

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

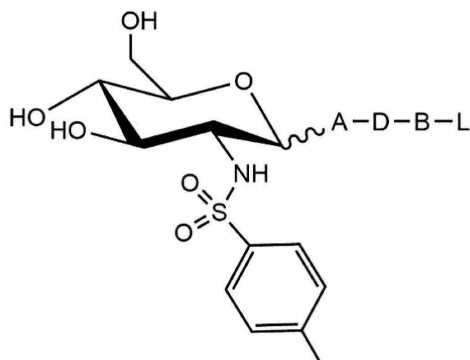
(11)特許番号  
特許第7566629号  
(P7566629)

(45)発行日 令和6年10月15日(2024.10.15)

(24)登録日 令和6年10月4日(2024.10.4)

|                             |                               |          |                         |       |
|-----------------------------|-------------------------------|----------|-------------------------|-------|
| (51)国際特許分類                  |                               | F I      |                         |       |
| A 6 1 K                     | 47/54 (2017.01)               | A 6 1 K  | 47/54                   | Z N A |
| A 6 1 K                     | 31/405 (2006.01)              | A 6 1 K  | 31/405                  |       |
| A 6 1 K                     | 31/7088 (2006.01)             | A 6 1 K  | 31/7088                 |       |
| A 6 1 K                     | 35/76 (2015.01)               | A 6 1 K  | 35/76                   |       |
| A 6 1 K                     | 38/16 (2006.01)               | A 6 1 K  | 38/16                   |       |
| 請求項の数 6 (全146頁) 最終頁に続く      |                               |          |                         |       |
| (21)出願番号                    | 特願2020-539755(P2020-539755)   | (73)特許権者 | 500449363               |       |
| (86)(22)出願日                 | 平成31年1月16日(2019.1.16)         |          | マックス・プランク・ゲゼルシャフト       |       |
| (65)公表番号                    | 特表2021-511321(P2021-511321 A) |          | ツール フェルデルンク デル ヴィッセ     |       |
|                             |                               |          | ンシャフテン エー. ファウ.         |       |
| (43)公表日                     | 令和3年5月6日(2021.5.6)            |          | ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 0 5 3  |       |
| (86)国際出願番号                  | PCT/EP2019/051055             |          | 9 ホフガルテンシュトラッセ 8        |       |
| (87)国際公開番号                  | WO2019/141731                 | (73)特許権者 | 520106862               |       |
| (87)国際公開日                   | 令和1年7月25日(2019.7.25)          |          | フンボルト - ウニヴェルズィテート ズ    |       |
| 審査請求日                       | 令和2年9月17日(2020.9.17)          |          | ベルリン                    |       |
| 審査番号                        | 不服2022-18297(P2022-18297/J 1) |          | HUMBOLDT-UNIVERSIT      |       |
|                             |                               |          | AT ZU BERLIN            |       |
| 審査請求日                       | 令和4年11月14日(2022.11.14)        |          | ドイツ 1 0 0 9 9 ベルリン ウンター |       |
| (31)優先権主張番号                 | 18152362.2                    |          | デン リンデン 6               |       |
| (32)優先日                     | 平成30年1月18日(2018.1.18)         |          | Unter den Linden 6,     |       |
| (33)優先権主張国・地域又は機関           |                               |          | 1 0 0 9 9 Berlin, (DE)  |       |
| 最終頁に続く                      |                               | 最終頁に続く   |                         |       |
| (54)【発明の名称】 ランゲリン+細胞ターゲティング |                               |          |                         |       |

## 【化 1】



10

A-D-B-Lは、スペーサーA-D-Bおよび上記式のグルコース誘導体を上記担体と連結するリンカーLからなり、

Aは、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-\text{シクロヘキセン}-$ 、および $-\text{トリアゾール}-$ からなる群から選択され、

Bは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(R^{c1})(R^{c2})-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R^{c1})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(R^{c1})=N-$ 、 $-N=N-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R^{c1})-$ 、 $-N(R^{c1})C(O)-$ 、 $-N(R^{c1})C(O)N(R^{c2})-$ 、 $-N(R^{c1})C(S)N(R^{c2})-$ 、 $-N(R^{c1})C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^{c1})-$ 、 $-\text{シクロヘキセン}-$ および $-\text{トリアゾール}-$ からなる群から選択され、

20

$R^{c1}$ および $R^{c2}$ は、水素、置換または非置換の $C_1-C_8$ アルキル、 $C_2-C_8$ アルケニル、 $C_3-C_8$ シクロアルキル、 $C_3-C_8$ アルキルシクロアルキル、 $C_6-C_8$ アリール、 $C_6-C_8$ アルキルアリール、 $C_6-C_8$ ヘテロアリール、および $C_6-C_8$ アルキルヘテロアリールからなる群から独立して選択され、

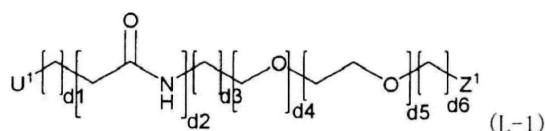
Dは、 $-(CH_2)_c-(CH_2-O)_{c1}-(CH_2-CH_2-O)_{c2}-(CH_2)_{c3}-$ であり、

$c$ 、 $c1$ 及び $c2$ は、 $0 \sim 20$ から選択される整数であり、 $c3$ は $1 \sim 20$ から選択される整数であり、

上記リンカーLは、以下の一般式(L-1)のリンカーであり、

30

## 【化 2】



式中、

$U^1$ は、Bを介してスペーサーDと連結された基であり、 $U^1$ は、 $-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、または $-C \equiv C-$ からなる群から選択され、

$Z^1$ は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^d)-$ 、 $-C(R^d)(R^e)-$ 、 $-R^dC=CR^e-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(O)N(R^d)-$ 、 $-N(R^d)C(O)-$ 、 $-N(R^d)C(O)N(R^e)-$ 、 $-N(R^d)C(S)N(R^e)-$ 、 $-N(R^d)C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^d)$ 、 $-\text{シクロヘキセン}-$ 、 $-\text{トリアゾール}-$ 、 $-NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-OP(O)(H)O-$ 、または $-OP(O)(OH)O-$ からなる群から選択された部分であり、

40

$R^d$ および $R^e$ は、水素、置換または非置換の $C_1-32$ アルキル、 $C_2-32$ アルケニル、 $C_3-8$ シクロアルキル、アリール、 $C_1-C_8$ アルキルアリール、ヘテロアリール、 $C_1-C_8$ アルキルヘテロアリールからなる群から独立して選択され、

$d1$ から $d5$ はそれぞれ0から50までの整数であり、 $d6$ は1から50までの整数であり、

上記複合体は、 $Z^1$ を介して上記担体、または上記担体の一部に直接的に共有結合的に

50

結合し、

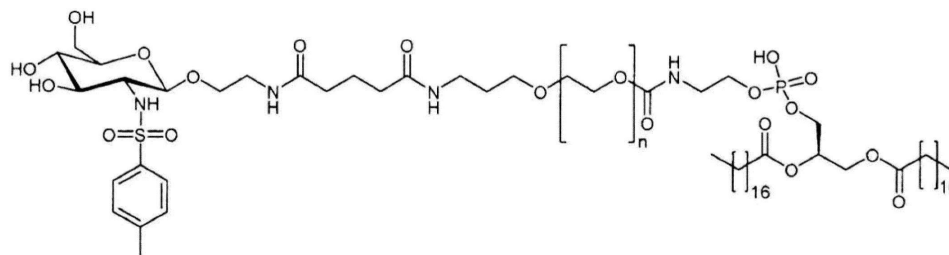
上記担体の上記一部は、脂質、リン脂質、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)、膜脂質、修飾ホスファチジルコリン、およびコレステロールからなる群から選択され、

上記担体は、薬学的に活性なカーゴおよび任意で薬学的に許容される担体物質もしくは薬学的アジュバントを含むかまたはそれらに結合する、医薬組成物。

【請求項2】

上記複合体は、軟質粒子担体の一部に結合して、以下の構造(II)になる、請求項1に記載の医薬組成物：

【化3】



(II)

式中、nは0～150の整数である。

【請求項3】

上記カーゴは、上記担体内に配置され、かつ／または、上記担体の外部に連結され、かつ／または、上記担体の単一層構造または二重層構造に組み込まれる、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

ランゲリン<sup>+</sup>細胞への標的化カーゴの送達のための添加剤をさらに含む、請求項1～3の何れか一項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

上記カーゴは、小分子、ペプチド、タンパク質、細胞傷害性物質、核酸、染料、放射性核種、ウイルスベクター、接種物、プラスミドおよび／またはさまざまな成分を含むゲノム編集系等の多成分系からなる群から選択される、または、

上記カーゴは、薬学的に活性な化合物または免疫学的に活性な化合物である、または上記カーゴは、

(i) 癌抗原もしくはエピトープを含むか、

(ii) 自己免疫疾患抗原もしくはエピトープを含むか、

(iii) 細菌抗原もしくはエピトープを含むか、

(iv) ウイルス抗原もしくはエピトープを含むか、

(v) 寄生性抗原もしくはエピトープを含むか、あるいは

(vi) アレルゲンもしくはアレルゲンのエピトープを含む、

請求項1～4の何れか一項に記載の医薬組成物。

【請求項6】

上記医薬組成物は、癌、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染、もしくは移植片対宿主病、局所性もしくは全身性の炎症、アレルギーの、治療もしくは予防に用いるか、または減感作のために用いる、請求項1～4の何れか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔発明の技術分野〕

本発明は、ランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティング（標的化）のためのビヒクルの使用であって、上記ビヒクルは、ランゲリン<sup>+</sup>細胞に特異的に結合することができ、上

10

20

30

40

50

記ビヒクルは、(a) 少なくとも1つの担体および(b) ランゲリン<sup>+</sup>細胞への標的化カーゴの送達のための少なくとも1つの糖類(saccharide)部分に基づいた複合体を含む使用に関する。本発明はまた、対応する医薬組成物および診断組成物、ならびに上記の進歩性のあるビヒクルを伴う使用および上記ビヒクルを伴う方法に関する。

【0002】

〔発明の背景技術〕

皮膚は、脊椎動物を被覆する軟組織である。哺乳類では、皮膚は、防水を提供し、感染に対するバリアとして働く表皮を含む外胚葉組織の多層を含む外皮系の器官であり、真皮は、プロテオグリカンおよび絡み合ったコラーゲンおよび弾性繊維を含む細胞外マトリックスを生成する線維芽細胞からなる細胞希薄層であり、両方の層は、基底膜、真皮と表皮との間の細胞および分子の輸送を制御し、リモデリングまたは修復プロセスに必要な因子を提供する繊維のシートによって分離される。したがって、皮膚は、外界と繋がっているため、物理的応力だけでなく、化学物質、細菌、および病原体を含む様々な環境抗原にも曝される。

【0003】

従って、皮膚免疫系は、多様な抗原を検出および識別するために調製されなければならない。寛容原性または防御免疫応答のような適切な反応を誘導することができなければならない。この機能を果たすために、皮膚は、免疫応答の重要な制御因子を表す樹状細胞(DC)の不均一集団を含む。樹状細胞は一般に、自然免疫と適応免疫の相互作用を調整する抗原提示細胞の集団と規定され、一次免疫応答を誘導できる唯一の細胞である。したがって、DCは、免疫療法ストラテジーにおける興味深い標的である。いくつかのDCの型は、ヒトにおいて表れており、それらの組織分布に従って分類することができる。これらのDCの型のいくつかは、MHC-Iを介して外因性腫瘍関連の抗原を交差提示し、未感作CD8<sup>+</sup>T細胞を効率的にプライミングする能力が認められている。皮膚樹状細胞は、侵入する病原体から宿主を保護するのに重要な働きをするが、付随的組織損傷も制限する。さらに、それらは、アレルギー性接触皮膚炎および乾癬のような慢性免疫媒介性炎症性疾患に至る末梢性トレランスの破綻と関連する(Clausen and Stoitzner, 2015, Frontiers in Immunology, 6, Article 534)。

【0004】

DCは、従来のDCおよび形質細胞様DC(pDC)に細分することができる。健康な皮膚においては、I型インターフェロンによって創傷治癒を促進するかまたは例えば乾癬時のTLR7刺激後に起きる炎症誘発性反応を媒介するために炎症皮膚に入るだけのpDCが全くないかまたは非常に少ない。定常状態において、皮膚中に存在する従来のDCは、通常不活性ではないが、未成熟細胞として、侵入する病原体を求めて自身の環境を絶えず探索し、自己および環境抗原を連続的にサンプリングする。成熟すると、DCは、皮膚流入リンパ節に遊走し、周囲のケラチノサイトから離れる。局所リンパ節のT細胞領域への遊走中に、細胞は、抗原特異的未感作T細胞の認識および相互作用のために、MHC/ペプチド複合体の表面発現をアップレギュレートする。中枢寛容を免れた潜在的自己反応性T細胞、または無害な外来抗原由来のペプチドを認識するT細胞と遭遇すると、これらのDCは、T細胞アネルギーまたは欠失T細胞寛容(寛容化機能)を誘導する。

【0005】

さらに、リンパ器官におけるDCのT細胞スキャンニング中、すなわち同族抗原がないときに頻繁にT細胞とDCが接触することによって、その後の炎症時の外来抗原との遭遇に対する速応性に必要なT細胞の基礎活性化レベルが誘導される。病原体侵入は、炎症誘発性シグナルとともに、通常、皮膚樹状細胞の完全な機能的成熟を促す。恒常的分化プログラム以外にも、細胞は、現在では、共刺激分子、特に、炎症誘発性サイトカインの発現もアップレギュレートしている。これらは共に、未感作抗原特異的T細胞のクローンの増大を促進し、侵入する病原体(感作機能)を除去するように特異的に調整された適切なエフェクター機能を獲得するようにT細胞に指示する。したがって、末梢における未成熟DCは、センチネル機能を有し、抗原捕捉、抗原プロセッシングおよびペプチド-MHC結合が

可能である。それらはまた、遊走機能を有し、リンパ節への抗原輸送に備える。そこで、DC-T細胞相互作用は、高表面MHC-IおよびI E /ペプチド複体をもたらし、最終的には、Th1 / Th2 / Th17指令、またはT細胞欠失およびアネルギーまたは細胞傷害性Tリンパ球（CTL、Tキラー細胞）活性化をもたらす。

#### 【0006】

最新の報告（Doebel et al., 2017, Trends Immunol, 38, 11, 817-828）によれば、皮膚中の樹状細胞の群は、いくつかのDCサブセットに細分することができる。樹状細胞は、表皮ランゲルハンス細胞（LC）と真皮DCのいずれでもよい。真皮DCは、ランゲリン<sup>+</sup>およびランゲリン<sup>-</sup>サブタイプ、すなわち、それらの表面にC型レクチンランゲリン（CD207としても知られる）を発現するか、またはそれを発現しない細胞を構成する。ランゲリン<sup>+</sup>真皮DCはさらに、CD103、すなわち、インテグリンアルファE（ITGAE）の発現に従って、CD103<sup>+</sup>およびCD103<sup>-</sup>群（Yamazaki and Morita, 2013, Frontiers in Immunology, 4, Article 151）に細分される。サブセットへのさらなる分割は、DCをランゲリン<sup>+</sup>CD11b<sup>low</sup>、ランゲリン<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>、およびランゲリン<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>集団と規定する（Yamazaki and Morita, 2013, Frontiers in Immunology, 4, Article 151）。

#### 【0007】

ランゲリンは、病原体および自己会合したグリカンならびにヘパリン様オリゴ糖の両方のCa<sup>2+</sup>依存型認識に関与することが知られている（Munoz-Gracia et al., J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 12, 4100-10）。さらに、ランゲリンは、ケラタン硫酸を含むグラクトース（glactose）-6-硫酸化オリゴ糖等のグリカンに結合する（Tateno et al., Journal of Biological Chemistry, 2010, 283, 9, 6390-6400）。ランゲリンは、主に皮膚において、特定のDCサブタイプに高度に制限された発現プロファイルを示すため、ワクチン開発または新規免疫療法の確立のための魅力的な標的を表す。

#### 【0008】

したがって、皮膚は、全身性反応の可能性を有する、針を使用しないワクチンまたは薬物の局所投与を可能にする、最上層中に存在するDCを発現するランゲリンのおかげで、ワクチンまたは他の免疫療法用の特に魅力的な入口点である。潜在的に追跡可能なストラテジーには、癌ワクチン、ウイルスもしくは細菌感染に対する予防ワクチン、アレルギーに対する免疫療法の提供、ループスのような自己免疫疾患の治療、または皮膚移植との関連における再生へのアプローチの使用が含まれる。

#### 【0009】

しかしながら、C型レクチンの糖質結合部位は、高度に溶媒曝露され、親水性であるため、ランゲリン<sup>+</sup>DCを特異的に標的とすることは困難である。その結果、モノおよびオリゴ糖との相互作用は、通常、ミリモル範囲の低親和性によって特徴付けられる。さらに、個々のC型レクチンがいくつかのモノまたはオリゴ糖に結合し、その逆もまた同様であるため、認識プロセスは非常に乱雑である。これに関連して、Aretzら、2014は、21のX線構造の構造ベースのインシリコ解析がC型レクチンのアンドラッグブルまたは困難な標的としての分類を裏付けたと述べている。糖質結合部位に隣接するドラッグブルな二次結合ポケットは、限られた治療的関連性のC型レクチンについて排他的に特定された（Aretz et al., 2014, Front Immunol, 5, Article 323）。他方、前駆樹状細胞が患者から単離され、エキスピボで分化され、その後SPIO粒子を負荷したエキスピボ法に基づく成功法がある（Verdijk et al., 2006, Int. J. Cancer, 120, 978-984）。しかしながら、この設定は、特に、注射部位から標的組織への細胞遊走がない、かつ、細胞分化が乏しいため、高コストおよび低効能の難点がある。さらなる代替の方法は、抗体の使用に基づく。例えば、Flacher et al., 2010, Journal of Investigative Dermatology, 130, 755-762には、表皮ランゲルハンス細胞におけるランゲリン標的化抗体からの抗原の提示の捕捉が記載されている。しかし、抗体は、エンドサイトーシス後に受容体からそれ自体溶解しないため、細胞の吸収能力を制限し得る。さらに、抗体の高親和性のために、抗体はまた、受容体の発現が非常に低い状態で細胞に結合し得る。

## 【0010】

したがって、特に皮膚において、ランゲリン<sup>+</sup>樹状細胞を効果的に標的化することを可能にし、さらに、物質、例えば抗原の細胞内への作用的かつ信頼性のある侵入およびその後の処理に備えるアプローチが必要である。

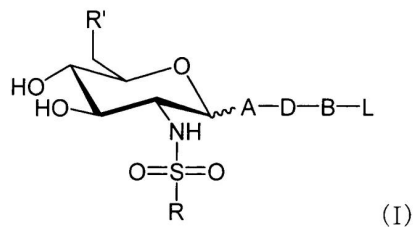
## 【0011】

## 〔発明の概要〕

本発明は、これらの必要性に対処し、ランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティングのためのビヒクルの使用であって、上記ビヒクルは、ランゲリン<sup>+</sup>細胞に特異的に結合することができ、上記ビヒクルは、ランゲリン<sup>+</sup>細胞への標的化カーゴの送達のための、(a) 少なくとも1つの担体および(b) 一般式(I)の少なくとも1つの複合体を含み、

## 【0012】

## 【化1】



(I)

式中、

(i) Rは、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、C<sub>1</sub>–C<sub>8</sub>アルキルシクロアルキル、アリール、C<sub>1</sub>–C<sub>8</sub>アルキルアリール、ヘテロアリール、C<sub>1</sub>–C<sub>8</sub>のアルキルヘテロアリール、ビアリール、およびC<sub>1</sub>–C<sub>8</sub>アルキルビアリールからなる群から独立して選択され、

置換基は、N(R<sup>a</sup>)(R<sup>b</sup>)、–OR<sup>a</sup>、–SR<sup>a</sup>、–C(O)R<sup>a</sup>、–C(O)OR<sup>a</sup>、–C(O)N(R<sup>a</sup>)(R<sup>b</sup>)、–N(R<sup>a</sup>)C(O)R<sup>b</sup>、–N(R<sup>a</sup>)S(O)<sub>2</sub>R<sup>b</sup>、–OS(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>、ハロゲン、–NO<sub>2</sub>、–CN、–NC、–N<sub>3</sub>、–NCO、–OCN、–NCS、–SCN、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、およびヘテロアリールからなる群から独立して選択され、

R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は、水素、置換または非置換のC<sub>1</sub>–8アルキル、C<sub>2</sub>–8アルケニル、C<sub>2</sub>–8アルキニル、C<sub>3</sub>–6シクロアルキル、アリール–C<sub>1</sub>–5アルキル、ヘテロアリール–C<sub>1</sub>–5アルキル、アリール、ヘテロアリールからなる群から独立して選択され、

(ii) R'は、–OR<sup>a</sup>、および–NHS(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>からなる群から独立して選択され、

R<sup>a</sup>は、上記のように規定され、

(iii) A–D–B–Lは、式(I)のグルコース誘導体を上記担体または上記担体の一部に共有結合的に結合するリンカー基であることを特徴とする使用を提供する。

## 【0013】

本発明者らは、驚くべきことに、上述のような上記ビヒクルがランゲリン<sup>+</sup>細胞に特異的に結合し、カーゴ、すなわちさまざまな大きさおよび性質の物質をランゲリン<sup>+</sup>細胞に効果的に送達し、その結果、その表面上に内在化物質(例えば、抗原)を提示し得ることを見出した。ランゲリンは、受容体媒介のエンドソーム区画への粒子の取り込みに特に適しており、これにより、標的細胞の表面上でのMHC–I分子を介する抗原の交差提示のおかげで、癌および抗ウイルス療法に適したCD8<sup>+</sup>T細胞免疫応答が可能になる。実際、C型レクチンランゲリンに適切に結合するリガンド構造の開発が本発明の主な課題であった。実際、糖結合タンパク質であるランゲルハンス細胞特異的マーカー、ランゲリンの結合部位のアドレッシングは、Ernst and Magnani, 2009, Nat Rev Drug Disc, 8(8), 661-77において糖質結合タンパク質全般について報告されているように、これまで薬物

様化合物の複雑な構造および低入手可能性が主な原因で失敗してきた。細胞のエンドソーム区画における結合ポケットの正しい選択およびそれに関連するカーゴの放出のメカニズムが成功の必須要因であった。本発明者らはさらに、カーゴが細胞内の酸性度およびカルシウム濃度の影響を受けて放出されると、受容体により多くの粒子を細胞内に有利にもたらしることができることを見出した。現在提供されているランゲリンリガンドは、上記のビヒクルの一部として、耐久性、拡張性、合成容易性、標的受容体に対する十分な親和性および特異性、ならびに担体との望ましくない相互作用（例えば、表面凝集）を回避するための十分な親水性の基準を満たすための合理的なリガンドデザインから出現した。コンピュータ支援の方法、ならびにフラグメント創薬の革新的な方法を用いて、本明細書に記載のリガンド構造に到達した。

10

#### 【0014】

ランゲリン<sup>+</sup>細胞へのカーゴ送達アプローチにおいて上記の有利なリガンドを使用することによって、初めて、標的化された経皮投与および皮内投与の使用が可能になり、これは、（ニードルフリー（無針）適用性のために）患者の薬剤服用順守を有意に増加させ、同時に、より安価なワクチンを可能にする。特殊化した樹状細胞を特異的にターゲティングすることによって、現在では、例えば治療または予防ワクチンとして導入されたカーゴに対してインビボで免疫応答を開始することができ、または例えば末梢または中枢寛容誘導による免疫応答を減少させることができる。別の有利な用途は、いくつかの自己免疫疾患およびランゲルハンス細胞組織球症、すなわち、ランゲルハンス細胞における癌性変化において表れるような、調節解除されたランゲルハンス細胞機能の直接変調である。したがって、例えば、有効成分が意図した樹状細胞に到達しておらず、免疫細胞に意図せずに含まれることによって望ましくない副作用さえも引き起こした可能性があるため、その複雑性がワクチン接種アプローチの効能をしばしば低下させた、いくつかの競合する細胞群を典型的に含む、従来のある皮膚の環境は、今や、免疫学および医学的手術の最高かつ非常に魅力的な領域となっている。

20

#### 【0015】

加えて、革新的なリガンド含有複合体と担体との結合に基づいて実施される本発明の多角的なカーゴ-担体コンセプトにより、様々な異なる物質（カーゴ）をランゲリン<sup>+</sup>細胞に導入することができる。したがって、従来技術に記載されているように、抗体に結合したタンパク質だけでなく、核酸等の物質、例えばDNAまたはRNA、グリコシル化成分、刺激剤、独立したペプチド、または任意の低分子化合物もまた、細胞に導入することができる。これにより、細胞および免疫変調ならびに免疫応答の誘発に関して、多様性が大幅に増大する。さらに、それは、異なる分子の同時送達を可能にするため、適応免疫系の異なるアーム、すなわち、抗体および細胞傷害性Tリンパ球を同時に調節し得る唯一のシステムである。

30

#### 【0016】

さらに、本発明のカーゴ-担体コンセプトは、ビヒクル（リガンド複合体+担体）およびカーゴの高い柔軟性および適応性を必要とする。これは、結果として、製品開発時の迅速かつ費用効果の高い適応および最適化の選択肢をもたらす。抗体ベースのシステムのような他のシステムは、柔軟性が低く、開発および製造時間が長いため、高コストを発生させる。したがって、経皮投与と組み合わせた標的送達は、薬物量を減少させることによって効率性および安全性を増大させるだけでなく、より良好な投薬および全身薬物投与の回避を可能にする。さらに、本発明の主題は、有害な抗体応答を誘導することなく、治療選択肢の提供を可能にする。また、本発明によって想定されるアジュバントおよび抗原の同時投与は、免疫系の全身活性化を回避することを可能にする。さらに、本発明は、同じまたは異なる標的についての異なるカーゴの組み合わせを可能にし、これにより、異なる経路を通して免疫応答の変調を増幅することができる。

40

#### 【0017】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した上記発明のビヒクルは、上記一般式（I）を有し、R'は、-OH、-OCH<sub>3</sub>、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、または-

50

NHS (O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>である。

【0018】

別の好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、R' は、-OH、または-NHS (O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>である。

【0019】

さらに好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、R' は、-OH、-NHS (O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>またはN-トシルである。

【0020】

さらに別の好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、R' は、-OHである。

【0021】

より一層好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、R は、置換または非置換のアルキル、シクロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルシクロアルキル、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルアリール、ヘテロアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルヘテロアリール、ビアリール、およびC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルビアリールからなる群から独立して選択される。

【0022】

別の好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、R は、置換または非置換のC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>シクロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>シクロアルキル、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アリール、ヘテロアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルヘテロアリール、ビアリール、およびC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルビアリールからなる群から独立して選択される。

【0023】

特に好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、R は、置換または非置換のシクロヘキシル、フェニル、ベンジル、ビフェニル、ピリジル、およびオキサゾリルからなる群から独立して選択される。

【0024】

さらに別の好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、R は、置換または非置換のフェニルである。

【0025】

特に好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、Rの置換基は、-N(R<sup>a</sup>)(R<sup>b</sup>)、-OR<sup>a</sup>、-SR<sup>a</sup>、-C(O)R<sup>a</sup>、-C(O)OR<sup>a</sup>、-C(O)N(R<sup>a</sup>)(R<sup>b</sup>)、-N(R<sup>a</sup>)C(O)R<sup>b</sup>、-N(R<sup>a</sup>)S(O)<sub>2</sub>R<sup>b</sup>、-OS(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>、ハロゲン、-NO<sub>2</sub>、-CN、-NC、-N<sub>3</sub>、-NCO、-OCN、-NCS、-SCN、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、およびヘテロアリールからなる群から独立して選択され、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は、水素およびC<sub>1</sub>-2アルキルからなる群から独立して選択される。

【0026】

別の好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、Rの置換基は、-NH<sub>2</sub>、-OH、-OCH<sub>3</sub>、-C(O)CH<sub>3</sub>、-NHC(O)CH<sub>3</sub>、-F、-Cl、-Br、-NO<sub>2</sub>、-CN、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルおよびフェニルからなる群から独立して選択される。

【0027】

さらに好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、上記フェニルは、一置換、二置換、または三置換されており、上記フェニルの置換基は、-NH<sub>2</sub>、-OH、-OCH<sub>3</sub>、-C(O)CH<sub>3</sub>、C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHCCH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OH-NHC(O)CH<sub>3</sub>、-F、-Cl、-Br、-NO<sub>2</sub>、-CN、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、ナフチルおよびフェニルからなる群から独立して選択される。

【0028】

別の好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、

10

20

30

40

50

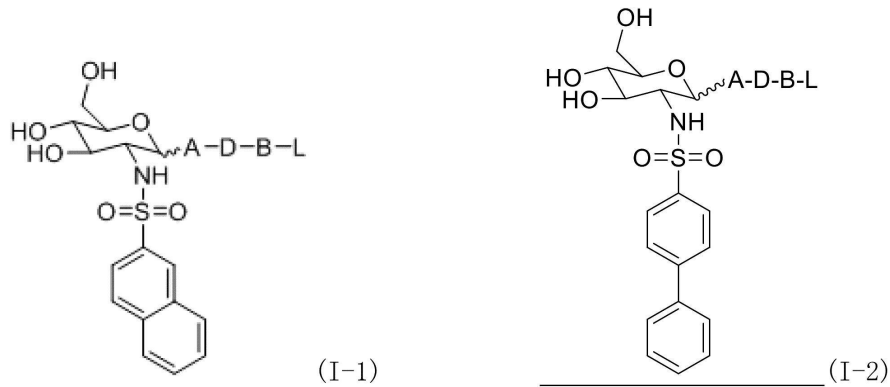
上記フェニルは、パラ位で一置換されており、上記フェニルの置換基は、 $-\text{NHCOCH}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_3$  およびフェニルからなる群から独立して選択される。

【0029】

さらに別の好ましい実施形態では、上述のような上記複合体は、以下の一般式（I-1）または（I-2）の複合体である。

【0030】

【化2】



10

より一層好ましい実施形態では、上述のような上記複合体は、以下の式（I-3）～（I-15）のうちのいずれか1つの複合体である。

20

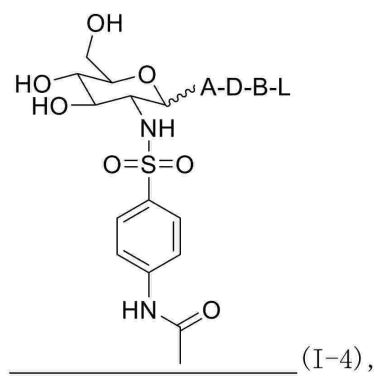
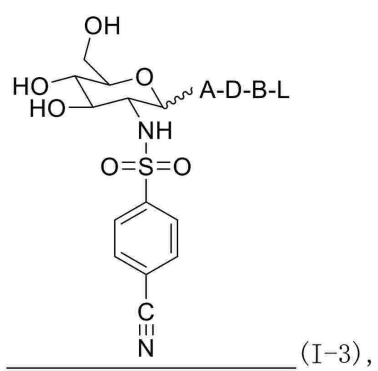
【0031】

30

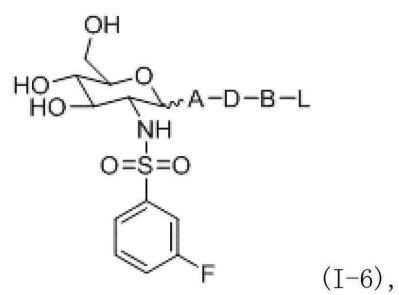
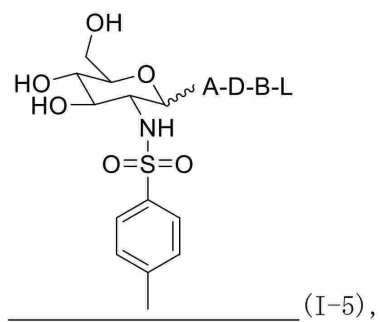
40

50

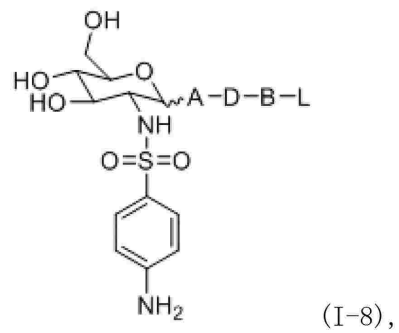
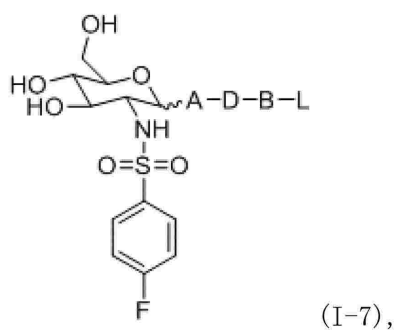
## 【化 3】



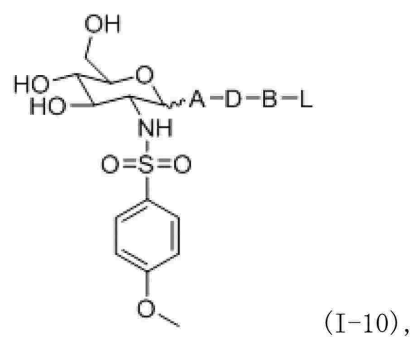
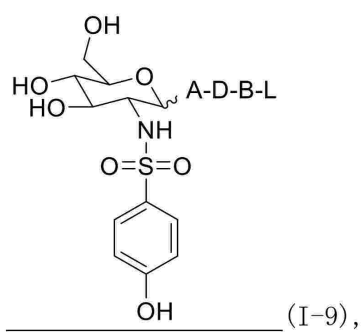
10



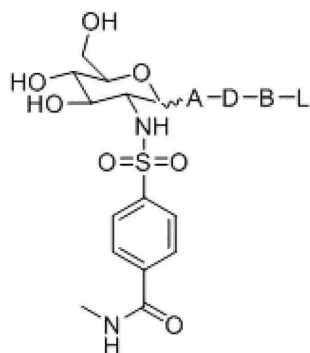
20



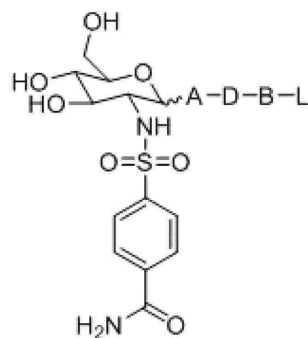
30



40

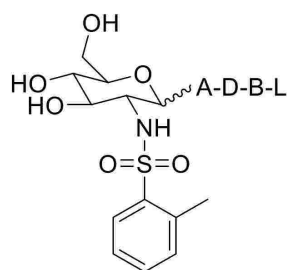


(I-11),

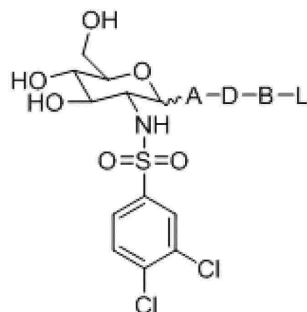


(I-12),

10

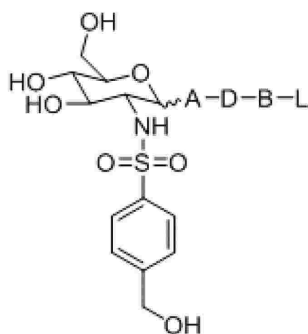


(I-13),



(I-14), または

20



(I-15).

30

特に好ましい実施形態では、上述のような上記 A-D-B-L リンカー基は、スペーサー A-D-B および上記グルコース誘導体を上記担体と連結するリンカー L からなる群である。上記リンカー L は、合成ポリマーもしくは天然ポリマーのうちの 1 つ以上またはそれらのポリマーもしくはそれらの組み合わせの 1 つ以上の単一ユニットを含むことが特に好ましい。

#### 【0032】

本発明のさらに好ましい実施形態によれば、上述のような上記合成ポリマーは、飽和および不飽和炭化水素ポリマー；ポリアミン；ポリアミド；ポリエステル；ポリエーテル、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール；ブロックコポリマー、およびポロキサマーからなる群から選択される。

40

#### 【0033】

本発明の別の好ましい実施形態群によれば、上述のような上記天然ポリマーは、糖質、修飾糖質、ペプチド、修飾ペプチド、脂質および修飾脂質からなる群から選択される。

#### 【0034】

特に好ましい実施形態では、上述のような本発明の上記ビヒクルは、上記一般式 (I) を有し、

D は、一般式 (D-1) の A および B と連結されたスペーサーであり、

A - (CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub> - (CH<sub>2</sub>-O)<sub>c1</sub> - (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>c2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>c3</sub> - B (D-1)

式中、

50

Dは、Bを介して上記リンカーLに連結され、Bは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(R^{c1})$   
 $(R^{c2})-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R^{c1})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(R^{c1})=N-$ 、 $-$   
 $N=N-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)N(R^{c1})-$ 、 $-N(R^{c1})$   
 $C(O)-$ 、 $-N(R^{c1})C(O)N(R^{c2})-$ 、 $-N(R^{c1})C(S)N(R^{c2})$   
 $-$ 、 $-N(R^{c1})C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^{c1})-$ 、 $-シクロヘキセン-$ お  
 よびトリアゾール-からなる群から選択され、

$R^{c1}$ および $R^{c2}$ は、水素、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、  
 シクロアルキル、 $C_1-C_8$ アルキルシクロアルキル、アリール、 $C_1-C_8$ アルキルアリ  
 ール、ヘテロアリール、および $C_1-C_8$ アルキルヘテロアリールからなる群から独立し  
 て選択され、

10

Dは、Aを介して上記グルコース誘導体に連結され、Aは、 $-OCH_2-$ 、 $-S-$ 、  
 $-NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-シクロヘキセン-$ およびトリアゾール  
 -からなる群から選択され、

cは0~20から選択される整数であり、c1は0~20から選択される整数であり、  
 c2は0~20から選択される整数であり、c3は1~20から選択される整数であり、  
 Aが $CH_2$ である場合、c3は0~20から選択される整数である。

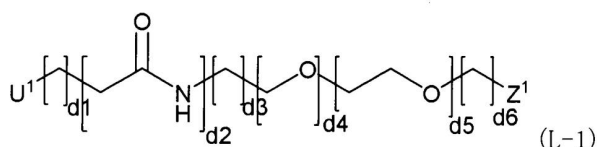
【0035】

さらに好ましい実施形態では、上述のような上記ビヒクルは、上記一般式(I)を有し  
 、リンカーLは、以下の一般式(L-1)のリンカーであり、

【0036】

20

【化4】



式中、

$U^1$ は、Bを介してスパーサーDと連結された基であり、 $U^1$ は、 $-CH_2-$ 、 $-CH=$   
 $CH-$ 、または $-C\equiv C-$ からなる群から選択され、

30

$Z^1$ は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^d)-$ 、 $-C(R^d)(R^e)-$ 、 $-R^dC=CR^e$   
 $-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(O)N(R^d)-$ 、 $-N(R^d)C(O)-$ 、 $-N(R^d)C(O)N(R^e)-$ 、 $-N(R^d)C$   
 $(S)N(R^e)-$ 、 $-N(R^d)C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^d)$ 、 $-シクロヘキ$   
 $セン-$ 、 $-トリアゾール-$ 、 $-NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-OP(O)(H)$   
 $O-$ 、または $-OP(O)(OH)O$ からなる群から選択された上記担体に上記リンカー  
 を結合する部分であり、

$R^d$ および $R^e$ は、水素、置換または非置換の $C_1-C_8$ アルキル、 $C_2-32$ アルケニ  
 ル、 $C_3-8$ シクロアルキル、アリール、 $C_1-C_8$ アルキルアリール、ヘテロアリール、  
 $C_1-C_8$ アルキルヘテロアリールからなる群から独立して選択され、

40

d1からd5はそれぞれ0から50までの整数であり、d6は1から50までの整数で  
 ある。

【0037】

より一層好ましい実施形態では、上述のような上記A-D-B-Lリンカー基は、主鎖  
 に含まれる炭素原子、窒素原子および酸素原子の総数が少なくとも4である分子鎖である。

【0038】

本発明のさらなる実施形態では、上述のような上記A-D-B-Lリンカー基は、主鎖  
 に含まれる炭素原子、窒素原子および酸素原子の総数が4原子から600原子である。

【0039】

さらに別のさらに好ましい実施形態では、上記A-D-B-Lリンカー基は、約0.4

50

nmから約400 nmの主鎖の長さを有する分子鎖である。

【0040】

さらに好ましい実施形態では、本明細書において上述した上記ビヒクルは、少なくとも1つの担体を含み、上記少なくとも1つの担体は、軟質粒子である。

【0041】

別の好ましい実施形態では、上記軟質粒子は、リポソーム、ノイソーム (noisome)、ミセル、sequeosome (商標)、およびトランスフェロソームからなる群から選択され、上記複合体は、 $Z^1$ を介して上記軟質粒子の一部に直接的に結合し、上記軟質粒子の上記一部は、脂質、リン脂質等の修飾脂質、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン (D S P E)、膜脂質、または修飾ホスファチジルコリン

10

【0042】

さらなる実施形態では、上記軟質粒子は、1種以上の脂質を含む、リポソーム等の軟質粒子であってもよい。一実施形態では、上記複合体は、上記リポソームの一部を形成する、任意の型の脂質等の上記軟質粒子の一部に結合していてもよい。

【0043】

別の実施形態では、複合体に結合した脂質および複合体に結合していない脂質は、約1:15、1:20、1:25、1:50、1:100、1:150、1:200、好ましくは1:20の特定の比率を有する。

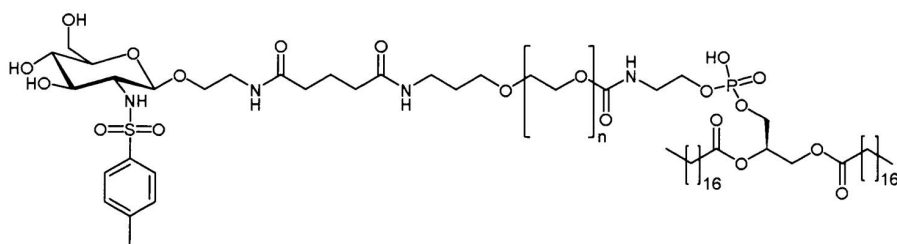
【0044】

特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した本発明の上記複合体は、軟質粒子担体の一部に結合して以下の式 (II) になる。

20

【0045】

【化5】



(II)

30

式中、 $n$ は0~150の整数である。

【0046】

さらに好ましい実施形態では、上記少なくとも1つの担体は、ナノ粒子、ペプチド、タンパク質、毒素、デンドリマー、フラーレンおよびカーボンナノチューブからなる群から選択され、上記複合体は、 $Z^1$ を介して上記担体に直接的に結合し、または、上記複合体は、 $Z^1$ を介して上記担体の追加のスペース要素に結合している。

40

【0047】

別の好ましい実施形態では、上記追加のスペース要素は、例えば、本明細書において上記に規定した天然または合成ポリマーである。

【0048】

さらに別の好ましい実施形態では、上記リポソームは、二重層リン脂質リポソームである。特に好ましい実施形態では、上記リポソームは、30~250 nmの大きさを有する。

【0049】

さらに好ましい実施形態では、上記リポソームは、追加成分を含むかまたはそれに結合する。上記追加成分は、コレステロールであることが特に好ましい。ある実施形態では、上記追加成分、例えばコレステロールの量は、好ましくは約20~50モル%の量で変化

50

し得る。より好ましくは、上記追加分の量は、約40モル%である。

【0050】

さらに好ましい実施形態では、上述のような上記ナノ粒子は、金、銀または鉄ナノ粒子である。上記ナノ粒子は、5～1000nmの大きさを有することが特に好ましい。

【0051】

より一層好ましい実施形態では、上記担体は、カーゴを含む、またはカーゴに結合する。

【0052】

特に好ましい実施形態では、上記カーゴは、上記担体内に配置され、かつ／または、上記担体の外部に連結され、かつ／または、上記担体の単一層構造または二重層構造に組み込まれる。

【0053】

さらに別の好ましい実施形態では、上述の上記特異的分子ターゲティングは、上記複合体とランゲリン<sup>+</sup>細胞上に存在する受容体との間の相互作用を含む。

【0054】

特に好ましい実施形態では、樹状細胞上に存在する上記受容体は、C型レクチン受容体(CLR)ランゲリン(CD207)である。

【0055】

好ましい実施形態では、上記ビヒクルの樹状細胞への上記特異的結合は、組換えランゲリンを提示するラージB細胞、組換えDC-SIGNを提示するラージB細胞(対照1)およびC型レクチン受容体を提示しないラージ野生型B細胞(WT、対照2)への同一条件下でのリボソームの導入を含む細胞ベースのアッセイにおける対照よりも少なくとも2、4、8または16倍高い特異性を有するC型レクチン受容体(CLR)ランゲリン(CD207)への結合に基づく。

【0056】

さらに好ましい実施形態では、上記ビヒクルの平均の大きさは、動的光散乱法(DLS)によって測定して、2～1000nmである。

【0057】

別の態様では、本発明は、本明細書において規定されるカーゴを含むかまたはそれらに結合した、先に規定したランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティングのための少なくとも1つのビヒクルおよび添加剤を含む、ランゲリン<sup>+</sup>細胞への標的化カーゴの送達のための組成物の使用に関する。

【0058】

好ましい実施形態では、上記添加剤は、二価イオン、アジュバント、またはC型レクチン受容体(CLR)ランゲリンへの結合を促進する因子である。上記二価イオンは、Ca<sup>2+</sup>またはZn<sup>2+</sup>であることが特に好ましい。

【0059】

別の好ましい実施形態では、上述のような上記組成物は、溶媒または溶媒とさらなる化合物との組み合わせをさらに含む。溶媒の好ましい例は、水、スクロース水溶液、リン酸緩衝化生理食塩水、トリシン緩衝液、ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)緩衝液である。具体的な実施形態では、溶媒のさらなる化合物との組み合わせは、前述のいずれかの溶媒のジメチルスルホキシド(DMSO)との組み合わせである。一つの具体的な実施形態では、DMSOの濃度は、10%である。

【0060】

さらに別の好ましい実施形態では、上記組成物は、先に規定した上記ビヒクルを約1～10モル%、好ましくは約4～6モル%、より好ましくは4.75～5モル%の量で含む。

【0061】

さらなる態様では、本発明は、本明細書において規定されるカーゴを含むかもしくはそれに結合する先に規定したランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティングのための上記ビヒクル、または先に規定した上記組成物を、ランゲリン<sup>+</sup>樹状細胞と接触させることを含むランゲリン<sup>+</sup>細胞への標的化カーゴの送達方法に関する。

## 【0062】

好ましい実施形態では、上記カーゴは、小分子、ペプチド、タンパク質、細胞傷害性物質、核酸、色素、染料、金属、放射性核種、ウイルス、修飾ウイルス、ウイルスベクター、接種物、プラスミドおよび／または多成分系からなる群から選択される。上記多成分系は、好ましくはさまざまな成分を含むゲノム編集系である。上記ゲノム編集系は、CRISPR/Cas系であることが特に好ましい。

## 【0063】

上述のような上記の使用または方法の別の好ましい実施形態では、上記カーゴは、(i) 体内で免疫反応を誘発することができ、(ii) 免疫調節剤、(iii) 免疫寛容誘導剤、または(iv) アポトーシスの阻害剤等の細胞機能の阻害剤である薬学的または免疫学的に活性な化合物である。

10

## 【0064】

上述のような上記の使用または方法のさらに好ましい実施形態では、上記カーゴは、(i) 癌抗原もしくはエピトープを含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、または癌抗原もしくはエピトープを含むか、(ii) 自己免疫疾患抗原もしくはエピトープを含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、または自己免疫疾患抗原もしくはエピトープを含むか、(iii) 細菌抗原を含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、または細菌抗原もしくはエピトープを含むか、(iv) ウイルス抗原を含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、またはウイルス抗原もしくはエピトープを含むか、(v) 寄生性抗原を含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、または寄生性抗原もしくはエピトープを含むか、あるいは(vi) アレルゲンもしくはアレルゲンのエピトープを含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、またはアレルゲンもしくはアレルゲンのエピトープを含む。

20

## 【0065】

別の態様では、本発明は、先に規定した上記ビヒクル、または先に規定した上記組成物を含む医薬組成物に関し、上記担体は、薬学的に活性なカーゴおよび任意で薬学的に許容される担体物質もしくは薬学的アジュバントを含むかまたはそれらに結合する。

## 【0066】

好ましい実施形態では、上記医薬組成物は、経口、静脈内、局所、角膜、経鼻、皮下、皮内、経皮投与、ワクチン接種または毛嚢を介した投与に適している。

30

## 【0067】

別の好ましい実施形態では、上記医薬組成物は、パッチとして、液体、クリーム、軟膏剤、ペースト、ゲル、ローション、テープ、フィルム、舌下錠、バツカル錠、錠剤、噴霧剤、坐剤、ワクチンとして、または微細針の形態で提供される。パッチの特に好ましい形態は、ナノパッチまたはヒドロゲルパッチである。

## 【0068】

より一層好ましい実施形態では、上記医薬組成物は、針、ワクチン注射器、硬膏剤、または吸入器等の医療用具を用いて投与されることになっている。

## 【0069】

特に好ましい実施形態では、上記医薬組成物は、癌、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、もしくは移植片対宿主病、局所性もしくは全身性炎症、アレルギーの、治療もしくは予防に用いるか、または減感作のために用いる。

40

## 【0070】

さらなる態様では、本発明は、先に規定した上記ビヒクル、または先に述べたような上記組成物を含む診断組成物に関し、上記担体は、薬学的に活性なカーゴおよび任意で薬学的に許容される担体物質もしくは薬学的アジュバントを含むかまたはそれらに結合する。

## 【0071】

好ましい実施形態では、上記診断組成物は、癌、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染または移植片対宿主病、局所性もしくは全身性炎症、またはアレルギーの、診断、検出、観察または予測に用いられる。

50

## 【0072】

さらなる態様では、上記発明は、疾患のランゲリン<sup>+</sup>樹状細胞ターゲティング治療のための適切な用量を特定する方法に関し、上記方法は、（a）ランゲリン<sup>+</sup>細胞の集団を、細胞に導入され得る化合物と接触させる工程と、（b）上記化合物が組み込まれた細胞の数を決定する工程と、（c）好ましくは1～3日後に、上記化合物が組み込まれた細胞の数と出発集団とを比較することによって、任意で、上記化合物が組み込まれた細胞の数または状態を、確認された文献の結果とさらに相関させることによって、上記化合物の適切な用量を決定する工程とを含む。

## 【0073】

別の態様では、上記発明は、先に規定した上記ビヒクルおよび／または先に規定した上記組成物から選択された少なくとも1つの要素を含む医療用キットに関し、上記担体は、薬学的に活性なカーゴを含むかまたは当該カーゴに結合し、上記医療用キットは、任意で使用説明書付きリーフレットを含んでもよい。

10

## 【0074】

さらに別の態様では、上記発明は、先に規定した上記ビヒクル、または先に規定した上記組成物を含むワクチンに関し、上記担体は、接種物カーゴを含むかまたは接種物カーゴに結合する。

## 【0075】

好ましい実施形態では、上記ワクチンは、癌、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染、または移植片対宿主病の治療または予防に用いられる。

20

## 【0076】

さらなる態様では、上記発明は、被験体における、癌、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染に対する免疫応答を誘導する方法に関し、上記方法は、上記被験体に、治療学的に有効な量の、上記担体が薬学的に活性なカーゴを含むかまたはそれに結合する先に規定した上記ビヒクル、上記担体が薬学的に活性なカーゴを含むかまたは当該カーゴに結合する先に規定した上記組成物、先に規定した上記医薬組成物、または先に規定した上記ワクチンを投与する工程を含む。

## 【0077】

最後の態様では、上記発明は、癌、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染、移植片対宿主病、局所性もしくは全身性炎症、アレルギーの、治療もしくは予防、または減感作の方法に関し、上記方法は、被験体に、治療学的に有効な量の、上記担体が薬学的に活性なカーゴを含むかまたはそれに結合する先に規定した上記ビヒクル、上記担体が薬学的に活性なカーゴを含むかまたはそれに結合する先に規定した上記組成物、先に規定した上記医薬組成物、または先に規定した上記ワクチンを投与する工程を含む。

30

## 【0078】

好ましい実施形態では、上記投与は、経口、角膜、経鼻、静脈内、局所、皮下、皮内、経皮投与、ワクチン接種または毛嚢を介した投与である。

## 【0079】

〔図面の簡単な説明〕

図1は、He k 2 9 3細胞の原形質膜における安定なヒトランゲリン発現がC L R特異的抗体を介して検出されたことを示す。アイソタイプ染色（灰色）を陰性対照として適用した。ランゲリン染色（濃い灰色）の蛍光強度を野生型細胞（薄い灰色）からのバックグラウンド蛍光と比較し、ヒストグラムプロットにプロットした。

40

## 【0080】

図2は、C L R特異的抗体を介して検出されたラージ細胞（Raji cell）の原形質膜における安定な受容体発現を示す。アイソタイプ染色を陰性対照として適用した。蛍光強度を野生型細胞からのバックグラウンド蛍光と比較し、ヒストグラムプロットにプロットした。

## 【0081】

図3は、F I T C - B S Aのカプセル化およびランゲリン発現細胞への送達を示す。図3（A）は、カプセル化抗原から遊離抗原を除去するためのサイズ排除および超遠心分離

50

法からの結果を示す。FITC-BSA蛍光をプレートリーダーで測定した。図3(A)はまた、細胞ベースのアッセイで利用されたFITC-BSAカプセル化リポソームを示す。リポソームを37℃で2時間インキュベートし、FITCおよびアレクサ647の平均蛍光強度(MFI)値をフローサイトメトリーによって測定した(図3(B))。図3(C)は、異なる精製方法の後にリポソームの質がDLSによってどのように測定されたかを示す。サイズおよびゼータ電位(ZP)を分析した。図3(D)は、ランゲリン<sup>+</sup>HeK293細胞と共に37℃で6時間インキュベートしたFITCカプセル化リポソームを示す。核をDAPIで染色し、細胞を顕微鏡検査によって分析した。

#### 【0082】

図4は、サイズ排除または超遠心分離によって精製されたFITC-BSAカプセル化リポソームを示す。続いて、精製リポソームを細胞ベースのアッセイで試験した。16μMリポソームをhランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞と共に37℃で2時間インキュベートした。細胞を、フローサイトメトリーによるそれらのFITC染色について分析した。MFI値をベースライン補正した。

#### 【0083】

図5は、試験タンパク質のFITC-BSAを用いたタンパク質のカプセル化の最適化について報告する。図5(A)では脂質薄膜を再水和するために使用された初期FITC-BSA濃度、図5(B)では再水和された脂質膜の初期リポソーム濃度を変化させて、最適化されたカプセル化効率を検出した。図5(C)には、DLSによって分析されたサイズおよびゼータ電位(ZP)を含む品質レポートが示されている。カプセル化効率は、超遠心分離後にプレートリーダーを用いて計算した。カプセル化FITC-BSA抗原(AG)を1mMリポソームごとに計算した。

#### 【0084】

図6は、FITC-BSAカプセル化リポソームの用量依存的内部移行および反応速度を示す。図6(A)には、FITC-BSAカプセル化リポソームの用量依存的内部移行が示されている。アレクサ647合剤化(co-formulated)リポソーム染料を、FITC-BSAのフルオレセインシグナルと比較した。図6(B)には、FITC-BSAカプセル化リポソームの反応速度研究が示されている。アレクサ647合剤化リポソーム染料を、FITC-BSAのフルオレセインシグナルと比較した。

#### 【0085】

図7は、免疫活性タンパク質EBNAおよび免疫不活性対照タンパク質PCNAの発現およびカプセル化を示す。図7(A)には、Hisタグ精製PCNAおよびEBNAタンパク質のFPLCクロマトグラムが示されている。図7(B)には、PCNAおよびEBNA精製タンパク質のSDS-PAGEゲル、ならびにロードコントロール、フローズルコントロール、およびウォッシュコントロールが示されている。タンパク質のサイズは、タンパク質ラダーを用いて測定した。図7(C)には、DLSによって分析された製剤化リポソームのサイズおよびゼータ電位(ZP)を含む品質レポートが示されている。カプセル化効率は、超遠心分離後にプレートリーダーを用いて計算した。カプセル化抗原(AG)を1mMリポソームごとに計算した。

#### 【0086】

図8は、ランゲリン標的化リポソームを介したLCへのPCNAおよびEBNAの送達を示す。FITC-PCNAおよびFITC-EBNAカプセル化リポソームを、37℃で表皮細胞懸濁液と共にインキュベートした。リポソームインキュベーション後、細胞を、CD45、HLA-DR、CD1aおよびランゲリンを含むランゲルハンス細胞マーカーで染色した。さらに、生/死(L/D)判定のために、細胞を生存率染料eFluor780で染色した。表皮細胞懸濁液をフローサイトメトリーによって分析し、ランゲルハンス細胞をリポソームおよびFITC染色について評価した。

#### 【0087】

図9は、CLR発現細胞に対するヒトランゲリンターゲティングリガンドのリポソーム特異性を示す。図9(A)は、リポソーム結合のために、16μMの非機能化および機能

10

20

30

40

50

化リポソームを、安定発現ラージ細胞と共に4℃で1時間インキュベートしたことを示す。洗浄後、細胞をフローサイトメトリーによって直接的に分析した。リポソーム結合を、合剤化アレクサ647染料を用いて分析した。1つの代表的な実験のMFI値を示し、t検定(\*\*\*p<0.0001、n=3)によって値をバックグラウンドシグナルと比較した。図9(B)において、ランゲリン<sup>+</sup>およびDC-SIGN<sup>+</sup>細胞へのリポソーム結合を、10mMのEDTAまたは50μg/mlのマンナンと競合させた。1つの代表的な例のMFI値をプロットした(\*\*\*p<0.0001、\*\*\*\*p<0.0001、n=3、t検定、2つの代表的な実験のうちの1つ)。

#### 【0088】

図10は、ランゲリン<sup>+</sup>HeK293細胞へのリポソーム内部移行の顕微鏡画像を示す。裸のリポソーム、ランゲリン標的化リポソームおよびマンノース複合化リポソームを、ランゲリン<sup>+</sup>HeK293細胞と共に37℃で2時間インキュベートした。核をDAPIで染色し、細胞膜を親油性染料DiOで染色した。異なる焦点高さの細胞層を示すランゲリンターゲットングリポソームと共にインキュベートしたランゲリン<sup>+</sup>細胞のZスタックを取得した。

#### 【0089】

図11は、ランゲリンターゲットングリポソームの結合反応速度および内部移行反応速度を示す。図11(A)ではランゲリンターゲットングリポソームの結合および図11(B)ではランゲリンターゲットングリポソームの内部移行を、それぞれ4℃または37℃での種々のインキュベーション期間後に分析した。図11(C)は、ランゲリン<sup>+</sup>細胞と共に37℃で24時間インキュベートしたランゲリンターゲットングリポソームの種々の濃度を示す。

#### 【0090】

図12は、顕微鏡検査によって測定されたリポソーム内部移行反応速度を示す。ランゲリンターゲットングリポソームを、hランゲリン<sup>+</sup>および野生型HeK293細胞と共にさまざまな時点インキュベートした。アレクサ647の高PMT電圧および低PMT電圧を用いて、早期のインキュベーション点での非常に感度の高い事象および後期のインキュベーション点からの強い蛍光シグナルを検出した。

#### 【0091】

図13は、GlcnTosyl機能化リポソームを有するヒトランゲリン発現ラージ細胞のターゲットングを示す。ターゲットングリガンドのリガンドモル比をリポソーム上で変化させ、16μMのリポソームを4℃で1時間インキュベートした。細胞を同一のゲートングストラテジーを用いて分析し、hランゲリン<sup>+</sup>および野生型ラージ細胞の蛍光シグナルを、GraphPad Prismにおいて線形フィットによってプロットした。

#### 【0092】

図14は、さまざまなリガンドモル比を含むランゲリンターゲットングリポソームの結合反応速度および内部移行反応速度を示す。図14(A)ではランゲリンターゲットングリポソームの結合および図14(B)ではランゲリンターゲットングリポソームの内部移行を、それぞれ4℃または37℃での種々のインキュベーション期間後に分析した。図14(C)は、種々の濃度のランゲリンターゲットングリポソームを、ランゲリン<sup>+</sup>細胞と共に37℃で24時間インキュベートしたことを示す。

#### 【0093】

図15は、エンドソーム区画へのリポソームの経路選択を示す。図15(A)では、ヒトランゲリン発現HeK293細胞を、16μMの標的化リポソームと共に37℃で2時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、Rab5、Rab11、EEA1およびLamp-1を含むエンドソームマーカーで免疫蛍光染色した。その後、一次抗体をアレクサ488複合化二次抗体で標識化した。細胞核をDAPIで染色し、細胞を顕微鏡検査によって分析した。図15(B)は、標的化リポソームの共存とピアソンR値によって表されるさまざまなエンドソーム(endosomal)区画の間の相関関係を示す。

#### 【0094】

図16は、早期の時点におけるエンドソーム区画へのリボソームの内部移行を示す。COS-7細胞をYFP-Rab9で一時的にトランスフェクトした。標的化リボソームを添加し、37℃でさまざまな期間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を固定し、EEA1については一次抗EEA1抗体（ウサギ、クローンC45B10）およびRab5（ウサギ、クローンC8B1）（Cell Signaling Technology）を用いて、Rab9については一次抗緑色蛍光タンパク質（GFP）抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。アレクサ488複合化抗ウサギ抗体を二次染色に使用した。さらに、細胞核をDAPIによって染色した。

【0095】

図17は、機能化リボソームの時間依存性細胞傷害性研究を示す。図17（A）において、ゲーティングストラテジーは、未処理、DMSO処理およびリボソーム処理の細胞について例示的に示される。細胞を37℃で72時間インキュベートした。DMSO処理細胞を、72時間のインキュベーション後に3分間、50%のDMSOと共にインキュベートした。FSC-A/SSC-Aプロットにおいて、生細胞および死細胞を細胞片と区別した。FSC-A/FSC-Hプロットにおいて、ダブレット（doublet）を識別した。その後、単細胞をx軸上のAnnexin-V-FITC染色とy軸上の7-AADを示すドットプロットで分析し、早期および後期のアポトーシス効果を判定した。未処理細胞を陰性対照として使用し、DMSO処理細胞は陽性対照を表す。図17（B）では、いくつかのインキュベーション時点の母集団中の頻度（FoP：frequent of parent）を各象限について分析し、グループ化された縦棒にプロットした。図17（C）では、ランゲリン<sup>+</sup>細胞と共にインキュベートした、標的化リボソーム、および裸のリボソームのA647のMFIを分析して、リボソームの内部移行を検出した。

【0096】

図18は、ランゲリンターゲットングリボソームの用量依存性細胞傷害性研究を示す。図18（A）において、ゲーティングストラテジーは、未処理、DMSO処理およびリボソーム処理の細胞について例示的に示される。細胞を37℃で24時間インキュベートした。DMSO処理細胞を、24時間のインキュベーション後に3分間、50%のDMSOと共にインキュベートした。FSC-A/SSC-Aプロットにおいて、生細胞および死細胞を細胞片と区別した。FSC-A/FSC-Hプロットにおいて、ダブレットを識別した。その後、単細胞をx軸上のAnnexin-V-FITC染色とy軸上の7-AADを示すドットプロットで分析し、早期および後期のアポトーシス効果を判定した。未処理細胞を陰性対照として使用し、DMSO処理細胞は陽性対照を表す。図18（B）では、1mMまでのいくつかの濃度のリボソームを分析した。親の頻度（FoP）を、各象限について決定し、グループされた縦棒にプロットした。図18（C）では、ランゲリン<sup>+</sup>細胞と共にインキュベートした、標的化リボソームおよび裸のリボソームのA647のMFIを分析して、リボソームの内部移行を検出した。

【0097】

図19は、関連したランゲリン多型に対するリボソーム活性を示す。図19（A）では、裸のリボソームおよび標的化リボソームを、ラージ野生型細胞、野生型ヒトランゲリン<sup>+</sup>を発現するラージ細胞、N288D変異体、K313I変異体またはN288D/K313I二重変異体へのそれらの結合について試験した。16μMのリボソームを4℃で1時間インキュベートした。結合を、A647合剤染料のMFIによって分析した。データを野生型ランゲリン<sup>+</sup>細胞に正規化した（\*\*\*p<0.001、\*\*\*p<0.001、n=3、t検定、2つの代表的な実験のうちの1つ）。図19（B）では、ラージ発現細胞を、PE複合化抗ヒトランゲリン抗体（クローンDCGM4）を用いて、それらの細胞外受容体発現について試験した。MFIを野生型ランゲリン発現に正規化した（\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、n=3、t検定、2つの代表的な実験のうちの1つ）。図19（C）では、相対リボソーム結合を、抗体染色（B）に対するリボソーム結合（A）の倍率を計算することによってプロットした（\*\*\*p<0.001、\*\*\*p<0.0001、n=3、t検定；# 野生型ラージ細胞のデータを除外した、2

10

20

30

40

50

つの代表的な実験のうちの1つ)。図19(D)では、リポソーム結合に加えて、リポソーム内部移行を37℃で24時間にわたって追跡した。合剤化A647染料のMFIを直接的にプロットした。

【0098】

図20は、MALDI-TOFによる、ターゲティングリガンドがロードされたGFPの定量化を示す。

【0099】

図21は、FITC-BSAカプセル化リポソームに対する複合化タンパク質の結合と内部移行を示す。図21(A)では、4℃および37℃での機能化GFPの結合および取り込みを、ラージおよびランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞を用いたフローサイトメトリーによって用量依存的に測定した。図21(B)では、GFPおよびリポソームを、ランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞と共に種々の時点インキュベートした。ここでは、FITC-BSAカプセル化リポソームを利用して、FITC蛍光をGFP蛍光と比較した。

【0100】

図22は、マンナンとの結合競合を示す。図22(A)では、リガンド機能化リポソームまたはGFPの結合をマンナンと競合させた。リガンド担体をランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞と共に37℃で4時間インキュベートした。マンナンを37℃で直接的に添加して結合および内部移行を競合させるか、または4時間のインキュベーション工程後(4℃での洗浄後)に添加して細胞外結合担体を除去した。(3つのうちの1つの代表的な実験、n=3)。図22(B)では、機能化リポソームまたはGFPを、ランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞と共に37℃で30分間インキュベートした。洗浄後、さまざまな時間周期の間、マンナンまたは( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ を有する)DPBSを添加した。(4つのうちの1つの代表的な実験、n=3)。

【0101】

図23は、ターゲティングリガンドがロードされたPMMAビーズのフローサイトメトリー分析が、ヒトランゲリン発現THP-1細胞への特異的結合を示すことを示す。

【0102】

図24は、表皮細胞懸濁液における初代ランゲルハンス細胞のターゲティングを示す。図24(A)では、ヒト皮膚試料から表皮細胞懸濁液を調製した。続いて、細胞を16μMの濃度のリポソームと共に37℃で1時間インキュベートした。対照として、10mMのEDTAを細胞培地に添加した。リポソームインキュベーション後、細胞を、CD45、HLA-DR、CD1aおよびランゲリンを含むランゲルハンス細胞マーカーで染色した。さらに、生/死(L/D)判定のために、細胞を生存率染料eFluor780で染色した。表皮細胞懸濁液をフローサイトメトリーによって分析し、ランゲルハンス細胞をリポソーム染色について評価した。図24(B)：(A)のターゲティングストラテジーに基づいて、裸のリポソームおよび標的化リポソームのMFIを、 $\text{CD45}^-$ ； $\text{CD1a}^-$ 、 $\text{HLR-DR}^-$ ；および $\text{CD1a}^+$ 、 $\text{HLR-DR}^+$ 発現細胞を含むさまざまな細胞サブセットについて分析した。図24(C)：リポソーム内部移行を分析するために、EDTAをインキュベーション工程の後または間に添加した。インキュベーション後に添加されたEDTAは、細胞外結合リポソームを除去するため、リポソーム内部移行を反映する。一方、インキュベーション工程中に添加されるEDTAはリポソーム結合を防止し、対照としての機能を果たす。受容体内部移行を防止するために、細胞を4℃でインキュベートした。図24(D)では、表皮細胞懸濁液をFITC複合化抗CD1a抗体で染色し、標的化リポソームと共に37℃で1時間インキュベートした。続いて、細胞を顕微鏡検査によって分析した。

【0103】

図25は、ランゲリンターゲティングリガンドを介したランゲルハンス細胞へのリポソーム特異性を示す。ヒト皮膚試料から全皮膚細胞懸濁液を調製した。続いて、皮膚細胞を16μMの濃度のリポソームと共に37℃で1時間インキュベートした。リポソームインキュベーション後、細胞を、CD45、HLA-DR、CD1aおよびランゲリンを含む

10

20

30

40

50

ランゲルハンス細胞マーカーで染色した。さらに、細胞を、生／死（L／D）判定のために生存率染料 e F l u o r 7 8 0 で染色し、単球およびマクロファージを染色するために C D 1 4 抗体で染色した。全皮膚細胞懸濁液をフローサイトメトリーによって分析し、種々の細胞サブセットをリボソーム染色について評価した。

【0104】

図26は、複合体のテール領域（疎水性部）が脂質二重層構造に埋め込まれ、一方、ヘッド領域が担体の外部に配置され、このため、受容体と相互作用することができる分子を概略的に示す。

【0105】

図27は、ヒトランゲリンのためのグリコミメティックターゲティングリガンドのヘパリンの影響を受けたデザインを示す。図27（A）では、ヘパリン由来単糖 G l c N S は、グリコミメティックリガンドデザインのための好ましいスキャフォールドとして同定された。G l c N S アナログの設計は、グリコミメティックターゲティングリガンド15の発見につながる。15は、送達プラットフォームへの結合のためのC1のβ配向のエチルアミノリンカーを担う。20は、この研究を通して、M a n ベースの参照分子としての機能を果たした。図27（B）：G l c N A c の結合モード（P D B コード：4 N 3 2）に基づいて、C2中の小さな芳香族置換基は、K299およびK313とのカチオン-π相互作用またはF315およびP310とのπ-πおよびH-π相互作用の形成によって親和性を増大させると仮定された。受容体表面は、その親油性に従って対比される（親油性：濃い灰色、親水性：薄い灰色）。図27（C）：<sup>19</sup>F R2フィルタNMR実験によって、M a n ベースの参照分子21（K<sub>i</sub>=10±1mM）に対して42倍のモデルリガンド16（K<sub>i</sub>=0.24±0.03mM）に対する親和性向上が明らかになった。さらに、16はD C - S I G N（K<sub>i</sub>, D C - S I G N=15±3mM）に対する有望な特異性を示した。図27（D）：高速（K<sub>D</sub>, f a s t=0.23±0.07mM）および低速（K<sub>D</sub>, s l o w=0.3±0.1mM）の交換レジームにおける共鳴を分析する<sup>15</sup>N H S Q C NMR実験において、ランゲリンに対する16の親和性が確認された。

【0106】

図28は、グリコミメティックターゲティングリガンドについての結合モード分析を示す。図28（A）および（B）：<sup>15</sup>N H S Q C NMR実験によって、16についての化学シフト摂動（C S P : chemical shift perturbation）パターンが明らかになった。滴定すると、I250およびE285等の高速交換共鳴ならびにY251を含む低速交換共鳴が確認された。図28（C）：G l c N A c（P D B コード：4 N 3 2）との複合体におけるランゲリンのX線構造上のC S Pのマッピングによって、E285およびK299について確認されたC S Pによって示されるように、C a<sup>2+</sup>依存性の結合モードが確認された。21を用いた滴定と比較して、Y251、I250およびT314は相対的なC S P増加を示したが、K313については減少が確認された。全体として、増加したC S Pを示す残基の大部分はN307およびF315と関連し得るが、これらは帰属され得なかった。図28（D）：S T D NMR実験は、16とランゲリンとの間に形成された相互作用をさらに確認するのに役立った。S T D NMRスペクトルは、0.4秒の飽和時間t<sub>s a t</sub>で記録し、8倍に拡大した。ビルドアップ曲線から決定されたエピートープは、フェニル置換基によって形成された強い相互作用を示唆する。対照的に、低相対S T D<sub>0</sub>値がアセチル化エチルアミノリンカーについて確認され、溶媒曝露方向（solvent exposed orientation）と一致した。図28（E）：<sup>15</sup>N H S Q CおよびS T D NMR実験からの観察結果を合理化するために、16を糖質結合部位にドッキングした。選択されたドッキングポーズ結合姿勢は、フェニル環とF315との間のπ-π相互作用の形成、ならびにスルホンアミド基とN307との間の水素結合の形成を予測した。リンカーは、高い溶媒曝露を示す。受容体表面は、その親油性に従って対比される（親油性：濃い灰色、親水性：薄い灰色）。

【0107】

図29は、構造と活性との相関および選択化合物のD C - S I G Nに対する特異性を示

す。

#### 【0108】

図30は、硫酸化GlcNAc誘導体の $K_i$ 判定を示す。 $^{19}\text{F}$   $R_2$ フィルタNMRを介したヘパリン由来GlcNAc誘導体の $K_i$ 判定によって、単糖親和性に対する硫酸化パターンの影響が明らかになった。得られた $K_i$ 値を図39に示す。

#### 【0109】

図31は、GlcNSアナログ1～5の $K_i$ 判定を示す。競合結合実験は、GlcNSアナログライブラリの親和性を決定するのに役立った。得られた $K_i$ 値を図39に示す。

#### 【0110】

図32は、Manアナログ21の $K_D$ 判定を示す。図32(A)および(B)： $^{15}\text{N}$  HSQC NMR実験は、2に関して得られた $K_i$ 値を確認するのに役立った。参照スペクトルで検出された帰属された共鳴がハイライトされる(グレー)。図32(C)： $K_D$ 値の測定のために、高速化学交換および0.06 ppmより大きいCSPを示す帰属された共鳴を選択した。得られた $K_D$ 値を図29に示す。

#### 【0111】

図33は、GlcNSアナログ2の $K_D$ 判定を示す。図33(A)および(B)： $^{15}\text{N}$  HSQC NMR実験は、2に関して得られた $K_i$ 値を確認するのに役立った。参照スペクトルで検出された帰属された共鳴がハイライトされる(グレー)。図33(C)： $K_D$ 値の測定のために、高速化学交換および0.04 ppmより大きいCSPを示す帰属された共鳴を選択した。図33(D)：さらに、K299およびT314を含む残基のセットは、遅い交換現象を示した。これらの残基について、ランゲリンの遊離状態と結合状態に対応する共鳴の積分 $V_f$ および $V_b$ を利用して、 $K_D$ 値を測定した。得られた $K_D$ 値を図29に示す。

#### 【0112】

図34は、GlcNSアナログ2、16およびManアナログ21についての $^{15}\text{N}$  HSQC NMR結合モード分析を示す。図34(A)～(C)：ランゲリン(PDBコード：4N32または35PF)のX線構造上のCSP値のマッピングによって、E285およびK299、10について確認されたCSPによって示されるように、2および16の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性結合モードが確認された。さらに、CSPは、N297、A300およびS302残基について確認され、また、Manまたは21の認識に影響を及ぼした。対照的に、Y251およびI250は、21と比較して大幅に増加したCSP値を示したが、K313については相対的な減少が確認された。この減少は、近位のT314の相対的な増加を伴った。特に、大幅に増加したCSP値を示す残基は主に、F315およびN307と関連し、これらは帰属されなかった。これは、より小さい相対的な増加を示したW252およびW306についても当てはまる。従って、確認されたCSPパターンは、K313ではなく、2または16とF315との間に形成された相互作用によって誘導され得る。Manおよび21と同様に、CSPはまた、C型レクチン様ドメインフォールドの遠隔領域において、特に短ループ領域におけるK257およびG259について確認された。これは、以前に報告されたアロステリックネットワークの変調を示し得る。図33(D)：16および21を用いた滴定の対比によって、E285またはW252等の糖質結合部位と関連する残基についての明確なCSP軌跡が明らかになったが、K257等のC型レクチン様フォールドの遠隔領域に位置する残基の軌跡は保存された。

#### 【0113】

図35は、GlcNSアナログ16のSTD NMRビルドアップ曲線を示す。方程式5をSTD値に当てはめて、16の結合エピトープの決定のためのSTD $_0$ 値を計算した。

#### 【0114】

図36は、Manアナログ21のSTD NMRエピトープマッピングを示す。図36(A)：STD NMR実験は、21とランゲリンとの相互作用を調べるのに役立った。STD NMRスペクトルは、0.4秒の飽和時間 $t_{sat}$ で記録し、8倍に拡大した。図

10

20

30

40

50

36 (B) : 21のエピトープは、ビルドアップ曲線から決定され、アセチル化エチルアミノリンカーに対する溶媒曝露方向を示唆する(図37も参照)。

【0115】

図37は、Manアナログ21のSTD NMRビルドアップ曲線を示す。方程式5をSTD値に当てはめて、21の結合エピトープの決定のためのSTD<sub>0</sub>値を計算した。

【0116】

図38は、GlcNSアナログ16の分子結合を示す。図38(A) : ファーマコフォアモデルは、ランゲリン(PDBコード: 4N32)の糖質結合部位における16の最初の配置を導き、ドッキングポーズを力場に基づいて改善する間のGlcスキャフォールドの配向を抑制するように規定された。示されたすべての特徴が、表示されたスフィア内の酸素原子を必要とする。図38(B) : 10個の生成されたドッキングポーズのうちの4個は、16の図示された配座に類似する。選択されたドッキングポーズは、フェニル環とF315との間の $\pi-\pi$ 相互作用の形成、ならびにスルホンアミド基とN307との間の水素結合の形成を予測した。アセチル化エチルアミノリンカーは、高い溶媒曝露を示す。従って、このドッキングポーズは、<sup>15</sup>N HSQCおよびSTD NMRの両方の実験と一致する。図38(C) : 16の図示された代替的な配座は、10個の生成されたドッキングポーズのうちの3個について表している。選択されたドッキングポーズは、フェニル環とK313との間のカチオン- $\pi$ 相互作用の形成、ならびにスルホンアミドとE293との間の水素結合の形成を予測した。アセチル化エチルアミノリンカーは、高い溶媒曝露を示す。しかしながら、このドッキングポーズは、<sup>15</sup>N HSQC NMRの結果、特にK313のCSP値の相対的な減少とあまり一致しなかった。分子のドッキング研究は、スルホンアミドリンカーに適さない二面角が原因で除外された16の3つの追加の独特なドッキングポーズをもたらした。受容体表面は、その親油性に従って対比される(親油性: 濃い灰色、親水性: 薄い灰色)。

【0117】

図39は、一連のターゲティングリガンド、2'位におけるGlcNのアナログ、および硫酸化単糖の構造と活性との相関を示す。

【0118】

〔発明を実施するための形態〕

本発明は特定の実施形態に関して記載されるが、この記載は限定的な意味で解釈されるべきではない。以下では、本発明を理解するために重要な定義が下される。

【0119】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、「a」および「an」の単数形は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、それぞれの複数形も含む。

【0120】

本発明の文脈において、用語「約」および「およそ」は、当業者が問題の構成の技術的效果を依然として保証することを理解するであろう精度の隔たりを示す。上記用語は、典型的には示された数値からの $\pm 20\%$ 、好ましくは $\pm 15\%$ 、より好ましくは $\pm 10\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 5\%$ の偏差を示す。

【0121】

用語「含む (comprising)」が限定しないことを理解すべきである。本発明の目的のために、用語「からなる (consisting of)」または「本質的に～からなる (essentially consisting of)」が用語「含む (comprising of)」の好ましい実施形態であると考えられる。以後、ある群が少なくとも一定数の実施形態を含むと規定される場合、これは、好ましくはこれらの実施形態のみからなる群も包含することを意味する。

【0122】

また、明細書または特許請求の範囲における「(i)」、「(ii)」、「(iii)」または「(a)」、「(b)」、「(c)」、「(d)」、または「第1」、「第2」、「第3」等の用語は、類似の要素を区別するために用いられ、必ずしも順序または時系

10

20

30

40

50

列順を示すために用いられているわけではない。そのように使用される用語は、適切な状況下では互換性があること、および本明細書に記載の発明の実施形態は、本明細書に記載または図示される以外の順序で実施可能であることを理解すべきである。用語が方法または使用の工程に関連する場合、工程間に時間または時間間隔の一貫性はなく、すなわち、工程は、別段の指示がない限り、同時に実施されてもよく、またはそのような工程間に秒、分、時間、日、週等の時間間隔があってもよい。

#### 【0123】

本明細書に記載の特定の方法、プロトコル、試薬等は、変更可能であるため、これらに限定されないことを理解すべきである。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範疇を限定することを意図するものではないことを理解すべきである。別途規定しない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、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。

10

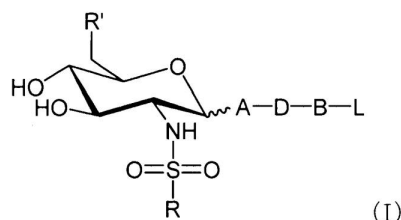
#### 【0124】

上記に示したように、本発明は、一態様では、ランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティングのためのビヒクルの使用であって、上記ビヒクルは、ランゲリン<sup>+</sup>細胞に特異的に結合することができ、上記ビヒクルは、(a) 少なくとも1つの担体および(b) 一般式(I)の少なくとも1つの複合体を含み、

#### 【0125】

#### 【化6】

20



式中、

(i) Rは、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、C<sub>1</sub>–C<sub>8</sub>アルキルシクロアルキル、アリール、C<sub>1</sub>–C<sub>8</sub>アルキルアリール、ヘテロアリール、C<sub>1</sub>–C<sub>8</sub>アルキルヘテロアリール、ビアリール、およびC<sub>1</sub>–C<sub>8</sub>アルキルビアリールからなる群から独立して選択され、

30

置換基は、N(R<sup>a</sup>)(R<sup>b</sup>)、–OR<sup>a</sup>、–SR<sup>a</sup>、–C(O)R<sup>a</sup>、–C(O)OR<sup>a</sup>、–C(O)N(R<sup>a</sup>)(R<sup>b</sup>)、–N(R<sup>a</sup>)C(O)R<sup>b</sup>、–N(R<sup>a</sup>)S(O)<sub>2</sub>R<sup>b</sup>、–OS(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>、ハロゲン、–NO<sub>2</sub>、–CN、–NC、–N<sub>3</sub>、–NCO、–OCN、–NCS、–SCN、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、およびヘテロアリールからなる群から独立して選択され、

R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は、水素、置換または非置換のC<sub>1</sub>–8アルキル、C<sub>2</sub>–8アルケニル、C<sub>2</sub>–8アルキニル、C<sub>3</sub>–6シクロアルキル、アリール–C<sub>1</sub>–5アルキル、ヘテロアリール–C<sub>1</sub>–5アルキル、アリール、ヘテロアリールからなる群から独立して選択され、

40

(ii) R'は、–OR<sup>a</sup>、および–NHS(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>からなる群から独立して選択され、

R<sup>a</sup>は、上記のように規定され、

(iii) A–D–B–Lは、式(I)のグルコース誘導体を上記担体または上記担体の一部に共有結合的に結合するリンカー基である、ランゲリン<sup>+</sup>細胞への標的化カーゴの送達のための使用に関する。

#### 【0126】

ランゲリン<sup>+</sup>細胞への標的化カーゴの送達のための本明細書に記載されるようなランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティングのためのビヒクルの使用は、例えば、治療もしくは

50

は診断の文脈におけるインビボ (in vivo) 使用、またはインビトロ (in vitro) もしくはエクスピボ (ex vivo) 使用のいずれかであり得る。

【0127】

本明細書で使用する時、用語「複合体」は、ランゲリンのためのリガンドとして作用する式 (I) に示されるグルコース誘導体と、A-D-B-Lの形をとるリンカー基との組み合わせに関し、要素A、DおよびBは、以下でさらに詳述されるように、スペーサー機能に関するか、またはそれを備え、要素Lは、以下、本明細書においてさらに詳細に説明されるように、リンカー要素に関する。

【0128】

従って、本発明の「複合体」は、式 (I) のグルコース誘導体-リガンドと、A-B-D-Lリンカー基と、担体とを含む「ビヒクル」の一部であり、上記担体は、カーゴを運搬または輸送することができる。

【0129】

本明細書で使用する時、用語「リガンド」は、受容体タンパク質に結合する分子、ペプチドまたはタンパク質であって、その立体形状の向きに影響を及ぼすことによって化学配座を変更するものを指す。結合は、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス力等の分子間力によって起こる。上記発明のビヒクルに含まれるリガンドは、「グルコース誘導体」とも呼ばれるランゲリンのリガンドであって、「ランゲリン」は、「CD207」とも呼ばれるランゲルハンス細胞の表面に位置するC型レクチン受容体のホモ三量体I型膜貫通型受容体およびサブタイプである。本明細書で使用する時、ランゲリンの配列は、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型バージョンによって表されるか、または配列番号2の塩基配列を有する核酸によってコードされる。本発明はさらに、その相同変異体、例えば、配列番号1または2の配列と90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または99.5%の相同性を有するアミノ酸配列または塩基配列の変異体を想定する。さらに想定されるのは、ランゲリンの自然に存在するSNP形態、例えば、配列番号4の塩基配列を有する核酸によってコードされる、配列番号3によって表されるアミノ酸配列を有するSNP形態V278A (rs741326、NCBI SNPデータベース) である。V278A SNPを含むランゲリンは、49.9%の有病率を有し、A278と同様の糖結合を示した (Ward et al., 2006. J Biol Chem, 281: 15450-6)。さらなる情報は、NCBI SNPデータベース、またはFeinberg et al., 2013, J. Biol Chem. 27, 288, 52, 36762-71等の好適な文献ソースから得ることができる。本発明はさらに、その相同変異体、例えば、配列番号3または4の配列と90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または99.5%の相同性を有するアミノ酸配列または塩基配列の変異体を想定する。配列番号6の塩基配列を有する核酸によってコードされる、配列番号5によって表されるアミノ酸配列を有するN288D (rs13383830、NCBI SNPデータベース)；配列番号8の塩基配列を有する核酸によってコードされる、配列番号7によって表されるアミノ酸配列を有するK313I (rs57302492、NCBI SNPデータベース)；および配列番号10の塩基配列を有する核酸によってコードされる、配列番号9によって表されるアミノ酸配列を有するN288D/K313I等の追加のSNP変異体もまた想定される。本発明はさらに、その相同変異体、例えば、配列番号5から10のうちのいずれか1つの配列と90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または99.5%の相同性を有するアミノ酸配列または塩基配列の変異体を想定する。ランゲリンのコドン最適化変異体がさらに包含される。これらの変異体は、想定される発現状況 (expression context) に適合され得、例えば、コドン最適化は、当業者に知られているように、菌株 (例えば、大腸菌株)、哺乳動物細胞等のために提供され得る。具体的な実施形態では、大腸菌での発現に使用することができる、C末端にストレプトタグIIおよびTEV部位を含むランゲリンのためのコドン最適化配列は、配列番号29の塩基配列によって表される。

【0130】

具体的な実施形態では、「ランゲリン」はまた、非ヒト哺乳類、例えば、マウス、サル、ウシ、ブタ等に由来する分子であってもよい。したがって、本発明は、特定の実施形態では、配列番号 14 の塩基配列を有する核酸によってコードされる、配列番号 13 によって表されるアミノ酸配列を有するマウスランゲリン変異体の使用を想定する。本発明はさらに、その相同変異体、例えば、配列番号 13 または 14 の配列と 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% または 99.5% の相同性を有するアミノ酸配列または塩基配列の変異体を想定する。

#### 【0131】

したがって、「ランゲリン<sup>+</sup>」に言及する場合、本明細書において上記に規定したランゲリン受容体の存在が意図される。本明細書で使用する時、用語「ランゲリン<sup>+</sup>細胞」は、その表面に特定の CLR ランゲリンを示す細胞、好ましくは樹状細胞 (DC)、例えばランゲルハンス細胞を指す。ある実施形態では、細胞は、異なる背景を有する細胞であってもよい。

#### 【0132】

先に規定したグリカンとランゲリンの相互作用は、主に単一の単糖に限られ、2つの近接エクアトリアル水酸基による  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの配位によって支配されることが見出された。これらの水酸基は、単糖、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンと E285、E293、N297 および N307 を含む受容体残基との間に形成される拡張水素結合ネットワークの一部である。さらに、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のエクアトリアルなアセトアミド基は、構造的な水分子および P310 とのメチル基の弱い疎水性接触を介して K299 と相互作用することが分かった。さらに、SAR によるグルコサミン-2-サルフェート (GlcNS) アナログの詳細な分析が行われており、これは、フェニル環の導入が K299、P310 または F315 との芳香族相互作用をもたらすこと、親和性の増加をもたらすことを示す。さらなるデザインアプローチは、本明細書の実施例の項に詳細に記載されるように、好ましい相互作用を示した。β-グルコシドの形成を介した Glc スキャフォールドの C1 におけるリンカーの導入によって、強力なターゲティングリガンドが得られた。これらの結果により、ビヒクルは、C1 位にリンカー構造、C2 位にサルフェートのいくつかの置換基、C3 位および C4 位にエクアトリアルな水酸基、ならびに GlcNS の C6 位に水酸基またはスルホン酸もしくはウロン酸を含む GlcNS 構造を含み得る。また、さらなる官能基も想定される。

#### 【0133】

本明細書で使用する時、用語「特異的分子ターゲティング」は、本明細書において規定される複合体の一部である、本明細書において上記に規定したリガンドと、本明細書において規定されるランゲリン<sup>+</sup>細胞上に存在するランゲリン受容体との間の相互作用を含む。好ましい実施形態では、特異的分子ターゲティングは、本明細書において規定されるビヒクルの一部である、本明細書において上記に規定したリガンドと、本明細書において規定されるランゲリン<sup>+</sup>細胞上に存在するランゲリン受容体との間の相互作用を含む。さらなる実施形態では、特異的分子ターゲティングは、上記複合体またはビヒクルとランゲリン<sup>+</sup>細胞上に存在する受容体との間の相互作用を含む。

#### 【0134】

したがって、本明細書で使用する時、用語「ランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティングのためのビヒクル」は、ランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティングが可能なビヒクルに関する。

#### 【0135】

上述のようなこの特異的ターゲティングは、樹状細胞、特にランゲリンを発現する樹状細胞に対する、本明細書において規定されるビヒクルの特異的結合である。特異的結合は、ビヒクル、すなわちビヒクルのリガンド部分と細胞の表面上のランゲリン受容体との間で起こる。具体的な実施形態では、上記結合は、組換えランゲリンを提示するラージ B 細胞、組換え DC-SIGN を提示するラージ B 細胞 (対照 1) および C 型レクチン受容体を提示しないラージ野生型 B 細胞 (WT、対照 2) への同一条件下でのリポソームの導入

を含む細胞ベースのアッセイにおける対照よりも少なくとも2倍高い特異性を示す。さらにより好ましい実施形態では、上記特異性は、組換えランゲリンを提示するラージB細胞、組換えDC-SIGNを提示するラージB細胞（対照1）およびC型レクチン受容体を提示しないラージ野生型B細胞（WT、対照2）への同一条件下でのリポソームの導入を含む細胞ベースのアッセイにおける対照よりも4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍または12倍高い。特に好ましい実施形態では、上記特異性は、組換えランゲリンを提示するラージB細胞、組換えDC-SIGNを提示するラージB細胞（対照1）およびC型レクチン受容体を提示しないラージ野生型B細胞（WT、対照2）への同一条件下でのリポソームの導入を含む細胞ベースのアッセイにおける対照よりも16倍高い。用語「DC-SIGN」は、配列番号12の塩基配列を有する核酸によってコードされる、配列番号11のアミノ酸配列を有する、さらなる樹状細胞発現受容体に関する。本発明はさらに、その相同変異体、例えば、配列番号11または12の配列と90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または99.5%の相同性を有するアミノ酸配列または塩基配列の変異体を想定する。DC-SIGNのコード最適化変異体がさらに包含される。これらの変異体は、想定される発現状況に適合され得、例えば、コード最適化は、当業者に知られているように、菌株（例えば、大腸菌株）、哺乳動物細胞等のために提供され得る。具体的な実施形態では、大腸菌での発現に使用することができる、C末端にストレプトタグEIIおよびTEV部位を含むDC-SIGNのためのコード最適化配列は、配列番号52の塩基配列によって表される。具体的な実施形態では、「DC-SIGN」はまた、非ヒト哺乳類、例えば、マウス、サル、ウシ、ブタ等に由来する分子であってもよい。

#### 【0136】

上述のような特異性を決定するために実施するアッセイは、好ましくは実施例10に記載されるような工程を含む。

#### 【0137】

本発明の文脈内で、さらなるランゲリン関連タンパク質を、例えば、DC-SIGN（上記参照）について記載したアッセイフォーマットに採用してもよい。このようなランゲリン関連タンパク質の好ましい例はデクチンである。デクチンはマウスデクチン変異体またはmデクチンであることが特に好ましい。用語「mデクチン」は、配列番号15のアミノ酸配列を有するか、または配列番号16の塩基配列を有する核酸によってコードされる、C型レクチンドメインファミリー7メンバーAに関する。本発明はさらに、その相同変異体、例えば、配列番号15または16の配列と90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%または99.5%の相同性を有するアミノ酸配列または塩基配列の変異体を想定する。具体的な実施形態では、「デクチン」はまた、ヒト、または他の非ヒト哺乳類、例えば、マウス、サル、ウシ、ブタ等に由来する分子であってもよい。

#### 【0138】

本明細書で使用する時、用語「標的化カーゴの送達」は、例えば本明細書において以下に規定されるカーゴの、標的化細胞、例えば本明細書において規定されるランゲリン<sup>+</sup>細胞、好ましくはその表面にランゲリンを示す細胞への輸送に関する。輸送は細胞内へのカーゴの導入を含んでもよく、または、細胞の近傍、例えば細胞の表面でのカーゴの荷降ろしを含んでもよい。カーゴの送達は、いずれにしても、本明細書において規定されるリガンドとその同族受容体、すなわち本明細書において言及されるようなランゲリンとの相互作用を含んでもよい。カーゴの送達は、使用される担体、特に本明細書において以下に規定される担体に従って、異なってもよく、かつ／または調整されてもよい。ある担体は細胞内へのカーゴの導入を必要とし得るが、他の担体は細胞の表面または細胞の近傍でカーゴを荷降ろしするために使用され得る。用語「送達」はカーゴの荷降ろしプロセスを含んでもよいが、リガンドがその標的、すなわちランゲリンに結合した後であっても、担体とカーゴとの結合を含んでもよい。ある実施形態では、送達は、初期のエンドソーム区画もしくは後期のエンドソーム区画における担体またはカーゴのさらなる処理のためのリソ

ソームの放出を含んでもよい。この放出は例えば、エンドソーム区画の酸性化によって、 $\text{Ca}^{2+}$ 等の受容体とリガンドの相互作用の補因子の濃縮または枯渇、受容体、ターゲティングリガンドまたは担体の酵素消化によって誘発してもよい。さらに想定されるのは、例えば  $\text{AuNP}$  スイッチを用いた感熱性  $\text{AuNP}$  - リポソームからの光誘導薬物放出である。代替的な実施形態では、送達は、感熱性リポソームまたは熱応答性磁性リポソームに基づいていてもよい。これらのリポソームは、例えば、高熱誘発局所薬物送達のための磁性ターゲティングおよび熱応答性制御放出の特徴を組み合わせるように設計されてもよい。さらなる詳細は、例えば、Dai et al., 2017, J Microencapsul. 34(4): 408-415 または from Kneidl et al., 2014, Int J Nanomedicine, 9: 4387-4398 から得てもよい。

10

## 【0139】

本明細書で使用する時、用語「アルキル」は、直鎖または分岐の炭化水素基を指す。示された数の炭素原子を有する炭化水素（例えば、「 $\text{C}1-\text{C}8$ 」アルキルは、1～8個の炭素原子を有するアルキル基を指す）。炭素原子の数が示されていない場合、アルキル基は1～100個の炭素原子を有する。アルキル基の例としては、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $tert$ -ブチル、および  $n$ -ペンチルが挙げられる。アルキル基は、任意で1つ以上の置換基で置換されてもよい。

## 【0140】

用語「アルケニル」は、2～100個の炭素原子および少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む、直鎖または分岐鎖であり得る不飽和炭化水素鎖を指す。アルケニル基は、任意で1つ以上の置換基で置換されてもよい。

20

## 【0141】

用語「アルキニル」は、2～100個の炭素原子および少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む、直鎖または分岐鎖であり得る不飽和炭化水素鎖を指す。アルキニル基は、任意で1つ以上の置換基で置換されてもよい。

## 【0142】

「置換された」基は、その基の任意のパターンの任意の置換を指す。この基は任意で1つ以上の置換基で置換されてもよく、これらの置換基の型は同じかまたは異なってもよい。置換基は、 $\text{N}(\text{R}^a)(\text{R}^b)$ 、 $-\text{OR}^a$ 、 $-\text{SR}^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^a)(\text{R}^b)$ 、 $-\text{N}(\text{R}^a)\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ 、 $-\text{N}(\text{R}^a)\text{S}(\text{O})_2\text{R}^b$ 、 $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^a$ 、ハロゲン、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NC}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NCO}$ 、 $-\text{OCN}$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{SCN}$ 、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、およびヘテロアリールからなる群から選択されてもよい。一方、用語「非置換」基は、炭化水素基である基を指す。

30

## 【0143】

本明細書で使用する時、用語「ハロゲン」、「ハル」または「ハロ」は、 $\text{F}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$  または  $\text{I}$  を意味する。

## 【0144】

本明細書で使用する時、用語「アリールアルキル」は、1～100個の炭素原子を含む、直鎖または分岐鎖であり得、かつ、炭素-炭素三重結合および／または二重結合の  $\text{sp}^2$  混成炭素を含み得る飽和または不飽和の炭化水素鎖を指す。アリール基および／またはアルキル基は、任意で1つ以上の置換基で置換されてもよい。アルケニル基およびアルキニル基の  $\text{sp}^2$  または  $\text{sp}$  炭素はそれぞれ、任意でアルケニル基またはアルキニル基の結合点であってもよい。

40

## 【0145】

用語「シクロアルキル」は、炭化水素3～8員環の単環式環系または7～14員環の二環式環系、または少なくとも1つの飽和環を有するもしくは少なくとも1つの非芳香族環を有する15超の環員のより大きな環系を指し、非芳香族環は、ある程度の不飽和を有することがある。シクロアルキル基は、任意で1つ以上の置換基で置換されてもよい。一実施形態では、シクロアルキル基の各環の0個、1個、2個、3個、または4個の原子は

50

、置換基によって置換されてもよい。シクロアルキル基の代表的な例としては、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロブチル、シクロヘプチル、シクロペンテニル、シクロペンタジエニル、シクロヘキセニル、シクロヘキサジエニル等が挙げられる。

【0146】

用語「アリール」は、炭化水素の単環式、二環式または三環式の芳香族環系を指す。アリール基は、任意で1つ以上の置換基で置換されてもよい。一実施形態では、アリール基の各環の0個、1個、2個、3個、4個、5個または6個の原子は、置換基によって置換されてもよい。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、アントラセニル、フルオレニル、インデニル、アズレニル等が挙げられる。

10

【0147】

用語「ビアリール」は、単結合によって結合される場合、2つの芳香族環またはアリール基の集合体である構造を含む芳香族環系を指す。アリール基は、任意で1つ以上の置換基で置換されてもよい。ビアリール基の例としては、ビフェニル、ビナフチル等が挙げられる。

【0148】

用語「ヘテロアリール」は、炭素原子（環員とも呼ばれる）とN、O、PまたはSから独立して選択されて、親環系の環原子から1つの炭素原子を取り除くことによって誘導されるヘテロ原子環員とを有する、少なくとも1つのヘテロ原子を含む単環式、二環式または三環式芳香族の環系を指す。ヘテロアリール基の例としては、フラン、チオフェン、ピロール、チアゾール、オキサゾール、ピリジン、ピラジン等が挙げられる。

20

【0149】

本明細書で使用する時、用語「アルキルシクロアルキル」、「アルキルアリール」、「アルキルビアリール」、および「アルキルヘテロアリール」は、飽和または不飽和の炭化水素鎖を指し、1～8個の炭素原子を含む、直鎖または分岐鎖であり得、かつ、炭素-炭素三重結合および／またはシクロアルキル、アリール、ビアリールまたはヘテロアリールに結合した二重結合のsp<sup>2</sup>混成炭素を含み得る。さまざまな環状構造は、上記のように規定される。シクロアルキル、アリール、ビアリールもしくはヘテロアリールおよび／またはアルキル基は、任意で1つ以上の置換基で置換されてもよい。アルケニル基およびアルキニル基のsp<sup>2</sup>またはsp炭素はそれぞれ、任意でアルケニルまたはアルキニル基の結合点であってもよい。

30

【0150】

好ましい実施形態では、残基Rは、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルシクロアルキル、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルアリール、ヘテロアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルヘテロアリール、ビアリール、およびC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルビアリールからなる群から独立して選択される。別の実施形態では、残基Rは、置換または非置換のアルキル、シクロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルシクロアルキル、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルアリール、ヘテロアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルヘテロアリール、ビアリール、およびC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルビアリールからなる群から独立して選択される。より好ましい実施形態では、残基Rは、置換または非置換のC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>シクロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>シクロアルキル、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>アリール、ヘテロアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルヘテロアリール、ビアリール、およびC<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルビアリールからなる群から独立して選択される。より好ましい実施形態では、残基Rは、置換または非置換のシクロヘキシル、フェニル、ベンジル、ビフェニル、ピリジル、またはオキサゾリルからなる群から独立して選択される。別の好ましい実施形態では、残基Rは、置換または非置換のフェニルである。

40

【0151】

残基Rの置換基は、ランゲリンへの結合においてリガンドを妨害しない任意の好適な置換基であってもよい。さらに、置換基は、同じ型または異なる型の1つ以上の置換基であ

50

ってもよい。Rの置換基は、任意の置換パターンを有してもよい。一実施形態では、残基Rの置換基は、 $N(R^a)(R^b)$ 、 $-OR^a$ 、 $-SR^a$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(O)OR^a$ 、 $-C(O)N(R^a)(R^b)$ 、 $-N(R^a)C(O)R^b$ 、 $-N(R^a)S(O)_2R^b$ 、 $-OS(O)_2R^a$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-NC$ 、 $-N_3$ 、 $-NCO$ 、 $-OCN$ 、 $-NCS$ 、 $-SCN$ 、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、およびヘテロアリールからなる群から独立して選択される。R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は、水素、置換または非置換のC<sub>1</sub>–8アルキル、C<sub>2</sub>–8アルケニル、C<sub>2</sub>–8アルキニル、C<sub>3</sub>–6シクロアルキル、アリール–C<sub>1</sub>–5アルキル、ヘテロアリール–C<sub>1</sub>–5アルキル、アリール、ヘテロアリールからなる群から独立して選択されてもよい。好ましい実施形態では、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は、水素、メチルおよびエチルからなる群から独立して選択されてもよい。

10

#### 【0152】

より好ましくは、残基Rの置換基は、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-C(O)CH_3$ 、 $-NHC(O)CH_3$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、C<sub>1</sub>–C<sub>4</sub>アルキルおよびフェニル、ビフェニル、ならびにナフチルからなる群から独立して選択される。好ましい実施形態では、残基Rは、置換フェニル残基である。このフェニル残基は、5つの置換基で置換されていてもよい。より好ましくは、フェニル残基は、一置換、二置換、または三置換されてもよい。最も好ましい実施形態では、残基Rは、一置換フェニル残基であり、置換基は、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-C(O)CH_3$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHCH_3$ 、 $-CH_2OH-NHC(O)CH_3$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、C<sub>1</sub>–C<sub>4</sub>アルキル、ナフチルおよびフェニルからなる群から選択される。さらに好ましい実施形態では、置換基は、リガンドに対してパラ位にある。さらに好ましい実施形態では、パラ位にある置換基およびフェニルの置換基は、 $-NHC(O)CH_3$ 、 $-CN$ 、 $-CH_3$ 、 $-F$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-C(O)NHCH_3$ 、 $-CH_2OH$ およびフェニルからなる群から独立して選択される。さらに好ましい実施形態では、置換基は、リガンドに対してメタ位にある。

20

#### 【0153】

別の実施形態では、R'は、 $-OR^a$ および $-NHS(O)_2R^a$ からなる群から独立して選択されてもよく、R<sup>a</sup>は、上記のように規定される。好ましい実施形態では、R'は、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-OCH_2CH_3$ 、または $-NHS(O)_2R^a$ からなる群から選択されてもよく、R<sup>a</sup>は、上記のように規定される。より好ましい実施形態では、 $-OH$ または $-NHS(O)_2R^a$ であり、R<sup>a</sup>は、上記のように規定される。より好ましい実施形態では、R'は、 $-OH$ 、 $-NHS(O)_2CH_3$ またはN-トシルである。最も好ましい実施形態では、R'は $-OH$ である。

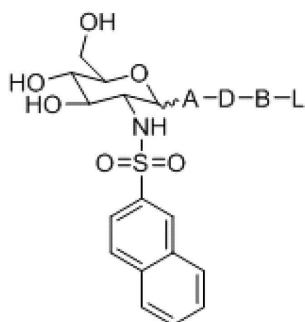
30

#### 【0154】

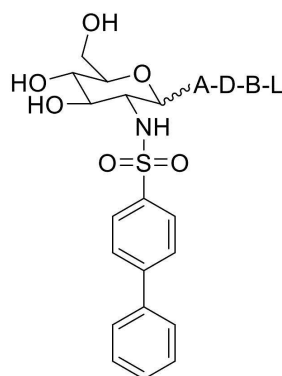
さらに別の好ましい実施形態では、上述のような複合体は、以下の式(I-1)または(I-2)の複合体である。

#### 【0155】

#### 【化7】



(I-1)



(I-2)

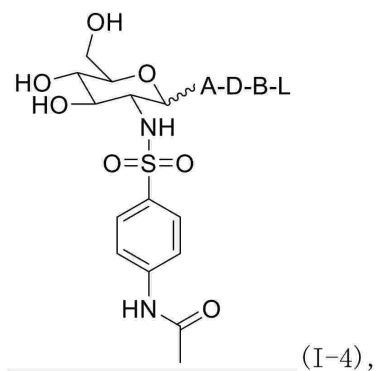
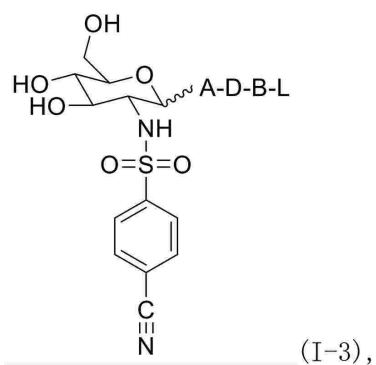
40

50

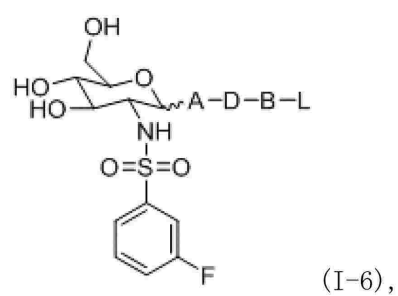
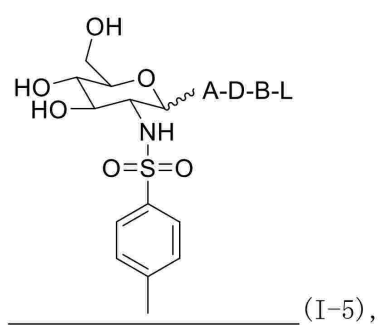
より一層好ましい実施形態では、上述のような複合体は、以下の式（I-3）～（I-15）のうちのいずれか1つの複合体である。

【0156】

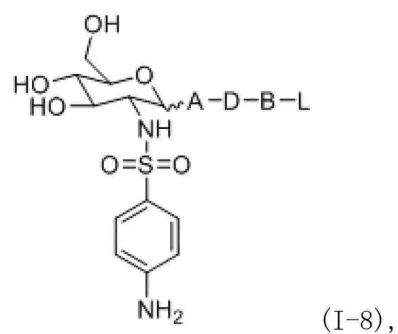
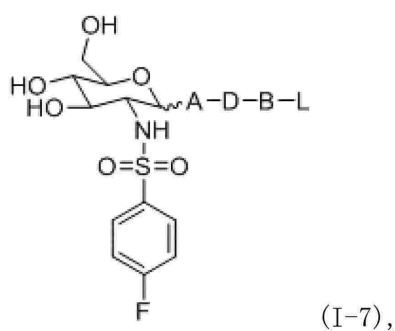
【化8】



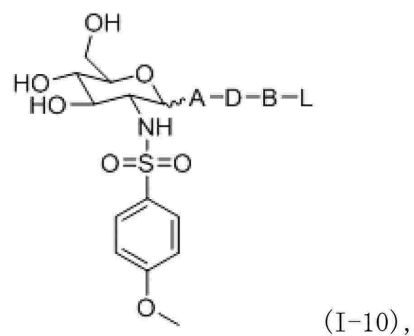
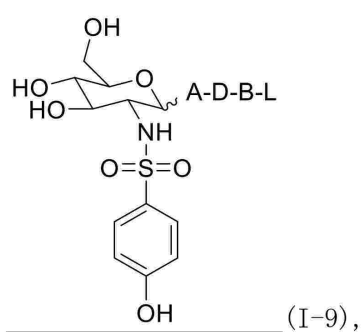
10



20

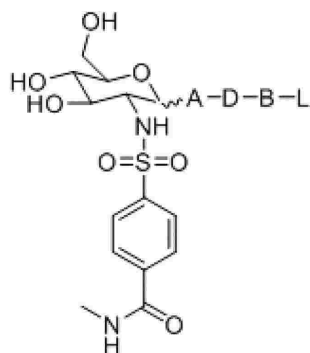


30

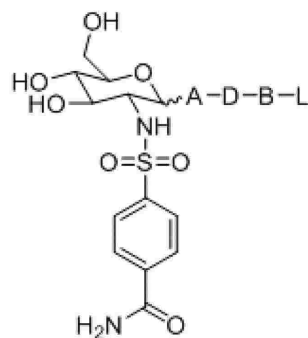


40

50

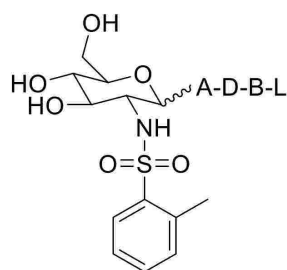


(I-11),

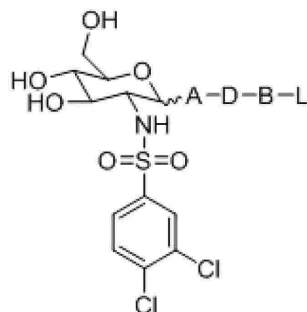


(I-12),

10

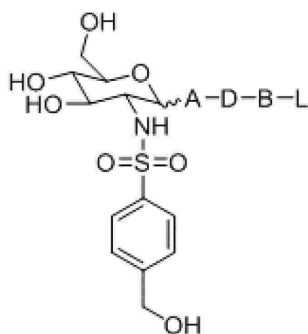


(I-13),



(I-14), または

20



(I-15)

30

用語「A-D-B-Lリンカー基」、「A-D-B-L」、または「リンカー基」は、スペーサーA-D-BおよびリンカーLからなる基を指す。この基は、グルコース誘導体-リガンドを担体に連結する。典型的な実施形態では、一端において、上記一般式(I)のリンカーLは、上述のように、スペーサーA-D-Bを介して、式(I)のグルコース誘導体を含む先に規定したランゲリンリガンド構造に結合している。スペーサーA-D-Bは、上記のグルコース誘導体のC1位に共有結合的に結合している。スペーサーA-D-Bはまた、上記のグルコース誘導体のC6位に共有結合的に結合していることも想定される。

#### 【0157】

ある実施形態では、リガンドと担体との間のA-D-B-Lリンカー基は、分子鎖である。好ましい実施形態では、上記主鎖は、少なくとも4原子、好ましくは4原子~600原子、より好ましくは15原子~400原子、さらにより好ましくは25原子~200原子、例えば25原子、30原子、40原子、50原子、60原子、70原子、80原子、90原子、100原子、110原子、120原子、130原子、140原子、150原子、160原子、170原子、180原子、190原子および200原子の主鎖に含まれる炭素原子、窒素原子および酸素原子の総数を有してもよい。別の実施形態では、リンカーの主鎖の長さは、約0.4nm~約400nm、より好ましくは約0.6nm~100nm、例えば0.6nm、0.8nm、1nm、2nm、4nm、8nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nmおよび100nmであってもよい。リンカーの大きさまたは長さは、例えば、Fuji et al., ACS

40

50

Symposium Series, 2017, 1271, "Control of Amphiphile Self-Assembling at the Molecular Level: Supra-Molecular Assemblies with Tuned Physicochemical Properties for Delivery Applications", Chapter 5, pages 115-129に記載されているように、分析遠心分離測定または SAXS 測定によって測定してもよい。例えば、Needham and Kim, 2000, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 18, 3-4, 183-195 または Stepniwieski et al., 2011, Langmuir, 27(12), 7788-7798に記載されているように、好適な測定技術によって平均鎖長を測定してもよい。

#### 【0158】

本明細書で使用する時、用語「リンカーL」または「L」はさらに化合物を指し、当該化合物を使用して、本明細書において上記に規定した上記発明のランゲリンリガンドおよび担体を、例えば、スパーサーA-D-Bを介して、直接的または間接的に連結してもよい。得られた結合は、任意の好適な化学結合によって、好ましくは共有結合を介して伝えられてもよい。

#### 【0159】

好ましい実施形態では、上記リンカーLは、合成ポリマーもしくは天然ポリマーのうちの1つ以上またはそれらのポリマーもしくはそれらの組み合わせの1つ以上の単一ユニットを含んでもよい。本発明のリンカーは、好ましくは生体適合性および／または生分解性である。上記リンカーは、ある実施形態では、水中で溶解、分散または膨潤するため、ゲル化、濃厚化または乳化／安定化の形態で水溶液系の物性を改変する合成水溶性ポリマーであってもよい。好ましい実施形態では、上記合成ポリマーは、飽和もしくは不飽和の炭化水素ポリマー；ポリアミン；ポリアミド；ポリエステル；ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等のポリエーテル；ブロックコポリマーまたはポロキサマーであってもよい。特に好ましい実施形態では、上記リンカーは、ポリエチレングリコールである。対応する具体的な実施形態では、上記ポリエチレングリコールリンカーは、 $(-CH_2-CH_2-O-)$  繰り返し単位の約0～150、より好ましくは1～100、さらにより好ましくは3～50の長さを有してもよい。好適なポリマーのさらなる例は、ポリビニルピロリドン、ポリビニルピロリドン-酢酸ビニル共重合体、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリアシルアミド、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドおよびポリオキサゾリンである。

#### 【0160】

好ましい実施形態では、天然ポリマーは、好適なリンカーであってもよく、糖質、修飾糖質、ペプチド、修飾ペプチド、脂質および修飾脂質からなる群から選択される。

#### 【0161】

本明細書で使用する時、用語「糖質」は、任意の天然または合成の糖質に関する。上記用語は、トリオース、テトロース、ペントース、ヘキソースおよびヘプトースをさらに含んでもよい。糖質は、アルドースまたはケトースであってもよい。糖質はD体またはL体であってもよい。糖質は、1つ以上の単糖または二糖を含んでもよい。糖質は、3～9個の単糖を含むオリゴ糖を形成してもよい。糖質はまた、9個より多い単糖を含む多糖であってもよい。用語「単糖」は、トレオース、リブロース、グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、リボース、アラビノースおよびマンノースを含むが、これらに限定されない。二糖、オリゴ糖および多糖に含まれる単糖は、任意の配置で互いに連結されてもよい。用語「二糖」は、スクロース、ラクトース、およびマルトースを含むが、これらに限定されない。用語「オリゴ糖」は、マルトデキストリンおよびセロデキストリンを含むが、これらに限定されない。用語「多糖」は、デンプン、セルロース、およびキチンを含むが、これらに限定されない。天然の糖質は、天然の単糖を含む。合成糖質は、D-体およびL-体の、修飾された、合成された、珍しい単糖および単糖誘導体を含んでもよい。「修飾糖質」とも呼ばれる「単糖誘導体」は、例えばアルキル化、アセチル化、リン酸化等による親単糖の共有結合による置換または修飾を有する単糖を含む。「単糖誘導体」の定義内にさらに含まれるのは、例えば、置換された結合を有する単糖の1つ以上のアナログ、ならびに当該技術分野で知られている他の修飾である。好ましい糖質は、マ

ンノース、グルコース、フコースまたはキシロースである。ある実施形態では、イノシトールもまた使用してもよい。

【0162】

本明細書で使用する時、用語「脂質」は、任意の天然または合成の脂質に関する。従って、脂質は、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドを含む脂肪酸およびそれらの誘導体、リン脂質、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、サッカロリピッド、ポリケチド、ステロール脂質並びにプレノール脂質を含んでもよく、DSPC (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)、DPPC (1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロイル-3-ホスホコリン)、DPPE (1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロイル-3-ホスホエタノールアミン)、DMPC (1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロイル-3-ホスホコリン)、DSPC (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロイル-3-ホスホコリン)、膜脂質、およびホスファチジルコリンならびにこれらの修飾バージョンを含む。好ましい脂質は、DPPC (1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロイル-3-ホスホコリン)、DPPE (1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロイル-3-ホスホエタノールアミン)、DMPC (1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロイル-3-ホスホコリン)、DSPC (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロイル-3-ホスホコリン) または DSPC (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン) である。用語「修飾脂質」は、1つ以上の修飾を有する脂質である。このような脂質の修飾は、アセチル化、グリコシル化、アルキル化、キレート化剤との組み合わせ、または pH 感受性の提供、炭素酸、ピオチン、アミン、thioethanol、アジド基等の追加のようなさらなる官能化を含んでもよい。脂質を、柔軟性、弾性および／または透過性の増強剤とさらに組み合わせてもよい。さらなる詳細は、当業者に既知であるか、または Benson, 2017, Methods Mol. Biol., 1522: 107-117, Sala et al., 2018, Int J. Pharm. 535 Molecular Cell Biology, 201(1-2), 1-17 または Harayama and Riezman, Nature Reviews, 2018 8, 19, 281-296 等の好適な文献ソースから得ることができる。

【0163】

本明細書で使用する時、用語「ペプチド」は、2 個より多いアミノ酸を含む任意のタイプのアミノ酸配列またはその機能的誘導体に関する。さらに、ペプチドは、さらなる化学部分または官能基と組み合わされてもよく、または合成ペプチドであってもよい。天然ペプチドは、通常、天然アミノ酸を含む。合成ペプチドは、D-体および L-体の、修飾された、合成された、または天然に存在しないアミノ酸およびアミノ酸誘導体を含んでもよい。天然ペプチドは、天然アミノ酸を含む。合成ペプチドは、D-体および L-体の、修飾された、合成された、または珍しいアミノ酸およびアミノ酸誘導体を含んでもよい。

「アミノ酸誘導体」は、例えばアルキル化、グリコシル化、アセチル化、リン酸化等による親アミノ酸の共有結合による置換または修飾を有するアミノ酸を含む。「アミノ酸誘導体」の定義内にさらに含まれるのは、例えば、置換された結合を有するアミノ酸の 1 つ以上のアナログ、ならびに当該技術分野で知られている他の修飾である。「天然アミノ酸」は、文脈によって別段の指示がない限り、アルギニン、グルタミン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、リジン、グリシン、アラニン、ヒスチジン、セリン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、トレオニン、システイン、メチオニン、ロイシン、アスパラギン、イソロイシン、およびバリンを指す。本発明に係る好ましいペプチドは、オリゴ-L-グルタミン酸またはオリゴ-L-リジンであってもよい。他の好ましいペプチドは、短い N 末端ジ-L-グリシンリンカーを用いて、例えば、配列 VLT TGL PAL I S W I K R K R Q Q (配列番号 81) の挿入によって、脂質ベースの担体に連結する両親媒性ペプチドであってもよい。ペプチドをポリペプチドと区別してもよい。「ポリペプチド」は、例えば、20~50 個より多いアミノ酸の長さを有してもよい。ある実施形態では、リンカーは、ポリペプチドリナーであってもよい。本明細書で使用する時、用語「タンパク質」は、1 つ以上のポリペプチドの配列に関する。従って、タンパク質は、1 つのポリペプチドを含んでもよいまたはそれからなってもよい。これにより、

ポリペプチドと同義であってもよい。他の実施形態では、タンパク質は、タンパク質の形態の高次構造のユニットまたはサブユニットに構成され得る2つ以上のポリペプチドを含んでもよい。

【0164】

水溶性であり、本発明の文脈においてリンカーとして好適に使用してもよい天然ポリマーのさらなる例は、ペクチン、キトサン誘導体、キサンタンガム、キトサン誘導体、デキストラン、セルロースエーテル、ヒアルロン酸、カゼイン、カラゲナン、デンプンおよびデンプン誘導体等である。

【0165】

ある実施形態では、リンカーは、単に共有結合であってもよい。このようなシナリオでは、担体構造は、スペーサーA-D-Bに直接的に結合していてもよい。

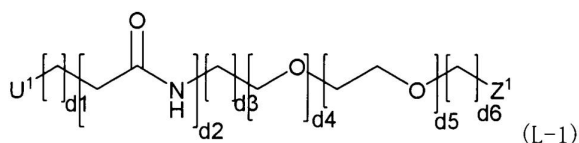
10

【0166】

好ましい実施形態では、上記リンカーLは、以下の一般式(L-1)のリンカーであり、

【0167】

【化9】



20

式中、

U<sup>1</sup>は、Bを介してスペーサーDと連結された基であり、U<sup>1</sup>は、-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, または-C≡C-からなる群から選択され、U<sup>1</sup>はまた、単結合であってもよく、好ましくはU<sup>1</sup>は、-CH<sub>2</sub>-または共有結合であり、

Z<sup>1</sup>は、-O-, -S-, -N(R<sup>d</sup>)-, -C(R<sup>d</sup>)(R<sup>e</sup>)-, -R<sup>d</sup>C=CR<sup>e</sup>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)S-, -C(O)N(R<sup>d</sup>)-, -N(R<sup>d</sup>)C(O)-, -N(R<sup>d</sup>)C(O)N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>d</sup>)C(S)N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>d</sup>)C(O)O-, -OC(O)N(R<sup>d</sup>), -シクロヘキセン-, -トリアゾール-, -NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>-, -OP(O)(H)O-, または-OP(O)(OH)Oからなる群から選択された上記担体に上記リンカーを結合する部分であり、Z<sup>1</sup>はまた、単結合であってもよく、好ましくはZ<sup>1</sup>は、共有結合、アミド基またはカルボニル基であり、

30

R<sup>d</sup>およびR<sup>e</sup>は、水素、置換または非置換のC<sub>1-32</sub>アルキル、C<sub>2-32</sub>アルケニル、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、アリール、C<sub>1-8</sub>アルキルアリール、ヘテロアリール、C<sub>1-8</sub>アルキルヘテロアリールからなる群から独立して選択され、

d<sub>1</sub>~d<sub>5</sub>はそれぞれ0~100の整数、好ましくは0、1、2、3、4、6、8、10、12、15、20、25、30、35、40、45、または50等の0~50の整数であり、d<sub>6</sub>は、1~100の整数、好ましくは1、2、3、4、6、8、10、12、15、20、25、30、35、40、45、または50等の1~50の整数である。

40

【0168】

以下により詳細に記載されるように、担体またはリガンドは、リガンドへの結合のための反応性部位を有するリンカーLユニットの一部を使用して、調製可能である。複合体を合成するために、リンカーは、二官能性リガンドまたは二官能性ユニットとして提供されてもよい。従って、リンカーLユニットは、リガンドユニットまたは担体ユニット上に存在する求電子基と反応性である求核基を有する反応性部位を有してもよい。また、従って、リガンドユニットまたは担体ユニットは、リンカーLユニット上に存在する求電子基と反応性である求核基を有する反応性部位を有してもよい。リガンドユニットまたは担体ユ

50

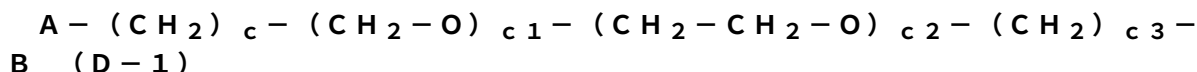
ニット上の求電子基は、リンカーユニットへの結合に好都合な部位を提供するか、または代わりに、リンカーユニット上の求電子基は、リガンドユニットまたは担体ユニットへの結合に好都合な部位を提供する。リガンドまたはリンカーユニット上の有用な求電子基としては、アルデヒドおよびケトンカルボニル基が挙げられるが、これらに限定されない。リンカーユニットの求核基のヘテロ原子は、リガンド上の求電子基と反応し、リガンドに対する共有結合を形成することができる。また、リガンドユニットの求核基のヘテロ原子は、リンカー上の求電子基と反応し、リンカーに対する共有結合を形成することができる。リンカーユニットまたはリガンドユニット上の有用な求核基としてはヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドが挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、1つのOH基を運搬するか、または例えば、一般的な求核剤、および追加の官能基であり得る二官能性リンカーを使用してもよい。第2の官能基は、オルソゴナルな保護基を運搬する任意の求核剤、またはグリコシル化反応および包括的な脱保護方法に適合する官能基であってもよい。続いて、二官能性要素を、OH基を介して単糖のアノマー中心と反応させてもよい。続いて、単糖および第2の官能基を脱保護する。その後、生成物を、対応するPEG化脂質に結合してもよい。

10

#### 【0169】

本明細書で使用する時、用語「スペーサー」は、リンカーを本明細書において上記に規定した上記発明のグルコース誘導体-リガンドと共有結合的に連結する任意の構造を指す。好ましい実施形態では、上記スペーサー基A-D-Bは、一般式(D-1)のAおよびBと連結されたスペーサーとしてDを含み、

20



式中、

Dは、Bを介してリンカーLに連結され、Bは、-O-、-S-、-C(R<sup>c1</sup>)(R<sup>c2</sup>)-、-S-S-、-N(R<sup>c1</sup>)-、-C(O)-、-C(R<sup>c1</sup>)=N-、-N=N-、-OC(O)-、-C(O)O-、-C(O)N(R<sup>c1</sup>)-、-N(R<sup>c1</sup>)C(O)-、-N(R<sup>c1</sup>)C(O)N(R<sup>c2</sup>)-、-N(R<sup>c1</sup>)C(S)N(R<sup>c2</sup>)-、-N(R<sup>c1</sup>)C(O)O-、-OC(O)N(R<sup>c1</sup>)-、-シクロヘキセン-およびトリアゾール-からなる群から選択され、Bはまた、単結合であってもよく、好ましくはBは、共有結合、アミド基またはカルボニル基であり、

30

R<sup>c1</sup>およびR<sup>c2</sup>は、水素、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルシクロアルキル、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルアリール、ヘテロアリール、およびC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルヘテロアリールからなる群から独立して選択され、好ましくはR<sup>c1</sup>およびR<sup>c2</sup>は、水素およびメチルからなる群から独立して選択され、

Dは、Aを介してグルコース誘導体に連結され、Aは、-O-、CH<sub>2</sub>-、-S-、-NH-、-NHC(O)-、-OC(O)-、-シクロヘキセン-およびトリアゾール-からなる群から選択され、Aはまた、単結合であってもよく、好ましくはAは、共有結合、アミド基またはカルボニル基であり、

40

cは0~20から選択される整数であり、好ましくはcは0、1、2、または3であり、c<sub>1</sub>は0~20から選択される整数であり、好ましくはc<sub>1</sub>は0、1、2、または3であり、c<sub>2</sub>は0~20から選択される整数であり、好ましくはc<sub>2</sub>は0、1、2、または3であり、c<sub>3</sub>は1~20から選択される整数であり、好ましくはc<sub>3</sub>は1、2、または3であり、AがCH<sub>2</sub>である場合、c<sub>3</sub>は0~20から選択される整数である。スペーサー基Dは、単結合、1つ以上のメチレングリコール基、1つ以上のエチレングリコール基、または炭化水素もしくはそれらの混合物であってもよい。スペーサーは、より好ましくは単結合、-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、または-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-から選択される基である。したがって、AおよびBは、単結合を介して連結されてもよい。

#### 【0170】

50

本明細書で使用する時、用語「担体」は、カーゴを細胞または細胞群に運搬することができる任意の構造を指す。従って、カーゴは、担体に結びつけられ、すなわち結合され、または担体によって構成され、担体に含まれ、または包含されてもよい。担体はまた、特に好ましい実施形態では、関連するリガンドの以前の相互作用を受けて、すなわち、標的細胞と、上記で規定された複合体またはビヒクルとの状況において、輸送されたカーゴを上記細胞に導入することが有利に可能であり得る。担体は、具体的な実施形態では、1種以上のカーゴを含んでもよい。これらのカーゴは、同一のまたは異なる方法で担体に連結されてもよい。例えば、1つのカーゴタイプは、例えば外部で担体に結合していてもよく、別のカーゴタイプは、担体に含まれ、または包含されてもよい。

#### 【0171】

本発明のある実施形態によれば、担体は、1：1の比率で、本明細書において規定される複合体に連結または結合し得る、すなわち、1つの担体が1つの複合体に結合している。さらなる実施形態では、担体は、2つ以上の複合体に結合していてもよい。特定の実施形態では、担体は、10個未満の複合体に結合している。より好ましい実施形態では、担体は、100個未満の複合体に結合していてもよい。別の好ましい実施形態では、担体は、200個未満の複合体に結合していてもよい。さらなる実施形態では、担体と複合体の比率は、調整可能であってもよく、例えば、担体の形態、意図されたカーゴ、二次結合目的等に合わせられてもよい。例えば、担体と複合体との間に、1：2、1：3、1：4、1：5、1：10、1：15、1：20、1：25、1：30、1：35、1：40、1：50、1：60、1：70、1：80、1：90、1：100もしくは1：200またはそれより大きい比率または上記の比率の間の任意の比率（整数値）が設けられてもよい。さらに代替の実施形態では、2つ以上の担体に対する1つの複合体の比率もまた設けられてもよい。従って、担体と複合体との間に、2：1、3：1、4：1、5：1、10：1、15：1、20：1、25：1、30：1もしくはそれより大きい比率または上記の比率の間の任意の比率が設けられてもよい。

#### 【0172】

具体的な実施形態では、担体は、軟質粒子であってもよい。本明細書で使用する時、用語「軟質粒子」は、弾性であり、変形可能であり、通常生分解性または非生体持続性である粒子に関する。軟質粒子の好ましい例は、リポソーム、ニオソーム、ミセル、*sequeosome*（商標）およびトランスフェロソームである。先に規定した軟質粒子は、異なる種類の成分、例えば脂質を含んでもよく、またはそれらから構成されてもよい。軟質粒子は、例えば、1種以上のリン脂質を含んでもよく、さらに、軟質粒子は、例えば、安定性、剛性、結合能力、細胞に対する浸透能力、二次ターゲティング能力等に影響を及ぼし得る追加成分を含んでもよい。成分の例は、コレステロールであり、これは、通常、二重層構造の流動性を減少させ、リポソームの安定性を増加させる。特に好ましい実施形態では、軟質粒子は、リポソームである。上記粒子は、57%のDSPC、38%のコレステロールおよび5%のDSPE-PEGを含むことが特に好ましい。

#### 【0173】

「リポソーム」は、例えば、本明細書において上記に規定した脂質の少なくとも1つの二重層を有する球形小胞である。リポソームは、リン脂質（例えば、ホスファチジルコリン）を含んでもよい、または他の脂質（例えば、ホスファチジルエタノールアミン）を含む。リポソームは、多層小胞（MLV）の形態で提供され得る、すなわち、小さな単層リポソーム小胞（SUV）として、いくつかのラメラ相脂質二重層を含む、すなわち、1つの脂質二重層、または大きな単層小胞（LUV）を含む。リポソームは、通常、疎水性膜によって取り囲まれた水溶液核を有する。従って、上記核に溶解した疎水性化合物は、上記二重層が、例えば細孔の導入によって開かれない限り、または上記二重層がさらなる二重層構造、例えば細胞膜と融合しない限り、上記二重層を通過することができず、それによって、リポソーム内容物を第2の二重層、例えば細胞の核に送達する。その結果、疎水性化合物は、通常、脂質二重層と結合するため、リポソームの上記区画に装填され得る。また、リポソームは、エンドサイトーシスまたはファゴサイトーシス事象の誘発によっ

10

20

30

40

50

て、細胞に送達され得る。リポソームは、脂質の性質、ラメラ構造、および脂質二重層中の追加の因子（例えば、コレステロール）の存在に大きく依存した、さまざまな大きさを有し得る。例えば、リポソームの大きさは、数ナノメートルから2000nmまでの間であってもよい。リポソームの大きさは、当業者に知られている任意の好適なアッセイ、好ましくは動的光散乱法（DLS）を用いて測定してもよい。

【0174】

特に好ましい実施形態では、リポソームは、二重層リン脂質リポソームである。上記二重層リン脂質リポソームの大きさは、10~500nmであることが本発明によって想定される。上記リポソームの大きさは、例えば、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、120nm、140nm、150nm、160nm、180nm、200nm、220nm、240nm、250nm、260nm、280nm、300nm、350nm、400nm、450nmまたは500nmであってもよい。好ましくは、上記の大きさは、30~250nm、例えば、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、120nm、140nm、150nm、160nm、180nm、200nm、220nm、240nm、または250nmである。また、上記の大きさの間でさらに大きさが決められるとも想定される。

【0175】

リポソームの約140nmの好ましい大きさは、数カ月以上にわたって再現性のあるリポソーム安定性を与えることがわかった。

【0176】

二重層リン脂質リポソームを含むリポソームは、1つ以上の追加成分を含んでもよい。これらの追加成分の一例は、コレステロールである。好ましい実施形態では、コレステロールが好ましくは約20~50mol%の量で、例えば、約20mol%、25mol%、30mol%、35mol%、40mol%、45mol%もしくは50mol%の量で、または上記の値の間の任意の好適な値で、上記リポソーム中に含まれてもよい。より好ましくは、コレステロールは、約40%の量で存在してもよい。

【0177】

リポソームはさらに好ましくはリン脂質、より好ましくはホスファチジルコリンで構成されてもよいが、脂質二重層構造と適合する限り、他の脂質、例えば、卵ホスファチジルエタノールアミンを含んでもよい。リン脂質の特に想定される例としては、POPC（1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、DPPG（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、DSPC（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、DOPC（1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、DSPE（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）、DMPC（1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、DPPC（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）、DMPE（1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）、DPPE（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）、DMPA・Na（1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスフェート（ナトリウム塩））、DPPA・Na（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート（ナトリウム塩））、DOPA・Na（1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）（ナトリウム塩））、DMPG・Na（1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）（ナトリウム塩））、DPPG・Na（1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン）（ナトリウム塩））、DMPS・Na（1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン（ナトリウム塩））、DPPS・Na（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン（ナトリウム塩））、およびDOPS・Na（1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン（ナトリウム塩））が挙げられる。

## 【0178】

本明細書で使用する時、用語「ニオソーム」は、非イオン性界面活性剤ベースの小胞を指す。通常、ノイソームは、アルキルまたはジアルキルポリグリセロールエーテルクラスの非イオン性界面活性剤およびコレステロールと、その後の水性媒体中での水和とによって形成される。ニオソームは、二重層を有する点でリポソームと構造的に類似しているが、それらの組成のためにより安定である。これらは、小さな単層小胞（SUV、サイズ＝0.025～0.05 μm）、多層小胞（MLV、サイズ＝>0.05 μm）、および大きな単層小胞（LUV、サイズ＝>0.10 μm）である。ニオソームの調製に使用される界面活性剤の例としては、ソルビタンモノステアレート（Span-60）、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、およびSpan 40（C16G2）が挙げられる。

10

## 【0179】

本発明の文脈において使用する時、用語「ミセル」は、液体中に分散された界面活性剤分子、例えばリン脂質、ブロックコポリマーまたはトリブロックコポリマーの凝集体を意味する。水溶液中の典型的なミセルは、周囲の溶媒と接触する親水性のヘッド領域と凝集体を形成し、ミセル中心の疎水性の単一テール領域を隔離する。したがって、ミセルは単一層構造を有する。ミセルは、臨界ミセル濃度を超えて形成され、通常1～100 nmの直径を示す。高分子ミセルは、一般により安定であり、通常20～50 nmの直径を有する単分散である。さらなる詳細は、Soussan et al., 2009, Angew Chem Int Ed Engl. 48(2), 274-88等の好適な文献ソースから得てもよい。これらの順相ミセルに加えて、テールが延出した状態で親水性のヘッドグループがミセルの中心にある、形の異なる逆ミセルの別のグループがある。ミセルの形および大きさは、その界面活性剤分子の分子構造および界面活性剤またはポリマー濃度、温度、pH、およびイオン強度等の溶液条件の関数である。想定される界面活性剤の例としては、DeTAB、DTAB、TTAB、またはCTAB等のカチオン界面活性剤；SDSまたはSDC等のアニオン界面活性剤；SB-14またはCHAPS等の双イオン性界面活性剤；またはNOG、Tween 20、Tween 80、またはTriton X等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。高分子ミセルは、その向上した安定性のため、本発明の好ましい実施形態である。特に好ましい実施形態によれば、これらの高分子ミセルは、親水性部分に使用され得るポリエチレンオキシドベースポリマーまたは生分解性の糖質ベースポリマーおよびグリセロールベースポリマーを含む。疎水性部分は、好ましくは生分解性の乳酸塩ベースのポリマーで構成されてもよい。別の好ましい実施形態では、pH感受性ブロックコポリマーで構成されるミセルが提供される。このようなミセルを、塩基性または酸性の官能基を含めることによって生成してもよく、これにより、ポリマーの溶解度、その結果、さまざまなpH値でのミセルの安定性が有利に変化し得る。

20

30

## 【0180】

本明細書で使用する時、用語「sequeesome」（商標）は、二重層として配置されたリン脂質および界面活性剤分子から作製された超変形可能な親水性の球に関する。界面活性剤を含めることで二重膜が柔らかくなり、sequeesome小胞を柔軟にのみならず安定にすることにより、それらは、注射または皮膚浸透促進剤を必要とせずに、無傷の皮膚を通過し、体内に深く浸透することができる。さらなる詳細は、例えば、Benson, 2017, Methods Mol. Biol., 1522: 107-117、またはSala et al., 2018, Int J. Pharm. 535 (1-2), 1-17から得てもよい。

40

## 【0181】

本明細書で使用する時、用語「トランスフェロソーム」は、少なくとも1つの両親媒性物質で構成される担体凝集体に関し、両親媒性物質は、水系溶媒において、単一の脂質小胞に閉じる脂質二重層に自己構成する。通常、両親媒性物質は、ホスファチジルコリンである。少なくとも1つの二重層軟化成分、例えば、生体適合性の界面活性剤または両親媒性薬物を添加することによって、脂質二重層の柔軟性および透過性が増加し得る。結果として生じるトランスファソーム（transfersome）は、柔軟性および透過性について最適化されているため、各二重層構成要素の局所濃度を上記二重層で受ける局所応力に合わ

50

せることによって、その形を周囲条件に容易かつ迅速に適合させることができる。トランスフェロソームは通常、主にそのより柔らかく、より変形可能で、より調整可能な人工膜によって、より慣用的な小胞またはリポソームとは異なる。トランスフェロソームはさらに典型的に、水を結合し、保持するための増加した親和性を有する。理論に束縛されることを望むものではないが、トランスフェロソーム等の超変形可能かつ高親水性の小胞は、正浸透に関連する輸送プロセスを含み得る脱水を回避する傾向があると考えられる。有利には、開放された生体表面、特に皮膚上に塗布されたトランスファソーム (transfersome) は、そのバリアを透過し、十分な水和を確保するために、水が豊富なより深い層に遊走する傾向がある。バリア透過は、可逆的な二重層の変形を含み得るが、内在する水和親和性および勾配が損なわれないままであるために、小胞の完全性またはバリア特性のいずれかを弱めてはならない。さらなる詳細は、例えば、Benson, 2017, *Methods Mol. Biol.*, 1522: 107-117、またはSala et al., 2018, *Int J. Pharm.* 535 (1-2), 1-17から得てもよい。

#### 【0182】

本発明のある実施形態では、軟質粒子の一部、例えば相互作用部分または化合物は、共有結合を介して、または $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^d)-$ 、 $-C(R^d)(R^e)-$ 、 $-R^dC=CR^e-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(O)N(R^d)-$ 、 $-N(R^d)C(O)-$ 、 $-N(R^d)C(O)N(R^e)-$ 、 $-N(R^d)C(S)N(R^e)-$ 、 $-N(R^d)C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R^d)-$ 、 $-シクロヘキセン-$ 、 $-トリアゾール-$ 、 $-NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-OP(O)(H)O-$ 、または $-OP(O)(OH)O-$ からなる群から選択された部分であって、 $R^d$ および $R^e$ は、水素、置換または非置換の $C_{1-32}$ アルキル、 $C_{2-32}$ アルケニル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、アリール、 $C_1-C_8$ アルキルアリール、ヘテロアリール、 $C_1-C_8$ アルキルヘテロアリールからなる群から独立して選択される部分を介して、例えば本明細書において上記に規定した $Z^1$ を介して、本明細書において上記に規定した複合体のリンカー基 $A-D-B-L$ に直接的に結合している。

#### 【0183】

用語「軟質粒子の一部」は、軟質粒子、例えば脂質、修飾脂質、リン脂質、1, 2-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)、膜脂質、または修飾ホスファチジルコリン、またはコレステロール等のリポソームの典型的な成分を指し、これは、本明細書において規定されるランゲリンリガンドに $A-D-B-L$ リンカー基を介して共有結合的に連結される。ある実施形態では、ランゲリンリガンドおよび $A-D-B-L$ リンカー基を含む複合体は、本明細書において「テール領域」とも呼ばれる疎水性領域、ならびに「ヘッド領域」とも称されるランゲリンリガンドも含む親水性領域を含んでもよい。具体的な実施形態では、複合体のテール領域は、脂質二重層構造に埋め込まれてもよく、一方、ヘッド領域は、担体の外部に配置されるため、受容体と相互作用することができる。この埋め込みの例は、図26に概略的に示され、この図は、軟質粒子担体、例えばリポソームに属する脂質二重層構造に挿入される複合体のテール領域を示す。複合体のヘッド領域は、好ましい実施形態では、リガンドと脂質との間に可撓性リンカーを含むため、同族受容体との相互作用が可能になる。特定の実施形態では、このリンカーの長さは、リガンドと軟質粒子の表面、例えばリポソームとの間の最小距離を維持するように適合させることができる。本発明はまた、上述のような脂質二重層またはリポソーム中に2つ以上の複合体が存在することを想定する。複合体の量および上記二重層におけるそれらの距離は、例えば、ランゲリン<sup>+</sup>細胞の表面上の同族受容体の量および頻度と関連付けて調節することができる。一実施形態では、複合体は、軟質粒子の一部、例えば、リポソーム、ミセルまたは類似の構造の一部を形成する、脂質種またはコレステロールに結合していてもよい。別の実施形態では、複合体に結合した脂質と複合体に結合していない脂質とは、約1:15、1:20、1:25、1:50、1:100、1:150、1:200、好ましくは1:20の特定の比率を有する。さらに具体的な実施形態では、脂質に結合した複合体の数を、脂質二重層領域の1平方ナノメートルあたりに存在する複合

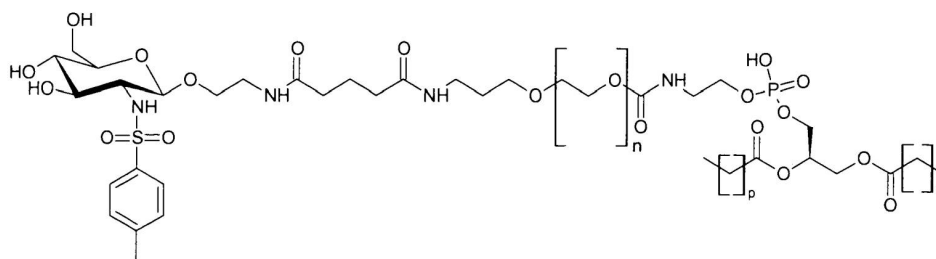
体の数として決定してもよい。好ましい実施形態では、この数は、リポソームの周囲の大きさに適合されるべきである。例えば、160 nmの周囲のリポソームについては、1平方ナノメートル当たり約0.05～0.075個の複合体が存在し得る。非常に具体的な実施形態では、1平方ナノメートル当たり約0.67個の複合体が存在し得る。

【0184】

好ましい実施形態では、複合体は、軟質粒子担体の一部に結合して以下の式（II-a）になり、

【0185】

【化10】



(II-a)

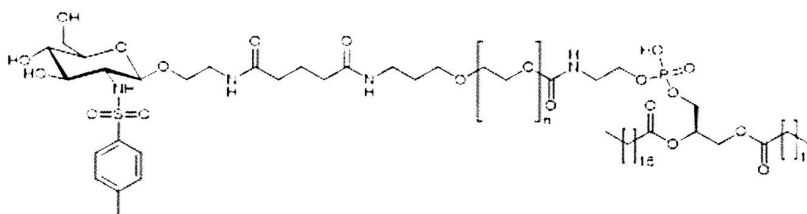
式中、pおよびqはそれぞれ独立して6～30の整数であり；より好ましくはpおよびqはそれぞれ独立して8～28の整数であり、さらにより好ましくはpおよびqはそれぞれ独立して9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27および28であり；nは0～150の整数であり、好ましくは10～100の整数であり、より好ましくは20～75の整数である。より好ましい実施形態では、nは20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75である。最も好ましい実施形態では、nは45である。

【0186】

より好ましい実施形態では、複合体は、軟質粒子担体の一部に結合して以下の式（II）になり、

【0187】

【化11】



(II)

式中、エチレングリコールユニットの平均個数nは、0～150の整数であり、好ましくは約20～110の整数であり、より好ましくは約40～70の整数である。

【0188】

より好ましい実施形態では、nは約40、50、55、60、または70である。最も好ましい実施形態では、nは約59である。具体的な実施形態では、PEGリンカーが使用される。特に好ましいのは、3-(N-スクシンイミジルオキシグルタリル)アミノプロピル、ポリエチレングリコールカルバミルジステアロイルホスファチジルエタノールアミンである。PEGリンカーは、任意の好適な重量を有してもよい。例えば、重量は、約1500～10000 Da、例えば、1500 Da、2000 Da、2500 Da、3000 Da、3200 Da、3500 Da、4000 Da、4500 Da、5000 Da、6000 Da、7000 Da、8000 Da、9000 Daもしくは10000 Da

、または上記の値の間の任意の値であってもよい。約2000～5000Daの範囲も想定される。2000Daの分子量を有するPEGリンカーを使用することが特に好ましい。

#### 【0189】

さらに好ましい実施形態では、担体は、固体構造を有してもよく、ナノ粒子、ペプチド、タンパク質、毒素、デンドリマー、フラレンまたはカーボンナノチューブであってもよい。複合体は、共有結合を介して担体に直接的に結合してもよい、または-O-、-S-、-N(R<sup>d</sup>)-、-C(R<sup>d</sup>)(R<sup>e</sup>)-、-R<sup>d</sup>C=CR<sup>e</sup>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)S-、-C(O)N(R<sup>d</sup>)-、-N(R<sup>d</sup>)C(O)-、-N(R<sup>d</sup>)C(O)N(R<sup>e</sup>)-、-N(R<sup>d</sup>)C(S)N(R<sup>e</sup>)-、-N(R<sup>d</sup>)C(O)O-、-OC(O)N(R<sup>d</sup>)-、-シクロヘキセン-、-トリアゾール-、-NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>-、-OP(O)(H)O-、または-OP(O)(OH)O-からなる群から選択された部分であって、R<sup>d</sup>およびR<sup>e</sup>は、水素、置換または非置換のC<sub>1</sub>-<sub>32</sub>アルキル、C<sub>2</sub>-<sub>32</sub>アルケニル、C<sub>3</sub>-<sub>8</sub>シクロアルキル、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルアリール、ヘテロアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルヘテロアリールからなる群から独立して選択される部分を介して、例えば本明細書において上記に規定したZ<sup>1</sup>を介して、担体に直接的に結合していてもよい。さらなる実施形態では、複合体は、追加のスペース要素を介して担体にさらに結合していてもよい。

10

#### 【0190】

本明細書で使用する時、用語「スペース要素」は、任意の好適な基または天然もしくは合成のポリマーを指す。天然または合成のポリマーは、先に規定した上記天然または合成のポリマーであることが特に好ましい。

20

#### 【0191】

本明細書で使用する時、用語「ナノ粒子」は、通常、取り囲んでいる界面層を有する、1～1000nm、好ましくは5～1000nmの大きさの粒子に関する。ナノ粒子は、本質的に、その輸送および特性に関してユニット全体として機能する。従って、粒子、ひいてはそれらの表面は、対称形、球状形、実質的に球状形もしくは球面形状を有してもよく、または不規則、非対称の形状もしくは形態を有してもよい。粒径（ひいては上記表面の寸法）は変化してもよい。好ましいのは、数百ナノメートルまでのナノメートル範囲の粒子および粒子表面である。特に好ましいのは、約1～700nmのナノ粒子である。特に好ましいのは、約10～600nm、例えば、10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、120nm、150nm、170nm、200nm、220nm、250nm、270nm、300nm、320nm、350nm、370nm、400nm、420nm、450nm、470nm、500nm、520nm、550nm、570nm、600nm、620nmまたはこれらの間の任意の値の直径を有し得るナノ粒子である。さらにより好ましいのは、約500nmの直径を有するナノ粒子である。ナノ粒子は、当業者に知られている任意の好適な材料で構成されてもよく、例えば、ナノ粒子は、無機材料または有機材料を含んでもよく、それらからなってもよく、または本質的にそれらからなってもよい。通常、ナノ粒子は、金属もしくは金属の合金、または有機材料を含んでもよく、それらからなってもよく、または本質的にそれらからなってもよく、または糖質要素、または前述の物質の混合物を含んでもよく、それらからなってもよく、または本質的にそれらからなってもよい。想定される物質の例としては、さらに、アガロース、ポリスチレン、ラテックス、ポリビニルアルコール、シリカおよび強磁性金属、合金または合成物質が挙げられる。ナノ粒子材料のさらなる想定される例としては、金、銀、シリコン、酸化セリウム、鉄、二酸化チタン、酸化亜鉛、粘土、酸化アルミニウム、酸化銅、金属炭化物、金属窒化物、例えば窒化アルミニウムまたは窒化シリコン、アルミニウムまたは銅が挙げられる。

30

40

#### 【0192】

通常、ナノ粒子の表面または表面塗料のイオン電荷によって、安定性、溶解度、およびターゲティングを含む、それらの物理特性および化学特性の多くが決定される。現在予想

50

されているような生物学的用途については、上記塗料は、高い水溶性を与え、ナノ粒子凝集を防ぐことが想定されている。細胞表面上では、高電荷の塗料は通常、非特異的結合を促進するが、一方、末端の水酸基またはメトキシ基に結合したポリエチレングリコールは、非特異的相互作用を拒否し得る。

#### 【0193】

ある実施形態では、ナノ粒子は、1つ以上の表面層を含んでもよい。例えば、第1の層またはシェル構造が存在することが想定される。また、多層またはメッシュ構造も想定される。このような構造は例えば、構造成分としてPEG、ビオチンおよびストレプトアビジンを含んでもよい。シェル構造は、本発明に係る複合体、またはさらに、さらなる親和性分子、例えば、様々な受容体、タンパク質相互作用因子、レクチン等のための抗体、リガンドを含んでもよい。さらに具体的な実施形態では、多価のストレプトアビジンは通常、ナノ粒子の表面上に非アフィン（non-affine）スパーサー分子のメッシュをもたらす。相互作用分子またはターゲティング分子、例えば、本発明に係る複合体、または上述のような追加の親和性分子の周りのこのようなメッシュ構造によって、相互作用分子またはターゲティング分子または親和性分子への、あるいはその近傍の分子への、分子もしくはエントティの非特異的結合を減少させるか、または完全に排除もしくは回避してもよい。

#### 【0194】

さらなる実施形態では、ナノ粒子は、生分解性構造体で構成されてもよく、またはそれを有してもよい。本明細書で使用する時、用語「生分解性」は、ナノ粒子が細胞内または細胞の周囲、すなわち細胞の外部で起こる自然のプロセスによって分解または崩壊され得ることを意味する。従って、生分解性ナノ粒子は、向上した生体適合性、核酸、タンパク質、または小分子薬物等のカーゴに対する良好なカプセル化能力を有することができる。生分解性ナノ粒子は、タンパク質、多糖および合成生分解性ポリマー等の様々な物質から調製することができる。ベースポリマーの選択は、様々な設計および最終用途基準に基づく。それは、所望のナノ粒子の大きさ、ポリマー中にカプセル化されるカーゴの特性（水溶性および安定性等）、表面特性および機能性、生分解性および生体適合性の程度、ならびに最終生成物のカーゴ放出プロファイル等の多くの要因に依存する。ナノ粒子の調製のための所望の基準の選択に応じて、生分解性ナノ粒子の製造のために使用される方法は、予め形成されたポリマーの分散、親水性ポリマーのための単量体の重合およびイオン性ゲル化法を含んでもよい。特に好ましいのは、ポリ-L-乳酸（PLA）、ポリ-D-ラクトリコリド（PLG）、ポリ-ε-カプロラクトン（PCL）、ポリ-D-ラクチド-コ-グリコリド（PLGA）およびポリ-シアノアクリレート（PCA）、キトサン、ゼラチン、ポリ-アルキル-シアノアクリレート（PAC）の使用である。生分解性ナノ粒子の最も好ましい変異体は、PLGAナノ粒子である。例えば、ナノ粒子の表面に存在するナノ粒子または高分子構造は、リパーゼ、エステラーゼ、アルカラゼ、ヒドロキシラーゼ、ジオキシゲナーゼ等の酵素によって分解可能であってもよい。

#### 【0195】

本発明のさらに具体的な実施形態では、ナノ粒子担体は、細胞透過性薬剤と結合し得るか、またはそれを提供し得る。このような薬剤は例えば、ポリArgペプチドTAT、ペネトラチンペプチド、ポリアルギニンペプチドまたはポリnリジン（polylnliysine）ペプチド、カチオン性核局在化シンガル（singal）配列を含むペプチド、スキャフォールドに結合されたカチオン性部分、例えば、ペプチド、オリゴカルバメート、ロリゴマー（lorigome）またはPNAオリゴマーであり得る。さらなる詳細は、Fillon et al., 2005 J. Am. Chem. Soc, 127, 11798-11803等の好適な文献ソースから得てもよい。

#### 【0196】

具体的な実施形態では、ナノ粒子は、体内の特定の部位、細胞内の特定のオルガネラにナノ粒子を導く生体分子にさらに結合していてもよく、または生細胞中の個々のタンパク質またはRNA分子の動きを特異的に追跡してもよい。このような親和性分子は、本明細書において規定される複合体の他に、アプタマーまたはペプチドを含んでもよい。これらの親和性分子は、通常、ナノ粒子またはそれらの表面上の層に共有結合的に結合している

。上記複合体または親和性分子は、ナノ粒子当たりの制御された数で存在することが好ましい。複数のターゲティング基を担う、本発明に係る2つ以上の複合体を含む多価ナノ粒子は、受容体をクラスター化することができ、これは、特定の細胞シグナル伝達経路を活性化し得、そしてより強力な固着を実現し得る。単一の結合部位または単一の複合体を担う一価ナノ粒子は、クラスター化を回避する傾向がある。好ましい実施形態では、多価ナノ粒子が提供される。ナノ粒子当たりの複合体の量は、ナノ粒子の大きさに合わせてもよい。例えば、ナノ粒子当たり2：100または5：100の比率の複合体を本発明の文脈内で使用してもよい。

#### 【0197】

本発明に係る複合体とナノ粒子との間の結合は、任意の好適な形態で提供されてもよい。例えば、上記結合は、ナノ粒子と生体分子との間の分子間引力（例えば、共有結合、化学吸着等の吸着、および非共有相互作用等）を介して実現され得る。上記結合は、ある実施形態では、例えば細胞の二重層構造へのリボソームの組み込みであってもよい。さらなる実施形態では、上記結合は、細胞上の受容体構造に共有結合的に結合されるリガンドを介して実現されてもよい。さらに、細胞を透過するか、または細胞に吸着されるナノ粒子が想定される。エンドソーム経路を介したリボソームの取り込みを利用することが特に好ましい。理論に束縛されることを望むものではないが、送達されたリボソームがエンドソーム区画で放出されると考えられる。リボソームの二重層からのカーゴ自体の放出は、後期のエンドソームまたはリソソーム区画におけるリボソームを破壊すると考えられるリパーゼによって引き続き実現され得る。カーゴの放出は、初期のエンドソームで行われることが好ましい。カーゴ放出に影響を及ぼす可能性がある追加の要因は、特定の実施形態において、上記カーゴ放出を制御するために、影響され得るかまたは変更され得るpHである。本発明はさらに、リボソームの脂質二重層の濃度および／または組成物を介したエンドソーム形態の適応を想定する。

#### 【0198】

本発明によって想定されるナノ粒子は、カーゴ輸送のための担体として使用されるべきである。従って、ナノ粒子は、通常粒子の表面上に提供される、本明細書に記載されるような1つ以上のカーゴ分子に連結される。そのようなカーゴ分子はまた、任意の好適な形態で、例えば、分子間引力、共有結合、化学吸着等の吸着、および非共有相互作用を介して、ナノ粒子に連結されてもよい。ナノ粒子当たりのカーゴの量は、ナノ粒子の大きさ、材料、形態、ならびにカーゴの大きさおよび／または形態を考慮して調整されてもよい。通常、1ナノ粒子：1～1000のカーゴエンティティの比率が与えられ得る。

#### 【0199】

さらなる実施形態では、ナノ粒子は、磁性ナノ粒子として、例えば超常磁性粒子として提供されてもよい。従って、好ましい材料は、磁性または強磁性金属、合金または組成物である。このような粒子は特に、磁気共鳴画像技術との関連において使用され得る。ナノ粒子は、金、銀または鉄ナノ粒子であることが特に好ましい。

#### 【0200】

ナノ粒子は、コロイドとして提供されてもよく、またはコロイド内に含まれてもよい。本明細書で使用する時、用語「コロイド」は、多分子粒子が1nm～1μmの間の少なくとも1つの寸法を有する媒体中に分散されているコロイド系に関する。また、上記系内で、1nmと1μmとの間の距離で不連続点が見出され得る。通常、コロイドは、液体媒体中に分散された固体粒子、例えば、本明細書において規定されるナノ粒子を有する混合物である。この用語は通常、上記粒子が原子寸法よりも大きい、ブラウン運動を示すのに十分に小さく、粒子径が通常ナノメートルからマイクロメートルの範囲である場合に適用される。

#### 【0201】

本明細書で使用する時、用語「ペプチド担体」または「タンパク質担体」は、担体としての役割を果たす、本明細書において上記に規定したペプチドまたはタンパク質構造に関する。したがって、ペプチドまたはタンパク質は、それ自体、1つ以上の異なった分子

10

20

30

40

50

に連結してもよい。このような連結は、例えば、アミノ酸の側鎖を介したさらなる分子への共有結合である。また、ペプチドまたはタンパク質が非共有結合、例えば、分子間引力、化学吸着、および静電引力等を介してさらなる要素に連結されてもよい。さらに具体的な実施形態では、ペプチドまたはタンパク質担体はそれ自体、1つ以上の追加の機能を有してもよい。通常、ペプチドまたはタンパク質担体は、抗原の機能を有してもよく、またはワクチン機能を有してもよく、例えば、細菌、ウイルス、真核寄生生物、または癌抗原もしくはアレルゲン等の病原体の露出または表面タンパク質を表す。

#### 【0202】

担体との関連において本明細書で使用する時、用語「毒素担体」または「毒素」は、(a) 生物学的要素、例えば、細胞または組織を有毒化し、妨害し、殺傷し、または傷つけるため、かつ (b) 例えば、本明細書において規定されるカーゴを輸送するための少なくとも2つの機能を提供する毒性化合物に関する。カーゴとして機能するために、毒素は、例えば共有結合または非共有結合によって、上記カーゴ、例えば抗原および小分子等に連結されてもよい。上記結合は、殺傷、損傷または有毒化機能をもたらすドメインが妨害されないか、または負の影響を受けないように最適化される。本発明の文脈において使用される毒素の例は、小分子、ペプチド、またはタンパク質である。これらの化合物は、生物学的巨大分子（例えば、酵素または細胞受容体）と相互作用してもよい。毒素は、通常、ミツバチ毒等の軽微な毒性からボツリヌス毒素の場合の重篤な毒性までの範囲で、毒性が大きく変化してもよい。本発明に係る好ましい毒素担体は、コレラ毒素、大腸菌エンテロトキシン、百日咳毒素、ボツリヌス毒素、ボツリヌス菌C2毒素、ウェルシュ菌イオタ毒素、またはストレプトリシンOである。

#### 【0203】

担体はさらに、デンドリマーであってもよい。本明細書で使用する時、用語「デンドリマー」は、樹状構造を有する反復分岐分子に関する。デンドリマーは通常、構造的完全性を特徴とし、単分散で対称的な球状化合物から構成される。デンドリマーは通常、3つの主要部分、すなわち、核、内殻、および外殻を有すると考えられる。デンドリマーは例えば、特定の用途のための溶解性、熱安定性、および化合物の結合等の特性を制御するために、これらの部分のそれぞれにさまざまな機能を有するように設計されてもよい。デンドリマーは、メチル基がデンドロン構造によって置換される、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリスチレン、ポリアセチレン、ポリフェニレン、ポリチオフエン、ポリフルオレン、ポリ(フェニレンビニレン)、ポリ(フェニレンアセチレン)、ポリシロキサン、ポリオキサノルボルネン、オリゴスピロケタール、ポリグリセロールまたはポリ(エチレンイミン) (PEI) バックボーン(主骨格)で構成されてもよい。特に好ましいのは、PMMAデンドリマーである。結果として生じるポリマーは、低分子量構造から高分子量構造までの範囲で、厚みおよび電荷、ならびに重量が異なってもよい。上記デンドリマーは、輸送されるカーゴ要素に連結されてもよく、またはそれを含んでもよい。例えば、上記カーゴは、共有結合または非共有結合によって、上記カーゴ、例えば、抗原、小分子等に連結されてもよい。上記結合は、エステル、アミド、トリアゾール、アミンまたはエーテルの形成に基づいてもよい。

#### 【0204】

さらなる実施形態では、担体は、フラーレンであってもよい。本明細書で使用する時、用語「フラーレン」は、中空球、楕円体、もしくは管、または任意の他の好適な中空形状の形態の炭素の分子に関する。フラーレンのサブタイプは、フットボールに類似し、五角形および六角形の環を含む、バックミンスターフラーレン (Buckminsterfullerene) またはバッキーボール (buckyball) である。フラーレンは、具体的な実施形態では、C<sub>60</sub>、C<sub>70</sub>、C<sub>76</sub>、C<sub>82</sub>、C<sub>84</sub>、C<sub>86</sub>、C<sub>88</sub>、C<sub>90</sub>、C<sub>92</sub>、C<sub>94</sub>、C<sub>96</sub>、C<sub>98</sub>またはC<sub>100</sub>構造を含んでもよい。本発明によって想定されるさらなる代替物は、例えばB<sub>80</sub>構造を有するホウ素ベースのフラーレンである。例えば、ホウ素、窒素、酸素または蛍光体原子等のいくつかの位置にヘテロ原子を含むヘテロフラーレンもまた想定される。さらなる実施形態では、フラーレンが、金属フラーレンとして、例えば

、典型的にはSc、Y、La、ランタニド系列またはアクチノイド元素の金属または金属酸化物でドーブされた黒鉛棒として提供されてもよい。また、3つの金属イオンに結合した中央窒素原子（窒化物）を含む三元金属窒化物鑄型金属フラーレン、クラスターフラーレンまたはトリメタスフィア（trimetasphere）も想定される。典型的な実施形態では、フラーレンを官能化または誘導体化して、例えば、アゾメチンイリドのシクロプロパン化（cyclopropanation）、ポリヒドロキシル化、またはシクロ付加によって、有機媒体または水性媒体中のフラーレンの溶解度を向上させてもよい。具体的な実施形態では、フラーレンが遊離ラジカルで誘導体化されてもよく、これにより、反応性酸素種の捕捉が可能となり、フラーレンは、高活性抗酸化剤になる。別の実施形態では、フラーレンは、非共有結合でカーゴを輸送してもよい。1つの可能性は、カーゴ、例えばタンパク質、抗体、および核酸等が、超分子相互作用、または疎水性相互作用および静電相互作用等を介して、フラーレン表面に結合されることである。核酸カーゴ輸送の場合、担体は、好ましくはn-テトラ（ピペラジノ）フラーレンエポキシド誘導体、またはシクロプロパン化C60フラーレン、例えば中性、カチオン性またはアニオン性官能基であってもよい。さらなる実施形態では、例えば、ジスルフィド結合が、フラーレンと、例えば抗体との間に存在する場合、フラーレン-免疫複合体を提供してもよい。これに関連して、抗体またはタンパク質とフラーレンとの間の非共有結合性の自発結合を可能にし得る、C60マロノジセリノラミド（malonodiserinolamide）フラーレン誘導体を使用することが好ましい。さらに好ましい実施形態では、フラーレンは、フラーレンベースのミセル、小胞またはリポソーム様構造への凝集を可能にする、配置および誘導体化において使用されてもよい。これらの構造は、それらの疎水性核において任意の好適な薬物分子を包含してもよい。さらに別の実施形態群では、フラーレン担体へのカーゴの共有結合があってもよい。これには通常、フラーレンとフラーレンの表面上に存在するカーゴ分子との間に追加のリンカー要素を設けてもよい。これによって、とりわけ、遅延のカーゴ放出が可能となる。さらに、トリアゾール結合の形成を介してさらなるエンティティに連結され得るグリコフラーレンが想定される。さらなる詳細は、当業者に既知であるか、またはBolskar, 2016, Encyclopedia of Nanotechnology, Springer、またはMunoz et al., 2016, Nature Chemistry, 8, 50-57等の好適な文献ソースから得ることができる。

#### 【0205】

さらなる実施形態では、担体は、カーボンナノチューブの形をとってもよい。本明細書で使用する時、用語「カーボンナノチューブ」は、管状ナノ構造を有する炭素の同素体に関する。これらの管状炭素分子は通常、カーゴ輸送および送達活動に使用され得る、珍しい特性を有する。カーボンナノチューブは通常、非常に高い強度および剛性を示す。それらは、通常132, 000, 000:1までの長さ対直径比で構築される。カーボンナノチューブは、さらに通常、高熱伝導率を有する。それらは通常、例えば、グラフェンと通常呼ばれる1原子厚の炭素シートによって形成された壁を有する長い中空構造を有する。これらのシートは通常、特異的かつ離散的な角度で圧延され、圧延角度および半径の組み合わせは、強度および剛性等に関してナノチューブ特性を決定し得る。ナノチューブは通常、単層ナノチューブ（SWNT）および多層ナノチューブ（MWNT）として分類され、これらはいずれも、本発明によって想定される。ナノチューブはさらに、ファンデルワールス力によって一緒に保持されると考えられるロープ状の構造に整列してもよい。

#### 【0206】

カーボンナノチューブは、一般にフラーレン構造ファミリーに属すると考えられる。本発明のある実施形態では、カーボンナノチューブは、フラーレンとの関連において本明細書において上述したように修飾してもよい。特に好ましいのは、カーボンナノチューブと、核酸、タンパク質およびペプチドとの間の結合である。さらに想定されるのは、エステルまたはアミン結合の形成を介してさらなるエンティティに連結され得る、遊離カルボン酸を介した修飾である。

#### 【0207】

ある実施形態では、本明細書において上記に規定した担体を、カーゴを伴って、または

伴わずに使用してもよい。担体をカーゴを伴わずに使用する場合、それ自体が本明細書に記載されるような機能を提供してもよい。さらなる実施形態では、担体は、カーゴを含む、またはそれに結合する。カーゴが担体に連結される形態は、担体の形態／性質、およびカーゴの形態／性質に依存し得る。場合によっては、共有結合を想定してもよいが、別の場合では、静電結合を使用してもよい。いくつかの他の実施形態では、上記結合は、リボソームまたは類似の構造へのカーゴ要素の埋め込みに基づいてもよい。例えば、カーゴは、担体内に配置されてもよく、かつ／または、担体の外部に連結されてもよく、かつ／または、担体の単一層または二重層構造、例えば、本明細書において上記に言及されるようなリボソームに組み込まれてもよい。

#### 【0208】

本明細書で使用する時、用語「カーゴ」は、例えば担体がりボソーム等の膜または二重層を含む実体であり、細胞の内側、特定の細胞区画、例えばエンドソームに、または細胞の表面もしくは周囲に輸送されるべきエンティティである場合、先に規定した担体内に位置し、かつ／または例えば担体の外側（例えば表面）に連結または結合され、かつ／または単一層または二重層構造に組み込まれる任意の好適な物質、化合物、または成分を指す。カーゴは、細胞の内部に降ろされることが好ましい。カーゴは、医学的状況において、細胞、上記細胞を含む組織、または上記細胞を含む生体に有益な効果を提供または媒介することが好ましい。このような有益な効果の例は、細胞へのまたは細胞中への送達の後、の治療活性／能力、診断活性／能力である。これはインビボで行われてもよいが、ある実施形態では、エクスピボで、例えばインビトロの環境において、例えば、細胞を再移植することにより、通常、後で生体に再導入する選択肢を有して行われてもよい。「治療活動」は、疾患または病状の治療、改善および／または予防／回避を含んでもよい。用語「診断活動」は、病理状態／病状を視覚化し、検出し、区別し、かつ／または特定し、偏差を臨床像に帰属することを含んでもよい。

#### 【0209】

好ましくは、「カーゴ」は、小分子、ペプチド、タンパク質、細胞傷害性物質、核酸、着色剤、色素、染料、金属、放射性核種、ウイルス、修飾ウイルス、ウイルスベクター、接種物、プラスミドおよび／または多成分系に関するが、これらに限定されない。

#### 【0210】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、「ペプチド」または「タンパク質」は、本明細書において上記に規定したペプチドまたは本明細書において上記に規定したタンパク質である。このようなペプチドまたはタンパク質は、カーゴが輸送される細胞、または上記細胞を含む生体に対して機能を果たすことが好ましい。このような機能は、治療または診断機能であり得る。ペプチドまたはタンパク質は、任意の好適なカテゴリーに由来してもよい。例えば、抗原性要素、抗体、酵素、アレルゲン、毒素、触媒エンティティ、および受容体等であってもよい。具体的な実施形態では、本発明に係るカーゴの一部としてのタンパク質は、治療タンパク質、自殺タンパク質、腫瘍抑制タンパク質、転写因子、キナーゼ阻害剤、キナーゼ、調節タンパク質、アポトーシスタンパク質、抗アポトーシスタンパク質、微生物抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生性抗原、細胞抗原、癌抗原、分化因子、不死化因子、タンパク質／ペプチド毒素、酵素、ペプチド／タンパク質ホルモン、ペプチド／タンパク質接着分子、受容体分子、ペプチド阻害剤またはペプチド／タンパク質老化防止剤を含む群から選択されてもよい。

#### 【0211】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「治療タンパク質」は、動物の身体、特に当業者に知られているように人体に治療効果を生じる任意のタンパク質に関する。通常、上記用語は治療酵素に関する。このような酵素の例は、リソソームグルコセレブロシダーゼ欠損症（ゴーシェ病）の治療に使用され得るアルグルセララーゼ、ムコ多糖症Ⅰの治療に使用され得るアルファールーイズロニダーゼ、または重症合併型免疫欠損症候群の治療に使用され得るアデノシンデアミナーゼである。

#### 【0212】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「自殺タンパク質」は、タンパク質の作用による、典型的には対応する基質の存在下での酵素反応による、細胞の破壊を引き起こす任意のタンパク質に関する。このようなタンパク質の例は、HSV-1 TKまたはDm-dNKの多基質デオキシリボヌクレオシドキナーゼ等のヌクレオシドキナーゼである。

【0213】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「腫瘍抑制タンパク質」は、癌への経路上の1つの段階から細胞を保護する任意のタンパク質に関する。好ましくは、上記用語は、当業者に知られている任意のそのようなタンパク質に関する。より好ましくは、上記用語は、Rbタンパク質、p53腫瘍抑制因子、APCおよびCD95に関する。

10

【0214】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「転写因子」は、DNA結合ドメインを使用してDNAの特定の部分に結合し、当業者に知られているようにDNAからRNAへの遺伝情報の転写を制御するシステムの一部である任意のタンパク質に関する。好ましくは、上記用語は、TFIIA、TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIHおよびTATA結合タンパク質(TBP)に関する。

【0215】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「キナーゼ阻害剤」は、タンパク質キナーゼの作用を特異的に阻害する酵素阻害剤の一種である任意のタンパク質に関する。好ましくは、上記用語は、Erbitux(cetuximab)およびハーセプチンに関する。当然、本発明はまた、非タンパク質キナーゼ阻害剤の使用を想定しており、これらは、例えば、本明細書において規定される小さな有機分子であってもよい。

20

【0216】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「キナーゼ」は、ATP等の高エネルギー供与体分子から特定の標的分子にリン酸基を移動させる任意のタンパク質に関する。好ましくは、上記用語は、チロシンキナーゼまたはMAPキナーゼ、MEK1、またはMEK2に関する。

【0217】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「アポトーシスタンパク質」は、多細胞生物におけるプログラム細胞死を引き起こす任意のタンパク質に関する。より好ましくは、上記用語は、アポトーシス促進性タンパク質BAX、BID、BAK、またはBADに関する。

30

【0218】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「抗アポトーシスタンパク質」は、多細胞生物におけるプログラム細胞死を妨害する任意のタンパク質に関する。好ましくは、上記用語は、Bcl-XL、Bcl-2のような抗アポトーシスタンパク質、さらにBcl-2ファミリーのメンバーに関する。

【0219】

カーゴ分子との関連において、用語「微生物抗原」、「ウイルス抗原」、「細菌抗原」、「寄生性抗原」および「細胞抗原」は、免疫原に関し、これらは、それぞれ、特に本明細書において以下に規定されるように、微生物、ウイルス、バクテリア、寄生虫、または細胞に由来する免疫応答を刺激することができる。

40

【0220】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、「分化因子」は、主に発生において機能し、特定の細胞の組織、細胞群の分化を引き起こす任意の因子に関する。好ましくは、上記用語は、GDF1、GDF2、GDF3、GDF5、GDF6、GDF8、GDF9、GDF10、GDF11、およびGDF15のような増殖分化因子(GDF)に関する。

【0221】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「不死化因子」は、任意の因子

50

に関し、これにより、暦年齢の関数としての細胞の死亡率が持続的に増加しなくなる。好ましくは、上記用語は、当業者に知られている任意のそのような因子に関する。より好ましくは、上記用語は、テロメラーゼまたはラージT抗原に関する。

【0222】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「ペプチド／タンパク質ホルモン」は、メッセンジャーとして、血液を介して1つの細胞（または細胞群）から別の細胞へシグナルを伝える、任意の化合物に関する。より好ましくは、上記用語は、プロスタグランジン、セロトニン、ヒスタミン、ブラジキニン、カリジン、および胃腸ホルモン、放出ホルモン、下垂体ホルモン、インスリン、バソプレシン（ADH）、グルカゴン、エンケファリン、カルシトニン、コルチコステロイド、コルチコトリピン放出ホルモン（CRH）、サブスタンスP、GRP、MSH、およびニューロメディエーターに関する。

10

【0223】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「ペプチド／タンパク質接着分子」は、細胞接着プロセスにおける他の細胞または細胞外マトリックス（ECM）との結合と関連した細胞表面上のペプチドまたはタンパク質に関する。好ましくは、上記用語は、当業者に知られている任意のそのような分子に関する。より好ましくは、上記用語は、NCAM、ICAM-1、VCAM-1、PECAM-1、L1、CHL1、MAG、インテグリンまたはセレクトインのようなIgSF CAMに関する。

【0224】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「受容体-分子」は、リガンドに結合し、通常シグナルを変換する、細胞膜上または細胞質もしくは細胞核内のタンパク質に関する。好適には、上記用語は、代謝調節型受容体、Gタンパク質共役受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体、アデノシン受容体、アドレナリン受容体、GABA受容体、アンギオテンシン受容体、カンナビノイド受容体、コレシストキニン受容体、ドーパミン受容体、グルカゴン受容体、代謝調節型グルタミン酸受容体、ヒスタミン受容体、嗅覚受容体、オピオイド受容体、ケモカイン受容体、カルシウム感知受容体、ソマトスタチン受容体、セロトニン受容体またはセクレチン受容体に関する。

20

【0225】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「ペプチド阻害剤」は、生理機能、好ましくは酵素機能のようなタンパク質機能に阻害効果を生じるペプチドに関する。

30

【0226】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「タンパク質／ペプチド老化防止剤」は、老化の影響を防止し、遅らせ、または逆転させる任意の化合物に関する。好ましくは、上記用語は、ヒト成長ホルモン（HGH）に関する。

【0227】

本明細書で使用する時、用語「細胞傷害性物質」は、一般に、生細胞、特に高等真核生物の細胞、より具体的には哺乳類またはヒト細胞に対して毒性である任意の化合物に関する。細胞傷害性物質の作用の結果として、細胞はネクローシスを受け得、細胞は増殖活動もしくは分裂を止めることができ、または、細胞はアポトーシスのプログラムを受け得る。通常、ネクローシスを受けている細胞が急速な膨潤を示し、膜統合性を失い、それらの代謝を低下させ、環境へ中身を放出する。一方、アポトーシスは、細胞の屈折率の変化、細胞質収縮、核凝縮およびDNAの規則的なサイズの断片への切断を含む特定の細胞学的および分子的事象によって特徴付けられる。細胞傷害性は、好適なアッセイに従って、例えば細胞膜統合性を測定することによって測定してもよい。細胞傷害性物質は、癌治療の場合、化学療法化合物であってもよい。また、細胞傷害性物質はまた、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）を伝達する抗体であってもよく、細胞は、抗体によって結合されたリンパ球によって殺される。細胞傷害性リンパ球の例としては、細胞傷害性T細胞およびナチュラルキラー細胞が挙げられる。

40

【0228】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「化学療法化合物」は、癌細胞

50

の治療上の処置のために使用される、いくつかのさまざまな機能分類の化合物に関する。上記化合物は、例えば、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤（タキサン）、エポチロン、ヒストン脱アセチル化阻害剤、トポイソメラーゼⅠおよびⅡの阻害剤、キナーゼ阻害剤、ヌクレオチドアナログまたは前駆体アナログ、ペプチド系抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ピンカアルカロイドおよびそれらの誘導体であってもよい。アルキル化剤の本明細書で想定される例は、低濃度のALDH（アルデヒドデヒドロゲナーゼ）を含む細胞、例えば肝臓、腸、骨髄幹細胞において形成されるホスホラミドヌースタード代謝物であるシクロホスファミドである。上記代謝物は通常、グアニンN7位でDNAを架橋し、これは、細胞アポトーシスを引き起こすと考えられる。さらなる例は、メクロレタミンであり、これは通常グアニンN7位でDNAを架橋するため、細胞の複製を妨げ、細胞のアポトーシスを引き起こす。別の例は、クロラムブシルであり、これは核酸アルカリ化を促進し、DNAを架橋し、細胞周期停止を引き起こす。この化合物は、ヒトグルタチオン転移酵素P1（GST P1-1）によって解毒することができ、しばしば、癌組織において過剰発現する。さらなる例は、親油性DNAアルキル化剤であるため血液脳関門を通過することができるニトロソウレアである。また、O6/n7位でグアニンのDNAのアルキル化／メチル化を促進するテモゾロミドも想定される。それはさらに、イミダゾテトラジン誘導体の形態のプロドラッグとして使用されてもよい。O6-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼとしてコードされるO6-アルキルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼは、細胞傷害を防ぎ得る。アントラサイクリンの本明細書で想定される例としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、ピクサントロン、ロソキサントロン、（ドキソルビシンの二糖アナログである）サバルビシンおよび（ドキソルビシンの半合成アナログである）バルビシンが挙げられる。これらの化合物は通常、DNAインターカレーターとして機能するため、例えば、トポイソメラーゼⅡを阻害する。細胞骨格破壊剤（タキサン）の本明細書で想定される例としては、パクリタキセル、ドセタキセル、アブラキサン、およびタキソテルが挙げられる。これらの化合物は通常、特にαβ-チューブリンヘテロ二量体サブユニット結合によってチューブリンを標的化し、これにより、有糸分裂紡錘体集合、染色体分離および細胞分裂の欠陥が引き起こされる。エポチロンの本明細書で想定される例としては、エポチロンA～Fがある。さらなる例は、ixabepilone、patupiloneおよびutideloneである。これらの化合物は、チューブリン干渉を引き起こす。それらは、増加した効能をもたらし得るパクリタキセル様化合物よりも良好な水溶性を有する。ヒストン脱アセチル化阻害剤の本明細書で想定される例としては、ボリノスタットおよびロミデプシンが挙げられる。これらの化合物は通常、亜鉛依存性活性部位に結合し、亜鉛イオンのキレート化剤として機能し、これにより、アセチル化タンパク質、特にヒストンが蓄積する。トポイソメラーゼⅠの阻害剤の本明細書で想定される例として、イリノテカンが挙げられる。イリノテカンはトポイソメラーゼⅠに結合し、三元DNA複合体を形成し、これにより、DNAの再連結が妨げられ、DNA損傷が引き起こされる。さらなる例としては、トポテカンが挙げられる。シラテカン、コシテカン、エキサテカン、ルルトテカン、ジャイマテカン、ペロテカンおよびルビテカンは、カンボテシンの半合成誘導体である。トポイソメラーゼⅡの阻害剤の本明細書で想定される例としては、エトポシドが挙げられ、これは、DNAおよびトポイソメラーゼⅡ酵素と三元錯体を形成し、これにより、DNA再連結が妨げられる。テニポシドもまた想定され、これはトポイソメラーゼⅡ-DNA中間体を安定化し、二本鎖DNA切断を誘導する。さらなる例は、タフルポシドである。キナーゼ阻害剤の本明細書で想定される例としては、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブが挙げられ、そのホウ素原子は、26Sプロテアソームの触媒部位に結合する。さらなる例としては、ATP結合部位に可逆的に結合することによってEGFRチロシンキナーゼを阻害し、それによってシグナルカスケードを防止するエルロチニブおよびゲフィチニブが挙げられる。B-RafがV600E突然変異を有する場合、B-Raf/MEK/ERK経路の妨害を引き起こすベムラフェニブがさらに想定される。多数のチロシンキナーゼ酵素の阻害剤であるイマチニブもまた意図さ

10

20

30

40

50

れる。それは通常、TK活性部位を占有し、例えば、a b lとb c rとの融合が起こる慢性骨髄性白血病において、b c r－a b l活性を低下させる。さらに想定されるのは、平滑化受容体のシクロパミン競合的アンタゴニストであるビスモデギブ（SMO、ヘッジホッグシグナル伝達経路の一部）である。それは、基底細胞癌に特異的に使用され得る。ヌクレオチドアナログまたは前駆体アナログの本明細書で想定される例としては、（ヌクレオシドシチジンのアナログであり、低濃度で低メチル化を引き起こし、高濃度で細胞傷害性を引き起こす可能性がある）アザシチジン、（プリン合成を阻害する）アザチオプリン、カペシタビン、（シトシン塩基をアラビノース糖と結合し、代謝拮抗剤であって、ヒトシトシンデオキシリボースによるDNAへの取り込みを介して作用し、通常細胞死を誘導する）シタラビン、（カペシタビンの代謝物である）ドキシフルリジン、（α-チミジル酸シンターゼ阻害剤であって、ピリミジンチミジン合成を阻害する）フルオロウラシル、（通常修復不能なエラーと細胞死を引き起こすDNA鎖内のシチジンとして組み込まれる）ゲムシタビン、（チロシル遊離ラジカルを除去することによってリボヌクレオチド還元酵素の阻害剤であり、通常デオキシリボヌクレオチドの産生を減少させる）ヒドロキシウレア、（キサンチンオキシダーゼを阻害する）メルカプトプリン、（DNA、RNA、チミジル酸およびタンパク質の合成を阻害する）メトトレキサート、および（グアニンのアナログであり、グアニンヌクレオチド合成の阻害につながる）チオグアニンが挙げられる。ペプチド系抗生物質の本明細書で想定される例としては、（DNA鎖切断の誘導につながる）ブレオマイシンおよび（転写開始複合体でDNAに結合するため、RNAの伸長を防ぐ）アクチノマイシンが挙げられる。白金ベースの薬剤の本明細書で想定される例としては、カルボプラチン、（DNAを結合および架橋することによってDNA複製を妨害する）シスプラチン、および（DNAを結合および架橋することによってDNA複製を妨害する）オキサリプラチンが挙げられる。レチノイドの本明細書中で想定される例としては、（急性前骨髄球性白血病細胞分化を強制することがわかっており、増殖を止める）トレチノイン、（レチノイドX受容体の内因性リガンドであると考えられる）アリトレチノインおよび（レチノイドX受容体を活性化し、細胞の分化およびアポトーシスを誘導する）ベキサロテンが挙げられる。ビンカアルカロイドおよび誘導体の本明細書で想定される例としては、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、およびビノレルビンが挙げられ、これらは微細管阻害剤として作用すると考えられる。

#### 【0229】

本発明は、さらなる実施形態では、特に、有害物質としてアルファアマンチン（alpha amantin）およびアナログまたはそれらの誘導体を使用することを想定する。これらの化合物は通常、RNAポリメラーゼIIおよびIIIを著しく阻害する。具体的な実施形態では、アルファアマンチンまたはそのアナログもしくは誘導体は、タンパク質またはペプチドに連結されてもよく、この形態で、所望の目的地（すなわち、細胞または組織）へカーゴとして輸送されてもよい。

#### 【0230】

自身の作用様式に従って、上記の特徴付けられた有害物質は、細胞内または細胞外投与に使用されてもよい。従って、それらは、本明細書において規定されるように、カーゴを細胞内に送達するか、または、本明細書において規定されるように、カーゴを細胞外に送達する担体システムで提供されてもよい。

#### 【0231】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「小分子」は、分子、例えば治療的に有用であり、好ましくは、細胞の適切な機能を保証するように作用する、薬物または他の生物学的、治療的または診断的に活性な薬剤を含む有機分子、癌細胞または異常細胞のような細胞の死滅が望まれる場合、アポトーシスまたは細胞分解を誘導し得る、免疫反応を誘導する、またはマーカー機能を誘導する分子に関する。小分子は通常、900 Da未満の低分子量を有する。通常、約900 Da以下の分子量を有する小分子は、細胞膜を横切って急速に拡散することができると考えられる。従って、小分子は、細胞内および／または細胞外に送達されるカーゴとして提供されてもよい。小分子は、ある実施形態で

10

20

30

40

50

は、血清および水性生理食塩水等の水性液体中での溶解度が不十分であり得る。したがって、その治療効果が自身の低溶解度によって限られた化合物は、本発明に係るより多くの用量で投与することができ、細胞によるより高い取り込みレベルのために、モルベースでより有効であり得る。同様に、化合物は、すでに低濃度または非常に低濃度で効果的であり得る。したがって、本発明に係るカーゴとしてのこれらの化合物を特定の細胞に対して特異的に標的化することによって、全身的な、かつかなり非特異的な投与が回避され、これにより、投与される化合物の全量を減少させることができる。本発明に係るカーゴとして輸送される想定される小分子の例は、例えば、抗菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、抗増殖剤、細胞増殖抑制剤、免疫抑制剤、ヒスタミン受容体アンタゴニスト、ビタミン、鎮痛剤、抗腫瘍剤、抗炎症剤、治療的有機分子、阻害剤、例えば、キナーゼ阻害剤等の酵素阻害剤である。抗菌剤の本明細書で想定される例としては、ネオマイシンまたはゲンタマイシンのようなアミノグリコシド、ポリミキシン、クロラムフェニコール、バシトラシン、フラミセチン、エンロフロキサシン、マルボフロキサシン、ミコナゾール、銀スルファジジン、ポビドンヨード、クロルヘキシジンおよび酢酸が挙げられる。抗真菌剤の本明細書で想定される例としては、アンホテリシンB、カンジシジン、またはハマイシン等のポリエン系抗真菌剤；ピフォナゾール、ブトコナゾール、またはクロトリマゾール等のイミダゾール；アルバコナゾール、エフィナコナゾール、またはエボキシコナゾール等のトリアゾール；アバファンギン等のチアゾール；アリルアミン、およびエキノカンジンが挙げられる。抗ウイルス剤の本明細書で想定される例としては、アマンタジン、リマンタジン、プレコナリル、アシクロビル (aciclovier)、ジドブジン、(逆転写阻害剤である) ラミブジンおよび(集合阻害剤である) リファンピシンが挙げられる。細胞増殖抑制剤の本明細書中で想定される例としては、例えば本明細書において上記に規定したアルキル化剤、すなわち、本明細書において上記に規定したメトトレキサート、アゾチオプリン、メルカプトプリン、またはフルオロウラシル等の代謝拮抗物質が挙げられる。免疫抑制剤の本明細書中で想定される例としては、プレドニゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン等のグルココルチコイド；細胞増殖抑制剤；抗体；シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、またはエベロリムス等のイムノフィリンに作用する薬物；ならびにインターフェロン、オピオイド、TNFアルファ結合タンパク質、ミコフェノール酸、フィンゴリモドおよびミリオシンが挙げられる。ヒスタミン受容体アンタゴニストの本明細書中で想定される例としては、シメチジン、ラニチジン、ファモチジンおよびジザチジンが挙げられる。鎮痛剤の本明細書中で想定される例としては、パラセタモール、フェナセチン、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、およびモルヒネ等のオピオイドが挙げられる。抗腫瘍剤の本明細書中で想定される例としては、ヌクレオシドアナログ、アンチフォレート、トポイソメラーゼⅠ阻害剤、アントラサイクリン、ポドフィロトキシン、タキサン、ビンカアルカロイド、アルキル化剤、白金化合物、チロシンキナーゼ阻害剤、mTOR阻害剤、レチノイド、免疫調節剤および例えば本明細書において上記に規定したヒストン脱アセチル化阻害剤が挙げられる。抗炎症剤の本明細書中で想定される例としては、抗インターロイキン抗体、レゾルビン、グルココルチコイド、プロテアーゼ阻害剤、スタチン、ヒストン脱アセチル化阻害剤、プロスタグランジンアゴニスト、ホスホジエステラーゼ4阻害剤、ペルオキシソーム増殖因子活性化因子受容体のアゴニスト、補体系の阻害剤、抗凝固剤および血栓溶解剤が挙げられる。

#### 【0232】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「核酸」は、当業者知られている任意の核酸、例えば、DNA、RNA、1本鎖DNA、cDNA、またはそれらの誘導体のようなポリヌクレオチドを指す。好ましくは、上記用語は、1本鎖または2本鎖標的のためのアンチセンス配列のような相補的標的に対するハイブリダイゼーションのために、または配列によってコードされる核酸転写物またはタンパク質を発現するために設計された選択された配列を有する、DNAおよびRNA、ならびにそれらのアナログからなるオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを指す。DNAは、例えば、A-DNA、B-DNAまたはZ-DNAの形態で提供され得る。アナログとしては、荷電および好ま

10

20

30

40

50

しくは非荷電のバックボーンアナログ、例えばホスホネート、メチルホスホネート、ホスホラミダート (phosphoramidate)、好ましくはN-3'またはN-5'、チオホスフェート、非荷電モルホリノ系ポリマー、PNA、またはCNA、HNA、LNAまたはANAが挙げられる。このような分子は、例えば、酵素補充療法、遺伝子治療、またはアンチセンス療法を含む、様々な治療レジメンにおいて使用することができる。RNAは、例えば、p-RNAの形態、すなわち、ピラノシスル (pyranosyl) -RNAの形態、またはヘアピンRNAもしくはステムループRNAのような構造的に修飾された形態であってもよい。さらに、上記用語は、アンチセンスRNAを指す。核酸によってコードされるタンパク質、RNA、またはリボソームは、例えば、細胞内で提示不足、機能していない、または存在しない場合があり、核酸によってコードされるアンチセンスRNAは、分子の望ましくない機能の排除を可能にし得る。用語「PNA」は、ペプチド核酸、すなわち、生物学的研究および医学的処置において使用されるが、天然に存在することが知られていない、DNAまたはRNAに類似する人工的に合成されたポリマーに関する。PNAバックボーンは通常、ペプチド結合によって結合された繰り返しN-(2-アミノエチル)-グリシン単位で構成される。種々のプリンおよびピリミジン塩基は、メチレンカルボニル結合によってバックボーンに連結される。PNAは一般に、ペプチドのように示され、N末端は第1(左側)の位置にあり、C末端は右側にある。用語「CNA」は、アミノシクロシクロヘキシルエタン酸核酸に関する。さらに、上記用語は、シクロペンタン核酸、すなわち、例えば2'-デオキシカルバグアノシンを含む核酸分子に関する。用語「HNA」は、ヘキシトール核酸、すなわち、標準核酸塩基とリン酸化された1, 5-アンヒドロヘキシトールバックボーンから形成されるDNAアナログに関する。用語「LNA」は、ロック核酸に関する。通常、ロック核酸は、修飾され、したがって、アクセス不能なRNAヌクレオチドである。LNAヌクレオチドのリボース部分は2'炭素と4'炭素とを連結する余分な架橋で修飾されてもよい。このような架橋は、リボースを3'-endo構造の配座においてロックする。ロックされたリボース配座は、塩基スタッキングおよびバックボーン事前組織化を強化する。これにより、オリゴヌクレオチドの熱安定性、すなわち、融解温度が著しく向上し得る。用語「ANA」は、アラビノ核酸またはそれらの誘導体に関する。本発明の文脈における好ましいANA誘導体は、2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノヌクレオシド(2'-F-ANA)である。さらに好ましい実施形態では、核酸分子は、1本鎖DNA、RNA、PNA、CNA、HNA、LNAおよびANAのうちのいずれか1つの組み合わせを含んでもよい。本発明の具体的な実施形態では、先に規定した核酸は、所定のタンパク質もしくはペプチド(例えば、治療タンパク質または免疫活性タンパク質)、または診断的に検出可能なタンパク質(例えば、生物発光タンパク質)(すなわち、標的細胞(すなわち、ランゲリン<sup>+</sup>細胞)に送達されることが意図されるタンパク質またはペプチド)をコードする。このようなタンパク質は、好ましい実施形態では、本明細書において以下に規定される癌抗原または毒性タンパク質等であってもよい。従って、核酸は、細胞状況におけるコードされたタンパク質の発現を可能にする要素(例えば、遺伝子に動作可能に連結されたプロモーター、ターミネーター)、または細胞のゲノムへの組み込みを可能にする要素、または核における、例えば、染色体外エンティティとしての永久的または一時的な存在を可能にする要素を提供する。例えば、核酸は、本明細書において以下に規定されるプラスミドの形態で提供されてもよい。

#### 【0233】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「着色剤」は、少なくとも生物学的要素、例えば、細胞または組織、を着色または染色するための機能性を提供する任意の好適な分子着色剤に関する。着色剤は、本明細書において規定される担体構造、例えばナノ粒子に連結されてもよい。着色剤は、例えば、共有結合または非共有結合によって、上記担体に連結されてもよく、または例えば、リボソーム担体でカーゴとして輸送されてもよく、または抗原および小分子等のさらなるカーゴに連結されてもよい。上記結合は、着色または染色機能性をもたらす発色団が妨害されないか、または負の影響を受けないように最適化されてもよい。通常、着色剤は、含まれるビヒクルに応じて色素または染料の

10

20

30

40

50

いずれかとして作用することができる。着色剤は、染料であることが好ましい。

#### 【0234】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「色素」は、波長選択的吸収の結果として反射光または透過光の色を変化させる任意の物質に関する。この物理的プロセスは、蛍光、燐光、および物質が発光する他の形態のルミネセンスとは異なる。色素は通常、水に溶解しない。一例では、色素は、無機物質であってもよい。また、色素は、有機性であってもよい。通常、色素は、水性液体に不溶であってもよい。具体的な実施形態では、色素は、1  $\mu\text{m}$  より大きいサイズを有してもよい。好適な色素の例は、クロロフィル、ビリルビン、ヘモシアニン、ヘモグロビン、ミオグロビン、カロテノイド、ヘマトクロム等のヘムまたはポルフィリン系、アルファおよびベータカロテン、リコペン、またはロドプシン等のカロテン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、またはルテイン等のキサントフィル、フィトクロム、フィコビリタンパク質、ポリエンエノラート、メラニン、ウロクロム、フラボノイドである。

10

#### 【0235】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「染料」は、通常、水溶液中で利用される、可視光のいくつかの特定の波長を吸収する着色物質に関する。典型的な例では、染料は、水不溶性小分子である。好適な染料の例は、アクリジン染料、アントラキノン染料、ジアリールメタン染料、トリアリールメタン染料等のアリールメタン染料、アゾ染料、ジアゾニウム染料、ニトロ官能基に基づくニトロ染料、ニトロソ官能基に基づくニトロソ染料、フタロシアニン染料、ユーロジン染料またはサフラニン染料等のキノンイミン染料、インダミン、インドフェノール染料、オキサゾン染料、チアジン染料、チアゾール染料、キサンテン染料、フルオレン染料、ピロニン染料、フルオロン染料、またはローダミン染料である。特に好ましいのは、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、フルオレスカミンおよびロドプシンである。

20

#### 【0236】

ある実施形態では、本発明はまた、(例えば、細胞に／細胞内に輸送されるカーゴとして)さらなる色付与化合物、例えば、化学発光化合物(例えば、ルミナル(luminal))、生物発光タンパク質(例えば、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、mCherry、mOrange、TagBFP、Cerulean、シトリン、mTurquoise、赤色蛍光タンパク質(RFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)およびそれらの誘導体(例えばEGFP、ECFP、BFP、EBFP、EBFP2、またはBFP))等の使用を想定する。本発明の文脈内で使用され得るさらなる色付与化合物としては、6-FAM、HEX、TET、ROX、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7、テキサス・レッドまたはローダミン、PerCP、Pacific Blue、Alexa405、430、488、546、559、594、633、660、674、680、700、パシフィックブルー(Pacific Blue)、TAMRA、ダブシル(Dabcyl)、ブラックホールクエンチャー(Black Hole Quencher)、BHQ-1またはBHQ-2が挙げられる。

30

#### 【0237】

ある実施形態では、上記用語はまた、造影剤にも及ぶ。このような造影剤の例は、診断用造影剤またはコントラスト剤である。例えば、インビボ用途等のための近赤外光音響剤(near infra red und photoacoustic agent)が想定される。

40

#### 【0238】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「金属」は、当業者に知られている任意の金属を指す。好ましくは、上記用語は、金、白金、オスミウム、銀、鉄、ランタニド金属またはアクチニド金属に関する。さらなる実施形態では、上記用語はまた、放射性金属に関する。

#### 【0239】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「放射性核種」は、それを不安定にする過剰な核エネルギーとしての放射性核種または放射性同位体を指す。放射性核種

50

は、 $\alpha$ 放出放射性核種、 $\beta$ 放出放射性核種、またはオージェ電子放出放射性核種のいずれかであってもよい。好適な放射性核種の例は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{129}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{82}\text{Rb}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ または $^{18}\text{F}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、および $^{105}\text{Rh}$ である。放射性核種はさらに、好適な組成物中に配合されてもよく、または追加の分子または担体に連結されてもよい。

【0240】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「ウイルス」は、当業者に知られている任意のタイプのウイルスに関する。好ましくは、ウイルスは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、単純ウイルス、レンチウイルスおよびレトロウイルスからなる群から選択される。上記用語は、特に好ましい実施形態では、例えばワクチンの形態で、免疫応答を誘発することができるウイルスに関する。

【0241】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「修飾ウイルス」は、野生型ウイルスと比べて改変されたウイルス分子に関する。このような修飾は、好ましくは、当業者が知っているように、活力の低下をもたらし得るか、またはウイルスの結合能力または相互作用能力に影響を及ぼし得る。修飾ウイルスの典型的な例は、ワクチンにおいて提供されるような弱毒化ウイルスである。

【0242】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「ウイルスベクター」は、ウイルスに由来する遺伝因子を指し、遺伝因子は、ウイルスを取り扱う危険性を最小限にするように修飾される。好ましくは、上記用語は、任意のこのような当業者に既知の因子に関する。通常、ウイルスベクターでは、ウイルス複製に重要なウイルスゲノムの一部が欠失している。好ましくは、このようなウイルスは、細胞を効率的に感染させることができるが、いったん感染が起こると、ヘルパーウイルスに、新たなビリオンの産生のための欠損タンパク質を提供するよう求める。さらに、ウイルスベクターは、通常、低毒性を示し、遺伝的に安定であり、それらのゲノムを再編成しない。より好ましくは、上記用語は、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはレトロウイルスに由来する、上記の定義に係るウイルス遺伝因子に関する。特に好ましい実施形態では、ウイルスベクターは、ワクチンのためのウイルスベクターである。このようなベクターは、一般に安全であると考えられ、通常、関連する機能の減弱および除去を示す。このようなウイルスベクターの好適な例は、ワクシニア、鶏痘、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ALVAC、MVA、ポックスウイルスである。特に好ましいのは、MVA（改変ワクシニアアンカラ）である。

【0243】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「接種物」は、獲得免疫を特定の疾患に提供する化合物または組成物を指す。接種物は、例えば、病原要素に類似しているが、弱毒化されているか、または死菌または非感染性形態で提供される薬剤であってもよい。また、微生物もしくはその一部の毒素、タンパク質もしくは糖タンパク質のような表面要素または病原要素の表面上に提示される糖分子も含まれる。さらに、接種物は、本明細書において規定される癌抗原、本明細書において規定される細菌抗原、本明細書において規定されるウイルス抗原、本明細書において規定される自己免疫疾患抗原、または本明細書において規定されるアレルゲンのような原因を引き起こす要素の抗原または抗原のエピトープを含み得るか、またはそれらであり得る。接種物はさらに、タンパク質もしくはペプチドの形態で、または発現コンピテント核酸として、または当業者に既知の任意の他の好適な化合物として提供されてもよい。また、2つ以上の接種物の好適な組み合わせ、2種以上の接種物、例えば、タンパク質および核酸の組み合わせの使用も想定される。接種物はさらに、例えばアジュバントの形態で好適な追加因子と組み合わせられてもよく、または好適な担体と配合されてもよい。

【0244】

カーゴとの関連において本明細書で使用する時、用語「プラスミド」は、染色体DNAから離れた、自己複製することができる任意の染色体外DNA分子を指す。好ましくは、上記用語は、当業者に知られている任意のそのような分子に関する。より好ましくは、上記用語は、真核細胞において自己複製することができ、関心のあるポリペプチド、例えば、治療タンパク質もしくは免疫活性タンパク質、または診断的に検出可能なタンパク質、例えば、本明細書において言及されるような生物発光タンパク質（例えば、GFPまたは類似の蛍光タンパク質）をコードするDNA分子に関する。

【0245】

本明細書で使用する時、「多成分系」は、2つ以上の成分を含む任意の系または成分のキットを指し得る。そのような2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上の成分は、例えばさまざまなタンパク質およびさまざまな核酸等のさまざまなカーゴタイプ、またはそのようなさまざまなカーゴタイプの混合物、例えば、タンパク質および核酸等であってもよい。さらに、特に好ましい実施形態では、上記系は、通常、共に作用するか、またはある方法が機能的であるために、もしくはある目標を達成するために必要とされる成分を含む。このような成分の例は、ヌクレアーゼ、RNAエレメント、DNAインサートまたは他のタイプの核酸のような特異タンパク質を含む、ゲノム編集に必要な成分である。このようなゲノム編集アプローチは、例えば、CRISPR/Cas系、TALENに基づくシステム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）に基づくシステム、メガヌクレアーゼに基づくシステム、CreまたはFLPリコンビナーゼおよびloxまたはFRT部位に基づくシステムであってもよい。多成分系は、例えば、既に発現された、またはすぐに使用できる成分の形態で提供されてもよい。また、上記系は、コードされた成分の形態で提供されてもよく、例えば、プラスミド上または転写物上に提供されてもよく、これにより、細胞機構は、発現し、従って自身の動作に必要な要素を提供するよう求められる。本発明は特に、DRACOに基づくシステム、すなわち、二本鎖RNA活性化カスパーゼオリゴマーに基づく系の使用を想定する。CRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）/Casシステムの使用が特に好ましい。CRISPR/Casを利用して、特定の遺伝子（または群もしくは類似の遺伝子）の発現を減少させるかまたはゲノム配列を編集することができる。これは、通常、CRISPR遺伝子またはヌクレアーゼに加えて、一本鎖RNAの発現によって達成される。本技術は通常、Cas9のようなCRISPR遺伝子、またはRNAガイド配列に加えて他の類似の遺伝子の発現に依存する（例えば、Cong et al. 2013, Science, 339, 6121, 819-823参照）。従って、二本鎖切断は、多成分系の1つの成分として、例えば、Cas9または類似の機能と共に提供され得る、適切なフランキングRNAガイド配列の発現を使用して、特異的配列に標的化され得る。また、CRISPR/Cas系を用いて、mRNAを切断し、それによって発現を減少させてもよい。好ましい実施形態では、RNAガイド配列およびCRISPR遺伝子発現（例えば、Cas9）は、発現コンストラクトの一部として含まれてもよい。従って、CRISPR/Cas系は、カーゴとして提供される必要な核酸および酵素成分を含んでもよい。

【0246】

用語「TALENに基づくシステム」は、TALEN、すなわちTALEフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合させることによって生成される、人工制限酵素である転写活性化因子様フェクターヌクレアーゼの使用に関する。TALEフェクターは、通常、キサントモナス細菌または関連種によって分泌されるか、またはそれに由来し、改変されているタンパク質である。TALEフェクターのDNA結合ドメインは、高度に可変であり（反復可変二残基またはRVD）、かつ通常、特異的なヌクレオチド認識との相関関係を示す12番目および13番目のアミノ酸を除き、例えば、約33~34アミノ酸配列の高度に保存された配列を含んでもよい。TALENDNA切断ドメインは、好適なヌクレアーゼに由来してもよい。例えば、FokIエンドヌクレアーゼ由来またはFokIエンドヌクレアーゼ変異体由来のDNA切断ドメインを用いて、ハイブリッドヌクレアーゼを構築してもよい。TALENは、好ましくは、二量体として機能するFo

10

20

30

40

50

k Iドメインの特殊性のために、別個のエンティティとして提供されてもよい。T A L E NまたはT A L E N構成要素は、好ましくは、任意の所望のDNA配列を標的化するために設計または改変されてもよい。このような設計は、好適な方法論（例えば、Zhang et al., Nature Biotechnology, 1-6 (2011)、またはReyon et al., Nature Biotechnology, 30, 460-465 (2012)）に従って実施されてもよい。従って、T A L E Nに基づくシステムは、カーゴとして提供される、例えばゲノムインサートまたは誘導配列としての必要な核酸および酵素成分を含んでもよい。

#### 【0247】

本明細書で使用する時、用語「ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）に基づくシステム」は、通常、ジンクフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合させることによって生成される、人工制限酵素のシステムを指す。ジンクフィンガードメインは、好ましくは、任意の所望のDNA配列を標的化するために設計または改変されてもよい。そのような設計方法は、当業者に既知であるか、またはBae et al., 2003, Nat Biotechnol, 21, 275-80; Wright et al., 2006, Nature Protocols, 1, 1637-1652等の好適な文献ソースから得ることができる。通常、I I型制限エンドヌクレアーゼ（例えば、F o k I由来）由来の非特異的切断ドメインを、ZFN中の切断ドメインとして使用してもよい。この切断ドメインがDNAを切断するために二量体化するので、非パリンドロームDNA部位を標的化するには通常一対のZFNが必要である。本発明によって想定されるZFNは、各ジンクフィンガードメインのC末端への非特異的切断の融合をさらに含んでもよい。例えば、2つの切断ドメインが二量体化してDNAを切断することを可能にするために、2つの個々のZFNは、通常、特定の距離で提供されるC末端を有するDNAの対向鎖に結合するよう求められる。ジンクフィンガードメインと切断ドメインとの間のリンカー配列は、各結合部位の5'末端が約5〜7塩基対で分離されるよう求めてもよいことを理解すべきである。本発明は、任意の好適なZNF形態または変異体、例えば、古典的F o k I融合体、またはF o k Iの最適化バージョン、ならびに修飾された二量化界面を有する酵素、改善された結合機能、またはヘテロ二量体種を提供することができる変異体を想定する。従って、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）に基づくシステムは、カーゴとして提供される、例えばゲノムインサートまたは誘導配列としての必要な核酸および酵素成分を含んでもよい。

#### 【0248】

用語「メガヌクレアーゼに基づくシステム」は、通常約12〜40ヌクレオチドの二本鎖DNA配列の形態の認識部位を有する、エンドデオキシリボヌクレアーゼを使用するシステムに関する。メガヌクレアーゼは通常、配列特異的な様式で配列を排除または修飾する可能性を提供する分子DNAハサミとして働く。好適なメガヌクレアーゼの例としては、イントロンエンドヌクレアーゼおよびインティンエンドヌクレアーゼが挙げられる。メガヌクレアーゼの認識配列は、任意の所望のDNA配列を標的化するために、遺伝子工学またはタンパク質工学によって修飾され得る。配列特異性を提供するために、既存のメガヌクレアーゼの特異性は、アミノ酸配列に変異を導入し、続いて機能的なタンパク質を選択することによって改変され得る。また、さまざまな酵素由来のタンパク質ドメインを上記ヌクレアーゼに融合させて、キメラメガヌクレアーゼを生じさせてもよい。このようなキメラメガヌクレアーゼは、例えば、メガヌクレアーゼの半部位およびタンパク質の半部位で構成される新しい認識部位を有してもよい。さらなる実施形態では、両方のアプローチ、すなわち、メガヌクレアーゼの結合配列の修飾および別の酵素由来のタンパク質ドメインへの融合が組み合わせられてもよい。さらなる詳細、特にメガヌクレアーゼを設計する可能性に関しては、Gao et al., 2010, The Plant Journal for Cell and Molecular Biology, 61, 176-87等の好適な文献ソースから得ることができる。従って、メガヌクレアーゼに基づくシステムは、カーゴとして提供される、例えばゲノムインサートまたは誘導配列としての必要な核酸および酵素成分を含んでもよい。

#### 【0249】

本明細書で使用する時、用語「Cre-loxシステム」は、Creリコンビナーゼ

とそのそれぞれの認識部位（*lock* 部位）との組み合わせに関する。また、上記システムは、*FLP*リコンビナーゼおよびそのそれぞれの認識部位（*FRT* 部位）で構成されてもよい。直接反復様式で上記認識部位を提供することによって、反復間の配列の欠失を実現することができる。同様に、他の方向または3つ以上の認識部位を提供することによって、さらなる再配列パターン（例えば、配列の反転）が起こり得る。さらなる詳細は、Ryder et al., 2004, Genetics, 167, 797-813またはIto et al., 1997, Development, 771, 761-771から得てもよい。

#### 【0250】

さらに好ましい実施形態では、カーゴは、薬学的または免疫学的に活性な化合物であり得る。本明細書で使用する時、用語「薬学的に活性な化合物」は、当業者に既知の任意の好適な物質、薬剤、薬物、細胞成分、組織、または活性薬成分（*API*）に関する。これらの化合物は、先に規定した治療タンパク質、先に規定した放射性核種、先に規定した細胞傷害性物質、先に規定した小分子、先に規定したペプチドまたはタンパク質阻害剤を含んでもよい。特に好ましい実施形態では、薬学的に活性な化合物は、細胞機能の阻害剤である。本明細書で使用する時、用語「細胞機能の阻害剤」は、生理機能、好ましくは酵素機能のようなタンパク質機能に阻害効果を生じる任意の有機分子、ペプチドまたはポリペプチドに関する。上記阻害は、例えば、上記阻害剤の非存在下の酵素の活性と比較した酵素の活性の低下であり得る。いくつかの実施形態では、用語「阻害」は、このように少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の酵素活性の低下を意味する。他の実施形態では、「阻害」は、約5%～約25%、約25%～約50%、約50%～約75%、または約75%～100%の酵素活性の低下を意味する。また、約95%～100%の酵素活性の低下、例えば、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の活性の低下も想定される。このような低下は、当業者に既知の任意の好適な方法またはアッセイを使用して測定することができ、当業者によって認識され得るであろう。

#### 【0251】

このような阻害剤の例は、プロテアーゼ阻害剤、例えば、リトナビル、*HIV*プロテアーゼ阻害剤チプラナビル、またはシルデナフィルである。さらに特に好ましいのは、アポトーシスの阻害剤である。アポトーシス阻害剤としては、*Bcl-2*、*Bcl-XL*、または*Bcl-w*等の*Bcl-2*ファミリーのタンパク質が挙げられる。さらなる例としては、カスパーゼ1、6、および8を阻害するために使用され得る*crmA*（細胞毒素反応修飾因子A）が挙げられる。また、*Cp-IAP*、*Op-IAP*、*XIAP*、*cIAP1*、*C-IAP2*、*NAIP*、リビンおよびサバイリンを含む*IAP*（アポトーシスタンパク質の阻害剤）の使用も意図される。

#### 【0252】

本明細書で使用する時、用語「免疫学的に活性な化合物」は、体内で免疫反応を誘発することができる任意の化合物に関する。さらなる実施形態では、それは、また、免疫調節が可能であり得る。また、免疫学的に活性な化合物が免疫寛容誘導剤であることも想定される。

#### 【0253】

本明細書で使用する時、用語「体内で免疫反応を誘発することができる化合物」は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒト免疫系の要素によって認識され、自然免疫系または適応免疫系の活性化を引き起こす任意の物質または物質の一部に関する。

#### 【0254】

自然免疫系の典型的な構成要素は、補体系またはナチュラルキラー細胞である。補体系は、抗体によって病原体を破壊することができる21個以上のタンパク質のカスケードを含む。上記反応は通常、病原体に付着した抗体への補体結合、または例えば細菌もしくはウイルスのような外的要素の表面の糖質への補体タンパク質の結合によって活性化される。補体系はさらに、細胞、寄生虫またはその一部（例えば、卵）、細菌またはウイルスの

ような外的要素を破壊することができるプロテアーゼを含む。補体活性化のさらなる結果は、追加の免疫細胞を誘引するシグナルペプチドの産生である。ナチュラルキラー（NK）細胞は、通常、易感染性宿主細胞、例えば、癌細胞またはウイルス感染細胞を破壊するリンパ球である。これらの細胞は、免疫系による自己認識を示さず、従ってNK細胞によって標的化可能であると考えられる。このような細胞、例えばウイルスに感染している細胞は、NK細胞によって明らかに検出されるMHC-I細胞の数がそれらの表面で減少していることを示す。NK細胞は、すべての一次免疫区画および二次免疫区画、ならびに粘膜組織において見られる。それらは、さらに、インターフェロンガンマのような炎症性サイトカインを産生する。NK細胞は、特に好ましい実施形態では、癌細胞を破壊するために活性化され得る。それらは、有利に、癌における適応免疫応答を導き得る、DC、NK T細胞またはT細胞のような他の免疫細胞と連絡するために使用されてもよい。理論に束縛されることを望むものではないが、NK細胞とDCは密接に連絡していると考えられる。NK細胞のDC媒介活性化は通常、強力な自然免疫の発生に寄与するが、一方で、ひいては、活性化NK細胞は、DC活性化、成熟、およびサイトカイン産生のためのシグナルを提供し、適応免疫を促進する。DC由来エクソソーム（Dex）の提供、またはDCの活性化は特に、NK細胞の活性化をもたらし、したがって、異常細胞、特に癌細胞を破壊することを可能にする。さらなる詳細は、当業者に既知であるか、またはLion et al., 2012, The Oncologist, 17, 1256-1270等の好適な文献ソースから得ることができる。通常、ランゲリン<sup>+</sup>細胞はNK細胞融合を抑制する。本発明の具体的な実施形態によれば、ランゲリン<sup>+</sup>細胞の活性化は、例えば、そのような活性化を可能にする上記細胞に好適なカーゴを送達することによって、NK細胞を活性化するため、および／または上記活性化に寄与するために使用されてもよい。

【0255】

他方、適応免疫系は、主に特殊化した白血球、すなわちリンパ球、すなわちB細胞とT細胞の活性に基づいている。B細胞は、通常、液性免疫応答に関与しているが、T細胞は、細胞性免疫応答に関与している。B細胞およびT細胞は両方とも、プロセッシングされ続いてMHC分子上に提示される特異的ターゲットを認識したT細胞受容体（TCR）分子を含み、MHC分子は、全宿主細胞によって提供または発現され得る。T細胞は、CD8<sup>+</sup>T細胞またはキラーT細胞としても知られる細胞傷害性T細胞（CTL）、およびヘルパーT細胞、ならびに制御性T細胞に分化され得る。細胞内の抗原は通常、クラスII MHC分子に結合し、クラスII MHC分子によって細胞表面に運ばれ、そこで抗原は、T細胞によって認識され得る。もしTCRがその抗原に特異的であれば、クラスII MHC分子と抗原の複合体に結合し、T細胞は、提示細胞を破壊する。MHC-I分子は、全ての有核細胞の表面に見られる。クラスII MHC分子は通常、主にプロテアソームによるサイトゾルタンパク質の劣化によって生成されたペプチドと結合する。MHC-I-ペプチド複合体は続いて、小胞体を介して細胞の外側原形質膜に挿入される。エピトープペプチドは、クラスII MHC分子の細胞外部分に結合する。このように、クラスII MHCの機能は、主に細胞傷害性T細胞（CTL）に対して細胞内タンパク質を示すことであると考えられている。さらに、クラスII MHCはまた、特定の抗原提示細胞（例えば、DC）が細胞傷害性CD8<sup>+</sup>T細胞に対してMHCクラスII分子を有する細胞外抗原を取り込み、プロセッシングし、提示する能力である交差提示を介して、外因性タンパク質から生成されたペプチドを提示することができる。このプロセスの結果であるクロスプライミングは、ナイーブ細胞傷害性CD8<sup>+</sup>T細胞の活性化細胞傷害性CD8<sup>+</sup>T細胞への刺激を示す。このプロセスは、腫瘍およびウイルスに対する免疫につながり得る。交差提示はまた、有利に、例えば、タンパク質抗原を用いたワクチン接種（例えば本明細書に記載されるような腫瘍ワクチン接種）による、細胞傷害性免疫の誘導のためであり得る。MHC-I分子は通常、長さ8〜10個のアミノ酸であるペプチドに結合する。

【0256】

他方、（CD4<sup>+</sup>T細胞としても知られる）ヘルパーT細胞および（Treg細胞またはサプレッサーT細胞としても知られる）制御性T細胞は、クラスII MHC分子に結

合した抗原を認識する。MHC-I分子は通常、樹状細胞、単核食細胞、胸腺上皮細胞またはB細胞等の抗原提示細胞（APC）上にのみ見られる。MHCクラスII分子のロードは通常、リソソーム区画で起こる。例えば、細胞外タンパク質は、エンドサイトーシスされ、リソソームで消化されてもよく、エピートープペプチド断片は、MHC-I分子に結合することができる。通常、MHC-I分子は、約15～24個のアミノ酸の長さの抗原を提示する。

#### 【0257】

本発明によれば、上記の活性のいずれかは、好適な化合物、例えば抗原またはエピートープによって誘発され得る。抗原の長さおよびその細胞区画の存在等は、MHC-I上またはMHC-II分子上の提示を調節し得るため、免疫系の特定のブランチの活性化もまた調節し得る。癌およびウイルス療法については、自然免疫系および適応免疫系の密接な相互作用を、例えばDCの活性化を介して誘発することが特に好ましい。さらなる詳細は、Ortner et al., Oncoimmunology, 2017, 6, 2, e1260215; Watt et al., 2008, J Immunol., 181, 8, 5323-30またはWalzer et al., 2005, Blood, 106, 7, 2252-8等の好適な文献ソースから得てもよい。

#### 【0258】

本明細書で使用する時、用語「免疫調節が可能な化合物」は、免疫系の制御調節を伝達する任意の物質または物質の一部に関する。従って、免疫応答は、治療目標に従って誘導、増幅、減弱または予防することができる。したがって、免疫調節は、例えば活性化（例えば、活性化免疫療法の形態）であってもよく、免疫応答が誘発または増幅されるか、または免疫調節は、抑制（例えば、抑制免疫療法の形態）であってもよい。

#### 【0259】

免疫調節を活性化することができる化合物の例としては、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、サイトカイン、インターロイキン、ケモカイン、免疫調節イミド薬（IMiD）合成シトシンリン酸グアノシン（CpG）オリゴデオキシヌクレオチドもしくはグルカンのような刺激因子、またはイミキモドのような免疫増強クリームが挙げられる。好適なインターロイキンの好ましい例は、IL-2、IL-7およびIL-12である。サイトカインの好ましい例は、インターフェロンおよびG-CSFである。好適なケモカインの好ましい例は、CCL3、CCL26およびCXCL7である。好適なIMiDの好ましい例は、例えばレナリドマイド、ポマリドミドおよびアプレミラスト等のサリドマイドおよびそのアナログである。

#### 【0260】

抑制的免疫調節が可能な化合物の例として、グルココルチコイド、細胞増殖抑制剤、抗体、イムノフィリンに作用する化合物等の免疫抑制薬が挙げられる。好適なグルココルチコイドの好ましい例は、プレドニゾン、デキサメタゾンおよびヒドロコルチゾンである。グルココルチコイドは通常、例えば、サイトカインIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、およびTNFアルファをコードする遺伝子を阻害することによって、細胞媒介免疫を抑制し、サイトカイン産生の減少は、T細胞増殖の低下を引き起こす。グルココルチコイドはまた、例えば、B細胞に少量のIL-2およびIL-2受容体を発現させることによって、液性免疫を抑制することもあり、これにより、B細胞クローン増殖および抗体合成が低下する。好適な細胞増殖抑制剤の好ましい例は、窒素マスタード（例えば、シクロホスファミド、ニトロソウレア、白金化合物）等のアルキル化剤である。他の例としては、代謝拮抗物質、例えば葉酸アナログ（例えば、メトトレキサート）、プリンアナログ（例えば、アザトリオピンまたはメルカプトプリン）、ピリミジンアナログ（フルオロウラシル等）が挙げられる。好適な例のさらなる一群としては、ダクチノマイシン、アントラサイクリン、マイトマイシンC、ブレオマイシンまたはマイトラマイシン等の細胞傷害性抗生物質が挙げられる。好適な抗体の好ましい例としては、例えばヒト胸腺細胞またはリンパ球で免疫化されたウマ等の動物の血清から得られる異種ポリクローナル抗体が挙げられる。本発明によって想定されるポリクローナル抗体調製物の例としては、atgamおよびチモグロブリンが挙げられる。また、CD25およ

びCD3に対するモノクローナル抗体も想定される。イムノフィリンに作用する好適な化合物の好ましい例は、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムスおよびエベロリムスである。抑制的免疫調節が可能なさらなる化合物は、フィンゴリモド、ミリオシン、ミコフェノール酸、インフリキシマブ、エタネルセプトまたはアダリムマブの膜透過性変異体等のTNFアルファ結合分子である。特に想定される具体例としては、（リンパ球のサイトゾルタンパク質シクロフィリンに結合し、それによってカルシレウリンを阻害する）シクロスポリン、（細胞内カルシニューリン阻害剤である）タクロリムス、（サイトゾルFK結合タンパク質12に結合することによってmTORを介してIL-2産生を阻害し、それによってTおよびB細胞の活性化を遮断する）シロリムスおよびエベロリムス、（スフィンゴシン-1-リン酸受容体の内部移行を引き起こし、リンパ節中のリンパ球を隔離する）フィンゴリモド、（イノシンモノホスフェートデヒドロゲナーゼの選択的阻害を提供し、グアノシンの生合成の阻害を引き起こし、それによってBリンパ球およびTリンパ球の増殖を阻害する）ミリオシンおよびミコフェノール酸が挙げられる。

#### 【0261】

本明細書で使用する時、用語「免疫寛容誘導剤」は、通常、生体において免疫応答を誘発する能力を有する物質または組織に対する免疫系の不応答状態を誘導することができる化合物に関する。免疫寛容は、中枢寛容または末梢寛容のいずれかであり得る。中枢寛容は通常、胸腺または骨髄で誘導されるが、末梢寛容はリンパ節で誘導される。本発明の文脈において、中枢寛容の誘導が好ましい。末梢寛容は、アレルゲンまたは腸内微生物等の様々な環境エンティティに対する免疫系の過剰反応度の抑制に関与していると考えられる。寛容系の機能不全は通常、典型的には全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、1型糖尿病、自己免疫性多内分泌症候群1型（APS-1）、免疫調節障害、多内分泌障害、または腸症等の自己免疫疾患を引き起こし、喘息、アレルギー、および炎症性腸疾患に寄与すると考えられる。寛容系はまた、移植および同種移植にとって重要である。さらに、アレルギーおよび過敏反応は、おそらく末梢寛容の破綻したまたは発達不十分のメカニズムが原因の、免疫系による誤ったまたは過剰な反応と通常考えられる。通常、粘膜表面のTreg細胞、TR1、およびTh3細胞は、アレルギー反応を媒介する2型CD4ヘルパー細胞、肥満細胞、および好酸球を抑制する。Treg細胞の欠損やそれらの粘膜への局在がアレルギー反応に関与している可能性がある。樹状細胞（DC）は、末梢寛容において重要な役割を果たすと考えられる。DCは、末梢非リンパ組織、例えば、さまざまな分化系統および成熟レベルの様々なサブセット中の皮膚およびリンパ組織において、特にランゲリン<sup>+</sup>細胞として、広く存在する。定常状態では、すなわち、非炎症状態では、樹状細胞の大部分は未成熟のままであり、共刺激を提供し得る弱い抗原刺激および抗原提示を受けて、未成熟樹状細胞は通常、免疫抑制能を有する種々の制御性T細胞を誘導および増幅しながら、ナイーブT細胞のクローン欠失および不活性化を誘導する。従って、未成熟樹状細胞は、T細胞機能を制御する制御メカニズムと関連する免疫寛容の誘導を介して、免疫学的恒常性の維持に関与すると考えられる。少なくともIL-10およびTGFB-βを含むサイトカインの使用は、寛容原性DCをもたらし得る。さらに、CD80high、CD86high、CD40highおよびCD83lowの表面発現の誘発を使用して、寛容を誘導してもよい。また、デキサメタゾン等のIL-10産生促進剤の使用も想定される。さらなる実施形態では、誘発免疫寛容は、5-アミノレブリン酸（ALA）またはその誘導体の使用、ならびにクエン酸第一鉄ナトリウム（SFC）の使用によって達成され得る。さらなる詳細は、US9399029等の好適な文献ソースから得てもよい。免疫寛容誘導化合物は、本明細書に記載されるようなランゲリン<sup>+</sup>細胞において、またはランゲリン<sup>+</sup>細胞用に、ならびにランゲリン<sup>+</sup>細胞が関与する病状との関連において使用されることが特に好ましい。

#### 【0262】

本発明のさらに好ましい実施形態では、上述のようなカーゴは、（i）癌抗原もしくはエピトープを含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、または癌抗原もしくはエピトープを含むか、（ii）自己免疫疾患抗原もしくはエピトープを含む、本質的

10

20

30

40

50

にそれらからなるもしくはそれらからなる、または自己免疫疾患抗原もしくはエピトープを含むか、(i i i) 細菌抗原を含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、または細菌抗原もしくはエピトープを含むか、(i v) ウイルス抗原を含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、またはウイルス抗原もしくはエピトープを含むか、(v) 寄生性抗原を含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、または寄生性抗原もしくはエピトープを含むか、あるいは(v i) アレルゲンもしくはアレルゲンのエピトープを含む、本質的にそれらからなるもしくはそれらからなる、またはアレルゲンもしくはアレルゲンのエピトープを含む。

#### 【0263】

本明細書で使用する時、用語「癌抗原」は、腫瘍細胞において産生される抗原性物質に関する。したがって、上記用語は通常、上述のような細胞抗原も含むことがある。それらの抗原性物質はまた、「癌抗原」と称されてもよい。これらの抗原は通常、宿主において免疫応答を引き起こす。理論に束縛されることを望むものではないが、体内の正常なタンパク質（すなわち、宿主自身によって産生されるタンパク質）は免疫系の自己寛容のために抗原性ではないと現在考えられているが、これは、自己反応性リンパ球が欠失してから、完全な免疫担当細胞に発達するものであるという概念である。免疫系にさらされていない他のタンパク質が免疫応答を引き起こすことがある。これには、免疫系から隔離されるタンパク質、通常は非常に少量で産生される（しかし、例えば、癌細胞においてははるかに多量に産生される）タンパク質、または通常細胞／生体の発達の特定の段階の間にのみ産生されるタンパク質、または突然変異の存在により構造もしくは機能が変化するタンパク質が含まれ得る。従って、癌抗原は例えば、突然変異癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子の産物、(i) 過剰発現または異常発現した細胞タンパク質、(i i) 発癌性ウイルスにより産生される癌抗原、(i i i) 癌胎児性抗原、(i v) 改変した細胞表面糖脂質および糖タンパク質、ならびに(v) 細胞型特異的分化抗原等の他の突然変異遺伝子の産物として、さまざまな群に分類され得る。さらに具体的な実施形態では、上記抗原は腫瘍特異的抗原であり得、これはその異常産生が癌または腫瘍の原因であるタンパク質をコードする遺伝子への突然変異によって産生される抗原である。このような腫瘍特異的抗原の想定される例は、p 53またはr a sの異常な型である。また、突然変異が腫瘍の発生とは無関係であるが、癌細胞と関連する異常なタンパク質の産生につながる場合は、腫瘍関連の抗原(T A A)と考えられる。また、この抗原群は、本発明に係るカーゴの一部であると想定される。T A A群は通常、共通T A A群と固有T A A群に細分される。共通T A Aの中にはいくつかのクラスの癌に共通する抗原があるが、固有T A Aは発癌物質によって含まれるランダム体細胞点突然変異に起因すると考えられ、したがって、個々の腫瘍によって発現される固有のネオ抗原が構成される。このような固有T A Aの存在は、例えばワクチンの形式での特異的な抗原カーゴの調製に有利に利用され得、これは、患者のミュータノームに関する情報を提供し、癌と関連する固有の突然変異ペプチドに関する情報を潜在的に提供する、次世代配列決定アプローチを介して得られる個人ゲノム配列に基づき、抗原として提示される場合に抗腫瘍T細胞の誘発に使用することができる。

#### 【0264】

本発明は、好ましくは以下の癌抗原のうちの1つ以上の使用を想定する。M A G E - A 1、N Y - E S O - 1、S S X - 2、G p - 100、M e l a n - A / M a r t - 1、チロシナーゼ、P S A、マンマグロビンA、U R L C 10、G A A、O F A、サイクリンB 1 / W T - C E F、V E G F R 1、T K、M U C 1 - K L H、H P V 16 E 7、H P V 16 / 18、C E A、K O C 1、S L - 701、p 53、サバイビン、テロメラゼ、G S K 2302025A、M A G E - 3. 1、O V A B i P、C O 16、D E P D C 1、M P H O S P H 1、O N T - 10、G D 2 LおよびG D 3 L、T F、r s P S M A、M U C - 2、P A P ; K L H、S T F - I I、G 17 D T、I C T - 107、L M P 2 A、N A 17 - A、N A 17. A 2、I M A 901、h T E R T、チロシナーゼ関連ペプチド2 (T R P 2)、P A N V A C、E B N A 1 / L M P 2、T R I C O M 5 T 4、M P H O S P H 1およびD E P D C 1。さらに、本発明はまた、上記の抗原の任意の組み合わせ、

ならびにそれらの誘導体もしくは改変バージョン、またはそれらに由来する相同タンパク質／ペプチド配列に関する。また、将来発見され、記載され得る追加の癌抗原の使用も想定される。当業者に知られているような任意の他の好適な抗原の使用もまた想定される。さらなる詳細は、Tagliamonte et al., 2014, Hum Vaccin Immunother, 10(11), 3332-3346から得てもよい。本明細書で使用する時、用語「癌エピトープ」は、例えば本明細書において上記に規定した癌抗原中に存在するMHC-IまたはMHC-Iイクラスの特異的エピトープに関する。癌エピトープの使用は、具体的な実施形態において、レシピエントのHLA対立遺伝子背景のさらなる特徴付けと組み合わせられ得る。

#### 【0265】

特に好ましいのは、癌抗原NY-ESO-1、URLC10、G17DT、MART-1；NA17-A；gp100；hTERT、PAP、MPHOSPH1、DEPDC1、HPV16／18もしくはSTF-II、またはこれらの抗原上に存在するエピトープの使用である。

#### 【0266】

本明細書で使用する時、用語「自己免疫疾患抗原」は、自己組織または無害な環境要素のいずれかを攻撃する不適切な免疫応答を引き起こす抗原性物質に関する。従って、自己免疫疾患は通常、ほとんどの場合、正常な身体部分への異常な免疫応答から生じる状態であり、ほぼ全ての身体部分が関与し得る。上記疾患は、免疫系内で機能的になる自己反応性細胞のリザーバの出現または存在に伴って生じる。すなわち、このような場合には、T細胞が成熟免疫細胞に発達するにつれて、胸腺内でネガティブ選択プロセスによって自己反応性T細胞が作られるのを妨げるメカニズムは破綻する。上記疾患は、自己抗体ならびに自己反応性リンパ球（例えば自己反応性T細胞）の存在に伴って生じる。上記疾患は、特定の器官に限定され得るか、またはさまざまな場所における特定の組織に伴って生じ得る。本発明の文脈における自己免疫疾患抗原の使用は、例えば本明細書において上述した上記抗原に対する免疫寛容の誘導を含む。本発明の具体的な実施形態では、移動性未成熟ランゲリン<sup>+</sup>細胞は、免疫寛容の誘導に使用されてもよい。特に、上述のような提示は、DCが活性化されない場合、上記抗原に対する免疫寛容効果を引き続き生み出しうる。従って、自己免疫疾患抗原の治療は、エフェクター免疫細胞へのその後の抗原の提示につながる抗原のサイトゾル送達、およびアジュバントを介した活性化等のDCの活性化につながり得る成分の明白な欠如を含むことが、本発明によって想定される。理論に束縛されることを望むものではないが、例えば、サイトゾル送達を介するDCへの抗原の提示は、上記抗原のMHC-Iベースの提示をもたらすと考えられる。このような提示は、DCが活性化されない場合、上記抗原に対する免疫寛容効果を引き続き生み出し得る。従って、自己免疫疾患抗原の治療は、抗原のサイトゾル供給およびアジュバント等のDCの活性化につながり得る成分の明白な欠如を含むことが、本発明によって想定される。

#### 【0267】

カーゴの形態で抗原が提供され得る自己免疫疾患には、例えば、抗リン脂質症候群（aPL症候群）、天疱瘡、多発性硬化症（MS）、重症筋無力症、グレーブス病、グッドパスチャー症候群、顕微鏡的血管炎、多発性血管炎を伴う肉芽腫症、全身性自己免疫性リウマチ性疾患（SARD）、混合性結合組織疾患、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性硬化症／クレスト症候群、多発性筋炎／皮膚筋炎、自己免疫性甲状腺疾患、セリアック病、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、ANCA関連疾患、抗リン脂質症候群／血栓塞栓症候群、抗GBM疾患、糖尿病、悪性貧血、またはクローン病が含まれる。好適な抗原は、当業者に既知であるか、またはWang et al., Nucleic Acids Research, 2017, 45, D1, D769-D776のような文献ソースから得てもよい。特定の実施形態では、本発明は、例えば以下の対応する抗原の使用を想定する。aPL症候群に対するベータ2-GP1、天疱瘡に対するDsg3、多発性硬化症に対するMBP、PLPおよび／またはMOG-1、重症筋無力症に対するACh受容体、グレーブス病に対するTSH受容体、グッドパスチャー症候群に対するIV型コラーゲン、顕微鏡的血管炎に対するp-ANCA、多発性血管炎を伴う肉芽腫症に対するc-ANCA、全身性自己免疫性リウマ

10

20

30

40

50

チ性疾患（SARD）に対するレンズ上皮由来増殖因子／転写活性化補助因子p75（LEDGF／p75）、混合性結合組織疾患に対するU1-snRNP 68／70、U1-snRNP A、U1-snRNP CまたはU-snRNP B／B'、全身性エリテマトーデスに対するSm、RNP／Sm、SmD、SmD1、SmD2、SmDまたはリボソームリンタンパク質P0、シェーグレン症候群に対するRo／SS-A、またはLa／SS-B、全身性硬化症／クレスト症候群に対するセントロメアプロテインB（CENP-B）、セントロメアプロテインA（CENP-A）、DNAトポイソメラーゼI（Sc1-70）、多発性筋炎／皮膚筋炎に対するヒスチジル-tRNA合成酵素（Jo-1）、スレオニル-tRNA合成酵素（PL-7）、アラニル-tRNA合成酵素（PL-12）、グリシル-tRNA合成酵素（EJ）またはSRP54、自己免疫性甲状腺疾患に対するサイロイドペルオキシダーゼ（TPO；別称：MSA）、チログロブリン、セリアック病に対する組織トランスグルタミナーゼ（tTG；別称：TGase-2）またはグリアジン、自己免疫性肝炎に対するシトクロムp450 2D6、ホルムイミノトランスファーゼシクロデアミターゼ（FTCD）、原発性胆汁性肝硬変に対するM2、分岐鎖2-オキソ酸デヒドロゲナーゼ複合体（BCOADC）、OGDC-E2またはPDC-E2、ANCA関連疾患に対するミエロペルオキシダーゼ（MPO）またはプロテイナーゼ3（PR3）、抗リン脂質症候群／血栓塞栓症候群に対する、以前はアポリポタンパク質H（Apo H）として知られていた、ベータ2-糖タンパク質1（ベータ-GP1）、抗GBM疾患に対する糸球体基底膜（GBM）、糖尿病に対するグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD65）、悪性貧血に対する内因子、クローン病に対する糖タンパク質2（GP2）。さらに想定されるのは、好ましくは先に規定した、抗原上に存在する自己免疫疾患エピトープである。本明細書で使用するとき、用語「自己免疫疾患エピトープ」は、本明細書において上記に規定した自己免疫疾患抗原中に存在するMHC-IまたはMHC-IIクラスの特異的エピトープに関する。自己免疫疾患エピトープの使用は、具体的な実施形態において、レシピエントのHLA対立遺伝子背景のさらなる特徴付けと組み合わせられ得る。

#### 【0268】

本明細書で使用するとき、用語「細菌抗原」は、細菌によって産生または提示される抗原性物質に関する。細菌抗原は例えば、タンパク質および多糖、または脂質によって運ばれてもよい。それらは、被膜、カプセル、細胞壁、鞭毛、線毛、または細菌の毒素を含み得る。通常は、このような物質は細菌の表面に見られる。多くの場合、莢膜多糖および／またはリボ多糖の形態の糖質は、細菌の表面上の主要な成分であり、従って、抗原構造であると見なすことができる。また、このような多糖および／またはリボ多糖は、ペプチドまたはタンパク質によって模倣され、それによって関連する抗原またはエピトープが提供されることも想定される。本発明は、当業者に既知の任意の好適な細菌抗原を想定している。細菌抗原または細菌エピトープは、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、髄膜炎菌多糖または無細胞形態の百日咳菌であるか、それらを含むか、またはそれらに由来することが好ましい。例えば、細菌抗原またはエピトープはCRM、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、髄膜炎菌外膜複合体、またはインフルエンザ菌タンパク質Dに存在する抗原に由来するT細胞エピトープである。さらなる例および詳細はDetmer and Glenting, 2006, Microbial Cell Factories, 5, 23などの好適な文献ソースから得られる。

#### 【0269】

本明細書で使用するとき、用語「ウイルス抗原」は、ウイルスによって産生される抗原性物質に関する。ウイルス抗原は、典型的にはタンパク質またはペプチド要素であり、通常はウイルスのゲノムによってコードされる。ウイルス抗原は、例えば、被膜もしくは外被もしくはその一部として、ウイルスの表面上に提示されてもよく、または例えば、細胞の内部でのウイルス崩壊後に細胞によって提示されてもよい、ウイルス核もしくは他のウイルス構造の一体部分であってもよい。ウイルス抗原の例にはカプシドタンパク質、マトリクスタンパク質、エンベロープタンパク質などのウイルス構造要素、ならびにホリン、移動タンパク質、NSタンパク質、例えばNS2、NSP1などの非構造タンパク質、ま

10

20

30

40

50

たはインテグラーゼ、逆転写酵素、ノイラミニダーゼ、エステラーゼなどのウイルスによってコードされる酵素活性化物が含まれる。好ましい抗原はA型肝炎ウイルス（加熱全ウイルス不活化）、B型肝炎、およびヒトパピローマウイルス（HPV）に由来する。Hep B表面抗原が特に好ましい。ウイルスエピトープの使用も想定される。本明細書で使用する時、用語「ウイルスエピトープ」は、本明細書において上記に規定したウイルス抗原中に存在するMHC-IまたはMHC-IIクラスの特異的エピトープに関する。ウイルスエピトープの使用は、具体的な実施形態において、レシピエントのHLA対立遺伝子背景のさらなる特徴付けと組み合わせられ得る。さらなる情報は、<https://www.who.int/immunization/diseases/en/>（2018年12月4日に最後のアクセス）のような適切なインターネットリソースから取得できる。

#### 【0270】

本明細書で使用する時、用語「寄生性抗原」は、寄生虫によって産生されるか、または寄生虫上に提示される抗原性物質に関連する。用語「寄生虫」は、哺乳類の寄生虫、好ましくはヒトの寄生虫に関連する。寄生虫は通常は原生動物または後生動物に属する。主要な寄生虫群は、寄生原虫と寄生蠕虫である。原生動物は単細胞真核生物である。寄生原虫は、その移動手段と生殖様式に基づいて、通常は鞭毛虫類、アメーバ類、孢子虫類、纖毛虫類の4群に分けられる。鞭毛虫の群の内において、ジアルジアやトリコモナスなどの腸管および泌尿生殖器の鞭毛虫類、ならびにトリパノソーマやリーシュマニアなどの血液および組織の鞭毛虫が存在する。アメーバ類の例としては、エントアメーバ、ネグレリア属、およびアカントアメーバが挙げられる。孢子虫類群は通常は有性生殖期と無性生殖期が交互に繰り返される複雑な生活環をとり、クリプトスポリジウム、サイクロスポーラ、トキソプラズマ、マラリア原虫、すなわちプラスモディウム種を含む。この孢子虫類は通常は細胞内寄生虫である。纖毛虫類は纖毛をもつ複雑な原生動物である。この群の例は、ヒトおよび豚の腸纖毛虫である大腸バランチジウムである。寄生蠕虫は通常、線虫と扁形動物の群に属する。扁形動物の例として、肝蛭のような吸虫、またはサナダムシなどの条虫が含まれる。また、住血吸虫またはバンクロフト糸状虫または回旋糸状虫などの寄生糸状虫が想定される。本発明は、上記の寄生虫のいずれか、または当業者に既知の任意の他の好適な寄生虫の抗原を想定する。具体的な実施形態では、上記抗原は、所定の生活環形態、例えば卵上に存在し得る。特に好ましくは、マラリア抗原、例えば、網状赤血球結合様相同タンパク質5（RH5）およびRH5結合タンパク質（Ripr）を含む三元複合体の重要な構成要素であるシステインリッチ保護抗原（CyRPA）などのその生活環形態の1つにおいてプラスモディウムによって示されるタンパク質構造の使用である。本明細書で使用する時、用語「寄生エピトープ」は、本明細書において上記に規定した寄生性抗原中に存在するMHC-IまたはMHC-IIクラスの特異的エピトープに関する。寄生エピトープの使用は、具体的な実施形態において、レシピエントのHLA対立遺伝子背景のさらなる特徴付けと組み合わせられ得る。さらなる情報は、Tarleton, 2005, Cellular Microbiology, 7, 10, 1379-1386またはHigashi, 1988, Ann Rev Public Health, 9, 483-501などの好適な文献ソースから得ることができる。

#### 【0271】

本明細書で使用する時、用語「アレルゲン」は、免疫グロブリンE（IgE）応答を介してアトピー性個体においてI型過敏反応を刺激することができる抗原性物質に関する。従って、アレルゲンは、さもなくば身体に害を与える感知された脅威に対して免疫系が生体を防御する異常に活発な免疫応答を産生する抗原の一種である。本発明の文脈内で、アレルゲンは主に、タンパク質またはペプチドを含むと理解される。アレルゲンは、イエダニの排泄物、花粉、またはペットの鱗屑など、さまざまな発生源で見られる。それらはまた、ピーナッツ、ナッツ、海産物または貝類などの食品中に見出され得る。参照によって本明細書に組み込まれるアレルギー誘発性タンパク質の一覧は、<http://fermi.utmb.edu>で閲覧できるSDAP（アレルギー誘発性タンパク質の構造データベース）で見られる。上記データベースにおいて言及される全てのアレルゲンは、本発明において想定される。また、当業者に既知の任意の他のアレルゲンも想定される。本明細書で使用する時

、用語「アレルゲンのエピトープ」は、本明細書において上記に規定したアレルゲン中に存在するMHC-IまたはMHC-IIクラスの特異的エピトープに関する。アレルゲンのエピトープの使用は、具体的な実施形態において、レシピエントのHLA対立遺伝子背景のさらなる特徴付けと組み合わせられ得る。さらなる情報は当業者に既知であるか、またはEFSA Journal、2004、32、1-197に公開される“Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes”などの好適な文献ソースから取得できる。

#### 【0272】

本発明のさらなる実施形態では、ビヒクルは、約1~2000nm、好ましくは約1~1000nmの平均の大きさを有し得る。本明細書で使用する時、「ビヒクルの大きさ」は、本明細書において規定される複合体と、本明細書において規定される無装填または空の担体との組み合わせ、または本明細書において規定される複合体と、本明細書において規定されるカーゴを含むかまたはカーゴと関連付けられる担体との組み合わせ、のいずれかに関する。ビヒクルの大きさは、担体の性質および形態、例えば、リポソームまたはナノ粒子またはタンパク質などに大きく依存する。したがって、1nm~100nmの範囲、または約100nm~250nmの範囲、または250nm~1000nmの範囲、または1000nm~2000nmの範囲であってよい。ビヒクルの大きさは、ビヒクルのために意図される使用、および／またはビヒクルに含まれる担体の形態および性質に有利に適合される。例えば、ビヒクルは、様々な細胞型による効率的な取り込みおよび標的

10

20

#### 【0273】

それに応じて、動的光散乱法(DLS)を介して平均ビヒクル長を測定することができる。DLS技術は、懸濁液中の小粒子または溶液中のポリマーのサイズ分布プロファイル

30

#### 【0274】

別の態様では、本発明は、上記で規定されるカーゴを含むかまたはそれらに結合した、先に規定したランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティングのための少なくとも本発明の1つのビヒクルを含む、ランゲリン<sup>+</sup>細胞への標的化カーゴの送達のための組成物に関する。好ましい実施形態では、上記組成物はさらに添加剤を含む。本明細書で使用する時、用語「添加剤」は(i)本明細書において規定されるリガンドと標的細胞との間の相互作用、(ii)本明細書において規定される標的細胞へのカーゴの送達、(iii)貯蔵、保存および／または使用中のビヒクルの安定化、または(iv)標的細胞における活性の誘導と関連する後続の工程、例えば、ビヒクルまたはカーゴのエンドソーム脱出または核転座、より具体的には、ランゲリン<sup>+</sup>細胞における抗原プロセッシングおよび提示を促進する事を容易にする、任意の物質または化合物に関する。

40

#### 【0275】

好適な想定される添加剤の例として、二価イオンが挙げられる。好ましい二価イオンは

50

$\text{Ca}^{2+}$ または $\text{Zn}^{2+}$ である。ランゲリンが二価イオン依存性レクチン、特に $\text{Ca}^{2+}$ 依存性レクチンであることが知られており、ここで、二価イオンの存在はリガンドとその同族受容体ランゲリンとの間の相互作用に影響を及ぼす。例えば、Valladeau, 2000, Immunity, 12(1), 71-81から取得され得るように、EDTAまたはEGTAなどのキレート化剤の存在は、ランゲリンの喪失または作用をさらに導くと推測される。従って、本発明は特に、EDTAなどのキレート化剤が本発明の組成物中に存在しないことを想定している。具体的な実施形態では、カルシウムイオン、すなわち $\text{Ca}^{2+}$ の濃度は $4\text{ }\mu\text{M}\sim 1\text{ mM}$ 、例えば $4\sim 40\text{ }\mu\text{M}$ 、 $40\sim 500\text{ }\mu\text{M}$ 、 $500\text{ }\mu\text{M}\sim 1\text{ mM}$ 、または上記の値の間の任意の値であり得る。さらに具体的な実施形態では、亜鉛イオン、すなわち $\text{Zn}^{2+}$ の濃度は、 $4\text{ }\mu\text{M}\sim 1\text{ mM}$ 、例えば $4\sim 40\text{ }\mu\text{M}$ 、 $40\sim 500\text{ }\mu\text{M}$ 、 $500\text{ }\mu\text{M}\sim 1\text{ mM}$ 、または上記の値の間の任意の値であり得る。具体的な実施形態では、添加剤の使用は、本発明の組成物の適用部位に調整され得る。従って、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンの使用は、天然 $\text{Ca}^{2+}$ の提供がない状態でのみ想定され得る。理論に束縛されることを望むものではないが、ヒト表皮中の $\text{Ca}^{2+}$ の濃度は約 $1\sim 2\text{ mM}$ であり、これはさらに、すべてのランゲリンを飽和させ、それらを機能的にすると仮定される。 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上記の通常の状態から逸脱する患者または状況において、上記のような添加剤を使用することが特に好ましい。

#### 【0276】

好適な添加剤のさらなる例として、アジュバントが挙げられる。先に規定した組成物の文脈において使用される用語「アジュバント」は一般に、他の薬剤の効果、特に、上述のようなカーゴを含む、または上述のようなカーゴに関連するビヒクルの効果、より具体的には、上述のようなカーゴエンティティの効果を改変する免疫学的薬剤に関する。アジュバントは例えば、免疫学的に誘発するカーゴに関して増作用を有し得る。アジュバントはさらに、DCまたはランゲリン<sup>+</sup>細胞のための特別な選択的効果を有し得る。DCの成熟および／または皮膚からリンパ節へのDCの移動を誘導し、通常はT細胞活性化を導くアジュバントが使用されることが特に好ましい。好ましいアジュバントの例として、水酸化アルミニウム、パラフィン油、MF59、AS03、MPL、QS21、AS04、AS01、AS02、IC31、CpG-オリゴヌクレオチド、ISCOMATRIXまたはビロソメス、不完全フロイント-アジュバン (incomplete Freund-Adjuvan)、KLHまたはBCGなどの免疫学的に活性な化合物が挙げられる。

#### 【0277】

好適な添加剤の別の例として、ビヒクル上のリガンドのランゲリンへの結合を促進する因子が挙げられる。このような促進因子は例えば、タンパク質機能のアロステリックアクチベーター、例えば、Aretz et al., 2018, Am. Chem. Soc., 140, 44, 14915-14925に記載されている分子などの小分子、または抗体もしくはアプタマーであり得る。促進因子はまた、糖質結合のより強固な結合を可能にする金属であり得る。

#### 【0278】

好ましい実施形態では、本発明に係る組成物は、液体の形態で提供される。これは、例えば、溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含み得る。さらなる実施形態では、組成物は $\text{H}_2\text{O}$ 、スクロース水溶液、緩衝液、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水、トリシン緩衝液、またはHEPES緩衝液などの溶媒を含み得る。さらに、前述の水溶液系と添加剤、例えば前述のものおよびジメチルスルホキシド (DMSO) のいずれかの組み合わせも想定される。DMSOは約15体積%までの任意の好適な量または濃度で、例えば、約5体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、12体積%、または15体積%の濃度で使用され得る。また、TweenまたはTriton Xなどの界面活性剤は添加剤として作用することができ、本発明の文脈内で使用することができる。

#### 【0279】

さらに別の好ましい実施形態では、本発明による組成物が任意の好適な量で、先に規定したビヒクル、すなわちカーゴを含む。上記の量は、担体の形態または種類、例えば、リポソーム、ナノ粒子、タンパク質などに従って調整されてもよい。さらに、ビヒクルの量は結合される受容体の数、ならびに標的細胞の位置に従って調整されてもよく、例えば、

皮膚または他の組織は、様々な量のビヒクルを必要としてもよい。ビヒクルは、約0.5～30モル%、より好ましくは約1～10モル%、さらにより好ましくは約4～6モル%、最も好ましくは約4.75～5モル%の量で提供されることが好ましい。典型的な実施形態では、上述の値が、例えば本明細書において上記に規定したリポソームに適用される。さらなる代替的な担体では、当業者に既知のように、上記の量は変化し、好適な計算に従って適合されてもよい。

#### 【0280】

さらに具体的な実施形態では、本発明による組成物が任意の好適な密度で、先に規定したビヒクル、すなわちカーゴを含む。上記の密度は、担体の形態または種類、例えば、リポソーム、ナノ粒子、タンパク質などに従って調整されてもよい。さらに、ビヒクルの密度は結合される受容体の数、ならびに標的細胞の位置に従って調整されてもよく、例えば、皮膚または他の組織は、様々な密度のビヒクルを必要としてもよい。ビヒクルは、1平方ナノメートル当たり約0.05～約0.08ビヒクルの密度で、より好ましくは1平方ナノメートル当たり約0.065ビヒクルの密度で、例えば約160nmの径の担体に対して1平方ナノメートル当たり約0.067ビヒクルで提供されることが好ましい。また、担体、例えばリポソーム、の大きさまたは径を考慮して決定され得る、さらなる好適な密度値も想定される。さらに、上記密度は、2つのビヒクルの距離が約4.4nmになるように調整されることが想定される。具体的な実施形態によれば、好適なビヒクル密度は、約26μMの脂質濃度および約75μMの平均リポソーム濃度値に基づいて計算され得る。これらの値はリポソームの種類、担体の大きさ、担体の大きさ、径または大きさ、ビヒクルの種類および大きさなどに応じて変化し、および／または適応させることができる。本発明による担体におけるビヒクルの密度の計算および適応に関するさらなる詳細は、Güven et al., 2009, Journal of Liposome Research, 19, 2, 148-154またはMethods of Enzymology, Vol. 391, 2005, Liposomes, Part E, Chapter 13, Use of Liposomes to deliver Bactericides to bacterial biofilms, p. 21などの好適な文献ソースから得ることができる。

#### 【0281】

さらなる態様では、本発明は、先に規定したランゲリン<sup>+</sup>細胞の特異的分子ターゲティングのためのビヒクル、または先に述べたような組成物を、樹状細胞と接触させることを含むランゲリン<sup>+</sup>細胞への標的化カーゴの送達方法に関する。具体的な実施形態では、担体が無装填の状態または空の状態を提供されるか、または担体は本明細書において上記に規定したカーゴを含むか、またはそれに関連付けられる。上記方法は例えば、好適な形態または構成でビヒクルを提供する工程、標的細胞の近傍にビヒクルを配置する工程、または標的細胞へのビヒクルの導入を容易にする工程、および標的細胞でリガンドと同族受容体（ランゲリン）との接触を可能にする工程を含み得る。標的化カーゴの送達を改善または促進するために適切に使用され得る因子は、本明細書に記載されるようなCa<sup>2+</sup>の濃度および存在である。さらに、温度は好適な範囲、例えば、4～37℃などのカーゴのエンドサイトーシスを可能にする任意の温度または温度範囲に設定されてもよい。好ましい実施形態では、上記方法は、実施例7に記載される工程に従って実施され得る。

#### 【0282】

別の態様では、本発明は、先に規定したビヒクル、または先に規定した組成物を含む医薬組成物に関し、担体は、例えば先に規定した薬学的に活性なカーゴを含むかまたはそれらに結合する。上記医薬組成物は、先に規定したビヒクルを含む医薬組成物を含むことが特に好ましく、ここで、担体は、以下の任意のものから選択されるカーゴを含むかまたは結合する：小分子、ペプチド、タンパク質、細胞毒性物質、核酸、金属、放射性核種、ウイルス、修飾ウイルス、ウイルスベクター、接種物質、プラスミド、多成分系、細胞機能の阻害剤などの薬学的に活性な化合物（例えばアポトーシスの阻害剤など）、体内で免疫反応を誘発することができる化合物、免疫調節剤、免疫寛容誘導剤、または癌抗原、またはエピトープ、または癌抗原、またはエピトープ、自己免疫疾患抗原またはエピトープを含む化合物、または自己免疫疾患抗原、またはエピトープ、細菌抗原、を含む化合物、ま

または細菌抗原、またはエпитープ、ウイルス抗原、を含む化合物、またはウイルス抗原、またはエпитープ、寄生性抗原、を含む化合物、または寄生性抗原、またはエпитープ、またはアレルゲン、またはアレルゲンのエпитープ、を含む化合物、またはアレルゲン、またはアレルゲンのエпитープ、を含む化合物、を含む免疫学的に活性な化合物。また、遺伝子治療または分子編集アプローチに必要な1つ以上の成分または構成要素、例えば、本明細書に記載されるようなCRISPR/CasまたはTALEN成分など、が想定される。さらに、上述した要素のすべてが、上述した要素の追加の例を含む、上記カーゴとの関連において本明細書において上記に規定した要素に対応することがさらに好ましい。また、上述したカーゴ、例えば、タンパク質および核酸、またはウイルスまたはウイルスベクターおよびタンパク質、または小分子および核酸またはタンパク質などの組み合わせが想定される。例えば本明細書において上記に規定したアジュバントおよび抗原の組み合わせ、または、例えば本明細書において規定される遺伝子治療または分子編集アプローチなどのRNA-タンパク質複合体など、が特に好ましい。

10

#### 【0283】

任意で、すなわち、ある実施形態では、先に規定した医薬組成物は、薬学的に許容される担体または薬学的アジュバントを含む。用語「薬学的に許容される」とは、動物、より詳細にはヒトにおいて使用するために規制当局または他の一般に認められている薬局方によって承認されていることを意味する。用語「担体」とは、カーゴまたは治療薬が投与される希釈剤、賦形剤、または医薬ビヒクルを指す。このような担体は薬学的に許容可能であり、すなわち、使用される投与量および濃度でレシピエントに対して非毒性である。このような担体は、好ましくは等張性、低張性、または弱い高張性であり、スクロース溶液によって提供されるような、相対的に低いイオン強度を有する。このような医薬担体は無菌液体（例えば、水および油（石油、動物、植物または合成起源のもの（例えば、落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油など）を含む））であり得る。食塩水およびデキストロース水溶液およびグリセロール溶液も液体担体として用いることができる。好適な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、ナトリウムイオン、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。必要に応じて、上記組成物は、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有してもよい。これらの組成物は例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン、粉末、徐放性製剤などの形態をとることができる。好適な医薬担体の例は、例えば、E. W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。医薬担体として機能することができる物質のいくつかの他の例として、グルコースおよびスクロースなどの糖；トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなどのセルロースおよびその誘導体；粉末トラガント；麦芽；ゼラチン；タルク；ステアリン酸；ステアリン酸マグネシウム；硫酸カルシウム；炭酸カルシウム；落花生油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびカカオの油などの植物油；プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどのポリオール；寒天；アルギン酸；発熱物質の無い水；等張性生理食塩水；クランベリーエキスおよびリン酸緩衝溶液；脱脂粉乳；ならびに医薬製剤で使用される他の非毒性適合性物質、例えばビタミンC、エストロゲンおよびエキナシアが挙げられる。ラウリル硫酸ナトリウムなどの湿潤剤および潤滑剤、ならびに着色剤、風味剤、潤滑剤、賦形剤、錠剤化剤、安定剤、酸化防止剤および防腐剤も存在することができる。ある実施形態では、医薬組成物の成分はカプセル化形態、例えば、セルロースのカプセル化として、ゼラチン中で、ポリアミド、ワックスマトリクスと共に、またはシクロデキストリンをカプセル化して投与することができる。

20

30

40

#### 【0284】

一般に、成分は例えば、活性剤の量を示すアンブルまたはサシェなどの密封容器中の乾燥凍結乾燥粉末または水分を含まない濃縮物として、別々にまたは一緒に混合されて、単

50

位剤形 (unit dosage form) で供給されてもよい。

【0285】

具体的な実施形態では、医薬組成物がヒトへの静脈内投与に適合した医薬組成物として、日常的な手順に従って製剤化される。通常は、静脈内投与のための組成物が無菌で等張性の水性緩衝液において溶液である。必要な場合には、組成物が可溶化剤及び注射部位における痛みを和らげるためにリグノカインなどの局所麻酔剤も含んでもよい。組成物を注入により投与する場合は、組成物は、無菌の医薬グレードの水または生理食塩水を含有する注入ボトルにより分注される。組成物を注射により投与する場合、無菌の注射用水または生理食塩水のアンプルを提供し、その成分が投与前に混合されるようにすることができる。

10

【0286】

本明細書で使用する時、用語「薬学的アジュバント」は、クロロキン、プロトン性の極性化合物（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロール、EtOH、1-メチル-2-ピロリドン、またはこれらの誘導体など）、または非プロトン性極性化合物（ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジエチルスルホキシド、ジ-n-プロピルスルホキシド、ジメチルスルホン、スルホラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、テトラメチルウレア、アセトニトリルまたはこれらの誘導体など）などの付加的成分に関する。薬学的アジュバントはさらに、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝液、安定剤または等張剤のうちの1つ以上であり得る。さらに、アジュバントは、ビヒクル／リガンドのランゲリンへの結合を促進し得る。本発明はまた、当業者に既知の任意の好適な薬学的アジュバントを想定する。上記の化合物は、pHの制限を考慮した条件下で添加される。

20

【0287】

本発明の医薬組成物はまた、防腐剤を含み得る。本発明の所定の組成物による防腐剤にはブチルパラベン；エチルパラベン；イミダゾリジニル尿素；メチルパラベン；O-フェニルフェノール；プロピルパラベン；クオタニウム-14；クオタニウム-15；デヒドロ酢酸ナトリウム；亜鉛ピリチオンなどが含まれるが、これらに限定されない。防腐剤は、微生物増殖を防ぐまたは遅延させるのに有効な量で使用される。一般に、防腐剤は全組成の約0.1～1重量%の量で使用され、約0.1～0.8重量%が好ましく、約0.1～0.5重量%が最も好ましい。

30

【0288】

本発明の組成物は、被験体または患者に投与することができる。用語「被験体」または「患者」は、哺乳類を指す。本明細書で使用する時、用語「哺乳類」は、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ことが意図される。哺乳類としては、霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどが好ましい。特に好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

【0289】

用語「投与される」は、任意の好適な経路による前述の医薬組成物の治療学的に有効な用量の投与を意味する。「治療学的に有効な量」とは、患者に投与される効果を生じる用量を意味する。厳密な用量は治療の目的に依存し、公知の技術を用いて当業者によって確かめられる。当該技術分野で既知のとおり、また本明細書に記載のとおり、全身性送達対局所性送達、年齢、体重、全体的な健康、性別、食事、投与時期、薬物相互作用、および状態の重症度の調整が必要であり得、当業者によって日常実験により確認可能であろう。投与は、好ましくは局所的であり、より好ましくは、局所的であり、特に好ましくは、皮膚全体にわたってまたは皮膚を介して行われる。

40

【0290】

医薬組成物は、ヒト治療および獣医治療の両方において、好ましくはヒト治療において、使用され得る。所望の治療活性を有するカーゴと関連する本明細書に記載のビヒクルは、本明細書に記載されるように、生理学的に許容される担体で患者に投与されてもよい。投与の様式に応じて、これらの要素は以下に記載されるように、様々な様式で製剤化され

50

てもよい。製剤中の所望の治療活性を有するカーゴと関連する、本明細書に記載のビヒクルの濃度は、約0.00001~100重量%で変動し得る。例えば、製剤は、約0.5~30モル%、より好ましくは約1~10モル%、さらにより好ましくは約4~6モル%、最も好ましくは約4.75~5モル%の量でビヒクルを提供してもよい。典型的な実施形態では、上述の値が、例えば本明細書において上記に規定したリポソームに適用される。さらなる代替的な担体では、当業者に既知のように、上記の量は変化し、好適な計算に従って適合されてもよい。

#### 【0291】

また、好適な密度でビヒクルを含む製剤も想定される。従って、さらに具体的な実施形態では、本発明による医薬組成物が任意の好適な密度で、先に規定したビヒクル、すなわちカーゴを含んでもよく、上記任意の密度は、担体の形態または種類、例えば、リポソーム、ナノ粒子、タンパク質などに従って調整されてもよい。さらに、ビヒクルの密度は結合される受容体の数、ならびに標的細胞の位置に従って調整されてもよく、例えば、皮膚または他の組織は、様々な密度のビヒクルを必要としてもよい。ビヒクルは、1平方ナノメートル当たり約0.05~約0.08ビヒクルの密度で、より好ましくは1平方ナノメートル当たり約0.065ビヒクルの密度で、例えば約160nmの径の担体に対して1平方ナノメートル当たり約0.067ビヒクルで提供されることが好ましい。また、担体、例えばリポソームの大きさまたは径を考慮して決定され得る、さらなる好適な密度値も想定される。さらに、密度は、2つのビヒクルの距離が約4.4nmになるように調整されることが想定される。具体的な実施形態によれば、好適なビヒクル密度は、約26μMの脂質濃度および約75μMの平均リポソーム濃度値に基づいて計算され得る。これらの値はリポソームの種類、担体の大きさ、担体の大きさ、径または大きさ、ビヒクルの種類および大きさなどに応じて変化し、かつ／または適応させることができる。本発明による担体におけるビヒクルの密度の計算および適応に関するさらなる詳細は、Methods of Enzymology, Vol. 391, 2005, Liposomes, Part E, Chapter 13, Use of Liposomes to deliver Bactericides to bacterial biofilms, p. 21などの好適な文献ソースから得ることができる。

#### 【0292】

本発明による医薬組成物の化合物の濃度は、意図される投薬レジメン、意図される使用期間、組成物の全ての成分の厳密な量および比率、ならびに当業者に既知のさらなる要因およびパラメータにさらに調整され得る。

#### 【0293】

本発明による所望の治療活性を有するカーゴと関連する本明細書に記載のビヒクルは、単独で、または他の治療と組み合わせて投与されてもよい。組み合わせ治療は例えば、例えば抗CTL A-4および抗PD1抗体などのチェックポイント阻害剤の同時投与を介した癌免疫療法、例えばアルキル化剤またはDNAおよびRNAポリメラーゼ阻害剤の同時投与による化学療法、例えばエントリー、プロテアーゼまたはDNAおよびRNAポリメラーゼ阻害剤の同時投与による抗ウイルス療法、および例えばグルコシルコイドまたはイムノフィリン阻害剤の同時投与による自己免疫疾患療法、が想定される。

#### 【0294】

医薬組成物の投与は、様々な方法で行うことができる。上記投与は例えば、経口、静脈内、局所、角膜、経鼻、皮下、皮内、または経皮投与であり得る。さらなる実施形態では、上記投与は、ワクチン接種のため、または毛嚢を介する投与のためである。

#### 【0295】

さらに、代替投与経路には、眼または腫瘍内投与、または胸骨内注射が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0296】

さらなる実施形態では、投与は以下に詳細に説明されるように、特定の医療用具、例えば、針、ワクチンガン、硬膏剤／接着剤、または吸入器を用いて実施され得る。

#### 【0297】

本発明は、ワクチン接種アプローチに集中的に焦点を当てている。用語「ワクチン接種」は、一般に、個体の免疫系を刺激するための（例えば、ワクチンとして）抗原性物質の投与に関する。従って、本明細書において規定される医薬組成物は、ワクチンとして投与されてもよい。ワクチンは（i）不活化ワクチン、（ii）弱毒化ワクチン、（iii）サブユニットワクチン、または（iv）DNAワクチンであってもよい。用語「不活化ワクチン」は、培養で増殖させ、続いて、好ましくは熱またはホルムアルデヒドを使用して死滅または破壊させた感染性粒子を含む、ワクチンまたは組成物を意味する。このような感染性粒子、例えばウイルスは、通常は複製することができないが、所定のタンパク質、例えばカプシドタンパク質は、免疫系によって認識されるのに十分なほど無傷であり、反応を引き起こす。用語「弱毒化ワクチン」は、低毒性の生きている感染性粒子を含むワクチンまたは組成物を意味する。通常、生きている弱毒化感染性粒子は非常にゆっくりとであるが、複製することができる。これらのワクチンが当業者に既知の任意の好適な方法によって産生され得る。上記方法は、通常は、より低い毒性株を選択する感染性組織培養物を増殖させる方法、または毒性に必要とされる遺伝子の変異誘発または標的化欠失による方法である。用語「サブユニットワクチン」は、抗原を含むワクチンまたは組成物を意味し、これは、感染性粒子の全部または一部を導入することなく免疫系に提供される。サブユニットワクチンは、当業者に既知の任意の好適な方法によって産生され得る。通常は、産生は、特異タンパク質またはタンパク質部分の分離、または糖構造の分離、およびワクチンまたはワクチン組成物としてのそれらの投与を含み得る。サブユニット戦略は、好適な癌抗原の提示のためにさらに使用され得る。用語「DNAワクチン」は、感染因子のDNAから作製されるか、または対応する構成成分をコードするDNA組成物に関し、通常、例えばヒトまたは動物細胞などの細胞に挿入され、そこで発現される。従って、DNAワクチンは、本明細書において上記に規定した任意の抗原またはエピトープをコードしてもよい。

#### 【0298】

本発明のワクチンは、任意の好適な方法によって、好ましくは、従来のシリンジまたは遺伝子ガンもしくはAccell（登録商標）遺伝子送達系などのワクチンガンのいずれかを使用する注射によって、被験体または個体に投与することができる。表皮の細胞へのDNAの送達は、皮膚関連リンパ系細胞へのアクセスを提供し、またレシピエントにおけるDNAの一過性の存在を提供するので、この投与様式が特に好ましい。核酸および／またはタンパク質／ペプチドの両方を、（i）皮下、（ii）表皮内、（iii）皮内、（iv）経鼻、直腸、膣などの粘膜内、（v）腹腔内、（vi）静脈内、（vii）経口、または（viii）筋肉内、のいずれかによる注入が可能である。他の投与様式として、経口および肺投与、坐剤、無針注射、経皮性および経皮的適用が含まれる。固体がワクチン製剤のための補助剤として使用される場合、例えば、ワクチン成分と補助剤との吸着質または懸濁混合物が投与される。特殊な実施形態では、ワクチンが水系溶媒中の溶液または液体ワクチンとしてそれぞれ投与される。投与は、表皮、皮内または粘膜内であることが好ましい。

#### 【0299】

特に好ましい実施形態では、投与は毛嚢を介して実施される。上記方法は、（毛嚢と皮脂腺からなる）毛嚢脂腺ユニットが薬物の皮膚への受動輸送に関与するという知見に基づいている。表皮に到達し、皮膚から循環に出るために、医薬組成物は、毛幹を取り囲むケラチノサイト層にさらに浸透しなければならない。このようなポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）ナノ粒子などの粒子を使用することによって、医薬組成物を毛嚢に保つことができ、これによって皮膚中の薬物滞留が可能になる。また、デポー効果を用いてもよい。任意で、アジュバントビス（3', 5'）-環状二量体アデノシン-リン酸を使用することができる。

#### 【0300】

さらに想定される投与経路としては、イオントフォoresis、微細針、レーザおよびジェット式注射器が含まれる。

## 【0301】

微細針は、通常は医薬組成物またはその一部を皮膚に、そして皮膚にわたって送達するために皮膚上に配置される経皮パッチの一部と見なされる。微細針は、通常はヒトの毛髪よりも細く、金属、Si、または生分解性ポリマーから構成される。通常は、微細針はアレイの形態で提供される。微細針の使用は、実質的に無痛であるという有意性がある。微細針手法の好ましい実施形態は、ナノパッチである。

## 【0302】

本明細書で使用される用語「ナノパッチ」は、塗布装置で適用された場合に皮膚の外層に穿孔する、何千ものワクチン被覆された微小突起のアレイに関する。ナノパッチの微小突起の先端は、通常は本発明による組成物を含むワクチン材料で被覆され、この材料を皮膚表面のすぐ下の多数の免疫細胞に直接的に放出する。この技術の中心的な要素はナノパッチアレイそのものであり、それ自身は、通常、その表面上に20,000個以下の微小突起を有する1cm<sup>2</sup>の正方形のシリコンからなる。ナノパッチアレイは保護用の外皮膚層（角質層）を貫通し、最適化された間隔および長さを有する微小突起を利用して、最外皮膚層の直下の免疫細胞に富んだ層に免疫活性化物質を標的化する。

## 【0303】

さらに好ましい投与経路は局所経路である。本発明の医薬組成物の局所投与は、所望の治療が、局所投与によって容易に接近可能な領域または器官を含む場合に有益である。例えば、皮膚、粘膜への局所適用のために、医薬組成物は、好ましくはヒドロゲルパッチ、液体、クリーム、軟膏剤、ペースト、ゲル、ローション、テープ、フィルム、舌下錠、バツカル錠、錠剤、噴霧剤、または坐剤として製剤化される。

## 【0304】

本明細書で使用する時、用語「ヒドロゲルパッチ」は、通気性不織布からなるパッチであって、透明なフィルムカバーによって通常どおりに保護されている先進的な接着ヒドロゲルで層状にされているパッチに関する。ヒドロゲルは水不溶性のポリマー鎖のネットワークであり、時には水が分散媒であるコロイド状ゲルとして見出される。ヒドロゲルは高吸収性の天然または合成のポリマーであり、その有意な水分量のために、天然組織に類似した柔軟度を有する。ある実施形態によれば、ハイドロパッチは、本発明による組成物を適量含む。

## 【0305】

好適なペーストは、担体中に懸濁された本発明による所望の治療活性を有するカーゴと関連する本明細書に記載のビヒクルを含む。このような担体として、石油、軟質白色パラフィン、黄色ワセリンおよびグリセロールが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0306】

医薬組成物はまた、担体中に懸濁または溶解された有効成分を含む好適な軟膏剤と共に製剤化され得る。このような担体として、以下のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない：グリセロール；鉱油；液体油；液体石油；白色ワセリン；黄色ワセリン；プロピレングリコール；アルコール類；トリグリセリド；セチルエステルなどの脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン化合物；白蠟および黄蠟などのワックス；セチルアルコール、ステアリルアルコール、セチルステアリルアルコールなどの脂肪酸アルコール；ステアリン酸などの脂肪酸；ステアリン酸セチル；ラノリン；水酸化マグネシウム；カオリン；および水。

## 【0307】

また、医薬組成物は、担体中に懸濁または溶解された有効成分を含む好適なローションまたはクリームと共に製剤化され得る。このような担体としては以下のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない：パラフィンなどの鉱油；ヒマシ油、ヒマシ種子油、および硬化ヒマシ油などの植物油；ソルビタンモノステアレート；ポリソルベート；セチルエステルなどの脂肪酸エステル；ワックス；セチルアルコールなどの脂肪酸アルコール；ステアリルアルコール；2-オクチルドデカノール；ベンジルアルコール；アルコール類；トリグリセリド；および水。

## 【0308】

医薬組成物はまた、経皮適用のためのテープまたは接着剤として製剤化され得る。テープは通常、パッチとして皮膚に粘着し、通常は遅延放出型の有効成分を含む。接着剤は、浸透促進剤、すなわち界面活性剤、脂肪酸、テルペンおよび溶媒が経皮製剤に導入されてもよい感圧性接着剤であることが想定される。感圧性接着剤は、通常、始めは高い粘性と粘着性がある液体であり、それらの適用ライフサイクルを通して同じ形態のまま変化しない。また、粘着付与剤および安定剤としての油、樹脂および抗酸化剤に加えて、天然ラバーまたは合成ラバーのいずれかを含有ラバー系感圧性接着剤を使用してもよい。また、粘着付与剤を加えずにまたは加えてアクリレートエステル、メタクリル酸、アクリルアミド、メタクリルアミド、N-アルコキシアルキルまたはN-アルキルアクリルアミドからアクリル系感圧性接着剤を調製するか、または主にゴムおよび樹脂からシリコン系感圧性接着剤を調製することも想定される。樹脂は、ケイ酸ハイドロゾルまたはポリケイ酸ハイドロゾルとトリメチルクロロシランとの反応の結果として得られる生成物である。

10

## 【0309】

「舌下投与」は、物質が舌下の組織を通して血液中に拡散する薬理的投与経路に関する。物質が舌の下の粘膜と接触すると、この物質が吸収される。上皮の下にある結合組織には、多量の毛細血管が含まれているため、上記物質は、その毛細血管に拡散して静脈循環に入る。舌下投与のための典型的な投与形態には、舌下錠剤、舌下ストリップ剤、舌下ドロップ剤、舌下噴霧剤、トローチ剤などが含まれる。

## 【0310】

舌下投与と同様に、頬側投与は、局所投与経路を指す。この局所投与経路によって、頬領域（頬内）に保持または塗布された薬物が口腔粘膜を通して拡散し、直接的に血流に入るか、または組織に存在するランゲリン陽性抗原提示細胞に取り込まれる。口腔投与は、薬物が消化器系を通過せず、それによって初回通過代謝を回避するので、経口投与と比較して、より良好なバイオアベイラビリティおよびより迅速な作用の発現を提供すると考えられている。本発明について想定される頬側投与のための最新のアプローチには、ナノファイバー系粘膜付着性膜などの複合材料が含まれる。これらの材料は、通常、粘膜付着性層、担体の制御放出を可能にするリザーバ層からなる。材料は、脂質ベースのナノ粒子および保護支持層を含むことが好ましい。界面活性剤、脂肪酸ならびにカチオン性およびアニオン性アミノ酸などの浸透促進剤のさらに想定される使用により、バツカル錠のバイオアベイラビリティが有利に増大され得る。さらなる詳細は、Morales et al., 2017, Curr Opin Pharmacol, 36, 22-28などの好適な文献ソースから得ることができる。

20

30

## 【0311】

また、医薬組成物は、担体中に懸濁または溶解された有効成分を含む好適なゲルと共に製剤化され得る。このような担体には、水、グリセロール、プロピレングリコール、流動パラフィン、ポリエチレン、脂肪油、セルロース誘導体、ベントナイトおよびコロイド状の二酸化ケイ素のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0312】

本発明による調製物は、そのような調製物において慣用的に使用される、さらなる助剤を一般に含んでもよい。そのような助剤としては、例えば、アルコール、ポリオール、ポリマー、泡安定剤、溶解プロモーター、電解質、有機酸、有機溶媒、またはシリコン誘導体などの化粧品または皮膚科製剤の、防腐剤、香料、消泡剤、染料、色素、増粘剤、界面活性物質、乳化剤、皮膚軟化剤、仕上げ剤、油脂、油、ワックスまたは他の通常の構成成分が挙げられる。

40

## 【0313】

本発明による医薬組成物は、皮膚軟化剤を含み得る。皮膚軟化剤は、乾燥を防止または軽減するのに有効な量で使用し得る。有用な皮膚軟化剤としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：炭化水素油およびワックス；シリコン油；トリグリセリドエステル；アセトグリセリドエステル；エトキシ化グリセリド；アルキルエステル；アルケニルエステル；脂肪酸；脂肪アルコール；脂肪アルコールエーテル；エーテルエステル；ラ

50

ノリンおよび誘導体；多価アルコール（ポリオール）およびポリエーテル誘導体；多価アルコール（ポリオール）エステル；ワックスエステル；蜜蝋誘導体；植物ロウ；リン脂質；ステロール；およびアミド。

#### 【0314】

したがって、典型的な皮膚軟化剤の例としては、鉱油、特に50 SUS～500 SUSの範囲の粘度を有する鉱油、ラノリン油、ミンク油、ココナッツ油、ココアバター、オリーブ油、アーモンド油、マカダミアナッツ油、アロア抽出物、ホホバ油、サフラワー油、トウモロコシ油、液体ラノリン、綿実油、ピーナッツ油、パーセリン油、ペルヒドロスクワレン（スクアレン）、ヒマシ油、ポリブテン、無臭ミネラルスピリット、スイートアーモンド油、アボカド油、タヌマ油、リシン油、ビタミンE酢酸塩、オリーブ油、ミネラルスピリット、セテアリルアルコール（主にセチルおよびステアリルアルコールから成る脂肪アルコールの混合物）、リノールアルコール、オレイルアルコール、オクチルドデカノール、小麦胚芽セテアリルオクタノエート（セテアリルアルコールと2-エチルヘキサン酸とのエステル）の油などの穀物麦芽油、セチルパルミテート、ジイソプロピルアジペート、イソプロピルパルミテート、オクチルパルミテート、イソプロピルミリステート、ブチルミリステート、グリセリルステアレート、ヘキサデシルステアレート、イソセチルステアレート、オクチルステアレート、オクチルヒドロキシステアレート、プロピレングリコールステアレート、ブチルステアレート、デシルオレエート、グリセリルオレエート、アセチルグリセリド、（C12～C15）アルコールのオクタノエートおよびベンゾエート、グリコールおよびグリセロールのオクタノエートおよびデカノエートなどのアルコールおよびポリアルコールのオクタノエートおよびデカノエート、ならびにイソプロピルアジペート、ヘキシルラウレート、オクチルドデカノエート、ジメチコンコポリオール、ジメチコンノール、ラノリン、ラノリンアルコール、ラノリンワックス、水素添加ラノリン、ヒドロキシ化ラノリン、アセチル化ラノリン、ペトロラタム、イソプロピルラノレート、セチルミリステート、グリセリルミリステート、ミリスチルミリステート、ミリスチラクトレート、セチルアルコール、イソステアリルアルコール、ステアリルアルコール、およびイソセチルラノレートのリシノレートなどのアルコールおよびポリアルコールのリシノレートが挙げられる。

#### 【0315】

さらに、本発明による医薬組成物はまた、乳化剤を含み得る。乳化剤（すなわち、乳化剤）は、組成物の成分の均一なブレンドを提供するのに有効な量で使用されることが好ましい。有用な乳化剤には、以下のものが含まれる：（i）脂肪酸石けん（例えば、ステアリン酸カリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸アンモニウム、およびステアリン酸トリエタノールアミン）；脂肪酸石けんを含有するポリオール脂肪酸モノエステル（例えば、カリウム塩またはナトリウム塩のいずれかを含有するモノステアリン酸グリセロール）；硫酸エステル（ナトリウム塩）（例えば、ラウリル5硫酸ナトリウム、およびセチル硫酸ナトリウム）；および硫酸エステルを含有するポリオール脂肪酸（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムを含有するポリオール脂肪酸モノエステル）などのアニオン；（ii）N（ステアロイルコラミノホルミルメチル）ピリジウム；N-ソヤ（soya）-N-エチルモルフォリニウムエトサルフェート；アルキルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ジイソブチルフェノキシエチルジメチルベンジルアンモニウムクロリド（diisobutylphenoxyethoxyethyl dimethyl benzyl ammonium chloride）；およびセチルピリジウムクロリドなどの塩化カチオン；および（iii）ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル（例えば、モノステアレート）；ポリオキシエチレンラウリルアルコール；ポリオキシプロピレン脂肪アルコールエーテル（例えば、プロポキシ化オレイルアルコール）；ポリオキシエチレン脂肪酸エステル（例えば、ポリオキシエチレンステアレート）；ポリオキシエチレン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ステアレート）；ソルビタン脂肪酸エステル（例えば、ソルビタン）；ポリオキシエチレングリコール脂肪酸エステル（例えば、ポリオキシエチレングリコールモノステアレート）；およびポリオール脂肪酸エステル（例えば、グリセリルモノステアレートお

10

20

30

40

50

よびプロピレングリコールモノステアレート) ; ならびにエトキシ化ラノリン誘導体 (例えば、エトキシ化ラノリン、エトキシ化ラノリンアルコールおよびエトキシ化コレステロール) などの非イオン性物質が含まれる。

【0316】

本発明による医薬組成物はまた、界面活性剤を含み得る。好適な界面活性剤は、例えば、クレンジング剤、乳化剤、起泡力増進剤、ハイドロトロープ、可溶化剤、懸濁剤および非界面活性剤 (液体中の固体の分散を促進する) として一般にグループ化されるものを含んでいてもよい。

【0317】

界面活性剤は、通常、両性界面活性剤、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤および非イオン性界面活性剤として分類される。両性界面活性剤には、アシルアミノ酸および誘導体ならびにN-アルキルアミノ酸が含まれる。アニオン界面活性剤としては、アシルグルタメート、アシルペプチド、アシルサルコシネート、およびアシルタウレートなどのアシルアミノ酸およびアシルアミノ酸塩; アルカン酸、エステルカルボン酸、およびエーテルカルボン酸などのカルボン酸およびカルボン酸塩; アシルイセチオネート、アルキルアリールスルホネート、アルキルスルホネート、およびスルホサクシネートなどのスルホン酸およびスルホン酸塩; アルキルエーテルスルフェートおよびアルキルスルフェートなどの硫酸エステルが挙げられる。カチオン界面活性剤としては、アルキルアミン、アルキルイミダゾリン、エトキシ化アミン、および四級物質 (例えば、アルキルベンジルジメチルアンモニウム塩、アルキルベタイン、ヘテロサイクリックアンモニウム塩、およびテトラアルキルアンモニウム塩) が挙げられる。そして、非イオン性界面活性剤としては、8~18個の炭素原子を含む第一級アルコールなどのアルコール; アルカノールアミン誘導アミドおよびエトキシ化アミドのようなアルカノールアミド; アミンオキシド; エトキシ化カルボン酸、エトキシ化グリセリド、グリコールエステルおよび誘導体、モノグリセリド、ポリグリセリルエステル、多価アルコールエステルおよびエーテル、ソルビタン/ソルビトールエステル、およびリン酸のトリエステルなどのエステル; ならびにエトキシ化アルコール、エトキシ化ラノリン、エトキシ化ポリシロキサン、およびプロボキシ化ポリオキシエチレンエーテルなどのエーテルが挙げられる。

【0318】

医薬組成物をフィルムとして提供する際には、当該医薬組成物はフィルム形成剤を含んでいてもよい。本発明に従って使用される好適なフィルム形成剤は、組成物を平滑かつ平らに保つ。そして、フィルム形成剤としては以下が挙げられる、これらに限定されない: アクリルアミド/アクリル酸ナトリウム共重合体; アクリル酸アンモニウム共重合体; ペルーバルサム; セルロースガム; エチレン/無水マレイン酸共重合体; ヒドロキシエチルセルロース; ヒドロキシプロピルセルロース; ポリアクリルアミド; ポリエチレン; ポリビニルアルコール; pvm/MA共重合体 (ポリビニルメチルエーテル/無水マレイン酸); PVP (ポリビニルピロリドン); Gulf Science and Technologyから入手できるPA-18などの無水マレイン酸共重合体; GAF社から入手できるGanex V-216などのPVP/ヘキサデセン共重合体; アクリルアクリレート共重合体など。

【0319】

一般に、フィルム形成剤は、全組成物の約0.1重量%~約10重量%の量で使うことができ、約1重量%~約8重量%が好ましく、約0.1DEG/O~約5重量%が最も好ましい。湿潤剤もまた、有効な量で使うことができる。保湿剤として、フルクトース; グルコース; グルタミン酸; グリセリン; 蜂蜜; マルチトール; メチルグルセス-10; メチルグルセス-20; プロピレングリコール; 乳酸ナトリウム; スクロースなどが挙げられる。

【0320】

本発明のさらなる実施形態では、医薬組成物は、吸入によって投与され得る。従って、医薬調製物は、噴霧剤の形態、例えば、ポンプ噴霧剤またはエアロゾルの形態であり得る

。通常、本発明に係るエアロゾルが、薬剤または医薬組成物、1つ以上のフロン噴射剤、および界面活性剤と溶媒とのうちのいずれか（例えば、エタノール）を含む。例えば、噴射剤11および／または噴射剤114および／または噴射剤12のようなエアロゾル噴射剤を使用し得る。本発明によるエアロゾルのためのさらなる好適な噴射剤は、プロパン、ブタン、ペンタン他である。従来のフロンに比べて最小限のオゾン層破壊効果を有すると考えられる、使用可能である追加の噴射剤は、フルオロカーボンおよび水素含有フロンを含む。医薬エアロゾル製剤のための追加のエアロゾルは、例えば、EP0372777に開示されている。通常、アルコール、アルカン、ジメチルエーテル、界面活性剤(フッ素化された界面活性剤およびフッ素化されていない界面活性剤、カルボン酸、ポリエトキシレートなどを含む)および従来のフロン噴射剤などの1つ以上のアジュバントが製剤に少量添加されてもよい。

10

#### 【0321】

1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタンを、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタンより高い極性を有する共溶媒（例えば、アルコールまたは低級アルカン）と界面活性剤との両方と併用することが、医薬組成物粉末の安定した製剤を獲得するためにさらに好ましい。さらに、本発明のさらに好ましい実施形態に従って使用される場合、医薬組成物の凝集を減少させ、例えば分散装置のバルブを潤滑化するために、エアロゾル製剤の重要な成分として界面活性剤を使用することができ、それによって、バルブ作動の一貫した再現性および投薬量の精度を確保する。通常、本発明に係る医薬組成物は、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン中での分散前に界面活性剤でプレコートされていてもよい。

20

#### 【0322】

本発明のさらに好ましい実施形態では、医薬エアロゾル製剤は、当業者に既知の任意の好適な装置で、好ましくは定量吸入器（MDI）、ネブライザー、ロタヘラー（Rotahaler）またはオートヘラー（autohaler）装置で分散され得る。

#### 【0323】

経口送達は、動物の腸内での消化酵素による分解に耐えることができる担体に本明細書において規定される上記組成物を複合化することによって行うことができる。このような担体の例には、当該技術分野で既知のものなどのプラスチックカプセルまたは錠剤が含まれる。

#### 【0324】

好適な坐剤は、コロイド状の二酸化ケイ素と共に本明細書において規定される組成物と、トリグリセリドを含む油性基剤とを含み得る。

30

#### 【0325】

例えば、適格な既知の文献ソースから導き出せるようなアッセイは、本発明の医薬組成物成分について最適な比率および／または投与量範囲を特定する助けになるように、任意で使用され得る。製剤中に使用される、本明細書において上記に規定した医薬組成物の正確な用量および成分間比率はまた、投与経路、および疾患または障害の正確なタイプに依存し、そして開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。有効な用量または成分比は、インビトロまたは（動物）モデル試験系から得られる投与-反応曲線から推定することができる。

40

#### 【0326】

通常、主治医および臨床学的因子により投薬レジメンが決定され得る。医術において周知のように、任意の1人の患者に対する投与量は、患者のサイズ、身体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間および経路、全体的な健康、ならびに同時に投与される他の薬物を含む多くの因子に依存する。典型的な用量は、例えば、0.001mg～1000mgの範囲であることが可能だが、この例示的な範囲よりも下または上の用量もまた、特に前述の因子を考慮して、想定される。

#### 【0327】

好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組成物は、疾患または病的状態の治療または予防に用いられる。

50

## 【0328】

本明細書で使用するとき「疾患」または「病的状態」は、先に規定した医薬組成物を用いる治療、特に、担体がカーゴ、好ましくは本明細書において上記に規定したカーゴを含むか、または当該カーゴに結合する、ビヒクルを用いた治療の恩恵を受けるあらゆる状態である。

## 【0329】

「治療する」または「治療」という用語は、文脈によって別段の指示がない限り、疾患または病的状態の発生または再発を予防するための治療上の処置および／または予防対策を指し、その目的は、望ましくない生理学的状態を阻害または減速（軽減）することである。本発明の目的で、有益な臨床結果または所望の臨床結果は、検出可能または検出不能な、症状の軽減、疾患の程度の低減、疾患の安定化状態（すなわち、悪化しない状態）、疾患の進行の遅延または減速、疾患状態の改善または緩和、および（部分的または全体的な）寛解を含むが、これらに限定されない。「治療」はまた、治療を受けない場合に見込まれる生存と比較して延命することも意味する。治療を必要とするものには、既に上記状態または障害を有するもの、ならびに上記状態または障害を有する傾向があるものが含まれる。具体的な実施形態では、治療はさらに、先に規定した医薬組成物の単回投与、または複数回投与を含んでもよい。対応する投与スキームは、患者の性別または体重、疾患、使用される医薬組成物、患者の全体的な健康状態などに合わせて調整され得る。例えば、投与スキームは、12時間毎、24時間毎、28時間毎、72時間毎、96時間毎、週1回、まさに2週間に1回、3週間毎に1回、月1回などの投与を意図してもよい。また、投与フェーズ間の休止または中断も想定される。これらのレジメンは、当然、治療に対する患者の反応および／または疾患の経過もしくは病的状態の経過に応じて、医師によって調整または変更可能である。

## 【0330】

本発明の特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組成物は、癌の治療または予防に用いられる。本明細書で使用するとき、用語「癌」は、癌性または悪性新生物の形成および増殖、すなわち、細胞増殖によって増殖し、しばしば正常よりも急速に増殖し、新たな増殖を開始した刺激が停止した後も増殖し続ける異常組織の形成および増殖をもたらす病理学的プロセスに関する。悪性新生物は、通常、正常組織との構造秩序および機能調整の部分的または完全な欠落を示し、ほとんどが周囲の組織に浸潤し、いくつかの部位に転移し、適切な治療を行わない限り、摘出を試みた後に再発し、患者の死亡を引き起こす可能性が高い。このように、この用語には転移の存在および進行も含まれる。本明細書で使用するとき、用語「新生組織形成」は、全ての癌性疾患状態を説明するために使用され、悪性血行性腫瘍、腹水性腫瘍および固形腫瘍と関連する病理学的プロセスを含む、または包含する。代表的な癌には、例えば、胃癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、子宮体癌、卵巣癌、転移性前立腺癌を含む前立腺癌、精巣癌、膀胱癌、腎癌、脳／CNS、頭頸部癌、咽頭癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、白血病、メラノーマ皮膚癌、非メラノーマ皮膚癌、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、ユーイング肉腫、小細胞肺癌、絨毛腫、横紋筋腫、ウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫、有毛細胞白血病、口腔／咽頭癌、食道癌、喉頭癌、腎臓癌およびリンパ腫が含まれる。当業者に既知の更なる癌の形態またはPavlopoulou et al., 2015, Oncol Rep., 33, 1, 3-18などの好適な文献ソースから導き出せる更なる癌の形態も想定される。

## 【0331】

癌は、ある実施形態では、難治性癌であり得る。被験体が癌の治療として手術を受けた場合、癌が残存していると考えられることがある。また、例えば、上記癌の形態の転移性癌の形態も想定される。

## 【0332】

上記の癌の形態は、好ましくは、上述のような腫瘍関連抗原または癌抗原または癌エピトープを使用することによって治療され得る。抗体またはエピトープは、本明細書におい

て上述したようにカーゴの形態でランゲリン<sup>+</sup>DCに提供される。カーゴの形態のこれらの抗原またはエピソープは、その後、ランゲリン<sup>+</sup>細胞によって、処理され、さらなる免疫細胞に提示される。そして、これらの抗原またはエピソープは、これらの免疫細胞を活性化して、上記抗原またはエピトープを示すエンティティ（例えば、細胞）に対して、例えばCTLまたは抗体を介して免疫応答を引き起こす。これらの免疫細胞の活性化は、その結果、好適なアジュバントの同時投与によって達成され得るランゲリン<sup>+</sup>DCの成熟および活性化に依存する。このようなアジュバントの非限定的な例としては、TLRまたはRig-I様受容体（RLR）アゴニストが挙げられる。

#### 【0333】

例えば、異なる癌の形態に由来するか、または同じ癌細胞上にまたは同じ腫瘍中に存在し得る異なるタンパク質もしくは糖タンパク質に由来するかのいずれかの異なる抗原および／または異なるエピトープが提供されることもまた、想定される。これらの抗原またはエピトープは、例えば、多重抗原融合タンパク質または多重エピトープタンパク質（例えば、2、3、4、5、6、7、8またはそれより多いエピトープを含む）中に、またはカーゴロード中にまとめて集められた単一の抗原／エピトープユニットとして提供され得る。例えば、異なる抗原同士は、混合され、その後、担体中に、例えば本明細書において規定されるリポソーム中に製剤化され得る。また、カーゴロード内で異なる分子形態の癌抗原／エピトープを使用することが好ましい。例えば、それは、タンパク質／ペプチドとして、または核酸として提供されてもよい。

#### 【0334】

さらなる特に好ましい実施形態では、用語「癌」は、ランゲルハンス細胞組織球症（LCH）、すなわちランゲルハンス細胞における癌性変化にも関連する。ランゲルハンス細胞組織球症は、ランゲルハンス細胞のクローン増殖を伴うまれな疾患である。臨床的には、その症状は、孤立性骨病変から多系統疾患まで様々である。ランゲルハンス細胞組織球症は、組織球増殖症と呼ばれる一群の臨床的な症候群のうちの一部であり、組織球の異常な増殖（すなわち、活性化樹状細胞および活性化マクロファージ）を特徴とする。この癌の形態は、白血病およびリンパ腫に関係している。上記疾患は、通常、ランゲリン<sup>+</sup>細胞、すなわち、表面にランゲリンを発現する細胞に現れる。理論に束縛されることを望むものではないが、過活動ERKは、LCHの発病に至らせる能力があると考えられる。さらに、BRA F-V600Eは、骨髄中の造血細胞中に存在するため、高リスクLCHに關与すると考えられている。これは、例えば、LCH発病に関する誤った骨髄性DCモデルによって説明することができる。このモデルでは、病的ERK活性化を生じる細胞分化の状態がLCHの臨床範囲を決定する。発病の態様に寄与し得るさらなる因子は、炎症性浸潤である。したがって、LCHは、骨髄増殖性腫瘍または炎症性骨髄性腫瘍であると考えられる。LCHは、好ましくは、細胞毒性物質、小分子、放射性核種、またはタンパク質（例えば、細胞表面上に存在する表面マーカーまたはタンパク質に対する抗体などの好適な抗体）、特に、本明細書において上述したカーゴの形態でランゲリン<sup>+</sup>細胞に提供される上述のような抗ランゲリン抗体および／または多成分系を使用することによって治療され得る。LCHの治療との関連において使用される好適な抗体としては、例えば、BRA F-V600Eの発見に基づくBRA F-V600Eに対する抗体が挙げられる。また、当業者に既知のLCHとの関連において、さらなる突然変異に対する抗体も想定される。

#### 【0335】

本発明のさらに特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組成物は、自己免疫疾患の治療または予防に用いられる。本明細書で使用するとき、用語「自己免疫疾患」は、本明細書において上記に規定した、自己組織または無害な環境要素のいずれかを攻撃する不適切な免疫応答に関する。本発明によって想定され、記載された医薬組成物で治療できる自己免疫疾患の例としては、以下のものが挙げられる：抗リン脂質症候群（aPL症候群）、天疱瘡、多発性硬化症（MS）、重症筋無力症、グレーブス病、グッドパスチャー症候群、顕微鏡的血管炎、多発性血管炎を伴う肉芽腫症、全身性自己免疫性リウマチ性疾患（SARD）、混合性結合組織疾患、全身性エリテマトーデス、シェ

10

20

30

40

50

ーグレン症候群、全身性硬化症／クレスト症候群、多発性筋炎／皮膚筋炎、自己免疫性甲状腺疾患、セリアック病、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、ANCA関連疾患、抗リン脂質症候群／血栓塞栓症候群、抗GBM疾患、糖尿病、悪性貧血、白斑、およびクローン病。上述のような自己免疫疾患の治療は、本明細書において上述したようにカーゴの形態でランゲリン<sup>+</sup>DCに提供される上述のような自己免疫疾患抗原または自己免疫疾患エピトープの使用に基づく。特に、ランゲリン<sup>+</sup>DCは、共刺激シグナルの非存在下で、すなわちアジュバントの共送達なしで、制御性T細胞の増殖およびCTLの抗原特異的欠失、すなわち抗原特異的寛容を誘導することが知られている。従って、治療スキームとの関連において、上述のような自己免疫疾患抗原または自己免疫疾患エピトープは、好ましくは任意のアジュバントの共送達なしに提供される。ランゲリン<sup>+</sup>DCの活性化につながる任意の共刺激シグナルは当業者に既知の任意の好適な手段によって阻害されることが、さらに好ましい。

#### 【0336】

本発明のさらに別の特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組成物は、細菌感染の治療または予防に用いられる。用語「細菌感染」は、生体内で存在することが望ましくない1つ以上の病原性細菌または細菌、例えば、細菌集団またはバイオフィローラの一部に、患者、特にヒトが感染することに関する。好ましい例としては、例えば、クラミドフィラ属、エールリヒア属、リケッチア属、サルモネラ属、ナイセリア属、ブルセラ属、マイコバクテリウム属、ノカルジア属、リステリア属、フランシセラ属、レジオネラ属、またはエルシニア属などの細菌によって移される細胞内細菌感染が挙げられる。本発明に係る医薬組成物で感染が治療されることが想定される病原性細菌のさらなる例としては、バシラス属、バルトネラ属、ボルデテラ属、ボレリア属、カンピロバクター属、クラミジア属、クロストリジウム属、コリネバクテリウム属、エンテロコッカス属、エシェリキア属、ヘモフィルス属、ヘリコバクター属、レプトスピラ属、マイコプラズマ属、シュドモナス属、シゲラ属、スタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属、トレポネーマ属、ウレアプラズマ属およびビブリオ属の細菌が挙げられる。具体的な実施形態では、治療される細菌感染は、以下の種のうちの1つ以上による感染であり得る：炭疽菌、セレウス菌、バルトネラ・ヘンセレ (*Bartonella henselae*)、バルトネラ・クインターナ (*Bartonella quintana*)、百日咳菌、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、ボレリア・ガリニ (*Borrelia garinii*)、ボレリア・アフゼリ (*Borrelia afzelii*)、ボレリア・リカレンチス (*Borrelia recurrentis*)、ブルセラ・アボータス (*Brucella abortus*)、ブルセラ・カニス (*Brucella canis*)、ブルセラ・メリテンシス (*Brucella melitensis*)、ブルセラ・スイ (*Brucella suis*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、クラミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、クラミドフィラ・シッタシ (*Chlamydia psittaci*)、クロストリジウム・ボツリヌス (*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*)、クロストリジウム・パーFRINGENS (*Clostridium perfringens*)、破傷風菌、ジフテリア菌、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、大腸菌、野兔病菌、インフルエンザ菌、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、レプトスピラ・インターロガンズ (*Leptospira interrogans*)、レプトスピラ・サンタロサイ (*Leptospira santarosai*)、レプトスピラ・ウェイリイ (*Leptospira weilii*)、レプトスピラ・ノグチ (*Leptospira noguchii*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、らい菌、ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、マイコバクテリウム・ウルセランス (*Mycobacterium ulcerans*)、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、淋菌、髄膜炎菌、緑膿菌、ロッキー山紅斑熱リケッチア (*Rickettsia rickettsii*)、チフス菌 (*Salmonella Typhi*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*)、ソンネ赤痢菌 (*Shigella sonnei*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)

10

20

30

40

50

）、腐性ブドウ球菌（*Staphylococcus saprophyticus*）、ストレプトコッカス・アガラクティアエ（*Streptococcus agalactiae*）、肺炎連鎖球菌、化膿連鎖球菌、梅毒トレポネーマ、ウレアプラズマ・ウレアリチカム（*Ureaplasma urealyticum*）、コレラ菌、ペスト菌（*Yersinia pestis*）、エルシニア・エンテロコリチカ（*Yersinia enterocolitica*）、および仮性結核菌（*Yersinia pseudotuberculosis*）。特に好ましいのは、髄膜炎菌、ジフテリア菌、百日咳菌または破傷風菌による感染の治療である。

#### 【0337】

細菌感染との関連において、用語「治療する」は、細菌の増殖の阻害、感染性疾患を引き起こす病原体の増殖または複製の阻害、および感染性疾患の1つ以上の症状の改善のうちのいずれかまたは全てを含む。上述のような細菌の感染は、好ましくは、本明細書において上述したようにカーゴの形態でランゲリン<sup>+</sup>DCに提供される、本明細書に記載されるような細菌抗原または細菌エпитープ、あるいは、例えば、Detmer and Glenting, 2006, Microbial Cell Factories, 5, 23などの好適な文献ソースから当業者に既知である細菌抗原または細菌エпитープを使用することによって治療され得る。上記カーゴの形態のこれらの抗原またはエピソープは、その後、ランゲリン<sup>+</sup>細胞によって、処理され、さらなる免疫細胞に提示される。そして、これらの抗原またはエピソープは、これらの免疫細胞を活性化して、上記抗原またはエピトープを示すエンティティ（例えば、細菌またはその一部）に対して、例えばCTLまたは抗体を介して免疫応答を引き起こす。例えば、異なる細菌に由来するか、または同じ細菌中に存在し得る異なるタンパク質もしくは糖タンパク質に由来するかのいずれかの異なる抗原および／または異なるエピトープが提供されることもまた、想定される。これらの抗原またはエピトープは、例えば、多重抗原融合タンパク質または多重エピトープタンパク質（例えば、2、3、4、5、6、7、8またはそれより多いエピトープを含む）中に、またはカーゴロード中にまとめて集められた単一の抗原／エピトープユニットとして提供され得る。また、カーゴロード内で異なる分子形態の細菌抗原／エピトープを使用することが好ましい。例えば、それは、タンパク質／ペプチドとして、オリゴ糖として、または核酸として提供されてもよい。いくつかの細菌抗原／エピトープが提供される場合、当該細菌抗原／エピトープは、例えば、リボソームが製剤化されるかまたは生成される際に、抗原／エピトープを組み合わせ、または抗原／エピトープの混合物として提供されることがさらに好ましい。

#### 【0338】

本発明の別の特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組成物は、ウイルス感染の治療または予防に用いられる。本明細書で使用する時、用語「ウイルス感染」は、病原性ウイルスまたは感染性ウイルス粒子（ビリオン）によって引き起こされる感染および／または疾患を指す。本発明に係る医薬組成物で感染が治療されることが想定される病原性ウイルスまたはビリオンの例としては、以下の群のウイルスが挙げられる：アデノウイルス科、ピコルナウイルス科、ヘルペスウイルス科、ヘパドナウイルス科、フラビウイルス科、レトロウイルス科、オルトミクソウイルス科、パラミクソウイルス科、パピローマウイルス科、ラブドウイルス科、トガウイルス科。具体的な実施形態では、治療されるウイルス感染が以下のウイルスタイプのうちの1つ以上による感染であってもよい：アデノウイルス、コクサッキーウイルス、エプスタインバーウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス、1型、単純ヘルペスウイルス、2型、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス8型、HIV、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒトパピローマウイルス、パラインフルエンザウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、風疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス。特に好ましいのは、ヒトパピローマウイルス、A型肝炎ウイルスおよびB型肝炎ウイルスによる感染の治療である。

#### 【0339】

ウイルス感染との関連において、用語「治療する」は、ウイルスの増殖の阻害、感染性疾患を引き起こす病原体の増殖または複製の阻害、および感染性疾患の1つ以上の症状の改善のうちのいずれかまたは全てを含む。上述のようなウイルスまたはビリオンによる感

染は、好ましくは、本明細書において上述したようにカーゴの形態でランゲリン<sup>+</sup>DCに提供される、本明細書に記載されるようなウイルス抗原またはウイルスエピトープ、あるいは、例えば、Ansari et al., 2010, Nucleic Acids Res, 38, D847-D853などの好適な文献ソースまたは<https://www.who.int/immunization/diseases/en/>（2018年12月4日に最後にアクセスした）のようなインターネットリソースから当業者に既知であるウイルス抗原またはウイルスエピトープを使用することによって治療され得る。上記カーゴの形態の抗原またはエピトープは、その後、ランゲリン<sup>+</sup>細胞によって、処理され、さらなる免疫細胞に提示される。そして、これらの抗原またはエピトープは、これらの免疫細胞を活性化して、上記抗原またはエピトープを示すエンティティ（例えば、ウイルスまたはその一部）に対して、例えばCTLまたは抗体を介して免疫応答を引き起こす。例えば、異なるウイルスに由来するか、または同じウイルス上または同じウイルス中に存在し得る異なるタンパク質もしくは糖タンパク質に由来するかのいずれかの異なる抗原および／または異なるエピトープが提供されることもまた、想定される。これらの抗原またはエピトープは、例えば、多重抗原融合タンパク質または多重エピトープタンパク質（例えば、2、3、4、5、6、7、8またはそれより多いエピトープを含む）中に、またはカーゴロード中にまとめて集められた単一の抗原／エピトープユニットとして提供され得る。例えば、異なる抗原同士は、混合され、その後、担体中に、例えば本明細書において規定されるリボソーム中に製剤化され得る。また、カーゴロード内で異なる分子形態のウイルス抗原／エピトープを使用することが好ましい。例えば、それは、タンパク質／ペプチドとして、オリゴ糖として、または核酸として提供されてもよい。

#### 【0340】

本発明のさらに別の特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組成物は、寄生虫感染の治療または予防に用いられる。用語「寄生虫感染」は、患者、特にヒトの寄生虫感染に関する。そのような感染は、寄生虫疾患や寄生虫症、すなわち、寄生虫によって引き起こされたり伝染されたりする感染性疾患につながる可能性はあるが、必ずしもそうある必要はない。このように本発明は、寄生虫疾患そのものの治療だけでなく、疾患を引き起こさない可能性がある寄生虫による感染の治療も想定している。このような感染は依然として、例えば、寄生虫によるエネルギーまたは食物資源の使用、疲労、または、例えば、感染していることを知ることによる精神的問題により、患者の健康にとって問題であると考えられる。また、疫学的観点から、このような感染の治療は、それによってさらなる異化作用を防止することができるので、有益である。その感染が治療されるべき寄生虫は、上述のように、哺乳類、特にヒトの寄生虫である。寄生虫は、通常、原生動物または後生動物のグループに属する。本発明に係る医薬組成物で感染が治療されることが想定される寄生虫の例としては、鞭毛虫類、アメーバ類、孢子虫類、および纖毛虫類、ならびに扁形動物が挙げられる。具体的な実施形態では、治療される寄生虫感染は、以下の属または種のうちの1つ以上による感染であり得る：ジアルジア、トリコモナス、トリパノソーマ、リーシュマニア、エントアメーバ、ネグレリア、アカントアメーバ、クリプトスポリジウム、サイクロスポーラ、トキソプラズマ、プラスモディウム、大腸バランチジウム、肝蛭、サナダムシ、住血吸虫、バンクロフト糸状虫および回旋糸状虫。特に好ましいのは、プラスモディウムによる感染の治療である。

#### 【0341】

ウイルス感染との関連において、用語「治療する」は、寄生虫の増殖の阻害、感染性疾患を引き起こす病原体の増殖または複製の阻害、および寄生虫感染の1つ以上の症状の改善のうちのいずれかまたは全てを含む。上述のような寄生虫による感染は、好ましくは、本明細書において上述したようにカーゴの形態でランゲリン<sup>+</sup>DCに提供される、本明細書に記載されるような寄生性抗原またはエピトープ、あるいは、例えば、Ansari et al., 2010, Nucleic Acids Res, 38, D847-D853, Tarleton, 2005, Cellular Microbiology, 7, 10, 1379-1386またはHigashi, 1988, Ann Rev Public Health, 9, 483-501などの好適な文献ソースから当業者に既知である寄生性抗原またはエピトープを使用することによって治療され得る。上記カーゴの形態のこれらの抗原またはエピトープは、その

後、ランゲリン<sup>+</sup>細胞によって、処理され、さらなる免疫細胞に提示される。そして、これらの抗原またはエピトープは、これらの免疫細胞を活性化して、上記抗原またはエピトープを示すエンティティ（例えば、ウイルスまたはその一部）に対して、例えばCTLまたは抗体を介して免疫応答を引き起こす。例えば、異なる寄生虫に由来するか、または同じ寄生虫上に、または同じ寄生虫の中に存在し得る異なるタンパク質もしくは糖タンパク質に由来するかのいずれかの異なる抗原および／または異なるエピトープが提供されることもまた、想定される。これらの抗原またはエピトープは、例えば、多重抗原融合タンパク質または多重エピトープタンパク質（例えば、2、3、4、5、6、7、8またはそれより多いエピトープを含む）中に、またはカーゴロード中にまとめて集められた単一の抗原／エピトープユニットとして提供され得る。例えば、異なる抗原同士は、混合され、その後、担体中に、例えば本明細書において規定されるリポソーム中に製剤化され得る。また、カーゴロード内で異なる分子形態の寄生虫抗原／エピトープを使用することが好ましい。例えば、それは、タンパク質／ペプチドとして、オリゴ糖として、または核酸として提供されてもよい。

#### 【0342】

本発明のさらに別の特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組成物は、移植片対宿主病の治療または予防に用いられる。本明細書で使用する時、用語「移植片対宿主病」は、遺伝的に異なった人から移植組織を受け取った後の医学的合併症に関する。移植片対宿主病は、通常、骨髄移植に伴って起こるもののよう、幹細胞移植と関連している。移植片対宿主病は、固形臓器移植のような他の形態の移植組織にも適用し得る。理論に束縛されることを望むものではないが、疾患は、提供された組織（移植片）内にとどまるドナーの免疫系の白血球がレシピエント（宿主）を異物（非自己）と認識するという事実によって引き起こされるものと考えられる。そして、移植組織内に存在する白血球は、通常、レシピエントの体内細胞を攻撃し、移植片対宿主病を引き起こす。移植片対宿主病は、移植拒絶反応とは異なる。移植拒絶反応は、移植レシピエントの免疫系が移植組織を拒絶した場合に起こる。他方、移植片対宿主病は、ドナーの免疫系の白血球がレシピエントを拒絶した場合に起こる。さらに、移植片対宿主病は、使用した血液製剤が放射線照射または既承認の病原体減少システムで処理されていなければ、輸血後にも起こりうる。本発明は、提供された組織（移植片）の宿主が、提供された組織に含まれるMHC抗原、例えば、移植片の抗原または組織のドナーの抗原を提供されることを想定する。この抗原は、本明細書において規定される好適な担体中のカーゴとして、ランゲリン<sup>+</sup>DC細胞に有利に提供され得る。この工程の後に、通常、MHC特異的制御性T細胞の増殖および活性化が続いてもよい。これにより、例えば、アジュバントの共送達なしに、CTLの抗原特異的欠失、すなわち、共刺激シグナルの非存在下での抗原特異的寛容をもたらす。従って、治療スキームとの関連において、上述のような抗原または自己免疫疾患エピトープは、任意のアジュバントの共送達なしに提供されることが好ましい。ランゲリン<sup>+</sup>DC細胞の活性化につながる任意の共刺激シグナルは、当業者に既知の任意の好適な手段によって阻害されることがさらに好ましい。さらなる詳細は、Sela et al., 2011, J. Exp. Med., 208, 12, 2489-2496などの好適な文献ソースから得ることができる。

#### 【0343】

さらなる実施形態では、本発明はさらに、提供された組織（移植片）のドナーの免疫反応が、例えばエキスピボで阻害されることを想定する。従って、本発明は、例えば、ドナー移植片中のLCがエキスピボで特異的に死滅する皮膚移植の使用に関する。さらなる詳細は、例えば、Zell et al., 2008, Journal of Investigative Dermatology, 128, 8, 1874; bhrai et al., 2008, Journal of Investigative Dermatology, 128, 8, 1950-1955; Molinero et al., 2007, American Journal of Transplantation, 8, 1; Adhikary et al., 2018, Transplantation, 102, S235またはYamano et al., 2011, Blood, 117, 2640-2648から得ることができる。

#### 【0344】

さらに、本発明の特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組

成物は、局所性炎症または全身性炎症の治療または予防に用いられる。本明細書で使用する  
とき、用語「炎症」は、病原体、損傷した細胞、または刺激物などの損傷性刺激または  
有害な刺激に対する身体組織の複雑な生物学的反応に関する。炎症は、免疫細胞、血管、  
および分子メディエーターに関係する防御反応である。炎症の機能は、細胞傷害の初期の  
原因を排除し、元の損傷および炎症過程で傷害された壊死細胞および壊死組織を除去し、  
組織修復を開始することである。炎症は、一般的反応であるため、自然免疫のメカニズム  
と考えられている。炎症の過程は、関係する組織に既に存在する常在免疫細胞、特に常在  
マクロファージ、樹状細胞、組織球（ランゲルハンス細胞）、クッパー細胞および肥満細胞  
によって開始される。これらの細胞は、パターン認識受容体（PRR）として知られる  
表面受容体を有する。パターン認識受容体（PRR）は、病原体関連分子パターン（PAMP）と損傷関連分子パターン（DAMP）との2つの分子サブクラスを認識する。PAMPは種々の病原体と関連するが、宿主分子と区別可能な化合物である。DAMPは、宿主関連傷害および細胞損傷に関連する化合物である。感染、熱傷、または他の傷害の発症時に、これらの細胞は活性化され（PRRのうちの1つがPAMPまたはDAMPを認識し）、炎症の臨床的徴候に関係する炎症性メディエーターを放出する。血管拡張とその結果生じる血流増加は、発赤と熱の増加を引き起こす。血管の透過性の増加は、血漿タンパク質および流体の組織への滲出を引き起こす。これは、組織自体の膨張として現れる。ブラジキニンなどの放出されたメディエーターのうちの一部は、痛みに対する感受性を高める。メディエーター分子はまた、白血球、主に好中球およびマクロファージが血管から外へ出て組織の中へ移動するのを可能にするように血管を変化させる。好中球は、局所細胞によって作られた走化性勾配に沿って遊走し、傷害部位に到達する。機能喪失は、おそらく痛み  
に反応した神経学的反射の結果である。

#### 【0345】

炎症が宿主を圧倒すると、すなわち「全身性炎症」となると、全身性炎症反応症候群を生じる。炎症が感染による場合、上記症候群は敗血症とみなされる。敗血性ショックや死亡につながるおそれのある広範な感染に伴い、血管拡張や臓器機能不全が起こることがある。これとは対照的に、「局所性炎症」は、最初の有害な刺激、傷害、または損傷の位置あるいは組織領域に限局される。理論に束縛されることを望むものではないが、ランゲルハンス細胞は、例えば、Sharabi et al., 2018, Nature Reviews Drug Discovery, 17, 823-844に記載されているように、制御性T細胞を調節し、その結果炎症性反応を停止させることができると現在考えられている。さらに、Stary et al., 2011, J Immunol, 186, 1, 103-112などの適切な文献リソースから引き出すことができるように、ランゲルハンス細胞は、Tregを介して抗炎症性反応を誘導できるという事実が考えられる。想定される治療アプローチは、本発明のビヒクルを介して、本明細書において規定される担体に含まれ得るグルココルチコステロイドなどの好適な化合物をランゲリン<sup>+</sup>細胞に提供することを含む。その結果、抗炎症性反応が開始され得る。さらなる情報は、Bartneck et al., 2014, Nanomedicine, 10, 6, 1209-20から得ることができる。

#### 【0346】

本発明のさらに特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組成物は、アレルギーの治療または予防に用いられる。本明細書で使用するとき、用語「アレルギー」は、普通は、すなわち健康な被験体においては、ほとんどまたは全く問題を  
起こさない、環境からの刺激に対する免疫系の過敏症によって引き起こされる病的状態に関する。したがって、アレルギーは、身体に害を与えないであろう、認識された脅威に対して免疫系が生体を守る異常に活発な免疫応答を患者が生じる状態である。根底にあるメカニズムは、例えば、本明細書において上記に規定したアレルゲンや肥満細胞または好塩基球上の受容体へ結合し、ヒスタミンなどの炎症性化学物質の放出を引き起こす、免疫グロブリンE抗体（IgE）に関係すると考えられる。

#### 【0347】

本発明のさらに特に好ましい実施形態では、本明細書において上記に規定した医薬組成物は、減感作（hyposensitization）に用いられる。脱感作（desensitization）または

低感作 (hypo-sensitization) としても知られる用語「減感作」は、ある型のアレルギーに対する内科療法の形態のアレルゲン免疫療法である。上記アレルゲン免疫療法は、増加する用量のアレルゲンの投与に依存して、I g E 産生から制御性T細胞反応の誘導に向かう免疫応答を生じさせ、それによってアレルゲン特異的寛容を促進する。本発明は、アジュバントがないときに、ランゲリン<sup>+</sup>DC、特に、ランゲルハンス細胞に対するアレルゲンの選択的送達を介して、より高効率に制御性T細胞反応を直接的に誘導するために使用できる。

#### 【0348】

本発明は、さらに、表面上にランゲリンを発現している細胞、特にDCに直接的または間接的にリンクされる任意の他の疾患または病状の治療を想定する。特に、本明細書において上記に規定した担体に含まれ得るか、または担体と結合し得るカーゴは、(i) 例えば、体内で免疫反応を誘発することができ、(ii) 免疫調節剤、免疫寛容誘導剤、またはアポトーシスの阻害剤などの細胞機能の阻害剤として作用する、活性な医薬化合物または免疫学的化合物であり得る。さらに、ランゲリン<sup>+</sup>細胞に送達される活性な医薬化合物または免疫学的化合物は、上記送達の際に、好ましくはDCのための典型的な経路を経て、免疫系の特異的活性化または抑制を可能にし得る。免疫系のこの活性化または調節は、疾患のインビボ治療または予防に役立ち得る。従って、治療されるべき疾患は、治療されるべき被験体において発生していないまたはすでに存在していてもよい。

#### 【0349】

別の態様では、本発明は、先に規定したビヒクル、または先に規定した組成物を含む診断組成物に関し、担体は、診断に好適なカーゴを含むかまたは診断に好適なカーゴに結合される。本明細書で使用するとき、用語「診断に好適なカーゴ」は、小分子、ペプチド、タンパク質、核酸、金属、放射性核種、毒素、色素、および染料のうちのいずれかから選択されるカーゴエンティティに関する。上記の要素のすべてが、カーゴとの関連において、上述した要素の追加の例を含む、本明細書で先に規定した要素に対応することが好ましい。さまざまな状況、例えば、皮膚またはリンパ組織において、ランゲリン<sup>+</sup>細胞を標的化および視覚化するために使用することができる染料が特に好ましい。また、例えば、タンパク質と核酸、またはタンパク質と染料、または小分子と染料などの上述したカーゴの組み合わせもまた、想定される。さらに好ましい実施形態では、言及した担体は、診断に好適なカーゴ（例えば、染料）、そして同時に、治療に適切なカーゴ（例えば、本明細書において規定される小分子など）を含むかまたはそれらに結合され得る。従って、診断に好適なカーゴの存在は、治療に好適なカーゴの送達を検出および／またはカウントするために用いられ得る。診断組成物は、本医薬組成物との関連において本明細書において上記に規定した薬学的に許容される担体、または本医薬組成物との関連において本明細書において上記に規定した薬学的アジュバントをさらに含み得る。

#### 【0350】

具体的な実施形態では、本明細書において規定される診断組成物は、ランゲルハンス細胞関連疾患、例えば、LC組織球症を直接的に診断するために用いることができ、診断組成物は、疾患特異的マーカー／バイオマーカーを含み得るか、またはLC組織球症を検知することを可能にする好適な成分を含み得る。

#### 【0351】

さらなる実施形態では、本明細書に記載されるような診断組成物は、予後利用および／または予測利用に用いられ得る。例えば、診断組成物は、ランゲルハンス細胞活性化レベルおよび／または疾患特異的抗原またはアレルゲンの交差提示レベルの変化を評価するために、例えば、治療前、治療中または治療後、好ましくは治療直後に使用し得る。このような利用は、特に、RNA、ペプチドまたはタンパク質レベルマーカーなどの活性化シグナル用の標識化マーカーを含む診断組成物を想定する。これらのマーカーは、本明細書において規定される薬学的に活性な化合物などのさらなる成分と共に、本明細書において規定されるビヒクルおよび担体を介して、標的細胞、すなわち、ランゲリン<sup>+</sup>細胞に送達または共送達され得る。

## 【0352】

したがって、(RNA、ペプチド／タンパク質レベル上の)活性化シグナル用の標識化マーカーは、上記系を用いて共送達され得る。好ましい実施形態では、先に規定した診断組成物は、癌、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、または移植片対宿主病、局所性もしくは全身性の炎症、またはアレルギーに対して、本明細書において規定される医薬組成物に基づく治療アプローチおよび／または上記治療アプローチの効能を検出または観察するのに用いられる。

## 【0353】

さらなる態様では、本発明は、疾患の樹状細胞ターゲティング治療のための適切な用量を特定する方法に関し、当該方法は、(a)ランゲリン<sup>+</sup>細胞の集団を、細胞に導入され得る化合物と接触させる工程と、(b)上記化合物が組み込まれた細胞の数を決定する工程と、(c)上記化合物が組み込まれた細胞の数と出発集団とを比較することによって、上記化合物の適切な用量を決定する工程とを含む。本明細書で使用する時、用語「樹状細胞ターゲティング治療」は、本明細書に記載されるような医薬組成物の使用に関する。好ましくは、上記用語は、本明細書において規定されるビヒクルの相互作用を含み、より好ましくは本明細書において規定されるカーゴを含み、本明細書において規定される複合体の一部としてのリガンドおよび同族受容体ランゲリンを介する、医薬組成物の治療形態または使用に関する。従って、上記疾患は、本明細書において上述された任意の疾患、例えば、癌、または細菌、ウイルス、寄生虫感染、アレルギーなどであってもよい。「ランゲリン<sup>+</sup>細胞の集団を、化合物と接触させる」工程とは、好ましくは先に規定したビヒクルを介して、上記化合物が上記細胞と接触させられるか、または上記細胞の近傍に持ってこられるか、または上記細胞に送達されることを意味する。細胞は、インビトロでの細胞培養に由来するか、または患者の皮膚から得られるエクスピボ細胞である。使用される細胞の数は決定されるか、または既知であることが特に好ましい。従って、これらの細胞は、限定された環境、例えば、反応チャンバなどにおいて提供され得る。上記化合物は、例えば、「細胞に導入され得る化合物」である。この化合物は、例えばエンドサイトーシスによって、ランゲリン<sup>+</sup>細胞によって取り込まれることが可能であることを意味する。このようなアプローチは、例えば、LCが染色される、またはフローサイトメトリー分析が行われるインビトロ工程を含み得る。化合物の導入は、好ましくは、ランゲリン<sup>+</sup>細胞のエンドサイトーシスを介して行い得る。

## 【0354】

例えば、具体的な実施形態では、このアプローチは、インビトロアプローチとして実施され得、ここで、ランゲリン<sup>+</sup>細胞は、例えば染料を含む、本発明に係る組成物で標識化され得る。さらに、標識化細胞を標識されていない細胞から分離するためのフローサイトメトリーの使用が想定される。また、インビボアプローチとして、またはインビトロ／エクスピボアプローチの組み合わせとしての実施も想定される。化合物は、具体的な実施形態では、本明細書において上記に規定したカーゴ、好ましくは染料または色素であってよく、より好ましくはAlexa Fluor 647である。

## 【0355】

上記方法の工程b)で使用される「上記化合物が組み込まれた細胞の数を決定する」工程は、化合物が組み込まれた細胞を組み込まなかった細胞から区別することを可能にする任意の好適な分析方法に関する。好ましくは、このプロセスは蛍光検出プロセスであり、染料または色素を組み込んだ細胞を、組み込まなかった細胞から識別する。より好ましくは、このプロセスは、Alexa Fluor 647の使用に基づくプロセスである。従って、上記化合物が組み込まれた細胞の数対上記化合物を組み込まなかった細胞の数は、例えば、蛍光シグナルまたは染色を示す細胞をカウントし、最初に提供された細胞の数、すなわち、アッセイで使用された細胞の総数から上記カウントされた数を差し引いて、非蛍光または非染色細胞の数を得られることによって、決定することができる。最後に、化合物の用量、または類似するまたは類似性により同等の任意の化合物の用量は、使用した化合物の量を、化合物が組み込まれた細胞の数または割合と相互に関連付けることによ

て決定され得る。従って、細胞に送達される化合物の量を増加させることによって、化合物が組み込まれた細胞の割合を増加させることができる。追加の実施形態では、例えば、添加剤の存在、化合物の処方、二価イオンの存在などの代替パラメータも変更され得る。したがって、「適切な用量」は、ある実施形態によれば、例えば、上記の工程に応じて蛍光により、化合物の組み込みを示す細胞の50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%または90%超の割合であり得る。さらに、この方法は、実施例、例えば、実施例10に記載されるように実施され得る。さらなる情報は、Boyd and Jackson, 2015, Cell Host & Microbe, 17, 301-307などの好適な文献ソースから得ることができる。

#### 【0356】

好ましい実施形態では、化合物が組み込まれた細胞対化合物が組み込まれていない細胞の比較は、1〜3日後、例えば、24時間後、30時間後、36時間後、40時間後、48時間後、55時間後、60時間後、65時間後、または72時間後に行い得る。

#### 【0357】

さらなる実施形態では、化合物が組み込まれた細胞の数は、確認された文献の結果またはデータベースもしくはインターネットリポジトリから引き出すことができる結果と比較され得る。例えば、化合物の組み込み割合、計算された適切な用量などは、例えば、同じアッセイまたはデータベースからの同様のアッセイにおける他の化合物についてのデータと比較され得る。ある実施形態では、データベースは、本発明に係る異なるアプローチ／異なる化合物からの情報を用いて開発されたデータベースであってもよい。また、このようなデータベースのために、本発明の外部のさらなるプロジェクトからの情報が使用されてもよい。

#### 【0358】

さらなる態様では、本発明は、本明細書において上記に規定したビヒクルおよび／または本明細書において上記に規定した組成物から選択された少なくとも1つの要素を含む医療用キットに関し、担体は、薬学的に活性なカーゴを含むかまたはそれに結合する。上記キットは、任意で説明書付きリーフレットを含み得る。用語「医療用キット」は、先に規定した任意の医薬組成物、医療用具、上述のような治療用などを含む。さらに具体的な実施形態では、医療用キットはまた、ワクチン接種の実施のため、例えば本明細書において規定されるランゲリンに関連する疾患の診断の実施のため、もしくはそのような疾患に関する健康状態の予後判定または予測判定のために好適な成分を含む、ワクチンキット、診断キット、予後キットまたは予測キットであってもよい。さらなる実施形態では、医療用キットは、パッケージ内において任意の医療用具を含んでいてもよい。用語「医療用具」は、好ましくは本明細書において上記に規定した、シリンジ、針（例えば、シリンジの針）、ワクチン注射器、硬膏剤、または吸入器を含む。本発明のビヒクルまたはその組成物は、例えば、医療用具を介して投与され得る。さらに、ビヒクルまたはその組成物は、医療用具に保存され得る。「パッケージ挿入物」または「説明書付きリーフレット」という用語は、治療用製品の使用に関する適応症、用法、投与量、投与、禁忌および／または警告についての情報を含む、治療用製品の商業的パッケージに慣習的に含まれる使用説明書を指すために使用される。使用説明書付きリーフレットは、医療用キットの一部であってもよい。

#### 【0359】

さらに別の態様では、本発明は、先に規定したビヒクル、または先に規定した組成物を含むワクチンに関する。ここで、担体は、例えば本明細書において上記に規定した接種物カーゴを含むか、または接種物カーゴに結合される。

#### 【0360】

用語「ワクチン」は、好ましい実施形態において、被験体のワクチン接種に適した、先に規定したビヒクルまたは組成物を含む組成物と理解されるべきである。ワクチン組成物は、医薬組成物との関連において本明細書に上述された。ワクチンは、アジュバント、特に上述のような免疫学的アジュバントを含むことが特に好ましい。ワクチンは、例えば、先に規定したカーゴを含む、治療学的に有効な量のビヒクルを含み得る。例えば、ワクチ

ンは、好ましい実施形態において、免疫原性要素としてタンパク質および／または核酸を含み得る。

#### 【0361】

用語「ワクチン接種」は、被験体における、先に規定した、癌抗原を介する腫瘍、細菌抗原を介する細菌感染、ウイルス抗原を介するウイルス感染、寄生性抗原を介する寄生虫感染に対する免疫応答の誘発を指し、先に規定したカーゴを含む治療学的に有効な量のビヒクルを上記被験体に投与することを含む。好ましくは、本発明のビヒクルの担体はカーゴを含み、当該カーゴは、先に規定した癌抗原またはエピトープ、先に規定した細菌抗原またはエピトープ、先に規定したウイルス抗原またはエピトープ、先に規定した寄生性抗原またはエピトープであるか、または上記の抗原またはエピトープを含む。また、先に規定した移植片対宿主病との関連において記載されたエンティティによるワクチン接種も想定される。本発明は、特に、ワクチン接種目的のために本明細書において規定されるリポソームまたはナノ粒子担体の使用を想定する。リポソームまたはナノ粒子担体は、本明細書に記載されるようなペプチドまたはタンパク質抗原を含むことがさらに好ましい。従って、ペプチドまたはタンパク質抗原は、本明細書に記載されるようなリポソームまたはナノ粒子担体中に含まれ得るか、またはカプセル化され得る。担体の投与は、好ましくは、本明細書に記載されるような皮内注射または本明細書に記載されるような経皮投与であり、好ましくは、微細針パッチを介した投与である。

10

#### 【0362】

ワクチンは、好ましい実施形態において、癌、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染または移植片対宿主病の治療または予防に用いられ得る。

20

#### 【0363】

免疫 (immunisation) は、例えば [www.who.int/immunization/documents/en/](http://www.who.int/immunization/documents/en/) (2018年12月4日に最後にアクセスした) または同様の情報源から引き出すことができる、当業者に既知の任意のスキームまたはスケジュールに従って行うことができる。この計画は、例えば、先に規定したビヒクルまたは組成物を含むワクチン組成物のいくつかの用量を含み得る。本発明の一実施形態では、少なくとも1用量のワクチン組成物が被験体に投与される。別の実施形態では、上記ワクチン接種は、1用量のワクチン組成物で構成される。別の実施形態では、被験体は、初回の2用量のワクチン接種を受けるが、ワクチン組成物のさらなる投与を受けないか、または少なくとも1ヶ月、または2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月もしくは12ヶ月、または1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年などの所定の期間後にさらなる投与を受ける。数回の投与、例えば2用量以上のワクチンの投与の間隔は、1週間から約1年以上、または1ヶ月から1年、または1ヶ月から3ヶ月の間でさらに変化し得る。

30

#### 【0364】

ワクチンの投与は、任意の好適な投与スキームおよび任意の好適な経路により実施し得る。例えば、ワクチンは、皮下投与、経皮投与、皮内投与、筋肉投与、経口投与、角膜または経鼻経路を経由する投与、静脈内投与、局所投与、または毛嚢を経由する投与などにより投与し得る。経皮経路、皮内経路または皮下経路（例えば、皮内注射）を用いることが特に好ましい。適用は、上述のような、針、微細針、ナノパッチ、ヒドロゲルパッチ、ワクチン注射器などを用いて行われることが好ましい。

40

#### 【0365】

同様に、さらなる態様では、本発明は、被験者における、癌、細菌感染、ウイルス感染、または寄生虫感染に対する免疫応答を誘導する方法に関し、上記方法は、上記被験体に、治療学的に有効な量の、上記担体が薬学的に活性な先に規定したカーゴを含むかもしくはそれに結合する先に規定した上記ビヒクル、または上記担体が薬学的に活性な先に規定したカーゴを含むかしくはそれに結合する先に規定した上記組成物、または先に規定した上記医薬組成物、または先に規定した上記ワクチンを投与する工程を含む。上記方法は、本質的に、本明細書において言及されるような免疫活性化合物をランゲリン<sup>+</sup>細胞に提

50

供し、それによって当該ランゲリン<sup>+</sup>細胞に当該化合物を組み込ませ、当該化合物を処理させ、その表面上に当該化合物もしくはその1つ以上の部分を提示させて、他の免疫細胞もしくは免疫系の反応を誘導させるか、またはランゲリン<sup>+</sup>細胞を介して他の任意の好適な方法で免疫応答を誘発させる工程を含む。上記方法は、特に好ましい実施形態において、本明細書において上記に規定したワクチン接種工程を含んでいてもよい。特に、言及したワクチン接種スキームおよびスケジュールを用いることができる。

#### 【0366】

用語「有効な量」は、必要な投与量で必要な期間の間に、所望の結果を達成するのに有効な量を含む。化合物の有効な量は、被験体の疾患状態、年齢、および体重、ならびに被験体において所望の反応を誘発する化合物の能力などの要因に従って変化し得る。投薬レジメンは、最適な治療反応を提供するために調節し得る。有効な量はまた、阻害剤化合物の任意の有毒作用または有害作用（例えば、副作用）を、治療的に有益な効果が上回る量である。

#### 【0367】

用語「治療学的に有効な量」は、治療されている状態または障害の症状のうちの1つ以上の発生を予防するか、またはある程度軽減するのに十分な、投与されている化合物の量を指す。

#### 【0368】

治療学的に有効な量の化合物（すなわち、有効投与量）は、患者の体重および当業者に既知の他の因子を考慮して決定され得る。治療学的に有効な量はさらに、例えば pM または μM の範囲の濃度として規定されて得る。当業者は、特定の因子が、被験体を効果的に治療するために必要とされる投与量に影響し得ることを理解する。特定の因子には、疾患または障害の重症度、過去の治療、被験体の全体的な健康および／または年齢、ならびに存在する他の疾患が含まれるが、これらに限定されない。さらに、治療学的に有効な量の化合物による被験体の治療は、一回の治療、または好ましくは、一続きの治療を含むことができる。一例では、被験体は、約1週間～約50週間、または任意の他の好適な期間、化合物で1日当たり1回または数回治療される。別の例では、被験体は、慢性状態または慢性疾患において、2年以上にわたって毎日治療され得る。治療のために使用される化合物の有効な投与量は、特定の治療の間に増減し得ることも理解される。

#### 【0369】

さらに別の態様では、本発明は、癌、自己免疫疾患、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染、移植片対宿主病、局所性もしくは全身性の炎症、またはアレルギーの治療もしくは予防の方法に関し、上記方法は、被験体に、治療学的に有効な量の、上記担体が薬学的に活性なカーゴを含むかもしくはそれに結合する先に規定した上記ビヒクル、上記担体が薬学的に活性なカーゴを含むかもしくはそれに結合する本明細書において上記に規定した上記組成物、先に規定した上記医薬組成物、または先に規定した上記ワクチンを投与する工程を含む。この方法は、本明細書において上述した任意の好適な投与スキームであり得る。本方法に使用される化合物は、特に好ましい実施形態において、上述のような医薬組成物、または本明細書において上述したワクチンである。特に好ましい実施形態では、上記治療法は、口、角膜、鼻、静脈内、局所、皮下、皮膚上、皮内もしくは経皮の経路を介した投与、またはワクチン接種、または毛嚢を介した投与を意図する。

#### 【0370】

ビヒクル、配合物、医薬組成物またはワクチンの投与は、特に癌に対する治療の場合、化学療法剤と併用し得る。好適な例としては、チェックポイント阻害剤または CAR-T 細胞が挙げられる。化学療法剤は、好ましくは上述のような任意の細胞毒性物質であり得る。化学療法剤での治療は、好ましくは、現在記載されている DC での相互作用とは別の方法で、すなわち、ランゲリン<sup>+</sup>細胞を介さずに行われる。例えば、化学療法剤は、全身的な方法で投与、または静脈内投与などで投与され得る。従って、化学療法剤は、癌細胞を化学療法的に破壊することによって、癌に対するワクチン接種アプローチをサポートし得る。例えば、化学療法剤との組み合わせに基づくアプローチは、例えば、腫瘍塊を外科

10

20

30

40

50

手術で最適に減少させた後に、残留腫瘍細胞の免疫表現型を調節することができる全身的化学療法に基づき得る。別のアプローチは、癌抗原自体、または抗原が結合するMHCクラスI分子の発現をアップレギュレートすることによる癌抗原提示の増強に基づき得る。さらに、化学療法は、共刺激分子（例えば、B7-1）をアップレギュレートするために、または腫瘍細胞表面に発現される共阻害分子（例えば、PD-L1/B7-H1またはB7-H4）をダウンレギュレートするために使用され得、これは、エフェクターT細胞活性の強度を増大する。さらなる実施形態では、腫瘍細胞を、fas依存性メカニズム、パーフォリン依存性メカニズム、またはグランザイムB依存性メカニズムによるT細胞媒介溶解により感受性を有するようにさせるために、化学療法を用いてもよい。

【0371】

さらなる態様では、本発明は、減感作の方法に関する。従って、本発明は、アレルギー患者に抗原性アレルゲンが与えられることを想定している。このアレルゲンは、本明細書において規定される好適な担体中のカーゴとして、ランゲリン<sup>+</sup>細胞に有利に提供され得る。抗原性アレルゲンは、1用量より多い用量で与えられることが特に好ましい。用量数および／またはアレルゲンの濃度は、治療期間の間に増量することができる。1回または数回繰り返され得るこのアレルゲンを与える工程の後に、通常、抗原性アレルゲン特異的な制御性T細胞の増殖および活性化が続き、これはCTLのアレルゲン特異的欠失、すなわち、共刺激シグナルの非存在下で、例えばアジュバントの共送達なしでアレルゲン特異的寛容をもたらす。この治療スキームとの関連において、上述のようなアレルゲンは、好ましくは任意のアジュバントの共送達なしに与えられる。ランゲリン<sup>+</sup>細胞の活性化をもたらす任意の共刺激シグナルが、当業者に既知の任意の好適な手段によって阻害されることがさらに好ましい。さらなる詳細は、Sela et al., 2011, J. Exp. Med., 208, 12, 2489-2496などの好適な文献ソースから得ることができる。

【0372】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明される。これらの実施例は、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0373】

〔実施例〕

（実施例1）

（ランゲリン発現Hek293細胞）

ヒト胎児腎臓細胞株Hek293を、10%のFCS（Biocrom）および100U/mlのペニシリン-ストレプトマイシンを補充したGlutaMaxを含むDMEM培地中で維持した。細胞を、70%コンフルエント状態まで培養し、2~3日毎にトリプシンで継代培養した。特に明記しない限り、全ての培地およびサプリメントは、Thermo Fisher Scientificから購入した。細胞を、37℃および5%CO<sub>2</sub>で制御された条件下で増殖させた。細胞を光学顕微鏡（IT40 5PH、VWR）で観察し、シャーレ（Corning）で培養した。細胞を、0.25%EDTAと組み合わせたタンパク質分解酵素トリプシンで継代培養した。通常の継代培養では、全ての細胞を500gで3分間遠心分離した（Heraeus Megafuge 8R、Thermo Fisher Scientific）。上清を吸引し、細胞を新鮮な増殖培地に再懸濁した。品質管理として、MycoAlert（登録商標）Mycoplasma Detection Kit（Lonza）を用いて、マイコプラズマ汚染のない細胞を頻繁に試験した。汚染は検出されなかった。細胞を自動セルカウンター（Eve、Montreal Biotech）でカウントした。細胞を凍結保存するために、生体細胞をカウントし、遠心分離し、吸引し、90%増殖培地および10%DMSO（細胞培養グレード、Euro Clone）からなる凍結培地に再懸濁した。凍結保存バイアルを、イソプロパノール（Mr. Frosty、Nalgene）を充填した凍結保存バイアル容器に移動させた。容器を-80℃で少なくとも24時間保存し、長期保存用バイアルを液体窒素中に保存した。

【0374】

ヒトランゲリンのcDNA ORFクローンをsinobiologicalから購入し、製造者の手順に従って、pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO TAベクター (life technologies) からGibson AssemblyによるRP172発現ベクター (K. J. Koymans et al., Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 and 5 (SSL1 & SSL5) Limit Neutrophil Chemotaxis and Migration through MMP-Inhibition. International journal of molecular sciences 17, 2016) に遺伝子をクローニングした。簡潔には、遺伝子断片を、Phusion高忠実度DNAポリメラーゼ (NEB) を使用するPCRによって、目的ベクターから突出部 (overhang) を備えて増幅した。PCR反応のために、反応毎に、10 µlのPhusion HF緩衝液 (NEB)、5 µlの2mM dNTP (Carl Roth)、0.5 µlのPhusionポリメラーゼ (NEB) および29 µlのH<sub>2</sub>Oからなるマスターミックスを調製した。それぞれの反応に、0.5 µlの50 µMのプライマーおよび2.5 µlの約10 ng/mlの鋳型ベクターを添加した。目的ベクターをPCR (Mastercycler nexus gradient, Eppendorf、エッペンドルフ株式会社) により線状化した。ここで、0.6 µlのDMSO (NEB) を添加した。PCR産物の質をアガロースゲル電気泳動でチェックし、DNA濃度をナノドロップ (Implen Nanophotometer) で測定した。

【0375】

特に、ランゲリンクローン、ランゲリン変異体クローンおよびmランゲリンクローンの作製のため、ならびにDC-SIGNおよびmデクチンクローンの作製のために、以下のプライマー配列およびPCR条件を使用した：

【0376】

10

20

30

40

50

【表 1】

| 名前                                         | 配列 (5' から 3')                                                         | 向き             | 配列番号 | PCR条件            |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------|------|------------------|
| h ランゲリン p c D<br>NA3. 1 (+)                | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAGCATGA<br>CTGTGGAGA<br>AGGAGGCC          | フォワード<br>プライマー | 17   | 62℃/30秒<br>/35   |
| h ランゲリン p c D<br>NA3. 1 (+)                | CTAGACTCG<br>AGCGGCCTC<br>ACGGTTCTG<br>ATGGGAC                        | リバースプ<br>ライマー  | 18   | 62℃/30秒<br>/35   |
| h ランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド p c D<br>NA3. 1 (+) | GCTTAAGTT<br>TAAACGCTA<br>GCC                                         | フォワード<br>プライマー | 19   | 59℃/2.5<br>分間/20 |
| h ランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド p c D<br>NA3. 1 (+) | GGCCGCTCG<br>AGTCTAGAG                                                | リバースプ<br>ライマー  | 20   | 59℃/2.5<br>分間/20 |
| h ランゲリン p c D<br>NA5                       | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAGCATGA<br>CTGTGGAGA<br>AGGAGGCC          | フォワード<br>プライマー | 21   | 59℃/1分間<br>/35   |
| h ランゲリン p c D<br>NA5                       | GTGATGGTG<br>ATGATGACT<br>CACGGTTCT<br>GATGGGAC                       | リバースプ<br>ライマー  | 22   | 59℃/1分間<br>/35   |
| h ランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド p c D<br>NA5        | GCTTAAGTT<br>TAAACGCTA<br>GCC                                         | フォワード<br>プライマー | 23   | 62℃/3.5<br>分間/20 |
| h ランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド p c D<br>NA5        | GTCATCATC<br>ACCATCACC                                                | リバースプ<br>ライマー  | 24   | 62℃/3.5<br>分間/20 |
| h ランゲリン RP1<br>72                          | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAG                                        | フォワード<br>プライマー | 25   | 60℃/1分間<br>/35   |
| h ランゲリン RP1<br>72                          | CAATGGTGA<br>TGGTGATGA<br>TG                                          | リバースプ<br>ライマー  | 26   | 60℃/1分間<br>/35   |
| h ランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド RP1<br>72           | GAGCTAGCA<br>G t a TTAATT<br>AACCACCT<br>GGCTAGCGT<br>TTAAACTTA<br>AG | フォワード<br>プライマー | 27   | 60℃/3.5<br>分間/20 |
| h ランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド RP1<br>72           | GTACCGGTT<br>AGGATGCAT<br>GCCAATGGT<br>GATGGTGAT<br>GATG              | リバースプ<br>ライマー  | 28   | 60℃/3.5<br>分間/20 |

10

20

30

40

50

|                                 |                                                                                                                                         |                |    |                    |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----|--------------------|
| hランゲリンSNPバックボーン                 | GAGCTAGCA<br>G t ATTAATT<br>AACCACCAT<br>GACTGTGGA<br>GAAGGAG                                                                           | フォワード<br>プライマー | 34 |                    |
| hLangerin-<br>FLAGバックボーン<br>SNP | ACGTTTCTT<br>TTCATTTGT<br>AAGCGACCC<br>TATGTCCCA<br>TCAGAACCG<br>GACTACAAA<br>GACGATGAC<br>GACAAGTGA<br>GCATGCATC<br>CTAACCGGT<br>AC    | リバースブ<br>ライマー  | 35 |                    |
| N288D                           | CCAGGTGAG<br>CCCAAC g AT<br>GCTGGGAAC<br>AATGAACAC<br>TG                                                                                | フォワード<br>プライマー | 36 |                    |
| N288D                           | CATTGTTCC<br>CAGCAT c GT<br>TGGGCTCAC<br>CTGGAATCC<br>AG                                                                                | リバースブ<br>ライマー  | 37 |                    |
| K313I                           | GTACCGGTT<br>AGGATGCAT<br>GCTCACGGT<br>TCTGATGGG<br>ACATAGGGT<br>CGCTTACAA<br>ATGAAAAGA<br>AACGTT a TG<br>TCACATGGG<br>GCATCATTC<br>CAG | フォワード<br>プライマー | 38 |                    |
| K313I                           | GAGCTAGCA<br>G t ATTAATT<br>AACCACCAT<br>GACTGTGGA<br>GAAGGAG                                                                           | リバースブ<br>ライマー  | 39 |                    |
| DC-SIGN pc<br>DNA3.1 (+)        | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAGCATGA<br>GTGACTCCA<br>AGGAACCAA<br>G                                                                      | フォワード<br>プライマー | 40 | 62°C / 30秒<br>/ 35 |

10

20

30

40

50

|                                            |                                                                     |                |     |                       |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------|-----|-----------------------|
| DC-SIGN p c<br>DNA 3. 1 (+)                | CTAGACTCG<br>AGCGGCCCT<br>ACGCAGGAG<br>GGGG                         | リバースプ<br>ライマー  | 4 1 | 6 2℃/ 3 0 秒<br>/ 3 5  |
| DC-SIGNバック<br>ボーンプラスミド p c<br>DNA 3. 1 (+) | GCTTAAAGTT<br>TAAACGCTA<br>GCC                                      | フォワード<br>プライマー | 4 2 | 5 9℃/ 2. 5<br>分間/ 2 0 |
| DC-SIGNバック<br>ボーンプラスミド p c<br>DNA 3. 1 (+) | GGCCGCTCG<br>AGTCTAGAG                                              | リバースプ<br>ライマー  | 4 3 | 5 9℃/ 2. 5<br>分間/ 2 0 |
| DC-SIGN p c<br>DNA 5                       | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAGCATGA<br>GTGACTCCA<br>AGGAACCAA<br>G  | フォワード<br>プライマー | 4 4 | 5 9℃/ 1 分間<br>/ 3 5   |
| DC-SIGN p c<br>DNA 5                       | GTGATGGTG<br>ATGATGACC<br>TACGCAGGA<br>GGGGGGTT                     | リバースプ<br>ライマー  | 4 5 | 5 9℃/ 1 分間<br>/ 3 5   |
| DC-SIGNバック<br>ボーンプラスミド p c<br>DNA 5        | GCTTAAAGTT<br>TAAACGCTA<br>GCC                                      | フォワード<br>プライマー | 4 6 | 6 2℃/ 3. 5<br>分間/ 2 0 |
| DC-SIGNバック<br>ボーンプラスミド p c<br>DNA 5        | GTCATCATC<br>ACCATCACC                                              | リバースプ<br>ライマー  | 4 7 | 6 2℃/ 3. 5<br>分間/ 2 0 |
| DC-SIGN RP<br>1 7 2                        | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAG                                      | フォワード<br>プライマー | 4 8 | 6 0℃/ 1 分間<br>/ 3 5   |
| DC-SIGN RP<br>1 7 2                        | CAATGGTGA<br>TGGTGATGA<br>TG                                        | リバースプ<br>ライマー  | 4 9 | 6 0℃/ 1 分間<br>/ 3 5   |
| DC-SIGNバック<br>ボーンプラスミド RP<br>1 7 2         | GAGCTAGCA<br>GTATTAATT<br>AACCACCCT<br>GGCTAGCGT<br>TTAAACTTA<br>AG | フォワード<br>プライマー | 5 0 | 6 0℃/ 3. 5<br>分間/ 2 0 |
| DC-SIGNバック<br>ボーンプラスミド RP<br>1 7 2         | GTACCGGTT<br>AGGATGCAT<br>GCCAATGGT<br>GATGGTGAT<br>GATG            | リバースプ<br>ライマー  | 5 1 | 6 0℃/ 3. 5<br>分間/ 2 0 |
| mランゲリン p c D<br>NA 3. 1 (+)                | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAGCATGC<br>CAGAGGCAG<br>AGATGAAG        | フォワード<br>プライマー | 5 7 | 6 2℃/ 3 0 秒<br>/ 3 5  |

10

20

30

40

50

|                                           |                                                                     |                |    |                  |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------|----|------------------|
| mランゲリン p c D<br>NA3. 1 (+)                | CTAGACTCG<br>AGCGGCCTC<br>ATTCAGTTG<br>TTTGGACG                     | リバースプ<br>ライマー  | 58 | 62℃/30秒<br>/35   |
| mランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド p c D<br>NA3. 1 (+) | GCTTAAGTT<br>TAAACGCTA<br>GCC                                       | フォワード<br>プライマー | 59 | 59℃/2.5<br>分間/20 |
| mランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド p c D<br>NA3. 1 (+) | GGCCGCTCG<br>AGTCTAGAG                                              | リバースプ<br>ライマー  | 60 | 59℃/2.5<br>分間/20 |
| mランゲリン p c D<br>NA5                       | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAGCATGC<br>CAGAGGCAG<br>AGATGAAG        | フォワード<br>プライマー | 61 | 59℃/1分間<br>/35   |
| mランゲリン p c D<br>NA5                       | GTGATGGTG<br>ATGATGACT<br>CATTCAGTT<br>GTTTGGACG                    | リバースプ<br>ライマー  | 62 | 59℃/1分間<br>/35   |
| mランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド p c D<br>NA5        | GCTTAAGTT<br>TAAACGCTA<br>GCC                                       | フォワード<br>プライマー | 63 | 62℃/3.5<br>分間/20 |
| mランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド p c D<br>NA5        | GTCATCATC<br>ACCATCACC                                              | リバースプ<br>ライマー  | 64 | 62℃/3.5<br>分間/20 |
| mランゲリン RP1<br>72                          | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAG                                      | フォワード<br>プライマー | 65 | 60℃/1分間<br>/35   |
| mランゲリン RP1<br>72                          | CAATGGTGA<br>TGGTGATGA<br>TG                                        | リバースプ<br>ライマー  | 66 | 60℃/1分間<br>/35   |
| mランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド RP1<br>72           | GAGCTAGCA<br>GTATTAATT<br>AACCACCCT<br>GGCTAGCGT<br>TTAAACTTA<br>AG | フォワード<br>プライマー | 67 | 60℃/3.5<br>分間/20 |
| mランゲリンバックボ<br>ーンプラスミド RP1<br>72           | GTACCGGTT<br>AGGATGCAT<br>GCCAATGGT<br>GATGGTGAT<br>GATG            | リバースプ<br>ライマー  | 68 | 60℃/3.5<br>分間/20 |
| mデクチン-1 p c<br>DNA3. 1 (+)                | TAGCGTTTA<br>AACTTAAGC<br>ATGAAATAT<br>CACTCTCAT<br>ATAGAGAAT<br>C  | フォワード<br>プライマー | 69 | 62℃/30秒<br>/35   |

10

20

30

40

50

|                                             |                                                                     |                |     |                     |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------|-----|---------------------|
| mデクチン-1 p c<br>DNA 3. 1 (+)                 | TAGACTCGA<br>GCGGCCTTA<br>CAGTTCCTT<br>CTCACAGAT<br>AC              | リバースブ<br>ライマー  | 7 0 | 6 2℃/3 0秒<br>/3 5   |
| mデクチン-1 バッ<br>クボーンプラスミド p<br>c DNA 3. 1 (+) | GCTTAAGTT<br>TAAACGCTA<br>GCC                                       | フォワード<br>プライマー | 7 1 | 5 9℃/2. 5<br>分間/2 0 |
| mデクチン-1 バッ<br>クボーンプラスミド p<br>c DNA 3. 1 (+) | GGCCGCTCG<br>AGTCTAGAG                                              | リバースブ<br>ライマー  | 7 2 | 5 9℃/2. 5<br>分間/2 0 |
| mデクチン-1 p c<br>DNA 5                        | TAGCGTTTA<br>AACTTAAGC<br>ATGAAATAT<br>CACTCTCAT<br>ATAGAGAAT<br>C  | フォワード<br>プライマー | 7 3 | 5 9℃/1 分間<br>/3 5   |
| mデクチン-1 p c<br>DNA 5                        | GTGATGGTG<br>ATGATGACT<br>TACAGTTCC<br>TTCTCACAG<br>ATAC            | リバースブ<br>ライマー  | 7 4 | 5 9℃/1 分間<br>/3 5   |
| mデクチン-1 バッ<br>クボーンプラスミド p<br>c DNA 5        | GCTTAAGTT<br>TAAACGCTA<br>GCC                                       | フォワード<br>プライマー | 7 5 | 6 2℃/3. 5<br>分間/2 0 |
| mデクチン-1 バッ<br>クボーンプラスミド p<br>c DNA 5        | GTCATCATC<br>ACCATCAC                                               | リバースブ<br>ライマー  | 7 6 | 6 2℃/3. 5<br>分間/2 0 |
| mデクチン-1 RP<br>1 7 2                         | CTGGCTAGC<br>GTTTAAACT<br>TAAG                                      | フォワード<br>プライマー | 7 7 | 6 0℃/1 分間<br>/3 5   |
| mデクチン-1 RP<br>1 7 2                         | CAATGGTG<br>TG GTGATGA<br>TG                                        | リバースブ<br>ライマー  | 7 8 | 6 0℃/1 分間<br>/3 5   |
| mデクチン-1 バッ<br>クボーンプラスミド R<br>P 1 7 2        | GAGCTAGCA<br>GTATTAAAT<br>AACCACCCT<br>GGCTAGCGT<br>TTAAACTTA<br>AG | フォワード<br>プライマー | 7 9 | 6 0℃/3. 5<br>分間/2 0 |
| mデクチン-1 バッ<br>クボーンプラスミド R<br>P 1 7 2        | GTACCGGTT<br>AGGATGCAT<br>GCCAATGGT<br>GATGGTGAT<br>GATG            | リバースブ<br>ライマー  | 8 0 | 6 0℃/3. 5<br>分間/2 0 |

最後に、PCR産物をGibson Assemblyによって集合させた。2～3過剰のインサートおよびGibson Assemblyマスターミックスを有する0.02～0.5 pmolのDNA断片を含有する等容量(2～10 μL)のDNAを50℃で20分間インキュベートした。マスターミックスは、一本鎖DNA突出部を作製し、ヌクレオチドをDNAギャップに組み込み、相補的DNA断片をアニールするために、T5エキソヌクレアーゼ、Phusion DNAポリマーラーゼおよびTaq DNAリガーゼを含んでいた。Gibson Assemblyの後、1 μLのDpnI (NEB)を添加して、所定のクローニングベクターを消化した。次いで、消化されたPCR反応(1 μL)を、42℃で30秒間の熱ショック形質転換によって、10 μLの5-アルファコン

ピテント大腸菌 (NEB) に形質転換した。氷上での2～3分後、200  $\mu$ lのSOC培地 (20mMのグルコースを含むSOB培地、Carl Roth) を反応バイアルに添加し、37℃で1時間インキュベートした。大腸菌細胞を、100  $\mu$ g/mlのアンプシリン (Panreac AppliChem) を含むLB寒天プレート (Luria/Miller、Carl Roth) 上にプレートし、一晚37℃でインキュベートした。DNAを単離するために、製造者の使用説明書 (GeneJET Plasmid Miniprep Kit、Thermo Fisher Scientific) に従って、Miniprepキットを使用した。DNA濃度をナノドロップで測定し、プラスミドDNAの配列を決定した。

#### 【0377】

細胞株の形質導入に使用したレンチウイルスを、リポポリプレックス (lipopolyplex) トランスフェクション (LT) 試薬Mirus LT1 (Sopachem) を使用して293T細胞中で産生した。この系を用いて、ランゲリン配列を含むRP172ベクター (BIC-PGK-Zeo-T2a-mAmetrin; EF1A) および3つの必須のプラスミド (pVSV-G、pMDL、およびpRSV) 全てを含むパッケージングミックスを293T細胞に導入した。LT系でトランスフェクションした後、293T細胞は3～4日間ウイルスを産生し、これを回収し、-80℃で凍結させて、残りの293T細胞を死滅させた。この上清を使用して、ランゲリン/RP172を種々の細胞株に形質導入した。

#### 【0378】

レンチウイルス含有上清をラージ細胞と混合し、33℃のポリブレン (Santa Cruz Biotechnology) を含む完全培地中で穏やかに遠心分離した。RP172ベクター (BIC-PGK-Zeo-T2a-mAmetrine; EF1A) は、ゼオシン抵抗カセットおよび蛍光GFP由来タンパク質mAmetrinを含む。5000個のラージ細胞の形質導入は、33℃で約90分間、1000\* $g$ でスピン感染することによって促進された。2～3日後、(部分的に) 感染した細胞をゼオシン (life technologies) 圧力に曝露して、RP172を含む細胞を選択した。形質導入細胞を、300  $\mu$ g/mlのゼオシン (life technologies) を含有する選択培地で2週間選択した。RP172の存在は、FACS (BD FACS canto II) によって測定されるmAmetrin発現によって評価される。初期のmAmetrinチェック (選択前に実施) は、感染した細胞の割合がレンチウイルス力価を測定するために極めて重要である。すべての形質導入において、初期のmAmetrinの割合を5～10%とすることを目指した。

#### 【0379】

組換えで発現される受容体をCLR特異的抗体で検出した。抗体染色のために、50000個の細胞を、(i) 1:100希釈のPE抗マウス/ヒトCD207 (4C7、Biolegend) を含む25  $\mu$ l培地と共にインキュベートしてマウスランゲリンを染色し、(ii) 1:100希釈のPE抗ヒトCD209 (9E9A8、Biolegend) を含む25  $\mu$ l培地と共にインキュベートしてDC-SIGNを染色し、(iii) 1:100希釈のPE抗マウスデクチン-1 (bg1fpj、eBioscience) を含む25  $\mu$ l培地と共にインキュベートしてmデクチン-1細胞を染色し、または(iv) 1:100希釈のPE抗マウス/IgG2a (RMG2a-62、Biolegend) またはPE抗正常マウス/IgG1 (sc-2866、Santa Cruz Biotechnology) を含む25  $\mu$ l培地と共にインキュベートしてアイソタイプ染色した。ヒトランゲリン発現細胞の細胞表面発現を染色するために、50000個の細胞を、CD207-PE複合化抗体 (DCGM4、Beckman Coulter) の1:5希釈液と共にインキュベートした。4℃で30分間インキュベーションした後、細胞を洗浄し、PE染色を、574/26フィルタ (Attune Next、life technologies) を用いて488レーザでフローサイトメトリーすることによって分析した。結果を図1に示す。

【0380】

(実施例2)

(CLR発現ラージ細胞)

造血細胞起源由来のヒトラージ細胞株を、10% FCS、100 U/mlのペニシリン・ストレプトマイシン、およびGlutaMaxを含むRPMI基本培地で増殖した。細胞を、完全増殖培地の添加または置換によって0.5~3個のMio細胞/mlの範囲に維持し、そしてHek293について記載と同じ条件下で増殖させ、維持し、観察し、そして保存した(上記参照)。DC-SIGNおよびマウスデクチン-1のcDNA ORFクローンもまた、pCDNA5/FRT/V5-His-TOPO TAベクター(Life technologies)からRP172ベクター(Koymans et al., 2016, Int. J. Mol. Sci., 17, 7, 1072)に移動し、形質導入によってラージ細胞で安定的に発現した。製造者の使用説明書に従って、Gibson Assemblyを用いてクローニングを行った(上記参照)。DNA濃度をナノドロップで測定し、プラスミドDNAの配列を決定した。ヒトランゲリン、DC-SIGN、マウスデクチン-1のラージ細胞株への形質導入は、Hek293細胞(実施例1参照)についての記載の通り実施した(実施例1参照)。組換えで発現される受容体をCLR特異的抗体で検出し、フローサイトメトリーを用いて測定した(実施例1および図2参照)。まとめると、これらの実験結果はここで用いた組換え体細胞株を説明する。

10

【0381】

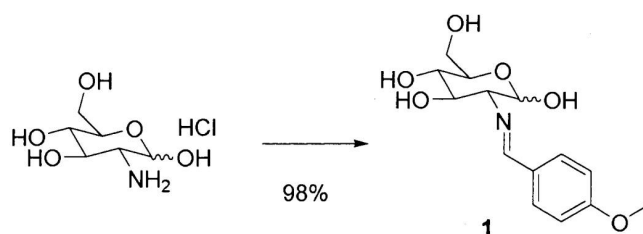
(実施例3)

(標的化リガンドの合成)

【0382】

【化12】

20

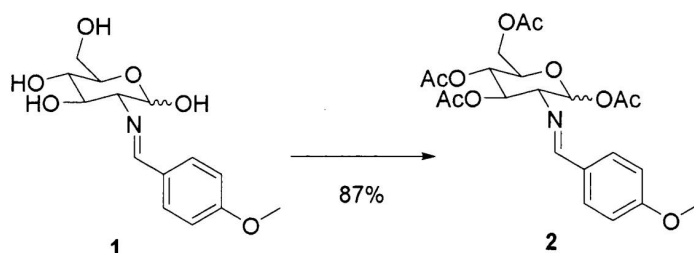


30

塩酸グルコサミン(46.4 mmol, 10 g)をNaOH水溶液(1 M, 47 ml)に0℃で溶解した。p-アニスアルデヒド(47 mmol, 5.7 ml)を5分間かけて滴加し、反応物を0℃で2時間攪拌したままにし、その間、溶液が凝固した。結晶性スラリーを吸引濾過し、H<sub>2</sub>Oおよび少量のEt<sub>2</sub>Oで洗浄し、45℃で高真空下で乾燥させ、97%収率(45.34 mmol, 13.48 g)で無色の固体として1を得た。

【0383】

【化13】



40

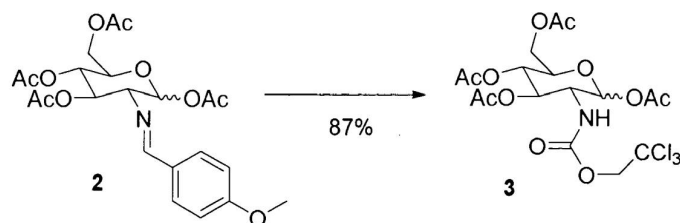
1(40.3 mmol, 11.98 g)をアルゴン下でピリジン(71 ml)に溶解し、0℃に冷却した。無水酢酸(36 ml)を攪拌しながら添加し、冷却槽を除去し、混合

50

物を攪拌下で一晩室温に温めた。混合物を氷水（240 mL）に注いだ。得られた析出物を吸引濾過し、水（350 mL）で洗浄し、高真空中で乾燥させて、2を無色の固体として87%収率（35.15 mmol、16.36 g）で得た。

【0384】

【化14】



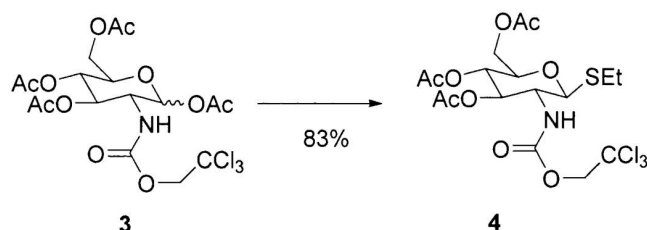
10

2（35.15 mmol、16.36 g）をビーカー（沸騰、70 mL）中の沸騰アセトン中で激しく攪拌した。7.03 mL（35 mmol）のHCl水溶液（5 M）を素早く添加した。すぐに凝固する塊を室温まで冷却し、続いて吸引濾過し、冷Et<sub>2</sub>Oで洗浄し、真空中で乾燥させた。得られた固体（35.15 mmol、11.67 g）を180 mLのピリジンに懸濁し、激しく攪拌しながら0℃に冷却した。2,2,2-トリクロロエチルクロロフォーマート（76 mmol、10.4 mL）を一度に混合物に添加し、3時間攪拌した。30 mLのメタノールを添加して過剰のTroc-Clをクエンチし、続いて混合物を真空中で濃縮した。250 mLのDCMを添加し、得られた析出物を濾過し、濾液を真空中で濃縮した。残渣を少量のDCMに再溶解し、液体クロマトグラフィーを用いて精製して、3を無色の固体として収率87%（30.61 mmol、16 g）で得た。

20

【0385】

【化15】



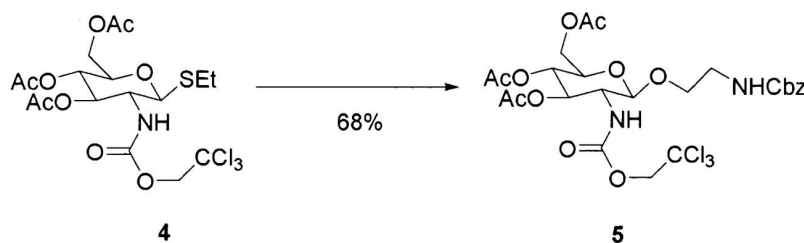
30

3（13.32 mmol、6.96 g）およびエタノール（18.64 mmol、1.38 mL）を35 mLの無水DCMにアルゴン雰囲気下で溶解し、0℃に冷却した。BF<sub>3</sub>・Et<sub>2</sub>O（18.64 mmol、2.36 mL）を5分間かけて添加し、反応物を0℃で40分間、次いで室温で4時間攪拌した。1.1 mLのNEt<sub>3</sub>を添加して反応を停止させ、混合物を真空中で濃縮した。液体クロマトグラフィーを用いた精製により、白色固体として4を83%の収率（11.05 mmol、5.8 g）で得た。

40

【0386】

【化16】

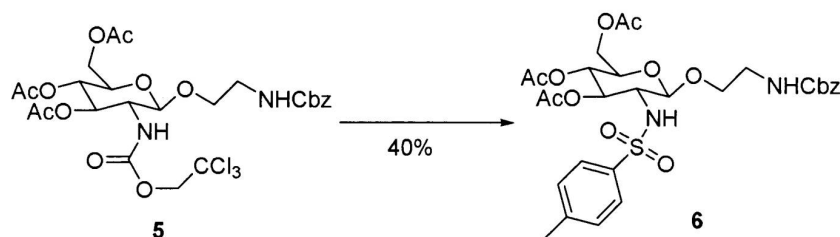


50

60 mLの無水DCM中の4 (2.48 mmol, 1.30 g) およびベンジル-2-ヒドロキシエチルカルバメート (3.96 mmol, 790 mg) の懸濁液物を、アルゴン雰囲気下で45分間攪拌した。ジメチル(メチルチオ)スルホニウムテトラフロロボレート (4.95 mmol, 1 g) を添加し、反応物を室温で一晩攪拌し続けた。溶媒を真空中で除去し、残渣を液体クロマトグラフィーにより精製して、5を白色固体として68%収率 (1.67 mmol, 1.1 g) で得た。

【0387】

【化17】

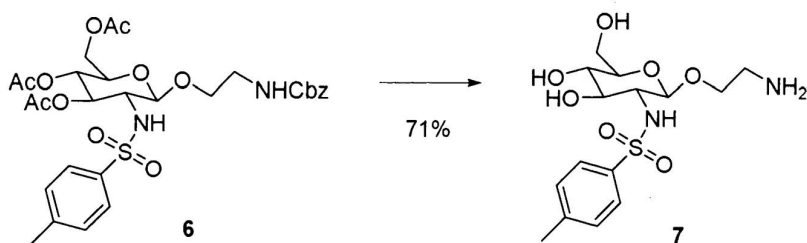


10

27 mLの酢酸中の5 (0.76 mmol, 500 mg) および新たに活性亜鉛 (6.46 g, 99 mmol) の懸濁液を4時間攪拌した。反応混合物をセライト上で濾過し、高真空中で一晩乾燥させた。次に、得られた固体をピリジン (12 mL) に溶解し、p-トルエンスルホニルクロライド (1.52 mmol, 290 mg; 12 mLのピリジンに溶解) を滴加した。反応混合物を一晩攪拌した。次いで、溶媒を真空中で除去し、残渣を液体クロマトグラフィーにより精製して、6を白色粉末として43%収率 (209 mg, 0.33 mmol) で得た。

【0388】

【化18】



30

無水メタノール (8 mL) 中の6 (0.30 mmol, 190 mg) の溶液に、ナトリウムメタノレート溶液 (c = 0.5 mM, 149 mmol, 2.98 mL) をアルゴン雰囲気下で添加し、2時間攪拌した。溶媒を真空中で除去した。得られた白色粉末を無水メタノール (30 mL) に再溶解し、30 mgのパラジウムチャコール (palladium on charcoal) (10%) を添加し、反応混合物を水素雰囲気中で一晩攪拌した。触媒をセライトで濾過し、メタノールで洗浄した。溶媒を除去し、残渣を逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製して、7を白色固体として収率71% (0.21 mmol, 80 mg) で得た。

【0389】

(実施例4)

(脂質複合体)

リガンドおよび染料を、NHS結合によってPEG-DSPEに結合させた。Alex

40

50

a Fluor 647 NHSエステル (A647、Life technologies) を、アミド結合を介してNH<sub>2</sub>-PEG-DSPE (PEG MW 2000、Sunb right) の一級アミンに結合させた。500  $\mu$ l のDMSOに溶解した脂質 (1.024 mg) を西洋梨型フラスコ中で攪拌し、500  $\mu$ l のDMSOに溶解した1 mgの染料 (1.5 当量) を脂質に滴加した。反応物を暗所において、室温で一晩攪拌した。DMSOを凍結乾燥し (アルファ2-4 LDplus、CHRIST)、反応生成物をpH 8.4の0.1 M炭酸水素ナトリウム (シグマアルドリッチ) を含む2~3 mLの緩衝液に溶解した。Slide-A-Lyzerカセット (7MWCO、0.5~3 mL、Thermo Fisher Scientific) を用いて、最初に500 mLの緩衝液に対して、2回の緩衝液交換で数時間、および一晩インキュベーションを用いて透析し、次いで、少なくとも1時間のインキュベーションによって、さらに3回、持続的に攪拌しながら、水に対して透析することによって、非複合化染料を除去した。凍結乾燥により水を除去し、最終生成物を8 mg/mLの濃度でDMSOに溶解した。グリコミメティックランゲリンリガンド、マンノース並びにマンノースポリマーは末端一級アミンを含有し、また、2 mgのリガンドを900  $\mu$ lの緩衝液に溶解し、0.125 当量の脂質を100  $\mu$ lのDMFに溶解したことを除いて、A647結合について記載したように、アミド結合を介してNHS-PEG-DSPE (PEG MW 2000、NOF Europe) に等しく結合させた。脂質を西洋梨型フラスコ中に滴加し、DMFを真空中で除去した (Heidolph)。最終生成物をDMSO-d<sub>6</sub> (Euriso-Top) に溶解し、結合効率性を、265 スキャン (400 MHz、Variant) を用いた<sup>1</sup>H-プロトン NMR分光法によって決定した。

【0390】

(実施例5)

(製剤リポソーム)

水和膜押出し法 (hydration film extrusion method) (hen et al., 2010, Blood, 115, 23, 4778-4786) により、標的化され、かつ裸のPEG化リポソームを調製した。特に明記しない限り、リポソームは、DSPE、コレステロール、リガンド-PEG-DSPE/PEG-DSPE、および染料-PEG-DSPEを、それぞれ57:38:4.75:0.25のモル比で含有した。リポソームが4.75モル%未満のリガンド複合化脂質を含む場合、リポソームは常に5% PEG化脂質の総モル比を得るためにPEG-DSPEで充填した。PEG化脂質を8 mg/mLの濃度でDMSOに溶解し、-20°Cで長期保存した。DSPE (NOF Europe) およびコレステロール (シグマアルドリッチ) を常時新たに調製し、それぞれ20 mg/mLおよび10 mg/mLの濃度でクロロホルムに溶解した。PEG化脂質をガラス管に添加し、DMSOを凍結乾燥した。次に、DSPEおよびコレステロールを添加し、クロロホルムを一晩、真空中で除去した。特に明記しない限り、乾燥した脂質膜を、1.6 mMの濃度でDPBS (カルシウムおよびマグネシウム (Life technologies) なし) で水和した。溶液を含む脂質を最初にボルテックスし、次いで3秒間超音波処理 (Ultrabath 1510、Branson) し、それを3回繰り返し、その間に短いタイムラグを挟んだ。均一な懸濁液が得られるまで、この工程を繰り返した。最初に200 nmのポリカーボネート膜を用い、次に100 nmのポリカーボネート膜を用いて (Avanti Polar Lipids)、30ストロークの細孔押出し (押出し機、Avanti Polar Lipids) によって、大きな単層リポソームを産生した。リポソーム濃度は、全脂質濃度を指す。

【0391】

(実施例6)

(リポソームの特徴付け)

粒径および安定性に関して実施例4に記載した手順に従って調製したリポソームを特徴付けるために、動的光散乱測定 (Malvern Instruments Zetasizer) を希釈リポソーム溶液 (純水中32  $\mu$ M) で行った。-35 mV~-15 mVの

間のゼータ電位、ならびに100～200 nmの間の平均粒径（%強度プロット）および0.3までの多分散性指数を示すリポソームが、さらなる使用のために可能であると考えられた。

#### 【0392】

##### （実施例7）

##### （リポソームのロードおよび精製）

リポソームの装填のためのカーゴとしていくつかのタンパク質が考案された。以下に、これらのタンパク質の組換え発現を提示し、リポソームへのロードを説明する。

#### 【0393】

2 mgのウシ血清アルブミン（BSA）（PAA）を1 mlのHBSS緩衝液（Life technologies）に溶解し、隔壁および攪拌棒を有する5 mlの西洋梨型フラスコに移した。フルオレセインイソチオシアナート（Thermo Fisher Scientific）をDMSO（1 mg/ml）に溶解し、200 μlをBSAに5 μlずつゆっくりと添加した。フラスコをアルミ箔で覆い、室温にて一晚攪拌した。反応を、50 mMエタノールアミン（シグマアルドリッチ）の最終濃度を添加することによってクエンチし、室温で1時間攪拌した。HBSS緩衝液（25 mM HEPES、Carl Roth；150 mM NaCl、Panreac AppliChem；pH 7.5）に対するSlide-A-Lyzerカセット（7 MWCO、0.5～3 ml、Thermo Fisher Scientific）で透析することにより、非複合化フルオレセインを除去した。1時間攪拌し、そしてさらに一晚インキュベーションした後、緩衝液を2回交換した。FITC複合化タンパク質のタンパク質濃度を280 nmの吸光度で測定し、結合効率性をナノドロップ（Implen Nanophotometer）を用いて495 nmで測定した。タンパク質試料を4℃で保存した。

#### 【0394】

FITC-BSAを含むDPBSを有する薄膜脂質の水和により、リポソームにFITC-BSAをロードした。FITC-BSA濃度は1～20 mg/mlの範囲であった。超音波処理および細孔押出しに続いて、リポソームを超遠心分離またはサイズ排除によって精製した。超遠心分離により遊離タンパク質を除去するために、リポソーム懸濁液を超遠心分離管（Thinwall、Ultra-Clear（商標）、4 ml、Beckman Coulter）に移した。管をDPBSで満たし、破裂を防止した。リポソームを、超遠心分離機（Optima L-80 XP Ultracentrifuge、Beckman Coulter）中で、55000 rpmで1時間、4℃で超遠心分離した。上清を除去し、ペレットをDPBSに再懸濁した。超遠心分離を2回繰り返した。サイズ排除による精製を、クロマトグラフィーカラム（Econo-column、1.5×30 cm、Bio Rad）に充填した20 mLのセファロースCLゲルろ過媒体（CL-4B、架橋、シグマアルドリッチ）を用いて行った。カラムをDPBSで平衡化した後、リポソーム溶液をカラムに装填した。リポソームおよび遊離FITC-BSAが溶出するまで、1.5 mLの画分を収集した（10～15画分）。分画後、カラムを0.1 MのNaOH中の0.5 MのNaClを含む再生緩衝液で再生し、pHが中性になるまでDPBSで平衡化し、次のリポソーム溶液をサイズ排除によって分離した。カプセル化効率をプレートリーダー（SpectraMax M5、Molecular Devices）で分析し、検量線に基づいて計算した。リポソーム濃度は、Alexa 647装飾リポソーム（ex. 640、em. 670）を介して測定し、FITC-BSA濃度は、（ex. 485、em. 525）を介して測定した。カプセル化効率は、1 mM全脂質濃度当たりで計算した。

#### 【0395】

##### （実施例8）

##### （リポソーム特徴付け）

リポソーム分散性および安定性を、前述のように測定した（実施例4～6を参照）。

#### 【0396】

FITC-BSAを利用して、タンパク質をカプセル化および精製する方法を示した。全FITC-BSAタンパク質濃度を超遠心分離後に測定した。次に、精製リボソームを細胞ベースのアッセイで試験した。FITC-BSAカプセル化リボソームをランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞と共に37℃で2hインキュベートし、内部移行を誘発した。単細胞のA647およびFITC蛍光を、フローサイトメトリーによって同時に測定した（図3を参照）。カプセル化FITC-BSAの有無にかかわらず、標的化リボソームについて以前に示したように、Alexa647の蛍光シグナルが検出されたが、より重要なこととして、FITC-BSAカプセル化リボソームについてのみFITCシグナルが検出された。FITC-BSAはカプセル化リボソームで標的化した細胞で有意に増加したが、裸のFITC-BSAカプセル化リボソームはFITCシグナルを示さなかった。超遠心分離したリボソームのリボソーム完全性をDLSによって分析した（図3（C）参照）。サイズおよびゼータ電位は、処理のリボソーム（実施例6および図5（C）を参照）またはサイズ排除によって精製されたリボソームと同様であり、これは、維持された構造完全性を示す。次に、FITC-BSAカプセル化リボソームをランゲリン<sup>+</sup>HeK293細胞と共に37℃で6時間インキュベートし、続いて、核を染色してから顕微鏡検査によって分析した（図表3（D）参照）。FITC-BSAは合剤化リボソーム染料A647と高度に共局在し、6時間後に同様のエンドソーム区画を示した。

【0397】

超遠心分離中のその高向心力を排除するために、リボソームはそれらのカーゴを上清中に放出し、より低いカプセル化効率をもたらし、サイズ排除および超遠心分離によって精製されたリボソームを、細胞ベースのアッセイにおいて比較した（図4を参照）。後者のFITC-BSAシグナルは、向心力がリボソームの完全性に影響を与えず、最も効率的な精製法に類似していると結論づけたサイズ排除により精製されたリボソームに比べてさらに高かった。その結果、特に明記しない限り、全てのさらなるリボソームを超遠心分離によって精製した。

【0398】

カプセル化効率に対するFITC-BSAの初期濃度の影響を分析するために、タンパク質濃度を20mg/ml~1mg/mlまで変化させ、カプセル化リボソームを細胞ベースのアッセイで試験した（図5（A）参照）。蛍光シグナルを合剤化染料A647に対して正規化した。最も高い蛍光シグナルが、20mg/mlのFITC-BSA製剤化リボソームで検出された。しかしながら、この蛍光シグナルは、リボソームを製剤化するために利用された初期タンパク質濃度と相関しなかった。この結果は1mg/ml~20mg/mlの間で、カプセル化効率が同様の温度範囲にあり、初期タンパク質濃度に対して非依存性であったことを示す。

【0399】

さらに、初期リボソーム濃度を変化させた。10mMを、細胞ベースのアッセイ中の1mMの再水和リボソームと比較した（図5を参照）。リボソームを20mg/mlのFITC-BSAで再水和した。FITC-BSAカプセル化リボソームと共にインキュベートした細胞のFITC蛍光は10mMおよび1mMの製剤化リボソームと非常に類似しており、これは、種々のリボソーム濃度がカプセル化効率に影響を及ぼさないことを示す。全てのリボソームを、サイズおよびゼータ電位についてDLSによって分析した（図5（C）参照）。さらに、FITC-BSAのカプセル化効率を、超遠心分離後にプレートリーダーで分析し、1mMリボソームについて計算した（図5（B））。ここでも、全ての製剤化リボソームのカプセル化効率は1mMリボソーム当たり17~95μgの間で同様であり、改善されたカプセル化効率の傾向を示さなかった。

【0400】

次に、カプセル化リボソームを用量依存的にインキュベートし、カプセル化FITC-BSAカーゴとA647標識送達ビヒクルとの間の差異を検出するために反応速度研究を行った（図6を参照）。カプセル化FITC標識タンパク質を、488nmのレーザおよび574/26nmのフィルタ（Attune Next, Life technology

10

20

30

40

50

es)を用いて測定した。これらの研究は図14(B)および図14(C)の結果を実証し、16  $\mu$ Mリポソームでは、24時間後に内部移行が飽和せず、より高濃度のリポソーム内部移行は、250  $\mu$ Mを超えるリポソームで飽和したことを再度示した。しかし、より重要なこととして、FITC-BSAカプセル化カーゴおよびA647標識リポソームがほぼ同一の用量依存的内部移行速度および高度に相関する内部移行反応速度を示し、これは、カーゴおよび送達ビヒクルが、図3(D)の顕微鏡検査によって既に見られるように、同様のプロセス経路に入ることを示した。

#### 【0401】

次いで、これらの最適化されたカプセル化方法を利用して、免疫活性EBNA1タンパク質を含むリポソームを製剤化した。モデルペプチドとしてEBNA(エプスタイン・バール核抗原)を選択した。成人集団において90%より多い有病率を有するのは、エプスタイン・バール・ウイルス(EBV)の短い免疫活性ペプチドである(Cohen, 2000, N Engl J Med, 343, 7, 481-492参照)。また、ハウスキーピングペプチドPCNA(増殖細胞核抗原)は癌の進行と関連し、免疫回避を促進すると考えられている(Rosental et al., 2011, J Immunol, 187, 11, 5693-5702)。また、ハウスキーピングペプチドPCNA(増殖細胞核抗原)は癌の進行と関連し、免疫回避を促進すると考えられている。したがって、このペプチドを陰性対照として使用した。

#### 【0402】

##### (実施例9)

##### (細菌のタンパク質発現およびEBNA1ならびにPCNAの精製)

EBNA1 BL21およびPCNA BL21大腸菌細胞をLCとして使用した(Barwell et al., 1995, J Biol Chem, 270, 35, 20556-20559参照)。タンパク質は、Hisタグおよびトロロニン認識部位に融合される。タンパク質発現のために、細胞を、50mlのLB培地(Luria/Miller, Carl Roth)中、200  $\mu$ g/mlのアンプシリンと共に、250mlの三角フラスコ内で一晩、37°Cおよび300 rpm(Max Q 4000, Thermo Fisher Scientific)で培養した。翌日、前培養物を3000gで12分間遠心分離した(Multifuge X3R Heraeus, Thermo Scientific Fisher)。ペレットを新鮮なLB培地に再懸濁した。200  $\mu$ g/mlのアンプシリンを補充した500ml培地の接種のために、20mlの前培養物を2000mlの三角フラスコに添加し、37°Cで300 rpmで振盪した。培養物を、約0.8の(600nmでの)光学密度値に到達するまで、30°Cで一晩かけての発現のために1mMのIPTGでタンパク質発現を誘導ためにインキュベートした。翌日、500mlの細菌細胞懸濁液を4000gで15分間遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットをPBSに再懸濁し、50ml管に移し、再度遠心分離し、最終的な大腸菌ペレットを-80°Cで凍結するか、またはHisタグカラム(His Trap HP, 1x1ml; GE Healthcare)でアフィニティークロマトグラフィーすることにより直接的にタンパク質精製に使用した。

#### 【0403】

組換え発現タンパク質を精製するために、大腸菌細胞を、1gの大腸菌ペレットあたり5mlの溶解緩衝液(50mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Carl Roth; 300mM NaCl, Panreac AppliChem; 10mMイミダゾール, Carl Roth; pH8)で溶解した。1mlの溶解物あたり1mgのリゾチーム(Fluka)を添加し、細胞を4°Cで30分間インキュベートした。その後、細胞を30%振幅で20秒ずつ3回、10秒の休止期間を間に挟んで超音波処理した(Bransen, Digital Sonifier)。溶解物を10000gで15分間遠心分離し、過剰発現したタンパク質を含む上清を0.45  $\mu$ mのメンブレンフィルター(Corning)で濾過して、細胞片を除去した。

#### 【0404】

組換え発現したタンパク質を、高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC, MWD2.1L Azura, Knauer)を用いて、hisタグアフィニティークロマ

10

20

30

40

50

トグラフィーにより精製し、FPLCを、結合緩衝液（ラインAにおいて：50mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300mM NaCl、10mMイミダゾール、pH8）、洗浄緩衝液（ラインBにおいて：50mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300mM NaCl、20mMイミダゾール、pH8）、蒸留水（ラインC）、および溶出緩衝液（ラインDにおいて：50mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300mM NaCl、250mMイミダゾール、pH8）で平衡化した。過剰発現したタンパク質を含む濾過上清をFPLCに注入した。上清を、1mL／分の流量および1barの最大圧力で20分間、結合緩衝液でhisトラップカラムにロードした。タンパク質濃度は、紫外線検出器を用いて280nmで測定した。洗浄緩衝液からのグラディエントを溶出緩衝液に10分間適用することによって、タンパク質を溶出する前に、ロードしたカラムを洗浄緩衝液で20分間洗浄し、1mLの画分を小反応管に集めた。さらに5分間、100%溶出緩衝液を適用して、全てのhisトラップタンパク質を溶出した。次回の実験を開始する前に、カラムを結合緩衝液で平衡化した。hisタグ化タンパク質を有する画分を収集して結合し、2mM CaCl<sub>2</sub>を含むHBS緩衝液（25mM HEPES、150mM NaCl、pH 7.5）に対してタンパク質を透析した（CelluTrans dialysis, Cral Roth）。タンパク質の質をSDS-PAGEゲルによりチェックし、タンパク質濃度をナノドロップ（Imple n Nanophotometer）により測定した。

#### 【0405】

ペプチドを大腸菌で過剰発現させた。その結果を図7に示す。細胞分解後、His融合ペプチドをhisタグアフィニティカラムで精製した（図7（A）参照）。次いで、SDS-PAGEを適用して、ペプチドの質を判定した（図7（B）参照）。装填、フロースルー、および洗浄画分を用いてペプチド精製を追跡した。次いで、PCNAおよびEBNAペプチドをFITC標識し、リポソーム中にカプセル化した。

#### 【0406】

FITC複合化EBNAタンパク質を10倍容量のトリプシンで消化し、サイズ排除により精製し、超遠心分離で濃縮したことを除いて、「リポソームのロードおよび精製」の部に記載されるように、タンパク質をロードした。他の全ての工程は、プロトコルに従った。

#### 【0407】

リポソームをDLSにより分析し、カプセル化効率を蛍光プレートリーダーにより検出した（図7（C）参照）。サイズ、ゼータ電位およびカプセル化効率は、前のリポソーム製剤の典型的な範囲にあった（図5（C）参照）。

#### 【0408】

次に、FITC-PCNAおよびFITC-EBNAの抗原をLCに送達した。LCを標的とした抗原カプセル化リポソームは、FITC-PCNAおよびFITC-EBNAによってそれぞれ56.9%および84.1%のLCによって染色したが、裸のリポソームはFITC蛍光の増加を示さなかった。これは、カプセル化リポソームを介した抗原の特異的送達を実証する。

#### 【0409】

まとめると、リポソーム中にカプセル化されたタンパク質は、特にランゲリン陽性細胞への送達であり得る。

#### 【0410】

##### （実施例10）

##### （細胞リポソーム結合・内部移行アッセイ）

モデル細胞株において重複結合パターンを有するいくつかのCLRを発現させ、リポソーム結合を分析することによって、リポソーム特異性を調べた。50000個のラージ細胞を、16μMのリポソームを含む100μLの完全増殖培地中にプレートした。リポソーム結合を測定するために、プレートを4℃でインキュベートし、一方、受容体内部移行を37℃のインキュベーションで誘導した。インキュベーション後、細胞を500gで3分間遠心分離し、上清を廃棄した。細胞を100μLの氷冷培地に再懸濁し、そして、5

10

20

30

40

50

70/20 nmのフィルタ (BD FACSCanto II、BD Biosciences) を用いた633 nmのレーザ、または670/14 nmのフィルタ (Attune Next、life technologies) を用いた654 nmのレーザ、を用いたフローサイトメトリーによって、合剤化Alexa 647染料を検出することによって分析した。

#### 【0411】

図9に示すように、裸の、GlcNTosylおよびマンノース複合化リポソームは、野生型、ランゲリン<sup>+</sup>、マウスランゲリン<sup>+</sup> (mランゲリン<sup>+</sup>)、DC-SIGN<sup>+</sup>およびマウスデクチン-1<sup>+</sup> (mデクチン-1<sup>+</sup>) の細胞へのリポソーム結合について試験した。4℃でCLR発現細胞とインキュベーションした後、リポソーム結合を検出した。合剤化A647脂質の蛍光シグナルは、ランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞へのGlcNTosyl機能化リポソームの有意な結合を示した。蛍光シグナルは46倍増加し、ランゲリン<sup>+</sup>細胞に特異的であった。マンノース機能化リポソームはランゲリン<sup>+</sup>細胞に結合することはできなかったが、有意にDC-SIGN<sup>+</sup>細胞に結合し、12倍の蛍光増加を示した。種々のリポソーム調製物と機能化GlcNTosylとのリポソーム結合は、ランゲリン<sup>+</sup>細胞への一貫した結合を示した。競合相手としてラミナリン、マンナンおよびEDTAを用いて、リポソーム結合をさらに特徴付けした。ランゲリンとDC-SIGNの一次結合部位に結合する天然リガンドマンナンは、両CLRに対するリポソーム結合を完全に消失させた。EDTAはGlcNTosyl機能化リポソームの結合を部分的に阻害し、マンノース複合化リポソームのリポソーム結合を完全に妨げた (図9 (B) 参照)。したがって、ヘパリンに影響を受けたグリコミメティックベースのリポソームは、カルシウムに依存した方法でヒトランゲリンの一次結合部位への特異的結合を示した。

#### 【0412】

##### (実施例11)

(ヘパリンに影響を受けたランゲリンリガンド機能化リポソームのリポソーム内部移行)

これまで、ランゲリン発現細胞に対するランゲリン標的化リポソームの特異的結合が検出された。しかし、免疫調整剤の送達のためには、リポソームを細胞内に内部移行させる必要がある。したがって、顕微鏡検査研究は非機能化リポソームおよび機能化リポソームを用いて行われた。レーザ走査型顕微鏡検査 (LSM) は、蛍光タンパク質または合成フルオロフォアと組み合わされて、粒子および細胞オルガネラの共局在化の検出を可能にする。細胞を、24培養ウェルプレート (Corning) 中のカバーガラス (Carl Roth) 上で培養した。細胞播種前に、カバーガラスを一晩インキュベーションし、ポリ-L-リジン (Sigma Aldrich) でコーティングした。カバーガラスをDPBSで洗浄した後、200000個の野生型またはランゲリン<sup>+</sup>HeK293細胞を500 μlの培地に播種した。24ウェルプレートを37℃および5% CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートした。翌日、特に明記しない限り、16 μMのリポソームを37℃で1時間添加した。リポソームインキュベーションの後、細胞を4%パラホルムアルデヒド (Roti-Histofix, Carl Roth) で10分間固定し、細胞膜を10 μM DiO (Thermo Fisher Scientific) で15分間染色した。核を染色するために、細胞をまず0.1%サポニン (Sigma Aldrich) で10分間透過処理し、続いて1 μg/ml DAPI (Sigma Aldrich) で5分間染色した。長期保存のために、カバーガラスを、マウンティング溶液 (Carl Roth) を用いて顕微鏡スライド (Carl Roth) 上に固定した。スライドを顕微鏡検査 (共焦点光シート顕微鏡DLS-DMi8、ライカ) によって分析した。ランゲリン標的化リポソームの内部移行は、種々の細胞焦点層をスキャンすることによって検出された (図10を参照)。リポソームは主に上部領域に位置したが、中央および下部細胞層はまた、リポソーム内部移行を裏付けるA647蛍光シグナルを示した。

#### 【0413】

次に、受容体とリガンドの相互作用を、ランゲリン機能化リポソームの結合および内部移行の反応速度を用いて、より詳細に研究した。結合反応速度は、ランゲリン<sup>+</sup>細胞への

リポソーム接着性が4時間後に飽和したことを明らかにした(図11(A)参照)。一方、内部移行反応速度は、37℃で24時間まで行われた(図11(B)参照)。インキュベーションの24時間後であっても、A647蛍光シグナルは飽和されず、ランゲリン標的化リポソームの高レベルの取り込みを示唆した。しかし、リポソーム内部移行は、より高い濃度を適用することによって限定された(図11(C)を参照)。

【0414】

以前の研究において適用された濃度(16 μM)は、図11(C)において黒矢印で示される。250 μMを超える濃度で飽和に達した。結合、取り込み、および濃度の研究は、レーザパワーをそれぞれの測定に適合させたので、直接的には比較できなかった。全ての実験において、ラージ野生型細胞への結合は観察されなかった(黒実線)。

【0415】

高いレベルのリポソーム取り込み速度を可視化および検証するために、マイクロコピー研究を行った。標的化リポソームを、ランゲリン<sup>+</sup>HeK293細胞と共に、48時間までの種々の時点インキュベートした(図12を参照)。30分後、リポソーム内部移行が既に観察された。

【0416】

24時間後、リポソームは非常に強く蓄積し、A647シグナルは完全に過飽和であった。したがって、PMT電圧は、右側パネルで目に見えて低下した。野生型HeK293細胞では、A647脂質の検出可能な蛍光シグナルが48時間後に高いPMTでも示されなかった。

【0417】

まとめると、ランゲリン発現細胞株に対する標的化リポソームの特異的結合および取り込みは、用量および時間に依存するものであることが示された。

【0418】

(実施例12)

(モデル細胞株への標的送達：モル%リガンド密度)

蛍光シグナルのリガンドモル比への依存性が検出され、標的化リガンドの濃度とランゲリン<sup>+</sup>細胞への結合効率性との間の関連性を実証した(図13参照)。

【0419】

異なるモル比を有するリポソーム製剤もまた、用量および時間に依存的にインキュベートした(図14を参照)。

【0420】

(実施例13)

(ランゲリン標的化リポソームを介するリポソーム経路選択および抗原送達)

MHCIまたはMHCI上の抗原提示の結果は、細胞内のプロセス経路に大きく依存している。したがって、リポソーム経路選択をエンドソームマーカーで分析した。リポソームの局在化を、Rab5、Rab7、Rab11、EEA1およびLamp-1に対する免疫染色で2時間のリポソームインキュベーション後、顕微鏡検査によって研究した(図15を参照)。図15(A)では、共局在は、中程度の灰色輝度を有する両チャンネルを単一の明るい灰色色調にマージすることによって可視化される。リポソームの近いまたは同一の近接から生じるほとんどの重複蛍光シグナルは、後期のエンドソーム/リソソームマーカーLamp-1で検出された。

【0421】

初期のエンドソームマーカーEEA1およびRab5ならびにリサイクリングマーカーRab11については、Lamp-1と比較して少ない共局在が検知された。結論として、リポソームインキュベーションの2時間後、ランゲリン標的化ビヒクルの大部分は後期のエンドソームおよびリソソームに位置した。しかし、リポソームは、2分および20分のより早い時点で、初期のエンドソームマーカーEEA1およびRab5と共局在化した(図16を参照)。

【0422】

10

20

30

40

50

まとめると、これらのデータは、標的化リボソームがランゲリン陽性細胞株に取り込まれ、初期のエンドソーム（2～20分）で始まるエンドソーム区画における細胞内経路選択に続いて、後期のエンドソームおよびリソソーム区画（60～120分）に移動することを実証する。

#### 【0423】

##### （実施例14）

（ヘパリンに影響を受けたランゲリン標的化リボソームのインビトロ細胞傷害性）

リボソームは、主にリン脂質およびコレステロールからなる。これらの、天然に存在し生体適合性のある化合物は、臨床試験において、リボソームの安全性が高いことを明らかにした（Immordinoら、2006、Int J Nanomedicine 1、3、297-315）。それにもかかわらず、より長いインキュベーション期間および機能化リボソームの高濃度は、細胞傷害性効果をもたらし得る。蛍光染料によって誘発される毒性を除外するために、グリコミメティックランゲリンリガンド毒性アッセイを行った。リボソームによって誘発される細胞傷害性効果を分析するために、細胞をAnnexin-Vおよび7-AADで染色した。初期および後期のアポトーシスを分析するために、10000個の細胞を50μL中の種々のリボソーム濃度で24時間のインキュベート、または16μMのリボソームを37℃および5%CO<sub>2</sub>で種々の時点でのインキュベート、を行った。陽性対照として、細胞を50%DMSOで3分間処理した。未処理細胞を陰性対照として適用した。細胞を洗浄し、1:100に希釈したAnnexin-V-FITC（Adipogen）を含む25μLの緩衝液（10mM HEPES、140mM NaClおよび2.5mM CaCl<sub>2</sub>、pH7.4）に再懸濁した。細胞を暗所にて、室温で10分間インキュベートした。洗浄後、細胞を、1μLの7-AAD溶液（Biolegend）を含む100μLの緩衝液に再懸濁し、暗所にて室温で5～10分間インキュベートした。細胞を、フローサイトメトリーによるさらなる洗浄工程なしに直接的に測定した。Annexin-Vおよび7-AADを488レーザで励起し、Alexa647を654レーザで励起した。Annexin-Vを530/30フィルタ、7-AADを695/40フィルタ、Alexa647を670/14フィルタ（Attune Next, life technologies）で検出した。スペクトルの重複を補った。ランゲリン標的化リボソームを72時間まで長期間、細胞と共にインキュベートし、続いて細胞毒性を分析した（図17参照）。

#### 【0424】

初期のアポトーシス効果は転座したホスファチジルセリンに結合するAnnexin-V染色で検出された一方、後期のアポトーシス細胞はDNAに結合し、スペクトルシフトを受ける細胞不透過性蛍光インターカラーである7-AADで染色された。7-AADはしかし、死細胞においては膜透過性である。FSC-A/SSC-Aプロットにおいて、生細胞および死細胞のゲーティングを行った際、細胞片は省略した。ダブレット識別後、Annexin-V-FITCと7-AADの染色について、二変量ヒストグラムにおいてプロットを4象限に分けて、単細胞を分析した。未処理の細胞、DMSO処理細胞、およびリボソーム処理細胞を、図17（A）に例示的に提示した。同じゲーティングストラテジーに従い、4つの象限すべての母集団の頻度（FoP）を、種々の期間でインキュベートした試料から分析した。二重陰性細胞（生細胞）、Annexin-V<sup>+</sup>細胞（初期のアポトーシス細胞）、および7-AADならびに二重陽性細胞（後期のアポトーシス細胞）のFoPを、群分けしたカラムプロットにおいて可視化した（図17（B）参照）。陰性対照を表す未処理細胞は、90%より多い生存細胞を示した。他方、DMSO処理細胞（50%DMSOで3分間）は、98%の死細胞を示す陽性対照として機能した。したがって、対照試料は、機能的アッセイを表す。72時間までの長期間においてでさえ、リボソームによって誘発される細胞傷害性効果の兆候を示さなかった。さらに、リボソーム内部移行を、合剤化A647脂質の蛍光を分析することによって追跡した（図17（C）を参照）。以前の結果と同様に、リボソーム内部移行の飽和は、24時間後よりも後に検出されなかった（図14と比較されたい）。しかし、リボソーム内部移行は48～

72時間後に飽和した。10000個の細胞を50μLの増殖培地のみにプレートしたことは注目に値する。

#### 【0425】

反応速度研究と同様に、用量依存的な毒性研究が実施された（図18参照）。ゲーティングストラテジーおよび対照試料は、以前の毒性研究におけるものと同一であった（図17を参照）。ここで、1μM～1mMのリポソーム濃度を24時間インキュベートした。インキュベーション後、前述の通り、Annexin-Vおよび7-AADの染色により、毒性を分析した。最高濃度の1mMリポソームでさえ、ランゲリン<sup>+</sup>細胞に対する毒性効果を示さなかった（図18（B）参照）。前述同様に、リポソーム内部移行は、合剤化A647脂質を用いて検出された。取り込みは、上記に示されたように、250μMを超える濃度で飽和した（図18（C）および図14（C）を参照）。

10

#### 【0426】

まとめると、標的化リポソームは、非常に高濃度で24時間適用された場合、長時間にわたっていかなる毒性も示さず、細胞死の誘発も示さなかった。

#### 【0427】

（実施例15）

（モデル細胞株への標的化送達：SNP）

（変異誘発）

N288DおよびK313I突然変異を、インビトロ部位特異的変異誘発法によりヒトランゲリンの野生型（wt）DNAに導入した。部位特異的変異誘発法のために、市販の変異誘発キット（QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit、Agilent）を使用した。全ての工程は、製造者にしたがって行った。簡潔には、部位特異的変異PCRのためのプライマーを、オンラインツールQuickChange Primer Design（Agilent）を用いて設計した。マスターミックスを調製し、それぞれの変異反応について48μLをPCR反応管に移した。1μLの10μMフォワードプライマーおよび1μLの10μMリバースプライマーを、1変異反応あたり添加した（実施例1も参照）。反応混合物をサーマルサイクラーに移し、製造者のガイドラインに従ったPCRプログラムを適用した。PCR反応後、親のメチル化DNA鎖および半メチル化DNA鎖を消化するために、1μLのDpnIを37℃で1時間添加した。次に、消化されたPCR反応を形質転換し、培養し、5-アルファコンピテント大腸菌細胞（NEB）で回収した。細胞をL-アンピシリンを含む寒天プレート上に置き、翌日、1クローン当たり2～3個の細菌コロニーを採取し、プラスミド分離のために培養した（GeneJET Plasmid Miniprep Kit、Thermo Fisher Scientific）。DNA濃度をナノドロップで測定し（Implen Nanophotometer）、プラスミドDNAの配列を決定した。2番目の変異を導入するために、変異誘発を変異プラスミドで繰り返した。

20

30

#### 【0428】

（ヒトランゲリンの関連ヌクレオチド多型へのリポソーム結合の評価）

ヒトランゲリン発現細胞へのリポソーム結合および内部移行の活性に対する多型残基の影響を判定した。関連する単一ヌクレオチド多型（SNP）を、ランゲリンの野生型cDNAに導入した。本明細書中で言及される野生型ランゲリンはV278A多型を含み、そして49.9%でヒト集団中に存在する（rs741326、National Center for Biotechnology Information（NCBI）（SNPデータベース）。ランゲリンはいくつかのSNPバリエーションを有するので、この研究においては、最も重要な多型である、二重多型N288D/K313Iに焦点が置かれた。当該二重多型は、以前の研究で提示された末端GlcNAc残基を有するグリカンに対する向上された結合親和性および6SO4-Galグリカンに対する減少した親和性を示した（J Biol Chem, 288, 52, 36762-36771）。N288D/K313I変異体は、13.5%の異型接合性を有する（それぞれ、rs13383830およびrs57302492、NCBI SNPデータベース）。二重多型N288DおよびK313I

40

50

は、ヒト集団において常時一緒に存在する。

#### 【0429】

単一変異体 N288D および二重変異体を、ランゲリンの N 末端で f l a g タグに融合させた。まず、標的化リポソームおよび裸のリポソームのリポソーム結合を、野生型ランゲリン<sup>+</sup>に対して試験し、そしてランゲリン変異体 N288D、K313I および二重変異体 N288D/K313I と比較した（図 19（A）を参照）。標的化リポソームの変異体 K313I への結合は、野生型ランゲリンと同様の範囲であった。N288D および二重変異体 N288D/K313I は、有意に向上されたリポソーム結合を示した。注目すべきは、f l a g タグも含むこれらの変異体についての増加した結合値の間の相関関係である。リポソーム結合はランゲリンの細胞表面発現に直接的に関連するので、細胞外受容体発現は抗ヒトランゲリン抗体を用いて検出した。標的化リポソームの結合について観察されるように、類似の抗体染色が検出された（図 19（B）を参照）。変異体 K313I の正規化 M F I 値は、野生型ランゲリンの M F I 値と同等であったが、N288D の M F I 値および N288D/K313I 変異体の M F I 値は有意に向上した。リポソーム結合との唯一の違いは、二重変異体と比較して N288D 変異体のより高い発現を抗体染色が示したことであった。その結果、明確な受容体発現は、抗体染色に対するリポソームの倍率変化に影響を及ぼした（図 19（C）参照）。N288D 変異体および二重変異体は、受容体発現と比較して標的化リポソームへの結合強度の有意な増加を示した。しかし、二重変異体のみが、野生型ランゲリンの 2 倍よりも高い倍率変化を有し、これは標的化リガンドに対する改善された親和性を示す。次に、リポソーム内部移行の結果に及ぼす変異体の影響を検討した。このために、リポソームを 37℃ で変異体と組み合わせて種々の期間インキュベートして、受容体内部移行を誘発した。リポソーム結合とは対照的に、最も高い M F I 値は受容体内部移行の 24 時間後に、K313I 変異体および野生型ランゲリンについて検出された。6 時間後の時点の前に、野生型ランゲリンおよび K313I 変異体はリポソーム結合の結果と同様に、より低い内部移行速度を示した。しかしながら、変異体の影響は野生型ランゲリンに関して無視できる程度であった。結果として、ランゲリンの天然に存在する N288D/K313I 多型は、リポソームの飲み込みに影響を及ぼさなかった。

#### 【0430】

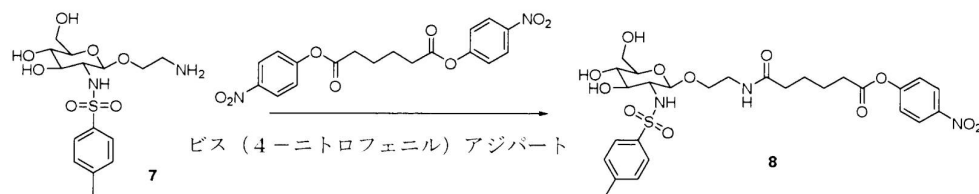
（実施例 16）

（直接的に修飾されたタンパク質のモデル細胞株への標的化送達）

（タンパク質のアミノ基と反応する反応性リガンドリンカーコンストラクトの調製）

#### 【0431】

##### 【化 19】



化合物 7（0.87 mg、2.3 μmol）を、不活性雰囲気中で、17.4 μL のトリメチルアミンの存在下、300 μL の DMSO および 43 μL のピリジンに溶解した。8.63 mg（22 μmol）のビス（4-ニトロフェニル）アジペート（193 μL の DMSO に溶解）を添加し、溶液を 3 時間攪拌した。続いて、溶媒を凍結乾燥によって除去した。残渣をトルエンで洗浄し、溶媒を真空中で除去して化合物 8 を得た。

#### 【0432】

（リガンド修飾緑色蛍光タンパク質（GFP）の調製）

緑色蛍光タンパク質（GFP）を、タンパク質の直接的リガンド修飾のためのモデルとして使用した。GFPのアミノ酸配列は以下の通りであった：

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY  
GKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMK  
QHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA EVKFEGDTL  
VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKN  
GIKVNFKIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH  
YLS TQSA LSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKA  
（配列番号 82）

175  $\mu$ L の PBS（pH 8）中の 1 mg の GFP の溶液を、1.45 mg（2.31  $\mu$ mol）の反応性化合物 8（上記の実施例 16 参照）に添加し、室温にて 23 時間攪拌した。混合物を PBS（pH 7.4）で 2.5 mL に希釈し、遠心分離した。上清を PBS（pH 7.4）に対して 4℃で 12 時間、2 回透析し、続いて溶液を 1.06 mg/mL の修飾されたタンパク質に濃縮した。

【0433】

（リガンド修飾緑色蛍光タンパク質（GFP）の特徴付け）

実施例 17 において説明した手順にしたがって得られた修飾 GFP に対するリガンドの総数を推定するために、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化（Bruker MALDI-TOF Autoflex speed）測定を、2,5-ジヒドロキシアセトフェノンマトリックスを用いて行った。元の状態の GFP およびリガンド修飾 GFP の平均分子量を比較すると、1 タンパク質分子あたり約 7 個のリガンド部分が得られた。

【0434】

（モデル細胞株への標的化送達：タンパク質のカーゴ取り込み）

次いで、機能化 GFP を、細胞ベースの結合および内部移行アッセイにおいて試験した。GlcnTosyl 機能化 GFP および非複合化 GFP の両方を、野生型または h ランゲリン<sup>+</sup> ラージ細胞とともに、4℃および 37℃で、それぞれ 1 時間または 2 時間インキュベートした（図 21 を参照）。標的化 GFP はランゲリン発現細胞に特異的に結合し、1  $\mu$ g/mL を超える濃度で飽和した（図 21（A）参照）。野生型ラージ細胞と共にインキュベートした非複合化 GFP および標的化 GFP は、増加した蛍光シグナルを示さなかった。さらに、37℃でインキュベートした標的化 GFP は、ランゲリン<sup>+</sup>細胞についても蛍光増加を示した。GFP 蛍光は結合アッセイと比較してわずかに上昇し、1  $\mu$ g/mL を超えて飽和した。

【0435】

しかしながら、リポソーム内部移行とは対照的に、GFP の取り込みはほとんど目に見えず、内部移行速度の低下または速い劣化を示した（図 21（B）参照）。

【0436】

蛍光顕微鏡検査を用いて、ランゲリン<sup>+</sup> COS-7 細胞とのインキュベーション後に、機能化 GFP および非複合化 GFP を調べた（図 16 参照）。機能化 GFP と共にインキュベートした細胞は増加した蛍光シグナルを示したが、非複合化 GFP はランゲリン<sup>+</sup>細胞に結合しなかった。37℃でわずか 5 分間インキュベーションした後、機能化 GFP を再分配し、60 分後、エンドソーム区画に位置するように見えた。0 分の時点での明確な細胞膜染色は 60 分の時点で完全に消失し、これは、GFP 内部移行を示唆する。さらに、マンナンとの結合および競合研究は、機能化 GFP が増加した結合親和性を示すことを実証した（図 22（A）を参照）。500  $\mu$ g/mL までのマンナン濃度を適用して、GlcnTosyl 機能化 GFP の結合と競合しなければならなかったが、対照的に、50  $\mu$ g/mL のマンナンは機能化リポソームと競合するのに十分であった。結合と内部移行とを区別するために、マンナンを 4℃での 4 時間のインキュベーション工程の後に添加した（図 22（A）参照）。リポソームも GFP も競合することはできず、この場合も、両方の担体が内部移行されていることを示している。しかしながら、マンナンを 37℃でより長いインキュベーション時間にわたって添加した場合、GFP 蛍光はリポソームと比較

して強く低下した（図22（B）参照）。シグナルの減少はDPBSと共にインキュベートした場合にも見られたが、マンナンの添加はその効果を向上させた。

【0437】

まとめると、約7リガンドと複合化した機能化GFPは、リガンド複合化リボソームと比べて結合親和性の増加を示した。しかし、GFP内部移行は、GlcNTosyl装飾リボソームと比較して劇的に損なわれた。

【0438】

（実施例17）

（代替ナノ粒子の標的化送達）

（リガンド修飾PMMAビーズの調製）

0.01mLのカルボキシル化ポリ（メタクリル酸メチル）ビーズ（0.5%ストック溶液、直径130nm、PolyAn）を200μLの活性化緩衝液（MES 50mM pH=5+0.001% tween）に溶解した。1.5Mの1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド水溶液を12μL、および0.3MのN-ヒドロキシスクシンイミド溶液を12μL、添加し、1時間激しく攪拌した。続いて、ビーズを結合緩衝液（HBS、pH=7、5mM  $Ca^{2+}$ ）で3回洗浄した。10mMの標的化リガンド水溶液の2μLを添加し、室温にて一晩攪拌した。修飾ビーズをエタノールアミン（結合緩衝液中1M、pH=8+0.02% tween）で2回洗浄し、続いて洗浄し、HBS緩衝液（pH=7、5mM  $Ca^{2+}$ 、0.02% Tween）と共に4℃で保存した。

【0439】

（リガンド修飾PMMAビーズのTHP-1細胞との相互作用）

さまざまな投与量（5μL、10μL、20μL）のリガンド修飾PMMAビーズ溶液（ $c = 2.5 \times 10^7$  ビーズ/mL）（実施例18に記載されるような調製物）を、50μLのTHP-1細胞懸濁液に添加した（細胞数は $2 \times 10^6$  細胞/mLであった）。氷上で45分間インキュベーションし、光を排除した後、混合物を遠心沈殿させ、120μLのパラホルムアルデヒド水溶液（4%）で固定し、最後に150μLの培地に再懸濁した。ビーズ-細胞の相互作用を、ビーズの赤色蛍光を検出するTHP1細胞について蛍光標識細胞分取（FACS）フローサイトメトリーゲートティングを用いて分析した。

【0440】

（実施例18）

（初代のランゲルハンス細胞への標的化送達）

（表皮細胞懸濁液におけるリボソーム送達）

初代の細胞は、インビボでの研究を変換する前の優れたモデルである。健康なドナーからの皮膚試料から、メスで皮下脂肪を除去した。表皮細胞懸濁液を、1.5U/mLのディスペーゼII（Roche）および0.1%トリプシン（シグマアルドリッチ）を補充したRPMI1640培地（Lonza）中で、4℃で一晩インキュベートした。他方、全皮膚細胞懸濁液は、10%FCS（Pan-Biotech）および1mg/mLコラゲナーゼIV（Worthington Biochemical Corporation）を補充したRPMI1640培地中で、37℃で一晩インキュベーションすることによって得た。剥がした表皮または全皮膚を100μmセルストレーナー（Thermo Fisher Scientific）で濾過し、単細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を、1%BSA（Serva Electrophoresis GmbH）を含むHBSS緩衝液（ $Mg^{2+}$ および $Ca^{2+}$ ；Biochrom GmbH）中の16μMリボソームと共に37℃で1時間インキュベートした。反応速度研究のために、リボソームを37℃または4℃で種々の期間インキュベートした。対照として、10mM EDTA（Lonza）を添加した。フローサイトメトリー（FACS CantoII、BD Biosciences）により細胞を分析する前に、eFluor（登録商標）780生存率染料（eBioscience）および蛍光色素複合化抗体（CD1a、クローン：HI149；CD14、クローン：HCD14；HLA-DR、クローン：L243；CD45、ク

10

20

30

40

50

ローン：HI30-Biolegend；ランゲリン、クローン：MB22-9F5-Miltenyi Biotec；アイソタイプ適合対照抗体）を使用し、細胞を4℃で15分間染色した。共焦点顕微鏡検査については、表皮細胞懸濁液をFITC複合化CD1a抗体（クローン：HI149；Biolegend）を使用し、4℃で15分間染色した。37℃で1時間のリボソームインキュベーション後、細胞を顕微鏡検査（Zeiss AxioObserver Z1）によって分析した。

#### 【0441】

初代の細胞の利用のために、表皮細胞懸濁液をヒト皮膚試料から調製し、ランゲルハンス細胞へのリボソーム結合をフローサイトメトリーによって分析した（図24（A）参照）。ランゲルハンス細胞は、CD45<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>およびCD1a<sup>+</sup>発現を介して特定された。さらに、生存率染料（eFluor780）は、死細胞（L/D）を識別する。生存CD45<sup>+</sup>造血細胞は94%HLA-DR<sup>+</sup>、CD1a<sup>+</sup>ランゲルハンス細胞を含んでいた。

#### 【0442】

97%を超える表皮ランゲルハンス細胞がランゲリン陽性であり、リボソーム上に存在するA647合剤化染料で染色された。ランゲルハンス細胞へのリボソーム結合は標的化リガンドで装飾されたリボソームに特異的であり、Ca<sup>2+</sup>依存性リボソーム結合は、10mM EDTAと競合した。この結果より、ランゲリンのCRDの一次結合部位における特異的リガンド-受容体相互作用が確認された。さらに、CD45-細胞およびCD45-、HLR-DR-細胞は、ランゲリン標的化リボソームに結合することができなかったため、リボソーム染色はLCに特異的であった（図24（B）参照）。さらに、EDTAがリボソーム結合を妨げるため、それは、細胞外に結合したリボソームを除去するためのインキュベーション工程の後にEDTAを添加することによってリボソーム内部移行を分析するための理想的なツールである（図24（C）を参照）。インキュベーション工程後のEDTAの添加は、蛍光シグナルを阻害することができず、これはリボソームが内部移行されたことを示唆し、一方、培地への直接的な添加はリボソーム結合および取り込みを完全に阻害した。さらに、リボソームを4℃でインキュベートして、リボソームが細胞表面受容体に結合した場合でさえ、内部移行を防止した。この工程は、LCへのリボソーム内部移行を確認する蛍光シグナルを完全に消失させた。リボソーム内部移行は、顕微鏡検査によってさらに検証された（図24（C）参照）。ここで、FITC複合化CD1a抗体は、表皮細胞懸濁液においてランゲルハンス細胞を染色した。標的化リボソームは、FITC標識ランゲルハンス細胞においてのみ検出された。

#### 【0443】

（全皮膚細胞懸濁液におけるリボソーム送達）

LCは、表皮における唯一のプロフェッショナル抗原提示細胞であることが知られている。他の樹状細胞株を上回る、LCに対するリボソーム特異性を示すために、ヒト皮膚試料から全皮膚細胞懸濁液を調製し、フローサイトメトリーにより分析して、リボソーム染色を検出した（図25参照）。ランゲルハンスの明確な細胞サブセットのA647蛍光をSSC-Wに対してプロットし、一方、LCのリボソーム染色を細胞外ランゲリン発現に対してプロットした。まず、CD45<sup>+</sup>、HLR-DR<sup>+</sup>、非自己蛍光（AF）細胞の18%が生存CD1a<sup>high</sup> LCとして特定され、40%の細胞はCD1a<sup>intermediate</sup>（CD1a<sup>inter</sup>）発現を含み、27%の細胞はCD1a<sup>-</sup>であり、8%はCD14<sup>+</sup>、単球およびマクロファージのマーカー、であった。生存CD1a<sup>high</sup> LC集団では、96%より多い細胞がランゲリン発現を示し、89.9%のLCが標的化リボソームを取り込んだ。CD1a<sup>inter</sup>細胞は8.3%のランゲリン<sup>+</sup>細胞を含み、4.9%の細胞はリボソーム染料で陽性染色された。リボソーム染色の大部分はランゲリン発現と相関し、標的化リボソームがランゲリンに特異的に結合したことを示した。ランゲルハンスの明確な細胞サブセット（CD45-細胞；CD45<sup>+</sup>、HLA-DR-細胞；CD45<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、AF<sup>+</sup>細胞；CD45<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>細胞；およびCD45<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CD1a<sup>-</sup>細胞を含む）は、リボソ

ームに結合することができなかった。しかしながら、単球およびマクロファージと呼ばれるCD45<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>は、裸のリポソームおよび標的化リポソームへの非特異的結合を3%未満で示した。しかし、一般に、裸のリポソームは、LCおよびLCの明確な細胞サブセットのいずれにも結合しなかった。これらの結果は、ランゲリン発現モデル細胞株を用いた我々の以前の研究を裏付ける。その結果、標的化リポソームは、ランゲリンのCRDの一次結合部位に結合することによって、Ca<sup>2+</sup>に依存的な形でランゲリン発現細胞によって特異的に内部移行される。

【0444】

要約すると、標的化リポソームは、表皮ならびに全皮膚細胞懸濁液においてランゲリン陽性細胞に特異的に送達される。

【0445】

(実施例19)

(ヒトランゲリンリガンドの生物物理学的特徴付け)

(受容体発現および精製)

(一般事項)

大腸菌におけるランゲリンおよびDC-SIGNの発現のためのコドン最適化遺伝子を、それぞれGenScriptおよびLife Technologiesから購入した。受容体発現および精製のために使用される全ての増殖培地または化学物質は、特に明記しない限り、Carl Rothから購入した。

【0446】

大腸菌における発現のためのC末端にストレプタグIIおよびTEV部位を含むランゲリンについてのコドン最適化遺伝子配列を、配列番号29によって提示する。上記配列の大腸菌発現のために、以下のプライマー配列を用いた：

【0447】

【表2】

| 名前                               | 配列 (5' から 3')                                              | 向き             | 配列番号 |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------|------|
| 切断型ランゲリン細胞外領域 (ECD) - 残基148から328 | GGTGGTCAT<br>ATGGCCTCG<br>ACGCTGAAT<br>GCCCAGATT<br>CCGG   | フォワード<br>プライマー | 30   |
| 切断型ランゲリン細胞外領域 (ECD) - 残基148から328 | ACCACCAAG<br>CTTTTATTT<br>TTCAAAC T<br>GCGGATG             | リバースプ<br>ライマー  | 31   |
| ランゲリン糖質認識領域 (CRD) - 残基193から328   | GGTGGTCAT<br>ATGGCCCAG<br>GTGGTTAGC<br>CAAGGCTGG<br>AAATAC | フォワード<br>プライマー | 32   |
| ランゲリン糖質認識領域 (CRD) - 残基193から328   | ACCACCAAG<br>CTTTTATTT<br>TTCAAAC TG<br>CGGATG             | リバースプ<br>ライマー  | 33   |

大腸菌における発現のためのC末端にストレプタグIIおよびTEV部位を含むDC-SIGNについてのコドン最適化遺伝子配列を、配列番号52によって提示する。上記配列の大腸菌発現のために、以下のプライマー配列を用いた：

【0448】

【表3】

| 名前                               | 配列 (5'から3')                                                                                                               | 向き             | 配列番号 |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------|
| DC-SIGN細胞外領域 (ECD) - 残基60から404   | GCCGCCTCT<br>AGAGAGTAA<br>TACGACTCA<br>CTATAGGGA<br>CTAGAGAAA<br>GAGGAGAAA<br>ACTAGATGG<br>CCAAAGTTC<br>CGAGCAGCA<br>TT   | フォワード<br>プライマー | 53   |
| DC-SIGN細胞外領域 (ECD)               | GGCGGCCTG<br>CAGGTACAA<br>AAAAGCAGG<br>CTACTAGT                                                                           | リバースプ<br>ライマー  | 54   |
| DC-SIGN糖質認識領域 (CRD) - 残基205から404 | CCGCCTCTA<br>GAGGAGTAA<br>TACGACTCA<br>CTATAGGGA<br>CTAGAGAAA<br>GAGGAGAAA<br>ACTAGATGG<br>CTGAACGTC<br>TGTGTCATC<br>CGTG | フォワード<br>プライマー | 55   |
| DC-SIGN糖質認識領域 (CRD)              | GGCGGCCTG<br>CAGGTACAA<br>AAAAGCAGG<br>CTACTAGT                                                                           | リバースプ<br>ライマー  | 56   |

## (ランゲリン細胞外領域)

発現および精製は、以前に公開されたように行った (Wamhoff, E.C. et al. (19) *F N m r-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands*. *ACS Chem Biol*, 11, 2407-13 (2016))。簡潔には、三量体ランゲリン細胞外領域 (ECD) を大腸菌 BL21\* (DE3) (Invitrogen) 中で不溶性に発現させた。酵素による細胞分解後、封入体を回収し、続いて可溶化した。試料を遠心分離し、ランゲリン ECD を急速希釈により一晩リフォールディングした。次に、試料を一晩透析し、遠心分離し、マンナン-アガロースアフィニティークロマトグラフィー (Sigma Aldrich) によって精製した。<sup>19</sup>F R<sub>2</sub> フィルタ NMR および脂質-酵素結合レクチンアッセイ (脂質-ELLA) 実験のために、緩衝液を、7 kDa サイズ排除脱塩カラム (Thermo Scientific) を使用して、pH 7.8 で、150 mM NaCl および 5 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 25 mM Tris に交換した。STD NMR 実験のために、ランゲリン ECD 試料を、水に対して少なくとも 8 時間、5 回透析した。続いて、水を凍結乾燥により除去し、残渣を -80 °C で保存した。STD NMR 実験を行い、ランゲリン ECD を、100% D<sub>2</sub>O、150 mM NaCl および 5 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 25 mM Tris-d<sub>11</sub> (Eurisotope) に pH 7 で溶解した。ランゲリン ECD の濃度は、紫外分光法 (A<sub>280</sub>, 0.1% = 2.45) によって決定した。ランゲリン ECD 試料の純度と単分散性を SDS PAGE と DLS で分析した。

【0449】

(ランゲリンおよびDC-SIGN糖質認識領域)

発現および精製は、以前に公開されたように行った。簡潔には、単量体 $^{15}\text{N}$ 標識ランゲリンおよびDC-SIGN糖質認識領域(CRD)を、大腸菌BL21\*(DE3)(Invitrogen)中で不溶性に発現させた。酵素による細胞分解後、封入体を回収し、続いて可溶化した。試料を遠心分離し、ランゲリンおよびDC-SIGN CRDを急速希釈により一晩リフォールディングした。次に、試料を一晩透析し、遠心分離し、StrepTactinアフィニティークロマトグラフィー(Iba)によって精製した。さらなる一晩の透析工程の後、試料を遠心分離し、緩衝液を、 $^{19}\text{F}$   $\text{R}_2$ フィルタおよび $^{15}\text{N}$  HSQC NMR実験のための7 kDaサイズ排除脱塩カラム(Thermo Scientific)を使用して、pH 7.0の150 mM NaClを含む25 mM HEPESに交換した。ランゲリンおよびDC-SIGN CRDの濃度は、紫外分光法( $A_{280}$ , 0.1% = 3.19および $A_{280}$ , 0.1% = 2.98)によって決定した。ランゲリンおよびDC-SIGN CRD試料の純度と単分散性をSDS PAGEとDLSで分析した。

【0450】

( $^{19}\text{F}$   $\text{R}_2$ フィルタNMR)

(一般事項)

$^{19}\text{F}$   $\text{R}_2$ フィルタNMR実験をPremium Compact 600 MHz分光計(Agilent)で行なを行った。スペクトルをMestReNovaで処理し、Origin Pro (Mestrelab Research, Mestrenova, 11.0.2. (2016); OriginLab, Originpro, 9.1. (2015)) でデータ分析を行った。ランゲリンECDとの実験は、10%  $\text{D}_2\text{O}$ 、150 mM NaCl、および5 mM  $\text{CaCl}_2$ を含む25 mM Tris中、50  $\mu\text{M}$ の受容体濃度で、pH 7.8および25°Cで行った。DC-SIGN CRDとの実験は、10%  $\text{D}_2\text{O}$ 、150 mM NaCl、および5 mM  $\text{CaCl}_2$ を含む25 mM HEPES中、50  $\mu\text{M}$ の受容体濃度で、pH 7.0および25°Cで行った。TFAは、50  $\mu\text{M}$ の濃度で内部標準として機能した。レポーターリガンドについての見かけの緩和率 $R_{2,\text{obs}}$ は、以前に公開されたようなCPMGパルスシーケンスを用いて決定した(Wamhoff, E.C. et al. (19)F Nmr-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. ACS Chem Biol, 11, 2407-13 (2016); Carr, H.Y. & Purcell, E.M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. Phys Rev, 94, 630-638 (1954); Meiboom, S. & Gill, D. Modified Spin - Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. Rev Sci Instrum 29, 688-691 (1958))。

【0451】

(DC-SIGNについてのアッセイ開発)

DC-SIGNについての $^{19}\text{F}$   $\text{R}_2$ フィルタNMRレポーター置換アッセイは、ランゲリンのために以前に公開された手順にしたがって開発された(Wamhoff, E.C. et al. (19)F Nmr-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. ACS Chem Biol 11, 2407-13 (2016))。簡潔には、結合状態 $R_{2,\text{b}}$ における $K_D$ 値と緩和率は、3つの独立した滴定実験におけるレポーターリガンド24の5つの濃度 $[L]_T$ で決定した。連続希釈により試料を調製した。10 mM EDTAを追加することで、DC-SIGNとレポーターリガンドの相互作用の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性を実証した。 $K_D$ と $K_I$ 判定の方程式の妥当性を保証するために、受容体の存在下で0.1 mMのレポーターリガンド濃度で $^{19}\text{F}$  NMR緩和分散実験により化学交換寄与 $R_{2,\text{ex}}$ を推定した。

【0452】

( $K_i$ 判定)

$K_i$ 値は、ランゲリンについて以前に公開されたように判定した(Wamhoff, E.C. et al. (19)F NMR-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. ACS Chem Biol 11, 2407-13 (2016))。簡潔には、滴定実験は、5つの競合濃度 $[I]_T$ で、0.1 mMのレポーターリガンド24の濃度で行った。連続希釈により試料を調製した。酸Glc

NS、GlcNAc-6-OSおよびGlcNS-6-OSについて、pH値を観察し、必要に応じて7.8に調整した。

【0453】

(<sup>15</sup>N HSQC NMR)

(一般事項)

<sup>15</sup>N HSQC NMR実験を、Ascend 700 MHz分光計 (Bruker) (Bodenhausen, G. & Ruben, D.J. Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy. Chem Phys Lett 69, 185-189 (1980)) で行った。スペクトルをNMRPipeで処理した (Delaglio, F. et al. Nmrpipe: A Multidimensional Spectral Processing System Based on Unix Pipes. J Biomol NMR 6, 277-93 (1995))。データ分析はCCPN Analysis、MatLab、およびOriginPro (OriginLab. Originpro. 9.1. (2015); Vranken, W.F. et al. The Ccpn Data Model for NMR Spectroscopy: Development of a Software Pipeline. Proteins, 59, 687-96 (2005); MathWorks. Matlab. 9.0. Natick, U.S.A. (2016)) を用いて行った。ランゲリンCRDとの実験は、10% D<sub>2</sub>O、150 mM NaCl、および5 mM CaCl<sub>2</sub>を含む25 mM HEPES中、100 μMの受容体濃度で、pH 7.8および25℃で行った。DSS-d<sub>6</sub>は100 μMの濃度においての内部標準として機能した。スペクトルは、内部分光計リファレンスを介して参照した。スペクトルは、3 mm試料管中の150 μL試料について、128増分および32走査／増分で取得した。緩和遅延d<sub>1</sub>を1.4秒に設定し、取得時間t<sub>acq</sub>を100 msに設定した。W5 Watergateパルスシーケンスを溶媒抑制に使用した (Liu, M. et al. Improved Watergate Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. J Magn Reson 132, 125-129 (1998))。ランゲリンCRDについて使用された共鳴割当ては、以前に公開されている (Hanske, J. et al. Intradomain Allosteric Network Modulates Calcium Affinity of the C-Type Lectin Receptor Langerin. J Am Chem Soc, 138, 12176-86 (2016))。

【0454】

(K<sub>D</sub>判定)

K<sub>D</sub>値は6リガンド濃度 [L]<sub>T</sub>の滴定実験で決定した。連続希釈により試料を調製した。リガンドを用いた滴定時に観察された高速または高速～中間交換レジームにおけるランゲリンCRD共鳴についての化学シフト摂動CSPを、方程式1を介して計算した (Williamson, M.P. Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc 73, 1-16 (2013))。

【0455】

【数1】

$$CSP = \sqrt{\frac{\delta(^1H) + (0.15\delta(^{15}N))^2}{2}}$$

方程式 1

0.02 ppmの標準偏差σが、ランゲリンCRDを用いた<sup>15</sup>N HSQC NMR実験における化学シフトの測定のために予め決定された (Hanske, J. et al. Intradomain Allosteric Network Modulates Calcium Affinity of the C-Type Lectin Receptor Langerin. J Am Chem Soc, 138, 12176-86 (2016))。従って、最も高いリガンド濃度で2σの閾値よりも高いCSP値を示す帰属された共鳴のみを、包括的な2パラメータフィットにおける方程式2によるK<sub>D</sub>値の決定のために選択した (Williamson, M.P. Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 73, 1-16 (2013))。標準誤差は、フィッティング手順から直接

得た。さらに、 $^1\text{H}$ または $^{15}\text{N}$ ディメンションのいずれかの滴定で、 $10\text{Hz}$ より大きい線幅拡大 $\Delta\nu_{0.5}$ を表示する共鳴は、 $K_D$ 値の決定のために考慮されなかった。 $\text{CSP}_{\text{max}}$ は、結合部位の飽和時に観測される $\text{CSP}$ 値を表す。

【0456】

【数2】

$$\text{CSP} = \text{CSP}_{\text{max}} p_b$$

と

$$p_b = \frac{[P]_T + [L]_T + K_D - \sqrt{([P]_T + [L]_T + K_D)^2 - 4[P]_T[L]_T}}{2[P]_T}$$

10

方程式2

滴定時に遅い交換レジームであると推定される共鳴について、 $K_D$ 値は、それぞれランゲリンCRDの結合状態と遊離状態に対応する積分 $V_b$ と $V_f$ から導出された。 $V$ 値は、方程式3を介して受容体 $p_b$ の結合画分を計算する機能を果たした。積分 $V$ は、N末端K347の積分 $V$ を介して正規化され、方程式3を介して受容体 $p_b$ の結合画分を計算する機能を果たした。これらの計算のために、結合状態を帰属することができる共鳴のみを考慮した。低SNRを示す選択されたデータ点またはベースライン補正に関する問題は、外れ値として扱われ、 $p_b$ 値の決定のために考慮されなかった。次に、平均 $p_b$ 値への方程式3の1パラメータフィットは、 $K_D$ 値を決定するために機能した。

20

【0457】

【数3】

$$\frac{V_b}{V_b + V_f} = p_b$$

と

$$p_b = \frac{[P]_T + [L]_T + K_D - \sqrt{([P]_T + [L]_T + K_D)^2 - 4[P]_T[L]_T}}{2[P]_T}$$

30

方程式3

結合モード分析。共鳴帰属に基づいて、最大リガンド濃度 $[L]_T$ で観察された $\text{CSP}$ 値を、B因子値の置換を介して、Matlab's Bioinformatics Toolboxを使用して、ランゲリンCRD (PDBコード: 4N32) のX線構造上にマッピングした (Feinberg, H. et al. Common Polymorphisms in Human Langerin Change Specificity for Glycan Ligands. J Biol Chem, 288, 36762-71 (2013); MathWorks. Bioinformatics Toolbox. 4.7. Natick, U.S.A. (2016))。得られた $\text{CSP}$ パターンは、GlcNAcとの複合体におけるランゲリンCRDの鎖Bを用いてMOEにて可視化した (ChemicalComputingGroup. Molecular Operating Environment. 2016.08. Montreal, Canada (2016))。モデルの質は、MOE's Structure Preparation、続いてプロトン化状態のシミュレーションおよびMOE's Protonate 3Dとの複合体の水素結合ネットワークを用いて維持した。受容体表面をConnolly提示 (Connolly representation) で可視化した (Connolly, M. L. The Molecular Surface Package. J Mol Graph, 11, 139-41 (1993))。

40

【0458】

50

## (STD NMR)

## (一般事項)

STD NMR実験は、Premium Compact 600 MHz分光計 (Agilent) で行った (Mayer, M. & Meyer, B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed*, 38, 1784-1788 (1999))。スペクトルをMestReNovaで処理し、OriginProでデータ分析を行った (Mestrelab Research. Mestrenova. 11.0.2. (2016): OriginLab. Originpro. 9.1. (2015))。ランゲリンECDとの実験を、100% D<sub>2</sub>O、150 mM NaClおよび5 mM CaCl<sub>2</sub>を含む25 mM Tris-d<sub>11</sub> (Eurisoisotope) 中、50 μMの受容体濃度で、pH 7.8および25°Cの実験で行った。受容体の無い状態で実験を繰り返し、リガンドの直接飽和によるSTD効果を排除した。0.1 mMでの残留水またはTSP-d<sub>6</sub>は内部標準として機能した。スペクトルは、500 μLの試料体積で5 mmの試料管中で記録した。多様な飽和時間 $t_{sat}$ で一連の50 ms ガウスパルス介して飽和を実施した。オン共鳴照射周波数 (on-resonance irradiation frequency)  $\nu_{sat}$ は0.0 ppmに設定され、オフ照射周波数 (off-resonance irradiation frequency)  $\nu_{ref}$ は80.0 ppmに設定された。取得時間 $t_{acq}$ を2.0秒に設定し、DPFGSEパルスシーケンスを溶媒抑制に利用した (Hwang, T.L. & Shaka, A.J. Water Suppression That Works - Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J Magn Reson*, 112, 275-279 (1995))。T<sub>1</sub>, rhoフィルタを用いて、35 ミリ秒の緩和時間 $\tau$ で受容体共鳴を抑制した。

## 【0459】

## (エピトープマッピング)

16についての結合エピトープを、500 μMの濃度で決定した。それぞれのスペクトルについて、512回の走査を記録した。緩和遅延 $d_1$ を6秒に設定し、スペクトルを0.25~6.00秒の範囲で変化させた5つの異なる飽和時間 $t_{sat}$ で記録した。方程式4は、対応するオン共鳴スペクトルおよびオフ共鳴スペクトルから分析した各共鳴についてのSTD効果STDを導出するために機能した (Mayer, M. & Meyer, B. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR to Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *J Am Chem Soc*, 123, 6108-17 (2001))。I<sub>0</sub>はオフ共鳴スペクトルにおける共鳴の積分値を表し、I<sub>sat</sub>はオン共鳴スペクトルにおける共鳴の積分値を表す。

## 【0460】

## 【数4】

$$STD = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0}$$

方程式4

見かけの飽和速度 $k_{sat}$ および最大STD効果STD<sub>max</sub>は、2パラメータフィットにおいて方程式5から導出された (Angulo, J. & Nieto, P.M. Std-Nmr: Application to Transient Interactions between Biomolecules-a Quantitative Approach. *Eur Biophys J*, 40, 1357-69 (2011))。標準誤差は、フィッティング手順から直接得た。これらのパラメータを用いて、方程式6を介してSTDビルドアップ曲線STD<sub>0</sub>の初期勾配を計算した。STD<sub>0</sub>値を正規化し、対応するリガンド構造上にマッピングした。多重線の少なくとも一部が単離された共鳴のみが、エピトープマッピングのために考慮された。

## 【0461】

## 【数5】

$$STD = STD_{max}(1 - e^{k_{sat}t_{sat}})$$

方程式 5

【 0 4 6 2 】

【数 6】

$$STD'_0 = STD_{max}k_{sat}$$

方程式 6

(分子モデリング)

(一般事項)

分子モデリング手順は、MOEで行った (ChemicalComputingGroup. Molecular Operating Environment. 2016.08. Montreal, Canada (2016))。既定のオプションおよびパラメータからの偏差が記録されている。AMBER 10: EHT力場が、ドッキングポーズおよび水素結合ネットワークの改善のために選択され、一方、MMFF 94 x 力場はジェネレーションコンフォーマ (generation conformer) に利用された (Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Crowley, M., R.C.Walker, Zhang, W., Merz, K. M., B.Wang, Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolossvary, I., K.F.Wong, Paesani, F., Vanicek, J., X.Wu, Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Sagui, C., Babin, V. and P.A. Kollman. Amber. 10. San Francisco, U.S.A. (2008); Gerber, P.R. & Muller, K. Mab, a Generally Applicable Molecular Force Field for Structure Modelling in Medicinal Chemistry. J Comput Aided Mol Des, 9, 251-68 (1995); Halgren, T.A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of Mmff94. J Comput Chem, 17, 490-519 (1996))。受容体表面を Connolly 提示で可視化した (Connolly, M.L. The Molecular Surface Package. J Mol Graph, 11, 139-41 (1993))。

【 0 4 6 3 】

(ファーマコフォアモデルの開発とランゲリン複合体の調製)

GLcNAc との複合体におけるランゲリン糖質結合部位の構造アラインメントを行った (PDBコード: 4N32) (Feinberg, H. et al. Common Polymorphisms in Human Langerin Change Specificity for Glycan Ligands. J Biol Chem, 288, 36762-71 (2013))。この可視化に基づいて、GLc スキャフォールドの O3、O4 および O5 についての特徴を有するファーマコフォアモデルを定義した。半径  $r$  が  $0.5 \text{ \AA}$  の球によって O3 と O4 上の空間的制約を定義したが、O5 の位置は半径  $r$  が  $1.0 \text{ \AA}$  の球によって制約された。GLcNAc との複合体におけるランゲリン CRD の鎖 B は実施した分子ドッキング研究の構造的基礎として機能した。さらに、Gal-6-OS とのランゲリン複合体について観察された K313 についての代替的な配座をモデル化し、研究に含めた (Feinberg, H. et al. Structural Basis for Langerin Recognition of Diverse Pathogen and Mammalian Glycans through a Single Binding Site. J Mol Biol, 405, 1027-39 (2011))。総合的なモデルの質およびタンパク質形状を、MOE's Structure Preparation を用いて評価し、維持した。次に、複合体のプロトン化状態および水素結合ネットワークを、MOE's Protonate 3D を用

いてシミュレーションし、続いて全ての溶媒分子を除去した。

【0464】

(分子ドッキング)

16に対する配座は、MOE's Conformation Importを利用して生成された。ファーマコフォアベースの配置方法を利用して、ロンドン $\Delta G$ 関数を使用してスコア付けしたドッキングポーズを生成した。高得点のポーズを、分子力学シミュレーションを利用して改善し、GBIV/WSA  $\Delta G$ 関数を用いて再スコア化し、ファーマコフォアモデルを用いてフィルタリングし、そして出力データベースに書き入れた (Corbeil, C.R., Williams, C.I. & Labute, P. Variability in Docking Success Rates Due to Dataset Preparation. *J Comput Aided Mol Des*, 26, 775-86 (2012))。側鎖原子にB因子由来のテザーを導入することにより、糖質結合部位の配座柔軟性を説明した。改善したドッキングポーズを、それらのGBIV/WSA  $\Delta G$ スコアにしたがってランク付けし、実施した $^{15}\text{N}$  HSQCおよびSTD NMR実験との関連において視覚的に評価した。

【0465】

(実施例20)

(ヘパリン由来単糖は、グリコミメティックリガンドデザインについての好ましいスキヤフォールドを表す)

病原体認識受容体としての機能以外に、ランゲリンはヘパリンを含むグリコサミノグリカンなどの自己抗原と相互作用する (Munoz-Garcia, J.C. et al. Langerin-Heparin Interaction: Two Binding Sites for Small and Large Ligands as Revealed by a Combination of NMR Spectroscopy and Cross-Linking Mapping Experiments. *J Am Chem Soc*, 137, 4100-10 (2015); Hanske, J. et al. Calcium-Independent Activation of an Allosteric Network in Langerin by Heparin Oligosaccharides. *ChemBioChem*, accepted (2017); Zhao, J. et al. Kinetic and Structural Studies of Interactions between Glycosaminoglycans and Langerin. *Biochemistry* (2016))。これらの線形多糖は、ガラクトースまたはウロン酸および差次的に硫酸化されたN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) からなる二糖繰り返し単位から構成される。ヘパリン由来三糖について最近報告されたマンノース (Man) ( $K_D$  = 約4 mM) を超える10倍親和性増加 ( $K_D$  =  $0.49 \pm 0.05$  mM) に鑑みて、リガンド観察 $^{19}\text{F}$   $R_2$  フィルタNMR実験 (ligand-observed  $^{19}\text{F}$   $R_2$ -filtered NMR experiment) を用いて、差次的硫酸化GlcNAc誘導体のセット (図27Aを参照) に対する $K_i$ 値を決定した (図27A) (Holla, A. & Skerra, A. Comparative Analysis Reveals Selective Recognition of Glycans by the Dendritic Cell Receptors Dc-Sign and Langerin. *Protein Eng Des Sel*, 24, 659-69 (2011); Munoz-Garcia, J.C. et al. Langerin-Heparin Interaction: Two Binding Sites for Small and Large Ligands as Revealed by a Combination of NMR Spectroscopy and Cross-Linking Mapping Experiments. *J Am Chem Soc*, 137, 4100-10 (2015); Wamhoff, E.C. et al. (19)F NMR-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. *ACS Chem Biol*, 11, 2407-13 (2016))。興味深いことに、グルコサミン-2-スルフェート (GlcNS) ( $K_i$  =  $1.4 \pm 0.2$  mM)、N-アセチルグルコサミン-6-スルフェート ( $K_{iE}$  =  $0.6 \pm 0.1$  mM) およびグルコサミン-2-スルフェート-6-スルフェート (GlcNS-6-OS) ( $K_i$  =  $0.28 \pm 0.06$  mM) の親和性は、Glc ( $K_i$  =  $21 \pm 4$  mM)、GlcNAc ( $K_i$  =  $4.1 \pm 0.7$  mM) およびMan ( $K_i$  =  $4.5 \pm 0.5$  mM) を含むヘパリン由来のオリゴ糖および他の単糖について観察されたものと同等またはより高かった (図30および図39参照) (Hanske, J. et al. Calcium-Independent Activation of an Allosteric Network in Langerin by Heparin Oligosaccharides. *ChemBioChem*, 2017)。

【0466】

特定された最も強力な単糖を代表するGlcNS-6-OSは、C2およびC6におけ

る硫酸化について相加的な構造と活性との相関 (SAR) を示した。この親和性増加はX線結晶学によって以前に示されたように、K299およびK313との塩橋の形成に基づく (Porkolab, V. et al. Rational-Differential Design of Highly Specific Glycomimetic Ligands: Targeting Dc-Sign and Excluding Langerin Recognition. ACS Chem Biol (2018))。GlcNS-6-OSは、ランゲリン-GlcNAc複合体と比較して、Glcスキャフォールドの配向の変化を示した (図27 (B)) (Feinberg, H. et al. Common Polymorphisms in Human Langerin Change Specificity for Glycan Ligands. J Biol Chem, 288, 36762-71 (2013))。一方、GlcNAcについて、Glcよりも観察された親和性増加は、K299との水媒介水素結合の結果である。重要なこととして、これらの相互作用のいずれかは、硫酸基のスルホンアミドリンカーでの生物学的等価性の置換を介して、グリコミメティックリガンドデザインのために活用され得る。特に、GlcNSアナログの合成は、好ましい相互作用について糖質結合部位を調査するための実行可能な断片成長アプローチを表す (図27 (A) 参照)。これらの特性により、硫酸化GlcNAc誘導体は、グリコミメティックランゲリンリガンドの設計のための好ましいスキャフォールドである。

【0467】

(実施例21)

(小さな芳香族スルホンアミド置換基により、グリコミメティックは、ランゲリンについての強力な標的化リガンドとなり、また、DC-SIGNに対する特異性を提供する)

GlcNAcについて観察されたGlcスキャフォールド配向の保存を想定した上で、C2中の小さな芳香族置換基は、K299およびK313とのカチオン- $\pi$ 相互作用、またはF315およびP310とのそれぞれ $\pi$ - $\pi$ 相互作用およびH- $\pi$ 相互作用、の形成によって親和性を増大させると仮定された (図27 (B) 参照)。従って、差次的に置換されたフェニル環を有するGlcNSアナログ1~5のパネルを調製し、続いて $K_i$ 値を判定した (図39参照)。GlcNAcを超える増加した親和性が、全てのアナログについて観察され、最も強力なパネルメンバーである2 ( $K_i = 0.32 \pm 0.05$  mM) について13倍の親和性増加を伴った (図29、図31および図39を参照)。アナログは、1について得られた $K_i$ 値 ( $K_{i1} = 0.37 \pm 0.04$  mM) によって例示されるように、親和性増加に実質的に寄与しないフェニル環のパラ位のメチル基を有する。

【0468】

複雑性が低いにもかかわらず、2は、LCとは異なるDCサブセットについての標的化リガンドとして以前に適用されたグリカンのもより優れた親和性を示す (Fehres, C.M. et al. Cross-Presentation through Langerin and Dc-Sign Targeting Requires Different Formulations of Glycan-Modified Antigens. J Control Release, 203, 67-76 (2015))。ここで、血液群抗原Le<sup>x</sup> ( $K_D$ , DC-SIGN = 約1 mM) は、単離された真皮DCによるリポソームのDC-SIGN依存性内部移行を促進して、インビトロでT細胞を活性化することが実証された (Pederson, K., Mitchell, D.A. & Prestegard, J.H. Structural Characterization of the Dc-Sign-Lex Complex. Biochemistry, 53, 5700-5709 (2014))。これらの報告によって推奨され、2は、標的化リガンド15を生じるために、GlcスキャフォールドのC1の $\beta$ 配向におけるエチルアミノリンカーの導入を介した標的化送達適用に向けて進められた (図27 (A) を参照)。

【0469】

アミノ基のアセチル化の後、モデルリガンド16を得た (図27 (A))。16 ( $K_i = 0.24 \pm 0.03$  mM) についての $K_i$ 値の判定により、Manベース参照分子21 ( $K_i = 1.0 \pm 1$  mM) よりも42倍の親和性の増大が示された (図27 (A) および27 (C) および図29)。これらの親和性を実証し、認識プロセスへの見識を広げるために、オルソゴナルなタンパク質が確認された<sup>15</sup>N HSQC NMR実験を実施した (図27 (D) および28 (A)、図29、ならびに図32)。特に、16の添加時に化学シフト摂動 (CSP) を示す共鳴のかなりの割合はまた、10 Hzを超える線幅拡大 $\Delta\nu_0$ .5を示し、中間交換現象を示した。従って、これらの共鳴は $K_D$ 判定のために考慮されな

かった。同時に、遅い交換現象が、Y 2 5 1、I 2 5 3、N 2 9 7 および K 2 9 9 に対応するセットの共鳴について観察された（図 2 7（A））。高速と低速の両方の交換ピークの分析により、1 6（ $K_D, fast = 0.23 \pm 0.07 \text{ mM}$ 、 $K_D, slow = 0.3 \pm 0.1 \text{ mM}$ ）ならびに 2 1（ $K_D = 1.2 \pm 1 \text{ mM}$ ）について得られた  $K_i$  値に相当する親和性が明らかになった（図 2 7（D）、図 2 9、図 3 2）。同様に、 $^{15}\text{N}$  HSQC NMR（ $K_D, fast = 0.46 \pm 0.04 \text{ mM}$ 、 $K_D, slow = 0.5 \pm 0.2 \text{ mM}$ ）を用いて 2 の親和性を実証した（図 2 9 および 図 3 3）。

【0 4 7 0】

次に、DC-SIGN に対して、標的化リガンド 1 6（図 2 7 A 参照）の特異性が調査されたが、オフターゲット親和性により、アプローチの効率性が低下し、潜在的に悪影響が誘発されることを示唆される。このために、 $^{19}\text{F}$  R<sub>2</sub> フィルタ NMR レポーター変位アッセイを DC-SIGN（）に移した。1 6（ $K_i, DC-SIGN = 1.5 \pm 3 \text{ mM}$ ）は、6 3 倍の特異性に対応するランゲリンと比較して、DC-SIGN についてかなり減少した  $K_i$  を示した（図 2 7（C）および 図 2 9）。同時に、2 1 は、ランゲリン（ $K_i, DC-SIGN = 2.7 \pm 0.3 \text{ mM}$ ）に対して DC-SIGN について 3. 7 倍の特異性を示した。2（ $K_{iI}, DC-SIGN = 1.7 \pm 1 \text{ mM}$ ）および Man（ $K_i, DC-SIGN = 3.0 \pm 0.3 \text{ mM}$ ）について決定された親和性との対比により、これらの CLR による  $\alpha$ -グリコシドおよび  $\beta$ -グリコシドの差分的認識が特異性に寄与することが示された（図 2 9）。

【0 4 7 1】

（実施例 2 2）

（NMR と分子モデリングの見識から導かれた結合モード分析：芳香族スルホンアミド置換基による  $\pi$ - $\pi$  相互作用と水素結合の形成は、ランゲリンの親和性増加を実現する）  
モデルリガンド 1 6 の結合モードを調べるために（図 2 7 A 参照）、 $^{15}\text{N}$  HSQC および STD NMR 実験を分子ドッキング研究と組み合わせた（図 2 8（A）～2 8（E））。ここで、リンカーの配向は、リポソーム上の標的化リガンド 1 5 の提示との結合モードの適合性を評価するために特に興味深いものであった。

【0 4 7 2】

1 6 の滴定（図 2 7（A）参照）は E 2 8 5 および K 2 9 9 について CSP を誘導し、グリコミメティックの Glc スキャフォールドの標準的な  $\text{Ca}^{2+}$  依存性結合モードについてのさらなるエビデンスを提供した（図 2 8（B）および 2 8（C））。これらのタンパク質が確認された NMR 実験はさらに、F 3 1 5 および N 3 0 7 に近接した残基についての強い CSP を明らかにした。特に、両方の残基は、おそらく可撓性の長ループ（long loop）との関連のために、帰属することができなかった（Hanske, J. et al. Intradomain Allosteric Network Modulates Calcium Affinity of the C-Type Lectin Receptor Langerin. J Am Chem Soc 138, 12176-86 (2016)。この効果は、図 2 7（A）からの Man アナログ 2 1 での滴定と比較して、K 3 1 3 についての CSP の減少を伴う（図 3 2 および 3 4）。両方の観察は、図 2 7（A）からの 2 での滴定において保存され、K 3 1 3 または P 3 1 0 ではなく、F 3 1 5 または K 2 9 9 に対するフェニル環の配向を示す（図 3 3 および 3 4）。興味深いことに、追加の CSP が糖質結合から離れた残基について誘導され、これは、ランゲリンによる  $\text{Ca}^{2+}$  認識の調節に関与するアロステリックネットワークの変調を示唆した。

【0 4 7 3】

タンパク質が確認された NMR 実験を補完し、アセチル化エチルアミノリンカーの配向を調べるために、1 6 および 2 1 による STD NMR エピトープマッピングを行った（図 2 7（A）参照）。1 6 の結合エピトープは、フェニル環に対する均一に高い STD 効果によって支配され、従って、この置換基とランゲリン表面との間に好ましい二次相互作用が形成されるモデルをサポートする（図 2 8（D）および 図 3 5）。対照的に、アセチル化エチルアミノリンカーは溶媒曝露方向を示す均一な低 STD 効果を示し、Glc NS アナログのために開発された複合化戦略の有効性を実証した。同様に、2 1 のエ

チルアミノリンカーは、Man スキャフォールドと比較してSTD 効果が減少した（図3 6 および 3 7）。

【0 4 7 4】

最後に、GlcNAc を有するランゲリン複合体のX線構造を利用して分子ドッキングを行った（図2 8（E）および図3 8を参照）（Feinberg, H. et al. Common Polymorphisms in Human Langerin Change Specificity for Glycan Ligands. J Biol Chem, 288, 36762-71 (2013)）。生成されたドッキングポーズはNMR実験との関連において評価され、代表的なポーズは潜在的な二次相互作用の形成を可視化するために選択された。実際に、フェニル環をF 3 1 5 に対して配向させると、 $\pi-\pi$  相互作用が形成された。この配向はまた、スルホンアミドリンカーとN 3 0 7 との間の弱い水素結合の形成と同時に発生した。両方の相互作用は、I 2 5 0、Y 2 5 1、N 2 9 7 およびK 2 9 9 を含むF 3 1 5 およびN 3 0 7 と関連する残基について観察された顕著なCSP 値を説明する。さらに、フェニル環は、二次相互作用の形成とランゲリン表面への高い近接を示す高いSTD 効果を受けた。反対に、アセチル化エチルアミノリンカーは大部分のドッキングポーズについて、高い溶媒曝露を示し、保存された二次相互作用を示さなかった。この観察結果は低STD 効果と一致し、従って、GlcNS アナログのための開発された複合化戦略の有効性を実証した。全体的に、STD および $^{15}\text{N}$  HSQC NMR 実験の両方と一致する、Glc スキャフォールドの保存された配向を示す1 6 についての結合モードが提案される。親和性増加は、フェニル置換基とF 3 1 5 との間の $\pi-\pi$  相互作用の形成、ならびにスルホンアミドリンカーとN 2 9 7 との間の水素結合によって合理化することができる。

【0 4 7 5】

（実施例 2 3）

（脂質ベース、プレートベースの酵素結合レクチンアッセイ（lipid-based plate-based enzyme-linked lectin assay）（ELLA）の適用）

単糖アナログ1 5 または2 0（図2 7（A）参照）を利用して、それぞれ糖脂質2 2 および2 3 を合成した（図2 7（E）参照）。ランゲリンに対するそれらの親和性を、プレートベースの酵素結合レクチンアッセイ（ELLA）で評価した。2 2 について用量依存性の相互作用を実証することができたが、2 3 の固定化については相互作用は検出されなかった。これにより、Man ベース参照分子2 1 を超えるモデルリガンド1 6（図2 7（A）を参照）の特定の親和性増大が実証された。次いで、 $160 \pm 60 \text{ nm}$  の直径  $d$  を有するAlexa Fluor（AF）6 4 7 で標識化された標的化リボソームを調製した。当該標的化リボソームは、PBS 中に4℃で保存した場合、数カ月にもわたって安定であった。 $^1\text{H}$  NMR 実験を用いて、リボソームの表面上の標的化リガンド1 5 のアクセシビリティ（accessibility）を調べた。ここでは、フェニル環のH 1 ' およびH 2 ' に対応する共鳴について、2 つの状態が観察された。両方の状態において、3 0 Hz 未満の線幅  $\nu_{0.5}$  が示され、拡張されたポリエチレングリコールリンカー上の標的化リガンドの提示による残留柔軟性が示唆された。代替的な状態は、潜在的に、リボソームの内腔に対して配向され標的化リガンドに対応する。まとめると、1 5 はランゲリンとの相互作用を可能にするようにリボソームの表面上に有利に提示されている可能性が高く、開発された複合化戦略の有効性をさらに実証する。

【図面の簡単な説明】

【0 4 7 6】

【図1】図1は、HeK 2 9 3 細胞の原形質膜における安定なヒトランゲリン発現がCLR 特異的抗体を介して検出されたことを示す。アイソタイプ染色（灰色）を陰性対照として適用した。ランゲリン染色（濃い灰色）の蛍光強度を野生型細胞（薄い灰色）からのバックグラウンド蛍光と比較し、ヒストグラムプロットにプロットした。

【図2】図2は、CLR 特異的抗体を介して検出されたラージ細胞（Raji cell）の原形質膜における安定な受容体発現を示す。アイソタイプ染色を陰性対照として適用した。蛍光強度を野生型細胞からのバックグラウンド蛍光と比較し、ヒストグラムプロットにプロッ

トした。

【図3】図3は、FITC-BSAのカプセル化およびランゲリン発現細胞への送達を示す。図3(A)は、カプセル化抗原から遊離抗原を除去するためのサイズ排除および超遠心分離法からの結果を示す。FITC-BSA蛍光をプレートリーダーで測定した。図3(A)はまた、細胞ベースのアッセイで利用されたFITC-BSAカプセル化リポソームを示す。リポソームを37℃で2時間インキュベートし、FITCおよびアレクサ647の平均蛍光強度(MFI)値をフローサイトメトリーによって測定した(図3(B))。図3(C)は、異なる精製方法の後にリポソームの質がDLSによってどのように測定されたかを示す。サイズおよびゼータ電位(ZP)を分析した。図3(D)は、ランゲリン<sup>+</sup>HeK293細胞と共に37℃で6時間インキュベートしたFITCカプセル化リポソームを示す。核をDAPIで染色し、細胞を顕微鏡検査によって分析した。

10

【図4】図4は、サイズ排除または超遠心分離によって精製されたFITC-BSAカプセル化リポソームを示す。続いて、精製リポソームを細胞ベースのアッセイで試験した。16μMリポソームをhランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞と共に37℃で2時間インキュベートした。細胞を、フローサイトメトリーによるそれらのFITC染色について分析した。MFI値をベースライン補正した。

【図5】図5は、試験タンパク質のFITC-BSAを用いたタンパク質のカプセル化の最適化について報告する。図5(A)では脂質薄膜を再水和するために使用された初期FITC-BSA濃度、図5(B)では再水和された脂質膜の初期リポソーム濃度を变化させて、最適化されたカプセル化効率を検出した。図5(C)には、DLSによって分析されたサイズおよびゼータ電位(ZP)を含む品質レポートが示されている。カプセル化効率は、超遠心分離後にプレートリーダーを用いて計算した。カプセル化FITC-BSA抗原(AG)を1mMリポソームごとに計算した。

20

【図6】図6は、FITC-BSAカプセル化リポソームの用量依存的内部移行および反応速度を示す。図6(A)には、FITC-BSAカプセル化リポソームの用量依存的内部移行が示されている。アレクサ647合剤化(co-formulated)リポソーム染料を、FITC-BSAのフルオレセインシグナルと比較した。図6(B)には、FITC-BSAカプセル化リポソームの反応速度研究が示されている。アレクサ647合剤化リポソーム染料を、FITC-BSAのフルオレセインシグナルと比較した。

【図7】図7は、免疫活性タンパク質EBNAおよび免疫不活性対照タンパク質PCNAの発現およびカプセル化を示す。図7(A)には、Hisタグ精製PCNAおよびEBNAタンパク質のFPLCクロマトグラムが示されている。図7(B)には、PCNAおよびEBNA精製タンパク質のSDS-PAGEゲル、ならびにロードコントロール、フロースルーコントロール、およびウォッシュコントロールが示されている。タンパク質のサイズは、タンパク質ラダーを用いて測定した。図7(C)には、DLSによって分析された製剤化リポソームのサイズおよびゼータ電位(ZP)を含む品質レポートが示されている。カプセル化効率は、超遠心分離後にプレートリーダーを用いて計算した。カプセル化抗原(AG)を1mMリポソームごとに計算した。

30

【図8】図8は、ランゲリン標的化リポソームを介したLCへのPCNAおよびEBNAの送達を示す。FITC-PCNAおよびFITC-EBNAカプセル化リポソームを、37℃で表皮細胞懸濁液と共にインキュベートした。リポソームインキュベーション後、細胞を、CD45、HLA-DR、CD1aおよびランゲリンを含むランゲルハンス細胞マーカーで染色した。さらに、生/死(L/D)判定のために、細胞を生存率染料eFluor780で染色した。表皮細胞懸濁液をフローサイトメトリーによって分析し、ランゲルハンス細胞をリポソームおよびFITC染色について評価した。

40

【図9】図9は、CLR発現細胞に対するヒトランゲリンターゲットングリガンドのリポソーム特異性を示す。図9(A)は、リポソーム結合のために、16μMの非機能化および機能化リポソームを、安定発現ラージ細胞と共に4℃で1時間インキュベートしたことを示す。洗浄後、細胞をフローサイトメトリーによって直接的に分析した。リポソーム結合を、合剤化アレクサ647染料を用いて分析した。1つの代表的な実験のMFI値を示

50

し、 $t$ 検定（\*\*\*\* $p < 0.0001$ 、 $n = 3$ ）によって値をバックグラウンドシグナルと比較した。図9（B）において、ランゲリン<sup>+</sup>およびDC-SIGN<sup>+</sup>細胞へのリポソーム結合を、10mMのEDTAまたは50 $\mu$ g/mlのマンナンと競合させた。1つの代表的な例のMFI値をプロットした（\*\*\*\* $p < 0.001$ 、\*\*\*\* $p < 0.0001$ 、 $n = 3$ 、 $t$ 検定、2つの代表的な実験のうちの1つ）。

【図10】図10は、ランゲリン<sup>+</sup>He k 2 9 3細胞へのリポソーム内部移行の顕微鏡画像を示す。裸のリポソーム、ランゲリン標的化リポソームおよびマンノース複合化リポソームを、ランゲリン<sup>+</sup>He k 2 9 3細胞と共に37℃で2時間インキュベートした。核をDAPIで染色し、細胞膜を親油性染料DiOで染色した。異なる焦点高さの細胞層を示すランゲリントーゲティングリポソームと共にインキュベートしたランゲリン<sup>+</sup>細胞のZスタックを取得した。

10

【図11】図11は、ランゲリントーゲティングリポソームの結合反応速度および内部移行反応速度を示す。図11（A）ではランゲリントーゲティングリポソームの結合および図11（B）ではランゲリントーゲティングリポソームの内部移行を、それぞれ4℃または37℃での種々のインキュベーション期間後に分析した。図11（C）は、ランゲリン<sup>+</sup>細胞と共に37℃で24時間インキュベートしたランゲリントーゲティングリポソームの種々の濃度を示す。

【図12】図12は、顕微鏡検査によって測定されたリポソーム内部移行反応速度を示す。ランゲリントーゲティングリポソームを、hランゲリン<sup>+</sup>および野生型He k 2 9 3細胞と共にさまざまな時点インキュベートした。アレクサ647の高PMT電圧および低PMT電圧を用いて、早期のインキュベーション点での非常に感度の高い事象および後期のインキュベーション点からの強い蛍光シグナルを検出した。

20

【図13】図13は、GlcNTosyl機能化リポソームを有するヒトランゲリン発現ラージ細胞のターゲティングを示す。ターゲティングリガンドのリガンドモル比をリポソーム上で変化させ、16 $\mu$ Mのリポソームを4℃で1時間インキュベートした。細胞を同一のゲーティングストラテジーを用いて分析し、hランゲリン<sup>+</sup>および野生型ラージ細胞の蛍光シグナルを、GraphPad Prismにおいて線形フィットによってプロットした。

【図14】図14は、さまざまなリガンドモル比を含むランゲリントーゲティングリポソームの結合反応速度および内部移行反応速度を示す。図14（A）ではランゲリントーゲティングリポソームの結合および図14（B）ではランゲリントーゲティングリポソームの内部移行を、それぞれ4℃または37℃での種々のインキュベーション期間後に分析した。図14（C）は、種々の濃度のランゲリントーゲティングリポソームを、ランゲリン<sup>+</sup>細胞と共に37℃で24時間インキュベートしたことを示す。

30

【図15】図15は、エンドソーム区画へのリポソームの経路選択を示す。図15（A）では、ヒトランゲリン発現He k 2 9 3細胞を、16 $\mu$ Mの標的化リポソームと共に37℃で2時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、Rab5、Rab11、EEA1およびLamp-1を含むエンドソームマーカーで免疫蛍光染色した。その後、一次抗体をアレクサ488複合化二次抗体で標識化した。細胞核をDAPIで染色し、細胞を顕微鏡検査によって分析した。図15（B）は、標的化リポソームの共存とピアソンR値によって表されるさまざまなエンドソーム（endosomal）区画の間の相関関係を示す。

40

【図16】図16は、早期の時点におけるエンドソーム区画へのリポソームの内部移行を示す。COS-7細胞をYFP-Rab9で一時的にトランスフェクトした。標的化リポソームを添加し、37℃でさまざまな期間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を固定し、EEA1については一次抗EEA1抗体（ウサギ、クローンC45B10）およびRab5（ウサギ、クローンC8B1）（Cell Signaling Technology）を用いて、Rab9については一次抗緑色蛍光タンパク質（GFP）抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。アレクサ488複合化抗ウサギ抗体を二次染色に使用した。さらに、細胞核をDAPIによって染色した。

【図17】図17は、機能化リポソームの時間依存性細胞傷害性研究を示す。図17（A

50

）において、ゲーティングストラテジーは、未処理、DMSO処理およびリポソーム処理の細胞について例示的に示される。細胞を37℃で72時間インキュベートした。DMSO処理細胞を、72時間のインキュベーション後に3分間、50%のDMSOと共にインキュベートした。FSC-A/SSC-Aプロットにおいて、生細胞および死細胞を細胞片と区別した。FSC-A/FSC-Hプロットにおいて、ダブルット (doublet) を識別した。その後、単細胞をx軸上のAnnexin-V-FITC染色とy軸上の7-AADを示すドットプロットで分析し、早期および後期のアポトーシス効果を判定した。未処理細胞を陰性対照として使用し、DMSO処理細胞は陽性対照を表す。図17(B)では、いくつかのインキュベーション時点の母集団中の頻度 (FoP: frequent of parent) を各象限について分析し、グループ化された縦棒にプロットした。図17(C)では、ランゲリン<sup>+</sup>細胞と共にインキュベートした、標的化リポソーム、および裸のリポソームのA647のMFIを分析して、リポソームの内部移行を検出した。

10

【図18】図18は、ランゲリンターゲットングリポソームの用量依存性細胞傷害性研究を示す。図18(A)において、ゲーティングストラテジーは、未処理、DMSO処理およびリポソーム処理の細胞について例示的に示される。細胞を37℃で24時間インキュベートした。DMSO処理細胞を、24時間のインキュベーション後に3分間、50%のDMSOと共にインキュベートした。FSC-A/SSC-Aプロットにおいて、生細胞および死細胞を細胞片と区別した。FSC-A/FSC-Hプロットにおいて、ダブルットを識別した。その後、単細胞をx軸上のAnnexin-V-FITC染色とy軸上の7-AADを示すドットプロットで分析し、早期および後期のアポトーシス効果を判定した。未処理細胞を陰性対照として使用し、DMSO処理細胞は陽性対照を表す。図18(B)では、1mMまでのいくつかの濃度のリポソームを分析した。親の頻度 (FoP) を、各象限について決定し、グループされた縦棒にプロットした。図18(C)では、ランゲリン<sup>+</sup>細胞と共にインキュベートした、標的化リポソームおよび裸のリポソームのA647のMFIを分析して、リポソームの内部移行を検出した。

20

【図19】図19は、関連したランゲリン多型に対するリポソーム活性を示す。図19(A)では、裸のリポソームおよび標的化リポソームを、ラージ野生型細胞、野生型ヒトランゲリン<sup>+</sup>を発現するラージ細胞、N288D変異体、K313I変異体またはN288D/K313I二重変異体へのそれらの結合について試験した。16μMのリポソームを4℃で1時間インキュベートした。結合を、A647合剤化染料のMFIによって分析した。データを野生型ランゲリン<sup>+</sup>細胞に正規化した (\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001、n=3、t検定、2つの代表的な実験のうちの1つ)。図19(B)では、ラージ発現細胞を、PE複合化抗ヒトランゲリン抗体 (クローンDCGM4) を用いて、それらの細胞外受容体発現について試験した。MFIを野生型ランゲリン発現に正規化した (\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、n=3、t検定、2つの代表的な実験のうちの1つ)。図19(C)では、相対リポソーム結合を、抗体染色 (B) に対するリポソーム結合 (A) の倍率を計算することによってプロットした (\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001、n=3、t検定；# 野生型ラージ細胞のデータを除外した、2つの代表的な実験のうちの1つ)。図19(D)では、リポソーム結合に加えて、リポソーム内部移行を37℃で24時間にわたって追跡した。合剤化A647染料のMFIを直接的にプロットした。図19は図19-1及び図19-2からなり、図19-2は図19-1の続きである。

30

40

【図20】図20は、MALDI-TOFによる、ターゲットングリガンドがロードされたGFpの定量化を示す。

【図21】図21は、FITC-BSAカプセル化リポソームに対する複合化タンパク質の結合と内部移行を示す。図21(A)では、4℃および37℃での機能化GFpの結合および取り込みを、ラージおよびランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞を用いたフローサイトメトリーによって用量依存的に測定した。図21(B)では、GFpおよびリポソームを、ランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞と共に種々の時点インキュベートした。ここでは、FITC-BSAカプセル化リポソームを利用して、FITC蛍光をGFp蛍光と比較した。

50

【図 2 2】図 2 2 は、マンナンとの結合競合を示す。図 2 2 (A) では、リガンド機能化リポソームまたは GFP の結合をマンナンと競合させた。リガンド担体をランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞と共に 37℃で 4 時間インキュベートした。マンナンを 37℃で直接的に添加して結合および内部移行を競合させるか、または 4 時間のインキュベーション工程後 (4℃での洗浄後) に添加して細胞外結合担体を除去した。(3 つのうちの 1 つの代表的な実験、n = 3)。図 2 2 (B) では、機能化リポソームまたは GFP を、ランゲリン<sup>+</sup>ラージ細胞と共に 37℃で 30 分間インキュベートした。洗浄後、さまざまな時間周期の間、マンナンまたは (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>を有する) DPBS を添加した。(4 つのうちの 1 つの代表的な実験、n = 3)。

【図 2 3】図 2 3 は、ターゲティングリガンドがロードされた PMMA ビーズのフローサイトメトリー分析が、ヒトランゲリン発現 THP-1 細胞への特異的結合を示すことを示す。

【図 2 4】図 2 4 は、表皮細胞懸濁液における初代ランゲルハンス細胞のターゲティングを示す。図 2 4 (A) では、ヒト皮膚試料から表皮細胞懸濁液を調製した。続いて、細胞を 16 μM の濃度のリポソームと共に 37℃で 1 時間インキュベートした。対照として、10 mM の EDTA を細胞培地に添加した。リポソームインキュベーション後、細胞を、CD45、HLA-DR、CD1a およびランゲリンを含むランゲルハンス細胞マーカーで染色した。さらに、生/死 (L/D) 判定のために、細胞を生存率染料 eFluor 780 で染色した。表皮細胞懸濁液をフローサイトメトリーによって分析し、ランゲルハンス細胞をリポソーム染色について評価した。図 2 4 (B) : (A) のゲーティングストラテジーに基づいて、裸のリポソームおよび標的化リポソームの MFI を、CD45<sup>-</sup>; CD1a<sup>-</sup>、HLR-DR<sup>-</sup>; および CD1a<sup>+</sup>、HLR-DR<sup>+</sup> 発現細胞を含むさまざまな細胞サブセットについて分析した。図 2 4 (C) : リポソーム内部移行を分析するために、EDTA をインキュベーション工程の後または間に添加した。インキュベーション後に添加された EDTA は、細胞外結合リポソームを除去するため、リポソーム内部移行を反映する。一方、インキュベーション工程中に添加される EDTA はリポソーム結合を防止し、対照としての機能を果たす。受容体内部移行を防止するために、細胞を 4℃でインキュベートした。図 2 4 (D) では、表皮細胞懸濁液を FITC 複合化抗 CD1a 抗体で染色し、標的化リポソームと共に 37℃で 1 時間インキュベートした。続いて、細胞を顕微鏡検査によって分析した。

【図 2 5】図 2 5 は、ランゲリンターゲティングリガンドを介したランゲルハンス細胞へのリポソーム特異性を示す。ヒト皮膚試料から全皮膚細胞懸濁液を調製した。続いて、皮膚細胞を 16 μM の濃度のリポソームと共に 37℃で 1 時間インキュベートした。リポソームインキュベーション後、細胞を、CD45、HLA-DR、CD1a およびランゲリンを含むランゲルハンス細胞マーカーで染色した。さらに、細胞を、生/死 (L/D) 判定のために生存率染料 eFluor 780 で染色し、単球およびマクロファージを染色するために CD14 抗体で染色した。全皮膚細胞懸濁液をフローサイトメトリーによって分析し、種々の細胞サブセットをリポソーム染色について評価した。

【図 2 6】図 2 6 は、複合体のテール領域 (疎水性部) が脂質二重層構造に埋め込まれ、一方、ヘッド領域が担体の外部に配置され、このため、受容体と相互作用することができる分子を概略的に示す。

【図 2 7】図 2 7 は、ヒトランゲリンのためのグリコミメティックターゲティングリガンドのヘパリンの影響を受けたデザインを示す。図 2 7 (A) では、ヘパリン由来単糖 GlcNS は、グリコミメティックリガンドデザインのための好ましいスキャフォールドとして同定された。GlcNS アナログの設計は、グリコミメティックターゲティングリガンド 15 の発見につながる。15 は、送達プラットフォームへの結合のための C1 の β 配向のエチルアミノリンカーを担う。20 は、この研究を通して、Man ベースの参照分子としての機能を果たした。図 2 7 (B) : GlcNAc の結合モード (PDB コード: 4N32) に基づいて、C2 中の小さな芳香族置換基は、K299 および K313 とのカチオン-π 相互作用または F315 および P310 との π-π および H-π 相互作用の形成に

10

20

30

40

50

よって親和性を増大させると仮定された。受容体表面は、その親油性に従って対比される（親油性：濃い灰色、親水性：薄い灰色）。図27（C）： $^{19}\text{F}$   $\text{R}_2$ フィルタNMR実験によって、Manベースの参照分子21（ $K_i = 10 \pm 1 \text{ mM}$ ）に対して42倍のモデルリガンド16（ $K_i = 0.24 \pm 0.03 \text{ mM}$ ）に対する親和性向上が明らかになった。さらに、16はDC-SIGN（ $K_i, \text{DC-SIGN} = 15 \pm 3 \text{ mM}$ ）に対する有望な特異性を示した。図27（D）：高速（ $K_D, \text{fast} = 0.23 \pm 0.07 \text{ mM}$ ）および低速（ $K_D, \text{slow} = 0.3 \pm 0.1 \text{ mM}$ ）の交換レジームにおける共鳴を分析する $^{15}\text{N}$  HSQC NMR実験において、ランゲリンに対する16の親和性が確認された。図27は図27-1～図27-3からなり、図27-2は図27-1の続きであり、図27-3は図27-2の続きである。

【図28】図28は、グリコミメティックターゲティングリガンドについての結合モード分析を示す。図28（A）および（B）： $^{15}\text{N}$  HSQC NMR実験によって、16についての化学シフト摂動（CSP：chemical shift perturbation）パターンが明らかになった。滴定すると、I250およびE285等の高速交換共鳴ならびにY251を含む低速交換共鳴が確認された。図28（C）：GlcNAc（PDBコード：4N32）との複合体におけるランゲリンのX線構造上のCSPのマッピングによって、E285およびK299について確認されたCSPによって示されるように、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の結合モードが確認された。21を用いた滴定と比較して、Y251、I250およびT314は相対的なCSP増加を示したが、K313については減少が確認された。全体として、増加したCSPを示す残基の大部分はN307およびF315と関連し得るが、これらは帰属され得なかった。図28（D）：STD NMR実験は、16とランゲリンとの間に形成された相互作用をさらに確認するのに役立った。STD NMRスペクトルは、0.4秒の飽和時間 $t_{\text{sat}}$ で記録し、8倍に拡大した。ビルドアップ曲線から決定されたエピートープは、フェニル置換基によって形成された強い相互作用を示唆する。対照的に、低相対STD  $\rho$ 値がアセチル化エチルアミノリンカーについて確認され、溶媒曝露方向（solvent exposed orientation）と一致した。図28（E）： $^{15}\text{N}$  HSQCおよびSTD NMR実験からの観察結果を合理化するために、16を糖結合部位にドッキングした。選択されたドッキングポーズ結合姿勢は、フェニル環とF315との間の $\pi-\pi$ 相互作用の形成、ならびにスルホンアミド基とN307との間の水素結合の形成を予測した。リンカーは、高い溶媒曝露を示す。受容体表面は、その親油性に従って対比される（親油性：濃い灰色、親水性：薄い灰色）。図28は図28-1～図28-3からなり、図28-2は図28-1の続きであり、図28-3は図28-2の続きである。

【図29】図29は、構造と活性との相関および選択化合物のDC-SIGNに対する特異性を示す。

【図30】図30は、硫酸化GlcNAc誘導体の $K_i$ 判定を示す。 $^{19}\text{F}$   $\text{R}_2$ フィルタNMRを介したヘパリン由来GlcNAc誘導体の $K_i$ 判定によって、単糖親和性に対する硫酸化パターンの影響が明らかになった。得られた $K_i$ 値を図39に示す。

【図31】図31は、GlcNSアナログ1～5の $K_i$ 判定を示す。競合結合実験は、GlcNSアナログライブラリの親和性を決定するのに役立った。得られた $K_i$ 値を図39に示す。

【図32】図32は、Manアナログ21の $K_D$ 判定を示す。図32（A）および（B）： $^{15}\text{N}$  HSQC NMR実験は、2に関して得られた $K_i$ 値を確認するのに役立った。参照スペクトルで検出された帰属された共鳴がハイライトされる（グレー）。図32（C）： $K_D$ 値の測定のために、高速化学交換および0.06 ppmより大きいCSPを示す帰属された共鳴を選択した。得られた $K_D$ 値を図29に示す。

【図33】図33は、GlcNSアナログ2の $K_D$ 判定を示す。図33（A）および（B）： $^{15}\text{N}$  HSQC NMR実験は、2に関して得られた $K_i$ 値を確認するのに役立った。参照スペクトルで検出された帰属された共鳴がハイライトされる（グレー）。図33（C）： $K_D$ 値の測定のために、高速化学交換および0.04 ppmより大きいCSPを示す帰属された共鳴を選択した。図33（D）：さらに、K299およびT314を含む残

10

20

30

40

50

基のセットは、遅い交換現象を示した。これらの残基について、ランゲリンの遊離状態と結合状態に対応する共鳴の積分 $V_f$ および $V_b$ を利用して、 $K_D$ 値を測定した。得られた $K_D$ 値を図29に示す。図33は図33-1及び図33-2からなり、図33-2は図33-1の続きである。

【図34】図34は、GlcNSアナログ2、16およびManアナログ21についての $^{15}\text{N}$  HSQC NMR結合モード分析を示す。図34(A)～(C)：ランゲリン(PDBコード：4N32または35PF)のX線構造上のCSP値のマッピングによって、E285およびK299、10について確認されたCSPによって示されるように、2および16の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性結合モードが確認された。さらに、CSPは、N297、A300およびS302残基について確認され、また、Manまたは21の認識に影響を及ぼした。対照的に、Y251およびI250は、21と比較して大幅に増加したCSP値を示したが、K313については相対的な減少が確認された。この減少は、近位のT314の相対的な増加を伴った。特に、大幅に増加したCSP値を示す残基は主に、F315およびN307と関連し、これらは帰属されなかった。これは、より小さい相対的な増加を示したW252およびW306についても当てはまる。従って、確認されたCSPパターンは、K313ではなく、2または16とF315との間に形成された相互作用によって誘導され得る。Manおよび21と同様に、CSPはまた、C型レクチン様ドメインフォールドの遠隔領域において、特に短ループ領域におけるK257およびG259について確認された。これは、以前に報告されたアロステリックネットワークの変調を示し得る。図33(D)：16および21を用いた滴定の対比によって、E285またはW252等の糖結合部位と関連する残基についての明確なCSP軌跡が明らかになったが、K257等のC型レクチン様フォールドの遠隔領域に位置する残基の軌跡は保存された。図34は図34-1～図34-4からなり、図34-2は図34-1の続きであり、図34-3は図34-2の続きであり、図34-4は図34-3の続きである。

【図35】図35は、GlcNSアナログ16のSTD NMRビルドアップ曲線を示す。方程式5をSTD値に当てはめて、16の結合エピトープの決定のためのSTD $_0$ 値を計算した。

【図36】図36は、Manアナログ21のSTD NMRエピトープマッピングを示す。図36(A)：STD NMR実験は、21とランゲリンとの相互作用を調べるのに役立った。STD NMRスペクトルは、0.4秒の飽和時間 $t_{\text{sat}}$ で記録し、8倍に拡大した。図36(B)：21のエピトープは、ビルドアップ曲線から決定され、アセチル化エチルアミノリンカーに対する溶媒曝露方向を示唆する(図37も参照)。

【図37】図37は、Manアナログ21のSTD NMRビルドアップ曲線を示す。方程式5をSTD値に当てはめて、21の結合エピトープの決定のためのSTD $_0$ 値を計算した。

【図38】図38は、GlcNSアナログ16の分子結合を示す。図38(A)：ファーマコフォアモデルは、ランゲリン(PDBコード：4N32)の糖結合部位における16の最初の配置を導き、ドッキングポーズを力場に基づいて改善する間のGlcスキャフォールドの配向を抑制するように規定された。示されたすべての特徴が、表示されたスフィア内の酸素原子を必要とする。図38(B)：10個の生成されたドッキングポーズのうちの4個は、16の図示された配座に類似する。選択されたドッキングポーズは、フェニル環とF315との間の $\pi$ - $\pi$ 相互作用の形成、ならびにスルホンアミド基とN307との間の水素結合の形成を予測した。アセチル化エチルアミノリンカーは、高い溶媒曝露を示す。従って、このドッキングポーズは、 $^{15}\text{N}$  HSQCおよびSTD NMRの両方の実験と一致する。図38(C)：16の図示された代替的な配座は、10個の生成されたドッキングポーズのうちの3個について表している。選択されたドッキングポーズは、フェニル環とK313との間のカチオン- $\pi$ 相互作用の形成、ならびにスルホンアミドとE293との間の水素結合の形成を予測した。アセチル化エチルアミノリンカーは、高い溶媒曝露を示す。しかしながら、このドッキングポーズは、 $^{15}\text{N}$  HSQC NMRの結果、特にK313のCSP値の相対的な減少とあまり一致しなかった。分子のドッキング研

10

20

30

40

50

究は、スルホンアミドリリンカーに適さない二面角が原因で除外された16の3つの追加の独特なドッキングポーズをもたらした。受容体表面は、その親油性に従って対比される（親油性：濃い灰色、親水性：薄い灰色）。

【図39】図39は、一連のターゲティングリガンド、2'位におけるGlcNのアナログ、および硫酸化単糖の構造と活性との相関を示す。

10

20

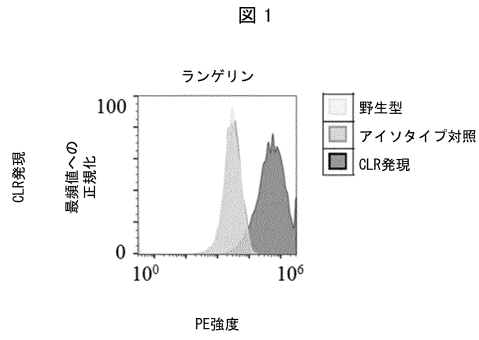
30

40

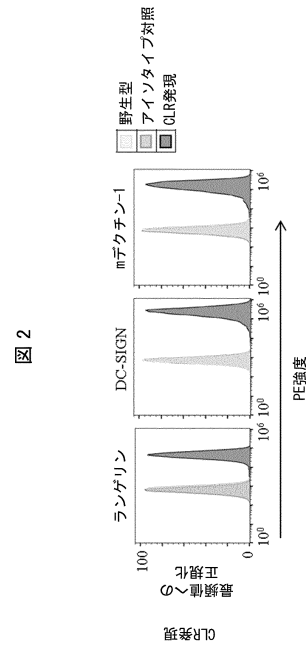
50

## 【図面】

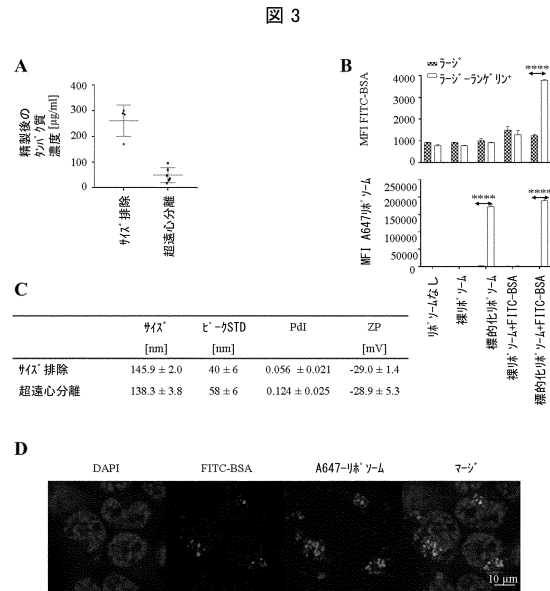
## 【図 1】



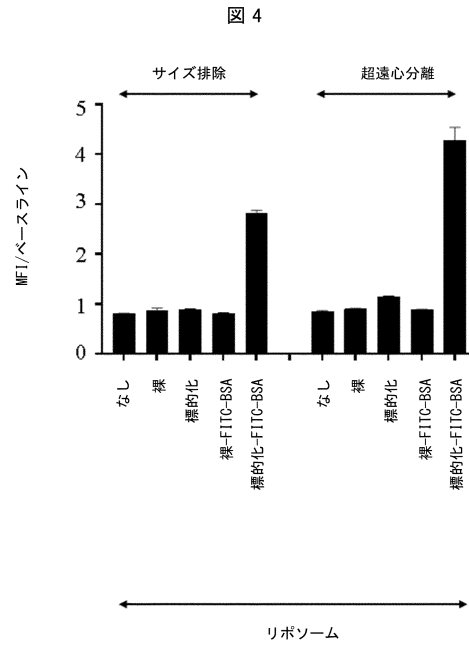
## 【図 2】



## 【図 3】



## 【図 4】



10

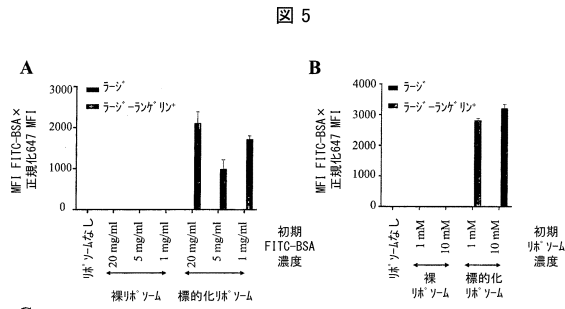
20

30

40

50

【図 5】



【図 6】

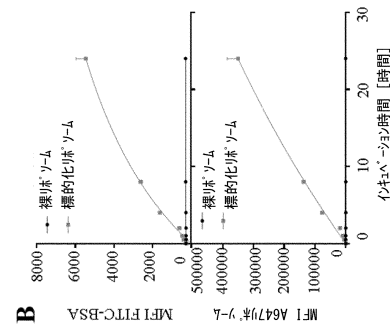
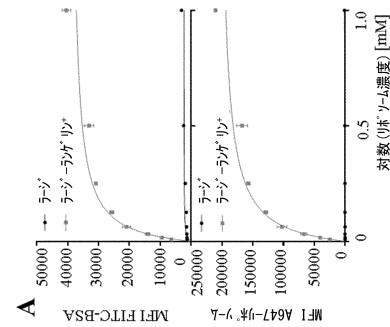
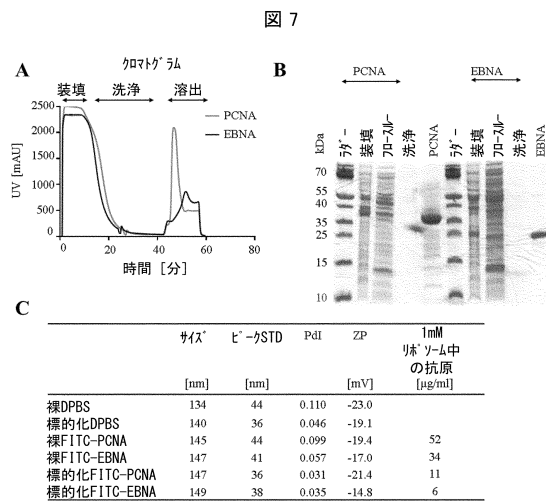


図 6

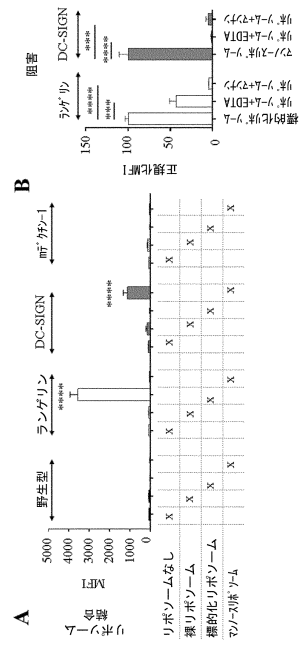


【図 7】



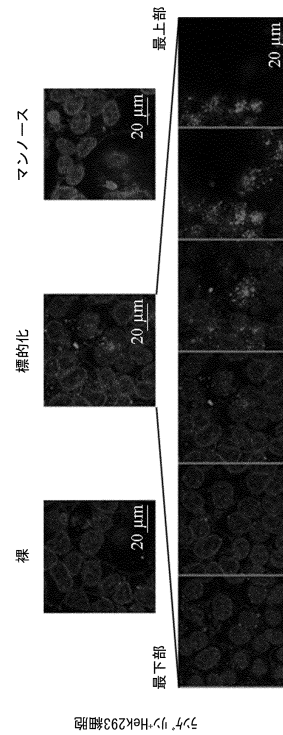
【図 9】

図 9



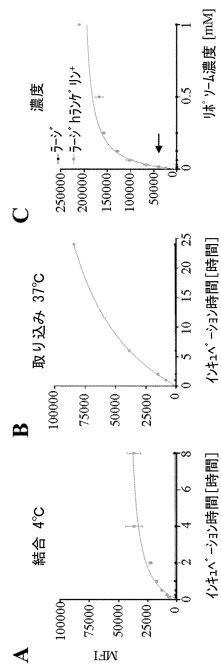
【図 10】

図 10



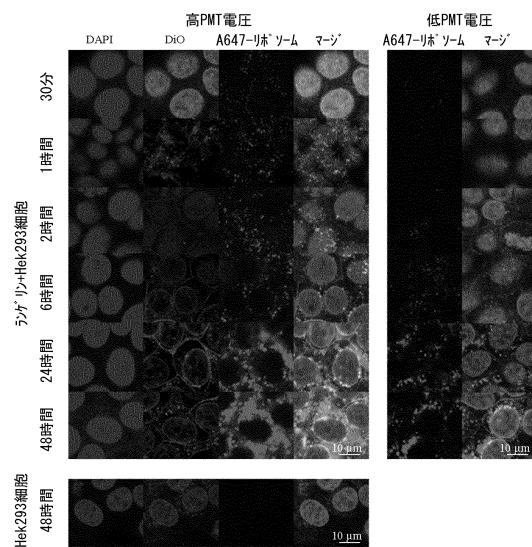
【図 11】

図 11



【図 12】

図 12



10

20

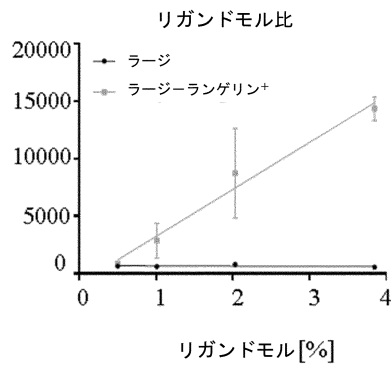
30

40

50

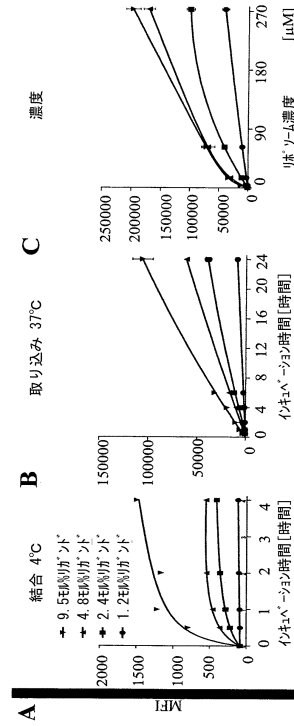
【図 13】

図 13



【図 14】

図 14

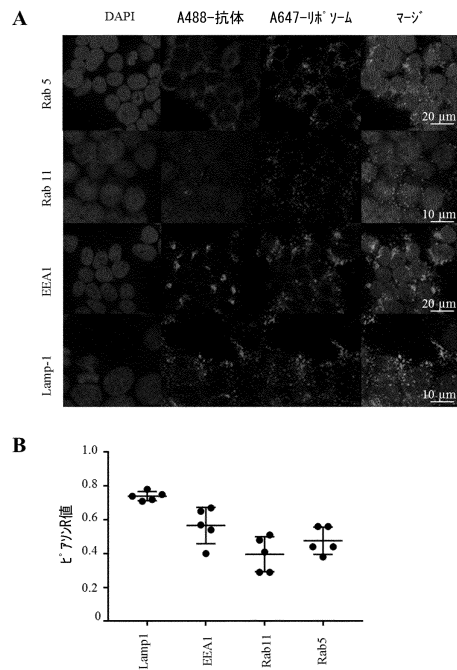


10

20

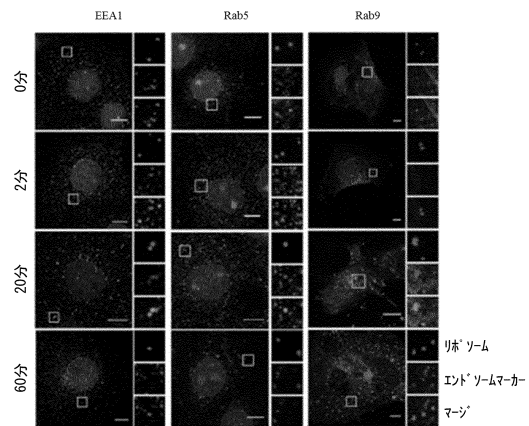
【図 15】

図 15



【図 16】

図 16



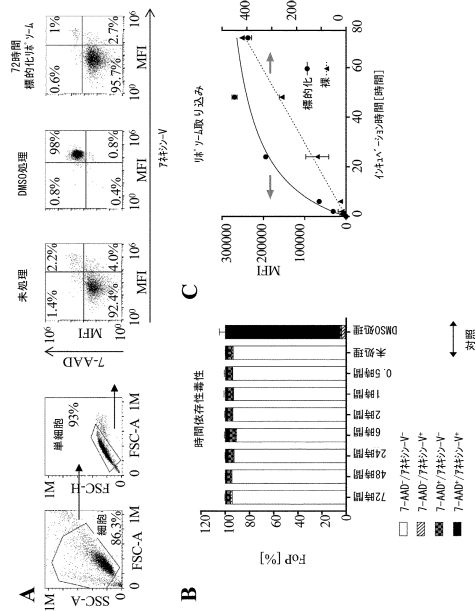
30

40

50

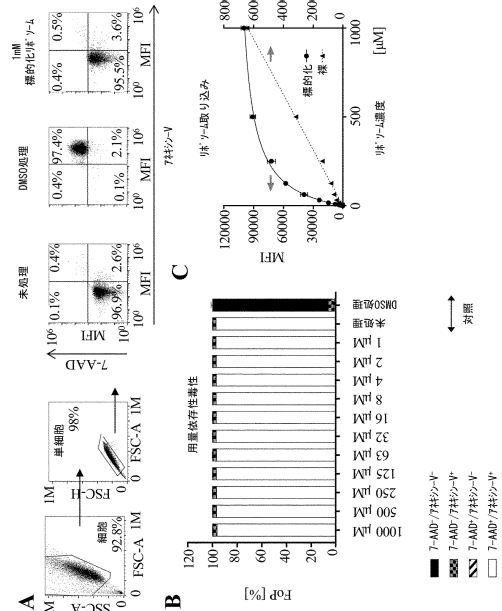
【図 17】

図 17



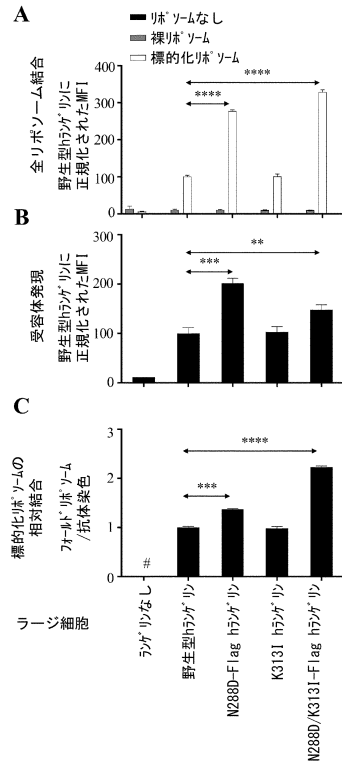
【図 18】

図 18



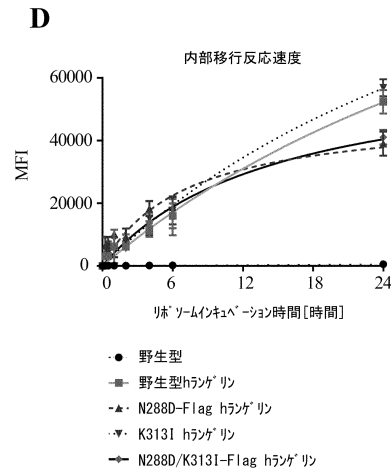
【図 19 - 1】

図 19



【図 19 - 2】

図 19 (続き)



10

20

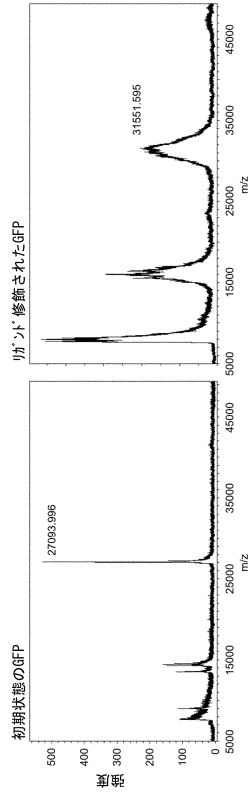
30

40

50

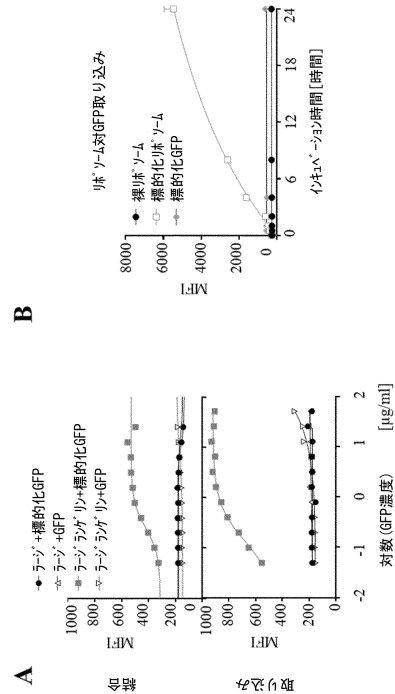
【図 20】

図 20



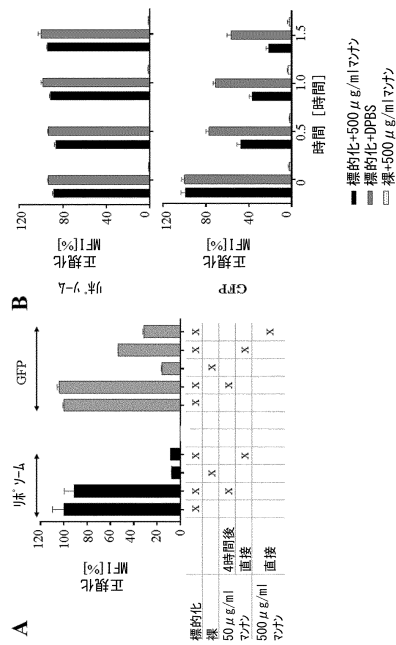
【図 21】

図 21



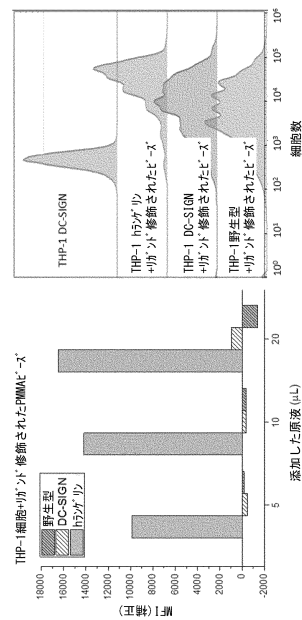
【図 22】

図 22



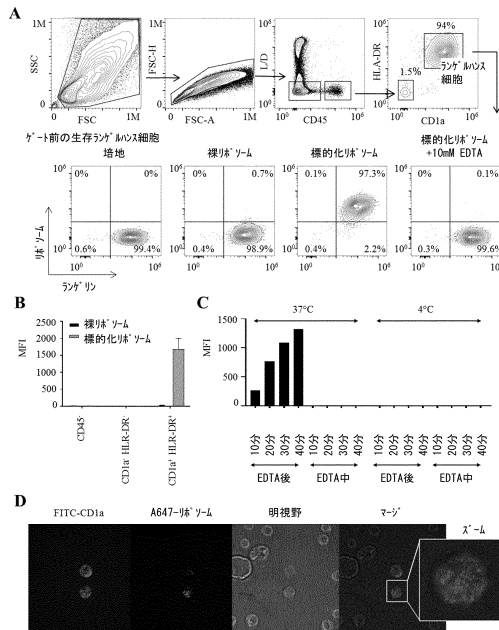
【図 23】

図 23



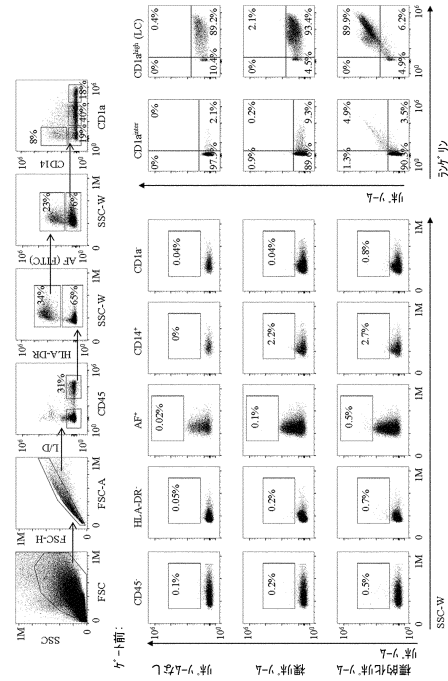
【図 2 4】

図 24



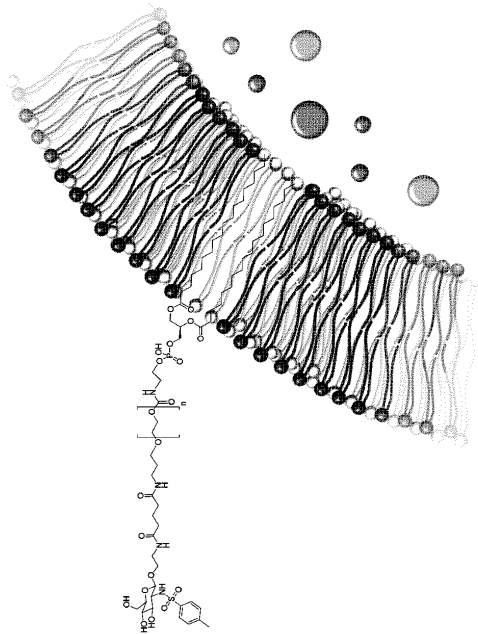
【図 2 5】

図 25



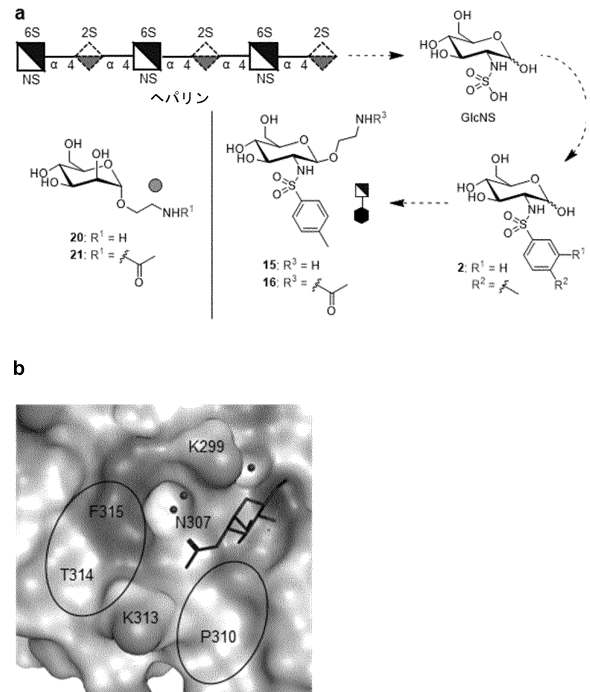
【図 2 6】

FIGURE 26



【図 2 7 - 1】

図 27



10

20

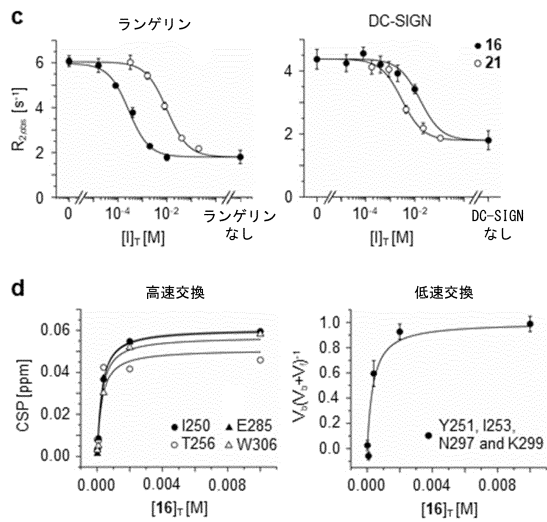
30

40

50

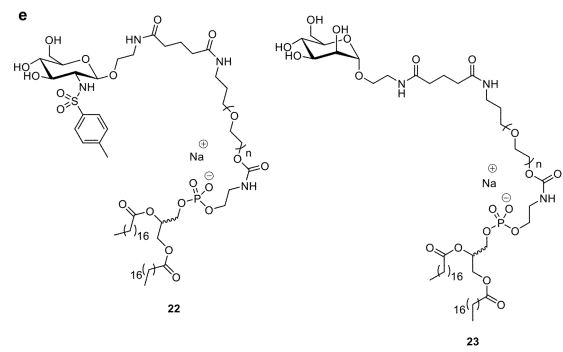
## 【図 27-2】

図 27 (続き)



## 【図 27-3】

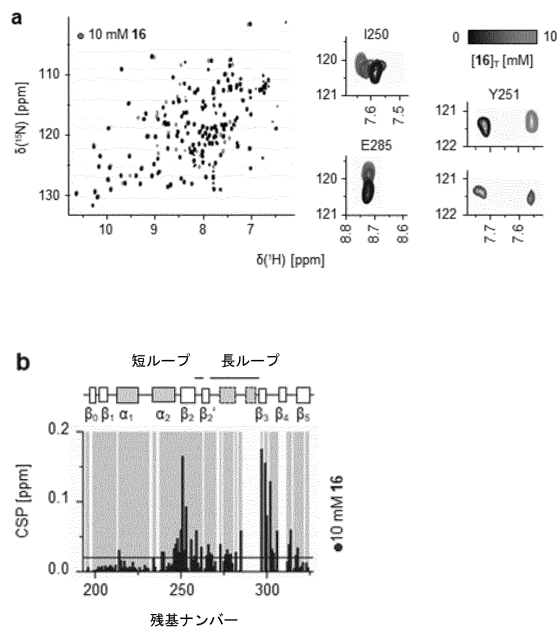
図 27 (続き)



10

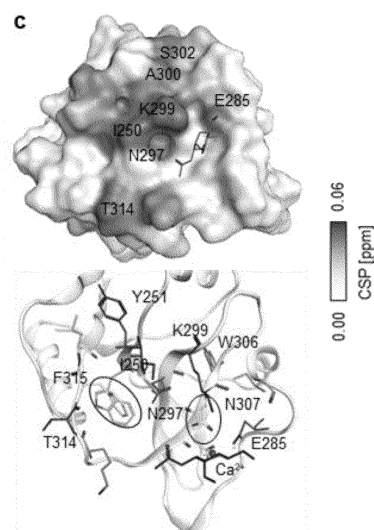
## 【図 28-1】

図 28



## 【図 28-2】

図 28 (続き)



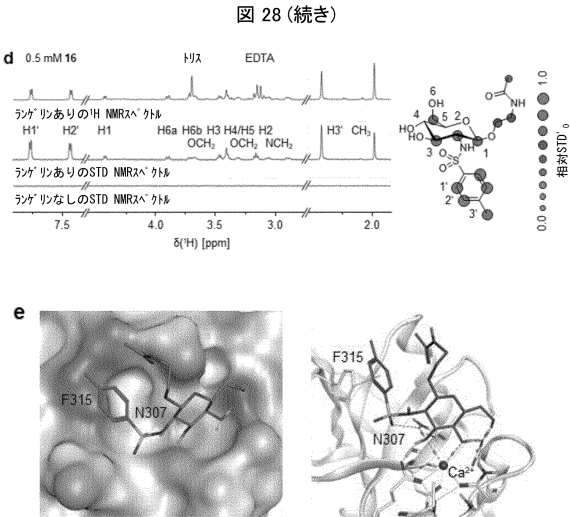
20

30

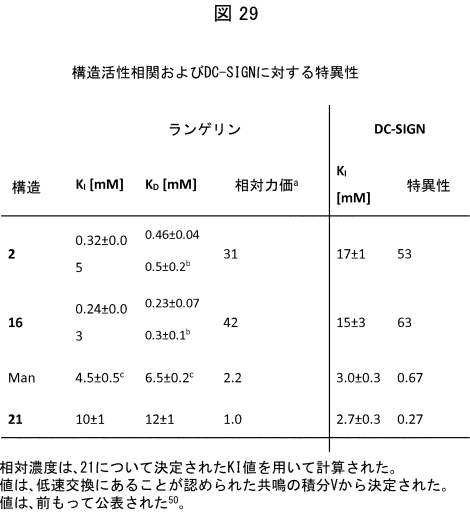
40

50

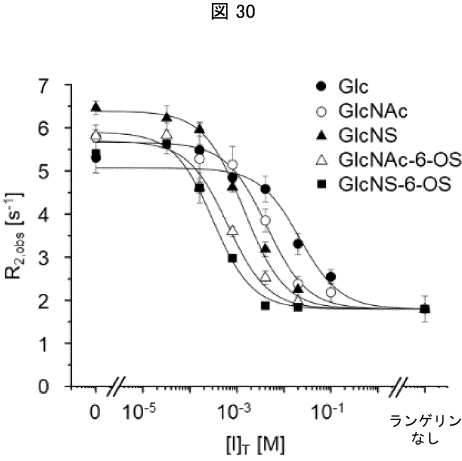
【図 2 8 - 3】



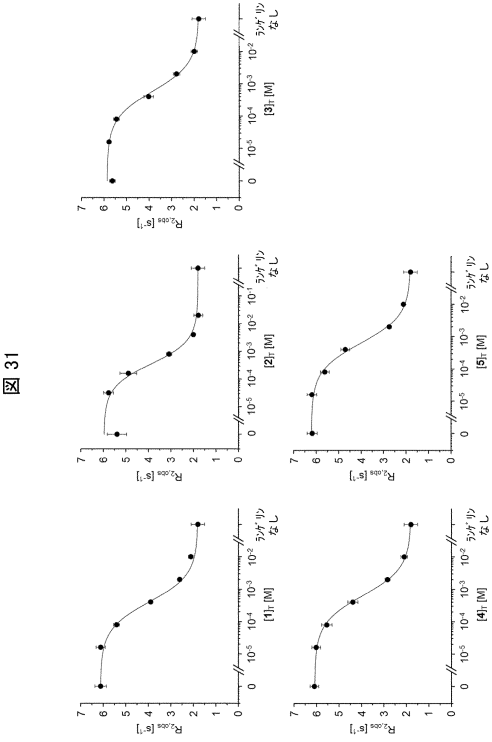
【図 2 9】



【図 3 0】



【図 3 1】



10

20

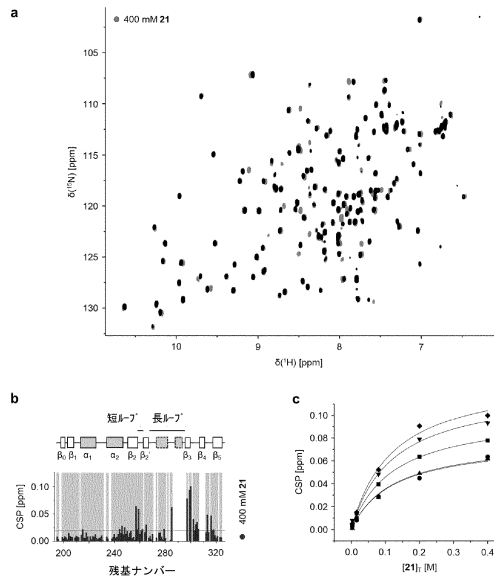
30

40

50

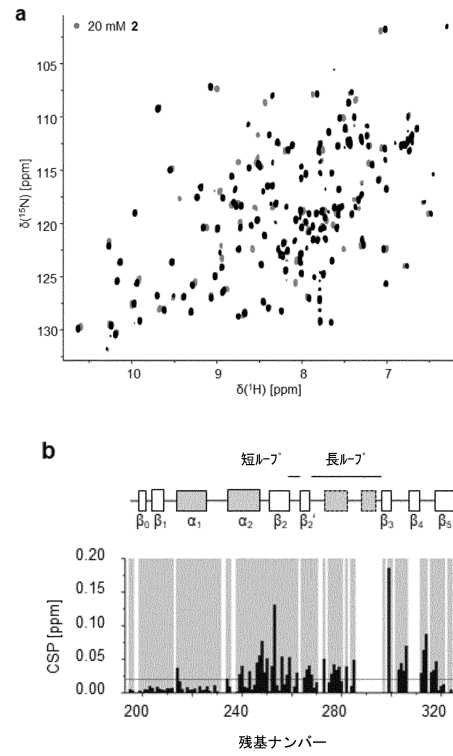
【図 3 2】

図 32



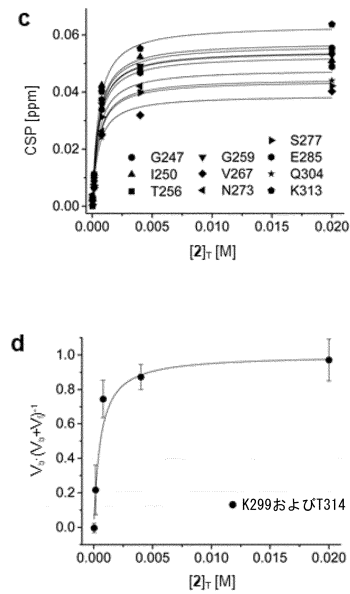
【図 3 3 - 1】

図 33

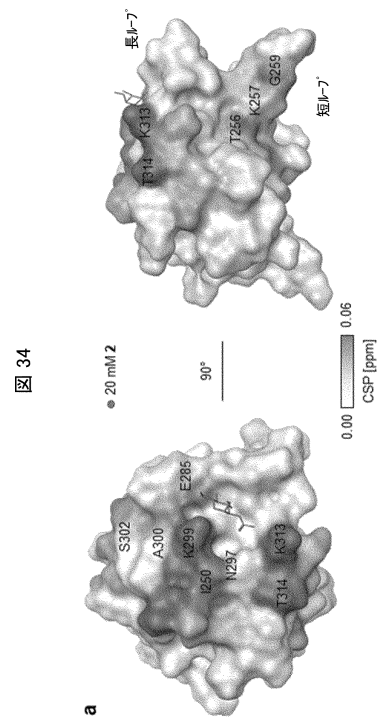


【図 3 3 - 2】

図 33 (続き)



【図 3 4 - 1】



10

20

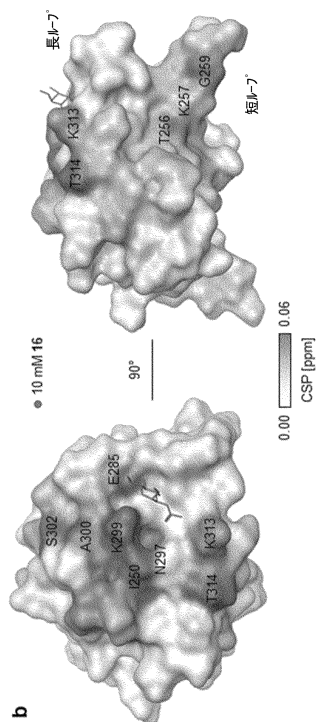
30

40

50

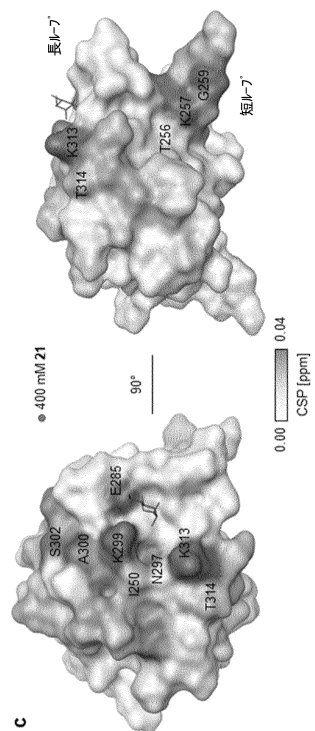
【図 3 4 - 2】

図 34 (続き)



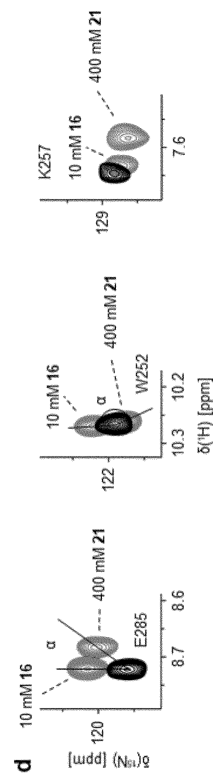
【図 3 4 - 3】

図 34 (続き)



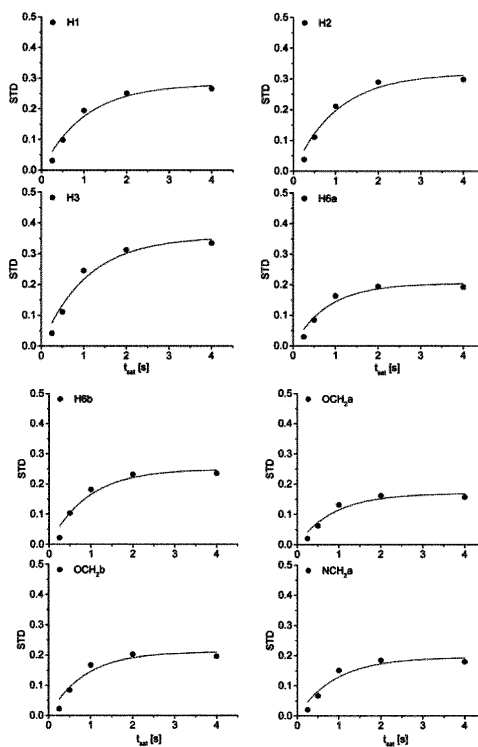
【図 3 4 - 4】

図 34 (続き)



【図 3 5 - 1】

FIGURE 35-1



10

20

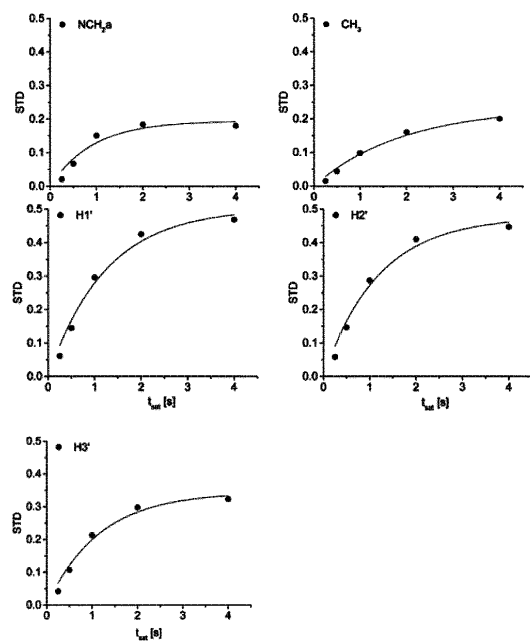
30

40

50

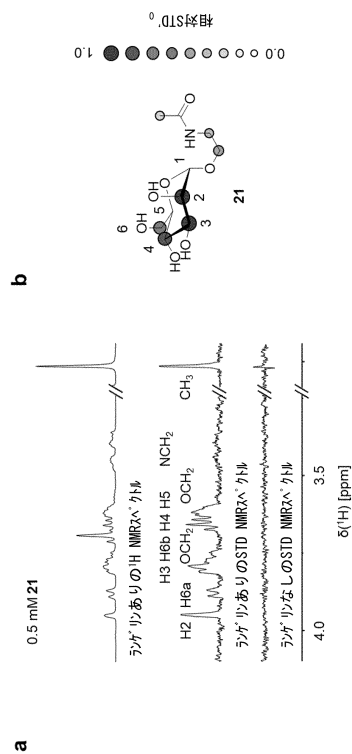
## 【図 35-2】

FIGURE 35-2



## 【図 36】

図 36

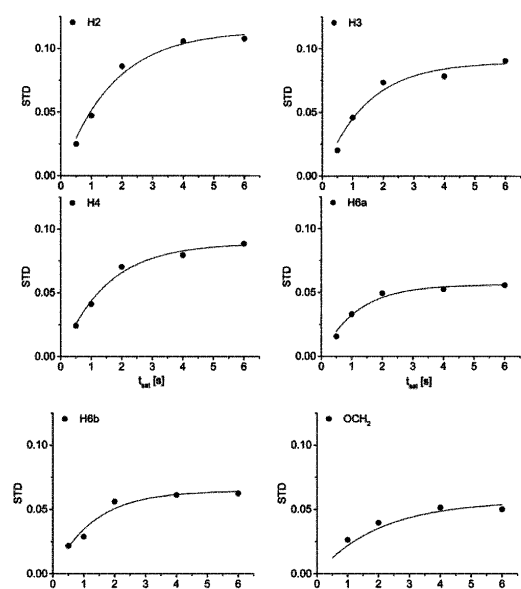


10

20

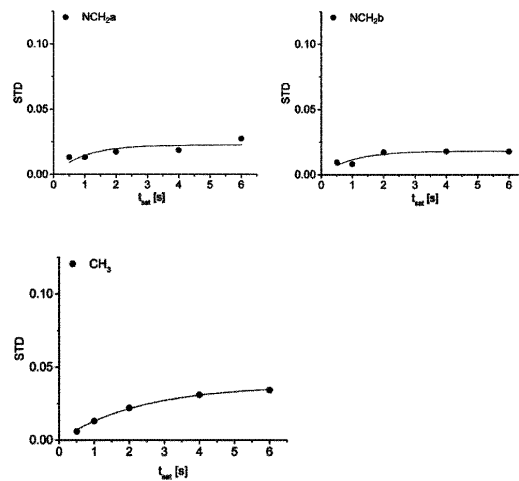
## 【図 37-1】

FIGURE 37-1



## 【図 37-2】

FIGURE 37-2



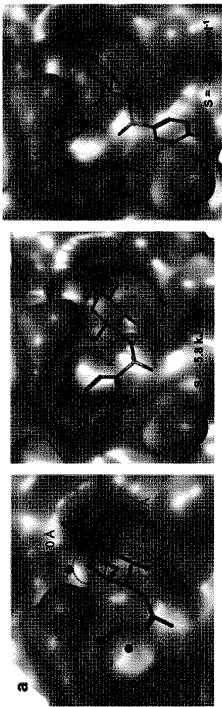
30

40

50

【図 3 8】

FIGURE 38



【図 3 9】

| 構造 | R | K <sub>d</sub> [mM] | 構造 | R | K <sub>d</sub> [mM] |
|----|---|---------------------|----|---|---------------------|
|    |   | 0.24 ± 0.03         |    |   | 0.37 ± 0.04         |
|    |   | 0.41 ± 0.14         |    |   | 0.32 ± 0.05         |
|    |   | 0.74 ± 0.23         |    |   | 0.56 ± 0.09         |
|    |   | 1.06 ± 0.77         |    |   | 0.60 ± 0.02         |
|    |   | 0.53 ± 0.21         |    |   | 0.59 ± 0.06         |
|    |   | 0.10 ± 0.02         |    |   | 21 ± 4              |
|    |   | 0.21 ± 0.05         |    |   | 4.1 ± 0.7           |
|    |   | 1.24 ± 0.69         |    |   | 1.4 ± 0.2           |
|    |   | 0.21 ± 0.01         |    |   | 0.6 ± 0.1           |
|    |   | 0.33 ± 0.01         |    |   | 0.28 ± 0.06         |

【配列表】

0007566629000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

|         |                  |         |        |       |
|---------|------------------|---------|--------|-------|
| A 6 1 K | 39/00 (2006.01)  | A 6 1 K | 39/00  | G     |
| A 6 1 K | 39/002 (2006.01) | A 6 1 K | 39/00  | H     |
| A 6 1 K | 39/12 (2006.01)  | A 6 1 K | 39/002 |       |
| A 6 1 K | 39/385 (2006.01) | A 6 1 K | 39/12  |       |
| A 6 1 K | 45/00 (2006.01)  | A 6 1 K | 39/385 |       |
| A 6 1 K | 47/24 (2006.01)  | A 6 1 K | 45/00  |       |
| A 6 1 K | 47/44 (2017.01)  | A 6 1 K | 47/24  |       |
| A 6 1 K | 47/46 (2006.01)  | A 6 1 K | 47/44  |       |
| A 6 1 K | 47/69 (2017.01)  | A 6 1 K | 47/46  |       |
| A 6 1 K | 49/00 (2006.01)  | A 6 1 K | 47/69  |       |
| A 6 1 K | 51/04 (2006.01)  | A 6 1 K | 49/00  |       |
| A 6 1 P | 29/00 (2006.01)  | A 6 1 K | 51/04  | 3 1 0 |
| A 6 1 P | 31/04 (2006.01)  | A 6 1 K | 51/04  | 3 2 0 |
| A 6 1 P | 31/12 (2006.01)  | A 6 1 P | 29/00  |       |
| A 6 1 P | 33/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 31/04  |       |
| A 6 1 P | 35/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 31/12  |       |
| A 6 1 P | 37/06 (2006.01)  | A 6 1 P | 33/00  |       |
| A 6 1 P | 37/08 (2006.01)  | A 6 1 P | 35/00  |       |
| C 0 7 K | 14/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 37/06  |       |
| C 0 7 K | 14/005 (2006.01) | A 6 1 P | 37/08  |       |
| C 0 7 K | 14/195 (2006.01) | C 0 7 K | 14/00  |       |
| C 0 7 K | 14/435 (2006.01) | C 0 7 K | 14/005 |       |
| C 0 7 K | 14/44 (2006.01)  | C 0 7 K | 14/195 |       |
| C 0 7 K | 14/47 (2006.01)  | C 0 7 K | 14/435 |       |
| C 1 2 N | 7/00 (2006.01)   | C 0 7 K | 14/44  |       |
| C 1 2 N | 15/09 (2006.01)  | C 0 7 K | 14/47  |       |
| C 1 2 N | 15/11 (2006.01)  | C 1 2 N | 7/00   |       |
| C 1 2 N | 15/63 (2006.01)  | C 1 2 N | 15/09  | Z     |
| C 1 2 N | 15/86 (2006.01)  | C 1 2 N | 15/11  | Z     |
|         |                  | C 1 2 N | 15/63  | Z     |
|         |                  | C 1 2 N | 15/86  | Z     |

## 欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 18162955.1

(32)優先日 平成30年3月20日(2018.3.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

## 欧州特許庁(EP)

(74)代理人 110000338

弁理士法人 HARAKENZO WORLD PATENT &amp; TRADEMARK

(72)発明者 ラーデマッハー, クリストフ

ドイツ連邦共和国, 1 4 4 7 1 プツダム, ツェッペリーンスシュトラッセ 1 1 6 ベー

(72)発明者 ヴァムホフ, アイケー・クリスティアン

アメリカ合衆国, 0 2 1 1 9 マサチューセッツ州, ロクスベリー, ワシントン ストリート 2 7 6 1

(72)発明者 シュルツェ, ジェッシカ

ドイツ連邦共和国, 1 4 4 7 1 ポツダム, マルツ フォン クヴィルンハイムシュトラッセ 4

(72)発明者 ヴァフチネック, ローベルト カルステン ヴィリ

ドイツ連邦共和国, 1 2 0 9 9 ベルリン, ヴェンケバハシュトラッセ 1 8 アー

(72)発明者 ザイツ, オリヴァー

ドイツ連邦共和国, 1 3 4 6 7 ベルリン, オディロシュトラッセ 4 1

(72)発明者 バヘム, グンナー

ドイツ連邦共和国, 1 2 0 4 9 ベルリン, リヒテンラーダー シュトラッセ 2 3

合議体

---

審判長 原田 隆興

審判官 岩下 直人

審判官 淵野 留香

(56)参考文献 国際公開第2005/092288 (WO, A1)

Drug Delivery System, 2017年, 32-3, pages 176-183

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K

A61P

C07K

C12N

CAPLUS/MEDLINE/REGISTRY/EMBASE/BIOSIS (STN)