

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-535351
(P2024-535351A)

(43)公表日 令和6年9月30日(2024.9.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	4 B 0 6 5
A 6 1 K	9/00 (2006.01)	A 6 1 K	9/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K	9/107(2006.01)	A 6 1 K	9/107	4 C 0 8 4
A 6 1 K	9/19 (2006.01)	A 6 1 K	9/19	4 C 0 8 6
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22	
		審査請求	未請求	予備審査請求
				未請求
				(全92頁)
				最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-518361(P2024-518361)	(71)出願人	522375693	
(86)(22)出願日	令和4年1月24日(2022.1.24)		エイチディーティー バイオ コーポレー	
(85)翻訳文提出日	令和6年5月21日(2024.5.21)		ション	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/013508		アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 2	
(87)国際公開番号	WO2023/048758		, シアトル, イーストレイク アペニ	
(87)国際公開日	令和5年3月30日(2023.3.30)		ユー イー 1 6 1 6, ナンバー 2 8 0	
(31)優先権主張番号	63/247,172	(74)代理人	100078282	
(32)優先日	令和3年9月22日(2021.9.22)		弁理士 山本 秀策	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413	
(31)優先権主張番号	63/297,449		弁理士 森下 夏樹	
(32)優先日	令和4年1月7日(2022.1.7)	(74)代理人	100181674	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 飯田 貴敏	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100181641	
	最終頁に続く		弁理士 石川 大輔	
		(74)代理人	230113332	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 乾燥ナノ粒子組成物

(57)【要約】

核酸の対象への送達における使用のための、乾燥組成物およびそのような組成物を調製するための方法が本明細書に提供される。乾燥組成物は、脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア、1つまたは複数の核酸、ならびに少なくとも1つの凍結保護物質を含み得る。これらの処置のための乾燥組成物を使用する方法も提供される。

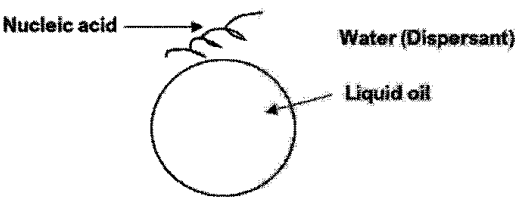


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

乾燥組成物であって、

(a) 脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；

(b) 1つまたは複数の核酸；ならびに

(c) 少なくとも1つの凍結保護物質

を含む乾燥組成物。

【請求項 2】

凍結乾燥されている、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 3】

噴霧乾燥されている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

熱的に安定である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

摂氏約 25 度で熱的に安定である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

摂氏約 45 度で熱的に安定である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

摂氏約 -20 度で熱的に安定である、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 8】

摂氏約 2 度～摂氏約 8 度で熱的に安定である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

少なくとも 1 週間、少なくとも 2 週間、および／または少なくとも 1 か月間、熱的に安定である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記疎水性コアが、油を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシシルグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナッツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミン E、カプリル酸／カプリン酸トリグリセリド、飽和ココナツ油／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステル、ジヒドロイソスクアレン (DHIS)、ファルネセン、ならびにスクアランの少なくとも 1 つを含む、請求項 10 に記載の組成物。

30

【請求項 12】

前記 1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 1 つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

40

【請求項 14】

前記 1 つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質である、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 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ウム)プロパン (DOTAP)；3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール (DCコレステロール)；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 (C16:0)トリメチルアンモニウムプロパン (DPTAP)；

50

ジステアロイルトリメチルアンモニウムブロパン (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 (DOEPC) ; 1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-ブロパン (DODAP) ; および 1, 2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-DMA) ; 1, 1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) (2-ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン-1-イル) エチル) アザンジイル) ビス(ドデカン-2-オール) (C12-200)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE) ; N-デシル-N, N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド (DDAB) ; 2, 3-ジオレイルオキシ-N- [2-(スベルミンカルボキサミド) エチル] -N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA) ; エチルホスファチジルコリン (ePC) ; およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 14 に記載の組成物。

10

【請求項 16】

前記脂質キャリアが、必要に応じて、少なくとも 1 つの界面活性剤を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記少なくとも 1 つの界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 16 に記載の組成物。

20

【請求項 18】

前記疎水性界面活性剤が、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、ソルビタントリスステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含み；前記親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記脂質キャリアが、約 0.1 ~ 約 0.4 の範囲の平均多分散指数で、約 40 nm ~ 約 150 nm の範囲の z 平均流体力学直径を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記 1 つまたは複数の核酸が、RNA である、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 21】

前記 RNA が、自己複製性 RNA である、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記 1 つまたは複数の核酸が、前記脂質キャリアに組み込まれるか、またはそれと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記脂質キャリアー核酸複合体が、非共有結合性相互作用を介して、または可逆的な共有結合性相互作用を介して形成される、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

窒素のホスフェートに対する (N : P) モル比によって特徴付けられる前記脂質キャリアの前記 1 つまたは複数の核酸に対するモル比が、約 1 : 1 ~ 約 150 : 1 の範囲である、請求項 1 に記載の組成物。

40

【請求項 25】

前記少なくとも 1 つの凍結保護物質が、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記少なくとも 1 つの凍結保護物質が、スクロースである、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

50

前記少なくとも1つの凍結保護物質が、約1% w/v ~ 約40% w/vである、請求項1に記載の組成物。

【請求項28】

前記少なくとも1つの凍結保護物質が、約10% w/v ~ 約20% w/vである、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

前記少なくとも1つの凍結保護物質が、約10% w/vである、請求項27に記載の組成物。

【請求項30】

好適な希釈剤中で再構成された請求項1~29のいずれか一項に記載の組成物および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。 10

【請求項31】

前記希釈剤が、水性である、請求項30に記載の医薬組成物。

【請求項32】

前記希釈剤が、水である、請求項30に記載の医薬組成物。

【請求項33】

請求項30に記載の医薬組成物、および対象への投与のための送達システムを含むキット。

【請求項34】

請求項30に記載の医薬組成物、および必要に応じて1つまたは複数のワクチンアジュバントを含むワクチン送達システム。 20

【請求項35】

対象における免疫応答を生じさせるための方法であって、治療有効量の請求項30に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項36】

対象における疾患を処置または防止する方法であって、治療有効量の請求項30に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項37】

対象における1つまたは複数の核酸の送達をイメージングおよび／または追跡する方法であって、治療有効量の請求項30に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。 30

【請求項38】

凍結乾燥組成物を調製するための方法であって、

(a) 脂質キャリアを得るステップであって、前記脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；

(b) 1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；

(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を前記脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；ならびに

(d) 前記製剤を凍結乾燥して、凍結乾燥組成物を形成するステップを含む、方法。 40

【請求項39】

噴霧乾燥組成物を調製するための方法であって、

(a) 脂質キャリアを得るステップであって、前記脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；

(b) 1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；

(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を前記脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤 50

を形成するステップ；ならびに

(d) 前記製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップを含む、方法。

【請求項 40】

凍結乾燥組成物を再構成するための方法であって、

(a) 脂質キャリアを得るステップであって、前記脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；

(b) 1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；

(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を前記脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；

(d) 前記製剤を凍結乾燥して、凍結乾燥組成物を形成するステップ；ならびに

(e) 好適な希釈剤中で前記凍結乾燥組成物を再構成するステップを含む、方法。

【請求項 41】

噴霧乾燥組成物を再構成するための方法であって、

(a) 脂質キャリアを得るステップであって、前記脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；

(b) 1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；

(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を前記脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；

(d) 前記製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップ；ならびに

(e) 好適な希釈剤中で前記噴霧乾燥組成物を再構成するステップを含む、方法。

【請求項 42】

前記希釈剤が、水性である、請求項 40 および 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記希釈剤が、水である、請求項 40 および 41 に記載の方法。

【請求項 44】

前記凍結乾燥組成物が、熱的に安定である、請求項 38 および 40 に記載の方法。

【請求項 45】

前記凍結乾燥組成物が、摂氏約 25 度で熱的に安定である、請求項 38 および 40 に記載の方法。

【請求項 46】

前記凍結乾燥組成物が、摂氏約 45 度で熱的に安定である、請求項 38 および 40 に記載の方法。

【請求項 47】

前記凍結乾燥組成物が、摂氏約 -20 度で熱的に安定である、請求項 38 および 40 に記載の方法。

【請求項 48】

前記凍結乾燥組成物が、摂氏約 2 度～摂氏約 8 度で熱的に安定である、請求項 38 および 40 に記載の方法。

【請求項 49】

前記凍結乾燥組成物が、少なくとも1週間、少なくとも2週間、および／または少なくとも1か月間、熱的に安定である、請求項 38 および 40 に記載の方法。

【請求項 50】

前記疎水性コアが、油を含む、請求項 38 ～ 41 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

前記油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナッツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミン E、カプリル酸／カプリン酸トリグリセリド、飽和ココナツ油／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステル、ジヒドロイソスクアレン (DHIS)、ファルネセン、ならびにスクアランの少なくとも 1 つを含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 3 8 ～ 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 5 3】

前記 1 つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 3 8 ～ 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記 1 つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質である、請求項 3 8 ～ 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 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ウム)プロパン (DOTAP)；3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール (DCコレステロール)；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 (DOEPC)；1, 2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン (DODAP)；および 1, 2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-DMA)；1, 1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)；N-デシル-N, N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド (DDAB)；2, 3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)；エチルホスファチジルコリン (ePC)；およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

20

30

【請求項 5 6】

前記脂質キャリアが、必要に応じて、1 つまたは複数の界面活性剤を含む、請求項 3 8 ～ 4 1 に記載の方法。

40

【請求項 5 7】

前記 1 つまたは複数の界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記疎水性界面活性剤が、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、ソルビタントリスステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含み；前記親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

50

前記脂質キャリアが、約 0.1～約 0.4 の範囲の平均多分散指数で、約 40 nm～約 150 nm の範囲の z 平均流体力学直径を有する、請求項 38～41 に記載の方法。

【請求項 60】

前記 1 つまたは複数の核酸が、RNA である、請求項 38～41 に記載の方法。

【請求項 61】

前記 RNA が、自己複製性 RNA である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記 1 つまたは複数の核酸が、前記脂質キャリアに組み込まれるか、またはそれと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成する、請求項 38～41 に記載の方法。

【請求項 63】

前記脂質キャリアー核酸複合体が、非共有結合性相互作用を介して、または可逆的な共有結合性相互作用を介して形成される、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記少なくとも 1 つの凍結保護物質が、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 38～41 に記載の方法。

【請求項 65】

前記少なくとも 1 つの凍結保護物質が、スクロースである、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記少なくとも 1 つの凍結保護物質が、約 1% w/v～約 20% w/v である、請求項 38～41 に記載の方法。

【請求項 67】

前記少なくとも 1 つの凍結保護物質が、約 10% w/v～約 20% w/v である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

前記少なくとも 1 つの凍結保護物質が、約 10% w/v である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 69】

ソルビタン脂肪酸エステル、エトキシ化ソルビタンエステル、カチオン性脂質、免疫刺激物質、および RNA を含む乾燥組成物。

【請求項 70】

前記ソルビタン脂肪酸エステルが、ソルビタンモノステアレートである、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 71】

前記エトキシ化ソルビタンエステルが、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレートである、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 72】

前記カチオン性脂質が、DOTAP である、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 73】

前記免疫刺激物質が、スクアレンである、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 74】

前記エステルの比が、8～11 の親水性－親油性バランスを生じさせる、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 75】

前記エステルおよび脂質の比が、30 nm～200 nm の粒子径を生じさせる、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 76】

前記エステルおよび脂質の比が、40 nm～70 nm の粒子径を生じさせる、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 77】

10

20

30

40

50

ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエート、DOTAP、免疫刺激物質、およびRNAを含む乾燥組成物。

【請求項78】

前記免疫刺激物質が、産生されるタンパク質の総量を減少させるが、ワクチンに対する免疫応答を増加させる、請求項69～77に記載の組成物。

【請求項79】

ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエート、DOTAP、およびスクアレンを含み、固体粒子を含まない、請求項77に記載の組成物。

【請求項80】

前記エステルの比が、8～11の親水性－親油性バランスを生じさせる、請求項77に記載の組成物。

【請求項81】

前記粒子径が、30nm～200nmである、請求項77に記載の組成物。

【請求項82】

N：Pの比が、5～35である、請求項77に記載の組成物。

【請求項83】

前記免疫刺激物質が、産生されるタンパク質の総量を増加させるが、ワクチンに対する免疫応答を減少させる、請求項69および77に記載の組成物。

【請求項84】

前記免疫刺激物質が、カプリル酸／カプリン酸トリグリセリド、または飽和ココナツ油／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステルである、請求項83に記載の組成物。

【請求項85】

乾燥組成物であって、

a) 脂質キャリアであって、前記脂質キャリアが、疎水性コア、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；

b) 必要に応じて1つまたは複数の核酸；ならびに

c) (i) 前記乾燥組成物の少なくとも約50重量%、または(ii) 少なくとも約50mgの量で存在する少なくとも1つの糖

を含む乾燥組成物。

【請求項86】

凍結乾燥されている、請求項85に記載の組成物。

【請求項87】

摂氏約25度で熱的に安定である、請求項85に記載の組成物。

【請求項88】

摂氏約45度で熱的に安定である、請求項85に記載の組成物。

【請求項89】

摂氏約－20度で熱的に安定である、請求項85に記載の組成物。

【請求項90】

摂氏約2度～摂氏約8度で熱的に安定である、請求項85に記載の組成物。

【請求項91】

少なくとも1週間、少なくとも2週間、および／または少なくとも1か月間、熱的に安定である、請求項85に記載の組成物。

【請求項92】

前記疎水性コアが、油を含む、請求項85に記載の組成物。

【請求項93】

前記油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシシルグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミンE、カ

10

20

30

40

50

ブリン酸／カブリン酸トリグリセリド、飽和ココナツ油／パーム核油由来カブリンおよびカブリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステル、ジヒドロイソスクアレン（DHIS）、ファルネセン、ならびにスクアランの少なくとも1つを含む、請求項92に記載の組成物。

【請求項94】

前記1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項85に記載の組成物。

【請求項95】

前記1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質を含む、請求項94に記載の組成物。

【請求項96】

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ウム)プロパン(DOTAP); 3β-[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール); 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); ジバルミトイル(C16:0)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); および1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-DMA); 1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE); N-デシル-N,N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド(DDAB); 2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート(DOSPA); エチルホスファチジルコリン(ePC); およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項94に記載の組成物。

【請求項97】

前記脂質キャリアが、少なくとも1つの界面活性剤を含む、請求項85に記載の組成物。

【請求項98】

前記少なくとも1つの界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項97に記載の組成物。

【請求項99】

前記疎水性界面活性剤が、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、ソルビタントリスステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含み; 前記親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、請求項98に記載の組成物。

【請求項100】

前記脂質キャリアが、約0.1~約0.4の範囲の平均多分散指数で、約40nm~約150nmの範囲のz平均流体力学直径を有する、請求項85に記載の組成物。

【請求項101】

前記1つまたは複数の核酸が、DNAである、請求項85に記載の組成物。

【請求項102】

前記1つまたは複数の核酸が、RNAである、請求項85に記載の組成物。

【請求項103】

前記RNAが、自己複製性RNAである、請求項102に記載の組成物。

【請求項104】

10

20

30

40

50

前記 1 つまたは複数の核酸が、前記脂質キャリアに組み込まれるか、またはそれと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成する、請求項 85 に記載の組成物。

【請求項 105】

前記脂質キャリアー核酸複合体が、非共有結合性相互作用を介して、または可逆的な共有結合性相互作用を介して形成される、請求項 104 に記載の組成物。

【請求項 106】

窒素のホスフェートに対する (N : P) モル比によって特徴付けられる前記脂質キャリアの前記 1 つまたは複数の核酸に対するモル比が、約 1 : 1 ~ 約 150 : 1 の範囲である、請求項 85 に記載の組成物。

【請求項 107】

前記少なくとも 1 つの糖が、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 85 ~ 106 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 108】

前記少なくとも 1 つの糖が、少なくとも約 50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300 mg、またはそれよりも多くの量で存在する、請求項 85 ~ 107 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 109】

前記少なくとも 1 つの糖が、50 mg ~ 250 mg の量で存在する、請求項 85 に記載の組成物。

【請求項 110】

前記少なくとも 1 つの糖が、少なくとも約 250 mg の量で存在する、請求項 85 に記載の組成物。

【請求項 111】

前記糖が、組成物の少なくとも 50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 重量%、またはそれよりも多くの量で存在する、請求項 85 ~ 107 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 112】

前記糖が、組成物の 80 ~ 98 重量%、必要に応じて 94 ~ 96 重量% の量で存在する、請求項 85 に記載の組成物。

【請求項 113】

前記糖が、組成物の約 95 重量% の量で存在する、請求項 85 に記載の組成物。

【請求項 114】

前記少なくとも 1 つの糖が、スクロースを含む、請求項 85 ~ 113 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 115】

前記疎水性コアが、1 つまたは複数の無機ナノ粒子を含む、請求項 85 ~ 113 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 116】

前記 1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 115 に記載の組成物。

【請求項 117】

前記 1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄、二酸化チタン、二酸化ケイ素 (SiO_2)、ヒドロキシリン酸アルミニウム ($Al(OH)_x(PO_4)_y$)、リン酸カルシウム ($Ca_3(PO_4)_2$)、カルシウムヒドロキシアパタイト ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)、グルコン酸鉄、または硫酸鉄を含む、請求項 115 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 118】

前記 1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、マグネタイト (Fe_3O_4)、マグヘマイト ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、ウスタイト (FeO)、もしくはヘマタイト (アルファ (α)- Fe_2O_3)、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 115 に記載の組成物。

【請求項 119】

最大で約 200 マイクログラム (μg) の量で存在する核酸；
最大で約 1.5 mg/ml の濃度で存在するカチオン性脂質；
最大で約 0.01 mg/ml の濃度で存在する酸化鉄；
最大で約 1.88 mg/ml の濃度で存在するスクアレン；
最大で約 1.86 mg/ml の濃度で存在するソルビタンモノステアレート；
最大で約 1.86 mg/ml の濃度で存在するポリソルベート 80；
最大で約 50 mg/ml の濃度で存在するスクロース；および
必要に応じて最大で約 2.1 mg/ml の濃度で存在するクエン酸一水和物を含む組成物。

10

【請求項 120】

前記核酸が、RNA または DNA である、請求項 119 に記載の組成物。

【請求項 121】

前記核酸が、RNA であり、最大で約 50 μg の量で存在する、請求項 119 に記載の組成物。

20

【請求項 122】

好適な希釈剤中で再構成された請求項 85 ~ 118 のいずれか一項に記載の組成物および薬学的に許容される担体、または請求項 119 ~ 121 のいずれか一項に記載の組成物を含む医薬組成物。

【請求項 123】

前記希釈剤が、水性である、請求項 122 に記載の医薬組成物。

【請求項 124】

前記希釈剤が、水である、請求項 123 に記載の医薬組成物。

【請求項 125】

請求項 122 に記載の医薬組成物、および対象への投与のための送達システムを含むキット。

30

【請求項 126】

対象における免疫応答を生じさせるための方法であって、治療有効量の請求項 123 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 127】

対象における疾患を処置または防止する方法であって、治療有効量の請求項 120 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 128】

対象における 1 つまたは複数の核酸の送達をイメージングおよび／または追跡する方法であって、治療有効量の請求項 122 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2021 年 9 月 22 日に提出された米国仮特許出願第 63 / 247, 172 号、および 2022 年 1 月 7 日に提出された米国仮特許出願第 63 / 297, 449 号に対する優先権の利益を主張し、それらのそれぞれの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

配列表

本出願は、ASCII フォーマットで電子的に提出され、その全体がこれにより参照に

50

より本明細書に組み込まれる、配列表を含む。2022年1月18日に作成された前記ASCIIコピーは、201953-712601__SL.txtという名称であり、3,396バイトのサイズである。

【背景技術】

【0002】

背景

ワクチンを含む各種の治療用および予防用製品が、疾患のために利用可能である。そのような製品に対する産業界における課題は、安定性である。そのような製品の多くは、安定性を維持するために、低温で維持されなければならない、高価な冷却ユニットまたは液体窒素を必要とする。そのため、治療用および予防用製品が最小限の冷却の必要性でまたは室温で安定である、溶液の製造、組成物、およびそれらの使用に対する必要性が存在する。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

簡潔な概要

乾燥組成物である組成物が本明細書に提供される。脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；1つまたは複数の核酸；ならびに少なくとも1つの凍結保護物質を含む、組成物が本明細書に提供される。

20

【0004】

好適な希釈剤中で再構成された乾燥組成物および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物が本明細書にさらに提供される。

【0005】

本明細書に提供される乾燥組成物を含む医薬組成物；および対象への投与のための送達システムを含む、キットが本明細書にさらに提供される。

【0006】

医薬組成物および必要に応じて1つまたは複数のワクチンアジュバントを含む、ワクチン送達システムが本明細書にさらに提供される。

【0007】

対象における免疫応答を生じさせるための方法であって、治療有効量の本明細書に提供される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

30

【0008】

対象における疾患を処置または防止する方法であって、治療有効量の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0009】

対象における1つまたは複数の核酸の送達をイメージングおよび／または追跡する方法であって、治療有効量の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

40

【0010】

凍結乾燥組成物を調製するための方法であって、(a)脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b)1つまたは複数の核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；(c)少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；ならびに(d)製剤を凍結乾燥して、凍結乾燥組成物を形成するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0011】

噴霧乾燥組成物を調製するための方法であって、(a)脂質キャリアを得るステップで

50

あって、脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 1つまたは複数の核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；ならびに(d) 製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0012】

凍結乾燥組成物を再構成するための方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；製剤を凍結乾燥して、凍結乾燥組成物を形成するステップ；ならびに(d) 好適な希釈剤中で凍結乾燥組成物を再構成するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

10

【0013】

噴霧乾燥組成物を再構成するための方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；(d) 製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップ；ならびに(e) 好適な希釈剤中で噴霧乾燥組成物を再構成するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

20

【0014】

ソルビタン脂肪酸エステル、エトキシ化ソルビタンエステル、カチオン性脂質、免疫刺激物質、およびRNAを含む乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。

【0015】

ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート、DOTAP、免疫刺激物質、およびRNAを含む乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。

30

【0016】

(a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；(b) 必要に応じて1つまたは複数の核酸；ならびに(c) (i) 乾燥組成物の少なくとも約50重量%、または(ii) 少なくとも約50mgの量で存在する少なくとも1つの糖を含む乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。

【0017】

好適な希釈剤中で再構成された本明細書に提供される乾燥組成物；および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物が本明細書にさらに提供される。

40

【0018】

本明細書に提供される医薬組成物および対象への投与のための送達システムを含む、キットが本明細書にさらに提供される。

【0019】

対象における免疫応答を生じさせるための方法であって、治療有効量の本明細書に提供される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0020】

対象における疾患を処置または防止する方法であって、治療有効量の本明細書に提供される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

50

【0021】

対象における1つまたは複数の核酸の送達をイメージングおよび／または追跡する方法であって、治療有効量の本明細書に記載される医薬組成物を投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1A～1Cは、ナノ粒子（NP）キャリアの概略図を示す。図1Aは、水中油型エマルジョンを示す。図1Bは、ナノ構造脂質キャリア（NLC）を示す。図1Cは、液状油中に無機ナノ粒子を有するナノ粒子を示す。

【0023】

【図2】図2は、凍結乾燥サイクル#1後の時間＝0時間での示された糖組成におけるナノ構造脂質キャリア（NLC）および脂質キャリア製剤についてのケーキの外観を図示する。

【0024】

【図3】図3は、凍結乾燥サイクル#1後の摂氏25度および摂氏42度で24時間後の示された糖組成におけるナノ構造脂質キャリア（NLC）および脂質キャリア製剤についてのケーキの外観を図示する。

【0025】

【図4】図4は、凍結乾燥サイクル#1後の摂氏25度および摂氏42度で24時間での示された糖組成におけるナノ構造脂質キャリア（NLC）および脂質キャリア製剤の外観を図示する。

【0026】

【図5A】図5A～5Bは、凍結乾燥サイクル#1後の示された糖組成における摂氏25度および摂氏42度で貯蔵後1日後の再構成ケーキの粒子径を図示する。図5Aは、示された糖組成における時間＝0時間での液体製剤と比した倍数変化を示す。図5Bは、示された糖組成におけるPDIの時間＝0時間での液体製剤と比した点変化を示す。

【図5B】同上。

【0027】

【図6】図6A～6Bは、脂質キャリア＋RNAおよびNLC＋RNA製剤について、凍結乾燥サイクル#1後の示された糖組成におけるアガロースゲル電気泳動によるRNA完全性を図示する。図6Aは、脂質キャリア＋RNA製剤について、凍結乾燥サイクル#1後の示された糖組成におけるアガロースゲル電気泳動によるRNA完全性を示す。図6Bは、脂質キャリア＋RNAおよびNLC＋RNA製剤について、凍結乾燥サイクル#1後の示された糖組成におけるアガロースゲル電気泳動によるRNA完全性を示す。

【0028】

【図7-1】図7A～7Gは、脂質キャリア＋repRNAおよびNLC＋repRNA－SEAP製剤について、凍結乾燥サイクル#1後の示された糖組成におけるBHK21細胞のSEAP発現を図示する。図7Aは、10%のトレハロースにおける脂質キャリア＋repRNA－SEAPについての相対発光単位（RLU）を示す。図7Bは、5%のマンニトールにおける脂質キャリア＋repRNA－SEAPについての相対発光単位（RLU）を示す。図7Cは、10%のスクロースにおける脂質キャリア＋repRNA－SEAPについての相対発光単位（RLU）を示す。図7Dは、20%のスクロースにおける脂質キャリア＋repRNA－SEAPについての相対発光単位（RLU）を示す。図7Eは、5%のグルコースにおける脂質キャリア＋repRNA－SEAPについての相対発光単位（RLU）を示す。図7Fは、10%のマルトースにおける脂質キャリア＋repRNA－SEAPについての相対発光単位（RLU）を示す。図7Gは、10%のスクロースにおけるNLC＋repRNA－SEAPについての相対発光単位（RLU）を示す。

【図7-2】同上。

【図7-3】同上。

【図 7-4】 同上。

【0029】

【図 8】 図 8 は、凍結乾燥サイクル # 1 後の示された糖組成におけるさまざまな時点（時間 = 0 時間、摂氏 25 度で 6 日後および摂氏 25 度で 1 か月後）での脂質キャリア + RNA-SEAP ケーキの外観を図示する。

【0030】

【図 9】 図 9 は、凍結乾燥サイクル # 1 後の示された糖組成におけるさまざまな時点（時間 = 0 時間、摂氏 42 度で 24 時間後、摂氏 42 度で 3 日後および摂氏 42 度で 1 か月後）での脂質キャリア + RNA-SEAP ケーキの外観を図示する。

【0031】

【図 10】 図 10 A ~ 10 B は、凍結乾燥サイクル # 3 後の示された糖組成における貯蔵 1 日後の再構成ケーキの粒子径を図示する。図 10 A は、示された糖組成における再構成製剤の PDI の点変化を示す。図 10 B は、脂質キャリア + RNA の新鮮な複合体と比べた粒子径の log₁₀ 倍数変化を示す。

【0032】

【図 11】 図 11 は、凍結乾燥サイクル # 3 後の示された糖組成におけるアガロースゲル電気泳動による RNA 完全性を図示する。

【0033】

【図 12】 図 12 は、凍結乾燥サイクル # 3 後の示された糖組成における BHK 21 細胞の SEAP 発現を図示する。

【0034】

【図 13 A】 図 13 A ~ 13 B は、miglyol-脂質キャリア製剤が、マクロファージにおいて増強された repRNA タンパク質産生を誘導することを示す。図 13 A は、第 1 の実験における Nano Luciferase コードレプリコン RNA を有するさまざまな製剤の吸収スペクトルを示す。図 13 B は、第 2 の実験における Nano Luciferase コードレプリコン RNA を有するさまざまな製剤の吸収スペクトルを示す。

【図 13 B】 同上。

【0035】

【図 14 A】 図 14 A ~ 14 B は、miglyol 製剤によるマクロファージの TNF- α 産生の低減を示す。図 14 A は、第 1 の実験におけるさまざまな製剤についての TNF- α の産生を示す。図 14 B は、第 2 の実験におけるさまざまな製剤についての TNF- α の産生を示す。

【図 14 B】 同上。

【0036】

【図 15】 図 15 A ~ 15 B は、miglyol 製剤によるマクロファージのタンパク質産生の増強と低 TNF- α 産生との間の相関を示す。図 15 A は、第 1 の実験におけるさまざまな製剤についての sec-NanoLuc と TNF- α との間の相関を示す。図 15 B は、第 2 の実験におけるさまざまな製剤についての sec-NanoLuc と TNF- α との間の相関を示す。

【0037】

【図 16-1】 図 16 A ~ 16 F は、種々の反復の脂質キャリア-製剤化 DNA SEAP が筋肉内注射された BALB/c マウスにおける SEAP レベルを図示する。図 16 A は、4 日目の相対発光単位 (RLU) を示す。図 16 B は、6 日目の相対発光単位 (RLU) を示す。図 16 C は、8 日目の相対発光単位 (RLU) を示す。図 16 D は、4 日目の相対発光単位 (RLU) のコピーである。図 16 E は、6 日目の相対発光単位 (RLU) のコピーである。図 16 F は、8 日目の相対発光単位 (RLU) のコピーである。

【図 16-2】 同上。

【図 16-3】 同上。

【0038】

10

20

30

40

50

【図 17】図 17 は、条件 1～14 についての、Y 軸に Z 平均測定および多分散指数（PDI）の測定値、ならびに X 軸に群番号を有する棒グラフである。

【0039】

【図 18】図 18 A～18 B は、条件 1～14 についての抗 D614G の IgG レベルを示すドットチャートを示す。図 18 A は、条件 1～14 についての、Y 軸に IgG（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、および X 軸に群番号を有するドットチャートを示す。測定値を、抗 D614G（1：40 希釈）の IgG 応答について、14 日目に記録した。図 18 B は、条件 1～14 についての、Y 軸に IgG（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、および X 軸に群番号を有するドットチャートを示す。測定値を、抗 D614G（1：200 希釈）の IgG 応答について、28 日目に記録した。

10

【0040】

【図 19】図 19 は、Y 軸に抗 D614G（1：200 希釈）の IgG（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）測定値、および X 軸に貯蔵条件の指示を有する、28 日目のドットチャートを示す。

【発明を実施するための形態】

【0041】

詳細な説明

ここに、さまざまな態様を、本明細書の以下でより完全に記載する。そのような態様は、しかしながら、多くの異なる形態で具現化され得、本明細書に示される実施形態に限定されずとして解釈されるべきではなく、むしろ、これらの実施形態は、本開示が徹底的および完全なものであり、その範囲を当業者に完全に伝えるように、提供される。

20

【0042】

増強された安全性プロファイルを有する治療的に関連する組成物の作製のための方法が本明細書に提供される。一部の実施形態では、組成物は、必要に応じて核酸と複合体化された、脂質ナノ粒子キャリアを含む。さらなる実施形態では、組成物は、凍結乾燥されている。

定義

【0043】

すべての定義は、本明細書で定義および使用される場合、辞書による定義、参照により組み込まれた文献における定義、および／または定義された用語の通常の意味を制御するものと理解されるべきである。

30

【0044】

本明細書に開示されるすべての参考文献、特許および特許出願は、それぞれが引用される主題に関して参照によって組み込まれ、一部の事例では、文献の全体を包含することがある。特許文献および非特許文献を含む本明細書に開示されるすべての参考文献は、それぞれが個々に組み込まれたかのように、それらの全体が、これにより参照により本明細書に組み込まれる。しかしながら、明白な定義を含有する特許、特許出願、または刊行物が参照により組み込まれる場合、これらの明白な定義は、それらが見出される組み込まれた特許、特許出願、または刊行物に適用され、本出願の本文、特に、本出願の特許請求の範囲に必ずしも適用されず、その場合には、本明細書に提供される定義が優先されることを意味するものとする理解されるべきである。

40

【0045】

不定冠詞の「a」および「an」は、明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、対照的に明確に指示されない限り、「少なくとも 1 つ」を意味すると理解されるべきである。

【0046】

「および／または」という語句は、明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、そのように結合された要素、すなわち、一部の事例において結合的に存在し、他の事例において分離的に存在する要素の「いずれかまたは両方」を意味すると理解されるべきである。「および／または」を用いて列挙された複数の要素は、同じ方式で、すなわち、そのように結合された要素の「1 つまたは複数」と解釈されるべきである。他

50

の要素は、具体的に特定された要素に関連するまたは関連しないかどうかにかかわらず、「および／または」節によって具体的に特定される要素以外に、必要に応じて存在していてもよい。そのため、非限定的な例として、「Aおよび／またはB」への言及は、「含む (comprising)」などのオープンエンドの語と組み合わせて使用される場合、一実施形態では、Aのみ（必要に応じて、B以外の要素を含む）、別の実施形態では、Bのみ（必要に応じて、A以外の要素を含む）、さらに別の実施形態では、AおよびBの両方（必要に応じて、他の要素を含む）などを指すことができる。

【0047】

明細書および特許請求の範囲において本明細書で使用される場合、「または」は、上記で定義された「および／または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、リスト中の項目を分ける場合、「または」または「および／または」は、包括的である、すなわち、要素の数またはリストの少なくとも1つを含むが、2つ以上も含み、必要に応じて、追加の列挙されていない項目を含むとして解釈されるべきである。「の1つのみ」もしくは「の正確に1つ」、または特許請求の範囲で使用される場合に「からなる」などの、明確に逆のことが示されている用語のみが、要素の数またはリストの正確に1つの要素を含むことを指す。一般に、「または」という用語は、本明細書で使用される場合、「いずれか」、「の1つ」、「のただ1つ」、または「の正確に1つ」などの排他的な用語が先行する場合に、排他的代替（すなわち、「どちらか一方であるが、両方ではない」）を示すとして単に解釈されるものとする。「から本質的になる」は、特許請求の範囲で使用される場合、特許法の分野で使用されるその通常の意味を有するものとする。

【0048】

本開示の組成物は、開示される構成要素を含み得るか、それから本質的になり得るか、またはそれからなり得る。

【0049】

本明細書で使用される場合、「必要に応じた」または「必要に応じて」は、その後に記載される状況が生じてもよく、または生じなくてもよいことを意味し、その結果、その記載は、状況が生じる例および状況が生じない例を含む。

【0050】

本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」という用語は、所与の値の最大で±20%の範囲を意味する。特定の値が本出願および特許請求の範囲に記載される場合、他に述べられない限り、「約」という用語は、黙示的であり、この文脈では、特定の値についての許容される誤差範囲内を意味する。

【0051】

本明細書で使用される場合、「N/Pの比（またはN:P）」という用語は、正に荷電したポリマーアミン（N＝窒素）基の負に帯電した核酸ホスフェート（P）基に対する比を指す。ポリマー／核酸複合体のN/Pの特徴は、その正味の表面電荷、サイズ、および安定性などの多くの他の性質に影響を及ぼし得る。

【0052】

本明細書で使用される場合、「改変ヌクレオチド」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））中のまたはその上の1つまたは複数の化学改変（例えば、置換）を含有するヌクレオチドを指す。

【0053】

値の範囲が本明細書に提供される場合、文脈が明確に他を指示しない限り、その範囲の上限および下限と、その述べられた範囲内の任意の他の述べられた値または介在する値との間のそれぞれの介在する値が、下限の単位の10分の1まで、本開示内に包含されることが理解される。述べられた範囲内の任意の具体的に除外される限定に従って、より小さい範囲に独立して含まれ得るこれらのより小さい範囲の上限および下限も、本開示内に包含される。述べられた範囲が、限定の一方または両方を含む場合、これらの含まれる限定のいずれかまたは両方を除外する範囲も本開示に含まれる。例えば、本明細書に提供され

る任意の濃度の範囲、パーセンテージの範囲、比の範囲、または整数の範囲は、他に指示されない限り、列挙された範囲内の任意の整数の値、および適切な場合、その分数（整数の10分の1および100分の1など）を含むことが理解されるべきである。また、ポリマーサブユニット、サイズまたは厚さなどの任意の物理的特色に関連する本明細書に列挙される任意の数の範囲は、他に指示されない限り、列挙された範囲内の任意の整数を含むことが理解されるべきである。

ナノ粒子キャリアシステム

【0054】

1つのナノ粒子および多数のナノ粒子を含むさまざまな組成物が本明細書に提供される。ナノ粒子はまた、本明細書においてキャリアと称されるか、またはNPと略される。本明細書に提供されるナノ粒子は、約1マイクロメートル（ μm ）未満の直径である、有機材料、無機材料、または無機材料および有機材料の組合せであり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、本明細書に提供される生物活性剤のための送達システムとして使用される。

10

【0055】

一部の実施形態では、脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；1つまたは複数の核酸；ならびに少なくとも1つの凍結保護物質を含む乾燥組成物が提供される。組成物は、当技術分野において公知の技法を使用して、噴霧乾燥または凍結乾燥することができる。組成物は、熱的に安定である。例えば、組成物は、摂氏約25度、摂氏約45度、摂氏約-20度、および摂氏約2度～摂氏約8度で熱的に安定である。組成物は、少なくとも1週間、少なくとも2週間、および／または少なくとも1か月間、熱的に安定である。

20

【0056】

本明細書に記載される組成物を凍結乾燥するための方法が本明細書に提供される。一部の実施形態では、昇華、または一次乾燥は、この点で行われて、未結合水が除去され；次いで、二次乾燥が行われて、結合水が昇華し、材料は、所望の残留水分レベルに低下する。この段階での水が、未結合ではなく標的に結合していることを考慮すると、典型的には、より多くのエネルギーが、このプロセスを駆動するために必要である。噴霧乾燥が使用されてもよく、これは、多くの場合に、より速いプロセスであり、単一ステップで液体製剤の乾燥粉末への変換を含む。溶液は、微細液滴に霧化され、これは、暖かいガスを使用して、大きなチャンバー中で、迅速に、間を置かずに乾燥される。次いで、得られた乾燥粒子は、サイクロンで収集され得る。追加の乾燥技法としては、例えば、噴霧凍結乾燥および超臨界流体乾燥が挙げられる。

30

【0057】

本開示は、RNAなどの1つまたは複数の核酸のキャリアとしての脂質キャリアの使用を提供する。特に、緩衝液中の荷電したコーティングを有する脂質マトリックス中の固体無機コアが開示される。これらのナノ粒子の使用は、多数の利点を有する：RNAは、粒子と無関係に複合体化され得、粒子は、磁気シグナルを有するように設計され得る、例えば、MRIまたは他のイメージング技法のために使用可能であり得る。RNAは、粒子によって保護され、それらは、細胞または生体に与えられた場合に、の抗原オフを含む多数の種類のタンパク質の、保護されたRNAからの発現を駆動する。

40

【0058】

さまざまなナノ粒子およびナノ粒子の製剤（すなわち、ナノエマルジョン）が用いられる。例示的なナノ粒子を図1A～1Cに図示する。本明細書に提供されるナノ粒子としては、限定されるものではないが、水中油型エマルジョン、ナノ構造脂質キャリア（NL C）、カチオン性ナノエマルジョン（CNE）、小胞状リン脂質ゲル（VPG）、ポリマーナノ粒子、カチオン性脂質ナノ粒子、リポソーム、金ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子（LN PまたはSLN）、混合相コアNL C、イオン化脂質キャリア、磁気キャリア、ポリエチレングリコール（PEG）官能化キャリア、コレステロール官能化キャリア、ポリ乳酸（

50

P L A) 官能化キャリア、およびポリ乳酸-ε-グリコール酸 (P L G A) 官能化脂質キャリアが挙げられ得る。

【0059】

図1Aに図示される水中油型エマルジョン（縮尺通りではない）は、水または水相に分散した油滴を含有する安定な不混和流体である。図1B（縮尺通りではない）は、固体有機脂質（例えば、トリミリスチン）および液状油（例えば、スクアレン）のブレンドを含み得るナノ構造脂質キャリア（N L C）を図示する。N L C中で、固体脂質は、液状油に分散される。ナノ液滴全体が、水性（水）相に分散される。一部の実施形態では、ナノ粒子は、図1C（縮尺通りではない）に図示されるように、液状油に分散した固体無機ナノ粒子（例えば、酸化鉄ナノ粒子）として、無機ナノ粒子を含む。次いで、ナノ液滴全体が、水性（水）相中のコロイドとして分散される。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、水溶液に分散される。水溶液の非限定的な例としては、水（例えば、滅菌、蒸留、脱イオン化、超純粋、RNAseを含まないなど）、生理食塩水（例えば、クレプス、Ascaris、デント、テト食塩水）、または1%（w/v）の水中のジメチルスルホキシド（DMSO）が挙げられる。

10

【0060】

脂質キャリアを含むさまざまな組成物および方法が本明細書に提供される。脂質キャリアは、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである。脂質キャリアの疎水性コアは、油を含む。一部の実施形態では、油は、液相中にある。

20

【0061】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、親水性表面を含む。一部の実施形態では、親水性表面は、カチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、親水性表面は、イオン化脂質を含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、膜を含む。一部の実施形態では、膜は、カチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、カチオン性脂質を含む。親水性表面への包含のための例示的なカチオン性脂質としては、限定されないが、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)、3β-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール)、ジメチルジオクタデシルアンモニウム(DDA); 1,2-ジミリスチル3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTAP)、ジパルミトイル(C16:0)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(DOEPIC)、1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DODAP)、および1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLindMA)、1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、3060i10、テトラキス(8-メチルノニル)3,3',3'',3'''-(4-(メチルアザンジイル)ビス(プロパン-3,1-ジイル))ビス(アザントリイル))テトラプロピオネート、9A1P9、デシル(2-(ジオクチルアンモニオ)エチル)ホスフェート; A2-ISO5-2DC18、エチル5,5-ジ((Z)-ヘプタデカ-8-エン-1-イル)-1-(3-(ピロリジン-1-イル)プロピル)-2,5-ジヒドロ-1H-イミダゾール-2-カルボキシレート; ALLC-0315、((4-ヒドロキシブチル)アザンジイル)ビス(ヘキサン-6,1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカノエート); ALLC-0159、2-[(ポリエチレングリコール)-2000]-N,N-ジテトラデシルアセトアミド; β-シトステロール、(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5-エチル-6-メチルヘプタン-2-イル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7

30

40

50

30

40

50

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、液体有機材料および固体無機材料を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、無機粒子を含む。一部の実施形態では、無機粒子は、固体無機粒子である。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、疎水性コア内の無機粒子を含む。一部の実施形態では、油は、

固相中にある。一部の実施形態では、油は、ソラネソールを含む。

【0064】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、金属を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、疎水性コア内の金属を含む。金属は、限定されないが、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、または金属リン酸塩であり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄 (Fe_3O_4 、 Fe_2O_3 、 FeO 、またはそれらの組合せ)、二酸化チタン、二酸化ケイ素 (SiO_2)、ヒドロキシリン酸アルミニウム ($Al(OH)_x(PO_4)_y$)、リン酸カルシウム ($Ca_3(PO_4)_2$)、カルシウムヒドロキシアパタイト ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)、グルコン酸鉄、または硫酸鉄を含む。無機粒子は、1つまたは複数の同じまたは異なる金属 (遷移金属を含む任意の金属) から形成されてもよい。一部の実施形態では、無機粒子は、遷移金属酸化物である。一部の実施形態では、遷移金属は、マグネタイト (Fe_3O_4)、マグヘマイト ($\gamma-Fe_2O_3$)、ウスタイト (FeO)、またはヘマタイト (アルファ (α)- Fe_2O_3) である。一部の実施形態では、金属は、水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムであり、ホスフェート末端脂質または界面活性剤、例えば、オレイン酸、オレイルアミン、SDS、TOPOまたはDSPAは、液状油と混合されて、疎水性コアが形成される前に、無機固体ナノ粒子をコーティングするために使用される。

10

【0065】

一部の実施形態では、金属は、常磁性、超常磁性、フェリ磁性または強磁性化合物を含むことができる。一部の実施形態では、金属は、超常磁性酸化鉄 (Fe_3O_4) である。

20

【0066】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、カチオン性脂質、油、および無機粒子を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、DOTAP；スクアレノおよび／またはグリセリルトリミリステート-dynasan；および酸化鉄を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、界面活性剤をさらに含む。そのため、一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、カチオン性脂質、油、無機粒子、および界面活性剤を含む。

【0067】

界面活性剤は、本明細書に提供されるナノ粒子の、2つの液体間、または液体および固体構成要素間の表面張力を低下させる化合物である。界面活性剤は、疎水性、親水性、または両親媒性であり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、疎水性界面活性剤を含む。用いられ得る例示的な疎水性界面活性剤としては、限定されるものではないが、ソルビタンモノラウレート (SPAN (登録商標) 20)、ソルビタンモノパルミテート (SPAN (登録商標) 40)、ソルビタンモノステアレート (SPAN (登録商標) 60)、ソルビタントリスステアレート (SPAN (登録商標) 65)、ソルビタンモノオレエート (SPAN (登録商標) 80)、およびソルビタントリオレエート (SPAN (登録商標) 85) が挙げられる。好適な疎水性界面活性剤は、10もしくはそれ未満、例えば、5もしくはそれ未満、1～5、または4～5の親水性-親油性バランス (HLB) 値を有するものを含む。例えば、疎水性界面活性剤は、1～5、または4～5のHLB値を有するソルビタンエステルであり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、乳化剤とも呼ばれる親水性界面活性剤を含む。

30

40

【0068】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、ポリソルベートを含む。ポリソルベートは、脂肪酸でエステル化されたエトキシ化ソルビタン (ソルビトールの誘導体) に由来する油性液体である。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子または脂質キャリアは、親水性界面活性剤を含む。用いられ得る例示的な親水性界面活性剤としては、限定されるものではないが、ポリソルベート、例えば、TWEEN (登録商標)、Kolliphor、Scattics、Alkest、またはCanarccl；ポリオキシエチレンソルビタンエステル (ポリソルベート)；ポリソルベート80 (ポリオ

50

キシエチレンソルビタンモノオレエート、またはTWEEN（登録商標）80）；ポリソルベート60（ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、またはTWEEN（登録商標）60）；ポリソルベート40（ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、またはTWEEN（登録商標）40）；およびポリソルベート20（ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、またはTWEEN（登録商標）20）が挙げられる。一実施形態では、親水性界面活性剤は、ポリソルベート80である。

【0069】

本明細書に提供されるナノ粒子は、脂質膜（例えば、DOTAPなどのカチオン性脂質）によって囲まれた疎水性コアを含む。一部の実施形態では、疎水性コアは、1つまたは複数の無機粒子；ホスフェート末端脂質；および界面活性剤を含む。

10

【0070】

本明細書に記載される無機固体ナノ粒子は、液状油と混合する前に、表面改変されていてもよい。例えば、無機固体ナノ粒子の表面が親水性である場合、無機固体ナノ粒子を、疎水性分子（または界面活性剤）でコーティングして、ナノエマルジョン粒子の「油」相中の液状油との無機固体ナノ粒子の混和性を促進し得る。一部の実施形態では、無機粒子は、キャッピングリガンド、ホスフェート末端脂質、および／または界面活性剤でコーティングされる。一部の実施形態では、疎水性コアは、ホスフェート末端脂質を含む。用いられ得る例示的なホスフェート末端脂質としては、限定されるものではないが、トリオクチルホスフィンオキシド（TOPO）またはジステアリルホスファチジン酸（DSPA）が挙げられる。一部の実施形態では、疎水性コアは、リン末端界面活性剤、カルボキシレート末端界面活性剤、サルフェート末端界面活性剤、またはアミン末端界面活性剤である界面活性剤を含む。典型的なカルボキシレート末端界面活性剤としては、オレイン酸が挙げられる。典型的なアミン末端界面活性剤としては、オレイルアミンが挙げられる。一部の実施形態では、界面活性剤は、ジステアリルホスファチジン酸（DSPA）、オレイン酸、オレイルアミンまたはドデシル硫酸ナトリウム（SDS）である。一部の実施形態では、無機固体ナノ粒子は、金属酸化物、例えば、酸化鉄であり、液状油と混合して、疎水性コアが形成される前に、界面活性剤、例えばオレイン酸、オレイルアミン、SDS、DSPA、またはTOPOを使用して、無機固体ナノ粒子がコーティングされる。

20

【0071】

一部の実施形態では、疎水性コアは、必要に応じてホスフェート末端脂質、リン末端界面活性剤、カルボキシレート末端界面活性剤、サルフェート末端界面活性剤、またはアミン末端界面活性剤でコーティングされた、少なくとも1つの金属水酸化物またはオキシ水酸化物粒子を含有する1つまたは複数の無機粒子；ならびに天然に存在するまたは合成のスクアレンを含有する液状油；DOTAPを含むカチオン性脂質；ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含む疎水性界面活性剤；ならびにポリソルベートを含む親水性界面活性剤を含む。

30

【0072】

一部の実施形態では、疎水性コアは、必要に応じてTOPOでコーティングされた、水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムナノ粒子を含有する1つまたは複数の無機ナノ粒子、ならびに天然に存在するまたは合成のスクアレンを含有する液状油；カチオン性脂質DOTAP；ソルビタンモノステアレートを含む疎水性界面活性剤；およびポリソルベート80を含む親水性界面活性剤を含む。

40

【0073】

一部の実施形態では、疎水性コアは、必要に応じてホスフェート末端脂質、リン末端界面活性剤、カルボキシレート末端界面活性剤、サルフェート末端界面活性剤、またはアミン末端界面活性剤でコーティングされた、少なくとも1つの金属水酸化物またはオキシ水酸化物粒子を含有する1つまたは複数の無機粒子；ならびに天然に存在するまたは合成のスクアレンを含有する液状油；DOTAPを含むカチオン性脂質；ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選

50

択されるソルビタンエステルを含む疎水性界面活性剤；ならびにポリソルベートを含む親水性界面活性剤からなる。一部の実施形態では、疎水性コアは、必要に応じてＴＯＰＯでコーティングされた、水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムナノ粒子を含有する１つまたは複数の無機ナノ粒子、ならびに天然に存在するまたは合成のスクアレンを含有する液状油；カチオン性脂質ＤＯＴＡＰ；ソルビタンモノステアレートを含む疎水性界面活性剤；およびポリソルベート８０を含む親水性界面活性剤からなる。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約０．２％～約４０％ｗ／ｖのスクアレン、約０．００１％～約１０％ｗ／ｖの酸化鉄ナノ粒子、約０．２％～約１０％ｗ／ｖのＤＯＴＡＰ、約０．２５％～約５％ｗ／ｖのソルビタンモノステアレート、および約０．５％～約１０％ｗ／ｖのポリソルベート８０を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約２％～約６％ｗ／ｖのスクアレン、約０．０１％～約１％ｗ／ｖの酸化鉄ナノ粒子、約０．２％～約１％ｗ／ｖのＤＯＴＡＰ、約０．２５％～約１％ｗ／ｖのソルビタンモノステアレート、および約０．５％～約５％ｗ／ｖのポリソルベート８０を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約０．２％～約４０％ｗ／ｖのスクアレン、約０．００１％～約１０％ｗ／ｖの水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムナノ粒子、約０．２％～約１０％ｗ／ｖのＤＯＴＡＰ、約０．２５％～約５％ｗ／ｖのソルビタンモノステアレート、および約０．５％～約１０％ｗ／ｖのポリソルベート８０を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約２％～約６％ｗ／ｖのスクアレン、約０．０１％～約１％ｗ／ｖの水酸化アルミニウムまたはオキシ水酸化アルミニウムナノ粒子、約０．２％～約１％ｗ／ｖのＤＯＴＡＰ、約０．２５％～約１％ｗ／ｖのソルビタンモノステアレート、および約０．５％～約５％ｗ／ｖのポリソルベート８０を含み得る。

10

20

30

40

50

【００７４】

一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、表１に記載される少なくとも１つのナノ粒子製剤を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、ＮＰ－１～ＮＰ－３０のいずれか１つを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、ＮＰ－１～ＮＰ－３１のいずれか１つを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、本明細書に提供される核酸と混合される。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、ホモジナイゼーションおよび超音波処理技法によって作製される。

【表 1 - 1】

表 1. ナノ粒子製剤。

名称	カチオン性脂質 %(w/v)または mg/ml	油 %(w/v)または mg/ml	界面活性剤 %(w/v) または mg/ml	追加成分 %(w/v)、mg/ml、ま たは mM
NP-1 [Fe-LC] (LC=脂質 キャリア)	30mg/mlの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)クロリド	37.5mg/ml のスクアレ ン	37mg/ml のソルビタ ンモノステアレート、 (2R)-2-[(2R,3R,4S)- 3,4-ジヒドロキシオキ ソラン-2-イル]-2-ヒド ロキシエチルオクタデ セノエート、 C ₂₄ H ₄₆ O ₆ (SPAN(登 録商標)60) 37mg/ml のポリオキ シエチレン(20)ソルビ タンモノオレエート、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ 、ポリソル ベート 80(TWEEN(登録商 標)80)	0.2mg Fe/ml の 12nm のオレイン酸コー ティング酸化鉄ナ ノ粒子 10mM のクエン酸ナ トリウム二水和物。
NP-2 [高 Fe- LC]	30mg/mlの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)クロリド	37.5mg/ml のスクアレ ン	37mg/ml のソルビタ ンモノステアレート、 (2R)-2-[(2R,3R,4S)- 3,4-ジヒドロキシオキ ソラン-2-イル]-2-ヒド ロキシエチルオクタデ セノエート C ₂₄ H ₄₆ O ₆ (SPAN(登 録 商 標)60) 37mg/ml のポリオキ シエチレン(20)ソルビ タンモノオレエート、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ 、ポリソル ベート 80(TWEEN(登録商 標)80)	1mg Fe/ml の 15nm のオレイン酸コーティ ング酸化鉄ナノ粒 子 10mM のクエン酸ナ トリウム二水和物
NP-3 [Fe-LC- Miglyol]	30mg/mlの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)クロリド	37.5mg/ml の Miglyol 812 N (飽和ココナツ油/パ ーム核油由来のカプリル 酸およびカプリン酸脂 肪酸、ならびに植物由 来グリセロールのトリグ リセリドエステル)	37mg/ml のソルビタ ンモノステアレート、 (2R)-2-[(2R,3R,4S)- 3,4-ジヒドロキシオキ ソラン-2-イル]-2-ヒド ロキシエチルオクタデ セノエート C ₂₄ H ₄₆ O ₆ (SPAN(登 録 商 標)60) 37mg/ml のポリオキ シエチレン(20)ソルビ タンモノオレエート、	0.2mg Fe/ml の 15nm のオレイン酸コー ティング酸化鉄ナ ノ粒子 10mM のクエン酸ナ トリウム二水和物

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

名称	カチオン性脂質 %(w/v)または mg/ml	油 %(w/v)または mg/ml	界面活性剤 %(w/v) または mg/ml	追加成分 %(w/v)、mg/ml、ま たは mM
			C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ ポリソ ルベ ー ト 80(TWEEN(登録商 標)80)	
NP-4 [高 Fe- LC- Miglyol]	30mg/mlの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)クロリド	37.5mg/ml の Miglyol 812 N (飽和ココナツ油/パー ム核油由来のカプリル 酸およびカプリン酸脂 肪酸、ならびに植物由 来グリセロールのトリグ リセリドエステル)	37mg/ml のソルビタ ンモノステアレート、 (2R)-2-[(2R,3R,4S)- 3,4-ジヒドロキシオキ ソラン-2-イル]-2-ヒド ロキシエチルオクタデ セ ノ エ ー ト 、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ 、ポリソ ルベ ー ト 80(TWEEN(登録商 標)80) 37mg/ml のポリオキ シエチレン(20)ソルビ タンモノオレエート、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ 、ポリソ ルベ ー ト 80(TWEEN(登録商 標)80)	1mg Fe/ml の 15nm のオレイン酸コーティ ング酸化鉄ナノ粒子 10mM のクエン酸ナ トリウム二水和物。
NP-5 [ミョウバン- LC]	30mg/ml の DOTAP クロリド	37.5mg/ml のスクアレ ン	37mg/ml のソルビタ ンモノステアレート (SPAN(登 録 商 標)60) 37mg/ml のポリソ ルベ ー ト 80(TWEEN(登録商 標)80)	1mg/ml のトリオクチ ルホスフィンオキシド (TOPO)コーティング 水酸化アルミニウム (Alhydrogel(登 録 商標)2%)粒子 10mM のクエン酸ナ トリウム二水和物
NP-6 [Fe-LC- ソ ラネソール]	30mg/ml の DOTAP クロリド	37.5mg/ml のソラネソ ー ル (Cayman chemicals)	37mg/ml のソルビタ ンモノステアレート (SPAN(登 録 商 標)60) 37mg/ml のポリソ ルベ ー ト 80(TWEEN(登録商 標)80)	0.2mg Fe/ml のオレ イン酸コーティング酸 化鉄ナノ粒子 10mM のクエン酸ナ トリウム
NP-7 [NLC]	30mg/ml の DOTAP クロリド	37.5mg/ml のスクアレ ン 2.4mg/ml の Dynasan 114	37mg/ml のソルビタ ンモノステアレート (SPAN(登 録 商 標)60) 37mg/ml のポリソ ルベ ー ト 80(TWEEN(登録商 標)80)	10mM のクエン酸ナ トリウム
NP-8	4mg/ml の DOTAP ク ロリド	43mg/ml のスクアレ ン	5mg/ml のソルビタン トリ オ レ エ ー ト	10mM のクエン酸ナ トリウム

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

名称	カチオン性脂質 %(w/v)または mg/ml	油 %(w/v)または mg/ml	界面活性剤 %(w/v) または mg/ml	追加成分 %(w/v)、mg/ml、ま たは mM
[CNE]			(SPAN(登録商標)85) 5mg/ml のポリソルベ ート 80(TWEEN(登録商標)80)	
NP-9	7.5mg/ml の 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)クロリド	9.4mg/ml のスクアレン (6E,10E,14E,18E)- 2,6,10,15,19,23-ヘキサ メチルテトラコサ- 2,6,10,14,18,22-ヘキサ ン, C30H50) 0.63mg/ml のグリセリル トリミリステート- dynasan(DYNASAN 114(登録商標))	9.3mg/ml のソルビタ ンモノステアレート (2R)-2-[(2R,3R,4S)- 3,4-ジヒドロキシオキ ソラン-2-イル]-2-ヒド ロキシエチルオクタデ セノエート、 C ₂₄ H ₄₆ O ₆ (SPAN(登 録商標)60) 9.3mg/ml のポリオキ シエチレン(20)ソルビ タンモノオレエート、 C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ 、ポリソル ベート 80(TWEEN(登録商 標)80)	0.05mg/ml の 15 ナ ノメートルの超常磁 性酸化鉄(Fe ₃ O ₄) 10mM のクエン酸ナ トリウム二水和物
NP-10	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリ ミリステート- dynasan(DYNASAN 114(登録商標)) 4.75%のスクアレン	0.5%のソルビタンモノ ステアレート (SPAN(登録商 標)60) 0.5%のポリソルベ ート 80(TWEEN(登録 商標)80)	
NP-11	3.0%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリ ミリステート- dynasan(DYNASAN 114(登録商標)) 3.75%のスクアレン	3.7%のソルビタンモノ ステアレート (SPAN(登録商 標)60) 3.7%のポリソルベ ート 80(TWEEN(登録 商標)80)	
NP-12	0.4%の DOTAP	4.3%のスクアレン	0.5%のソルビタントリ オレエート(SPAN(登 録商標)85) 0.5%のポリソルベ ート 80(TWEEN(登録 商標)80)	
NP-13	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリ ミリステート- dynasan(DYNASAN 114(登録商標))	2.0%のポリソルベ ート 80(TWEEN(登録 商標)80)	

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

名称	カチオン性脂質 %(w/v)または mg/ml	油 %(w/v)または mg/ml	界面活性剤 %(w/v) または mg/ml	追加成分 %(w/v)、mg/ml、ま たは mM
		4.08%のスクアレン		
NP-14	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリミ リ ス テ ー ト - dynasan(DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	0.5%のソルビタントリ オレエート(SPAN(登 録商標)85) 2.0%のポリソルベート 80(TWEEN(登録 商標)80)	
NP-15	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリミ リ ス テ ー ト - dynasan(DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	0.25%のソルビタントリ オレエート (SPAN(登 録 商 標)85) 2.0%のポリソルベート 80(TWEEN(登録 商標)80)	
NP-16	0.4%の DOTAP	5%のスクアレン	0.5%のソルビタントリ オレエート(SPAN(登 録商標)85) 2.0%のポリソルベート 80(TWEEN(登録 商標)80)	
NP-17	0.4%の DOTAP	5%のスクアレン	0.5%のソルビタンモノ ス テ ア レ ー ト (SPAN(登 録 商 標)60) 2%のポリソルベート 80(TWEEN(登録 商標)80)	
NP-18	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリミ リ ス テ ー ト - dynasan(DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	2%のソルビタントリオ レエート(SPAN(登 録商標)85) 2%のポリソルベート 80(TWEEN(登録 商標)80)	
NP-19	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリミ リ ス テ ー ト - dynasan(DYNASAN 114(登録商標)) 4.75%のスクアレン	0.5%のソルビタンモノ ス テ ア レ ー ト (SPAN(登 録 商 標)60) 0.5%のポリソルベート 80(TWEEN(登録 商標)80)	1%の水酸化アルミ ニウム
NP-20	3.0%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリミ リ ス テ ー ト - dynasan(DYNASAN 114(登録商標))	3.7%のソルビタンモノ ス テ ア レ ー ト (SPAN(登 録 商 標)60)	1%の水酸化アルミ ニウム

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

名称	カチオン性脂質 %(w/v)または mg/ml	油 %(w/v)または mg/ml	界面活性剤 %(w/v) または mg/ml	追加成分 %(w/v)、mg/ml、ま たは mM
		3.75%のスクアレン	3.7%のポリソルベート 80(TWEEN(登録商標)80)	
NP-21	0.4%の DOTAP	4.3%のスクアレン	0.5%のソルビタントリオレート(SPAN(登録商標)85) 0.5%のポリソルベート 80(TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-22	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリス テ ー ト - dynasan(DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	2.0%のポリソルベート 80(TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-23	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリス テ ー ト - dynasan(DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	0.5%のソルビタントリオレート(SPAN(登録商標)85) 2.0%のポリソルベート 80(TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-24	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリス テ ー ト - dynasan(DYNASAN 114(登録商標)) 4.08%のスクアレン	0.25%のソルビタントリオレート (SPAN(登 録 商 標)85) 2.0%のポリソルベート 80(TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-25	0.4%の DOTAP	5%のスクアレン	0.5%のソルビタントリオレート(SPAN(登録商標)85) 2.0%のポリソルベート 80(TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-26	0.4%の DOTAP	5%のスクアレン	0.5%のソルビタンモノステアレート (SPAN(登 録 商 標)60) 2%のポリソルベート 80(TWEEN(登録商標)80)	1%の水酸化アルミニウム
NP-27	0.4%の DOTAP	0.25%のグリセリルトリス テ ー ト - dynasan(DYNASAN 114(登録商標))	2%のソルビタントリオレート(SPAN(登 録 商 標)85)	1%の水酸化アルミニウム

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

名称	カチオン性脂質 %(w/v)または mg/ml	油 %(w/v)または mg/ml	界面活性剤 %(w/v) または mg/ml	追加成分 %(w/v)、mg/ml、ま たは mM
		4.08%のスクアレン	2%のポリソルベート 80(TWEEN(登録商 標)80)	
NP-28	0.5 ~ 5.0mg/ml の DOTAP	0.2 ~ 10%(v/v)のスク アレン	0.01 ~ 2.5%(v/v) の ポリソルベート 80(TWEEN(登録商 標)80)	
NP-29	0.4%(w/w) の DOTAP	4.3%(w/w)のスクアレ ン	0.5%(w/w)のソルビ タントリオレート (SPAN(登録商 標)85) 0.5%(w/w)のポリソ ルベート 80(TWEEN(登録商 標)80)	
NP-30 [無機コア なしの LC]	30mg/ml の DOTAP クロリド	37.5mg/ml のスクアレ ン	37mg/ml のソルビタ ンモノステアレート (SPAN(登録商 標)60) 37mg/ml のポリソル ベート 80(TWEEN(登録商 標)80)	10mM のクエン酸ナ トリウム
NP-31	30mg/ml の DOTAP クロリド	37.5mg/ml のスクアレ ン	37mg/ml のソルビタ ンモノステアレート (SPAN(登録商 標)60) 37mg/ml のポリソル ベート 80(TWEEN(登録商 標)80)	0.4mg Fe/ml の 5 nm のオレイン酸コー ティング酸化鉄ナノ 粒子 10mM のクエン酸ナ トリウム二水和物

【0075】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、ソルビタンモノステアレート（例えば、SPAN（登録商標）60）、ポリソルベート80（例えば、TWEEN（登録商標）80）、DOTAP、スクアレンを含み、固体粒子を含まない。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、ソルビタンモノステアレート（例えば、SPAN（登録商標）60）、ポリソルベート80（例えば、TWEEN（登録商標）80）、DOTAP、スクアレン、および酸化鉄粒子を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、免疫刺激物質を含む。一部の実施形態では、免疫刺激物質は、スクアレンである。一部の実施形態では、免疫刺激物質は、中鎖トリグリセリドである。一部の実施形態では、免疫刺激物質は、Miglyol 810またはMiglyol 812である。Miglyol 810は、飽和カプリルおよびカプリン脂肪酸とグリセロールのトリグリセリドエステルである。Miglyol 812は、飽和ココナツ油／パー

ム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステルである。一部の実施形態では、免疫刺激物質は、産生されるタンパク質の総量を減少させ得るが、本明細書に提供される組成物に対する免疫応答を増加させ得る（例えば、ワクチンとして送達される場合）。一部の実施形態では、免疫刺激物質は、産生されるタンパク質の総量を増加させ得るが、本明細書に提供される組成物に対する免疫応答を減少させ得る。

【0076】

本明細書に提供されるナノ粒子は、さまざまな平均直径のサイズのものであり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約20ナノメートル（nm）～約200nmの範囲の平均直径（z平均流体力学直径、動的光散乱によって測定される）を有する。一部の実施形態では、ナノ粒子のz平均直径は、約20nm～約150nm、約20nm～約100nm、約20nm～約80nm、約20nm～約60nmの範囲である。一部の実施形態では、ナノ粒子のz平均直径は、約40nm～約200nm、約40nm～約150nm、約40nm～約100nm、約40nm～約90nm、約40nm～約80nm、または約40nm～約60nmの範囲である。一実施形態では、ナノ粒子のz平均直径は、約40nm～約80nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子のz平均直径は、約40nm～約60nmである。一部の実施形態では、ナノ粒子は、最大で100nmの直径である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、50～70nmの直径である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、40～80nmの直径である。一部の実施形態では、ナノ粒子の疎水性コア内の無機粒子（例えば、酸化鉄）は、約3nm～約50nmの範囲の平均直径（数加重平均直径）であり得る。例えば、無機粒子は、約5nm、約10nm、約15nm、約20nm、約25nm、約30nm、約35nm、約40nm、約45nm、または約50nmの平均直径を有し得る。

【0077】

本明細書に提供されるナノ粒子は、多分散指数（PDI）によって特徴付けられ得、これは、サイズ分布に関するそれらの品質の指標である。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子の平均多分散指数（PDI）は、約0.1～約0.5の範囲である。一部の実施形態では、ナノ粒子の平均PDIは、約0.2～約0.5、約0.1～約0.4、約0.2～約0.4、約0.2～約0.3、または約0.1～約0.3の範囲であり得る。

【0078】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約0.1：1～約20：1、約0.5：1～約12：1、約0.5：1～約9：1、約0.5：1～約5：1、約0.5：1～約3：1、または約0.5：1～約1：1の範囲の油の界面活性剤に対するモル比を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約0.1：1～約2：1、約0.2：1～約1.5：1、約0.3：1～約1：1、約0.5：1～約1：1、または約0.6：1～約1：1の範囲の親水性界面活性剤の脂質に対する比を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約0.1：1～約5：1、約0.2：1～約3：1、約0.3：1～約2：1、約0.5：1～約2：1、または約1：1～約2：1の範囲の疎水性界面活性剤の脂質に対する比を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、約0.2%～約40%w/vの液状油、約0.001%～約10%w/vの無機固体ナノ粒子、約0.2%～約10%w/vの脂質、約0.25%～約5%w/vの疎水性界面活性剤、および約0.5%～約10%w/vの親水性界面活性剤を含む。一部の実施形態では、脂質はカチオン性脂質を含み、油はスクアレンを含み、および／または疎水性界面活性剤は、ソルビタンエステルを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるナノ粒子は、8～11の親水性－親油性バランスを生じさせる、エステルの比を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される核酸は、本明細書に提供される脂質キャリアに組み込まれるか、それと会合するか、またはそれと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成する。一部の実施形態では、脂質キャリアー核酸複合体は、非共有結合性相互作用を介して、または可逆的な共有結合性相互作用を介して形

成される。

核酸

【0079】

一部の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、1つまたは複数の核酸を含む。一部の実施形態では、核酸は、DNAまたはRNAである。自然免疫応答をモジュレートするRNA、タンパク質または抗原をコードするRNA、サイレンシングRNA、マイクロRNA、tRNA、自己複製性RNAなどを含む各種のRNAは、送達のために脂質キャリアと会合し得る。本開示の具体的な態様では、RNAは、自己複製性RNAである。

【0080】

ナノ粒子および核酸を含む組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、核酸は、ナノ粒子を有する複合体中にある。一部の実施形態では、核酸は、ナノ粒子の膜を有する複合体中にある。一部の実施形態では、核酸は、ナノ粒子の親水性表面を有する複合体中にある。一部の実施形態では、核酸は、ナノ粒子内にある。一部の実施形態では、核酸は、疎水性コア内にある。

【0081】

一部の実施形態では、1つまたは複数の核酸は、RNAまたはDNAポリメラーゼをコードする。一部の実施形態では、1つまたは複数の核酸は、RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする。一部の実施形態では、1つまたは複数の核酸は、自己複製のためのエレメント、例えば、RNAポリメラーゼ（例えば、VEEVポリメラーゼ）をコードする。

【0082】

自己複製性ヌクレオチドは、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から選択される少なくとも1つまたは複数の遺伝子を含み、5'および3'末端シス活性複製配列、ならびにがん関連タンパク質をコードする抗原配列も含む。異種配列の発現を方向付けるサブゲノムプロモーターは、自己複製性ヌクレオチド配列に含まれ得る。所望により、異種配列は、自己複製性RNA中の他のコード領域に、インフレームで融合されていてもよく、および／または配列内リボソーム進入部位（IRES）の制御下であってもよい。

【0083】

さまざまな実施形態では、自己複製性ヌクレオチド配列は、自己複製性RNA分子である。本開示の自己複製性RNA分子は、自己複製性RNA分子が、感染性ウイルス粒子の生成を誘導することができないように、設計され得る。これは、例えば、自己複製性RNA中のウイルス粒子の生成のために必要である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くことによって達成することができる。例えば、自己複製性RNA分子がアルファウイルス、例えば、シンドビスウイルス（SIN）、セムリキ森林熱ウイルスおよびベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEE）に基づいている場合、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をコードする1つまたは複数の遺伝子を除くことができる。所望により、本開示の自己複製性RNA分子は、弱毒化されているもしくは病原性がある感染性ウイルス粒子の生成を誘導するように、またはその後の感染の単一ラウンドが可能であるウイルス粒子を生成するように、設計することができる。

【0084】

自己複製性RNA分子は、任意のタンパク質なしでも脊椎動物細胞に送達される場合に、それ自身からの転写によって（またはそれ自身のアンチセンスコピーから）複数の娘RNAの生成をもたらし得る。自己複製性RNAは、細胞への送達後に、直接翻訳され得、この翻訳は、次いで送達されたRNAから転写物を生成するRNA依存性RNAポリメラーゼを提供する。このようにして、送達されたRNAは、複数の娘RNAの生成をもたらす。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、それら自身が翻訳されて、コードされるがん関連タンパク質のin situ発現を提供してもよく、または転写されて、コードされるがん関連タンパク質のin situ発現を提供するよう

10

20

30

40

50

に翻訳される、送達されたRNAと同じセンスを有するさらなる転写物を提供してもよい。

【0085】

所望により、自己複製性RNAは、ヌクレオシドの糖部分（例えば、リボース、デオキシリボース、改変リボース、改変デオキシリボース、6員糖アナログ、または開環糖アナログ）中にもしくはその上に、またはホスフェートに化学改変を含有し得る。

【0086】

本開示の自己複製性RNA分子は、1つまたは複数の改変ヌクレオチドを含有し、したがって、改善された安定性を有し、*in vivo*での分解およびクリアランスに対して抵抗性であり、ならびに他の利点を有し得る。任意の特定の理論に縛られることを望まないが、改変ヌクレオチドを含有する自己複製性RNA分子は、自己複製性RNAが細胞に送達される場合に、エンドソームおよび細胞質免疫受容体の刺激を回避または低減すると考えられる。これは、タンパク質の自己複製、増幅および発現が生じるのを可能にする。これはまた、改変ヌクレオチドを含有する自己複製性RNAが、自然免疫系の活性化およびその後の望ましくない結果（例えば、注射部位の炎症、注射部位の刺激、痛みなど）を低減するので、改変ヌクレオチドを含有しない自己複製性RNAと比べて安全性の懸念も低減する。自己複製の結果として生成したRNA分子は、細胞質免疫受容体によって外来核酸として認識されとも考えられる。そのため、改変ヌクレオチドを含有する自己複製性RNA分子は、宿主細胞におけるRNAの効率的な増幅、およびがん関連タンパク質の発現、ならびにアジュバント効果を提供する。

【0087】

RNA配列は、例えば、RNAの翻訳効率および半減期を増加させるために、そのコドン使用頻度に関して改変することができる。ポリAテール（例えば、約30またはそれよりも多くのアデノシン残基のもの）は、その半減期を増加させるために、RNAの3'末端に付着されてもよい。RNAの5'末端は、m7G(5')ppp(5')N構造（キャップ0構造）を有する改変リボヌクレオチドまたはその誘導体でキャップされていてもよく、これは、RNA合成の間に組み込まれ得るか、RNA転写後に酵素的に操作され得る（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）。キャップ構造は、RNA分子に安定性および翻訳効率を提供し得る。RNA分子の5'キャップは、キャップ1構造（m7Gppp[m2'-O]N）の生成をもたらす2'-O-メチルトランスフェラーゼによってさらに改変されてもよく、これは、翻訳効率をさらに増加させ得る。キャップ1構造は、*in vivo*効力も増加させ得る。

【0088】

本明細書で使用される場合、「改変ヌクレオチド」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））中のまたはその上の1つまたは複数の化学改変（例えば、置換）を含有するヌクレオチドを指す。所望により、自己複製性RNA分子は、ヌクレオシドの糖部分（例えば、リボース、デオキシリボース、改変リボース、改変デオキシリボース、6員糖アナログ、または開環糖アナログ）中にもしくはその上に、またはホスフェートに化学改変を含有し得る。

【0089】

自己複製性RNA分子は、好ましくは、5'キャップの一部ではない少なくとも1つの改変ヌクレオチドを含有し得る（例えば、5'キャップの一部である改変に加えて）。したがって、自己複製性RNA分子は、単一の位置に改変ヌクレオチドを含有することができ、2つもしくは複数の位置に特定の改変ヌクレオチド（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）を含有することができ、または2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれよりも多くの改変ヌクレオチドを含有することができる（例えば、1つまたは複数の位置のそれぞれに）。好ましく

は、自己複製性RNA分子は、窒素塩基上またはその中に改変を含有するが、改変糖またはリン酸部分を含有しない、改変ヌクレオチドを含む。

【0090】

一部の例では、自己複製性RNA分子中の0.001%~99%または100%のヌクレオチドが、改変ヌクレオチドである。例えば、自己複製性RNA分子中の0.001%~25%、0.01%~25%、0.1%~25%、または1%~25%のヌクレオチドが、改変ヌクレオチドである。

【0091】

他の例では、自己複製性RNA分子中の0.001%~99%または100%の特定の未改変ヌクレオチドが、改変ヌクレオチドで置き換えられる。例えば、ウリジンを含有する自己複製性RNA分子中の約1%のヌクレオチドが、例えば、ウリジンのシュドウリジンでの置き換えによって、改変され得る。他の例では、自己複製性RNA分子中の所望の量（パーセンテージ）の2、3、または4つの特定のヌクレオチド（ウリジン、シチジン、グアノシン、またはアデニンを含有するヌクレオチド）が、改変ヌクレオチドである。例えば、自己複製性RNA分子中の0.001%~25%、0.01%~25%、0.1%~25%、または1%~25%の特定のヌクレオチドが、改変ヌクレオチドである。他の例では、自己複製性RNA分子中の0.001%~20%、0.001%~15%、0.001%~10%、0.01%~20%、0.01%~15%、0.1%~25%、0.01%~10%、1%~20%、1%~15%、1%~10%、または約5%、約10%、約15%、約20%の特定のヌクレオチドが、改変ヌクレオチドである。

【0092】

自己複製性RNA分子中の100%未満のヌクレオチドが、改変ヌクレオチドであることが好ましい。自己複製性RNA分子中の100%未満の特定のヌクレオチドが、改変ヌクレオチドであることも好ましい。したがって、好ましい自己複製性RNA分子は、少なくともいくつかの未改変ヌクレオチドを含む。

【0093】

改変ヌクレオシドおよびヌクレオチドに組み込まれ得、RNA分子中に存在し得る改変核酸塩基としては、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-（シス-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-（シス-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バモイルアデノシン）；ms2hn6A（2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）；Ar(p)（2'-O-リボシルアデノシン（ホスフェート））；I（イノシン）；m1I（1-メチルイノシン）；m'I m（1, 2'-O-ジメチルイノシン）；m3C（3-メチルシチジン）；Cm（2T-O-メチルシチジン）；s2C（2-チオシチジン）；ac4C（N4-アセチルシチジン）；f5C（5-フォニルシチジン）；m5Cm（5, 2-O-ジメチルシチジン）；ac4Cm（N4アセチル2TOMethylシチジン）；k2C（ライシジン）；m1G（1-メチルグアノシン）；m2G（N2-メチルグアノシン）；m7G（7-メチルグアノシン）；Gm（2'-O-メチルグアノシン）；m22G（N2, N2-ジメチルグアノシン）；m2Gm（N2, 2'-O-ジメチルグアノシン）；m22Gm（N2, N2, 2'-O-トリメチルグアノシン）；Gr(p)（2'-O-リボシルグアノシン（ホスフェート））；yW（ウイブトシン）；o2yW（ペルオキシウイブトシン）；OH yW（ヒドロキシウイブトシン）；OH yW*

(未改変ヒドロキシウイプトシン) ; *i* m G (ウイオシン) ; *m i* m G (メチルグアノシン) ; *Q* (キューオシン) ; *o* *Q* (エポキシキューオシン) ; *g a l* *Q* (ガルタクトシルキューオシン) ; *m a n* *Q* (マンノシルキューオシン) ; *p r e* *Q o* (7-シアノー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 S U* (5-ヒドロキシウリジン) ; *m o S 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* (5-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* (N6, N6-ジメチルアデノシン) ; *T m* (2'-O-メチルイノシン) ; *m 4 C* (N4-メチルシチジン) ; *m 4 C m* (N4, 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* (N6, T-O-ジメチルアデノシン) ; *r n 6 2 A m* (N6, N6, O-2-トリメチルアデノシン) ; *m 2 ' 7 G* (N2, 7-ジメチルグアノシン) ; *m 2 ' 2 ' 7 G* (N2, N2, 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* (5-タウリノメチル-2-チオウリジン) ; *i m G - 1 4* (4-デメチルグアノシン) ; *i m G 2* (イソグアノシン) ; *a c 6 A* (N6-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-(C₁~C₆)-アルキルウラシル、5-メチルウラシル、5-(C₂~C₆)-アルケニルウラシル、5-(C₂~C₆)-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-ブロモウラシル、5-ヒドロキシシトシン、5-(C₁~C₆)-アルキルシトシン、5-メチルシトシン、5-(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-ブロモシトシン、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(脱塩基残基)、*m 5 C*、*m 5 U*、*m 6 A*、*s 2 U*、*W*、または2'-O-メチル-Uが挙げられる。これらの改変核酸塩基のいずれか1つまたは任意の組合せは、本開示の自己複製性RNAに含まれていてもよい。これらの改変核酸塩基の多くおよびそれらの対応するリボヌクレオシドは、商業的供給業者から入手可能である。

【0094】

一部の実施形態では、RNA分子、必要に応じて自己複製性RNA分子は、ホスホロア

ミデート、ホスホロチオエート、および／またはメチルホスホネート連結を含む。

【0095】

少なくとも1つの改変ヌクレオチドを含む自己複製性RNA分子は、任意の好適な方法を使用して調製することができる。改変ヌクレオチドを含有するRNA分子を生成するために、いくつかの好適な方法が、当技術分野において公知である。例えば、改変ヌクレオチドを含有する自己複製性RNA分子は、好適な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、または改変ヌクレオチドのRNA分子への効率的な組み込みを可能にするこれらのポリメラーゼの突然変異体を使用して、自己複製性RNA分子をコードするDNAを転写すること（例えば、*in vitro*転写）によって調製することができる。転写反応は、ヌクレオチドおよび改変ヌクレオチド、ならびに選択されたポリメラーゼの活性をサポートする他の構成要素、例えば、好適な緩衝液および好適な塩を含有する。ヌクレオチドアナログの自己複製性RNAへの組み込みは、例えば、そのようなRNA分子の安定性を変更する、RNAseに対する抵抗性を増加させる、適切な宿主細胞への導入後に複製を確立する（RNAの「感染力」）、ならびに／または自然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、操作され得る。

10

【0096】

自己複製性RNA分子中の1つまたは複数の改変ヌクレオチドの存在および／または量は、任意の好適な方法を使用して決定することができる。例えば、自己複製性RNAを、モノホスフェートに消化（例えば、ヌクレアーゼP1を使用する）および脱リン酸化し（例えば、CIAPなどの好適なホスファターゼを使用する）、得られたヌクレオシドを、逆相HPLC（例えば、YMC Pack ODS-AQカラム（5ミクロン、4.6×250mm）、および30%のB（0～5分）から100%のB（5～13分）および100%のB（13～40）分のグラジエント、流速（0.7ml/分）、UV検出（波長：260nm）、カラム温度（30℃）、緩衝液A（20mMの酢酸-酢酸アンモニウムpH3.5）、緩衝液B（20mMの酢酸-酢酸アンモニウムpH3.5/メタノール[90/10]）を使用する溶出を使用する）によって分析することができる。

20

【0097】

自己複製性RNAは、送達システムと会合していてもよい。自己複製性RNAは、アジュバントありまたはなしで投与され得る。

30

【0098】

1つまたは複数の核酸は、脂質キャリアに組み込まれて／それと会合して／それと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成し得る。脂質キャリアー核酸複合体は、非共有結合性相互作用を介して、または可逆的な共有結合性相互作用を介して形成される。

【0099】

一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、1つまたは複数の核酸を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、2つまたはそれよりも多くの核酸を含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、少なくとも1つのDNAを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、少なくとも1つのRNAを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、少なくとも1つのDNAおよび少なくとも1つのRNAを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される核酸は、5ng～約1mgを上回る量で存在する。一部の実施形態では、本明細書に提供される核酸は、最大で約25、50、75、100、150、175ngの量で存在する。一部の実施形態では、本明細書に提供される核酸は、最大で約1mgの量で存在する。一部の実施形態では、本明細書に提供される核酸は、約0.05μg、0.1μg、0.2μg、0.5μg、1μg、5μg、10μg、12.5μg、15μg、25μg、40μg、50μg、100μg、200μg、300μg、400μg、500μg、600μg、700μg、800μg、900μg、1mgの量で存在する。一部の実施形態では、本明細書に提供される核酸は、0.05μg、0.1μg、0.2μg、0.5μg、1μg、5μg、10μg、12.5μg、15μg、25μg、40μg、50μ

40

50

g、100 μg、200 μg、300 μg、400 μg、500 μg、600 μg、700 μg、800 μg、900 μg、1mgの量で存在する。一部の実施形態では、本明細書に提供される核酸は、約5 μg、約10 μg、約25 μg、約50 μg、または約100 μgの量で存在する。一部の実施形態では、本明細書に提供される核酸は、最大で約5 μg、約10 μg、約25 μg、約50 μg、または100 μgの量で存在する。一部の実施形態では、核酸は、少なくとも約200、250、500、750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、11000、12000、13000、14000、15000、16000、17000、18000、19000、または20000ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、核酸は、最大で約7000、8000、9000、10000、11000、12000、13000、14000、15000、16000、17000、18000、19000、または20000ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、核酸は、約7500、10000、15000、または20000ヌクレオチド長である。

10

凍結保護物質

【0100】

一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物および方法は、少なくとも1つの凍結保護物質を含む。包含のための例示的な凍結保護物質は、限定されるものではないが、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、またはグルコース、およびそれらの任意の組合せである。一部の実施形態では、包含のための追加のまたは代替の凍結保護物質は、ソルビトール、リビトール、エリスリトール (erthritol)、トレイトール、エチレングリコール、またはフルクトースである。一部の実施形態では、包含のための追加のまたは代替の凍結保護物質は、ジメチルスルホキシド (DMSO)、グリセロール、プロピレングリコール、エチレングリコール、3-O-メチル-D-グルコピラノース (3-OMG)、ポリエチレングリコール (PEG)、1,2-プロパンジオール、アセトアミド、トレハロース、ホルムアミド、糖、タンパク質、および炭水化物である。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約1% w/v ~ 約20% w/v、好ましくは、約10% w/v ~ 約20% w/v、より好ましくは、約10% w/v で存在する。本開示のある特定の態様では、凍結保護物質は、スクロースである。本開示の一部の態様では、凍結保護物質は、マルトースである。本開示の一部の態様では、凍結保護物質は、トレハロースである。本開示の一部の態様では、凍結保護物質は、マンニトールである。本開示の一部の態様では、凍結保護物質は、グルコースである。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、325、350、375、400、450、500 mg またはそれよりも多くの量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約50 ~ 約500 mg の量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約200 ~ 約300 mg の量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、約250 mg の量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、凍結乾燥組成物の少なくとも50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 またはそれよりも多い重量パーセントの量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、凍結乾燥組成物の約95重量%の量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、凍結乾燥組成物の80 ~ 98%、85 ~ 98%、90 ~ 98%、または94 ~ 96重量%の量で存在する。一部の実施形態では、凍結保護物質は、糖である。一部の実施形態では、糖は、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、またはグルコースである。一部の実施形態では、糖は、スクロースである。一部の実施形態では、スクロースは、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、325、350、375、400、450、500 mg またはそれよりも多くの量で存在する。一

20

30

40

50

部の実施形態では、スクロースは、約50～約500mgの量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、約200～約300mgの量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、約250mgの量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、凍結乾燥組成物の少なくとも50、55、60、65、70、75、80、85、90、95またはそれよりも多い重量パーセントの量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、凍結乾燥組成物の約95重量%の量で存在する。一部の実施形態では、スクロースは、凍結乾燥組成物の80～98%、85～98%、90～98%、または94～96重量%の量で存在する。

【0101】

一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、熱的に安定である。組成物は、組成物が、熱または低温の作用に抵抗し、所与の温度で分解から核酸分子を保護する能力などのその性質を維持する場合に、熱的に安定であると考えられる。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチンは、摂氏約25度または標準的な室温で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチンは、摂氏約45度で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチンは、摂氏約-20度で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチンは、摂氏約2度～摂氏約8度で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチンは、少なくとも摂氏約-80度、少なくとも摂氏約-20度、少なくとも摂氏約0度、少なくとも摂氏約2度、少なくとも摂氏約4度、少なくとも摂氏約6度、少なくとも摂氏約8度、少なくとも摂氏約10度、少なくとも摂氏約20度、少なくとも摂氏約25度、少なくとも摂氏約30度、少なくとも摂氏約37度、最高で摂氏45度の温度で熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチンは、少なくとも約5日間、少なくとも約1週間、少なくとも約2週間、少なくとも約1か月間、最大で3か月間、熱的に安定である。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチンは、少なくとも約4℃から最高で摂氏37度の温度で、少なくとも約5日間、少なくとも約1週間、少なくとも約2週間、少なくとも約1か月間、最大で3か月間、貯蔵される。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物およびワクチンは、少なくとも摂氏約20度から最高で摂氏25度の温度で、少なくとも約5日間、少なくとも約1週間、少なくとも約2週間、少なくとも約1か月間、最大で3か月間、貯蔵される。

組合せ組成物

【0102】

本明細書に記載される核酸および本明細書に記載される脂質キャリアを含む組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-1を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-2を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-3を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-4を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-5を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-6を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-7を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-8を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-9を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-10を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-11を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-12を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-13を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-14を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-15を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-16を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-17を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-18を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-19を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-20を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-21を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-22を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-23を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-24を含む。一部の実

施形態では、脂質キャリアは、NP-25を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-26を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-27を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-28を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-29を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-30を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-31を含む。一部の実施形態では、脂質キャリアは、NP-1～NP-31のいずれかおよび凍結保護物質を含む。一部の実施形態では、凍結保護物質は、本明細書に記載される糖である。本明細書に提供される組成物は、窒素のホスフェートに対する（N：P）モル比によって特徴付けられ得る。N：Pの比は、窒素を含有するナノ粒子中のカチオン性脂質の量、および負に荷電したホスフェートを含有する組成物中で使用される核酸の量によって決定される。脂質キャリアの核酸に対するモル比は、核酸の送達効率を増加させる、核酸保持ナノエマルジョン組成物が抗原に対する免疫応答を誘発する能力を増加させる、核酸保持ナノエマルジョン組成物が対象において抗原に対する抗体価の生成を誘発する能力を増加させるように選択することができる。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、窒素のホスフェートに対するモル比によって特徴付けられ得る脂質キャリアの核酸に対するモル比を有し、これは、約0.01：1～約1000：1、例えば、約0.2：1～約500：1、約0.5：1～約150：1、約1：1～約150：1、約1：1～約125：1、約1：1～約100：1、約1：1～約50：1、約1：1～約50：1、約5：1～約50：1、約5：1～約25：1、または約10：1～約20：1の範囲であり得る。一部の実施形態では、窒素のホスフェートに対する（N：P）モル比によって特徴付けられる脂質キャリアの核酸に対するモル比は、約1：1～約150：1、約5：1～約25：1、または約10：1～約20：1の範囲である。一部の実施形態では、ナノエマルジョン組成物のN：Pのモル比は、約15：1である。一部の実施形態では、ナノ粒子は、膜に共有結合的に付着した本明細書に提供される核酸を含む。

10

20

【0103】

本明細書に提供される組成物は、油の界面活性剤に対するモル比によって特徴付けられ得る。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対する比は、スクアレン：カチオン性脂質、疎水性界面活性剤、および親水性界面活性剤のモル比である。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対する比は、スクアレン：DOTAP、疎水性界面活性剤、および親水性界面活性剤のモル比である。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対する比は、スクアレン：DOTAP、ソルビタンモノステアレート、およびポリソルベート80のモル比である。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対するモル比は、約0.1：1～約20：1、約0.5：1～約12：1、約0.5：1～約9：1、約0.5：1～約5：1、約0.5：1～約3：1、または約0.5：1～約1：1の範囲である。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対するモル比は、少なくとも約0.1：1、少なくとも約0.2：1、少なくとも約0.3：1、少なくとも約0.4：1、少なくとも約0.5：1、少なくとも約0.6：1、少なくとも約0.7：1である。一部の実施形態では、油の界面活性剤に対するモル比は、少なくとも約0.4：1から最大で1：1である。

30

【0104】

本明細書に提供される組成物は、親水性界面活性剤のカチオン性脂質に対する比によって特徴付けられ得る。一部の実施形態では、親水性界面活性剤のカチオン性脂質に対する比は、約0.1：1～約2：1、約0.2：1～約1.5：1、約0.3：1～約1：1、約0.5：1～約1：1、または約0.6：1～約1：1の範囲である。本明細書に提供される組成物は、疎水性界面活性剤の脂質（例えば、カチオン性脂質）に対する比によって特徴付けられ得る。一部の実施形態では、疎水性界面活性剤の脂質に対する比は、約0.1：1～約5：1、約0.2：1～約3：1、約0.3：1～約2：1、約0.5：1～約2：1、または約1：1～約2：1の範囲である。一部の実施形態では、カチオン性脂質は、DOTAPである。

40

【0105】

50

ソルビタン脂肪酸エステル、エトキシ化ソルビタンエステル、カチオン性脂質、免疫刺激物質、およびRNAを含む乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。ソルビタンモノステアレート（例えば、SPAN（登録商標）60）、ポリソルベート80（例えば、TWEEN（登録商標）80）、DOTAP、免疫刺激物質、およびRNAを含む乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。

医薬組成物

【0106】

一態様では、本開示は、脂質キャリア、および必要に応じて、本明細書に記載される核酸を含む医薬組成物を提供する。必要に応じて、医薬組成物は、薬学的に許容される担体または賦形剤を含むことができる。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体または賦形剤」という用語は、医薬品投与に適合する、溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。

10

【0107】

医薬組成物は、好適な希釈剤中で再構成された乾燥組成物および薬学的に許容される担体を含む。希釈剤は、水性である。好ましい態様では、希釈剤は、水である。

【0108】

本開示は、医薬組成物および対象への投与のための送達システムを含むキットも提供する。対象は、哺乳動物であり得る。好ましい態様では、対象は、ヒトである。

【0109】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載される医薬組成物、および必要に応じて1つまたは複数のワクチンアジュバントを含む組成物を含むワクチン送達システムを提供する。

20

【0110】

脂質キャリアと核酸の複合体化によって、組成物は、細胞に送達され得る。細胞は、必要とする対象中のものであり得る。例えば、核酸が、タンパク質抗原であるか、タンパク質抗原をコードする場合、核酸を保持する組成物は、抗原に対する対象における免疫応答を誘発し得る。組成物は、対象において抗原に対する抗体価を誘発することによって、例えば、対象において中和抗体価を誘導することによって、貢献し得る。

【0111】

本開示は、対象における免疫応答を生じさせるための方法であって、治療有効量の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法に関する。

30

【0112】

一実施形態では、脂質キャリアを含有する組成物は、有効量で対象に投与された場合に、核酸が脂質キャリアなしで対象に投与された場合に誘発される免疫応答と同等またはそれよりも高い抗原に対する免疫応答を誘発することができる。

【0113】

理論によって縛られないが、ナノエマルジョン組成物中の疎水性界面活性剤は、核酸を細胞に送達するナノエマルジョン組成物の能力を増加させる、または抗原に対する対象における免疫応答を誘発する核酸を保持するナノエマルジョン組成物の能力を増加させるのに寄与し得る（核酸が、タンパク質抗原であるか、またはタンパク質抗原をコードする場合）。例えば、ナノエマルジョン組成物中の疎水性界面活性剤は、核酸を保持するナノエマルジョン組成物の能力を増加させるのに寄与し得る。

40

【0114】

本開示の別の態様は、対象における感染症または疾患を処置または防止する方法であって、治療有効量の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法に関する。

【0115】

上記で論じられたように、無機固体ナノ粒子は、イメージング法を介して検出可能なレポーターエレメントを含有する場合に、得られたナノエマルジョン粒子を、ナノエマルジョン粒子が身体に投与された後に、イメージングおよび追跡することができる。例えば、無機固体ナノ粒子は、磁気共鳴画像法（MRI）を介して検出可能なレポーターエレメン

50

ト、例えば、常磁性、超常磁性、フェリ磁性または強磁性化合物を含有していてもよい。

【0116】

したがって、本開示の一態様は、対象における核酸送達をイメージングおよび／または追跡する方法であって、治療有効量の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法にも関する。

【0117】

本開示は、凍結乾燥組成物および噴霧乾燥組成物を調製および再構成するための方法も提供する。

【0118】

本開示の一部の態様では、組成物および方法は、各種の疾患および開示を処置するのに有用である。

【0119】

感染症の非限定的な例としては、ウイルスおよび非ウイルス感染症が挙げられ得る。ウイルス感染症の例としては、限定されるものではないが、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、インフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスのタイプおよびサブタイプ、黄熱病ウイルス（YFV）、ジカウイルス、西ナイルウイルス、チクングニアウイルス、デング熱、呼吸器多核体ウイルス（RSV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）、およびそのバリエーションが挙げられる。

【0120】

疾患の例としては、黒色腫関連抗原A遺伝子、例えば、MAGE-A1、MAGE-A3、およびチロシナーゼ関連タンパク質（TYRP）遺伝子、例えば、TYRP-1に関連するがんが挙げられる。

【0121】

本開示の一部の態様では、組成物および方法は、抗原をコードする1つまたは複数の核酸を含み、抗原は、細菌感染症、細菌疾患、ウイルス感染症、ウイルス疾患、原虫感染症、原虫疾患、非伝染性疾患、1つもしくは複数のがん、または自己免疫疾患に由来する。

【0122】

一部の態様では、抗原は、ウイルスに由来する。ウイルスは、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、インフルエンザウイルス、インフルエンザウイルスのタイプおよびサブタイプ、黄熱病ウイルス（YFV）、ジカウイルス、西ナイルウイルス、チクングニアウイルス、デング熱、呼吸器多核体ウイルス（RSV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）、およびそのバリエーションからなる群から選択される。

投与および投薬量

【0123】

ある態様では、本開示の乾燥組成物は、核酸（例えば、RNA、必要に応じて自己複製性RNA）を細胞または対象、例えば、限定されるものではないが、ヒト、イヌ、ネコ、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ）、ウマなどを含む哺乳動物に送達するために使用され得る。本明細書に記載される組成物における組み込みのための総核酸の例示的な量は、約1、2、2.5、5、7.5、10、12.5、15、20、25、30、35、40、45、50マイクログラム（μg）またはそれよりも多くを含む。

【0124】

一部の実施形態では、本明細書に記載される製剤は、投与のために単一の容器内で調製される。一部の実施形態では、本明細書に記載される製剤は、投与のために2つの容器内で調製され、ナノ粒子キャリアから製剤を分離する。

【0125】

本明細書で使用される場合、「容器（container）」としては、容器（vessel）、バイアル、アンプル、管、カップ、ボックス、ボトル、フラスコ、ジャー、デ

10

20

30

40

50

イッシュ、単一ウェルもしくは複数ウェルの器具のウェル、リザーバー、タンクなど、または本明細書に開示される組成物が、入れられ、貯蔵され、および／もしくは輸送され得、ならびに内容物を取り出すためにアクセスされ得る他のデバイスが挙げられる。そのような容器の例としては、針および注射器を使用する内容物の抜き取りに適合するゴム栓または他のシール手段を有するものを含む、ガラスおよび／もしくはプラスチックのシールされたまたは再シール可能な管およびアンプルが挙げられる。一部の実行では、容器は、RNAseを含まない。

【0126】

好ましい実施形態では、乾燥組成物は、凍結乾燥されている。一部の実施形態では、乾燥組成物は、噴霧乾燥されている。

【0127】

一部の実施形態では、凍結乾燥組成物は、本明細書に記載される方法によって再構成される。他の実施形態では、噴霧乾燥組成物は、本明細書に記載される方法によって再構成される。

【0128】

一部の実施形態では、本明細書に提供される医薬組成物は、組成物を対象に投与することを可能にする形態である。一部の実施形態では、医薬組成物は、固体、半固体、液体または気体（エアロゾル）の形態である。

【0129】

核酸を細胞または対象に送達するために、任意の好適な投与経路が用いられ得る。一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物は、腫瘍内、皮下、皮内、筋肉内、吸入／鼻腔内、静脈内、腹腔内、頭蓋内、もしくはくも膜下腔内経路を介した投与のためおよび／またはそれを介した投与における使用のために製剤化される。一部の実施形態では、医薬組成物は、非経口投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、経皮的投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、筋肉内投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、皮内投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、経皮投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、皮下投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、鼻腔内、例えば、鼻噴霧器を介して投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、経口、例えば、ドロップを介して投与される。

【0130】

ある態様では、任意の好適な剤形が、本明細書に記載される医薬組成物の送達のために使用され得る。一部の実施形態では、医薬組成物は、注射可能な剤形、例えば、溶液または懸濁液で提供される。

【0131】

他の実施形態では、組成物は、吸入器を介して送達され得る剤形、例えば、溶液、懸濁液、または粉末で提供され、剤形は、計量式吸入器、ソフトミスト吸入器、ネブライザー、または乾燥粉末吸入器などの吸入器を介した送達のために製剤化される。

【0132】

他の実施形態では、組成物は、経鼻送達され得る剤形、例えば、溶液、懸濁液、または粉末で提供され、剤形は、アトマイザーもしくは鼻ポンプボトル、または経鼻投与される医薬組成物の送達のための他の好適なデバイスを介した経鼻送達のために製剤化される。

【0133】

ある態様では、薬学的に許容される担体、保存剤、および／または他の賦形剤が、本開示の組成物の送達のための本明細書に記載される剤形で使用され得る。

【0134】

本開示は、1つまたは複数の無機ナノ粒子を含有しない乾燥組成物も提供する。乾燥組成物は、ソルビタン脂肪酸エステル、エトキシ化ソルビタンエステル、カチオン性脂質、免疫刺激物質およびRNAを含む。具体的な態様では、乾燥組成物は、ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエート、DOTAP、免疫刺激物質、およびRNAを含む。

10

20

30

40

50

【0135】

一部の態様では、免疫刺激物質は、産生されるタンパク質の総量を減少させ得るが、ワクチンに対する免疫応答を増加させ得る。一部の態様では、免疫刺激物質は、産生されるタンパク質の総量を増加させ得るが、ワクチンに対する免疫応答を減少させ得る。一部の態様では、免疫刺激物質は、スクアレンである。一部の態様では、免疫刺激物質は、カプリル酸／カプリン酸トリグリセリド（MIGLYOL（登録商標）810）、または飽和ココナツ油／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステル（MIGLYOL（登録商標）812N）である。

例示的な実施形態

【0136】

(a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；(b) 1つまたは複数の核酸；ならびに(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を含む乾燥組成物が本明細書に提供される。組成物が、凍結乾燥されている、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。組成物が、噴霧乾燥されている、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。摂氏約25度で熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書に提供される。摂氏約45度で熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書に提供される。摂氏約-20度で熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書に提供される。摂氏約2度～摂氏約8度で熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書に提供される。少なくとも1週間、少なくとも2週間、および／または少なくとも1か月間、熱的に安定である、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。組成物の疎水性コアが、油を含む、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシシルグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミンE、カプリル酸／カプリン酸トリグリセリド、飽和ココナツ油／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステル、ジヒドロイソスクアレン（DHIS）、ファルネセン、ならびにスクアランの少なくとも1つを含む、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質である、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。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ウム)プロパン（DOTAP）；3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール（DCコレステロール）；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（C16:0）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（DOEPC）；1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン（DODAP）；および1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLINDMA）；1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジール)ビス(ドデカン-2-オール)(C12-200)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）；N-デシル-N,N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド（DDAB）；2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパ

10

20

30

40

50

ンアミニウムトリフルオロアセテート (D O S P A) ; エチルホスファチジルコリン (e P C) ; およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。脂質キャリアが、必要に応じて、少なくとも1つの界面活性剤を含む、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、および任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。疎水性界面活性剤が、ソルビタンエステルを含む、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。ソルビタンエステルが、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、ソルビタントリスステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択され；親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。脂質キャリアが、約0.1~0.4の範囲の平均多分散指数で、約40nm~約150nmの範囲のz平均流体力学直径を有する、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、RNAである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。RNAが、自己複製性RNAである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、脂質キャリアに組み込まれるか、またはそれと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成する、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。脂質キャリアー核酸複合体が、非共有結合性相互作用を介して、または可逆的な共有結合性相互作用を介して形成される、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。窒素のホスフェートに対する(N:P)モル比によって特徴付けられる脂質キャリアの1つまたは複数の核酸に対するモル比が、約1:1~約150:1の範囲である、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、スクロースである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、約1%w/v~約20%w/vである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、約1%w/v~約40%w/vである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、約10%w/v~約20%w/vである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの凍結保護物質が、約10%w/vである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、酸化アルミニウム(Al_2O_3)、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄、二酸化チタン、二酸化ケイ素(SiO_2)、ヒドロキシリン酸アルミニウム($Al(OH)_x(PO_4)_y$)、リン酸カルシウム($Ca_3(PO_4)_2$)、カルシウムヒドロキシアパタイト($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)、グルコン酸鉄、または硫酸鉄を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、マグネタイト(Fe_3O_4)、マグヘマイト($\gamma-Fe_2O_3$)、ウスタイト(FeO)、もしくはヘマタイト(アルファ(α)- Fe_2O_3)、またはそれらの任意の組合せを含む、組成物が本明細書にさらに提供される。

10

20

30

40

50

【0137】

好適な希釈剤中で再構成された本明細書に提供される乾燥組成物；および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物が本明細書にさらに提供される。好適な希釈剤が、水性である、医薬組成物が本明細書にさらに提供される。好適な希釈剤が、水である、医薬組成物が本明細書にさらに提供される。

【0138】

本明細書に提供される医薬組成物または本明細書に提供される乾燥組成物；および対象への投与のための送達システムを含む、キットが本明細書にさらに提供される。

【0139】

本明細書に提供される医薬組成物および必要に応じて1つまたは複数のワクチンアジュバントを含む、ワクチン送達システムが本明細書にさらに提供される。

【0140】

対象における免疫応答を生じさせるための方法であって、治療有効量の本明細書に提供

される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0141】

対象における疾患を処置または防止する方法であって、治療有効量の本明細書に提供される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0142】

対象における1つまたは複数の核酸の送達をイメージングおよび／または追跡する方法であって、治療有効量の本明細書に提供される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0143】

凍結乾燥組成物を調製するための方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 1つまたは複数の核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；ならびに(d) 製剤を凍結乾燥して、凍結乾燥組成物を形成するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0144】

噴霧乾燥組成物を調製するための方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 1つまたは複数の核酸を脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；ならびに(d) 製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0145】

凍結乾燥組成物を再構成するための方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；製剤を凍結乾燥して、凍結乾燥組成物を形成するステップ；ならびに(d) 好適な希釈剤中で凍結乾燥組成物を再構成するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。好適な希釈剤が、水性である、方法が本明細書にさらに提供される。好適な希釈剤が、水である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、少なくとも1週間、少なくとも2週間、および／または少なくとも1か月間、熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、摂氏約25度で熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、摂氏約45度で熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、摂氏約-20度で熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、摂氏約2度～摂氏約8度で熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄、二酸化チタン、二酸化ケイ素 (SiO_2)、ヒドロキシリン酸アルミニウム ($Al(OH)_x(PO_4)_y$)、リン酸カルシウム ($Ca_3(PO_4)_2$)、カルシウムヒドロキシアパタイト ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)、グルコン酸鉄、または硫酸鉄を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、マグネタイト (Fe_3O_4)、マグヘタイト ($\gamma-Fe_2O_3$)、ウスタイト (FeO)、もしくはヘマタイト (アルファ (α) - Fe_2O_3)、またはそれらの任意の組合せを含む、組成物が本明細書にさらに提供される。

10

20

30

40

50

【0146】

噴霧乾燥組成物を再構成するための方法であって、(a) 脂質キャリアを得るステップであって、脂質キャリアが、疎水性コア、必要に応じて1つまたは複数の無機ナノ粒子、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、ステップ；(b) 1つまたは複数の核酸を前記脂質キャリアに組み込んで、脂質キャリアー核酸複合体を形成するステップ；(c) 少なくとも1つの凍結保護物質を脂質キャリアー核酸複合体に添加して、製剤を形成するステップ；(d) 製剤を噴霧乾燥して、噴霧乾燥組成物を形成するステップ；ならびに(e) 好適な希釈剤中で噴霧乾燥組成物を再構成するステップを含む方法が本明細書にさらに提供される。希釈剤が、水性である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、摂氏約25度で熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、摂氏約45度で熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥組成物が、摂氏約-20度で熱的に安定である、方法が本明細書に提供される。凍結乾燥組成物が、摂氏約2度～摂氏約8度で熱的に安定である、方法が本明細書にさらに提供される。疎水性コアが、油を含む、方法が本明細書にさらに提供される。油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナッツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミンE、カプリル酸／カプリン酸トリグリセリド、飽和ココナツ油／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステル、ジヒドロイソスクアレン(DHIS)、ファルネセン、ならびにスクアランの少なくとも1つを含む、方法が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、方法が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質を含む、方法が本明細書にさらに提供される。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ウム)プロパン(DOTAP)；3 β -[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DCコレステロール)；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(C16:0)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)；および1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)；1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール))(C12-200)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)；N-デシル-N,N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド(DDAB)；2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート(DOSP A)；エチルホスファチジルコリン(ePC)；およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、方法が本明細書にさらに提供される。脂質キャリアが、必要に応じて、1つまたは複数の界面活性剤を含む、方法が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、方法が本明細書にさらに提供される。疎水性界面活性剤が、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、ソルビタントリステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含み；親水性界面活性剤が、ポリ

ソルベートを含む、方法が本明細書にさらに提供される。脂質キャリアが、約 0.1 ~ 約 0.4 の範囲の平均多分散指数で、約 40 nm ~ 約 150 nm の範囲の z 平均流体力学直径を有する、方法が本明細書にさらに提供される。1 つまたは複数の核酸が、RNA である、方法が本明細書にさらに提供される。RNA が、自己複製性 RNA である、方法が本明細書にさらに提供される。1 つまたは複数の核酸が、脂質キャリアに組み込まれるか、またはそれと複合体化して、脂質キャリアー核酸複合体を形成する、方法が本明細書にさらに提供される。脂質キャリアー核酸複合体が、非共有結合性相互作用を介して、または可逆的な共有結合性相互作用を介して形成される、方法が本明細書にさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、方法が本明細書にさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、スクロースである、方法が本明細書にさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、約 1 % w / v ~ 約 20 % w / v である、方法が本明細書にさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、約 10 % w / v ~ 約 20 % w / v である、方法が本明細書にさらに提供される。少なくとも 1 つの凍結保護物質が、約 10 % w / v である、方法が本明細書にさらに提供される。1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄、二酸化チタン、二酸化ケイ素 (SiO_2)、ヒドロキシリン酸アルミニウム ($Al(OH)_x(PO_4)_y$)、リン酸カルシウム ($Ca_3(PO_4)_2$)、カルシウムヒドロキシアパタイト ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)、グルコン酸鉄、または硫酸鉄を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、マグネタイト (Fe_3O_4)、マグヘマイト ($\gamma-Fe_2O_3$)、ウスタイト (FeO)、もしくはヘマタイト (アルファ (α) - Fe_2O_3)、またはそれらの組合せを含む、組成物が本明細書にさらに提供される。

10

20

30

40

50

【0147】

ソルビタン脂肪酸エステル、エトキシ化ソルビタンエステル、カチオン性脂質、免疫刺激物質、および RNA を含む乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。ソルビタン脂肪酸エステルが、ソルビタンモノステアレートである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。エトキシ化ソルビタンエステルが、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレエートである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。カチオン性脂質が、DOTAP である、乾燥組成物が本明細書に提供される。免疫刺激物質が、スクアレンである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。エステルの比が、8 ~ 11 の親水性 - 親油性バランスを生じさせる、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。エステルおよび脂質の比が、30 nm ~ 200 nm の粒子径を生じさせる、乾燥組成物が本明細書に提供される。エステルおよび脂質の比が、40 nm ~ 70 nm の粒子径を生じさせる、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄、二酸化チタン、二酸化ケイ素 (SiO_2)、ヒドロキシリン酸アルミニウム ($Al(OH)_x(PO_4)_y$)、リン酸カルシウム ($Ca_3(PO_4)_2$)、カルシウムヒドロキシアパタイト ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)、グルコン酸鉄、または硫酸鉄を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。1 つまたは複数の無機ナノ粒子が、マグネタイト (Fe_3O_4)、マグヘマイト ($\gamma-Fe_2O_3$)、ウスタイト (FeO)、もしくはヘマタイト (アルファ (α) - Fe_2O_3)、またはそれらの任意の組合せを含む、組成物が本明細書にさらに提供される。

【0148】

ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレエート、DOTAP、免疫刺激物質、および RNA を含む乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。免疫刺激物質が、産生されるタンパク質の総量を減少させるが、ワクチンに対する免疫応答を増加させる、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレエート、DOTAP、およびスクアレンを含み、固体粒子を含まない、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。エステルの比が、8 ~ 11 の親水性 - 親油性バランスを生じさせる、乾燥組成物が本明細書

にさらに提供される。粒子径が、 $30\text{ nm} \sim 200\text{ nm}$ である、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。N：Pの比が、 $5 \sim 35$ である、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。免疫刺激物質が、産生されるタンパク質の総量を増加させるが、ワクチンに対する免疫応答を減少させる、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。免疫刺激物質が、カプリル酸／カプリン酸トリグリセリド、または飽和ココナツ油／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステルの少なくとも1つである、乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄、二酸化チタン、二酸化ケイ素 (SiO_2)、ヒドロキシリン酸アルミニウム ($\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$)、リン酸カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)、カルシウムヒドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)、グルコン酸鉄、または硫酸鉄を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、マグネタイト (Fe_3O_4)、マグヘマイト ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、ウスタイト (FeO)、もしくはヘマタイト ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、またはそれらの任意の組合せを含む、組成物が本明細書にさらに提供される。

10

【0149】

(a) 脂質キャリアであって、脂質キャリアが、疎水性コア、および1つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリア；(b) 必要に応じて1つまたは複数の核酸；ならびに(c) (i) 乾燥組成物の少なくとも約50重量%、または(ii) 少なくとも約50mgの量で存在する少なくとも1つの糖を含む乾燥組成物が本明細書にさらに提供される。凍結乾燥されている組成物が本明細書にさらに提供される。摂氏約25度で熱的に安定である組成物が本明細書にさらに提供される。摂氏約45度で熱的に安定である組成物が本明細書にさらに提供される。摂氏約-20度で熱的に安定である組成物が本明細書にさらに提供される。摂氏約2度～摂氏約8度で熱的に安定である組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1週間、少なくとも2週間、および／または少なくとも1か月間、熱的に安定である組成物が本明細書にさらに提供される。疎水性コアが、油を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。油が、 α -トコフェロール、ラウロイルポリオキシシルグリセリド、モノアシルグリセロール、プロポリス、スクアレン、鉱物油、ブドウ種子油、オリーブ油、パラフィン油、ピーナツ油、大豆油、ヒマワリ油、大豆レシチン、トリグリセリド、ビタミンE、カプリル酸／カプリン酸トリグリセリド、飽和ココナツ油／パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステル、ジヒドロイソスクアレン (DHIS)、ファルネセン、ならびにスクアレンの少なくとも1つを含む、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の脂質が、カチオン性脂質を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。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ウム)プロパン (DOTAP)；3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル] コレステロール (DCコレステロール)；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 (C16:0)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 (DOEPC)；1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン (DODAP)；および1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLindMA)；1,1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ビス(ドデカン-2-オール))(C12-200)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエ

20

30

40

50

タノールアミン (DOPE) ; N-デシル-N, N-ジメチルデカン-1-アミニウムブロミド (DDAB) ; 2, 3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA) ; エチルホスファチジルコリン (ePC) ; およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書にさらに提供される。脂質キャリアが、少なくとも1つの界面活性剤を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの界面活性剤が、疎水性界面活性剤、親水性界面活性剤、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書にさらに提供される。疎水性界面活性剤が、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、ソルビタントリステアレート、ソルビタンモノオレエート、およびソルビタントリオレエートからなる群から選択されるソルビタンエステルを含み ; 親水性界面活性剤が、ポリソルベートを含む、組成物が本明細書にさらに提供される。脂質キャリアが、約0.1~約0.4の範囲の平均多分散指数で、約40nm~約150nmの範囲のz平均流体力学直径を有する、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、DNAである、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、RNAである、組成物が本明細書にさらに提供される。RNAが、自己複製性RNAである、組成物が本明細書にさらに提供される。疎水性コアが、1つまたは複数の無機ナノ粒子を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、金属塩、金属酸化物、金属水酸化物、金属リン酸塩、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の核酸が、脂質キャリアに組み込まれるか、またはそれと複合体化して、脂質キャリア-核酸複合体を形成する、組成物が本明細書にさらに提供される。脂質キャリア-核酸複合体が、非共有結合性相互作用を介して、または可逆的な共有結合性相互作用を介して形成される、組成物が本明細書にさらに提供される。窒素のホスフェートに対する(N:P)モル比によって特徴付けられる脂質キャリアの1つまたは複数の核酸に対するモル比が、約1:1~約150:1の範囲である、組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの糖が、スクロース、マルトース、トレハロース、マンニトール、グルコース、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの糖が、少なくとも約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300mg、またはそれよりも多くの量で存在する、組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの糖が、50mg~250mgの量で存在する、組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの糖が、少なくとも約250mgの量で存在する、組成物が本明細書にさらに提供される。糖が、組成物の少なくとも50、55、60、65、70、75、80、85、90、95重量%、またはそれよりも多くの量で存在する、組成物が本明細書にさらに提供される。糖が、組成物の80~98%、必要に応じて94~96重量%の量で存在する、組成物が本明細書にさらに提供される。糖が、組成物の約95重量%の量で存在する、組成物が本明細書にさらに提供される。少なくとも1つの糖が、スクロースを含む、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、オキシ水酸化アルミニウム、酸化鉄、二酸化チタン、二酸化ケイ素 (SiO_2)、ヒドロキシリン酸アルミニウム ($Al(OH)_x(PO_4)_y$)、リン酸カルシウム ($Ca_3(PO_4)_2$)、カルシウムヒドロキシアパタイト ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)、グルコン酸鉄、または硫酸鉄を含む、組成物が本明細書にさらに提供される。1つまたは複数の無機ナノ粒子が、マグネタイト (Fe_3O_4)、マグヘマイト ($\gamma-Fe_2O_3$)、ウスタイト (FeO)、もしくはヘマタイト (アルファ (α)- Fe_2O_3)、またはそれらの任意の組合せを含む、組成物が本明細書にさらに提供される。

【0150】

最大で約200マイクログラム (μg) の量で存在する核酸 ; 最大で約1.5mg/mlの濃度で存在するカチオン性脂質 ; 最大で約0.01mg/mlの濃度で存在する酸化

10

20

30

40

50

鉄；最大で約 1.88 mg/ml の濃度で存在するスクアレン；最大で約 1.86 mg/ml の濃度で存在するソルビタンモノステアレート；最大で約 1.86 mg/ml の濃度で存在するポリソルベート 80；最大で約 50 mg/ml の濃度で存在するスクロース；および必要に応じて最大で約 2.1 mg/ml の濃度で存在するクエン酸一水和物を含む組成物が本明細書にさらに提供される。核酸が、RNA または DNA である、組成物が本明細書にさらに提供される。核酸が、RNA であり、最大で約 50 µg の量で存在する、組成物が本明細書にさらに提供される。

【0151】

本明細書に提供される医薬組成物および対象への投与のための送達システムを含む、キットが本明細書にさらに提供される。それぞれ、脂質キャリアおよび核酸を含む、2 つまたはそれよりも多くの別々のユニットを含む、キットが本明細書にさらに提供される。脂質キャリアおよび核酸を含むユニットを含む、キットが本明細書にさらに提供される。乾燥組成物の水和のための試薬を含むユニットをさらに含む、キットが本明細書にさらに提供される。水和のための試薬が、水を含む、キットが本明細書にさらに提供される。

10

【0152】

対象における免疫応答を生じさせるための方法であって、治療有効量の本明細書に提供される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0153】

対象における疾患を処置または防止する方法であって、治療有効量の本明細書に提供される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

20

【0154】

対象における 1 つまたは複数の核酸の送達をイメージングおよび／または追跡する方法であって、治療有効量の本明細書に記載される医薬組成物を投与するステップを含む、方法が本明細書にさらに提供される。

【0155】

以下の実施例は、本明細書に開示される実施形態の原理およびプラクティスを当業者により明確に説明するために示され、任意の特許請求の範囲に記載の実施形態の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。他に述べられない限り、すべての部およびパーセンテージは、重量基準である。

30

【実施例】

【0156】

（実施例 1）

一般的な生成技法および用いた材料

以下の材料を、脂質キャリアが、疎水性コア、1 つまたは複数の無機ナノ粒子および 1 つまたは複数の脂質を含むナノエマルジョンである、脂質キャリアの製造において使用した。

【0157】

剤は、スクアレン、ソルビタンモノステアレート（SPAN（登録商標）60）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート（TWEEN（登録商標）80）、DOTAP クロリド、酸化鉄ナノ粒子およびクエン酸ナトリウム二水和物を含む。一般に、5 nm の数—重量平均直径を有する酸化鉄ナノ粒子に、クロロホルムを添加した。クロロホルムを、ドラフト中で蒸発させ、酸化鉄ナノ粒子の乾燥コーティングが残った。酸化鉄ナノ粒子に、SPAN（登録商標）60、スクアレン、および DOTAP クロリドを添加して、「油」相を調製した。油相を、60℃に事前に加熱した水浴中で 30 分間超音波処理した。別々に、1 リットルのガラスボトル中で、「水」相を、TWEEN（登録商標）80 を、Milli-Q 水を用いて調製されたクエン酸ナトリウム二水和物溶液に添加することによって調製した。水相を 30 分間攪拌して、TWEEN（登録商標）80 を完全に溶解させた。TWEEN（登録商標）80 の完全な溶解後、水相を、ビーカーに移し、60℃に事前に加熱した水浴中でインキュベートした。加熱した油相に、事前に加熱され

40

50

た水相を添加した。混合物を、乳様の外観を有する均質なコロイドが生成するまで、VWR 200ホモジナイザー（VWR International）を使用して、直ぐに乳化した。コロイドを、その後、20,000psiで、LM10マイクロフルイダイザーのY型相互作用チャンバーに流体を通過させることによって、処理した。流体を、動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、0.2の多分散指数で、59nmになるまで、通過させた。マイクロフルイダイズされた脂質キャリア試料を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン（PES）注射器フィルターで濾過した。

（実施例2）

脂質キャリア+RNA-分泌型胚性アルカリホスファターゼ（SEAP）複合体の調製。
【0158】

脂質キャリア+RNA-SEAP複合体を調製し、凍結乾燥のために三反復で等分した。本明細書のどこかに記載されるFe-脂質キャリアは、37.5mg/mlのスクアレン（SEPPIC）、37mg/mlのSPAN（登録商標）60（Millipore Sigma）、37mg/mlのTWEEN（登録商標）80（Fisher Chemical）、30mg/mlのDOTAPクロリド（LIPOID）、0.2mg Fe/mlの12nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子（Imagion Biosystems, San Diego, CA, USA）および10mMのクエン酸ナトリウム二水和物（Fisher Chemical）を含む。脂質試料は、比較のために省いた。試料を収集し、再構成のために選択した。次いで、凍結乾燥ケーキの外観を記録した。次いで、すべての凍結乾燥ケーキを、0.7mlのmilliQ水中で再構成した。次いで、（i）粒子径、（ii）サイズ分布、（iii）RNA完全性、（iv）DOTAPおよびスクアレン含有量、ならびに（v）in vitroタンパク質発現の測定を含む、再構成された材料の物理化学的性質を測定した。結果を下記に示す。表2は、脂質キャリア+RNA-SEAP複合体の調製において使用される材料を開示する。

【表2】

表 2: 脂質キャリア+RNA-SEAP 複合体の調製のための材料。

名称	供給業者(適用可能な場合)	分子量	濃度
Fe-脂質キャリア	--		30mg の DOTAP/ml
NLC	--		30mg の DOTAP/ml
repRNA-SEAP(配列番号 1)	--		1015ng の RNA/ul
スクロース	EMD Millipore	342.3	
D-グルコース	JT Baker	180.16	
D-マンニトール	VWR	182.17	
マルトースー水和物	Sigma	360.31	
トレハロース二水和物	Sigma	378.33	
クエン酸ナトリウム	Teknova		1M

【0159】

凍結乾燥のための条件を、表3～5に下記の通り示す。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3: 凍結乾燥サイクル#1。

時間[時間]	T[C]	P[mTorr]
0	20	760000
1.5	-50	760000
2	-50	760000
2.1	-50	50
2.5	-30	50
20	-30	50
20.5	25	50
22	25	50
22.1	25	760000

10

【表 4】

表 4: 凍結乾燥サイクル#2。

時間[時間]	T[C]	P[mTorr]
0	20	760000
1.5	-65	760000
2	-65	760000
2.1	-65	15
2.5	-50	15
24	-50	15
24.5	25	15
26	25	15
26.1	25	760000

20

30

40

50

【表 5】

表 5: 凍結乾燥サイクル#3。

時間[時間]	T[C]	P[mTorr]
0	20	760000
1.5	-65	760000
2	-65	760000
2.1	-65	15
2.5	-50	15
26.5	-50	15
26.6	-30	15
46	-30	15
48	25	15
48.1	25	760000

10

20

【0160】

希釈剤の調製：糖およびクエン酸塩を含む希釈剤を、表 6 に概説されるようにして調製した。それぞれの糖を、50ml の RNase を含まないコニカル管に量りとった。約 35 ~ 40 ml のヌクレアーゼを含まない水を添加して、糖を溶解し、必要により、わずかに加熱し、超音波処理を使用した。0.5 ml の 1 M のクエン酸 Na、pH = 6 の溶液をピペットで入れる。すべての糖が溶解し、溶液が透明になった後、コニカル管において、50 ml のマークまで、ヌクレアーゼを含まない水で、Q.S. にした。希釈剤を 0.22 μm の STERIFLIP（登録商標）で濾過し、無菌を維持するために、無菌でキャップをしめた。

【表 6】

30

表 6: 希釈剤の調製。

希釈剤	組成物 ID	総体積[ml]	実際の質量[g]	計算濃度[g/L]
22%スクロース/10mM のクエン酸塩	22%スクロース	50.0	11.1	222.0
50%スクロース/10mM のクエン酸塩	50%スクロース	50.0	25.0	500.0
22%マルトース/10mM のクエン酸塩	22%マルトース	50.0	11.7	233.7
22%トレハロース/10mM のクエン酸塩	22%トレハロース	50.0	12.3	245.4
11%グルコース/10mM のクエン酸塩	11%グルコース	50.0	5.6	111.0
11%マンニトール/10mM のクエン酸塩	11%マンニトール	50.0	5.6	111.0

40

【0161】

プレ複合体製剤の調製：脂質キャリア「DS」は、30 mg の DOTAP / ml のバルク溶液であり、Fe-脂質キャリア製剤を指し、その調製は、実施例 8 に記載する。

【0162】

5 倍の 50 % のスクロース組成の脂質キャリアを希釈して、2 × 6 mg の DOTAP / ml の脂質キャリア「DP」を作製したのを除いて、10 倍の脂質キャリア「DS」（30 mg の DOTAP / ml）を、それぞれの希釈剤に希釈して、3 mg の DOTAP / m

50

l の脂質キャリア「DP」を作製した。液体製剤中の標的RNA濃度は、50 ng / μ l であり、15のN：Pで、脂質キャリアと複合体化した。これは、バイアルあたり25 μ g のRNA用量をシミュレートする。表7は、プレ複合体の脂質キャリア複合体の調製を開示する。未使用の脂質キャリアを、摂氏2～8度で貯蔵した。

【表7】

表 7: プレ複合体脂質キャリア調製物。

組成物 ID	脂 質 キャリア DS[ul]	希釈剤[ul]	合計[ul]
22%スクロース	420	3780	4200
50%スクロース	420	1680	2100
22%マルトース	420	3780	4200
22%トレハロース	420	3780	4200
11%グルコース	420	3780	4200
11%マンニトール	420	3780	4200
マルトースー水和物	Sigma	360.31	
トレハロースニ水和物	sigma	378.33	
クエン酸ナトリウム	Teknova		1M

【0163】

表8は、プレ複合体のナノ構造脂質キャリア（NLC）複合体の調製を開示する。NLCを対照として使用した。未使用のNLCを、新鮮な複合体対照のために、摂氏2～8度で貯蔵した。

【表8】

表 8: プレ複合体 NLC 調製物。

組成物 ID	NLC[ul]	希釈剤[ul]	合計[ul]
22%スクロース	420	3780	4200

【0164】

RNAプレ複合体の調製を表9に開示する。RNAストックを調製した。アリコートあたり50%のスクロースのために約7.5 mlまたは0.63 mlに分け、摂氏-80度で貯蔵した。

【表9】

表 9: RNA プレ複合体の調製物。

組成物 ID	RNA スト ック[ul]	5mM のクエン酸塩 [ul]	合計[ul]	プレ複合体の実際の RNA 濃度 [ng/ul]
すべて	2141.4	19593.6	21735.0	107.3
50%スクロース	356.9	1454.4	1811.3	221.0

【0165】

脂質キャリアーRNA複合体の調製を表9に開示する。RNAストックを調製した。凍

結乾燥（lyo）サイクルごとの複合体化ごとに、希釈されたRNAの体積は、（+5%）であり、希釈された脂質キャリアは、（+5%）であった。

【0166】

脂質キャリア+RNAまたはNLC+RNAの複合体を、1：1の体積で、上記に記載の表8および表9に列挙されたそれぞれの希釈製剤を、表10に開示されたRNAを希釈した対応する「組成物ID」と混合することによって、調製した。複合体を、凍結乾燥サイクルまたは長期貯蔵条件に付す前に、室温で30分間平衡化した。

【表10】

表 10: 脂質キャリア-RNA プレ複合体の調製物。

組成物 ID	希 釈 RNA	希釈脂質キ ャリア	希 釈 NLC[ul]	合計 [ul]	最終 RNA 濃度 [ng/ul]	最 終 糖 濃 度 [%w/v]
22%スクロース	1102.5	1102.5		2205	50	10
50%スクロース	551.25	551.25		1102.5	100	20
22%マルトース	1102.5	1102.5		2205	50	10
22%トレハロース	1102.5	1102.5		2205	50	10
11%グルコース	1102.5	1102.5		2205	50	5
11%マンニトール	1102.5	1102.5		2205	50	5
22%スクロース	1102.5		1102.5	2205	50	10

（実施例3）

粒子径測定。

【0167】

製剤を、使い捨てサイジングキュベットDTS0012において、900μlのmilliQ水を10μlのGLB51-F04-20-02に添加することによって、100倍希釈した。ボルテックスし、泡を、キュベットを軽くタッピングすることによって除去した。粒子径を、zetasisizer ULTRAにおいて、MALDS法によって測定した。最低で5つの測定値を収集した。平均z平均直径、および平均PDIを、後方散乱（173°）測定から記録した。

（実施例4）

アガロースゲル電気エイドによるRNA完全性。

【0168】

試料を、50ng／μlの複合体を、10ng／μlのヌクレアーゼを含まない水：12μlの複合体+48μlの水で、5倍希釈することによって調製した。60μlのフェノール：クロロホルムを添加し、10～15回反転させて、RNAを抽出した。15分間遠心分離して、10μlの上清を除去し、10μlのグリオキサールロード色素と混ぜ、それに続いて、摂氏50度に30分間加熱することによって、RNAを変性させた。レーンあたり10μlをロードした。

（実施例5）

BHK21細胞のSEAP発現。

【0169】

細胞トランスフェクション：96ウェルプレートに、トランスフェクションの1日前に、1.5×10⁵個細胞／mLで事前に播種した。トランスフェクションの日に、増殖培地を、ピペティングによってプレートから除去した。50μLのRNA：脂質キャリア混合物および50μLのOpti-MEM（商標）（Thermo Fisher Sc

ientific、Waltham、MA USA)を、BHK21(ベビーハムスター腎臓線維芽細胞)細胞に添加した。細胞を4時間インキュベートした。RNA:脂質キャリアおよびOpti-MEM(商標)培地を、ピペティングによって除去し、DMEM増殖培地で置き換えた。細胞を終夜インキュベートした。

【0170】

上清におけるSEAP発現の評価:SEAPレポーターアッセイキット(商標)(Novus Biologicals NPB2-25285)のキットを使用して、上清におけるSEAPレベルを測定した。上清を、製造業者の推奨プロトコールに従って、未希釈で分析した。

(実施例6)

サイクル#1後の特徴付けデータ

【0171】

すべての凍結乾燥ケーキは、サイクル#1後に時間=0時間で良好な完全性を示した。5%のグルコースにおける脂質キャリア+RNA-SEAPの完全性は、摂氏25度で24時間後に、部分的に損なわれた。すべての他の製剤の完全性は保存された。本明細書のどこかに記載されるFe-脂質キャリアは、37.5mg/mlのスクアレニ(SEPIC)、37mg/mlのSPAN(登録商標)60(Millipore Sigma)、37mg/mlのTWEEN(登録商標)80(Fisher Chemical)、30mg/mlのDOTAPクロリド(LIPOID)、0.2mg Fe/mlの12nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子(Imagion Biosystems)および10mMのクエン酸ナトリウム二水和物(Fisher Chemical)を含む。10%のスクロースにおけるNLC+RNA-SEAPおよび5%のグルコースにおける脂質キャリア+RNA-SEAPの製剤からのケーキは、摂氏42度で24時間後に著しく縮んだ。すべての他の製剤の完全性は保存された。図2~4は、凍結乾燥サイクル#1後の示された糖組成における凍結乾燥ケーキの外観を図示する。図2は、時間=0時間での示された糖組成におけるNLCおよび脂質キャリアケーキの外観を図示する。図3は、t=摂氏25度および摂氏42度で24時間後の示された糖組成におけるNLCおよび脂質キャリアケーキの外観を図示する。図4は、t=摂氏25度および摂氏42度で24時間での示された糖組成におけるNLCおよび脂質キャリアケーキの外観を図示する。

【0172】

凍結乾燥サイクル#1後の摂氏25度および摂氏42度で示された糖組成における貯蔵1日後の再構成ケーキの粒子径を、図4A~4Bにおけるようにして測定した。図5Aは、示された糖組成における時間=0時間での液体製剤と比べた粒子径の倍数変化を示す。図5Bは、示された糖組成におけるそれらの対応する液体製剤と比べた再構成凍結乾燥製剤のPDIの点変化を示す。平均サイズおよびサイズ分布の値を表11に示す。すべての再構成された凍結乾燥製剤は、再構成後に、脂質キャリア+RNA複合体のサイズの増加をもたらした。凍結保護物質としてスクロースを含有するすべての再構成された製剤は、摂氏25度で時間=0時間および24時間で最小限のPDI変化をもたらした。

【0173】

表11に記載される凍結乾燥(t=0)は、凍結乾燥サイクルの完了と同じ日に再構成された凍結乾燥製剤を指す。表11に記載される液体は、凍結乾燥製剤の同等の液体(非凍結乾燥)製剤を指す。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 11: 凍結乾燥サイクル#1 の平均 z 平均直径および平均 PDI。

平均 z 平均直径[nm]							
	10%スクロース [NLC]	10% スクロース [脂質キャ リア]	20%スクロース [脂質キャリア]	10% マルトース [脂質キャ リア]	10% トレハロール [脂質キャ リア]	5% マンニトール [脂質キャ リア]	5% グルコース [脂質キャ リア]
液体	74.7	80.5	98.1	76.3	77.3	74.7	73.6
凍結乾燥 t=0	98.3	99.8	113.3	158.9	153.0	327.1	153.2
t=摂氏 25 度にお ける凍結乾燥 24 時間	103.0	103.7	120.3	158.0	179.1	199.4	168.6
t=摂氏 42 度にお ける凍結乾燥 24 時間	121.1	95.4	118.2	153.7	157.5	238.4	353.0
平均 PDI							
液体	0.21	0.22	0.25	0.21	0.19	0.20	0.19
凍結乾燥 t=0	0.23	0.22	0.24	0.33	0.30	0.63	0.28
t=摂氏 25 度にお ける凍結乾燥 24 時間	0.26	0.23	0.24	0.36	0.45	0.35	0.27
t=摂氏 42 度にお ける凍結乾燥 24 時間	0.17	0.21	0.20	0.34	0.36	0.46	0.30

10

20

凍結乾燥サイクル # 1 後のアガロースゲル電気泳動による RNA 完全性：

【0 1 7 4】

脂質キャリア + RNA および NLC + RNA 製剤について、凍結乾燥サイクル # 1 後の示された糖組成におけるアガロースゲル電気泳動による RNA 完全性を、図 6 A ~ 6 B に図示する。図 6 A は、脂質キャリア + RNA 製剤について、凍結乾燥サイクル # 1 後の示された糖組成におけるアガロースゲル電気泳動による RNA 完全性を示す。図 6 B は、脂質キャリア + RNA および NLC + RNA 製剤について、凍結乾燥サイクル # 1 後の示された糖組成におけるアガロースゲル電気泳動による RNA 完全性を示す。

30

【0 1 7 5】

摂氏 25 度および摂氏 42 度の凍結乾燥ケーキを、再構成の前に 24 時間貯蔵した。再構成、および脂質キャリア + RNA - SEAP からの RNA - SEAP のフェノール：クロロホルム抽出後のすべての凍結乾燥試料は、図 6 A ~ 6 B に示されるように、ネイキッド RNA - SEAP 陽性対照と関係がある規定の RNA バンドを示した。図 6 A は、摂氏 42 度で 24 時間貯蔵された 10 % のスクロースにおける脂質キャリア + RNA - SEAP 複合体の液体製剤が、液体として貯蔵された場合に、分解の加速を示唆する RNA バンド強度の有意な減少をもたらしたが、乾燥凍結乾燥形態で貯蔵されていない場合には、分解の加速を示唆する RNA バンド強度の有意な減少をもたらさなかったことを示す。

40

【0 1 7 6】

凍結乾燥は、摂氏 42 度での貯蔵で、液体脂質キャリア + RNA 製剤における RNA 完全性を保存した。

凍結乾燥サイクル # 1 後の BHK 21 細胞の SEAP 発現：

【0 1 7 7】

脂質キャリア + repRNA および NLC + repRNA - SEAP 製剤について、凍結乾燥サイクル # 1 後の示された糖組成における BHK 21 細胞の SEAP 発現を、図 7 A ~ 7 G に図示する。図 7 A は、10 % のトレハロースにおける脂質キャリア + repR

50

RNA-SEAPについての相対発光単位 (RLU) を示す。図 7 B は、5 % のマンニトールにおける脂質キャリア+repRNA-SEAPについての相対発光単位 (RLU) を示す。図 7 C は、10 % のスクロースにおける脂質キャリア+repRNA-SEAPについての相対発光単位 (RLU) を示す。図 7 D は、20 % のスクロースにおける脂質キャリア+repRNA-SEAPについての相対発光単位 (RLU) を示す。図 7 E は、5 % のグルコースにおける脂質キャリア+repRNA-SEAPについての相対発光単位 (RLU) を示す。図 7 F は、10 % のマルトースにおける脂質キャリア+repRNA-SEAPについての相対発光単位 (RLU) を示す。図 7 G は、10 % のスクロースにおけるNLC+repRNA-SEAPについての相対発光単位 (RLU) を示す。

【0178】

比較のために、細胞に、示された糖組成において、新たに調製された脂質キャリア+RNA-SEAPをトランスフェクトした。追加の安定性の比較として、細胞に、摂氏25度で24時間または摂氏42度で24時間貯蔵された10 % のスクロースにおける脂質キャリア+RNA-SEAPの液体製剤をトランスフェクトした。後者の条件は、in vitroタンパク質発現における分解されたRNAの効果を測定するための対照としての役割を果たした。図 7 A ~ 7 G は、時間=0時間または摂氏25度で24時間後の再構成されたすべての凍結乾燥製剤が、対応する新たに調製された脂質キャリア+RNA-SEAP複合体と比べて、RNA用量依存性の発現プロファイルの変化をもたらさなかったことを図示する。液体製剤において摂氏42度で24時間貯蔵された10 % のスクロースにおける脂質キャリア+RNA-SEAP (図 7 C) は、凍結乾燥製剤と比較して、有意に減少したSEAP発現をもたらした。10 % のトレハロース (図 7 A)、20 % のスクロース (図 7 D) および10 % のマルトース (図 7 F) も、摂氏42度で24時間貯蔵後に、SEAP発現によって測定されるように、RNA-SEAPの効力を保存した。最後に、摂氏42度で、5 % のマンニトール (図 7 B) または5 % のグルコース (図 7 E) を含有する凍結乾燥された脂質キャリア+RNA-SEAPは、それらの対応する新たに調製された液体製剤と比べて、SEAPの用量依存性の発現プロファイルの著しい減少をもたらした。比較のために、NLCを、10 % のスクロースにおいてRNA-SEAPを用いて調製した (図 7 G)。

凍結乾燥サイクル#1後の脂質キャリア+RNA-SEAPケーキの外観：

【0179】

図 8 および図 9 は、サイクル#1後のさまざまな時点での示された糖組成における脂質キャリア+RNA-SEAPケーキの外観を示す。すべての凍結乾燥ケーキは、サイクル#1後に時間=0時間で良好な完全性を示した。図 8 は、凍結乾燥サイクル#1後の示された糖組成におけるさまざまな時点 (時間=0時間、摂氏25度で6日後および摂氏25度で1か月後) での脂質キャリア+RNA-SEAPケーキの外観を図示する。図 8 は、5 % のグルコースにおける脂質キャリア+RNA-SEAPの完全性が、摂氏25度で6日後および摂氏25度で1か月後に有意に損なわれたことを示す。10 % のスクロースにおけるNLC+RNA-SEAPの完全性は、摂氏25度で6日後に部分的に損なわれ、摂氏25度で1か月後に有意に損なわれた。すべての他の製剤の完全性は、摂氏25度で1か月後に保存された。

【0180】

図 9 は、凍結乾燥サイクル#1後の示された糖組成におけるさまざまな時点 (時間=0時間、摂氏42度で24時間後、および摂氏42度で3日後、および摂氏42度で1か月後) での脂質キャリア+RNA-SEAPケーキの外観を図示する。図 8 は、すべてのスクロースおよびグルコースを含有する製剤が、摂氏42度での貯蔵の24時間後、3日後、および1か月後に次第に縮んだことを示す。すべての他の製剤の完全性は、摂氏42度で1か月後に保存された。

(実施例7)

サイクル#3後の特徴付けデータ

凍結乾燥サイクル#3後の粒子径：

【0181】

凍結乾燥サイクル#3後の示された糖組成における摂氏25度および摂氏42度での貯蔵1日後の再構成ケーキの粒子径を、図10A～10Bにおけるようにして測定した。図10A～10Bは、凍結乾燥サイクル#3後の示された糖組成における貯蔵1日後の再構成ケーキの粒子径を図示する。図10Aは、示された糖組成における再構成製剤のPDIの点変化を示す。図10Bは、脂質キャリア+RNAの新鮮な複合体と比べた粒子径のlog10倍数変化を示す。

【0182】

平均サイズおよびサイズ分布の値を表12に示す。摂氏25度または摂氏42度で1か月間貯蔵されたすべての凍結乾燥製剤は、再構成後に複合体のサイズの増加をもたらした。20%のスクロースにおいて調製された脂質キャリア+RNA-SEAPは、図10A～10Bに示されるように、摂氏5度で1か月間貯蔵された液体製剤と比べて、粒子径の最も小さい倍数変化および最低限のPDIの変化をもたらした。

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 12: 凍結乾燥サイクル#3 後の平均 z 平均直径および平均 PDI。

平均 Z 平均直径[nm]			
	摂氏 5 度 (液体)	摂氏 25 度 (凍結乾燥)	摂氏 42 度 (凍結乾燥)
以下で 1 か月貯蔵:			
10%スクロース(液体)	x	81.6	82.5
10%スクロース	79.3	112.4	830.7
20%スクロース	112.6	129.4	159.0
10%トレハロース	77.6	270.7	153.7
5%グルコース	75.0	583.6	711.9
5%マンニトール	73.3	559.0	488.0
10%マルトース	76.5	164.1	2370.3
10%スクロース(NLC)	74.8	423.8	634.9
10%スクロースにおける新たな複合体 (t=0)	94.1		
平均 PDI			
	摂氏 5 度 (液体)	摂氏 25 度 (凍結乾燥)	摂氏 42 度 (凍結乾燥)
以下で 1 か月貯蔵:			
10%スクロース(液体)	x	0.215	0.142
10%スクロース	0.220	0.197	0.648
20%スクロース	0.225	0.278	0.277
10%トレハロース	0.204	0.312	0.305
5%グルコース	0.193	0.564	0.625
5%マンニトール	0.189	0.468	0.483
10%マルトース	0.202	0.330	1.238
10%スクロース(NLC)	0.202	0.452	0.540
10%スクロースにおける新たな複合体 (t=0)	0.268		

凍結乾燥サイクル # 3 後のアガロースゲル電気泳動による RNA 完全性：

【 0 1 8 3 】

凍結乾燥サイクル # 3 後の示された糖組成におけるアガロースゲル電気泳動による RNA 完全性を図 1 1 に図示する。液体製剤および凍結乾燥製剤の両方を、摂氏 2 5 度および摂氏 4 2 度で 1 か月間貯蔵した。図 1 1 は、バンドの光学密度 (OD) % が、1 0 % のスクロースにおける新たに調製された脂質キャリア + RNA - SEAP から抽出された RNA - SEAP に対して正規化されたことを示す。摂氏 4 2 度で 1 か月間貯蔵された、液体または凍結乾燥のすべての試料は、RNA - SEAP の完全な分解を示す検出可能な RNA バンドを示さなかった。1 0 % のスクロースにおける NLC + RNA - SEAP および

5 % のマンニトールにおける脂質キャリア + RNA - SEAP を除いて、すべての凍結乾燥された脂質キャリア + RNA - SEAP 製剤は、摂氏 5 度で 1 か月間液体形態で貯蔵された脂質キャリア + RNA - SEAP よりも、摂氏 25 度で 1 か月間、RNA - SEAP をより良好に保護した。摂氏 25 度で 1 か月間液体として貯蔵された 10 % のスクロースにおける脂質キャリア + RNA - SEAP は、完全であった。比較において、凍結乾燥形態で摂氏 25 度で貯蔵された場合に、RNA - SEAP は、新鮮な複合体と比べて 50 % の OD であり、液体形態で摂氏 5 度で貯蔵された場合、23 % の OD であった。20 % のスクロースまたは 10 % のマルトースにおいて製剤化された脂質キャリア + RNA - SEAP は、摂氏 25 度で 1 か月貯蔵後に、RNA - SEAP を有意に保存した。

凍結乾燥サイクル # 3 後の BHK 21 細胞の SEAP 発現：

10

【0184】

凍結乾燥サイクル # 3 後の示された糖組成における BHK 21 細胞の SEAP 発現を図 12 に図示する。平均 SEAP 発現レベルを、12.5 ng / ウェルの単一 RNA トランスフェクション用量について示した。比較のために、細胞に、図 12 に示されるように、10 % のスクロースにおける新たに調製された脂質キャリア + RNA - SEAP をトランスフェクトした（上側の点線）。摂氏 42 度で 1 か月間貯蔵された 10 % のスクロースにおける脂質キャリア + RNA - SEAP の液体製剤をトランスフェクトした細胞は、*in vitro* タンパク質発現に対する分解した RNA の効果を測定するための比較としての役割を果たした（下側の点線）。摂氏 42 度で 1 か月間貯蔵されたすべての凍結乾燥試料からの発現は、摂氏 42 度で 1 か月間液体形態で貯蔵された 10 % のスクロースにおける脂質キャリア + RNA - SEAP の発現レベルであったか、またはそれを下回った。摂氏 25 度で 1 か月間貯蔵された 10 % のスクロース、20 % のスクロース、10 % のトレハロースおよび 10 % のマルトースにおける凍結乾燥された脂質キャリア + RNA - SEAP 複合体は、摂氏 5 度で液体形態で 1 か月間貯蔵された同じ組成物よりも高い SEAP 発現をもたらした。

20

（実施例 8）

マクロファージの免疫応答。

【0185】

脂質キャリアおよび repRNA のさまざまな製剤を調製し、分析して、マクロファージにおける脂質キャリアの自然免疫応答をアッセイした。THP-1 マクロファージにおけるタンパク質発現および TNF 産生の刺激を研究した。

30

【0186】

最初に、THP-1 単球を、ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート（PMA）を使用して、マクロファージに分化させた。次いで、細胞に、NanoLuciferase コードレプリコン RNA（配列番号 2）を有するさまざまな製剤をトランスフェクトした。次いで、細胞培養培地を、NanoLuc および TNF 発現について評価した。

【0187】

このアッセイにおいて使用された、製剤、ならびに粒子径および PDI などのそれらの特徴を表 13 に記載する。repRNA コード NanoLuc の濃度は、909 ng / μ l であり、摂氏 -80 度で維持した。飽和ココナツ油 / パーム核油由来カプリルおよびカプリン脂肪酸と植物由来グリセロールのトリグリセリドエステルである MIGLYOL（登録商標）812 N を、このアッセイにおいて使用した。

40

【表 1 3】

表 13: 製剤。

製剤	粒子径 [直径、 nm]	PDI	鉄 [mg Fe/ml]	アルミニウム [mg Al/ml]	DOTAP [mg/ml]	スクアレン [mg/ml]	MIGLYOL [mg/ml]	ソラネソ ー ル [mg/ml]
Fe-脂質キ ャリア	59.3	0.23	0.19	n/a	27.9	39.4	n/a	n/a
高 Fe-脂質 キャリア	57.5	0.24	0.85	n/a	29.1	40.5	n/a	n/a
Fe-脂質キ ャリ ア MIGLYOL	48.7	0.2	0.18	n/a	28.3	n/a	測定せず	n/a
高 Fe-脂質 キャリア MIGLYOL	62.6	0.28	0.94	n/a	27.7	n/a	測定せず	n/a
ミョウバン- 脂質キャリア ア	64.5	0.25	n/a	0.88	27.4	41.2	n/a	n/a
Fe-脂質キ ャリアソラネ ソ ー ル (SLN)	86.1	0.26	0.16	n/a	26.2	n/a	n/a	36
NLC	50	0.26	n/a	n/a	26.7	34.1	n/a	n/a
CNE	105.4	0.06	n/a	n/a	4.4	47.4	n/a	n/a
脂質キャリア ア(w/o IO)	54.2	0.22	n/a	n/a	19.3	32.6	n/a	n/a

【0188】

Fe-脂質キャリア製剤（100mlスケールで調製）：Fe-脂質キャリア製剤は、37.5mg/mlのスクアレン（SEPPIC）、37mg/mlのSPAN（登録商標）60（Millipore Sigma）、37mg/mlのTWEEN（登録商標）80（Fisher Chemical）、30mg/mlのDOTAPクロリド（LIPOID）、0.2mg Fe/mlの12nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子（Imagion Biosystems）および10mMのクエン酸ナトリウム二水和物（Fisher Chemical）を含む。1mlのクロロホルム（Imagion Biosystems、ロット番号95-127）中の20mg Fe/mlの直径12nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を、4：1のアセトン：クロロホルム（v/v）溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後

、揮発性溶媒（アセトンおよびクロロホルム）を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN（登録商標）60、および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN（登録商標）80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR 200ホモジナイザー（VWR International）を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1~0.25の多分散指数（PDI）で、40~80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー（Microfluidics）を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン（PES）フィルターで濾過し、摂氏2~8度で貯蔵した。鉄濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、RP-HPLCによって測定した。

10

20

30

40

50

【0189】
高Fe-脂質キャリア製剤（100mlスケールで調製）：高Fe-脂質キャリア製剤は、37.5mg/mlのスクアレン（SEPPIC）、37mg/mlのSPAN（登録商標）60（Millipore Sigma）、37mg/mlのTWEEN（登録商標）80（Fisher Chemical）、30mg/mlのDOTAPクロリド（LIPOID）、1mg Fe/mlの15nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子（Imagion Biosystems）および10mMのクエン酸ナトリウム二水和物（Fisher Chemical）を含む。5mlのクロロホルム（Imagion Biosystems、ロット番号95-133）中の20mg Fe/mlの直径15nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を、4:1のアセトン：クロロホルム（v/v）溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後、揮発性溶媒（アセトンおよびクロロホルム）を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN（登録商標）60、および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN（登録商標）80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR 200ホモジナイザー（VWR International）を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1~0.3の多分散指数（PDI）で、40~80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー（Microfluidics）を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン（PES）フィルターで濾過し、摂氏2~8度で貯蔵した。鉄濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、RP-HPLCによって測定した。

【0190】

Fe-脂質キャリアmiglyol製剤（100mlスケールで調製）：Fe-脂質キャリアmiglyol製剤は、37.5mg/mlのMIGLYOL（登録商標）812

N (IOI Oleo GmbH, Hamburg, Germany)、37 mg/ml のSPAN (登録商標) 60 (Millipore Sigma)、37 mg/ml のTWEEN (登録商標) 80 (Fisher Chemical)、30 mg/ml のDOTAPクロリド (LIPOID)、0.2 mg Fe/ml の15 nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子 (Imagion Biosystems) および10 mMのクエン酸ナトリウム二水和物 (Fisher Chemical) を含む。1 mlのクロロホルム (Imagion Biosystems、ロット番号95-127) 中の20 mg Fe/mlの直径15 nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を、4:1のアセトン:クロロホルム (v/v) 溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後、揮発性溶媒 (アセトンおよびクロロホルム) を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75 gラムのスクアレ、3.7 gラムのSPAN (登録商標) 60、および3 gラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500 mlの10 mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5 gラムのTWEEN (登録商標) 80を溶解することによって調製した。92 mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92 mlの水相と混合した。混合物を、VWR 200ホモジナイザー (VWR International) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的
光散乱 (Malvern Zetasizer Nano S) によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1~0.3の多分散指数 (PDI) で、40~80 nmに達する
まで、30,000 psiで、F12Y 75 μmのダイヤモンド相互作用チャンバーお
よび補助的なH30Z-200 μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110P
マイクロフルイダイザー (Microfluidics) を通過させることによって処理
した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200 nmの細孔サイズのポリエー
テルスルホン (PES) フィルターで濾過し、摂氏2~8度で貯蔵した。鉄濃度を、IC
P-OESによって決定した。DOTAP濃度を、RP-HPLCによって測定した。

10

20

30

40

50

【0191】

高Fe-脂質キャリアmiglyol製剤 (100 mlスケールで調製) : 高Fe-脂
質キャリアmiglyol製剤は、37.5 mg/mlのMIGLYOL (登録商標) 8
12 N (IOI Oleo GmbH)、37 mg/mlのSPAN (登録商標) 60
(Millipore Sigma)、37 mg/mlのTWEEN (登録商標) 80 (Fisher Chemical)、30 mg/mlのDOTAPクロリド (LIPOID)、1 mg/mlの15 nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子 (Imagion Biosystems) および10 mMのクエン酸ナトリウム二水和物 (Fisher Chemical) を含む。5 mlのクロロホルム (Imagion Biosystems、ロット番号95-127) 中の20 mg Fe/mlの直径15 nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を、4:1のアセトン:クロロホルム (v/v) 溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後、揮発性溶媒 (アセトンおよびクロロホルム) を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75 gラムのスクアレ、3.7 gラムのSPAN (登録商標) 60、および3 gラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500 mlの10 mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5 gラムのTWEEN (登録商標) 80を溶解することによって調製した。92 mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92 mlの水相と混合した。混合物を、VWR 200ホモジナイザー (VWR International) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的
光散乱 (Malvern Zetasizer Nano S) によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1~0.3の多

分散指数 (PDI) で、40～80 nmに達するまで、30,000 psiで、F12 Y 75 μ mのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30 Z-200 μ mのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー (Microfluidics) を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200 nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン (PES) フィルターで濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。鉄濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAP濃度を、RP-HPLCによって測定した。

【0192】

ミョウバン-脂質キャリア製剤 (100 mLスケールで調製) : ミョウバン-脂質キャリア製剤は、37.5 mg/mLのスクアレン (SEPPIC)、37 mg/mLのSPAN (登録商標) 60 (Millipore Sigma)、37 mg/mLのTWEEN (登録商標) 80 (Fisher Chemical)、30 mg/mLのDOTAPクロリド (LIPOID)、1 mg Al/mLのTOPOコーティングAlhydrogel (登録商標) (オキシ水酸化アルミニウム) 粒子 (Croda) および10 mMのクエン酸ナトリウムを含む。10 mLのAlhydrogelを、1000 rpmで20分間遠心分離することによって、メタノール中で3回洗浄した。3回目の洗浄後、Alhydrogelを10 mLのメタノールに分散させ、この分散液に、1 mLの250 mg/mLのトリオクチルホスフィンオキシド (TOPO) を添加し、オービタルシェーカーで、摂氏37度で終夜インキュベートした。過剰のTOPOを、追加のメタノール洗浄によって除去し、次いで、11 mLのメタノールに分散させた。メタノールを、ドラフト中で終夜蒸発させて、TOPO-Alhydrogelの乾燥層が残った。この乾燥TOPO-Alhydrogel層に、3.75 gのスクアレン、3.7 gのSPAN (登録商標) 60、および3 gのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500 mLの10 mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5 gのTWEEN (登録商標) 80を溶解することによって調製した。92 mLの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92 mLの水相と混合した。混合物を、VWR 200ホモジナイザー (VWR International) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱 (Malvern Zetasizer Nano S) によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1～0.3の多分散指数 (PDI) で、40～80 nmに達するまで、30,000 psiで、F12 Y 75 μ mのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30 Z-200 μ mのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー (Microfluidics) を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200 nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン (PES) フィルターで濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。アルミニウム濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、RP-HPLCによって測定した。

【0193】

Fe-脂質キャリアソラネソール製剤 (100 mLスケールで調製) : Fe-脂質キャリアソラネソール製剤は、37.5 mg/mLのソラネソール (Cayman chemicals)、37 mg/mLのSPAN (登録商標) 60 (Millipore Sigma)、37 mg/mLのTWEEN (登録商標) 80 (Fisher Chemical)、30 mg/mLのDOTAPクロリド (LIPOID)、0.2 mg Fe/mLのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子 (Imagion Biosystems) および10 mMのクエン酸ナトリウムを含む。1 mLのクロロホルム (Imagion Biosystems、ロット番号95-133) 中の20 mg Fe/mLの直径15 nmのオレイン酸コーティング酸化鉄ナノ粒子を、4:1のアセトン:クロロホルム (v/v) 溶媒混合物中で磁気分離することによって、3回洗浄した。3回目の洗浄後、揮発性溶媒 (アセトンおよびクロロホルム) を、ドラフト中で完全に蒸発させて、乾燥オレイ

ン酸酸化鉄ナノ粒子のコーティングが残った。この酸化鉄コーティングに、3.75グラムのソラネソール、3.7グラムのSPAN（登録商標）60、および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN（登録商標）80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR 200ホモジナイザー（VWR International）を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー（Microfluidics）を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン（PES）フィルターで濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。鉄濃度を、ICP-OESによって決定した。DOTAPおよびソラネソール濃度を、RP-HPLCによって測定した。

10

20

30

40

50

【0194】

NLC製剤（100mlスケールで調製）：NLC製剤は、37.5mg/mlのスクアレン（SEPPIC）、37mg/mlのSPAN（登録商標）60（Millipore Sigma）、37mg/mlのTWEEN（登録商標）80（Fisher Chemical）、30mg/mlのDOTAPクロリド（LIPOID）、2.4mg/mlのDynasan 114（IOI Oleo GmbH）および10mMのクエン酸ナトリウムを含む。200mlのビーカーに、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN（登録商標）60、0.24グラムのDynasan 114および3グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN（登録商標）80を溶解することによって調製した。92mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、92mlの水相と混合した。混合物を、VWR 200ホモジナイザー（VWR International）を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱（Malvern Zetasizer Nano S）によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1～0.3の多分散指数（PDI）で、40～80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー（Microfluidics）を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン（PES）フィルターで濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、RP-HPLCによって測定した。

【0195】

CNE製剤（100mlスケールで調製）：CNE製剤は、43mg/mlのスクアレン（SEPPIC）、5mg/mlのSPAN（登録商標）85（Millipore Sigma）、5mg/mlのTWEEN（登録商標）80（Fisher Chemical）、4mg/mlのDOTAPクロリド（LIPOID）および10mMのクエン酸ナトリウムを含む。200mlのビーカーに、4.3グラムのスクアレン、0.5グラムのSPAN（登録商標）85、および0.4グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に2.6グラムのTWEEN（登録商標）80を溶解することによって調製した。95mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、95mlの水相と混合した。混合物を、V

WR 200ホモジナイザー (VWR International) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱 (Malvern Zetasizer Nano S) によって測定される z 平均流体力学直径が、 $0.05 \sim 0.1$ の多分散指数 (PDI) で、 $100 \pm 10 \text{ nm}$ に達するまで、 $30,000 \text{ psi}$ で、 $F12Y 75 \mu\text{m}$ のダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的な $H30Z-200 \mu\text{m}$ のセラミック相互作用チャンバーを備えた $M110P$ マイクロフルイダイザー (Microfluidics) を通過させることによって処理した。マイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、 200 nm の細孔サイズのポリエーテルスルホン (PES) フィルターで濾過し、摂氏 $2 \sim 8$ 度で貯蔵した。DOTAP およびスクアレン濃度を、RP-HPLC によって測定した。

10

【0196】

処置群を調製した。8つのこれらの群は、NanoLuc repRNA 群であり、ウェルあたり 600 ng 用量を、Fe-脂質キャリア、高Fe-脂質キャリア、Fe-脂質キャリア $miglyol$ 、高Fe-脂質キャリア $miglyol$ 、ミョウバン-脂質キャリア、Fe-脂質キャリアソラネソール (SLN)、NLC、およびCNE製剤を使用して調製した。未処置群は、NanoLucを有していなかった。

【0197】

さまざまな製剤を、NanoLuc repRNA を 2.2 mL のRNAseを含まない水に $8 \text{ ng} / \mu\text{L}$ に希釈することによって調製した。脂質キャリア製剤およびRNAマスターミックスを、 $250 \mu\text{L}$ のそれぞれの希釈された製剤と $250 \mu\text{L}$ の希釈されたRNAを添加することによって複合体化し、上下にピペッティングすることによって混合した。

20

【0198】

細胞トランスフェクションを、 24 ウェルプレートにおいて、ウェルあたり 7×10^5 個のTHP-1sを播種することによって行った。ウェルあたり $80 \mu\text{M}$ のPMAを添加し、摂氏 37 度でインキュベートした。翌日、トランスフェクションの1時間前に、PMA含有培地を除去し、cRPMIで置き換えた。次いで、試料を、Opti-MEM (商標) に連続希釈して、 $0.45 \text{ ng} / \mu\text{L}$ で開始する10点の1.5倍の希釈系列を作製した。次いで、培養培地を、ピペッティングによってプレートから除去した。 $450 \mu\text{L}$ のOpti-MEM (商標) および $150 \mu\text{L}$ の複合体化製剤を、二反復で、プレートに添加した。空のウェルには、 $450 \mu\text{L}$ のOpti-MEM (商標) のみを入れた。4時間後、試料を、ピペッティングによってプレートから除去し、 $500 \mu\text{L}$ の増殖培地で置き換えた。次いで、プレートを、摂氏 37 度で終夜インキュベートした。増殖培地を翌日回収し、摂氏 -80 度で貯蔵した。下流のアッセイを実施した。

30

【0199】

ルシフェラーゼアッセイを、最初にNano-Gloルシフェラーゼアッセイ試薬を緩衝液に $1:50$ で希釈することによって行った。 $25 \mu\text{L}$ の上清を除去し、 96 ウェルプレートにおいて、 $25 \mu\text{L}$ のNano-Glo試薬と混合した。これを、室温で3分間インキュベートした。発光を読み取った。

【0200】

R&D Systems製のヒトTNF- α DuoSet ELISAを使用して、製造業者のプロトコールに従って、ELISAアッセイを行って、培地におけるTNF- α タンパク質レベルを評価した。 96 ウェルマイクロプレートを、抗TNF捕捉抗体でコーティングした。プレートをブロッキングし、次いで、培地試料を、希釈なしで直接添加した。ビオチン化検出抗体SA-HRPおよび基質の添加後、吸光度を、SPECTRAMAX (登録商標) i3 (Molecular Devices, LLC, San Jose CA, USA) プレートリーダーにおいて、 450 nm で読み取った。

40

【0201】

この実施例におけるすべての研究は、二反復で行った。二反復からの結果を、それぞれ、第1の実験および第2の実験として表す。

50

【0202】

アッセイは、脂質キャリアおよびM i g l y o lから構成される液体製剤が、図13Aにおける第1のアッセイおよび図13Bにおける第2のアッセイに示されるように、レブリコンからのより高いタンパク質産生を誘導したことを実証する。TNF- α 分泌によって測定されるように、自然免疫応答の低減が検出され、図14Aにおける第1のアッセイおよび図14Bにおける第2のアッセイに示した。

【0203】

タンパク質産生の増強と低TNF- α 刺激との間の相関が、図15Aにおける第1のアッセイおよび図15Bにおける第2のアッセイに示されるように、M i g l y o l脂質キャリア製剤で観察された。ソラネソールは、図15Aにおける第1のアッセイおよび図15Bにおける第2のアッセイに示されるように、わずかに低いタンパク質産生を誘導したが、潜在的に高いTNF産生を誘導した。

10

【0204】

図16A～16Fは、種々の反復の脂質キャリア-製剤化DNA SEAPが筋肉内注射されたBALB/cマウスにおけるSEAPレベルを図示する。図16Aは、4日目の相対発光単位(RLU)を示す。図16Bは、6日目の相対発光単位(RLU)を示す。図16Cは、8日目の相対発光単位(RLU)を示す。図16Dは、4日目の相対発光単位(RLU)のコピーである。図16Eは、6日目の相対発光単位(RLU)のコピーである。図16Fは、8日目の相対発光単位(RLU)のコピーである。

【0205】

図17は、Y軸にZ平均測定および多分散指数(PDI)の測定値、ならびに条件1～14についてX軸に群番号を有する棒グラフである。

20

【0206】

図18A～18Bは、Y軸にIgG(μ g/ml)、条件1～14についてX軸に群番号を有するドットチャートであり、記録は、それぞれ、14日目の抗D614G(1:40希釈)および28日目の抗D614G(1:200希釈)での測定について示す。

【0207】

図19は、Y軸に抗D614G(1:200希釈)のIgG(μ g/ml)測定値、およびX軸に貯蔵条件の指示を有する、28日目のドットチャートを示す。

【0208】

製剤間の他の主な相違は観察されなかった。これは、脂質キャリアおよびm i g l y o lから構成される製剤(F e-脂質キャリアm i g l y o l)が、限定されるものではないが、抗ウイルス療法およびがん療法などの治療的適用における見込みがある製剤であることを示唆する。そのような治療的適用では、限定されるものではないが、治療用タンパク質または抗体のi n v i v o産生などの高いタンパク質産生および低い免疫刺激が望ましい。

30

(実施例9)

マウスにおけるDNA(SEAP)生物活性。

【0209】

この実施例は、BALB/cマウスにおける脂質キャリアおよびDNA(SEAP)の生物活性に対する注射された用量の影響を研究する。動態、持続期間および大きさを研究した。材料：摂氏-20度のSEAPをコードするDNA(供給業者：A l d e v r o n ; カタログ番号：g W i z - S E A P、ロット番号：38611)、5mg/ml、摂氏-80度のSEAPをコードするrepRNA(配列番号1)、2217 μ g/ml、および摂氏4度の脂質キャリア製剤(30mg DOTAP/ml)をこの実施例で使用した。C57BL/6マウスに、表14にリストされる処置群で、記載の通り接種し、その後、SEAPレベルを血清中で測定した。

40

【表 1 4】

表 14: 処置群。

群	n	製剤	DNA/RNA-SEAP	RNA 用量[μg]	DNA 用 量 [μg]	N:P	注 射 体 積 [μL]
1	5	ネイキッド	DNA-SEAP		20	n/a	50
2	5	脂質キャリア	DNA-SEAP		10	15	50
3	5	脂質キャリア	DNA-SEAP		10	7.5	
4	5	脂質キャリア	DNA-SEAP		20	15	
5	5	脂質キャリア	DNA-SEAP		20	7.5	
6	5	脂質キャリア	RNA-SEAP	1		15	50
7	5	MIGLYOL+ 脂 質キャリア	RNA-SEAP	1		15	50

10

20

【0 2 1 0】

7つの異なる製剤を調製し、7つの処置群（群1～7）にわたって筋肉内投与した。DNA-SEAPまたはRNA-SEAPを、表15に示される体積セットに従って希釈して、群1～7のための製剤を調製した。

【表 1 5】

表 15: 製剤の調製: RNA/DNA の希釈。

群	DNA-または RNA-SEAP	DNA または RNA [μL]	40%のスクロー ス [μL]	水 [μL]	合計 [μL]
1	DNA-SEAP	40.0	125.0	85.0	250.0
2	DNA-SEAP	20.0	0.0	230.0	250.0
3	DNA-SEAP	20.0	0.0	230.0	250.0
4	DNA-SEAP	40.0	125.0	85.0	250.0
5	DNA-SEAP	40.0	0.0	210.0	250.0
6	RNA-SEAP	4.5	0.0	245.5	250.0
7	RNA-SEAP	4.5	0.0	245.5	250.0

30

40

【0 2 1 1】

脂質キャリアと複合体化する前の希釈されたDNAまたはRNAの濃度は、以下の通りであった（NanoDrop specによって測定）：群1、4および5は約820 μg/mlのDNAを含有し；群2および3は約480 μg/mlのDNAを含有し；群6および7は約43 μg/mlのRNAを含有した。群1～6についての製剤を、下記の表16に示されるように、100 mMのクエン酸塩で希釈した。

50

【表 1 6】

表 16: 脂質キャリア製剤の希釈。

群	製剤	脂質キャリア [μl]	40%スクロース [μl]	100mM のクエン酸塩 [μl]	水 [μl]	合計 [μl]
1	ネイキッド	0	0	30	270	300
2	脂質キャリア	120	150	30	0	300
3	脂質キャリア	60	150	30	60	300
4	脂質キャリア	240	0	30	30	300
5	脂質キャリア	120	150	30	0	300
6	脂質キャリア	12	150	30	108	300
7	MIGLYOL+ 脂質キャリア	12	150	30	108	300

【 0 2 1 2 】

上記の製剤を、250 μ l の希釈された脂質キャリアを250 μ l の希釈されたDNAまたはRNAに添加することによって複合体化した。得られた複合体化製剤を、氷上で少なくとも30分間インキュベートした。表17は、このアッセイのためのスケジュールを示す。

【表 1 7】

表 17: スケジュール。

日	手順	マウスに対する注釈
0	すべての接種	なし
4	採血	群 4 は、毛皮が逆立ち、1 頭のマウスが衰弱した(収集の間に死亡した)。Hydropaque をケージに設置した。
6	採血	なし
8	採血	なし
11	採血	なし
14	採血	なし

【 0 2 1 3 】

マウスを定期的な間隔で採血し、血清を直ぐに調製し、SEAP 活性のための分析まで、摂氏−80度で貯蔵した。

【 0 2 1 4 】

血清におけるSEAPレベルを評価するために、すべての血清試料を同じ時に解凍し、SEAP検出を実施した。図16A〜16Fは、種々の反復の脂質キャリアー製剤化DNA SEAPが筋肉内注射されたBALB/cマウスにおけるSEAPレベルを図示する。マウスを定期的な間隔で採血し、血清を調製し、SEAPアッセイによる分析まで貯蔵した。データは、平均およびSEで示す(群あたりn=5)。

【0215】

図16A～16Fから分かるように、脂質キャリア製剤は、特に注射後6日目後に、DNA単独の送達よりも標的タンパク質産生を支援する。加えて、この実施例は、migl-yolの包含が、migl-yolを欠く脂質キャリア製剤よりもRNAレプリコンからのタンパク質産生を増強することを示す。

(実施例10)

無機コアなしの脂質キャリアの製剤。

【0216】

無機コアなしの脂質キャリアの製剤を100mlスケールで調製した。無機コアなしの脂質キャリアは、37.5mg/mlのスクアレン (SEPPIC)、37mg/mlのSPAN (登録商標) 60 (Millipore Sigma)、37mg/mlのTWEEN (登録商標) 80 (Fisher Chemical)、30mg/mlのDOTAPクロリド (LIPOID) および10mMのクエン酸ナトリウムを含む。200mlのビーカーに、3.75グラムのスクアレン、3.7グラムのSPAN (登録商標) 60、および3.0グラムのDOTAPを添加して、油相を生成した。油相を、摂氏65度の水浴中で45分間超音波処理した。別々に、水相を、ヌクレアーゼを含まない水中で調製された500mlの10mMのクエン酸ナトリウム緩衝液に19.5グラムのTWEEN (登録商標) 80を溶解することによって調製した。96mlの水相を、別々のガラスボトルに移し、摂氏65度に30分間加熱した。油相を、温かい油相を温かい水相に添加することによって、96mlの水相と混合した。混合物を、VWR 200ホモジナイザー (VWR International) を使用して乳化し、得られた粗エマルジョンを、動的光散乱 (Malvern Zetasizer Nano S) によって測定されるz平均流体力学直径が、0.1～0.3の多分散指数 (PDI) で、40～80nmに達するまで、30,000psiで、F12Y 75μmのダイヤモンド相互作用チャンバーおよび補助的なH30Z-200μmのセラミック相互作用チャンバーを備えたM110Pマイクロフルイダイザー (Microfluidics) を通過させることによって処理した。無機コアなし製剤のマイクロフルイダイズされた製剤を、最後に、200nmの細孔サイズのポリエーテルスルホン (PES) フィルターで濾過し、摂氏2～8度で貯蔵した。DOTAPおよびスクアレン濃度を、RP-HPLCによって測定した。

(実施例11)

追加のナノ粒子製剤

【0217】

追加のナノ粒子製剤を、以下の表 (表18および表19) に従って生成する。

10

20

30

40

50

【表 1 8】

表 18: mRNA ワクチン製剤。

剤形:	IM 経路の投与のための注射用溶液		
組成:	それぞれの 0.5ml バイアルが含有:	量	濃度(mg/ml)
	mRNA	25mcg	0.05
	DOTAP	0.75mg	1.5
	酸化鉄ナノ粒子	0.005mg	0.01
	スクアレン	0.94mg	1.88
	ソルピタンモノステアレート	0.93mg	1.86
	ポリソルベート 80	0.93mg	1.86
	スクロース IP	50mg	100
	クエン酸一水和物	1.05mg	2.1
	注射用水	0.5ml にするのに十分な量	

10

20

【表 1 9】

表 19: 凍結乾燥 mRNA ワクチン製剤。

剤形:	凍結乾燥粉末			
組成:	それぞれの、5 回の投薬分のバイアルが含有:	量	濃度(mg/ml)	およその乾燥重量%
	mRNA	50mcg	0.02	0.02
	DOTAP	1.5mg	0.6	0.57
	スクアレン	1.88mg	0.752	0.72
	ソルピタンモノステアレート	1.86mg	0.744	0.71
	ポリソルベート 80	1.86mg	0.744	0.71
	スクロース IP	250mg	100	95.3
	クエン酸一水和物	5.25mg	2.1	2
	注射用水(再構成用)	2.5ml		

30

40

(実施例 1 6)

マウスにおける凍結乾燥 COVID ワクチンの評価

【0 2 1 8】

50

以下を行って、SARS-CoV-2スパイク抗原配列をコードするレプリコンRNAを有する凍結乾燥NP-1の活性、再構成されたワクチンの物理化学的性質、効力、および免疫原性をアッセイした。簡潔には、表20における材料を使用した。

【表20】

表 20. 材料。

名称	ストック濃度
NP-1	30mg/ml(DOTAP 濃度を測定)
NP-7	30mg/ml(DOTAP 濃度を測定)
バリエント A.1 RNA 配列をコードする repRNA(VEEV)-SARS-CoV2-スパイク(野生型)	1687 µg/ml
バリエント Delta-preF 配列をコードする repRNA(VEEV)-SARS-nCoV19-S-Delta.AY1-S2P-wtFur(「Delta-SJ」)	783 µg/ml
スクロース(EMD、Millipore)	----
クエン酸 Na(Teknova)	1M

10

20

【0219】

製剤複合体の調製。脂質ナノ粒子／RNA複合体の組成物を、下記の表21に示されるように、このアッセイにおいて調製した。NP-1またはNP-7およびrepRNAを、15のNPに対する比で複合体化し、それぞれ、50mg/mlまたは100mg/ml(「2×」材料)の最終repRNA濃度、および10%または20%w/vのスクロース含有量を得るために複合体化した。10%のスクロースを有する複合体化材料(50mg/mlのrepRNA)は、5mMのクエン酸ナトリウムを含有したが、20%のスクロースを有する複合体化材料(100mg/mlのrepRNA)は、10mMのクエン酸塩を含有した。複合体を、2mlの無菌の脱パイロジェン化した焼成バイアルに充填した。10%のスクロースを有する複合体をバイアルあたり0.7mlで、20%のスクロースを有する複合体をバイアルあたり0.35mlで充填した。次いで、バイアルを凍結乾燥し貯蔵したか、または液体形態のままに貯蔵した。貯蔵温度は、摂氏25度または摂氏42度で1週間であった。組成物ごとの凍結乾燥バイアルおよび液体バイアルの量を表21に要約する。

30

40

50

【表 2 1】

表 21. 凍結乾燥組成物および液体組成物。

説明	N:P	DOTAP [μg/ml]	RNA [μg/ml]	バイアルあたり の体積[ml]	凍 結 乾 燥 バイア ル	液体バイアル
10%スクロースにおける NP-1+WT-S	15	1500	50	0.7	8	6
10%スクロースにおける NP-1+Delta-S	15	1500	50	0.7	2	0
20%スクロースにおける NP-1+WT-S	15	3000	100	0.35	8	0
20%スクロースにおける NP-1+Delta-S	15	3000	100	0.35	2	0
10%スクロースにおける NP-7+WT-S	15	1500	50	0.7	8	6

【 0 2 2 0 】

凍結乾燥サイクル。S P V i r t i s A d v a n t a g e P r oトレイおよび不活性ガスで満たされたバッチ凍結乾燥機およびストッパー能力を使用した。凍結乾燥サイクルの概要を下記の表 2 2 に示す。サイクルの終了後、バイアルを 4 8 t o r r の窒素で充填し、栓をした後、室内圧力に平衡化した。

【表 2 2】

表 22. 凍結乾燥サイクル。

時間 [時間]	温度 [° C]	圧力 [mT]	注釈
0	5	760	棚を摂氏 5 度に事前に冷却
0.5	5	760	凍 結
2	-50	760	
2.5	-50	50	排 出
3	-30	50	一 次 乾 燥
20.5	-30	50	
22.5	25	50	二 次 乾 燥
24	25	50	

【 0 2 2 1 】

条件群。このアッセイで分析された 1 4 群の概要を下記の表 2 3 に提供する。群 1 および 4 は、貯蔵の欄に示されるように、ワクチン調製のための標準的なプロトコールとの比較のための陽性対照としての役割を果たすように、新たに調製した。

【表 2 3】

表 23. 条件群。

群	製剤	RNA	スクロース [% w/v]	形態	貯蔵 [温度/時間]
1	NP-1	WT-S	10	液体	新鮮
2	NP-1	WT-S	10	液体	25C/1 週間
3	NP-1	WT-S	10	液体	42C/1 週間
4	NP-7	WT-S	10	液体	新鮮
5	NP-7	WT-S	10	液体	25C/1 週間
6	NP-7	WT-S	10	液体	42C/1 週間
7	NP-1	WT-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間
8	NP-1	WT-S	10	凍結乾燥	42C/1 週間
9	NP-1	WT-S	20	凍結乾燥	25C/1 週間
10	NP-1	WT-S	20	凍結乾燥	42C/1 週間
11	NP-7	WT-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間
12	NP-7	WT-S	10	凍結乾燥	42C/1 週間
13	NP-1	Delta-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間
14	NP-1	Delta-S	20	凍結乾燥	25C/1 週間

【0 2 2 2】

免疫原性アッセイ。抗スパイク Ig G 応答の誘導を、6 ～ 8 週齢の雌 C 5 7 B l / 6 マウスにおいて評価した。5 頭のマウスの群のサイズを使用した。スケジュールを表 2 4 に示す。

【表 2 4】

表 24. 免疫原性スケジュール。

日付	日	手順
8/23/21	-7	凍結乾燥
9/01/21	0	IM 経路による免疫化
9/15/21	14	採血
9/29/21	28	採血
10/8/21	37	マウスを屠殺

【0 2 2 3】

摂氏 2 5 度または摂氏 4 2 度の安定性チャンバーにおける 1 週間の貯蔵後。凍結乾燥ナノ粒子 / RNA 複合体を、0 . 7 m l の無菌 m i l l i Q 水で再構成し、粒子が肉眼で見えなくなるまで穏やかに回転させた。複合体の粒子径（z 平均）およびサイズ分布（P D I）を測定し、図 1 7 に要約し、群の指定を表 2 5 に示した。新たに調製された N P - 1

／WT-S複合体（群1）の粒子径およびPDIは、それぞれ、76.8nmおよび0.223であった。再構成後、凍結乾燥試料（群7～14）は、平均で45%（+／-11%）成長した。群1と比べたz平均の変化%の概要を表25に含めた。

【表25】

表 25. z 平均のパーセント%変化。

群番号	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
群1に対する z平均 の%変化	2%	0%	15%	-4%	-1%	30%	42%	59%	53%	48%	33%	41%	55%

10

【0224】

フェノールクロロホルム抽出repRNAのアガロースゲル電気泳動。10%のスクロースまたは20%のスクロースにおけるNP-1／repRNAおよびNP-7+repRNAの液体製剤を、NP-1／repRNAおよびNP-7+repRNAで1週間貯蔵し、それぞれ、repRNA産物の部分的または完全な分解をもたらした（データは示さない）。10%のスクロースまたは20%のスクロースにおけるNP-1／repRNAおよびNP-7+repRNAの凍結乾燥は、NP-1／repRNAおよびNP-7+repRNAで1週間の貯蔵後にrepRNA完全性を保存した（データは示さない）。

20

【0225】

効力アッセイ。摂氏25度で1週間貯蔵された10%のスクロースにおける凍結乾燥NP-1／WT-Sは、トランスフェクトBHK細胞において、スパイクタンパク質の用量依存性の発現を生じた。発現プロファイルは、新たに複合体化されたNP-1／WT-Sと類似していた。10%のスクロースにおける凍結乾燥NP-1／WT-Sの摂氏42度での1週間の貯蔵は、in vitroタンパク質発現を有意に低減した。摂氏25度または摂氏42度で1週間貯蔵された10%のスクロースにおける液体NP-1／WT-Sは、BHK細胞においてスパイクタンパク質を産生しなかった（データは示さない）。

30

【0226】

ELISAによる抗D614GスパイクIgG応答。血清抗D614GスパイクIgGレベルを、それぞれ、図18Aおよび18Bで下記に示す、プライム後14日目および28日目に評価した。マウス血清を、1：40（14日目）または1：200（28日目）希釈で、抗D614GスパイクELISAにおいてアッセイした。血清IgGレベル（μg／ml）を、既知濃度のマウスIgG標準によって作製された4PL標準曲線から内挿した。

【0227】

プライム後28日目の抗D614G IgG応答。摂氏25度で1週間後、10%のスクロースにおける液体NP-1／WT-Sは、新たに調製されたNP-1／WT-S陽性対照と比較して、抗スパイクIgGの統計学的に有意な低減をもたらした。摂氏25度で1週間貯蔵された10%のスクロースにおける新たに調製されたNP-1／WT-Sおよび凍結乾燥NP-1／WT-Sの間の平均IgGレベルに有意差はなかった。

40

【0228】

摂氏42度で1週間後、10%のスクロースにおける凍結乾燥NP-1／WT-Sは、100%の抗体陽転を誘導したが、平均IgGレベルは、新たに調製されたNP-1／WT-Sと比較して、有意に低減された。新たに調製されたNP-1／WT-S陽性対照に対して比較する通常の一元配置分散分析によって決定されたp値を含む、免疫化後28日目からの平均+／-標準偏差IgG濃度データの要約を表26に示した。P<0.05は、考慮される統計学的有意差である。

50

【表 2 6】

表 26. 1:200 血清希釈での平均 IgG。

群	製剤	RNA	スクロース [% w/v]	状態	貯蔵温度および時間	1:200 血清希釈での D28 の平均 IgG [μg/ml]	SD [μg/ml]	群 1 に対する P 値
1	NP-1	WT-S	10	液体	新鮮	30.38	12.29	n/a
2	NP-1	WT-S	10	液体	25C/1 週間	0.17	0.23	0.0014
3	NP-1	WT-S	10	液体	42C/1 週間	0.02	0.02	0.0013
4	NP-7	WT-S	10	液体	新鮮	25.69	16.45	0.9990
5	NP-7	WT-S	10	液体	25C/1 週間	8.47	15.99	0.0385
6	NP-7	WT-S	10	液体	42C/1 週間	0.00	0.00	0.0013
7	NP-1	WT-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間	27.44	14.68	0.9994
8	NP-1	WT-S	10	凍結乾燥	42C/1 週間	7.34	10.63	0.0257
9	NP-1	WT-S	20	凍結乾燥	25C/1 週間	9.07	6.41	0.0474
10	NP-1	WT-S	20	凍結乾燥	42C/1 週間	10.56	11.25	0.0777
11	NP-7	WT-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間	27.53	24.96	0.9994
12	NP-7	WT-S	10	凍結乾燥	42C/1 週間	5.33	2.68	0.0121
13	NP-1	Delta-S	10	凍結乾燥	25C/1 週間	25.83	6.66	0.9990
14	NP-1	Delta-S	20	凍結乾燥	25C/1 週間	28.25	5.60	0.9996

【0 2 2 9】

新鮮な製剤対凍結乾燥製剤の比較。プライム後 28 日目の血清における抗 D 6 1 4 G スパイク I g G 濃度を図 1 9 に示す。平均 I g G 値間の統計学的な差を、ダネットの多重比較検定を伴う通常の一元配置分散分析によって決定した。すべての群を、10%のスクロースにおける新たに調製された NP-1/RNA と比較した。有意差は、摂氏 25 度で 7 日間貯蔵された 10%のスクロースにおける新たに調製された NP-1/RNA および凍結乾燥 NP-1/RNA の間で示されなかった。摂氏 42 度で、10%または 20%のスクロースにおける凍結乾燥 NP-1/RNA は、新たに調製された NP-1/RNA と比較して、有意に低い抗スパイク I g G を誘導した。摂氏 25 度または 42 度で貯蔵された 20%のスクロースにおける凍結乾燥 NP-1/RNA は、新たに調製された NP-1/WT-S よりも有意に低い I g G を誘導した。摂氏 25 度で貯蔵された 10%または 20%のスクロースにおける凍結乾燥 NP-1/Delta-S は、新たに調製された NP-1/WT-S と類似の平均 I g G (統計学的に有意ではない) を誘導した。

【0 2 3 0】

特許文献および非特許文献を含む本明細書に開示されるすべての参考文献は、それぞれが個々に組み込まれたかのように、それらの全体が、これにより参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で使用する専門用語が、単に具体的な実施形態を記載する目的のものであり、限定することを意図するものではないことが理解されるべきである。本明細書で具体的に定義されない限り、本明細書で使用する専門用語が、関連する技術分野において公知のその従来の意味を与えるべきであることがさらに理解されるべきである。

【化 1】

配列

配列番号 1 RNA

```

augcuccucu ugcuccuucu cuugggacuc cgauugcagc ucucuuggg uauaaauccu
gucgaagaag agaaucccga cuucuggaau cgcgaagcgg cagaagcauu gggugcgga
aaaaagcucc aaccggcaca gacugcggcc aagaauccu uauuuucuu gggugauggc
augggcgguu ccacugugac ugcggcacga auccugaagg gucaaaagaa ggauaaacug
gguccagaga ucccgugggc uauaggauagg uuuccauacg uugcgucuc uaagaccuau
aacgucgaua agcauguacc agacuccgga gcgacggcca cugcuuaccu uuguggagu
aaagguaauu uccaaacaau aggacugagc gcagcugcaa gauucaacca augcaacacg
acaagaggga augaggugau uucagucaug aaucgagcaa agaaagcugg gaaauccguu
ggcgugguca ccacuacaag agugcagcau gcaucuccag caggaaacua cgcccacacu
guaaacagaa acugguauag ugacgccgau guucccgccu cugcgaggca agagggguugu
caagacaucg cuaccagcu cauaagcaac auggacauug auguaauacu gggugggggu
cggaaaauaca uguuccggau gggcacuccc gaucgggagu acccggauga cuauucccaa
ggagguacca gauuggacgg gaaaaaucuu guccaagaau ggcucgcca gcggcagggg
gcaagguacg uguggaacag gacagaacug augcaggcaa gcuuggaucc aagcguaacg
caucuauagg gucuuuuuga acccgguau augaaauacg aaauacaucg cgacucaaca
cuggacccgu cucucaugga gaugacugaa gcugccuuga gguuguugag ucggaaccu
aggggcuuuu ucuuguucgu agagggcggg cgaauugacc acggucauca cgaauucga
gcguaccggg cgcucacaga aaccaucaug uuugacgaug cuaucgaacg agcgggucag
cuuaccucug aagaagauac gcucucucuu gacaccggg accauagcca uguuuuuucc
uucggugguu auccguugcg agguuccagc auauucggcc ucgcgccagg gaaagccgc
gaccgcaaag cuuauacggg gcugcuuac ggaaacggcc cugguacgu ccuuaagac
ggugcgagac cugacgugac ggaucugaa uccgguucuc ccgaauauag acaacagagu
gcuguuccgc uggaugaaga gacucaugcg ggagaagau uagcgguuuu ugcuaagggg
ccgcaagcac accuuguuca uggcguucag gagcaaacuu ucauagccca uguaauggca
uuugcugcgu gucucgagcc guauaccgcu ugcgaucucg cuccgccggc ggguaacaacc
gaugcugccc acccggggua cucaagagua ggggcagcag ggcgaauuga acaacu

```

10

20

30

配列番号 2 RNA

```

augaacaguu ucaguaccuc cgcguucggg cggguugccu uuagccuggg gcuucucug
gugcuccccg ccgcauuccc agcgccgguc uucacacucg aagauuucgu uggggacugg
cgacagacag ccggcuacaa ccuggaccaa guccuugaac agggaggugu guccaguug
uuucagaauc ucgggguguc cguaacuccg auccaaagga uuguccugag cggugaaaau
gggcugaaga ucgacaacca ugucaucauc ccguaugaag gucugagcgg cgaccaaau
ggccagaucg aaaaaauuuu uaagguggug uaccugugg augaucauca cuuaaggug
auccugcacu auggcacacu gguaaucgac gggguuacgc cgaacaugau cgacuauuuc
ggacggccgu augaaggcau cgccguguuc gacggcaaaa agaucacugu aacagggacc
cuguggaacg gcaacaaaau uaucgacgag cgccugauca acccgacgg cuccugcug
uuccgagua ccaucaacgg agugaccggc uggcggcugu gcgaacgcau ucuggcg

```

40

【図面】
【図 1】

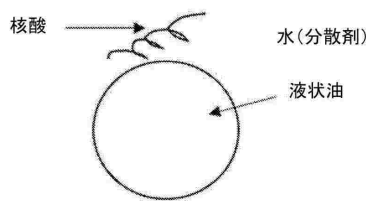


FIG. 1A

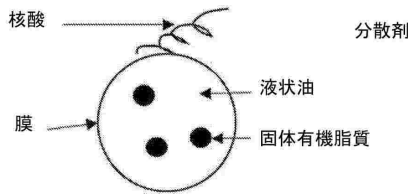


FIG. 1B

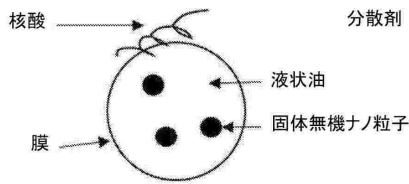


FIG. 1C

【図 3】

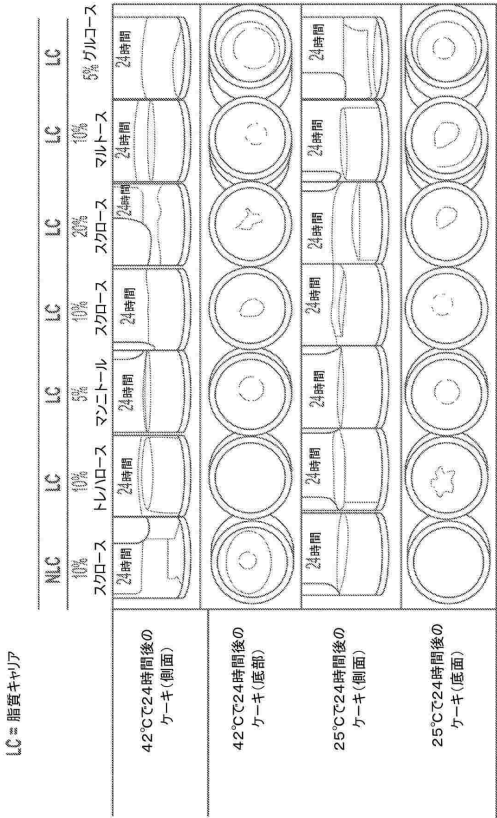


FIG. 3

【図 2】

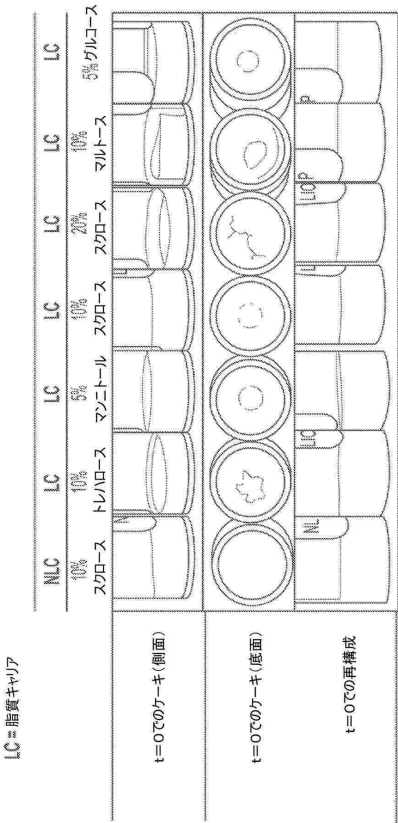


FIG. 2

【図 4】

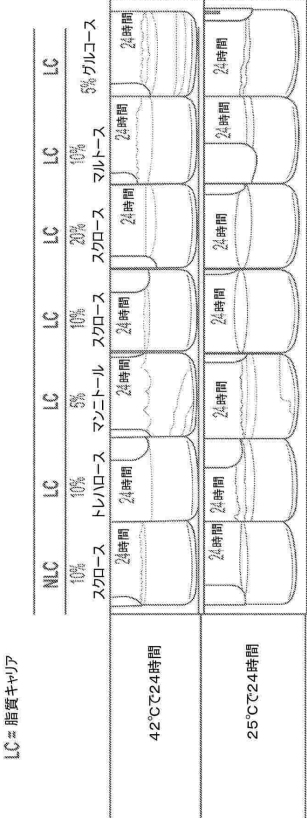


FIG. 4

【図 5 A】

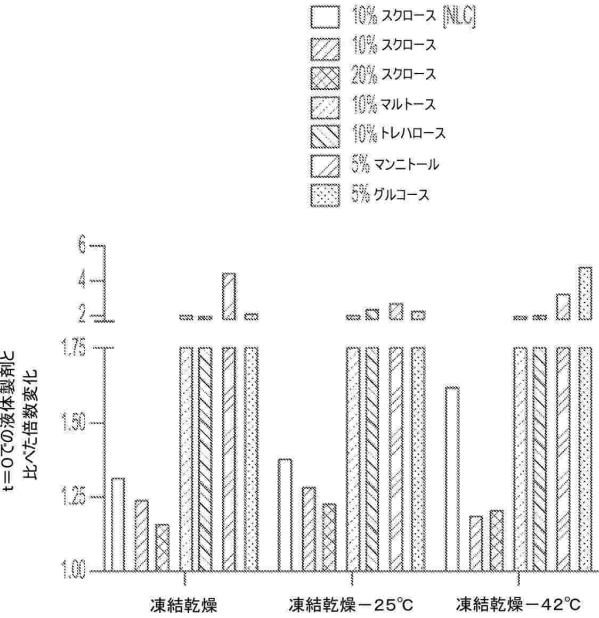


FIG. 5A

【図 5 B】

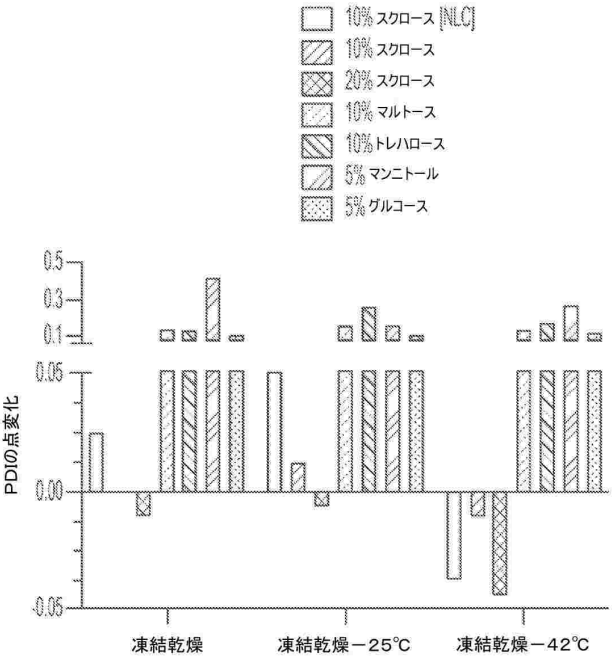


FIG. 5B

【図 6】

脂質キャリア + RNA											
ネイキッド RNA	10% スクロース 液体	10% スクロース 凍結乾燥	20% スクロース 凍結乾燥	20% スクロース 液体	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥
	液体	凍結乾燥	凍結乾燥	液体	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥
	25°C/24時間	42°C/24時間	42°C/24時間	42°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間
	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥

FIG. 6A

脂質キャリア + RNA											
ネイキッド RNA	10% スクロース 液体	10% スクロース 凍結乾燥	20% スクロース 凍結乾燥	20% スクロース 液体	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥	10% スクロース 凍結乾燥
	液体	凍結乾燥	凍結乾燥	液体	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥
	25°C/24時間	42°C/24時間	42°C/24時間	42°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間	25°C/24時間
	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥	凍結乾燥

FIG. 6B

【図 7 - 1】

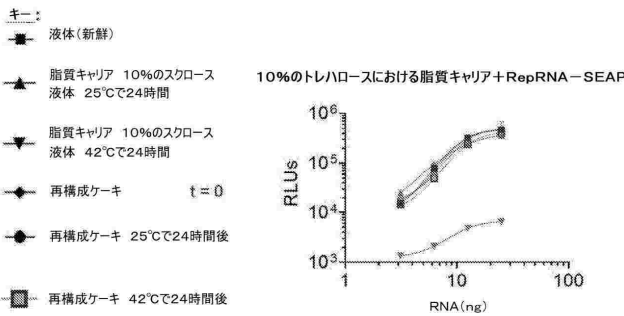


FIG. 7A

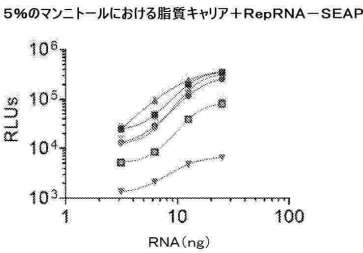


FIG. 7B

【図 7 - 2】

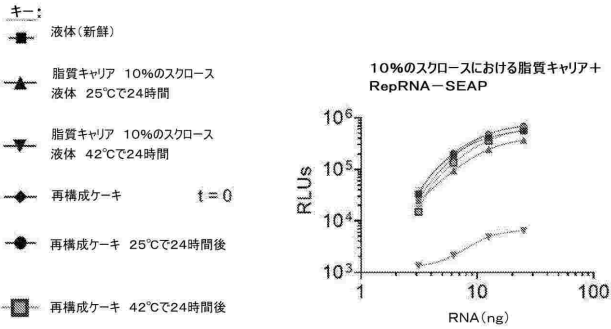


FIG. 7C

【図 7 - 3】

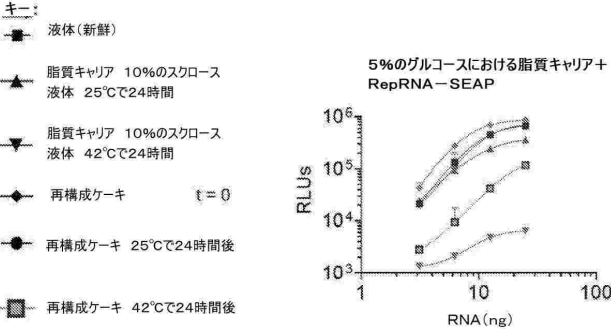


FIG. 7E

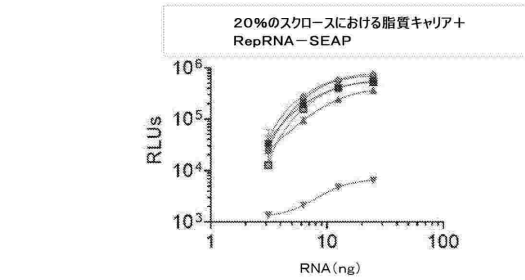


FIG. 7D

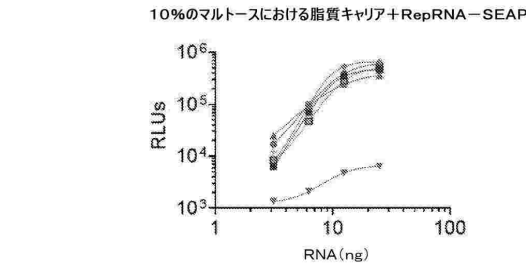


FIG. 7F

【図 7 - 4】

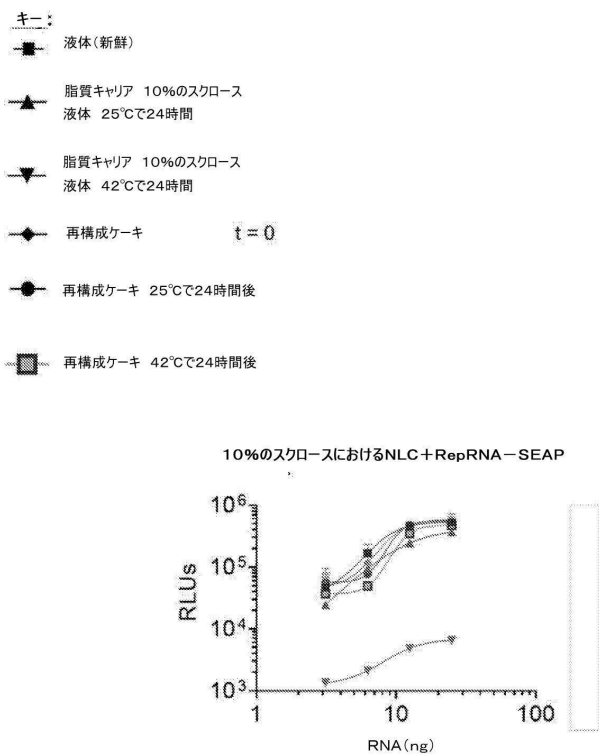


FIG. 7G

【図 8】

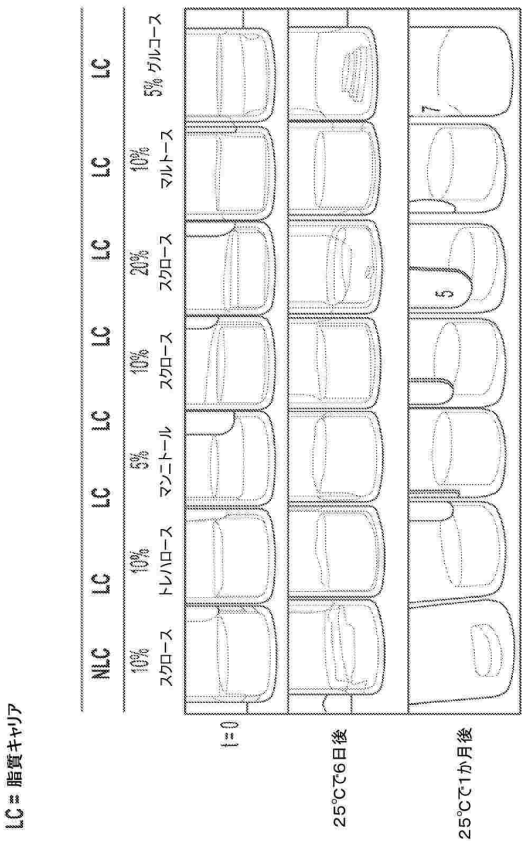


FIG. 8

10

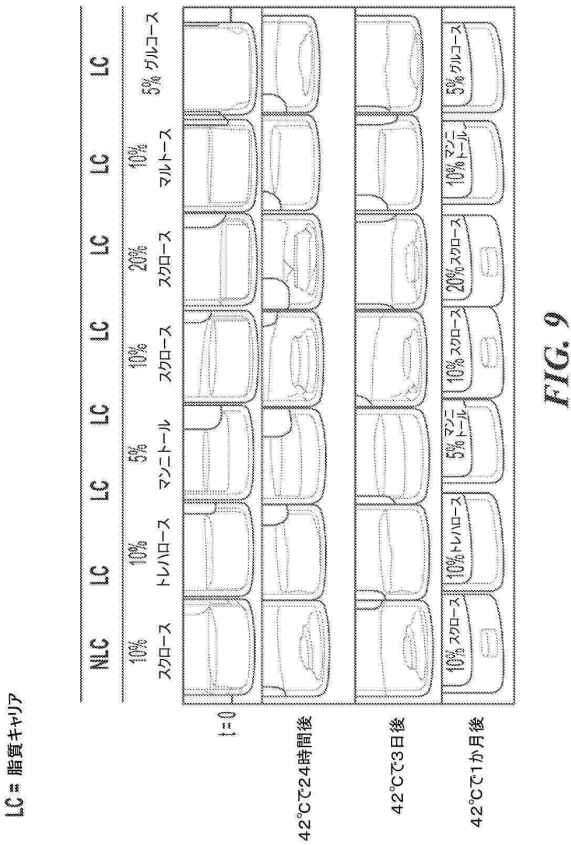
20

30

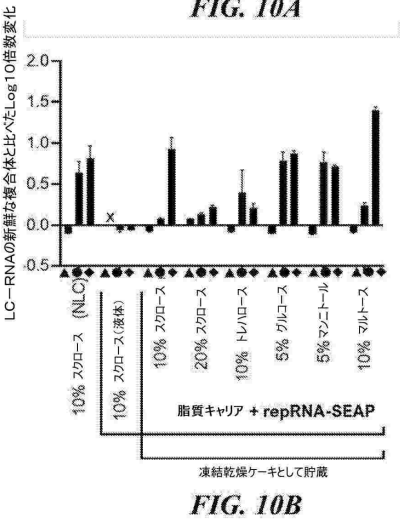
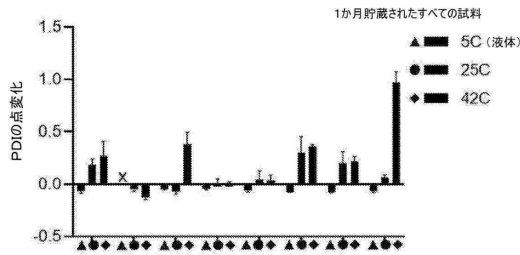
40

50

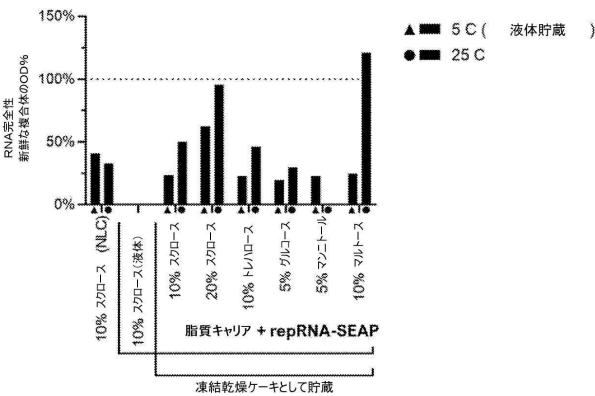
【図 9】



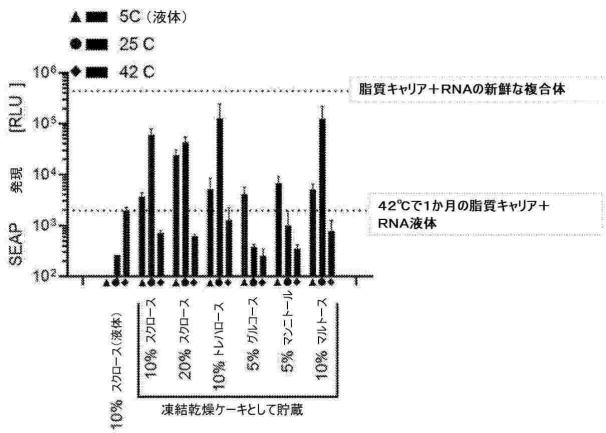
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

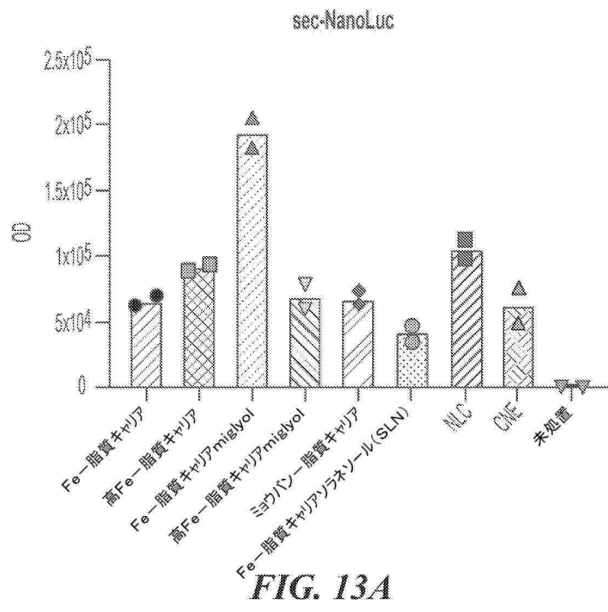
20

30

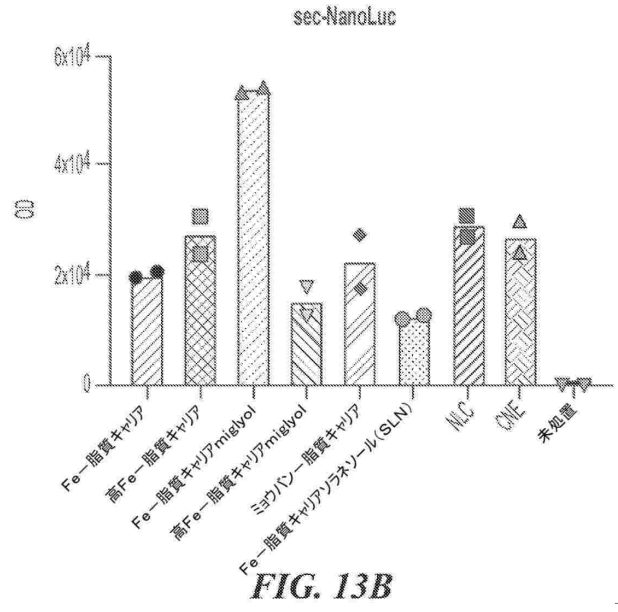
40

50

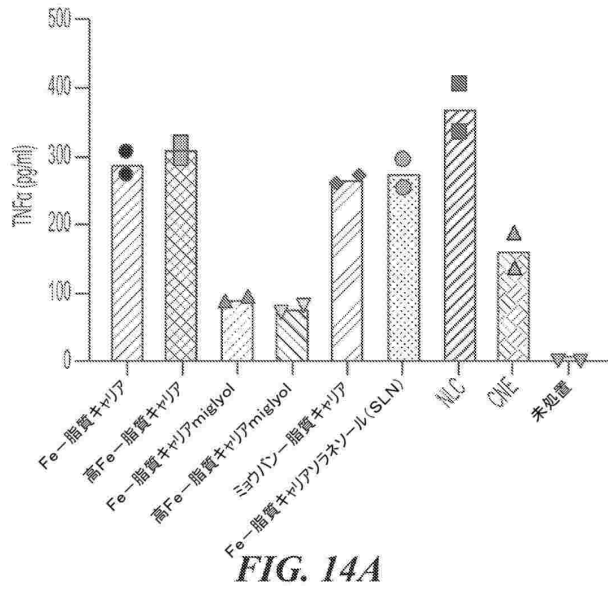
【図 13 A】



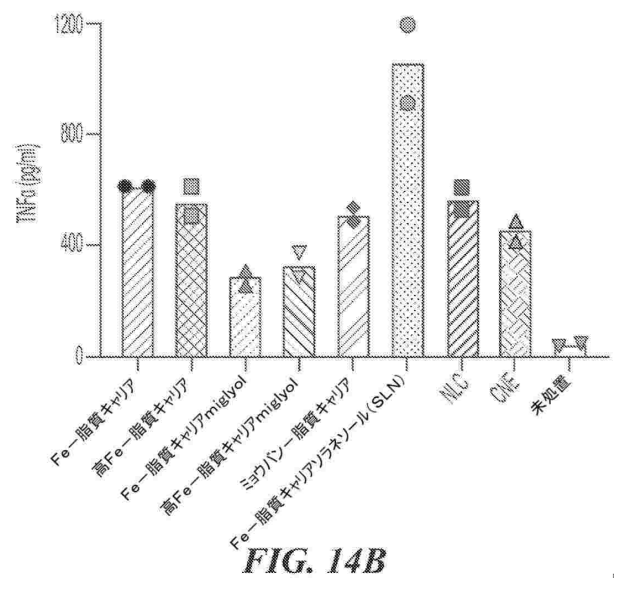
【図 13 B】



【図 14 A】



【図 14 B】



10

20

30

40

50

【図 15】

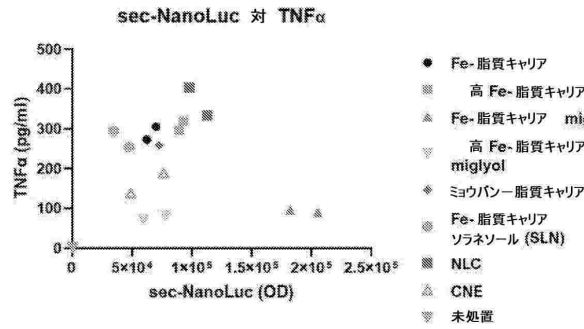


FIG. 15A

【図 16-1】

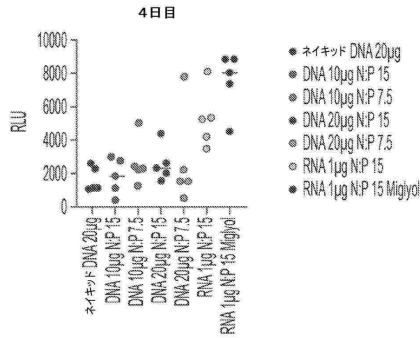


FIG. 16A

10

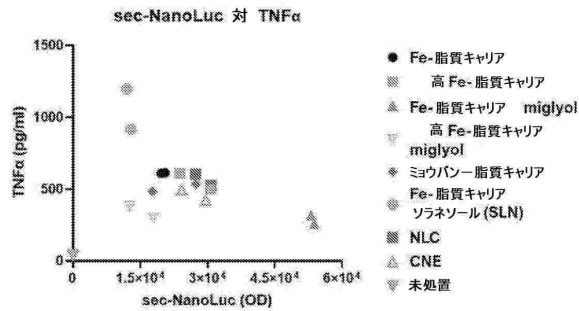


FIG. 15B

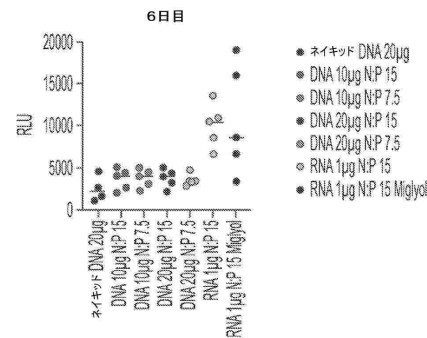


FIG. 16B

20

【図 16-2】

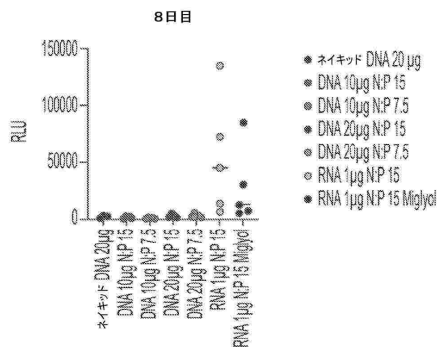


FIG. 16C

【図 16-3】

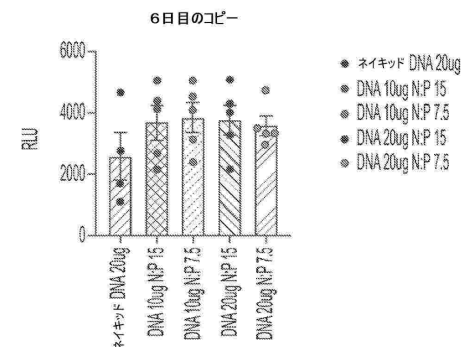


FIG. 16E

30

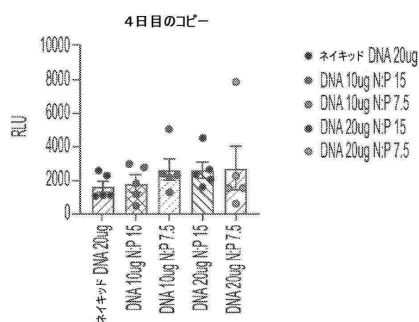


FIG. 16D

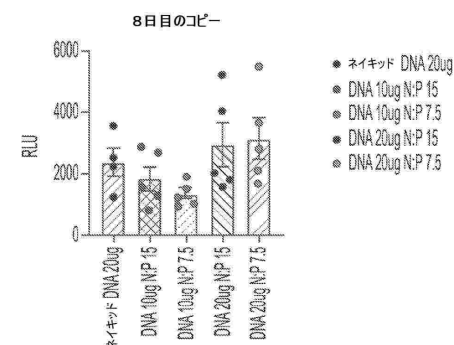


FIG. 16F

40

50

【図 1 7】

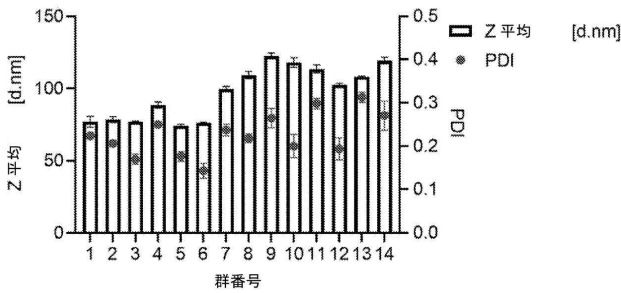


FIG. 17

【図 1 8】

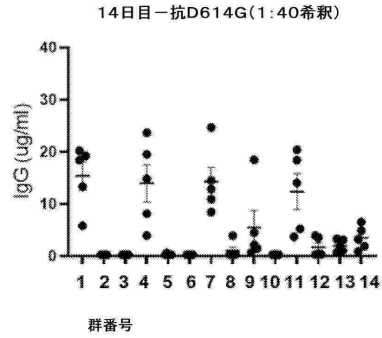


FIG. 18A

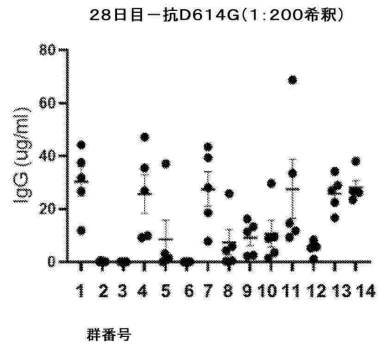


FIG. 18B

【図 1 9】

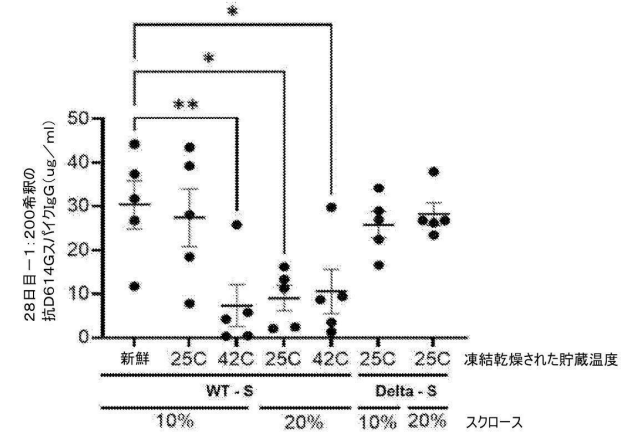


FIG. 19

【配列表】

2024535351000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 9/19; A61K 9/14; B82Y 5/00; A61K 48/00 (2022.01)

CPC - A61K 9/19; A61K 9/143; A61K 9/145; A61K 9/1623; A61K 9/5123; B82Y 5/00; B82Y 40/00; A61K 48/0008; A61K 48/005; A61K 9/107; A61K 9/127; C07K 16/10; C07K 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y --- A	WO 2018/232257 A1 (INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE) 20 December 2018; abstract; paragraphs [0008], [0010], [0013], [0033], [0036], [0062], [0063], [0093], [0097], [00101], [00104], [00120], [00122], [00126], [00128], [00130], [00135], [00138], [00140], [00141], [00142], [00144], [00151], [00153], [00155], [00178], [00191], [00182], [00193], [00194], [00195], [00199], [00202], [00206], [00208], [00209], [00214], [00282], [00285], [00307], [00308], [00309], [00318], [00322], [00325], [00330], [00331], [00334], [00337], [00339], [00351], [00355], [00402], [00404], [00405], [00406], embodiment 88, [00410], [00412], [00430], [00463]; claims 1, 92, 109; figs. 1A-E	1-2, 4-6, 8-29, 30/1-2, 30/4-6, 30/8-29, 31/30/1-2, 31/30/4-6, 31/30/8-29, 32/30/1-2, 32/30/4-6, 32/30/8-29, 33/30/1-2, 33/30/4-6, 33/30/8-29, 34/30/1-2, 34/30/4-6, 34/30/8-29, 35/30/1-2, 35/30/4-6, 35/30/8-29, 36/30/1-2, 36/30/4-6, 36/30/8-29, 37/30/1-2, 37/30/4-6, 37/30/8-29, 38, 40, 42-46, 48-77, 79-82, 85-88, 90-107, 109 --- 7, 30/7, 31/30/7, 32/30/7, 33/30/7, 34/30/7, 35/30/7, 36/30/7, 37/30/7, 47, 89, 110, 119-121, 127 --- 112-113
Y	WO 2007/024826 A2 (CELSION CORPORATION) 1 March 2007; page 3, 1st paragraph; page 9, 2nd paragraph; claims 1, 3, 80	7, 30/7, 31/30/7, 32/30/7, 33/30/7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May 2022 (16.05.2022)

Date of mailing of the international search report

JUN 14 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13508

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		36/30/7, 37/30/7, 47, 69
Y	US 2021/0128583 A1 (MARINUS PHARMACEUTICALS, INC.) 6 May 2021; paragraph [0089], [0169], [0289]; tables 2, 10	110
—		112-113
A		119-121, 127
Y	(MARCUS, M et al.) Iron oxide nanoparticles for neuronal cell applications: uptake study and magnetic manipulations. Journal of Nanobiotechnology. 14 May 2016, Vol. 14, No. 37; pages 1-3; abstract; page 2, 1st column, 4th paragraph and 2nd column, 4th paragraph; page 3, 1st column, 2nd paragraph; DOI: 10.1186/s12951-016-0190-0	112-113
A	US 2017/0189368 A1 (PFIZER INC.) 6 July 2017; abstract; paragraphs [0006], [0008], [0010], [0025], [0059]	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US22/13508
Box No. 1	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13508

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 78, 83-84, 108, 111, 114-118, 122-126, 128
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I+, Claims 1-107, 109-110, 112-113, 119-121; lyophilized (process); alpha tocopherol (oil); metal salt (inorganic nanoparticle); cationic lipid (lipid); DOTAP (cationic lipid); hydrophobic surfactant (surfactant); sorbitan monolaurate (hydrophobic surfactant); sucrose (cryoprotectant)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13508

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-107, 109-110, 112-113, 119-121; lyophilized (process); alpha tocopherol (oil); metal salt (inorganic nanoparticle); cationic lipid (lipid); DOTAP (cationic lipid); hydrophobic surfactant (surfactant); sorbitan monolaurate (hydrophobic surfactant); sucrose (cryoprotectant) are directed towards dried compositions, comprising a lipid carrier, wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core, optionally one or more inorganic nanoparticles and one or more lipids, one or more nucleic acid, and at least one cryoprotectant, kits and methods for preparing such compositions for use in delivery of a nucleic acid for treatment of a subject.

The dried compositions, kits, and methods of Claims 1-2, 4-10, 11-15 (each in-part), 16, 17-18 (each in-part), 19-24, 25-26 (each in-part), 27-38, 40, 42-43 (each in-part), 44-49, 50-68 (each in-part), 69-77, 79-82, 85-92, 93-96 (each in-part), 97, 98-99 (each in-part), 100-106, 107 (in-part), 109-110, 112-113, 119-121 and 127 are believed to encompass the first named invention of Group I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass lyophilized (first exemplary process); alpha tocopherol (first exemplary oil); metal salt (first exemplary inorganic nanoparticle); cationic lipid (first exemplary lipid); DOTAP (first exemplary cationic lipid); hydrophobic surfactant (first exemplary surfactant); sorbitan monolaurate (first exemplary hydrophobic surfactant); and sucrose (first exemplary cryoprotectant).

Applicant is invited to elect additional process(es), oil(s), inorganic nanoparticle(s), lipid(s), surfactant(s), and cryoprotectant(s), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional process(es), oil(s), inorganic nanoparticle(s), lipid(s), surfactant(s), and cryoprotectant(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected process(es), oil(s), inorganic nanoparticle(s), lipid(s), surfactant(s), and cryoprotectant(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be spray-dried (process).

No technical features are shared between the processes, oils, inorganic nanoparticles, lipids, surfactants, and cryoprotectants of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a dried composition comprising: (a) a lipid carrier, wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core, one or more inorganic nanoparticles, and one or more lipids; (b) one or more nucleic acid; and (c) at least one cryoprotectant; a pharmaceutical composition comprising the composition reconstituted in a suitable diluent and a pharmaceutically acceptable carrier; a kit comprising the pharmaceutical composition and a delivery system for administration to a subject; a vaccine delivery system comprising the pharmaceutical composition and optionally one or more vaccine adjuvants; a method for generating an immune response in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject; a method of treating or preventing a disease in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject; a method of imaging and/or tracking delivery of one or more nucleic acids in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject; a method for preparing a lyophilized composition comprising: (a) obtaining a lipid carrier, wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core, optionally one or more inorganic nanoparticles, and one or more lipids; (b) incorporating one or more nucleic acid into the lipid carrier to form a lipid carrier-nucleic acid complex; (c) adding at least one cryoprotectant to the lipid carrier-nucleic acid complex to form a formulation; and (d) lyophilizing the formulation to form a lyophilized composition; a method for preparing a spray-dried composition comprising: (e) obtaining a lipid carrier, wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core, optionally one or more inorganic nanoparticles, and one or more lipids; (f) incorporating one or more nucleic acid into the lipid carrier to form a lipid carrier-nucleic acid complex; (g) adding at least one cryoprotectant to the lipid carrier-nucleic acid complex to form a formulation; and (h) spray drying the formulation to form a spray-dried composition; a method for reconstituting a lyophilized composition comprising: (a) obtaining a lipid carrier, wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core, optionally one or more inorganic nanoparticles, and one or more lipids; (b) incorporating one or more nucleic acid into the said lipid carrier to form a lipid carrier-nucleic acid complex; (c) adding at least one cryoprotectant to the lipid carrier-nucleic acid complex to form a formulation; (d) lyophilizing the formulation to form a lyophilized composition; and (e) reconstituting the lyophilized composition in a suitable diluent; a method for reconstituting a spray-dried composition comprising: (a) obtaining a lipid carrier, wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core, optionally one or more inorganic nanoparticles, and one or more lipids; (b) incorporating one or more nucleic acid into the said lipid carrier to form a lipid carrier-nucleic acid complex; (c) adding at least one cryoprotectant to the lipid carrier-nucleic acid complex to form a formulation; (d) spray drying the formulation to form a spray-dried composition; and (e) reconstituting the spray-dried composition in a suitable diluent; a dried composition comprising a sorbitan fatty acid ester, an ethoxylated sorbitan ester, a cationic lipid, an immune stimulant and a RNA; a dried composition comprising sorbitan monostearate, polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate, DOTAP, an immune stimulant, and a RNA; a dried composition comprising: a) a lipid carrier, wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core, and one or more lipids; b) optionally one or more nucleic acid; and c) at least one sugar present in amount of (i) at least about 50% by weight of the dried composition, or (ii) present in an amount of least about 50 mg; a composition comprising: a nucleic acid present in an amount of up to about 200 micrograms (g); a cationic lipid present in a concentration of up to about 1.5 mg/ml; iron oxide present in a concentration of up to about 0.01 mg/ml; squalene present in a concentration of up to about 1.86 mg/ml; sorbitan monostearate present in a concentration of up to about 1.86 mg/ml; polysorbate 80 present in a concentration of up to about 1.86 mg/ml; sucrose present in a concentration of up to about 50 mg/ml; and optionally, citric acid monohydrate present in a concentration of up to about 2.1 mg/ml; these shared technical features are previously disclosed by WO 2018/232257 A1 (INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE) (hereinafter 'Infectious'257') in view of the publication entitled 'An Alphavirus-derived replicon RNA vaccine induces SARS-CoV-2 neutralizing antibody and T cell responses in mice and nonhuman primates' by Erasmus, et al. (hereinafter 'Erasmus'), WO 2020/243115 A1 (INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE) (hereinafter 'Infectious'115'), and US 9,555,136 B2 to University of Washington through its Center for Commercialization (hereinafter 'Washington').

Infectious'257 discloses a dried composition (the material in the vial is dry (a dried composition); paragraph [00404]) comprising: (a) a

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13508

-***-Continued from previous Supplemental Box-***-

lipid carrier (comprising: (a) a lipid carrier; claim 1), wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core (wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising an oil (hydrophobic) core; paragraph [00414]; claim 1), one or more nanoparticles (one or more nanoparticles; claim 1), and one or more lipids (one or more lipids; claim 1); (b) one or more nucleic acid (a bioactive agent including a nucleic acid; claims 1, 92); and (c) at least one cryoprotectant (at least one cryoprotectant; paragraph [00334]); a pharmaceutical composition comprising the composition reconstituted in a suitable diluent (a pharmaceutical composition comprising the composition reconstituted in a suitable diluent; paragraphs [00308], [00314], [00326]) and a pharmaceutically acceptable carrier (and a pharmaceutically acceptable carrier; paragraph [00309]); a kit comprising the pharmaceutical composition (a kit comprising the pharmaceutical composition; paragraph [00402]) and a delivery system for administration to a subject (vaccine (a delivery system for administration to a subject); abstract); a vaccine delivery system comprising the pharmaceutical composition (a vaccine delivery system comprising the pharmaceutical composition; abstract) and optionally one or more vaccine adjuvants; a method for generating an immune response in a subject (a method for generating an immune response in a subject; abstract), comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject (comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject; claim 10); a method of treating or preventing a disease in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject (a method of treating or preventing a disease in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject; paragraph [0008]; claim 10); a method for preparing a lyophilized composition (a method for preparing a lyophilized composition; paragraph [00330]) comprising: (a) obtaining a lipid carrier (obtaining a lipid carrier; paragraphs [0062]-[0063]), wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core (wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core; claim 1), optionally one or more inorganic nanoparticles, and one or more lipids (one or more lipids; claim 1); (b) incorporating one or more nucleic acid into the lipid carrier to form a lipid carrier-nucleic acid complex (incorporating one or more nucleic acid into the lipid carrier to form a lipid carrier-nucleic acid complex; paragraphs [0062], [00143]); (c) adding at least one cryoprotectant to the lipid carrier-nucleic acid complex to form a formulation (adding at least one cryoprotectant to the lipid carrier-nucleic acid complex to form a formulation; paragraph [00334]); and (d) lyophilizing the formulation to form a lyophilized composition (lyophilizing the formulation to form a lyophilized composition; paragraph [00330]); the material may be dry (paragraph [00404]); a method for reconstituting a lyophilized composition (a method for reconstituting a lyophilized composition; claim 65) comprising: (a) obtaining a lipid carrier (obtaining a lipid carrier; paragraphs [0062]-[0063]), wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core (wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core; claim 1), optionally one or more inorganic nanoparticles, and one or more lipids (one or more lipids; claim 1); (b) incorporating one or more nucleic acid into the said lipid carrier to form a lipid carrier-nucleic acid complex (incorporating one or more nucleic acid into the lipid carrier to form a lipid carrier-nucleic acid complex; paragraphs [0062], [00143]); (c) adding at least one cryoprotectant to the lipid carrier-nucleic acid complex to form a formulation (adding at least one cryoprotectant to the lipid carrier-nucleic acid complex to form a formulation; paragraph [00334]); (d) lyophilizing the formulation to form a lyophilized composition (lyophilizing the formulation to form a lyophilized composition; paragraph [00330]); and (e) reconstituting the lyophilized composition in a suitable diluent (reconstituting the lyophilized composition in a suitable diluent; claim 65); a method for reconstituting a dried composition (a method of reconstituting a dry composition; paragraph [00404]; claim 65) comprising: and (e) reconstituting the dried composition in a suitable diluent (reconstituting the dried composition in a suitable diluent; claim 65); a dried composition (composition may be dried; paragraph [00404]) comprising a sorbitan fatty acid ester (comprising a sorbitan fatty acid ester; paragraph [00413]; claim 43), an ethoxylated sorbitan ester (an ethoxylated sorbitan ester; paragraph [00413]), a cationic lipid (a cationic lipid; paragraph [00413]), an immune stimulant (squalene (immune stimulant); paragraph [00447]), and a RNA (claim 13); a dried composition (composition may be dried; paragraph [00404]) comprising sorbitan monostearate (comprising a sorbitan monostearate; paragraph [00413]; claim 43), polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (tween 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate); paragraph [00413]; DOTAP (paragraph [00413]), an immune stimulant (squalene (immune stimulant); paragraph [00447]), and a RNA (claim 13); a dried composition (composition may be dried; paragraph [00404]) comprising: a) a lipid carrier (comprising: a) a lipid carrier; claim 1), wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core (wherein the lipid carrier is a nanoemulsion comprising a hydrophobic core; paragraph [00414]; claim 1), and one or more lipids (and one or more lipids; claim 1); b) optionally one or more nucleic acid; and c) at least one sugar (sucrose present in a concentration; paragraph [00144]); a composition comprising: a nucleic acid present in an amount of up to about 200 micrograms (g) (a composition comprising: a nucleic acid present in an amount of up to about 200 micrograms; claims 1, 51); a cationic lipid present in a concentration of up to about 1.5 mg/ml (cationic lipid present in a concentration of up to about 1.5 mg/ml; paragraph [00120]; claim 1); squalene present in a concentration (squalene present in a concentration; claims 24, 84); sorbitan monostearate present in a concentration (sorbitan monostearate present in a concentration; claims 43, 84); polysorbate 80 present in a concentration (polysorbate 80 present in a concentration; claim 84); sucrose present in a concentration (sucrose present in a concentration; paragraph [00144]); and optionally, citric acid monohydrate present in a concentration of up to about 2.1 mg/ml.

Infectious'257 does not disclose inorganic nanoparticles; a method of imaging and/or tracking delivery of one or more nucleic acids in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject; a method for preparing a spray-dried composition comprising: (d) spray drying the formulation to form a spray-dried composition; sugar present in amount of (i) at least about 50% by weight of the dried composition, or (ii) present in an amount of least about 50 mg; iron oxide present in a concentration of up to about 0.01 mg/ml; squalene present in a concentration of up to about 1.88 mg/ml; sorbitan monostearate present in a concentration of up to about 1.86 mg/ml; polysorbate 80 present in a concentration of up to about 1.86 mg/ml; sucrose present in a concentration of up to about 50 mg/ml.

Erasmus discloses inorganic nanoparticles (inorganic nanoparticles; abstract) and iron oxide (iron oxide; page 7, first column, second paragraph).

Infectious'115 discloses a method for preparing a spray-dried composition (a method for preparing a spray-dried composition; claim 26) comprising: (d) spray drying the formulation to form a spray-dried composition (comprising: (d) spray drying the formulation to form a spray-dried composition; claim 26).

Washington discloses a method of imaging (a method of imaging; abstract; column 12, lines 20-25), comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject (comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject; column 11, lines 48-58); iron oxide present in a concentration of up to about 0.01 mg/ml (iron oxide present in a concentration of up to about 0.01 mg/ml; column 37, line 10).

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/13508

-***-Continued from previous Supplemental Box-***-

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have included sugar present in amount of (i) at least about 50% by weight of the dried composition, or (ii) present in an amount of least about 50 mg; squalene present in a concentration of up to about 1.88 mg/ml; sorbitan monostearate present in a concentration of up to about 1.86 mg/ml; polysorbate 80 present in a concentration of up to about 1.86 mg/ml; sucrose present in a concentration of up to about 50 mg/ml, as the previous disclosure of Infectious'257 provides guidance for incorporating different concentrations of sugar, squalene, sorbitan monostearate, and polysorbate 80 into the composition (paragraph [00144]; claims 24, 43, 84), and such concentrations could have been readily achieved and implemented through routine experimentation and testing, in order to provide superior therapeutic and prophylactic compositions. It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Infectious'257, to include inorganic nanoparticles, as disclosed by Erasmus, in order to provide a superior composition having enhanced vaccine stability, delivery, and immunogenicity. Furthermore, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Infectious'257, to include a method for preparing a spray-dried composition comprising: (d) spray drying the formulation to form a spray-dried composition, as disclosed by Infectious'115, in order to provide a superior composition having enhanced thermostability. Additionally, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Infectious'257, to include a method of imaging, comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition to the subject; iron oxide present in a concentration of up to about 0.01 mg/ml, as disclosed by Washington, in order to provide a composition having superior stability and customizability.

Since none of the special technical features of the Groups i+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Infectious'257, Erasmus, Infectious'115, and Washington references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/14 (2017.01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 47/18 (2017.01)	A 6 1 K 47/18	
C 1 2 N 15/88 (2006.01)	C 1 2 N 15/88	Z Z N A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

弁護士 山本 健策

- (72)発明者 リード, スティーブン グレゴリー
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 0 5, ベルビュー, 1 2 2 プレイス エヌイー 2 8 4 3
- (72)発明者 カーター, ダリック アルバート
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 7, シアトル, エヌダブリュー 6 4 ティーエイチ スト
リート 8 3 6
- (72)発明者 カンダール, アミット プラフル
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 2 9, イサクア, エスイー 4 3 アールディー プレイス 2
2 3 2 4

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 BA05
4C076 AA17 AA29 AA99 CC06 DD09 DD26 DD29 DD30 DD34 DD38
DD43 DD46 DD49 DD59 DD63 DD67 EE51 EE53 FF36 FF68 GG05
GG06
4C084 AA13 MA11 MA22 MA44 NA03 NA13 ZB09
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 MA11 MA22 MA44 NA03 NA13
ZB09