

【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；

(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D C - 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（D O T A P）、1,2-ジオレオイル-sn-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、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2.58mM（1.8mg/mL）～約7.16mM（5mg/mL）の濃度のD O T A P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 1 3】

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 R N A 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 m M であり；および

(iii) 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。

【請求項 1 4】

前記粒子の平均直径が約 80 nm ~ 180 nm である、請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記組成物の N / P 比が約 4 : 1 ~ 約 20 : 1 である、請求項 1 3 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

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 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記油がスクアレンまたはスクアランである、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

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) 請求項 1 ~ 1 0 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 R N A 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 1 9】

(i) の前記カチオン性水中油型エマルジョンと (ii) の R N A 溶液とを約 1 : 1 (v / v) の比で合わせる、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 R N A 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 1 8 または 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

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、請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

被験体において免疫応答を生じさせるための、請求項 1 3 ~ 2 1 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 D O T A P であり、単回投与で被験体に投与される D O T A P 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；

(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）ブ

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 ~ 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 D O T A P 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 D O T A P 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 D O T A P 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 R N A 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；

(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 1.25 mM であり；および

(i i i) 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 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エート)、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。

(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(DOPEC)、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。

(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。

(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つて：

(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。

(項目 48)

前記水性溶液が約 20 mM 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 2 mM のクエン酸塩を含む、項目 50 に記載の方法。

(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。

(項目 56)

前記水性溶液が約 560 mM 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。

(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 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。

(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。

(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 2.5 mM 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。

(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エート)、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(DOPEC)、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。

(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レブリコンである、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81)

前記組成物がさらに無機塩を含み、該無機塩の濃度が30mM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。

(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つて：

(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85)

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21～43、73～82および84のいずれか1項に記載の組成物。

(項目86)

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85に記載の組成物。

(項目87)

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86に記載の組成物。

(項目88)

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87に記載の組成物。

(項目89)

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87または88に記載の組成物。

(項目90)

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89に記載の組成物。

(項目91)

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89または90に記載の組成物。

(項目92)

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91に記載の組成物。

(項目93)

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91または92に記載の組成物。

(項目94)

前記第5のス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93に記載の組成物。

(項目95)

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87～94のいずれか1項に記載の組成物。

(項目96)

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21～43、73～82および84～95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97)

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96に記載の方法。

(項目98)

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96に記載の方法。

(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。

(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。

(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。

(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。

(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エート)、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。

(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(DOPEC)、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。

(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。

(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

(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。

(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SPAN85（ソルビタントリオレエート）、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Tween80および約0.25% (v/v) のSPAN85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(DOPEC)、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1.29mM(0.9mg/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1.29mM(0.9mg/mL)～約3.58mM(2.5mg/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リストロン性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)

前記ポリリストロン性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。

(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。

(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。