

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成27年8月20日(2015.8.20)

【公表番号】特表2014-522841(P2014-522841A)

【公表日】平成26年9月8日(2014.9.8)

【年通号数】公開・登録公報2014-048

【出願番号】特願2014-519088(P2014-519088)

【国際特許分類】

A 6 1 K 9/107 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 47/06 (2006.01)

A 6 1 K 47/14 (2006.01)

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

A 6 1 K 47/16 (2006.01)

A 6 1 K 47/18 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 K 39/12 (2006.01)

A 6 1 K 47/02 (2006.01)

A 6 1 K 47/12 (2006.01)

A 6 1 K 47/10 (2006.01)

A 6 1 K 47/26 (2006.01)

A 6 1 K 47/34 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 9/107

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 47/06

A 6 1 K 47/14

A 6 1 K 47/24

A 6 1 K 47/16

A 6 1 K 47/18

A 6 1 P 37/04

A 6 1 K 39/12

A 6 1 K 47/02

A 6 1 K 47/12

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 47/26

A 6 1 K 47/34

A 6 1 K 48/00

【手続補正書】

【提出日】平成27年7月2日(2015.7.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

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 ~ 180 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少なくとも約 2.5 mM であり；
および

(i i i) 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。

【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】

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、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。

【請求項 8】

前記カチオン性脂質の頭部が第 4 級アミンを含む、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。

【請求項 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 (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、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。

【請求項 10】

前記カチオン性脂質が、約 2.58 mM (1.8 mg / mL) ~ 約 7.16 mM (5 mg / mL) の濃度の DOTAP である、請求項 9 に記載の水中油型エマルジョン。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 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。

【請求項 12】

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、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

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；

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

【請求項 14】

前記粒子の平均直径が約 80 nm ~ 180 nm である、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記組成物の N / P 比が約 4：1 ~ 約 20：1 である、請求項 13 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

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 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記油がスクアレンまたはスクアランである、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

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 ~ 10 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。

【請求項 19】

(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 18 に記載の方法。

【請求項 20】

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 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

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 13 に記載の組成物。

【請求項 22】

被験体において免疫応答を生じさせる ための、請求項 13 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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 30 mg 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 24 mg 以下または約 4 mg 以下である。

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 80 nm ~ 180 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少なくとも約 2 . 5 mM であり；

および

(i i i) 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 80 nm ~ 約 150 nm 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 80 nm ~ 約 130 nm である、項目 1 または 2 に記載の水中油型エマルジョン。

(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 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、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 Tween 80 および約 0 . 5 % (v / v) の SPAN 85 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 (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 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 2.58 mM (1.8 mg / 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 2.58 mM (1.8 mg / mL) ~ 約 7.16 mM (5 mg / 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) 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 1.25 mM 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 80 nm ~ 180 nm 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 80 nm ~ 150 nm 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 80 nm ~ 約 130 nm 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 2 9 に記載の組成物。

(項目 3 1)

前記粒子が、さらに界面活性剤を含む、項目 2 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 3 2)

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、項目 3 1 に記載の組成物。

(項目 3 3)

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 3 1 または 3 2 に記載の組成物。

(項目 3 4)

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 3 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 3 5)

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 3 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 3 6)

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 3 5 に記載の組成物。

(項目 3 7)

前記カチオン性脂質の頭部が第 4 級アミンを含む、項目 2 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 3 8)

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 2 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 3 9)

前記カチオン性脂質が D O T A P である、項目 3 8 に記載の組成物。

(項目 4 0)

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 3 9 に記載の組成物。

(項目 4 1)

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 3 9 に記載の組成物。

(項目 4 2)

前記 R N A 分子が、抗原をコードする自己複製 R N A 分子である、項目 2 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 4 3)

前記自己複製 R N A がアルファウイルス由来 R N A レプリコンである、項目 4 2 に記載の組成物。

(項目 4 4)

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 R N A 分子を含む組成物の調製方法であって：

(i) 項目 1 ~ 1 8 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；

(i i) 該 R N A 分子を含む水性溶液を提供すること；および

(i i i) (i) の該水中油型エマルジョンと (i i) 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 4 5)

(i) の前記カチオン性水中油型エマルジョンと (i i) の R N A 溶液とを約 1 : 1 (v / v) の比で合わせる、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記 R N A 分子を含む前記水性溶液が塩を含む、項目 4 4 または 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記塩が N a C l である、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記水性溶液が約 2 0 m M の N a C l を含む、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記 R N A 分子を含む前記水性溶液がバッファーである、項目 4 4 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 0)

前記バッファーがクエン酸バッファーである、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記バッファーが約 2 m M のクエン酸塩を含む、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記 R N A 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 4 4 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 3)

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 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

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 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記非イオン性張度調整剤がスクロースである、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記水性溶液が約 5 6 0 m M のスクロースを含む、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記 R N A 分子を含む前記水性溶液がポリマーを含む、項目 4 4 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 8)

前記ポリマーが P l u r o n i c (登録商標) F 1 2 7 である、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記水性溶液が約 0 . 0 5 % ~ 約 2 0 % (w / v) のポリマーを含む、項目 5 7 または 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記水性溶液が約 1 % (w / v) の P l u r o n i c (登録商標) F 1 2 7 を含む、項目 5 7 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 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 8 0 n m ~ 1 8 0 n m 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 . 2 5 m M である、水中油型エマルジョン。

(項目 6 2)

前記水中油型エマルジョンが安定である、項目 6 1 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 6 3)

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 m M である、項目 6 1 または 6 2 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 6 4)

前記油がスクアレンまたはスクアランである、項目 6 1 ~ 6 3 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。

(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(DOEPCL)、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。

(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80nm～約180nmである、項目73～78のいずれか1項に記載の組成物。

(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 8 1)

前記組成物がさらに無機塩を含み、該無機塩の濃度が 3 0 m M 以下である、項目 2 1 ~ 4 3 および 7 3 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 8 2)

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 2 1 ~ 4 3 および 7 3 ~ 8 1 に記載の組成物。

(項目 8 3)

前記水中油型エマルジョンが安定である、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 8 4)

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 R N A 分子を含む組成物であって：

(i) 項目 6 1 ~ 7 2 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；

(i i) 該 R N A 分子を含む水性溶液を提供すること；および

(i i i) (i) の該水中油型エマルジョンと (i i) 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プロセスを用いて調製される、組成物。

(項目 8 5)

前記 R N A 分子が、2 つ以上の抗原をコードするポリシストロン性 R N A 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 R N A 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。

(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。

(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。

(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、I R E S 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。

(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 D O T A P の総量が約 2 4 m g 以下である、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 9 9)

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

(項目 1 0 0)

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 8 0 n m ~ 1 8 0 n m 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；

(i i) 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 . 5 m M であり；

(i i i) 該油が約 0 . 2 % ~ 約 8 % (w / v) 存在し；および

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

(項目 1 0 1)

前記油が 0 . 6 % ~ 4 % (w / v) 存在する、項目 1 0 0 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 0 2)

前記油が約 1 % ~ 約 3 . 2 % (w / v) 存在する、項目 1 0 0 または 1 0 1 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 0 3)

前記粒子の平均直径が約 8 0 n m ~ 約 1 5 0 n m である、項目 1 0 0 ~ 1 0 2 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 0 4)

前記粒子の平均直径が約 8 0 n m ~ 約 1 3 0 n m である、項目 1 0 0 ~ 1 0 3 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 0 5)

前記水中油型エマルジョンが安定である、項目 1 0 0 ~ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 0 6)

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 0 0 ~ 1 0 5 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 0 7)

前記油がスクアレンまたはスクアランである、項目 1 0 0 ~ 1 0 6 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 0 8)

前記粒子が、さらに界面活性剤を含む、項目 1 0 0 ~ 1 0 7 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 0 9)

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、項目 1 0 8 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 1 0)

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 0 8 または 1 0 9 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 1 1)

前記カチオン性水中油型エマルジョンが約 0 . 0 1 % ~ 約 2 . 5 % (v / v) の界面活性剤を含む、項目 1 0 8 ~ 1 1 0 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 1 2)

前記界面活性剤が S P A N 8 5 (ソルビタントリオレエート)、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 0 8 ~ 1 1 1 のいずれか 1 項に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 1 3)

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

(項目 1 1 4)

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 0 0 ~ 1 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 1 1 5)

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 0 0 ~ 1 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 1 1 6)

前記カチオン性脂質が D O T A P である、項目 1 1 5 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 1 7)

前記エマルジョン中の D O T A P の濃度が少なくとも約 2 . 5 8 m M (1 . 8 m g / m L) である、項目 1 1 6 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 1 8)

前記エマルジョン中の D O T A P の濃度が約 2 . 5 8 m M (1 . 8 m g / m L) ~ 約 7 . 1 6 m M (5 m g / m L) である、項目 1 1 6 に記載の水中油型エマルジョン。

(項目 1 1 9)

項目 1 0 0 ~ 1 1 8 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。

(項目 1 2 0)

ステップ (a) がさらに、前記油を約 3 0 ~ 約 6 5 の温度まで加熱することを含む、項目 1 1 9 に記載の方法。

(項目 1 2 1)

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 R N A 分子を含む組成物であって、該粒子が、2 5 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；

(i i) 該組成物中のカチオン性脂質の濃度が少なくとも約 1 . 2 5 m M であり；および

(i i i) 該油が約 0 . 1 % ~ 約 4 % (w / v) 存在し；および

(i v) 該カチオン性脂質が D C - コレステロールではない、組成物。

(項目 1 2 2)

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 80 nm ~ 180 nm である、項目 121 ~ 123 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 125)

前記粒子の平均直径が約 80 nm ~ 150 nm 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 80 nm ~ 約 130 nm 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 項に記載の組成物。

(項目 128)

前記組成物の N/P 比が約 4 : 1 ~ 約 20 : 1 である、項目 121 ~ 126 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 129)

前記組成物の N/P 比が約 4 : 1 ~ 約 15 : 1 である、項目 121 ~ 126 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 130)

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 121 ~ 129 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 131)

前記油がスクアレンまたはスクアランである、項目 121 ~ 130 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 132)

前記粒子が、さらに界面活性剤を含む、項目 121 ~ 131 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 133)

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤である、項目 132 に記載の組成物。

(項目 134)

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 132 または 133 に記載の組成物。

(項目 135)

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 132 ~ 134 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 136)

前記界面活性剤が 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、項目 132 ~ 135 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 137)

前記カチオン性水中油型エマルジョンが約 0.25% (v/v) の Tween 80 および約 0.25% (v/v) の SPAN 85 を含む、項目 136 に記載の組成物。

(項目 138)

前記カチオン性脂質の頭部が第 4 級アミンを含む、項目 121 ~ 137 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 139)

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 121 ~ 138 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 140)

前記カチオン性脂質が DOTAP である、項目 139 に記載の組成物。

(項目 141)

前記組成物中の DOTAP の濃度が少なくとも約 1 . 29 mM (0 . 9 mg / mL) である、項目 140 に記載の組成物。

(項目 142)

前記組成物中の DOTAP の濃度が約 1 . 29 mM (0 . 9 mg / mL) ~ 約 3 . 58 mM (2 . 5 mg / mL) である、項目 140 に記載の組成物。

(項目 143)

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 1 5 0 または 1 5 1 に記載の組成物。

(項目 1 5 3)

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 1 5 2 に記載の組成物。

(項目 1 5 4)

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 1 5 2 または 1 5 3 に記載の組成物。

(項目 1 5 5)

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 1 5 4 に記載の組成物。

(項目 1 5 6)

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 1 5 4 または 1 5 5 に記載の組成物。

(項目 1 5 7)

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 1 5 6 に記載の組成物。

(項目 1 5 8)

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、I R E S 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 1 5 0 ~ 1 5 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 1 5 9)

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 1 2 1 ~ 1 4 4 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 1 6 0)

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 1 5 9 に記載の方法。

(項目 1 6 1)

単回投与で前記被験体に投与される D O T A P の総量が約 2 4 m g 以下である、項目 1 5 9 に記載の方法。

(項目 1 6 2)

単回投与で前記被験体に投与される D O T A P の総量が約 4 m g 以下である、項目 1 5 9 に記載の方法。

(項目 1 6 3)

さらに抗酸化剤を含んでいる、項目 1 ~ 1 8 、 2 1 ~ 4 3 、 6 1 ~ 8 3 、 8 5 ~ 9 5 、 1 0 0 ~ 1 1 8 、 1 2 1 ~ 1 4 4 または 1 4 7 ~ 1 5 8 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。