

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7409594号
(P7409594)

(45)発行日 令和6年1月9日(2024.1.9)

(24)登録日 令和5年12月25日(2023.12.25)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00 G
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12
A 6 1 K	39/21 (2006.01)	A 6 1 K	39/21
A 6 1 K	39/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/02
A 6 1 K	39/015 (2006.01)	A 6 1 K	39/015
請求項の数 22 (全109頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-500810(P2020-500810)	(73)特許権者	517237539
(86)(22)出願日	平成29年11月9日(2017.11.9)		イミューノヴァクシーン テクノロジーズ
(65)公表番号	特表2020-526530(P2020-526530 A)		インコーポレイテッド
(43)公表日	令和2年8月31日(2020.8.31)		IMMUNOVACCINE TECH
(86)国際出願番号	PCT/CA2017/051336		NOLOGIES INC.
(87)国際公開番号	WO2019/010560		カナダ, ノヴァ スコティア州, ビー
(87)国際公開日	平成31年1月17日(2019.1.17)		3 ビー 2 シー 4, ダートマス, アイリ
審査請求日	令和2年10月22日(2020.10.22)		ーン スタブス アベニュー 1 3 0, ス
(31)優先権主張番号	62/530,498	(74)代理人	イート 1 9
(32)優先日	平成29年7月10日(2017.7.10)		100107456
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 池田 成人
前置審査		(74)代理人	100162352
			弁理士 酒巻 順一郎
		(74)代理人	100123995
			弁理士 野田 雅一
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 医薬組成物、規定のサイズの脂質ベシクル粒子を使用する調製物のための方法、及びそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を調製するための方法であって、

(a) 1 2 0 n m の平均粒径及び 0 . 1 の多分散指数 (P D I) を有する脂質ベシクル粒子を用意するステップ、

(b) 前記脂質ベシクル粒子を少なくとも 1 つの可溶化された治療剤と混合して混合物を形成するステップ、及び

(c) ステップ (b) において形成された前記混合物を乾燥して、脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を形成するステップ

を含み、前記治療剤が 1 個又は複数のペプチド抗原である、方法。

【請求項 2】

ステップ (a) が、脂質ベシクル粒子を分粒して、 1 2 0 n m の平均粒径及び 0 . 1 の P D I を有する脂質ベシクル粒子を用意することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記脂質ベシクル粒子の平均粒径が約 8 0 n m ~ 約 1 2 0 n m の間である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記脂質ベシクル粒子の平均粒径が 1 0 0 n m である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記脂質ベシクル粒子が、合成ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、又は合成DOPC及びコレステロールを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記脂質ベシクル粒子が合成DOPC及びコレステロールを10：1（w/w）のDOPC：コレステロール比で含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記脂質ベシクル粒子がリボソームである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記1個又は複数のペプチド抗原がネオ抗原である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項9】

前記1個又は複数のペプチド抗原が、ヒトパピローマウイルス（HPV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、呼吸器多核体ウイルス（RSV）、バチルス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）、プラスモジウム属（*Plasmodium*）又はサバイビンポリペプチドに由来する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記1個又は複数のペプチド抗原が、FTELT LGEF（配列番号4）、LMLGEFLKL（配列番号5）、RISTFKNWPK（配列番号6）、STFKNWPF L（配列番号7）若しくはLP PAWQPFL（配列番号8）、又はこれらの任意の組み合わせである、請求項9に記載の方法。

20

【請求項11】

前記1個又は複数のペプチド抗原がNKLC EYNVFHNKTFELPRARVNT（配列番号2）及び／又はNK LSEHKTF CNK TLEQGQMYQINT（配列番号3）である、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

ステップ（b）が、5個以上の異なる可溶化されたペプチド抗原を前記脂質ベシクル粒子と混合することを含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

ステップ（b）が、最大で30個の異なる可溶化されたペプチド抗原を前記脂質ベシクル粒子と混合することを含む、請求項12に記載の方法。

30

【請求項14】

前記異なる可溶化されたペプチド抗原が、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する任意の特性に基づいて事前に選択されていない、請求項12又は13に記載の方法。

【請求項15】

前記異なる可溶化されたペプチド抗原が、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する1つ又は複数の異なる特性を有する、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

ステップ（b）が、可溶化されたTヘルパーエピトープを任意の順序で前記脂質ベシクル粒子及び前記1個又は複数のペプチド抗原と混合することをさらに含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項17】

ステップ（b）が、10～15個のネオ抗原を1つの可溶化されたTヘルパーエピトープと混合することを含み、前記Tヘルパーエピトープがアミノ酸配列AQYIKANSKF IGI TEL（配列番号1）を含む、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

ステップ（b）が、任意の順序でアジュバントを前記脂質ベシクル粒子及び前記1個又は複数のペプチド抗原と混合することをさらに含む、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 19】

前記アジュバントがポリ I : Cヌクレオチドアジュバントである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記乾燥が凍結乾燥によって行われる、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

疎水性担体に、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法によって得られる乾燥調製物を可溶化するステップを含む、医薬組成物を調製するための方法。

【請求項 22】

前記疎水性担体が鉱油又は鉱油溶液中のオレイン酸マンニドである、請求項 21 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

[0001]本出願は、2017年7月10日に提出された米国特許仮出願第62/530,498号の利益及び優先権を主張し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【分野】

【0002】

[0002]本出願は、脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を調製するための方法、医薬組成物を調製するための方法、並びに単一層脂質集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体、少なくとも1つの治療剤、及び疎水性担体を含む、安定で水を含まない医薬組成物に関する。

20

【背景】

【0003】

[0003]医薬品の分野において、治療剤の効果的な送達は、詳細には、治療剤の有効性を増強するために設計された新たな送達プラットフォームの複雑さの点で、困難さ及び課題をしばしばもたらす。特有の構成成分を利用するこれらの特殊な送達プラットフォームに関して、従来の医薬組成物では存在しなかった新たなハードルが生じる。このことは、水を含まない疎水性担体を使用する送達プラットフォームに対する場合に当てはまる。

【0004】

30

[0004]治療剤の様々な特性により、詳細には、複数の異なる治療剤が単一組成物と一緒に製剤化されなければならない場合に、そのような送達プラットフォームへの組み込みには時間がかかり労働集約的な技能となる。例えば、多くの治療剤の親水性又は疎水性が高いため、水性及び疎水性溶液の両方において調製の順次的な段階を伴う製造プロセスでは、医薬品グレードの製剤を調製するために特有の妨げが生じる。また、サイズ押出ステップを意味するリボソーム送達ビヒクルへの治療剤のカプセル化は、医薬品グレードの組成物を得るための滅菌濾過手順を効果的に行うために、しばしば必要である。しかしながら、これらの押出ステップにより、溶液から治療剤が出てくる原因となり得、再現性の欠如及び/又は医薬品の目的のために許容できない組成物がもたらされる。

【0005】

40

[0005]これらの課題は、例えば、個別化がんワクチンの文脈において、複数の異なる治療剤を有する医薬組成物を製剤化するために望ましい場合に、妥協される。

【0006】

[0006]個別化がんワクチンは、アミノ酸コード配列を変える変異（非同義体細胞変異）によって生じる腫瘍特異抗原である、患者特異的ネオ抗原に基づいて設計することができる。最近、シーケンシング技術の助けにより、個々の腫瘍のゲノム（エクソーム）のタンパク質コード部分内に存在する変異を特定し、それによって潜在的なネオ抗原を予測することが可能になっている。しかしながら、ネオ抗原系の個別化がんワクチンは、典型的には、免疫化の際に効果的な免疫応答を容易にするために、数週間以内に製剤化しなければならない。タイミングが重要であり、大きなハードルをもたらす。潜在的なネオ抗原を

50

最初に選択すること、次いで、この集団内で、安定な組成物を製剤化するための適切な特性を有するペプチドを選択することにかかる時間は、この分野で進歩してきたが最良は難しい。

【 0 0 0 7 】

[0007]適切な処置を提供する目的のために、現在臨床試験で開発されているネオ抗原ワクチンは、複数の製剤中で10～30の個々のペプチドを送達する。このアプローチは、最も適したネオ抗原を選択するのにかかる時間を減少させるが、製剤安定性及び／又は免疫原性、コスト並びに患者のコンプライアンスに関わる重大な問題が残されている。等電点、安定性、溶解度（例えば共溶解度）及び／又は免疫原性に関する特性の特定のセットを有する抗原の選択において時間のかかる労力なく、抗原を単一の安定な製剤で送達することができることが理想的である。しかし、実際には、その特有の性質に基づいてそれぞれのペプチド抗原のための完全な製剤方法を特定することは、労力と時間のかかるプロセスである。

10

【 0 0 0 8 】

[0008]そのため、安定で免疫学的に有効な医薬組成物に治療剤を製剤化するための堅固で時間的制約のある製造方法についての必要性が残されている。複数の治療剤を含む安定で有効な医薬組成物についての必要性も残されている。

【 概要 】

【 0 0 0 9 】

[0009]一実施形態において、本開示は、脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を調製するための方法であって、(a) 120 nmの平均粒径及び 0.1の多分散指数(PDI)を有する脂質ベシクル粒子を用意するステップ、(b) 脂質ベシクル粒子を少なくとも1つの可溶化された治療剤と混合して混合物を形成するステップ、及び(c) ステップ(b)において形成された混合物を乾燥して、脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を形成するステップを含む方法に関する。

20

【 0 0 1 0 】

[0010]一実施形態において、本開示は、疎水性担体に、本明細書に記載の方法によって得られる乾燥調製物を可溶化するステップを含む、医薬組成物を調製するための方法に関する。

【 0 0 1 1 】

[0011]一実施形態において、本開示は、本明細書に開示の方法によって調製される医薬組成物に関する。

30

【 0 0 1 2 】

[0012]一実施形態において、本開示は、単一層脂質集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体、少なくとも1つの治療剤、及び疎水性担体を含む、安定で水を含まない医薬組成物に関する。

【 0 0 1 3 】

[0013]一実施形態において、本開示は、単一層集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体、5個以上の異なるペプチドネオ抗原、及び疎水性担体を含む、安定で水を含まない医薬組成物であって、ペプチドネオ抗原が、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する任意の特性に基づいて事前に選択されていない、医薬組成物に関する。

40

【 0 0 1 4 】

[0014]一実施形態において、本開示は、本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、対象において抗体及び／又はCTL免疫応答を誘導する方法に関する。

【 0 0 1 5 】

[0015]一実施形態において、本開示は、対象において抗体及び／又はCTL免疫応答を誘導するための、本明細書に記載の医薬組成物の使用に関する。

【 0 0 1 6 】

[0016]一実施形態において、本開示は、抗体及び／又はCTL免疫応答を誘導するための医薬組成物を調製するためのキットであって、本明細書に記載の方法によって調製され

50

る乾燥調製物を含む容器、及び疎水性担体を含む容器を含むキットに関する。

【 0 0 1 7 】

[0017]本発明の他の態様及び特徴は、添付の図面と併せて以下の説明を検討する際に当業者に明らかになるであろう。

【 0 0 1 8 】

[0018]本明細書の一部を構成する添付の図面は例としてのみ本発明の実施形態を図示する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 9 】

【図 1】100 mM、pH 7.0 のリン酸ナトリウム緩衝液を用いて調製された乾燥脂質 / 治療剤の調製物（左パネル）及び可溶化の際にこの調製物から得られた医薬組成物（右パネル）の写真である。

10

【図 2】50 mM、pH 7.0 のリン酸ナトリウム緩衝液を用いて調製された乾燥脂質 / 治療剤の調製物（左パネル）及び可溶化の際にこの調製物から得られた医薬組成物（右パネル）の写真である。

【図 3】50 mM、pH 7.0 のリン酸ナトリウム緩衝液を用いて調製された別の乾燥脂質 / 治療的調製物（左パネル）及び可溶化の際にこの調製物から得られた医薬組成物（右パネル）の写真である。

【図 4】乾燥脂質 / 治療剤の調製物及び可溶化の際にこの調製物から得られた医薬組成物を表す写真である。パネル（A）：分粒された脂質ベシクル粒子及び r P A 抗原、パネル（B）：分粒された脂質ベシクル粒子及び H I V 抗原、パネル（C）：分粒された脂質ベシクル粒子及び サバイピン抗原、パネル（D）：分粒された脂質ベシクル粒子及び R S V 抗原、パネル（E）：分粒されていない脂質ベシクル粒子及び r P A 抗原、パネル（F）：分粒されていない脂質ベシクル粒子及び H I V 抗原、パネル（G）：分粒されていない脂質ベシクル粒子及び サバイピン抗原、パネル（H）：分粒されていない脂質ベシクル粒子及び R S V 抗原。

20

【図 5】乾燥脂質 / 治療剤の調製物及び可溶化の際にこの調製物から得られた医薬組成物を表す写真である。パネル（A）：D O P C / コレステロールの分粒された脂質ベシクル粒子及び サバイピン抗原、パネル（B）：D O P C / コレステロールの分粒された脂質ベシクル粒子及び R S V 抗原、パネル（C）：D O P C 単独の分粒された脂質ベシクル粒子及び サバイピン抗原、パネル（D）：D O P C 単独の分粒された脂質ベシクル粒子及び R S V 抗原。

30

【図 6】滅菌バッグに密封される前に凍結乾燥のためのトレイに載せられた、分粒された脂質ベシクル粒子 / 抗原混合物の無菌充填バイアルの写真である。

【図 7】凍結乾燥のための調製物において、2つの滅菌バッグに入れられ、密封された図 6 の無菌充填バイアルの写真である。

【図 8】凍結乾燥のための V i r t i s 卓上凍結乾燥機の内部の図 7 の二重滅菌バッグバイアルの写真である。

【図 9】凍結乾燥後の V i r t i s 卓上凍結乾燥機の内部に留められた図 7 の二重滅菌バッグバイアルのトレイの写真である。

40

【図 10】滅菌バッグ技法による凍結乾燥後の 5 個のバイアル、及び可溶化の際にこれらのバイアルから得られた医薬組成物の 1 つのバイアルの写真である。医薬組成物は澄明な溶液である。

【図 11】50 mM、pH 6.0 の酢酸ナトリウム緩衝液を用いて調製された乾燥脂質 / 治療剤の調製物（左及び中央パネル）及び可溶化の際にこの調製物から得られた医薬組成物（右パネル）の写真である。

【図 12】14 個のネオ抗原及び A 1 6 L T ヘルパーエピトープを示す標準サンプルの H P L C クロマトグラムである。

【図 13】凍結乾燥前の、14 個のネオ抗原及び A 1 6 L T ヘルパーエピトープを示す H P L C クロマトグラムである。

50

【図14】凍結乾燥直後 ($T = 0$) の、14個のネオ抗原及びA16L Tヘルパーエピトープを示すHPLCクロマトグラムである。

【図15】凍結乾燥の1か月後 ($T = 1M$) の、14個のネオ抗原及びA16L Tヘルパーエピトープを示すHPLCクロマトグラムである。

【図16】凍結乾燥の3か月後 ($T = 3M$) の、14個のネオ抗原及びA16L Tヘルパーエピトープを示すHPLCクロマトグラムである。

【図17】本発明の油性組成物又は水性製剤のいずれかの中で調製された14個の異なるネオ抗原でワクチン接種された、C57BL/6NCrlマウスのIFN-ガンマELISPOT応答を示す図である。免疫応答は、IFN-ガンマELISPOTプレートにおいて、無負荷、又は非関連 (irrelevant) ペプチド若しくは個々のネオ抗原 (Mut17、20、22、24、25、28、29A、29B、30、36、44、45、48、50) で負荷された、同系の樹状細胞で脾細胞を刺激することによって、ワクチン接種の8日後に測定した。結果を平均応答 \pm SEMとして示す。統計解析を、それぞれのペプチドに应答する群を比較するボンフェローニ事後検定による二元配置ANOVAによって行った。 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ 。

10

【図18】モンタニド (Montanide) ISA51VGのサンプルについての小角X線散乱 (SAXS) パターンを表す図である。

【図19】バッチ # 4cのサンプル (サバイピン) についてのSAXSパターンを表す図である。27.3 cmの検出器距離でのバッチ # 4cサンプルについての二体間距離分布関数も示す。

20

【図20】バッチ # 4aのサンプル (rPA) についてのSAXSパターンを表す図である。27.3 cmの検出器距離でのバッチ # 4aサンプルについての二体間距離分布関数も示す。

【図21】DOPC / コレステロール又はS100レシチンの分粒された脂質ベシクル粒子を用いてMS80油担体中で調製された医薬組成物を表す写真である。パネル (A) : DOPC / コレステロールの分粒された脂質ベシクル粒子及びrPA抗原; パネル (B) : DOPC / コレステロールの分粒された脂質ベシクル粒子及びRSV抗原; パネル (C) : S100レシチンの分粒された脂質ベシクル粒子及びRSV抗原; パネル (D) : S100レシチンの分粒された脂質ベシクル粒子及びサバイピン抗原; パネル (E) : S100レシチンの分粒された脂質ベシクル粒子及びマラリア抗原; パネル (F) : S100レシチン / コレステロール (10 : 1 w / w) の分粒された脂質ベシクル粒子及びHIV抗原。すべて、澄明な溶液をもたらした。S100レシチンを使用する組成物について、S100材料が黄色であるので、その溶液の色はわずかに黄色であった。

30

【図22】DOPC / コレステロール及び低分子治療剤のシクロホスファミドの分粒された脂質ベシクル粒子を用いて調製された乾燥脂質 / 治療剤の調製物 (左パネル) ; 及び可溶化の際にこの調製物から得られた医薬組成物 (右パネル) の写真である。乾燥調製物は、乾燥し、白くかつ崩壊していないという点で、良好な外観を有していた。この調製物から得られた組成物は、澄明からわずかに濁った溶液であった。

【詳細な説明】

【0020】

40

[0041]本発明は、脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を調製するための有利な方法、並びにこの方法から調製された医薬組成物に関する。開示される方法は、時間のかかる処理ステップを回避し、複数の治療剤を含有する医薬組成物の迅速な生成を可能にし、これは、例えば、ペプチド抗原 (例えば患者特異的ネオ抗原) が関わる個別化がんワクチンの文脈において、特に有用であると予想される。

【0021】

[0042]乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製するための方法

【0022】

[0043]一実施形態において、本発明は、脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を調製するための方法であって、(a) 120 nmの平均粒径及び 0.1の多分散指数 (PDI)

50

を有する脂質ベシクル粒子を用意するステップ、(b)脂質ベシクル粒子を少なくとも1つの可溶化された治療剤と混合して混合物を形成するステップ、及び(c)ステップ(b)において形成された混合物を乾燥して、脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を形成するステップを含む方法に関する。本方法のステップはこの特定の順序で行われるものであるが、本方法は、例えば、限定されないが本明細書に記載のステップなどの追加のステップを含んでいてもよい。

【0023】

[0044]本明細書で使用される場合、「脂質ベシクル粒子」という用語は、「脂質ベシクル」と互換的に使用することができる。脂質ベシクル粒子は、包み込む脂質の連続層によって外部環境から分離された内部環境を有する複合体又は構造体を指す。本開示の文脈において、「包み込む脂質の層」という表現は、単一層脂質膜(例えば、ミセル又は逆ミセルにおいて見られる)、二重層脂質膜(例えば、リポソームにおいて見られる)、又は単一及び/又は二重層脂質膜から形成された任意の多層膜を意味し得る。包み込む脂質の層は、典型的には、その周囲全体にわたって、単一層、二重層又は多層であるが、層がその周囲にわたって異なる配置を有するように、他の立体構造が可能であってもよいと考えられる。脂質ベシクル粒子は、その内部環境内に、他のベシクル構造体を含有していてもよい(すなわち、脂質ベシクル粒子は多胞体であってもよい)。

10

【0024】

[0045]「脂質ベシクル粒子」という用語は、本明細書の記載の粒径の限定に適合する限り(すなわち、120nmの平均粒径及び0.1のPDI)、限定されないが、ミセル、逆ミセル、単層リポソーム、多重層リポソーム及び多胞体リポソームを含む、多くの異なる種類の構造体を包含する。

20

【0025】

[0046]脂質ナノ粒子に帰する定義に応じて、本開示の脂質ベシクル粒子は、脂質ナノ粒子と同義であってもよい。しかしながら、「脂質ナノ粒子」という用語の意味に対して、当技術分野には対照的な見解がある。1つの見解は、脂質ナノ粒子が、脂質膜によって形成される任意のナノサイズの粒子(すなわち、1ナノメートル~1000ナノメートルの間の直径を有する)を指すというものである。もう1つの見解は、ナノ粒子材料についてのサイズの閾値が、1ナノメートル~100ナノメートルの間に限定されるというものである。この後者の定義は、本開示によって包含される脂質ベシクルのサイズ(例えば、サイズ>100nmの脂質ベシクル粒子)を排除し、この点で、本開示において使用される「脂質ベシクル粒子」という用語と矛盾する。

30

【0026】

[0047]脂質ベシクル粒子は様々な異なる形状を取ってもよく、形状は任意の所与の時間(例えば乾燥の際)に変化してもよい。典型的には、脂質ベシクル粒子は球形又は実質的に球形の構造体である。「実質的に球形」に関して、これは、脂質ベシクルが球形に近いが、完全な球体ではなくてもよいことを意味する。脂質ベシクル粒子の他の形状としては、限定されないが、長円形、楕円形、正方形、長方形、三角形、直方体、三日月形、菱形、円柱又は半球体の形状が挙げられる。任意の規則的又は不規則な形状が形成されてもよい。さらに、単一の脂質ベシクル粒子は、多胞体である場合、異なる形状を含んでいてもよい。例えば、外側のベシクルの形状は楕円形又は長方形であってもよいが、内側のベシクルは球形であってもよい。

40

【0027】

[0048]脂質ベシクル粒子は、単一層脂質膜、二重層脂質膜及び/又は多層脂質膜から形成される。脂質膜は脂質によって主に構成及び形成されるが、追加の構成成分も含んでいてもよい。例えば、限定されないが、脂質膜は、脂質ベシクル粒子のサイズ及び/又は形状を維持するのを助ける安定化分子を含んでいてもよい。開示される方法において使用される脂質ベシクル粒子の能力に負の影響を与えない限り、当技術分野で公知の任意の安定化分子を使用することができる。

【0028】

50

【0049】「脂質」という用語は、非極性溶媒に可溶性であるが、一般に極性溶媒（例えば水）に不溶性である任意の有機物質又は化合物であるという、当技術分野における通常の意味を有する。脂質は、限定されないが、脂肪、ワックス、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド及びリン脂質を含む、多様な群の化合物である。本明細書における脂質ベシクル粒子のために、膜形成脂質である限り、任意の脂質を使用することができる。「膜形成脂質」に関して、これは、脂質が、単独で、又は他の脂質及び／又は安定化分子と一緒に脂質ベシクル粒子の脂質膜を形成することができることを意味する。脂質ベシクル粒子は単一の種類の脂質又は２種以上の異なる種類の脂質を含んでいてもよい。

【0029】

10

【0050】一実施形態において、脂質ベシクル粒子の脂質又は複数の脂質は、親水性及び疎水性（脂溶性）の性質の両方を有することを意味する両親媒性脂質である。

【0030】

【0051】上記に定義される任意の脂質を使用することができるが、特に適切な脂質としては、少なくとも４個の炭素、典型的には約４～２８個の炭素を含有する少なくとも１つの脂肪酸鎖を有する脂質を挙げることができる。脂肪酸鎖は、任意の数の飽和及び／又は不飽和結合を含有していてもよい。脂質は、天然脂質又は合成脂質であってもよい。脂質の非限定的な例としては、リン脂質、スフィンゴ脂質、スフィンゴミエリン、セレブロシド、ガングリオシド、エーテル脂質、ステロール、カルジオリピン、カチオン性脂質、及びポリ（エチレングリコール）で改変された脂質、並びに他のポリマーを挙げることができる。合成脂質としては、限定されないが、以下の脂肪酸構成要素：ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、アラキドイル、オレオイル、リノレオイル、エルコイル、又はこれらの脂肪酸の組み合わせを挙げることができる。

20

【0031】

【0052】一実施形態において、脂質は、リン脂質又はリン脂質の混合物である。広範に定義すると、「リン脂質」は、リン酸、アルコール、脂肪酸及び窒素含有塩基の加水分解において生じる脂質化合物の群のメンバーである。

【0032】

【0053】使用することができるリン脂質としては、例えば、限定されないが、ホスホグリセロール、ホスホエタノールアミン、ホスホセリン、ホスホコリン（例えば、ＤＯＰＣ； 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン）及びホスホイノシトールからなる群から選択される少なくとも１つの頭部基を有するリン脂質が挙げられる。一実施形態において、リン脂質は、ホスファチジルコリン、又はホスファチジルコリンを含む脂質の混合物であってもよい。一実施形態において、脂質は、ＤＯＰＣ（Lipoid GmbH、ドイツ）又はリポイド（Lipoid）S 100 レシチンであってもよい。いくつかの実施形態において、ＤＯＰＣ及び非エステル化コレステロールの混合物を使用してもよい。他の実施形態において、リポイドS 100 レシチン及び非エステル化コレステロールの混合物を使用してもよい。

30

【0033】

【0054】一実施形態において、脂質ベシクル粒子は合成脂質を含む。一実施形態において、脂質ベシクル粒子は合成ＤＯＰＣを含む。別の実施形態において、脂質ベシクル粒子は合成ＤＯＰＣ及びコレステロールを含む。

40

【0034】

【0055】コレステロールを使用する場合、コレステロールは、脂質膜中で脂質を安定化するために十分な任意の量でを使用することができる。一実施形態において、コレステロールは、リン脂質の重量の約１０％と同等の量で（例えば、１０：１ w / w のＤＯＰＣ：コレステロール比で）使用してもよい。コレステロールは、リン脂質ベシクル粒子の形成を安定化することができる。コレステロール以外の化合物を使用する場合、当業者であれば、必要な量を容易に決定することができる。

【0035】

50

[0056]一実施形態において、本明細書に開示される組成物は、約 120 mg/ml の D O P C 及び約 12 mg/ml のコレステロールを含む。

【0036】

[0057]別の一般的なリン脂質は、スフィンゴミエリンである。スフィンゴミエリンは、長鎖不飽和炭化水素鎖を有するアミノアルコールであるスフィンゴシンを含有する。脂肪アシル側鎖は、アミド結合によってスフィンゴシンのアミノ基に連結され、セラミドを形成する。スフィンゴシンのヒドロキシル基は、ホスホコリンにエステル化される。ホスホグリセリドのように、スフィンゴミエリンは両親媒性である。

【0037】

[0058]レシチンは、使用されてもよく、典型的には、鶏卵、羊毛、大豆及び他の野菜源に由来する天然のリン脂質混合物である。

10

【0038】

[0059]これら及び他のリン脂質のすべては本発明の実施において使用することができる。リン脂質は、例えば、様々な他の供給業者のうち、Avanti lipids (Alabastar, AL, 米国)、Lipoid LLC (Newark, NJ, 米国) 及び Lipoid GmbH (ドイツ) から購入することができる。

【0039】

[0060]脂質ベシクル粒子は閉じられた小胞構造体である。小胞構造体は、典型的には球形の形状であるが、他の形状及び立体構造を形成してもよく、これらは排除されない。脂質ベシクル粒子の例示的な実施形態としては、限定されないが、単一層小胞構造体（例えばミセル）及び二重層小胞構造体（例えば、単層又は多重層ベシクル）、又はこれらの様々な組み合わせが挙げられる。

20

【0040】

[0061]「単一層」に関して、これは、脂質は二重層を形成しないが、むしろ疎水性部分が片側に向いており、親水性部分はその逆側に向いている層を維持していることを意味する。「二重層」に関して、これは、脂質が、典型的には、それぞれの層の疎水性部分が、二重層の中心の方に内部に向いており、親水性部分が外部に向いている、二重層のシートを形成することを意味する。しかしながら、逆の配置も可能である。「多層」という用語は、単一層及び二重層構造体の任意の組合せを包含することを意味する。選ばれる形態は、使用される特定の脂質によって決めてもよい。また、本明細書の方法において使用される形態は、開示される方法のサイズの制限、すなわち、 120 nm の平均粒径及び 0.1 の PDI によって決められる。

30

【0041】

[0062]一実施形態において、脂質ベシクル粒子は、例えば、リボソームなどの二重層小胞構造体である。リボソームは、完全に閉じられた脂質二重層膜である。リボソームは、単層ベシクル（単一の二重層膜を有する）、多重層ベシクル（多重膜の二重層によって特徴付けられ、それによって、それぞれの二重層は、水性層によって隣と分離されていてもよく、又は分離されていなくてもよい）、又は多胞体ベシクル（ベシクル内に1つ又は複数のベシクルを有する）であってもよい。一般的ナリボソームの議論は、Gregoriadis 1990年；及びFrezard 1999年に見ることができる。

40

【0042】

[0063]このように、一実施形態において、脂質ベシクル粒子はリボソームである。一実施形態において、リボソームは単層、多重層、多胞体又はこれらの混合物である。一実施形態において、リボソームの平均粒径は 80 nm である。このように、一実施形態において、本明細書に開示される方法において使用されるリボソームの平均粒径は $80\text{ nm} \sim 120\text{ nm}$ の範囲であり、PDI は 0.1 である。

【0043】

[0064]本明細書に開示される方法は、 120 nm の平均粒径及び 0.1 の多分散指数 (PDI) を有する脂質ベシクル粒子の使用を必要とする。

【0044】

50

[0065]本明細書で使用される場合、「平均 (mean)」は、所与の集団中の脂質ベシクル粒子の粒径の算術平均を指す。これは、平均 (average) と同義である。このように、「平均粒径」は、集団中の脂質ベシクル粒子の総数によって割った、集団のそれぞれの脂質ベシクル粒子の直径の合計を指すものとする (例えば、95 nm、98 nm、102 nm 及び 99 nm の粒径を有する 4 個の脂質ベシクル粒子の集団において、平均粒径は、 $(95 + 98 + 102 + 99) / 4 = 98.5$ nm である)。しかしながら、当業者には明らかであるように、脂質ベシクル粒子が、完全な球形でなくてもよく、したがって、所与のベシクル粒子の「粒径」がその直径の正確な寸法でなくてもよい。むしろ、粒径は、例えば等面積の球体の直径又は粒子の逆側に接する平行な接線の間の最大垂直距離 (フェレットの統計的直径) を含む、当技術分野で公知の他の手段によって定義されてもよい。

10

【0045】

[0066]脂質ベシクル粒子の平均粒径を測定するために利用可能ないくつかの技法、機器及びサービス、例えば、電子顕微鏡法 (透過、TEM、又は走査、SEM)、原子間力顕微鏡法 (AFM)、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR)、X線光電子分光法 (XPS)、粉末X線回折 (XRD)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS)、核磁気共鳴 (NMR) 及び動的光散乱 (DLS) がある。DLS は、1 nm 未満の粒径を測定するために利用可能な技術で、サブミクロンサイズの範囲で粒径を測定するための十分に確立された技法である (LS Instruments、スイス; Malvern Instruments、英国)。

20

【0046】

[0067]一実施形態において、120 の平均粒径は、脂質ベシクル粒子の平均粒径を測定するために適切な任意の機器及び/又は機械によって、例えば、上記の方法によって、測定される。

【0047】

[0068]本明細書に開示される方法の実施形態において、平均粒径は、DLS (Malvern Instruments、英国) によって決定される。

【0048】

[0069]一実施形態において、120 の平均粒径は、マルバーン ゼータサイザー (Malvern Zetasizer) シリーズの機器、例えば、ゼータサイザー ナノ S (Zetasizer Nano S)、ゼータサイザー APS (Zetasizer APS)、ゼータサイザー μ V (Zetasizer μ V) 又はゼータサイザー AT (Zetasizer AT) の機械 (Malvern Instruments、英国) などを用いて DLS により測定される。一実施形態において、120 の平均粒径は、マルバーン ゼータサイザー ナノ S の機械を用いて DLS により測定される。例示的な条件及びシステム設定としては以下を挙げることができる。

30

分散剤の名称: 0.006% の NaCl

分散剤の RI: 1.330

粘度 (cP): 0.8872

温度 (): 25.0

40

使用時間 (秒): 60

カウントレート (kcps): 200 ~ 400

測定位置 (mm): 4.65

セルの説明: 使い捨て分粒キュベット

減衰器: 7

【0049】

[0070]本明細書の方法において、脂質ベシクル粒子は、120 ナノメートル未満又はそれに等しい (すなわち 120 nm) の平均粒径及び 0.1 の多分散指数 (PDI) を有する。一実施形態において、脂質ベシクル粒子は、115 nm、より詳細には依然として 110 nm、より詳細には依然として 100 nm の平均粒径を有する。一実施形

50

態において、脂質ベシクル粒子の平均粒径は50 nm～120 nmの間である。一実施形態において、脂質ベシクル粒子の平均粒径は80 nm～120 nmの間である。一実施形態において、脂質ベシクル粒子の平均粒径は、約80 nm～約115 nmの間、約85 nm～約115 nmの間、約90 nm～約115 nmの間、約95 nm～約115 nmの間、約100 nm～約115 nmの間、又は約105 nm～約115 nmの間である。

【0050】

[0071]一実施形態において、脂質ベシクル粒子の平均粒径は、約80 nm、約81 nm、約82 nm、約83 nm、約84 nm、約85 nm、約86 nm、約87 nm、約88 nm、約89 nm、約90 nm、約91 nm、約92 nm、約93 nm、約94 nm、約95 nm、約96 nm、約97 nm、約98 nm、約99 nm、約100 nm、約101 nm、約102 nm、約103 nm、約104 nm、約105 nm、約106 nm、約107 nm、約108 nm、約109 nm、約110 nm、約111 nm、約112 nm、約113 nm、約114 nm、約115 nm、約116 nm、約117 nm、約118 nm又は約119 nmである。一実施形態において、平均粒径は120 nmである。

10

【0051】

[0072]本明細書全体にわたって使用される場合、「約」という用語は、適度な近さを意味する。例えば、「約」は、当業者によって決定される特定の値について、許容される標準偏差及び/又は許容される誤差範囲内であることを意味することができ、これは、特定の値が測定される方法によって決まる。さらに、整数を表す場合、約は、整数のいずれかの側の10進値を指すことができる。範囲の文脈において使用される場合、「約」という用語は、範囲の一方の端の1つの特定の値と範囲の他の端の他の特定の値の間のすべての例示的な値、並びにそれぞれの端を超える適度な近さの値を包含する。

20

【0052】

[0073]平均粒径に関して、「約」という用語は、120 nmを超える平均粒径を引き起こさない限り、 ± 2.0 nmの偏差を表すために使用される。また、「約」という用語は、示される平均粒径の任意の小数を包含することを意味する。

【0053】

[0074]一実施形態において、脂質ベシクル粒子の平均粒径は、例えば、脂質ベシクル粒子がDOPC/コレステロール(10:1 w:w)から形成される場合などは、約105 nm～約115 nmの間である。

30

【0054】

[0075]一実施形態において、脂質ベシクル粒子の平均粒径は、例えば、脂質ベシクル粒子がDOPC単独から形成される場合などは、約90 nm～約100 nmの間である。

【0055】

[0076]本明細書で使用される場合、多分散指数(PDI)は、脂質ベシクル粒子のサイズ分布の評価基準である。「多分散」という用語が「分散度」と互換的に使用することができることは当技術分野において公知である。PDIは、脂質ベシクル粒子の平均粒径及びそのサイズから標準偏差を決定することによって計算することができる。脂質ベシクル粒子のPDIを測定するために利用可能な技法及び機器がある。例えば、DLSは、1 nm未満の粒径を測定するために利用可能な技術で、サブミクロンサイズの範囲で粒子の粒径及びサイズ分布を測定するための十分に確立された技法である(LS Instruments、スイス; Malvern Instruments、英国)。

40

【0056】

[0077]完全に均一なサンプルに関して、PDIは0.0であろう。本明細書に開示される方法は、PDIが0.1である必要があり、これは、「単分散」であるクラス内である。

【0057】

[0078]一実施形態において、0.1のPDIは、脂質ベシクル粒子のPDIを測定するために適切な任意の機器及び/又は機械によって測定される。

【0058】

50

[0079] PDIの実施形態において、サイズ分布は、DLS (Malvern Instruments、英国)によって決定される。

【0059】

[0080]一実施形態において、0.1のPDIは、マルバーンゼータサイザーシリーズの機器、例えば、ゼータサイザー ナノS、ゼータサイザーAPS、ゼータサイザー μ V又はゼータサイザーATの機械 (Malvern Instruments、英国)などを用いてDLSにより測定される。一実施形態において、0.1のPDIは、マルバーンゼータサイザー ナノSの機械を用いてDLSにより測定される。例示的な条件及びシステム設定は平均粒径の決定に関して上に記載されているものである。

【0060】

[0081]脂質ベシクル粒子が120nmの平均粒径及び0.1のPDIを有する要件は、所与の集団中のいくつかの脂質ベシクル粒子が120nmよりも大きな粒径を有することが可能であることを意味する。これは、平均粒径が120のままであり、かつPDIが0.1のままである限り、許容される。実施例2に示すように、これらの仕様に適合するように分粒された脂質ベシクル粒子は、疎水性担体へのその後の可溶化のための適切な乾燥脂質/治療剤の調製物を得る際に(すなわち、澄明な溶液を得る際に)、分粒されていない脂質ベシクル粒子に対して有利である。

【0061】

[0082]120nmの平均粒径及び0.1のPDIを有し、本明細書に包含される脂質ベシクル粒子は、任意の適切な手段によって、調製及び用意することができる。一実施形態において、脂質ベシクル粒子は、120nmの平均粒径及び0.1のPDIを達成するために、脂質ベシクル粒子のサイズがコントロールされる様式で調製される。一実施形態において、脂質ベシクル粒子は、120nmの平均粒径及び0.1のPDIを達成するための1つ又は複数の分粒ステップ又はプロトコルに供される。一実施形態において、脂質ベシクル粒子は、製造の間に脂質ベシクル粒子のサイズをコントロールすること、分粒ステップを行うこと、及び/又は当技術分野において利用可能な任意の他の手段の任意の組み合わせによって調製及び用意することができる。

【0062】

[0083]一実施形態において、脂質ベシクル粒子は、120nmの平均粒径及び0.1のPDIを達成するために、1つ又は複数の分粒する積極的なステップに供されなければならない。一実施形態において、分粒はフィルター押出によって行われ、それにより、脂質ベシクル粒子が適した細孔サイズのフィルター膜又は一連のフィルター膜(例えばポリカーボネート膜)を通過する。

【0063】

[0084]このように、本明細書で使用される場合、「分粒された脂質ベシクル粒子」は、脂質ベシクル粒子のサイズがコントロールされて120nmの平均粒径及び0.1のPDIに達する手段、及び/又は脂質ベシクル粒子が120nmの平均粒径及び0.1のPDIを有するという基準に適合するように分粒される手段によって調製されている脂質ベシクル粒子を指す。当業者は、120nmの平均粒径及び0.1のPDIを有する脂質ベシクル粒子を用意するために利用可能な技法を承知しているであろう。本明細書における「分粒されていない脂質ベシクル粒子」又は「分粒されていない脂質ベシクル粒子調製物」への言及は、脂質ベシクル粒子が、定義されたサイズの基準に適合するように脂質ベシクル粒子のサイズを限定する手順に付されていないこと、及び/又は脂質ベシクル粒子が120nmの平均粒径及び0.1のPDIを有さないことを意味する。

【0064】

[0085]一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は、必要なサイズの脂質ベシクル粒子を自然に形成する脂質前駆体から調製することができる。例えば、限定されないが、分粒された脂質ベシクル粒子は、プレソーム(Presome)(登録商標)(日本精化株式会社、日本)を用いて調製することができる。プレソーム(登録商標)は、異なる脂質の組み合わせで作られた乾燥粉末の前駆体である。プレソーム(登録商標)は、適

10

20

30

40

50

切な緩衝液で湿らせて、リポソームを調製することが直ぐにできるように供給される。プレソーム（登録商標）から形成されるリポソームは、約 93 nm の平均粒径を有し、分粒手順（例えば、膜押出、高圧均質化など）を、必要な 120 nm の平均粒径及び 0.1 の PDI を達成するために使用することができる。一実施形態において、プレソーム（登録商標）は、例えば、pH 9.0 ± 0.5 の酢酸ナトリウムで湿らせて、リポソームを形成してもよい。一実施形態において、プレソーム（登録商標）のバルク乾燥粉末は、DOPC / コレステロール（10 : 1（w / w））又は DOPC 単独から作製してもよい。

【0065】

【0086】別の実施形態において、任意のサイズの脂質ベシクル粒子を調製するための標準的な手順を利用してもよい。例えば、溶媒に可溶化させた脂質の水和などの従来のリポソーム形成プロセスを使用してもよい。リポソームを調製する例示的な方法は、例えば、Gregoriadis 1990 年；及び Frezard 1999 年において議論されている。脂質ベシクル粒子を調製した後、分粒されていない脂質ベシクル粒子の調製物を分粒手順に供して、120 nm の平均粒径及び 0.1 の PDI を有する脂質ベシクル粒子が得られる。脂質ベシクル粒子を分粒するために利用可能な様々な技法がある（例えば、Akbarzadeh 2013 年を参照されたい）。例えば、一実施形態において、分粒されていない脂質ベシクル粒子の調製物は、高圧均質化（マイクロフルイダイザー）、超音波処理又は膜に基づく押出によって分粒することができる。

【0066】

【0087】一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は、脂質を適切な溶媒（例えば、50 mM、pH 7.0 のリン酸ナトリウム）に添加すること、脂質混合物を振とう及び／又は攪拌すること（例えば、300 RPM で約 1 時間）、並びに膜に基づく押出を用いて分粒された脂質ベシクル粒子を得ることによって調製することができる。例として、膜に基づく押出の非限定的な実施形態としては、(i) 分粒されていない脂質ベシクル粒子の調製物を 0.2 µm のポリカーボネート膜に 20 ~ 40 回通過させ、次いで 0.1 µm のポリカーボネート膜に 10 ~ 20 回通過させること、又は (ii) 分粒されていない脂質ベシクル粒子の調製物を 0.2 µm のポリカーボネート膜を 20 ~ 40 回通過させ、次いで 0.1 µm のポリカーボネート膜に 10 ~ 20 回通過させ、次いで 0.08 µm のポリカーボネート膜に 10 ~ 20 回通過させることが挙げられる。

【0067】

【0088】特定の実施形態において、分粒は、分粒されていない脂質ベシクル粒子の調製物を 0.2 µm のポリカーボネート膜に 25 回通過させ、次いで 0.1 µm のポリカーボネート膜に 10 回通過させることによって行うことができる。別の特定の実施形態において、分粒は、分粒されていない脂質ベシクル粒子の調製物を 0.2 µm のポリカーボネート膜に 25 回通過させ、次いで 0.1 µm のポリカーボネート膜に 10 回通過させ、次いで 0.08 µm のポリカーボネート膜に 15 回通過させることによって行うことができる。

【0068】

【0089】ステップ (a) の実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は、可溶化された治療剤と混合するのに適した溶媒中で用意してもよい。溶媒は、治療剤を可溶化するために使用される溶媒と同じであってもよく、又は異なる適合性の溶媒であってもよい。「適合性」に関して、これは、溶媒が、ステップ (b) の混合の間に溶液に可溶化された治療剤が出てくる原因とならないことを意味する。或いは、別の実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は、脱水形態で用意され、可溶化された治療剤を含有する溶液を添加することによって再懸濁させてもよい。

【0069】

【0090】開示される方法によれば、ステップ (b) において、分粒された脂質ベシクル粒子は、少なくとも 1 つの可溶化された治療剤と混合されて混合物を形成する。

【0070】

【0091】本明細書で使用される場合、「治療剤」という用語は、診断剤及び予防剤を含む、疾患、障害若又は状態の処置又は予防において治療活性、応答又は効果を提供すること

10

20

30

40

50

ができる任意の分子、物質又は化合物である。本明細書の他の箇所で記載されるように、「治療剤」という用語は、Ｔヘルパーエピトープ又はアジュバントを含まず、又は包含せず、これらは、本明細書において別途記載され、本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用及びキットに含まれていてもよく、又は含まれていなくてもよい、異なる構成成分である。

【 0 0 7 1 】

[0092]一実施形態において、治療剤は、ペプチド抗原、ポリペプチドをコードするDNA又はRNAポリヌクレオチド（例えばmRNA）、ホルモン、サイトカイン、アレルゲン、触媒活性DNA（デオキシリボザイム）、触媒活性RNA（リボザイム）、アンチセンスRNA、干渉RNA（例えば、siRNA又はmiRNA）、アンタゴミル、低分子薬物、生物学的薬物、抗体、又はこれらのいずれか１つの断片若しくは誘導体、或いはこれらの混合物である。

10

【 0 0 7 2 】

[0093]一実施形態において、本明細書に開示される方法は、組成物において単一の種類の治療剤を製剤化するためのものである。別の実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において複数の異なる治療剤の混合物を製剤化するためのものである。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０個又はそれ以上の異なる治療剤の混合物を製剤化するためのものである。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において１０～２０個の異なる治療剤の混合物を製剤化するためのものである。

20

【 0 0 7 3 】

[0094]特定の実施形態において、治療剤は本明細書に記載の１個又は複数のペプチド抗原である。一実施形態において、ペプチド抗原は合成的に生成されるポリペプチドである。

【 0 0 7 4 】

[0095]ペプチド抗原は任意の長さのポリペプチドであってもよい。一実施形態において、ペプチド抗原は、５～１２０個のアミノ酸長、５～１００個のアミノ酸長、５～７５個のアミノ酸長、５～５０個のアミノ酸長、又は５～３０個のアミノ酸長であってもよい。一実施形態において、ペプチド抗原は、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、３１個、３２個、３３個、３４個、３５個、３６個、３７個、３８個、３９個、４０個、４１個、４２個、４３個、４４個、４５個、４６個、４７個、４８個、４９個又は５０個のアミノ酸長であってもよい。

30

【 0 0 7 5 】

[0096]一実施形態において、ペプチド抗原は２０～３０個のアミノ酸長である。一実施形態において、ペプチド抗原は２７個のアミノ酸長である。

【 0 0 7 6 】

[0097]一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は単一の可溶化されたペプチド抗原と混合される。一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は、最大で３０個又はそれ以上の異なる可溶化されたペプチド抗原と混合される。

40

【 0 0 7 7 】

[0098]一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は２個以上の異なる可溶化されたペプチド抗原と混合される。一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０個又はそれ以上の異なる可溶化されたペプチド抗原と混合される。一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は、２～３０個の異なる可溶化されたペプチド抗原、５～３０個の異なる可溶化されたペプチド抗原、１０～２０個の異なる可溶化されたペプチド抗原、

50

又は10～15個の異なる可溶化されたペプチド抗原と混合される。一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は5個以上の異なる可溶化されたペプチド抗原と混合される。一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の異なる可溶化されたペプチド抗原と混合される。

【0078】

[0099]一実施形態において、1個又は複数のペプチド抗原は本明細書に記載のネオ抗原である。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において複数の異なるネオ抗原の混合物を製剤化するためのものである。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個又はそれ以上の異なるネオ抗原の混合物を製剤化するためのものである。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において10～20個の異なるネオ抗原の混合物を製剤化するためのものである。一実施形態において、異なるネオ抗原のそれぞれは20～30個のアミノ酸長である。

【0079】

[00100]本明細書に開示される方法の実施において使用することができる治療剤のさらなる例示的な実施形態を以下に記載するが、それらに限定されない。

【0080】

[00101]開示される方法により、複数の異なる治療剤を単一の医薬組成物に製剤化することが可能となる。一実施形態において、治療剤は、等電点、溶解度（例えば共溶解度）、安定性及び／又は免疫原性に関する異なる特性を有していてもよく、開示される方法における適合性についてのこれらの特性に基づいて事前に選択する必要はない。特定の実施形態において、治療剤はネオ抗原などのペプチド抗原である。このように、一実施形態において、ペプチド抗原は、開示される方法における使用のための適切性を決定するため、又は他のペプチド抗原との適合性（例えば共溶解度）を決定するために、広範囲のペプチド選択ステップに供する必要はない。より詳細には、一実施形態において、ペプチド抗原は、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する任意の特性に基づいて事前に選択する必要はない。

【0081】

[00102]本明細書で使用される場合、「等電点」は、特定の分子（例えば治療剤）が正味の電荷を有さないpHを指すという当技術分野におけるその通常の意味を有する。等電点（pI）の値は、所与のpHで分子の溶解度に影響を及ぼし得る。例えば、ポリペプチド/タンパク質を作るアミノ酸は、実際には、正、負、中性又は極性であってもよく、その全体としてポリペプチド/タンパク質に電荷を与える。ポリペプチド/タンパク質のpIより低いpHでは、ポリペプチド/タンパク質は、正味の正電荷を有するが、ポリペプチド/タンパク質のpIより上では、正味の負電荷を有する。このように、pIは、多くの場合、ペプチド系製剤などの医薬組成物の製剤において重要な考慮事項である。等電点を推定するための多くのアルゴリズムが開発されており、そのほとんどは、異なるpK値を用いるヘンダーソン - ハッセルバルヒの式を使用する。

【0082】

[00103]本明細書で使用される場合、「溶解度」は、溶媒に溶解する物質の能力を指すという当技術分野におけるその通常の意味を有する。物質の溶解度は、物質及び溶媒の物理的及び化学的性質、並びに温度、圧力及び溶液のpHに根本的に依存する。溶解度は、平衡で、溶媒に溶解する物質の最大量の観点で測定されてもよい。

【0083】

[00104]本明細書で使用される場合、「安定性」は、定義された条件又は合理的に予想される条件下、経時的に未変化で維持される物質の能力を指す。溶解度のように、物質の安定性は、物質の物理的及び化学的性質、並びに物質が置かれる環境に根本的に依存する。安定性は、分解、凝集及び／又はミスフォールディングの観点で測定されてもよい。

【 0 0 8 4 】

[00105]本明細書で使用される場合、「免疫原性」は、対象（例えばヒト）の体内で免疫応答を起こさせる、抗原又はエピトープなどの特定の物質の能力を指す。一実施形態において、免疫原性は、体液性（抗体）及び／又は細胞媒介（CTL）免疫応答を誘導する能力である。酵素結合免疫吸着測定アッセイ（ELISA）又は酵素結合免疫スポットアッセイ（ELISPOT）を伴う技法を含む、免疫原性を測定するための当技術分野で公知の多くのインビトロ及びインビボの技法がある。

【 0 0 8 5 】

[00106]本明細書で使用される場合、「等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する特性」は、治療剤の等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関連することがある治療剤の任意の物理的又は化学的性質を指す。例えば、限定されないが、ペプチド抗原について、このような特性は、ペプチドの長さ、配列、分子量、電荷、極性、疎水性及び／又は親水性を含んでいてもよい。これらの特性は、全体としてペプチド抗原、又はペプチド抗原に含まれるアミノ酸に関するものであってもよい。とりわけ、1つ又は複数のこれらの特性が、治療剤を用いて通常の作業の間に観察又は決定されてもよいと考えられる。しかしながら、本明細書に開示される方法の利点は、本方法が、適切な乾燥脂質／治療剤の調製物を調製するために、これらの性質を事前に決定する必要がないことである。

10

【 0 0 8 6 】

[00107]一実施形態において、本明細書に開示される方法において使用される異なる可溶化された治療剤は、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する1つ又は複数の異なる特性を有する。

20

【 0 0 8 7 】

[00108]一実施形態において、本明細書に開示される方法において使用される異なる可溶化された治療剤は、異なる長さ、配列、分子量、電荷、極性、疎水性及び／又は親水性を有する。複数の異なる治療剤が本明細書に開示される方法において使用される例において、これらの相違点は、いずれか1つ又は複数の治療剤の間の比較に関していてもよく、複数の治療剤は全体として相違点の任意の組み合わせを有していてもよい。

【 0 0 8 8 】

[00109]本明細書で使用される場合、「可溶化された治療剤」に関して、これは、治療剤が溶媒に溶解していることを意味する。一実施形態において、これは、澄明な溶液を観察することによって肉眼で視覚的に決定してもよい。濁った溶液は、不溶性を示し、乾燥脂質／治療剤の調製物がその後に疎水性担体に可溶化される時に、澄明な組成物を形成するのに問題があることがあるので、本明細書に開示される方法のためには望ましくない。

30

【 0 0 8 9 】

[00110]本明細書に記載されるように、開示される方法は、脂質及び治療剤を含む、安定で水を含まない組成物の調製において有利である。このような組成物を調製するために、複雑な製剤化の要件がある。分粒された脂質ベシクル粒子／治療剤の混合物である調製物において使用される溶媒は、脂質を有する水性環境で治療剤を可溶化するために適切でなければならないだけでなく、疎水性担体と適合する乾燥脂質／治療剤の調製物を形成するためにも適切でなければならない（例えば、任意の塩及び／又は非揮発性溶媒は、好ましくは、疎水性担体と適合性でなければならない）。また、複数の治療剤が関わる実施形態において、溶媒（複数可）は、理想的には、すべての治療剤を可溶化するため、及び分粒された脂質ベシクル粒子と混合するために適切であろう。

40

【 0 0 9 0 】

[00111]広範囲の研究により、本発明者らは、澄明な医薬組成物を得るための最適な塩及び／又はpH条件を含む、本明細書に開示される方法において普遍的な適用を有し得る、多くの例示的な溶媒を特定した。

【 0 0 9 1 】

[00112]使用することができる例示的な溶媒としては、例えば、限定されないが、双性イオン溶媒が挙げられる。双性イオン溶媒の非限定的な例としては、H E P E S（4 -（

50

2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸)、M O P S (3 - (N - モルホリノ)プロパンスルホン酸)及びM E S (2 - (N - モルホリノ)エタンスルホン酸)が挙げられる。

【0092】

[00113]別の実施形態において、例示的な溶媒は、水性の塩溶液である。塩は、治療剤を可溶化する有用な性質を提供し、ある特定の塩が乾燥脂質/治療剤の調製物に安定性を提供することが本明細書においても認識されている。このような溶媒の非限定的な例としては、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、酢酸カリウム、リン酸カリウム、炭酸カリウム及び重炭酸カリウムが挙げられる。

【0093】

[00114]一実施形態において、溶媒は水性酢酸ナトリウムである。本発明の過程において、酢酸ナトリウムが、疎水性担体へのその後の可溶化のために、乾燥脂質/治療剤の調製物に好ましい性質を付与することが観察された。これは、幅広いpH範囲(例えば、6.0~10.5)にわたって観察される。複数の治療剤の溶解のためには(例えば、普遍的な溶媒として)、50~200mMの範囲のモル濃度が好ましくあり得る。

【0094】

[00115]一実施形態において、酢酸ナトリウムは、6.0~10.5の範囲のpHを有する25~250mMの酢酸ナトリウムであってもよい。一実施形態において、溶媒は、6.0±1.0のpHを有する100mMの酢酸ナトリウムである。一実施形態において、溶媒は、9.5±1.0のpHを有する100mMの酢酸ナトリウムである。

【0095】

[00116]一実施形態において、溶媒は、6.0のpHを有する100mMの酢酸ナトリウムである。

【0096】

[00117]一実施形態において、溶媒は、9.5のpHを有する100mMの酢酸ナトリウムである。

【0097】

[00118]一実施形態において、溶媒は水性リン酸ナトリウムである。本発明の過程において、リン酸ナトリウムが、疎水性担体へのその後の可溶化のために、乾燥脂質/治療剤の調製物に好ましい性質を付与することが観察された。より詳細に、水性リン酸ナトリウムが、より低いモル濃度(すなわち100mM)で複数のペプチド抗原を溶解するために好ましい性質を示すことが観察された。疎水性担体への乾燥脂質/治療剤の調製物の可溶化のためには6.0~7.0の範囲のpHが好ましくあり得る。

【0098】

[00119]一実施形態において、リン酸ナトリウムは、6.0~8.0の範囲のpHを有する25~250mMのリン酸ナトリウムであってもよい。一実施形態において、溶媒は、7.0±1.0のpHを有する50mMのリン酸ナトリウムである。一実施形態において、溶媒は、6.0±1.0のpHを有する100mMのリン酸ナトリウムである。

【0099】

[00120]一実施形態において、溶媒は、7.0のpHを有する50mMのリン酸ナトリウムである。

【0100】

[00121]一実施形態において、溶媒は、6.0のpHを有する100mMのリン酸ナトリウムである。

【0101】

[00122]本明細書に包含されるように、治療剤は、分粒された脂質ベシクル粒子と混合する前に溶媒に可溶化されるか、又は分粒された脂質ベシクル粒子と混合される際に治療剤が可溶化されるかのいずれかである。この後者の実施形態において、治療剤は、分粒された脂質ベシクル粒子を含有する溶液に乾燥粉末として添加されてもよく、又は分粒された脂質ベシクル粒子及び乾燥治療剤の両方が新たな溶媒中で一緒に混合されてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 2 】

[00123]治療剤が、分粒された脂質ベシクル粒子と混合される前に可溶化される場合、2つ以上の治療剤が使用される実施形態において、個々の治療剤は、同じ溶媒中に一緒に又は異なる溶媒中で互いに別々に可溶化されてもよい。3つ以上の治療剤が使用される場合、いくつかの治療剤は一緒に可溶化されてもよく、他の治療剤は個々に可溶化されてもよい。

【 0 1 0 3 】

[00124]一実施形態において、すべての治療剤が、治療剤ストックとして同じ溶媒中に一緒に可溶化される。

【 0 1 0 4 】

[00125]複数の異なる治療剤が製剤化される開示の方法の実施形態において、治療剤を、穏和 / 弱い酸性の溶媒（主に塩基性の治療剤の混合物のため）又は穏和 / 弱い塩基性の溶媒（主に酸性の治療剤の混合物のため）に最初に可溶化することが有利である場合がある。使用することができる例示的な酸性の溶媒としては、限定されないが、塩酸、酢酸が挙げられる。使用することができる例示的な塩基性の溶媒としては、限定されないが、水酸化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、酢酸ナトリウム及び炭酸ナトリウムが挙げられる。主に中性の治療剤の混合物のためには、例示的な溶媒はジメチルスルホキシド（DMSO）であってもよい。

【 0 1 0 5 】

[00126]本明細書に開示される方法において、治療剤は本明細書に記載の溶媒のいずれかに可溶化することができる。本開示に基づいて、当業者は、本明細書に記載の特性と同様の特性を示す、使用することができる他の溶媒を特定することもできる。

【 0 1 0 6 】

[00127]本明細書に包含されるように、その他の任意の構成成分（例えば、Tヘルパーエピトープ及び / 又はアジュバント）も本明細書に記載の溶媒に可溶化又は混合することができる。同様に、分粒された脂質ベシクル粒子は本明細書に記載の溶媒中に提供されてもよい。

【 0 1 0 7 】

[00128]一実施形態において、可溶化された治療剤を調製するか、治療剤を分粒された脂質ベシクル粒子と混合する任意の段階で、1つ又は複数のTヘルパーエピトープ及び / 又はアジュバントを添加してもよい。アジュバント及びTヘルパーエピトープは、互いに独立して、任意の段階及び任意の順序で添加されてもよい。典型的には、Tヘルパーエピトープ及び / 又はアジュバントの使用に関わる本明細書に開示される方法の実施形態は、治療剤が少なくとも1個のペプチド抗原又は抗原をコードするポリヌクレオチドを含むものである。

【 0 1 0 8 】

[00129]本明細書に開示される方法の実施において使用することができるTヘルパーエピトープ及びアジュバントの例示的な実施形態を以下に記載するが、それらに限定されない。一実施形態において、Tヘルパーエピトープは、改変された破傷風毒素ペプチドA16L（830～844；AQYIKANSKFIGITEL；配列番号1）を含むか、又はそれからなる。一実施形態において、アジュバントはポリI：Cヌクレオチドアジュバントである。

【 0 1 0 9 】

[00130]一実施形態において、ステップ（b）の混合は、分粒された脂質ベシクル粒子を調製するため、及び / 又は治療剤、Tヘルパーエピトープ及び / 又はアジュバントを可溶化するために使用される同一又は異なる溶媒を用いて行うことができる。

【 0 1 1 0 】

[00131]一実施形態において、ステップ（b）の混合は酢酸ナトリウム又はリン酸ナトリウムの溶液で行われる。

【 0 1 1 1 】

10

20

30

40

50

[00132]一実施形態において、ステップ(b)の混合は、6.0~10.5の範囲のpHを有する25~250mMの酢酸ナトリウム中、又は6.0~8.0の範囲のpHを有する25~250mMのリン酸ナトリウム中で行われる。

【0112】

[00133]一実施形態において、ステップ(b)の混合は、6.0±1.0のpHを有する50mMの酢酸ナトリウム中、9.5±1.0のpHを有する100mMの酢酸ナトリウム中、7.0±1.0のpHを有する50mMのリン酸ナトリウム中、又は6.0±1.0のpHを有する100mMのリン酸ナトリウム中で行われる。

【0113】

[00134]一実施形態において、ステップ(b)の混合は、7.0のpHを有する50mMのリン酸ナトリウム中、6.0のpHを有する100mMのリン酸ナトリウム中、6.0のpHを有する50mMの酢酸ナトリウム中、又は9.5のpHを有する100mMの酢酸ナトリウム中で行われる。

【0114】

[00135]一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子を、可溶化された治療剤及び任意選択で他の構成成分(例えば、Tヘルパーエピトープ及び/又はアジュバント)と混合した後、混合物のpHは、10±1.0に調整される。一実施形態において、pHは、酢酸ナトリウムが溶媒として使用された場合に10±1.0に上昇する。

【0115】

[00136]分粒された脂質ベシクル粒子及び少なくとも1つの可溶化された治療剤の実際の混合は、分粒された脂質ベシクル粒子及び治療剤の一般に均質な混合物を得るために、任意の適切な条件下で行ってもよい。しかしながら、混合は、分粒された脂質ベシクル粒子及び/又は治療剤が溶液から沈殿物を引き起こす可能性がある攻撃的な条件下では行っていない。一実施形態において、混合は、100~500RPMでの穏やかな振とう又は攪拌で2~60分間行ってもよい。一実施形態において、混合は、300RPMでの振とう/攪拌によって約3分間行ってもよい。別の実施形態において、混合は、300RPMでの振とう/攪拌によって約15分間行ってもよい。

【0116】

[00137]混合が行われる様式に関係なく、本明細書に開示される方法において、治療剤は、分粒された脂質ベシクル粒子(すなわち、120nmの平均粒径及び0.1のPDIを有する脂質ベシクル粒子)とのみ混合される。治療剤は、例えば、脂質ベシクル粒子の形成の間などの分粒の前に、脂質ベシクル粒子に添加されない。治療剤がステップ(b)において添加される場合、提供された分粒された脂質ベシクル粒子は、治療剤を含有しない。本明細書に記載されるように、開示される方法のこの特徴は、澄明な医薬組成物を得ることに関連する。

【0117】

[00138]開示される方法によれば、ステップ(c)において、分粒された脂質ベシクル粒子及び、少なくとも1つの可溶化された治療剤の混合物は、乾燥されて乾燥脂質/治療剤の調製物を形成する。

【0118】

[00139]本明細書で使用される場合、互換的に使用される「乾燥調製物」、「乾燥脂質/治療剤の調製物」又は「脂質及び治療剤を含む乾燥調製物」という用語は、調製物が完全に乾燥されていることを必ずしも意味しない。例えば、本明細書に開示される方法において使用される溶媒又は複数の溶媒に応じて、揮発性及び/又は非揮発性材料の小さな構成成分が乾燥調製物中に残ったままであることが可能である。一実施形態において非揮発性材料が残るであろう。「乾燥調製物」に関して、これは、調製物がもはや実質的な量の水を含有しないことを意味する。調製物を乾燥するために使用されるプロセスは、分粒された脂質ベシクル粒子/治療剤の混合物から実質的にすべての水を除去することができなければならない。このように、一実施形態において、乾燥調製物は完全に水を含まない。別の実施形態において、乾燥調製物は、乾燥プロセス(例えば凍結乾燥)の限界に基づい

10

20

30

40

50

て残留水分含量を含有していてもよい。この残留水分含量は、乾燥調製物の重量で、典型的には、2 %未満、1 %未満、0 . 5 %未満、0 . 2 5 %未満、0 . 1 %未満、0 . 0 5 %未満、又はそれよりも少ない。この残留水分含量は、澄明ではない製品をもたらすので、乾燥調製物の5重量%を超えない。

【0119】

[00140]様々な方法を、当技術分野で公知の分粒された脂質ベシクル粒子/治療剤の混合物を乾燥するために使用することができる。一実施形態において、乾燥は凍結乾燥、噴霧凍結乾燥又は噴霧乾燥によって行われる。当業者は、これらの乾燥技法及び乾燥を行うことができる方法についてよく承知している。

【0120】

[00141]一実施形態において、乾燥は凍結乾燥によって行われる。本明細書で使用される場合、「凍結乾燥」、「凍結乾燥された」及び「凍結乾燥すること」は、互換的に使用される。当技術分野においてよく知られているように、凍結乾燥は、材料を凍結させ、次いで周囲の圧力を低下させて、材料中の揮発性溶媒（例えば水）を固相から気相に直接昇華させることによって行われる。

【0121】

[00142]任意の従来の凍結乾燥する手順を用いて、本明細書に開示される方法の乾燥ステップを行うことができる。一実施形態において、凍結乾燥は、投入、凍結、排出及び乾燥（例えば、一次乾燥及び二次乾燥）の順次的なステップによって行われる。

【0122】

[00143]一実施形態において、凍結乾燥は、下記の表8（実施例4）において説明するプロトコールに従って行われる。簡潔には、分粒された脂質ベシクル粒子及び治療剤の混合物は、約5分の間にわたって約 - 40 の温度に凍結される。次いで、排出は約 100 mTに圧力を低下させることによって行われる。次いで、混合物を乾燥する。一次乾燥は、減圧下で約 - 30 に温度を上昇させることによって、約1時間行われる。次いで、二次乾燥は、減圧下で約 25 に温度をさらに上昇させることによって、約20分間行われる。

【0123】

[00144]凍結及び乾燥段階について関連する考慮事項は以下が挙げられる。

凍結：

材料を、その三重点、すなわち、材料の固相及び液相が共存することができる最低温度より低く冷却することが重要である。これは、融解よりもむしろ昇華が以下のステップにおいて生じることを確実にする。

一次乾燥：

昇華が起きるために十分な熱が供給される。このフェーズはゆっくり（数時間～数日）行うことができる。より多くの熱が付与されると、材料の構造が変化することもある。

二次乾燥：

任意の凍結していない水分子を除去する目的である。水分子及び凍結された材料の間で形成される任意の物理化学的相互作用を破壊するために、温度を上昇させる（通常は0超）。

【0124】

[00145]個別化医療に適合し得るが、より広い適用も有し得る実施形態において、発明者らは、分粒された脂質ベシクル粒子/治療剤の混合物の凍結乾燥を、卓上凍結乾燥機中の密封されたバッグ内で行うことができることを見出した。これは、滅菌実験室環境において行わなければならないステップの数を減らし、より小さなバッチサイズの迅速な製造を可能にするので、特に有利であり得る。例えば、分粒された脂質ベシクル粒子/治療剤の混合物の滅菌濾過の後、混合物を含有する無菌充填バイアルに入れて、滅菌条件下、滅菌バッグ内に密封することができる。これらの滅菌の密封されたユニットに対しては、次いで、卓上凍結乾燥機を用いる開放実験室（すなわち非滅菌環境）における凍結乾燥を行うことができる。この方法により、単一の凍結乾燥機において複数の異なる密封されたユ

10

20

30

40

50

ニットで凍結乾燥を行うことも可能である。これは、大スケールの凍結乾燥機を用いる滅菌実験室環境における高価な凍結乾燥のステップを回避することによって製造のコスト及び時間を減らすことができる。また、複数の異なる小スケールバッチの乾燥脂質 / 治療剤の調製物を、別々の密封された滅菌バッグ中で同時に調製することができる。

【 0 1 2 5 】

[00146]このように、一実施形態において、凍結乾燥は、ステップ (b) の混合物を含む 1 つ又は複数の容器をバッグに入れること、バッグを密封して密封されたユニットを形成すること、及び次いで、密封されたユニットを凍結乾燥機において凍結乾燥することによって行われる。一実施形態において、単一の密封されたユニットを凍結乾燥のために凍結乾燥機に入れてもよい。別の実施形態において、複数の別々の密封されたユニットを凍結乾燥のために単一の凍結乾燥機に入れてもよい。一実施形態において、凍結乾燥機は、凍結乾燥のために、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個又はそれ以上の異なる密封されたユニットを含有することができる。

10

【 0 1 2 6 】

[00147]複数の別々の密封されたユニットを単一の凍結乾燥機に入れる実施形態において、密封されたユニットは、(i) それぞれが、同じ分粒された脂質ベシクル粒子 / 治療剤の混合物を他の密封されたユニットとして含有する、(i i) それぞれが他の密封されたユニットと異なる分粒された脂質ベシクル粒子 / 治療剤の混合物を含有する、又は (i i i) これらの任意の組み合わせであってもよい (すなわち、いくつかの密封されたユニットは、他の密封されたユニット及びいくつかの密封されたユニットが異なる分粒された脂質ベシクル粒子 / 治療剤の混合物を含有していてもよいように、いくつかの分粒された脂質ベシクル粒子 / 治療剤の混合物を含有していてもよい) 。密封されたユニット中の分粒された脂質ベシクル粒子 / 治療剤の混合物の間の相違は、ベシクル粒子を調製するために使用される脂質に関してであってもよく、治療剤 (複数可) は混合物 (例えば、異なるペプチド抗原又はネオ抗原) 及び / 又はその他の構成成分中に含まれていた。特定の実施形態において、これは、密封されたユニットの間に相違する治療剤 (複数可) である。医薬品グレードの組成物の製造のために、それぞれの個々の密封されたユニットは、同じ分粒された脂質ベシクル粒子 / 治療剤の混合物を有する容器のみを含んでいなければならない。

20

【 0 1 2 7 】

[00148]取り扱いの容易さのために、容器はトレイに載せてもよく、次いで、トレイはバッグ内に密封されてもよい。一実施形態において、トレイは金属トレイ又はプラスチックトレイである。

30

【 0 1 2 8 】

[00149]分粒された脂質ベシクル粒子 / 治療剤の混合物を含む容器は、凍結乾燥のために適切な任意の容器であってもよい。一実施形態において、容器はバイアル、ボトル、フラスコ、試験管又は任意の適切な代替物である。一実施形態において、容器は、ガラスバイアル又はプラスチックバイアルなどのバイアルである。一実施形態において、バイアルはガラスバイアルである。一実施形態において、容器は、例えば、2 m l 又は 3 m l の 1 3 M M F T N B B L Y O P F バイアルなどの 2 m l 又は 3 m l のガラスバイアルである。容器は、凍結乾燥のために適切なストッパー及び / 又はシールをさらに含んでいてもよい。一実施形態において、ストッパーはベントストッパーである。一実施形態において、ストッパーはフルオロテック (F l u o r o t e c) 凍結乾燥クロージャー、1 3 M M、シングルベントストッパーである。一実施形態において、シールは、例えば、アルミニウムクリンプシールなどのクリンプシールである。一実施形態において、シールはウェスト - スペクトル フリップ - オフ (W e s t - S p e c t r a F l i p - O f f) 1 3 M M シールである。

40

【 0 1 2 9 】

[00150]凍結乾燥のためのサンプルを含有するバッグは、凍結乾燥のために適切な任意のバッグであってもよい。一実施形態において、バッグは、滅菌バッグを提供するために

50

オートクレーブされる能力もなければならない。滅菌バッグを提供するために、バッグは、オートクレーブされ、その後、滅菌条件下で維持される。このように、一実施形態において、バッグは、滅菌されており、オートクレーブされているバッグである。

【0130】

[00151]一実施形態において、バッグは紙、プラスチック又は紙/プラスチックの組み合わせで作られている。一実施形態において、紙は医療グレードの紙であり、プラスチックはポリエステル/ポリプロピレンの積層フィルムである。滅菌医療機器のために適切な種々のバッグは当技術分野で公知であり、これらの任意のバッグを使用することができる。一実施形態において、滅菌バッグは、フィッシャーブランド (Fisher brand) (商標) のインスタント密封滅菌パウチ (Fisher Scientific) である。

10

【0131】

[00152]凍結乾燥は任意の適切な凍結乾燥機で行ってもよい。一実施形態において、凍結乾燥機は卓上凍結乾燥機である。一実施形態において、凍結乾燥機は Virtis 卓上凍結乾燥機である。一実施形態において、凍結乾燥機は開放実験室 (すなわち非滅菌環境) にある。

【0132】

[00153]乾燥脂質/治療剤の調製物を調製するための開示される方法の有利な性質は、分粒された脂質ベシクル粒子の開示されるサイズの限定 (すなわち、120 nm とともに 0.1 の PDI) を使用することによって、治療剤が、医薬組成物の調製の間に遭遇する、複数の異なる相、すなわち水相、乾燥及び疎水性相のそれぞれにもちこたえる (例えば沈殿しない) ことが可能であることである。これは、分粒されていない脂質ベシクルでは観察されず、それによって、乾燥調製物の適正な外観にもかかわらず、沈殿物を有する濁った溶液が、最終的な医薬組成物について観察される。

20

【0133】

[00154]また、予想外にも、乾燥脂質/治療剤の調製物を調製するための開示される方法を使用することによって、分粒された脂質ベシクル粒子内に治療剤をカプセル化する任意の積極的なステップなしに、安定で澄明な水を含まない医薬組成物を生じさせることが可能であった。これは、開示される方法が、費用がかかり時間のかかる不必要な処理ステップを回避し、最終的に治療剤 (例えば、脂質ベシクル粒子中にカプセル化されていない任意の治療剤) の有意な量の喪失をもたらすことができる点で、有利な性質である。

30

【0134】

[00155]理論によって拘束されないが、分粒された脂質ベシクル粒子と少なくとも1つの可溶化された治療剤を用意及び混合した後、分粒された脂質ベシクル粒子が処理ステップ (例えば、乾燥、疎水性担体への可溶化など) に応じて、再配列して異なる構造体を形成することができると思われる。分粒された脂質ベシクル粒子は、小さく均一なサイズ (すなわち、120 nm の平均粒径とともに 0.1 の PDI) により、特にこれらの立体構造の変化に対応することができる。例えば、疎水性担体中に置かれると、分粒された脂質ベシクル粒子は、並び換えられて、本明細書に記載の、代替りの脂質系構造体を形成してもよい。実際に、脂質の再配列は、例えば、本明細書において行われる SAXS 分析によって示されるように、これらのその後の製造ステップの間に起こると思われる。

40

【0135】

[00156]乾燥脂質/治療剤の調製物を調製するための本明細書に開示される方法は滅菌のステップをさらに含んでもよい。滅菌は当技術分野で公知の任意の方法によって行うことができる。一実施形態において、滅菌は、滅菌濾過、蒸気熱滅菌、照射 (例えばガンマ線照射) 又は化学的滅菌により行われる。特定の実施形態において、滅菌は滅菌濾過により行われる。一実施形態において、滅菌濾過は、ステップ (b) 及び (c) の間、すなわち分粒された脂質ベシクル粒子を治療剤と混合した後であるが、乾燥の前に行ってもよい。

【0136】

50

[00157]分粒された脂質ベシクル粒子の混合物中の治療剤の溶解度及び安定性に影響を及ぼさない限り、滅菌濾過のための任意の従来の手順を利用してもよい。これに関して、低圧条件下（例えば、30～50 psiの間）で滅菌濾過を行うことが望ましい場合がある。

【0137】

[00158]連続濾過を市販の滅菌濾過膜（例えばミリポアシグマ（Millipore Sigma））を用いて行ってもよい。一実施形態において、滅菌濾過は、0.22 µm定格膜、0.2 µm定格膜及び/又は0.1 µm定格膜を用いて行われる。一実施形態において、滅菌濾過は、単一の濾過膜を通す、分粒された脂質ベシクル粒子/治療剤の混合物の単回通過によって行われる。別の実施形態において、滅菌濾過は、同一又は異なるサイズの濾過膜の組み合わせを連続して通す、分粒された脂質ベシクル粒子/治療剤の混合物の連続的な通過によって行われる。

10

【0138】

[00159]限定されないが、一実施形態において、滅菌濾過は以下の条件下で行ってもよい。

- 1) 濾過圧：30～50 psiの窒素ガス
- 2) 温度：室温
- 3) 生成物の接触時間：45分
- 4) フィルターの種類：ミリパック-20（Millipak-20）PVDFフィルター、0.22 µm
- 5) サイズ：6 L バッチサイズ

20

【0139】

[00160]一実施形態において、滅菌濾過は、単一のミリパック-20 PVDFフィルター-0.22 µmを通す、ステップ（b）の混合物の通過によって行われる。別の実施形態において、滅菌濾過は、2つ以上の滅菌濾過膜を通す、ステップ（b）の混合物の連続通過によって行われる。連続滅菌濾過の実施形態において、ステップ（b）の混合物は、2つ、3つ、4つ、5つ又はそれ以上のミリパック-20 PVDFの0.22 µm膜を通過させる。連続滅菌濾過の実施形態において、ステップ（b）の混合物は、2つのミリパック-20 PVDFの0.22 µm膜を通過させる。

【0140】

30

[00161]乾燥脂質/治療剤の調製物を調製するための本明細書に開示される方法は、分粒された脂質ベシクル粒子が120の平均粒径及び0.1のPDIを維持していることを確認するステップをさらに含んでもよい。本明細書の他の箇所に記載されるように、脂質ベシクル粒子の平均粒径及びPDIを測定するために利用可能ないくつかの技法、機器及びサービス、例えば、限定されないが、TEM、SEM、AFM、FTIR、XPS、XRD、MALDI-TOF-MS、NMR及びDLSなどがある。

【0141】

[00162]一実施形態において、脂質ベシクル粒子のサイズ及びPDIを確認するステップはDLSゼータサイザー ナノ-S粒径分析器を用いて行われる。

【0142】

40

[00163]サイズ/PDIの確認のステップは、開示される方法全体にわたって、1回又は異なる時間に複数回行ってもよい。一実施形態において、このステップは、分粒された脂質ベシクル粒子がステップ（a）で準備される前、ステップ（b）において分粒された脂質ベシクル粒子を治療剤と混合する前、分粒された脂質ベシクル粒子を治療剤と混合した後、及び/又はステップ（c）の乾燥を行う前に行ってもよい。一実施形態において、サイズの確認ステップは、乾燥の前に、分粒された脂質ベシクル粒子のサイズ/PDIを確認するために、ステップ（b）及び（c）の間に行われる。

【0143】

[00164]一実施形態において、サイズの確認ステップは、目的の調製物の小さいサンプル体積を分析することによって行ってもよい。別の実施形態において、サイズの確認ステ

50

ップは、目的の調製物と並行して調製された調製物からのサンプルを分析することによって行ってもよい。

【0144】

[00165]一実施形態において、分粒された脂質ベシクル粒子のサイズ／PDIを確認するステップは、分粒された脂質ベシクル粒子／治療剤の調製物のpHを確認することを含む。一実施形態において、pHは、分粒された脂質ベシクル粒子のサイズ／PDIを測定するために使用される同じ機械を用いて測定される。一実施形態において、pHは、pHを決定するための任意の適切なデバイスを用いて別に測定される。例示的な溶媒は本明細書の他の箇所で議論され、一実施形態において、このステップは、本明細書に記載されるように、溶媒が所望のpHを維持することを確認することを含む。例えば、分粒された脂質ベシクル粒子がリン酸ナトリウムに懸濁される実施形態において、このステップは、pHが6.0～8.0であることを確認することを含む。分粒された脂質ベシクル粒子が酢酸ナトリウムに懸濁される実施形態において、このステップは、pHが6.0～10.5であることを確認することを含む。モル濃度に基づくこれらの溶媒についてのより詳細な例示的なpH値は本明細書の他の箇所に記載する。

10

【0145】

[00166]乾燥脂質／治療剤の調製物を調製するための本明細書に開示される方法は、ステップ(c)の乾燥の前及び／又は後に、治療剤(複数可)の安定性を評価するステップをさらに含んでもよい。治療剤の安定性は、任意の公知の手段又は方法によって測定することができる。Tヘルパーエピトープが存在する実施形態において、本明細書に開示される方法は、ステップ(c)の乾燥の前及び／又は後に、Tヘルパーエピトープの安定性を評価するステップもさらに含んでもよい。

20

【0146】

[00167]治療剤の安定性を評価するステップは、例えば、限定されないが、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって行ってもよい。HPLCは、混合物中のそれぞれの構成成分を、分離、特定及び定量化するために使用することができる技法である。したがって、HPLCを使用することによって、混合物中のそれぞれの治療剤のおおよその量を決定すること、及び治療剤を定性的に特徴付けること(例えば、分解生成物、二量体化した生成物などを観察すること)が可能である。

【0147】

30

[00168]一実施形態において、本明細書に開示される方法は、治療剤の最初の量／濃度の、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%が乾燥の直前に未分解の形態で維持されている、分粒された脂質ベシクル粒子／治療剤の混合物を提供することができる。一実施形態において、治療剤の最初の量／濃度の100%が乾燥の直前に未分解の形態で維持されている。

【0148】

[00169]一実施形態において、本明細書に開示される方法は、治療剤の最初の量／濃度の、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%が乾燥の直後に未分解の形態で維持されている、乾燥脂質／治療剤の調製物を提供することができる。一実施形態において、治療剤の最初の量／濃度の100%が乾燥の直後に未分解の形態で維持されている。

40

【0149】

[00170]一実施形態において、本明細書に開示される方法は、治療剤の最初の量／濃度の、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少な

50

くとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% 又は少なくとも 99% が乾燥の少なくとも 3 か月後に未分解の形態で維持されている、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を提供することができる。一実施形態において、治療剤の最初の量 / 濃度の 100% が乾燥の少なくとも 3 か月後に未分解の形態で維持されている。

【0150】

[00171]一実施形態において、本明細書に開示される方法は、1 つ又は複数の治療剤が、乾燥の後、最大で 1 か月、2 か月、3 か月、4 か月、5 か月、6 か月、7 か月、8 か月、9 か月、10 か月、11 か月、12 か月又はそれ以上の間分解を示さない、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を提供することができる。特定の実施形態において、本明細書に開示される方法は、1 つ又は複数の治療剤が、乾燥の後、最大で 3 か月又はそれ以上の間分解を示さない、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を提供することができる。

10

【0151】

[00172]本明細書に開示される方法の実施形態において、ステップ (b) の後、可溶化された治療剤のそれぞれは、約 0.1 mg/ml ~ 10 mg/ml の間の濃度である。一実施形態において、可溶化された治療剤のそれぞれは、少なくとも約 0.1 mg/ml、0.2 mg/ml、0.3 mg/ml、0.4 mg/ml、0.5 mg/ml、0.6 mg/ml、0.7 mg/ml、0.8 mg/ml、0.9 mg/ml 又は 1.0 mg/ml の濃度である。

20

【0152】

[00173]一実施形態において、本方法は、5 個以上の異なる治療剤の使用を含み、ステップ (b) の後、異なる可溶化された治療剤のそれぞれは約 0.5 mg/ml の濃度である。

【0153】

[00174]本明細書に開示される方法の特定の実施形態において、治療剤はペプチド抗原である。例えば、本明細書に開示される方法はペプチド系免疫原性組成物 (例えばワクチン) の調製において使用してもよい。

【0154】

[00175]生物全体又は巨大タンパク質を使用する従来のワクチン戦略は、特に感染性疾患の処置において、数十年にわたって非常に有効であった。しかしながら、不要な抗原物質の含有は、それが、製剤内の少数の選択されたペプチドエピトープのみに依存している防御免疫に伴う望ましくない反応性をしばしば生じさせるという点で問題である。これは、ペプチド系ワクチンに大きな関心を集めている。

30

【0155】

[00176]完全な合成ペプチド系ワクチンは、将来、可能性のあるワクチン接種である。ペプチドワクチンは、高度に標的化された免疫応答を誘導する短ペプチド断片の使用に依拠する。ペプチド系ワクチンは、従来のワクチンを上回るいくつかの利点を提供する。例えば、ペプチド抗原は、不要な要素の欠如に起因して望ましくないアレルギー応答又は自己免疫応答を誘導する可能性が低く、化学的合成は、生物学的汚染に関連するすべての問題を実際に取り除き、ペプチドは、カスタマイズ化され、又は非常に特異的な目的物を標的化するために利用されるアプローチであり得る。

40

【0156】

[00177]しかしながら、ペプチド系ワクチンの欠点は、ペプチド系ワクチンが比較的小さなサイズであることにより、ペプチド抗原がしばしば弱い免疫原性であり、したがって、典型的には、アジュバント及び / 又は効果的な送達システムの助けが必要であることである。ペプチド抗原はまた、特に組成物が複数の異なるペプチド抗原を含むことが望ましい場合に、医薬組成物に製剤化することが困難であり得る。より詳細には、個別化医療などの免疫療法の新たな領域において、適切なペプチド系組成物をタイムリーかつ費用対効果が高い様式で製剤化する困難さは、大きな課題を示す。

50

【 0 1 5 7 】

[00178]潜在的なエピトープの特定における効率は、シーケンシング技法の助け及びコンピューターアルゴリズム（例えば、MHCクラスⅠ及び／又はMHCクラスⅡタンパク質と結合すると予測されるモチーフを特定するNetMHC）の作成により大いに改善されているが、これらの技術は、ペプチド抗原を用いて、安定で免疫学的に有効な組成物を生じる能力を正確に予測することにほとんど効果がない。また、複数のペプチド抗原の使用は、抗原的多様性によってより広い適用範囲を提供するためにしばしば望ましいが、これらの種類のワクチンは、追加のペプチド選択性の要件を示し、特に、脂質系送達ビヒクル及び／又は疎水性担体などの特有の構成成分を利用する特殊な送達システムの文脈において、安定な組成物として製剤化することはさらにより難しい。したがって、前進があるにもかかわらず、適切な抗原の製剤化には、ペプチド系ワクチンの開発において、極めて重大かつ時間のかかるステップが残っている。これは、個別化がんワクチンなどの免疫原性組成物の速い開発が極めて重大である免疫療法の分野において、重大な問題を示している。

10

【 0 1 5 8 】

[00179]一実施形態において、本発明は、乾燥ペプチド抗原調製物を調製するための有利な方法、及びペプチド抗原を含む医薬組成物に関する。本方法は、時間のかかる処理ステップを回避し、広範囲のペプチド選択ステップを行う必要なく、ペプチド系抗原製剤の調製を可能にする。開示される方法は、ペプチド抗原の性質に関係なく、複数の異なるペプチド抗原を単一の医薬組成物として製剤化することを可能にする。また、本方法は、1個又は複数のペプチド抗原を含有する医薬組成物の迅速な生成を可能にし、これは、患者特異的ネオ抗原が関わる個別化がんワクチンの文脈において、特に有用であると予想される。

20

【 0 1 5 9 】

[00180]したがって、一実施形態において、本開示は、120nmの平均粒径及び0.1の多分散指数（PDI）を有する脂質ベシクル粒子を用意するステップ、脂質ベシクル粒子を1つ又は複数の可溶化されたペプチド抗原と混合して混合物を形成するステップ、及びステップ（b）において形成された混合物を乾燥して、乾燥ペプチド抗原調製物を形成するステップを含む、乾燥ペプチド抗原調製物を調製するための方法に関する。

【 0 1 6 0 】

[00181]このような方法の実施形態において、1個又は複数のペプチド抗原のそれぞれは、抗原ストックを提供するために一緒に可溶化されてもよい。したがって、本明細書に開示される方法の実施形態において、ステップ（b）は、（b1）少なくとも1つの可溶化されたペプチド抗原及び任意選択で可溶化されたTヘルパーエピトープを含む抗原ストックを用意すること、及び（b2）抗原ストックを脂質ベシクル粒子と混合して混合物を形成することを含む。

30

【 0 1 6 1 】

[00182]一実施形態において、抗原ストックは、事前に可溶化された抗原を組み合わせることによって調製してもよい。別の実施形態において、抗原ストックは、乾燥粉末のペプチド抗原を組み合わせること、溶媒を添加すること、及び溶媒中で抗原を混合することによって調製してもよい。別の実施形態において、抗原ストックは、1個又は複数の乾燥粉末のペプチド抗原を1つ又は複数の事前に可溶化された抗原と組み合わせることによって調製してもよい。

40

【 0 1 6 2 】

[00183]抗原ストックは、例えば、単一の容器中の乾燥粉末のペプチド抗原を組み合わせること、及び混合しながらペプチド抗原を可溶化すること、及び／又は溶媒中で超音波処理することによって調製してもよい。一実施形態において、ペプチド抗原の乾燥粉末混合物は、可溶化され、ボルテックスによって1～5分間混合され、1～5分間超音波処理されてもよい。一実施形態において、ペプチド抗原の乾燥粉末混合物は、可溶化され、ボルテックスによって約1分間混合され、約2分間超音波処理されてもよい。

50

【 0 1 6 3 】

[00184]一実施形態において、Tヘルパーエпитープは、乾燥粉末のTヘルパーエピトープを乾燥粉末の抗原の混合物と組み合わせ、次いで混合物を可溶化することによる抗原ストックの調製の間に添加される。この実施形態において、Tヘルパーエピトープは、分粒された脂質ベシクル粒子と混合される抗原ストックの一部になる。別の実施形態において、Tヘルパーエピトープは、ペプチド抗原とは別に、分粒された脂質ベシクル粒子と混合されてもよい。この実施形態において、Tヘルパーエピトープは、ペプチド抗原の前、後又は同時に、分粒された脂質ベシクル粒子に添加されてもよい。複数のペプチド抗原が使用され、複数のペプチド抗原が分粒された脂質ベシクル粒子と別々に混合される場合、Tヘルパーエピトープは任意の順序で添加することができる。

10

【 0 1 6 4 】

[00185]一実施形態において、アジュバントは、抗原ストックの調製の間に添加される。アジュバントは、乾燥粉末のアジュバントを乾燥粉末の抗原の混合物と組み合わせ、次いで、混合物を可溶化することによって添加されてもよい。或いは、アジュバントは、可溶化されたペプチド抗原の溶液に添加されてもよい。これらの実施形態のいずれかにおいて、アジュバントは、分粒された脂質ベシクル粒子と混合される抗原ストックの一部になる。別の実施形態において、アジュバントは、ペプチド抗原とは別に、分粒された脂質ベシクル粒子と混合されてもよい。この実施形態において、アジュバントは、ペプチド抗原の前、後又は同時に、分粒された脂質ベシクル粒子に添加されてもよい。複数のペプチド抗原が使用され、かつ複数のペプチド抗原が分粒された脂質ベシクル粒子と別々に混合される場合、アジュバントは任意の順序で添加することができる。

20

【 0 1 6 5 】

[00186]ペプチド抗原、Tヘルパーエピトープ及び/又はアジュバントを組み合わせることができる順序に関係なく、本明細書に開示される方法において、これらの構成成分は、分粒された脂質ベシクル粒子とのみ混合される。ペプチド抗原（又は一般に治療剤）、Tヘルパー及び/又はアジュバントは、分粒の前に脂質ベシクル粒子に添加されることはない。

【 0 1 6 6 】

[00187]一実施形態において、本明細書に開示される方法の有利な性質は、本方法が、単一組成物に複数の異なる治療剤を製剤化するために使用することができることである。

30

【 0 1 6 7 】

[00188]この目的を達成するための実施形態は、1つ又は複数の可溶化されたペプチド抗原を、任意選択でTヘルパーエピトープと一緒に含む、抗原ストックの調製を含む。

【 0 1 6 8 】

[00189]一実施形態において、抗原ストックは、上記のように、乾燥粉末のペプチド抗原の混合物、及び任意選択でTヘルパーエピトープを溶媒に溶解することによって調製してもよい。一実施形態において、溶媒は0.1Mの水酸化ナトリウム溶液（pH12.0）である。一実施形態において、抗原は約0.5mg/ml～5.0mg/mlの間の濃度でそれぞれ可溶化される。一実施形態において、抗原は約2.0mg/mlの濃度でそれぞれ可溶化される。抗原ストックは、次いで、例えば本明細書に記載の溶液のような等体積（1:1）の酢酸ナトリウム又はリン酸ナトリウムの溶液に添加されてもよい。一実施形態において、抗原ストックは等体積のpH6.0の100mMの酢酸ナトリウムに添加されてもよい。一実施形態において、抗原ストック中のそれぞれの抗原の最終濃度は約1.0mg/mlである。この手順は、複数の異なるペプチド抗原を含有する抗原ストックを調製するために使用することができる普遍的なアプローチの例示的な実施形態である。本明細書における開示を考慮すると、本明細書の開示に基づいて異なる溶媒を用いてこの手順を修正することは当業者の能力の範囲内であろう。

40

【 0 1 6 9 】

[00190]本明細書に開示されるように、驚くべきことに、ペプチド抗原を、120nmの平均粒径及び0.1の多分散指数（PDI）を有する事前に形成された脂質ベシク

50

ル粒子に添加することができ、それにも関わらず、依然として疎水性担体中で可溶化のための適切な乾燥抗原調製物を形成することを見出した。理論によって拘束されないが、抗原との混合の際、及び／又はその後の乾燥（例えば凍結乾燥）の間に、小さく均一な分粒された脂質ベシクル粒子は、その粒子自体を再編成（例えば、並び換え及び／又は融合）することができると思われる。分粒された脂質ベシクル粒子の構造の再配列は、不適合性の環境、例えば、水性環境中の疎水性ペプチド、次いで疎水性担体中の親水性ペプチドにおいて、ペプチド抗原を効率的に取り囲む働きをしてもよい。本質において、分粒された脂質ベシクル粒子は、ペプチド抗原ペイロードが親水性環境及び疎水性環境の両方に適切に存在することができる再配列を許容すると思われる。これは、分粒されていない脂質ベシクル粒子では観察されず、それによって、最終的に医薬組成物について濁った溶液が得られた。

10

【0170】

[00191]本明細書の実施例5に示すように、HPLC分析は、本方法が、ペプチド抗原が長期間にわたる（すなわち3か月以上の）保管下でさえ安定である乾燥ペプチド抗原調製物を提供することを確認する。実施例5は、HPLCによってペプチドを評価するための例示的な方法を提供する。

【0171】

[00192]最初に、ペプチドは、既知濃度のすべてのペプチドを含有する標準サンプルに対してHPLC分析を行うことによって特徴付けられる（例えば、実施例5の14個のネオ抗原及びA16Lペプチドを示すHPLCクロマトグラムについての図12を参照されたい）。この標準を用いて、次いで、HPLC分析を、例えば、ステップ(c)の乾燥の前及び／又は後などの本明細書に開示される方法における所与の時間に分粒された脂質ベシクル粒子／抗原の混合物中のペプチドを定量化するために使用することができる。例えば、凍結乾燥の前及び後の14個のネオ抗原を示すクロマトグラムを図13～16に示す。計算されたペプチド濃度を、凍結乾燥の直前、凍結乾燥の直後（ $T = 0$ ）、凍結乾燥の1か月後（ $T = 1M$ ）及び凍結乾燥の3か月後（ $T = 3M$ ）について、表12に示す。 $T = 1M$ 及び $T = 3M$ の時点に関しては、サンプルは、HPLC分析が行われるまで、凍結乾燥の直後に $-20^{\circ}C$ で保管された。

20

【0172】

[00193]ほとんどのペプチドについてのペプチド濃度は、ほとんどの時点で設定された仕様内であった。最初のタンパク質濃度及び使用されるHPLCプロトコールに基づいて、ネオ抗原に対して設定された仕様は、 $0.40 \sim 0.60 \text{ mg/ml}$ であり、A16Lペプチドに対して設定された仕様は、 $0.2 \sim 0.3 \text{ mg/ml}$ であった。Mut36は、一貫して設定された仕様外であったが、しかしながら、これは、二量体の形成をもたらす末端のシステイン残基に起因すると思われる。実際に、HPLCクロマトグラムに示すように、Mut36二量体について観察される別のピークが存在する。Mut29a及びMut17も設定された仕様外である値を示す。これらのペプチドは、二量体の形成、したがって、ペプチドの安定性の不正確な説明をもたらす場合がある内部のシステインを含有する。

30

【0173】

[00194]このように、一実施形態において、本明細書に開示される方法は、それぞれのペプチド抗原の最初のペプチド濃度の少なくとも80%が乾燥直前に未分解の形態で維持される、分粒された脂質ベシクル粒子／抗原の混合物を提供することができる。

40

【0174】

[00195]別の実施形態において、本明細書に開示される方法は、それぞれのペプチド抗原の最初のペプチド濃度の少なくとも75%が乾燥直後に未分解の形態で維持される、乾燥脂質／ペプチド抗原の調製物を提供することができる。

【0175】

[00196]別の実施形態において、本明細書に開示される方法は、それぞれのペプチド抗原の最初のペプチド濃度の少なくとも70%が少なくとも乾燥後3か月間未分解の形態で

50

維持される、乾燥脂質 / ペプチド抗原の調製物を提供することができる。

【 0 1 7 6 】

[00197]別の実施形態において、本明細書に開示される方法は、1個又は複数のペプチド抗原が乾燥後最大3か月間分解を示さない、乾燥脂質 / ペプチド抗原の調製物を提供することができる。

【 0 1 7 7 】

[00198]全体として、HPLC分析は、本明細書に開示される方法が、ペプチド抗原が長期間にわたる(すなわち3か月以上の)保管下でさえ安定である乾燥脂質 / ペプチド抗原の調製物を提供することができることを示す。とりわけ、個別化されたネオ抗原がんワクチンは、典型的には、免疫化の際に効果的な免疫応答を容易にするために数週間以内に製剤化しなければならないので、これらの製品のより短い保存可能期間が必要であると予想される。

【 0 1 7 8 】

[00199]また、本明細書に開示される方法は、有利には、より大きなペプチド抗原カプセル化リボソームを用いる異なるサイズ押出ステップを行う必要性を回避する。医薬品グレードの製剤のために、これらのサイズ押出ステップは、滅菌濾過を効率的に行うために、ペプチド抗原カプセル化リボソーム調製物においてしばしば行う必要がある。しかしながら、これらの押出ステップが行われる高圧(例えば5000psi)下では、溶液にペプチド抗原が出てきて、フィルターへの結合を引き起こし得る。ここで、驚くべきことに、これらの押出ステップは、ペプチド抗原が120nmの平均粒径及び0.1のPDIを有する事前に形成された脂質ベシクル粒子に添加される場合に必要ではないことを見出した。これらの煩わしい押出ステップがなかったとしても、本明細書の方法によって調製される乾燥抗原調製物は、疎水性担体への可溶化の際に澄明な医薬組成物を形成することが可能であった。

【 0 1 7 9 】

[00200]図4A、4B、4C及び4Dに示すように、本明細書に開示される方法によって生成する乾燥抗原調製物は、疎水性担体(例えば鉱油)への可溶化の際に澄明な溶液を生じることができる。対照的に、乾燥抗原調製物が分粒されていない脂質ベシクル粒子を用いて調製されると、可溶化の際に濁った溶液が形成された(図4E、4F、4G及び4Hを参照されたい)。

【 0 1 8 0 】

[00201]医薬品の文脈において、澄明な溶液を再現可能に得ることは有利な性質である。医薬製品は、均一性及び再現性を含む規制当局の認可のための閾値の要件を満たさなければならない。沈殿物の形成及び/又は溶液の澄明性の欠如は、それらが、構成成分(例えば抗原)が完全な可溶性ではない製品を示し得るので、望ましい性質ではない。曇った溶液について、追加の処理ステップが均一性を確立するために必要であることがあり、その場合にも、組成物が医薬品の目的のために承認されないことがある。わずかに濁った溶液は、それが沈殿した抗原ではなく濁りを引き起こす塩であることがあるので、承認される場合がある。しかしながら、それが塩の沈殿析出であってペプチド抗原ではないことを確認する必要性を避けられるので、澄明な溶液が好ましい。

【 0 1 8 1 】

[00202]本明細書に示すように、分粒された脂質ベシクル粒子を使用することによって、開示される方法は、疎水性担体への可溶化の際に澄明な溶液を形成するが、分粒されていない脂質ベシクル粒子の調製物は、澄明な溶液を形成しない。実際に、図5に示すように、開示される方法は、分粒された脂質ベシクル粒子がDOPC / コレステロール又はDOPC単独で作られているか否かに関わらず、澄明な溶液を提供することができる。これらの結果は、開示される方法において使用される小さい脂質ベシクル粒子が、コレステロールなしでさえも安定であることを示す。完全な合成生成物がしばしば好ましく、避けることができるならば、コレステロールを摂取することは望ましくないため、この特徴は医薬組成物の文脈において有利であり得る。

【0182】

[00203]さらに特定の実施形態において、乾燥脂質／治療剤の調製物及び医薬組成物を生成するための開示される方法は、個別化がんワクチンの文脈において特に有利である場合もある。

【0183】

[00204]個別化がんワクチンは、アミノ酸コード配列を変える変異（非同義体細胞変異）によって生じる腫瘍特異抗原である、患者特異的ネオ抗原に基づいて設計される。最近、シーケンシング技術の助けにより、個々の腫瘍のゲノム（エクソーム）のタンパク質コード部分内に存在する変異を特定し、それによって潜在的なネオ抗原を予測することが可能になっている。しかしながら、ネオ抗原系の個別化がんワクチンは、典型的には、免疫化の際に効果的な免疫応答を容易にするために数週間以内に製剤化しなければならない。タイミングが重要であり、大きなハードルをもたらす。潜在的なネオ抗原を最初を選択すること、次いで、この集団内で、安定な組成物を製剤化するための適切な特性を有するペプチドを選択することにかかる時間は、この分野で進歩してきたが最良は難しい。

10

【0184】

[00205]乾燥脂質／治療剤の調製物を調製するための本明細書に開示される方法において、ペプチド抗原（複数可）の存在中で分粒された脂質ベシクル粒子を調製することは必要ではないため、開示される方法は、個別化ネオ抗原を製剤化するために必要なコスト及び時間の両方を減らすことができる。処理ステップに費やす時間は、あらかじめ分粒された脂質ベシクル粒子のストックを調製又は購入することによって回避することができる。

20

【0185】

[00206]また、開示される方法が、異なるペプチド抗原の大きなペイロード負荷で、安定で水を含まない組成物を製剤化することができたことを見出した。実施例4に示すように、複数の異なるペプチド抗原は、それらの性質に関係なく、開示される方法を用いて1つの単一組成物と一緒に製剤化することが可能であった。これは、等電点、安定性、溶解度、免疫原性及び／又はペプチド間の相互適合性（例えば共溶解度）に関するような広範囲の抗原選択ステップを行う必要なく成し遂げられた。

【0186】

[00207]単一組成物に複数の異なるペプチド抗原を製剤化することは公知の製造の問題である。異なるペプチド抗原は、ペプチド抗原の等電点、安定性及び溶解度に関する異なる特性を有しているため、選択ステップは、製造プロセスにおいて、仮にそうだとした場合、ある特定のペプチドと一緒に製剤化できる場合に、決定することが必要であろう。これは、1つには、共溶解性の問題が原因であり、それによって、異なる特性を有するペプチドは、他のペプチドが溶液に出る原因になる。この問題のある特徴は、異なる相（例えば、水相及び疎水性相）の製造を伴う方法において増大する。しかしながら、実施例4に示すように、開示される方法は、等電点、安定性、溶解度及び／又は相互適合性についてペプチドを選択する任意のステップなしで、単一組成物に同時に14個の異なるペプチド抗原を製剤化することが可能であった。使用されるペプチドは、潜在的なネオ抗原として、単に、Castleら（2012年）によって特定されたペプチドである。

30

【0187】

[00208]また、抗原が、油中に形成される水滴に含有され得る油中水型エマルションとは対照的に、水を含まない組成物は、構成成分（例えば、治療剤、アジュバントなど）のすべてを直接油に組み込むことが必要である。これを、区別されるアミノ酸配列（表12、図13～16）をそれぞれ有する14個の異なるペプチド抗原はもちろんのこと、1個のペプチド抗原に対してさえも、事前に形成された分粒された脂質ベシクル粒子の外側にそれを追加することによって行うことができることは予想外であった。

40

【0188】

[00209]これらの障害にも関わらず、本明細書に開示される方法を使用することによって、発明者らは、複数の異なるペプチド抗原を含む、安定で水を含まない組成物を製剤化することが可能であった。これは、疎水性担体への可溶化のために、好ましい乾燥抗原調

50

製物を調製するための分粒された脂質ベシクル体を使用することによって達成された。理論によって拘束されないが、水を含まない製剤において非常に多くのペプチドを安定して製剤化する能力は、本明細書に開示される方法の処理ステップの間の分粒された脂質ベシクル粒子の特有の再配列に起因し得ると思われる。

【0189】

[00210]複数の異なるペプチド抗原を含む安定で水を含まない医薬組成物を調製するための本明細書に開示される方法の能力は、個別化がんワクチンの分野において有意な利点を有していてもよい。

【0190】

[00211]個別化されたネオ抗原系がんワクチンによる効果的な免疫療法の提供を成功させるために、ワクチンを、数週間以内に製剤化及び患者に送達することができることが重要である。これらの時間的制約を考慮すると、多くの場合、等電点、安定性、溶解度及び／又は免疫原性などの特性に関して、いわゆる「最良の」ネオ抗原を特定する広範囲のペプチド選択のための時間は、わずかであるか、又はない。適切な処置を提供する目的のために、現在臨床試験で開発されているネオ抗原ワクチンは、複数の製剤において10～30個の個々のペプチドを送達する。このアプローチは、最も適したネオ抗原を選択するのにかかる時間を減少させるが、製剤の安定性及び／又は免疫原性、コスト並びに患者のコンプライアンスに関わる重大な問題が残されている。等電点、安定性、溶解度（例えば共溶解度）及び／又は免疫原性に関する特性の特定のセットを有する抗原の選択において時間のかかる労力なく、抗原を単一の安定な製剤で送達することができることが理想的である。

【0191】

[00212]本明細書に開示される方法は、多数の異なるペプチド抗原が、時間のかかる抗原選択ステップなしに、単一組成物に製剤化することができるという点で利点を提供することができる。本明細書に開示される乾燥抗原調製物は、疎水性担体（例えば油）に迅速に可溶化することができ、皮下注射によって容易に投与することができ、それぞれのペプチドについて複雑な製剤調製物を回避し、かつ頻回注射を回避することによって時間を節約する。

【0192】

[00213]開示される方法は、多くの異なるペプチド抗原と一緒に製剤化する能力において有利であるだけでなく、乾燥脂質／ペプチド抗原の調製物及び得られる医薬組成物中のペプチド抗原の量においても有利である。実施例4に示すように、本明細書に開示される方法によって、乾燥脂質／ペプチド抗原の調製物は、疎水性担体に可溶化されて、7.0 mg/mlのペプチド抗原を含む最終組成物を提供することができた。加えて、この組成物は、0.25 mg/mlのTヘルパーペプチドエピトープも含有する。

【0193】

[00214]また、本明細書に開示される結果は、大きなペプチド抗原ペイロードであっても、組成物が、単回投与後、迅速で増強された免疫応答を促進する能力を保持することを示す。図17に示すように、14個の異なるネオ抗原を用いて開示される方法によって調製された組成物は、比較的水性組成物に対して増強されたCTL免疫応答を提供することが可能であった。免疫応答は、ネオ抗原Mut25について約5倍まで、ネオ抗原Mut44について約3倍まで改善された。統計学的有意差が他のネオ抗原について観察されなかったことは、抗原が強い免疫原性特性のために事前に選択されていなかったことを考慮すると驚くべきことではない。むしろ、個別化ネオ抗原ワクチンには普通にあることだが、目標は、1つ又は複数の効果的な免疫療法を提供することを期待して、いくつかの異なるネオ抗原を含めることである。本明細書に記載されるように、本発明の方法及び組成物は、この目的のために十分に適切で有利であると思われる。

【0194】

[00215]医薬組成物を調製するための方法

[00216]一実施形態において、本発明は医薬組成物を調製するための方法に関する。一

10

20

30

40

50

実施形態において、医薬組成物は、本明細書に開示される方法に従って乾燥脂質 / 治療剤の調製物を最初に調製し、次いで疎水性担体に乾燥調製物を可溶化することによって調製される。

【0195】

[00217]本明細書で使用される場合、「可溶化すること」に関して、これは、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を、乾燥構成物質を疎水性担体に溶解することにより、液体状態に回復させることを意味する。疎水性担体は、乾燥構成物質（例えば、脂質及び治療剤）を疎水性担体に溶解する任意の手段によって添加されてもよい。例えば、限定されないが、乾燥脂質 / 治療剤の調製物は、2つを一緒に混合することによって疎水性担体に可溶化させてもよい。一実施形態において、可溶化することには、疎水性担体を乾燥脂質 / 治療剤の調製物に添加すること、1 ~ 30 分間そのままにすること、及び次いで、1 ~ 15 分間混合物を穏やかに振とう又は混合することを含む。このプロセスは、乾燥構成物質が疎水性担体に溶解する（例えば、澄明な溶液が得られる）まで繰り返すことができる。

10

【0196】

[00218]一実施形態において、可溶化することには、疎水性担体を乾燥脂質 / 治療剤の調製物に添加すること、5 分間そのままにすること、及び次いで、1 分間穏やかに振とう又は混合することを含む。このプロセスは、乾燥構成物質が疎水性担体に溶解する（例えば、澄明な溶液が得られる）まで繰り返すことができる。

【0197】

[00219]図 4 A、4 B、4 C 及び 4 D に示すように、本明細書に開示される方法によって生成する乾燥脂質 / 治療剤の調製物は、疎水性担体への可溶化の際に澄明な溶液を生じることができる。対照的に、乾燥脂質 / 治療剤の調製物が分粒されていない脂質ベシクル粒子を用いて調製されると、濁った溶液が形成された（図 4 E、4 F、4 G 及び 4 H を参照されたい）。

20

【0198】

[00220]本明細書において議論されるように、医薬品の文脈において、澄明な溶液を再現可能に得ることは、有利な性質である。医薬製品は、均一性及び再現性を含む規制当局の認可のための閾値の要件を満たさなければならない。沈殿物の形成及び / 又は溶液の澄明性の欠如は、それらが、構成成分（例えば治療剤）が完全な可溶性ではない製品を示し得るので、望ましい性質ではない。曇った溶液について、追加の処理ステップが均一性を確立するために必要であることがあり、その場合にも、組成物が医薬品の目的のために承認されないことがある。わずかに濁った溶液は、それが沈殿した治療剤ではなく濁りを引き起こす塩であれば、承認される場合がある。しかしながら、澄明な溶液が有利である。

30

【0199】

[00221]分粒された脂質ベシクル粒子を使用することによって、開示される方法は、疎水性担体への可溶化の際に澄明な溶液を形成するが、分粒されていない脂質ベシクル粒子の調製物は、澄明な溶液を形成しない。実際に、図 5 に示すように、開示される方法は、分粒された脂質ベシクル粒子が D O P C / コレステロール又は D O P C 単独で作られているか否かに関係なく、澄明な溶液を提供することができる。これらの結果は、開示される方法において使用される分粒された脂質ベシクル粒子が、コレステロールなしでさえも安定であることを示す。この特徴は、完全な合成生成物がしばしば好ましく、避けることができるならば、コレステロールを摂取することは望ましくないため、医薬組成物の文脈において有利であることがある。

40

【0200】

[00222]一実施形態において、乾燥脂質 / 治療剤を疎水性担体に可溶化するステップは、乾燥構成物質が疎水性担体に完全に溶解している組成物をもたらす。一実施形態において、乾燥構成物質は、疎水性担体に完全に溶解しなくてもよいが、乾燥構成物質は、澄明な溶液を再現可能に提供する十分な程度まで溶解される。

【0201】

[00223]本明細書で使用される場合、「疎水性担体」は液状の疎水性物質を指す。「疎

50

水性担体」という用語は、本明細書において「油性担体」を互換的に指してもよい。

【0202】

[00224]疎水性担体は、本質的に純粋な疎水性物質、又は疎水性物質の混合物であってもよい。本明細書に記載される方法及び組成物において有用である疎水性物質は、薬学的及び／又は免疫学的に許容される物質である。担体は、典型的には、室温（例えば、約18～25）で液体であるが、室温で液体ではなく、例えば、温めることによって液化することができる、ある特定の疎水性物質も有用であり得る。

【0203】

[00225]油又は油の混合物は、本明細書で開示される方法及び組成物における使用のための特に適切な担体である。油は、薬学的及び／又は免疫学的に許容されなければならない。適切な油としては、例えば、鉱油（特に、ドラケオール（Drakeol）（登録商標）6VRなどの軽又は低粘度の鉱油）、植物油（例えば、MS80などの大豆油）、ナッツ油（例えばピーナツ油）、又はこれらの混合物が挙げられる。したがって、一実施形態において、疎水性担体は、植物油、ナッツ油又は鉱油などの疎水性物質である。動物脂肪及び人工疎水性ポリマー材料、特に、大気温で液体であるもの又は比較的容易に液化することができるものを使用することもできる。

【0204】

[00226]いくつかの実施形態において、疎水性担体は、不完全フロイントアジュバント（IFA）、鉱油ベースのモデル疎水性担体であってもよく、又は含んでいてもよい。別の実施形態において、疎水性担体は、モンタニド（登録商標）ISA51（SEPPIC、フランス）として市販されているものなどの鉱油溶液中のオレイン酸マンニドであってもよく、又は含んでいてもよい。これらの担体は、油中水型エマルジョンを調製するために一般的に使用されるが、本開示は、水を含まない組成物に関する。このように、これらの担体は、本明細書に開示される方法及び組成物において水と乳化されない。

【0205】

[00227]一実施形態において、疎水性担体は鉱油又は鉱油溶液中のオレイン酸マンニドである。

【0206】

[00228]一実施形態において、疎水性担体はモンタニド（登録商標）ISA51である。

【0207】

[00229]一実施形態において、疎水性担体は、鉱油（Sigma Aldrich）及びスパン（Span）80（Fluka）の混合物であるMS80油である。構成成分は、別々に購入して使用前に混合することができる。

【0208】

[00230]一実施形態において、本開示は、本明細書に開示の方法によって調製される医薬組成物に関する。

【0209】

[00231]小角X線散乱（SAXS）は、平均粒径、形状、分布及び表面と体積の比率などのパラメーターに関して、ナノスケールの粒子系の構造を決定するために使用することができる。分粒された脂質ベシクル粒子を用いて乾燥脂質／治療剤の調製物を調製する開示される方法を用いて、疎水性担体中で脂質が再配列されて、単一層脂質集合体を有する脂質系構造体を形成することを見出した。これは図19及び20のSAXSパターンに示される。

【0210】

[00232]「単一層脂質集合体」に関して、これは、脂質が、途中で、脂質の疎水性部分が疎水性担体に対して外側に向き、脂質の親水性部分がコアとして凝集する凝集構造体を形成することを意味する。SAXSパターンから、親水性部分が連続的な単一層膜（例えば逆ミセル）を形成するか、又はコアが不連続的な凝集体であるか否かを決定することはできない。配置に関係なく、脂質系構造体は、例えば、リポソームにおいて見られる二重

10

20

30

40

50

層とは逆に、脂質の単一層を含む。この配置において、親水性治療剤は単一層脂質集合体のコアにあり、疎水性治療剤は非極性油に可溶化される。

【0211】

[00233]理論によって拘束されないが、本明細書の実施例に基づいて、120 nmの平均粒径及び0.1のPDIに達するための脂質ベシクル粒子の分粒が、乾燥脂質/治療剤の調製物と疎水性担体とのより良好な適合性を可能にする好ましい性質を有する乾燥脂質/治療剤の調製物を提供されると思われる。例えば、分粒された脂質ベシクル粒子は、疎水性担体への可溶化の際に、脂質系構造体への脂質ベシクル粒子のより容易な再配列を可能にし、それによって、澄明な生成物を提供することができる。これは、おそらく、小さく均一なサイズの分粒された脂質ベシクル粒子に起因する。この性質はまた、より大きなペイロードのために、疎水性担体に安定に製剤化することを可能にすると思われる。

10

【0212】

[00234]医薬組成物

[00235]一実施形態において、本開示は、単一層脂質集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体、少なくとも1つの治療剤、及び疎水性担体を含む、安定で水を含まない医薬組成物に関する。これらの構成成分のそれぞれはより詳細に本明細書の他の箇所に個々に記載される。

【0213】

[00236]本明細書で使用される場合、「医薬組成物」、「組成物」、「ワクチン組成物」又は「ワクチン」という用語は文脈の必要性により互換的に使用することができる。

20

【0214】

[00237]本明細書に開示される医薬組成物は、治療有効量で対象に投与することができる。本明細書で使用される場合、「治療有効量」は、対象に治療的、予防的若しくは診断的な利益を提供するため、及び/又は対象において免疫応答を刺激、誘導、維持、ブースト若しくは増強するために有効な組成物又は治療剤の量を意味する。いくつかの実施形態において、組成物の治療有効量は、特定の疾患又は障害の処置において、対象に臨床応答を誘導することができる量である。組成物の治療有効量の決定は、特に、本明細書において提供される開示を考慮すると、十分に当業者の能力の範囲内である。治療有効量は、対象の状態、体重、性別及び年齢などのいろいろな要因に従って変わることがある。

【0215】

30

[00238]本明細書に開示される医薬組成物は水を含まない。本明細書で使用される場合、「水を含まない」とは、完全に又は実質的に水を含まないことを意味し、すなわち、医薬組成物はエマルションではない。

【0216】

[00239]「完全に水を含まない」に関して、これは、組成物が全く水を含有しないことを意味する。対照的に、「実質的に水を含まない」という用語は、疎水性担体が依然として少量の水を含有していてもよく、但し、水が担体の非連続相に存在するような実施形態を包含するものとする。例えば、組成物の個々の構成成分は、凍結乾燥又は蒸発などのプロセスによって完全に除去することができない少量の結合水を有していてもよく、ある特定の疎水性担体は、その中に溶解した少量の水を含有していてもよい。一般に、「実質的に水を含まない」本発明に開示される組成物は、例えば、組成物の担体構成成分の総重量の重量/重量に基づいて、約5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%又は0.01%未満の水を含有する。依然として少量の水を含有する組成物は、エマルションを形成するような十分な量の水を含有しない。

40

【0217】

[00240]本明細書に開示される医薬組成物は安定である。「安定」に関して、これは、脂質及び治療剤が、疎水性担体中に可溶化された形態で残っていることを意味する。これは、開示される組成物の有利な性質である。例えば、複数の治療剤(例えばペプチド抗原)が関わる実施形態の文脈において、等電点、溶解度、安定性及び/又は免疫原性に基づく事前選択なしに、多くのいろいろな治療剤と一緒に製剤化することが可能である。組成

50

物は、異なる特性（例えば、長さ、配列分子量、電荷、極性、疎水性及び／又は親水性）を有する治療剤と一緒に製剤化される場合、典型的に生じる共溶解性の問題に対して耐性である。

【0218】

[00241]一実施形態において、組成物の安定性は、澄明な溶液又はわずかに濁った溶液である製剤を調製する能力に基づいていてもよい。一実施形態において、組成物の安定性は、澄明な溶液である製剤を調製する能力に基づいていてもよい。「澄明な溶液」に関して、これは、溶液が、曇った外観又は濁った外観を有さないことを意味する。一実施形態において、これは、澄明な溶液を観察することによって肉眼で視覚的に、又は分光光度計を使用する測定によって決定してもよい。一実施形態において、組成物は、ヨーロッパ薬局方（Ph．Eur．）、第9版、2．9．20項に従って視覚的に検査することができる。

10

【0219】

[00242]一実施形態において、組成物の安定性は、目に見える沈殿物を有さない製剤を調製する能力に基づいていてもよい。「目に見える沈殿物」に関して、これは、組成物を保持する容器の壁、又は組成物の溶液中のいずれかに位置する沈殿物を指すことを意味する。一実施形態において、これは、沈殿物の非存在を観察することによって肉眼で視覚的に、又は分光光度計を使用する測定によって決定してもよい。一実施形態において、組成物は、ヨーロッパ薬局方（ph．Eur．）、第9版、2．9．20項に従って視覚的に検査することができる。

20

【0220】

[00243]一実施形態において、組成物の安定性は、乾燥脂質／治療剤の調製物中の治療剤の観察された安定性に基づいていてもよい。例えば、組成物の安定性は、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、又はそれよりも長い保管期間にわたって、実質的に一貫した治療剤の濃度に基づいていてもよい。一実施形態において、治療剤の濃度は本明細書の他の箇所に記載されるHPLC分析によって決定されてもよい。乾燥調製物中の治療剤の安定性は、疎水性担体に安定に可溶化するそれらの能力を示す。

【0221】

[00244]一実施形態において、組成物の安定性は、以下の1つ又は複数を考慮に入れることによってさらに評価することができる。不純物及び／又は分解物の特定を含む治療剤及び／又は脂質の特定及び定量化（例えば、RP-HPLCによる）、単一層脂質集合体を有する脂質系構造体の粒径（例えば、SAXSによる）、光学密度、粘度（例えば、Ph．Eur．2．2．9の通り）、シリンジなどからの抽出可能体積（例えば、Ph．Eur．2．9．17の通り）、及び免疫原性アッセイ（例えばELISpot）。

30

【0222】

[00245]一実施形態において、本明細書に開示される組成物は、疎水性担体への可溶化後に、少なくとも30分間、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも3時間、少なくとも4時間、少なくとも5時間、少なくとも6時間、少なくとも7時間、少なくとも8時間、少なくとも9時間、少なくとも10時間、少なくとも11時間、少なくとも12時間、少なくとも18時間、少なくとも24時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間又はそれよりも長い間安定である。

40

【0223】

[00246]上記のように、本明細書に開示される医薬組成物は、単一層脂質集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体を含む。本明細書で使用される場合、「脂質系構造体」という用語は、脂質によって形成される任意の構造体を指す。単一層脂質集合体を有する脂質系構造体を形成する脂質は、分粒された脂質ベシクル粒子を形成する本明細書に記載の脂質と同じ脂質である。

【0224】

[00247]形成することができる様々な脂質系構造体があり、本明細書に開示される組成

50

物は、単一層脂質集合体を有する単一の種類の脂質系構造体を含んでいてもよく、又は異なる脂質系構造体の混合物を含んでいてもよい。

【0225】

[00248]一実施形態において、単一層脂質集合体を有する脂質系構造体は部分的又は完全に治療剤を取り囲む。例として、脂質系構造体は、治療剤を取り囲む閉じられた小胞構造であってもよい。一実施形態において、小胞構造中の脂質の疎水性部分は疎水性担体に対して外側に向いている。

【0226】

[00249]別の例として、単一層脂質集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体は、疎水性担体に対して外側に向いている脂質の疎水性部分、及びコアとして凝集する脂質の親水性部分を有する脂質の凝集体を含んでいてもよい。これらの構造体は必ずしも連続的な脂質層膜を形成しない。一実施形態において、これらは単量体の脂質の凝集体である。

【0227】

[00250]一実施形態において、単一層脂質集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体は逆ミセルを含む。水性溶液中の典型的なミセルは、周囲の水性溶液と接触して親水性部分と凝集体を形成し、ミセル中央の疎水性部分を隔離する。対照的に、疎水性担体中において、逆性/逆ミセルは、周囲の疎水性溶液と接触して疎水性部分で形成し、ミセル中央の親水性部分を隔離する。球形の逆ミセルは、そのコア（すなわち内部環境）内で親水性親和性によって治療剤を内包することができる。

【0228】

[00251]限定されないが、単一層脂質集合体を有する脂質系構造体のサイズは直径2 nm (20 Å) ~ 20 nm (200 Å) の範囲内である。一実施形態において、単一層脂質集合体を有する脂質系構造体のサイズは直径約2 nm ~ 約10 nmの間である。一実施形態において、単一層脂質集合体を有する脂質系構造体のサイズは直径約2 nm、3 nm、4 nm、5 nm、6 nm、約7 nm、約8 nm、約9 nm又は10 nmである。一実施形態において、脂質系構造体の最大直径は約4 nm又は約6 nmである。一実施形態において、これらのサイズの脂質系構造体は逆ミセルである。

【0229】

[00252]一実施形態において、1つ又は複数の治療剤は、疎水性担体への可溶化後、脂質系構造体の内側にある。「脂質系構造体の内側」に関して、これは、治療剤が、治療剤の親水性構成成分が疎水性担体に曝されないように、脂質によって実質的に取り囲まれていることを意味する。一実施形態において、脂質系構造体の内側の治療剤は大部分は親水性である。

【0230】

[00253]一実施形態において、1つ又は複数の治療剤は、疎水性担体への可溶化後、脂質系構造体の外側にある。「脂質系構造体の外側」に関して、これは、治療剤が、単一層脂質集合体と、内側の環境内で隔離されていないことを意味する。一実施形態において、脂質系構造体の外側の治療剤は大部分は疎水性である。

【0231】

[00254]本明細書に開示される医薬組成物は、少なくとも1つの治療剤を含む。例示的な治療剤を本明細書の他の箇所に記載するが、それらに限定されない。

【0232】

[00255]一実施形態において、治療剤は、ペプチド抗原、ポリペプチドをコードするDNA又はRNAポリヌクレオチド（例えばmRNA）、ホルモン、サイトカイン、アレルゲン、触媒活性DNA（デオキシリボザイム）、触媒活性RNA（リボザイム）、アンチセンスRNA、干渉RNA（例えば、siRNA又はmiRNA）、アンタゴミル、低分子薬物、生物学的薬物、抗体、又はこれらのいずれか1つの断片若しくは誘導体、或いはこれらの混合物である。

【0233】

[00256]特定の実施形態において、治療剤は、1個又は複数のペプチド抗原である。本

10

20

30

40

50

明細書で使用される場合、「ペプチド抗原」という用語は、タンパク質又はポリペプチドである抗原である。本組成物中で使用することができるペプチド抗原の例示的な実施形態を本明細書に記載するが、それらに限定されない。

【0234】

[00257]一実施形態において、本組成物は単一のペプチド抗原を含む。一実施形態において、本組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個又はそれ以上の異なるペプチド抗原を含む。一実施形態において、本組成物は、5～30個の異なるペプチド抗原、10～20個の異なるペプチド抗原、又は10～15個の異なるペプチド抗原を含む。一実施形態において、本組成物は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の異なるペプチド抗原を含む。一実施形態において、本組成物は14個の異なるペプチド抗原を含む。

10

【0235】

[00258]「異なる」ペプチド抗原に関して、これは、医薬組成物中のペプチド抗原が同一のアミノ酸配列を有さないことを意味する。抗原は、同じ起源（例えば、ウイルス、細菌、原生動物、がん細胞など）に由来していてもよく、又は同じ配列を共有しないが同じタンパク質由来であってもよい。

【0236】

[00259]一実施形態において、本組成物中のそれぞれのペプチド抗原は、独立して、5～120個のアミノ酸長、5～100個のアミノ酸長、5～75個のアミノ酸長、5～50個のアミノ酸長、又は5～30個のアミノ酸長であってもよい。一実施形態において、本組成物中のペプチド抗原は、独立して、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個又は50個のアミノ酸長であってもよい。一実施形態において、本組成物中のペプチド抗原は独立して20～30個のアミノ酸長であってもよい。それぞれのペプチド抗原は、同一若しくは異なる長さ、又はこれらの任意の組み合わせであってもよい。一実施形態において、ペプチド抗原はすべて27個のアミノ酸長である。

20

30

【0237】

[00260]一実施形態において、1個又は複数のペプチド抗原は、ヒトパピローマウイルス（HPV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、呼吸器多核体ウイルス（RSV）、バチルス・アントラシス（*Bacillus anthracis*）、プラスモジウム属（*Plasmodium*）及び/又はサバイビンポリペプチドに由来する。

【0238】

[00261]一実施形態において、1個又は複数のペプチド抗原は、例えば、NKLC EYNV FHNK TFE LPR ARV NT（配列番号2）及び/又はNK LSE HK TFC NK TLE QG QMY QINT（配列番号3）などのRSVに由来する。

【0239】

40

[00262]一実施形態において、本組成物中の1個又は複数のペプチド抗原はがん関連ペプチド抗原である。一実施形態において、本組成物中のすべてのペプチド抗原はがん関連ペプチド抗原である。本明細書に開示される組成物中で使用することができるがん関連ペプチド抗原の例示的な実施形態を以下に記載するが、それらに限定されない。一実施形態において、がん関連ペプチド抗原は、例えば、限定されないが、本明細書に記載されるものなどの1個又は複数のサバイビン抗原であってもよい。

【0240】

[00263]一実施形態において、1個又は複数のペプチド抗原は、FT E L T L G E F（配列番号4）、L M L G E F L K L（配列番号5）、R I S T F K N W P K（配列番号6）、S T F K N W P F L（配列番号7）若しくはL P P A W Q P F L（配列番号8）、又

50

はこれらの任意の組み合わせである。一実施形態において、本組成物は全部で5個のこれらのペプチド抗原（配列番号4～7）を含む。

【0241】

[00264]一実施形態において、本組成物中の1個又は複数のペプチド抗原はネオ抗原である。一実施形態において、本組成物中のすべてのペプチド抗原はネオ抗原である。本明細書に開示される組成物中使用することができるネオ抗原の例示的な実施形態を以下に記載するが、それらに限定されない。一実施形態において、本組成物は、例えば、10～30個のネオ抗原などの複数のネオ抗原を含む組成物である。

【0242】

[00265]一実施形態において、ペプチド抗原は、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する任意の特性に基づいて事前に選択されていない。一実施形態において、本組成物中のペプチド抗原は、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する1つ又は複数の異なる特性を有する。例えば、ペプチド抗原は、異なる長さ、配列、分子量、電荷、極性、疎水性及び／又は親水性を有していてもよい。

10

【0243】

[00266]本明細書に開示される組成物の実施形態において、それぞれのペプチド抗原は、独立して、約0.05 µg / µl～約10 µg / µlの間、0.1 µg / µl～約5.0 µg / µlの間、又は約0.5 µg / µl～約1.0 µg / µlの間の濃度である。本明細書に開示される組成物の実施形態において、それぞれのペプチド抗原は、独立して、約0.1 µg / µl、0.25 µg / µl、約0.5 µg / µl、約0.75 µg / µl、約1.0 µg / µl、約1.25 µg / µl、約1.5 µg / µl、約1.75 µg / µl、約2.0 µg / µl、約2.25 µg / µl又は約2.5 µg / µlの濃度である。「独立して」に関して、これは、本組成物中のそれぞれのペプチド抗原の量が、任意の他の量と独立しており、したがって、それぞれ個別のペプチド抗原は、任意の他のペプチド抗原と同一又は異なる濃度を有していてもよい。一実施形態において、本組成物中のそれぞれのペプチド抗原は約0.5 µg / µlの濃度である。

20

【0244】

[00267]一実施形態において、医薬組成物は、10個以上の異なるペプチド抗原を含み、それぞれのペプチド抗原は、少なくとも約0.5 µg / µlの濃度である。一実施形態において、これらの10個以上のペプチド抗原のそれぞれは独立して20～30個のアミノ酸長である。

30

【0245】

[00268]本明細書に開示される医薬組成物は疎水性担体を含む。本明細書で使用される場合、「疎水性担体」は液状の疎水性物質を指す。「疎水性担体」という用語は、本明細書において「油性担体」を互換的に指してもよい。

【0246】

[00269]疎水性担体は、本質的に純粋な疎水性物質、又は疎水性物質の混合物であってもよい。本明細書に記載される方法及び組成物において有用である疎水性物質は、薬学的及び／又は免疫学的に許容される物質である。担体は、典型的には、室温（例えば、約18～25℃）で液体であるが、室温で液体ではなく、例えば、温めることによって液化することができる、ある特定の疎水性物質も有用であり得る。

40

【0247】

[00270]油又は油の混合物は、本明細書で開示される方法及び組成物における使用のための特に適切な担体である。油は、薬学的及び／又は免疫学的に許容されなければならない。適切な油としては、例えば、鉱油（特に、ドラケオール（Drakeol）（登録商標）6VRなどの軽又は低粘度の鉱油）、植物油（例えば、MS80などの大豆油）、ナッツ油（例えばピーナツ油）、又はこれらの混合物が挙げられる。したがって、一実施形態において、疎水性担体は、植物油、ナッツ油又は鉱油などの疎水性物質である。動物脂肪及び人工疎水性ポリマー材料、特に、大気温で液体であるもの又は比較的容易に液化することができるものを使用することもできる。

50

【0248】

[00271]いくつかの実施形態において、疎水性担体は、不完全フロイントアジュバント（IFA）、鉱油ベースのモデル疎水性担体であってもよく、又は含んでいてもよい。別の実施形態において、疎水性担体は、モンタニド（登録商標）ISA51（SEPPIC、フランス）として市販されているものなどの鉱油溶液中のオレイン酸マンニドであってもよく、又は含んでいてもよい。これらの担体は、油中水型エマルションを調製するために一般的に使用されるが、本開示は水を含まない組成物に関する。このように、これらの担体は、本明細書に開示される方法及び組成物において水と乳化されない。

【0249】

[00272]一実施形態において、疎水性担体は鉱油又は鉱油溶液中のオレイン酸マンニドである。

10

【0250】

[00273]一実施形態において、疎水性担体はモンタニド（登録商標）ISA51である。

【0251】

[00274]一実施形態において、疎水性担体は、鉱油（Sigma Aldrich）及びスパン80（Fluka）の混合物であるMS80油である。構成成分は、別々に購入して使用前に混合することができる。

【0252】

[00275]本明細書に開示される組成物は当技術分野で公知の1つ又は複数の追加の構成成分をさらに含んでいてもよい（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Easton, Pa., USA、1985年；及びThe United States Pharmacopoeia: The National Formulary（USP 24 NF19）1999年発行を参照されたい）。

20

【0253】

[00276]一実施形態において、本組成物は、アジュバント、Tヘルパーエпитープ、界面活性剤及び/又は賦形剤を追加で含んでいてもよい。使用することができるアジュバント、Tヘルパーエпитープ及び界面活性剤の例示的かつ非限定的な実施形態を以下に記載する。一実施形態において、本組成物は、治療剤が1個又は複数のペプチド抗原である場合、Tヘルパーエпитープ及び/又はアジュバントを含む。

30

【0254】

[00277]一実施形態において、医薬組成物は澄明な溶液である。一実施形態において、医薬組成物は目に見える沈殿物を有さない。

【0255】

[00278]本発明に開示される組成物を調製するための能力は、特にネオ抗原が関わる個別化がん医薬の分野において有意な利点を有することがある。

【0256】

[00279]これに関して、一実施形態において、本開示は、単一脂質層集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体、5個以上の異なるペプチドネオ抗原、及び疎水性担体を含む、安定で水を含まない医薬組成物であって、ペプチドネオ抗原が等電点、溶解度、安定性及び/又は免疫原性に関する任意の特性に基づいて事前に選択されていない医薬組成物に関する。この実施形態において、「安定」及び「水を含まない」という用語は本明細書に記載の意味と同じ意味を有する。また、単一脂質層集合体及び疎水性担体を有する脂質系構造体は本明細書に記載の通りである。

40

【0257】

[00280]ネオ抗原組成物の実施形態において、ネオ抗原は、異なる長さ、配列、分子量、電荷、極性、疎水性及び/又は親水性を有する。

【0258】

[00281]本明細書において議論されるように、ネオ抗原を含む医薬組成物は、この医薬

50

組成物が、典型的には、免疫化の際に効果的な免疫応答を容易にするために数週間以内に製剤化しなければならない点で、特別な考慮事項を含む。タイミングが重要であり、大きなハードルをもたらす。他の種類の医薬製剤のように、多くの場合、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に基づいて適したペプチド抗原を選択するステップを行うための時間は、わずかであるか、又はない。これらの選択性ステップなしで、一様な単一のペプチド抗原よりも安定で治療的に有効な医薬組成物を製剤化することは障害である。

【0259】

[00282]しかしながら、実施例4に示すように、複数のペプチド抗原は、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する特性に基づく任意の事前の選択なしで、単一の組成物に可溶化することができた。したがって、本組成物は、個別化ワクチンのためのいわゆる「最良の」抗原を特定する時間のかかる選択ステップを行う必要性を減らすと考えられる。むしろ、本明細書に開示される組成物は、抗原選択ステップについての必要なく、免疫応答を誘導する有効量でそれぞれ、複数の異なるペプチドネオ抗原（例えば5個以上）の包含を可能にする。実際に、本明細書に示されるように、大きなペプチド抗原ペイロードであっても、ネオ抗原組成物が、単回投与後、迅速で増強された免疫応答を促進する能力を保持する（実施例6；図17）。

10

【0260】

[00283]免疫応答及び処置の適応症

[00284]本明細書に開示される組成物は、任意の例において、対象に治療剤を投与することが望まれる適用が見出され得る。対象は、魚類、鳥類又は哺乳動物などの脊椎動物であってもよい。一実施形態において、対象は哺乳動物である。一実施形態において、哺乳動物はヒトである。

20

【0261】

[00285]一実施形態において、本組成物は、治療剤が標的とする疾患、障害又は状態を処置、予防又は診断するための方法において使用することができる。一実施形態において、本方法は、本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与するステップを含む。

【0262】

[00286]一実施形態において、本組成物は、対象における免疫応答をモジュレートするための方法において使用することができる。本明細書で使用される場合、「モジュレートすること」という用語は、免疫刺激（例えば、免疫応答を誘導又は増強する）及び免疫抑制（例えば、免疫応答を予防又は低減する）の両方を指すものとする。典型的には、本方法は1つ又は他の免疫刺激又は免疫抑制が関わるが、本方法は両方を対象とすることが可能である。本明細書で言及するように、「免疫応答」は、細胞媒介性（CTL）免疫応答又は抗体（液性）免疫応答のいずれかであってもよい。

30

【0263】

[00287]いくつかの実施形態において、本明細書に開示される組成物は、治療剤（例えばペプチド抗原）に対する細胞媒介性免疫応答を誘導するために使用することができる。

【0264】

[00288]本明細書で使用される場合、免疫応答を「誘導する」ことは免疫応答を誘発及び／又は強化することである。免疫応答を誘導することは、以前の免疫応答状態、例えば、本明細書に開示される組成物の投与前と比べて、宿主の利益に対して、免疫応答を、惹起し、増強し、上昇させ、改善し、又は強化する場合を包含する。

40

【0265】

[00289]本明細書で使用される場合、「細胞媒介性免疫応答」、「細胞性免疫」、「細胞性免疫応答」又は「細胞傷害性Tリンパ球（CTL）免疫応答」という用語（本明細書において、互換的に使用される）は、マクロファージ及びナチュラルキラー細胞の活性化、抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球の産生及び／又は抗原に対する応答における様々なサイトカインの放出によって特徴付けられる免疫応答を指す。細胞傷害性Tリンパ球は、感染した体細胞又は腫瘍細胞の死を誘導することができるTリンパ球のサブグループ（白血球の種類）であり、ウイルス（又は他の病原体）に感染したか、又は他に損傷若しくは機

50

能不全の細胞を死滅させる。

【0266】

[00290]大部分の細胞傷害性T細胞は、MHCクラスI分子に結合する特異的ペプチド抗原を認識することができるT細胞受容体を発現する。典型的には、細胞傷害性T細胞は、CD8（すなわちCD8+ T細胞）も発現し、これはMHCクラスI分子の一部に誘引される。この親和性は、抗原特異的活性化の間に、一緒に密接に結合した細胞傷害性T細胞及び標的細胞を保つ。

【0267】

[00291]細胞性免疫は、例えば、腫瘍特異的抗原（例えばネオ抗原）を提示するがん細胞などの、その表面で外来性又は変異した抗原のエピトープを提示する体細胞を溶解することができる抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球（例えば抗原特異的CD8+ T細胞）を活性化すること、マクロファージ及びナチュラルキラー細胞を活性化し、細胞内の病原体を破壊できるようにすること、及び細胞を刺激して、適応性免疫応答及び先天性免疫応答に關与する他の細胞の機能に影響を与える様々なサイトカインを分泌することによって身体を保護する。

10

【0268】

[00292]細胞性免疫は、適応性免疫応答の重要な構成部分であり、樹状細胞、Bリンパ球及び少ない程度ではあるがマクロファージなどの抗原提示細胞との相互作用を通して、細胞によって抗原を認識した後に、

1．腫瘍特異的抗原を提示するがん細胞などの、その表面で外来性又は変異した抗原のエピトープを提示する体細胞において、アポトーシスを誘導することが可能な抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球を活性化すること、

20

2．マクロファージ及びナチュラルキラー細胞を活性化し、細胞内の病原体を破壊できるようにすること、及び

3．細胞を刺激して、適応性免疫応答及び先天性免疫応答に關与する他の細胞の機能に影響を与える様々なサイトカインを分泌すること
などの様々なメカニズムによって身体を保護する。

【0269】

[00293]細胞媒介性免疫は、ウイルスに感染した細胞を除去するのに最も効果的であるが、真菌、原生動物、がん及び細胞内の細菌に対する防御にも關与する。これは移植拒絶反応において主要な役割も果たす。

30

【0270】

[00294]細胞媒介性免疫は、様々な細胞型の關与を含み、異なるメカニズムによって媒介されるので、いくつかの方法を用いてワクチン接種後の免疫の誘導を実証することができる。これらは以下の検出に幅広く分類することができる：i) 特異的抗原提示細胞、ii) 特異的エフェクター細胞及びその機能、及びiii) サイトカインなどの可溶性メディエーターの放出。

【0271】

[00295]i) 抗原提示細胞：樹状細胞及びB細胞（及び少ない程度ではあるがマクロファージ）は、T細胞の活性化を増強することを可能にする特殊な免疫刺激受容体を備え、プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）と称される。これらの免疫刺激分子（共刺激分子とも呼ばれる）は、感染又はワクチン接種後、CD4及びCD8細胞傷害性T細胞などのエフェクター細胞に抗原提示するプロセスの間に、これらの細胞上で上方制御される。このような共刺激分子（CD40、CD80、CD86、MHCクラスI又はMHCクラスIIなど）は、例えば、これらの分子に対する蛍光色素コンジュゲート抗体を、APCを特異的に識別する抗体（樹状細胞に対してCD11cなど）とともに、フローサイトメトリーを使用することによって検出することができる。

40

【0272】

[00296]ii) 細胞傷害性T細胞：（Tc、キラーT細胞、又は細胞傷害性Tリンパ球（CTL）としても公知である）は、ウイルス（及び他の病原体）に感染した細胞又は腫

50

瘍抗原を発現する細胞の死を誘導するT細胞のサブグループである。これらのCTLは、ある特定の外来性分子又は異常分子をその表面に有する他の細胞を直接攻撃する。このような細胞傷害活性の能力は、インビトロでの細胞溶解アッセイ（クロム放出アッセイ）を用いて検出することができる。したがって、適応性細胞性免疫の誘導は、抗原が負荷された標的細胞が、ワクチン接種又は感染の後にインビトロで生じた特異的CTLによって溶解する場合に、そのような細胞傷害性T細胞の存在によって実証することができる。

【0273】

[00297]ナイーブ細胞傷害性T細胞は、そのT細胞受容体（TCR）がペプチド結合MHCクラスI分子と強く相互作用する場合に活性化される。この親和性は、抗原/MHC複合体の種類及び方向づけに依存し、CTL及び感染した細胞と一緒に結合するのを保つものである。活性化すると、CTLは、クローン増殖と呼ばれる、機能性を獲得するプロセスを受け、迅速に分裂し、「武装化」エフェクター細胞の部隊を産生する。次いで、活性化されたCTLは、その特有のMHCクラスI + ペプチドを有する細胞を探して全身にわたって移動する。これは、ペプチドMHCクラスI四量体をフローサイトメトリーアッセイにおいて使用することによって、インビトロでそのようなCTLを識別するために使用することができる。

10

【0274】

[00298]これらの感染又は機能不全の体細胞に曝露されると、エフェクターCTLは、標的細胞の形質膜に孔を形成する細胞毒素であるパーフォリン及びグラニュライシンを放出し、イオン及び水が感染した細胞へ流れ出すことを可能にし、破裂又は溶解を引き起こす。CTLは、孔を介して細胞に侵入し、アポトーシス（細胞死）を誘導するセリンプロテアーゼであるグランザイムを放出する。CTLからのこれらの分子の放出は、ワクチン接種後の細胞媒介性免疫応答の成功した誘導の評価基準として使用することができる。これは、CTLを定量的に測定することができる、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）又は酵素結合免疫スポットアッセイ（ELISPOT）によって行うことができる。CTLは、IFN- γ などの重要なサイトカインを産生する能力もあるので、IFN- γ を産生するCD8細胞の定量的測定を、ELISPOTによって、及びこれらの細胞中の細胞内IFN- γ のフローサイトメトリー測定によって達成することができる。

20

【0275】

[00299]CD4 + 「ヘルパー」T細胞：CD4 + リンパ球、又はヘルパーT細胞は、免疫応答メディエーターであり、適応性免疫応答の能力の確立及び最大化において重要な役割を果たす。これらの細胞は、細胞毒性又は食細胞活性を有さず、感染した細胞を死滅又は病原体を除去することはできないが、本質において、他の細胞にこれらの作業を行うように指示することによって免疫応答を「管理する」。2つの種類のエフェクターCD4 + Tヘルパー細胞応答は、Th1及びTh2と呼ばれるプロフェッショナルAPCによって誘導することができ、それぞれが、異なる種類の病原体を排除するように設計される。

30

【0276】

[00300]ヘルパーT細胞は、MHCクラスII分子に結合した抗原を認識するT細胞受容体（TCR）を発現する。ナイーブヘルパーT細胞の活性化は、サイトカインの放出を引き起こし、活性化されたAPCを含む、多くの細胞型の活性に影響を与える。ヘルパーT細胞は、細胞傷害性T細胞よりもはるかに穏やかな活性化刺激を必要とする。ヘルパーT細胞は、細胞傷害性細胞の活性化を「助ける」余分なシグナルを提供することができる。2つの種類のエフェクターCD4 + Tヘルパー細胞応答は、Th1及びTh2と呼ばれるプロフェッショナルAPCによって誘導することができ、それぞれが、異なる種類の病原体を排除するように設計される。2つのTh細胞集団は、産生したエフェクタータンパク質（サイトカイン）のパターンにおいて異なる。一般に、Th1細胞は、マクロファージ及び細胞傷害性T細胞の活性化によって、細胞媒介性免疫応答を補助するのに対して、Th2細胞は、形質細胞への変換のためのB細胞の刺激によって、及び抗体の形成によって、体液性免疫応答を促進する。例えば、Th1細胞によって制御される応答は、マウスにおいてIgG2a及びIgG2b（ヒトにおいてIgG1及びIgG3）を誘導するこ

40

50

とができ、抗原に対する細胞媒介性免疫応答が好ましくあり得る。抗原に対する I g G 応答が T h 2 型細胞によって制御される場合、マウスにおける I g G I (ヒトにおける I g G 2) の産生が主に増強され得る。T h 1 又は T h 2 応答に関連するサイトカインの測定は、成功したワクチン接種の評価基準を与える。これは、I F N - 、I L - 2、I L - 1 2、T N F - などのような T h 1 - サイトカイン、又は中でも I L - 4、I L - 5、I L 1 0 などの T h 2 サイトカインのために設計された特異的 E L I S A によって達成することができる。

【 0 2 7 7 】

[00301] i i i) 局所リンパ節から放出されたサイトカインの測定は、成功した免疫化の良好な指標を与える。抗原提示と、A P C、並びに C D 4 及び C D 8 T 細胞などの免疫エフェクター細胞の成熟の結果として、いくつかのサイトカインがリンパ節細胞によって放出される。これらの L N C を、抗原の存在下、インビトロで培養することによって、I F N - 、I L - 2、I L - 1 2、T N F - 及び G M - C S F などのある特定の重要なサイトカインが放出されるかどうかを測定することによって、抗原特異的免疫応答を検出することができる。これは、培養上清及び標準として組換えサイトカインを使用する E L I S A によって行うことができる。

10

【 0 2 7 8 】

[00302] 成功した免疫化は、限定されないが、機能的抗体を検出するための赤血球凝集阻害 (A I J) 及び血清中和阻害アッセイ；ワクチン接種された対象に、関連する病原体を負荷し、ワクチン接種の有効性を決定する負荷試験；並びに、例えば、活性化又はメモリーリンパ球の識別において、特異的細胞表面マーカーを発現する細胞の集団を決定するための蛍光活性化細胞分類 (F A C S) の使用を含む、当業者に公知の多くの方法で決定することができる。当業者であれば、他の公知の方法を用いて、本発明に開示される組成物による免疫化が抗体及び / 又は細胞媒介性免疫応答を誘発したかどうかを決定することもできる。例えば、C o l l i g a n ら編、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y、W i l e y I n t e r s c i e n c e、2 0 0 7 年を参照されたい。

20

【 0 2 7 9 】

[00303] 一実施形態において、本明細書に開示される組成物は、組成物中の 1 つ又は複数の治療剤 (例えばペプチド抗原) に対して、抗原を水系ワクチン製剤中で製剤化したときよりも、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍又は少なくとも 1 0 倍大きい細胞媒介性免疫応答の増強を生じることができる。「水系ワクチン」に関して、これは、疎水性担体が水性担体で置き換えられたこと、及び水系ワクチンが、脂質系構造体を含まないこと以外は、本明細書に記載される組成物と同一の構成成分を含むワクチンを意味する。

30

【 0 2 8 0 】

[00304] 一実施形態において、本明細書に開示される組成物は、組成物の単回投与のみで、細胞媒介性免疫応答の増強を生じることができる。したがって、一実施形態において、本明細書に開示される組成物は、単回投与によって治療剤 (例えばペプチド抗原) を送達するためのものである。

40

【 0 2 8 1 】

[00305] 一実施形態において、本明細書に開示される組成物は、治療剤 (例えばペプチド抗原) に対する抗体免疫応答を誘導するために使用することができる。

【 0 2 8 2 】

[00306] 「抗体免疫応答」又は「体液性免疫応答」(本明細書において互換的に使用される) は、細胞媒介性免疫とは逆に、B リンパ球系列 (B 細胞) の細胞において産生される分泌型抗体によって媒介される。このような分泌型抗体は、例えば、外来物質、病原体 (例えば、ウイルス、細菌など) 及び / 又はがん細胞の表面上のものなどの抗原に結合し、破壊のためにフラグする。

50

【 0 2 8 3 】

[00307]本明細書で使用される場合、「体液性免疫応答」は、抗体産生を指し、加えて、又は代わりに、例えば、Tヘルパー2 (Th2) 又はTヘルパー17 (Th17) 細胞の発生及び/又は活性化、サイトカイン産生、アイソタイプ転換、親和性成熟並びに記憶細胞活性化などのそれに伴う補助的なプロセスを含んでいてもよい。「体液性免疫応答」はまた、例えば、毒素の中和、古典的補体活性化及び貪食作用の促進、並びに病原体の排除などの抗体のエフェクター機能を含んでいてもよい。体液性免疫応答は、多くの場合CD4+ Th2細胞によって助けられ、したがって、この細胞型の活性化又は発生はまた、体液性免疫応答の指標でもあり得る。

【 0 2 8 4 】

[00308]「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子の断片によって、実質的又は部分的にコードされた1つ又は複数のポリペプチドを含むタンパク質である。認識されている免疫グロブリン遺伝子としては、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 及び μ 定常領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、 κ 又は λ のいずれかとして分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 γ 、 ϵ 、又は α として分類され、これらは、順番に、それぞれ、免疫グロブリンクラスであるIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEと定義する。典型的な免疫グロブリン(抗体)構造単位は、4つのポリペプチドを含有するタンパク質を含む。それぞれの抗体構造単位は、2つの同一のポリペプチド鎖の対で構成され、1つの「軽鎖」及び1つの「重鎖」をそれぞれ有する。それぞれの鎖のN末端は、抗原認識の主な原因となる可変領域を定義する。抗体構造単位(例えば、IgA及びIgMクラス)はまた、互いに、及び例えば鎖ポリペプチドと会合したIgM五量体として追加のポリペプチド鎖と、オリゴマー形態に集合していてもよい。

【 0 2 8 5 】

[00309]抗体は、Bリンパ球(B細胞)と呼ばれる白血球のサブセットの抗原特異的糖タンパク質産物である。抗原とB細胞の表面上で発現する抗体との連結によって、活性化させ、有糸分裂を受けさせ、最終的に形質細胞に分化させる、B細胞の刺激を含む、抗体応答を誘導することができ、これは、抗原特異的抗体の合成及び分泌に専門化される。

【 0 2 8 6 】

[00310]B細胞は、免疫応答の間の抗体の唯一の産生者であり、したがって、有効な体液性免疫のための重要な要素である。大量の抗体の産生に加えて、B細胞は抗原提示細胞としても作用し、TヘルパーCD4又は細胞傷害性CD8+T細胞などのT細胞に対して抗原性ペプチドを提示することができ、このようにして免疫応答を伝播する。B細胞及びT細胞は適応性免疫応答の一部である。例えば、ワクチン接種又は自然感染のいずれかによって誘導される能動免疫応答の間に、抗原特異的B細胞が活性化され、クローン増殖する。増殖の間に、B細胞は、エピトープに対して高親和性を有するように進化する。B細胞の増殖は、活性化されたTヘルパー細胞によって間接的に、及びTLRなどの受容体の刺激を介して直接的にも誘導することができる。

【 0 2 8 7 】

[00311]樹状細胞及びB細胞などの抗原提示細胞は、ワクチン接種部位に引き付けられ、ワクチン組成物に含有される抗原及びアジュバントと相互作用することができる。典型的には、アジュバントは、細胞を刺激して、活性化させ、抗原は、標的に対する青写真を提供する。異なる種類のアジュバントが、異なる刺激シグナルを細胞に提供することができる。例えば、ポリI:C (TLR3アゴニスト)は、樹状細胞を活性化することができるが、B細胞は活性化できない。Pam3Cys、Pam2Cys及びFSL-1などのアジュバントは、特に、B細胞を巧みに活性化させ、増殖を開始させ、抗体応答の産生を容易にすると予想される(Moyle 2008年; So 2012年)。

【 0 2 8 8 】

[00312]体液性免疫応答は、(例えば、ウイルス又は細菌侵入者に対して保護する)有効な感染性疾患ワクチンに関する一般的なメカニズムの1つである。しかしながら、体液性免疫応答は、がんと戦うためにも有用であり得る。がんワクチンは、典型的には、がん

10

20

30

40

50

細胞を認識及び破壊することができる細胞媒介性免疫応答を産生するように設計されているのに対して、B細胞媒介性応答は、場合によっては、最大の利点のために細胞傷害性T細胞と協力してもよい他のメカニズムを通して、がん細胞を標的にしてもよい。B細胞媒介性（例えば体液性免疫応答媒介性）抗腫瘍応答の例としては、限定されないが、以下が挙げられる。1）腫瘍細胞又は腫瘍形成に影響を与える他の細胞上に見出される表面抗原（例えばネオ抗原）に結合する、B細胞によって産生される抗体。このような抗体は、例えば、抗体依存性細胞媒介性傷害（ADCC）又は補体結合を通して標的細胞の死滅を誘導することができ、免疫系によって認識することができる追加の抗原の放出をもたらす可能性がある；2）腫瘍細胞上の受容体に結合して、その刺激をブロックし、その効果を事実上中和する抗体；3）腫瘍又は腫瘍関連細胞によって、又はそれらに関連して放出される因子と結合して、がんを維持するシグナル伝達又は細胞経路をモジュレートする抗体；並びに4）細胞内標的と結合し、これまで未知のメカニズムを通して抗腫瘍活性を媒介する抗体。

【0289】

[00313]抗体応答を評価する1つの方法は、特定の抗原と反応性の抗体の力価を測定することである。これは、動物から得た抗体含有物質の酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）などの当技術分野で公知の様々な方法を用いて行ってもよい。例えば、特定の抗原に結合する血清抗体の力価は、抗原に曝露される前及び後の両方に対象において決定してもよい。抗原への曝露の後に、抗原特異的抗体の力価の統計学的に有意な増加は、対象が抗原に対する抗体応答を開始したことを示すであろう。

【0290】

[00314]限定されないが、抗原特異的抗体の存在を検出するために使用することができる他のアッセイとしては、免疫学的アッセイ（例えばラジオイムノアッセイ（RIA））、免疫沈降アッセイ、及びタンパク質プロット（例えばウエスタンブロット）アッセイ、並びに中和アッセイ（例えば、インビトロ又はインビボアッセイにおけるウイルス感染性の中和）が挙げられる。

【0291】

[00315]本明細書に開示される組成物は、細胞媒介性免疫応答又は体液性免疫応答によって回復する疾患及び／又は障害を処置又は予防するために有用であり得る。本明細書に開示される組成物は、治療剤（例えばペプチド抗原）を対象に投与して、細胞媒介性免疫応答又は体液性免疫応答を誘導することが望まれる任意の場合において、適用を見出すことができる。一実施形態において、組成物は、例えば、ネオ抗原を含む個別化ワクチンの送達のための適用を見出すことができる。

【0292】

[00316]一実施形態において、本開示は、本明細書に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法に関する。一実施形態において、本方法は、対象における疾患、障害又は状態の処置及び／又は予防のためのものである。一実施形態において、本方法は感染性疾患又はがんの処置及び／又は予防のためのものである。

【0293】

[00317]一実施形態において、本方法は、治療剤（例えばペプチド抗原）に対する抗体免疫応答及び／又は細胞媒介性免疫応答を前記対象において誘導するためのものである。一実施形態において、このような方法は感染性疾患又はがんの処置及び／又は予防のためのものである。

【0294】

[00318]本明細書で使用される場合、「処置すること」若しくは「の処置」、又は「予防すること」若しくは「の予防」とは、有益又は所望の結果を得るためのアプローチを指す。有益又は所望の結果としては、限定されるものではないが、1つ又は複数の症状又は状態の緩和又は回復、疾患の程度の減弱、疾患の状態の安定化、疾患の発生の予防、疾患の蔓延の予防、疾患の進行の遅延又は減速（例えば抑制）、疾患の発症の遅延又は減速、疾患を引き起こす薬剤に対する防御免疫の付与、及び疾患状態の回復又は軽減を挙げるこ

10

20

30

40

50

とができる。「処置すること」又は「予防すること」とは、処置がない場合に予想される患者の生存率を超えて生存率を延長することを意味することもでき、例えば、対象において感染症を予防することによって、疾患の進行を一時的に阻害すること、又は疾患の発生を予防することを意味することもできる。「処置すること」又は「予防すること」とは、腫瘍塊のサイズの減少、腫瘍の攻撃性の減少などを指すこともある。

【0295】

[00319]「処置すること」が、典型的には、既に疾患又は障害を有するか、又は感染病原体に既に曝露されたことが分かっている対象において起こるのに対して、「予防すること」が、典型的には、疾患又は障害を有していないか、又は感染病原体に曝露されたことが分かっていない対象において起こる点で、「処置すること」は「予防すること」と区別することができる。理解されるであろうが、処置及び予防は重複していてもよい。例えば、疾患の症状又は進行を「予防すること」と同時に対象の疾患を「処置すること」ことが可能である。また、少なくともワクチン接種の文脈において、「処置すること」及び「予防すること」は、対象の処置が、病原体による感染を予防するか又は病原体による感染によって引き起こされる基礎疾患又は症状を予防する後続の効果を有し得る免疫応答を誘導する点で重複していてもよい。これらの予防的態様は、本明細書において、「感染性疾患の処置」又は「がんの処置」などの表現によって包含される。

【0296】

[00320]—実施形態において、本明細書に開示される組成物は、それを必要とする対象において、例えば、ウイルス感染症によって引き起こされる感染性疾患を処置及び／又は予防するために使用することができる。対象は、ウイルスに感染していてもよく、又はウイルス感染症を発生する危険性があってもよい。本発明に開示される組成物の使用又は投与によって処置及び／又は予防することができるウイルス性疾患は、限定されないが、牛痘ウイルス、ワクシニアウイルス、偽牛痘ウイルス、ヒトヘルペスウイルス1、ヒトヘルペスウイルス2、サイトメガロウイルス、ヒトアデノウイルスA～F、ポリオーマウイルス、ヒトパピローマウイルス（HPV）、パルボウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、オルトレオウイルス、ロタウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザA型ウイルス、インフルエンザB型ウイルス、インフルエンザC型ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、ニューモウイルス、呼吸器多核体ウイルス（RSV）、狂犬病ウイルス、カリフォルニア脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ハンタンウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、ポリオウイルス、ノロウイルス、フラビウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス及び水痘が挙げられる。特定の実施形態において、ウイルス感染症は、ヒトパピローマウイルス、エボラウイルス、呼吸器多核体ウイルス又はインフルエンザウイルスである。

【0297】

[00321]—実施形態において、本明細書に開示される組成物は、それを必要とする対象において、例えば、非ウイルス病原体（細菌又は原生動物など）によって引き起こされる感染性疾患を処置及び／又は予防するために使用することができる。対象は、病原体に感染していてもよく、又は病原体による感染症を発生する危険性があってもよい。限定されないが、例示的な細菌性病原体としては、炭疽菌（バチルス・アントラシス）、ブルセラ属（*Bruceella*）、百日咳菌（*Bordetella pertussis*）、カンジダ属（*Candida*）、肺炎クラミジア（*Chlamydia pneumoniae*）、オウム病クラミジア（*Chlamydia psittaci*）、コレラ、ボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*）、コクシジオイデス・イミチス（*Coccidioides immitis*）、クリプトコッカス属（*Cryptococcus*）、ジフテリア、大腸菌（*Escherichia coli*）O157:H7、腸管出血性大腸菌、腸内毒素原性大腸菌、ヘモフィルス・インフルエンザエ（*Haemophilus influenzae*）、ヘリコバクター・ピロリ（*Helico*

10

20

30

40

50

bacter pylori)、レジオネラ属(Legionella)、レプトスピラ属(Leptospira)、リステリア属(Listeria)、髄膜炎菌(Meningococcus)、肺炎マイコプラズマ(Mycoplasma pneumoniae)、マイコバクテリウム属(Mycobacterium)、百日咳、肺炎、サルモネラ属(Salmonella)、シゲラ属(Shigella)、スタフィロкокカス属(Staphylococcus)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)及びエルシニア・エンテロコリチカ(Yersinia enterocolitica)を挙げることができる。特定の実施形態において、細菌感染症は炭疽菌である。限定されないが、例示的な原生動物病原体としては、マラリアを引き起こす、プラスモジウム属(熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)、四日熱マラリア原虫(Plasmodium malariae)、三日熱マラリア原虫(Plasmodium vivax)、卵形マラリア原虫(Plasmodium ovale)又は二日熱マラリア原虫(Plasmodium knowlesi)のものを挙げることができる。

10

【0298】

[00322]一実施形態において、本明細書に開示される組成物は、それを必要とする対象において、がんを処置及び/又は予防する使用のためのものであってもよい。対象は、がんを有していてもよく、又はがんを発生する危険性があってもよい。

【0299】

[00323]本明細書で使用される場合、「がん」、「がん細胞」、「腫瘍」及び「腫瘍細胞」(互換的に使用される)という用語は、細胞増殖のコントロールの著しい喪失によって特徴付けられる異常な成長を示す細胞、又は不死化した細胞を指す。「がん」又は「腫瘍」という用語は、転移性及び非転移性のがん又は腫瘍を含む。がんは、悪性腫瘍の存在を含む、当技術分野において一般に認められた基準を用いて診断されてもよい。

20

【0300】

[00324]限定されないが、本発明に開示される組成物の使用又は投与によって処置及び/又は予防する能力を有し得るがんとしては、癌腫、腺がん、リンパ腫、白血病、肉腫、芽細胞腫、骨髄腫及び胚細胞腫瘍が挙げられる。限定されないが、特に適切な実施形態としては、神経膠芽腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、乳がん、卵管がん、前立腺がん又は腹膜がんを挙げることができる。1つの実施形態において、がんは、ウイルスなどの病原体によって引き起こされることがある。がんの発生と関連するウイルスは、当業者に公知であり、限定されるものではないが、ヒトパピローマウイルス(HPV)、ジョン・カニンガムウイルス(JCV)、ヒトヘルペスウイルス8、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、メルケル細胞ポリオーマウイルス、C型肝炎ウイルス及びヒトT細胞白血病ウイルス1が挙げられる。一実施形態において、がんは、1つ又は複数の腫瘍特異的ネオ抗原を発現するものである。

30

【0301】

[00325]特定の実施形態において、がんは、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、卵管がん、腹膜がん、神経膠芽腫又はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である。

【0302】

[00326]本明細書に開示される方法及び組成物は、がんの処置又は発症予防;例えば、がんの重症度(例えば、腫瘍のサイズ、攻撃性及び/又は侵襲性、悪性度など)の減少、又はがんの再発の予防のいずれかのために有用であり得る。

40

【0303】

[00327]一実施形態において、がんを処置及び/又は予防するための方法は、最初に、患者の腫瘍細胞において1個又は複数のネオ抗原又はネオエピトープを特定するステップを含む。当業者であれば、1個又は複数のネオ抗原を特定するために使用することができる当技術分野で公知の方法は理解するであろう(例えば、Srivastava 2015年及びそこに引用されている文献を参照されたい)。例示的な実施形態として、個々の患者の腫瘍に固有に存在する変異したネオ抗原を特定するために、全ゲノム/エクソーム

50

のシーケンシングを使用してもよい。特定されたネオ抗原の収集物を分析して、個別化がんワクチンとしての使用のためのネオ抗原及び／又はネオエピトープの特異的に最適化されたサブセットを、（例えば、アルゴリズムに基づいて）選択することができる。

【0304】

[00328] 1個又は複数のネオ抗原が特定及び選択されると、当業者は、インビトロ又はインビボのいずれかでそのようなネオ抗原を産生するいろいろな方法があることは理解するであろう。ネオ抗原性ペプチドは、当技術分野で公知の任意の方法によって産生させてもよく、次いで、本明細書に記載の組成物又はキットに製剤化し、対象に投与することができる。

【0305】

[00329] 一実施形態において、対象に投与する際に、本組成物は、がんの処置において腫瘍特異的免疫応答を誘導する。これによって、免疫応答が、ネオ抗原を発現していない身体の正常な細胞に著しい影響を与えることなく、腫瘍細胞を特異的に標的化することを意味する。さらに、一実施形態において、本組成物は、腫瘍特異的免疫応答が、対象又は対象のサブセットに関して患者特異的である、すなわち個別化免疫療法であるように、少なくとも1つの患者特異的ネオエピトープを含んでいてもよい。

【0306】

[00330] 本発明に開示される組成物は任意の適切な経路によって投与することができる。一実施形態において、投与の経路は皮下注射である。

【0307】

[00331] 本組成物が注射による投与のためのものである実施形態において、本明細書に開示される医薬組成物はマイクロドーズとして製剤化されてもよい。本明細書で使用される場合、「マイクロドーズ体積」に関して、これは100 µl未満の単回用量の体積を意味する。いくつかの実施形態において、マイクロドーズ体積は、約50 µl、約55 µl、約60 µl、約65 µl、約70 µl、約75 µl、約80 µl、約85 µl、約90 µl又は約95 µlの組成物である。いくつかの実施形態において、マイクロドーズ体積は、約50 µl～約75 µlの間の組成物である。いくつかの実施形態において、マイクロドーズ体積は、約50 µl、又は正確に50 µlである。一実施形態において、本明細書に開示される方法の実施及び本明細書に開示される組成物の使用に関して、マイクロドーズ体積は、マイクロドーズで5 µg超の総ペプチド抗原濃度で複数の異なるペプチド抗原を用いて製剤化することができ、マイクロドーズ体積は、ヒト対象において抗体及び／又はCTL免疫応答を誘導することができる。

【0308】

[00332] キット

[00333] 本明細書に開示される組成物は、任意選択で、キットとしてユーザーに提供される。一実施形態において、本キットは、疾患、障害又は状態の処置、予防及び／又は診断のための組成物を調製するためのものである。一実施形態において、本キットは、抗体及び／又はCTL免疫応答を誘導するための組成物を調製するためのものである。

【0309】

[00334] 一実施形態において、本開示のキットは、本明細書に開示される方法によって調製された乾燥脂質／治療剤の調製物を含む容器、及び疎水性担体を含む容器を含む。乾燥脂質／治療剤の調製物は、本明細書に開示されるいずれかの調製物であってもよい。一実施形態において、乾燥脂質／治療剤の調製物は10個以上の異なるペプチド抗原を含む。一実施形態において、ペプチド抗原はネオ抗原である。疎水性担体は本明細書に記載の通りであり、一実施形態において、疎水性担体は鉱油又は鉱油溶液中のオレイン酸マンニドである。

【0310】

[00335] 別の実施形態において、本開示のキットは、本明細書に開示される方法によって調製された乾燥脂質／治療剤の調製物を含む容器を含む。このような実施形態において、このキットは、疎水性担体を含まないが、むしろ疎水性担体は、別途供給されるか、又

10

20

30

40

50

はエンドユーザーによって既に所有されている。一実施形態において、乾燥脂質 / 治療剤の調製物は 10 個以上の異なるペプチド抗原を含む。一実施形態において、ペプチド抗原はネオ抗原である。

【0311】

[00336]本キットは、1つ又は複数の追加の試薬、包装材料、及びキットの構成成分を使用する好ましい方法を詳述する使用説明書のセット又はユーザーマニュアルをさらに含むことができる。一実施形態において、容器はバイアルである。

【0312】

[00337]方法、乾燥調製物、組成物、使用及びキットの構成成分

[00338]本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用及びキットは、1つ又は複数の治療剤とともに使用されるか、又はこれらを含み、限定されないが、1つ又は複数の追加の構成成分、例えば、Tヘルパーエпитープ、アジュバント及び界面活性剤などとともにさらに使用されてもよく、又はこれらをさらに含んでもよい。これらの構成成分の例示的な実施形態を本明細書に記載するが、賦形剤、保存剤、又は他の不活性成分などの他の構成成分も使用することができることが理解されるであろう。

10

【0313】

[00339]本明細書で使用される場合、「治療剤」という用語は、Tヘルパーエピトープ又はアジュバントを含まず、又はこれらを包含せず、これらは下記に別途記載されるが、本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用及びキットに含まれていてもよく又は含まれていなくてもよい異なる構成成分である。さらに、一実施形態において、Tヘルパーエピトープ及び / 又はアジュバントは、治療剤が抗原である場合のみ含まれる。

20

【0314】

[00340]治療剤

[00341]本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用及びキットにおいて使用することができる治療剤としては、診断剤及び予防的薬剤を含む、疾患、障害又は状態の処置又は予防において治療活性、応答又は効果を提供することができる任意の分子、物質又は化合物が挙げられる。「治療剤」という用語は、生物学的に活性である医薬の構成成分を表す「原薬」又は「有効成分」と一般に称される、分子、化合物及び物質、又はそれらの部分を含む。

【0315】

[00342]本明細書で使用される場合、「治療剤」は、以下に別途記載されるTヘルパーエピトープ又はアジュバントではない。

30

【0316】

[00343]治療剤としては、限定されるものではないが、米国薬局方及び他の公知の薬局方に列挙されたものを含む、抗原、薬物及び他の薬剤が挙げられる。治療剤は、任意の化学的改変あり又はなしで、本発明の実施において使用することができる。治療剤としては、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、多糖類及び薬物（例えば、低分子又は生物製剤）が挙げられる。

【0317】

[00344]一実施形態において、治療剤は、ペプチド抗原、ポリペプチドをコードするDNA又はRNAポリヌクレオチド、ホルモン、サイトカイン、アレルゲン、触媒活性DNA（デオキシリボザイム）、触媒活性RNA（リボザイム）、アンチセンスRNA、干渉RNA、アンタゴミル、低分子薬物、生物学的薬物、抗体、又はこれらのいずれか1つの断片若しくは誘導体、或いはこれらの混合物である。

40

【0318】

[00345]一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において複数の異なる治療剤の混合物を製剤化するためのものである。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個又はそれ以上の異なる治療剤の混合物を製

50

剤化するためのものである。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において10～20個の異なる治療剤の混合物を製剤化するためのものである。

【0319】

[00346]複数の異なる治療剤が関わる実施形態において、1つの態様において、すべての治療剤は同じ種類のものであってもよい(例えば、すべてペプチド抗原の場合、すべて低分子薬物の場合、すべてポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの場合など)。他の態様において、治療剤は異なる種類のものであってもよい(例えば、1個又は複数のペプチド抗原と1つ又は複数の低分子薬物の組み合わせの場合)。

【0320】

[00347]一実施形態において、治療剤は、水性溶液又は疎水性溶液の一方又は両方に対して適合性ではない(例えば、不溶性の又は不安定な)ものである。一実施形態において、治療剤は親水性又は実質的に親水性であり、当然ながら疎水性環境に適合性ではない。一実施形態において、治療剤は疎水性又は実質的に疎水性であり、当然ながら親水性(例えば水性)環境に適合性ではない。一実施形態において、治療剤は、サイズ押出手順に適合性ではないもの(例えば、5000 psiの背圧及び0.22 µm膜などの膜を通す高圧押出下において沈殿物)である。

10

【0321】

[00348]治療剤の例示的な実施形態を以下に記載するが、それらに限定されない。

【0322】

[00349]ペプチド抗原

20

[00350]一実施形態において、治療剤は1個又は複数のペプチド抗原である。

【0323】

[00351]一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一のペプチド抗原を含む医薬組成物を調製するために使用することができる。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、最大で30個又はそれ以上の異なる可溶化されたペプチド抗原を含む医薬組成物を調製するために使用することができる。

【0324】

[00352]一実施形態において、本明細書に開示される方法は、2個以上の異なるペプチド抗原を含む医薬組成物を調製するために使用することができる。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個又はそれ以上の異なるペプチド抗原を含む医薬組成物を調製するために使用することができる。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、2～30個の異なる可溶化されたペプチド抗原、5～30個の異なるペプチド抗原、10～20個の異なるペプチド抗原、又は10～15個の異なるペプチド抗原を含む医薬組成物を調製するために使用することができる。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、5個以上の異なる可溶化されたペプチド抗原を含む医薬組成物を調製するために使用することができる。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の異なるペプチド抗原を含む医薬組成物を調製するために使用することができる。

30

40

【0325】

[00353]本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、免疫系の構成成分に特異的に結合することができる任意の物質又は分子を指す。いくつかの実施形態において、適切な抗原は、対象において免疫応答を誘導又は生じることができるものである。免疫応答を誘導することができる抗原は、免疫原性であると言われ、免疫原と呼ばれることもある。したがって、本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、免疫原を含み、この用語は、他に具体的に言及されない限り、互換的に使用することができる。

【0326】

[00354]本明細書で使用される場合、「ペプチド抗原」という用語は、タンパク質又はポリペプチドである上記に定義の抗原である。一実施形態において、ペプチド抗原は、例

50

えば、生きているか、弱毒化されたか、不活性化されたか、又は死滅した細菌、ウイルス又は原生動物、或いはその一部などの微生物に由来していてもよい。一実施形態において、ペプチド抗原は、例えば、ヒトなどの動物、又はそれに実質的に関連する抗原に由来していてもよい。

【0327】

[00355]本明細書で使用される場合、「由来する」という用語は、限定されないが、元々の起源（例えば対象）から単離されたか又は直接得られたペプチド抗原；元々の起源からのペプチド抗原と同一又は実質的に関連する合成又は組換えにより生じたペプチド抗原；或いは、元々の起源のペプチド抗原又はその断片から作られたペプチド抗原を包含する。ペプチド抗原が起源「から（from）」であると言及される場合、「から（from）」という用語は、「由来する」と同一視することができる。この文脈において、「実質的に関連する」という用語は、ペプチド抗原が、化学的、物理的又は他の手段（例えば配列改変）によって改変されていてもよいが、得られる産物が、元のペプチド抗原及び／又は元の抗原に関連する疾患又は障害に対して免疫応答をまだ生じることができることを意味する。「実質的に関連する」には、天然のペプチド抗原のバリエーション及び／又は誘導体を含む。

10

【0328】

[00356]一実施形態において、ペプチド抗原は、天然源から単離することができる。いくつかの実施形態において、ペプチド抗原は、約90%～約95%の純度、約95%～約98%の純度、約98%～約99%の純度、又は99%より高い純度に精製されていてもよい。

20

【0329】

[00357]一実施形態において、ペプチド抗原は、例えば、インビトロ又はインビボでの発現によって、組換え的に生じさせることができる。

【0330】

[00358]一実施形態において、ペプチド抗原は、天然の標的タンパク質のアミノ酸の配列に基づいて合成的に生成したポリペプチドである。ペプチド抗原は、当技術分野で周知の化学的方法を用いて全部又は一部を合成することができる（例えば、Caruthers 1980年、Horn 1980年、Banga 1995年）。例えば、ペプチド合成は様々な固相技法を用いて行うことができ（例えば、Roberge 1995年、Merrifield 1997年を参照されたい）、自動合成は、例えば、ABI 431Aペプチド合成装置（Perkin Elmer）を製造業者により提供される説明書に従って使用して達成してもよい。

30

【0331】

[00359]本明細書において互換的に使用されるように、「バリエーション」又は「改変されたバリエーション」という用語は、代替の治療剤を提供する任意の化学的、物理的又は他の手段によって改変された治療剤を指す。改変されたバリエーションは、未改変の対応物と比較して、1つ又は複数の改善された特性（例えば、溶解度、安定性、活性など）を有していてもよい。治療剤（例えば、ペプチド抗原、ホルモン、触媒活性DNA又はRNAなど）の種類に応じて、種々の改変は当技術分野において公知であり得、改変されたバリエーションを調製するために適用し得る。

40

【0332】

[00360]ペプチド抗原の文脈において、多くの異なる種類のペプチドの改変は、当技術分野において公知であり、本発明の実施において使用することができる。例えば、限定されないが、ペプチド抗原は、その溶解度、安定性及び／又は免疫原性を改善するために改変されてもよい。行うことができる改変の非限定的な例としては、N末端の改変、C末端の改変、アミド化、アセチル化、ジスルフィド架橋を生み出すことによるペプチド環化、リン酸化、メチル化、他の分子（例えば、BSA、KLM、OVA）とのコンジュゲーション、ペグ化、及び非天然アミノ酸の組み入れを挙げることができる。

【0333】

50

【00361】一実施形態において、改変は、アミノ酸配列の改変、例えば、欠失、置換又は挿入であってもよい。置換は、保存アミノ酸置換又は非保存アミノ酸置換であってもよい。このような変化を行う際に、類似のアミノ酸残基の置換を、側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、それらのサイズ、電荷、疎水性、親水性などに基づいて行うことができ、このような置換は、通例の試験によって、ペプチドの機能に対する置換の効果についてアッセイすることができる。保存的置換の具体的な非限定的な例としては、以下の例が挙げられる。

【表 1】

元の残基	保存的置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Val	Ile, Leu

10

20

【0334】

30

【00362】一実施形態において、ペプチド抗原は、5～120個のアミノ酸長、5～100個のアミノ酸長、5～75個のアミノ酸長、5～50個のアミノ酸長、又は5～30個のアミノ酸長であってもよい。一実施形態において、ペプチド抗原は、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個又は50個のアミノ酸長であってもよい。

【0335】

40

【00363】一実施形態において、ペプチド抗原は20～30個のアミノ酸長である。一実施形態において、ペプチド抗原は27個のアミノ酸長である。

【0336】

【00364】一実施形態において、ペプチド抗原は、少なくとも1つのB細胞エピトープ、少なくとも1つのCTLエピトープ、又はこれらの任意の組み合わせを含む。

【0337】

【00365】B細胞エピトープは、B細胞によって、及び抗体によって、認識されるエピトープである。B細胞ペプチドエピトープは、典型的には、少なくとも5個のアミノ酸長、より多くの場合は、少なくとも6個のアミノ酸長、さらにより多くの場合は、少なくとも7又は8個のアミノ酸長であり、連続的（「直鎖状」）又は不連続（「立体構造的」）であってもよく、後者は、例えば、タンパク質のフォールディングによって、一次アミノ酸

50

配列の非連続的な部分を物理的に近接させることによって形成される。

【0338】

[00366]CTLエピトープは、細胞傷害性Tリンパ球によって認識される分子である。CTLエピトープは、典型的には、MHC分子と複合体化した抗原提示細胞の表面上に存在する。本明細書で使用される場合、「CTLエピトープ」という用語は、抗原の天然CTLエピトープと実質的に同じであるエピトープを指す。CTLエピトープは、その天然の対応物と比較して、1個又は2個のアミノ酸などで改変されていてもよい。他に言及しない限り、本明細書におけるCTLエピトープへの言及は、細胞によって取り込まれ、抗原提示細胞の表面上に提示されることが出来る未結合の分子である。

【0339】

[00367]CTLエピトープは、典型的には、細胞媒介性免疫応答が起こり得るように、T細胞受容体による認識が修正可能であるものでなければならない。ペプチドに関して、CTLエピトープは、クラスI又はクラスII MHC分子と相互作用してもよい。MHCクラスI分子によって提示されるCTLエピトープは、典型的には、8～15個の間のアミノ酸長、より多くの場合は、9～11個の間のアミノ酸長のペプチドである。MHCクラスII分子によって提示されるCTLエピトープは、典型的には、5～24個の間のアミノ酸長、より多くの場合は、13～17個の間のアミノ酸長のペプチドである。抗原がこれらのサイズよりも大きい場合、抗原は、免疫系によって、MHCクラスI又はクラスII分子との相互作用により適切なサイズの断片にプロセッシングされる。したがって、CTLエピトープは、上述したものよりも大きなペプチド抗原の一部であってもよい。

【0340】

[00368]多くのCTLエピトープが知られている。追加のCTLエピトープを特定するいくつかの技法が当技術分野において認識されている。一般に、それらは、CTLエピトープを潜在的に提供する分子を調製すること、及びその分子に対する免疫応答を特徴づけることを含む。

【0341】

[00369]一実施形態において、ペプチド抗原は、がん、感染性疾患、中毒性疾患又は任意の他の疾患若しくは障害に関連するものであってもよい。

【0342】

[00370]ペプチド抗原が由来し得るウイルス又はその部分としては、限定されないが、牛痘ウイルス、ワクシニアウイルス、偽牛痘ウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトヘルペスウイルス1、ヒトヘルペスウイルス2、サイトメガロウイルス、ヒトアデノウイルスA～F、ポリオーマウイルス、ヒトパピローマウイルス(HPV)、パルボウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、セネカバレーウイルス(SVV)、オルトレオウイルス、ロタウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス(例えば、H5N1インフルエンザウイルス、インフルエンザA型ウイルス、インフルエンザB型ウイルス、インフルエンザC型ウイルス)、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、ニューモウイルス、呼吸器多核体ウイルス、呼吸器多核体ウイルス(RSV)、狂犬病ウイルス、カリフォルニア脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ハンタンウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、ポリオウイルス、ノロウイルス、フラビウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス及び水痘が挙げられる。

【0343】

[00371]一実施形態において、ペプチド抗原はHPVに由来する。一実施形態において、HPVペプチド抗原はHPV関連子宮頸がん又はHPV関連頭頸部がんに関連するものである。一実施形態において、ペプチド抗原は、RAHYNI VTF(HPV16E7(H-2Db)ペプチド49～57; R9F; 配列番号9)の配列を含むペプチドである。一実施形態において、ペプチド抗原は、YMLNLGPET(HPV Y9Tペプチド; 配列番号10)の配列を含むペプチドである。

【0344】

【00372】一実施形態において、ペプチド抗原はHIVに由来する。一実施形態において、HIVペプチド抗原はHIV-1 gp120のV3ループに由来していてもよい。一実施形態において、HIVペプチド抗原はRGP10 (RGPGRFVTI; 配列番号11) であってもよい。RGP10はGenscript (Piscataway, NJ) から購入してもよい。別の実施形態において、ペプチド抗原はAMQ9 (AMQMLKETI; 配列番号12) であってもよい。AMQ9ペプチドは、H-2Kdハプロタイプのマウスについてのgagの免疫優性のMHCクラスIエピトープである。AMQ9もGenscriptから購入してもよい。

【0345】

【00373】一実施形態において、ペプチド抗原はRSVに由来する。パラミクソウイルス属のメンバーであるRSVビリオンは、15,222個のヌクレオチドを有する一本鎖のマイナスセンスRNAで構成される。ヌクレオチドは、3つの膜貫通表面タンパク質 (F、G及び小さな疎水性タンパク質又はSH)、2つのマトリックスタンパク質 (M及びM2)、3つのヌクレオカプシドタンパク質 (N、P及びL)、及び2つの非構造タンパク質 (NS1及びNS2) をコードする。一実施形態において、ペプチド抗原は、RSVタンパク質のいずれか1つ又は複数に由来していてもよい。特定の実施形態において、ペプチド抗原は、RSV若しくは任意の他のパラミクソウイルスのSHタンパク質、又はこれらの断片に由来していてもよい。RSVペプチド抗原は、国際公開第2012/065997号に記載又は開示のRSVペプチドのいずれか1つ又は複数であってもよい。

【0346】

【00374】多くのパラミクソウイルスに存在するSHタンパク質 (Collins 1990年) は、細胞外ドメイン又は「細胞外」構成成分を有する膜貫通タンパク質である。ヒトRSV SHタンパク質は、64個のアミノ酸 (サブグループA) 及び65のアミノ酸 (サブグループB) を含有し、非常に保存されている。

ヒトRSV SH (サブグループA) :

MENTSITIEFSSKFWPYFTLIHMITTTIISLLIIISIMIA
ILNKLCEYNVFNHKTTFELPRARVNT (配列番号13)

ヒトRSV SH (サブグループB) :

MGNTSITIEFTSKFWPYFTLIHMITLTLISLLIIITIMIA
ILNKLSEHKTFCNKTLEQGQMYQINT (配列番号14)

【0347】

【00375】一実施形態において、ペプチド抗原は、パラミクソウイルスのSHタンパク質 (She) の細胞外ドメイン、又はその断片若しくは改変されたバリエーションを含むか、又はそれからなる。一実施形態において、SheはウシRSVに由来する。別の実施形態において、SheはヒトRSV株のサブグループA又はヒトRSV株のサブグループBに由来する。

ヒトRSV SheのサブグループA (RSV She A) :

NKLCEYNVFNHKTTFELPRARVNT (配列番号2)

ヒトRSV SheのサブグループB (RSV She B) :

NKLSEHKTFCNKTLEQGQMYQINT (配列番号3)

【0348】

【00376】一実施形態において、RSVペプチド抗原は、単量体の形態、二量体の形態若しくは別のオリゴマー形態、又は任意のこれらの組み合わせであってもよい。一実施形態において、She A及び/又はShe Bを含むペプチド抗原は単量体 (例えば単一ポリペプチド) である。別の実施形態において、She A及び/又はShe Bを含むペプチド抗原は二量体 (例えば、二量体化された2つの別々のポリペプチド) である。二量体化の手段は当技術分野において公知である。例示的な手順は、RSV Sheペプチド抗原を水中10% DMSO / 0.5% 酢酸 (w/w) の混合物に溶解させ、37℃で終夜加熱することである。

10

20

30

40

50

【 0 3 4 9 】

[00377]—実施形態において、R S Vに由来するペプチド抗原は以下のいずれか1つ又は複数を含んでいてもよく、又はそれからなっているもよい。

【表 2】

名称	配列	配列番号
SheA (単量体)	NKLCEYNVFNKTFELPRARVNT	2
SheA (二量体)	NKLCEYNVFNKTFELPRARVNT NKLCEYNVFNKTFELPRARVNT	2 2
SHeA (C45S)	NKLSEYNVFNKTFELPRARVNT	15
bSheA (単量体)	NKLCDLNDHHTNSLDIRTLRLRNDTQLITRAHEGSINQSSN	16
bSheA (二量体)	NKLCDLNDHHTNSLDIRTLRLRNDTQLITRAHEGSINQSSN NKLCDLNDHHTNSLDIRTLRLRNDTQLITRAHEGSINQSSN	16 16
bSHeA (C45S)	NKLSDLNDHHTNSLDIRTLRLRNDTQLITRAHEGSINQSSN	17
SheB (単量体)	NKLSEHKTFCNKTLEQGQMYQINT	3
SheB (二量体)	NKLSEHKTFCNKTLEQGQMYQINT NKLSEHKTFCNKTLEQGQMYQINT	3 3
SHeB (C51S)	NKLSEHKTFSNKTLEQGQMYQINT	18
SHeB (C45S)	NKLCEHKTFSNKTLEQGQMYQINT	19
SHe B (C45S)	NKLCEHKTFSNKTLEQGQMYQINT NKLCEHKTFSNKTLEQGQMYQINT	19 19
L-SHe B (C51S)	CGGGSNKLSEHKTFSNKTLEQGQMYQINT CGGGSNKLSEHKTFSNKTLEQGQMYQINT	20 20

【 0 3 5 0 】

[00378]例えば、国際公開第2012/065997号に記載されているように、S H e ペプチド抗原は、遺伝子学的又は化学的に担体と連結していてもよい。ペプチド抗原の提示のために適切な担体の例示的な実施形態は当技術分野において公知であり、そのいくつかは国際公開第2012/065995号に記載されている。別の実施形態において、S H e ペプチド抗原は、本明細書に記載の分粒された脂質ベシクル粒子、又は製造の方法の結果としてそれから形成されるか若しくはそれから生じる構造体と連結していてもよい。

【 0 3 5 1 】

[00379]別の実施形態において、ペプチド抗原はインフルエンザウイルスに由来する。インフルエンザはオルトミクソウイルス科ファミリーの一本鎖RNAウイルスであり、多くの場合、ウイルス粒子の外側の2つの大きな糖タンパク質である赤血球凝集素(H A)及びノイラミニダーゼ(N A)に基づいて特徴付けられる。インフルエンザA型の多数のH Aサブタイプが特定されている(K a w a o k 1990年、W e b s t e r 1983年)。いくつかの実施形態において、抗原はH A又はN A糖タンパク質に由来していてもよい。特定の実施形態において、抗原は、例えば、G e n B a n k 受入番号A Y 8 1 8 1 3 5で見出される配列又はその任意の適切な配列バリエーションに由来する組換えH A抗原(H 5 N 1、A / ベトナム / 1 2 0 3 / 2 0 0 4 ; P r o t e i n S c i e n c e s ; 米

国)であってもよい。

【0352】

[00380]ペプチド抗原が由来していてもよい細菌又はその部分としては、例えば、限定されないが、炭疽菌(バチルス・アントラシス)、ブルセラ属、百日咳菌、カンジダ属、肺炎クラミジア、オウム病クラミジア、コレラ、ボツリヌス菌、コクシジオイデス・イミチス、クリプトコッカス属、ジフテリア、大腸菌O157:H7、腸管出血性大腸菌、腸内毒素原性大腸菌、ヘモフィルス・インフルエンザエ、ヘリコバクター・ピロリ、レジオネラ属、レプトスピラ属、リステリア属、髄膜炎菌、肺炎マイコプラズマ、マイコバクテリウム属、百日咳、肺炎、サルモネラ属、シゲラ属、スタフィロコッカス属、肺炎連鎖球菌及びエルシニア・エンテロコリチカが挙げられる。

10

【0353】

[00381]一実施形態において、ペプチド抗原はバチルス・アントラシスに由来する。限定されないが、ペプチド抗原は、例えば、炭疽菌組換え防御抗原(rPA)(List Biological Laboratories, Inc.; Campbell, CA)又は炭疽菌変異体組換え防御抗原(mrPA)に由来していてもよい。rPAは、およそ83,000ダルトン(Da)の分子量を有し、バチルス・アントラシスによって産生される3つのタンパク質の外毒素の細胞結合成分に相当する。防御抗原は、標的細胞への炭疽菌の致死因子及び浮腫因子の侵入を媒介する。いくつかの実施形態において、抗原は、GenBank受入番号P13423で見出される配列又はその任意の適切な配列バリエーションに由来していてもよい。

20

【0354】

[00382]ペプチド抗原が由来していてもよい原生動物又はその部分としては、例えば、限定されないが、マラリアを引き起こす、プラスモジウム属(熱帯熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫又は二日熱マラリア原虫)が挙げられる。

【0355】

[00383]一実施形態において、ペプチド抗原はプラスモジウム種に由来する。例えば、限定されないが、ペプチド抗原はスポロゾイト周囲タンパク質(CSP)に由来していてもよく、これはマラリア原虫(プラスモジウム種)のスポロゾイト段階の分泌タンパク質である。寄生虫が蚊から哺乳動物ベクターに移動するので、CSPのアミノ酸配列は、タンパク質のプロセッシングに関わるN及びC末端で保存モチーフに隣接する免疫優性の中央反復領域で構成される。CSPの構造及び機能は、ヒト、非ヒト霊長類及びげっ歯類に感染するマラリアの様々な株にわたって非常に保存されている。一実施形態において、CSPに由来するペプチド抗原は、ウッドチャック肝炎ウイルスのコア抗原に提示されるスポロゾイト周囲T及びB細胞エпитープを含むマラリアウイルス様粒子(VLP)抗原である。

30

【0356】

[00384]別の実施形態において、ペプチド抗原は、例えば、膜表面結合がん抗原などのがん又は腫瘍関連タンパク質に由来していてもよい。

【0357】

[00385]一実施形態において、がんは、ウイルスなどの病原体によって引き起こされるがんであってもよい。がんの発生と関連するウイルスは当業者に公知であり、限定されるものではないが、ヒトパピローマウイルス(HPV)、ジョン・カニンガムウイルス(JCV)、ヒトヘルペスウイルス8、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、メルケル細胞ポリオーマウイルス、C型肝炎ウイルス及びヒトT細胞白血病ウイルス1が挙げられる。したがって、一実施形態において、ペプチド抗原は、がんの発生に関連するウイルスに由来していてもよい。

40

【0358】

[00386]一実施形態において、ペプチド抗原はがん関連抗原である。例えば、限定されないが、国際公開第2016/176761号に記載のものなどの多くのがん又は腫瘍関

50

連抗原は当技術分野において公知である。本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用及びキットは、がん関連抗原の任意のペプチド抗原又はその断片若しくは改変されたバリエーションを使用してもよく、又は含んでいてもよい。

【 0 3 5 9 】

[00387]特定の実施形態において、ペプチド抗原は1つ又は複数のサバイピン抗原である。

【 0 3 6 0 】

[00388]アポトーシス反復含有5のバキュロウイルス阻害剤（B I R C 5）とも呼ばれるサバイピンはアポトーシスの負の制御に参与するタンパク質である。これは、アポトーシスタンパク質の阻害剤（I A P）のファミリーのメンバーとして分類されている。サバイピンは、単一のB I Rモチーフ及びR I N Gフィンガーの代わりにより高い荷電のカルボキシ末端コイル領域を含有する16.5 kDaの細胞質タンパク質である。サバイピンをコードする遺伝子はエフェクター細胞プロテアーゼ受容体-1（E P R - 1）の配列とほぼ同一であるが、反対方向に向いている。サバイピンのコード配列（ヒト（h o m o s a p i e n s））は、ストップコドンを含む429個の長さのヌクレオチドである：

【 化 1 】

atgggtgccc	cgacgttgcc	ccctgcctgg	cagccctttc	tcaaggacca	ccgcatctct	60
acattcaaga	actggccctt	cttggagggc	tgcgcctgca	ccccggagcg	gatggccgag	120
gctggcttca	tccactgccc	cactgagaac	gagccagact	tgcccagtg	tttcttctgc	180
ttcaaggagc	tgaaggctg	ggagccagat	gacgaccca	tagaggaaca	taaaaagcat	240
tcgtccggtt	gcgctttcct	ttctgtcaag	aagcagtttg	aagaattaac	ccttggtgaa	300
tttttgaaac	tggacagaga	aagagccaag	aacaaaattg	caaaggaaac	caacaataag	360
aagaaagaat	ttgaggaaac	tgcgaagaaa	gtgcgccgtg	ccatcgagca	gctggctgcc	420
atggattga						429

配列番号 21

【 0 3 6 1 】

[00389]コードされるタンパク質のサバイピン（ヒト）は142個のアミノ酸の長さである：

10

20

30

40

50

【化 2】

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
 1 5 10 15
 His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
 20 25 30
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
 35 40 45
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50 55 60
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
 85 90 95
 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 100 105 110
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
 115 120 125
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
 130 135 140

10

20

配列番号 22

【 0 3 6 2】

[00390]一実施形態において、ペプチド抗原は、サバイピンタンパク質又はその断片に由来する任意のペプチド、ポリペプチド又はそのバリエーションである。

【 0 3 6 3】

[00391]一実施形態において、ペプチド抗原は、例えば、限定されないが、国際公開第 2 0 1 6 / 1 7 6 7 6 1 号に開示のものなどのサバイピン抗原であってもよい。

30

【 0 3 6 4】

[00392]一実施形態において、サバイピンペプチド抗原は全長サバイピンポリペプチドを含んでいてもよい。或いは、サバイピンペプチド抗原は、サバイピンタンパク質の任意の長さの断片を含むサバイピンペプチドであってもよい。例示的な実施形態は、少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は 20 個のアミノ酸残基を含むサバイピンペプチドを含む。具体的な実施形態において、サバイピンペプチドは、サバイピンタンパク質（例えば配列番号 22）のそれぞれ 7、8、9、10、11 個の連続するアミノ酸残基からなる、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド又はウンデカペプチドからなる。サバイピン抗原の特定の実施形態は、約 9 又は 10 個のアミノ酸のサバイピンペプチドを含む。

40

【 0 3 6 5】

[00393]サバイピンペプチド抗原は、天然サバイピンペプチドのバリエーション及び機能的等価物も包含する。サバイピンペプチドのバリエーション又は機能的等価物は、1 つ又は複数のアミノ酸の置換、欠失又は付加、或いはその任意の組み合わせなどの、サバイピンタンパク質の特定の配列と比較して相違を有するアミノ酸配列を示すペプチドを包含する。相違は、サバイピンタンパク質配列及びサバイピンペプチドのバリエーション又はサバイピンペプチドの機能的等価物の間の同一性の減少として測定してもよい。

【 0 3 6 6】

[00394]一実施形態において、本発明のワクチン組成物は、国際公開第 2 0 0 4 / 0 6

50

7023号、国際公開第2006/081826号又は国際公開第2016/176761号に開示されるサバイピンペプチド、サバイピンペプチドのバリエーション又はサバイピンペプチドの機能的等価物のいずれか1つ又は複数を含んでいてもよい。

【0367】

[00395]特定の実施形態において、サバイピンペプチド抗原は、以下のいずれか1つ又は複数であってもよい：

- i) F E E L T L G E F [H L A - A 1] (配列番号23)
- ii) F T E L T L G E F [H L A - A 1] (配列番号4)
- iii) L T L G E F L K L [H L A - A 2] (配列番号24)
- iv) L M L G E F L K L [H L A - A 2] (配列番号5)
- v) R I S T F K N W P F [H L A - A 3] (配列番号25)
- vi) R I S T F K N W P K [H L A - A 3] (配列番号6)
- vii) S T F K N W P F L [H L A - A 2 4] (配列番号7)
- viii) L P P A W Q P F L [H L A - B 7] (配列番号8)

10

【0368】

[00396]上記に列挙したサバイピンペプチドは、限定されないが、例示的にMHCクラスI制限ペプチドを表す。サバイピンペプチドのそれぞれが結合すると考えられる特定のMHCクラスI HLA分子を、右の角括弧内に示す。

【0369】

[00397]一実施形態において、本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用及びキットは、以下のサバイピンペプチド抗原のうちの1つ又は複数を使用するか、又は含む。

20

- i) F T E L T L G E F [H L A - A 1] (配列番号4)
- ii) L M L G E F L K L [H L A - A 2] (配列番号5)
- iii) R I S T F K N W P K [H L A - A 3] (配列番号6)
- iv) S T F K N W P F L [H L A - A 2 4] (配列番号7)
- v) L P P A W Q P F L [H L A - B 7] (配列番号8)

【0370】

[00398]一実施形態において、本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用及びキットは、全部で5個の上記に列挙したサバイピンペプチド抗原を使用するか、又は含む。

30

【0371】

[00399]一実施形態において、ペプチド抗原は自己抗原である。当技術分野においてよく知られているように、自己抗原は、対象の体内が起源である抗原である。免疫系は、通常、正常な恒常的状态下で自己抗原に対して非反応性である。したがって、これらの種類の抗原は、標的とする免疫療法の開発に困難さをもたらす。一実施形態において、ペプチド抗原は自己抗原又はその断片若しくは改変されたバリエーションである。

【0372】

[00400]一実施形態において、ペプチド抗原はネオ抗原である。本明細書で使用される場合、「ネオ抗原」という用語は、発現したタンパク質中で腫瘍特異的変異体から生じる腫瘍抗原のクラスを指す。ネオ抗原は任意のがん、腫瘍又はこれらの細胞に由来し得る。

40

【0373】

[00401]ネオ抗原の文脈において、本明細書で使用される「由来する」という用語は、限定されないが、元々の起源（例えば対象）から単離されたか又は得られたネオ抗原；元々の起源からのネオ抗原と配列が同一の合成又は組換えにより生じたネオ抗原；或いは元々の起源のネオ抗原又はその断片から作られたネオ抗原を包含する。

【0374】

[00402]ネオ抗原を生み出す発現したタンパク質中の変異は、患者特異的であってもよい。「患者特異的」に関して、これは、変異（複数可）が個々の対象に対して特有であることを意味する。しかしながら、2以上の対象が同じ変異（複数可）を共有することが可

50

能である。したがって、「患者特異的」変異は、対象の小さい亜集団又は大きい亜集団によって共有されていてもよい。

【0375】

[00403]ネオ抗原は、1つ又は複数のネオエピトープを含んでいてもよい。本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、免疫系によって、特に、抗体、B細胞又はT細胞によって認識することができるペプチド配列を指す。「ネオエピトープ」は、天然アミノ酸配列と比較して、腫瘍特異的変異を含むネオ抗原のエピトープである。一般に、ネオエピトープは、患者のHLAと結合する潜在力を有するアンカー残基についてのネオ抗原のスクリーニングによって特定されてもよい。ネオエピトープは、通常、HLAに結合するペプチドを予測することができるNetMHCなどのアルゴリズムを用いてランク付けされる。

10

【0376】

[00404]「T細胞ネオエピトープ」は、ペプチド提示MHC分子又はMHC複合体の形態でクラスI又はクラスIIのMHC分子によって結合され得る変異ペプチド配列を意味するとして理解されるべきである。T細胞ネオエピトープは、典型的には、細胞媒介性免疫応答が起こり得るように、T細胞受容体による認識が修正可能であるものでなければならない。「B細胞ネオエピトープ」は、B細胞によって、及び/又は抗体によって認識され得る変異ペプチド配列を意味するとして理解されるべきである。

【0377】

[00405]いくつかの実施形態において、ネオ抗原の少なくとも1つのネオエピトープは患者特異的ネオエピトープである。本明細書で使用される場合、「患者特異的ネオエピトープ」に関して、これは、ネオエピトープにおける変異(複数可)が個々の対象に対して特有であることを意味する。しかしながら、2以上の対象が同じ変異(複数可)を共有することが可能である。したがって、「患者特異的ネオエピトープ」は、対象の小さい亜集団又は大きい亜集団によって共有されていてもよい。

20

【0378】

[00406]上記から明らかであるように、ネオ抗原は、個体に対して特有である多様なペプチドのセットを含むことができる。これらのペプチドは、水性緩衝液又はエマルション型製剤などの従来の種類のワクチン製剤に製剤化することを困難にするであろう異なる溶解性を有していてもよい。加えて、これらは、これらが由来する宿主において、これらのペプチドに対して事前耐容性であってもよい。中でも、これらの態様は、ネオ抗原を弱免疫原性にしてもよい。したがって、本明細書に開示されるように、頑強な免疫応答を生じることができる組成物中でそれらを送達することが重要である。

30

【0379】

[00407]本明細書で使用される場合、「弱免疫原性」に関して、これは、従来のワクチン(例えば、水性ワクチン、エマルションなど)において、ネオ抗原がネオ抗原特異的免疫応答を誘導、維持及び/又はブーストする能力をわずかに有するか、又は有さないことを意味する。一実施形態において、弱免疫原性のネオ抗原は、ネオ抗原の単回投与後に、ネオ抗原特異的免疫応答を誘導、維持及び/又はブーストする能力をわずかに有するか、又は有さないものである。

40

【0380】

[00408]一実施形態において、ネオ抗原は、がんの変異体細胞タンパク質からMHCクラスI及び/又はMHCクラスIIタンパク質に結合すると予測されるモチーフを探すNetMHCなどの選択アルゴリズムを用いて選択してもよい。

【0381】

[00409]一実施形態において、ネオ抗原は、例えば、腫瘍抑制遺伝子(例えばp53);DNA修復経路タンパク質(例えばBRCA2)及びがん遺伝子などのがん表現型とあらかじめ関連付けられている変異遺伝子又はタンパク質に由来していてもよい。がん表現型を与える変異をしばしば含有する遺伝子の例示的な実施形態は、例えば、Castle 2012年に記載されている。当業者であれば、他の変異遺伝子及び/又はがんに関連す

50

るタンパク質を十分承知し、これらは他の参考文献から利用可能である。

【0382】

[00410]いくつかの実施形態において、ネオ抗原は、Castle 2012年によって開示されたネオ抗原を含んでいてもよく、又はそれからなっているもよい。Castle 2012年は、ネオ抗原の実際の配列を提供していないが、遺伝子ID及び変異ペプチドの位置を提供しており、そこから実際の配列を、例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) からオンラインで利用可能なPubmedデータベースを用いて特定することができる。

【0383】

[00411]一実施形態において、ネオ抗原は、Castle 2012年の表1に開示されたMut1~50のネオ抗原、又は同一若しくは関連タンパク質（例えばヒト相同体）のネオ抗原のうちの1つ又は複数であってもよい。一実施形態において、ネオ抗原は、本明細書の表5に列挙されたネオ抗原ペプチド、又は同一若しくは関連タンパク質（例えばヒト相同体）のネオ抗原から選択することができる。一実施形態において、ネオ抗原は、Mut25 (STANYNTSHLNNDVWQIFENPVDWKEK; 配列番号26)、Mut30 (PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL; 配列番号27) 及びMut44 (EFKHIAFDRTFANNPGPMVVFATPGM; 配列番号28)、又は同一若しくは関連タンパク質（例えばヒト相同体）のネオ抗原のうちの1つ又は複数であってもよい。

10

【0384】

[00412]一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物中に複数の異なるネオ抗原の混合物を含む医薬組成物を調製するために使用することができる。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個又はそれ以上の異なるネオ抗原の混合物を製剤化するためのものである。一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単一の組成物において10~20個の異なるネオ抗原の混合物を製剤化するためのものである。一実施形態において、異なるネオ抗原のそれぞれは20~30個のアミノ酸長である。本明細書に記載されるように、開示される方法は、ネオ抗原選択のかなりのステップなしで、これらの複数の異なるネオ抗原を含む安定な組成物を提供する能力を有する。

20

30

【0385】

[00413]ポリペプチドをコードするDNA又はRNAポリヌクレオチド

[00414]一実施形態において、治療剤は、ポリペプチドをコードするDNAポリヌクレオチド又はRNAポリヌクレオチドであってもよい。一実施形態において、DNA又はRNAポリヌクレオチドは本明細書に記載の1個又は複数のペプチド抗原をコードする。

【0386】

[00415]本明細書で使用される場合、「DNA又はRNAポリヌクレオチド」は、任意の長さ（例えば、9、12、15、18、21、24、27、30、60、90、120、150、300、600、1200、1500個又はそれ以上のヌクレオチド）又は鎖数（例えば、一本鎖又は二本鎖）のヌクレオチドの鎖を包含する。ポリヌクレオチドは、DNA（例えば、ゲノムDNA、cDNA又はプラスミドDNA）又はRNA（例えばmRNA）或いはこれらの組み合わせであってもよい。ポリヌクレオチドは、天然に存在していてもよく、又は合成（例えば化学合成）されていてもよい。ポリヌクレオチドが、ヌクレオチド鎖中の1つ又は複数の窒素塩基、五炭糖、又はリン酸基の改変を含有していてもよいことが企図される。このような改変は当技術分野においてよく知られており、例えば、ポリヌクレオチドの安定性、溶解度又は転写/翻訳活性を改善する目的のためのものである。

40

【0387】

[00416]一実施形態において、ポリヌクレオチドは、対象中にインビボで発現するポリ

50

ペプチドをコードする。本発明は、任意の特定の種類のポリペプチドの発現に限定されない。

【0388】

[00417]ポリヌクレオチドは様々な形態で 사용할 수 있는。一実施形態において、ネイキッドポリヌクレオチドは、直鎖状の形態で又は発現プラスミドなどのプラスミ드에挿入して의いずれかで 사용할 수 있는。他の実施形態において、ウイル스 벡터-又は細菌 벡터-などの生 벡터-를 사용해도よい。

【0389】

[00418]ポリヌクレオチ드의性質及び意圖される用途に応じて、DNA의 RNA への転写及び/又は RNA 的의 폴리펩티드 への翻訳을 助ける 1 つ 또는 複数の制御配列이 存在していてもよい。예를 들어, 폴리ヌクレオチ드가 転写 또는 翻訳される 것이 意圖される か 또는 必要ではない 場合、このような 制御配列은 非存在 であってもよい。いくつか의 場合において、메ッセンジャー RNA (mRNA) 分子 である 폴리ヌクレオチ드 的의 場合のように、转写 프로세스 に関する 制御配列 (例如 프로모터) 是 必要ではなく、탄백質 發現은、프로모터 的의 非存在 中 で 生じて てもよい。狀況이 必要 として すれば、당業者는、適切な 制御配列을 含める ことができる。

10

【0390】

[00419]いくつか의 実施形態 において、폴리ヌクレオチ드 是、發現 카세트 中 存在し、ここで、폴리ヌクレオチ드 是、폴리ヌクレオチ드 가 対象 中 で 發現 する こと を 可能にする 制御配列에 作動 可能 に 連結 される。發現 카세트 的의 選擇은、対象 及び 發現 する 폴리펩티드 について 望まれる 特徴에 依存 する。

20

【0391】

[00420]典型的 には、發現 카세트 是、対象 において 機能的 であり、かつ 構成的 又は 誘導的 であり 得る 프로모터 ; 리보솜 結合部位 ; 必要 により、開始 코돈 (ATG) ; 目的 的의 폴리펩티드 를 코드 する 폴리ヌクレオチ드 ; 終止 코돈 ; 及び 任意 選擇 で 3 ' 末端領域 (翻訳 及び / 又は 转写 터미네이터) 을 含む。シグナル 펩티드 를 코드 する領域 などの 追加 的의 配列을 含んで いてもよい。目的 的의 폴리펩티드 를 코드 する 폴리ヌクレオチ드 是、發現 카세트 中 的의 其他 的의 制御配列 的의 いくつか 和 相同 又は 非相同 であってもよい。領域 를 코드 する 시그ナル 펩티드 などの 目的 的의 폴리펩티드 和 一緒に 發現 する 配列은、典型的 には、탄백質 를 코드 する 폴리ヌクレオチ드 에 近接 して 位置 して、發現 し、適した 리딩 프레임 에 配置 される。탄백質 를 코드 する 폴리ヌクレオチ드 によって 構成 されて、単独 で 發現 するか、又は 任意 的의 其他 的의 配列 和 一緒に 發現 する、オープン 리딩 프레임 (例如 시그ナル 펩티드) 是、組成物 가 投与 された 対象 において 转写 及び 翻訳 が生じる ように、프로모터 的의 컨트롤 下 に 置かれる。

30

【0392】

[00421]広範 的의 宿主系 における 폴리ヌクレオチ드 的의 發現 的의 ため 到 適切な 프로모터 是 當技術分野 において よく 知られて いる。哺乳動物 における 폴리ヌクレオチ드 的의 發現 的의 ため 到 適切な 프로모터 是、構造的、遍在 的 又は 組織特異 的に 機能 する もの を 含む。非組織特異 的의 프로모터 的의 例 として 是、ウイル스 起源 的의 프로모터 가 挙げられる。ウイル스 프로모터 的의 例 として 是、마우스 乳癌 ウイル스 (MMTV) 프로모터、ヒト 免疫不全 ウイル스 的의 長い 末端反復 (HIV LTR) 프로모터、モロニー ウイル스、トリ白 血病 ウイル스 (ALV)、サイトメガロ ウイル스 (CMV) 前初期 프로모터 / 엔ハンサー、ラウス 肉腫 ウイル스 (RSV)、アデノ 随伴 ウイル스 (AAV) 프로모터、アデノ ウイル스 프로모터、及び エプ스타イン · バー ウイル스 (EBV) 프로모터 가 挙げられる。ある 特定 的의 폴리ヌクレオチ드 를 有する ウイル스 프로모터 的의 適合性은、それら 的의 組み合わせ 가 發現 レベル 에 影響 을 与える ことができる ため、考慮 される。發現 을 最適化 する ため 到 合成 프로모터 / 엔ハンサー 를 使用 する こと が 可能 である (例如、米国 特許出願 公開 第 2004 / 0171573 号 를 参照 されたい)。

40

【0393】

[00422]組織特異 的의 프로모터 的의 例은、筋細胞 において 發現 을 推進 する 데스ミン 프로

50

モーターである (Li 1989年; Li及びPaulin 1991年; 並びにLi及びPaulin 1993年)。他の例としては、合成筋特異的プロモーター及びキメラ筋特異的/CMVプロモーターなどの人工プロモーターが挙げられる (Li 1999年; Hagstrom 2000年)。

【0394】

[00423]上記で述べたように、目的のポリヌクレオチドは、任意の必要な制御配列と一緒に、ネイキッドで、例えば、単独若しくはプラスミドの部分としてのいずれかで送達されてもよく、又はウイルス若しくは細菌又は細菌ベクターで送達されてもよい。

【0395】

[00424]プラスミド型ベクター、又は細菌ベクター若しくはウイルスベクターが使用されようと、ベクターが対象中で実質的に複製又は統合することができないことが望ましくあり得る。このようなベクターとしては、配列が、宿主-ベクターの組換えの危険性を最小化するように、対象のゲノムと実質的に同一の領域がないものが挙げられる。これを行う1つの方法は、目的のポリペプチドの発現を推進するレシピエントのゲノムに由来しないプロモーターを使用することである。例えば、レシピエントが哺乳動物である場合、プロモーターは、非哺乳動物に由来するが、哺乳動物細胞で機能することが可能でなければならない、例えば、ウイルスプロモーターが好ましい。

【0396】

[00425]ポリヌクレオチドを送達するために使用することができるウイルスベクターは、例えば、アデノウイルス及びポックスウイルスが挙げられる。有用な細菌ベクターとしては、例えば、シゲラ属、サルモネラ属、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、乳酸菌 (*Lactobacillus*)、カルメット・گران桿菌 (*Bacille bilie de Calmette - Guerin*) (BCG) 及び連鎖球菌 (*Streptococcus*) が挙げられる。

【0397】

[00426]アデノウイルスベクターの例、及びポリヌクレオチドを発現することができるアデノウイルスベクターを構築するための方法は、米国特許第4,920,209号に記載されている。ポックスウイルスベクターとしては、それぞれ、米国特許第4,722,848号及び米国特許第5,364,773号に記載のワクシニアウイルス及びカナリアポックスウイルスが挙げられる。例えば、ワクシニアウイルスベクターの記載についてはTartaglia 1992年、及びカナリアポックスの参照文献についてはTaylor 1995年も参照されたい。

【0398】

[00427]目的のポリヌクレオチドを発現することができるポックスウイルスベクターは、ポリヌクレオチドが、哺乳動物細胞中での発現のために適した条件下でウイルスゲノムに挿入されるように、Kieny 1984年に記載の相同組換えによって得てもよい。

【0399】

[00428]細菌ベクターに関して、宿主中で外来ポリヌクレオチドを発現するために有用な非毒性コレラ菌変異株が知られている。Mekalanos 1983年及び米国特許第4,882,278号は、非機能的コレラ毒素を産生するように、2つの欠失したctxAアレルのそれぞれのコード配列の相当量を有する株を記載している。国際公開第92/11354号は、irgA遺伝子座が変異によって不活性化されている株を記載しており、この変異は、ctxA変異を有する単一株中で組み合わせることができる。国際公開第94/01533号は、機能的ctxA及びattRS1 DNA配列を欠く欠失変異体を記載している。これらの変異体株は、国際公開第94/19482号に記載のように、異種タンパク質を発現するように遺伝子操作される。

【0400】

[00429]異種タンパク質の組換え発現のために遺伝子操作された弱毒化ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 株は、Nakayama 1998年及び国際公開第92/11361号に記載されている。

10

20

30

40

50

【0401】

[00430]対象中で外来タンパク質を発現するためにベクターとして使用することができる他の細菌株は、シゲラ・フレックスネリ (*Shigella flexneri*) について、High 1992年及び Sizemore 1995年に；ストレプトコッカス・ゴルドニ (*Streptococcus gordonii*) について、Medagli ni 1995年に；並びにカルメット・ゲラン桿菌 (*Bacille Calmette Guerin*) について、Flynn 1994年、国際公開第88/06626号、国際公開第90/00594号、国際公開第91/13157号、国際公開第92/01796号及び国際公開第92/21376号に記載されている。

【0402】

[00431]細菌ベクターにおいて、目的のポリヌクレオチドは、細菌のゲノムに挿入されてもよく、又はプラスミドの部分としてフリーな状態で残っていてもよい。

【0403】

[00432]ホルモン

[00433]一実施形態において、治療剤はホルモン又はその断片、アナログ若しくはバリエーションであってもよい。ホルモン、その断片、アナログ又はバリエーションは天然起源から得られてもよく、又は合成的に調製してもよい。

【0404】

[00434]例示的なホルモンとしては、限定されないが、アミリン、インスリン、グルカゴン、エリスロポエチン (EPO)、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH)、副甲状腺ホルモン (PTH)、甲状腺刺激ホルモン、成長ホルモン (GH)、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH)、カルシトニン、ソマトスタチン、ソマトメジン (インスリン様成長因子)、インターロイキン (例えば、インターロイキン1~17)、顆粒球/単球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、テストステロン、インターフェロン (例えば、インターフェロンアルファ又はガンマ)、レプチン、黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG)、エンケファリン、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、黄体形成ホルモン、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、組織プラスミノゲン活性化因子 (TPA)、オキシトシン、リラキシン、ステロイド (例えば、アンドロゲン、エストロゲン、グルココルチコイド、プロゲステロン及びセコステロイド) 並びにこれらのアナログ及び組み合わせが挙げられる。

【0405】

[00435]サイトカイン

[00436]一実施形態において、治療剤はサイトカイン又はその断片、アナログ若しくはバリエーションであってもよい。サイトカイン、その断片、アナログ又はバリエーションは天然起源から得られてもよく、又は合成的に調製してもよい。

【0406】

[00437]例示的なサイトカインとしては、限定されないが、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン及び腫瘍壊死因子、並びにこれらのアナログが挙げられる。

【0407】

[00438]アレルゲン

[00439]一実施形態において、治療剤はアレルゲン又はその断片、アナログ若しくはバリエーションであってもよい。アレルゲン、その断片、アナログ又はバリエーションは天然起源から得られてもよく、又は合成的に調製してもよい。

【0408】

[00440]本明細書で使用される場合、「アレルゲン」は、アレルギーを引き起こし得る任意の物質を指す。アレルゲンは、限定されないが、細胞、細胞抽出物、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、多糖類、多糖類コンジュゲート、多糖類及び他の分子のペプチド

10

20

30

40

50

及び非ペプチドのミミック、低分子、脂質、糖脂質、並びに植物、動物、真菌、昆虫、食品、薬物、粉塵及びダニの糖質に由来していてもよい。アレルゲンとしては、限定されないが、環境中の空気アレルゲン、植物花粉（例えば、ブタクサノ枯草熱）、雑草花粉アレルゲン、草花粉アレルゲン、セイバンモロコシ、樹木花粉アレルゲン、ライグラス、クモ類アレルゲン（例えばハウスダストダニアレルゲン）、貯蔵庫ダニアレルゲン、スギ（*Japanese cedar*）花粉ノ枯草熱、カビノ真菌孢子アレルゲン、動物アレルゲン（例えば、イヌ、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ラット、マウスなどのアレルゲン）、食物アレルゲン（例えば、甲殻類、ナッツ、かんきつ類、小麦粉、コーヒー）、昆虫アレルゲン（例えば、ノミ、ゴキブリ）、毒液（膜翅目（*Hymenoptera*））、スズメバチ（*yellow jacket*）、ミツバチ、カリバチ、スズメバチ（*hornet*）、カミアリ）、細菌アレルゲン（例えば、連鎖球菌抗原、回虫属（*Ascaris*）抗原などの寄生生物アレルゲン）、ウイルスアレルゲン、薬物アレルゲン（例えばペニシリン）、ホルモン（例えばインスリン）、酵素（例えばストレプトキナーゼ）、並びに不完全抗原又はハプテンとして作用することができる薬物又は化学物質（例えば、酸無水物及びイソシアネート）が挙げられる。

【0409】

[00441]触媒活性DNA又はRNA

[00442]一実施形態において、治療剤は、触媒活性DNA（デオキシリボザイム）又は触媒活性RNA（リボザイム）であってもよい。

【0410】

[00443]本明細書で使用される場合、「触媒活性DNA」という用語は、酵素活性を有する任意のDNA分子を指す。一実施形態において、触媒活性DNAは一本鎖DNA分子である。一実施形態において、触媒活性DNAは、天然に存在するのとは対照的に合成的に生成される。

【0411】

[00444]触媒活性DNAは、1つ又は複数の化学反応を行ってもよい。一実施形態において、触媒活性DNAはリボヌクレアーゼであり、触媒活性DNAはそれによりリボヌクレオチドホスホジエステル結合の切断を触媒する。別の実施形態において、触媒活性DNAはDNAリガーゼであり、それによって触媒活性DNAは、新しい結合を形成することによって2つのポリヌクレオチド分子の連結を触媒する。他の実施形態において、触媒活性DNAは、DNAのリン酸化、DNAのアデニル化、DNAの脱グリコシル化、ポルフィリンのメタル化、チミン二量体のフォトリバージョン（*photoreversion*）又はDNA切断を触媒することができる。

【0412】

[00445]本明細書で使用される場合、「触媒活性RNA」という用語は、酵素活性を有する任意のRNA分子を指す。触媒活性RNAは、RNAのプロセシング及びタンパク質合成を含む多くの生物学的プロセスに関与している。一実施形態において、触媒活性RNAは天然に存在するRNAである。一実施形態において、触媒活性RNAは合成的に生成される。

【0413】

[00446]アンチセンスRNA

[00447]一実施形態において、治療剤はアンチセンスRNAであってもよい。

【0414】

[00448]本明細書で使用される場合、「アンチセンスRNA」は、メッセンジャーRNA（mRNA）と相補的である任意の一本鎖RNAである。アンチセンスRNAが依然として塩基対合によってmRNAの翻訳を阻害することが可能であり、それによって翻訳機構を妨害する限り、アンチセンスRNAは、mRNAに対して100%の相補性又は100%未満の相補性を示してもよい。

【0415】

[00449]一実施形態において、アンチセンスRNAは、高度に構造化され、1つ又は複

10

20

30

40

50

数のステム - ループの二次構造で構成され、一本鎖（不對）領域に隣接するか、又は分離される。いくつかの実施形態において、シュードノットなどの三次構造が、2以上の二次構造エレメントの間で形成されてもよい。

【0416】

[00450] 干渉RNA及びアンタゴミル

[00451] 一実施形態において、治療剤は、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）又は小ヘアピンRNA（shRNA）などの干渉RNAであってもよい。

【0417】

[00452] RNA干渉（RNAi）は、RNA分子が、標的とするmRNA分子を中和することによって、遺伝子発現又は翻訳を阻害する生物学的プロセスである。2種類の小さなリボ核酸（RNA）分子 - マイクロRNA（miRNA）及び低分子干渉RNA（siRNA）は、RNA干渉の中核をなす。

10

【0418】

[00453] siRNAは、典型的には、20～25塩基対の長さの二本鎖RNA分子のクラスである。転写後にmRNAを分解することによって、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現を妨げ、それによって翻訳を防ぐ。siRNAの天然構造は、典型的には、それぞれの末端で2つのオーバーハングするヌクレオチドを有する短い20～25二本鎖RNAである。ダイサー酵素は、長いdsRNA及び小ヘアピンRNA（shRNA）からのsiRNAの生成を触媒する。shRNAは、厳格なヘアピントーンを有する人工RNA分子である。siRNA分子の設計及び生成、並びに作用機序は当技術分野において公知である。

20

【0419】

[00454] miRNAが、それ自身が折り畳まれて短ヘアピンを形成するRNA転写物の領域に由来するのに対して、siRNAが、より長い二本鎖RNAに由来する以外は、miRNAはsiRNAと似ている。

【0420】

[00455] 一実施形態において、治療剤は、これらの干渉RNA（siRNA、miRNA又はshRNA）のうちのいずれか1つ又は複数であってもよい。干渉RNAは、その内因性細胞対応物の遺伝子/mRNAの発現を低減又はサイレンシング（防ぐ）ことができるものでなければならない。一実施形態において、干渉RNAは天然に存在する干渉RNAに由来していた。一実施形態において、干渉RNAは合成的に生成される。

30

【0421】

[00456] 一実施形態において、治療剤はアンタゴミルであってもよい。アンタゴミル（アンチmiR又はブロックミル）は、内因性miRNAをサイレンシングする、合成的に操作されたオリゴヌクレオチドである。アンタゴミル化（アンタゴミルがmiRNA活性を阻害することによるプロセス）がどのように作動するかは不明であるが、miRNAを不可逆的に結合することによって阻害すると思われる。マイクロRNAの混乱状態のため、アンタゴミルは、多くの異なるmRNA分子の制御に影響を与え得るであろう。アンタゴミルは、マイクロRNAについての結合部位としての機能を果たすmRNA配列に相補的である配列を有するように設計される。

40

【0422】

[00457] 薬物

[00458] 一実施形態において、治療剤は、薬物、すなわち疾患、障害又は状態を処置、治療、予防又は診断するために使用される化学物質である。

【0423】

[00459] 一実施形態において、限定されないが、例示的な薬物として、免疫調節剤（免疫刺激薬及び免疫抑制薬）、免疫応答チェックポイント分子、解熱薬、鎮痛薬、抗片頭痛剤、抗血液凝固剤、制吐剤、抗炎症剤、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌剤、心血管系薬剤、中枢神経系薬剤、降圧剤及び血管拡張剤、鎮静薬、麻酔性アゴニスト、キレート化剤、

50

抗利尿剤、及び抗がん剤、抗腫瘍剤が挙げられる。例としては以下が挙げられる。

【0424】

[00460]一実施形態において、薬物は低分子薬物である。本明細書で使用される場合、「低分子薬物」という用語は、疾患、障害又は状態を処置、治療、予防又は診断するために使用することができる有機化合物を指す。

【0425】

[00461]「低分子」という用語は、合成的に生成してもよく、又は天然源から得てもよく、典型的には、2000Da未満、1000Da未満又は600Da未満の分子量を有する低分子量の化合物を指すことが理解される。特定の実施形態において、低分子は900Da未満の分子量を有し、これは、細胞膜全体に迅速に拡散する可能性という効果がある。より詳細には、低分子は600Da未満、さらにより詳細には500Da未満の分子量を有する。

10

【0426】

[00462]一実施形態において、低分子薬物は、約100Da～約2000Daの間；約100Da～約1500Daの間；約100Da～約1000Da；約100Da～約900Daの間；約100Da～約800Daの間；約100Da～約700Daの間；約100Da～約600Daの間；又は約100Da～約500Daの分子量を有する。一実施形態において、低分子薬物は、約100Da、約150Da、約200Da、約250Da、約300Da、約350Da、約400Da、約450Da、約500Da、約550Da、約600Da、約650Da、約700Da、約750Da、約800Da、約850Da、約900Da、約950Da又は約1000Daの分子量を有する。一実施形態において、低分子薬物は1nmオーダーのサイズを有していてもよい。

20

【0427】

[00463]一実施形態において、薬物は、エパカドスタット、ラパマイシン、ドキソルビシン、バルプロ酸、ミトキサントロン、ボリノスタット、シクロホスファミド、イリノテカン、シスプラチン又はメトトレキサートのうちの1つ又は複数である。特定の実施形態において、低分子薬物はシクロホスファミドである。

【0428】

[00464]一実施形態において、低分子薬物はDNA複製を妨げる薬剤である。本明細書で使用される場合、「DNA複製を妨げる」という表現は、細胞のDNAをコピーする（すなわち複製する）生物学的プロセスを予防する、阻害する又は遅延させる任意の作用を包含するものとする。当業者であれば、例えば、DNA架橋、DNAのメチル化、塩基の置換などのようなDNA複製を予防する、阻害する又は遅延させるための様々なメカニズムが存在することを理解するであろう。本開示は、当技術分野で公知の任意の手段によってDNA複製を妨げる任意の薬剤の使用を包含する。このような薬剤の例示的な非限定的な実施形態は、例えば、国際公開第2014/153636号及び/又は国際出願PCT/CA2017/050539に記載されている。一実施形態において、DNA複製を妨げる薬剤は、例えば、ナイトロジェンマスタードアルキル化剤などのアルキル化剤である。一実施形態において、DNA複製を妨げる薬剤はシクロホスファミドである。

30

【0429】

[00465]一実施形態において、低分子薬物は免疫応答チェックポイント阻害剤である。本明細書で使用される場合、「免疫応答チェックポイント阻害剤」は、1つ又は複数のチェックポイントタンパク質を完全又は部分的に減少させ、阻害し、妨げ、又はモジュレートする任意の化合物又は分子を指す。チェックポイントタンパク質はT細胞の活性化又は機能を制御する。例えば、CTLA-4及びそのリガンドのCD80及びCD86、並びにPD-1及びそのリガンドのPD-L1及びPD-L2などの多数のチェックポイントタンパク質が公知である。チェックポイントタンパク質はT細胞応答の共刺激性又は阻害性相互作用の原因である。チェックポイントタンパク質は、自己寛容、並びに生理学的免疫応答の持続時間及び振幅を制御及び維持する。本明細書において、「免疫応答チェックポイント阻害剤」という用語は「チェックポイント阻害剤」と互換的に使用することがで

40

50

きる。チェックポイント阻害剤の例示的な非限定的な実施形態を以下に記載する。

【0430】

[00466]一実施形態において、免疫応答チェックポイント阻害剤は、プログラム死リガンド1 (PD-L1、B7-H1、CD274としても公知)、プログラム死1 (PD-1、CD279)、CTLA-4 (CD154)、PD-L2 (B7-DC、CD273)、LAG3 (CD223)、TIM3 (HAVCR2、CD366)、41BB (CD137)、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS (T細胞共刺激分子を誘導可能)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO (コラーゲン性構造を有するマクロファージ受容体)、PS (ホスファチジルセリン)、OX-40、SLAM、TIGIT、VISTA、VTCN1、又はこれらの任意の組み合わせの阻害剤である。

10

【0431】

[00467]一実施形態において、免疫応答チェックポイント阻害剤は、PD-L1、PD-1、CTLA-4又はこれらの任意の組み合わせの阻害剤である。

【0432】

[00468]一実施形態において、薬物は生物学的薬物である。本明細書で使用される場合、「生物学的薬物」は、生物学的起源において製造され、生物学的起源から抽出され、又は生物学的起源から半合成された任意の医薬製剤である。一実施形態において、生物学的薬物は、血液構成成分、細胞、細胞構成成分、アレルゲン、抗体、遺伝子又はそれらの断片、組織、組織構成成分、又は組換えタンパク質である。

20

【0433】

[00469]抗体

[00470]一実施形態において、治療剤は抗体、その抗原結合断片又はその誘導体である。

【0434】

[00471]本明細書において使用される「抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgD若しくはIgEの抗体のクラス、又はFab、F(ab')₂、Fdを含むそれらの断片若しくは誘導体、並びに単鎖抗体、ダイアボディ、二重特異性抗体、二機能性抗体及びそれらの誘導体を意味する。抗体は、所望のエピトープ又はそれに由来する配列に十分な結合特異性を示す、哺乳動物の血清サンプルから単離された抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、親和性精製抗体、又はその混合物であり得る。

30

【0435】

[00472]抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であり得る。抗体は、キメラ抗体、単鎖抗体、親和性成熟抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、又は完全ヒト抗体であり得る。ヒト化抗体は、非ヒト種からの1つ又は複数の相補性決定領域(CDR)及びヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域を有する所望の抗原と結合する非ヒト種からの抗体であり得る。

【0436】

[00473]本明細書で使用される場合、「抗原結合断片」という用語は、全長抗体の標的抗原に特異的に結合する能力を残した抗体の任意の断片若しくは部分又はそのバリエーションを指す。一実施形態において、抗原結合断片は抗体の重鎖可変領域及び/又は軽鎖可変領域を含む。

40

【0437】

[00474]一実施形態において、抗体は、抗PD-1抗体、そのバリエーション若しくはその抗原結合断片、又はその組み合わせであり得る。一実施形態において、PD-1抗体はニボルマブ(オプジーボ(Opdivo)(商標))であってもよい。一実施形態において、PD-1抗体はペムブロリズマブ(キイトルーダ(Keytruda)(商標))であってもよい。

50

【0438】

[00475]他の実施形態において、限定されないが、抗体は、例えば、国際公開第2015/103602号に開示されたものなどの抗PD1又は抗PDL1抗体であってもよい。例えば、一実施形態において、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピディリズマブ、BMS-936559 (ClinicalTrials.gov; 識別子NCT02028403を参照されたい)、MPDL3280A (Roche, ClinicalTrials.gov; 識別子NCT02008227を参照されたい)、MDX1105-01 (Bristol Myers Squibb, ClinicalTrials.gov; 識別子NCT00729664を参照されたい)、MED14736 (MedImmune, ClinicalTrials.gov; 識別子NCT01693562を参照されたい)、及びMK-3475 (Merck, ClinicalTrials.gov; 識別子NCT02129556を参照されたい)から選択されてもよい。一実施形態において、抗PD-1抗体は、RMP1-4若しくはJ43 (BioXCell)、又はそれらのヒト対応物若しくはヒト化対応物であってもよい。

10

【0439】

[00476]一実施形態において、抗体は、抗CDL4-1抗体、そのバリエーション若しくはその抗原結合断片、又はその組み合わせである。抗CTL4抗体はCTL4活性を阻害することができ、それによって免疫応答を誘導、誘発又は増強する。一実施形態において、抗CTLA-4抗体はイピリムマブ (Bristol-Myers Squibb) 又はBN13 (BioXCell) であってもよい。別の実施形態において、抗CTLA-4抗体は、UC10-4F10-11、9D9若しくは9H10 (BioXCell)、又はそれらのヒト対応物若しくはヒト化対応物であってもよい。

20

【0440】

[00477]任意の特定の治療剤の量は、治療剤 (例えば、ペプチド抗原、低分子薬物、抗体など) の種類に依存し得る。当業者であれば、経験的な試験によって、特定の適用において必要な治療剤の量を容易に決定することができる。

【0441】

【00478】Tヘルパーエピトープ

[00479]いくつかの実施形態において、1つ又は複数のTヘルパーエピトープは、本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用又はキットにおいて使用することができる。一実施形態において、Tヘルパーエピトープは、少なくとも1つの治療剤が抗原である場合に使用される。

30

【0442】

[00480]Tヘルパーエピトープは、Tヘルパー活性を有するアミノ酸 (天然又は非天然アミノ酸) の配列である。TヘルパーエピトープはTヘルパーリンパ球によって認識され、これは、免疫系の能力の確立及び最大化において重要な役割を果たし、例えば、細胞傷害性Tリンパ球などの他の免疫細胞の活性化及び指示に参与する。Tヘルパーエピトープは連続又は非連続エピトープで構成され得る。したがって、Tヘルパーのすべてのアミノ酸が必ずしもエピトープの一部であるわけではない。

40

【0443】

[00481]したがって、Tヘルパーエピトープのアナログ及びセグメントを含むTヘルパーエピトープは、免疫応答を増強又は刺激することができる。免疫優性Tヘルパーエピトープは、MHCタイプが広く相違する動物及びヒト集団において広く反応する (Cellis 1988年、Demotz 1989年、Chong 1992年)。対象のペプチドのTヘルパードメインは、約10~約50個のアミノ酸、より詳細には、約10~約30個のアミノ酸を有していてもよい。複数のTヘルパーエピトープが存在する場合、その結果として、それぞれのTヘルパーエピトープは独立して作用する。

【0444】

[00482]別の実施形態において、TヘルパーエピトープはTヘルパーエピトープアナロ

50

グ又はTヘルパーセグメントであってもよい。Tヘルパーエピトープアナログは、Tヘルパーエピトープ中の1～約10個のアミノ酸残基の置換、欠失及び挿入を含んでいてもよい。Tヘルパーセグメントは、免疫応答を増強又は刺激するのに十分なTヘルパーエピトープの連続的な部分である。Tヘルパーセグメントの例は、単一のより長いペプチドに由来する一連の重複ペプチドである。

【0445】

[00483]いくつかの実施形態において、Tヘルパーエピトープは本明細書に記載のペプチド抗原の一部からであってもよい。特に、ペプチド抗原が十分なサイズである場合、これは、Tヘルパーエピトープとして機能するエピトープを含有していてもよい。他の実施形態において、Tヘルパーエピトープはペプチド抗原からの別々の分子である。他の実施形態において、Tヘルパーエピトープはペプチド抗原と融合していてもよい。

10

【0446】

[00484]特定の実施形態において、Tヘルパーエピトープは、アラニン残基がそのアミノ末端に付加して、安定性が増強された、改変された破傷風毒素ペプチドA16L(830～844番目のアミノ酸；AQYIKANSKFIGITEL(配列番号1))を含んでいてもよい(Slingluff 2001年)。

【0447】

[00485]使用することができるTヘルパーエピトープの他の起源としては、例えば、B型肝炎表面抗原ヘルパーT細胞エピトープ、百日咳毒素ヘルパーT細胞エピトープ、麻疹ウイルスFタンパク質ヘルパーT細胞エピトープ、クラミジア・トラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)の主要外膜タンパク質ヘルパーT細胞エピトープ、ジフテリア毒素ヘルパーT細胞エピトープ、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト周囲ヘルパーT細胞エピトープ、マンソン住血吸虫(*Schistosoma mansoni*)トリオースリン酸イソメラーゼヘルパーT細胞エピトープ、大腸菌TraTヘルパーT細胞エピトープ及びこれらのTヘルパーエピトープのいずれかの免疫増強アナログ及びセグメントが挙げられる。

20

【0448】

[00486]いくつかの実施形態において、TヘルパーエピトープはユニバーサルTヘルパーエピトープであってもよい。本明細書で使用されるユニバーサルTヘルパーエピトープは、多数のMHCクラスII分子に、クラスII(CD4+T細胞)制限様式でT細胞機能を活性化する様式で結合する、ペプチド若しくは他の免疫原性分子又はそれらの断片を指す。ユニバーサルTヘルパーエピトープの例は、ペプチド配列AKXVAAWTLKAA(ここで、Xはシクロヘキシルアラニルであってもよい(配列番号29))を含むPADRE(pan-DRエピトープ)である。PADREは、特に、CD4+Tヘルパーエピトープを有し、すなわちPADRE-特異的CD4+Tヘルパー応答の誘導を刺激する。

30

【0449】

[00487]前述の改変破傷風毒素ペプチドA16Lに加えて、破傷風トキシイドは、PADREと同じ様式で働く他のTヘルパーエピトープを有する。破傷風毒素及びジフテリア毒素は、ヒトCD4+細胞に対するユニバーサルエピトープを有する(Dietheilm-Okita 2000年)。別の実施形態において、Tヘルパーエピトープは、ペプチド配列FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(947～967番目のアミノ酸；配列番号30)を含むF21Eなどの破傷風トキシイドペプチドであってもよい。

40

【0450】

[00488]多くの他のTヘルパーエピトープは当技術分野において公知であり、任意のこれらのTヘルパーエピトープを、本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用及びキットの実施において使用することができる。

【0451】

[00489]一実施形態において、本明細書に開示される乾燥調製物又は組成物は、単一の種類のTヘルパーエピトープを含む。別の実施形態において、本明細書に開示される乾燥

50

調製物又は組成物は、複数の異なる種類のＴヘルパーエピトープ（例えば、１、２、３、４又は５個の異なるＴヘルパーエピトープ）を含む。

【０４５２】

【００４９０】一実施形態において、本明細書に開示される乾燥調製物又は組成物は、Ｔヘルパーエピトープを含まない。例えば、治療剤が抗原ではない場合、このような場合がある。

【０４５３】

【００４９１】使用されるＴヘルパーエピトープの量は、治療剤の種類及び量、並びにＴヘルパーエピトープの種類に依存していてもよい。当業者であれば、経験的な試験によって、特定の適用において必要なＴヘルパーエピトープの量を容易に決定することができる。

【０４５４】

【００４９２】アジュバント

【００４９３】いくつかの実施形態において、１つ又は複数のアジュバントは、本明細書に開示される方法、乾燥調製物、組成物、使用又はキットにおいて使用することができる。

【０４５５】

【００４９４】多数のアジュバントが記載されており、当業者に公知である。例示的なアジュバントとしては、限定されないが、ミョウバン、他のアルミニウム化合物、バチルス・カルメット・ゲラン（ＢＣＧ）、タイターマックス（ＴｉｔｅｒＭａｘ）（商標）、リビ（Ｒｉｂｉ）（商標）、完全フロイントアジュバント（ＦＣＡ）、ＣｐＧ含有オリゴデオキシヌクレオチド（ＣｐＧ ＯＤＮ）、リポＡミミック又はそのアナログ、リポペプチド及びポリＩ：Ｃポリヌクレオチドが挙げられる。

【０４５６】

【００４９５】一実施形態において、アジュバントはＣｐＧ ＯＤＮである。ＣｐＧ ＯＤＮは、１つ又は複数の非メチル化ＣｐＧモチーフ（中央の非メチル化ＣＧジヌクレオチドと隣接領域を含む）を含有するＤＮＡ分子である。例示的なＣｐＧ ＯＤＮは、５′ - T C C A T G A C G T T C C T G A C G T T - 3′（配列番号３１）である。当業者であれば、標的種及び効能に基づいて、他の適したＣｐＧ ＯＤＮを容易に選択することができる。

【０４５７】

【００４９６】一実施形態において、アジュバントは、ポリＩ：Ｃポリヌクレオチドであってもよい。

【０４５８】

【００４９７】ポリＩ：Ｃポリヌクレオチドは、イノシン酸残基（Ｉ）及びシチジル酸残基（Ｃ）を含有するポリヌクレオチド分子（ＲＮＡ若しくはＤＮＡ、又はＤＮＡ及びＲＮＡの組み合わせのいずれか）であり、インターフェロンなどの炎症性サイトカインの産生を誘導する。一実施形態において、ポリＩ：Ｃポリヌクレオチドは二本鎖である。このような実施形態において、ポリＩ：Ｃポリヌクレオチドは、完全にシトシン含有ヌクレオチドからなる一本鎖及び完全にイノシン含有ヌクレオチドからなる一本鎖で構成されてもよいが、他の配置も可能である。例えば、それぞれの鎖は、シトシン含有ヌクレオチド及びイノシン含有ヌクレオチドの両方を含有していてもよい。いくつかの例において、いずれか又は両方の鎖は、１つ又は複数の非シトシンヌクレオチド又は非イノシンヌクレオチドを追加で含んでもよい。

【０４５９】

【００４９８】ポリＩ：Ｃは、そのインターフェロンの活性化能に対する効果がなく、１６個の残基ごとにセグメント化できると報告されている。（Ｂｏｂｓｔ １９８１年）。さらに、ウリジン残基を１２個の反復シチジル酸残基ごとに導入することによって、ミスマッチさせたポリＩ：Ｃ分子のインターフェロン誘導能は（Ｈｅｎｄｒｉｘ １９９３年）、１２個の残基の最小二本鎖ポリＩ：Ｃ分子がインターフェロン産生を促進するのに十分であることを示唆する。他も、０．５～１の二本鎖ポリヌクレオチドのらせんターンに相当する６～１２個の残基程度の小さな領域が、誘導プロセスを引き起こすことができることを示唆している（Ｇｒｅｅｎｅ １９７８年）。合成的に作られる場合、ポリＩ：Ｃポリヌクレオチドは典型的には約２０個以上の残基長（通常は２２、２４、２６、

10

20

30

40

50

28又は30個の残基長)である。(例えば、酵素を用いて)半合成的に作られる場合、鎖の長さは500、1000個又はそれ以上の残基であってもよい。

【 0 4 6 0 】

【00499】したがって、本明細書で使用される場合、「ポリⅠ：Ⅱ」、「ポリⅠ：Ⅲポリヌクレオチド」又は「ポリⅠ：Ⅲポリヌクレオチドアジュバント」は、二本鎖又は一本鎖ポリヌクレオチド分子（RNA若しくはDNA、又はDNA及びRNAの組み合わせ）であり、これらのそれぞれの鎖は、少なくとも6個の連続的なイノシン酸若しくはシチジル酸残基、又は任意の順序のイノシン酸及びシチジル酸から選択される少なくとも6個の連続的な残基（例えば、ⅠⅠⅠⅠⅠⅠ又はⅠⅢⅠⅢⅠⅢ）を含有し、哺乳動物対象において、インターフェロンなどの少なくとも1つの炎症性サイトカインの産生を誘導又は増強することができる。ポリⅠ：Ⅲポリヌクレオチドは、典型的には、約8、10、12、14、16、18、20、22、24、25、26、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、500、1000個又はそれ以上の残基の長さを有する。好ましいポリⅠ：Ⅲポリヌクレオチドは、最小で約6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28又は30個のヌクレオチドの長さ、かつ最大で約1000、500、300、200、100、90、80、70、60、50、45又は40個のヌクレオチドの長さを有していてもよい。

【 0 4 6 1 】

[00500]二本鎖ポリ I : C ポリヌクレオチドのそれぞれの鎖はイノシン酸又はシチジル酸残基のホモポリマーであってもよく、或いはそれぞれの鎖は、イノシン酸及びシチジル酸残基の両方を含有するヘテロポリマーであってもよい。いずれかの場合において、ポリマーは、上記のように、6 個の I、6 個の C、又は 6 個の I / C 残基の少なくとも 1 つの連続的な領域が存在するならば、1 つ又は複数の非イノシン酸又は非シチジル酸残基（例えばウリジン）によって中断されてもよい。典型的には、ポリ I : C ポリヌクレオチドのそれぞれの鎖は、6 個の I / C 残基当たり 1 個以下の非 I / C 残基、より好ましくは、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 又は 30 個ごとの I / C 残基当たり 1 個以下の非 I / C 残基を含有する。

【 0 4 6 2 】

【00501】ポリⅠ：Ｃポリヌクレオチド中のイノシン酸又はシチジル酸（又は他の）残基は、インターフェロンなどの炎症性サイトカインの産生を促進するポリⅠ：Ｃポリヌクレオチドの能力は維持されるならば、当技術分野において知られているように誘導化又は改変されてもよい。誘導体又は改変体の非限定的な例としては、例えば、アジド改変、フルオロ改変、又はインピボ安定性を増強するための天然ホスホジエステル結合の代わりにチオエステル（又は類似の）結合の使用が挙げられる。ポリⅠ：Ｃポリヌクレオチドはまた、例えば、分子を正に帯電したポリリジン及びカルボキシメチルセルロース、又は正に帯電した合成ペプチドと複合体化することによって、例えば、インピボでの分解に対するその抵抗性を増強するために改変することができる。

【 0 4 6 3 】

[00502]一実施形態において、ポリ I : C ポリヌクレオチドは、イノシン酸残基 (I) 及びシチジル酸残基 (C) を含有する一本鎖分子であってもよい。例として、限定されないが、一本鎖ポリ I : C は、d I d C の反復配列であってもよい。特定の実施形態において、一本鎖ポリ I : C の配列は、(I C)₁₃ の 26 アミノ酸長の配列、すなわち I C I C I C I C I C I C I C I C I C I C I C I C I C I C (配列番号 32) であってもよい。当業者には明らかであるように、これらの性質 (例えば相補性) に起因して、反復 d I d C のこれらの一本鎖分子が、自然にホモ二量体を形成し、そのためこれらが、ポリ I / ポリ C 二量体に概念上類似していることは明らかである。

【 0 4 6 4 】

[00503]一実施形態において、ポリ I : C ポリヌクレオチドアジュバントは、異なる鎖長の数百塩基対のポリ I 及びポリ C の混合物を含有する、およそ 989,486 ダルトン

の分子量を有するポリ I : C の伝統的な形態 (Thermo Scientific ; 米国) である。

【0465】

[00504]一実施形態において、アジュバントは、TLR2 を活性化又は TLR2 の活性を増加させるものであってもよい。本明細書で使用される場合、TLR2 を「活性化する」又は「活性を増加させる」アジュバントとしては、任意のアジュバントが挙げられ、いくつかの実施形態において、TLR2 アゴニストとして作用する脂質系アジュバントが挙げられる。さらに、TLR2 の活性化又は活性の増加は、任意の単量体、ホモ二量体又はヘテロ二量体の形態におけるその活性化を包含し、詳細には、TLR1 又は TLR6 とのヘテロ二量体 (すなわち、TLR1 / 2 又は TLR2 / 6) としての TLR2 の活性化を含む。TLR2 を活性化するか、又は活性を増加させるアジュバントの例示的な実施形態としては、国際公開第 2013 / 049941 号に記載されているものなどの脂質系アジュバントが挙げられる。

10

【0466】

[00505]一実施形態において、アジュバントは、例えば、国際公開第 2013 / 049941 号に開示されているような脂質系アジュバントであってもよい。一実施形態において、脂質系アジュバントは、ジパルミトイル - S - グリセリル - システイン (PAM₂Cys) 又はトリパルミトイル - S - グリセリル - システイン (PAM₃Cys) などのパルミチン酸部分を含むものである。一実施形態において、アジュバントはリポペプチドである。例示的なリポペプチドとしては、限定されないが、PAM₂Cys - Ser - (Lys)₄ (配列番号 33) 又は PAM₃Cys - Ser - (Lys)₄ (配列番号 33) が挙げられる。

20

【0467】

[00506]一実施形態において、アジュバントは、PAM₃Cys - SKKKK (EMC Microcollections、ドイツ ; 配列番号 33) 又はそのバリエーション、ホモログ及びアナログである。リポペプチドの PAM₂ ファミリーは、リポペプチドの PAM₃ ファミリーに対する有効な代替物として示されている。

【0468】

[00507]一実施形態において、アジュバントは、例えば、国際出願第 2016 / 109880 号及びそこで引用された参考文献に開示されているものなどの、リポド A ミミック又はアナログアジュバントであってもよい。特定の実施形態において、アジュバントは、国際公開第 2016 / 109880 号に開示されたような JL - 265 又は JL - 266 であってもよい。

30

【0469】

[00508]一実施形態において、国際公開第 2017 / 083963 号に開示されたアジュバント系における記載のように、ポリ I : C ポリヌクレオチドアジュバント及び脂質系アジュバントの組み合わせを使用してもよい。

【0470】

[00509]使用することができるアジュバントのさらなる例としては、限定されないが、ケモカイン、コロニー刺激因子、サイトカイン、1018 ISS、アルミニウム塩、アンプリヴァックス (Amplivax)、AS04、AS15、ABM2、アジュマー (Adjuver)、アルガムリン (Algamulin)、AS01B、AS02 (SBASA)、AS02A、BCG、カルシトリオール、キトサン、コレラ毒素、CP - 870、893、CpG、ポリ I : C、CyaA、デトックス (DETOX) (Ribbi Immunochemicals)、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム (DDA)、フタル酸ジブチル (DBP)、dSLIM、ガンマイヌリン、GM - CSF、GMDP、グリセロール、IC30、IC31、イミキモド、イムファクト (ImuFact) IMP321、IS パッチ (IS Patch)、イスコム (ISCOM)、イスコムマトリックス (ISCOMATRIX)、ジュヴィミューン (JuvImmune)、リポバックス (LipoVac)、LPS、脂質コアタンパク質、MF59、モノホスホリルリピ

40

50

ドA及びそのアナログ又はミミック、モンタニド（登録商標）IMS1312、モンタニド（登録商標）系アジュバント（例えば、モンタニドISA-51、-50及び-70）、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、オンタック（ONTAK）、ペプテル（Peptel）ベクター系、他のパルミトイル系分子、PLG微粒子、レシキモド、スクアレン、SLR172、YF-17DBCG、QS21、クイルA（QuilA）、P1005、ポロクサマー、サポニン、合成ポリヌクレオチド、ザイモサン、百日咳毒素が挙げられる。

【0471】

[00510]一実施形態において、少なくとも1つの治療剤は少なくとも1つのアジュバントにカップリングされていてもよい。一実施形態において、アジュバントは任意の治療剤にカップリングされていない。

10

【0472】

[00511]使用されるアジュバントの量は、治療剤の種類及び量並びにアジュバントの種類に依存し得る。当業者であれば、経験的な試験によって、特定の適用において必要なアジュバントの量を容易に決定することができる。

【0473】

[00512]界面活性剤

[00513]一実施形態において、本明細書に開示される組成物は1つ又は複数の界面活性剤を含んでいてもよい。界面活性剤は、単一の剤又は剤の混合物であってもよい。界面活性剤（複数可）は、薬学的及び/又は免疫学的に許容されなければならない。

20

【0474】

[00514]いくつかの実施形態において、界面活性剤は、疎水性担体中に、単一層脂質集合体、治療剤及び/又は他の構成成分（例えば、アジュバント及び/又はTヘルパーエпитープ）を有する脂質系構造体を安定化するのに助けるために使用することができる。界面活性剤の使用は、例えば、表面張力を減少させることによって、これらの構成成分の混合物のより一様な分散を促進することができる。一実施形態において、界面活性剤は、本明細書に開示される組成物が複数の異なる治療剤（例えば、5個以上の異なるペプチド抗原）又は比較的高濃度の治療剤（例えば、合計で5mg/mgの治療剤）を含有する場合に使用してもよい。

【0475】

30

[00515]界面活性剤は両親媒性であってもよく、したがって、界面活性剤は広範囲の化合物を含み得る。使用することができる界面活性剤の例としてはポリソルベートが挙げられ、これは、ポリエチレングリコール化ソルビトール及びソルビタンエステルから誘導される油状液体である。ポリソルベートとしては、例えばソルビタンモノオレエートを挙げることができる。典型的な界面活性剤は当技術分野においてよく知られており、限定されないが、オレイン酸マンニド（アラセル（Arlace1）（商標）A）、レシチン、ツイーン（Tween）（商標）80、スパン（商標）20、80、83及び85が挙げられる。一実施形態において、組成物中での使用のための界面活性剤はオレイン酸マンニドである。一実施形態において、組成物中での使用のための界面活性剤はスパン80である。

【0476】

40

[00516]界面活性剤は、一般に疎水性担体と事前に混合される。いくつかの実施形態において、界面活性剤をすでに含有している疎水性担体を使用してもよい。例えば、モンタニド（登録商標）ISA51などの疎水性担体は、界面活性剤であるオレイン酸マンニドをすでに含有している。他の実施形態において、疎水性担体は、他の構成成分（例えば、乾燥脂質/治療剤の調製物）と組み合わせる前に界面活性剤と混合してもよい。

【0477】

[00517]界面活性剤は、疎水性担体中で乾燥調製物の一様な分散を促進するため、及び/又は脂質系構造体の単一層集合体の形成を補助するのに有効な量で使用される。典型的には、疎水性担体と界面活性剤の体積比率（v/v）は約4:1～約15:1の範囲である。

50

【 0 4 7 8 】

[00518]一実施形態において、本組成物は界面活性剤を含有しない。このような実施形態において、小さく均一なサイズの分粒された脂質ベシクル粒子は、疎水性担体中の治療剤及び／又は他の構成成分（例えば、アジュバント及び／又はＴヘルパーエпитープ）の存在下、脂質が、容易に再配列して、単一層脂質集合体を有する脂質系構造体を形成することを可能にすることができる。したがって、このような実施形態において界面活性剤は必要ではない。

【 0 4 7 9 】

[00519]実施形態

[00520]本発明の特定の実施形態としては、限定されないが、以下が挙げられる。

10

[00521]（１）脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を調製するための方法であって、（ａ）１２０ｎｍの平均粒径及び０．１の多分散指数（ＰＤＩ）を有する脂質ベシクル粒子を用意するステップ、（ｂ）脂質ベシクル粒子を少なくとも１つの可溶化された治療剤と混合して混合物を形成するステップ、及び（ｃ）ステップ（ｂ）において形成された混合物を乾燥して、脂質及び治療剤を含む乾燥調製物を形成するステップを含む方法。

[00522]（２）ステップ（ａ）が、脂質ベシクル粒子を分粒して、１２０ｎｍの平均粒径及び０．１のＰＤＩを有する脂質ベシクル粒子を用意することを含む、項（１）に記載の方法。

[00523]（３）分粒がフィルター押出による、項（２）に記載の方法。

[00524]（４）分粒が、０．２μｍのポリカーボネート膜、０．１μｍのポリカーボネート及び／又は０．０８μｍのポリカーボネート膜等の、１つ又は複数のポリカーボネート膜を通す押出による、項（２）又は（３）に記載の方法。

20

[00525]（５）分粒が、（ｉ）０．２μｍのポリカーボネート膜を２０～３０回通し、次いで０．１μｍのポリカーボネート膜を１０～２０回通すか、又は（ｉｉ）０．２μｍのポリカーボネート膜を２０～４０回通し、次いで０．１μｍのポリカーボネート膜を１０～２０回通し、次いで０．０８μｍのポリカーボネート膜を１０～２０回通す押出による、項（２）～（４）のいずれか一項に記載の方法。

[00526]（６）分粒が、（ｉ）０．２μｍのポリカーボネート膜を２５回通し、次いで０．１μｍのポリカーボネート膜を１０回通すか、又は（ｉｉ）０．２μｍのポリカーボネート膜を２５回通し、次いで０．１μｍのポリカーボネート膜を１０回通し、次いで０．０８μｍのポリカーボネート膜を１５回通す押出による、項（２）～（５）のいずれか一項に記載の方法。

30

[00527]（７）脂質ベシクル粒子の平均粒径が約８０ｎｍ～約１２０ｎｍの間である、項（１）～（６）のいずれか一項に記載の方法。

[00528]（８）脂質ベシクル粒子の平均粒径が、約８０ｎｍ、約８１ｎｍ、約８２ｎｍ、約８３ｎｍ、約８４ｎｍ、約８５ｎｍ、約８６ｎｍ、約８７ｎｍ、約８８ｎｍ、約８９ｎｍ、約９０ｎｍ、約９１ｎｍ、約９２ｎｍ、約９３ｎｍ、約９４ｎｍ、約９５ｎｍ、約９６ｎｍ、約９７ｎｍ、約９８ｎｍ、約９９ｎｍ、約１００ｎｍ、約１０１ｎｍ、約１０２ｎｍ、約１０３ｎｍ、約１０４ｎｍ、約１０５ｎｍ、約１０６ｎｍ、約１０７ｎｍ、約１０８ｎｍ、約１０９ｎｍ、約１１０ｎｍ、約１１１ｎｍ、約１１２ｎｍ、約１１３ｎｍ、約１１４ｎｍ又は約１１５ｎｍである、項（１）～（７）のいずれか一項に記載の方法。

40

[00529]（９）脂質ベシクル粒子の平均粒径が１００ｎｍである、項（１）～（８）のいずれか一項に記載の方法。

[00530]（１０）脂質ベシクル粒子が合成脂質を含む、項（１）～（９）のいずれか一項に記載の方法。

[00531]（１１）脂質ベシクル粒子が、合成ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、又は合成ＤＯＰＣ及びコレステロールを含む、項（１０）に記載の方法。

[00532]（１２）脂質ベシクル粒子が合成ＤＯＰＣ及びコレステロールを１０：１（ｗ／ｗ）のＤＯＰＣ：コレステロール比で含む、項（１１）に記載の方法。

[00533]（１３）ステップ（ａ）の脂質ベシクル粒子がリポソーム前駆体から調製され

50

る、項(1)～(12)のいずれか一項に記載の方法。

[00534](14)リポソーム前駆体がプレソーム(登録商標)である、項(13)に記載の方法。

[00535](15)脂質ベシクル粒子がリポソームである、項(1)～(14)のいずれか一項に記載の方法。

[00536](16)リポソームが単層、多重層、多胞体又はこれらの混合物である、項(15)に記載の方法。

[00537](17)少なくとも1つの治療剤が、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム又は水酸化ナトリウムのうちの1つ又は複数に可溶化される、項(1)～(16)のいずれか一項に記載の方法。

10

[00538](18)少なくとも1つの治療剤が、0.1Mの水酸化ナトリウム、 6.0 ± 1.0 のpHを有する100mMの酢酸ナトリウム、 9.5 ± 1.0 のpHを有する100mMの酢酸ナトリウム、 7.0 ± 1.0 のpHを有する50mMのリン酸ナトリウム、又は 6.0 ± 1.0 のpHを有する100mMのリン酸ナトリウムのうちの1つ又は複数に可溶化される、項(1)～(17)のいずれか一項に記載の方法。

[00539](19)ステップ(b)の混合が酢酸ナトリウム又はリン酸ナトリウムの溶液中で行われる、項(1)～(18)のいずれか一項に記載の方法。

[00540](20)ステップ(b)の混合が、 $6.0 \sim 10.5$ の範囲のpHを有する25～250mMの酢酸ナトリウム中、又は $6.0 \sim 8.0$ の範囲のpHを有する25～250mMのリン酸ナトリウム中で行われる、項(19)に記載の方法。

20

[00541](21)ステップ(b)の混合が、 6.0 ± 1.0 のpHを有する50mMの酢酸ナトリウム中、 9.5 ± 1.0 のpHを有する100mMの酢酸ナトリウム中、 7.0 ± 1.0 のpHを有する50mMのリン酸ナトリウム中、又は 6.0 ± 1.0 のpHを有する100mMのリン酸ナトリウム中で行われる、項(19)に記載の方法。

[00542](22)ステップ(b)の混合が、7.0のpHを有する50mMのリン酸ナトリウム中、6.0のpHを有する100mMのリン酸ナトリウム中、6.0のpHを有する50mMの酢酸ナトリウム中、又は9.5のpHを有する100mMの酢酸ナトリウム中で行われる、項(19)に記載の方法。

[00543](23)治療剤が、ペプチド抗原、ポリペプチドをコードするDNA又はRNAポリヌクレオチド、ホルモン、サイトカイン、アレルゲン、触媒活性DNA(デオキシリボザイム)、触媒活性RNA(リボザイム)、アンチセンスRNA、干渉RNA、アンタゴミル、低分子薬物、生物学的薬物、抗体、又はこれらのいずれか1つの断片若しくは誘導体、或いはこれらの混合物である、項(1)～(22)のいずれか一項に記載の方法。

30

[00544](24)治療剤が1個又は複数のペプチド抗原である、項(1)～(22)のいずれか一項に記載の方法。

[00545](25)1個又は複数のペプチド抗原が20～30個のアミノ酸長である、項(24)に記載の方法。

[00546](26)1個又は複数のペプチド抗原がネオ抗原である、項(24)又は(25)に記載の方法。

[00547](27)1個又は複数のペプチド抗原が、ヒトパピローマウイルス(HPV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、呼吸器多核体ウイルス(RSV)、パチルス・アントラシス、プラスモジウム属又はサバイビンポリペプチドに由来する、項(24)に記載の方法。

40

[00548](28)1個又は複数のペプチド抗原が、FTELT LGEF(配列番号4)、LM LGEFLKL(配列番号5)、RISTFKNWPK(配列番号6)、STFKNWPF L(配列番号7)若しくはLP PAWQPFL(配列番号8)、又はこれらの任意の組み合わせである、項(27)に記載の方法。

[00549](29)1個又は複数のペプチド抗原がNKLC EYNVFHNKTFELP RARVNT(配列番号2)及び/又はNK LSEHKTF CNK TLEQGQMYQ I NT(配列番号3)である、項(27)に記載の方法。

50

[00550] (30) ステップ (b) が、5 個以上の異なる可溶化されたペプチド抗原を脂質ベシクル粒子と混合することを含む、項 (24) ~ (27) のいずれか一項に記載の方法。

[00551] (31) ステップ (b) が、最大で 30 個の異なる可溶化されたペプチド抗原を脂質ベシクル粒子と混合することを含む、項 (30) に記載の方法。

[00552] (32) ステップ (b) が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の異なる可溶化されたペプチド抗原を脂質ベシクル粒子と混合することを含む、項 (30) に記載の方法。

[00553] (33) ステップ (b) の後、異なる可溶化されたペプチド抗原のそれぞれが、少なくとも約 0.1 mg/ml、0.2 mg/ml、0.3 mg/ml、0.4 mg/ml、0.5 mg/ml、0.6 mg/ml、0.7 mg/ml、0.8 mg/ml、0.9 mg/ml 又は 1.0 mg/ml の濃度である、項 (30) ~ (32) のいずれか一項に記載の方法。

10

[00554] (34) ステップ (b) の後、異なる可溶化されたペプチド抗原のそれぞれが約 0.5 mg/ml の濃度である、項 (30) ~ (33) のいずれか一項に記載の方法。

[00555] (35) 異なる可溶化されたペプチド抗原が、等電点、溶解度、安定性及び/又は免疫原性に関する任意の特性に基づいて事前に選択されていない、項 (30) ~ (34) のいずれか一項に記載の方法。

[00556] (36) 異なる可溶化されたペプチド抗原が、等電点、溶解度、安定性及び/又は免疫原性に関する 1 つ又は複数の異なる特性を有する、項 (30) ~ (35) のいずれか一項に記載の方法。

20

[00557] (37) 異なる可溶化されたペプチド抗原が、異なる長さ、配列、分子量、電荷、極性、疎水性及び/又は親水性を有する、項 (30) ~ (36) のいずれか一項に記載の方法。

[00558] (38) ステップ (b) が、可溶化された T ヘルパーエピトープを任意の順序で脂質ベシクル粒子及び 1 個又は複数のペプチド抗原と混合することをさらに含む、項 (24) ~ (37) のいずれか一項に記載の方法。

[00559] (39) ステップ (b) が、10 ~ 15 個のネオ抗原を 1 つの可溶化された T ヘルパーエピトープと混合することを含み、T ヘルパーエピトープがアミノ酸配列 A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 1) を含む、項 (37) に記載の方法。

30

[00560] (40) ステップ (b) が、任意の順序でアジュバントを脂質ベシクル粒子及び 1 個又は複数のペプチド抗原と混合することをさらに含む、項 (24) ~ (39) のいずれか一項に記載の方法。

[00561] (41) ステップ (b) が、(b1) 1 個又は複数のペプチド抗原及び可溶化された T ヘルパーエピトープを含む抗原ストックを用意すること、及び (b2) 抗原ストックを脂質ベシクル粒子と混合して混合物を形成することを含む、項 (38) 又は (39) に記載の方法。

[00562] (42) ステップ (b1) において、抗原ストックが、約 2.0 mg/ml の濃度のそれぞれ可溶化された抗原を用いて 100 mM の水酸化ナトリウム中で調製される、項 (41) に記載の方法。

40

[00563] (43) 抗原ストックが、 6.0 ± 0.5 の pH を有する 50 mM の酢酸ナトリウムで 1 : 1 に希釈されて、約 1.0 mg/ml の濃度でそれぞれ可溶化された抗原を用意する、項 (42) に記載の方法。

[00564] (44) ステップ (b2) における混合の後かつ乾燥の前に混合物の pH が 10 ± 1.0 に調整される、項 (41) ~ (43) のいずれか一項に記載の方法。

[00565] (45) ステップ (b2) が、混合物をアジュバントと混合することをさらに含む、項 (41) ~ (44) のいずれか一項に記載の方法。

[00566] (46) アジュバントがポリ I : C ヌクレオチドアジュバントである、項 (40) 又は (45) に記載の方法。

[00567] (47) 乾燥の前に、ステップ (b) において形成された混合物の滅菌濾過の

50

ステップをさらに含む、項(1)～(46)のいずれか一項に記載の方法。

[00568](48)ステップ(b)及び(c)の間に、脂質ベシクル粒子が120nmの平均粒径及び0.1の多分散指数(PDI)を依然として有することを確認するステップをさらに含む、項(1)～(47)のいずれか一項に記載の方法。

[00569](49)乾燥が凍結乾燥、噴霧凍結乾燥又は噴霧乾燥によって行われる、項(1)～(48)のいずれか一項に記載の方法。

[00570](50)乾燥が凍結乾燥によって行われる、項(49)に記載の方法。

[00571](51)凍結乾燥が、ステップ(b)の混合物を含む1つ又は複数の容器をバッグに入れること、バッグを密封して密封されたユニットを形成すること、及び密封されたユニットを凍結乾燥機において凍結乾燥することによって行われる、項(50)に記載の方法。

10

[00572](52)バッグが滅菌オートクレープバッグである、項(51)に記載の方法。

[00573](53)凍結乾燥機が卓上凍結乾燥機である、項(51)又は(52)に記載の方法。

[00574](54)凍結乾燥機が凍結乾燥の間に2つ以上の密封されたユニットを含有する、項(51)～(53)のいずれか一項に記載の方法。

[00575](55)それぞれ密封されたユニットが、ステップ(a)及び(b)によって調製された異なる混合物を含有する、項(54)に記載の方法。

[00576](56)ステップ(c)の乾燥の前及び/又は後に、少なくとも1つの可溶化された治療剤の安定性を評価するステップをさらに含む、項(1)～(55)のいずれか一項に記載の方法。

20

[00577](57)治療剤の安定性がHPLC分析によって評価される、項(56)に記載の方法。

[00578](58)治療剤がペプチド抗原であり、それぞれのペプチド抗原の最初のペプチド濃度の少なくとも80%が、乾燥前に評価された時に未分解の形態で維持される、項(56)又は(57)に記載の方法。

[00579](59)それぞれのペプチド抗原の最初のペプチド濃度の少なくとも75%が、乾燥直後に評価された時に未分解の形態で維持される、項(60)に記載の方法。

[00580](60)それぞれのペプチド抗原の最初のペプチド濃度の少なくとも70%が、乾燥の3か月後に評価された時に未分解の形態で維持される、項(58)又は(59)に記載の方法。

30

[00581](61)1個又は複数のペプチド抗原が乾燥の3か月後まで分解を示さない、項(58)～(60)のいずれか一項に記載の方法。

[00582](62)疎水性担体に、項(1)～(61)のいずれか一項に記載の方法によって得られる乾燥調製物を可溶化するステップを含む、医薬組成物を調製するための方法。

[00583](63)疎水性担体が鉱油又は鉱油溶液中のオレイン酸マンニドである、項(62)に記載の方法。

[00584](64)疎水性担体がモンタニド(登録商標)ISA51である、項(62)又は(63)に記載の方法。

40

[00585](65)項(62)～(64)のいずれか一項に記載の方法によって調製される医薬組成物。

[00586](66)脂質が、疎水性担体中に単一層脂質集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体の形態である、項(65)に記載の医薬組成物。

[00587](67)疎水性担体中において、脂質が、疎水性担体に対して外側に向いている脂質の疎水性部分、及びコアとして凝集する脂質の親水性部分を有する、逆ミセル及び/又は脂質の凝集体の形態である、項(66)に記載の医薬組成物。

[00588](68)単一層脂質集合体を有する1つ又は複数の脂質系構造体、少なくとも1つの治療剤、及び疎水性担体を含む、安定で水を含まない医薬組成物。

[00589](69)治療剤が、ペプチド抗原、ポリペプチドをコードするDNA又はRN

50

A ポリヌクレオチド、ホルモン、サイトカイン、アレルゲン、触媒活性DNA（デオキシリボザイム）、触媒活性RNA（リボザイム）、アンチセンスRNA、干渉RNA、インタゴミル、低分子薬物、生物学的薬物、抗体、又はこれらのいずれか1つの断片若しくは誘導体、或いはこれらの混合物である、項（68）に記載の医薬組成物。

[00590]（70）治療剤が1個又は複数のペプチド抗原である、（68）又は（69）に記載の医薬組成物。

[00591]（71）1個又は複数のペプチド抗原が20～30個のアミノ酸長である、項（70）に記載の医薬組成物。

[00592]（72）1個又は複数のペプチド抗原がネオ抗原である、項（70）又は（71）に記載の医薬組成物。

[00593]（73）1個又は複数のペプチド抗原が、ヒトパピローマウイルス（HPV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、呼吸器多核体ウイルス（RSV）、パチルス・アントラシス、プラスモジウム属又はサバイビンポリペプチドに由来する、項（70）に記載の医薬組成物。

[00594]（74）1個又は複数のペプチド抗原が、FTELTLEGF（配列番号4）、LMLGEFLKL（配列番号5）、RISTFKNWP K（配列番号6）、STFKNWPFL（配列番号7）若しくはLPPAWQPFL（配列番号8）、又はこれらの任意の組み合わせである、項（73）に記載の医薬組成物。

[00595]（75）1個又は複数のペプチド抗原がNKLC EYNVFHNKTFELPRARVNT（配列番号2）及び／又はNKLS EHKTF CNK TLEQGQMYQINNT（配列番号3）である、項（73）に記載の医薬組成物。

[00596]（76）5個以上の異なるペプチド抗原を含む、項（70）～（73）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00597]（77）最大で30個の異なるペプチド抗原を含む、項（76）に記載の医薬組成物。

[00598]（78）10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の異なるペプチド抗原を含む、項（76）に記載の医薬組成物。

[00599]（79）ペプチド抗原のそれぞれが独立して約0.1μg/μl～約5.0μg/μlの間の濃度である、項（76）～（78）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00600]（80）ペプチド抗原のそれぞれが独立して約0.25μg/μl、約0.5μg/μl、約0.75μg/μl、約1.0μg/μl、約1.25μg/μl、約1.5μg/μl、約1.75μg/μl、約2.0μg/μl、約2.25μg/μl又は約2.5μg/μlの濃度である、項（76）～（79）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00601]（81）それぞれ少なくとも約0.5μg/μlの濃度で10個以上の異なるペプチド抗原を含む、項（76）～（80）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00602]（82）ペプチド抗原が、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する任意の特性に基づいて事前に選択されていない、項（76）～（81）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00603]（83）ペプチド抗原が、等電点、溶解度、安定性及び／又は免疫原性に関する1つ又は複数の異なる特性を有する、項（76）～（82）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00604]（84）ペプチド抗原が、異なる長さ、配列、分子量、電荷、極性、疎水性及び／又は親水性を有する、項（76）～（83）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00605]（85）Tヘルパーエпитープ及びアジュバントの一方又は両方をさらに含む、項（68）～（84）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00606]（86）疎水性担体が鉱油又は鉱油溶液中のオレイン酸マンニドである、項（68）～（85）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00607]（87）疎水性担体がモンタニド（登録商標）ISA51である、項（68）～（86）のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

[00608] (8 8) 単一層脂質集合体を有する 1 つ又は複数の脂質系構造体が、疎水性担体に対して外側に向いている脂質の疎水性部分、及びコアとして凝集する脂質の親水性部分を有する脂質の凝集体を含む、項 (6 8) ~ (8 7) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00609] (8 9) 単一層脂質集合体を有する 1 つ又は複数の脂質系構造体が逆ミセルを含む、項 (6 8) ~ (8 8) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00610] (9 0) 少なくとも 1 つの治療剤の 1 つ又は複数の脂質系構造体の内側にある、項 (6 8) ~ (8 9) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00611] (9 1) 少なくとも 1 つの治療剤の 1 つ又は複数の脂質系構造体の外側にある、項 (6 8) ~ (9 0) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

[00612] (9 2) 澄明な溶液である、項 (6 8) ~ (9 1) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00613] (9 3) 目に見える沈殿物を有さない、項 (6 8) ~ (9 2) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00614] (9 4) 単一層集合体を有する 1 つ又は複数の脂質系構造体、5 個以上の異なるペプチドネオ抗原、及び疎水性担体を含む、安定で水を含まない医薬組成物であって、ペプチドネオ抗原が、等電点、溶解度、安定性及び / 又は免疫原性に関する任意の特性に基づいて事前に選択されていない、医薬組成物。

[00615] (9 5) 最大で 3 0 個の異なるペプチドネオ抗原を含む、項 (9 4) に記載の医薬組成物。

20

[00616] (9 6) 1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9 又は 2 0 個の異なるペプチドネオ抗原を含む、項 (9 4) 又は (9 5) に記載の医薬組成物。

[00617] (9 7) ペプチドネオ抗原のそれぞれが独立して約 0 . 1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ~ 約 5 . 0 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ の間の濃度である、項 (9 4) ~ (9 6) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00618] (9 8) ペプチドネオ抗原のそれぞれが独立して約 0 . 2 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 、約 0 . 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 、約 0 . 7 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 、約 1 . 0 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 、約 1 . 2 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 、約 1 . 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 、約 1 . 7 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 、約 2 . 0 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 、約 2 . 2 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 又は約 2 . 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ の濃度である、項 (9 4) ~ (9 7) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

[00619] (9 9) それぞれ少なくとも約 0 . 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ の濃度で少なくとも 1 4 個の異なるペプチドネオ抗原を含む、項 (9 4) ~ (9 8) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00620] (1 0 0) ペプチドネオ抗原が 2 0 ~ 3 0 個のアミノ酸長である、項 (9 4) ~ (9 9) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00621] (1 0 1) ペプチドネオ抗原が、等電点、溶解度、安定性及び / 又は免疫原性に関する 1 つ又は複数の異なる特性を有する、項 (9 4) ~ (1 0 0) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00622] (1 0 2) ネオ抗原が、異なる長さ、配列、分子量、電荷、極性、疎水性及び / 又は親水性を有する、項 (9 4) ~ (1 0 1) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

[00623] (1 0 3) T ヘルパーエпитープ及びアジュバントの一方又は両方をさらに含む、項 (9 4) ~ (1 0 2) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00624] (1 0 4) 疎水性担体が鉱油又は鉱油溶液中のオレイン酸マンニドである、項 (9 4) ~ (1 0 3) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00625] (1 0 5) 疎水性担体がモンタニド (登録商標) I S A 5 1 である、項 (9 4) ~ (1 0 4) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00626] (1 0 6) 脂質系構造体が、疎水性担体に対して外側に向いている脂質の疎水性部分を有する小胞構造体である、項 (9 4) ~ (1 0 5) のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00627] (1 0 7) 単一層脂質集合体を有する 1 つ又は複数の脂質系構造体が、疎水性

50

担体に対して外側に向いている脂質の疎水性部分、及びコアとして凝集する脂質の親水性部分を有する、逆ミセル及び／又は脂質の凝集体を含む、項(94)～(106)のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00628](108)少なくとも1つの治療剤の1つ又は複数が脂質系構造体の内側にある、項(94)～(107)のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00629](109)少なくとも1つの治療剤の1つ又は複数が脂質系構造体の外側にある、項(94)～(108)のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00630](110)澄明な溶液である、項(94)～(109)のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00631](111)目に見える沈殿物を有さない、項(94)～(110)のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

[00632](112)注射による投与のためのマイクロドーズとして製剤化できる、項(65)～(111)のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00633](113)マイクロドーズが、約 $50\mu\text{l}$ 、 $55\mu\text{l}$ 、 $60\mu\text{l}$ 、 $65\mu\text{l}$ 、 $70\mu\text{l}$ 又は $75\mu\text{l}$ の単回用量の体積である、項(112)に記載の医薬組成物。

[00634](114)脂質系構造体のサイズが約 2nm ～約 10nm の間の直径である、項(66)～(112)のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[00635](115)項(65)～(114)のいずれか一項に記載の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、対象において抗体及び／又はCTL免疫応答を誘導する方法。

[00636](116)がん又は感染性疾患を処置するための、項(115)に記載の方法。

20

[00637](117)対象において抗体及び／又はCTL免疫応答を誘導するための、項(65)～(114)のいずれか一項に記載の医薬組成物の使用。

[00638](118)がんの処置のための、項(117)に記載の使用。

[00639](119)感染性疾患の処置のための、項(117)に記載の使用。

[00640](120)抗体及び／又はCTL免疫応答を誘導するための医薬組成物を調製するためのキットであって、項(1)～(62)のいずれか一項に記載の方法によって調製される乾燥調製物を含む容器、及び疎水性担体を含む容器を含むキット。

[00641](121)乾燥調製物が10個以上の異なるペプチド抗原を含む、項(120)に記載のキット。

30

[00642](122)疎水性担体が鉱油又は鉱油溶液中のオレイン酸マンニドである、項(120)又は(121)に記載のキット。

【0480】

[00643]本発明を以下の非限定的な実施例によってさらに説明する。

【実施例】

【0481】

[00644]本発明を、添付の図面に関する非限定的な実施例によって以下に記載する。

【0482】

[00645]実施例1

[00646]乾燥脂質／治療剤の調製物

40

[00647]乾燥脂質／治療剤の調製物を調製するために、DOPC及びコレステロール(Lipoid GmbH、ドイツ)の10:1(w:w)の均質な混合物を、 132mg/ml の濃度で、 100mM 、 $\text{pH}7.0$ のリン酸ナトリウムに 300RPM で約1時間振とうしながら添加して脂質ベシクル粒子を形成した。次いで、材料を $0.2\mu\text{m}$ のポリカーボネート膜に25回通過させ、 $0.1\mu\text{m}$ のポリカーボネート膜に10回通過させることによって混合物を分粒して、 120nm の平均粒径とともに 0.1 のPDIに達した。分粒された脂質ベシクル粒子に、両方とも 300RPM で約15分間振とうしながら、HPV抗原(Y9Tペプチド; YMLNLGPET; 配列番号10)を 0.5mg/mL の濃度で添加し、アジュバント(dIdCオリゴヌクレオチド)を 0.2mg/mL の濃度で添加した。次いで、Tヘルパーペプチド(A16Lペプチド; AQYIKANS

50

K F I G I T E L ; 配列番号 1) を、 0 . 2 5 m g / m l の濃度で、分粒された脂質ベシクル粒子 / 抗原 - アジュバントの混合物に 3 0 0 R P M で約 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、ミリバック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる連続滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。この乾燥脂質 / 治療剤の調製物を以下バッチ # 1 と称する。

【 0 4 8 3 】

[00648]異なる緩衝液を用いて乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製するために、 1 0 0 m M、p H 7 . 0 のリン酸ナトリウムを 5 0 m M、p H 7 . 0 のリン酸ナトリウムと置き換える以外は上記と同じプロトコールに従った。2 つのバッチを調製した。これらは以下バッチ # 2 及びバッチ # 3 と称する。

10

【 0 4 8 4 】

[00649]疎水性担体への可溶化

[00650]乾燥脂質 / 治療剤の調製物のバッチ # 1、# 2 及び # 3 をそれぞれ別々に油希釈剤 (すなわちモンタニド (登録商標) I S A 5 1) に可溶化して、下記の表に示すプロファイルを有する最終組成物を得た。

【表 3】

表 1: 例示的な生成物のプロファイル

構成成分	最終組成物中の濃度 (mg/ml)
抗原(複数可)、例えばタンパク質／ペプチド	1.00
アジュバント	0.40
T ヘルパーペプチド	0.50
DOPC/コレステロール (10:1,w/w)	132.00

20

【 0 4 8 5 】

[00651]可溶化後に得られた組成物の特性を以下の表及び図 1 ~ 3 に記載する。

【表 4】

表 2: 生成物の特性 - 緩衝液及び pH の効果

30

プロトコール及び バッチサイズ	製剤化方法	凍結乾燥前の 粒径及び pH 分析	生成物の説明
バッチ#1 160 バイアル	リン酸ナトリウム, 100 mM, pH 7.0	109.7 nm 0.087 pdi pH 7.05	わずかな沈殿物を 有する澄明な溶液 [図 1]
バッチ#2 190 バイアル	リン酸ナトリウム, 50 mM, pH 7.0	108.5 nm 0.083 pdi pH 6.92	澄明な溶液 [図 2]
バッチ#3 190 バイアル	リン酸ナトリウム, 50 mM, pH 7.0	114.1 nm 0.087 pdi pH 6.96	澄明な溶液 [図 3]

40

【 0 4 8 6 】

[00652]ペプチド抗原を事前に形成された分粒された脂質ベシクル粒子の外側に添加した場合でさえ、抗原が疎水性担体に可溶化されて、著しい沈殿物なしで澄明な溶液を得ることが可能であったことを予想外に見出した。

【 0 4 8 7 】

[00653]実施例 2

50

[00654]分粒された脂質ベシクル粒子を使用する効果を分粒されていない脂質ベシクル粒子と比較した。

【0488】

[00655]分粒された脂質ベシクル粒子を用いて組成物を製剤化するために、以下の抗原を使用した以外はバッチ#1を調製するための実施例1の手順に従った。

【0489】

バッチ#4aを、List Biologics (Campbell, CA) から購入した炭疽菌組換え防御抗原を用いて調製した。この組換えタンパク質は、およそ83,000ダルトンの分子量を有し、パチルス・アントラシスによって産生される3つのタンパク質の外毒素の細胞結合成分である防御抗原に相当する。製剤中において、0.25mg/mlの濃度を使用した。この抗原は、本明細書において、rPAと言う。この製剤において、バッチ#1において使用したdIdCオリゴヌクレオチドアジュバントを、リポペプチドアジュバント(R-Pam3Cys)と置き換えた。

10

【0490】

バッチ#4bを、Genscript (Piscataway, NJ) から購入したHIVペプチド抗原のAMQ9 (AMQMLKETI; 配列番号12) 及びRGP10 (RGPGRFVETI; 配列番号11) を用いて調製した。RGP10ペプチドは、HIV-1 gp120のV3ループに由来しており、AMQ9ペプチドは、H-2Kdハプロタイプのマウスについてのgagの免疫優性のMHCクラスIエピトープである。両方とも特異的免疫応答を誘導することが公知である。両方とも製剤中で0.5mg/mlの濃度で使用した。

20

【0491】

バッチ#4cを、アミノ酸配列: FTELT LGEF (配列番号4)、LMLGEFLKL (配列番号5)、RISTFKNWPK (配列番号6)、STFKNWPF L (配列番号7) 及びLPPAWQPFL (配列番号8) を有する、Polypeptide (San Diego, CA) から購入した5個の合成サバイピンペプチド抗原を用いて調製した。この製剤において、バッチ#1との比較として、同じTヘルパーエピトープ及びアジュバントを使用した。それぞれのサバイピンペプチド抗原を、製造の間、製剤中で0.5mg/mlの濃度で使用した。

【0492】

バッチ#4dを、二量体形態のRSVペプチド抗原 (SHe Aペプチド; NKLC EYNVFHNKTFELPRARVNT; 配列番号2) を用いて調製した。製剤中において、Tヘルパーエピトープは含まれず、dIdCオリゴヌクレオチドアジュバントを、リポペプチドアジュバント(R-Pam3Cys)と置き換えた。

30

【0493】

[00656]分粒されていないベシクル粒子を用いて組成物を製剤化するために、120nmの粒径とともに0.1のPDIに達するための材料を分粒するステップを行わなかった以外はバッチ#1を調製するための実施例1の手順に従った。バッチ#4a、4b、4c及び4cについて上記に記載の異なる抗原をそれぞれ用いて4バッチを調製した。詳細には、分粒されていない脂質ベシクル粒子の組成物は、バッチ#5a (rPA抗原); バッチ#5b (HIV抗原); バッチ#5c (サバイピン抗原); 及びバッチ#5d (RSV抗原) であった。使用した抗原の量は分粒された脂質ベシクル粒子の組成物と同じであった。

40

【0494】

[00657]モンタニド (登録商標) ISA51への可溶化後に得られた組成物の特性を下記の表及び図4に記載する。

【表 5】

表 3: 生成物の特性 - 分粒されたもの対分粒されていないものの効果

抗原	分粒された脂質ベシクル粒子の組成物	分粒されていない脂質ベシクル粒子の組成物
rPA	バッチ 4a - 乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に澄明な溶液を形成した。 [図 4, パネル A]	バッチ 5a - 乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際にわずかに濁った溶液を形成した。 [図 4, パネル E]
HIV	バッチ 4b - 乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に澄明な溶液を形成した。 [図 4, パネル B]	バッチ 5b - 乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に濁った溶液を形成した。 [図 4, パネル F]
サバイビン	バッチ 4c - 乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に澄明な溶液を形成した。 [図 4, パネル C]	バッチ 5c - 乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に濁った溶液を形成した。 [図 4, パネル G]
RSV	バッチ 4d - 乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に澄明な溶液を形成した。 製造の間の分粒された脂質ベシクルの平均粒径は 83.96nm、pdi は 0.092 であった。 [図 4, パネル D]	バッチ 5d - 乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際にわずかな沈殿物を有する濁った溶液を形成した。 製造の間の分粒されていない脂質ベシクルの平均粒径は 2959nm、pdi は 0.362 であった。 [図 4, パネル H]

【0495】

[00658]結果は、分粒された脂質ベシクル粒子を用いて調製された組成物が、分粒されていない脂質ベシクル粒子を用いて調製された組成物と比較して、改善された医薬品の性質を有していることを実証する。

【0496】

[00659]実施例 3

[00660]コレステロールを用いて及び用いずに、分粒された脂質ベシクル粒子を調製する効果を研究した。

【0497】

[00661]分粒された D O P C / コレステロールの製剤

[00662]バッチ # 6 : D O P C / コレステロールの脂質ベシクル粒子を用いて乾燥サバイビン抗原調製物を調製するために、D O P C 及びコレステロール (L i p o i d G m b H、ドイツ) の 10 : 1 (w : w) の均質な混合物を 100 mM、pH 9.5 の酢酸ナトリウムに 300 RPM で約 1 時間振とうしながら添加した。次いで、材料を、0.2 μm のポリカーボネート膜に 25 回通過させ、次いで 0.1 μm のポリカーボネート膜に 10 回通過させることによって混合物を分粒して、120 nm の粒径とともに 0.1 の PDI に達した。5 個の合成サバイビンペプチド抗原 (F T E L T L G E F (配列番号 4)、L M L G E F L K L (配列番号 5)、R I S T F K N W P K (配列番号 6)、S T F K N W P F L (配列番号 7) 及び L P P A W Q P F L (配列番号 8) ; それぞれ 0.5 mg / mL) 及び d I d C オリゴヌクレオチドアジュバント (0.2 mg / mL) を 300 RPM で約 15 分間振とうしながら添加した。次いで、T ヘルパーペプチド (A 16 L ペプチド ; A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 1) ; 0.25 mg / mL) を分粒された脂質ベシクル粒子 / サバイビン - アジュバントの混合物に 300 RPM で約 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、ミリパック - 20 P V D F の 0.22 μ

m膜に混合物を通過させることによる連続滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。

【 0 4 9 8 】

[00663]バッチ # 7 : D O P C / コレステロールの脂質ベシクル粒子を用いて乾燥 R S V 抗原調製物を調製するために、D O P C 及びコレステロール (L i p o i d G m b H 、ドイツ) の 1 0 : 1 (w : w) の均質な混合物を 1 0 0 m M 、 p H 6 . 0 のリン酸ナトリウムに 3 0 0 R P M で約 1 時間振とうしながら添加した。次いで、材料を、0 . 2 μ m のポリカーボネート膜に 2 5 回通過させ、次いで 0 . 1 μ m のポリカーボネート膜に 1 0 回通過させることによって混合物を分粒して、1 2 0 n m の粒径とともに 0 . 1 の P D I に達した。二量体形態の R S V ペプチド抗原 (S H e A ペプチド ; N K L C E Y N V F H N K T F E L P R A R V N T (配列番号 2) ; 0 . 2 5 m g / m L) 及びリボペプチドアジュバント (R - P a m 3 C y s ; 0 . 0 2 m g / m L) を 3 0 0 R P M で約 1 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、単一のミリパック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。

10

【 0 4 9 9 】

[00664]分粒された D O P C 製剤

[00665]バッチ # 8 : D O P C の脂質ベシクル粒子のみを用いて乾燥サバイビン抗原調製物を調製するために、D O P C (L i p o i d G m b H 、ドイツ) を 1 0 0 m M 、 p H 9 . 5 の酢酸ナトリウムに 3 0 0 R P M で約 1 時間振とうしながら添加した。次いで、材料を、0 . 2 μ m のポリカーボネート膜に 2 5 回通過させ、次いで 0 . 1 μ m のポリカーボネート膜に 1 0 回通過させ、次いで 0 . 0 8 μ m のポリカーボネート膜に 1 5 回通過させることによって混合物を分粒して、1 0 0 n m の粒径とともに 0 . 1 の P D I に達した。5 個の合成サバイビンペプチド抗原 (F T E L T L G E F (配列番号 4) 、 L M L G E F L K L (配列番号 5) 、 R I S T F K N W P K (配列番号 6) 、 S T F K N W P F L (配列番号 7) 及び L P P A W Q P F L (配列番号 8) ; それぞれ 0 . 5 m g / m L) 及び d I d C オリゴヌクレオチドアジュバント (0 . 2 m g / m L) を 3 0 0 R P M で約 1 5 分間振とうしながら添加した。次いで、T ヘルパーペプチド (A 1 6 L ペプチド ; A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 1) ; 0 . 2 5 m g / m L) を分粒された脂質ベシクル粒子 / サバイビン抗原 - アジュバントの混合物に 3 0 0 R P M で約 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、ミリパック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる連続滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。

20

30

【 0 5 0 0 】

[00666]バッチ # 9 : D O P C の脂質ベシクル粒子のみを用いて乾燥 R S V 抗原調製物を調製するために、D O P C (L i p o i d G m b H 、ドイツ) を 1 0 0 m M 、 p H 6 . 0 のリン酸ナトリウムに 3 0 0 R P M で約 1 時間振とうしながら添加した。次いで、材料を、0 . 2 μ m のポリカーボネート膜に 2 5 回通過させ、次いで 0 . 1 μ m のポリカーボネート膜に 1 0 回通過させ、次いで 0 . 0 8 μ m のポリカーボネート膜に 1 5 回通過させることによって混合物を分粒して、1 0 0 n m の粒径とともに 0 . 1 の P D I に達した。R S V ペプチド抗原 (S H e A ペプチド ; N K L C E Y N V F H N K T F E L P R A R V N T (配列番号 2) ; 0 . 2 5 m g / m L) 及びリボペプチドアジュバント (R - P a m 3 C y s ; 0 . 0 2 m g / m L) を 3 0 0 R P M で約 1 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、単一のミリパック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。

40

【 0 5 0 1 】

[00667]乾燥脂質 / 治療剤の調製物のバッチ # 6 、 # 7 、 # 8 及び # 9 を、それぞれ別々にモンタニド (登録商標) I S A 5 1 に可溶化して、最終組成物を得た。

【 0 5 0 2 】

50

[00668]可溶化後に得られた組成物の特性を以下の表及び図5に記載する。

【表6】

表4 生成物の特性 - DOPC/コレステロール対 DOPC 単独

パラメーター	DOPC + コレステロール	DOPC 単独
サバイビン抗原についての粒径	111.1 nm, 0.038 pdi	97.07 nm, 0.086 pdi
RSV 抗原についての粒径	115.10 nm, 0.092 pdi	97.94 nm, 0.098 pdi
サバイビン抗原についての凍結乾燥及び可溶化の詳細	乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に澄明な溶液を形成した。 [図5, パネルA]	乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に澄明な溶液を形成した。 [図5, パネルC]
RSV 抗原についての凍結乾燥及び可溶化の詳細	乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に澄明な溶液を形成した。 [図5, パネルB]	乾燥調製物は良好に見える。可溶化の際に澄明な溶液を形成した。 [図5, パネルD]
安定性	≥5 年	継続中

10

20

【0503】

[00669]結果は、DOPC及びコレステロールの両方又はDOPC単独を用いて調製された組成物が油担体への可溶化の点で同様の医薬品の性質を有していることを実証する。

【0504】

[00670]実施例4

[00671]本明細書に開示されるこの方法はペプチドネオ抗原の製剤化において例示的な適用を有する。

【0505】

[00672]この実施例で使用されるネオ抗原を下記の表に示す。これらの抗原は、一般的なマウスメラノーマ腫瘍であるB16-F10由来のCastleら(2012年)によって特定及び公開された。

30

40

50

【表 7】

表5: ネオ抗原ペプチドのリスト

ペプチド	配列
Mut17	VVDRNPQFLDPVLAYLMKGLCEKPLAS (配列番号34)
Mut20	FRRKAFLHWYTGEAMDEMEFTEAESNM (配列番号35)
Mut22	PKPDFSQLQRNILPSNPRVTRFHINWD (配列番号36)
Mut24	TAVITPPTTTTKKARVSTPKPATPSTD (配列番号37)
Mut25	STANYNTSHLNNDVWQIFENPVDWKEK (配列番号26)
Mut28	NIEGIDKLTQLKKPFLVNNKINKIENI (配列番号38)
Mut29A	IPSGTTILNCFHDVLSGKLSGGSPGVP (配列番号39)
Mut29B	SFACLRQPSQGPTVGVKGAAGGGYAQ (配列番号40)
Mut30	PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL (配列番号27)
Mut36	CGTAAFFINFIAIYHHASRAIPFGTMVA (配列番号41)
Mut44	EFKHIKAFDRTFANNPGPMVVFATPGM (配列番号28)
Mut45	ECRITSNFVIPSEYWVEEKEEKQKLIQ (配列番号42)
Mut48	SHCHWNDLAVIPAGVVHNWDFEPRKVS (配列番号43)
Mut50	GFSQPLRRLVLHVVSAAQAERLARAEE (配列番号44)

10

20

【0506】

[00673]簡潔には、上記に列挙されたネオ抗原を、単一の滅菌容器中で、次々に秤量した。TヘルパーペプチドのA16L(AQYIKANSKFIGITEL; 配列番号1)も、ネオ抗原の半分の重量で、秤量された粉末混合物に添加した。次いで、全ネオ抗原/Tヘルパー粉末混合物を、1分間のボルテックス及び2分間の超音波処理によって、ネオ抗原当たり2mg/gmの濃度の100mMの水酸化ナトリウム溶液及び1mg/gmのA16に溶解した。ネオ抗原ストック溶液を調製するために、等しい割合(1:1)の100mM、pH6.0の酢酸ナトリウム溶液を素早く添加して、ネオ抗原当たり1mg/gmの濃度、及びA16ペプチド抗原について0.5mg/gmに達した。

30

【0507】

[00674]別途、ヌクレオチドアジュバントストックを、滅菌水中のDNA系ポリI:Cポリヌクレオチドアジュバント(dIdC)を混合することによって10mg/mLの濃度で調製し、0.2mg/mLの濃度で製剤中で使用した。

【0508】

[00675]希釈したネオ抗原ストック溶液に、事前に調製した50mM、pH6.0の酢酸ナトリウム中のDOPC:コレステロール(10:1、w/w)の分粒された脂質ベシクル粒子(<100nmのサイズと<0.1のPDI)のストックを添加し、マグネチック攪拌子/シェーカーを用いて、300RPMで3分間よく混合した。次に、ヌクレオチドアジュバントストックをネオ抗原の分粒された脂質ベシクル粒子に添加し、300RPMで2分間振とう/攪拌することによってよく混合した。pHを氷酢酸で10±1に調整した。分粒された脂質ベシクル粒子/ネオ抗原の混合物のサイズ及びpHを、次のステップに進める前にDLSゼータサイザー ナノ-S粒径分析器を用いて確認した。

40

【0509】

[00676]滅菌濾過を、分粒された脂質ベシクル粒子/ネオ抗原の混合物に対して、ミリパック-20滅菌グレードのデュラポア(Durapore)膜に混合物を通過させることによって行った。濾過を<55psiの医療グレードの窒素ガス圧を用いて行った。手短に、分粒された脂質ベシクル粒子/ネオ抗原の混合物を、ミリパック-20PVDFの

50

0.22 μm膜を取り付けた圧力容器に入れ、40 psiの窒素ガスを用いて通過させて滅菌濾過を完了した。

【0510】

[00677]滅菌濾過後、適した体積（例えば1.0 mg / バイアル）の分粒された脂質ベシクル粒子 / ネオ抗原の滅菌混合物を、乾燥調製物がその後モンタニド（登録商標）ISA 51に可溶化された時に下記の一覧にした濃度を提供するように滅菌バイアルに無菌充填した。

【表 8】

表 6: 製剤の構成成分及び濃度

構成成分	標準製剤, mg/mL (最終の油溶化ワクチン製品)
脂質混合物	132.0
ネオ抗原ペプチド(複数可)	0.5(各ペプチド)
Tヘルパーペプチドエピトープ	0.25
オリゴヌクレオチドアジュバント	0.4
酢酸ナトリウム	100 mM, pH 10±1

10

【0511】

[00678]凍結乾燥のために使用されるバイアル及び他の製品の仕様は、詳細には下記の表のものである。

【表 9】

表 7: 一次包装の仕様(製品の容器)

仕様	説明
バイアル	2mL 又は 3mL の 13MM FTN BB LYO PF バイアル
ストッパー	フルオロテック凍結乾燥クロージャー13MM, シングルベントストッパー
シール	ウェスト-スペクトル フリップ-オフ 13mm シール
オートクレーブバッグ	フィッシャーブランドのインスタント密封滅菌パウチ (19 × 33 cm), カタログ#01-812-55 フィッシャーブランドのインスタント密封滅菌パウチ (30 × 46 cm), カタログ#01-812-58

20

30

【0512】

[00679]凍結乾燥のために、無菌充填バイアルに入れ、滅菌条件下で滅菌オートクレーブバッグに密封し、次いで凍結乾燥した（図 6 ~ 10）。凍結乾燥はおよそ75時間にわたって行った。ここで、一次乾燥を - 30 で50時間、二次乾燥を + 25 で16時間行った。より詳細には、凍結乾燥は以下のプロトコールに従って行った。

40

【表 10】

表 8: 例示的な凍結乾燥サイクル

ステップ	ステップの種類	棚温度 設定点(°C)	真空	ステップの 時間(時:分)	条件温度 設定点(°C)
1	投入	20			
2	凍結	5		00:20	
3	凍結	5		02:00	
4	凍結	-40		01:00	
5	凍結	-40		02:00	
6	排出	-40	100mT	-	-75
7	乾燥	-40	100mT	02:30	-75
8	一次乾燥	-30	100mT	08:20	-75
9	一次乾燥	-30	100mT	50:00	-75
10	二次乾燥	25	100mT	16:40	-75
11	二次乾燥	25	100mT	5:00	-75

10

【0513】

[00680]次いで、乾燥脂質 / 治療剤の調製物をモンタニド（登録商標）ISA51に可溶化して、水を含まない組成物として構成成分を製剤化した。下記の表は、脂質構成成分と比較した、ネオ抗原、Tヘルパーペプチド及びオリゴヌクレオチドアジュバントのモル比を示す。

【表 11】

表9: 脂質濃度と比較した14個のネオ抗原、A16L及びオリゴヌクレオチドアジュバントのモル濃度

構成成分	構成成分の詳細	油溶化ワクチン最終製品中の構成成分のモル濃度	油溶化ワクチン最終製品中の脂質のモル濃度
14 個のネオ抗原	Mut-17, 20, 22, 24, 25, 28, 29A, 29B, 30, 36, 44, 45, 48, 50	2.32 mM	183 mM
T ヘルパーペプチド	A16L	0.139 mM	
アジュバント	オリゴヌクレオチド	0.051 mM	
抗原(複数可)/アジュバント対脂質のモル比		2.51 mM: 183 mM (1:73 の比率)	

30

【0514】

[00681]凍結乾燥された製品は、均質に乾燥されたケーキを生じ、モンタニド（登録商標）ISA51への可溶化の際に、澄明からわずかに濁った溶液を形成した（図11を参照されたい）。

40

【0515】

[00682]実施例 5

[00683]14個のネオ抗原及びA16L Tヘルパーペプチドを含有する、実施例4に記載のようにして調製された組成物を、HPLC分析に供して、凍結乾燥の前及び後のペプチドの安定性を評価した。HPLC機器の条件及び試験したグラジエントプロファイルを下記の表に示す。

50

【表 1 2】

表 10: HPLC 機器の条件

HPLC モデル	アジレント (Agilent) 1100 シリーズ (G1322A 真空脱気装置, G1311A クォータナリーポンプ, G1329A オートサンプラー, G1316A カラムコンパートメント, G1315B DAD, G1330A オートサンプラーサーモスタット)
HPLC 法	NEO.M (又はそのクローン)
HPLC カラム	フェノメネックスエアリス (PhenomenexAeris) PEPTIDEXB-C18, 3.6µm, 250 × 4.6mm, 100 Å, ガードカートリッジあり
移動相 A	水中の 0.1%TFA
移動相 B	アセトニトリル中の 0.1%TFA
移動相 C	メタノール
流速	1.0 mL/分
注入体積	50 µL
カラム温度	45 °C
オートサンプラー温度	5°C
検出器	UV
検出 (nm)	215
実行時間 (分)	90
予定時間 (分)	10

10

20

【表 1 3】

表 11: グラジエントプロファイル

ステップ番号	時間 (分)	% MPA	% MPB	% MPC
1	0.0	83.0	17.0	0.0
2	12.0	75.0	25.0	0.0
3	25.0	74.0	26.0	0.0
4	40.0	70.0	30.0	0.0
5	75.0	55.0	45.0	0.0
6	75.01	0.0	0.0	100.0
7	90	0.0	0.0	100.0

30

【 0 5 1 6 】

[00684]実験条件：

I P Q C 溶液：

I P Q C 溶液を、メタノール、次いで移動相 A で、例えば以下のようにして希釈する。

- 1 0 0 m g の処理中の試験溶液
- + 4 5 0 µ L のメタノール、混合する
- + 4 5 0 µ L の移動相 A、混合する

ボルテックスによって混合する。脂質を含有するサンプルはわずかに濁っている。希釈係数 = 1 0 倍

凍結乾燥（放出及び安定性試験のため）：

凍結乾燥物を超純水で可溶化する。3 ~ 4 個のガラスビーズを加え、1 分間激しくボルテックスして、完全な均質化を確実にする。この溶液を、メタノール、その後移動相 A で、例えば以下のようにして希釈する。

40

50

1 0 0 m g の処理中の試験溶液
 + 4 5 0 μ L のメタノール、混合する
 + 4 5 0 μ L の移動相 A、混合する
 ボルテックスによって混合する。サンプル調製物はわずかに濁っている。希釈係数 = 2 0 倍

【 0 5 1 7 】

[00685] 1 4 個のネオ抗原及び A 1 6 L T ヘルパーペプチドを含有する標準の H P L C クロマトグラムを図 1 2 に示す。

【 0 5 1 8 】

[00686] 実施例 4 に従って調製したネオ抗原及び A 1 6 L の材料を、凍結乾燥の前及び後の両方で、H P L C 法を用いて定量的に特徴付けた。凍結乾燥前の 1 4 個のネオ抗原及び A 1 6 L T ヘルパーペプチドを示す H P L C クロマトグラムを図 1 3 に示す。

10

【 0 5 1 9 】

[00687] 凍結乾燥後の T = 0、T = 1 M 及び T = 3 M について得られた H P L C クロマトグラムを、図 1 4 ~ 1 6 にそれぞれ示す。乾燥調製物を、H P L C 分析のために水に可溶化させた。T = 0 は、サンプルが凍結乾燥機から取り出された日である。T = 1 M 及び T = 3 M は、- 2 0 で保管された乾燥調製物で、T = 0 のそれぞれ 1 か月後及び 3 か月後である。計算されたペプチドの回収を下記の表に表す。

【表 1 4】

表 12: 凍結乾燥前後のネオ抗原及び A16L の回収

20

サンプル 時間	検証されていない HPLC アッセイからの量 (mg/mL)														
	Mut 24	Mut 29b	A16L	Mut 28	Mut 45	Mut 22	Mut 20	Mut 44	Mut 48	Mut 25	Mut 30	Mut 50	Mut 29a	Mut 17	Mut 36
凍結乾燥 前	0.56	0.56	0.25	0.53	0.47	0.54	0.42	0.51	0.47	0.56	0.53	0.42	0.54	0.51	0.47
凍結乾燥 後 T=0	0.44	0.48	0.25	0.50	0.44	0.51	0.41	0.47	0.38	0.54	0.51	0.42	0.38	0.27	0.19
凍結乾燥 後 T=1M	0.38	0.44	0.23	0.50	0.42	0.47	0.47	0.44	0.37	0.50	0.51	0.44	0.34	0.23	0.25
凍結乾燥 後 T=3M	0.37	0.48	0.27	0.51	0.46	0.54	0.54	0.50	0.41	0.56	0.56	0.46	0.35	0.26	0.31

30

【 0 5 2 0 】

[00688] 図 1 3 ~ 1 6 及び上記の表 1 2 に示す結果は、ペプチドが、記載の方法によって調製された場合に乾燥脂質 / 治療剤の調製物中で安定であり、ペプチド濃度が設定された仕様内であったことを示す（設定された仕様：ネオ抗原について 0 . 4 0 ~ 0 . 6 0 m g / m L、及び A 1 6 L について 0 . 2 ~ 0 . 3 m g / m L）。

【 0 5 2 1 】

[00689] 実施例 6

[00690] 6 ~ 8 週齢の病原菌不含 C 5 7 B L / 6 N C r l マウスを、Charles River Laboratories (St. Constant, PQ) から購入し、協会ガイドラインに従って、水及び餌を自由に与え、フィルター制御された空気循環下で飼育した。ネオ抗原を G e n s c r i p t によって合成し、上記の表 5 に列挙した。

40

【 0 5 2 2 】

[00691] グループ 1 のマウス (n = 5) を、p H 1 0 . 5 の酢酸ナトリウム緩衝液中に、それぞれ 5 0 マイクログラムの用量の 1 4 個のネオ抗原、5 0 マイクログラムの用量の A 1 6 L T ヘルパーペプチド、4 0 マイクログラムの用量の D N A 系ポリ I : C を含有する、水性の非デガ形成ワクチン 1 0 0 マイクロリットルでワクチン接種した。

【 0 5 2 3 】

[00692] グループ 2 のマウス (n = 5) を、I S A V G 油中に、それぞれ 5 0 マイクログラムの用量の 1 4 個のネオ抗原、5 0 マイクログラムの用量の A 1 6 L T ヘルパー

50

ペプチド及び40マイクログラムの用量のDNA系ポリI:C、12ミリグラムのDOPC、1.2ミリグラムのコレステロールを含有する油性のデポ形成ワクチン100マイクロリットルでワクチン接種した。

【0524】

[00693]ワクチン接種の8日後、マウスを殺し、脾臓を収集した。脾細胞を、IFN-ガンマELISPOTプレート(BD Biosciences)中で、無負荷(バックグラウンド; BG)、又は非関連(irrelevant)ペプチド(RAHYNIVTF; 配列番号9)若しくは個々のネオ抗原(17、20、22、24、25、28、29A、29B、30、36、44、45、48、50)で負荷された合成樹状細胞で刺激した。18時間の培養後、プレートを展開し、スポット形成単位(SFU)の数を、Immunospot Reader(C.T.L.)を用いて計数した。結果を平均応答±SEMとして図17に示す。統計解析を、それぞれのペプチドに应答する群を比較するボンフェローニ事後検定による二元配置ANOVAによって行った。

10

【0525】

[00694]結果は、油性製剤が単回免疫化後に水性製剤よりも良好に免疫応答を増強することを実証する。

【0526】

[00695]実施例7

[00696]実施例1のバッチ#4c(サバイピン)及びバッチ#4a(rPA)の組成物を、小角X線散乱技法(SAXS)によって分析して、組成物が分粒された脂質ベシクル粒子で調製された場合に、疎水性担体中に存在する脂質系構造体のサイズ及び形状を決定した。

20

【0527】

[00697]SAXSパターンを、45kV/0.65mAのマイクロフォーカス銅アノード、モンタル オプティクス(MONTAL OPTICS)及びサンプルから27.3cmの距離のバンテック(VANTEC)2000 2D検出器を備えたブルカーAXSナノスター(Bruker AXS Nanostar)システムを用いて、シャープブルック大学、QC、カナダで収集した。距離を、測定の前に、ベヘン酸銀標準で校正した。サンプルを0.6mm直径の特別なガラスキャピラリーに注入し、密封し、所定の位置に置いた。位置の微調整をナノグラフィーによって行い、サンプルの正確な位置を見つけるために、ステップ当たり2秒、X及びYでスキャンスイープした。散乱強度を、ATSA 2.3ソフトウェアのPrimus GNOM 3.0プログラムで処理した。

30

【0528】

[00698]スキャンを、(1)モンタニドISA51 VG(ブランク対照)、(2)バッチ#4c組成物、及び(3)バッチ#4a組成物について測定した。スキャンを、モンタニドISA51 VGサンプル、バッチ#4cサンプル、及びバッチ#4aサンプルについて、800秒曝露して行った。モンタニドISA51 VGを、バッチ#4c及びバッチ#4aサンプルから数学的に減算して、二体間距離分布関数によって粒径及び形状を決定した。ガウシアン曲線の形状は、球形粒子の典型である。

【0529】

[00699]図18は、モンタニドISA51 VG(ブランク対照)についての結果を示す。粒子構造体は観察されなかった。このため、粒径の評価は行わなかった。

40

【0530】

[00700]図19は、バッチ#4c組成物(サバイピン)についての結果を示す。画像は、脂質が単一層集合体を形成することを示す。粒径の評価によって示されるように、 D_{max} 粒径は約5.8nmであり、SAXSによって推定された形状は球形である。これは、逆ミセルのサイズに一致する。

【0531】

[00701]図20は、バッチ#4a組成物(rPA)についての結果を示す。画像は、脂質が単一層集合体を形成することを示す。粒径の評価によって示されるように、 D_{max} 粒

50

径は約 4 . 0 n m であり、S A X S によって推定された形状は球形である。これは、逆ミセルのサイズに一致する。

【 0 5 3 2 】

[00702]実施例 8

[00703]M S 8 0 油担体中で D O P C / コレステロール又は S 1 0 0 レシチンを用いて分粒された脂質ベシクル粒子を調製する効果を研究した。M S 8 0 油は、別々に購入し、混合した、鉱油 (S i g m a A l d r i c h) 及びスパン 8 0 (F l u k a) の混合物である。

【 0 5 3 3 】

[00704]M S 8 0 中の分粒された D O P C / コレステロールの製剤

10

[00705]バッチ # 1 0 : 組換え防御抗原 (r P A ; バッチ # 4 a 中と同じ抗原) を含む乾燥調製物を調製するために、D O P C / コレステロール (L i p o i d G m b H、ドイツ) の 1 0 : 1 (w : w) の均質な混合物を 1 0 0 m M、p H 7 . 0 のリン酸ナトリウムに 3 0 0 R P M で約 1 時間振とうしながら添加した。次いで、材料を、0 . 2 μ m のポリカーボネート膜に 2 5 回通過させ、次いで 0 . 1 μ m のポリカーボネート膜に 1 0 回通過させることによって混合物を分粒して、1 2 0 n m の粒径とともに 0 . 1 の P D I に達した。r P A 抗原 (0 . 2 5 m g / m L) 及びリポペプチドアジュバント (R - P a m 3 C y s ; 0 . 0 2 m g / m l) を 3 0 0 R P M で約 1 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、ミリパック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる連続滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。乾燥調製物に、7 0 0 μ l の M S 8 0 油を 5 分間浸漬し、続いて 2 分間振とうしながら添加した。図 2 1 A に示すように、澄明な溶液が得られた。

20

【 0 5 3 4 】

[00706]バッチ # 1 1 : 二量体形態の R S V ペプチド抗原 (S H e A ペプチド ; N K L C E Y N V F H N K T F E L P R A R V N T ; 配列番号 2) を含む乾燥調製物を調製するために、D O P C / コレステロール (L i p o i d G m b H、ドイツ) の 1 0 : 1 (w : w) の均質な混合物を 1 0 0 m M、p H 6 . 0 のリン酸ナトリウムに 3 0 0 R P M で約 1 時間振とうしながら添加した。次いで、材料を、0 . 2 μ m のポリカーボネート膜に 2 5 回通過させ、次いで 0 . 1 μ m のポリカーボネート膜に 1 0 回通過させることによって混合物を分粒して、1 2 0 n m の粒径とともに 0 . 1 の P D I に達した。R S V ペプチド抗原二量体 (0 . 2 5 m g / m L) 及びリポペプチドアジュバント (R - P a m 3 C y s ; 0 . 0 2 m g / m l) を 3 0 0 R P M で約 1 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、単一のミリパック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。乾燥調製物に、4 5 0 μ l の M S 8 0 油を 5 分間浸漬し、続いて 2 分間振とうしながら添加した。図 2 1 B に示すように、澄明な溶液が得られた。

30

【 0 5 3 5 】

[00707]M S 8 0 中の分粒された S 1 0 0 レシチンの製剤

[00708]バッチ # 1 2 : 二量体形態の R S V ペプチド抗原 (S H e A ペプチド ; N K L C E Y N V F H N K T F E L P R A R V N T ; 配列番号 2) を含む乾燥調製物を調製するために、リポイド S 1 0 0 レシチン (L i p o i d G m b H、ドイツ) を 1 0 0 m M、p H 6 . 0 の酢酸ナトリウムに 3 0 0 R P M で約 1 時間振とうしながら添加した。次いで、材料を、0 . 2 μ m のポリカーボネート膜に 2 5 回通過させ、次いで 0 . 1 μ m のポリカーボネート膜に 1 0 回通過させることによって混合物を分粒して、1 2 0 n m の粒径とともに 0 . 1 の P D I に達した。R S V ペプチド抗原二量体 (0 . 2 5 m g / m L) 及びリポペプチドアジュバント (R - P a m 3 C y s ; 0 . 0 2 m g / m l) を 3 0 0 R P M で約 1 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、単一のミリパック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。乾燥調製物に、4 5 0 μ l の M S 8 0 油を 5 分間浸漬し、続いて 2 分間振とうしながら添加した。

40

50

図 2 1 C に示すように、澄明な黄色溶液が得られた。溶液は、S 1 0 0 (大豆レシチン) 材料が黄色であり、そのため可溶化された組成物も黄色であるので、黄色である。

【 0 5 3 6 】

[00709] バッチ # 1 3 : S 1 0 0 レシチンベシクル粒子を用いて乾燥サバイビン抗原調製物を調製するために、リポイド S 1 0 0 レシチン (L i p o i d G m b H、ドイツ) を 1 0 0 m M、p H 9 . 5 の酢酸ナトリウムに 3 0 0 R P M で約 1 時間振とうしながら添加した。次いで、材料を、0 . 2 μ m のポリカーボネート膜に 2 5 回通過させ、次いで 0 . 1 μ m のポリカーボネート膜に 1 0 回通過させることによって混合物を分粒して、1 2 0 n m の粒径とともに 0 . 1 の P D I に達した。5 個の合成サバイビンペプチド抗原 (F T E L T L G E F (配列番号 4)、L M L G E F L K L (配列番号 5)、R I S T F K N W P K (配列番号 6)、S T F K N W P F L (配列番号 7) 及び L P P A W Q P F L (配列番号 8) ; それぞれ 0 . 5 m g / m L) 及び d I d C オリゴヌクレオチドアジュバント (0 . 2 m g / m L) を 3 0 0 R P M で約 1 5 分間振とうしながら添加した。次いで、T ヘルパーペプチド (A 1 6 L ペプチド ; A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 1) ; 0 . 2 5 m g / m L) を分粒された脂質ベシクル粒子 / サバイビン抗原 - アジュバントの混合物に 3 0 0 R P M で約 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、ミリパック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる連続滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。乾燥調製物に、7 0 0 μ l の M S 8 0 油を 5 分間浸漬し、続いて 2 分間振とうしながら添加した。図 2 1 D に示すように、澄明な黄色溶液が得られた。この場合もやはり、溶液は、S 1 0 0 (大豆レシチン) 材料が黄色であり、そのため可溶化された組成物も黄色であるので、黄色である。

【 0 5 3 7 】

[00710] バッチ # 1 4 : マラリア抗原を含む乾燥調製物を調製するために、サバイビンペプチド抗原及び T ヘルパーエピトープをマラリア V L P 抗原 (ウッドチャック肝炎ウイルスのコア抗原 (W H c A g) に提示されるスポロゾイト周囲 (C S) の T 及び B 細胞エピトープ ; 0 . 2 m g / m L) に置き換えた以外は、バッチ # 1 3 についての上記の手順を繰り返した。乾燥調製物に、5 4 5 μ l の M S 8 0 油を 5 分間浸漬し、続いて 2 分間振とうしながら添加した。図 2 1 E に示すように、澄明な黄色溶液が得られた。この場合もやはり、溶液は、S 1 0 0 (大豆レシチン) 材料が黄色であり、そのため可溶化された組成物も黄色であるので、黄色である。

【 0 5 3 8 】

[00711] M S 8 0 中の分粒された S 1 0 0 レシチン / コレステロールの製剤

[00712] バッチ # 1 5 : G e n s c r i p t (P i s c a t a w a y、N J) から購入した H I V ペプチド抗原の A M Q 9 (A M Q M L K E T I ; 配列番号 1 2) 及び R G P 1 0 (R G P G R A F V T I ; 配列番号 1 1) を含む乾燥調製物を調製するために、リポイド S 1 0 0 レシチン / コレステロール (L i p o i d G m b H、ドイツ) の 1 0 : 1 (w : w) の均質な混合物を 1 0 0 m M、p H 9 . 5 の酢酸ナトリウムに 3 0 0 R P M で約 1 時間振とうしながら添加した。次いで、材料を、0 . 2 μ m のポリカーボネート膜に 2 5 回通過させ、次いで 0 . 1 μ m のポリカーボネート膜に 1 0 回通過させることによって混合物を分粒して、1 2 0 n m の粒径とともに 0 . 1 の P D I に達した。H I V ペプチド抗原 (それぞれ 0 . 5 m g / m L) 及び d I d C オリゴヌクレオチドアジュバント (0 . 2 m g / m L) を 3 0 0 R P M で約 1 5 分間振とうしながら添加した。次いで、T ヘルパーペプチド (A 1 6 L ペプチド ; A Q Y I K A N S K F I G I T E L (配列番号 1) ; 0 . 2 5 m g / m L) を分粒された脂質ベシクル粒子 / H I V 抗原 - アジュバントの混合物に 3 0 0 R P M で約 5 分間振とうしながら添加した。次いで、混合物を、ミリパック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる連続滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。乾燥調製物に、7 0 0 μ l の M S 8 0 油を 5 分間浸漬し、続いて 2 分間振とうしながら添加した。図 2 1 E に示すように、澄明な黄色溶液が得られた。この場合もやはり、溶液は

、S 1 0 0（大豆レシチン）材料が黄色であり、そのため可溶化された組成物も黄色であるので、黄色である。

【 0 5 3 9 】

[00713]可溶化後に得られた組成物の特性を下記の表及び図 2 1 に記載する。

【表 1 5 】

表 13: 生成物の特性 – MS80 中の DOPC/コレステロール又は S100 レシチン

バッチ	抗原	脂質	分粒された脂質ベシクル粒子の組成物
10	rPA	DOPC/コレステロール	図 21A – 澄明な溶液
11	RSV	DOPC/コレステロール	図 21B – 澄明な溶液
12	RSV	S100 レシチン	図 21C – 澄明な黄色溶液
13	サバイビン	S100 レシチン	図 21D – 澄明な黄色溶液
14	マラリア	S100 レシチン	図 21E – 澄明な黄色溶液
15	HIV	S100/コレステロール	図 21F – 澄明な黄色溶液

10

【 0 5 4 0 】

20

[00714]結果は、D O P C / コレステロール、S 1 0 0 レシチン及び S 1 0 0 レシチン / コレステロールを用いて調製された分粒された脂質ベシクル粒子を用いて調製された組成物がすべて M S 8 0 油担体への可溶化の際に澄明な溶液を提供したことを実証する。これは、モンタニド I S A 5 1 中の界面活性剤（すなわちオレイン酸マンニド）が適切な医薬組成物を得るために重大な意味を持たないことを例証する。

【 0 5 4 1 】

[00715]実施例 9

[00716]乾燥脂質 / 治療剤の調製物

[00717]乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製するために、D O P C 及びコレステロール（L i p o i d G m b H、ドイツ）の 1 0 : 1（w : w）の均質な混合物を、1 3 2 m g / m l の濃度で、1 0 0 m M、p H 9 . 5 の酢酸ナトリウムに 3 0 0 R P M で約 1 時間振とうしながら添加して脂質ベシクル粒子を形成した。次いで、材料を 0 . 2 μ m のポリカーボネート膜に 2 5 回通過させ、0 . 1 μ m のポリカーボネート膜に 1 0 回通過させることによって混合物を分粒して、1 2 0 n m の平均粒径とともに 0 . 1 の P D I に達した。低分子薬物（シクロホスファミド）を、2 . 0 m g / m L の濃度で、分粒された脂質ベシクル粒子に 3 0 0 R P M で約 1 5 分間攪拌しながら添加した。次いで、混合物を、ミリパック - 2 0 P V D F の 0 . 2 2 μ m 膜に混合物を通過させることによる連続滅菌濾過に供した。滅菌溶液をバイアルに等分し、凍結乾燥して、乾燥脂質 / 治療剤の調製物を調製した。この乾燥脂質 / 治療剤の調製物を以下バッチ # 1 6 と称する。図 2 2 に示すように、乾燥調製物の外観は良好に見える、すなわち乾燥し、白色及び非崩壊性である。

30

40

【 0 5 4 2 】

[00718]疎水性担体への可溶化

[00719]バッチ # 1 6 の乾燥脂質 / 治療剤の調製物は、油希釈剤（すなわちモンタニド（登録商標）I S A 5 1 V G）に可溶化して、4 . 0 m g / m L のシクロホスファミド及び 1 3 2 m g / m l の D O P C / コレステロール（1 0 : 1、w / w）を有する最終組成物を提供した。

【 0 5 4 3 】

[00720]図 2 2 に示すように、本明細書に開示される方法を使用することによって、疎水性担体にシクロホスファミドを可溶化して、粒子を含まない澄明からわずかに濁った溶液を得ることが可能であった。

50

【 0 5 4 4 】

[00721]本明細書に引用されるすべての刊行物及び特許出願は、個々の刊行物又は特許出願のそれぞれが、あたかも参照によって組み込まれることを具体的かつ個々に示したかのように、参照によって本明細書に組み込まれる。いずれの刊行物の引用も出願日前のその開示内容に関するものであり、本発明が、発明前の効力によって、そのような刊行物に先行する権利を有さないことを認めるものとして解釈されるべきではない。

【 0 5 4 5 】

[00722]前述の発明を、明瞭に理解する目的で、図示及び実施例によってある程度詳細に記載してきたが、当業者であれば、本発明の教示を考慮すると、添付の特許請求の範囲の精神又は範囲から逸脱することなく、ある程度の変更及び改変をそこに行ってもよいことは容易に明らかである。

10

【 0 5 4 6 】

[00723]本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈が明らかに他を指示していない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。他の定義がない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者に通常理解されるものと同じ意味を有する。

【 0 5 4 7 】

[00724]本明細書及び特許請求の範囲において使用される「及び/又は」という語句は、そのように等位接続した要素の「いずれか又は両方」、すなわち、いくつかの場合において連言的に存在し、他の場合において選言的に存在する要素を意味することが理解されるべきである。「及び/又は」を用いて列挙された複数の要素は、同じように、すなわち、そのように等位接続した要素の「1つ又は複数」と解釈されるべきである。他の要素は、具体的に特定された要素に関連しようとは又は関連しなかつと、「及び/又は」の節によって具体的に特定された要素以外に任意選択で存在していてもよい。したがって、非限定的な例として、「A及び/又はB」への言及は、「含む(comprising)」などのオープンエンドな語と併用された場合に、1つの実施形態において、Aのみ(任意選択でB以外の要素を含む)；別の実施形態において、Bのみ(任意選択でA以外の要素を含む)；さらに別の実施形態において、A及びBの両方(任意選択で他の要素を含む)などを指すことができる。

20

30

【 0 5 4 8 】

[00725]本明細書及び特許請求の範囲において使用される場合、「又は」は、上記で定義した「及び/又は」と同じ意味を包含すると理解されるべきである。例えば、リスト中の項目を区切る場合、「又は」又は「及び/又は」は、包括的なものとして、すなわち、複数の要素の少なくとも1つを含むだけでなく、それらの要素及び任意選択でさらなる列挙されていない項目のうちの2つ以上も含むものと解釈されるものとする。

【 0 5 4 9 】

[00726]本明細書で使用される場合、本明細書においてであろうと、又は添付の特許請求の範囲においてであろうと、「含む(comprising)」、「含む(including)」、「有する(carrying)」、「有する(having)」、「含有する(containing)」、「含む(involving)」などの移行句は、包括的又はオープンエンドであるとして(すなわち、これらに限定されないが、含む(including but not limited to)ことを意味する)、かつこれらの移行句は、列挙されていない要素、材料又は方法のステップを除外するものではないとして理解されるべきである。それぞれ「からなる」及び「実質的に、からなる」という移行句のみは、特許請求の範囲及び本明細書における例示的な実施形態の項に関してクローズ又はセミクローズの移行句である。「からなる」という移行句は、特に列挙されていない任意の要素、ステップ、又は有効成分を除外する。「実質的に、からなる」という移行句は、範囲を、特定の要素、材料又はステップに限定し、かつ本明細書において開示されるか、及び/又は特許請求の範囲に係る発明の基本的な特性(複数可)に実質的に影響を

40

50

与えないものに限定する。

【0550】

参考文献：

- 1) Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S.W.; Zarghami, N.; Hanif ehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; and Nejati-Koshki, K. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res Lett.* 8(1), 102.
- 2) Banga, A. K. *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (Lancaster, PA: Technomic Publishing Co., 1995). 10
- 3) Bobst, A. M.; Langemeier, P. W.; Torrence, P. F.; De Clercq, E. (1981) Interferon Induction by Poly(inosinic acid)·Poly(cytidylic acid) Segmented by Spin-Labels, *Biochemistry* 20(16), 4798-4803.
- 4) Caruthers, M. H.; Beaucage, S. L.; Efca vitch, J. W.; Fisher, E. F.; Matteucci, M. D.; Stabinsky, Y. (1980) New chemical methods for synthesizing polynucleotides, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* (7), 215-223. 20
- 5) Castle, J.C.; Kreiter, S.; Diekmann, J.; Lower, M.; van de Roemer, N.; de Graaf, J.; Selmi, A.; Diken, M.; Boegel, S.; Pare t, C.; Koslowski, M.; Kuhn, A.N.; Britten, C.M.; Huber, C.; Turesi, O.; and Sahin, U. (2012) Exploiting the Mutanome for Tumor V accination. *Cancer Res*, 72(5): 1081-1091. 30
- 6) Celis, E.; Ou, D.; Otvos, L. Jr. (1988) Recognition of hepatitis B surface antigen by human T lymphocytes. Proliferative and cytotoxic responses to a major antigenic d eterminant defined by synthetic peptides, *J. Immunol.* 140, 1808-1815.
- 7) Chong, P.; Zobrist, G.; Sia, C.; Loosmo re, S.; Klein, M. (1992) Identification of T- and B-cell epitopes of the S2 and S3 su bunits of pertussis toxin by use of synthe tic peptides, *Infect Immun.* 60, 4640-4647. 40
- 8) Coligan et al., ed. *Current Protocols i n Immunology*, Wiley Interscience, 2007
- 9) Collins, P.L.; Olmsted, R.A.; Johnson, P.R. (1990) The small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus: com parison between antigenic subgroups A and B, *J Gen Virol.* 71(7), 1571-6.
- 10) Demotz, S.; Lanzavecchia, A.; Eisel, U .; Niemann, H.; Widmann, C.; Corradin, G.P 50

- . (1989) Delineation of several DR-restricted epitopes in tetanus toxin, *J. Immunol.* 142, 394-402.
- 11) Diethelm-Okita, B.M.; Okita, D.K.; Banaszak, L.; Conti-Fine, B.M. (2000) Universal epitopes for human CD4+ cells on tetanus and diphtheria toxins, *J. Infect. Dis.* 181, 1001-1009.
- 12) Flynn, J.L. (1994) Recombinant BCG as an antigen delivery system, *Cell. Mol. Biol.* 40 (suppl. 1), 31-36. 10
- 13) Frezard, F. (1999) Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines, *Braz. J. Med. Bio. Res.* 32, 181-189.
- 14) Greene, J. J.; Alderfer, J. L.; Tazawa, I.; Tazawa, S.; Ts'o, P. O.; O'Malley, J. A.; Carter, W. A. (1978) Interferon induction and its dependence on the primary and secondary structure of poly(inosinic acid).poly(cytidylic acid), *Biochemistry* 17(20), 4214-4220. 20
- 15) Gregoriadis G. (1990) Immunological adjuvants: a role for liposomes, *Immunol. Today* 11, 89-97.
- 16) Hachohen, N.; Wu, C.J.; Fritsch, E.F.; Combination therapy with Neoantigen Vaccine, US20160339090A1.
- 17) Hagstrom, N.J.; Couto, L.B.; Scallan, C.; Burton, M.; McClelland, M.L.; Fields, P. A.; Arruda, V.R.; Herzog, R.W. and High, K.A. (2000) *Blood*, 95, 2536-2542. 30
- 18) Hendrix, C. W.; Margolick, J. B.; Petty, B. G.; Markham, R. B.; Nerhood, L.; Farzadegan, H.; Ts'o, P. O.; Lietman, P. S. (1993) Biologic effects after a single dose of poly(I):poly(C12U) in healthy volunteers, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(3), 429-435.
- 19) High, N.; Mounier, J.; Prevost, M.C.; Sansonetti, P.J. (1992) IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole, *EMBO J* 11, 1991-1999. 40
- 20) Horn, T.; Vasser, M. P.; Struble, M. E.; Crea, R. (1980) Synthesis of oligonucleotides on cellulose. Part II: Design and synthetic strategy to the synthesis of 22 oligodeoxynucleotides coding for gastric inhibitory polypeptide (GIP), *Nucleic Acids Symp. Ser.* (7), 225-232. 50

- 21) Kawaoka, Y.; Yamnikova, S.; Chambers, T. M.; Lvov, D. K.; Webster, R. G. (1990) Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus, *Virology* 179(2), 759-767.
- 22) Kieny, M.P.; Lathe, R.; Drillien, R.; Spehner, D.; Skory, S.; Schmitt, D.; Wiktor, T.; Koprowski, H. and Lecocq, J.P. (1984) Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus, *Nature* 312, 163-166. 10
- 23) Levey, D.L.; Castle, J.C.; Stein, R.B. and Buell, J.S. Vaccines for treatment and prevention of cancer, US20160331821A1.
- 24) Li, X.; Eastman, E.M.; Schwartz, R.J.; and Draghia-Akli, R. (1999) Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences, *Nat. Biotechnol* 17, 241-245.
- 25) Li, Z.L. and Paulin, D. (1991) High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer, *J. Biol. Chem.* 266, 6562-6570. 20
- 26) Li, Z.L. and Paulin, D. (1993) Different factors interact with myoblast-specific and myotube-specific enhancer regions of the human desmin gene, *J. Biol. Chem.* 268, 10403-10415.
- 27) Medaglini, D.; Pozzi, G.; King, T.P. and Fischetti, V.A. (1995) Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordonii* after oral colonization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6868-6872. 30
- 28) Mekalanos, J.J.; Swartz, D.J.; Pearson, G.D.N.; Harford, N.; Groyne, F. and de Wilde, M. (1983) Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development, *Nature* 306, 551-557. 40
- 29) Merrifield, B. (1997) Concept and early development of solid-phase peptide synthesis, *Methods Enzymol.* 289, 3-13.
- 30) Moyle, P. M.; Toth, I. (2008) Self-adjuvanting lipopeptide vaccines, *Curr. Med. Chem.* 15(5), 506-516.
- 31) Mullard A. (2016) The cancer vaccine resurgence, *Nat Rev Drug Disc* 15, 663-665.
- 32) Nakayama, K.; Kelly, S.M. and Curtis, R. III (1988) Construction of an Asd⁺ expr 50

ession cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* strain, *Bio/Technology* 6, 693-697.

33) Roberge, J. Y.; Beebe, X.; Danishefsky, S. J. (1995) A strategy for a convergent synthesis of N-linked glycopeptides on a solid support, *Science* 269(5221), 202-204.

34) Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985. 10

35) Sizemore, D.R.; Branstrom, A.A.; and Sadoff, J.C. (1995) Attenuated *Shigella* as a DNA Delivery Vehicle for DNA-Mediated Immunization, *Science* 270, 299-303.

36) Slingluff, C.L. Jr.; Yamshchikov, G.; Neese, P.; Galavotti, H.; Eastham, S.; Engelhard, V.H.; Kittlesen, D.; Deacon, D.; Hibbitts, S.; Grosh, W.W.; Petroni, G.; Cohen, R.; Wiernasz, C.; Patterson, J.W.; Conway, B.P.; Ross, W.G. (2001) Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100(280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: Immunologic and clinical outcomes, *Clin Cancer Res.* 7, 3012-3024. 20

37) Skwarczynski, M. and Toth, I. (2016) Peptide-based synthetic vaccines, *Chem. Sci.* 7, 842-854.

38) So, N. S. Y.; Ostrowski, M. A.; Gray-Owen, S. D. (2012) Vigorous Response of Human Innate Functioning IgM Memory B Cells upon Infection by *Neisseria gonorrhoeae*, *J. Immunol.* 188(8), 4008-4022. 30

39) Srivastava, P. (2015) Neoepitopes of Cancers: Looking Back, Looking Ahead, *Cancer Immunol. Res.* 3, 969-977.

40) Tartaglia, J.; Perkus, M.E.; Taylor, J.; Norton, E.K.; Audonnet, J.C.; Cox, W.I.; Davis, S.W.; van der Hoeven, J.; Meignier, B.; Riviere, M.; et al. (1992) NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus, *Virology* 188, 217-232. 40

41) Taylor, J.; Meignier, B.; Tartaglia, J.; Languet, B.; VanderHoeven, J.; Franchini, G.; Trimarchi, C.; and Paoletti E. (1995) Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non-avian species, *Vaccine* 13, 539-549.

42) The United States Pharmacopoeia: The N 50

ational Formulary (USP 24 NF19) published in 1999.

43) Webster, R. G.; Laver, W. G.; Air, G. M. Antigenic variation among type A influenza viruses, p. 127-168. In: Palese, P. & Kingsbury, D. W., eds. Genetics of influenza viruses. (New York: Springer-Verlag, 1983).

44) Zhenlin, L.; Lilienbaum, A.; Butler-Browne, G.; Paulin, D. (1989) Human desmin coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development, Gene 78, 243-254.

【図面】

【図 1】

【図 2】

Figure 1

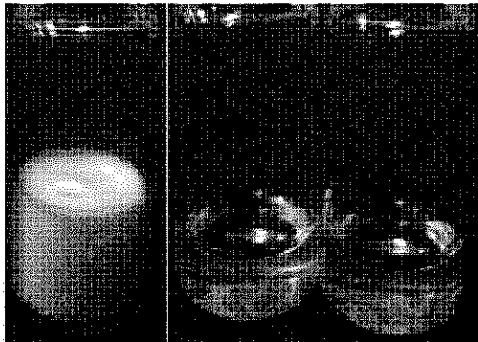
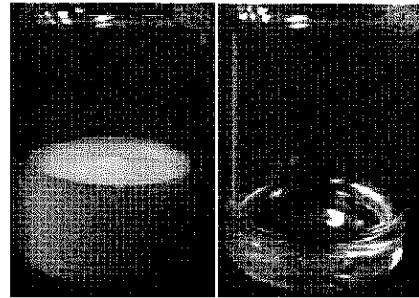


Figure 2



10

20

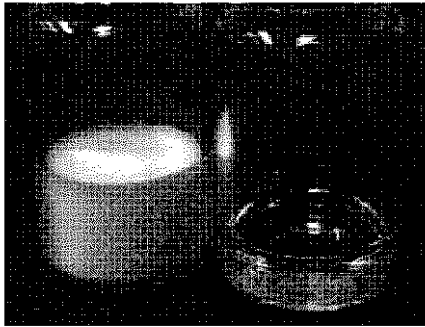
30

40

50

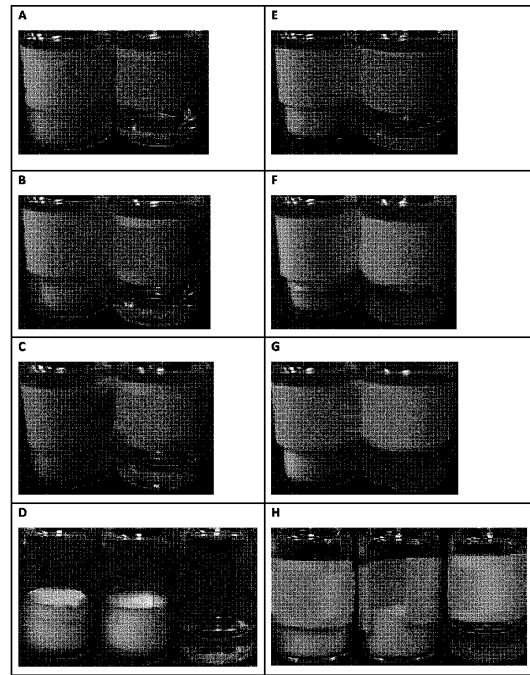
【 図 3 】

Figure 3



【 図 4 】

Figure 4

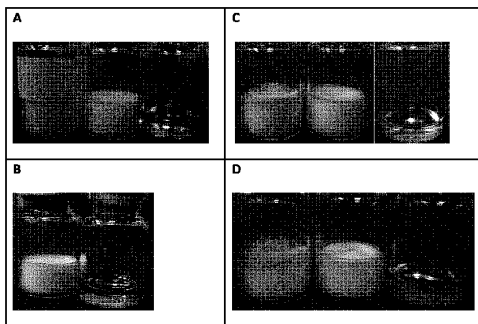


10

20

【 図 5 】

Figure 5



【 図 6 】

Figure 6



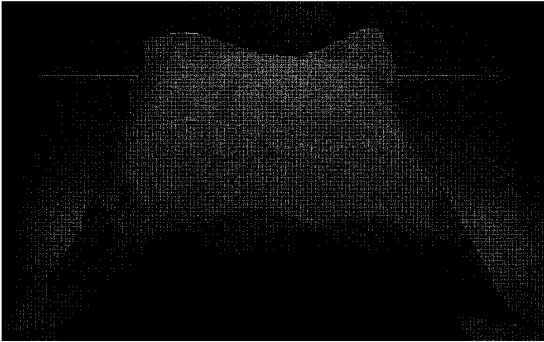
30

40

50

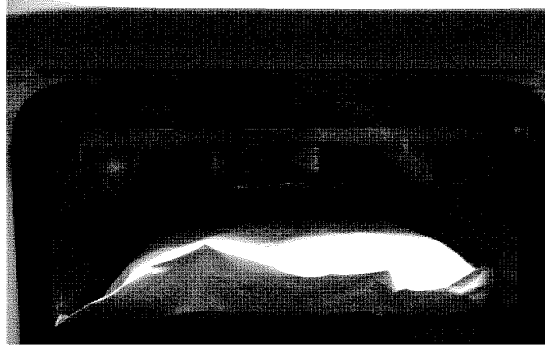
【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】

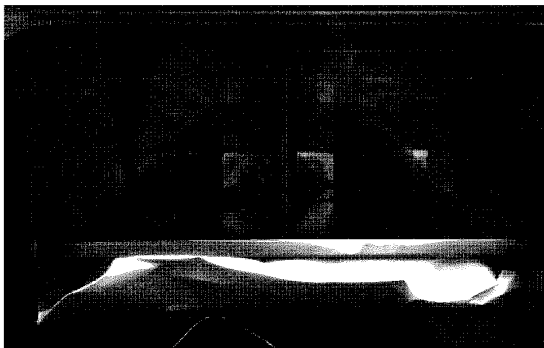
Figure 8



10

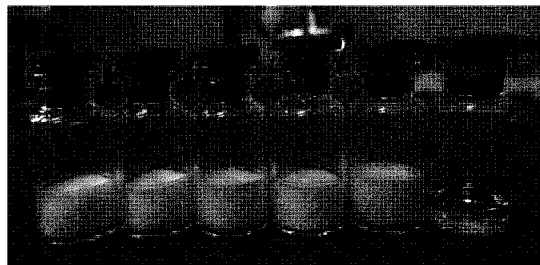
【 図 9 】

Figure 9



【 図 10 】

Figure 10



20

30

40

50

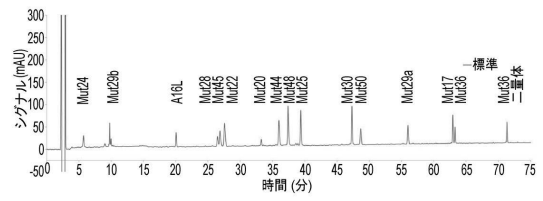
【図 1 1】

Figure 11



【図 1 2】

Figure 12

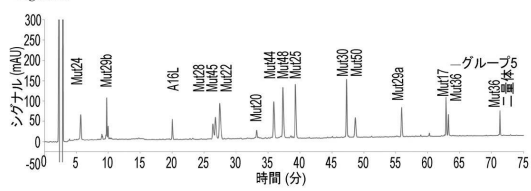


10

20

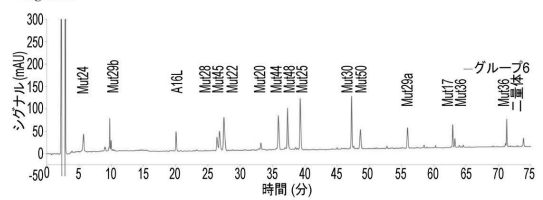
【図 1 3】

Figure 13



【図 1 4】

Figure 14



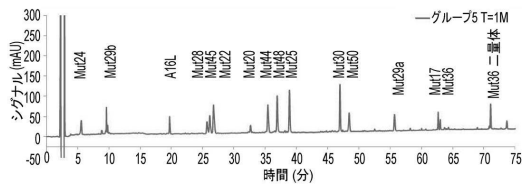
30

40

50

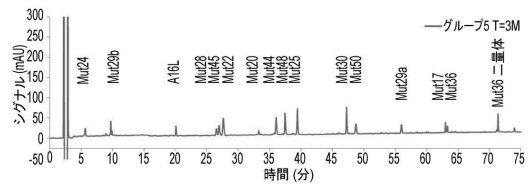
【図 15】

Figure 15



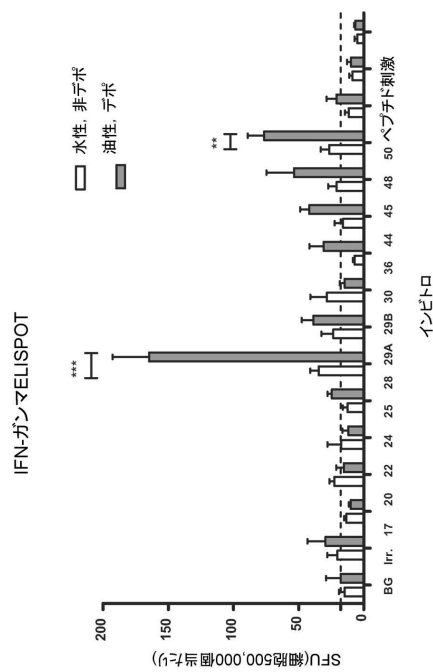
【図 16】

Figure 16



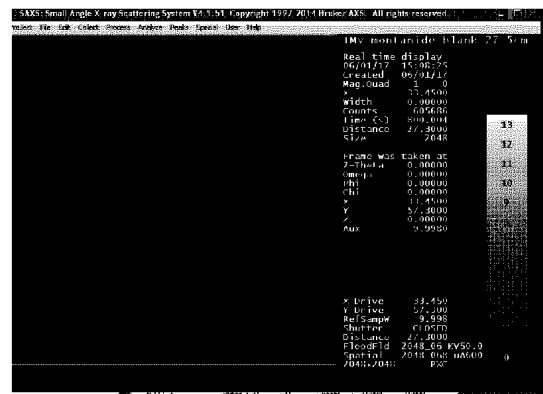
【図 17】

Figure 17



【図 18】

Figure 18



10

20

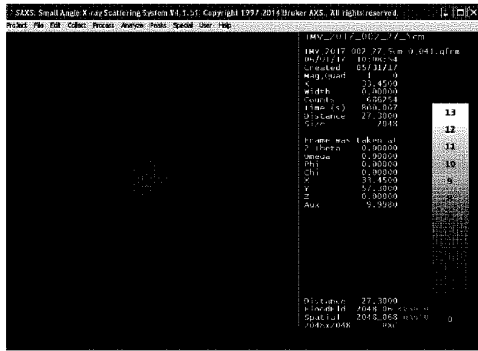
30

40

50

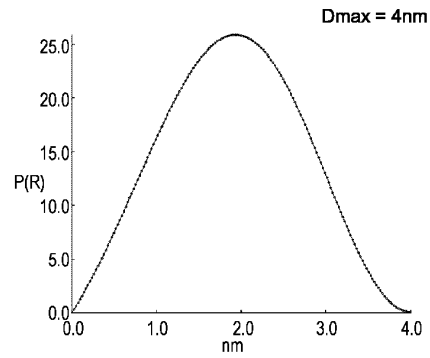
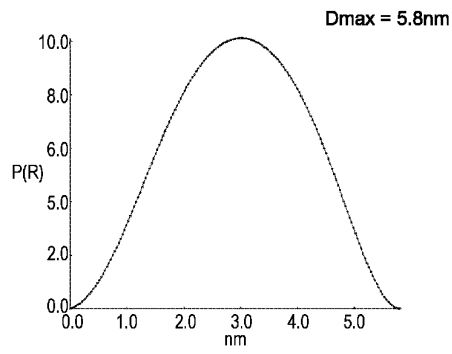
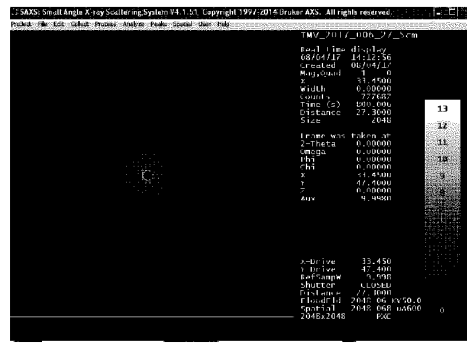
【図 19】

Figure 19



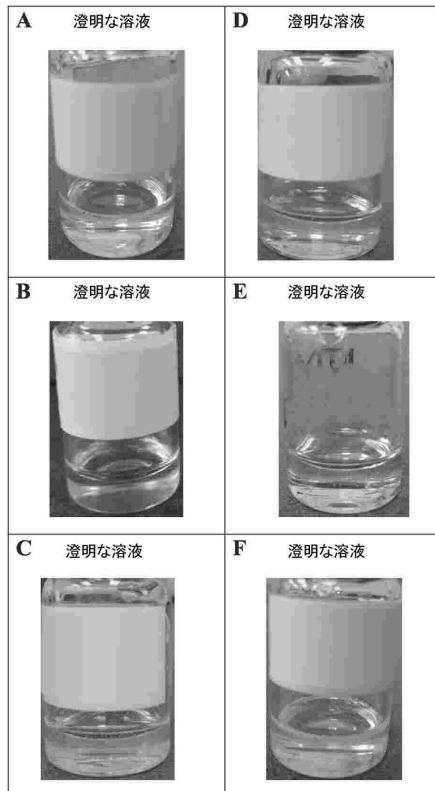
【図 20】

Figure 20



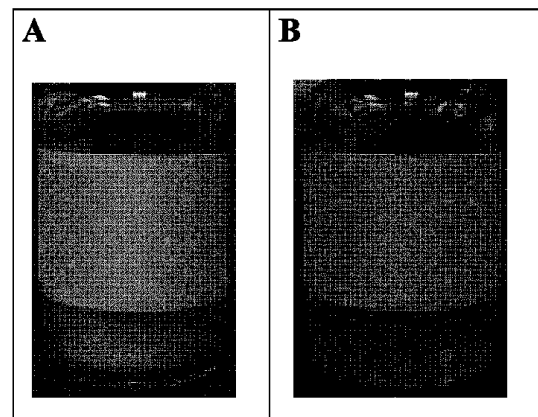
【図 21】

Figure 21



【図 22】

Figure 22



10

20

30

40

50

【配列表】

0007409594000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39
A 6 1 K	9/19 (2006.01)	A 6 1 K	9/19
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 K	39/116(2006.01)	A 6 1 K	39/116
A 6 1 K	39/295(2006.01)	A 6 1 K	39/295
A 6 1 K	47/44 (2017.01)	A 6 1 K	47/44
C 0 7 K	14/025 (2006.01)	C 0 7 K	14/025
C 0 7 K	14/16 (2006.01)	C 0 7 K	14/16
C 0 7 K	14/32 (2006.01)	C 0 7 K	14/32
C 0 7 K	14/445 (2006.01)	C 0 7 K	14/445
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
C 1 2 N	15/117 (2010.01)	C 1 2 N	15/117
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52
C 0 7 K	14/575 (2006.01)	C 0 7 K	14/575
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00

Z N A

Z

Z

(72)発明者 サマトゥール, リーラダー

カナダ, ノバスコシア州 ビー3エム 0エー7, ハリファックス, ファトム コート 4 6

(72)発明者 ラジャゴパラン, ラジカナン

カナダ, ノバスコシア州 ビー2ダブリュー 4ジー3, ダートマス, コリンズ グローヴ 1

(72)発明者 シャーマ, アースヴァン

カナダ, ノバスコシア州 ビー3エヌ 1ゼット1, ハリファックス, コーク ストリート 6 3
0 6, アパート 1 0 2

(72)発明者 カリアペルマル, ヴァラルマシー

カナダ, ノバスコシア州 ビー3エヌ 3エイチ1, ハリファックス, オズボーン ストリート
2 8 3

(72)発明者 ウィアー, ジェネヴィーヴ

カナダ, ノバスコシア州 ビー2ゼット 1エス6, ローレンスタウン, ウェスト ローレンス
タウン ロード 9 3 6

(72)発明者 スタンフォード, マリアンヌ

カナダ, ノバスコシア州 ビー3ゼット 1エヌ3, アッパー タンタロン, パークリン コート
1 3 2

(72)発明者 ペンウェル, アンドレア

カナダ, ノバスコシア州 ビー2ティー 1エス6, フォール リヴァー, ピゴット アヴェニュー
ー 1 2 2

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 7 / 0 8 3 9 6 3 (WO, A 1)

特表2 0 1 4 - 5 1 9 4 9 6 (JP, A)

特開2 0 1 5 - 0 9 6 5 0 5 (JP, A)

特開2 0 1 0 - 1 8 0 2 5 3 (JP, A)

特表2 0 1 6 - 5 1 7 4 2 3 (JP, A)

特表 2 0 1 5 - 5 2 2 0 4 1 (J P , A)

特開 2 0 1 0 - 2 3 5 4 6 4 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 9 7 1 9 6 (W O , A 1)

特表 2 0 1 3 - 5 3 0 1 9 0 (J P , A)

Biochimica et Biophysica Acta , 1993年 , Vol.1151 , pp.201-215

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8

A 6 1 K 9 / 1 2 7

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)