

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-505628

(P2025-505628A)

(43)公表日 令和7年2月28日(2025.2.28)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/4745(2006.01)	A 6 1 K 31/4745	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/127(2025.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 7

(全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-546278(P2024-546278)	(71)出願人 523385846
(86)(22)出願日 令和5年2月6日(2023.2.6)	コーナー セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日 令和6年9月20日(2024.9.20)	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, ノースビーコン ストリート 3 0 0, ビルディング 3 9, 스위트 2 0 2
(86)国際出願番号 PCT/US2023/062064	
(87)国際公開番号 WO2023/150758	
(87)国際公開日 令和5年8月10日(2023.8.10)	
(31)優先権主張番号 63/307,569	(74)代理人 100078282
(32)優先日 令和4年2月7日(2022.2.7)	弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(74)代理人 100113413
(31)優先権主張番号 63/417,282	弁理士 森下 夏樹
(32)優先日 令和4年10月18日(2022.10.18)	(74)代理人 100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	弁理士 飯田 貴敏
(81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ)	(74)代理人 100181641
	弁理士 石川 大輔

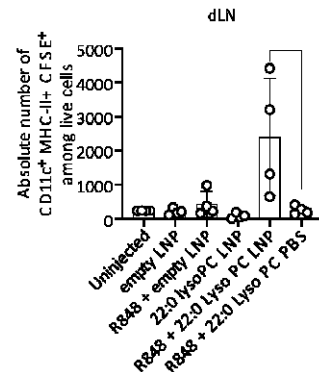
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 過剰活性化脂質ナノ粒子

(57)【要約】

本開示は、リゾホスファチジルコリン(LPC)化合物および少なくとも1つのさらなる脂質を含む脂質ナノ粒子、ならびに哺乳動物樹状細胞、例えばヒト樹状細胞の過剰活性化におけるその使用に関する。本開示はまた、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質を含む脂質ナノ粒子を含む組成物であって、病原体認識受容体アゴニスト、抗原、および哺乳動物樹状細胞の1つまたは複数を含む組成物、ならびに組成物の生成および使用のための方法に関する。

FIG. 8D



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン（LPC）、少なくとも1つのさらなる脂質、およびTLR7/8アゴニストを含む組成物であって、前記アシル鎖が、C13～C22アシル鎖またはC13～C24アシル鎖であり、前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である、

10

【請求項 2】

前記アシル鎖が、C18～C22アシル鎖またはC21～C24アシル鎖である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

抗原をさらに含む、請求項1または請求項2に記載の組成物。

【請求項 4】

樹状細胞をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン（LPC）、少なくとも1つのさらなる脂質、および抗原を含む組成物であって、前記アシル鎖が、C21～C24アシル鎖であり、前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である、

20

【請求項 6】

樹状細胞をさらに含む、請求項5に記載の組成物。

【請求項 7】

TLR7/8アゴニストをさらに含む、請求項5または請求項6に記載の組成物。

30

【請求項 8】

単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン（LPC）、少なくとも1つのさらなる脂質、および樹状細胞を含む組成物であって、前記アシル鎖が、C21～C24アシル鎖であり、前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である、

【請求項 9】

TLR7/8アゴニストをさらに含む、請求項8に記載の組成物。

40

【請求項 10】

抗原をさらに含む、請求項8または請求項9に記載の組成物。

【請求項 11】

前記アシル鎖が、C22アシル鎖である、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記アシル鎖が、完全に飽和している、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

50

前記 L P C が、1 - ベヘノイル - 2 - ヒドロキシ - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン [L P C (2 2 : 0)] を含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記 T L R 7 / 8 アゴニストが、9 0 0 ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する小分子である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記 T L R 7 / 8 アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記 T L R 7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R 8 4 8) を含む、請求項 1 5 に記載の組成物。 10

【請求項 1 7】

前記 T L R 7 / 8 アゴニストが、N L R ファミリーパイリンドメイン含有 3 (N L R P 3) を阻害しない、請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

前記 L P C が、L P C (2 2 : 0) を含み、前記 T L R 7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R 8 4 8) を含む、請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記抗原が、個体から得られた生体試料中に存在する、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 2 0】

前記生体試料が、生検組織を含む、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記生体試料が、細胞を含む、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記生体試料が、細胞を含まない、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記生体試料が、膿瘍由来の膿汁を含む、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記抗原が、タンパク質抗原を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の組成物。 30

【請求項 2 5】

前記抗原が、腫瘍抗原を含む、請求項 2 4 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記腫瘍抗原が、合成または組換えネオアンチゲンを含む、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記腫瘍抗原が、腫瘍細胞溶解物を含む、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記抗原が、微生物抗原を含み、前記微生物抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫抗原、および真菌抗原の 1 つまたは複数を含む、請求項 2 4 に記載の組成物。 40

【請求項 2 9】

前記微生物抗原が、精製または組換え表面タンパク質を含む、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記微生物抗原が、不活化全ウイルスを含む、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

リポソームを含む、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 2】

リポ多糖 (L P S) もモノホスホリル脂質 A (M P L A) も含まない、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の組成物。 50

【請求項 33】

酸化 1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (oxPAPC) も oxPAPC 種も含まない、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 34】

2 - [[(2R) - 2 - [(E) - 7 - カルボキシ - 5 - ヒドロキシヘプタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] - ヒドロキシホスホリル] オキシエチル - トリメチルアザニウム (HODiA-PC)、 [(2R) - 2 - [(E) - 7 - カルボキシ - 5 - オキソヘプタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2 - (トリメチルアザニウムイリ) エチルホスフェート (KODiA-PC) 10
、 1 - パルミトイル - 2 - (5 - ヒドロキシ - 8 - オキソ - オクタノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (HOOA-PC)、 2 - [[(2R) - 2 - [(E) - 5 , 8 - ジオキソオクタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] - ヒドロキシホスホリル] オキシエチル - トリメチルアザニウム (KOOA-PC)、 [(2R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - (5 - オキソペンタノイルオキシ) プロピル] 2 - (トリメチルアザニウムイリ) エチルホスフェート (POVPC)、 [(2R) - 2 - (4 - カルボキシブタノイルオキシ) - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2 - (トリメチルアザニウムイリ) エチルホスフェート (PGPC)、 [(2R) - 3 - 20
ヘキサデカノイルオキシ - 2 - [4 - [3 - [(E) - [2 - [(Z) - オクタ - 2 - エニル] - 5 - オキソシクロペンタ - 3 - エン - 1 - イリデン] メチル] オキシラン - 2 - イル] ブタノイルオキシ] プロピル] 2 - (トリメチルアザニウムイリ) エチルホスフェート (PEPC)、 [(2R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - [4 - [3 - [(E) - [3 - ヒドロキシ - 2 - [(Z) - オクタ - 2 - エニル] - 5 - オキソシクロペンタイリデン] メチル] オキシラン - 2 - イル] ブタノイルオキシ] プロピル] 2 - (トリメチルアザニウムイリ) エチルホスフェート (PEIPC) および / または 1 - パルミトイル - 2 - アゼラオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (PAzePC) を含まない、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

アジュバントをさらに含み、前記アジュバントが、アルミニウム塩アジュバント、水中スクアレン型エマルジョン、サポニン、またはそれらの組合せを含む、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の組成物。 30

【請求項 36】

請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の組成物、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤。

【請求項 37】

過剰活性化された樹状細胞を生成するための方法であって、前記方法が、前記樹状細胞を、過剰活性化された樹状細胞の生成のための、単一 C13 ~ C22 アシル鎖または C13 ~ C24 アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン (LPC)、少なくとも 1 つのさらなる脂質、および TLR7 / 8 アゴニストを含む有効量の組成物と接触させることを含み、 40

前記過剰活性化された樹状細胞が、パイロトーシスを受けることなく IL-1 ベータを分泌し、

前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、

前記 LPC および前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子 (LNP) の一部である、

方法。

【請求項 38】

前記樹状細胞が、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の組成物または請求項 36 に記載の製剤と *ex vivo* で接触させられる、請求項 37 に記載の方法。 50

【請求項 39】

前記樹状細胞が、請求項 36 に記載の製剤と *in vivo* で接触させられる、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

請求項 38 に記載の方法によって生成された少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 または 10^6 の前記過剰活性化された樹状細胞、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤。

【請求項 41】

抗原に対する免疫応答を刺激する方法であって、有効量の請求項 36 に記載の製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記抗原に対する前記免疫応答を刺激することを含む、方法。 10

【請求項 42】

がんを処置する方法であって、有効量の請求項 36 に記載の製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記がんを処置することを含む、方法。

【請求項 43】

異常細胞増殖を阻害する方法であって、有効量の請求項 36 に記載の製剤を、それを必要とする個体に投与して、異常細胞増殖を阻害することを含む、方法。

【請求項 44】

感染性疾患を処置する方法であって、有効量の請求項 36 に記載の製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記感染性疾患を処置することを含む、方法。 20

【請求項 45】

それを必要とする個体において前記抗原に対する免疫応答を誘導するための、請求項 36 に記載の製剤の使用。

【請求項 46】

腫瘍を有しているか、または有していた、それを必要とする個体において抗腫瘍免疫応答を誘導するための、請求項 36 に記載の製剤の使用。

【請求項 47】

微生物に感染しているか、または前記微生物に曝露された、それを必要とする個体において抗微生物免疫応答を誘導するための、請求項 36 に記載の製剤の使用。

【請求項 48】

前記個体が、哺乳動物対象である、請求項 19 ~ 47 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。 30

【請求項 49】

前記個体が、ヒト対象である、請求項 19 ~ 47 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 50】

免疫原性組成物を調製する方法であって、前記方法が、
 a) 腫瘍から腫瘍細胞が濃縮された懸濁液を得るステップと、
 b) 前記腫瘍細胞が濃縮された懸濁液から細胞を溶解させて、腫瘍細胞溶解物を得るステップと、
 c) 前記腫瘍細胞溶解物を、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン (LPC)、少なくとも 1 つのさらなる脂質、および toll 様受容体 7 / 8 (TLR 7 / 8) アゴニストを含む組成物と接触させて、前記免疫原性組成物を得るステップとを含み、
 前記アシル鎖が、C13 ~ C22 アシル鎖または C13 ~ C24 アシル鎖であり、
 前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、
 前記 LPC および前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子 (LNP) の一部である、
 方法。 40 50

【請求項 5 1】

ステップ a) が、前記腫瘍細胞が濃縮された懸濁液から白血球を枯渇させることを含み、必要に応じて前記白血球が、負の選択によって抗 CD 4 5 抗体を使用して枯渇させられる、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記細胞が、ステップ b) において 1 つまたは複数の凍結融解サイクルによって溶解させられる、請求項 5 0 または請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記アシル鎖が、完全飽和 C 1 8 ~ C 2 2 アシル鎖または完全飽和 C 1 8 ~ C 2 4 アシル鎖である、請求項 5 0 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5 4】

前記 LPC が、1 - ベヘノイル - 2 - ヒドロキシ - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン [LPC (2 2 : 0)] を含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記 TLR 7 / 8 アゴニストが、9 0 0 ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する小分子である、請求項 5 0 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記 TLR 7 / 8 アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記 TLR 7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R 8 4 8) を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

20

【請求項 5 8】

前記 TLR 7 / 8 アゴニストが、NLR ファミリーパイリンドメイン含有 3 (NLR P 3) を阻害しない、請求項 5 5 または請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記 LPC が、LPC (2 2 : 0) を含み、前記 TLR 7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R 8 4 8) を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 0】

ステップ a) の前に、がんを有する哺乳動物対象からの前記腫瘍から試料を得、前記試料から細胞の懸濁液を調製することをさらに含む、請求項 5 0 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6 1】

請求項 5 0 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の方法によって調製された、免疫原性組成物。

【請求項 6 2】

抗がん免疫応答を誘発する方法であって、がんを有する哺乳動物対象に、有効量の請求項 6 1 に記載の免疫原性組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 6 3】

前記抗がん免疫応答が、細胞性免疫応答を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記抗がん免疫応答が、がん抗原誘発性 IL - 1 ベータ分泌および / または CD 8 + T リンパ球の活性化を含む、請求項 6 3 に記載の方法。

40

【請求項 6 5】

前記がんが、非血液がんである、請求項 6 2 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記非血液がんが、癌腫、肉腫、または黒色腫である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記がんが、リンパ腫である、請求項 6 2 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

がんを処置する方法であって、

50

a) 腫瘍細胞溶解物、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン (LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、および toll 様受容体 7/8 (TLR 7/8) アゴニストを含む免疫原性組成物を調製するステップと

(前記腫瘍細胞溶解物は、がんを有する前記哺乳動物対象から得られた腫瘍の試料から調製されるか、または調製されたものであり、

前記アシル鎖は、C13 ~ C22 アシル鎖または C13 ~ C24 アシル鎖であり、

前記少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、

前記 LPC および前記少なくとも1つのさらなる脂質は、脂質ナノ粒子 (LNP) の一部である)、

b) 前記対象に、有効量の前記免疫原性組成物を投与するステップとを含む、方法。

【請求項 69】

前記アシル鎖が、完全飽和 C18 ~ C22 アシル鎖または完全飽和 C18 ~ C24 アシル鎖である、請求項 62 ~ 68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

前記 LPC が、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン [LPC (22:0)] を含む、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 71】

前記 TLR 7/8 アゴニストが、900 ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する小分子である、請求項 62 ~ 70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

前記 TLR 7/8 アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

前記 TLR 7/8 アゴニストが、レシキモド (R848) を含む、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記 LPC が、22:0 LPC を含み、前記 TLR 7/8 アゴニストが、レシキモド (R848) を含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 75】

前記対象に、有効量の追加の治療剤を投与することをさらに含む、請求項 68 ~ 74 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

前記追加の治療剤が、免疫チェックポイント阻害剤、抗悪性腫瘍薬剤、および放射線治療からなる群の1つまたは複数を含む、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン (LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、および病原体認識受容体 (PRR) アゴニストを含む組成物であって

、前記アシル鎖が、C13 ~ C22 アシル鎖または C13 ~ C24 アシル鎖であり、

前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、

前記 LPC および前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子 (LNP) の一部である、

組成物。

【請求項 78】

前記 PRR アゴニストが、toll 様受容体 (TLR)、NOD 様受容体 (NLR)、RIG-I 様受容体 (RLR)、または C 型レクチン受容体 (CLR) のアゴニストである、請求項 77 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 79】

前記 PRR アゴニストが、細胞質 DNA センサー (CDS) または IFN 遺伝子の刺激因子 (STING) のアゴニストである、請求項 77 に記載の組成物。

【請求項 80】

前記 PRR アゴニストが、R848、TL8-506、LPS、Pam2CSK4、および ODN2336 の 1 つまたは複数を含む、請求項 77 に記載の組成物。

【請求項 81】

抗原をさらに含む、請求項 77 ~ 80 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 82】

樹状細胞をさらに含む、請求項 77 ~ 81 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 83】

請求項 77 ~ 82 のいずれか一項に記載の組成物、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤。

【請求項 84】

単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン (LPC)、少なくとも 1 つのさらなる脂質、および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬製剤であって、前記アシル鎖が、C21 ~ C24 アシル鎖であり、前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記 LPC および前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子 (LNP) の一部である、
医薬製剤。

20

【請求項 85】

前記アシル鎖が、完全飽和 C22 アシル鎖である、請求項 83 または請求項 84 に記載の医薬製剤。

【請求項 86】

前記 LPC が、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン [LPC(22:0)] を含む、請求項 85 に記載の医薬製剤。

【請求項 87】

単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン (LPC)、少なくとも 1 つのさらなる脂質、および病原体認識受容体 (PRR) アゴニストを含む、ヒト樹状細胞の過剰活性化のための組成物であって、前記アシル鎖が、C22 アシル鎖であり、前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記 LPC および前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子 (LNP) の一部であり、前記組成物が、前記 LPC の代わりに PGPC を含む比較用組成物よりも高いレベルの樹状細胞過剰活性化を達成するのに有効である、
組成物。

30

40

【請求項 88】

前記より高いレベルの樹状細胞過剰活性化が、前記 PGPC および前記 PRR アゴニストを含む前記比較用組成物と接触させられた場合よりも、前記 LPC および前記 PRR アゴニストを含む前記組成物と接触させられた場合の方が、少なくとも 2、3 または 4 倍高いレベルで、前記ヒト樹状細胞から IL-1β 分泌を *in vitro* で誘導することを含み、前記 PRR アゴニストが LPS である、請求項 87 に記載の組成物。

【請求項 89】

前記 LPC の濃度および前記 PGPC の濃度が、約 10 μM ~ 約 80 μM の範囲内の同じ濃度であり、前記 LPS が、前記組成物および前記比較用組成物の両方において 1 μg / ml の濃度で存在する、請求項 88 に記載の組成物。

50

【請求項 90】

前記より高いレベルの樹状細胞過剰活性化が、前記 P G P C および前記 P R R アゴニストを含む前記比較用組成物の活性単位よりも、前記 L P C および前記 P R R アゴニストを含む前記組成物について活性単位が少なくとも 4、5 または 6 倍高い、前記ヒト樹状細胞からの I L - 1 ベータ分泌の脂質活性指数を含む、請求項 88 に記載の組成物。

【請求項 91】

前記個体が、イヌ対象である、請求項 19 ~ 47 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 92】

前記哺乳動物対象が、ヒト患者である、請求項 60 ~ 90 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

10

【請求項 93】

前記哺乳動物対象が、非ヒト患者である、請求項 60 ~ 90 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 94】

前記哺乳動物対象が、イヌ患者である、請求項 60 ~ 90 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 95】

前記樹状細胞が、ヒト樹状細胞である、請求項 1 ~ 90 または 92 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

20

【請求項 96】

前記樹状細胞が、イヌ樹状細胞である、請求項 1 ~ 91 または 94 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 97】

前記樹状細胞が、末梢血単核細胞 (P B M C) を含む組成物中に存在する、請求項 95 または請求項 96 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 98】

前記過剰活性化された樹状細胞が、I F N および T N F の一方または両方を分泌する、請求項 37 ~ 49 または請求項 91 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

30

【請求項 99】

前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、さらなるリン脂質および構造的脂質の一方または両方を含み、必要に応じて前記さらなるリン脂質が、1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C) を含み、前記構造的脂質が、コレステロールを含む、請求項 1 ~ 98 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 100】

前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、ペグ化脂質を含み、必要に応じて前記ペグ化脂質が、ポリエチレングリコール [P E G] 2000 ジミリスチルグリセロール [D M G] を含む、請求項 99 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 101】

前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質を含み、必要に応じて前記イオン化可能な脂質が、4 - (ジメチルアミノ) - ブタン酸、(10Z, 13Z) - 1 - (9Z, 12Z) - 9, 12 - オクタデカジエン - 1 - イル - 10, 13 - ノナデカジエン - 1 - イルエステル (D L i n - M C 3 - D M A) またはそのアナログもしくは誘導体を含む、請求項 99 または請求項 100 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

40

【請求項 102】

脂質ナノ粒子 (L N P) を含む組成物であって、前記 L N P が、第 1 のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第 2 のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも 1 つの脂質を含み、前記第 1 のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン (L P C) を含み、前記アシル鎖が、C 1

50

3 ~ C 2 4 アシル鎖である、組成物。

【請求項 1 0 3】

脂質ナノ粒子 (L N P) を含む組成物であって、前記 L N P が、第 1 のリン脂質、イオン化可能な脂質、第 2 のリン脂質、ペグ化脂質、および構造的脂質を含み、前記第 1 のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン (L P C) を含み、前記アシル鎖が、C 1 3 ~ C 2 4 アシル鎖である、組成物。

【請求項 1 0 4】

前記イオン化可能な脂質が、

i) 8 - [(2 - ヒドロキシエチル) [6 - オキソ - 6 - (ウンデシルオキシ) ヘキシル] アミノ] - オクタン酸、1 - オクチルノニルエステル (S M - 1 0 2) またはそのアナログもしくは誘導体、および / または 6 - ((2 - ヘキシルデカノイル) オキシ) - N - (6 - ((2 - ヘキシルデカノイル) オキシ) ヘキシル) - N - (4 - ヒドロキシブチル) ヘキサン - 1 - アミニウム (A L C - 0 3 1 5) またはそのアナログもしくは誘導体、あるいは

i i) (6 Z , 9 Z , 2 8 Z , 3 1 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6 , 9 , 2 8 , 3 1 - テトラエン - 1 9 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (D L i n - M C 3 - D M A) またはそのアナログもしくは誘導体

を含む、請求項 1 ~ 1 0 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0 5】

前記ペグ化脂質が、P E G 修飾ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine)、P E G 修飾ホスファチド酸、P E G 修飾セラミド、P E G 修飾ジアルキルアミン、P E G 修飾ジアシルグリセロール、P E G 修飾ジアルキルグリセロール (dialkylglycerol)、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0 6】

前記ペグ化脂質が、ポリエチレングリコール [P E G] 2 0 0 0 ジミリストイルグリセロール [D M G] を含む、請求項 1 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0 7】

前記構造的脂質が、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンブエステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、ウルソール酸、アルファ - トコフェロール、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 0 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0 8】

前記構造的脂質が、コレステロールを含む、請求項 1 ~ 1 0 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0 9】

前記さらなるリン脂質 (phospholipid) または前記第 2 のリン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2 - リゾホスファチジルコリン、およびスフィンゴミエリンからなる群から選択される親水性頭部部分を含む、請求項 1 ~ 1 0 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 1 0】

前記さらなるリン脂質または前記第 2 のリン脂質が、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ - リノレン酸、エルカ酸、アラキジン酸、アラキドン酸、フィタン (phytanoic) 酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される 1 つまたは複数の脂肪酸尾部部分を含む、請求項 1 ~ 1 0 8 に記載の組成物。

【請求項 1 1 1】

前記さらなるリン脂質または前記第 2 のリン脂質が、

10

20

30

40

50

1, 2 - ジリノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D L P C)、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - ホスホコリン (D M P C)、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D O P C)、
 1, 2 - ジバルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D P P C)、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C)、
 1, 2 - ジウンデカノイル - sn - グリセロ - ホスホコリン (D U P C)、
 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 (P O P C)、
 1, 2 - ジ - O - オクタデセニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - オレオイル - 2 - コレステリルヘミスクシノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、

10

1, 2 - ジリノレノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジアラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジドコサヘキサエノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D O P E)、
 1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 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、
 1, 2 - ジリノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジリノレノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジアラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジドコサヘキサエノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - r a c - (1 - グリセロール) ナ
 トリウム塩 (D O P G)、
 スフィンゴミエリン、および
 それらの組合せ

20

からなる群から選択される、請求項 1 ~ 108 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 112】

前記さらなるリン脂質または前記第 2 のリン脂質が、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C) を含む、請求項 1 ~ 108 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 113】

前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、i) カチオン性脂質を含み、ii) 中性またはアニオン性脂質を含むかまたはさらに含む、請求項 1 ~ 112 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 114】

前記カチオン性脂質が、
 i) 1, 2 - ジ - O - オクタデセニル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (D O T M A) またはそのアナログもしくは誘導体、および
 ii) 1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (D O T A P) またはそのアナログもしくは誘導体
 の一方または両方を含む、請求項 113 に記載の組成物。

40

【請求項 115】

前記中性またはアニオン性脂質が、
 i) 1, 2 - ジ - (9 Z - オクタデセノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D O P E) またはそのアナログもしくは誘導体、および / あるいは
 ii) コレステロールまたはそのアナログもしくは誘導体、および / あるいは
 iii) 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D O P C) またはそのアナログもしくは誘導体
 を含む、請求項 113 または請求項 114 に記載の組成物。

【請求項 116】

前記 L P C の前記アシル鎖が、C 21 ~ C 24 アシル鎖である、請求項 102 ~ 115

50

のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 117】

前記 LPC の前記アシル鎖が、C22アシル鎖である、請求項 102 ~ 115 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 118】

TLR7 / 8 アゴニストをさらに含む、請求項 102 ~ 117 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 119】

前記 TLR7 / 8 アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、請求項 118 に記載の組成物。

10

【請求項 120】

前記 TLR7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R848) を含む、請求項 119 に記載の組成物。

【請求項 121】

前記 LPC が、LPC (22:0) を含み、前記 TLR7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R848) を含む、請求項 119 に記載の組成物。

【請求項 122】

抗原をさらに含む、請求項 102 ~ 121 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 123】

前記抗原が、腫瘍抗原またはネオアンチゲンである、請求項 122 に記載の組成物。

20

【請求項 124】

前記抗原が、微生物 (microbioal) 抗原であり、必要に応じて前記微生物抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫抗原、または真菌抗原である、請求項 122 に記載の組成物。

【請求項 125】

前記組成物が、単離された mRNA を含まない、請求項 1 ~ 124 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 126】

前記 LNP が、約 500 ナノメートル未満、必要に応じて約 5 ~ 約 500 ナノメートル、必要に応じて約 10 ~ 約 400 ナノメートル、必要に応じて約 20 ~ 約 300 ナノメートル、または必要に応じて約 25 ~ 約 250 ナノメートルの有効径を有する、請求項 1 ~ 125 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

30

【請求項 127】

前記 LNP が、約 250 ナノメートル未満の有効径を有する、請求項 126 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 128】

前記 LNP が、約 125 ナノメートル未満の有効径を有する、請求項 127 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【請求項 129】

前記 LNP が、約 10 ~ 約 110 ナノメートルの有効径を有する、請求項 128 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

40

【請求項 130】

前記組成物が、界面活性剤を含まない、請求項 1 ~ 129 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、方法または使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年10月18日出願の米国仮特許出願第63/417,282号および2022年2月7日出願の米国仮特許出願第63/307,569号に基づく優先権

50

および利益を主張するものであり、その全体はそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

分野

本開示は、リゾホスファチジルコリン(LPC)化合物および少なくとも1つのさらなる脂質を含む脂質ナノ粒子、ならびに哺乳動物樹状細胞、例えばヒト樹状細胞の過剰活性化におけるその使用に関する。本開示はまた、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質を含む脂質ナノ粒子を含む組成物であって、病原体認識受容体アゴニスト、抗原、および哺乳動物細胞の1つまたは複数を含む組成物、ならびに組成物の生成および使用のための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

脂質ナノ粒子(LNP)は、特にmRNAワクチンの状況において重要なワクチン送達ツールになってきた。LNPベースのmRNAワクチンおよびタンパク質サブユニットワクチンは、抗原特異的抗体応答を誘導するのに有効であるが、多くの場合、抗原特異的T細胞応答の制限を示す。

【0004】

樹状細胞(DC)は、適切なT細胞応答の確立に重要ないくつかのシグナルをT細胞に提供する。シグナルの種類および大きさは、DCの活性化状態に依存して決まる(Zhivaki and Kagan, Nature Reviews Immunology, 22:322-339, 2022)。ナイーブDCは、抗原を取り込む能力を有する静止細胞である。活性DCは、抗原を取り込む能力を有するだけでなく、主要組織適合性複合分子上に抗原のペプチド断片を提示する増強された能力も有する。加えて、活性DCは、T細胞の刺激のために共刺激分子の発現が増加している。活性化過剰DCは、それらの活性化DC対応物と活性を共有しているだけでなく、リンパ節に過剰遊走し、IL-1を分泌する能力も得る。パイロトーシスのDCは、活性化過剰DCと同様に、高レベルのIL-1を分泌する。しかし、パイロトーシスのDCは、それらのT細胞刺激能力を急速に喪失する死細胞である。DCは、病原体関連分子パターン(PAMP)含有分子、リポ多糖(LPS)およびダメージ関連分子パターン(DAMP)含有分子、例えば、PGPC(1-パルミトイル-2-グルタリル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)を使用して成熟する場合、パイロトーシスを伴うことなくIL-1を分泌し、これらの細胞が活性化過剰であることを特徴付けている(Zanoni et al., Science, 352(6290):1232-1236, 2016)。

したがって、樹状細胞を過剰活性化する能力を有するLNP製剤は、ワクチンに包含するのに望ましい。特に、IL-1分泌を誘導し、長寿命T細胞応答の産生を増強する能力を有するLNPが、当技術分野において必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Zhivaki and Kagan, Nature Reviews Immunology, 22: 322-339, 2022

【非特許文献2】Zanoni et al., Science, 352(6290):1232-1236, 2016

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

簡単な要旨

本開示は、リゾホスファチジルコリン(LPC)化合物および少なくとも1つのさらなる脂質を含む脂質ナノ粒子、ならびに哺乳動物樹状細胞の過剰活性化におけるその使用に関する。本開示はまた、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質を含む脂質ナノ粒子を含む組成物であって、病原体認識受容体アゴニスト、抗原、および哺乳動物樹状細胞の

10

20

30

40

50

1つまたは複数をさらに含む組成物、ならびに組成物の生成および使用のための方法に関する。

【0007】

特に、本開示は、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、およびTLR7/8アゴニストを含む組成物であって、アシル鎖が、C13~C22アシル鎖またはC13~C24アシル鎖であり、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である、組成物を提供する。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、アシル鎖は、C18~C22アシル鎖、C21~C24アシル鎖、またはC22アシル鎖である。一部の実施形態では、組成物は、抗原および/または樹状細胞をさらに含む。

10

【0008】

一部の態様では、本開示は、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、および抗原を含む組成物であって、アシル鎖が、C21~C24アシル鎖であり、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である、組成物を提供する。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、組成物は、樹状細胞および/またはTLR7/8アゴニストをさらに含む。

20

【0009】

一部の態様では、本開示は、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、および樹状細胞を含む組成物であって、アシル鎖が、C21~C24アシル鎖であり、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である、組成物を提供する。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、組成物は、TLR7/8アゴニストおよび/または抗原をさらに含む。

【0010】

前述の態様の一部の実施形態では、抗原は、個体から得られた生体試料中に存在する。一部の実施形態では、生体試料は、生検組織を含む。一部の実施形態では、生体試料は、細胞を含む。他の実施形態では、生体試料は、細胞を含まない。一部の実施形態では、生体試料は、膿瘍由来の膿汁を含む。一部の実施形態では、抗原は、タンパク質抗原を含む。一部の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原を含む。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、合成または組換えネオアンチゲンを含む。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍細胞溶解物を含む。一部の実施形態では、抗原は、微生物抗原を含み、微生物抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫抗原、および真菌抗原の1つまたは複数を含む。一部の実施形態では、微生物抗原は、精製または組換え表面タンパク質を含む。一部の実施形態では、微生物抗原は、不活化全ウイルスを含む。

30

【0011】

一部の実施形態では、組成物は、LPSもMPLAも含まない。一部の実施形態では、組成物は、oxPAPCもoxPAPC種も含まない。一部の実施形態では、組成物は、HOdiA-PC、KOdiA-PC、HOOA-PC、KOOA-PC、および/またはPGPCを含まない。一部の実施形態では、組成物は、単離されたmRNAを含まない。一部の実施形態では、組成物は、界面活性剤(例えば、ポロキサマー)を含まない。一部の実施形態では、組成物は、Poloxamer 407(KP407)、Poloxamer 188(KP188)、および/またはPluronic(登録商標) P123(P123)を含まない。

40

【0012】

一部の実施形態では、組成物は、アジュバントをさらに含み、アジュバントは、アルミ

50

ニウム塩アジュバント、水中スクアレン型エマルジョン、サポニン、またはそれらの組合せを含む。

【0013】

一部の実施形態では、本開示は、前述の態様のいずれかの組成物および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬製剤を提供する。一部の実施形態では、製剤は、界面活性剤（例えば、ポロキサマー）を含まない。一部の実施形態では、製剤は、Poloxamer 407（KP407）、Poloxamer 188（KP188）、および/またはPluronic（登録商標）P123（P123）を含まない。

【0014】

他の態様では、本開示は、過剰活性化された樹状細胞を生成するための方法であって、樹状細胞を、過剰活性化された樹状細胞の生成のための、単一C13～C22アシル鎖またはC13～C24アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン（LPC）、少なくとも1つのさらなる脂質、およびTLR7/8アゴニストを含む有効量の組成物と接触させることを含み、過剰活性化された樹状細胞が、パイロトーシスを受けることなくIL-1ベータを分泌し、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である、方法を提供する。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、樹状細胞は、前述の実施形態のいずれか1つの組成物または医薬製剤と*ex vivo*で接触させられる。他の実施形態では、樹状細胞は、前述の実施形態のいずれか1つの組成物を含む医薬製剤と*in vivo*で接触させられる。一部の態様では、本開示は、前述の実施形態によって生成された複数の過剰活性化された樹状細胞、および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬製剤を提供する。一部の実施形態では、複数は、少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 または 10^8 の過剰活性化されたDCを含む。

【0015】

他の態様では、本開示は、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン（LPC）、少なくとも1つのさらなる脂質、および病原体認識受容体（PRR）アゴニストを含む組成物であって、アシル鎖が、C13～C22アシル鎖またはC13～C24アシル鎖であり、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である、組成物を提供する。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、PRRアゴニストは、*tol*様受容体（TLR）、NOD様受容体（NLR）、RIG-I様受容体（RLR）、またはC型レクチン受容体（CLR）のアゴニストである。一部の実施形態では、PRRアゴニストは、細胞質DNAセンサー（CDS）またはIFN遺伝子の刺激因子（STING）のアゴニストである。一部の実施形態では、PRRアゴニストは、TLR7/8アゴニストを含む。一部の実施形態では、組成物は、抗原および/または樹状細胞をさらに含む。

【0016】

前述の態様の一部の実施形態では、アシル鎖は、C21～C24アシル鎖である。一部の実施形態では、アシル鎖は、C22アシル鎖である。一部の実施形態では、アシル鎖は、完全に飽和している。一部の実施形態では、LPCは、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン[LPC(22:0)]を含む。

【0017】

前述の態様の一部の実施形態では、TLR7/8アゴニストは、900ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する小分子である。一部の実施形態では、TLR7/8アゴニストは、イミダゾキノリン化合物を含む。一部の実施形態では、TLR7/8アゴニストは、レシキモド(R848)を含む。一部の実施形態では、LPCは、LPC(22:0)を含み、TLR7/8アゴニストは、レシキモド(R848)を含む。

【0018】

10

20

30

40

50

本開示はさらに、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン (LPC) 化合物、少なくとも1つのさらなる脂質、および病原体認識受容体 (PRR) アゴニストを含む、ヒト樹状細胞の過剰活性化のための組成物であって、アシル鎖が、C22アシル鎖であり、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子 (LNP) の一部であり、組成物が、LPCの代わりに比較用化合物を含む比較用組成物よりも高いレベルの樹状細胞過剰活性化を達成するのに有効である、組成物を提供する。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、過剰活性化は、*in vitro*または*ex vivo*で生じる。他の実施形態では、過剰活性化は、*in vivo*で生じる。一部の実施形態では、より高いレベルの樹状細胞過剰活性化は、比較用化合物およびPRRアゴニストを含む比較用組成物と接触させられた場合よりも、LPCおよびPRRアゴニストを含む組成物と接触させられた場合の方が、少なくとも2、3または4倍高いレベルで、哺乳動物 (例えば、ヒト) 樹状細胞からIL-1ベータ分泌を*in vitro*で誘導することを含み、PRRアゴニストはLPSである。一部の実施形態では、LPCの濃度および比較用化合物の濃度は、必要に応じて約10 μ M ~ 約80 μ Mの範囲内の同じ濃度であり、LPSは、組成物および比較用組成物の両方において1 μ g/mlの濃度で存在する。一部の実施形態では、より高いレベルの樹状細胞過剰活性化は、比較用化合物およびPRRアゴニストを含む比較用組成物の活性単位よりも、LPCおよびPRRアゴニストを含む組成物について活性単位が少なくとも4、5または6倍高い、哺乳動物 (例えば、ヒト) 樹状細胞からのIL-1ベータ分泌の脂質活性指数を含む。一部の実施形態では、比較用化合物はPGPCである。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1A~1Bは、指定された刺激を用いる活性化後2日目の、イヌ末梢血単核細胞 (PBMC) によるIL-1分泌を示しており、それぞれ全濃度 (図1A) およびR848単独と比べたドナー当たりの倍数変化 (図1B) として示されている。結果は、22:0 LYSO PCがR848と組み合わせられた場合、イヌPBMCを刺激して、DAMP、例えばPGPCまたはLPSおよびAlumと同等かまたはそれよりも高いレベルでIL-1を分泌することができることを実証している。図1Cは、指定された刺激を用いる活性化後2日目の、イヌPBMCの相対的生存率を示している。結果は、イヌPBMCが、22:0 LYSO PCを用いる処置後もまだ生存していることを実証している。

【0020】

【図2】図2A~2Bは、指定された刺激を用いる活性化後2日目の、ヒトPBMCによるIL-1分泌を示しており、全濃度 (図2A) およびR848単独と比べたドナー当たりの倍数変化 (図2B) として示されている。結果は、22:0 LYSO PCがR848と組み合わせられた場合、ヒトPBMCを刺激して、DAMP、例えばPGPCまたはLPSおよびAlumと同等かまたはそれよりも高いレベルでIL-1を分泌することができることを実証している。図2Cは、指定された刺激を用いる活性化後2日目の、ヒトPBMCの相対的生存率を示している。結果は、ヒトPBMCが、22:0 LYSO PCを用いる処置後もまだ生存していることを実証している。

【0021】

【図3】図3A~3Bは、指定された刺激を用いる活性化後2日目の、ヒトPBMCによるIFN (図3A) およびTNF (図3B) の分泌を示しており、R848単独と比べたドナー当たりの倍数変化として示されている。結果は、22:0 LYSO PCがR848と組み合わせられた場合、ヒトPBMCを刺激して、DAMP、例えばPGPCまたはLPSおよびAlumと同等かまたはそれよりも高いレベルで他の免疫刺激性サイトカインを分泌することができることを実証している。

【0022】

【図4】図4は、脂質ナノ粒子(LNP)に様々な濃度の22:0 Lys o P Cを包含しても、生じるLNPのサイズに影響を与えないことを示している。このプロットでは、LNP2およびLNP3のビヒクル対照は同じであった。

【0023】

【図5-1】図5Aは、GenVoy LNPへの22:0 Lys o P Cの包含の定量化を示している。図5Bは、イオン化可能な脂質を含有するLNPへの22:0 Lys o P Cの包含の定量化を示している。図5Cは、イオン化可能な脂質を欠いたLNPへの22:0 Lys o P Cの包含の定量化を示している。図5Dは、22:0 Lys o P Cの投入量が増加すると、LNPへの22:0 Lys o P Cの負荷が増大することを示している。

10

【図5-2】同上。

【0024】

【図6-1】図6Aは、LNPの存在または非存在下および病原体関連分子パターン含有分子(PAMP)の存在または非存在下で培養した単球由来樹状細胞(moDC)の生存率を示している。図6Bは、LNPの存在または非存在下およびPAMPの存在または非存在下で培養したmoDCによるIL-1分泌を示している。図6A~6Bのアッセイで利用したPAMPは、TLR7/8アゴニストであるレシキモド(R848)であった。22:0 Lys o P Cは、存在する場合、82.5 μMの濃度で包含されていた。

【図6-2】同上。

【0025】

20

【図7】図7Aは、PBS中22:0 Lys o P Cの直径が大きく、大きい範囲の粒径を有することを示している。図7Bは、LNPに負荷された22:0 Lys o P Cが、かなり小さい粒径をもたらし、均一性が増大していることを示している。

【0026】

【図8】図8A~Dは、22:0 Lys o P C LNPが、マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)の過剰活性化を誘導することを示している。図8Aは、Cell Titer Glowアッセイを使用して測定される通り、種々の製剤を用いる処置後48時間目のBMDCの生存率を示している。提示されているデータは、R848で処置した細胞と比べたものである。図8Bは、IL-6分泌を示しており、図8Cは、ELISAによって測定される通り、種々の製剤を用いる処置後48時間目のBMDCによるIL-1分泌を示している。平均およびSDが示されており、1回の実験からの3回繰り返しの代表値である。図8Dは、フローサイトメリーによって測定される通り、CFSE+である流入領域リンパ節におけるCD11c+MHC-II+DCの絶対数を示している。CFSE染色および注入前に、BMDCを種々の製剤で24時間処置した。独立t試験を使用した。平均およびSDが示されており、これらは、1回の実験からのマウス4匹の代表値である。

30

【発明を実施するための形態】

【0027】

詳細な説明

本開示は、リゾホスファチジルコリン(LPC)化合物および少なくとも1つのさらなる脂質を含む脂質ナノ粒子(LNP)、ならびに哺乳動物樹状細胞の過剰活性化におけるその使用に関する。本開示はまた、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質を含むLNPを含む組成物であって、病原体認識受容体アゴニスト、抗原、および哺乳動物樹状細胞の1つまたは複数を含む組成物、ならびに組成物の生成および使用のための方法に関する。一部の実施形態では、樹状細胞は、ヒト樹状細胞である。他の実施形態では、樹状細胞は、非ヒト樹状細胞である。一部の実施形態では、非ヒト樹状細胞は、げっ歯類樹状細胞ではない。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。

40

【0028】

50

本開示の一部の実施形態では、組成物のLNPは、単一脂質層を有する粒子（ミセル）と比べて、脂質二重層を有する粒子（リポソーム）が濃縮されている。具体的には、一部の実施形態では、LNPは、リポソームを含み、ミセルをほとんどまたは全く含んでいない。

一般技術および定義

【0029】

本開示の実践では、別段指定されない限り、当業者が備えている技能の範囲内の分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術を用いる。

【0030】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、別段の指定がない限り、複数の言及対象を含む。例えば、「1種の(an)」賦形剤は、1種または複数の賦形剤を含む。

【0031】

「含む」という句は、本明細書で使用される場合、オープンエンドであり、そのような実施形態がさらなる要素を含み得ることを示す。それとは対照的に、「からなる」という句は、クローズドであり、そのような実施形態がさらなる要素を含まないことを示す（微量の不純物を除く）。「から本質的になる」という句は、部分的にクローズドであり、そのような実施形態が、そのような実施形態の基本的特徴を実質的に変化させることのない要素をさらに含み得ることを示す。

【0032】

「約」という用語は、本明細書で値に言及して使用される場合、その値の90%~110%を包含する（例えば、約900ダルトンの分子量は、810ダルトン~990ダルトンの分子量を指す）。

【0033】

物質の「有効量」または「十分な量」は、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量であり、したがって、「有効量」は、それが適用される状況に応じて決まる。例えば、免疫原性組成物を投与する状況では、有効量は、抗原に対する免疫応答（例えば、抗原反応性抗体および/または細胞免疫応答）を刺激するのに十分な抗原、ならびにリゾホスファチジルコリン(LPC)化合物およびPRRアゴニストの一方または

【0034】

「個体」および「対象」という用語は、哺乳動物を指す。「哺乳動物」には、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、サル）、家畜動物、スポーツ用動物、げっ歯類（例えば、マウスおよびラット）、およびペット（例えば、イヌおよびネコ）が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、対象は、ヒト患者、例えば、がんおよび/または感染性疾患に罹患しているヒト患者である。

【0035】

「用量」という用語は、本明細書で免疫原性組成物に言及して使用される場合、いずれかの時点で対象によって摂取される（対象に投与されるまたは対象が受ける）免疫原性組成物の測定された一部分を指す。

【0036】

「単離された」および「精製された」という用語は、本明細書で使用される場合、材料の生成中に、他の関連している少なくとも1種の構成成分から除去される（例えば、その本来の環境から除去される）材料を指す。一例として、LPCに言及して使用される場合、単離されたLPCは、薄層クロマトグラフィー、またはガスクロマトグラフィーによって決定される通り、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%純粋である。さらなる例として、組換えタンパク質に言及して使用される場合、単離されたタンパク質は、タンパク質を生成した宿主細胞の培養培地から除去されたタンパク質を指す。加えて、合成された化合物に言及して使用される場合、単離された化合物または精製

10

20

30

40

50

された化合物は、それが合成していた反応混合物から除去されている。」

【0037】

「医薬製剤」および「医薬組成物」という用語は、活性成分の生物活性を有効にするような形態で存在しており、製剤または組成物が投与され得る個体に対して容認しがたく毒性になるさらなる構成成分を含有していない調製物を指す。そのような製剤または組成物は、無菌であることが意図される。

【0038】

「賦形剤」は、本明細書で使用される場合、用いられる投与量および濃度で曝露される細胞または哺乳動物に対して非毒性の、薬学的に許容される賦形剤、担体、ビヒクルまたは安定剤を含む。多くの場合、生理的に許容される賦形剤は、pH緩衝水溶液である。

10

【0039】

「抗原」という用語は、抗体またはT細胞抗原受容体によって特異的に認識され、結合される物質を指す。抗原には、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖、複合炭水化物、糖、糖グリコシド、脂質およびリン脂質、それらの一部ならびにそれらの組合せが含まれ得る。抗原は、本開示の組成物中に存在する場合、合成されるか、または自然から単離され得る。本開示の方法における投与に好適な抗原には、抗原特異的B細胞またはT細胞応答を誘発することができるあらゆる分子が含まれる。ハプテンは、「抗原」の範囲内に含まれる。「ハプテン」は、それ自体は免疫原性ではないが、一般により大きい免疫原性分子（担体）とコンジュゲートした場合に免疫原性にされる、低分子量化合物である。

20

【0040】

「ポリペプチド抗原」には、精製された天然ペプチド、合成ペプチド、組換えペプチド、粗ペプチド抽出物、または部分的に精製されたもしくは未精製の活性な状態のペプチド（例えば、弱毒化または不活化ウイルス、微生物または細胞の一部であるペプチド）、またはそのようなペプチドの断片が含まれ得る。ポリペプチド抗原は、好ましくは長さがアミノ酸残基少なくとも8個分である。

【0041】

「アゴニスト」という用語は、最も広範な意味で使用され、それには、受容体を介してシグナル伝達を活性化するあらゆる分子が含まれる。一部の実施形態では、アゴニストは、受容体に結合する。例えば、TLR8アゴニストは、TLR8受容体に結合し、TLR8 - シグナル伝達経路を活性化する。

30

【0042】

「アルキル」は、一価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基を指す。Cxアルキルは、x個の炭素原子を有するアルキル基を指す。Cx~CyアルキルまたはCx~yアルキルは、両端を含みx個~y個の間の炭素原子を有するアルキル基を指す。

【0043】

「アルキレン」は、二価の飽和脂肪族ヒドロカルビル基を指す。

【0044】

「アルケニル」は、少なくとも1つの二重結合(>C=C<)を有する一価のヒドロカルビル基を指す。Cxアルケニルは、x個の炭素原子を有するアルケニル基を指す。Cx~CyアルケニルまたはCx~yアルケニルは、両端を含みx個~y個の間の炭素原子を有するアルケニル基を指す。

40

【0045】

応答またはパラメーターの「刺激」には、その応答またはパラメーターを、目的のパラメーターを除くこと以外は同じ条件と比較した場合または代替的に別の条件と比較して、誘発および/または増強することが含まれる（例えば、TLRアゴニストが存在しない場合と比較して、TLRアゴニストの存在下でTLRシグナル伝達が増大する）。例えば、免疫応答の「刺激」は、応答の増大を意味する。その増大は、測定されるパラメーターに応じて、2倍~2,000倍、または5倍~500倍もしくはそれより大きく、または2、5、10、50、または100倍~500、1,000、2,000、5,000、ま

50

たは10,000倍になり得る。

【0046】

それとは逆に、応答またはパラメーターの「阻害」には、その応答またはパラメーターを、目的のパラメーターを除くこと以外は同じ条件と比較した場合または代替的に別の条件と比較して、低減および/または抑制することが含まれる(例えば、プラセボ組成物の投与または処置なしと比較して、LPC化合物、ならびに病原体認識受容体アゴニスト、抗原およびヒト樹状細胞の1つまたは複数を含む組成物の投与後に、異常細胞増殖が低減する)。例えば、免疫応答の「阻害」は、応答の低減を意味する。その低減は、測定されるパラメーターに応じて、2分の1~2,000分の1、または5分の1~500分の1もしくはそれより小さく、または2,5,10,50,または100分の1~500,1000,2,000,5,000,または10,000分の1になり得る。

10

【0047】

「より高い」および「より低い」という相対的用語は、目的のパラメーターを除くこと以外は同じ条件と比較した場合、または代替的に別の条件と比較して、それぞれ応答またはパラメーターの測定可能な増加または低下を指す。例えば、「より高いレベルのDC過剰活性化」は、処置条件(本開示のLPC化合物を含む)の結果としてのDC過剰活性化のレベルが、対照条件(例えば、LPC、PGPC、oxPAPCなどが無い)の結果としてのDC過剰活性化のレベルの、少なくとも2,3,4,5,6,7,8,9,または10倍であることを指す。同様に、「より低いレベルのDC過剰活性化」は、処置条件(本開示のLPC化合物を含む)の結果としてのDC過剰活性化のレベルが、対照条件(例えば、LPC、PGPC、oxPAPCなどが無い)の結果としてのDC過剰活性化のレベルの、少なくとも2,3,4,5,6,7,8,9,または10分の1であることを指す。一部の実施形態では、対照条件は、処置条件のLPCの代わりに、比較用化合物を含む。

20

【0048】

本明細書で使用される場合、「免疫化」という用語は、抗原に対する哺乳動物対象の反応を増大し、それゆえに感染に抵抗するもしくはそれを克服する、および/または疾患に抵抗するその能力を改善するプロセスを指す。

【0049】

「ワクチン接種」という用語は、本明細書で使用される場合、哺乳動物対象の身体へのワクチンの導入を指す。

30

【0050】

「アジュバント」は、抗原を含む組成物に添加される場合、曝露時に哺乳動物レシピエントにおける抗原に対する免疫応答を増強または強化する物質を指す。

【0051】

疾患を「処置すること」または疾患の「処置」という用語は、個体において臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得ることを目指して、個体(ヒトまたはヒト以外)に1種または複数の治療剤を投与することを含み得るプロトコールを実行することを指す。有益なまたは所望の臨床結果には、疾患の1つまたは複数の徴候または症状の軽減または改善、疾患の程度の低下、病状の安定化(すなわち、悪化しないこと)、疾患の拡大の防止、疾患進行の遅延または緩徐、病状の改善または緩和、および寛解(部分的であろうと完全であろうと)が含まれるが、これらに限定されない。「処置」は、処置を受けていない個体の予想される生存期間と比較して、生存期間を延長することを意味することもできる。さらに、「処置すること」および「処置」は、一用量の1種もしくは複数の治療剤の投与によって生じ得るか、または一連の用量の1種もしくは複数の治療剤の投与の際に生じ得る。「処置すること」または「処置」は、徴候または症状の完全な軽減を必要とせず、治癒を必要とせず、具体的には個体に対して緩和効果だけを有するプロトコールを含む。疾患または障害を「緩和すること」は、予想される未処置の転帰と比較して、疾患もしくは障害の程度および/もしくは望ましくない臨床症状が減少すること、および/または疾患もしくは障害の進行の時間経過が緩徐されることを意味する。

40

50

I. リゾホスファチジルコリン化合物

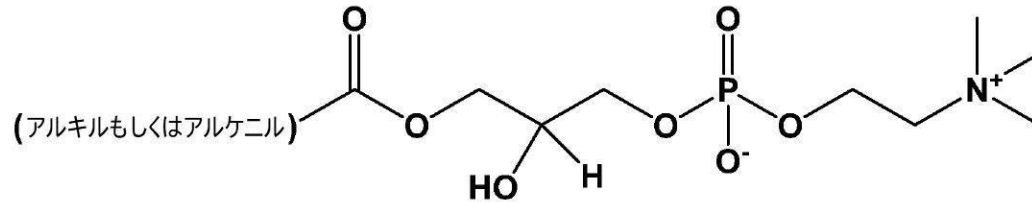
【0052】

「リゾホスファチジルコリン」(LPC)または「リゾホスファチジルコリン分子」は、グリセロールのヒドロキシ基上に1個のホスホコリン基を担持しており、グリセロールのその他の2つのヒドロキシ基のうちの1つの上に1個のアシル基を担持しているグリセロール分子を指す。残りのヒドロキシ基は置換されていない。

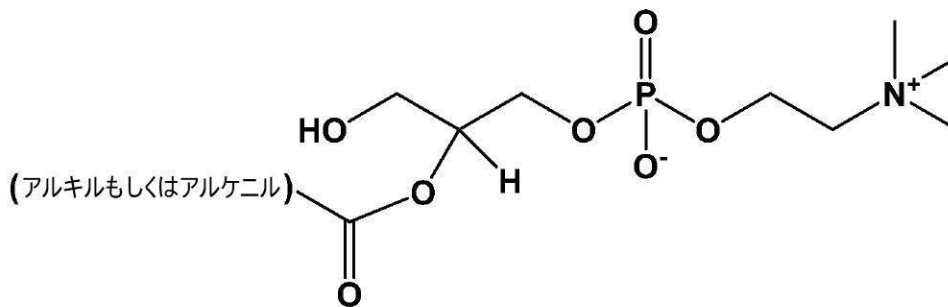
【0053】

一部の実施形態では、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)は、形態

【化1】



または

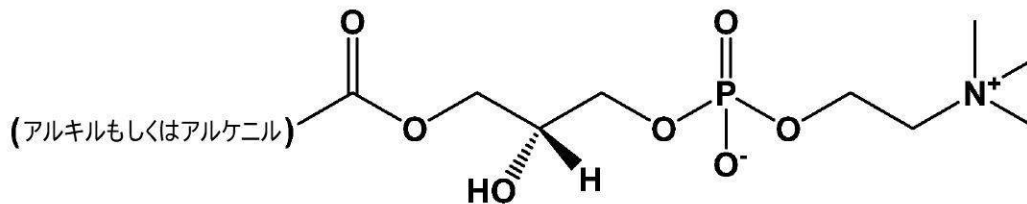


のものである。

【0054】

一部の実施形態では、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)は、形態

【化2】



または

10

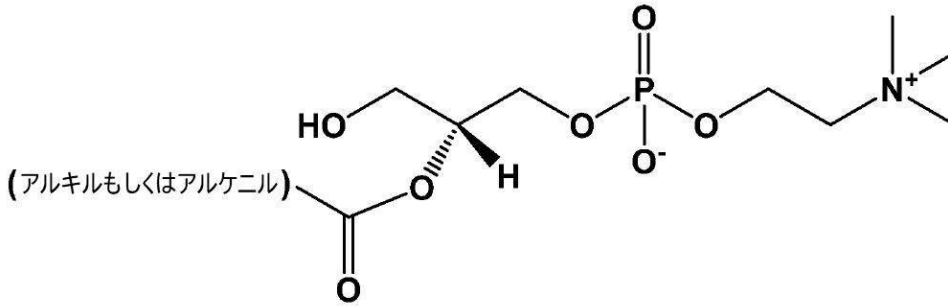
20

30

40

50

【化3】



10

のものである。

【0055】

アルキルまたはアルケニル鎖は、カルボニル炭素と一緒にあって、アルキルまたはアルケニル鎖よりも炭素原子が1個分長いアシル鎖を形成する。例えば、(C23アルキル) - C(=O) - 基は、C24アシル鎖を形成する。したがって、「(アルキルまたはアルキレン)」基がC12～C23アルキル基(例えば、C12～C19アルキル基またはC20～C23アルキル基)である場合、(C12～C23アルキル - C(=O) - 基は、C13～C24アシル鎖(例えば、C13～C20アシル鎖またはC21～C24アシル鎖)を形成する。「(アルキルまたはアルキレン)」基がC12～C23アルケニル基(例えば、C12～C19アルケニル基またはC20～C23アルケニル基)である場合、(C12～C23アルケニル - C(=O) - 基は、C13～C24アシル鎖(例えば、C13～C20アシル鎖またはC21～C24アシル鎖)を形成する。アシル鎖は、アルキル含有アシル基とアルケニル含有アシル基とを区別するために、飽和アシルまたは不飽和アシルと呼ぶことができる。標準的なデルタ表示またはオメガ表示は、不飽和アシル鎖中の1つまたは複数の二重結合の位置を示すために使用され得る。

20

【0056】

本開示のリゾホスファチジルコリン(LPC)化合物は、アシル鎖がC13～C22アシル鎖またはC13～C24アシル鎖である単一アシル鎖を有する。一部の実施形態では、アシル鎖は、C18～C22アシル鎖またはC21～C24アシル鎖である。一部の好ましい実施形態では、アシル鎖は、C22アシル鎖である。本開示のLNPに包含するための例示的なLPC化合物の名称および構造、ならびにそれらのケミカルアブストラクトサービス(CAS)登録番号は、参照により本明細書に組み込まれる国際出願PCT/US2022/071664号の表Iの化合物番号30～43、必要に応じて番号30～42として列挙されている。リゾリン脂質を合成するためのいくつかの方法が公知である(例えば、D'Arrigo et al, "Synthesis of lysophospholipids," *Molecules*, 15(3):1354-77, 2010およびYang et al., "Lysophosphatidylcholine synthesis by lipase-catalyzed ethanolysis," *J Oleo Sci.*, 64(4):443-7, 2015、およびそれらに引用されている参考文献を参照されたい)。加えて、多くのリゾリン脂質が商業的に入手可能である。

30

40

II. 病原体認識受容体アゴニスト

【0057】

本開示の組成物および方法は、病原体認識受容体(PRR)アゴニストをさらに含む得る。一部の実施形態では、PRRアゴニストは、Toll様受容体(TLR)、NOD様受容体(NLR)、RIG-I様受容体(RLR)、またはC型レクチン受容体(CLR)のアゴニストを含む。他の実施形態では、PRRアゴニストは、細胞質DNAセンサー(CDS)またはIFN遺伝子の刺激因子(STING)を含む。一部の実施形態では、PRRアゴニストは、TLR7/8アゴニストを含む。

A. TLR7/8アゴニスト

【0058】

50

「TLR7/8アゴニスト」という用語は、本明細書で使用される場合、TLR7および/またはTLR8のアゴニストを指す。一態様では、TLR7/8アゴニストは、TLR7アゴニストである。別の態様では、TLR7/8アゴニストは、TLR8アゴニストである。さらなる態様では、TLR7/8アゴニストは、TLR7およびTLR8の両方のアゴニストである。本開示のTLR7/8アゴニストは、LPCの存在下でヒト樹状細胞を過剰活性化するのに好適である。

【0059】

一部の態様では、TLR7/8アゴニストは、小分子である。一部の実施形態では、TLR7/8アゴニストは、900ダルトンもしくはそれ未満の分子量を有する小分子またはその塩である。すなわち、小分子TLR7/8アゴニストは、米国FDAの生物製剤評価研究センター（Center for Biologics Evaluation and Research）によって規制可能な組換えタンパク質または合成オリゴヌクレオチドなどの大型分子ではない。むしろ、小分子TLR7/8アゴニストは、FDAの薬物評価センター（Center for Drug Evaluation and Research）によって規制可能である。一部の実施形態では、小分子は、約90～約900ダルトンの分子量を有する。一部の実施形態では、TLR7/8アゴニストは、イミダゾキノリン化合物を含む。一部の好ましい実施形態では、TLR7/8アゴニストは、レシキモド（R848）を含む。

B. 他のPRRアゴニスト

【0060】

一部の態様では、病原体認識受容体（PRR）アゴニストは、TLRアゴニストがTLR7/8アゴニストを含まないという条件で、tol1様受容体（TLR）アゴニストを含む。一部の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR9およびTLR13の1つまたは複数のアゴニストを含む。一部の実施形態では、PRRアゴニストは、TLR2/6アゴニスト、例えば、Pam2CSK4である。他の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR4アゴニスト、例えば、モノホスホリル脂質A（MPLA）である。しかし、好ましい実施形態では、TLRアゴニストは、TLR2、TLR4および/またはTLR9のアゴニストではない。例えば、好ましい実施形態では、TLR9アゴニストは、TLR4リガンド、例えば、LPS（エンドトキシン）ではない。

【0061】

他の態様では、PRRアゴニストは、NOD様受容体（NLR）アゴニストを含む。さらなる態様では、PRRアゴニストは、RIG-I様受容体（RLR）アゴニストを含む。さらなる態様では、PRRアゴニストは、C型レクチン受容体（CLR）アゴニストを含む。またさらなる態様では、PRRアゴニストは、CDSアゴニストまたはSTINGアゴニストを含む。

III. 抗原

【0062】

本開示の組成物および方法は、抗原をさらに含み得る。一部の実施形態では、抗原は、タンパク質抗原を含む。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書では、少なくとも8アミノ酸長のペプチド鎖を含むタンパク質抗原を指すために、互換的に使用される。一部の実施形態では、タンパク質抗原は、8～1800アミノ酸、9～1000アミノ酸、または10～100アミノ酸長である。一部の実施形態では、抗原は、合成タンパク質または組換えタンパク質を含む。他の実施形態では、抗原は、生体試料から精製されたタンパク質を含む。ポリペプチドは、例えば、リン酸化、ヒドロキシル化、スルホン化、パルミトイル化、および/またはグリコシル化によって翻訳後修飾され得る。

【0063】

一部の実施形態では、抗原は、少なくとも1つの全長タンパク質のアミノ酸配列またはその断片を含む腫瘍抗原である。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍性タンパク質由

10

20

30

40

50

来のアミノ酸配列またはその断片を含む。一部の実施形態では、哺乳動物抗原は、ネオアンチゲンであるか、または哺乳動物対象からの正常細胞中に存在する遺伝子に対して、突然変異を含む遺伝子によってコードされる。ネオアンチゲンは、T細胞ががん細胞と非がん細胞とを区別できるようにするのに特に有用であると考えられている（例えば、Schumacher and Schreiber, *Science*, 348:69-74, 2015を参照されたい）。他の実施形態では、腫瘍抗原は、ウイルス抗原、例えば、がんを引き起こすウイルスの抗原を含む。

【0064】

一部の実施形態では、腫瘍抗原は、2つまたはそれよりも多いポリペプチドを含む融合タンパク質であり、ここで各ポリペプチドは、異なる腫瘍抗原由来のアミノ酸配列または同じ腫瘍抗原由来の非連続アミノ酸配列を含む。これらの実施形態のいくつかでは、融合タンパク質は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、同じ腫瘍抗原由来の非連続アミノ酸配列を含む。

10

【0065】

一部の実施形態では、抗原は、微生物抗原である。一部の実施形態では、微生物抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫抗原、真菌抗原、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、微生物抗原は、微生物の表面タンパク質または他の抗原サブユニットを含む。他の実施形態では、微生物抗原は、不活化または弱毒化微生物を含む。例えば、微生物抗原は、不活化ウイルス、例えば化学的または遺伝的不活化ウイルスを含み得る。代替的に、微生物抗原は、ウイルス様粒子を含み得る。

20

【0066】

一部の実施形態では、抗原は、個体、例えばヒト患者から得られた生体試料に存在し得る。例えば、抗原は、がん細胞を含み得る。別の態様では、抗原は、微生物感染細胞、例えばウイルス感染細胞を含み得る。

IV. 樹状細胞

【0067】

本開示の組成物および方法は、哺乳動物の自然免疫系および適応免疫系を橋渡しすると考えられる抗原提示細胞である、樹状細胞(DC)をさらに含み得る。好ましい実施形態では、DCは、形質細胞様DC(pDC)とは対照的に、サブセット-1従来型DC(cDC1、以前はミエロイドDC1と呼ばれていた)である。

30

【0068】

一部の実施形態では、DCは、高レベルのCD40およびIL-12p70を発現する活性化過剰DCである。本明細書で使用される場合、「活性化過剰樹状細胞」という用語は、DCが、細胞生存率を維持しながら（例えば、パイロトーシスを受けることなく）、IL-1を分泌することができる細胞状態を指す。このように、過剰活性化された樹状細胞は、頑強なT細胞免疫を刺激することができ（図1）、このことは、活性化された樹状細胞とパイロトーシスの樹状細胞の利益を明らかに併せ持っている（Zhivaki et al., *Cell Reports*, 33 (7), 2020, 108381）。

V. さらなる脂質

【0069】

本開示の組成物および方法は、少なくとも1つのさらなる脂質を含み、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質は、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、またはそれらの混合物を含む。一部の実施形態では、LNPは、第1のリン脂質（単一C13~C24アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン[LPC:C13~C24]）、イオン化可能な脂質、第2のリン脂質、ペグ化脂質、および構造的脂質を含む。本開示の組成物および方法における使用に好適なさらなる脂質の構造は、以下に示される（Hou et al., *Nature Review Materials*, 6:1078-1094, 2021の図2から再現）。

40

【0070】

50

一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、さらなるリン脂質および構造的脂質の一方または両方を含み、必要に応じてさらなるリン脂質は、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)を含み、構造的脂質は、コレステロールを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、ペグ化脂質を含むかまたはさらに含み、必要に応じてペグ化脂質は、ポリエチレングリコール[PEG]2000ジミリストイルグリセロール[DMG]を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質を含むかまたはさらに含み、必要に応じてイオン化可能な脂質は、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(4-(ジメチルアミノ)-ブタン酸としても公知)、(10Z,13Z)-1-(9Z,12Z)-9,12-オクタデカジエン-1-イル-10,13-ノナデカジエン-1-イルエステル(DLin-MC3-DMA)またはそれらのアナログもしくは誘導体を含む。

10

20

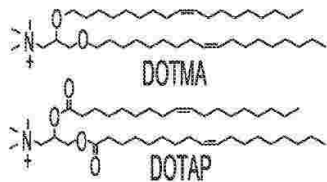
30

40

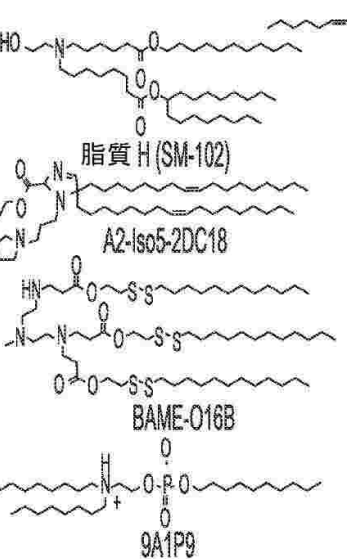
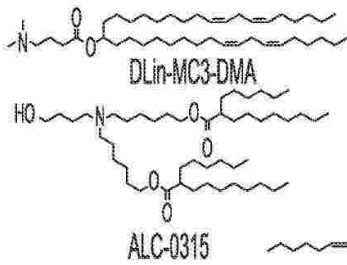
50

【化4】

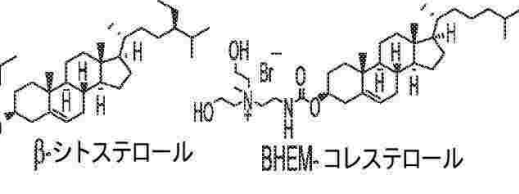
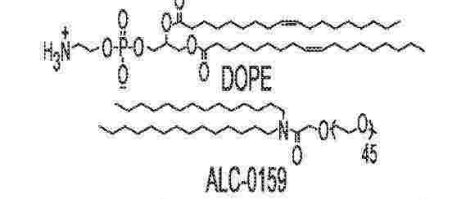
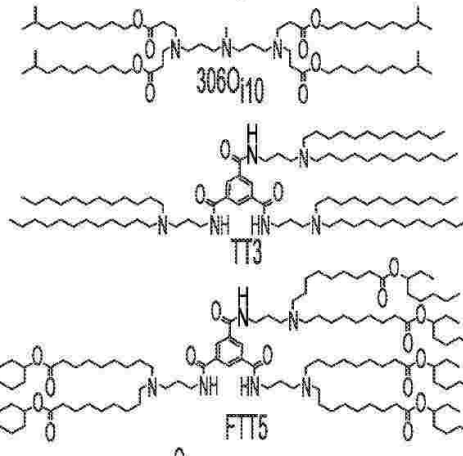
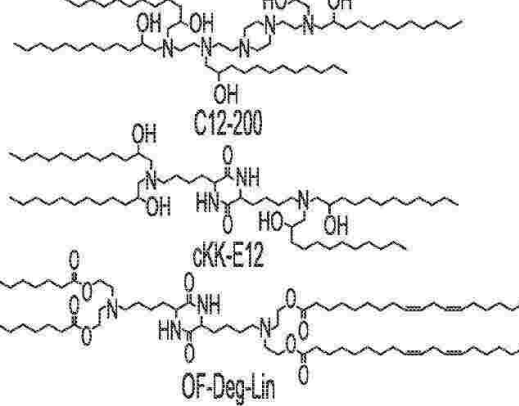
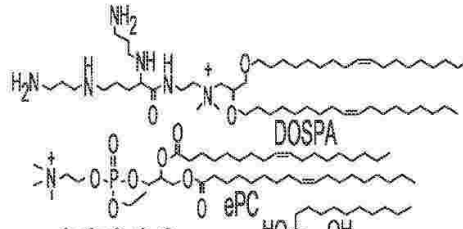
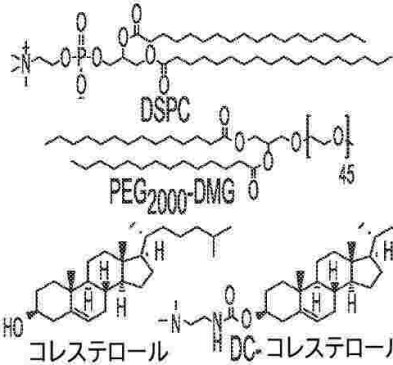
カチオン性脂質



イオン化可能な脂質



他の種類の脂質



10

20

30

40

V I . 医薬製剤

【0071】

本開示の一部の組成物は、薬学的に許容される賦形剤、ならびにLPC化合物および少なくとも1つのさらなる脂質を含む脂質ナノ粒子(LNP)を含む医薬製剤である。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、医薬製剤は、PRRアゴニスト、樹状細胞、抗原、アジュバント、またはそれらの任意の組合せをさらに含む。本開示の一部の組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含む医薬製剤である。本開示の医薬製剤は、溶液または懸濁液の

50

形態であり得る。代替的に、医薬製剤は、無水固体（例えば、凍結乾燥またはスプレー乾燥させた固体）であり得る。本開示の医薬製剤は、好ましくは無菌であり、好ましくは本質的にエンドトキシンを含まない。「医薬製剤」という用語は、本明細書では「医薬生成物」および「医薬」という用語と互換的に使用される。一部の実施形態では、医薬製剤は、製剤の意図された目的に基づいて、特定の比率の種々の構成成分を含む。

A. 賦形剤

【0072】

本開示の薬学的に許容される賦形剤には、例えば、溶媒、緩衝剤、浸透圧調整剤、増量剤、および防腐剤が含まれる（例えば、Pramanick et al., *Pharma Times*, 45:65-77, 2013を参照されたい）。一部の実施形態では、医薬製剤は、溶媒、緩衝剤、浸透圧調整剤、および増量剤の1つまたは複数として機能する賦形剤を含み得る（例えば、生理食塩水中の塩化ナトリウムは、水性ビヒクルおよび浸透圧調整剤の両方として働くことができる）。

10

【0073】

一部の実施形態では、医薬製剤は、溶媒として水性ビヒクルを含む。好適なビヒクルには、例えば滅菌水、生理食塩水溶液、リン酸緩衝食塩水、およびリンゲル溶液が含まれる。一部の実施形態では、組成物は等張である。

【0074】

医薬製剤は、緩衝剤を含み得る。緩衝剤は、pHを制御して、処理、保存および必要に応じて再構成中の活性薬剤の分解を阻害する。好適な緩衝剤には、例えば酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩または硫酸塩を含む塩が含まれる。他の好適な緩衝剤には、例えばアミノ酸、例えば、アルギニン、グリシン、ヒスチジン、およびリシンが含まれる。緩衝剤は、塩酸または水酸化ナトリウムをさらに含み得る。一部の実施形態では、緩衝剤は、組成物のpHを6~9の範囲内に維持する。一部の実施形態では、pHは、6、7または8（下限）よりも大きい。一部の実施形態では、pHは、9、8、または7（上限）よりも小さい。すなわち、pHは、約6~9の範囲であり、ここで下限は上限よりも小さい。

20

【0075】

医薬組成物は、浸透圧調整剤を含み得る。好適な浸透圧調整剤には、例えばブドウ糖、グリセロール、塩化ナトリウム、グリセリンおよびマンニトールが含まれる。

【0076】

医薬製剤は、増量剤を含み得る。増量剤は、医薬組成物が投与前に凍結乾燥させられるべき場合に、特に有用である。一部の実施形態では、増量剤は、凍結もしくはスプレー乾燥中および/または保存中に、活性薬剤の安定化および分解防止の一助になる保護剤である。好適な増量剤は、糖（単糖、二糖および多糖）、例えば、スクロース、ラクトース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール（sorbital）、グルコースおよびラフィノースである。

30

【0077】

医薬製剤は、防腐剤を含み得る。好適な防腐剤には、例えば抗酸化剤および抗微生物剤が含まれる。しかし、好ましい実施形態では、医薬製剤は、無菌条件下で調製され、単一の使用容器に入れられ、したがって防腐剤を含む必要はない。

40

【0078】

本開示の医薬組成物および他の組成物は、典型的に、界面活性剤（例えば、ポロキサマー）を含まない。特に、一部の実施形態では、医薬組成物および他の組成物は、Poloxamer 407 (KP407)、Poloxamer 188 (KP188)、および/またはPluronic（登録商標）P123 (P123)を含まない。

【0079】

本開示の医薬製剤は、非経口投与に好適である。すなわち、本開示の医薬製剤は、経腸投与を意図されない（例えば、経口、胃内、または直腸内によるものではない）。

B. アジュバント

【0080】

50

本開示の薬学的に許容されるアジュバントには、例えば、アルミニウム塩アジュバント、水中スクアレン型エマルジョン、サポニン、またはそれらの組合せが含まれる。一部の実施形態では、アジュバントは、非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェート硫酸塩、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム、およびそれらの組合せからなる群から選択されるアルミニウム塩アジュバントである。他の実施形態では、アジュバントは、水中スクアレン型エマルジョン、例えばMF59またはAS03である。他の実施形態では、アジュバントは、サポニン、例えばAS01またはAS02などにおけるQuil AまたはQS-21である。

VII. 生成のための方法

【0081】

本開示は、一部の態様では、過剰活性化された樹状細胞を調製するための方法、および免疫原性組成物を調製するための方法に関する。免疫原性組成物は、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*での樹状細胞の過剰活性化に好適である。

【0082】

一態様では、本開示は、過剰活性化された樹状細胞(DC)を生成するための方法であって、方法が、樹状細胞を、過剰活性化された樹状細胞の生成のための、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、およびPRRアゴニストを含む有効量の組成物と接触させることを含み、過剰活性化された樹状細胞が、パイロトーシスを受けることなくIL-1ベータを分泌し、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である、方法を提供する。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、DCは単離され、一方、他の実施形態では、DCは、哺乳動物対象、例えばヒト患者から得られた生体試料中に存在する。一部の実施形態では、DCは、単球由来DC、好ましくはcDC1である。

【0083】

特定の実施形態では、本開示は、免疫原性組成物の生成のための方法であって、

- 必要に応じて、腫瘍から調製された細胞の懸濁液から白血球を枯渇させて、腫瘍細胞が濃縮された懸濁液を得るステップと、
- 腫瘍細胞が濃縮された懸濁液から細胞を溶解させて、腫瘍細胞溶解物を得るステップと、
- 腫瘍細胞溶解物を、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、およびPRRアゴニストと接触させて、免疫原性組成物を得るステップと(LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質は、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である)を含む方法を提供する。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、白血球は、腫瘍細胞が濃縮された懸濁液を、白血球に特異的な抗体と接触させることによって、腫瘍細胞が濃縮された細胞懸濁液から枯渇させられる。一部の実施形態では、白血球は、腫瘍細胞が濃縮された懸濁液を抗CD45抗体と接触させることによって枯渇させられる。一部の実施形態では、細胞は、限定されるものではないが、機械的溶解、液体ホモジナイゼーション、超音波処理、凍結融解、または手動粉碎などの物理的破壊に基づく細胞溶解方法によって溶解させられる。一部の好ましい実施形態では、細胞は、1つまたは複数の凍結融解サイクルによって溶解させられる。

【0084】

前述の方法の一部の実施形態では、LPCのアシル鎖は、C13~C22アシル鎖またはC13~C24アシル鎖である。一部の実施形態では、LPCのアシル鎖は、C18~C22アシル鎖またはC18~C24アシル鎖である。一部の好ましい実施形態では、アシル鎖は、完全に飽和している。一部の好ましい実施形態では、LPCのアシル鎖は、C22アシル鎖である。一部の好ましい実施形態では、LPCは、1-ベヘノイル-2-ヒ

10

20

30

40

50

ドロキシ - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン [L P C (2 2 : 0)] である。一部の実施形態では、P R R アゴニストは、T L R 7 / 8 アゴニストである。一部の好ましい実施形態では、T L R 7 / 8 アゴニストは、イミダゾキノリン化合物であり、特に好ましい実施形態ではレシキモド (R 8 4 8) である。

V I I I . 使用方法

【 0 0 8 5 】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される組成物または製剤のいずれか1つの使用方法に関する。一部の実施形態では、組成物または製剤は、L P C 化合物および少なくとも1つのさらなる脂質を含み、L P C および少なくとも1つのさらなる脂質は、脂質ナノ粒子 (L N P) の一部である。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される。一部の実施形態では、組成物または製剤は、P R R アゴニスト、樹状細胞、抗原、アジュバント、またはそれらの任意の組合せをさらに含む。使用法は、免疫応答を刺激することを含む複数の使用に好適である。一部の実施形態では、使用法は、がんを処置する方法を含む。一部の実施形態では、使用法は、異常細胞増殖を阻害する方法を含む。一部の実施形態では、使用法は、感染性疾患を処置または防止する方法を含む。方法は、有効量の本明細書に記載される製剤または組成物を、それを必要とする個体に投与して、特定の転帰を達成することを含む。個体は、哺乳動物対象、例えばヒト患者である。他の実施形態では、個体は、非ヒト患者である。一部の実施形態では、個体は、イヌ患者である。すなわち、一部の実施形態では、使用法は臨床的使用を含み、一方、他の実施形態では、使用法は前臨床的および/または獣医学的使用を含む。前臨床的使用について、哺乳動物対象は、非ヒト霊長類 (例えば、サルまたは類人猿) またはげっ歯類 (例えば、マウスまたはラット) であり得る。獣医学的使用について、哺乳動物対象は、家畜 (例えば、ウシ) 、スポーツ用動物 (例えば、ウマ) 、またはペット (例えば、コンパニオン・アニマル、例えば、イヌまたはネコ) であり得る。

A . 免疫応答の刺激

【 0 0 8 6 】

手短には、本開示は、個体において免疫応答を刺激する方法であって、個体において免疫応答を刺激するのに十分な量の、本明細書に記載される組成物または製剤を個体に投与することを含む方法を提供する。免疫応答を「刺激すること」(「誘発すること」および免疫応答と互換的に使用される)は、新たな免疫応答を誘発するか(例えば、初回ワクチン接種レジメンの結果として)、または既存の免疫応答を増強する(例えば、ブースターワクチン接種レジメンの結果として)ことから生じ得る、免疫応答の増大を意味する。一部の実施形態では、免疫応答を刺激することは、サイトカイン生成を刺激する、Bリンパ球増殖を刺激する、インターフェロン経路関連遺伝子発現を刺激する、化学誘引物質関連遺伝子発現を刺激する、および樹状細胞D C 成熟を刺激することからなる群の1つまたは複数を含む。免疫応答の刺激を測定するための方法は、当技術分野で公知である。

【 0 0 8 7 】

例えば、本開示は、個体において抗原特異的免疫応答を誘導するのに十分な量の、本明細書に記載される組成物または製剤を個体に投与することによって、個体において抗原特異的免疫応答を誘導する方法を提供する。好ましい実施形態では、組成物または製剤は、抗原を含む。一部の実施形態では、組成物または製剤は、抗原を含む個体の組織に投与される。免疫応答は、抗原特異的抗体応答および抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球 (C T L) 応答の一方または両方を含み得る。抗原特異的抗体応答を「誘導すること」は、抗原特異的抗体の力価を、閾値レベル、例えば、投与前のベースライン力価または防御抗体 (s eroprotective) レベルよりも上昇させることを意味する。抗原特異的C T L 応答を「誘導すること」は、抗原特異的C T L が末梢血に見出される頻度を、投与前のベースラインの頻度よりも上昇させることを意味する。

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

免疫応答の解析（質的および量的の両方）は、抗原特異的抗体生成（特異的抗体サブクラスを測定することを含む）、リンパ球、例えばB細胞およびヘルパーT細胞の特定集団の活性化、サイトカイン、例えばIFN-アルファ、IFN-ガンマ、IL-6、IL-12の生成、ならびに/またはヒスタミンの放出を測定することを含むが、これらに限定されない当技術分野で公知のいずれかの方法によって行われ得る。抗原特異的抗体応答を測定するための方法には、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）が含まれる。リンパ球の特定集団の活性化は、増殖アッセイによって、蛍光活性化細胞選別（FACS）を用いて測定され得る。サイトカインの生成は、ELISAによって測定することもできる。一部の実施形態では、免疫応答を刺激する方法は、単球由来樹状細胞または末梢血単核細胞による、インターロイキン-1ベータ（IL-1）分泌、インターフェロン-ガンマ（IFN-）分泌、および/または腫瘍壊死因子-アルファ（TNF-）分泌の刺激を含む。一部の好ましい実施形態では、本開示の組成物と接触させられた細胞の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%または75%は、接触後40~56時間（または約48時間）目もまだ生存している。

10

【0089】

一部の実施形態では、方法は、抗腫瘍免疫応答を刺激するのに好適である。他の実施形態では、方法は、抗微生物免疫応答を刺激するのに好適である。一部の実施形態では、抗微生物応答は、抗菌免疫応答である。一部の実施形態では、抗微生物応答は、抗真菌免疫応答である。一部の実施形態では、抗微生物応答は、抗ウイルス免疫応答である。一部の実施形態では、抗微生物応答は、抗原虫免疫応答である。

20

B. 疾患の処置または防止

【0090】

本開示はさらに、個体における疾患を処置または防止する方法であって、個体における疾患を処置または防止するのに十分な量の、本明細書に記載される組成物または製剤を個体に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、疾患は、がんである。一部の実施形態では、疾患は、異常細胞増殖である。他の実施形態では、疾患は、感染性疾患である。

【0091】

一態様では、方法は、LPC化合物および少なくとも1つのさらなる脂質を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み得、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質は、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である。別の態様では、方法は、養子細胞治療を含み、樹状細胞、例えば、過剰活性化された樹状細胞、LPC化合物、およびさらなる脂質を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質は、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である。一部の実施形態では、組成物は、PRRアゴニスト、抗原、アジュバント、またはそれらの任意の組合せをさらに含む。

30

【0092】

一部の実施形態では、方法は、個体におけるがんを処置するか、またはそうでなければがんを有する哺乳動物対象を処置することを含む。一部の実施形態では、方法は、a) 腫瘍細胞溶解物、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン（LPC）、少なくとも1つのさらなる脂質、およびtoll様受容体7/8（TLR7/8）アゴニストを含む免疫原性組成物を調製するステップと（腫瘍細胞溶解物は、がんを有する対象から得られた腫瘍の試料から調製されるか、または調製されたものであり、アシル鎖は、C13~C22アシル鎖またはC13~C24アシル鎖であり、LPCおよび少なくとも1つのさらなる脂質は、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である）、b) 対象に、有効量の免疫原性組成物を投与するステップとを含む。一部の実施形態では、がんは、血液がん、例えばリンパ腫、白血病、または骨髄腫である。他の実施形態では、がんは、非血液がん、例えば肉腫、癌腫、または黒色腫である。一部の実施形態では、がんは悪性である。

40

【0093】

一部の実施形態では、方法は、個体における異常細胞増殖を阻害することを含む。「異

50

常細胞増殖」は、良性腫瘍または悪性腫瘍の増殖を指す。悪性腫瘍は、転移性腫瘍であり得る。

【 0 0 9 4 】

一部の実施形態では、方法は、個体における感染性疾患を処置または防止することを含む。一部の実施形態では、感染性疾患は、ウイルス感染によって引き起こされる。他の実施形態では、感染性疾患は、細菌感染によって引き起こされる。さらなる実施形態では、感染性疾患は、真菌感染によって引き起こされる。またさらなる実施形態では、感染性疾患は、原生動物感染によって引き起こされる。ヒトおよび他の動物、例えば哺乳動物または鳥に感染する人獣共通病原体によって引き起こされる感染性疾患が、特に重要である。一部の実施形態では、人獣共通病原体は、中間種（ベクター）を介してヒトに伝染する。

10

実施形態の列挙

1 単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン（LPC）、少なくとも1つのさらなる脂質、およびTLR7/8アゴニストを含む組成物であって、前記アシル鎖が、C13～C22アシル鎖またはC13～C24アシル鎖であり、前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である、組成物。

2 前記アシル鎖が、C18～C22アシル鎖またはC21～C24アシル鎖である、実施形態1に記載の組成物。

20

3 抗原をさらに含む、実施形態1または実施形態2に記載の組成物。

4 樹状細胞をさらに含む、実施形態1～3のいずれか一つに記載の組成物。

5 単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン（LPC）、少なくとも1つのさらなる脂質、および抗原を含む組成物であって、

前記アシル鎖が、C21～C24アシル鎖であり、

前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、

前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である、

30

組成物。

6 樹状細胞をさらに含む、実施形態5に記載の組成物。

7 TLR7/8アゴニストをさらに含む、実施形態5または実施形態6に記載の組成物。

8 単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン（LPC）、少なくとも1つのさらなる脂質、および樹状細胞を含む組成物であって、

前記アシル鎖が、C21～C24アシル鎖であり、

前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、

前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子（LNP）の一部である、

40

組成物。

9 TLR7/8アゴニストをさらに含む、実施形態8に記載の組成物。

10 抗原をさらに含む、実施形態8または実施形態9に記載の組成物。

11 前記アシル鎖が、C22アシル鎖である、実施形態1～10のいずれか一つに記載の組成物。

12 前記アシル鎖が、完全に飽和している、実施形態1～11のいずれか一つに記載の組成物。

13 前記LPCが、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン[LPC(22:0)]を含む、実施形態1～12のいずれか一つに記載の組成物。

14 前記TLR7/8アゴニストが、900ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する

50

小分子である、実施形態 1 ~ 13 のいずれか一つに記載の組成物。

15 前記 TLR7 / 8 アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、実施形態 14 に記載の組成物。

16 前記 TLR7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R848) を含む、実施形態 15 に記載の組成物。

17 前記 TLR7 / 8 アゴニストが、NLRファミリーパイリンドメイン含有 3 (NLRP3) を阻害しない、実施形態 14 または実施形態 15 に記載の組成物。

18 前記 LPC が、LPC (22:0) を含み、前記 TLR7 / 8 アゴニストが、レシキモド (R848) を含む、実施形態 13 に記載の組成物。

19 前記抗原が、個体から得られた生体試料中に存在する、実施形態 1 ~ 18 のいずれか一つに記載の組成物。 10

20 前記生体試料が、生検組織を含む、実施形態 19 に記載の組成物。

21 前記生体試料が、細胞を含む、実施形態 19 に記載の組成物。

22 前記生体試料が、細胞を含まない、実施形態 19 に記載の組成物。

23 前記生体試料が、膿瘍由来の膿汁を含む、実施形態 19 に記載の組成物。

24 前記抗原が、タンパク質抗原を含む、実施形態 1 ~ 23 のいずれか一つに記載の組成物。

25 前記抗原が、腫瘍抗原を含む、実施形態 24 に記載の組成物。

26 前記腫瘍抗原が、合成または組換えネオアンチゲンを含む、実施形態 25 に記載の組成物。 20

27 前記腫瘍抗原が、腫瘍細胞溶解物を含む、実施形態 26 に記載の組成物。

28 前記抗原が、微生物抗原を含み、前記微生物抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫抗原、および真菌抗原の 1 つまたは複数を含む、実施形態 24 に記載の組成物。

29 前記微生物抗原が、精製または組換え表面タンパク質を含む、実施形態 28 に記載の組成物。

30 前記微生物抗原が、不活化全ウイルスを含む、実施形態 28 に記載の組成物。

31 リポソームを含む、実施形態 1 ~ 30 のいずれか一つに記載の組成物。

32 リポ多糖 (LPS) もモノホスホリル脂質 A (MPLA) も含まない、実施形態 1 ~ 31 のいずれか一つに記載の組成物。

33 酸化 1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (oxPAPC) も oxPAPC 種も含まない、実施形態 1 ~ 32 のいずれか一つに記載の組成物。 30

34 2 - [[(2R) - 2 - [(E) - 7 - カルボキシ - 5 - ヒドロキシヘプタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] - ヒドロキシホスホリル] オキシエチル - トリメチルアザニウム (HODiA-PC)、 [(2R) - 2 - [(E) - 7 - カルボキシ - 5 - オキソヘプタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2 - (トリメチルアザニウムイリ) エチルホスフェート (KODiA-PC)、1 - パルミトイル - 2 - (5 - ヒドロキシ - 8 - オキソ - オクテノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (HOOA-PC)、2 - [[(2R) - 2 - [(E) - 5, 8 - ジオキソオクタ - 6 - エノイル] オキシ - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロポキシ] - ヒドロキシホスホリル] オキシエチル - トリメチルアザニウム (KOOA-PC)、 [(2R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - (5 - オキソペンタノイルオキシ) プロピル] 2 - (トリメチルアザニウムイリ) エチルホスフェート (POVPC)、 [(2R) - 2 - (4 - カルボキシブタノイルオキシ) - 3 - ヘキサデカノイルオキシプロピル] 2 - (トリメチルアザニウムイリ) エチルホスフェート (PGPC)、 [(2R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - [4 - [3 - [(E) - [2 - [(Z) - オクタ - 2 - エニル] - 5 - オキソシクロペンタ - 3 - エン - 1 - イリデン] メチル] オキシラン - 2 - イル] ブタノイルオキシ] プロピル] 2 - (トリメチルアザニウムイリ) エチルホスフェート (PEPC)、 [(2R) - 3 - ヘキサデカノイルオキシ - 2 - [4 - [3 - [(E) - [3 - ヒドロキシ - 2 - [(Z) - オクタ - 2 - エニル] - 5 - オキソシクロ 40 50

ペンタイリデン]メチル]オキシラン-2-イル]ブタノイルオキシ]プロピル]2-(トリメチルアザニウムイル)エチルホスフェート(PEIPC)および/または1-パルミトイル-2-アゼラオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(PAzePC)を含まない、実施形態33に記載の組成物。

35 アジュバントをさらに含み、前記アジュバントが、アルミニウム塩アジュバント、水中スクアレン型エマルジョン、サポニン、またはそれらの組合せを含む、実施形態1~34のいずれか一つに記載の組成物。

36 実施形態1~35のいずれか一つに記載の組成物、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤。

37 過剰活性化された樹状細胞を生成するための方法であって、前記方法が、前記樹状細胞を、過剰活性化された樹状細胞の生成のための、単一C13~C22アシル鎖またはC13~C24アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、およびTLR7/8アゴニストを含む有効量の組成物と接触させることを含み、

前記過剰活性化された樹状細胞が、パイロトーシスを受けることなくIL-1ベータを分泌し、

前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である、

方法。

38 前記樹状細胞が、実施形態1~35のいずれか一つに記載の組成物または実施形態36に記載の製剤と*ex vivo*で接触させられる、実施形態37に記載の方法。

39 前記樹状細胞が、実施形態36に記載の製剤と*in vivo*で接触させられる、実施形態37に記載の方法。

40 実施形態38に記載の方法によって生成された少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 または 10^6 の前記過剰活性化された樹状細胞、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤。

41 抗原に対する免疫応答を刺激する方法であって、有効量の実施形態36に記載の製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記抗原に対する前記免疫応答を刺激することを含む、方法。

42 がんを処置する方法であって、有効量の実施形態36に記載の製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記がんを処置することを含む、方法。

43 異常細胞増殖を阻害する方法であって、有効量の実施形態36に記載の製剤を、それを必要とする個体に投与して、異常細胞増殖を阻害することを含む、方法。

44 感染性疾患を処置する方法であって、有効量の実施形態36に記載の製剤を、それを必要とする個体に投与して、前記感染性疾患を処置することを含む、方法。

45 それを必要とする個体において前記抗原に対する免疫応答を誘導するための、実施形態36に記載の製剤の使用。

46 腫瘍を有しているか、または有していた、それを必要とする個体において抗腫瘍免疫応答を誘導するための、実施形態36に記載の製剤の使用。

47 微生物に感染しているか、または前記微生物に曝露された、それを必要とする個体において抗微生物免疫応答を誘導するための、実施形態36に記載の製剤の使用。

48 前記個体が、哺乳動物対象である、実施形態19~47のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。

49 前記個体が、ヒト対象である、実施形態19~47のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。

50 免疫原性組成物を調製する方法であって、前記方法が、

a) 腫瘍から腫瘍細胞が濃縮された懸濁液を得るステップと、

b) 前記腫瘍細胞が濃縮された懸濁液から細胞を溶解させて、腫瘍細胞溶解物を得るステ

10

20

30

40

50

ップと、

c) 前記腫瘍細胞溶解物を、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン (LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、および toll 様受容体 7/8 (TLR7/8) アゴニストを含む組成物と接触させて、前記免疫原性組成物を得るステップとを含み、

前記アシル鎖が、C13~C22アシル鎖またはC13~C24アシル鎖であり、前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である、

方法。

51 ステップa)が、前記腫瘍細胞が濃縮された懸濁液から白血球を枯渇させることを含み、必要に応じて前記白血球が、負の選択によって抗CD45抗体を使用して枯渇させられる、実施形態50に記載の方法。

52 前記細胞が、ステップb)において1つまたは複数の凍結融解サイクルによって溶解させられる、実施形態50または実施形態51に記載の方法。

53 前記アシル鎖が、完全飽和C18~C22アシル鎖または完全飽和C18~C24アシル鎖である、実施形態50~52のいずれか一つに記載の方法。

54 前記LPCが、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン[LPC(22:0)]を含む、実施形態53に記載の方法。

55 前記TLR7/8アゴニストが、900ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する小分子である、実施形態50~54のいずれか一つに記載の方法。

56 前記TLR7/8アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、実施形態55に記載の方法。

57 前記TLR7/8アゴニストが、レシキモド(R848)を含む、実施形態56に記載の方法。

58 前記TLR7/8アゴニストが、NLRファミリーパイリンドメイン含有3(NLRP3)を阻害しない、実施形態55または実施形態56に記載の方法。

59 前記LPCが、LPC(22:0)を含み、前記TLR7/8アゴニストが、レシキモド(R848)を含む、実施形態54に記載の方法。

60 ステップa)の前に、がんを有する哺乳動物対象からの前記腫瘍から試料を得、前記試料から細胞の懸濁液を調製することをさらに含む、実施形態50~59のいずれか一つに記載の方法。

61 実施形態50~60のいずれか一つに記載の方法によって調製された、免疫原性組成物。

62 抗がん免疫応答を誘発する方法であって、がんを有する哺乳動物対象に、有効量の実施形態61に記載の免疫原性組成物を投与することを含む、方法。

63 前記抗がん免疫応答が、細胞性免疫応答を含む、実施形態62に記載の方法。

64 前記抗がん免疫応答が、がん抗原誘発性IL-1ベータ分泌および/またはCD8+Tリンパ球の活性化を含む、実施形態63に記載の方法。

65 前記がんが、非血液がんである、実施形態62~64のいずれか一つに記載の方法。

66 前記非血液がんが、癌腫、肉腫、または黒色腫である、実施形態65に記載の方法。

67 前記がんが、リンパ腫である、実施形態62~64のいずれか一つに記載の方法。

68 がんを処置する方法であって、

a) 腫瘍細胞溶解物、単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、および toll 様受容体 7/8 (TLR7/8) アゴニストを含む免疫原性組成物を調製するステップと

(前記腫瘍細胞溶解物は、がんを有する前記哺乳動物対象から得られた腫瘍の試料から調製されるか、または調製されたものであり、

前記アシル鎖は、C13~C22アシル鎖またはC13~C24アシル鎖であり、

10

20

30

40

50

前記少なくとも1つのさらなる脂質は、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質は、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である)、

b) 前記対象に、有効量の前記免疫原性組成物を投与するステップとを含む、方法。

69 前記アシル鎖が、完全飽和C18~C22アシル鎖または完全飽和C18~C24アシル鎖である、実施形態62~68のいずれか一つに記載の方法。

70 前記LPCが、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン[LPC(22:0)]を含む、実施形態68に記載の方法。

71 前記TLR7/8アゴニストが、900ダルトンまたはそれ未満の分子量を有する小分子である、実施形態62~70のいずれか一つに記載の方法。

72 前記TLR7/8アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、実施形態71に記載の方法。

73 前記TLR7/8アゴニストが、レシキモド(R848)を含む、実施形態72に記載の方法。

74 前記LPCが、22:0 LPCを含み、前記TLR7/8アゴニストが、レシキモド(R848)を含む、実施形態70に記載の方法。

75 前記対象に、有効量の追加の治療剤を投与することをさらに含む、実施形態68~74のいずれか一つに記載の方法。

76 前記追加の治療剤が、免疫チェックポイント阻害剤、抗悪性腫瘍薬剤、および放射線治療からなる群の1つまたは複数を含む、実施形態75に記載の方法。

77 単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、および病原体認識受容体(PRR)アゴニストを含む組成物であって、

前記アシル鎖が、C13~C22アシル鎖またはC13~C24アシル鎖であり、前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である、

組成物。

78 前記PRRアゴニストが、toll様受容体(TLR)、NOD様受容体(NLR)、RIG-I様受容体(RLR)、またはC型レクチン受容体(CLR)のアゴニストである、実施形態77に記載の組成物。

79 前記PRRアゴニストが、細胞質DNAセンサー(CDS)またはIFN遺伝子の刺激因子(STING)のアゴニストである、実施形態77に記載の組成物。

80 前記PRRアゴニストが、R848、TL8-506、LPS、Pam2CSK4、およびODN2336の1つまたは複数を含む、実施形態77に記載の組成物。

81 抗原をさらに含む、実施形態77~80のいずれか一つに記載の組成物。

82 樹状細胞をさらに含む、実施形態77~81のいずれか一つに記載の組成物。

83 実施形態77~82のいずれか一つに記載の組成物、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬製剤。

84 単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬製剤であって、

前記アシル鎖が、C21~C24アシル鎖であり、

前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)の一部である、

医薬製剤。

10

20

30

40

50

- 85 前記アシル鎖が、完全飽和C22アシル鎖である、実施形態83または実施形態84に記載の医薬製剤。
- 86 前記LPCが、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン[LPC(22:0)]を含む、実施形態85に記載の医薬製剤。
- 87 単一アシル鎖を有する単離されたリゾホスファチジルコリン(LPC)、少なくとも1つのさらなる脂質、および病原体認識受容体(PRR)アゴニストを含む、ヒト樹状細胞の過剰活性化のための組成物であって、
前記アシル鎖が、C22アシル鎖であり、
前記少なくとも1つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質、カチオン性脂質、さらなるリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択され、
前記LPCおよび前記少なくとも1つのさらなる脂質が、脂質ナノ粒子(LNP)の一部であり、
前記組成物が、前記LPCの代わりにPGPCを含む比較用組成物よりも高いレベルの樹状細胞過剰活性化を達成するのに有効である、
組成物。
- 88 前記より高いレベルの樹状細胞過剰活性化が、前記PGPCおよび前記PRRアゴニストを含む前記比較用組成物と接触させられた場合よりも、前記LPCおよび前記PRRアゴニストを含む前記組成物と接触させられた場合の方が、少なくとも2、3または4倍高いレベルで、前記ヒト樹状細胞からIL-1ベータ分泌を*in vitro*で誘導することを含み、前記PRRアゴニストがLPSである、実施形態87に記載の組成物。
- 89 前記LPCの濃度および前記PGPCの濃度が、約10μM~約80μMの範囲内の同じ濃度であり、前記LPSが、前記組成物および前記比較用組成物の両方において1μg/mlの濃度で存在する、実施形態88に記載の組成物。
- 90 前記より高いレベルの樹状細胞過剰活性化が、前記PGPCおよび前記PRRアゴニストを含む前記比較用組成物の活性単位よりも、前記LPCおよび前記PRRアゴニストを含む前記組成物について活性単位が少なくとも4、5または6倍高い、前記ヒト樹状細胞からのIL-1ベータ分泌の脂質活性指数を含む、実施形態88に記載の組成物。
- 91 前記個体が、イヌ対象である、実施形態19~47のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 92 前記哺乳動物対象が、ヒト患者である、実施形態60~90のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 93 前記哺乳動物対象が、非ヒト患者である、実施形態60~90のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 94 前記哺乳動物対象が、イヌ患者である、実施形態60~90のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 95 前記樹状細胞が、ヒト樹状細胞である、実施形態1~90または92のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 96 前記樹状細胞が、イヌ樹状細胞である、実施形態1~91または94のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 97 前記樹状細胞が、末梢血単核細胞(PBMC)を含む組成物中に存在する、実施形態95または実施形態96に記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 98 前記過剰活性化された樹状細胞が、IFN およびTNF の一方または両方を分泌する、実施形態37~49または実施形態91のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 99 前記少なくとも1つのさらなる脂質が、さらなるリン脂質および構造的脂質の一方または両方を含み、必要に応じて前記さらなるリン脂質が、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)を含み、前記構造的脂質が、コレステロールを含む、実施形態1~98のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 100 前記少なくとも1つのさらなる脂質が、ペグ化脂質を含み、必要に応じて前記ペグ化脂質が、ポリエチレングリコール[PEG]2000ジミリストイルグリセロール[

D M G] を含む、実施形態 99 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

101 前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、イオン化可能な脂質を含み、必要に応じて前記イオン化可能な脂質が、4 - (ジメチルアミノ) - ブタン酸、(10Z, 13Z) - 1 - (9Z, 12Z) - 9, 12 - オクタデカジエン - 1 - イル - 10, 13 - ノナデカジエン - 1 - イルエステル (DLin - MC3 - DMA) またはそのアナログもしくは誘導体を含む、実施形態 99 または実施形態 100 に記載の組成物、製剤、方法または使用。

102 脂質ナノ粒子 (LNP) を含む組成物であって、前記 LNP が、第 1 のリン脂質、ならびにイオン化可能な脂質、第 2 のリン脂質、ペグ化脂質、構造的脂質、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも 1 つの脂質を含み、前記第 1 のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン (LPC) を含み、前記アシル鎖が、C13 ~ C24 アシル鎖である、組成物。

10

103 脂質ナノ粒子 (LNP) を含む組成物であって、前記 LNP が、第 1 のリン脂質、イオン化可能な脂質、第 2 のリン脂質、ペグ化脂質、および構造的脂質を含み、前記第 1 のリン脂質が、単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン (LPC) を含み、前記アシル鎖が、C13 ~ C24 アシル鎖である、組成物。

104 前記イオン化可能な脂質が、

i) 8 - [(2 - ヒドロキシエチル) [6 - オキソ - 6 - (ウンデシルオキシ) ヘキシル] アミノ] - オクタン酸、1 - オクチルノニルエステル (SM - 102) またはそのアナログもしくは誘導体、および / または 6 - ((2 - ヘキシルデカノイル) オキシ) - N - (6 - ((2 - ヘキシルデカノイル) オキシ) ヘキシル) - N - (4 - ヒドロキシブチル) ヘキサン - 1 - アミニウム (ALC - 0315) またはそのアナログもしくは誘導体、あるいは

20

ii) (6Z, 9Z, 28Z, 31Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (DLin - MC3 - DMA) またはそのアナログもしくは誘導体

を含む、実施形態 1 ~ 103 のいずれか一つに記載の組成物。

105 前記ペグ化脂質が、PEG 修飾ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine)、PEG 修飾ホスファチド酸、PEG 修飾セラミド、PEG 修飾ジアルキルアミン、PEG 修飾ジアシルグリセロール、PEG 修飾ジアルキルグリセロール (dialkylglycerol)、およびそれらの組合せからなる群から選択される、実施形態 1 ~ 104 のいずれか一つに記載の組成物。

30

106 前記ペグ化脂質が、ポリエチレングリコール [PEG] 2000 ジミリスチルグリセロール [DMG] を含む、実施形態 1 ~ 104 のいずれか一つに記載の組成物。

107 前記構造的脂質が、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンブエステロール、スチグマステロール、プラシカステロール、トマチジン、ウルソール酸、アルファ - トコフェロール、およびそれらの組合せからなる群から選択される、実施形態 1 ~ 106 のいずれか一つに記載の組成物。

108 前記構造的脂質が、コレステロールを含む、実施形態 1 ~ 106 のいずれか一つに記載の組成物。

40

109 前記さらなるリン脂質 (phospholipid) または前記第 2 のリン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2 - リゾホスファチジルコリン、およびスフィンゴミエリンからなる群から選択される親水性頭部部分を含む、実施形態 1 ~ 108 のいずれか一つに記載の組成物。

110 前記さらなるリン脂質または前記第 2 のリン脂質が、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ - リノレン酸、エルカ酸、アラキジン酸、アラキドン酸、フィタン (phytanoic) 酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される 1 つまたは複数の脂肪酸尾部部分を含む、実施

50

形態 1 ~ 108 に記載の組成物。

111 前記さらなるリン脂質または前記第 2 のリン脂質が、
 1, 2 - ジリノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DLPC)、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - ホスホコリン (DMPC)、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、
 1, 2 - ジバルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、
 1, 2 - ジウンデカノイル - sn - グリセロ - ホスホコリン (DUPC)、
 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 (POPC)、
 1, 2 - ジ - O - オクタデセニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - オレオイル - 2 - コレステリルヘミスクシノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジリノレノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジアラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジドコサヘキサエノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、
 1, 2 - ジフィタノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 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、
 1, 2 - ジリノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジリノレノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジアラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジドコサヘキサエノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - (1 - グリセロール) ナトリウム塩 (DOPG)、
 スフィンゴミエリン、および
 それらの組合せ

からなる群から選択される、実施形態 1 ~ 108 のいずれか一つに記載の組成物。

112 前記さらなるリン脂質または前記第 2 のリン脂質が、1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC) を含む、実施形態 1 ~ 108 のいずれか一つに記載の組成物。

113 前記少なくとも 1 つのさらなる脂質が、i) カチオン性脂質を含み、ii) 中性またはアニオン性脂質を含むかまたはさらに含む、実施形態 1 ~ 112 のいずれか一つに記載の組成物。

114 前記カチオン性脂質が、
 i) 1, 2 - ジ - O - オクタデセニル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (DOTMA) またはそのアナログもしくは誘導体、および
 ii) 1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP) またはそのアナログもしくは誘導体
 の一方または両方を含む、実施形態 113 に記載の組成物。

115 前記中性またはアニオン性脂質が、
 i) 1, 2 - ジ - (9Z - オクタデセノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE) またはそのアナログもしくは誘導体、および / あるいは
 ii) コレステロールまたはそのアナログもしくは誘導体、および / あるいは
 iii) 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC) またはそのアナログもしくは誘導体
 を含む、実施形態 113 または実施形態 114 に記載の組成物。

116 前記 LPC の前記アシル鎖が、C21 ~ C24 アシル鎖である、実施形態 102 ~ 115 のいずれか一つに記載の組成物。

117 前記 LPC の前記アシル鎖が、C22 アシル鎖である、実施形態 102 ~ 115 のいずれか一つに記載の組成物。

- 118 TLR7/8アゴニストをさらに含む、実施形態102~117のいずれか一つに記載の組成物。
- 119 前記TLR7/8アゴニストが、イミダゾキノリン化合物を含む、実施形態118に記載の組成物。
- 120 前記TLR7/8アゴニストが、レシキモド(R848)を含む、実施形態119に記載の組成物。
- 121 前記LPCが、LPC(22:0)を含み、前記TLR7/8アゴニストが、レシキモド(R848)を含む、実施形態119に記載の組成物。
- 122 抗原をさらに含む、実施形態102~121のいずれか一つに記載の組成物。
- 123 前記抗原が、腫瘍抗原またはネオアンチゲンである、実施形態122に記載の組成物。 10
- 124 前記抗原が、微生物(microbioal)抗原であり、必要に応じて前記微生物抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、原虫抗原、または真菌抗原である、実施形態122に記載の組成物。
- 125 前記組成物が、単離されたmRNAを含まない、実施形態1~124のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 126 前記LNPが、約500ナノメートル未満、必要に応じて約5~約500ナノメートル、必要に応じて約10~約400ナノメートル、必要に応じて約20~約300ナノメートル、または必要に応じて約25~約250ナノメートルの有効径を有する、実施形態1~125のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。 20
- 127 前記LNPが、約250ナノメートル未満の有効径を有する、実施形態126に記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 128 前記LNPが、約125ナノメートル未満の有効径を有する、実施形態127に記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 129 前記LNPが、約10~約110ナノメートルの有効径を有する、実施形態128に記載の組成物、製剤、方法または使用。
- 130 前記組成物が、界面活性剤を含まない、実施形態1~129のいずれか一つに記載の組成物、製剤、方法または使用。

【実施例】

【0095】

略語：CDS(細胞質DNAセンサー)、CLR(C型レクチン受容体)、DAMP(ダメージ関連分子パターン)、DC(樹状細胞)、dLN(流入領域リンパ節)、DLS(動的光散乱)、DMG-PEG-2000(ポリエチレングリコール[PEG]2000ジミリスチルグリセロール[DMG])、DSPC(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、ELSD(蒸発光散乱検出器)、FLT3L(Fms関連チロシンキナーゼ3リガンド)、HOdiA-PC(1-パルミトイル-2-(5-ヒドロキシ-8-オキソ-6-オクテンジオイル)-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン)、HOOA-PC(1-パルミトイル-2-(5-ヒドロキシ-8-オキソオクタ-6-エノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、IFN(インターフェロン-ガンマ)、IL-1b/IL1-ベータ/IL-1(インターロイキン-1ベータ) 40

KOdiA-PC(1-(パルミトイル)-2-(5-ケト-6-オクテン-ジオイル)ホスファチジルコリン)、KOOA-PC(1-パルミトイル-(5-ケト-8-オキソ-6-オクテノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、LNP(脂質ナノ粒子)、LPC/LysoPC(リゾホスファチジルコリン)、LysoPC(22:0)(1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、LPS(リポ多糖)、MC3((6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート、DLin-MC3-DMAとも呼ばれる)、moDC(単球由来樹状細胞)、MPLA(モノホスホリル脂質A)、NLR(NOD様受容体)、oxPAPC(酸化1-パルミトイル-2-アラキドニル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン)、PAMP(病原体関連分子 50

パターン)、P B M C (末梢血単核細胞)、P G P C (1 - パルミトイル - 2 - グルタリル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、P O V P C (1 - パルミトイル - 2 - (5' - オキソ - バレロイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、P R R (病原体認識受容体)、R L R (R I G - I 様受容体)、R 8 4 8 (レシキモド)、S C (皮下)、S T I N G (I F N 遺伝子の刺激因子)、T N F (腫瘍壊死因子 - アルファ)、および T L R (t o l l 様受容体)。

【0096】

本開示を、明確にし、理解を進めるために、例証または例示によって一部を詳細に記載してきたが、ある程度の変更および修正が実施され得ることが、当業者には明らかである。それゆえに、以下の実施例は、本開示の範囲を制限するものとして解釈されるべきではなく、本開示の範囲は、添付の特許請求の範囲によって説明される。

10

(実施例1)

単一アシル鎖を有するリゾホスファチジルコリン(L P C)およびT L R 7 / 8 アゴニストの組合せは、哺乳動物の末梢血単核細胞を過剰活性化する

【0097】

この実施例は、脂質D A M P を小分子P A M P と組み合わせて用いるイヌおよびヒト末梢血単核細胞(P B M C)の過剰活性化を記載する。

材料および方法

【0098】

全血からのP B M Cの単離。P B M Cを、F i c o l l - P a q u e P L U S (C y t i v i a)を用いて、密度勾配遠心分離を使用して全血から単離した。全血を、P B S で1 : 1希釈し、F i c o l l - P a q u e P L U Sの最上部に積層し、1000 x gで、室温で30分間遠心分離した。P B M Cを収集し、P B Sで2回洗浄し、A c k溶解緩衝剤(L o n z a)と共にインキュベートして、残りのあらゆる赤血球を除去した。

20

【0099】

細胞培養および刺激。単離直後に、P B M Cを、10% F B S、50単位/mLのペニシリン、50mg/mLのストレプトマイシン、2mM L - グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、および50mMベータ - メルカプトエタノールを含有するR P M I培地(R 10培地)に蒔いた。細胞を、1ウェル当たり 1×10^5 (イヌ細胞)または 1×10^6 (ヒト細胞)で96ウェル平底組織培養プレートに蒔いた。凍結乾燥させたV a c c i g r a d e R 8 4 8 (I n v i v o g e n)を再構成し、製造業者の推奨に従って希釈し、最終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で細胞に添加した。直後に、22 : 0 L Y S O P Cを、最終濃度 $82.5 \mu\text{M}$ で細胞に添加した。さらなる自然アゴニストを、製造業者の推奨に従ってR 10培地で希釈し、以下の通り細胞に添加した。ヒトG M - C S F (P e p r o t e c h)を最終濃度 $10 \text{ng}/\text{mL}$ で添加し、2' 3' c G A M P (I n v i v o g e n)を最終濃度 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ で添加し、L P S、血清型O 5 5 : B 5 (E n z o L i f e S c i e n c e s)を最終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で添加し、水酸化A l u m (I n v i v o g e n)を最終濃度 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ で添加した。細胞を、37、5% C O ₂で2日間インキュベートした。次に、細胞培養物を、エンドポイント解析のために使用した。

30

【0100】

エンドポイント解析。P B M CをP A M PおよびD A M Pと共に2日間培養した後、解析のために上清および細胞試料を収集した。培養物中の細胞を、400 x gで5分間遠心分離することによってペレット状にした。ウェル中の培地体積の半分を、酵素結合免疫吸着検定法(E L I S A)またはL u m i t (商標)生物発光アッセイによってサイトカインを定量化するために収集し、一方、残りの培地および細胞を使用して、代謝活性を評価することによって細胞生存率を定量化した。

40

【0101】

サイトカイン分泌の定量化。ヒトP B M CからのI L - 1分泌を、以下のキットのうちの1つを使用して評価した。E L I S A M A X D e l u x e S e tヒトI L - 1キット(B i o l e g e n d)、I n v i t r o g e nヒトI L - 1キット、または

50

Lumit (商標) ヒトIL-1 イムノアッセイ (Promega)。ヒトPBMCからのIFN 分泌を、ELISA MAX Deluxe Set ヒトIFN (Biolegend) を使用して評価し、ヒトPBMCからのTNF 分泌を、ヒトTNF 未コーティングELISAキット (Invitrogen) を使用して評価した。ELISAを、以下の修正を加えて、製造業者の指示に従って実施した。i) インキュベーションのための全試料+緩衝剤体積を、100 μ L から50 μ L に低減し、ii) 最高標準物質を500 pg/mL で調製し、7.8 pg/mL に2倍希釈し、iii) 試料のインキュベーションを、4 で一晩、オービタルシェイカーで完了させた。Lumit (商標) アッセイを、製造業者の指示に従って実施した。イヌPBMCからのIL-1 分泌を、イヌIL-1 / IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D) を製造業者の指示に従って使用し、以下の修正を加えて評価した。i) インキュベーションのための全試料+緩衝剤体積を、100 μ L から50 μ L に低減し、ii) 試料のインキュベーションを、4 で一晩、オービタルシェイカーで完了させた。すべてのELISAについて、吸光度を、Spectramax M5eプレートリーダー (Molecular Devices) を使用して450 nmで測定し、補正に570 nmを用いた。Lumit (商標) アッセイについては、発光を、すべての波長に対して、Spectramax M5eプレートリーダー (Molecular Devices) を使用し、500ミリ秒の積分時間で測定した。上清中のサイトカイン濃度を決定するために、試料濃度を、Graph Pad Prism 9 (Graph Pad Software) で4 PL解析により標準曲線を使用して補間した。次に、試料の補間結果を、上清に対して行われたあらゆる希釈度に合わせて調整した。

【0102】

細胞生存率の定量化。細胞生存率を、CellTiter-Glo発光細胞生存アッセイ (Promega) を使用して、代謝的に活性な細胞の指標としてATPの存在を定量化することによって評価した。代謝活性を、製造業者の指示に従って評価した。CellTiter-Glo試薬を、細胞ペレットおよび新鮮培地と混合し、次に白色不透明の96ウェルプレートに移した。発光を、すべての波長に対して、Spectramax M5eプレートリーダー (Molecular Devices) で500ミリ秒の積分時間を使用して測定した。生存率パーセントを、R848で処置したPBMCの対照条件と比べて計算した。

【0103】

統計解析。条件ごとに、各ドナーからの細胞を三連で試験するために蒔いた。サイトカインの定量化のために、三連の値を補間のために使用し、データを、全濃度 (pg/mL) またはドナー当たりの倍数変化として、R848単独の対照条件と比べてプロットした。生存率の定量化については、各ドナーからの三連の値を平均し、その平均を1つのドナー測定値として使用した。複数のドナーを試験し、棒グラフ上の各データ点は、1つのドナーについての値を表す。試験条件の差異について試験するために、試験結果を、R848単独の対照条件と比較した。p値を、混合効果一元配置ANOVAを使用して計算し、多重比較のためにダネット検定を使用して補正した。

結果 - 22 : 0 LYSO PCおよびR848を用いる処置は、イヌPBMCを過剰活性化する

【0104】

22 : 0 LYSO PC (DAMP) およびTLR7 / 8 アゴニストR848 (PAMP) の組合せは、ヒトmoDCにおいて強力な過剰刺激活性を有することが既に見出されている。この過剰刺激活性が他の臨床的に関連する種につながるかどうかを評価するために、イヌ全血から単離したPBMCを過剰活性化する22 : 0 LYSO PC + R848の能力を評価した。本物のイヌmoDCを誘導するのに入手可能なイヌに特異的な試薬がなかったので、データセットごとに、moDCの代わりに複数のドナーからのPBMCを使用した。手短には、PBMCを、密度勾配遠心分離を使用して全血から単離し、次に、目的の過剰活性化刺激を用いて2日間培養した。

10

20

30

40

50

【0105】

2日間培養した後、過剰活性化を、細胞培養上清中のIL-1の定量化および細胞生存率の測定によって評価した。22:0 LYSO PCおよびR848と一緒に用いて処置した場合、イヌPBMCは、1mL当たりの濃度およびドナー当たりのR848単独に対する倍数変化の両方として、試験した他のあらゆる刺激と比較して同等のまたはより高いレベルのIL-1を分泌した(図1A~1B)。PBMCの5~10%を構成する単球が、R848を用いる活性化に応答してIL-1を放出し得ることを示す過去の研究と一致して、イヌPBMCは、未処置細胞と比較してR848単独で上昇したレベルのIL-1を分泌していた。パイロトシスのLPS+Alumの組合せは、予想通り高レベルのIL-1を誘発した。とりわけ、PGPC+R848は、R848単独と比較して同様のレベルのIL-1を誘発したのに対して、GM-CSFも2'3'cGAMPも、未処置細胞と比較してイヌPBMCからの著しいIL-1分泌を誘導しなかった。

10

【0106】

IL-1は、細胞培養上清中でイヌPBMCが過剰活性化された翌日に検出することができたが、細胞生存率を過剰活性化後2日目に評価すると、IL-1分泌後の永続的な生存が保証された。22:0 LYSO+R848では、細胞の相対的生存率は著しく低下しなかった(図1C)。興味深いことに、PGPCをR848と組み合わせると、イヌPBMCに対していくらか毒性になることが証明されたが、ヒトmoDCまたはヒトPBMCに対する毒性は観察されなかった。しかし、目的の特定の細胞集団(この場合、単球)の生存率は、混合物で得られた結果からは決定することができないので、混合細胞集団の試験から行った観察を解釈することは難易度が高い。これらのデータをまとめると、22:0 LYSO+R848は、イヌPBMCから高レベルのIL-1分泌を誘発し、これが過剰活性化の指標になることが実証される。

20

結果-22:0 LYSO PCおよびR848を用いる処置はヒトPBMCを過剰活性化する

【0107】

ヒトドナーから得た全血から単離したPBMCでも、過剰活性化実験を実施した。手短には、PBMCを、複数のヒトドナーの全血から密度勾配遠心分離によって単離し、目的の過剰活性化刺激を用いて2日間培養した。

【0108】

ヒトPBMCは、ヒトmoDCおよびイヌPBMCと同様に、試験した他のすべての刺激よりも高いか、またはそれらと同等のレベルでIL-1を分泌した(図2A~2B)。ヒトPBMCは、イヌPBMCと同様に、単球活性化に起因してR848単独に反応してIL-1を分泌し、これは22:0 LYSO PCの添加によって上昇した。LPS+Alumのパイロトシスの組合せは、予想通り高レベルのIL-1を誘発した。イヌPBMCにおける観察と一致して、PGPC+R848は、R848単独ほど実質的に高レベルのIL-1を誘導しなかった。GM-CSFは、未処置細胞によって生じたバックグラウンドレベルを著しく上回るレベルのヒトPBMCからのIL-1分泌は誘導しなかった。

30

【0109】

また、ヒトPBMCの生存率を過剰活性化後2日目に評価すると、IL-1分泌後のヒトPBMCの永続的な生存が保証された。いずれの刺激を用いる処置の後も、ヒトPBMCの生存率の著しい低下は観察されなかった(図2C)。しかし、目的の特定の細胞集団(この場合、単球)の生存率は、混合物で得られた結果からは決定することができないので、混合細胞集団の試験から行った観察を解釈することは難易度が高い。これらのデータをまとめると、ヒトおよびイヌPBMCは共に、22:0 LYSO PC+R848によって過剰活性化されることが実証される。興味深いことに、イヌPBMCは、PGPC+R848よりも22:0 LYSO PC+R848によって過剰活性化される程度が大きい。

40

【0110】

50

活性化されたヒトPBMCは、IL-1に加えて他のサイトカインを分泌することができるので、細胞培養上清における炎症促進性サイトカインIFN およびTNFの分泌を、過剰活性化後2日目に測定した。22:0 LYSO PC + R848の組合せは、IFN分泌およびTNF分泌の両方において、試験した他のすべての刺激と比較して、R848単独と比べたドナー当たり最高の倍数変化を誘導した(図3A~3B)。とりわけ、LPS + Alumは、ヒトPBMCから高レベルのIL-1分泌を誘導したが(図3B)、この刺激の組合せは、IFNまたはTNF分泌の倍率上昇を誘導しなかった。さらに、GM-CSFも2'3'cGAMPも、R848単独を上回るIFN分泌の実質的な倍数変化を誘発しなかった。これらのデータは、22:0 LYSO PC + R848の組合せが、ヒトPBMCからの炎症性サイトカインIFN およびTNFの分泌を誘導するのに優れていることを示している。

(実施例2)

リゾホスファチジルコリン(LPC)を含む脂質ナノ粒子の調製

【0111】

この実施例は、過剰活性化脂質(例えば、22:0 LYSO PC)が負荷された脂質ナノ粒子(LNP)をマイクロ流体プロセスで調製することを記載する。

材料および方法

【0112】

LNPを、Nano Assembler(登録商標)Ignite(商標)マイクロ流体機器(Precision Nanosystems、Vancouver、BC、カナダ)を使用して合成した。最初に、GenVoy-ILM(商標)イオン化可能な脂質ミックス(Precision Nanosystems、Vancouver、BC、カナダ)を含有するキットを使用して、LNPを生成した。mRNAを含まないキットを使用して、空のLNPビヒクルを構築し、過剰活性化剤が負荷されたLNPを、全LNP含量の10%のモル比まで22:0 Lyso PCを添加することによって産生した。また、LNPを、個々の構成成分を使用して生成して(キットを用いずに)、LNPへの22:0 Lyso PCの負荷が意図的に変えられ得るかどうかを決定した。LNPを、以下の構成成分:

(10Z, 13Z) - 1 - (9Z, 12Z) - 9, 12 - オクタデカジエン - 1 - イル - 10, 13 - ノナデカジエン - 1 - イルエステル(CAS登録番号1224606 - 06 - 7、本明細書では「DLin - MC3 - DMA」または「MC3」と呼ばれる)(Cayman Chemical)、

1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン(CAS登録番号816 - 94 - 4、本明細書では「DSPC」と呼ばれる)(Avanti)、

コレステロール(Sigman)、および

1, 2 - ジミリストイル - rac - グリセロ - 3 - メトキシポリエチレングリコール - 2000(CAS登録番号160743 - 62 - 4、本明細書では「DMG - PEG2000」と呼ばれる)(Avanti)

を、1 - ベヘノイル - 2 - ヒドロキシ - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン(CAS登録番号125146 - 65 - 8、本明細書では「22:0 Lyso PC」と呼ばれる)(Avanti)と組み合わせて、または組み合わせることなく調製した。まず、脂質を

エタノールに溶解させ、次に表2-1に示されているモル濃度パーセンテージに従って合わせた。エタノール中の脂質を、PBS、pH7.4と1:3の体積比で合わせた。Nano Assembler(登録商標)Ignite(商標)マイクロ流体機器を、流速12 mL/分、出発廃棄物量(start waste)0.35 mL、および最終廃棄物量(end waste)0.05 mLでプログラムした。LNPを、PBS、pH7.4で洗浄して、残留エタノールを除去し、次にAmicon 10K MWCO遠心フィルターを使用して2000 x gで30分間スピンすることによって濃縮した。

表2-1. LNP製剤[^]

【表 2 - 1】

脂質	GenVoy ビヒクル LNP	LPC GenVoy LNP	LNP ビヒクル 1	LPC LNP 1	LNP ビヒクル 2	LPC LNP 2	LPC LNP 3
GenVoy-ILM	100.0%	90.0%	--	--	--	--	--
MC3	--	--	45.0%	41.0%	--	--	--
DSPC	--	--	15.0%	10.0%	50.0%	25.0%	10.0%
コレステロール	--	--	38.5%	37.5%	48.5%	48.5%	48.5%
DMG-PEG2000	--	--	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
22:0 Lyso PC	--	10.0%	--	10.0%	--	25.0%	40.0%

10

^異なるLNP製剤の構成成分のモル濃度パーセント。LNP2およびLNP3製剤は、同じビヒクル(LNPビヒクル2)を共有している。

【0113】

LNPへの22:0 Lyso PCの負荷を、HPLCを使用して評価した。PBS中LNPを、-80で凍結させ、次に凍結乾燥させ、定量化され得るまで-20で保存した。LNPをエタノールで再構成し、次に水と混合して、PBSを溶解させた。22:0 Lyso PCの7点標準曲線を、試料の調製に合致するように水およびPBSが添加されたエタノール中で調製した。標準物質および試料を、0.45µmフィルターを介して濾過した後、HPLCに流した。HPLC定量化を、1260 Infinity II 蒸発光散乱検出器(ELSD)を備えたAgilent 1260 Infinity II HPLCを使用して実施した。Luna 5µm NH2 100、150×4.6mmのLCカラム(Phenomenex、Torrance、CA)をカラム温度30で使用して、試料を検出した。A、100%水、およびB、100%アセトニトリルの2種の溶離液を使用した。5%/95%A/Bから構成された初期移動相を使用して、2.5分後に24%/76%A/Bに達する勾配でカラムにロードした。2.5~6分ではより狭い勾配を使用し、その時間枠中にA/Bは25%/75%にゆっくり達した。その後、3分間かけて勾配を出発条件に戻した後、次の試料を流した。流速は1mL/分に設定し、注入体積は、試料および標準物質について5µLであった。ELSDは、エバポレーター温度80、ネブライザー温度30、および窒素ガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御、データ取得、および処理のために、Agilent CDS 2.6ソフトウェアを使用した。

20

30

【0114】

LNPのサイズを、NanoBrook Omni粒径およびゼータ電位解析器(Brookhaven Instruments Corp.、Holtsville、NY)で動的光散乱(DLS)を使用して評価した。試料ごとにそれぞれ120秒間、4回の測定を行い、試料ごとに行われた最初の測定は、試料の平衡化に必要な時間として下流解析から除外された。サイズ分類グラフ上のデータ点は、LNPの2つの調製物からの個々の反復測定値を表す。

40

結果

【0115】

LNPへの22:0 Lyso PCの組込みを探索して、LNPの物理的特徴および生物活性に対する22:0 Lyso PCの効果を試験した。負荷されたLNPの負荷レベルおよび数の両方が、細胞に送達される22:0 Lyso PCのペイロードに影響を及ぼす非常に重要な変数であると考えられた。

【0116】

GenVoy-ILM(商標)イオン化可能な脂質ミックス(Precision Nanosystems、Vancouver、BC、カナダ)を使用して、10%22:0 Lyso PCを添加して(モル比に基づく)または22:0 Lyso PCを添

50

加することなく（空のビヒクルLNP）、LNPを生成した。さらなるLNPを、以下の構成成分：MC3、DPSC、コレステロール、およびDMG-PEG2000を22：0 Lyso PCと組み合わせることによって、または組み合わせることなく生成した。すべてのLNPを、NanoAssembler（登録商標）Ignite（商標）マイクロ流体機器（Precision Nanosystems、Vancouver、BC、カナダ）を使用することによって生成した。その後、LNPを、スピン濾過を使用して精製して、エタノールおよび組み込まれなかった材料を除去した。

【0117】

LNP製剤を、動的光散乱（DLS）を使用してサイズ分類して、それらの平均有効径を決定した。各製剤の2つのLNPバッチを調製し、1つのバッチにつき3回のサイズ分類測定を行った。LNPは、製剤および22：0 Lyso PCの添加に応じて直径が50～200nmの範囲であった（図4）。22：0 Lyso PCの添加は、試験した製剤のいずれのLNPの有効径にも、大幅に影響を与えるようには見えなかった。

10

【0118】

試験される4つのLNP製剤を、異なる22：0 LPC投入モル比で開始した。投入比のモジュレートが、LNPへの22：0 Lyso PCの負荷レベルに影響を与えるかどうかを決定するために、LNP中に存在する22：0 Lyso PCの分量を、HPLCを使用して評価した。LNP調製物を凍結乾燥させ、次に、定量化のためにエタノールおよび水の混合物に溶解させた。試料を、同じ溶解条件を使用して調製した22：0 Lyso PCの標準曲線と比較した。22：0 Lyso PCは、22：0 Lyso PCが出発投入物に含まれていた調製物においては首尾よく検出され、それらの対応する空のビヒクル対照には検出されなかった（図5A～5C）。LNPへの22：0 Lyso PCの組込み効率を100%と想定して、脂質の組込みの理論値を計算した。HPLCにより測定された22：0 Lyso PCの実的な量は、理論値の75%以内であった（図5D）。22：0 Lyso PCの投入量が増加すると、測定されるLNPへの22：0 Lyso PCの負荷も増大した。このことは、LNPへの22：0 Lyso PCの負荷が、特定の適用に必要な22：0 Lyso PCの量に応じて調整され得ることを示している。

20

（実施例3）

TLR7/8アゴニストを、リゾホスファチジルコリン（LPC）を含む脂質ナノ粒子と組み合わせて用いる、ヒト樹状細胞の過剰活性化

30

【0119】

この実施例は、TLR7/8アゴニストを、過剰活性化脂質（例えば、22：0 LYSO PC）を負荷したLNPと組み合わせて用いる、ヒト単球由来樹状細胞（moDC）の過剰活性化を記載する。

材料および方法

【0120】

ヒト単球を、Straight From Leukopak CD14マイクロビーズキットを製造業者の指示に従って使用して、Miltenyi Inc.（San Jose、CA）から購入したLeukopakから単離した。次に、単球を一定分量に分け、10%ジメチルスルホキシドを含有するウシ胎仔血清中で凍結させた。単球由来樹状細胞（moDC）の培養物を用いる研究のために、単球を解凍し、10%FBS、50単位/mLのペニシリン、50mg/mLのストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、1mMビルビン酸ナトリウム、50mMベータ-メルカプトエタノール、10mM HEPES、およびGibco MEM非必須アミノ酸を含有するRPMI培地（R10培地）中で培養した。単球をmoDCに分化させるために、組換えヒトGM-CSF（50ng/mL）およびIL-4（25ng/mL）をR10培地に添加した。細胞を、GM-CSFおよびIL-4と共に6日間培養し、3日目にGM-CSFおよびIL-4を含有するR10培地で細胞をさらに供給した。

40

【0121】

50

分化後6日目にmoDCを収集し、計数した。細胞を、96ウェル平底プレートに 1×10^5 細胞/ウェルで蒔いた。細胞を、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のR848(最終)を用いてまたは用いずに、過剰活性化脂質(またはビヒクル対照)を用いてまたは用いずに処置した。LNPによって誘導された過剰活性化を、2つのアッセイを使用して測定した。細胞生存率の尺度として、CellTiter-Gloアッセイ(Promega)によりATPを検出する。IL-1のLumitアッセイ(Promega)により、moDC細胞培養上清中に存在しているIL-1サイトカインを測定する。実験条件を三連で試験し、1つのドナーからの結果の平均をプロットした。データは、2回の実験にわたって試験した6つのヒトドナー試料からの結果を表す。

結果

10

【0122】

活性化過剰moDCは、細胞生存率を保持しながら、長寿命メモリーT細胞の産生および再活性化の重要なサイトカインであるIL-1を生成する。実施例2に記載されている通り調製したLNPが、ヒトmoDCを過剰活性化する能力を試験した。また、比較のために、PBS培地に22:0 Lyso PCを単に再懸濁させ、それによって、22:0 Lyso PCが大きい薄片状の不溶性材料になる。ATP定量アッセイを使用して細胞生存率を測定した場合、ほとんどの実験条件で、細胞生存率に対する効果はごくわずかであった(図6A)。最も明らかな例外は、moDCを、GenVoy-ILMを用いて作製したLNPで処置した条件であり、これは、平均生存率が75%を下回った(R848だけの処置に対して)。GenVoy-ILM LNPは、製剤に22:0 Lyso PCが包含されるか否かにかかわらず、IL-1生成を誘導した(図6B)。細胞生存率が低下したことを考慮すると、GenVoy-ILM LNPは、細胞死を引き起こしていたと推定され、したがって、IL-1放出はmoDC過剰活性化の結果ではあり得ない。

20

【0123】

細胞に、PBSに直接再懸濁させた22:0 Lyso PCを投与した場合、IL-1は、細胞生存率の低下を伴って生成された(図6A)。加えて、PBS中の大きい薄片状型式の22:0 Lyso PCでは、moDCの投与量が一定でなかったため、ドナー由来のmoDCを使用した場合の複製は変動した。比較として、LNP製剤は、より一貫したIL-1応答を有していた。22:0 Lyso PC LNPは、それらの対応する空のLNPビヒクル対照から、バックグラウンド測定を上回るIL-1分泌を誘導した(図6B)。興味深いことに、異なる製剤にわたって $82.5 \mu\text{M}$ の22:0 Lyso PCを投与したにもかかわらず、LNP1個当たりより多量の22:0 Lyso PCを負荷した、より少数のLNPで処置した細胞から、増加した量のIL-1が生成された。10%22:0 Lyso PCを含有する製剤(GenVoyおよびLNP1)は、それらのビヒクル対照と比較して、免疫原性が増大しなかった。それとは対照的に、25%または40%22:0 Lyso PCを含有する製剤は、それらのビヒクル対照と比較して、実際、より高いレベルのIL-1分泌を誘導し、40%22:0 Lyso PCを含有するLNPは、最高レベルのIL-1分泌を誘導した。これらのデータは、LNP1個当たりには与えられた22:0 Lyso PCのペイロードが、moDC過剰活性化の重要な寄与要因であることを示している。当量の22:0 Lyso PCを、より多くのLNPに分散させると、過剰活性化の効率が低下する。

30

40

【0124】

まとめると、データは、22:0 Lyso PCがLNPに組み込まれ得ることを実証している。この新しい製剤化方法は、粒子に組み込まれる22:0 Lyso PCの量を微調整することを可能にし、それによって過剰活性化の効率に対して著しい影響を及ぼすことができるので、臨床的に有意義であると考えられる。PBS中の22:0 Lyso PCは、過剰活性化されても同レベルの調整可能性をもたらすことができない。加えて、PBS中で22:0 Lyso PCを調製することに関する別の懸念は、溶液に均一に分布しない、目に見える非常に大きい粒子が形成されるということである。均一に

50

分布した大きい粒子は、正確な投与量に関して課題を提示すると考えられる。また、眼に見える微粒子は、細胞よりもかなり大きいので、非常に大きい粒子は、*in vivo*で22:0 Lyso PCの体内分布を制限する可能性が高い。大きい粒子は、*in vivo*で送達される場合、免疫系によって隔絶され得る可能性があり、それによって、過剰活性化のために22:0 Lyso PCが樹状細胞に到達する能力が制限され得る。

(実施例4)

TLR7/8アゴニストを、リゾホスファチジルコリン(LPC)を含む脂質ナノ粒子と組み合わせて用いるマウス樹状細胞の過剰活性化

【0125】

この実施例は、TLR7/8アゴニストを、過剰活性化脂質(例えば、22:0 Lyso PC)が負荷された脂質ナノ粒子(LNP)と組み合わせて用いるマウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)の過剰活性化を記載する。 10

材料および方法

【0126】

LNPの合成。LNPを、以下の構成成分:

1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(CAS登録番号816-94-4、本明細書では「DSPC」と呼ばれる)(Avanti);

コレステロール(Sigman)、および

1, 2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(CAS登録番号160743-62-4、本明細書では「DMG-PEG2000」と呼ばれる)(Avanti) 20

を、1-ベヘノイル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(CAS登録番号125146-65-8、本明細書では「22:0 Lyso PC」と呼ばれる)

(Avanti)と組み合わせて、または組み合わせることなく調製した。LNPを、22:0 Lyso PCなしに、または20%もしくは40%モル比の22:0 Lyso PCを負荷して調製して、22:0 Lyso PCの負荷が意図的に変えられ得る

かどうかを決定した。脂質ナノ粒子(LNP)を、NanoAssemble Ignite機器(Precision Nanosystems)を使用して合成した。まず、

脂質をエタノールに溶解させ、次に表4-1に示されているモルパーセンテージに従って、全脂質濃度が12.5mMに達するようにした。エタノール中の脂質を、クエン酸ナトリウム緩衝剤、pH4と1:3の体積比で、流速12mL/分で合わせた。LNPを、10体積のリン酸緩衝食塩水(PBS)、pH7.4で洗浄して、残留エタノールを除去し、次にAmicon 10K MWCO遠心フィルターを使用して濃縮した。 30

次にAmicon 10K MWCO遠心フィルターを使用して濃縮した。

【0127】

LNPの特徴付け。LNPへの22:0 Lyso PCの負荷を、HPLCを使用して評価した。PBS中LNPを、定量化まで-20で凍結させた。LNPを、1部のエタノールをPBS中LNPに添加することによって溶解させた。22:0 Lyso PCの7点標準曲線を、試料の調製に合致するように添加される1:1のエタノール:PBS中で調製した。標準物質および試料を、0.45μmフィルターを介して濾過した後、HPLCに流した。HPLC定量化を、1260 Infinity II蒸発光散乱検出器を備えたAgilent 1260 Infinity II HPLCを使用して実施した。Luna 5μm NH2 100、150x4.6mmのLCカラム(Phenomenex)をカラム温度30で使用して、試料を検出した。A、100%水、およびB、100%アセトニトリルの2種の溶離液を使用した。5%/95%A/Bから構成された初期移動相を使用して、2.5分後に24%/76%A/Bに達する勾配でカラムにロードした。2.5~6分ではより狭い勾配を使用し、その時間枠中にA/Bは25%/75%にゆっくり達した。その後、3分間かけて勾配を出発条件に戻した後、次の試料を流した。流速は1mL/分に設定し、注入体積は、試料および標準物質について2.5μLであった。蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御 40

流速は1mL/分に設定し、注入体積は、試料および標準物質について2.5μLであった。蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

蒸発光散乱検出器(ELSD)は、エバポレーター温度50、ネブライザー温度30、およびガス流速0.9標準L/分を使用した。HPLC機器制御

、データ取得、および処理のために、Agilent CDS 2.6ソフトウェアを使用した。

【0128】

LNPのサイズを、NanoBrook Omni (Brookhaven) デバイスで動的光散乱 (DLS) を使用して評価した。LNPを、PBSで1:10希釈した後、DLSで行った。試料ごとに90秒間の3回の測定値を記録した。PBS中の22:0 Lyso PCのサイズを、スピン速度1500rpmに設定したHydro SV小体積分散ユニットを備えたMastersizer 3000 (Malvern) を使用して評価した。試料ごとに5秒間の5回の読み取り値を記録した。

【0129】

マウス骨髄由来FLT3L-DCの産生。マウスから大腿骨および脛骨を除去し、ハサミで切断し、滅菌管に流し入れた。骨髄懸濁液を、ACK溶解緩衝剤で1分間処置し、次に40 μ mの細胞濾過器を通過させた。細胞を計数し、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシン、ならびにL-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムのサプリメントを含有する完全IMDMからなる培地 (I10) に再懸濁させた。次に、細胞をP12プレート中1ウェル当たり 8×10^6 骨髄細胞で蒔いた。組換えマウスFLT3L (Miltenyi) を、200ng/mLで培養物に添加した。分化した細胞を、8日目のその後のアッセイのために使用した。分化効率を、BD Symphony A3を使用してフローサイトメトリーによってモニタリングし、CD11c⁺MHC-I⁺細胞は、日常的に生細胞の80%を上回っていた。実験ごとに、5~15匹のマウスを使用して、骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を産生した。

【0130】

マウス骨髄由来FLT3L-DCの過剰活性化。BMDCを、分化後8日目に回収し、PBSで洗浄し、FLT3Lを含有する完全IMDM培地 (I10) に 2×10^5 細胞/mLの濃度で再び蒔いた。細胞を、1 μ g/mLのR848の存在下または非存在下で培養し、次に82 μ MのPBS中22:0 Lyso PCまたは22:0 Lyso PC LNPを用いてまたは用いずに処置した。刺激後48時間目に、サイトカインの測定のために上清を収集した。生存率を、細胞からのATP含量を測定するCellTiter-Gloアッセイ (Promega) を使用して測定した。CellTiter-Glo試薬50マイクロリットルを、50 μ Lの細胞に添加した。発光を、SpectraMax M5eプレートリーダーで、500ミリ秒の積分時間を使用して定量化した。生存率データを、細胞をR848で処置した対照条件に対して設定した。IL-1 およびIL-6サイトカイン分泌を、サンドイッチELISA (Invitrogen) を使用して測定した。

【0131】

細胞生存率の定量化。細胞生存率を、CellTiter-Glo発光細胞生存アッセイ (Promega) を使用して、代謝的に活性な細胞の指標としてATPの存在を定量化することによって評価した。代謝活性を、製造業者の指示に従って評価した。CellTiter-Glo試薬を、細胞ベレットおよび残りの上清と混合し、白色不透明の96ウェルプレートに移した。発光を、すべての波長に対して、SpectraMax M5eプレートリーダー (Molecular Devices) で500ミリ秒の積分時間を使用して測定した。生存率パーセントを、R848で処置したDCと比べて計算した。

【0132】

IL-1 およびIL-6分泌の定量化。IL-1 およびIL-6分泌を、ELISAマウスIL-1 およびIL-6キット (Invitrogen) を使用して評価した。ELISAを、製造業者の指示に従って実施した。吸光度を、SpectraMax M5eプレートリーダー (Molecular Devices) を使用して450nmで測定し、補正に570nmを用いた。上清中のIL-1 およびIL-6濃度を決定するために、試料のIL-1 またはIL-6濃度を、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) で4PL解析により標準曲線を使用して補間し

10

20

30

40

50

た。次に、試料の補間結果を、上清に対して行われたあらゆる希釈度に合わせて調整した。

【0133】

遊走アッセイのためのFLT3L-DCの過剰活性化。マウス骨髄由来樹状細胞(BMDc)を、分化後8日目に回収し、PBSで洗浄し、FLT3Lを含有するI10に 10×10^6 細胞/mLの濃度で再び蒔いた。過剰活性化のために、500 μ LのR848を最終濃度1 μ g/mLで添加し、500 μ Lの脂質(PBS中で調製した22:0 Lyso PCまたは22:0 Lyso PC LNP)を最終濃度82 μ Mで添加した。細胞を、チューブローターで、37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした。刺激後24時間目に、細胞をPBSで洗浄し、CFSE(1:1000)で、暗所において37 $^{\circ}$ Cで30分間染色した。次に、DCを計数し、 1×10^6 細胞をマウス1匹当たり100 μ Lで皮下注射した(SC)。注射後24時間目に、皮膚流入領域リンパ節(dLN)を、注射側から切開した。単一細胞懸濁液を調製し、細胞を、PBS中、固定可能な生/死細胞用色素(ThermoFisher)で、4 $^{\circ}$ Cで20分間染色した。次に、以下の蛍光コンジュゲート抗体:抗CD11c、および抗I-A/I-E(MHC-II)を含有するMACS緩衝剤(1%FCSおよび2mMEDTAを含むPBS)で細胞を再び洗浄し、4 $^{\circ}$ Cで20分間染色した。生細胞の中のCD11c⁺MHC-II⁺の絶対数を決定するために、countBright計数ビーズ(ThermoFisher)を、製造業者のプロトコールに従って使用した。データは、BD FACS Symphony(Becton-Dickenson)で取得した。データは、FlowJoソフトウェア(TreeStar)を使用して解析した。実験群ごとに4匹のマウスを使用した。

結果

【0134】

22:0 Lyso PCをLNPに負荷することができる。22:0 Lyso PCを、DSPC、コレステロールおよびDMG-PEG2000を含むLNPに効率的に組み込んだ。前述のLNP合成プロセスを使用すると、合成中に添加した22:0 Lyso PCの87.4%が、LNPから集められ、表4-1に示される通りHPLCによって検出された。

表4-1. LNP構成成分のモル濃度パーセント

【表4-1】

脂質	空のLNP	22:0 Lyso PC LNP	封入効率 (%)
DSPC	50.0%	10.0%	
コレステロール	48.5%	48.5%	
DMG-PEG2000	1.5%	1.5%	
22:0 Lyso PC	0.0%	40.0%	87.4 \pm 0.1

【0135】

LNP調製物中の22:0 Lyso PCは、より均一である。PBS中で22:0 Lyso PCを調製することに関する1つの懸念は、22:0 Lyso PCが不溶性であり、それゆえに、溶液に均一に分布しない大きい粒子が生じることである。粒子は、直径が130 μ mほどであり(図7A)、多分散指数が大きく、粒径範囲が広いことを示している。この粒径は、細胞のサイズよりもほぼ10倍大きいので、細胞(例えば、貪食細胞)によって取り込まれるには大きすぎる。結果として、これらの大きい粒子は、in vivoで樹状細胞(または目的の他の細胞)に到達することができない。それとは対照的に、22:0 Lyso PCがLNPに組み込まれる場合、LNPは、サイズが約50nmほどであり、最も大きい粒子(濾過されていない)でも直径が1 μ m未満である(図7B)。加えて、これらの粒子の多分散指数(PDI)は、かなり小さく、懸濁液がより均一であることを示している。このサイズのLNPは、細胞によって容易に

取り込まれ得る。したがって、22:0 Lyso PCは、*in vivo*でより生体利用可能になると予想される。LNP懸濁液中の22:0 Lyso PC分布の均一性は、より反復可能な、正確な投与レベルにつながると予想される。

【0136】

22:0 Lyso PC LNPは、*in vitro*でマウスDCからのIL-1分泌を誘導する。FLT3L-DCを、培地単独、空のLNP、またはPBS中82 μMの22:0 Lyso PCもしくはLNPに負荷された22:0 Lyso PCで刺激した。代替的に、FLT3L-DCを、1 μg/mlのR848を空のLNP、22:0 Lyso PC LNP、またはPBS中22:0 Lyso PCと組み合わせで処置した。刺激後48時間目に、細胞上清をELISAのために回収し、細胞生存率をCell Titer Glowアッセイによって測定し、それによって、細胞からのATP放出レベルを測定した。細胞を、R848を過剰活性化脂質製剤(PBSまたはLNP中22:0 Lyso PC)と組み合わせるか、または空のLNPと組み合わせで処置した場合、FLT3L DCは、R848単独と比較して細胞生存率パーセントによって明らかにされた通り、生存可能であった(図8A)。加えて、R848を空のLNPまたは22:0 Lyso PCと組み合わせで用いる刺激では、22:0 Lyso PCがPBSまたはLNP中で製剤化されたか否かにかかわらず、高レベルの炎症促進性サイトカインIL-6を誘導した(図8B)。さらに、R848およびPBS中の22:0 Lyso PCは、生存細胞からのIL-1分泌を誘導しなかったが、R848をLNP中の22:0 Lyso PCと組み合わせでDCを処置すると、実際、生存細胞からのIL-1分泌が誘導され(図8C)、このことは、LNP中の22:0 Lyso PCがDC過剰活性化を誘導し、PBS中の22:0 Lysoを上回る利点を有していることを示している。

【0137】

22:0 Lyso PC LNPは、*in vivo*でDCの過剰遊走を誘導する。過剰活性化の別の顕著な特徴は、過剰活性化脂質が、皮膚から流入領域リンパ節(dLN)へのDCの過剰遊走を誘導する能力である。LNP中の22:0 Lyso PCがDCの遊走を誘導し得るかどうかを評価するために、FLT3L-DCを、空のLNP、LNP中の22:0 Lyso PC、または空のLNP、LNP中の22:0 Lyso PCもしくはPBS中の22:0 Lyso PCと組み合わせたR848と共にチューブローターで一晩インキュベートした。翌日、細胞を洗浄し、CFSEで染色した。マウス1匹当たり 1×10^6 細胞を、右背部に皮下注射した。注射後24時間目に、dLNを回収し、単一細胞懸濁液を調製した。注射しなかったマウスからのdLNを、負の対照として使用した。細胞を、生/死細胞用色素で染色して、生細胞であるCD11cおよびMHC-IIを特定した。CFSE⁺、CD11c⁺MHC-II⁺DCのパーセンテージを、フローサイトメトリーによって測定した。予想通り、R848を空のLNPまたは22:0 Lyso PC LNP単独と組み合わせで処置したDCは、皮膚からdLNへのDCの遊走を全く誘導しなかった(図8D)。同様に、R848を空のLNPと組み合わせで処置したDCも、R848をPBS中の22:0 Lyso PCと組み合わせで処置したDCも、dLNへのDCの遊走を誘導しなかった。興味深いことに、R848をLNP中の22:0 Lyso PCと組み合わせで処置したDCは、dLNへのDCの遊走を増強した(図8D)。

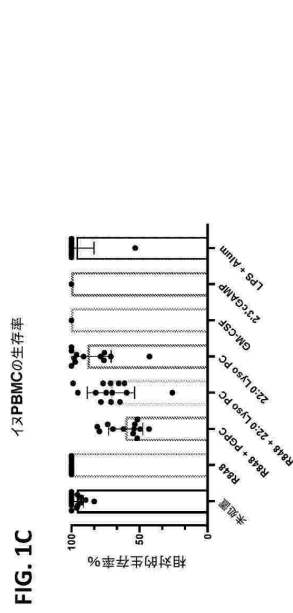
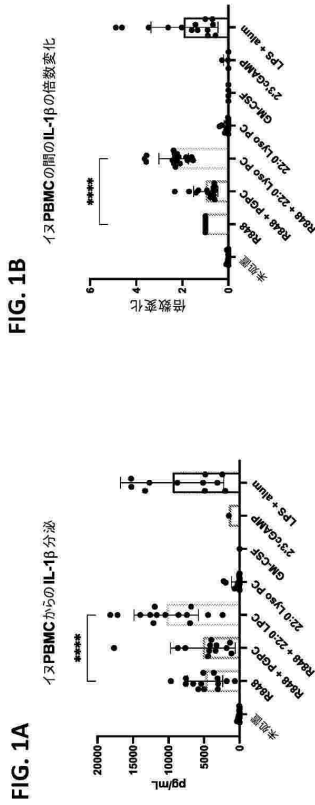
【0138】

これらのデータは、22:0 Lyso PCを含有するLNPが、緩衝水溶液、例えばPBS中の22:0 Lyso PCと比較して優れた過剰活性化脂質製剤であることを実証している。LNPで送達される22:0 Lyso PCで処置したDCは、22:0 Lyso PCがないLNPおよびPBS中で製剤化された22:0 Lyso PCと比較して、IL-1分泌の増大および流入領域リンパ節への遊走の増大を示した。したがって、LNPで送達される22:0 Lyso PCは、*in vivo*で抗原と共に送達される場合、PBS中の22:0 Lyso PC(または22:0 Lyso

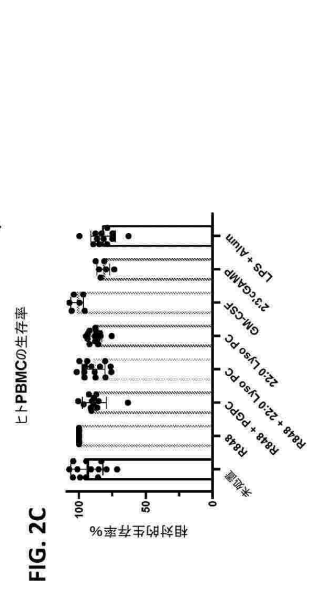
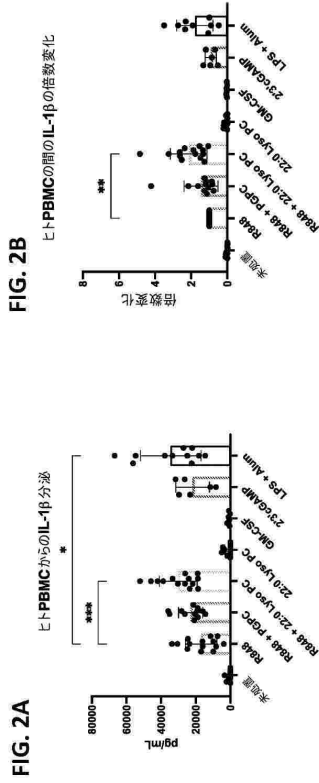
o PCがないLNP)で送達される抗原よりも強力な、新たなT細胞(特に、メモリーT細胞)の産生をもたらすと考えられる。

【図面】

【図1】



【図2】



10

20

30

40

50

【 図 3 】

FIG. 3B

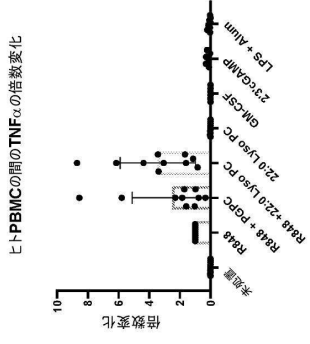
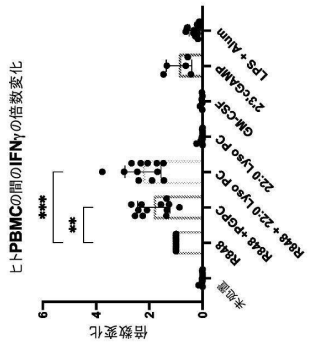
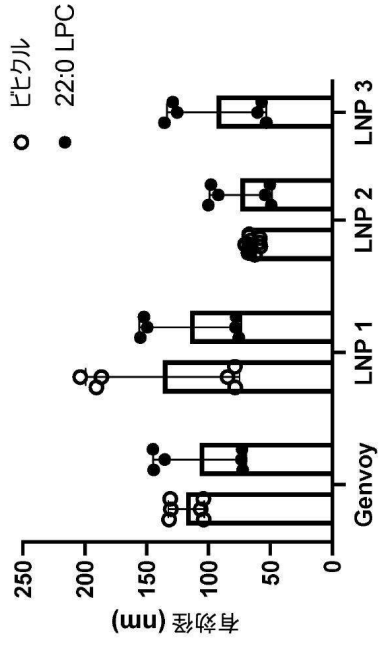


FIG. 3A



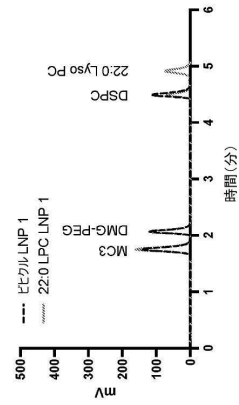
【 図 4 】

FIG. 4



【 図 5 - 1 】

FIG. 5B



【 図 5 - 2 】

FIG. 5D

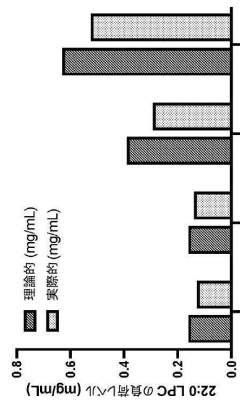


FIG. 5A

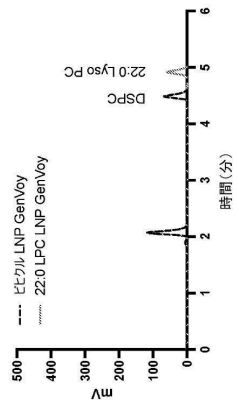
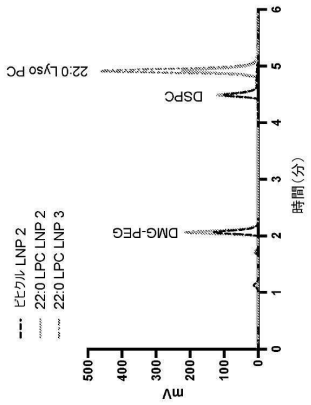


FIG. 5C



10

20

30

40

50

FIG. 7A

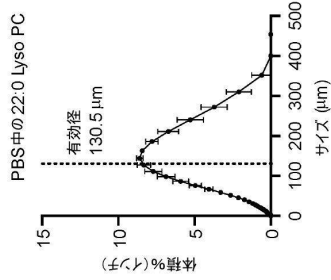
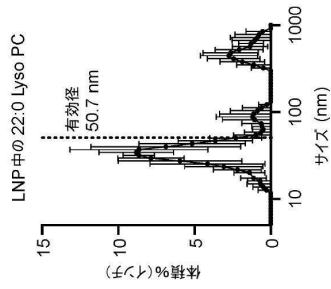


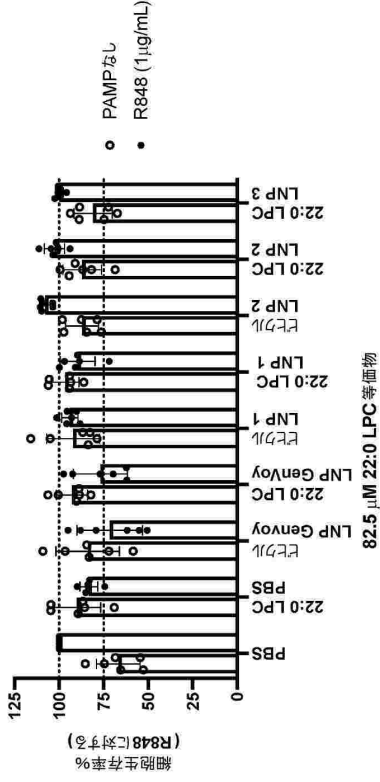
FIG. 7B



【 図 7 】

製剤	有効径 (\pm SD)	PDI (\pm SD)
PBS中の22:0 Lyso PC	130.5 $\mu\text{m} \pm 7.9 \mu\text{m}$	0.480 ± 0.002
LNP中の22:0 Lyso PC	50.7 nm $\pm 2.7 \text{ nm}$	0.152 ± 0.027

FIG. 6A



【 図 6 - 1 】

FIG. 8A

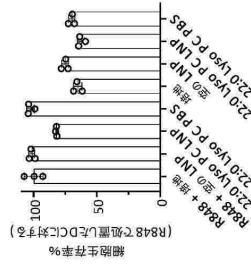
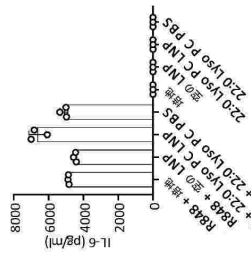


FIG. 8B



【 図 8 】

FIG. 8C

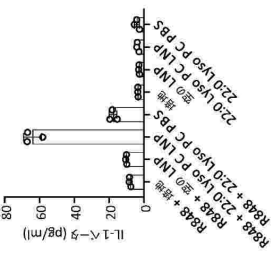


FIG. 8D

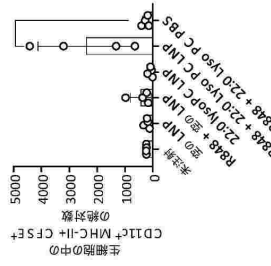


FIG. 6B



【 図 6 - 2 】

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2023/062064
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K9/51	A61K31/685
	A61P35/00	
	A61K31/4745	A61K39/39
		A61P31/00
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORY D. SAGO ET AL: "High-throughput in vivo screen of functional mRNA delivery identifies nanoparticles for endothelial cell gene editing", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 115, no. 42, October 2018 (2018-10), pages E9944-E9952, XP055538045, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1811276115 page E9947, right-hand column, paragraph 2 - page E9948, left-hand column, paragraph 1	102,105, 107,108, 126-130
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
30 May 2023	07/06/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Nyeki, Agnes	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062064

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 974 715 A1 (ARIBIO INC [KR]) 20 January 2016 (2016-01-20) page 7; examples 1,2 claims 1-12 -----	84-86, 99-117, 125-130
A	PERRIN-COCON L ET AL: "Lysophosphatidylcholine is a natural adjuvant that initiates cellular immune responses", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 24, no. 9, 27 February 2006 (2006-02-27), pages 1254-1263, XP028011249, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2005.09.036 [retrieved on 2006-02-27] the whole document -----	1-130
A	MALIK VAISHALI ET AL: "TLR7/8 Agonist and SHP2 Inhibitor Loaded Nanoparticle Enhances Macrophage Immunotherapy Efficacy", ADVANCED THERAPEUTICS, vol. 4, no. 8, 22 July 2021 (2021-07-22), page 2100086, XP093049837, ISSN: 2366-3987, DOI: 10.1002/adtp.202100086 the whole document figure 4 -----	1-130
A	CN 109 692 326 A (UNIV HUAZHONG SCIENCE TECH ET AL.) 30 April 2019 (2019-04-30) the whole document claims 1-9 -----	1-130
X,P	WO 2022/221827 A2 (CORNER THERAPEUTICS INC [US]) 20 October 2022 (2022-10-20) the whole document -----	1-130

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/062064

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2974715	A1	20-01-2016	CN 105246487 A
			13-01-2016
			EP 2974715 A1
			20-01-2016
			ES 2690393 T3
			20-11-2018
			JP 6259474 B2
			10-01-2018
			JP 2016518313 A
			23-06-2016
			KR 20140112622 A
			24-09-2014
			US 2016022711 A1
			28-01-2016
			WO 2014142517 A1
			18-09-2014

CN 109692326	A	30-04-2019	NONE

WO 2022221827	A2	20-10-2022	NONE

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 47/18 (2017.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 35/15 (2025.01)	A 6 1 K 35/15	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/002 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/002	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	
	A 6 1 P 31/00	
	A 6 1 K 39/00	K

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ゴセリン, エミリー エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, ノース ビーコン ストリ
ート 3 0 0, ビルディング 3 9, スイート 2 0 2, コーナー セラピューティクス, イン
コーポレイテッド 気付

(72)発明者 コーンフォース, アンドリュー エヌ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, ノース ビーコン ストリ
ート 3 0 0, ビルディング 3 9, スイート 2 0 2, コーナー セラピューティクス, イン
コーポレイテッド 気付

(72)発明者 チャウ, ジョナサン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, ノース ビーコン ストリ
ート 3 0 0, ビルディング 3 9, スイート 2 0 2, コーナー セラピューティクス, イン
コーポレイテッド 気付

(72)発明者 ジヴァキ, ダニア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, ノース ビーコン ストリ
ート 3 0 0, ビルディング 3 9, スイート 2 0 2, コーナー セラピューティクス, イン
コーポレイテッド 気付

(72)発明者 フィン, ケルシー ケー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 2, ウォータータウン, ノース ビーコン ストリ
ート 3 0 0, ビルディング 3 9, スイート 2 0 2, コーナー セラピューティクス, イン
コーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4C076 AA16 AA19 AA65 AA95 CC06 CC07 CC27 DD09 DD49 DD63
DD70 EE23

4C084 AA17 MA05 MA24 MA55 MA66 NA14 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262

F ターム (参考)

ZC411 ZC412

4C085 AA03 AA38 BA01 BA02 BA07 BA49 BA51 BB01 DD62 FF02
FF12 FF14

4C086 AA01 AA02 CB05 MA03 MA05 MA24 MA55 MA66 NA14 ZB09
ZB26 ZC41

4C087 AA01 AA02 BB37 BB63 CA04 MA05 MA24 MA55 MA66 NA14
ZB09 ZB26 ZC41