)、約4:1(モル:モル)~約50:1(モル:モル)、
 約5:1(モル:モル)~約50:1(モル:モル)、約6:1(モル:モル)~約50:1(モル:モル)、
 約7:1(モル:モル)~約50:1(モル:モル)、約4:1(モル:モル)~約49:1(モル:モル)、
 約4:1(モル:モル)~約48:1(モル:モル)、約4:1(モル:モル)~約47:1(モル:モル)、
 約4:1(モル:モル)~約46:1(モル:モル)、約4:1(モル:モル)~約45:1(モル:モル)、
 約4:1(モル:モル)~約44:1(モル:モル)、約4:1(モル:モル)~約43:1(モル:モル)、
 約4:1(モル:モル)~約42:1(モル:モル)、約4:1(モル:モル)~約41:1(モル:モル)、
 約5:1(モル:モル)~約43:1(モル:モル)、約6:1(モル:モル)~約43:1(モル:モル)、
 約7:1(モル:モル)~約43:1(モル:モル)などであり得る。

10

【0098】

場合によっては、カチオン性脂質の濃度を増大させる(それにより、エマルジョン粒子に負荷する核酸分子の量を増大させる)という要望と、*in vivo*投与した場合の該脂質の毒性または忍耐力とのバランスをとる必要があり得る。例えば、高用量のDOTAPは毒性効果を有することがあり得ることが報告されている。例えば、Lappalainenら, Pharm. Res., 11巻(8):1127-31(1994)参照。具体的なエマルジョンにおける脂質用量の最適な範囲は、熟練医師の知識に従って決定され得る。

20

【0099】

油が分子の混合物を含む場合、該油のモル濃度は、該油の平均分子量に基づいて計算され得る。例えば、ダイズ油の平均分子量(292.2)は、平均脂肪酸分布(12%の重量パーセントのパルミチン酸; 52%の重量パーセントのリノレン酸; など)および各成分の分子量に従って計算され得る。

【0100】

C. 追加の成分

本明細書に記載されるカチオン性水中油型エマルジョンは、追加の成分をさらに含むことができる。例えば、エマルジョンは、粒子形成を促し、負に荷電した分子とカチオン性粒子との間の複合体形成を改善し、または負に荷電した分子の安定性を増大させる(例えば、RNA分子の分解を防止する)ことができる成分を含むことができる。所望の場合、カチオン性水中油型エマルジョンは、抗酸化剤(例えば、シトレート、アスコルベートまたはそれらの塩)を含むことができる。

30

【0101】

界面活性剤

ある特定の実施形態では、本明細書中に記載されるとおりのカチオン性水中油型エマルジョンは、界面活性剤をさらに含む。

【0102】

相当な数の界面活性剤が医薬品科学において使用されている。これらには、天然に由来する材料、例えば、樹木からのゴム、植物タンパク質、アルギネートなどの糖ベースのポリマーなどが含まれる。炭素主鎖上にヒドロキシドまたは他の親水性置換基を有するある特定のオキシポリマーまたはポリマー、例えば、ポビドン、ポリビニルアルコール、およびグリコールエーテルベースの一官能性化合物および多官能性化合物は、界面活性剤活性を有する。イオン性または非イオン性の界面活性剤および長鎖脂肪酸由来化合物もまた、本発明で使用することができる。

40

【0103】

適切な界面活性剤の具体例として、以下のものが挙げられる:

【0104】

1. 高級脂肪酸($C_{10} \sim C_{22}$)のナトリウム、カリウム、アンモニウム、およびア

50

ルカノール - アンモニウム塩などの水溶性石けん、特に、ナトリウムタロウおよびカリウムタロウならびにココナツ石けん。

【 0 1 0 5 】

2. その分子構造内に約 8 ~ 22 個の炭素原子を含有するアルキルラジカル、ならびにスルホン酸ラジカルおよび硫酸エステルラジカルからなる群より選択されるラジカルを有する有機硫酸反応生成物の水溶性塩によって代表され得るアニオン性合成非石けん界面活性剤。これらの例は、タロウまたはヤシ油に由来するナトリウムまたはカリウムアルキルスルフェート；ナトリウムまたはカリウムアルキルベンゼンスルホネート；ナトリウムアルキルグリセリルエーテルスルホネート；ナトリウムヤシ油脂肪酸モノグリセリドスルホネートおよびスルフェート；高級脂肪アルコール 1 モルとエチレンオキシド約 1 ~ 6 モルとの反応生成物の硫酸エステルのナトリウムまたはカリウム塩；1 分子当たり 1 ~ 10 単位のエチレンオキシドを有し、アルキルラジカルが 8 ~ 12 個の炭素原子を含有するナトリウムまたはカリウムアルキルフェノールエチレンオキシドエーテルスルホネート；イセチオン酸でエステル化され、水酸化ナトリウムで中和された脂肪酸の反応生成物；メチルタウリド (methyl tauride) の脂肪酸アミドのナトリウムまたはカリウム塩；ならびに SO_3 - スルホン化された $\text{C}_{10} \sim \text{C}_{24}$ - オレフィンのナトリウムまたはカリウム塩である。

10

【 0 1 0 6 】

3. アルキレンオキシド基を有機疎水性化合物と縮合することによって作製される非イオン性合成界面活性剤。一般的な疎水性基には、プロピレンオキシドのプロピレングリコールとの縮合生成物、アルキルフェノール、プロピレンオキシドとエチレンジアミンの縮合生成物、8 ~ 22 個の炭素原子を有する脂肪族アルコール、および脂肪酸のアミドが含まれる。

20

【 0 1 0 7 】

4. 半極性特性を有する非イオン性界面活性剤、例えば、アミンオキシド、ホスフィンオキシド、およびスルホキシドなど。長鎖第 3 級アミンオキシドの具体例には、ジメチルドデシルアミンオキシド、およびビス - (2 - ヒドロキシエチル) ドデシルアミンが含まれる。ホスフィンオキシドの具体例は、1967 年 2 月 14 日に発行された米国特許第 3,304,263 号に見出され、これらには、ジメチルドデシルホスフィンオキシドおよびジメチル - (2 ヒドロキシドデシル) ホスフィンオキシドが含まれる。

30

【 0 1 0 8 】

5. 式 $\text{R}^1 - \text{SO} - \text{R}^2$ (式中、 R^1 および R^2 は、置換または非置換のアルキル基であり、前者は、約 10 ~ 約 28 個の炭素原子を含有し、一方、 R^2 は、1 ~ 3 個の炭素原子を含有する) に対応するものを含めた長鎖スルホキシド。これらのスルホキシドの具体例には、ドデシルメチルスルホキシド、および 3 - ヒドロキシトリデシルメチルスルホキシドが含まれる。

【 0 1 0 9 】

6. ナトリウム 3 - ドデシルアミノプロピオネート、およびナトリウム 3 - ドデシルアミノプロパンスルホネートなどの両性合成界面活性剤。

【 0 1 1 0 】

7. 3 - (N, N - ジメチル - N - ヘキサデシルアンモニオ) プロパン - 1 - スルホネート、および 3 - (N, N - ジメチル - N - ヘキサデシルアンモニオ) - 2 - ヒドロキシプロパン - 1 - スルホネートなどの双性イオン性合成界面活性剤。

40

【 0 1 1 1 】

さらに、以下のタイプの界面活性剤のすべてを、本発明の組成物中に使用することができる：(a) 脂肪酸、ロジン酸、およびトールオイルの石けん (すなわち、アルカリ塩)；(b) アルキルアレーンスルホネート；(c) 分岐鎖および直鎖疎水性基の両方、ならびに 1 級および 2 級スルフェート基を有する界面活性剤を含めたアルキルスルフェート；(d) 疎水性基と親水性基との間に中間連結を含有するスルフェートおよびスルホネート、例えば、脂肪アシル化メチルタウリドおよび硫酸化脂肪モノグリセリドなど；(e) ポ

50

リエチレングリコールの長鎖の酸エステル、特にトールオイルエステル；(f)アルキルフェノールのポリエチレングリコールエーテル；(g)長鎖アルコールとメルカプタンのポリエチレングリコールエーテル；ならびに(h)脂肪アシルジエタノールアミド。界面活性剤は、1つを超える様式で分類することができるので、この段落で示した界面活性剤のいくつかのクラスは、以前に記載した界面活性剤のクラスと重複する。

【0112】

生物学的状況のために具体的に設計され、その状況において一般に使用されるいくつかの界面活性剤が存在する。このような界面活性剤は、4つの基本タイプ、すなわち、アニオン性、カチオン性、双性イオン性(両性)、および非イオン性に分けられる。例示的なアニオン性界面活性剤として、例えば、ペルフルオロオクタノエート(PFOAもしくはPFO)、ペルフルオロオクタンスルホネート(PFOS)、アルキル硫酸塩、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、または硫酸ラウリルアンモニウム、硫酸ラウレスナトリウム(ナトリウムラウリルエーテルスルフェート、SLESとしても公知)、アルキルベンゼンスルホネート、および脂肪酸塩が含まれる。例示的なカチオン性界面活性剤には、例えば、アルキルトリメチルアンモニウム塩、例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB、またはヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド)、塩化セチルピリジニウム(CPC)、ポリエトキシ化タロウアミン(POEA)、塩化ベンザルコニウム(BAC)、塩化ベンゼトニウム(BZT)が含まれる。例示的な双性イオン性(両性)界面活性剤には、例えば、ドデシルベタイン、ココミドプロピルベタイン、およびココアンホ(coco ampho)グリシネートが含まれる。例示的な非イオン性界面活性剤として、例えば、アルキルポリ(エチレンオキシド)、アルキルフェノールポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレンオキシド)とポリ(プロピレンオキシド)のコポリマー(ポロキサマーまたはポロキサミンと商業的に呼ばれる)、アルキル(aal)ポリグルコシド(例えば、オクチルグルコシドまたはデシルマルトシド)、脂肪アルコール(例えば、セチルアルコールまたはオレイルアルコール)、ココミドMEA、ココミドDEA、Pluronic(登録商標)F-68(ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリマー)、およびポリソルベート、例えば、Tween20(ポリソルベート20)、Tween80(ポリソルベート80；ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(polyoxyethylenesorbitan monooleate))、ドデシルジメチルアミンオキシド、およびビタミンEトコフェロールプロピレングリコールコハク酸(ビタミンE TPGS)が挙げられる。

【0113】

界面活性剤の特に有用な群は、ソルビタンベースの非イオン性界面活性剤である。これらの界面活性剤は、ソルビトールを脱水して1,4-ソルビタンを得、次いでこれを、1つまたは複数の当量の脂肪酸と反応させることによって調製される。脂肪酸置換部分を、エチレンオキシドとさらに反応させることによって、第2の群の界面活性剤を得ることができる。

【0114】

脂肪酸置換ソルビタン界面活性剤は、1,4-ソルビタンを、脂肪酸、例えば、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、または同様の長鎖脂肪酸などと反応させて、1,4-ソルビタンモノエステル、1,4-ソルビタンセスキエステル、または1,4-ソルビタントリエステルを得ることによって作製される。これらの界面活性剤の一般名称には、例えば、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート(sorbitan monoesterate)、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンセスキオレエート、およびソルビタントリエステートが含まれる。これらの界面活性剤は、通常、様々なモノエステル、ジエステル、およびトリエステル置換ソルビタンを区別する文字または数値が指定されて、SPAN(登録商標)、またはARLACEL(登録商標)の名称で市販されている。

【0115】

SPAN(登録商標)およびARLACEL(登録商標)界面活性剤は、親水性であり

10

20

30

40

50

、一般に、油中に可溶性または分散性である。これらはまた、ほとんどの有機溶媒中に可溶性である。水中で、これらは、一般に不溶性であるが分散性である。一般に、これらの界面活性剤は、1.8 ~ 8.6の親水性親油性バランス(HLB)数を有することになる。このような界面活性剤は、当該技術分野で公知の手段によって容易に作製することができ、または市販されている。

【0116】

界面活性剤の関係した群は、ポリオキシエチレン(olxyethylene)ソルビタンモノエステル、およびポリオキシエチレンソルビタントリエステルを含む。これらの材料は、1,4-ソルビタンモノエステル(monester)またはトリエステルにエチレンオキシドを付加することによって調製される。ポリオキシエチレンを付加すると、親油性のソルビタンモノエステルまたはトリエステル界面活性剤が、一般に水中で可溶性または分散性であり、有機液体中で様々な程度に可溶性である親水性界面活性剤に変換される。

10

【0117】

これらの材料は、TWEEN(登録商標)の商標で市販されており、水中油型エマルジョンおよび分散物の調製、または油の可溶化、および水溶性または洗浄可能な無水軟膏の作製に有用である。TWEEN(登録商標)界面活性剤は、関係したソルビタンモノエステルまたはトリエステル界面活性剤と合わせることによって、エマルジョン安定性を促すことができる。TWEEN(登録商標)界面活性剤は、一般に、9.6 ~ 16.7に入るHLB値を有する。TWEEN(登録商標)界面活性剤は、市販されている。

20

【0118】

単独で、またはSPAN、ARLACEL(登録商標)、およびTWEEN(登録商標)界面活性剤とともに使用することができる非イオン性界面活性剤の第3の群は、エチレンオキシドを長鎖脂肪酸と反応させることによって作製されるポリオキシエチレン脂肪酸である。このタイプの最も一般に入手可能な界面活性剤は、MYRJ(登録商標)の名称で販売されており、ステアリン酸のポリオキシエチレン誘導体である。MYRJ(登録商標)界面活性剤は、TWEEN(登録商標)界面活性剤のように、親水性であり、水中で可溶性または分散性である。MYRJ(登録商標)界面活性剤は、エマルジョンを形成するために、TWEEN(登録商標)界面活性剤と、またはTWEEN(登録商標)/SPAN(登録商標)もしくはARLACEL(登録商標)界面活性剤の混合物とブレンドすることができる。MYRJ(登録商標)界面活性剤は、当該技術分野で公知の方法によって作製することができ、または市販されている。

30

【0119】

ポリオキシエチレンベースの非イオン性界面活性剤の第4の群は、ラウリルアルコール、アセチルアルコール、ステアリルアルコール、およびオレイルアルコールに由来するポリオキシエチレン脂肪酸エーテルである。これらの材料は、脂肪アルコールにエチレンオキシドを付加することによって、上記のように調製される。これらの界面活性剤の商業的な名称は、BRIJ(登録商標)である。BRIJ(登録商標)界面活性剤は、界面活性剤中のポリオキシエチレン部分のサイズに応じて、親水性または親油性となり得る。これらの化合物の調製物は、当該技術分野から利用可能であるが、これらは、商業的供給源からも容易に入手可能である。

40

【0120】

潜在的に使用することができる他の非イオン性界面活性剤は、例えば、ポリオキシエチレン、ポリオール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシプロピレン脂肪エーテル、ポリオキシエチレンを含有する蜜ろう誘導体、ポリオキシエチレンラノリン誘導体、ポリオキシエチレン脂肪グリセリド、グリセロール脂肪酸エステル、または他の12 ~ 22炭素原子の長鎖脂肪酸のポリオキシエチレンの酸アルコールもしくはエーテル誘導体である。

【0121】

多相系であることが意図された本発明のエマルジョンおよび製剤として、約7 ~ 16の

50

範囲内のHLB値を有するエマルジョン形成非イオン性界面活性剤を選ぶことが好ましい。この値は、TWEEN（登録商標）界面活性剤などの単一の非イオン性界面活性剤の使用を通じて得ることができ、あるいはソルビタンモノエステル、ジエステル、もしくはトリエステルベースの界面活性剤などとの界面活性剤のブレンド；ソルビタンエステルポリオキシエチレン脂肪酸；ポリオキシエチレンラノリン由来界面活性剤と組み合わせたソルビタンエステル；高HLBポリオキシエチレン脂肪エーテル界面活性剤と組み合わせたソルビタンエステル界面活性剤；またはポリエチレン脂肪エーテル界面活性剤、もしくはポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸を使用することによって達成することができる。

【0122】

ある特定の実施形態では、エマルジョンは、エマルジョン安定化非イオン性界面活性剤として、単一の非イオン性界面活性剤、最も特にTWEEN（登録商標）界面活性剤を含む。例示的な実施形態では、エマルジョンは、ポリソルベート80またはポリオキシエチレン20ソルビタンモノオレエートとして別に公知であるTWEEN（登録商標）80を含む。他の実施形態では、エマルジョンは、2つ以上の非イオン性界面活性剤、特に、TWEEN（登録商標）界面活性剤、およびSPAN（登録商標）界面活性剤を含む。例示的な実施形態では、エマルジョンは、TWEEN（登録商標）80およびSPAN（登録商標）85を含む。

10

【0123】

水中油型エマルジョンは、約0.01%～約2.5%の界面活性剤(w/v)、約0.01%～約2%の界面活性剤、0.01%～約1.5%の界面活性剤、0.01%～約1%の界面活性剤、0.01%～約0.5%の界面活性剤、0.05%～約0.5%の界面活性剤、0.08%～約0.5%の界面活性剤、約0.08%の界面活性剤、約0.1%の界面活性剤、約0.2%の界面活性剤、約0.3%の界面活性剤、約0.4%の界面活性剤、約0.5%の界面活性剤、約0.6%の界面活性剤、約0.7%の界面活性剤、約0.8%の界面活性剤、約0.9%の界面活性剤、または約1%の界面活性剤を含有することができる。

20

【0124】

代わりにまたはさらに、水中油型エマルジョンは、0.05%～約1%、0.05%～約0.9%、0.05%～約0.8%、0.05%～約0.7%、0.05%～約0.6%、0.05%～約0.5%、約0.08%、約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、または約1% (w/v) のTween 80 (ポリソルベート80；ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート (polyoxyethylenesorbitan monooleate)) を含有することができる。

30

【0125】

例示的な実施形態では、水中油型エマルジョンは、0.08% (w/v) のTween 80 (ポリソルベート80；ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート (polyoxyethylenesorbitan monooleate)) を含有する。

【0126】

代わりにまたはさらに、水中油型エマルジョンは、0.05%～約1%、0.05%～約0.9%、0.05%～約0.8%、0.05%～約0.7%、0.05%～約0.6%、0.05%～約0.5%、約0.08%、約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、または約1% (w/v) のSPAN 85 (ソルビタントリオレエート) を含有することができる。

40

【0127】

水中油型エマルジョンは、本明細書に記載される界面活性剤の組合せを含有することができる。例えば、Tween 80 (ポリソルベート80；ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート) とSPAN 85 (ソルビタントリオレエート) の組合せを使用することができる。エマルジョンは、様々な量のTween 80およびSPAN 85 (例えば、上記に例示したもの) または等しい量を含有することができる。例えば、水中油型エマルジ

50

ヨンは、(w/v)で、約0.05%のTween 80と約0.05%のSPAN 85、約0.1%のTween 80と約0.1%のSPAN 85、約0.2%のTween 80と約0.2%のSPAN 85、約0.3%のTween 80と約0.3%のSPAN 85、約0.4%のTween 80と約0.4%のSPAN 85、約0.5%のTween 80と約0.5%のSPAN 85、約0.6%のTween 80と約0.6%のSPAN 85、約0.7%のTween 80と約0.7%のSPAN 85、約0.8%のTween 80と約0.8%のSPAN 85、約0.9%のTween 80と約0.9%のSPAN 85、または約1%のTween 80と約1.0%のSPAN 85を含有することができる。

【0128】

特定の実施形態では、界面活性剤は、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質である。他の実施形態では、エマルジョンは、PEG-脂質を含まない。PEG-脂質、例えば、ジアルキルオキシプロピルにカップリングしたPEG(PEG-DAA)、ジアシルグリセロールにカップリングしたPEG(PEG-DAG)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)(PEG-PE)もしくはいくつかの他のリン脂質(PEG-リン脂質)とカップリングしたPEG、セラミドとコンジュゲートしたPEG(PEG-Cer)、またはこれらの組合せなども、界面活性剤として使用することができる(例えば、米国特許第5,885,613号;米国特許出願公開第2003/0077829号、同第2005/0175682号、および同第2006/0025366を参照)。他の適切なPEG-脂質には、例えば、PEG-ジアルキルオキシプロピル(DAA)脂質、またはPEG-ジアシルグリセロール(DAG)脂質が含まれる。例示的なPEG-DAG脂質として、例えば、PEG-ジラウロイルグリセロール(C₁₂)脂質、PEG-ジミリスチルグリセロール(C₁₄)脂質、PEG-ジパルミトイルグリセロール(C₁₆)脂質、またはPEG-ジステアロイルグリセロール(C₁₈)脂質が挙げられる。例示的なPEG-DAA脂質として、例えば、PEG-ジラウリルオキシプロピル(C₁₂)脂質、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(C₁₄)脂質、PEG-ジパルミチルオキシプロピル(C₁₆)脂質、またはPEG-ジステアリルオキシプロピル(C₁₈)脂質が挙げられる。

【0129】

PEGは、その分子量によって分類される。例えば、PEG 2000は、約2,000ダルトンの平均分子量を有し、PEG 5000は、約5,000ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、Sigma Chemical Co.ならびに他の会社から市販されており、これらには、例えば、以下のものが含まれる:モノメトキシポリエチレングリコール(MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコール-コハク酸(MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシンイミジルコハク酸(MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコール-アミン(MePEG-NH₂)、モノメトキシポリエチレングリコール-トレシレート(MePEG-TRES)、およびモノメトキシポリエチレングリコール-イミダゾリル-カルボニル(MePEG-IM)。さらに、モノメトキシポリエチレングリコール-酢酸(MePEG-CH₂COOH)は、例えば、PEG-DAAコンジュゲートを含めた、PEG-脂質コンジュゲートの調製に特に有用である。

【0130】

D. 水相(連続相)

水中油型エマルジョンの水相(連続相)は水、または塩(例えば、NaCl)、バッファー(例えば、クエン酸バッファー)、非イオン性張度調整剤(例えば、糖)、ポリマー、界面活性剤もしくはそれらの任意の組合せを含み得る水性溶液である。複合体を形成する前のエマルジョン(負に荷電した分子の添加前の水中油型エマルジョン)の水相は、複合体を形成した後のエマルジョン(負に荷電した分子がエマルジョン粒子と複合体を形成した水中油型エマルジョン)の水相と異なり得る。一般的に、複合体を形成する前のエマルジョンは、所望の特性(例えば、平均直径など)を有する粒子の形成を促進させる水性

10

20

30

40

50

溶媒で調製される。複合体を形成する前のエマルジョンを、負に荷電した分子と他の所望の成分を含む水性溶液で希釈し、所望の容量オスモル濃度および張度を有する最終の水相を含む最終のカチオン性水中油型エマルジョンを作製する。水相に、抗酸化剤、例えば、シトレート、アスコルベートまたはその塩を含めてもよい。

【0131】

エマルジョンをインピボでの投与のために製剤化する場合、望ましくない投与後の結果（例えば、腫脹または組成物の迅速な吸収）を防止するために、最終的な溶液を、エマルジョンの張度および容量オスモル濃度が通常の生理的液体と実質的に同じとなるように調製することが好ましい。また、ある特定の事例では、エマルジョンのある特定の成分の安定性を保証するために、pHを特定のレベルに維持することが望ましい場合がある。例えば、等張性であり、等浸透圧であるエマルジョンを調製することが望ましい場合がある。張性を制御するために、エマルジョンは、ナトリウム塩などの生理的塩を含むことができる。例えば、塩化ナトリウム（NaCl）を約0.9%（w/v）（生理食塩水）で使用することができる。存在し得る他の塩には、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウムなどが含まれる。非イオン性張度調整剤も張性を制御するのに使用することができる。いくつかの非イオン性張度調整剤が、通常、当業者に公知である。これらは一般的に様々な分類の炭水化物である（例えば、VoetおよびVoet（1990年）Biochemistry（John Wiley & Sons, New York）を参照）。アルドースとして分類される単糖、例えば、グルコース、マンノース、アラビノース、およびリボースなど、ならびにケトースとして分類されるもの、例えば、フルクトース、ソルボース、およびキシロースなどを、本発明における非イオン性張度調整剤として使用することができる。二糖、例えば、スクロース、マルトース、トレハロース、およびラクトースなども使用することができる。さらに、アルジトール（非環式ポリヒドロキシアルコール、糖アルコールとも呼ばれる）、例えば、グリセロール、マンニトール、キシリトール、およびソルビトールなどは、本発明において有用な非イオン性張度調整剤である。非イオン性張度調整剤は、使用される作用物質に応じて、約0.1%～約10%または約1%～約10%の濃度で存在し得る。

【0132】

水相を、緩衝化することができる。任意の生理学的に許容されるバッファー、例えば、水、クエン酸バッファー、リン酸バッファー、酢酸バッファー、トリスバッファー、ピカルボネートバッファー、カルボネートバッファー、コハク酸バッファーなどを、本明細書で使用することができる。水性成分のpHは、好ましくは、6.0～8.0、より好ましくは、約6.2～約6.8である。例示的な実施形態では、バッファーは、6.5のpHを有する10mMのクエン酸バッファーである。別の例示的な実施形態では、水相は、RNaaseフリー水またはDEPC処理水を使用して調製されるか、またはこうして調製されるバッファーである。いくつかの場合では、バッファー中の高濃度の塩は、負に荷電した分子のエマルジョン粒子への複合体形成に干渉する場合があります。したがって、回避される。他の場合では、バッファーにおいてある特定の量の塩を含めることができる。

【0133】

例示的な実施形態では、バッファーは、6.5のpHを有する10mMのクエン酸バッファーである。所望の場合、水相は、RNaaseフリー水またはDEPC処理水を使用して調製されるか、またはこうして調製されるバッファーである。

【0134】

水相は、追加の成分、例えば、水相の容量オスモル濃度を変化させる分子、または複合体形成後の負に荷電した分子を安定化させる分子なども含むことができる。水相の容量オスモル濃度は、非イオン性張度調整剤、例えば、糖（例えば、トレハロース、スクロース、デキストロース、フルクトース、還元パラチノースなど）、糖アルコール（マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ラクチトール、マルチトール、グリセロールなど）などを使用して調整していることが好ましい。所望の場合、非イオン性ポリマーポリマー（例えば、ポリ（アルキルグリコール）、例えば、ポリエチレングリコー

10

20

30

40

50

ル、ポリプロピレングリコール、もしくはポリブチレングリコールなど)、または非イオン性界面活性剤を使用することができる。

【0135】

ある特定の実施形態では、カチオン性水中油型エマルジョンの水相は、ポリマーもしくは界面活性剤、またはこれらの組合せを含むことができる。例示的な実施形態では、水中油型エマルジョンは、ポロキサマーを含有する。ポロキサマーは、ポリオキシエチレン(ポリ(エチレンオキシド))の2本の親水性鎖が隣接するポリオキシプロピレン(ポリ(プロピレンオキシド))の中心の疎水性鎖を有する非イオン性トリブロックコポリマーである。ポロキサマーは、商標名 Pluronic (登録商標)ポリマーによっても公知である。ポロキサマーポリマーは、RNA複合体形成後のRNA分子の安定性をより大きくし、RNAase耐性を増大させることができる。

10

【0136】

代わりにまたはさらに、カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.1%~約20%(w/v)のポリマー、または約0.05%~約10%(w/v)のポリマーを含むことができる。例えば、カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.1%~約20%(w/v)、約0.1%~約10%(w/v)、約0.05%~約10%(w/v)、または約0.05%~約5%(w/v)でポリマー(例えば、Pluronic(登録商標)F127((エチレンオキシド/プロピレンオキシド)ブロックコポリマー: $H(OCH_2CH_2)_x(OCH_2CH(CH_3))_y(OCH_2CH_2)_zOH$)などのポロキサマー)を含むことができる。

20

【0137】

例示的な実施形態では、水中油型エマルジョンは、約4%(w/v)、または約8%(w/v)のPluronic(登録商標)F127を含む。

【0138】

これらの組成物中に使用される水性成分の量は、組成の値を1にするのに必要な量となる。すなわち、100%にするのに十分な水性成分の量が、上記に列挙された他の成分と混合されることによって、その組成物の容積となる。

【0139】

4. 負に荷電した分子

負に荷電した分子が送達される場合、これは、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成させることができる。負に荷電した分子は、例えば、負に荷電した分子と粒子の表面上のカチオン性脂質との間の相互作用、ならびに負に荷電した分子と粒子の表面との間の疎水性/親水性相互作用によって、エマルジョン粒子と複合体を形成する。いずれの特定の理論にも束縛されることを望まないが、負に荷電した分子は、非共有結合性イオン電荷相互作用(静電気力)を通じてカチオン性脂質と相互作用し、複合体の強度、ならびに粒子と複合体を形成することができる負に荷電した化合物の量は、粒子中のカチオン性脂質の量に関係すると考えられる。さらに、負に荷電した分子と粒子の表面との間の疎水性/親水性相互作用も、役割を果たす場合がある。

30

【0140】

負に荷電した分子の例には、負に荷電したペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質、核酸分子(例えば、一本鎖もしくは二本鎖RNAもしくはDNA)、小分子(例えば、小分子免疫増強因子(SMIP)、ホスホネート、フルオロホスホネートなど)などが含まれる。好適な態様では、負に荷電した分子は、自己複製RNA分子、または低分子干渉RNAを含めた、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードするRNAなどのRNA分子である。

40

【0141】

複合体は、当該技術分野で公知の技法を使用して形成することができ、その例は、本明細書に記載されている。例えば、核酸-粒子複合体は、例えば、ボルテックスすることによって、カチオン性エマルジョンを核酸分子と混合することによって形成することができる。負に荷電した分子およびエマルジョン中のカチオン性脂質の量を調整または最適化す

50

ることによって、所望の結合強度および結合能力をもたらすことができる。例えば、本明細書に記載され、例として示されているように、例示的なRNA-粒子複合体は、RNA：カチオン性脂質の比（「N/P比」で測定した場合）を変更することによって生成された。用語N/P比は、RNA上のホスフェートの量（モル）によって除かれた、カチオン性脂質中のプロトン化可能な（protonatable）窒素原子の量（モル）を指す。

【0142】

好適なN/P比は、約1：1～約20：1、約2：1～約18：1、約3：1～16：1、約4：1～約14：1、約6：1～約12：1、約3：1、約4：1、約5：1、約6：1、約7：1、約8：1、約9：1、約10：1、約11：1、約12：1、約13：1、約14：1、約15：1または約16：1である。あるいは、好適なN/P比は、少なくとも約3：1、少なくとも約4：1、少なくとも約5：1、少なくとも約6：1、少なくとも約7：1、少なくとも約8：1、少なくとも約9：1、少なくとも約10：1、少なくとも約11：1、少なくとも約12：1、少なくとも約13：1、少なくとも約14：1、少なくとも約15：1または少なくとも約16：1である。より好適なN/P比は約4：1またはそれより高くである。

10

【0143】

各エマルジョンは、所望の効果（例えば、複合体を形成したRNAの所望のレベルの発現）を生じさせるために、それ自体の最適または好適なN/P比を有することができ、これは、実験的に（例えば、RNAによってコードされるタンパク質の発現レベルの測定、またはヘパリンの存在下で複合体から放出されるRNA分子の百分率の測定など、本明細書に記載されるアッセイ、または他の当該技術分野で公知の技法を使用して）求めることができる。一般に、N/P比は、RNA-粒子複合体が細胞によって取り込まれた場合に、RNA分子の少なくとも約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%が、RNA-粒子複合体から放出される値であるべきである。いくつかの実施形態では、N/P比は、RNA-粒子複合体が細胞によって取り込まれる場合に、RNA分子の少なくとも0.5%または少なくとも1%が、RNA-粒子複合体から放出される放出を提供する値である。

20

【0144】

RNA分子にコードされた抗原の発現レベルは、該抗原の免疫原性と必ずしも相関しなくてもよい。このような場合、免疫原性に最適または好ましいN/P比は、例えば、特異的抗体の力価を測定することにより決定され得る。

30

【0145】

本明細書に記載されるカチオン性水中油型エマルジョンは、核酸ベースのワクチン（例えば、DNAワクチン、RNAワクチン）を製剤化するのに特に適している。核酸-エマルジョン粒子複合体の形成は、核酸の宿主細胞への取り込みを促進し、核酸分子をヌクレアーゼ分解から保護する。次いで、トランスフェクション細胞は、核酸分子によってコードされる抗原を発現することができ、抗原への免疫応答を生じさせることができる。生ウイルスまたは弱毒化ウイルスのように、核酸ベースのワクチンは、MHC-I経路およびMHC-II経路の両方に有効に関与し、CD8⁺T細胞応答およびCD4⁺T細胞応答の誘導を可能にすることができ、一方、組換えタンパク質などの可溶性形態で存在する抗原は、一般に、抗体応答のみを誘導する。

40

【0146】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される負に荷電した分子は、RNA分子である。ある特定の実施形態では、RNA分子は、抗原（ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質）をコードし、カチオン性水中油型エマルジョンは、RNAベースのワクチンとして使用するのに適している。組成物は、抗原をコードする1種を超えるRNA分子、例えば、エマルジョン粒子と複合体を形成している2、3、5、または10の異なる種のRNA分子を含有することができる。すなわち、組成物は、それぞれが異なる抗原をコード

50

する、1つまたは複数の異なる種のRNA分子を含有することができる。代わりにまたはさらに、1つのRNA分子、例えば、異なるかまたは同一の抗原をコードするバイシストロニックまたはトリシストロニックなRNA分子は、1つを超える抗原をコードすることもできる。したがって、カチオン性水中油型エマルジョンは、一価または多価であるRNAベースのワクチンとして使用するのに適している。所望の場合、RNA分子はポリシストロン性であってもよい。

【0147】

RNA分子の配列は、ヒト細胞などの所望の宿主における発現について最適化または脱最適化された(deoptimized)コドンとすることができる。

【0148】

RNA分子の配列は、例えば、RNAの発現もしくは複製の効率を増大させ、または分解に対する追加の安定性もしくは耐性をもたらすために、必要に応じて修飾することができる。例えば、RNA配列は、例えば、RNAの翻訳効率および半減期を増大させるために、そのコドン使用頻度に関して修飾することができる。ポリAテール(例えば、約30アデノシン残基またはそれより多くの)(配列番号28)は、RNAの3'テールに結合することによって、RNAの半減期を増大させることができる。RNAの5'テールを、構造m7G(5')ppp(5')N(キャップ0構造)を有する修飾されたりボヌクレオチドまたはその誘導體でキャッピングすることができ、これは、RNA合成の間に組み込むことができ、またはRNA転写後に酵素的に操作することができる(例えば、N7-モノメチル化キャップ0構造の構築を触媒するmRNAトリホスファターゼ、グアニリル-トランスフェラーゼ、およびグアニン-7-メチルトランスフェラーゼからなるワクシニアウイルスキャッピング酵素(VCE)を使用することによって)。キャップ0構造は、RNA分子の安定性および翻訳効率の維持に重要な役割を果たす。RNA分子の5'キャップを、2'-O-メチルトランスフェラーゼによってさらに修飾することができ、これは、キャップ1構造(m7Gppp[m2'-O]N)の生成をもたらし、この構造は、翻訳効率をさらに増大させることができる。

【0149】

所望の場合、RNA分子は、任意の5'キャップ構造に加えて1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含むことができる。哺乳動物RNAに96を超える天然に存在するヌクレオチド修飾が見ついている。例えば、Limbachら、Nucleic Acids Research、22巻(12号):2183~2196頁(1994年)を参照。ヌクレオチドならびに修飾ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドの調製は、例えば、米国特許第4373071号、同第4458066号、同第4500707号、同第4668777号、同第4973679号、同第5047524号、同第5132418号、同第5153319号、同第5262530号、同第5700642号から当該技術分野で周知であり、これらの特許のすべては、その全体が参照により本明細書に組み込まれており、多くの修飾ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドが市販されている。

【0150】

修飾ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチド中に組み込むことができ、RNA分子中に存在し得る修飾核酸塩基として、m5C(5-メチルシチジン)、m5U(5-メチルウリジン)、m6A(N6-メチルアデノシン)、s2U(2-チオウリジン)、Um(2'-O-メチルウリジン)、m1A(1-メチルアデノシン); m2A(2-メチルアデノシン); Am(2-1-O-メチルアデノシン); ms2m6A(2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン); i6A(N6-イソペンテニルアデノシン); ms2i6A(2-メチルチオ-N6イソペンテニルアデノシン); io6A(N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン); ms2io6A(2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン); g6A(N6-グリシニルカルバモイルアデノシン); t6A(N6-トレオニルカルバモイルアデノシン); ms2t6A(2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン); m6t6A(N6-メチル-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン); hn6A(N6-ヒドロキシノルバリルカル

10

20

30

40

50

バモイルアデノシン) ; m s 2 h n 6 A (2 - メチルチオ - N 6 - ヒドロキシノルバリル
 カルバモイルアデノシン) ; A r (p) (2 ' - O - リボシルアデノシン (ホスフェート
)) ; I (イノシン) ; m 1 I (1 - メチルイノシン) ; m ' I m (1 , 2 ' - O - ジメ
 チルイノシン) ; m 3 C (3 - メチルシチジン) ; C m (2 T - O - メチルシチジン) ;
 s 2 C (2 - チオシチジン) ; a c 4 C (N 4 - アセチルシチジン) ; f 5 C (5 - ホン
 ニルシチジン) ; m 5 C m (5 , 2 - O - ジメチルシチジン) ; a c 4 C m (N 4 アセチ
 ル 2 T O メチルシチジン) ; k 2 C (リシジン) ; m 1 G (1 - メチルグアノシン) ; m
 2 G (N 2 - メチルグアノシン) ; m 7 G (7 - メチルグアノシン) ; G m (2 ' - O -
 メチルグアノシン) ; m 2 2 G (N 2 , N 2 - ジメチルグアノシン) ; m 2 G m (N 2 ,
 2 ' - O - ジメチルグアノシン) ; m 2 2 G m (N 2 , N 2 , 2 ' - O - トリメチルグア
 ノシン) ; G r (p) (2 ' - O - リボシルグアノシン (ホスフェート)) ; y W (ワイ
 ブトシン) ; o 2 y W (ベルオキシワイブトシン) ; O H y W (ヒドロキシワイブトシン
) ; O H y W * (修飾未満 (u n d e r m o d i f i e d) ヒドロキシワイブトシン) ;
 i m G (ワイオシン) ; m i m G (メチルグアノシン) ; Q (クエウオシン) ; o Q (エ
 ポキシクエウオシン) ; g a l Q (ガラクトシル - クエウオシン) ; m a n Q (マンノシ
 ル - クエウオシン) ; p r e Q o (7 - シアノ - 7 - デアザグアノシン) ; p r e Q i (7 -
 アミノメチル - 7 - デアザグアノシン) ; G * (アルカエオシン) ; D (ジヒドロウ
 リジン) ; m 5 U m (5 , 2 ' - O - ジメチルウリジン) ; s 4 U (4 - チオウリジン)
 ; m 5 s 2 U (5 - メチル - 2 - チオウリジン) ; s 2 U m (2 - チオ - 2 ' - O - メチ
 ルウリジン) ; a c p 3 U (3 - (3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル) ウリジン) ;
 h o 5 U (5 - ヒドロキシウリジン) ; m o 5 U (5 - メトキシウリジン) ; c m o 5 U
 (ウリジン 5 - オキシ酢酸) ; m c m o 5 U (ウリジン 5 - オキシ酢酸メチルエステル)
 ; c h m 5 U (5 - (カルボキシヒドロキシメチル) ウリジン) ; m c h m 5 U (5 - (カ
 ルボキシヒドロキシメチル) ウリジンメチルエステル) ; m c m 5 U (5 - メトキシカ
 ルボニルメチルウリジン) ; m c m 5 U m (S - メトキシカルボニルメチル - 2 - O - メ
 チルウリジン) ; m c m 5 s 2 U (5 - メトキシカルボニルメチル - 2 - チオウリジン)
 ; n m 5 s 2 U (5 - アミノメチル - 2 - チオウリジン) ; m n m 5 U (5 - メチルアミ
 ノメチルウリジン) ; m n m 5 s 2 U (5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウリジン) ;
 m n m 5 s e 2 U (5 - メチルアミノメチル - 2 - セレノウリジン) ; n c m 5 U (5 -
 カルバモイルメチルウリジン) ; n c m 5 U m (5 - カルバモイルメチル - 2 ' - O - メ
 チルウリジン) ; c m n m 5 U (5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン) ; c n m
 m 5 U m (5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - L - O メチルウリジン) ; c m n m
 5 s 2 U (5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン) ; m 6 2 A (N 6 ,
 N 6 - ジメチルアデノシン) ; T m (2 ' - O - メチルイノシン) ; m 4 C (N 4 - メチ
 ルシチジン) ; m 4 C m (N 4 , 2 - O - ジメチルシチジン) ; h m 5 C (5 - ヒドロキ
 シメチルシチジン) ; m 3 U (3 - メチルウリジン) ; c m 5 U (5 - カルボキシメチル
 ウリジン) ; m 6 A m (N 6 , T - O - ジメチルアデノシン) ; r n 6 2 A m (N 6 , N
 6 , O - 2 - トリメチルアデノシン) ; m 2 ' 7 G (N 2 , 7 - ジメチルグアノシン) ;
 m 2 ' 2 ' 7 G (N 2 , N 2 , 7 - トリメチルグアノシン) ; m 3 U m (3 , 2 T - O -
 ジメチルウリジン) ; m 5 D (5 - メチルジヒドロウリジン) ; f 5 C m (5 - ホルミル
 - 2 ' - O - メチルシチジン) ; m 1 G m (1 , 2 ' - O - ジメチルグアノシン) ; m '
 A m (1 , 2 - O - ジメチルアデノシン) イリノメチルウリジン ; t m 5 s 2 U (S - タ
 ウリノメチル - 2 - チオウリジン) ; i m G - 1 4 (4 - ジメチル (d e m e t h y l)
 グアノシン) ; i m G 2 (イソグアノシン) ; a c 6 A (N 6 - アセチルアデノシン)、
 ヒポキサンチン、イノシン、8 - オキソ - アデニン、その7 - 置換誘導体、ジヒドロウラ
 シル、シュードウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - アミノウラシル、
 5 - (C ₁ ~ C ₆) - アルキルウラシル、5 - メチルウラシル、5 - (C ₂ ~ C ₆) - アル
 ケニルウラシル、5 - (C ₂ ~ C ₆) - アルキニルウラシル、5 - (ヒドロキシメチル)
 ウラシル、5 - クロロウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - ヒ
 ドロキシシトシン、5 - (C ₁ ~ C ₆) - アルキルシトシン、5 - メチルシトシン、5 -

10

20

30

40

50

(C₂ ~ C₆) - アルケニルシトシン、5 - (C₂ ~ C₆) - アルキニルシトシン、5 - クロロシトシン、5 - フルオロシトシン、5 - プロモシトシン、N² - ジメチルグアニン、7 - デアザグアニン、8 - アザグアニン、7 - デアザ - 7 - 置換グアニン、7 - デアザ - 7 - (C₂ ~ C₆) アルキニルグアニン、7 - デアザ - 8 - 置換グアニン、8 - ヒドロキシグアニン、6 - チオグアニン、8 - オキソグアニン、2 - アミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、2, 4 - ジアミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、8 - アザプリン、置換7 - デアザプリン、7 - デアザ - 7 - 置換プリン、7 - デアザ - 8 - 置換プリン、水素 (無塩基残基)、m5C、m5U、m6A、s2U、W、または2' - O - メチル - Uが挙げられる。これらの修飾核酸塩基およびこれらの対応するリボヌクレオシドの多くは、商業的供給者から入手可能である。例えば、参照により本明細書に組み込まれているWO2011/005799を参照。

10

【0151】

所望の場合、RNA分子は、ホスホラミデート連結、ホスホロチオエート連結、および/またはメチルホスホネート連結を含有することができる。

【0152】

いくつかの実施形態では、RNA分子は、修飾ヌクレオチドを含まず、例えば、修飾核酸塩基を含まず、RNA分子中のヌクレオチドのすべては、例えば、7 - メチルグアノシンを含むことができる必要に応じた5' キャップを例外として、従来の標準的なリボヌクレオチドA、U、G、およびCである。他の実施形態では、RNAは、7' - メチルグアノシンを含む5' キャップを含むことができ、最初の1、2、または3つの5' リボヌクレオチドは、リボースの2' 位でメチル化されている場合がある。

20

【0153】

A. 自己複製RNA

いくつかの態様では、カチオン性水中油型エマルジョンは、自己複製RNA分子を含有する。ある特定の実施形態では、自己複製RNA分子は、アルファウイルスに由来し、またはこれに基づく。

【0154】

自己複製RNA分子は、当該技術分野で周知であり、例えば、アルファウイルスに由来する複製エレメントを使用し、ウイルスの構造タンパク質を、目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列と置換することによって生成することができる。自己複製RNAをトランスフェクトされた細胞は、アポトーシス死を起こす前に、短期間、抗原を産生する。この死は、要求される二本鎖(ds)RNA中間体の結果である可能性があり、これらはまた樹状細胞を超活性化することが示されている。したがって、自己複製RNAの増強された免疫原性は、炎症促進性(pro-inflammatory) dsRNAの生成の結果である場合があり、これは宿主細胞のRNA - ウイルス感染を模倣する。

30

【0155】

有利には、細胞の機構が自己複製RNA分子により使用されることによって、タンパク質または抗原などのコードされる遺伝子産物の指数関数的増加が生じ、これらは、細胞内に蓄積することができ、または細胞から分泌され得る。自己複製RNA分子によるタンパク質または抗原の過剰発現は、RNAの複製および増幅、ならびにトランスフェクション細胞のアポトーシスを誘導する翻訳の産物による、トル様受容体(TLR)3、7、および8、ならびに非TLR経路(例えば、RIG-1、MD-5)の刺激を含めた免疫賦活性アジュバント効果を活用する。

40

【0156】

自己複製RNAは、一般に、ウイルスレプリカーゼ、ウイルスプロテアーゼ、ウイルスヘリカーゼ、および他の非構造ウイルスタンパク質からなる群より選択される少なくとも1つまたは複数の遺伝子を含有し、5' - 末端および3' - 末端のシス活性複製配列、ならびに必要に応じて、所望のアミノ酸配列(例えば、目的の抗原)をコードする異種配列も含む。異種配列の発現を指示するサブゲノムプロモーターを、自己複製RNA中に含めることができる。必要に応じて、異種配列(例えば、目的の抗原)を、自己複製RNA中

50

の他のコード領域にインフレームで融合することができ、かつ/または内部リボソーム進入部位 (IRES) の制御下とすることができる。

【0157】

ある特定の実施形態では、自己複製RNA分子は、ウイルス様粒子内に被包されない。本発明の自己複製RNA分子は、自己複製RNA分子が感染性ウイルス粒子の産生を誘導することができないように設計することができる。これは、例えば、自己複製RNA中でウイルス粒子を産生するのに必要な構造タンパク質をコードする1つまたは複数のウイルス遺伝子を除外することによって達成することができる。例えば、自己複製RNA分子がアルファウイルス、例えば、シンドビス (Sinebis) ウイルス (SIN)、セムリキ森林ウイルス、およびベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEE) などに基づく場合、ウイルス構造タンパク質、例えば、カプシドおよび/またはエンベロープ糖タンパク質などをコードする1つまたは複数の遺伝子を除外することができる。

10

【0158】

所望の場合、本発明の自己複製RNA分子を、弱毒化された、もしくは伝染性の強い感染性ウイルス粒子の産生を誘導するように、またはその後1ラウンド感染させることができるウイルス粒子を生成するように、設計することもできる。

【0159】

脊椎動物細胞に送達された場合、自己複製RNA分子は、それ自体から(またはそのアンチセンスコピーから)転写されることにより複数の娘RNAの産生をもたらすことができる。自己複製RNAは、細胞に送達された後に直接翻訳され得、そしてこの翻訳は、RNA依存性RNAポリメラーゼをもたらし、次いでこれは、送達されたRNAからの転写物を生成する。したがって、送達されたRNAにより、複数の娘RNAの産生がもたらされる。これらの転写物は、送達されたRNAに対してアンチセンスであり、これら自体が翻訳されて、遺伝子産物の *in situ* 発現をもたらすことができ、または転写されて、送達されたRNAと同じセンスを有するさらなる転写物をもたらすことができ、これらが翻訳されて、遺伝子産物の *in situ* 発現をもたらす。

20

【0160】

自己複製を達成するための1つの適切なシステムは、アルファウイルスベースのRNAレプリコンを使用することである。アルファウイルスは、トガウイルス科の一連の遺伝的、構造的、および血清学的に関係した節足動物媒介性ウイルスを含む。シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ロスリバーウイルス、およびベネズエラウマ脳炎ウイルスを含めた26の公知のウイルスおよびウイルスサブタイプが、アルファウイルス属に分類されている。したがって、本発明の自己複製RNAは、セムリキ森林ウイルス (SFV)、シンドビスウイルス (SIN)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEE)、ロスリバーウイルス (RRV)、またはアルファウイルス科に属する他のウイルスに由来するRNAレプリカーゼを組み込むことができる。

30

【0161】

アルファウイルスベースの「レプリコン」発現ベクターを、本発明において使用することができる。レプリコンベクターは、DNA、RNA、および組換えレプリコン粒子を含めたいくつかの形式で利用することができる。このようなレプリコンベクターは、例えば、シンドビスウイルス (Xiongら (1989年) Science 243巻: 1188~1191頁; Dubenskyら、(1996年) J. Virol. 70巻: 508~519頁; Hariharanら (1998年) J. Virol. 72巻: 950~958頁; Poloら (1999年) PNAS 96巻: 4598~4603頁)、セムリキ森林ウイルス (Liljestrom (1991年) Bio/Technology 9巻: 1356~1361頁; Berglundら (1998年) Nat. Biotech. 16巻: 562~565頁)、およびベネズエラウマ脳炎ウイルス (Pushkoら (1997年) Virology 239巻: 389~401頁) を含むアルファウイルスから得られている。アルファウイルス由来レプリコンは一般的に、全体的な特性(例えば、構造、複製)がかなり類似しており、個々のアルファウイルスは、ユニ

40

50

ークであるいくつかの特性（例えば、受容体結合、インターフェロン感受性、および疾患プロファイル）を示すことができる。したがって、多岐にわたるウイルス科から作製されるキメラアルファウイルスレプリコンも有用となり得る。

【0162】

アルファウイルスベースのレプリコンは、細胞に送達された後に翻訳されてレプリカーゼ（またはレプリカーゼ-転写酵素）をもたらし得る（+）鎖レプリコンである。レプリカーゼは、ポリタンパク質として翻訳され、これは、自己切断して（+）鎖で送達されたRNAのゲノム（-）鎖コピーを作り出す複製複合体をもたらす。これらの（-）鎖転写物は、それ自体が転写されることによって、（+）鎖親RNAのさらなるコピーを与え、また、所望の遺伝子産物をコードするサブゲノム転写物を与えることができる。したがって、サブゲノム転写物が翻訳されると、感染細胞によって所望の遺伝子産物が *in situ* で発現される。適切なアルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルスなどに由来するレプリカーゼを使用することができる。

10

【0163】

好適な自己複製RNA分子は、従って、（i）自己複製RNA分子からRNAを転写することができるRNA依存性RNAポリメラーゼ、および（ii）ポリペプチド抗原をコードする。ポリメラーゼは、例えば、アルファウイルスタンパク質 *nsP4* を含むアルファウイルスレプリカーゼとすることができる。

【0164】

天然のアルファウイルスゲノムは、非構造レプリカーゼに加えて、構造ビリオンタンパク質をコードするが、本発明のアルファウイルスベースの自己複製RNA分子は、アルファウイルス構造タンパク質をコードしないことが好適である。したがって、自己複製RNA分子は、細胞内でそれ自体のゲノムRNAコピーの産生をもたらすことができるが、RNA含有アルファウイルスビリオンの産生をもたらすことはできない。これらのビリオンを生成することができないことは、野生型アルファウイルスとは異なり、自己複製RNA分子は、感染性形態でそれ自体を永続させることができないことを意味する。野生型ウイルスの永続に必要なアルファウイルス構造タンパク質は、本発明の自己複製RNA分子にはなく、その場所は、所望の遺伝子産物をコードする遺伝子（複数可）によって奪われており、その結果、サブゲノム転写物は、構造アルファウイルスビリオンタンパク質ではなく所望の遺伝子産物をコードする。

20

30

【0165】

従って、本発明で有用な自己複製RNA分子は、2つのオープンリーディングフレームを有することができる。第1の（5'）オープンリーディングフレームは、レプリカーゼをコードし、第2の（3'）オープンリーディングフレームは、ポリペプチド抗原をコードする。いくつかの実施形態では、RNAは、例えば、別の所望の遺伝子産物をコードする追加の（下流）オープンリーディングフレームを有することができる。自己複製RNA分子は、コードされたレプリカーゼと適合性である5'配列を有することができる。

【0166】

他の態様では、自己複製RNA分子は、アルファウイルス以外のウイルス、好ましくは、プラス鎖RNAウイルス、より好ましくは、ピコルナウイルス、フラビウイルス、ルビウイルス、ペスチウイルス、ヘパシウイルス、カリチウイルス、またはコロナウイルスから、またはこれらに基づいて得られる。適切な野生型アルファウイルス配列は、周知であり、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville、Mdなどの配列受託機関から入手可能である。適切なアルファウイルスの代表的な例として、アウラ（ATCC VR-368）、ベバルウイルス（ATCC VR-600、ATCC VR-1240）、カバツソウ（Cabassou）（ATCC VR-922）、チクングニアウイルス（ATCC VR-64、ATCC VR-1241）、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス（ATCC VR-65、ATCC VR-1242）、フォートモーガン（ATCC VR-924）、ゲタウイルス（ATCC VR-369、ATCC VR-124

40

50

3)、キジラガハ(Kyzylgach)(ATCC VR-927)、マヤロ(ATCC VR-66)、マヤロウイルス(ATCC VR-1277)、ミドルバーグ(ATCC VR-370)、ムカンボウイルス(ATCC VR-580、ATCC VR-1244)、ヌドゥム(ATCC VR-371)、ピクスナウイルス(ATCC VR-372、ATCC VR-1245)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373、ATCC VR-1246)、セムリキ森林(ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、シンドビスウイルス(ATCC VR-68、ATCC VR-1248)、トナテ(Tonate)(ATCC VR-925)、トリニチ(Trinititi)(ATCC VR-469)、ウナ(ATCC VR-374)、ベネズエラウマ脳脊髄炎(ATCC VR-69、ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR-1249、ATCC VR-532)、西部ウマ脳脊髄炎(ATCC VR-70、ATCC VR-1251、ATCC VR-622、ATCC VR-1252)、ワタロア(ATCC VR-926)、およびY-62-33(ATCC VR-375)が挙げられる。

10

【0167】

本発明の自己複製RNA分子は、他のタイプのRNA(例えば、mRNA)より大きい。一般的に、本発明の自己複製RNA分子は、少なくとも約4kbを含有する。例えば、自己複製RNAは、少なくとも約5kb、少なくとも約6kb、少なくとも約7kb、少なくとも約8kb、少なくとも約9kb、少なくとも約10kb、少なくとも約11kb、少なくとも約12kb、または12kb超を含有することができる。ある特定の例では、自己複製RNAは、約4kb~約12kb、約5kb~約12kb、約6kb~約12kb、約7kb~約12kb、約8kb~約12kb、約9kb~約12kb、約10kb~約12kb、約11kb~約12kb、約5kb~約11kb、約5kb~約10kb、約5kb~約9kb、約5kb~約8kb、約5kb~約7kb、約5kb~約6kb、約6kb~約12kb、約6kb~約11kb、約6kb~約10kb、約6kb~約9kb、約6kb~約8kb、約6kb~約7kb、約7kb~約11kb、約7kb~約10kb、約7kb~約9kb、約7kb~約8kb、約8kb~約11kb、約8kb~約10kb、約8kb~約9kb、約9kb~約11kb、約9kb~約10kb、または約10kb~約11kbである。

20

【0168】

本発明の自己複製RNA分子は、1つまたは複数の修飾ヌクレオチド(例えば、シュードウリジン、N6-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジン)を含むことができる。

30

【0169】

自己複製RNA分子は、単一のポリペプチド抗原、または必要に応じて、配列のそれぞれが、アミノ酸配列として発現される場合に、その同一性を保持するように一緒に連結された(例えば、連続して連結された)2つ以上のポリペプチド抗原をコードすることができる。次いで、自己複製RNAから生成されるポリペプチドを、融合ポリペプチドとして生成し、または別個のポリペプチドまたはペプチド配列をもたらす様式で操作することができる。

40

【0170】

本発明の自己複製RNAは、様々なエピトープを含有する1つまたは複数のポリペプチド抗原をコードすることができる。エピトープは、ヘルパーT細胞応答、もしくは細胞傷害性T細胞応答、またはその両方を誘発することができるのが好ましい。

【0171】

本明細書に記載される自己複製RNA分子を、2つ以上のオープンリーディングフレームから複数のヌクレオチド配列を発現するように操作することができ、それによって、免疫応答の生成を増強することができるサイトカインまたは他の免疫調節剤を伴った、2つ以上の抗原などのタンパク質の共発現を可能にする。このような自己複製RNA分子は、例えば、二価ワクチンまたは多価ワクチンとして、例えば、様々な遺伝子産物(例えば、

50

タンパク質)を同時に生成することにおいて特に有用となり得る。

【0172】

本発明の自己複製RNA分子は、任意の適切な方法を使用して調製することができる。修飾ヌクレオチドを含有するRNA分子を生成するためのいくつかの適切な方法が当該技術分野で公知である。例えば、修飾ヌクレオチドを含有する自己複製RNA分子は、適切なDNA依存性RNAポリメラーゼ、例えば、T7ファージRNAポリメラーゼ、SP6ファージRNAポリメラーゼ、T3ファージRNAポリメラーゼなど、またはRNA分子中への修飾ヌクレオチドの効率的な組込みを可能にする、これらのポリメラーゼの変異体を使用して、自己複製RNA分子をコードするDNAを転写(例えば、*in vitro* 転写)することによって調製することができる。転写反応物は、ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチド、ならびに適切なバッファー、および適切な塩などの選択されたポリメラーゼの活性を支持する他の成分を含有することになる。自己複製RNA中へのヌクレオチド類似体の組込みは、例えば、このようなRNA分子の安定性を変更し、RNAseに対する耐性を増大させ、適切な宿主細胞内に導入した後の複製(RNAの「感染力」)を確立し、かつ/または先天性免疫応答および適応免疫応答を誘導もしくは低減するように操作することができる。

10

【0173】

本発明の自己複製RNA分子を生成するために、適切な合成法を単独で、または1つもしくは複数の他の方法(例えば、組換えDNA技術もしくは組換えRNA技術)と組み合わせ、使用することができる。*de novo*合成のための適切な方法は、当該技術分野で周知であり、特定の用途に適応させることができる。例示的な方法には、例えば、CEMなどの適切な保護基を使用する化学合成(Masudaら(2007年) *Nucleic Acids Symposium Series* 51巻:3~4頁)、*-シアノエチルホスホラミダイト法*(Beaucage S Lら(1981年) *Tetrahedron Lett* 22巻:1859頁);ヌクレオシドH-ホスホネート法(Garegg Pら(1986年) *Tetrahedron Lett* 27巻:4051~4頁;Froehler B Cら(1986年) *Nucl Acid Res* 14巻:5399~407頁;Garegg Pら(1986年) *Tetrahedron Lett* 27巻:4055~8頁;Gaffney B Lら(1988年) *Tetrahedron Lett* 29巻:2619~22頁)が含まれる。これらの化学法を、市販されている自動核酸シンセサイザーとともに実施するか、またはこれとともに使用するのに適応させることができる。追加の適切な合成法は、Uhlmannら(1990年) *Chem Rev* 90巻:544~84頁、およびGoodchild J(1990年) *Bioconjugate Chem* 1巻:165頁に開示されている。核酸合成は、クローニング、プロセッシング、ならびに/またはポリヌクレオチドおよびこのようなポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物の発現を含めた、当該技術分野で周知であり、慣例的である適切な組換え法を使用して実施することもできる。ランダム断片化ならびに遺伝子断片および合成ポリヌクレオチドのPCR再構築によるDNAシャッフリングは、ポリヌクレオチド配列を設計および操作するのに使用することができる公知の技法の例である。核酸およびコードされるタンパク質を変更する、例えば、新しい制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変更し、コドン選択を変化させ、スプライスパリアントを生成し、変異を導入するためなどに、部位特異的変異誘発を使用することができる。核酸配列の転写、翻訳、および発現のための適切な方法は、当該技術分野で公知であり、慣例的である。(一般に、*Current Protocols in Molecular Biology*、2巻、Ausubelら編、Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience、13章、1988年;Glover、*DNA Cloning*、II巻、IRL Press、Wash.、D. C.、3章、1986年;Bitterら、*Methods in Enzymology* 153巻:516~544頁(1987年);*The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*、Strather

20

30

40

50

nら編、Cold Spring Harbor Press、I巻およびII巻、1982年；ならびに Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、1989年を参照)。

【0174】

自己複製RNA分子中の1つまたは複数の修飾ヌクレオチドの存在および/または量を、任意の適切な方法を使用して判定することができる。例えば、自己複製RNAを消化してモノホスフェートにし(例えば、ヌクレアーゼP1を使用して)、脱リン酸化することができ(例えば、CIAPなどの適切なホスファターゼを使用して)、得られるヌクレオシドを、逆相HPLC(例えば、YMC Pack ODS-AQカラム(5ミクロン、4.6×250mm))を使用して、勾配(30%のB(0~5分)から100%のB(5~13分))および100%のB(13~40分)、流量(0.7ml/分)、UV検出(波長:260nm)、カラム温度(30)、バッファーA(20mMの酢酸-酢酸アンモニウム pH3.5)、バッファーB(20mMの酢酸-酢酸アンモニウム pH3.5/メタノール[90/10])を使用して溶出する)によって分析することができる。

10

【0175】

必要に応じて、本発明の自己複製RNA分子は、自己複製RNA分子が、修飾ヌクレオチドを含有しない対応する自己複製RNA分子と比較して、宿主細胞(例えば、ヒト細胞)内に導入または進入した際により低い免疫調節活性を有することになるように、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含むことができる。

20

【0176】

所望の場合、自己複製RNA分子をスクリーニングまたは分析することによって、当業者に公知である様々な*in vitro*または*in vivo*試験法を使用して、その治療特性および予防特性を確認することができる。例えば、自己複製RNA分子を含むワクチンを、目的の特定のリンパ球型、例えば、B細胞、T細胞、T細胞株、およびT細胞クローンの増殖またはエフェクター機能の誘導に対する、ワクチンの効果について試験することができる。例えば、免疫化されたマウスに由来する脾臓細胞を単離することができる。細胞傷害性Tリンパ球の、ポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子を含有する自己標的細胞を溶解する能力。さらに、Tヘルパー細胞分化を、ELISAにより、TH1(IL-2およびIFN-)サイトカインならびに/もしくはTH2(IL-4およびIL-5)サイトカインの増殖もしくは産生を測定することによって、または細胞質サイトカイン染色およびフローサイトメトリーによってCD4+T細胞内で直接に分析することができる。

30

【0177】

ポリペプチド抗原をコードする自己複製RNA分子は、例えば、目的の抗原に特異的な抗体のB細胞産生の誘導によって立証されるような、体液性免疫応答を誘導する能力についても試験することができる。これらのアッセイは、例えば、免疫化された個体に由来する末梢Bリンパ球を使用して行うことができる。このようなアッセイ法は、当業者に公知である。本発明の自己複製RNA分子を特徴付けるのに使用することができる他のアッセイでは、標的細胞による、コードされる抗原の発現の検出を伴う場合がある。例えば、FACSを使用することによって、細胞表面上または細胞内で抗原発現を検出することができる。FACS選択の別の利点は、異なるレベルの発現について選別することができることである。場合により、より低い発現が望まれる場合がある。特定の抗原を発現する細胞を同定するための他の適切な方法は、プレート上のモノクローナル抗体を使用するパンニング、またはモノクローナル抗体でコーティングされた磁気ビーズを使用する捕捉を伴う。

40

【0178】

B. 抗原

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される負に荷電した分子は、抗原をコードする核酸分子(例えば、RNA分子)である。適切な抗原には、それだけに限らないが、細

50

菌性抗原、ウイルス抗原、真菌抗原、原生動物 (p r o t a z o a n) 抗原、植物抗原、がん抗原、またはこれらの組合せが含まれる。

【 0 1 7 9 】

適切な抗原には、病原体、例えば、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、植物、または腫瘍に由来するタンパク質およびペプチドが含まれる。自己複製RNA分子によってコードされ得るウイルス抗原ならびに免疫原として、それだけに限らないが、オルソミクソウイルス、例えば、インフルエンザA、B、およびCなど；パラミクソウイルス科ウイルス、例えば、ニューモウイルス (R S V)、パラミクソウイルス (P I V)、メタニューモウイルス、および麻疹ウイルス (M o r b i l l i v i r u s) (例 例 ば、麻疹 (m e a s l e s)) など；ニューモウイルス、例えば、RSウイルス (R S V)、ウシRSウイルス、マウスの肺炎ウイルス、およびシチメンチョウ鼻気管支炎ウイルスなど；パラミクソウイルス、例えば、パラインフルエンザウイルス1～4型 (P I V)、ムンプスウイルス、センダイウイルス、シミアンウイルス5、ウシパラインフルエンザウイルス、ニパウイルス、ヘニパウイルス、およびニューカッスル病ウイルスなど；真正痘瘡 (それだけに限らないが、大痘瘡および小痘瘡を含む) などのオルソポックスウイルスを含めたポックスウイルス科；メタニューモウイルス、例えば、ヒトメタニューモウイルス (h M P V) およびトリメタニューモウイルス (a M P V) など；麻疹 (m e a s l e s) などの麻疹ウイルス (M o r b i l l i v i r u s) ；ピコルナウイルス、例えば、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパルナウイルス、パレコウイルス、カルジオウイルス、およびアフタウイルスなど；エンテロウイルス、例えば、ポリオウイルス1型、2型、または3型、コクサッキーAウイルス1～22型および24型、コクサッキーBウイルス1～6型、エコーウイルス (E C H O) ウイルス1～9型、11～27型、および29～34型、ならびにエンテロウイルス68～71など、カリフォルニア脳炎ウイルスなどのオルソブニヤウイルスを含めたブニヤウイルス；リフトバレー熱ウイルスなどのフレボウイルス；クリミアコンゴ出血熱ウイルスなどのナイロウイルス；A型肝炎ウイルス (H A V) などのヘパルナウイルス；トガウイルス (風疹)、例えば、ルビウイルス、アルファウイルス、またはアルテリウイルスなど；フラビウイルス、例えば、ダニ媒介脳炎 (T B E) ウイルス、デング熱 (1型、2型、3型、もしくは4型) ウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、キャサヌール森林ウイルス、西ナイル脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ロシア春夏脳炎ウイルス、ポーワッサン脳炎ウイルスなど；ペスチウイルス、例えば、ウシウイルス性下痢症 (B V D V)、古典的ブタ熱 (C S F V)、またはボーダー病 (B D V) など；ヘパドナウイルス、例えば、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスなど；ラブドウイルス、例えば、リッサウイルス (狂犬病ウイルス)、およびベシクロウイルス (V S V) など、カリシウイルス科、例えば、ノーウォークウイルスなど、ならびにノーウォーク様ウイルス、例えば、ハワイウイルスおよびスノーマウンテンウイルスなど；コロナウイルス、例えば、S A R S、ヒト呼吸器コロナウイルス、トリ感染性気管支炎 (I B V)、マウス肝炎ウイルス (M H V)、およびブタ伝染性胃腸炎ウイルス (T G E V) など；レトロウイルス、例えば、オンコウイルス、レンチウイルス、またはスプマウイルスなど；レオウイルス、例えば、オルトレオウイルス、ロタウイルス、オルビウイルス、またはコルチウイルスなど；パルボウイルスB19などのパルボウイルス；デルタ肝炎ウイルス (H D V) ；E型肝炎ウイルス (H E V) ；G型肝炎ウイルス (H G V) ；ヒトヘルペスウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス (H S V)、水痘 - 帯状疱疹ウイルス (V Z V)、エプスタイン - バーウイルス (E B V)、サイトメガロウイルス (C M V)、ヒトヘルペスウイルス6 (H H V 6)、ヒトヘルペスウイルス7 (H H V 7)、およびヒトヘルペスウイルス8 (H H V 8) など；パポバウイルス、例えば、パピローマウイルスおよびポリオマウイルスなど、アデノウイルス (A d e n o v i r u e s s)、ならびにアレナウイルスに由来するタンパク質およびペプチドが挙げられる。

【 0 1 8 0 】

いくつかの実施形態では、抗原は、魚に感染するウイルス、例えば、伝染性サケ貧血ウイルス (I S A V)、サケ腭臓病ウイルス (S P D V)、伝染性腭臓壊死症ウイルス (I

10

20

30

40

50

PNV)、アメリカナマズウイルス(CCV)、魚のリンホシスチス病ウイルス(FLDV)、伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)、コイヘルペスウイルス、サケピコルナ様ウイルス(大西洋サケのピコルナ様ウイルスとしても公知)、ヤマメウイルス(LSV)、大西洋サケロタウイルス(ASR)、マスイチゴ病ウイルス(TSD)、銀サケ腫瘍ウイルス(CSTV)、またはウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV)などに対する免疫応答を誘発する。

【0181】

いくつかの実施形態では、抗原は、Plasmodium属、例えば、P. falciparum、P. vivax、P. malariae、またはP. ovaleなどに由来する寄生虫に対する免疫応答を誘発する。したがって、本発明は、マラリアに対して免疫化

10

いくつかの実施形態では、抗原は、Caligidae科、特に、Lepeophtheirus属およびCaligus属に由来する寄生虫、例えば、Lepeophtheirus salmonisまたはCaligus rogercresseyiなどのフナムシに対する免疫応答を誘発する。

【0182】

自己複製RNA分子によってコードされ得る細菌性抗原および免疫原として、それだけに限らないが、Neisseria meningitides、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus pyogenes、Moraxella catarrhalis、Bordetella pertussis、Burkholderia sp. (例えば、Burkholderia mallei、Burkholderia pseudomallei、およびBurkholderia cepacia)、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermis、Haemophilus influenzae、Clostridium tetani(破傷風)、Clostridium perfringens、Clostridium botulinum(ボツリヌス中毒)、Corynebacterium diphtheriae(ジフテリア)、Pseudomonas aeruginosa、Legionella pneumophila、Coxiella burnetii、Brucella sp. (例えば、B. abortus、B. canis、B. melitensis、B. neotomae、B. ovis、B. suis、およびB. pinnipediae)、Francisella sp. (例えば、F. novicida、F. philomiragia、およびF. tularensis)、Streptococcus agalactiae、Neisseria gonorrhoeae、Chlamydia trachomatis、Treponema pallidum(梅毒)、Haemophilus ducreyi、Enterococcus faecalis、Enterococcus faecium、Helicobacter pylori、Staphylococcus saprophyticus、Yersinia enterocolitica、E. coli(腸毒素産生性E. coli(ETEC)、腸管凝集性E. coli(EAggEC)、分散接着性E. coli(DAEC)、腸管病原性E. coli(EPEC)、腸外病原性E. coli(ExPEC; 尿路疾患性E. coli(UPEC)、および髄膜炎/敗血症関連E. coli(MNEC)など)、ならびに/または腸管出血性E. coli(EHEC))、Bacillus anthracis(炭疽)、Yersinia pestis(ペスト)、Mycobacterium tuberculosis、Rickettsia、Listeria monocytogenes、Chlamydia pneumoniae、Vibrio cholerae、Salmonella typhi(腸チフス)、Borrelia burgdorferi、Porphyromonas gingivalis、Klebsiella、Mycoplasma pneumoniaeなどに由来するタンパク質およびペプチドが挙げられる。

20

30

40

【0183】

自己複製RNA分子によってコードされ得る真菌抗原および免疫原として、それだけに限らないが、皮膚糸状菌(Dermatophytes)、例えば、

【化2】

Epidermophyton floccusum, Microsporium audouini,

Microsporium canis, Microsporium distortum, Microsporium equinum, Microsporium gypsum, Microsporium nanum, Trichophyton concentricum, Trichophyton equinum, Trichophyton gallinae, Trichophyton gypseum, Trichophyton megnini, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton quinckeanum, Trichophyton rubrum, Trichophyton schoenleini, Trichophyton tonsurans, Trichophyton verrucosum, T. verrucosum var. album, var. discoides, var.

10

【化3】

ochraceum, Trichophyton violaceum, および/または Trichophyton faviforme; または Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, Aspergillus terreus, Aspergillus sydowi, Aspergillus flavatus, Aspergillus glaucus, Blastoschizomyces capitatus, Candida albicans, Candida enolase, Candida tropicalis, Candida glabrata, Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida stellatoidea, Candida kusei, Candida parakwsei, Candida lusitaniae, Candida pseudotropicalis, Candida guilliermondi, Cladosporium carrionii, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatidis, Cryptococcus neoformans, Geotrichum clavatum, Histoplasma capsulatum, Klebsiella pneumoniae, Microsporidia, Encephalitozoon spp., Septata intestinalis および Enterocytozoon bienensei; それほど一般的ではないものは Brachiola spp, Microsporidium spp., Nosema spp., Pleistophora spp., Trachipleistophora spp., Vittaforma spp Paracoccidioides brasiliensis, Pneumocystis carinii, Pythium insidiosum, Pityrosporum ovale, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces boulardii, Saccharomyces pombe, Scedosporium apiosperum, Sporothrix schenckii, Trichosporon beigeli, Toxoplasma gondii, Penicillium marneffei, Malassezia spp., Fonsecaea spp., Wangiella spp., Sporothrix spp., Basidiobolus spp., Conidiobolus spp., Rhizopus spp, Mucor spp, Absidia spp, Mortierella spp, Cunninghamella spp, Saksenaea spp., Alternaria spp, Curvularia spp, Helminthosporium spp, Fusarium spp, Aspergillus spp, Penicillium spp, Monolinia spp, Rhizoctonia spp, Paecilomyces spp, Pithomyces spp, および Cladosporium spp.

20

30

40

に由来するタンパク質およびペプチドが挙げられる。

【0184】

自己複製RNA分子によってコードされ得る原生動物抗原および免疫原には、それだけに限らないが、Entamoeba histolytica、Giardia lamblia、Cryptosporidium parvum、Cyclospora cayatanensis、およびToxoplasmaに由来するタンパク質およびペプチドが含まれる。

【0185】

自己複製RNA分子によってコードされ得る植物抗原および免疫原には、それだけに限

50

らないが、*Ricinus communis*に由来するタンパク質およびペプチドが含まれる。

【0186】

適切な抗原として、ウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、A型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、サイトメガロウイルス(CMV)、インフルエンザウイルス(インフルエンザ)、RSウイルス(RSV)、パルボウイルス(*parvovirus*)、ノロウイルス、ヒトパピローマウイルス(HPV)、ライノウイルス、黄熱病ウイルス、狂犬病ウイルス、デング熱ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、風疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、エンテロウイルス(例えば、エンテロウイルス71)、エボラウイルス、およびウシ下痢症ウイルスなどに由来するタンパク質およびペプチドが挙げられる。抗原性物質は、HSV糖タンパク質gD、HIV糖タンパク質gp120、HIV糖タンパク質gp40、HIV p55 gag、ならびにpol領域およびtat領域に由来するポリペプチドからなる群より選択されることが好ましい。本発明の他の好適な実施形態では、抗原は、細菌、例えば、*Helicobacter pylori*、*Haemophilus influenzae*、*Vibrio cholerae*(コレラ)、*C. diphtheriae*(ジフテリア)、*C. tetani*(破傷風)、*Neisseria meningitidis*、*B. pertussis*、*Mycobacterium tuberculosis*などに由来するタンパク質またはペプチドである。

10

20

【0187】

本発明の自己複製RNA分子によってコードされ得るHIV抗原は、1990年3月9日に出願された米国出願第490,858号、公開された欧州出願第181150号(1986年5月14日)、ならびに米国出願第60/168,471号;同第09/475,515号;同第09/475,504号;および同第09/610,313号に記載されており、これらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0188】

本発明の自己複製RNA分子によってコードされ得るサイトメガロウイルス抗原は、米国特許第4,689,225号、1989年6月16日に出願された米国出願第367,363号、およびPCT公開第WO89/07143号に記載されており、これらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

30

【0189】

本発明の自己複製RNA分子によってコードされ得るC型肝炎抗原は、PCT/US88/04125、公開された欧州出願第318216号(1989年5月31日)、1988年11月18日に出願された、公開された日本国出願第1-500565号、カナダ国出願第583,561号、およびEPO388,232に記載されており、これらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。異なるセットのHCV抗原は、1990年3月16日に出願された欧州特許出願第90/302866.0号、および1989年12月21日に出願された米国出願第456,637号、およびPCT/US90/01348に記載されており、これらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

40

【0190】

いくつかの実施形態では、抗原は、アレルゲン、例えば、花粉アレルゲン(樹木、ハーブ、雑草、および草の花粉アレルゲン);昆虫またはクモ形類のアレルゲン(吸入アレルゲン、唾液アレルゲン、および毒液アレルゲン、例えば、ダニアレルゲン、ゴキブリおよび小昆虫のアレルゲン、膜翅目(*hymenoptera*)毒液アレルゲン);動物の毛アレルゲンおよびフケアレルゲン(例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ラット、マウスなどからの);ならびに食物アレルゲン(例えば、グリアジン)から得られる。樹木、草、ならびにハーブに由来する重要な花粉アレルゲンは、それだけに限らないが、カバノキ(*Betula*)、ハンノキ(*Alnus*)、ハシバミ(*Corylus*)、シデ(*Carpinus*)

50

nus)、およびオリーブ(Olea)、シーダー(CryptomeriaおよびJuniperus)、プラタナス(Platanus)を含めたFagales、Oleales、Pinalesの分類学上の目およびスズカケノキ科、Lolium属、Phleum属、Poa属、Cynodon属、Dactylis属、Holcus属、Phalaris属、Secale属、およびSorghum属の草を含むPoales目、Ambrosia属、Artemisia属、およびParietaria属のハープを含むAsterales目およびUrticales目が起源であるものである。他の重要な吸入性アレルゲンは、Dermatophagoides属およびEuroglyphus属のイエダニ、貯蔵庫ダニ、例えば、Lepidoglyphys、Glycyphagus、およびTyrophagusに由来するもの、ゴキブリ、小昆虫、およびノミ、例えば、Blattella、Periplaneta、Chironomus、およびCtenocephalidesに由来するもの、ならびに哺乳動物、例えば、ネコ、イヌ、およびウマなどに由来するもの、ミツバチ(Apidae)、スズメバチ(Vespidae)、およびアリ(Formicoidae)を含む膜翅目の分類学上の目からのものなどの刺咬昆虫(stinging or biting insect)が起源であるものを含めた毒液アレルゲンである。

10

【0191】

ある特定の実施形態では、腫瘍免疫原もしくは抗原、またはがん免疫原もしくは抗原は、自己複製RNA分子によってコードされ得る。ある特定の実施形態では、腫瘍免疫原および抗原は、ペプチド含有腫瘍抗原、例えば、ポリペプチド腫瘍抗原または糖タンパク質腫瘍抗原である。

20

【0192】

本明細書で使用するのに適した腫瘍免疫原および抗原は、(a)ポリペプチド(これは、例えば、長さが8~20アミノ酸の範囲とすることができるが、この範囲外の長さも一般的である)、リポポリペプチド、および糖タンパク質を含めたポリペプチド含有腫瘍抗原などの多種多様な分子を包含する。

【0193】

ある特定の実施形態では、腫瘍免疫原は、例えば、(a)がん細胞に関連する全長分子、(b)欠失、付加および/または置換された部分を有する分子を含めた、この全長分子の相同体および修飾形態、ならびに(c)この全長分子の断片である。腫瘍免疫原には、例えば、CD8+リンパ球によって認識されるクラスI制限抗原、またはCD4+リンパ球によって認識されるクラスII制限抗原が含まれる。

30

【0194】

ある特定の実施形態では、腫瘍免疫原として、それだけに限らないが、(a)がん精巢抗原、例えば、NY-ESO-1、SSX2、SCP1、ならびにRAGE、BAGE、GAGE、およびMAGEファミリーポリペプチド、例えば、GAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、およびMAGE-12など(これらは、例えば、黒色腫、肺、頭頸部、NSCLC、乳房、胃腸、および膀胱の腫瘍に対処するために使用することができる)、(b)変異抗原、例えば、p53(様々な固形腫瘍、例えば、結腸直腸、肺、頭頸部のがんに関連する)、p21/Ras(例えば、黒色腫、膵がん、および結腸直腸がんに関連する)、CDK4(例えば、黒色腫に関連する)、MUM1(例えば、黒色腫に関連する)、カスパーゼ-8(例えば、頭頸部がんに関連する)、CIA0205(例えば、膀胱がんに関連する)、HLA-A2-R1701、カテニン(例えば、黒色腫に関連する)、TCR(例えば、T細胞非ホジキンリンパ腫に関連する)、BCR-ab1(例えば、慢性骨髄性白血病に関連する)、トリオースリン酸イソメラーゼ、KIA0205、CDC-27、およびLDLR-FUT、(c)過剰発現抗原、例えば、ガレクチン4(例えば、結腸直腸がんに関連する)、ガレクチン9(例えば、ホジキン病に関連する)、プロテインアーゼ3(例えば、慢性骨髄性白血病に関連する)、WT1(例えば、様々な白血病に関連する)、炭酸脱水酵素(例えば、腎がんに関連する)、アルドラーゼA(例えば、肺がん

40

50

に関連する)、P R A M E (例えば、黒色腫に関連する)、H E R - 2 / n e u (例えば、乳房、結腸、肺、および卵巣のがんに関連する)、アルファ-フェトプロテイン(例えば、肝細胞がんに関連する)、K S A (例えば、結腸直腸がんに関連する)、ガストリン(例えば、膵がん、および胃がんに関連する)、テロメラーゼ触媒タンパク質、M U C - 1 (例えば、乳がん、および卵巣がんに関連する)、G - 2 5 0 (例えば、腎細胞がんに関連する)、p 5 3 (例えば、乳がん、結腸がんに関連する)、およびがん胎児性抗原(例えば、乳がん、肺がん、および結腸直腸がんなどの胃腸管のがんに関連する)、(d) 共通抗原、例えば、黒色腫-メラノサイト分化抗原、例えば、M A R T - 1 / メランA、g p 1 0 0、M C 1 R、メラニン細胞刺激ホルモン受容体、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質-1 / T R P 1、およびチロシナーゼ関連タンパク質-2 / T R P 2 など(例えば、黒色腫に関連する)、(e) 例えば、前立腺がんに関連する前立腺関連抗原、例えば、P A P、P S A、P S M A、P S H - P 1、P S M - P 1、P S M - P 2 など、(f) 免疫グロブリンイデオタイプ(例えば、骨髄腫およびB細胞リンパ腫に関連する)が挙げられる。

10

【0195】

ある特定の実施形態では、腫瘍免疫原として、それだけに限らないが、p 1 5、H o m / M e l - 4 0、H - R a s、E 2 A - P R L、H 4 - R E T、I G H - I G K、M Y L - R A R、エプスタインバーウイルス抗原、E B N A、E 6 および E 7 を含めたヒトパピローマウイルス(H P V)抗原、B型肝炎ウイルス抗原およびC型肝炎ウイルス抗原、ヒトT細胞リンパ球向性ウイルス抗原、

20

【化4】

TSP-180, p185crbB2,

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

30

(M a c - 2 結合タンパク質/サイクロフィリンC関連タンパク質)、T A A L 6、T A G 7 2、T L P、T P Sなどが挙げられる。

【0196】

C. 負に荷電した分子についての製剤

負に荷電した分子(R N Aなど)は、一般に、水性溶液の形態、または水性溶液中に容易に溶解することができる形態(例えば、凍結乾燥した)で提供される。水性溶液は、水、または塩(例えば、N a C l)、バッファー(例えば、クエン酸バッファー)、非イオン性張度調整剤(n o n i o n i c t o n i c i f y i n g a g e n t)(例えば、サッカリド)、ポリマー、界面活性剤、もしくはこれらの組合せを含む水性溶液とすることができる。製剤がi n v i v o投与のために意図されている場合、水性溶液は、正常な生理的条件と適合性であるp Hを維持する生理学的に許容されるバッファーであることが好ましい。また、ある特定の場では、製剤のある特定の成分の安定性を保証するために、p Hを特定のレベルに維持することが望ましい場合がある。

40

【0197】

例えば、等張性および/または等浸透圧である水性溶液を調製することが望ましい場合がある。高張性および低張性の溶液は、注入されたとき、組成物と生理学的な液との間でイオン濃度が異なるために、組成物の投与後の膨張または急速な吸収などの厄介な問題および望ましくない影響を場合により引き起こすことがある。張性を制御するために、エマルジョンは、ナトリウム塩などの生理的な塩を含むことができる。例えば、塩化ナトリウ

50

ム (NaCl) を、約 0.9% (w/v) (生理食塩水) で使用することができる。存在する場合がある他の塩には、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二ナトリウム無水物、塩化マグネシウム、塩化カルシウムなどが含まれる。例示的な実施形態では、水性溶液は、10 mM の NaCl、および他の塩、または非イオン性張度調整剤を含む。本明細書に記載されるように、非イオン性張度調整剤も、張性を制御するのに使用することができる。

【0198】

水性溶液を、緩衝化させることができる。任意の生理学的に許容されるバッファー、例えば、クエン酸バッファー、リン酸バッファー、酢酸バッファー、コハク酸バッファー、トリスバッファー、ピカルボネートバッファー、カルボネートバッファーなどを本明細書
10
で使用することができる。水性溶液の pH は、好ましくは、6.0 ~ 8.0、より好ましくは、約 6.2 ~ 約 6.8 となる。いくつかの場合では、ある特定の量の塩をバッファー中に含めることができる。他の場合では、バッファー中の塩は、負に荷電した分子のエマルジョン粒子への複合体形成に干渉し得、したがって、回避される。

【0199】

水性溶液は、追加の成分、例えば、水性溶液の容量オスモル濃度を変化させる分子、または複合体形成後の負に荷電した分子を安定化させる分子なども含むことができる。例えば、一般に炭水化物であるが、ポリマーとすることもできる非イオン性張度調整剤を使用して、重量オスモル濃度を調整することができる。(例えば、Voet および Voet (1990年) Biochemistry (John Wiley & Sons, New
20
York) を参照)。適切な非イオン性張度調整剤の例には、糖(例えば、単糖、二糖または多糖(例えば、トレハロース、スクロース、デキストロース、フルクトース))、糖アルコール(例えば、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ラクチトール、マルチトール、グリセロール、還元パラチノース)、およびこれらの組合せが含まれる。必要に応じて、非イオン性ポリマー(例えば、ポリ(アルキルグリコール)、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、もしくはポリブチレングリコールなど)、または非イオン性界面活性剤を使用することができる。これらのタイプの作用物質、特に、糖および糖アルコールは、凍結乾燥されたとき、RNA、および他の負に荷電した分子を保護することができる凍結保護物質でもある。例示的な実施形態では、バッファーは、約 560 nM ~ 600 mM のトレハロース、スクロース、ソルビトール、またはデキストロースを含む。他の例示的な実施形態では、バッファーは、約 50
30
0 nM ~ 600 mM のトレハロース、スクロース、ソルビトール、またはデキストロースを含む。

【0200】

いくつかの場合では、高張性溶液として、負に荷電した分子を含む水性溶液を調製し、純水または低張性バッファーを使用してカチオン性エマルジョンを調製することが好ましい場合がある。エマルジョンと負に荷電した分子が合わされると、混合物は、等張性となる。例えば、RNA を含む水性溶液を 2 × 高張性溶液とすることができ、カチオン性エマルジョンを、10 mM のクエン酸バッファーを使用して調製することができる。RNA 溶液とエマルジョンが 1 : 1 (v/v) の比で混合されると、組成物は等張性となる。エマル
40
ジョンと負に荷電した分子を含む水性溶液の所望の相対量(例えば、1 : 1 (v/v) の混合、2 : 1 (v/v) の混合、1 : 2 (v/v) の混合など)に基づいて、等張性の混合物を達成するのに必要とされる水性溶液の張性を容易に決定することができる。

【0201】

同様に、生理的な重量オスモル濃度を有する組成物が、in vivo 投与にとって望ましい場合がある。生理的な重量オスモル濃度は、水 1 kg 当たり約 255 mOsm ~ 水 1 kg 当たり約 315 mOsm である。場合により、高浸透圧性溶液として、負に荷電した分子を含む水性溶液を調製し、純水または低浸透圧性バッファーを使用してカチオン性エマルジョンを調製することが好ましい場合がある。エマルジョンと負に荷電した分子が
50
合わされると、生理的な重量オスモル濃度が達成される。エマルジョンと負に荷電した分

子を含む水性溶液の所望の相対量（例えば、1：1（v/v）の混合、2：1（v/v）の混合、1：2（v/v）の混合など）に基づいて、等浸透圧性の混合物を達成するのに必要とされる水性溶液の重量オスモル濃度を容易に決定することができる。

【0202】

ある特定の実施形態では、負に荷電した分子を含む水性溶液は、ポリマー、もしくは界面活性剤、またはこれらの組合せをさらに含むことができる。例示的な実施形態では、水中油型エマルジョンは、ポロキサマーを含有する。特に、本発明者らは、カチオン性エマルジョン粒子との複合体形成の前に、RNA水性溶液にPluronic（登録商標）F127を添加すると、RNA分子の安定性がより大きくなり、RNA分子のRNase耐性が増大することを観察した。RNA水性溶液にpluronic F127を添加すると、RNA/CNE複合体の粒子サイズが小さくなることも見出された。ポロキサマーポリマーはまた、RNA分子の適切な脱複合体形成/放出を促進し、エマルジョン粒子の凝集を防止し、免疫調節効果を有することができる。使用することができる他のポリマーには、例えば、Pluronic（登録商標）F68、またはPEG300が含まれる。

10

【0203】

代わりにまたはさらに、負に荷電した分子を含む水性溶液は、約0.05%～約20%（w/v）のポリマーを含むことができる。例えば、カチオン性水中油型エマルジョンは、約0.05%～約10%（w/v）、例えば、0.05%、0.5%、1%、または5%などで、ポリマー（例えば、ポロキサマー、例えば、Pluronic（登録商標）F127、Pluronic（登録商標）F68、またはPEG300）を含むことができる。

20

【0204】

緩衝系は、2つ以上の上述した分子（塩、バッファー、サッカリド、ポリマーなど）の任意の組合せを含むことができる。好適な実施形態では、バッファーは、560mMのスクロース、20mMのNaCl、および2mMのクエン酸塩を含み、これを、本明細書に記載されるカチオン性水中油型エマルジョンと混合することによって、280mMのスクロース、10mMのNaCl、および1mMのクエン酸塩を含む最終的な水相を生成することができる。

【0205】

5. 調製方法

別の態様では、本発明は、本明細書中に記載のとおりの中油型エマルジョンを調製する方法を提供し、この方法は、（1）油およびカチオン性脂質を合わせて、エマルジョンの油相を形成するステップと、（2）水性溶液を提供して、エマルジョンの水相を形成するステップと、（3）例えば、均質化によって水相中に油相を分散させるステップを含む。均質化は、任意の適した方法で、例えば、市販のホモジナイザー（例えば、IKA T25ホモジナイザー、VWR International（West Chester, PA）で入手可能）を使用して達成され得る。

30

【0206】

特定の実施形態では、水中油型エマルジョンは、（1）カチオン性脂質を油中に直接溶解させて油相を形成させること；（2）エマルジョンの水相を提供すること；および（3）均質化によって水相中に油相を分散させること、によって調製される。この方法は、脂質を油に添加する前にカチオン性脂質をまず可溶化させるために有機溶媒（例えば、クロロホルム（CHCl₃）、ジクロロメタン（DCM）、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン（THF）、2,2,2トリフルオロエタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、ヘキサン、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）など）を使用しない。

40

【0207】

脂質の溶解を促進するために、油を約37～約65の温度に加熱することが望ましい場合がある。カチオン性脂質（例えば、DOTAP）の所望の量を測定し、所望の最終濃度に達するように、油中に直接的に添加してもよい。

50

【0208】

エマルジョンが1種または複数の界面活性剤を含む場合には、界面活性剤（複数可）は、当該技術分野における従来の慣例に従って油相に含まれる場合も、水相に含まれる場合もある。例えば、SPAN 85は、油相（例えば、スクアレン）に溶解させることができ、Tween 80は、水相（例えば、クエン酸バッファー）に溶解させてもよい。

【0209】

別の態様では、本発明は、(i)本明細書に記載されるようなカチオン性水中油型エマルジョンを提供するステップと、(ii)負に荷電した分子（RNAなど）を含む水性溶液を提供するステップと、(iii)負に荷電した分子がエマルジョンの粒子と複合体を形成するように、(i)の水中油型エマルジョンおよび(iii)の水性溶液を合わせるステップとを含む、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した負に荷電した分子（RNAなど）を含む組成物を調製する方法を提供する。

10

【0210】

例えば、カチオン性水中油型エマルジョンを、水性RNA溶液と、任意の所望の相対量、例えば、約1:1(v/v)、約1.5:1(v/v)、約2:1(v/v)、約2.5:1(v/v)、約3:1(v/v)、約3.5:1(v/v)、約4:1(v/v)、約5:1(v/v)、約10:1(v/v)、約1:1.5(v/v)、約1:2(v/v)、約1:2.5(v/v)、約1:3(v/v)、約1:3.5(v/v)、約1:4(v/v)、約1:1.5(v/v)または約1:1.10(v/v)などで合わせてもよい。

20

【0211】

粒子形成を促し、負に荷電した分子とカチオン性粒子との間の複合体形成を改善し、負に荷電した分子の安定性を増大し（例えば、RNA分子の分解を防ぎ）、負に荷電した分子（RNA分子など）の適切な脱複合体形成/放出を促進し、またはエマルジョン粒子の凝集を防ぐ、さらなる必要に応じたステップが含まれてもよい。例えば、ポリマー（例えば、Pluronic（登録商標）F127）または界面活性剤を、負に荷電した分子（RNAなど）を含む水性溶液に添加してもよい。

【0212】

エマルジョン粒子のサイズは、油に対する界面活性剤の比（比を増大すると、粒子のサイズが減少する）、運転圧力（運転圧力を増大すると、粒子のサイズが減少する）、温度（温度を高めると、粒子のサイズが減少する）およびその他の処理パラメータを変更することによって変えることができる。実際の粒子サイズは、使用される特定の界面活性剤、油およびカチオン性脂質によって、選択された特定の運転条件によっても変わる。エマルジョン粒子サイズは、Coulter Corporationによって製造された、市販のSub-Micron Particle Analyzer（モデルN4MD）などの分粒機器（sizing instrument）を使用することによって確認でき、粒子の平均直径が、約200nm未満、約150nm未満または約100nm未満となるまで、パラメータを上記に記載されたガイドラインを使用して変更することができる。好ましくは、粒子は、約180nm以下、約150nm以下、約140nm以下または約130nm以下、約120nm以下、または約100nm以下、約50nm~200nm、約80nm~200nm、約50nm~180nm、約60nm~180nm、約70~180nmまたは約80nm~180nm、約80nm~約170nm、約80nm~約160nm、約80nm~約150nm、約80nm~約140nm、約80nm~約130nm、約80nm~約120nm、約80nm~約110nmまたは約80nm~約100nmの平均直径を有する。平均粒子サイズが約200nm以下であるエマルジョンは、無菌濾過が可能である。

30

40

【0213】

カチオン性水中油型エマルジョン（複合体形成前エマルジョン）または負に荷電した分子-エマルジョン複合体を調製するための必要に応じたプロセスとして、例えば、滅菌、粒子サイズ選択（例えば、大きな粒子を除去すること）、充填、パッケージングおよび標

50

識などが挙げられる。例えば、複合体形成前エマルジョンまたは負に荷電した分子 - エマルジョン複合体が、*in vivo* 投与のために製剤化される場合には、それは滅菌され得る。例えば、製剤は、滅菌グレードフィルターを通した（例えば、0.22ミクロンフィルターを通した）濾過によって滅菌され得る。その他の滅菌技術として、熱プロセスまたは放射線滅菌プロセスまたは滅菌組成物を製造するためにパルス光を使用することが挙げられる。

【0214】

本明細書に記載されたカチオン性水中油型エマルジョンを使用してワクチンを製造してもよい。MF59について記載されたような同様の方法を使用して、滅菌および/または臨床グレードのカチオン性水中油型エマルジョンを調製できる。例えば、VACCINE ADJUVANTS (O'Hagan編)、Humana Press中の、Ottら、Methods in Molecular Medicine、2000年、第42巻、211~228頁参照のこと。例えば、MF59の製造プロセスと同様に、エマルジョンの油相および水相を合わせ、ローターステーターホモジナイザー (rotor stator homogenizer) において、またはインラインホモジナイザーにおいて処理して、粗エマルジョンを得ることができる。次いで、粗エマルジョンをマイクロフルイダイザー中に送り、そこでさらに処理して、安定なサブミクロンエマルジョンを得ることができる。粗エマルジョンを、所望の粒子サイズが得られるまで、マイクロフルイダイザーの相互作用チャンパーに繰り返し通してもよい。次いで、バルクエマルジョンを濾過して（例えば、窒素下で0.22μmフィルターを通して）、大きな粒子を除去し、エマルジョンバルクを得、これを適した容器（例えば、ガラス瓶）中に充填してもよい。自己貯蔵 (self storage) について、水中油型エマルジョンの存在下での長期の安定性を実証したワクチン抗原については、抗原およびエマルジョンを合わせ、無菌濾過（例えば、0.22μmフィルターメンブランを通して）してもよい。合わせた単一バイアルワクチンを、単回用量容器中に充填してもよい。長期の安定性が実証されていないワクチン抗原については、エマルジョンを別個のバイアルとして供給することができる。このような場合には、エマルジョンバルクを濾過滅菌（例えば、0.22μmフィルターメンブランを通して）し、最終単回用量バイアルに充填し、パッケージングしてもよい。

【0215】

品質管理は、場合により、エマルジョンバルクまたは混合ワクチンの小サンプルで実施してもよく、サンプルが品質管理試験に合格する場合にのみ、バルクまたは混合ワクチンを用量にパッケージングする。

【0216】

6. キット、医薬組成物および投与

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される、カチオン性水中油型エマルジョンの粒子と複合体を形成した負に荷電した分子（例えば、RNA）を含む医薬組成物を提供し、1種または複数の薬学的に許容されるキャリア、希釈剤または賦形剤をさらに含み得る。好ましい実施形態では、医薬組成物は、ワクチンとして使用することができる免疫原性組成物である。

【0217】

あるいは、本明細書において記載された組成物を使用して、負に荷電した分子を細胞に送達してもよい。例えば、種々の目的のために、例えば、遺伝子療法などのために、所望の遺伝子産物（例えば、タンパク質）の産生を誘導するために、遺伝子の発現を調節するために、核酸分子（例えば、DNAまたはRNA）を細胞に送達することができる。また、本明細書に記載された組成物を使用して、治療目的で、例えば、がんまたは増殖性障害、代謝疾患、心血管疾患、感染、アレルギーなどの疾患を処置するために、免疫応答を誘導するなどのために、核酸分子（例えば、DNAまたはRNA）を細胞に送達してもよい。例えば、標的遺伝子の発現を阻害するために、核酸分子を細胞に送達してもよい。このような核酸分子として、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉RNAなどの二本鎖RNAなどが挙げられる。低分子干渉RNAなどの二本鎖RNA分子は、対応

10

20

30

40

50

する標的遺伝子の特異的にサイレンシングする（遺伝子ロックダウン）RNA干渉を引き起こし得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、選択された配列に相補的であるDNAまたはRNAの一本鎖である。一般に、アンチセンスRNAは、特定のメッセンジャーRNA鎖のタンパク質翻訳を、それと結合することによって妨げることができる。アンチセンスDNAを使用して、特異的な、相補的な（コーディングまたは非コーディング）RNAを標的とすることができる。したがって、本明細書に記載されたカチオン性エマルジョンは、例えば、がんの処置のために（腫瘍学標的の産生を阻害することによる）、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは二本鎖RNAを送達するのに有用である。

【0218】

また、本発明は、負に荷電した分子（RNAなど）とカチオン性水中油型エマルジョンを別々の容器に存在させたキットを提供する。例えば、キットは、負に荷電した分子（RNAなど）を含む組成物を含む第1の容器と、カチオン性水中油型エマルジョンを含む第2の容器とを含み得る。2つの成分は、投与前、例えば、投与前の約72時間、約48時間、約24時間、約12時間、約10時間、約9時間、約8時間、約7時間、約6時間、約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間、約45分間、約30分間、約15分間、約10分間、約5分間以内に混合され得る。また、2つの成分を投与の約1分前または投与直前に混合してもよい。

【0219】

負に荷電した分子（例えば、RNA）は液状形態であってもよく、固形形態であってもよい（例えば、凍結乾燥された）。固形形態の場合、キットは、負に荷電した分子を再水和させるための適切な水性溶液を含む第3の容器を含んでもよい。適切な水性溶液としては、薬学的に許容されるバッファー、例えば、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、上記の水性溶液のいずれか1つが挙げられる。ある特定の実施形態では、特に、張度調整剤および/または重量オスモル濃度調整剤などのさらなる成分を負に荷電した分子（例えば、RNA）とともに凍結乾燥した場合、滅菌された水が再水和のための水性溶液として使用され得る。あるいは、凍結乾燥された負に荷電した分子（例えば、RNA）をカチオン性エマルジョンと直接混合してもよい。

【0220】

該組成物（例えば、ワクチン）が負に荷電した分子（例えば、RNA）とタンパク質免疫原などのさらなる成分とを含むものである場合、両方の成分を凍結させ、凍結乾燥し（別々に、または混合物としてのいずれかで）、投与前に再構成してカチオン性エマルジョンと混合してもよい。

【0221】

キットに、さらに、エンドユーザーに有用な他の物質、例えば、他の薬学的に許容される製剤化溶液、例えば、バッファー、希釈剤、フィルター、針およびシリンジまたは他の送達デバイスを含めてもよい。例えば、キットは、水またはエマルジョンを一方のチャンバーに含み、負に荷電した分子（例えば、RNA）を固形（例えば、凍結乾燥）形態で他方のチャンバーに備えたデュアルチャンバーシリンジを含み得る。

【0222】

キットは、さらに、アジュバント（アルミニウム含有アジュバントまたはMF59など）を含む別の容器を含んでもよい。一般的には、アルミニウム含有アジュバントは、負に荷電した分子とカチオン性エマルジョンとの複合体形成に干渉し得るので好ましくない。

【0223】

該組成物に適切な容器としては、例えば、ビン、バイアル、シリンジおよび試験管が挙げられる。容器は、多種多様な材料、例えば、ガラスまたはプラスチックで形成され得る。容器は、無菌のアクセスポートを有するものであってもよい（例えば、容器は、静脈内液剤バッグ、または皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有するバイアルであり得る）。また、負に荷電した分子（例えば、RNA）を凍結乾燥し、シリンジ内で水で再構成するか、または本明細書に記載されるカチオン性エマルジョンで直接再構成するかのいずれかとするデュアルチャンバーシリンジも使用され得る。

10

20

30

40

50

【0224】

また、キットに、免疫の誘導方法または感染の処置方法の書面による指示を含む添付文書を含めてもよい。添付文書は、未承認の原案添付文書であってもよく、米国食品医薬品局（FDA）または他の規制機関によって承認された添付文書であってもよい。

【0225】

本発明はまた、上記の組成物が予め充填された送達デバイスを提供する。

【0226】

本明細書において提供された医薬組成物は、単独で投与しても、1種または複数のさらなる治療薬と組み合わせて投与してもよい。投与方法として、それだけには限らないが、経口投与、直腸投与、非経口投与、皮下投与、静脈内投与、硝子体内投与、筋肉内投与、吸入、鼻腔内投与、局所投与、眼部投与または耳への投与が挙げられる。

10

【0227】

本明細書に記載された組成物の治療上有効な量は、とりわけ、示された疾患、疾患の重篤度、被験体の年齢および関連のある健康状態、投与される化合物の効力、投与様式および所望の処置に応じて変わる。

【0228】

その他の実施形態では、本明細書に記載された医薬組成物は、1種または複数のさらなる治療薬と組み合わせて投与してもよい。さらなる治療薬として、それだけには限らないが、抗生物質または抗菌薬、制吐薬、抗真菌薬、抗炎症薬、抗ウイルス薬、免疫調節薬、サイトカイン、抗うつ剤、ホルモン、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質、有糸分裂阻害薬、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞増殖抑制剤、抗浸潤薬（anti-invasion agent）、抗血管新生薬、ウイルス複製の増殖因子機能阻害剤の阻害剤、ウイルス酵素阻害剤、抗がん剤、インターフェロン、インターフェロン、リバビリン、ホルモンおよびその他のトル様受容体モジュレーター、免疫グロブリン（Ig）およびIg機能を調節する抗体（抗IgE（オマリズマブ）など）が挙げられる。

20

【0229】

特定の実施形態では、本明細書において提供された医薬組成物は、それだけには限らないが、性器疣贅、尋常性疣贅、足底疣贅、狂犬病、RSウイルス（RSV）、B型肝炎、C型肝炎、デングウイルス、黄熱病、単純ヘルペスウイルス（ほんの一例として、HSV-I、HSV-II、CMVまたはVZV）、伝染性軟属腫、ワクシニア、痘瘡、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、肝炎ウイルス（C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス）、サイトメガロウイルス（CMV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、ライノウイルス、エンテロウイルス（例えば、EV71）、アデノウイルス、コロナウイルス（例えば、SARS）、インフルエンザ、パラインフルエンザ、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パポウイルス、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、アレナウイルス（ほんの一例として、LCM、フニンウイルス、マチュポウイルス、グアナリトウイルスおよびラッサ熱）およびフィロウイルス（ほんの一例として、エボラウイルスまたはマールブルグウイルス）などのウイルス性疾患をはじめとする、本明細書に開示された病原体によって引き起こされる疾患をはじめとする感染性疾患の処置において使用される。

30

40

【0230】

特定の実施形態では、本明細書において提供された医薬組成物は、それだけには限らないが、マラリア、結核およびmycobacterium avium、ハンセン病；pneumocystis carinii、クリプトスポリジウム症、ヒストプラズマ症、トキソプラズマ症、トリパノソーマ感染、リーシュマニア症、Escherichia属、Enterobacter属、Salmonella属、Staphylococcus属、Klebsiella属、Proteus属、Pseudomonas属、Streptococcus属およびChlamydia属の細菌によって引き起こされる感染ならびにカンジダ症、アスペルギルス症、ヒストプラズマ症およびクリプトコッカス髄膜炎などの真菌感染症をはじめとする細菌感染症、真菌感染症および原生動物感染症の処置

50

において使用される。

【0231】

特定の実施形態では、本明細書において提供された医薬組成物は、同種移植片拒絶、自己免疫およびアレルギー、がん、または癬痕および皸などの損傷を受けた皮膚もしくは加齢皮膚をはじめとする、呼吸器疾患および/または障害、皮膚科障害、眼性疾患および/または障害、泌尿生殖器疾患および/または障害の処置において使用される。

【0232】

別の態様では、本発明は、有効量の本明細書に開示された組成物を投与するステップを含む、哺乳動物などのそれを必要とする被験体において、免疫応答を発生させるかまたは強化する方法を提供する。免疫応答は、好ましくは、保護的であり、好ましくは、抗体および/または細胞媒介性免疫を含む。本方法は、一次免疫応答を誘導するため、および/または免疫応答をブースト (b o o s t) するために使用してもよい。

10

【0233】

特定の実施形態では、本明細書に開示された組成物は、例えば、哺乳動物などのそれを必要とする被験体において免疫応答を引き起こすかまたは増強することにおいて使用するための、医薬として使用してもよい。

【0234】

特定の実施形態では、本明細書に開示された組成物は、哺乳動物などのそれを必要とする被験体において免疫応答を発生させるかまたは強化するための医薬の製造において使用してもよい。

20

【0235】

哺乳動物は、好ましくは、ヒトであるが、本明細書の範囲内の病原体は、広範な種にわたって問題となり得るので、例えば、ウシ、ブタ、ニワトリ、ネコまたはイヌであってもよい。ワクチンが、予防的使用のためのものである場合には、ヒトは、好ましくは、小児（例えば、幼児または乳児）、十代の若者または成人であり；ワクチンが、治療的使用のためのものである場合には、ヒトは、好ましくは、十代の若者または成人である。小児を対象としたワクチンはまた、例えば、安全性、投与量、免疫原性などを評価するために成人に投与してもよい。

【0236】

治療的処置の有効性を調べる1つの方法は、本明細書に開示された組成物またはワクチンの投与後に病原体感染をモニタリングすることを含む。予防的処置の有効性を調べる1つの方法は、抗原に対する免疫応答を全身的にモニタリングすること (I g G 1 および I g G 2 a 産生のレベルをモニタリングすることなど) および/または粘膜的にモニタリングすること (I g A 産生のレベルをモニタリングすることなど) を含む。通常、抗原特異的粘膜炎抗体応答は、免疫化後およびチャレンジ後に決定されるのに対し、抗原特異的血清抗体応答は、免疫化後であるが、チャレンジ前に決定される。

30

【0237】

核酸分子 (例えば、RNA) がタンパク質抗原をコードする、本明細書に開示された組成物またはワクチンの免疫原性を評価する別の方法は、免疫プロットおよび/またはマイクロアレイによって患者の血清または粘膜炎分泌物をスクリーニングするために組換えによってタンパク質抗原を発現させることである。タンパク質と患者サンプルとの間の陽性反応は、患者が、問題のタンパク質に対する免疫応答を開始したことを示す。この方法はまた、免疫優性抗原および/またはタンパク質抗原内のエピトープを同定するために使用してもよい。

40

【0238】

組成物の有効性はまた、目的の感染症の病原体の適切な動物モデルをチャレンジすることによって *in vivo* で決定できる。

【0239】

投与量は、単回用量スケジュールまたは複数回用量スケジュールによるものであり得る。複数回用量は、一次免疫化スケジュールおよび/またはブースタースケジュールにおい

50

て使用してよい。複数回用量スケジュールでは、種々の用量を、同一または異なる経路、例えば、非経口の一次免疫および粘膜のブースト、粘膜の一次免疫および非経口のブーストなどによって与えてもよい。複数回用量は、通常、少なくとも1週間（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間など）の間隔で投与する。

【0240】

ある特定の実施形態では、単回投与で被験体に投与されるカチオン性脂質（DOTAPなど）の総量は約30mg以下または約24mg以下である。

【0241】

ある特定の実施形態では、単回投与で被験体に投与されるカチオン性脂質（DOTAPなど）の総量は4mg以下である。

【0242】

1種もしくは複数の抗原を含むか、または1種もしくは複数の抗原と組み合わせて使用される本明細書に開示された組成物は、小児および成人の両方を処置するために使用できる。したがって、ヒト被験体は、1歳未満、1～5歳、5～15歳、15～55歳または少なくとも55歳であり得る。組成物を受け取るのに好ましい被験体は、高齢者（例えば、>50歳、>60歳、好ましくは、>65歳）、若年者（例えば、<5歳）、入院患者、医療従事者、軍職員および軍人、妊婦、慢性疾患患者または免疫不全患者である。しかし、組成物は、これらの群にのみ適しているのではなく、集団においてより一般的に使用してもよい。

【0243】

1種もしくは複数の抗原を含むか、または1種もしくは複数の抗原と組み合わせて使用される本明細書に開示された組成物は、その他のワクチンと実質的に同時に（例えば、同一の医療相談または医療専門家もしくは予防接種センターへの訪問の際に）、例えば、麻疹ワクチン、ムンプスワクチン、風疹ワクチン、MMRワクチン、水痘ワクチン、MMRVワクチン、ジフテリアワクチン、破傷風ワクチン、百日咳ワクチン、DTPワクチン、結合型H・インフルエンザb型ワクチン、不活化ポリオウイルスワクチン、B型肝炎ウイルスワクチン、髄膜炎菌結合型ワクチン（四価A C W 1 3 5 Yワクチンなど）、RSウイルスワクチンなどと実質的に同時に患者に投与してもよい。

【0244】

特定の実施形態では、本明細書において提供された組成物は、1種もしくは複数のアジュバントなどの免疫調節剤を含むか、または場合により含んでもよい。例示的アジュバントとして、それだけには限らないが、以下でさらに論じるTH1アジュバントおよび/またはTH2アジュバントが挙げられる。特定の実施形態では、本明細書において提供された免疫原性組成物において使用されるアジュバントとして、それだけには限らないが、以下が挙げられる：

- 1．ミネラル含有組成物；
- 2．油エマルジョン；
- 3．サポニン製剤；
- 4．ピロソームおよびウイルス様粒子；
- 5．細菌または微生物誘導体；
- 6．生体接着剤（bioadhesive）および粘膜付着剤（mucoadhesive）；
- 7．リポソーム；
- 8．ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル製剤；
- 9．ポリホスファゼン（PCPP）；
- 10．ムラミルペプチド；
- 11．イミダゾキノロン化合物；
- 12．チオセミカルバゾン化合物；
- 13．トリプタントリン化合物；

- 14．ヒト免疫調節物質；
- 15．リポペプチド；
- 16．ベンゾナフチリジン；
- 17．微粒子
- 18．免疫賦活性ポリヌクレオチド（RNAまたはDNAなど；例えば、CpG含有オリゴヌクレオチド）。

【実施例】

【0245】

例示

ここで、一般的に記載されている本発明は、以下の実施例を参照することによってより容易に理解されよう。これらは、単に本発明の特定の態様および実施形態を例示する目的で含まれるのであって、本発明を制限しようとするものではない。

【0246】

(実施例1)

カチオン性水中油型エマルジョンの開発

この実施例において、高濃度のカチオン性脂質（DOTAP）を含むカチオン性ナノエマルジョン（本明細書において「CNE」と称する）を自己複製RNAの送達のために開発した。

【0247】

CNE製剤を以下の表1にまとめる。これらはCNE01をベースにして修正したものである。CNE01、CMF40、CNE16、CNE02およびCNE17は、比較試験での参考サンプルとして使用した。

【表1-1】

表1

	CNE	カチオン性脂質 mg/mL	界面活性剤	スクアレン	油:脂質比 (モル:モル)	水相
参考1	CNE01	DOTAP (CHCl ₃ 中) 0.8	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	91.7:1	10mMのクエン酸バッファー pH 6.5
参考2	CMF40	DOTAP (有機溶媒なし) 1.0	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	73.3:1	10mMのクエン酸バッファー pH 6.5
参考3	CNE16	DOTAP (有機溶媒なし) 1.2	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	61.1:1	10mMのクエン酸バッファー pH 6.5
参考4	CNE02	DOTAP (有機溶媒なし) 1.6	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	45.8:1	10mMのクエン酸バッファー pH 6.5
参考5	CNE17	DOTAP (DCM中) 1.4	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	52.4:1	10mMのクエン酸バッファー pH 6.5
実施例1	CMF41	DOTAP (有機溶媒なし) 1.8	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	40.7:1	10mMのクエン酸バッファー pH 6.5

10

20

30

40

【表 1 - 2】

実施例 2	CMF30	DOTAP (有機溶媒なし) 2.0	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	36.7:1	10mMのクエン酸 バッファー pH 6.5	
実施例 3	CMF31	DOTAP (有機溶媒なし) 2.6	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	28.2:1	10mMのクエン酸 バッファー pH 6.5	
実施例 4	CMF32	DOTAP (有機溶媒なし) 3.2	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	22.9:1	10mMのクエン酸 バッファー pH 6.5	10
実施例 5	CMF33	DOTAP (有機溶媒なし) 3.8	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	19.3:1	10mMのクエン酸 バッファー pH 6.5	
実施例 6	CMF34	DOTAP (有機溶媒なし) 4.4	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	16.7:1	10mMのクエン酸 バッファー pH 6.5	
実施例 7	CMF35	DOTAP (有機溶媒なし) 5.0	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	4.3%	14.7:1	10mMのクエン酸 バッファー pH 6.5	20
実施例 8	CMF44	DOTAP (有機溶媒なし) 4.4	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	3.23%	12.5:1	10mMのクエン酸 バッファー pH 6.5	
実施例 9	CMF45	DOTAP (有機溶媒なし) 4.4	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	2.15%	8.4:1	10mMのクエン酸 バッファー pH 6.5	
実施例 10	CMF46	DOTAP (有機溶媒なし) 4.4	0.5% SPAN 85 0.5% Tween 80	1.08%	4.2:1	10mMのクエン酸 バッファー pH 6.5	30

【0248】

CNEは、以前に記載された(Ottら, Journal of Controlled Release, 79巻, 1~5頁, 2002)とおりの荷電したMF59と同様にして、1点大きな修正を行って調製した。DOTAPをスクアレンに直接溶解させ、有機溶媒は使用しなかった。1.6mg/mlより多くのDOTAPを含むエマルジョンに溶媒を含めると、エマルジョンを得るのにマイクロフルイダイズされ得ない泡状の供給原料が生成されることがわかった。スクアレンを37℃まで加熱するとDOTAPをスクアレンに直接溶解させることが可能となり、次いで、油相が(例えば、均質化によって)水相中に成功裏に分散され、エマルジョンが得られた。DOTAPはスクアレンに可溶性であり、表1に示したものより高濃度の、スクアレン中DOTAPが達成され得る。しかしながら、高用量のDOTAPは毒性効果を有することがあり得ることが報告されている。例えば、Lappalainenら, Pharm. Res., 11巻(8): 1127-31(1994)参照。

【0249】

簡単には、スクアレンを37℃まで加熱し、DOTAPをスクアレンに直接、SPAN 85の存在下で溶解させた。次いで、得られた油相を水相(Tween 80含有クエン酸バッファー)と合わせ、IKA T25ホモジナイザーを用いて24K RPMで即座に2分間均質化し、均質な供給原料(一次エマルジョン)を得た。この一次エマルジョン

10

20

30

40

50

をM-110S MicrofluidizerまたはM-110P Microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA) に3~5回、氷浴冷却コイルを伴っておよそ15K~20K PSIの均質化圧力で通した。20mlのバッチサンプルをユニットから取り出し、4℃で保存した。

【0250】

表1に示したとおりのCNEの成分濃度は、エマルジョンを調製するために使用したこれらの成分の初期の量に従って計算された濃度であることに注意されたい。エマルジョンの作製プロセス中または濾過滅菌プロセス中、少量のスクアレン、DOTAPまたは他の成分が失われることがあり得ること、および最終製品(例えば、投与の準備ができていないパッケージングされ滅菌されたエマルジョン)中のこれらの成分の実際の濃度はわずかに低い場合がある(典型的には最大約20%まで、場合によっては最大約25%まで、または最大約35%まで)ことが理解される。しかしながら、当該技術分野における従来の慣例により、最終製品中の実際の濃度の代わりに、エマルジョンを調製するために使用される初期量に基づいた特定の成分の濃度が記載される。

10

【0251】

以下の表2に、スクアレンおよびDOTAPの「理論」濃度(エマルジョンを調製するために使用したスクアレンおよびDOTAPの初期量に従って計算される)と、最終製品において測定されたスクアレンおよびDOTAPの実際の濃度の差を示す。

【表2】

表2

20

CNE	理論 DOTAP (mg/mL)	実際の DOTAP (mg/mL)	理論DOTAP 収率の%	理論 スクアレン (mg/mL)	実際の スクアレン (mg/mL)	理論 スクアレン 収率の%
CMF32 バッチ1	3.2	2.20	68.76	43	19.33	44.95
CMF32 バッチ2	3.2	2.57	80.32	43	34.45	80.12
CMF32 バッチ3	3.2	2.37	73.95	43	38.38	89.25
CMF34 バッチ1	4.4	2.75	62.44	43	30.46	70.84
CMF34 バッチ2	4.4	3.21	73.00	43	33.98	79.02
CMF34 バッチ3	4.4	3.08	70.08	43	32.71	76.07
CMF34 バッチ4	4.4	3.52	79.93	43	28.95	67.34

30

【0252】

(実施例2)

RNA-粒子複合体の調製

1. RNA合成

アルファウイルスレプリコン(自己複製RNA)をコードするプラスミドDNAを、*in vitro*でのRNAの合成のための鋳型として使用した。各レプリコンは、RNA複製に必要な遺伝子エレメントを含有するが、粒子アッセムブリに必要な遺伝子産物をコードする配列を欠く。アルファウイルスゲノムの構造遺伝子を異種タンパク質(その発現が、アルファウイルスサブゲノムプロモーターによって駆動される)をコードする配列によって置換した。レプリコンが真核細胞へ送達されると、プラス鎖RNAが翻訳されて、4種の非構造タンパク質が生じ、これはゲノムRNAと一緒に複製し、異種タンパク質をコードする大量のサブゲノムmRNAを転写する。アルファウイルス構造タンパク質の発現がないために、レプリコンは、感染粒子を生成できない。バクテリオファージT7プロモーターを、アルファウイルスcDNAの上流に配置して、*in vitro*でレプリコンRNAの合成を促進し、ポリ(A)テールのすぐ下流に位置するデルタ肝炎ウイルス(HDV)リボザイムが、その自己切断活性によって正しい3'末端を作製する。

40

【0253】

適した制限エンドヌクレアーゼを用いて、HDVリボザイムの下流でプラスミドDNA

50

を線状化した後、T7またはSP6バクテリオファージ由来DNA依存性RNAポリメラーゼを使用して*in vitro*でランオフ転写物を合成した。転写は、製造業者(Ambion、Austin、TX)によって提供された使用説明書に従って、7.5mM(T7 RNAポリメラーゼ)または5mM(SP6 RNAポリメラーゼ)最終濃度の各ヌクレオシド三リン酸(ATP、CTP、GTPおよびUTP)の存在下、37℃で2時間実施した。転写後、鋳型DNAをTURBO DNase(Ambion、Austin、TX)を用いて消化した。レプリコンRNAを、LiClを用いて沈殿させ、ヌクレアーゼフリー水中で再構成した。非キャッピングRNAを、ユーザーマニュアルに概説されるように、ScriptCap m⁷Gキャッピングシステム(Epicentre Biotechnologies、Madison、WI)を使用してワクシニアキャップ形成酵素(Vaccinia Capping Enzyme)(VCE)を用いて転写後にキャッピングした。転写後キャッピングRNAをLiClを用いて沈殿させ、ヌクレアーゼフリー水中で再構成した。あるいは、レプリコンを、6mM(T7 RNAポリメラーゼに対して)または4mM(SP6 RNAポリメラーゼに対して)のm⁷G(5')ppp(5')G、非可逆性キャップ構造類似体(New England Biolabs、Beverly、MA)を転写反応物に補充すること、およびグアノシン三リン酸の濃度を1.5mM(T7 RNAポリメラーゼに対して)または1mM(SP6 RNAポリメラーゼに対して)に低下させることによってキャッピングしてもよい。次いで、転写物をTURBO DNase(Ambion、Austin、TX)消化と、それに続くLiCl沈殿および75%エタノールでの洗浄によって精製してもよい。

10

20

【0254】

RNAサンプルの濃度は、260nmで光学濃度を測定することによって決定した。*in vitro*転写物の完全性は、全長構築物の存在について変性アガロースゲル電気泳動によって確認した。

【0255】

2. RNA複合体形成

N/P比という用語は、RNAのホスフェートの量と比較したカチオン性脂質中の窒素の量を指す。窒素は、試験したカチオン性脂質内の電荷を有する元素である。ホスフェートは、RNA主鎖上に見られ得る。10/1のN/P電荷比は、RNA上の負に荷電した各ホスフェートに対して存在するカチオン性脂質由来の正に荷電した窒素が10個であることを示す。

30

【0256】

溶液中の窒素数を、カチオン性脂質濃度から算出した。例えば、DOTAPは、分子あたり1個のプロトン化され得る窒素を有する。RNA濃度を使用し、RNA1マイクログラムあたり3nmolのホスフェートという推定値を使用して溶液中のホスフェート量を算出した。RNA：脂質の量を変えることによって、N/P比を改変することができる。RNAを様々な窒素/ホスフェート比(N/P)でCNEと複合体形成させた。N/P比の算出は、1ミリリットルあたりのエマルジョン中のプロトン化できる窒素のモル数を算出することによって行った。ホスフェート数を算出するために、RNA1マイクログラムあたり3nmolのホスフェートという定数を使用した。値を決定した後、RNAに適切な割合のエマルジョンを添加した。これらの値を使用して、RNAを適切な濃度に希釈し、軽くボルテックス処理しながら等容積のエマルジョン中に直接添加した。溶液をおよそ2時間室温に放置した。複合体形成後、得られた溶液を適切な濃度に希釈し、1時間以内に使用した。

40

【0257】

3. 粒子サイズアッセイ

エマルジョンの粒子サイズは、Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments、Worcestershire、UK)を製造業者の使用説明書に従って使用して測定した。粒子サイズは、多分散指数(pdi)とともにZ平均(Z Ave)として報告した。測定の前にすべてのサンプルを水で希釈した。さらに、エマ

50

ルジヨンの粒子サイズは、Horiba LA-930 粒子サイズ分析計 (Horiba Scientific, USA) を使用して測定した。測定の前にサンプルを水で希釈した。ゼータ電位は、Zetasizer Nano ZS を使用し、希釈サンプルを使用して製造業者の使用説明書に従って測定した。

【0258】

4. ウイルスレプリコン粒子 (VRP)

本発明者らは、RNA ワクチンを、リポーター遺伝子または抗原の *in vivo* 発現を達成するための伝統的な RNA ベクターによるアプローチと比較するために、Perrira, J. Virol 第 77 巻: 10394 ~ 10403 頁 (2003 年) によって記載された方法によって BHK 細胞において産生されたウイルスレプリコン粒子 (VRP) を利用した。この系では、抗原 (またはリポーター遺伝子) レプリコンは、シンドビスウイルスの 3' 末端配列 (3' UTR) およびシンドビスウイルスパッケージングシグナル (PS) (Perrira, J. Virol 第 77 巻: 10394 ~ 10403 頁 (2003 年) の図 2 参照のこと) を含有するよう遺伝子操作されたベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) のゲノムに由来するアルファウイルスキメラレプリコン (VCR) からなるものであった。これらのレプリコンを、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞中に、シンドビスウイルスカプシドおよび糖タンパク質遺伝子 (Perrira の図 2 参照のこと) をコードする欠損ヘルパー RNA とともに共エレクトロポレーションすることによって VRP にパッケージングした。次いで、標準方法によって VRP を収集し、力価測定し、培養液またはその他の等張性バッファー中で動物に接種した。

【0259】

(実施例 3)

免疫原性に対する DOTAP 濃度の効果

この実施例は、マウスモデルにおいて、高濃度の DOTAP を用いて作製したカチオン性水中油型エマルジョンでは、RSV-F 抗原をコードする RNA レプリコンの免疫原性が増大したことを示す。

【0260】

1. 材料および方法

ヘパリン結合アッセイ

RNA を上記のようにして複合体を形成させた。RNA/CNE 複合体を様々な濃度のヘパリン硫酸 (Alfa Aesar, Ward Hill MA) とともに、室温で 30 分間インキュベートした。次いで、得られた溶液を Airfuge 高速遠心分離機 (Beckman Coulter, Brea, CA) に 15 分間入れた。遠心管をツベルクリンシリンジで穿刺し、浮上分離液を取り出した。次いで、この溶液を RNA 濃度について、Ribogreen アッセイ (Invitrogen, Carlsbad CA) を用いて製造業者の指示書に従ってアッセイした。サンプルは Biotek Synergy 4 (Winooski, VT) 蛍光プレートリーダーで解析した。遊離 RNA の値を、標準曲線を用いて計算した。

【0261】

2. RNA - 粒子相互作用に対する DOTAP 濃度の効果

表 3 は、((RNA - 粒子相互作用の堅固さを測定した) ヘパリン結合アッセイによって測定した場合の) RNA - 粒子相互作用および免疫原性に対する DOTAP 濃度の効果を示す。

【表 3 - 1】

表 3

CNE	DOTAP 濃度 (mg/mL)	ヘパリン結合アッセイ	
		N/P 比	8×ヘパリン硫酸 におけるRNA放出 %
CNE01	0.8	2:1	nt
		4:1	nt
		6:1	62.82
		8:1	54.18
		10:1	nt
		12:1	116.6
		14:1	62.79
CMF41	1.0	2:1	nt
		4:1	4.61
		6:1	33.41
		8:1	70.68
		10:1	54.92
		12:1	52.93
CNE16	1.2	2:1	nt
		4:1	1.83
		6:1	nt
		8:1	33.79
		10:1	58.86
		12:1	68.02
CNE17	1.4	14:1	55.07
		2:1	nt
		4:1	nt
		6:1	3.91
		8:1	44.00
		10:1	69.65
		12:1	61.53
		14:1	57.26

10

20

30

【表 3 - 2】

CNE	DOTAP 濃度 (mg/mL)	ヘパリン結合アッセイ	
		比率	値
CNE02	1.6	2:1	nt
		4:1	nt
		6:1	2.01
		8:1	2.87
		10:1	7.38
		12:1	19.37
		14:1	21.44
CMF41	1.8	2:1	nt
		4:1	0.76
		6:1	1.33
		8:1	1.10
		10:1	2.69
		12:1	2.59
		14:1	3.67
CMF30	2.0	2:1	nt
		4:1	0.7
		6:1	0.81
		8:1	1.17
		10:1	2.35
		12:1	5.15
		14:1	9.44
CMF30	2.6	2:1	nt
		4:1	nt
		6:1	0.83
		8:1	1.18
		10:1	1.00
		12:1	0.96
		14:1	1.10

nt = 試験せず。

【0262】

表 3 に示されるように、RNA 分子は、高濃度の DOTAP (1 . 8 m g / m L 以上) を用いて作製したエマルジョン粒子に強く結合した。

【0263】

3 . RNA 負荷に対する DOTAP 濃度の効果

表 4 は、RNA 負荷に対する DOTAP 濃度の効果を示す。DOTAP の濃度を増大させると、より多量の RNA 分子が RNA - 粒子複合体中に配合された。

10

20

30

【表4】

表4

CNE	CNE17	CMF41	CMF30	CMF31	CMF32	CMF33	CMF34	CMF35
DOTAP (0.5mlのエマルジョン中)	0.35mg	0.45mg	0.5mg	0.65mg	0.8mg	0.95mg	1.1mg	1.25mg
N/P比	RNAの量 (μg)							
4対1	41.8	53.7	59.6	77.5	95.4	113.3	131.2	149.1
6対1	27.8	35.8	39.8	51.7	63.6	75.6	87.5	99.4
8対1	20.9	26.8	29.8	38.8	47.7	56.7	65.6	74.6
10対1	16.7	21.5	23.9	31	38.2	45.3	52.5	59.6
12対1	13.9	17.9	19.9	25.8	31.8	37.8	43.7	49.7
14対1	11.9	15.3	17	22.2	27.3	32.4	37.5	42.6

10

【0264】

4. 免疫原性に対するDOTAP濃度の効果

表5は、*in vivo*マウスモデルにおけるRSV F抗原の免疫原性に対するDOTAP濃度の効果を示す。

【0265】

RSVの表面融合糖タンパク質(RSV-F)を発現するvA317レプリコンをこの試験に使用した。BALB/cマウス(8~10週齢および体重約20g, 1群あたり10匹の動物)に、両側筋肉内ワクチン接種を行なった。動物にはすべて、2つの後肢の四頭筋に各々が等価な体積(片脚に50μL)を受けるように、0日目と21日目に、RSV-Fを発現する裸の自己複製RNA(vA317, 1μg)、40%のDlindMA、10%のDSPC、48%のChol、2%のPEG DMG 2000を含むリポソーム中に配合した1μgのA317(RV01(15))、または表示したCNE中に配合した自己複製RNA(1μg vA317)を注射した。各投与ごとに製剤を新たに調製した。血清を、抗体解析のために14日目(2wp1)と35日目(2wp2)に収集した。

20

30

【表 5】

表 5

CNE (I DOTAP)	RNA (μg /0.5mL)	N/P	DOTAP (mg/0.5mL)	2wp1 GMT (プールした)	2wp2 GMT	2wp2/2wp1 比
1μg vA317	-	-	-	764	344	0.5
1μg RV01(15)	-	-	-	3898	66348	17.0
CNE01 (0.8mg/mL)	9.55	10:1	0.20	163	993	6.1
CMF40 (1.0mg/mL)	11.93	10:1	0.25	505	3350	6.6
CNE16 (1.2mg/mL)	14.32	10:1	0.30	465	3851	8.3
CNE17 (1.4mg/mL)	16.70	10:1	0.35	843	3638	4.3
CNE02 (1.6mg/mL)	19.09	10:1	0.40	1253	5507	4.4
CMF41 (1.8mg/mL)	21.48	10:1	0.45	961	5132	5.3
CMF30 (2.0mg/mL)	23.86	10:1	0.50	2021	10068	5.0
CMF31 (2.6mg/mL)	31.02	10:1	0.65	1557	11940	7.7
CMF32 (3.2mg/mL)	38.18	10:1	0.80	1124	6941	6.2

10

20

【 0 2 6 6 】

表 5 に示されるように、DOTAP 濃度を増大させると、より多量の RNA がエマルジョン粒子に負荷され、これにより次いで宿主の免疫応答が増大した。CMF31 では、CNE17 と比べて抗体力価 (2wp2 で) の 3 倍の増大が観察された。このモデルでは、2.6mg/mL DOTAP (CMF31) において免疫原性のプラトーが観察された。

【 0 2 6 7 】

各マウスに投与する RNA の量および DOTAP の量を一定に保持した場合 (より高濃度の DOTAP を有するエマルジョンでは、より少ない体積のエマルジョンを用いて RNA / エマルジョン複合体を調製し; 次いで、免疫化前に、RNA / エマルジョン製剤を、マウスに注射される RNA / エマルジョン製剤の体積が同じになるように希釈したことを意味する)、F 特異的総 IgG 力価は異なる CNE 製剤と同等であった (表 6)。vA317 レプリコンをすべての CNE 製剤に使用した。RNA は Ambion キットを用いて作製した。GMT データは、各群の個々のマウス (8 匹のマウス / 群) の幾何平均力価を反映している。結果は、エマルジョンの DOTAP の濃度を高くすると、必要とされる製剤の量が少なくなったことを示す。

30

【表6】

表6

製剤	RNA ($\mu\text{g}/\text{用量}$)	N/P 比	DOTAP ($\mu\text{g}/\text{用量}$)	スクアレン ($\text{mg}/\text{用量}$)	2wp1 GMT	2wp2 GMT	2wp2/2wp1 (ブースト)	最大幾何 平均力価 に対する %, 2wp2
裸のRNA	1	--	--	--	764	334	0	0
RV01 粒子	1	--	--	--	3898	66348	17	-
CNE17	1	10:1	21	0.65	673	5314	8	41
CMF41	1	10:1	21	0.50	784	7083	9	55
CMF30	1	10:1	21	0.45	492	8543	17	66
CMF31	1	10:1	21	0.35	1123	6972	6	54
CMF32	1	10:1	21	0.28	1665	10498	6	82
CMF33	1	10:1	21	0.24	1351	12279	9	96
CMF34	1	10:1	21	0.20	936	12851	14	100
CMF35	1	10:1	21	0.18	628	7766	12	60

免疫化前血清の力価には検出不能力価を含めた。

【0268】

各マウスに投与するスクアレンの量およびN/P比(DOTAP:RNA)を一定に保持した場合、F特異的総IgG力価は、製剤中のRNAおよびDOTAPの量を増大させるにつれて増大した(表7)。VA317レプリコンをすべてのCNE製剤に使用した。RNAはAmbionキットを用いて作製した。GMTデータは、各群の個々のマウス(8匹のマウス/群)の幾何平均力価を反映している。結果は、DOTAP濃度を増大させると、より多量のRNAがエマルジョン粒子に負荷され、これにより次いで宿主の免疫応答が増大したことを示す。

【表7】

表7

製剤	RNA ($\mu\text{g}/\text{用量}$)	N/P 比	DOTAP ($\mu\text{g}/\text{用量}$)	スクアレン ($\text{mg}/\text{用量}$)	2wp1 GMT	2wp2 GMT	2wp2/2wp1 (ブースト)	最大幾何 平均力価 に対する %, 2wp2
裸の	11.9	--	--	--	14	682	49	2
RV01 粒子	3.3	--	--	--	3767	64889	17	-
RV01 粒子	11.9	--	--	--	6562	102359	16	-
CNE17	0	--	70	2.15	5	5	1	1
CMF35	0	--	250	2.15	10	5	1	1
CNE17	3.3	10:1	70	2.15	223	8567	38	25
CMF41	4.3	10:1	90	2.15	974	7020	7	21
CMF30	4.8	10:1	100	2.15	1212	10999	9	33
CMF31	6.2	10:1	130	2.15	874	15142	17	45
CMF32	7.6	10:1	160	2.15	1816	22239	12	66
CMF33	9.1	10:1	190	2.15	1862	17445	9	52
CMF34	10.5	10:1	220	2.15	1302	33634	26	100
CMF35	11.9	10:1	250	2.15	1554	24971	16	74
未処置	--	--	--	--	5	5	1	0

【0269】

CMF32およびCMF34を、異なるN/P比を用いてさらに試験した。表8は、製剤のF特異的総IgG力価を示す。理論N/P比は、製剤を調製するために使用されたDOTAPおよびRNAの初期量に従って計算されるN/P比を反映している。実際のN/P比は、エマルジョンの調製中に少量のDOTAPが失われたため、理論N/P比よりわずかに小さかった。vA317をすべてのCNE製剤およびCMF製剤に使用した。GMTデータは、各群の個々のマウス(8匹のマウス/群)の平均log₁₀力価を反映している。製剤はすべて、スクロースで300mOsm/kgに調整した。CMF32製剤またはCMF34製剤のいずれでも、明白な忍容性の問題は観察されなかった(例えば、体重、初期血清サイトカイン)。

【0270】

実際のN/P比は、CNEバッチまたはCMFバッチ中のDOTAP含有量を、荷電エーロゾル検出器(Corona Ultra, Chelmsford, MA)を備えたHPLCを用いて定量することによって決定した。CNEおよびCMFのサンプルをイソプロパノール中に希釈し、XTera C18 4.6x150mm 3.5umカラム(Waters, Milford, MA)に注入した。クロマトグラムのDOTAPピークから曲線下面積を求め、濃度をDOTAP標準曲線に補間した。実際のDOTAP濃度を使用し、実際のN/P比を計算した。

【表8】

表8

製剤	RNA (μg/用量)	理論 N/P 比	実際のN/P 比	2wp1 GMT	2wp1 GMT	2wp2/2wp1 (ブースト)
裸の	1	--	--	68	1019	15
RV01	1	--	--	9883	68116	7
CNE17	1	10:1	--	1496	6422	4
CMF32	1	12:1	9.4:1	2617	14246	5
	1	10:1 (バッチ1)	6.0:1	1537	10575	7
	1	10:1 (バッチ2)	8.0:1	2047	16244	8
	1	8:1	6.3:1	2669	7656	3
	1	6:1	4.7:1	1713	4715	3
	1	4:1	3.1:1	872	3773	4
CMF34	1	12:1	7.4:1	3141	10134	3
	1	10:1 (バッチ1)	6.1:1	1906	11081	6
	1	10:1 (バッチ2)	7.0:1	2388	9857	4
	1	8:1	5:1	1913	8180	4
	1	6:1	3.7:1	1764	6209	4
	1	4:1	2.5:1	1148	4936	4

【0271】

(実施例4)

免疫原性に対するDOTAP濃度の効果

この実施例は、高濃度のDOTAPを用いて作製したカチオン性水中油型エマルジョンでは、コットンラットモデルにおいて、RSV-F抗原をコードするRNAレプリコンの免疫原性が増大したことを示す。

【0272】

1. 材料および方法

RNAレプリコン。RNAレプリコンであるvA142 RSV-F-delFP-完全長リボザイムの配列

【0273】

コットンラットのワクチン接種。雌コットンラット(Sigmodon hispidus)をHarlan Laboratoriesから入手した。試験はすべて、Nov

10

20

30

40

50

artis 動物実験委員会 (Novartis Animal Care and Use Committee) に承認されたものであり、当該委員会に従って行なった。動物群に、表示したワクチンを0日目に筋肉内 (i.m., 100 μ l) 免疫化した。各免疫化の3週間後に血清サンプルを収集した。免疫化した、またはワクチン接種していない対照動物に、最終の免疫化の4週間後、 1×10^5 の PFU RSV を鼻腔内 (i.n.) チャレンジした。

【0274】

RSV-F 三量体サブユニットワクチン。RSV F 三量体は、融合ペプチド領域が欠失した (その他の三量体との会合を防ぐ)、RSV F の外部ドメインを含む組換えタンパク質である。得られた構築物は、同種三量体を形成することがサイズ排除クロマトグラフィーによって観察され、融合後 F コンホメーションと一致する予測された表現型を有することが電子顕微鏡によって観察された。タンパク質は、昆虫細胞または CHO 細胞において発現され、構築物の C 末端と融合した HIS タグ、さらに、従来技術を使用するサイズ排除クロマトグラフィーによって精製された。得られたタンパク質サンプルは、95% 超の純度を示す。F-サブユニットワクチンの *in vivo* 評価のために、100 μ g/mL 三量体タンパク質を、10 mM ヒスチジンバッファー、pH 6.3 を使用して 2 mg/mL アラム (alum) 上に吸着させ、塩化ナトリウムを用いて等張へ調整した (150 mM に)。F-サブユニットタンパク質を、2~8 で穏やかに攪拌しながらアラム上に一晩吸着させた。

【0275】

RSV F 特異的 ELISA。個々の血清サンプルを、酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA) によって RSV F 特異的 IgG の存在についてアッセイした。ELISA プレート (Maxisorp 96 ウェル、Nunc) を、PBS 中、1 μ g/mL の精製 RSV F (del p23 - fur del - trunc 非切断型) を用いて 4 で一晩コーティングした。洗浄 (0.1% Tween-20 を含む PBS) 後、プレートを、PBS 中の Superblock ブロッキングバッファー (Thermo Scientific) を用いて、37 で少なくとも 1.5 時間ブロッキングした。次いで、プレートを洗浄し、実験または対照コottonラットから得た、アッセイ希釈剤 (0.1% Tween-20 および 5% ヤギ血清を含む PBS) での血清の段階希釈物を添加し、プレートを 37 で 2 時間インキュベートした。洗浄後、プレートを、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ニワトリ抗コottonラット IgG (Immunology Consultants Laboratory, Inc、アッセイ希釈剤で 1:5, 000 希釈) とともに 37 で 1 時間インキュベートした。最後に、プレートを洗浄し、各ウェルに 100 μ l の TMB ペルオキシダーゼ基質溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) を添加した。100 μ l の 1M H_3PO_4 を添加することによって反応を停止させ、プレートリーダーを使用して 450 nm で吸光度を読み取った。各血清サンプルについて、光学濃度 (OD) 対血清希釈の逆数の対数のプロットを、非線形回帰 (GraphPad Prism) によって作成した。力価は、およそ 0.5 の OD での血清希釈の逆数として定義した (各プレートに含まれていた、1:2500 の定義された力価を有する、RSV 感染したコottonラットから得たプールされた標準の血清に正規化された)。

【0276】

マイクロ中和アッセイ。血清サンプルを、ブランク減少中和試験 (PRNT) によって中和抗体の存在について試験した。HI-血清の 2 倍段階希釈物 (5% HI-FBS を含む PBS 中) を、以前に力価測定された等容積の RSV Long に添加した (およそ 115 PFU / 25 μ l を生じる)。血清/ウイルス混合物を 37 および 5% CO₂ で 2 時間インキュベートして、ウイルス中和が生じるのを可能にし、次いで、25 μ l のこの混合物 (およそ 115 PFU を含有する) を 96 ウェルプレート中の HEp-2 細胞の 2 連のウェルに接種した。37 および 5% CO₂ で 2 時間後、細胞を 0.75% メチルセルロース / MEM 5% HI-FBS で覆い、42 時間インキュベートした。免疫染色

10

20

30

40

50

とそれに続く自動計数によるシンシチウム形成の検出によって感染性ウイルス粒子の数を決定した。中和力価は、対照（血清なし）に対して、ウェルあたりのシンシチウム（*syncytia*）の数の少なくとも60%の減少を生じる、血清希釈の逆数として定義される。

【0277】

2. 免疫原性に対するDOTAP濃度の効果

表9は、*in vivo*コottonラットモデルにおけるRSV F抗原の免疫原性に対するDOTAP濃度の効果を示す。最初の2回のワクチン接種には、表9に示したとおりのRNA/CNE製剤を使用した。3回目のワクチン接種では、3 μ gのRSV Fサブユニットタンパク質（アラム中）を、未処置群以外のすべての動物に使用した。

【表9】

表9

製剤	RNA (μ g/用量)	3wp1 F 特異的 総IgG 力価	3wp2 F 特異的 総IgG 力価	3wp3 F 特異的 総IgG 力価	3wp1 F 特異的中和 IgG力価	3wp2 F 特異的中和 IgG力価	3wp3 F 特異的中和 IgG力価
6 μ g F- 三量体 + アラム	--	16,373	64,928	84,133	327	3,565	3979
1E6 IU/ 200 μ l VRP	--	2819	2,478	15,473	135	299	1791
CNE17 (Ambion MegaScript RNA)	0.01	112	771	23,939	28	66	689
	0.1	351	1,505	19,495	41	173	1060
	1	722	2,379	22,075	82	249	2550
CMF31 (Ambion MegaScript RNA)	0.01	184	1,015	31,082	31	67	1301
	0.1	375	1,250	16,597	51	99	2393
	1	1013	2,736	20,861	199	341	2783
	10	4556	6,867	27,299	253	672	3593
CMF34 (Ambion MegaScript RNA)	0.01	214	690	25,470	35	38	1440
	0.1	411	1,574	19,030	45	129	1835
	1	953	2,248	18,894	75	353	3224
	10	4,804	5,122	16,566	282	521	3738
CNE17 (社内合成 RNA)	1	1,042	2,944	23,097	128	288	2086
未処置	5	5	5	5	0	10	10

Ambion MegaScript RNAと社内合成RNAは、異なる方法を用いて調製した。

【0278】

表9のデータは、すべてのCNE-RNA製剤で、宿主において用量依存性の免疫応答が誘導されたことを示す（総IgG力価ならびに中和抗体力価）。CMF31-RNA製剤の投与とCMF34-RNA製剤の投与では同様のF特異的総IgG力価が得られ、各々は、表示した各RNA用量においてCNE17のものより大きかった。また、すべてのCNE-RNA製剤で、10 μ gのRNAにおいて良好な中和抗体力価が誘導された。CMF31-RNA、CMF34-RNAおよびCNE17-RNA群の中和抗体力価は、1 μ g RNA/CMF31群での力価が驚くほど高かったこと以外は同様であった。

【0279】

（実施例5）

免疫原性に対するバッファ組成の効果の評価

【 0 2 8 0 】

この実施例では、CMF34をベースとするが異なるバッファー成分を有する様々なエマルジョンを調製した。

【 0 2 8 1 】

表10に、CMF34配合RNAを異なるバッファー系を用いて調製した場合のマウス免疫原性試験の結果をまとめる。

【表10】

表 10

群番号	説明			2wp1	2wp2	2wp2/2wp1 比
	RNA	エマルジョン	N/P 比			
1	1 µg RSV-F*	PBS	-	100	2269	23
2	RV01 (15)	PBS	-	8388	105949	13
3	1 µg RSV-F*	280mMのスクロースを有するCNE17	10:1	898	9384	10
4		280mMのスクロースを有するCMF34	10:1	1835	10853	6
5		280mMのスクロースと1mMのクエン酸塩を有するCMF34	10:1	1751	15589	9
6		280mMのスクロースと10mMのクエン酸塩を有するCMF34	10:1	1699	17078	10
7		280mMのスクロース、1mMのクエン酸塩および2mM NaClを有するCMF34	10:1	1342	16400	12
8		280mMのスクロース、10mMのクエン酸塩および2mM NaClを有するCMF34	10:1	1318	10467	8
9		C 280mMのスクロース、1mMのクエン酸塩および10mM NaClを有するCMF34	10:1	1735	12457	7
10		280mMのスクロース、10mMのクエン酸塩および10mM NaClを有するCMF34	10:1	1365	14414	11

*vA375 レプリコン。

【 0 2 8 2 】

(実施例6)

エマルジョンの安定性

CMF34の安定性を、エマルジョン粒子の平均直径ならびにエマルジョンを作製した後(T=0)および4で1ヶ月後(T=1ヶ月)と4で2ヶ月後(T=1ヶ月)の多分散性を測定することにより評価した。また、安定性を4で3、6および12ヶ月後にも評価した。表11に示した結果は、エマルジョンが少なくとも12ヶ月にわたって安定であったことを示す。

【表11】

表 11

	T=0	T=1ヶ月	T=2ヶ月	T=3ヶ月	T=6ヶ月	T=12ヶ月
ナノZS (nm)	101.4	100.6	99.76	99.23	101.0	101.0
多分散性	0.109	0.102	0.096	0.103	0.080	0.094

【 0 2 8 3 】

(実施例7)

ヘルペスウイルスタンパク質をコードするレプリコンの免疫原性

A. CMVタンパク質

ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)由来の糖タンパク質複合体を発現するピシストロン性およびペンタシストロン性のアルファウイルスレプリコンを、調製した。これを、図1および3に模式的に示す。アルファウイルスレプリコンはベネズエラウマ脳炎ウイル

ス (V E E) をベースにした。レプリコンをウイルスレプリコン粒子 (V R P) 内にパッケージングし、脂質ナノ粒子 (L N P) 内に封入するか、または C M F 3 4 を配合した。コードされた H C M V タンパク質および該レプリコンの各々に由来するタンパク質複合体の発現を、免疫プロット、免疫共沈降およびフローサイトメトリーによって確認した。フローサイトメトリーは、複合体のタンパク質成分をコードする五量体レプリコンからの五量体 g H / g L / U L 1 2 8 / U L 1 3 0 / U L 1 3 1 複合体の発現を確認するために使用し、該五量体複合体上に存在するコンフォメーションエピトープに特異的なヒトモノクローナル抗体を使用した (M a c a g n o ら (2 0 1 0) , J . V i r o l . 8 4 (2) : 1 0 0 5 - 1 3) 。図 2 は、これらの抗体が、H C M V g H / g L / U L 1 2 8 / U L 1 3 0 / U L 1 3 1 五量体複合体を発現するレプリコン RNA (A 5 2 7) でトランスフェクトされた B H K V 細胞に結合することを示す。細胞を同じレプリコン構築物から作製した V R P に感染させた場合にも、同様の結果が得られた。これは、該五量体複合体を発現するように設計されたレプリコンが実際に所望の抗原を発現し、潜在的副生成物 g H / g L は発現しないことを示す。

10

【 0 2 8 4 】

V R P 、 L N P 内に封入した RNA 、および C M F 3 4 を配合した RNA を使用し、後肢四頭筋への筋肉内注射によって B a l b / c マウスを免疫化した。マウスは 3 週間ずつ間隔をおいて 3 回免疫化し、血清サンプルを、各免疫化の前ならびに 3 回目と最後の免疫化の 3 週間後に収集した。血清をマイクロ中和アッセイで、ワクチン接種によって誘発された中和抗体応答の効力を測定するために評価した。力価は 5 0 % 中和力価として示す。

20

【 0 2 8 5 】

V R P 内の可溶性 H C M V g H / g L 複合体についてのいくつかの異なる構成のピシストロン性発現カセットの免疫原性を評価した。図 3 は、膜につなぎ留められた完全長 g H / g L 複合体を発現する V R P が、同様のピシストロン性発現カセットから発現された可溶性複合体 (g H s o l / g L) よりわずかに高い力価において強力な中和抗体を誘発したことを示す。g H s o l および g L をコードする遺伝子の順序を変更すること、またはサブゲノムプロモーターのうちの 1 つを I R E S もしくは F M D V 2 A 部位で置き換えることによって、免疫原性は実質的に改善されなかった。

【 0 2 8 6 】

g H / g L を発現するピシストロン性レプリコンおよび五量体複合体を発現するペンタシストロン性レプリコンにより種々の製剤で中和抗体が誘発されるかどうかを確認するため、コットンラットを、C M F 3 4 と混合したピシストロン性レプリコンまたはペンタシストロン性レプリコンで免疫化した。表 1 2 は、C M F 3 4 中のレプリコンにより、L N P 内に封入した同じレプリコンと同等の中和抗体力価が誘発されたことを示す。

30

【表 1 2】

表 12. 中和抗体力価。血清を2回目の免疫化の3週間後に収集した。	
レプリコン	50% 中和力価
A160 gH FL/gL VRP 10 ⁶ IU	594
A160 gH FL/gL 1 μg LNP	141
A527 五量体 IRES 1 μg LNP	4,416
A160 gH FL/gL 1 μg CMF34	413
A527 五量体 IRES 1 μg CMF34	4,411

40

【 0 2 8 7 】

B . V Z V タンパク質

V Z V タンパク質をコードする核酸を V E E レプリコンベクター内にクローニングし、

50

g Bをコードするモノシストロン性レプリコン、g Hをコードするモノシストロン性レプリコン、g Lをコードするモノシストロン性レプリコン、g Eをコードするモノシストロン性レプリコンおよびg Iをコードするモノシストロン性レプリコンを産生させ、また、g H / g Lまたはg E / g Iをコードするピシストロン性レプリコンを産生させた。ピシストロン性レプリコンでは、各V Z Vのオープンリーディングフレームの発現は、別々のサブゲノムプロモーターによって駆動された。

【0288】

レプリコンRNAを調製するため、該レプリコンをコードするプラスミドをPmeIでの消化によって線状化し、線状化されたプラスミドをフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出し、酢酸ナトリウム/エタノール中で沈降させ、20 μ lのRNaseフリー水中に再懸濁させた。

10

【0289】

RNAは、1 μ gの線状化DNAの*in vitro*転写により、MEGAscript T7キット(AMBION# AM1333)を用いて調製した。20 μ lの反応液を、キャップ類似体なしで製造業者の使用説明書に従ってセットアップし、32 °Cで2時間インキュベートした。TURBO DNase (1 μ l)を添加し、混合物を32 °Cで30分間インキュベートした。RNaseフリー水(30 μ l)および酢酸アンモニウム溶液(30 μ l)を添加した。この溶液を混合し、-20 °Cで少なくとも30分間冷却した。次いで、この溶液を最大速度で25分間、4 °Cにて遠心分離した。上清みを廃棄し、ペレットを70%エタノールですすぎ洗浄し、最大速度で10分間、4 °Cにて再度、遠心分離した。ペレットを風乾し、50 μ lのRNaseフリー水中に再懸濁させた。RNAの濃度を測定し、量を変性ゲルで確認した。

20

【0290】

RNAを、ScriptCap m7G Capping System (Epicentre #SCCE0625)を用いてキャッピングした。反応を、RNAとRNaseフリー水を合わせるによりスケールアップした。次いで、RNAを65 °Cで5~10分間変性させた。この変性RNAを速やかに氷に移し、以下の試薬を以下に順に添加した: ScriptCapキャッピングバッファー、10 mM GTP、2 mM SAM (新鮮調製)、ScriptGuard RNaseインヒビター、およびScriptCapキャッピング酵素。混合物を37 °Cで60分間インキュベートした。RNaseフリー水および7.5 M LiClを添加し、十分に混合し、混合物を-20 °Cで少なくとも30分間保存することにより反応を停止させた。次いで、混合物を最大速度で25分間、4 °Cにて遠心分離し、ペレットを70%エタノールですすぎ洗浄し、最大速度で10分間、4 °Cにて再度、遠心分離し、ペレットを風乾させた。ペレットをRNaseフリー水中に再懸濁させた。RNAの濃度を測定し、量を変性ゲル上で確認した。

30

【0291】

RNAトランスフェクション

細胞(BHK-V細胞)を6ウェルプレートに播種し、トランスフェクションの時点で90~95%コンフルエンスにした。各トランスフェクションでは、3 μ gのRNAを第1のチューブ内にて50 mLのOPTIMEM培地中で希釈した。リポフェクタミン2000を、50 mLのOPTIMEM培地を入れた第2のチューブに添加した。第1のチューブと第2のチューブとを合わせ、室温で20分間維持した。6ウェルプレート内の培養培地を新鮮培地と交換し、RNA-リポフェクタミン複合体を該細胞上に配置し、プレートを穏やかに揺り動かすことにより混合した。プレートをCO₂インキュベータ内で37 °Cにて24時間インキュベートした。

40

【0292】

免疫蛍光のため、トランスフェクトした細胞を収集し、96ウェルプレート内に播種し、市販のマウスmAb (希釈範囲 1:100 ~ 1:400)を用いて細胞内染色を行った。細胞ペレットを固定し、Citofix-Citoperm溶液で透過性にした。二次試薬はAlexa488標識ヤギ抗マウスF(ab')₂ (1:400の最終希釈度

50

)を使用した。

【0293】

VZVタンパク質gEおよびgIの発現は、モノシストロン性構築物(gEまたはgI)でトランスフェクトされた細胞において検出され、gEおよびgIの両方の発現は、市販のマウス抗体である、gEに対する13B1およびgIに対する8C4を用いたウエスタンブロットにおいて、ビストロン性gE/gI構築物でトランスフェクトされた細胞において検出された。VZVタンパク質gBの発現は、gBをコードするモノシストロン性構築物でトランスフェクトされた細胞において、市販の抗体10G6を用いて免疫蛍光によって検出された。VZVタンパク質複合体gH/gLの発現は、免疫蛍光により、モノシストロン性gHおよびモノシストロン性gLまたはビストロン性gH/gL構築物

10

【0294】

マウス免疫原性試験

8匹の雌BALB/cマウス群(6~8週齢および体重約20g)を、CMF32またはLNP(RV01)を配合した7.0または1.0μgのレプリコンRNAで、0、21および42日目に筋肉内免疫化した。免疫化した動物から血液サンプルを、2回目の免疫化の3週間後および3回目の免疫化の3週間後に採取した。群を表13に示す。

【表13】

表13			
群	抗原	用量(マイクログラム)	製剤
1	YFP	7	CMF32
2	YFP	1	CMF32
3	gB	7	CMF32
4	gB	1	CMF32
5	gE	7	CMF32
6	gE	1	CMF32
7	gH	7	CMF32
8	gH	1	CMF32
9	gI	7	CMF32
10	gI	1	CMF32
11	gL	7	CMF32
12	gL	1	CMF32
13	gE/gI	7	CMF32
14	gE/gI	1	CMF32
15	gH/gL	7	CMF32
16	gH/gL	1	CMF32

20

30

【0295】

VZV抗原に対する免疫応答

血清サンプルを、gBに対する抗体の存在について、VZV-レプリコンでトランスフェクトしたMRC-5細胞の細胞内染色によって試験した。MRC-5細胞を、10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地中に維持した。VZV Oka株接種材料(ATCCから入手)を用いてMRC-5細胞培養物を感染させ、感染した細胞全体をウイルスの継代培養に使用した。感染細胞と非感染細胞との比は1:10であった。感染の30時間後、細胞を、96ウェルプレート内への播種のためにトリプシンで分散させ、免疫化後に採取したマウス血清プール(希釈範囲は1:200~1:800)での細胞内染色を行なった。感染レベルの定量的ための対照としては市販のmAbを使用した。細胞ペレットを固定し、Citofix-Citoperm溶液で透過性にした。二次試薬はAlexa488標識ヤギ抗マウスF(ab')₂を使用した(1:400の最終希釈度)。

40

【0296】

gBに対する市販の抗体(10G6)、gHに対する市販の抗体(SG3)、ならびに

50

g E に対する市販の抗体 (1 3 B 1 (S B A) および 8 6 1 2 (M i l l i p o r e)) を陽性対照として使用し、各々で感染 M R C - 5 細胞を細胞内染色した。C M F 3 2 を配合した 1 または 7 μ g の R N A のいずれかでの 3 回目の免疫化の 3 週間後に採取した免疫血清を 1 / 2 0 0、1 / 4 0 0 および 1 / 8 0 0 に希釈し、感染 M R C - 5 細胞の細胞内染色に使用した。結果を図 4 に示す (試験 1、群 1、5、7、9、11、13 および 15、C M F 3 2 製剤)。

【 0 2 9 7 】

中和アッセイ

各免疫化マウスの血清を増分 2 倍で連続希釈し (標準的な培養培地中、1 : 2 0 で開始)、等しい体積の V Z V 懸濁液にモルモット補体の存在下で添加した。3 7 で 1 時間のインキュベーション後、ヒト上皮細胞株 A 5 4 9 を添加した。感染細胞は、1 週間の培養後、培養物中に形成されたプラークを顕微鏡下で計数することにより測定され得る。プラーク数から、各血清希釈度での阻害 % を計算した。阻害 % の値を希釈係数の対数目盛に対してプロットすることにより、各血清サンプルについての図表を作成した。続いて、希釈係数と阻害 % の関係の近似直線を引いた。次いで、5 0 % 中和力価を希釈係数として求め、このとき、直線の交点が 5 0 % 阻害の値である。

【 0 2 9 8 】

表 1 4 は、モノシストロン性 g E、ビシストロン性 g E / g I、およびビシストロン性 g H / g L で免疫化されたマウスから得られた血清がロバストな中和抗体力価を含んでいたことを示す。

【 0 2 9 9 】

【 表 1 4 】

マウス ID	対照 (YFP)	gB	gE	gI	gE/gI	gH	gL	gH/gL
1	<20	<20	1111	<20	440	<20	<20	1070
2	<20	<20	413	51	>2560	<20	<20	>2560
3	<20	<20	>2560	<20	1031	<20	<20	>2560
4	<20	20	2128	<20	1538	<20	<20	>2560
5	<20	20	861	<20	636	20	<20	>2560
6	<20	<20	1390	<20	2339	<20	<20	>2560
7	<20	<20	969	<20	1903	<20	<20	900
8	<20	<20	1011	20	1969	20	<20	>2560
9	<20*	<20*	<20*	<20*	<20*	<20*	<20*	<20*

* 免疫前にプールした血清

【 0 3 0 0 】

(実施例 8)

スクアレン中における脂肪酸の溶解度

この実施例では、スクアレン中における様々な脂肪酸の溶解度を調べ、表 1 5 に示した。表示した量 (4 0、2 0、1 0 または 5 m g / m L) の脂肪酸をスクアレンと 6 0 で混合した。表 1 5 において、(

【 化 5 】

√

) は、脂肪酸が指定の濃度でスクアレンに可溶性であったことを意味し ; 「 x 」 は、脂肪酸が指定の濃度でスクアレンに可溶性でなかったことを意味し ; 「 - 」 は、指定の濃度での脂肪酸の溶解度を試験しなかったことを示す (該脂肪酸が、より高濃度で可溶性であったため)。脂肪酸をスクアレンに溶解させた後、溶液を 4 で一晩放置した。4 一晩と表示した列は、各脂肪酸がその最高濃度にある溶液の溶解性を示す。例えば、オレイン酸は、4 0 m g / m l でスクアレンに可溶性であり、4 で一晩、スクアレン中に可溶性の

ままであった。

【表 15】

表 15

脂肪酸		40 mg/mL	20 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	4 °C (一晚)
飽和脂肪酸 (奇数炭素鎖)	ウンデカン酸	√	-	-	-	√
	トリデカン酸	√	-	-	-	x
	ペンタデカン酸	√	-	-	-	x
	ヘプタデカン酸	x	x	x	√	x
飽和脂肪酸 (偶数炭素鎖)	ノナデカン酸	x	x	x	x	x
	ヘンエイコサン酸	x	x	x	x	x
	トリコサン酸	x	x	x	x	x
飽和脂肪酸 (偶数炭素鎖)	カプリン酸 (10:0)	√	-	-	-	√
	ラウリン酸 (12:0)	√	-	-	-	x
	ミリスチン酸 (14:0)	x	√	-	-	x
	パルミチン酸 (16:0)	x	x	x	√	x
	ステアリン酸 (18:0)	x	x	x	√	x
	アラキジン酸 (20:0)	x	x	x	√	x
	ヘヘン酸 (22:0)	x	x	x	x	x
	リグノセリン酸 (24:0)	x	x	x	x	x
不飽和脂肪酸	ドコサヘキサエン酸 (22:6)	√	-	-	-	√
	エライジン酸 (18:1)-トランス	√	-	-	-	x
	エルカ酸 (22:1)	√	-	-	-	√
	リノール酸 (18:2)	√	-	-	-	√
	リノレン酸 (18:3)	√	-	-	-	√
	ネルボン酸 (24:1)	√	-	-	-	x
	オレイン酸 (18:1)-シス	√	-	-	-	√
	パルミトレイン (16:1)	√	-	-	-	√
	ベトロセリン酸 (18:1)	√	-	-	-	√

【 0 3 0 1 】

配列

10

20

30

40

50

R S V - F 抗原をコードする、v A 3 1 7 RNA をコードする DNA のヌクレオチド配列 (配列番号 1)。

【 0 3 0 2 】

v A 1 4 2 RNA をコードする DNA のヌクレオチド配列 (配列番号 2)。

【 0 3 0 3 】

v A 3 7 5 RNA をコードする DNA のヌクレオチド配列 (配列番号 3)。

【 0 3 0 4 】

A 5 2 6 ベクター : S G P - g H - S G P - g L - S G P - U L 1 2 8 - 2 A - U L 1 3 0 - 2 A m o d - U L 1 3 1 (配列番号 4)。

【 0 3 0 5 】

A 5 2 7 ベクター : S G P - g H - S G P - g L - S G P - U L 1 2 8 - E M C V - U L 1 3 0 - E V 7 1 - U L 1 3 1 (配列番号 5)。

【 0 3 0 6 】

A 5 3 1 ベクター : S G P - g H s o l - S G P - g L (配列番号 6)。

【 0 3 0 7 】

A 5 3 2 ベクター : S G P - g H s o l - 2 A - g L (配列番号 7)。

【 0 3 0 8 】

A 5 3 3 ベクター : S G P - g H s o l - E V 7 1 - g L (配列番号 8)。

【 0 3 0 9 】

A 5 3 4 ベクター : S G P - g L - E V 7 1 - g H (配列番号 9)。

【 0 3 1 0 】

A 5 3 5 ベクター : S G P - 3 4 2 - E V 7 1 - g H s o l - 2 A - g L (配列番号 10)。

【 0 3 1 1 】

A 5 3 6 ベクター : S G P - 3 4 2 - E V 7 1 - g H s o l - E M C V - g L (配列番号 11)。

【 0 3 1 2 】

A 5 3 7 ベクター : S G P - 3 4 2 - E V 7 1 - g L - E M C V - g H s o l (配列番号 12)。

【 0 3 1 3 】

A 5 5 4 ベクター : S G P - g H - S G P - g L - S G P - U L 1 2 8 - S G P - U L 1 3 0 - S G P - U L 1 3 1 (配列番号 13)。

【 0 3 1 4 】

A 5 5 5 ベクター : S G P - g H s o l - S G P - g L - S G P - U L 1 2 8 - S G P - U L 1 3 0 - S G P - U L 1 3 1 (配列番号 14)。

【 0 3 1 5 】

A 5 5 6 ベクター : S G P - g H s o l 6 H i s - S G P - g L - S G P - U L 1 2 8 - S G P - U L 1 3 0 - S G P - U L 1 3 1 (配列番号 15)。

【 0 3 1 6 】

V Z V g B (配列番号 16)。

【 0 3 1 7 】

V Z V g H (配列番号 17)。

【 0 3 1 8 】

V Z V g L (配列番号 18)。

【 0 3 1 9 】

V Z V g I (配列番号 19)。

【 0 3 2 0 】

V Z V g E (配列番号 20)。

【 0 3 2 1 】

V Z V V E E R e p . S G P g B (配列番号 21)。

10

20

30

40

50

【 0 3 2 2 】

V Z V V E E R e p . S G P g H (配列番号 2 2) 。

【 0 3 2 3 】

V Z V V E E R e p . S G P g L (配列番号 2 3) 。

【 0 3 2 4 】

V Z V V E E R e p . S G P g H - S G P g L (配列番号 2 4) 。

【 0 3 2 5 】

V Z V V E E R e p . S G P g E (配列番号 2 5) 。

【 0 3 2 6 】

V Z V V E E R e p . S G P g I (配列番号 2 6) 。

10

【 0 3 2 7 】

V Z V V E E R e p . S G P g E - S G P g I (配列番号 2 7) 。

【 0 3 2 8 】

本明細書は、本明細書内に引用される参考文献の教示を踏まえると、最も完全に理解される。本明細書内の実施形態は、本発明の実施形態の例示を提供するものであって、本発明の範囲を制限すると解釈されてはならない。当業者ならば、多数のその他の実施形態が、本発明によって包含されることは容易に認識しよう。本開示内容中に引用されるすべての刊行物および特許は、参照によりその全文が組み込まれる。参照によって組み込まれる材料が、この明細書と相反するかまたは矛盾する範囲においては、本明細書が任意のこのような材料に優先する。本明細書における任意の参考文献の引用は、このような参考文献が本発明の先行技術であると認めることではない。

20

【 0 3 2 9 】

当業者ならば、本明細書に記載された本発明の特定の実施形態の多数の等価物を認識するだろうし、慣例的な実験程度を使用して確認できる。このような等価物は、以下の実施形態によって包含されるものとする。

【 図 1 】

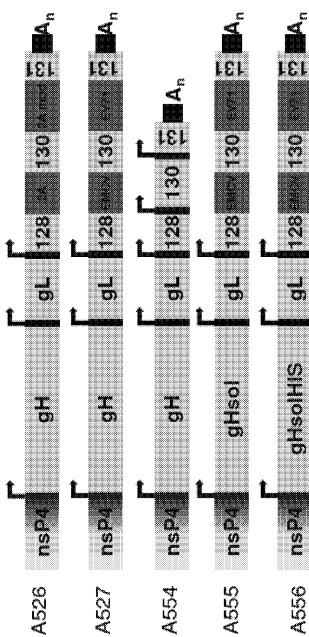


Figure 1

【 図 2 】

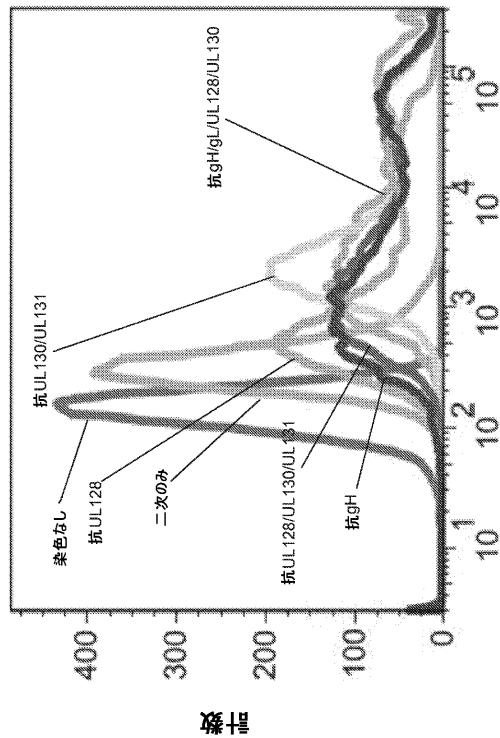


Figure 2

【 図 3 】

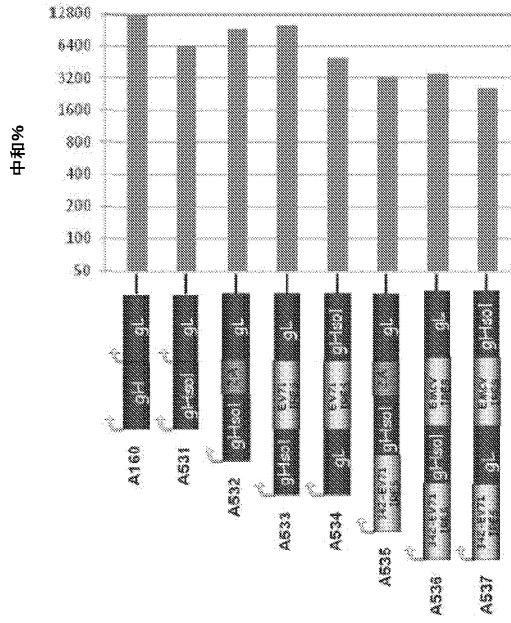


Figure 3

【 図 4 】

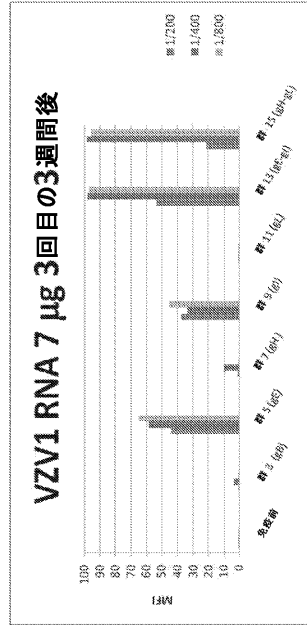


Figure 4

【 配列表 】

000612083900001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A

- (31)優先権主張番号 61/545,936
 (32)優先日 平成23年10月11日(2011.10.11)
 (33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (72)発明者 ブリト, ルイス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 - 2 9 1 6 , エメリービル, ホールトン ストリート 4 5 6 0 , ノバルティス バクシンズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド, アイピー サービス エム/エス エックス - 1 0 0 ビー
- (72)発明者 チャン, マイケル
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 - 2 9 1 6 , エメリービル, ホールトン ストリート 4 5 6 0 , ノバルティス バクシンズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド, アイピー サービス エム/エス エックス - 1 0 0 ビー
- (72)発明者 ジアール, アンドリュウ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 - 2 9 1 6 , エメリービル, ホールトン ストリート 4 5 6 0 , ノバルティス バクシンズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド, アイピー サービス エム/エス エックス - 1 0 0 ビー
- (72)発明者 オーヘイガン, デレック
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 - 2 9 1 6 , エメリービル, ホールトン ストリート 4 5 6 0 , ノバルティス バクシンズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド, アイピー サービス エム/エス エックス - 1 0 0 ビー
- (72)発明者 シン, マンモハン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 - 2 9 1 6 , エメリービル, ホールトン ストリート 4 5 6 0 , ノバルティス バクシンズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド, アイピー サービス エム/エス エックス - 1 0 0 ビー

審査官 高橋 樹理

- (56)参考文献 国際公開第2011/005799(WO, A1)
 特表2002-521423(JP, A)
 YI SUN WOO, A CATIONIC LIPID EMULSION/DNA COMPLEX AS A PHYSICALLY STABLE AND SERUM-RESISTANT GENE 以下備考, PHARMACEUTICAL RESEARCH, 米国, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, 2000年 3月 1日, V17 N3, P314-320, DELIVERY SYSTEM
 OTT G, A CATIONIC SUB-MICRON EMULSION (MF59/DOTAP) IS AN EFFECTIVE DELIVERY SYSTEM FOR DNA VACCINES, JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, NL, ELSEVIER, 2002年 2月19日, V79 N1-3, P1-5

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 9 / 1 0 7
 A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9