

明 細 書

発明の名称： T細胞の活性化／増殖方法

技術分野

[0001] 本発明は、T細胞活性化リガンドを表面に付加した核酸送達担体、該核酸送達担体を用いた、T細胞の活性化及び／又は増殖方法、並びにT細胞内への核酸の送達方法等に関する。本発明はまた、T細胞活性化リガンドと核酸送達担体とを同時にT細胞と接触させることを特徴とする、T細胞の活性化及び／又は増殖並びにT細胞内への核酸の送達方法に関する。

[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、T細胞の活性化／増殖、ウイルスベクターの調製、T細胞への遺伝子導入等、長期間に渡る多段階のステップが必要となるため、細胞培養やウイルスベクター調製にかかるコスト等により製造原価が高くなるという課題がある。

[0003] ウイルスベクターを用いないCARのT細胞への導入方法として、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。

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）。

また、特許文献4には、T細胞を含む種々の細胞、組織又は臓器内に核酸等の活性成分を導入するためのカチオン性脂質が記載されている。

[0004] 一方、T細胞の活性化／増殖方法としては、抗CD3/CD28抗体を固定化したビーズや、ナノサイズのマトリクスビーズを用いて、T細胞を活性化及び／又は増殖させる方法が報告されている（特許文献5及び6）。

[0005] しかしながら、これまでに、T細胞を活性化／増殖させる工程と、T細胞への遺伝子導入工程とを、One Podで同時に行うことができる技術は報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：US 2017/0296676

特許文献2：US 2016/0145348

特許文献3：WO 2016/189532

特許文献4：WO 2016/021683

特許文献5：US 6,352,694

特許文献6：US 2014/0087462

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Nature Nanotechnology 12, 813-820 (2017)

非特許文献2：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、CAR-T療法等の免疫細胞療法剤の製造プロセスを短縮・簡略化し、短期間で、製造原価の低い免疫細胞療法剤を提供すること、及びウ

イルスベクターによる潜在的ながん原性リスクを排除したより安全性の高い免疫細胞療法剤の製造プロセス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、T細胞活性化リガンドを表面に付加した核酸送達担体を用いることにより、T細胞を活性化／増殖させる工程と、T細胞への遺伝子導入工程とを、One Podで同時に行うことに成功した。さらに、意外にも、T細胞活性化リガンドと核酸送達担体とを同時にT細胞と接触させるだけで、効率よくT細胞の活性化／増殖とT細胞への核酸導入とが達成されることを見出し、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] T細胞の活性化及び／又は増殖方法であって、T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンドを表面に付加した核酸送達担体とを接触させる工程を含む、方法。

[2] 前記T細胞活性化リガンドがCD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、[1]に記載の方法。

[3] 前記核酸送達担体の表面にT細胞活性化リガンドが2種以上付加されている、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 前記核酸送達担体の内部に、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸が含まれる、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 前記核酸送達担体の内部に、CAR又はTCRをコードする核酸が含まれる、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] *ex vivo*で行われる、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[8] T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンドを表面に付加し、かつ内部に核酸を含む核酸送達担体とを接触させる工程を含む、T細胞内への核酸の送達方法。

〔 9 〕 前記T細胞活性化リガンドが、CD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、〔 8 〕 に記載の方法。

〔 1 0 〕 前記核酸送達担体の表面にT細胞活性化リガンドが2種以上付加されている、〔 8 〕 又は〔 9 〕 に記載の方法。

〔 1 1 〕 前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、〔 8 〕 ～〔 1 0 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 2 〕 前記核酸が、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸を含む、〔 8 〕 ～〔 1 1 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 3 〕 前記核酸が、CAR又はTCRをコードする核酸を含む、〔 8 〕 ～〔 1 2 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 4 〕 ex vivoで行われる、〔 8 〕 ～〔 1 3 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 5 〕 T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、並びに、内部に核酸を含む、T細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体とを同時に接触させる工程を含む、T細胞内への核酸の送達方法。

〔 1 6 〕 前記T細胞活性化リガンドが、CD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、〔 1 5 〕 に記載の方法。

〔 1 7 〕 2種以上のT細胞活性化リガンドを接触させる、〔 1 5 〕 又は〔 1 6 〕 に記載の方法。

〔 1 8 〕 前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、〔 1 5 〕 ～〔 1 7 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 1 9 〕 前記核酸が、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸を含む、〔 1 5 〕 ～〔 1 8 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 2 0 〕 前記核酸が、CAR又はTCRをコードする核酸を含む、〔 1 5 〕 ～〔 1 9 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 2 1 〕 ex vivoで行われる、〔 1 5 〕 ～〔 2 0 〕 のいずれかに記載の方法。

〔22〕 T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンドを表面に付加し、かつ内部に核酸を含む核酸送達担体とを接触させる工程を含む、T細胞を含有してなる医薬の製造方法。

〔23〕 前記T細胞活性化リガンドが、CD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、〔22〕に記載の方法。

〔24〕 前記核酸送達担体の表面にT細胞活性化リガンドが2種以上付加されている、〔22〕又は〔23〕に記載の方法。

〔25〕 前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、〔22〕～〔24〕のいずれかに記載の方法。

〔26〕 前記核酸が、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸を含む、〔22〕～〔25〕のいずれかに記載の方法。

〔27〕 前記核酸が、CAR又はTCRをコードする核酸を含む、〔22〕～〔26〕のいずれかに記載の方法。

〔28〕 *ex vivo*で行われる、〔22〕～〔27〕のいずれかに記載の方法。

〔29〕 T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、並びに、内部に核酸を含む、T細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体とを同時に接触させる工程を含む、T細胞を含有してなる医薬の製造方法。

〔30〕 前記T細胞活性化リガンドが、CD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、〔29〕に記載の方法。

〔31〕 2種以上のT細胞活性化リガンドを接触させる、〔29〕又は〔30〕に記載の方法。

〔32〕 前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、〔29〕～〔31〕のいずれかに記載の方法。

〔33〕 前記核酸が、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸を含む、〔29〕～〔32〕のいずれかに記載の方法。

〔34〕前記核酸が、CAR又はTCRをコードする核酸を含む、〔29〕～〔33〕のいずれかに記載の方法。

〔35〕*ex vivo*で行われる、〔29〕～〔34〕のいずれかに記載の方法。

〔36〕少なくとも1種のT細胞活性化リガンドを表面に付加した核酸送達担体。

〔37〕前記T細胞活性化リガンドがCD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、〔36〕に記載の核酸送達担体。

〔38〕前記核酸送達担体の表面にT細胞活性化リガンドが2種以上付加されている、〔36〕又は〔37〕に記載の核酸送達担体。

〔39〕前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、〔36〕～〔38〕のいずれかに記載の核酸送達担体。

〔40〕T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸を内部に含む、〔36〕～〔39〕のいずれかに記載の核酸送達担体。

〔41〕CAR又はTCRをコードする核酸を内部に含む、〔36〕～〔40〕のいずれかに記載の核酸送達担体。

〔42〕〔36〕～〔41〕のいずれかに記載の核酸送達担体を含有してなる医薬。

〔43〕〔15〕～〔21〕のいずれかに記載の方法により細胞内に核酸が送達されたT細胞。

〔44〕〔43〕に記載のT細胞を含有してなる医薬。

〔45〕T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、T細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体、及び培地を含む、細胞培養物。

〔46〕少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体を含む、T細胞への核酸送達用組成物。

〔47〕少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体を含む、T細胞への核酸送達用キット。

〔48〕〔8〕～〔14〕のいずれかに記載の方法により細胞内に核酸が送達されたT細胞。

〔49〕〔48〕に記載のT細胞を含有してなる医薬。

〔50〕T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンドを表面に付加し、かつ内部に核酸を含む核酸送達担体、及び培地を含む、細胞培養物。

〔51〕少なくとも1種のT細胞活性化リガンドを表面に付加し、かつ内部に核酸を含む核酸送達担体を含む、T細胞への核酸送達用組成物。

〔52〕少なくとも1種のT細胞活性化リガンドを表面に付加し、かつ内部に核酸を含む核酸送達担体を含む、T細胞への核酸送達用キット。

発明の効果

〔0011〕 本発明によれば、ウイルスベクターを用いることなく、T細胞を活性化／増殖させる工程と、T細胞への遺伝子導入工程とを、One Podで同時に行うことができるので、短期間で製造原価の低い免疫細胞療法剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

〔0012〕〔図1〕種々のカチオン性脂質（化合物7、11、12、21、31及び35）を含む、抗CD3抗体を表面に付加した脂質ナノ粒子によるT細胞への遺伝子導入効率の比較を示す図である。

〔図2〕抗CD3抗体及び／又は抗CD28抗体を表面に付加した脂質ナノ粒子によるT細胞への遺伝子導入効率の比較を示す図である。

〔図3〕抗CD3抗体及び抗CD28抗体を表面に付加した脂質ナノ粒子によりT細胞への遺伝子導入（I）とT細胞の活性化（II）が同時に達成されることを示す図である。（I）及び（II）において、上段の数値は内封したmRNA濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）を、下段の数値は抗体濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）を示す。（III）は、従来公知の抗CD3抗体及び抗CD28抗体を表面に付加したビーズによるT細胞の活性化効率を比較のために示す。

〔図4〕活性化刺激剤と脂質ナノ粒子の共添加によりヒト末梢血CD3陽性汎T細胞

へ luc mRNA が効率よく導入されることを示す図である。

[図5]脂質ナノ粒子によって luc mRNA をトランスフェクションした T 細胞の生存及び増殖率を示す図である。

[図6]活性化刺激剤と脂質ナノ粒子の共添加によりヒト CD4/CD8 陽性 T 細胞への効率よく luc mRNA が導入されること（左）、並びに T 細胞の生存及び増殖率が高い水準で維持されること（右）を示す図である。

[0013]（発明の詳細な説明）

1. 本発明の核酸送達担体

本発明は、少なくとも 1 種の T 細胞活性化リガンドを表面に付加した核酸送達担体（以下、「本発明の核酸送達担体」ともいう。）を提供する。

ここで「核酸送達担体」とは、核酸を担持することができ、かつ該核酸を細胞内に送達し得る担体を意味する。「細胞内に送達し得る」とは、少なくとも、細胞の細胞質内に担持する核酸を送達することができることを意味する。

[0014] 1-1. 核酸送達担体

本発明で用いられる核酸送達担体は、上記のように、核酸を担持することができ、かつ該核酸を細胞内に送達し得るものである限り、その構造、構成分子、核酸の担持形態に特に制限はない。代表的な核酸のドラッグデリバリーシステム（DDS）としては、正電荷を持つカチオン性リポソームやカチオン性ポリマー等を担体として利用し、それらと核酸との静電的相互作用に基づいて形成された複合体が挙げられる。該複合体は負に荷電した細胞膜に結合した後、吸着性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。

[0015] より具体的には、本発明で用いられる核酸送達担体としては、例えば、脂質ナノ粒子（LNP）、リポソーム（例、カチオン性リポソーム、PEG 修飾リポソーム等）、カチオン性ポリマー（例、ポリエチレンイミン、ポリリジン、ポリオルニチン、キトサン、アテロコラーゲン、プロタミン等）、カチオン性ポリマーをリポソームに封入したもの等が挙げられるが、それらに限定されない。あるいは、生体由来成分であるエキソソームを用いることもできる

。好ましくは、脂質ナノ粒子又はリポソームであり、より好ましくは脂質ナノ粒子である。

[0016] 1-1-1. 脂質ナノ粒子 (LNP)

本明細書において「脂質ナノ粒子 (LNP)」とは、カチオン性脂質及び非カチオン性脂質を含む脂質集合体の外殻の内部に、大孔構造 (例、リポソーム) や小孔構造 (例、メソポーラス材料) を有しない、平均径1 μ m未満の粒子を意味する。

以下、脂質ナノ粒子の構成要素について説明する。

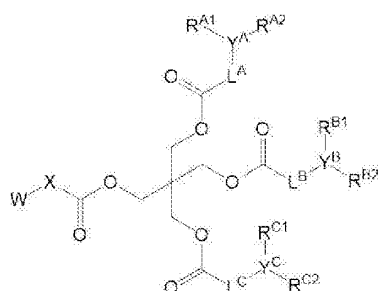
[0017] (a) カチオン性脂質

本明細書において、「カチオン性脂質」とは、生理学的pHやエンドソーム内などの低pH環境下において、正味の正電荷を持つ脂質を意味する。本発明で用いられる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 2016/021683、WO 2015/011633、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、WO2019/131839等に記載のカチオン性脂質などが挙げられる。

あるいは、Dongら (Proc Natl Acad Sci U S A, 2014 Apr 15;111(15):5753) に記載の合成カチオン性脂質 (例、K-E12、H-A12、Y-E12、G-012、K-A12、R-A12、cKK-E12、cPK-E12、PK1K-E12、PK500-E12、cQK-E12、cKK-A12、KK-A12、PK-4K-E12、cWK-E12、PK500-012、PK1K-012、cYK-E12、cDK-E12、cSK-E12、cEK-E12、cMK-E12、cKK-012、cIK-E12、cKK-E10、cKK-E14、及びcKK-E16、好ましくは、cKK-E12、cKK-E14)、Love KTら (Proc Natl Acad Sci U S A, 2010 May 25;107(21):9915) に記載の合成カチオン性脂質 (例、C14-98、C18-96、C14-113、C14-120、C14-120、C14-110、C16-96及びC12-200、好ましくはC14-110、C16-96及びC12-200) を挙げることができる。

[0018] 好ましい一実施態様においては、WO 2016/021683に記載の下記一般式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。

[0019] [化1]



[0020] [式中、

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

、

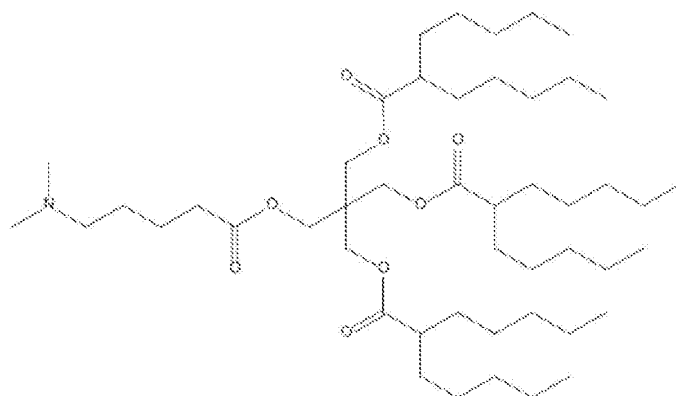
L^A 、 L^B 及び L^C は、それぞれ独立して、置換されていてもよいメチレン基又は結合手を、

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。

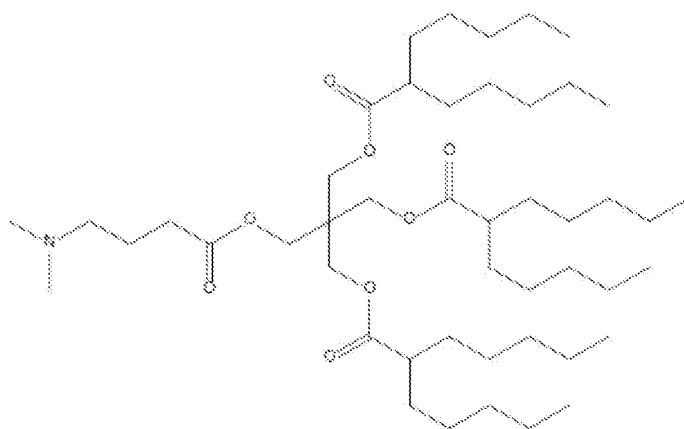
[0021] より好ましくは、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。

[0022] [化2]



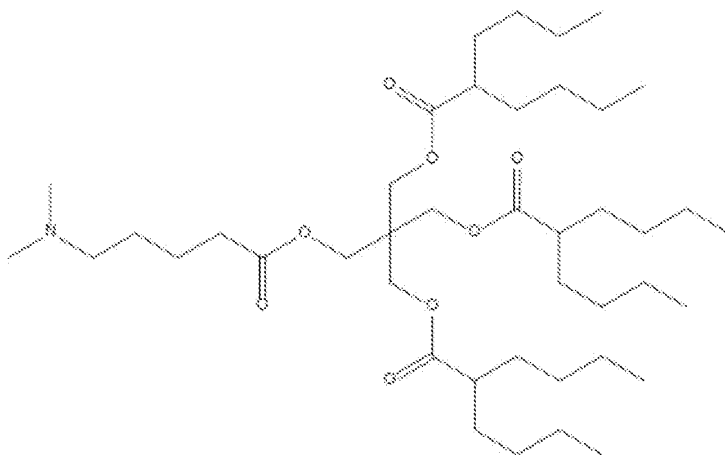
(化合物1)

[0023] [化3]



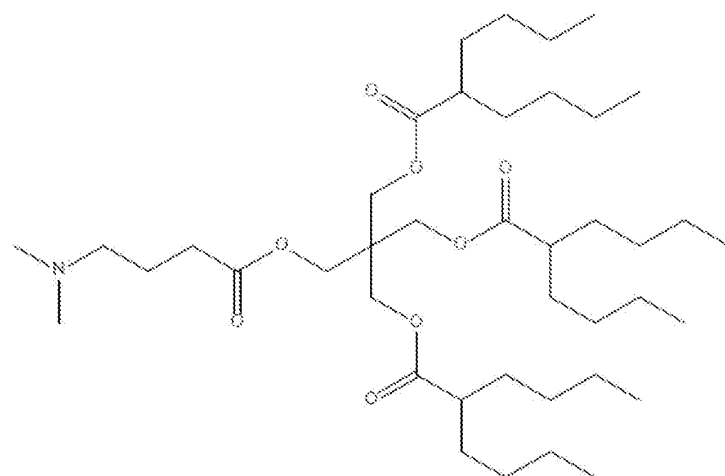
(化合物 2)

[0024] [化4]



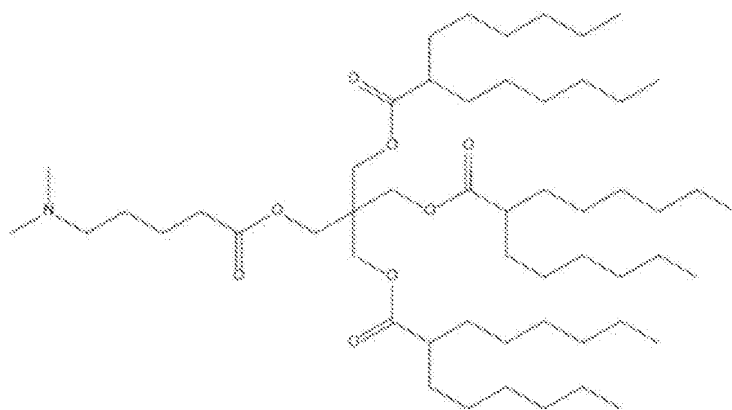
(化合物 3)

[0025] [化5]



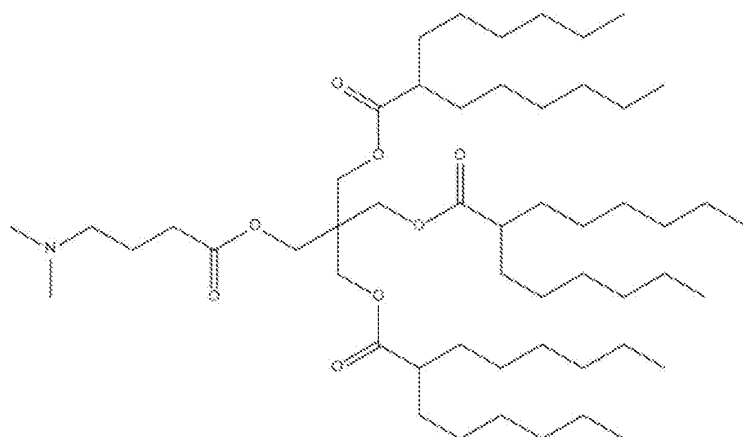
(化合物 4)

[0026] [化6]



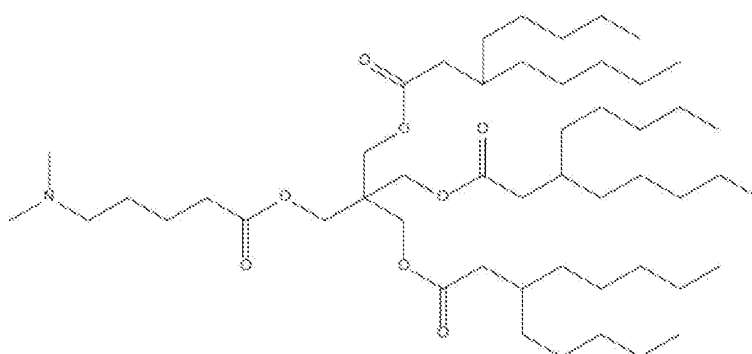
(化合物 5)

[0027] [化7]



(化合物 6)

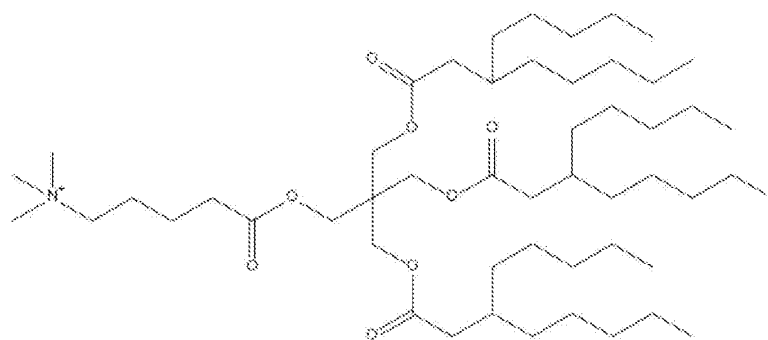
[0028] [化8]



(化合物 7)

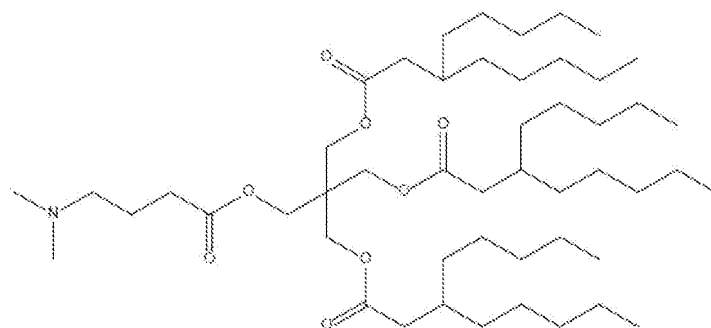
[0029]

[化9]



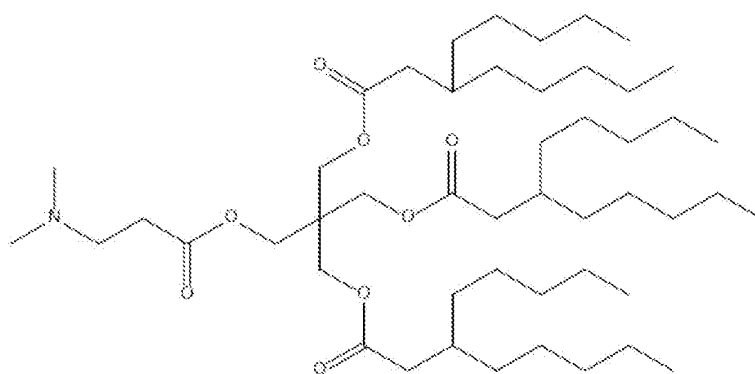
(化合物8)

[0030] [化10]



(化合物9) 及び

[0031] [化11]



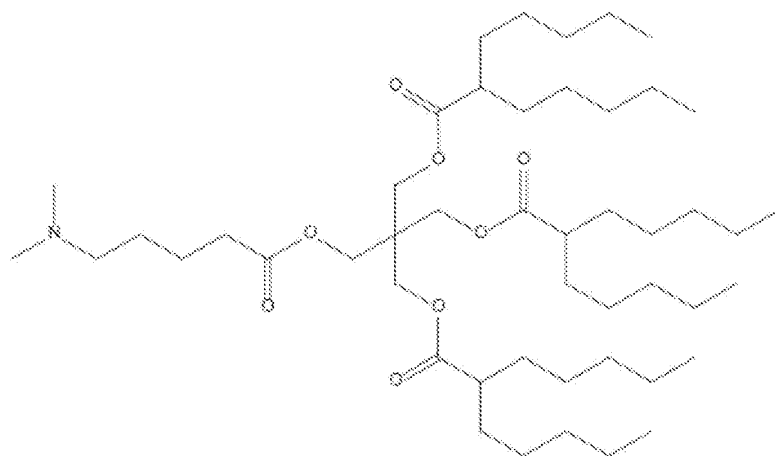
(化合物10)

[0032] 並びにそれらの塩。

[0033] 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。

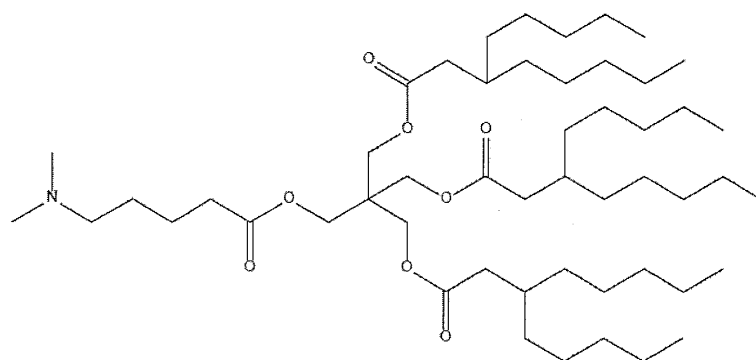
[0034]

[化12]



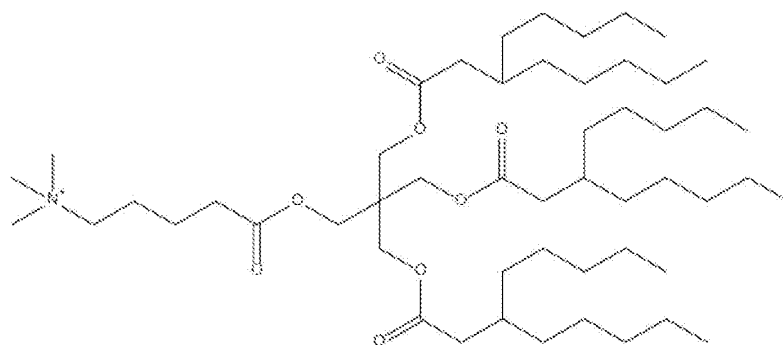
(化合物1)

[0035] [化13]



(化合物7) 及び

[0036] [化14]



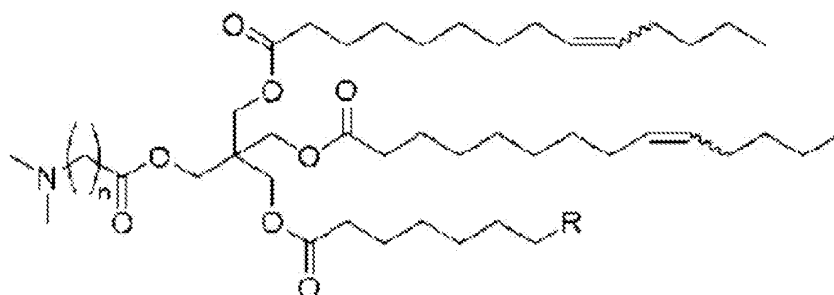
(化合物8)

[0037] 並びにそれらの塩。

[0038] 別の好ましい実施態様においては、W02019/131839に記載の下記一般式で表

されるカチオン性脂質が挙げられる。

[0039] [化15]



[0040] [式中、

n は、2～5の整数を、

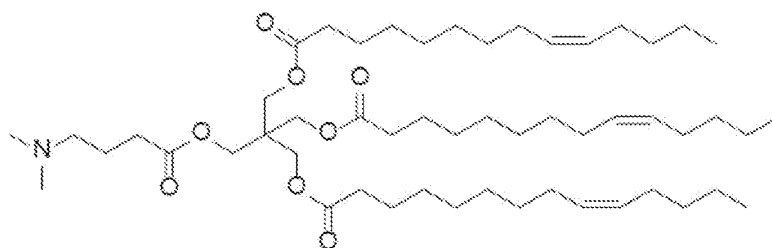
R は、直鎖状 C_{1-5} アルキル基、直鎖状 C_{7-11} アルケニル基又は直鎖状 C_{11} アルカジェニル基を、

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。

[0041] 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。

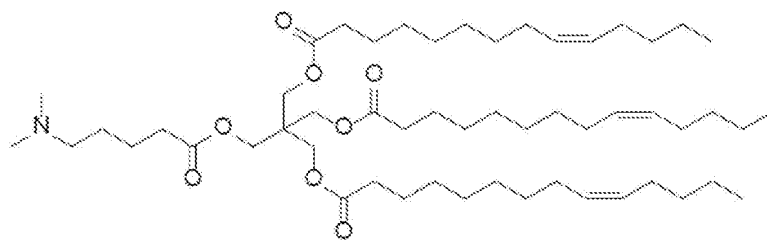
[0042] [化16]



(化合物 11)

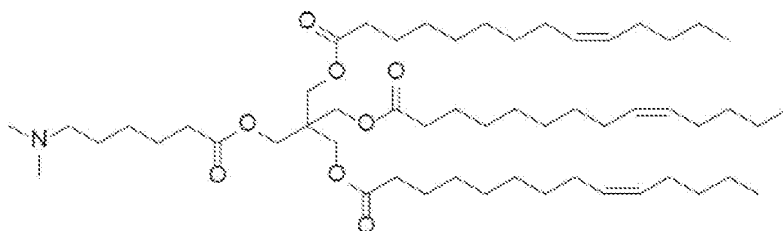
[0043]

[化17]



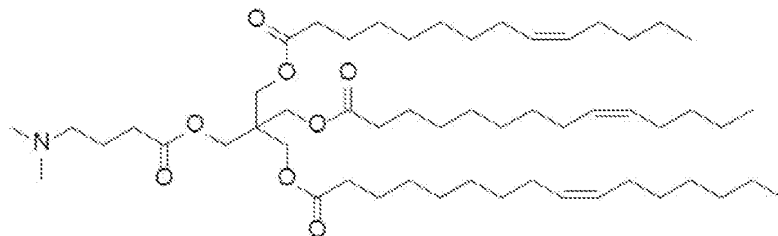
(化合物 1 2)

[0044] [化18]



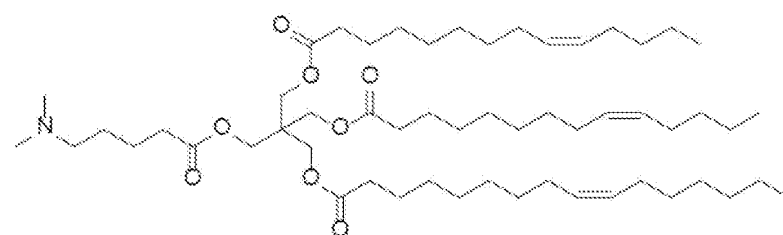
(化合物 1 3)

[0045] [化19]



(化合物 1 4)

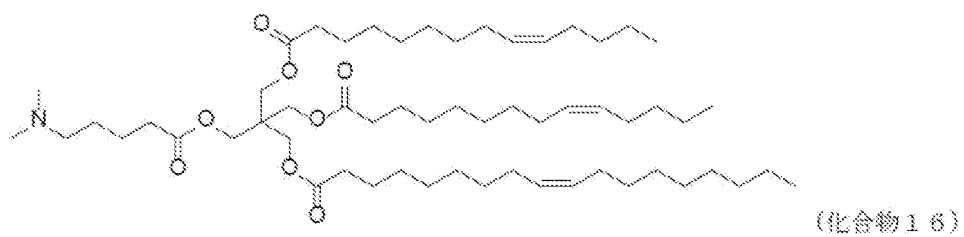
[0046] [化20]



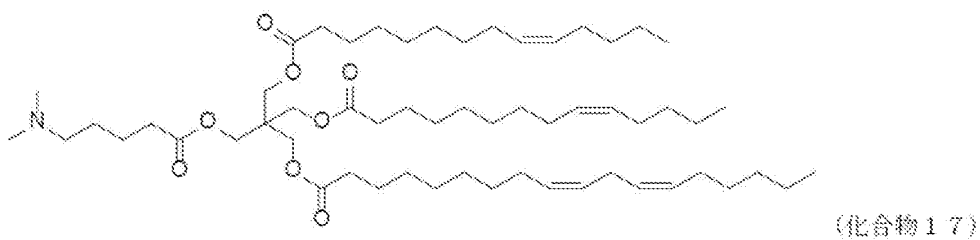
(化合物 1 5)

[0047]

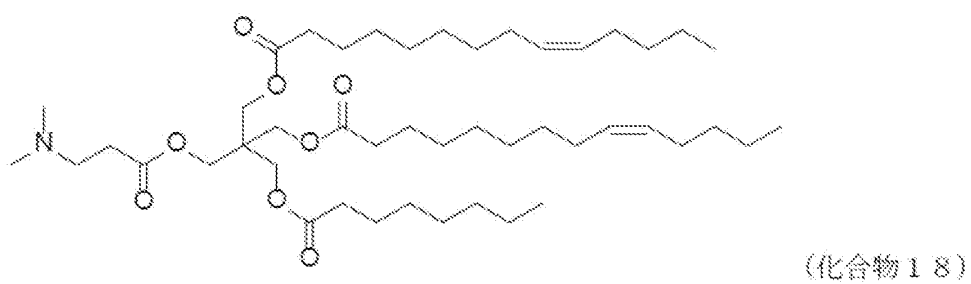
[化21]



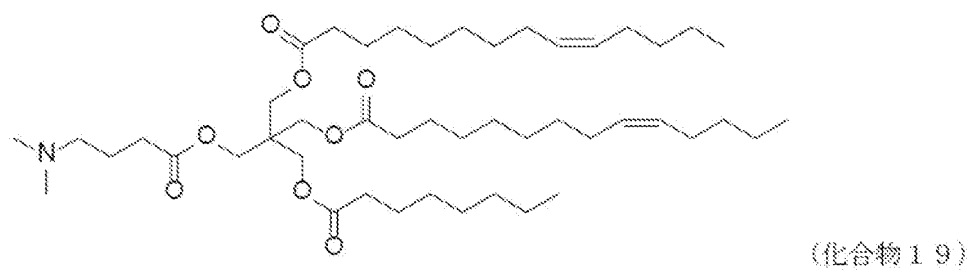
[0048] [化22]



[0049] [化23]

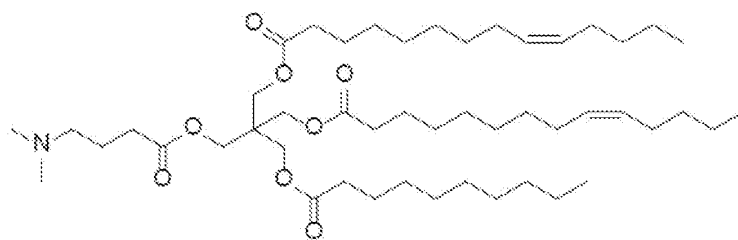


[0050] [化24]



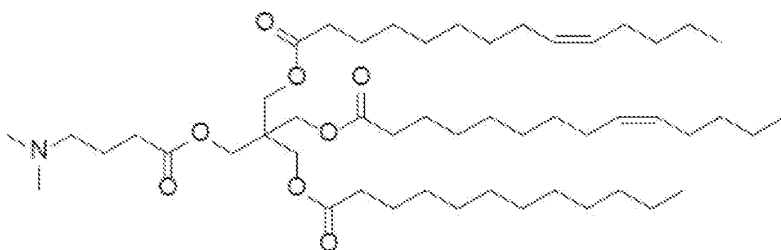
[0051]

[化25]



(化合物20) 及び

[0052] [化26]

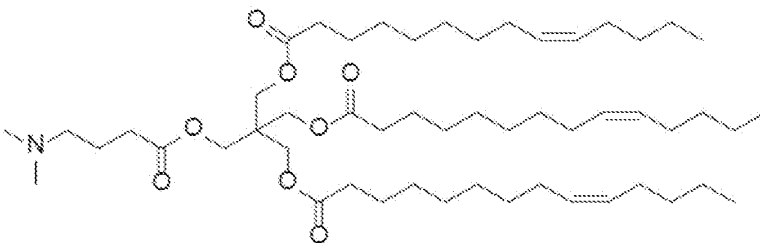


(化合物21)

[0053] 並びにそれらの塩。

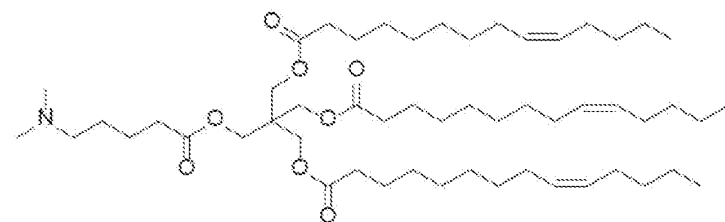
[0054] 上記カチオン性脂質のうち、より好ましいものとして、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。

[0055] [化27]



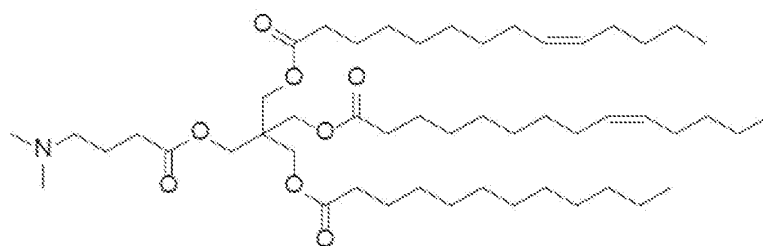
(化合物11)

[0056] [化28]



(化合物12) 及び

[0057] [化29]

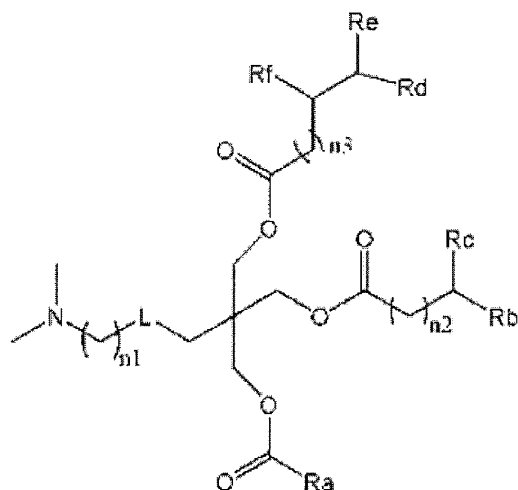


(化合物 21)

[0058] 並びにそれらの塩。

[0059] 別の好ましい実施態様においては、下記一般式(III)で表されるカチオン性脂質が挙げられる。

[0060] [化30]



(III)

[0061] [式中、

n_1 は、2～6の整数を、

n_2 は、0～2の整数を、

n_3 は、0～2の整数を、

L は、 $-C(O)O-$ 又は $-NHC(O)O-$ を、

R_a は、直鎖状 C_{5-13} アルキル基、直鎖状 C_{13-17} アルケニル基又は直鎖状 C_{17} アルカジェニル基を、

R b は、直鎖状C₂₋₉アルキル基を、

R c は、水素原子又は直鎖状C₂₋₉アルキル基を、

R d は、水素原子又は直鎖状C₂₋₉アルキル基を、

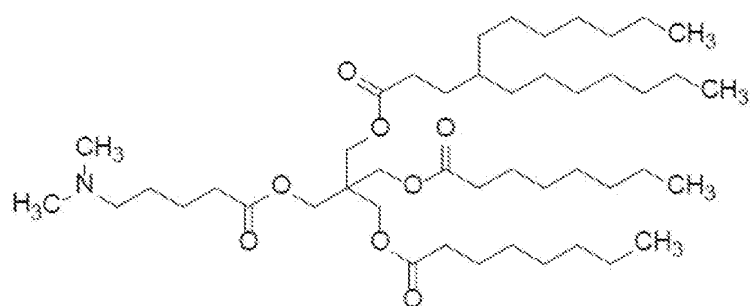
R e は、直鎖状C₂₋₉アルキル基を、

R f 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。

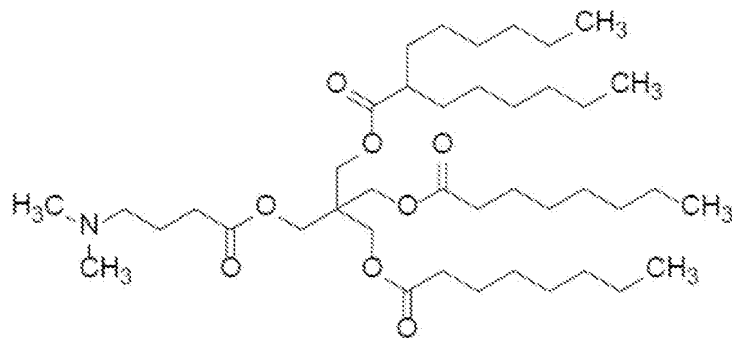
[0062] より好ましくは、下記構造式で表されるカチオン性脂質が挙げられる。

[0063] [化31]



(化合物 2 2)

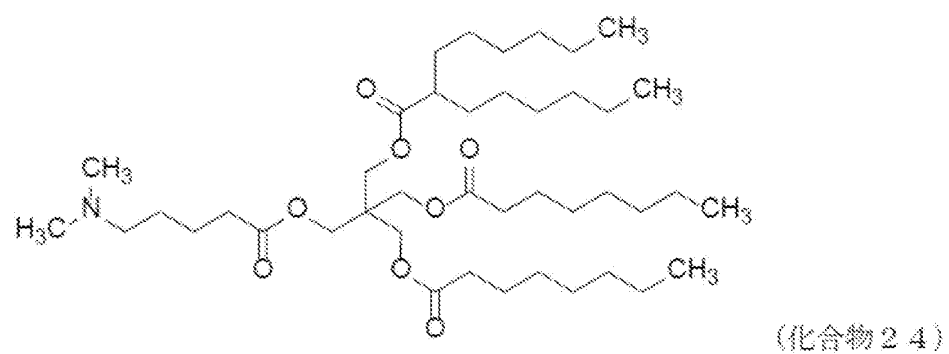
[0064] [化32]



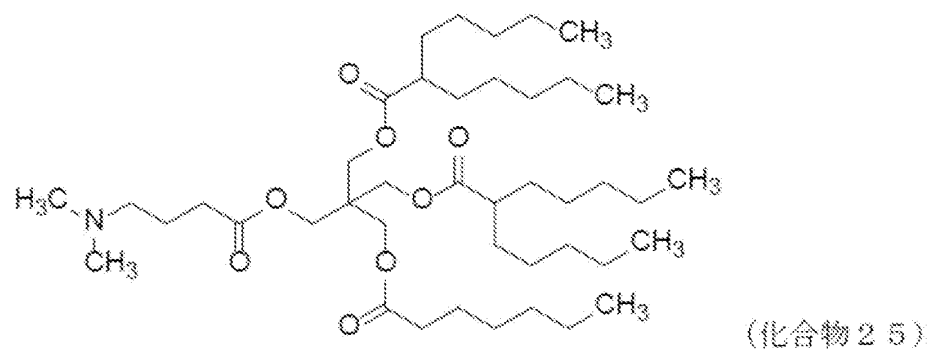
(化合物 2 3)

[0065]

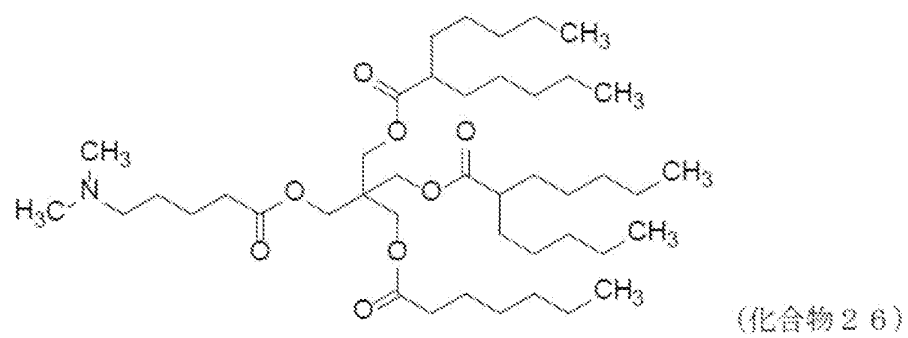
[化33]



[0066] [化34]

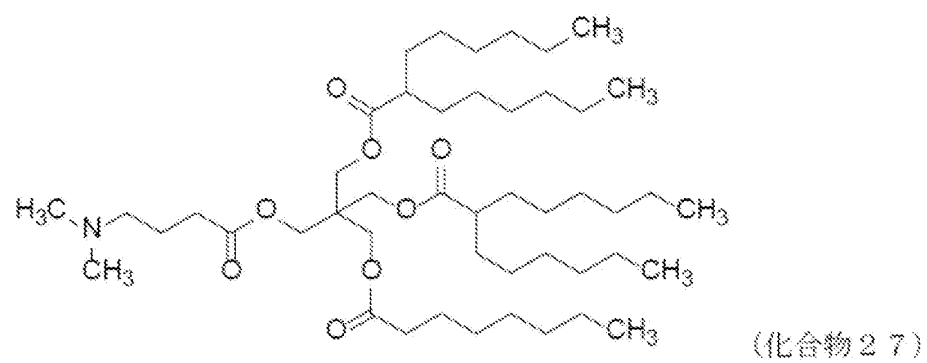


[0067] [化35]

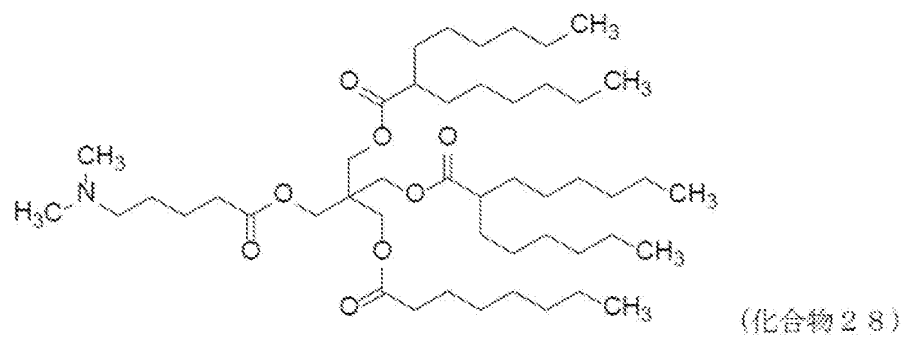


[0068]

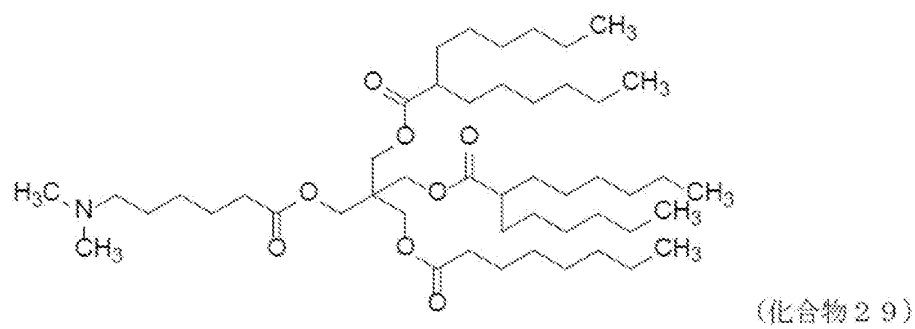
[化36]



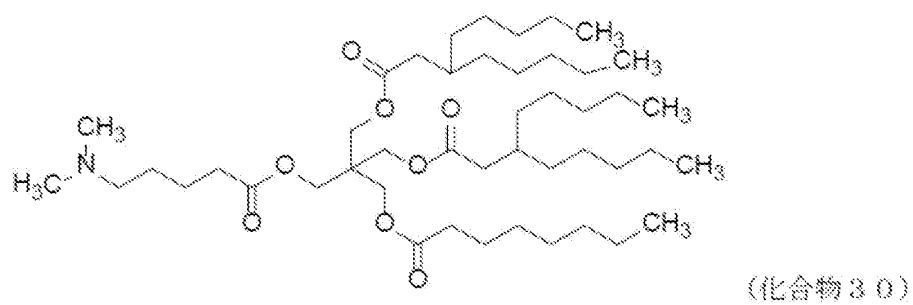
[0069] [化37]



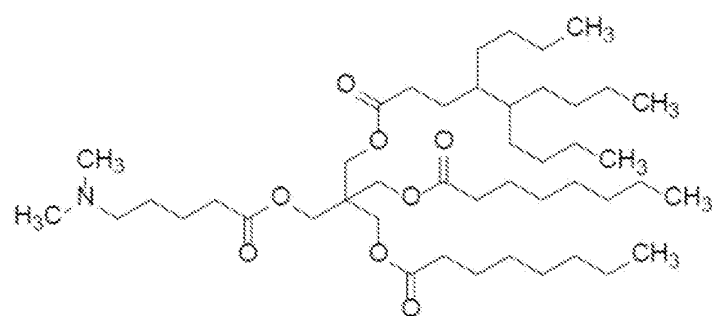
[0070] [化38]



[0071] [化39]

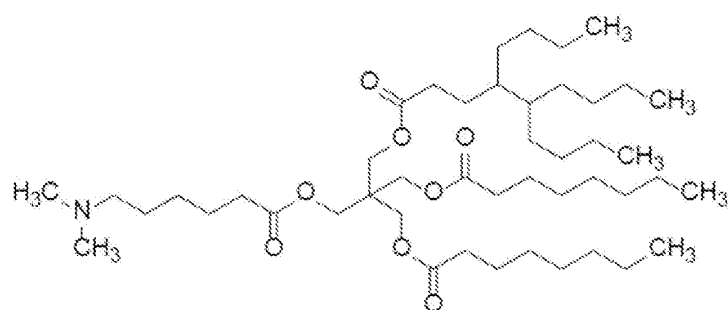


[0072] [化40]



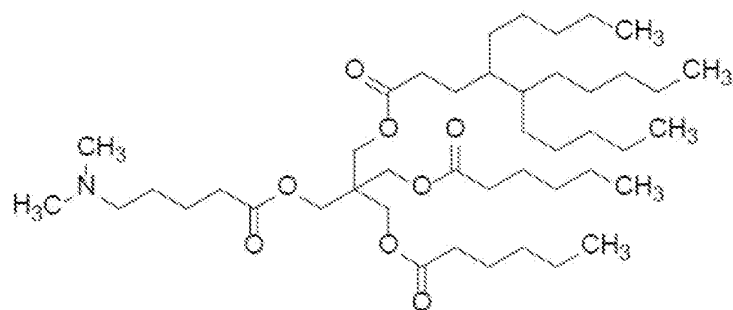
(化合物 3-1)

[0073] [化41]



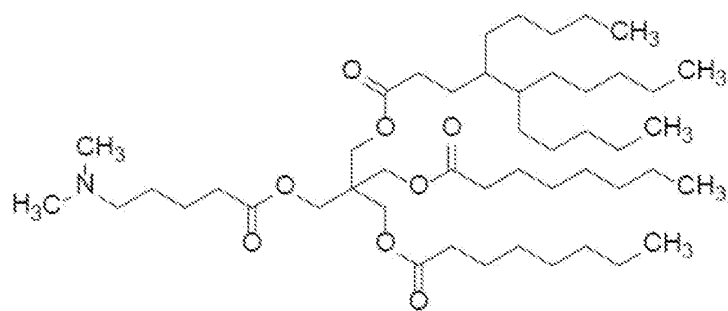
(化合物 3-2)

[0074] [化42]



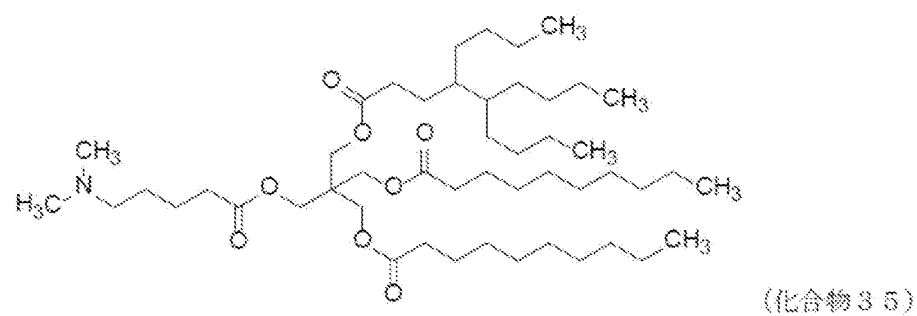
(化合物 3-3)

[0075] [化43]

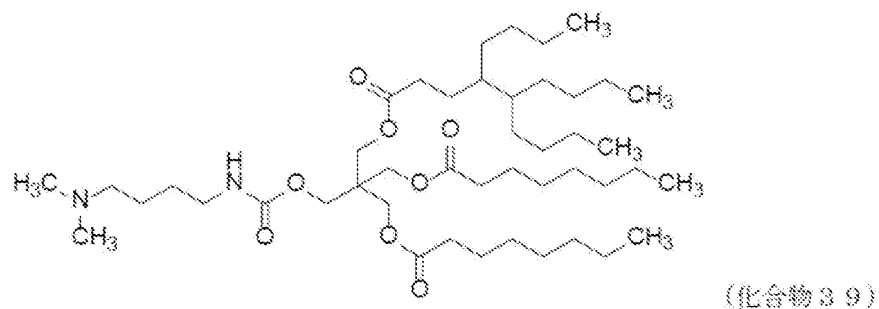


(化合物 3-4)

[0076] [化44]



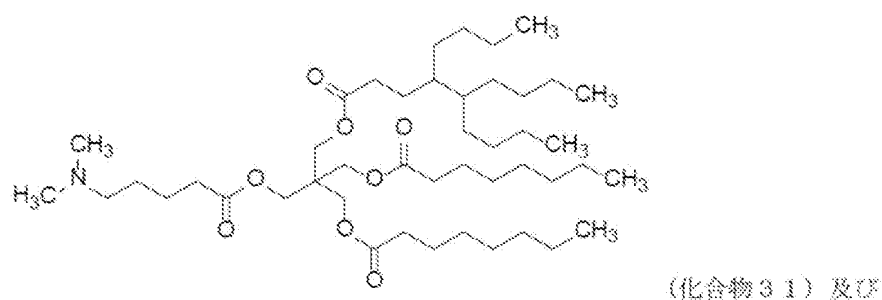
[0080] [化48]



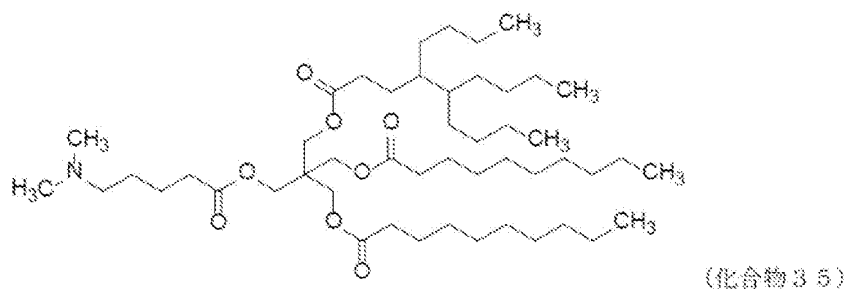
[0081] 並びにそれらの塩。

[0082] 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。

[0083] [化49]



[0084] [化50]

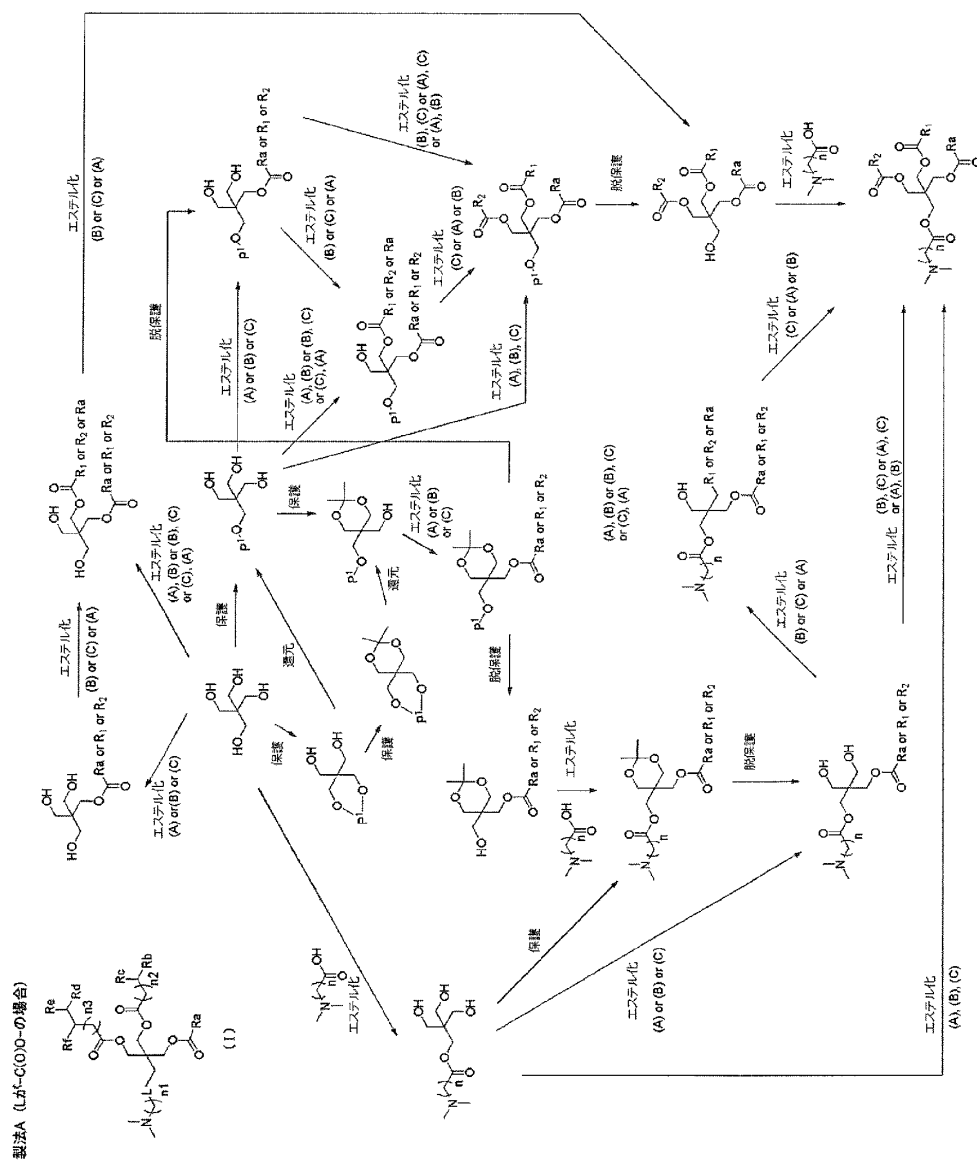


[0085] 並びにそれらの塩。

[0086] 化合物 (111) 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 (111) 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 (1) を合成することが可能である。また、化合物 (111) 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。

[0087] [化51]

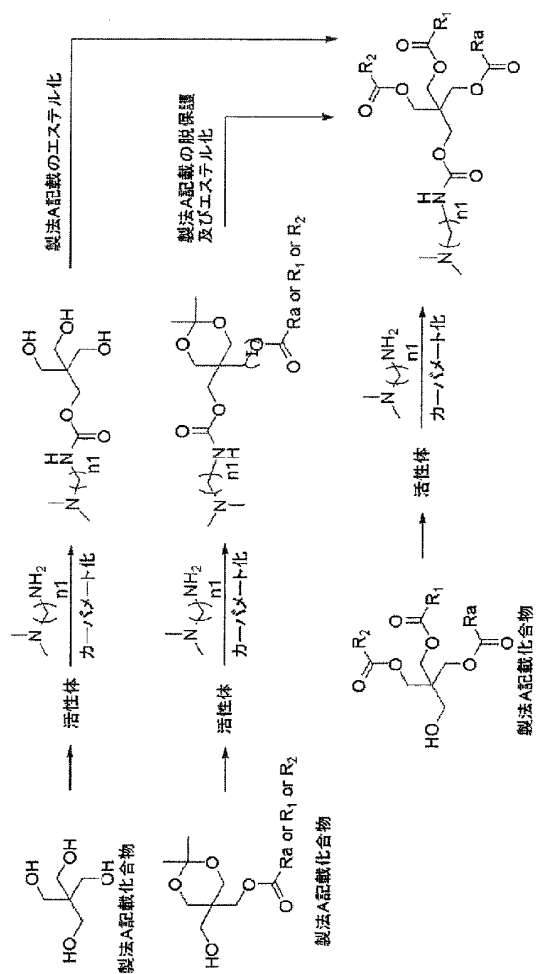


[0088]

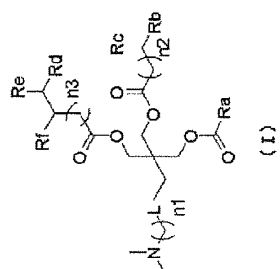
製法A (Lが-C(O)O-の場合)

(C1)

[化52]



製法B (Lが-NHC(O)O-の場合)

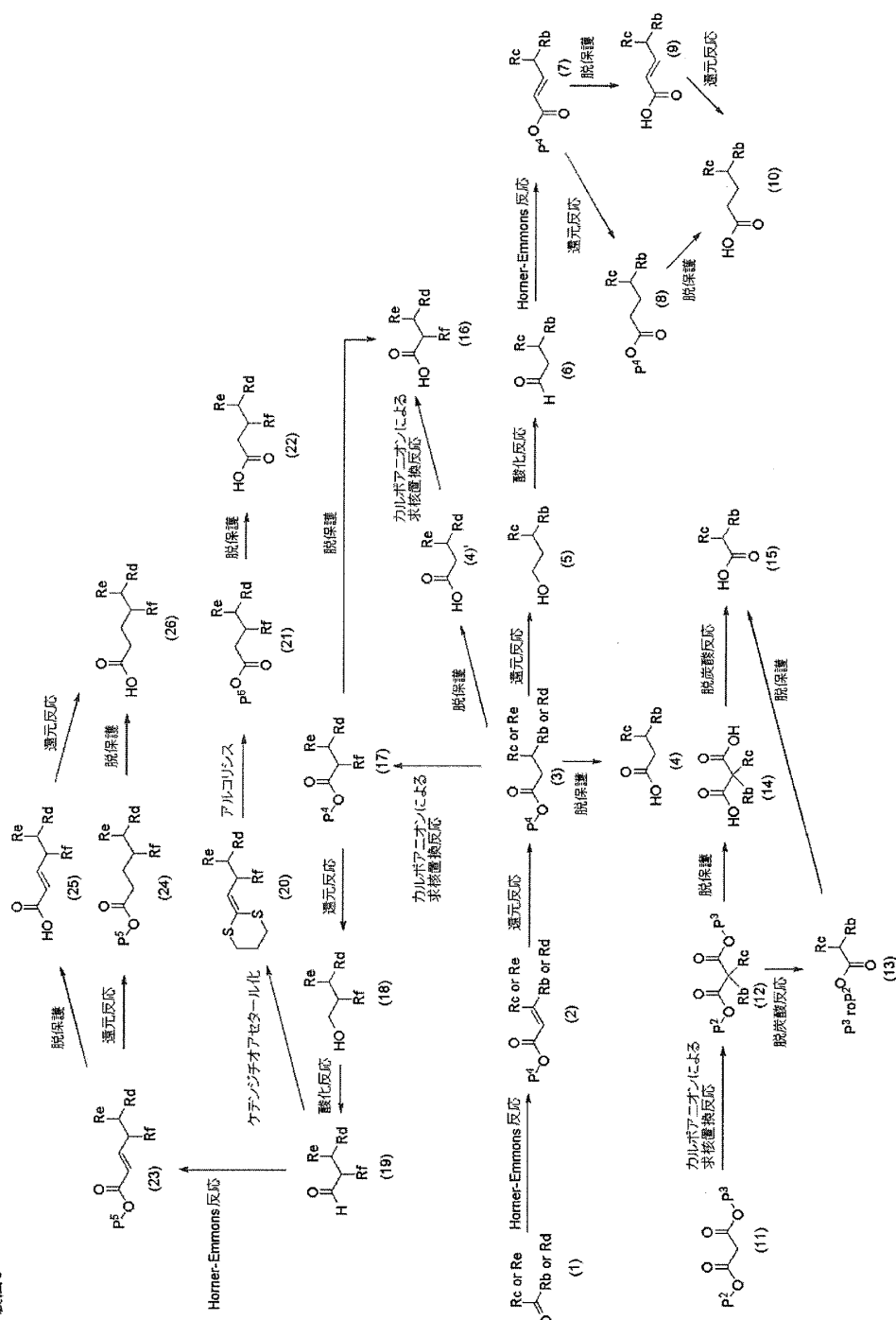


[0089]

[化53]

製法C

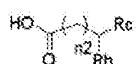
[0090]

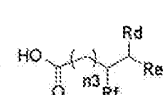
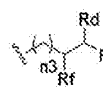


[化54]

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、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、

- [0091] 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。
- [0092] 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。
- [0093] 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。
- [0094] 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。
- [0095] 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。
- [0096] 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°C ～ 300°C 、好ましくは -78°C ～ 150°C である。
- [0097] 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。

- [0098] 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。
- [0099] 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。
- [0100] 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。
- [0101] 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。

[0102] 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。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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。

- [0106] 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 SYNTHESSES Collective Volume I～VII（John Wiley & Sons Inc）；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。
- [0107] 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, 4th Ed.」（Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts著）；Thieme社2004年刊「Protecting Groups 3rd Ed.」（P. J. Kocienski著）などに記載された方法に準じて行われる。
- [0108] 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。

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 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L i n d l a r触媒などの触媒を用いる方法がある。

[0116] 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(MC P B A)、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含む試薬；四酢酸鉛などの鉛類；クロロクロム酸ピリジニウム(P C C)、ニクロム酸ピリジニウム(P D C)、ジョーンズ試薬などのクロムを含む試薬；N－ブロモスクシンイミド(N B S)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；二酸化ゼレン；2, 3－ジクロロ－5, 6－ジシアノ－1, 4－ベンゾキノン(D D Q)などが挙げられる。

[0117] 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(A I B N)などのアゾ化合物；4－4’－アゾビス－4－シアノペンタン酸(A C P A)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。

[0118] 各工程において、W i t t i g反応を行う場合、使用されるW i t t i g

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。

- [0119] 各工程において、H o r n e r - E m m o n s 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。
- [0120] 各工程において、F r i e d e l - C r a f t s 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。
- [0121] 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。
- [0122] 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（M i c h a e l 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。
- [0123] 各工程において、G r i g n a r d 反応を行う場合、G r i g n a r d 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。G r i g n a r d 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。
- [0124] 各工程において、K n o e v e n a g e l 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。

[0125] 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。

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 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'-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。

[0130] 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。

[0131] 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、代表的には五硫化ニリンが用いられるが、五硫化ニリンの他に、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。

- [0132] 各工程において、Wohler-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。
- [0133] 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。
- [0134] 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、プ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。
- [0135] 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。

- [0136] 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。
- [0137] 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、五酸化ニリン、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。
- [0138] 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'-ジベンジリ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。
- [0139] 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。

[0140] (b) 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。

[0141] リン脂質としては、例えば、T細胞内への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、ホスファチジリンノシトール、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、又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。

[0142] 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）、パルミトイルオレオイ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）、及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、及びDOPEである。

[0143] 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。

[0144] 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。

[0145] 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。

[0146] 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、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、ジアシ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-0-アルキル-sn3-カルボモイルグリセリド（PEG-C-DMG）、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)（2 KPEG-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、T細胞活性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細胞活性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SUN BRIGHT DSPE-020MA（日油）を用いることができる。

[0147] 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30％～約100％、より好ましくは約40％～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。

[0148] 1-1-2. リポソーム

本発明で用いられる別の好ましい核酸送達担体として、リポソームが挙げられる。リポソームとしては、核酸の細胞へのDDSにおいて従来より用いられているものを、同様に用いることができる。例えば、トランスフェクション試薬として開発された種々のカチオン性脂質（例、DOTMA、DOTAP、DDAB、DMRIE等）と、エンドソームからの放出を促進する膜融合性の中性脂質（例、DOP E、コレステロール等）を混合して調製したリポソームが広く使用されている。リポソームの表面に、PEGや、pH応答性膜融合ペプチド、膜透過促進ペプチド等の機能性分子を付加したリポソームを用いることもできる。

[0149] 1-2. T細胞活性化リガンド

本発明の核酸送達担体は、上記の核酸送達担体の表面にT細胞活性化リガン

ドが付加されたものである。

本発明で用いられるT細胞活性化リガンドは、T細胞の表面分子と相互作用して、T細胞の活性化及び／又は増殖を促進する分子であれば特に制限はない。例えば、TCRと共役してTCRを介したシグナル伝達を担うCD3や、T細胞活性化の共刺激因子として知られる表面分子CD28、ICOS、CD137、OX40、CD27、GITR、BAFFR、TACI、BMCA、CD40L等の特異的に結合して、活性化／増殖シグナルや共シグナルを、T細胞内又は抗原提示細胞内に伝達する機能を有する分子が挙げられる。そのような分子としては、上記T細胞表面分子に対する生理的なりガンド（又は受容体）であってもよいし、アゴニスト活性を有する非生理的なりガンド（又は受容体）であってもよい。非生理的なりガンドとして、好ましくはアゴニスト抗体を挙げることができる。

[0150] より好ましくは、本発明で用いられるT細胞活性化リガンドとして、CD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体が挙げられる。CD3に対する抗体及びCD28に対する抗体は、それぞれ活性化及び／又は増殖を誘導する標的T細胞で発現するCD3及びCD28と特異的に結合し（例えば、標的T細胞がヒト由来である場合、CD3に対する抗体及びCD28に対する抗体は、それぞれ抗ヒトCD3抗体及び抗ヒトCD28抗体であることが望ましい）、これらT細胞の表面分子を刺激してT細胞内にシグナルを伝達する能力を有する限り、完全抗体であっても、そのフラグメント（例、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、Fv、還元抗体（rIgG）、dsFv、sFv、ダイアボディ、トリアボディ等）であってもよい。また、抗体のサブクラスについても特に制限はないが、好ましくはIgG抗体である。

[0151] T細胞活性化リガンドとして、CD3に対する抗体やCD28に対する抗体等のアゴニスト抗体を用いる場合、完全抗体分子であれば、市販の抗CD3抗体、抗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、前記いずれかの抗体フラグメントの場合には、完全抗体を還元剤（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、後述の核酸送達担体に内包する核酸を取得す

るのと同様の方法により、抗CD3抗体、抗CD28抗体等のフラグメントをコードする核酸を単離し、それを用いて該抗体フラグメントを組換え生産することができる。

[0152] T細胞活性化リガンドは、1種のみを用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよいが、2種以上を組み合わせることが好ましい。2種以上のT細胞活性化リガンドを組み合わせ用いる場合、少なくとも1種は、CD3に対する抗体もしくはCD28に対する抗体であることが好ましく、CD3に対する抗体であることがより好ましい。特に好ましくは、CD3に対する抗体とCD28に対する抗体の両方を、T細胞活性化リガンドとして用いることができる。

[0153] T細胞活性化リガンドとして、少なくともCD3に対する抗体とCD28に対する抗体とを組み合わせ用いる場合、本発明の核酸送達担体の表面に付加される両者のモル比は、1:4～4:1、好ましくは1:2～2:1である。

[0154] 2種以上のT細胞活性化リガンドを組み合わせ用いる場合、それらのT細胞活性化リガンドは、それぞれ別個に核酸送達担体の表面に付加してもよいし、各々のT細胞活性化活性が保持される限り、それらを複合体化したものを核酸送達担体の表面に付加してもよい。例えば、2種のT細胞活性化リガンドが抗体（例、CD3に対する抗体とCD28に対する抗体）である場合、自体公知の二重特異性抗体として提供することができる。

[0155] 本発明の核酸送達担体において、T細胞活性化リガンドは、核酸送達担体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脂質を含む脂質ナノ粒子を核酸送達担体として用いる場合には、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-020M A）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を調製することができる。核酸送達担体としてPEG修飾リポソームを用いる場合でも、同様にしてT細胞活性化リガンドをリポソーム表面に付加することができる。

[0156] 1－3. 本発明の核酸送達担体に含まれる核酸

本発明の核酸送達担体は、核酸を含まない形態で、T細胞の活性化及び／又は増殖を誘導するのに用いることもできるが、好ましい一実施態様においては、核酸を内包することにより、T細胞の活性化及び／又は増殖と、T細胞内への該核酸の送達とを同時に一工程で行うことができる。従って、好ましい一実施態様において、本発明の核酸送達担体は、その内部にさらにT細胞内へ送達させるための核酸を含む。

[0157] 本発明の核酸送達担体が内部に核酸を含む場合、該核酸は、T細胞内で、それ自体又はその転写産物もしくは翻訳産物が、該T細胞を所望の状態に変化させる機能を有するものであれば、特に制限されない。

[0158] 1-3-1. T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸

好ましい一実施態様においては、本発明の核酸送達担体は、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸を内部に含む。対象となるT細胞活性化抑制因子としては、T細胞の活性化を抑制するものであれば特に制限はないが、例えば、抗原提示細胞や腫瘍細胞から刺激を受けて、T細胞の活性化及び／又は増殖に対して負のシグナルを伝達する細胞表面分子である免疫チェックポイント因子（例、CTLA-4、PD-1、TIM-3、LAG-3、TGIT、BTLA、VISTA (PD-1H) 等）、CD160、Cbl-b、内因性TCRなどが挙げられる。

[0159] T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸は、該因子をコードする遺伝子の転写レベル、転写後調節のレベル、タンパク質への翻訳レベル、翻訳後修飾のレベル等のいかなる段階で作用するものであってもよい。従って、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸としては、例えば、該因子をコードする遺伝子の転写を阻害する核酸（例、アンチジーン）、初期転写産物からmRNAへのプロセッシングを阻害する核酸、mRNAからタンパク質への翻訳を阻害するか（例、アンチセンス核酸、miRNA）あるいはmRNAを分解する（例、siRNA、リボザイム、miRNA）核酸などが含まれる。いずれの段階で作用するものであっても用いることができるが、mRNAに相補的に結合してタンパク質への翻訳を阻害するかあるいはmRNAを分解する物質が好ましい。当該核酸としては、

- (a) 該因子をコードするmRNAに対してRNAi活性を有する核酸もしくはその前駆体、
 - (b) 該因子をコードするmRNAに対するアンチセンス核酸、及び
 - (c) 該因子をコードするmRNAに対するリボザイム核酸
- 等が挙げられる。

各T細胞活性化抑制因子をコードするmRNA (cDNA) のヌクレオチド配列は公知であり、例えば、公共のデータベース (例、NCBI、EMBL、DDBJ等) から配列情報を入手することができる。

- [0160] (a) T細胞活性化抑制因子をコードするmRNAに対してRNAi活性を有する核酸もしくはその前駆体

T細胞活性化抑制因子をコードするmRNAに対してRNAi活性を有する核酸としては、標的mRNAに相補的なオリゴRNAとその相補鎖とからなる二本鎖RNA、即ちsiRNAが挙げられる。siRNAは、標的遺伝子のcDNA配列情報に基づいて、例えば、Elbashirら (Genes Dev., 15, 188-200 (2001)) の提唱する規則に従って設計することができる。また、siRNAの前駆体であるショートヘアピンRNA (shRNA) は、ループ構造を形成しうる任意のリンカー配列 (例えば、5-25塩基程度) を適宜選択し、siRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖とを該リンカー配列を介して連結することにより設計することができる。

- [0161] siRNA及び／又はshRNAの配列は、種々のwebサイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、Dharmaconが提供するsiDESIGN Center (<http://dharmacon.horizondiscovery.com/jp/design-center/?rdr=true&LangType=1041&pageid=17179928204>)、GenScriptが提供するsiRNA Target Finder (<https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder>) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

- [0162] 本明細書においては、T細胞活性化抑制因子をコードするmRNAを標的とするマイクロRNA (miRNA) もまた、該mRNAに対してRNAi活性を有する核酸に包含されるものとして定義される。miRNAはまず、それをコードする遺伝子から一次転写産物であるprimary-microRNA (pri-miRNA)が転写され、次いで、Drosh

aにより特徴的なヘアピン構造を有する約70塩基長のprecursor-microRNA (pre-miRNA)にプロセッシングされた後、核から細胞質に輸送され、さらに、Dicer介在によるプロセッシングにより成熟型miRNAとなり、RISCに取り込まれて標的mRNAに作用する。従って、miRNAの前駆体として、pre-miRNAやpri-miRNA、好ましくはpre-miRNAを用いることもできる。

[0163] miRNAは、種々のwebサイト上に無料で提供される標的予測ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、米国ホワイトヘッド研究所が公開しているTargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/)、ギリシアのアレクサンダー・フレミング生体医科学研究センターが公開しているDIANA-micro-T-CDS (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index) 等が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、チェザレー大学・パスツール研究所等が公開している、標的mRNAに作用することが実験的に証明されているmiRNAに関するデータベースであるTarBase (http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8/index) を用いて、T細胞活性化抑制因子をコードするmRNAを標的とするmiRNAを検索することもできる。

[0164] siRNA及び／又はshRNA、あるいはmiRNA及び／又はpre-miRNAを構成するヌクレオチド分子は、天然型のRNAもしくはDNAでもよいが、安定性（化学的及び／又は対酵素）や比活性（RNAとの親和性）を向上させるために、自体公知の種々の化学修飾を含むことができる。

[0165] siRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、siRNAの前駆体となるshRNAを合成し、これをダイサー（dicer）を用いて切断することにより調製することもできる。miRNA及びpre-miRNAは、それらの配列情報に基づいて、DNA/RNA自動合成機で合成することができる。

[0166] 本明細書においては、生体内でT細胞活性化抑制因子をコードするmRNAに対

するsiRNA又はmiRNAを生成し得るようにデザインされた核酸もまた、該mRNAに対してRNAi活性を有する核酸に包含されるものとして定義される。そのような核酸としては、上記したshRNAもしくはsiRNA又はmiRNAもしくはpre-miRNAを発現するように構築された発現ベクターなどが挙げられる。プロモーターとしては、polII系プロモーター（例えば、CMV前初期プロモーター）を使用することもできるが、短いRNAの転写を正確に行わせるために、polIII系プロモーターを使用するのが一般的である。polIII系プロモーターとしては、マウス及びヒトのU6-sRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどが挙げられる。また、転写終結シグナルとして4個以上Tが連続した配列が用いられる。miRNAやpre-miRNAの発現カセットも、shRNAと同様にして作製することができる。

[0167] (b) T細胞活性化抑制因子をコードするmRNAに対するアンチセンス核酸

T細胞活性化抑制因子をコードするmRNAに対するアンチセンス核酸は、該mRNAのヌクレチド配列と相補的なヌクレオチド配列又はその一部を含む核酸であって、標的mRNAと特異的かつ安定した二重鎖を形成して結合することにより、タンパク質合成を抑制する機能を有するものである。アンチセンス核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こすことができる。アンチセンス核酸の標的領域は、該アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてタンパク質への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、タンパク質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約10塩基程度、長いものでmRNAもしくは初期転写産物の全配列が挙げられる。また、アンチセンス核酸は、標的mRNAや初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるこれらの遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAへの転写を阻害し得るもの（アンチジーン）であってもよい。

[0168] アンチセンス核酸を構成するヌクレオチド分子もまた、安定性、比活性などを向上させるために、上記のsiRNA等の場合と同様の修飾を受けていてもよい。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子のcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。

[0169] 本明細書においては、生体内でT細胞活性化抑制因子をコードするmRNAに対するアンチセンスRNAを生成し得るようにデザインされた核酸もまた、該mRNAに対するアンチセンス核酸に包含されるものとして定義される。そのような核酸としては、上記したアンチセンスRNAを発現するように構築された発現ベクターなどが挙げられる。プロモーターとしては、転写されるアンチセンスRNAの長さに応じて、polII系プロモーターかpolIII系プロモーターを適宜選択して用いることができる。

[0170] (c) T細胞活性化抑制因子をコードするmRNAに対するリボザイム核酸

T細胞活性化抑制因子をコードするmRNAをコード領域の内部で特異的に切断し得るリボザイム核酸もまた、該因子の発現を抑制する核酸として使用することができる。「リボザイム」とは、狭義には、核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイム核酸として最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる。

[0171] (d) ゲノム編集を用いてT細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸

上記(a)～(c)とは別の好ましい実施態様として、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸は、該因子をコードする遺伝子を不活性化（ノックアウト

）し得る核酸であり得る。そのような核酸として、該遺伝子中の部分ヌクレオチド配列を標的として特異的に認識し得る核酸配列認識モジュール（例、CRISPR/Cas9、ZFモチーフ、TALエフェクター等）と、標的配列の内部もしくはその近傍で、該遺伝子に二重鎖切断（DSB）を導入するヌクレアーゼとからなる人工ヌクレアーゼをコードする核酸が挙げられる。DSB導入後、非相同末端結合（NHEJ）修復エラーによる挿入又は欠失変異により該遺伝子をノックアウトすることができる。あるいは、該遺伝子配列内にマーカー遺伝子（例、蛍光タンパク質遺伝子等のレポーター遺伝子、薬剤耐性遺伝子等の選択マーカー遺伝子）を挿入したターゲティングベクターと組み合わせることによって、相同組換え（HR）修復による遺伝子ノックアウトを行うこともできる。また、内因性TCR遺伝子を外因性TCR遺伝子でHR修復によりノックインすることもできる。

[0172] 1-3-2. T細胞活性化促進因子をコードする核酸

別の好ましい実施態様においては、本発明の核酸送達担体は、T細胞活性化促進因子をコードする核酸を内部に含む。対象となるT細胞活性化促進因子としては、例えば、上述のT細胞活性化リガンドが結合して、T細胞内に活性化及び／又は増殖シグナルを伝達する、T細胞表面分子（例、CD28、ICOS、CD137、OX40、CD27、GITR、BAFFR、TACI、BMCA、CD40L等）などが挙げられる。

各T細胞活性化促進因子をコードするmRNA（cDNA）のヌクレオチド配列は公知であり、例えば、公共のデータベース（例、NCBI、EMBL、DDBJ等）から配列情報を入手することができる。

[0173] T細胞活性化促進因子をコードする核酸は、mRNA又は該因子をコードするDNAを含む発現ベクターの形態で、本発明の核酸送達担体に内包され得る。T細胞活性化促進因子をコードするmRNAは、その配列情報に基づいて作製したプローブやプライマーを用いて、T細胞から抽出したRNAを鋳型として、自体公知の方法により単離することができる。得られたmRNAはそのまま本発明の核酸送達担体に内包させてもよいし、RT-PCRによりcDNAに変換して増幅させることができる。

[0174] 得られたT細胞活性化促進因子をコードする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SR α 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。

[0175] T細胞活性化促進因子をコードするmRNAは、該因子をコードする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。

[0176] 1-3-3. キメラ抗原受容体（CAR）又は外因性T細胞受容体（TCR）をコードする核酸

上述のように、本発明の核酸送達担体は、核酸を内包することにより、T細胞の活性化及び／又は増殖と、T細胞内への該核酸の送達とを同時に一工程で行うことができる。従って、本発明の核酸送達担体に、CAR又はTCRをコードする核酸を内包させることにより、T細胞を活性化／増殖させる工程と、T細胞への遺伝子導入工程とを、One Podで同時に行うことができる。

[0177] 即ち、好ましい一実施態様において、本発明の核酸送達担体は、CAR又はTCRをコードする核酸を内部に含む。

[0178] (a) 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拘束の様式で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。

[0179] 本発明の核酸送達担体に内包されるCAR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、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。

[0180] 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 antigen、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、IgG κ 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。

[0181] 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ーリンカーペプチドー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T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。

[0182] 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、CD8 α 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。

[0183] 細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3 ζ 鎖を有するもの、膜貫通ドメインとCD3 ζ 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使用することができる。

[0184] 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。

[0185] 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SR α 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。

[0186] 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。

[0187] (b) 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、本発明の核酸送達担体の標的細胞である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

核酸送達担体の標的細胞であるT細胞が発現する内因性TCRと同一であっても、異なってもよい。

[0188] 本発明の核酸送達担体に内包される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のアミノ酸配列又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。

[0189] 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。

[0190] 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TCR α 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 (クオンテック社製) 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。

[0191] 1-4. T細胞標的化リガンド

本発明の核酸送達担体は、好ましくはex vivoでT細胞を活性化及び／又は増殖させるのに使用することが望ましいが、対象にin vivo投与する使用態様も含まれる。その場合、本発明の核酸送達担体の表面に、該核酸送達担体をT細胞へ標的化し得るリガンド（以下、「T細胞標的化リガンド」ともいう。）をさらに付加することにより、T細胞へのターゲッティング効率を高めることができる。

[0192] T細胞標的化リガンドとしては、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又はCD8に対する抗体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は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。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。

[0193] 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。

[0194] 2. 本発明の核酸送達担体の製造

以下に、本発明の核酸送達担体の代表例として、担体として脂質ナノ粒子を用いた場合の本発明の核酸送達担体(以下、「本発明の脂質ナノ粒子」ともいう。)の製造例について説明するが、リポソーム等の他の担体を用いる場合でも、使用する担体に応じて適宜変更を加えることにより、同様に本発明の核酸送達担体を得ることができる。

[0195] 本発明の脂質ナノ粒子は、例えば、US 9,404,127に記載される方法を用いて脂質ナノ粒子を作成後にT細胞活性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、WO 2016/021683に記載されるように、例えば、カチオン性脂質と非カチオン性脂質を溶解した有機溶媒溶液を調製し、脂質ナノ粒子に内包させる核酸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細胞活性化リガンド(本発明の脂質ナノ粒子をin vivoで使用する場合には、必要に応じてさらにT細胞標的化リ

グンド)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細胞活性化リグンドをPEGの末端に付加する場合、PEG脂質と該リグンドとの配合比(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 (Syrrix))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、透析及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。

[0196] 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、又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-ピペラジニウムエタンスルホン酸(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。

[0197] 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15~45℃である。

[0198] 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、脂質ナノ粒子に内包させる核酸を添加しておくことにより、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、核酸及びT細胞活性化リグンド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、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™ 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。

[0199] 分散媒は、透析することで水又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。

[0200] 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。

[0201] 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 Instruments）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。

[0202] 3. T細胞活性化リガンド及び核酸送達担体を用いたT細胞の活性化／増殖方法、T細胞内への核酸送達方法、T細胞含有医薬の製造方法

本発明はまた、上記のようにして得られる本発明の核酸送達担体を用いたT細胞の活性化及び／又は増殖方法（以下、「本発明の活性化／増殖方法」ともいう。）を提供する。当該方法は、T細胞を含む細胞集団と、本発明の核酸送達担体とを接触させる工程を含む。ここで、T細胞は、生体から採取したT細胞（本明細書において「ex vivo T細胞」ともいう。）であってもよいし、生体内のT細胞（本明細書において「in vivo T細胞」ともいう。）であってもよいが、好ましくはex vivo T細胞である。

[0203] 別の側面において、本発明の核酸送達担体が内部に核酸を含む場合には、本発明の活性化／増殖方法の実施により、同時にT細胞内へ該核酸を送達する

ことができる。従って、本発明はまた、T細胞を含む細胞集団と、本発明の核酸送達担体とを接触させる工程を含む、T細胞内への核酸の送達方法を提供する。また、別の実施態様において、本発明は、T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、並びにT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない上記いずれかの核酸送達担体とを同時に接触させる工程を含む、T細胞内への核酸の送達方法を提供する（以下、上記の両実施態様を包括して「本発明の核酸送達法」ともいう。）。本明細書において、核酸送達担体に結合していない遊離のT細胞活性化リガンドを用いる場合、当該リガンドは単独で用いてもよいし、当該リガンドを担体（例：Dynabeads(R) (Thermo Fisher Scientific社)）に結合させた複合体で用いてもよい。また、このような複合体としては市販品（例：TransAct (Milteny Biotech社)、Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific社)）を用いてもよい。

[0204] さらに別の側面において、本発明の核酸送達担体を用いて活性化及び／又は増殖したT細胞、あるいは、核酸を送達されたT細胞は、免疫細胞療法剤として使用することができる。従って、本発明はまた、T細胞を含む細胞集団と、本発明の核酸送達担体とを接触させる工程を含む、T細胞を含有する医薬の製造方法を提供する。また、別の実施態様において、本発明は、T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、並びにT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない上記いずれかの核酸送達担体とを同時に接触させる工程を含む、T細胞を含有する医薬の製造方法を提供する。

[0205] 本発明の核酸送達担体、あるいはT細胞活性化リガンド及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体と接触させるT細胞を含む細胞集団としては、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。

[0206] 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、骨髓及び臍帯血より採取することができる。本発明の核酸送達担体と接触させたex vivo T細胞を、がん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。

[0207] 本発明の核酸送達担体、あるいはT細胞活性化リガンド及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体と接触させるT細胞を含む細胞集団は、多能性細胞を含むリンパ球の前駆細胞からT細胞に分化誘導された細胞集団であってもよい。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：MPP）、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T細胞に分化させることができる。

[0208] 本発明の核酸送達担体、あるいはT細胞活性化リガンド及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体をex vivo T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T細胞の培地に本発明の核酸送達担体、あるいはT細胞活性化リガンド及びT細胞活性化リガンドが表面に付加さ

れていない核酸送達担体を添加すればよい。従って、別の側面において、本発明はまた、T細胞を含む細胞集団、本発明の核酸送達担体、あるいは少なくとも1種のT細胞活性化リガンド及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体、並びに培地を含む細胞培養物を提供する。

本発明の核酸送達法においては、核酸の送達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。

[0209] 本発明の核酸送達法において、本発明の核酸送達担体、あるいはT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体が、特に外因性TCRをコードする核酸を内部に含む場合、外因性TCRの発現上昇、ミスペアTCRの出現の抑制、又は非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因性のTCR α 鎖及びTCR β 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、内因性TCR α 鎖及びTCR β 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WO 2008/153029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、内因性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。

あるいは、上述のように、内因性TCR遺伝子はゲノム編集技術を用いてノックアウトすることもできる。

[0210] 4. 少なくとも1種のT細胞活性化リガンドと、T細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体とを組み合わせる核酸送達システム

上述のように、T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、並びにT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない上記いずれかの核酸送達担体とを同時に接触させることにより、T細胞内に核酸を送達する

ことができる。従って、本発明はまた、少なくとも1種のT細胞活性化リガンドと、T細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体とを組み合わせる核酸送達システムを提供する。当該核酸送達システムにおいて、T細胞活性化リガンドと、T細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体とは、それらの両方を含んでなる組成物として提供されてもよく、あるいは、それぞれ別個の構成要素として、キットの形態で提供されてもよい。当該核酸送達用キットには、上記両構成要素の他に、例えば、T細胞を含む細胞集団とそれらの構成要素とを接触させる際に用いる培地などを、さらに含めることができるが、これに限定されない。

[0211] 5. T細胞活性化リガンド及び核酸送達担体により活性化及び／又は増殖した、あるいは核酸を送達されたex vivo T細胞を含有してなる医薬

本発明はまた、本発明の活性化／増殖方法により活性化及び／又は増殖したex vivo T細胞、あるいは、本発明の核酸送達法により核酸を送達されたex vivo T細胞（さらに培地を含んでなる細胞培養物を含む）、並びにそれらを含有してなる医薬を提供する。

[0212] 本発明の活性化／増殖方法により活性化及び／又は増殖したex vivo T細胞は、該T細胞が発現する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。また、本発明の核酸送達法によりCAR又は外因性TCRをコードする核酸を送達されたex vivo T細胞は、該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TCRを発現するT細胞が活性化及び／又は増殖したex vivo T細胞や、当該表面分子を認識するCAR又は外因性TCRをコードする核酸が送達されたex vivo T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。

[0213] 本発明の核酸送達担体、あるいはT細胞活性化リガンド及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体と接触させたex vivo T細胞を活性成分とする医薬において、該T細胞は、対象に投与する前に適切な培地を使用して培養を行ってもよい。また、培地に刺激分子を添加して、T細胞の活性化及び／又は増殖を維持増幅することもできる。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。

[0214] 本発明の核酸送達担体、あるいはT細胞活性化リガンド及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体と接触させたex vivo T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、年齢等に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回当たり、通常 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 個となるように、好ましくは $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 個となるように、より好ましくは $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 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。本発明の核酸送達担体と接触させたex vivo T細胞を活性成分とする医薬は、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、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。

[0215] 本発明の核酸送達担体、あるいはT細胞活性化リガンド及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体と接触させたex vivo T細胞を活性成分とする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、脾臓癌；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、それらの限定されない。

[0216] 6. 本発明の核酸送達担体を含有してなる医薬

本発明の核酸送達担体は、ヒト等の哺乳動物にin vivo投与することにより、生体内のT細胞の活性化及び／又は増殖を誘導することができる。また、CARや外因性TCRをコードする核酸を内部に含む本発明の核酸送達担体は、ヒト等の哺乳動物にin vivo投与することにより、生体内のT細胞内に該核酸を送達し、発現させることにより、該T細胞に該CAR又は外因性TCRが特異的に認識する表面抗原（例、がん抗原）を発現する細胞（例、がん細胞）を特異的に認識し、これを殺傷（例、アポトーシスを誘導）する能力を付与することができる。従って、本発明はまた、本発明の核酸送達担体を含有してなる医薬を提供する。

[0217] 本発明の核酸送達担体を含有してなる医薬は、該核酸送達担体に、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。

[0218] 本発明の核酸送達担体を含有してなる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。

[0219] 本発明の核酸送達担体を含有してなる医薬は、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T細胞(in vivo T細胞)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 T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

がん細胞等の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。

[0220] 本発明の核酸送達担体を含有してなる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。

[0221] 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

[0222] 1. 抗体の還元処理

9.21 mg/mlの抗CD3抗体及び抗CD28抗体（Bio X Cell社）溶液各111 μ lに、10 mMのDTT水溶液12.3 μ l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 $\times$ 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、及びチオール基濃度はそれぞれ230 nmの吸光度及びN-(7-ジメチルアミノ-4-メチルクマリン-3-イル)マレイミド（DAC

M) を用いた蛍光呈色反応により測定した。

[0223] 2. Maleimide-脂質ナノ粒子の調製

カチオン性脂質として化合物 7、11、12、21、31 もしくは 35 を含む脂質混合物（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。一方、luciferase mRNA (TriLink社) は 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) 緩衝液 pH 5.0 に溶解して 0.2 mg/ml の mRNA 溶液を得た。得られた脂質溶液及び mRNA 溶液は、室温にて NanoAssemblr 装置 (Precision Nanosystems 社) によって、流速比 3 ml/min:6 ml/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、Slide-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 μ m の syringe filter (Iwaki) を用いてろ過を行い、4℃ に保存した。

[0224] 3. 還元抗体と Maleimide-脂質ナノ粒子の結合反応

Maleimide に対する還元抗体のモル濃度が 1/20 となるように maleimide-脂質ナノ粒子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。

[0225] 4. 抗体-脂質ナノ粒子のゲルろ過精製

還元抗体と Maleimide-脂質ナノ粒子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-脂質ナノ粒子が含まれる分画を同定し、抗体-脂質ナノ粒子原液を得た。抗体-脂質ナノ粒子は 0.2 μ m 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。

[0226] 5. 抗体-脂質ナノ粒子の粒子径測定

抗体-脂質ナノ粒子原液 1 μ l に 99 μ l の phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 7.99 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) を添加した。得られた分散液を Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments) を用いた

動的光散乱測定に供し、自己相関関数のキュムラント解析を行ってZ平均粒子径及びpolydispersity index (PDI) を測定した。

[0227] 6. 抗体-脂質ナノ粒子の ζ 電位測定

抗体-脂質ナノ粒子原液50 μ lに700 μ lのHEPESバッファー (10 mM HEPES-NaOH, pH 7.3) を添加した。得られた分散液をZetasizer Nano ZS (Malvern instruments) を用いた電気泳動光散乱測定に供し、 ζ 電位を測定した。

[0228] 7. 抗体-脂質ナノ粒子のmRNA内封率・濃度測定

抗体-脂質ナノ粒子原液をTEバッファーで希釈し、mRNA濃度を約4 μ g/mlに調整した。また、mRNA濃度基準液として、naked mRNAをTEバッファーにより4 μ g/mlに希釈した。希釈した抗体-脂質ナノ粒子及びnaked mRNA濃度基準液各60 μ lには、60 μ lのTEバッファー又は2% Triton-X100を含むTEバッファーをそれぞれ混合した。室温に5分間静置した後、120 μ lのQuant-iTTM RiboGreen (登録商標) を混合し、さらに5分間静置した。混合液の蛍光強度測定はEnvisionマイクロプレートリーダー (Perkin-Elmer社) を用いて行った。mRNA内封率及びmRNA濃度は次式により算出した。

$$[0229] \quad \% \text{ mRNA内封率} = (1 - F_{\text{TE}}/F_{\text{Triton}}) \times 100$$

$$\text{mRNA濃度} = (F_{\text{Triton}} - b) \times d/m$$

(ただし、 F_{TE} は TEバッファーを混合した脂質ナノ粒子のRiboGreen蛍光強度を示し、 F_{Triton} は2 % Triton-X100を含むTEバッファーを混合した脂質ナノ粒子のRiboGreen蛍光強度を示す。bとmは濃度基準siRNAの検量線から得られるy切片と傾きを示す。dは脂質ナノ粒子の希釈率を示す。)

[0230] 調製された抗体-脂質ナノ粒子の分析結果一覧を下表に示した。

[0231]

[表1]

	粒子径 (nm)	Polydispersity index	mRNA内封率 (%)	mRNA濃度 (ng/ml)	抗体濃度 (ng/ml)
抗CD3-化合物7	78	0.114	95	94.1	20.4
抗CD3-化合物11	78	0.071	97	87.0	29.4
抗CD3-化合物12	99	0.134	96	93.9	27.6
抗CD3-化合物31	135	0.121	90	92.3	49.6
抗CD3-化合物21	89	0.095	96	73.1	72.7
抗CD3-化合物35	108	0.129	97	72.1	85.3
抗CD28-化合物12	93	0.137	94	128	10.1
抗CD3抗CD28-化合物12	97	0.068	98	30.7	55.1

[0232] 8. 抗CD3抗体を結合した脂質ナノ粒子によるヒト初代培養T細胞へのmRNAトランスフェクション

ヒト末梢血CD3陽性汎T細胞 (Precision Bioservices社) を 1×10^5 cells/wellの細胞密度で丸底96-well plate (Corning社) に播種した。培地には30 ng/mlの組み換えIL-2 (Thermo Fisher Scientific社) を添加した無血清造血

細胞培地X-VIV010 (Lonza社) を用いた。続いて、luciferase mRNA (TriLink社) を内封する抗CD3抗体結合脂質ナノ粒子を、培地中luciferase mRNA濃度が1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように培地へ添加し、37°Cの5% CO_2 インキュベーター内にて72時間静置した。T細胞に発現したluciferaseはBright-Glo Luciferase Assay Systemキット (Promega社) を用いて測定した。各抗CD3抗体-脂質ナノ粒子を添加したT細胞の相対的なluciferase発光強度を図1に示した。

[0233] 9. 抗CD3抗体及び／又は抗CD28抗体を結合した脂質ナノ粒子によるヒト初代培養T細胞へのmRNAトランスフェクション

ヒト末梢血CD3陽性汎T細胞 (Precision Bioservices社) を 1×10^5 cells/wellの細胞密度で丸底96-well plate (Corning社) に播種した。培地には30 ng/mlの組み換えIL-2 (Thermo Fisher Scientific社) を添加した無血清造血細胞培地X-VIV010 (Lonza社) を用いた。続いて、luciferase mRNA (TriLink社) を内封する抗CD3抗体結合脂質ナノ粒子、抗CD28抗体結合脂質ナノ粒子、抗CD3抗体結合脂質ナノ粒子と抗CD28抗体結合脂質ナノ粒子の混合物、及び、抗CD3抗体と抗CD28抗体を混合して結合した脂質ナノ粒子を培地中luciferase mRNA濃度が1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように培地へ添加し、37°Cの5% CO_2 インキュベーター内にて72時間静置した。T細胞に発現したluciferaseはBright-Glo Luciferase Assay Systemキット (Promega社) を用いて測定した。各抗体-脂質ナノ粒子を添加したT細胞の相対的なluciferase発光強度を図2に示した。

[0234] 10. 抗CD3/抗CD28抗体を結合した脂質ナノ粒子によるヒト初代培養T細胞へのmRNAトランスフェクションとT細胞活性化刺激

ヒト末梢血CD3陽性汎T細胞 (Precision Bioservices社) を 1×10^5 cells/wellの細胞密度で丸底96-well plate (Corning社) に播種した。培地には30 ng/mlの組み換えIL-2 (Thermo Fisher Scientific社) を添加した無血清造血細胞培地X-VIV010 (Lonza社) を用いた。続いて、luciferase mRNA (TriLink社) を内封する抗CD3抗体及び抗CD28抗体結合した脂質ナノ粒子を、培地中luciferase mRNA濃度が0.3及び1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように培地へ添加し、37°Cの5% CO_2 インキュベーター内にて72時間静置した。なお、T細胞活性化刺激のコントロ

ールサンプルとして、TransAct (Miltenyi Biotec社) 及びDynabeads (Thermo Fisher Scientific社) を添加したT細胞も調製した。T細胞に発現したLuciferaseはBright-Glo Luciferase Assay Systemキット(Promega社) を用いて測定した。また、T細胞の生存細胞数はCellTiter-Gloキット (Promega社) を用いて測定した。Luciferaseの発現量を図3(I)に、T細胞の生存数は図3(II) 及び(III) に示した。

[0235] 1 1. Luc mRNA内封脂質ナノ粒子の調製

カチオン性脂質として化合物35を含む脂質混合物(化合物35:DPPC:Cholesterol:SUNBRIGHT GM-020:SUNBRIGHT = 60:10.6:28:1.4モル比)を、90% EtOH、10% 水に溶解して、8.1 mg/mlの脂質溶液を得た。一方、luciferase mRNA (Luc mRNA) (TriLink社) は2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) 緩衝液pH 5.0に溶解して0.18 mg/mlのmRNA溶液を得た。得られた脂質溶液及びmRNA溶液は、室温にてNanoAssemblr装置(Precision Nanosystems社) によって、流速比 3 ml/min:6 ml/minで混合し、Luc mRNA内封脂質ナノ粒子の分散液を得た。得られた分散液は、Slide-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 μ mのsyringe filter (Iwaki) を用いてろ過を行い、4℃に保存した。

[0236] 1 2. Luc mRNA内封脂質ナノ粒子の粒子径測定

Luc mRNA内封脂質ナノ粒子原液1 μ lに99 μ lのphosphate buffered saline (137 mM NaCl, 7.99 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) を添加した。得られた分散液をZetasizer Nano ZS (Malvern instruments) を用いた動的光散乱測定に供し、自己相関関数のキュムラント解析を行ってZ平均粒子径及びpolydispersity indexを測定した。

[0237] 1 3. Luc mRNA内封脂質ナノ粒子のζ電位測定

Luc mRNA内封脂質ナノ粒子原液50 μ lに700 μ lのHEPESバッファ(10 mM HEPES-NaOH, pH 7.3) を添加した。得られた分散液をZetasizer Nano ZS (Malvern instruments) を用いた電気泳動光散乱測定に供し、ζ電位を測定し

た。

[0238] 1 4. Luc mRNA内封脂質ナノ粒子のmRNA内封率・濃度測定

Luc mRNA内封脂質ナノ粒子原液をTEバッファーで希釈し、mRNA濃度を約4 $\mu\text{g/ml}$ に調整した。また、mRNA濃度基準液として、naked mRNAをTEバッファーにより4 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した。希釈したLuc mRNA内封脂質ナノ粒子及びnaked mRNA濃度基準液各60 μl には、60 μl のTEバッファー又は2% Triton-X100を含むTEバッファーをそれぞれ混合した。室温に5分間静置した後、120 μl のQuant-iTTM RiboGreen (登録商標)を混合し、さらに5分間静置した。混合液の蛍光強度測定はEnvisionマイクロプレートリーダー (Perkin-Elmer社)を用いて行った。mRNA内封率及びmRNA濃度は次式により算出した。

$$[\text{0239}] \quad \% \text{ mRNA内封率} = (1 - F_{\text{TE}}/F_{\text{Triton}}) \times 100$$

$$\text{mRNA濃度} = (F_{\text{Triton}} - b) \times d/m$$

(ただし、 F_{TE} は TEバッファーを混合した脂質ナノ粒子のRiboGreen蛍光強度を示し、 F_{Triton} は2 % Triton-X100を含むTEバッファーを混合した脂質ナノ粒子のRiboGreen蛍光強度を示す。bとmは濃度基準siRNAの検量線から得られるy切片と傾きを示す。dは脂質ナノ粒子の希釈率を示す。)

[0240] Luc mRNA内封脂質ナノ粒子の分析結果を表2に示した。

[0241] [表2]

組成物	Z 平均粒子径	Polydispersity index	ゼータ電位	mRNA 内封率
化合物 3 5-luc mRNA	88 nm	0.029	-0.2 mV	96%

[0242] 1 5. 活性化刺激剤と脂質ナノ粒子の共添加によるヒト末梢血CD3陽性汎T細胞への高効率なluc mRNAトランスフェクション

ヒト末梢血CD3陽性汎T細胞 (Precision Bioservices社) を 1×10^5 cells/wellの細胞密度で丸底96-well plate (Corning社) に播種した。培地には30 ng/mlの組み換えIL-2 (Thermo Fisher Scientific社)、およびT細胞に活性化刺激を与えるTransAct (Milteny Biotech社) もしくはDynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific社)を各メーカー推奨プロトコールに則って添加した無血清造血細胞培地X-VIVO10 (Lonza社)を用いた。続

いて、luciferase mRNA (TriLink社) を内封する脂質ナノ粒子化合物 3 5-luc mRNAを、培地中 luciferase mRNA濃度が0.1, 0.3, 1 $\mu\text{g/ml}$ となるように培地へ添加し、37°Cの5% CO₂インキュベーター内にて72時間静置した。T細胞に発現した luciferaseはBright-Glo Luciferase Assay Systemキット(Promega社)を用いて測定した。T細胞の生存および増殖率はCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assayキット (Promega社) を用いて測定した。得られた結果を図4及び5に示した。活性化刺激下のT細胞にLuc mRNAを内封した脂質ナノ粒子を添加する事により、トランスフェクション活性は劇的に向上する事が示された(図4)。また、T細胞の生存および増殖率は高い水準で維持された(図5)。

[0243] 16. 活性化刺激剤と脂質ナノ粒子の共添加によるヒトCD4/CD8陽性T細胞への高効率な luc mRNAトランスフェクション

ヒト末梢血白血球画分Leukopak (HemaCare社) はLOVO Cell Processing System (Fresenius社)によって洗浄を行い、細胞処理システムCliniMACS (Milteny Biotec社) によってCD4およびCD8陽性細胞を回収した。得られたCD4/CD8陽性細胞は 1×10^5 cells/wellの細胞密度で平底96-well plate (Corning社) に播種した。なお、細胞の培養にはOPTmizer CTS T-Cell Expansion Basal Medium 1 Lあたりに26 mLのOPTmizer CTS T-cell Expansion Supplement、20 mLのCTS Immune SR、10 mLのL-Glutamine 200 mM (以上ThermoFischer Scientific社)、10 mLのStreptomycin Sulfate 10 mg/ml (MEIJI社)、4.2 ng/mlのMACS GMP Recombinant Human IL-2 (Milteny Biotec社) を含有する培地を用いた。また、T細胞の活性化刺激剤としては、TransAct (Milteny Biotech社) をメーカー推奨プロトコールに則って添加した。続いて、luciferase mRNA (TriLink社) を内封する脂質ナノ粒子化合物 3 5-luc mRNAを、培地中 luciferase mRNA濃度が1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ となるように培地へ添加し、37°Cの5% CO₂インキュベーター内にて72時間静置した。T細胞に発現した luciferaseはBright-Glo Luciferase Assay Systemキット(Promega社)を用いて測定した。T細胞の生存および増殖率はCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assa

yキット（Promega社）を用いて測定した。得られた結果を図6に示した。活性化刺激下のT細胞にLuc mRNAを内封した脂質ナノ粒子を添加する事により、トランスフェクション活性は劇的に向上する事が示された。また、T細胞の生存および増殖率は高い水準で維持された。

産業上の利用可能性

[0244] 本発明の核酸送達担体、あるいは本発明の核酸送達方法を用いることにより、T細胞を活性化／増殖させる工程と、T細胞への遺伝子導入工程とを、One Podで同時に行うことができるので、短期間で製造原価の低い免疫細胞療法剤を製造することができ、より安価に免疫細胞療法を提供できる点で極めて有用である。

[0245] 本出願は、2018年10月18日付で出願された特願2018-197069及び2019年7月3日付で出願された特願2019-124629を基礎としており、ここで言及することによりそれらの内容はすべて本明細書に包含される。

請求の範囲

- [請求項1] T細胞の活性化及び／又は増殖方法であって、T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンドを表面に付加した核酸送達担体とを接触させる工程を含む、方法。
- [請求項2] 前記T細胞活性化リガンドがCD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記核酸送達担体の表面にT細胞活性化リガンドが2種以上付加されている、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 前記核酸送達担体の内部に、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸が含まれる、請求項1に記載の方法。
- [請求項6] 前記核酸送達担体の内部に、CAR又はTCRをコードする核酸が含まれる、請求項1に記載の方法。
- [請求項7] ex vivoで行われる、請求項1に記載の方法。
- [請求項8] T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンドを表面に付加し、かつ内部に核酸を含む核酸送達担体とを接触させる工程を含み、当該核酸がCAR又はTCRをコードする核酸が含まない、T細胞内への核酸の送達方法。
- [請求項9] 前記T細胞活性化リガンドが、CD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 前記核酸送達担体の表面にT細胞活性化リガンドが2種以上付加されている、請求項8に記載の方法。
- [請求項11] 前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、請求項8に記載の方法。
- [請求項12] 前記核酸が、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸を含む、請求項8に記載の

方法。

- [請求項13] ex vivoで行われる、請求項8に記載の方法。
- [請求項14] T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、並びに、内部に核酸を含む、T細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体とを同時に接触させる工程を含む、T細胞内への核酸の送達方法。
- [請求項15] 前記T細胞活性化リガンドが、CD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] 2種以上のT細胞活性化リガンドを接触させる、請求項14に記載の方法。
- [請求項17] 前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、請求項14に記載の方法。
- [請求項18] 前記核酸が、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸を含む、請求項14に記載の方法。
- [請求項19] 前記核酸が、CAR又はTCRをコードする核酸を含む、請求項14に記載の方法。
- [請求項20] ex vivoで行われる、請求項14に記載の方法。
- [請求項21] T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、並びに、内部に核酸を含む、T細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体とを同時に接触させる工程を含む、T細胞を含有してなる医薬の製造方法。
- [請求項22] 前記T細胞活性化リガンドが、CD3に対する抗体及び／又はCD28に対する抗体を含む、請求項21に記載の方法。
- [請求項23] 2種以上のT細胞活性化リガンドを接触させる、請求項21に記載の方法。
- [請求項24] 前記核酸送達担体が、脂質ナノ粒子又はリポソームである、請求項21に記載の方法。

- [請求項25] 前記核酸が、T細胞活性化抑制因子の発現を抑制する核酸及び／又はT細胞活性化促進因子をコードする核酸を含む、請求項21に記載の方法。
- [請求項26] 前記核酸が、CAR又はTCRをコードする核酸を含む、請求項21に記載の方法。
- [請求項27] ex vivoで行われる、請求項21に記載の方法。
- [請求項28] 請求項14に記載の方法により細胞内に核酸が送達されたT細胞。
- [請求項29] 請求項28に記載のT細胞を含有してなる医薬。
- [請求項30] T細胞を含む細胞集団と、少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、T細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体、及び培地を含む、細胞培養物。
- [請求項31] 少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体を含む、T細胞への核酸送達用組成物。
- [請求項32] 少なくとも1種のT細胞活性化リガンド、及びT細胞活性化リガンドが表面に付加されていない核酸送達担体を含む、T細胞への核酸送達用キット。