

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-552195

(P2023-552195A)

(43)公表日 令和5年12月14日(2023.12.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127	Z N A	4 B 0 6 4
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18		4 C 0 7 6
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24		4 C 0 8 6
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28		4 H 0 4 5
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全292頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-533878(P2023-533878)	(71)出願人	522261019		
(86)(22)出願日	令和3年12月3日(2021.12.3)		タイダル・セラビューティクス・インコ		
(85)翻訳文提出日	令和5年7月31日(2023.7.31)		ーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/072745		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0		
(87)国際公開番号	WO2022/120388		2 1 3 9、ケンブリッジ、メイン・スト		
(87)国際公開日	令和4年6月9日(2022.6.9)		リート・7 0 0		
(31)優先権主張番号	63/121,801	(74)代理人	100127926		
(32)優先日	令和2年12月4日(2020.12.4)		弁理士 結田 純次		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100140132		
(31)優先権主張番号	63/166,205		弁理士 竹林 則幸		
(32)優先日	令和3年3月25日(2021.3.25)	(74)代理人	100216105		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 守安 智		
(31)優先権主張番号	63/169,296	(72)発明者	ミル・アーリィ		
	最終頁に続く		アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 1		
			8 0 1、ウォーバン、ホウソーン・スト		
			最終頁に続く		

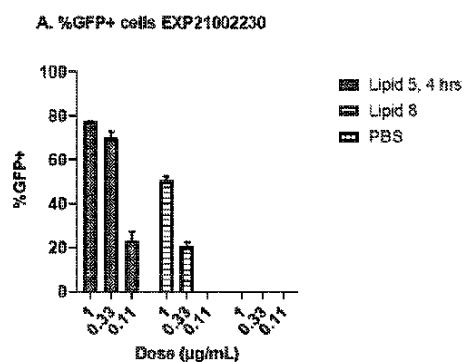
(54)【発明の名称】 イオン化可能なカチオン性脂質および脂質ナノ粒子ならびにその合成および使用の方法

(57)【要約】

細胞（例えば、免疫細胞）への核酸の送達のためのイオン化可能なカチオン性脂質および脂質ナノ粒子、ならびにそのような脂質および標的化脂質ナノ粒子を製造および使用する方法が提供される。

【選択図】図54A

FIG. 54A



【特許請求の範囲】

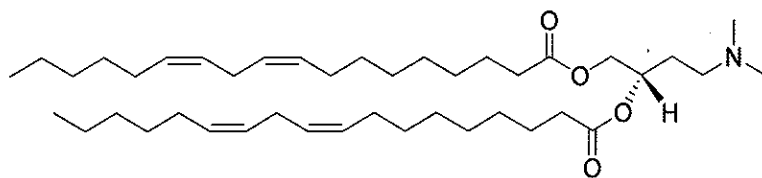
【請求項 1】

免疫細胞への核酸の標的化送達のための脂質ブレンドを含む脂質ナノ粒子（LNP）であって、前記脂質ブレンドは：

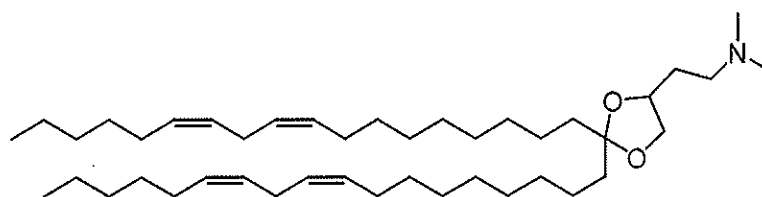
（a）式ⅠⅤの化合物：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含む脂質－免疫細胞標的化基コンジュゲート、および

（b）

【化 1】



または



を含むイオン化可能なカチオン性脂質

を含み、LNPはそこに置かれる核酸をさらに含む、脂質ナノ粒子（LNP）。

【請求項 2】

前記免疫細胞標的化基はT細胞抗原に結合する抗体を含む、請求項 1 に記載の LNP。

【請求項 3】

前記T細胞抗原はCD 3、CD 4、CD 7、CD 8またはその組合せ（例えば、CD 3とCD 8、CD 4とCD 8、またはCD 7とCD 8）である、請求項 2 に記載の LNP。

【請求項 4】

前記免疫細胞標的化基はナチュラルキラー（NK）細胞抗原に結合する抗体を含む、請求項 2 に記載の LNP。

【請求項 5】

前記NK細胞抗原はCD 7、CD 8、CD 5 6またはその組合せ（例えば、CD 7とCD 8）である、請求項 4 に記載の LNP。

【請求項 6】

前記免疫細胞標的化基は、ポリエチレングリコール（PEG）含有リンカーを通して前記脂質ブレンド中の脂質に共有結合している、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 7】

PEG含有リンカーを通して前記免疫細胞標的化基に共有結合している前記脂質は、ジステアロイルグリセロール（DSG）、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（DSPE）、ジミリスティル－ホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイル－グリセロール－ホスホグリセロール（DSPG）、ジミリスティル－グリセロール（DMG）、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジパルミトイル－グリセロール（DPG）またはセラミドである、請求項 6 に記載の LNP。

【請求項 8】

前記PEGはPEG 2000またはPEG 3400である、請求項 6 または 7 に記載の LNP。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

前記脂質－免疫細胞標的化基コンジュゲートは、0.001～0.5モルパーセント（例えば、0.002～0.2モルパーセント）の範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項1～8のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項10】

前記脂質ブレンドは、構造脂質（例えば、ステロール）、中性リン脂質および遊離PEG－脂質の1つまたはそれ以上をさらに含む、請求項1～9のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項11】

前記イオン化可能なカチオン性脂質は、30～70（例えば、40～60）モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項1～10のいずれか1項に記載のLNP。

10

【請求項12】

前記ステロールは、20～70（例えば、30～50）モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項10に記載のLNP。

【請求項13】

前記ステロールはコレステロールである、請求項10または12に記載のLNP。

【請求項14】

前記中性リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスホエタノールアミン（DSPЕ）、1，2－ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスホコリン（DSPC）、1，2－ジオレオイル－sn－グリセロ－3－ホスホエタノールアミン（DOPE）、1，2－ジオレオイル－sn－グリセロ－3－ホスホコリン（DOPC）、スフィンゴミエリンからなる群から選択される、請求項10～13のいずれか1項に記載のLNP。

20

【請求項15】

前記中性リン脂質は、1～10モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項10～14のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項16】

前記遊離PEG－脂質は、PEG改変ホスファチジルエタノールアミン、PEG改変ホスファチジン酸、PEG改変セラミド、PEG改変ジアルキルアミン、PEG改変ジアシルグリセロールおよびPEG改変ジアルキルグリセロールからなる群から選択される、請求項10～15のいずれか1項に記載のLNP。例えば、PEG脂質は、PEG－ジオレオイルグリセロール（PEG－DOG）、PEG－ジミリストイル－グリセロール（PEG－DMG）、PEG－ジパルミトイル－グリセロール（PEG－DPG）、PEG－ジリノレオイル－グリセロ－ホスファチジルエタノールアミン（PEG－DLPE）、PEG－ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（PEG－DMPE）、PEG－ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（PEG－DPPE）、PEG－ジステアロイルグリセロール（PEG－DSG）、PEG－ジアシルグリセロール（PEG－DAG、例えば、PEG－DMG、PEG－DPGおよびPEG－DSG）、PEG－セラミド、PEG－ジステアロイル－グリセロ－ホスホグリセロール（PEG－DSPG）、PEG－ジオレオイル－グリセロ－ホスホエタノールアミン（PEG－DOPE）、2－[（ポリエチレングリコール）－2000]－N，N－ジテトラデシルアセトアミドまたはPEG－ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（PEG－DSPЕ）脂質であってよい。

30

40

【請求項17】

前記遊離PEG－脂質は、ジパルミトイル（C16）鎖またはジステアロイル（C18）鎖を含むジアシルホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項10～15のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項18】

前記遊離PEG－脂質は、1～4モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項10～17のいずれか1項に記載のLNP。

50

【請求項 19】

前記遊離 PEG-脂質は前記脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲート中の前記脂質と同じか異なる脂質を含む、請求項 10～18 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 20】

50～200 nm の範囲の平均直径を有する、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 21】

約 100 nm の平均直径を有する、請求項 20 に記載の LNP。

【請求項 22】

0.05～1 の範囲の多分散指数を有する、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の LNP。 10

【請求項 23】

pH 5 で約 -10 mV～約 +30 mV のゼータ電位を有する、請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 24】

前記核酸は DNA または RNA である、請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 25】

前記 RNA は mRNA である、請求項 24 に記載の LNP。

【請求項 26】

前記 mRNA は受容体、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、抗原、酵素またはワクチンをコードする、請求項 25 に記載の LNP。 20

【請求項 27】

前記 mRNA は、前記免疫細胞で免疫応答を調節することが可能なポリペプチドをコードする、請求項 25 に記載の LNP。

【請求項 28】

前記 mRNA は、前記免疫細胞を再プログラムすることが可能なポリペプチドをコードする、請求項 25 に記載の LNP。

【請求項 29】

前記 mRNA は合成 T 細胞受容体 (synTCR) またはキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする、請求項 27 に記載の LNP。 30

【請求項 30】

前記免疫細胞標的化基は抗体を含み、前記抗体は Fab または免疫グロブリン単一可変ドメイン (例えば、ナノボディ) である、請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 31】

前記免疫細胞標的化基は Fab、F(ab')₂、Fab'-SH、Fv または scFv 断片を含む、請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 32】

前記免疫細胞標的化基は、C 末端の天然の鎖間ジスルフィド結合をロックアウトするように工学操作されている Fab を含む、請求項 30 または請求項 31 に記載の LNP。 40

【請求項 33】

カバットによる番号付けによると、前記 Fab は、C233S 置換を含む重鎖断片および C214S 置換を含む軽鎖断片を含む、請求項 32 に記載の LNP。

【請求項 34】

前記免疫細胞標的化基は、非天然の鎖間ジスルフィド結合 (例えば、工学操作された、埋まっている鎖間ジスルフィド結合) を有する Fab を含む、請求項 31～33 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 35】

カバットによる番号付けによると、前記 Fab は前記重鎖断片に F174C 置換を、お 50

よび前記軽鎖断片に S 1 7 6 C 置換を含む、請求項 3 4 に記載の L N P。

【請求項 3 6】

前記免疫細胞標的化基は前記重鎖または軽鎖断片の C 末端にシステインを含む F a b を含む、請求項 3 1 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 3 7】

前記 F a b は前記 F a b の前記重鎖断片と前記 C 末端のシステインの間に 1 つまたはそれ以上のアミノ酸をさらに含む、請求項 3 6 に記載の L N P。

【請求項 3 8】

前記免疫細胞標的化基は免疫グロブリン単一可変ドメインを含む、請求項 3 0 に記載の L N P。

10

【請求項 3 9】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは C 末端にシステインを含む、請求項 3 0 または請求項 3 8 に記載の L N P。

【請求項 4 0】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは V H H ドメインを含み、前記 V H H ドメインと前記 C 末端システインの間に 1 つまたはそれ以上のアミノ酸を含むスペーサーをさらに含む、請求項 3 9 に記載の L N P。

【請求項 4 1】

前記免疫細胞標的化基は 2 つまたはそれ以上の V H H ドメインを含む、請求項 3 1 および 3 8 ～ 4 0 のいずれか 1 項に記載の L N P。

20

【請求項 4 2】

前記 2 つまたはそれ以上の V H H ドメインはアミノ酸リンカーによって連結されている、請求項 4 1 に記載の L N P。

【請求項 4 3】

前記免疫細胞標的化基は、抗体 C H 1 ドメインに連結されている第 1 の V H H ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている第 2 の V H H ドメインを含み、前記抗体 C H 1 ドメインおよび前記抗体軽鎖定常ドメインは 1 つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって連結されている、請求項 4 1 に記載の L N P。

【請求項 4 4】

前記免疫細胞標的化基は抗体 C H 1 ドメインに連結されている V H H ドメインを含み、前記抗体 C H 1 ドメインは 1 つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって抗体軽鎖定常ドメインに連結されている、請求項 3 0 および 3 8 ～ 4 0 のいずれか 1 項に記載の L N P。

30

【請求項 4 5】

カバットによる番号付けによると、前記 C H 1 ドメインは F 1 7 4 C および C 2 3 3 S 置換を含み、前記軽鎖定常ドメインは S 1 7 6 C および C 2 1 4 S 置換を含む、請求項 4 3 または 4 4 に記載の L N P。

【請求項 4 6】

前記免疫細胞標的化基は：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号 2 または 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；または

40

(b) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖断片

を含む F a b を含む、請求項 1 ～ 2 7 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 4 7】

対象の免疫細胞を核酸の送達の標的にする方法であって、

前記免疫細胞を脂質ナノ粒子 (L N P) と接触させることを含み、前記 L N P は：

(a) イオン化可能なカチオン性脂質、

(b) 以下の式：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞標的化基] の化合物を含むコンジュゲート；

50

- (c) ステロールまたは他の構造脂質；
- (d) 中性リン脂質、
- (e) 遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および
- (f) 核酸

を含み、前記LNPは以下の利益：

- (i) 参照LNPと比較した前記免疫細胞への標的化送達の特異性の増加；
- (ii) 参照LNPと比較した前記免疫細胞中の前記核酸または前記核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
- (iii) 参照LNPと比較したトランスフェクション率の増加；および
- (iv) 色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル（＜15％）および高いRNAカプセル化効率（LNPバッチ調製で使用される全RNAに対して最終製剤で少なくとも80％のmRNAが回収される）

10

の少なくとも1つを提供する、方法。

【請求項48】

対象の標的化免疫細胞で目的のポリペプチドを発現させる方法であって、前記免疫細胞を脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含み、前記LNPは：

- (a) イオン化可能なカチオン性脂質；
- (b) 以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲート；
- (c) ステロールまたは他の構造脂質；
- (d) 中性リン脂質、
- (e) 遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および
- (f) 前記ポリペプチドをコードする核酸

20

を含む、方法。

【請求項49】

前記LNPは以下の利益：

- (i) 参照LNPと比較した前記免疫細胞中の発現レベルの増加；
- (ii) 参照LNPと比較した前記免疫細胞中の発現の特異性の増加；
- (iii) 参照LNPと比較した前記免疫細胞中の前記核酸または前記核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
- (iv) 参照LNPと比較したトランスフェクション率の増加；および
- (v) 色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル（＜15％）および高いRNAカプセル化効率（LNPバッチ調製で使用される全RNAに対して最終製剤で少なくとも80％のmRNAが回収される）

30

の少なくとも1つを提供する、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

対象の標的免疫細胞の細胞機能をモジュレートする方法であって、前記対象に脂質ナノ粒子（LNP）を投与することを含み、前記LNPは：

- (a) イオン化可能なカチオン性脂質、
- (b) 以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲート；
- (c) ステロールまたは他の構造脂質；
- (d) 中性リン脂質；
- (e) 遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および
- (f) 前記免疫細胞の前記細胞機能をモジュレートするためのポリペプチドをコードする核酸

40

を含む、方法。

【請求項51】

前記LNPは以下の利益：

- (i) 参照LNPと比較した前記免疫細胞中の発現レベルの増加；

50

(i i) 参照 L N P と比較した前記免疫細胞中の発現の特異性の増加；
(i i i) 参照 L N P と比較した前記免疫細胞中の前記核酸または前記核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
(i v) 参照 L N P と比較したトランスフェクション率の増加；および
(v) 前記 L N P は、前記免疫細胞で同じ生物学的作用に到達するために参照 L N P と比較してより低い用量で投与することができること；および
(v i) 色素がアクセス可能な m R N A の低いレベル (< 1 5 %) および高い R N A カプセル化効率 (L N P バッチ調製で使用される全 R N A に対して最終製剤で少なくとも 8 0 % の m R N A が回収される)
の少なくとも 1 つを提供する、請求項 5 0 に記載の方法。

10

【請求項 5 2】

細胞機能の前記モジュレーションは、免疫応答を開始するように前記免疫細胞を再プログラムすることを含む、請求項 5 0 または 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

細胞機能の前記モジュレーションは前記免疫細胞の抗原特異性をモジュレートすることを含む、請求項 5 0 または 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

それを必要とする対象で障害または疾患の症状を処置、改善または予防する方法であって、前記対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子 (L N P) を前記対象に投与することを含み、前記 L N P は：

20

- (a) イオン化可能なカチオン性脂質、
- (b) 以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；
- (c) ステロールまたは他の構造脂質；
- (d) 中性リン脂質；
- (e) 遊離ポリエチレングリコール (P E G) 脂質、および
- (f) 核酸、

を含み、前記核酸は前記免疫細胞の前記免疫応答をモジュレートし、したがって前記症状を処置または改善する、方法。

【請求項 5 5】

30

前記 L N P は以下の利益：

- (i) 参照 L N P と比較した前記免疫細胞への前記核酸の送達の特異性の増加；
- (i i) 参照 L N P と比較した前記免疫細胞中の前記核酸または前記核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
- (i i i) 参照 L N P と比較したトランスフェクション率の増加；
- (i v) 前記 L N P は、同じ処置効果に到達するために参照 L N P と比較してより低い用量で投与することができること；および
- (v) 色素がアクセス可能な m R N A の低いレベル (< 1 5 %) および高い R N A カプセル化効率 (L N P バッチ調製で使用される全 R N A に対して最終製剤で少なくとも 8 0 % の m R N A が回収される)
の少なくとも 1 つを提供する、請求項 5 0 に記載の方法。

40

【請求項 5 6】

前記障害は免疫障害、炎症性障害またはがんである、請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

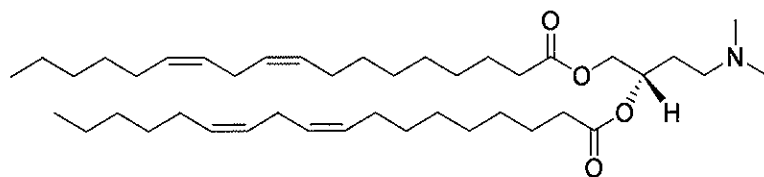
前記核酸は、病原体による感染症の処置または予防のための治療的または予防的ワクチンで使用するための抗原をコードする、請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

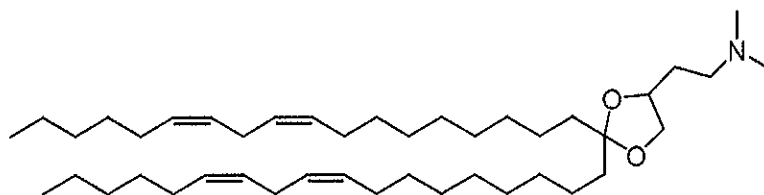
前記イオン化可能なカチオン性脂質は

50

【化 2】



または



10

である、請求項 44～57 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 59】

前記免疫細胞標的化基は T 細胞抗原に結合する抗体を含む、請求項 44～57 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 60】

前記 T 細胞抗原は CD3、CD8 または CD3 および CD8 の両方である、請求項 57 に記載の方法。

20

【請求項 60】

前記免疫細胞標的化基はナチュラルキラー（NK）細胞抗原に結合する抗体を含む、請求項 44～56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 61】

前記 NK 細胞抗原は CD7、CD8 または CD56 である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記抗体はヒトまたはヒト化抗体である、請求項 58～61 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 63】

前記免疫細胞標的化基は、ポリエチレングリコール（PEG）含有リンカーを通して前記脂質ブレンド中の脂質に共有結合している、請求項 44～62 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 64】

PEG 含有リンカーを通して前記免疫細胞標的化基に共有結合している前記脂質は、ジステアロイルグリセロール（DSG）、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン（DSPE）、ジミリスチル-ホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイル-グリセロール-ホスホグリセロール（DSPG）、ジミリスチル-グリセロール（DMG）、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジパルミトイル-グリセロール（DPG）またはセラミドである、請求項 63 に記載の方法。

40

【請求項 65】

前記 PEG は PEG 2000 である、請求項 63 または 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートは、0.002～0.2 モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項 46～65 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 67】

前記イオン化可能なカチオン性脂質は、40～60 モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項 46～66 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 68】

前記ステロールはコレステロールである、請求項 44～67 のいずれか 1 項に記載の方

50

法。

【請求項 69】

前記ステロールは、30～50モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項44～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 70】

前記中性リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、スフィンゴミエリン(SM)からなる群から選択される、請求項44～69のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 71】

前記中性リン脂質は、1～10モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項44～70のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 72】

前記遊離PEG-脂質は、PEG改変ホスファチジルエタノールアミン、PEG改変ホスファチジン酸、PEG改変セラミド、PEG改変ジアルキルアミン、PEG改変ジアシルグリセロールおよびPEG改変ジアルキルグリセロールからなる群から選択される、請求項44～71のいずれか1項に記載の方法。例えば、PEG脂質は、PEG-ジオレオイルグリセロール(PEG-D OG)、PEG-ジミリストイル-グリセロール(PEG-DMG)、PEG-ジパルミトイル-グリセロール(PEG-DPG)、PEG-ジリノレオイル-グリセロ-ホスファチジルエタノールアミン(PEG-DLPE)、PEG-ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(PEG-DMPE)、PEG-ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン(PEG-DPPE)、PEG-ジステアロイルグリセロール(PEG-DSG)、PEG-ジアシルグリセロール(PEG-DAG、例えば、PEG-DMG、PEG-DPGおよびPEG-DSG)、PEG-セラミド、PEG-ジステアロイル-グリセロ-ホスホグリセロール(PEG-DSPG)、PEG-ジオレオイル-グリセロ-ホスホエタノールアミン(PEG-DOPE)、2-[(ポリエチレングリコール)-2000]-N、N-ジテトラデシルアセトアミドまたはPEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(PEG-DSPE)脂質であってよい。

20

30

【請求項 73】

前記遊離PEG-脂質は、ジパルミトイル(C16)鎖またはジステアロイル(C18)鎖を含むジアシルホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項44～71のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 74】

前記遊離PEG-脂質は2～4モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項44～73のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 75】

前記遊離PEG-脂質は前記脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲート中の前記脂質と同じか異なる脂質を含む、請求項65～74のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 76】

前記LNPは50～200nmの範囲の平均直径を有する、請求項44～73のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 77】

前記LNPは約100nmの平均直径を有する、請求項74に記載の方法。

【請求項 78】

前記LNPは0.05～1の範囲の多分散指数を有する、請求項44～77のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 79】

50

前記 L N P は p H 5 で約 -10 mV ～約 $+30\text{ mV}$ のゼータ電位を有する、請求項 44 ～78 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 80】

前記核酸は D N A または R N A である、請求項 44 ～79 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 81】

前記 R N A は m R N A、t R N A、s i R N A またはマイクロ R N A である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記 m R N A は受容体、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、抗原、酵素またはワクチンをコードする、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記 m R N A は、前記免疫細胞で免疫応答を調節することが可能なポリペプチドをコードする、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 84】

前記 m R N A は、前記免疫細胞を再プログラムすることが可能なポリペプチドをコードする、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 85】

前記 m R N A は合成 T 細胞受容体 (s y n T C R) またはキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 86】

前記免疫細胞標的化基は抗体を含み、前記抗体は F a b または免疫グロブリン単一可変ドメインである、請求項 44 ～85 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 87】

前記免疫細胞標的化基は、F a b、F (a b ') ₂、F a b ' - S H、F v および s c F v 断片からなる群から選択される抗体断片を含む、請求項 44 ～85 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 88】

前記免疫細胞標的化基は、1 つまたはそれ以上の鎖間ジスルフィド結合を含む F a b を含む、請求項 86 または 87 に記載の方法。

【請求項 89】

カバットによる番号付けによると、前記 F a b は、F 174 C および C 233 S 置換を含む重鎖断片および S 176 C および C 214 S 置換を含む軽鎖断片を含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記免疫細胞標的化基は、前記重鎖または軽鎖断片の C 末端にシステインを含む F a b を含む、請求項 86 ～89 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 91】

前記 F a b は前記 F a b の前記重鎖断片と前記 C 末端のシステインの間に 1 つまたはそれ以上のアミノ酸をさらに含む、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 92】

前記 F a b は、抗体 C H 1 ドメインに連結されている重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている軽鎖可変ドメインを含み、前記 C H 1 ドメインおよび前記軽鎖定常ドメインは 1 つまたはそれ以上の鎖間ジスルフィド結合によって連結され、前記免疫細胞標的化基は、アミノ酸リンカーによって前記軽鎖定常ドメインの C 末端に連結されている単鎖可変断片 (s c F v) をさらに含む、請求項 87 ～91 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 93】

前記免疫細胞標的化基は免疫グロブリン単一可変ドメインを含む、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは C 末端にシステインを含む、請求項 8 6 または 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは V H H ドメインを含み、前記 V H H ドメインと前記 C 末端システインの間に 1 つまたはそれ以上のアミノ酸を含むスペーサーをさらに含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記免疫細胞標的化基は 2 つまたはそれ以上の V H H ドメインを含む、請求項 8 6 および 9 3 ～ 9 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 9 7】

前記 2 つまたはそれ以上の V H H ドメインはアミノ酸リンカーによって連結されている、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記免疫細胞標的化基は、抗体 C H 1 ドメインに連結されている第 1 の V H H ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている第 2 の V H H ドメインを含み、前記抗体 C H 1 ドメインおよび前記抗体軽鎖定常ドメインは 1 つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって連結されている、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記免疫細胞標的化基は、抗体 C H 1 ドメインに連結されている V H H ドメインを含み、前記抗体 C H 1 ドメインは 1 つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって抗体軽鎖定常ドメインに連結されている、請求項 8 6 および 9 3 ～ 9 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 0 0】

カバットによる番号付けによると、前記 C H 1 ドメインは F 1 7 4 C および C 2 3 3 S 置換を含み、前記軽鎖定常ドメインは S 1 7 6 C および C 2 1 4 S 置換を含む、請求項 9 6 または 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記免疫細胞標的化基は、

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号 2 または 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

30

(b) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖断片

を含む F a b を含む、請求項 4 4 ～ 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

5 % 以下の非免疫細胞が前記 L N P によってトランスフェクトされる、請求項 4 4 ～ 1 0 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記 L N P によって送達される前記核酸または前記 L N P によって送達される前記核酸によってコードされるポリペプチドの半減期は、参照 L N P によって送達される核酸または参照 L N P によって送達される核酸によってコードされるポリペプチドの半減期より少なくとも 1 0 % 長い、請求項 4 4 ～ 1 0 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 0 4】

少なくとも 1 0 % の免疫細胞が前記 L N P によってトランスフェクトされる、請求項 4 4 ～ 1 0 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記 L N P によって送達される前記核酸の発現レベルが参照 L N P によって送達される核酸の発現レベルより少なくとも 1 0 % 高い、請求項 4 4 ～ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

50

対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）であって：

- （a）イオン化可能なカチオン性脂質、
- （b）以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲート；
- （c）ステロールまたは他の構造脂質；
- （d）中性リン脂質；
- （e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および
- （f）核酸、

を含み、前記免疫細胞はNK細胞であり、前記免疫細胞標的化基はCD56に結合する抗体を含む、脂質ナノ粒子（LNP）。

10

【請求項107】

対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）であって：

- （a）イオン化可能なカチオン性脂質、
- （b）以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲート；
- （c）ステロールまたは他の構造脂質；
- （d）中性リン脂質；
- （e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および
- （f）核酸、

を含み、前記免疫細胞標的化基は、CD7またはCD8に結合する抗体を含み、前記遊離PEG脂質はDMG-PEGである、脂質ナノ粒子（LNP）。

20

【請求項108】

対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）であって：

- （a）イオン化可能なカチオン性脂質
- （b）以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲート；
- （c）ステロールまたは他の構造脂質；
- （d）中性リン脂質；
- （e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および
- （f）核酸、

を含み、前記免疫細胞標的化基は抗体を含み、前記抗体はFabまたは免疫グロブリン単一可変ドメインである、脂質ナノ粒子（LNP）。

30

【請求項109】

前記Fabは、C末端の天然の鎖間ジスルフィドをロックアウトするように工学操作されている、請求項108に記載のLNP。

【請求項110】

前記Fabは、C233S置換を含む重鎖断片およびC214S置換を含む軽鎖断片を含む、請求項109に記載のLNP。

【請求項111】

前記Fabは非天然の鎖間ジスルフィドを含む、請求項110に記載のLNP。

40

【請求項112】

前記Fabは前記重鎖断片にF174C置換を、および前記軽鎖断片にS176C置換を含む、請求項110に記載のLNP。

【請求項113】

前記抗体は免疫グロブリン単一可変（ISV）ドメインであり、前記ISVドメインはNanobody（登録商標）ISVである、請求項108に記載のLNP。

【請求項114】

前記遊離PEG脂質は、少なくとも2000ダルトンの分子量を有するPEGを含む、請求項113に記載のLNP。

【請求項115】

50

前記 P E G は約 3 0 0 0 ～ 5 0 0 0 ダルトンの分子量を有する、請求項 1 1 4 に記載の L N P。

【請求項 1 1 6】

前記抗体は F a b である、請求項 1 0 8 に記載の L N P。

【請求項 1 1 7】

前記 F a b は C D 3 に結合し、前記 L N P 中の前記遊離 P E G 脂質は、約 2 0 0 0 ダルトンの分子量を有する P E G を含む、請求項 1 1 6 に記載の L N P。

【請求項 1 1 8】

前記 F a b は抗 C D 4 抗体であり、前記 L N P 中の前記遊離 P E G 脂質は、約 3 0 0 0 ～ 3 5 0 0 ダルトンの分子量を有する P E G を含む、請求項 1 1 6 に記載の L N P。

【請求項 1 1 9】

前記免疫細胞標的化基は 2 つまたはそれ以上の V H H ドメインを含む、請求項 1 0 8 に記載の L N P。

【請求項 1 2 0】

前記 2 つまたはそれ以上の V H H ドメインはアミノ酸リンカーによって連結されている、請求項 1 1 9 に記載の L N P。

【請求項 1 2 1】

前記免疫細胞標的化基は、抗体 C H 1 ドメインに連結されている第 1 の V H H ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている第 2 の V H H ドメインを含む、請求項 1 2 0 に記載の L N P。

【請求項 1 2 2】

対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（L N P）であって：

（a）イオン化可能なカチオン性脂質、

（b）以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；

（c）ステロールまたは他の構造脂質；

（d）中性リン脂質；

（e）遊離ポリエチレングリコール（P E G）脂質、および

（f）核酸、

を含み、C D 3 に結合し、C D 1 1 a または C D 1 8 にも結合する脂質ナノ粒子（L N P）。

【請求項 1 2 3】

2 つのコンジュゲートを含み、第 1 のコンジュゲートは、C D 3 に結合する抗体を含み、第 2 のコンジュゲートは、C D 1 1 a または C D 1 8 に結合する抗体を含む、請求項 1 2 2 に記載の L N P。

【請求項 1 2 4】

1 つのコンジュゲートを含み、前記コンジュゲートは、C D 3 および C D 1 1 a に結合する二重特異性抗体を含む、請求項 1 2 2 に記載の L N P。

【請求項 1 2 5】

1 つのコンジュゲートを含み、前記コンジュゲートは、C D 3 および C D 1 8 に結合する二重特異性抗体を含む、請求項 1 2 2 に記載の L N P。

【請求項 1 2 6】

前記二重特異性抗体は免疫グロブリン単一可変ドメインまたは F a b－S c F v である、請求項 1 2 4 または 1 2 5 に記載の L N P。

【請求項 1 2 7】

対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（L N P）であって：

（a）イオン化可能なカチオン性脂質、

（b）以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；

（c）ステロールまたは他の構造脂質；

10

20

30

40

50

- (d) 中性リン脂質；
- (e) 遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および
- (f) 核酸、

を含み、前記免疫細胞のCD7およびCD8に結合する脂質ナノ粒子（LNP）。

【請求項128】

2つのコンジュゲートを含み、第1のコンジュゲートは、CD7に結合する抗体を含み、第2のコンジュゲートは、CD8に結合する抗体を含む、請求項127に記載のLNP。

【請求項129】

1つのコンジュゲートを含み、前記コンジュゲートは、CD7およびCD8に結合する二重特異性抗体を含む、請求項127に記載のLNP。

【請求項130】

前記二重特異性抗体は免疫グロブリン単一可変ドメインまたはFab-ScFvである、請求項129に記載のLNP。

【請求項131】

対象の2つの異なるタイプの免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）であって：

- (a) イオン化可能なカチオン性脂質、
- (b) 以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；
- (c) ステロールまたは他の構造脂質；
- (d) 中性リン脂質；
- (e) 遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および
- (f) 核酸、

を含み、第1のタイプの免疫細胞の表面の第1の抗原に結合し、さらに第2のタイプの免疫細胞の表面の第2の抗原にも結合する脂質ナノ粒子（LNP）。

【請求項132】

前記2つの異なるタイプの免疫細胞はCD4＋T細胞およびCD8＋T細胞である、請求項131に記載のLNP。

【請求項133】

2つのコンジュゲートを含み、第1のコンジュゲートは、前記第1のタイプの免疫細胞の前記第1の抗原に結合する第1の抗体を含み、第2のコンジュゲートは、前記第2のタイプの免疫細胞の前記第2の抗原に結合する第2の抗体を含む、請求項131に記載のLNP。

【請求項134】

1つのコンジュゲートを含み、前記コンジュゲートは二重特異性抗体を含み、前記二重特異性抗体は前記第1のタイプの免疫細胞の上の前記第1の抗原および前記第2のタイプの免疫細胞の上の前記第2の抗原の両方に結合する、請求項131に記載のLNP。

【請求項135】

前記二重特異性抗体は免疫グロブリン単一可変ドメインまたはFab-ScFvである、請求項134に記載のLNP。

【請求項136】

対象のCD4＋およびCD8＋T細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）であって：

- (a) イオン化可能なカチオン性脂質、
- (b) 以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；
- (c) ステロールまたは他の構造脂質；
- (d) 中性リン脂質；
- (e) 遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および

10

20

30

40

50

(f) 核酸、

を含み、前記免疫細胞標的化基は、CD3またはCD7に結合する単一の抗体を含む、脂質ナノ粒子(LNP)。

【請求項137】

対象のT細胞およびNK細胞の両方に核酸を送達するための脂質ナノ粒子(LNP)であって：

(a) イオン化可能なカチオン性脂質、

(b) 以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；

(c) ステロールまたは他の構造脂質；

(d) 中性リン脂質；

(e) 遊離ポリエチレングリコール(PEG)脂質、および

(f) 核酸、

を含み、前記免疫細胞標的化基はCD7、CD8、またはCD7およびCD8の両方に結合する脂質ナノ粒子(LNP)。

【請求項138】

対象のT細胞およびNK細胞の両方に核酸を送達するための脂質ナノ粒子(LNP)であって：

(a) イオン化可能なカチオン性脂質、

(b) 以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；

(c) ステロールまたは他の構造脂質；

(d) 中性リン脂質；

(e) 遊離ポリエチレングリコール(PEG)脂質、および

(f) 核酸、

を含み、前記免疫細胞標的化基は、

(i) CD3およびCD56の両方；

(ii) CD8およびCD56の両方；または

(iii) CD7およびCD56の両方

に結合する、脂質ナノ粒子(LNP)。

【請求項139】

前記免疫細胞標的化基は、ポリエチレングリコール(PEG)含有リンカーを通して前記脂質ブレンド中の脂質に共有結合している、請求項106～138のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項140】

PEG含有リンカーを通して前記免疫細胞標的化基に共有結合している前記脂質は、ジステアロイルグリセロール(DSG)、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン(DMPE)、ジステアロイル－グリセロール－ホスホグリセロール(DSPG)、ジミリストイル－グリセロール(DMG)、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジパルミトイル－グリセロール(DPG)またはセラミドである、請求項139に記載のLNP。

【請求項141】

前記脂質－免疫細胞標的化基コンジュゲートは、0.002～0.2モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項106～130のいずれか1項に記載のLNP。

【請求項142】

前記脂質ブレンドは、構造脂質(例えば、ステロール)、中性リン脂質および遊離PEG－脂質の1つまたはそれ以上をさらに含む、請求項106～141のいずれか1項に記載のLNP。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4 3】

前記イオン化可能なカチオン性脂質は、40～60モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項 1 0 6～1 4 2 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 1 4 4】

前記ステロールは、30～50モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項 1 4 2 に記載の L N P。

【請求項 1 4 5】

前記ステロールはコレステロールである、請求項 1 4 2 または 1 4 4 に記載の L N P。

【請求項 1 4 6】

前記中性リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (D S P E)、1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (D S P C)、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (D O P E)、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (D O P C) からなる群から選択される、請求項 1 3 8～1 4 5 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 1 4 7】

前記中性リン脂質は、1～10モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項 1 0 6～1 4 6 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 1 4 8】

前記遊離 P E G-脂質は、P E G-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (P E G-D S P E) または P E G-ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン (P E G-D M P E)、N-(メチルポリオキシエチレンオキシカルボニル)-1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (D P P E-P E G) 1, 2-ジミリストイル-r a c-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (P E G-D M G)、1, 2-ジパルミトイル-r a c-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (P E G-D P G)、1, 2-ジオレオイル-r a c-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール (D O G-P E G) 1, 2-ジステアロイル-r a c-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (P E G-D S G)、N-パルミトイルスフィンゴシン-1-{サクシニル [メトキシ (ポリエチレングリコール)]} (P E G-セラミド)、および D S P E-P E G-システイン、またはその誘導体からなる群から選択される、請求項 1 0 6～1 4 6 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 1 4 9】

前記遊離 P E G-脂質は、ジパルミトイル (C 1 6) 鎖またはジステアロイル (C 1 8) 鎖を含むジアシルホスファチジルエタノールアミンを含む、請求項 1 0 6～1 4 8 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 1 5 0】

前記遊離 P E G-脂質は、1～2モルパーセントの範囲で前記脂質ブレンド中に存在する、請求項 1 0 6～1 4 9 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 1 5 1】

前記遊離 P E G-脂質は前記脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲート中の前記脂質と同じか異なる脂質を含む、請求項 1 0 6～1 5 0 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 1 5 2】

50～200nmの範囲の平均直径を有する、請求項 1 0 6～1 5 1 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 1 5 3】

約 100nmの平均直径を有する、請求項 1 5 2 に記載の L N P。

【請求項 1 5 4】

0.05～1の範囲の多分散指数を有する、請求項 1 0 6～1 5 3 のいずれか 1 項に記載の L N P。

【請求項 1 5 5】

10

20

30

40

50

pH 5 で約 -10 mV ～ 約 $+30\text{ mV}$ のゼータ電位を有する、請求項 106 ～ 154 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 156】

前記核酸は DNA または RNA である、請求項 106 ～ 155 のいずれか 1 項に記載の LNP。

【請求項 157】

前記 RNA は mRNA である、請求項 156 に記載の LNP。

【請求項 158】

前記 mRNA は受容体、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、抗原、酵素またはワクチンをコードする、請求項 157 に記載の LNP。

【請求項 159】

前記 mRNA は、前記免疫細胞で免疫応答を調節することが可能なポリペプチドをコードする、請求項 157 に記載の LNP。

【請求項 160】

前記 mRNA は、前記免疫細胞を再プログラムすることが可能なポリペプチドをコードする、請求項 159 に記載の LNP。

【請求項 161】

前記 mRNA は合成 T 細胞受容体 (synTCR) またはキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする、請求項 160 に記載の LNP。

【請求項 162】

対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子 (LNP) であって：

(a) イオン化可能なカチオン性脂質、

(b) 以下の構造：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞標的化基] を含むコンジュゲート；

(c) ステロールまたは他の構造脂質；

(d) 中性リン脂質；

(e) 遊離ポリエチレングリコール (PEG) 脂質、および

(f) 核酸、

を含み、前記免疫細胞標的化基は、天然の鎖間ジスルフィド結合を欠く Fab を含む、脂質ナノ粒子 (LNP)。

【請求項 163】

前記 Fab は、非システインアミノ酸と天然の鎖間ジスルフィドを形成する、天然の定常軽鎖および天然の定常重鎖の上の片方または両方のシステインを置き換え、したがって前記 Fab の前記天然の鎖間ジスルフィド結合を除去するように工学操作されている、請求項 162 に記載の LNP。

【請求項 164】

対象の免疫細胞を核酸の送達の標的にする方法であって、前記免疫細胞を請求項 106 ～ 163 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子 (LNP) と接触させることを含む方法。

【請求項 165】

NK 細胞を標的にするためのものであり、前記免疫細胞標的化基は CD56 に結合する、請求項 164 に記載の方法。

【請求項 166】

T 細胞および NK 細胞の両方を同時に標的にするためのものであり、前記免疫細胞標的化基は CD7、CD8、または CD7 および CD8 の両方に結合する、請求項 164 に記載の方法。

【請求項 167】

CD4+ および CD8+ T 細胞の両方を同時に標的にするためのものであり、前記免疫細胞標的化基は、CD3 または CD7 に結合するポリペプチドを含む、請求項 164 に記載の方法。

【請求項 168】

10

20

30

40

50

対象の標的化免疫細胞で目的のポリペプチドを発現させる方法であって、前記免疫細胞を請求項 106～163 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含む方法。

【請求項 169】

対象の標的免疫細胞の細胞機能をモジュレートする方法であって、前記対象に請求項 106～159 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子（LNP）を投与することを含む方法。

【請求項 170】

それを必要とする対象で障害または疾患の症状を処置、改善または予防する方法であって、前記対象に請求項 106～163 のいずれか 1 項に記載の脂質ナノ粒子（LNP）を投与することを含む方法。

【請求項 171】

3つの相補性決定ドメイン CDR1、CDR2 および CDR3 を含み、
(a) CDR1 は GSTFSDYG（配列番号 100）を含み、
(b) CDR2 は IDWNGEHT（配列番号 101）を含み、
(c) CDR3 は AADALPYTVRKYN Y（配列番号 102）を含む、
ヒト CD8 に結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン（ISVD）。

【請求項 172】

ヒト化されている、請求項 171 に記載の ISVD。

【請求項 173】

配列番号 77 を含む、請求項 172 に記載の ISVD。

【請求項 174】

GSTFSDYG（配列番号 100）、IDWNGEHT（配列番号 101）および AADALPYTVRKYN Y（配列番号 102）を含むポリペプチド。

【請求項 175】

請求項 171 に記載の ISVD を含むポリペプチド。

【請求項 176】

第2の結合性部分をさらに含み、前記第2の結合性部分は CD8 または別の異なる標的に結合する、請求項 175 に記載のポリペプチド。

【請求項 177】

前記第2の結合性部分も ISVD である、請求項 176 に記載のポリペプチド。

【請求項 178】

検出可能なマーカーをさらに含む、請求項 175 に記載のポリペプチド。

【請求項 179】

治療剤をさらに含む、請求項 175 に記載のポリペプチド。

【請求項 180】

請求項 171～173 のいずれか 1 項に記載の ISVD、または請求項 174～179 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項 181】

請求項 171～173 のいずれか 1 項に記載の ISVD、または請求項 174～179 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 182】

対象で CD8 に関連した疾患または障害を処置する方法であって、前記対象に請求項 181 に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 183】

前記疾患または障害はがんである、請求項 182 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

関連出願の相互参照

本出願は、2020年12月4日出願の米国仮出願第63/121,801号；2021年3月25日出願の米国仮出願第63/166,205号；2021年4月1日出願の米国仮出願第63/169,296号；2021年4月1日出願の米国仮出願第63/169,395号；および2021年4月7日出願の米国仮出願第63/172,024号の優先権および利益を主張し、当該出願の全開示は、それらの全体を参照によって本明細書に組み入れる。

【0002】

ASCIIテキストファイルでの配列表の提出

ASCIIテキストファイルでの後続の提出の内容：コンピューター可読形式（CRF）の配列表（ファイル名：183952034040SEQULIST.TXT、記録日：2021年12月3日、サイズ：205,763バイト）は、その全体を参照によって本明細書に組み入れる。

【0003】

発明の分野

本発明は、免疫細胞への核酸の送達のためのイオン化可能なカチオン性脂質および脂質ナノ粒子、ならびにそのような脂質および標的化脂質ナノ粒子を製造および使用する方法を提供する。

【背景技術】

【0004】

背景

最近、対象への1つまたはそれ以上の核酸の送達を含むいくつかの治療様式が開発されている。処置様式は、例えば、デオキシリボース核酸（DNA）の形態の目的の遺伝子が細胞へ導入され、その後それが発現されて、遺伝子産物の欠損または非存在によって引き起こされるかまたはそれに関連する障害を処置するための遺伝子産物、例えばタンパク質を生産する、遺伝子療法を含む。この手法において、遺伝子はメッセンジャーリボ核酸（mRNA）へ転写され、すると、mRNAは翻訳されて、遺伝子産物を生産する。別の手法において、目的の遺伝子ではなくmRNAを、細胞へ送達してもよい。生ずる発現産物は、対象（例えば、ある特定の型の嚢胞性線維症もしくはリソソーム貯蔵障害において起こるタンパク質欠損）で特定のタンパク質の欠損もしくは非存在を改善することができるか、または例えば、対象で免疫細胞をリプログラミングして免疫応答を開始もしくは別の方法でモジュレートして（例えば、がんを処置するための治療剤として、もしくは微生物もしくはウイルス感染のリスクもしくは重症度を予防するかもしくは最小限にするための予防ワクチンとして）細胞機能をモジュレートするために使用することができる。

【0005】

しかしながら、細胞内での翻訳のための、細胞へのmRNAの送達は、様々な因子、例えば細胞への進入前における、およびその後の、しかし細胞への導入後翻訳前におけるmRNAのヌクレアーゼ分解のために困難であった。

【0006】

RNAは、様々な送達媒体、例えば、RNAと共にナノ粒子を形成するカチオン性ポリマーまたは脂質に基づく送達媒体を使用して対象へ送達することができる。ナノ粒子は、分解からRNAを保護し、標的部位へのRNAの送達を可能にし、標的細胞による細胞取り込みおよびプロセッシングを促進することを意図される。送達有効性のために、分子組成に加えて、粒子サイズ、電荷、または分子部分、例えばポリエチレングリコール（PEG）もしくはリガンドによるグラフト化のようなパラメーターが役割を果たす。PEGによるグラフト化は、血清相互作用を低減し、血清安定性を増加させ、循環中の時間を増加させると考えられ、このことはある特定の標的化手法に有益であり得る。

【0007】

ある特定の遺伝子療法において使用されるDNA送達技術と比較して、mRNAに基づく遺伝子処置は、いくつかの優れた特質、例えば操作の容易さ、迅速かつ一過性の発現、

10

20

30

40

50

および突然変異を伴わない適応性のある処理性を有する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、細胞への治療用RNAの送達は、RNAの相対的不安定性および低い細胞透過性の点で困難である。したがって、細胞へのRNA、例えばmRNAの送達を促進する方法および組成物を開発することについての要求が存在している。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、イオン化可能なカチオン性脂質、脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲート、ならびにそのようなイオン化可能なカチオン性脂質および／または脂質-免疫細胞（例えば、T細胞）標的化基コンジュゲートを含む脂質ナノ粒子組成物、そのような脂質および／またはコンジュゲートを含有する医療キット、ならびにそのような脂質およびコンジュゲートの製造および使用方法を提供する。

10

【0010】

本明細書で提供される脂質ナノ粒子組成物は、核酸、例えばRNA、例えばメッセンジャーRNAまたはmRNAをさらに含むことができる。脂質ナノ粒子組成物は、対象の細胞（例えば、T細胞などの免疫細胞）へのmRNA送達のために使用することができる。メッセンジャーRNAをベースとした遺伝子療法は、血漿中の循環細胞（例えば、免疫細胞、例えばT細胞またはNK細胞）への、または所定の組織中の細胞へのmRNAの効率的な送達を必要とする。タンパク質発現の頑強なレベルを達成するための効率的なmRNA送達に関連した主な課題には以下のものが含まれる：（a）対象への投与の後のmRNAペイロードを優勢な血清ヌクレアーゼから保護する能力；（b）標的細胞（例えば、T細胞）集団へのmRNA送達を特異的に標的にし、それによってそこでのタンパク質発現を最大にする能力；および（c）細胞質の中でのタンパク質への翻訳のために細胞（例えば、T細胞）のサイトゾルコンパートメントへmRNAペイロードを最大限に送達する能力。

20

【0011】

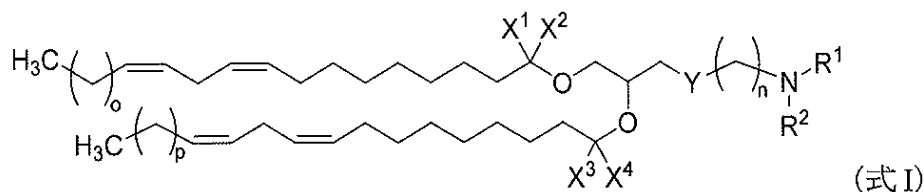
本発明は、細胞、例えば哺乳動物細胞、例えば免疫細胞への、その中に置かれるペイロード（例えば、核酸、例えばDNAまたはRNA、例えばmRNA）の送達を促進する脂質ナノ粒子組成物を生成するための、イオン化可能なカチオン性脂質を提供する。脂質は、標的細胞型のサイトゾルコンパートメントへの核酸、例えばmRNAの細胞内送達を可能にし、無毒の成分に速やかに分解するように設計される。これらの複雑な機能は、イオン化可能なカチオン性脂質中のイオン化可能な脂質頭基、疎水性の「アシルテール」基ならびに頭基およびアシルテール基を連結するリンカーの化学反応および幾何構造の間の相互作用によって達成される。

30

【0012】

一態様では、本発明は、式Iによって表される化合物：

【化1】



40

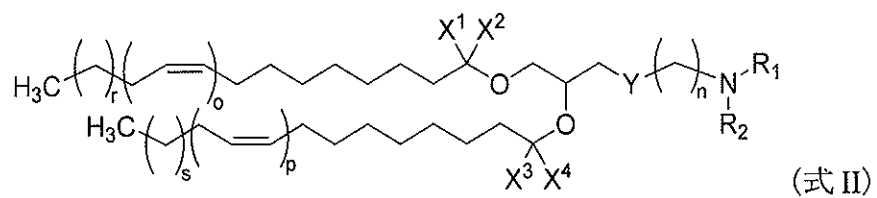
またはその塩を提供し、ここで、変数は本明細書に規定される通りである。

【0013】

別の態様では、本発明は、式IIによって表される化合物：

50

【化 2】



またはその塩を提供し、ここで、変数は本明細書に規定される通りである。

【 0 0 1 4 】

本明細書で、以下からなる群から選択される化合物：

10

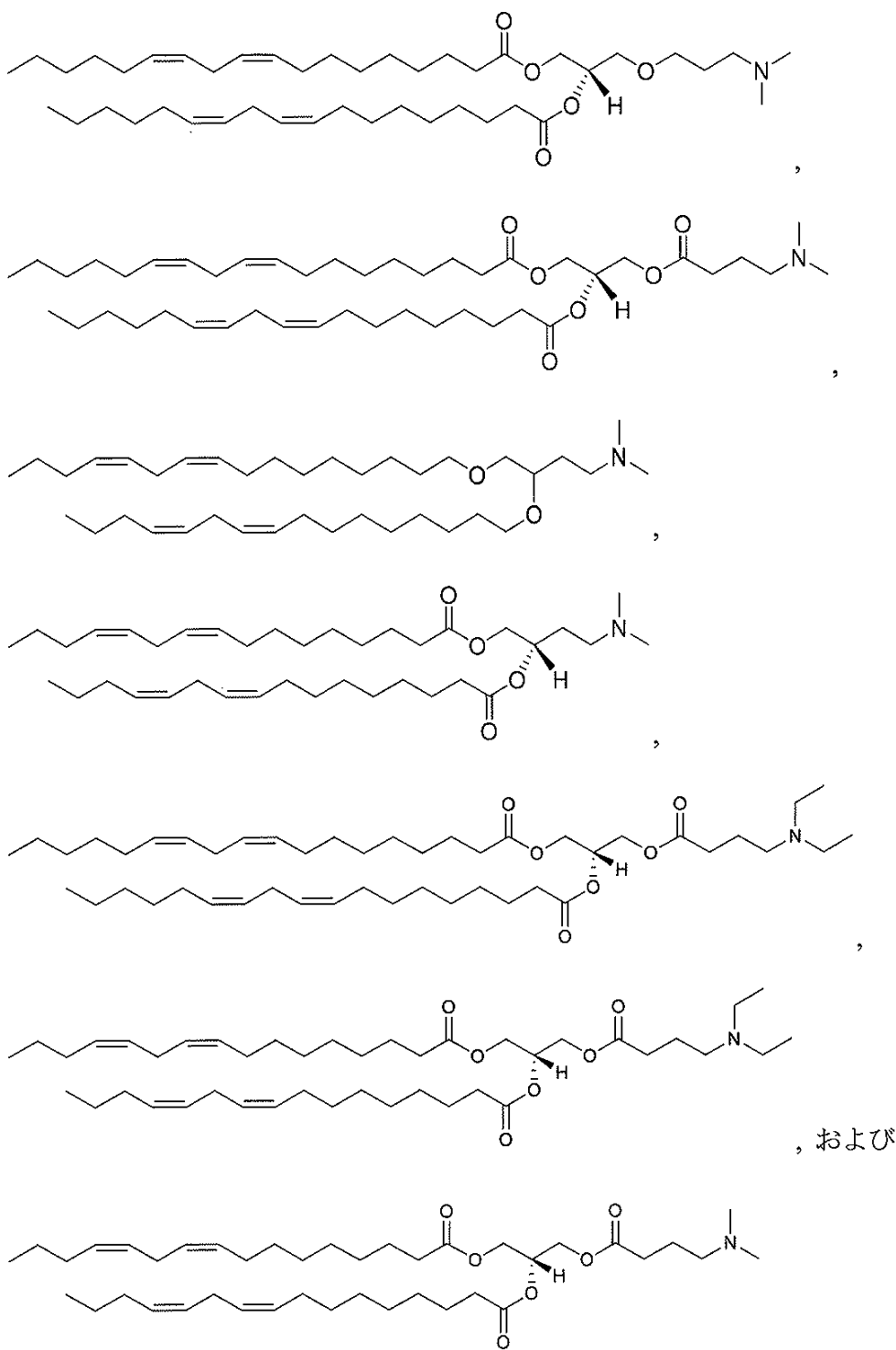
20

30

40

50

【化 3】

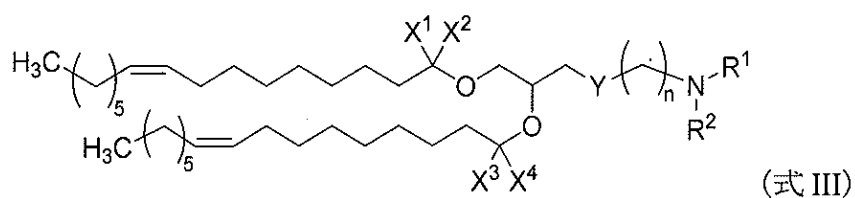


またはその塩が一部提供される。

【0015】

ある特定の実施形態では、化合物は式 I I I の化合物：

【化 4】



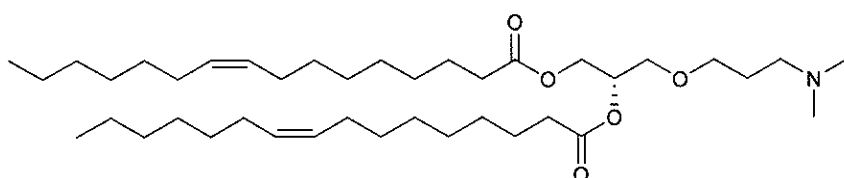
またはその塩であり、ここで、変数は本明細書に規定される通りである。

10

【0016】

本明細書で、以下の式の化合物：

【化 5】



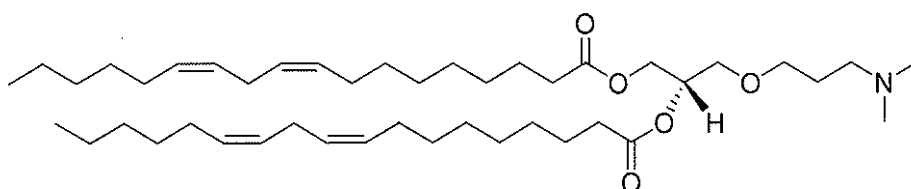
またはその塩も提供される。

20

【0017】

本明細書で、以下の式の化合物：

【化 6】



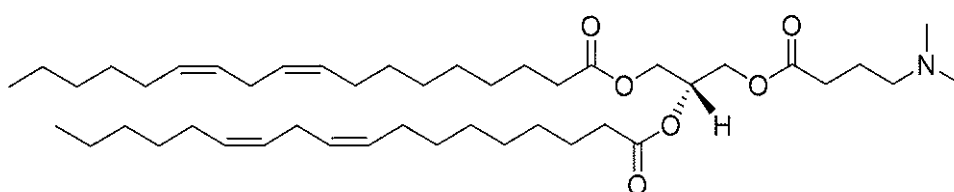
30

またはその塩も提供される。

【0018】

本明細書で、以下の式の化合物：

【化 7】



40

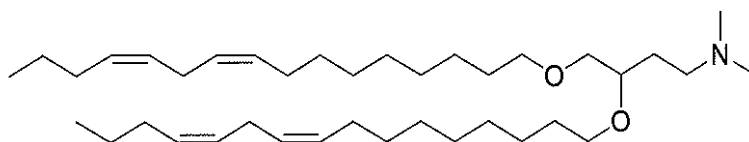
またはその塩も提供される。

【0019】

本明細書で、以下の式の化合物：

50

【化 8】



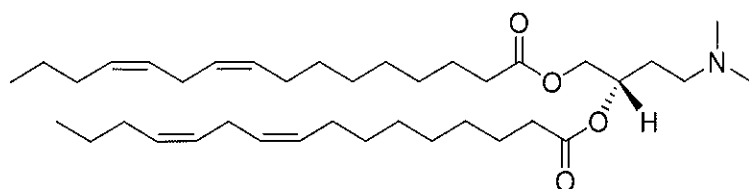
またはその塩も提供される。

【0020】

本明細書で、以下の式の化合物：

10

【化 9】



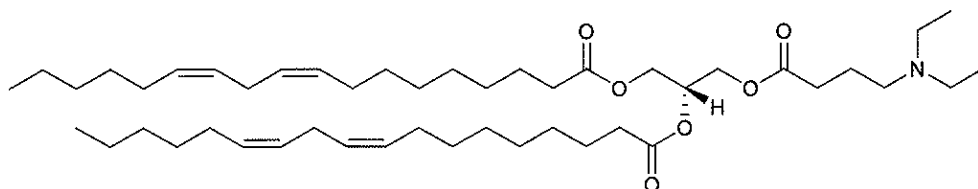
またはその塩も提供される。

【0021】

本明細書で、以下の式の化合物：

20

【化 10】



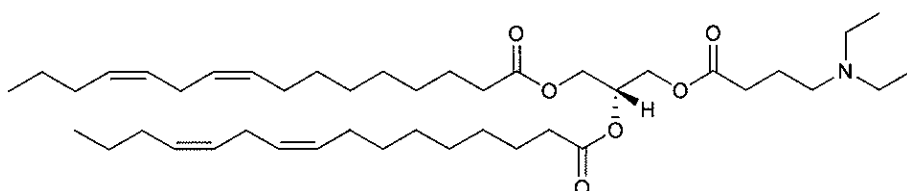
またはその塩も提供される。

【0022】

本明細書で、以下の式の化合物：

30

【化 11】



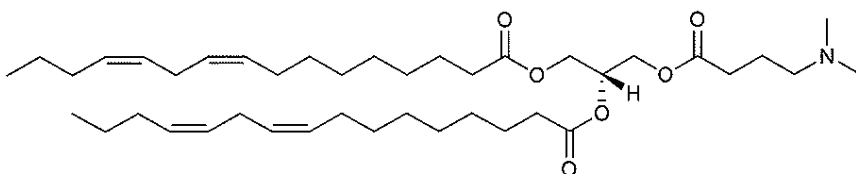
またはその塩も提供される。

【0023】

本明細書で、以下の式の化合物：

40

【化 12】



50

またはその塩も提供される。

【0024】

本明細書で、本明細書で提供されるイオン化可能なカチオン性脂質および／または脂質－免疫細胞標的化基コンジュゲート（例えば、脂質－T細胞標的化基コンジュゲート）を含む脂質ブレンドを含む脂質ナノ粒子（LNP）も提供される。

【0025】

別の態様では、本明細書で、免疫細胞（例えば、T細胞）へ核酸を送達する方法であって、核酸を含有する本明細書に記載されるLNPへ、核酸が免疫細胞に入ることを可能にする条件の下で免疫細胞を曝露させることを含む方法が提供される。

【0026】

別の態様では、本明細書で、それを必要とする対象の免疫細胞（例えば、T細胞）へ核酸を送達する方法であって、核酸を含有する本明細書に記載されるLNPを含む組成物を対象に投与し、それによって核酸を免疫細胞に送達することを含む方法が提供される。

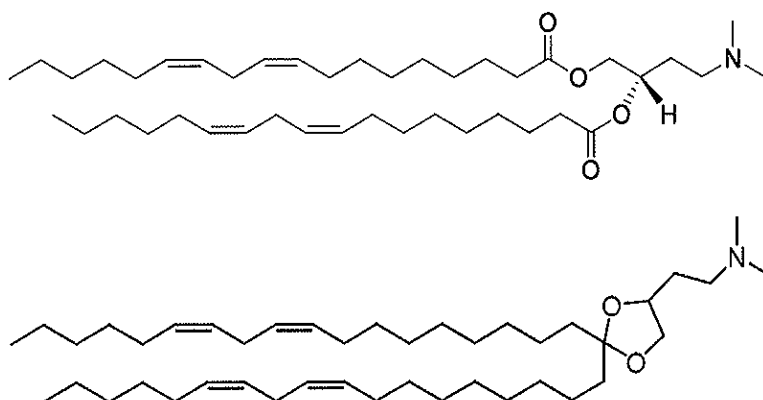
【0027】

別の態様では、本明細書で、対象の免疫細胞（例えば、T細胞）を核酸（例えば、mRNA）の送達の標的にする方法であって、免疫細胞への核酸の標的化送達を促進するために核酸を含有する本明細書に記載されるLNPを対象に投与することを含む方法が提供される。

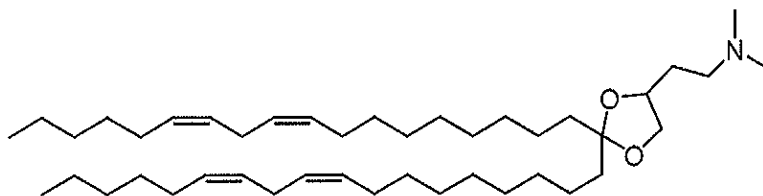
【0028】

一態様では、本明細書で、免疫細胞への核酸の標的化送達のための脂質ブレンドを含む脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。一部の実施形態では、脂質ブレンドは、式IVの化合物：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含む脂質－免疫細胞標的化基コンジュゲートを含む。一部の実施形態では、脂質ブレンドは、イオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、イオン化可能なカチオン性脂質は、

【化13】



または



を含む。一部の実施形態では、LNPは、その中に置かれる核酸を含む。

【0029】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はT細胞抗原に結合する抗体を含む。一部の実施形態では、T細胞抗原はCD3、CD4、CD7またはCD8、またはその組合せ（例えば、CD3とCD8、CD4とCD8、またはCD7とCD8）である。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はナチュラルキラー（NK）細胞抗原に結合する抗体を含む。一部の実施形態では、NK細胞抗原はCD7、CD8またはCD56、またはその組合せ（例えば、CD7とCD8）である。一部の実施形態では、抗体はヒトまたはヒト化抗体である。

【0030】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、ポリエチレングリコール（PEG）含有リンカーを通して脂質ブレンド中の脂質に共有結合している。一部の実施形態では、PEG

含有リンカーを通して免疫細胞標的化基に共有結合している脂質は、ジステアロイルグリセロール (DSG)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイル-グリセロ-ホスホグリセロール (DSPG)、ジミリストイル-グリセロール (DMG)、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジパルミトイル-グリセロール (DPG) またはセラミドである。一部の実施形態では、PEGはPEG 2000である。

【0031】

一部の実施形態では、脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートは、0.002~0.2モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、脂質ブレンドは、構造脂質（例えば、ステロール）、中性リン脂質および遊離PEG-脂質の1つまたはそれ以上を含む。一部の実施形態では、イオン化可能なカチオン性脂質は、40~60モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、ステロールは30~50モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、ステロールは、20~70モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、ステロールはコレステロールである。

10

【0032】

一部の実施形態では、中性リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DSPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、スフィンゴミエリンからなる群から選択される。一部の実施形態では、中性リン脂質は、1~10モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。

20

【0033】

一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は、PEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DSPE) またはPEG-ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DMPE)、N-(メチルポリオキシエチレンオキシカルボニル)-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DPPE-PEG) 1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (PEG-DMG)、1,2-ジパルミトイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (PEG-DPG)、1,2-ジオレオイル-rac-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール (DOG-PEG) 1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (PEG-DSG)、N-パルミトイルスフィンゴシン-1-{サクシニル[メトキシ(ポリエチレングリコール)]} (PEG-セラミド)、およびDSPE-PEG-システイン、またはその誘導体からなる群から選択される。一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は、ジパルミトイル(C16)鎖またはジステアロイル(C18)鎖を含むジアシルホスファチジルエタノールアミンを含む。一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は、2つまたはそれ以上の特異な遊離PEG-脂質の混合物である。一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は、1~4モルパーセント、例えば約1~2モルパーセント、または約2~4モルパーセントの範囲で、または約1.5モルパーセントで脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は、脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲート中の脂質と同じか異なる脂質を含む。

30

40

【0034】

一部の実施形態では、LNPは、50~200nmの範囲の平均直径を有する。一部の実施形態では、LNPは約100nmの平均直径を有する。一部の実施形態では、LNPは0.05~1の範囲の多分散指数を有する。一部の実施形態では、LNPはpH5で約-10mV~約+30mVのゼータ電位を有する。

【0035】

一部の実施形態では、核酸はDNAまたはRNAである。一部の実施形態では、RNA

50

は mRNA、tRNA、siRNA またはマイクロRNA である。一部の実施形態では、mRNA は受容体、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、抗原、酵素またはワクチンをコードする。一部の実施形態では、mRNA は免疫細胞で免疫応答を調節することが可能なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、mRNA は免疫細胞を再プログラムすることが可能なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、mRNA は合成 T 細胞受容体 (synTCR) またはキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする。一部の実施形態では、CAR は配列番号 24 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CAR をコードする mRNA は、配列番号 25 のポリヌクレオチド配列を含む。

【0036】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体を含み、抗体は Fab または免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばナノボディである。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は Fab、F(ab')₂、Fab'-SH、Fv または scFv 断片を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、1 つまたはそれ以上の天然の鎖間ジスルフィド結合をロックアウトするように工学操作されている Fab を含む。例えば、一部の実施形態では、カバット番号付けによると、Fab は C233S 置換を含む重鎖断片および／または C214S 置換を含む軽鎖断片を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、1 つまたはそれ以上の埋まっている鎖間ジスルフィド結合を導入するように工学操作されている Fab を含む。例えば、一部の実施形態では、カバット番号付けによると、Fab 抗体は F174C 置換を含む重鎖断片および／またはカバット番号付けによる S176C 置換を含む軽鎖断片を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、1 つまたはそれ以上の天然の鎖間ジスルフィド結合をロックアウトするように、および 1 つまたはそれ以上の埋まっている鎖間ジスルフィド結合を導入するように工学操作されている Fab を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、重鎖または軽鎖断片の C 末端にシステインを含む Fab を含む。一部の実施形態では、Fab は、Fab の重鎖断片と C 末端システインの間に 1 つまたはそれ以上のアミノ酸をさらに含む。一部の実施形態では、Fab は抗体 CH1 ドメインに連結されている重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている軽鎖可変ドメインを含み、CH1 ドメインおよび軽鎖定常ドメインは 1 つまたはそれ以上の鎖間ジスルフィド結合によって連結され、免疫細胞標的化基はアミノ酸リンカーによって軽鎖定常ドメインの C 末端に連結されている単鎖可変断片 (scFv) をさらに含む。一部の実施形態では、Fab 抗体は、DS Fab (野生型 (天然) 鎖間ジスルフィド結合を有する Fab)、NoDS Fab (天然のジスルフィド結合がロックアウトされた Fab、例えばカバットによる番号付けによる重鎖の上の C233S 置換および／または軽鎖の上の C214S 置換を有する Fab)、bDS Fab (天然のジスルフィド結合がなく、導入された非天然の鎖間の埋まっているジスルフィド結合のある Fab、例えばカバット番号付けによる重鎖の上の F174C および C233S および／または軽鎖の上の S176C および C214S 置換を有する Fab)、または、bDS Fab-ScFv (図 47 で例証されるように、(G4S)_x などのリンカーを通して ScFv に連結されている bDS Fab) である。

【0037】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばナノボディを含む。一部の実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは C 末端にシステインを含む。一部の実施形態では、ナノボディは V_HH ドメインと C 末端システインの間に 1 つまたはそれ以上のアミノ酸を含むスペーサーをさらに含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は 2 つまたはそれ以上の V_HH ドメインを含む。一部の実施形態では、2 つまたはそれ以上の V_HH ドメインはアミノ酸リンカーによって連結されている。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体 CH1 ドメインに連結されている第 1 の V_HH ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている第 2 の V_HH ドメインを含み、抗体 CH1 ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインは 1 つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって連結されている。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体 CH1 ドメインに連結されている V_HH ドメインを含み、抗体 CH1 ドメインは 1 つまたはそれ以上の

10

20

30

40

50

ジスルフィド結合によって抗体軽鎖定常ドメインに連結されている。一部の実施形態では、カバット番号付けによると、CH1ドメインはF174CおよびC233S置換を含み、および／または軽鎖定常ドメインはS176CおよびC214S置換を含む。一部の実施形態では、図47で例証されるように、抗体はScFv、V_{HH}(Nb)、2xV_{HH}、V_{HH}-CH1／空のV_K、またはV_{HH}1-CH1／V_{HH}-2-Nb bDSである。

【0038】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号2または3のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含むFabを含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含むFabを含む。一部の実施形態では、抗体は、実施例で記載される抗体である。

10

【0039】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、以下を含むFabを含む：

(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号2または3のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

(b) 配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

20

(d) 配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

(e) 配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

(f) 配列番号12のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

(g) 配列番号14のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号15のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

(h) 配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

30

(i) 配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

(j) 配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；または

(k) 配列番号22のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号23のアミノ酸配列を含む軽鎖断片。

【0040】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はFab、F(ab')₂、Fab'-SH、FvまたはscFv断片を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、C末端の天然の鎖間ジスルフィド結合をロックアウトするように工学操作されているFabを含む。一部の実施形態では、カバット番号付けによると、FabはC233S置換を含む重鎖断片およびC214S置換を含む軽鎖断片を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、非天然の鎖間ジスルフィド結合（例えば、工学操作された、埋まっている鎖間ジスルフィド結合）を有するFabを含む。一部の実施形態では、カバット番号付けによると、Fabは重鎖断片にF174C置換を、および軽鎖断片にS176C置換を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、重鎖または軽鎖断片のC末端にシステインを含むFabを含む。一部の実施形態では、Fabは、Fabの重鎖断片とC末端システインの間に1つまたはそれ以上のアミノ酸をさらに含む。

40

【0041】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。一

50

部の実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインはC末端にシステインを含む。一部の実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインはV_HHドメインを含み、V_HHドメインとC末端システインの間に1つまたはそれ以上のアミノ酸を含むスペーサーをさらに含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は2つまたはそれ以上のV_HHドメインを含む。一部の実施形態では、2つまたはそれ以上のV_HHドメインはアミノ酸リンカーによって連結されている。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体C_H1ドメインに連結されている第1のV_HHドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている第2のV_HHドメインを含む。一部の実施形態では、抗体C_H1ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインは1つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって連結されている。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体C_H1ドメインに連結されているV_HHドメインを含む。一部の実施形態では、抗体C_H1ドメインは1つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって抗体軽鎖定常ドメインに連結されている。一部の実施形態では、カバット番号付けによると、C_H1ドメインはF174CおよびC233S置換を含み、軽鎖定常ドメインはS176CおよびC214S置換を含む。

10

【0042】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号2または3のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；または(b) 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含むFabを含む。

【0043】

20

別の態様では、本明細書で、対象の免疫細胞を核酸の送達の標的にする方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、免疫細胞を脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、以下の式：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞標的化基]の化合物を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール(PEG)脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。

【0044】

一部の実施形態では、本開示のある態様は、対象の免疫細胞を核酸の送達の標的にする方法で使用するための、本明細書で開示されるLNPまたはそれを含有する医薬組成物に関する。そのような方法は、この後開示されるような疾患または障害の処置のためであってよい。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、対象の免疫細胞をインビトロまたはエクスピボで脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含むことができる。一部の実施形態では、LNPは、本開示でここに記載されるLNPである。

30

【0045】

一部の実施形態では、LNPは以下の利益：

(i) 参照LNPと比較した免疫細胞への標的化送達の特異性の増加；
(ii) 参照LNPと比較した免疫細胞中の核酸または核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
(iii) 参照LNPと比較して増加するトランスフェクション率；および
(iv) 色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル(<15%)および高いRNAカプセル化効率、の少なくとも1つを提供し、
LNPバッチ調製で使用される全RNAに対して最終製剤で少なくとも80%のmRNAが回収された。

40

【0046】

一部の態様では、対象の標的化免疫細胞で目的のポリペプチドを発現させる方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、免疫細胞を脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞

50

胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール(PEG)脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、ポリペプチドをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、本開示のある態様は、対象の標的化免疫細胞で目的のポリペプチドを発現させる方法で使用するための、本明細書で開示されるLNPまたはそれを含有する医薬組成物に関する。そのような方法は、この後開示されるような疾患または障害の処置のためであってよい。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、対象の免疫細胞をインビトロまたはエクスピボで脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含むことができる。

【0047】

一部の実施形態では、LNPは以下の利益：

- (i) 参照LNPと比較した免疫細胞中の発現レベルの増加；
 - (ii) 参照LNPと比較した免疫細胞中の発現の特異性の増加；
 - (iii) 参照LNPと比較した免疫細胞中の核酸または核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
 - (iv) 参照LNPと比較して増加するトランスフェクション率；および
 - (v) 色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル(<15%)および高いRNAカプセル化効率、の少なくとも1つを提供し、
- LNPバッチ調製で使用される全RNAに対して最終製剤で少なくとも80%のmRNAが回収された。

【0048】

一部の態様では、対象の標的免疫細胞の細胞機能をモジュレートする方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、対象に脂質ナノ粒子(LNP)を投与することを含む。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール(PEG)脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは免疫細胞の細胞機能をモジュレートするためのポリペプチドをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、本開示のある態様は、対象の標的化免疫細胞の細胞機能をモジュレートする方法で使用するための、本明細書で開示されるLNPまたはそれを含有する医薬組成物に関する。そのような方法は、この後開示されるような疾患または障害の処置のためであってよい。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、対象の免疫細胞をインビトロまたはエクスピボで脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含むことができる。

【0049】

一部の実施形態では、LNPは以下の利益：

- (i) 参照LNPと比較した免疫細胞中の発現レベルの増加；
 - (ii) 参照LNPと比較した免疫細胞中の発現の特異性の増加；
 - (iii) 参照LNPと比較した免疫細胞中の核酸または核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
 - (iv) 参照LNPと比較して増加するトランスフェクション率；
 - (v) LNPは、免疫細胞で同じ生物学的作用に到達するために参照LNPと比較してより低い用量で投与することができる；および
 - (vi) 色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル(<15%)および高いRNAカプセル化効率、の少なくとも1つを提供し、
- LNPバッチ調製で使用される全RNAに対して最終製剤で少なくとも80%のmRNAが回収された。

【0050】

一部の実施形態では、細胞機能のモジュレーションは、免疫応答を開始するために免疫

10

20

30

40

50

細胞を再プログラムすることを含む。一部の実施形態では、細胞機能のモジュレーションは免疫細胞の抗原特異性をモジュレートすることを含む。

【0051】

一部の態様では、それを必要とする対象で障害または疾患の症状を処置、改善または予防する方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。

10

【0052】

一部の実施形態では、核酸は免疫細胞の免疫応答をモジュレートし、これによって症状を処置または改善する。一部の実施形態では、本開示のある態様は、それを必要とする対象で障害または疾患の症状を処置、改善または予防する方法で使用するための、本明細書で開示されるLNPまたはそれを含有する医薬組成物に関する。疾患または障害は、この後開示されるようなものであってよい。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、対象の免疫細胞をインビトロまたはエキスピボで脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含むことができる。

【0053】

一部の実施形態では、LNPは以下の利益：

- （i）参照LNPと比較した免疫細胞への核酸の送達の特異性の増加；
- （i i）参照LNPと比較した免疫細胞中の核酸または核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
- （i i i）参照LNPと比較して増加するトランスフェクション率；
- （i v）LNPは、同じ処置効果に到達するために参照LNPと比較してより低い用量で投与することができる；
- （v）参照LNPと比較した免疫細胞による機能獲得のレベルの増加；および
- （v i）色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル（<15%）および高いRNAカプセル化効率、の少なくとも1つを提供し、

LNPバッチ調製で使用する全RNAに対して最終製剤で少なくとも80%のmRNAが回収された。

20

30

【0054】

一部の実施形態では、障害は免疫障害、炎症性障害またはがんである。一部の実施形態では、核酸は、病原体による感染症の処置または予防のための治療的または予防的ワクチンで使用するための抗原をコードする。一部の実施形態では、Fab抗体は、カバット番号付けによるF174C置換を含む重鎖断片および／またはカバット番号付けによるS176C置換を含む軽鎖断片を含む。

【0055】

一部の実施形態では、非免疫細胞の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%以下が、LNPによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、送達の予定される目的地ではない望ましくない免疫細胞の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%以下がLNPによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、免疫細胞へLNPによって送達される核酸またはLNPによって送達される核酸によってコードされるポリペプチドの半減期は、免疫細胞へ参照LNPによって送達される核酸または参照LNPによって送達される核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍であるかまたはそれより長い。

40

【0056】

50

一部の実施形態では、送達の予定の目的地である免疫細胞の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、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90%、少なくとも95%またはそれより多くがLNPによってトランスフェクトされる。

【0057】

一部の実施形態では、LNPによって送達される核酸の発現レベルは、参照LNPによって送達される同じ免疫細胞中の核酸の発現レベルより少なくとも5%、少なくとも10%、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍またはそれ以上高い。

10

【0058】

一態様では、対象のNK細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。LNPは、（a）イオン化可能なカチオン性脂質、（b）以下の構造：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；（c）ステロールまたは他の構造脂質；（d）中性リン脂質；（e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および（f）核酸、を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はCD56に結合する抗体を含む。

【0059】

一態様では、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。LNPは、（a）イオン化可能なカチオン性脂質、（b）以下の構造：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；（c）ステロールまたは他の構造脂質；（d）中性リン脂質；（e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および（f）核酸、を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、CD7またはCD8に結合する抗体を含み、遊離PEG脂質はDMG-PEGである。

20

【0060】

一態様では、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。LNPは、（a）イオン化可能なカチオン性脂質、（b）以下の構造：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；（c）ステロールまたは他の構造脂質；（d）リン脂質；（e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および（f）核酸、を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体を含み、抗体はFabまたは免疫グロブリン単一可変ドメインである。一部の実施形態では、Fabは、C末端の天然の鎖間ジスルフィドをロックアウトするように工学操作されている。一部の実施形態では、Fabは、埋まっている鎖間ジスルフィドを有する。一部の実施形態では、抗体は免疫グロブリン単一可変（ISV）ドメインであり、ISVドメインはNanobody（登録商標）ISVである。一部の実施形態では、遊離PEG脂質は少なくとも2000ダルトンの分子量を有するPEGを含む。一部の実施形態では、PEGは約3000～5000ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、Fabは抗CD3抗体であり、LNP中の遊離PEG脂質は約2000ダルトンの分子量を有するPEGを含む。一部の実施形態では、Fabは抗CD4抗体であり、LNP中の遊離PEG脂質は約3000～3500ダルトンの分子量を有するPEGを含む。

30

40

【0061】

一態様では、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。LNPは、（a）イオン化可能なカチオン性脂質、（b）以下の構造：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲート；（c）ステロールまたは他の構造脂質；（d）中性リン脂質；（e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および（f）核酸、を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、CD3に結合する抗体、およびCD11aまたはCD18に結合する抗体を含む。

【0062】

一態様では、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。LNPは、（a）イオン化可能なカチオン性脂質、（b）以下の構造：[脂質] -

50

〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲート；（c）ステロールまたは他の構造脂質；（d）中性リン脂質；（e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および（f）核酸、を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、CD 7に結合する抗体、およびCD 8に結合する抗体を含む。

【0063】

一態様では、対象の2つの異なるタイプの免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。LNPは、（a）イオン化可能なカチオン性脂質、（b）以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲート；（c）ステロールまたは他の構造脂質；（d）中性リン脂質；（e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および（f）核酸、を含む。

10

【0064】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、二重特異性標的化部分を含む。一部の実施形態では、二重特異性標的化部分は2つの異なるタイプの免疫細胞に結合する。一部の実施形態では、2つの異なるタイプの免疫細胞はCD 4＋T細胞およびCD 8＋T細胞である。一部の実施形態では、二重特異性標的化部分は、二重特異性抗体である。一部の実施形態では、二重特異性抗体は、Fab－ScFvである。

【0065】

一態様では、対象のCD 4＋およびCD 8＋T細胞の両方に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。LNPは、（a）イオン化可能なカチオン性脂質、（b）以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲート；（c）ステロールまたは他の構造脂質；（d）中性リン脂質；（e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および（f）核酸、を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、CD 3またはCD 7に結合する単一の抗体を含む。

20

【0066】

対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）がさらに提供され、LNPは：（a）イオン化可能なカチオン性脂質、（b）以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲート；（c）ステロールまたは他の構造脂質；（d）中性リン脂質；（e）遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質、および（f）核酸を含み、免疫細胞標的化基は天然の鎖間ジスルフィド結合を欠くFabを含む。一部の実施形態では、Fabは、非システインアミノ酸と天然の鎖間ジスルフィドを形成する、天然の定常軽鎖および天然の定常重鎖の上の片方または両方のシステインを置き換え、これによりFabの天然の鎖間ジスルフィド結合を除去するように工学操作されている。

30

【0067】

ヒトCD 8に結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン（ISVD）も提供される。一部の実施形態では、ISVDは3つの相補性決定ドメインCDR 1、CDR 2およびCDR 3を含み、

（a）CDR 1はGSTFS DY G（配列番号100）を含み、

（b）CDR 2はIDWNGE HT（配列番号101）を含み、

（c）CDR 3はAADALPYTVRK YNY（配列番号102）を含む。

40

【0068】

一部の実施形態では、ISVDはヒト化される。

【0069】

一部の実施形態では、ISVDは配列番号77を含むか、それからなるか、それから本質的になる。

【0070】

GSTFS DY G（配列番号100）、IDWNGE HT（配列番号101）およびAADALPYTVRK YNY（配列番号102）を含むポリペプチドも提供される。

【0071】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、本明細書に記載されるISVDを含む。

50

【0072】

一部の実施形態では、ポリペプチドは第2の結合性部分をさらに含み、第2の結合性部分はCD8または別の異なる標的に結合する。一部の実施形態では、第2の結合性部分もISVDである。

【0073】

一部の実施形態では、ポリペプチドは検出可能なマーカーまたは治療剤をさらに含む。

【0074】

本明細書に記載されるISVDまたはポリペプチドを含む組成物も提供される。

【0075】

本明細書に記載されるISVDまたはポリペプチド、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物がさらに提供される。

10

【0076】

対象でCD8に関連した疾患または障害を処置する方法であって、本明細書に記載される医薬組成物を対象に投与することを含む方法がさらに提供される。

【0077】

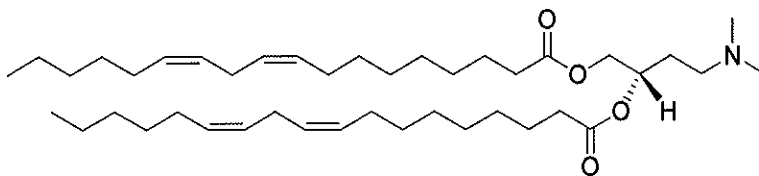
一部の実施形態では、疾患はがんである。一部の実施形態では、障害は免疫障害、炎症性障害またはがんである。

【0078】

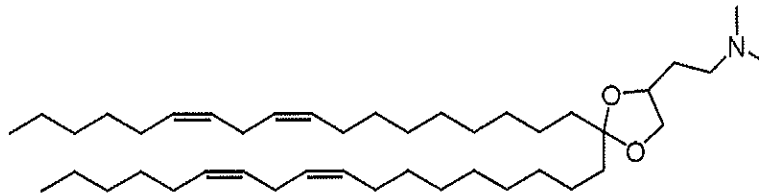
一部の実施形態では、核酸は、病原体による感染症の処置または予防のための治療的または予防的ワクチンで使用するための抗原をコードする。一部の実施形態では、イオン化可能なカチオン性脂質は、

20

【化14】



または



30

である。

【0079】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はT細胞抗原に結合する抗体を含む。一部の実施形態では、T細胞抗原はCD3、CD8またはCD3およびCD8の両方である。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はナチュラルキラー（NK）細胞抗原に結合する抗体を含む。一部の実施形態では、NK細胞抗原はCD56である。一部の実施形態では、抗体は、ヒトのまたはヒト化された抗体である。

40

【0080】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、ポリエチレングリコール（PEG）含有リンカーを通して脂質ブレンド中の脂質に共有結合している。一部の実施形態では、PEG含有リンカーを通して免疫細胞標的化基に共有結合している脂質は、ジステアロイルグリセロール（DSG）、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン（DSPE）、ジミリスティル-ホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイル-グリセロール-ホスホグリセロール（DSPG）、ジミリスティル-グリセロール（DMG）、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジパルミトイル-グリセ

50

ロール（DPG）またはセラミドである。一部の実施形態では、PEGはPEG 2000である。

【0081】

一部の実施形態では、脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートは、0.002～0.2モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、イオン化可能なカチオン性脂質は、40～60モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。

【0082】

一部の実施形態では、ステロールはコレステロールである。一部の実施形態では、ステロールは、30～50モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、中性リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DSPЕ）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、スフィンゴミエリンからなる群から選択される。

【0083】

一部の実施形態では、中性リン脂質は、1～10モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。

【0084】

一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は、PEG改変ホスファチジルエタノールアミン、PEG改変ホスファチジン酸、PEG改変セラミド、PEG改変ジアルキルアミン、PEG改変ジアシルグリセロールおよびPEG改変ジアルキルグリセロールからなる群から選択される。例えば、PEG脂質は、PEG-ジオレオイルグリセロール（PEG-D OG）、PEG-ジミリストイル-グリセロール（PEG-DMG）、PEG-ジパルミトイル-グリセロール（PEG-DPG）、PEG-ジリノレオイル-グリセロ-ホスファチジルエタノールアミン（PEG-DLPE）、PEG-ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（PEG-DMPE）、PEG-ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（PEG-DPPE）、PEG-ジステアロイルグリセロール（PEG-DSG）、PEG-ジアシルグリセロール（PEG-DAG、例えば、PEG-DMG、PEG-DPGおよびPEG-DSG）、PEG-セラミド、PEG-ジステアロイル-グリセロ-ホスホグリセロール（PEG-DSPG）、PEG-ジオレオイル-グリセロ-ホスホエタノールアミン（PEG-DOPE）、2-[(ポリエチレングリコール)-2000]-N，N-ジテトラデシルアセトアミドまたはPEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン（PEG-DSPЕ）脂質であってよい。

【0085】

一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は、ジパルミトイル（C16）鎖またはジステアロイル（C18）鎖を含むジアシルホスファチジルエタノールアミンを含む。一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は、2～4モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲート中の脂質と同じか異なる脂質を含む。

【0086】

一部の実施形態では、LNPは、50～200nmの範囲の平均直径を有する。一部の実施形態では、LNPは約100nmの平均直径を有する。一部の実施形態では、LNPは0.05～1の範囲の多分散指数を有する。一部の実施形態では、LNPはpH5で約-10mV～約+30mVのゼータ電位を有する。

【0087】

一部の実施形態では、核酸はDNAまたはRNAである。一部の実施形態では、RNAはmRNA、tRNA、siRNAまたはマイクロRNAである。一部の実施形態では、mRNAは受容体、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、抗原、酵素またはワクチンをコードする。一部の実施形態では、mRNAは免疫細胞で免疫応答を調節することが

10

20

30

40

50

可能なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、mRNAは免疫細胞を再プログラムすることが可能なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、mRNAは合成T細胞受容体(synTCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)をコードする。

【0088】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体を含み、この抗体はFabまたは免疫グロブリン単一可変ドメインである。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はFab、F(ab')₂、Fab'-SH、FvおよびscFv断片からなる群から選択される抗体断片を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は1つまたはそれ以上の鎖間ジスルフィド結合を含むFabを含む。一部の実施形態では、カバット番号付けによると、FabはF174CおよびC233S置換を含む重鎖断片およびS176CおよびC214S置換を含む軽鎖断片を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は重鎖または軽鎖断片のC末端にシステインを含むFabを含む。

10

【0089】

一部の実施形態では、Fabは、Fabの重鎖断片とC末端システインの間に1つまたはそれ以上のアミノ酸をさらに含む。一部の実施形態では、Fabは抗体CH1ドメインに連結されている重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、CH1ドメインおよび軽鎖定常ドメインは1つまたはそれ以上の鎖間ジスルフィド結合によって連結されている。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、アミノ酸リンカーによって軽鎖定常ドメインのC末端に連結されている単鎖可変断片(scFv)をさらに含む。

20

【0090】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。一部の実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインはC末端にシステインを含む。一部の実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインはVHHドメインを含み、VHHドメインとC末端システインの間に1つまたはそれ以上のアミノ酸を含むスペーサーをさらに含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は2つまたはそれ以上のVHHドメインを含む。一部の実施形態では、2つまたはそれ以上のVHHドメインはアミノ酸リンカーによって連結されている。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体CH1ドメインに連結されている第1のVHHドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている第2のVHHドメインを含む。一部の実施形態では、抗体CH1ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインは1つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって連結されている。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体CH1ドメインに連結されているVHHドメインを含む。一部の実施形態では、抗体CH1ドメインは1つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって抗体軽鎖定常ドメインに連結されている。一部の実施形態では、カバット番号付けによるとCH1ドメインはF174CおよびC233S置換を含み、軽鎖定常ドメインはS176CおよびC214S置換を含む。

30

【0091】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は：

(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号2または3のアミノ酸配列を含む軽鎖断片；

40

(b) 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖断片、を含むFabを含む。

【0092】

一部の実施形態では、5%以下の非免疫細胞がLNPによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、LNPによって送達される核酸またはLNPによって送達される核酸によってコードされるポリペプチドの半減期は、参照LNPによって送達される核酸または参照LNPによって送達される核酸によってコードされるポリペプチドの半減期より少なくとも10%長い。一部の実施形態では、少なくとも10%の免疫細胞がLNPによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、LNPによって送達される核酸の

50

発現レベルは、参照 L N P によって送達される核酸の発現レベルより少なくとも 1 0 % 高い。

【 0 0 9 3 】

一部の態様では、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（L N P）が提供される。一部の実施形態では、L N P はイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、L N P は、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は、遊離ポリエチレングリコール（P E G）脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は核酸を含む。一部の実施形態では、免疫細胞は N K 細胞である。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、C D 5 6 に結合する抗体を含む。

10

【 0 0 9 4 】

一部の態様では、本明細書で、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（L N P）が提供される。一部の実施形態では、L N P はイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、L N P は、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は、遊離ポリエチレングリコール（P E G）脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は核酸を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、C D 7 または C D 8 に結合する抗体を含む。一部の実施形態では、遊離 P E G 脂質は D M G－P E G である。

20

【 0 0 9 5 】

一部の態様では、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（L N P）が提供される。一部の実施形態では、L N P はイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、L N P は、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は、遊離ポリエチレングリコール（P E G）脂質を含む。一部の実施形態では、L N P は核酸を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体を含む。一部の実施形態では、抗体は F a b または免疫グロブリン単一可変ドメインである。

30

【 0 0 9 6 】

一部の実施形態では、F a b は、C 末端の天然の鎖間ジスルフィドをロックアウトするように工学操作されている。一部の実施形態では、F a b は、C 2 3 3 S 置換を含む重鎖断片および C 2 1 4 S 置換を含む軽鎖断片を含む。一部の実施形態では、F a b は非天然の鎖間ジスルフィドを含む。一部の実施形態では、F a b は重鎖断片に F 1 7 4 C 置換を、および軽鎖断片に S 1 7 6 C 置換を含む。一部の実施形態では、抗体は免疫グロブリン単一可変（I S V）ドメインであり、I S V ドメインは N a n o b o d y（登録商標）I S V である。一部の実施形態では、遊離 P E G 脂質は少なくとも 2 0 0 0 ダルトンの分子量を有する P E G を含む。一部の実施形態では、P E G は約 3 0 0 0 ～ 5 0 0 0 ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、抗体は F a b である。一部の実施形態では、F a b は C D 3 に結合し、L N P 中の遊離 P E G 脂質は約 2 0 0 0 ダルトンの分子量を有する P E G を含む。一部の実施形態では、F a b は抗 C D 4 抗体であり、L N P 中の遊離 P E G 脂質は約 3 0 0 0 ～ 3 5 0 0 ダルトンの分子量を有する P E G を含む。

40

【 0 0 9 7 】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は 2 つまたはそれ以上の V H H ドメインを含む。一部の実施形態では、2 つまたはそれ以上の V H H ドメインはアミノ酸リンカーによって連結されている。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体 C H 1 ドメインに連結されている第 1 の V H H ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている第 2 の V H H ドメインを含む。

【 0 0 9 8 】

50

一部の態様では、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。

【0099】

一部の実施形態では、LNPはCD3に結合し、CD11aまたはCD18にも結合する。一部の実施形態では、LNPは、2つのコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、第1のコンジュゲートは、CD3に結合する抗体を含む。一部の実施形態では、第2のコンジュゲートは、CD11aまたはCD18に結合する抗体を含む。一部の実施形態では、LNPは1つのコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、コンジュゲートはCD3およびCD11aに結合する二重特異性抗体を含む。一部の実施形態では、コンジュゲートはCD3およびCD18の両方に結合する二重特異性抗体を含む。一部の実施形態では、二重特異性抗体は免疫グロブリン単一可変ドメインまたはFab-ScFvである。

【0100】

一部の態様では、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。一部の実施形態では、LNPは免疫細胞のCD7およびCD8に結合する。

【0101】

一部の実施形態では、LNPは2つのコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、第1のコンジュゲートはCD7に結合する抗体を含み、第2のコンジュゲートはCD8に結合する抗体を含む。一部の実施形態では、LNPは1つのコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、コンジュゲートはCD7およびCD8に結合する二重特異性抗体を含む。一部の実施形態では、二重特異性抗体は免疫グロブリン単一可変ドメインまたはFab-ScFvである。

【0102】

一部の態様では、対象の2つの異なるタイプの免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。一部の実施形態では、LNPは：イオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。一部の実施形態では、LNPは第1のタイプの免疫細胞の表面の第1の抗原に結合し、さらに第2のタイプの免疫細胞の表面の第2の抗原にも結合する。一部の実施形態では、2つの異なるタイプの免疫細胞はCD4+T細胞およびCD8+T細胞である。一部の実施形態では、LNPは2つのコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、第1のコンジュゲートは第1のタイプの免疫細胞の第1の抗原に結合する第1の抗体を含み、第2のコンジュゲートは第2のタイプの免疫細胞の第2の抗原に結合する第2の抗体を含む。一部の実施形態では、LNPは1つのコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、コンジュゲートは二重特異性抗体を含む。一部の実施形態では、二重特異性抗体は第1のタイプの免疫細胞の上の第1の抗原、第2のタイプの免疫細胞の上の第2の抗原の両方に結合する。一部の実施形態では、二重特異性抗体は免疫グロブリン単一可変ドメインまたはFab-ScFvである。

【0103】

一部の態様では、対象のCD4+およびCD8+T細胞の両方に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、CD3またはCD7に結合する単一の抗体を含む。

【0104】

一部の態様では、対象のT細胞およびNK細胞の両方に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はCD7、CD8、またはCD7およびCD8の両方に結合する。

【0105】

一部の態様では、対象のT細胞およびNK細胞の両方に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）が提供される。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、(i) CD3およびCD56の両方；(ii) CD8およびCD56の両方；または(iii) CD7およびCD56の両方に結合する。

【0106】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、ポリエチレングリコール（PEG）含有リンカーを通して脂質ブレンド中の脂質に共有結合している。一部の実施形態では、PEG含有リンカーを通して免疫細胞標的化基に共有結合している脂質は、ジステアロイルグリセロール（DSG）、ジステアロイル－ホスファチジルエタノールアミン（DSPE）、ジミリストイル－ホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイル－グリセロール－ホスホグリセロール（DSPG）、ジミリストイル－グリセロール（DMG）、ジパルミトイル－ホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジパルミトイル－グリセロール（DPG）またはセラミドである。一部の実施形態では、脂質－免疫細胞標的化基コンジュゲートは、0.002～0.2モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、脂質ブレンドは、構造脂質（例えば、ステロール）、中性リン脂質および遊離PEG－脂質の1つまたはそれ以上をさらに含む。

【0107】

一部の実施形態では、イオン化可能なカチオン性脂質は、40～60モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。

【0108】

一部の実施形態では、ステロールは、30～50モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、ステロールはコレステロールである。

【0109】

一部の実施形態では、中性リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスホエタノールアミン（DSPE）、1,2－ジステアロイル－sn－グリセロ－3－ホスホコリン（DSPC）、1,2

10

20

30

40

50

ージオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (D O P E)、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (D O P C) からなる群から選択される。一部の実施形態では、中性リン脂質は、1~10モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。

【0110】

一部の実施形態では、遊離 P E G-脂質は P E G-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (P E G-D S P E) または P E G-ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン (P E G-D M P E)、N-(メチルポリオキシエチレンオキシカルボニル)-1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (D P P E-P E G) 1, 2-ジミリストイル-r a c-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (P E G-D M G)、1, 2-ジパルミトイル-r a c-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (P E G-D P G)、1, 2-ジオレオイル-r a c-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール (D O G-P E G) 1, 2-ジステアロイル-r a c-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (P E G-D S G)、N-パルミトイルスフィンゴシン-1-{サクシニル [メトキシ (ポリエチレングリコール)]} (P E G-セラミド)、および D S P E-P E G-システイン、またはその誘導体からなる群から選択される。一部の実施形態では、遊離 P E G-脂質は、ジパルミトイル (C 1 6) 鎖またはジステアロイル (C 1 8) 鎖を含むジアシルホスファチジルエタノールアミンを含む。一部の実施形態では、遊離 P E G-脂質は、1~2モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する。一部の実施形態では、遊離 P E G-脂質は、脂質免疫細胞標的化基コンジュゲート中の脂質と同じか異なる脂質を含む。

10

20

【0111】

一部の実施形態では、L N Pは、50~200nmの範囲の平均直径を有する。一部の実施形態では、L N Pは約100nmの平均直径を有する。一部の実施形態では、L N Pは0.05~1の範囲の多分散指数を有する。一部の実施形態では、L N Pはp H 5で約-10mV~約+30mVのゼータ電位を有する。

【0112】

一部の実施形態では、核酸はD N AまたはR N Aである。一部の実施形態では、R N Aはm R N Aである。一部の実施形態では、m R N Aは受容体、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、抗原、酵素またはワクチンをコードする。一部の実施形態では、m R N Aは免疫細胞での免疫応答を調節することが可能なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、m R N Aは免疫細胞を再プログラムすることが可能なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、m R N Aは合成T細胞受容体 (s y n T C R) またはキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする。

30

【0113】

一部の態様では、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子 (L N P) が提供される。一部の実施形態では、L N Pはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、L N Pは以下の構造: [脂質]-[任意選択のリンカー]-[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、L N Pは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、L N Pは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、L N Pは、遊離ポリエチレングリコール (P E G) 脂質を含む。一部の実施形態では、L N Pは核酸を含む。

40

【0114】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は天然の鎖間ジスルフィド結合を欠く F a b を含む。一部の実施形態では、F a b は、非システインアミノ酸と天然の鎖間ジスルフィドを形成する、天然の定常軽鎖および天然の定常重鎖の上の片方または両方のシステインを置き換え、これにより F a b の天然の鎖間ジスルフィド結合を除去するように工学操作されている。

【0115】

一部の態様では、対象の免疫細胞を核酸の送達の標的にする方法が提供される。一部の

50

実施形態では、本方法は、免疫細胞を本明細書で提供される脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含む。一部の実施形態では、本方法は、NK細胞を標的にするためのものである。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はCD56に結合する。一部の実施形態では、本方法は、T細胞およびNK細胞を同時に標的にするためのものである。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、CD7、CD8、またはCD7およびCD8の両方に結合する。一部の実施形態では、本方法は、CD4+およびCD8+ T細胞を同時に標的にするためのものである。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、CD3またはCD7に結合するポリペプチドを含む。

【0116】

一部の態様では、対象の標的化免疫細胞中で目的のポリペプチドを発現させる方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、免疫細胞を本明細書で提供される脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含む。

10

【0117】

一部の態様では、対象の標的免疫細胞の細胞機能をモジュレートする方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、対象に本明細書で提供される脂質ナノ粒子（LNP）を投与することを含む。

【0118】

一部の態様では、それを必要とする対象で障害または疾患の症状を処置、改善または予防する方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、対象に本明細書で提供される脂質ナノ粒子（LNP）を投与することを含む。

20

【0119】

一部の態様では、ヒトCD8に結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン（ISVD）が提供される。一部の実施形態では、ISVDは3つの相補性決定ドメインCDR1、CDR2およびCDR3を含む。一部の実施形態では、CDR1はGSTFSDYG（配列番号100）を含む。一部の実施形態では、CDR2はIDWNGEHT（配列番号101）を含む。一部の実施形態では、CDR3はAADALPYTVRKYN（配列番号102）を含む。一部の実施形態では、ISVDはヒト化される。一部の実施形態では、ISVDは配列番号77を含む。

【0120】

一部の態様では、GSTFSDYG（配列番号100）、IDWNGEHT（配列番号101）およびAADALPYTVRKYN（配列番号102）を含むポリペプチドが提供される。別の態様では、本明細書で提供されるISVDを含むポリペプチドが提供される。一部の実施形態では、ポリペプチドは第2の結合性部分を含む。一部の実施形態では、第2の結合性部分はCD8または別の異なる標的に結合する。一部の実施形態では、第2の結合性部分もISVDである。一部の実施形態では、ポリペプチドは検出可能なマーカーを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは治療剤を含む。

30

【0121】

一部の態様では、本明細書で提供されるISVDまたは本明細書で提供されるポリペプチドを含む組成物が提供される。

【0122】

一部の態様では、本明細書で提供されるISVDまたは本明細書で提供されるポリペプチド、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。

40

【0123】

一部の態様では、対象でCD8に関連した疾患または障害を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、本明細書に記載される医薬組成物を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、疾患または障害はがんである。

【0124】

本発明の様々な態様および実施形態は、下でさらに詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0125】

50

- 【図1】図1は、脂質1のNMRスペクトルを表す図である。
- 【図2A】脂質1のLC-MSスペクトルを表す図である。
- 【図2B】脂質1のLC-MSスペクトルを表す図である。
- 【図3】図3は、脂質2のNMRスペクトルを表す図である。
- 【図4A】脂質2のLC-MSスペクトルを表す図である。
- 【図4B】脂質2のLC-MSスペクトルを表す図である。
- 【図5】図5は、脂質3のNMRスペクトルを表す図である。
- 【図6】図6は、脂質4のNMRスペクトルを表す図である。
- 【図7A】脂質4のLC-MSスペクトルを表す図である。
- 【図7B】脂質4のLC-MSスペクトルを表す図である。
- 【図8A】脂質2および脂質6のLNP pKa (TNS)を表す図である。
- 【図8B】脂質5および脂質7のLNP pKa (TNS)を表す図である。
- 【図9A】脂質2および脂質6由来のLNPの流体力学直径を表す図である。
- 【図9B】脂質2および脂質6由来のLNPの多分散（動的光散乱）を表す図である。
- 【図10A】脂質5および脂質7由来のLNPの流体力学直径を表す図である。
- 【図10B】脂質5および脂質7由来のLNPの多分散（動的光散乱）を表す図である。
- 【図11】図11A～Dは、脂質2および脂質6由来のLNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション、GFP+細胞%（図11A）、GFP平均蛍光強度(MFI)（図11B）、Cy5-GFP+細胞%（図11C）およびCy5-GFP MFI、E. T細胞生存率（図11D）を表す図である。
- 【図12】図12A～Eは、脂質5および脂質7由来のLNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション、GFP+細胞%（図12A）、GFP平均蛍光強度(MFI)（図12B）、Cy5-GFP+細胞%（図12C）、Cy5-GFP MFI（図12D）、T細胞生存率（図12E）を表す図である。
- 【図13A】24時間のトランスフェクション後のGFP+（翻訳）ヒトCD8 T細胞%を表す図である。
- 【図13B】24時間のトランスフェクション後のCy5+（結合）ヒトCD8 T細胞%を表す図である。
- 【図14A】24時間のトランスフェクション後の生存ヒトCD8 T細胞%を表す図である。
- 【図14B】24時間のトランスフェクション後の細胞培養上清から測定されたヒトIFN γ を表す図である。
- 【図15A】mRNA LNPを用いる24時間のトランスフェクション後のTTR-023+（抗CD20 CAR）CD8 T細胞%を表す図である。
- 【図15B】mRNA LNPを用いた24時間のトランスフェクション後のTTR-023+（抗CD20 CAR）CD4 T細胞%を表す図である。
- 【図16A】抗CD20 CAR mRNA LNPを用いる24時間のトランスフェクション後のCD69+CD8細胞%を表す図である。
- 【図16B】抗CD20 CAR mRNA LNPを用いた24時間のトランスフェクション後のCD69+CD4 T細胞%を表す図である。
- 【図17】図17は、抗CD20 CAR mRNA LNPを用いる24時間のトランスフェクション後のT細胞によるヒトIFN γ 分泌を表す図である。
- 【図18A】24時間の2.5 μ g/mLのCy5/GFP mRNAを用いる24時間のトランスフェクション後のCD8 T細胞のGFP+（トランスフェクション／翻訳）%を表す図である。
- 【図18B】24時間の2.5 μ g/mLのCy5/GFP mRNAを用いる24時間のトランスフェクション後のCD8 T細胞のGFP+（トランスフェクション／翻訳）平均蛍光強度(MFI)%を表す図である。
- 【図19A】24時間の2.5 μ g/mLのCy5/GFP mRNAを用いる24時間のトランスフェクション後のCD8 T細胞のCy5+（結合）%を表す図である。

【図 19 B】24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy5 / GFP mRNA を用いる 24 時間のトランスフェクション後の CD8⁺ T 細胞の Cy5 (結合) 平均蛍光強度 (MFI) を表す図である。

【図 20 A】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy5 / GFP mRNA LNP を用いてトランスフェクトされたヒト CD3 細胞の GFP+ (トランスフェクション/翻訳) CD8 細胞 % を表す図である。

【図 20 B】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy5 / GFP mRNA LNP を用いてトランスフェクトされたヒト CD3 細胞の GFP+ (トランスフェクション/翻訳) CD4 細胞 % を表す図である。

【図 21 A】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy5 / GFP mRNA LNP を用いてトランスフェクトされたヒト CD3 細胞の Cy5+ (結合) CD8 細胞 % を表す図である。

【図 21 B】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy5 / GFP mRNA LNP を用いてトランスフェクトされたヒト CD3 細胞の Cy5+ (結合) CD4 細胞 % を表す図である。

【図 22 A】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy5 / GFP mRNA LNP を用いてトランスフェクトされたヒト CD3 細胞の CD69+CD8 細胞 % を表す図である。

【図 22 B】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy5 / GFP mRNA LNP を用いてトランスフェクトされたヒト CD3 細胞の CD69+CD4 細胞 % を表す図である。

【図 23】図 23 は、24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cy5 / GFP mRNA LNP を用いてトランスフェクトされたヒト CD3 細胞からのヒト IFN γ 分泌を表す図である。

【図 24 A】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mCherry mRNA LNP で全血中においてトランスフェクトされた mCherry+ CD8⁺ T 細胞 % を表す図である。

【図 24 B】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mCherry mRNA LNP で全血中においてトランスフェクトされた mCherry+ CD4⁺ T 細胞 % を表す図である。

【図 25 A】、24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mCherry mRNA LNP で全血中においてトランスフェクトされた mCherry+ B 細胞 % を表す図である。

【図 25 B】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mCherry mRNA LNP で全血中においてトランスフェクトされた mCherry+ NK 細胞 % を表す図である。

【図 26 A】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mCherry mRNA LNP で全血中においてトランスフェクトされた mCherry+ 顆粒球 % を表す図である。

【図 26 B】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mCherry mRNA LNP で全血中においてトランスフェクトされた CD69+CD8⁺ T 細胞 % を表す図である。

【図 26 C】24 時間、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mCherry mRNA LNP で全血中においてトランスフェクトされた CD69+CD4⁺ T 細胞 % を表す図である。

【図 27 A】、血液における CD3 によって標的化される mCherry LNP を用いるそれぞれ CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞の *in vivo* 再プログラムの経時的推移を表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の記号は、バッファ対照処置されたマウスを表し、塗りつぶされた記号は、mCherry LNP 処置されたものを表す。丸は 24 時間を表し、三角は 48 時間を表し、菱形は 96 時間を表す。

【図 27 B】血液における CD3 によって標的化される mCherry LNP を用いるそれぞれ CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞の *in vivo* 再プログラムの経時的推移を表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の記号は、バッファ対照処置されたマウスを表し、塗りつぶされた記号は、mCherry LNP 処置されたものを表す。丸は 24 時間を表し、三角は 48 時間を表し、菱形は 96 時間を表す。

【図 27 C】肝臓における CD8⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞の *in vivo* 再プログラムの経時的推移を表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。バッファ対照処置されたマウスを表し、塗りつぶされた記号は、mCherry LNP 処置されたものを表す。丸は 24 時間を表し、三角は 48 時間を表し、菱形は 96 時間を表す。

【図 27D】肝臓における CD8+T 細胞および CD4+T 細胞の *in vivo* 再プログラムの経時的推移を表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。バッファ対照処置されたマウスを表し、塗りつぶされた記号は、mCherry LNP 処置されたものを表す。丸は 24 時間を表し、三角は 48 時間を表し、菱形は 96 時間を表す。

【図 27E】脾臓における CD8+T 細胞および CD4+T 細胞の *in vivo* 再プログラムの経時的推移を表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の記号は、バッファ対照処置されたマウスを表し、塗りつぶされた記号は、mCherry LNP 処置されたものを表す。丸は 24 時間を表し、三角は 48 時間を表し、菱形は 96 時間を表す。

【図 27F】脾臓における CD8+T 細胞および CD4+T 細胞の *in vivo* 再プログラムの経時的推移を表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の記号は、バッファ対照処置されたマウスを表し、塗りつぶされた記号は、mCherry LNP 処置されたものを表す。丸は 24 時間を表し、三角は 48 時間を表し、菱形は 96 時間を表す。

【図 28】図 28 は、CD3 によって標的化される mCherry LNP を用いて 24 時間処置した後の肝臓、骨髄および Kupfer 細胞における mCherry の最小発現を表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の記号は、バッファ対照処置されたマウスを表し、塗りつぶされた記号は、mCherry LNP 処置されたものを表す。

【図 29A】血液における mCherry を発現する LNP の第 1 の用量の 24 時間後の *in vivo* 再プログラムを表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は mCherry を発現している CD4+T 細胞であり、中白の四角は mCherry を発現している CD8+T 細胞である。

【図 29B】血液における TTR-023 を発現する LNP の第 1 の用量の 24 時間後の *in vivo* 再プログラムを表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は抗 CD20 CAR を発現している CD4+T 細胞であり、中白の四角は抗 CD20 CAR を発現している CD8+T 細胞である。

【図 30A】図 30A~E は、血液（図 30A）、脾臓（図 30B）、肝臓（図 30C）、骨髄（図 30D）および胸腺（図 30E）における TTR-023 を発現する LNP を用いる第 2 の用量の 40 時間後の *in vivo* 再プログラムを表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は抗 CD20 CAR を発現している CD4+T 細胞であり、中白の四角は抗 CD20 CAR を発現している CD8+T 細胞である。

【図 30B】図 30A~E は、血液（図 30A）、脾臓（図 30B）、肝臓（図 30C）、骨髄（図 30D）および胸腺（図 30E）における TTR-023 を発現する LNP を用いる第 2 の用量の 40 時間後の *in vivo* 再プログラムを表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は抗 CD20 CAR を発現している CD4+T 細胞であり、中白の四角は抗 CD20 CAR を発現している CD8+T 細胞である。

【図 30C】図 30A~E は、血液（図 30A）、脾臓（図 30B）、肝臓（図 30C）、骨髄（図 30D）および胸腺（図 30E）における TTR-023 を発現する LNP を用いる第 2 の用量の 40 時間後の *in vivo* 再プログラムを表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は抗 CD20 CAR を発現している CD4+T 細胞であり、中白の四角は抗 CD20 CAR を発現している CD8+T 細胞である。

【図 30D】図 30A~E は、血液（図 30A）、脾臓（図 30B）、肝臓（図 30C）、骨髄（図 30D）および胸腺（図 30E）における TTR-023 を発現する LNP を用いる第 2 の用量の 40 時間後の *in vivo* 再プログラムを表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は抗 CD20 CAR を発現している CD4+T 細胞であり、中白の四角は抗 CD20 CAR を発現している CD8+T 細胞である。

【図 30E】図 30A~E は、血液（図 30A）、脾臓（図 30B）、肝臓（図 30C）、骨髄（図 30D）および胸腺（図 30E）における TTR-023 を発現する LNP を用いる第 2 の用量の 40 時間後の *in vivo* 再プログラムを表す図である。各記号は

10

20

30

40

50

、1匹のマウスを表す。中白の丸は抗CD20 CARを発現しているCD4+T細胞であり、中白の四角は抗CD20 CARを発現しているCD8+T細胞である。

【図31A】図31A～Eは、血液（図31A）、脾臓（図31B）、肝臓（図31C）、骨髓（図31D）および胸腺（図31E）における血液におけるmCherryを発現するLNPを用いる第2の用量の40時間後のin vivo再プログラムを表す図である。各記号は、1匹のマウスを表す。中白の丸はmCherryを発現しているCD4+T細胞であり、中白の四角はmCherryを発現しているCD8+T細胞である。

【図31B】図31A～Eは、血液（図31A）、脾臓（図31B）、肝臓（図31C）、骨髓（図31D）および胸腺（図31E）における血液におけるmCherryを発現するLNPを用いる第2の用量の40時間後のin vivo再プログラムを表す図である。各記号は、1匹のマウスを表す。中白の丸はmCherryを発現しているCD4+T細胞であり、中白の四角はmCherryを発現しているCD8+T細胞である。

【図31C】図31A～Eは、血液（図31A）、脾臓（図31B）、肝臓（図31C）、骨髓（図31D）および胸腺（図31E）における血液におけるmCherryを発現するLNPを用いる第2の用量の40時間後のin vivo再プログラムを表す図である。各記号は、1匹のマウスを表す。中白の丸はmCherryを発現しているCD4+T細胞であり、中白の四角はmCherryを発現しているCD8+T細胞である。

【図31D】図31A～Eは、血液（図31A）、脾臓（図31B）、肝臓（図31C）、骨髓（図31D）および胸腺（図31E）における血液におけるmCherryを発現するLNPを用いる第2の用量の40時間後のin vivo再プログラムを表す図である。各記号は、1匹のマウスを表す。中白の丸はmCherryを発現しているCD4+T細胞であり、中白の四角はmCherryを発現しているCD8+T細胞である。

【図31E】図31A～Eは、血液（図31A）、脾臓（図31B）、肝臓（図31C）、骨髓（図31D）および胸腺（図31E）における血液におけるmCherryを発現するLNPを用いる第2の用量の40時間後のin vivo再プログラムを表す図である。各記号は、1匹のマウスを表す。中白の丸はmCherryを発現しているCD4+T細胞であり、中白の四角はmCherryを発現しているCD8+T細胞である。

【図32】図32は、PK研究の投薬および出血スキームを表す図である。

【図33】図33は、マウス血清サンプルからの変換されたDiI-CD18(3)-DS測定器に基づいた算出されたmRNA濃度を表す図である。

【図34A】2.5 μg/mLのmRNA LNPとの2時間のインキュベーション後のDiR+CD4 T細胞%を表す図である。

【図34B】2.5 μg/mLのmRNA LNPとの2時間のインキュベーション後のDiR平均蛍光強度(MFI) CD4 T細胞を表す図である。

【図35A】2.5 μg/mLのmRNA LNPとの2時間のインキュベーション後のDiR+CD8 T細胞%を表す図である。

【図35B】2.5 μg/mLのmRNA LNPとの2時間のインキュベーション後のDiR平均蛍光強度(MFI) CD8 T細胞を表す図である。

【図36A】2.5 μg/mLのmRNA LNPとの24時間のインキュベーション後のmCherry+CD4 T細胞%を表す図である。

【図36B】2.5 μg/mLのmRNA LNPとの24時間のインキュベーション後のmCherry+CD8 T細胞%を表す図である。

【図37A】脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMA由来LNPの流体力学直径を表す図である。

【図37B】脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMA由来LNPの多分散（動的光散乱）を表す図である。

【図38】図38A～Eは、脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMA由来LNPを使用するGFP mRNAのin vitro T細胞トランスフェクション、GFP+細胞%（図38A）、GFP平均蛍光強度(MFI)（図38B）、Cy5-GFP+細胞%（図38C）、Cy5-GFP MFI（図38D）およびT細胞生存率（図38E）

を表す図である。

【図 39】図 39 は、脂質 5 の NMR スペクトルを表す図である。

【図 40 A】脂質 5 の LC-MS スペクトルを表す図である。

【図 40 B】脂質 5 の LC-MS スペクトルを表す図である。

【図 41】図 41 は、脂質 6 の NMR スペクトルを表す図である。

【図 42 A】脂質 6 の LC-MS スペクトルを表す図である。

【図 42 B】脂質 6 の LC-MS スペクトルを表す図である。

【図 43】図 43 は、脂質 7 の NMR スペクトルを表す図である。

【図 44 A】脂質 7 の LC-MS スペクトルを表す図である。

【図 44 B】脂質 7 の LC-MS スペクトルを表す図である。

10

【図 45 A】脂質 8 および脂質 5 由来 LNP の流体力学直径を表す図である。

【図 45 B】脂質 8 および脂質 5 由来 LNP の多分散（動的光散乱）を表す図である。

【図 46】図 46 A～E は、脂質 8 および脂質 5（O および N）由来 LNP を使用する GFP mRNA の *in vitro* T 細胞トランスフェクション、GFP+細胞%（図 46 A）、GFP 平均蛍光強度（MFI）（図 46 B）、Cy5-GFP+細胞%（図 46 C）、Cy5-GFP MFI（図 46 D）、T 細胞生存率（図 46 E）を表す図である。

【図 47】図 47 は、種々の Fab、VHH（Nb）、ScFv、Fab-ScFv および Fab-VHH ハイブリッドの構造を表す図である。

【図 48-1】図 48 A は、脂質 9 の NMR スペクトルを表す図である。図 48 B および図 48 C は、脂質 9 の質量スペクトルおよび LC クロマトグラムを表す図である。

20

【図 48-2】図 48-1 の続き。

【図 49-1】図 49 A は、脂質 10 の NMR スペクトルを表す図である。図 49 B および図 49 C は、脂質 10 の質量スペクトルおよび LC クロマトグラムを表す図である。

【図 49-2】図 49-1 の続き。

【図 50-1】図 50 A は、脂質 11 の NMR スペクトルを表す図である。図 50 B および図 50 C は、脂質 11 の質量スペクトルおよび LC クロマトグラムを表す図である。

【図 50-2】図 50-1 の続き。

【図 51-1】図 51 A は、脂質 12 の NMR スペクトルを表す図である。図 51 B および図 51 C は、脂質 12 の質量スペクトルおよび LC クロマトグラムを表す図である。

【図 51-2】図 51-1 の続き。

30

【図 52-1】図 52 A は、脂質 13 の NMR スペクトルを表す図である。図 52 B および図 52 C は、脂質 13 の質量スペクトルおよび LC クロマトグラムを表す図である。

【図 52-2】図 52-1 の続き。

【図 53】図 53 A は、抗体コンジュゲート挿入前および後の脂質 5 および脂質 8 の流体力学直径（DLS）を表す図である。図 53 B は、抗体コンジュゲート挿入前および後の多分散（DLS）を表す図である。図 53 C および 53 D は、pH 5.5 の MES および pH 7.4 の HEPES バッファーにおける抗体コンジュゲート挿入前および後の LNP 表面電荷（ゼータ電位、DLS）を表す図である。

【図 54 A】図 54 A～54 E は、脂質 5 および脂質 8 由来 LNP を使用する GFP mRNA の *in vitro* T 細胞トランスフェクション：GFP+細胞%（図 54 A）、GFP 平均蛍光強度（MFI）（図 54 B）、DiI+細胞%（図 54 C）および DiI MFI（図 54 D）ならびに T 細胞生存率（図 54 E）を表す図である。

40

【図 54 B】図 54 A～54 E は、脂質 5 および脂質 8 由来 LNP を使用する GFP mRNA の *in vitro* T 細胞トランスフェクション：GFP+細胞%（図 54 A）、GFP 平均蛍光強度（MFI）（図 54 B）、DiI+細胞%（図 54 C）および DiI MFI（図 54 D）ならびに T 細胞生存率（図 54 E）を表す図である。

【図 54 C】図 54 A～54 E は、脂質 5 および脂質 8 由来 LNP を使用する GFP mRNA の *in vitro* T 細胞トランスフェクション：GFP+細胞%（図 54 A）、GFP 平均蛍光強度（MFI）（図 54 B）、DiI+細胞%（図 54 C）および DiI MFI（図 54 D）ならびに T 細胞生存率（図 54 E）を表す図である。

50

【図54D】図54A～54Eは、脂質5および脂質8由来LNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション：GFP+細胞%（図54A）、GFP平均蛍光強度（MFI）（図54B）、DiI+細胞%（図54C）およびDiI MFI（図54D）ならびにT細胞生存率（図54E）を表す図である。

【図54E】図54A～54Eは、脂質5および脂質8由来LNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション：GFP+細胞%（図54A）、GFP平均蛍光強度（MFI）（図54B）、DiI+細胞%（図54C）およびDiI MFI（図54D）ならびにT細胞生存率（図54E）を表す図である。

【図55A】図55Aは、抗体コンジュゲート挿入前および後の脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMAの流体力学直径（DLS）を表す図である。図55Bは、抗体コン
10
ジュゲート挿入前および後の多分散（DLS）を表す図である。図55Cは、pH5.5のMESおよびpH7.4のHEPESバッファーにおける抗体コンジュゲート挿入前のLNP表面電荷（ゼータ電位、DLS）を表す図である。図55Dは、アクセス可能なRNA含量およびRNAカプセル化効率を表す図である。

【図55B】図55Aは、抗体コンジュゲート挿入前および後の脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMAの流体力学直径（DLS）を表す図である。図55Bは、抗体コン
20
ジュゲート挿入前および後の多分散（DLS）を表す図である。図55Cは、pH5.5のMESおよびpH7.4のHEPESバッファーにおける抗体コンジュゲート挿入前のLNP表面電荷（ゼータ電位、DLS）を表す図である。図55Dは、アクセス可能なRNA含量およびRNAカプセル化効率を表す図である。

【図55C】図55Aは、抗体コンジュゲート挿入前および後の脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMAの流体力学直径（DLS）を表す図である。図55Bは、抗体コン
ジュゲート挿入前および後の多分散（DLS）を表す図である。図55Cは、pH5.5のMESおよびpH7.4のHEPESバッファーにおける抗体コンジュゲート挿入前のLNP表面電荷（ゼータ電位、DLS）を表す図である。図55Dは、アクセス可能なRNA含量およびRNAカプセル化効率を表す図である。

【図55D】図55Aは、抗体コンジュゲート挿入前および後の脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMAの流体力学直径（DLS）を表す図である。図55Bは、抗体コン
30
ジュゲート挿入前および後の多分散（DLS）を表す図である。図55Cは、pH5.5のMESおよびpH7.4のHEPESバッファーにおける抗体コンジュゲート挿入前のLNP表面電荷（ゼータ電位、DLS）を表す図である。図55Dは、アクセス可能なRNA含量およびRNAカプセル化効率を表す図である。

【図56A】図56A～56Eは、脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMA由来LNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション：GFP+細胞%（図56A）、GFP平均蛍光強度（MFI）（図56B）、DiI+細胞%（図56C）およびDiI MFI（図56D）およびT細胞生存率（図56E）を表す
図である。

【図56B】図56A～56Eは、脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMA由来LNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション：GFP+細胞%（図56A）、GFP平均蛍光強度（MFI）（図56B）、DiI+細胞%（図56C）およびDiI MFI（図56D）およびT細胞生存率（図56E）を表す
40
図である。

【図56C】図56A～56Eは、脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMA由来LNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション：GFP+細胞%（図56A）、GFP平均蛍光強度（MFI）（図56B）、DiI+細胞%（図56C）およびDiI MFI（図56D）およびT細胞生存率（図56E）を表す
図である。

【図56D】図56A～56Eは、脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMA由来LNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション：GFP+細胞%（図56A）、GFP平均蛍光強度（MFI）（図56B）、DiI+細胞%
50

(図56C) および DiI MFI (図56D) および T細胞生存率 (図56E) を表す図である。

【図56E】図56A～56Eは、脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMA由来LNPを使用するGFP mRNAのin vitro T細胞トランスフェクション：GFP+細胞% (図56A)、GFP平均蛍光強度 (MFI) (図56B)、DiI+細胞% (図56C) および DiI MFI (図56D) および T細胞生存率 (図56E) を表す図である。

【図57A】4Cで保存した、または-80Cで保存した後の脂質5製剤の流体力学直径 (DLS) を表す図である；製剤は-80Cのフリーザー中に入れることまたは液体窒素中で急速冷凍されることのいずれかによって凍結された。

【図57B】凍結保存前および後の製剤多分散 (DLS) を表す図である。

【図58A】図58A～58Eは、4Cで保存した、または-80Cで保存した後の脂質5 LNP製剤に起因するin vitro T細胞トランスフェクション of GFP mRNA および T細胞生存率を表す図である；製剤は-80Cのフリーザー中に入れることまたは液体窒素中で急速冷凍されることのいずれかによって凍結された。GFP+細胞% (図58A)、GFP平均蛍光強度 (MFI) (図58B)、DiI+細胞% (図58C) および DiI MFI (図58D) および T細胞生存率 (図58E)。

【図58B】図58A～58Eは、4Cで保存した、または-80Cで保存した後の脂質5 LNP製剤に起因するin vitro T細胞トランスフェクション of GFP mRNA および T細胞生存率を表す図である；製剤は-80Cのフリーザー中に入れることまたは液体窒素中で急速冷凍されることのいずれかによって凍結された。GFP+細胞% (図58A)、GFP平均蛍光強度 (MFI) (図58B)、DiI+細胞% (図58C) および DiI MFI (図58D) および T細胞生存率 (図58E)。

【図58C】図58A～58Eは、4Cで保存した、または-80Cで保存した後の脂質5 LNP製剤に起因するin vitro T細胞トランスフェクション of GFP mRNA および T細胞生存率を表す図である；製剤は-80Cのフリーザー中に入れることまたは液体窒素中で急速冷凍されることのいずれかによって凍結された。GFP+細胞% (図58A)、GFP平均蛍光強度 (MFI) (図58B)、DiI+細胞% (図58C) および DiI MFI (図58D) および T細胞生存率 (図58E)。

【図58D】図58A～58Eは、4Cで保存した、または-80Cで保存した後の脂質5 LNP製剤に起因するin vitro T細胞トランスフェクション of GFP mRNA および T細胞生存率を表す図である；製剤は-80Cのフリーザー中に入れることまたは液体窒素中で急速冷凍されることのいずれかによって凍結された。GFP+細胞% (図58A)、GFP平均蛍光強度 (MFI) (図58B)、DiI+細胞% (図58C) および DiI MFI (図58D) および T細胞生存率 (図58E)。

【図58E】図58A～58Eは、4Cで保存した、または-80Cで保存した後の脂質5 LNP製剤に起因するin vitro T細胞トランスフェクション of GFP mRNA および T細胞生存率を表す図である；製剤は-80Cのフリーザー中に入れることまたは液体窒素中で急速冷凍されることのいずれかによって凍結された。GFP+細胞% (図58A)、GFP平均蛍光強度 (MFI) (図58B)、DiI+細胞% (図58C) および DiI MFI (図58D) および T細胞生存率 (図58E)。

【図59】図59A～59Jは、DMG、DPGもしくはDSG-PEG 2.5%のいずれかでの24または48時間後の、またはDPPEもしくはDSPE 1.5もしくは2.5%いずれかでの24時間後の、0.3mg/kgの用量のCD3によって標的化されるDiI/GFP LNPを用いる免疫細胞のin vivo再プログラムの結果を表す図である。各記号は、1匹のマウスを表す。中白の丸は、発現しているCD4+T細胞であり、中白の四角は、発現しているCD8+T細胞である；(図59A)血液における、(図59B)肝臓における、(図59C)肺における、(図59D)脾臓における、(図59E)骨髄におけるGFP%；(図59F)血液における、(図59G)肝臓における、(図59H)肺における、(図59I)脾臓における、(図59J)骨髄におけるG

10

20

30

40

50

F P M F I ; (図 5 9 K) 血液における、(図 5 9 L) 肝臓における、(図 5 9 M) 肺における、(図 5 9 N) 脾臓における、(図 5 9 O) 骨髄における D i I % ; (図 5 9 P) 血液における、(図 5 9 Q) 肝臓における、(図 5 9 R) 肺における、(図 5 9 S) 脾臓における、および (図 5 9 T) 骨髄における D i I M F I 。

【図 6 0】図 6 0 A ~ 6 0 T は、2 4 時間後の D M G、D P G、1. 5 または 2. 5 % のいずれかでの 0. 3 m g / k g の脂質 5 の C D 3、C D 8 抗体 / ナノボディによって標的化される D i I / G F P L N P を用いる i n v i v o 再プログラムの結果を表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は、発現している C D 4 + T 細胞であり、中白の四角は、発現している C D 8 + T 細胞である ; (6 0 A) 血液における、(6 0 B) 肝臓における、(6 0 C) 肺における、(6 0 D) 脾臓における、(6 0 E) 骨髄における G F P % ; (6 0 F) 血液における、(6 0 G) 肝臓における、(6 0 H) 肺における、(6 0 I) 脾臓における、(6 0 J) 骨髄における G F P M F I ; (6 0 K) 血液における、(6 0 L) 肝臓における、(6 0 M) 肺における、(6 0 N) 脾臓における、(6 0 O) 骨髄における D i I % ; (6 0 P) 血液における、(6 0 Q) 肝臓における、(6 0 R) 肺における、(6 0 S) 脾臓における、(6 0 T) 骨髄における D i I M F I 。

【図 6 1】図 6 1 A ~ 6 1 T は、2 4 時間後の D M G または D P G、1. 5 % のいずれかでの 0. 3 m g / k g の脂質 5 の C D 8、C D 1 1 a、C D 4 ナノボディまたは C D 4 抗体によって標的化される D i I / G F P L N P のいずれかを用いる i n v i v o 再プログラムの結果を表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は、発現している C D 4 + T 細胞であり、中白の四角は、発現している C D 8 + T 細胞である ; (6 1 A) 血液における、(6 1 B) 肝臓における、(6 1 C) 肺における、(6 1 D) 脾臓における、(6 1 E) 骨髄における G F P % ; (6 1 F) 血液における、(6 1 G) 肝臓における、(6 1 H) 肺における、(6 1 I) 脾臓における、(6 1 J) 骨髄における G F P M F I ; (6 1 K) 血液における、(6 1 L) 肝臓における、(6 1 M) 肺における、(6 1 N) 脾臓における、(6 1 O) 骨髄における D i I % ; (6 1 P) 血液における、(6 1 Q) 肝臓における、(6 1 R) 肺における、(6 1 S) 脾臓における、(6 1 T) 骨髄における D i I M F I 。

【図 6 2 - 1】図 6 2 A ~ 6 2 S は、2 4 時間後の D P G - P E G、1. 5 % での 0. 1 m g / k g の C D 3 (h s p 3 4) 抗体によって標的化される D i I / G F P L N P を用いて、イオン化可能な脂質 (D L n - M C 3 - D M A、脂質 5 および脂質 8) を比較する i n v i v o 再プログラムを表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は、発現している C D 4 + T 細胞であり、中白の四角は、発現している C D 8 + T 細胞である ; (6 2 A) 血液における、(6 2 B) 肝臓における、(6 2 C) 肺における、(6 2 D) 脾臓における、(6 2 E) 骨髄における G F P % ; (6 2 F) 血液における、(6 2 G) 肝臓における、(6 2 H) 肺における、(6 2 I) 脾臓における、(6 2 J) 骨髄における G F P M F I ; (6 2 K) 血液における、(6 2 L) 肝臓における、(6 2 M) 肺における、(6 2 N) 脾臓における、(6 2 O) 骨髄における D i I % ; (6 2 P) 血液における、(6 2 Q) 肝臓における、(6 2 R) 肺における、(6 2 S) 脾臓における、(6 2 T) 骨髄における D i I M F I 。

【図 6 2 - 2】図 6 2 - 1 の続き。

【図 6 2 - 3】図 6 2 - 2 の続き。

【図 6 3 - 1】図 6 3 A ~ 6 3 T は、2 4 時間後の D M G、D P G、1. 5 または 2. 5 % のいずれかでの 0. 3 m g / k g の脂質 5 の C D 7 V H H / ナノボディによって標的化される D i I / G F P L N P を用いる i n v i v o 再プログラムを表す図である。各記号は、1 匹のマウスを表す。中白の丸は、発現している C D 4 + T 細胞であり、中白の四角は、発現している C D 8 + T 細胞である ; (6 3 A) 血液における、(6 3 B) 肝臓における、(6 3 C) 肺における、(6 3 D) 脾臓における、(6 3 E) 骨髄における G F P % ; (6 3 F) 血液における、(6 3 G) 肝臓における、(6 3 H) 肺における、(6 3 I) 脾臓における、(6 3 J) 骨髄における G F P M F I ; (6 3 K) 血液にお

ける、(63L) 肝臓における、(63M) 肺における、(63N) 脾臓における、(63O) 骨髄における $DiI\%$ ；(63P) 血液における、(63Q) 肝臓における、(63R) 肺における、(63S) 脾臓における、(63T) 骨髄における $DiI\ MFI$ 。

【図63-2】図63-1の続き。

【図64-1】図64Aは、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入されたFabまたはNbを伴う、およそ24時間の $2.5\ \mu g/mL$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後の共培養されたT細胞およびNK細胞のGFPトランスフェクション%を表す図である。図64Bは、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入されたFabまたはNbを伴う、およそ24時間の、 $2.5\ \mu g/mL$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後の共培養されたT細胞およびNKの平均蛍光強度(MFI)によるGFP発現レベルを表す図である。図64Cは、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入されたFabまたはNbを伴う、およそ24時間の $2.5\ \mu g/mL$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後の共培養されたT細胞およびNK細胞のDiI取り込み%を表す図である。図64Dは、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入されたFabまたはNbを伴う、およそ24時間の $2.5\ \mu g/mL$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後の共培養されたT細胞およびNKの平均蛍光強度(MFI)によるDiI取り込みレベル%を表す図である。

10

【図64-2】図64-1の続き。

20

【図65-1】図65Aは、コンジュゲーションの前に変動するTCEP濃度での還元によって生成されたSP34-hlam DS (WT鎖間ジスルフィドを含有する) FabコンジュゲートのSDS-PAGEを表す図である。図65Bは、コンジュゲーションの前に変動するTCEP濃度での還元によって生成されたSP34-hlam NoDS (鎖間ジスルフィドがない、例えば、HCおよびLCにおけるCからSへの突然変異) FabコンジュゲートのSDS-PAGEを表す図である。図65Cは、コンジュゲーションの前に $0.025\ mM$ TCEP還元条件を用いて生成されたhSP34-hlam DS FabおよびFabコンジュゲートのR8 RP-HPLCクロマトグラムを表す図である。図65Dは、コンジュゲーションの前に種々のTCEP還元条件を用いて生成されたhSP34-hlam NoDS FabおよびFabコンジュゲートのR8 RP-HPLCクロマトグラムを表す図である。図65Eは、種々の密度で後挿入されたFabを伴う、およそ24時間の $2.5\ \mu g/mL$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後のT細胞のGFPトランスフェクション%を表す図である。図65Fは、種々の密度で後挿入されたFabを伴う、およそ24時間の $2.5\ \mu g/mL$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後のT細胞の平均蛍光強度(MFI)によるGFP発現レベルを表す図である。

30

【図65-2】図65-1の続き。

【図65-3】図65-2の続き。

【図65-4】図65-3の続き。

【図66A】図66Aは、コンジュゲーションの前に変動するTCEP濃度での還元によって生成されたTS2/18.1および9.6 (WT鎖間ジスルフィドを含有する) FabコンジュゲートのSDS-PAGEを表す図である。左：TS2/18.1；右：9.6。

40

【図66B】図66Bは、コンジュゲーションの前に変動するTCEP濃度での還元によって生成されたTS2/18.1、9.6およびTRX2 NoDS FabおよびFabコンジュゲートのSDS-PAGEを表す図である。

【図66C】図66Cは、コンジュゲーションの前に種々のTCEP還元条件を用いて生成されたTS2/18.1 DSおよびNoDS FabおよびFabコンジュゲートのR8 RP-HPLCクロマトグラムを表す図である。

【図66D】図66Dは、コンジュゲーションの前に種々のTCEP還元条件を用いて生

50

成された 9.6 および TRX2 NoDS Fab および Fab コンジュゲートの R8 RP-HPLC クロマトグラムを表す図である。

【図 67】図 67A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞の GFP トランスフェクション%を表す図である。図 67B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (MFI) による GFP 発現レベルを表す図である。図 67C は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞から上清への IFN γ 分泌を表す図である。

10

【図 68】図 68A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞の GFP トランスフェクション%を表す図である。図 68B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の CD8 T 細胞の平均蛍光強度 (MFI) による GFP 発現レベルを表す図である。

【図 69】図 69A は、単一の標的化される条件と同一の密度で個々にまたは一緒に後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞の GFP トランスフェクション%を表す図である。図 69B は、単一の標的化される条件と同一の密度で個々にまたは一緒に後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (MFI) による GFP 発現レベルを表す図である。図 69C は、単一の標的化される条件と同一の密度で個々にまたは一緒に後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞から上清への IFN γ 分泌を表す図である。

20

【図 70】図 70A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab または Fab-ScFv を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞の GFP トランスフェクション%を表す図である。図 70B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab または Fab-ScFv を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (MFI) による GFP 発現レベルを表す図である。図 70C は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab または Fab-ScFv を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞から上清への IFN γ 分泌を表す図である。

30

【図 71】図 71A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞の GFP トランスフェクション%を表す図である。図 71B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (MFI) による GFP 発現レベルを表す図である。図 71C は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された Fab を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の mRNA の標的化される LNP とのインキュベーション後の T 細胞から上清への IFN γ 分泌を表す図である。

40

【図 72】図 72A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で

50

後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の G F P トランスフェクション%を表す図である。図 7 2 B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。図 7 2 C は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞から上清への I F N γ 分泌を表す図である。

【図 7 3 A】図 7 3 A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の G F P トランスフェクション%を表す図である。

10

【図 7 3 B】図 7 3 B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。

【図 7 3 C】図 7 3 C は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞から上清への I F N γ 分泌を表す図である。

20

【図 7 4】図 7 4 A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の G F P トランスフェクション%を表す図である。図 7 4 B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。

【図 7 5 A】図 7 5 A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の C D 8 T 細胞の G F P トランスフェクション%を表す図である。

30

【図 7 5 B】図 7 5 B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の C D 4 T 細胞の G F P トランスフェクション%を表す図である。

【図 7 5 C】図 7 5 C は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の C D 8 T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。

40

【図 7 5 D】図 7 5 D は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の C D 4 T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。

【図 7 6 A】図 7 6 A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の G F P トランスフェクション%を表す図である。

【図 7 6 B】図 7 6 B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 24 時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の m R N A

50

の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。

【図 7 7】図 7 7 A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の G F P トランスフェクション % を表す図である。図 7 7 B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。

【図 7 8 A】図 7 8 A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の G F P トランスフェクション % を表す図である。

【図 7 8 B】図 7 8 B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b および N b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。

【図 7 9 - 1】図 7 9 A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の G F P トランスフェクション % を表す図である。図 7 9 B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。図 7 9 C は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞から上清への I F N γ 分泌を表す図である。

【図 7 9 - 2】図 7 9 - 1 の続き。

【図 8 0 - 1】図 8 0 A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の C D 8 T 細胞の G F P トランスフェクション % を表す図である。図 8 0 B は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の C D 4 T 細胞の G F P トランスフェクション % を表す図である。図 8 0 C は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の C D 8 T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。図 8 0 D は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の C D 4 T 細胞の平均蛍光強度 (M F I) による G F P 発現レベルを表す図である。図 8 0 E は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞から上清への I F N γ 分泌を表す図である。

【図 8 0 - 2】図 8 0 - 1 の続き。

【図 8 0 - 3】図 8 0 - 2 の続き。

【図 8 1 - 1】図 8 1 A は、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入された F a b または N b を伴う、およそ 2 4 時間の 2 . 5 μ g / m L の m R N A の標的化される L N P とのインキュベーション後の T 細胞の G F P トランスフェクシ

ン%を表す図である。図81Bは、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入されたFabまたはNbを伴う、およそ24時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後のT細胞の平均蛍光強度(MFI)によるGFP発現レベルを表す図である。図81Cは、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入されたFabまたはNbを伴う、およそ24時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後のT細胞からのIFN γ 分泌を表す図である。

【図81-2】図81-1の続き。

【図82-1】図82Aは、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入されたFabまたはNbを伴う、およそ24時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後のT細胞のGFPトランスフェクション%を表す図である。図82Bは、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入されたFabまたはNbを伴う、およそ24時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後のT細胞の平均蛍光強度(MFI)によるGFP発現レベルを表す図である。図82Cは、評価された最高レベルのトランスフェクションをもたらす密度で後挿入されたFabまたはNbを伴う、およそ24時間の $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のmRNAの標的化されるLNPとのインキュベーション後のT細胞からのIFN γ 分泌を表す図である。

【図82-2】図82-1の続き。

【図83】図83Aは、抗体コンジュゲート挿入前および後の脂質2、脂質6、脂質12および脂質13の流体力学直径(DLS)を表す図である。図83Bは、抗体コンジュゲート挿入前および後の多分散(DLS)を表す図である。図83Cは、pH5.5のMESおよびpH7.4のHEPESバッファにおける抗体コンジュゲート挿入前のLNP表面電荷(ゼータ電位、DLS)を表す図である。図83Dは、アクセス可能なRNAパーセントおよび全RNA含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)を表す図である。

【図84】図84A~84Eは、脂質2、脂質6、脂質12および脂質13由来LNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション、GFP+細胞%(図84A)、GFP平均蛍光強度(MFI)(図84B)、DiI+細胞%(図84C)およびDiI MFI(図84D)およびT細胞生存率(図84E)を表す図である。

【図85】図85A~85Eは、脂質2、脂質6、脂質12および脂質13由来のLNPを使用するGFP mRNAの*in vitro* T細胞トランスフェクション、GFP+細胞%(図85A)、GFP平均蛍光強度(MFI)(図85B)、DiI+細胞%(図85C)およびDiI MFI(図85D)およびT細胞生存率(図85E)を表す図である。

【発明を実施するための形態】

【0126】

本発明は、イオン化可能なカチオン性脂質、脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲート、ならびにそのようなイオン化可能なカチオン性脂質および/または脂質-免疫細胞(例えばT細胞)標的化基コンジュゲートを含む脂質ナノ粒子組成物、そのような脂質および/またはコンジュゲートを含有する医療キット、ならびにそのような脂質およびコンジュゲートを製造および使用方法を提供する。

【0127】

本発明の実施は、別に示されない限り、有機化学、薬理学、細胞生物学および生化学の従来技術を用いる。そのような技術は、文献において、例えば「Comprehensive Organic Synthesis」(B. M. TrostおよびI. Fleming編、1991~1992); 「Current protocols in molecular biology」(F. M. Ausubelら編、1987および定期更新); ならびに「Current protocols in immunology」(J. E. Coliganら編、1991)において説明されており、それら

の各々は、その全体を参照によって本明細書に組み入れる。本発明の様々な態様は、以下の節において示される；しかしながら、1つの特定の節において説明される本発明の態様は、任意の特定の節に限定すべきでない。

【0128】

I. 定義

本発明の理解を促進するために、いくつかの用語および句を以下に定義する。

【0129】

別に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において使用される略語は、化学および生物学分野内のそれらの従来の意味を有する。本明細書において示される化学構造および式は、化学分野において公知の化学結合価の標準規則に従って解釈すべきである。加えて、例えば、化学基がジラジカルである場合、化学基は一方向または両方向の構造の残りの部分のそれらの隣接する原子に結合することができ、例えば、 $-OC(O)-$ は $-C(O)O-$ と互換的であるか、または $-OC(S)-$ は $-C(S)O-$ と互換的であることが理解される。

10

【0130】

「a」および「an」という用語は、本明細書において使用される場合、「1つまたはそれ以上」を意味し、文脈が不適切でない限り、複数を含む。

【0131】

「アルキル」という用語は、本明細書において使用される場合、飽和直鎖または分枝鎖炭化水素、例えば本明細書において $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルとそれぞれ称される、1～12、1～10または1～6個の炭素原子の直鎖状または分枝鎖状基を指す。例示的なアルキル基には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、2-メチル-1-プロピル、2-メチル-2-プロピル、2-メチル-1-ブチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-3-ブチル、2, 2-ジメチル-1-プロピル、2-メチル-1-ペンチル、3-メチル-1-ペンチル、4-メチル-1-ペンチル、2-メチル-2-ペンチル、3-メチル-2-ペンチル、4-メチル-2-ペンチル、2, 2-ジメチル-1-ブチル、3, 3-ジメチル-1-ブチル、2-エチル-1-ブチル、ブチル、イソブチル、セブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチルなどが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0132】

「アルキレン」という用語は、アルキル基のジラジカルを指す。例示的なアルキレン基は $-CH_2CH_2-$ である。

【0133】

「ハロアルキル」という用語は、少なくとも1つのハロゲンによって置換されているアルキル基を指す。例えば、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2CF_3$ 、 $-CF_2CF_3$ など。

【0134】

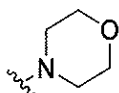
「オキソ」という用語は、当該技術分野において認知されており、「 $=O$ 」置換基を指す。例えば、オキソ基によって置換されているシクロペントンはシクロペントノンである。

40

【0135】

「モルホリニル」という用語は：

【化15】



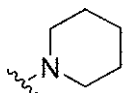
の構造を有する置換基を指す。

50

【0136】

「ピペリジニル」という用語は：

【化16】



の構造を有する置換基を指す。

【0137】

一般的に、「置換されている」という用語は、「場合により」という用語が先行するかどうかにかかわらず、指定される部分の1つまたはそれ以上の水素が好適な置換基によって置き換えられていることを意味する。別に示されない限り、「場合により置換されている」基は、基の各置換可能な位置において好適な置換基を有することができ、任意の所与の構造において2つ以上の位置が、特定される群から選択される2つ以上の置換基によって置換することができる場合、置換基は、各位置において同じであっても、異なってもよい。本発明の下で想定される置換基の組合せは、好ましくは、安定なまたは化学的に実行可能な化合物の形成をもたらす組合せである。一部の実施形態において、任意選択の置換基は、 $C_1 \sim 6$ アルキル、シアノ、ハロゲン、 $-O-C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_1 \sim 6$ ハロアルキル、 $C_3 \sim 7$ シクロアルキル、3～7員のヘテロシクリル、5～6員のヘテロアリールおよびフェニルからなる群から選択することができ、ここで、 R^a は水素または $C_1 \sim 6$ アルキルである。一部の実施形態において、任意選択の置換基は、 $C_1 \sim 6$ アルキル、ハロゲン、 $-O-C_1 \sim 6$ アルキルおよび $-CH_2N(R^a)_2$ からなる群から選択することができ、ここで、 R^a は水素または $C_1 \sim 6$ アルキルである。

【0138】

「ハロアルキル」という用語は、少なくとも1つのハロゲンによって置換されているアルキル基を指す。例えば、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2CF_3$ 、 $-CF_2CF_3$ など。

【0139】

「シクロアルキル」という用語は、本明細書において例えば、シクロアルカンに由来する「 $C_4 \sim 8$ シクロアルキル」と称される、3～12、3～8、4～8または4～6個の炭素の一価飽和環式、二環式、架橋環式（例えばアダマンチル）またはスピロ環状炭化水素基を指す。例示的なシクロアルキル基には、シクロヘキサン、シクロペンタン、シクロブタンおよびシクロプロパンが含まれるが、これらに限定されない。別に特定されない限り、シクロアルキル基は、場合により、1つまたはそれ以上の環の位置において、例えばアルカノイル、アルコキシ、アルキル、ハロアルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミジノ、アミノ、アリール、アリールアルキル、アジド、カルバメート、カーボネート、カルボキシ、シアノ、シクロアルキル、エステル、エーテル、ホルミル、ハロゲン、ハロアルキル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ヒドロキシル、イミノ、ケトン、ニトロ、ホスフェート、ホスホナート、ホスフィナート、サルフェート、スルフィド、スルホンアミド、スルホニルまたはチオカルボニルによって置換されている。ある特定の実施形態において、シクロアルキル基は置換されていない、すなわち、それは非置換である。

【0140】

「ヘテロシクリル」および「複素環式基」という用語は、当該技術分野において認知されており、飽和、部分不飽和または芳香族3～10員環構造、あるいは3～7員環を指し、その環構造は、1～4個のヘテロ原子、例えば窒素、酸素および硫黄を含む。ヘテロシクリル基における環原子の数は、 $C_x \sim C_x$ 命名法を使用して特定することができ、ここで、 x は環原子の数を特定する整数である。例えば、 $C_3 \sim C_7$ ヘテロシクリル基とは、1～4個のヘテロ原子、例えば窒素、酸素および硫黄を含有する飽和または部分不飽和3～7員環構造を指す。「 $C_3 \sim C_7$ 」の名称は、複素環式環が、環原子位置を占有する任

10

20

30

40

50

意のヘテロ原子を含めて全部で3～7個の環原子を含有することを示す。C₃ヘテロシクリルの1例はアジリジニルである。複素環は、例えばモノー、バイーまたは他の多環式環系（例えば縮合、スピロ、架橋二環式）であってもよい。複素環は、1つまたはそれ以上のアリール、部分不飽和または飽和環に縮合してもよい。ヘテロシクリル基には、例えばピオチニル、クロメニル、ジヒドロフリール、ジヒドロインドリル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジチアゾリル、ホモピペリジニル、イミダゾリジニル、イソキノリル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、フェノキサントヘニル（phenoxantheny l）、ピペラジニル、ピペリジニル、ピラニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル、ピロリジン-2-オニル、ピロリニル、テトラヒドロフリル、テトラヒドロイソキノリル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリル、チアゾリジニル、チオラニル、チオモルホリニル、チオピラニル、キサントヘニル、ラクトン、ラクタム、例えばアゼチジノンおよびピロリジノン、スルタム、スルトンなどが含まれる。別に特定されない限り、複素環式環は、場合により、1つまたはそれ以上の位置において、置換基、例えばアルカノイル、アルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミジノ、アミノ、アリール、アリールアルキル、アジド、カルバメート、カーボネート、カルボキシ、シアノ、シクロアルキル、エステル、エーテル、ホルミル、ハロゲン、ハロアルキル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ヒドロキシル、イミノ、ケトン、ニトロ、オキソ、ホスフェート、ホスホナート、ホスフィナート、サルフェート、スルフィド、スルホンアミド、スルホニルおよびチオカルボニルによって置換されている。ある特定の実施形態において、ヘテロシクリル基は置換されていない、すなわち、それは非置換である。

10

20

【0141】

「アリール」という用語は、当該技術分野において認知されており、炭素環式芳香族基を指す。代表的なアリール基には、フェニル、ナフチル、アントラセニルなどが含まれる。「アリール」という用語は、2つまたはそれ以上の炭素が2つの隣接している環に共通している（環が「縮合環」である）、2つまたはそれ以上の炭素環式環を有する多環式環系を含み、ここで、環のうちの少なくとも1つは芳香族であり、例えば、他の環はシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニルおよび／またはアリールであってもよい。別に特定されない限り、芳香環は、1つまたはそれ以上の環の位置において、例えばハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、カルボン酸、-C(O)アルキル、CO₂アルキル、カルボニル、カルボキシル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド（sulfonamido）、スルホンアミド（sulfonamide）、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、アリールまたはヘテロアリール部分、-CF₃、-CNその他によって置換することができる。ある特定の実施形態において、芳香環は、1つまたはそれ以上の環の位置において、ハロゲン、アルキル、ヒドロキシルまたはアルコキシによって置換されている。ある特定の他の実施形態において、芳香環は置換されていない、すなわち、それは非置換である。ある特定の実施形態において、アリール基は6～10員環構造である。

30

【0142】

「ヘテロアリール」という用語は、当該技術分野において認知されており、少なくとも1個の環ヘテロ原子を含む芳香族基を指す。ある特定の場合、ヘテロアリール基は、1、2、3または4個の環ヘテロ原子を含有する。ヘテロアリール基の代表的な例には、ピロリル、フラニル、チオフエニル、イミダゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、トリアゾリル、ピラゾリル、ピリジニル、ピラジニル、ピリダジニルおよびピリミジニルなどが含まれる。別に特定されない限り、ヘテロアリール環は、1つまたはそれ以上の環の位置において、例えばハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、カルボン酸、C(O)アルキル、-CO₂アルキル、カルボニル、カルボキシル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、

40

50

エステル、ヘテロシクリル、アリールまたはヘテロアリール部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ その他によって置換することができる。また、「ヘテロアリール」という用語は、2つまたはそれ以上の炭素が2つの隣接している環に共通している（環が「縮合環」である）、2つまたはそれ以上の環を有する多環式環系を含み、ここで、環のうちの少なくとも1つは複素芳香環であり、例えば、他の環式環はシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニルおよび／またはアリールであってもよい。ある特定の実施形態において、ヘテロアリール環は、1つまたはそれ以上の環の位置において、ハロゲン、アルキル、ヒドロキシルまたはアルコキシルによって置換されている。ある特定の他の実施形態において、ヘテロアリール環は置換されていない、すなわち、それは非置換である。ある特定の実施形態において、ヘテロアリール基は5～10員環構造、あるいは5～6員環構造であり、その環構造は、1、2、3または4個のヘテロ原子、例えば窒素、酸素および硫黄を含む。

10

【0143】

「アミン」および「アミノ」という用語は、当該技術分野において認知されており、非置換および置換アミンの両方、例えば一般式 $-N(R^{10})(R^{11})$ によって表される部分を指し、式中、 R^{10} および R^{11} は、各々独立して、水素、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アルケニル、アリール、アラルキルもしくは $(CH_2)_m-R^{12}$ を表すか；または R^{10} および R^{11} は、それらが結合するN原子と一緒にあって、環構造において4～8個の原子を有する複素環を完成し； R^{12} はアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、複素環または多環を表し；mは0、または1～8の範囲内の整数である。ある特定の実施形態において、 R^{10} および R^{11} は、各々独立して、水素、アルキル、アルケニルまたは $-(CH_2)_m-R^{12}$ を表す。

20

【0144】

「アルコキシル」または「アルコキシ」という用語は、当該技術分野において認知されており、酸素ラジカルが結合している、上記に定義されるアルキル基を指す。代表的なアルコキシル基には、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、tert-ブトキシなどが含まれる。「エーテル」は、酸素によって共有結合される2つの炭化水素である。したがって、アルキルをエーテルにする、そのアルキルの置換は、アルコキシルであるかまたはそれに似ており、例えば、 $-O$ -アルキル、 $-O$ -アルケニル、 O -アルキニル、 $-O$ - $(CH_2)_m-R^{12}$ のうちの1つによって表すことができ、ここで、mおよび R^{12} は上記に説明されている。「ハロアルコキシル」という用語は、少なくとも1個のハロゲンによって置換されているアルコキシル基を指す。例えば、 $-O-CH_2F$ 、 $-O-CHF_2$ 、 $-O-CF_3$ など。ある特定の実施形態において、ハロアルコキシルは、少なくとも1つのフルオロ基によって置換されているアルコキシル基である。ある特定の実施形態において、ハロアルコキシルは、1～6、1～5、1～4、2～4または3つのフルオロ基によって置換されているアルコキシル基である。

30

【0145】

記号「

【化17】

~~~~~

40

」は、結合点を示す。

#### 【0146】

本開示の化合物は、1つまたはそれ以上のキラル中心および／または二重結合を含有してもよく、それゆえ、立体異性体、例えば幾何異性体、エナンチオマーまたはジアステレオマーとして存在する。「立体異性体」という用語は、本明細書において使用される場合、全ての幾何異性体、エナンチオマーまたはジアステレオマーからなる。これらの化合物は、立体中心炭素原子の周囲の置換基のコンフィギュレーションによって、記号「R」または「S」によって指定することができる。本発明は、これらの化合物の様々な立体異性体、およびそれらの混合物を包含する。立体異性体にはエナンチオマーおよびジアステレオマーが含まれる。エナンチオマーまたはジアステレオマーの混合物は、命名法において

50

「(±)」で指定することができるが、当業者は、構造が暗にキラル中心を示し得ることを認識する。化学構造、例えば一般化学構造の図画描写は、別に示されない限り、特定の化合物の全ての立体異性形を包含することが理解される。

【0147】

本発明の化合物の個々の立体異性体は、不斉もしくは立体中心を含有する市販の出発材料から合成で、またはラセミ混合物の製造および後続の、当業者に周知の分解法によって、製造することができる。これらの分解の方法は、(1) エナンチオマー混合物の不斉補助剤への結合、生ずるジアステレオマー混合物の、再結晶化もしくはクロマトグラフィーによる分離、および補助剤からの光学的に純粋な生成物の遊離、(2) 光学活性分解剤を用いる塩形成、または(3) キラルクロマトグラフィーカラムにおける光学エナンチオマー混合物の直接的な分離によって例示される。また、立体異性体混合物は、周知の方法、例えばキラル相気体クロマトグラフィー、キラル相高速液体クロマトグラフィー、化合物をキラル塩複合体として結晶化すること、またはキラル溶媒中において化合物を結晶化することによって、それらの成分立体異性体に分解することができる。さらに、エナンチオマーは、文献において説明されている超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)技術を使用して分離することができる。またさらに、立体異性体は、周知の不斉合成法によって、立体異性体的に純粋な中間体、試薬および触媒から取得することができる。

10

【0148】

また、幾何異性体は、本発明の化合物において存在することができる。記号「  
【化18】

20

」は、本明細書において説明される一重、二重または三重結合であり得る結合を示す。本発明は、炭素-炭素二重結合の周囲の置換基の配置、または炭素環式環の周囲の置換基の配置から生ずる、様々な幾何異性体およびそれらの混合物を包含する。炭素-炭素二重結合の周囲の置換基は、「Z」または「E」コンフィギュレーションであることが指定され、「Z」および「E」という用語は、IUPAC基準に従って使用される。別に特定されない限り、二重結合を示す構造は、「E」および「Z」異性体の両方を包含する。

【0149】

あるいは、炭素-炭素二重結合の周囲の置換基は、「シス」または「トランス」と呼んでもよく、「シス」とは二重結合の同じ側の置換基を表し、「トランス」とは二重結合の反対側の置換基を表す。炭素環式環の周囲の置換基の配置は、「シス」または「トランス」として指定される。「シス」という用語は、環の面の同じ側の置換基を表し、「トランス」という用語は、環の面の反対側の置換基を表す。置換基が環の面の同じまたは反対側の両方に置かれる、化合物の混合物は、「シス/トランス」と指定される。

30

【0150】

また、本発明は、1個またはそれ以上の原子が通常天然に見出される原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子によって置き換えられていることを除いては、本明細書において列挙される化合物と同一である、本発明の同位体標識化合物を包含する。本発明の化合物に組み入れることができる同位体の例には、水素、炭素、窒素、酸素、リン、フッ素および塩素の同位体、例えばそれぞれ、 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ および $^{36}\text{Cl}$ が含まれる。

40

【0151】

ある特定の同位体標識された開示される化合物(例えば、 $^3\text{H}$ および $^{14}\text{C}$ により標識された化合物)は、化合物および/または基質組織分布アッセイにおいて有用である。トリチウム標識した(すなわち、 $^3\text{H}$ )および炭素 $^{14}$ (すなわち、 $^{14}\text{C}$ )同位体は、それらの製造の容易さおよび検出可能性のために特に好ましい。さらに、より重い同位体、例えば重水素(すなわち、 $^2\text{H}$ )による置換は、より大きな代謝安定性(例えば、インビボ(in vivo)半減期の増加、または投薬量の必要量の低減)から生ずるある特定の治療的利益を与えることができ、それゆえ、一部の状況において好ましい場合がある。

50

本発明の同位体標識化合物は、一般的に、例えば本明細書中の実施例において開示される手技と類似する手技に従うことによって、同位体標識試薬を非同位体標識試薬と置換することによって、製造することができる。

【0152】

本明細書において使用される場合、「対象」および「患者」という用語は、本発明の方法によって処置されるべき生物を指す。そのような生物は、好ましくは、哺乳動物（例えばマウス、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど）およびより好ましくはヒトである。

【0153】

本明細書において使用される場合、「医薬組成物」という用語は、とりわけインビボまたはエクスピボ（*ex vivo*）における診断的または治療的使用に好適な、組成物を構成する、活性剤と、不活性または活性な担体との組合せを指す。

【0154】

本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、標準の医薬担体、例えばリン酸緩衝食塩水、水、エマルジョン（例えば油／水または水／油エマルジョン）および様々な種類の湿潤剤のいずれかを指す。また、組成物は、安定化剤および保存剤を含んでもよい。担体、安定化剤および佐剤の例について、Remington's The Science and Practice of Pharmacy、第21版、A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD、2006を参照されたい。

【0155】

当業者に公知である通り、本発明の化合物の「塩」は、無機または有機酸および塩基に由来し得る。酸の例には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、蟻酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などが含まれるが、これらに限定されない。他の酸、例えばシュウ酸は、それら自体では薬学的に許容されないが、本発明の化合物およびそれらの薬学的に許容される酸添加塩を取得することにおいて中間体として有用な塩の製造において用いることができる。

【0156】

塩基の例には、水酸化アルカリ金属（例えばナトリウム）、水酸化アルカリ土類金属（例えばマグネシウム）、アンモニア、およびWがC<sub>1</sub>~4アルキルである、式NW<sub>4</sub><sup>+</sup>の化合物などが含まれるが、これらに限定されない。

【0157】

塩の例には、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタノエート（*flucoheptanoate*）、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルモエート（*palmolate*）、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、ウンデカン酸塩などが含まれるが、これらに限定されない。塩の他の例には、好適なカチオン、例えばNa<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>およびNW<sub>4</sub><sup>+</sup>（式中、WはC<sub>1</sub>~4アルキル基である）などと化合された、本発明の化合物のアニオンが含まれる。

【0158】

本明細書において使用される略語には、ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）；4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）；ヨウ化テトラブチルアンモニウム（TBAI）；1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）；ベン

10

20

30

40

50

ゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP)、9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc)、テトラブチルジメチルシリルクロリド (TBDMSCl)、フッ化水素 (HF)、フェニル (Ph)、ビス(トリメチルシリル)アミン (HMDS)、ジメチルホルムアミド (DMF)；塩化メチレン (DCM)；テトラヒドロフラン (THF)；高速液体クロマトグラフィー (HPLC)；質量分析 (MS)、蒸発光散乱検出器 (ELSD)、エレクトロスプレー (ES)；核磁気共鳴分光法 (NMR) が含まれる。

#### 【0159】

本明細書において使用される場合、「有効量」という用語は、有益なまたは所望の結果を産出するのに十分な化合物（例えば核酸、例えば mRNA）の量を指す。有効量は、1 つまたはそれ以上の投与、適用または投与量において投与することができ、特定の製剤または投与経路に限定されずとは意図されない。有効量という用語は、化合物の治療有効量および／または予防有効量を含むと考えることができる。

10

#### 【0160】

「治療有効量」という句は、本明細書において使用される場合、任意の医療処置に適用可能な合理的な利益／リスク比において、哺乳動物、例えばヒトまたは対象（例えばヒト対象）にて、少なくとも細胞のサブ集団で一部の所望の治療効果を生産するために有効である化合物（例えば核酸、例えば mRNA）、材料、または化合物（例えば核酸、例えば mRNA）を含む組成物の量を意味する。

20

#### 【0161】

「予防有効量」という句は、本明細書において使用される場合、任意の医療処置に適用可能な合理的な利益／リスク比において、状態を発症するリスクを低減、最小化もしくは除去するか、または状態の重症度を低減もしくは最小化することによって、哺乳動物、例えばヒトまたは対象（例えばヒト対象）において、少なくとも細胞のサブ集団にて一部の所望の予防効果を生産するために有効である化合物（例えば核酸、例えば mRNA）、材料、または化合物（例えば核酸、例えば mRNA）を含む組成物の量を意味する。

#### 【0162】

本明細書において使用される場合、「処置する」、「処置すること」および「処置」という用語は、任意の効果、例えば状態、疾患、障害の改善をもたらす軽減すること、低減すること、モジュレートすること、改善することもしくは除去することなど、またはその症状を改善することを含む。

30

#### 【0163】

「薬学的に許容される」という句は、十分な医療的判断の範囲内において、合理的な利益／リスク比に釣り合っており、過度の毒性、刺激、アレルギー反応または他の問題もしくは合併症を伴わずに、ヒトおよび動物の組織との接触における使用に好適である、化合物、材料、組成物および／または剤形を指すために本明細書において用いられる。

#### 【0164】

要素または成分が、列挙される要素または成分のリストに含まれ、かつ／またはそれから選択されると言われる適用において、要素または成分は、列挙される要素または成分のいずれであってもよく、要素または成分は、列挙される要素または成分のうちの 2 つまたはそれ以上からなる群から選択してもよいことを理解すべきである。

40

#### 【0165】

さらに、本明細書において説明される組成物または方法の要素および／または特質は、本明細書において明示的であるか暗示的であるかにかかわらず、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々に組み合わせることができることを理解すべきである。例えば、言及が特定の化合物についてなされる場合、その化合物は、文脈から別のように理解されるのでない限り、本発明の組成物の様々な実施形態においておよび／または本発明の方法において使用することができる。言い換えれば、本出願内で、実施形態は、明確かつ簡潔な適用が記載および描写されることを可能にするような様式で説明および描写されているが、実施形態は、本教示および発明から逸脱することなく、様々に組み合わせるかま

50

たは分離することができることが意図され、かつ理解される。例えば、本明細書において説明および描写されている全ての特質は、本明細書において説明および描写されている本発明の全ての態様に適用可能であり得ることが理解される。

【0166】

「のうちの少なくとも1つ」という表現は、文脈および使用から別のように理解されるのでない限り、この表現に続く列挙される目的物のうちの個々の各々、および列挙される目的物のうちの2つまたはそれ以上の様々な組合せを含むと理解すべきである。3つまたはそれ以上の列挙される目的物と関係する「および／または」という表現は、文脈から別のように理解されるのでない限り、同じ意味を有すると理解すべきである。

【0167】

「を含む (include)」、「を含む (includes)」、「を含むこと (including)」、「を有する (have)」、「を有する (has)」、「を有すること (having)」、「を含有する (contain)」、「を含有する (contains)」または「を含有すること (containing)」という用語およびそれらの文法的同等物の使用は、一般的に、別のように特に示されるかまたは文脈から理解されるのでない限り、開放型かつ非限定的なもの、例えば追加の列挙されていない要素または工程を排除しないものとして理解すべきである。

【0168】

「約」という用語の使用が定量的な値の前である場合、本発明は、別のように特に示されない限り、特定の定量的値それ自体もまた含む。本明細書において使用される場合、「約」という用語は、別に示されるかまたは推測されない限り、名目上の値からの±10%の変動を指す。

【0169】

本明細書において使用される場合、別に示されない限り、「抗体」という用語は、特定の抗原に特異的に結合するかまたはそれと相互作用する少なくとも1つの相補性決定領域 (CDR) を含む、任意の抗原結合分子または分子複合体を意味する。この用語は、インタクトな抗体 (例えばインタクトなモノクローナル抗体) またはその断片、例えば抗体のFc断片 (例えばモノクローナル抗体のFc断片) もしくは抗体の抗原結合性断片 (例えばモノクローナル抗体の抗原結合性断片) を包含し、これは改変または工学操作されているインタクトな抗体、抗原結合性断片またはFc断片を含むと理解される。抗原結合性断片の例には、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv、単鎖抗体 (例えばscFv)、ミニボディおよびディアボディが含まれる。改変または工学操作されている抗体の例には、キメラ抗体、ヒト化抗体および多重特異性抗体 (例えば二重特異性抗体) が含まれる。また、この用語は、免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばナノボディ (例えばV<sub>HH</sub>) を包含する。

【0170】

本明細書において使用される場合、「Xに結合する抗体」(すなわち、Xは特定の抗原) または「抗X抗体」は、抗原Xを特異的に認識する抗体である。

【0171】

本明細書において使用される場合、「埋まっている鎖間ジスルフィド結合」または「鎖間の埋まっているジスルフィド結合」とは、ジスルフィド結合が還元剤および他の親水性PEGへのコンジュゲーション用の両方に使用されないように、水溶性還元剤に容易にアクセス可能ではないか、またはポリペプチドの疎水性領域に有効に「埋まっている」、ポリペプチド上のジスルフィド結合を指す。埋まっている鎖間ジスルフィド結合は、WO 2017096361 A1においてさらに説明されており、当該公報はその全体を参照によって組み入れる。

【0172】

本明細書において使用される場合、LNPによる標的化送達の特異性は、送達された核酸を受容する所望の免疫細胞種の% (例えばオンターゲット送達) と、送達の目的地であるとは考えられていないが送達された核酸を受容する所望されない免疫細胞種の% (例え

10

20

30

40

50

ばオフターゲット送達)との間の比によって定義される。例えば、より多くの所望の免疫細胞が、送達された核酸を受容し、一方で、より少ない所望されない免疫細胞が、送達された核酸を受容する場合、特異性は、より高い。また、LNPによる標的化送達の特異性は、所望の免疫細胞へ送達される核酸の量(例えばオンターゲット送達)と、所望されない免疫細胞へ送達される核酸の量(例えばオフターゲット送達)との比と定義することができる。送達の特異性は、任意の好適な方法を使用して決定することができる。非限定的な例として、所望の免疫細胞種における核酸の発現レベルを測定し、送達の目的地であるとは考えられていない異なる免疫細胞種の核酸の発現レベルと比較してもよい。

#### 【0173】

本明細書において使用される場合、一部の実施形態において、LNPという言葉及は、免疫細胞標的化基を有しないが、別の点で、試験されるLNPと同じであるLNPである。一部の他の実施形態において、LNPという言葉及は、異なるイオン化可能なカチオン性脂質を有するが、別の点で、試験されるLNPと同じであるLNPである。一部の実施形態において、LNPという言葉及は、試験されるLNP中のイオン化可能なカチオン性脂質とは異なるが、別の点で、試験されるLNPと同じである、イオン化可能なカチオン性脂質としてのD-Lin-MC3-DMAを含む。

#### 【0174】

本明細書において使用される場合、ヒト化抗体は、全体的にまたは部分的に非ヒト起源の抗体であり、そのタンパク質配列が、例えば、ヒトにおいて免疫応答を回避または最小化するために、ヒトにおいて天然に生産される抗体とのその類似性を増加させるように、ヒト由来の抗体の配列におけるVHおよびVLドメインのフレームワーク領域の対応する位置に生ずるある特定のアミノ酸を置き換えるように改変されている抗体である。例えば、遺伝子工学操作の技術を使用して、目的の非ヒト抗体の可変ドメインは、ヒト抗体の定常ドメインと組み合わせてもよい。ヒト化抗体の定常ドメインは、ほとんどの場合、ヒトCHおよびCLドメインである。

#### 【0175】

本明細書において使用される場合、「構造脂質」という用語は、ステロールおよびまたステロール部分を含有する脂質を指す。

#### 【0176】

工程の順序、またはある特定の作業を行うための順序は、本発明が実施可能なままである限り、重要ではないことを理解すべきである。さらに、2つまたはそれ以上の工程または作業は、同時に行ってもよい。

#### 【0177】

本明細書中の様々な箇所において、置換基は、群または範囲において開示されている。説明は、そのような群および範囲の構成員の各およびどの個々の下位の組合せも含むことが特に意図される。例えば、「C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキル」という用語は、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>、C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub>、C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>、C<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>、C<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>、C<sub>2</sub>C<sub>5</sub>、C<sub>2</sub>C<sub>4</sub>、C<sub>2</sub>C<sub>3</sub>、C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>、C<sub>3</sub>C<sub>5</sub>、C<sub>3</sub>C<sub>4</sub>、C<sub>4</sub>C<sub>6</sub>、C<sub>4</sub>C<sub>5</sub>およびC<sub>5</sub>C<sub>6</sub>アルキルを個々に開示すると特に意図される。他の例として、0~40の範囲内の整数は、0、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39および40を個々に開示すると特に意図され、1~20の範囲内の整数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19および20を個々に開示すると特に意図される。

#### 【0178】

本明細書中の任意および全ての例または例示的な言語、例えば「のような」もしくは「例えば」(such as)または「を含むこと(including)」の使用は、単に本発明をより良く例示することを意図し、請求されない限り、本発明の範囲に対して限定を課すものではない。本明細書中のいかなる言語も、任意の請求されていない要素を本

10

20

30

40

50

発明の実施に本質的なものとして示すと解釈すべきでない。

【0179】

組成物およびキットが特定の成分を有するか、それを含む (including) かもしくはそれを含む (comprising) ことが説明されているか、またはプロセスおよび方法が特定の工程を有するか、それを含む (including) かもしくはそれを含む (comprising) ことが説明されている説明全体を通して、加えて、列挙される成分から本質的になるかもしくはそれからなる本発明の組成物およびキットが存在すること、ならびに列挙される加工工程から本質的になるかもしくはそれからなる本発明に記載のプロセスおよび方法が存在することが企図される。

【0180】

一般的な事柄として、パーセンテージを特定している組成は、別に特定されない限り、重量によるパーセンテージである。さらに、変数に定義が伴わない場合、変数の以前の定義が優先される。

【0181】

免疫グロブリン単一可変ドメイン

一部の実施形態において、本明細書において説明される LNP の免疫細胞標的化基は、免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばナノボディを含む。

【0182】

「免疫グロブリン単一可変ドメイン」(ISV) という用語は、「単一可変ドメイン」と互換的に使用され、抗原結合部位が単一の免疫グロブリンドメイン上に存在し、かつ単一の免疫グロブリンドメインによって形成される、免疫グロブリン分子を定義する。これは、免疫グロブリン単一可変ドメインを、2つの免疫グロブリンドメイン、特に2つの可変ドメインが相互作用して抗原結合部位を形成する「従来型」免疫グロブリン (例えばモノクローナル抗体) またはそれらの断片 (例えば Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、di-scFv) と区別する。典型的に、従来型免疫グロブリンにおいて、重鎖可変ドメイン (V<sub>H</sub>) および軽鎖可変ドメイン (V<sub>L</sub>) は相互作用して、抗原結合部位を形成する。この場合、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の両方の相補性決定領域 (CDR) は、抗原結合部位に寄与する、すなわち、全部で6つの CDR が抗原結合部位形成に関与する。上記の定義の点では、従来型四鎖抗体 (例えば IgG、IgM、IgA、IgD もしくは IgE 分子; 当該技術分野において公知) の、またはそのような従来型四鎖抗体に由来する Fab、F(ab')<sub>2</sub> 断片、Fv 断片、例えばジスルフィド結合 Fv もしくは scFv 断片、もしくはディアボディ (全て当該技術分野において公知) の抗原結合ドメインは、これらの場合、抗原の各々のエピトープへの結合は普通1つの (単一の) 免疫グロブリンドメインによって起こらず、一对の免疫グロブリンドメイン (会合している免疫グロブリンドメイン)、例えば軽鎖および重鎖可変ドメインによって、すなわち、各々の抗原のエピトープに連帯して結合する免疫グロブリンドメインの V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 対によって起こり得るので、普通、免疫グロブリン単一可変ドメインとは見なされない。

【0183】

対照的に、免疫グロブリン単一可変ドメインは、追加の免疫グロブリン可変ドメインと対形成することなく、抗原のエピトープに特異的に結合することが可能である。免疫グロブリン単一可変ドメインの結合部位は、単一の V<sub>H</sub>、単一の V<sub>HH</sub> または単一の V<sub>L</sub> ドメインによって形成される。それゆえ、免疫グロブリン単一可変ドメインの抗原結合部位は、3つ以下の CDR によって形成される。

【0184】

そのため、単一可変ドメインは、軽鎖可変ドメイン配列 (例えば V<sub>L</sub> 配列) もしくはその好適な断片; または重鎖可変ドメイン配列 (例えば V<sub>H</sub> 配列 もしくは V<sub>HH</sub> 配列) もしくはその好適な断片であってもよく; ただし、それは、単一の抗原結合単位 (すなわち、単一の抗原結合ドメインが別の可変ドメインと相互作用して機能的抗原結合単位を形成する必要がないような、単一可変ドメインから本質的になる機能的抗原結合単位) を形成することが可能である。

10

20

30

40

50

## 【0185】

免疫グロブリン単一可変ドメイン（ISV）は、例えば重鎖ISV、例えばV<sub>H</sub>、V<sub>H</sub><sub>H</sub>であってもよく、これらはラクダ化V<sub>H</sub>またはヒト化V<sub>HH</sub>を含む。一実施形態において、それはV<sub>HH</sub>であり、これはラクダ化V<sub>H</sub>またはヒト化V<sub>HH</sub>を含む。重鎖ISVは、従来型四鎖抗体に、または重鎖抗体に由来し得る。

## 【0186】

例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインは、ドメイン抗体（単一ドメイン抗体）（もしくは単一ドメイン抗体としての使用に好適であるアミノ酸配列）、「dAb」もしくはdAb（もしくはdAbとしての使用に好適であるアミノ酸配列）、もしくはナノボディ（登録商標）ISV（本明細書において定義される通りであり、V<sub>HH</sub>を含むがこれらに限定されない）；他の単一可変ドメイン、またはそれらのいずれかの任意の好適な断片であり得る。

## 【0187】

特に、免疫グロブリン単一可変ドメインは、ナノボディ（登録商標）ISV（例えばV<sub>HH</sub>；ヒト化V<sub>HH</sub>もしくはラクダ化V<sub>H</sub>を含む）またはその好適な断片であり得る。〔注釈：ナノボディ（登録商標）はAblynx N.V.の登録された商標である〕。

## 【0188】

「V<sub>HH</sub>ドメイン」は、V<sub>HH</sub>、V<sub>HH</sub>抗体断片およびV<sub>HH</sub>抗体としても公知であり、元々、「重鎖抗体」の（すなわち、「軽鎖を欠く抗体」の）抗原結合免疫グロブリン可変ドメインとして説明されていた；Hamers-Castermanら、1993（Nature 363：446～448）。「V<sub>HH</sub>ドメイン」という用語は、これらの可変ドメインを、従来型四鎖抗体に存在する重鎖可変ドメイン（本明細書において「V<sub>H</sub>ドメイン」と称される）から、および従来型四鎖抗体に存在する軽鎖可変ドメイン（本明細書において「V<sub>L</sub>ドメイン」と称される）から区別するために選択された。V<sub>HH</sub>のさらなる説明について、Muyldermans 2001による総説論文（Reviews in Molecular Biotechnology 74：277～302）について参照がなされる。

## 【0189】

「dAb」および「ドメイン抗体」という用語については、例えば、Wardら 1989（Nature 341：544）について、Holtら 2003（Trends Biotechnol. 21：484）について；ならびに例えばWO2004/068820、WO2006/030220、WO2006/003388およびDomanthis Ltd社の他の公開された特許出願について参照がなされる。また、特定の種類のサメに由来する単一可変ドメインは哺乳動物起源のものではないので本発明の関係においてあまり好ましくないが、単一可変ドメインはある特定の種類のサメに由来してもよいことに留意すべきである（例えば、いわゆる「IgNARドメイン」、例えばWO2005/18629を参照されたい）。

## 【0190】

典型的に、免疫グロブリンの生成は、実験動物の免疫化、ハイブリドーマを作出するための免疫グロブリン生産細胞の融合、および所望の特異性についてのスクリーニングを含む。あるいは、免疫グロブリンは、ナイーブ免疫または合成ライブラリーのスクリーニングによって、例えばファージディスプレイによって生成することができる。

## 【0191】

免疫グロブリン配列、例えばV<sub>HH</sub>の生成は、様々な公開公報において広範に説明されており、中でも、WO1994/04678、Hamers-Castermanら 1993（Nature 363：446～448）およびMuyldermansら 2001（Reviews in Molecular Biotechnology 74：277～302、2001）において説明されている。これらの方法において、ラクダ類を、標的抗原によって免疫化して、前記標的抗原に対する免疫応答を誘導する。前記免疫化から取得されるV<sub>HH</sub>のレパートリーは、標的抗原を結合するV<sub>HH</sub>についてさら

にスクリーニングされる。

【0192】

これらの場合、抗体の生成は、免疫化および／またはスクリーニングのための精製抗原を必要とする。抗原は、天然源からまたは組換え生産の過程において精製することができる。免疫化および／または免疫グロブリン配列についてのスクリーニングは、そのような抗原のペプチド断片を使用して行うことができる。

【0193】

マウス、ラット、ウサギ、ロバ、ヒトおよびラクダ免疫グロブリン配列を含む、様々な起源の免疫グロブリン配列は、本明細書において使用することができる。また、完全ヒト、ヒト化またはキメラ配列は、本明細書において説明される方法において使用することができる。例えば、Wardら 1989 (Nature 341:544)、WO1994/04678ならびにDavisおよびRiechmann (1994、Fests Lett.、339:285~290; および1996、Prot. Eng.、9:531~537) によって説明される、ラクダ免疫グロブリン配列およびヒト化ラクダ免疫グロブリン配列、またはラクダ化ドメイン抗体、例えばラクダ化dAbは、本明細書において使用することができる。さらに、ISVは融合して、多価および／または多重特異性構築物を形成する(1つまたはそれ以上のV<sub>H</sub>Hドメインを含有する多価および多重特異性ポリペプチドならびにそれらの調製について、また、Conrathら 2001 (J. Biol. Chem.、第276巻、10.7346~7350) に、ならびに例えばWO1996/34103およびWO1999/23221に参照がなされる)。

【0194】

「ヒト化V<sub>H</sub>H」は、天然に存在するV<sub>H</sub>Hドメインのアミノ酸配列に対応するが、「ヒト化」されている、すなわち、前記天然に存在するV<sub>H</sub>H配列(特にフレームワーク配列内)のアミノ酸配列における1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を、ヒト由来の従来型四鎖抗体(例えば上記に示される)由来のV<sub>H</sub>ドメインにおける対応する位置に生ずるアミノ酸残基のうちの1つまたはそれ以上によって置き換えることによって「ヒト化」されている、アミノ酸配列を含む。これは、例えば先行技術(例えばWO2008/020079)に基づいて当業者に明らかである、それ自体公知の様式において行うことができる。ここでもまた、そのようなヒト化V<sub>H</sub>Hは、それ自体公知の任意の好適な様式において取得することができ、したがって、天然に存在するV<sub>H</sub>Hドメインを含むポリペプチドを出発材料として使用して取得されたポリペプチドに厳密に限定されないことに留意すべきである。

【0195】

「ラクダ化V<sub>H</sub>」は、天然に存在するV<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列に対応するが、「ラクダ化」されている、すなわち、従来型四鎖抗体由来の天然に存在するV<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列における1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を、重鎖抗体(ラクダ重鎖抗体)のV<sub>H</sub>Hドメインにおける対応する位置に生ずるアミノ酸残基のうちの1つまたはそれ以上によって置き換えることによって「ラクダ化」されている、アミノ酸配列を含む。これは、例えば先行技術(例えばDaviesおよびRiechman 1994、FEB S 339:285; 1995、Biotechnol. 13:475; 1996、Prot. Eng. 9:531; およびRiechman 1999、J. Immunol. Methods 231:25)中の説明に基づいて当業者に明らかである、それ自体公知の様式において行うことができる。そのような「ラクダ化」置換は、本明細書において定義される通り、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>界面を形成し、かつ／もしくはそこに存在するアミノ酸位置に、および／またはいわゆるラクダ特徴的残基(Camelidae hallmark residue)に挿入される(例えばWO1994/04678、ならびにDaviesおよびRiechmann (1994および1996、上記)を参照されたい)。一実施形態において、ラクダ化V<sub>H</sub>を生成または設計するための出発材料または出発点として使用されるV<sub>H</sub>配列は、哺乳動物由来のV<sub>H</sub>配列、例えばヒトのV<sub>H</sub>配列、例えばV<sub>H</sub>3配列である。しかしながら、そのようなラクダ化V<sub>H</sub>は、それ自体公知の任意の

好適な様式において取得することができ、したがって、天然に存在するV<sub>H</sub>ドメインを含むポリペプチドを出発材料として使用して取得されたポリペプチドに厳密に限定されないことに留意すべきである。

【0196】

免疫グロブリン単一可変ドメイン配列の構造は、当該技術分野においておよび本明細書において、それぞれ、「フレームワーク領域1」（「FR1」）；「フレームワーク領域2」（「FR2」）；「フレームワーク領域3」（「FR3」）；および「フレームワーク領域4」（「FR4」）と称される4つのフレームワーク領域（「FR」）からなると考えることができ；このフレームワーク領域は、当該技術分野においておよび本明細書において、それぞれ、「相補性決定領域1」（「CDR1」）；「相補性決定領域2」（「CDR2」）；および「相補性決定領域3」（「CDR3」）と称される3つの相補性決定領域（「CDR」）によって中断されている。

10

【0197】

そのような免疫グロブリン配列において、フレームワーク配列は任意の好適なフレームワーク配列であってもよく、好適なフレームワーク配列の例は、例えば標準のハンドブックならびにさらなる開示および本明細書で挙げられる先行技術に基づいて、当業者に明らかである。

【0198】

フレームワーク配列は、免疫グロブリンフレームワーク配列、または免疫グロブリンフレームワーク配列に由来する（例えばヒト化またはラクダ化による）フレームワーク配列（の好適な組合せ）である。例えば、フレームワーク配列は、軽鎖可変ドメイン（例えばV<sub>L</sub>配列）に由来する、かつ／または重鎖可変ドメイン（例えばV<sub>H</sub>配列もしくはV<sub>HH</sub>配列）に由来するフレームワーク配列であってもよい。1つの特定の態様において、フレームワーク配列は、V<sub>HH</sub>配列に由来するフレームワーク配列（前記フレームワーク配列が場合により部分的にもしくは完全にヒト化されている）であるか、またはラクダ化されている従来型V<sub>H</sub>配列（本明細書において定義される）である。

20

【0199】

特に、本明細書において説明されるISV配列に存在するフレームワーク配列は、ISV配列がナノボディ（登録商標）ISV、例えばヒト化V<sub>HH</sub>またはラクダ化V<sub>H</sub>を含むV<sub>HH</sub>であるように、特徴的残基（本明細書において定義される）のうちの1つまたはそれ以上を含有し得る。そのようなフレームワーク配列（の好適な組合せ）の非限定的な例は、本明細書中のさらなる開示から明らかになる。

30

【0200】

V<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>HH</sub>ドメインにおけるアミノ酸残基の総数は通常、110～120、多くの場合112～115の範囲内である。しかしながら、より小さいおよびより長い配列もまた本明細書において説明される目的のために好適であり得ることに留意すべきである。

【0201】

しかしながら、本明細書において説明されるISVは、ISV配列の（またはそれを発現するために使用されるヌクレオチド配列の）起源についても、ISV配列またはヌクレオチド配列が生成もしくは取得される（または生成もしくは取得された）方法についても限定されないことに留意すべきである。したがって、ISV配列は、天然に存在する配列（任意の好適な種由来の）または合成もしくは半合成配列であり得る。特定であるが非限定的な態様において、ISV配列は、天然に存在する配列（任意の好適な種由来の）または合成もしくは半合成配列であり、「ヒト化」（本明細書において定義される）免疫グロブリン配列（例えば部分的にもしくは完全にヒト化されているマウスもしくはウサギ免疫グロブリン配列、特に部分的にもしくは完全にヒト化されているV<sub>HH</sub>配列）、「ラクダ化」（本明細書において定義される）免疫グロブリン配列（特にラクダ化V<sub>H</sub>配列）、および親和性成熟（例えば合成、ランダムもしくは天然に存在する免疫グロブリン配列から出発する）、CDRグラフト化、上張り、異なる免疫グロブリン配列由来の組合せ断片を

40

50

組み合わせること、重複プライマーを使用するPCRアセンブリ、および当業者に周知の免疫グロブリン配列を工学操作するための同様の技術などの技術によって取得されたISV；または上記のいずれかの任意の好適な組合せを含むが、これらに限定されない。

【0202】

同様に、ヌクレオチド配列は、天然に存在するヌクレオチド配列または合成もしくは半合成配列であってもよく、例えば、好適な天然に存在する鋳型（例えば細胞から単離されたDNAもしくはRNA）からPCRによって単離される配列、ライブラリー（特に、発現ライブラリー）から単離されたヌクレオチド配列、突然変異を天然に存在するヌクレオチド配列へ導入すること（それ自体公知の任意の好適な技術、例えばミスマッチPCRを使用して）によって調製されたヌクレオチド配列、重複プライマーを使用するPCRによって調製されたヌクレオチド配列、またはそれ自体公知のDNA合成のための技術を使用して調製されたヌクレオチド配列であってもよい。

10

【0203】

一般的に、ナノボディ（登録商標）ISV（特にV<sub>HH</sub>配列、（部分的には）ヒト化V<sub>HH</sub>配列およびラクダ化V<sub>H</sub>配列を含む）は、フレームワーク配列（本明細書においてさらに説明される）のうちの1つまたはそれ以上における1つまたはそれ以上の「特徴的残基」（これもまた本明細書において説明される）の存在によって特徴付けることができる。したがって、一般的に、ナノボディ（登録商標）ISVは、構造（一般構造）

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

を有する免疫グロブリン配列として定義することができ、ここで、FR1~FR4は、それぞれ、フレームワーク領域1~4を指し、CDR1~CDR3は、それぞれ、相補性決定領域1~3を指し、特徴的残基のうちの1つまたはそれ以上は、本明細書においてさらに定義される通りである。

20

【0204】

特に、ナノボディ（登録商標）ISVは、構造（一般構造）

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

を有する免疫グロブリン配列であってもよく、ここで、FR1~FR4は、それぞれ、フレームワーク領域1~4を指し、CDR1~CDR3は、それぞれ、相補性決定領域1~3を指し、フレームワーク配列は、本明細書においてさらに定義される通りである。

【0205】

より特に、ナノボディ（登録商標）ISVは、構造（一般構造）

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

を有する免疫グロブリン配列であってもよく、ここで、FR1~FR4は、それぞれ、フレームワーク領域1~4を指し、CDR1~CDR3は、それぞれ、相補性決定領域1~3を指し、カバットによる番号付けによる11、37、44、45、47、83、84、103、104および108位のアミノ酸残基のうちの1つまたはそれ以上は、以下の表2Aに挙げられる特徴的残基から選択される。

30

【0206】

40

50

【表 1 - 1】

表 2A: ナノボディ (登録商標) ISV における特徴的残基

| 位置                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | ヒト V <sub>H</sub> 3 | 特徴的残基                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | L, V; L が優勢         | L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; 好ましくは L                                                                                                                                                        |
| 37                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | V, I, F; 通常 V       | F <sup>(1)</sup> , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, 好ましくは F <sup>(1)</sup> または Y                                                                                                                         |
| 44 <sup>(8)</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | G                   | E <sup>(3)</sup> , Q <sup>(3)</sup> , G <sup>(2)</sup> , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; 好ましくは G <sup>(2)</sup> , E <sup>(3)</sup> または Q <sup>(3)</sup> ; 最も好ましくは G <sup>(2)</sup> または Q <sup>(3)</sup> |
| 45 <sup>(8)</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | L                   | L <sup>(2)</sup> , R <sup>(3)</sup> , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; 好ましくは L <sup>(2)</sup> または R <sup>(3)</sup>                                                                                          |
| 47 <sup>(8)</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | W, Y                | F <sup>(1)</sup> , L <sup>(1)</sup> または W <sup>(2)</sup> G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; 好ましくは W <sup>(2)</sup> , L <sup>(1)</sup> または F <sup>(1)</sup>                                        |
| 83                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | R または K; 通常 R       | R, K <sup>(5)</sup> , T, E <sup>(5)</sup> , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; 好ましくは K または R; 最も好ましくは K                                                                                                          |
| 84                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | A, T, D; A が優勢      | P <sup>(5)</sup> , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; 好ましくは P                                                                                                                                           |
| 103                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | W                   | W <sup>(4)</sup> , R <sup>(6)</sup> , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P <sup>(6)</sup> , E, C; 好ましくは W                                                                                                        |
| 104                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | G                   | G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; 好ましくは G                                                                                                                                                                             |
| 108                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | L, M または T; L が優勢   | Q, L <sup>(7)</sup> , R, P, E, K, S, T, M, A, H; 好ましくは Q または L <sup>(7)</sup>                                                                                                                                     |
| <p>注釈:</p> <p>特に、ただし排他的ではなく、43～46 位の KERE (配列番号 103) または KQRE (配列番号 104) との組合せで。</p> <p>通常 44～47 位の GLEW (配列番号 105) として。</p> <p>通常 43～46 位の KERE (配列番号 103) または KQRE (配列番号 104) として、例えば 43～47 位の KEREL (配列番号 106)、KEREF (配列番号 107)、KQREL (配列番号 108)、KQREF (配列番号 109)、KEREG (配列番号 110)、KQREW (配列番号 111) または KQREG (配列番号 112) として。あるいは、また、配列、例えば TERE (配列番号 113) (例えば TEREL (配列番号 114))、TQRE (配列番号 115) (例えば TQREL (配列番号 116))、KECE (配列番号 117) (例えば KECER (配列番号 118) または KECER (配列番号 119))、KQCE (配列番号 120) (例えば KQCEL (配列番号 121))、RERE (配列番号 122) (例えば REREG (配列番号 123))、RQRE (配列番号 124) (例えば RQREL (配列番号 125))、RQREF (配列番号 126) または RQREW (配列番号 127))、QERE (配列番号</p> |                     |                                                                                                                                                                                                                   |

10

20

30

40

50

## 【表 1 - 2】

128) (例えば QEREG (配列番号 129))、QQRE (配列番号 130)、(例えば QQREW (配列番号 131)、QQREL (配列番号 132) または QQREF (配列番号 133))、KGRE (配列番号 134) (例えば KGREG (配列番号 135))、KDRE (配列番号 136) (例えば KDREV (配列番号 137)) は、可能である。一部の他の可能であるが、あまり好ましくない配列には、例えば DECKL (配列番号 138) および NVCEL (配列番号 139) が含まれる。

44～47 位の GLEW (配列番号 105) および 43～46 位の KERE (配列番号 103) または KQRE (配列番号 104) の両方と共に。

多くの場合、天然に存在する  $V_{HH}$  ドメインの 83～84 位の KP または EP として。特に、ただし排他的ではなく、44～47 位の GLEW (配列番号 105) との組合せで。ただし、44～47 位が GLEW (配列番号 105) である場合、 $V_{HH}$  配列 (非ヒト化  $V_{HH}$  配列) において 108 位はいつも Q であり、また、この配列は 103 位に W を含有する。また、GLEW 基は、44～47 位において GLEW 様配列、例えば GVEW (配列番号 140)、EPEW (配列番号 141)、GLER (配列番号 142)、DQEW (配列番号 143)、DLEW (配列番号 144)、GIEW (配列番号 145)、ELEW (配列番号 146)、GPEW (配列番号 147)、EWLP (配列番号 148)、GPER (配列番号 149)、GLER (配列番号 142) および ELEW (配列番号 146) を含有する。

10

20

## 【0207】

一実施形態において、免疫グロブリン単一可変ドメインは、ポリペプチドへのいわゆる「既存の抗体」の結合を防止または低減することにおいて有効な、フレームワーク領域におけるある特定のアミノ酸置換を有する。(i) 112 位のアミノ酸残基は K もしくは Q のうちの 1 つであり；かつ／または (ii) 89 位のアミノ酸残基は T であり；かつ／または (iii) 89 位のアミノ酸残基は L であり、110 位のアミノ酸残基は K もしくは Q のうちの 1 つであり；かつ (iv) (i) ～ (iii) の場合の各々において、11 位のアミノ酸は、好ましくは V である、ISV が、WO 2015 / 173325 において説明されている。

30

## 【0208】

## ポリペプチド

免疫グロブリン単一可変ドメインは、タンパク質またはポリペプチドの部分を形成してもよく、タンパク質またはポリペプチドは、1 つまたはそれ以上の (少なくとも 1 つの) 免疫グロブリン単一可変ドメインを含むか、またはそれから本質的になってもよく、かつ場合により 1 つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸配列 (全て、場合により 1 つまたはそれ以上の好適なリンカーを介して連結されている) をさらに含み得る。また、「免疫グロブリン単一可変ドメイン」という用語は、そのようなポリペプチドを包含し得る。1 つまたはそれ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインは、場合により、結合単位として働き得る 1 つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸を含有し得るそのようなタンパク質またはポリペプチドにおいて、結合単位として使用されて、それぞれ、本発明の一価、多価または多重特異性ポリペプチドを提供することができる (1 つまたはそれ以上の  $V_{HH}$  ドメインを含有する多価および多重特異性ポリペプチドならびにそれらの調製については、また、Conrath ら 2001 (J. Biol. Chem. 276: 7346) に、ならびに例えば WO 1996 / 34103、WO 1999 / 23221 および WO 2010 / 115998 に参照がなされる)。

40

## 【0209】

ポリペプチドは、上記に概略される 1 つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含むか、またはそれから本質的になり得る。また、そのようなポリペプチドは、本明細書において一価のポリペプチドと称される。

50

## 【0210】

「多価」という用語は、ポリペプチドにおける多数のISVの存在を示す。一実施形態において、ポリペプチドは「二価」である、すなわち、2つのISVを含むかまたはそれからなる。一実施形態において、ポリペプチドは「三価」である、すなわち、3つのISVを含むかまたはそれからなる。別の実施形態において、ポリペプチドは「四価」である、すなわち、4つのISVを含むかまたはそれからなる。したがって、ポリペプチドは、「二価」、「三価」、「四価」、「五価」、「六価」、「七価」、「八価」、「九価」などであってもよく、すなわち、ポリペプチドは、それぞれ、2、3、4、5、6、7、8、9つなどのISVを含むかまたはそれからなる。一実施形態において、多価ISVポリペプチドは、三価である。別の実施形態において、多価ISVポリペプチドは、四価である。また別の実施形態において、多価ISVポリペプチドは、五価である。

10

## 【0211】

一実施形態において、また、多価ISVポリペプチドは、多重特異性であり得る。「多重特異性」という用語は、多数の異なる標的分子（抗原とも称される）に結合することを指す。したがって、多価ISVポリペプチドは、「二重特異性」、「三重特異性」、「四重特異性」などであってもよい、すなわち、それぞれ、2、3、4種などの異なる標的分子に結合し得る。

## 【0212】

例えば、ポリペプチドは、二重特異性三価、例えば3つのISVを含むかまたはそれからなるポリペプチドであって、2つのISVが第1の標的に結合し、1つのISVが第1の標的とは異なる第2の標的に結合する、ポリペプチドであってもよい。別の例において、ポリペプチドは、三重特異性四価、例えば4つのISVを含むかまたはそれからなるポリペプチドであって、1つのISVが第1の標的に結合し、2つのISVが第1の標的とは異なる第2の標的に結合し、1つのISVが第1および第2の標的とは異なる第3の標的に結合する、ポリペプチドであってもよい。また別の例において、ポリペプチドは、三重特異性五価、例えば5つのISVを含むかまたはそれからなるポリペプチドであって、2つのISVが第1の標的に結合し、2つのISVが第1の標的とは異なる第2の標的に結合し、1つのISVが第1および第2の標的とは異なる第3の標的に結合する、ポリペプチドであってもよい。

20

## 【0213】

一実施形態において、また、多価ISVポリペプチドは、マルチパラトピック（multiparatoptic）であり得る。「マルチパラトピック」という用語は、同じ標的分子（抗原とも称される）上の多数の異なるエピトープに結合することを指す。したがって、多価ISVポリペプチドは、「バイパラトピック」、「トリパラトピック」などであり得る、すなわち、それぞれ、同じ標的分子上の2、3種などの異なるエピトープに結合することができる。

30

## 【0214】

別の態様において、1つまたはそれ以上の免疫グロブリン単一可変ドメイン（またはその好適な断片）を含むかまたはそれから本質的になる本発明のポリペプチドは、1つまたはそれ以上の他の基、残基、部分または結合単位をさらに含み得る。そのようなさらなる基、残基、部分、結合単位またはアミノ酸配列は、免疫グロブリン単一可変ドメインに（および／またはそれが存在するポリペプチドに）さらなる機能性を提供しても、提供しなくてもよく、免疫グロブリン単一可変ドメインの特性を改変しても、改変しなくてもよい。

40

## 【0215】

例えば、そのようなさらなる基、残基、部分または結合単位は、化合物、構築物またはポリペプチドがタンパク質（融合タンパク質）またはポリペプチド（融合ポリペプチド）であるように、1つまたはそれ以上の追加のアミノ酸であってもよい。好ましいが非限定的な態様において、前記1つまたはそれ以上の他の基、残基、部分または結合単位は、免疫グロブリンである。さらにより好ましくは、前記1つまたはそれ以上の他の基、残基、

50

部分または結合単位は、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適であるアミノ酸、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適であるアミノ酸、「dAb」、dAbとしての使用に好適であるアミノ酸、またはナノボディからなる群から選択される。

【0216】

あるいは、そのような基、残基、部分または結合単位は、例えば、それ自体は生物学的かつ／または薬理学的に活性であっても、活性でなくてもよい化学基、残基、部分であってもよい。例えば、限定ではなく、そのような基は、1つまたはそれ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインに連結して、免疫グロブリン単一可変ドメインの「誘導体」を提供することができる。

【0217】

別の実施形態において、前記さらなる残基は、ポリペプチドへのいわゆる「既存の抗体」の結合を防止または低減することにおいて有効であり得る。この目的のために、ポリペプチドおよび構築物は、C末端延長(X)<sub>n</sub>（配列番号150）を含有し得る（式中、nは1～10、好ましくは1～5、例えば1、2、3、4または5（好ましくは1または2、例えば1）であり；各Xは、独立して選択され、かつ好ましくは独立してアラニン（A）、グリシン（G）、バリン（V）、ロイシン（L）またはイソロイシン（I）からなる群から選択されるアミノ酸残基（好ましくは天然に存在するアミノ酸残基）であり、これらについてWO2012/175741に参照がなされる。したがって、ポリペプチドは、C末端延長(X)<sub>n</sub>（配列番号151）をさらに含んでもよく、式中、nは1～5、例えば1、2、3、4または5であり、Xは天然に存在するアミノ酸であり、好ましくはシステインではない。

【0218】

上記に説明されるポリペプチドにおいて、1つまたはそれ以上の免疫グロブリン単一可変ドメインおよび1つまたはそれ以上の基、残基、部分または結合単位は、互いに直接的に、かつ／または1つもしくはそれ以上の好適なリンカーもしくはスペーサーを介して連結することができる。例えば、1つまたはそれ以上の基、残基、部分または結合単位がアミノ酸である場合、生ずるポリペプチドが融合タンパク質または融合ポリペプチドであるように、リンカーもまたアミノ酸であってもよい。

【0219】

本明細書において使用される場合、「リンカー」という用語は、2つまたはそれ以上のISVと一緒に融合して単一の分子にするペプチドを示す。2つまたはそれ以上のペプチド（ポリペプチド）を接続するリンカーの使用は、当該技術分野において周知である。さらなる例示的なペプチドリナーは、表2Bにおいて示される。1つのよく使用されるクラスのペプチドリナーは、「Gly-Ser」または「GS」リンカーとして公知である。これらは、グリシン（G）およびセリン（S）残基から本質的になり、通常、ペプチドモチーフ、例えばGGGGS（配列番号154）モチーフ（例えば、式（Gly-Gly-Gly-Ser）<sub>n</sub>（配列番号152）を有し、式中、nは、1、2、3、4、5、6、7またはそれ以上であってもよい）の1つまたはそれ以上の繰り返しを含む。そのようなGSリンカーの一部がよく使用される例は、9GSリンカー（GGGGS GGGS、配列番号157）、15GSリンカー（n=3）および35GSリンカー（n=7）である。例えば、Chenら 2013（Adv. Drug Deliv. Rev. 65（10）：1357～1369）、およびKleinら 2014（Protein Eng. Des. Sel. 27（10）：325～330）について参照がなされる。

【0220】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2B: リンカー配列(「ID」とは、本明細書において使用される場合、配列番号を指す)

| 名称         | ID  | アミノ酸配列                                                         |
|------------|-----|----------------------------------------------------------------|
| 3A リンカー    | 153 | AAA                                                            |
| 5GS リンカー   | 154 | GGGGS                                                          |
| 7GS リンカー   | 155 | SGGSGGS                                                        |
| 8GS リンカー   | 156 | GGGSGGS                                                        |
| 9GS リンカー   | 157 | GGGSGGGS                                                       |
| 10GS リンカー  | 158 | GGGSGGGGS                                                      |
| 15GS リンカー  | 159 | GGGSGGGGSGGGGS                                                 |
| 18GS リンカー  | 160 | GGGSGGGGSGGGGSGGS                                              |
| 20GS リンカー  | 161 | GGGSGGGGSGGGGSGGGGS                                            |
| 25GS リンカー  | 162 | GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS                                       |
| 30GS リンカー  | 163 | GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS                                  |
| 35GS リンカー  | 164 | GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS                             |
| 40GS リンカー  | 165 | GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS                        |
| G1 ヒンジ     | 166 | EPKSCDKTHTCPPCP                                                |
| 9GS-G1 ヒンジ | 167 | GGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP                                        |
| ラマ上部長ヒンジ領域 | 168 | EPKTPKPQAAA                                                    |
| G3 ヒンジ     | 169 | ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP |

10

20

30

40

## 【0221】

一態様において、また、本開示は、CD8に結合し、かつ／またはそれを対象とすることができ、かつ一般的に本明細書においてさらに定義されるCDR配列を含む、アミノ酸配列および／またはナノボディに、その好適な断片に、ならびにそのようなナノボディおよび／または好適な断片のうちの1つまたはそれ以上を含むかまたはそれから本質的になるポリペプチドに関する。一部の態様において、本開示は、配列番号77を有するナノボディに関する。特に、一部の特定の態様における本開示は：

I) CD8に方向付けられ、かつ配列番号77のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つと少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、例えば90%もしくは95%またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；

50

II) CD 8 への配列番号 77 のアミノ酸配列の結合を交差遮断し、かつ／または CD 8 への結合について少なくとも配列番号 77 のアミノ酸配列と競合するアミノ酸配列；を提供する。

【0222】

そのようなアミノ酸配列は、本明細書においてさらに説明される通りであってもよく（例えばナノボディであってもよく）；そのようなアミノ酸配列のうちの1つまたはそれ以上を含む本開示のポリペプチド（本明細書においてさらに説明される通りであり得る）、および特に本明細書において説明される二重特異性（または多重特異性）ポリペプチド、ならびにそのようなアミノ酸配列およびポリペプチドをコードする核酸配列もまた、本明細書においてさらに説明される通りであり得る。そのようなアミノ酸配列およびポリペプチドは、任意の天然に存在するリガンドを含まない。

10

【0223】

一部の実施形態において、CD 8 は、哺乳動物、例えばヒトに由来する。1つの特定であるが非限定的な態様において、本開示は：

- a) 配列番号 77 のアミノ酸配列；
  - b) 配列番号 77 のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列、もしくは
  - c) 配列番号 77 のアミノ酸配列のうちの少なくとも1つと3、2もしくは1つのアミノ酸の相違を有するアミノ酸配列；
- またはそれらの任意の好適な組合せを含む、CD 8 に対して方向付けられたアミノ酸配列に関する。

20

【0224】

一部の実施形態において、4つのフレームワーク領域（それぞれ、FR 1～FR 4）および3つの相補性決定領域（それぞれ、CDR 1～CDR 3）からなる、CD 8 に対するナノボディが開示される。一部の実施形態において、そのようなナノボディでは：

- (I) CDR 1 は、GSTFSDYG（配列番号 100）のアミノ酸配列、または GSTFSDYG（配列番号 100）との少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%もしくはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、(1) 任意のアミノ酸置換は保存的アミノ酸置換であり；かつ／もしくは(2) 前記アミノ酸配列は、GSTFSDYG（配列番号 100）と比較して、アミノ酸置換のみを含有し、アミノ酸欠失もしくは挿入を含有しない、アミノ酸配列；
- および／または GSTFSDYG（配列番号 100）との2もしくはただ1つのアミノ酸の相違を有するアミノ酸配列からなる群からのアミノ酸配列であって、任意のアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換であり；かつ／もしくは前記アミノ酸配列は、GSTFSDYG（配列番号 100）と比較して、アミノ酸置換のみを含有し、アミノ酸欠失もしくは挿入を含有しない、アミノ酸配列を含むかまたはそれから本質的になる。

30

【0225】

- (II) CDR 2 は、IDWNGEHT（配列番号 101）のアミノ酸配列、または IDWNGEHT（配列番号 101）との少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%もしくはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、(1) 任意のアミノ酸置換は保存的アミノ酸置換であり；かつ／もしくは(2) 前記アミノ酸配列は、IDWNGEHT（配列番号 101）と比較して、アミノ酸置換のみを含有し、アミノ酸欠失もしくは挿入を含有しない、アミノ酸配列；
- および／または IDWNGEHT（配列番号 101）との2もしくはただ1つのアミノ酸の相違を有するアミノ酸配列からなる群からのアミノ酸配列であって、任意のアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換であり；かつ／もしくは前記アミノ酸配列は、IDWNGEHT（配列番号 101）と比較して、アミノ酸置換のみを含有し、アミノ酸欠失もしくは挿入を含有しない、アミノ酸配列を含むかまたはそれから本質的になる。

40

50

## 【0226】

(III) CDR3は、A A D A L P Y T V R K Y N Y (配列番号102)のアミノ酸配列、

またはA A D A L P Y T V R K Y N Y (配列番号102)との少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%もしくはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、(1)任意のアミノ酸置換は保存的アミノ酸置換であり；かつ／もしくは(2)前記アミノ酸配列は、A A D A L P Y T V R K Y N Y (配列番号102)と比較して、アミノ酸置換のみを含有し、アミノ酸欠失もしくは挿入を含有しない、アミノ酸配列；

および／またはA A D A L P Y T V R K Y N Y (配列番号102)との2もしくはただ1つのアミノ酸の相違を有するアミノ酸配列からなる群からのアミノ酸配列であって、

任意のアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換であり；かつ／もしくは

前記アミノ酸配列は、A A D A L P Y T V R K Y N Y (配列番号102)と比較して、アミノ酸置換のみを含有し、アミノ酸欠失もしくは挿入を含有しない、アミノ酸配列を含むかまたはそれから本質的になる。

## 【0227】

本明細書において開示されるCD8ナノボディは、上記に明白に列挙されるCDRのうちの1、2または全て3つを含み得る。一部の実施形態において、CD8ナノボディは：

CDR1：IMGT命名法に基づくG S T F S D Y G (配列番号100)；

CDR2：IMGT命名法に基づくI D W N G E H T (配列番号101)；および

CDR3：IMGT命名法に基づくA A D A L P Y T V R K Y N Y (配列番号102)を含む。

## 【0228】

上記に言及されるCDRの組合せを含む本開示のナノボディにおいて、各CDRは、言及されるCDRのアミノ酸配列との少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるCDRであって：

(1)任意のアミノ酸置換は、好ましくは保存的アミノ酸置換であり；かつ／もしくは

(2)前記アミノ酸配列は、好ましくは、上記アミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換のみを含有し、アミノ酸欠失もしくは挿入を含有しない

CDR；

ならびに／または上記アミノ酸配列の言及されるCDRの1つとの3、2もしくは1つのみの(上記の段落において示される)「アミノ酸の相違」を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるCDRであって：

(1)任意のアミノ酸置換は、好ましくは保存的アミノ酸置換であり；かつ／もしくは

(2)前記アミノ酸配列は、好ましくは、上記アミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換のみを含有し、アミノ酸欠失もしくは挿入を含有しない

CDRによって置き換えることができる。

## 【0229】

一実施形態において、CD8ナノボディは、B D S n：

抗CD8 B D S n N b配列(CDR1、CDR2、CDR3はIMGT命名法に基づいて下線を引いた)：

## 【化19】

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTFSDYGVGWFRQAPGKGRFVADIDWN

GEHTSYADSVKGRFATSRDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAADALPYTVRKY

NYWGQGTQVTVSSGGCGGHHHHHH(配列番号77)

10

20

30

40

50

である。

#### 【0230】

一部の実施形態において、本開示のCD8ナノボディは、 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ モル／リットル(M)もしくはそれ以下、好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-12}$ モル／リットル(M)もしくはそれ以下、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12}$ モル／リットル(M)の解離定数(KD)により、および／または少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、例えば少なくとも $10^{12} M^{-1}$ の会合定数(KA)により；特に500nM未満、好ましくは200nM未満、より好ましくは10nM未満、例えば500μM未満のKDにより、CD8に結合する。vWFに対する本開示のナノボディのKDおよびKA値は、それ自体公知の様式において、例えば本明細書において説明されるアッセイを使用して、決定することができる。より一般的には、本明細書において説明されるナノボディは、好ましくはこの段落において説明されるvWFについての解離定数を有する。

10

#### 【0231】

一般的に、最も広い意味での、本明細書において使用されるナノボディという用語は、特定の生物供給源にまたは特定の調製方法に限定されないことに留意すべきである。例えば、以下により詳細に説明される通り、ナノボディは、(1)天然に存在する重鎖抗体のVHHドメインを単離することによって；(2)天然に存在するVHHドメインをコードするヌクレオチド配列の発現によって；(3)天然に存在するVHHドメインの「ヒト化」(以下に説明される)によって、もしくはそのようなヒト化VHHドメインをコードする核酸の発現によって；(4)任意の動物種、特に哺乳動物の種由来の、例えばヒト由来の天然に存在するVHドメインの「ラクダ化」(以下に説明される)によって、もしくはそのようなラクダ化VHドメインをコードする核酸の発現によって；(5)Wardら(上記)によって説明されている「ドメイン抗体」もしくは「Dab」の「ラクダ化」によって、もしくはそのようなラクダ化VHドメインをコードする核酸の発現によって；(6)タンパク質、ポリペプチドもしくは他のアミノ酸配列を調製するための合成もしくは半合成技術を使用して；(7)核酸合成のための技術を使用してナノボディをコードする核酸を調製し、続いてそのようにして取得された核酸を発現させることによって；および／または(8)上記の任意の組合せによって取得することができる。上記を行うための好適な方法および技術は、本明細書中の開示に基づいて当業者に明らかであり、例えば本明細書中以下により詳細に説明される方法および技術を含む。

20

30

#### 【0232】

一部の実施形態において、本開示のCD8ナノボディは、天然に存在するVHHドメインのアミノ酸配列、例えば哺乳動物由来、特にヒト由来の天然に存在するVHドメインのアミノ酸配列とまったく同じである(すなわち、それとの100%の配列同一性の程度としての)アミノ酸配列を有しない。

#### 【0233】

本開示のCD8ナノボディの1つのクラスは、天然に存在するVHHドメインのアミノ酸配列に対応するが、「ヒト化」されている、すなわち、前記天然に存在するVHH配列のアミノ酸配列における1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を、ヒト由来の従来型四鎖抗体(上記に示される)由来のVHドメインにおける対応する位置に生ずるアミノ酸残基のうちの1つまたはそれ以上によって置き換えることによって「ヒト化」されている、アミノ酸配列を有するナノボディを含む。本開示のそのようなヒト化CD8ナノボディは、それ自体公知の任意の好適な様式において(すなわち、上記の点(1)～(8)で示されるように)取得することができ、したがって、天然に存在するVHHドメインを含むポリペプチドを出発材料として使用して取得されたポリペプチドに厳密に限定されないことに留意すべきである。

40

#### 【0234】

本開示のCD8ナノボディの別のクラスは、「ラクダ化」されている、すなわち、従来型四鎖抗体由来の天然に存在するVHドメインのアミノ酸配列における1つまたはそれ以

50

上のアミノ酸残基を、重鎖抗体のVHHドメインにおける対応する位置に生ずるアミノ酸残基のうちの1つまたはそれ以上によって置き換えることによって「ラクダ化」されている、天然に存在するVHドメインのアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するナノボディを含む。これは、例えば以下のさらなる説明に基づいて当業者に明らかである、それ自体公知の様式において行うことができる。また、WO 94 / 0 4 6 7 8 について参照がなされる。そのようなラクダ化は、以下にも言及される通り、VH-VL界面に存在するアミノ酸位置において、およびいわゆるラクダ特徴的残基において優先的に生じ得る（例えばWO 94 / 0 4 6 7 8 もまた参照されたい）。一部の実施形態において、ラクダ化ナノボディを生成または設計するための出発材料または出発点として使用されるVHドメインまたは配列は、哺乳動物由来のVH配列、例えばヒトのVH配列である。本開示のそのようなラクダ化ナノボディは、それ自体公知の任意の好適な様式において取得することができ、したがって、天然に存在するVHドメインを含むポリペプチドを出発材料として使用して取得されたポリペプチドに厳密に限定されないことに留意すべきである。

10

#### 【0235】

例えば、「ヒト化」および「ラクダ化」の両方は、それぞれ、そのような天然に存在するVHHドメインまたはVHドメインをコードするヌクレオチド配列を提供し、その後、新しいヌクレオチド配列が、それぞれ、本開示のヒト化またはラクダ化ナノボディをコードするように、それ自体公知の様式において前記ヌクレオチド配列における1つまたはそれ以上のコドンを変更し、その後、それ自体公知の様式においてそのようにして取得されたヌクレオチド配列を発現させて、所望のナノボディを提供することによって行うことができる。あるいは、天然に存在するVHHドメインまたはVHドメインのアミノ酸配列に基づいて、それぞれ、本開示の所望のヒト化またはラクダ化ナノボディのアミノ酸配列を、それぞれ設計し、その後、それ自体公知のペプチド合成のための技術を使用して新規に（*de novo*）合成してもよい。また、天然に存在するVHHドメインまたはVHドメインのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列に基づいて、それぞれ、所望のヒト化またはラクダ化ナノボディをコードするヌクレオチド配列を設計し、その後それ自体公知の核酸合成のための技術を使用して新規に合成してもよく、その後、このようにして取得されたヌクレオチド配列を、それ自体公知の様式において発現させて、所望のナノボディを提供してもよい。

20

#### 【0236】

天然に存在するVHドメインもしくは好ましくはVHHドメイン（そのアミノ酸配列）から、ならびに／またはこれをコードするヌクレオチド配列および／もしくは核酸から出発して、ナノボディ、ならびに／またはこれをコードするヌクレオチド配列および／もしくは核酸を取得するための他の好適な方法および技術は、当業者に明らかであり、例えば、好適な様式において、天然に存在するVHドメイン（例えば1つまたはそれ以上のFRのドメインおよび／またはCDRのドメイン）由来の1つまたはそれ以上のアミノ酸配列および／またはヌクレオチド配列を、天然に存在するVHHドメイン（例えば1つまたはそれ以上のFRのドメインまたはCDRのドメイン）由来の1つまたはそれ以上のアミノ酸配列および／またはヌクレオチド配列と組み合わせて、ナノボディ（をコードするヌクレオチド配列または核酸）を提供することを含み得る。また、少なくとも1つのそのようなアミノ酸配列および／または本開示のナノボディ（もしくはその好適な断片）を含むかまたはそれから本質的になり、かつ場合により、1つまたはそれ以上の他の基、残基、部分または結合単位をさらに含む化合物および構築物、特にタンパク質およびポリペプチドが提供される。一部の実施形態において、そのようなさらなる基、残基、部分、結合単位またはアミノ酸配列は、アミノ酸配列および／もしくはナノボディに（ならびに／またはそれらが存在する化合物もしくは構築物に）さらなる機能性を提供しても、提供しなくてもよく、アミノ酸配列および／またはナノボディの特性を改変しても、改変しなくてもよい。

30

40

#### 【0237】

また、本開示は、通常、ポリペプチドを発現するために使用される*host*に依存して、

50

1つまたはそれ以上のアミノ酸位置においてグリコシル化されている本開示の任意のポリペプチドを包含する。ポリペプチドは、本開示のCD8ナノボディのアミノ酸配列を含んでもよく、それは、そのアミノ末端において、そのカルボキシ末端において、またはそのアミノ末端およびそのカルボキシ末端の両方において、少なくとも1つのさらなるアミノ酸配列と融合されている。そのようなさらなるアミノ酸配列は、少なくとも1つのさらなるナノボディを含んで、少なくとも2つ、例えば3、4または5つのナノボディを含むポリペプチドを提供することができ、ここで、前記ナノボディは、場合により、1つまたはそれ以上のリンカー配列（本明細書において定義される）を介して連結することができる。本開示のCD8ナノボディおよび1つまたはそれ以上の別のナノボディを含むポリペプチドは、多価ポリペプチドである。多価ポリペプチドにおいて、2つまたはそれ以上のナノボディは、同じであっても、異なってもよい。例えば、多価ポリペプチドにおける2つまたはそれ以上のナノボディは：

10

- ・同じ抗原に対して、すなわち、前記抗原の同じ部分もしくはエピトープに対して、もしくは前記抗原の2つもしくはそれ以上の異なる部分もしくはエピトープに対して方向付けられてもよく；かつ／もしくはは：

- ・異なる抗原に対して方向付けられてもよく；
- ・またはそれらの組合せ

であってもよい。したがって、二価のポリペプチドは、例えば：

- ・2つの同一のナノボディを含んでもよく；
- ・抗原の第1の部分もしくはエピトープに対して方向付けられた第1のナノボディ、および前記抗原の同じ部分もしくはエピトープに対してもしくは前記抗原の別の部分もしくはエピトープに対して方向付けられた第2のナノボディを含んでもよく；

または第1の抗原に対して方向付けられた第1のナノボディおよび前記第1の抗原とは異なる第2の抗原に対して方向付けられた第2のナノボディを含んでもよく；

20

一方で、本発明の三価のポリペプチドは、例えば：

- ・同じ抗原の同じもしくは異なる部分もしくはエピトープに対して方向付けられた3つの同一のもしくは異なるナノボディを含んでもよく；
- ・第1の抗原上の同じもしくは異なる部分もしくはエピトープに対して方向付けられた2つの同一のもしくは異なるナノボディ、および前記第1の抗原とは異なる第2の抗原に対して方向付けられた第3のナノボディを含んでもよく；または
- ・第1の抗原に対して方向付けられた第1のナノボディ、前記第1の抗原とは異なる第2の抗原に対して方向付けられた第2のナノボディ、ならびに前記第1および第2の抗原とは異なる第3の抗原に対して方向付けられた第3のナノボディを含み得る。

30

【0238】

また、本明細書において開示されるCD8ナノボディおよびポリペプチドは、例えば予防目的および／または治療目的のために（例えば遺伝子療法として）、多細胞生物の1つまたはそれ以上の細胞、組織または臓器において導入および発現してもよい。この目的のために、本明細書において開示されるCD8ナノボディまたはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、任意の好適な方法において、例えばそのまま（例えばリポソームを使用して）、またはそれらが好適な遺伝子療法ベクター（例えば、レトロウイルス、例えばアデノウイルス、もしくはパルボウイルス、例えばアデノ随伴ウイルスに由来する）へ挿入された後、細胞または組織へ導入することができる。また、当業者に明らかである通り、そのような遺伝子療法は、本発明の核酸またはそれをコードする好適な遺伝子療法ベクターを、患者へまたは患者の特定の細胞もしくは特定の組織もしくは臓器へ投与することによって、患者の体内においてインビボおよび／またはインサイチュ（*in situ*）で行ってもよく；あるいは、好適な細胞（多くの場合、処置される患者の身体から採取された細胞、例えば外植されたリンパ球、骨髓穿刺液または組織生検）を、本発明のヌクレオチド配列によってインビトロ（*in vitro*）で処置し、その後、好適に患者の身体へ導入（再導入）してもよい。この全ては、Culver, K. W., 「Gene Therapy」、1994、p. xii、Mary Ann Liebert,

40

50

Inc., Publishers, New York, N. Y.), Giordano, Nature F Medicine 2 (1996), 534~539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911~919; Anderson, Science 256 (1992), 808~813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370~374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077~1086; Onodera, Blood 91; (1998), 30~36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692~699; Nabel, Ann. N. Y. Acad. Sci.: 811 (1997), 289~292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243~51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714~716; WO94/29469; WO97/00957、米国特許第5,580,859号; 1米国特許第5,589,546号; または Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635~640について、当業者に周知である遺伝子療法ベクター、技術および送達系を使用して行うことができる。例えば、ScFv断片のインサイチュ発現 (Afanasiyevaら、Gene Ther., 10、1850~1859 (2003)) およびディアボディのインサイチュ発現 (Blancoら、J. Immunol., 171, 1070~1077 (2003)) は、当該技術分野において説明されている。

10

20

30

40

50

【0239】

したがって、また、本明細書において説明されるCD8ナノボディをコードする核酸配列、ならびに核酸配列を含む発現構築物および宿主細胞が提供される。

【0240】

また、本開示のCD8ナノボディおよびポリペプチドを使用する方法が開示される。

【0241】

一部の実施形態において、CD8ナノボディを含むポリペプチドは、本明細書において説明される通り、核酸を免疫細胞へ送達するための本開示の脂質ナノ粒子において使用することができる。一部の実施形態において、本開示のCD8ナノボディおよびポリペプチドは、それを必要とする対象で状態または疾患を処置するために使用することができる。一部の実施形態において、そのような状態または疾患には、がん、感染症、免疫障害、自己免疫疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【0242】

一部の実施形態において、CD8ナノボディを含むポリペプチドは、造影剤において使用することができる。一部の実施形態において、造影剤は、免疫系の画像診断のために、T細胞のサブセットの表面上に見出される特定のバイオマーカーであるヒトCD8の検出を可能にする。CD8の造影は、T細胞局在性のインビボ検出を可能にする。T細胞局在性の変化は、免疫応答の進行を反映することができ、様々な治療処置の結果またはさらには疾患状態として経時的に起こり得る。一部の実施形態において、それは、免疫療法のためにT細胞局在性を造影するために使用される。

【0243】

加えて、CD8は、ウイルス病原体を取り除くように機能し、かつ腫瘍への免疫性を提供する細胞溶解性T細胞の活性化に重要である下流のシグナル伝達経路を活性化することにおいて役割を果たす。CD8陽性T細胞は、抗原提示細胞のMHC Iタンパク質内に提示される短いペプチドを認識し得る。一部の実施形態において、CD8ナノボディを含むポリペプチドは、T細胞受容体を通してシグナル伝達を増強し、対象の、ウイルス病原体を取り除き、腫瘍抗原へ応答する能力を向上することができる。したがって、一部の実施形態において、本明細書において提供される抗原結合構築物は、アゴニストであってもよく、CD8標的を活性化することができる。

【0244】

II. イオン化可能なカチオン性脂質

20

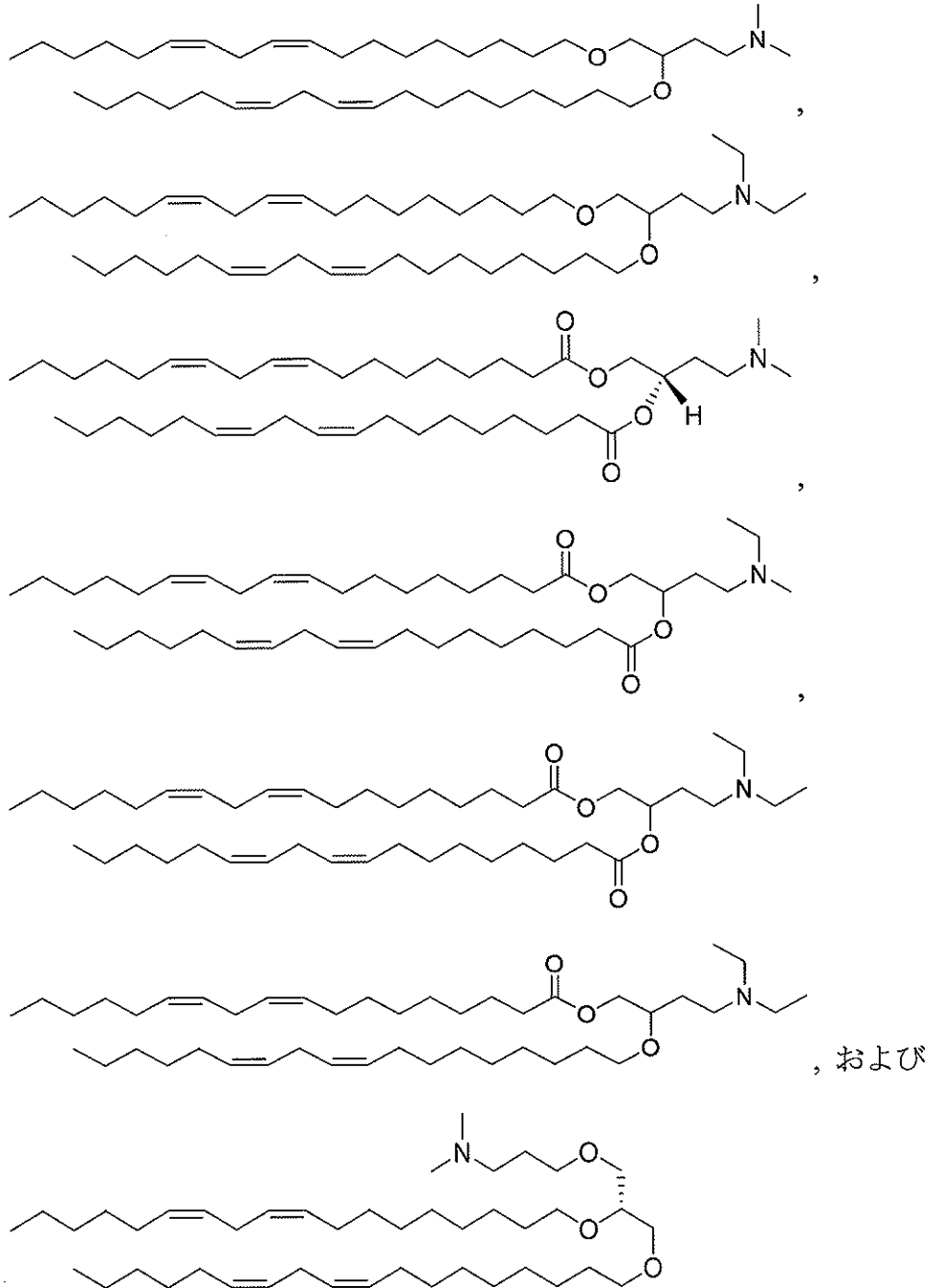
一態様において、本発明は、式Ⅰ：

30



50

## 【化 2 1】



10

20

30

またはその塩からなる群から選択される化合物ではない。

## 【0246】

40

ある特定の実施形態において、 $o$  および  $p$  は 2 であってもよい。ある特定の実施形態において、 $o$  および  $p$  は 3 であってもよい。他の実施形態において、 $o$  および  $p$  は 4 であってもよい。一部の実施形態において、 $o$  および  $p$  は 5 であってもよい。他の実施形態において、 $o$  および  $p$  は 6 であってもよい。

## 【0247】

ある特定の実施形態において、 $X^1$  および  $X^2$  は、一緒になって、オキソを形成してもよく、 $X^3$  および  $X^4$  は、一緒になって、オキソを形成する。他の実施形態において、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$  および  $X^4$  は、水素であり得る。

## 【0248】

ある特定の実施形態において、 $Y$  は、 $-O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $OC(S)-$  および

50

$\text{CH}_2$ —からなる群から選択してもよい。例えば、ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-\text{O}-$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-\text{OC}(\text{O})-$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-\text{CH}_2-$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-\text{OC}(\text{S})-$ であり得る。

【0249】

ある特定の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、独立して、 $\text{C}_1\sim 3$ アルキルであり得る。他の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、 $-\text{CH}_3$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ である。ある特定の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、 $\text{C}_3$ アルキルである。

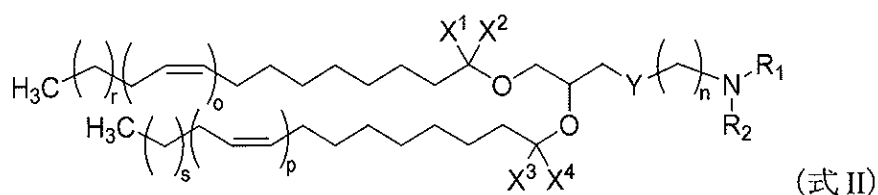
【0250】

ある特定の実施形態において、 $n$ は、0であり得る。他の実施形態において、 $n$ は、3であり得る。

【0251】

また、部分的には、式II：

【化22】



によって表される化合物またはその塩が本明細書において提供され、式中：

$R^1$ および $R^2$ は、独立して、 $\text{C}_1\sim 3$ アルキルであるか、または $R^1$ および $R^2$ は、窒素原子と一緒にあって、場合により置換されるピペリジニルもしくはモルホリニルを形成し；

$Y$ は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{S})-$ および $-\text{CH}_2-$ からなる群から選択され；

$X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ および $X^4$ は、水素であるか、または $X^1$ および $X^2$ もしくは $X^3$ および $X^4$ は、一緒にあって、オキソを形成し；

$n$ は、0～4であり；

$o$ は1であり、 $r$ は3～8から選択される整数であるか、または $o$ は2であり、 $r$ は1～8から選択される整数であり、

$p$ は1であり、 $s$ は3～8から選択される整数であるか、または $p$ は2であり、 $s$ は1～8から選択される整数であり、

ここで、

$o$ および $p$ が、両方とも1である場合、 $r$ および $s$ は、独立して、4、5、7または8であり、

$o$ および $p$ が、両方とも2である場合、 $r$ および $s$ は、独立して、1、2、4または5である。

【0252】

ある特定の実施形態において、 $X^1$ および $X^2$ は、一緒にあって、オキソを形成してもよく、 $X^3$ および $X^4$ は、一緒にあって、オキソを形成してもよい。他の実施形態において、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ および $X^4$ は、水素であり得る。

【0253】

ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ および $-\text{CH}_2-$ からなる群から選択してもよい。例えば、ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-\text{O}-$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-\text{OC}(\text{O})-$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-\text{CH}_2-$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-\text{OC}$

(S) -であり得る。

【0254】

ある特定の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、独立して、 $C_1 \sim 3$ アルキルであり得る。他の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、 $-CH_3$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、 $-CH_2CH_3$ であり得る。一部の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、 $C_3$ アルキルであり得る。ある特定の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、窒素原子と一緒にあって、場合により置換されるピペリジニルを形成する。

【0255】

ある特定の実施形態において、 $n$ は、0であり得る。他の実施形態において、 $n$ は、3であり得る。

10

【0256】

部分的には：

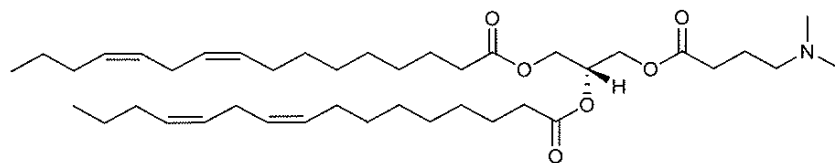
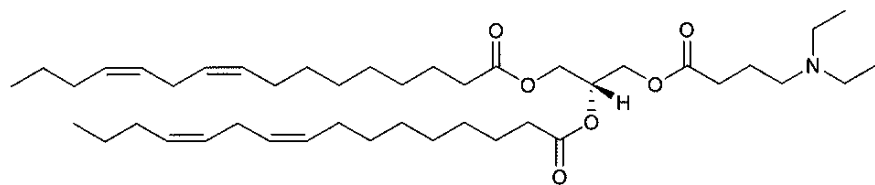
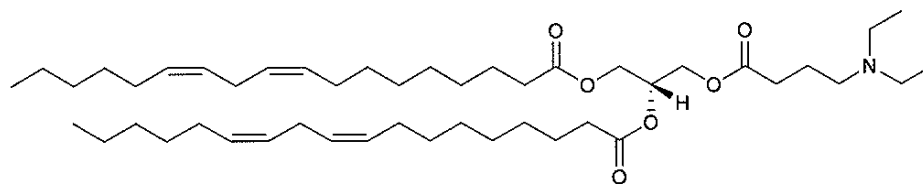
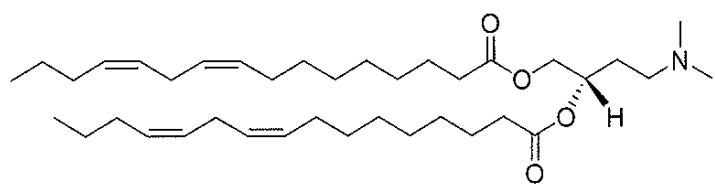
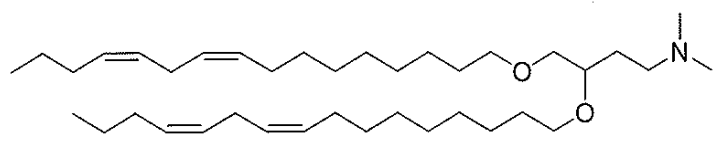
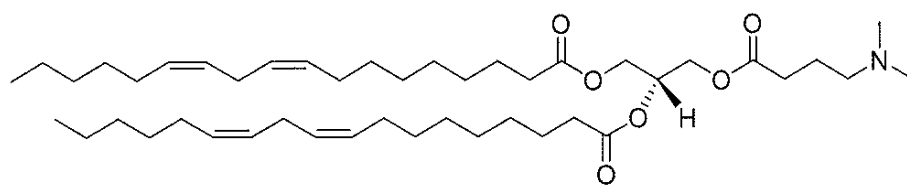
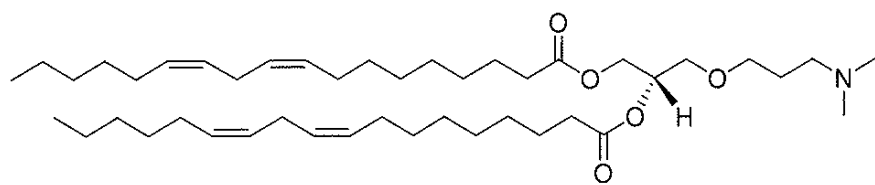
20

30

40

50

【化 2 3】



からなる群から選択される化合物またはその塩が、本明細書において提供される。

【0257】

部分的には、式：

10

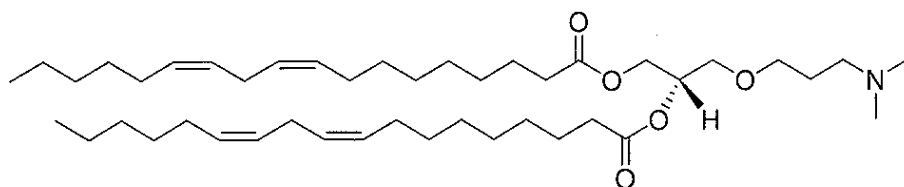
20

30

40

50

【化 2 4】



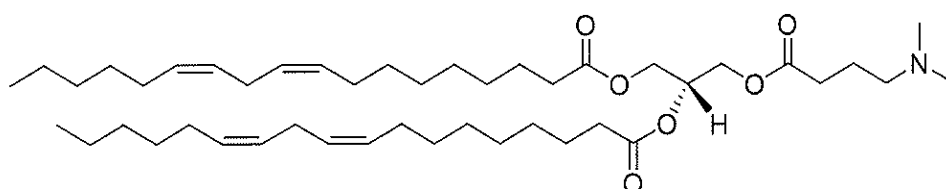
の化合物またはその塩が、本明細書において提供される。

【 0 2 5 8】

10

部分的には、式：

【化 2 5】



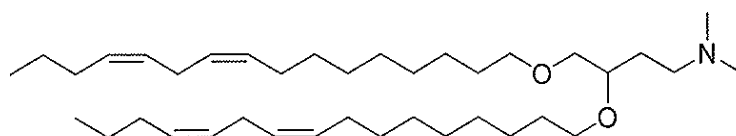
の化合物またはその塩が、本明細書において提供される。

20

【 0 2 5 9】

部分的には、式：

【化 2 6】



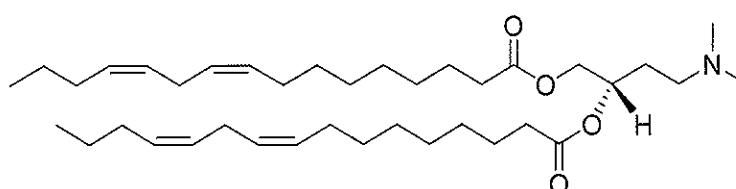
の化合物またはその塩が、本明細書において提供される。

30

【 0 2 6 0】

部分的には、式：

【化 2 7】



の化合物またはその塩が、本明細書において提供される。

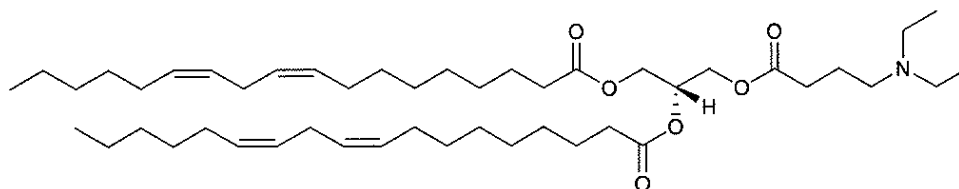
40

【 0 2 6 1】

部分的には、式：

50

【化 2 8】



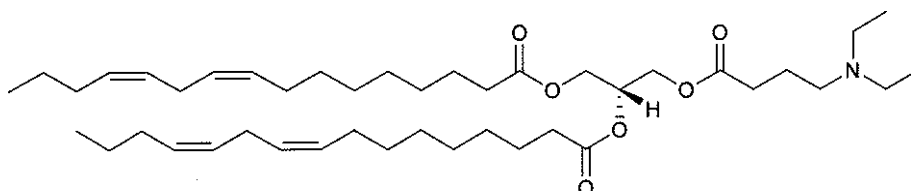
の化合物またはその塩が、本明細書において提供される。

【0 2 6 2】

10

部分的には、式：

【化 2 9】



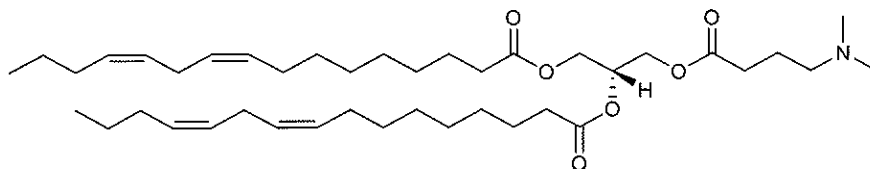
の化合物またはその塩が、本明細書において提供される。

20

【0 2 6 3】

部分的には、式：

【化 3 0】



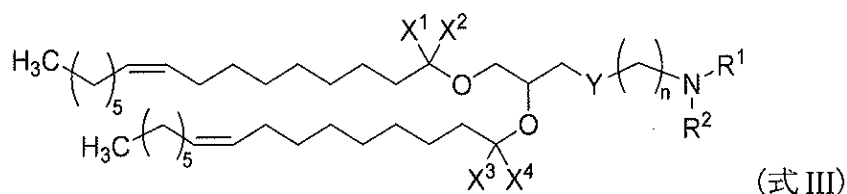
の化合物またはその塩が、本明細書において提供される。

30

【0 2 6 4】

ある特定の実施形態において、化合物は、式 I I I：

【化 3 1】



40

の化合物またはその塩であり、式中：

$R^1$  および  $R^2$  は、独立して、 $C_{1\sim 3}$  アルキルであるか、または  $R^1$  および  $R^2$  は、窒素原子と一緒にあって、場合により置換されるピペリジニルもしくはモルホリニルを形成し；

$Y$  は、 $-O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(S)-$  および  $-CH_2-$  からなる群から選択され；

$X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$  および  $X^4$  は、水素であるか、または  $X^1$  および  $X^2$  もしくは  $X^3$  および  $X^4$  は、一緒にあって、オキソを形成し；

$n$  は、 $0\sim 4$  から選択される整数である。

50

## 【0265】

ある特定の実施形態において、 $X^1$ および $X^2$ は、一緒になって、オキソを形成してもよく、 $X^3$ および $X^4$ は、一緒になって、オキソを形成してもよい。他の実施形態において、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ および $X^4$ は、水素であり得る。

## 【0266】

ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-O-$ 、 $-OC(O)-$ および $-CH_2-$ からなる群から選択してもよい。例えば、ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-O-$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-OC(O)-$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-CH_2-$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $Y$ は、 $-OC(S)-$ であり得る。

10

## 【0267】

ある特定の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、独立して、 $C_1 \sim 3$ アルキルであり得る。他の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、 $-CH_3$ であり得る。ある特定の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、 $-CH_2CH_3$ であり得る。一部の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、 $C_3$ アルキルであり得る。ある特定の実施形態において、 $R^1$ および $R^2$ は、窒素原子と一緒に、場合により置換されるピペリジニルを形成する。

## 【0268】

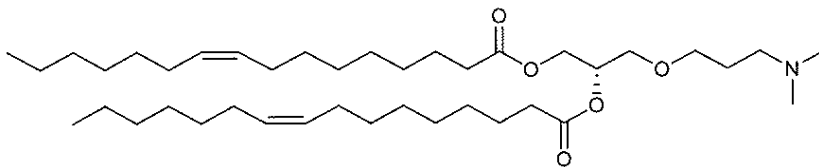
ある特定の実施形態において、 $n$ は、0であり得る。他の実施形態において、 $n$ は、3であり得る。

## 【0269】

20

また、式：

## 【化32】



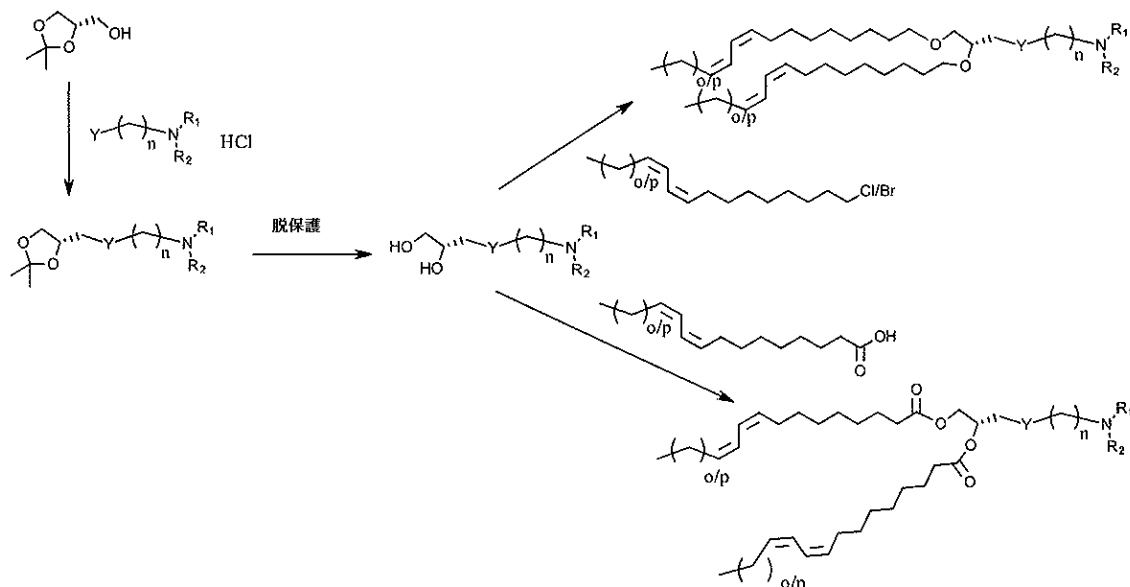
の化合物またはその塩が、本明細書において提供される。

30

## 【0270】

スキーム1—式(I)の脂質を製造するための合成スキーム

## 【化33】



40

50

## 【0271】

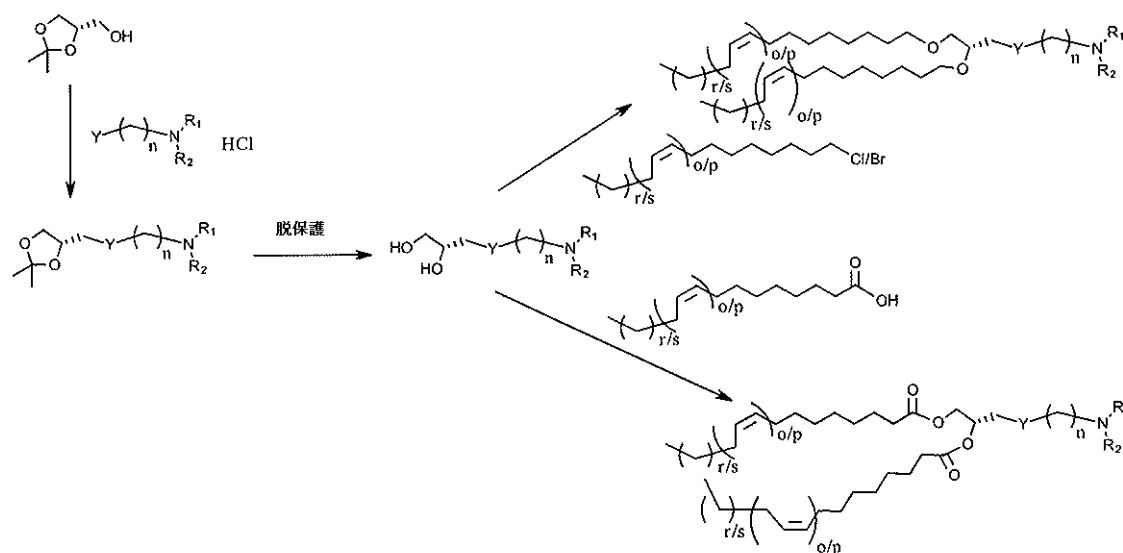
式Ⅰの化合物は、例えばスキーム1に従って製造することができる。ヒドロキシ官能基保護プロパンジオールを、対応するジメチルアミノ基エーテル（ $Y = \text{オキソ}$ ）またはエステル（ $Y = \text{O}-\text{C}(\text{O})$ ）に変換する。エーテル結合形成は、 $80^\circ\text{C}$ におけるTHF中の第3ブチルアンモニウムヨード／NaOHの存在下でのハロゲン化アルキルとアルコールとの反応から生ずる。エステル結合形成は、カルボジイミド活性化（DCM、EDC、DIEPA、DMAP）の下での酸官能性ジメチルアミンの、アルコールでの処理を利用する。ジオール脱保護は、ビシナルジオール中間体を産出し、これは続いて、TBAl／NaOHおよびプロモアシルによる処理、またはエステル結合形成のためのカルボジイミド媒介性カルボン酸活性化によって、それぞれ、対応するエーテル結合、またはエステル結合ジアシル脂質に変換される。

10

## 【0272】

スキーム2—式（Ⅱ）の脂質組成物を製造するための合成スキーム

## 【化34】



20

30

## 【0273】

式Ⅱの化合物は、例えばスキーム2に従って製造することができる。合成手技は、スキーム1について上記に概略される通りである；しかしながら、スキーム2においては、ビス-不飽和アシル基またはモノ-不飽和アシル基のいずれかを用いて、式Ⅱの脂質を取得してもよい。

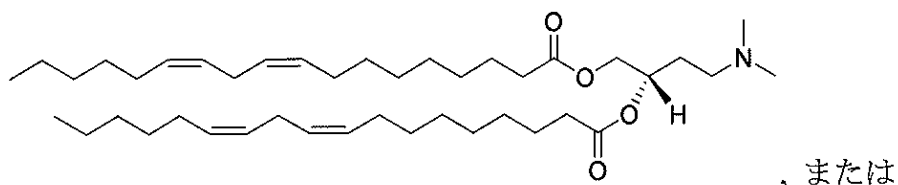
## 【0274】

一部の実施形態において、本開示のLNPにおいて使用されるイオン化可能なカチオン性脂質は、表1中の脂質またはそれらの組合せから選択される。一部の実施形態において、イオン化可能なカチオン性脂質は：

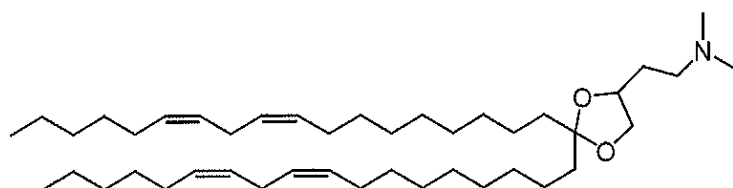
40

50

【化 3 5】



, または



10

である。

【0275】

一部の実施形態において、イオン化可能なカチオン性脂質は、Dlin-MC3-DMAではない。

【0276】

III. 脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲート

20

本明細書において説明される通り、LNPは、特定の細胞種、例えば免疫細胞、例えばT細胞、B細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞に標的化することができる。これは、本明細書において説明される脂質のうちの1つまたはそれ以上を使用して達成することができる。さらに、標的化は、LNP粒子の、溶媒がアクセス可能な表面に標的化基を含めることによって増強することができる。例えば、標的化基は、特定の結合対、例えば抗体-抗原対、リガンド-受容体対などの構成員を含み得る。ある特定の実施形態において、標的化基は、抗体である。標的化は、例えば、本明細書において説明される脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートを使用することによって、実行することができる。

【0277】

場合により、標的化部分は、Fc成分を伴わない抗体断片である。循環免疫細胞をLNPによって標的化する以前の試みは、完全抗体を用いていた（WO2016/189532 A1）。完全抗体をコンジュゲートしたリポソームまたは脂質ベースの粒子は、Fcの係合のために循環から、より素早く除去され、目的の標的細胞へ到達する可能性は低減する（Hardingら（1997）Biochim Biophys. Acta 1327、181～192；Sapraら（2004）Clin Cancer Res 10、1100～1111；Aragónら（1986）Proc Natl Acad Sci USA 83、2699～2703）。抗体断片によって標的化されたりポソームは、EGFR（Mamotら（2005）Cancer Res 65、11631～11638）、ErbB2（Parkら（2002）Clin Cancer Res 8、1172～1181）またはEphA2（Kamounら、2019 Nat. Biomed. Eng 3、264～280）に標的化されたりポソームのように、それらの長い循環特性を保持する。加えて、完全IgGをコンジュゲートする場合の非常に非効率的な挿入（Ishidaら（1999）FEBS Lett. 460、129～133）、またはインタクトなLNPに対して直接的にコンジュゲーションを完了する必要性（WO2016/189532 A1）と比較して、脂質ベースの担体は、抗体コンジュゲーションの別々の製造後に、抗体コンジュゲーションのほとんど定量的な組込みを可能にするミセル挿入プロセスを使用して調製することができる（Nellisら（2005）Biotechnol Prog 21、221～232）。また、scFv、FabまたはVHH断片を、活性化PEG-脂質へ直接的にコンジュゲートして、挿入可能なコンジュゲートを製造することができる。

30

40

50

## 【0278】

ある特定の実施形態において、標的化基は、表面結合抗体またはその表面結合抗原結合性断片であってもよく、これらは、細胞標的化特異性の調整を可能にし得る。これは、所望の標的化部位についての目的のエピトープに対して非常に特異的な抗体を生じさせることができるので、とりわけ有用である。一実施形態において、多数の異なる抗体を、LNPの表面に組み込み、そこで提示することができ、そこで、各抗体は、同じ抗原上の異なるエピトープ、または異なる抗原上の異なるエピトープに結合する。そのような手法は、特定の標的細胞への相互作用を標的化する結合活性および特異性を増加させることができる。

## 【0279】

標的化基または標的化基の組合せは、所与の標的細胞の所望の局在性、機能または構造特質に基づいて選択することができる。例えば、T細胞、T細胞集団またはT細胞サブ集団を標的化するために、例えばT細胞表面抗原を介して、T細胞を標的化する1つまたはそれ以上の抗体またはその抗原結合性断片もしくは抗原結合誘導体を選択することができる。例示的なT細胞表面抗原には、例えばCD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD28、CD39、CD69、CD103、CD137、CD45、T細胞受容体(TCR)β、TCR-α、TCR-α/β、TCR-γ/δ、PD1、CTLA4、TIM3、LAG3、CD18、IL-2受容体、CD11a、GL7、TLR2、TLR4、TLR5およびIL-15受容体が含まれるが、これらに限定されない。NK細胞またはNK細胞集団を標的化するために、例えばNK細胞表面抗原を介して、NK細胞を標的化する1つまたはそれ以上の抗体、その抗原結合性断片または抗原結合誘導体を選択することができる。例示的なNK細胞表面抗原には、CD48、CD56、CD85a、CD85c、CD85d、CD85e、CD85f、CD85i、CD85j、CD158b2、CD161、CD244、CD16a、CD16b、IL-2受容体、CD27、CD28、CD48、CD69、CD70、CD86、CD112、CD122、CD155、CD161、CD244、CD266、CD314/NKG2D、CD336/NKP44、CD337/NKP30が含まれるが、これらに限定されない。B細胞またはB細胞集団を標的化するために、例えばB細胞抗原を介して、B細胞を標的化する1つまたはそれ以上の抗体、その抗原結合性断片または抗原結合誘導体を選択することができる。例示的なB細胞抗原には、形質細胞を除く全てのB細胞についてのCD19、活性化B細胞についてのCD19、CD25およびCD30、形質細胞についてのCD27、CD38、CD78、CD138およびCD319、メモリー細胞についてのCD20、CD27、CD40、CD80およびPD1-2、辺縁帯B細胞についてのNotch2、CD1、CD21およびCD27、濾胞B細胞についてのCD21、CD22およびCD23、ならびに制御性B細胞についてのCD1、CD5、CD21、CD24およびTLR4が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0280】

ある特定の実施形態において、標的化は、例えば、本明細書において説明される脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートを使用することによって、実行することができる。例示的な脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートは、式IV、

〔脂質〕-〔任意選択のリンカー〕-〔免疫細胞標的化基、例えばT細胞標的化分子、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗CD7抗体または抗CD8抗体〕(式IV)  
の化合物を含み得る。

## 【0281】

一部の実施形態において、免疫細胞標的化基は、ポリペプチドであり、脂質は、N末端、C末端、またはポリペプチドの中部のどこかにコンジュゲートされる。

## 【0282】

ある特定の実施形態では、標的化基または標的化分子は、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD28、CD137、CD45、T細胞受容体(TCR)β、TCR-α、TCR-α/β、TCR-γ/δ、PD1、CTLA4、TIM3、LAG

3、CD18、IL-2受容体、CD11a、TLR2、TLR4、TLR5、IL-7受容体、またはIL-15受容体からなる群から選択されるT細胞抗原に結合するT細胞標的化剤、例えば抗体である。ある特定の実施形態では、T細胞抗原はCD2であってよく、標的化基は、例えば抗CD2抗体であってよい。ある特定の実施形態では、T細胞抗原はCD3であってよく、標的化基は、例えば抗CD3抗体であってよい。ある特定の実施形態では、T細胞抗原はCD4であってよく、標的化基は、例えば抗CD4抗体であってよい。ある特定の実施形態では、T細胞抗原はCD5であってよく、標的化基は、例えば抗CD5抗体であってよい。ある特定の実施形態では、T細胞抗原はCD7であってよく、標的化基は、例えば抗CD7抗体であってよい。ある特定の実施形態では、T細胞抗原はCD8であってよく、標的化基は、例えば抗CD8抗体であってよい。ある特定の実施形態では、T細胞抗原はTCR $\beta$ であってよく、標的化基は、例えば抗TCR $\beta$ 抗体であってよい。一部の実施形態では、抗体はヒトまたはヒト化抗体である。

10

【0283】

例示的なCD2結合剤は、9.6 (<https://academic.oup.com/intimm/article/10/12/1863/744536>)、9-1 (<https://academic.oup.com/intimm/article/10/12/1863/744536>)、TS2/18.1.1 (ATCC HB-195)、Lo-CD2b (ATCC PTA-802)、Lo-CD2a/BTI-322 (米国特許第6849258B1号)、シビルズマブ/MEDI-507 (米国特許第6849258B1号/en)、35.1 (ATCC HB-222)、OKT11 (ATCC CRL-8027)、RPA-2.1 (PCT公開WO2020023559A1)、AF1856 (R&D Systems)、MAB18562 (R&D Systems)、MAB18561 (R&D Systems)、MAB1856 (R&D Systems)、PAB30359 (Abnova Corporation)、10299-1 (Abnova Corporation)、およびその抗原結合性断片からなる群から選択される抗体であってよい。ある特定の実施形態では、結合剤は、AF1856 (R&D Systems)、MAB18562 (R&D Systems)、MAB18561 (R&D Systems)、MAB1856 (R&D Systems)、PAB30359 (Abnova Corporation) および10299-1 (Abnova Corporation) からなる群から選択される抗体の重鎖可変ドメイン (V<sub>H</sub>) および軽鎖可変ドメイン (V<sub>L</sub>) を含む。ある特定の実施形態では、結合剤は、カバット (Kabata, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesdaを参照する)、Chothia (例えば、Chothia C&Lesk A M, (1987)、J. MOL. BIOL. 196:901~917頁を参照する)、MacCallum (MacCallum R Mら、(1996) J. MOL. BIOL. 262:732~745頁を参照する)、または当技術分野で公知である任意の他のCDR決定方法の下で決定される、AF1856 (R&D Systems)、MAB18562 (R&D Systems)、MAB18561 (R&D Systems)、MAB1856 (R&D Systems)、PAB30359 (Abnova Corporation) および10299-1 (Abnova Corporation) からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列の、重鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>ならびに軽鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>を含む。

20

30

40

【0284】

例示的なCD2結合剤は、クローン9.6、9-1、TS2/18.1.1、Lo-CD2b、Lo-CD2a、BTI-322、シビルズマブ、35.1、OKT11、RPA-2.1、SQB-3.21、LT2、TS1/8、UT329、4F22、OX-34、UQ2/42、MU3、U7.4、NFN-76またはMOM-181-4-F (E) のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することもできる。

50

## 【0285】

例示的なCD3結合剤(CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma/\epsilon$ 、CD3 $\delta/\epsilon$ またはCD3 $\epsilon$ )は、MEM-57(CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$ 、Enzo Life Sciences)、MAB100(CD3 $\epsilon$ 、R&D Systems)、CD3-H5(CD3 $\epsilon$ 、Abnova Corporation)、CD3-12(CD3 $\epsilon$ 、Cell Signaling Technology)、LE-CD3(CD3 $\epsilon$ 、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、NBP1-31250(CD3 $\gamma$ 、Novus Biologicals)、16669-1-AP(CD3 $\delta$ 、Invitrogen)およびその抗原結合性断片からなる群から選択される抗体であってよい。ある特定の実施形態では、結合剤は、MEM-57(CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$ 、Enzo Life Sciences)、MAB100(CD3 $\epsilon$ 、R&D Systems)、CD3-H5(CD3 $\epsilon$ 、Abnova Corporation)、CD3-12(CD3 $\epsilon$ 、Cell Signaling Technology)、LE-CD3(CD3 $\epsilon$ 、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、NBP1-31250(CD3 $\gamma$ 、Novus Biologicals)および16669-1-AP(CD3 $\delta$ 、Invitrogen)からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインを含む。ある特定の実施形態では、結合剤は、カバット(Kabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、NIH Publication No. 91-3242、Bethesdaを参照する)、Chothia(例えば、Chothia C&Lesk A M、(1987)、J. MOL. BIOL. 196:901~917頁を参照する)、MacCallum(MacCallum R Mら、(1996) J. MOL. BIOL. 262:732~745頁を参照する)、または当技術分野で公知である任意の他のCDR決定方法の下で決定される、MEM-57(CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$ 、Enzo Life Sciences)、MAB100(CD3 $\epsilon$ 、R&D Systems)、CD3-H5(CD3 $\epsilon$ 、Abnova Corporation)、CD3-12(CD3 $\epsilon$ 、Cell Signaling Technology)、LE-CD3(CD3 $\epsilon$ 、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、NBP1-31250(CD3 $\gamma$ 、Novus Biologicals)および16669-1-AP(CD3 $\delta$ 、Invitrogen)からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列の、重鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>ならびに軽鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>を含む。

## 【0286】

例示的なCD3結合剤は、クローンhsp34、OKT-3、UCHT1、38.1、HIT3a、RFT8、SK7、BC3、SP34-2、HU291、TRX4、カツマキソマブ、テブリズマブ、3-106、3-114、3-148、3-190、3-271、3-550、4-10、4-48、H2C、F12Q、I2C、SP7、3F3A1、CD3-12、301、RIV9、JB38-29、JE17-74、GT0013、4E2、7A4、4D10A6、SPV-T3b、M2AB、ICO-90、30A1またはHu38E4.v1(米国特許出願公開第20200299409A1号)、REG N5458(米国特許出願公開第20200024356A1号)、ブリナツモマブ([https://go.drugbank.com/drugs/DB09052/poly peptide\\_sequences.fasta](https://go.drugbank.com/drugs/DB09052/poly peptide_sequences.fasta))のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することもできる。一部の実施形態では、コンジュゲートは、(a)配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号2または3のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含むFabを含む。

## 【0287】

例示的なCD4結合剤は、イバリズマブ([https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?D09575](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?D09575))、AF1856(R&D Systems)、MAB554(R&D Systems)、BF0174(Affi

nity Biosciences)、PAB31115 (Abnova Corporation)、CAL4 (Abcam) およびその抗原結合性断片からなる群から選択される抗体であってよい。ある特定の実施形態では、結合剤は、AF1856 (R&D Systems)、MAB554 (R&D Systems)、BF0174 (Affinity Biosciences)、PAB31115 (Abnova Corporation) および CAL4 (Abcam) からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインを含む。ある特定の実施形態では、結合剤は、カバット (Kabattら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、NIH Publication No. 91-3242、Bethesdaを参照する)、Chothia (例えば、Chothia C&Lesk A M、(1987)、J. MOL. BIOL. 196:901~917頁を参照する)、MacCallum (MacCallum R Mら、(1996) J. MOL. BIOL. 262:732~745頁を参照する)、または当技術分野で公知である任意の他のCDR決定方法の下で決定される、AF1856 (R&D Systems)、MAB554 (R&D Systems)、BF0174 (Affinity Biosciences)、PAB31115 (Abnova Corporation) および CAL4 (Abcam) からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列の重鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>ならびに軽鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>を含む。

10

20

【0288】

例示的なCD4結合剤は、クローンイバリズマブ、OKT4、RPA-T4、S3.5、SK3、N1UG0、RIV6、OTI18E3、MEM-241、B486A1、RFT-4g、7E14、MDX.2、MEM-115、MEM-16、ICO-86、Edu-2またはイルバリズマブのCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することもできる。

【0289】

例示的なCD5結合剤は、He3、MAB1636 (R&D Systems)、AF1636 (R&D Systems)、MAB115 (R&D Systems)、C5/473+CD5/54/F6 (Abcam)、CD5/54/F6 (Abcam)、65152 (Proteintech) およびその抗原結合性断片からなる群から選択される抗体であってよい。一部の実施形態では、結合剤は、MAB1636 (R&D Systems)、AF1636 (R&D Systems)、MAB115 (R&D Systems)、C5/473+CD5/54/F6 (Abcam)、CD5/54/F6 (Abcam) および65152 (Proteintech) からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>を含む。ある特定の実施形態では、結合剤は、カバット (Kabattら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、NIH Publication No. 91-3242、Bethesdaを参照する)、Chothia (例えば、Chothia C&Lesk A M、(1987)、J. MOL. BIOL. 196:901~917頁を参照する)、MacCallum (MacCallum R Mら、(1996) J. MOL. BIOL. 262:732~745頁を参照する)、または当技術分野で公知である任意の他のCDR決定方法の下で決定される、MAB1636 (R&D Systems)、AF1636 (R&D Systems)、MAB115 (R&D Systems)、C5/473+CD5/54/F6 (Abcam)、CD5/54/F6 (Abcam) および65152 (Proteintech) からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列の重鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>ならびに軽鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>を含む。

30

40

【0290】

例示的なCD5結合剤は、ゾリモマブ、5D7、L17F12およびUCHT2、1D8、3I21、4H10、8J23、5O4、4H2、5G2、8G8、6M4、2E3

50

、4E24、4F10、7J9、7P9、8E24、6L18、7H7、1E7、8J21、7I11、8M9、1P21、2H11、3M22、5M6、5H8、7I19、1A2、8E15、8C10、3P16、4F3、5M24、5O24、7B16、1E8、2H16、BLa1、1804、DK23、Cris1、MEM-32、H65、4C7、OX-19、Leu-1、53-7.3、4H8E6、T101、EP2952、D-9、H-3、HK231、N-20、Y2/178、H-300、CD5/54/F6、Q-20、CC17、MOM-18539-S(P)またはMOM-18885-S(P)のクローンのCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することもできる。

#### 【0291】

例示的なCD7結合剤は、MAB7579 (R&D Systems)、AF7579 (R&D Systems)、EPR22065 (Abcam)、1G10D8 (Proteintech)、NBP2-32097 (Novus Biologicals)、NBP2-38440 (Novus Biologicals) およびその抗原結合性断片からなる群から選択される抗体であってよい。ある特定の実施形態では、結合剤は、MAB7579 (R&D Systems)、AF7579 (R&D Systems)、EPR22065 (Abcam)、1G10D8 (Proteintech)、NBP2-32097 (Novus Biologicals) およびNBP2-38440 (Novus Biologicals) からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>を含む。ある特定の実施形態では、結合剤は、カバット (Kabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、NIH Publication No. 91-3242、Bethesdaを参照する)、Chothia (例えば、Chothia C&Lesk A M、(1987)、J. MOL. BIOL. 196:901~917頁を参照する)、MacCallum (MacCallum R Mら、(1996) J. MOL. BIOL. 262:732~745頁を参照する)、または当技術分野で公知である任意の他のCDR決定方法の下で決定される、MAB7579 (R&D Systems)、AF7579 (R&D Systems)、EPR22065 (Abcam)、1G10D8 (Proteintech)、NBP2-32097 (Novus Biologicals) およびNBP2-38440 (Novus Biologicals) からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列の重鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>ならびに軽鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>を含む。

#### 【0292】

例示的なCD7結合剤は、クローンTH-69、3Afl1、T3-3A1、124-1D1、3A1f、CD7-6B7またはVHH6のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することもできる。

#### 【0293】

例示的なCD8 (CD8 $\alpha$ 、CD8 $\alpha$ / $\alpha$ 、CD8 $\alpha$ / $\beta$ またはCD8 $\beta$ ) 結合剤は、2.43 (Invitrogen)、Du CD8-1 (CD8 $\alpha$ 、Invitrogen)、9358-CD (CD8 $\alpha$ / $\beta$ 、R&D Systems)、MAB116 (CD8 $\alpha$ 、R&D Systems)、ab4055 (CD8 $\alpha$ 、Abcam)、C8/144B (CD8 $\alpha$ 、Novus Biologicals)、YTS105.18 (CD8 $\alpha$ 、Novus Biologicals)、TRX2 (<https://patents.justia.com/patent/20170198045>) およびその抗原結合性断片からなる群から選択される抗体であってよい。ある特定の実施形態では、結合剤は、2.43 (Invitrogen)、51.1 (ATCC HB-230)、Du CD8-1 (CD8 $\alpha$ 、Invitrogen)、9358-CD (CD8 $\alpha$ / $\beta$ 、R&D Systems)、MAB116 (CD8 $\alpha$ 、R&D Systems)、ab4055 (CD8 $\alpha$ 、Abcam)、C8/144B (CD8 $\alpha$ 、Novus Biologicals) およびYTS105.18 (CD8 $\alpha$ 、Novus Biologicals) からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインを含む。ある特定

の実施形態では、結合剤は、カバット (Kabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、NIH Publication No. 91-3242、Bethesdaを参照する)、Chothia (例えば、Chothia C&Lesk A M、(1987)、J. MOL. BIOL. 196:901~917頁を参照する)、MacCallum (MacCallum R Mら、(1996) J. MOL. BIOL. 262:732~745頁を参照する)、または当技術分野で公知である任意の他のCDR決定方法の下で決定される、2.43 (Invitrogen)、Du CD8-1 (CD8 $\alpha$ 、Invitrogen)、9358-CD (CD8 $\alpha$ / $\beta$ 、R&D Systems)、MAB116 (CD8 $\alpha$ 、R&D Systems)、ab4055 (CD8 $\alpha$ 、Abcam)、C8/144B (CD8 $\alpha$ 、Novus Biologicals) および YTS105.18 (CD8 $\alpha$ 、Novus Biologicals) からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列の重鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>ならびに軽鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>を含む。

10

20

30

40

50

【0294】

例示的なCD8結合剤は、クローンOKT-8、51.1、S6F1、TRX2およびUCHT4、SP16、3B5、C8-144B、HIT8a、RAVB3、LT8、17D8、MEM-31、MEM-87、RIV11、DK-25、YTC141.1HLまたはYTC182.20のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することもできる。一部の実施形態では、コンジュゲートは、配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖断片および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖断片を含むFabを含む。

【0295】

例示的なCD137結合剤は、クローン4B4-1、P566またはウレルマブのCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なCD28結合剤は、クローンTAB08のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なCD45結合剤は、クローンBC8、9.4、4B2、Tu116またはGAP8.3のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なCD18結合剤は、クローン1B4、TS1/18、MEM-48、YFC118-3、TA-4、MEM-148またはR3-3、24のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なCD11a結合剤は、クローンMHM24またはエファリズマブのCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なIL-2受容体結合剤は、クローンYTH 906.9HL、IL2R.1、BC96、B-B10、216、MEM-181、ITYV、MEM-140、ICO-105、ダクリズマブの、またはIL2もしくはIL2の断片からなる群からのCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なIL-15R結合剤は、クローンJM7A4もしくはOTI3D5の、またはIL15もしくはIL15の断片からなる群からのCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なTLR2結合剤は、クローンJM22-41、TL2.1、11G7またはTLR2.45のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なTLR4結合剤は、クローンHTA125または76B357-1のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なTLR5結合剤は、クローン85B152-5または9D759-2のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的なGL7結合剤は、クローンGL7のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。

【0296】

例示的なPD1結合剤は、クローンMIH4、J116、J150、OTIB11、OTI17B10、OTI3A1またはOTI16D4のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。さらに、例示的な抗PD-1抗体が、例えば、米国特許第8,952,136号、8,779,105号、8,008,449号、8,741,295号、9,205,148号、9,181,342号、9,102,728号、9,102,727号、8,952,136号、8,927,697号、8,900,587号

、8, 735, 553号および7, 488, 802号に記載される。例示的な抗PD-1抗体には、例えば、ニボルマブ（Opdivo（登録商標）、Bristol-Myers Squibb Co.）、ペムブロリズマブ（Keytruda（登録商標）、Merck Sharp & Dohme Corp.）、PDR001（Novartis Pharmaceuticals）およびピジリズマブ（CT-011、Cure Tech）が含まれる。例示的な抗PD-L1抗体は、例えば、米国特許第9, 273, 135号、7, 943, 743号、9, 175, 082号、8, 741, 295号、8, 552, 154号および8, 217, 149号に記載される。例示的な抗PD-L1抗体には、例えば、アテゾリズマブ（Tecentriq（登録商標）、Genentech）、デュルバルマブ（AstraZeneca）、MED14736、アベルマブおよびBMS 936559（Bristol Myers Squibb Co.）が含まれる。

10

【0297】

例示的なCTLA-4結合剤は、クローンER4.7G.11 [7G11]、OTI9G4、OTI9F3、OTI3A5、A3.4H2.H12、14D3、OTI3A12、OTI1A11、OTI1E8、OTI3B11、OTI3D2、OTI10C8、OTI2E9、OTI6F1、OTI7D3、OTI85B、OTI12C6のCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。例示的な抗CTLA-4抗体は、米国特許第6, 984, 720号、6, 682, 736号、7, 311, 910号；7, 307, 064号、7, 109, 003号、7, 132, 281号、6, 207, 156号、7, 807, 797号、7, 824, 679号、8, 143, 379号、8, 263, 073号、8, 318, 916号、8, 017, 114号、8, 784, 815号および8, 883, 984号、国際公開第98/42752号、国際公開第00/37504号および国際公開第01/14424号、ならびに欧州特許第1212422号に記載される。例示的なCTLA-4抗体には、イピリムマブまたはトレメリムマブが含まれる。

20

【0298】

例示的なTCR $\beta$ 結合剤は、H57-597（Invitrogen）、8A3（Novus Biologicals）、R73（TCR $\alpha/\beta$ 、Abcam）、E6Z3S（TRBC1/TCR $\beta$ 、Cell Signaling Technology）およびその抗原結合性断片からなる群から選択される抗体であってよい。ある特定の実施形態では、結合剤は、H57-597（Invitrogen）、8A3（Novus Biologicals）、R73（TCR $\alpha/\beta$ 、Abcam）およびE6Z3S（TRBC1/TCR $\beta$ 、Cell Signaling Technology）からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>を含む。ある特定の実施形態では、結合剤は、カバット（Kabatら、（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest、NIH Publication No. 91-3242、Bethesdaを参照する）、Chothia（例えば、Chothia C&Lesk A M、（1987）、J. MOL. BIOL. 196：901～917頁を参照する）、MacCallum（MacCallum R Mら、（1996）J. MOL. BIOL. 262：732～745頁を参照する）、または当技術分野で公知である任意の他のCDR決定方法の下で決定される、H57-597（Invitrogen）、8A3（Novus Biologicals）、R73（TCR $\alpha/\beta$ 、Abcam）およびE6Z3S（TRBC1/TCR $\beta$ 、Cell Signaling Technology）からなる群から選択される抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列の重鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>ならびに軽鎖CDR<sub>1</sub>、CDR<sub>2</sub>およびCDR<sub>3</sub>を含む。

30

40

【0299】

例示的なCD137結合剤は、クローン4B4-1、P566またはウレルマブのCDRを用いる抗体または抗体断片から選択することができる。

【0300】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'-SH、

50

F v および s c F v 断片からなる群から選択される抗体を含む。一部の実施形態では、抗体はヒトまたはヒト化抗体である。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、F a b または免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばナノボディを含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、天然の鎖間ジスルフィド結合を含まない F a b を含む。例えば、一部の実施形態では、カバット番号付けによると、F a b は C 2 3 3 S 置換を含む重鎖断片および／または C 2 1 4 S 置換を含む軽鎖断片を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、1つまたはそれ以上の非天然の鎖間ジスルフィド結合を含む F a b を含む。一部の実施形態では、鎖間ジスルフィド結合は、それぞれ軽鎖断片および重鎖断片の上の2つの非天然のシステイン残基の間にある。例えば、一部の実施形態では、カバット番号付けによると、F a b は F 1 7 4 C 置換を含む重鎖断片および／または S 1 7 6 C 置換を含む軽鎖断片を含む。一部の実施形態では、カバット番号付けによると、F a b は F 1 7 4 C および C 2 3 3 S 置換を含む重鎖断片および／または S 1 7 6 C および C 2 1 4 S 置換を含む軽鎖断片を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は C 末端システイン残基を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、重鎖または軽鎖断片の C 末端にシステインを含む F a b を含む。一部の実施形態では、F a b は、F a b の重鎖断片と C 末端システインの間に1つまたはそれ以上のアミノ酸をさらに含む。例えば、一部の実施形態では、F a b は、F a b の C 末端と C 末端システインの間に抗体ヒンジ領域（例えば、部分的ヒンジ配列）に由来する2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、F a b は、抗体 C H 1 ドメインに連結されている重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている軽鎖可変ドメインを含み、C H 1 ドメインおよび軽鎖定常ドメインは1つまたはそれ以上の鎖間ジスルフィド結合によって連結され、免疫細胞標的化基は、アミノ酸リンカーによって軽鎖定常ドメインの C 末端に連結されている単鎖可変断片（s c F v）をさらに含む。一部の実施形態では、F a b 抗体は、図 4 7 で例証される通り、D S F a b、N o D S F a b、b D S F a b、b D S F a b - S c F v である。  
【0301】

一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばナノボディ（例えば、V<sub>H</sub>H）を含む。一部の実施形態では、ナノボディは C 末端にシステインを含む。一部の実施形態では、ナノボディは、V<sub>H</sub>H ドメインと C 末端システインの間に1つまたはそれ以上のアミノ酸を含むスペーサーをさらに含む。一部の実施形態では、スペーサーは、1つまたはそれ以上のグリシン残基、例えば2つのグリシン残基を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は2つまたはそれ以上の V<sub>H</sub>H ドメインを含む。一部の実施形態では、2つまたはそれ以上の V<sub>H</sub>H ドメインはアミノ酸リンカーによって連結されている。一部の実施形態では、アミノ酸リンカーは、1つまたはそれ以上のグリシンおよび／またはセリン残基（例えば、配列 G G G G S の1つまたはそれ以上の反復配列）を含む。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体 C H 1 ドメインに連結されている第1の V<sub>H</sub>H ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインに連結されている第2の V<sub>H</sub>H ドメインを含み、抗体 C H 1 ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインは1つまたはそれ以上のジスルフィド結合（例えば、鎖間ジスルフィド結合）によって連結されている。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は抗体 C H 1 ドメインに連結されている V<sub>H</sub>H ドメインを含み、抗体 C H 1 ドメインは1つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって抗体軽鎖定常ドメインに連結されている。一部の実施形態では、カバット番号付けによると C H 1 ドメインは F 1 7 4 C および C 2 3 3 S 置換を含み、軽鎖定常ドメインは S 1 7 6 C および C 2 1 4 S 置換を含む。一部の実施形態では、図 4 7 で例証されるように、抗体は S c F v、V<sub>H</sub>H、2 x V<sub>H</sub>H、V<sub>H</sub>H - C H 1 / 空の V<sub>K</sub>、または V<sub>H</sub>H 1 - C H 1 / V<sub>H</sub>H - 2 - N b b D S である。  
【0302】

例示的な標的化部分は、以下に示されるアミノ酸配列を有し得る：

抗 C D 3 h S P 3 4 - F a b 配列：

h S P 3 4 重鎖（H C）配列（配列番号1）：

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W V R Q A

P G K G L E W V A R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T  
A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y I S Y W A Y W G Q G T L  
V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E  
P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S  
L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C

h S P 3 4 - m l a m 輕鎖 ( L C ) 配列 ( マウスラムダ ) ( 配列番号 2 ) :

Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G N Y P N W V Q Q  
K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V  
Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L G Q P K S S P S V T L  
F P P S S E E L E T N K A T L V C T I T D F Y P G V V T V D W K V D G T P V T Q  
G M E T T Q P S K Q S N N K Y M A S S Y L T L T A R A W E R H S S Y S C Q V T H  
E G H T V E K S L S R A D S S

10

S P 3 4 - h l a m L C ( ヒトラムダ ) ( 配列番号 3 ) :

Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G N Y P N W V Q Q  
K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V  
Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L S Q P K A A P S V T L  
F P P S S E E L Q A N K A T L V C L V S D F Y P G A V T V A W K A D G S P V K V  
G V E T T K P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C R V T H  
E G S T V E K T V A P A E S S

20

抗 C D 3 H u 2 9 1 - F a b 配列 :

H u 2 9 1 H C ( 配列番号 4 ) :

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F I S Y T M H W V R Q A  
P G Q G L E W M G Y I N P R S G Y T H Y N Q K L K D K A T L T A D K S A S T A Y  
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S A Y Y D Y D G F A Y W G Q G T L V T V S S  
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T  
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C

H u 2 9 1 L C ( 配列番号 5 ) :

M D M R V P A Q L L G L L L L W L P G A K C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R  
V T I T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G K A P K R L I Y D T S K L A S G V P  
S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q W S S N P P T F G  
G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F  
Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L  
T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E S

30

抗 C D 8 T R X 2 - F a b 配列 :

T R X 2 H C ( 配列番号 6 ) :

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S D F G M N W V R Q A  
P G K G L E W V A L I Y Y D G S N K F Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K P H Y D G Y Y H F F D S W G Q G T L V T V S  
S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V  
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q  
T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C

40

T R X 2 L C ( 配列番号 7 ) :

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K G S Q D I N N Y L A W Y Q Q K P  
G K A P K L L I Y N T D I L H T G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P  
E D I A T Y Y C Y Q Y N N G Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S  
D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E  
S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L  
S S P V T K S F N R G E S

抗 C D 8 O K T 8 - F a b 配列 :

50

OKT8 HC (配列番号8) :

QVQLVQSGAEDKKPGASVKVSCKASG FNIKDTYIHWVRQA  
PGQGLEWMGRIDPANDNTLYASKFQGRVTITADTSSNTAY  
MELSSLRSEDTAVYYCGRGYGYVFDHWGQGTTVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

OKT8 LC (配列番号9) :

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRTCRTSRSSISQYLAWYQEK  
GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP  
EDFATYYCQQHNENPLTFGQGQTKVEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

抗CD4イバリズマブ-Fab配列:

イバリズマブHC (配列番号10) :

QVQLQQSGPEVVVKPGASVKMCKASGYTFFTSYVIHWVRQK  
PGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAY  
MELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

イバリズマブLC (配列番号11) :

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCCKSSQSLLYSTNQKNYLA  
WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLT  
ISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEIKRTVAAPSV  
FIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRGES

抗CD5 He3-Fab配列:

He3 HC (配列番号12) :

EIQLVQSGGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFFTNYGMNWVRQA  
PGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAY  
LQINSLRAEDTAVYFCTRRTGYDWYFDVWGQGT  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

He3 LC (配列番号13) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLSWFFQQKP  
GKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQY  
EDFGIYYCQQYDESPWTFGGGQTKLEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

抗CD7 TH-69-Fab配列:

TH-69 HC (配列番号14) :

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAMSWVRQT  
PEKRLIEWVASISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYL  
QMSSLRSEDTAMYYCARDEVGRGYLDVWGAGTTVTVSSAST  
KGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

10

20

30

40

50

G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C  
N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C

TH-69 LC (配列番号15) :

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P  
D G T V K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E P  
E D I A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P  
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
L S S P V T K S F N R G E C

抗CD2 TS2/18.1-Fab配列:

TS2/18.1 HC (配列番号16) :

E V Q L V E S G G G L V M P G G S L K L S C A A S G F A F S S Y D M S W V R Q T  
P E K R L E W V A Y I S G G G F T Y Y P D T V K G R F T L S R D N A K N T L Y L  
Q M S S L K S E D T A M Y Y C A R Q G A N W E L V Y W G Q G T L V T V S A A S T  
K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S  
G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C  
N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C

TS2/18.1 LC (配列番号17) :

D I V M T Q S P A T L S V T P G D R V F L S C R A S Q S I S D F L H W Y Q Q K S  
H E S P R L L I K Y A S Q S I S G I P S R F S G S G S G S D F T L S I N S V E P  
E D V G V Y F C Q N G H N F P P T F G G G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P  
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
L S S P V T K S F N R G E S

抗CD2 9.6-Fab配列:

9.6 HC (配列番号18) :

Q V Q L Q Q P G A E L V R P G S S V K L S C K A S G Y T F T R Y W I H W V K Q R  
P I Q G L E W I G N I D P S D S E T H Y N Q K F K D K A T L T V D K S S G T A Y  
M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A T E D L Y Y A M E Y W G Q G T S V T V S S A S  
T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N  
S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I  
C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C

9.6 LC (配列番号19) :

N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M T C K S S Q S V L Y S S N Q K N Y L A  
W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T  
I S S V Q P E D L A V Y Y C H Q Y L S S H T F G G G T K L E I K R T V A A P S V  
F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q  
S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E  
V T H Q G L S S P V T K S F N R G E S

抗CD2 9-1-Fab配列:

9-1 HC (配列番号20) :

Q V Q L Q Q P G T E L V R P G S S V K L S C K A S G Y T F T S Y W V N W V K Q R  
P D Q G L E W I G R I D P Y D S E T H Y N Q K F T D K A I S T I D T S S N T A Y  
M Q L S T L T S D A S A V Y Y C S R S P R D S S T N L A D W G Q G T L V T V S S  
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T  
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C

9-1 LC (配列番号21) :

D I V M T Q S P A T L S V T P G D R V S L S C R A S Q S I S D Y L H W Y Q Q K S  
H E S P R L L I K Y A S Q S I S G I P S R F S G S G S G S D F T L S I N S V E P

10

20

30

40

50

EDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELRRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

mutOKT8-Fab配列:

mutOKT8 HC (配列番号22):

QVQLVQSGAEDKKPGASVKVSCKASGFNICKDTYIHWVRQA  
PGQGLEWMGRIDPANDNTLYASKFQGRVTITADTSSNTAY  
MELSSLRSEDTAVYYCGRGAGAYVFDHWGQGTTVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVVTVPSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

mutOKT8 LC (配列番号23):

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSRSSISAALAWYQEK  
GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP  
EDFATYYCQQHNENPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

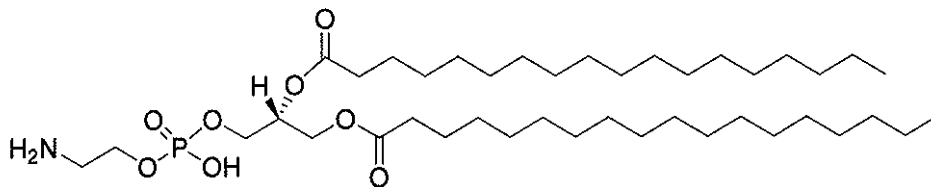
【0303】

ある特定の実施形態において、標的化基または免疫細胞標的化基（例えばT細胞標的化剤、B細胞標的化剤またはNK細胞標的化剤）は、リンカーを含有するポリエチレングリコール（PEG）を介して脂質へ共有結合してもよい。

【0304】

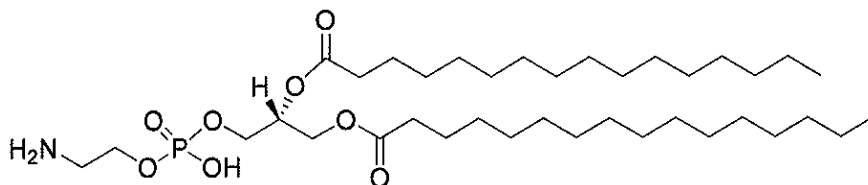
他の実施形態において、コンジュゲートを作出するために使用される脂質は、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン（DSPE）:

【化36】



、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン（DPPE）:

【化37】



、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン（DMPE）:

10

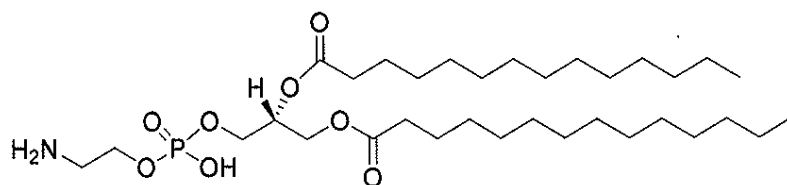
20

30

40

50

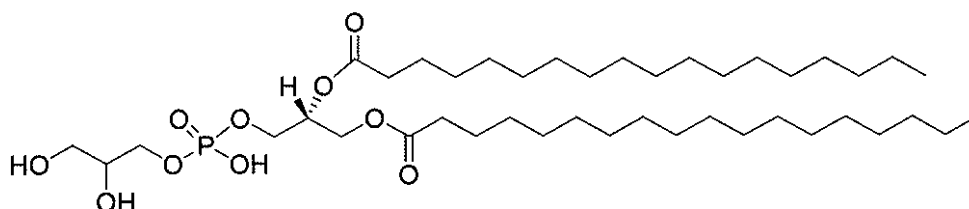
【化 3 8】



、ジステアロイルーグリセロ－ホスホグリセロール（DSPG）：

【化 3 9】

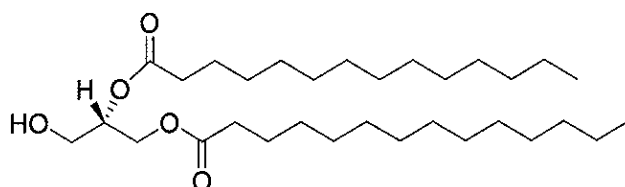
10



、ジミリスティルーグリセロール（DMG）：

【化 4 0】

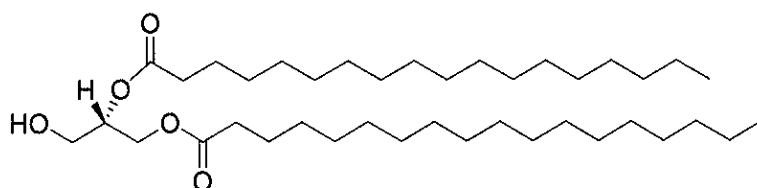
20



、ジステアロイルグリセロール（DSG）：

【化 4 1】

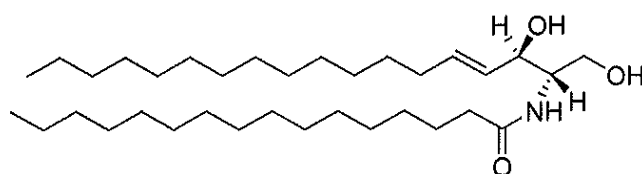
30



およびN－パルミトイル－スフィンゴシン（C16－セラミド）

【化 4 2】

40



から選択することができる。

【0305】

免疫細胞標的化基は、直接的に、またはリンカー、例えばリンカーを含有するポリエチレングリコール（PEG）を介して、脂質へ共有結合することができる。ある特定の実施形態において、PEGは、PEG1000、PEG2000、PEG3400、PEG3

50

000、PEG3450、PEG4000またはPEG5000である。ある特定の実施形態において、PEGはPEG2000である。

【0306】

一部の実施形態において、脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートは、0.001~0.5モルパーセント、0.001~0.3モルパーセント、0.002~0.2モルパーセント、0.01~0.1モルパーセント、0.1~0.3モルパーセントまたは0.1~0.2モルパーセントの範囲内において脂質配合物中に存在する。

【0307】

ある特定の実施形態において、脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートは、DSPE、PEG成分および標的化抗体を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、T細胞標的化剤、例えば抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD5抗体、抗CD7抗体、抗CD8抗体または抗TCR β抗体である。

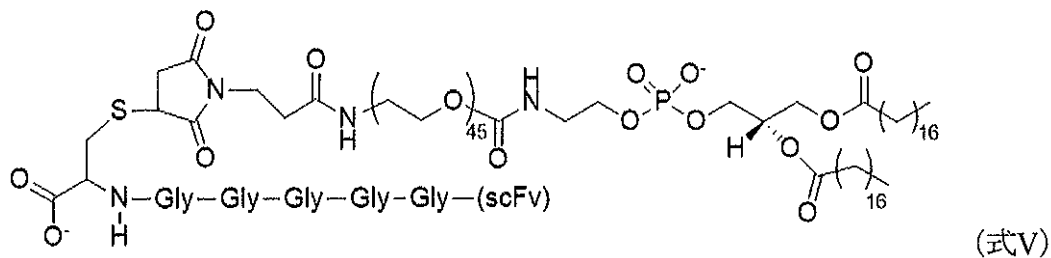
【0308】

例示的な脂質免疫細胞標的化基コンジュゲートは、例えばNellisら (2005) BIOTECHNOL. PROG. 21、205~220において説明されるように、DSPEおよびPEG 2000を含む。例示的なコンジュゲートは、式Vの構造を含み、ここで、scFvは、目的の標的に結合する工学操作された抗体結合部位を表す。ある特定の実施形態において、工学操作された抗体結合部位は、本明細書中上記に説明される標的のいずれかに結合する。ある特定の実施形態において、工学操作された抗体結合部位は、例えば、工学操作された抗CD3抗体または工学操作された抗CD8抗体であり得る。ある特定の実施形態において、工学操作された抗体結合部位は、例えば、工学操作された抗CD2抗体または工学操作された抗CD7抗体であり得る。

【0309】

式(V)の化合物の例は、以下に示される通りである：

【化43】

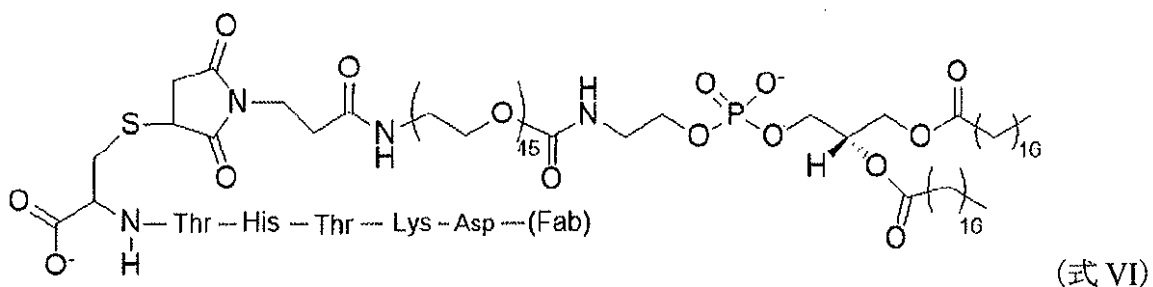


。式VにおけるscFvは、インタクトな抗体またはその抗原断片（例えばFab）と置き換えることができることが企図される。

【0310】

式(VI)の化合物の別の例は、以下に示される通りであり：

【化44】



、その生産は、Nellisら (2005) (上記) または米国特許第7,022,33

6号において説明されている。式ⅤⅠにおけるF a bは、インタクトな抗体もしくはその抗原断片（例えば（F a b'）<sub>2</sub>断片）または工学操作された抗体結合部位（例えばs c F v）と置き換えることができることが企図される。

【0311】

他の脂質免疫細胞標的基コンジュゲートは、例えば米国特許第7,022,336号において説明されており、ここで、標的化基は、目的の標的化基、例えば、本明細書中上記に説明される、T細胞またはNK細胞表面抗原に結合する標的化基と置き換えることができる。

【0312】

ある特定の実施形態において、式ⅤⅠの例示的なコンジュゲートの脂質成分は、本明細書において説明されるイオン化可能なカチオン性脂質、例えば式Ⅰ、式Ⅱまたは式Ⅲのイオン化可能なカチオン性脂質に基づいていてもよい。例えば、例示的なイオン化可能なカチオン性脂質は：

10

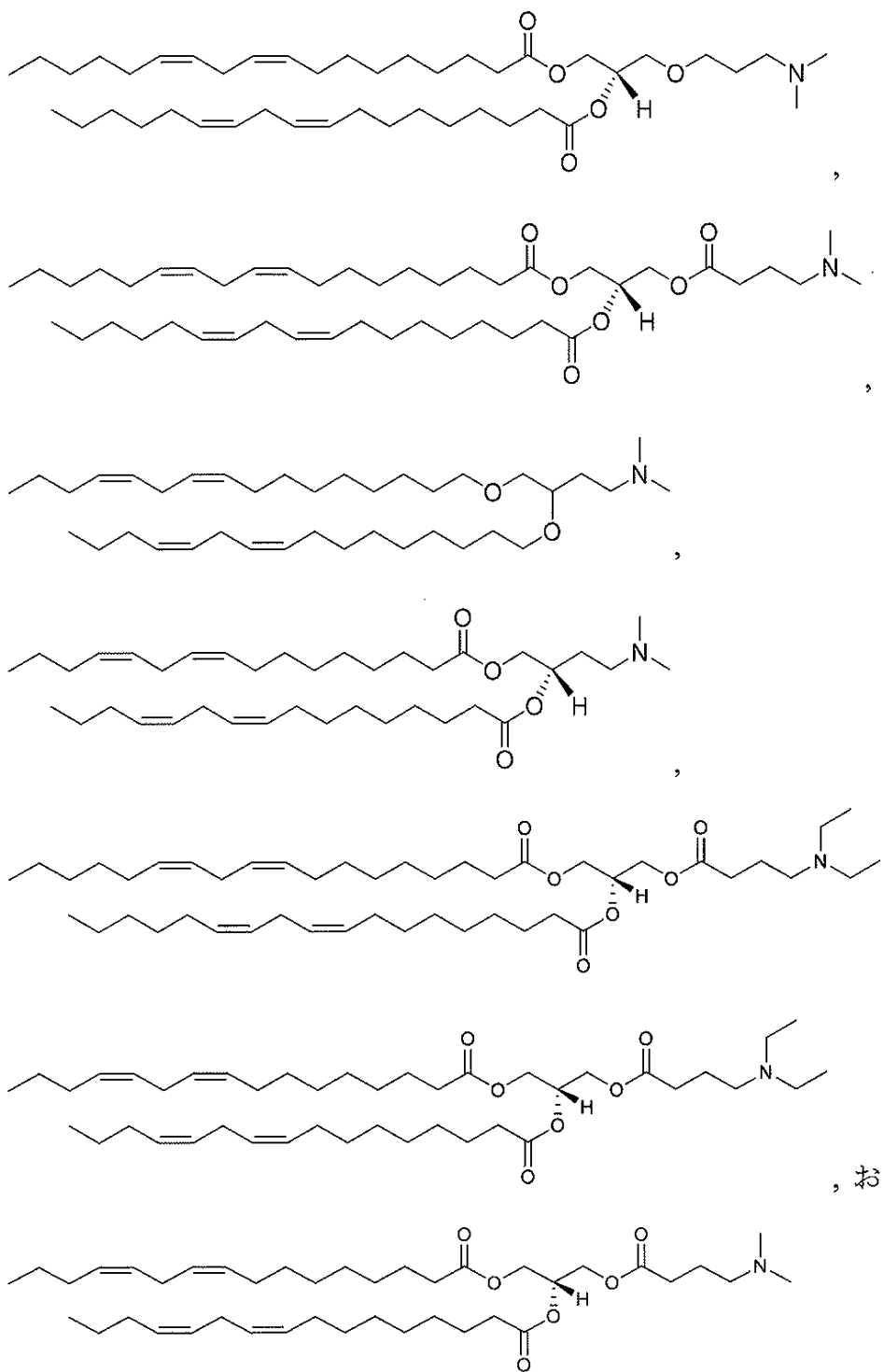
20

30

40

50

【化 4 5】

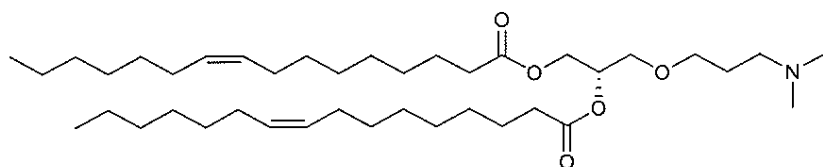


またはそれらの塩からなる群から選択することができる。

**【 0 3 1 3 】**

ある特定の実施形態において、例示的なイオン化可能なカチオン性脂質は、式：

【化 4 6】



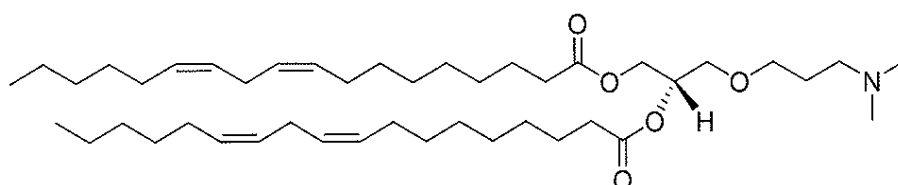
の化合物またはその塩であり得る。

【0314】

10

一部の実施形態において、例示的なイオン化可能なカチオン性脂質は、式：

【化 4 7】



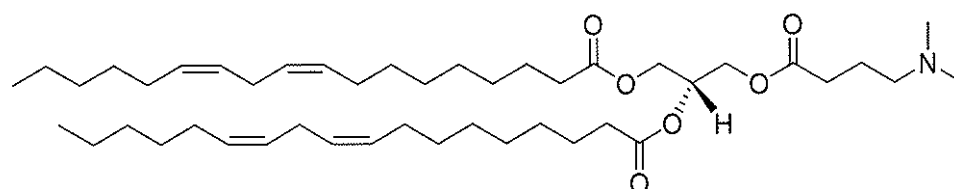
の化合物またはその塩であり得る。

20

【0315】

他の実施形態において、例示的なイオン化可能なカチオン性脂質は、式：

【化 4 8】



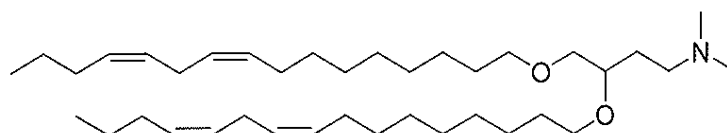
30

の化合物またはその塩であり得る。

【0316】

ある特定の実施形態において、例示的なイオン化可能なカチオン性脂質は、式：

【化 4 9】



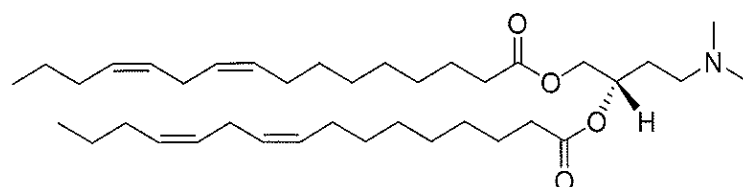
40

の化合物またはその塩であり得る。

【0317】

一部の実施形態において、例示的なイオン化可能なカチオン性脂質は、式：

【化 5 0】



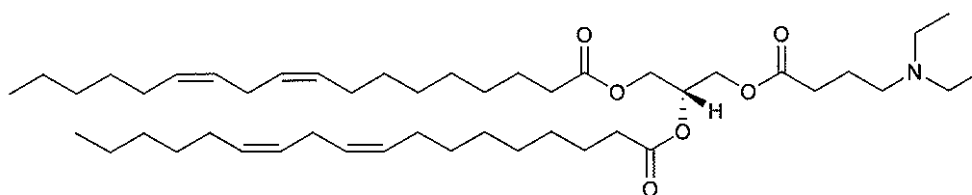
50

の化合物またはその塩であり得る。

【0318】

他の実施形態において、例示的なイオン化可能なカチオン性脂質は、式：

【化51】



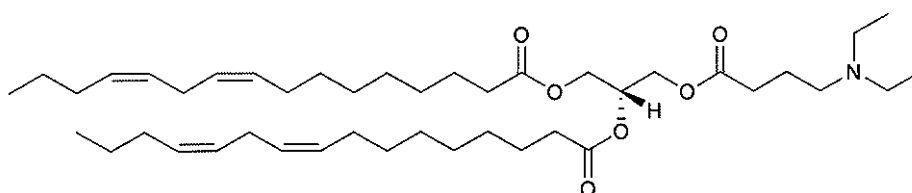
10

の化合物またはその塩であり得る。

【0319】

ある特定の実施形態において、例示的なイオン化可能なカチオン性脂質は、式：

【化52】



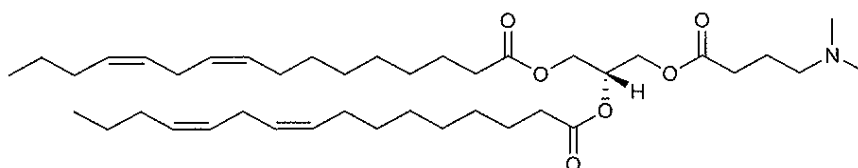
20

の化合物またはその塩であり得る。

【0320】

一部の実施形態において、例示的なイオン化可能なカチオン性脂質は、式：

【化53】



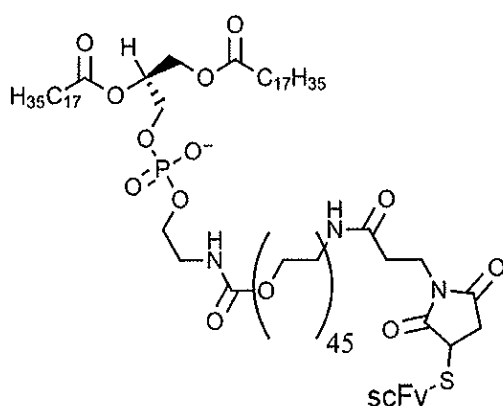
30

の化合物またはその塩であり得る。

【0321】

ある特定の実施形態において、式IIIの脂質に基づくコンジュゲートは：

【化54】



40

50

を含んでもよく、式中、 $scFv$ は、本明細書中上記に説明される標的、例えばCD2、CD3、CD7またはCD8に結合する工学操作された抗体結合部位を表す。

#### 【0322】

ある特定の実施形態では、脂質ブレンドは、標的化基を通した非特異的結合の量を低減するように、遊離PEG-脂質をさらに含むことができる。遊離PEG-脂質は、コンジュゲートに含まれるPEG-脂質と同じであっても異なってもよい。ある特定の実施形態では、遊離PEG-脂質は、PEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(PEG-DSPЕ)またはPEG-ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン(PEG-DMPE)、N-(メチルポリオキシエチレンオキシカルボニル)-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE-PEG)1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン(PEG-DMG)、1,2-ジパルミトイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン(PEG-DPG)、1,2-ジオレオイル-rac-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール(DOG-PEG)1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン(PEG-DSG)、N-パルミトイルスフィンゴシン-1-{サクシニル[メトキシ(ポリエチレングリコール)]}(PEG-セラミド)、DSPЕ-PEG-システイン、またはその誘導体からなる群から選択され、全ては2000~5000の間、2000、3400または5000の平均PEG長を有する。最終組成物は、これらのペグ化脂質の2つまたはそれ以上の混合物を含有することができる。ある特定の実施形態では、LNP組成物は、PEG-脂質とミリストイルおよびステアリンアシル鎖との混合物を含む。

10

20

#### 【0323】

ある特定の実施形態では、PEG-脂質の誘導体は、PEG末端にヒドロキシルまたはカルボン酸末端基を有する。

#### 【0324】

脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートは、下記のようにLNPの中に、例えば、イオン化可能なカチオン性脂質、ステロール、中性リン脂質およびPEG-脂質を例えば含有するLNPの中に組み込むことができる。ある特定の実施形態では、脂質-免疫細胞標的化基を含有するLNPは、本明細書に記載されるイオン化可能なカチオン性脂質、または、例えば、米国特許第10,221,127号、10,653,780号もしくは米国特許出願公開第2018/0085474号、米国特許出願公開第2016/0317676号、国際公開WO2009/086558、またはMiaoら(2019)NATURE BIOTECH 37:1174~1185頁もしくはJayaramanら(2012)ANGEW CHEM INT. 51:8529~8533頁に記載されるカチオン性脂質を含有することができると考えられる。他の実施形態では、カチオン性脂質は、表1に示すイオン化可能なカチオン性脂質から選択することができる。

30

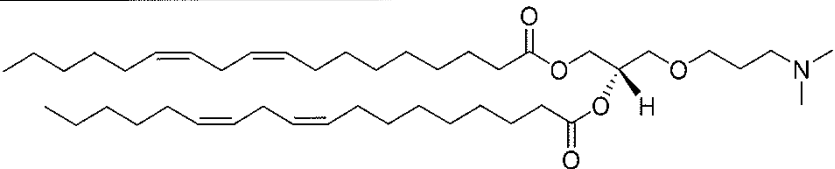
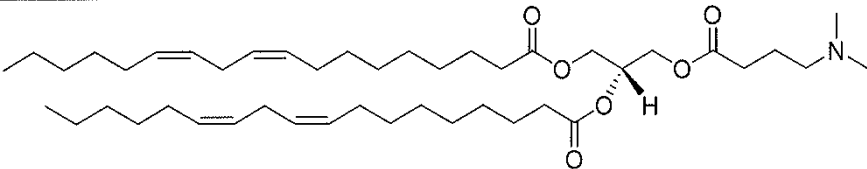
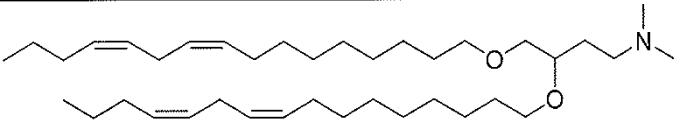
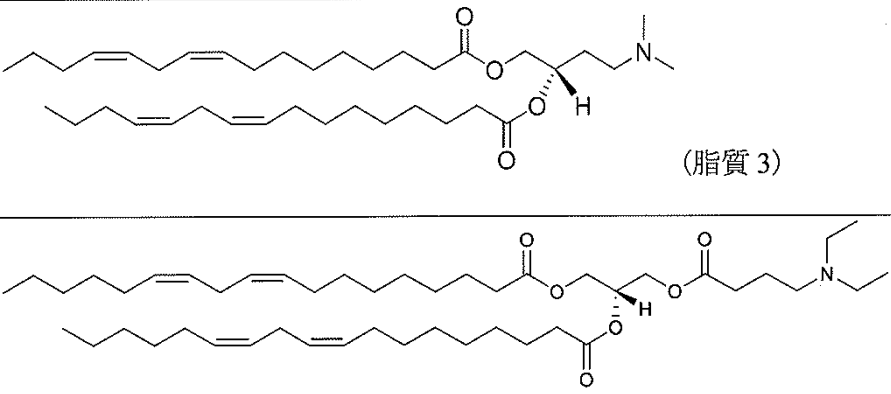
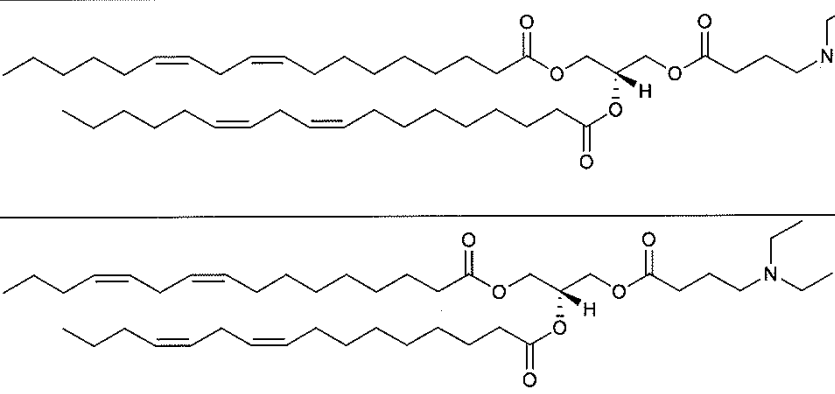
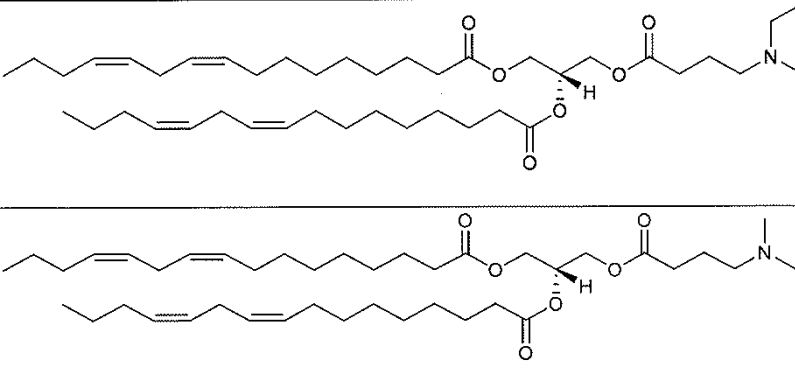
#### 【0325】

40

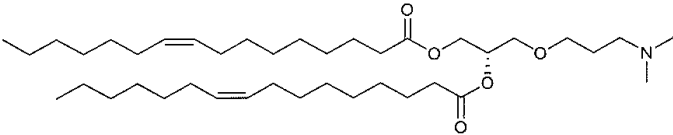
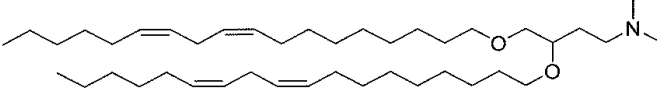
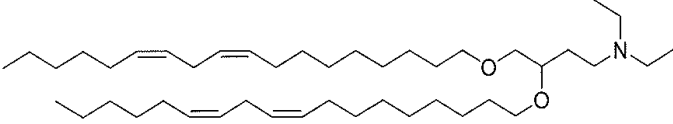
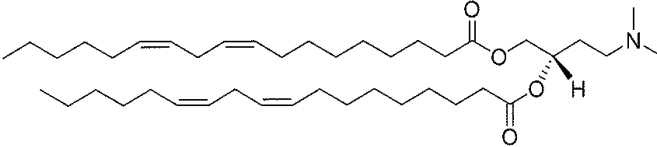
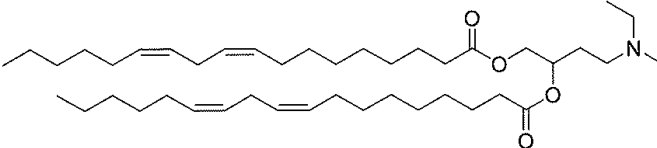
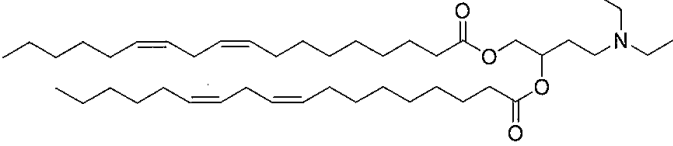
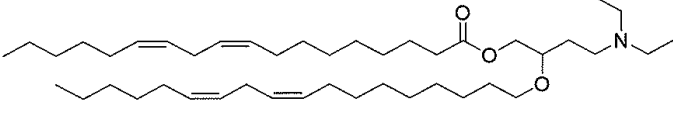
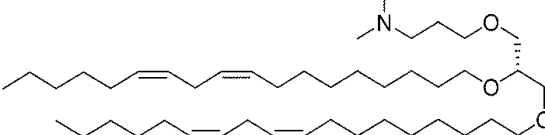
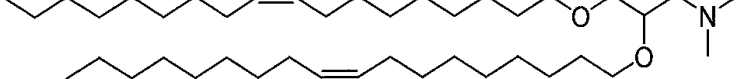
50

【表 3 - 1】

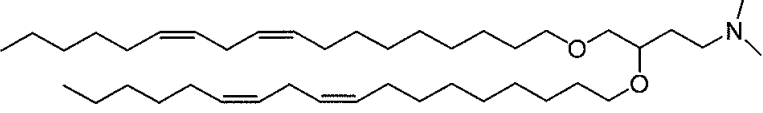
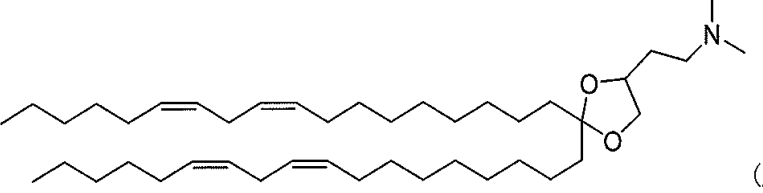
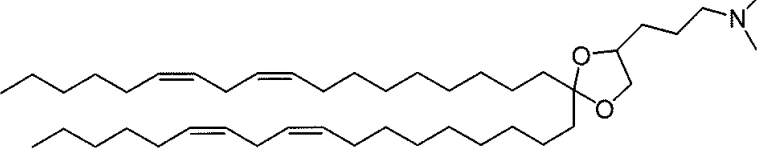
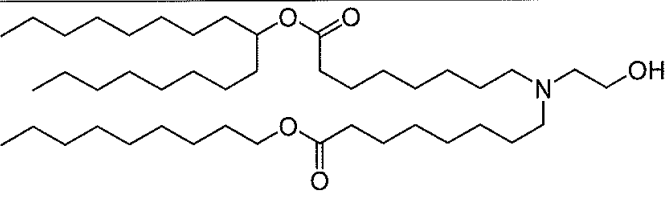
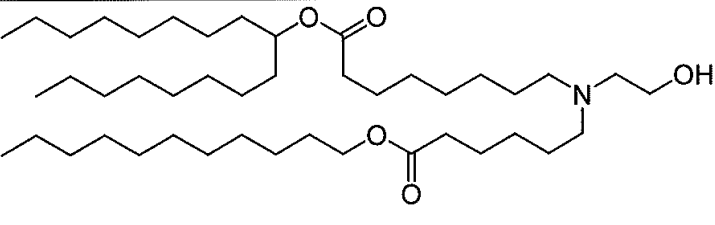
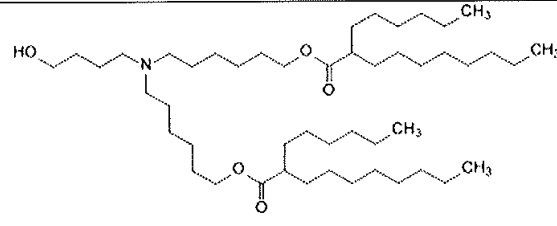
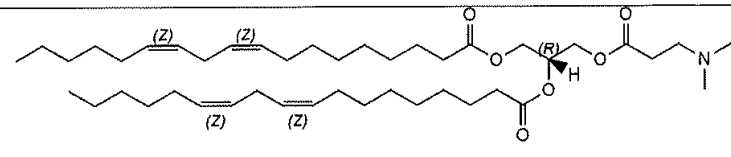
表 1.

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|  <p>(脂質 1)</p>   |    |
|  <p>(脂質 2)</p>   | 10 |
|  <p>(脂質 3)</p>    | 20 |
|  <p>(脂質 6)</p>  | 30 |
|  <p>(脂質 6)</p> | 40 |
|  <p>(脂質 6)</p> | 50 |

【表 3 - 2】

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|  <p>(脂質 4)</p>   |    |
|                  | 10 |
|                  |    |
|  <p>(脂質 5)</p>   |    |
|                 | 20 |
|  <p>(脂質 7)</p> |    |
|                | 30 |
|                |    |
|                | 40 |

【表 3 - 3】

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                   |    |
|  <p>(脂質 8)</p>    | 10 |
|                   |    |
|                   | 20 |
|  <p>(脂質 14)</p> |    |
|  <p>脂質 15</p>   | 30 |
|  <p>(脂質 9)</p>  | 40 |

【表 3 - 4】

|  |         |
|--|---------|
|  | (脂質 10) |
|  | (脂質 11) |
|  | (脂質 12) |
|  | (脂質 13) |

10

20

## 【0326】

LNPは、以下のセクションで下に記載される方法および他の成分を使用して製剤化することができる。

## 【0327】

30

## I V . 脂質ナノ粒子組成物

本発明は、本明細書に記載されるイオン化可能なカチオン性脂質および／または本明細書に記載される脂質－免疫細胞標的化剤コンジュゲートを含有する脂質ブレンドを含む脂質ナノ粒子（LNP）組成物を提供する。ある特定の実施形態では、脂質ブレンドは、本明細書に記載されるイオン化可能なカチオン性脂質、ならびにステロール、中性リン脂質、PEG－脂質および脂質－免疫細胞標的化基コンジュゲートの1つまたはそれ以上を含むことができる。

## 【0328】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるイオン化可能なカチオン性脂質は、30～70モルパーセント、30～60モルパーセント、30～50モルパーセント、40～70モルパーセント、40～60モルパーセント、40～50モルパーセント、50～70モルパーセント、50～60モルパーセントの範囲で、または約30モルパーセント、約35モルパーセント、約40モルパーセント、約45モルパーセント、約50モルパーセント、約55モルパーセント、約60モルパーセント、約65モルパーセントもしくは約70モルパーセントで脂質ブレンド中に存在することができる。

40

## 【0329】

## ステロール

ある特定の実施形態では、脂質ナノ粒子の脂質ブレンドは、ステロール成分、例えば、コレステロール、フェコステロール、β－シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、スチグマスタノール、ブラシカステロールからなる群か

50

ら選択される1つまたはそれ以上のステロールを含むことができる。ある特定の実施形態では、ステロールはコレステロールである。

#### 【0330】

ステロール（例えば、コレステロール）は、20～70モルパーセント、20～60モルパーセント、20～50モルパーセント、30～70モルパーセント、30～60モルパーセント、30～50モルパーセント、40～70モルパーセント、40～60モルパーセント、40～50モルパーセント、50～70モルパーセント、50～60モルパーセントの範囲で、または約20モルパーセント、約25モルパーセント、約30モルパーセント、約35モルパーセント、約40モルパーセント、約45モルパーセント、約50モルパーセント、約55モルパーセント、約60モルパーセントもしくは約65モルパーセントで脂質ブレンド中に存在することができる。

10

#### 【0331】

##### 中性リン脂質

ある特定の実施形態では、脂質ナノ粒子の脂質ブレンドは、1つまたはそれ以上の中性リン脂質を含有することができる。中性リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（D S P E）、1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（D S P C）、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（D O P E）、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン（D O P C）、スフィンゴミエリン（S M）からなる群から選択することができる。

20

#### 【0332】

他の中性リン脂質は、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン（D S P E）、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン（D M P E）、ジステアロイル-グリセロ-ホスホコリン（D S P C）、ジオレオイル-グリセロ-ホスホエタノールアミン（D O P E）、ジリノレオイル-グリセロ-ホスホコリン（D L P C）、ジミリストイル-グリセロ-ホスホコリン（D M P C）、ジオレオイル-グリセロ-ホスホコリン（D O P C）、ジパルミトイル-グリセロ-ホスホコリン（D P P C）、ジウンデカノイル-グリセロ-ホスホコリン（D U P C）、パルミトイル-オレオイル-グリセロ-ホスホコリン（P O P C）、ジオクタデセニル-グリセロ-ホスホコリン、オレオイル-コレステリルヘミスクシノイル-グリセロ-ホスホコリン、ヘキサデシル-グリセロ-ホスホコリン、ジリノレノイル-グリセロ-ホスホコリン、ジアラキドノイル-グリセロ-3-ホスホコリン、ジドコサヘキサエノイル-グリセロ-ホスホコリンまたはスフィンゴミエリンからなる群から選択することができる。

30

#### 【0333】

中性リン脂質は、1～10モルパーセント、1～15モルパーセント、1～12モルパーセント、1～10モルパーセント、3～15モルパーセント、3～12モルパーセント、3～10モルパーセント、4～15モルパーセント、4～12モルパーセント、4～10モルパーセント、4～8モルパーセント、5～15モルパーセント、5～12モルパーセント、5～10モルパーセント、6～15モルパーセント、6～12モルパーセント、6～10モルパーセントの範囲で、または約1モルパーセント、約2モルパーセント、約3モルパーセント、約4モルパーセント、約5モルパーセント、約6モルパーセント、約7モルパーセント、約8モルパーセント、約9モルパーセント、約10モルパーセント、約11モルパーセント、約12モルパーセント、約13モルパーセント、約14モルパーセントもしくは約15モルパーセントで脂質ブレンド中に存在することができる。

40

#### 【0334】

##### P E G-脂質

脂質ナノ粒子の脂質ブレンドは、1つまたはそれ以上のP E GまたはP E G改変脂質を含むことができる。そのような種は、ペグ化脂質と代わり呼ぶことができる。P E G脂質は、ポリエチレングリコールで改変された脂質である。上記の通り、脂質-免疫細胞標的化基が脂質ブレンドに含まれるときに標的化基を通した非特異的結合を低減または排除

50

するために、遊離 PEG-脂質が脂質ブレンドに含まれてもよい。

【0335】

PEG 脂質は、PEG 改変ホスファチジルエタノールアミン、PEG 改変ホスファチジン酸、PEG 改変セラミド、PEG 改変ジアルキルアミン、PEG 改変ジアシルグリセロールおよび PEG 改変ジアルキルグリセロールからなる非限定群から選択することができる。例えば、PEG 脂質は、PEG-ジオレオイルグリセロール (PEG-DOG)、PEG-ジミリスティル-グリセロール (PEG-DMG)、PEG-ジパルミトイル-グリセロール (PEG-DPG)、PEG-ジリノレオイル-グリセロール-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DLPE)、PEG-ジミリスティル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DMPE)、PEG-ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DPPE)、PEG-ジステアロイル-グリセロール (PEG-DSG)、PEG-ジアシルグリセロール (PEG-DAG、例えば、PEG-DMG、PEG-DPG および PEG-DSG)、PEG-セラミド、PEG-ジステアロイル-グリセロール-ホスホグリセロール (PEG-DSPG)、PEG-ジオレオイル-グリセロール-ホスホエタノールアミン (PEG-DOPE)、2-[(ポリエチレングリコール)-2000]-N、N-ジテトラデシルアセトアミドまたは PEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DSPE) 脂質であってよい。

10

【0336】

ある特定の実施形態では、ブレンドは、PEG-ジステアロイル-グリセロール (PEG-DSG)、PEG-ジアシル-グリセロール (PEG-DAG、例えば、PEG-DMG、PEG-DPG および PEG-DSG)、PEG-ジミリスティル-グリセロール (PEG-DMG)、PEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DSPE) および PEG-ジミリスティル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DMPE) からなる群から選択することができる遊離 PEG-脂質を含有することができる。一部の実施形態では、遊離 PEG-脂質は、ジパルミトイル (C16) 鎖またはジステアロイル (C18) 鎖を含むジアシルホスファチジルコリンを含む。

20

【0337】

PEG-脂質は、1~10 モルパーセント、1~8 モルパーセント、1~7 モルパーセント、1~6 モルパーセント、1~5 モルパーセント、1~4 モルパーセント、1~3 モルパーセント、2~8 モルパーセント、2~7 モルパーセント、2~6 モルパーセント、2~5 モルパーセント、2~4 モルパーセント、2~3 モルパーセントの範囲で、または約 1 モルパーセント、約 2 モルパーセント、約 3 モルパーセント、約 4 モルパーセントまたは約 5 モルパーセントで脂質ブレンド中に存在することができる。一部の実施形態では、PEG-脂質は遊離 PEG-脂質である。

30

【0338】

一部の実施形態では、PEG-脂質は、0.01~10 モルパーセント、0.01~5 モルパーセント、0.01~4 モルパーセント、0.01~3 モルパーセント、0.01~2 モルパーセント、0.01~1 モルパーセント、0.1~10 モルパーセント、0.1~5 モルパーセント、0.1~4 モルパーセント、0.1~3 モルパーセント、0.1~2 モルパーセント、0.1~1 モルパーセント、0.5~10 モルパーセント、0.5~5 モルパーセント、0.5~4 モルパーセント、0.5~3 モルパーセント、0.5~2 モルパーセント、0.5~1 モルパーセント、1~2 モルパーセント、3~4 モルパーセント、4~5 モルパーセント、5~6 モルパーセントまたは 1.25~1.75 モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在することができる。一部の実施形態では、PET-脂質は、脂質ブレンドの約 0.5 モルパーセント、約 1 モルパーセント、約 1.5 モルパーセント、約 2 モルパーセント、約 2.5 モルパーセント、約 3 モルパーセント、約 3.5 モルパーセント、約 4 モルパーセント、約 4.5 モルパーセント、約 5 モルパーセント、または約 5.5 モルパーセントであってよい。一部の実施形態では、PEG-脂質は遊離 PEG-脂質である。

40

【0339】

50

一部の実施形態では、PEG-脂質の脂質アンカー長は、C14である（PEG-DMGの場合のように）。一部の実施形態では、PEG-脂質の脂質アンカー長は、C16である（DPGの場合のように）。一部の実施形態では、PEG-脂質の脂質アンカー長は、C18である（PEG-DSGの場合のように）。一部の実施形態では、PEG-脂質の骨格または頭基は、ジアシルグリセロールまたはホスホエタノールアミンである。一部の実施形態では、PEG-脂質は遊離PEG-脂質である。

#### 【0340】

本開示のLNPは、免疫細胞標的化基にコンジュゲートしてない1つまたはそれ以上の遊離PEG-脂質、および免疫細胞標的化基にコンジュゲートしているPEG-脂質を含むことができる。一部の実施形態では、遊離PEG-脂質は、脂質免疫細胞標的化基コンジュゲート中の脂質と同じか異なる脂質を含む。

10

#### 【0341】

免疫細胞標的化基コンジュゲート

ある特定の実施形態では、脂質ブレンドは、上のセクションIIIに記載される脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートを含むこともできる。

#### 【0342】

脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートは、0.001~0.5モルパーセント、0.001~0.1モルパーセント、0.01~0.5モルパーセント、0.05~0.5モルパーセント、0.1~0.5モルパーセント、0.1~0.3モルパーセント、0.1~0.2モルパーセント、0.2~0.3モルパーセントの範囲、約0.01モルパーセント、約0.05モルパーセント、約0.1モルパーセント、約0.15モルパーセント、約0.2モルパーセント、約0.25モルパーセント、約0.3モルパーセント、約0.35モルパーセント、約0.4モルパーセント、約0.45モルパーセントまたは約0.5モルパーセントで脂質ブレンド中に存在することができる。

20

#### 【0343】

脂質ブレンド中に存在する脂質に加えて、LNP組成物は、ペイロード、例えば以下に記載されるペイロードをさらに含むことができる。ある特定の実施形態では、ペイロードは核酸、例えばDNAまたはRNA、例えば、mRNA、転移RNA（tRNA）、マイクロRNAまたは小干渉RNA（siRNA）である。

#### 【0344】

ある特定の実施形態では、核酸中のヌクレオチドの数は、約400~約6000である。

30

#### 【0345】

脂質ナノ粒子の生産

一般に、LNPはオービタルボルテクサーまたは微流動混合による急速混合を使用して生産される。オービタルボルテクサー混合は、目的の核酸の水溶液へのエタノール中の脂質溶液の急速添加と、直後の2,500rpmでのボルテクシングによって達成される。微流動混合は、例えば、最適化された混合槽幾何構造（Precision Nanosystems、Vancouver、BC）で構成されるNanoAssembler装置および微流動チップを使用して、微流動チャンネルの中で制御された流速で水性および有機のストリームを混合して達成される。

40

#### 【0346】

ある特定の実施形態では、生じたLNP組成物は、例えば、約40モルパーセント~約60モルパーセントの本明細書に記載される1つまたはそれ以上のイオン化可能なカチオン性脂質、約35モルパーセント~約50モルパーセントの1つまたはそれ以上のステロール、約5モルパーセント~約15モルパーセントの1つまたはそれ以上の中性脂質、および約0.5モルパーセント~約5モルパーセントの1つまたはそれ以上のPEG-脂質を含有する脂質ブレンドを含む。

#### 【0347】

脂質ナノ粒子の物理特性

50

LNP組成物の特徴は、脂質ナノ粒子（LNP）組成物に含有される成分、それらの絶対もしくは相対量に依存することがある。特徴は、LNP組成物の製造の方法および条件によって異なることもある。

【0348】

LNP組成物は、様々な方法によって特徴付けることができる。例えば、LNP組成物の形態およびサイズ分布を検査するために、顕微鏡検査（例えば、透過電子顕微鏡法または走査電子顕微鏡法）を使用することができる。ゼータ電位を測定するために、動的光散乱または電位差測定（例えば、電位差滴定）を使用することができる。粒径を決定するために、動的光散乱を利用することもできる。粒径、多分散指数およびゼータ電位などのLNP組成物の複数の特徴を測定するために、Zetasizer Nano ZS（Malvern Instruments Ltd、Malvern、Worcestershire、UK）などの機器を使用することもできる。RNA封入効率は、RNA結合性色素（色素がアクセス可能なRNA分画を決定するribogreen、cybergreen）およびLNP脱製剤化に頼る方法と続く全RNA含有量のHPLC分析の組合せによって決定される。

【0349】

一部の実施形態では、LNPは、1～250nm、1～200nm、1～150nm、1～100nm、50～250nm、50～200nm、50～150nm、50～100nm、75～250nm、75～200nm、75～150nm、75～100nm、100～250nm、100～200nm、100～150nmの範囲の平均直径を有することができる。ある特定の実施形態では、LNP組成物は、約1nm、約10nm、約20nm、約30nm、約40nm、約50nm、約60nm、約70nm、約80nm、約90nm、約100nm、約110nm、約120nm、約130nm、約140nm、約150nm、約160nm、約170nm、約180nm、約190nmまたは約200nmの平均直径を有することができる。一部の実施形態では、LNPは約100nmの平均直径を有する。

【0350】

あるいは、またはさらに、LNP組成物は、0.05～1、0.05～0.75、0.05～0.5、0.05～0.4、0.05～0.3、0.05～0.2、0.08～1、0.08～0.75、0.08～0.5、0.08～0.4、0.08～0.3、0.08～0.2、0.1～1、0.1～0.75、0.1～0.5、0.1～0.4、0.1～0.3、0.1～0.2の範囲の多分散指数を有することができる。ある特定の実施形態では、多分散指数は、0.1～0.25、0.1～0.2、0.1～0.19、0.1～0.18、0.1～0.17、0.1～0.16または0.1～0.15の範囲である。

【0351】

あるいは、またはさらに、LNP組成物は約-30mV～約+30mVのゼータ電位を有することができる。ある特定の実施形態では、LNP組成物は約-10mV～約+20mVのゼータ電位を有する。ゼータ電位は、pHの関数として異なることができる。その結果、ある特定の実施形態では、LNP組成物は、pH5.5またはpH5で約-10mV～約+30mV、または約0mV～+30mV、または約+5mV～約+30mVのゼータ電位を、および／またはpH7.4で約-30mV～約+5mVまたは約-20mV～約+15mVのゼータ電位を有することができる。

【0352】

V. ペイロード

LNP組成物は、細胞（例えば、免疫細胞）または組織、例えば対象の細胞（例えば、免疫細胞）または組織への送達のための薬剤、例えば核酸分子を含むことができる。

【0353】

本発明のLNP組成物は、核酸、例えばDNAまたはRNA、例えばmRNA、tRNA、マイクロRNA、siRNAまたはダイサー基質siRNAを含むことができる。核

酸は、天然に存在する成分、例えば天然に存在する塩基、糖または連結基（例えば、ホスホジエステル連結基）を含有することができるか、または天然に存在しない成分もしくは改変（例えば、チオエステル連結基）を含有することができると考えられる。例えば、核酸は、当業者に公知である塩基、糖、リンカー改変形を含有するように合成することができる。さらに、核酸は線状もしくは環状であってよい、または任意の所望の構成を有することができる。LNP組成物は、同じであっても異なってもよい複数の核酸分子、例えば複数のRNA分子を含むことができる。

#### 【0354】

ある特定の実施形態では、ペイロードはmRNAである。ある特定の実施形態では、特定のLNP組成物は、同じであっても異なってもよい、いくつかのmRNA分子を含有することができる。ある特定の実施形態では、1つまたはそれ以上の異なるmRNAを含む1つまたはそれ以上のLNP組成物を細胞と合わせる、および／または同時に接触させることができる。mRNAは、ステムループ、鎖終止ヌクレオシド、ポリA配列、ポリアダニル化シグナルおよび／または5'キャップ構造の1つまたはそれ以上を含むことができる。mRNAは、例えば免疫障害、炎症性障害またはがんで使用するための受容体、例えばキメラ抗原受容体(CAR)をコードすることができる。さらに、mRNAは、治療的または予防的ワクチンで使用する、例えば、病原体、例えば微生物もしくはウイルスの病原体による感染症を処置もしくは予防するための、またはそのような感染症によって直接的もしくは間接的に引き起こされる副作用を低減もしくは改善するための抗原をコードすることができる。

#### 【0355】

ある特定の実施形態では、LNP組成物は、1つまたはそれ以上の薬学的に許容される賦形剤、疎水性小分子、治療剤、炭水化物、ポリマー、透過性増強分子、および表面改変剤を限定されずに含む、1つまたはそれ以上の他の成分を含むことができる。

#### 【0356】

一部の実施形態では、生じるLNP組成物中の脂質成分のペイロード（例えば、mRNA）に対するwt/wt比は、約1:1～約50:1である。ある特定の実施形態では、生じる組成物中の脂質成分のペイロード（例えば、mRNA）に対するwt/wt比は、約5:1～約50:1である。ある特定の実施形態では、wt/wt比は、約5:1～約40:1である。ある特定の実施形態では、wt/wt比は、約10:1～約40:1である。ある特定の実施形態では、wt/wt比は、約15:1～約25:1である。

#### 【0357】

ある特定の実施形態では、脂質ナノ粒子中のペイロード（例えば、mRNA）の封入効率は、少なくとも50%である。ある特定の実施形態では、封入効率は、少なくとも80%、少なくとも90%または90%を超える。

#### 【0358】

##### RNAペイロード

ある特定の実施形態では、RNAペイロードは、mRNA、tRNA、マイクロRNAまたはsiRNAペイロードである。

#### 【0359】

ある特定の実施形態では、脂質ナノ粒子組成物は、細胞中での翻訳のために標的細胞へのRNA、例えばmRNAの送達のために最適化される。mRNAは、天然に存在するかまたは天然に存在しないmRNAであってよい。mRNAは、1つまたはそれ以上の改変された核酸塩基、ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むことができる。

#### 【0360】

核酸塩基は、アデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、7-メチルグアニン、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、チミン、プソイドウラシル、ジヒドロウラシル、ヒポキサンチンおよびキサンチンからなる非限定群から選択することができる。

#### 【0361】

mRNAのヌクレオシドは、核酸塩基と一緒に糖分子（例えば、5炭素または6炭素糖

、例えばペントース、リボース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトースまたはそのデオキシ誘導体）を含む化合物である。ヌクレオシドは正規のヌクレオシド（例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン、リボチミジン、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシシチジン、デオキシウリジンおよびチミジン）またはその類似体であってよく、1つまたはそれ以上の置換または改変を含むことができる。

【0362】

mRNAのヌクレオチドは、ヌクレオシドおよびリン酸基または代替基（例えば、ボラノホスフェート、チオホスフェート、セレノホスフェート、ホスホナート、アルキル基、アミデートおよびグリセロール）を含有する化合物である。ヌクレオチドは正規のヌクレオチド（例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン、リボチミジン、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシシチジン、デオキシウリジンおよびチミジン—リン酸）またはその類似体であってよく、アルキル、アリール、ハロ、オキソ、ヒドロキシル、アルキルオキシおよび／もしくはチオ置換；1つまたはそれ以上の縮合もしくは開環；酸化；ならびに／または核酸塩基、糖および／もしくはリン酸もしくは代替成分の還元を限定されずに含む、1つまたはそれ以上の置換または改変を含むことができる。ヌクレオチドは、1つまたはそれ以上のリン酸または代替基を含むことができる。例えば、ヌクレオチドはヌクレオシドおよび三リン酸基を含むことができる。「ヌクレオシド三リン酸」（例えば、グアノシン三リン酸、アデノシン三リン酸、シチジン三リン酸およびウリジン三リン酸）は、正規のヌクレオシド三リン酸またはその類似体もしくは誘導体を指すことができ、本明細書に記載される1つまたはそれ以上の置換または改変を含むことができる。

10

20

【0363】

mRNAは、5'非翻訳領域、3'非翻訳領域および／またはコードもしくは翻訳配列を含むことができる。mRNAは、数十、数百または数千の塩基対を含む、任意の数の塩基対を含むことができる。核酸塩基、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの任意の数（例えば、全部、一部またはゼロ）は、正規の種の類似体であってよく、置換、改変されてもよく、さもなければ天然に存在しなくてもよい。ある特定の実施形態では、特定の核酸塩基タイプの全ては、改変されてもよい。例えば、mRNA中の全てのシトシンは、5-メチルシトシンであってよい。

【0364】

ある特定の実施形態では、mRNAは、5'キャップ構造、鎖終止ヌクレオチド、ステムループ、ポリA配列および／またはポリアデニル化シグナルを含むことができる。

30

【0365】

キャップ構造またはキャップ種は、リンカーによって連結されている2つのヌクレオシド部分を含む化合物であり、天然に存在するキャップ、天然に存在しないキャップまたはキャップ類似体から選択することができる。キャップ種は、1つまたはそれ以上の改変されたヌクレオシドおよび／またはリンカー部分を含むことができる。例えば、天然のmRNAキャップは、グアニンヌクレオチド、およびそれらの5'位置で三リン酸連結によって連結される、7位置でメチル化されたグアニン（G）ヌクレオチド、例えば、一般的にm7GpppGと書かれるm7G（5'）ppp（5'）Gを含むことができる。キャップ種は、抗リバースキャップ類似体であってもよい。可能なキャップ種の非限定的リストには、m7GpppG、m7Gpppm7G、m73'dGpppG、m7Gpppm7G、m73'dGpppGおよびm2702'GpppGが含まれる。

40

【0366】

代わりに、またはさらに、mRNAは鎖終止ヌクレオシドを含むことができる。例えば、鎖終止ヌクレオシドは、それらの糖基の2'および／または3'位置で脱酸素されたヌクレオシドを含むことができる。そのような種は、3'-デオキシアデノシン（コルジセピン）、3'-デオキシウリジン、3'-デオキシシトシン、3'-デオキシグアノシン、3'-デオキシチミンおよび2'，3'-ジデオキシヌクレオシド、例えば2'，3'-ジデオキシアデノシン、2'，3'-ジデオキシウリジン、2'，3'-ジデオキシシトシン、2'，3'-

50

ジデオキシグアノシンおよび 2', 3'-ジデオキシチミンを含むことができる。

【0367】

代わりに、またはさらに、mRNA はヒストンステムループなどのステムループを含むことができる。ステムループは 1、2、3、4、5、6、7、8 またはそれ以上のヌクレオチド塩基対を含むことができる。例えば、ステムループは、4、5、6、7 または 8 つのヌクレオチド塩基対を含むことができる。ステムループは、mRNA の任意の領域に位置することができる。例えば、ステムループは、非翻訳領域（5' 非翻訳領域または 3' 非翻訳領域）、コード領域またはポリ A 配列もしくはテールの中、その前または後に位置することができる。

【0368】

代わりに、またはさらに、mRNA はポリ A 配列および／またはポリアデニル化シグナルを含むことができる。ポリ A 配列は、アデニンヌクレオチドまたはその類似体もしくは誘導体で全体が、または大部分が構成されてもよい。ポリ A 配列は、mRNA の 3' 非翻訳領域に隣接して位置するテールであってよい。

【0369】

mRNA は、任意の天然に存在するかまたは天然に存在しないかさもなければ改変されたポリペプチドを含む、目的の任意のポリペプチドをコードすることができる。mRNA によってコードされるポリペプチドは任意のサイズであってよく、任意の二次構造または活性を有することができる。一部の実施形態では、mRNA によってコードされるポリペプチドは、細胞の中で発現されるときに治療作用を有することができる。一部の実施形態では、mRNA は、抗体、酵素、増殖因子、ホルモン、サイトカイン、ウイルスタンパク質（例えば、ウイルスカプシドタンパク質）、抗原、ワクチンまたは受容体をコードすることができる。一部の実施形態では、mRNA は、治療ワクチン（例えば、がんワクチン）または予防ワクチン（例えば、微生物またはウイルス病原体による感染症のリスクまたは重症度を最小にするためのワクチン）で使用するための工学操作された受容体、例えば CAR、または抗原をコードすることができる。一部の実施形態では、mRNA は免疫細胞で免疫応答を調節することが可能なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、mRNA は免疫細胞を再プログラムすることが可能なポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、mRNA は合成 T 細胞受容体（synTCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）をコードする。

【0370】

脂質組成物は、1 つまたはそれ以上の特定の適用または標的について設計することができる。例えば、LNP 組成物は、mRNA を、哺乳動物の体内の特定の細胞、組織、臓器もしくは系またはそれらの群、例えば腎臓系へ送達するように設計してもよい。LNP 組成物の生理化学特性は、対象内の特定の標的部位についての選択性を増加させるために変更してもよい。例えば、粒子サイズは、様々な臓器の開窓サイズに基づいて調節してもよい。また、LNP 組成物に含まれる mRNA は、所望の送達標的（複数可）に依存し得る。例えば、mRNA は、特定の適応症、状態、疾患もしくは障害について、および／または特定の細胞、組織、臓器もしくは系もしくはそれらの群への送達（例えば局在化送達もしくは特異的送達）について選択してもよい。

【0371】

脂質組成物中の mRNA の量は、mRNA のサイズ、配列および他の特徴に依存し得る。また、LNP 中の mRNA の量は、LNP 組成物のサイズ、組成、所望の標的および他の特徴に依存し得る。また、mRNA および他の要素（例えば脂質）の相対量は変動し得る。LNP 組成物中の mRNA の量は、例えば、吸収分光法（例えば紫外・可視分光法）を使用して測定することができる。

【0372】

一部の実施形態において、1 つまたはそれ以上の mRNA、脂質およびポリマーならびにそれらの量は、特定の N:P 比（正に荷電可能な脂質またはポリマーアミン（N = 窒素）基の、負に荷電した核酸リン酸（P）基に対する比）を提供するように選択してもよい

10

20

30

40

50

。組成物の N : P 比は、1 つまたはそれ以上の脂質中の窒素原子の、mRNA 中のリン酸基の数に対するモル比を指す。一般的に、より低い N : P 比は好ましい。N : P 比は、特定の脂質およびその pKa に依存し得る。ある特定の実施形態において、mRNA および LNP 組成物、ならびに／またはそれらの相対量は、約 1 : 1 ~ 約 30 : 1、または約 1 : 1 ~ 約 20 : 1 の N : P 比を提供するように選択してもよい。ある特定の実施形態において、N : P 比は、例えば、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1 または 8 : 1 であり得る。ある特定の実施形態において、N : P 比は、約 2 : 1 ~ 約 5 : 1 であり得る。ある特定の実施形態において、N : P 比は、約 4 : 1 であり得る。他の実施形態において、N : P 比は、約 4 : 1 ~ 約 8 : 1 である。例えば、N : P 比は、約 4 : 1、約 4.5 : 1、約 4.6 : 1、約 4.7 : 1、約 4.8 : 1、約 4.9 : 1、約 5.0 : 1、約 5.1 : 1、約 5.2 : 1、約 5.3 : 1、約 5.4 : 1、約 5.5 : 1、約 5.6 : 1、約 5.7 : 1、約 6.0 : 1、約 6.5 : 1 または約 7.0 : 1 であり得る。

10

#### 【0373】

ナノ粒子組成物中の mRNA の量は、mRNA のサイズ、配列および他の特徴に依存し得る。また、ナノ粒子組成物中の mRNA の量は、ナノ粒子組成物のサイズ、組成、所望の標的および他の特徴に依存し得る。また、mRNA および他の要素（例えば脂質）の相対量は変動し得る。一部の実施形態において、ナノ粒子組成物中の脂質成分の、mRNA に対する wt / wt 比は、約 5 : 1 ~ 約 50 : 1、例えば 5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1、16 : 1、17 : 1、18 : 1、19 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1、40 : 1、45 : 1 および 50 : 1 であり得る。例えば、脂質成分の、mRNA に対する wt / wt 比は、約 10 : 1 ~ 約 40 : 1 であり得る。ナノ粒子組成物中の mRNA の量は、例えば、吸収分光法（例えば紫外・可視分光法）を使用して測定することができる。

20

#### 【0374】

mRNA の封入の効率とは、提供される最初の量と比較した、調製後の脂質組成物に封入されているかまたは別の方法でそれに関連する mRNA の量を説明する。封入効率は、高い（例えば 100 % に近い）ことが望ましい。封入効率は、例えば、1 つまたはそれ以上の有機溶媒または界面活性剤により LNP 組成物を分離させる前後の、脂質組成物を含む溶液中の mRNA の量を比較することによって測定することができる。蛍光を使用して、溶液中の遊離 mRNA の量を測定してもよい。本発明の LNP 組成物について、mRNA の封入効率は、少なくとも 50 %、例えば、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % であり得る。ある特定の実施形態において、封入効率は、少なくとも 80 % であり得る。

30

#### 【0375】

#### VI. 製剤化および送達の様式

本発明の LNP 組成物は、全体的にまたは部分的に医薬組成物として製剤化することができる。医薬組成物は、本明細書において説明される賦形剤または補助成分などの、1 つまたはそれ以上の薬学的に許容される賦形剤または補助成分をさらに含んでもよい。医薬組成物および薬剤の製剤化および製造についての一般的ガイドラインは、例えば、Remington's (2006) (上記) において入手可能である。従来型賦形剤および補助成分は、任意の従来型賦形剤または補助成分が本発明の LNP 組成物の 1 つまたはそれ以上の成分と不適合性であり得る場合を除いては、本発明の任意の医薬組成物において使用することができる。賦形剤または補助成分は、成分とのその組合せが任意の望ましくない生物学的効果または別の有害効果をもたらし得る場合、LNP 組成物の成分と不適合性であり得る。

40

#### 【0376】

一部の実施形態において、1 つまたはそれ以上の賦形剤または補助成分は、本発明の LNP 組成物を含む医薬組成物の全質量または全体積の 50 % 超を構成し得る。例えば、1

50

つまたはそれ以上の賦形剤または補助成分は、医薬組成物の30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上を構成し得る。ある特定の実施形態において、賦形剤は、ヒトにおける使用のために、および獣医学的使用のために、例えば米国食品医薬品局によって承認されている。ある特定の実施形態において、賦形剤は、医薬品グレードである。ある特定の実施形態において、賦形剤は、米国薬局方（USP）、欧州薬局方（EP）、英国薬局方および／または国際薬局方の基準を満たしている。

#### 【0377】

医薬組成物中の1つもしくはそれ以上の脂質もしくはLNP、1つもしくはそれ以上の薬学的に許容される賦形剤、および／または任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の同一性、サイズおよび／または状態に依存して、ならびにさらに組成物が投与される経路に依存して変動する。

10

#### 【0378】

脂質組成物、および／または1つもしくはそれ以上のLNP組成物を含む医薬組成物は、核酸、例えばRNA（例えばmRNA、tRNAまたはsiRNA）の、1つまたはそれ以上の特定の細胞、組織、臓器もしくは系またはそれらの群、例えば腎臓系への送達によって提供される治療効果から利益を得ることができるヒト患者を含む任意の対象へ投与することができる。LNP組成物およびLNP組成物を含む医薬組成物の本明細書において提供される説明は、主として、ヒトへの投与に好適である組成物を対象としているが、そのような組成物は、任意の他の哺乳動物への投与について概して好適であることを当業者は理解する。組成物を、様々な動物への投与に好適にするための、ヒトへの投与に好適な組成物の改変は、理解されている。

20

#### 【0379】

本開示による医薬組成物は、原体で、単一の単位用量として、および／または複数の単一の単位用量として調製、包装および／または販売することができる。本明細書において使用される場合、「単位用量」とは、所定の量の有効成分（例えばペイロード）を含む医薬組成物の別個の量である。

#### 【0380】

本発明の医薬組成物は、様々な投与経路および投与方法に好適な様々な形態で調製することができる。例えば、本発明の医薬組成物は、液体剤形（例えばエマルション、マイクロエマルション、ナノエマルション、溶液、懸濁液、シロップおよびエリキシル剤）、注射用形態、固形剤形（例えばカプセル、錠剤、ピル、粉末および顆粒）、局所および／または経皮投与のための剤形（例えば軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ジェル、粉末、溶液、スプレー、吸入薬およびパッチ）、懸濁液、粉末ならびに他の形態で調製することができる。

30

#### 【0381】

経口および非経口投与のための液体剤形は、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、ナノエマルション、溶液、懸濁液、シロップおよび／またはエリキシル剤を含むが、これらに限定されない。有効成分に加えて、液体剤形は、例えば水または他の溶媒などの当該技術分野において通常使用される不活性希釈剤、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルカーボネート、エチルアセテート、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミドなどの可溶化剤および乳化剤、油（特に、綿実油、ピーナッツ油、トウモロコシ油、胚芽油オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセリン、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物を含み得る。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、補助剤、例えば湿潤剤、乳化および懸濁剤、甘味料、香味料ならびに／または香料を含み得る。

40

#### 【0382】

注射用調製物、例えば、滅菌注射用水性または油性懸濁液は、好適な分散剤、湿潤剤および／または懸濁剤を使用して公知の技術分野に従って製剤化することができる。滅菌注射用調製物は、例えば1,3-ブタンジオール中の溶液として、非毒性の非経口で許容さ

50

れる希釈剤および／または溶媒中の滅菌注射用溶液、懸濁液および／またはエマルションであってもよい。用いることができる許容される媒体および溶媒には、水、リンガー液、U.S.P. および等張塩化ナトリウム溶液がある。滅菌不揮発性油は、溶媒または懸濁用媒体として従来から用いられている。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の無刺激性の不揮発性油を用いることができる。脂肪酸、例えばオレイン酸は、注射剤の調製において使用することができる。

#### 【0383】

注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを通した濾過によって、および／または使用前に滅菌水もしくは他の滅菌注射用媒体中に溶解もしくは分散することができる滅菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み入れることによって滅菌することができる。

10

#### 【0384】

他の成分

さらに、医薬組成物は、本発明者において上記で記載されるものに加えて1つまたはそれ以上の成分を含み得ることが企図される。

#### 【0385】

医薬組成物はまた、1つまたはそれ以上の透過性エンハンサー分子、炭水化物、ポリマー、治療薬、表面改質剤または他の成分も含み得る。透過性エンハンサー分子は、例えば、米国特許出願公開第2005/0222064号に記載された分子であり得る。炭水化物は、単糖（例えば、グルコース）および多糖（例えば、グリコーゲンならびにその誘導体および類似体）を含み得る。

20

#### 【0386】

医薬組成物はまた、例えば、アニオン性タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）、界面活性剤（例えば、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミドのような陽イオン性界面活性剤）、糖または糖誘導体（例えば、シクロデキストリン）、ポリマー（例えば、ヘパリン、ポリエチレングリコールおよびポロキサマー）、粘液溶解剤（例えば、アセチルシステイン、ヨモギ、プロメライン、パパイン、クサギ属（*cle rodendr um*）、プロムヘキシシ、カルボシステイン、エブラジノン、メスナ、アンブロキシソール、ソブレロール、ドミオドール、レトステイン、ステプロニン、チオプロニン、ゲルゾリン、チモシンβ4、ドルナーゼアルファ、ネルテネキシシおよびエルドステイン）およびDNアーゼ（例えば、rhDNアーゼ）を含む表面改質剤を含有し得る。表面改質剤は、本明細書に記載される組成物内におよび／またはその表面上に配置できる。

30

#### 【0387】

これらの成分に加えて、本発明のLNP組成物を含有する医薬組成物は、医薬組成物において有用な任意の物質を含み得る。例えば、医薬組成物は、それだけには限らないが、1つまたはそれ以上の溶媒、分散媒、希釈剤、分散助剤、懸濁助剤、造粒助剤、崩壊剤、充填剤、流動促進剤、液体ビヒクル、結合剤、界面活性剤、等張化剤、増粘または乳化剤、緩衝剤、滑沢剤、オイル、保存料および他の種のような1つまたはそれ以上の薬学的に許容される賦形剤または補助成分を含み得る。ワックス、バター、着色剤、コーティング剤、香味料および香料のような賦形剤も含むことができる。薬学的に許容される賦形剤は、当技術分野で周知である（例えば、Remington's (2006)前掲を参照されたい）。

40

#### 【0388】

分散剤は、ジャガイモデンプン、コーンスターチ、タピオカデンプン、デンプングリコール酸ナトリウム、クレイ、アルギン酸、グアーガム、柑橘類果肉、寒天、ベントナイト、セルロースおよび木製品、天然スポンジ、陽イオン交換樹脂、炭酸カルシウム、ケイ酸塩、炭酸ナトリウム、架橋ポリ（ビニルピロリドン）（クロスポビドン）、カルボキシメチルデンプンナトリウム（デンプングリコール酸ナトリウム）、カルボキシメチルセルロース、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム（クロスカルメロース）、メチルセルロース、アルファ化デンプン（デンプン1500）、微晶質デンプン、水不溶性デンプン、カルシウムカルボキシメチルセルロース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム（VEEGUM（登録商標））、ラウリル硫酸ナトリウム、第四級アンモニウム化合物および／ま

50

たはそれらの組合せからなる限定されないリストから選択できる。

【0389】

界面活性剤および／または乳化剤として、それだけには限らないが、天然乳化剤（例えば、アラビアガム、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、コンドラックス（chondrux）、コレステロール、キサンタン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、ワックスおよびレシチン）、コロイド状クレイ（例えば、ベントナイト〔ケイ酸アルミニウム〕およびVEEGUM（登録商標）〔ケイ酸アルミニウムマグネシウム〕）、長鎖アミノ酸誘導体、高分子量アルコール（例えば、ステアリルアルコール、セチルアルコール、オレイルアルコール、モノステアリン酸トリアセチン、ジステアリン酸エチレングリコール、モノステアリン酸グリセリルおよびモノステアリン酸プロピレングリコール、ポリビニルアルコール）、カルボマー（例えば、カルボキシポリメチレン、ポリアクリル酸、アクリル酸ポリマーおよびカルボキシビニルポリマー）、カラゲナン、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、粉末セルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース）、ソルビタン脂肪酸エステル（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート〔TWEEN（登録商標）20〕、ポリオキシエチレンソルビタン〔TWEEN（登録商標）60〕、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート〔TWEEN（登録商標）80〕、ソルビタンモノパルミテート〔SPAN（登録商標）40〕、ソルビタンモノステアレート〔SPAN（登録商標）60〕、ソルビタントリステアレート〔SPAN（登録商標）65〕、グリセリルモノオレエート、ソルビタンモノオレエート〔SPAN（登録商標）80〕）、ポリオキシエチレンエステル（例えば、ポリオキシエチレンモノステアレート〔MYRJ（登録商標）45〕、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエトキシ化ヒマシ油、ポリオキシメチレンステアレートおよびSOLUTOL（登録商標））、スクロース脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル（例えば、CREMOPHOR（登録商標））、ポリオキシエチレンエーテル、（例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル〔BRIJ（登録商標）30〕）、ポリ（ビニルピロリドン）、ジエチレングリコールモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート、オレイン酸ナトリウム、オレイン酸カリウム、オレイン酸エチル、オレイン酸、ラウリン酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、PLURONIC（登録商標）F68、ポロキサマー（登録商標）188、臭化セトリモニウム、セチルピリジニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド、ドキュセートナトリウムおよび／またはそれらの組合せを挙げることができる。

【0390】

保存料の例として、それだけには限らないが、抗酸化物質、キレート化剤、抗菌保存料、抗真菌保存料、アルコール保存料、酸性保存料および／または他の保存料が挙げることができる。抗酸化物質の例として、それだけには限らないが、アルファトコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル（acorbil palmitate）、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、メタ重亜硫酸カリウム、プロピオン酸、没食子酸プロピル、アスコルビン酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウムおよび／または亜硫酸ナトリウムが挙げられる。キレート化剤の例として、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、クエン酸一水和物、エデト酸二ナトリウム、エデト酸二カリウム、エデト酸、フマル酸、リンゴ酸、リン酸、エデト酸ナトリウム、酒石酸および／またはエデト酸三ナトリウムが挙げられる。抗菌保存料の例として、それだけには限らないが、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、プロノポール、セトリミド、塩化セチルピリジニウム、クロルヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、クロロキシレノール、クレゾール、エチルアルコール、グリセリン、ヘキセチジン、イミド尿素、フェノール、フェノキシエタノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀、プロピレングリコールおよび／またはチメロサルが挙げられる。抗真菌保存料の例として、それだけには限らないが、ブチルパラベン、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、

ヒドロキシ安息香酸、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウムおよび／またはソルビン酸が挙げられる。アルコール保存料の例として、それだけには限らないが、エタノール、ポリエチレングリコール、ベンジルアルコール、フェノール、フェノール化合物、ビスフェノール、クロロブタノール、ヒドロキシベンゾエートおよび／またはフェニルエチルアルコールが挙げられる。酸性保存料の例として、それだけには限らないが、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンE、ベータカロテン、クエン酸、酢酸、デヒドロアスコルビン酸、アスコルビン酸、ソルビン酸および／またはフィチン酸が挙げられる。他の保存料として、それだけには限らないが、トコフェロール、酢酸トコフェロール、メシル酸デテロキシム、セトリミド、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、エチレンジアミン、ラウリル硫酸ナトリウム（SLS）、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム（SLES）、重亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、メタ重亜硫酸カリウムが挙げられる。

10

#### 【0391】

緩衝剤の例として、それだけには限らないが、クエン酸バッファー溶液、酢酸バッファー溶液、リン酸バッファー溶液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、グルセプト酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、d-グルコン酸、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、ラクトビオン酸カルシウム、プロパン酸、レブリン酸カルシウム、ペンタン酸、二塩基性リン酸カルシウム、リン酸、三塩基性リン酸カルシウム、水酸化リン酸カルシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、二塩基性リン酸カリウム、一塩基性リン酸カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、アミノスルホネートバッファー（例えば、HEPES）、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、発熱物質不含水、等張性生理食塩水、リンゲル溶液、エチルアルコールおよび／またはそれらの組合せが挙げられる。

20

#### 【0392】

ある特定の実施形態では、脂質ナノ粒子組成物およびその製剤は、静脈内に、筋肉内に、皮内に、皮下に、動脈内に、腫瘍内に、または吸入によって投与するのに適している。ある特定の実施形態では、約0.001mg/kg～約10mg/kgの用量が対象に投与される。本開示に従う組成物は、投与の容易性および投与量の均一性のために投与量単位形態で製剤化できる。しかし、本開示の組成物の総1日使用量は健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されることは理解される。

30

#### 【0393】

任意の特定の患者にとって特定の治療上有効、予防上有効またはそうではない適当な用量レベル（例えば、イメージングのために）は、処置されている障害の重症度およびあるとすれば同定；1つまたはそれ以上の利用されるmRNA；利用される特定の組成物；患者の年齢、体重、全身の健康状態、性別および食事；投与の時間、投与の経路および利用される特定の医薬組成物の排出速度；治療の持続期間；利用される特定の医薬組成物と組み合わせて、または同時に使用される薬物；および医学の技術分野で周知の同様の因子を含む様々な因子に応じて変わる。

40

#### 【0394】

#### VII. 方法

本開示は、ペイロードを標的細胞または組織、例えば、対象における標的細胞または組織に送達する方法およびこのような方法において使用するためのLNPまたはLNPを含む医薬組成物を提供する。

#### 【0395】

ある特定の実施形態では、本発明は、哺乳動物細胞において目的のポリペプチド（例えば、目的のタンパク質）を生成する方法およびこのような方法において使用するためのL

50

N PまたはL N Pを含有する医薬組成物を提供する。このような細胞においてポリペプチドを生成する方法は、細胞を、目的のRNA（例えば、目的のポリペプチド（例えば、目的のタンパク質）をコードするmRNA）を含むL N P組成物と接触させることを含む。細胞をL N P組成物と接触させると、mRNAが細胞に取り込まれ、翻訳されて、目的のポリペプチドを生成する。

【0396】

一般に、哺乳動物細胞を、目的のポリペプチドをコードするmRNAを含むL N P組成物と接触させる工程は、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*で実施できる。細胞と接触されるL N P組成物の量および／または中のmRNAの量は、接触している細胞または組織の種類、投与の手段、L N P組成物および中のmRNAの生理化学的特徴（例えば、サイズ、電荷および化学組成）および他の因子に応じて変わり得る。一般に、L N P組成物の有効量は、細胞における効率的なポリペプチド生成を可能にする。効率の測定基準は、ポリペプチド翻訳（ポリペプチド発現によって示される）、mRNA分解のレベルおよび免疫応答指標を含み得る。

【0397】

mRNAを含むL N P組成物を細胞と接触させる工程は、L N P組成物が細胞の膜と融合して、細胞中へのmRNAの送達を可能にできるトランスフェクションを含み得るまたは引き起こし得る。細胞の細胞質へ導入されると、mRNAは、次いで、細胞の細胞質内でタンパク質合成機構を介してタンパク質またはペプチドに翻訳される。

【0398】

ある特定の実施形態では、対象に治療薬または予防薬を送達するために本明細書に記載されるL N P組成物が使用される。例えば、L N P組成物中に含まれるmRNAは、細胞と接触すると、および／または細胞中に侵入すると（例えば、トランスフェクション）ポリペプチドをコードし、治療用または予防用ポリペプチドを生成し得る。ある特定の実施形態では、本発明のL N P組成物中に含まれるmRNAは、対象の免疫性を改善または増大し得るポリペプチドをコードし得る。

【0399】

ある特定の実施形態では、細胞を、mRNAを含むL N P組成物と接触させることは、外因性核酸に対する細胞の自然免疫応答を低減し得る。細胞を第1の量の翻訳可能領域を含む第1の外因性mRNAを含む第1のL N P組成物と接触させることができ、第1の外因性mRNAに対する細胞の自然免疫応答のレベルを決定できる。その後、細胞を第2の量の第1の外因性mRNAを含む第2の組成物と接触させることができ、第2の量は、第1の量と比較してより少ない量の第1の外因性mRNAである。あるいは、第2の組成物は、第1の外因性mRNAとは異なっている第1の量の第2の外因性mRNAを含み得る。細胞を第1のおよび第2の組成物と接触させる工程は、反復される1回またはそれ以上の回数であり得る。

【0400】

さらに、細胞におけるポリペプチド生成の効率を場合により決定でき、標的タンパク質生成効率が達成されるまで、細胞を第1のおよび／または第2の組成物と反復して再接触させることができる。

【0401】

本開示は、哺乳動物細胞または組織、例えば、対象における哺乳動物細胞または組織に核酸（例えば、mRNA）を送達する方法を提供する。このような細胞または組織へのmRNAの送達は、例えば、注射によって、例えば、対象への筋肉内注射または血管内送達を介してmRNAを含むL N P組成物を対象へ投与することを含む。投与後、L N Pは、細胞、例えば、T細胞のような免疫細胞を標的とする、および／または接触することができる。細胞をL N P組成物と接触させると、翻訳可能mRNAは、細胞において翻訳されて、目的のポリペプチドを生成する。

【0402】

ある特定の実施形態では、本発明のL N P組成物は、特定の種類またはクラスの細胞を

標的とすることができる。この標的化は、目的の細胞を標的化するための標的化基も含む L N P を形成する本明細書に記載される脂質を使用して促進される。ある特定の実施形態では、特異的送達、別の目的地（例えば、発現しない、または低レベルでのみ目的の受容体を発現する細胞）と比較して、標的とされる目的地（例えば、L N P の免疫細胞標的化基に結合する目的の受容体を発現する、または高レベルで発現する細胞）への m R N A の量の 2 倍、5 倍、10 倍、15 倍または 20 倍より多い増大をもたらす得る。

#### 【0403】

本発明の L N P 組成物は、失われているまたは異常なタンパク質もしくはポリペプチド活性を特徴とする疾患、障害または状態を処置するために有用であり得る。細胞に失われているまたは異常なポリペプチドをコードする m R N A を送達すると、m R N A の翻訳によってポリペプチドが生成され、それによって、ポリペプチドによって引き起こされる活性がないことまたは異常な活性によって引き起こされた問題を低減または排除できる。翻訳は迅速に生じ得るので、本発明の方法および組成物は、敗血症、卒中および心筋梗塞のような急性疾患、障害または状態の処置において有用であり得る。本発明の L N P 組成物中に含まれる m R N A はまた、所与の種の転写の速度を変更可能であり、それによって遺伝子発現に影響を及ぼし得る。

#### 【0404】

本発明の組成物が投与される、機能障害性または異常なタンパク質またはポリペプチド活性を特徴とする疾患、障害および／または状態として、それだけには限らないが、がんおよび増殖性疾患、遺伝病（例えば、嚢胞性線維症）、自己免疫疾患、糖尿病、神経変性疾患、心-および腎-血管疾患ならびに代謝性疾患が挙げられる。複数の疾患、障害および／または状態は、失われている（または実質的に減少し、その結果、適切なタンパク質機能が生じない）タンパク質活性を特徴とし得る。このようなタンパク質が存在しない場合もあり、それらは本質的に非機能性であり得る。機能障害性タンパク質の具体例として、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（C F T R）遺伝子のミスセンス突然変異バリエーションがあり、これは、C F T R タンパク質の機能障害性タンパク質バリエーションを生成し、嚢胞性線維症を引き起こす。本開示は、m R N A ならびに K L 10、リン脂質（場合により、不飽和）、P E G 脂質および構造脂質を含む脂質成分を含む L N P 組成物を投与することによって、対象においてこのような疾患、障害および／または状態を処置する方法を提供し、m R N A は、対象の細胞において存在する異常なタンパク質活性をアンタゴナイズする、またはそうではなく克服するポリペプチドをコードする。

#### 【0405】

本明細書に記載される治療用および／または予防用組成物は、疾患、障害および／もしくは状態を防止、処置、診断もしくはイメージングするために、ならびに／または任意の他の目的のために有効な任意の合理的な量および任意の投与経路を使用して対象に投与できる。所与の対象に投与される特定の量は、対象の種、年齢および全身状態、投与の目的、特定の組成物、投与様式などに応じて変わり得る。本開示に従う組成物は、投与の容易性および投与量の均一性のために投与量単位形態で製剤化できる。しかし、本開示の組成物の総 1 日使用量は健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されることは理解される。

#### 【0406】

1 つまたはそれ以上の m R N A を含む L N P 組成物は、様々な経路によって、例えば、経口的に、静脈内に、筋肉内に、動脈内に、髄内に、くも膜下腔内に、皮下に、脳室内に、経皮的にまたは皮内に、皮内に、直腸性に、腔内に、腹膜内に、局所的に、粘膜に、経鼻的に、腫瘍内に投与できる。ある特定の実施形態では、L N P 組成物は、静脈内に、筋肉内に、皮内に、動脈内に、腫瘍内にまたは皮下に投与できる。しかし、本開示は、薬物送達の科学の進歩の可能性を考慮して任意の適切な経路による本発明の L N P 組成物の送達を包含する。一般に、最も適切な投与経路は、1 つまたはそれ以上の m R N A を含む L N P 組成物の性質（例えば、血流および消化管のような種々の身体環境におけるその安定性）、患者の状態（例えば、患者が特定の投与経路を許容できるか否か）などを含む様々

な因子に応じて変わる。

【0407】

ある特定の実施形態では、本開示に従う組成物は、所与の用量中、約0.0001mg/kg～約10mg/kg、約0.001mg/kg～約10mg/kg、約0.005mg/kg～約10mg/kg、約0.01mg/kg～約10mg/kg、約0.05mg/kg～約10mg/kg、約0.1mg/kg～約10mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kg、約2mg/kg～約10mg/kg、約5mg/kg～約10mg/kg、約0.0001mg/kg～約5mg/kg、約0.001mg/kg～約5mg/kg、約0.005mg/kg～約5mg/kg、約0.01mg/kg～約5mg/kg、約0.05mg/kg～約5mg/kg、約0.1mg/kg～約5mg/kg、約1mg/kg～約5mg/kg、約2mg/kg～約5mg/kg、約0.0001mg/kg～約2.5mg/kg、約0.001mg/kg～約2.5mg/kg、約0.005mg/kg～約2.5mg/kg、約0.01mg/kg～約2.5mg/kg、約0.05mg/kg～約2.5mg/kg、約0.1mg/kg～約2.5mg/kg、約1mg/kg～約2.5mg/kg、約2mg/kg～約2.5mg/kg、約0.0001mg/kg～約1mg/kg、約0.001mg/kg～約1mg/kg、約0.005mg/kg～約1mg/kg、約0.01mg/kg～約1mg/kg、約0.05mg/kg～約1mg/kg、約0.1mg/kg～約1mg/kg、約0.0001mg/kg～約0.25mg/kg、約0.001mg/kg～約0.25mg/kg、約0.005mg/kg～約0.25mg/kg、約0.01mg/kg～約0.25mg/kg、約0.05mg/kg～約0.25mg/kgまたは約0.1mg/kg～約0.25mg/kgの組成物を送達するのに十分な投与量レベルで投与でき、1mg/kgの用量は、対象の体重1kgあたり1mgの組成物を提供する。

10

20

【0408】

特定の実施形態では、約0.001mg/kg～約10mg/kgの用量の本発明のLNP組成物を投与できる。他の実施形態では、約0.005mg/kg～約2.5mg/kgの用量のLNP組成物を投与できる。ある特定の実施形態では、約0.1mg/kg～約1mg/kgの用量を投与できる。他の実施形態では、約0.05mg/kg～約0.25mg/kgの用量を投与できる。所望のレベルのmRNA発現および/または治療効果、診断効果、予防効果もしくはイメージング効果を得るために、用量を1日あたり1回またはそれ以上の回数、同一または異なる量で投与できる。所望の投与量を例えば、1日に3回、1日に2回、1日1回、隔日で、3日に1回、毎週、2週間毎に、3週間毎に、または4週間毎に送達できる。ある特定の実施形態では、所望の投与量は、複数の投与（例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回またはそれより多い投与）を使用して送達できる。一部の実施形態では、例えば、外科手術手技の前もしくは後に、または急性疾患、障害もしくは状態の場合に単回用量を投与できる。

30

【0409】

1つまたはそれ以上のmRNAを含むLNP組成物を、1つまたはそれ以上の他の治療剤、予防剤、診断剤または造影剤と組み合わせて使用できる。「と組み合わせて」とは、薬剤を同時に投与しなければならない、および/または一緒に送達するために製剤化しなければならないことを意味するものではないが、これらの送達方法が本開示の範囲内である。例えば、1つまたはそれ以上の異なるmRNAを含む1つまたはそれ以上のLNP組成物は、組合せで投与できる。組成物は、1つまたはそれ以上の他の所望の治療薬または医学的手順と同時に、その前に、またはその後に投与できる。一般に、各薬剤は、その薬剤のために決定された用量でおよび/またはタイムスケジュールで投与される。一部の実施形態では、本開示は、そのバイオアベイラビリティを改善する、その代謝を低減する、および/もしくは改変する、その排出を阻害する、ならびに/または身体内のその分布を改変する薬剤と組み合わせた本発明の組成物またはそのイメージング用、診断用もしくは予防用組成物の送達を包含する。

40

50

## 【0410】

組み合わせて利用される治療上、予防上、診断上活性またはイメージング活性薬剤は、単一組成物と一緒に投与できる、または異なる組成物で別個に投与できるということはさらに理解されるであろう。一般に、組み合わせて利用される薬剤は、それらが個々に利用されるレベルを超えないレベルで利用されることが予測される。一部の実施形態では、組み合わせて利用されるレベルは、個々に利用されるものよりも低い場合がある。

## 【0411】

併用レジメンにおいて利用するための療法（治療薬または手順）の特定の組合せは、所望の治療薬および／または手順の適合性および達成されるべき所望の治療効果を考慮する。利用される療法は、同一障害のための所望の効果を達成できる（例えば、がんを処置するのに有用な組成物を化学療法薬と同時に投与できる）、またはそれらは異なる効果を達成できる（例えば、任意の有害効果の制御）ということは理解されるであろう。

10

## 【0412】

一部の実施形態では、送達の目的地であるとされない細胞の1%以下、2%以下、3%以下、4%以下、5%以下、6%以下、7%以下、8%以下、9%以下、10%以下、15%以下、20%以下、25%以下、30%以下、35%以下、40%以下、45%以下または50%以下が、LNPによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、送達の目的地であるとされない細胞は、対象の非免疫細胞である。一部の実施形態では、送達の目的地であるとされない細胞は、方法によって標的化されない細胞である。一部の実施形態では、送達の目的地であるとされない細胞は、方法によって標的化されない対象の細胞である。

20

## 【0413】

一部の実施形態では、免疫細胞に本明細書に記載されるLNPによって送達される核酸またはLNPによって送達される核酸によってコードされ、免疫細胞において発現されるポリペプチドの半減期は、免疫細胞に参照LNPによって送達される核酸または参照LNPによって送達される核酸によってコードされ、免疫細胞において発現されるポリペプチドの半減期よりも少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍または少なくとも5倍長い。

30

## 【0414】

一部の実施形態では、LNPの組成物は、イオン化可能なカチオン性脂質のタイプ、イオン化可能なカチオン性脂質の相対量、PEG脂質中の脂質アンカーの長さ、PEG脂質の骨格もしくは頭基、PEG脂質の相対量、または免疫細胞標的化基のタイプ、またはその任意の組合せにおいて参照LNPの組成物と異なる。一部の実施形態では、LNPの組成物は、イオン化可能なカチオン性脂質のタイプだけで参照LNPの組成物と異なる。一部の実施形態では、LNPの組成物は、PEG脂質の量だけで参照LNPの組成物と異なる。一部の実施形態では、参照LNPはカチオン性脂質DLin-MC3-DMAまたは脂質7を含むが、それ以外は試験されたLNPと同じである。一部の実施形態では、PEG脂質は遊離PEG脂質である。

40

## 【0415】

一部の実施形態では、免疫細胞の少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、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90%、または少なくとも95%はLNPによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、免疫細胞は、対象の免疫細胞である。一部の実施形態では、免疫細胞は、本方法の標的である免疫細胞である。一部の実施形態では、免疫細胞は、本方法の標的である対象の免疫細胞である。

50

## 【0416】

一部の実施形態では、LNPによって送達される核酸の発現レベルは、参照LNPによって送達される核酸の発現レベルと比べて、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、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倍または少なくとも10倍高い。一部の実施形態では、発現レベルは測定され、本明細書に記載される方法と比較される。一部の実施形態では、発現レベルはコードされたポリペプチドを発現する細胞の比によって測定される。一部の実施形態では、発現レベルは、FACSで測定される。一部の実施形態では、発現レベルは、細胞の中で発現されるコードされたポリペプチドの平均の量によって測定される。一部の実施形態では、発現レベルは平均の蛍光強度で測定される。一部の実施形態では、発現レベルは、細胞によって分泌されるコードされたポリペプチドまたは他の物質の量によって測定される。

10

## 【0417】

別の態様では、本明細書で、対象の免疫細胞を核酸の送達の標的にする方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、免疫細胞を脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、以下の式：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞標的化基]の化合物を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール(PEG)脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。

20

## 【0418】

一部の実施形態では、本開示のある態様は、対象の免疫細胞を核酸の送達の標的にする方法で使用するための、本明細書で開示されるLNPまたはそれを含有する医薬組成物に関する。そのような方法は、この後開示されるような疾患または障害の処置のためであってよい。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、対象の免疫細胞をインビトロまたはエキスピボで脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含むことができる。一部の実施形態では、LNPは、ここで本開示に記載されるLNPである。

30

## 【0419】

一部の実施形態では、LNPは以下の利益：

- (i) 参照LNPと比較した免疫細胞への標的化送達の特異性の増加；
  - (i i) 参照LNPと比較した免疫細胞中の核酸または核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
  - (i i i) 参照LNPと比較したトランスフェクション率の増加；および
  - (i v) 色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル(<15%)および高いRNA封入効率であって、LNPバッチ製造で使用する全RNAに対して最終製剤で少なくとも80%のmRNAが回収されたこと
- の少なくとも1つを提供する。

40

## 【0420】

一部の態様では、対象の標的化免疫細胞中で目的のポリペプチドを発現させる方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、免疫細胞を脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質] - [任意選択のリンカー] - [免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール(PEG)脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、ポリペプチドをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、

50

本開示のある態様は、対象の標的化免疫細胞で目的のポリペプチドを発現させる方法で使用するための、本明細書で開示されるLNPまたはそれを含有する医薬組成物に関する。そのような方法は、この後開示されるような疾患または障害の処置のためであってよい。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、対象の免疫細胞をインビトロまたはエキスピボで脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含むことができる。

#### 【0421】

一部の実施形態では、LNPは以下の利益：

- (i) 参照LNPと比較した免疫細胞中の発現レベルの増加；
  - (ii) 参照LNPと比較した免疫細胞中の発現の特異性の増加；
  - (iii) 参照LNPと比較した免疫細胞中の核酸または核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
  - (iv) 参照LNPと比較したトランスフェクション率の増加；および
  - (v) 色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル（＜15％）および高いRNA封入効率であって、LNPバッチ製造で使用される全RNAに対して最終製剤で少なくとも80％のmRNAが回収されたこと
- の少なくとも1つを提供する。

#### 【0422】

一部の態様では、対象の標的免疫細胞の細胞機能をモジュレートする方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、対象に脂質ナノ粒子（LNP）を投与することを含む。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：[脂質]－[任意選択のリンカー]－[免疫細胞標的化基]を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは免疫細胞の細胞機能をモジュレートするためのポリペプチドをコードする核酸を含む。一部の実施形態では、本開示のある態様は、対象の標的化免疫細胞の細胞機能をモジュレートする方法で使用するための、本明細書で開示されるLNPまたはそれを含有する医薬組成物に関する。そのような方法は、この後開示されるような疾患または障害の処置のためであってよい。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、対象の免疫細胞をインビトロまたはエキスピボで脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含むことができる。

#### 【0423】

一部の実施形態では、LNPは以下の利益：

- (i) 参照LNPと比較した免疫細胞中の発現レベルの増加；
  - (ii) 参照LNPと比較した免疫細胞中の発現の特異性の増加；
  - (iii) 参照LNPと比較した免疫細胞中の核酸または核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
  - (iv) 参照LNPと比較したトランスフェクション率の増加；
  - (v) LNPは、免疫細胞で同じ生物学的作用に到達するために参照LNPと比較してより低い用量で投与することができること；および
  - (vi) 色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル（＜15％）および高いRNA封入効率であって、LNPバッチ製造で使用される全RNAに対して最終製剤で少なくとも80％のmRNAが回収されたこと
- の少なくとも1つを提供する。

#### 【0424】

一部の実施形態では、細胞機能のモジュレーションは、免疫応答を開始するために免疫細胞を再プログラムすることを含む。一部の実施形態では、細胞機能のモジュレーションは免疫細胞の抗原特異性をモジュレートすることを含む。

#### 【0425】

一部の態様では、それを必要とする対象で障害または疾患の症状を処置、改善または予

10

20

30

40

50

防する方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、対象の免疫細胞に核酸を送達するための脂質ナノ粒子（LNP）を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは以下の構造：〔脂質〕－〔任意選択のリンカー〕－〔免疫細胞標的化基〕を含むコンジュゲートを含む。一部の実施形態では、LNPは、ステロールまたは他の構造脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは中性リン脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは、遊離ポリエチレングリコール（PEG）脂質を含む。一部の実施形態では、LNPは核酸を含む。

#### 【0426】

一部の実施形態では、核酸は免疫細胞の免疫応答をモジュレートし、これによって症状を処置または改善する。一部の実施形態では、本開示のある態様は、それを必要とする対象で障害または疾患の症状を処置、改善または予防する方法で使用するための、本明細書で開示されるLNPまたはそれを含有する医薬組成物に関する。疾患または障害は、この後開示されるようなものであってよい。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、対象の免疫細胞をインビトロまたはエクスピボで脂質ナノ粒子（LNP）と接触させることを含むことができる。

#### 【0427】

一部の実施形態では、LNPは以下の利益：

- （i）参照LNPと比較した免疫細胞への核酸の送達の特異性の増加；
  - （ii）参照LNPと比較した免疫細胞中の核酸または核酸によってコードされるポリペプチドの半減期の増加；
  - （iii）参照LNPと比較したトランスフェクション率の増加；
  - （iv）LNPは、同じ処置効果に到達するために参照LNPと比較してより低い用量で投与することができること；
  - （v）参照LNPと比較した免疫細胞による機能獲得のレベルの増加；および
  - （vi）色素がアクセス可能なmRNAの低いレベル（＜15％）および高いRNA封入効率であって、LNPバッチ製造で使用する全RNAに対して最終製剤で少なくとも80％のmRNAが回収されたこと
- の少なくとも1つを提供する。

#### 【0428】

一部の実施形態では、障害は免疫障害、炎症性障害またはがんである。一部の実施形態では、核酸は、病原体による感染症の処置または予防のための治療的または予防的ワクチンで使用するための抗原をコードする。

#### 【0429】

一部の実施形態では、非免疫細胞の1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％または10％以下が、LNPによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、送達の予定される目的地ではない望ましくない免疫細胞の1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％または10％以下がLNPによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、免疫細胞にLNPによって送達される核酸またはLNPによって送達される核酸によってコードされるポリペプチドの半減期は、免疫細胞へ参照LNPによって送達される核酸または参照LNPによって送達される核酸によってコードされるポリペプチドの半減期と比べて、少なくとも5％、10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍またはそれ以上長い。

#### 【0430】

一部の実施形態では、少なくとも5％、少なくとも10％、少なくとも15％、少なくとも20％、少なくとも25％、少なくとも30％、少なくとも35％、少なくとも40％、少なくとも45％、少なくとも50％、少なくとも55％、少なくとも60％、少なくとも65％、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90％、少なくとも95％またはそれ以上の送達の予定目的地である免疫細胞が、LNPによってトランスフェクトされる。

## 【0431】

一部の実施形態では、LNPによって送達される核酸の発現レベルは、参照LNPによって送達される同じ免疫細胞中の核酸の発現レベルと比べて、少なくとも5%、少なくとも10%、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍またはそれ以上高い。

## 【0432】

一部の態様では、対象の免疫細胞を核酸の送達の標的にする方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、免疫細胞を本明細書で提供される脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。一部の実施形態では、本方法は、NK細胞を標的にするためのものである。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基はCD56に結合する。一部の実施形態では、本方法は、T細胞およびNK細胞を同時に標的にするためのものである。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、CD7、CD8、またはCD7およびCD8の両方に結合する。一部の実施形態では、本方法は、CD4+およびCD8+T細胞を同時に標的にするためのものである。一部の実施形態では、免疫細胞標的化基は、CD3またはCD7に結合するポリペプチドを含む。

10

## 【0433】

一部の態様では、対象の標的化免疫細胞中で目的のポリペプチドを発現させる方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、免疫細胞を本明細書で提供される脂質ナノ粒子(LNP)と接触させることを含む。

## 【0434】

一部の態様では、対象の標的免疫細胞の細胞機能をモジュレートする方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、対象に本明細書で提供される脂質ナノ粒子(LNP)を投与することを含む。

20

## 【0435】

一部の態様では、それを必要とする対象で障害または疾患の症状を処置、改善または予防する方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、対象に本明細書で提供される脂質ナノ粒子(LNP)を投与することを含む。

## 【0436】

一部の態様では、対象でCD8に関連した疾患または障害を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、本方法は、本明細書に記載される組成物を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、疾患または障害はがんである。

30

## 【0437】

本開示で開示され請求されるLNPは、上記の方法に好適である。

## 【0438】

## V I I I . 医療適用で使用するためのキット

本発明の別の態様は、障害を処置するためのキットを提供する。キットは、以下を含む：イオン化可能なカチオン性脂質、脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲート、封入されたペイロード(例えば、mRNA)の有る無しのイオン化可能なカチオン性脂質および／または脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートを含む脂質ナノ粒子組成物、およびがんまたは微生物もしくはウイルス感染症などの医療障害を処置するための使用説明書。

40

## 【実施例】

## 【0439】

本発明を以下で一般的に記載するが、単に本発明のある特定の態様および実施形態を示す目的で含まれるものであり、本発明を限定することを意図するものではない以下の実施例を参照することによってより容易に理解されるであろう

## 【実施例1】

## 【0440】

## イオン化可能なカチオン性脂質の調製

この実施例は、種々のカチオン性脂質の合成を記載する。

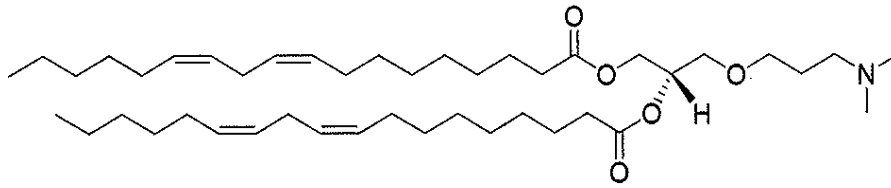
## 【0441】

50

## カチオン性脂質 1

以下の式

【化 5 5】

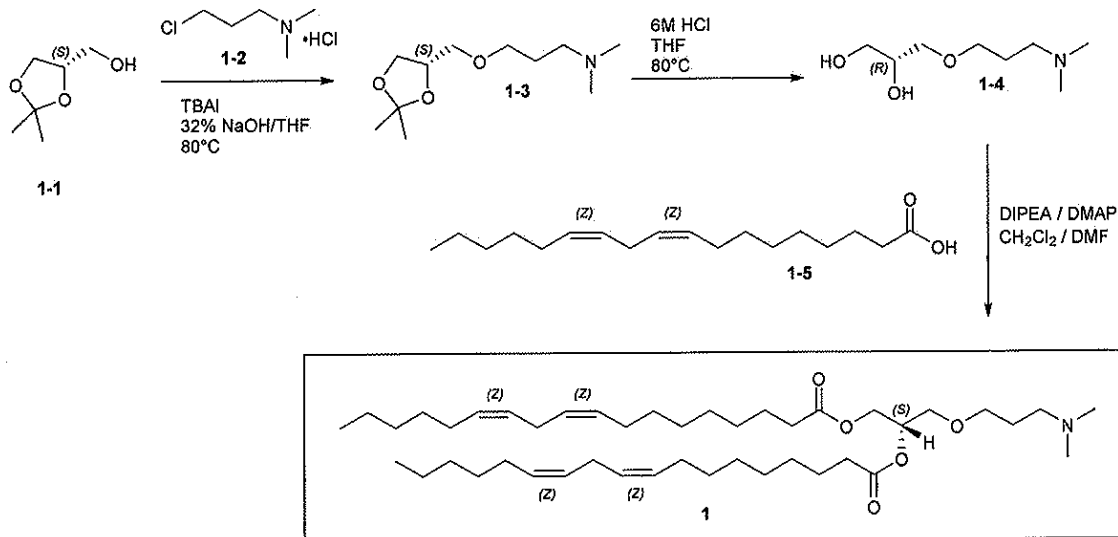


10

に示されるカチオン性脂質 1 の合成は、以下のスキーム 1

【0 4 4 2】

【化 5 6】



20

(スキーム 1)

に記載されるように調製した。

【0 4 4 3】

エーテル中間体 1-3 は、ヒドロキシ官能基の保護された 1, 2-ジオール出発材料 (1-1) (0.151 mol, 24 g) を、ジメチルアミノプロピルクロリド、化合物 1-2 (0.051 mol, 24 g, 1 当量) および TBAI (0.0015 mol, 554 mg, 0.01 当量) と NaOH (32%) / THF の存在下、80°C で一晩反応させることによって調製し、エーテル中間体化合物 1-3 (20.1 g, 0.1 mol) を得た。その後、化合物 1-3 (2.2 g, 0.01 mol) を脱保護して (THF、6M HCl、4 時間)、隣接ジオール中間体化合物 1-4 (1.6 g, 0.009 mol) を定量的収率で得た。化合物 1-4 (1.12 g, 0.006 mol) を、脂肪酸 1-5 (5.9 mL 0.018 mol, 3 当量) を使用して、DCM 中の 10 当量の EQ DIPEA を使用して、EDC (3.8 g, 0.019 mol, 3.2 当量) を使用してビスアシル化して、脂質化合物 1 (238 mg, 0.0034 mol) を得た。脂質化合物 1 を、分取 HPLC (CombiFlash Nextgen 300+ Teledyne ISCO) によって精製し、最終生成物純度は、98% (Durashell-C18、4.6 × 50 mm、3 μM、カタログ番号 DC930505-0 を使用する RP-HPLC-ELSD) であった。

40

【0 4 4 4】

精製された脂質 1 遊離塩基 (C<sub>44</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>5</sub>、分子量 702.12 g/mol) を、図 1 で示されるように CDCl<sub>3</sub> におけるプロトン NMR 分光法 (400 MHz) に

50

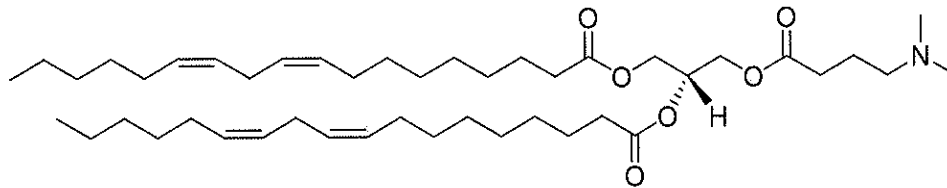
よって、ならびに図 2 A および 2 B で示されるように構造 (NMR、 $m/z$ ) および純度 (NMR、LC) を確認するために LC-MS によって特性決定した。

【0445】

カチオン性脂質 2

以下の式

【化 57】

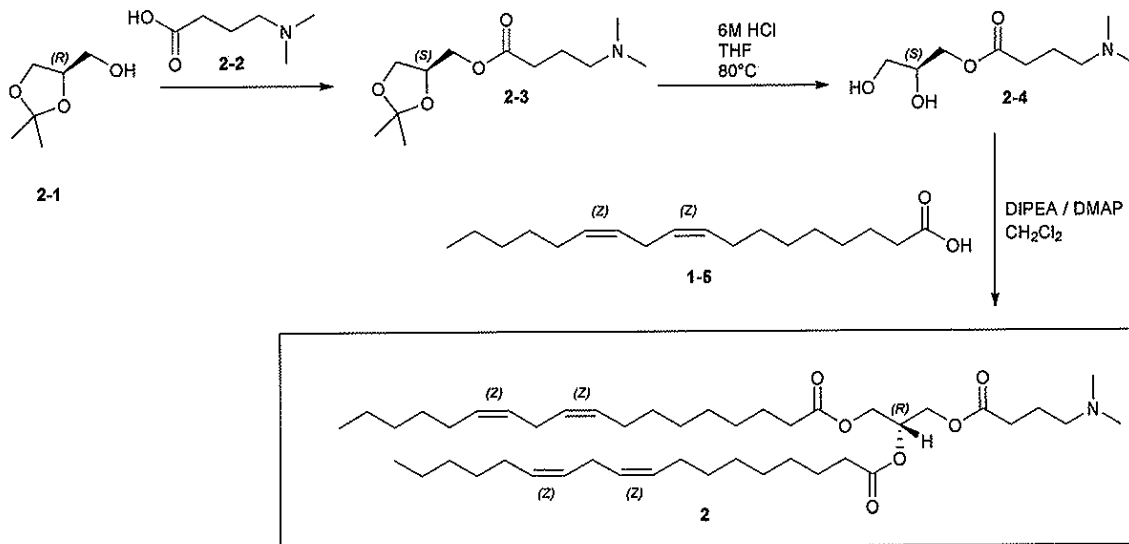


10

に示されるカチオン性脂質 2 の合成は、以下のスキーム 2

【0446】

【化 58】



20

30

(スキーム 2)

に記載されるように調製した。

【0447】

エステル中間体 2-3 を、保護された 1, 2-ジオール (1, 2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -グリセリン) 出発材料 (2-1) を、DCM (300 mL) 溶液中の EDCI (0.03 mol、5.73 g、1 当量)、DIPEA (0.12 mol、12.9 g、4.0 当量) および DMAP (0.006 mol、733 mg、0.2 当量) を使用してジメチルアミノブタン酸化合物 2-2 (0.03 mol、4.19 g、0.03 当量) を用いてアシル化することによって調製して、5.44 g (0.02 mol) の 2-3 を得た。中間体 2-3 (670 mg、0.0027 mol、1.0 当量) を、10 mL の TFA / 水 (50 : 50 v / v) および 10 mL の 6 M HCl の混合物中、室温で脱保護して、560 mg (0.0027 mol) の化合物 2-4 を得た。化合物 2-4 (0.003 mol、641 mg、1 当量) を、EDC (0.009 mol、1.72 g、1 当量)、DIPEA (0.001 mol、122 mg、0.33 当量) を使用して 50 mL の DCM 中の脂肪酸 1-5 (0.009 mol、2.52 g、3 当量) を用いてエステル化して、カチオン性脂質 2 (260 mg、0.0003 mol) を得た。

40

【0448】

脂質化合物 2 を分取 HPLC によって精製した。得られた生成物は、99% よりも高く

50

純粋であった（DurasHELL-C18、 $4.6 \times 50$  mm、 $3 \mu\text{M}$ 、カタログ番号DC930505-0を使用する逆相HPLC-ELSD）。

【0449】

精製された脂質2遊離塩基（ $\text{C}_{45}\text{H}_{79}\text{NO}_6$ 、分子量 $730.10 \text{ g/mol}$ ）を、図3で示されるように $\text{CDCl}_3$ におけるプロトンNMR分光法（ $400 \text{ MHz}$ ）によって、ならびに図4Aおよび4Bで示されるように構造（NMR、 $m/z$ ）および純度（NMR、LC）を確認するためにLC-MSによって特性決定した。

【0450】

脂質6を、脂質2のために使用されたジメチルアミノブタン酸の代わりに、ジエチルアミノブタン酸を使用して第三級アミンヘッド基を生成した点を除いて、脂質2の合成と類似の方法を使用して合成した。

【0451】

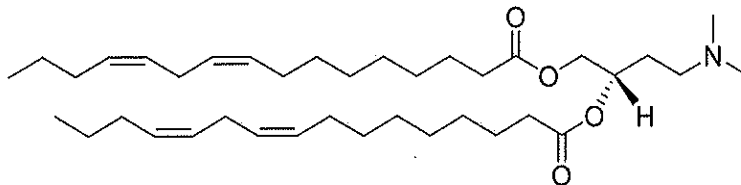
精製された脂質6を、図41で示されるようにプロトンNMR分光法によって、ならびに図42Aおよび42Bで示されるように質量分析および逆相HPLCによって特性決定した。

【0452】

カチオン性脂質3

以下の式

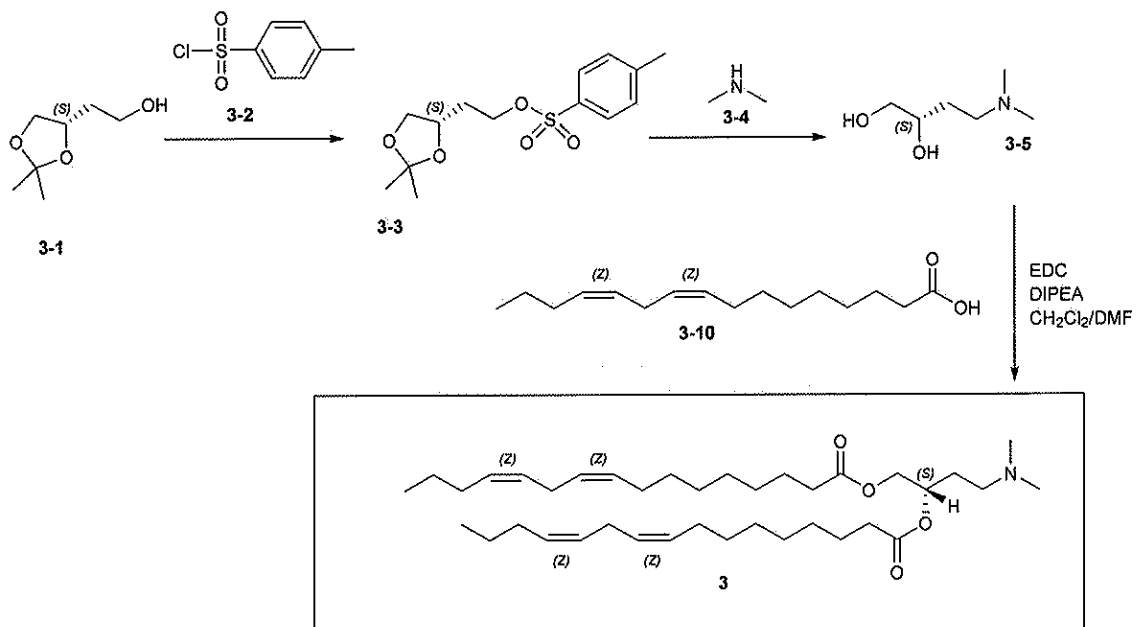
【化59】



に示されるカチオン性脂質3の合成は、以下のスキーム3

【0453】

【化60】



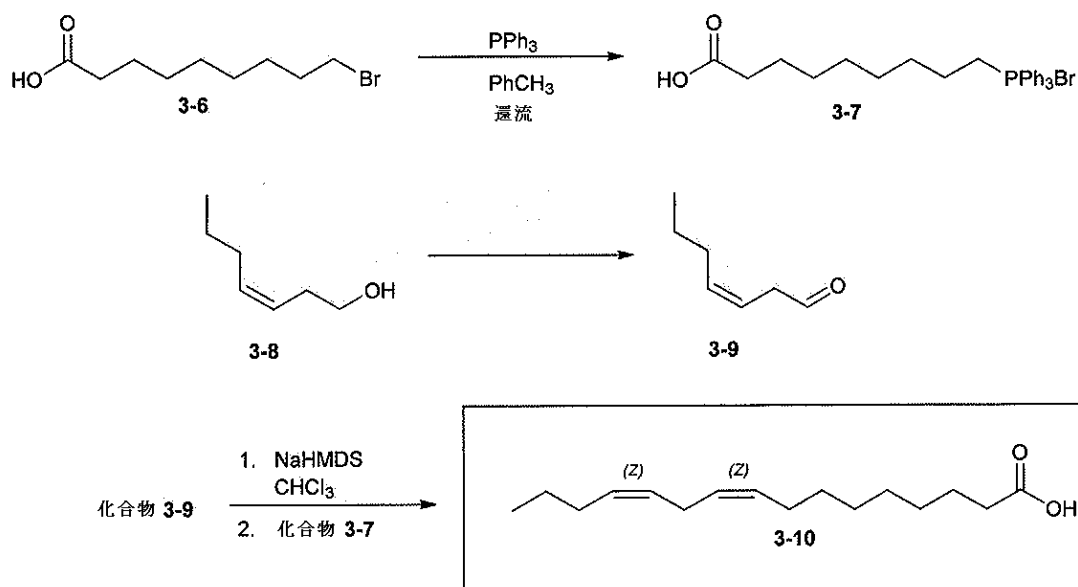
（スキーム3）

に記載されるように調製した。

【0454】

脂肪酸 3-10 は、以下のスキーム 3 a :

【化 6 1】



10

(スキーム 3 a)

20

を使用して調製した。

【0455】

脂肪酸 3-10 (9Z, 12Z)-ヘキサデカ-9, 12-ジエン酸は、スキーム 3 a に示されるようなウィティッヒ反応アプローチを使用して合成した。化合物 3-7 を生成するために、9-ブロモノナン酸 (0.0148 mol, 3.50 g) を 5 mL のトルエン中の PPh<sub>3</sub> (0.0148 mol, 3.87 g, 1 当量) と組合せ、48 時間還流させて、7.23 g の臭化ホスホニウム 3-7 を得た。化合物 3-9 を生成するために、化合物 3-8 (0.0076 mol, 0.87 g) を 20 mL の DCM 中のデスーマーチンペルヨージナン (0.0082 mol, 3.48 g, 1.1 当量) を使用して酸化して、アルデヒド 0.85 g の 3-9 を得た。化合物 3-9 (0.0076 mol, 0.85 g) を、60 mL の THF 中の 7.6 mL の 40% NaHMDS 中の化合物 3-7 (0.0076 mol, 3.78 g, 1 当量) と反応させて、400 mg の脂肪酸 3-10 を得た。

30

【0456】

スキーム 3 に示されるように、中間体 3-3 を、室温で 250 mL の DCM 中の塩化トリシル (3-2) (0.034 mol, 6.5 g, 1 当量) およびトリエチルアミン (0.034 mol, 4.9 mL, 1 当量)、DMAP (0.011 mol, 200 mg, 0.3 当量) を使用して、保護された 1, 2, 4-ブタントリオール出発材料 (3-1) (0.0342 mol, 5.0 g, 1 当量) 上の遊離ヒドロキシルのトシル化によって生成した。化合物 3-3 (0.0032 mol, 1.0 g, 1 当量) の、16.6 mL の THF 中のジメチルアミン (0.03 mol, 1.5 g, 10 当量) を用いる求核置換によって、400 mg の第三級アミン 3-4 を得た。化合物 3-4 を MeOH 中の 2 M HCl を用いて脱保護した、410 mg の化合物 3-5 を得た。化合物 3-5 (90 mg) を、5.4 mL の DCM 中の EDC (0.0018 mol, 306 mg, 3 当量)、DIPEA (0.0024 mol, 8.8 mL, 4.5 当量) を使用し、脂肪酸 3-10 (0.0016 mol, 400 mg, 3 当量) を用いて 2 時間エステル化して、12 mg のイオン化可能な脂質 3 を得た。脂質化合物 3 を分取 HPLC によって精製した。

40

【0457】

脂質化合物 3 を分取 HPLC (CombiFlash Nextgen 300+ Teledyne ISCO) によって精製した。逆相 HPLC-ELSD (Durash

50

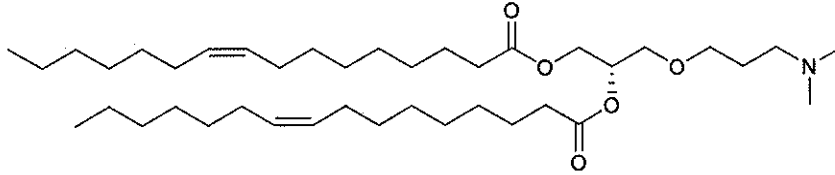
e l l - C 1 8、4.6 × 50 mm、3 μ M、カタログ番号 D C 9 3 0 5 0 5 - 0 を使用する) によって 99 % の生成物純度が決定された。

【 0 4 5 8 】

カチオン性脂質 4

以下の式

【 化 6 2 】

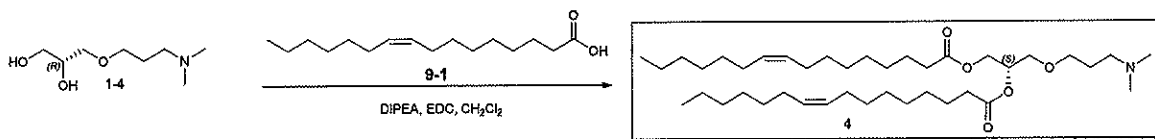


10

に示されるカチオン性脂質 4 の合成は、以下のスキーム 4

【 0 4 5 9 】

【 化 6 3 】



20

(スキーム 4)

に記載されるように調製した。

【 0 4 6 0 】

脂肪酸 9-1 は、9-ブロモノナン酸へプタナル出発材料を使用する上記の脂肪酸 4-6 の合成のために使用されたものと類似のプロトコールを使用して合成した。

【 0 4 6 1 】

脂肪酸 9-1 (0.01 mol、2.14 g、3 当量) による 1-4 (0.003 mol、600 mg) のビス-アシル化は、7 mL の DCM 中の EDC (0.009 mol、1.7 g、3.2 当量)、DIPEA (0.009 mol、2.45 mL、3.2 当量) を使用して進行し、203 mg のイオン化可能な脂質 4 (質量、収率) を提供した。脂質化合物 4 を分取 HPLC (CombiFlash Nextgen 300 + Teledyne ISCO) によって精製し、99 % 純粋な生成物 (Durashell-C18、4.6 × 50 mm、3 μ M、カタログ番号 DC930505-0 を使用する HPLC-ELSD) を得た。

30

【 0 4 6 2 】

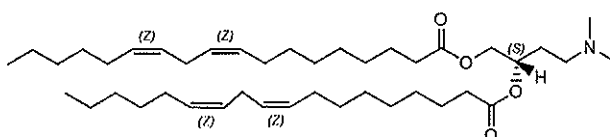
精製された脂質 4 を、図 6 に示されるようなプロトン NMR 分光法によって、ならびに図 7 A および 7 B で示されるような質量分析および逆相 HPLC によって特性決定した。

【 0 4 6 3 】

カチオン性脂質 5

以下の式

【 化 6 4 】



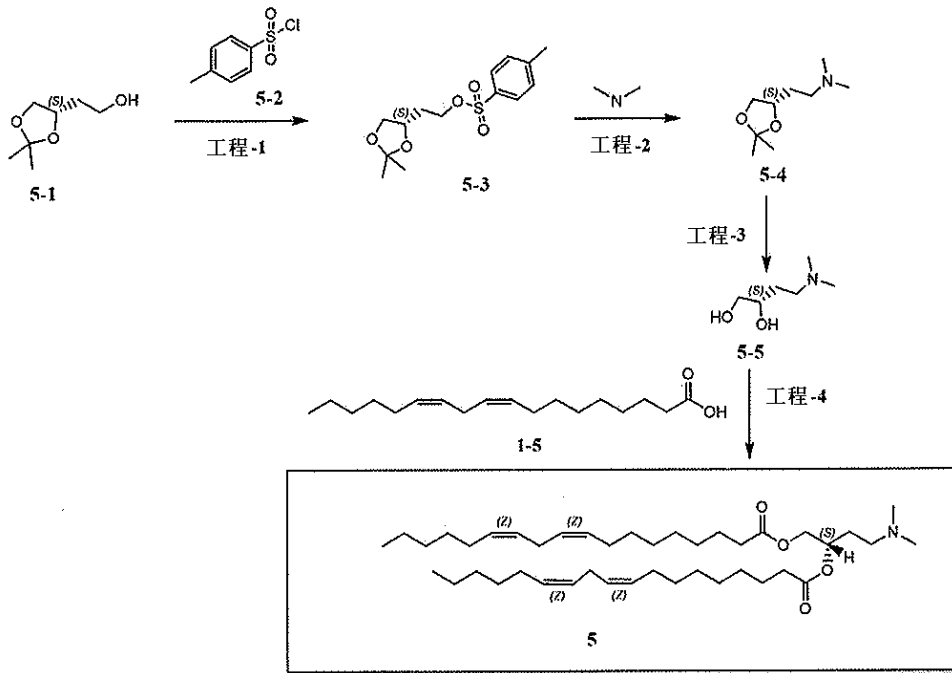
40

に示されるカチオン性脂質 5 の合成は、以下のスキーム 5

50

【0464】

【化65】



10

20

(スキーム5)

に記載されるように調製した。

【0465】

スキーム5に示されるように、中間体5-3を、室温で250mLのDCM中の塩化トリシル(5-2)(0.039mol、7.5g、1当量)およびトリエチルアミン(0.039mol、5.6mL、1当量)、DMAP(0.013mol、230mg、0.3当量)を使用して、保護された1,2,4-ブタントリオール出発材料(5-1)(0.0342mol、5.0g、1当量)上の遊離ヒドロキシルのトリシル化によって生成した。化合物5-3(0.0032mol、1.0g、1当量)の、16.6mLのTHF中のジメチルアミン(0.03mol、1.5g、10当量)を用いる一晚の求核置換によって、1.1gの第三級アミン5-4を得た。化合物5-4(712mg)を、水中の6M HCl(5mL)中で脱保護して、551mgの化合物5-5を得た。化合物5-5(2g)を、55mLのDCM中のEDC・HCl(35.5mol、6.7g、3当量)、DIPEA(47mmol、6.7mL、4当量)を使用し、脂肪酸1-5(35.5mmol、8.88g、3当量)を用いて2時間エステル化して、1.09gのイオン化可能な脂質5を得た。脂質化合物5を分取HPLCによって精製した。

30

【0466】

脂質化合物5を分取HPLC(CombiFlash Nextgen 300+ Teledyne ISCO)によって精製した。逆相HPLC-ELSD(Durashell-C18、4.6×50mm、3μM、カタログ番号DC930505-0を使用する)によって99%の生成物純度が決定された。

40

【0467】

精製された脂質5遊離塩基( $C_{42}H_{74}NO_4$ 、分子量657.57 g/mol)を、図39Aで示されるようにCDCl<sub>3</sub>におけるプロトンNMR分光法(400MHz)によって、ならびに図40Aおよび40Bで示されるように構造(NMR、m/z)および純度(LC-ELSD)を確認するために質量分析によって特性決定した。

【0468】

脂質7は、第三級アミンヘッド基を組み込むためにジメチルアミンの代わりにジエチルアミンを使用することを除いて脂質5の合成に類似の方法を使用して合成した。

50

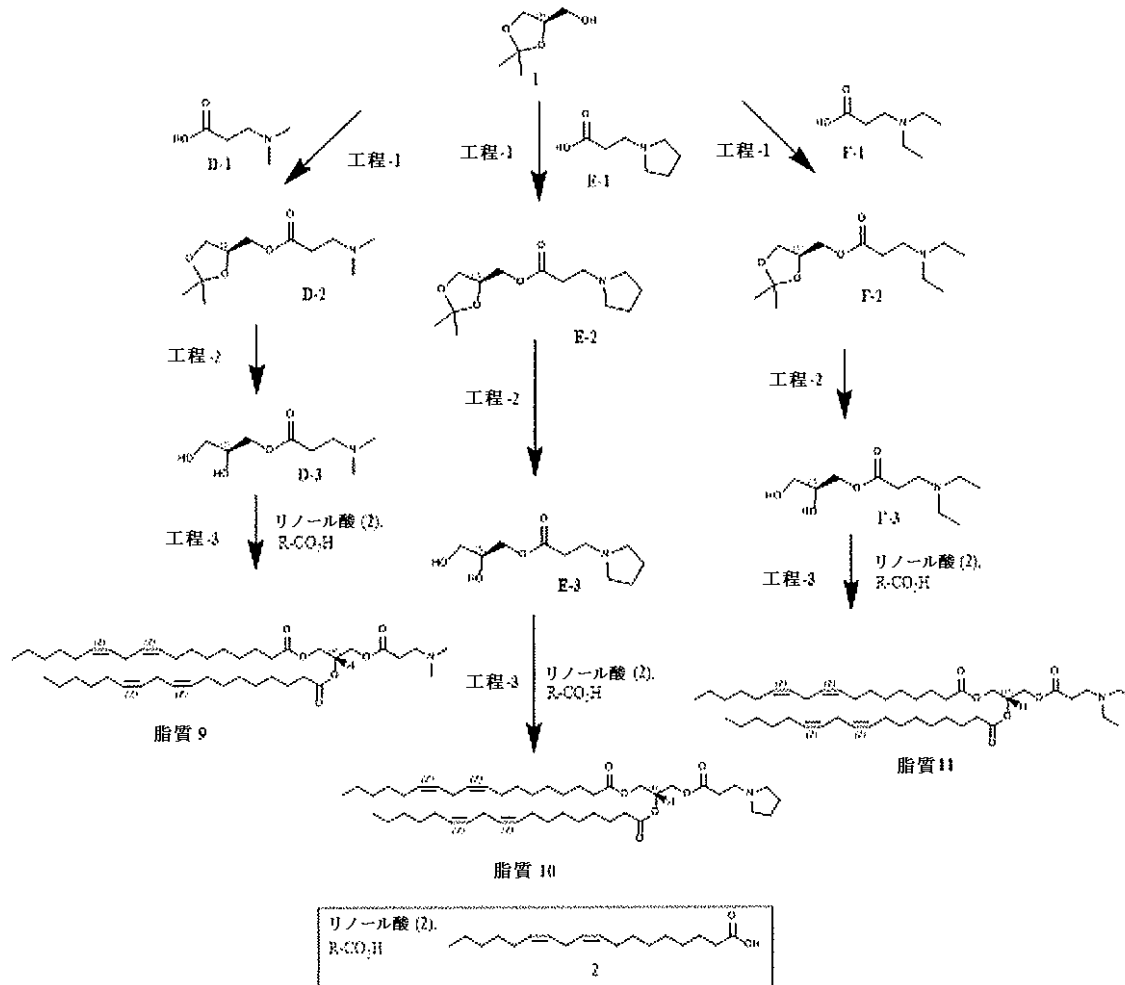
## 【0469】

精製された脂質7を、図43に示されるようにプロトンNMR分光法によって、ならびに図44Aおよび44Bで示されるように質量分析および逆相HPLCによって特性決定した。

## 【0470】

以下のスキーム6は、脂質9、脂質10および脂質11の合成を表す：

## 【化66】



## (スキーム6)

## 【0471】

## カチオン性脂質9

エステル中間体D-2は、4 g (30.2 mmol) の保護された1,2-ジオール (1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -グリセリン) 出発材料(1)を、DCM (100 mL) の溶液中のジメチルアミノプロパン酸化合物D-1 (33.3 mmol、6.06 g、1.71当量)、EDCI (33.2 mmol、6.28 g、1.1当量)、DIPEA (121.0 mmol、21.08 mL、4.0当量) およびDMAP (6 mmol、740 mg、0.2当量) を用いてアシル化することによって調製して、37%の収率で2.6 g (0.02 mol) のD-2を得た。中間体D-2 (2.5 g、10.68 mmol、1.0当量) を、室温で1 M HCl水溶液およびTHFの1:3 (v/v) 混合物 (総容量20 mL) 中で脱保護して、2.4 g (12.6 mmol) の粗化合物D-3を得た。粗化合物D-3 (12.6 mmol、2.4 g、1当量) を脂肪酸2 (8.9 g、2.5当量、31.8 mmol)、EDCI (6.1 g、2.5当量、31.8 mmol)、DIPEA (5.53 mL、2.5当量、31.8 mmol)、DMAP (285

mg、0.2当量、2.6 mmol)、DCM (100 mL)を用いてエステル化して、7 gの粗イオン化可能脂質9を得た。粗生成物(3 g)を分取HPLCによって精製して、100 mgの純粋脂質(Durashell-C18、4.6×50 mm、3 μM、カタログ番号DC930505-0を使用する逆相HPLC-ELSDによって>99%純粋)を得た。

【0472】

精製された脂質9遊離塩基(C<sub>44</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>6</sub>、分子量716.10 g/mol)を、CDCl<sub>3</sub>におけるプロトンNMR分光法(400 MHz)および構造(図48Aおよび図48B)を確認するための質量分析によって、ならびに純度を決定するためのLC-ELSDによって(図48C)特性決定した。

10

【0473】

#### カチオン性脂質10

エステル中間体E-2は、4 g(30.2 mmol)の保護された1,2-ジオール(1,2-O-イソプロピリデン-D-グリセリン)出発材料(1)を、DCM(150 mL)溶液中のジメチルアミノプロパン酸化合物E-1(4.76 g、1.1当量、33 mmol)、EDCI(6.38 g、1.1当量、33 mmol)、DIPEA(21.08 mL、4.0当量、120 mmol)およびDMAP(680 mg、0.2当量、6 mmol)を用いてアシル化することによって調製して、25%の収率で1.9 g(7.38 mmol)のE-2を得た。中間体E-2(1.9 g、7.38 mmol、1当量)を、室温で1 MのHCl水溶液およびTHFの1:3(v/v)混合物(総容量80 mL)中で脱保護して、1.58 g(7.27 mmol)の粗化合物E-3を得た。粗化合物E-3(7.27 mmol、1.58 g、1当量)を、DCM(80 mL)の溶液中の脂肪酸2(18.2 mmol、5.1 g、2.5当量)、EDCI(18.2 mmol、3.48 g、2.5当量)、DIPEA(18.2 mmol、3.16 mL、2.5当量)およびDMAP(1.4 mmol、160 mg、0.2当量)を用いてエステル化して、約7.5 gの粗イオン化可能脂質10を得た。粗生成物(3 g)を分取HPLCによって精製して、105 mgの純粋脂質(Durashell-C18、4.6×50 mm、3 μM、カタログ番号DC930505-0を使用する逆相HPLC-ELSDによって>99%純粋)を得た。

20

【0474】

精製された脂質10遊離塩基(C<sub>46</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>6</sub>、分子量742.14 g/mol)を、構造を確認するためにCDCl<sub>3</sub>におけるプロトンNMR分光法(400 MHz)および質量分析によって(図49Aおよび図49B)、ならびに純度を決定するためのLC-ELSDによって(図49C)特性決定した。

30

【0475】

#### カチオン性脂質11

エステル中間体F-2を、4 g(30.2 mmol)の保護された1,2-ジオール(1,2-O-イソプロピリデン-D-グリセリン)出発材料(1)を、DCM(100 mL)の溶液中のジメチルアミノプロパン酸化合物F-1(6.06 g、1.38当量、41.7 mmol)、EDCI(6.38 g、1.1当量、33.3 mmol)、DIPEA(21.08 mL、4.0当量、121.0 mmol)およびDMAP(740 mg、0.2当量、6 mmol)を用いてアシル化することによって調製して、41.7%の収率で3.3 g(12.7 mmol)のF-2を得た。中間体F-2(3.2 g、12.3 mmol、1当量)を、室温で1 MのHCl水溶液およびTHFの1:3(v/v)混合物(総容量80 mL)中で脱保護して、3.1 g(14.1 mmol)の粗化合物F-3を得た。粗化合物F-3(14.13 mmol、3.1 g、1当量)を、DCM(100 mL)の溶液中の脂肪酸2(35.3 mmol、9.9 g、2.5当量)、EDCI(6.8 g、2.5当量、35.3 mmol)、DIPEA(6.2 mL、2.5当量、35.3 mmol)およびDMAP(316 mg、0.2当量、2.8 mmol)を用いてエステル化して、約9 gの粗イオン化可能脂質11を得た。粗生成物(3 g)を分取HPL

40

50

Cによって精製して、55mgの純粋脂質11 (Durashell-C18、 $4.6 \times 50$  mm、 $3 \mu$  M、カタログ番号DC930505-0を使用する逆相HPLC-ELSDによって>99%純粋)を得た。

【0476】

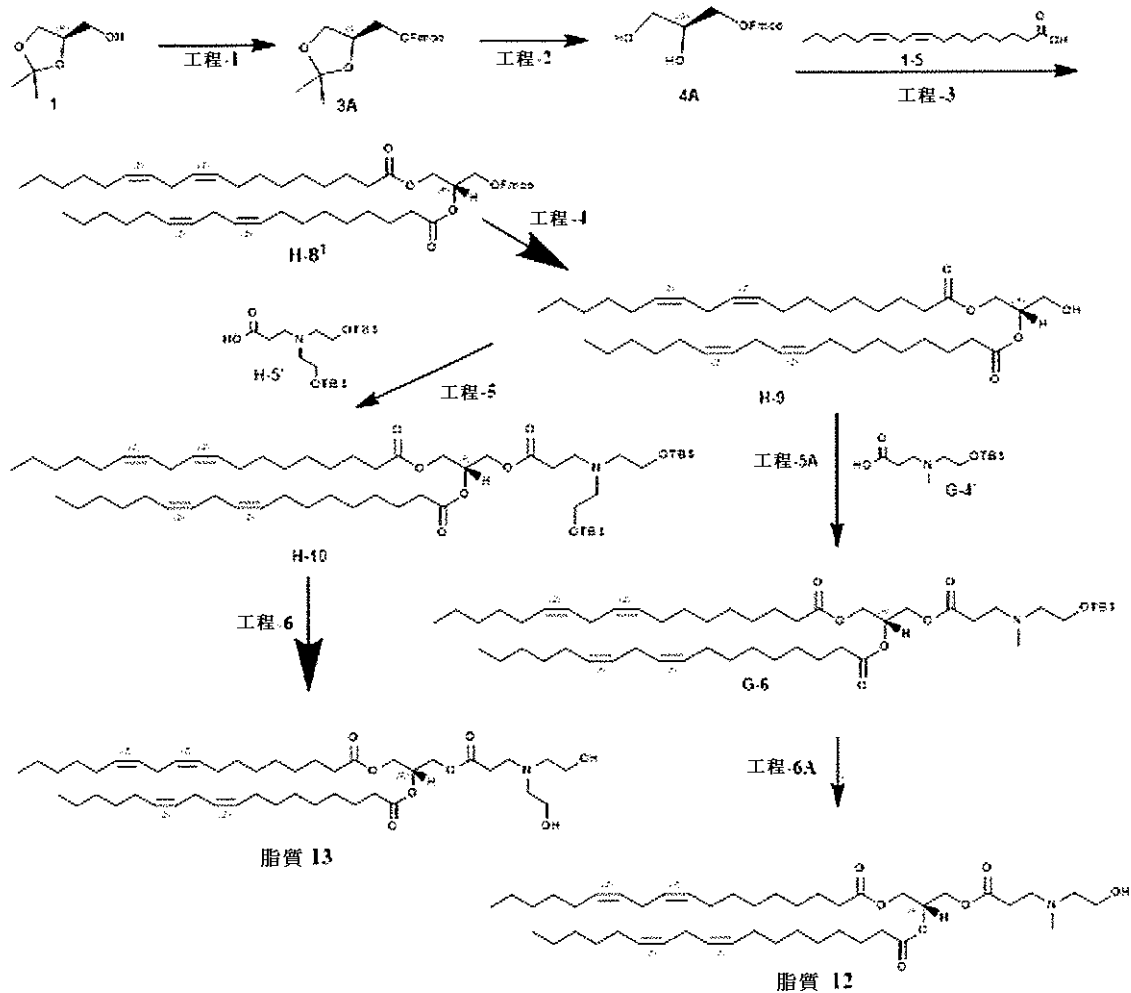
精製された脂質11遊離塩基 ( $C_{46}H_{81}NO_6$ 、分子量744.16 g/mol) を、構造を確認するためにCDC13におけるプロトンNMR分光法 (400 MHz) および質量分析によって (図50Aおよび図50B)、ならびに純度を決定するためにLC-ELSDによって (図50C)、特性決定した。

【0477】

以下のスキーム7およびスキーム8は、脂質12および脂質13の合成を表す：

10

【化67】



20

30

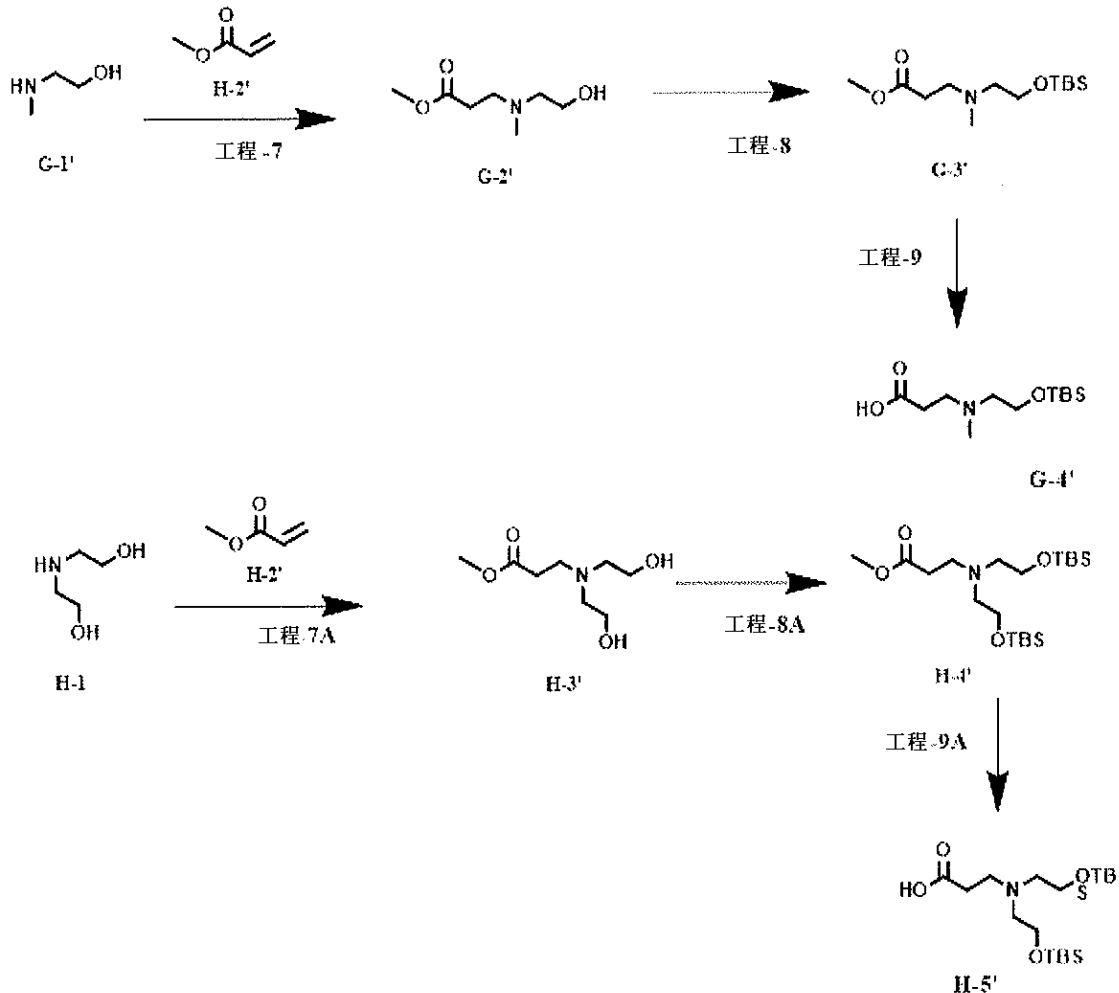
(スキーム7)

40

【0478】

50

## 【化 6 8】



(スキーム 8)

【0479】

## カチオン性脂質 12

Fmoc 保護された中間体 3A を、ピリジン (20 mL) 中の Fmoc クロリド (30 mmol、7.9 g、2.0 当量) を使用して (R) - (2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4-イル) メタノール (1)、2.0 g (1.0 当量、15.2 mmol) から生成して、71% の収率で 3.8 g の 3A を得た (工程 1、スキーム 7)。3A、2.3 g (1.0 当量、6.5 mmol) を 1M の HCL : THF (1 : 3、20 mL) 中で選択的に脱保護し、0.5 mL のメタノールに約 2 g の 4A を得た (工程 2、スキーム 7)。3 mL の DMF 中の PyBOP (9.2 mmol、4.7 g、2.2 当量) および DIPEA (9.2 mmol、1.6 mL、2.2 当量) を使用する、リノール酸、1-5 (9.2 mmol、2.9 mL、2.2 当量) を用いる 4A、1.3 g (1.0 当量、4.2 mmol) の O-アシル化。2つのバッチからの組み合わせられた生成物は、合計 1.6 g (21%) の純粋な中間体 H-8' (工程 3、スキーム 7) をもたらした。THF (25 mL) 中の 1% ピペリジンを使用する、0℃ で 4 時間の H-8'、2.05 g (1.0 当量、2.44 mmol) からの Fmoc 除去 (工程 4、スキーム 7) によって、680 mg の精製された中間体 H-9 が 45% の収率で得られた。脂質 12 の生成 (G-4' の O-アシル化を介した) のための、ならびに脂質 13 の生成 (以下の関連節に記載されるように H-5' の O-アシル化を介した) のためのその後の工程において重要な中間体 H-9 を使用した。

【0480】

保護された化合物 G-4'、3-((2-((tert-ブチルジメチルシリル)オキ

シ) エチル) (メチル) アミノ) プロパン酸を、マイケル付加を介して、出発材料、アクリル酸メチル、H-2' および 2- (メチルアミノ) エタン-1-オール、G-1' を使用して調製した。アクリル酸メチル (H-2')、1.6 mL (1 当量、17.8 mmol) を、G-1' (2 g、1.5 当量、26.6 mmol) および酸化アルミニウム (904 mg、0.5 当量、8.9 mmol) と溶媒不含条件下、室温で 3 時間反応させて、2.58 g (91%) の G-2' (工程 7、スキーム 8) を得た。G-2'、1.33 g (1 当量、8.26 mmol) を、3 mL DCM 中の tert-ブチルジメチルシリルクロリド、TBDMSCl (1.62 g、1.3 当量、10.74 mmol) および TEA (2.3 mL、2 当量、16.52 mmol) を室温で一晩使用して、第三級ブチルジメチルシリル保護された中間体 G-3' に変換し (工程 8、スキーム 8)、その結果、精製された G-3' の約 1.13 g (50%) が回収された。THF/MeOH/1M HCl (3/2/1 (v/v); 6 mL の総容量) における、室温で一晩の G-3'、1.14 g (1 当量、4 mmol) のその後の選択的脱保護によって、1.13 g の G-4' が得られた (工程 9、スキーム 8)。G-4' および H-9 を合わせて、中間体 G-6 (工程 5A、スキーム 8) を生成した。H-9、400 mg (1.0 当量、0.65 mmol) を、2.0 mL の DCM 中の EDCI (198 mg、1.5 当量、0.98 mmol)、DIPEA (167  $\mu$ L、1.5 当量、0.98 mmol)、DMAP (15.9 mg、0.2 当量、0.13 mmol) を使用し、G-4' (0.98 mmol、268 mg、1.5 当量) を用いてアシル化して、308 mg (55%) の粗 G-6 (308 mg) を、6.0 mL の THF 中の HF ピリジン (9.0 mmol、641  $\mu$ L、25 当量) 中で脱保護して (工程 6A、スキーム 7)、308 mg の粗脂質 12 を得た。粗生成物を分取 HPLC を使用して 2 回精製して、213 mg (79%) の精製された脂質 12 を単離した (Durashell-C18、4.6  $\times$  50 mm、3  $\mu$ M、カタログ番号 DC930505-0 を使用する逆相 HPLC-ELSD によって >99% 純粋)。

10

20

30

40

50

#### 【0481】

精製された脂質 12 遊離塩基 (C<sub>45</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>7</sub>、分子量 746.13 g/mol) を、構造を確認するために CDC13 におけるプロトン NMR 分光法 (400 MHz) および質量分析によって (図 51A および 図 51B)、ならびに純度を決定するために LC-ELSD によって (図 51C) 特性決定した。

#### 【0482】

##### カチオン性脂質 13

保護された化合物 3- (ビス (2- ((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ) エチル) アミノ) プロパン酸 (H5') を、マイケル付加を介して、出発材料、アクリル酸メチル、H-2' および 2, 2'-アザンジイルビス (エタン-1-オール)、H-1' を使用して調製した。アクリル酸メチル (H-2')、1.65 g (1 当量、19.2 mmol) を、H-1' (28.5 mmol、3.0 g、1.5 当量)、酸化アルミニウム (960 mg、0.5 当量、9.6 mmol) と、溶媒不含条件下、室温で 3 時間反応させて、3.53 g (97%) の H-3' を得た。H-3'、830 mg (1 当量、4.3 mmol) を、8 mL の DCM 中の tert-ブチルジメチルシリルクロリド、TBDMSCl (1.56 g、2.5 当量、10.9 mmol)、TEA (1.16 mL、2.0 当量、10.9 mmol) を室温で一晩使用して、第三級ブチルジメチルシリル保護された中間体 H-4' に変換し、その結果、精製された H-4' の約 1.51 g (83%) が回収された。THF (3 mL)/MeOH (2 mL)/1M LiOH (1 mL) における室温で一晩の H-4'、600 mg (1 当量、1.4 mmol) のその後の選択的脱保護によって、約 500 mg の H-5' が得られた。3- (ビス (2- ((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ) エチル) アミノ) プロパン酸 (H5') を使用する H-9 の O-アシル化によって中間体 H-10 を生成した。H-5' および H-9 を合わせて、中間体 H-10 (工程 5、スキーム 7) を生成した。H-9、150 mg (1.0 当量、0.24 mmol) を、1.0 mL の DCM 中の EDCI (0.36 mmol、74 mg、1.5

当量)、DIPEA (0.36 mmol、62  $\mu$ L、1.5当量)、DMAP (0.048 mmol、6 mg、0.2当量)を使用し、H-5' (0.36 mmol、150 mg、1.5当量)を用いてアシル化して、108 mg (44%)の粗H-10を得た。粗H-10、108 mg (1.0当量、0.11 mmol)を、2.0 mLのTHF中のHFピリジン (2.75 mmol、200  $\mu$ L、25当量)中で脱保護して、41 mg (48%)の粗脂質13を得た。2つのバッチからの粗生成物を合わせ、分取HPLCを使用して2回精製して、71 mgの精製された脂質13を単離した (DurasHELL-C18、4.6  $\times$  50 mm、3  $\mu$ M、カタログ番号DC930505-0を使用する逆相HPLC-ELSDによって>99%純粋)。

【0483】

精製された脂質13遊離塩基 (C<sub>46</sub>H<sub>81</sub>NO<sub>8</sub>、分子量776.15 g/mol)を、構造を確認するためにCDC13におけるプロトンNMR分光法 (400 MHz)および質量分析によって (図52Aおよび図52B)、ならびに純度を決定するためにLC-ELSDによって (図52C)特性決定した。

【実施例2】

【0484】

例示的なイオン化可能な脂質を使用するボルテックス混合によるLNPの調製

実施例1において合成されたようにカチオン性脂質2およびカチオン性脂質5を使用して、ならびに市販のカチオン性脂質8およびカチオン性脂質DLin-MC3-DMA (MedChemExpress、米国、ニュージャージー州；カタログ番号HY-112758)を使用して例示的LNPを作出した。

【0485】

mRNA溶液およびエタノール性脂質溶液をボルテックス混合することによってカプセル化されたmRNAペイロードおよび脂質ブレンドを用いてLNPを作出した。mRNA (eGFPをコードするmRNAおよびCy5で標識されたeGFP mRNAの9:1 w/wミックス、Trilink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)を、pH4の酢酸バッファーと混合して、133  $\mu$ g/mLのmRNAおよび21.7 mM酢酸バッファーを含有する最終mRNA水溶液を提供した。脂質成分を以下の表3に示される相対比率で水性エタノールに溶解した。

【0486】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3

| 脂質                 | 供給元                                 | mRNA に対する<br>脂質の比率<br>(nmol 脂質/100<br>μg mRNA) | 脂質溶液中の<br>濃度 (mM) | 理論上の LNP<br>脂質組成<br>(mol%) |
|--------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------|----------------------------|
| イオン化可能な<br>カチオン性脂質 | -                                   | 1,500                                          | 6                 | 48.8                       |
| コレステロール            | Dishman<br>Netherlands              | 1,200                                          | 4.8               | 39.0                       |
| DSPC               | Avanti Polar<br>Lipids、米国、<br>アラバマ州 | 300                                            | 1.2               | 9.8                        |
| DMG-PEG(2000)      | Avanti Polar<br>Lipids、米国、<br>アラバマ州 | 75                                             | 0.3               | 2.4                        |

## 【0487】

手短には、mRNA 溶液（375 μL）を円錐底遠心管中に移し、脂質溶液（125 μL）を mRNA 溶液を含有する管中に迅速に添加した（3：1 v/v 比率の mRNA 溶液対脂質溶液）。混合物を含有する管を直ちにキャップし、2,500 rpm で 15 秒間ボルテックス処理し、続いて、室温で 5 分以上インキュベーションし、その後、エタノール除去およびバッファー交換に進んだ。

## 【0488】

混合した後、Sephadex G-25 樹脂が充填された SEC カラム（PD Mini Trap G-25、Cytiva、米国、マサチューセッツ州）を使用し、重力流によって、得られた LNP 懸濁液でエタノール除去およびバッファー交換を実施した。手短には、2.5 mL の交換バッファー（150 mM NaCl を有する 25 mM pH 7.4 HEPES バッファー）を用いて SEC カラムを 5 回すすぎ、その後、425 μL の LNP 懸濁液をローディングした。LNP 懸濁液が樹脂床中に十分に移動すると、製造業者の仕様書に従って、75 μL のスタッカー容量の交換バッファーをカラムに適用して、カラムの指定の標的ロード容量を達成し、回収率を最大にした。スタッカーが樹脂床中に十分に移動した後、SEC カラムを新規遠心管に移し、カラムに 1.0 mL の交換バッファーを添加することによって LNP 懸濁液を溶出した。交換バッファー中の LNP を含有する溶出液を回収し、さらなる使用まで 4℃で保存した。

## 【実施例 3】

## 【0489】

## LNP の特性決定

この実施例は、実施例 2 において生成された LNP の特性決定を記載する。

## 【0490】

実施例 2 において生成された LNP のサンプルを特性決定して、平均流体力学直径、ゼータ電位および mRNA 含量（総および色素がアクセス可能な）を決定した。流体力学直径は、Zetasizer モデル ZEN3600（Malvern Pananalytical、英国）を使用して動的光散乱（DLS）によって決定した。ゼータ電位は、Zetasizer を使用してレーザードプラ電気泳動によって 5 mM の pH 5.5 の MES バッファーおよび 5 mM の pH 7.4 の HEPES バッファーにおいて測定した。

## 【0491】

ナノ粒子のRNA含量は、Thermo Fisher Quant-iT Ribo Green RNAアッセイキットを使用して測定する。組み込まれていないRNAおよびナノ粒子の表面付近にあるRNAの両方を含む色素がアクセス可能なRNAは、HEPES緩衝生理食塩水を使用してナノ粒子をおよそ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のmRNAに希釈すること、次いで、混合物にQuant-iT試薬を添加することによって測定する。全RNA含量は、HEPES緩衝生理食塩水を使用して粒子を $1\mu\text{g}/\text{mL}$  mRNAに希釈すること、それらを0.5% Tritonを含有するHEPES緩衝生理食塩水中で60℃に30分間加熱することによってナノ粒子を破壊すること、次いで、Quant-iT試薬を添加することによって測定する。RNAは、 $485/535\text{nm}$ で蛍光を測定することによって定量化し、濃度は、同時実施したRNA標準曲線に対して決定する。結果は、表5に示されている。

## 【0492】

## 【表5】

表5

| 製剤番号 | イオン化可能な脂質           | DLS Z-平均直径 (nm) | DLS PDI | pH5.5 でのゼータ電位 (mV) | pH7.4 でのゼータ電位 (mV) | 色素がアクセス可能な mRNA (%) |
|------|---------------------|-----------------|---------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 1    | カチオン性脂質 2           | 120             | 0.19    | 21                 | 5.4                | 16                  |
| 2    | カチオン性脂質 5           | 109             | 0.14    | 23                 | 0.3                | 13                  |
| 3    | カチオン性脂質 8           | 91              | 0.12    | 20                 | 0.9                | 6.3                 |
| 4    | カチオン性脂質 DLn-MC3-DMA | 96              | 0.14    | 16                 | -0.4               | 9.4                 |

## 【実施例4】

## 【0493】

T細胞標的化を可能にするFabコンジュゲートの調製

この実施例は、例示的な脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートの生成を記載する。

## 【0494】

抗CD3 Fab (マウスラムダおよびヒトラムダを有するhSP34) (以下のアミノ酸配列を参照されたい) を、マレイミド基と重鎖(HC)中のC末端システインの間の共有結合カップリングによってDSPE-PEG(2k)-マレイミドにコンジュゲートした。抗CD3 FabクローンHu291、抗CD8 FabクローンTRX2、抗CD8 FabクローンOKT8、非機能性突然変異OKT8 (mutOKT8)、イバリズマブ配列由来の抗CD4 Fab、抗CD5 FabクローンHe3、抗CD7 FabクローンTH-69、抗CD2 FabクローンTS2/18.1、抗CD2 Fabクローン9.6、ヒトカッパを有する抗CD2 Fabクローン9-1も、本明細書に記載される同様の方法を使用してコンジュゲートした。タンパク質( $3\sim 4\text{mg}/\text{mL}$ )を、酸素不含のpH7のリン酸バッファーへのバッファー交換後、酸素不含のpH7のリン酸バッファー中、2mMのTCEPで室温で1時間還元した。還元されたタンパク質を7kDaのSECカラムを使用して単離して、TCEPを除去し、新鮮な酸素不含のpH7

のリン酸バッファーにバッファー交換した。

【0495】

コンジュゲーション反応を、酸素不含のpH5.7のクエン酸バッファー（1mMクエン酸）中のDSPE-PEG-マレイミド（Avanti Polar Lipids、米国、アラバマ州）および30mg/mLのDSPE-PEG-OCH<sub>3</sub>（Avanti Polar Lipids、米国、アラバマ州）（タンパク質に応じて1:1~1:3重量比が使用される）の10mg/mLのミセル懸濁液の添加によって開始した。タンパク質溶液を10kDaの再生セルロースメンブレンを使用して3~4mg/mLに濃縮し、その後、40kDaのサイズ排除カラムを使用して酸素不含のpH7のリン酸バッファーでバッファー交換する。コンジュゲーション反応を、2~4mg/mLのタンパク質および3.5モル過剰のマレイミドを使用して、37℃で2時間実施し、続いて、室温でさらに12~16時間インキュベートした。

10

【0496】

得られたコンジュゲートの生成をHPLCによってモニタリングし、反応を2mMのシステインでクエンチした。得られたコンジュゲート（DSPE-PEG（2k）-抗hSP34 Fab）を、pH7.4のHEPESバッファー生理食塩水（25mM HEPES、150mM NaCl）バッファーを使用する100kDa Millipore再生セルロースメンブレン濾過を使用して単離し、使用前に4℃で保存する。クエンチした後、最終ミセル組成物は、DSPE-PEG-Fab、DSPE-PEG-マレイミド（システイン終端の）およびDSPE-PEG-OCH<sub>3</sub>の混合物からなる。3つの成分の比率は、DSPE-PEG-Fab:DSPE-PEG-マレイミド（システイン終端の）:DSPE-PEG-OCH<sub>3</sub>=1:2.45:3.45~10.35（モルで）である。

20

【0497】

得られたコンジュゲートは、ELISAアッセイによって、コンジュゲートしていない抗CD3 Fabと同等の組換えRhesus CD3イプシロンへの結合を示した。

抗CD3 hSP34-Fab配列：

hSP34 HC（配列番号1）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQA  
PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT  
AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE  
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS  
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

30

hSP34-mLam LC（マウスラムダ）（配列番号2）：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQ  
KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGKKAALTLSGV  
QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTL  
FPPSSSEELQANKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQ  
GMETTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSQCQVTH  
EGHTVEKSLSRADSS

40

SP34-hLam LC（ヒトラムダ）（配列番号3）：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQ  
KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGKKAALTLSGV  
QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTL  
FPPSSSEELQANKATLVCLVSDFYPGA VTVAWKADGSPVKV  
GVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSYSCRVT  
H EGSTVEKTVAPAES

抗CD3 Hu291-Fab配列：

Hu291 HC（配列番号4）：

50

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQA  
PGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAY  
MELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQGTLVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

Hu 291 LC (配列番号5) :

MDMRVPAQLLGLLLWLPGAKCDIQMTQSPSSLSASVGD  
RVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGV  
PSRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNP  
PTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
TKSFNRGES

10

抗CD8 TRX2 - Fab 配列 :

TRX2 HC (配列番号6) :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDFGMNWVRQA  
PGKGLEWVALIYYDGSNKFYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHYDGY  
YHFFDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST  
SGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
FPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTTQTYICNV  
NHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

20

TRX2 LC (配列番号7) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKGSQDINN  
YLAWYQQKPGKAPKLLIYNTDILHTGVP  
SRFSGSGSGTDFTFTITSSSLQPED  
IATYYCYQYNNGYTFGGQGTKEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  
GES

抗CD8 OKT8 - Fab 配列 :

OKT8 HC (配列番号8) :

QVQLVQSGAEDKKPGASVKVSCKASGFN  
IKDITYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANDNT  
LYASKFQGRVTITADTSSNTAYMELSSLRSEDT  
AVYYCGRGYGYVFDHWGQGTTVTVSSASTKGP  
SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEP  
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLV  
VTVPSSSLGTTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE  
PKSSDKTHTC

30

OKT8 LC (配列番号9) :

DIVMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRTSR  
SISQYLAWEYQEKPGKAPKLLIYSGSTLQSG  
VPSRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFAT  
YYCQQHNENPLTFGGQGTKEIKRTVAAPSVF  
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  
GES

40

抗CD4イバリズマブ - Fab 配列 :

イバリズマブHC (配列番号10) :

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTF  
FTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTD  
YDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDT  
AVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGTLVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YSLSLVVTVPSSSLGTT

50

QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

イバリズマブLC（配列番号11）：

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLA  
WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLT  
ISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEIKRTVAAPSV  
FIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRGES

抗CD5 He3-Fab配列：

He3 HC（配列番号12）：

EIQLVQSGGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQA  
PGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAY  
LQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTTVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

He3 LC（配列番号13）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLSWVQQKP  
GKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDTYTLTISSSLQY  
EDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

抗CD7 TH-69-Fab配列：

TH-69 HC（配列番号14）：

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAMSWVRQT  
PEKRLIEWVASISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYL  
QMSSSLRSEDTAMYYCARDEVGRGYLDVWGAGTTTVTVSSAST  
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

TH-69 LC（配列番号15）：

DIQMTQTTSLSASLGDRTITSCSASQGINSYLNWYQQKP  
DGTVKLLIYYTSSLSHSGVPSRFSGSGSGTDTYSLTISNLEP  
EDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC

抗CD2 TS2/18.1-Fab配列：

TS2/18.1 HC（配列番号16）：

EVQLVESGGGLVMPGGSLKLSCAASGFATSSYDMSWVRQT  
PEKRLIEWVAYISSGGFTYYPDTSVKGRFTLSRDNAAKNTLYL  
QMSSSLKSEDTAMYYCARQGAWELVYWGQGTTLVTVSAAST  
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

TS2/18.1 LC（配列番号17）：

DIVMTQSPATLSVTPGDRVFLSCRASQSISDFLHWYQQKS  
HESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEP  
EDVGVYFCQNGHNFPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFFPP

10

20

30

40

50

SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSSPVTKSFNRGES

抗CD2 9.6-Fab配列：

9.6 HC (配列番号18)：

QVQLQQPGAELVRPGSSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQR  
PIQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKFKD KATLTVDKSSGTAY  
MQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTSTVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

10

9.6 LC (配列番号19)：

NIMMTQSPSSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLA  
WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT  
ISSVQPEDLAVYYCHQYLSSTHTFGGGTKLEIKRTVAAPSV  
FIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSSPVTKSFNRGES

抗CD2 9-1-Fab配列：

9-1 HC (配列番号20)：

QVQLQQPGTELVVRPGSSSVKLSCKASGYTFTSYWVNWVKQR  
PDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFTDKAISTIDTSSNTAY  
MQLSTLTSDASAVYYCSRSPRDSSTNLADWGQGTTLVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

20

9-1 LC (配列番号21)：

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKS  
HESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEP  
EDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELRRTVAAPSVFIFFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSSPVTKSFNRGES

30

mutOKT8-Fab配列：

mutOKT8 HC (配列番号22)：

QVQLVQSGAEDKKPGASVKVSCKASGFNICKDTYIHWVRQA  
PGQGLEWMGRIDPANDNTLYASKFQGRVTITADTSSNTAY  
MELSSLRSEDTAVYYCGRGAGAYVFDHWGQGTTVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

40

mutOKT8 LC (配列番号23)：

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSRSSISAAALAWYQEK  
GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP  
EDFATYYCQQHNENPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSSPVTKSFNRGES

【実施例5】

【0498】

50

# T細胞標的化基を含有するLNPの調製

この実施例は、事前に形成されたLNPへの例示的な免疫細胞標的化コンジュゲートの組込みを記載する。

【0499】

表6に示されるように、エッペンドルフチューブ中で実施例3からのLNPおよび実施例4からのコンジュゲートを組み合わせ、2,500rpmで10秒間ボルテックス処理した。エッペンドルフチューブを300rpmの37℃のThermoMixer中に14時間入れ、次いで、使用まで4℃で保存した。

【0500】

【表6】

表6

| nmol 総脂質 / mg RNA | FAb 標的 g/mol 脂質 | FAb mg/mg RNA | RNA mg/mL LNP | FAb mg/mL Fab | Fab mg/mL LNP | LNP mL/mL Fab |
|-------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 30,750            | 17              | 0.52275       | 1             | 1             | 0.52          | 1.91          |

10

【0501】

この実施例は、事前に形成されたLNPへの免疫細胞標的化コンジュゲートの組込みを記載する。

【0502】

実施例2からのLNPおよびコンジュゲート（抗CD3（hSP34）および抗CD8（TRX-2）コンジュゲート）を実施例4に記載される方法を使用して調製し、エッペンドルフチューブ中で表6Aに示されるように組み合わせ、2,500rpmで10秒間ボルテックス処理した。エッペンドルフチューブを300rpmの37℃のThermoMixer中に14時間入れ、次いで、使用まで4℃で保存した。あるいは、エッペンドルフチューブを300rpmの60℃のThermoMixer中に30分～3時間入れ、続いて、4℃および300rpmで混合をさらに12～24時間継続し、次いで、4℃で使用まで保存した。

【0503】

【表7】

表6A

| Nmol 総脂質 / mg RNA | FAb 標的 g/mol 脂質 | FAb mg/mg RNA | RNA mg/mL LNP | FAb mg/mL Fab | Fab mg/mL LNP | LNP mL/mL Fab | LNP 中の Mol% DSPE-PEG |
|-------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------------|
| 30,750            | 17              | 0.52275       | 0.45          | 1.46          | 0.235         | 6.2           | 0.47                 |

20

30

【実施例6】

【0504】

例示的なイオン化可能な脂質を使用するマイクロ流体混合によるLNPの調製

【0505】

この実施例は、マイクロ流体混合法によるカチオン性脂質5およびカチオン性脂質8を使用するLNPの調製を記載する。

【0506】

インラインマイクロ流体混合プロセスを使用してmRNA水溶液およびエタノール性脂質溶液を混合することによって、カプセル化されたmRNAペイロードおよび脂質ブレンドを用いてLNPを作出した。mRNA（eGFPをコードするmRNAおよびCy5で標識されたeGFP mRNA）の9:1 w/wミックス、TriLink Biot

40

50

technologies、米国、カリフォルニア州)を、pH 4の酢酸バッファーと混合して、133  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のmRNAおよび21.7 mM酢酸バッファーを含有する最終mRNA水溶液を提供した。脂質成分を以下の表7に示される相対比率で水性エタノールに溶解した。

【0507】

【表8】

表7

| 脂質                 | 供給元                                 | MRNA に対する<br>脂質の比率<br>(nmol 脂質/<br>100 $\mu\text{g}$ mRNA) | 脂質溶液中の<br>濃度 (mM) | 理論上の LNP<br>脂質組成(mol%) |
|--------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------|
| イオン化可能な<br>カチオン性脂質 | -                                   | 1,500                                                      | 6                 | 48.8                   |
| コレステロール            | Dishman<br>Netherlands              | 1,200                                                      | 4.8               | 39.0                   |
| DSPC               | Avanti Polar<br>Lipids、米国、<br>アラバマ州 | 300                                                        | 1.2               | 9.8                    |
| DMG-PEG(2000)      | Avanti Polar<br>Lipids、米国、<br>アラバマ州 | 75                                                         | 0.3               | 2.4                    |

10

20

【0508】

mRNAおよび脂質溶液を、Precision Nanosystems Inc. (カナダ、ブリティッシュコロンビア州)製のNanoAssembler Igniteマイクロ流体混合デバイス(パート番号NIN0001)およびNxGen混合カートリッジ(パート番号NIN0002)を使用して混合した。手短には、mRNAおよび脂質溶液を各々、別個のポリプロピレンシリンジ中にロードした。混合カートリッジをNanoAssembler Ignite中に挿入し、次いで、シリンジをカートリッジに取り付けた。次いで、2つの溶液を、NanoAssembler Igniteを使用して9 mL/分の総流速で3:1 v/v比のmRNA溶液(975  $\mu\text{L}$ )対脂質溶液(325  $\mu\text{L}$ )で混合した。得られた懸濁液を室温で5分以上インキュベーションし、その後、エタノール除去およびバッファー交換に進んだ。

30

【0509】

混合後、2つのSephadex G-25樹脂が充填されたSECカラム(PD MiniTrap G-25、Cytiva、米国、マサチューセッツ州)を使用し、重力流によって、得られたLNP懸濁液でエタノール除去およびバッファー交換を実施した。手短には、2.5 mLの交換バッファー(150 mM NaClを有する25 mM pH 7.4 HEPESバッファー)を用いてSECカラムを各々5回すすぎ、その後、カラムあたり450  $\mu\text{L}$ のLNP懸濁液をローディングした。LNP懸濁液が樹脂床中に十分に移動すると、製造業者の仕様書に従って、50  $\mu\text{L}$ のスタッカー容量の交換バッファーを各カラムに適用して、カラムの指定の標的ロード容量を達成し、回収率を最大にした。スタッカーが樹脂床中に十分に移動した後、SECカラムを新規遠心管に移し、各カラムに1.0 mLの交換バッファーを添加することによってLNP懸濁液を溶出した。交換バッファー中のLNPを含有する溶出液を各カラムから回収し、単一LNPバッチ中で組み合わせ、さらなる使用まで4℃で保存した。

40

50

## 【0510】

得られたLNPを実施例3に記載されたように特性決定した。結果は以下の表8にまとめられている。表8に示されるように、マイクロ流体プロセスは、狭い多分散および良好なmRNAカプセル化（＜20%色素がアクセス可能なRNA）を示す100nm未満の粒子をもたらす。

## 【0511】

## 【表9】

表8

| 製剤番号 | イオン化可能な脂質 | DLS Z-平均直径(nm) | DLS PDI | pH5.5でのゼータ電位(mV) | pH7.4でのゼータ電位(mV) | 色素がアクセス可能なmRNA(%) |
|------|-----------|----------------|---------|------------------|------------------|-------------------|
| 5    | カチオン性脂質5  | 52             | 0.11    | 24               | 3.8              | 19                |
| 6    | カチオン性脂質8  | 55             | 0.15    | 24               | 4.0              | 11                |

10

## 【実施例7】

20

## 【0512】

トルイジニル-ナフタレンスルホン酸（TNS）蛍光プローブを使用するLNP pKaの特性決定

この実施例は、脂質ナノ粒子の見かけのpKaの測定に使用される蛍光色素ベースの方法を記載する。見かけのpKaは、生理学的pH条件下でナノ粒子表面電荷を決定し、通常、エンドソームpH範囲（6～7.4）のpKa値は、血漿または細胞外間隙（pH7.4）で中性またはわずかに電荷を有するLNPをもたらし、酸性エンドソーム環境下で強力に陽性となる。この陽性表面電荷は、LNP表面の、負電荷を有するエンドソーム膜との融合を駆動し、エンドソームコンパートメントの脱不安定化および破裂ならびにサイトゾルコンパートメント中へのLNP脱出、細胞リボソーム機構の関与によるmRNAの

30

## 【0513】

イオン化可能な脂質2、5（実施例1に記載されたように合成された）、6および7（第三級アミンヘッド基を組み込むためにジメチルアミンの代わりにジエチルアミンを使用することを除いて、それぞれ脂質2、5に類似の方法を使用して合成された）を使用して作製されたLNPの見かけのpKaを、pH値（pH4～pH10）の範囲を網羅する水性バッファーにおける6-（p-トルイジノ）-2-ナフタレンスルホン酸（TNS）蛍光測定によって決定した。TNSは、溶液中で遊離している場合には非蛍光であるが、正電荷を有する脂質ナノ粒子と会合される場合には強力に蛍光を発する。ナノ粒子のpKa未満のpH値では、陽性LNP表面電荷が、粒子境界面での色素補充をもたらし、TNS

40

。

50

## 【実施例 8】

## 【0514】

一次ヒトT細胞における *in vitro* トランスフェクションプロトコール

この実施例は、一次ヒトT細胞における *in vitro* LNP トランスフェクションに使用されるプロトコールを記載する。この方法は、GFP mRNA のようなリポーター遺伝子をコードする mRNA がロードされた LNP を使用して細胞にまずトランスフェクトすること、次いで、蛍光作動細胞選別 (FACS) によってリポーター遺伝子発現を測定することによってトランスフェクションを評価することによって関連標的細胞 (CD3+T細胞) における LNP の *in vitro* 効能を評価するために使用される。さらに、Cy5 のような蛍光色素を用いて mRNA のような個々のナノ粒子成分を標識すること、次いで、FACS によって細胞/色素会合を観察することによって同一アッセイにおいて細胞との粒子会合を観察できる。

10

## 【0515】

STEMCELL 製の RoboSep 自動細胞単離システムで EasySep Human T細胞単離キットを使用して、凍結末梢血単核細胞から CD3+T細胞を単離した。glutamax、10%ウシ胎児血清および 40 ng/mL の IL2 を補給した RPMI 細胞培養培地中で T細胞を平底 96 ウェルプレートにプレーティングした。1M の T細胞/mL (100K 個の T細胞/ウェル) の密度でウェルあたり 100  $\mu$ L の細胞懸濁液を播種した。細胞を 37°C のインキュベーター中で 2 時間休息させ、次いで、10  $\mu$ L の 22  $\mu$ g/mL (mRNA によって) のナノ粒子懸濁液を穏やかに添加することによってトランスフェクトし、その結果、2  $\mu$ g/mL の最終 mRNA 濃度が得られた。細胞をピペットを用いて穏やかに混合し、次いで、37°C のインキュベーター中で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、ThermoFisher Attune NX T フローサイトメーターを使用して細胞を分析した。670/14 nm フィルターを用い、638 nm のレーザーを使用して Cy5 を検出した。488 nm のレーザーおよび 530/30 nm フィルターを使用して eGFP を検出した。BD biosciences 製の FlowJo ソフトウェアを使用してデータを分析した。FACS データをダブレットおよび死細胞を排除するためにまずゲーティングし、次いで、GFP および Cy5 についてゲーティングした。GFP+ および Cy5+ のゲートは、対照サンプル (PBS 処置した T細胞) が  $\leq 0.1\%$  陽性であるように設定した。

20

30

## 【実施例 9】

## 【0516】

一次ヒトT細胞における脂質 2、脂質 6 LNP の特性および *in vitro* タンパク質発現 この実施例は、脂質 2 および脂質 6 に由来する LNP のトランスフェクション能力を記載する。ナノ粒子を、混合プロセス、それに続いてバッファー交換を使用してまず生成する。このように生成された粒子を続いて、細胞との LNP 会合およびリポーター遺伝子の発現を評価するためにヒト CD3+T細胞において *in vitro* で試験した。

## 【0517】

GFP-mRNA とシアニン-5 色素標識 mRNA (TriLink Biotechnologies Inc.) の 90-10 (w/w) 混合物をカプセル化する脂質 2 および脂質 6 の LNP を、実施例 6 に記載される混合プロセス、実施例 21 において以下に記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。両製剤は、150 nm 未満の範囲の流体力学直径および中程度の多分散ならびに良好な mRNA カプセル化および回収率 (実施例 3 に記載された Triton-デフォーミュレーション手順を使用して、 $< 25\%$  の色素がアクセス可能な mRNA および  $> 80\%$  のカプセル化された mRNA が回収された) を示す粒子をもたらした。

40

## 【0518】

図 9A および 9B ならびに表 9 に示されるように、実施例 4 に記載される挿入手順を使用する抗 CD3 hSP34-PEG2k-DSPE コンジュゲートの挿入の際に、粒子サイズおよび PDI の中程度の変化が観察された。得られた標的化された LNP を、一次

50

ヒトT細胞において実施例8に記載される *in vitro* トランスフェクションプロトコルを使用して評価した。図11に示されるように、両製剤は  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  未満の用量でT細胞によって十分に許容され（PBS対照に対して細胞生存率の $<40\%$ の低下）、脂質6のLNPは、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  のより高い用量で中程度に高い生存率をもたらした。GFP+細胞の高いパーセンテージおよび強いGFP MFI値によって例示されるように、両方のイオン化可能な脂質（2および6）を用いてGFPタンパク質の用量依存性発現が観察された。Cy5+およびCy5 MFI値によって例示されるように、両製剤は、細胞と等しく会合し、これは、コンジュゲート挿入プロセスが、イオン化可能な脂質の化学に依存しなかったことを示唆した。両方のイオン化可能な脂質（2および6）が、許容されるレベルのmRNAカプセル化（ $<30\%$ の色素がアクセス可能なRNAおよび $>60\%$ の総mRNA回収率）をもたらした。

10

【0519】

【表10】

表9. 脂質2および脂質6のLNP mRNA含量

| イオン化可能な脂質 | 理論上の総mRNA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 測定された総 (Triton法) mRNA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | Ribogreen 色素がアクセス可能なmRNA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 色素がアクセス可能なmRNA % |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------|
| 脂質2       | 45                                    | 30                                                | 6                                                    | 20%              |
| 脂質6       | 45                                    | 40                                                | 6                                                    | 15%              |

20

【0520】

これらの知見は、代替のイオン化可能な脂質2および6を使用して作製された脂質ナノ粒子がmRNAを効率的にカプセル化し、*in vitro* でT細胞にトランスフェクトすることができることを実証する。

【実施例10】

【0521】

一次ヒトT細胞における脂質5、脂質7のLNP特性および *in vitro* タンパク質発現

この実施例は、脂質5および脂質7に由来するLNPのトランスフェクション能力を記載する。ナノ粒子を、混合プロセス、それに続いてバッファー交換を使用してまず生成する。このように生成された粒子を続いて、細胞とのLNP会合およびリポーター遺伝子の発現を評価するためにヒトCD3+T細胞において *in vitro* で試験した。

30

【0522】

GFP-mRNAとシアニン-5色素標識mRNA (TriLink Biotechnologies Inc.) の90-10 (w/w) 混合物をカプセル化する脂質5および脂質7のLNPを、実施例6に記載される混合プロセス、実施例21において以下に記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。両製剤は、 $150 \text{ nm}$  未満の範囲の流体力学直径および中程度の多分散ならびに良好なmRNAカプセル化および回収率（実施例3に記載されたTriton-デフォーミュレーション手順を使用して、 $<25\%$ の色素がアクセス可能なmRNAおよび $>80\%$ のカプセル化されたmRNAが回収された）を示す粒子をもたらした。図10Aおよび10Bならびに表10に示されるように、実施例4に記載される挿入手順を使用する抗CD3 hSP34-PEG2k-DSP Eコンジュゲートの挿入の際に、脂質5のLNPは、流体力学直径の大きな変化を示した（脂質7のLNPに対して）。得られた標的化されたLNPを、一次ヒトT細胞において実施例8に記載される *in vitro* トランスフェクションプロトコルを使用して評価した。図12A~12Eに示されるように、両製剤は  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  未満の用量でT細胞によって十分に許容された（PBS対照に対して細胞生存率の最小の低下が観察された）。Cy5+およびCy5 MFI値によって例示されるように、両製剤は、細胞と等しく会合し、これは、コンジュゲート挿入プロセスが、イオン化可能な脂質の化学に依存

40

50

しないことを示唆した。

#### 【0523】

同様のGFP+%およびGFP MFI値によって例示されるように（図12AおよびB）、両方のイオン化可能な脂質（5および7）を用いて、GFPタンパク質の用量依存性発現が観察された。同様のCy5+%およびCy5 MFI値によって例示されるように（図12CおよびD）、両製剤が同様のレベルの細胞会合をもたらした。しかし、脂質7のLNP製剤（見かけのpKa約6.4）は、脂質5のLNP製剤（見かけのpKa約7）に対して有意に低いレベルのGFPタンパク質発現を示し、これは、相対的に不十分な脂質7のLNPとのサイトゾルへのアクセスを示唆した。両方のイオン化可能な脂質（5および7）が、許容されるレベルのmRNAカプセル化（<30%の色素がアクセス可能なRNAおよび>60%の総mRNA回収率）をもたらした。

#### 【0524】

#### 【表11】

表10. 脂質5および脂質7のLNPのmRNA含量

| イオン化可能な脂質 | 理論上の総mRNA (μg/mL) | 測定された総 (Triton法) mRNA (μg/mL) | Ribogreen 色素がアクセス可能なmRNA (μg/mL) | 色素がアクセス可能なmRNA % |
|-----------|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------|
| 脂質5       | 50                | 43                            | 10                               | 23%              |
| 脂質7       | 50                | 42                            | 6                                | 14%              |

#### 【実施例11】

#### 【0525】

一次ヒトT細胞における脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMAのLNPの特性 *in vitro* タンパク質発現

この実施例は、脂質5および脂質8に由来するLNPに起因するGFPタンパク質発現を、DLn-MC3-DMAを使用して作製されたLNPと比較する。ナノ粒子を、混合プロセス、それに続いてバッファー交換を使用してまず生成する。このように生成された粒子を続いて、細胞とのLNP会合およびリポーター遺伝子の発現を評価するためにヒトCD3+T細胞において *in vitro* で試験した。

#### 【0526】

GFP-mRNAとシアニン-5色素標識mRNA (TriLink Biotechnologies Inc.) の90-10 (w/w) 混合物をカプセル化する脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMAのLNPを、実施例4に記載されるボルテキサー混合およびバッファー交換プロセスを使用して調製した。3種の製剤全てが、150nm未満の範囲の流体力学直径および中程度の多分散を示す粒子をもたらした（図37AおよびB）。さらに、脂質5、8およびDLn-MC3-DMAを使用し、ボルテキサー法を使用して作製された3種の製剤全てが、許容されるmRNAカプセル化（<30%の色素がアクセス可能なmRNA）および中程度のmRNA回収率（実施例3において記載されたTriton-デフォーミュレーション手順を使用して回収された>60%のカプセル化されたmRNA）を示した。図37に示されるように、実施例4に記載される挿入手順を使用する抗CD3 hSP34-PEG2k-DSP Eコンジュゲーションの挿入は、流体力学直径およびPDIのわずかな増大しかもたらさなかった。得られた標的化されたLNPを、一次ヒトT細胞において実施例8に記載される *in vitro* トランスフェクションプロトコルを使用して評価した。図38に示されるように、3種の製剤全てが、0.5 μg/mL未満の用量でT細胞によって十分に許容され（PBS対照に対して細胞生存率の<40%の低下）、脂質8のLNPは、2 μg/mLのより高い用量でわずかに低い生存率を示した（図38E）。GFP+細胞の高いパーセンテージおよび強いGFP MFI値によって例示されるように（図38A、B）、イオン化可能な脂質2および8を用いてGFPタンパク質の用量依存性発現が観察された。しかし、DLn-MC3-DMA

A（同様に図38A、Bにおいて示される）のLNPは、GFPタンパク質を発現できなかった。脂質2または脂質8製剤におけるCy5+およびCy5 MFI値の、DLn-MC3-DMAのLNPのトランスフェクションにおける対応するレベルとの比較（図38CおよびD）は、3種の製剤全てがT細胞と等しく会合したことを示し、これは、抗体挿入プロセスの効率がイオン化可能な脂質の化学的特性とは独立していることを示唆する。DLn-MC3-DMA LNPの不十分な性能は、この製剤が一次ヒトT細胞におけるmRNAの不十分なサイトゾルでの利用可能性をもたらすことに起因する可能性がある。

【0527】

【表12】

表11A. 脂質5、脂質8およびDLn-MC3-DMA LNP mRNA 含量

| イオン化可能な脂質   | 理論上の総 mRNA (μg/mL) | 測定された総 (Triton 法) mRNA (μg/mL) | Ribogreen 色素がアクセス可能な mRNA (μg/mL) |
|-------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 脂質8         | 42.5               | 30                             | 3                                 |
| DLn-MC3-DMA | 42.5               | 33                             | 2                                 |
| 脂質5         | 42.5               | 27                             | 4                                 |

【実施例12】

【0528】

IN VITROタンパク質発現一種々の密度を有するCD3およびCD8標的化CY5/GFP LNP

この実施例は、種々のFab密度でCy5/GFP mRNA LNP中に後挿入された抗CD3または抗CD8 Fabのいずれかを用いてヒトCD8 T細胞を標的化することならびに粒子結合、トランスフェクション、生存率、CD69上方制御およびIFNγ分泌に対するその効果を記載する。

【0529】

LNPを、実施例6に記載される混合プロセス、実施例21において記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。実施例4に記載される方法から生成したhSP34およびTRX2 Fab-脂質コンジュゲートおよび非T細胞特異的抗HER2脂質コンジュゲート(Nellis DF, Ekstrom DL, Kirpotin DB, Zhu J, Andersson R, Broadt TL, Ouellette TF, Perkins SC, Roach JM, Drummond DC, Hong K, Marks JD, Park JW and Giardina SL (2005) Preclinical manufacture of an anti-HER2 scFv-PEG-DSPE, liposome-inserting conjugate. 1. Gram-scale production and purification. Biotechnol Prog 21:205~220頁)を、コンジュゲートおよびLNPと一緒に添加することおよび溶液を混合せずにサーマルサイクラー中、60℃で60分間加熱し、4℃に3~5分間冷却することによって、脂質8、Cy5標識GFP mRNAおよびGFP mRNA (1:9 Cy5:GFP質量比)を含有するLNP中に種々の密度 (SP34 0.6~17 g/mol; TRX2 3~9 g/mol; 抗HER2 17 g/mol)で後挿入した。次いで、粒子を、Hepes緩衝生理食塩水pH7.4を用いて25 μg/mLのmRNAに希釈し、その後、最終濃度がおおよそ2.5 μg/mLのmRNAであった実施例8と同様の方法を使用しておおよそ24時間ヒトCD8 T細胞にトランスフェクションした（または偽トランスフェクションとして10 μLのHepes緩衝生理食塩水pH7.4バッファーを添加し

10

20

30

40

50

た)。トランスフェクション後、LNP結合効率(Cy5)およびトランスフェクション効率(GFP)をフローサイトメトリーによって評価した。市販のELISAキットを製造業者の推奨条件下(R&D Systems Duo set)で使用する、上清をヒトIFN $\gamma$ 濃度について測定した。

#### 【0530】

SP34およびTRX2 Fabが後挿入されたLNPについて高いトランスフェクション(図13A)および結合(図13B)が観察され、広い範囲のFab密度がトランスフェクションを媒介し、一方で、非特異的HER2標的化LNPは、低い結合およびトランスフェクションを示した。hSP34 CD3標的化LNPを使用した場合に細胞生存率の幾分かの喪失が観察された(図14A)が、TRX2 CD8標的化LNPは、非特異的HER2標的化LNPおよびトランスフェクトされていない(偽バッファーが添加された)T細胞と同様の生存率を有していた。さらに、hSP34(マウスまたはヒトラムダを有する)CD3標的化LNPは、TRX2 CD8標的化、HER2標的化LNPおよび偽T細胞トランスフェクション条件と比較して高いIFN $\gamma$ 分泌を媒介した(図14B)。

10

#### 【0531】

この研究は、全ての場合において、広い範囲のFab密度を使用し、CD3および／またはCD8標的化LNPを用いて、CD8 T細胞に効率的にトランスフェクトできることを示す。さらに、抗CD8 Fabを使用することで、高いCD69上方制御およびIFN $\gamma$ 分泌を避けながら効率的なLNPトランスフェクションを媒介できる。

20

#### 【実施例13】

#### 【0532】

IN VITROタンパク質発現一種々の密度を有するCD3、CD8およびCD3/CD8標的化TTR-023 LNP

この実施例は、種々のFab密度で抗CD20 CAR(TTR-023)mRNA LNP中に後挿入された抗CD3または抗CD8 Fabのいずれかを用いてヒトCD3 T細胞を標的化することならびにトランスフェクション、生存率、CD69上方制御およびIFN $\gamma$ 分泌に対するその効果を記載する。

#### 【0533】

LNPを、実施例6に記載される混合プロセス、実施例21において以下に記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。実施例12と同様の方法を使用して、hSP34およびTRX2 Fab-脂質コンジュゲートおよび非T細胞特異的抗HER2脂質コンジュゲート(Nellis DF, Ekstrom DL, Kirpotin DB, Zhu J, Andersson R, Broadt TL, Ouellette TF, Perkins SC, Roach JM, Drummond DC, Hong K, Marks JD, Park JW and Giardina SL (2005) Preclinical manufacture of an anti-HER2 scFv-PEG-DSPE, liposome-inserting conjugate. 1. Gram-scale production and purification. Biotechnol Prog 21:205~220頁)を、脂質8および抗CD20標的化CART mRNAを含有するLNP中に種々の密度(SP34 0.25~17 g/mol; TRX2 0.25~9 g/mol; SP34+TRX2 0.25~9 g/mol各コンジュゲート; 抗HER2 17 g/mol)で後挿入した。トランスフェクションは、およそ2.5  $\mu$ g/mLのmRNAでヒトCD3 T細胞を用いておよそ24時間実施した。FACS分析のために、CD8をCD4細胞から区別するためのCD69(Biolegend、310930)およびCD4(Biolegend、344648)についての染色に加えて、TTR-023 CAR(以下に提供される配列)上のN末端FLAG-タグバリエーション配列に結合するM1抗体(Sigma、F3040)を用いてT細胞を染色した。

30

40

#### 【0534】

50

単独または T R X 2 と同時標的化された h S P 3 4 について、2 ～ 1 7 g / m o l の間の F a b で高いトランスフェクション効率（図 1 5 A および 1 5 B）が観察され、6 ～ 9 g / m o l の F a b で T R X 2 についてトランスフェクションがバックグラウンドを上回って検出された。トランスフェクション結果と一致して、C D 6 9 は標的特異的に上方制御され、h S P 3 4 F a b による C D 3 標的化は、C D 8 および C D 4 細胞両方で C D 6 9 発現を誘導し、T R X 2 による C D 8 標的化は、C D 8 細胞でのみ C D 6 9 発現を媒介した（図 1 6 A および 1 6 B）。T R X 2 F a b を用いる C D 8 標的化 L N P は、C D 8 T 細胞での観察可能な C D 6 9 上方制御に関わらず、C D 3 および C D 3 / C D 8 標的化 L N P に対して低レベルの I F N  $\gamma$  分泌を誘導した（図 1 7）。

【0535】

10

この研究は、全ての場合において広い範囲の F a b 密度を使用して、C D 4 および C D 8 T 細胞の両方を、C D 3 標的化および C D 3 / C D 8 標的化 L N P を用いて効率的にトランスフェクトできることならびに C D 8 標的化 L N P を用いて、C D 8 細胞に特異的に（C D 4 トランスフェクションの回避）トランスフェクトできることを示す。さらに、抗 C D 8 F a b を使用することで、高い C D 6 9 上方制御および I F N  $\gamma$  分泌を避けながら、C A R m R N A を用いる効率的なトランスフェクションを媒介できる。

【0536】

T T R - 0 2 3 抗 C D 2 0 ( L e u - 1 6 ) C A R 配列（リーダーを含む）（配列番号 2 4）：

M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D Y K A K E V Q L Q Q S G A E L V K P G  
A S V K M S C K A S G Y T F T S Y N M H W V K Q T P G Q G L E W I G A I Y P G N  
G D T S Y N Q K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A D Y Y  
C A R S N Y Y G S S Y W F F D V W G A G T T V T V S S G G G S G G G S G G G G S  
S D I V L T Q S P A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S V N Y M D W Y Q K K P  
G S S P K P W I Y A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S R V E A  
E D A A T Y Y C Q Q W S F N P P T F G G G T K L E I K G G G G S A A A I E V M Y  
P P P Y L D N E K S N G T I I H V K G K H L C P S P L F P G P S K P F W V L V V  
V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H S D Y M N M T P R R  
P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S R V K F S R S A E P P A Y Q Q G Q N  
Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L  
Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K  
D T Y D A L H M Q A L P P R

20

30

40

50

対応する核酸配列（配列番号 2 5）：

a t g g a g a c c g a c a c c c c t g t t g c t t t g g g t a c t g t t a c t t t  
g g g t g c c c g g a t c t a c c g g t g a t t a c a a g g c c a a g g a g g t  
g c a g c t g c a g c a g a g c g g a g c c g a g c t g g t g a a g c c a g g c  
g c t t c c g t g a a g a t g t c t t g t a a g g c c t c c g g c t a c a c a t  
t c a c c a g c t a c a a t a t g c a c t g g g t a a a g c a g a c t c c g g g  
g c a g g g c c t g g a g t g g a t a g g t g c c a t c t a c c c t g g c a a c  
g g c g a c a c c a g c t a c a a c c a g a a g t t t a a g g g g a a g g c t a  
c t c t a a c a g c g g a c a a g t c g t c c t c t a c c g c c t a c a t g c a  
a c t c a g c t c c c t g a c g a g c g a g g a c t c c g c g g a c t a c t a c  
t g t g c c c g c t c c a a c t a c t a c g g c t c t a g c t a t t g g t t c t  
t c g a c g t g t g g g g c g c t g g a a c g a c c g t g a c c g t g t c t t c  
c g g t g g a g g t t c c g g g g c g g a a g c g g c g g t g g c g g c a g t  
t c g g a c a t c g t g c t g a c c c a g a g c c c t g c c a t c c t g t c c g  
c t t c c c c g g g g a g a a a g t t a c g a t g a c c t g c c g a g c g a g  
c t c c a g t g t c a a c t a c a t g g a t t g g t a c c a g a a g a a g c c c  
g g c a g c a g t c c c a a g c c g t g g a t t t a c g c t a c t a g c a a c c  
t g g c g t c c g g t g t c c c g g c t c g c t t c t c a g g t t c t g g c t c

g g g t a c t a g t t a t t c a t t a a c c a t t t c t c g c g t g g a g g c t  
 g a g g a c g c t g c c a c c t a c t a c t g c c a a c a g t g g t c t t t c a  
 a c c c t c c c a c t t t t c g g a g g c g g c a c c a a g c t c g a g a t c a a  
 g g g c g g g g t g g c t c c g c a g c a g c c a t t g a g g t g a t g t a t  
 c c t c c t c c c t a t t t g g a c a a c g a g a a g t c a a a t g g c a c c a  
 t c a t c c a c g t t a a g g g c a a g c a c c t g t g c c c a t c t c c c c t  
 g t t c c c a g g c c c c t c t a a g c c c t t c t g g g t c c t g g t g g t g  
 g t c g g c g g c g t c c t g g c a t g t t a c t c t c t g c t g g t g a c c g  
 t c g c g t t c a t c a t c t t t t g g g t c c g g t c c a a g c g c a g c c g  
 c c t g c t c c a c t c c g a c t a c a t g a a t a t g a c t c c t c g t a g g  
 c c c g g t c c a a c c c g c a a g c a c t a c c a g c c g t a c g c g c c g c  
 c c a g a g a c t t t g c t g c t t a c c g a t c c a g a g t g a a a t t t t c  
 t a g g t c g g c c g a a c c t c c c g c a t a t c a g c a g g g c c a g a a c  
 c a g c t g t a c a a c g a a c t c a a c t t g g g a c g g c g c g a g g a a t  
 a c g a t g t g c t g g a t a a a c g c c g t g g c c g c g a t c c c g a g a t  
 g g g c g g g a a g c c a c g t c g c a a a a a c c c t c a g g a g g g c c t t  
 t a c a a c g a g t t g c a g a a g g a c a a a a t g g c g g a g g c c t a c t  
 c c g a g a t c g g a a t g a a g g g g g a g c g c c g g c g c g g c a a a g g  
 g c a t g a c g g c c t c t a c c a g g g c c t g t c c a c a g c c a c g a a a  
 g a c a c c t a t g a c g c c c t g c a t a t g c a g g c c c t g c c c c c g c  
 g c t g a t a a t g a

【実施例 14】

【0537】

IN VITROタンパク質発現—他のクローンを用いるCD3およびCD8標的化された  
 この実施例は、種々のFab密度でCy5／GFP mRNA LNPに後挿入された  
 抗CD3または抗CD8 Fabのいずれかを用いてヒトCD8 T細胞を標的化するこ  
 とならびに粒子結合、トランスフェクション、生存率、CD69上方制御およびIFN $\gamma$   
 分泌に対するその効果を記載する。

【0538】

LNPを、実施例6に記載される混合プロセス、実施例21において記載されるバッ  
 ファー交換プロセスを使用して調製した。実施例12と同様の方法を使用して、hSP34  
 、Hu291、TRX2、OKT8 Fab—脂質コンジュゲートおよび非T細胞特異的  
 抗HER2脂質コンジュゲート(Nellis DF, Ekstrom DL, Kiprotin DB, Zhu J, Andersson R, Broadt TL,  
 Ouellette TF, Perkins SC, Roach JM, Drummond DC, Hong K, Marks JD, Park JW and Gi  
 ardina SL (2005) Preclinical manufacture  
 of an anti-HER2 scFv-PEG-DSPE, liposome-  
 inserting conjugate. 1. Gram-scale prod  
 uction and purification. Biotechnol Prog  
 21:205~220頁)を、脂質8およびCy5／GFP mRNAを含有するLNP  
 中に種々の密度(表11)で後挿入した。トランスフェクションは、およそ2.5  $\mu$ g/  
 mLのmRNAでヒトCD8 T細胞を用いておよそ24時間実施した。

【0539】

両クローンが高レベルのCy5+T細胞%を示し、同一標的、CD3に結合するにもか  
 かわらず(図19Aおよび19B)、SP34は、Hu291よりも高いトランスフェク  
 ション%(図18A)および平均蛍光強度、MFI)によって定量化される実質的により  
 高いGFP発現レベル(図18B)を媒介した。CD8標的化についてと同様に、両クロ  
 ーンがCy5+% (図19A)によって測定される高レベルの粒子結合を媒介するにも関  
 わらず、TRX2は、GFP+%およびMFIの両測定基準(図18Aおよび18B)に

よって O K T 8 よりも高いトランスフェクションを媒介した。さらに、O K T 8 および T R X 2 を組み合わせることで、粒子結合（図 1 9 B）の量が増大したが、トランスフェクションの増強は提供しなかった（図 1 8 A および 1 8 B）。

【0540】

このデータは、標的タンパク質上の F a b が結合するエピトープが、効率的な粒子取り込み、トランスフェクションおよび翻訳を媒介するその能力の決定において重要であり得ることならびに標的への効率的な結合は、効率的なトランスフェクションを保証しないことを示す。

【0541】

【表 1 3】

10

表 11: 標的挿入後 LNP Fab 密度

| Fab クローン    | Fab 密度 1 (g/mol) | Fab 密度 2 (g/mol) |
|-------------|------------------|------------------|
| SP34-mlam   | 12               | 17               |
| Hu291       | 6                | 12               |
| OKT8        | 3                | 6                |
| TRX2        | 3                | 6                |
| OKT8 / TRX2 | 3                | 6                |
| F5          | 17               | -                |

20

【実施例 1 5】

【0542】

I N V I T R O タンパク質発現 - C D 3、C D 8、C D 4 および C D 8 / C D 4 標的化  
【0543】

この実施例は、種々の F a b 密度で C y 5 / G F P m R N A L N P 中に後挿入された抗 C D 3、抗 C D 8 抗 C D 4 または抗 C D 8 および抗 C D 4 F a b のいずれかを用いてヒト C D 3 T 細胞を標的化することならびに粒子結合、トランスフェクション、生存率、C D 6 9 上方制御および I F N  $\gamma$  分泌に対するその効果を示す。

30

【0544】

L N P は、実施例 6 に記載される混合プロセス、実施例 2 1 において記載されるバッファ交換プロセスを使用して調製した。実施例 1 2 と同様の方法を使用して、h S P 3 4、T R X 2 およびイバリズマブ F a b - 脂質コンジュゲートおよび非 T 細胞特異的抗 H E R 2 脂質コンジュゲートを種々の密度で（図 2 0 A および 2 0 B に指定される）脂質 8 および C y 5 / G F P m R N A を含有する L N P 中に後挿入した。トランスフェクションを、ヒト C D 3 T 細胞を用いておよそ 2 . 5  $\mu$  g / m L の m R N A でおよそ 2 4 時間実施し、F A C S 分析のために、C D 8 を C D 4 細胞から区別するために C D 6 9（B i o l e g e n d、3 1 0 9 3 0）および C D 4（B i o l e g e n d、3 4 4 6 4 8）について染色した。

40

【0545】

以前の結果と一致して、h S P 3 4 および T R X 2 は、特定の L N P 結合ならびに C D 3 および C D 8 細胞へのトランスフェクションをそれぞれ媒介した（図 2 0 A および 2 0 B ならびに図 2 1 A 2 1 B）。イバリズマブの V H および V L 配列に基づく C D 4 標的化 F a b は、C D 4 T 細胞の高い結合およびトランスフェクションを媒介する一方で、C D 8 T 細胞の最小のオフターゲット結合およびトランスフェクションを示した。同一 L N P 中に T R X 2 およびイバリズマブ F a b が後挿入された場合には、広い範囲の F a

50

b密度を使用してCD4およびCD8両細胞において高レベルの結合およびトランスフェクションが観察された。hSP34が高レベルのCD69上方制御を駆動する一方で（図22Aおよび22B）、TRX2単独、イバリズマブーFab単独およびイバリズマブーFabと組み合わせたTRX2は、かなり低いレベルのCD69を媒介した。さらに、SP34は、TRX2、イバリズマブーFabまたはそれらの組合せよりも高いレベルのIFN $\gamma$ （図23）を駆動した。

【0546】

この研究は、全ての場合において広い範囲のFab密度を使用して、CD4およびCD8T細胞の両方を、CD3標的化およびCD8／CD4標的化LNPを用いて効率的にトランスフェクトできること、CD8標的化LNPを用いて、CD8細胞に特異的に（CD4トランスフェクションの回避）トランスフェクトできることならびにCD4標的化LNPを用いて、CD4細胞に特異的に（CD8トランスフェクションの回避）トランスフェクトできることを示す。さらに、抗CD8 Fab、抗CD4 Fabまたは抗CD8および抗CD4 Fabの両方を使用することで、高いCD69上方制御およびIFN $\gamma$ 分泌を避けながら、効率的なトランスフェクションを媒介できる。

【実施例16】

【0547】

全血トランスフェクションのためのIN VITRO実験プロトコール

この実施例は、Fab標的化mRNA LNPを使用して全血において免疫細胞にトランスフェクトするために使用される方法を記載する。

【0548】

健常なボランティアから得た静脈血をヘパリンチューブ（BD Biosciences 367526番）において抗凝固剤処置し、96ウェル丸底プレート中に50 $\mu$ Lで播種した。全血のトランスフェクションは、5 $\mu$ g/mLのmRNAを含有するナノ粒子を細胞に添加することおよび37 $^{\circ}$ Cで分析の時間まで共培養することによって簡単に実施した。トランスフェクション効率を評価するために、トランスフェクションの24時間後にフローサイトメトリーによって細胞を分析した。2.5 $\mu$ g/mLで使用されたLNP（後挿入された標的とともに、および伴わずに）：RDM073.23。ヒト血液から得られた細胞をフローサイトメトリーによって分析した。全血トランスフェクション効率の分析の前に、赤血球を、VersaLyse Lysing溶液（Beckman Coulter A09777番）を用いて室温で10分間2回溶解した。全血のフローサイトメトリー分析において適用される一次抗体は、以下を含んでいた：CD4-FITC（1：200）（BD Biosciences 555346番）、CD19-BUV395（1：400）（BD Biosciences 563551番）、CD56-BUV737（1：400）（BD Biosciences 741842番）。固定可能な生存率色素eFluor780（eBiosciences 65-0865-14番）を使用して、全てのサンプルの生存率を評価した。フロー分析のために、 $1 \times 10^5$ 個の細胞を氷上で5分間Fcブロックし（BD Biosciences 564219番）、それに続いて、固定可能な生存率色素eFluor780を用いて死細胞を標識し、特異的抗体を用いて氷上で30分間表面染色した。

【0549】

ポジティブおよびネガティブコンペンセーションビーズを使用してマルチカラーフローパネルにおいて各蛍光色素のコンペンセーションを実施した。バックグラウンド蛍光のレベルを決定するために、および陽性細胞集団に対して陰性細胞集団のゲートを設定するために、蛍光マイナス1（FMO）サンプルおよび未染色対照を含めた。

【0550】

全てのサンプルは、FACS DIVAソフトウェア（Becton Dickinson）を起動するBD LSRT Fortessa X-20（BD Biosciences）で獲得した。収集した全てのデータをFlowJo 10.7.1ソフトウェアおよびGraphPad Prismバージョン9.0を使用して分析した。

## 【実施例 17】

## 【0551】

ヒト全血における *In vitro* 細胞特異的タンパク質発現 (*mcherry*)

この実施例は、種々の Fab 密度で *mCherry* mRNA LNP 中に後挿入された抗 CD3、抗 CD8、抗 CD2、抗 CD5、抗 CD7 Fab またはそれらの組合せを用いて全血においてヒト T 細胞を特異的に標的化することならびにトランスフェクションおよび CD69 上方制御分泌に対するその効果を記載する。

## 【0552】

LNP を、以下の表 12 に記載される成分比率を使用し、実施例 2 に記載されるボルテックス混合プロセスを使用して調製した。実施例 4 に記載されるプロセスからのコンジュゲートを粒子形成後に後挿入した。実施例 3 に記載される方法を使用して粒子特性を特性決定し、表 13 において以下に記載する。

## 【0553】

## 【表 14】

表 12

| バッチ   | 100 $\mu$ g の mRNA あたりの nmol 脂質 |         |      |             |          |
|-------|---------------------------------|---------|------|-------------|----------|
|       | 脂質 8                            | コレステロール | DSPC | DMG-PEG2000 | コンジュゲート  |
| 73.23 | 1500                            | 1200    | 300  | 75          | 0.1-0.6* |

\*特定のコンジュゲートに応じて変わる。100 $\mu$ g の mRNA あたり 0.6 nmol において使用される TRX2。

## 【0554】

## 【表 15】

表 13

| バッチ   | サイズ(nm) | PDI   | EE (%) | pH7.4 でのゼータ(mV) |
|-------|---------|-------|--------|-----------------|
| 73.23 | 123.6   | 0.217 | 93.2   | N.D.            |

## 【0555】

実施例 16 に記載される方法を使用する、ヒト全血において直接的に、それぞれ後挿入された (表 14 に記載された密度)、Fab クローン hSP34 (抗 CD3)、TRX2 (抗 CD8)、He3 (抗 CD5)、抗 CD2 (TS2、9.6 または 9-1)、抗 CD7 (TH-69) または *mutOKT8* およびこれらの組合せを用いる、古典的な電離層製剤を用いるトランスフェクション効率。WB において脂質 8 を有する LNP を 2.5  $\mu$ g/mL の *mCherry* mRNA とともに 24 時間トランスフェクトした。

## 【0556】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 14

| コンジュゲート 1 | コンジュゲート 2 | 密度(g/mol) | 標的 1 | 標的 2 |
|-----------|-----------|-----------|------|------|
| hSP34     | -         | 9,00      | CD3  | -    |
| TRX2      | -         | 9,00      | CD8  | -    |
| TRX2      | hSP34     | 9,00      | CD8  | CD3  |
| He3       | -         | 3,00      | CD5  | -    |
| He3       | TRX2      | 3,00      | CD5  | CD8  |
| TS2/18.1  | -         | 1,50      | CD2  | -    |
| 9.6       | -         | 1,50      | CD2  | -    |
| TS2/18.1  | TRX2      | 1,50      | CD2  | CD8  |
| 9.6       | TRX2      | 1,50      | CD2  | CD8  |
| TH-69     | -         | 3,00      | CD7  | -    |
| TH-69     | TRX2      | 3,00      | CD7  | CD8  |
| 9-1       | TS1/18.1  | 1,50      | CD2  | CD2  |
| 9-1       | 9.6       | 1,50      | CD2  | CD2  |
| He3       | TH-69     | 3,00      | CD5  | CD7  |
| mutOKT8   | -         | 9,00      | NT   | -    |
| DSPE-PEG  | -         | 9,00*     | NT   | -    |
| TH-69     | hSP34     | 3,00      | CD7  | CD3  |
| TS2/18.1  | He3       | 1,50      | CD2  | CD5  |

\*約 48kD Fab の 9g/mol から添加される量に対応する添加される DSPE-PEG 量

## 【0557】

標的化 Fab の全てが、標的およびクローンに応じて変動する程度の効率でバックグラウンドに対して観察可能なトランスフェクションを可能にする。CD8 および CD4 細胞両方の最も効率的なトランスフェクションを、hSP34、He3 および hSP34/He3、He3/TH-69、hSP34/TRX2、He3/TRX2、hSP34/TH-69、TH-69/TRX2、9.6/9-1、TS2/9-1 の組合せ（図 24A および 24B）を使用して観察した。TRX2 は、CD4 T 細胞において観察されるトランスフェクションを伴わずに、CD8 T 細胞に効率的にトランスフェクトする（図 24A および 24B）。TRX2/He3、9.6/9-1、TS2/9-1 および He3/TH-69 を用いる組合せのトランスフェクション効率の点で相加効果が観察され（図 24A および 24B）、2 つの異なる標的または同一標的上の 2 つの異なるエピトープを標的化することによって相互作用が媒介されることを示した。それらの組合せに加えて CD3、CD8、CD2 および CD7 標的化を用いて、NK 細胞におけるトランスフェクションも観察された（図 25B）。一般に、B 細胞（図 25A）および顆粒球（図 26A）においてオフターゲットトランスフェクションは観察されない。CD3 標的化または CD8 もしくは CD7 のような他の標的と組み合わせた CD3 標的化を用いて CD4 および CD8 細胞においてのみ、高い CD69 上方制御が観察された（図 26B および 26C）。さらに、Fab 標的化製剤に比べて同様の DPSE-PEG を用いて後挿入された非標的

化 L N P および m u t O K T 8 F a b を用いて後挿入された L N P は、免疫細胞種のいずれかのトランスフェクションを示さず、これは、F a b 標的化によって特異的トランスフェクションが媒介されることを示唆した（図 2 4 A および 2 4 B）。

#### 【0558】

この研究は、全血において、C D 3 標的化、C D 5 標的化、C D 7 標的化または C D 2 標的化 L N P ならびにそれらの標的化組合せを用いて、C D 4 および C D 8 T 細胞に効率的にトランスフェクトできること、C D 8 標的化 L N P を用いて、C D 8 細胞に特異的に（C D 4 トランスフェクションの回避）トランスフェクトできること、C D 5、C D 7 または C D 2 標的化と組み合わせた C D 8 標的化を使用して、トランスフェクションを C D 4 細胞に対して C D 8 細胞に向けて偏らせることができることを示す。

10

#### 【0559】

異なる標的を標的化する F a b または同一標的に結合するが、異なるエピトープを標的とすると知られている F a b クローン（例えば、抗 C D 2 クローン 9 . 6 および 9 - 1）を組み合わせることは、トランスフェクション効率の相乗的増大につながり得る。C D 8、C D 7 または C D 2 標的化 F a b またはその組合せを、ヒト N K 細胞または N K 細胞サブセット上のこれらのマーカーの既知表面発現と一致して用いて、N K 細胞にトランスフェクトした。抗 C D 3、抗 C D 8、抗 C D 5、抗 C D 7 または抗 C D 2 F a b またはそれらの組合せを有する L N P は、T 細胞および N K 細胞（一部の F a b について）の効率的トランスフェクションを媒介できるが、B 細胞または顆粒球では最小トランスフェクションが観察され、これは、非標的化 F a b（m u t O K T 8）または非標的化 L N P が T 細胞または N K 細胞にトランスフェクトしなかったことを考慮して、F a b 標的化によって可能となった高い特異的取り込みおよびトランスフェクションを示した。さらに、抗 C D 8、抗 C D 5、抗 C D 7 または抗 C D 2 F a b またはそれらの組合せを使用することで、高い C D 6 9 発現を駆動せずに効率的トランスフェクションを媒介できる。

20

#### 【実施例 18】

#### 【0560】

M C H E R R Y を発現する L N P を用いる免疫細胞の I N - V I V O 再プログラム

この実施例は、m C h e r r y を発現する L N P を用いて処置されたヒト化マウスにおける免疫細胞の再プログラムの経時的推移を記載する。

#### 【0561】

30

マウス系統およびヒト化

N C G マウス（N O D - P r k d c e m 2 6 C d 5 2 I l 2 r g e m 2 6 C d 2 2 / N j u C r l）マウスモデルを、Charles River Laboratories から購入した。4 週齢の雄マウスに、尾静脈注射によって滅菌 P B S 中の適格ドナー（Charles river による）の 1 0 0 0 万個の P B M C を移植し、T i d a l 施設へ輸送した。個々の体重を週に 2 回モニタリングし、適切な間隔で血液サンプルを収集して、ヒト免疫細胞移植を評価した。

#### 【0562】

免疫不全マウスにおけるヒト T 細胞移植の評価

各マウスからの尾静脈出血によって 5 0  $\mu$  l の血液を収集した。赤血球を、V e r s a l l y s e、R B C 溶解溶液を、製造業者によって指示されるようなプロトコールに従って使用して（Beckman Coulter A 0 9 7 7 7）、溶解した。細胞を h C D 4 5 & h C D 3 を用いて染色して、ヒト T 細胞の移植を決定した。P B M C 注射の 3 0 日後、マウスは 3 0 ~ 6 0 % の範囲の h u C D 4 5 + を有していた。これらのヒト化マウスを、m C h e r r y を発現する L N P による免疫細胞の再プログラムについて評価した。

40

#### 【0563】

免疫細胞の再プログラム

時間ゼロで、カチオン性脂質 8 および実施例 6 に記載される混合プロセス、実施例 2 1 において記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製され、実施例 5 に記載される

50

プロセスを使用してhSP34-脂質を用いて標的化されたmCherryを発現するLNP（ロット番号201109APG-NF70-409）を、i.v.によって3mg/kgで9匹のマウスに注射し、または6匹のマウスに適切なバッファを注射した。各時点、24、48および96時間で、LNPを用いて処置された3匹のマウスまたはバッファを用いて処置された2匹のマウスを殺した。末端の血液および組織の収集を実施して、以下のように種々の臓器および免疫細胞におけるmCherry発現を決定した。

【0564】

#### 組織および血液サンプル収集

上記の指定の時点で、CO<sub>2</sub>を用いてマウスに麻酔し、その後、サンプル収集した。血液収集のために、胸部を開いて、心臓を露出させた。左心室から最大300μlを採血し、K3EDTAMニコレクトチューブ（Greiner Bio-One）に分注した。次いで、新規シリンジを使用して、心臓から残りの血液をできる限り多く採取した。全ての免疫臓器；脾臓、骨髄、胸腺および全てのリンパ節（舌、腋窩、顎下および腸間膜）を肝臓とともに単離した。免疫細胞を、シリンジによって塗抹および断片化することによって脾臓、胸腺およびリンパ節から単離し、細胞懸濁液を70μMのセルストレーナーを通して濾過し、PBSで洗浄した。肝臓組織の小片を組織ホモジナイザーを用いて穏やかにすりつぶし、ホモジナイズされた組織を消化溶液（0.05%のIV型コラゲナーゼ（Sigma C5138-5G）0.02% BSA（Sigma A2153-100G）、0.001% DNアーゼI、グレードII（Sigma 10104159001）および1mM塩化カルシウム（Sigma C7902-500G）を補給した10mlのHBSS）とともに37℃で30分間インキュベートした。30分後、10mlのHBSSの氷冷溶液を用いて消化を終結させた。

【0565】

#### 免疫表現型検査分析

血液および上記の臓器の全てから得た免疫細胞を、Versalyse、RBC溶解バッファを製造使用説明書のとおりを用いて処理した。以下のパネルに示されるように、生存／死滅固定可能な色素および表面マーカーを用い、標準フロー分析プロトコルを用いて免疫細胞を染色した。Attune、Thermoフローサイトメーターを使用して、陽性集団を決定した。

【0566】

10

20

30

40

50

## 【表 1 7】

表 15. パネル 1

| 抗原           | フルオロフォア        | クローン    | 企業        | カタログ番号 |
|--------------|----------------|---------|-----------|--------|
| 生死色素         | Zombie Aqua    | NA      | BioLegend | 423102 |
| 抗ヒト CD45     | FITC           | 2D1     | BioLegend | 368508 |
| 抗ヒト CD3      | PerCP/シアニン 5.5 | UCTH1   | BioLegend | 300430 |
| 抗ヒト CD8      | APC-Fire750    | SK1     | BioLegend | 344746 |
| 抗ヒト CD4      | BV711          | SK3     | BioLegend | 344648 |
| 抗ヒト CD69     | BV421          | FN50    | BioLegend | 310930 |
| 抗ヒト CD137    | BV421          | 4B4-1   | BioLegend | 309820 |
| 抗ヒト 279 PD-1 | APC            | NAT05   | BioLegend | 367406 |
| 抗ヒト CD366    | APC            | F38-2E2 | BioLegend | 345012 |
| mCherry      | mCherry        | NA      | NA        | NA     |

10

20

## 【 0 5 6 7】

## 【表 1 8】

30

表 16. パネル 2

| 抗原            | フルオロフォア     | クローン   | 企業        | カタログ番号 |
|---------------|-------------|--------|-----------|--------|
| 生死色素          | Zombie Aqua | NA     | BioLegend | 423102 |
| 抗ヒト           | FITC        | 2D1    | BioLegend | 368508 |
| 抗ヒト/マウス CD11b | BV785       | M1/70  | BioLegend | 101243 |
| 抗マウス F4/80    | APC         | BM8    | BioLegend | 123116 |
| 抗ヒト CD19      | BV711       | SJ25C1 | BioLegend | 563036 |
| mCherry       | mCherry     | NA     |           | NA     |

40

## 【 0 5 6 8】

3 mg / kg の mCherry を発現する CD3 標的化 LNP を用いて処置した h u N

50

CG-PBMCマウスは、血液、肝臓および脾臓のT細胞においてmCherryを示した。CD8+T細胞（図27A、27Cおよび27E）は、最高mCherry発現を示し、血液、肝臓および脾臓におけるCD8+T細胞の最大約30%であった。CD4+T細胞（図27B、27Dおよび27F）は、血液、肝臓および脾臓において最大約15%のmCherry発現を示した。分析した他の臓器では、再プログラムは見られなかった。mCherryの発現は、CD3+細胞に限定される。肝臓、骨髄、マクロファージまたはクッパー細胞において、最小のmCherry発現が観察された、または観察されなかった（図28）。

#### 【0569】

全体的に、CD3標的化mCherry LNPは、T細胞を特異的に再プログラムし、骨髄集団では、発現が最小であるか、または発現がなかった。

10

#### 【実施例19】

#### 【0570】

CD3およびまたはCD8標的化抗体のいずれかを含むMCHERRYまたはCD20 CARを発現するLNPを用いる免疫細胞のIN-VIVO再プログラム

この実施例は、mCherryまたはCD20 CARのいずれかを発現するLNPを用いるin vivo再プログラムを記載し、CD3対CD8標的化または両方の組合せを比較する。

#### 【0571】

マウス系統およびヒト化

20

NSG雌マウスをJackson labから購入した。8週齢のマウスに2000万個のPBMC（社内で単離されたロイコパック、ドナー555046、医薬用精度）をi.v.注射した。

#### 【0572】

免疫不全マウスにおけるヒトT細胞移植の評価

各マウスからの尾静脈出血によって50μlの血液を収集した。赤血球を、Versalyse、RBC溶解溶液を、製造業者によって指示される以下のようなプロトコールに従って使用して（Beckman Coulter A09777）、溶解した。細胞をhCD45 & hCD3を用いて染色して、ヒトT細胞の移植を決定した。PBMC注射の30日後、マウスは60~80%の範囲のhuCD45+を有していた。これらのヒト化マウスを、以下のような免疫細胞の再プログラムについて評価した。

30

#### 【0573】

CD3および／またはCD8標的化抗体を含むmCherry & CD20 CARを用いる免疫細胞の再プログラム

時間ゼロで、マウス（n=5）に、i）バッファーまたはLNP発現；ii）17g/molのhSP34を用いて標的化されるTTR-023 mRNA；iii）9g/molのhSP34を用いて標的化されるTTR-023 mRNA；iv）9g/molのTRX2を用いて標的化されるTTR-023 mRNA；v）9g/molのTRX2+9g/molのhSP34を用いて標的化されるTTR-023 mRNA；vi）17g/molのhSP34を用いて標的化されるmCherry mRNA（n=3匹のマウス）のいずれかを用いて3mg/kgの用量でi.v.注射した。24時間後、実施例18に記載されるように50mlの血液を収集し、処理した。96時間で、LNP（上記のような）またはバッファーのいずれかの第2の用量を、3mg/kgでマウスに注射した。第2の用量後、40時間の時点で実施例18に記載のとおり末端の血液および臓器を収集し、処理した。

40

#### 【0574】

LNPを、カチオン性脂質8および実施例6に記載される混合プロセス、実施例21において以下に記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製し、実施例5に記載されるプロセスを使用してhSP34-脂質またはTRX2-脂質を用いて標的化した。以下の表には使用された製剤およびロット番号がまとめられている。

50

【 0 5 7 5 】

【 表 1 9 】

表 17.

| 被験物質の説明                                                | 第 1 の用量材料のロット番号 | 第 2 の用量材料のロット番号 |
|--------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| 17g/mol の hSP34 とともに挿入される TTR-023 LNP                  | 210128APG-NT317 | 210201APG-NT317 |
| 9g/mol の hSP34 とともに挿入される TTR-023 LNP                   | 210128APG-NT309 | 210201APG-NT309 |
| 9g/mol の TRX2 とともに挿入される TTR-023 LNP                    | 210128APG-NT809 | 210201APG-NT809 |
| 9g/mol の hSP34 および 9g/mol の TRX2 とともに挿入される TTR-023 LNP | 210128APG-NT38  | 210201APG-NT38  |
| 17g/mol の hSP34 とともに挿入される mCherry LNP                  | 210128APG-NM317 | 210201APG-NM317 |
| HBS 中の 5.3 重量%スクロース                                    | 210128APG-S1    | 210128APG-S1    |

10

20

【 0 5 7 6 】

## 免疫表現型検査分析

同様の免疫表現型検査分析を、以下に列挙されるパネルを用いて実施例 1 8 に記載されるように行った。CD 2 0 CAR 発現を、一次 M 1 抗体、それに続いて、二次抗体を用いて CD 2 0 CAR によって発現された M 1 タグを検出することによって評価した。

30

【 0 5 7 7 】

40

50

## 【表 2 0】

表 18. パネル 1

| 抗原              | フルオロフォア        | クローン  | 企業               | カタログ番号   |
|-----------------|----------------|-------|------------------|----------|
| 生死色素            | Zombie Aqua    | NA    | BioLegend        | 423102   |
| 抗ヒト CD45        | FITC           | 2D1   | BioLegend        | 368508   |
| 抗ヒト CD3         | PerCP/シアニン 5.5 | UCTH1 | BioLegend        | 300430   |
| 抗ヒト CD8         | APC-Fire750    | SK1   | BioLegend        | 344746   |
| 抗ヒト CD4         | BV711          | SK3   | BioLegend        | 344648   |
| 抗ヒト CD69        | BV421          | FN50  | BioLegend        | 310930   |
| 抗ヒト CD137       | BV421          | 4B4-1 | BioLegend        | 309820   |
| M1 タグ           | NA             | NA    | Sigma            | M1-F3040 |
| M1 に対する二次<br>抗体 | APC            | NA    | Southern biotech | 1090-11S |
| mCherry         | mCherry        | NA    | NA               | NA       |

【 0 5 7 8 】

## 【表 2 1】

表 19. パネル 2

| 抗原            | フルオロフォア     | クローン   | 企業               | カタログ番号   |
|---------------|-------------|--------|------------------|----------|
| 生死色素          | Zombie Aqua | NA     | BioLegend        | 423102   |
| 抗ヒト           | FITC        | 2D1    | BioLegend        | 368508   |
| 抗ヒト/マウス CD11b | BV786       | M1/70  | BioLegend        | 101243   |
| 抗マウス F4/80    | BV421       | BM8    | BioLegend        | 123132   |
| 抗ヒト CD19      | BV711       | SJ25C1 | BioLegend        | 563036   |
| mCherry       | mCherry     | NA     | NA               | NA       |
| M1 タグ         | NA          | NA     | Sigma            | M1-F3040 |
| M1 に対する二次抗体   | APC         | NA     | Southern biotech | 1090-11S |

10

20

## 【0579】

3 mg / kg での第 1 の用量の 24 時間後、抗 CD 3 標的化を使用して mCherry mRNA を用いて > 60 % の T 細胞が再プログラムされる (図 29 A)。CD 3 および CD 8 標的化の両方が、CD 20 CAR mRNA を用いて再プログラムされた > 20 % の T 細胞を示したが、両方の組合せは、CD 20 CAR mRNA を用いて再プログラムされた約 30 % の T 細胞を示した (図 29 B)。3 mg / kg の抗 CD 20 CAR を発現する LNP で第 2 の用量の 40 時間後、CD 3 標的化を使用し、抗 CD 20 CAR を用いて、> 30 % の T 細胞が再プログラムされる；脾臓 > 血液 > 肝臓 > 骨髄 > 胸腺 (図 30 A ~ E)。抗 CD 3 標的化の密度の増大を用いて T 細胞の再プログラムの有意な増大は観察されない (図 30 A ~ E)。3 mg / kg の、CD 8 を用いて標的化された抗 CD 20 CAR を発現する LNP の第 2 の用量の 40 時間後、脾臓 (> 50 %) において他の組織と比較して最大再プログラムを示した (図 30 A ~ E)。予測されたように、CD 8 標的化は、CD 8 + T 細胞を CD 4 + 細胞を上回って選択的に再プログラムする。CD 3 および CD 8 標的化の組合せは、複数の組織において最も頑強な再プログラムを示す；血液 = 脾臓 > 骨髄 > 胸腺 > 肝臓 (図 30 A ~ E)。第 2 の用量の 40 時間後、> 60 % の T 細胞が、抗 CD 3 標的化を使用し、mCherry mRNA を用いて再プログラムされる；脾臓 > 肝臓 > 骨髄 > 血液 (図 31 A ~ E)。mCherry を発現する LNP を用いてこの時点で胸腺またはリンパ節では再プログラムは観察されない。

30

40

## 【0580】

全体的に、CD 3 または CD 8 標的化された再プログラムされた細胞の分布に相違があり、これは mRNA カーゴ依存的でもあるように見える。理論に捉われようとは思わないが、末梢および他の臓器におけるすでに再プログラムされた T 細胞の再分布の異なる速度論による可能性がある。CD 8 標的化は、血液および試験された全ての臓器における CD 8 T 細胞の再プログラムの特異性を示す。血液または臓器中の骨髄細胞において再プログラムは観察されなかった。

## 【実施例 20】

50

## 【0581】

LNPを用いるマウスにおける薬物動態研究

この実施例は、雌のBALB/cマウスにおけるLNPの薬物動態を記載する。

## 【0582】

LNPを、以下の表20に記載される成分比率を使用し、実施例2に記載されるボルトックス混合プロセスを使用して調製した。実施例3に記載される方法を使用して粒子特性を特性決定し、表21において以下に記載する。

## 【0583】

## 【表22】

表20.

10

| バッチ  | 100μg の mRNA あたりの nmol 脂質 |         |      |             |               |
|------|---------------------------|---------|------|-------------|---------------|
|      | 脂質 8                      | コレステロール | DSPC | DMG-PEG2000 | DiI-C18(3)-DS |
| 83.1 | 1500                      | 1200    | 300  | 75          | 9             |

## 【0584】

## 【表23】

表21.

20

| バッチ  | サイズ(nm) | PDI   | EE (%) |
|------|---------|-------|--------|
| 83.1 | 157.4   | 0.165 | 79.6*  |

\* mRNA 定量化に干渉する DiI-C18(3)-DS 蛍光によって影響を受ける可能性が高いカプセル化効率

## 【0585】

8匹の雌のBALB/cマウスを、Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) から購入し、1週間順化させた。食餌は自由に提供された。

30

## 【0586】

マウスに、単回用量の3mg/kgの1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニン-5,5'-ジスルホン酸 (DiI-C18(3)-DS) およびmCherry mRNAを用いて製剤化されたLNPを用いて尾静脈を介して静脈内に注射した。顔面静脈から血液サンプルを得、サンプル収集は、30分~24時間の範囲の時間で行った(各時点についてn=2)。サンプルを10,000g×10分で遠心分離し、血清を分析の時間まで4℃で保存した。表20に記載される製剤のLNPの薬物動態を、図32に概説され、図33に示される時点で血液の収集後にBALB/cマウスにおいて決定し、LNPは、24時間にわたって循環からゆっくりとしか排除されない。

40

## 【0587】

蛍光マイクロプレートリーダー (Spark マルチモードリーダー、Tecan) を使用して蛍光定量化を実施した。リーディングは、555/570nmの励起/発光波長を用い、上部からであった。循環中のナノ粒子の定量化は、標準曲線を使用する内挿によって実施した。

## 【0588】

血清中の37.5μg/mLの理論上の初期LNP濃度を算出する25gの平均マウス重量および2mLのおよその血液用量を使用して、30分後に血漿において注射された用

50

量の約 80 %、1 時間後に約 40 % および 8 時間後に約 10 % が検出された（図 33）。

【0589】

この研究は、現在の製剤が、3 mg / kg の mRNA 用量で投薬された場合に循環中の mRNA レベルを 24 時間よりも長く 0.5  $\mu$ g / mL の濃度を上回って維持できることを示す。

【実施例 21】

【0590】

例示的なイオン化可能な脂質を使用するマイクロ流体インライン混合および接線流濾過による LNP の調製

この実施例は、スケーラブルな単位操作、すなわち、インラインマイクロ流体混合、それに続くエタノール除去およびバッファー交換のための接線流濾過（TFF）を使用する LNP の調製を記載する。

【0591】

実施例 6 における混合プロセスを使用して、複数の LNP バッチを一緒にプールし、300  $\mu$ g / mL の RNA 濃度で合計 60 mL となった。接線流濾過（TFF）を使用するエタノール除去およびバッファー交換を、その後実施した。

【0592】

混合後、中空繊維 TFF モジュール（Repligen、US P / N D02-E100-05-N）を使用して得られた LNP 懸濁液でエタノール除去およびバッファー交換を実施した。手短には、TFF モジュールを使用前に DI 水ですすぎ、ポンプ乾燥した。次いで、LNP をリザーバーに添加し、交換バッファー（150 mM NaCl を有する 25 mM の pH 7.4 の HEPES バッファー）をダイアフィルトレーションバッファーとして使用した。TFF モジュールをプライミングし、次いで、蠕動ポンプを標的流速に増大することおよび標的膜間圧力差（TMP）に到達するまで保持液バルブを調整することによってダイアフィルトレーション（DV）を開始した。212 mL / 分の流速および 3.5 psi の TMP をダイアフィルトレーションを開始したシステムの標的運転パラメータとした。ダイアフィルトレーションプロセスを通じて、保持液バルブを調整することによって TMP を一定に維持した。透過流速をモニタリングし、経時的に大幅に低下しなかった。6 回のダイアフィルトレーションを実施し、各ダイアフィルトレーションの最後に、バッファー交換プロセスを後に追跡するためのサンプルを確保した。最終エタノール含量は、DV サンプルでの屈折率測定によって測定されるように < 0.1 % であり、pH 測定によって、交換バッファーへのバッファー交換が確認された。6 回のダイアフィルトレーションが完了すると、ポンプを停止し、得られた LNP 懸濁液の濃縮をその後実施した。

【0593】

バッファー交換プロセスの際に使用された同一 TFF モジュールを使用して、LNP 懸濁液の濃縮を実施した。バッファー交換プロセスからのポンプ上昇後の TMP および流速を維持し、ダイアフィルトレーションバッファーの添加を停止することによって懸濁液を濃縮させた。得られた LNP 懸濁液を収集し、0.2  $\mu$ m のシリンジフィルターを用いて濾過した。懸濁液を分析目的でサンプリングし、次いで、さらなる使用まで 4 °C で保存した。

【0594】

実施例 3 における LNP 特性決定プロセスを使用して、LNP バッチを特性決定して、平均流体力学直径および mRNA 含量（総および色素がアクセス可能な）を決定した；以下の表 22 に示される。表 22 に示されるように、TFF によるエタノール除去およびバッファー交換を用いるマイクロ流体混合プロセスは、狭い多分散および良好な mRNA カプセル化（< 20 % の色素がアクセス可能な RNA）を示す 100 nm 未満の粒子をもたらす。

【0595】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 22

| サンプル ID/<br>ロット番号  | プロセス点/説明                            | DLS Z-<br>平均<br>直径<br>(nm) | DLS<br>PDI | 総 mRNA<br>含量<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 色素が<br>アクセス<br>可能な<br>mRNA<br>含量<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 色素が<br>アクセス<br>可能な<br>mRNA<br>含量<br>(%) |
|--------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 210107MTM-<br>NR20 | HBS における 6<br>つの DV 後の LNP          | 64                         | 0.08       | 282                                  | 11                                                       | 4%                                      |
| 210107MTM-<br>NR30 | 濃縮(プレフィル<br>ター)後の LNP               | 64                         | 0.10       | 1111                                 | 43                                                       | 4%                                      |
| 210107MTM-<br>NR40 | 濃縮および $0.2\mu\text{m}$<br>の濾過後の LNP | 63                         | 0.06       | 1099                                 | 30                                                       | 3%                                      |

10

## 【実施例 2 2】

20

## 【0 5 9 6】

mRNA LNP の全血トランスフェクションにおける PEG の効果

この実施例は、LNP 結合 (DiR シグナル) およびトランスフェクション効率 (mCherry) に対する PEG の効果を決定するために粒子形成の際に組み込まれた変動するレベルの PEG を有する、DiR 標識を伴う、または伴わない、mCherry mRNA LNP 中に後挿入された抗 CD3 Fab を用いて全血中のヒト T 細胞を特異的に標的化することを記載する。

## 【0 5 9 7】

実施例 4 に記載されたプロセスからの SP34-Fab 脂質コンジュゲートは、3 種の PEG-脂質バリエーション (DSPE-PEG2k-Fab、DSPE-PEG2k-マレイミド (クエンチされた)、DSPE-PEG2k- $\text{OCH}_3$ ) の混合物であり、したがって、追加の PEG (DMG-PEG200) の効果を調査した。LNP を以下の表 23 に記載される成分比率を使用して実施例 2 に記載されるボルテックス混合プロセスを使用して調製し、粒子形成後にコンジュゲートに後挿入する。粒子特性は実施例 3 に記載される方法を使用して特性決定され、表 24 において以下に記載される。

30

## 【0 5 9 8】

40

50

## 【表 2 5】

表 23.

| バッチ       | 100μg の mCherry mRNA あたりの nmol 脂質 |         |      |             |     |         |
|-----------|-----------------------------------|---------|------|-------------|-----|---------|
|           | 脂質 8                              | コレステロール | DSPC | DMG-PEG2000 | DiR | コンジュゲート |
| RDM085.8  | 1500                              | 1200    | 300  | 75          | 4.5 | 1.0     |
| RDM0138   | 1575                              | 1200    | 300  | -           | 4.5 | 1.0     |
| RDM073.19 | 1500                              | 1200    | 300  | 75          | -   | 1.0     |
| RDM149    | 1575                              | 1200    | 300  | -           | -   | 1.0     |

10

## 【0 5 9 9】

## 【表 2 6】

表 24.

| バッチ       | サイズ(nm) | PDI   | EE (%) |
|-----------|---------|-------|--------|
| RDM085.8  | 103.2   | 0.113 | 96.3   |
| RDM0138   | 113.8   | 0.096 | 87.4   |
| RDM073.19 | 119.4   | 0.129 | 83.4   |
| RDM149    | 170.5   | 0.083 | 92.3   |

20

30

## 【0 6 0 0】

健常なボランティアから得た静脈血を、ヒルジンチューブ（Sarstedt 04.1959.001番）において抗凝固剤処置し、96ウェル丸底プレート中に50μLで播種した。全血のトランスフェクションは、細胞に2.5μg/mLのmRNAを含有するLNPを添加することおよび37℃で分析の時間まで共培養することによって実施した。DiR標識されたLNPの結合を評価するために、LNP添加の2時間後に細胞を分析し、トランスフェクション効率のためにフローサイトメトリーによってインキュベーションの24時間後に細胞を分析した。

40

## 【0 6 0 1】

非標的化LNPのために、SP34標的化LNPに対応するようにDSPE-PEG2kのみを後挿入し、図34A～36BにおいてDSPE-PEGと表示された。非標的化LNPについて検出可能な結合（図34A～35B）またはトランスフェクション（図36Aおよび36B）が観察されず、これは、CD3標的化を介したSP34媒介性の高度に特異的なトランスフェクションを示した。SP34-Fab脂質コンジュゲートが後挿入された粒子について、粒子形成の際にDMG-PEG200を欠くLNPは、粒子形成の際にDMG-PEG200を含有していたLNPよりも、CD4（図34Aおよび34B）およびCD8（図35Aおよび34B）T細胞についてDiRシグナルによってより高い結合を示したが、より低いトランスフェクション効率（図36Aおよび36B）を示

50

した。

【0602】

この研究は、後挿入プロセスの部分として添加されている3種のPEG-脂質バリエーションに加えて、第4のPEG-脂質バリエーションの粒子への導入が、粒子取り込みおよびトランスフェクション効率に対して著しい効果を有し得ることを示し、この場合には、トランスフェクション効率においておよそ2～3倍の相違が観察された。

【実施例23】

【0603】

一次ヒトT細胞における、脂質8および脂質5 LNP特性、*in vitro*細胞生存率およびタンパク質発現

この実施例は、GFP-mRNAの一次ヒトT細胞トランスフェクションにおける脂質8および脂質5に由来するCD3標的化LNPの関連*in vitro*毒性を記載する。ナノ粒子を、混合プロセス、それに続いてバッファー交換を使用してまず生成する。このように生成された粒子を続いて、3つのLNP用量でのT細胞生存率、細胞とのLNP会合およびリポーター遺伝子の発現を評価するためにヒトCD3+T細胞において*in vitro*で試験した。

【0604】

GFP-mRNAとシアニン-5色素標識mRNA (TriLink Biotechnologies Inc.) の90-10 (w/w) 混合物をカプセル化する脂質8および脂質5のLNPを、実施例6に記載される混合プロセス、実施例21において記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。2週間または1日のいずれかの間、-20°Cで凍結されて保存されていた脂質5保存溶液（それぞれ、脂質5 (O) および脂質5 (N)）を使用して、脂質5のLNPを生成した。両製剤は、100 nm未満の範囲の流体力学直径および中程度の多分散ならびに良好なmRNAカプセル化および回収率を示す粒子をもたらした（表25、実施例3に記載されたTriton-デフォーミュレーション手順を使用して<25%の色素がアクセス可能なmRNAおよび≥80%のカプセル化されたmRNAが回収された）。図45Aおよび45Bに示されるように、脂質5のLNPは、実施例4に記載される挿入手順を使用する抗CD3 hSP34-PEG2k-DSP Eコンジュゲートの挿入の際に、流体力学直径の大きな変化（脂質8のLNPに対して）を示した。得られた標的化されたLNPを、一次ヒトT細胞において実施例8に記載される*in vitro*トランスフェクションプロトコルを使用して評価した。図46A～46Eに示されるように、PBS対照アームは、約50%のT細胞生存率を示したのに対し、脂質8のLNPのウェルあたり0.125、0.5および2 μgのmRNA/mLの用量は、T細胞に対して用量依存性毒性を示し、T細胞生存率は、ウェルあたり0.125 μgのmRNA/mLでの約45%の生存から、ウェルあたり2 μgのmRNA/mLでの約25%の生存へ低下した。対照的に、脂質5およびLNP（サンプル「O」および「N」の両方）は、T細胞によって一貫して良好に許容され、3つの用量レベル全てで40～45%のT細胞生存率が観察された。脂質5のLNPを用いて観察されたより低い毒性は、脂質5分子中の不安定なエステル結合の加水分解性および／または酵素性分解によって駆動されるT細胞からの脂質5のより迅速な分解およびクリアランスに起因する可能性がある。

【0605】

GFP+%およびGFP MFI値の両方によって例示されるように（図46AおよびB）、両イオン化可能な脂質（5および8）を用いて、GFPタンパク質の用量依存性発現は観察されたが、脂質5のLNPは、3つのmRNA用量レベル全てでより大きな全体的なタンパク質発現をもたらし、これは、脂質5のLNPを用いるmRNAペイロードのサイトゾルでの利用可能性の改善を示唆した。

【0606】

10

20

30

40

50

## 【表 27】

表 25.脂質 8 および脂質 5LNP の mRNA 含量

| イオン化可能な<br>脂質 | 理論上の総<br>mRNA (μg/mL) | 測定された総<br>(Triton 法) mRNA<br>(μg/mL) | Ribogreen 色素が<br>アクセス可能な<br>mRNA (μg/mL) |
|---------------|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|
| 脂質 8          | 45                    | 40                                   | 4                                        |
| 脂質 5(O)       | 45                    | 38                                   | 7                                        |
| 脂質 5(N)       | 45                    | 36                                   | 7                                        |

10

## 【0607】

全体的に、これらのデータは、脂質 8 を用いて調製された LNP と比較して、脂質 5 を用いて形成された CD3 標的化 LNP が、ヒト T 細胞において、より低い細胞毒性およびより高いトランスフェクション活性の両方を示したことを示す。

20

## 【実施例 24】

## 【0608】

GFP を発現する DiI LNP を用いる免疫細胞の In-Vivo 再プログラムの標準手順

実施例 29 における実験において、GFP を発現する DiI LNP を用いる免疫細胞の in-vivo 再プログラムの以下の標準手順を使用した。

## 【0609】

マウス系統およびヒト化

NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) マウスモデルを、Jax Laboratories から購入した。6～8 週齢の雄マウスに、尾静脈注射によって滅菌 PBS 中の適格ドナーの 1000 万個の PBMC を移植した。個々の体重を週に 2 回モニタリングし、適切な間隔で血液サンプルを収集して、ヒト免疫細胞移植を評価した。

30

## 【0610】

免疫不全マウスにおけるヒト T 細胞移植の評価

各マウスからの尾静脈出血によって 50 μl の血液を収集した。赤血球を、Versalysse、RBC 溶解溶液を、製造業者によって指示されるようなプロトコールに従って使用して (Beckman Coulter A09777)、溶解した。細胞を hCD45 & hCD3 を用いて染色して、ヒト T 細胞の移植を決定した。PBMC 注射の 15 日後、マウスは 30～60% の範囲の huCD45+ を有していた。これらのヒト化マウスを、DiI 色素および GFP を発現する LNP による免疫細胞の再プログラムについて評価した。

40

## 【0611】

免疫細胞の再プログラム

時間ゼロで、マウス (群あたり n=4) に GFP を発現する DiI LNP を注射した (適切なバッファーとともに、0.3 mg/kg または 0.1 mg/kg で i.v. によって)。例に応じて各時点、24 または 48 時間で、LNP またはバッファーのいずれかを用いて処置されたマウスを殺した。末端の血液および組織収集を実施して、以下のよう種々の臓器および免疫細胞における DiI および GFP 発現を決定した。

50

## 【0612】

## 組織および血液サンプル収集

上記の指定の時点で、CO<sub>2</sub>を用いてマウスに麻酔し、その後、サンプル収集した。血液収集のために、胸部を開いて、心臓を露出させた。左心室から最大300μlを採血し、K<sub>3</sub>EDTAミニコレクトチューブ（Greiner Bio-One）に分注した。次いで、新規シリンジを使用して、心臓から残りの血液をできる限り多く採取した。全ての免疫臓器；脾臓、骨髄を肝臓および肺とともに単離した。免疫細胞を、シリンジによって塗抹および断片化することによって脾臓から単離し、細胞懸濁液を70μMのセルストレーナーを通して濾過し、PBSで洗浄した。骨髄をニードルを用いてフラッシュして、全ての免疫細胞を収集した。肝臓および肺組織の小片を組織ホモジナイザーを用いて穏やかにすりつぶし、miltenyi肝臓解離キット（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-105-807）および肺解離キット（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-0950927）および使用説明書を使用してホモジナイズされた細胞を単離し、製造使用説明書に従った。

10

## 【0613】

## 免疫表現型検査分析

血液および上記の臓器の全てから得た免疫細胞を、Versalyse、RBC溶解バッファーを製造使用説明書のとおり用いて処理した。以下のパネルに示されるように、生存／死滅固定可能な色素および表面マーカーを用い、標準フロー分析プロトコルを用いて免疫細胞を染色した。BD symphonyフローサイトメーターを使用して、陽性集団を決定した。

20

## 【0614】

## パネル

## 【0615】

30

40

50

【表 2 8】

| 抗原                      | フルオロフォア   | クローン     | 企業             | カタログ番号     |
|-------------------------|-----------|----------|----------------|------------|
| Dil                     | APC       | NA       | NA             | NA         |
| GFP                     | mRNA      | NA       | NA             | NA         |
| 抗 CD45                  | BUV395    | HI30     | BD Biosciences | 563792     |
| 抗 CD3                   | BUV805    | UCHT1    | BD Biosciences | 612895     |
| 抗 CD4                   | BV711     | SK3      | BioLegend      | 344648     |
| 抗 CD8                   | BV421     | RPA-TB   | BD Biosciences | 562428     |
| 抗 CD45                  | BB700     | 30-F11   | BD Biosciences | 566439     |
| 抗 CD11b                 | BV785     | M1/70    | BioLegend      | 101243     |
| 抗 F4/80                 | PE Dazzle | BM8      | BioLegend      | 123146     |
| 抗 CD31                  | BUV737    | MEC 13.3 | BD Biosciences | 612802     |
| TruStain 単球ブロッカー        | NA        | NA       | BioLegend      | 462103     |
| Arc Amine Comp ビーズ      | NA        | NA       | NA             | 01-3333-42 |
| UltraComp eBeads        | NA        | NA       | Invitrogen     | 01-3333-42 |
| LIVE/DEAD Far Red Stain | NA        | NA       | Invitrogen     | L34974     |
| TruStain Fc X           | NA        | NA       | Invitrogen     | 422302     |

## 【実施例 2 5】

## 【0 6 1 6】

## 代替エタノール除去およびバッファー交換プロセス

実施例 6 に記載されたエタノール除去およびバッファー交換プロセスに加えて、代替プロセスを使用して、本開示の LNP を生成できる。特に、非連続ダイアフィルトレーションプロセスを使用して、得られた LNP 懸濁液で以下の混合、エタノール除去およびバッファー交換を実施した。100,000 kDa MWCO 再生セルロースメンブレン (Amicon Ultra-15、Millipore Sigma、米国、マサチューセッツ州) を備えた遠心限外濾過デバイスを、70%エタノール溶液を用いて清浄化し、次いで、交換バッファー (150 mM NaCl を有する 25 mM の pH 7.4 の HEPES バッファー) を用いて 2 回洗浄した。次いで、LNP 懸濁液 (1.5 mL) をデバイス中にロードし、500 rcf で容量が半量 (0.75 mL) に低減するまで遠心分離した。次いで、懸濁液を交換バッファー (0.75 mL) を用いて希釈して、懸濁液を元の容量に戻した。合計 6 回の非連続ダイアフィルトレーション工程のために、2 倍濃縮および 2 倍希釈のこのプロセスをさらに 5 回反復した。遠心限外濾過デバイスから交換バッファー中に LNP を含有する保持液を回収し、さらなる使用まで 4℃で保存した。

## 【実施例 2 6】

## 【0 6 1 7】

## 一次ヒト T 細胞における脂質 8 および脂質 5 の LNP 特性ならびに IN VITRO 細胞生存率およびタンパク質発現

この実施例は、一次ヒト T 細胞における脂質 5 および脂質 8 を使用して調製された LNP の特性ならびに GFP タンパク質発現を比較する。両 LNP 製剤 (表 2 6) を、実施例 6 に記載されるマイクロ流体混合プロセスを使用して、および実施例 2 5 に記載されるエ

タノール除去のための非連続ダイアフィルトレーションプロセスを使用して調製した。LNPを、以下の表26に示される脂質比率を使用して、eGFPをコードするmRNA (TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州) を使用して製剤化し、0.01mol%のDiIC18(5)-DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州) を用いて標識した。次いで、最終標的化LNP製剤を提供する特定の条件を使用して、標的化コンジュゲートを用いてLNPを挿入した。LNPを実施例3に記載されるように特性決定した。LNPの特徴は、表27に示されている。

【0618】

【表29】

表 26. LNP 製剤組成および抗体コンジュゲート挿入条件

| イオン化<br>可能な<br>脂質 | 製剤番号                     | 脂質-<br>PEG  | 脂質-PEG<br>含量<br>(mol%) | 標的化コン<br>ジュゲート | コンジュ<br>ゲート挿入<br>密度<br>(g/mol) | 挿入条件                                |
|-------------------|--------------------------|-------------|------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 脂質 8              | EXP21002179-<br>N00H60T  | DMG-<br>PEG | 2.5                    | hSP34          | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>おいて 60°C で 1<br>時間 |
| 脂質 5              | EXP21002179-<br>N02H374T | DMG-<br>PEG | 2.5                    | hSP34          | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>おいて 37°C で 4<br>時間 |

【0619】

【表30】

表 27. LNP サイズ、電荷(動的光散乱)および mRNA カプセル化(Ribogreen アッセイ)

| イオン化<br>可能な<br>脂質 | 製剤番号                     | 挿入後 DLS<br>Z-平均直径<br>(nm)/ PDI | pH5.5 (mV)/<br>pH7.4 (mV)での<br>挿入前ゼータ<br>電位 | 挿入前の色素が<br>アクセス可能な<br>mRNA(%) | 挿入前の<br>mRNA 含量<br>(ug/mL)*%/<br>カプセル化 |
|-------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|
| 脂質 8              | EXP21002179-<br>N00H60T  | 75 / 0.24                      | +21.9 / +3.5                                | 12                            |                                        |
| 脂質 5              | EXP21002179-<br>N02H374T | 81 / 0.24                      | +23.3 / +3.0                                | 14                            |                                        |

\*実施例3に記載される Triton 変形手順を使用して決定された mRNA 含量

【0620】

脂質5および脂質8製剤の両方とも、100nm未満の範囲の流体力学直径を示す粒子をもたらした(表27および図53A)、抗体コンジュゲート挿入前の狭い多分散(<0.1)および抗体コンジュゲート挿入後の中程度により高い多分散(<0.3)を有する。さらに、両製剤において低いレベルの色素がアクセス可能なmRNA(<15%)および高いRNAカプセル化効率(LNPバッチ調製に使用された全RNAに対して>80%のmRNAが最終製剤中に回収された)が観察された。LNPサイズ分布に対するこれらの改善は、サイズ排除カラムを使用するバッファー交換によるエタノール除去(実施例6において記載される)と比較した、エタノール除去のための非連続ダイアフィルトレーション(実施例25において記載される)の使用に起因する。図53Bおよび53Cに見られるように、脂質5および脂質8のLNPは、抗体挿入の前後の両方でpH5.5で正のゼータ電位を、pH7.4で中性付近またはわずかに負の電荷を示し(図53D)、これは、予測されるようなLNPイオン化状態の変化を示唆した。

【0621】

得られた標的化されたLNPを、一次ヒトT細胞において実施例8に記載される*in vitro*トランスフェクションプロトコルを使用して評価した。同様のGFP+%およびGFP MFI値によって例示されるように、イオン化可能な脂質（5および8）の両方を用いて、GFPタンパク質の用量依存性発現が観察された（図54Aおよび54B）。しかし、脂質5のLNPを用いた場合に（0.5 μg/mLおよび1.0 μg/mLの用量/ウェルの両方で）2倍高い平均蛍光強度（GFP MFI）が観察され、これは、脂質8製剤と比較して脂質5製剤を用いた場合の、mRNAペイロードのより効率的なサイトゾルでの放出（従って、より大きなGFPタンパク質発現）を示唆した。DiI+およびDiI MFI値によって例示されるように、両製剤は、細胞と等しく会合し、これは、コンジュゲート挿入プロセスがイオン化可能な脂質の化学的特性に依存しないことを示唆した（図54Cおよび54D）。図54Eに見られるように、両製剤は、1.0 μg/mL以下の用量でT細胞によって十分に許容された（PBS対照と比較して細胞生存率の最小低下しか観察されなかった）。

10

#### 【実施例27】

#### 【0622】

一次ヒトT細胞における脂質5、脂質8およびDLN-MC3-DMAのLNPの特性および*IN VITRO* GFPタンパク質発現

この実施例は、一次ヒトT細胞における脂質5、脂質8およびDLN-MC3-DMAのLNPの特性および*in vitro* GFPタンパク質発現を使用して調製されたLNPの特性を比較する。全てのLNP製剤（表28）は、マイクロ流体混合プロセス（実施例6において記載される）を使用して、およびエタノール除去のための非連続ダイアフィльтраーションプロセス（実施例25において記載される）を使用して調製した。LNPを、以下の表28に示される脂質比率を使用して、eGFPをコードするmRNA（Trilink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州）を使用して製剤化し、0.01mol%のDiIC18（5）-DS（Invitrogen、米国、マサチューセッツ州）を用いて標識した。次いで、最終標的化LNP製剤を提供する特定の条件を使用して、標的化コンジュゲートを用いてLNPを挿入した。LNPを実施例3に記載されるように特性決定した。

20

#### 【0623】

#### 【表31】

30

表 28. LNP 製剤組成物および抗体挿入条件

| イオン化可能な脂質    | 製剤番号             | 脂質-PEG  | 脂質-PEG含量 (mol%) | 標的化コンジュゲート/挿入密度 (g/mol) | 抗体コンジュゲート挿入条件           |
|--------------|------------------|---------|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| DLin-MC3-DMA | EXP21003471-N1H3 | DPG-PEG | 1.5             | hSP34/9                 | pH7.4のHBSにおいて60°Cで0.5時間 |
| 脂質8          | EXP21003471-N2H3 | DPG-PEG | 1.5             | hSP34/9                 | pH7.4のHBSにおいて60°Cで0.5時間 |
| 脂質5          | EXP21003471-N3H3 | DPG-PEG | 1.5             | hSP34/9                 | pH7.4のHBSにおいて37°Cで4時間   |

40

#### 【0624】

50

## 【表 3 2】

表 29. LNP サイズ、電荷(動的光散乱)および mRNA カプセル化(Ribogreen アッセイ)

| イオン化可能な脂質    | 製剤番号             | 挿入後 DLS Z-平均直径 (nm) / PDI | pH5.5(mV) / pH7.4(mV)での挿入前ゼータ電位 | 挿入前の色素がアクセス可能な mRNA (%) | 挿入前の総 mRNA 含量 (ug/mL) |
|--------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| DLin-MC3-DMA | EXP21003471-N1H3 | 107 / 0.20                | 16.4 / -0.1                     | 9.1                     |                       |
| 脂質 8         | EXP21003471-N2H3 | 103 / 0.19                | 16.2 / 1.6                      | 10                      |                       |
| 脂質 5         | EXP21003471-N3H3 | 92 / 0.11                 | 20.1 / 4.4                      | 6.4                     |                       |

10

## 【0625】

DLn-MC3-DMA、脂質 5 および脂質 8 を、1.5 モル%のDPG-PEGを使用して製剤化した。表 29 および図 55A~55B に見られるように、全ての LNP が、抗体挿入前に 100 nm 未満の、抗体コンジュゲート挿入後におよそ 100 nm またはそれより小さい流体力学直径 (DLS) を示す。脂質 5 の LNP の多分散は、抗体コンジュゲート挿入後に狭いままであるが ( $< 0.15$ )、DLn-MC3-DMA および脂質 8 は、わずかに大きな変化の多分散 (挿入後約 0.2) を示す。さらに、全ての製剤において、低レベルの色素がアクセス可能な mRNA ( $< 15\%$ ) および高い RNA カプセル化効率 (親 LNP サンプルにおける  $> 80\%$  の mRNA) が観察された (表 29 および図 55D)。図 55C で示されるように、3 種の製剤全てが、抗体挿入の前に pH 5.5 で正のゼータ電位を、pH 7.4 で中性付近またはわずかに負の電荷を示し、これは、予測されるような LNP イオン化状態の変化を示唆した。得られた標的化された LNP を、一次ヒト T 細胞において実施例 8 に記載される *in vitro* トランスフェクションプロトコルを使用して評価した。

20

## 【0626】

図 56E に見られるように、全ての製剤は、 $0.125 \mu\text{g/mL}$  以下の用量で T 細胞によって十分に許容された (PBS 対照と同様)。しかし、2 つのエステルベースの脂質、DLn-MC3-DMA および脂質 5 は、より高い用量でより良好に許容され、脂質 5 は、 $1 \mu\text{g/mL}$  の用量で最も毒性が低かった。DiI+ および DiI MFI 値によって例示されるように (図 56C および 56D)、全ての製剤は、試験したほとんどの用量レベルで同様のレベルの細胞会合を示し、これは、コンジュゲート挿入プロセスがイオン化可能な脂質の化学的特性に依存しないことを示唆する。全ての場合において、GFP タンパク質の用量依存性発現が観察された (図 56A および 56B)。しかし、試験した全ての用量で、脂質 5 は、脂質 8 および DLn-MC3-DMA の両方よりも優れており、脂質 8 に対して  $0.5 \mu\text{g/mL}$  および  $1.0 \mu\text{g/mL}$  の用量/ウェルで  $> 2$  倍高い平均蛍光強度 (GFP MFI) を、DLn-MC3-DMA に対して  $> 5$  倍を示し、これは、脂質 8 および DLn-MC3-DMA 製剤の両方と比較して、脂質 5 製剤を用いた場合の mRNA ペイロードのより効率的なサイトゾルでの放出 (従って、より大きな GFP タンパク質発現) を示唆した。

30

40

## 【実施例 28】

## 【0627】

凍結解凍ストレス後の脂質 5 の LNP 製剤の安定性

この実施例は、1 回の凍結解凍サイクル後の脂質 5 の LNP 製剤の安定性を例示する。表 30 に示される脂質 5 の LNP 製剤組成物を、マイクロ流体混合プロセス (実施例 6 において記載される) を使用して、およびエタノール除去のための非連続ダイアフィльтраシヨンプロセス (実施例 25 において記載される) を使用して調製した。LNP を、e

50

GFPをコードするmRNA (TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州) を使用して製剤化し、0.06mol%のDiIC18(5)-DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州) を用いて標識した。次いで、最終標的化LNP製剤を提供する特定の条件を使用して、標的化コンジュゲートを用いてLNPを挿入した。LNPを実施例3に記載されるように、DLSによるサイズについておよびmRNA含量について特性決定した。

【0628】

標的化LNP製剤を調製した後、製剤を2つの部分にわけた。一方の部分を40mMのpH7.4 HEPESバッファーに交換し、もう一方の部分を30mMのpH7.4 Trisバッファーに交換した。バッファー交換は、非連続ダイアフィルトレーション法を使用して実施し、LNP製剤サンプルを、100,000kDa MWCO再生セルロースメンブレン (Amicon Ultra-4、MilliporeSigma、米国、マサチューセッツ州) を備えた遠心限外濾過デバイスに移し、次いで、交換バッファーで10倍希釈し、500rcfで遠心分離することによって元の容量に濃縮して戻した。この希釈および濃縮工程をさらに1回反復した。次いで、交換されたLNPサンプルを別個のアリコートにわけ、これを、濃縮された塩化ナトリウムおよびスクロース溶液と混合して、最終凍結解凍サンプル製剤を提供した。次いで、各凍結解凍製剤のサンプルを4℃で保存した、-80℃で凍結した、または液体窒素中で急速冷凍した。サンプルを後に室温で解凍し、DLSによるサイズおよびin vitro T細胞トランスフェクションについて試験した。

【0629】

【表33】

表 30. LNP 製剤組成物および抗体挿入条件

| 製剤番号            | イオン化可能な脂質 | 脂質-PEG  | 脂質-PEG 含量 (mol%) | 標的化コンジュゲート/挿入密度 (g/mol) | 挿入条件                        |
|-----------------|-----------|---------|------------------|-------------------------|-----------------------------|
| EXP21001639-N14 | 脂質 5      | DMG-PEG | 2.5              | hSP34/9                 | pH7.4 の HBS において 37℃で 14 時間 |

【0630】

【表34】

表 31. 挿入前の脂質 5 LNP のサイズおよび多分散(DLS)

| 製剤番号            | 挿入後 DLS Z-平均直径 (nm) | 挿入後 DLS PDI | 挿入前の色素がアクセス可能な mRNA(%) |
|-----------------|---------------------|-------------|------------------------|
| EXP21001639-N14 | 106                 | 0.19        | 24                     |

【0631】

10

20

30

40

50

【表 3 5】

表 32. 脂質 5 の LNP の LNP 製剤組成および保存条件/凍結方法の一覧

| 脂質 5 の<br>LNP、<br>製剤番号 | バッファー種        | バッファー<br>濃度(mM) | スクロース<br>濃度(wt%) | NaCl 濃度<br>(mM) | 保存条件   |
|------------------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|--------|
| EXP21001639-<br>N24    | pH7.4 の HEPES | 20              | 9.6              | 0               | 4 °C   |
| EXP21001639-<br>N28    | pH7.4 の HEPES | 20              | 9.6              | 0               | -80 °C |
| EXP21001639-<br>N2N    | pH7.4 の HEPES | 20              | 9.6              | 0               | LN2*   |
| EXP21001639-<br>N34    | pH7.4 の HEPES | 20              | 9.6              | 25              | 4 °C   |
| EXP21001639-<br>N38    | pH7.4 の HEPES | 20              | 9.6              | 25              | -80 °C |
| EXP21001639-<br>N3N    | pH7.4 の HEPES | 20              | 9.6              | 25              | LN2    |
| EXP21001639-<br>N44    | pH7.4 の HEPES | 20              | 9.6              | 50              | 4 °C   |
| EXP21001639-<br>N48    | pH7.4 の HEPES | 20              | 9.6              | 50              | -80 °C |
| EXP21001639-<br>N4N    | pH7.4 の HEPES | 20              | 9.6              | 50              | LN2    |
| EXP21001639-<br>N54    | pH7.4 の HEPES | 20              | 18.6             | 0               | 4 °C   |
| EXP21001639-<br>N58    | pH7.4 の HEPES | 20              | 18.6             | 0               | -80 °C |
| EXP21001639-<br>N5N    | pH7.4 の HEPES | 20              | 18.6             | 0               | LN2    |
| EXP21001639-<br>N84    | pH7.4 の Tris  | 15              | 9.6              | 0               | 4 °C   |
| EXP21001639-<br>N88    | pH7.4 の Tris  | 15              | 9.6              | 0               | -80 °C |
| EXP21001639-<br>N8N    | pH7.4 の Tris  | 15              | 9.6              | 0               | LN2    |
| EXP21001639-<br>N94    | pH7.4 の Tris  | 15              | 18.6             | 0               | 4 °C   |
| EXP21001639-<br>N98    | pH7.4 の Tris  | 15              | 18.6             | 0               | -80 °C |
| EXP21001639-<br>N9N    | pH7.4 の Tris  | 15              | 18.6             | 0               | LN2    |

\*LN2: 液体窒素

## 【 0 6 3 2 】

図 5 7 A および 5 7 B に示されるように、使用された凍結方法（液体窒素中で急速冷凍された対 -80 °C フリーザー中での保存）は、凍結-解凍後の LNP サイズ分布に影響を与えず、流体力学半径および多分散は両方とも、2つの方法の間で類似性を見せた。しかし、凍結保護物質およびバッファー組成は、凍結-解凍後の LNP サイズ特徴に有意に影響を及ぼした。塩を添加されていない、または 25 および 50 mM NaCl を有する、ならびに 9.6 重量%または 18 重量%のいずれかのスクロースを有する HEPES バッファー中で凍結保存されたものは、LNP 多分散の有意な増大をもたらした。対照的に、TRIS バッファーおよび 9.6 重量%または 18 重量%のいずれかのスクロース中での保存は、凍結解凍ストレスに供されなかった 4 °C 保存された LNP と比較して、LNP サイズおよび多分散を効果的に保った。全ての製剤は、一次ヒト T 細胞において実施例 8 に

記載される *in vitro* トランスフェクションプロトコルを使用して評価した。

【0633】

図58Aおよび58Bに見られるように、HEPESバッファー中で保存された全てのLNPは、凍結解凍サイクル後にT細胞にトランスフェクトする能力を失ったが、TRISバッファー中で保存された製剤は、凍結解凍活動後にT細胞にトランスフェクトする能力を保持した。図58Cおよび58Dに見られるように、HEPESバッファー組成物の細胞会合(DiI%+細胞およびDiI MFI値によって測定されるような)は、凍結解凍サイクル後にわずかに減少したが、TRISバッファー製剤のものは維持された。HEPESバッファー製剤における凍結解凍ストレス後のより少ない細胞会合レベルおよびLNPサイズ特性の変化が、観察された活性の喪失の原因となった可能性が高い。注目すべきことに、TRISバッファー中での保存は、LNP特性ならびに凍結保存および凍結解凍ストレス後にT細胞にトランスフェクトするその能力の両方を維持する。

10

【実施例29】

【0634】

IN VIVO再プログラムに対するPEG-脂質アンカーおよびPEG%の影響

この研究の目的は、免疫細胞の *in vivo* 再プログラムのための最適PEG-脂質およびmol%を同定することであった。本発明者らは、PEG-DMPEまたはPEG-DMG(両方ともC14)のような短い鎖のアンカーがあまりにも迅速に失われる一方で、PEG-DSPEおよびPEG-DSG(両方ともC18)のようなより長いアシル鎖を有するPEG-脂質は、あまりにも安定であり、トランスフェクション効率の低下をもたらすであろうから、血中のT細胞/NK細胞または他の免疫細胞の関与にとって中間のアンカー長が最適であろうと仮定した。

20

【0635】

パートA. 抗CD3脂質8 LNP

この研究では、本発明者らは、CD3に標的化されるLNP(hsp34 Fab'-PEG-DSPEコンジュゲート)および脂質8を組み込むことを使用して、総脂質の1.5または2.5mol%のいずれかでDMG-PEG(C14)、DPG-PEG(C16)、DPPE-PEG(16)またはDSG-PEG(C18)を用いて調製されたLNPを試験した。

【0636】

30

以下の表中のLNP製剤を、実施例6において記載されるマイクロ流体混合法および実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA(Trilink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)を使用して製剤化し、0.06mol%のDiIC18(5)-DS(Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。次いで、標的化LNP製剤を提供する特定の条件を使用して、標的化コンジュゲートを用いてLNPを挿入した。LNP懸濁液を濃縮スクロース溶液と混合して、5.3重量%のスクロースを有する最終LNP製剤を提供することによって、最終標的化LNP製剤を調製した。LNPを実施例3に記載されるように特性決定した。

【0637】

40

50

## 【表 3 6】

表 33. 製剤表

| 製剤番号            | イオン化可能な脂質 | 脂質-PEG   | 脂質-PEG 含量 (mol%) | 標的化コンジュゲート | コンジュゲート挿入密度 (g/mol) | 挿入条件                 |
|-----------------|-----------|----------|------------------|------------|---------------------|----------------------|
| EXP21001532-N1T | 脂質 8      | DMG-PEG  | 2.5              | hSP34      | 9                   | pH7.4のHBSにおいて60℃で1時間 |
| EXP21001532-N2T | 脂質 8      | DPG-PEG  | 2.5              | hSP34      | 9                   | pH7.4のHBSにおいて60℃で1時間 |
| EXP21001532-N3T | 脂質 8      | DSG-PEG  | 2.5              | hSP34      | 9                   | pH7.4のHBSにおいて60℃で1時間 |
| EXP21001532-N4T | 脂質 8      | DPPE-PEG | 1.5              | hSP34      | 9                   | pH7.4のHBSにおいて60℃で1時間 |
| EXP21001532-N5T | 脂質 8      | DPPE-PEG | 2.5              | hSP34      | 9                   | pH7.4のHBSにおいて60℃で1時間 |
| EXP21001532-N6T | 脂質 8      | DSPE-PEG | 1.5              | hSP34      | 9                   | pH7.4のHBSにおいて60℃で1時間 |
| EXP21001532-N7T | 脂質 8      | DSPE-PEG | 2.5              | hSP34      | 9                   | pH7.4のHBSにおいて60℃で1時間 |

## 【0 6 3 8】

## 【表 3 7】

表 34. 製剤分析結果

| 製剤番号            | 挿入後 DLS Z-平均直径 (nm) | 挿入後 DLS PDI | pH5.5 での挿入前のゼータ電位 (mV) | pH7.4 での挿入前のゼータ電位 (mV) | 挿入前の色素がアクセス可能な mRNA(%) |
|-----------------|---------------------|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| EXP21001532-N1T | 76                  | 0.18        | 21.3                   | 1.8                    | 13                     |
| EXP21001532-N2T | 86                  | 0.17        | 17.8                   | 1.0                    | 8.7                    |
| EXP21001532-N3T | 96                  | 0.18        | 17.1                   | -3.4                   | 10                     |
| EXP21001532-N4T | 119                 | 0.23        | 20.1                   | -5.9                   | 12                     |
| EXP21001532-N5T | 73                  | 0.15        | 17.2                   | -7.0                   | 11                     |
| EXP21001532-N6T | 108                 | 0.17        | 17.9                   | -4.9                   | 10                     |
| EXP21001532-N7T | 77                  | 0.18        | 18.6                   | -6.6                   | 10                     |

## 【0639】

DMG、DPGまたはDSG-PEG 2.5%のいずれかを用いる24もしくは48時間後の、またはDPPEもしくはDSPE 1.5もしくは2.5%のいずれかを用いる24時間後の、0.3mg/kgの用量でCD3標的化DiI/GFP LNPを用いる免疫細胞のin vivo再プログラムの結果が、図59A~59Tに示されている。

## 【0640】

抗CD3 hsp34クローン標的化脂質8 LNPを用いる全ての製剤は、24時間でピークGFP発現を示し、最大発現は血液>肺>脾臓>骨髄>肝臓であった。ジアシルグリセリンまたはホスホエタノールアミン骨格に関わらず、DPG-PEGまたはDPPE-PEG、すなわち、C16アンカー長は、他のアシル鎖長(C14またはC18)のPEG-脂質と比較して、1.5%のPEG-脂質を用いた場合に最大再プログラムを示す。GFP、MFIは、GFP陽性T細胞%と同様の傾向を示した。陽性DiIパーセントまたはDiI MFIも、GFP陽性T細胞のものと同様の傾向を示し、これは、CD3標的化脂質8 LNPを用いる場合、LNPの結合効率は、その再プログラム能力と関連することを示す。

## 【0641】

パートB. 抗CD3または抗CD8脂質5 LNP

この研究では、脂質5を組み込む、CD3に標的化されるLNP(hsp34 Fab'-PEG-DSPEコンジュゲート)およびCD8に標的化されるLNP(TRX2 Fab'-PEG-DSPEコンジュゲートまたはV2-PEG-DSPE Nbコンジュゲート)を使用して、総脂質の1.5mol%でDMG-PEG(C14)またはDPG-PEG(C16)を用いて調製されたLNPを試験した。

## 【0642】

以下の表中のLNP製剤を、実施例6において記載されるマイクロ流体混合法および実施例25において記載される非連続ダイアフィльтраーション法を使用して調製した。LNPを、未改変のeGFPをコードするmRNA(Trilink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州;カタログ番号L-7601)を使用して製剤化し、0.06mol%のDiIC18(5)-DS(Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。次いで、標的化LNP製剤を提供する特定の条件を使用して、標的化コンジュゲートを用いてLNPを挿入した。LNP懸濁液を濃縮スクロース溶液と混合して、9.6重量%のスクロースを有する最終LNP製剤を提供することによって、最終標的化LNP製剤を調製した。LNPを実施例3に記載されるように特性決定した。

## 【0643】

10

20

30

40

50

【表 3 8】

表 35. LNP 製剤

| 製剤番号                      | イオン<br>化可能<br>な脂質 | 脂質-PEG  | 脂質-<br>PEG<br>含量<br>(mol%) | 標的化コ<br>ンジュ<br>ゲート | コンジュ<br>ゲート挿入<br>密度<br>(g/mol) | 挿入条件                          |
|---------------------------|-------------------|---------|----------------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| EXP21002551<br>-N6H-TRX2S | 脂質 5              | DMG-PEG | 1.5                        | TRX2               | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002551<br>-N7H-TRX2S | 脂質 5              | DMG-PEG | 2.5                        | TRX2               | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002414<br>-N2H-TRX2S | 脂質 5              | DPG-PEG | 1.5                        | TRX2               | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002551<br>-N5H-TRX2S | 脂質 5              | DPG-PEG | 2.5                        | TRX2               | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002551<br>-N6H-SP34S | 脂質 5              | DMG-PEG | 1.5                        | hSP34              | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002551<br>-N7H-SP34S | 脂質 5              | DMG-PEG | 2.5                        | hSP34              | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002414<br>-N2H-SP34S | 脂質 5              | DPG-PEG | 1.5                        | hSP34              | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002551<br>-N5H-SP34S | 脂質 5              | DPG-PEG | 2.5                        | hSP34              | 9                              | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002551<br>-N6H-Nb V2 | 脂質 5              | DMG-PEG | 1.5                        | V2                 | 5.86                           | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002551<br>-N7H-Nb V2 | 脂質 5              | DMG-PEG | 2.5                        | V2                 | 5.86                           | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002414<br>-N2H-Nb V2 | 脂質 5              | DPG-PEG | 1.5                        | V2                 | 5.86                           | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |
| EXP21002551<br>-N5H-Nb V2 | 脂質 5              | DPG-PEG | 2.5                        | V2                 | 5.86                           | pH7.4 の HBS に<br>いて 37℃で 4 時間 |

【 0 6 4 4 】

10

20

30

40

50

## 【表 3 9】

表 36. 製剤分析結果

| 製剤番号                      | 挿入後<br>DLS Z-<br>平均直径<br>(nm) | 挿入後<br>DLS PDI | pH5.5 での挿入<br>前のゼータ電<br>位(mV) | pH7.4 での挿入<br>前のゼータ電<br>位(mV) | 挿入前の色素が<br>アクセス可能な<br>mRNA(%) |
|---------------------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| EXP21002551-<br>N6H-TRX2S | 83                            | 0.06           | 23.7                          | 5.2                           | 14                            |
| EXP21002551-<br>N7H-TRX2S | 70                            | 0.15           | 21.9                          | 4.0                           | 30                            |
| EXP21002414-<br>N2H-TRX2S | 90                            | 0.12           | 27.9                          | 7.3                           | 6.9                           |
| EXP21002551-<br>N5H-TRX2S | 76                            | 0.19           | 22.9                          | 5.5                           | 17                            |
| EXP21002551-<br>N6H-SP34S | 96                            | 0.16           | 23.7                          | 5.2                           | 14                            |
| EXP21002551-<br>N7H-SP34S | 138                           | 0.26           | 21.9                          | 4.0                           | 30                            |
| EXP21002414-<br>N2H-SP34S | 104                           | 0.14           | 27.9                          | 7.3                           | 6.9                           |
| EXP21002551-<br>N5H-SP34S | 79                            | 0.17           | 22.9                          | 5.5                           | 17                            |
| EXP21002551-<br>N6H-Nb V2 | 85                            | 0.10           | 23.7                          | 5.2                           | 14                            |
| EXP21002551-<br>N7H-Nb V2 | 69                            | 0.11           | 21.9                          | 4.0                           | 30                            |
| EXP21002414-<br>N2H-Nb V2 | 90                            | 0.12           | 27.9                          | 7.3                           | 6.9                           |
| EXP21002551-<br>N5H-Nb V2 | 82                            | 0.21           | 22.9                          | 5.5                           | 17                            |

## 【0 6 4 5】

24 時間後の DMG-PEG または DPG-PEG (1.5 または 2.5%) のいずれかを用いる、0.3 mg/kg の脂質 5 で CD3-または CD8-標的化 DiI/GFP LNP を用いる免疫細胞の *in vivo* 再プログラムの結果が、図 60A~60T に示されている。

## 【0 6 4 6】

脂質 5 CD3 標的化 LNP は、CD4 および CD8 T 細胞の両方の再プログラムを示したが、CD8 標的化抗体 TRX2 または CD8 ナノボディは、予測されるように CD8 T 細胞を再プログラムするのに特異的である。同様に、CD3 標的化 LNP は、CD4 および CD8 T 細胞の両方に結合し、抗体またはナノボディのいずれかを有する CD8 標的化 LNP は、CD8 T 細胞にのみ結合する。CD3 標的化脂質 5 LNP は、1.5% PEG を用い、DMG または DPG の両方 (すなわち、C14 または C16 脂質アンカー長) を用いた場合に、同様の GFP 発現を示したが、血液中では、CD8 抗体またはナノボディ標的化 LNP は、DMG-PEG を用いた場合に最大 GFP 発現を示し、これは、24 時間で DPG-PEG と比較して 2 倍より多かった。他の組織 (例えば、肺、脾臓および骨髄) では、抗体またはナノボディのいずれかを用いる CD8 標的化 LNP は、DMG-PEG および DPG-PEG-1.5% の両方を用いた場合に同様の GFP 発現を示した。GFP MFI は、GFP 発現のものと同様の傾向を示した。DiI 陽性 T 細胞パーセントは、血液においてのみ観察されるが、他のコンパートメントでは観察されず、DiI MFI も血液コンパートメントにおいて最大である。

## 【0 6 4 7】

# パート C . 抗 C D 8、抗 C D 1 1 a および抗 C D 4 脂質 5 L N P

この研究では、本発明者らは、脂質 5 を組み込む、C D 8 に標的化される L N P (ナノボディー P E G - D S P E コンジュゲート)、C D 1 1 a に標的化される L N P (h M H M 2 4 F a b - P E G - D S P E コンジュゲート) および C D 4 に標的化される L N P (ナノボディー P E G - D S P E コンジュゲートまたはイバリズマブ P E G - D S P E コンジュゲート) を使用して、総脂質の 1 . 5 m o l % で D P G - P E G (C 1 6) を用いて調製された L N P を試験した。

【 0 6 4 8 】

以下の表中の L N P 製剤を、実施例 6 において記載されるマイクロ流体混合法および実施例 2 5 において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。L N P を、e G F P をコードする m R N A (T r i L i n k B i o t e c h n o l o g i e s、米国、カリフォルニア州) を使用して製剤化し、0 . 0 6 m o l % の D i I C 1 8 ( 5 ) - D S (I n v i t r o g e n、米国、マサチューセッツ州) を用いて標識した。次いで、標的化 L N P 製剤を提供する特定の条件を使用して、標的化コンジュゲートを用いて L N P を挿入した。L N P を実施例 3 に記載されるように特性決定した。

【 0 6 4 9 】

【表 4 0 】

表 37. LNP 製剤

| 製剤番号                    | イオン化可能な脂質 | 脂質-PEG  | 脂質-PEG 含量 (mol%) | 標的化コンジュゲート         | コンジュゲート挿入密度 (g/mol) | 挿入条件                         |
|-------------------------|-----------|---------|------------------|--------------------|---------------------|------------------------------|
| <u>EXP21003027-N201</u> | 脂質 5      | DPG-PEG | 1.5              | hSP34              | 9                   | pH7.4 の HBS において 37°C で 4 時間 |
| <u>EXP21003027-N105</u> | 脂質 5      | DMG-PEG | 1.5              | BDSn (ナノボディ)       | 5.3                 | pH7.4 の HBS において 37°C で 4 時間 |
| <u>EXP21003027-N206</u> | 脂質 5      | DPG-PEG | 1.5              | BDSn (ナノボディ)       | 5.3                 | pH7.4 の HBS において 37°C で 4 時間 |
| <u>EXP21003027-N107</u> | 脂質 5      | DMG-PEG | 1.5              | hMHM24 Fab         | 6.12                | pH7.4 の HBS において 37°C で 4 時間 |
| <u>EXP21003027-N208</u> | 脂質 5      | DPG-PEG | 1.5              | hMHM24 Fab         | 6.12                | pH7.4 の HBS において 37°C で 4 時間 |
| <u>EXP21003027-N109</u> | 脂質 5      | DMG-PEG | 1.5              | T023200008 (ナノボディ) | 1.86                | pH7.4 の HBS において 37°C で 4 時間 |
| <u>EXP21003027-N210</u> | 脂質 5      | DPG-PEG | 1.5              | T023200008 (ナノボディ) | 1.86                | pH7.4 の HBS において 37°C で 4 時間 |
| <u>EXP21003027-N111</u> | 脂質 5      | DMG-PEG | 1.5              | イバリズマブ Fab         | 6.12                | pH7.4 の HBS において 37°C で 4 時間 |
| <u>EXP21003027-N212</u> | 脂質 5      | DPG-PEG | 1.5              | イバリズマブ Fab         | 6.12                | pH7.4 の HBS において 37°C で 4 時間 |

【 0 6 5 0 】

10

20

30

40

50

【表 4 1】

表 38. 製剤分析結果

| 製剤番号                 | 挿入後<br>DLS Z-<br>平均直径<br>(nm) | 挿入後<br>DLS PDI | pH5.5 での挿入<br>前のゼータ電<br>位(mV) | pH7.4 での挿入<br>前のゼータ電<br>位(mV) | 挿入前の色素が<br>アクセス可能な<br>mRNA (%) |
|----------------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| EXP21003027<br>-N201 | 94                            | 0.13           | 測定されてい<br>ない                  | 測定されてい<br>ない                  | 8.4                            |
| EXP21003027<br>-N105 | 85                            | 0.07           | 21.5                          | 5.5                           | 11                             |
| EXP21003027<br>-N206 | 89                            | 0.07           | 測定されてい<br>ない                  | 測定されてい<br>ない                  | 8.4                            |
| EXP21003027<br>-N107 | 81                            | 0.10           | 21.5                          | 5.5                           | 11                             |
| EXP21003027<br>-N208 | 86                            | 0.08           | 測定されてい<br>ない                  | 測定されてい<br>ない                  | 8.4                            |
| EXP21003027<br>-N109 | 83                            | 0.10           | 21.5                          | 5.5                           | 11                             |
| EXP21003027<br>-N210 | 87                            | 0.06           | 測定されてい<br>ない                  | 測定されてい<br>ない                  | 8.4                            |
| EXP21003027<br>-N111 | 83                            | 0.10           | 21.5                          | 5.5                           | 11                             |
| EXP21003027<br>-N212 | 88                            | 0.06           | 測定されてい<br>ない                  | 測定されてい<br>ない                  | 8.4                            |

## 【0651】

24 時間後の DMG-PEG または DPG-PEG (1.5 mol%) のいずれかを用いる、0.3 mg/kg の脂質 5 で上記の LNP を用いる免疫細胞の *in vivo* 再プログラムの結果が、図 61A ~ 61T に示されている。

## 【0652】

CD8 ナノボディ 標的化 LNP を用いる脂質 5 LNP は、CD8 T 細胞においてのみ特異的に GFP 発現を示し、CD4 T 細胞では示さなかった。同様に、ナノボディまたは抗体のいずれかを用いる CD4 標的化は、CD4 T 細胞においてのみ GFP 発現を特異的に示し、CD11a 標的化は、GFP を発現する CD4 および CD8 T 細胞の両方を示した。CD8 ナノボディ LNP は、DPG-PEG と比較して、DMG-PEG-1.5% を用いた場合に最大 GFP 発現を示し、一方で、CD11a Fab ならびに CD4 ナノボディ および Fab 抗体の両方は、DMG-PEG および DPG-PEG (1.5 mol%) の両方を用いた場合に同様の GFP 発現を示した。GFP MFI は、GFP T 細胞 % のものと同様の傾向を示した。DiI 陽性 T 細胞 % および MFI は、血液、肝臓 および 肺において最大であり、異なる CD8、CD11a または CD4 標的化抗体またはナノボディを有していた。

## 【0653】

パート D. 抗 CD7 脂質 5 LNP

この研究では、本発明者らは、脂質 5 を組み込む CD7 に標的化される LNP (V1-PEG-DSPE コンジュゲート) を使用して、総脂質の 2.5 または 1.5 mol% で DMG-PEG (C14) または DPG-PEG (C16) を用いて調製された LNP を試験した。

## 【0654】

LNP 製剤を、実施例 6 において記載されるマイクロ流体混合法および実施例 25 において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNP を、eGFP をコードする mRNA (TriLink Biotechnologies、米国、

カリフォルニア州)を使用して製剤化し、0.06mol%のDiIC18(5)-DS(Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。次いで、標的化LNP製剤を提供する特定の条件を使用して、標的化コンジュゲートを用いてLNPを挿入した。LNPを実施例3に記載されるように特性決定した。

#### 【0655】

24時間後のDMG-PEGまたはDPG-PEG(1.5%)のいずれかを用いる、0.3mg/kgの脂質5でLNPを用いる免疫細胞のin vivo再プログラムの結果が、図63A~63Tに示されている。

#### 【0656】

脂質5、CD7ナノボディ標的化LNPは、両方とも1.5mol%のPEG-脂質を用い、DPG-PEG(35%)と比較してDMG-PEG(50%)を用いた場合に、最大GFPを発現するT細胞を示した。他の組織、肝臓および肺は、DMG-PEGおよびDPG-PEG-1.5%の両方を用いた場合に、等しい20%のGFPを発現するT細胞を示した。GFP MFIは、同様の傾向を示した。DiI陽性T細胞およびDiI MFIは、最もGFP発現が観察される血液においてのみ最大結合を示した。

#### 【実施例30】

#### 【0657】

脂質5、脂質8、DLN-MC3-DMAのLNP IN VIVO再プログラム比較

この実施例では、CD3(SP34)またはCD8(V2(ナノボディ))に標的化される、脂質5、脂質8またはDLN-MC3-DMA(0.1mg/kg用量)を利用するLNPを、in vivoで免疫細胞を再プログラムするその能力について試験した。

#### 【0658】

以下の表中のLNP製剤を、実施例6において記載されるマイクロ流体混合法および実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA(TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)を使用して製剤化し、0.06mol%のDiIC18(5)-DS(Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。次いで、最終標的化LNP製剤を提供する特定の条件を使用して、標的化コンジュゲートを用いてLNPを挿入した。LNPを実施例3に記載されるように特性決定した。

#### 【0659】

#### 【表42】

表 39. LNP 製剤

| 製剤番号                    | イオン化可能な脂質    | 脂質-PEG  | 脂質-PEG含量(mol%) | 標的化コンジュゲート | コンジュゲート挿入密度(g/mol) | 挿入条件                   |
|-------------------------|--------------|---------|----------------|------------|--------------------|------------------------|
| <u>EXP21003471-N101</u> | DLin-MC3-DMA | DPG-PEG | 1.5            | hSP34      | 9                  | pH7.4のHBSにおいて60℃で0.5時間 |
| <u>EXP21003471-N202</u> | 脂質8          | DPG-PEG | 1.5            | hSP34      | 9                  | pH7.4のHBSにおいて60℃で0.5時間 |
| <u>EXP21003471-N303</u> | 脂質5          | DPG-PEG | 1.5            | hSP34      | 9                  | pH7.4のHBSにおいて37℃で4時間   |
| <u>EXP21003471-N111</u> | DLin-MC3-DMA | DPG-PEG | 1.5            | V2(ナノボディ)  | 5.86               | pH7.4のHBSにおいて60℃で0.5時間 |

#### 【0660】

【表 4 3】

表 40. 製剤分析結果

| 製剤番号                 | 挿入後<br>DLS Z-<br>平均直径<br>(nm) | 挿入後<br>DLS PDI | pH5.5 での<br>挿入前の<br>ゼータ電位<br>(mV) | pH7.4 での<br>挿入前の<br>ゼータ電位<br>(mV) | 挿入前の色素が<br>アクセス可能な<br>mRNA (%) |
|----------------------|-------------------------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| EXP21003471-<br>N101 | 107                           | 0.20           | 16.4                              | -0.1                              | 9.1                            |
| EXP21003471-<br>N202 | 103                           | 0.19           | 16.2                              | 1.6                               | 10                             |
| EXP21003471-<br>N303 | 92                            | 0.11           | 20.1                              | 4.4                               | 6.4                            |
| EXP21003471-<br>N111 | 92                            | 0.16           | 16.4                              | -0.1                              | 9.1                            |

10

## 【0661】

24 時間後の DPG-PEG (1.5%) を用いる、0.1 mg/kg で上記 LNP を用いる免疫細胞の *in vivo* 再プログラムの結果が、図 62A~62S に示されている。

## 【0662】

20

DPG-PEG-1.5% および 0.1 mg/kg 用量の CD3 (hsp34) 標的化 LNP を用いて、DLn-MC3-DMA、脂質 8 および脂質 5 を比較すると、脂質 5 が T 細胞を再プログラムするために優れており、血液および肺において T 細胞の最大再プログラムを示し、最大 GFP 発現、約 25% を有していた (血液 = 肺 > 肝臓 > 骨髄)。GFP MFI は、同様の傾向を示した。3 種の脂質は全て、同様の DiI 陽性 T 細胞を示し、全ての脂質が等しく結合できるが、T 細胞の再プログラムでは脂質 5 がより良好であることを示した。

## 【実施例 31】

## 【0663】

IN VITRO タンパク質発現 - 共培養中の NK および T 細胞の LNP トランスフェクション

30

この実施例は、GFP mRNA DiI 標識 LNP 中に後挿入された抗 CD3、抗 CD7、抗 CD11a、抗 CD18、抗 CD56 (ロルボツズマブ (Lorvotuzumab)) 抗 CD137 (4B4-1) および抗 CD2 (RPA-2.10v1) Fab または ナノボディを用いて、共培養されたヒト NK および T 細胞を標的化することならびに トランスフェクションおよび翻訳に対するそれらの効果を記載する。

## 【0664】

磁気ベースの CD3 ネガティブ選択を使用して一次ヒト T 細胞を精製した。2000 万個の精製された T 細胞を、抗 CD3 / 抗 CD28 でコーティングされたビーズを使用して 100 IU/mL の IL-2 を含有する培地中で 48 時間活性化した。活性化後、活性化ビーズを除去し、T 細胞を、100 IU/mL の IL-2 を含有する培地中でさらに 48 時間拡大増殖させた。拡大増殖期間の後、T 細胞を、一次ヒト NK 細胞とのコトランスフェクションの準備において 100 万個の細胞/mL に濃縮した。

40

## 【0665】

CD3 が枯渇した PBMC を、磁気ベースの CD3 ポジティブ選択およびネガティブ画分を保持することを使用して精製した。2000 万個の CD3 が枯渇した PBMC を、10 ng/mL の IL-15 を含有する培地中、6 ウェルの GREX プレートの 1 ウェルに添加し 7 日間おいた。7 日目に、各ウェルを 2 つにわけ、細胞を 10 ng/mL の IL-15 を含有する培地中で、追加の 7 日間、さらに培養した。14 日目に、NK 細胞を、一次ヒト T 細胞とのコトランスフェクションの準備において 100 万個の細胞/mL に濃縮

50

した。

【0666】

LNPを、実施例6において記載される混合プロセス、実施例25において記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA (TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)、イオン化可能な脂質として脂質8を使用して製剤化し、0.01mol%のDiIC18(5)-DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。Fab-脂質コンジュゲートは実施例4に記載された方法から生成し、一方でNbがコンジュゲートされたものの生成は、遊離NbからNbがコンジュゲートされたものを分離するために、1:1:4のNb:DSPE-5KPEG-マレイミド(maleimide):DSPE-2KPEG-OCH<sub>3</sub>および50kDのUFメンブレン(Millipore Corp、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ)を使用することにおいて異なっていた。実施例12と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされたFabおよびコンジュゲートされたNbを、脂質8およびGFP mRNAをDiI色素とともに含有するLNP中に、脂質8、GFP mRNAおよびDiI色素を含有するLNP中に種々の密度(表41)で後挿入した。

【0667】

【表44】

表 41. LNP の表面上に後挿入された Fab または Nb 密度

| 標的化部分                               |                    |
|-------------------------------------|--------------------|
| αCD11a HzMHM24 bDS Fab              | 3, 5, 9 g/mol      |
| αCD18 h1B4 bDS Fab                  | 3, 5, 9 g/mol      |
| αCD7 V1                             | 3, 5, 9 g/mol      |
| αCD56 A1 Fab bDS                    | 3, 9, 19 g/mol     |
| αCD56 A2 Fab bDS                    | 3, 9, 19 g/mol     |
| αCD56 A3 Fab bDS                    | 3, 9, 19 g/mol     |
| αCD56 ロルボツズマブ Fab bDS               | 3, 6, 9 g/mol      |
| αCD137 4B4-1 Fab bDS                | 3, 9, 18 g/mol     |
| αCD2 9.6 Fab bDS                    | 0.75, 1.5, 3 g/mol |
| αCD2 TS2/18.1 Fab bDS               | 0.75, 1.5, 3 g/mol |
| αCD2 RPA-2.10v1 Fab bDS             | 0.75, 1.5, 3 g/mol |
| αCD2 Lo-CD2b Fab bDS                | 0.75, 1.5, 3 g/mol |
| αCD2 35.1 Fab bDS                   | 0.75, 1.5, 3 g/mol |
| αCD2 OKT11 Fab bDS                  | 0.75, 1.5, 3 g/mol |
| デッド Fab mutOKT8                     | 9 g/mol            |
| αCD8 TRX2 NoDS (鎖間ジスルフィド<br>ノックダウン) | 9 g/mol            |
| HEPES 緩衝生理食塩水                       | LNP なし             |

抗CD56 A1 Fab 配列

A1 bDS HC (配列番号26) :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIR  
 QSPSNWIRQSPSGLEWLGRITYYRSKWYNDYAVSVKSRITI  
 NPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARENIAAWTWAFDI  
 WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLV  
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSVSV  
 TVPSSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC  
 GGHHHHHH

A1 bDS LC (配列番号27) :

EIVMTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK  
PGLAPRLLIYDTSLRATDIPDRFSGSGSGTAFTLTISRLE  
PEDFAVYYCQQYGSSTPTFGQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSSTYSLCSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

抗CD56 A2 Fab配列

A2 bDS HC (配列番号28) :

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFTGYMHVWRQA  
PGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAY  
MELSLRLRSDDTAVYYCARDLSSGYSGYFDYWGGGTLLVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVTPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTTCGGHHHHHH

10

A2 bDS LC (配列番号29) :

DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLNV  
YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI  
SRVEGEDVDYICMQALQSPFTFGQGGTKLEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLCSLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRGES

20

抗CD56 A3 Fab配列

A3 bDS HC (配列番号30) :

EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFTGYMHVWRQA  
PGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAY  
MELSLRLRSDDTAVYYCARDLSSGYSGYFDYWGGGTLLVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVTPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTTCGGHHHHHH

30

A3 bDS LC (配列番号31) :

DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNFLDW  
YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI  
SRVEADDVGVYYCMQSLQTPWTFGHGHTKVEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLCSLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRGES

抗CD56 ロルボツズマブ Fab配列

ロルボツズマブ bDS HC (配列番号32) :

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFS SFGMHWV  
RQA PGKGLEWVAYISSGSFTIYY ADSVKGRFTI SRDN  
SKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARMR KGYAMDYWGQ  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY  
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVTP  
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHH  
HHH

40

ロルボツズマブ bDS LC (配列番号33) :

DVVMTQSPLSLPVTTLGQPASISCRSSQIIIIHSDGNTYLEW  
FQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
SRVEAEDVGVYYCFQGSHPHTFGQGGTKVEIKRTVAAPSV

50

F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q  
S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L C S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E  
V T H Q G L S S P V T K S F N R G E S

抗CD2 RPA-2.10v1 Fab配列

RPA-2.10v1 bDS HC (配列番号34) :

E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S S Y D M S W V R Q T  
P E K R L E W V A S I S G G G F L Y Y L D S V K G R F T I S R D N A R N I L Y L  
H M T S L R S E D T A M Y Y C A R S S Y G E I M D Y W G Q G T S V T V S S A S T  
K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S  
G A L T S G V H T C P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C  
N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C H H H H H H

10

RPA-2.10v1 bDS LC (配列番号35) :

D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S F S C R A S Q R I G T S I H W Y Q Q R T  
T G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S  
E D V A D Y Y C Q Q S H G W P F T F G G G T K L E I E R T V A A P S V F I F P P  
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
E S V T E Q D S K D S T Y S L C S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
L S S P V T K S F N R G E S

抗CD137 4B4-1 Fab配列

4B4-1 bDS HC (配列番号36) :

Q V Q L Q Q P G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F S S Y W M H W V K Q R  
P G Q V L E W I G E I N P G N G H T N Y N E K F K S K A T L T V D K S S S T A Y  
M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R S F T T A R G F A Y W G Q G T L V T V S A S  
T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N  
S G A L T S G V H T C P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I  
C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C H H H H H H

20

4B4-1 bDS LC (配列番号37) :

D I V M T Q S P A T Q S V T P G D R V S L S C R A S Q T I S D Y L H W Y Q Q K S  
H E S P R L L I K Y A S Q S I S G I P S R F S G S G S G S D F T L S I N S V E P  
E D V G V Y Y C Q D G H S F P P T F G G G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P  
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
E S V T E Q D S K D S T Y S L C S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
L S S P V T K S F N R G E S

30

【0668】

LNPトランスフェクションの当日に、100IU/mLのIL-2を含有する100μLの総容量で50000個のT細胞および50000個のNK細胞を、96ウェル培養プレートの各ウェルに添加した。各ウェルに10μLの各試験LNPを添加して、2.5μg/mLのmRNAでの一次ヒトT細胞およびNK細胞の同時トランスフェクションを促進した。

【0669】

LNPトランスフェクションの24時間後、遠心分離後にT細胞およびNK細胞共培養から細胞培養培地を吸引した。室温で20分間の共培養物内の各細胞種において独立にLNPトランスフェクションの分析を容易にするために、T細胞およびNK細胞を抗CD3および抗CD56蛍光標識抗体とともに再懸濁した。インキュベーション後、細胞を遠心分離によって濃縮し、フローサイトメトリーによる分析のために1×PBSで再懸濁した。フローサイトメトリーによる獲得後、FlowJo (フローサイトメトリー分析ソフトウェア) を使用してT細胞およびNK細胞を独立に分析した。CD3+細胞 (T細胞) またはCD56+細胞 (NK細胞) のいずれかにおいて、GFPネガティブ事象に対するGFPポジティブ事象の頻度を算出した (図64A)。さらに、GFPの全体蛍光を平均蛍光強度 (MFI、図64B) の評価によって定量化した。同様の頻度およびMFI分析を

40

50

、D i I 色素について実施した（図 6 4 C、図 6 4 D）。まとめると、これらの測定基準によって、一次ヒト T 細胞および NK 細胞共培養において試験された全ての標的化された L N P の L N P トランスフェクション効率の定量化が可能となった。

#### 【0670】

未刺激 T 細胞または全血を用いて実施された実験とは対照的に、ex vivo で拡大増殖された NK および T 細胞の両方とも、非標的特異的 mut O K T 8 F a b を用いて後挿入された L N P の高い D i I % および G F P % を示す。頻度 % のこの相違にもかかわらず、M F I によって製剤を比較する場合には、mut O K T 8 非標的化 L N P と表面抗原標的化 L N P の多くの間には明確な分離があった。これまでの研究と一致して、T 細胞に抗 C D 7、抗 C D 8、抗 C D 2、抗 C D 1 1 a および抗 C D 1 8 標的化 L N P によってトランスフェクトしたが、抗 C D 1 3 7 または抗 C D 5 6 標的化 L N P について、T 細胞の最小のトランスフェクションしか観察されなかった、または観察されなかった。同様に、抗 C D 7、抗 C D 8、抗 C D 2、抗 C D 1 1 a および抗 C D 1 8 標的化 L N P によって NK 細胞にトランスフェクトできた。しかし、T 細胞とは対照的に、ロルボツズマブまたは A 3 クローンを用いる C D 5 6 標的化 L N P のみが、NK 細胞の高度に特異的なトランスフェクションを示す。

10

#### 【0671】

このデータは、抗 C D 7、抗 C D 8、抗 C D 2、抗 C D 1 1 a または抗 C D 1 8 標的化 L N P を使用して NK 細胞および T 細胞の両方についてトランスフェクション／翻訳を可能にすることができるが、抗 C D 5 6 標的化 L N P を使用すると、他の免疫細胞を上回る高い特異性で NK 細胞について翻訳／翻訳が可能であることを示す。

20

#### 【実施例 3 2】

#### 【0672】

P E G - 脂質コンジュゲーションおよび I N V I T R O タンパク質発現 - 天然鎖間ジスルフィドを有する、および有さない C D 3 標的化 F A B

この実施例は、C y 5 / G F P m R N A L N P 中に後挿入された、天然鎖間ジスルフィドを有する、および有さないいずれかの抗 C D 3 F a b のコンジュゲーション、純度ならびにその T 細胞トランスフェクションを記載する。

#### 【0673】

L N P を、実施例 6 において記載される混合プロセス、実施例 2 1 において記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。コンジュゲートを、コンジュゲーション前の還元のために、h S P 3 4 D S について 0 . 0 2 5、0 . 1、0 . 5 m M の T C E P を使用したこと、h S P 3 4 - h l a m N o D S について 0 . 0 2 5、0 . 2、2 m M の T C E P を使用したこと（鎖間ジスルフィドノックアウト）、コンジュゲーション反応を 3 7 C で 2 時間実施したことを除いて、実施例 4 のものと同様の方法を使用して生成した。S D S - P A G E（図 6 5 A、6 5 B）を、1 μ g のタンパク質（T h e r m o、4 ~ 1 2 % B i s - T r i s M i n i G e l）を用いて製造業者によって推奨される条件を使用して実施した。R P - H P L C（図 6 5 C、6 5 D）を、1 ~ 2 5 μ g のタンパク質の標的を有する 1 0 μ l を注射して、6 0 ° C のカラム温度、移動相 A : 0 . 1 % T F A を有する水、移動相 B : 0 . 1 % T F A を有するアセトニトリル、勾配 B % : 0 分 5 %、1 分 5 %、6 . 5 分 9 5 %、8 分 9 5 % を用いて、0 . 5 m L / 分で A g i l e n t 3 0 0 S B - C 8 を使用して実施した。実施例 1 2 と同様の方法を使用して、脂質 8 および C y 5 / G F P m R N A を含有する L N P 中に種々の F a b 密度（6、1 2、1 7 g の F a b / m o l 総脂質）で、抗（a n t -）C D 3 h S P 3 4（天然鎖間ジスルフィドを有する、および有さない、D S（鎖間ジスルフィドを有する）対 N o D S（鎖間ジスルフィドを有さない）、以下の配列を参照されたい）P E G - 脂質がコンジュゲートされた F a b を後挿入した。トランスフェクションを、およそ 2 . 5 μ g / m L の m R N A を用いておよそ 2 4 時間、ヒト C D 3 T 細胞を用いて実施した。C D 3 T 細胞のトランスフェクションのレベルを、フローサイトメトリーによって測定した。

30

40

抗 H u C D 3 h S P 3 4 - h l a m F a b N o D S（鎖間ジスルフィドを有さない

50

）およびDS（鎖間ジスルフィドを有する）

hSP34-hlam NoDS HC（配列番号38）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQA  
PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT  
AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGQGL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE  
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS  
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

hSP34-hlam NoDS LC（配列番号39）：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQ  
KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGKKAALTL SGV  
QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTL  
FPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGA V T VAWKADGSPVKV  
GVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSYSCRVT  
H EGSTVEKTVAPAESS

hSP34-hlam DS HC（配列番号40）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQA  
PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT  
AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWQGQGL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE  
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS  
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

hSP34-hlam DS LC（配列番号41）：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQ  
KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGKKAALTL SGV  
QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTL  
FPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGA V T VAWKADGSPVKV  
GVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSYSCRVT  
H EGSTVEKTVAPAECS

【0674】

SP34 DS Fabは、非還元ゲルでおよそ49kDに泳動され（図65A）、一方で、SP34 NoDS Fab LCおよびHCは、非還元ゲルで28kDよりもわずかに小さく互いと同様に泳動され（図65B）、鎖間ジスルフィドは、重鎖および軽鎖中の対応するシステインをセリンに突然変異することによってロックアウトされていることが確認された。種々のレベルのTCEPで還元されたSP34 DS Fabは、ゲルおよびRP-HPLCクロマトグラムの両方で示されるように（図65C）、高レベルのLC/HC単一および二重PEG-脂質コンジュゲーションを示し、最高純度を有する条件は、還元の際の0.025mM TCEPであったが、0.1および0.5mMのTCEPは、困難な量の二重コンジュゲートを有していた。対照的に、SP34 NoDS Fabは、最大2mM TCEPまでの評価されたTCEPの全範囲で高純度を示し、鎖間ジスルフィドの除去が、高純度（単一脂質）コンジュゲートFabを生成する能力に対して著しい効果を有することを強調する。T細胞トランスフェクション研究のために、最も純粋な反応条件であり、UF精製後の他の条件と同様の回収率を有する（表42）と仮定して、0.025mMのTCEPによって生成されたSP34 DS Fabを選択し、高純度およびUF精製後に最良の回収率を与える（表43）と仮定して、0.2mMのTCEPによって生成されたSP34 NoDS Fabを選択した。

【0675】

10

20

30

40

50

## 【表 4 5】

表 42. 還元の際の TCEP 濃度と、UF 精製後の SP34-hlam DS コンジュゲートの最終回収率の間の関連

| TCEP mM | UF 後回収率% |
|---------|----------|
| 0.5     | 20.5     |
| 0.1     | 27.6     |
| 0.025   | 24.3     |

10

## 【0 6 7 6】

## 【表 4 6】

表 43. 還元の際の TCEP 濃度と、UF 精製後の SP34-hlam NoDS コンジュゲートの最終回収率の間の関連

| TCEP mM | UF 後回収率% |
|---------|----------|
| 2       | 14.0     |
| 0.2     | 55.5     |
| 0.025   | 25.9     |

20

## 【0 6 7 7】

SP34 NoDS Fab は、最低の  $6 \text{ g/mol}$ 、および中程度の  $12 \text{ g/mol}$  で、SP34 DS Fab よりも高いトランスフェクション% (図 6 5 E) およびより高い GFP 発現レベル (図 6 5 F) を媒介し、Fab 密度は、このコンジュゲートの効力が SP34 DS Fab のものよりもより高いことを示し、これは、相応により高い純度と一致する (Fab あたり 1 つの PEG-脂質、LC-PEG-脂質なし)。

## 【0 6 7 8】

このデータは、天然鎖間ジスルフィドをロックアウトすることによって、単一 PEG-脂質を有する C 末端システインに対する高度に効率的な部位特異的コンジュゲーションが可能になることを示す。これは、高いプロセス回収率を有する高純度コンジュゲート (Fab あたり 1 つの PEG-脂質) を得るために利用できる還元剤の範囲を広げ、免疫細胞に対する標的化された LNP の最終トランスフェクション効率を低減し得る、Fab あたり 2 つまたはそれより多い PEG-脂質のコンジュゲーションを避ける。

30

## 【実施例 3 3】

## 【0 6 7 9】

FAB-PEG-脂質コンジュゲーションおよび純度-天然鎖間ジスルフィドを有する、および有さない CD2 および CD8 標的化 FAB

この実施例は、天然鎖間ジスルフィドを有する、および有さない、抗 CD2 および抗 CD8 Fab のコンジュゲーションおよび純度を記載する (図 4 7)。

40

## 【0 6 8 0】

コンジュゲートを、コンジュゲーション前の還元のために、抗 CD2 TS2/18.1 および 9.6 DS Fab について 0.025、0.0375、0.05、0.0625 mM の TCEP を使用したこと、抗 CD2 TS2/18.1 および 9.6 NoDS Fab について 0.05、0.1、0.2 mM の TCEP を使用したこと (以下の配列を参照)、抗 CD8 TRX2 NoDS Fab について 0.025、0.05、0.1、0.2 mM の TCEP を使用したことならびにコンジュゲーション反応を  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間実施したことを除いて、実施例 4 のものと同様の方法を使用して生成した。SDS-PAGE (図 6 6 A および 6 6 B) を、 $1 \mu\text{g}$  のタンパク質 (Thermo、4~12% Bis-Tris Mini Gel) を用いて製造業者の推奨条件を使用して実施し

50

た。RP-HPLC（図66Cおよび66D）を、1～25 μgのタンパク質の標的を有する10 μlを注射して、60℃のカラム温度、移動相A：0.1% TFAを有する水、移動相B：0.1% TFAを有するアセトニトリル、勾配B%：0分 5%、1分 5%、6.5分 95%、8分 95%を用いて、0.5 mL/分でAgilent 300 SB-C8を使用して実施した。

抗CD2 TS2/18.1 DS Fab

TS2/18.1 DS HC（配列番号42）：

EVQLVESGGGLVMPGGSLKLSCAASGFAFSSSYDMSWVRQT  
PEKRLIEWVAYISGGGFTYYPDTVKGRFTLSRDNAKNTLYL  
QMSSSLKSEDTAMYYCARQGAWELVYWGQGTLVTVSAAST  
KGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

TS2/18.1 DS LC（配列番号43）：

DIVMTQSPATLSVTPGDRVFLSCRASQSISDFLHWYQQKS  
HESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEP  
EDVGVYFCQNGHNFPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFFP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC

抗CD2 9.6 DS Fab

9.6 DS HC（配列番号44）：

QVQLQQPGAELVRPGSSSVKLSCSKASGYTFTRYWIHWVKQR  
PIQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAY  
MQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTSVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

9.6 DS LC（配列番号45）：

NIMMTQSPSSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSSNQKNYLA  
WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT  
ISSVQPEDLAVYYCHQYLSSTHTFGGGTKLEIKRTVAAPSV  
FIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0681】

TS2/18.1および9.6 DS Fabは、非還元ゲルでおよそ49 kDに泳動され（図26-1）、一方で、TS2/18.1、9.6およびTRX2 NoDS Fab LCおよびHCは、非還元ゲルで28 kDよりもわずかに小さく互と同様に泳動され（図66B）、鎖間ジスルフィドは、重鎖および軽鎖中の対応するシステインをセリンに突然変異することによってロックアウトされていることが確認された。コンジュゲーションの前に種々のレベルのTCEPで還元されたTS2/18.1および9.6 DS Fabは、SDS-PAGE（図66A）およびRP-HPLCクロマトグラム（TS2/18.1のみ、図66C）の両方で示されるように、高レベルのLC/HC単一および二重PEG-脂質コンジュゲーションを示し、最高純度を有する条件は、還元の際の0.025 mM TCEPであり、より高いTCEPレベルは、LCコンジュゲートおよび二重コンジュゲート（Fabあたり2つのPEG-脂質）の量を増大した。対照的に、TS2/18.1、9.6およびTRX2 NoDS Fabは、最大0.2 mM TCEPまでの評価されたTCEPの全範囲で高純度を示し、鎖間ジスルフィドの除去が、高純度（Fabあたり1つのPEG-脂質）コンジュゲートを生成する能力に対して著しい効果

を有することを強調する。

【0682】

多くの免疫細胞標的化 Fab にわたるこのデータは、天然鎖間ジスルフィドをノックアウトすることが、軽鎖へのコンジュゲーションを避け、Fab あたり 1 つより多い PEG-脂質をコンジュゲートすることを避けながら、重鎖上の C 末端システインに対する高度に効率的な部位特異的コンジュゲーションを可能にする一般化できるアプローチであることを示す。

【実施例 34】

【0683】

IN VITRO タンパク質発現 - CD3 および TCR 標的化比較ならびに埋没ジスルフィドを有する、および有さない SP34 FAB

この実施例は、Cy5 / GFP mRNA LNP 中に後挿入された、抗 CD3 または抗 TCR Fab のいずれかならびに埋没鎖間ジスルフィドを有する、および有さない抗 CD3 Fab を用いてヒト CD3 T 細胞を標的化すること（図 47）ならびにトランスフェクションおよび IFN $\gamma$  分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0684】

LNP を、実施例 6 において記載される混合プロセス、実施例 21 において記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。コンジュゲートは、コンジュゲーション前の還元のために、0.1 mM の TCEP を使用したことおよびコンジュゲーション反応を 37°C で 2 時間実施したことを除いて、実施例 4 のものと同様の方法を使用して生成した。実施例 12 と同様の方法を使用して、抗 CD3 hSP34（埋没ジスルフィドを有する、および有さない、bDS 対 NoDS）、TR66（Bortolottoら Optimizing anti-CD3 affinity for effective T cell targeting against tumor cells、Eu. J of Immun. 2002; Frankら Combining T cell specific activation and in vivo gene delivery through CD3-targeted lentiviral vectors、Blood Adv 2020）、抗 CD3 TRX4、抗 CD3 ヒト化 UCHT1（Hz UCHT1）および抗 CD3 テプリズマブ PEG-脂質コンジュゲート Fab を、脂質 8 および Cy5 / GFP mRNA を含有する LNP 中に後挿入した。トランスフェクションは、およそ 2.5  $\mu$ g/mL の mRNA でヒト CD3 T 細胞を用いておよそ 24 時間実施した。2 つの細胞種を区別するために、CD8 および CD4 細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗 CD4 抗体（クローン SK3）を使用するフローサイトメトリーによって測定した。上清中の IFN $\gamma$  を製造業者の推奨手順を使用して測定した（R&D Systems、DY285B）。

抗 CD3 hSP34-hlam bDS Fab 配列

hSP34-hlam bDS HC（配列番号 46）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNHWVRQA  
PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT  
AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTL  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE  
PVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS  
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH  
hSP34-hlam bDS LC（配列番号 47）：

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSSTGAVTSGNYPNHWVQQ  
KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGKAAALTLSGV  
QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTL  
FPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGA V T VAWKADGSPVKV  
GVETTKPSKQSNNKYAACSYLSLTPEQWKSHRSYSYSCRVT  
H  
EGSTVEKTVAPAESS

10

20

30

40

50

抗CD3 TR66 bDS Fab配列

TR66 bDS HC (配列番号48) :

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTTRYTMHWVKQR  
PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAY  
MQLSSSLTSEDSAVYYCARYYDDNYSLDYWGQGTTTLTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

TR66 bDS LC (配列番号49) :

QIVLTQSPSSLSASLGEEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKPG  
TSPKRWIYDTSKVASGVDPDRFSGSGSGTSSYSLTISSMEE  
DAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDSTYSLCSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  
SSPVTKSFNRGES

10

抗CD3 TRX4 bDS Fab配列

TRX4 bDS HC (配列番号50) :

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSFPMAWVRQA  
PGKGLEWVSTISTSGGRTY YRDSVKGRFTISRDN SKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQYSGGFDYWGQGT LVTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

20

TRX4 bDS LC (配列番号51) :

DIQLTQPNSVSTSLGSTVKLSCTLS SGNIENNYVHWYQLY  
EGRSPTTMIYDDDKRPDGVDPDRFSGSIDRSSNSAFLTIHN  
VAIEDEAIYFCHSYVSSFNVFGGGTKLTVLGQPKANPTVT  
LFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK  
AGVETTKPSKQSNNKYAACSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT  
HEGSTVEKTVAPTESS

30

抗CD3 HzUCHT1 bDS Fab配列

HzUCHT1 (Y59T) bDS HC (配列番号52) :

EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTFTGYTMNWVRQA  
PGKGLEWVALINPTKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFDVWGQGT LVTV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

HzUCHT1 bDS LC (配列番号53) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIRNYLNWYQQKP  
GKAPKLLIYYTSRLES GVP SRFS GSGSGTDYTLTISSLQP  
EDFATYYCQQGNLTPWTFGQG TKVEIKRTVAAPS VFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYSLCSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

40

抗CD3テブリズマブbDS Fab配列

テブリズマブ bDS HC (配列番号54) :

QVQLLVQSGGGGVVQPGRSRLRLSCKASGYTFTTRYTMHWVRQA  
PGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDN SKNTAF  
LQMDSL RPEDTG VYFCARYYDDHYCLDYWGQGT PVTVSSA

50

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

テプリズマブ bDS LC (配列番号 55) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPG  
KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFITISSLQPE  
DIATYYCQQWSSNPFTFGQGQTKLQITRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  
SSPVTKSFNRGES

【0685】

SP34 NoDS Fab は、他の Fab 構築物よりも、高いトランスフェクション % (図 67A) およびより平均蛍光強度、MFI) によって定量化される高い GFP 発現レベル (図 67B) を媒介した。SP34 bDS および TR66 bDS Fab は、GFP によって同様のレベルのトランスフェクション % を媒介したが、発現レベルは、平均蛍光強度によって定量化される SP34 NoDS Fab のものよりも低かった。SP34 について、NoDS および bDS Fab 形式は、同様のレベルの IFN $\gamma$  分泌を有していた (図 67C)。さらに、TR66、TRX4、HzUCHT1 および テプリズマブは、SP34 よりも高いレベルの IFN $\gamma$  分泌を有していたが、それらはより低いレベルの GFP 発現を示した (図 67B)。

【0686】

このデータは、複数の CD3 標的化 Fab にわたって、それらがカップまたはラムダ軽鎖を有するか否かに関わらず、多数が、CD8 および CD4 T 細胞トランスフェクションおよび翻訳を媒介するための頑強な T 細胞標的として CD3 を例証する NoDS または bDS のいずれかにおいて高いトランスフェクション／翻訳を媒介可能であることを示す。SP34 クローンについては、T 細胞トランスフェクション／翻訳効率に関して bDS 形式を上回って NoDS 形式が好ましい。さらに、このデータは、T 細胞活性化は、効率的なトランスフェクションおよび翻訳を保証しないことを示唆する。

【実施例 35】

【0687】

IN VITRO タンパク質発現—埋没ジスルフィドを有する、および有さない CD8 標的化 FAB ならびに他の CD2 標的化 FAB クローン

この実施例は、Cy5／GFP mRNA LNP 中に後挿入された、NoDS または bDS 形式の抗 CD8 Fab または抗 CD2 Fab を用いてヒト CD8 T 細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよび翻訳に対するそれらの効果を記載する。

【0688】

LNP を、実施例 6 において記載される混合プロセス、実施例 21 において記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。実施例 4 に記載される方法から生成された Fab—脂質コンジュゲート。実施例 12 と同様の方法を使用して、抗 (ant) CD3 hSP34、抗 CD8 TRX2 および抗 CD2 クローン Lo—CD2b (ATCC、PTA—802)、35.1 (ATCC、HB—222) および OKT11 (ATCC、CRL—8027) PEG—脂質がコンジュゲートされた Fab を、脂質 8 および Cy5／GFP mRNA を含有する LNP 中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ 2.5  $\mu$ g/mL の mRNA でおよそ 24 時間ヒト CD3 T 細胞を用いて実施した。CD8 細胞のトランスフェクションのレベルをフローサイトメトリーによって測定した。

抗 CD8 TRX2 bDS Fab 配列

TRX2 bDS HC (配列番号 56) :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDFGMNWVRQA  
PGKGLEWVALIYYDGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLY

LQMNSLRAEDTAVYYCAKPHYDGYHFFDSWGQGTLVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

TRX2 bDS LC (配列番号57) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKGSQDINNYLAWYQQKP  
GKAPKLLIYNTDILHTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISSSLQP  
EDIATYYCYQYNNGYTFFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPS  
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  
SSPVTKSFNRRGES

10

抗CD2 Lo-CD2b bDS Fab配列

Lo-CD2b bDS HC (配列番号58) :

EVQLVESGGGLVQPGASLKLSCVASSGFTTFSDYWMSSWVRQT  
PGKPMIEWIGHIKYDGSYTNYPAPSLKNRFTISRDNAAKTTLY  
LQMSNVRSEDSATYYCAREAPGAASYWGQGTLVTVSSAST  
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

Lo-CD2b bDS LC (配列番号59) :

DVVLTTQTPVAQPVTLGDAQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEW  
FLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPRDFIGSGSGSDFTLKI  
SRVEPEDWGVYYCFQGTHDPYTFGAGTKLELKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRRGES

20

抗CD2 35.1 bDS Fab配列

35.1 bDS HC (配列番号60) :

EVQLQQSGAELVKPGASVKLS CRTSGGFNIKDTYIHWVKQR  
PEQGLKWIGRIDPANGNTKYDPKFQDKATVTADTSSNTAY  
LQLSSLTSED TAVYYCVTYAYDGNWYFDVWGAGTAVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQT  
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

30

35.1 bDS LC (配列番号61) :

DIKMTQSPSSSMYVSLGERVTITCKASQDINSFLSWFQQKP  
GKSPKTLIYRANRLVDGVPSTRFSGSGSGQDYSLTISSLEY  
EDMEIYYCLQYDEFPTYTFGGGTKLEMKRTVAAPS VFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRRGES

40

抗CD2 OKT11 bDS Fab配列

OKT11 bDS HC (配列番号62) :

QVQLQQPGAE LVRPGTSVKLSCKASGYTF TSYWMHWIKQR  
PEQGLEWIGRIDPYDSETHYNEKF KDKAILSVDKSSSTAY  
IQLSSLTSDDSAVYYCSRRDAKYDGYALDYWGQGTSVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

OKT11 bDS LC (配列番号63) :

50

D I V M T Q A A P S V P V T P G E S V S I S C R S S K T L L H S N G N T Y L Y W  
F L Q R P G Q S P Q V L I Y R M S N L A S G V P N R F S G S G S E T T F T L R I  
S R V E A E D V G I Y Y C M Q H L E Y P Y T F G G G T K L E I E R T V A A P S V  
F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q  
S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L C S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E  
V T H Q G L S S P V T K S F N R G E S

【0689】

鎖間ジスルフィドノックアウト（NoDS）抗CD8 TRX2 Fabは、埋没ジスルフィド（bDS）TRX2 Fabよりもわずかに高いトランスフェクション%（図68A）およびGFP発現レベル（図68B）を有していたが、差は小さかった。実施例17と同様に、本明細書において調査されたCD2標的化Fabのうち、抗CD3または抗CD8 Fabほど良好に性能を発揮したものはなかった。

【0690】

このデータは、NoDS形式のTRX2クローンが好ましいが、bDS形式のFabは、効率的なT細胞トランスフェクション／翻訳を媒介できることを示す。さらに、CD8およびCD3は、評価されたクローンについてCD2を上回る好ましい標的である。

【実施例36】

【0691】

IN VITROタンパク質発現－埋没ジスルフィドを有する、および有さないCD8標的化FABならびに他のCD2標的化FABクローン

この実施例は、Cy5／GFP mRNA LNP中に後挿入された、抗CD3および抗（ant-）CD11aまたは抗CD3および抗CD18 Fabを用いて同時標的化することによってヒトT細胞を標的化することをならびにトランスフェクション／翻訳およびIFN $\gamma$ サイトカイン分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0692】

LNPを、実施例6において記載される混合プロセス、実施例21において記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。実施例4に記載される方法から生成されたFab－脂質コンジュゲート。実施例12と同様の方法を使用して、抗（ant-）CD3 hSP34、抗CD11 $\alpha$  HzMHM24、抗CD18エルリズマブ（ErliZuma b）PEG－脂質がコンジュゲートされたFabを、脂質8およびCy5／GFP mRNAを含有するLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5  $\mu$ g/mLのmRNAでおよそ24時間ヒトCD3 T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗CD4抗体（SK7）を使用するフローサイトメトリーによって測定した。上清中のIFN $\gamma$ を製造業者の推奨手順を使用して測定した（R&D Systems、DY285B）。

【0693】

CD11aまたはCD18いずれかを単独を標的化することで、CD8およびCD4 T細胞両方のトランスフェクション（図69A）およびGFP発現（図69B）を媒介した。重要なことに、抗CD11aまたはCD18クローンのいずれかを用いて抗CD3クローンのいずれかを同時標的化することによって、IFN $\gamma$ 分泌のレベルがほぼ50%低減され、一方で、トランスフェクションおよび翻訳のレベルは、同様またはCD3標的化単独よりも高かった（図69C）。

【0694】

このデータは、CD11aおよびCD18を標的化することで、効率的な免疫細胞トランスフェクション／翻訳を媒介できることおよびCD3を、CD11aまたはCD18のいずれかと同時標的化することで、T細胞トランスフェクションおよびタンパク質翻訳に負の影響を与えることなくT細胞からのサイトカイン放出を実質的に低減できることを示す。NoDS Fab形式の別の抗CD3クローンは、NoDS Fab形式のSP34の同様のレベルのトランスフェクション／翻訳に近づくことができる。

10

20

30

40

50

抗CD11a HzMHM24 bDS Fab配列

HzMHM24 bDS HC (配列番号64) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTHGHWMNWVRQA  
PGKGLEWVGMIHPSDSETRYNQKFKDRFTISVDKSKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARGIYFYGTTFDYWGQGTLVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTV  
SWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

HzMHM24 bDS LC (配列番号65) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKTISKYLAWYQQKPK  
GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP  
EDFATYYCQQHNEYPLTFGQGQGTKEIKRTVAAPSVEIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

10

抗CD18 h1B4 bDS Fab配列

h1B4 bDS HC (配列番号66) :

EVQLVESGGDLVQPGRSRLRLSCAASGFSTFSDYYMSWVRQA  
PGKGLEWVAAIDNDGGSISYPDTVKGRFTISRDNANKNSLY  
LQMNSLRVEDTALYYCARQGRLRRDYFDYWGQGTLVTVST  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTV  
WNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

20

h1B4 bDS LC (配列番号67) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDSYGNSSFHWHY  
QQKPGKAPKLLIYRASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTFIT  
SLQPEDIATYYCQQSNEDPLTFGQGQGTKEIKRTVAAPSVE  
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
GNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
THQGLSSPVTKSFNRGES

30

抗CD18エルリズマブbDS Fab配列

エルリズマブbDS HC (配列番号68) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYTFTEYTMHWMRQA  
PGKGLEWVAGINPKNGGTSHNQRFMDRFTISVDKSTSTAY  
MQMNSLRAEDTAVYYCARWRGLNYGFDFVRYFDVWGQGTLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEP  
VTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSL  
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

エルリズマブbDS LC (配列番号69) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINNLYLNWYQQKPK  
GKAPKLLIYYTSTLHSGVPSRFSGSGSGTDFYTLTISSLQP  
EDFATYYCQQGNTLPPTFGQGQGTKEIKRTVAAPSVEIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

40

【実施例37】

【0695】

IN VITROタンパク質発現ーCD4およびCD8 FABまたはCD4／CD8

FabーScFv二重特異性体を用いる同時標的化LNP

この実施例は、Cy5／GFP mRNA LNP中に後挿入された、抗CD4または

50

抗CD8 Fab、抗CD4および抗CD8 FabならびにCD4 Fab軽鎖からCD8 ScFvを除去したCD4 Fab (Fab-ScFv)を用いてヒトT細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよびIFN $\gamma$ 分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0696】

LNPを、実施例6において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA (Trilink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)、イオン化可能な脂質として脂質8を使用して製剤化し、0.01 mol%のDiIC18 (5)-DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。実施例4に記載される方法から生成したFab-脂質コンジュゲート。実施例12と同様の方法を使用して、抗CD3 hSP34、抗CD4イバリズマブ、抗CD8 TRX2コンジュゲートFabおよびCD4/CD8イバリズマブ/TRX2 Fab-ScFvを、脂質8およびGFP mRNAをDiI色素とともに含有するLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5  $\mu$ g/mLのmRNAでおよそ24時間ヒトCD3 T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗CD4抗体(SK3)を使用するフローサイトメトリーによって測定した。上清中のIFN $\gamma$ を製造業者の推奨手順を使用して測定した(R&D Systems、DY285B)。

【0697】

抗CD8および抗CD4 Fabを一緒に後挿入することは、独立に後挿入された(FIGS. 70Aおよび70B) Fabに対する、同様のCD8およびCD4 T細胞トランスフェクションおよびタンパク質発現を示す。CD4およびCD8 Fabを一緒に後挿入することと比較して、CD4/CD8 Fab-ScFv二重特異性体は、わずかに低いCD4およびCD8 T細胞トランスフェクションを示す。SP34 Fabを用いるCD3標的化(図70C)とは対照的に、CD4、CD8またはCD4/CD8同時標的化条件のうち、実質的にIFN $\gamma$ 放出を媒介したものはなかった。

【0698】

このデータは、二重特異性標的化部分を、同一LNP中に個別に標的化部分を後挿入することを上回って、標的化機能の喪失を最小にしながら、単一タンパク質構築物を2つの異なる免疫細胞種を標的とするように活用できることを示す。

抗CD4/CD8イバリズマブ/TRX2 bDS Fab-ScFv配列

イバリズマブ/TRX2 bDS Fab-ScFv HC (配列番号70) :

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFFTSYVITHWVRQK  
PGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAY  
MELSSSLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGGLVTV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSGVHTCPSAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLG  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

イバリズマブ/TRX2 bDS Fab-ScFv LC (配列番号71) :

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLA  
WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPPDRFSGSGSGSTDFTLT  
ISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEIKRTVAAPSV  
FIAPPSSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRGESSGGGGSGGGGGSGGGGGSGVQLVE  
SGGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDFGMNWVRQAPGKGLE  
WVALIYYDGSNKFYADSVKGRFTISRDNISKNTLYLQMNSL  
RAEDTAVYYCAKPHYDGYHYHFFDSWGQGGLVTVSSGGGGGS  
GGGGSGGGGGSGGGGGSDIQMTQSPSSSLASVGVDRVTITCKG

10

20

30

40

50

S Q D I N N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y N T D I L H T G V P S R F S G S  
G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A T Y Y C Y Q Y N N G Y T F G Q G T K V E I  
K

【実施例 38】

【0699】

IN VITRO タンパク質発現－天然鎖間ジスルフィドを有さない、または埋没鎖間ジスルフィドを有する CD4 標的化 Fab

この実施例は、Cy5 / GFP mRNA LNP 中に後挿入された抗 CD3 または抗 CD4 Fab を用いてヒト T 細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよび IFN $\gamma$  分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0700】

LNP を、実施例 6 において記載される混合プロセス、実施例 21 において記載されるバッファー交換プロセスを使用して調製した。実施例 4 に記載される方法から生成された Fab-脂質コンジュゲート。実施例 12 と同様の方法を使用して、抗 (ant-) CD3 hSP34、抗 CD4 イバリズマブ、抗 CD4 ヒト化 OKT4 PEG-脂質コンジュゲート Fab および Nb を、脂質 8 および Cy5 / GFP mRNA を含有する LNP 中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ 2.5  $\mu$ g/mL mRNA でおよそ 24 時間ヒト CD3<sup>+</sup> T 細胞を用いて実施した。2 つの細胞種を区別するために、CD8 および CD4 細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗 CD4 抗体 (SK4) を使用するフローサイトメトリーによって測定した。上清中の IFN $\gamma$  を製造業者の推奨手順を使用して測定した (R&D Systems、DY285B)。

【0701】

CD4 標的化 Fab の中で、イバリズマブが、より高いトランスフェクション% (図 71A) および平均蛍光強度、MFI) によって定量化される GFP 発現レベル (図 71B) を媒介したが、抗 CD3 SP34 Fab よりも低かった。抗 CD4 Fab のうち、非標的化 mu t OKT8 Fab を上回る実質的な IFN $\gamma$  分泌レベルを媒介したものはなかったが、抗 CD3 SP34 Fab は、より高いレベルの IFN $\gamma$  を示した (図 71C)。

【0702】

このデータは、天然鎖間ジスルフィドを有さない抗 CD4 Fab (イバリズマブ、NoDS) または埋没鎖間ジスルフィドを有する抗 CD4 Fab (OKT4、bDS) は、CD8<sup>+</sup> T 細胞に対して CD4<sup>+</sup> T 細胞の高度に特異的な LNP トランスフェクションおよびタンパク質翻訳を媒介でき、CD4 を標的化することで、T 細胞活性化および IFN $\gamma$  放出を避けることができることを示す。

抗 CD4 イバリズマブ NoDS Fab 配列

イバリズマブ NoDS LC (配列番号 72) :

Q V Q L Q Q S G P E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y V I H W V R Q K  
P G Q G L D W I G Y I N P Y N D G T D Y D E K F K G K A T L T S D T S T S T A Y  
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R E K D N Y A T G A W F A Y W G Q G T L V T V  
S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T  
V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T  
Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C

イバリズマブ NoDS HC (配列番号 73) :

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R V T M N C K S S Q S L L Y S T N Q K N Y L A  
W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T  
I S S V Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S Y R T F G G G T K L E I K R T V A A P S V  
F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q  
S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E  
V T H Q G L S S P V T K S F N R G E S

抗 CD4 OKT4 bDS Fab 配列

OKT4 bDS LC (配列番号74) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQA  
PGKRLIEWVSAISDHSTNTYYPD SVKGRFTISRDN AKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARKYGGDYDPFDYWGQGGLVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

OKT4 bDS HC (配列番号75) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCQASQDINNYIAWYQHQP  
GKGP KLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDTLTITSSSLQP  
EDFATYYCLQYDNL LFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGES

【実施例39】

【0703】

IN VITROタンパク質発現—他のCD4標的化FABクローンおよびCD4標的化ナノボディ

この実施例は、GFP mRNA DiI標識LNP中に後挿入された抗CD3または抗CD4 Fabを用いてヒトT細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよびIFN $\gamma$ 分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0704】

LNPを、実施例6において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA (TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)、イオン化可能な脂質としての脂質8を使用して製剤化し、0.01mol%のDiI C18(5)-DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。Fab-脂質コンジュゲートは実施例4に記載された方法から生成し、一方でNbがコンジュゲートされたものの生成は、遊離NbからNbがコンジュゲートされたものを分離するために、1:1:4のNb:DSPE-3.4KPEG-マレイミド(maleimide):DSPE-2KPEG-OCH<sub>3</sub>および50kDのUFメンブレン(Millipore Corp、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ)を使用することにおいて異なっていた。実施例12と同様の方法を使用することで、抗CD3 hSP34、抗CD4イバリズマブ、抗CD4 hBF5がコンジュゲートされたFabおよびコンジュゲートされたNb(ラマ免疫化に由来する)を、脂質8およびGFP mRNAをDiI色素とともに含有するLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5 $\mu$ g/mLのmRNAでおよそ24時間ヒトCD3 T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗CD4抗体(OKT3)を使用するフローサイトメトリーによって測定した。上清中のIFN $\gamma$ を製造業者の推奨手順を使用して測定した(R&D Systems、DY285B)。

【0705】

CD4標的化コンジュゲートの中で、抗CD4が、わずかに高いトランスフェクション% (図72A) および平均蛍光強度、MFI) によって定量化されるGFP発現レベル (図72B) を媒介したが、抗CD3 SP34 Fabよりも低かった。CD4標的化FabおよびNbについては、トランスフェクションおよび翻訳は、CD4+T細胞集団において唯一観察された。抗CD4 Fabのうち、非標的化mutOKT8 Fabを上回る実質的なIFN $\gamma$ 分泌レベルを媒介したものはなかったが、抗CD3 SP34 Fabは、より高いレベルのIFN $\gamma$ を示した。

【0706】

10

20

30

40

50

このデータは、F a bおよびナノボディの両方とも、C D 8 + T細胞に対してC D 4 + T細胞による高度に特異的なL N Pトランスフェクションおよびタンパク質翻訳を媒介でき、C D 4を標的化することで、T細胞活性化およびI F N γ放出を避けることができることを示す。

【0707】

抗C D 4 T O 2 3 2 0 0 0 8 N b配列（配列番号76）

C D R 1、C D R 2、C D R 3は、I M G T指定に基づいて下線が引かれている：

【化69】

EVQLVESGGGSGVQPGGSLTLSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKEREFVAAVRWSST  
GIYYTQYADSVKSRFTISRDNANKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAADTYNSNPARW  
DGYDFRGQGTLTVSSGGCGGHHHHHHH

10

【実施例40】

【0708】

I N V I T R Oタンパク質発現－C D 8標的化ナノボディクローン

この実施例は、G F P mRNA D i I標識L N P中に後挿入された抗C D 3、抗C D 8 F a bまたは抗C D 8ナノボディを用いてヒトT細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよびI F N γ分泌に対するそれらの効果を記載する。

20

【0709】

L N Pを、実施例6において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。L N Pを、e G F PをコードするmRNA（T r i L i n k B i o t e c h n o l o g i e s、米国、カリフォルニア州）、イオン化可能な脂質としての脂質8を使用して製剤化し、0.01mol%のD i I C 1 8（5）－D S（I n v i t r o g e n、米国、マサチューセッツ州）を用いて標識した。F a b－脂質コンジュゲートは実施例4に記載された方法から生成し、一方でN bがコンジュゲートされたものの生成は、遊離N bからN bがコンジュゲートされたものを分離するために、1：1：4のN b：D S P E－5 K P E G－マレイミド（m a i l e i m i d e）：D S P E－2 K P E G－O C H 3および50kD U Fメンブレン（M i l l i p o r e C o r p、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ）を使用することにおいて異なっていた。実施例12と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされたF a bおよびコンジュゲートされたN b（ラマまたはアルパカ免疫化に由来する）を、脂質8およびG F P mRNAをD i I色素とともに含有するL N P中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5μg/mLのmRNAでおよそ24時間ヒトC D 3 T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、C D 8およびC D 4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗C D 4抗体（S K 3）を使用するフローサイトメトリーによって測定した。上清中のI F N γを製造業者の推奨手順を使用して測定した（R & D S y s t e m s、D Y 2 8 5 B）。

30

【0710】

C D 8標的化N bコンジュゲートは、抗C D 8 T R X 2よりも高いトランスフェクション%（図73A）およびG F P発現レベル（図73B）を示した。C D 8標的化N bについては、m u t O K T 8 F a bと比較して、トランスフェクションおよび翻訳は、C D 8 T細胞集団において唯一観察された。抗C D 8 N bは、非標的化m u t O K T 8 F a bを上回る実質的なI F N γ分泌レベルを媒介しなかったが、抗C D 3 S P 3 4 F a bは、より高いレベルのI F N γを示した（図73C）。

40

【0711】

このデータは、F a bおよびナノボディの両方が、C D 4 T細胞に対してC D 8 T細胞による高度に特異的なL N Pトランスフェクションおよびタンパク質翻訳を媒介することならびにC D 8を標的化することで、T細胞活性化およびI F N γ放出を避けるこ

50

とができることを示す。

【0712】

抗CD8 BDSn Nb配列（配列番号77）

CDR1、CDR2、CDR3は、IMGT指定に基づいて下線が引かれている：

【化70】

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSDYGVGWFRQAPGKGRFVADIDW  
NGEHTSYADSVKGRFATSRLDNKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAADALPYTVR  
KYNYWGQGTQVTVSSGGCGGHHHHHH

10

【実施例41】

【0713】

IN VITROタンパク質発現－2Kまたは5K PEGを有するCD3およびCD7  
標的化ナノボディ

この実施例は、GFP mRNA DiI標識LNP中に後挿入された抗CD3、抗CD7 Fabまたは抗CD8ナノボディを用いてヒトT細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよびIFN $\gamma$ 分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0714】

LNPを、実施例6において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA（Trilink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州）、イオン化可能な脂質としての脂質8を使用して製剤化し、0.01mol%のDiIC18（5）-DS（Invitrogen、米国、マサチューセッツ州）を用いて標識した。Fab-脂質コンジュゲートは実施例4に記載された方法から生成し、一方でNbがコンジュゲートされたものの生成は、遊離NbからNbがコンジュゲートされたものを分離するために、1:1:4のNb:DSPE-5KPEG-マレイミド（maleimide）またはDSPE-3.4KPEG-マレイミド（maleimide）:DSPE-2KPEG-OCH<sub>3</sub>および50kDのUFメンブレン（Millipore Corp、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ）を使用することにおいて異なっていた。実施例12と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされたFabおよびコンジュゲートされたNb（E11およびG03）、V1（抗CD7）を、脂質8およびGFP mRNAをDiI色素とともに含有するLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5 $\mu$ g/mLのmRNAでおよそ24時間ヒトCD3 T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗CD4抗体（SK3）を使用するフローサイトメトリーによって測定した。

20

30

【0715】

抗CD3 Nbクローンおよび抗CD7 Nbの両方について、より長い5K PEGが、2K PEGを上回ってトランスフェクション%（図74A）およびGFP発現レベル（図74B）を改善した。抗CD3 Nbについて、コンジュゲートPEG長間の相違は、抗CD7 Nbについてよりも著しかった。

40

【0716】

このデータは、ナノボディコンジュゲートが、2Kよりも長いPEG長から恩恵を受けることができることおよび異なるクローンが、変動する改善度を有し得ることを示す。

抗CD3 T0170117G03-A Nb配列（配列番号78）

EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQA  
PGKEREFVAAIVWSGGNTYYEDSVKGRFTISRDNANKNIMY  
LQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAAGQYDYWGQGTLLV  
TVSSAGGGSGGHHHHHHHC

50

抗CD3 T0170060E11 Nb配列（配列番号79）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQA  
PGKQRDLVAVIGSRGNNRGRTNYADSVKGRFTISRDTGN  
TVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSS  
GGGSGGHHHHHHHC

抗CD7 V1 Nb配列（配列番号80）

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGYPYSSSYCMGWFRQA  
PGKEREGVAAIDSDGRTRYADSVKGRFTISQDNAKNTLYL  
QMNRMKPEDTAMY YCAARFGPMGCVDLSTLSFGHWGQGQTQ  
VTVSITGGGCHHHHHHHH

10

【実施例42】

【0717】

IN VITROタンパク質発現－2Kまたは5K PEGを有する、CD8、CD3、  
CD28、CD4およびTCR標的化ナノボディ

この実施例は、GFP mRNA DiI標識LNP中に後挿入された、抗CD8、抗  
CD3、抗CD4 Fabおよび抗CD8、抗CD3、抗CD28、抗CD4および抗T  
CRナノボディを用いてヒトT細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよ  
びIFN $\gamma$ 分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0718】

LNPを、実施例6において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例25に  
おいて記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、e  
GFPをコードするmRNA（TriLink Biotechnologies、米国  
、カリフォルニア州）、イオン化可能な脂質としての脂質8を使用して製剤化し、0.0  
1mol%のDiIC18（5）－DS（Invitrogen、米国、マサチューセッ  
ツ州）を用いて標識した。Fab－脂質コンジュゲートは実施例4に記載された方法から  
生成し、一方でNbがコンジュゲートされたものの生成は、コンジュゲートされていない  
NbからNbがコンジュゲートされたものを分離するために、1：1：4のNb：DSP  
E－2KPEG－マレイミド（maleimide）：DSPE－2KPEG－OCH  
3またはNb：DSPE－5KPEG－マレイミド（maleimide）：DSPE  
－2KPEG－OCH3および50kD UFメンブレン（Millipore Cor  
p、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ）を使用することにおいて異なっていた。実施  
例12と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされたFabおよびコンジュゲ  
ートされたNb（ラマまたはアルパカ免疫化に由来する）を、脂質8およびGFP mRNA  
AをDiI色素とともに含有するLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およ  
そ2.5 $\mu$ g/mLのmRNAでおよそ24時間ヒトCD3 T細胞を用いて実施した。  
2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションの  
レベルを、抗CD4抗体（SK3）を使用するフローサイトメトリーによって測定した。

20

30

【0719】

評価された標的の全てについて、より長い5K PEGがコンジュゲートされたナノボ  
ディは、逆の関係を示した抗CD8クローンE05を除いて一般的に、2K PEGを上  
回ってトランスフェクション%（図75Aおよび75B）およびGFP発現レベル（図7  
5Cおよび75D）を改善した。改善の規模は、クローン特異的であると思われる。

40

【0720】

このデータは、標的に関わらず、ナノボディPEG－脂質コンジュゲートの好ましいP  
EG長は、2Kよりも大きいことを示す。

【0721】

抗TCR T017000700 Nb配列（配列番号81）

CDR1、CDR2、CDR3は、IMGT指定に基づいて下線が引かれている：

50

## 【化 7 1】

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIG  
 DQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWG  
 QGTLVTVSSGGCGGHHHHHH

抗CD28 28CD065G01 Nb配列（配列番号82）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FRLHTMEWYRRT  
 PETQREWVATITSGGT TNYPDSVKGRFTISRDDTKKTVYL  
 QMNSLKPEDTAVYYCHAVATEDAGFP PSNYWGQGTLVTVS  
 SGGCGGHHHHHHH

抗CD3 T0170061C09 Nb配列（配列番号83）

EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGR TYRGYS MGWFRQA  
 PGREREFVAAI VWS DGN TY YEDSVKGRFTISRDN AKNTMY  
 LQMTSLKPEDSATY YCAAKIRPYIFK IAGQYDYWGQGTLV  
 TVSSGGCGGHHHHHHH

## 【0722】

抗CD4 T023200008 Nb配列（配列番号76）

## 【化 7 2】

EVQLVESGGGSVQPGGSLTLSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKEREFVAAVRWSST  
 GIYYTQYADSVKSRFTISRDN AKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAADTYNSNPAR  
 WDGYDFRGQGLVTVSSGGCGGHHHHHHH

## 【実施例 4 3】

## 【0723】

IN VITROタンパク質発現－5Kまたは3.4K PEGを有する、CD8、CD7およびCD3標的化ナノボディ

この実施例は、GFP mRNA DiI標識LNP中に後挿入された抗CD8、抗CD3 Fabならびに抗CD8、抗CD7および抗CD3ナノボディを用いてヒトT細胞を標的化することならびにトランスフェクションに対するそれらの効果を記載する。

## 【0724】

LNPを、実施例6において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA（TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州）、イオン化可能な脂質としての脂質8を使用して製剤化し、0.01mol%のDiIC18(5)-DS（Invitrogen、米国、マサチューセッツ州）を用いて標識した。Fab-脂質コンジュゲートは実施例4に記載された方法から生成し、一方でNbがコンジュゲートされたものの生成は、コンジュゲートされていないNbからNbがコンジュゲートされたものを分離するために、1:1:4のNb:DSPE-3.4KPEG-マレイミド（maleimide）:DSPE-2KPEG- $\text{OCH}_3$ またはNb:DSPE-5KPEG-マレイミド（maleimide）:DSPE-2KPEG- $\text{OCH}_3$ および50kDのUFメンブレン（Millipore Corp、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ）を使用することにおいて異なっていた。実施例12と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされたFabおよびコンジュゲートされたNb（ラマまたはアルパカ免疫化に由来する）を、37Cの温度で4時間、脂質5およびGFP mRNAをDiI色素とともに含有するLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のmRNAでおよそ24時間ヒトCD3T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗CD4抗体（SK3）を使用するフローサイトメ

トリーによって測定した。

【0725】

評価された標的の全てについて、より短い3.4K PEGをコンジュゲートされたNbは、トランスフェクション% (図76A) およびGFP発現レベル (図76B) にあって、より長い5K PEGよりもわずかに良好とは言えないまでも同様であり、または抗CD7 V1 Nbの場合には、3.4K PEGは、5K PEGよりも高いトランスフェクションおよび発現を媒介した。

【0726】

このデータは、標的に関わらず、一般的に、ナノボディーPEG-脂質コンジュゲートにとって好ましいPEG長は、実施例42に先に記載されるようなより短い2K PEGまたは本明細書に記載されるようなより長い5K PEGに対して、3.4K PEGであることを示す。

【実施例44】

【0727】

IN VITROタンパク質発現-FABのための2K対3.4K PEGスペーサー

この実施例は、GFP mRNA DiI標識LNP中に後挿入された抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗CD28、Fabを用いてヒトT細胞を標的化することおよびトランスフェクションに対するそれらの効果を記載する。

【0728】

LNPを、実施例6において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA (TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)、イオン化可能な脂質としての脂質8を使用して製剤化し、0.01mol%のDiIC18(5)-DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。実施例4に記載された方法から生成されたFab-脂質コンジュゲート。実施例12と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされたFab(12D2)を、脂質8およびGFP mRNAをDiI色素とともに含有するLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5μg/mLのmRNAでおよそ24時間ヒトCD3 T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗CD4抗体(SK3)を使用するフローサイトメトリーによって測定した。

【0729】

ほとんどのFabクローンは、2つのPEG長の間でトランスフェクション% (図77A) およびGFP発現レベル (図77B) が異ならなかったが、抗CD4イバリズマブは、2K PEGから3.4K PEGへとトランスフェクション効率の増大を示し、一方で抗CD3 SP34トランスフェクション効率は、2K PEGから3.4K PEGへと低下した。

【0730】

このデータは、一般的に、Fab-PEG-脂質コンジュゲートにとって2K PEGスペーサーが好ましいが、一部のクローンは、より長いPEGスペーサーから恩恵を受けることができることを示す。さらに、埋没ジスルフィドを有する、2Kまたは3.4K PEGのいずれかを有する抗CD3クローン12D2が、CD8およびCD4 T細胞サブセットの両方を効率的にトランスフェクトできることを示す。

抗CD3 12D2 bDS Fab配列

12D2 bDS HC (配列番号84) :

EVKLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFFNYAYWMGWVRQAPGKGLEWIGEIKKDGTTINYPSTLKDRTFTISRDNANQNTLYLQMTKLGSEDTALYYCAREERDGYFDYWGGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSSGLYSLSVSVTVPSSSLGTQTYI

C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S S D K T H T C G G H H H H H

1 2 D 2 b D S L C (配列番号 85) :

Q F V L T Q P N S V S T N L G S T V K L S C K R S T G N I G S N Y V N W Y Q Q H  
E G R S P T T M I Y R D D K R P D G V P D R F S G S I D R S S N S A L L T I N N  
V Q T E D E A D Y F C Q S Y S S G I V F G G G T K L T V L S Q P K A A P S V T L  
F P P S S E E L Q A N K A T L V C L V S D F Y P G A V T V A W K A D G S P V K V  
G V E T T K P S K Q S N N K Y A A C S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C R V T H  
E G S T V E K T V A P A E S S

【実施例 45】

【0731】

IN VITRO タンパク質発現 - CD8 標的化ナノボディ mRNA 滴定

この実施例は、GFP mRNA DiI 標識 LNP 中に後挿入された抗 CD3、抗 CD8 Fab または抗 CD8 ナノボディを用いてヒト T 細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよびタンパク質発現に対するそれらの効果を記載する。

【0732】

LNP を、実施例 6 において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例 25 において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNP を、eGFP をコードする mRNA (Trilink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)、イオン化可能な脂質としての脂質 8 を使用して製剤化し、0.01 mol % の DiIC18 (5) -DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州) を用いて標識した。Fab-脂質コンジュゲートは実施例 4 に記載された方法から生成し、一方で Nb がコンジュゲートされたものの生成は、遊離 Nb から Nb がコンジュゲートされたものを分離するために、1:1:4 の Nb:DSPE-3.4KPEG-マレイミド (maleimide):DSPE-2KPEG-CH<sub>3</sub> および 50 kD の UF メンブレン (Millipore Corp、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ) を使用することにおいて異なっていた。実施例 12 と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされた Fab およびコンジュゲートされた Nb (アルパカ免疫化に由来する) を、脂質 8 および GFP mRNA を DiI 色素とともに含有する LNP 中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ 2.5、0.5 および 0.1 μg/mL の mRNA でおよそ 24 時間ヒト CD3<sup>+</sup> T 細胞を用いて実施した。2 つの細胞種を区別するために、CD8 および CD4 細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗 CD4 抗体 (SK3) を使用するフローサイトメトリーによって測定した。

【0733】

CD8 標的化 Nb コンジュゲートは、0.1 μg/mL mRNA まで、mut OKT8 陰性対照よりも大きいトランスフェクション% (図 78A) および GFP 発現レベル (図 78B) を示した。

【0734】

このデータは、3.4KPEG-脂質がコンジュゲートされたナノボディは、溶液中の低レベルの mRNA 濃度を用いて高度に強力な T 細胞トランスフェクションを媒介できることを示す。

【実施例 46】

【0735】

IN VITRO タンパク質発現 - CD28 標的化 FAB クローン

この実施例は、GFP mRNA LNP (DiI 色素が添加された) 中に後挿入された抗 CD28、抗 CD8、抗 CD4、抗 CD3 Fab を用いてヒト T 細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよび IFNγ 分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0736】

LNP を、実施例 6 において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例 25 において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNP を、e

10

20

30

40

50

GFPをコードするmRNA (TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)、イオン化可能な脂質としての脂質8を使用して製剤化し、0.01mol%のDiIC18(5)-DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。実施例4に記載される同様の方法から生成されたFab-脂質コンジュゲート。実施例12と同様の方法を使用して、抗CD28 8G8A、抗CD28 2E12、抗CD28 CD28.9.3、抗CD28 HzTN228、抗CD28 TGN2122.C/H。

#### 【0737】

PEG-脂質がコンジュゲートされたFabを脂質8およびGFP mRNAを含有し、DiI色素が添加されたLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5μg/mLのmRNAでおよそ24時間ヒトCD3 T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗CD4抗体(SK3)を使用するフローサイトメトリーによって測定した。上清中のIFNγを製造業者の推奨手順を使用して測定した(R&D Systems、DY285B)。

10

#### 【0738】

CD28を標的化するFabのほとんどが、mutOKT8が後挿入された粒子のものよりも大きいCD8およびCD4 T細胞GFPトランスフェクション(図79A)および発現レベル(図79B)を示すが、評価されたクローンのうち、抗CD4 hBF5、抗CD8 TRX2を用いて標的化する、または抗CD3 SP34を用いて両サブセットを標的化する単一T細胞サブセットに勝るものはなかった。SP34以外に、評価されたクローンのうち、mutOKT8 LNPを上回る実質的なIFNγ分泌を誘発したものはなかった(図79C)。

20

#### 【0739】

このデータは、CD4およびCD8 T細胞サブセット両方をトランスフェクト可能であるにもかかわらず、評価されたクローンについて、CD4、CD8またはCD3を標的化することに対してCD28を標的化することによる、トランスフェクション／翻訳効率における優位性がないことを示す。

抗CD28 8G8A Fab配列

8G8A bDS HC (配列番号86) :

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF TSYV I QWVKQK  
PGQG LEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAY  
MEFSLTSEDSALYCARWGDGNYWGRGTLTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
PSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

30

8G8A bDS LC (配列番号87) :

DIEMTQSPA IMSASLGERTMTCTASSSVSSSYFHWYQKP  
GSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISMEAED  
AATYFCHQYHRSP TFGGGTKLETKRTVAAPS VFIFPPSDE  
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV  
TEQDSKDS TYS L CSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKS FNRGES

40

抗CD28 2E12 Fab配列

2E12 bDS HC (配列番号88) :

QVQLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTG YGVNWVRQP  
PGKGLEWLGM IWGDGSTDYNSALKSRLSITKDNSKSKQVFL  
KMNSLQTD D TARYYCARDGYSNFHYVMDYWGQGTSVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQ

50

TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTTCGGHHHHHH  
2E12 bDS LC (配列番号89) :  
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWY  
QQKPGQPPKLLISAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIH  
PVEEDDIAMYFCQQSRKVPWTFGGGTTKLEIKRRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRRGES

抗CD28 CD28.9.3 Fab配列

CD28.9.3 bDS HC (配列番号90) :

QVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS  
PGQGLEWLGVWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSKQVFL  
KMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYSMDYWGQGTITVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVTS  
WNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTTCGGHHHHHHH

CD28.9.3 bDS LC (配列番号91) :

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVEYYVTSLMQ  
WY QQKPGQPPKLLIFAASNVES GVPARFSGSG SGTN  
FSLNIHPVDEDDVAMY FCQQSRKVPY TFGGGTTKLEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW  
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEK  
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRRGES

抗CD28 HzTN228 Fab配列

HzTN228 bDS HC (配列番号92) :

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGFSLTSYGVHWIRQP  
GKGLEWLGVWPGTNFNSALMSRLTISEDTSKNQVSLKLS  
SVTAADTAVYCARDRAYGNLYAMDYWGQGTITVTVSSAST  
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVTSWNS  
GALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTTCGGHHHHHHH

HzTN228 bDS LC (配列番号93) :

DIQMTQSPSLASVGDRTITCRASESVEYYVTSLMQWYQK  
PGKAPKLLIYAASNVD SGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPED  
IATYCQSRKVPFTFGGGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRRGES

抗CD28 TGN2122.C Fab配列

TGN2122.C bDS HC (配列番号94) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITDYKIHWRQA  
PGQGLEWIGYIYPYSGSSDYNQKFKSRATLTVDNSISTAY  
MELSRRLRSDDTAVYYCARGGDAMDYWGQGTITVTVSSASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSG  
ALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICN  
VNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTTCGGHHHHHHH

TGN2122.C bDS LC (配列番号95) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCGASENIYGALNWKYQRKP  
GKAPKLLIYGATNLAGVPSRFSGSGSGRDTLTISLQPD  
EDFATYFCQNILGTWTFGGGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS

10

20

30

40

50

DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
SVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  
SSPVTKSFNRGES

抗CD28 TGN2122.H Fab配列

TGN2122.H bDS HC (配列番号96) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIYYMSWVRQA  
PGKGLEELVAAINPDGGNTYYPDTVKGRFTISRDNANKNSLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARYGGPGFDSWGQGTLVTVSSAST  
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHHH

TGN2122.H bDS LC (配列番号97) :

ENVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPG  
QAPRLWIYDTSKLASGIPARFSGSGSRNDYTLTISSLEPE  
DFAVYYCFPGSGFPMYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
GLSSPVTKSFNRGES

【実施例47】

【0740】

IN VITROタンパク質発現—CD3、CD4、CD7、CD8、CD11a、CD18、CD28およびTCR標的化FABおよびナノボディ

この実施例は、GFP mRNA DiI標識LNP中に後挿入された抗CD3、抗CD4、抗CD7、抗CD8、抗CD11a、抗CD18、抗CD28および抗TCR FabおよびNbを用いてヒトT細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよびIFN $\gamma$ 分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0741】

LNPを、実施例6において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA (TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)、イオン化可能な脂質としての脂質8を使用して製剤化し、0.01mol%のDiI C18(5)-DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。Fab-脂質コンジュゲートは実施例4に記載された方法から生成し、一方でNbがコンジュゲートされたものの生成は、遊離NbからNbがコンジュゲートされたものを分離するために、1:1:4のNb:DSPE-3.4KPEG-マレイミド (maleimide):DSPE-2KPEG-OCH<sub>3</sub>および50kDのUFメンブレン (Millipore Corp、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ)を使用することにおいて異なっていた。実施例12と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされたFabおよびコンジュゲートされたNbを、脂質8およびGFP mRNAをDiI色素とともに含有するLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mLおよび0.1 $\mu$ g/mL mRNAでおよそ24時間、ヒトCD3 T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗CD4抗体 (SK3)を使用するフローサイトメトリーによって測定した。

【0742】

評価されたクローンの全てが、mutOKT8 LNP対照と比較して、ある程度のレベルのトランスフェクション (図80A、80B) およびGFP発現レベル (図80C、80D) を媒介した。CD8およびCD4 T細胞サブセットの両方を同時に標的化するために、抗CD3および抗CD7が、最高および2番目に高いmRNA用量の両方で両細胞サブセットの間で最高のトランスフェクション/翻訳を有するものとして際立っている

10

20

30

40

50

。抗TCRクローンは、最高用量で高いトランスフェクション／翻訳効率を有するが、2番目に高い用量では低下する。特異的T細胞サブセット標的化のために、抗CD8または抗CD4を標的化することで、FabまたはNbの使用に関わらず、対応するサブセットに最高の特異性が提供される。CD3またはTCRのいずれかを標的化することで、T細胞活性化およびIFN $\gamma$ の分泌が誘発されたが、他の標的化クローンは、mutOKT8LNPを実質的に上回るレベルを誘発しなかった（図80E）。

【0743】

このデータは、CD4およびCD8 T細胞両サブセットの高トランスフェクションを可能にするために、FabまたはNbを用いてCD3またはCD7を標的化することは好ましいことを示す。CD4またはCD8 T細胞サブセットを個別に標的化するために、抗CD4または抗CD8 FabまたはNbに特異的なサブセットの使用が、その対応するT細胞サブセットの高トランスフェクションを可能にするために好ましい。CD3またはTCRを標的化することは、IFN $\gamma$ 分泌を誘発し得るが、CD4、CD7、CD8、CD11a、抗CD18または抗CD28を標的化することで、IFN $\gamma$ 分泌を避けることができる。

【実施例48】

【0744】

IN VITROタンパク質発現－CD7およびCD8同時標的化LNP

この実施例は、GFP mRNA DiI標識LNP中に単独でまたは一緒に後挿入された抗CD7抗CD8 Nbを用いてヒトT細胞を標的化することならびにトランスフェクションおよびIFN $\gamma$ 分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0745】

LNPを、実施例6において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例25において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。LNPを、eGFPをコードするmRNA (TriLink Biotechnologies、米国、カリフォルニア州)、イオン化可能な脂質としての脂質8を使用して製剤化し、0.01mol%のDiIC18(5)-DS (Invitrogen、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。Fab-脂質コンジュゲートは実施例4に記載された方法から生成し、一方でNbがコンジュゲートされたものの生成は、遊離NbからNbがコンジュゲートされたものを分離するために、1:1:4のNb:DSPE-5KPEG-マレイミド (maleimide):DSPE-2KPEG-OCH<sub>3</sub>および50kDのUFメンブレン (Millipore Corp、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ)を使用することにおいて異なっていた。実施例12と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされたFabおよびコンジュゲートされたNbを、脂質8およびGFP mRNAをDiI色素とともに含有するLNP中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ2.5 $\mu$ g/mL mRNAでおよそ24時間ヒトCD3 T細胞を用いて実施した。2つの細胞種を区別するために、CD8およびCD4細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗CD4抗体 (SK3)を使用するフローサイトメトリーによって測定した。上清中のIFN $\gamma$ を製造業者の推奨手順を使用して測定した (R&D Systems、DY285B)。

【0746】

抗CD7 V1 Nbと組み合わせた抗CD8 Nbクローン (V3およびV4) 両方について、CD8 T細胞サブセットにおけるトランスフェクション% (図81A) およびGFP発現レベル (図81B) は、Nbを用いてCD8単独またはCD7単独を標的化することまたはTRX2 NoDS Fabを用いるCD8標的化よりも高かった。CD7/CD8標的化組合せは、CD8 T細胞については抗CD3 SP34 NoDS Fabと同様のレベルのGFP発現に近づいており、CD4 T細胞では、より低いレベルではないとしても同様のレベルのトランスフェクションを維持している。CD8/CD7同時標的化が、CD8 T細胞集団において抗CD3 Fabのものと同様のレベルのトランスフェクション／翻訳を達成しているにもかかわらず、非特異的mutOKT8対

10

20

30

40

50

照 L N P と比較して、T 細胞によって分泌される実質的な量の I F N  $\gamma$  はなかった（図 8 1 C）。

【0747】

このデータは、C D 7 および C D 8 を同時標的化することで、実質的な量の I F N  $\gamma$  分泌を避けながら、C D 8 T 細胞集団において高度に効率的なトランスフェクションを媒介できることを示す。

【実施例 49】

【0748】

I N V I T R O タンパク質発現－C D 7 および C D 8 二重特異性標的化 L N P および C D 8 標的化 S C F V

この実施例は、単独でまたは一緒に後挿入された抗 C D 8 T R X 2 F a b N o D S または抗 C D 8 T R X 2 S c F v、抗 C D 7 もしくは抗 C D 8 N b および G F P m R N A D i I 標識 L N P 中に後挿入された、抗 C D 7 / 抗 C D 8 2 x V H H ( V 1 / V 2 )、抗 C D 8 / 抗 C D 7 2 x V H H ( V 2 / V 1 ) または抗 C D 7 / 抗 C D 8 V H H - C H 1 / V H H - V k b D S を含む図 47 に記載される二重特異的設計を用いてヒト T 細胞を標的化することならびにトランスフェクション／翻訳および I F N  $\gamma$  分泌に対するそれらの効果を記載する。

【0749】

L N P を、実施例 6 において記載されるマイクロ流体混合プロセスおよび実施例 25 において記載される非連続ダイアフィルトレーション法を使用して調製した。L N P を、e G F P をコードする m R N A ( T r i L i n k B i o t e c h n o l o g i e s、米国、カリフォルニア州)、イオン化可能な脂質としての脂質 8 を使用して製剤化し、0.01 mol % の D i I C 18 ( 5 ) - D S ( I n v i t r o g e n、米国、マサチューセッツ州)を用いて標識した。F a b - 脂質コンジュゲートは実施例 4 に記載された方法から生成し、一方で S c F v または N b コンジュゲーションの生成は、遊離タンパク質から S c F v または N b がコンジュゲートされたものを分離するために、1 : 1 : 4 の N b : D S P E - 3.4 K P E G - マレイミド ( m a i l e i m i d e ) : D S P E - 2 K P E G - O C H 3 および 50 k D の U F メンブレン ( M i l l i p o r e C o r p、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ)を使用することにおいて異なっていた。実施例 12 と同様の方法を使用することで、コンジュゲートされた F a b、コンジュゲートされた S c F v およびコンジュゲートされた N b を、脂質 8 および G F P m R N A を D i I 色素とともに含有する L N P 中に後挿入した。トランスフェクションを、およそ 2.5  $\mu$ g / mL の m R N A でおよそ 24 時間ヒト C D 3 T 細胞を用いて実施した。2 つの細胞種を区別するために、C D 8 および C D 4 細胞両方のトランスフェクションのレベルを、抗 C D 4 抗体 ( S K 3 ) を使用するフローサイトメトリーによって測定した。上清中の I F N  $\gamma$  を製造業者の推奨手順を使用して測定した ( R & D S y s t e m s、D Y 285 B )。

【0750】

T R X 2 S c F v は、抗 C D 8 T R X 2 N o D S F a b と比較して C D 8 T 細胞サブセットにおいてわずかに低いトランスフェクション% (図 8 2 A) および G F P 発現レベル (図 8 2 B) を媒介したが、非標的化 m u t O K T 8 F a b L N P よりもシグナルは大きかった。一緒に後挿入された抗 C D 8 および抗 C D 7 N b または抗 C D 7 / 抗 C D 8 2 x V H H、抗 C D 8 / 抗 C D 7 2 x V H H および抗 C D 7 / 抗 C D 8 V H H - C H 1 / V H H - V k b D S を含む後挿入された二重特異性体のいずれかを用いて C D 8 および C D 7 を同時標的化する L N P は全て、抗 C D 3 S P 34 - h l a m N o D S F a b よりも高レベルの C D 8 T 細胞トランスフェクション% およびより高いレベルの G F P 発現を示し、これは、F a b を用いて C D 8 (クローン T R X 2) および C D 7 (クローン T H - 69) を同時標的化する実施例 17 において観察されたものと同様の、C D 8 および C D 7 標的化を N b と組み合わせることの相乗作用を示す。C D 7 / C D 8 同時標的化が C D 8 T 細胞サブセットにおける抗 C D 3 S P 34 N o D S F a b のものと同様またはより良好なトランスフェクション／翻訳を達成しているにもか

10

20

30

40

50

かわらず、非特異的  $\text{mut OKT8}$  対照  $\text{LNP}$  と比較して、また  $\text{SP34}$  と対照的に、 $\text{T}$  細胞によって分泌される実質的な量の  $\text{IFN}\gamma$  はなかった（図 82C）。

【0751】

このデータは、 $\text{ScFv}$  単独で  $\text{Fab}$  のものと同様のトランスフェクション効率を媒介可能であることを示す。さらに、トランスフェクション／翻訳に対する相乗作用は、標的化部分が個々のタンパク質として一緒に後挿入されたか、二重標的化する二重特異性体として後挿入されたかに関わらず、同一  $\text{LNP}$  上の  $\text{CD7}$  および  $\text{CD8}$  の両方を標的化する場合に達成できることを示す。

抗  $\text{CD8}$   $\text{TRX2}$   $\text{ScFv}$  配列（配列番号 98）：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDFGMNWVRQA  
PGKGLEWVALIYYDGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKPHYDGYHYHFFDSWGQGT LVTVS  
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RV  
TITCKGSGQDINNYLAWYQQKPKAPKLLIYNTDILHTGVP  
SRFSGSGSGTDFFTFTISSSLQPEDIAITYYCYQYNNGYTFGQ  
GTKVEIKGGGSGGGCGGHHHHHHH

10

V1 VHH-CH1 bDS HC（配列番号 99）：

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGYPYSSYCMGWFRQA  
PGKEREGVAAIDSDGRTRYADSVKGRFTISQDNAKNTLYL  
QMNRMKPEDTAMYYCAARFGPMGCVDLSTLSFGHWGQGTQ  
VTVSITASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP  
EPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSLVVTVPS  
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHH  
HHH

20

【実施例 50】

【0752】

一次ヒト  $\text{T}$  細胞における脂質 2、脂質 6、脂質 12 および脂質 13 の  $\text{LNP}$  特性ならびに  $\text{in vitro}$   $\text{GFP}$  タンパク質発現

この実施例は、一次ヒト  $\text{T}$  細胞における脂質 2、脂質 6、脂質 12 および脂質 13 を使用して調製された  $\text{LNP}$  の特性ならびに  $\text{in vitro}$   $\text{GFP}$  タンパク質発現を比較する。 $\text{LNP}$  製剤を、マイクロ流体混合プロセス（実施例 6 において記載される）およびエタノール除去のための非連続ダイアフィルトレーションプロセス（実施例 25 において記載される）を使用して調製した。 $\text{LNP}$  を、以下の製剤化表 44 に示される脂質比率を使用して、 $\text{eGFP}$  をコードする  $\text{mRNA}$ （ $\text{TriLink Biotechnologies}$ 、米国、カリフォルニア州）を使用して製剤化し、 $0.01\text{mol}\%$  の  $\text{DiIC18(5)-DS}$ （ $\text{Invitrogen}$ 、米国、マサチューセッツ州）を用いて標識した。次いで、最終標的化  $\text{LNP}$  製剤を提供する特定の条件を使用して、標的化コンジュゲートを用いて  $\text{LNP}$  を挿入した。 $\text{LNP}$  を実施例 3 に記載されるように特性決定した。

30

【0753】

40

## 【表 4 7】

表 44. LNP 製剤組成および抗体挿入条件

| イオン化可能な脂質 | 製剤番号             | 脂質-PEG  | 脂質-PEG 含量(mol%) | 標的化コンジュゲート/挿入密度 (g/mol) | 抗体コンジュゲート挿入条件              |
|-----------|------------------|---------|-----------------|-------------------------|----------------------------|
| 脂質 2      | EXP21003810-N1M3 | DPG-PEG | 1.5             | hSP34 / 9               | pH6.5 の MBS において 37℃で 4 時間 |
| 脂質 6      | EXP21003810-N2M3 | DPG-PEG | 1.5             | hSP34 / 9               | pH6.5 の MBS において 37℃で 4 時間 |
| 脂質 12     | EXP21003810-N3M3 | DPG-PEG | 1.5             | hSP34 / 9               | pH6.5 の MBS において 37℃で 4 時間 |
| 脂質 13     | EXP21003810-N4M3 | DPG-PEG | 1.5             | hSP34 / 9               | pH6.5 の MBS において 37℃で 4 時間 |

10

20

## 【 0 7 5 4 】

## 【表 4 8】

表 45. LNP サイズ、電荷(動的光散乱)および mRNA カプセル化(Ribogreen アッセイ)

| イオン化可能な脂質 | 製剤番号            | 挿入前 DLS Z-平均直径 (nm) / PDI | pH5.5(mV) / pH7.4 (mV)での挿入前のゼータ電位 | 挿入前の色素がアクセス可能な mRNA (%) | 挿入前総 mRNA 含量 (ug/mL) |
|-----------|-----------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------|
| 脂質 2      | EXP21003810-N1H | 62.3 / 0.08               | 26.2 / 11.4                       | 9.1                     | 59.4                 |
| 脂質 6      | EXP21003810-N2H | 82.0 / 0.07               | 25.5 / 2.27                       | 9.2                     | 54.6                 |
| 脂質 12     | EXP21003810-N3H | 75.9 / 0.02               | 12.9 / -1.06                      | 10.4                    | 79.2                 |
| 脂質 13     | EXP21003810-N4H | 76.3 / 0.09               | 12.2 / -5.20                      | 16.5                    | 77.4                 |

30

## 【 0 7 5 5 】

脂質 2、脂質 6、脂質 12 および脂質 13 を、表 44 および表 45 に見られるように、1.5 モル%の DPG-PEG を使用して製剤化し、全ての LNP は、pH 7.4 の HEPES バッファーにおいて 100 nm 未満の流体力学直径 (DLS) を示す。pH 6.5 の MES へのバッファー交換および抗体挿入は、4 種の脂質組成物全てにおいてサイズおよび多分散の増大をもたらした。しかし、脂質 2 および脂質 6 の LNP は、脂質 12 および脂質 13 の LNP と比較して有意に大きなサイズ分布の変化を示した (図 83A および図 83B)。図 83C に見られるように、生理学的小および酸性 pH 条件下 (pH 7.4 および pH 5.5) の両方で、脂質 2 および脂質 6 は、脂質 12 および 13 と比較してより大きな正の表面電荷を示し、これはそれぞれ、イオン化可能なアミンヘッド基のモノーおよびジ-ヒドロキシエチル置換に起因する LNP の見かけの  $pK_a$  のより低い値への有意なシフトを示す (脂質 12 および 13 の LNP において)。さらに、4 種の LNP 組成物全てにおいて、低レベルの色素がアクセス可能な mRNA (< 20%) および良好な RN

40

50

Aカプセル化効率（親LNPサンプルにおいて>80%のmRNA）が観察された（表45および図83D）。得られた標的化されたLNPを、一次ヒトT細胞において実施例8に記載される*in vitro*トランスフェクションプロトコルを使用して評価した。図84Eに見られるように、全ての製剤は、試験されたLNP用量でT細胞によって十分に許容された（T細胞生存率は、PBS対照と同様のままであった）。DiI+およびDiI MFI値（図84Cおよび84D）によって例示されるように、全ての製剤は、試験されたほとんどの用量レベルで同様のレベルの細胞会合を示し、これは、コンジュゲート挿入プロセスがイオン化可能な脂質の化学的特性に依存しないことを示唆する。脂質2および脂質6のLNPは、GFPタンパク質の用量依存性発現を示した（図84Aおよび84B）。しかし、試験した全ての用量で、脂質12および脂質13のLNPは、不十分にしか性能を発揮せず、これは非最適LNP表面電荷特性およびT細胞におけるサイトゾルへのアクセスの減少のためである可能性がある。さらに、脂質2および脂質6のLNPは、図85に例示されるように、凍結解凍ストレスに供された後に機能を保持した。両組成物は、図83Aおよび図83Bに見られるように4Cで保存された粒子と比較して、-80Cでの凍結保存後に粒径分布においてわずかな変化しか示さなかった。さらに、両組成物は、凍結解凍後に一次ヒトT細胞に結合し、トランスフェクトする能力を保持しており、冷蔵（4C）および凍結（-80C）保存条件後に、同様のレベルのDiI+%およびDiI MFI値ならびに同様のレベルのタンパク質発現（GFP+%細胞およびGFP MFI値）が観察された。

10

20

30

40

50

【実施例51】

【0756】

DiI T細胞トランスフェクション実験：

STEMCELL製のRoboSep自動化細胞単離システムでEasySepヒトT細胞単離キットを使用して凍結末梢血単核細胞からCD3+T細胞を単離した。T細胞を、丸底96ウェルプレート中のglutamax、10%ウシ胎児血清、ペンストレップおよび40ng/mLのIL-2を補給したRPMI細胞培養培地中にプレーティングした。1MのT細胞/mL（100K個T細胞/ウェル）の密度でウェルあたり100μLの細胞懸濁液を播種した。細胞を37℃のインキュベーター中で2時間休息させ、次いで、10μLの22μg/mL（mRNAによって）のナノ粒子懸濁液を穏やかに添加することによってトランスフェクトし、その結果、2μg/mLの最終mRNA濃度が得られた（特に断りのない限り）。細胞をピペットを用いて穏やかに混合し、次いで、37℃のインキュベーター中で24時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をFACSバッファ（BD 554657）を用いて希釈し、BD Fortessaフローサイトメーターを使用して分析した。BD biosciences製のFlowJoソフトウェアを使用してデータを分析した。

【実施例52】

【0757】

CD4およびCD69染色

24時間後、細胞を96ウェル円錐底ポリプロピレンプレートに移し、350×gで5分間遠心分離した。上清を回収し、さらなる分析のために新たな円錐底ポリプロピレンプレートに移した。200μLのFACSバッファ（BD 554657）を添加すること、350×gで5分間遠心分離すること、次いで、各ウェルから上清を吸引することによって細胞を洗浄した。100μLの各抗体を10mLのFACSバッファに添加することによって、BV421抗ヒトCD69（BioLegend 310930クローンFN50）およびBV711抗ヒトCD4（BioLegend 344648クローンSK3）抗体を100×希釈した。100μLの希釈された抗体溶液を各ウェルに添加し、プレートを室温で20分間インキュベートした。次いで、350×gで5分間遠心分離すること、上清を除去すること、200μLのFACSバッファに再懸濁すること、350×gで5分間遠心分離することおよび各ウェルから上清を吸引することによって、プレートを洗浄した。洗浄後、細胞を100μLの1.6%ホルムアルデヒドに再懸濁し、

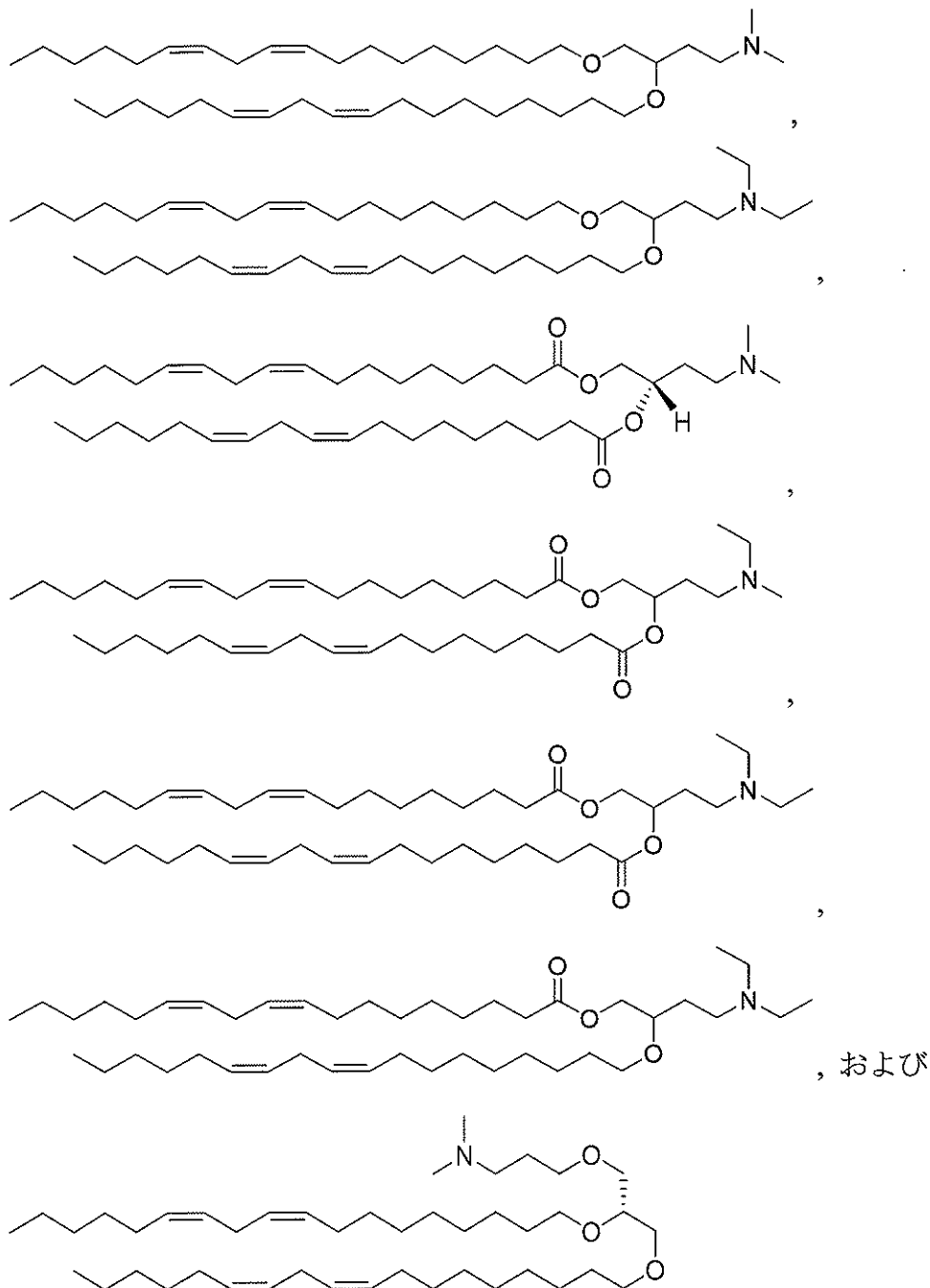
20

30

40

本化合物は、

## 【化 7 4】



からなる群から選択される化合物でも、その塩でもない。

2. o および p は 2 である、実施形態 1 の化合物。

3. o および p は 4 である、実施形態 1 の化合物。

4. o および p は 6 である、実施形態 1 の化合物。

5. X 1 および X 2 は一緒にオキソを形成し、X 3 および X 4 は一緒にオキソを形成する、実施形態 1 ～ 4 のいずれか 1 つの化合物。

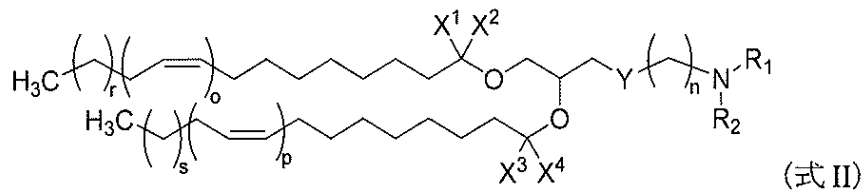
6. X 1、X 2、X 3 および X 4 は水素である、実施形態 1 ～ 4 のいずれか 1 つの化合物。

7. Y は、 $-O-$ 、 $-OC(O)-$  および  $-CH_2-$  からなる群から選択される、実施形態 1 ～ 6 のいずれか 1 つの化合物。

8. Y は  $-O-$  である、実施形態 7 の化合物。

9. Y は  $-OC(O)-$  である、実施形態 7 の化合物。  
 10. Y は  $-CH_2-$  である、実施形態 7 の化合物。  
 11. R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は独立して C<sub>1</sub>～3 アルキルである、実施形態 1～10 のいずれか 1 つの化合物。  
 12. R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は  $-CH_3$  である、実施形態 11 の化合物。  
 13. R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は  $-CH_2CH_3$  である、実施形態 11 の化合物。  
 14. n は 0 である、実施形態 1～13 のいずれか 1 つの化合物。  
 15. n は 3 である、実施形態 1～13 のいずれか 1 つの化合物。  
 【0761】  
 16. 式 II によって表される化合物：  
 【化 75】

10



またはその塩であり、式中：

- R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は独立して C<sub>1</sub>～3 アルキルであるか、または R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は窒素原子と一緒にあって、場合により置換されたピペリジニルまたはモルホリニルを形成し；  
 Y は、 $-O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(S)-$  および  $-CH_2-$  からなる群から選択され；  
 X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup> および X<sup>4</sup> は水素であるか、または X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> もしくは X<sup>3</sup> および X<sup>4</sup> は一緒にオキソを形成し；  
 n は 0～4 であり；  
 o は 1 であり r は 3～8 から選択される整数であるか、o は 2 であり r は 1～8 から選択される整数であり、  
 p は 1 であり s は 3～8 から選択される整数であるか、p は 2 であり s は 1～8 から選択される整数であり、  
 ここで、

20

- o および p の両方が 1 であるとき、r および s は独立して 4、5、7 または 8 であり、  
 o および p の両方が 2 であるとき、r および s は独立して 1、2、4 または 5 である。  
 17. X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> は一緒にオキソを形成し、X<sup>3</sup> および X<sup>4</sup> は一緒にオキソを形成する、実施形態 16 の化合物。  
 18. X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup> および X<sup>4</sup> は水素である、実施形態 16 または 17 の化合物。  
 19. Y は、 $-O-$ 、 $-OC(O)-$  および  $-CH_2-$  からなる群から選択される、実施形態 16～18 のいずれか 1 つの化合物。  
 20. Y は  $-O-$  である、実施形態 19 の化合物。  
 21. Y は  $-OC(O)-$  である、実施形態 19 の化合物。  
 22. Y は  $-CH_2-$  である、実施形態 19 の化合物。  
 23. R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は独立して C<sub>1</sub>～3 アルキルである、実施形態 16～22 のいずれか 1 つの化合物。  
 24. R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は  $-CH_3$  である、実施形態 23 の化合物。  
 25. R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は  $-CH_2CH_3$  である、実施形態 23 の化合物。  
 26. n は 0 である、実施形態 16～25 のいずれか 1 つの化合物。  
 27. n は 3 である、実施形態 16～25 のいずれか 1 つの化合物。  
 【0762】

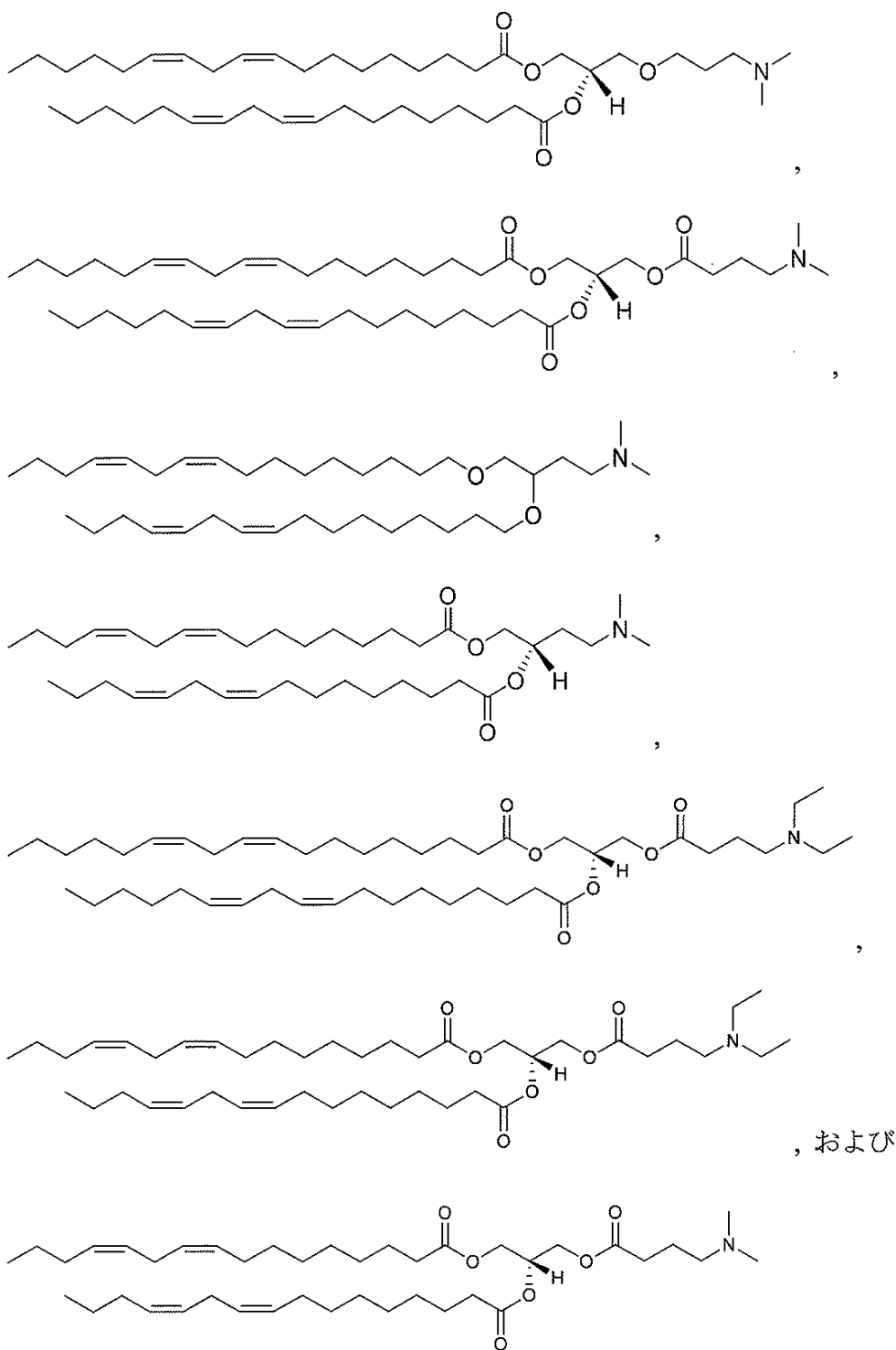
30

40

28. 以下からなる群から選択される化合物：

50

【化 7 6】

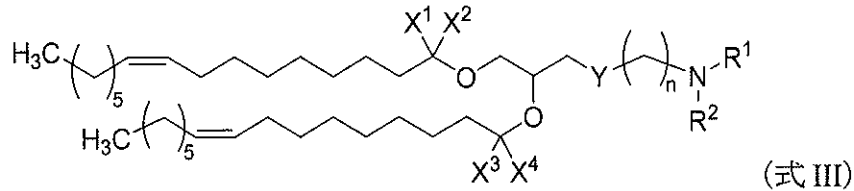


またはその塩。

【 0 7 6 3】

29. 式 I I I の化合物：

## 【化 7 7】



またはその塩である実施形態 16 の化合物であり、式中：

$R^1$  および  $R^2$  は独立して  $C_{1\sim3}$  アルキルであるか、または  $R^1$  および  $R^2$  は窒素原子と一緒にあって、場合により置換されたピペリジニルを形成し；

$Y$  は、 $-O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-OC(S)-$  および  $-CH_2-$  からなる群から選択され；

$X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$  および  $X^4$  は水素であるか、または  $X^1$  および  $X^2$  もしくは  $X^3$  および  $X^4$  は一緒にオキソを形成し；

$n$  は、0～4 から選択される整数である。

30.  $R^1$  および  $R^2$  は独立して  $C_{1\sim3}$  アルキルである、実施形態 29 の化合物。

31.  $R^1$  および  $R^2$  は  $-CH_3$  である、実施形態 29 または 30 の化合物。

32.  $Y$  は  $-O-$  である、実施形態 29～31 のいずれか 1 つの化合物。

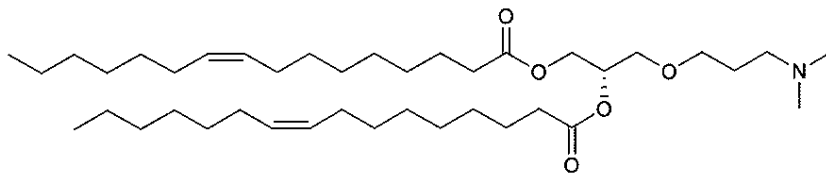
33.  $X^1$  および  $X^2$  は一緒にオキソを形成し、 $X^3$  および  $X^4$  は一緒にオキソを形成する、実施形態 29～32 のいずれか 1 つの化合物。

34.  $n$  は 3 である、実施形態 29～33 のいずれか 1 つの化合物。

## 【0764】

35. 以下の式の化合物：

## 【化 7 8】



またはその塩。

36. 実施形態 1～35 のいずれか 1 つの化合物または表 1 の脂質を含む脂質ブレンドを含む脂質ナノ粒子 (LNP)。

37. 脂質ブレンドはステロール、中性リン脂質、PEG-脂質および脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートの 1 つまたはそれ以上をさらに含む、実施形態 36 の LNP。

38. 化合物は 30～70～60 モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態 35 または 36 の LNP。

39. ステロール (例えばコレステロール) は 20～70 モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態 36～38 のいずれか 1 つの LNP。

40. 中性リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DSPe)、1,2-ジステアロイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1,2-ジオレオイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、1,2-ジオレオイル- $s n$ -グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC) からなる群から選択される、実施形態 36～39 のいずれか 1 つの LNP。

41. 中性リン脂質は 1～10 モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態 36～40 のいずれか 1 つの LNP。

42. PEG-脂質は、PEG-ジステアロイルグリセロール (PEG-D SG)、PEG-ジパルミトイルグリセロール (PEG-D AG、例えば、PEG-DMG、PEG-D PG および PEG-D SG)、PEG-ジミリスティール-グリセロール (PEG-DMG)、PEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-D SPE)、PEG-ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-D PPE) および PEG-ジミリスティール-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DMPE) からなる群から選択される、実施形態 36~41 のいずれか 1 つの LNP。

43. PEG-脂質は、1~10 モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態 36~42 のいずれか 1 つの LNP。

44. 脂質-免疫細胞標的化基コンジュゲートは 0.1~0.3 モルパーセントまたは 0.002~0.2 モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態 36~43 のいずれか 1 つの LNP。

45. 標的化基は T 細胞標的化基である、実施形態 44 の LNP。

46. T 細胞標的化基は T 細胞抗原に結合する抗体またはその抗原結合性断片である、実施形態 45 の LNP。

47. T 細胞抗原は、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD28、CD137 および T 細胞受容体 (TCR)  $\beta$  (例えば、CD3 または CD8) からなる群から選択される、実施形態 46 の LNP。

48. T 細胞標的化基は、ポリエチレングリコール (PEG) 含有リンカーを通して脂質に共有結合している、実施形態 36~47 のいずれか 1 つの LNP。

49. 脂質は、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリスティール-ホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイル-グリセロール-ホスホグリセロール (DSPG)、ジステアロイル-グリセロール (DSG)、ジミリスティール-グリセロール (DMG) またはセラミドである、実施形態 48 の LNP。

50. PEG は、PEG 2000、PEG 1000、PEG 3000、PEG 3450、PEG 4000 または PEG 5000 からなる群から選択される、実施形態 48 または 49 の LNP。

51. 脂質ブレンドは、遊離 PEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-D SPE)、PEG-ジミリスティール-ホスファチジルエタノールアミン (PEG-DMPE)、N-(メチルポリオキシエチレンオキシカルボニル)-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DPPE-PEG) 1,2-ジミリスティール-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (PEG-DMG)、1,2-ジパルミトイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (PEG-D PG)、1,2-ジオレオイル-rac-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール (DOG-PEG) 1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (PEG-D SG)、N-パルミトイル-スフィンゴシン-1-{サクシニル [メトキシ (ポリエチレングリコール)]} (PEG-セラミド)、および DSPE-PEG-システイン、またはその誘導体をさらに含む、実施形態 36~50 のいずれか 1 つの LNP。

52. PEG-脂質の誘導体は、PEG 末端にヒドロキシルまたはカルボン酸末端基を有する、実施形態 51 の LNP。

53. 50~200 nm の範囲の平均直径を有する、実施形態 36~52 のいずれか 1 つの LNP。

54. 約 100 nm の平均直径を有する、実施形態 53 の LNP。

55. LNP は 0.05~1 の範囲の多分散指数を有する、実施形態 36~54 のいずれか 1 つの LNP。

56. LNP は pH 5 で約 -10 mV~約 +30 mV のゼータ電位を有する、実施形態 36~55 のいずれか 1 つの LNP。

57. LNP は pH 7.4 で約 -30 mV~約 +5 mV のゼータ電位を有する、実施形態

10

20

30

40

50

36～55のいずれか1つのLNP。

58. その中に置かれる核酸をさらに含む、実施形態36～57のいずれか1つのLNP。

59. 核酸はDNAまたはRNAである、実施形態58のLNP。

60. 脂質-T細胞標的化基コンジュゲートおよび場合により表1に示す脂質を含む脂質ブレンドを含む脂質ナノ粒子(LNP)。

61. T細胞標的化基はT細胞抗原に結合する抗体である、実施形態60のLNP。

62. T細胞抗原は、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD28、CD137およびT細胞受容体(TCR)βからなる群から選択される、実施形態61のLNP。

63. T細胞抗原はCD2、CD3、CD7またはCD8である、実施形態62のLNP。

64. T細胞標的化基は、ポリエチレングリコール(PEG)含有リンカーを通して脂質に共有結合している、実施形態60～63のいずれか1つのLNP。

65. 脂質は、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジミリス Toil-ホスファチジルエタノールアミン(DMPE)、ジステアロイル-グリセロールホスホグリセロール(DSPG)、ジミリス Toil-グリセロール(DMG)、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジパルミトイル-グリセロール(DPG)またはセラミドである、実施形態64のLNP。

66. PEGは、PEG2000、PEG1000、PEG3000、PEG3450、PEG4000またはPEG5000である、実施形態64または65のLNP。

67. 脂質-T細胞標的化基コンジュゲートは、0.002～0.2モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態60～66のいずれか1つのLNP。

68. 脂質ブレンドは、カチオン性脂質、ステロール、中性リン脂質およびPEG-脂質の1つまたはそれ以上をさらに含む、実施形態60～67のいずれか1つのLNP。

69. イオン化可能なカチオン性脂質は、実施形態1～35のいずれか1つの化合物、または表1に示す脂質である、実施形態68のLNP。

70. イオン化可能なカチオン性脂質は、40～60モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態68または69のLNP。

71. ステロール(例えばコレステロール)は30～50モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態68～70のいずれか1つのLNP。

72. 中性リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、スフィンゴミエリンからなる群から選択される、実施形態68～71のいずれか1つのLNP。

73. 中性リン脂質は、1～10モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態68～72のいずれか1つのLNP。

74. PEG-脂質は、PEG-ジステアロイルグリセロール(PEG-DSG)、PEG-ジアシルグリセロール(PEG-DAG、例えば、PEG-DMG、PEG-DPGおよびPEG-DSG)、PEG-ジミリス Toil-グリセロール(PEG-DMG)、PEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(PEG-DSPE)およびPEG-ジミリス Toil-ホスファチジルエタノールアミン(PEG-DMPE)、N-(メチルポリオキシエチレンオキシカルボニル)-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE-PEG)、1,2-ジパルミトイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン(PEG-DPG)、1,2-ジオレオイル-rac-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール(DOG-PEG)およびN-パルミトイル-スフィンゴシン-1-{サクシニル[メトキシ(ポリエチレングリコール)]}(PEG-セラミド)からなる群から選択される、実施形態68～73のい

10

20

30

40

50

れか1つのLNP。

75. PEG-脂質は2～4モルパーセントの範囲で脂質ブレンド中に存在する、実施形態68～74のいずれか1つのLNP。

76. 脂質ブレンドは、遊離PEG-ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(PEG-DSPЕ)またはPEG-ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン(PEG-DMPE)、N-(メチルポリオキシエチレンオキシカルボニル)-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE-PEG)1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン(PEG-DMG)、1,2-ジパルミトイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン(PEG-DPG)、1,2-ジオレオイル-rac-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール(DOG-PEG)1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン(PEG-DSG)、N-パルミトイル-スフィンゴシン-1-{サクシニル[メトキシ(ポリエチレングリコール)]}(PEG-セラミド)、およびDSPЕ-PEG-システイン、またはその誘導体をさらに含む、実施形態68～75のいずれか1つのLNP。

77. 50～200nmの範囲の平均直径を有する、実施形態60～75のいずれか1つのLNP。

78. 約100nmの平均直径を有する、実施形態77のLNP。

79. 0.05～1の範囲の多分散指数を有する、実施形態60～78のいずれか1つのLNP。

80. pH5で約-10mV～約+30mVのゼータ電位を有する、実施形態60～79のいずれか1つのLNP。

81. その中に置かれる核酸をさらに含む、実施形態60～80のいずれか1つのLNP。

82. 核酸はDNAまたはRNA(例えば、mRNA、tRNAまたはsiRNA)である、実施形態81のLNP。

83. 核酸中のヌクレオチドの数は約400～約6000である、実施形態81または82のLNP。

84. 免疫細胞(例えば、T細胞)へ核酸を送達する方法であって、核酸を含有する実施形態36～83のいずれか1つのLNPへ、核酸が免疫細胞に入ることを可能にする条件の下で免疫細胞を曝露させることを含む方法。

85. それを必要とする対象の免疫細胞(例えば、T細胞)へ核酸を送達する方法であって、核酸を含有する実施形態36～83のいずれか1つのLNPを含む組成物を対象に投与し、それによって核酸を免疫細胞に送達することを含む方法。

86. 対象の免疫細胞(例えば、T細胞)を核酸(例えば、mRNA)の送達の標的にする方法であって、免疫細胞への核酸の標的化送達を促進するために、核酸を含有する実施形態36～83のいずれか1つのLNPを対象に投与することを含む方法。

【0765】

参照による組込み

別途規定されない限り、本明細書の全ての専門用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業技術者が通常理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものに類似するか均等であるいかなる方法および材料も本発明の実施または試験で用いることができるが、好ましい方法および材料が本明細書で記載される。引用される全ての刊行物、科学論文、特許および特許出願は、全ての目的のために本明細書で参照により完全に組み込まれる。

【0766】

本明細書で議論される刊行物は、本出願の出願日の前のそれらの開示のために単に提供される。本明細書のいかなるものも先行発明のために本発明がそのような刊行物に先行する権利がないことの承認と解釈するべきではない。

【0767】

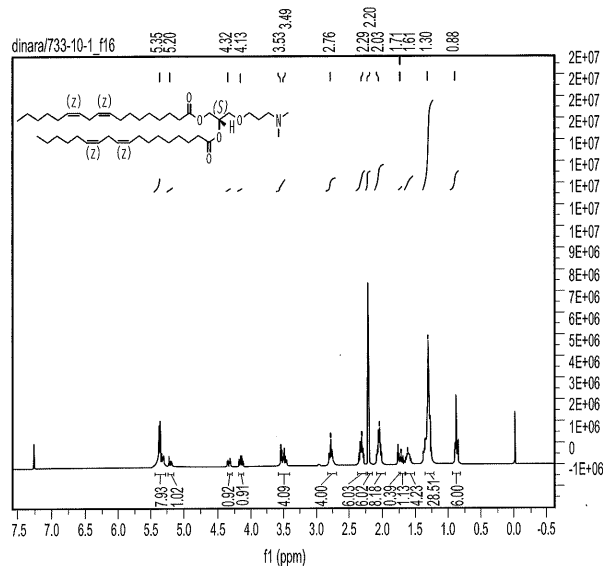
## 均等物

本発明は、その精神も本質的な特徴も逸脱しない範囲で、他の特異な形で具体化することができる。したがって、前述の実施形態は、全ての観点で本明細書に記載される発明を限定ではなく例示するものと考えるべきである。したがって、本発明の範囲は、前述の記載よりは添付の請求項によって指示され、請求項の均等性の意味および範囲内の全ての変更はその中に包含されるものである。本発明はその具体的な実施形態に関連して記載されているが、それはさらなる改変が可能であり、本出願は、一般に本発明の原理に従っているが、本発明が関係する技術分野の中の公知のまたは慣例的な行為に含まれるような、ならびに上に示すような、および以下の添付の請求項の範囲におけるように本質的な特徴に適用できるような本開示からの逸脱を含む、本発明の任意の変異形、使用または適応をカバーするものであることが理解される。

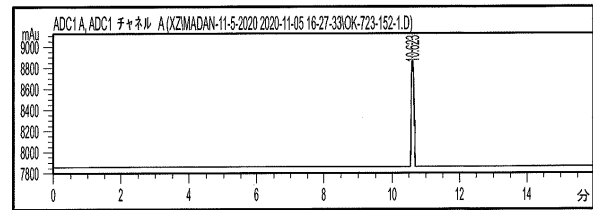
10

## 【図面】

## 【図 1】



## 【図 2 A】



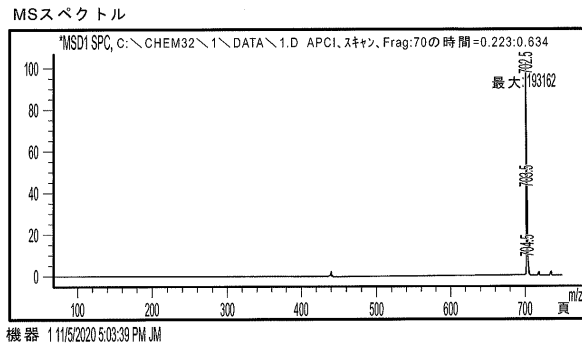
20

30

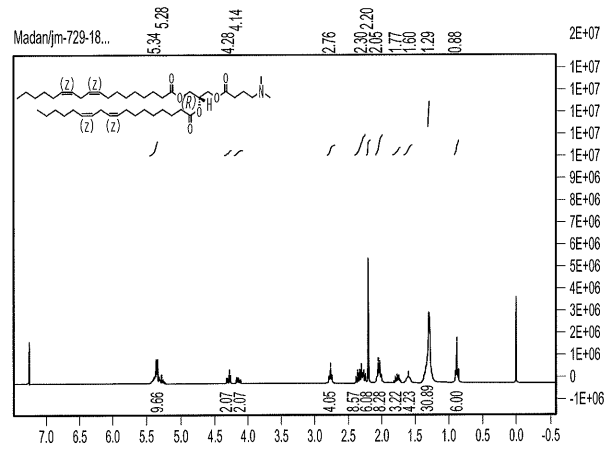
40

50

【図 2 B】

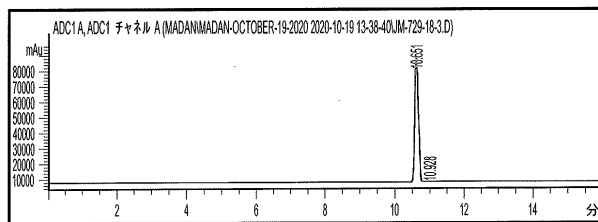


【図 3】

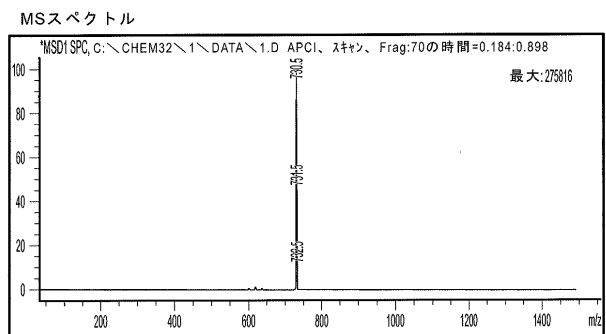


10

【図 4 A】



【図 4 B】



20

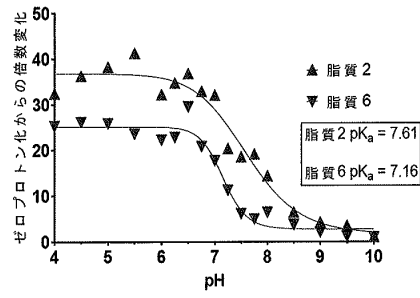
30

40

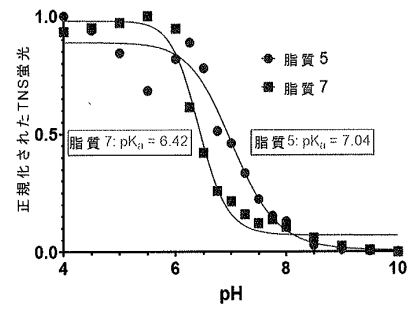
50



【図 8 A】



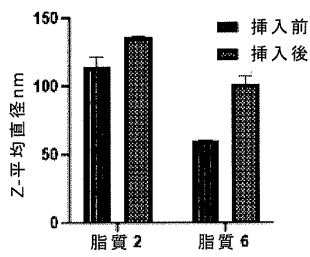
【図 8 B】



10

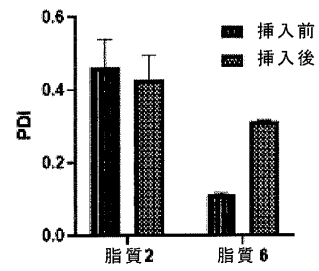
【図 9 A】

脂質2および脂質6LNPのサイズ (DLS)



【図 9 B】

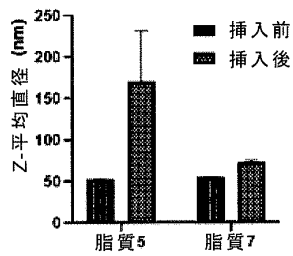
脂質2および脂質6 LNP PDI (DLS)



20

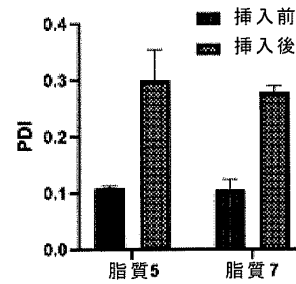
【図 10 A】

脂質5および脂質7LNPのサイズ (DLS)



【図 10 B】

脂質5および脂質7 LNP PDI (DLS)

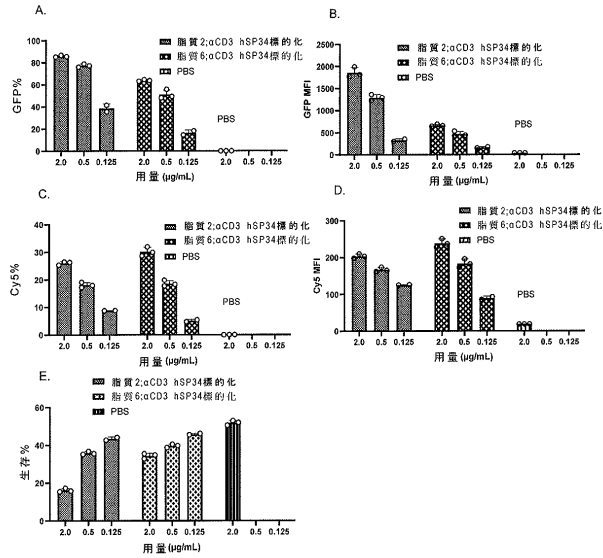


30

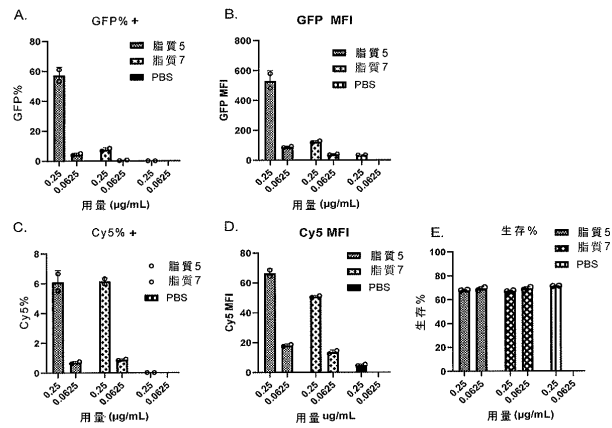
40

50

【図 1 1】

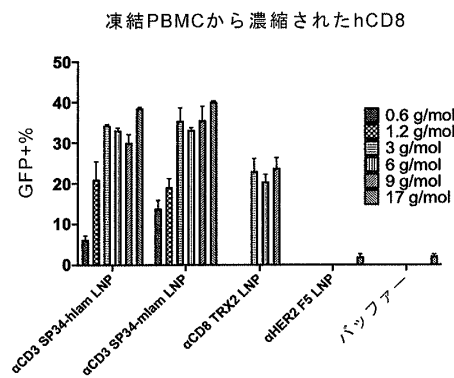


【図 1 2】

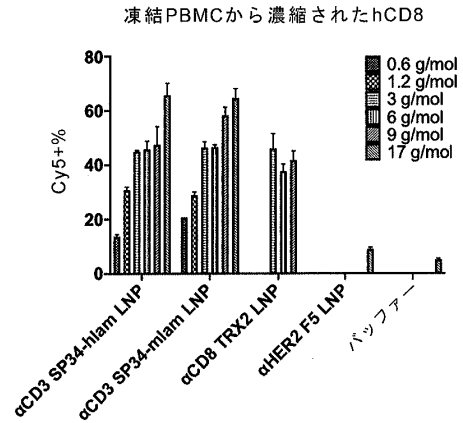


10

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



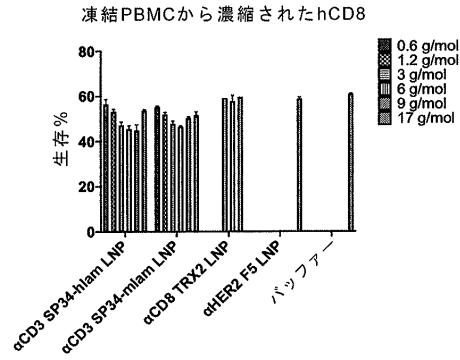
20

30

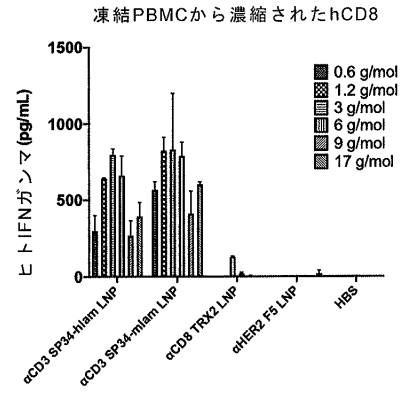
40

50

【図 14 A】

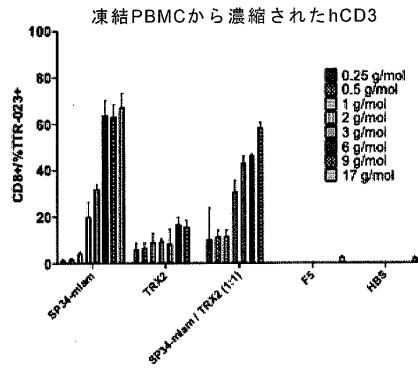


【図 14 B】

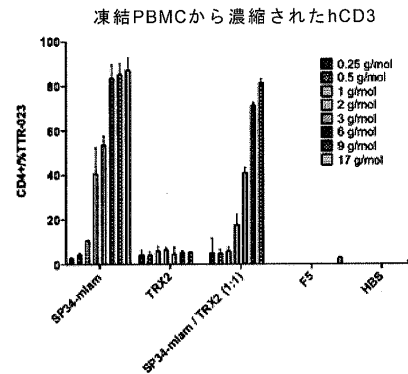


10

【図 15 A】

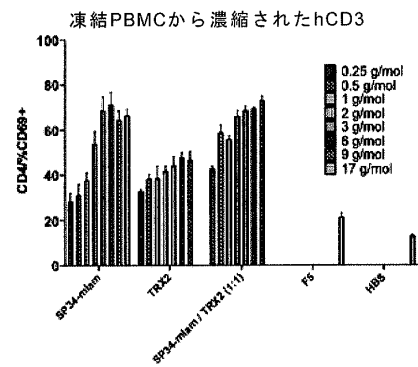


【図 15 B】

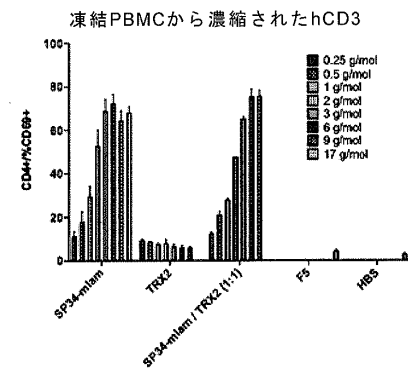


20

【図 16 A】



【図 16 B】

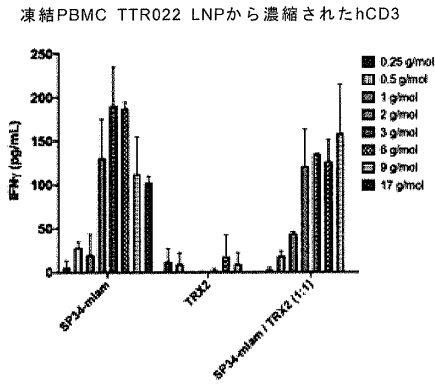


30

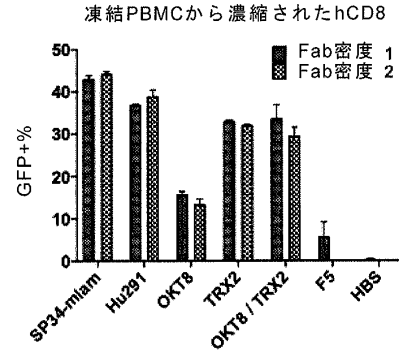
40

50

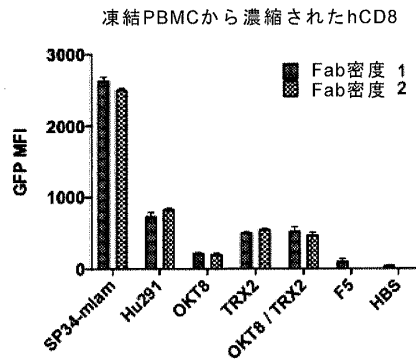
【図 17】



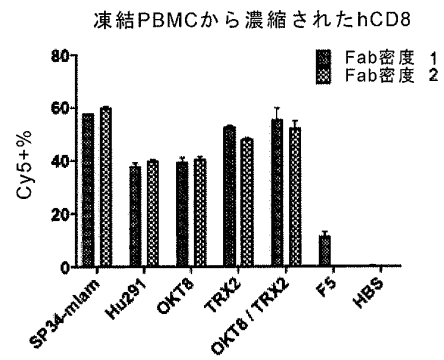
【図 18 A】



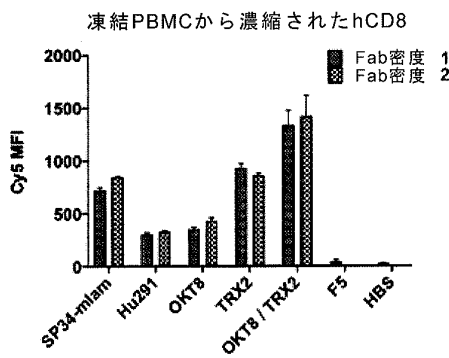
【図 18 B】



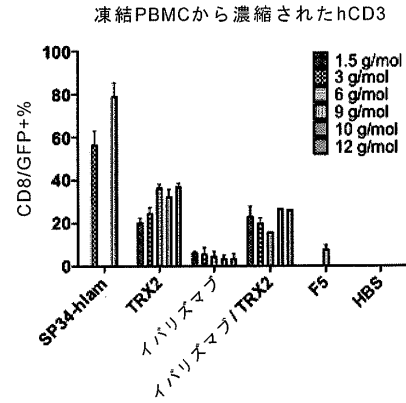
【図 19 A】



【図 19 B】



【図 20 A】



10

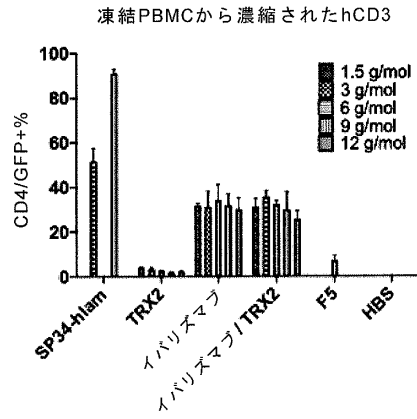
20

30

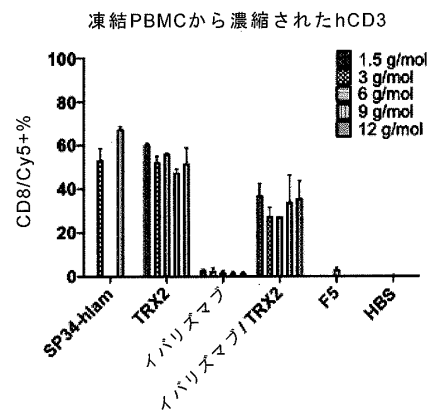
40

50

【図 20 B】

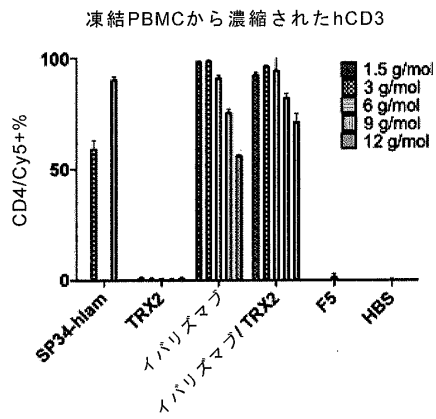


【図 21 A】

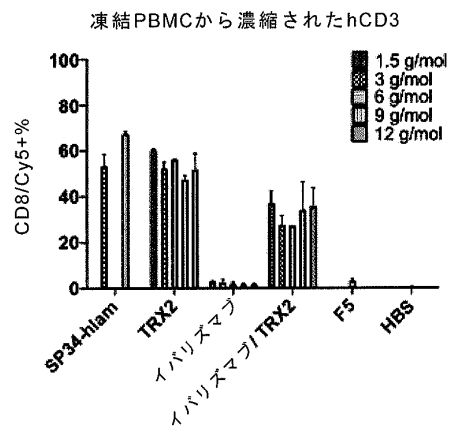


10

【図 21 B】



【図 22 A】



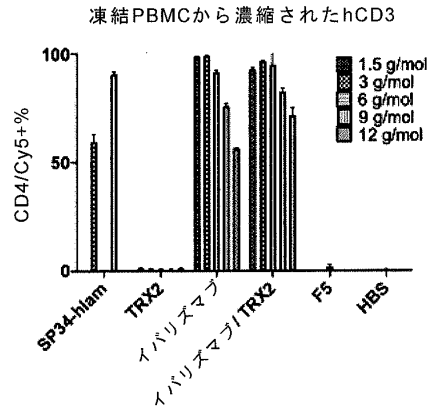
20

30

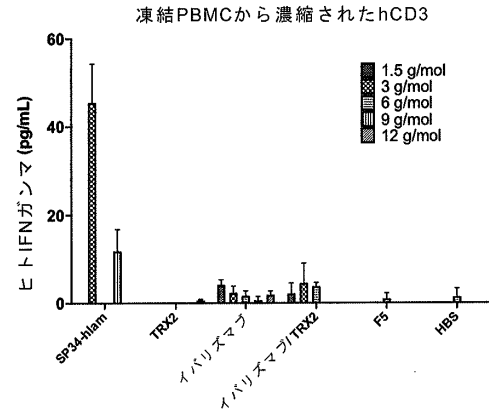
40

50

【図 2 2 B】

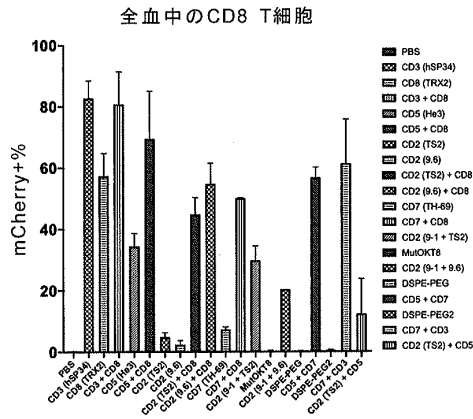


【図 2 3】

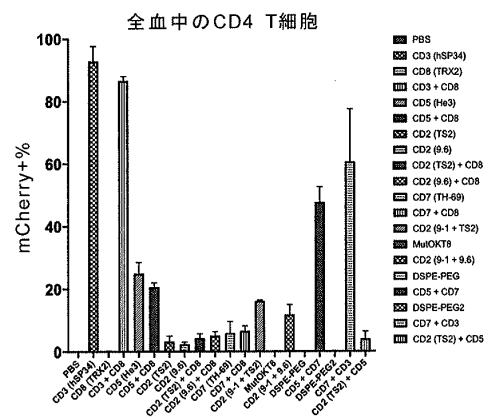


10

【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



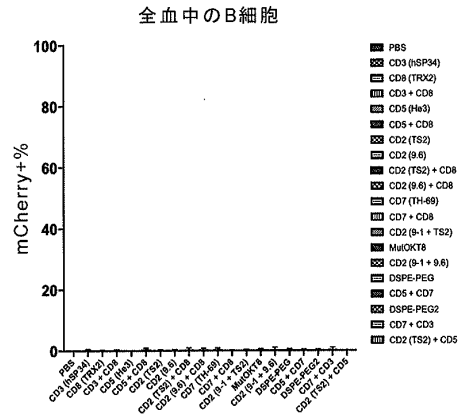
20

30

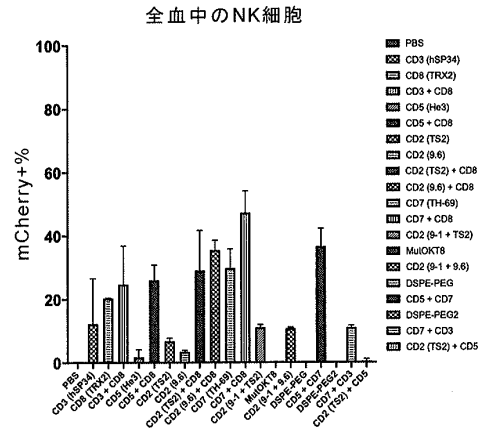
40

50

【図 2 5 A】

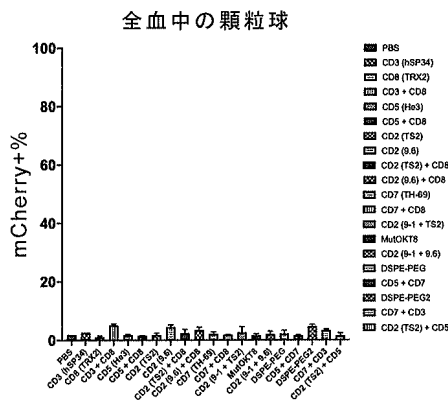


【図 2 5 B】

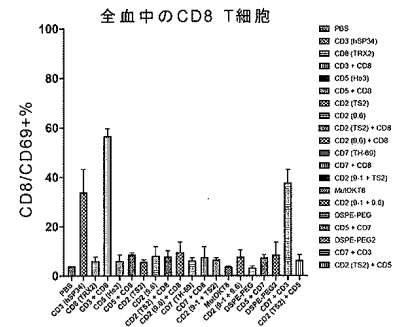


10

【図 2 6 A】



【図 2 6 B】



20

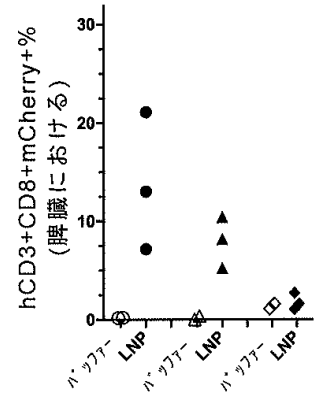
30

40

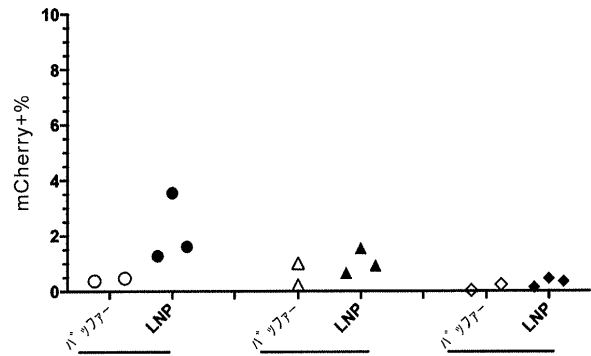
50



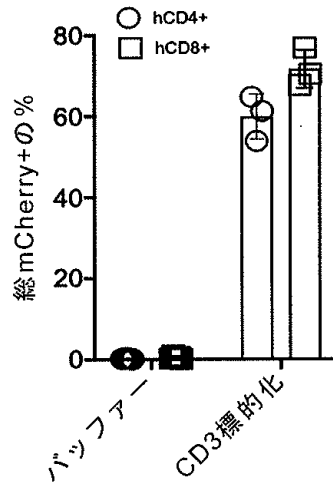
【図 27 E】



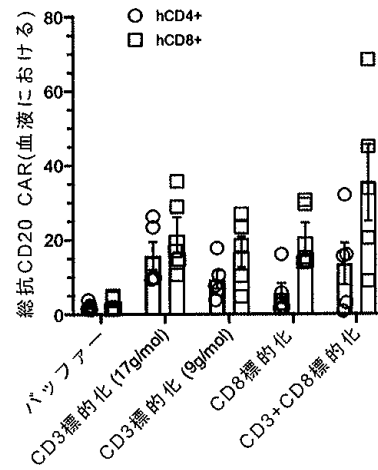
【圖 28】



【図 29 A】

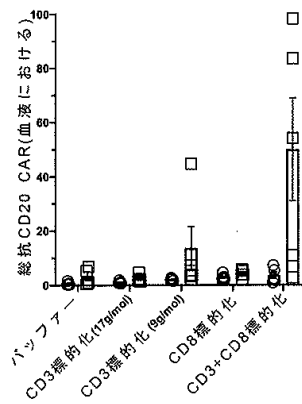


【図 29 B】

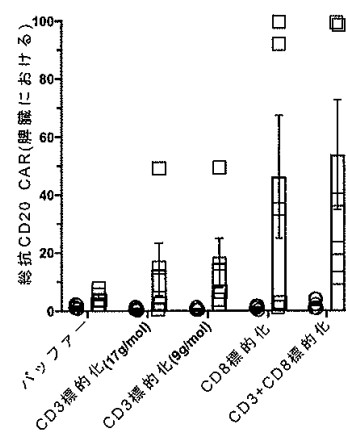


10

【図 30 A】



【図 30 B】



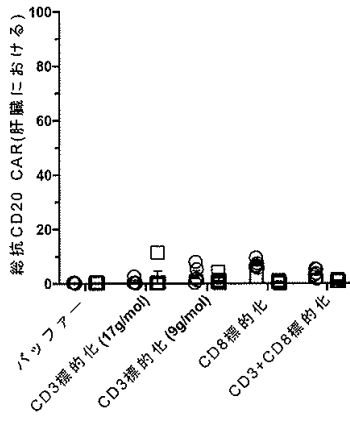
20

30

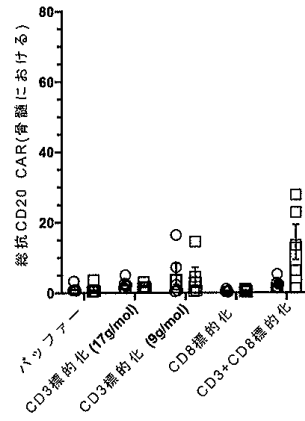
40

50

【図 30 C】

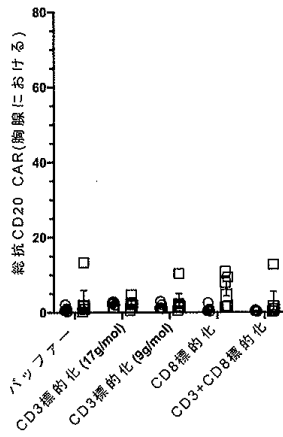


【図 30 D】

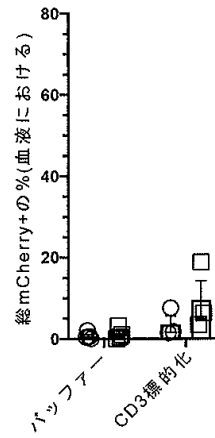


10

【図 30 E】



【図 31 A】



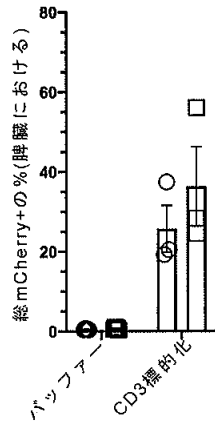
20

30

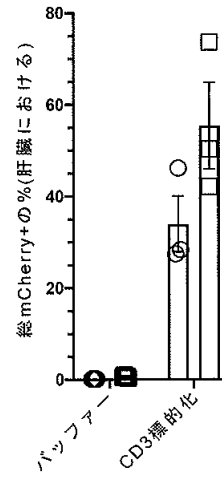
40

50

【図 3 1 B】

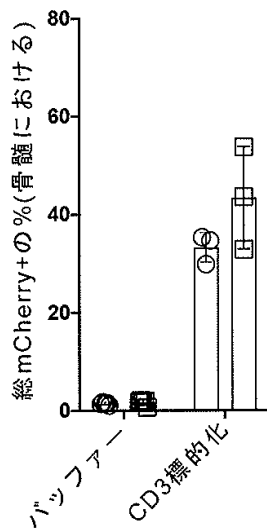


【図 3 1 C】

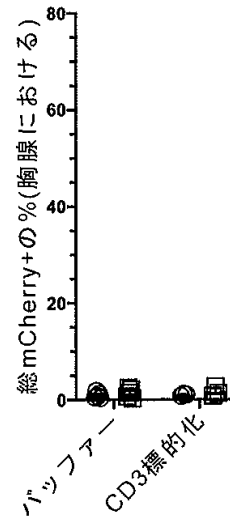


10

【図 3 1 D】



【図 3 1 E】



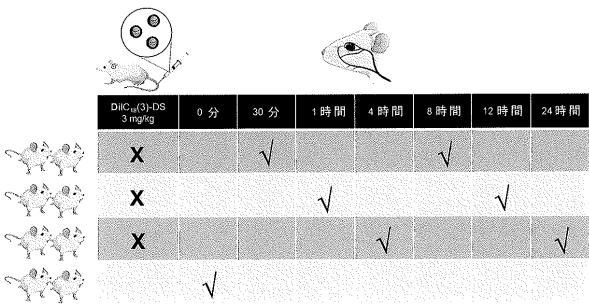
20

30

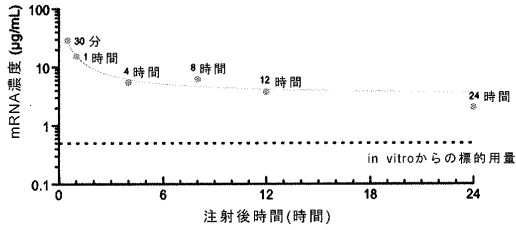
40

50

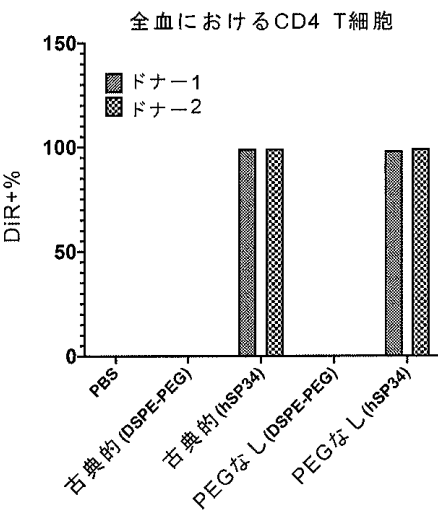
【図 3 2】



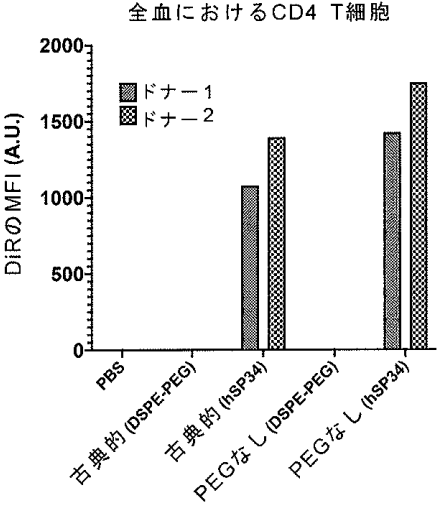
【図 3 3】



【図 3 4 A】



【図 3 4 B】



10

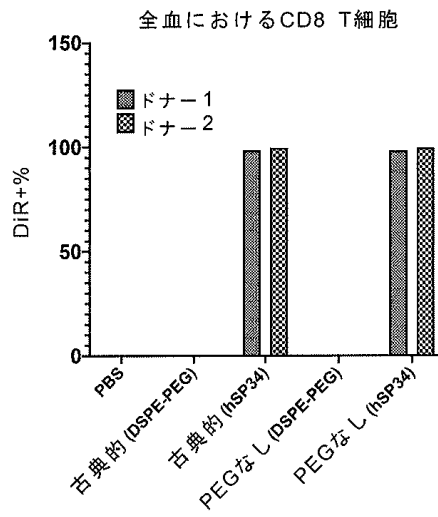
20

30

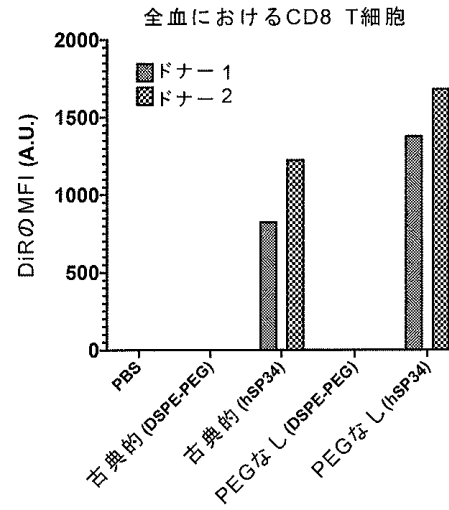
40

50

【図 3 5 A】

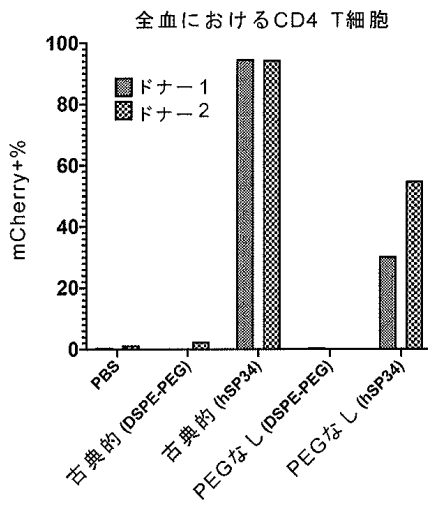


【図 3 5 B】

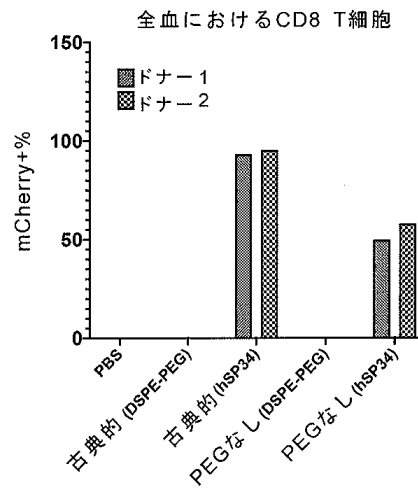


10

【図 3 6 A】



【図 3 6 B】



20

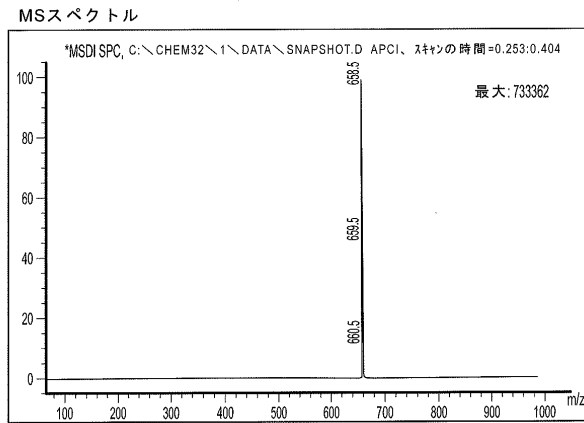
30

40

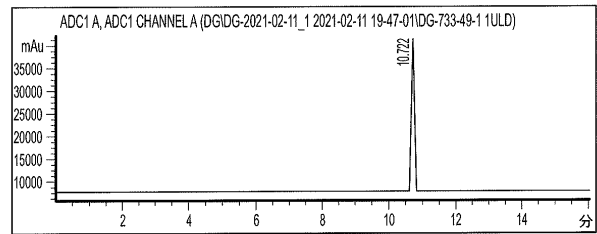
50



【図 40A】

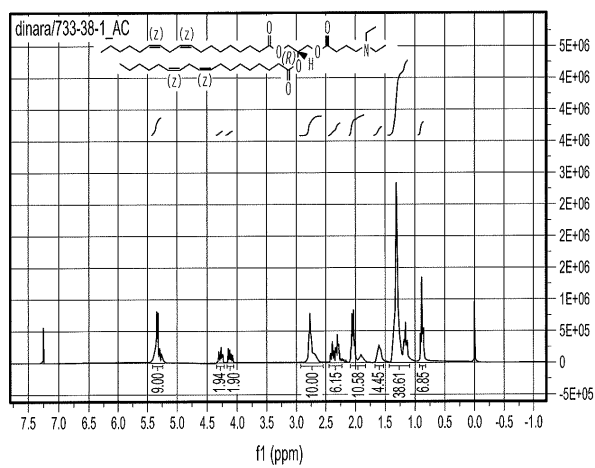


【図 40B】

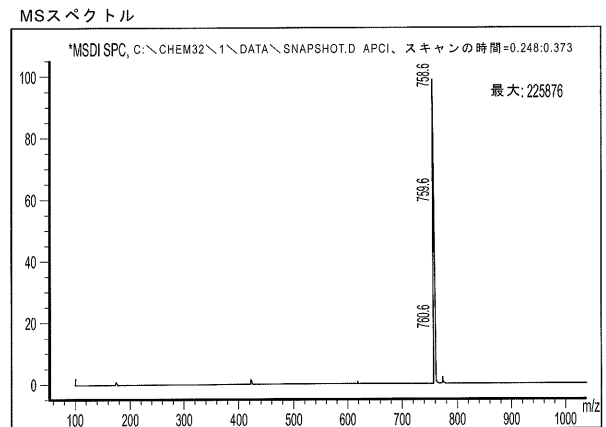


10

【図 41】



【図 42A】



20

30

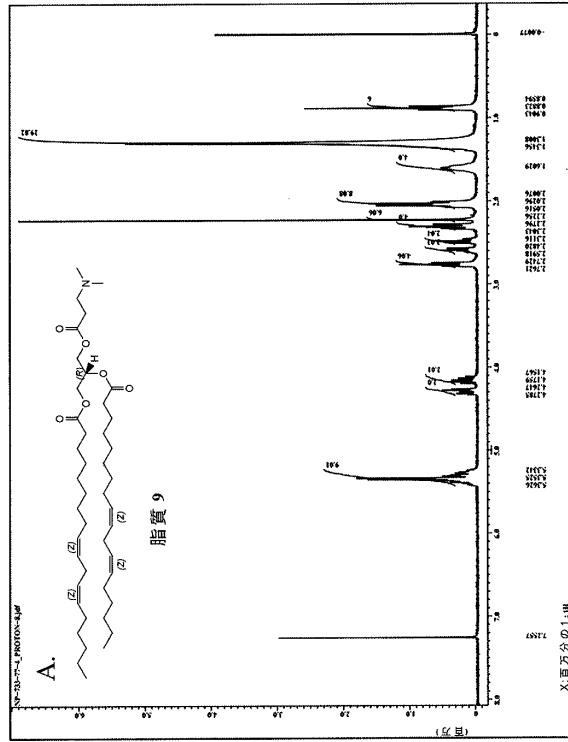
40

50

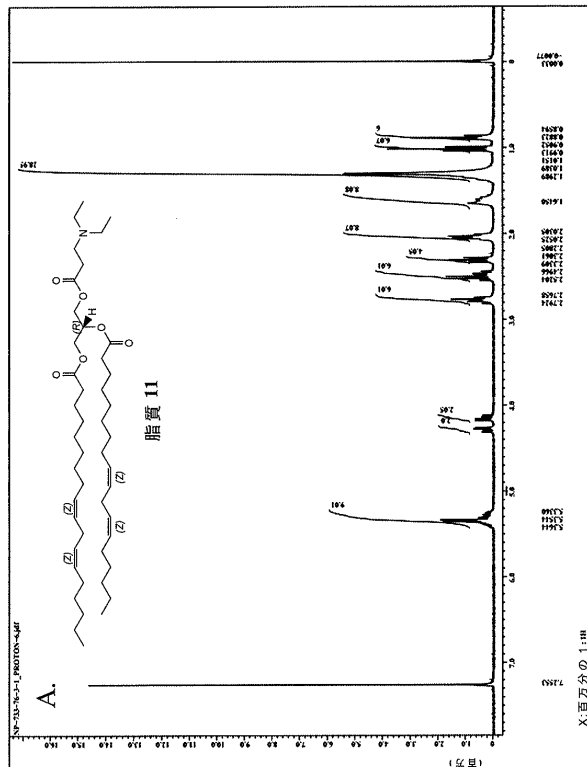




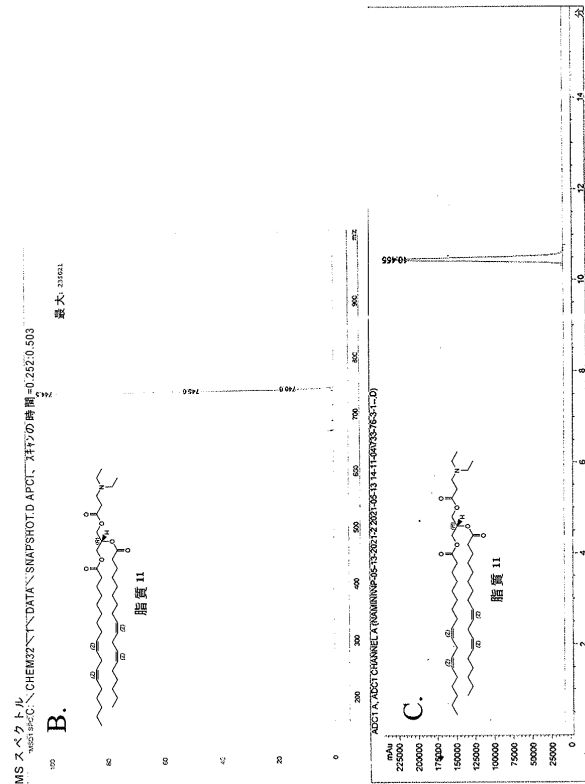
【図 48-1】



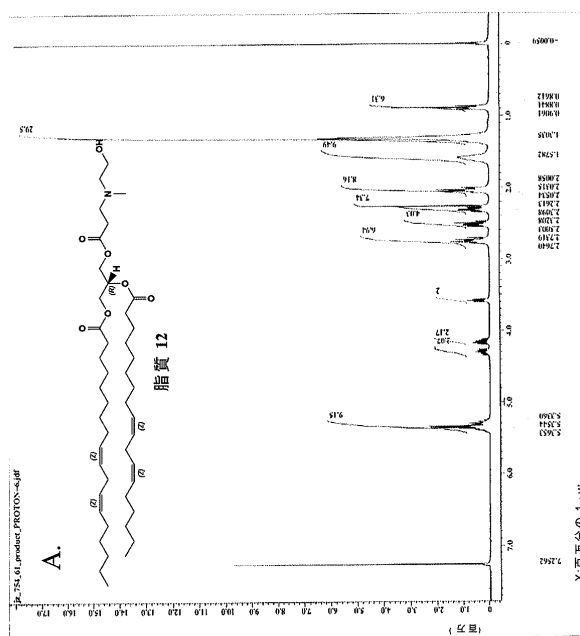
【圖 50-1】



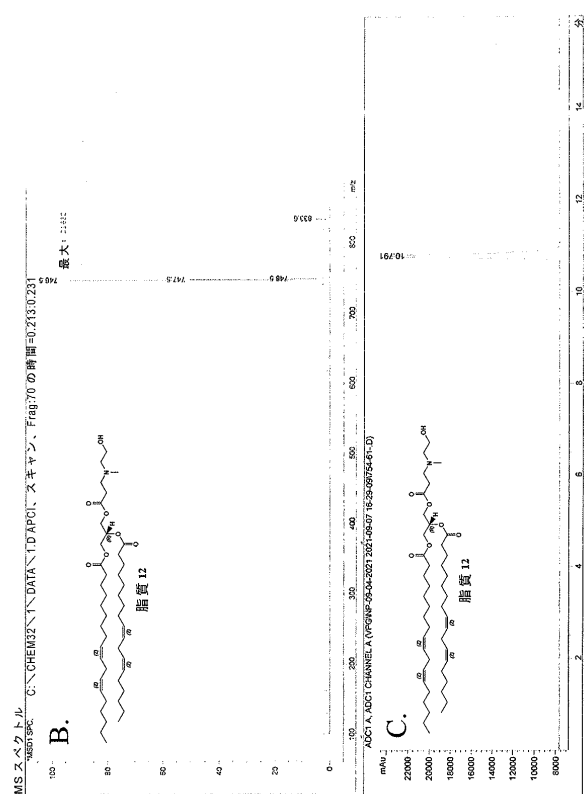
【圖 50-2】



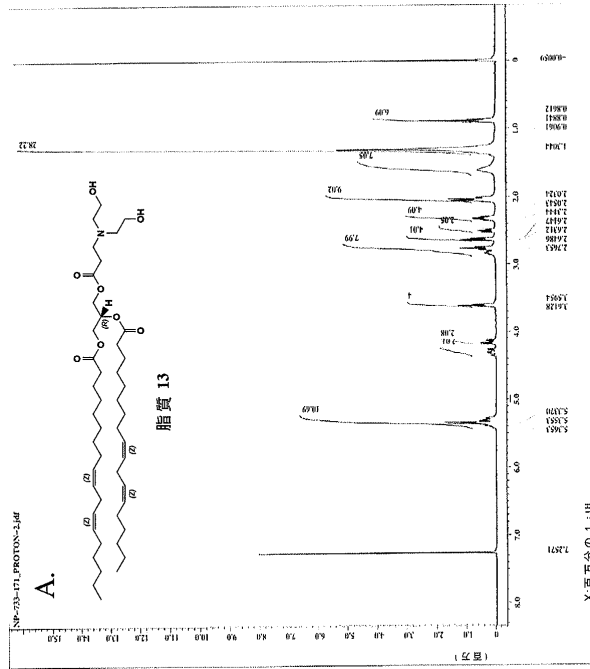
【図 5 1 - 1】



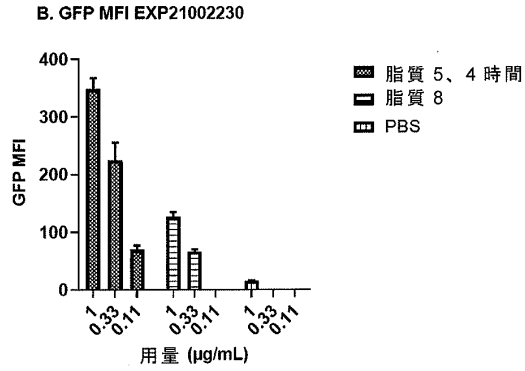
【圖 5 1 - 2】



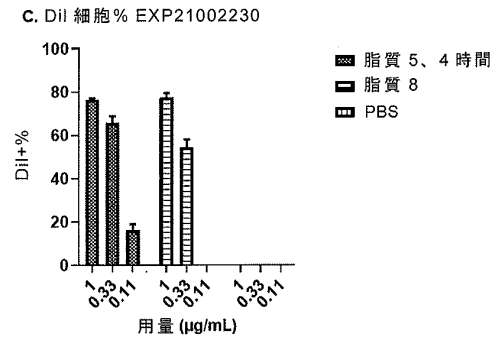
【図 5 2 - 1】



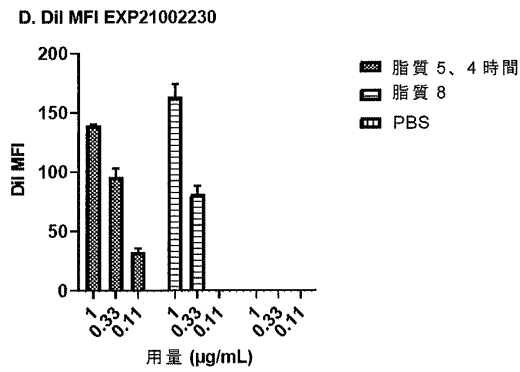
【図 5 4 B】



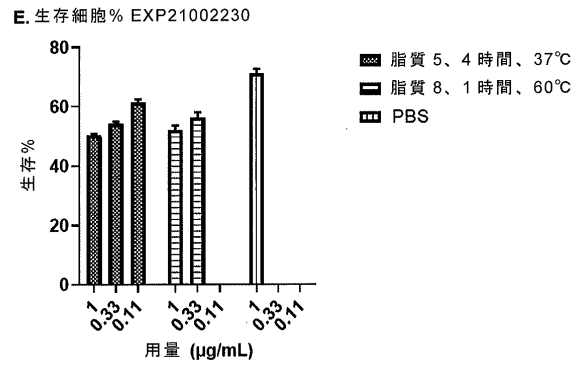
【図 5 4 C】



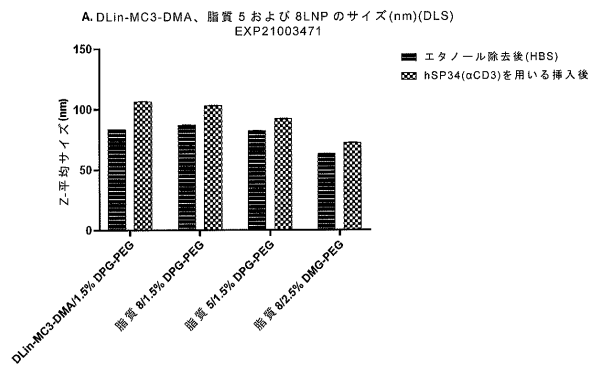
【図 5 4 D】



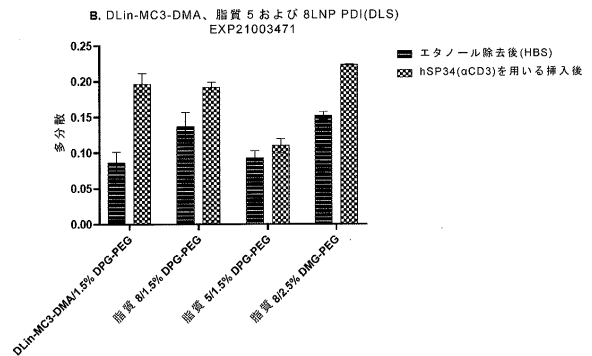
【図 5 4 E】



【図 5 5 A】



【図 5 5 B】



10

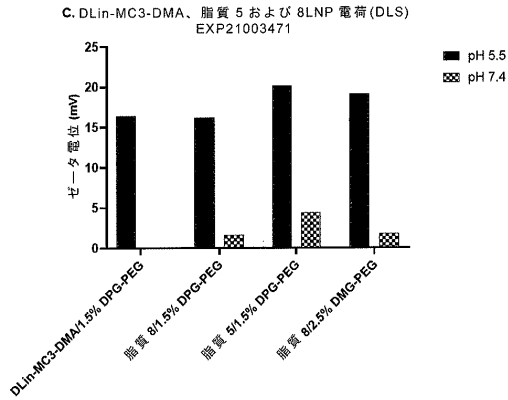
20

30

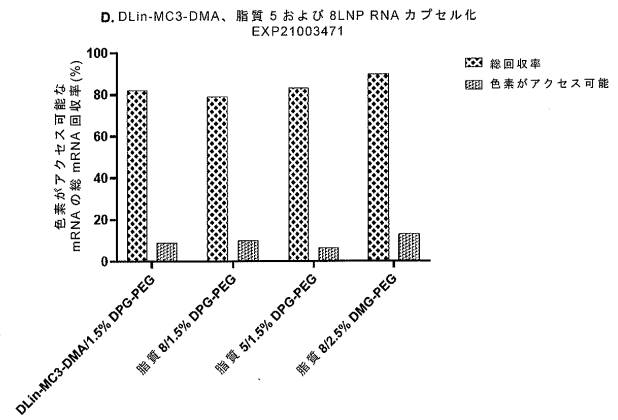
40

50

【図 5 5 C】

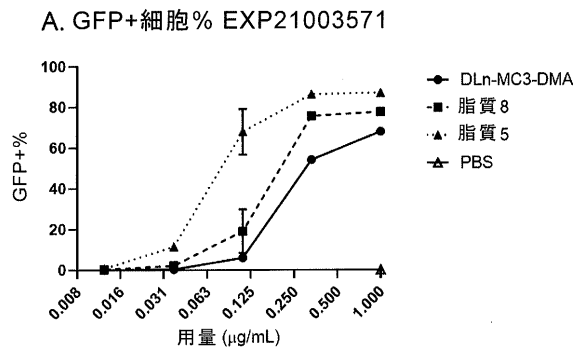


【図 5 5 D】

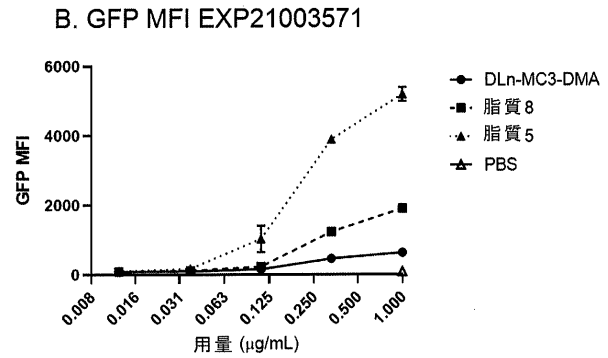


10

【図 5 6 A】

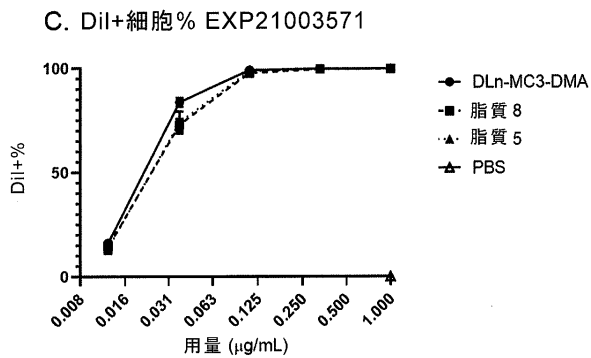


【図 5 6 B】

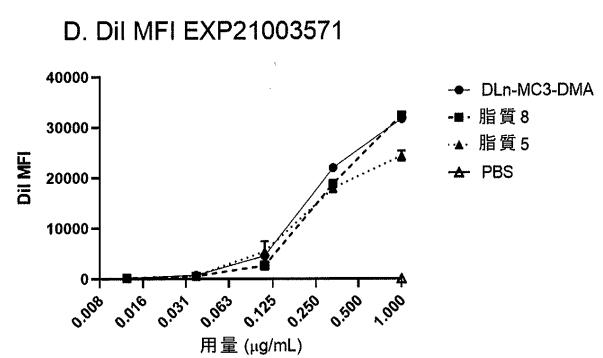


20

【図 5 6 C】



【図 5 6 D】



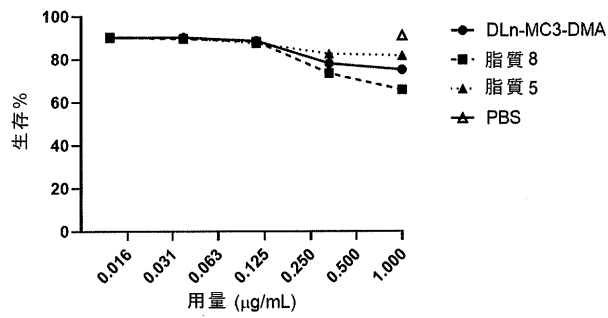
30

40

50

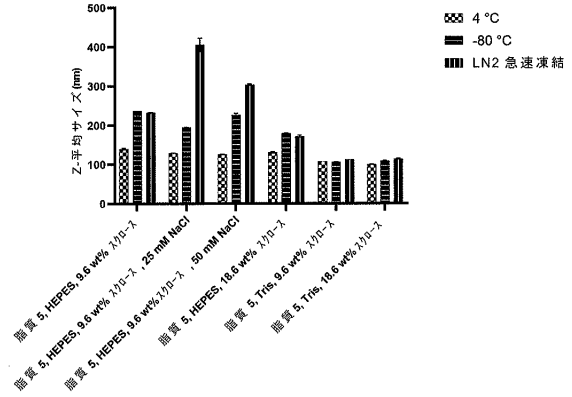
【図 5 6 E】

E. 生存細胞% EXP21003571



【図 5 7 A】

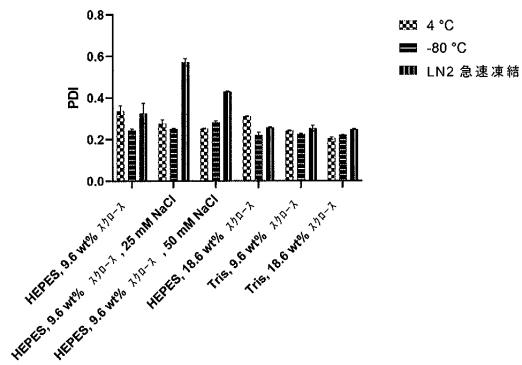
A. 4°C で保存したおよび凍結-解凍後の脂質 5LNP のサイズ (nm) EXP21001639



10

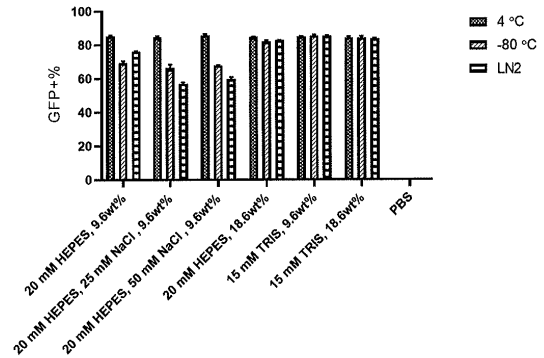
【図 5 7 B】

B. 4°C で保存したおよび凍結-解凍後の脂質 5LNP 多分散 EXP21001639



【図 5 8 A】

A. GFP+細胞% EXP21001693



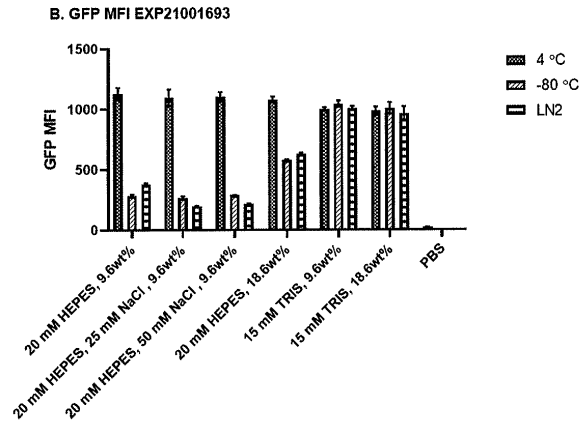
20

30

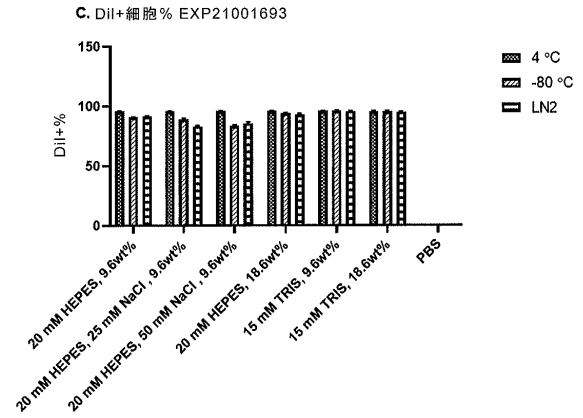
40

50

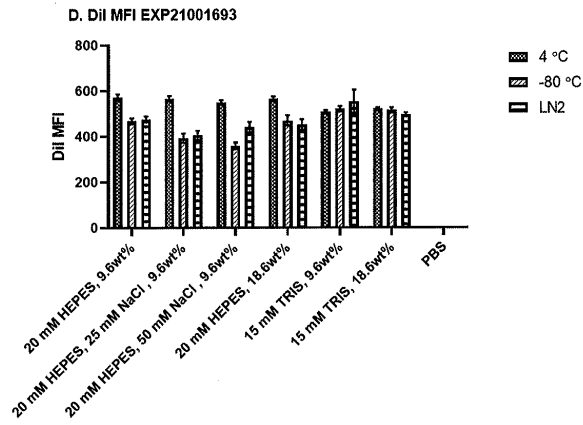
【図 58 B】



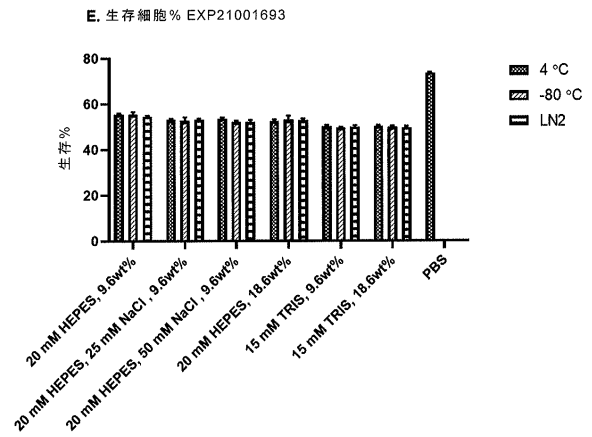
【図 58 C】



【図 58 D】



【図 58 E】



10

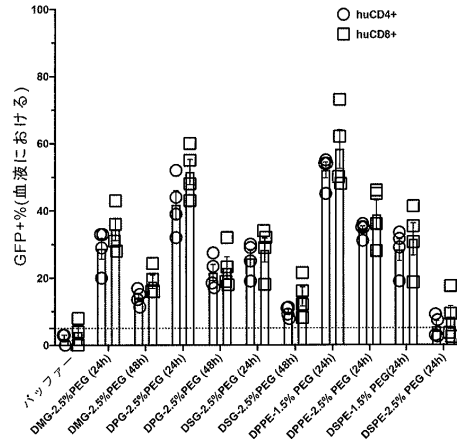
20

30

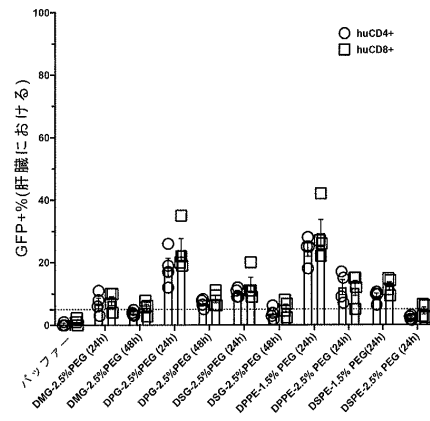
40

50

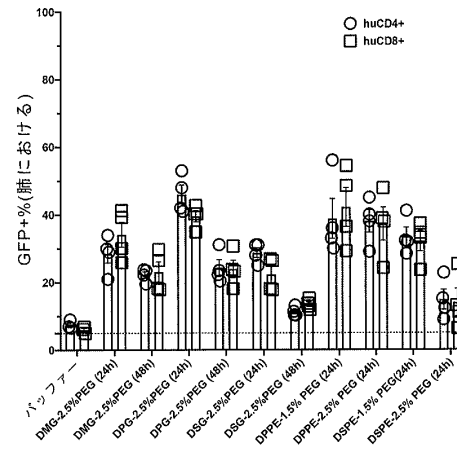
【図 59 A】



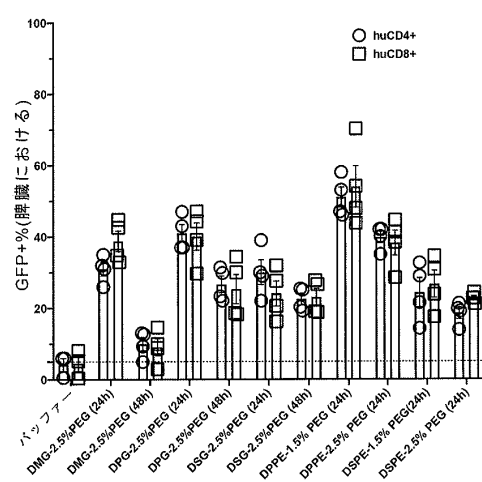
【図 59 B】



【図 59 C】



【図 59 D】



10

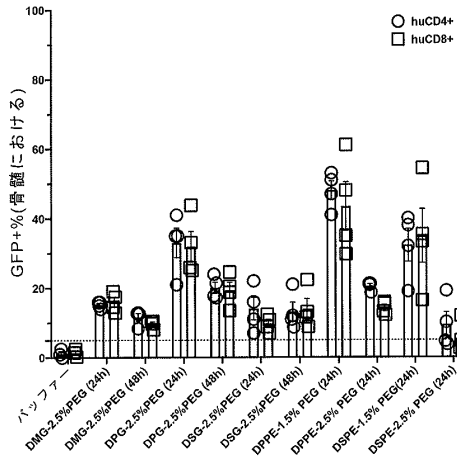
20

30

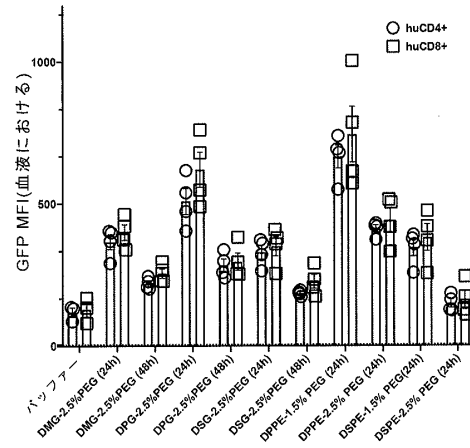
40

50

【図 59 E】

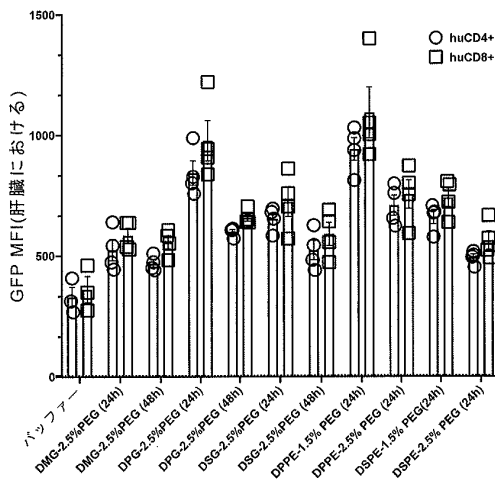


【図 59 F】

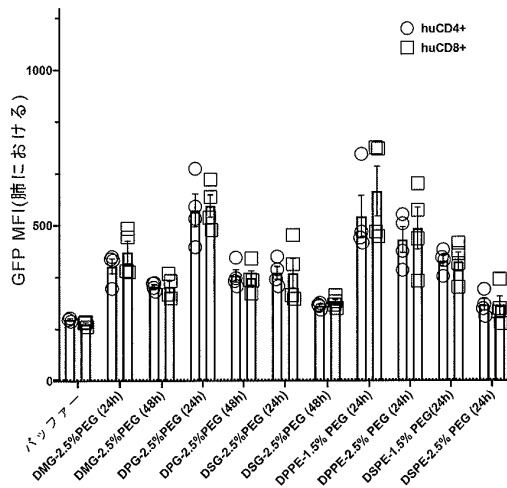


10

【図 59 G】



【図 59 H】



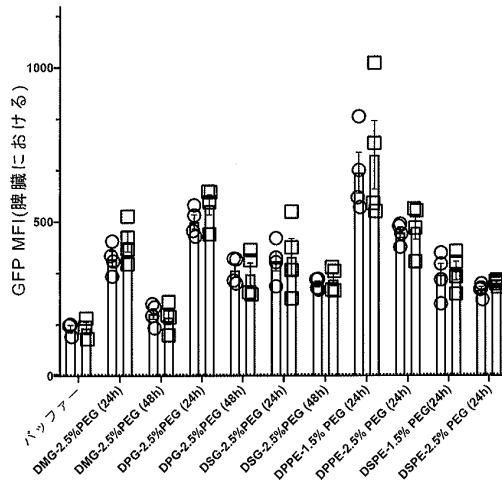
20

30

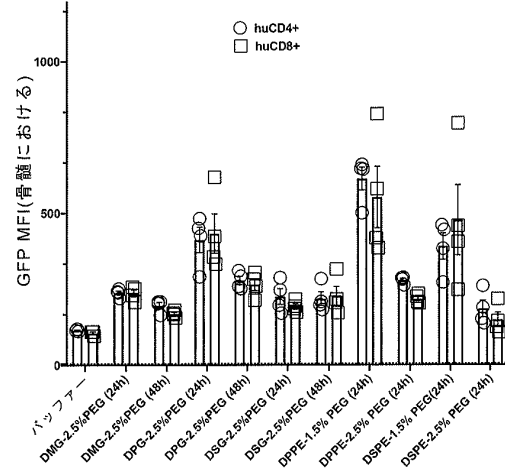
40

50

【図 59 I】

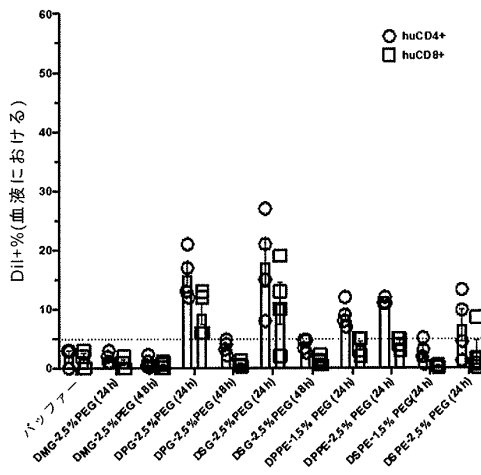


【図 59 J】

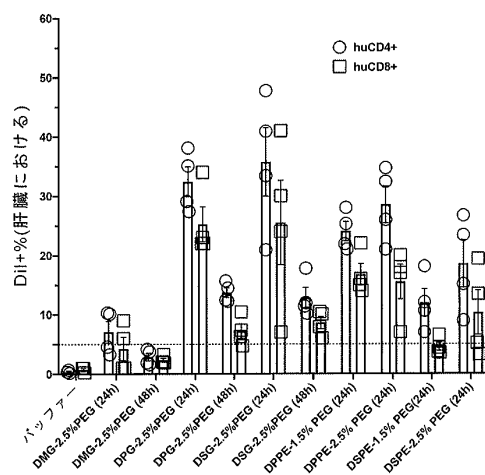


10

【図 59 K】



【図 59 L】



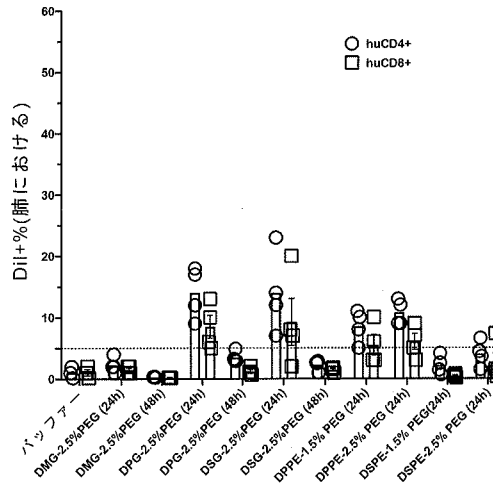
20

30

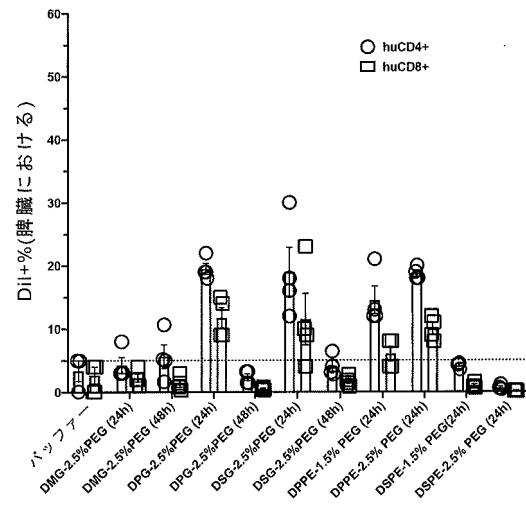
40

50

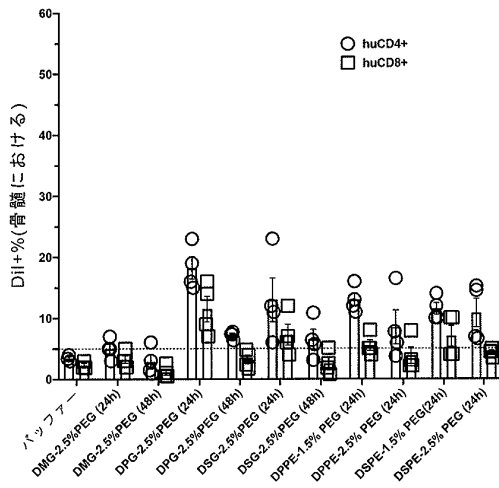
【図 5 9 M】



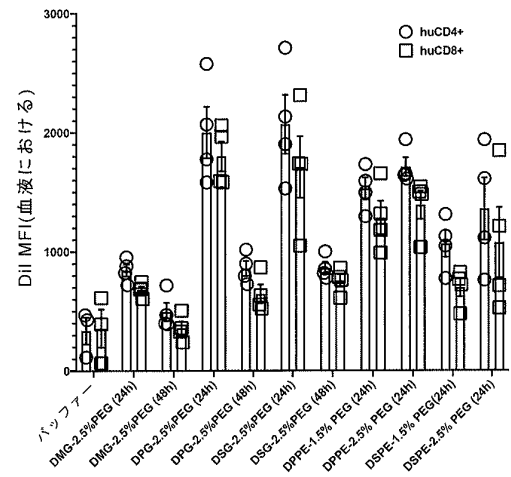
【図 5 9 N】



【図 5 9 O】



【図 5 9 P】



10

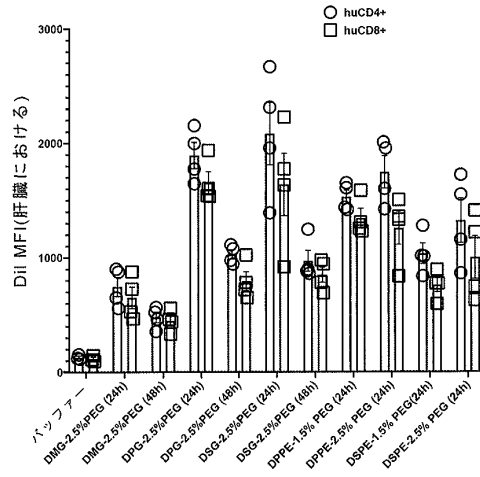
20

30

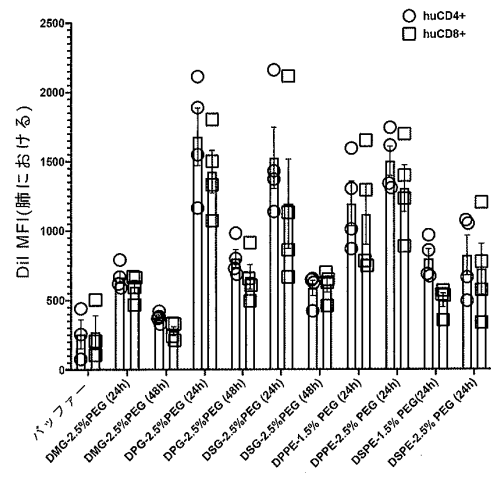
40

50

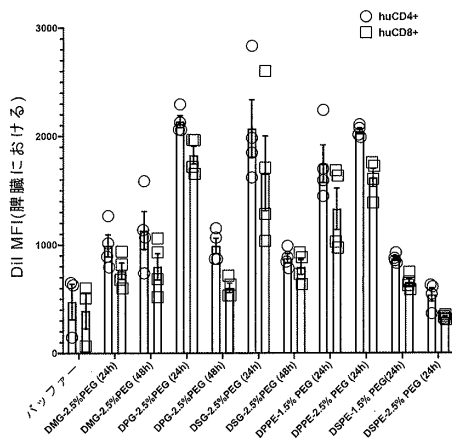
【図 5 9 Q】



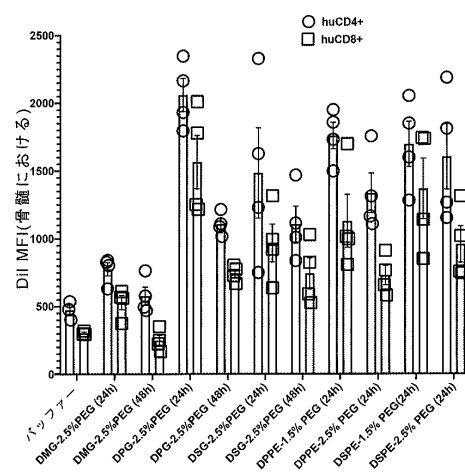
【図 5 9 R】



【図 5 9 S】



【図 5 9 T】



10

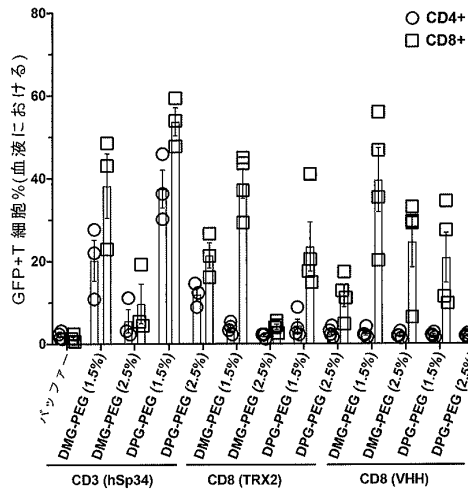
20

30

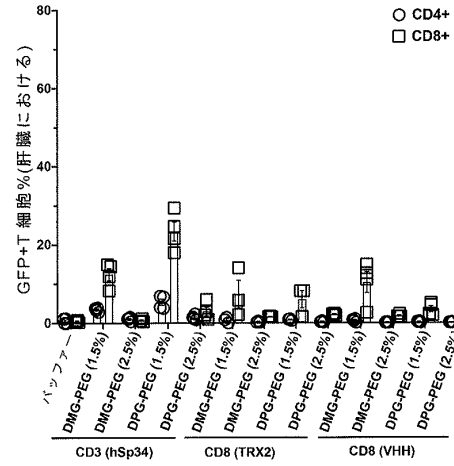
40

50

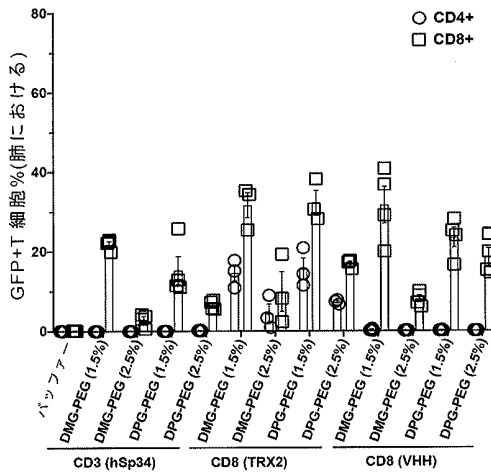
【図 60 A】



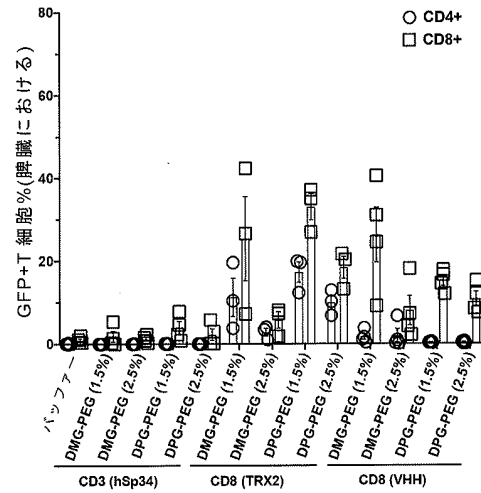
【図 60 B】



【図 60 C】



【図 60 D】



10

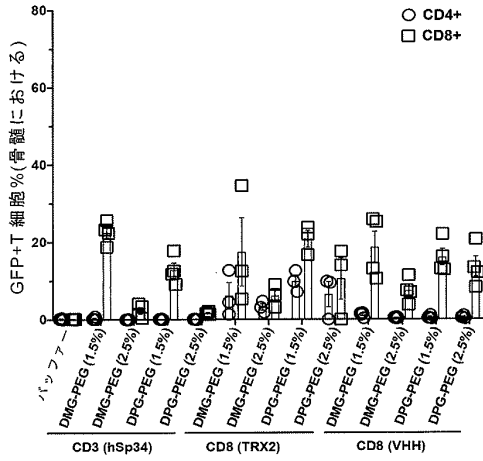
20

30

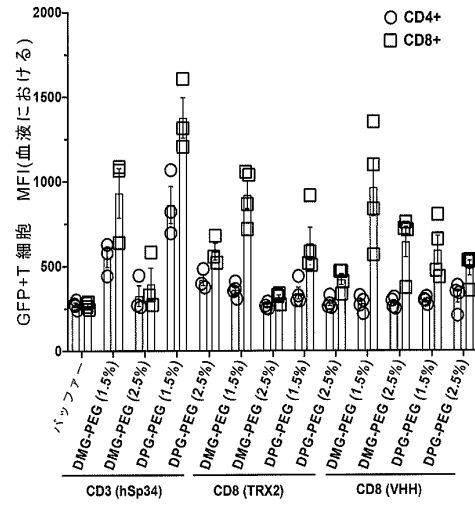
40

50

【図 60 E】

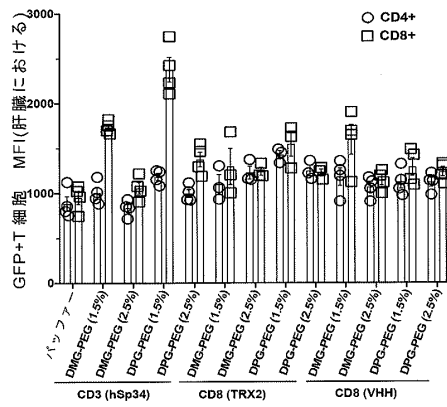


【図 60 F】

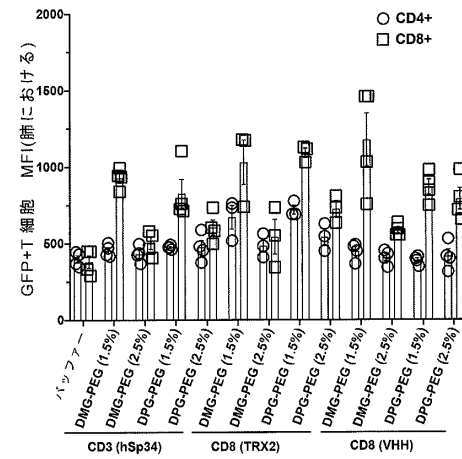


10

【図 60 G】



【図 60 H】



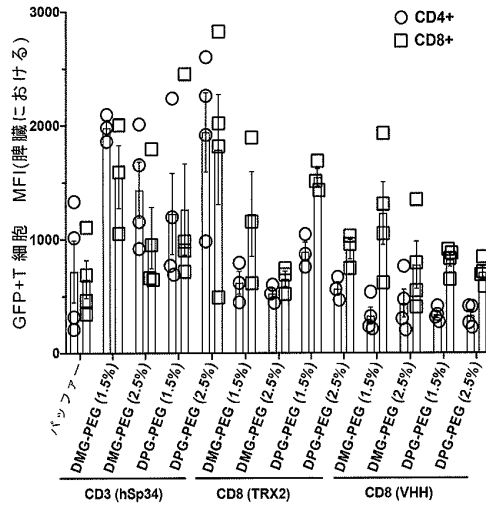
20

30

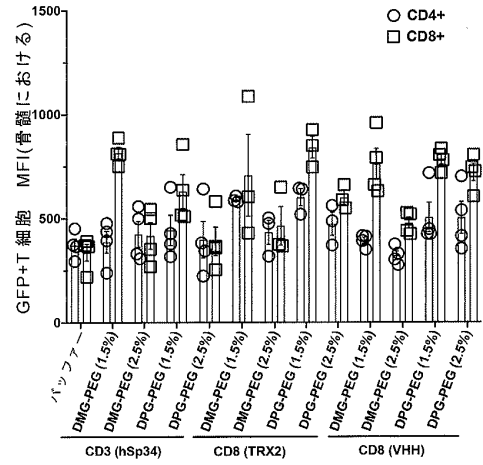
40

50

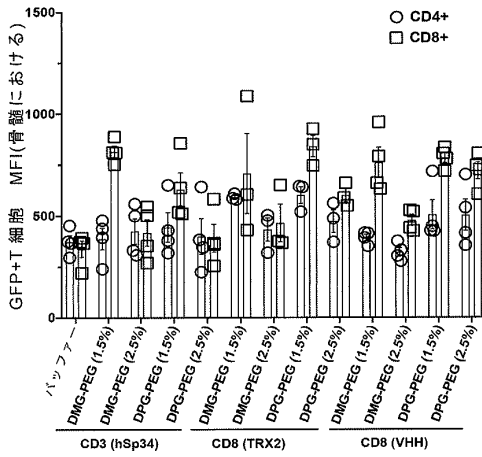
【図 60 I】



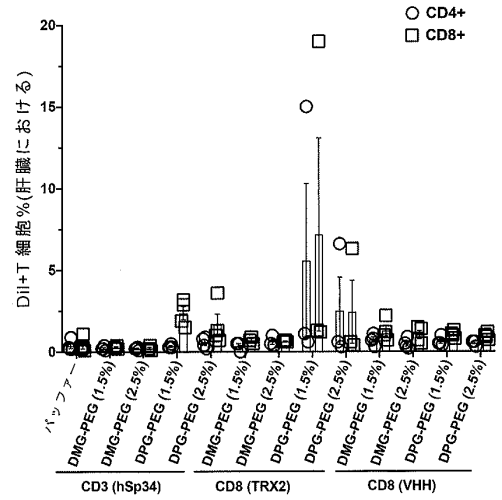
【図 60 J】



【図 60 K】



【図 60 L】



10

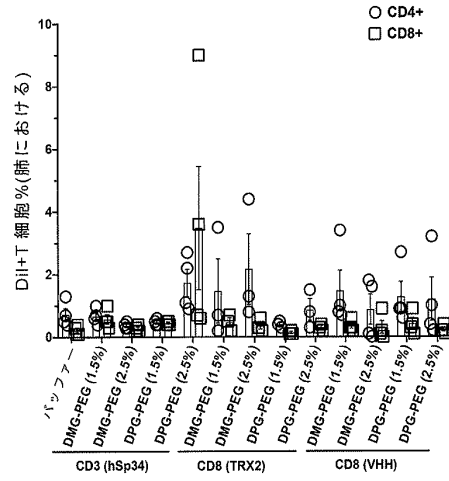
20

30

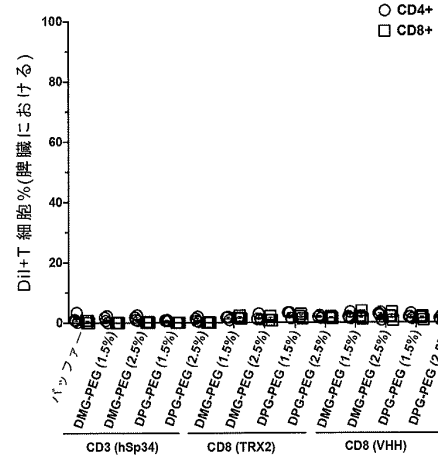
40

50

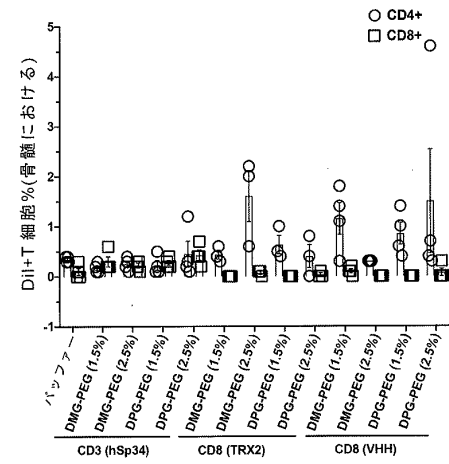
【図 60 M】



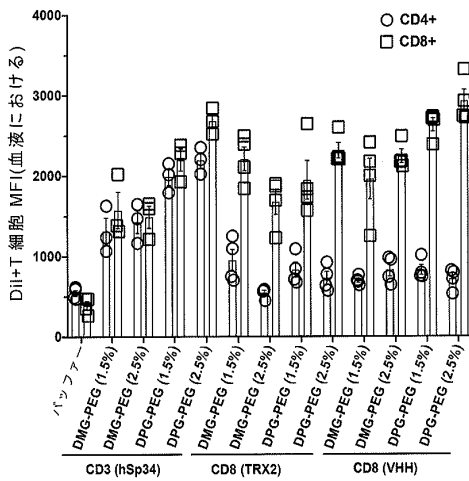
【図 60 N】



【図 60 O】



【図 60 P】



10

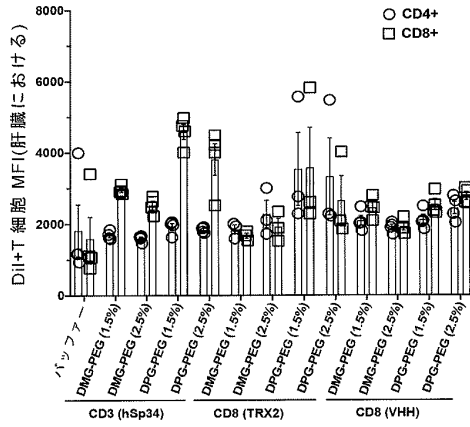
20

30

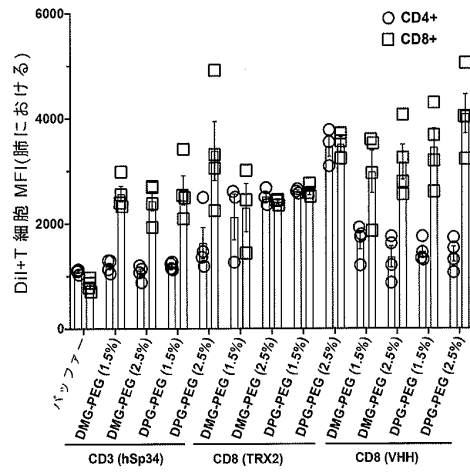
40

50

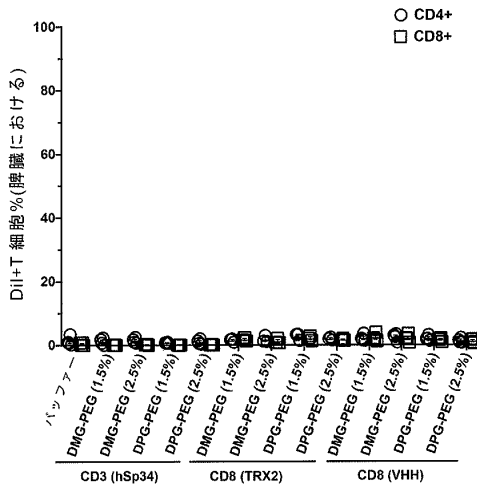
【図 60 Q】



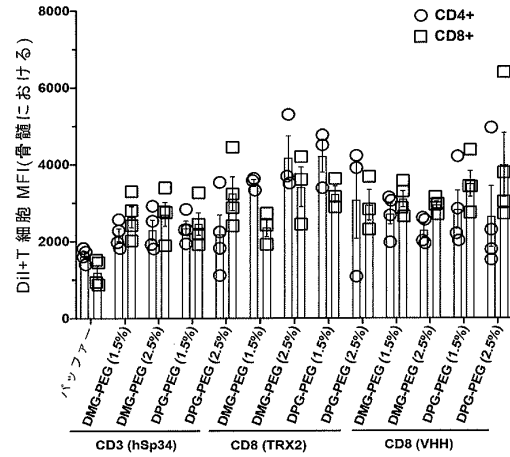
【図 60 R】



【図 60 S】



【図 60 T】



10

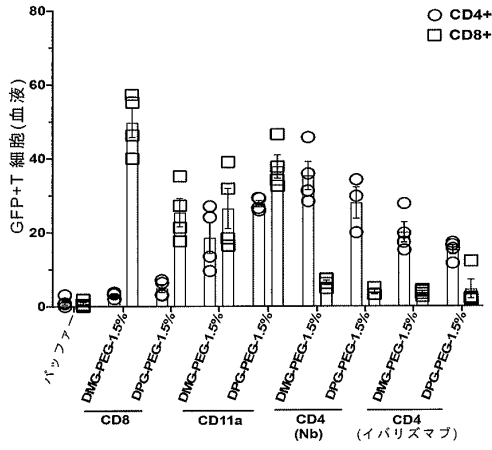
20

30

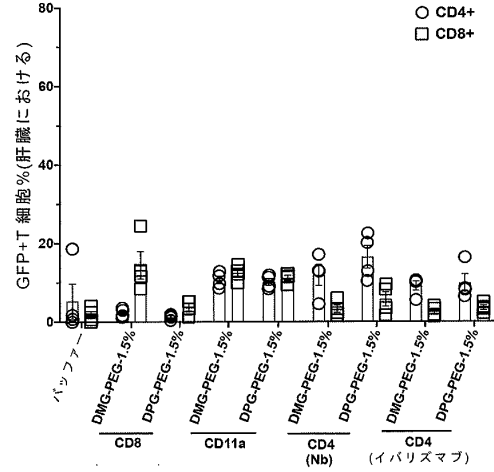
40

50

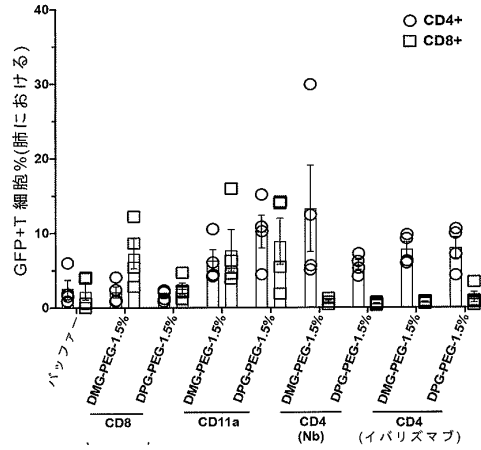
【図 6 1 A】



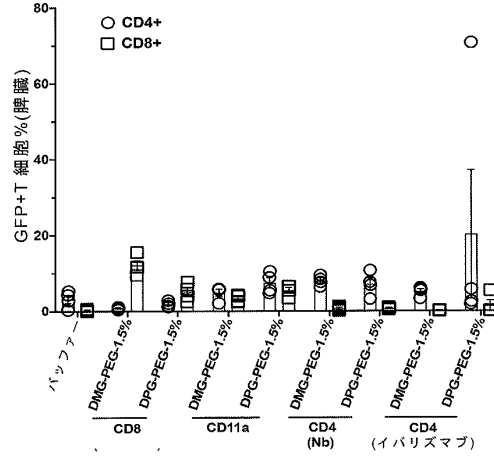
【図 6 1 B】



【図 6 1 C】



【図 6 1 D】



10

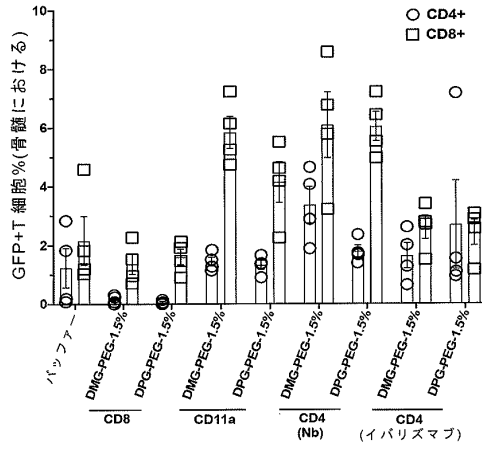
20

30

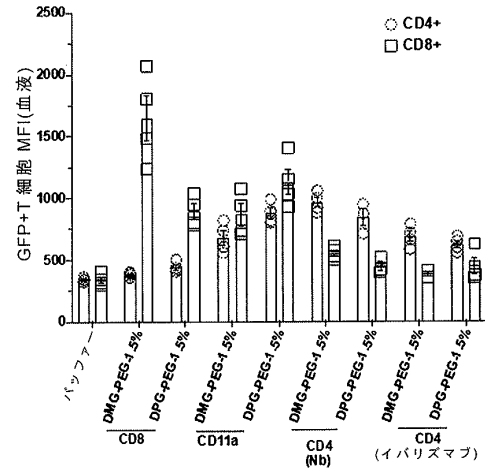
40

50

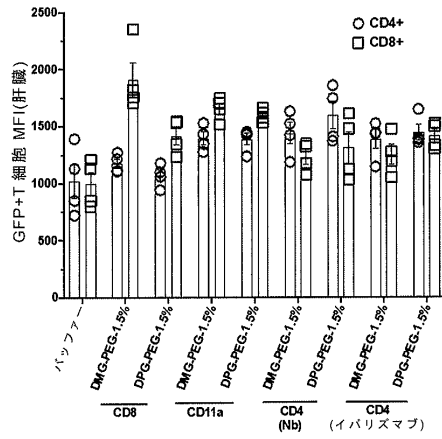
【図 6 1 E】



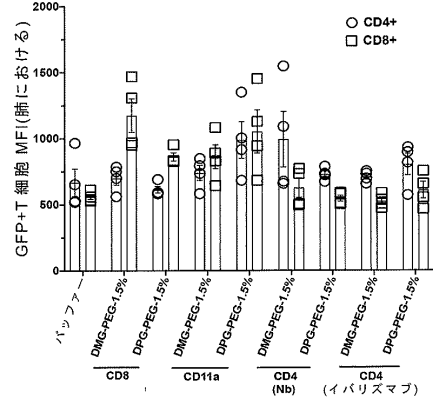
【図 6 1 F】



【図 6 1 G】



【図 6 1 H】



10

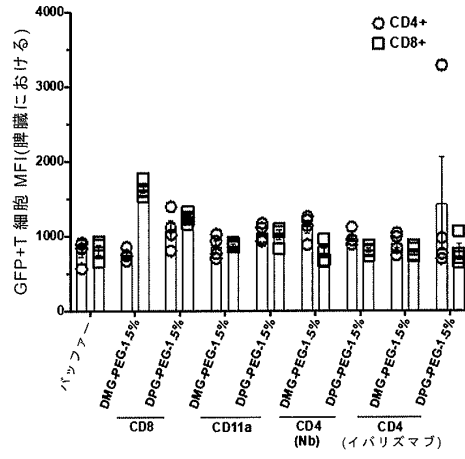
20

30

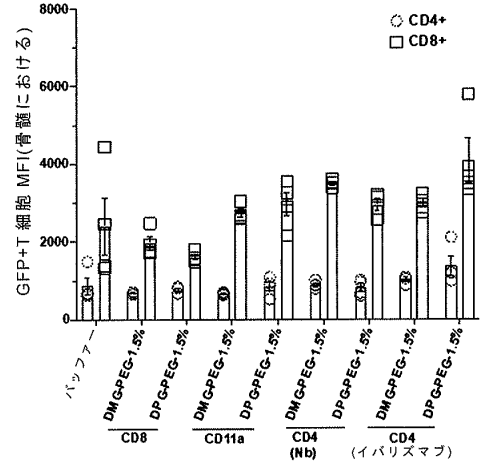
40

50

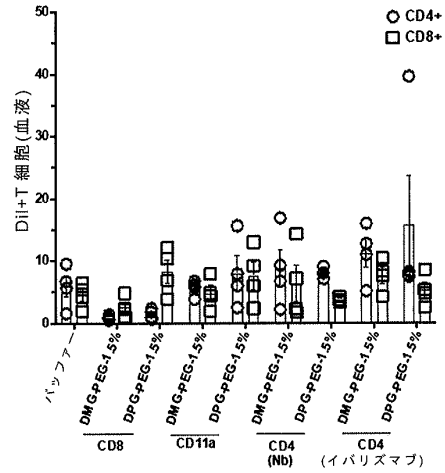
【図 6 1 I】



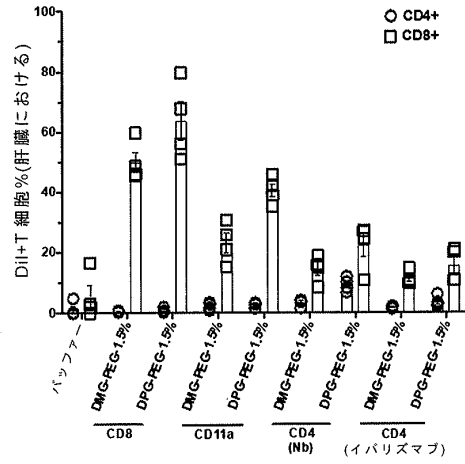
【図 6 1 J】



【図 6 1 K】



【図 6 1 L】



10

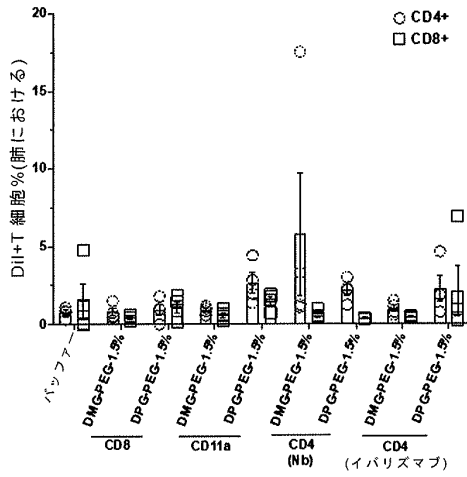
20

30

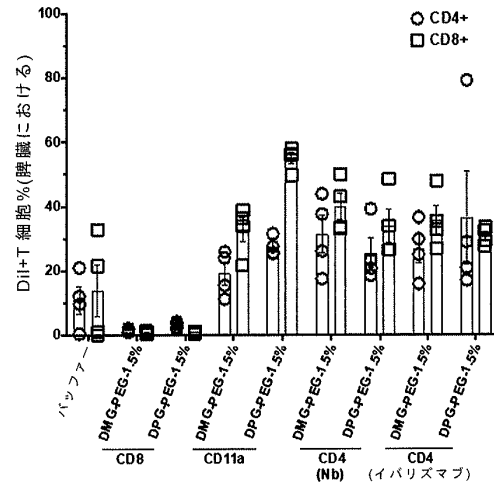
40

50

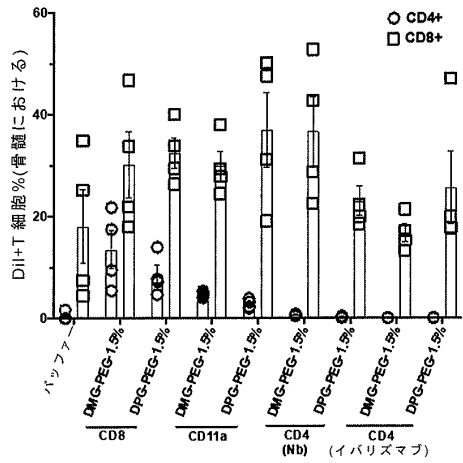
【図 6 1 M】



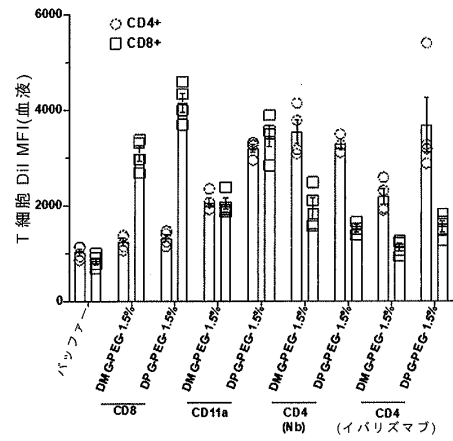
【図 6 1 N】



【図 6 1 O】



【図 6 1 P】



10

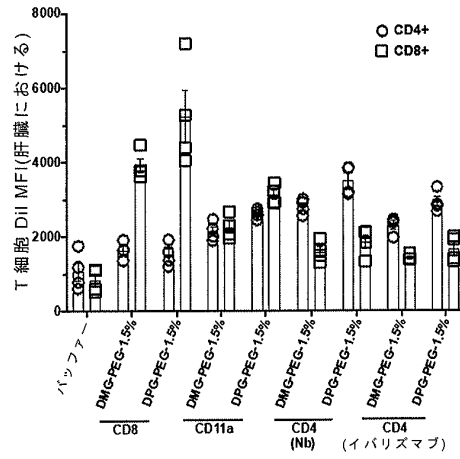
20

30

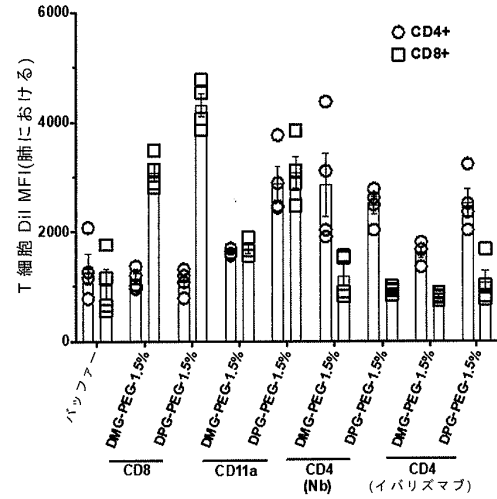
40

50

【図 6 1 Q】

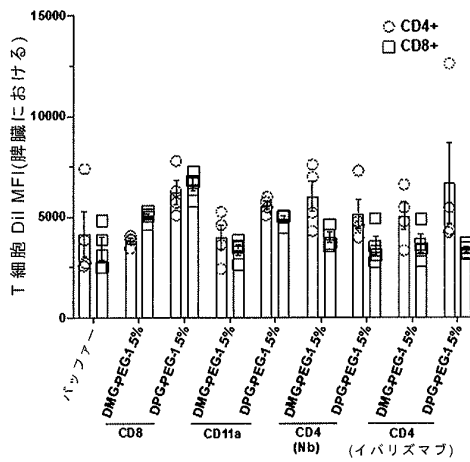


【図 6 1 R】

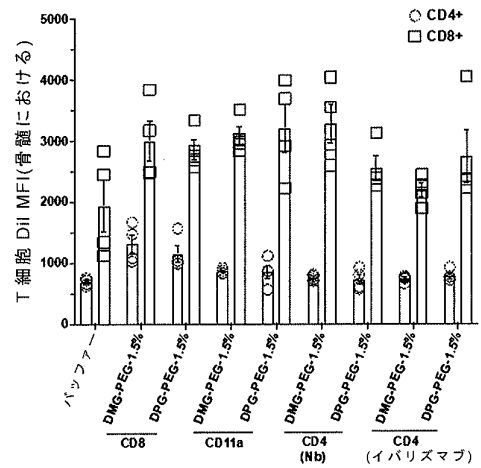


10

【図 6 1 S】



【図 6 1 T】



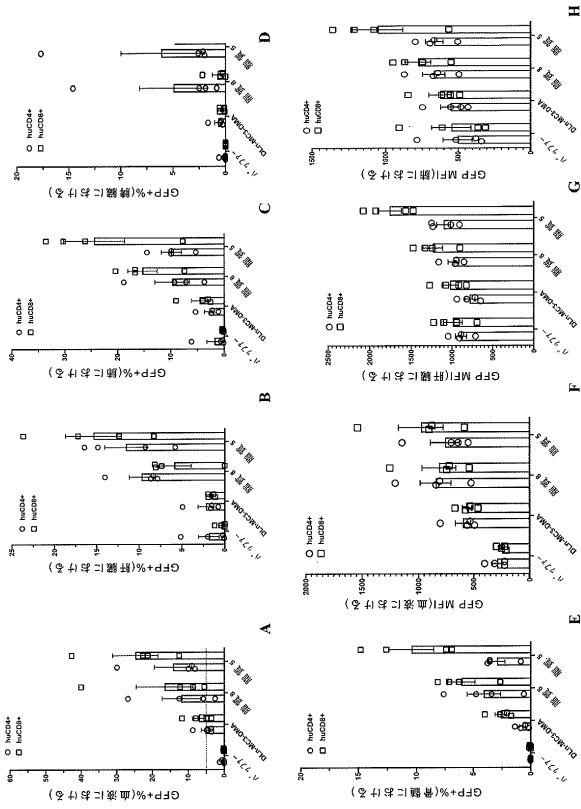
20

30

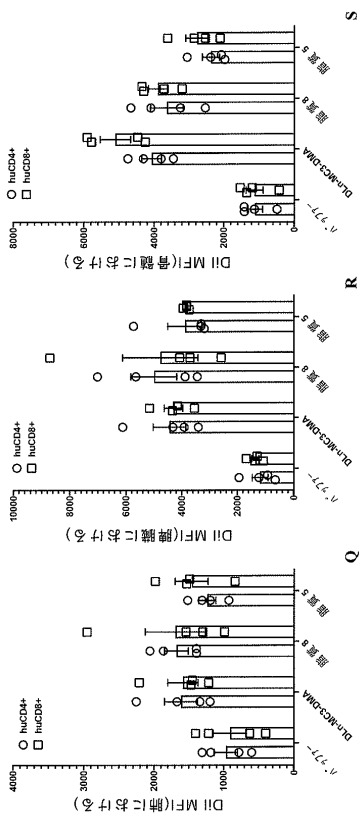
40

50

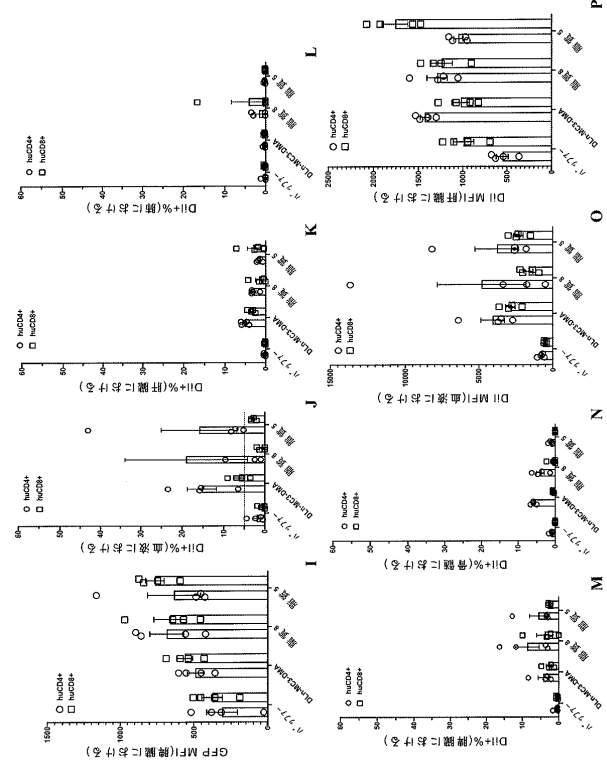
【図 6 2 - 1】



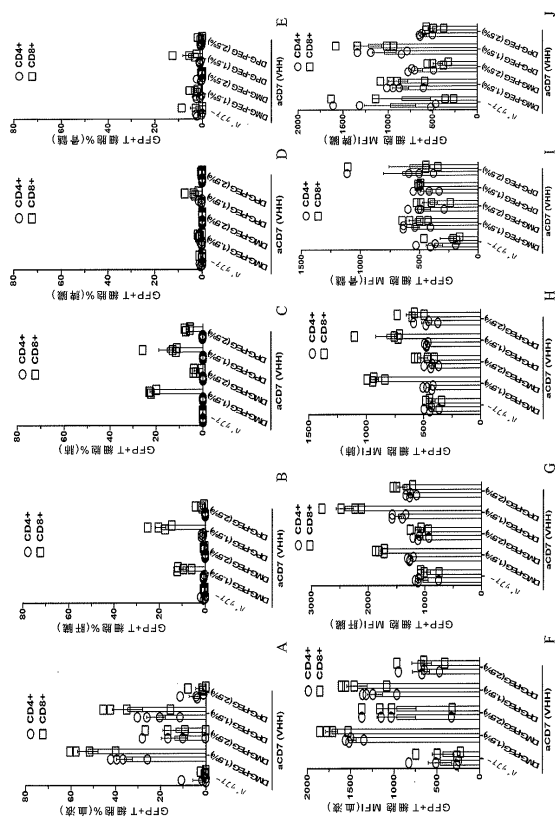
【図 6 2 - 3】



【図 6 2 - 2】



【図 6 3 - 1】



10

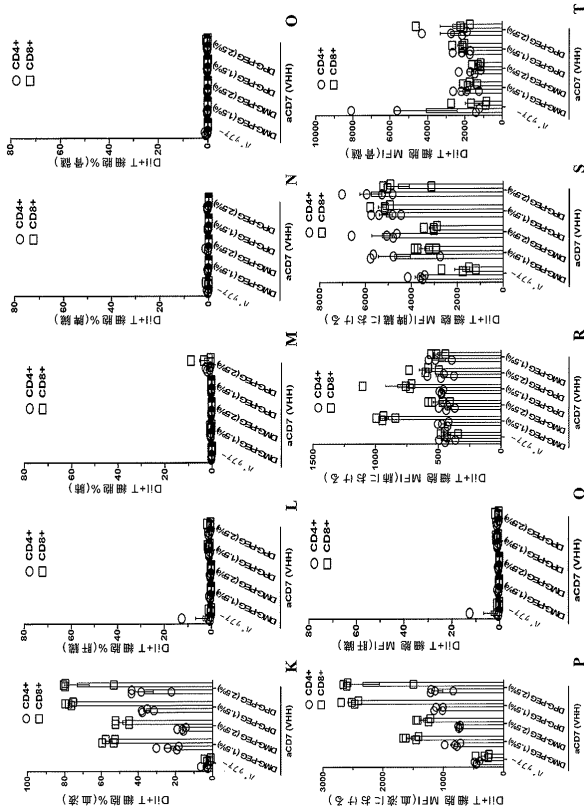
20

30

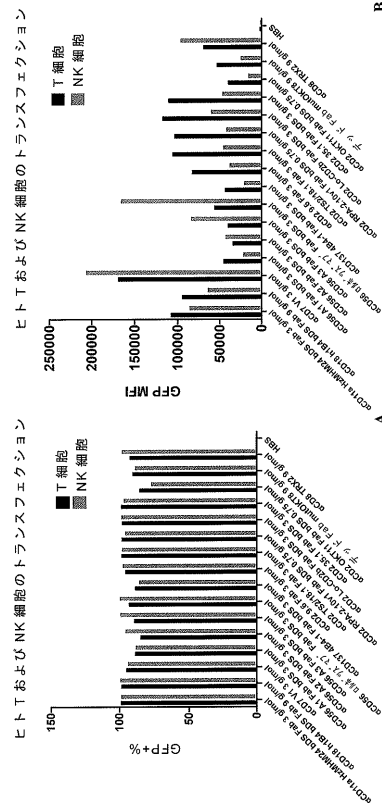
40

50

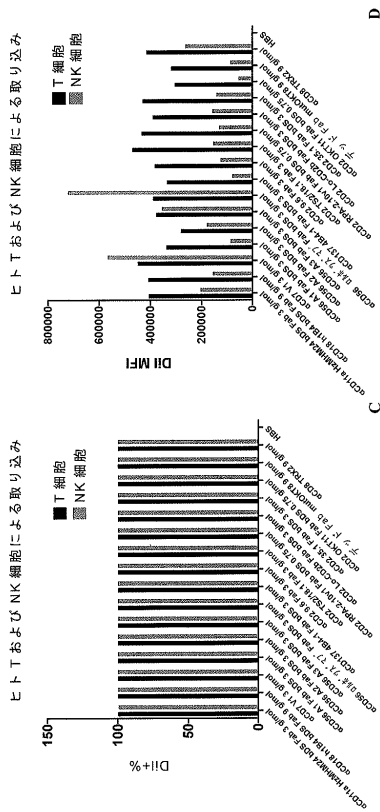
【図 6 3 - 2】



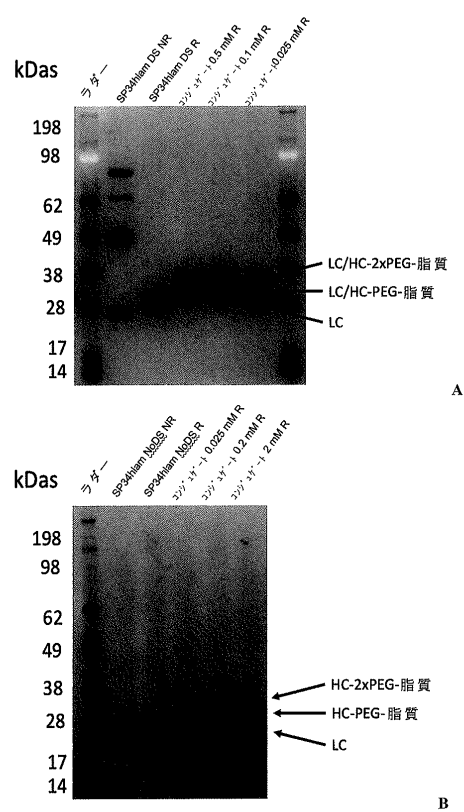
【図 6 4 - 1】



【図 6 4 - 2】



【図 6 5 - 1】



10

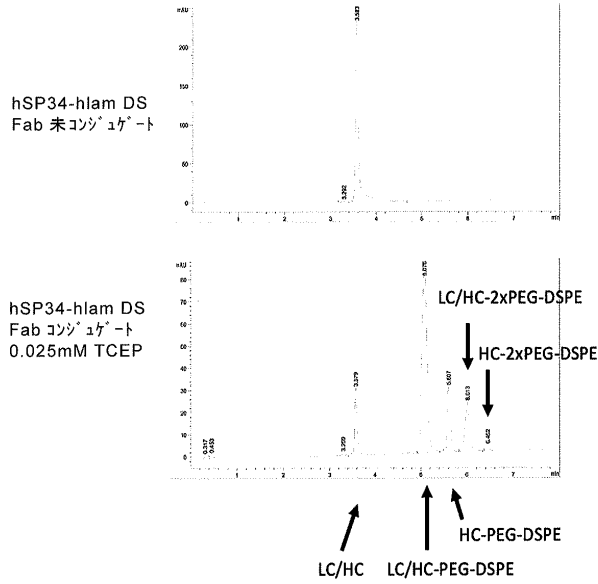
20

30

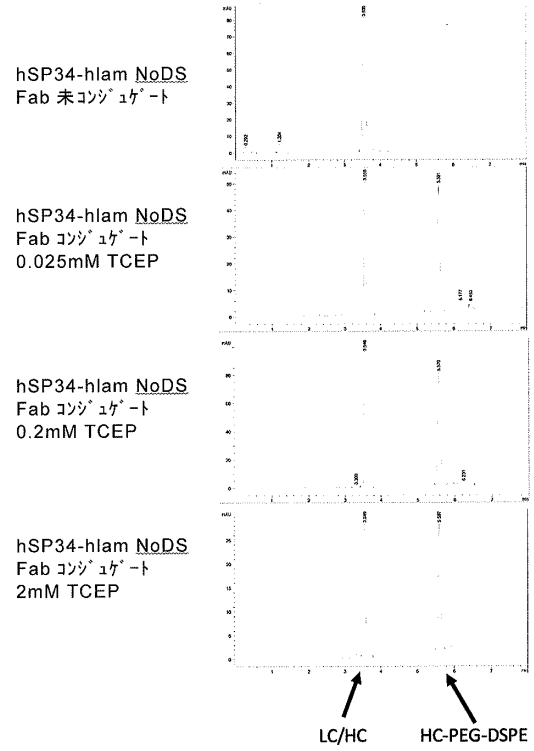
40

50

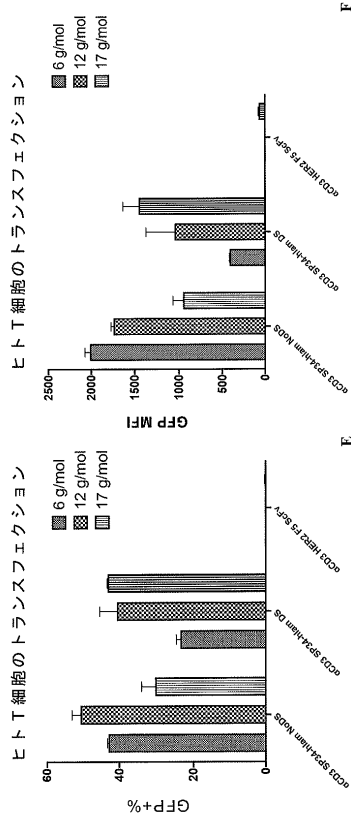
【図 6 5 - 2】



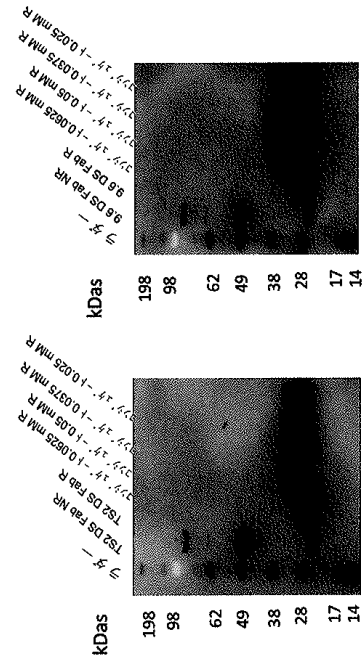
【図 6 5 - 3】



【図 6 5 - 4】



【図 6 6 A】



10

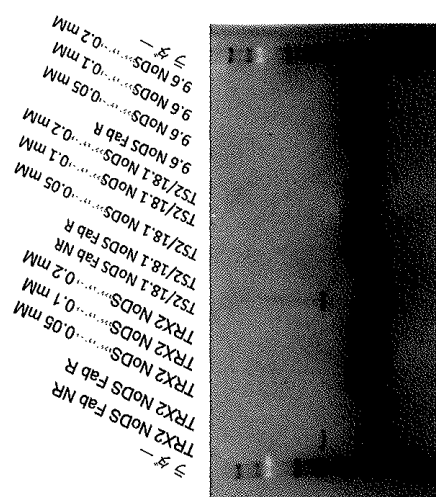
20

30

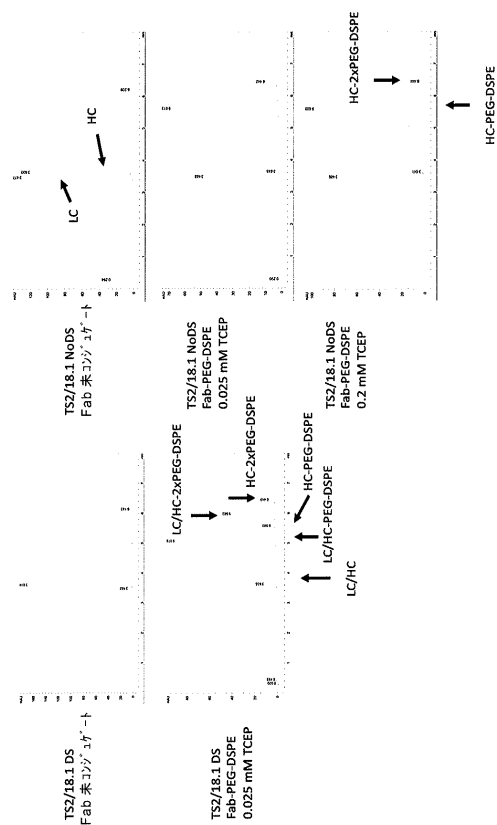
40

50

【図 6 6 B】



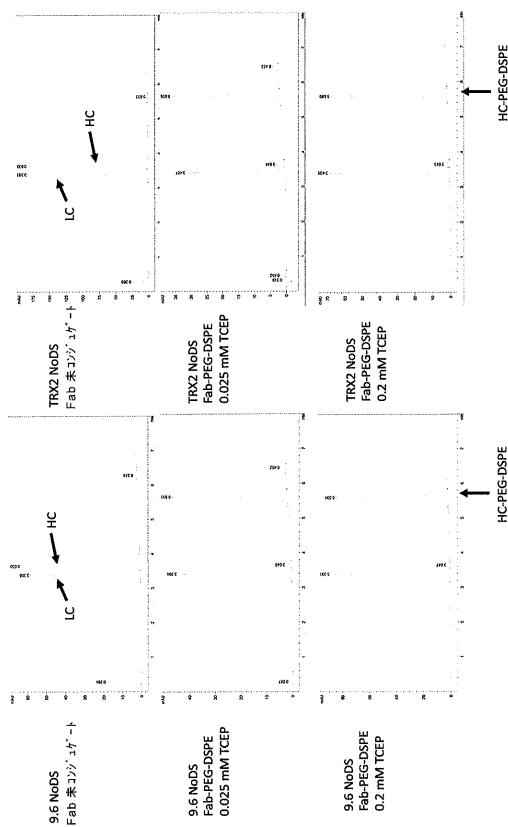
【図 6 6 C】



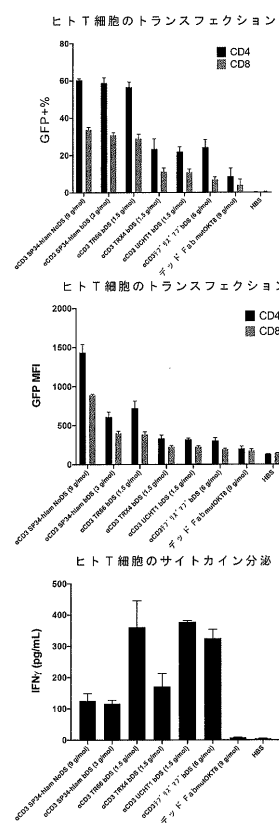
10

20

【図 6 6 D】



【圖 6 7】



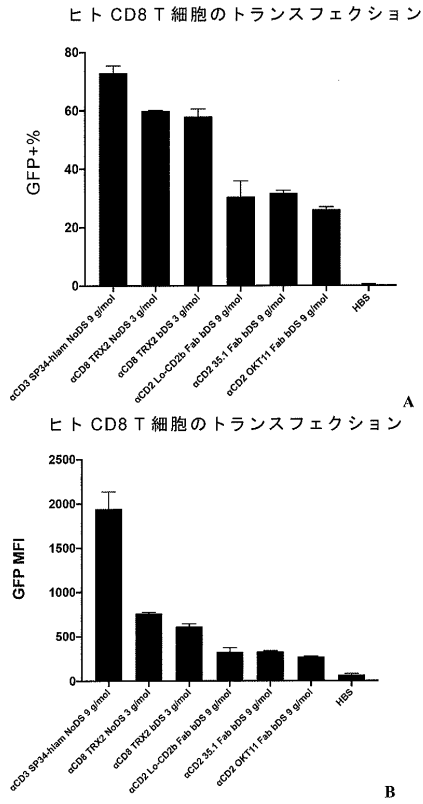
30

40

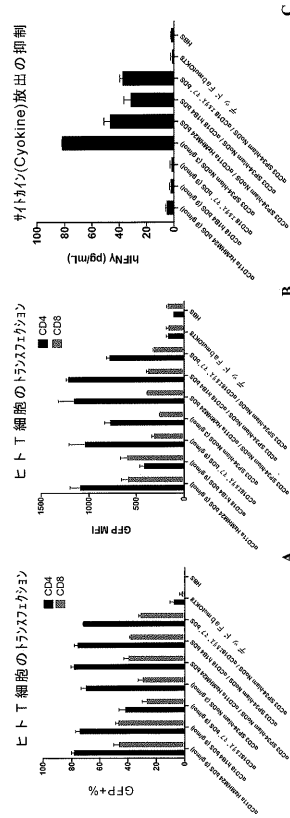
**C**

50

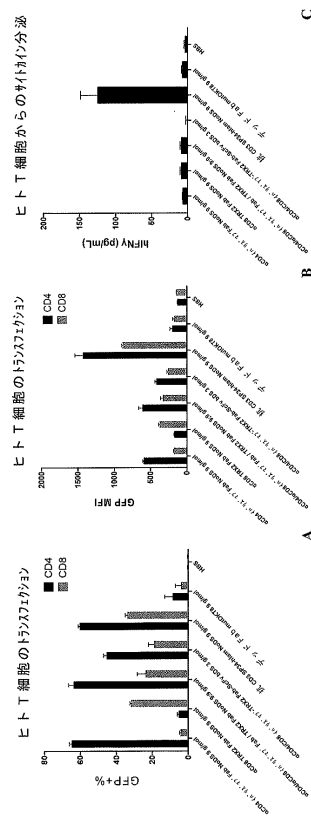
【図 68】



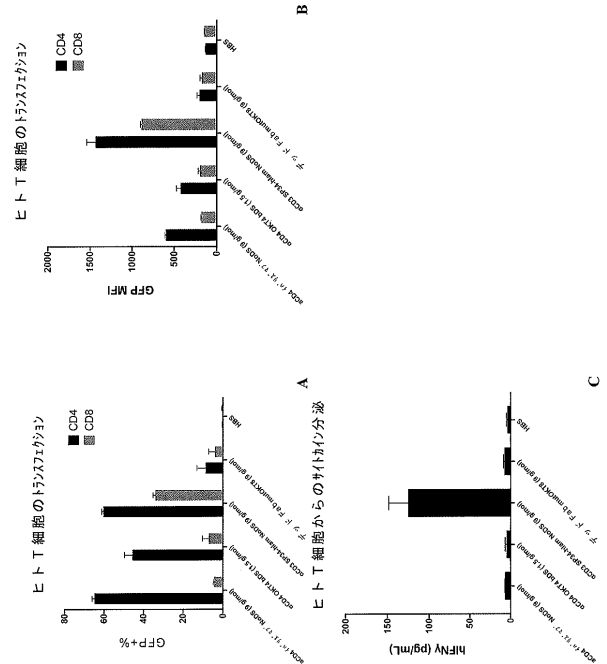
【図 69】



【図 70】



【図 71】



10

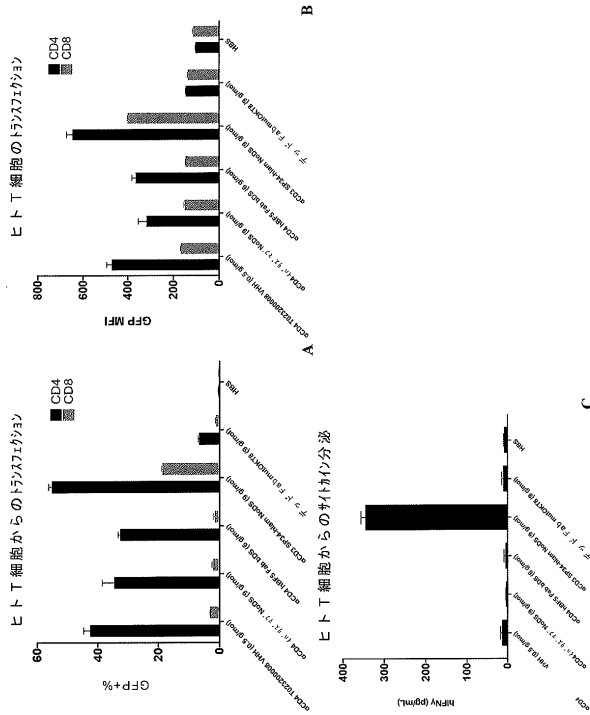
20

30

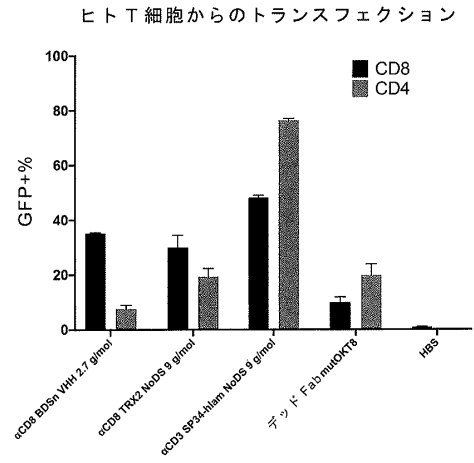
40

50

【図 7 2】



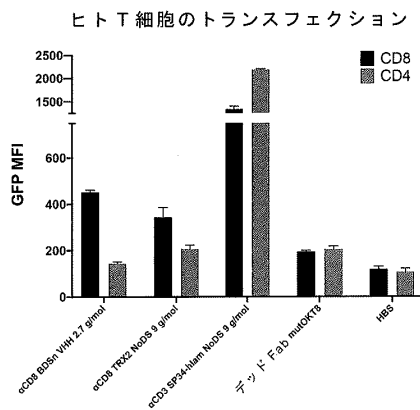
【図 7 3 A】



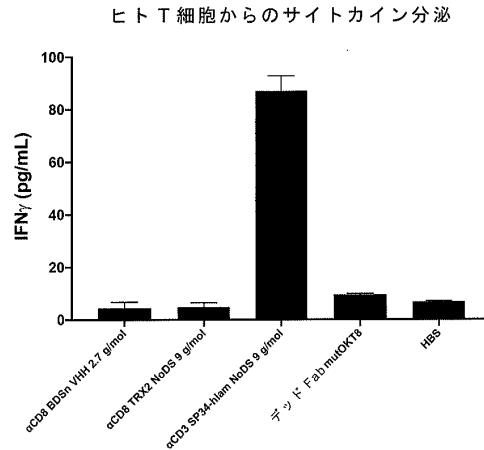
10

20

【図 7 3 B】



【図 7 3 C】



30

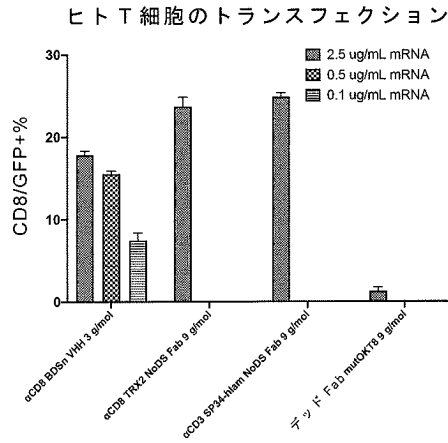
40

50

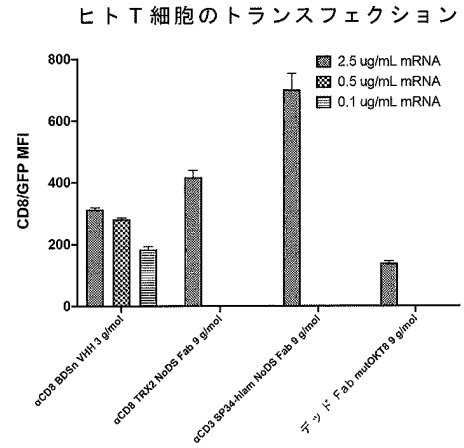




【図 7 8 A】

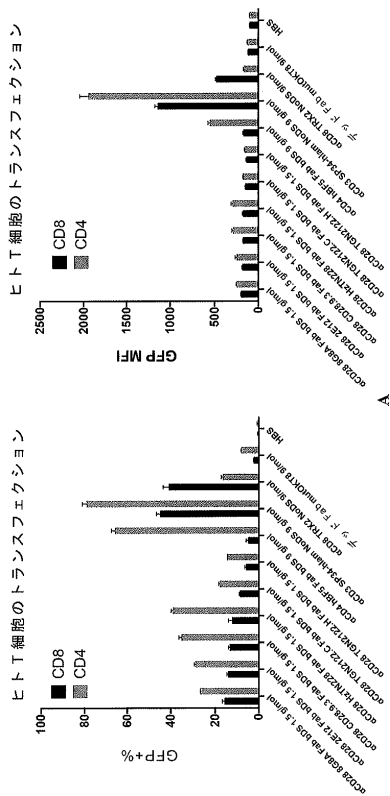


【図 7 8 B】



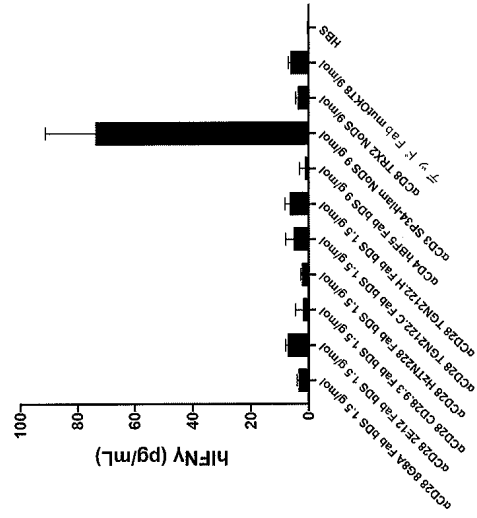
10

【図 7 9 - 1】



【図 7 9 - 2】

ヒト T 細胞からのサイトカイン放出



20

30

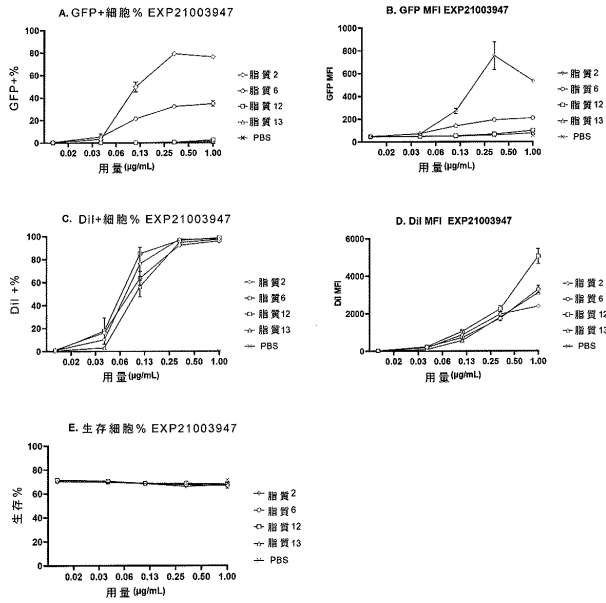
40

50

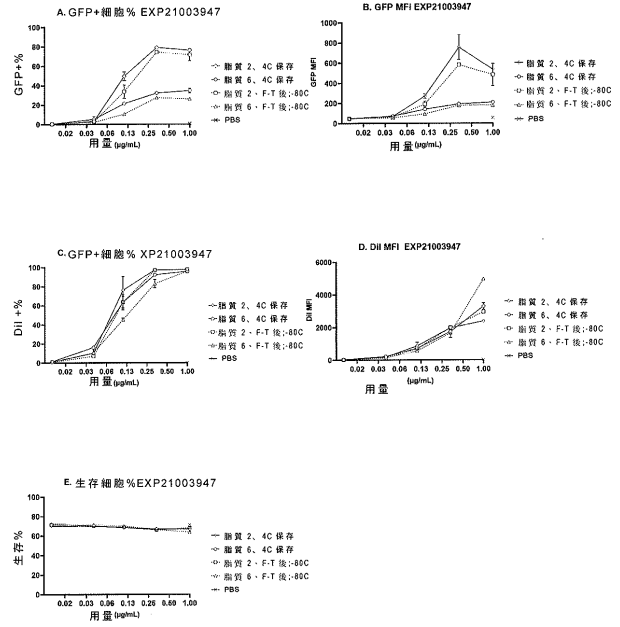




【図 8 4】



【図 8 5】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023552195000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
**PCT/US2021/072745**

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>INV. C12N15/88 A61K9/127</b><br><b>ADD.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                |                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                |                                                    |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br><b>A61K C12N</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                |                                                    |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                |                                                    |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br><b>EPO-Internal, WPI Data</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                |                                                    |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                |                                                    |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                             | Relevant to claim No.                              |
| <b>X</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>WO 2011/000106 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC [CA]; HEYES JAMES [CA] ET AL.)</b><br><b>6 January 2011 (2011-01-06)</b><br><b>claims; examples</b><br>----- | <b>1-170</b>                                       |
| <b>X</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>WO 2011/000107 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC [CA]; YAWORSKI ED [CA] ET AL.)</b><br><b>6 January 2011 (2011-01-06)</b><br><b>claims; examples</b><br>----- | <b>1-170</b>                                       |
| <b>A</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>WO 2016/176330 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; ACUITAS THERAPEUTICS INC [CA] ET AL.)</b><br><b>3 November 2016 (2016-11-03)</b><br><b>claims</b><br>-----       | <b>1-170</b>                                       |
| <b>X</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>EP 3 733 211 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICALS CO [JP])</b><br><b>4 November 2020 (2020-11-04)</b><br><b>claims; examples</b><br>-----                             | <b>1-170</b>                                       |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                |                                                    |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                |                                                    |
| Date of the actual completion of the international search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                | Date of mailing of the international search report |
| <b>6 April 2022</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                | <b>20/06/2022</b>                                  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                | Authorized officer<br><br><b>West, Nuki</b>        |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/072745

**Box No. 1**      **Nucleotide and/or amino acid sequence(s)** (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

10

20

30

40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2021/072745

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

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

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

10

20

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see additional sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims.; it is covered by claims Nos.:  
**1-170**

30

40

**Remark on Protest**

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

50

International Application No. PCT/US2021/072745

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-170

A lipid nanoparticle (NLP) comprising the following two components:

- (a) a conjugate containing an antigen bound to a lipid and
- (b) any ionizable cationic lipid

Furthermore, claims referring to methods of treatment employing such compositions are likewise within this invention

---

2. claims: 171-183

An immunoglobuline single variable domain as defined in claim 171. Methods making use thereof are also within this second invention

---

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/072745

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                                                                                                                                                 | Publication<br>date                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------|----|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 2011000106                             | A1 | 06-01-2011          | US 2012202871 A1<br>WO 2011000106 A1                                                                                                                                                                                                                       | 09-08-2012<br>06-01-2011                                                                                                                                                           |
| WO 2011000107                             | A1 | 06-01-2011          | CA 2767127 A1<br>EP 2449114 A1<br>ES 2613498 T3<br>IL 217278 A<br>IL 257382 A<br>JP 5766188 B2<br>JP 2012531469 A<br>US 2011076335 A1<br>US 2013122104 A1<br>US 2015374834 A1<br>US 2018071397 A1<br>US 2019240339 A1<br>WO 2011000107 A1                  | 06-01-2011<br>09-05-2012<br>24-05-2017<br>28-02-2018<br>01-06-2022<br>19-08-2015<br>10-12-2012<br>31-03-2011<br>16-05-2013<br>31-12-2015<br>15-03-2018<br>08-08-2019<br>06-01-2011 |
| WO 2016176330                             | A1 | 03-11-2016          | AU 2016253972 A1<br>AU 2020202322 A1<br>CA 2984125 A1<br>EP 3289083 A1<br>JP 2018526321 A<br>JP 2021138741 A<br>US 2018303925 A1<br>US 2022040285 A1<br>WO 2016176330 A1                                                                                   | 14-12-2017<br>23-04-2020<br>03-11-2016<br>07-03-2018<br>13-09-2018<br>16-09-2021<br>25-10-2018<br>10-02-2022<br>03-11-2016                                                         |
| EP 3733211                                | A1 | 04-11-2020          | AU 2018397910 A1<br>BR 112020013201 A2<br>CA 3087147 A1<br>CN 111542338 A<br>CO 2020008972 A2<br>EA 202091566 A1<br>EP 3733211 A1<br>JP WO2019131770 A1<br>KR 20200104360 A<br>SG 11202006033Y A<br>TW 201929868 A<br>US 2021052646 A1<br>WO 2019131770 A1 | 16-07-2020<br>01-12-2020<br>04-07-2019<br>14-08-2020<br>31-07-2020<br>18-09-2020<br>04-11-2020<br>24-12-2020<br>03-09-2020<br>29-07-2020<br>01-08-2019<br>25-02-2021<br>04-07-2019 |

## フロントページの続き

| (51)国際特許分類              | F I           | テーマコード (参考) |
|-------------------------|---------------|-------------|
| A 6 1 K 47/60 (2017.01) | A 6 1 K 47/60 |             |
| A 6 1 K 47/68 (2017.01) | A 6 1 K 47/68 |             |
| A 6 1 P 37/04 (2006.01) | A 6 1 P 37/04 |             |
| A 6 1 P 29/00 (2006.01) | A 6 1 P 29/00 |             |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |             |
| C 0 7 K 16/28 (2006.01) | C 0 7 K 16/28 |             |
| C 0 7 K 16/46 (2006.01) | C 0 7 K 16/46 |             |
| C 1 2 N 15/88 (2006.01) | C 1 2 N 15/88 | Z           |
| C 1 2 N 15/12 (2006.01) | C 1 2 N 15/12 |             |
| C 1 2 N 15/52 (2006.01) | C 1 2 N 15/52 | Z           |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | C 1 2 P 21/08 |             |

(32)優先日 令和3年4月1日(2021.4.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/169,395

(32)優先日 令和3年4月1日(2021.4.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/172,024

(32)優先日 令和3年4月7日(2021.4.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. T R I T O N

リート10

(72)発明者 オースティン・ウェイン・ボッシュ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02143・サマービル・オリーブ・スクエア4

(72)発明者 ダリル・クラーク・ドラモンド

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01773・リンカン・ブルックス・ロード1

(72)発明者 ウィリアム・クールマン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02144・サマービル・ウィロー・アベニュー96

(72)発明者 ウルリク・ニールセン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02171・クインシー・シカモア・ロード49

Fターム (参考) 4B064 AG27 CC24 DA01

4C076 AA19 AA65 AA95 BB11 CC50 DD15F DD15H DD49F DD49H DD63F  
DD63H DD70F DD70H EE23F EE23H EE59 FF16 FF21 FF36 FF43 FF654C086 AA01 AA02 AA10 EA16 MA02 MA05 MA24 MA38 MA66 NA13  
ZB02 ZB07 ZB11 ZB26

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 BA55 CA40 DA76 EA20 FA74