(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7631407号
(P7631407)

(45)発行日　令和7年2月18日(2025.2.18)

(24)登録日　令和7年2月7日(2025.2.7)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	48/00
Ａ６１Ｋ　9/16　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	9/16
Ａ６１Ｋ　9/51　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	9/51
Ａ６１Ｋ　31/7105(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/7105
Ａ６１Ｋ　31/711(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/711

ＦＩ

請求項の数　18　（全117頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-75172(P2023-75172)
(22)出願日　令和5年4月28日(2023.4.28)
(62)分割の表示　特願2019-562110(P2019-562110)の分割
原出願日　平成30年12月26日(2018.12.26)
(65)公開番号　特開2023-99136(P2023-99136A)
(43)公開日　令和5年7月11日(2023.7.11)
審査請求日　令和5年5月26日(2023.5.26)
(31)優先権主張番号　特願2017-252616(P2017-252616)
(32)優先日　平成29年12月27日(2017.12.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　000002934
武田薬品工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町四丁目１番１号
(74)代理人　100136629
弁理士　鎌田 光宜
(74)代理人　100080791
弁理士　高島 一
(74)代理人　100125070
弁理士　土井 京子
(74)代理人　100121212
弁理士　田村 弥栄子
(74)代理人　100174296
弁理士　當麻 博文
(74)代理人　100137729

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　核酸含有脂質ナノ粒子及びその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

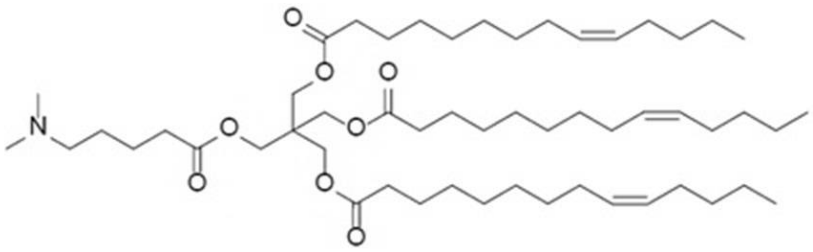
以下の（ａ）～（ｃ）を含む脂質ナノ粒子であって、Ｔ細胞へ標的化し得るリガンドを表面に有する、脂質ナノ粒子：

（ａ）キメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体をコードする核酸；

（ｂ）以下の化合物１２、２１、３５および７からなる群より選択される、カチオン性脂質；及び

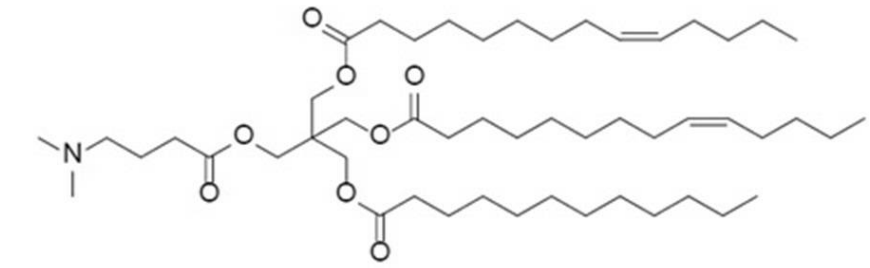
（ｃ）非カチオン性脂質。

【化１】



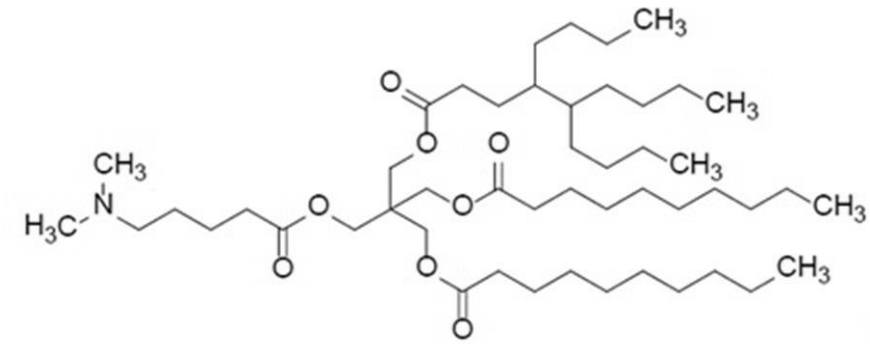
（化合物１２）

【化２】



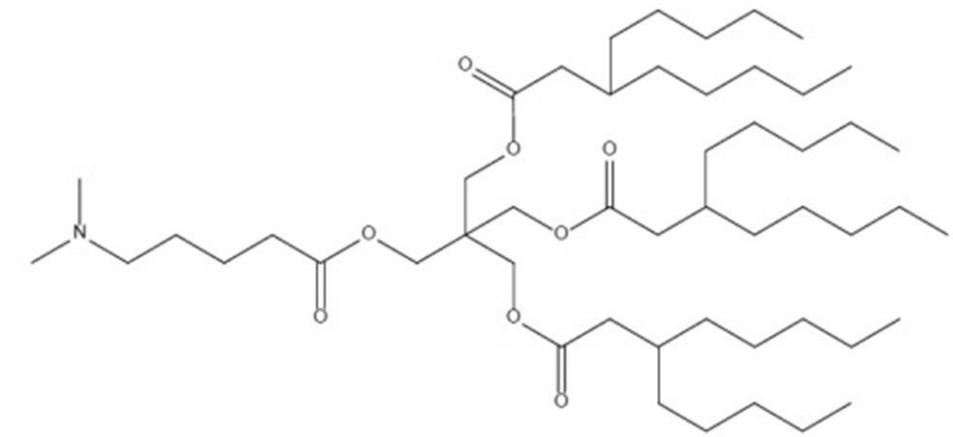
（化合物２１）

【化３】



（化合物３５）

【化４】



（化合物７）

【請求項２】
前記核酸がｍＲＮＡ又はＤＮＡである、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３】
前記非カチオン性脂質が、リン脂質、コレステロール及び/又はＰＥＧ脂質である、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項４】
前記ＰＥＧ脂質が、末端反応性ＰＥＧ脂質である、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項５】
前記リガンドが、ＣＤ３に対する抗体、ＣＤ４に対する抗体、ＣＤ８に対する抗体およびＣＤ２８に対する抗体からなる群より選択される１以上の抗体の抗原結合ドメインを含むリガンドである、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項６】
前記リガンドが、ＣＤ３に対する抗体及び／又はＣＤ２８に対する抗体の抗原結合ドメ

インを含むリガンドである、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項７】
前記リガンドが、ＣＤ３に対する抗体及びＣＤ２８に対する抗体の抗原結合ドメインを含むリガンドである、請求項６に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項８】
請求項１に記載の脂質ナノ粒子を含有してなる医薬。
【請求項９】
癌の予防又は治療薬である、請求項８に記載の医薬。
【請求項１０】
in vivo免疫細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を遺伝子導入し、その発現を誘導する、請求項８に記載の医薬。
【請求項１１】
in vivo Ｔ細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を遺伝子導入し、その発現を誘導する、請求項８に記載の医薬。
【請求項１２】
癌の予防・治療に使用するための、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１３】
癌の予防・治療剤を製造するための、請求項１に記載の脂質ナノ粒子の使用。
【請求項１４】
請求項１に記載の脂質ナノ粒子を含有してなるキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体発現誘導用組成物。
【請求項１５】
請求項１に記載の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞を含む培養液に添加することを特徴とする、ex vivo 免疫細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を遺伝子導入し、発現させる方法。
【請求項１６】
請求項１に記載の脂質ナノ粒子をex vivo Ｔ細胞を含む培養液に添加することを特徴とする、ex vivo Ｔ細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現させる方法。
【請求項１７】
請求項１に記載の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞を含む培養液に添加する工程を含む、キメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo 免疫細胞を含有してなる医薬の製造方法。
【請求項１８】
請求項１に記載の脂質ナノ粒子をex vivo Ｔ細胞を含む培養液に添加する工程を含む、キメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo T細胞を含有してなる医薬の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、キメラ抗原受容体又はT細胞受容体をコードする核酸を含有する脂質ナノ粒子、該脂質ナノ粒子を用いて対象の免疫細胞にキメラ抗原受容体又は外因性T細胞受容体を発現させる方法、並びにそれらの医薬用途等に関する。
【０００２】
（発明の背景）
キメラ抗原受容体（CAR）又はがん抗原特異的キラーT細胞由来のT細胞受容体（TCR）を遺伝子導入したCAR-T細胞又はTCR-T細胞によるがん免疫療法の研究・開発が急速に進展している。現在のCAR-T細胞療法は、米国で承認されたKymriah（商品名）やYescarta（商品名）のように、患者から採取したT細胞にレンチウイルスベクター等のウイルスベクターを用いてex vivoでCAR遺伝子を導入してCAR-T細胞を製造し、当該CAR-T細胞を患者に投与するという方法が一般的である。しかし、この方法では、細胞培養やウイルス

ベクター等の調製にかかるコストにより製造原価が高くなるという課題がある。in vivoでT細胞等の免疫細胞選択的にCARや外因性TCRを導入することができれば、ex vivoでの調製が不要となり、製造原価の低いCAR-もしくはTCR-免疫細胞療法の提供が可能となる。またex vivoでも、製造原価の高いウイルスベクターを用いずにT細胞等の免疫細胞選択的にCARや外因性TCRを導入することができれば、ウイルス残存試験等にかかるコストが不要になることにより、製造原価の低いCAR-もしくはTCR-免疫細胞療法の提供が可能となる。

【０００３】

これまでにCARをコードするプラスミドDNAをカチオン性ポリマーと凝集させ、該凝集体を抗CD3抗体フラグメントをコンジュゲートした非カチオン性ポリマーで被覆したナノ粒子（特許文献１、非特許文献１）や、小孔内にCARをコードするDNAを封入したメソポーラスシリカを、抗CD3抗体で表面修飾した脂質で被覆したナノキャリア（特許文献２）を用いた、CARのT細胞へのex vivoもしくはin vivoトランスフェクションが報告されている。

【０００４】

それらとは別に、内部に小孔構造を有さず、カチオン性脂質と非カチオン性のヘルパー脂質、及び標的細胞へ送達するためのリガンドからなる「脂質ナノ粒子（LNP）」内に目的のsiRNAを封入して、標的細胞に該siRNAを送達する技術が報告されている。例えば、抗CD4抗体フラグメントを標的化リガンドとして、CD45に対するsiRNAをT細胞へex vivoもしくはin vivoトランスフェクションしたことが報告されている（特許文献３、非特許文献２）。

【０００５】

しかしながら、これまでに、CARや外因性TCRをコードする核酸（例、mRNA、DNA）を、LNPを用いてT細胞等の免疫細胞に選択的に導入したとの報告はない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【文献】US 2017/0296676
【文献】US 2016/0145348
【文献】WO 2016/189532

【非特許文献】

【０００７】

【文献】Nature Nanotechnology 12, 813-820 (2017)
【文献】ACS Nano, 2015, 9(7), 6706-6716

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本発明の目的は、in vivoまたはex vivoでT細胞等の免疫細胞選択的にCAR又は外因性TCRを効率よく導入し得る新規なトランスフェクション技術を提供し、以て製造原価の低いCAR-又はTCR-免疫細胞療法を提供することである。また、本発明の別の目的は、ウィルスタンパク質による抗原性の問題を回避したより安全性の高いCAR-又はTCR-免疫細胞療法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

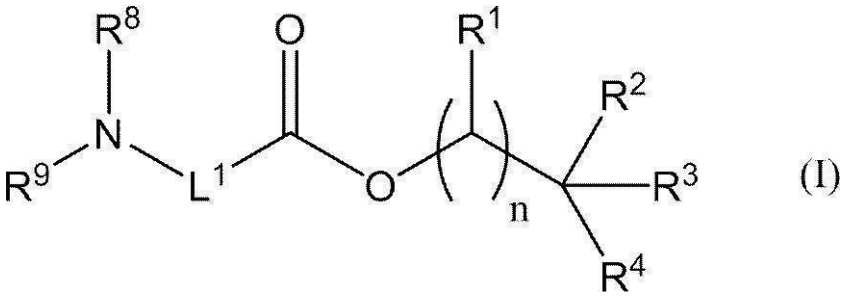
本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意検討を重ねた結果、LNPを用いてCAR又は外因性TCRをコードする核酸を、in vivo及びex vivoでT細胞等の免疫細胞選択的に効率よく導入することに成功し、本発明を完成するに至った。

【００１０】

即ち、本発明は以下のものを提供する。

［１］以下の（ａ）～（ｃ）を含む脂質ナノ粒子：

（ａ）キメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体をコードする核酸；
（ｂ）カチオン性脂質；及び
（ｃ）非カチオン性脂質。
［２］前記カチオン性脂質が、
式（Ｉ）：
【００１１】
【化１】



(I)

[式中、
L^1は、C_{1-22}アルキレン基、C_{2-22}アルケニレン基またはC_{3-22}アルカジエニレン基であり、
ｎは、０または１の整数であり、
R^1は、
（１）水素原子、
（２）直鎖状のC_{1-22}アルキル基および直鎖状のC_{2-22}アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のC_{1-22}アルキル基、
（３）直鎖状のC_{1-22}アルキル基および直鎖状のC_{2-22}アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のC_{2-22}アルケニル基、または
（４）直鎖状のC_{1-22}アルキル基および直鎖状のC_{2-22}アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のC_{3-22}アルカジエニル基であり、
R^2は、$-CH_2-O-CO-R^5$、$-CH_2-CO-O-R^5$または$-R^5$であり、
R^3は、$-CH_2-O-CO-R^6$、$-CH_2-CO-O-R^6$または$-R^6$であり、
R^4は、水素原子、$-CH_2-O-CO-R^7$、$-CH_2-CO-O-R^7$または$-R^7$であり、
R^5、R^6およびR^7は、それぞれ独立して、
（１）直鎖状のC_{1-22}アルキル基および直鎖状のC_{2-22}アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のC_{1-22}アルキル基、
（２）直鎖状のC_{1-22}アルキル基および直鎖状のC_{2-22}アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のC_{2-22}アルケニル基、または
（３）直鎖状のC_{1-22}アルキル基および直鎖状のC_{2-22}アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のC_{3-22}アルカジエニル基であり、
R^8およびR^9は、それぞれ独立して、C_{1-6}アルキル基を示す]
で表される化合物またはその塩である、［１］に記載の脂質ナノ粒子。
［３］前記核酸がｍＲＮＡ又はＤＮＡである、［１］または［２］に記載の脂質ナノ粒子。
［４］前記非カチオン性脂質が、リン脂質、コレステロール及び／又はＰＥＧ脂質である、［１］～［３］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子。
［５］前記脂質ナノ粒子がＴ細胞へ標的化し得るリガンドを表面に有する、［１］～［４］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子。
［６］前記リガンドが、ＣＤ３に対する抗体、ＣＤ４に対する抗体、ＣＤ８に対する抗体およびＣＤ２８に対する抗体からなる群より選択される１以上の抗体の抗原結合ドメイン

を含むリガンドである、［５］に記載の脂質ナノ粒子。
［７］前記リガンドが、ＣＤ３に対する抗体および／またはＣＤ２８に対する抗体の抗原結合ドメインを含むリガンドである、［５］に記載の脂質ナノ粒子。
［８］前記リガンドが、ＣＤ３に対する抗体およびＣＤ２８に対する抗体の抗原結合ドメインを含むリガンドである、［５］に記載の脂質ナノ粒子。
［９］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子を含有してなる医薬。
［１０］癌の予防又は治療薬である、［９］に記載の医薬。
［１１］in vivo免疫細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を遺伝子導入し、その発現を誘導する、［９］に記載の医薬。
［１２］in vivo Ｔ細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を遺伝子導入し、その発現を誘導する、［９］に記載の医薬。
［１３］哺乳動物に対し、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子を投与することを特徴とする、該哺乳動物のin vivo免疫細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を遺伝子導入し、発現させる方法。
［１４］哺乳動物に対し、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子を投与することを特徴とする、該哺乳動物のin vivo Ｔ細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を遺伝子導入し、発現させる方法。
［１５］哺乳動物に対し、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子を投与することを特徴とする、該哺乳動物における癌の予防又は治療方法。
［１６］癌の予防・治療に使用するための、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子。
［１７］癌の予防・治療剤を製造するための、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子の使用。
［１８］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子を含有してなるキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体発現誘導用組成物。
［１９］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo 免疫細胞。
［２０］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo Ｔ細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo Ｔ細胞。
［２１］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo 免疫細胞、を含有してなる医薬。
［２２］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo Ｔ細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo Ｔ細胞、を含有してなる医薬。
［２３］癌の予防又は治療薬である、［２１］または［２２］に記載の医薬。
［２４］アポトーシス誘導薬である、［２１］または［２２］に記載の医薬。
［２５］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞を含む培養液に添加することを特徴とする、ex vivo 免疫細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を遺伝子導入し、発現させる方法。
［２６］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo Ｔ細胞を含む培養液に添加することを特徴とする、ex vivo Ｔ細胞にキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現させる方法。
［２７］哺乳動物に対し、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo 免疫細胞を投与することを特徴とする、癌の予防又は治療方法。
［２８］哺乳動物に対し、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo Ｔ細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現

するex vivo Ｔ細胞を投与することを特徴とする、癌の予防又は治療方法。
［２９］癌の予防・治療に使用するための、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo 免疫細胞。
［３０］癌の予防・治療に使用するための、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo Ｔ細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo Ｔ細胞。
［３１］癌の予防・治療剤を製造するための、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo 免疫細胞の使用。
［３２］癌の予防・治療剤を製造するための、［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo Ｔ細胞を含む培養液に添加して得られたキメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo Ｔ細胞の使用。
［３３］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞を含む培養液に添加する工程を含む、キメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo免疫細胞を含有してなる医薬の製造方法。
［３４］［１］～［８］のいずれかに記載の脂質ナノ粒子をex vivo Ｔ細胞を含む培養液に添加する工程を含む、キメラ抗原受容体または外因性Ｔ細胞受容体を発現するex vivo Ｔ細胞を含有してなる医薬の製造方法。
【発明の効果】
【００１２】
本発明によれば、ex vivoのみならず、in vivoでも効率よくT細胞等の免疫細胞選択的に、CAR又は外因性TCRを導入することができるので、製造原価の低いCAR-又はTCR-免疫細胞療法を提供することができる。また、ウイルスベクターを用いないので、ウイルスタンパク質による抗原性の問題を回避することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１３】
【図１】図１は、hCD3/hCD28-化合物12 -pcDNA3.1-hCD19CARによるトランスフェクションを行ったヒト初代培養T細胞の、フローサイトメトリー解析によるCD19 CAR発現解析結果を示す。
【図２】図２は、hCD3/hCD28-化合物21-pcDNA3.1-hCD19CARおよびhCD3/hCD28-化合物35-pcDNA3.1-hCD19CARによるトランスフェクションを行ったヒト初代培養T細胞の、フローサイトメトリー解析によるCD19 CAR発現解析結果を示す。
【図３】図３は、CD19 CARをトランスフェクションしたヒト初代培養T細胞の添加によるNalm-6およびDaudiの細胞障害率を示す。
【００１４】
（発明の詳細な説明）
<u>１．本発明の脂質ナノ粒子（LNP）</u>
本発明は、以下の（ａ）～（ｃ）：
（ａ）キメラ抗原受容体（CAR）または外因性Ｔ細胞受容体（TCR）をコードする核酸；
（ｂ）カチオン性脂質；及び
（ｃ）非カチオン性脂質
を含む脂質ナノ粒子（以下、「本発明の脂質ナノ粒子」、「本発明のLNP」ともいう）を提供する。
本明細書において「脂質ナノ粒子（LNP）」とは、上記（ｂ）及び（ｃ）により構成される分子集合体の内部に、小孔構造（例、メソポーラス材料）を有しない、平均径１μｍ未満の粒子を意味する。
以下、本発明の脂質ナノ粒子の構成要素（ａ）～（ｃ）について説明する。
【００１５】
（ａ）キメラ抗原受容体（CAR）または外因性Ｔ細胞受容体（TCR）をコードする核酸

（ａ－１）CARをコードする核酸

CARは、Ｔ細胞シグナル伝達ドメインに連結された抗体の抗原結合ドメイン（例、ｓｃＦｖ）を含む、人工的に構築されたハイブリッドタンパク質である。ＣＡＲの特徴には、モノクローナル抗体の抗原結合特性を利用して、非ＭＨＣ拘束的様式でＴ細胞の特異性及び反応性を、選択された標的に対して転換する能力が挙げられる。非ＭＨＣ拘束的抗原認識は、ＣＡＲを発現するＴ細胞に、抗原プロセシングと無関係に抗原を認識する能力を与え、それにより、腫瘍エスケープの主要な機構を迂回する。さらに、Ｔ細胞中で発現されると、ＣＡＲは、有利なことに、内在性ＴＣＲ α鎖及びβ鎖と二量体化しない。

【００１６】

本発明の脂質ナノ粒子に使用されるCARは、標的免疫細胞（例、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等）が認識すべき表面抗原（例、がん抗原ペプチド、がん細胞で発現が亢進している表面受容体等）を特異的に認識し得る抗体の抗原結合ドメイン、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内Ｔ細胞シグナル伝達ドメインを含む。

【００１７】

抗原結合ドメインが特異的に認識する表面抗原としては、例えば、各種がん（例、急性リンパ球性癌、胞巣状横紋筋肉腫、膀胱癌、骨癌、脳癌（例、髄芽細胞腫）、乳癌、肛門、肛門管若しくは肛門直腸の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、頸部、胆嚢若しくは胸膜の癌、鼻、鼻腔若しくは中耳の癌、口腔の癌、外陰部の癌、慢性骨髄性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、頭頸部癌（例、頭頸部扁平上皮癌）、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病（例、急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病）、液性腫瘍、肝臓癌、肺癌（例、非小細胞肺癌）、リンパ腫（例、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫）、悪性中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、卵巣癌、膵臓癌；腹膜、網及び腸間膜の癌；咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌、皮膚癌、小腸癌、軟組織癌、固形腫瘍、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌など）で発現が亢進している表面受容体、例えば、CD19、EGF受容体、BCMA、CD30、Her2、ROR1、MUC16、CD20、mesothelin、B-cell mutation antiten（BCMA）、CD123、CD3、prostate specific membrane antigen（PSMA）、CD33、MUC-1、CD138、CD22、GD2、PD-L1、CEA、chondroitin sulfate proteoglycan-4、IL-13受容体α鎖、IgGκ軽鎖等や、がん抗原ペプチド（例、WT1、GPC3、MART-1、gp100、NY-ESO-1、MAGE-A4等由来のペプチド）等が挙げられるが、それらに限定されない。

【００１８】

本発明において使用される抗原結合ドメインとしては、標的抗原を特異的に認識し得る抗体フラグメントであれば、特に制限はないが、CAR作製の容易さを考慮すれば、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とをリンカーペプチドを介して連結した一本鎖抗体（scFv）であることが望ましい。一本鎖抗体における軽鎖可変領域と重鎖可変領域の配置は、両者が機能的な抗原結合ドメインを再構成できる限り特に限定されないが、通常N末端側から軽鎖可変領域－リンカーペプチド－重鎖可変領域の順序で設計され得る。リンカーペプチドとしては、一本鎖抗体の作製に通常使用されている自体公知のリンカーペプチドを用いることができる。軽鎖可変領域をコードするDNA、重鎖可変領域をコードするDNAは、例えば、それぞれ抗体産生細胞から軽鎖遺伝子、重鎖遺伝子をクローニングし、それらを鋳型としてPCRを行う等して調製するか、あるいは既存の抗体の配列情報から化学的に合成することができる。得られた各DNA断片とリンカーペプチドをコードするDNAとを、適当な方法によりライゲーションすることにより一本鎖抗体をコードするDNAを取得することができる。抗原結合ドメインのＮ末端側には、CARを免疫細胞表面に提示させるために、リーダー配列がさらに付加されていることが好ましい。

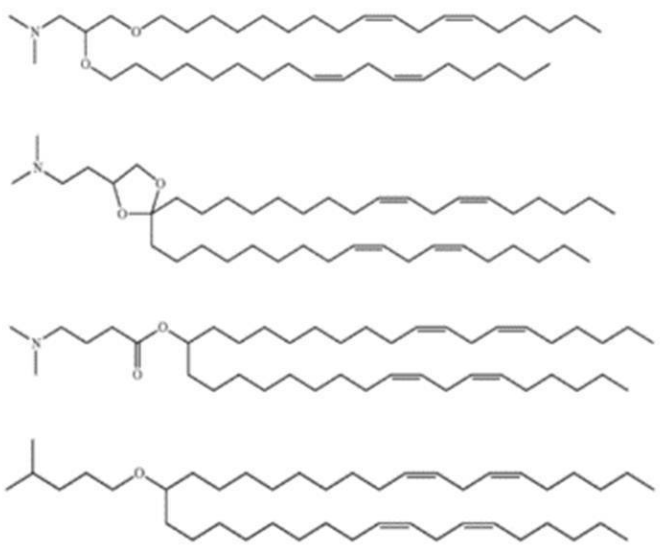
【００１９】

細胞外ヒンジドメイン及び膜貫通ドメインとしては、当該技術分野で通常使用されるＴ細胞表面分子由来のドメインを適宜使用することができ、例えば、ＣＤ８αやＣＤ２８由

来の各ドメインが挙げられるが、それらに限定されない。
【００２０】
細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、ＣＤ３ζ鎖を有するもの、膜貫通ドメインとＣＤ３ζ鎖との間に、ＣＤ２８、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、Ｌｃｋ、ＤＡＰ１０、ＩＣＯＳ、４－１ＢＢなどの共刺激伝達モチーフをさらに有するもの、２つ以上の共刺激伝達モチーフを有するもの等が挙げられるが、それらに限定されず、当該技術分野で通常使用される任意のドメインを組み合わせて使用することができる。
【００２１】
細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列情報は、当該技術分野で周知であり、当業者であれば、それらの情報に基づいて、Ｔ細胞から容易に各ドメインをコードするＤＮＡ断片を取得することができる。
そのようにして得られた、抗原結合ドメイン、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインをそれぞれコードするＤＮＡ断片を、常法により連結することにより、ＣＡＲをコードするＤＮＡを取得することができる。
【００２２】
得られたＣＡＲをコードするＤＮＡは、そのまま、あるいは、適当なリンカー及び／又は核移行シグナル等を付加した後に、Ｔ細胞内で機能的なプロモーターを含む発現ベクター、好ましくはプラスミドベクターに挿入することができる。Ｔ細胞で機能的なプロモーターとしては、哺乳動物細胞で構成的なSRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどを用いることができるが、それらに限定されない。また、Ｔ細胞特異的に発現するＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８等の遺伝子プロモーターを用いることもできる。
【００２３】
ＣＡＲをコードするＲＮＡ、好ましくはｍＲＮＡは、前記ＣＡＲをコードするＤＮＡを含む発現ベクターを鋳型として、自体公知のインビトロ転写系にてｍＲＮＡに転写することにより調製することができる。
【００２４】
（ａ－２）外因性TCRをコードする核酸
本明細書において、「Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）」とは、ＴＣＲ鎖（α鎖、β鎖）のダイマーから構成され、抗原又は該抗原-ＨＬＡ（ヒト白血球型抗原）（ＭＨＣ；主要組織適合遺伝子複合体）複合体を認識してＴ細胞へ刺激シグナルを伝達する受容体を意味する。それぞれのＴＣＲ鎖は可変領域と定常領域から構成され、可変領域には、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）が存在する。また、本発明で使用されるＴＣＲには、ＴＣＲのα鎖とβ鎖がヘテロダイマーを構成しているものだけでなく、ホモダイマーを構成しているものも包含される。さらに、該ＴＣＲには、定常領域の一部若しくは全部を欠損したものや、アミノ酸配列を組み換えたもの、可溶性ＴＣＲ(soluble TCR)としたものなども包含される。
尚、「外因性ＴＣＲ」とは、本発明の脂質ナノ粒子の標的細胞であるＴ細胞にとって外因性であることを意味する。外因性ＴＣＲのアミノ酸配列は、本発明の脂質ナノ粒子の標的細胞であるＴ細胞が発現する内因性ＴＣＲと同一であっても、異なっていてもよい。
【００２５】
本発明の脂質ナノ粒子に使用されるTCRをコードする核酸は、標的Ｔ細胞が認識すべき表面抗原（例、がん抗原ペプチド等）を特異的に認識し得るＴＣＲのα鎖及びβ鎖をコードする核酸である。
該核酸は自体公知の方法により調製することができる。目的のTCRのアミノ酸配列または核酸配列が公知である場合には、該配列に基づき、例えば、化学的にDNA鎖やRNA鎖を合成するか、もしくは合成した一部オーバーラップするオリゴDNA短鎖を、PCR法やGibson Assembly法を利用して接続することにより、本発明のTCRの全長又は一部をコードす

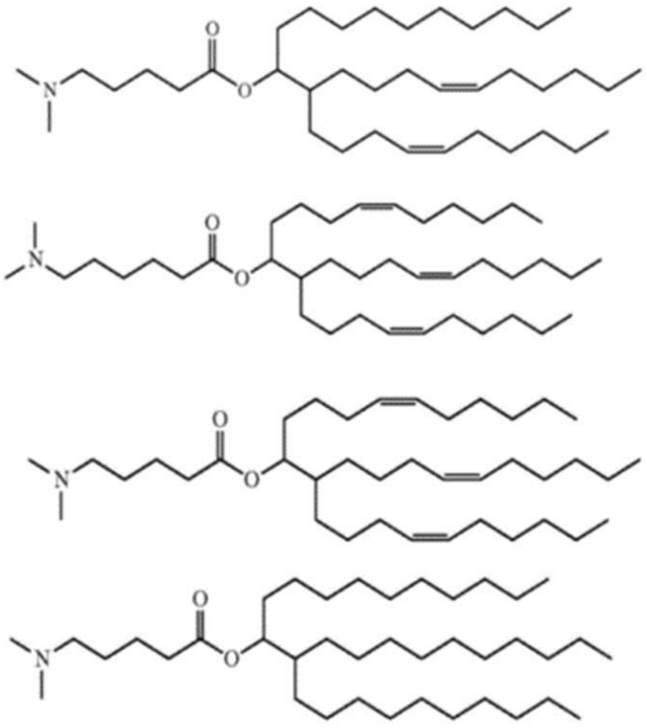
るDNAを構築することが可能である。
【００２６】
目的のTCRの配列が公知でない場合には、例えば、目的のTCRを発現するT細胞を含む細胞集団から目的のT細胞を単離し、このT細胞からTCRをコードする核酸を得ることができる。具体的には、生体（例：ヒト）からT細胞を含有する細胞集団（例：PBMC）を採取して、目的のTCRが認識する細胞表面抗原のエピトープの存在下でこれらの細胞集団を刺激しながら培養し、この細胞集団から、該細胞表面抗原を発現する細胞に対する特異性と、CD8やCD4等の細胞表面抗原とを指標として、公知の方法で該細胞表面抗原を発現する細胞を特異的に認識するT細胞を選択することができる。T細胞の該表面抗原を発現する細胞に対する特異性は、例えば、デキストロマーアッセイ、ELISPOTアッセイ又は細胞障害性アッセイなどを利用して測定することができる。前記T細胞を含有する細胞集団は、例えば、目的のTCRが認識する細胞表面抗原を発現する細胞を多く有する生体（例：がんなどの疾患患者、あるいは、該抗原のエピトープ又は該エピトープでパルスした樹状細胞と接触させたＴ細胞含有集団）から採取することが好ましい。
【００２７】
前記単離したT細胞から常法によりDNAを抽出し、該DNAを鋳型として、TCRの定常領域の核酸配列を基にTCR遺伝子を増幅し、クローニングすることで、本発明の核酸が得られる。また、常法により細胞からRNAを抽出してcDNAを合成し、これを鋳型としてTCRα鎖及びβ鎖の定常領域をそれぞれコードする核酸に相補的なアンチセンスプライマーを用いて、５’－RACE（Rapid amplification of cDNA ends）を行うことにより調製することもできる。５’－RACEは公知の方法により行えばよく、例えば、SMART PCR cDNA Synthesis Kit（クロンテック社製）のような市販のキットを用いて行うことができる。得られたＴＣＲのα鎖及びβ鎖をそれぞれコードするＤＮＡは、前記ＣＡＲをコードするＤＮＡと同様に、適当な発現ベクターに挿入することができる。α鎖をコードするＤＮＡとβ鎖をコードするＤＮＡとは、同一のベクターに挿入してもよいし、別個のベクターに挿入してもよい。同一のベクターに挿入する場合、該発現ベクターは両鎖をポリシストロニックに発現してもよいし、モノシストロニックに発現してもよい。前者の場合、両鎖をコードするＤＮＡの間にＩＲＥＳやＦＭＶ ２Ａのようなポリシストロニックな発現を許容する介在配列を挿入する。
また、ＴＣＲの各鎖をコードするＲＮＡ、好ましくはｍＲＮＡは、例えば、該発現ベクターを鋳型として、前記ＣＡＲをコードするＲＮＡと同様にして、調製することができる。
【００２８】
（ｂ）カチオン性脂質
本明細書において、「カチオン性脂質」とは、生理学的pHなどの選択したpHにおいて、正味の正電荷を持つ脂質を意味する。本発明の脂質ナノ粒子に使用されるカチオン性脂質は特に限定されないが、例えば、WO 2015/011633、WO 2016/021683、WO 2011/153493、WO 2013/126803、WO 2010/054401、WO 2010/042877、WO 2016/104580、WO 2015/005253、WO 2014/007398、WO 2017/117528、WO 2017/075531、WO 2017/00414、WO 2015/199952、US 2015/0239834、等に記載のカチオン性脂質などが挙げられる。
【００２９】
好ましくは、WO 2015/011633に記載の下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。
【００３０】

【化２】



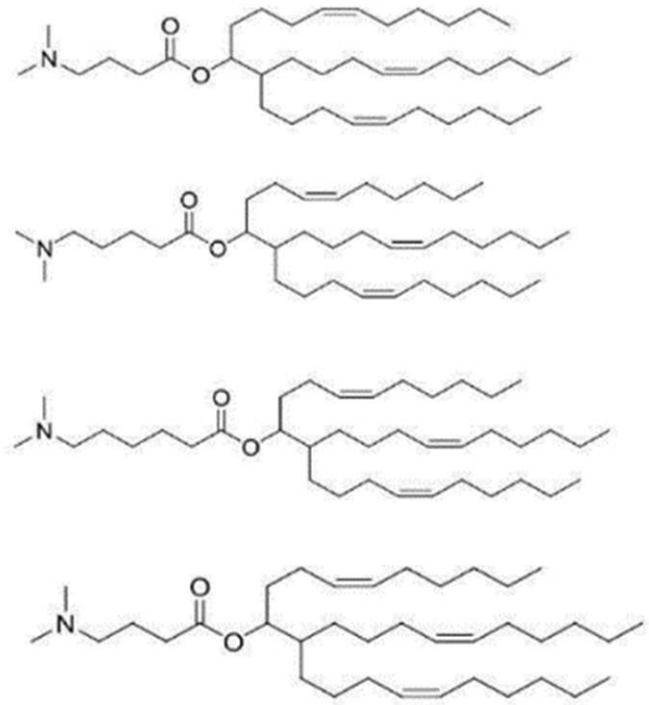
【００３１】

【化３】



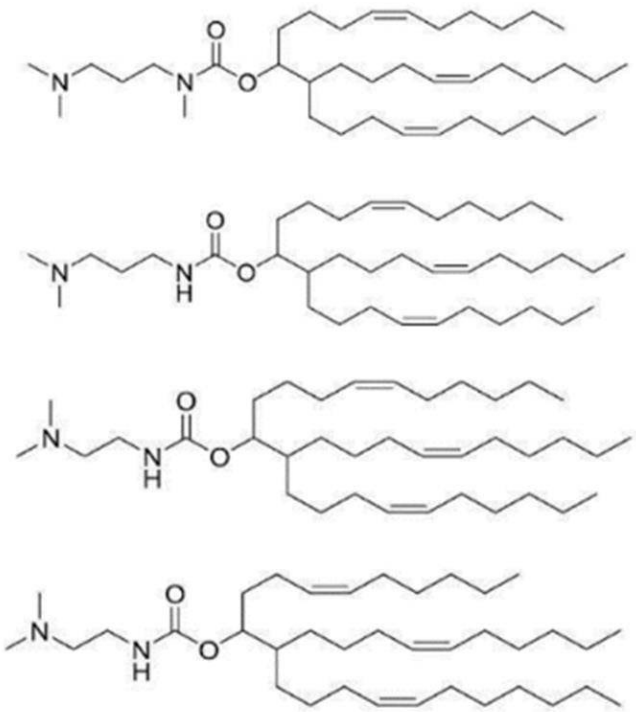
【００３２】

【化４】



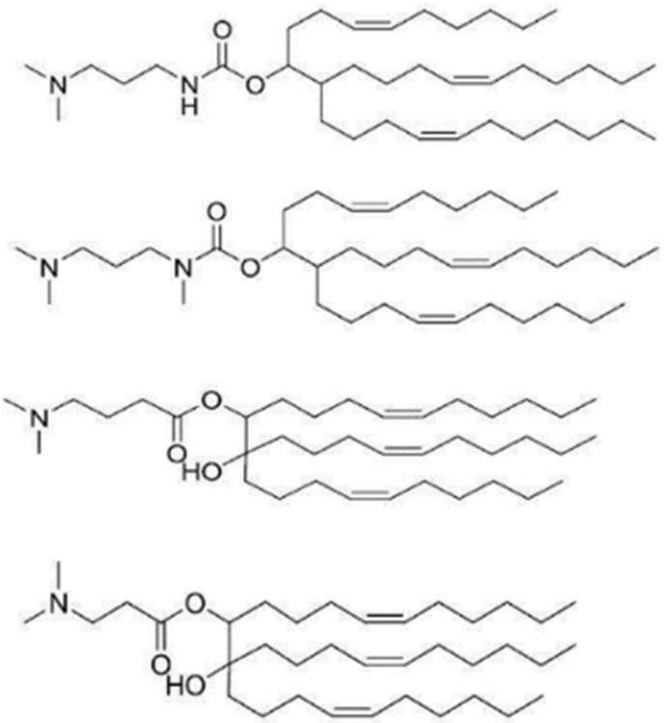
【００３３】

【化５】



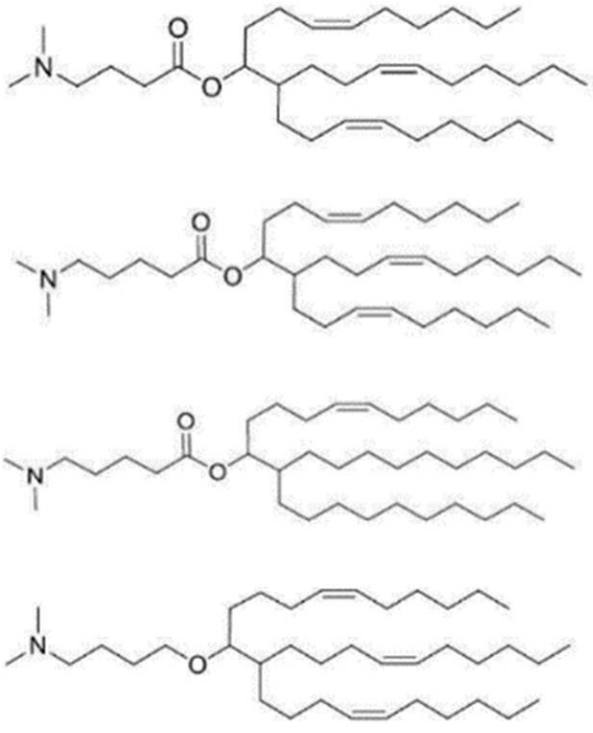
【００３４】

【化６】



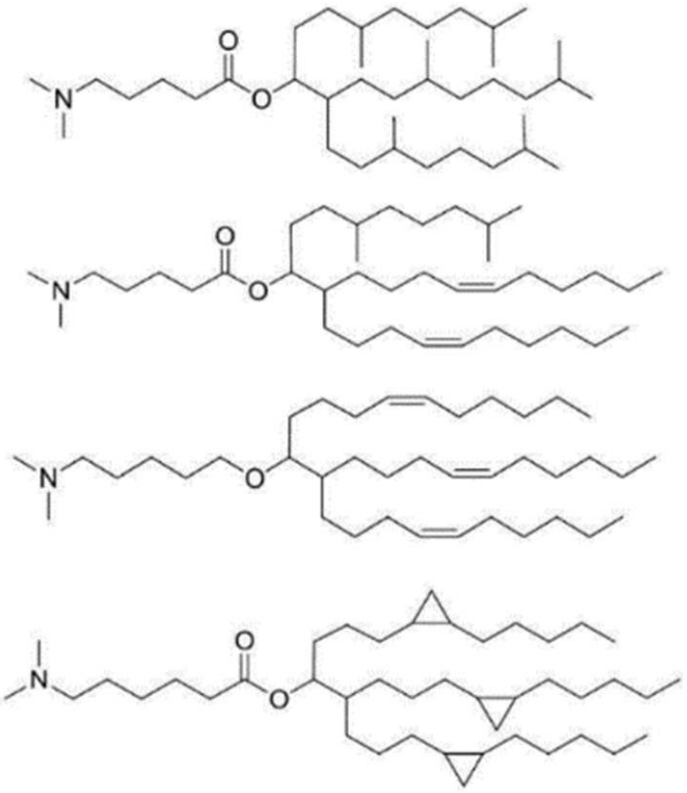
【００３５】

【化７】

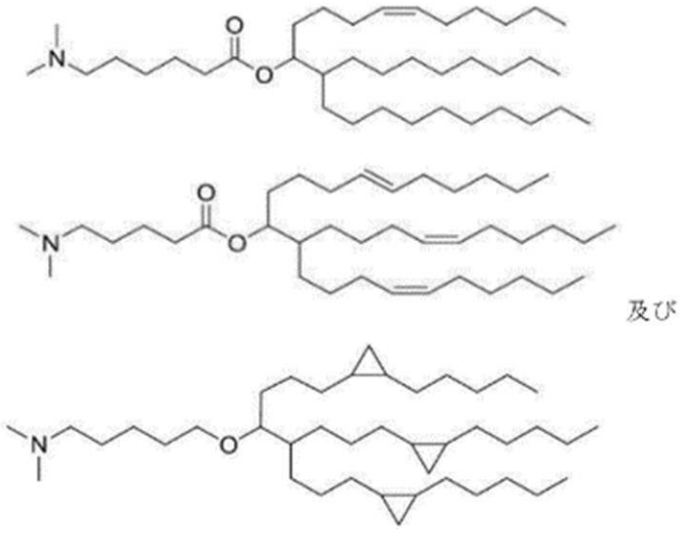


【００３６】

【化８】



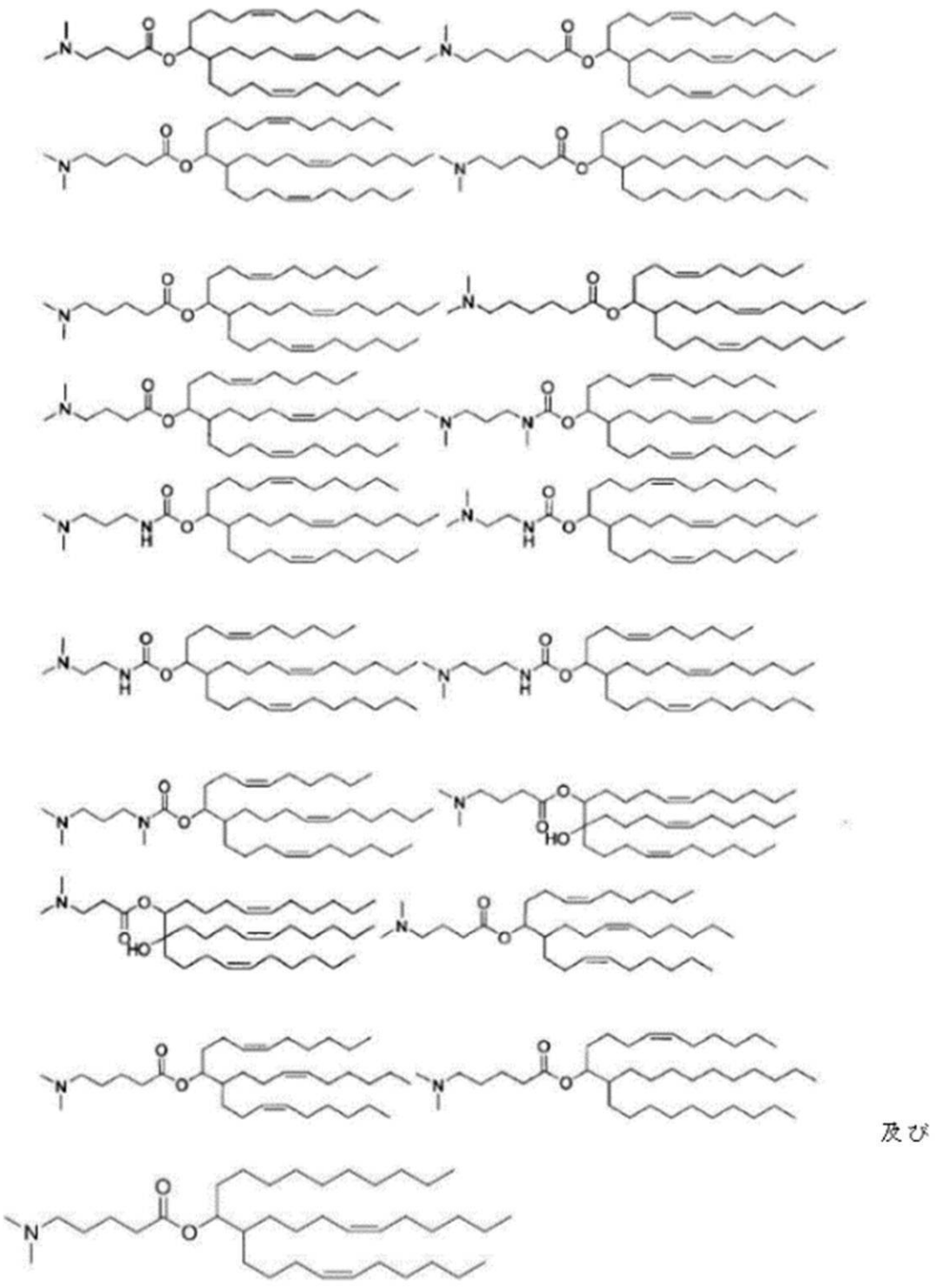
【００３７】
【化９】



及び

【００３８】
並びにそれらの塩。
【００３９】
上記カチオン性脂質のうち、より好ましいものとして、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。
【００４０】

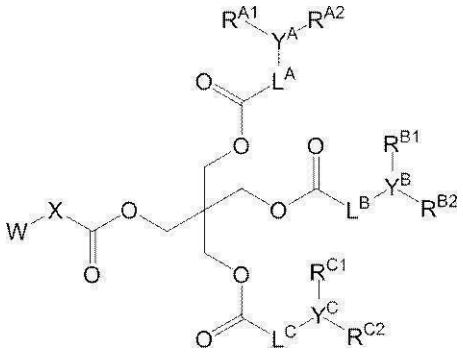
【化１０】



及び

【００４１】
並びにそれらの塩。
【００４２】
好ましくは、WO 2016/021683に記載の下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。
【００４３】

【化１１】



【００４４】

[式中、

Ｗは、式－ＮＲ^{1}Ｒ^{2}又は式－Ｎ$^{+}$Ｒ^{3}Ｒ^{4}Ｒ^{5}（Ｚ$^{-}$）を、

Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、それぞれ独立して、Ｃ$_{1-4}$アルキル基又は水素原子を、

Ｒ^{3}、Ｒ^{4}及びＲ^{5}は、それぞれ独立して、Ｃ$_{1-4}$アルキル基を、

Ｚ$^{-}$は、陰イオンを、

Ｘは、置換されていてもよいＣ$_{1-6}$アルキレン基を、

Ｙ^{A}、Ｙ^{B}及びＹ^{C}は、それぞれ独立して、置換されていてもよいメチン基を、

Ｌ^{A}、Ｌ^{B}及びＬ^{C}は、それぞれ独立して、置換されていてもよいメチレン基又は結合手を、

Ｒ^{A1}、Ｒ^{A2}、Ｒ^{B1}、Ｒ^{B2}、Ｒ^{C1}及びＲ^{C2}は、それぞれ独立して、置換されていてもよいＣ$_{4-10}$アルキル基を示す。]

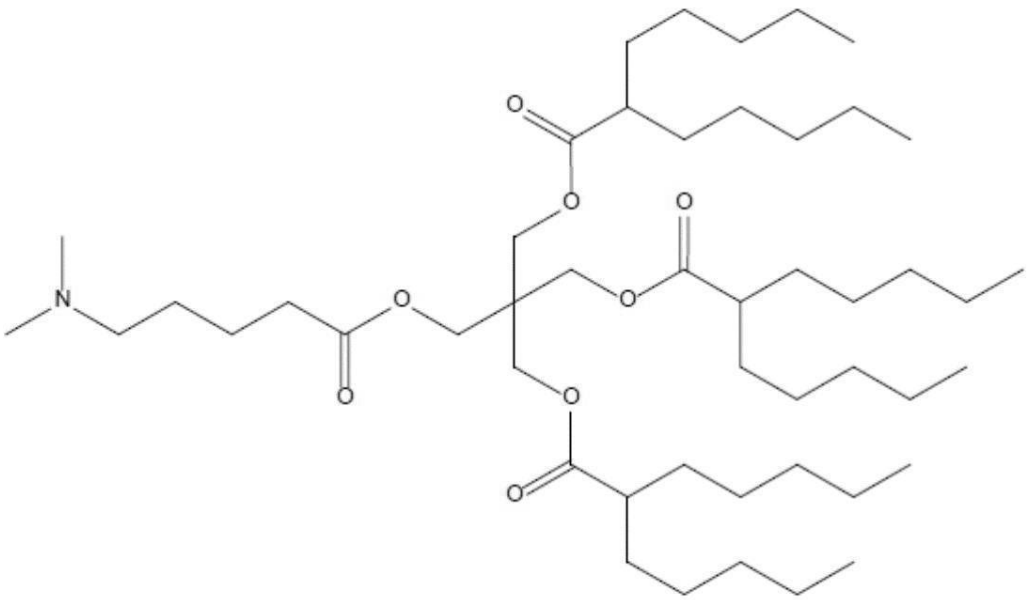
で表される化合物又はその塩。

【００４５】

より好ましくは、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。

【００４６】

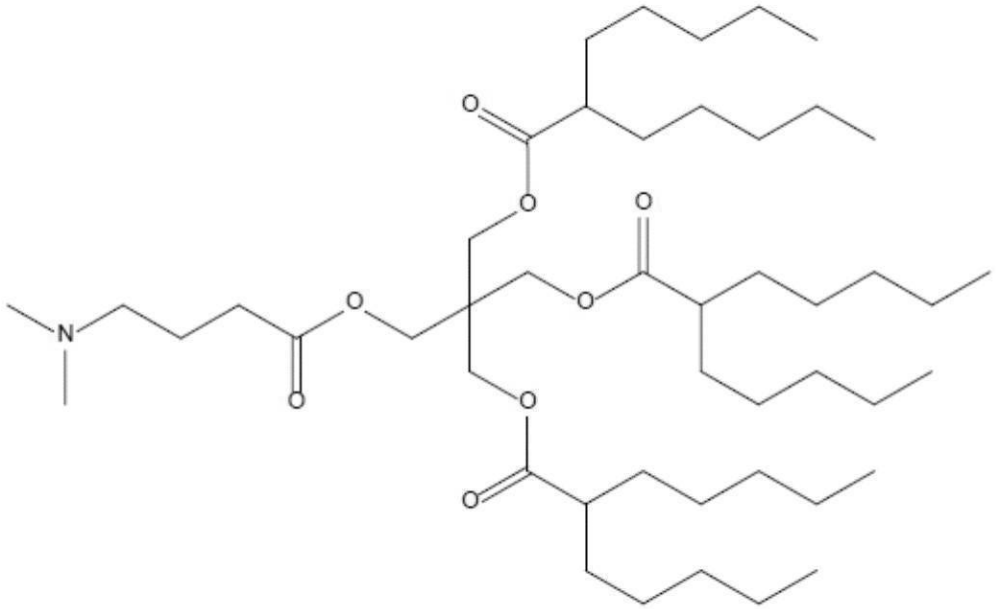
【化１２】



（化合物１）

【００４７】

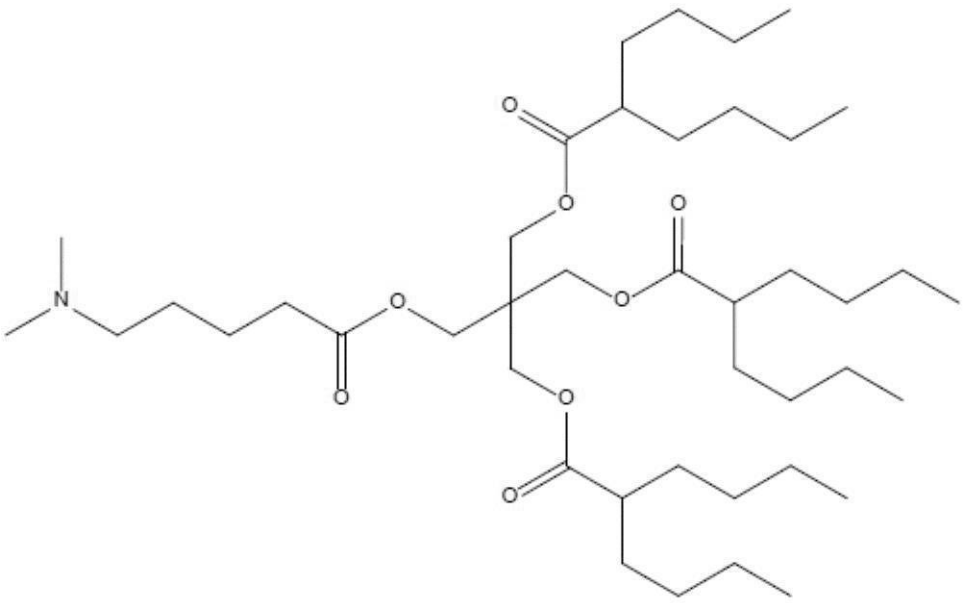
【化１３】



（化合物２）

【００４８】

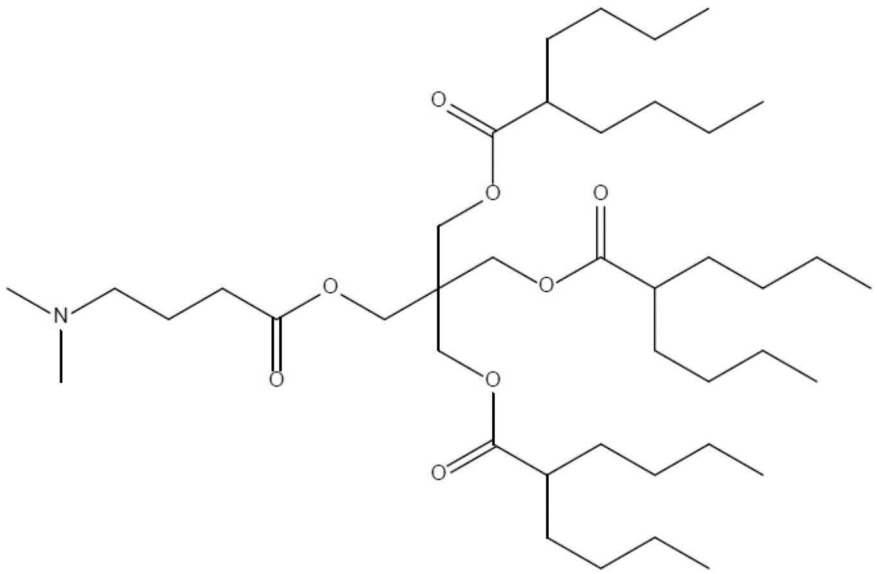
【化１４】



（化合物３）

【００４９】

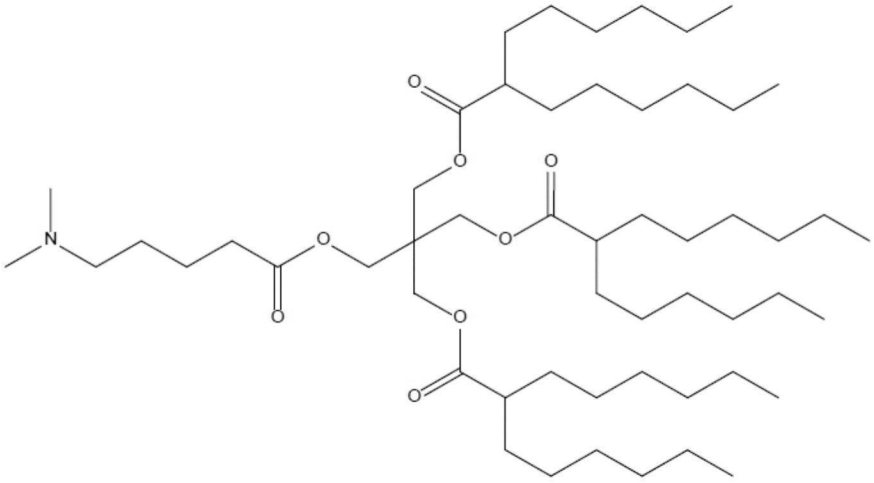
【化１５】



（化合物４）

【００５０】

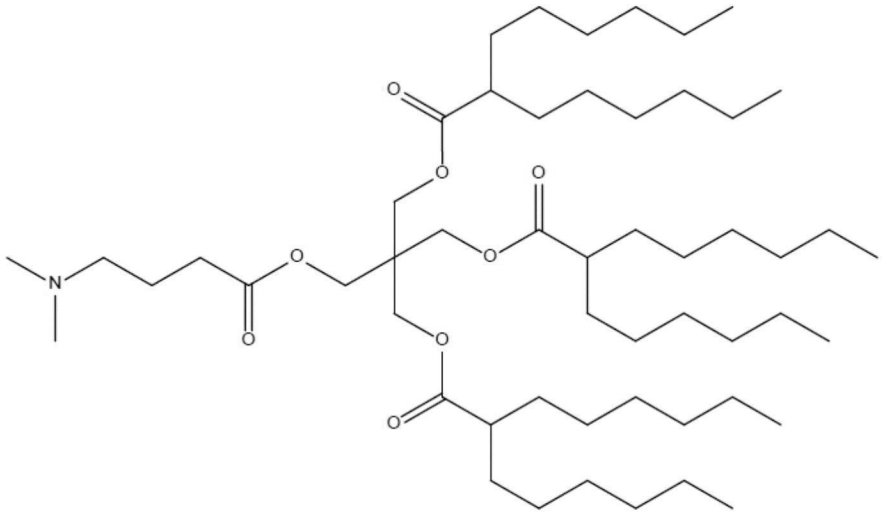
【化１６】



（化合物５）

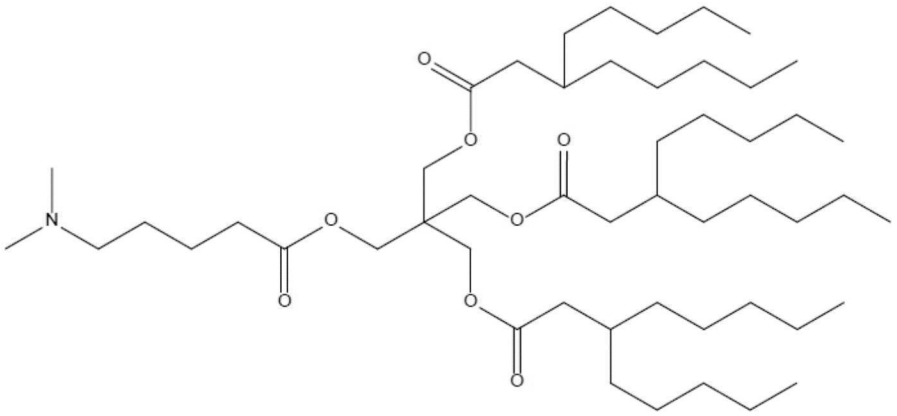
【００５１】

【化１７】



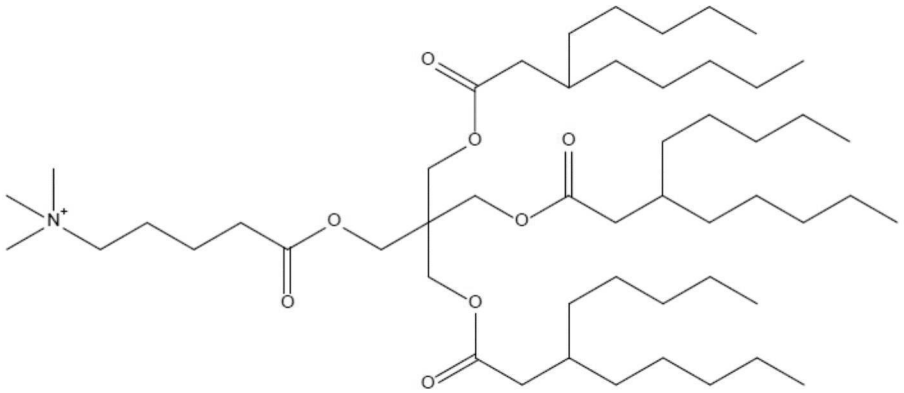
（化合物６）

【００５２】
【化１８】



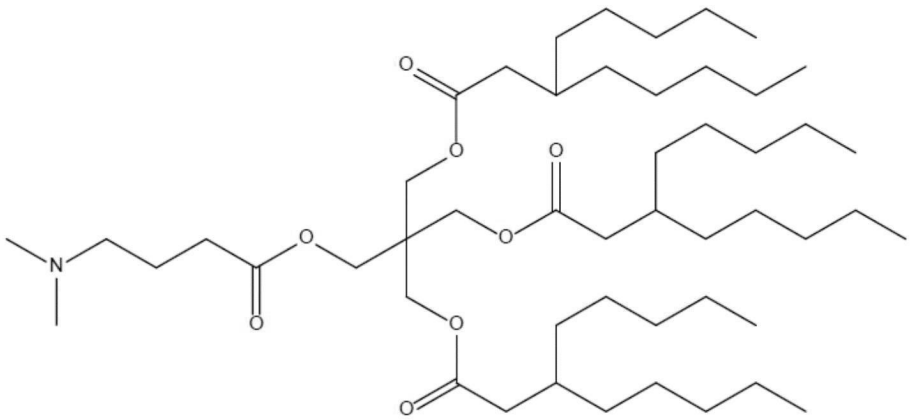
（化合物７）

【００５３】
【化１９】



（化合物８）

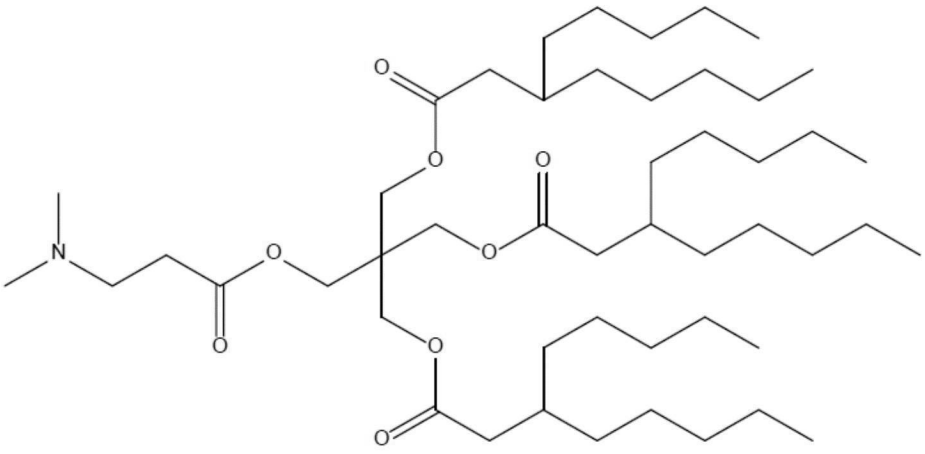
【００５４】
【化２０】



（化合物９）及び

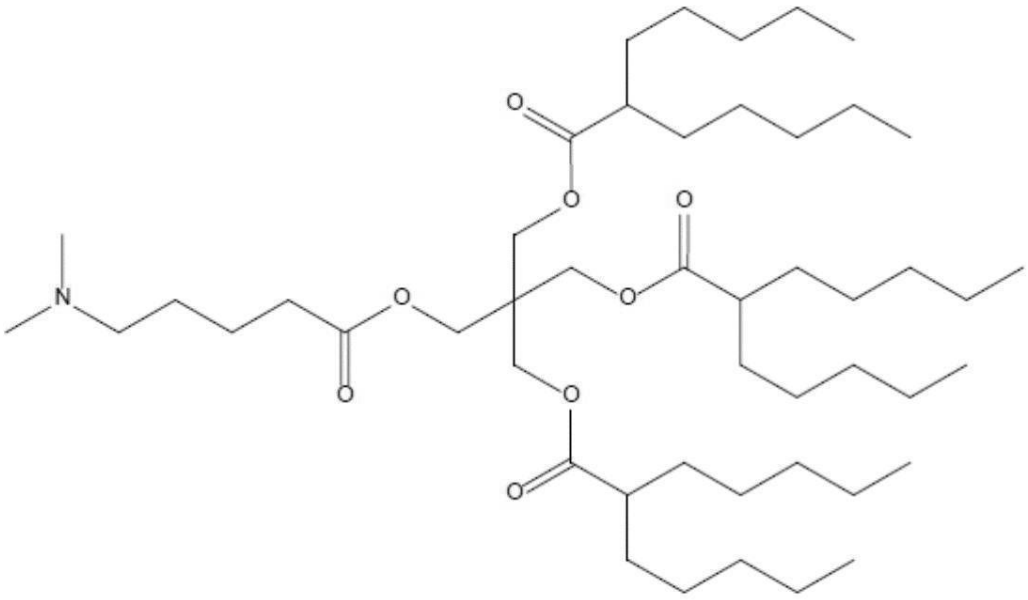
【００５５】

【化２１】



（化合物１０）

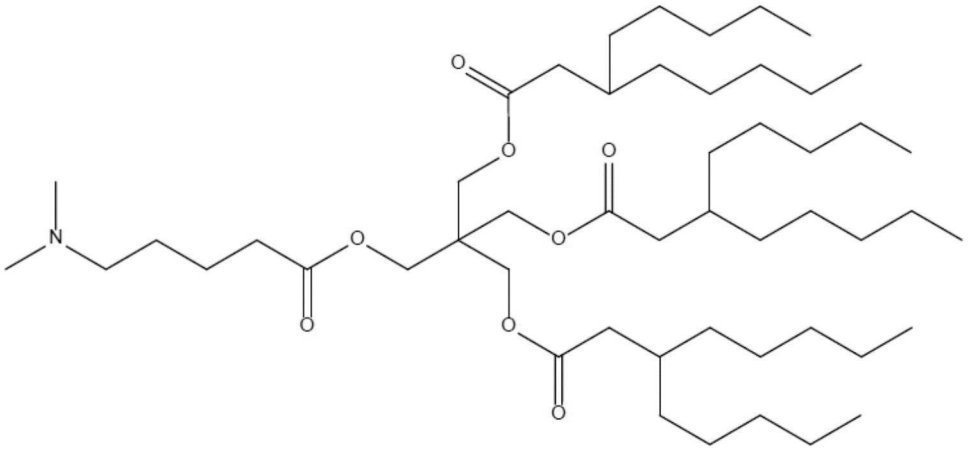
【００５６】
並びにそれらの塩。
【００５７】
上記カチオン性脂質のうち、より好ましいものとして、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。
【００５８】
【化２２】



（化合物１）

【００５９】

【化２３】

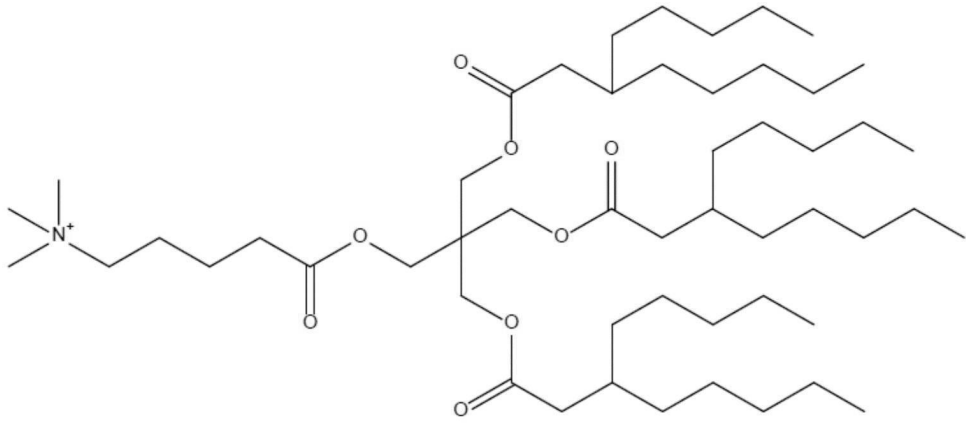


（化合物７）

及び

【００６０】

【化２４】



（化合物８）

【００６１】

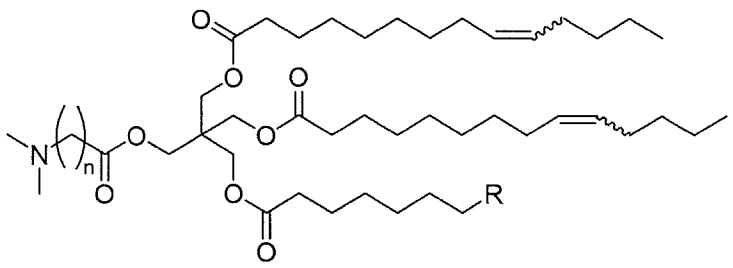
並びにそれらの塩。

【００６２】

別の好ましい実施態様においては、下記式（ＩＩ）で表されるカチオン性脂質（以下、「化合物（ＩＩ）」ともいう。）が挙げられる。

【００６３】

【化２５】



(II)

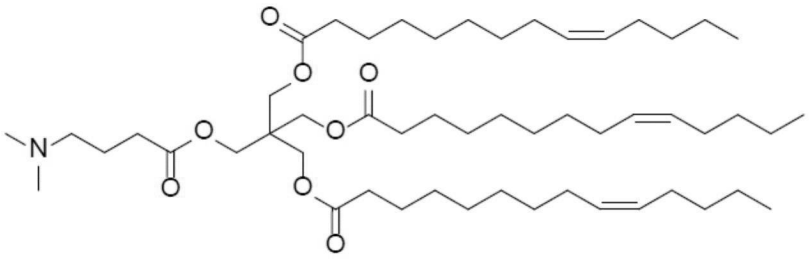
【００６４】

[式中、

ｎは、２～５の整数を、

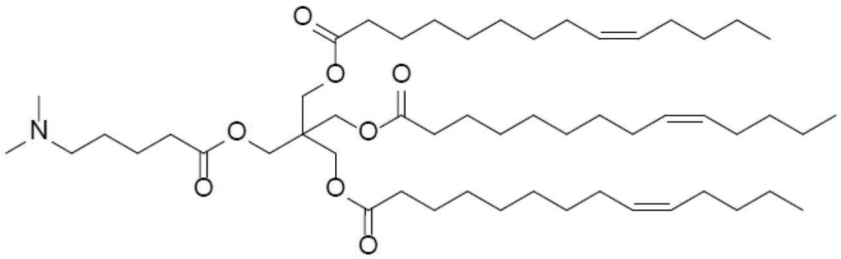
Ｒは、直鎖状Ｃ$_{1-5}$アルキル基、直鎖状Ｃ$_{7-11}$アルケニル基又は直鎖状Ｃ$_{11}$アル

カジエニル基を、
波線は、それぞれ独立して、シス型又はトランス型の結合を
示す。]
で表される化合物又はその塩。
【００６５】
より好ましくは、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。
【００６６】
【化２６】



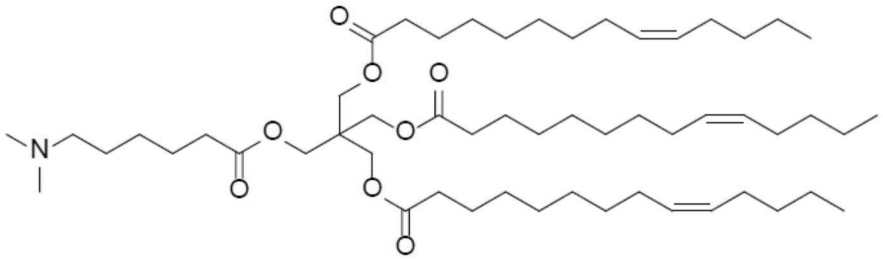
（化合物１１）

【００６７】
【化２７】



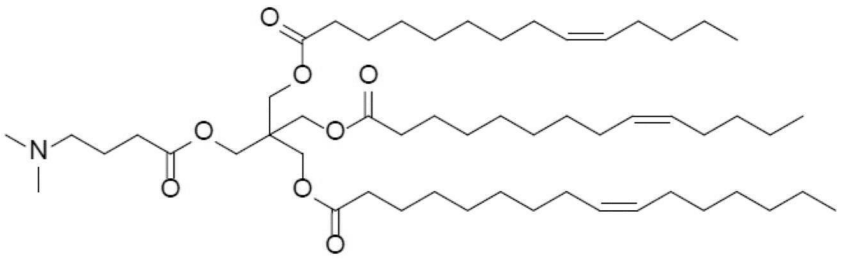
（化合物１２）

【００６８】
【化２８】



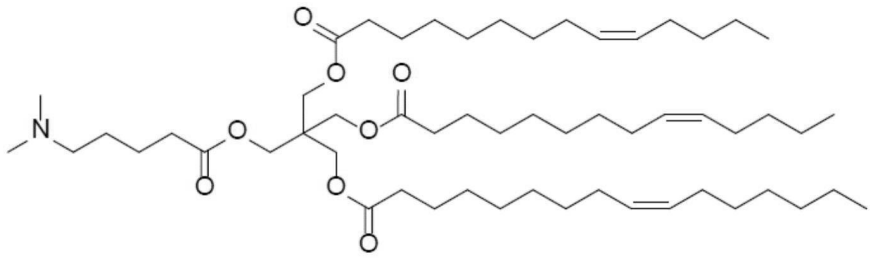
（化合物１３）

【００６９】
【化２９】



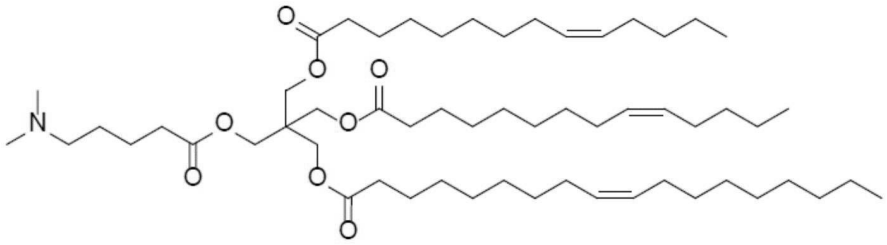
（化合物１４）

【００７０】
【化３０】



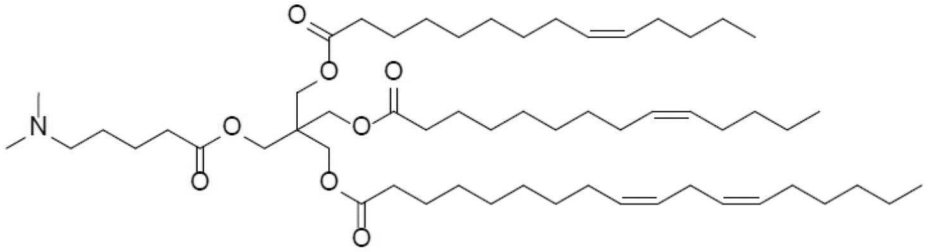
（化合物１５）

【００７１】
【化３１】



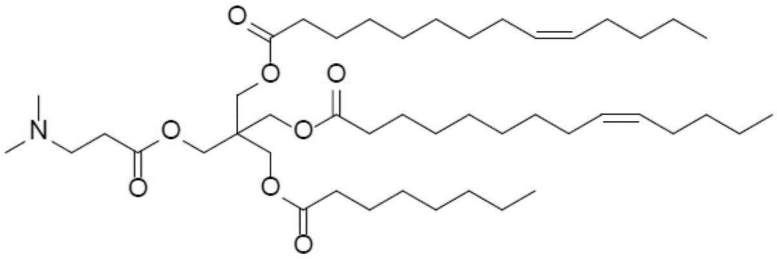
（化合物１６）

【００７２】
【化３２】



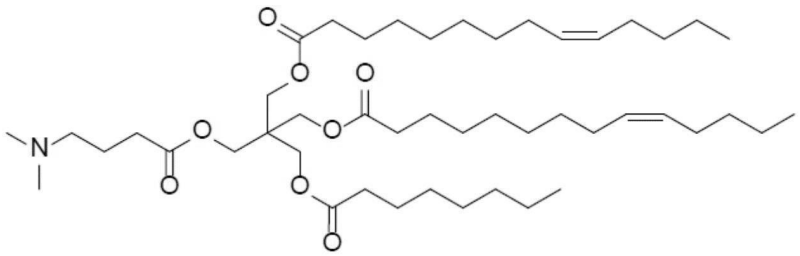
（化合物１７）

【００７３】
【化３３】



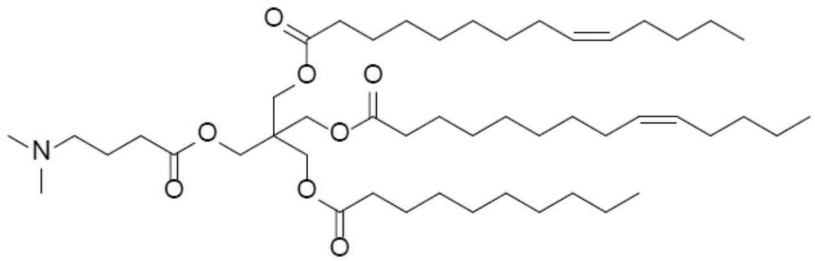
（化合物１８）

【００７４】
【化３４】



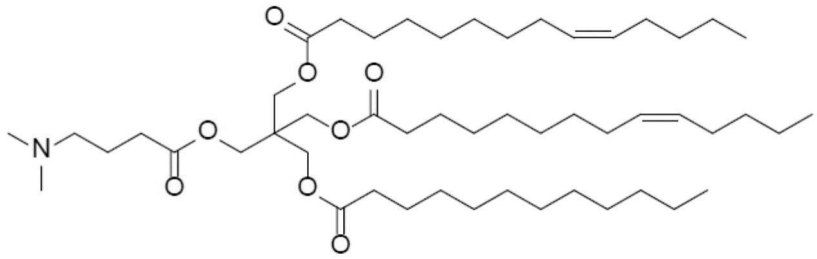
（化合物１９）

【００７５】
【化３５】



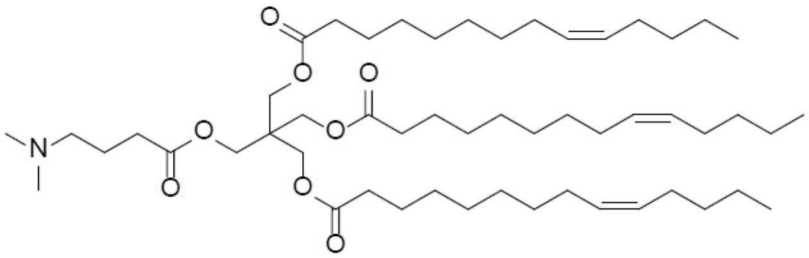
（化合物２０）及び

【００７６】
【化３６】



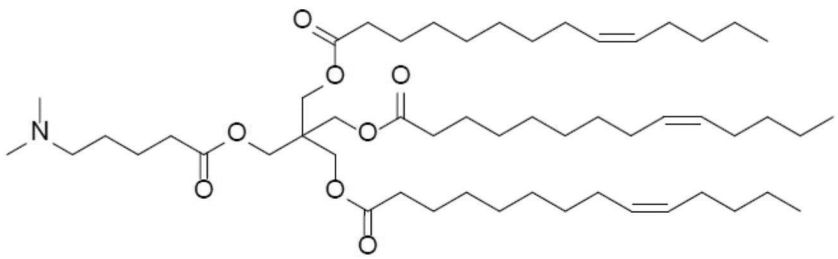
（化合物２１）

【００７７】
並びにそれらの塩。
【００７８】
上記カチオン性脂質のうち、より好ましいものとして、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。
【００７９】
【化３７】



（化合物１１）

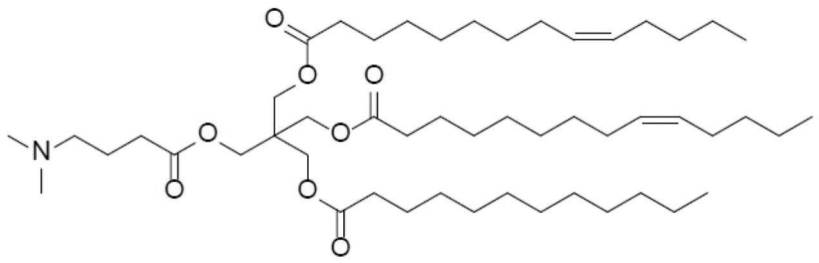
【００８０】
【化３８】



（化合物１２）及び

【００８１】

【化３９】



（化合物２１）

【００８２】

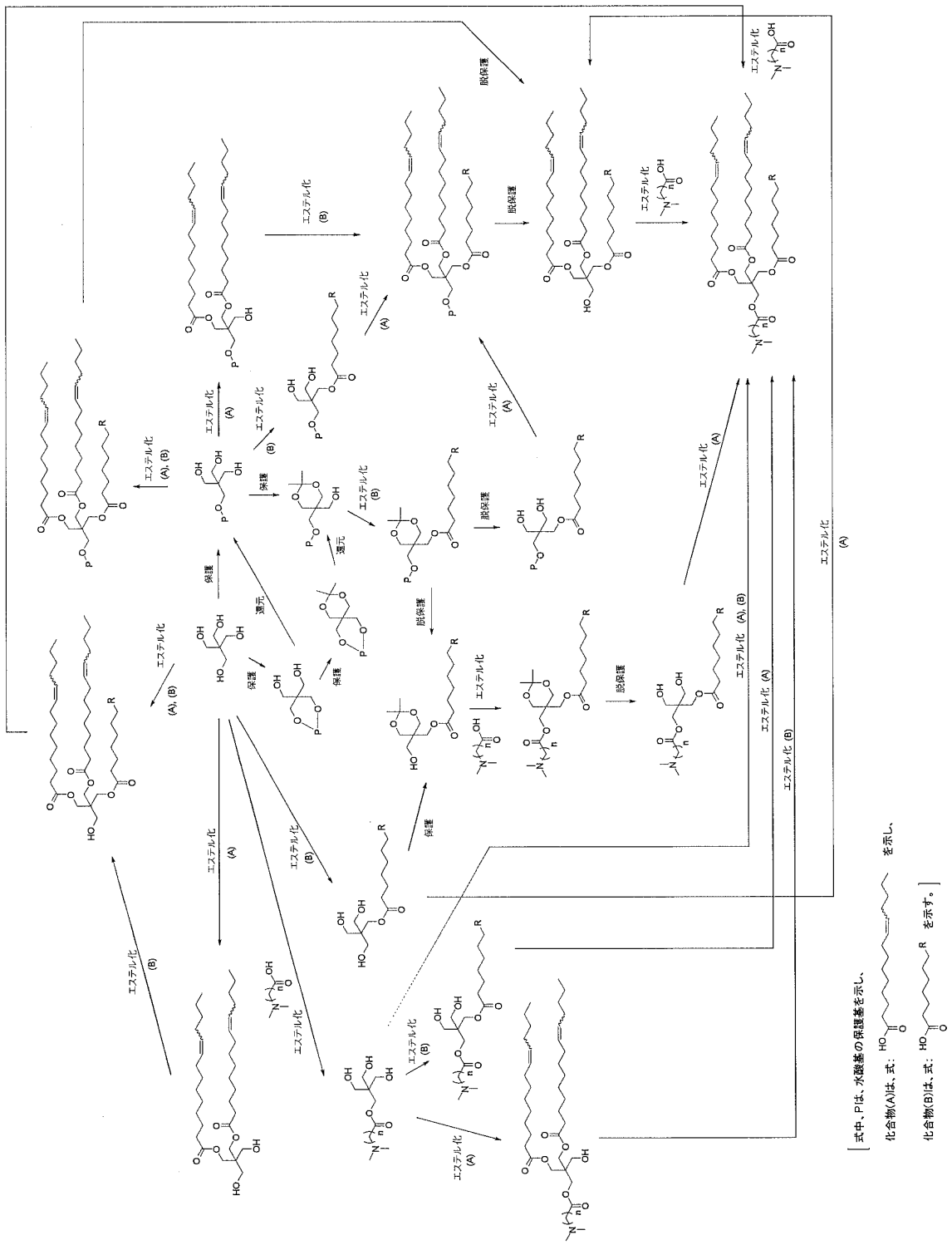
並びにそれらの塩。

【００８３】

化合物（ＩＩ）は、例えば、以下の製法によって製造することができる。化合物（ＩＩ）のうち、波線の両方がシス型となる結合である化合物、および、波線の一方または両方がトランス型となる結合である化合物のいずれも以下に示す製法と同様の製法で製造することができる。特にエステル化の際に、目的とする化合物（ＩＩ）の構造に応じた適切な原料を用いることにより、所望の構造の化合物（ＩＩ）を合成することが可能である。また、化合物（ＩＩ）の塩は、無機塩基、有機塩基、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸との適切な混合により得ることができる。

【００８４】

【化４０】



【００８５】

上記の製造方法における各工程で用いられた原料や試薬、ならびに得られた化合物は、それぞれ塩を形成していてもよい。

【００８６】

各工程で得られた化合物が遊離化合物である場合には、公知の方法により、目的とする塩に変換することができる。逆に各工程で得られた化合物が塩である場合には、公知の方法により、遊離体または目的とする他の種類の塩に変換することができる。

【００８７】

各工程で得られた化合物は反応液のままか、または粗生成物として得た後に、次反応に

用いることもできる、あるいは、各工程で得られた化合物を、常法に従って、反応混合物から濃縮、晶出、再結晶、蒸留、溶媒抽出、分溜、クロマトグラフィーなどの分離手段により単離および／または精製することができる。

【００８８】

各工程の原料や試薬の化合物が市販されている場合には、市販品をそのまま用いることができる。

【００８９】

各工程の反応において、反応時間は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載の無い場合、通常１分～４８時間、好ましくは１０分～８時間である。

【００９０】

各工程の反応において、反応温度は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載が無い場合、通常－７８℃～３００℃、好ましくは－７８℃～１５０℃である。

【００９１】

各工程の反応において、圧力は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載が無い場合、通常１気圧～２０気圧、好ましくは１気圧～３気圧である。

【００９２】

各工程の反応において、例えば、Ｂｉｏｔａｇｅ社製ＩｎｉｔｉａｔｏｒなどのＭｉｃｒｏｗａｖｅ合成装置を用いることがある。反応温度は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載がない場合、通常室温～３００℃、好ましくは室温～２５０℃、より好ましくは５０℃～２５０℃である。反応時間は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、特に記載の無い場合、通常１分～４８時間、好ましくは１分～８時間である。

【００９３】

各工程の反応において、試薬は、特に記載が無い場合、基質に対して０．５当量～２０当量、好ましくは０．８当量～５当量が用いられる。試薬を触媒として使用する場合、試薬は基質に対して０．００１当量～１当量、好ましくは０．０１当量～０．２当量が用いられる。試薬が反応溶媒を兼ねる場合、試薬は溶媒量が用いられる。

【００９４】

各工程の反応において、特に記載が無い場合、これらの反応は、無溶媒、あるいは適当な溶媒に溶解または懸濁して行われる。溶媒の具体例としては、以下が挙げられる。

【００９５】

アルコール類：メタノール、エタノール、イソプロパノール、イソブタノール、ｔｅｒｔ－ブチルアルコール、２－メトキシエタノールなど；

エーテル類：ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジフェニルエーテル、テトラヒドロフラン、１，２－ジメトキシエタンなど；

芳香族炭化水素類：クロロベンゼン、トルエン、キシレンなど；

飽和炭化水素類：シクロヘキサン、ヘキサン、ヘプタンなど；

アミド類：Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ－メチルピロリドンなど；

ハロゲン化炭化水素類：ジクロロメタン、四塩化炭素など；

ニトリル類：アセトニトリルなど；

スルホキシド類：ジメチルスルホキシドなど；

芳香族有機塩基類：ピリジンなど；

酸無水物類：無水酢酸など；

有機酸類：ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸など；

無機酸類：塩酸、硫酸など；

エステル類：酢酸エチル、酢酸イソプロピルエステルなど；

ケトン類：アセトン、メチルエチルケトンなど；

水。

上記溶媒は、二種以上を適宜の割合で混合して用いてもよい。

【００９６】

各工程の反応において塩基を用いる場合、例えば、以下に示す塩基が用いられる。

【００９７】
無機塩基類：水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化マグネシウムなど；
塩基性塩類：炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウムなど；
有機塩基類：トリエチルアミン、ジエチルアミン、ピリジン、４－ジメチルアミノピリジン、Ｎ，Ｎ－ジメチルアニリン、１，４－ジアザビシクロ［２．２．２］オクタン、１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］－７－ウンデセン、イミダゾール、ピペリジンなど；
金属アルコキシド類：ナトリウムエトキシド、カリウムｔｅｒｔ－ブトキシド、ナトリウムｔｅｒｔ－ブトキシドなど；
アルカリ金属水素化物類：水素化ナトリウムなど；
金属アミド類：ナトリウムアミド、リチウムジイソプロピルアミド、リチウムヘキサメチルジシラジドなど；
有機リチウム類：ｎ－ブチルリチウム、ｓｅｃ－ブチルリチウムなど。
【００９８】
各工程の反応において酸または酸性触媒を用いる場合、例えば、以下に示す酸や酸性触媒が用いられる。
【００９９】
無機酸類：塩酸、硫酸、硝酸、臭化水素酸、リン酸など；
有機酸類：酢酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、１０－カンファースルホン酸など；
ルイス酸：三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体、ヨウ化亜鉛、無水塩化アルミニウム、無水塩化亜鉛、無水塩化鉄など。
【０１００】
各工程の反応は、特に記載の無い限り、公知の方法、例えば、第５版実験化学講座、１３巻～１９巻（日本化学会編）；新実験化学講座、１４巻～１５巻（日本化学会編）；精密有機化学 改定第２版（Ｌ． Ｆ． Ｔｉｅｔｚｅ，Ｔｈ． Ｅｉｃｈｅｒ、南江堂）；改訂 有機人名反応 そのしくみとポイント（東郷秀雄著、講談社）；ＯＲＧＡＮＩＣ ＳＹＮＴＨＥＳＥＳ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｖｅ Ｖｏｌｕｍｅ Ｉ～ＶＩＩ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ ＳｏｎｓＩｎｃ）；Ｍｏｄｅｒｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｔａｎｄａｒｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ（Ｊｉｅ Ｊａｃｋ Ｌｉ著、ＯＸＦＯＲＤ ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ出版）；Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ＩＩＩ、Ｖｏｌ．１～Ｖｏｌ．１４（エルゼビア・ジャパン株式会社）；人名反応に学ぶ有機合成戦略（富岡清監訳、化学同人発行）；コンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ（ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｉｎｃ．）１９８９年刊などに記載された方法に準じて行われる。
【０１０１】
各工程において、官能基の保護または脱保護反応は、公知の方法、例えば、Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ社２００７年刊「Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ， ４ｔｈＥｄ．」（Ｔｈｅｏｄｏｒａ Ｗ． Ｇｒｅｅｎｅ， Ｐｅｔｅｒ Ｇ． Ｍ． Ｗｕｔｓ著）；Ｔｈｉｅｍｅ社２００４年刊「Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ ３ｒｄＥｄ．」（Ｐ．Ｊ．Ｋｏｃｉｅｎｓｋｉ著）などに記載された方法に準じて行われる。
【０１０２】
アルコールなどの水酸基やフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、メトキシメチルエーテル、ベンジルエーテル、ｐ－メトキシベンジルエーテル、ｔ－ブチルジメチルシリルエーテル、ｔ－ブチルジフェニルシリルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテルなどのエーテル型保護基；酢酸エステルなどのカルボン酸エステル型保護基；メタンスルホン酸エステルなどのスルホン酸エステル型保護基；ｔ－ブチルカルボネートなどの炭酸エステル型保護基などが挙げられる。
【０１０３】

アルデヒドのカルボニル基の保護基としては、例えば、ジメチルアセタールなどのアセタール型保護基；環状１，３－ジオキサンなどの環状アセタール型保護基などが挙げられる。

【０１０４】

ケトンのカルボニル基の保護基としては、例えば、ジメチルケタールなどのケタール型保護基；環状１，３－ジオキサンなどの環状ケタール型保護基；Ｏ－メチルオキシムなどのオキシム型保護基；Ｎ，Ｎ－ジメチルヒドラゾンなどのヒドラゾン型保護基などが挙げられる。

【０１０５】

カルボキシル基の保護基としては、例えば、メチルエステルなどのエステル型保護基；Ｎ，Ｎ－ジメチルアミドなどのアミド型保護基などが挙げられる。

【０１０６】

チオールの保護基としては、例えば、ベンジルチオエーテルなどのエーテル型保護基；チオ酢酸エステル、チオカルボネート、チオカルバメートなどのエステル型保護基などが挙げられる。

【０１０７】

アミノ基や、イミダゾール、ピロール、インドールなどの芳香族ヘテロ環の保護基としては、例えば、ベンジルカルバメートなどのカルバメート型保護基；アセトアミドなどのアミド型保護基；Ｎ－トリフェニルメチルアミンなどのアルキルアミン型保護基、メタンスルホンアミドなどのスルホンアミド型保護基などが挙げられる。

【０１０８】

保護基の除去は、公知の方法、例えば、酸、塩基、紫外光、ヒドラジン、フェニルヒドラジン、Ｎ－メチルジチオカルバミン酸ナトリウム、テトラブチルアンモニウムフルオリド、酢酸パラジウム、トリアルキルシリルハライド（例えば、トリメチルシリルヨージド、トリメチルシリルブロミド）を使用する方法や還元法などを用いて行うことができる。

【０１０９】

各工程において、還元反応を行う場合、使用される還元剤としては、水素化アルミニウムリチウム、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム、水素化シアノホウ素ナトリウム、水素化ジイソブチルアルミニウム（ＤＩＢＡＬ－Ｈ）、水素化ホウ素ナトリウム、水素化トリアセトキシホウ素テトラメチルアンモニウムなどの金属水素化物類；ボランテトラヒドロフラン錯体などのボラン類；ラネーニッケル；ラネーコバルト；水素；ギ酸などが挙げられる。例えば、水素またはギ酸存在下で、ラネーニッケルまたはラネーコバルトを用いることができる。炭素－炭素二重結合あるいは三重結合を還元する場合は、パラジウム－カーボンやＬｉｎｄｌａｒ触媒などの触媒を用いる方法がある。

【０１１０】

各工程において、酸化反応を行う場合、使用される酸化剤としては、ｍ－クロロ過安息香酸（ＭＣＰＢＡ）、過酸化水素、ｔ－ブチルヒドロペルオキシドなどの過酸類；過塩素酸テトラブチルアンモニウムなどの過塩素酸塩類；塩素酸ナトリウムなどの塩素酸塩類；亜塩素酸ナトリウムなどの亜塩素酸塩類；過ヨウ素酸ナトリウムなどの過ヨウ素酸類；ヨードシルベンゼンなどの高原子価ヨウ素試薬；二酸化マンガン、過マンガン酸カリウムなどのマンガンを有する試薬；四酢酸鉛などの鉛類；クロロクロム酸ピリジニウム（ＰＣＣ）、二クロム酸ピリジニウム（ＰＤＣ）、ジョーンズ試薬などのクロムを有する試薬；Ｎ－ブロモスクシンイミド（ＮＢＳ）などのハロゲン化合物類；酸素；オゾン；三酸化硫黄・ピリジン錯体；四酸化オスミウム；二酸化セレン；２，３－ジクロロ－５，６－ジシアノ－１，４－ベンゾキノン（ＤＤＱ）などが挙げられる。

【０１１１】

各工程において、ラジカル環化反応を行う場合、使用されるラジカル開始剤としては、アゾビスイソブチロニトリル（ＡＩＢＮ）などのアゾ化合物；４－４’－アゾビス－４－シアノペンタン酸（ＡＣＰＡ）などの水溶性ラジカル開始剤；空気あるいは酸素存在下でのトリエチルホウ素；過酸化ベンゾイルなどが挙げられる。また、使用されるラジカル反応

試剤としては、トリブチルスタナン、トリストリメチルシリルシラン、１，１，２，２－テトラフェニルジシラン、ジフェニルシラン、ヨウ化サマリウムなどが挙げられる。

【０１１２】

各工程において、Ｗｉｔｔｉｇ反応を行う場合、使用されるＷｉｔｔｉｇ試薬としては、アルキリデンホスホラン類などが挙げられる。アルキリデンホスホラン類は、公知の方法、例えば、ホスホニウム塩と強塩基を反応させることで調製することができる。

【０１１３】

各工程において、Ｈｏｒｎｅｒ－Ｅｍｍｏｎｓ反応を行う場合、使用される試薬としては、ジメチルホスホノ酢酸メチル、ジエチルホスホノ酢酸エチルなどのホスホノ酢酸エステル類；アルカリ金属水素化物類、有機リチウム類などの塩基が挙げられる。

【０１１４】

各工程において、Ｆｒｉｅｄｅｌ－Ｃｒａｆｔｓ反応を行う場合、使用される試薬としては、ルイス酸と、酸クロリドあるいはアルキル化剤（例、ハロゲン化アルキル類、アルコール、オレフィン類など）が挙げられる。あるいは、ルイス酸の代わりに、有機酸や無機酸を用いることもでき、酸クロリドの代わりに、無水酢酸などの酸無水物を用いることもできる。

【０１１５】

各工程において、芳香族求核置換反応を行う場合、試薬としては、求核剤（例、アミン類、イミダゾールなど）と塩基（例、塩基性塩類、有機塩基類など）が用いられる。

【０１１６】

各工程において、カルボアニオンによる求核付加反応、カルボアニオンによる求核１，４－付加反応（Ｍｉｃｈａｅｌ付加反応）、あるいはカルボアニオンによる求核置換反応を行う場合、カルボアニオンを発生するために用いる塩基としては、有機リチウム類、金属アルコキシド類、無機塩基類、有機塩基類などが挙げられる。

【０１１７】

各工程において、Ｇｒｉｇｎａｒｄ反応を行う場合、Ｇｒｉｇｎａｒｄ試薬としては、フェニルマグネシウムブロミドなどのアリールマグネシウムハライド類；メチルマグネシウムブロミド、イソプロピルマグネシウムブロミドなどのアルキルマグネシウムハライド類が挙げられる。Ｇｒｉｇｎａｒｄ試薬は、公知の方法、例えばエーテルあるいはテトラヒドロフランを溶媒として、ハロゲン化アルキルまたはハロゲン化アリールと、金属マグネシウムとを反応させることにより調製することができる。

【０１１８】

各工程において、Ｋｎｏｅｖｅｎａｇｅｌ縮合反応を行う場合、試薬としては、二つの電子求引基に挟まれた活性メチレン化合物（例、マロン酸、マロン酸ジエチル、マロノニトリルなど）および塩基（例、有機塩基類、金属アルコキシド類、無機塩基類）が用いられる。

【０１１９】

各工程において、Ｖｉｌｓｍｅｉｅｒ－Ｈａａｃｋ反応を行う場合、試薬としては、塩化ホスホリルとアミド誘導体（例、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドなど）が用いられる。

【０１２０】

各工程において、アルコール類、アルキルハライド類、スルホン酸エステル類のアジド化反応を行う場合、使用されるアジド化剤としては、ジフェニルホスホリルアジド（ＤＰＰＡ）、トリメチルシリルアジド、アジ化ナトリウムなどが挙げられる。例えば、アルコール類をアジド化する場合、ジフェニルホスホリルアジドと１，８－ジアザビシクロ［５，４，０］ウンデカ－７－エン（ＤＢＵ）を用いる方法やトリメチルシリルアジドとルイス酸を用いる方法などがある。

【０１２１】

各工程において、還元的アミノ化反応を行う場合、使用される還元剤としては、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム、水素化シアノホウ素ナトリウム、水素、ギ酸などが挙げられる。基質がアミン化合物の場合は、使用されるカルボニル化合物としては、パラホ

ルムアルデヒドの他、アセトアルデヒドなどのアルデヒド類、シクロヘキサノンなどのケトン類が挙げられる。基質がカルボニル化合物の場合は、使用されるアミン類としては、アンモニア、メチルアミンなどの１級アミン；ジメチルアミンなどの２級アミンなどが挙げられる。

【０１２２】

各工程において、光延反応を行う場合、試薬としては、アゾジカルボン酸エステル類（例、アゾジカルボン酸ジエチル（ＤＥＡＤ）、アゾジカルボン酸ジイソプロピル（ＤＩＡＤ）など）およびトリフェニルホスフィンが用いられる。

【０１２３】

各工程において、エステル化反応、アミド化反応、あるいはウレア化反応を行う場合、使用される試薬としては、酸クロリド、酸ブロミドなどのハロゲン化アシル体；酸無水物、活性エステル体、硫酸エステル体など活性化されたカルボン酸類が挙げられる。カルボン酸の活性化剤としては、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（ＷＳＣＤ）などのカルボジイミド系縮合剤；４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロライド－ｎ－ハイドレート（ＤＭＴ－ＭＭ）などのトリアジン系縮合剤；１，１－カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）などの炭酸エステル系縮合剤；ジフェニルリン酸アジド（ＤＰＰＡ）；ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ－トリスジメチルアミノホスホニウム塩（ＢＯＰ試薬）；ヨウ化２－クロロ－１－メチル－ピリジニウム（向山試薬）；塩化チオニル；クロロギ酸エチルなどのハロギ酸低級アルキル；Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロリン酸塩（ＨＡＴＵ）；硫酸；あるいはこれらの組み合わせなどが挙げられる。カルボジイミド系縮合剤を用いる場合、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド（ＨＯＳｕ）、ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）などの添加剤をさらに反応に加えてもよい。

【０１２４】

各工程において、カップリング反応を行う場合、使用される金属触媒としては、酢酸パラジウム（ＩＩ）、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（０）、ジクロロビス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（ＩＩ）、ジクロロビス（トリエチルホスフィン）パラジウム（ＩＩ）、トリス（ジベンジリデンアセトン）ジパラジウム（０）、塩化１，１’－ビス（ジフェニルホスフィノ）フェロセンパラジウム（ＩＩ）、酢酸パラジウム（ＩＩ）などのパラジウム化合物；テトラキス（トリフェニルホスフィン）ニッケル（０）などのニッケル化合物；塩化トリス（トリフェニルホスフィン）ロジウム（ＩＩＩ）などのロジウム化合物；コバルト化合物；酸化銅、ヨウ化銅（Ｉ）などの銅化合物；白金化合物などが挙げられる。さらに反応に塩基を加えてもよく、このような塩基としては、無機塩基類、塩基性塩類などが挙げられる。

【０１２５】

各工程において、チオカルボニル化反応を行う場合、チオカルボニル化剤としては、代表的には五硫化二リンが用いられるが、五硫化二リンの他に、２，４－ビス（４－メトキシフェニル）－１，３，２，４－ジチアジホスフェタン－２，４－ジスルフィド（Ｌｏｗｅｓｓｏｎ試薬）などの１，３，２，４－ジチアジホスフェタン－２，４－ジスルフィド構造を持つ試薬を用いてもよい。

【０１２６】

各工程において、Ｗｏｈｌ－Ｚｉｅｇｌｅｒ反応を行う場合、使用されるハロゲン化剤としては、Ｎ－ヨードコハク酸イミド、Ｎ－ブロモコハク酸イミド（ＮＢＳ）、Ｎ－クロロコハク酸イミド（ＮＣＳ）、臭素、塩化スルフリルなどが挙げられる。さらに、熱、光、過酸化ベンゾイル、アゾビスイソブチロニトリルなどのラジカル開始剤を反応に加えることで、反応を加速させることができる。

【０１２７】

各工程において、ヒドロキシ基のハロゲン化反応を行う場合、使用されるハロゲン化剤

としては、ハロゲン化水素酸と無機酸の酸ハロゲン化物、具体的には、塩素化では、塩酸、塩化チオニル、オキシ塩化リンなど、臭素化では、４８％臭化水素酸などが挙げられる。また、トリフェニルホスフィンと四塩化炭素または四臭化炭素などとの作用により、アルコールからハロゲン化アルキル体を得る方法を用いてもよい。あるいは、アルコールをスルホン酸エステルに変換の後、臭化リチウム、塩化リチウムまたはヨウ化ナトリウムと反応させるような２段階の反応を経てハロゲン化アルキル体を合成する方法を用いてもよい。

【０１２８】

各工程において、Ａｒｂｕｚｏｖ反応を行う場合、使用される試薬としては、ブロモ酢酸エチルなどのハロゲン化アルキル類；トリエチルフォスファイトやトリ（イソプロピル）ホスファイトなどのホスファイト類が挙げられる。

【０１２９】

各工程において、スルホンエステル化反応を行う場合、使用されるスルホン化剤としては、メタンスルホニルクロリド、ｐ－トルエンスルホニルクロリド、メタンスルホン酸無水物、ｐ－トルエンスルホン酸無水物、トリフルオロメタンスルホン酸無水物などが挙げられる。

【０１３０】

各工程において、加水分解反応を行う場合、試薬としては、酸または塩基が用いられる。また、ｔ－ブチルエステルの酸加水分解反応を行う場合、副生するｔ－ブチルカチオンを還元的にトラップするためにギ酸やトリエチルシランなどを加えることがある。

【０１３１】

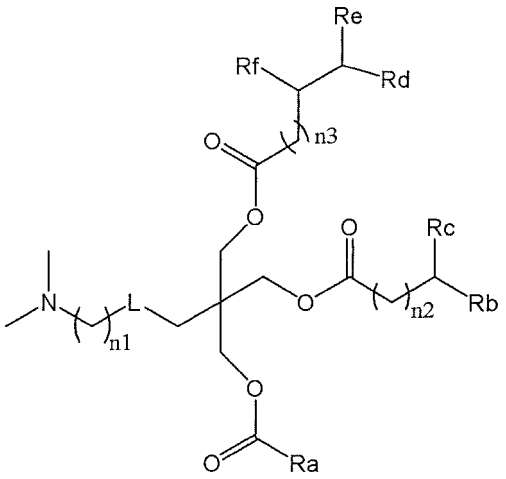
各工程において、脱水反応を行う場合、使用される脱水剤としては、硫酸、五酸化二リン、オキシ塩化リン、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド、アルミナ、ポリリン酸などが挙げられる。

【０１３２】

別の好ましい実施態様においては、下記式（ＩＩＩ）で表されるカチオン性脂質（以下、「化合物（ＩＩＩ）」ともいう。）が挙げられる。

【０１３３】

【化４１】



(III)

【０１３４】

[式中、

ｎ１は、２～６の整数を、

ｎ２は、０～２の整数を、

ｎ３は、０～２の整数を、

Ｌは、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－又は－ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ－を、

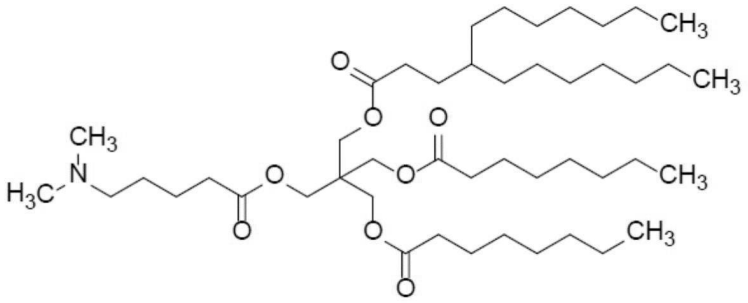
Ｒａは、直鎖状Ｃ５－１３アルキル基、直鎖状Ｃ１３－１７アルケニル基又は直鎖状Ｃ１７アルカジエニル基を、
Ｒｂは、直鎖状Ｃ２－９アルキル基を、
Ｒｃは、水素原子又は直鎖状Ｃ２－９アルキル基を、
Ｒｄは、水素原子又は直鎖状Ｃ２－９アルキル基を、
Ｒｅは、直鎖状Ｃ２－９アルキル基を、
Ｒｆは、直鎖状Ｃ２－９アルキル基を示す。]
で表される化合物又はその塩。

【０１３５】

より好ましくは、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。

【０１３６】

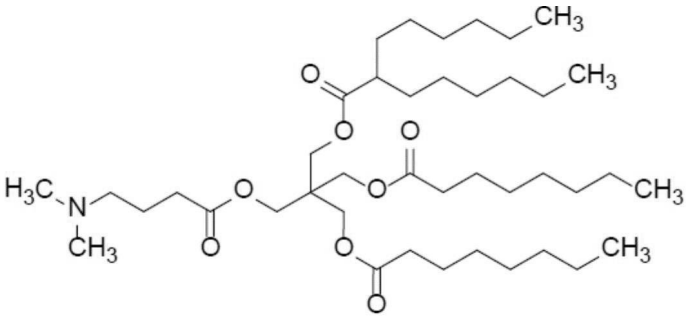
【化４２】



（化合物２２）

【０１３７】

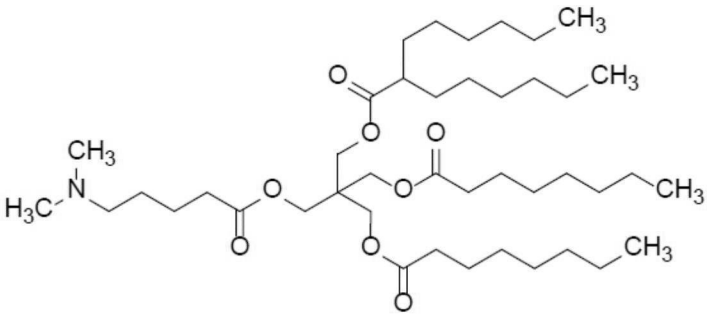
【化４３】



（化合物２３）

【０１３８】

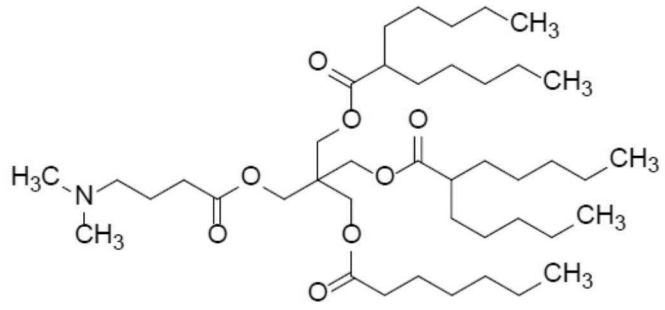
【化４４】



（化合物２４）

【０１３９】

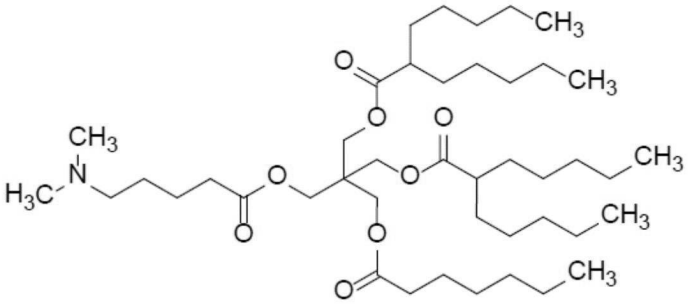
【化４５】



（化合物２５）

【０１４０】

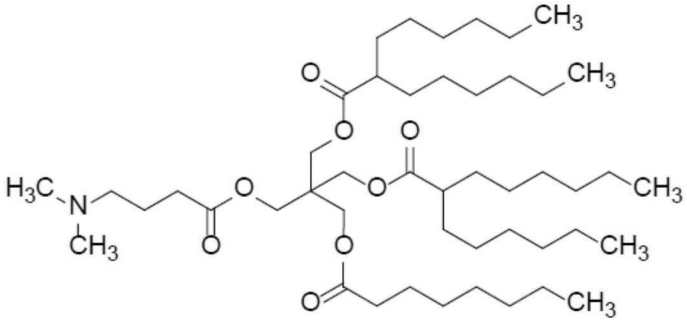
【化４６】



（化合物２６）

【０１４１】

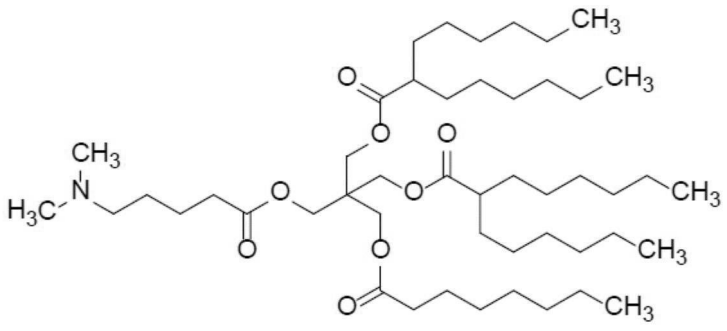
【化４７】



（化合物２７）

【０１４２】

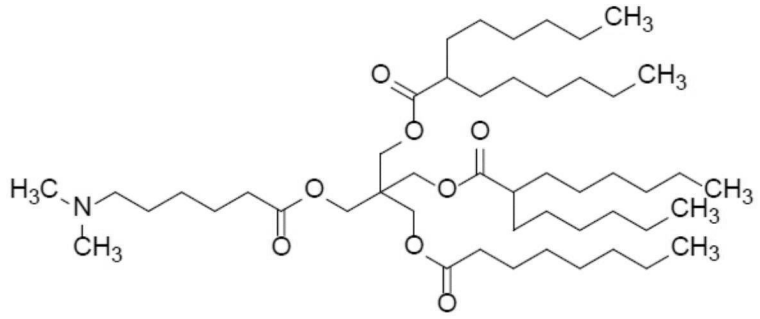
【化４８】



（化合物２８）

【０１４３】

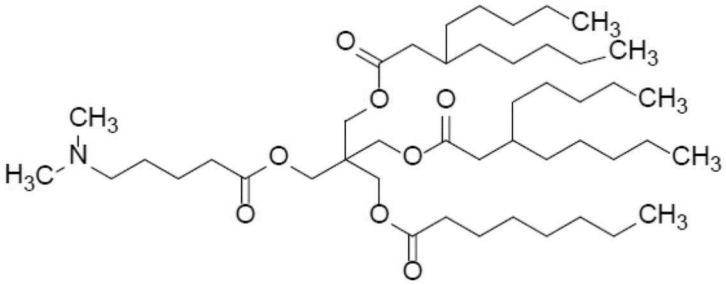
【化４９】



（化合物２９）

【０１４４】

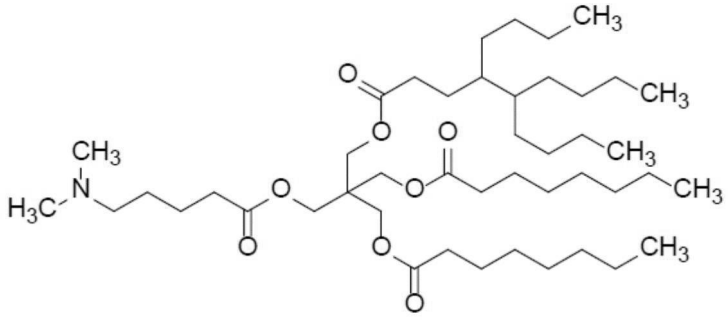
【化５０】



（化合物３０）

【０１４５】

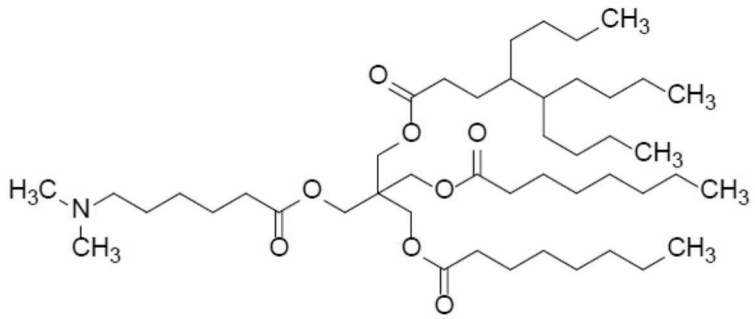
【化５１】



（化合物３１）

【０１４６】

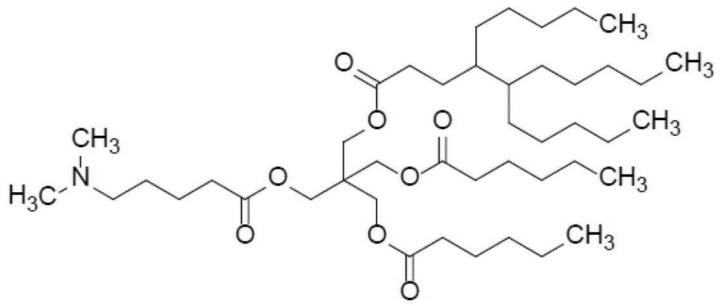
【化５２】



（化合物３２）

【０１４７】

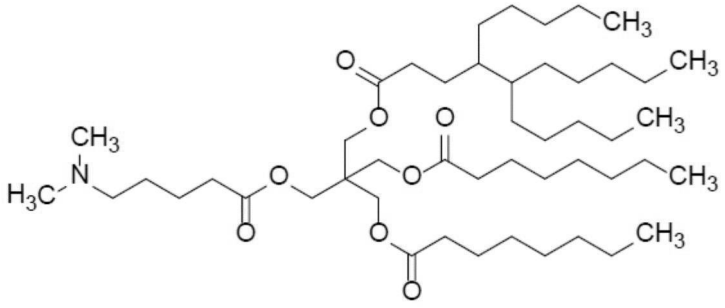
【化５３】



（化合物３３）

【０１４８】

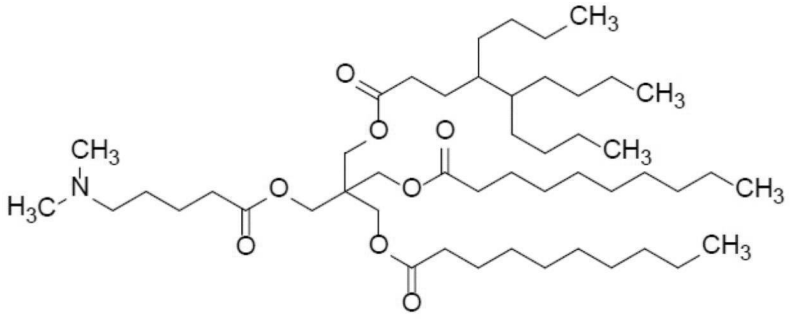
【化５４】



（化合物３４）

【０１４９】

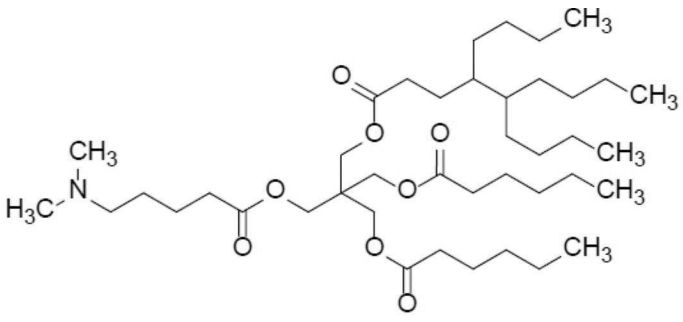
【化５５】



（化合物３５）

【０１５０】

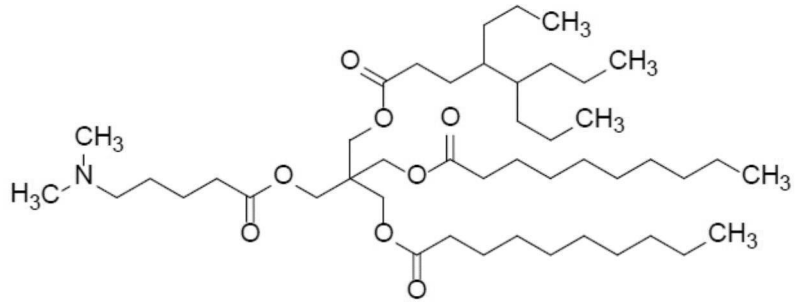
【化５６】



（化合物３６）

【０１５１】

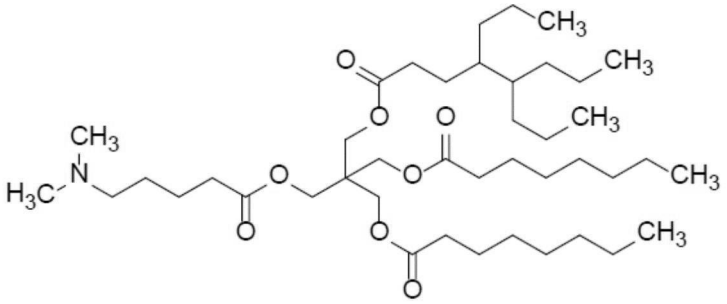
【化５７】



（化合物３７）

【０１５２】

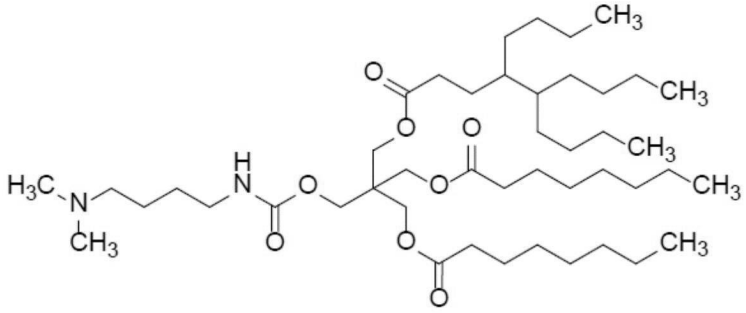
【化５８】



（化合物３８）及び

【０１５３】

【化５９】



（化合物３９）

【０１５４】

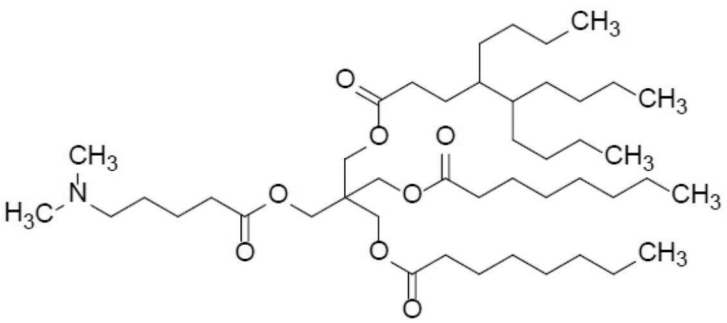
並びにそれらの塩。

【０１５５】

上記カチオン性脂質のうち、より好ましいものとして、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。

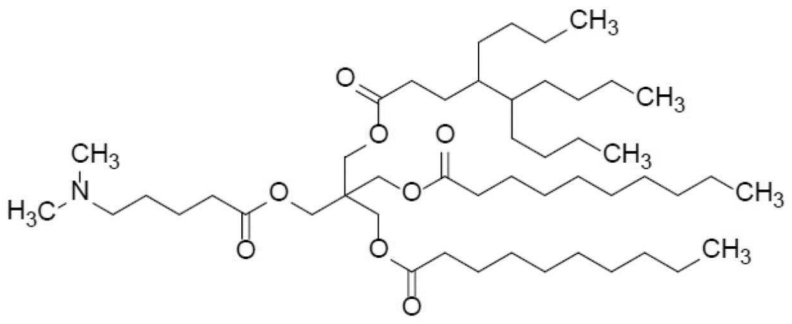
【０１５６】

【化６０】



（化合物３１）及び

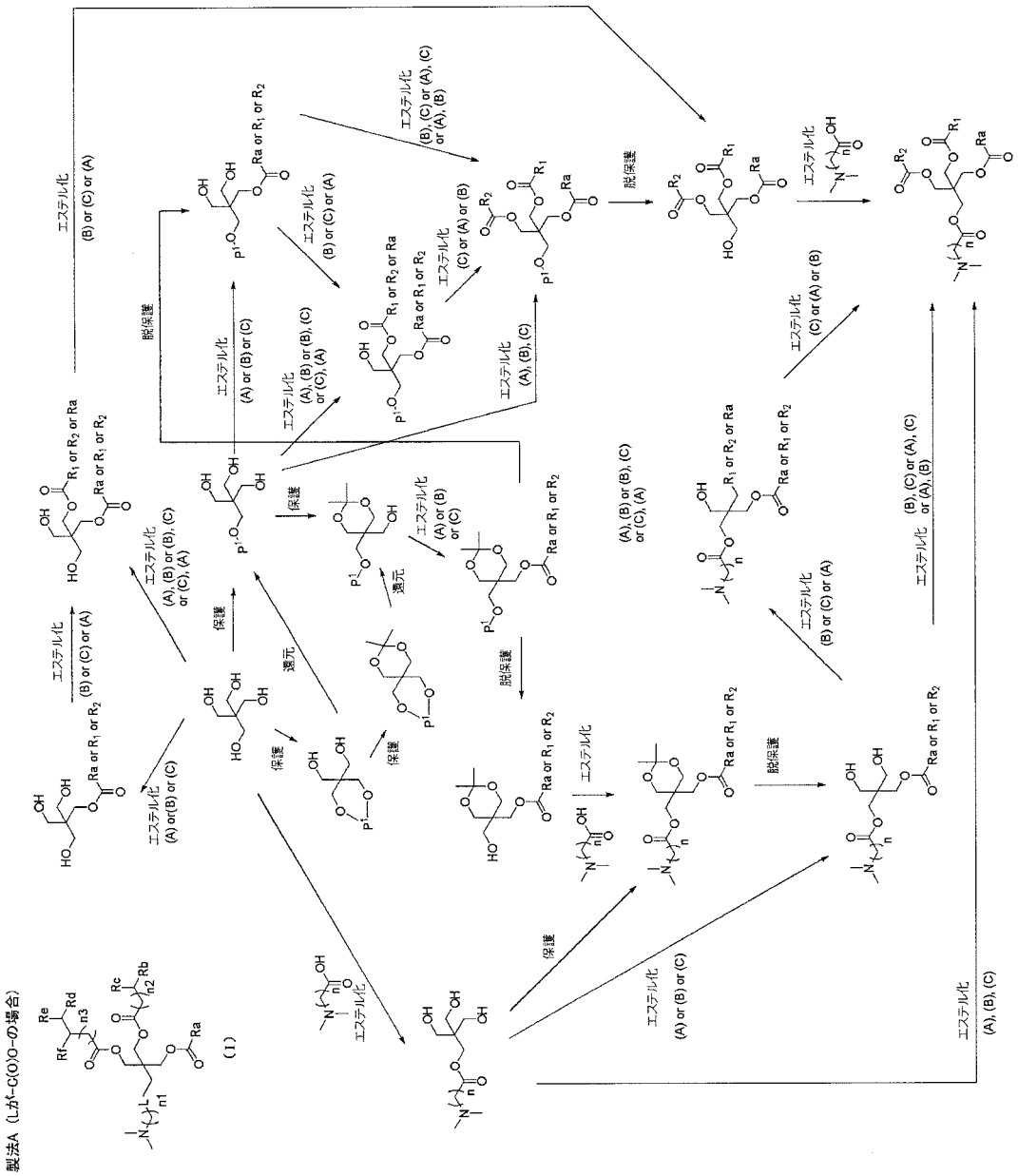
【０１５７】
【化６１】



（化合物３５）

【０１５８】
並びにそれらの塩。
【０１５９】
化合物（ＩＩＩ）は、例えば、以下の製法によって製造することができる。特にエステル化の際に、目的とする化合物（ＩＩＩ）の構造に応じた適切な原料を用いることにより、所望の構造の化合物（Ｉ）を合成することが可能である。また、化合物（ＩＩＩ）の塩は、無機塩基、有機塩基、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸との適切な混合により得ることができる。
【０１６０】

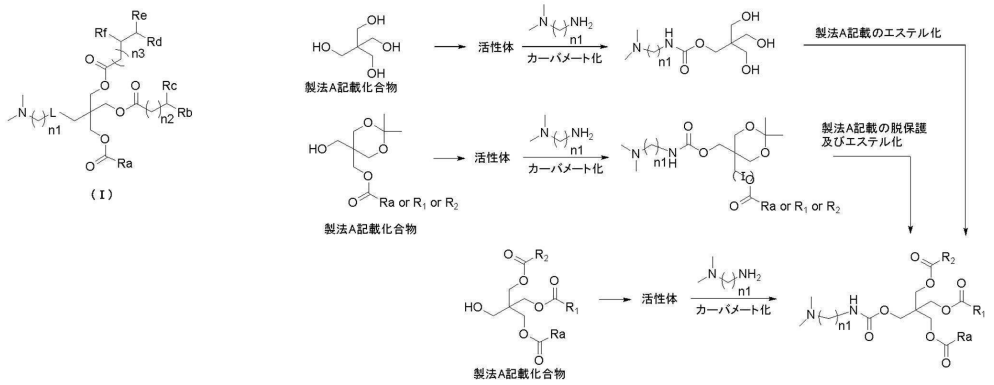
【化６２】



【０１６１】

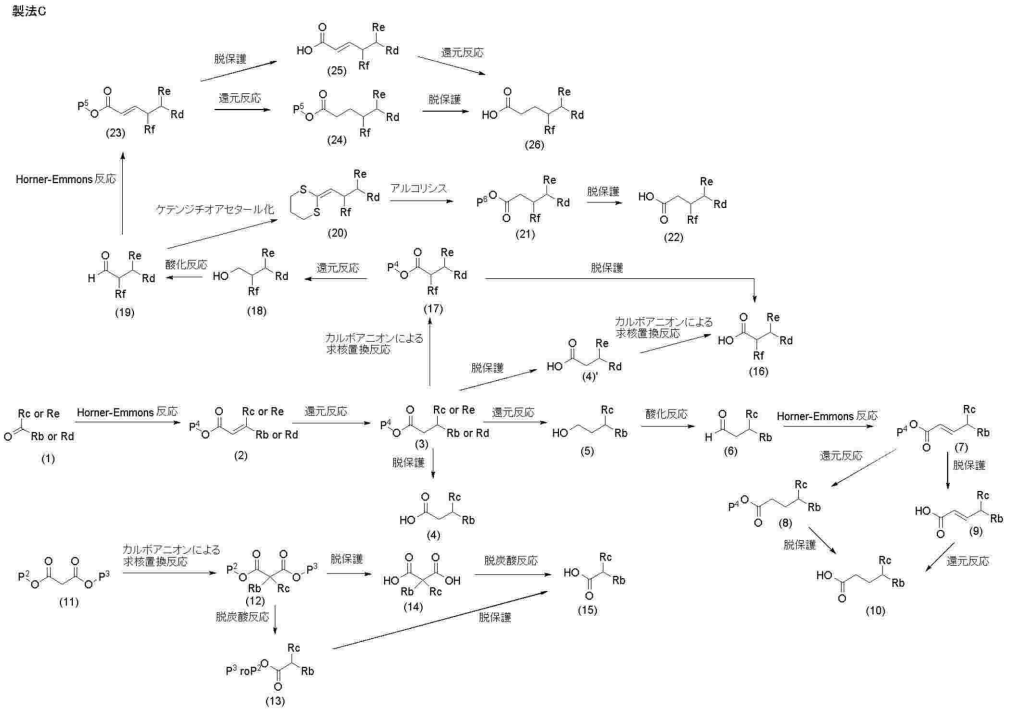
【化６３】

製法B（Lが-NHC(O)O-の場合）



【０１６２】

【化６４】

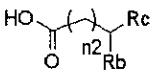
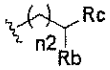


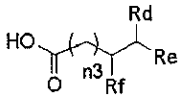
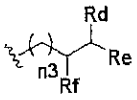
【０１６３】

【化６５】

以上の式中、P^1, P^2, P^3, P^4, P^5 およびP^6 は、それぞれ独立していて、保護基を示し、

化合物(A)は、式:  を示し、

化合物(B)は、式:  を、R1は  を示し、

化合物(C)は、式:  を、R2は  を示し、

その他の各記号は前記と同意義を示す。

【０１６４】

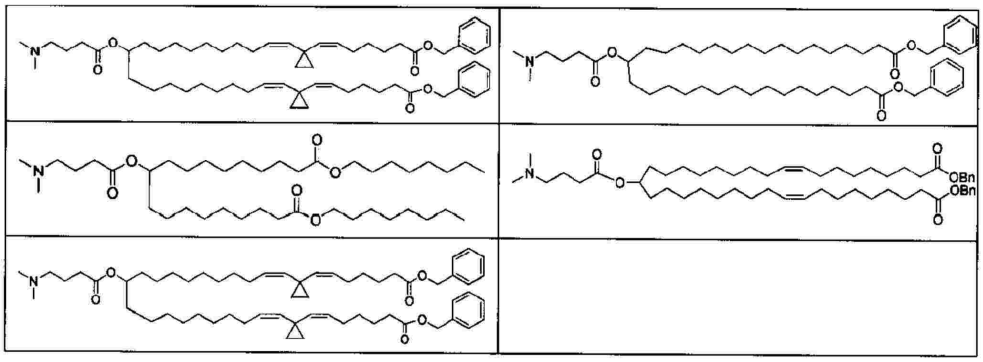
上記の製造方法における各工程の反応で用いられる原料や試薬、ならびに反応条件は、化合物（ＩＩ）の製造方法において上記したのと同様であり得る。

【０１６５】

別の実施態様においては、ＷＯ ２０１１/１５３４９３に記載の下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。

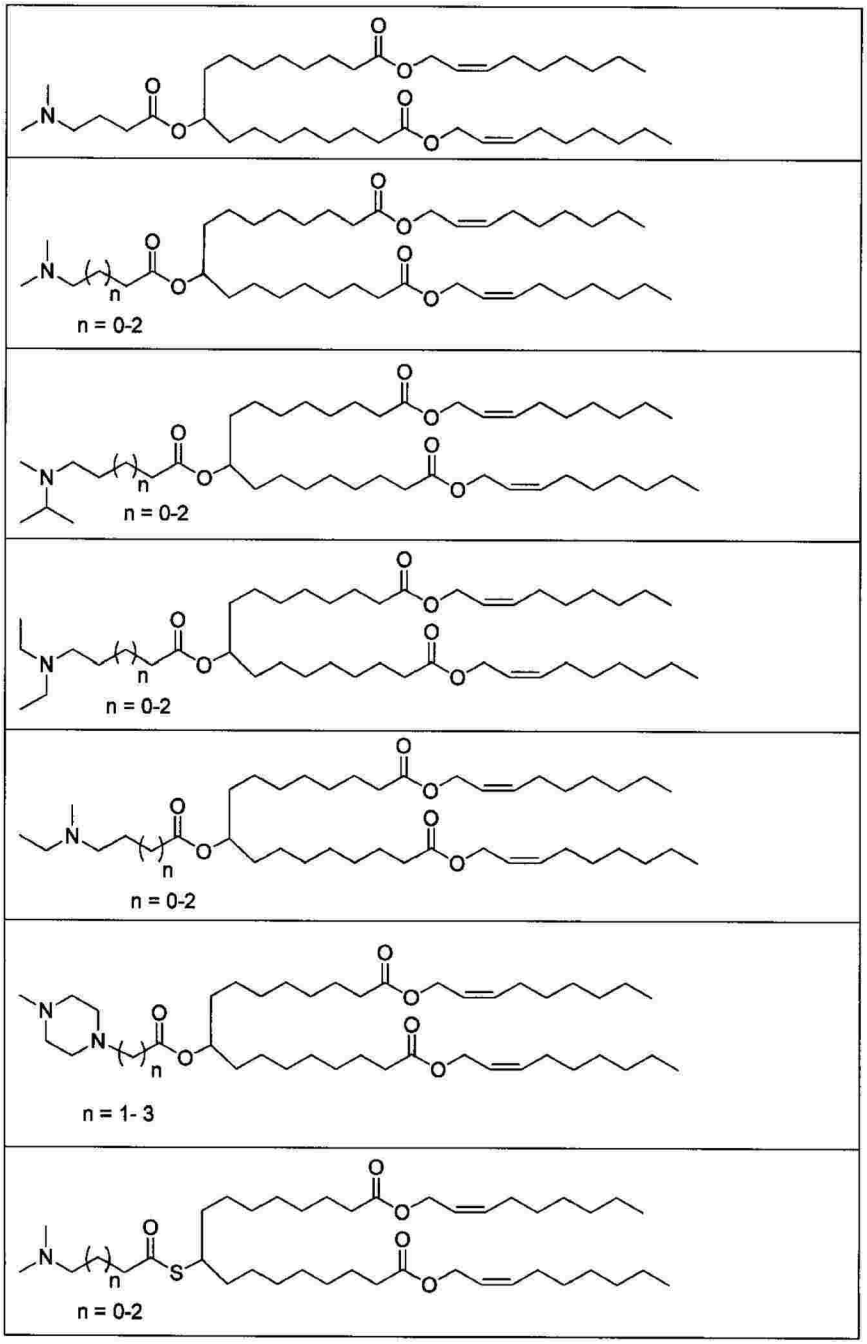
【０１６６】

【化６６】

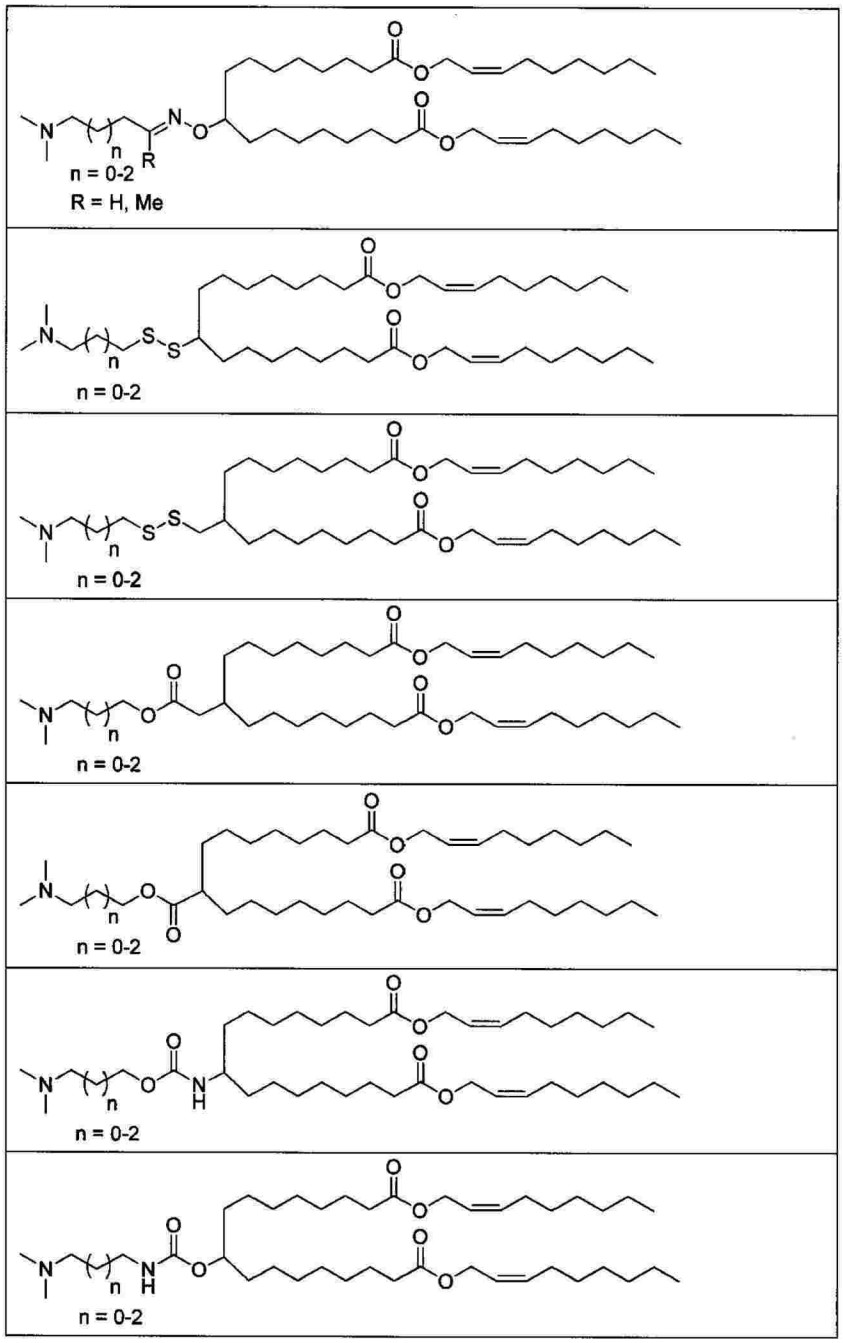


【０１６７】

【化６７】

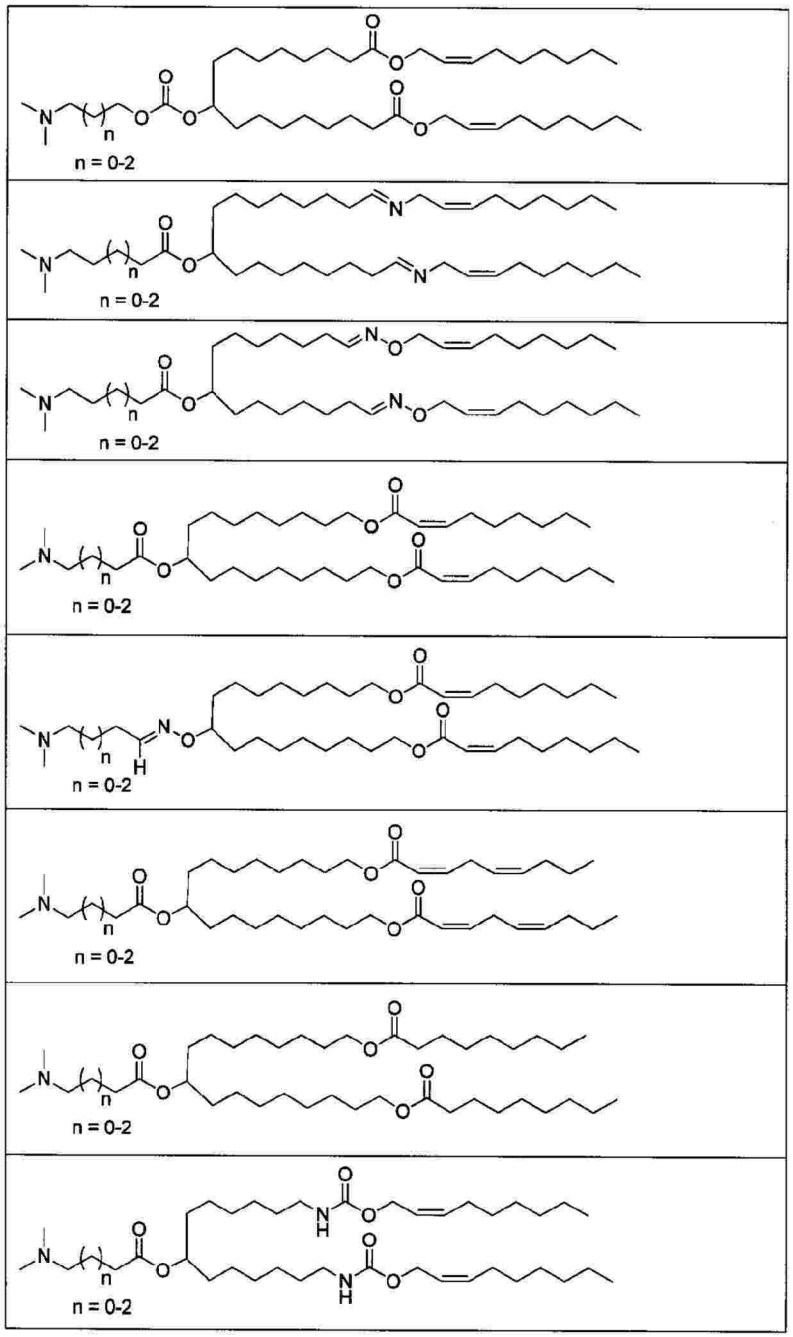


【０１６８】
【化６８】



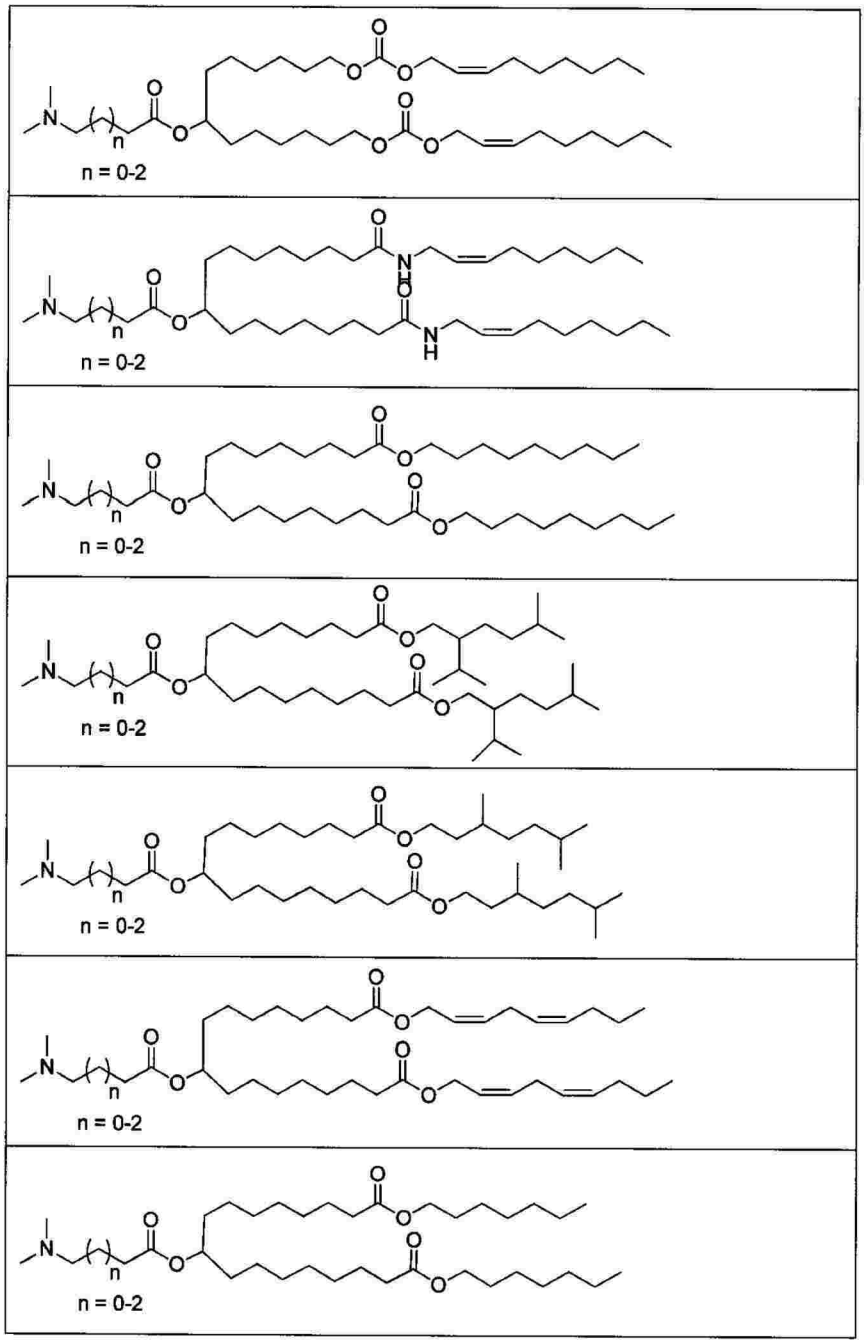
【０１６９】

【化６９】



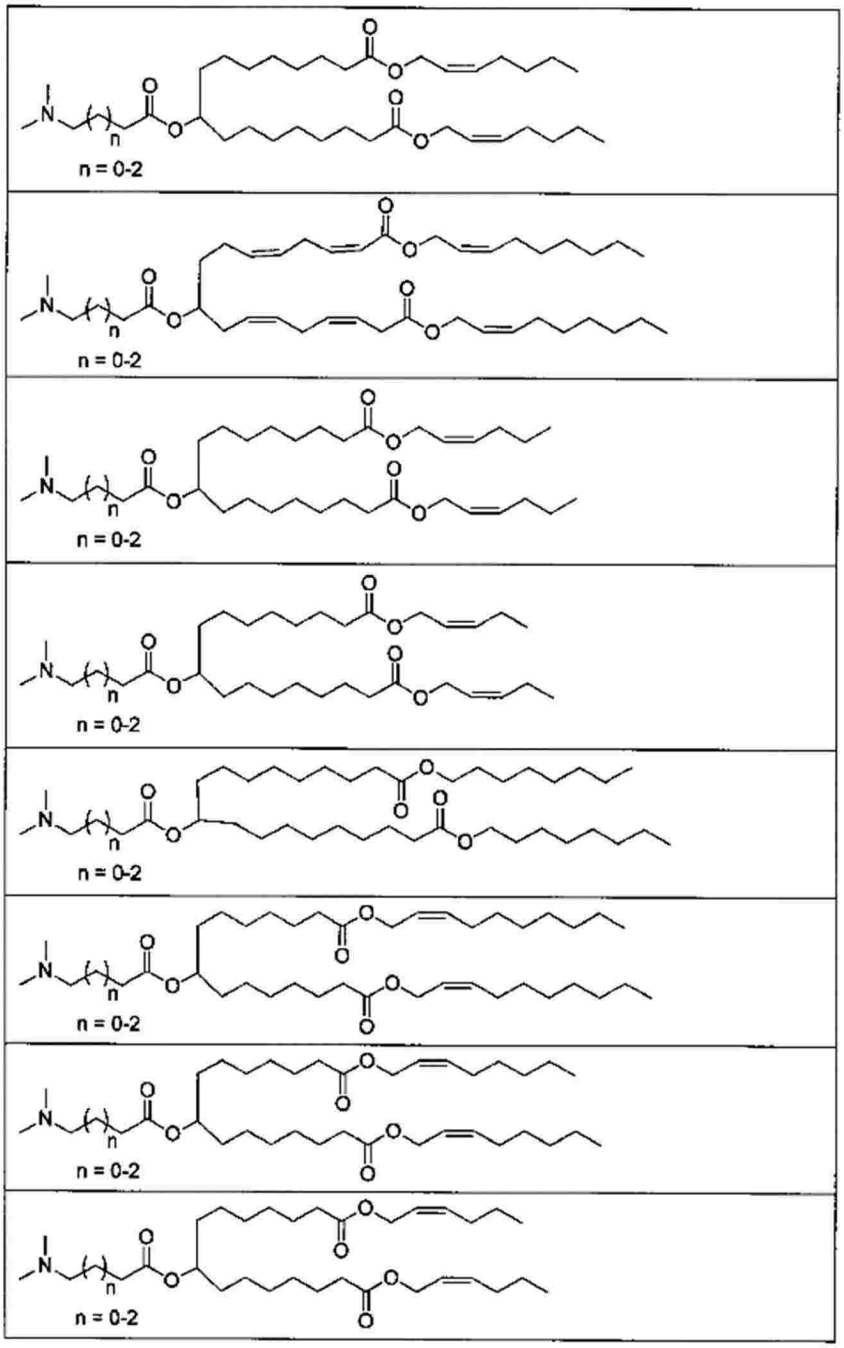
【０１７０】

【化７０】



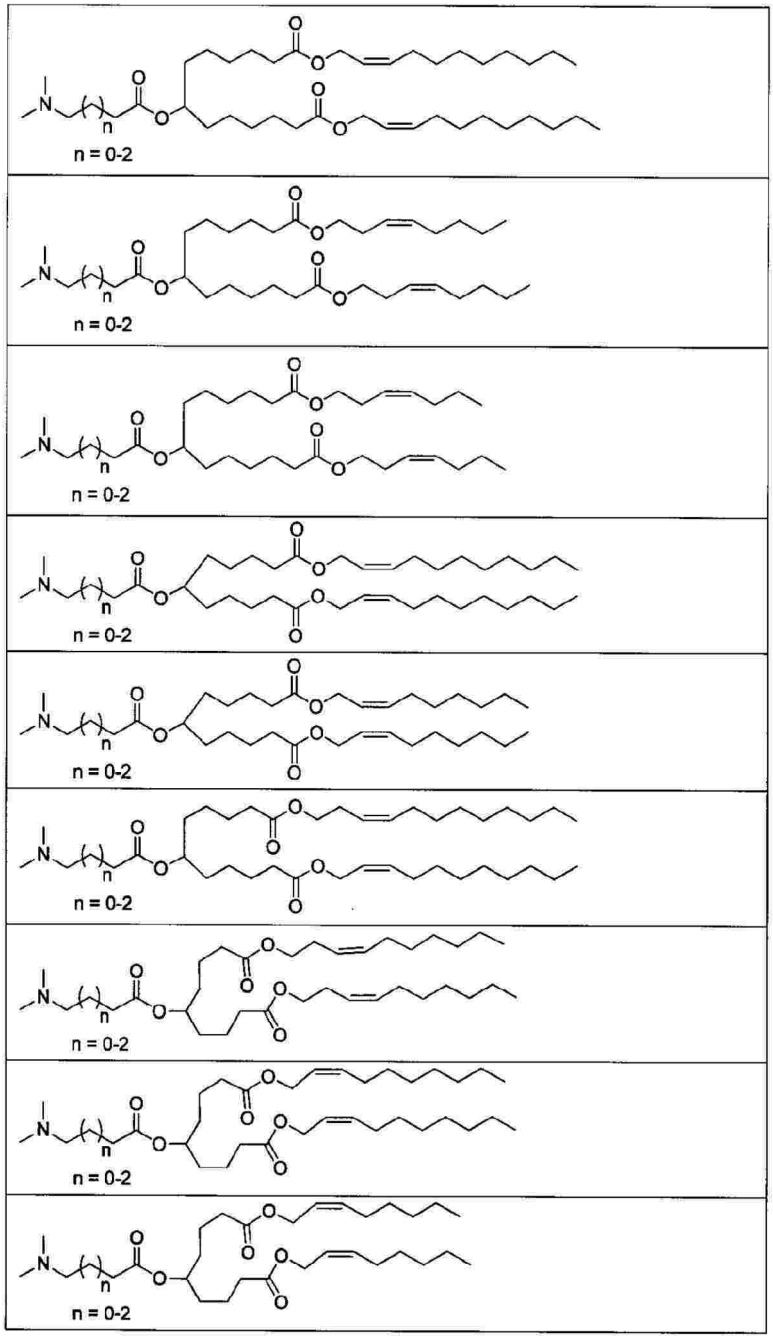
【０１７１】

【化７１】



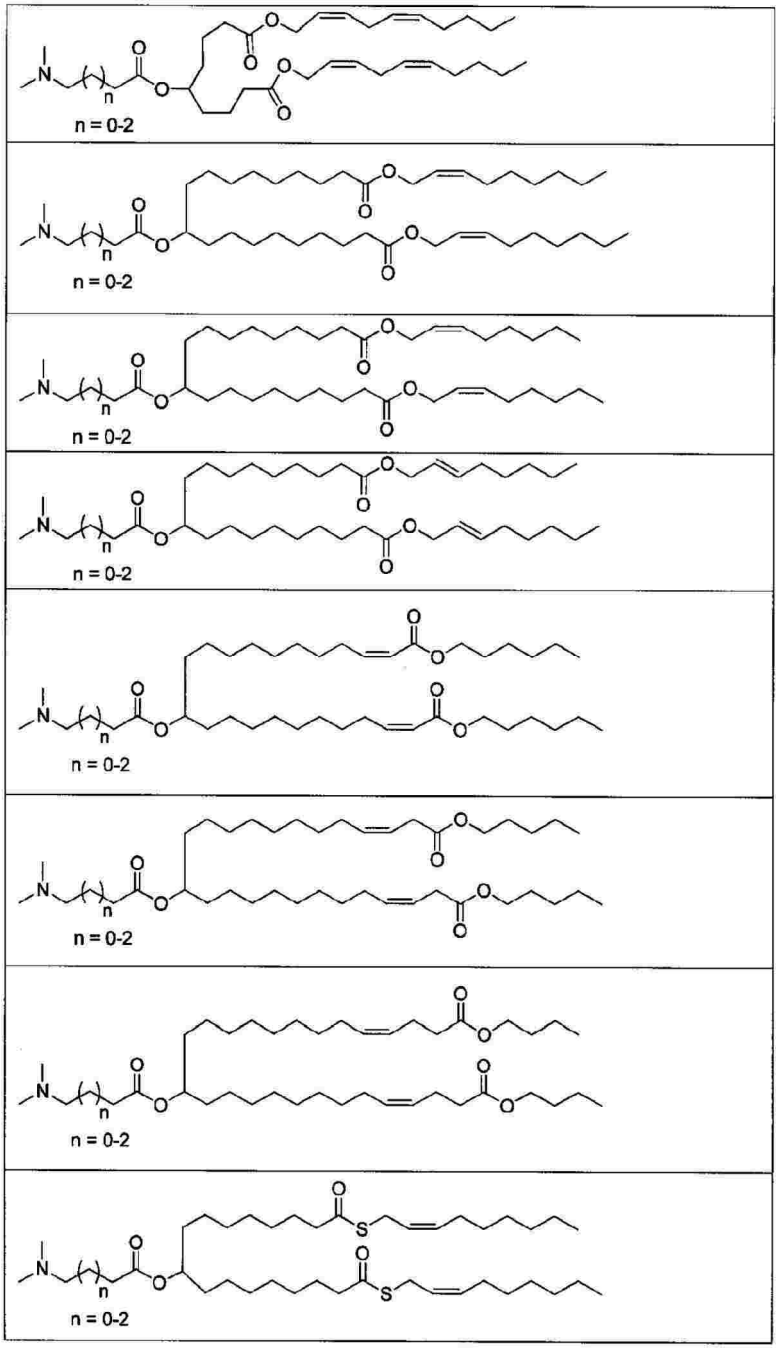
【０１７２】

【化７２】



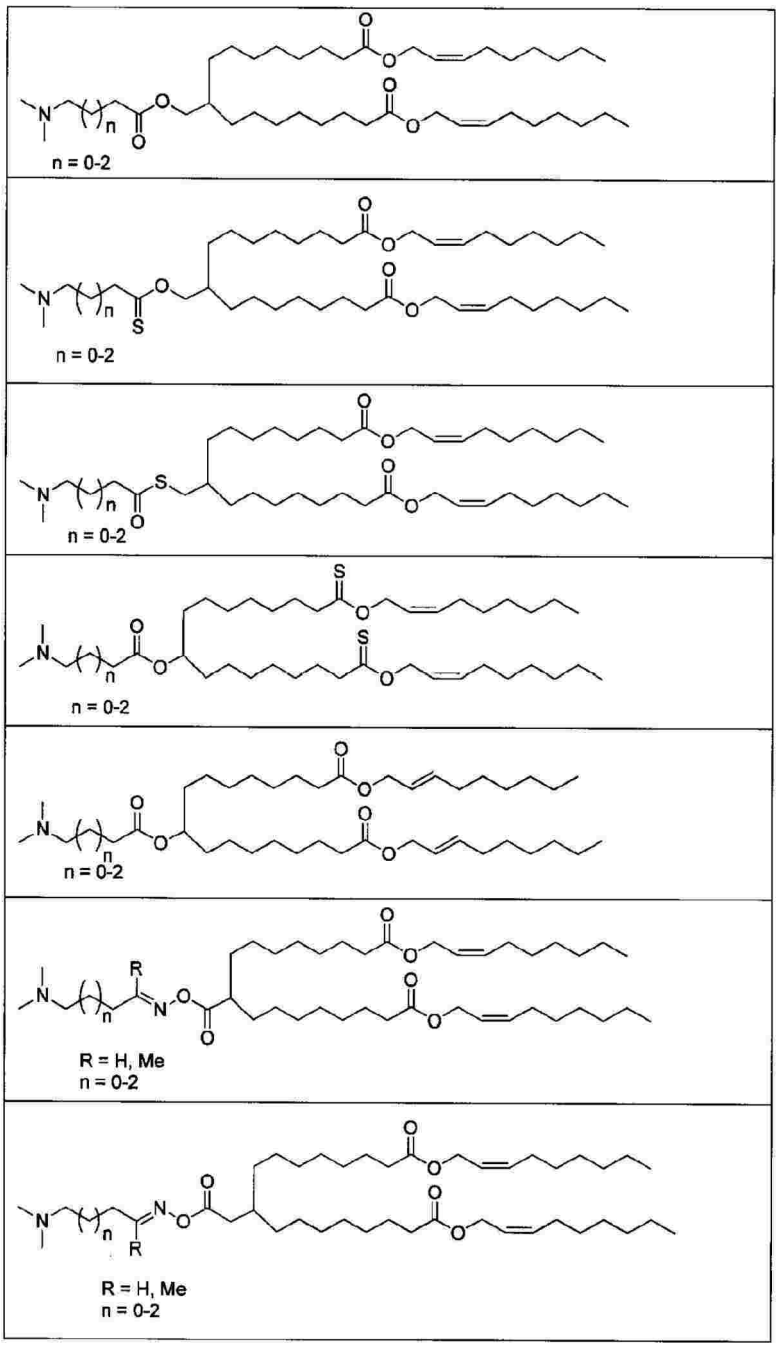
【０１７３】

【化７３】



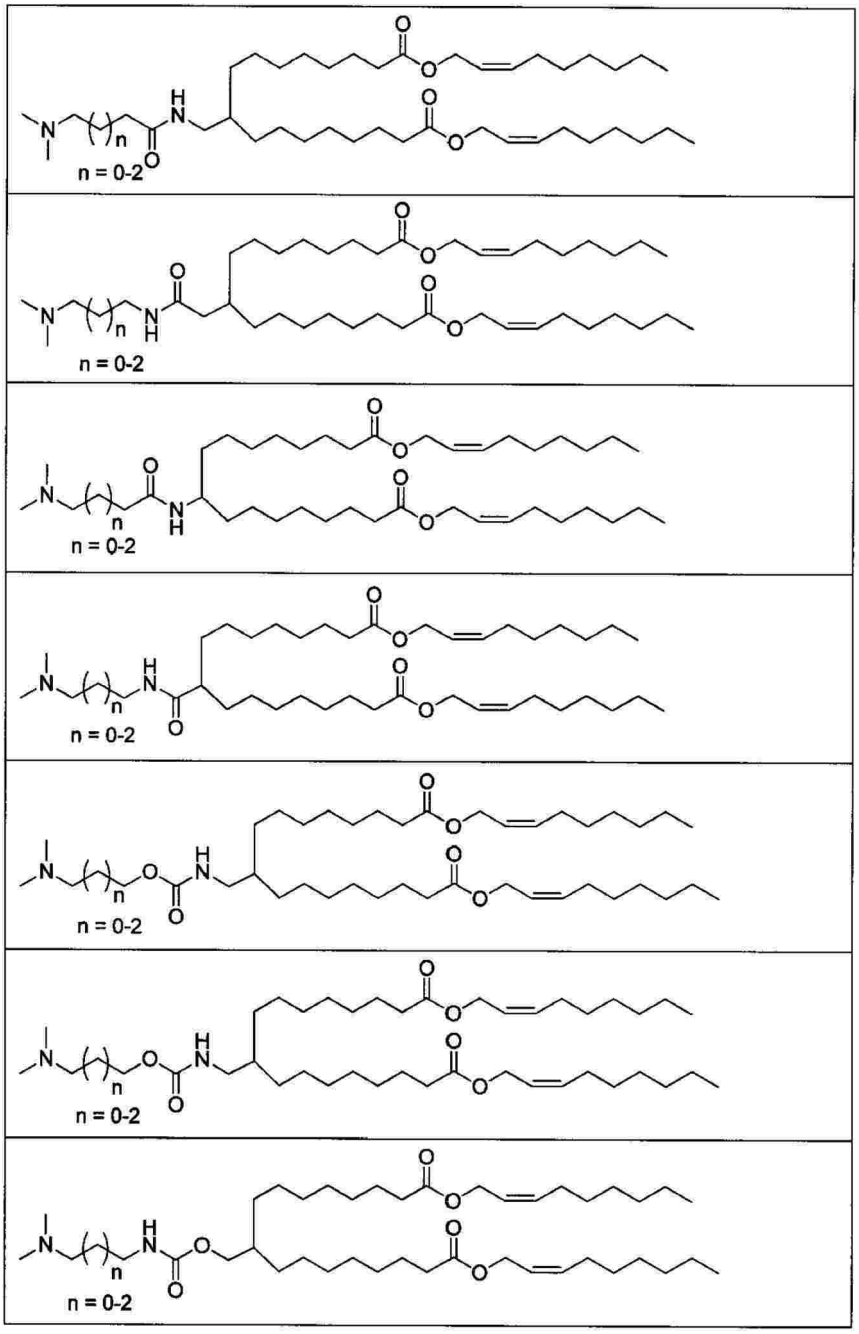
【０１７４】

【化７４】



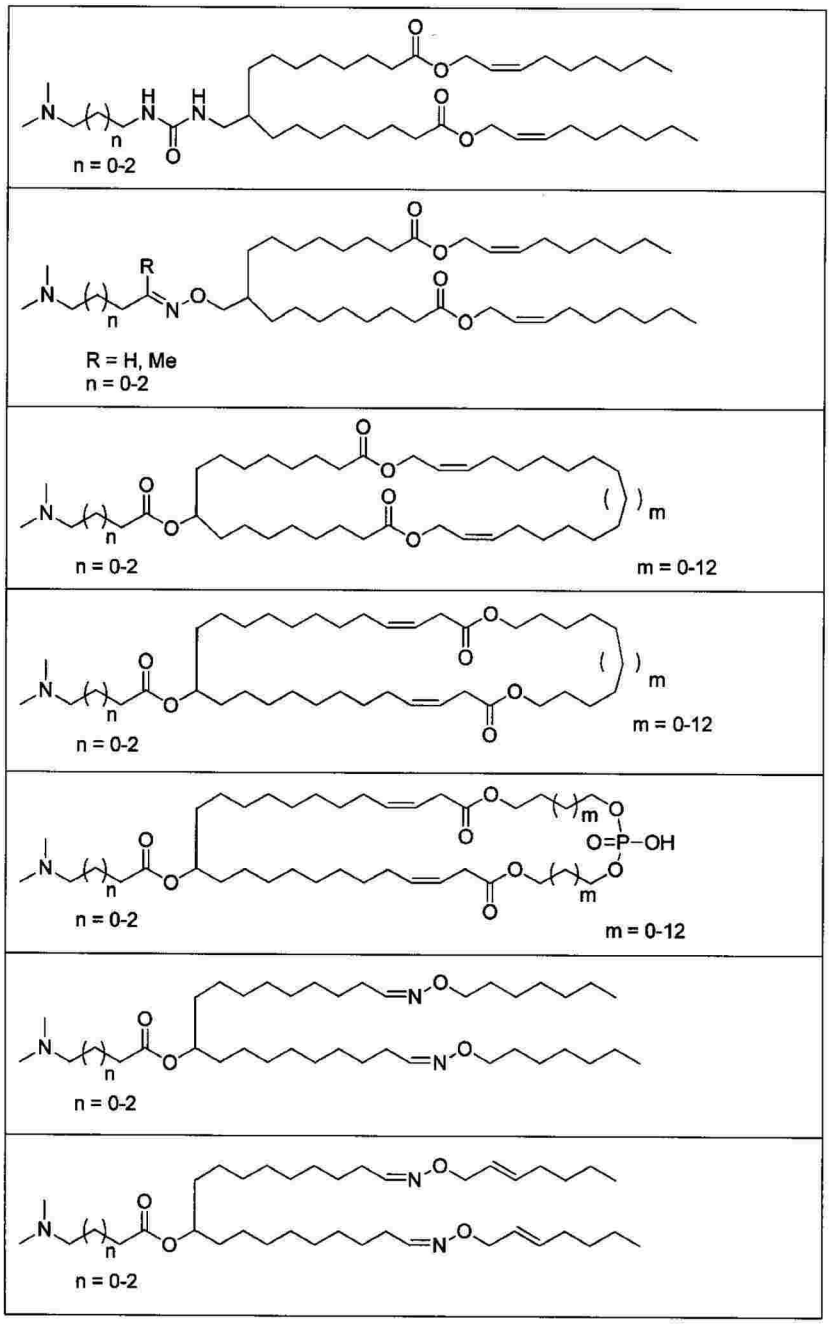
【０１７５】

【化７５】



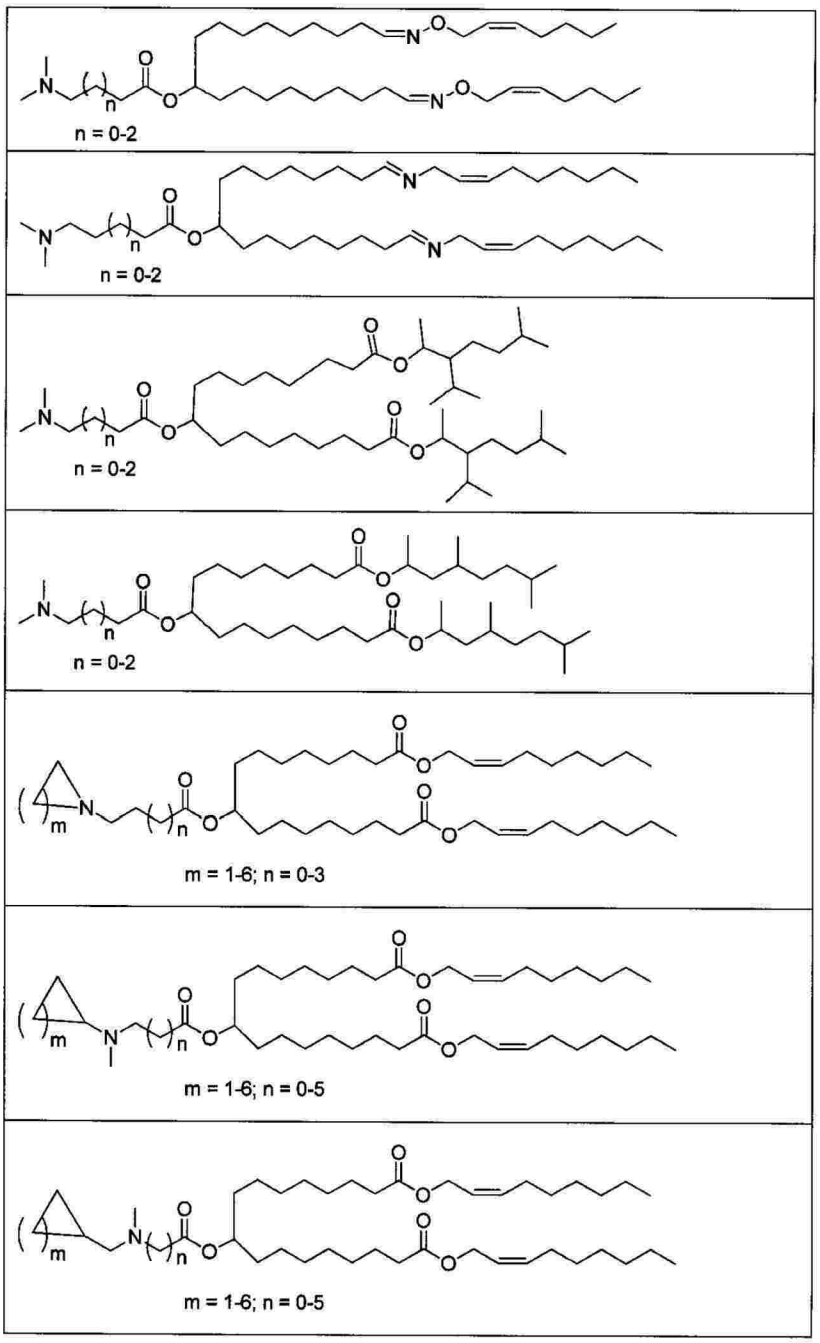
【０１７６】

【化７６】



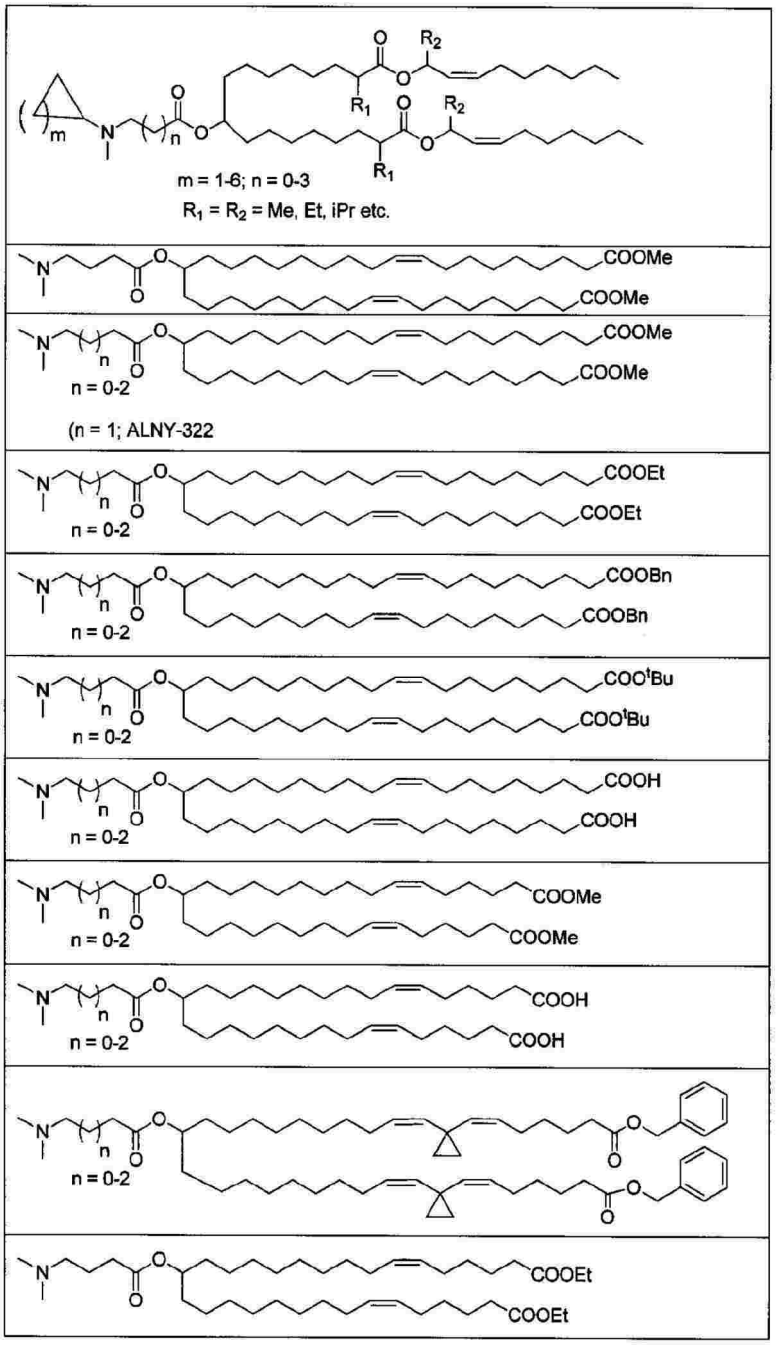
【０１７７】

【化７７】



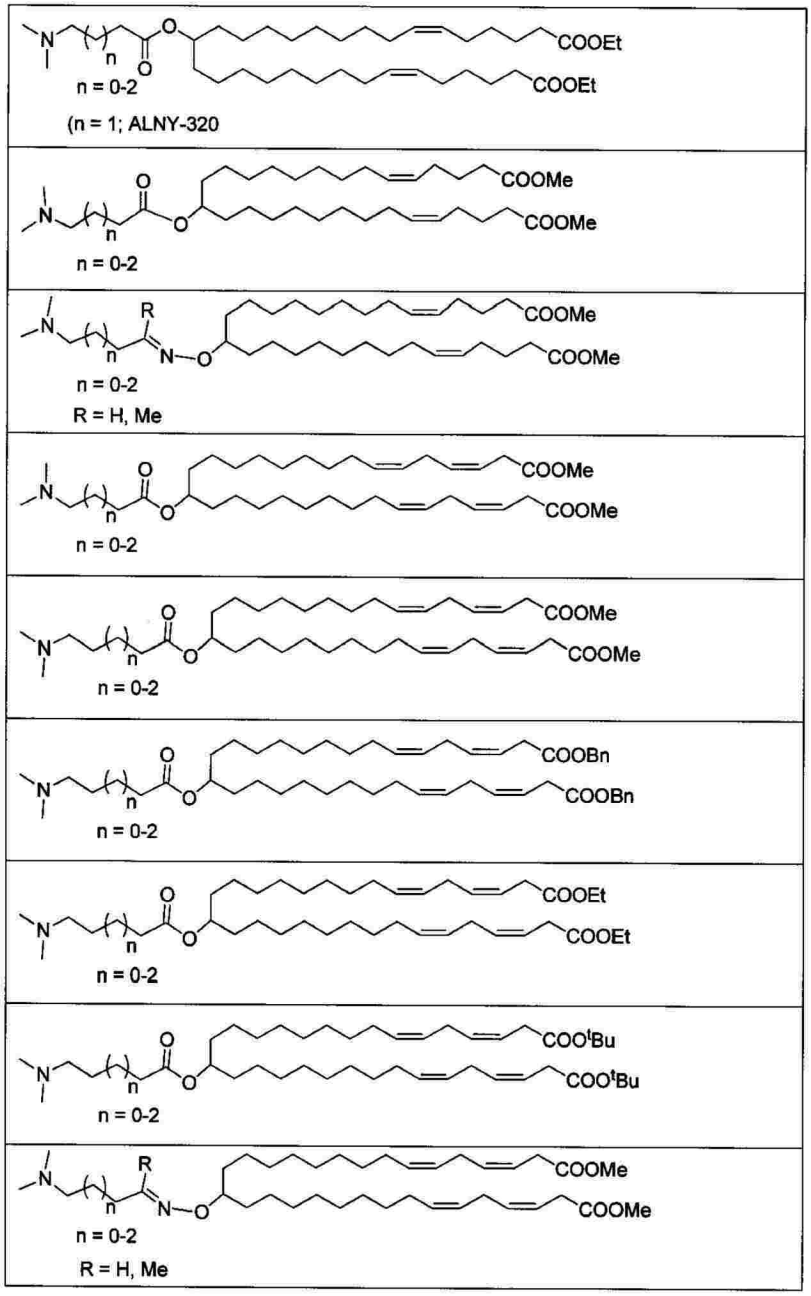
【０１７８】

【化７８】


m = 1-6; n = 0-3
R1 = R2 = Me, Et, iPr etc.
COOMe
COOMe
n = 0-2
(n = 1; ALNY-322
COOEt
COOBn
COO^{t}Bu
COOH
COOMe
COOH

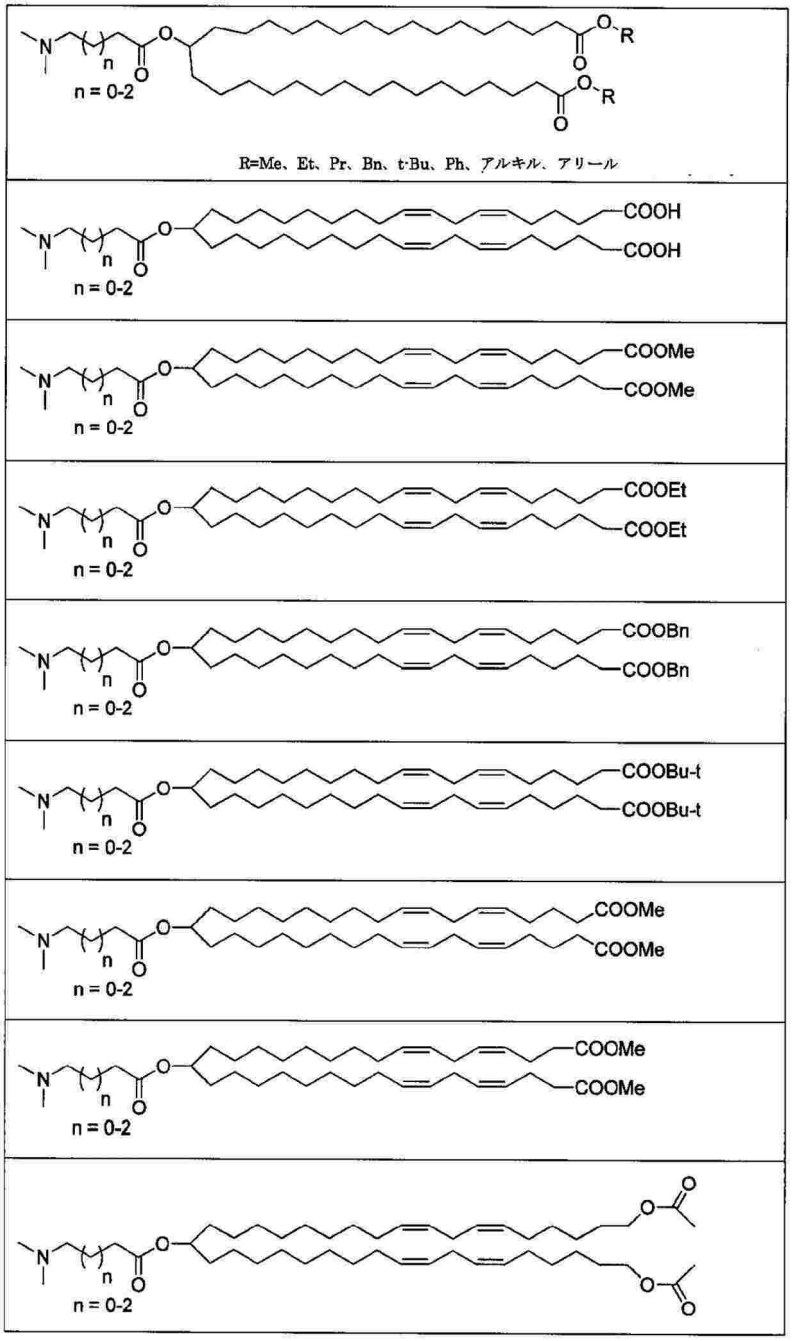
【０１７９】

【化７９】


n = 0-2
(n = 1; ALNY-320
COOEt
COOEt
n = 0-2
COOMe
COOMe
n = 0-2
R = H, Me
COOMe
COOMe
n = 0-2
COOMe
COOMe
n = 0-2
COOBn
COOBn
n = 0-2
COOEt
COOEt
n = 0-2
COO^{t}Bu
COO^{t}Bu
n = 0-2
COOMe
COOMe
n = 0-2
R = H, Me

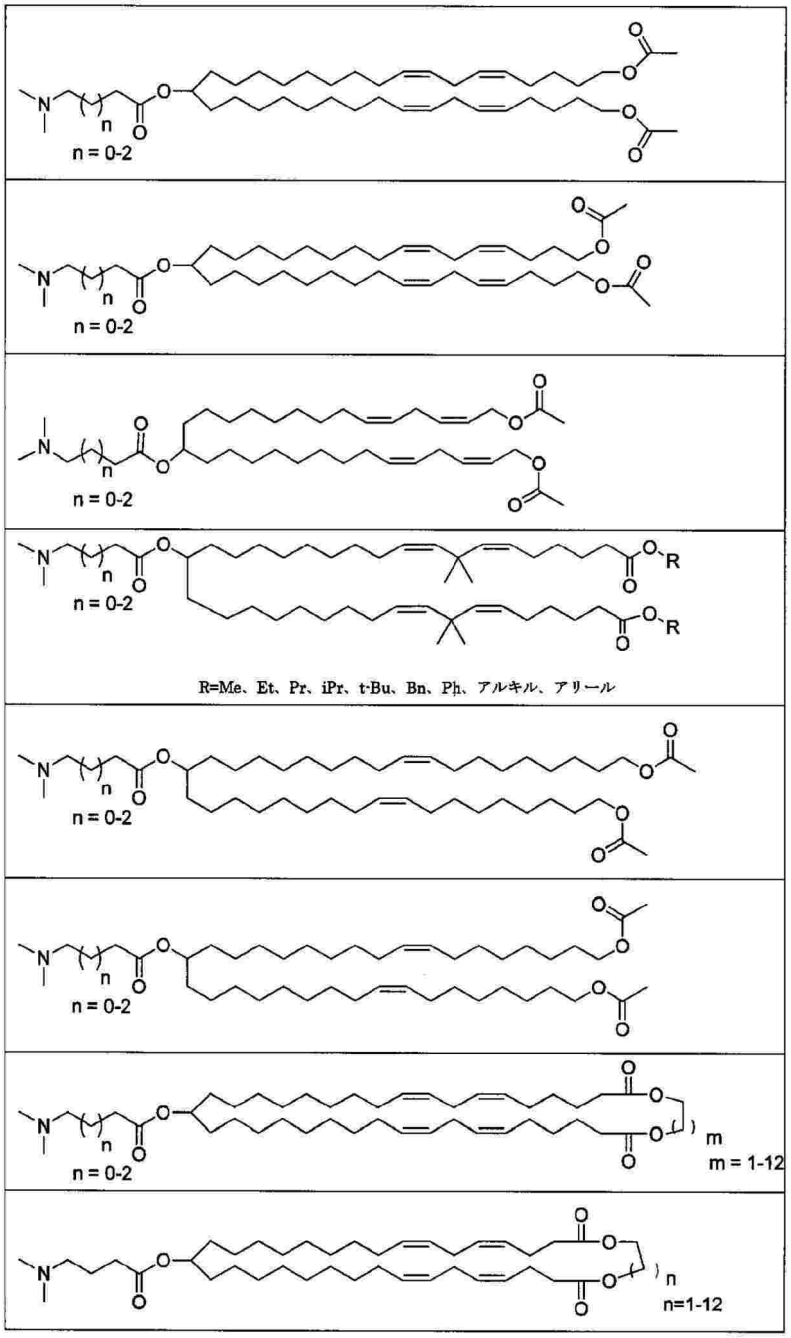
【０１８０】

【化８０】


n = 0-2
R=Me、Et、Pr、Bn、t-Bu、Ph、アルキル、アリール
COOH
COOMe
COOEt
COOBn
COOBu-t

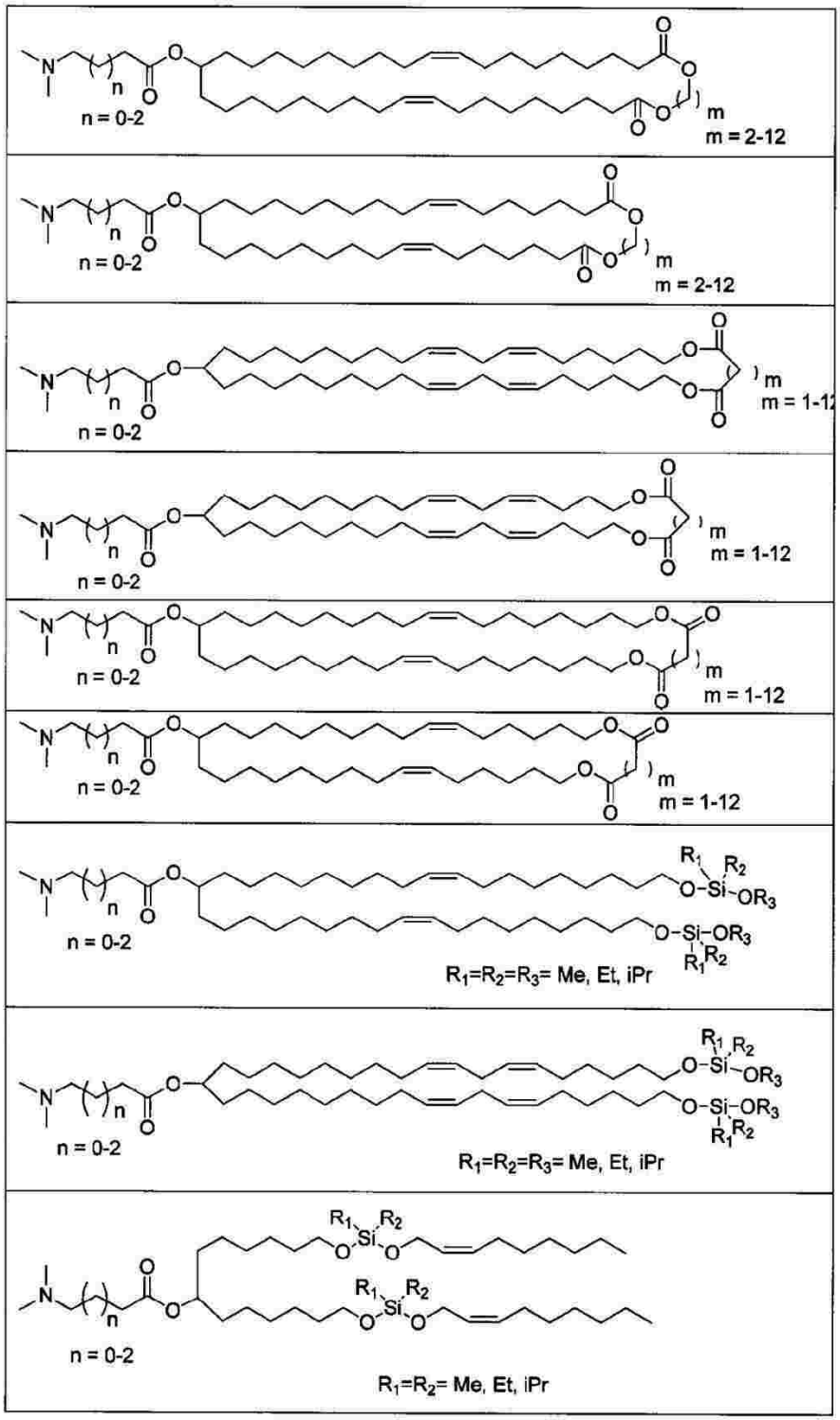
【０１８１】

【化８１】


n = 0-2
n = 0-2
n = 0-2
n = 0-2
R=Me、Et、Pr、iPr、t-Bu、Bn、Ph、アルキル、アリール
n = 0-2
n = 0-2
n = 0-2
m
m = 1-12
n
n=1-12

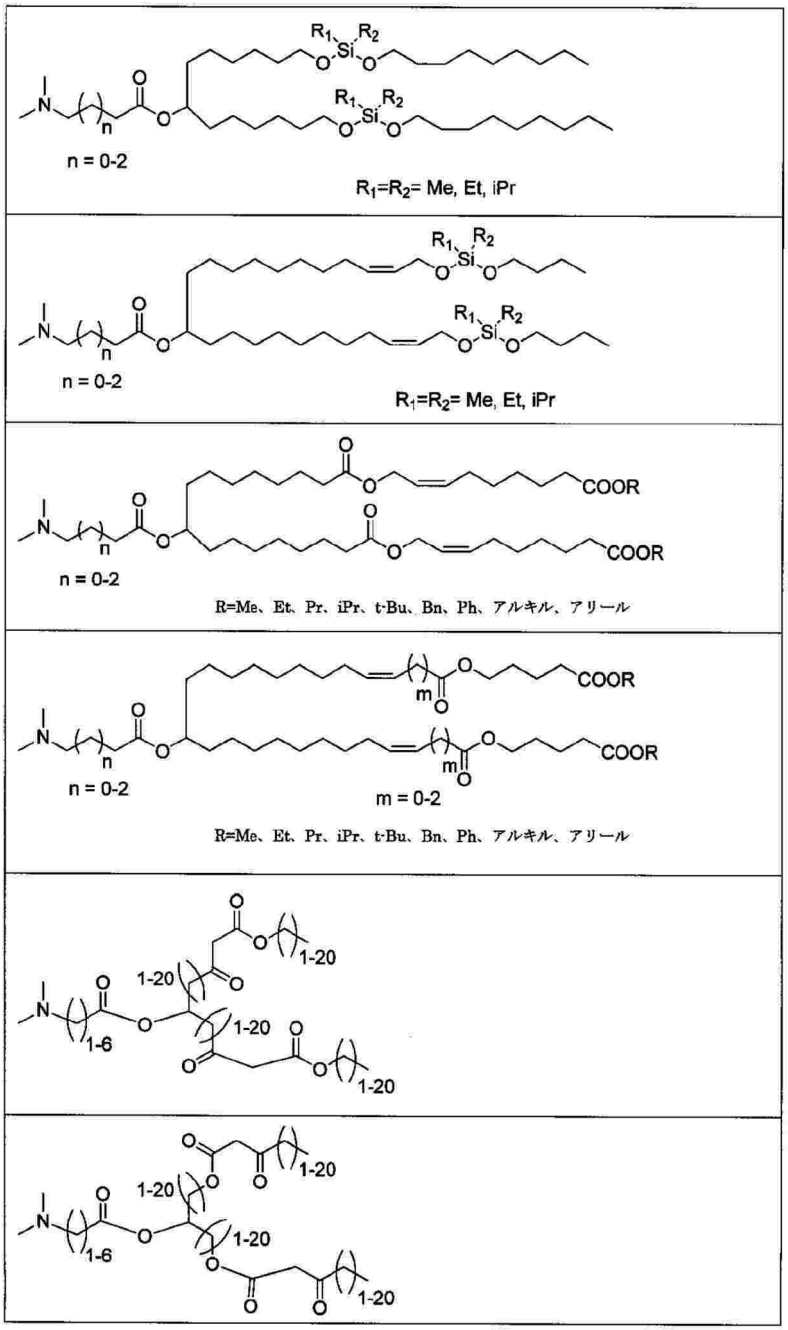
【０１８２】

【化８２】


n = 0-2
m = 2-12
n = 0-2
m = 2-12
n = 0-2
m = 1-12
n = 0-2
m = 1-12
n = 0-2
m = 1-12
n = 0-2
m = 1-12
n = 0-2
R1=R2=R3= Me, Et, iPr
n = 0-2
R1=R2=R3= Me, Et, iPr
n = 0-2
R1=R2= Me, Et, iPr

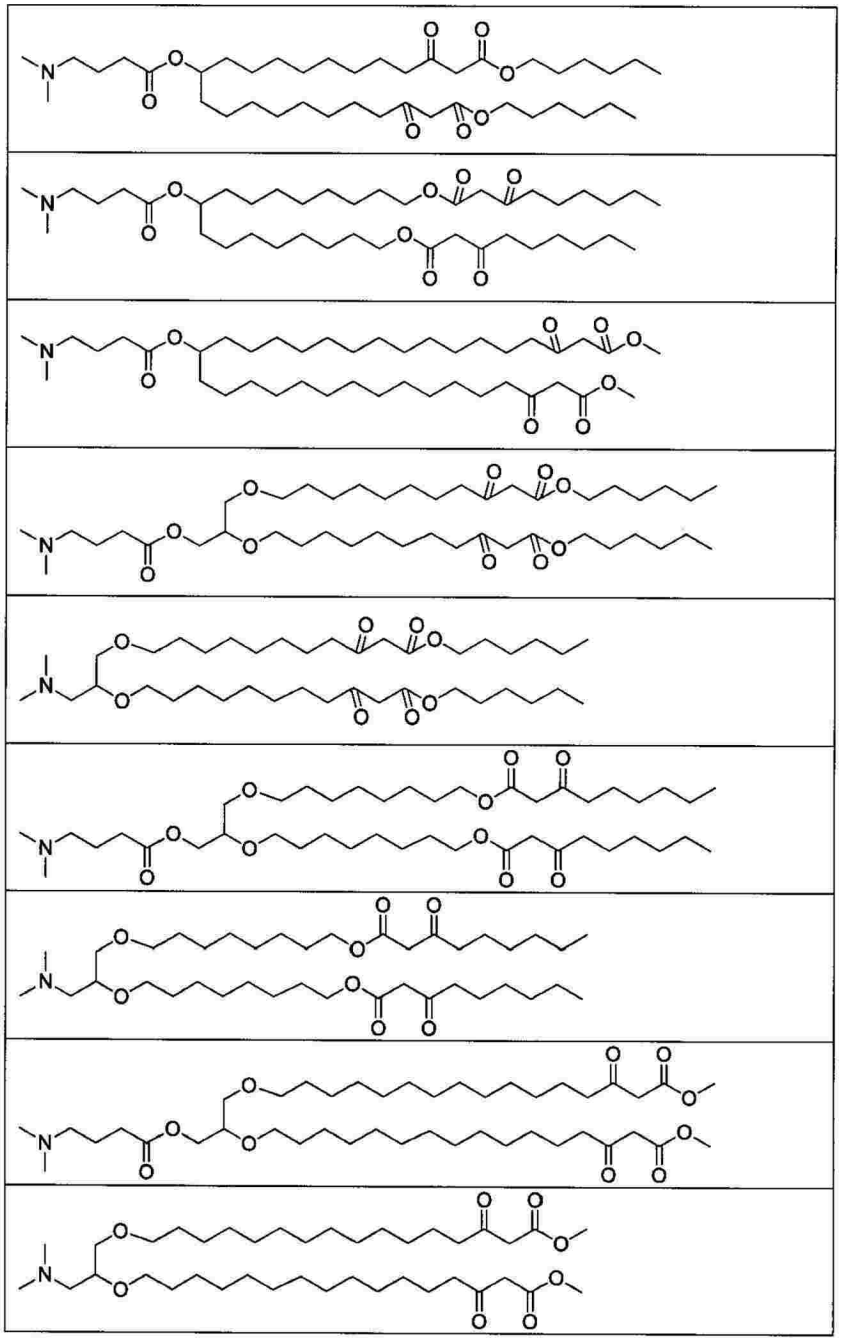
【０１８３】

【化８３】


n = 0-2
R1=R2= Me, Et, iPr
n = 0-2
R1=R2= Me, Et, iPr
COOR
COOR
n = 0-2
R=Me、Et、Pr、iPr、t-Bu、Bn、Ph、アルキル、アリール
COOR
COOR
n = 0-2
m = 0-2
R=Me、Et、Pr、iPr、t-Bu、Bn、Ph、アルキル、アリール
1-20
1-20
1-20
1-6
1-20
1-20
1-20
1-6
1-20

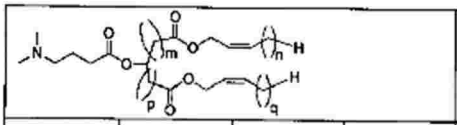
【０１８４】

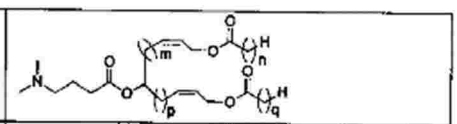
【化８４】



【０１８５】

【化８５】





m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	1	12	12	1	12	1
2	11	2	11	11	2	11	2
3	10	3	10	10	3	10	3
4	9	4	9	9	4	9	4
5	8	5	8	8	5	8	5
6	7	6	7	7	6	7	6
7	6	7	6	6	7	6	7
8	5	8	5	5	8	5	8
9	4	9	4	4	9	4	9
10	3	10	3	3	10	3	10
11	2	11	2	2	11	2	11
12	1	12	1	1	12	1	12
1	12	2	11	12	1	11	2
2	11	3	10	11	2	10	3
3	10	4	9	10	3	9	4
4	9	5	8	9	4	8	5
5	8	6	7	8	5	7	6
6	7	7	6	7	6	6	7
7	6	8	5	6	7	5	8
8	5	9	4	5	8	4	9
9	4	10	3	4	9	3	10
10	3	11	2	3	10	2	11
11	2	12	1	2	11	1	12
12	1	1	12	1	12	12	1
1	12	3	10	12	1	10	3
2	11	4	9	11	2	9	4
3	10	5	8	10	3	8	5
4	9	6	7	9	4	7	6
5	8	7	6	8	5	6	7
6	7	8	5	7	6	5	8
7	6	9	4	6	7	4	9

【０１８６】

【化８６】

8	5	10	3	5	8	3	10
9	4	11	2	4	9	2	11
10	3	12	1	3	10	1	12
11	2	2	11	2	11	11	2
12	1	4	9	1	12	10	3
1	12	4	9	12	1	9	4
2	11	5	8	11	2	8	5
3	10	6	7	10	3	7	6
4	9	7	6	9	4	6	7
5	8	8	5	8	5	5	8
6	7	9	4	7	6	4	9
7	6	10	3	6	7	3	10
8	5	11	2	5	8	2	11
9	4	12	1	4	9	1	12
10	3	2	11	3	10	11	2
11	2	3	10	2	11	10	3
12	1	4	9	1	12	11	2
1	12	5	8	12	1	8	5
2	11	6	7	11	2	7	6
3	10	7	6	10	3	6	7
4	9	8	5	9	4	5	8
5	8	9	4	8	5	4	9
6	7	10	3	7	6	3	10
7	6	11	2	6	7	2	11
8	5	12	1	5	8	1	12
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	10	3
11	2	4	9	2	11	11	2
12	1	5	8	1	12	12	1
1	12	6	7	12	1	7	6
2	11	7	6	11	2	6	7
3	10	8	5	10	3	5	8
4	9	9	4	9	4	4	9
5	8	10	3	8	5	3	10
6	7	11	2	7	6	2	11
7	6	12	1	6	7	1	12
8	5	2	11	5	8	11	2
9	4	3	10	4	9	10	3

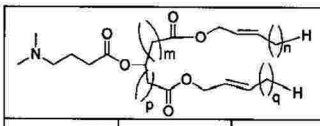
【０１８７】

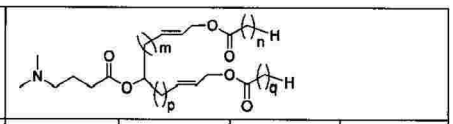
【化８７】

10	3	4	9	3	10	11	2
11	2	5	8	2	11	12	1
12	1	6	7	1	12	1	12
1	12	7	6	12	1	6	7
2	11	8	5	11	2	5	8
3	10	9	4	10	3	4	9
4	9	8	5	9	4	3	10
5	8	9	4	8	5	2	11
6	7	10	3	7	6	1	12
7	6	11	2	6	7	11	2
8	5	12	1	5	8	10	3
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	12	1
11	2	4	9	2	11	1	12
12	1	5	8	1	12	2	11

【０１８８】

【化８８】





m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	1	12	12	1	12	1
2	11	2	11	11	2	11	2
3	10	3	10	10	3	10	3
4	9	4	9	9	4	9	4
5	8	5	8	8	5	8	5
6	7	6	7	7	6	7	6
7	6	7	6	6	7	6	7
8	5	8	5	5	8	5	8
9	4	9	4	4	9	4	9
10	3	10	3	3	10	3	10
11	2	11	2	2	11	2	11
12	1	12	1	1	12	1	12
1	12	2	11	12	1	11	2
2	11	3	10	11	2	10	3
3	10	4	9	10	3	9	4
4	9	5	8	9	4	8	5
5	8	6	7	8	5	7	6
6	7	7	6	7	6	6	7
7	6	8	5	6	7	5	8
8	5	9	4	5	8	4	9
9	4	10	3	4	9	3	10
10	3	11	2	3	10	2	11
11	2	12	1	2	11	1	12
12	1	1	12	1	12	12	1
1	12	3	10	12	1	10	3
2	11	4	9	11	2	9	4
3	10	5	8	10	3	8	5
4	9	6	7	9	4	7	6
5	8	7	6	8	5	6	7
6	7	8	5	7	6	5	8
7	6	9	4	6	7	4	9

【０１８９】

【化８９】

8	5	10	3	5	8	3	10
9	4	11	2	4	9	2	11
10	3	12	1	3	10	1	12
11	2	2	11	2	11	11	2
12	1	4	9	1	12	10	3
1	12	4	9	12	1	9	4
2	11	5	8	11	2	8	5
3	10	6	7	10	3	7	6
4	9	7	6	9	4	6	7
5	8	8	5	8	5	5	8
6	7	9	4	7	6	4	9
7	6	10	3	6	7	3	10
8	5	11	2	5	8	2	11
9	4	12	1	4	9	1	12
10	3	2	11	3	10	11	2
11	2	3	10	2	11	10	3
12	1	4	9	1	12	11	2
1	12	5	8	12	1	8	5
2	11	6	7	11	2	7	6
3	10	7	6	10	3	6	7
4	9	8	5	9	4	5	8
5	8	9	4	8	5	4	9
6	7	10	3	7	6	3	10
7	6	11	2	6	7	2	11
8	5	12	1	5	8	1	12
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	10	3
11	2	4	9	2	11	11	2
12	1	5	8	1	12	12	1
1	12	6	7	12	1	7	6
2	11	7	6	11	2	6	7
3	10	8	5	10	3	5	8
4	9	9	4	9	4	4	9
5	8	10	3	8	5	3	10
6	7	11	2	7	6	2	11
7	6	12	1	6	7	1	12
8	5	2	11	5	8	11	2
9	4	3	10	4	9	10	3

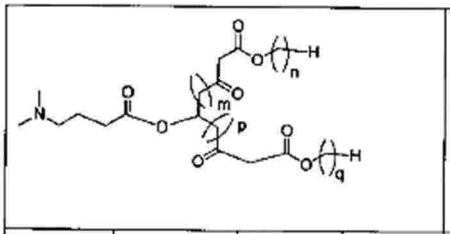
【０１９０】

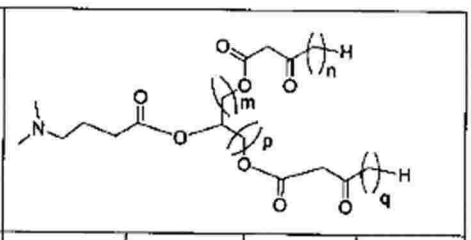
【化９０】

10	3	4	9	3	10	11	2
11	2	5	8	2	11	12	1
12	1	6	7	1	12	1	12
1	12	7	6	12	1	6	7
2	11	8	5	11	2	5	8
3	10	9	4	10	3	4	9
4	9	8	5	9	4	3	10
5	8	9	4	8	5	2	11
6	7	10	3	7	6	1	12
7	6	11	2	6	7	11	2
8	5	12	1	5	8	10	3
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	12	1
11	2	4	9	2	11	1	12
12	1	5	8	1	12	2	11

【０１９１】

【化９１】





m	n	p	q	m	n	p	q
1	13	1	13	1	13	1	13
2	12	2	12	2	12	2	12
3	11	3	11	3	11	3	11
4	10	4	10	4	10	4	10
5	9	5	9	5	9	5	9
6	8	6	8	6	8	6	8
7	7	7	7	7	7	7	7
8	6	8	6	8	6	8	6
9	5	9	5	9	5	9	5
10	4	10	4	10	4	10	4
11	3	11	3	11	3	11	3
12	2	12	2	12	2	12	2
13	1	13	1	13	1	13	1
1	13	2	12	1	13	2	12
2	12	3	11	2	12	3	11
3	11	4	10	3	11	4	10
4	10	5	9	4	10	5	9
5	9	6	8	5	9	6	8
6	8	7	7	6	8	7	7
7	7	8	6	7	7	8	6
8	6	9	5	8	6	9	5
9	5	10	4	9	5	10	4
10	4	11	3	10	4	11	3
11	3	12	2	11	3	12	2
12	2	13	1	12	2	13	1
13	1	1	13	13	1	1	13
1	13	3	11	1	13	3	11

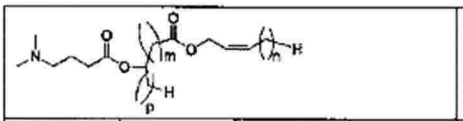
【０１９２】

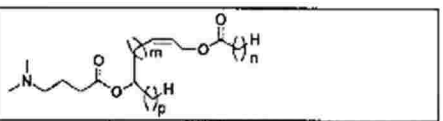
【化９２】

2	12	4	10	2	12	4	10
3	11	5	9	3	11	5	9
4	10	6	8	4	10	6	8
5	9	7	7	5	9	7	7
6	8	8	6	6	8	8	6
7	7	9	5	7	7	9	5
8	6	10	4	8	6	10	4
9	5	11	3	9	5	11	3
10	4	12	2	10	4	12	2
11	3	13	1	11	3	13	1
12	2	1	13	12	2	1	13
13	1	2	12	13	1	2	14

【０１９３】

【化９３】





m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	
8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	
10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	
7	6	16		6	7	16	

【０１９４】

【化９４】

8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	
9	4	14		4	9	14	
10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	
7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	

【０１９５】

【化９５】

10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	
6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	
8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	
10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	
6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	

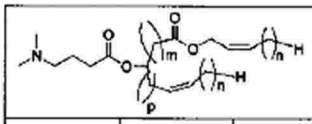
【０１９６】

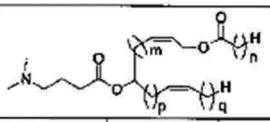
【化９６】

11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	
4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	
6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	
9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

【０１９７】

【化９７】





m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7
9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7
11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6
3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6

【０１９８】

【化９８】

8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6
12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4
8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4
10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3
3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3

【０１９９】

【化９９】

10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3
12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9
7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9
9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10
2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10

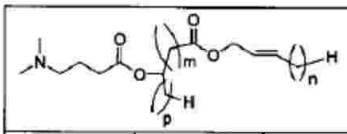
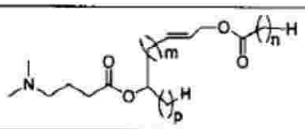
【０２００】

【化１００】

11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	5	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12
5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

【０２０１】

【化１０１】

							
m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	
8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	
10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	
7	6	16		6	7	16	

【０２０２】

【化１０２】

8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	
9	4	14		4	9	14	
10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	
7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	

【０２０３】

【化１０３】

10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	
6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	
8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	
10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	
6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	

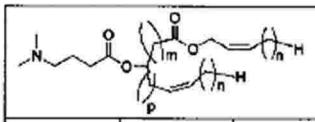
【０２０４】

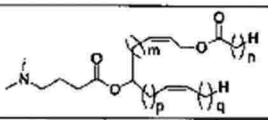
【化１０４】

11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	
4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	
6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	
9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

【０２０５】

【化１０５】





m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7
9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7
11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6
3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6

【０２０６】

【化１０６】

8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6
12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4
8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4
10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3
3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3

【０２０７】

【化１０７】

10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3
12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9
7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9
9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10
2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10

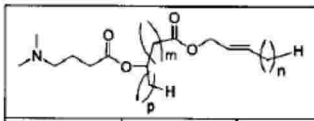
【０２０８】

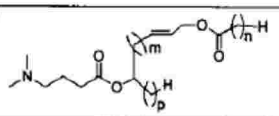
【化１０８】

11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	5	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12
5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

【０２０９】

【化１０９】





m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	
8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	
10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	
7	6	16		6	7	16	

【０２１０】

【化１１０】

8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	
9	4	14		4	9	14	
10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	
7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	

【０２１１】

【化１１１】

10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	
6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	
8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	
10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	
6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	

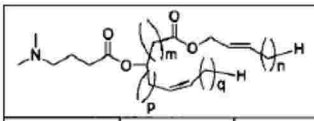
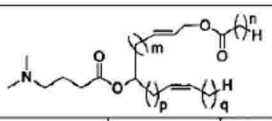
【０２１２】

【化１１２】

11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	
4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	
6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	
9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

【０２１３】

【化１１３】

m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7
9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7
11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6
3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6

【０２１４】

【化１１４】

8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6
12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4
8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4
10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3
3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3

【０２１５】

【化１１５】

10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3
12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9
7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9
9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10
2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10

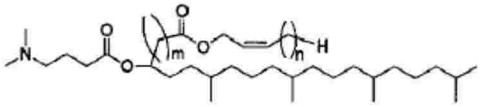
【０２１６】

【化１１６】

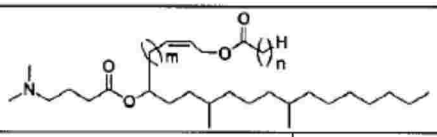
11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	5	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12
5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

【０２１７】

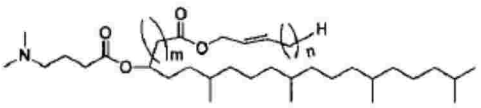
【化１１７】



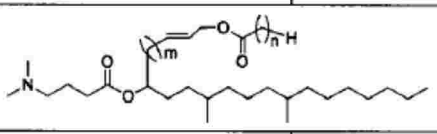
m	n
1	12
2	11
3	10
4	9
5	8
6	7
7	6
8	5
9	4
10	3
11	2
12	1



m	n
12	1
11	2
10	3
9	4
8	5
7	6
6	7
5	8
4	9
3	10
2	11
1	12



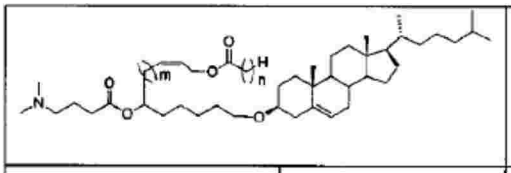
1	12
2	11
3	10
4	9
5	8
6	7
7	6
8	5
9	4
10	3
11	2
12	1



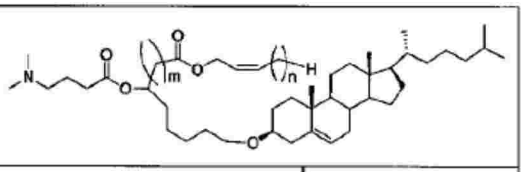
12	1
11	2
10	3
9	4
8	5
7	6
6	7
5	8
4	9
3	10
2	11
1	12

【０２１８】

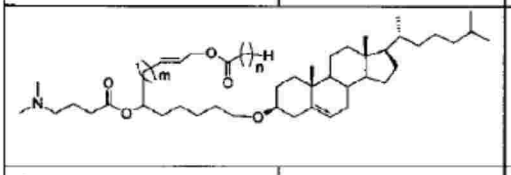
【化１１８】



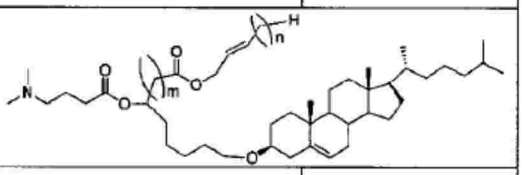
m	n
1	12
2	11
3	10
4	9
5	8
6	7
7	6
8	5
9	4
10	3
11	2
12	1



m	n
12	1
11	2
10	3
9	4
8	5
7	6
6	7
5	8
4	9
3	10
2	11
1	12



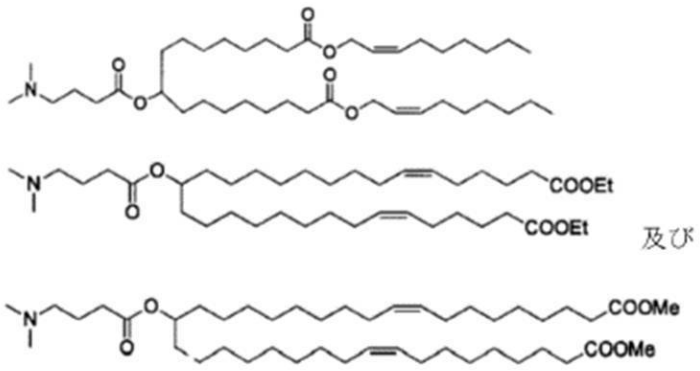
1	12
2	11
3	10
4	9
5	8
6	7
7	6
8	5
9	4
10	3
11	2
12	1



12	1
11	2
10	3
9	4
8	5
7	6
6	7
5	8
4	9
3	10
2	11
1	12

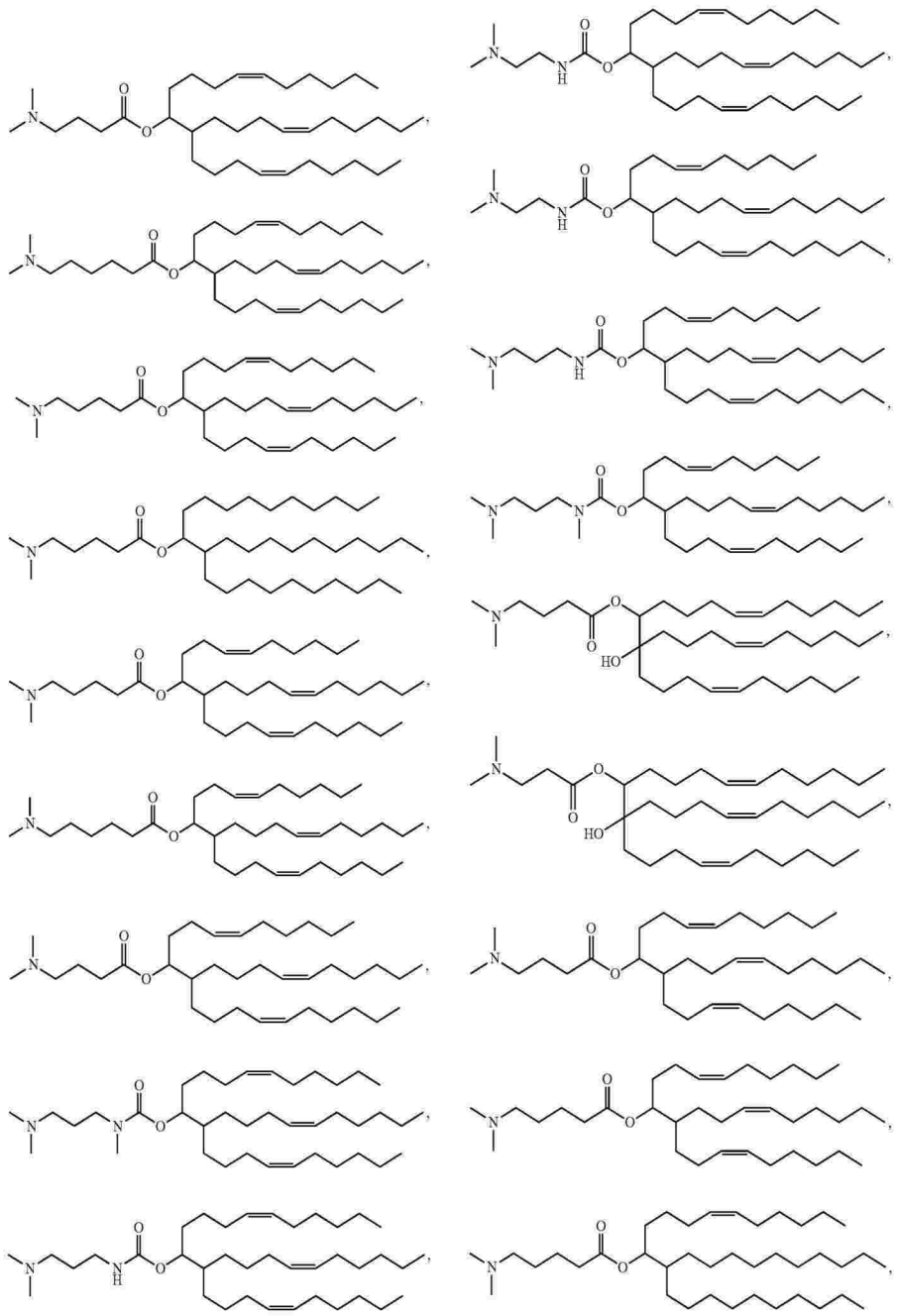
【０２１９】
及びそれらの塩。
【０２２０】
上記カチオン性脂質のうち、より好ましいものとして、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。
【０２２１】

【化１１９】



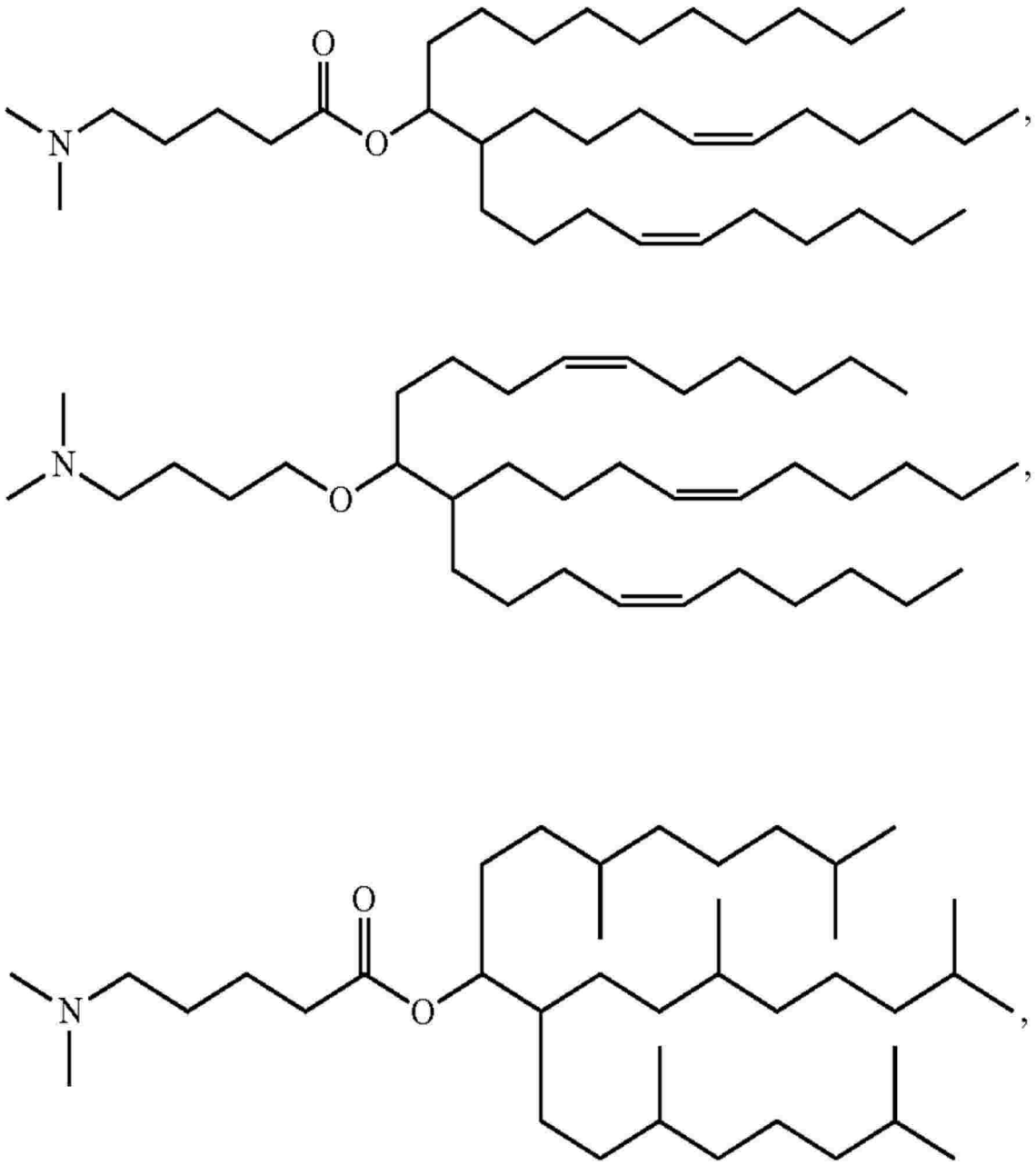
【０２２２】
並びにそれらの塩。
【０２２３】
別の実施態様においては、WO 2013/126803に記載の下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。
【０２２４】

【化１２０】



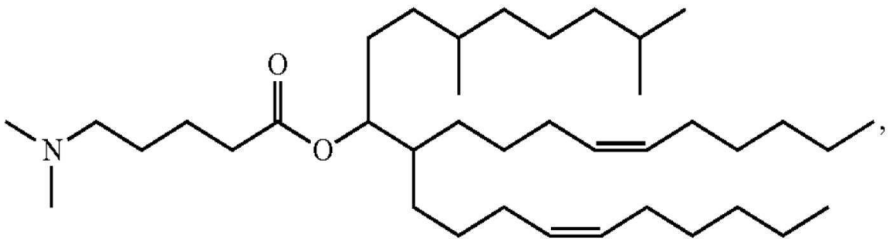
【０２２５】

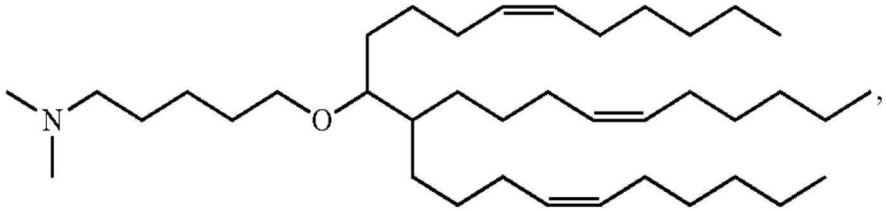
【化１２１】

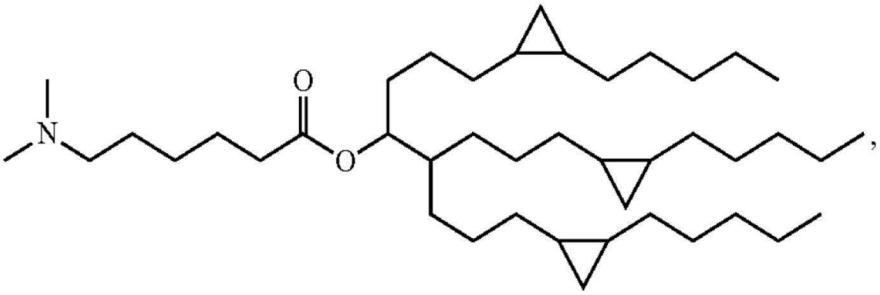


【０２２６】

【化１２２】

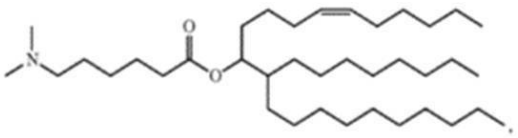


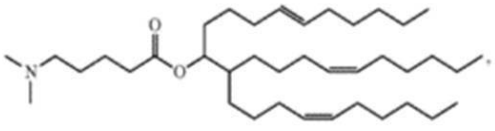




【０２２７】

【化１２３】

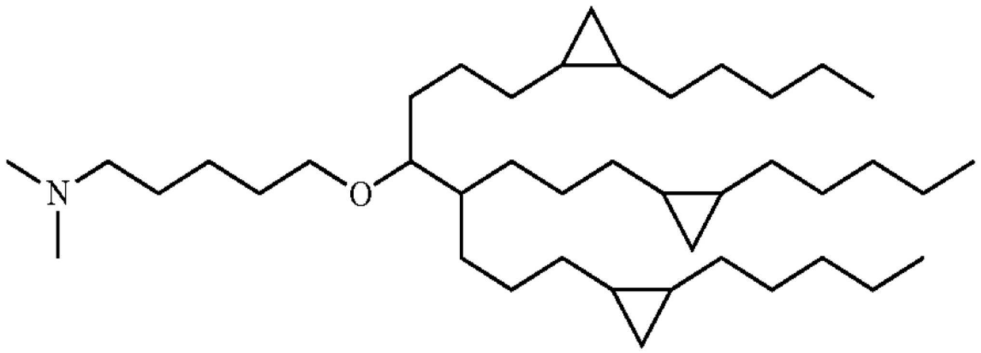




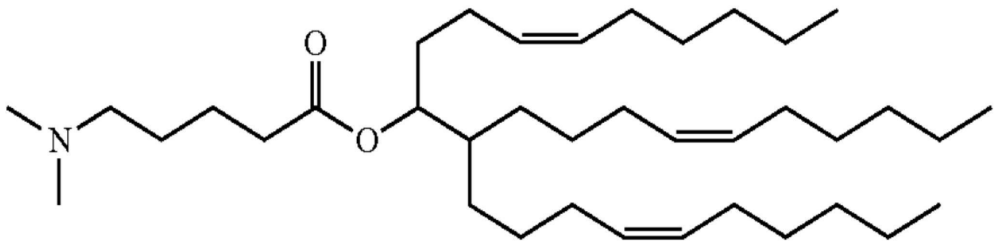
及び

【０２２８】

【化１２４】

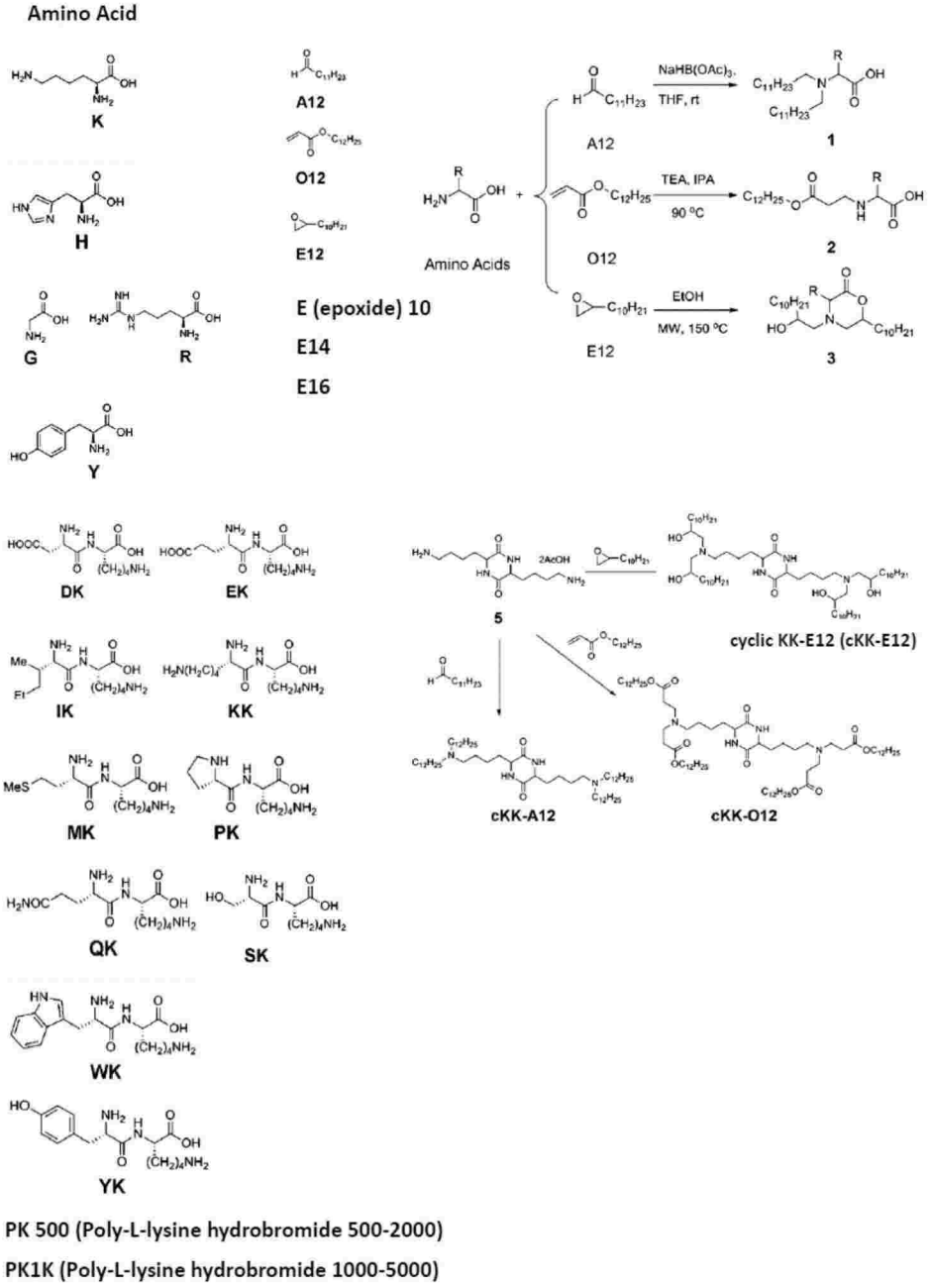


【０２２９】
並びにそれらの塩。
【０２３０】
上記カチオン性脂質のうち、より好ましいものとして、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。
【０２３１】
【化１２５】



【０２３２】
及びその塩。
【０２３３】
別の実施態様においては、Dongら（Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 15;111(15):5753）に記載の下記スキームにより合成されるカチオン性脂質K-E12、H-A12、Y-E12、G-O12、K-A12、R-A12、cKK-E12、cPK-E12、PK1K-E12、PK500-E12、cQK-E12、cKK-A12、KK-A12、PK-4K-E12、cWK-E12、PK500-O12、PK1K-O12、cYK-E12、cDK-E12、cSK-E12、cEK-E12、cMK-E12、cKK-O12、cIK-E12、cKK-E10、cKK-E14、及びcKK-E16が挙げられる。
【０２３４】

【化１２６】



【０２３５】

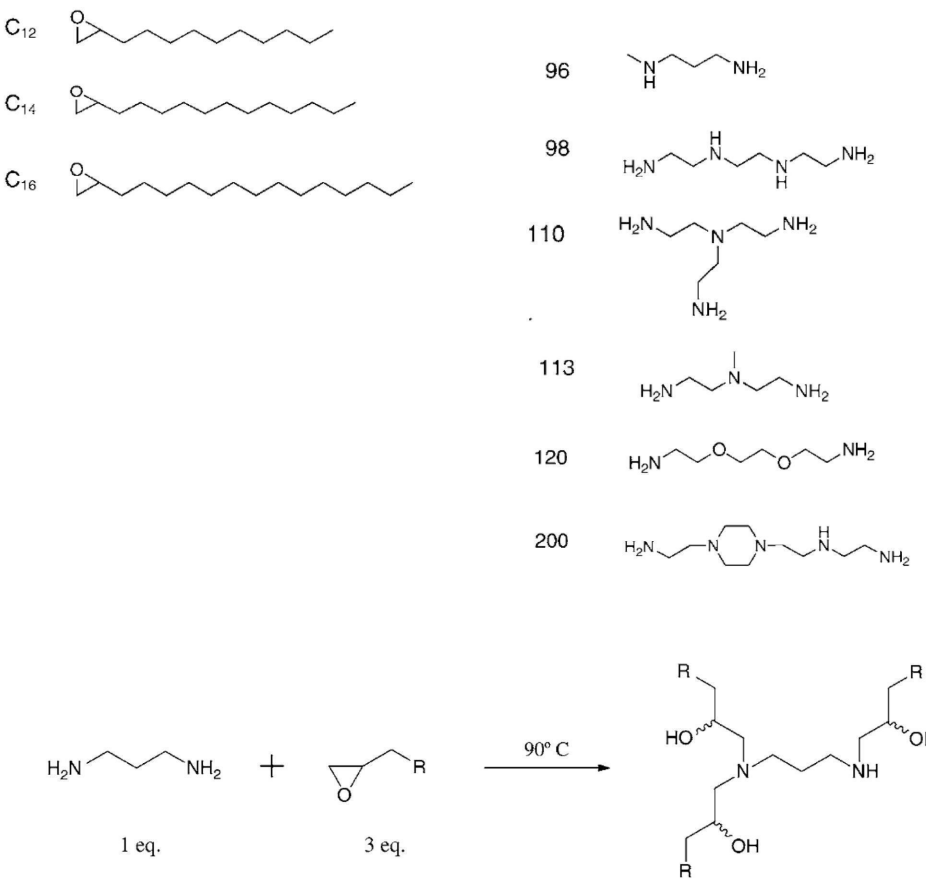
上記カチオン性脂質のうち、より好ましいものとして、cKK-E12、cKK-E14が挙げられる。

【０２３６】

別の実施態様においては、Love KTら（Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 May 25;107(21):9915）に記載の下記スキームにより合成されるカチオン性脂質C14-98、C18-96、C14-113、C14-120、C14-120、C14-110、C16-96、C12-200が挙げられる。

【０２３７】

【化１２７】



【０２３８】

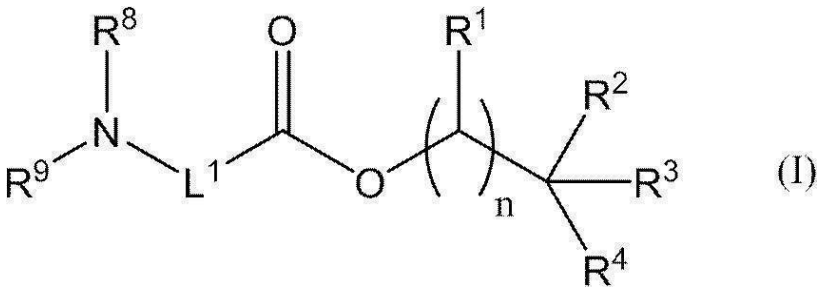
上記カチオン性脂質のうち、より好ましいものとして、C14-110、C16-96及びC12-200が挙げられる。

【０２３９】

特に好ましい実施態様においては、下記式（Ｉ）で表されるカチオン性脂質（以下、「化合物（Ｉ）」ともいう。）が挙げられる。

【０２４０】

【化１２８】



(I)

【０２４１】

[式中、

Ｌ^{1}は、Ｃ$_{1-22}$アルキレン基、Ｃ$_{2-22}$アルケニレン基またはＣ$_{3-22}$アルカジエニレン基であり、

ｎは、０または１の整数であり、

Ｒ^{1}は、

（１）水素原子、

（２）直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基および直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基、

（３）直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基および直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基、または
（４）直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基および直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{3-22}$アルカジエニル基であり、
Ｒ^{2}は、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{5}、－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－Ｏ－Ｒ^{5}または－Ｒ^{5}であり、
Ｒ^{3}は、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{6}、－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－Ｏ－Ｒ^{6}または－Ｒ^{6}であり、
Ｒ^{4}は、水素原子、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{7}、－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－Ｏ－Ｒ^{7}または－Ｒ^{7}であり、
Ｒ^{5}、Ｒ^{6}およびＲ^{7}は、それぞれ独立して、
（１）直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基および直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基、
（２）直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基および直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基、または
（３）直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基および直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{3-22}$アルカジエニル基であり、
Ｒ$_{8}$およびＲ$_{9}$は、それぞれ独立して、Ｃ$_{1-6}$アルキル基を示す]
又はその塩。

【０２４２】

Ｌ^{1}は、Ｃ$_{1-22}$アルキレン基、Ｃ$_{2-22}$アルケニレン基またはＣ$_{3-22}$アルカジエニレン基である。
Ｌ^{1}は、好ましくは、Ｃ$_{1-22}$アルキレン基である。
Ｌ^{1}は、より好ましくは、Ｃ$_{1-12}$アルキレン基である。
Ｌ^{1}は、さらに好ましくは、Ｃ$_{1-6}$アルキレン基である。

【０２４３】

ｎは、０または１の整数である。
ｎは、好ましくは、１の整数である。

【０２４４】

Ｒ^{1}は、
（１）水素原子、
（２）直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基および直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基、
（３）直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基および直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基、または、
（４）直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基および直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{3-22}$アルカジエニル基である。
Ｒ^{1}は、好ましくは、
（１）水素原子、
（２）１つまたは２つの直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{6-12}$アルキル基）で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{6-12}$アルキル基）、または、
（３）１つまたは２つの直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{6-12}$アルケニル基）で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{6-12}$アルケニル基）である。
Ｒ^{1}は、特に好ましくは、水素原子である。

【０２４５】

Ｒ^{2}は、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{5}、－ＣＨ$_{2}$－ＣＯ－Ｏ－Ｒ^{5}または－Ｒ^{5}である。

R^2は、好ましくは、$-CH_2-O-CO-R^5$または$-R^5$である。
R^2は、より好ましくは、$-CH_2-O-CO-R^5$である。

【０２４６】

R^3は、$-CH_2-O-CO-R^6$、$-CH_2-CO-O-R^6$または$-R^6$である。
R^3は、好ましくは、$-CH_2-O-CO-R^6$または$-R^6$である。
R^3は、より好ましくは、$-CH_2-O-CO-R^6$である。

【０２４７】

R^4は、水素原子、$-CH_2-O-CO-R^7$、$-CH_2-CO-O-R^7$または$-R^7$である。
R^4は、好ましくは、水素原子または$-CH_2-O-CO-R^7$である。
R^4は、より好ましくは、$-CH_2-O-CO-R^7$である。

【０２４８】

R^5、R^6およびR^7は、それぞれ独立して、
（１）直鎖状のC_{1-22}アルキル基および直鎖状のC_{2-22}アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のC_{1-22}アルキル基、
（２）直鎖状のC_{1-22}アルキル基および直鎖状のC_{2-22}アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のC_{2-22}アルケニル基、または
（３）直鎖状のC_{1-22}アルキル基および直鎖状のC_{2-22}アルケニル基から選ばれる１つまたは２つの置換基で置換されていてもよい直鎖状のC_{3-22}アルカジエニル基である。
R^5、R^6およびR^7は、それぞれ独立して、好ましくは、
（１）１つまたは２つの直鎖状のC_{1-22}アルキル基（好ましくは直鎖状のC_{1-10}アルキル基）で置換されていてもよい直鎖状のC_{1-22}アルキル基（好ましくは直鎖状のC_{4-18}アルキル基）、
（２）直鎖状のC_{2-22}アルケニル基（好ましくは直鎖状のC_{4-18}アルケニル基）、または
（３）直鎖状のC_{3-22}アルカジエニル基（好ましくは直鎖状のC_{4-18}アルカジエニル基）である。
R^5、R^6およびR^7は、それぞれ独立して、より好ましくは、
（１）１つまたは２つの直鎖状のC_{1-22}アルキル基（好ましくは直鎖状のC_{1-10}アルキル基）で置換されていてもよい直鎖状のC_{1-22}アルキル基（好ましくは直鎖状のC_{4-18}アルキル基）、または
（２）直鎖状のC_{2-22}アルケニル基（好ましくは直鎖状のC_{4-18}アルケニル基）である。

【０２４９】

R_8およびR_9は、それぞれ独立して、C_{1-6}アルキル基である。
R_8およびR_9は、それぞれ独立して、C_{1-3}アルキル基（好ましくはメチル）である。

【０２５０】

好ましくは、化合物（Ｉ）は、上記式（Ｉ）において、
L^1が、C_{1-22}アルキレン基（好ましくはC_{1-12}アルキレン基、より好ましくはC_{1-6}アルキレン基）であり、
ｎが、１の整数であり、
R^1が、
（１）水素原子、
（２）１つまたは２つの直鎖状のC_{1-22}アルキル基（好ましくは直鎖状のC_{6-12}アルキル基）で置換されていてもよい直鎖状のC_{1-22}アルキル基（好ましくは直鎖状のC_{6-12}アルキル基）、または、
（３）１つまたは２つの直鎖状のC_{2-22}アルケニル基（好ましくは直鎖状のC_{6-12}アルケニル基）で置換されていてもよい直鎖状のC_{2-22}アルケニル基（好ましくは直鎖

状のＣ$_{6-12}$アルケニル基）であり、
Ｒ^{2}が、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{5}または－Ｒ^{5}であり、
Ｒ^{3}が、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{6}または－Ｒ^{6}であり、
Ｒ^{4}が、水素原子または－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{7}であり、
Ｒ^{5}、Ｒ^{6}およびＲ^{7}が、それぞれ独立して、
（１）１つまたは２つの直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{1-10}$アルキル基）で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{4-18}$アルキル基）、
（２）直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{4-18}$アルケニル基）、または
（３）直鎖状のＣ$_{3-22}$アルカジエニル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{4-18}$アルカジエニル基）であり、かつ
Ｒ$_{8}$およびＲ$_{9}$が、それぞれ独立して、Ｃ$_{1-6}$アルキル基（好ましくはＣ$_{1-3}$アルキル基、特に好ましくはメチル）である、
化合物である。
【０２５１】
より好ましくは、化合物（Ｉ）は、上記式（Ｉ）において、
Ｌ^{1}が、Ｃ$_{1-12}$アルキレン基（好ましくはＣ$_{1-6}$アルキレン基）であり、
ｎが、１の整数であり、
Ｒ^{1}が、水素原子であり、
Ｒ^{2}が、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{5}であり、
Ｒ^{3}が、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{6}であり、
Ｒ^{4}が、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{7}であり、
Ｒ^{5}、Ｒ^{6}およびＲ^{7}が、それぞれ独立して、
（１）１つまたは２つの直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{1-10}$アルキル基）で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{4-18}$アルキル基）、
（２）直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{4-18}$アルケニル基）、または
（３）直鎖状のＣ$_{3-22}$アルカジエニル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{4-18}$アルカジエニル基）であり、かつ
Ｒ$_{8}$およびＲ$_{9}$が、それぞれ独立して、Ｃ$_{1-6}$アルキル基（好ましくはＣ$_{1-3}$アルキル基、特に好ましくはメチル）である、
化合物である。
【０２５２】
より好ましくは、化合物（Ｉ）は、上記式（Ｉ）において、
Ｌ^{1}が、Ｃ$_{1-6}$アルキレン基であり、
ｎが、１の整数であり、
Ｒ^{1}が、水素原子であり、
Ｒ^{2}が、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{5}であり、
Ｒ^{3}が、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{6}であり、
Ｒ^{4}が、－ＣＨ$_{2}$－Ｏ－ＣＯ－Ｒ^{7}であり、
Ｒ^{5}、Ｒ^{6}およびＲ^{7}が、それぞれ独立して、
（１）１つまたは２つの直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{1-10}$アルキル基）で置換されていてもよい直鎖状のＣ$_{1-22}$アルキル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{4-18}$アルキル基）、または
（２）直鎖状のＣ$_{2-22}$アルケニル基（好ましくは直鎖状のＣ$_{4-18}$アルケニル基）であり、かつ
Ｒ$_{8}$およびＲ$_{9}$が、それぞれ独立して、Ｃ$_{1-3}$アルキル基（好ましくはメチル）である、
化合物である。

【０２５３】
上記の各構造式で表される化合物の塩としては、薬理学的に許容される塩が好ましく、例えば、無機塩基との塩（例、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩、アンモニウム塩）、有機塩基との塩（例、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン［トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン］、ｔｅｒｔ－ブチルアミン、シクロヘキシルアミン、ベンジルアミン、ジシクロヘキシルアミン、Ｎ,Ｎ－ジベンジルエチレンジアミンとの塩）、無機酸との塩（例、フッ化水素酸、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸との塩）、有機酸との塩（ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸との塩）、塩基性アミノ酸との塩（アルギニン、リジン、オルニチンとの塩）又は酸性アミノ酸との塩（アスパラギン酸、グルタミン酸との塩）が挙げられる。

【０２５４】
本発明の脂質ナノ粒子中に存在する全脂質に占めるカチオン性脂質の比率（モル％）は、例えば、約１０％～約８０％、好ましくは約２０％～約７０％、より好ましくは約４０％～約６０％であるが、それらに限定されない。
上記のカチオン性脂質は１種のみを用いてもよいし、２種以上を組み合わせて用いてもよい。複数のカチオン性脂質を用いる場合、カチオン性脂質全体として前記の比率となることが好ましい。

【０２５５】
（ｃ）非カチオン性脂質
本明細書において、「非カチオン性脂質」とは、カチオン性脂質以外の脂質を意味し、生理学的pHなどの選択したpHにおいて、正味の正電荷を持たない脂質である。本発明の脂質ナノ粒子に使用される非カチオン性脂質としては、例えば、リン脂質、ステロイド類、ＰＥＧ脂質等が挙げられる。

【０２５６】
リン脂質としては、例えば、標的免疫細胞内へのCAR又は外因性TCRをコードする核酸の送達性を高めるべく、核酸を安定に保持してかつ、細胞膜（原形質膜及びオルガネラ膜）との融合を阻害しないものであれば特に限定されず、例えば、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、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、またはジリノレノイルホスファチジルコリン等が挙げられる。

【０２５７】
好ましいリン脂質としては、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、パルミトイルオレヨールホスファチジルグリセロール（POPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（POPE）、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン‐1-カルボキシレート（DOPE-mal）が挙げられ、より好ましくは、DOPC、DPPC、POPC、およびDOPEである。

【０２５８】
本発明の脂質ナノ粒子中に存在する全脂質に占めるリン脂質の比率（モル％）は、例えば、約０％～約９０％、好ましくは約５％～約３０％、より好ましくは約８％～約１５％であり得る。

上記のリン脂質は１種のみを用いてもよいし、２種以上を組み合わせて用いてもよい。複数のリン脂質を用いる場合、リン脂質全体として前記の比率となることが好ましい。

【０２５９】

ステロイド類としては、コレステロール、５α‐コレスタノール、５β‐コプロスタノール、コレステリル‐（２’－ヒドロキシ）－エチルエーテル、コレステリル‐（４’－ヒドロキシ）－ブチルエーテル、６－ケトコレスタノール、５α‐コレスタン、コレステノン、５α‐コレスタノン、５β‐コレスタノン、コレステリルデカノエートが挙げられ、好ましくはコレステロールである。

【０２６０】

本発明の脂質ナノ粒子中に存在する全脂質に占めるステロイド類の比率（モル％）は、存在する場合、例えば約１０％～約６０％、好ましくは約１２％～約５８％、より好ましくは約２０％～約５５％であり得る。

上記のステロイド類は１種のみを用いてもよいし、２種以上を組み合わせて用いてもよい。複数のステロイド類を用いる場合、ステロイド類全体として前記の比率となることが好ましい。

【０２６１】

本明細書において「PEG脂質」とは、ポリエチレングリコール（PEG）と脂質との任意の複合体を意味する。PEG脂質としては、例えば、本発明の脂質ナノ粒子の凝集を抑制し得る効果を有するものであれば特に限定されず、例えば、ジアルキルオキシプロピルと結合したPEG（PEG-DAA）、ジアシルグリセロールと結合したPEG（PEG-DAG）(例えば、SUNBRIGHT GM-020（日油）)、ホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質と結合したPEG（PEG-PE）、セラミドとコンジュゲートしたPEG（PEG-Cer）、コレステロールとコンジュゲートしたPEG（PEG-cholesterol）又はこれらの誘導体、又はこれらの混合物、mPEG2000-1,2-ジ-O-アルキル-sn3-カルボモイルグリセリド（PEG-C-DOMG）、1-[8’-(1,2-ジミリストイル-3-プロパノキシ)-カルボキサミド-3’,6-ジオキサオクタニル]カルバモイル-ω-メチル-ポリ(エチレングリコール)（２KPEG-DMG）等が挙げられる。好ましいPEG脂質としては、PEG-DGA、PEG-DAA、PEG-PE、PEG-Cer、及びこれらの混合物が挙げられ、より好ましくは、PEG-ジデシルオキシプロピルコンジュゲート、PEG-ジラウリルオキシプロピルコンジュゲート、PEG-ジミリスチルオキシプロピルコンジュゲート、PEG-ジパルミチルオキシプロピルコンジュゲート、PEG-ジステアリルオキシプロピルコンジュゲートからなる群から選択されるPEG-DAAコンジュゲート、及びそれらの混合物である。

ＰＥＧの自由末端としてはメトキシ基の他に、後述するＴ細胞標的化リガンドを結合するためのマレイミド基やＮ－ヒドロキシスクシンイミジル基等を用いることができる。Ｔ細胞標的化リガンドを結合するための官能基を有するＰＥＧ脂質（本明細書中「末端反応性ＰＥＧ脂質」という場合がある）としては、例えばＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＤＳＰＥ－０２０ＭＡや、ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＤＳＰＥ－０２０ＭＡ（日油）を用いることができる。

【０２６２】

本発明の脂質ナノ粒子中に存在する全脂質に占めるＰＥＧ脂質の比率（モル％）は、例えば、約０％～約２０％、好ましくは約０．１％～約５％、より好ましくは約０．７％～約２％であり得る。

上記の全ＰＥＧ脂質に占める末端反応性ＰＥＧ脂質の比率（モル％）は、例えば、約１０％～約１００％、好ましくは約２０％～約１００％、より好ましくは約３０％～約１００％であり得る。

上記のPEG脂質は１種のみを用いてもよいし、２種以上を組み合わせて用いてもよい。複数のPEG脂質を用いる場合、PEG脂質全体として前記の比率となることが好ましい。

【０２６３】

本発明の脂質ナノ粒子は、免疫細胞、特に獲得免疫のうち細胞性免疫を担うＴ細胞や、自然免疫を担うＮＫ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等、並びにＮＫ細胞の性質を有するＴ細胞であるＮＫＴ細胞に、ＣＡＲ又は外因性ＴＣＲを遺伝子導入し、発現させる

のに使用される。従って、本発明の脂質ナノ粒子は、特にin vivoで標的免疫細胞に効率よく送達されるために、脂質ナノ粒子を免疫細胞、特にＴ細胞へ標的化し得るリガンドを、さらに含有することができる。

【０２６４】

（ｄ）脂質ナノ粒子をＴ細胞へ標的化し得るリガンド

本発明の脂質ナノ粒子をＴ細胞へ標的化し得るリガンドとしては、Ｔ細胞で特異的に又は高発現している表面分子を特異的に認識し得るものであれば、特に制限はないが、好ましくは、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８又はＣＤ２８に対する抗体の１つ以上の抗原結合ドメインを含むものであり、さらに好ましい例としては抗ＣＤ３抗体及び／又は抗ＣＤ２８抗体の抗原結合ドメインを含むものが挙げられる。また、特にin vivoでのT細胞への送達における好ましい例として、抗ＣＤ３抗体の抗原結合ドメインのみを含むものが挙げられる。ここで「抗原結合ドメイン」とは、前記ＣＡＲを構成する抗原結合ドメインと同義であるが、ＣＡＲはそれをコードする核酸として調製する必要があるため制約があり、通常は一本鎖抗体を用いる場合が多いが、Ｔ細胞標的化リガンドとしての抗原結合ドメインは、タンパク質の状態で本発明の脂質ナノ粒子に含有させるので、一本鎖抗体だけでなく、例えば、完全抗体分子、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、Ｆｖ、還元抗体（ｒＩｇＧ）、ｄｓＦｖ、ｓＦｖ、ダイアボディ、トリアボディ等の他の任意の抗体フラグメントも、好ましく使用することができる。特にin vivoでの標的免疫細胞への送達においては、Fc部分を有さないＦａｂ’を好ましく使用することができる。これらの抗体フラグメントは、完全抗体（例、ＩｇＧ）を還元剤（例、２－メルカプトエタノール、ジチオスレイトール）やペプチダーゼ（例、パパイン、ペプシン、フィシン）で処理することにより、あるいは遺伝子組換え操作を用いて調製することができる。

【０２６５】

Ｔ細胞標的化リガンドが、完全抗体分子であれば、市販の抗ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２８抗体等を用いることもでき、あるいは該抗体を産生する細胞の培養液から単離することもできる。一方、該リガンドが、前記いずれかの抗原結合ドメイン（抗体フラグメント）の場合には、前記ＣＡＲを構成する抗原結合ドメインをコードする核酸を取得するのと同様の方法により、抗ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２８抗体等の抗原結合ドメインをコードする核酸を単離し、それを用いて該抗原結合ドメインを組換え生産することができる。

【０２６６】

本発明の脂質ナノ粒子において、Ｔ細胞標的化リガンドは、該脂質ナノ粒子の表面上に存在する限り、いかなる様式によって外殻と結合していてもよいが、例えば、非カチオン性脂質として末端反応性ＰＥＧ脂質を含む場合には、ＰＥＧの末端に付加することができる。例えば、末端にマレイミド基を導入したＰＥＧ脂質（例、ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＤＳＰＥ－０２０ＭＡ）と、上記の還元抗体のチオール基とを反応させることにより、リガンド（抗体）で標識された脂質ナノ粒子（「抗体-LNP」という場合がある）を調製することができる。

【０２６７】

本発明の脂質ナノ粒子をＴ細胞以外の免疫細胞、例えば、ＮＫ細胞や樹状細胞等への遺伝子導入に使用する場合、それらの免疫細胞へ標的化するためのリガンドを脂質ナノ粒子表面に有しなくとも、効率よく脂質ナノ粒子を送達させ得るが、各免疫細胞の表面に発現する分子に対する適当な標的化リガンドを脂質ナノ粒子表面に有していてもよい。例えば、ＮＫ細胞の場合、ＣＤ１６、ＣＤ５６に対する抗体の抗原結合ドメインを含むもの等が挙げられるが、それらに限定されない。

【０２６８】

２．本発明の脂質ナノ粒子の製造

本発明の脂質ナノ粒子は、例えば、ＵＳ９，４０４，１２７に記載される方法を用いて製造することができる。脂質ナノ粒子がＴ細胞標的化リガンドをさらに含む場合には、脂質ナノ粒子を作製後にＴ細胞標的化リガンドを化学結合することにより製造することがで

きる。あるいは、ＷＯ２０１６／０２１６８３に記載されるように、例えば、上記成分（ｂ）と（ｃ）を溶解した有機溶媒溶液を調製し、（ａ）を溶解した水もしくは緩衝液と混合することにより脂質ナノ粒子を作成した後に、Ｔ細胞標的化リガンドを化学結合することにより製造することができる。カチオン性脂質、リン脂質、コレステロール及びＰＥＧ脂質の混合比（モル比）としては、例えば、４０～６０：０～２０：０～５０：０～５が挙げられるが、それらに限定されない。また、非カチオン性脂質としてＰＥＧ脂質を配合し、Ｔ細胞標的化リガンドをＰＥＧの末端に付加する場合、ＰＥＧ脂質と該リガンドとの配合比（モル比）は、例えば、２０：１～１：２０であり得る。上記ＰＥＧ脂質には末端反応性ＰＥＧを比率（モル％）として約１０％～約１００％で含み得る。上記混合は、ピペットや微小流体混合システム（例えば、Ａｓｉａ ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃ ｓｙｓｔｅｍ（Ｓｙｒｒｉｓ）やＮａｎｏａｓｓｅｍｂｌｒ（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ））を用いて行うことができる。得られた脂質粒子は、ゲルろ過による精製や、透析および滅菌ろ過に付してもよい。

有機溶媒溶液中の全脂質成分の濃度は、好ましくは０．５～１００ｍｇ／ｍＬである。

【０２６９】

有機溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、tert－ブタノール、アセトン、アセトニトリル、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、またはこれらの混合物が挙げられる。該有機溶媒は、０～２０％の水もしくは緩衝液を含有してもよい。緩衝液としては、酸性緩衝液（例えば、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液）や、中性緩衝液（例えば、４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Ｔｒｉｓ）緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水(ＰＢＳ)）が挙げられる。

【０２７０】

微小流体混合システムを用いて混合を行う場合、有機溶媒溶液１容積部に対して水もしくは緩衝液１～５容積部を混合することが好ましい。また、該システムにおいて、混合液（有機溶媒溶液と水もしくは緩衝液との混合液）流速は、好ましくは０．１～１０ｍＬ／ｍｉｎであり、温度は、好ましくは４～４５℃である。

【０２７１】

上記のようにして脂質粒子分散液を製造する際、水もしくは緩衝液にＣＡＲ又は外因性ＴＣＲをコードする核酸を添加しておくことにより、成分（ａ）～（ｄ）を含む分散液として製造することができる。ここで該核酸は、水もしくは緩衝液における濃度が０．０５～２．０ｍｇ／ｍＬとなるように添加することが好ましい。

また、本発明の脂質ナノ粒子は、脂質粒子分散液と該核酸を自体公知の方法で混和することにより製造することもできる。

本発明の脂質ナノ粒子における該核酸の含量は、好ましくは、１～２０重量％である。該含量は、Ｑｕａｎｔ－ｉＴ^{TM}Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて測定することができる。また、本発明の脂質ナノ粒子における該核酸の内封率は、界面活性剤（例、Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００）添加の有無による蛍光強度の差をもとに算出することができる。

【０２７２】

分散媒は、透析することで水または緩衝液に置換することができる。透析には、分画分子量１０～２０Ｋの限外ろ過膜を用い、４℃～室温にて実施する。繰り返し透析を行ってもよい。透析には、タンジェンシャルフロー・フィルトレーションを使用してもよい。

【０２７３】

上記のようにして得られる本発明の脂質ナノ粒子における核酸と脂質との比率（重量比）は約０．０１～約０．２である。

【０２７４】

本発明の脂質ナノ粒子の平均粒子径は、好ましくは１０～２００ｎｍである。該脂質粒子の平均粒子径は、例えば、Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎ

ｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を用い、自己相関関数のキュムラント解析を行うことにより算出することができる。

【０２７５】

３．本発明の脂質ナノ粒子が導入されたex vivo 免疫細胞

本発明は、生体から採取した免疫細胞（本明細書において「ex vivo 免疫細胞」ともいう）に、本発明の脂質ナノ粒子を接触させ、該Ｔ細胞内にＣＡＲ又は外因性ＴＣＲをコードする核酸を導入することにより、該ＣＡＲ又は外因性ＴＣＲを発現するex vivo 免疫細胞を製造する方法、並びに該方法により得られるex vivo 免疫細胞を提供する。ここで「免疫細胞」としては、がん細胞等の標的細胞（病原細胞）を、何らかの作用機序により障害し得る能力を有する細胞（いわゆる免疫エフェクター細胞）であれば特に制限はないが、例えば、獲得免疫のうち細胞性免疫を担うＴ細胞や、自然免疫を担うＮＫ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等、並びにＮＫ細胞の性質を有するＴ細胞であるＮＫＴ細胞などが挙げられる。好ましい一実施態様においては、免疫細胞はＴ細胞であり得る。生体から採取したＴ細胞を、本明細書において「ex vivo Ｔ細胞」ともいう。一方、別の好ましい実施態様においては、免疫細胞は、ＮＫ細胞、マクロファージ、樹状細胞等の自然免疫を担う細胞であり得る。Ｔ細胞はＨＬＡタイプが一致する場合でも、同種異系（アロ）移植によりＧＶＨＤを引き起こすリスクが相当程度あるのに対し、アロＮＫ細胞等はＧＶＨＤを引き起こさないと考えられている。従って、種々のＨＬＡタイプのアロex vivo免疫細胞を準備しておけば、off-the-shelfでの使用が可能となる。ＣＡＲ－ＮＫ細胞については、例えば、US2016/0096892、Mol Ther. 25(8): 1769-1781 (2017)等に、ＣＡＲ－樹状細胞、ＣＡＲ－マクロファージ等については、例えば、WO2017/019848、eLIFE. 2018 e36688等に記載されている。

また、別の側面では、本発明は、本発明の脂質ナノ粒子を含有してなるＣＡＲまたは外因性ＴＣＲの発現誘導用組成物を提供する。

【０２７６】

本発明の脂質ナノ粒子を導入する免疫細胞（例、Ｔ細胞）としては、免疫細胞（例、Ｔ細胞）又はその前駆細胞を含む細胞集団であれば、単離された特定の免疫細胞（例、Ｔ細胞）であっても、例えば、リンパ球や多能性細胞を含むリンパ球の前駆細胞のような不均質な細胞集団であってもよい。本発明において、「リンパ球」とは、脊椎動物の免疫系における白血球のサブタイプの一つを意味し、リンパ球としては、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）が挙げられる。好ましくは、単離精製されたＴ細胞である。本発明において、「Ｔ細胞」とは、リンパ器官あるいは末梢血中等に認められる白血球の一種で、主に胸腺で分化成熟しＴＣＲを発現することを特徴とするリンパ球の一分類を意味する。本発明に用いることができるＴ細胞としては、例えば、ＣＤ８陽性細胞である細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）、ＣＤ４陽性細胞であるヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、エフェクターＴ細胞などが挙げられるが、好ましくは、細胞傷害性Ｔ細胞である。

【０２７７】

前記リンパ球は、ヒト又は非ヒト哺乳動物の例えば末梢血、骨髄及び臍帯血より採取することができる。本発明の脂質ナノ粒子が導入されたex vivo 免疫細胞（例、ex vivo Ｔ細胞）を、癌などの疾患の治療に用いる場合には、当該細胞集団は治療対象本人、又は治療対象のＨＬＡタイプと一致したドナーから採取することが好ましい。

【０２７８】

多能性細胞を含むリンパ球の前駆細胞としては、例えば、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ＥＳ細胞）、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：ｉＰＳ細胞）、胚性腫瘍細胞（ＥＣ細胞）、胚性生殖幹細胞（ＥＧ細胞）、造血幹細胞、自己複製能を失った多能性前駆細胞（multipotent progenitor：ＭＭＰ）、ミエローリンフォイド共通前駆細胞（ＭＬＰ）、ミエロイド系前駆細胞（ＭＰ）、顆粒球単核前駆細胞（ＧＭＰ）、マクロファージ－樹状細胞前駆細胞（ＭＤＰ）、樹状細胞前駆細胞（ＤＣＰ）などが挙げられる。多能性細胞等の未分化細胞は、自体公知の方法により各種免疫細胞、例えばＴ細胞に分化させることができる。

【０２７９】
本発明の脂質ナノ粒子をex vivo 免疫細胞に接触させる方法に特に限定はないが、例えば、通常の免疫細胞の培地に本発明の脂質ナノ粒子を添加すればよい。あるいは、導入効率を上げるために、例えば、リン酸カルシウム共沈殿法、ＰＥＧ法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法などを併用してもよい。
【０２８０】
本発明の脂質ナノ粒子が、特に外因性ＴＣＲをコードする核酸を活性成分として含む場合、外因性ＴＣＲの発現上昇、ミスペアＴＣＲの出現の抑制、又は自己反応性の抑制の観点から、該Ｔ細胞が本来発現する内在性のＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖の発現をｓｉＲＮＡによって抑制してもよい。前記の核酸を当該方法に適用する場合には、外因性ＴＣＲに対するｓｉＲＮＡの効果を避けるため、該ＴＣＲをコードする核酸の塩基配列を、内在性のＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖の発現を抑えるｓｉＲＮＡが作用するＲＮＡに対応する塩基配列とは異なる配列（コドン変換型配列）とすることが好ましい。これらの方法は、例えば国際公開第２００８／１５３０２９号に記載されている。前記の塩基配列は、天然から取得されたＴＣＲをコードする核酸へのサイレント変異の導入や、人為的に設計した核酸を化学的に合成することで作製することができる。あるいは、内在性のＴＣＲ鎖とのミスペアを避けるため、外因性ＴＣＲをコードする核酸の定常領域の一部又は全部を、ヒト以外の動物、例えばマウス由来の定常領域に置換してもよい。
【０２８１】
４．本発明の脂質ナノ粒子、又は該脂質ナノ粒子が導入されたex vivo 免疫細胞を含有してなる医薬
本発明は、本発明の脂質ナノ粒子、又は該脂質ナノ粒子が導入されたex vivo 免疫細胞（例、ex vivo Ｔ細胞）を含有してなる医薬（以下「本発明の医薬」と略記する。）を提供する。
（４－１．本発明の脂質ナノ粒子が導入されたex vivo 免疫細胞を含有してなる医薬）
本発明の脂質ナノ粒子が導入された免疫細胞（例、Ｔ細胞）は、ＣＡＲ又は外因性ＴＣＲを発現することにより、該ＣＡＲ又は外因性ＴＣＲが特異的に認識する表面抗原を発現する細胞を特異的に認識し、これを殺傷（例、アポトーシスを誘導）することができる。従って、表面抗原として、がん細胞等の疾患細胞で特異的に発現するか、発現が亢進している表面分子を認識するＣＡＲ又は外因性ＴＣＲをコードする核酸を活性成分として含有させることにより、本発明の脂質ナノ粒子が導入されたex vivo 免疫細胞は、がん等の疾患の予防又は治療のために用いることができ、哺乳動物（ヒト又は他の哺乳動物（例：マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル。好ましくは、ヒト）に安全に投与することができる。
【０２８２】
（４－２．本発明の脂質ナノ粒子を含有してなる医薬）
本発明の脂質ナノ粒子を含有してなる本発明の医薬は、該脂質ナノ粒子に、公知の薬学的に許容される担体（賦形剤、希釈剤、増量剤、結合剤、滑沢剤、流動助剤、崩壊剤、界面活性剤等などが含まれる）や慣用の添加剤などと混合して医薬組成物として調製することが好ましい。賦形剤は、当業者にはよく知られており、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（例えば、０．０１Ｍリン酸塩、０．１３８Ｍ ＮａＣｌ、０．００２７Ｍ ＫＣｌ、ｐＨ７．４）、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの鉱酸塩を含有する水溶液、生理食塩液、グリコール又はエタノールなどの溶液及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸の塩などが挙げられる。また、湿潤剤又は乳化剤などの補助剤、及びｐＨ緩衝剤も使用することができる。さらに、懸濁化剤、保存剤、安定化剤及び分散剤などの製剤補助剤などを用いてもよい。また、上記医薬組成物は、使用前に適切な無菌の液体により再構成するための乾燥形態であってもよい。該医薬組成物は、調製する形態（錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、懸濁液などの経口投与剤；注射剤、点滴剤、外用剤、坐剤などの非経口投与剤）等に応じて、全身的に又は局所的に、経口投与又は非経口投与することができる。非経口投与する場合には、静脈投与

、皮内投与、皮下投与、直腸投与、経皮投与すること等が可能である。また注射剤型で用いる場合には、許容される緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等を添加することもできる。

【０２８３】

本発明の脂質ナノ粒子を含有してなる本発明の医薬の投与量としては、例えば、１回につき体重１ｋｇあたり、ＣＡＲ又は外因性ＴＣＲをコードする核酸量として、０．００１ｍｇ～１０ｍｇの範囲で投与される。例えば、ヒト患者に投与する場合、体重６０ｋｇの患者に対し０．００１～５０ｍｇの範囲で投与される。上記の投与量は例示であり、用いる核酸の種類や投与経路、投与対象又は患者の年齢、体重、症状などにより、投与量を適宜選択することができる。

【０２８４】

本発明の脂質ナノ粒子を含有してなる本発明の医薬は、哺乳動物（ヒト又は他の哺乳動物（例：マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル）。好ましくは、ヒト。）に投与することにより、該動物体内の免疫細胞、例えばＴ細胞（本明細書において「in vivo 免疫細胞」、「in vivo Ｔ細胞」ともいう）においてＣＡＲ又は外因性ＴＣＲの発現を誘導することができ、該in vivo 免疫細胞が、ＣＡＲ又は外因性ＴＣＲが標的とする表面抗原を発現するがん細胞等を特異的に認識して当該疾患細胞を殺傷することにより、当該疾患に対する予防又は治療効果を示す。

【０２８５】

本発明の脂質ナノ粒子が導入されたex vivo 免疫細胞を活性成分とする医薬の場合、該免疫細胞は、対象に投与する前に適切な培地及び／又は刺激分子を使用して培養及び／又は刺激を行ってもよい。刺激分子としては、サイトカイン類、適当なタンパク質、その他の成分などが挙げられるが、これらに限定されない。例えばＴ細胞の場合、サイトカイン類としては、例えばＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＦＮ－γ等が例示され、好ましくは、ＩＬ－２を用いることができる。ＩＬ－２の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば、好適には０．０１～１×１０^{5}Ｕ／ｍＬ、より好適には１～１×１０^{4}Ｕ／ｍＬである。また、適当なタンパク質としては、例えばＣＤ３リガンド、ＣＤ２８リガンド、抗ＩＬ－４抗体が例示される。また、この他、レクチン等のリンパ球刺激因子を添加することもできる。さらに、培地中に血清や血漿を添加してもよい。これらの培地中への添加量は特に限定はないが、０体積％～２０体積％が例示され、また培養段階に応じて使用する血清や血漿の量を変更することができる。例えば、血清又は血漿濃度を段階的に減らして使用することもできる。血清又は血漿の由来としては、自己又は非自己のいずれでも良いが、安全性の観点からは、自己由来のものが好ましい。

【０２８６】

本発明の脂質ナノ粒子が導入されたex vivo 免疫細胞を活性成分とする医薬は、非経口的に対象に投与して用いることが好ましい。非経口的な投与方法としては、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、及び皮下投与などの方法が挙げられる。投与量は、対象の状態、体重、年齢等応じて適宜選択されるが、通常、細胞数として、体重６０ｋｇの対象に対し、１回当り、通常１×１０^{6}～１×１０^{10}個となるように、好ましくは１×１０^{7}～１×１０^{9}個となるように、より好ましくは５×１０^{7}～５×１０^{8}個となるように投与される。また、１回で投与してもよく、複数回にわたって投与してもよい。本発明の脂質ナノ粒子が導入されたex vivo 免疫細胞を活性成分とする本発明の医薬は、非経口投与に適した公知の形態、例えば、注射又は注入剤とすることができる。該医薬は、適宜、薬理学的に許容できる賦形剤を含んでいてもよい。薬理学的に許容できる賦形剤としては、上記に記載したものが挙げられる。該医薬は、細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、培地等を含んでもよい。培地としては、特に限定するものではないが、ＲＰＭＩ、ＡＩＭ－Ｖ、Ｘ－ＶＩＶＯ１０などの培地が挙げられるが、これらに限定されない。また該医薬には医薬的に許容される担体（例：ヒト血清アルブミン）、保存剤等が安定化の目的で添加されていてもよい。

【０２８７】

本発明の医薬はがんの予防又は治療薬であり得る。本発明の医薬の適用対象となるがん

は特に制限されず、例えば、急性リンパ球性癌、胞巣状横紋筋肉腫、膀胱癌、骨癌、脳癌（例、髄芽細胞腫）、乳癌、肛門、肛門管若しくは肛門直腸の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、頸部、胆嚢若しくは胸膜の癌、鼻、鼻腔若しくは中耳の癌、口腔の癌、外陰部の癌、慢性骨髄性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、頭頸部癌（例、頭頸部扁平上皮癌）、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病（例、急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病）、液性腫瘍、肝臓癌、肺癌（例、非小細胞肺癌）、リンパ腫（例、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫）、悪性中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、卵巣癌、膵臓癌；腹膜、網及び腸間膜の癌；咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌、皮膚癌、小腸癌、軟組織癌、固形腫瘍、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌などが挙げられるが、それらに限定されない。

【０２８８】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらは単なる例示であって本発明はこれらに限定されない。

【実施例】

【０２８９】

実施例１

（抗体の還元処理）

9.21 mg/mlの抗CD3抗体（Bio X Cell社）111 μlに10 mMの DTT水溶液12.3 μlを混合した。同様に、6.73 mg/mlのIgG2a抗体（Bio X Cell社）149 μlに10 mMのDTT水溶液16.6 μlを混合した。各抗体とDTTの混合液はvortexにより混合し、室温にて30分間反応を行った。反応液はHPLC（カラム：TSKgel G2000SWXL 7.8 mm×30 cm, TOSOH社, 移動相：PBS）により分画を行い、還元抗体を含む分取液を得た。分取液はAmicon 0.5 ml-10Kを用いて限外濃縮を行った。濃縮液中の抗体タンパク濃度、およびチオール基濃度はそれぞれ230 nmの吸光度およびN-(7-ジメチルアミノ-4-メチルクマリン-3-yl)マレイミド（DACM）を用いた蛍光呈色反応により測定した。なお、還元抗CD3抗体の収量は176 μl、タンパク濃度1.75 mg/ml, チオール基濃度5.14 μMであり、還元IgG2a抗体の収量は86 μl、タンパク濃度5.19 mg/ml、チオール基濃度45.1 μMであった。

【０２９０】

実施例２

（Maleimide-LNPの調製）

脂質混合物（カチオン性脂質：DPPC:Cholesterol:SUNBRIGHT GM-020:ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＤＳＰＥ－０２０ＭＡ＝60：10.6：28：1.4：1, モル比）を、90% EtOH、10% 水に溶解して、7.0 mg/mlの脂質溶液を得た。カチオン性脂質としては、WO2016/021683に記載される3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((3-ペンチルオクタノイル)オキシ)メチル)プロピル 3-ペンチルオクタノアート（化合物７）とN,N,N-トリメチル-5-オキソ-5-(3-((3-ペンチルオクタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((3-ペンチルオクタノイル)オキシ)メチル)プロポキシ)ペンタン-1-アミニウム ヨージド（化合物８）を59.1：0.9（モル比）で混合して使用した。細胞内シグナル伝達ドメインとして４－１ＢＢとＣＤ３ζを有するＣＤ１９標的ＣＡＲをコードするmRNAは10 mM 2－モルホリノエタンスルホン酸（MES）緩衝液pH 5.0に溶解して0.2 mg/mlの核酸溶液を得た。得られた脂質溶液および核酸溶液を、室温で、Nanoassemblr装置 (Precision Nanosystems社)によって、流速比 3 ml/min：６ml/minで混合し、組成物を含む分散液を得た。得られた分散液は、Slyde-A-Lyzer(20ｋの分画分子量、Thermo Scientific社)を用いて水に対して室温で１時間、PBSに対して4℃で48時間透析を行った。続いて、0.2 μmのsyringe filter（Iwaki)を用いてろ過を行い、4℃に保存した。

【０２９１】

実施例３

（還元抗体とMaleimide-LNPの結合反応）

maleimideに対する還元抗体のモル濃度が1/20となるようにmaleimide-LNP分散液に還元抗体溶液を混合し、室温にて4時間静置した。その後、精製工程まで４℃に保管した。

【０２９２】

実施例４

（抗体-LNPのゲルろ過精製）

還元抗体とMaleimide-LNPの反応液をゲルろ過カラムSepharose CL-4B (Cat No.17-0150-01 / GE Healthcare)にロードし、D-PBS(-)を移動相として分画を行った。続いて、各フラクションのタンパク濃度を測定する事により、目的とする抗体-LNPが含まれる分画を同定した。抗体-LNPは0.2μmのシリンジフィルターによってろ過を行い、４℃に保存した。

【０２９３】

実施例５

（CD8+ T細胞へのex vivoトランスフェクション）

脾臓をC57BL/6Jマウスより採取し、ACK lysing buffer（Biosource）に分散することでマウス脾細胞を得る。得られたマウス脾細胞を1 ng/ml interleukin 7および2 μg/ml concavalin Aを含有するcomplete RPMI 1640培地で2日間の培養し、Ficoll密度勾配遠心を用いた死細胞除去とCD8 Negative Isolation Kit (Stemcell Technologies)を用いた処理により、マウスCD8+ T細胞を分離する。得られたマウスCD8+ T細胞を10 ng/ml interleukin 2および抗体-LNPを含有するcomplete RPMI 1640培地に分散して培養することにより、マウスCD8+ T細胞にCARまたは外因性TCRをトランスフェクションする。

同様にして、購入したヒト初代培養T細胞よりCD8+ T細胞を分離し、ヒトCD8+ T細胞にCARまたは外因性TCRをトランスフェクションする。

【０２９４】

実施例６

（CAR-T細胞のin vitro細胞障害性評価）

障害性評価細胞であるCD19を強制発現させたヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562細胞をmembrane dye PKH-26 (Sigma-Aldrich)によって標識し、10% fetal calf serumを含むRPMI培地によって洗浄し、同培地に1 x 10^5 cells/mlで分散して培養する。標識された障害性評価細胞を96-well plateに分注して培養し、CAR-T細胞を混合後に37℃で3時間培養し、Annexin V-Brilliant Violet 421 (BioLegend)を用いた染色を行った上でフローサイトメトリーを行うことにより、アポトーシスを起こした細胞を定量する。

【０２９５】

実施例７

（in vivo抗がん活性評価試験）

ルシフェラーゼを安定発現するK562-CD19細胞を6週齢のNOD-SCIDマウスに尾静脈投与し、1週間の飼育期間を経る事でマウス血液がんモデルを作成する。続いて、抗体-LNPを用いてex vivoでCARをコードする核酸をトランスフェクションして得られたヒトCAR-T細胞1×10^6 cellsを1週間に一度、3週に亘って尾静脈投与し、in vivo発光イメージングシステム IVIS (PerkinElmer)を用いた測定により、CAR-T細胞によるがん細胞の減少を評価する。

【０２９６】

実施例８

（カチオン性脂質を用いたMaleimide-LNPの調製）

脂質混合物（カチオン性脂質：DPPC:Cholesterol:SUNBRIGHT GM-020:ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ　ＤＳＰＥ－０２０ＭＡ＝60：10.6：28：1.4：1, モル比）を、90% EtOH、10% 25 mM酢酸バッファー pH 4.0に溶解して、10 mg/mlの脂質溶液を得た。カチオン性脂質としては、3-((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)-2,2-ビス(((9Z)-テトラデカ-9-エノイルオキシ)メチル)プロピル (9Z)-テトラデカ-9-エノアート（化合物１２）と2-(((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)メチル)-2-((ドデカノイルオキシ)メチル)

プロパン-1,3-ジイル (9Z,9'Z)ビス-テトラデカ-9-エノアート（化合物２１）、および2-(((4,5-ジブチルノナノイル)オキシ)メチル)-2-(((5-(ジメチルアミノ)ペンタノイル)オキシ)メチル)プロパン-1,3-ジイル ジデカノアート（化合物３５）を使用した。ＣＤ１９標的ＣＡＲをコードするpcDNA3.1-hCD19CARを10 mM 2－モルホリノエタンスルホン酸（MES）緩衝液pH 5.5に溶解して0.2 mg/mlの核酸溶液を得た。なお、pcDNA3.1-hCD19CARは、WO2013/126712より引用したCD19 IgG4 28z 配列を、pcDNA3.1（Thermo Fisher Scientific）のmulti cloning siteへ組み込み作成した。得られた脂質溶液および核酸溶液を、室温で、Nanoassemblr装置 (Precision Nanosystems社)によって、流速比 3 ml/min：６ml/minで混合し、組成物を含む分散液を得た。得られた分散液は、Slyde-A-Lyzer(20ｋの分画分子量、Thermo Scientific社)を用いて、水に対して室温で１時間、PBSに対して4℃で48時間透析を行った。続いて、0.2 μmのsyringe filter（Iwaki)を用いてろ過を行い、4℃に保存した。

【０２９７】

（Maleimide-LNPの核酸濃度測定と、推定maleimide濃度の算出）

Maleimide-LNPを0.5% Triton X-100によって溶解し、Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いてpDNA濃度を測定した。また、Triton X-100を添加せずに測定したpDNA濃度をLNPに内封されなかったpDNAの濃度とし、LNPへのpDNA内封率を算出した。推定maleimide濃度は、測定されたpDNA濃度にmaleimide-PEG-lipid (ＤＳＰＥ－０２０ＭＡ)の仕込み比率を乗じる事によって算出した。得られた各値は表１に示した。

【０２９８】

【表１】

Maleimide-LNP	pDNA 濃度 (μg/ml)	pDNA 内封率	推定 Maleimide 濃度 (μM)
化合物 12-pcDNA3.1-hCD19CAR	193	94%	66.0
化合物 21-pcDNA3.1-hCD19CAR	253	89%	86.2
化合物 35-pcDNA3.1-hCD19CAR	169	95%	57.7

【０２９９】

（２種類の混合還元抗体とMaleimide-LNPの結合反応）

DTTを用いて還元したanti-human CD3 antibody(BE0001-2, BioXCell)およびanti-human/monkey CD28 antibody(BE0248, BioXCell)を等量ずつ混合し、maleimide-LNPのmaleimideに対して1/20モル量となるように混合した。Maleimide-LNPと還元抗体の濃度と体積は表２に示した。混合液は室温にて4時間静置した後、精製工程まで４℃に保管した。

【０３００】

【表２】

Maleimide-LNP	推定Maleimide濃度（μM）	LNP体積（ml）	混合した抗体重量（μg）	混合した抗体溶液体積（μl）
化合物12-pcDNA3.1-hCD19CAR	66.0	1.5	742	176
化合物21-pcDNA3.1-hCD19CAR	86.2	0.27	175	43
化合物35-pcDNA3.1-hCD19CAR	57.7	0.3	130	32

【０３０１】
（抗体-LNPのゲルろ過精製）
還元抗体とMaleimide-LNPの反応液をゲルろ過カラムSepharose CL-4B (Cat No.17-0150-01 / GE Healthcare)にロードし、D-PBS(-)を移動相として分画を行った。続いて、各フラクションのタンパク濃度を測定する事により、目的とする抗体-LNPが含まれる分画を同定した。抗体-LNPは0.2μmのシリンジフィルターによってろ過を行い、４℃に保存した。得られた抗体-LNPの粒子径はZetasizer Nano ZS （Malvern Panalytical）によって測定した。核酸濃度と抗体タンパク濃度はそれぞれQuant-iT^{TM} PicoGreen^{TM} dsDNA Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）およびATTO-TAG^{TM} FQ Amine-Derivatization Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて測定した。各分析結果の値は表３に示した。
【０３０２】
【表３】

抗体-LNPの実施例	粒子径（nm）	核酸濃度（μg/ml）	抗体濃度（μg/ml）
hCD3/hCD28-化合物12-pcDNA3.1-hCD19CAR	119	69	94
hCD3/hCD28-化合物21-pcDNA3.1-hCD19CAR	95	65	82
hCD3/hCD28-化合物35-pcDNA3.1-hCD19CAR	98	49	38

【０３０３】
実施例９
（抗体-LNPを用いたヒト初代培養T細胞へのCD19 CARトランスフェクション試験）
Human Pan-T Cells (AccuCell human peripheral blood pan-T cells, Negative selection) を1.1 ×10^6 cells/mlに培地で調製し、96-well plateに90μl/wellで播種した。培地にはrecombinant IL-2 (Thermo Fisher Scientific)を30 ng/mlの濃度で添加したX-VIVO10 (Lonza) を用いた。続いて、30μg/mlのpcDNA3.1-hCD19CAR濃度にPBSで希釈した抗体-LNP10μlを培地に添加し、37℃、5% CO_2インキュベーターにて3日および6日間の培養を行った。
【０３０４】
（フローサイトメトリーによるCD19CAR発現評価）
96-well plateにて培養したヒト初代培養T細胞は1.5 mlチューブに回収し、Recombinant human CD19 protein , Fc Chimera Active, Biotin (Abcam)を2μl添加し、氷上にて30分間静置した。続いて、200 μlの1% FBSを添加したCell Wash (BD) の添加と300×g, 5分間の遠心による洗浄を2回行った後、上清を除去して100 μlの1% FBS, Cell Washに細胞を分散した。細胞の分散液には、0.2μlのBrilliant Violet 421 Streptavidinを添加してピペッティングによる混合の後、氷上に30分間静置した。染色した細胞

は200μlの1% FBS Cell Washと遠心による洗浄を3回行い、フィルターろ過後、200μlの 1% FBS Cell Washに分散してLSRFortessa(BD)によるフローサイトメトリー解析を行った。

hCD3/hCD28-化合物12-pcDNA3.1-hCD19CARによるトランスフェクションを行ったヒト初代培養T細胞の、フローサイトメトリー解析によるCD19 CAR発現解析結果を図１に示した。抗体-LNP添加後3日および6日におけるCD19 CAR陽性率はそれぞれ51.9%および41.7%であり、ウイルスベクターによる遺伝子導入と比較しても十分な効率でCAR陽性細胞が得られた。

hCD3/hCD28-化合物21-pcDNA3.1-hCD19CARおよびhCD3/hCD28-化合物35-pcDNA3.1-hCD19CARによるトランスフェクションを行ったヒト初代培養T細胞の、フローサイトメトリー解析によるCD19 CAR発現解析結果を図２に示した。抗体-LNP添加後3日おけるCD19 CAR陽性率はそれぞれ5.12%および47.0%であった。

【０３０５】

実施例１０

（抗体-LNPによりCD19 CARをトランスフェクションしたヒト初代培養Ｔ細胞によるがん細胞障害性評価）

DELFIA 細胞障害性アッセイキット（Perkin Elmer）を用いて標識したヒトpre B細胞株NALM-6、およびヒトバーキットリンパ腫細胞株Daudiをtarget cellとして、1×10^4cell/100 μl/wellの細胞密度にて96-well U bottom plateに播種した。培地には10% FBS含有RPMI (phenol red free)を用いた。続いて、別項に記載の方法にてhCD3/hCD28-化合物12-pcDNA3.1-hCD19CAR によりCD19CARをトランスフェクションしたヒト初代培養T細胞（抗体-LNP添加後3日おけるCD19 CAR陽性率：19%）をeffector cellとして、target cellとの細胞数比が0～16となるように100μlの培地に分散して添加した。Target cellとeffector cellを混合してから3時間後、20μlの培養上清を回収した。回収した培養上清には20 μlのeuropium solution（Eu）を添加し、障害を受けたtarget cellより放出されたキレート剤TDAとEuの複合体により発せられる蛍光強度から、細胞障害率を算出した。

CD19 CARをトランスフェクションしたヒト初代培養T細胞の添加によるNalm-6およびDaudiの細胞障害率を図３に示した。

【０３０６】

実施例１１

（還元Fab'の調製）

Mleimide-LNPと結合する還元Fab'は、anti-mouse CD3ε antibody(BE0001-1, BioXCell)およびanti-mouse CD28 antibody(BE0015-1, BioXCell)よりPierce F(ab')2 Preparation Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて調製した。7.86 mg/mlのanti-mouse CD3ε antibody 0.5 mlからは1.75 mg/mlのF(ab')2が1 ml得られた。3.86 mg/mlのanti-mouse CD28 antibody 0.5 mlからは0.97 mg/mlのF(ab')2が0.62 ml得られた。各F(ab')2には還元剤として2-アミノエタンチオールp-トルエンスルホン酸塩を40 mMの濃度で混合し、37℃にて1時間静置した。得られたFab'はZeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO-0.5 ml (Thermo Fischer Scientific)により精製し、Maleimide-LNPとの反応まで4℃に保存した。なお、Fab'のタンパク濃度、およびチオール基濃度はそれぞれ230 nmの吸光度およびN-(7-ジメチルアミノ-4-メチルクマリン-3-yl)マレイミド（DACM）を用いた蛍光呈色反応により測定した。

【０３０７】

実施例１２

（還元Fab’とMaleimide-LNPの結合反応）

還元したanti-mouse CD3εFab'およびanti-mouse CD28 Fab'は、上記の方法によって調製されたmaleimide-LNPのmaleimideに対して1/20モル量となるように混合した。混合液は室温にて4時間静置した後、精製工程まで４℃に保管した。

【０３０８】

実施例１３

（還元Fab’-LNPのゲルろ過精製）

還元Fab'とMaleimide-LNPの反応液をゲルろ過カラムSepharose CL-4B (Cat No.17-0150-01 / GE Healthcare)にロードし、D-PBS(-)を移動相として分画を行った。続いて、各フラクションのタンパク濃度を測定する事により、目的とするFab'-LNPが含まれる分画を同定した。Fab'-LNPは0.2μmのシリンジフィルターによってろ過を行い、４℃に保存した。得られた抗体-LNPの粒子径はZetasizer Nano ZS （Malvern Panalytical）によって測定した。核酸濃度と抗体タンパク濃度はそれぞれQuant-iT^{TM} PicoGreen^{TM} dsDNA Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）およびATTO-TAG^{TM} FQ Amine-Derivatization Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて測定した。

【産業上の利用可能性】

【０３０９】

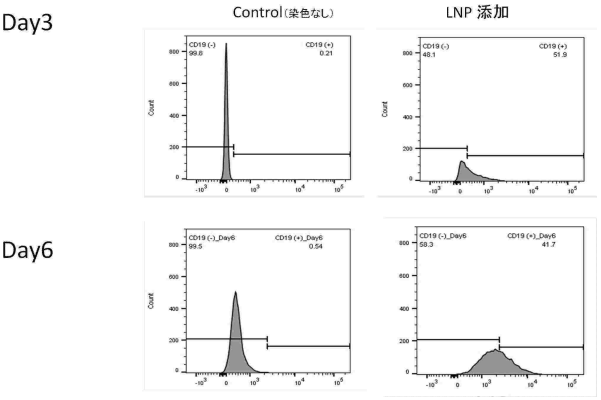
本発明の脂質ナノ粒子は、ex vivoのみならず、in vivoでも効率よくT細胞選択的に、CAR又は外因性TCRを導入することができるので、製造原価の低いCAR-T又はTCR-T細胞療法を提供することができる。また、ウイルスベクターを用いないので、ウイルスタンパク質による抗原性の問題を回避することができ、がん免疫療法の新規プラットフォームとして極めて有用である。

【０３１０】

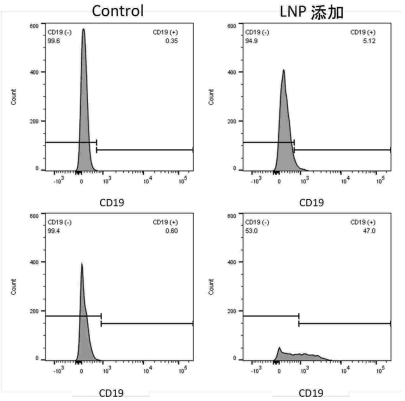
本出願は、2017年12月27日付で日本に出願した特願2017-252616を基礎としており、ここで言及することにより、その内容はすべて本明細書に包含されるものである。

【図面】

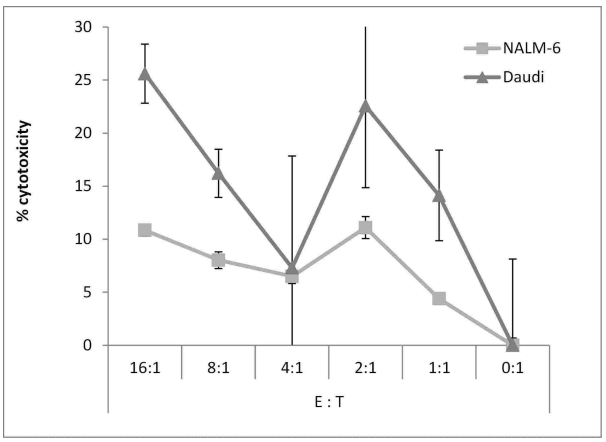
【図１】


Control（染色なし）
LNP 添加
Day3
Day6

【図２】


Control
LNP 添加
hCD3/hCD28-化合物21-pcDNA3.1-hCD19CAR
hCD3/hCD28-化合物35-pcDNA3.1-hCD19CAR
CD19

【図３】


NALM-6
Daudi
% cytotoxicity
E : T
16:1
8:1
4:1
2:1
1:1
0:1

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
Ａ６１Ｋ	*35/17*	*(2025.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	
Ａ６１Ｋ	*47/18*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18	
Ａ６１Ｋ	*47/24*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ	*47/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28	
Ａ６１Ｋ	*47/34*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34	
Ａ６１Ｋ	*47/44*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/44	
Ａ６１Ｋ	*47/68*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/68	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１
Ｃ１２Ｎ	*15/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12	
Ｃ１２Ｎ	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	
Ｃ１２Ｎ	*15/88*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ
Ｃ０７Ｋ	*16/28*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ
			Ｃ０７Ｋ	16/28	

弁理士　赤井 厚子
(74)代理人　100151301
弁理士　戸崎 富哉
(72)発明者　桑江 忍
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１　武田薬品工業株式会社内
(72)発明者　松本 悟
神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１　武田薬品工業株式会社内
審査官　菊池 美香
(56)参考文献　国際公開第２０１７／０９９８２３（WO，Ａ１）
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　４８／００
Ａ６１Ｋ　９／１６
Ａ６１Ｋ　９／５１
Ａ６１Ｋ　３１／７１０５
Ａ６１Ｋ　３１／７１１
Ａ６１Ｋ　３５／１７
Ａ６１Ｋ　４７／１８
Ａ６１Ｋ　４７／２４
Ａ６１Ｋ　４７／２８
Ａ６１Ｋ　４７／３４
Ａ６１Ｋ　４７／４４
Ａ６１Ｋ　４７／６８
Ａ６１Ｐ　３５／００
Ａ６１Ｐ　３５／０２
Ａ６１Ｐ　４３／００
Ｃ１２Ｎ　５／１０
Ｃ１２Ｎ　１５／１２
Ｃ１２Ｎ　１５／１３
Ｃ１２Ｎ　１５／６２
Ｃ１２Ｎ　１５／８８
Ｃ０７Ｋ　１６／２８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）