

【11】證書號數：I938234

【45】公告日：中華民國 115 (2026) 年 09 月 11 日

【51】Int. Cl. : A61K31/7088(2006.01) A61K9/127 (2025.01)  
 A61K47/18 (2006.01) A61K47/24 (2006.01)  
 A61K47/28 (2006.01) A61K47/10 (2006.01)  
 A61P35/00 (2006.01)

發明

全 174 頁

【54】名稱：可電離陽離子脂質和脂質奈米顆粒，及其合成和使用方法

【21】申請案號：110145547

【22】申請日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 06 日

【11】公開編號：202241458

【43】公開日期：中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

【30】優先權：2020/12/04 美國 63/121,801  
 2021/03/25 美國 63/166,205  
 2021/04/01 美國 63/169,296  
 2021/04/01 美國 63/169,395  
 2021/04/07 美國 63/172,024  
 2021/12/03 世界智慧財產權組織 PCT/US21/72745  
 2021/12/03 美國 17/542,348

【72】發明人：阿里 米爾 (US) ALI, MIR；博施 奧斯汀 (US) BOESCH, AUSTIN  
 WAYNE；德拉蒙德 達里爾 (US) DRUMMOND, DARYL CLARK；庫爾曼  
 威廉 (US) KUHLMAN, WILLIAM；尼爾森 烏爾里克 (US) NIELSEN,  
 ULRIK

【71】申請人：美商泰德治療公司 TIDAL THERAPEUTICS, INC.  
 美國

【74】代理人：何愛文；王仁君

【56】參考文獻：

EP 3733211A1

US 2020/0093936A1

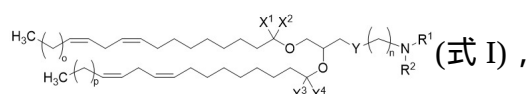
審查人員：方冠岳

## 【57】申請專利範圍

1. 一種用於將核酸靶向遞送至免疫細胞的脂質奈米顆粒 (LNP)，其包含脂質共混物，所述脂質共混物包含：

(a) 脂質-免疫細胞靶向基團接合物，其包含式 IV 的化合物：[脂質]-[任選的连接子]-[免疫細胞靶向基團]，以及

(b) 可電離陽離子脂質，  
 其中所述 LNP 進一步包含放置在其中的核酸；並且  
 其中所述陽離子脂質包含式 I 的化合物：



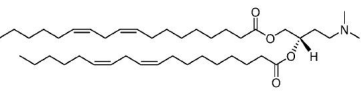
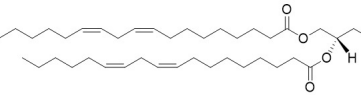
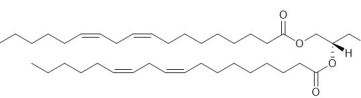
或其鹽，其中：

$\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  獨立地是  $\text{C}_{1-3}$  烷基，或者  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  與氮原子一起形成任選取代的 啉基或嗎啉基；

Y 選自 -O-、-OC(O)-、-OC(S)-和 -CH<sub>2</sub>-；

(2)

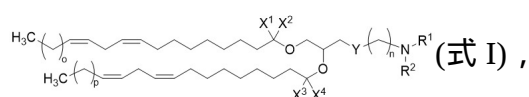
$X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$  和  $X^4$  是氫，或者  $X^1$  和  $X^2$  或  $X^3$  和  $X^4$  獨立地一起形成側氧基；  
 $n$  是 0 或 3；  
 $o$  和  $p$  獨立地是選自 2-6 的整數。

2. 如請求項 1 所述的 LNP，其中所述陽離子脂質包含  (脂質 5)，或其鹽。
3. 如請求項 1 所述的 LNP，其中所述陽離子脂質包含  (脂質 2)，或其鹽。
4. 如請求項 1 所述的 LNP，其中所述陽離子脂質包含  (脂質 6)，或其鹽。
5. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的 LNP，其中所述免疫細胞靶向基團包含結合 T 細胞抗原的抗體，其中所述 T 細胞抗原是 CD3、CD4、CD7、CD8 或其組合。
6. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的 LNP，其中所述免疫細胞靶向基團包含結合自然殺手 (NK) 細胞抗原的抗體，其中所述 NK 細胞抗原是 CD7、CD8、CD56 或其組合。
7. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的 LNP，其中(i)所述免疫細胞靶向基團經由含有聚乙二醇 (PEG) 的连接子與所述脂質共混物中的脂質共價偶聯；(ii) 經由含有 PEG 的连接子與所述免疫細胞靶向基團共價偶聯的所述脂質是二硬脂醯甘油 (DSG)、二硬脂醯-磷脂醯乙醇胺 (DSPE)、二肉豆蔻醯-磷脂醯乙醇胺 (DMPE)、二硬脂醯-甘油-磷酸甘油 (DSPG)、二肉豆蔻醯-甘油 (DMG)、二棕櫚醯-磷脂醯乙醇胺 (DPPE)、二棕櫚醯-甘油 (DPG) 或神經醯胺；(iii) 所述 PEG 是 PEG 2000 或 PEG 3400；(iv) 所述脂質-免疫細胞靶向基團接合物以 0.001-0.5 莫耳百分比的範圍存在於所述脂質共混物中；或(v) 所述可電離陽離子脂質以 30-70 莫耳百分比的範圍存在於所述脂質共混物中；或(i)至(v)之任何組合。
8. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的 LNP，其中所述脂質共混物進一步包含結構脂質、中性磷脂和游離 PEG-脂質中的一種或多種。
9. 如請求項 8 所述的 LNP，其中所述結構脂質為固醇，且其中(i)所述固醇以 20-70 莫耳百分比的範圍存在於所述脂質共混物中；(ii)所述固醇是膽固醇；(iii) 所述中性磷脂選自由以下組成之群組：磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DSPE)、1,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸膽鹼 (DSPC)、1,2-二油醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、1,2-二油醯-sn-甘油-3-磷酸膽鹼 (DOPC) 及鞘磷脂；(iv)所述中性磷脂以 1-10 莫耳百分比的範圍存在於所述脂質共混物中；(v)所述游離 PEG-脂質選自由以下組成之群組：PEG-修飾的磷脂醯乙醇胺、PEG-修飾的磷脂酸、PEG-修飾的神經醯胺、PEG-修飾的二烷基胺、PEG-修飾的二醯基甘油和 PEG-修飾的二烷基甘油；(vi)所述游離 PEG-脂質包含二醯基磷脂醯乙醇胺，其包含二棕櫚醯 (C16) 鏈或二硬脂醯 (C18) 鏈；(vii) 所述游離 PEG-脂質以 1-4 莫耳百分比的範圍存在於所述脂質共混物中；或(viii)所述游離 PEG-脂質包含與所述脂質-免疫細胞靶向基團接合物中的脂質相同或不同的脂質；或(i)至(viii)之任何組合。
10. 如請求項 9 所述的 LNP，其中所述 PEG 脂質為 PEG-二油醯甘油 (PEG-DOG)、PEG-二肉豆蔻醯-甘油 (PEG-DMG)、PEG-二棕櫚醯-甘油 (PEG-DPG)、PEG-二亞油醯-甘油-磷脂醯乙醇胺 (PEG-DLPE)、PEG-二肉豆蔻醯-磷脂醯乙醇胺 (PEG-DMPE)、

PEG-二棕櫚醯-磷脂醯乙醇胺 (PEG-DPPE)、PEG-二硬脂醯甘油 (PEG-DSG)、PEG-二醯基甘油 (PEG-DAG)、PEG-神經醯胺、PEG-二硬脂醯-甘油-磷酸甘油 (PEG-DSPG)、PEG-二油醯-甘油-磷酸乙醇胺 (PEG-DOPE)、2-[(聚乙二醇)-2000]-N,N-雙十四烷基乙醯胺或 PEG-二硬脂醯-磷脂醯乙醇胺 (PEG-DSPE) 脂質。

11. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的 LNP，其中所述 LNP 具有(i)在 50-200 nm 範圍內的平均直徑；(ii)在從 0.05 至 1 範圍內的多分散性指數；或(iii)所述 LNP 在 pH 5 下具有從約-10 mV 至約+30 mV 的  $\zeta$  電位；或(i)至(iii)之任何組合。
12. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的 LNP，其中所述核酸為 mRNA，且所述 mRNA (i)編碼受體、生長因子、激素、細胞激素、抗體、抗原、酶或疫苗；(ii)能夠調節所述免疫細胞中的免疫反應的多肽；或(iii)能夠對所述免疫細胞進行再程式化(reprogramming)的多肽；或(i)至(iii)之任何組合。
13. 如請求項 12 所述的 LNP，其中所述 mRNA 編碼合成 T 細胞受體 (synTCR) 或嵌合抗原受體 (CAR)。
14. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的 LNP，其中所述免疫細胞靶向基團包含 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'-SH、Fv 或 scFv 片段。
15. 如請求項 14 所述的 LNP，其中(i)所述免疫細胞靶向基團包含被工程化以剔除 C 末端的天然鏈間二硫鍵的 Fab；(ii)所述 Fab 包含含有 C233S 取代的重鏈片段和含有 C214S 取代的輕鏈片段，根據 Kabat 編號；(iii)所述免疫細胞靶向基團包含具有非天然鏈間二硫鍵的 Fab；(iv)所述 Fab 在重鏈片段中包含 F174C 取代，並且在輕鏈片段中包含 S176C 取代，根據 Kabat 編號；(v)所述免疫細胞靶向基團包含在所述重鏈或輕鏈片段的 C 末端含有半胱氨酸的 Fab；(vi)所述 Fab 進一步包含在所述 Fab 的重鏈片段與所述 C 末端半胱氨酸之間的一個或多個胺基酸；(vii)所述 Fab 包含與抗體 CH1 結構域連接的重鏈可變結構域和與抗體輕鏈恒定結構域連接的輕鏈可變結構域，其中所述 CH1 結構域和所述輕鏈恒定結構域經由一個或多個鏈間二硫鍵連接，並且其中所述免疫細胞靶向基團進一步包含經由胺基酸連接子與所述輕鏈恒定結構域的 C 末端連接的單鏈可變片段 (scFv)；或(i)至(vii)之任何組合。
16. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的 LNP，其中所述免疫細胞靶向基團包含免疫球蛋白單可變結構域。
17. 如請求項 16 所述的 LNP，其中(i)所述免疫球蛋白單可變結構域在 C 末端包含半胱氨酸；(ii)所述免疫球蛋白單可變結構域包含 VHH 結構域，並且進一步包含間隔子，其包含在所述 VHH 結構域與所述 C 末端半胱氨酸之間的一個或多個胺基酸；(iii)所述免疫細胞靶向基團包含兩個或更多個 VHH 結構域；(iv)所述兩個或更多個 V<sub>HH</sub> 結構域通過胺基酸連接子連接(v)所述免疫細胞靶向基團包含與抗體 CH1 結構域連接的第一 V<sub>HH</sub> 結構域和與抗體輕鏈恒定結構域連接的第二 V<sub>HH</sub> 結構域，並且其中所述抗體 CH1 結構域和所述抗體輕鏈恒定結構域通過一個或多個二硫鍵連接；(vi)所述免疫細胞靶向基團包含與抗體 CH1 結構域連接的 VHH 結構域，並且其中所述抗體 CH1 結構域通過一個或多個二硫鍵與抗體輕鏈恒定結構域連接；(vii)所述 CH1 結構域包含 F174C 和 C233S 取代，並且所述輕鏈恒定結構域包含 S176C 和 C214S 取代，根據 Kabat 編號；或(i)至(vii)之任何組合。
18. 如請求項 1 至 4 中任一項所述的 LNP，其中所述免疫細胞靶向基團包含 Fab，其包含：
  - (a) 含有 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列的重鏈片段和含有 SEQ ID NO: 2 或 3 的胺基酸序列的輕鏈片段；或者
  - (b) 含有 SEQ ID NO: 6 的胺基酸序列的重鏈片段和含有 SEQ ID NO: 7 的胺基酸序列的輕鏈片段。

19. 如請求項 8 所述的 LNP，其中(i)所述免疫細胞是 NK 細胞，並且所述免疫細胞靶向基團包含結合 CD56 的抗體；(ii)所述免疫細胞靶向基團包含結合 CD7 或 CD8 的抗體，並且所述游離 PEG 脂質是 DMG-PEG；(iii)所述 LNP 結合 CD3，並且還結合 CD11a 或 CD18；(iv)所述 LNP 結合所述免疫細胞的 CD7 和 CD8；(v)所述 LNP 與第一類型的免疫細胞的表面上第一抗原結合，並且還與第二類型的免疫細胞的表面上第二抗原結合；(vi)所述免疫細胞靶向基團包含與 CD3 或 CD7 結合的單一抗體；(vii)所述免疫細胞靶向基團與 CD7、CD8 或 CD7 和 CD8 兩者結合；(viii)所述免疫細胞靶向基團與以下結合：(a) CD3 和 CD56 兩者；(b) CD8 和 CD56 兩者；或者(c) CD7 和 CD56 兩者；或(ix)所述免疫細胞靶向基團包含缺乏天然鏈間二硫鍵的 Fab；或(i)至(ix)之任何組合。
20. 一種如請求項 1 至 19 中任一項所述的脂質奈米顆粒 (LNP) 用於製備藥物之用途，該藥物用於將核酸的遞送靶向至受試者的免疫細胞、在受試者的靶向免疫細胞中表現目的多肽、或調節受試者的靶免疫細胞的細胞功能。
21. 一種如請求項 1 至 19 中任一項所述的脂質奈米顆粒 (LNP) 用於製備治療、改善或預防有需要的受試者的障礙或疾病的症狀的藥物之用途，其中核酸被遞送至所述受試者的免疫細胞，且所述核酸調節所述免疫細胞的免疫反應，從而治療或改善所述症狀。
22. 如請求項 21 所述的用途，其中(i)所述障礙是免疫障礙、炎性障礙或癌症；(ii)所述核酸編碼用於在治療或預防病原體感染的治療性或預防性疫苗中使用的抗原；或(iii)所述抗體是人或人類化抗體；或(i)至(iii)之任何組合。
23. 一種式 I 化合物：



或其鹽，其中：

$R^1$  和  $R^2$  獨立地是  $C_{1-3}$  烷基，或者  $R^1$  和  $R^2$  與氮原子一起形成任選取代的 啉基或嗎啉基；

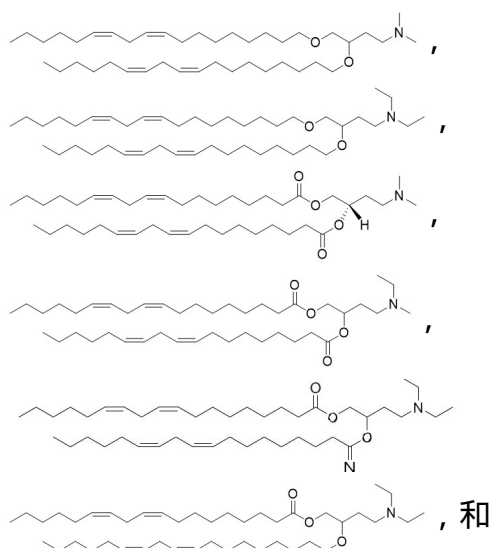
Y 選自由-O-、-OC(O)-、-OC(S)-和-CH<sub>2</sub>-組成之群組；

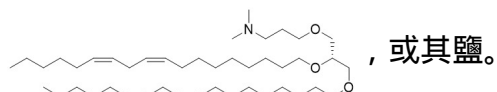
$X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$  和  $X^4$  是氫，或者  $X^1$  和  $X^2$  或  $X^3$  和  $X^4$  獨立地一起形成側氧基；

n 是 0 或 3；

o 和 p 獨立地是選自 2-6 的整數；

其中所述化合物或其鹽不是選自以下組成之群組的化合物





#### 圖式簡單說明

圖 1 描繪了脂質 1 的 NMR 譜。

圖 2A 和 圖 2B 描繪了脂質 1 的 LC-MS 譜。

圖 3 描繪了脂質 2 的 NMR 譜。

圖 4A 和 圖 4B 描繪了脂質 2 的 LC-MS 譜。

圖 5 描繪了脂質 3 的 NMR 譜。

圖 6 描繪了脂質 4 的 NMR 譜。

圖 7A 和 圖 7B 描繪了脂質 4 的 LC-MS 譜。

圖 8A 描繪了脂質 2 和脂質 6 LNP pKa (TNS)。圖 8B 描繪了脂質 5 和脂質 7 LNP pKa (TNS)。

圖 9A 描繪了脂質 2 和脂質 6 衍生的 LNP 的流體動力學直徑。圖 9B 描繪了脂質 2 和脂質 6 衍生的 LNP 的多分散性 (動態光散射)。

圖 10A 描繪了脂質 5 和脂質 7 衍生的 LNP 的流體動力學直徑。圖 10B 描繪了脂質 5 和脂質 7 衍生的 LNP 的多分散性 (動態光散射)。

圖 11A- 圖 11E 描繪了使用脂質 2 和脂質 6 衍生的 LNP 的 GFP mRNA 的體外 T 細胞轉染：% GFP+細胞 (圖 11A)、GFP 平均螢光強度 (MFI) (圖 11B)、% Cy5-GFP+細胞 (圖 11C)、和 Cy5-GFP MFI (圖 11D)、T 細胞活力 (圖 11E)。

圖 12A- 圖 12E 描繪了使用脂質 5 和脂質 7 衍生的 LNP 的 GFP mRNA 的體外 T 細胞轉染：% GFP+細胞 (圖 12A)、GFP 平均螢光強度 (MFI) (圖 12B)、% Cy5-GFP+細胞 (圖 12C)、Cy5-GFP MFI (圖 12D)、T 細胞活力 (圖 12E)。

圖 13A 描繪了轉染 24 h 後的% GFP+ (轉譯) 人 CD8 T 細胞。圖 13B 描繪了轉染 24 h 後的% Cy5+ (結合) 人 CD8 T 細胞。

圖 14A 描繪了轉染 24 h 後的%活人 CD8 T 細胞。圖 14B 描繪了在轉染 24 h 後從細胞培養上清液測量的人 IFN $\gamma$ 。

圖 15A 描繪了用 mRNA LNP 轉染 24 h 後的% TTR-023+ (抗 CD20 CAR) CD8 T 細胞。圖 15B 描繪了用 mRNA LNP 轉染 24 h 後的% TTR-023+ (抗 CD20 CAR) CD4 T 細胞。

圖 16A 描繪了用抗 CD20 CAR mRNA LNP 轉染 24 h 後的% CD69+ CD8 細胞。圖 16B 描繪了用抗 CD20 CAR mRNA LNP 轉染 24 h 後的% CD69+ CD4 T 細胞。

圖 17 描繪了用抗 CD20 CAR mRNA LNP 轉染 24 h 後 T 細胞的人 IFN $\gamma$  分泌。

圖 18A 描繪了用 2.5 ug/mL 的 Cy5/GFP mRNA 轉染 24 h 後 CD8 T 細胞的% GFP+ (轉染/轉譯)。圖 18B 描繪了用 2.5 ug/mL 的 Cy5/GFP mRNA 轉染 24 h 後 CD8 T 細胞的% GFP+ (轉染/轉譯) 平均螢光強度 (MFI)。

圖 19A 描繪了用 2.5 ug/mL 的 Cy5/GFP mRNA 轉染 24 h 後 CD8 T 細胞的% Cy5+ (結合)。圖 19B 描繪了用 2.5 ug/mL 的 Cy5/GFP mRNA 轉染 24 h 後 CD8 T 細胞的 Cy5 (結合) 平均螢光強度 (MFI)。

圖 20A 描繪了用 2.5 ug/mL Cy5/GFP mRNA LNP 轉染 24 h 的人 CD3 細胞的% GFP+ (轉染/轉譯) CD8 細胞。圖 20B 描繪了用 2.5 ug/mL Cy5/GFP mRNA LNP 轉染 24 h 的人 CD3 細胞的% GFP+ (轉染/轉譯) CD4 細胞。

圖 21A 描繪了用 2.5 ug/mL Cy5/GFP mRNA LNP 轉染 24 h 的人 CD3 細胞的% Cy5+ (結合) CD8 細胞。圖 21B 描繪了用 2.5 ug/mL Cy5/GFP mRNA LNP 轉染 24 h 的人 CD3 細胞的% Cy5+ (結合) CD4 細胞。

圖 22A 描繪了用 2.5 ug/mL Cy5/GFP mRNA LNP 轉染 24 h 的人 CD3 細胞的% CD69+ CD8 細胞。圖 22B 描繪了用 2.5 ug/mL Cy5/GFP mRNA LNP 轉染 24 h 的人 CD3 細胞的% CD69+ CD4 細胞。

圖 23 描繪了來自用 2.5  $\mu$ g/mL Cy5/GFP mRNA LNP 轉染 24 h 的人 CD3 細胞的人 IFN $\gamma$  分泌。

圖 24A 描繪了在全血中以 2.5  $\mu$ g/mL mCherry mRNA LNP 轉染 24 h 的% mCherry+ CD8 T 細胞。圖 24B 描繪了在全血中以 2.5  $\mu$ g/mL mCherry mRNA LNP 轉染 24 h 的% mCherry+ CD4 T 細胞。

圖 25A 描繪了在全血中以 2.5  $\mu$ g/mL mCherry mRNA LNP 轉染 24 h 的% mCherry+ B 細胞。圖 25B 描繪了在全血中以 2.5  $\mu$ g/mL mCherry mRNA LNP 轉染 24 h 的% mCherry+ NK 細胞。

圖 26A 描繪了在全血中以 2.5  $\mu$ g/mL mCherry mRNA LNP 轉染 24 h 的% mCherry+粒細胞。圖 26B 描繪了在全血中以 2.5 ug/mL mCherry mRNA LNP 轉染 24 h 的% CD69+ CD8 T 細胞。圖 26C 描繪了在全血中以 2.5 ug/mL mCherry mRNA LNP 轉染 24 h 的% CD69+ CD4 T 細胞。

圖 27A 和 圖 27B 分別描繪了在血液中用 CD3 靶向性 mCherry LNP 對 CD8+ T 細胞和 CD4+ T 細胞進行體內再程式化的時間過程。每個符號代表一隻小鼠。空心符號代表緩衝液對照處理的小鼠，並且實心符號代表 mCherry LNP 處理的小鼠。圓圈代表 24 h，三角形代表 48 h，並且菱形代表 96 h。圖 27C 和 圖 27D 分別描繪了在肝臟中對 CD8+ T 細胞和 CD4+ T 細胞進行體內再程式化的時間進程。每個符號代表一隻小鼠。空心符號代表緩衝液對照處理的小鼠，並且實心符號代表 mCherry LNP 處理的小鼠。圓圈代表 24 h，三角形代表 48 h，並且菱形代表 96 h。圖 27E 和 圖 27F 分別描繪了在脾臟中用 CD3 靶向性 mCherry LNP 對 CD8+ T 細胞和 CD4+ T 細胞進行體內再程式化的時間過程。每個符號代表一隻小鼠。空心符號代表緩衝液對照處理的小鼠，並且實心符號代表 mCherry LNP 處理的小鼠。圓圈代表 24 h，三角形代表 48 h，並且菱形代表 96 h。

圖 28 描繪了在用 CD3 靶向性 mCherry LNP 處理 24 h 後 mCherry 在肝臟髓系細胞和庫普弗細胞中的最少表現。每個符號代表一隻小鼠。空心符號代表緩衝液對照處理的小鼠，並且實心符號代表 mCherry LNP 處理的小鼠。

圖 29A 描繪了在第一劑表現 mCherry 的 LNP 後 24 h 的體內再程式化。每個符號代表一隻小鼠。空心圓圈是表現 mCherry 的 CD4+ T 細胞，並且空心正方形是表現 mCherry 的 CD8+ T 細胞。圖 29B 描繪了在第一劑表現 TTR-023 的 LNP 後 24 h 的體內再程式化。每個符號代表一隻小鼠。空心圓圈是表現抗 CD20 CAR 的 CD4+ T 細胞，並且空心正方形是表現抗 CD20 CAR 的 CD8+ T 細胞。

圖 30A- 圖 30E 描繪了血液 (圖 30A)、脾臟 (圖 30B)、肝臟 (圖 30C)、骨髓 (圖 30D) 和胸腺 (圖 30E) 中在第二劑表現 TTR-023 的 LNP 後 40 h 的體內再程式化。每個符號代表一隻小鼠。空心圓圈是表現抗 CD20 CAR 的 CD4+ T 細胞，並且空心正方形是表現抗 CD20 CAR 的 CD8+ T 細胞。

圖 31A- 圖 31E 描繪了血液 (圖 31A)、脾臟 (圖 31B)、肝臟 (圖 31C)、骨髓 (圖 31D) 和胸腺 (圖 31E) 中在第二劑表現 mCherry 的 LNP 後 40 h 的體內再程式化。每個

符號代表一隻小鼠。空心圓圈是表現 mCherry 的 CD4<sup>+</sup> T 細胞，並且空心正方形是表現 mCherry 的 CD8<sup>+</sup> T 細胞。

圖 32 描繪了 PK 研究的投予和放血方案。

圖 33 描繪了基於來自小鼠血清樣品的轉化的 DiI-C18(3)-DS 測量值計算的 mRNA 濃度。

圖 34A 描繪了在與 2.5 µg/mL mRNA LNP 一起培育 2 h 後的% DiR<sup>+</sup> CD4 T 細胞。圖 34B 描繪了在與 2.5 µg/mL mRNA LNP 一起培育 2 h 後的 DiR 平均螢光強度 (MFI) CD4 T 細胞。

圖 35A 描繪了在與 2.5 µg/mL mRNA LNP 一起培育 2 h 後的% DiR<sup>+</sup> CD8 T 細胞。圖 35B 描繪了在與 2.5 µg/mL mRNA LNP 一起培育 2 h 後的 DiR 平均螢光強度 (MFI) CD8 T 細胞。

圖 36A 描繪了在與 2.5 µg/mL mRNA LNP 一起培育 24 h 後的% mCherry<sup>+</sup> CD4 T 細胞。

圖 36B 描繪了在與 2.5 µg/mL mRNA LNP 一起培育 24 h 後的% mCherry<sup>+</sup> CD8 T 細胞。

圖 37A 描繪了脂質 5、脂質 8 和 DLn-MC3-DMA 衍生的 LNP 的流體動力學直徑。圖 37B 描繪了脂質 5、脂質 8 和 DLn-MC3-DMA 衍生的 LNP 的多分散性 (動態光散射)。

圖 38A- 圖 38E 描繪了使用脂質 5、脂質 8 和 DLn-MC3-DMA 衍生的 LNP 的 GFP mRNA 的體外 T 細胞轉染：% GFP<sup>+</sup>細胞 (圖 38A)、GFP 平均螢光強度 (MFI) (圖 38B)、% Cy5-GFP<sup>+</sup>細胞 (圖 38C)、Cy5-GFP MFI (圖 38D) 和 T 細胞活力 (圖 38E)。

圖 39 描繪了脂質 5 的 NMR 譜。

圖 40A 和 圖 40B 描繪了脂質 5 的 LC-MS 譜。

圖 41 描繪了脂質 6 的 NMR 譜。

圖 42A 和 圖 42B 描繪了脂質 6 的 LC-MS 譜。

圖 43 描繪了脂質 7 的 NMR 譜。

圖 44A 和 圖 44B 描繪了脂質 7 的 LC-MS 譜。

圖 45A 描繪了脂質 8 和脂質 5 衍生的 LNP 的流體動力學直徑。圖 45B 描繪了脂質 8 和脂質 5 衍生的 LNP 的多分散性 (動態光散射)。

圖 46A- 圖 46E 描繪了使用脂質 8 和脂質 5 (O 和 N) 衍生的 LNP 的 GFP mRNA 的體外 T 細胞轉染：% GFP<sup>+</sup>細胞 (圖 46A)、GFP 平均螢光強度 (MFI) (圖 46B)、% Cy5-GFP<sup>+</sup>細胞 (圖 46C)、Cy5-GFP MFI (圖 46D)、T 細胞活力 (圖 46E)。

圖 47 描繪了各種 Fab、VHH (Nb)、ScFv、Fab-ScFv 和 Fab-VHH 雜交體的結構。

圖 48A 描繪了脂質 9 的 NMR 譜。圖 48B 和圖 48C 描繪了脂質 9 的質譜和 LC 層析圖。

圖 49A 描繪了脂質 10 的 NMR 譜。圖 49B 和圖 49C 描繪了脂質 10 的質譜和 LC 層析圖。

圖 50A 描繪了脂質 11 的 NMR 譜。圖 50B 和圖 50C 描繪了脂質 11 的質譜和 LC 層析圖。

圖 51A 描繪了脂質 12 的 NMR 譜。圖 51B 和圖 51C 描繪了脂質 12 的質譜和 LC 層析圖。

圖 52A 描繪了脂質 13 的 NMR 譜。圖 52B 和圖 52C 描繪了脂質 13 的質譜和 LC 層析圖。

圖 53A 描繪了在插入抗體接合物之前和之後脂質 5 和脂質 8 的流體動力學直徑 (DLS)。圖 53B 描繪了在插入抗體接合物之前和之後的多分散性 (DLS)。圖 53C 和 圖 53D 描繪了在 pH 5.5 MES 和 pH 7.4 HEPES 緩衝液中在插入抗體接合物之前和之後的 LNP 表面電荷 (ζ 電位, DLS)。

圖 54A 至 圖 54E 描繪了使用脂質 5 和脂質 8 衍生的 LNP 的 GFP mRNA 的體外 T 細胞轉染：% GFP<sup>+</sup>細胞 (圖 54A)、GFP 平均螢光強度 (MFI) (圖 54B)、% DiI<sup>+</sup>細胞 (圖 54C)、和 DiI MFI (圖 54D) 以及 T 細胞活力 (圖 54E)。

圖 55A 描繪了在插入抗體接合物之前和之後脂質 5、脂質 8 和 DLn-MC3-DMA 的流體動力學直徑 (DLS)。圖 55B 描繪了在插入抗體接合物之前和之後的多分散性 (DLS)。圖

55C 描繪了在 pH 5.5 MES 和 pH 7.4 HEPES 緩衝液中在插入抗體接合物之前的 LNP 表面電荷 ( $\zeta$  電位, DLS)。圖 55D 描繪了可及 RNA 含量和 RNA 囊封效率。

圖 56A 至圖 56E 描繪了使用脂質 5、脂質 8 和 DLn-MC3-DMA 衍生的 LNP 的 GFP mRNA 的體外 T 細胞轉染：% GFP+細胞 (圖 56A)、GFP 平均螢光強度 (MFI) (圖 56B)、% DiI+細胞 (圖 56C)、和 DiI MFI (圖 56D) 以及 T 細胞活力 (圖 56E)。

圖 57A 描繪了在 4°C 下儲存的或在 -80°C 下儲存後的脂質 5 配製物的流體動力學直徑 (DLS)；將配製物經由放置在 -80°C 冰箱中冷凍或者在液氮中速凍。圖 57B 描繪了在冷凍儲存之前和之後的配製物多分散性 (DLS)。

圖 58A 至圖 58E 描繪了由在 4°C 下儲存的或在 -80°C 下儲存後的脂質 5 LNP 配製物產生的 GFP mRNA 的體外 T 細胞轉染和 T 細胞活力；將配製物經由放置在 -80°C 冰箱中冷凍或者在液氮中速凍。% GFP+細胞 (圖 58A)、GFP 平均螢光強度 (MFI) (圖 58B)、% DiI+細胞 (圖 58C)、和 DiI MFI (圖 58D) 以及 T 細胞活力 (圖 58E)。

圖 59A 至圖 59T 描繪了在用 DMG、DPG 或 DSG-PEG 2.5% 24 或 48 h 後或者在用 DPPE 或 DSPE 1.5% 或 2.5% 24 h 後用劑量為 0.3 mg/kg 的 CD3 靶向性 DiI/GFP LNP 對免疫細胞進行體內再程式化的結果。每個符號代表一隻小鼠。空心圓圈是表現的 CD4+ T 細胞並且空心正方形是表現的 CD8+ T 細胞；(圖 59A) 在血液中、(圖 59B) 在肝臟中、(圖 59C) 在肺中、(圖 59D) 在脾臟中、(圖 59E) 在骨髓中的 % GFP；(圖 59F) 在血液中、(圖 59G) 在肝臟中、(圖 59H) 在肺中、(圖 59I) 在脾臟中、(圖 59J) 在骨髓中的 GFP MFI；(圖 59K) 在血液中、(圖 59L) 在肝臟中、(圖 59M) 在肺中、(圖 59N) 在脾臟中、(圖 59O) 在骨髓中的 % DiI；(圖 59P) 在血液中、(圖 59Q) 在肝臟中、(圖 59R) 在肺中、(圖 59S) 在脾臟中和 (圖 59T) 在骨髓中的 DiI MFI。

圖 60A 至圖 60T 描繪了在用 DMG、DPG 1.5% 或 2.5% 24 h 後用脂質 5 的 0.3 mg/kg 的 CD3、CD8 抗體/奈米抗體靶向性 DiI/GFP LNP 的體內再程式化結果。每個符號代表一隻小鼠。空心圓圈是表現的 CD4+ T 細胞並且空心正方形是表現的 CD8+ T 細胞；(60A) 在血液中、(60B) 在肝臟中、(60C) 在肺中、(60D) 在脾臟中、(60E) 在骨髓中的 % GFP；(60F) 在血液中、(60G) 在肝臟中、(60H) 在肺中、(60I) 在脾臟中、(60J) 在骨髓中的 GFP MFI；(60K) 在血液中、(60L) 在肝臟中、(60M) 在肺中、(60N) 在脾臟中、(60O) 在骨髓中的 % DiI；(60P) 在血液中、(60Q) 在肝臟中、(60R) 在肺中、(60S) 在脾臟中、(60T) 在骨髓中的 DiI MFI。

圖 61A 至圖 61T 描繪了在用 DMG 或 DPG 1.5% 24 h 後用脂質 5 的 0.3 mg/kg 的 CD8、CD11a、CD4 奈米抗體或 CD4 抗體靶向性 DiI/GFP LNP 的體內再程式化結果。每個符號代表一隻小鼠。空心圓圈是表現的 CD4+ T 細胞並且空心正方形是表現的 CD8+ T 細胞；(61A) 在血液中、(61B) 在肝臟中、(61C) 在肺中、(61D) 在脾臟中、(61E) 在骨髓中的 % GFP；(61F) 在血液中、(61G) 在肝臟中、(61H) 在肺中、(61I) 在脾臟中、(61J) 在骨髓中的 GFP MFI；(61K) 在血液中、(61L) 在肝臟中、(61M) 在肺中、(61N) 在脾臟中、(61O) 在骨髓中的 % DiI；(61P) 在血液中、(61Q) 在肝臟中、(61R) 在肺中、(61S) 在脾臟中、(61T) 在骨髓中的 DiI MFI。

圖 62A 至圖 62S 描繪了在用 DPG-PEG 1.5% 24 h 後將 0.1 mg/kg 的可電離脂質 (DLn-MC3-DMA、脂質 5 和脂質 8) 與 CD3 (hsp34) 抗體靶向性 DiI/GFP LNP 進行比較的體內再程式化。每個符號代表一隻小鼠。空心圓圈是表現的 CD4+ T 細胞並且空心正方形是表現的 CD8+ T 細胞；(62A) 在血液中、(62B) 在肝臟中、(62C) 在肺中、(62D) 在脾臟中、(62E) 在骨髓中的 % GFP；(62F) 在血液中、(62G) 在肝臟中、(62H) 在肺中、(62I) 在脾臟中的 GFP MFI；(62J) 在血液中、(62K) 在肝臟中、(62L) 在肺中、(62M) 在

脾臟中、(62N)在骨髓中的% DiI；(62O)在血液中、(62P)在肝臟中、(62Q)在肺中、(62R)在脾臟中、(62S)在骨髓中的 DiI MFI。

**圖 63A 至圖 63T** 描繪了在用 DMG、DPG 1.5%或 2.5% 24 h 後用脂質 5 的 0.3 mg/kg 的 CD7 VHH/奈米抗體靶向性 DiI/GFP LNP 的體內再程式化。每個符號代表一隻小鼠。空心圓圈是表現的 CD4<sup>+</sup> T 細胞並且空心正方形是表現的 CD8<sup>+</sup> T 細胞；(63A)在血液中、(63B)在肝臟中、(63C)在肺中、(63D)在脾臟中、(63E)在骨髓中的% GFP；(63F)在血液中、(63G)在肝臟中、(63H)在肺中、(63I)在脾臟中、(63J)在骨髓中的 GFP MFI；(63K)在血液中、(63L)在肝臟中、(63M)在肺中、(63N)在脾臟中、(63O)在骨髓中的% DiI；(63P)在血液中、(63Q)在肝臟中、(63R)在肺中、(63S)在脾臟中、(63T)在骨髓中的 DiI MFI。

**圖 64A** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後共培養的 T 細胞和 NK 細胞的% GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。**圖 64B** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後共培養的 T 細胞和 NK 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。**圖 64C** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後共培養的 T 細胞和 NK 細胞的% DiI 攝取，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。**圖 64D** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後共培養的 T 細胞和 NK 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的% DiI 攝取，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。

**圖 65A** 描繪了經由在接合前在不同 TCEP 濃度下還原而產生的 SP34-hlam DS (含有 WT 鏈間二硫鍵) Fab 接合物的 SDS-PAGE。**圖 65B** 描繪了經由在接合前在不同 TCEP 濃度下還原而產生的 SP34-hlam NoDS (沒有鏈間二硫鍵，例如在 HC 和 LC 中的 C 至 S 突變) Fab 接合物的 SDS-PAGE。**圖 65C** 描繪了 hSP34-hlam DS Fab 和在接合前用 0.025 mM TCEP 還原條件產生的 Fab 接合物的 R8 RP-HPLC 層析圖。**圖 65D** 描繪了 hSP34-hlam NoDS Fab 和在接合前用各種 TCEP 還原條件產生的 Fab 接合物的 R8 RP-HPLC 層析圖。**圖 65E** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下在與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的% GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以各種密度後插入了 Fab。**圖 65F** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下在與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以各種密度後插入了 Fab。

**圖 66A** 描繪了經由在接合前在不同 TCEP 濃度下還原而產生的 TS2/18.1 和 9.6 (含有 WT 鏈間二硫鍵) Fab 接合物的 SDS-PAGE。左：TS2/18.1；右：9.6。**圖 66B** 描繪了 TS2/18.1、9.6 和 TRX2 NoDS Fab 以及經由在接合前在不同 TCEP 濃度下還原而產生的 Fab 接合物的 SDS-PAGE。**圖 66C** 描繪了 TS2/18.1 DS 和 NoDS Fab 以及在接合前用各種 TCEP 還原條件產生的 Fab 接合物的 R8 RP-HPLC 層析圖。**圖 66D** 描繪了 9.6 和 TRX2 NoDS Fab 以及在接合前用各種 TCEP 還原條件產生的 Fab 接合物的 R8 RP-HPLC 層析圖。

**圖 67A** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的% GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。**圖 67B** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。**圖 67C** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後從 T 細胞向上清液中的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。

**圖 68A** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的% GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。**圖 68B** 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 CD8 T 細胞的依據平均螢光強度

(MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。

圖 69A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以與單一靶向條件相同的密度單獨或一起後插入了 Fab。圖 69B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以與單一靶向條件相同的密度單獨或一起後插入了 Fab。圖 69C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後從 T 細胞向上清液中的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以與單一靶向條件相同的密度單獨或一起後插入了 Fab。

圖 70A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Fab-ScFv。圖 70B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Fab-ScFv。圖 70C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後從 T 細胞向上清液中的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Fab-ScFv。

圖 71A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。圖 71B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。圖 71C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後從 T 細胞向上清液中的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。

圖 72A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。圖 72B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。圖 72C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後從 T 細胞向上清液中的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。

圖 73A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。圖 73B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。圖 73C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後從 T 細胞向上清液中的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。

圖 74A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 74B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。

圖 75A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 CD8 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。

圖 75B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 CD4 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 75C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 CD8 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 75D 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 CD4 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。

圖 76A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。圖 76B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。

圖 77A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。圖 77B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。

圖 78A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。圖 78B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 和 Nb。

圖 79A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。圖 79B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。圖 79C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後從 T 細胞向上清液中的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。

圖 80A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 CD8 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 80B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 CD4 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 80C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 CD8 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 80D 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 CD4 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 80E 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後從 T 細胞向上清液中的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab。

圖 81A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 81B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 81C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後來自 T 細

胞的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。

圖 82A 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的 % GFP 轉染，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 82B 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後 T 細胞的依據平均螢光強度 (MFI) 的 GFP 表現水準，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。圖 82C 描繪了在 2.5 ug/mL mRNA 下與靶向 LNP 一起培育大約 24 h 後來自 T 細胞的 IFN $\gamma$  分泌，其中所述靶向 LNP 以給出所評價的最高轉染水準的密度後插入了 Fab 或 Nb。

圖 83A 描繪了在插入抗體接合物之前和之後脂質 2、脂質 6、脂質 12 和脂質 13 的流體動力學直徑 (DLS)。圖 83B 描繪了在插入抗體接合物之前和之後的多分散性 (DLS)。圖 83C 描繪了在 pH 5.5 MES 和 pH 7.4 HEPES 緩衝液中在插入抗體接合物之前的 LNP 表面電荷 ( $\zeta$  電位, DLS)。圖 83D 描繪了可及 RNA 百分比和總 RNA 含量 (ug/mL)。

圖 84A 至圖 84E 描繪了使用脂質 2、脂質 6、脂質 12 和脂質 13 衍生的 LNP 的 GFP mRNA 的體外 T 細胞轉染：% GFP+細胞 (圖 84A)、GFP 平均螢光強度 (MFI) (圖 84B)、% DiI+細胞 (圖 84C)、和 DiI MFI (圖 84D) 以及 T 細胞活力 (圖 84E)。

圖 85A 至圖 85E 描繪了使用脂質 2、脂質 6、脂質 12 和脂質 13 衍生的 LNP 的 GFP mRNA 的體外 T 細胞轉染：% GFP+細胞 (圖 85A)、GFP 平均螢光強度 (MFI) (圖 85B)、% DiI+細胞 (圖 85C)、和 DiI MFI (圖 85D) 以及 T 細胞活力 (圖 85E)。

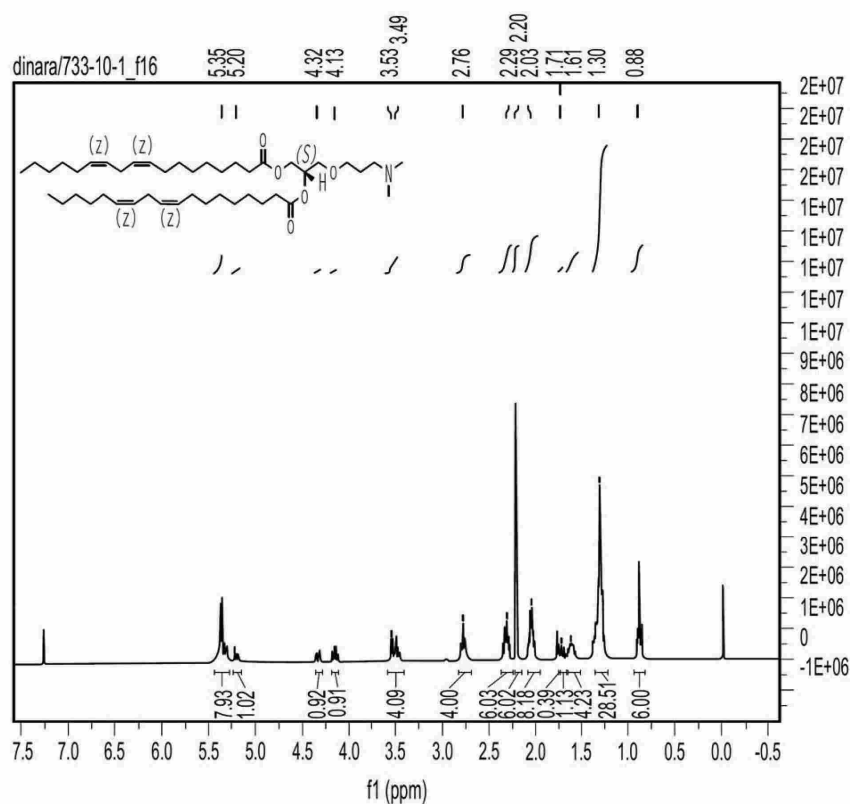


圖 1

(13)

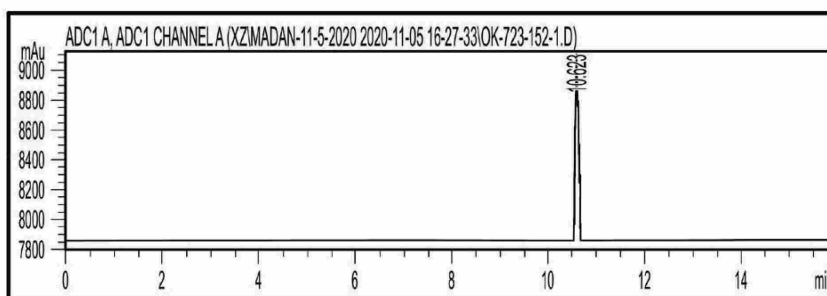
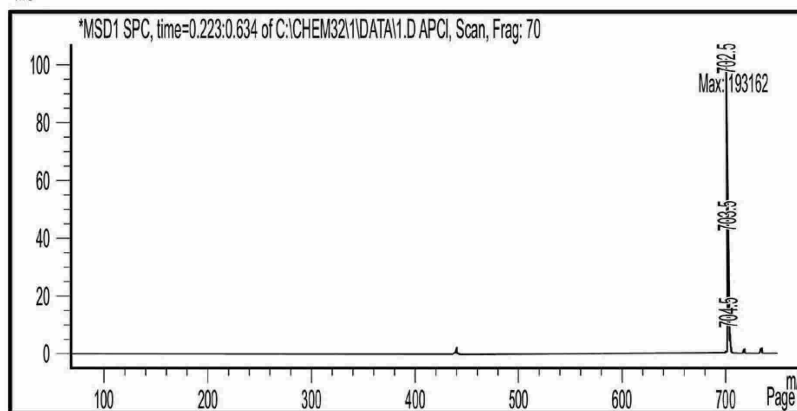


圖2A

MS 譜



儀器 1 11/5/2020 5:03:39 PM JM

圖2B

(14)

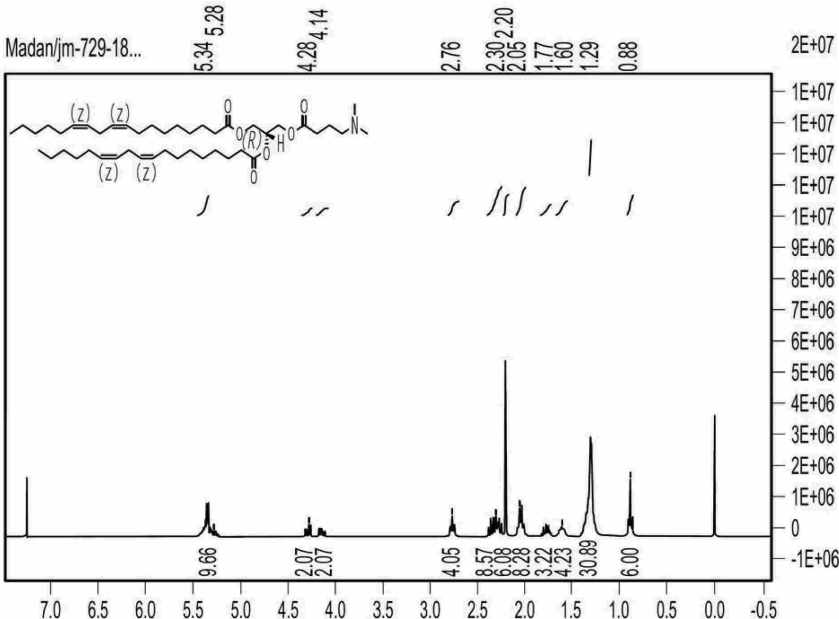


圖3

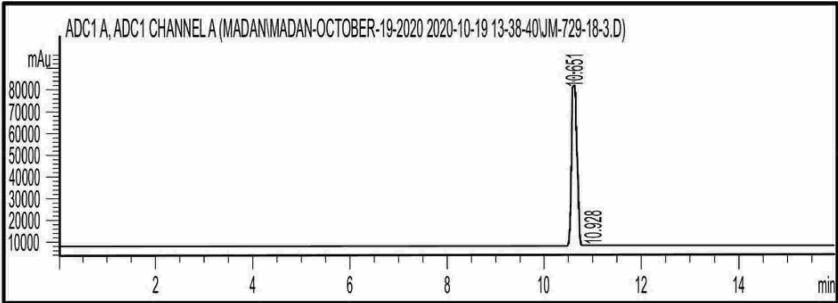


圖 4A

(15)

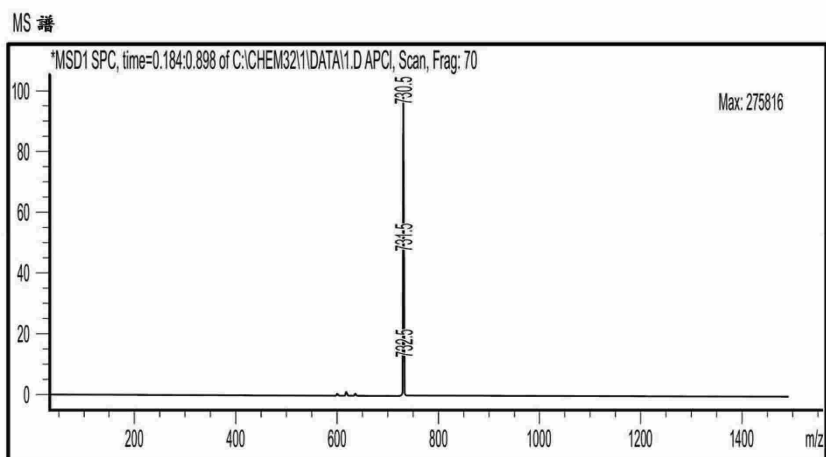


圖4B

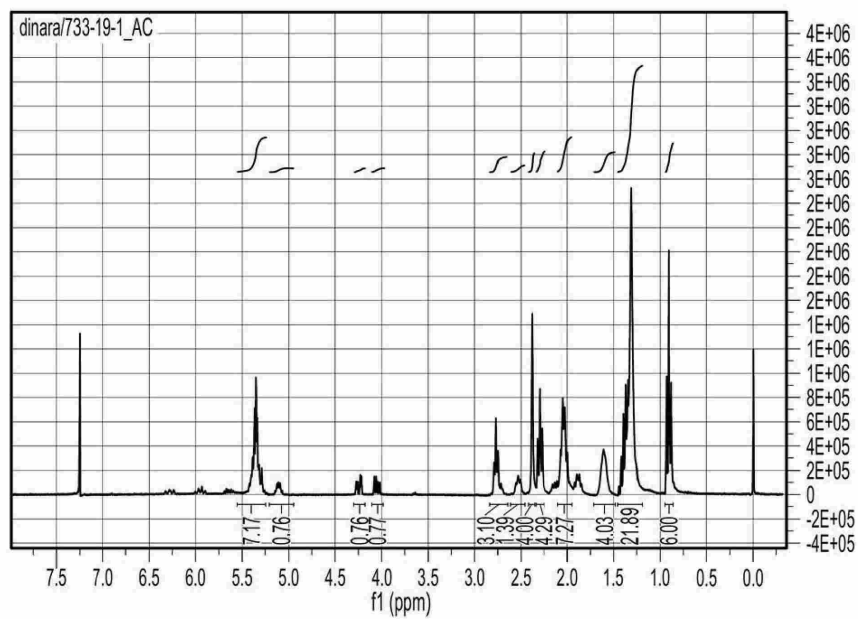


圖5

(16)

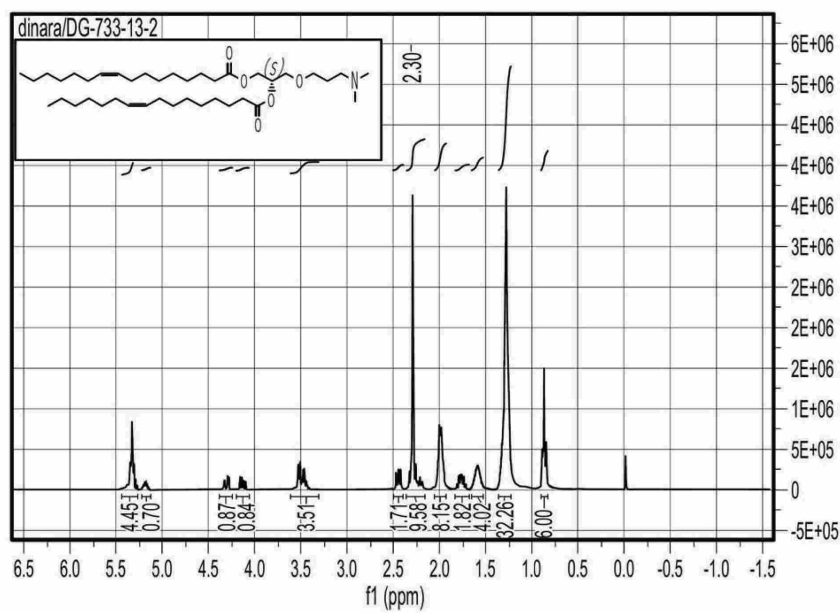


圖6

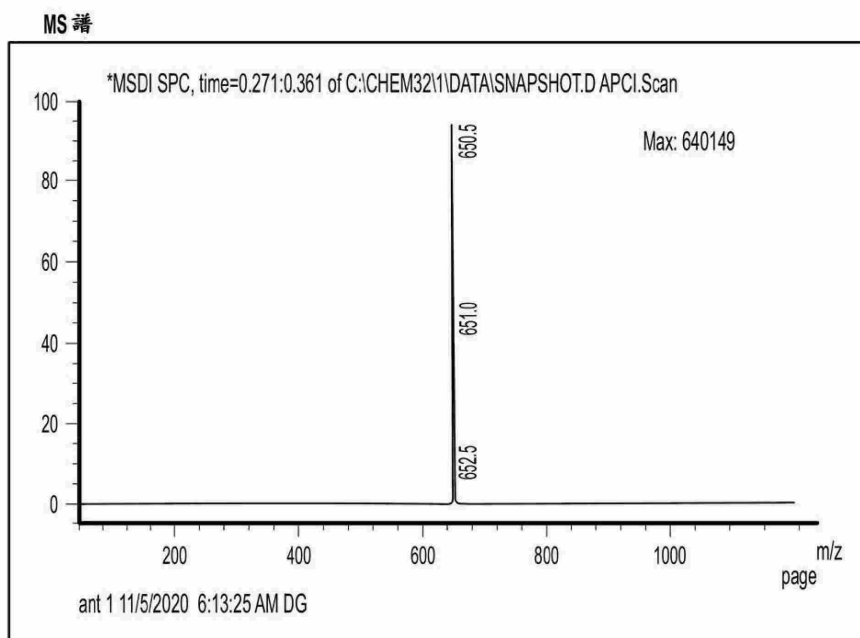


圖7A

(17)

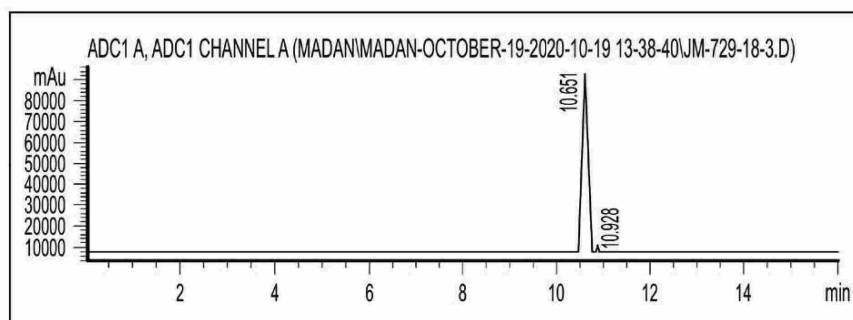


圖7B

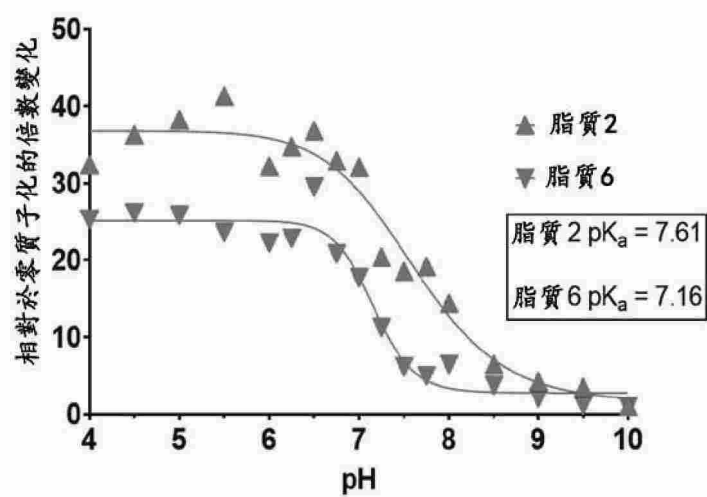


圖8A

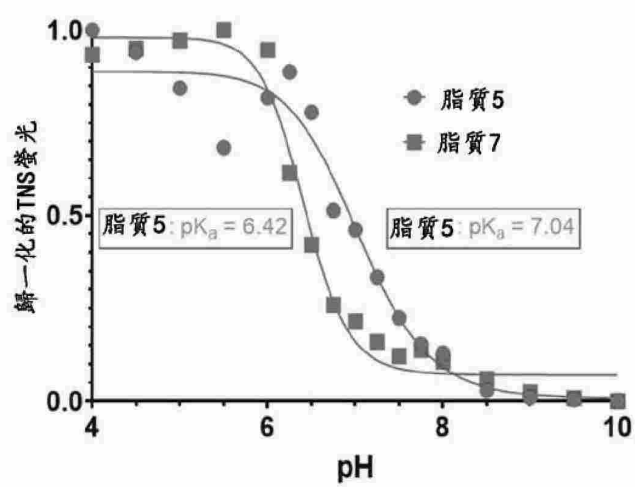


圖8B

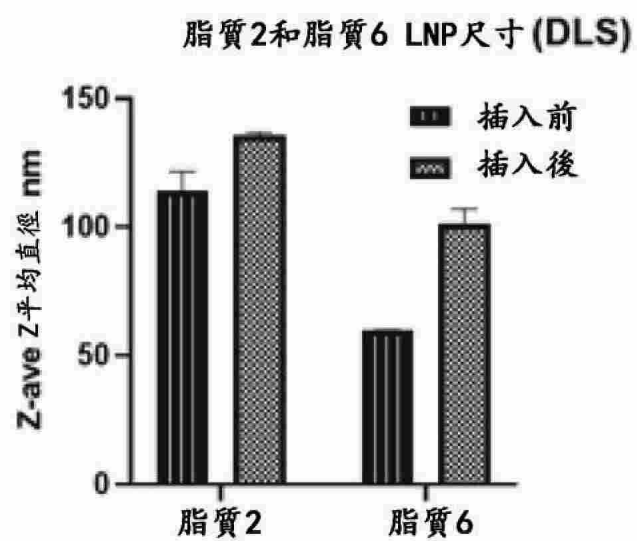


圖9A

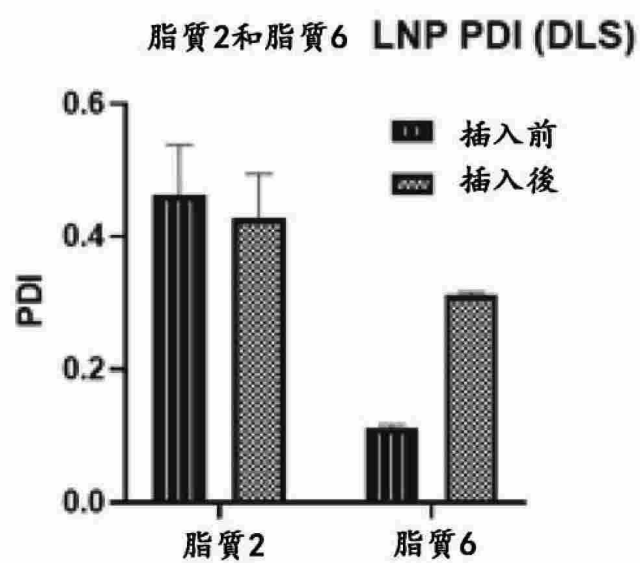


圖9B

脂質5和脂質7 LNP尺寸 (DLS)

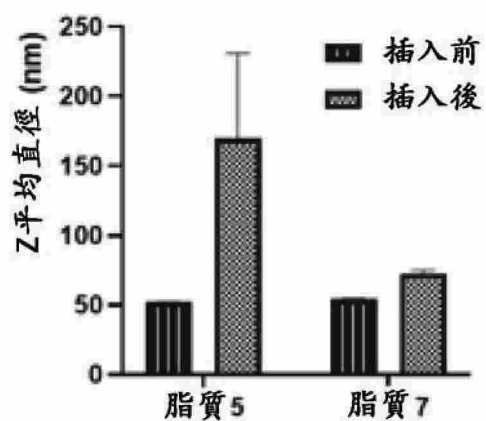


圖 10A

脂質5和脂質 LNP PDI (DLS)

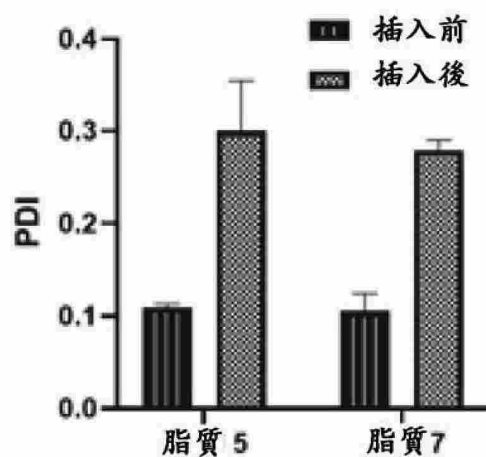


圖 10B

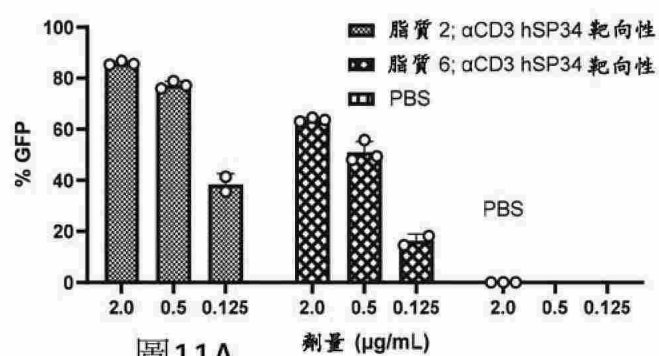


圖 11A

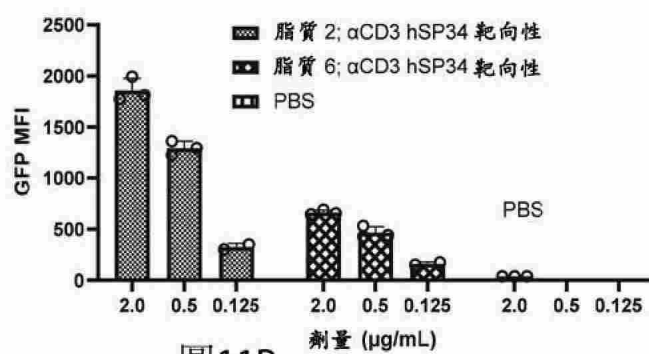


圖11B

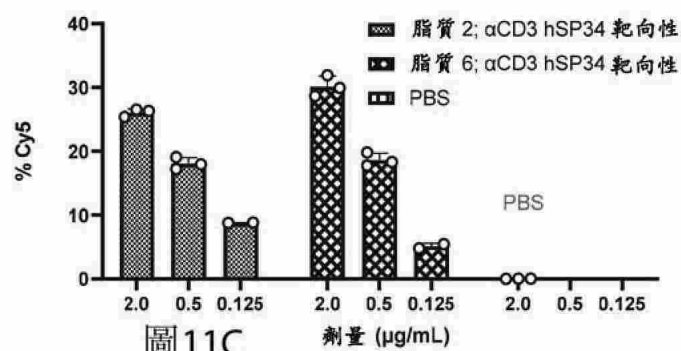


圖11C

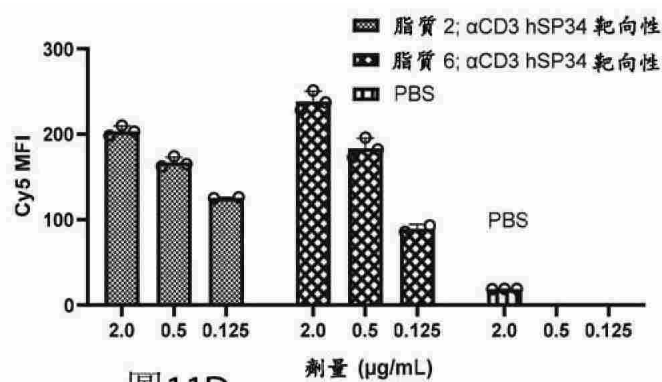


圖11D

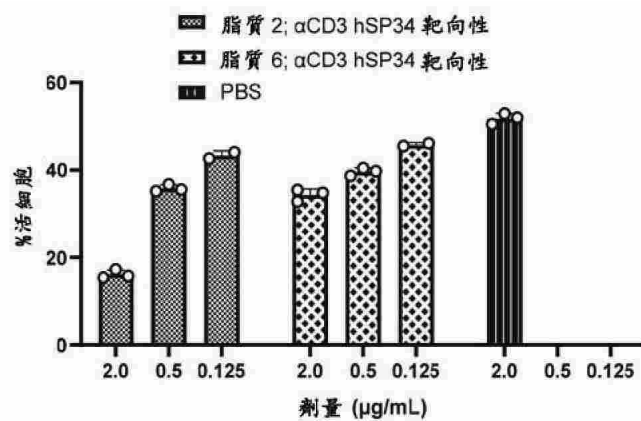


圖11E

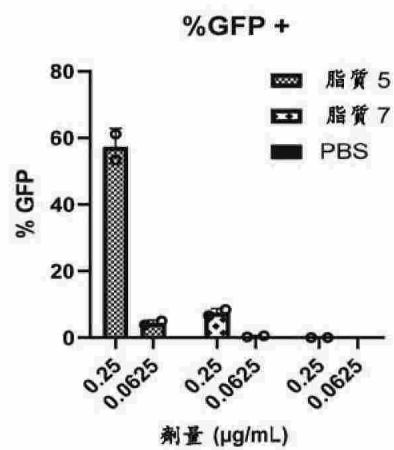


圖12A

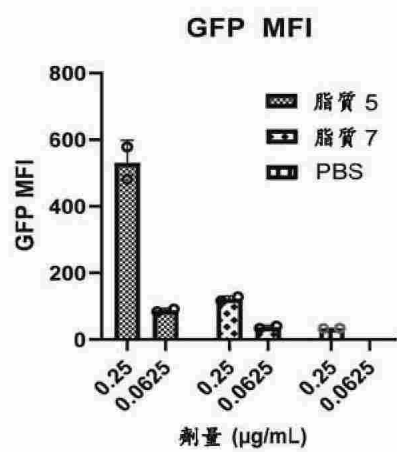


圖12B

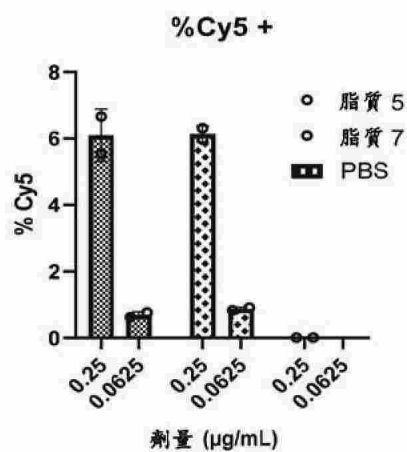


圖12C

(22)

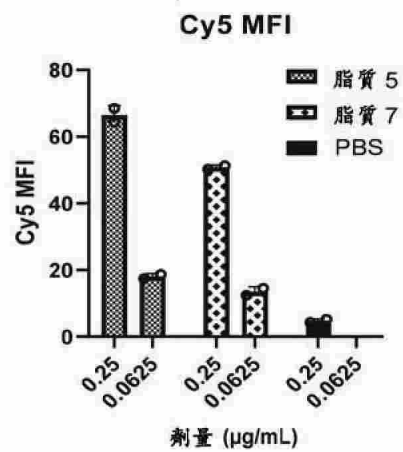


圖 12D

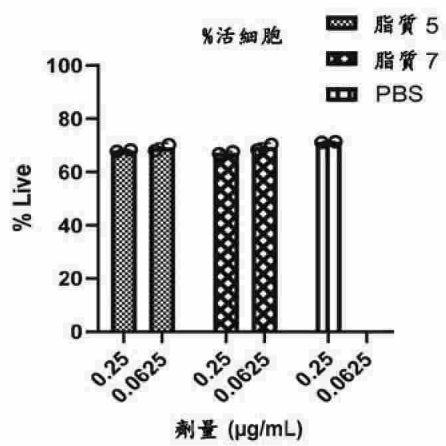


圖 12E

## 從冷凍的PBMC中富集的hCD8

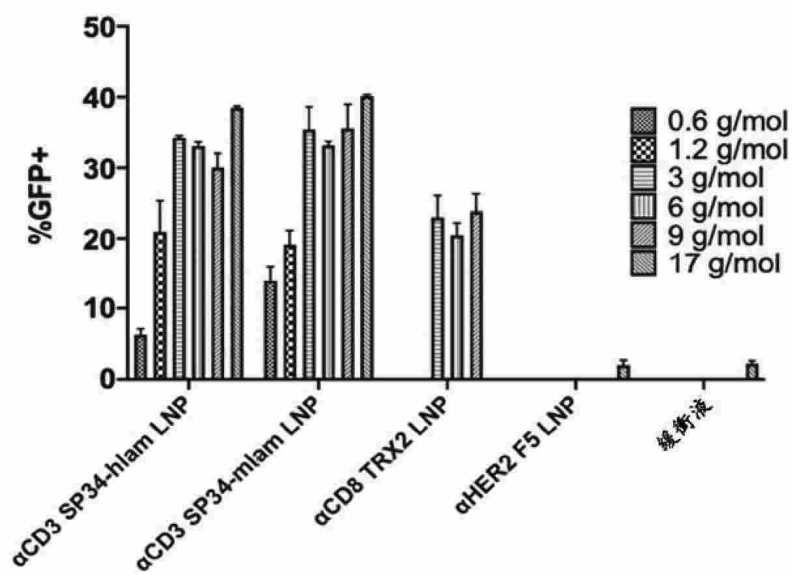


圖 13A

## 從冷凍的PBMC中富集的hCD8

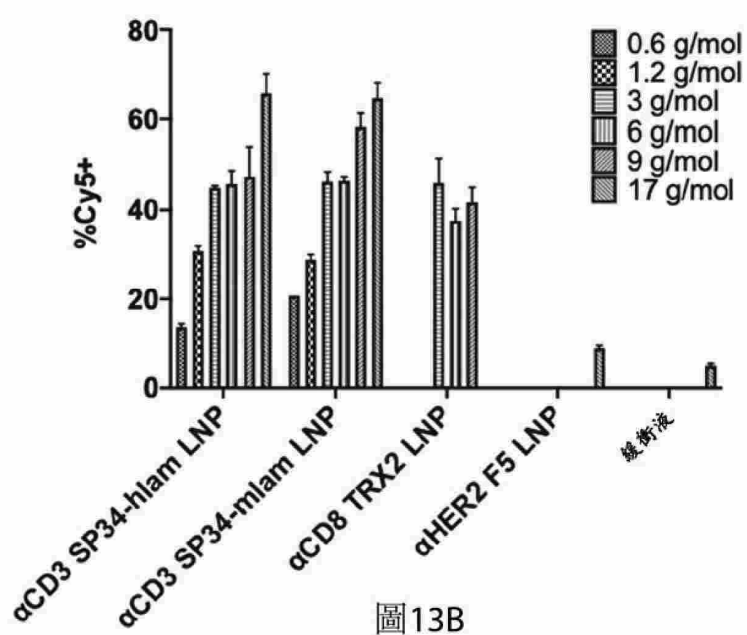


圖 13B

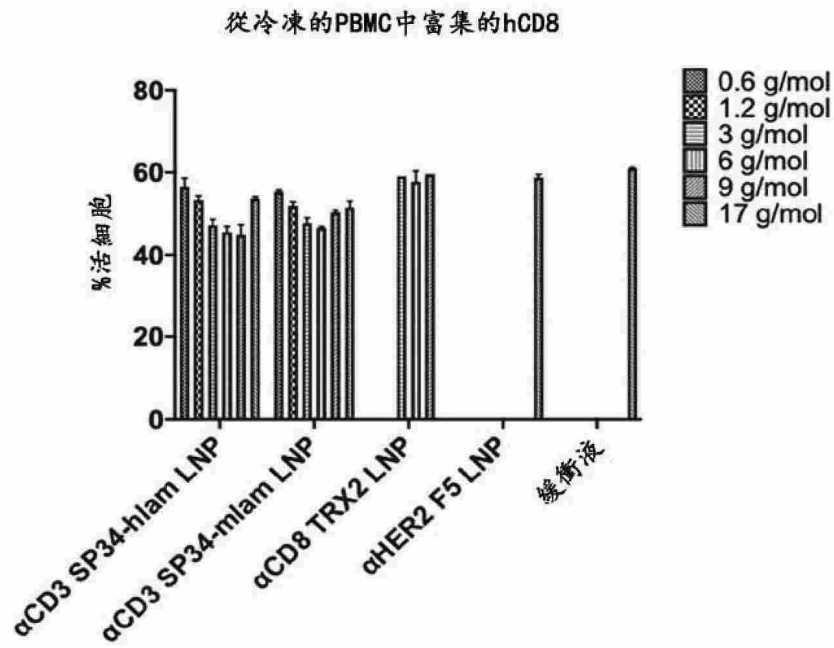


圖14A

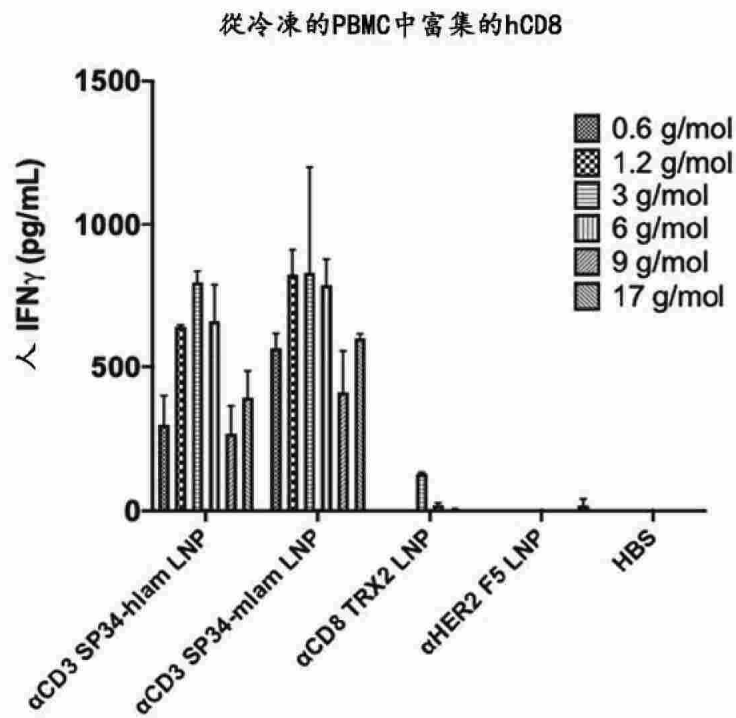


圖14B

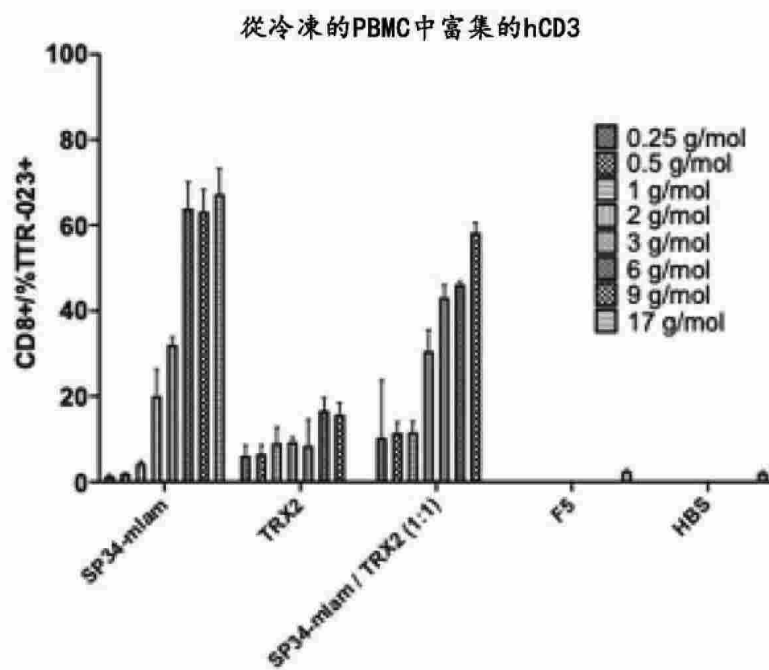


圖15A

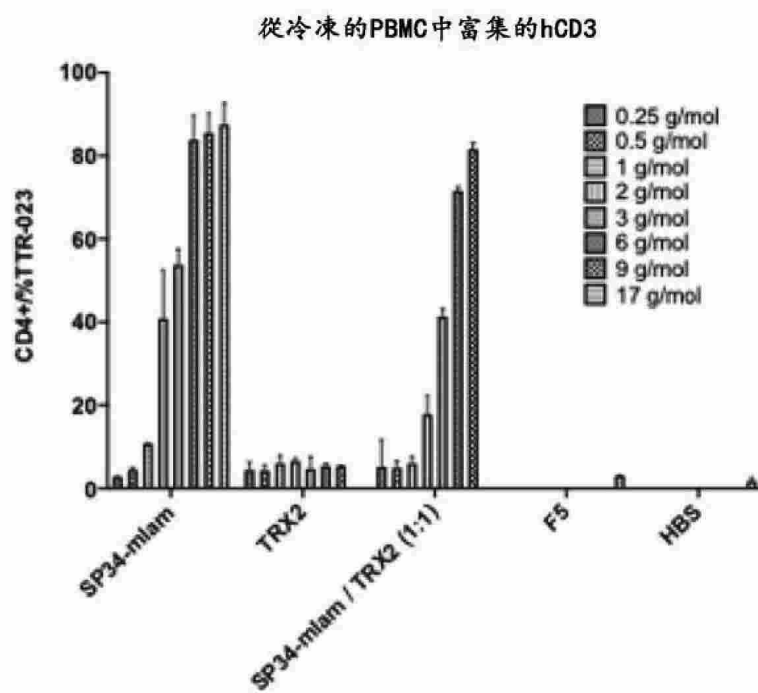


圖15B

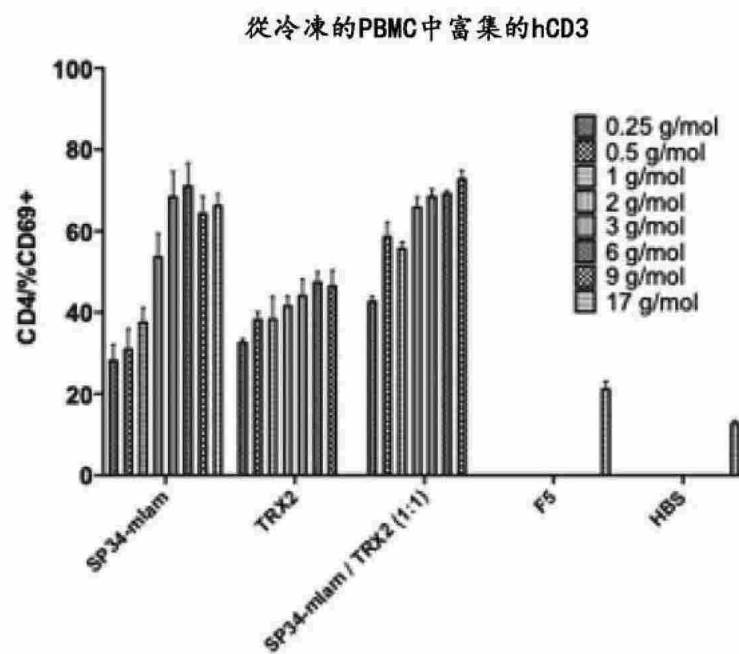


圖 16A

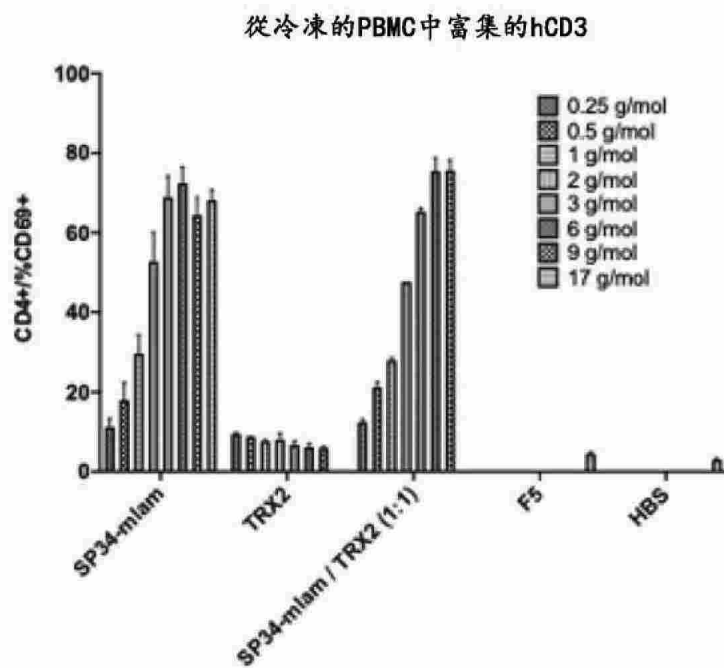


圖 16B

從冷凍的PBMC中富集的hCD3 TTR023 LNP

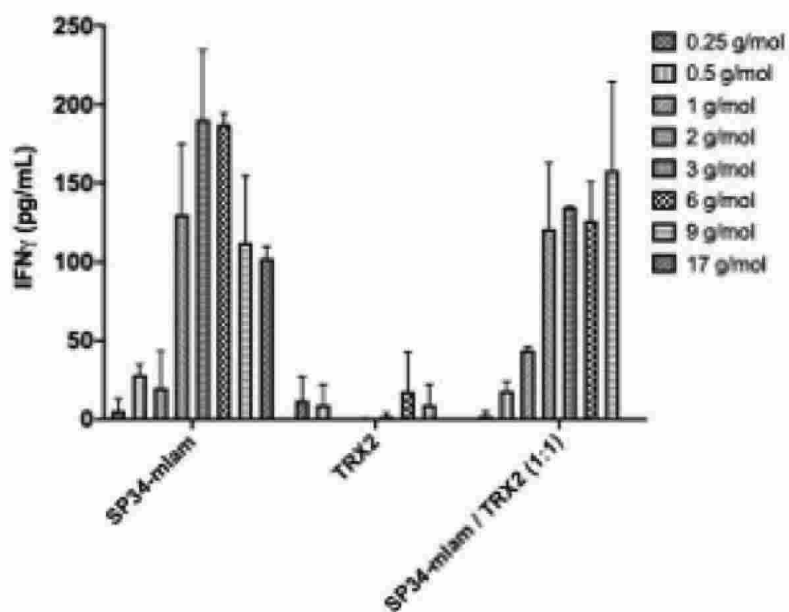


圖17

從冷凍的PBMC中富集的hCD8

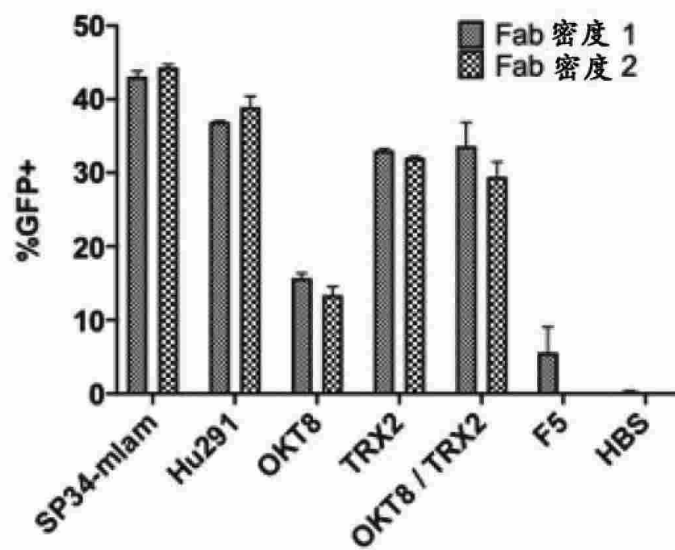


圖18A

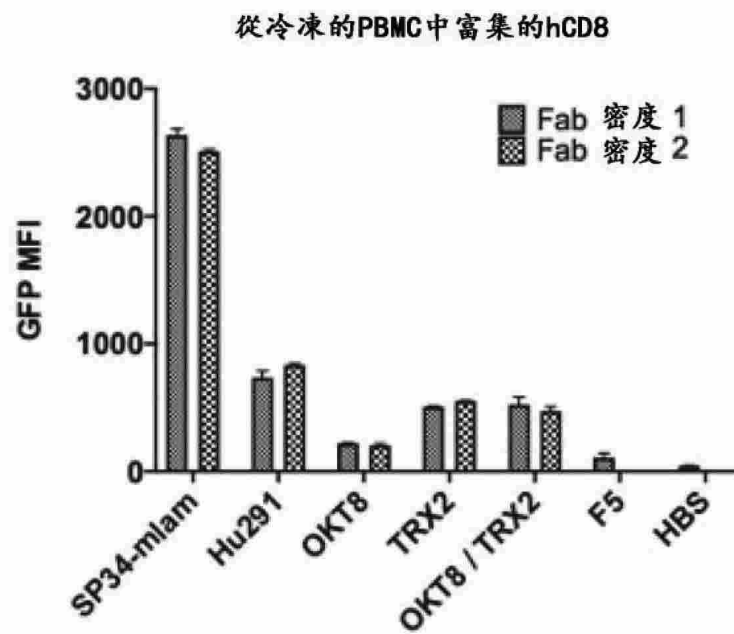


圖18B

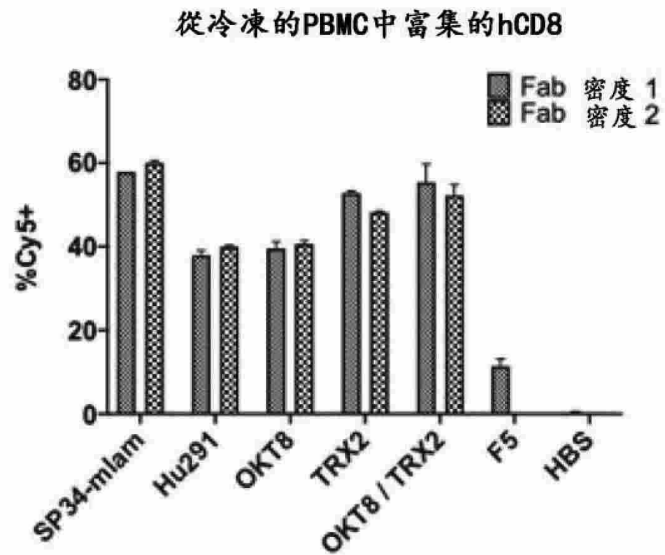


圖19A

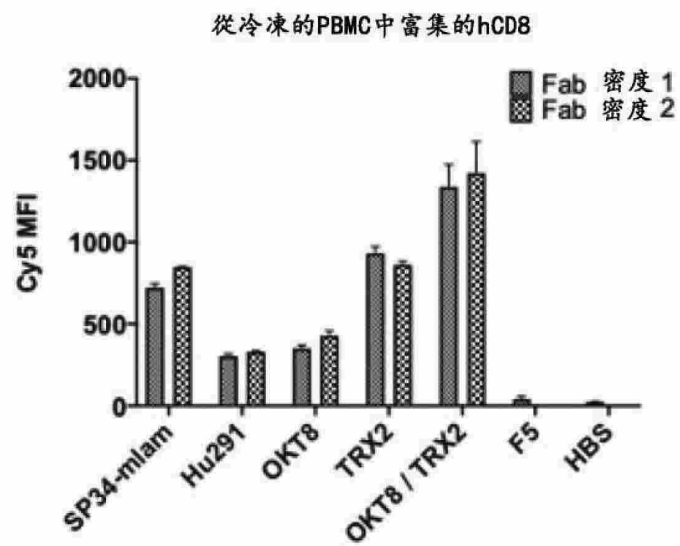


圖19B

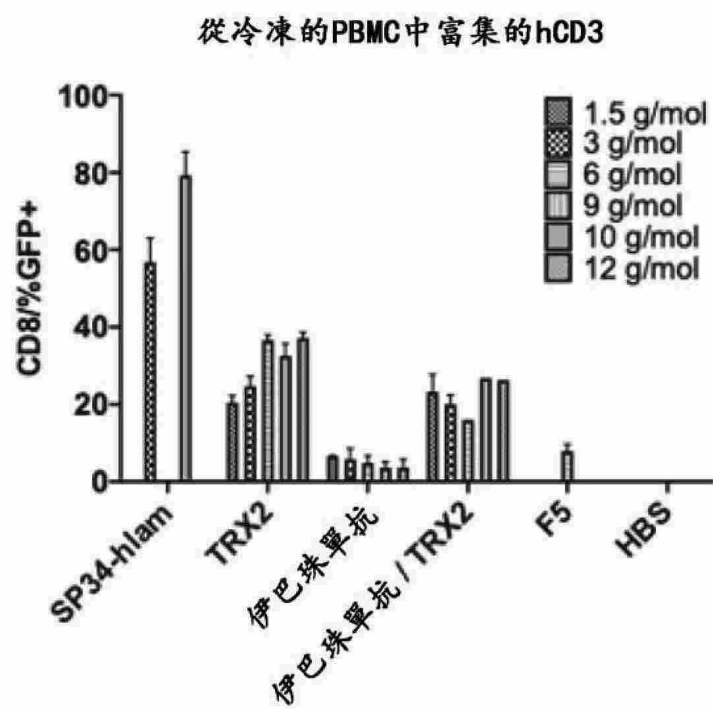


圖20A

## 從冷凍的PBMC中富集的hCD3

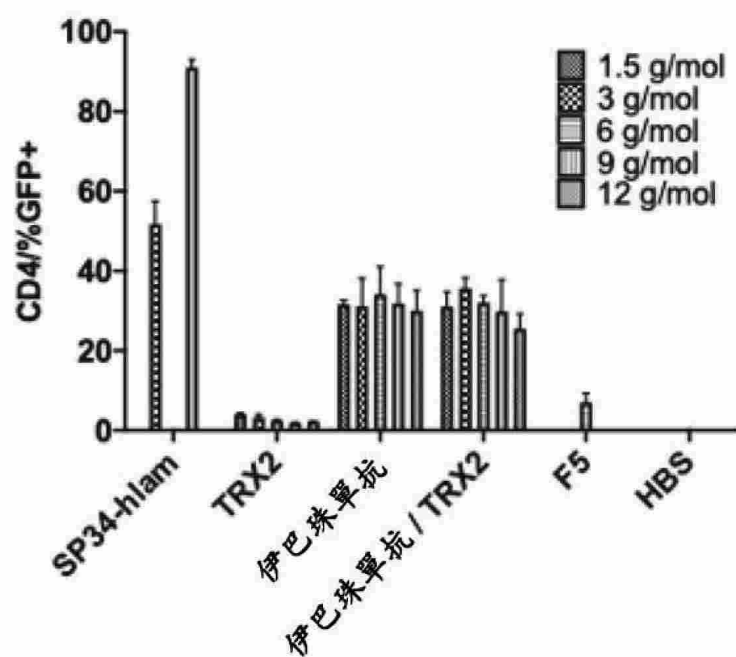


圖20B

## 從冷凍的PBMC中富集的hCD3

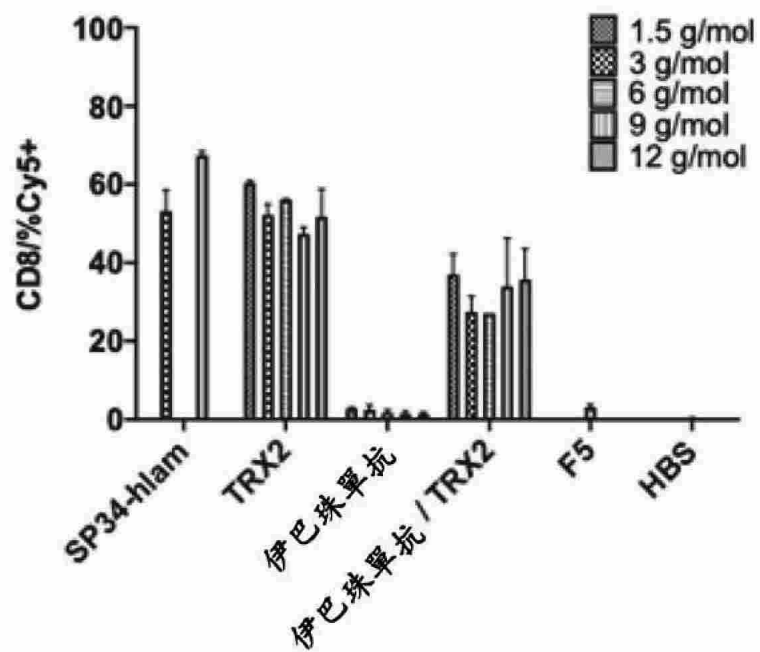


圖21A

從冷凍的PBMC中富集的hCD3

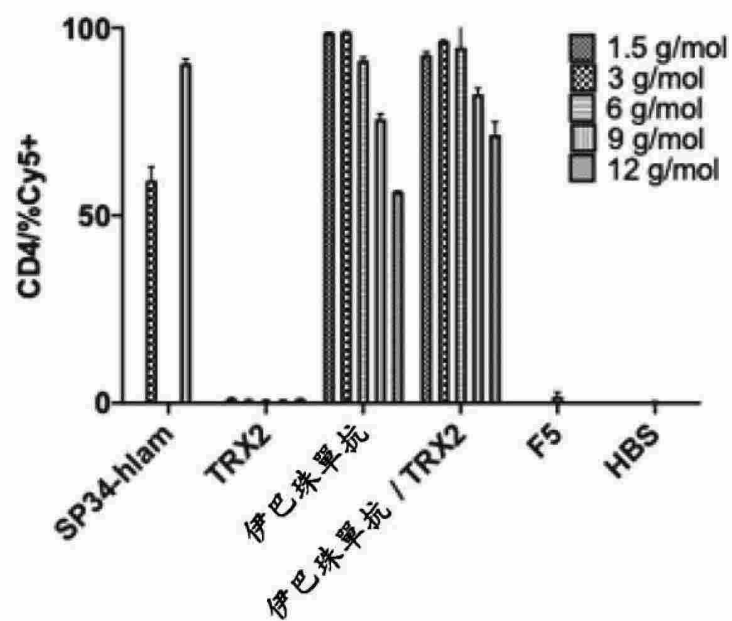


圖21B

從冷凍的PBMC中富集的hCD3

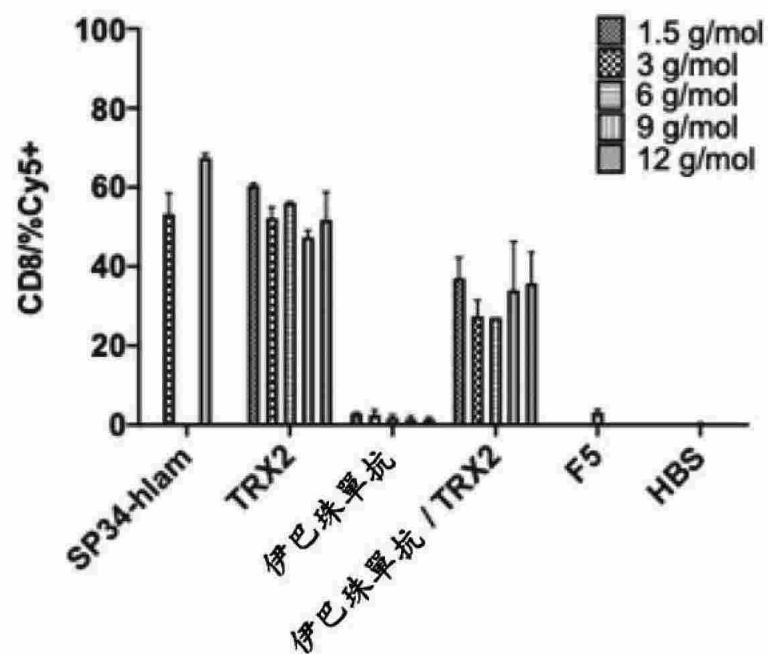


圖22A

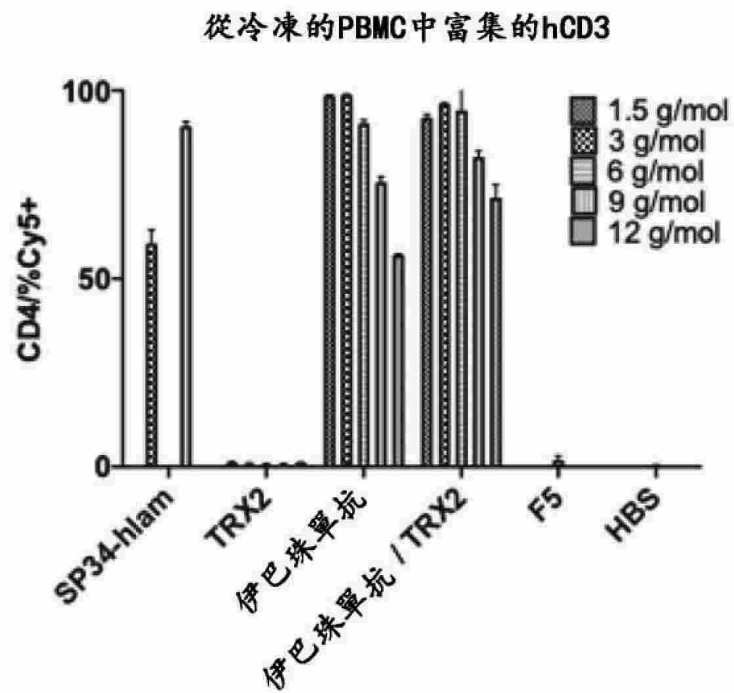


圖22B

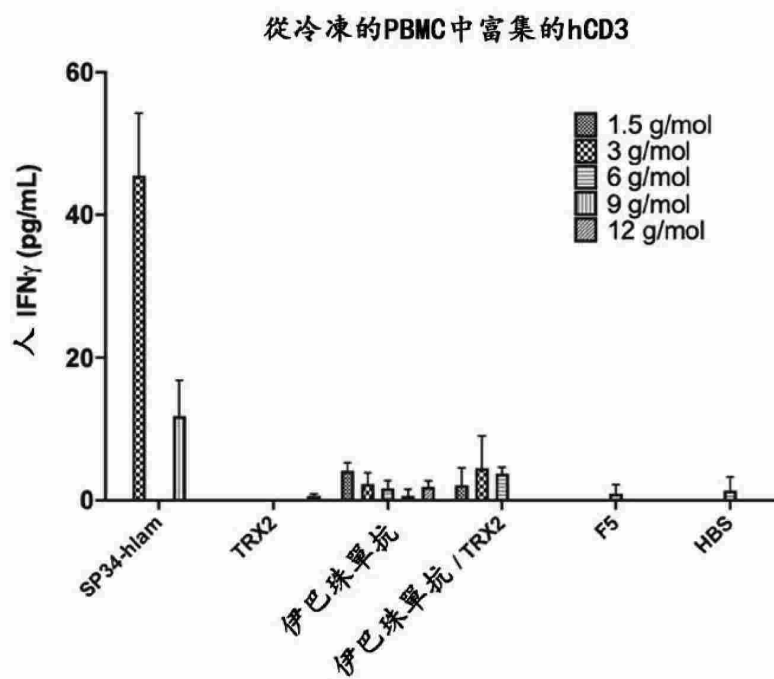


圖23

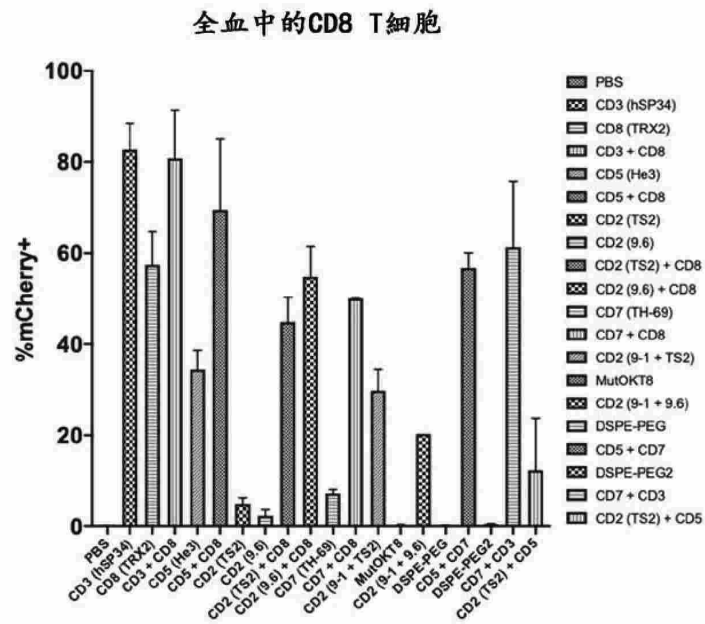


圖24A

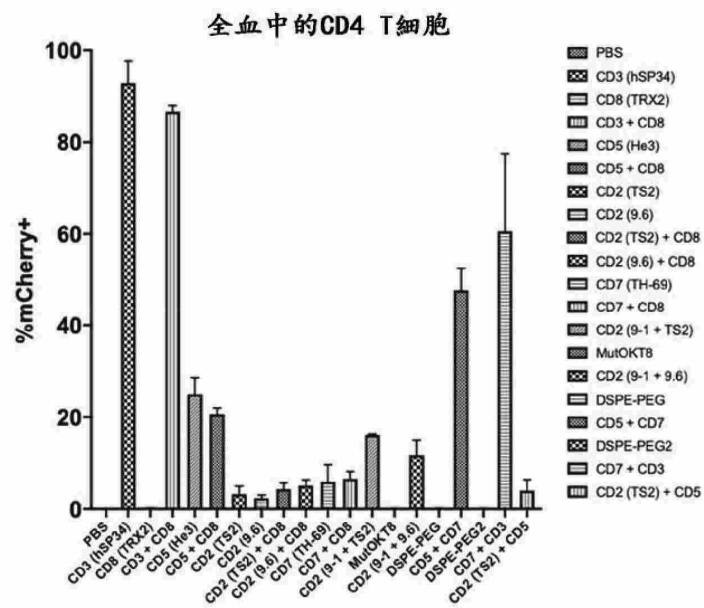


圖24B

## 全血中的B細胞

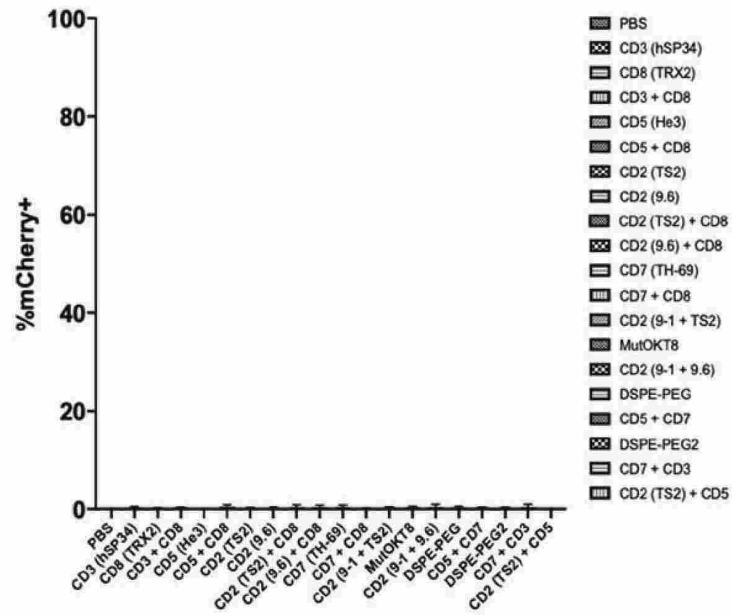


圖25A

## 全血中的NK細胞

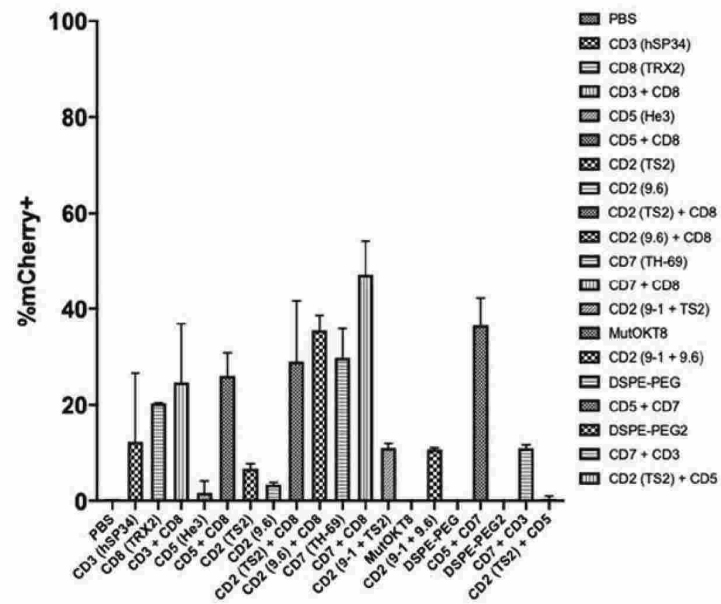


圖25B

## 全血中的粒細胞

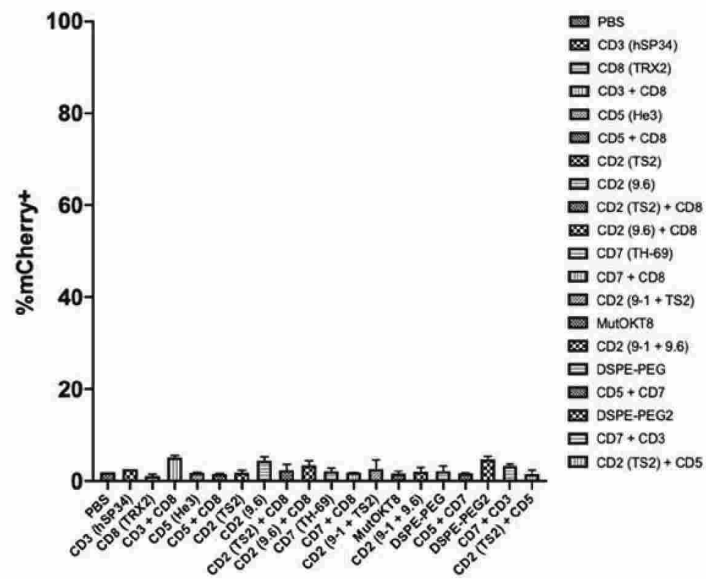


圖26A

## 全血中的CD8 T細胞

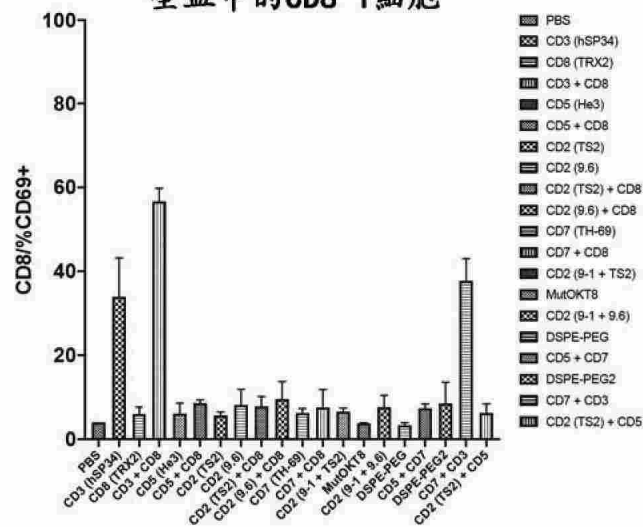


圖26B

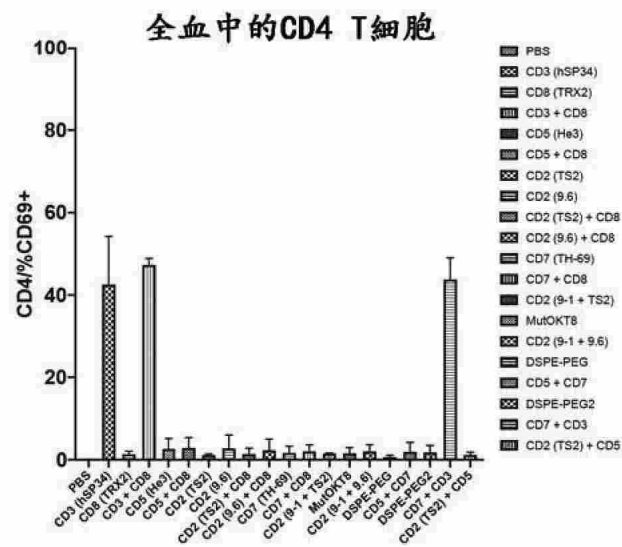


圖 26C

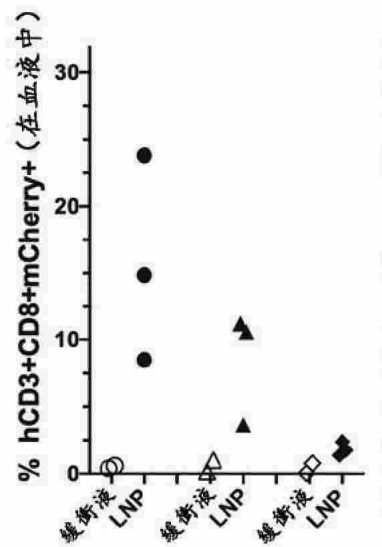


圖 27A

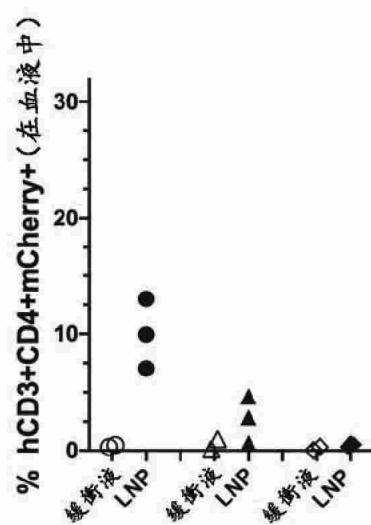


圖27B

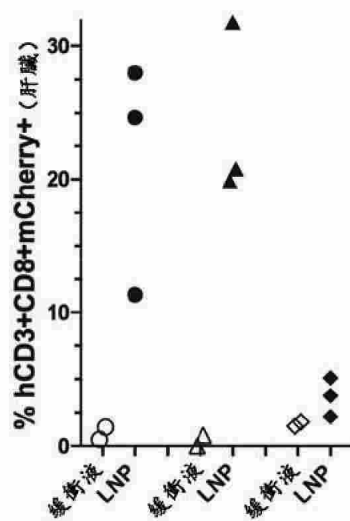


圖27C

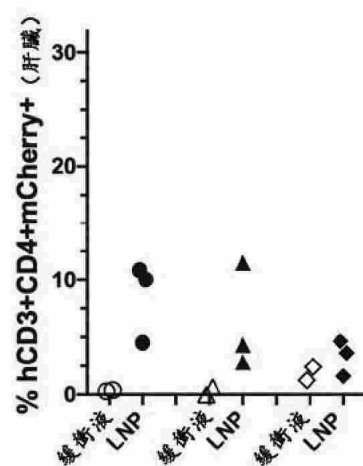


圖27D

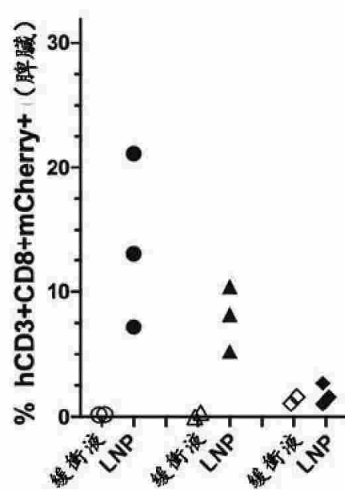


圖27E

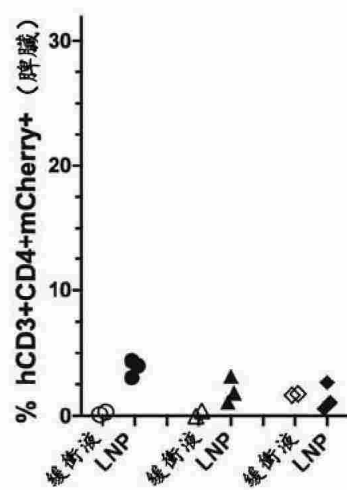


圖27F

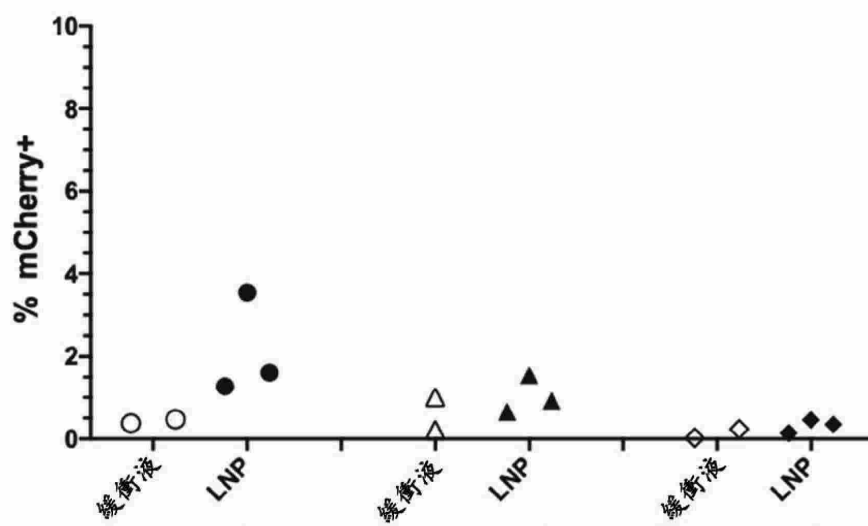


圖28

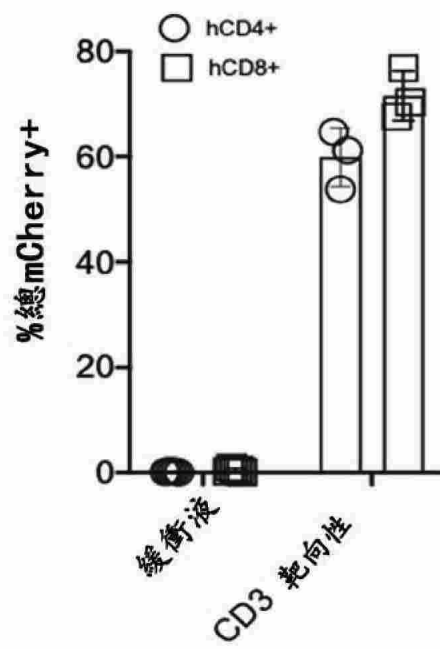


圖29A

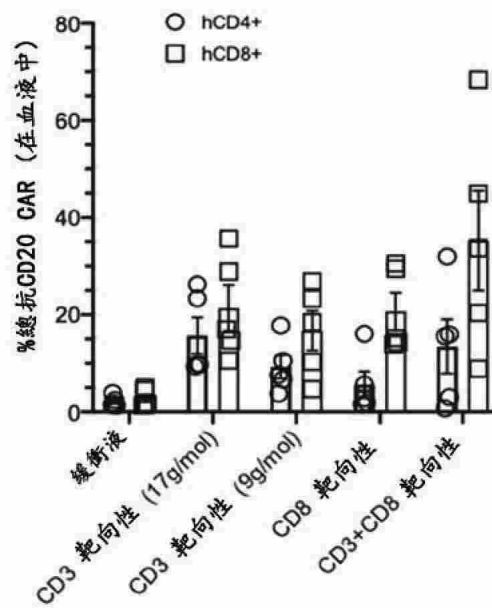


圖29B

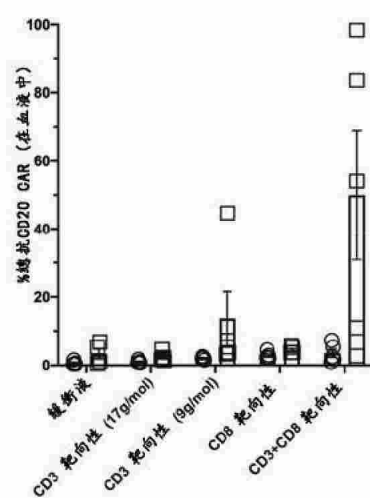


圖 30A

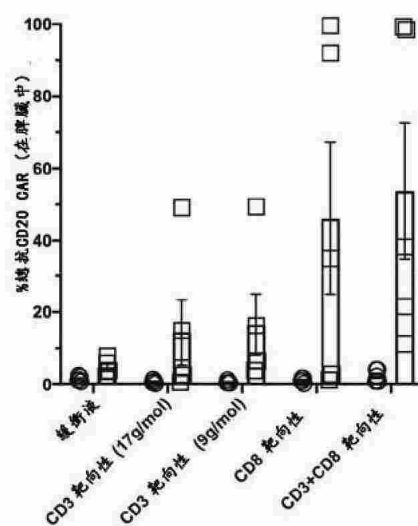


圖 30B

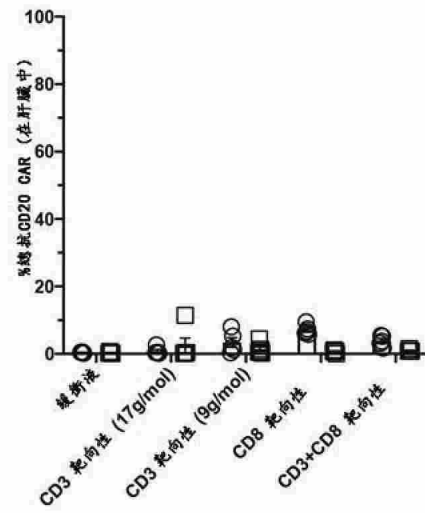


圖30C

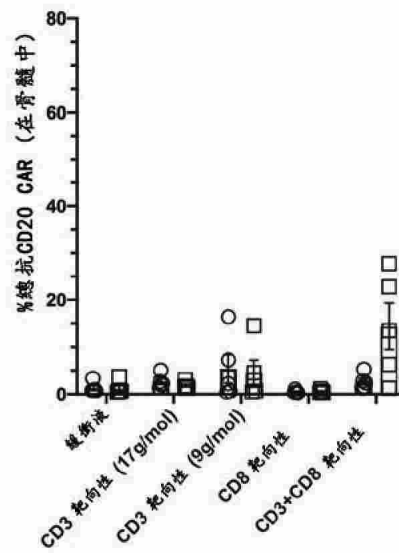


圖30D

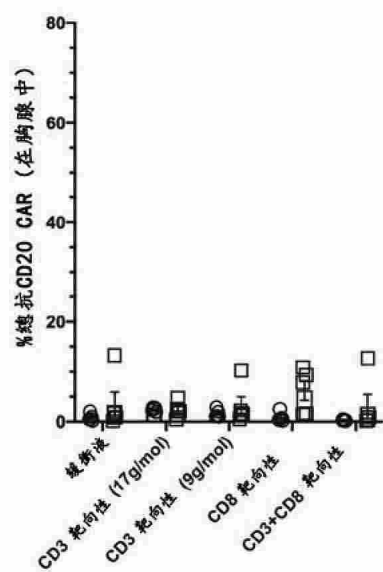


圖 30E

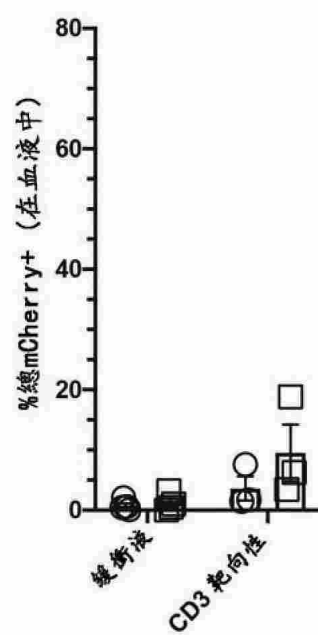


圖 31A

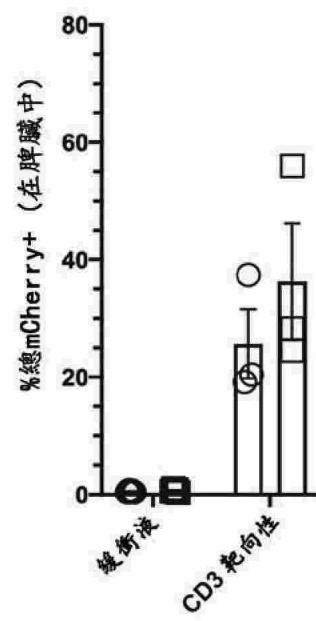


圖31B

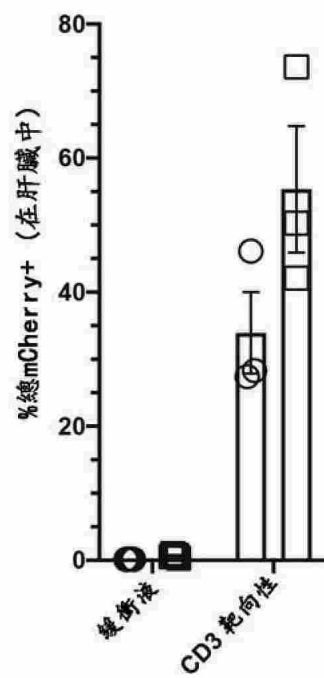


圖31C

(45)

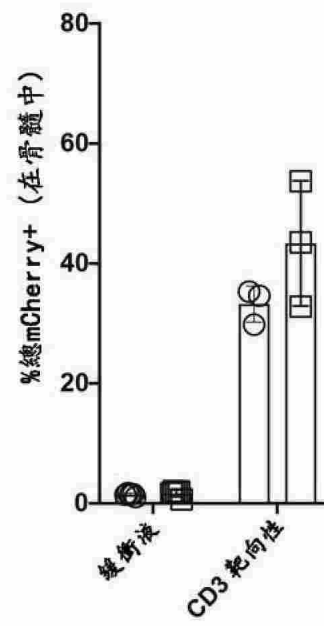


圖31D

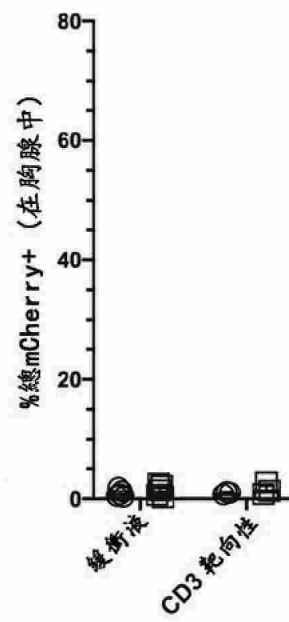


圖31E

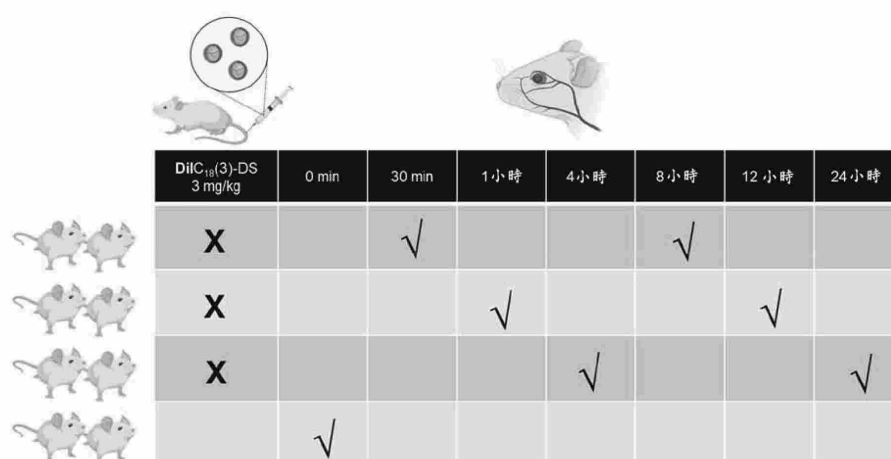


圖32

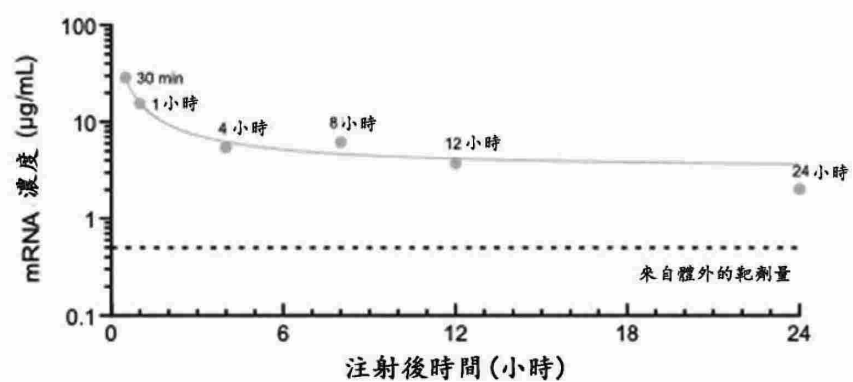


圖33

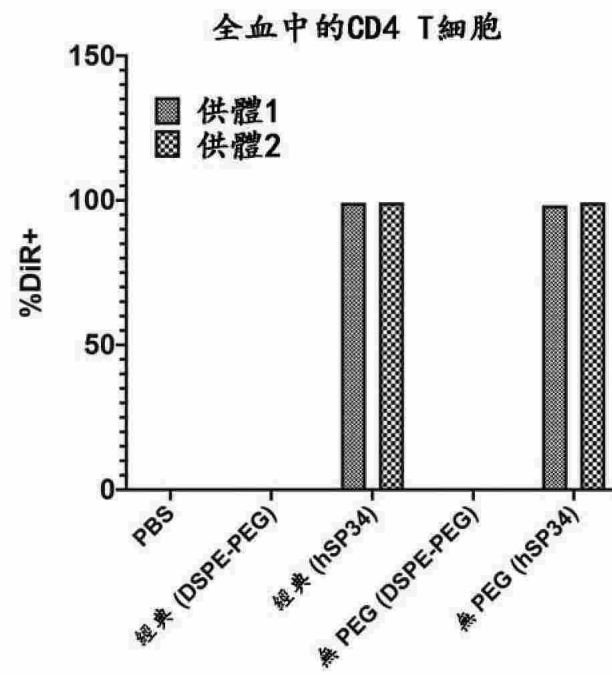


圖34A

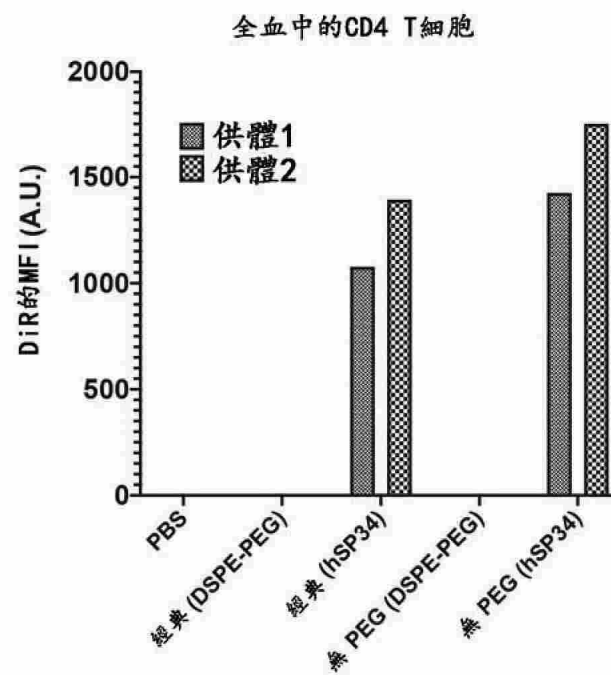


圖34B

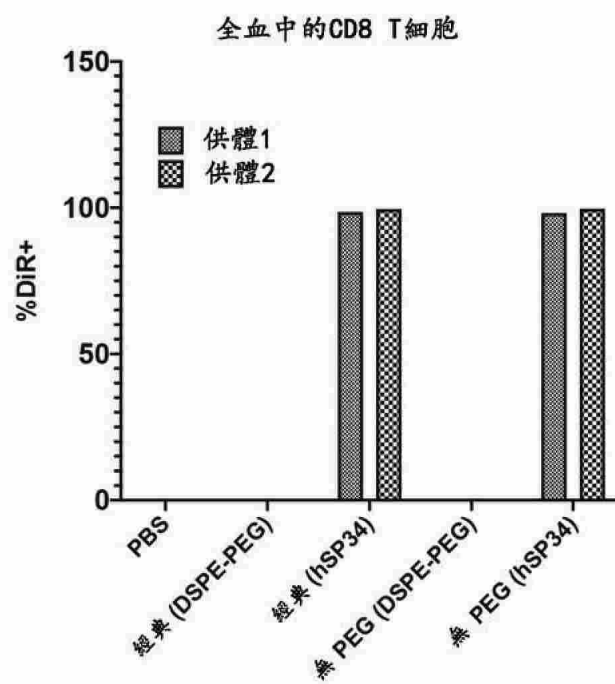


圖35A

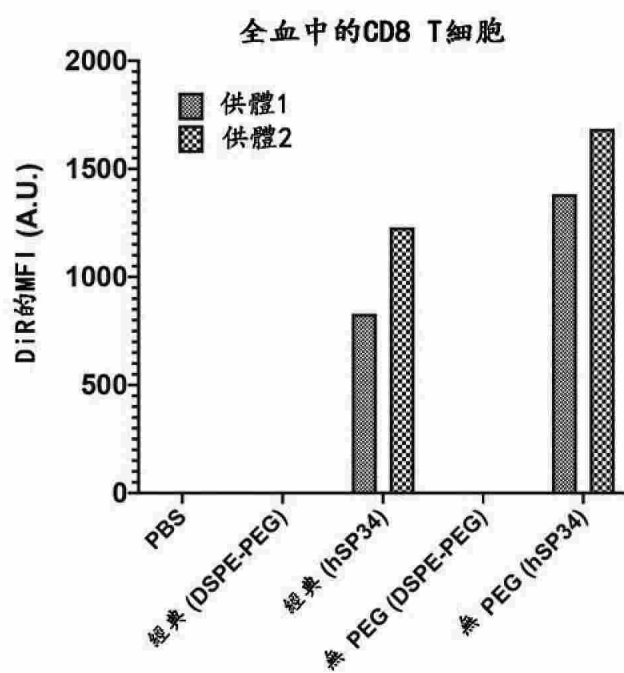


圖35B

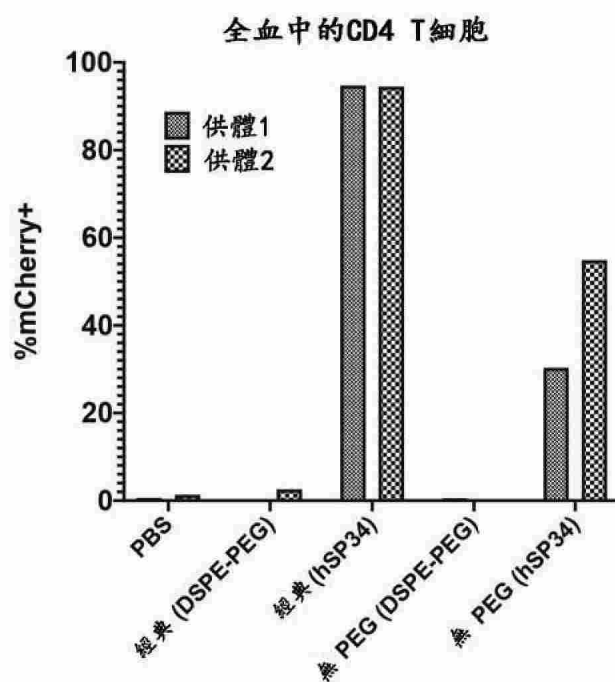


圖36A

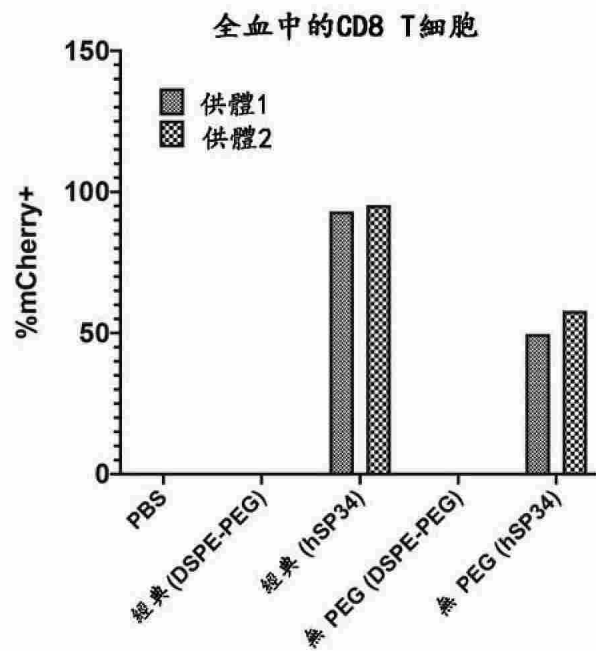


圖36B

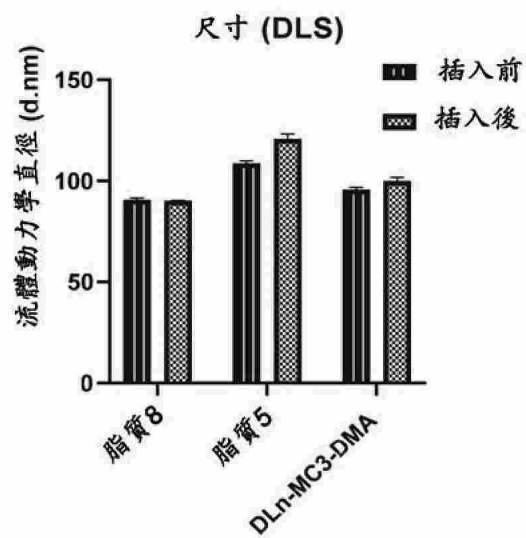


圖37A

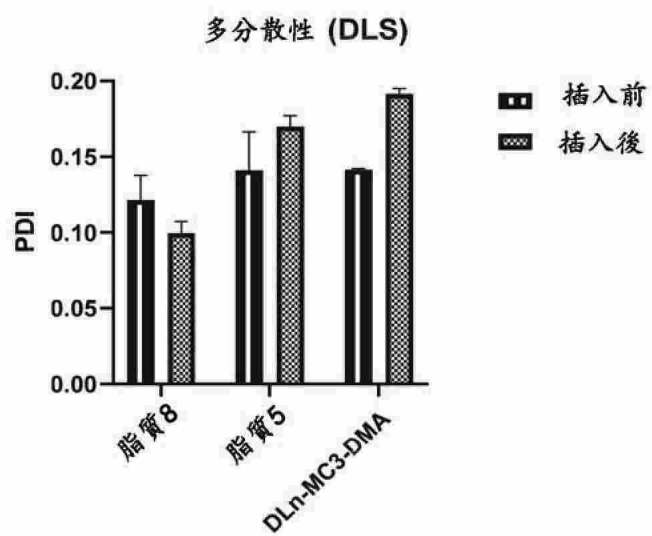


圖37B

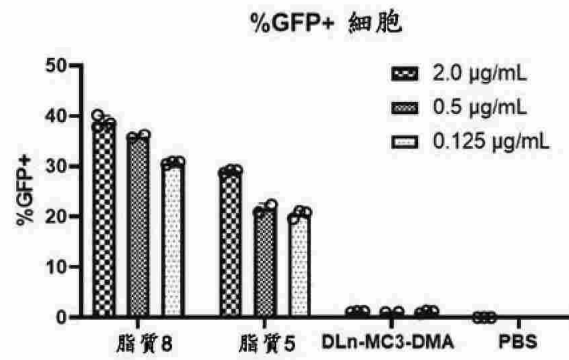


圖38A

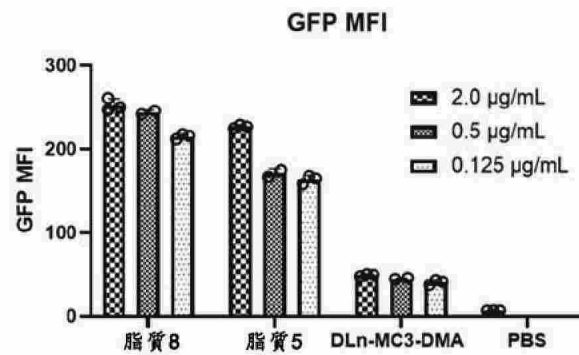


圖38B

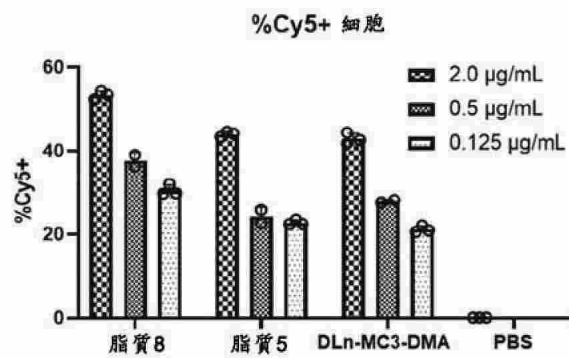


圖38C

(52)

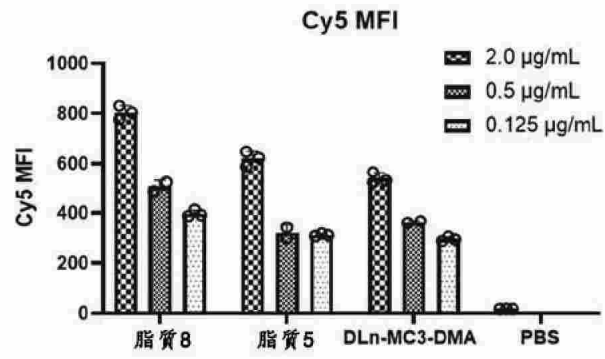


圖38D

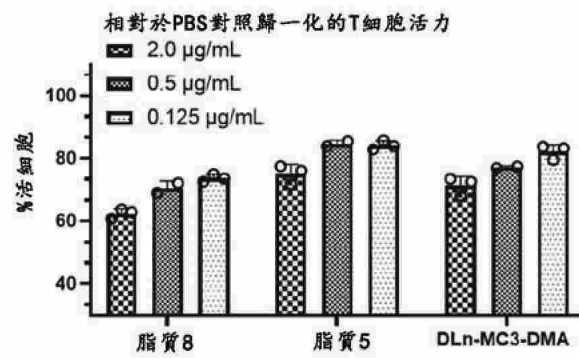


圖38E

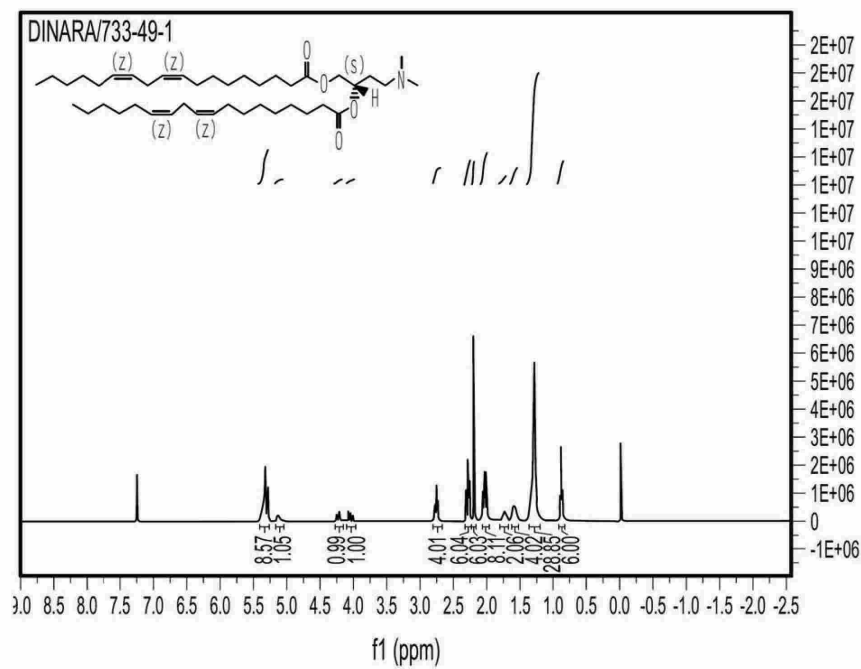


圖39

MS 譜

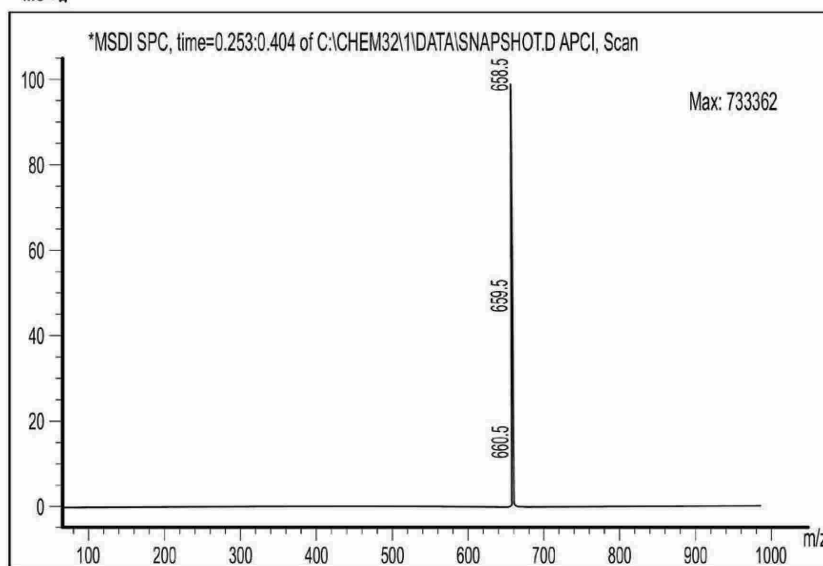


圖40A

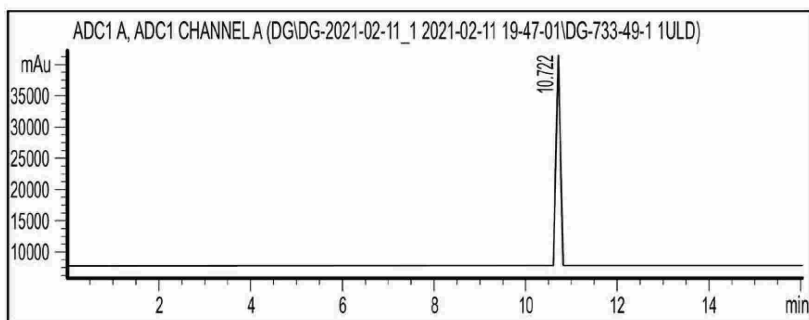


圖40B

(54)

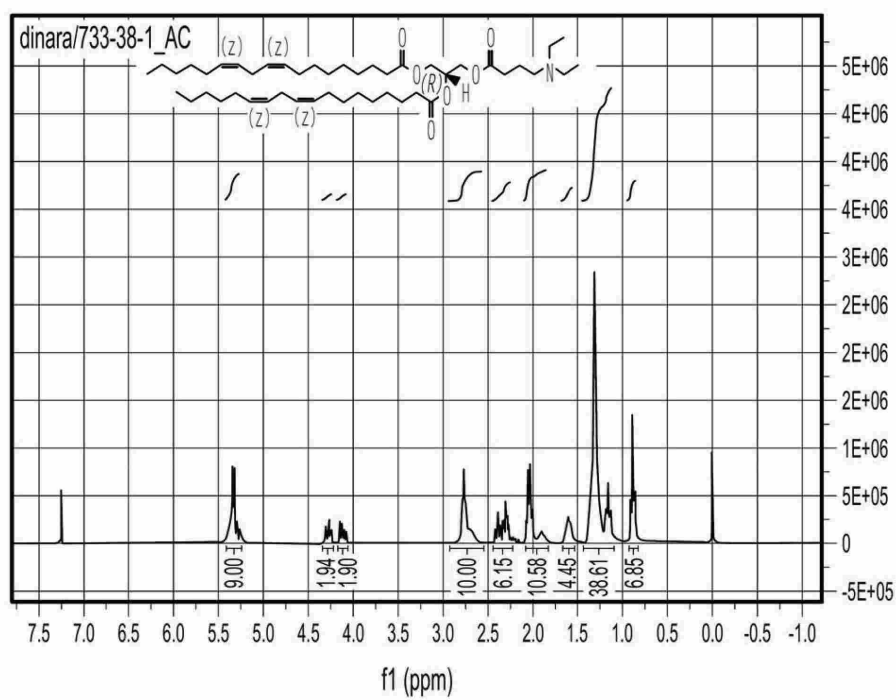


圖41

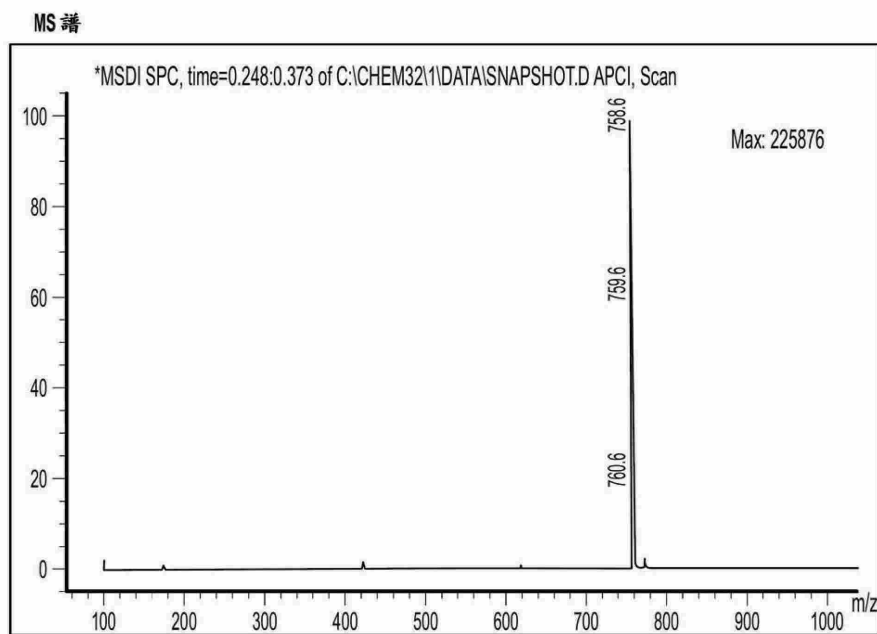


圖42A

(55)

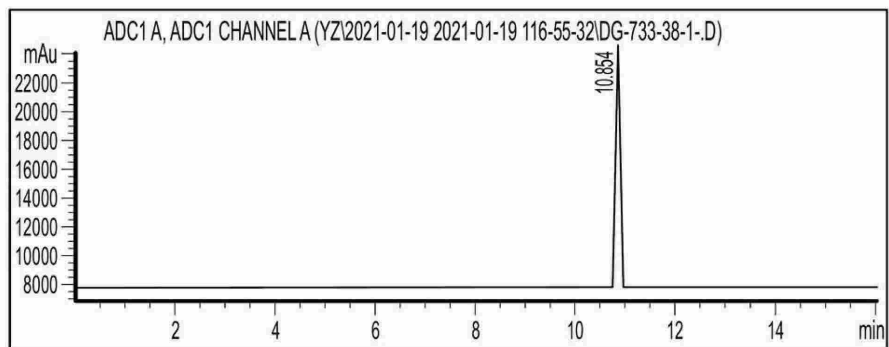


圖42B

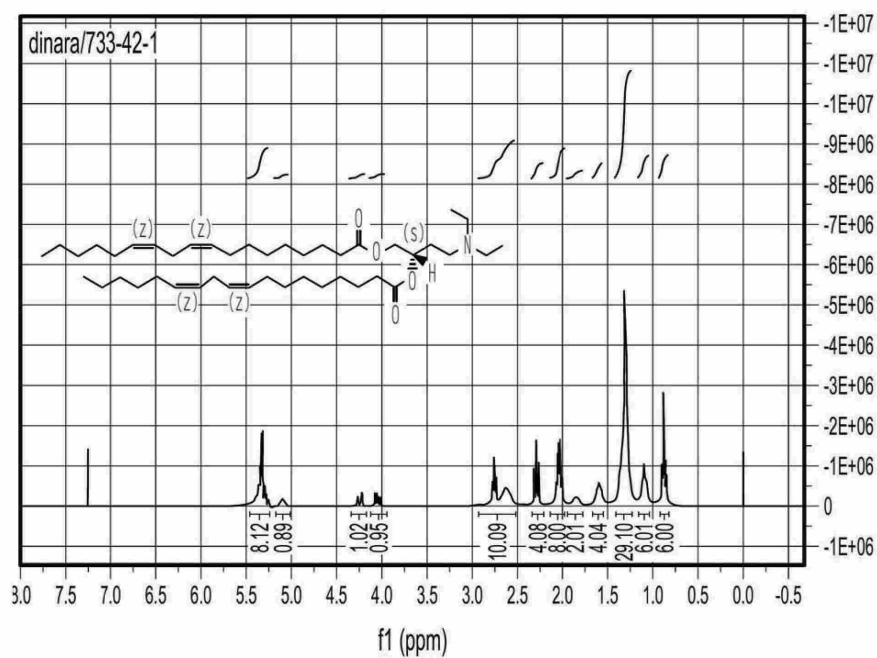


圖43

(56)

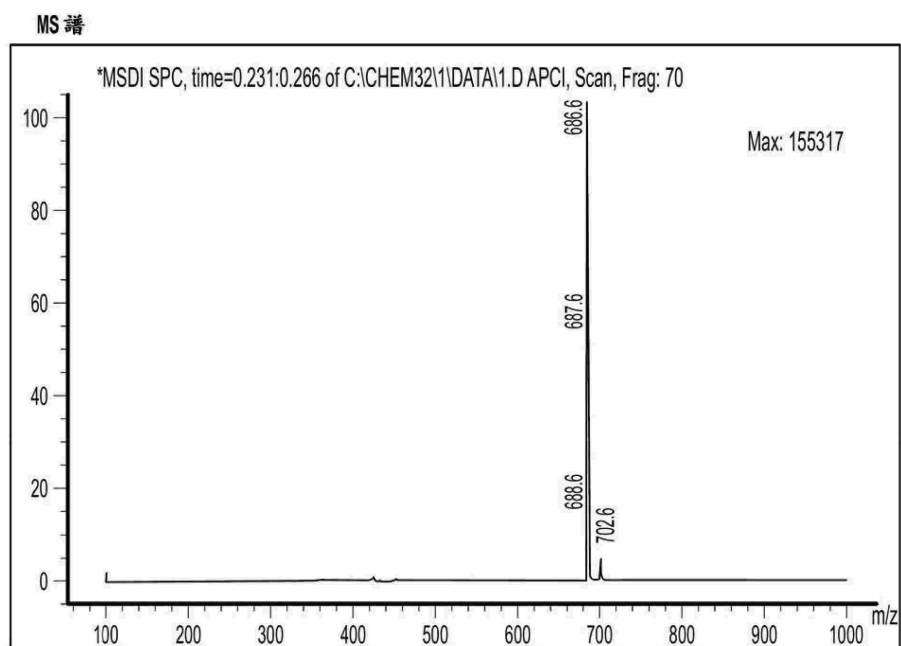


圖44A

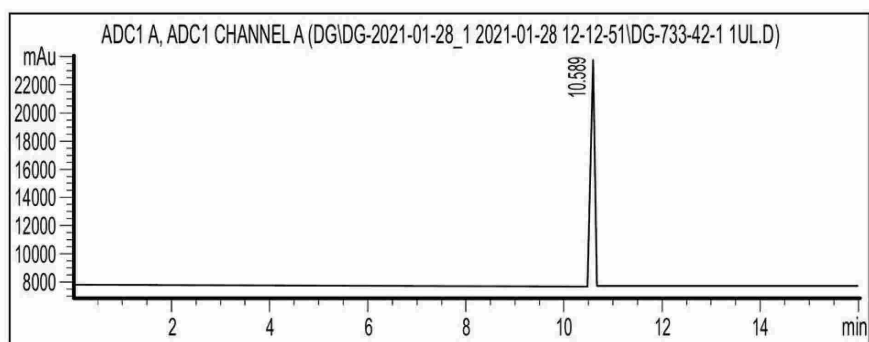


圖44B

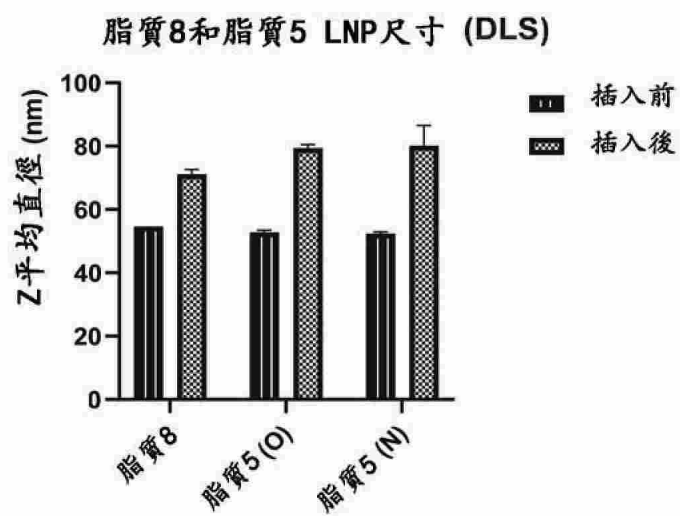


圖45A

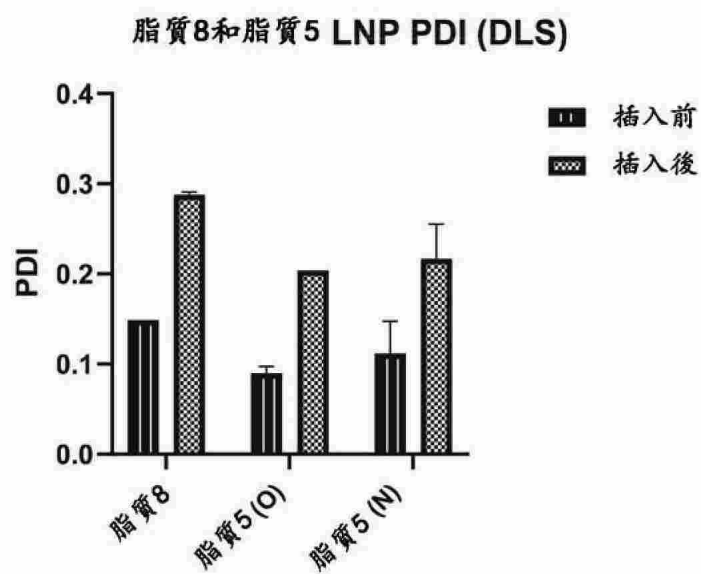


圖45B

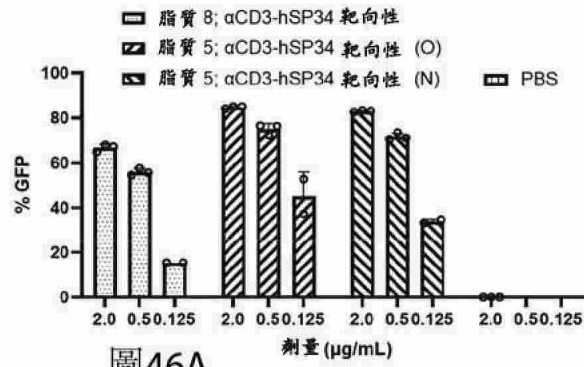


圖46A

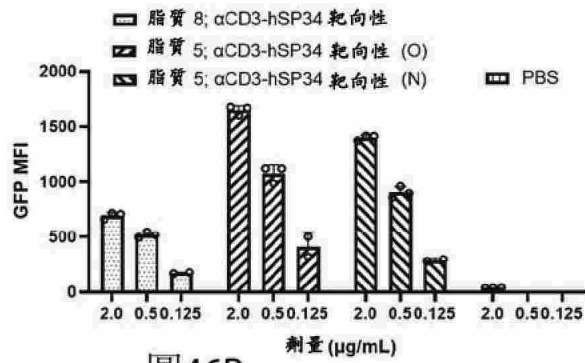


圖46B

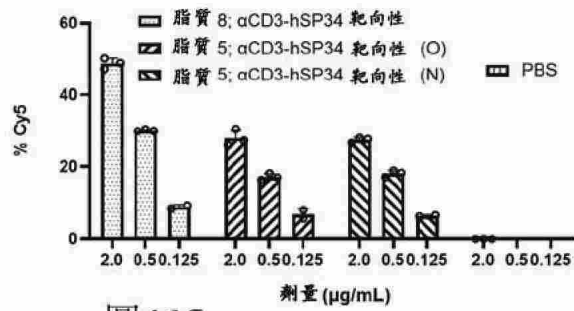


圖46C

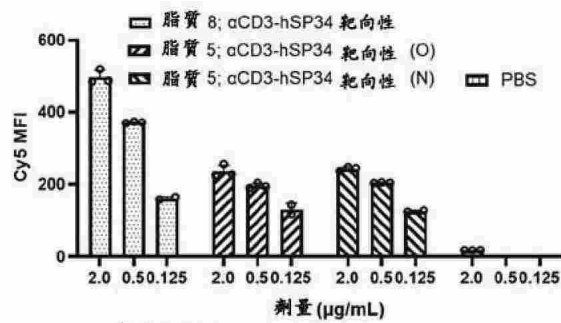


圖46D

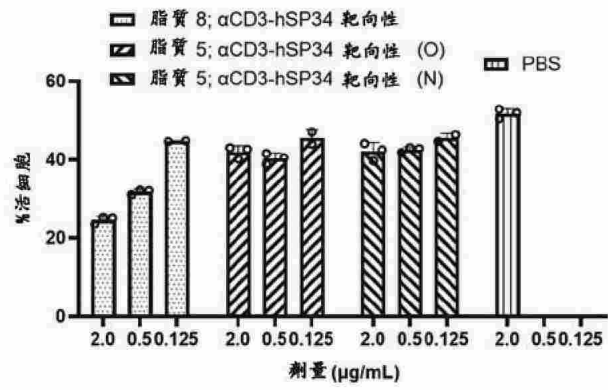


圖46E

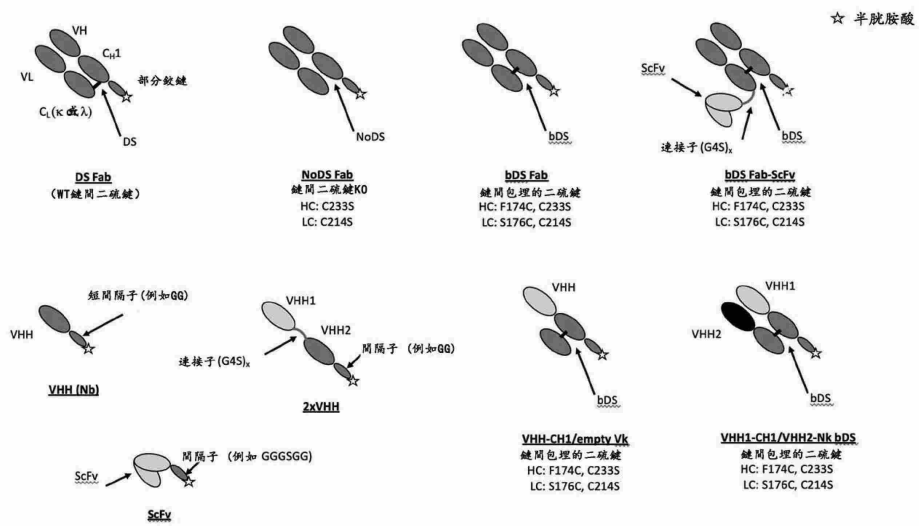


圖47

(60)

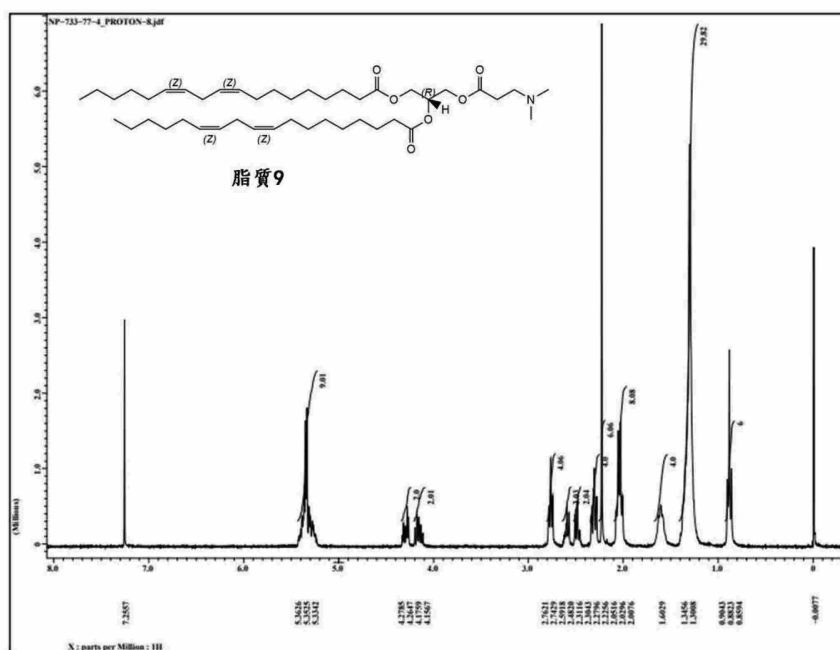
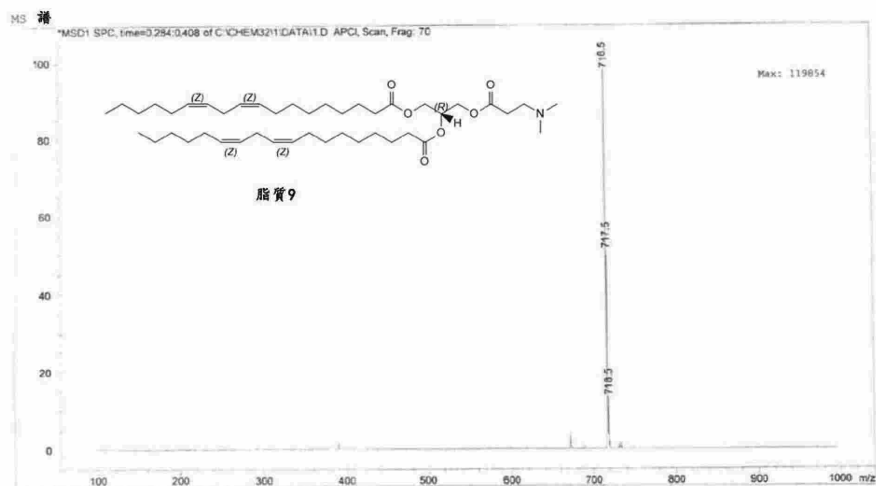


圖48A

圖48B



(61)

圖48C

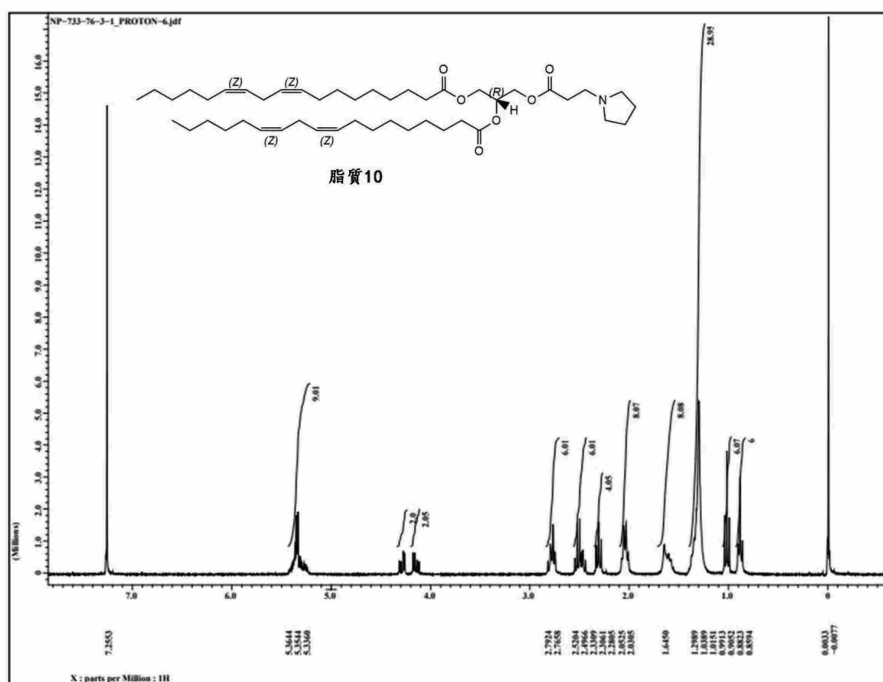
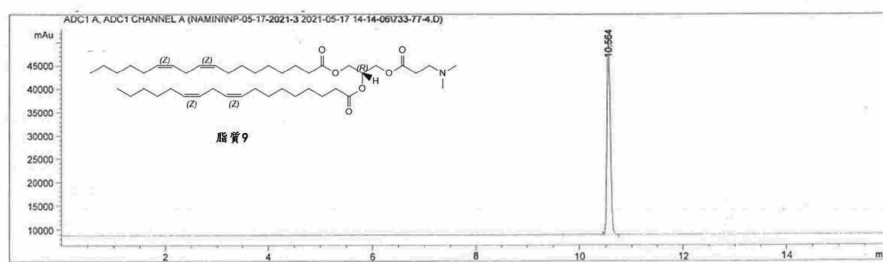


圖49A

圖49B

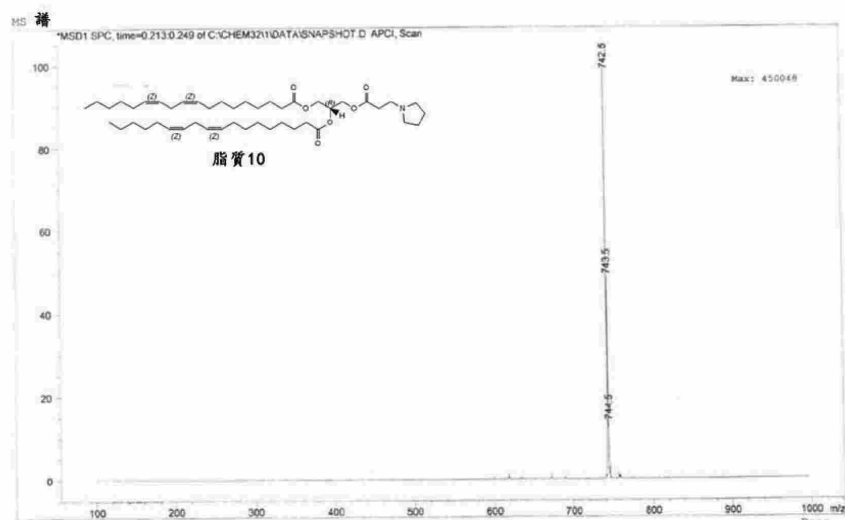
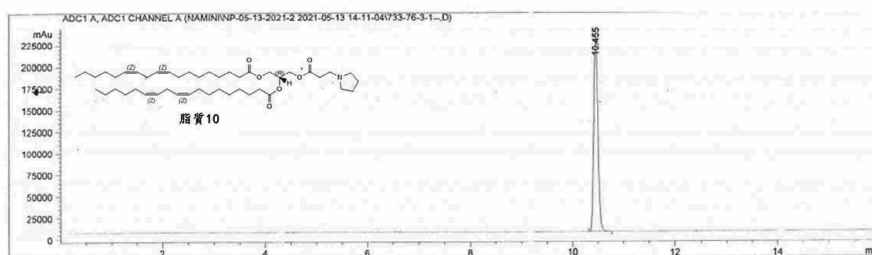


圖49C



(63)

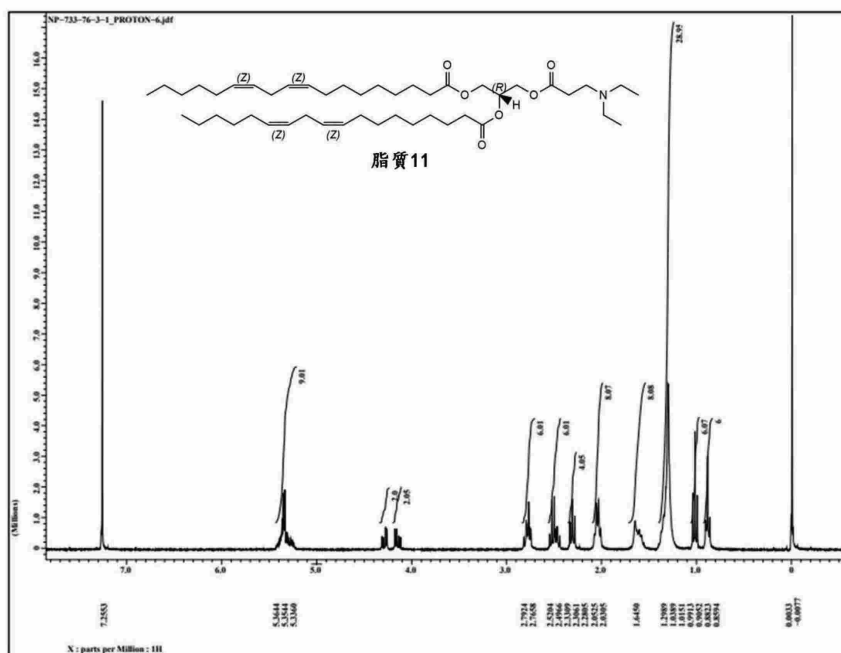


圖50A

圖50B

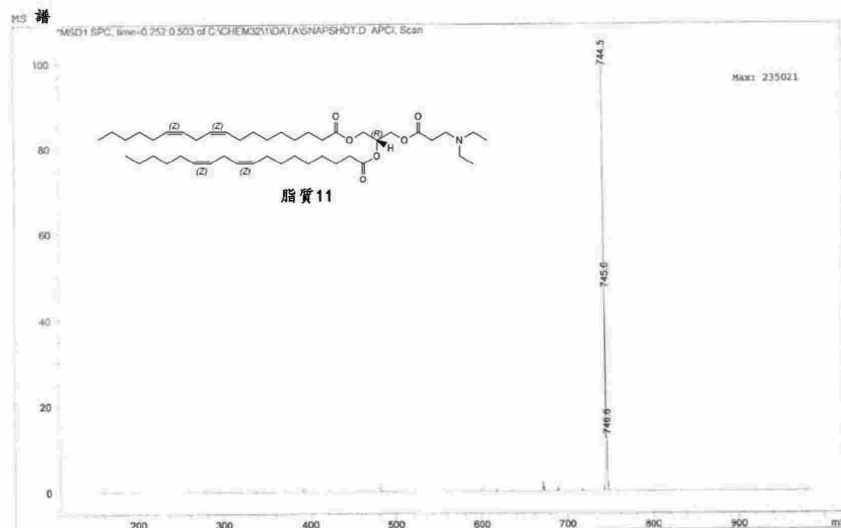


圖50C

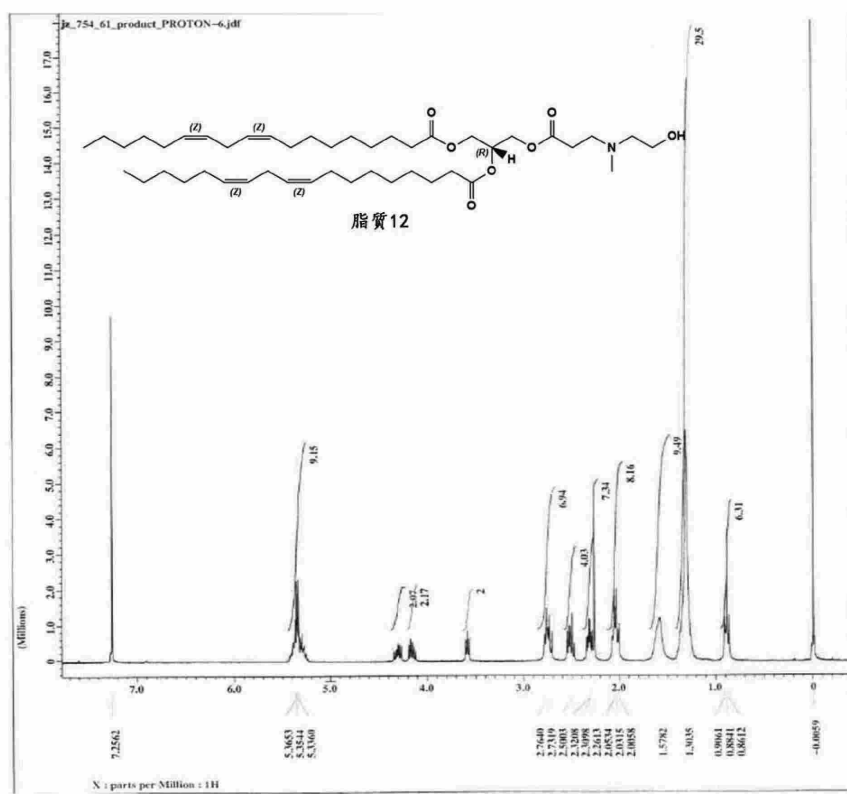
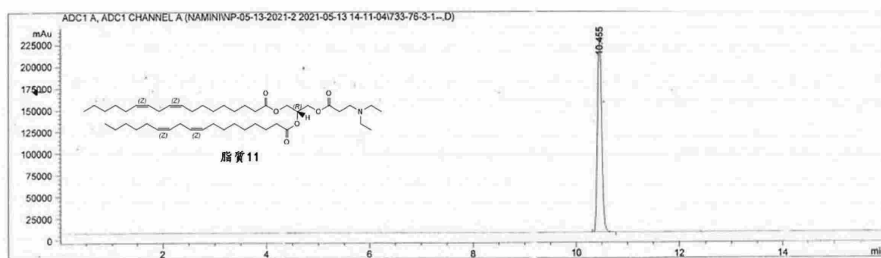


圖51A

圖51B

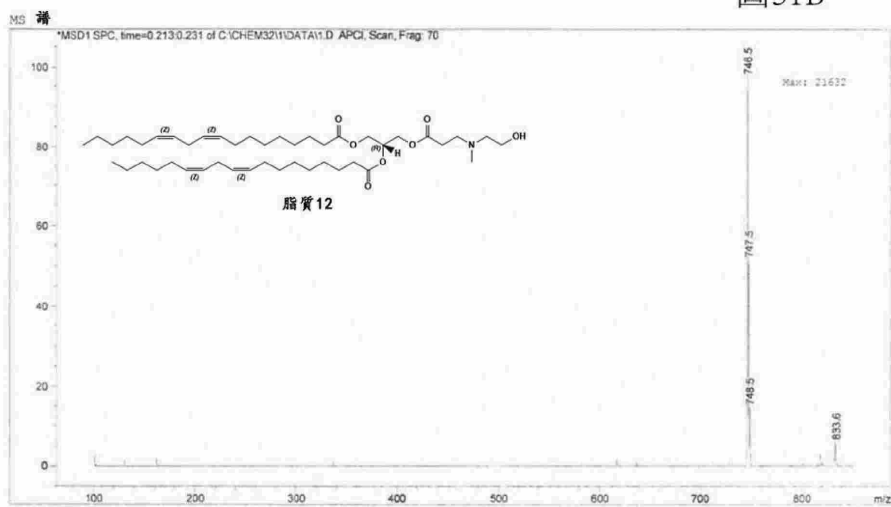
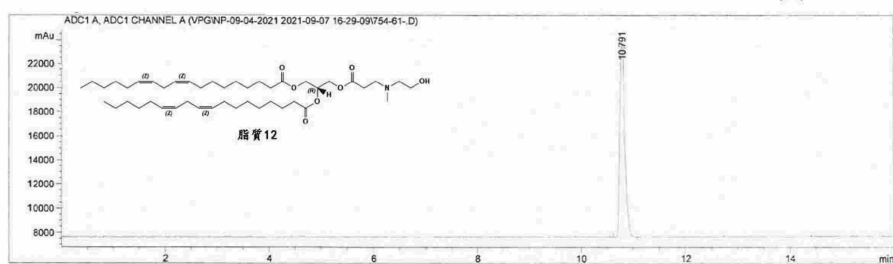


圖51C



(66)

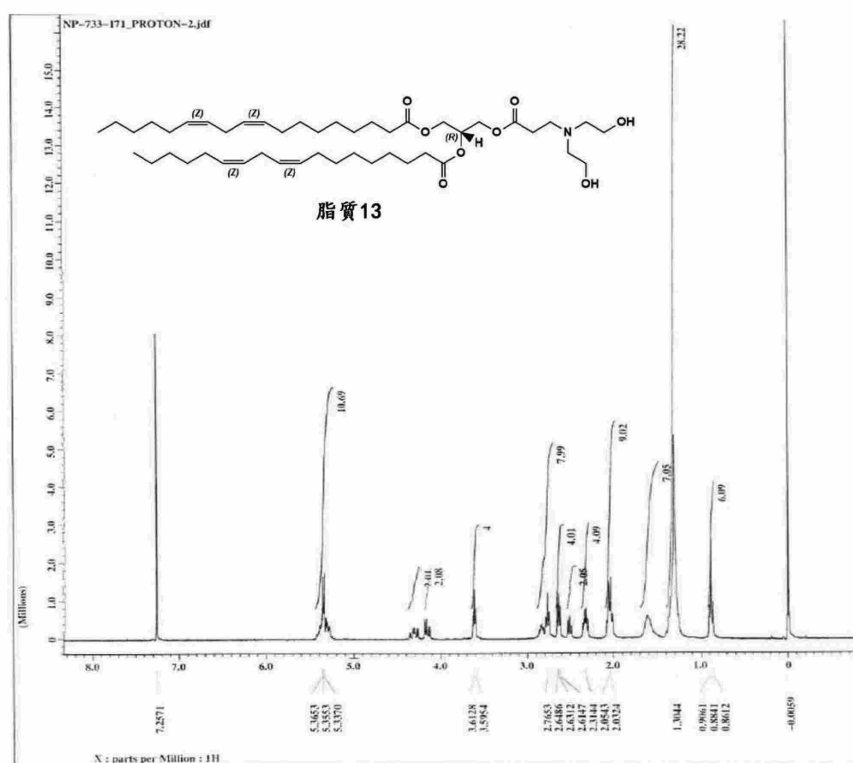


圖52A

圖52B

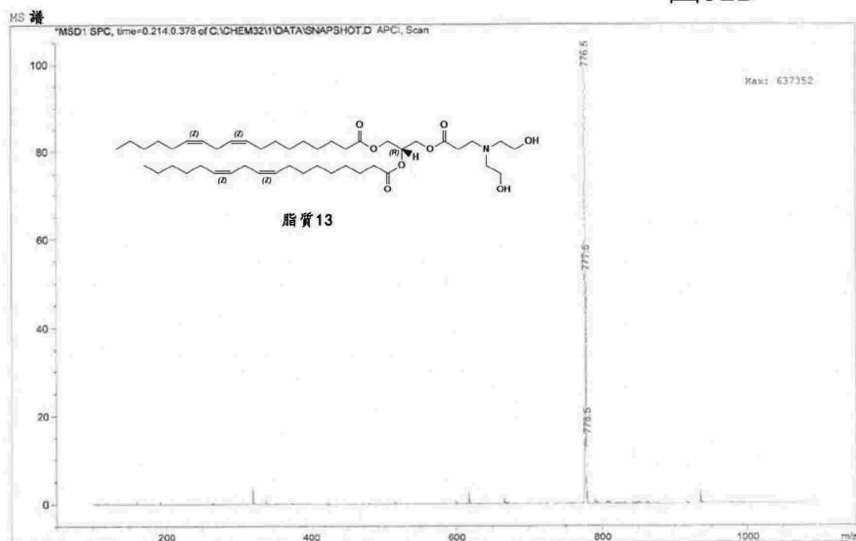


圖52C

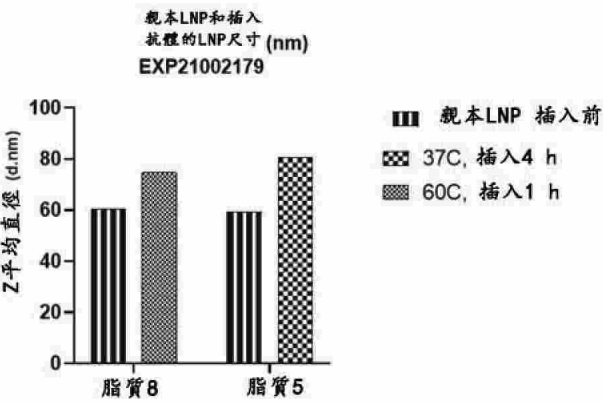
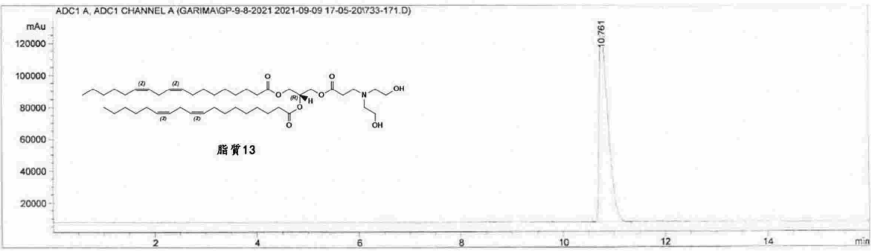


圖53A

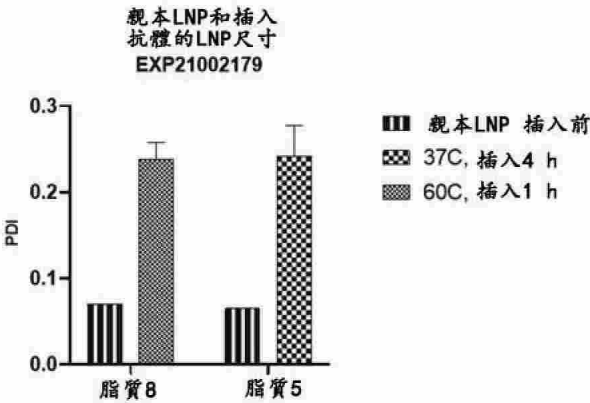


圖53B

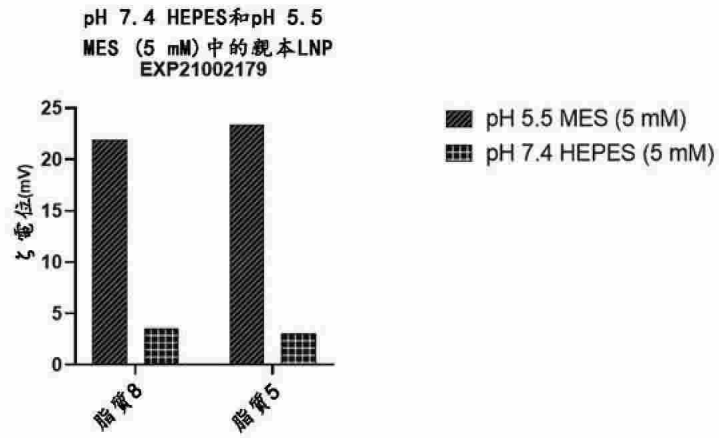


圖53C

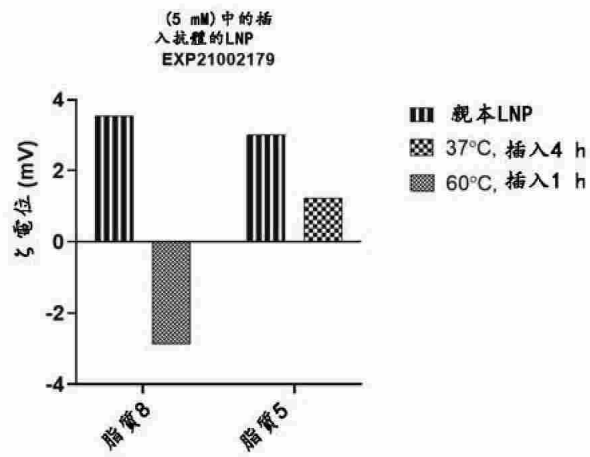


圖53D

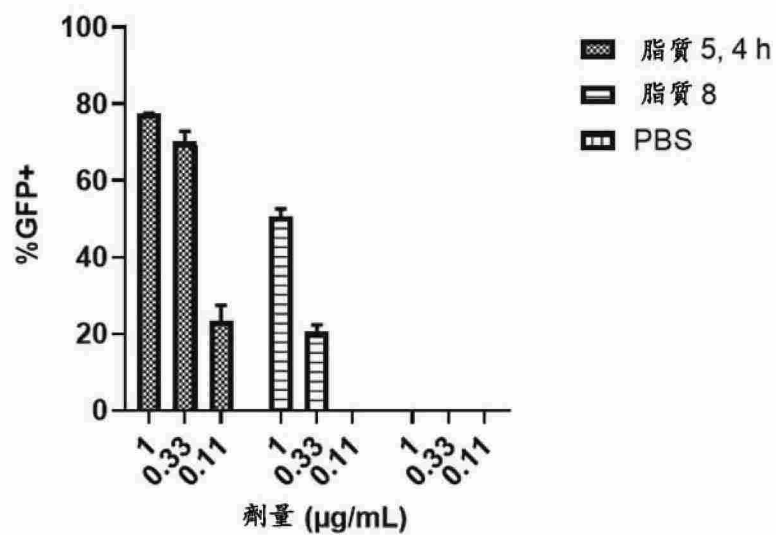
**A. %GFP+ 細胞 EXP21002230**

圖54A

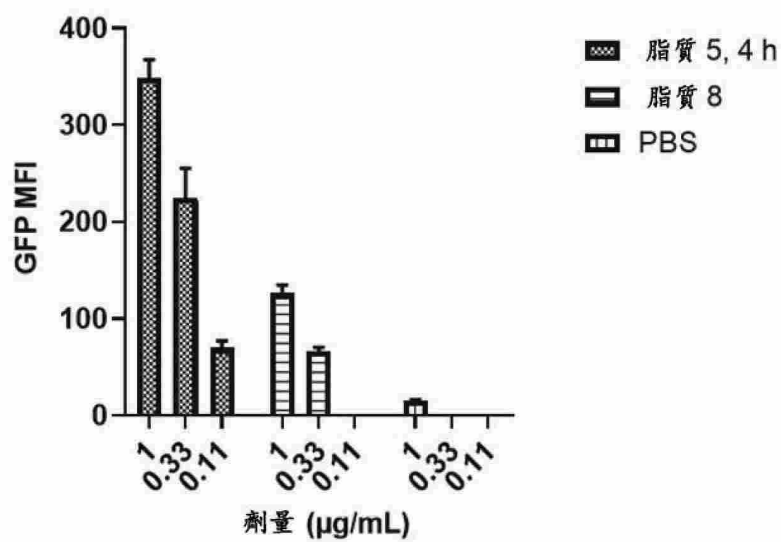
**B. GFP MFI EXP21002230**

圖54B

C. % Dil 細胞 EXP21002230

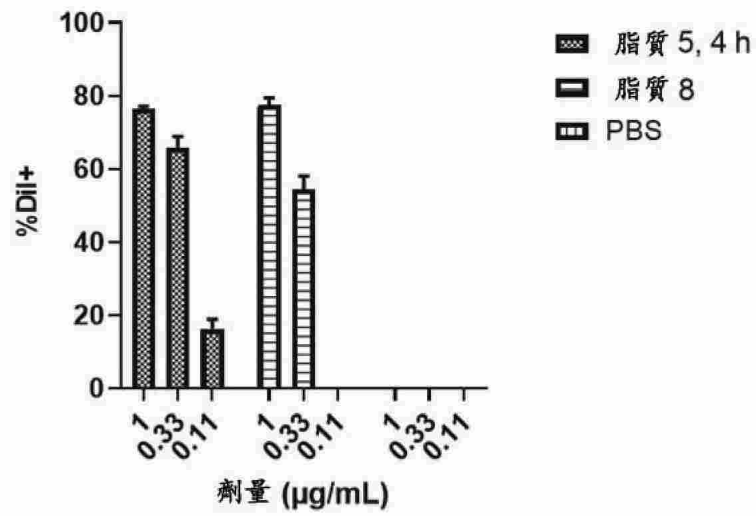


圖54C

D. Dil MFI EXP21002230

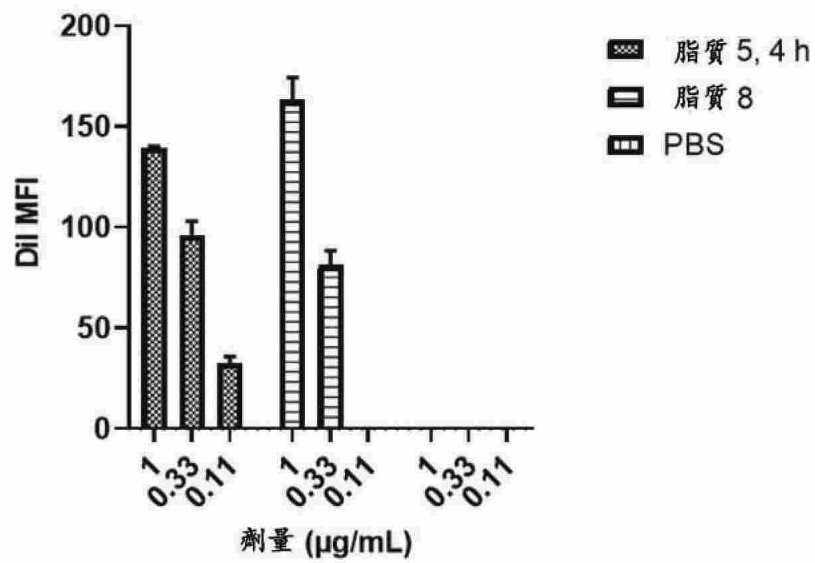


圖54D

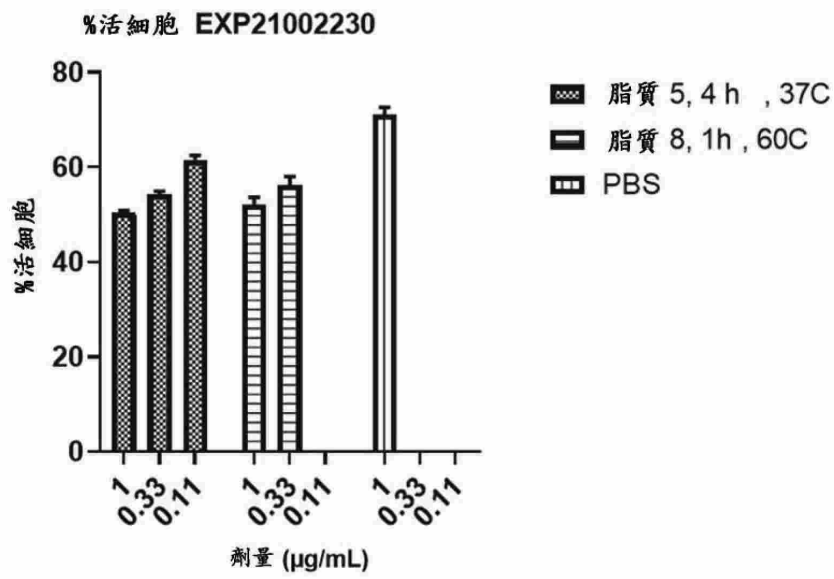


圖54E

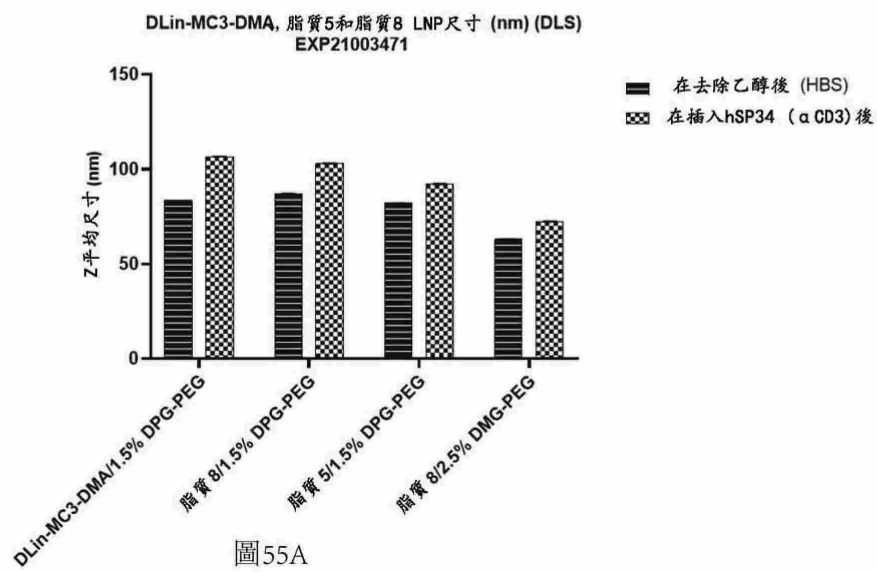


圖55A

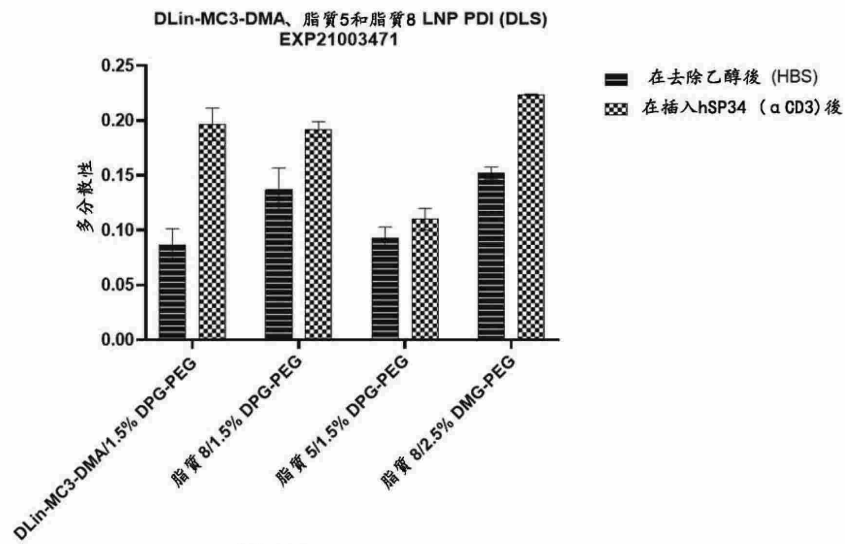


圖55B

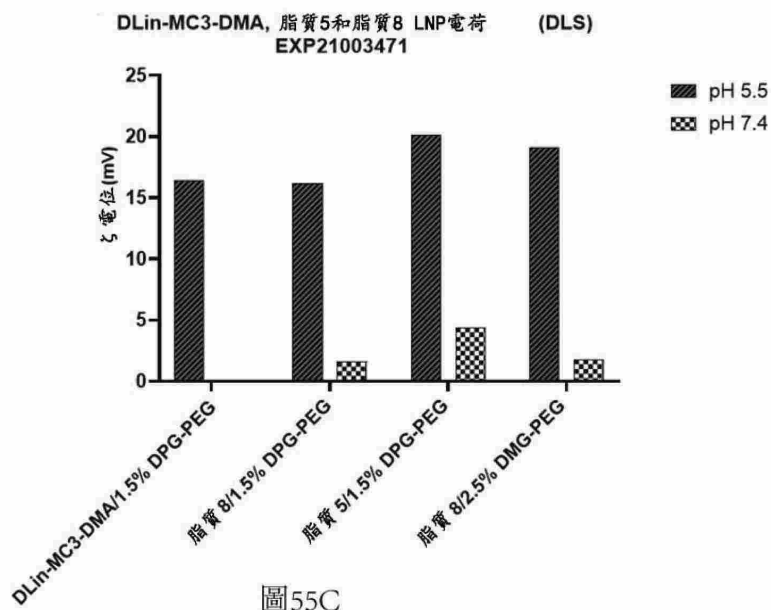


圖55C

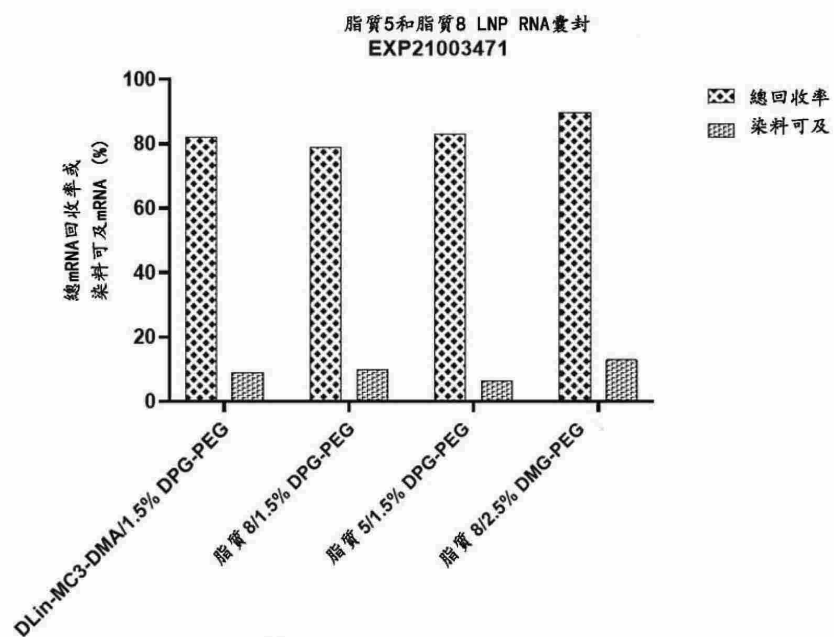


圖55D

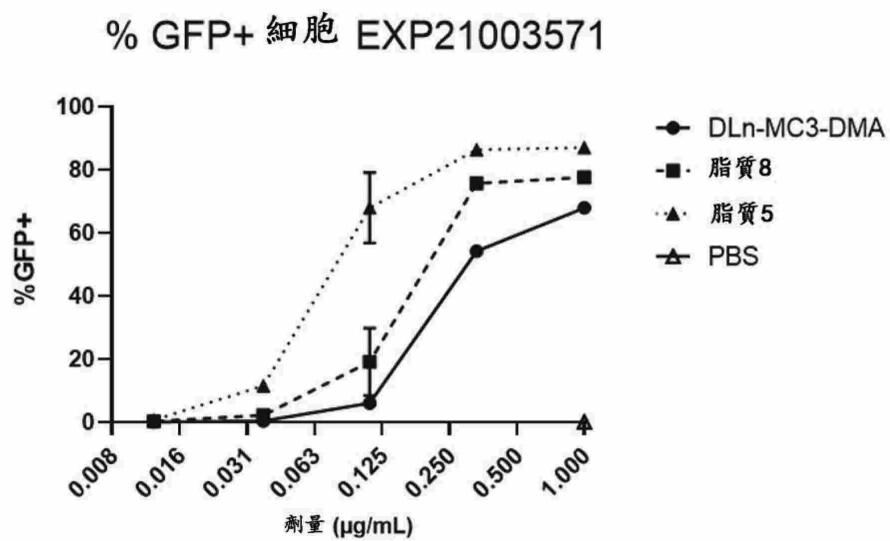


圖56A

## GFP MFI EXP21003571

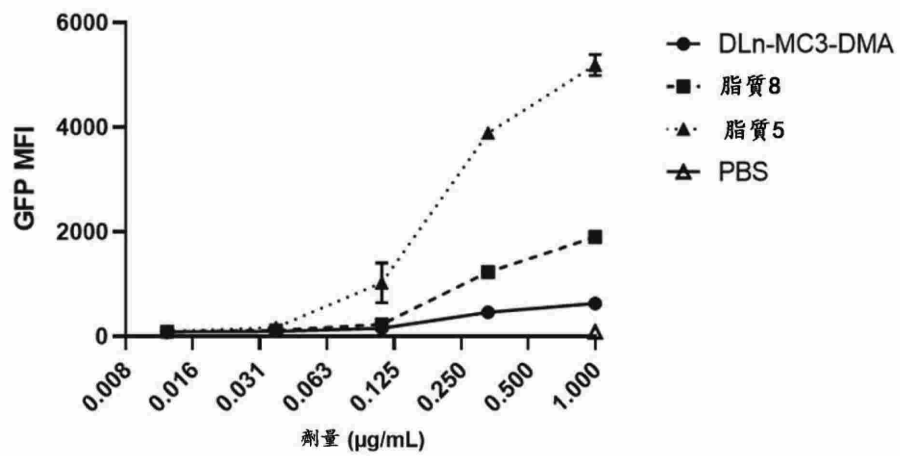


圖56B

## % Dil+ 細胞 EXP21003571

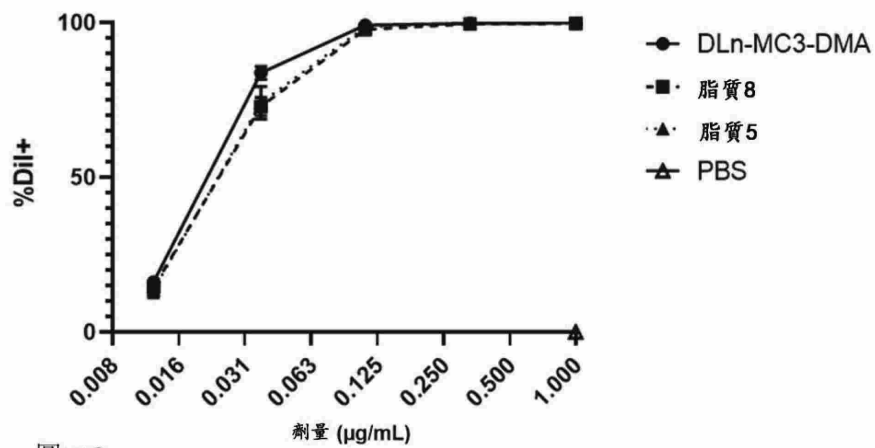


圖56C

## Dil MFI EXP21003571

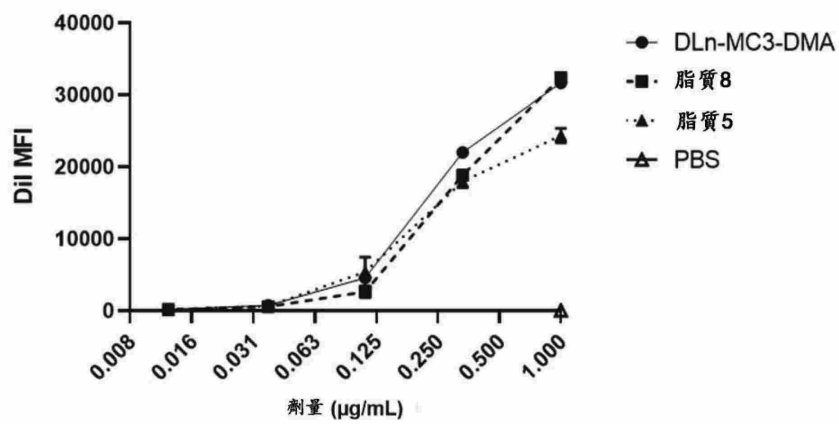


圖56D

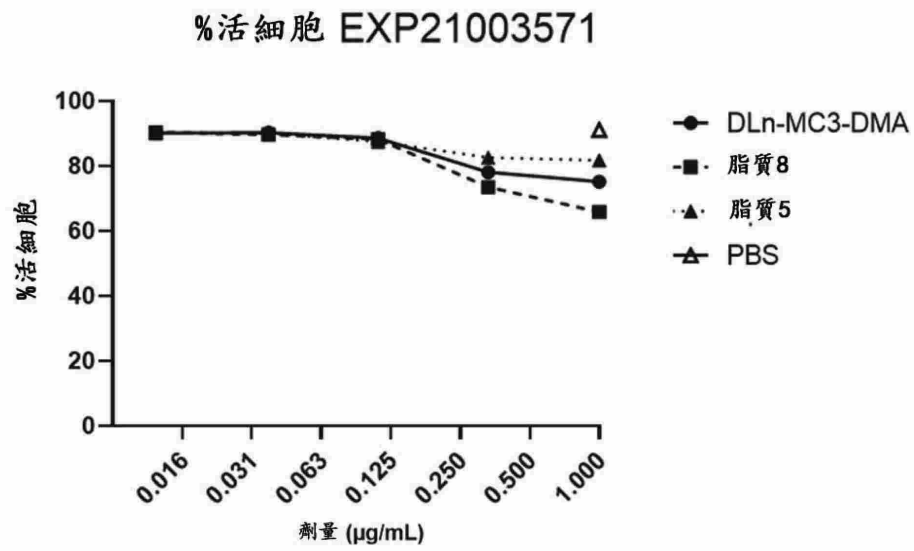


圖56E

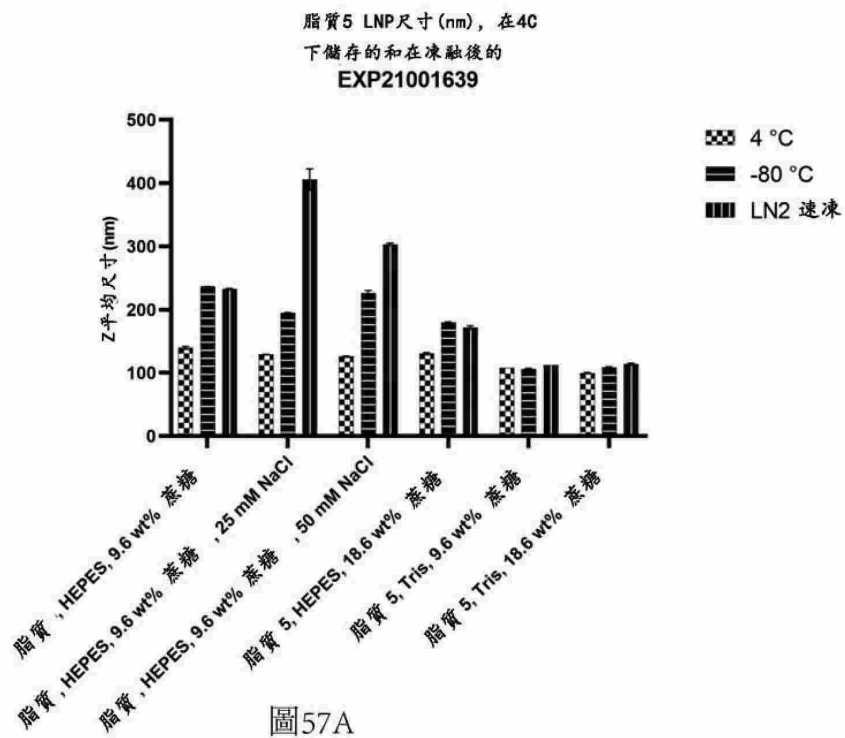


圖57A

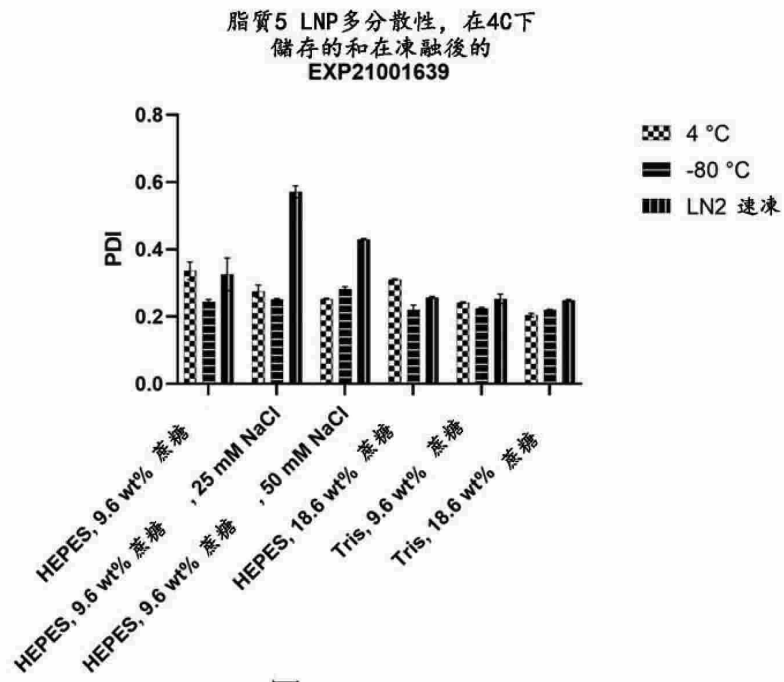


圖57B

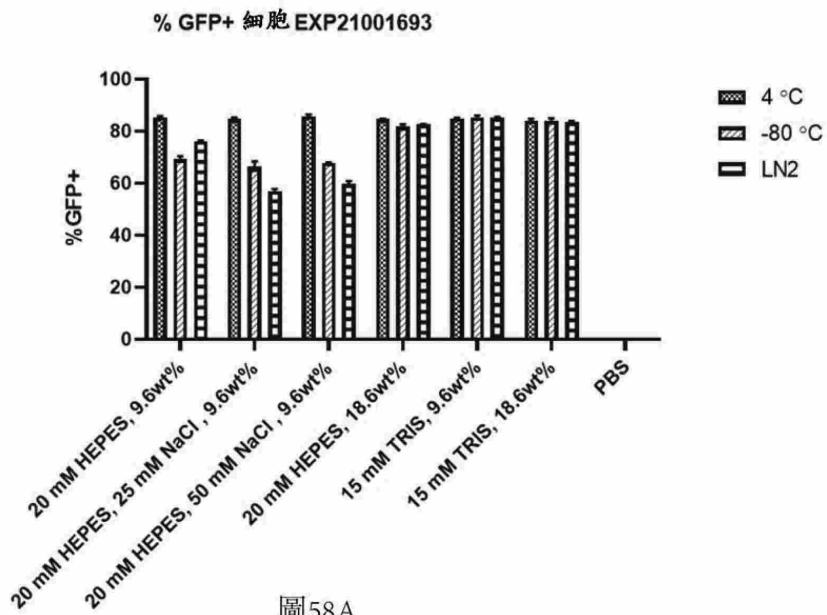


圖58A

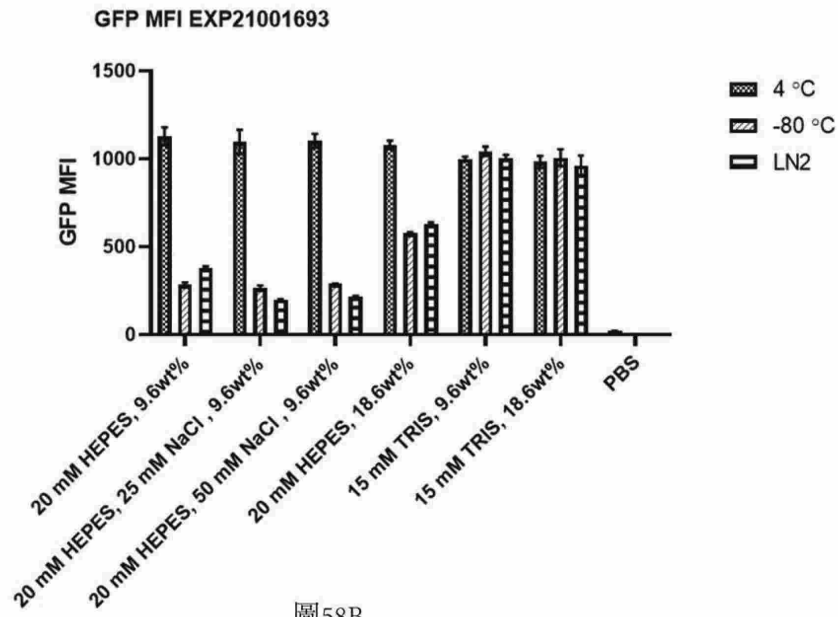


圖58B

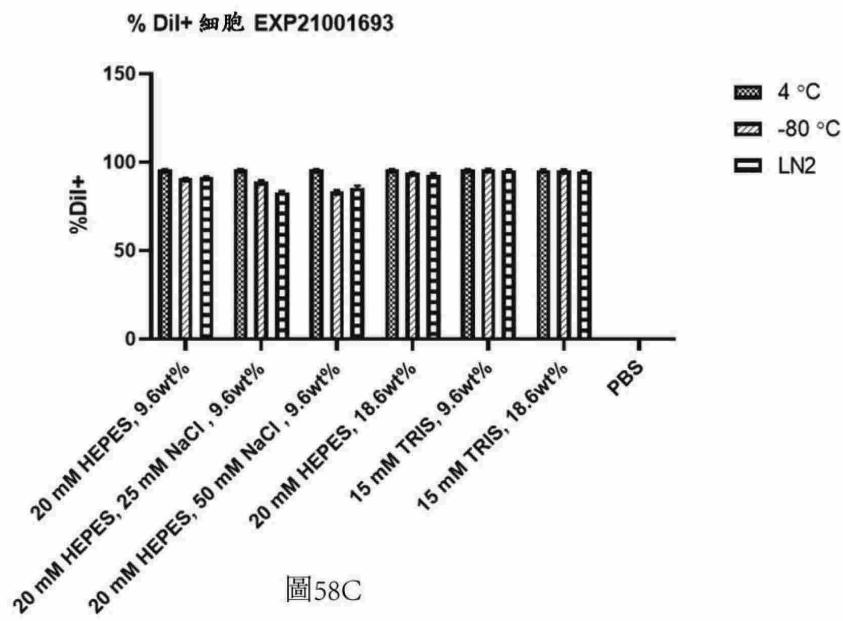


圖58C

(78)

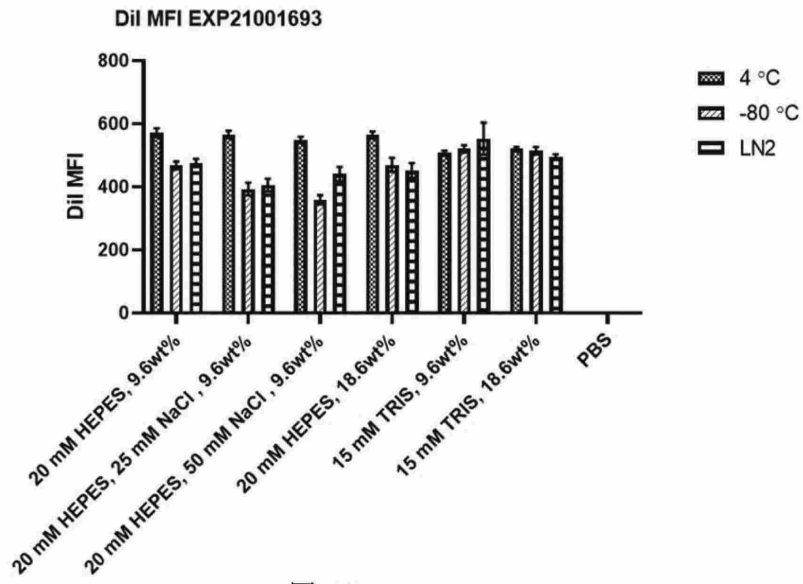


圖58D

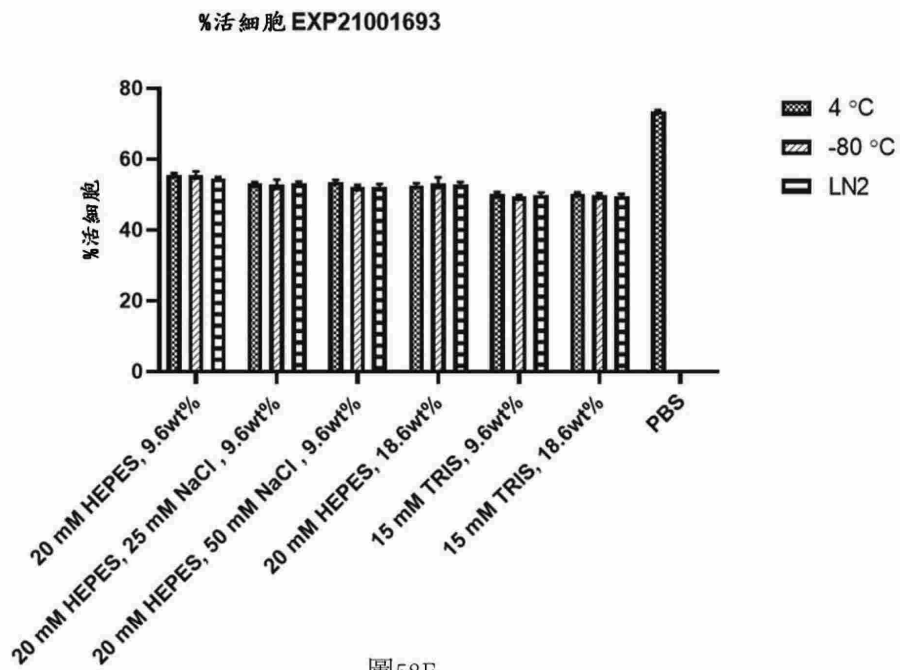


圖58E

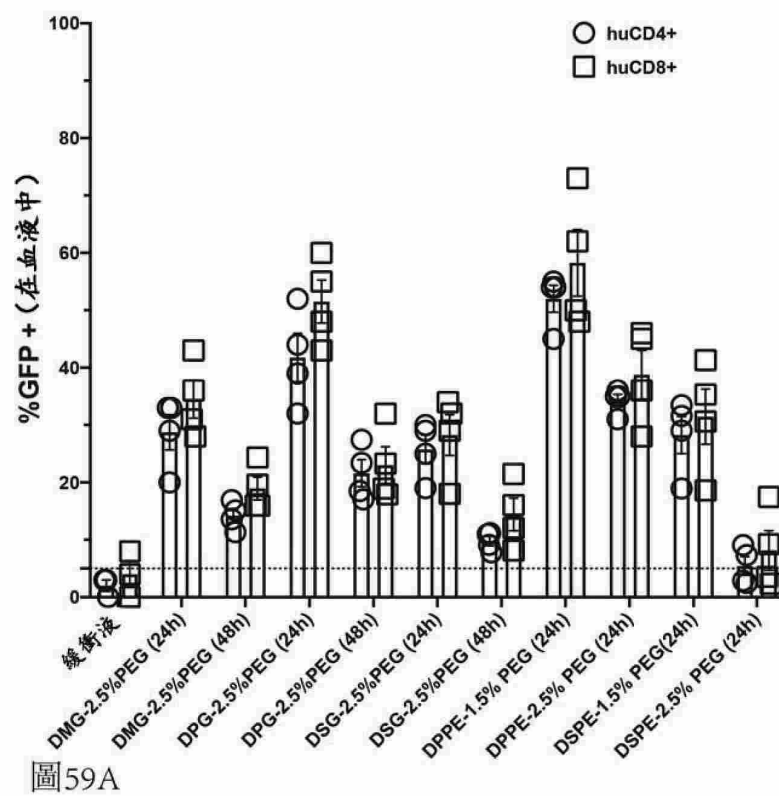


圖59A

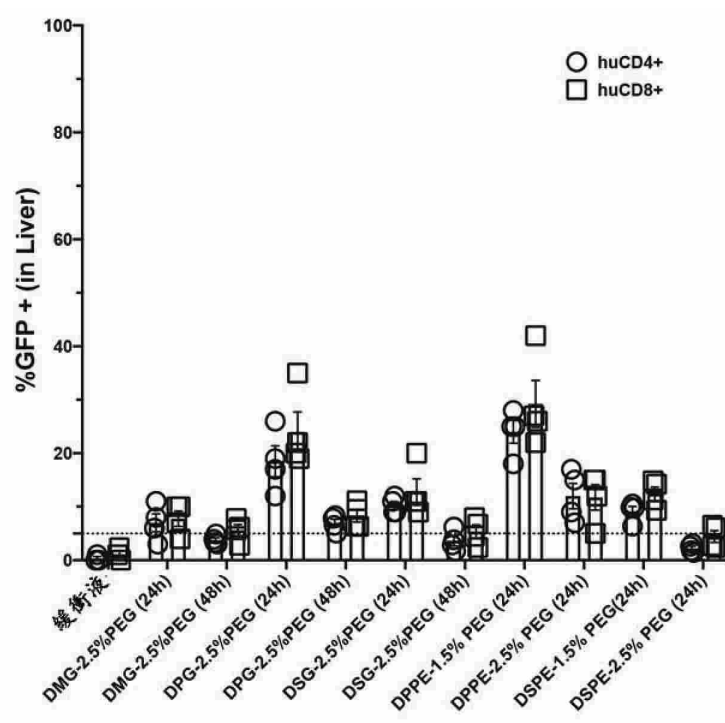


圖59B

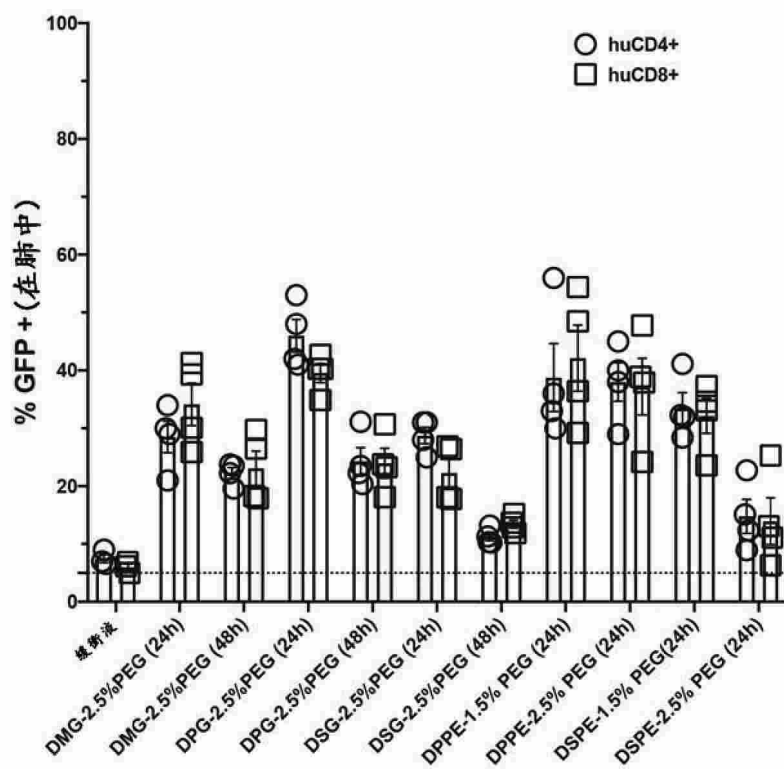


圖59C

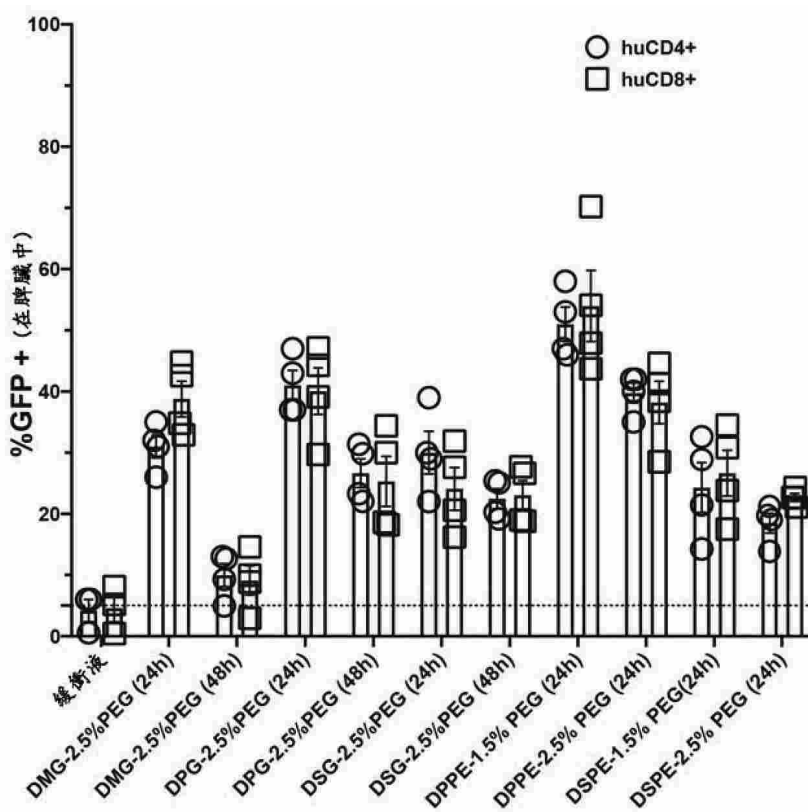


圖59D

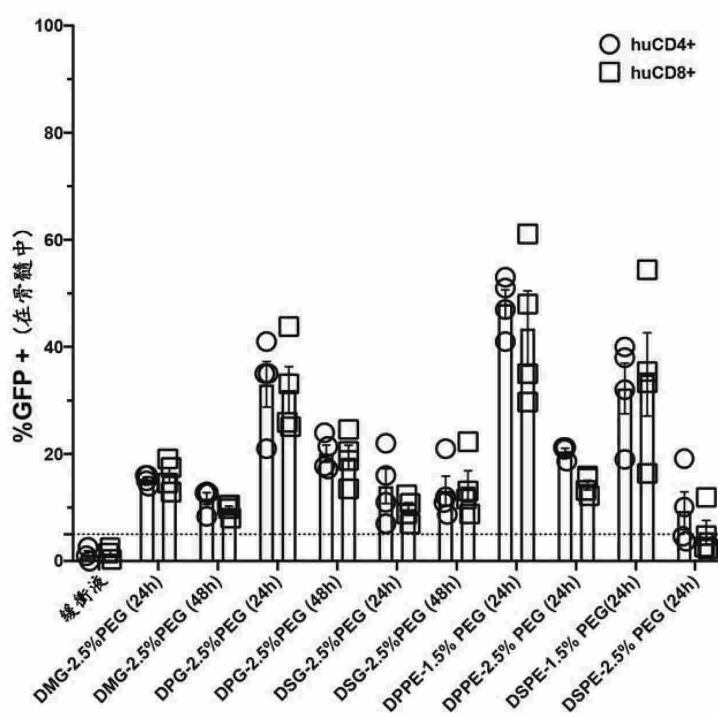


圖59E

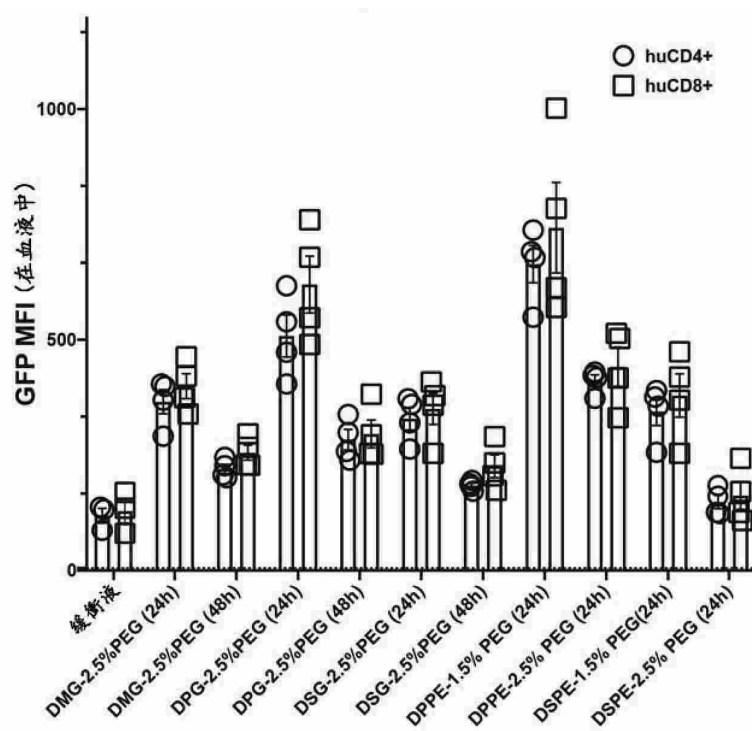


圖59F

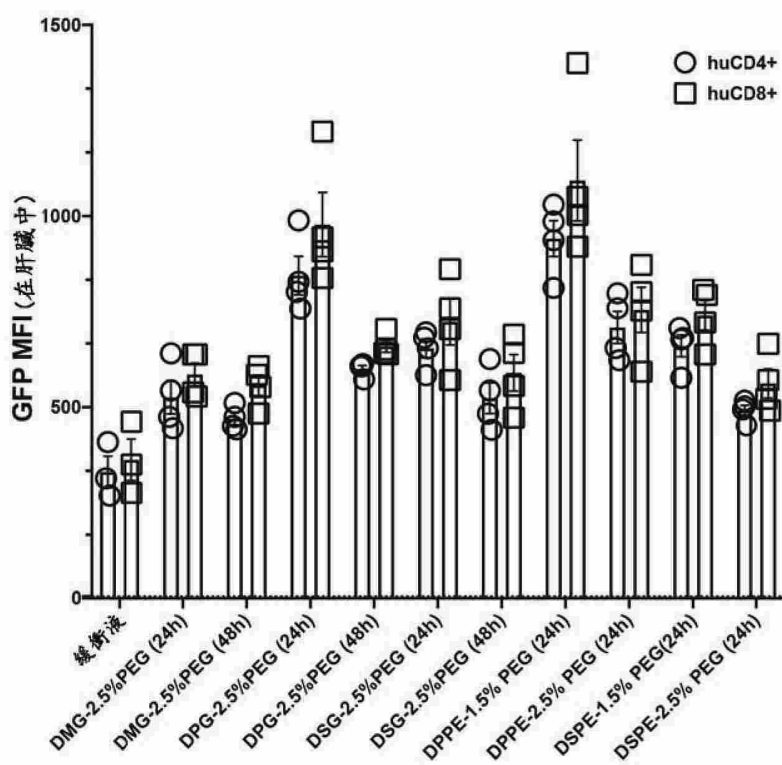


圖59G

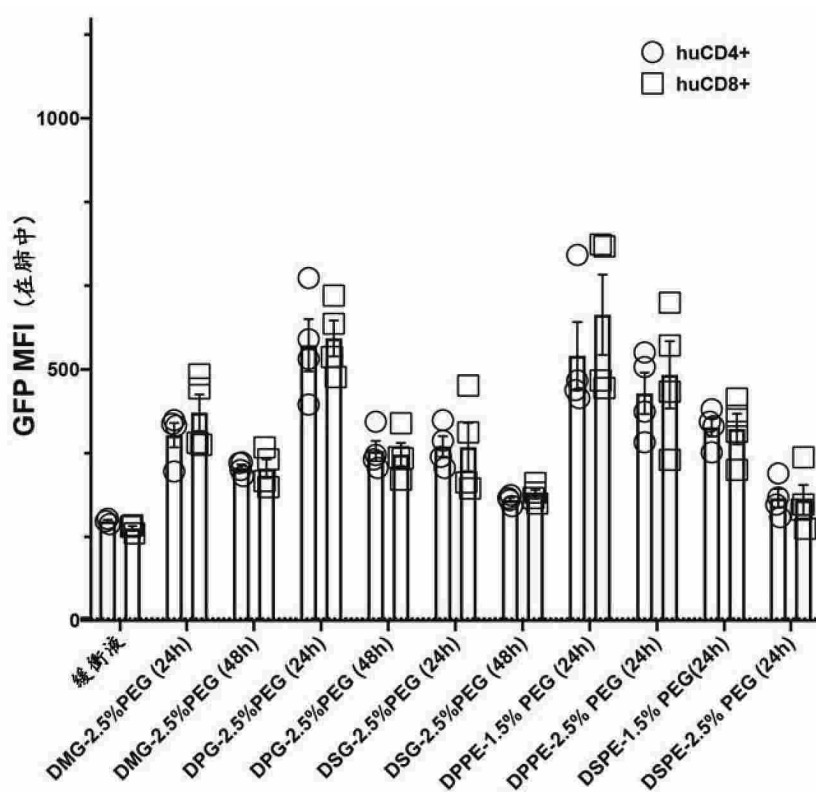


圖59H

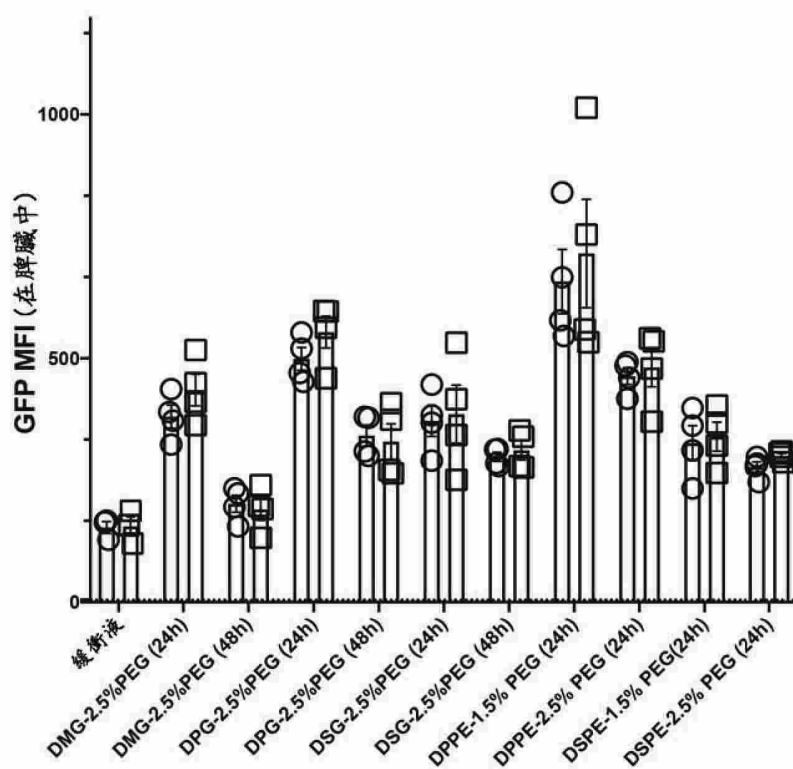


圖59I

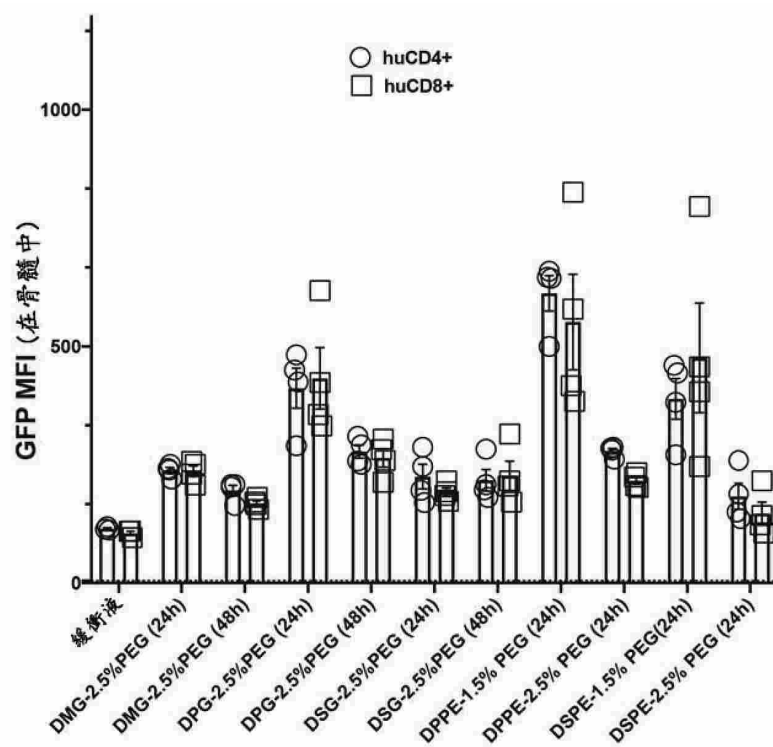


圖59J

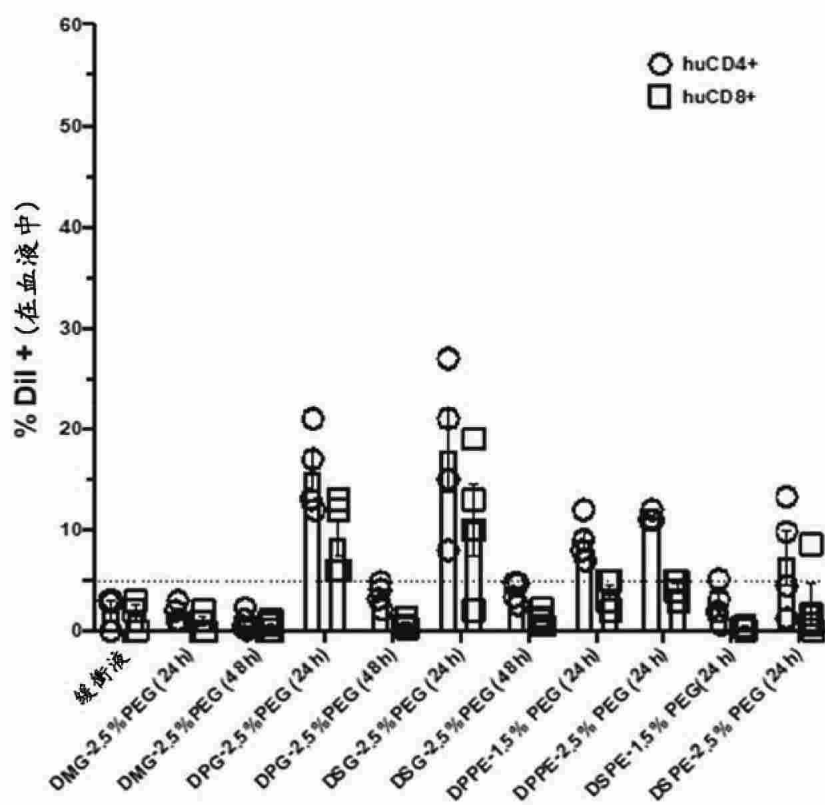


圖 59K

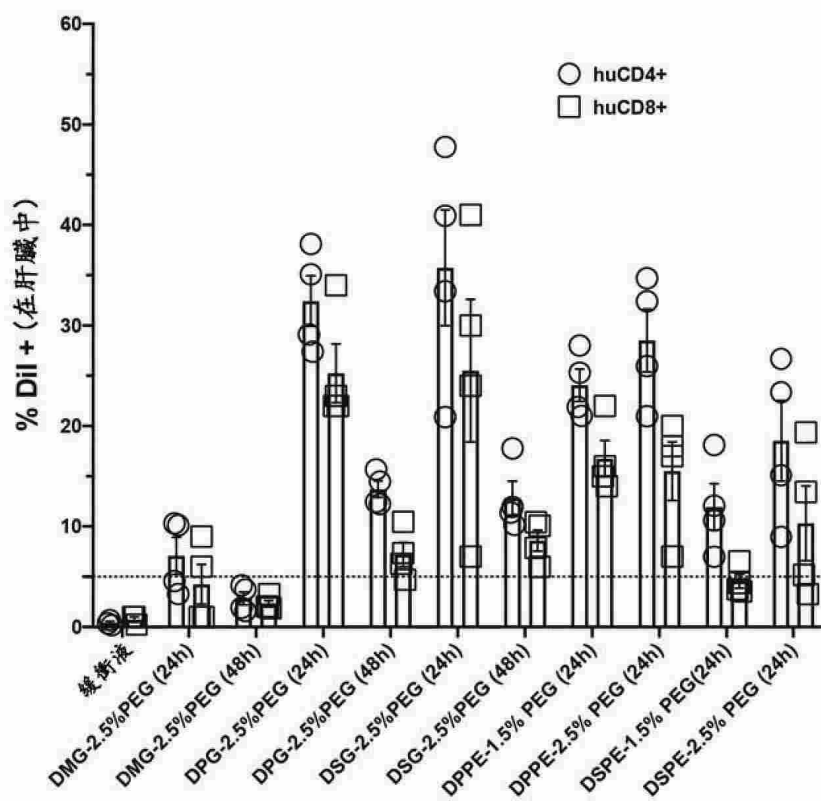


圖 59L

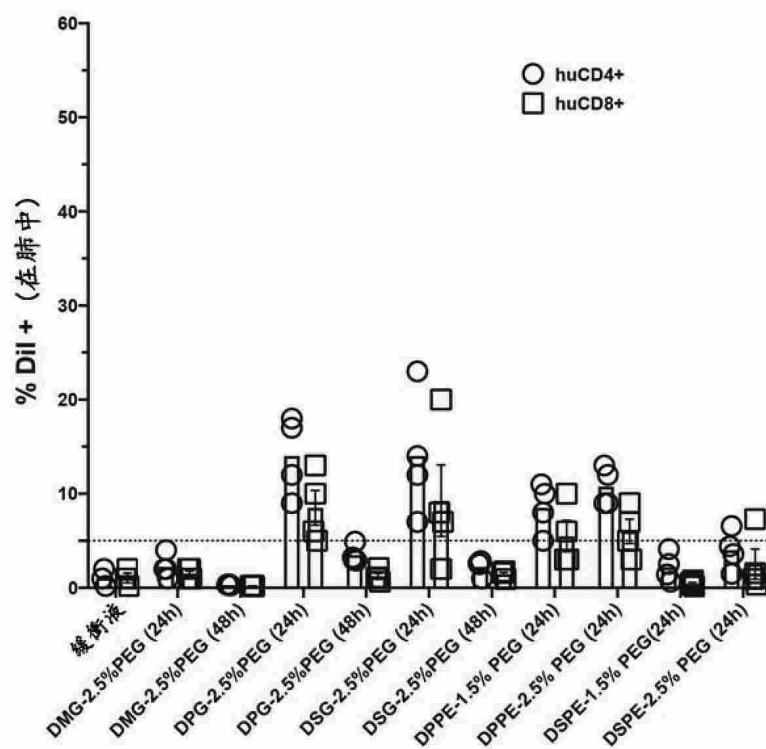


圖59M

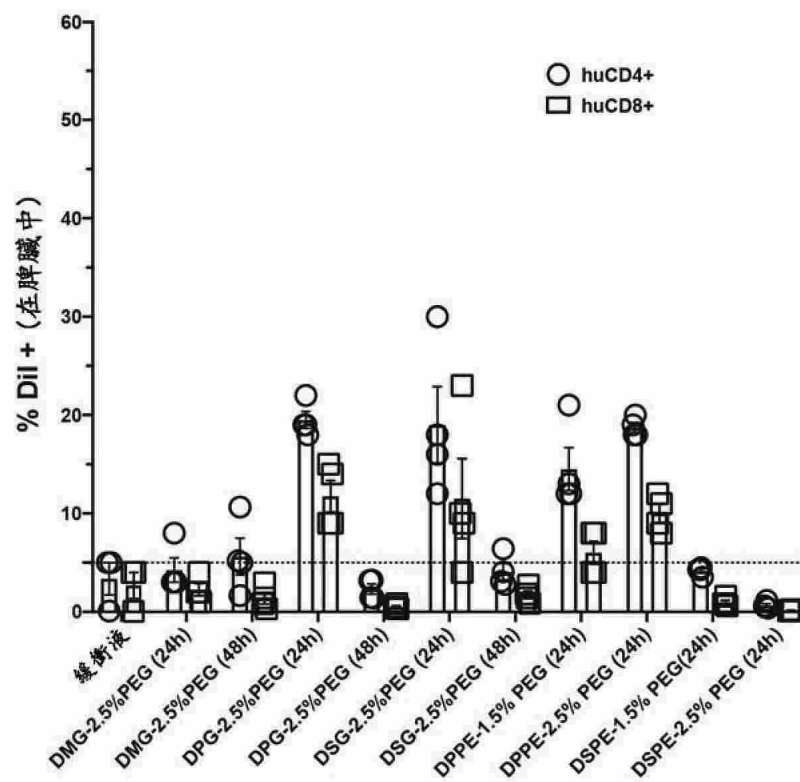


圖59N

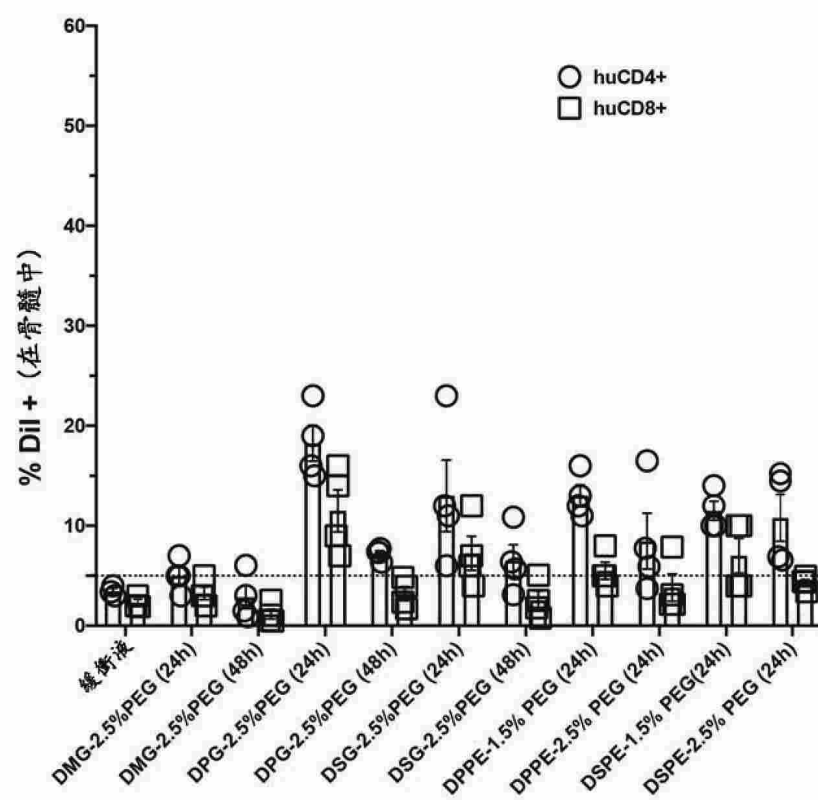


圖590

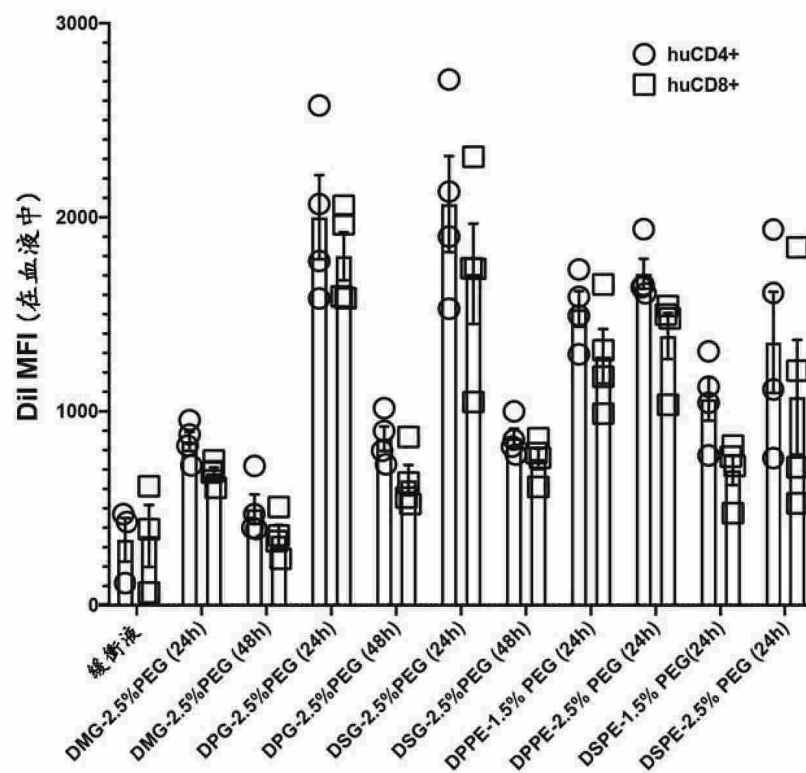


圖59P

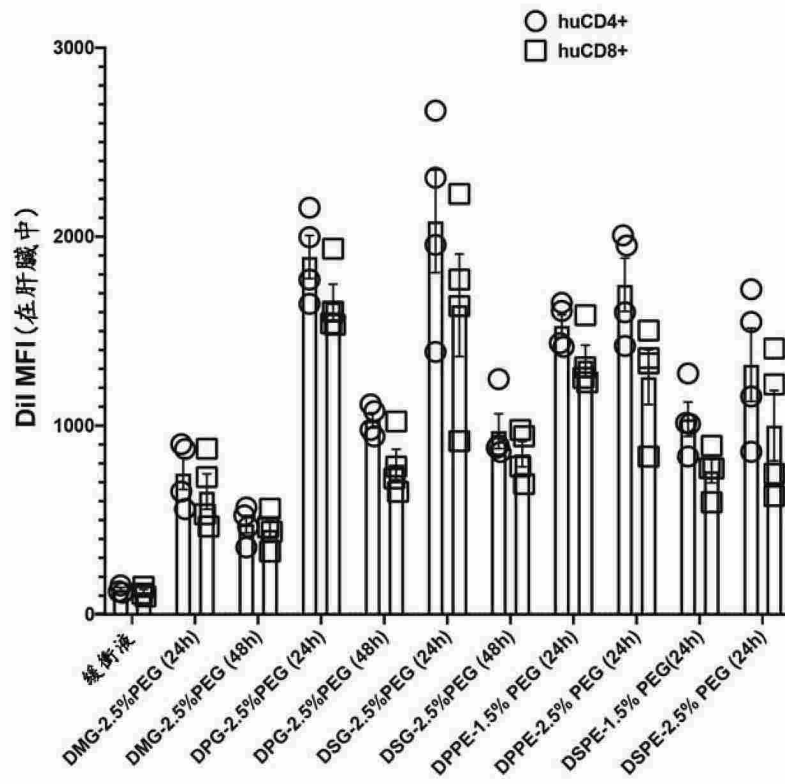


圖59Q

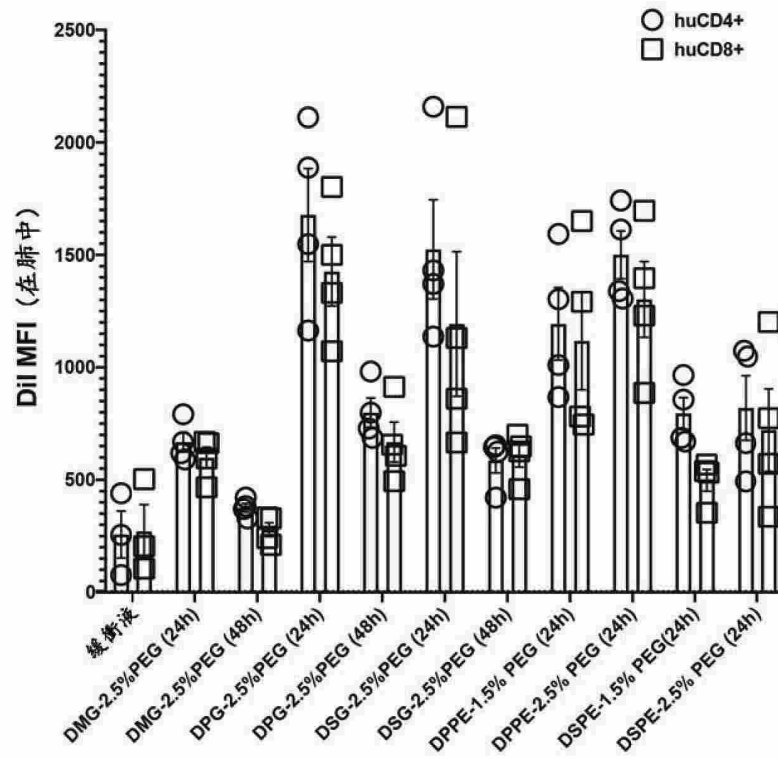


圖59R

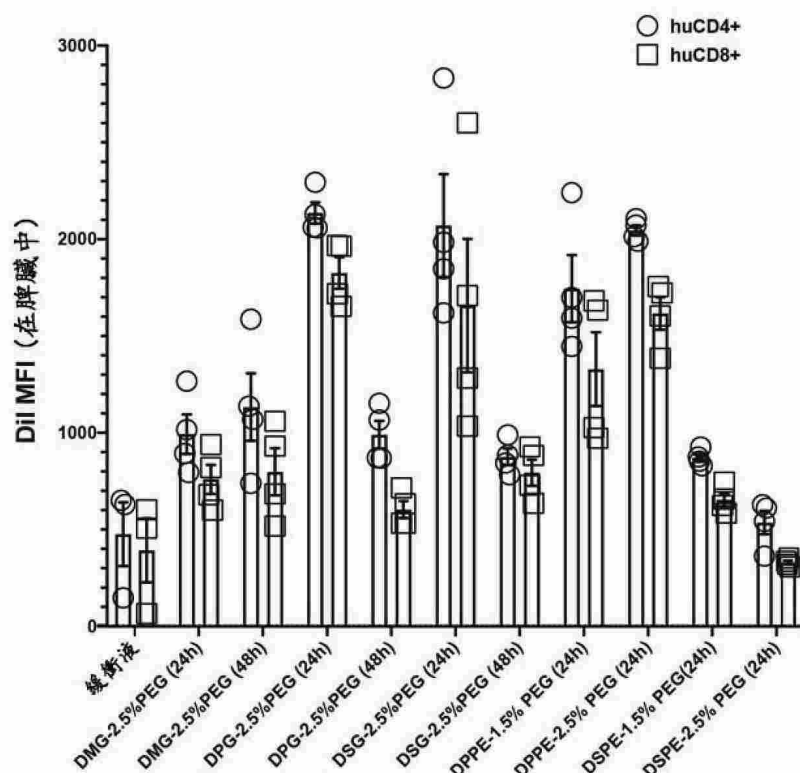


圖59S

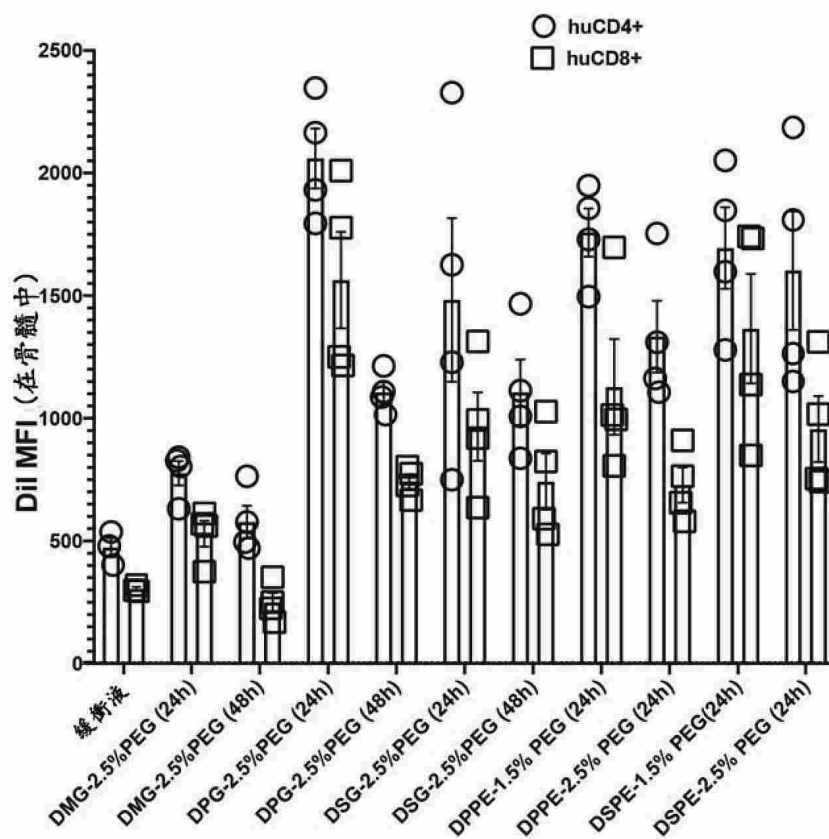


圖59T

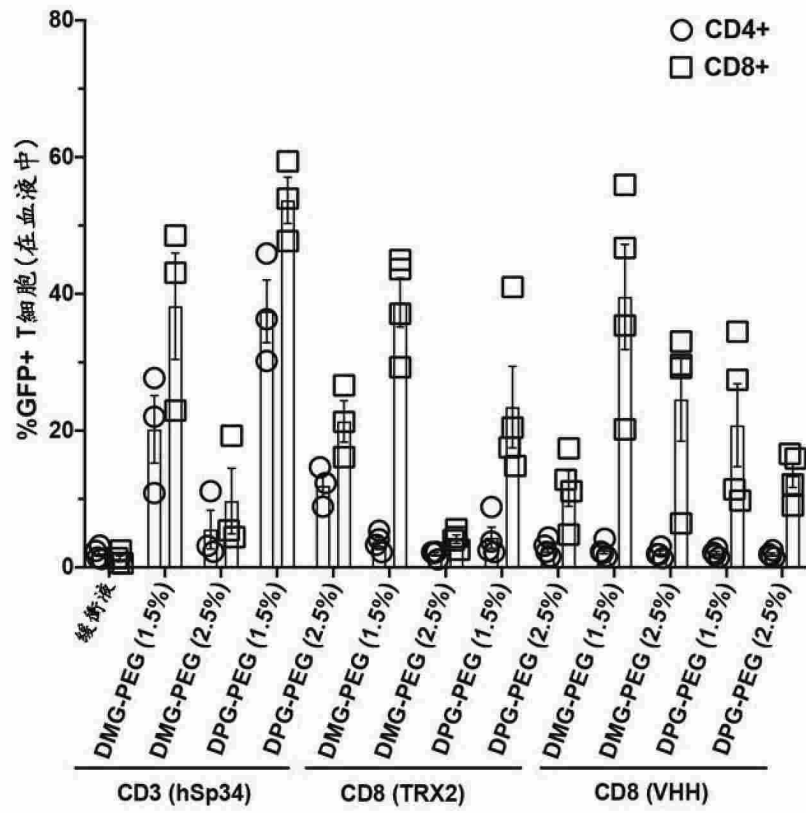


圖 60A

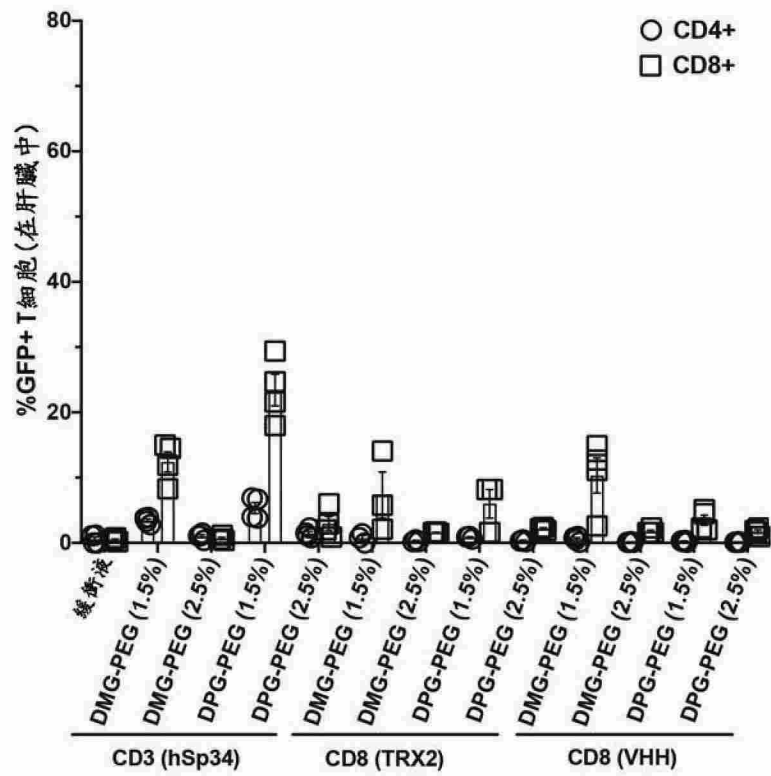


圖 60B

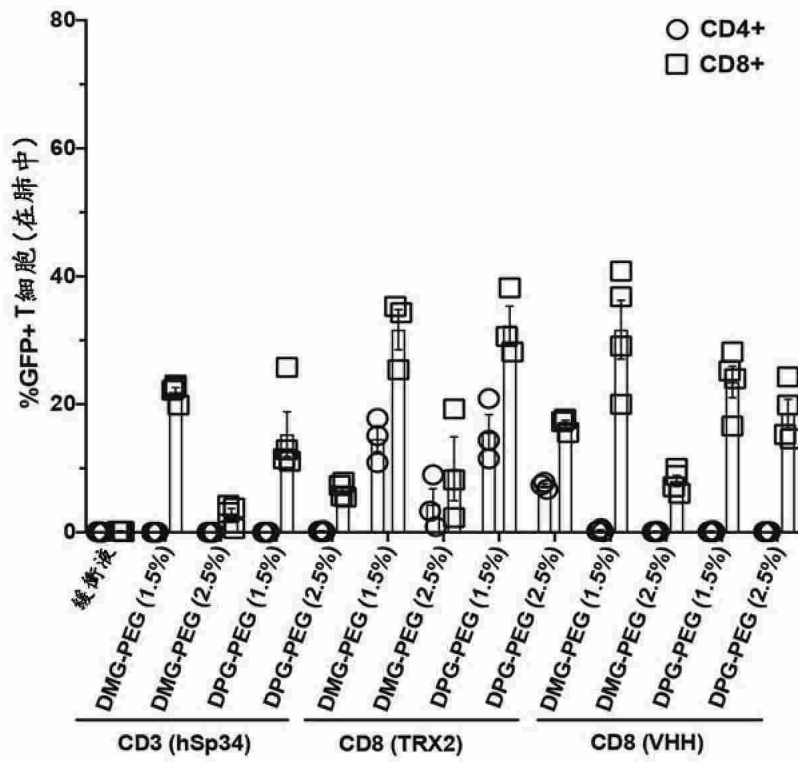


圖 60C

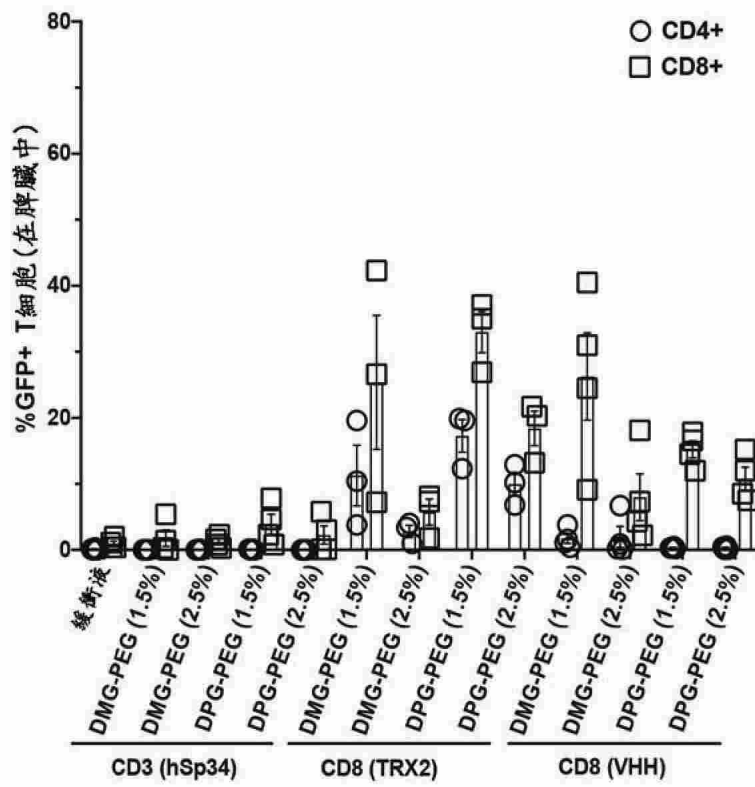


圖 60D

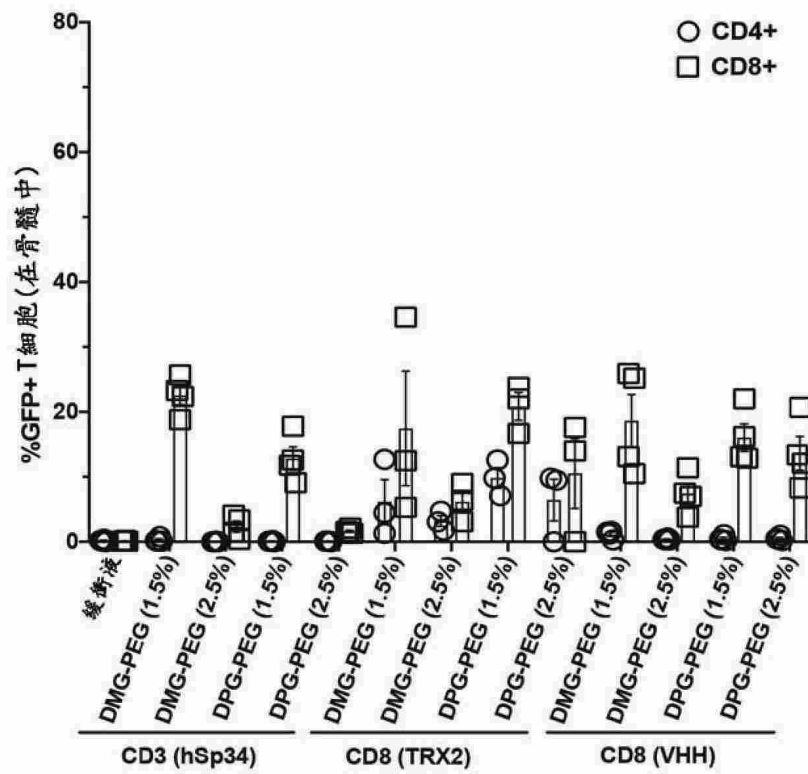


圖 60E

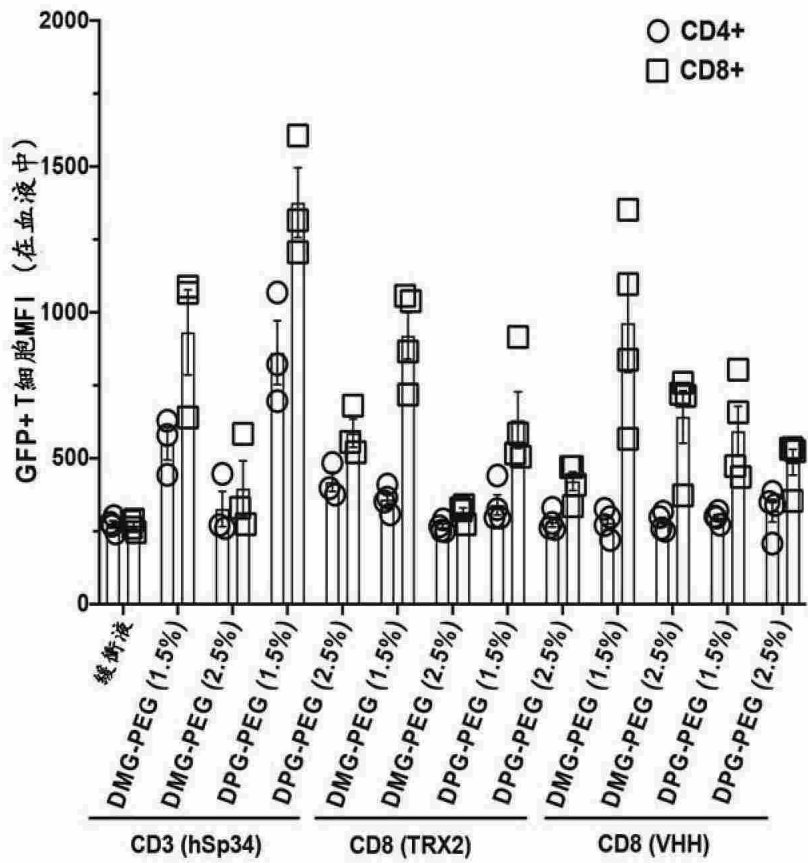


圖 60F

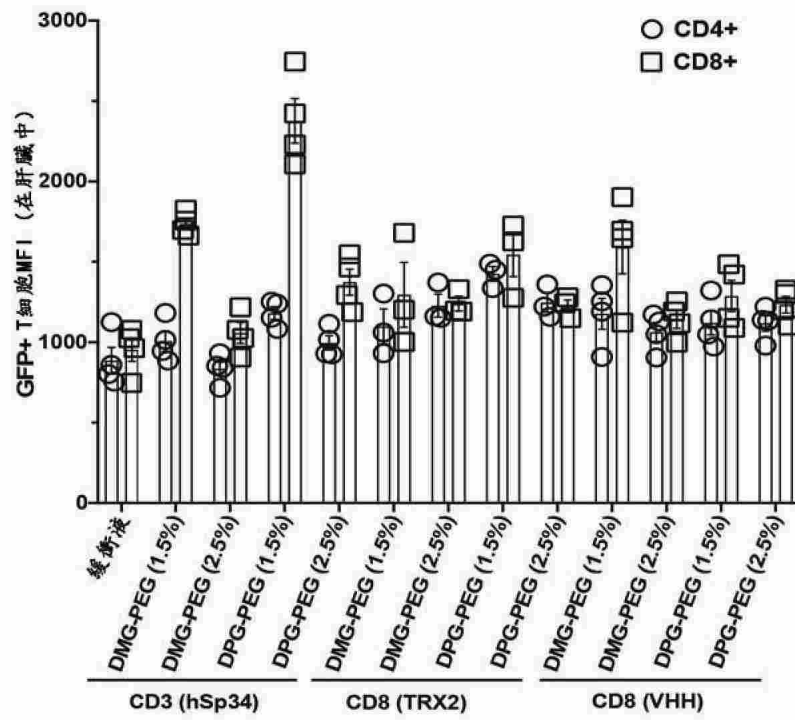


圖 60G

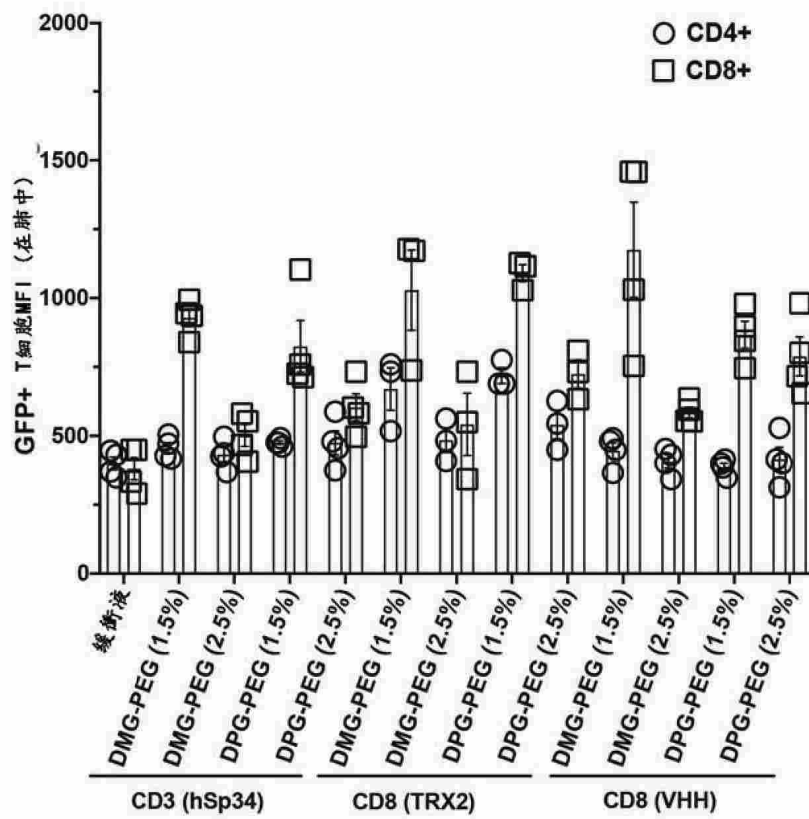


圖 60H

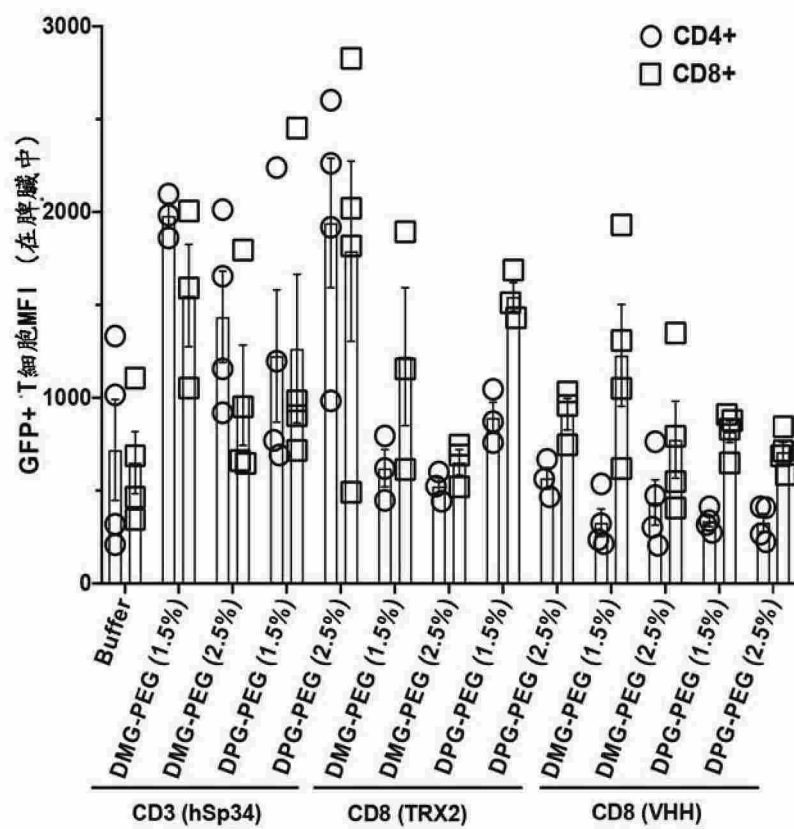


圖 601

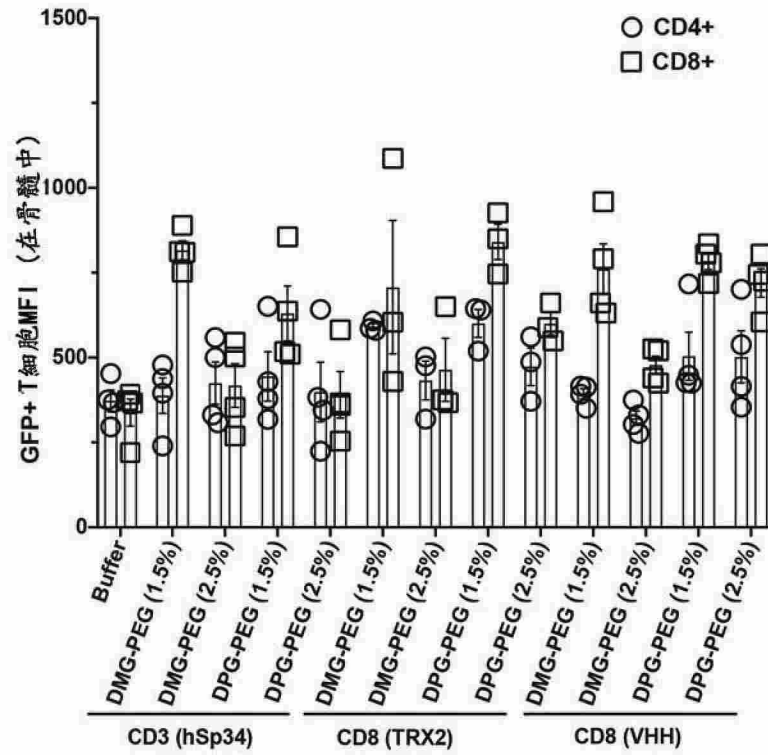


圖 60J

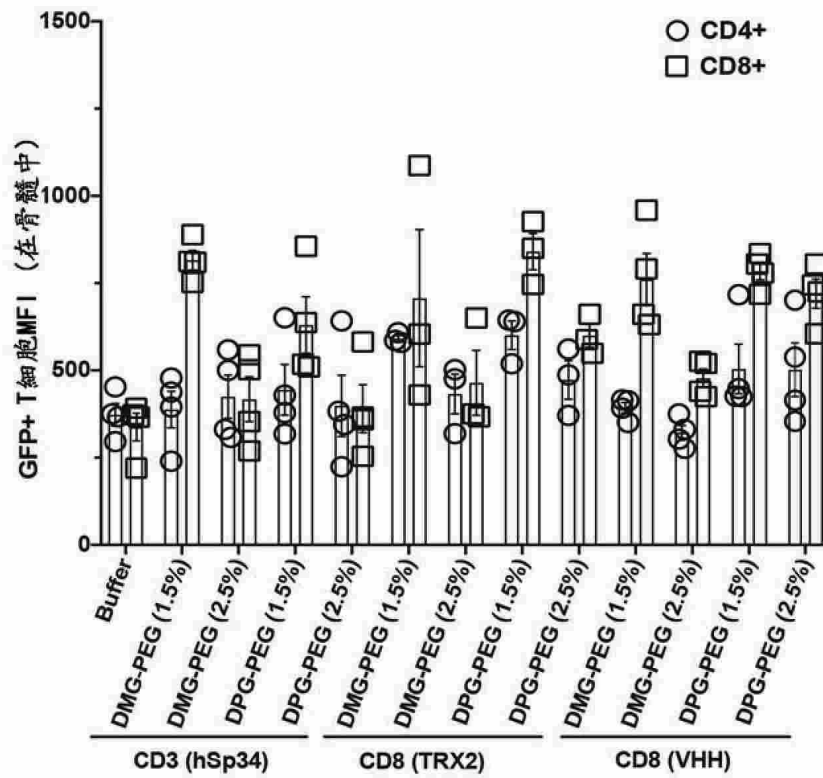


圖 60K

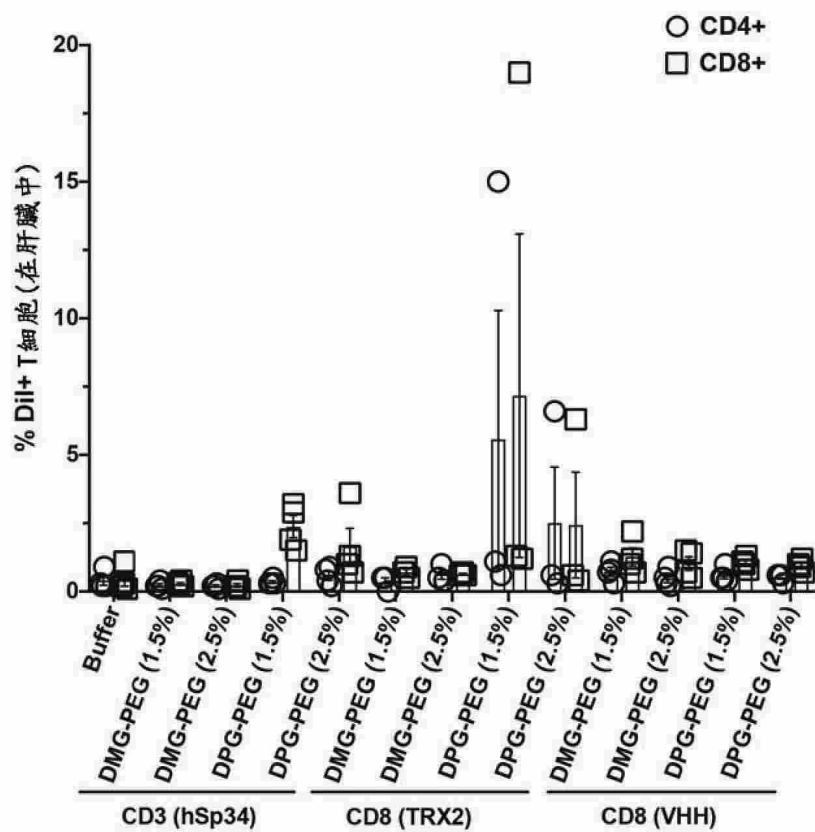


圖 60L

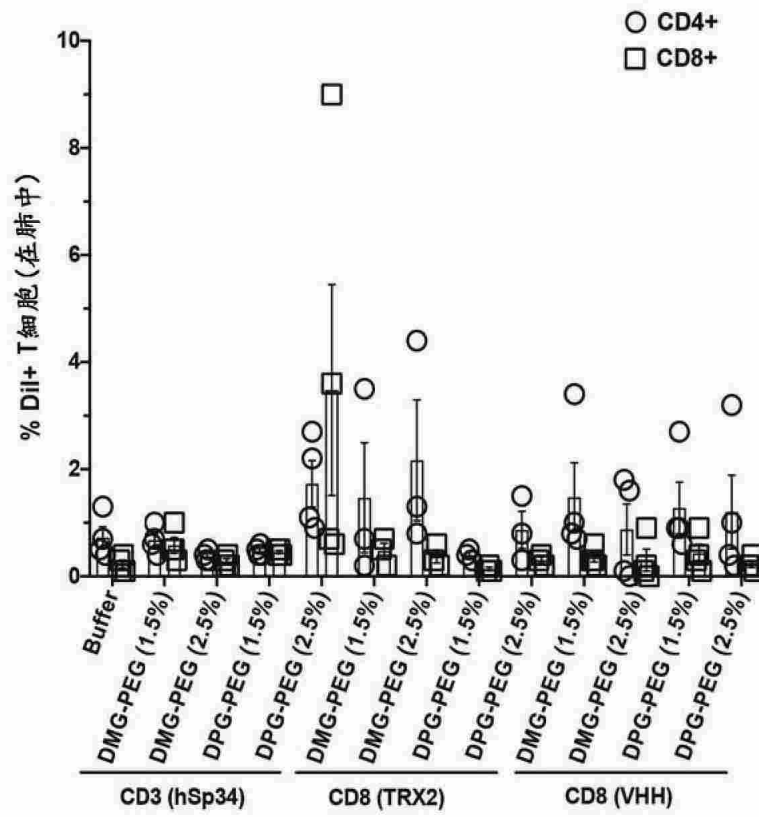


圖 60M

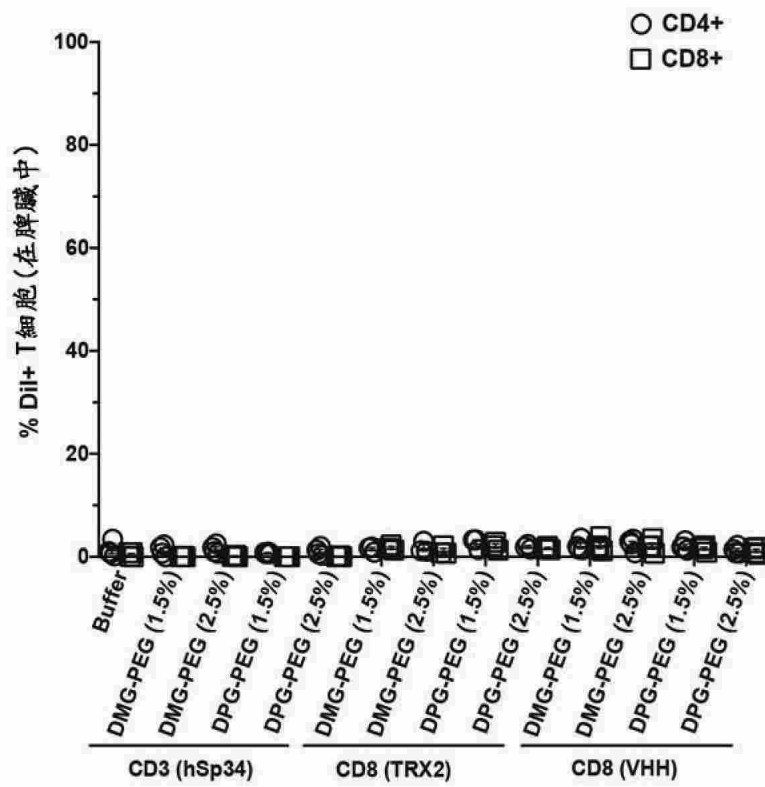


圖 60N

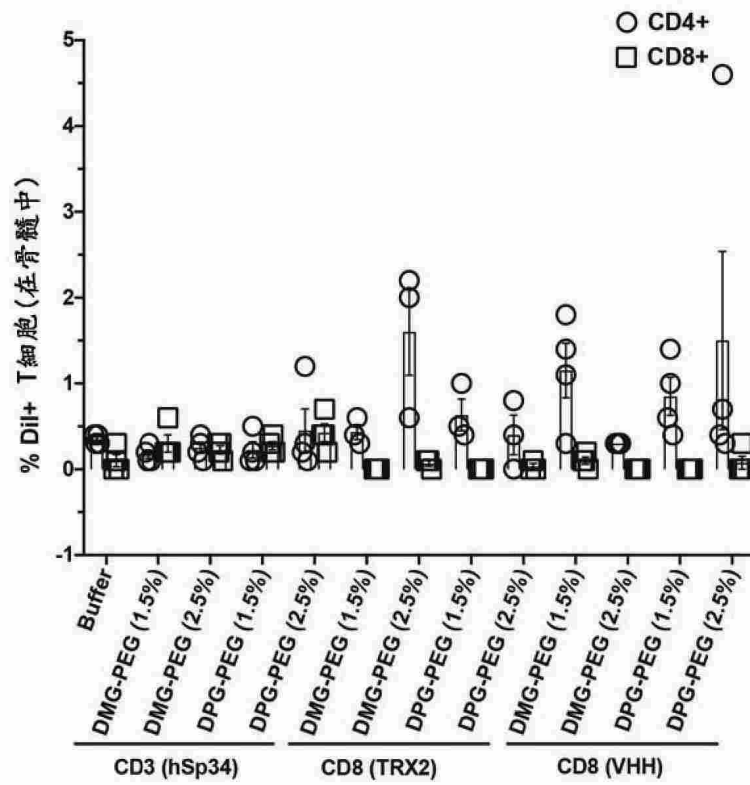


圖 600

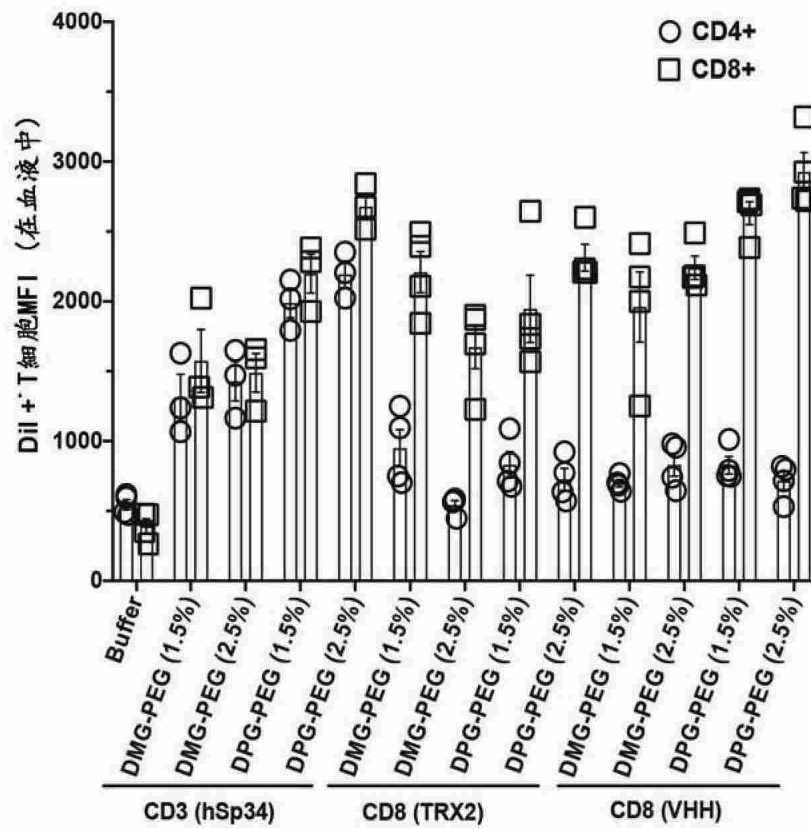


圖 60P

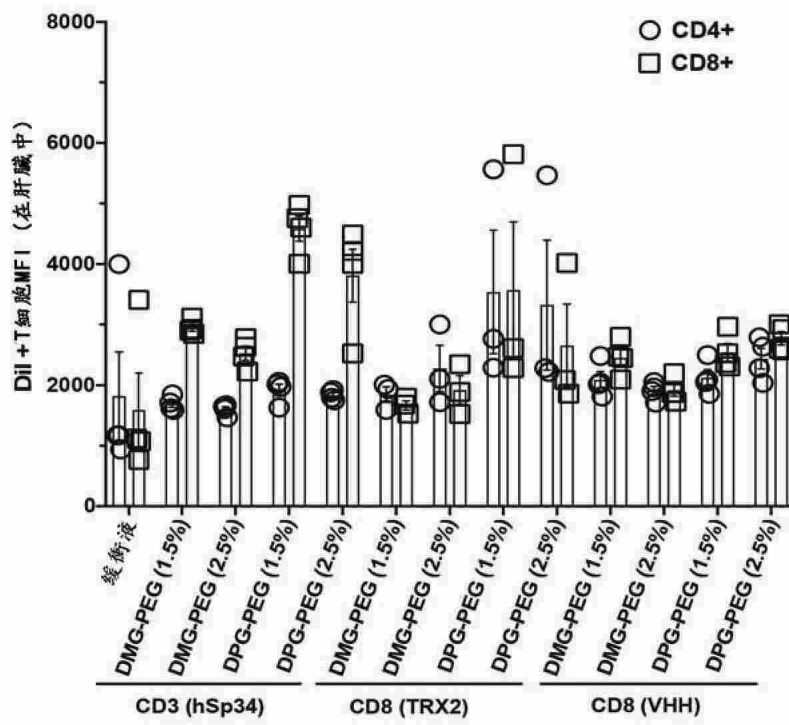


圖 60Q

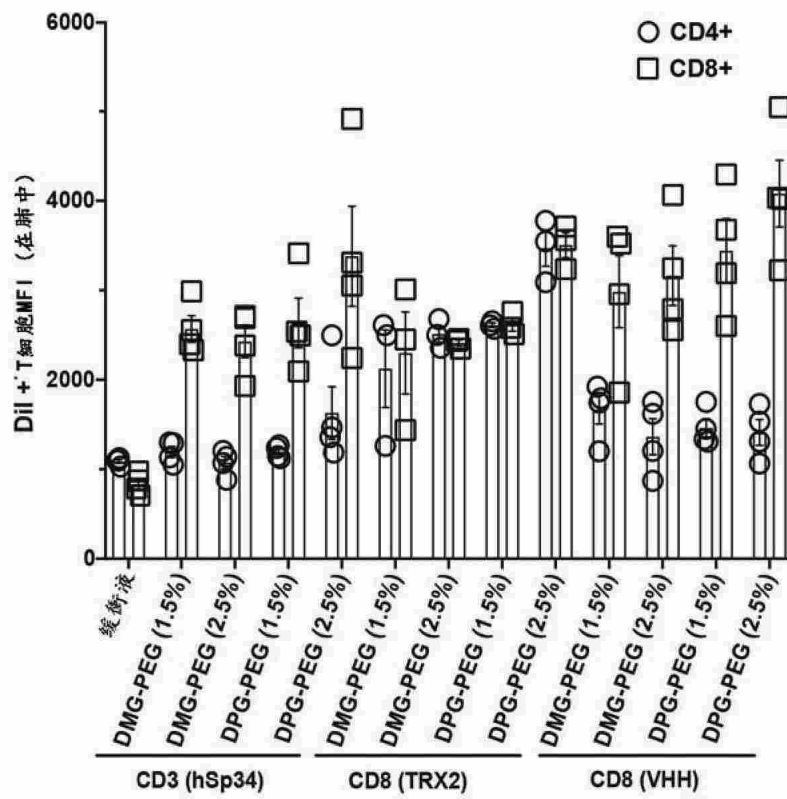


圖 60R

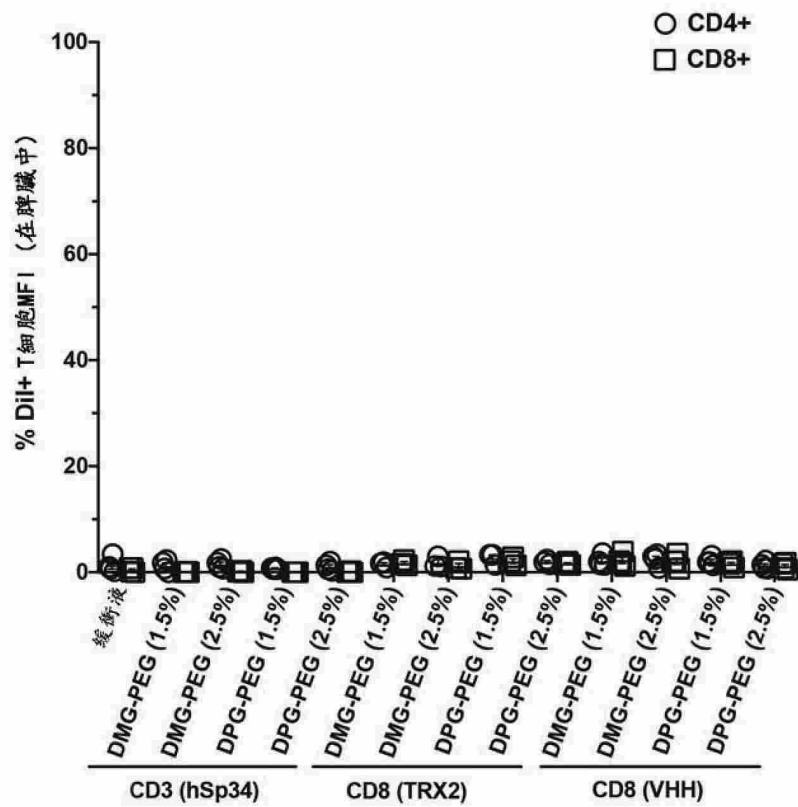


圖 60S

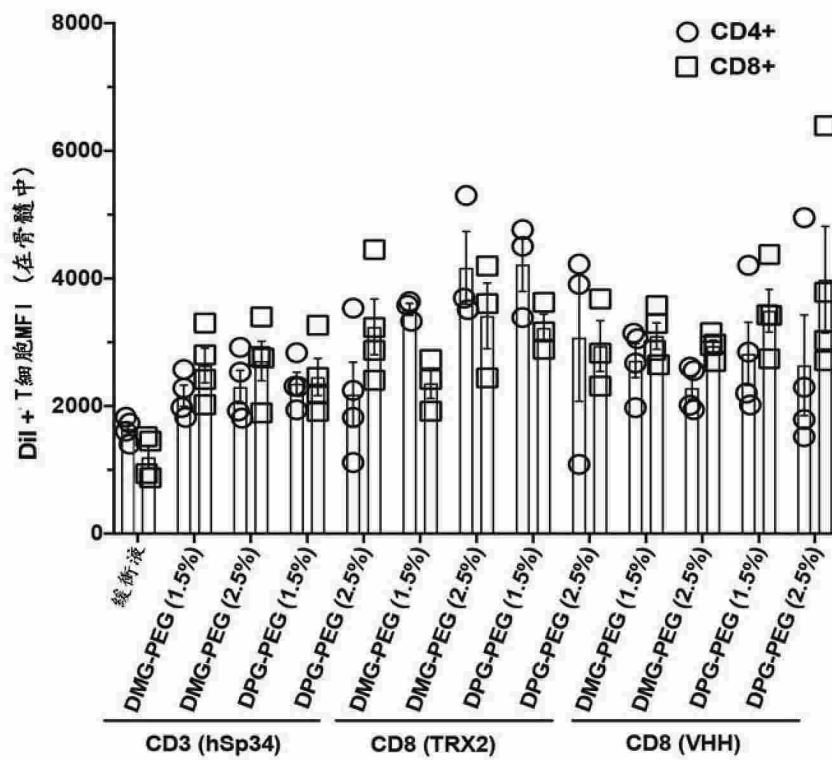


圖 60T

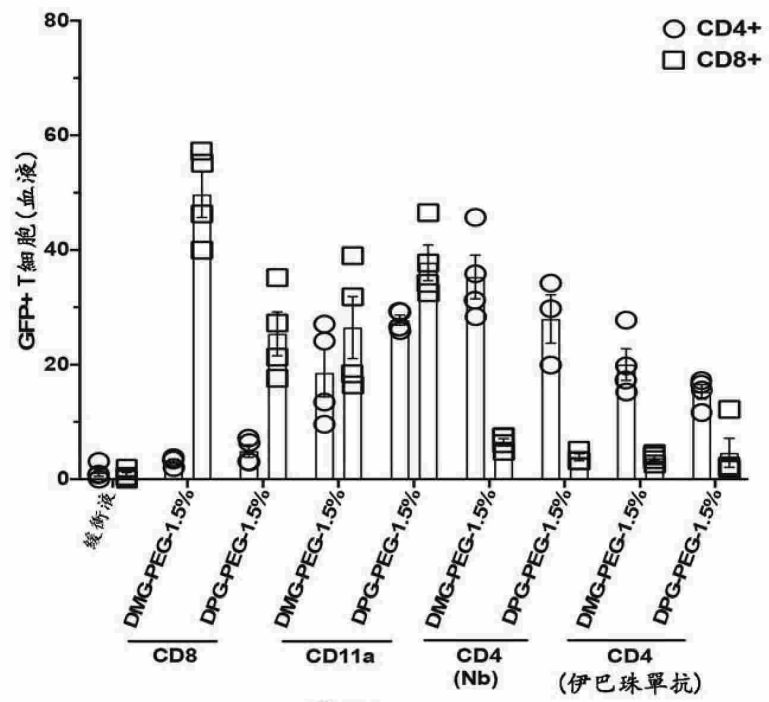


圖61A

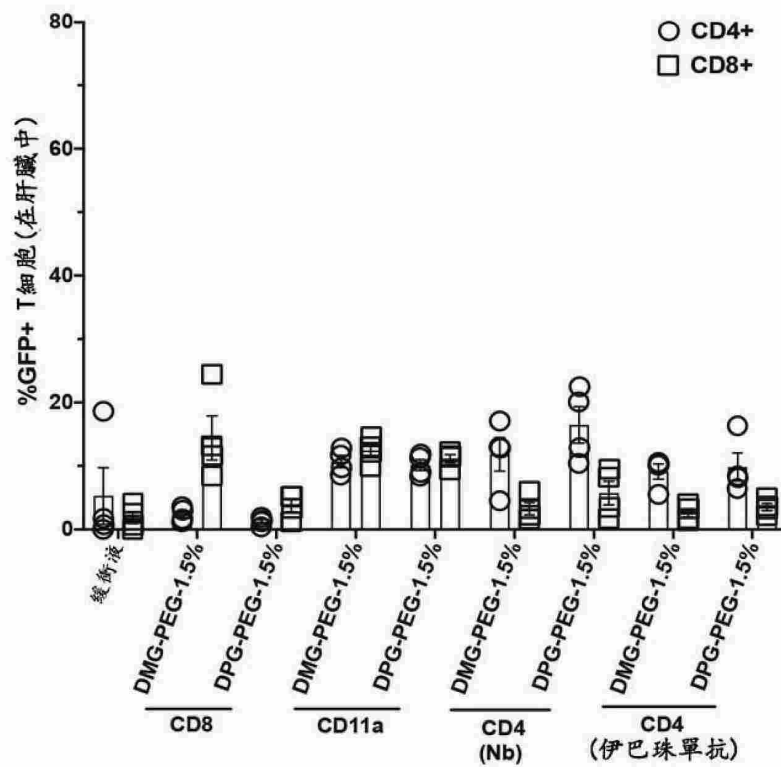


圖61B

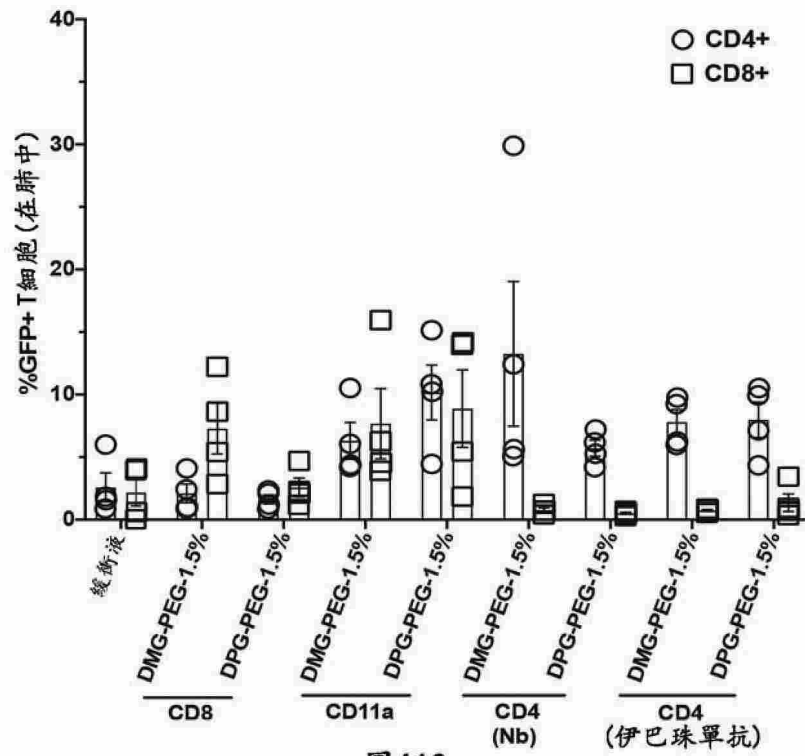


圖61C

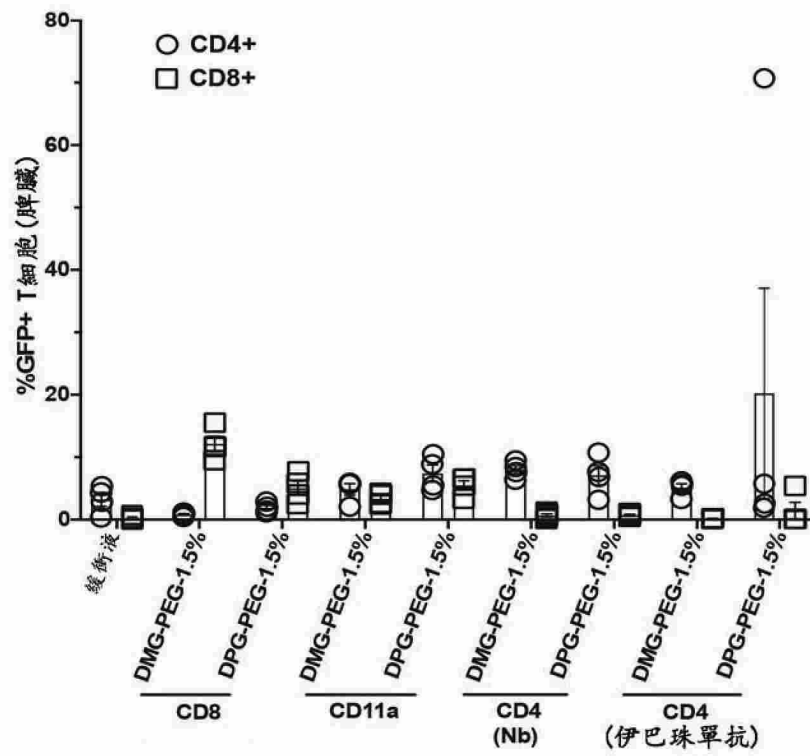


圖61D

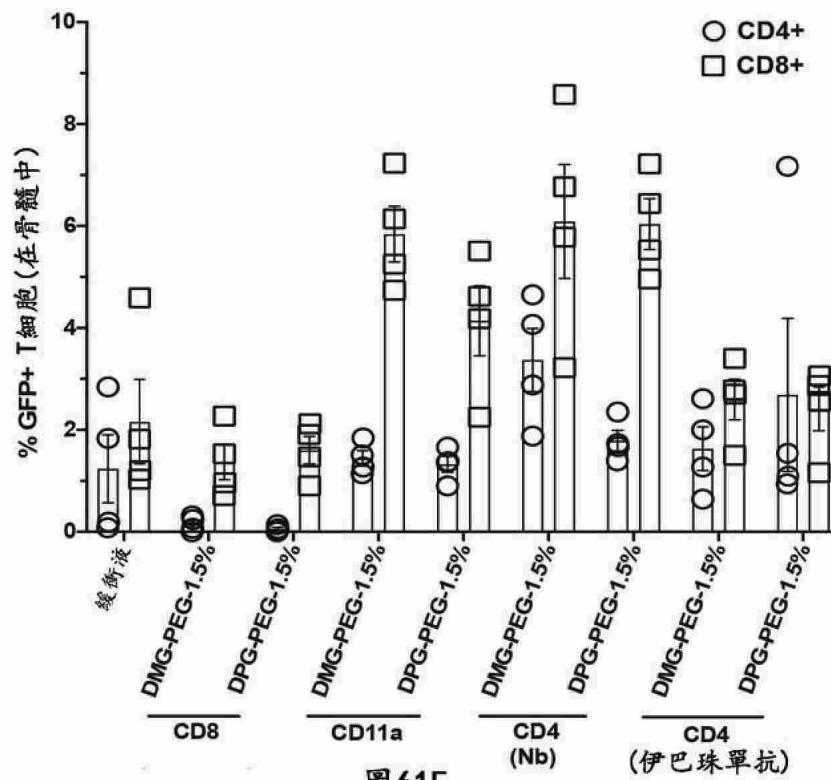


圖61E

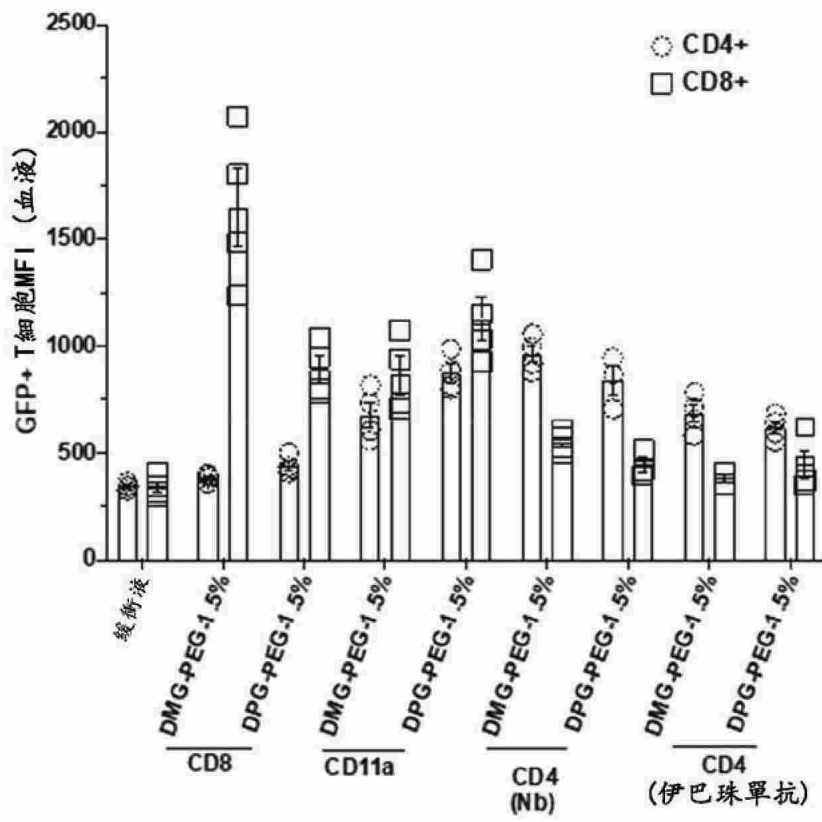
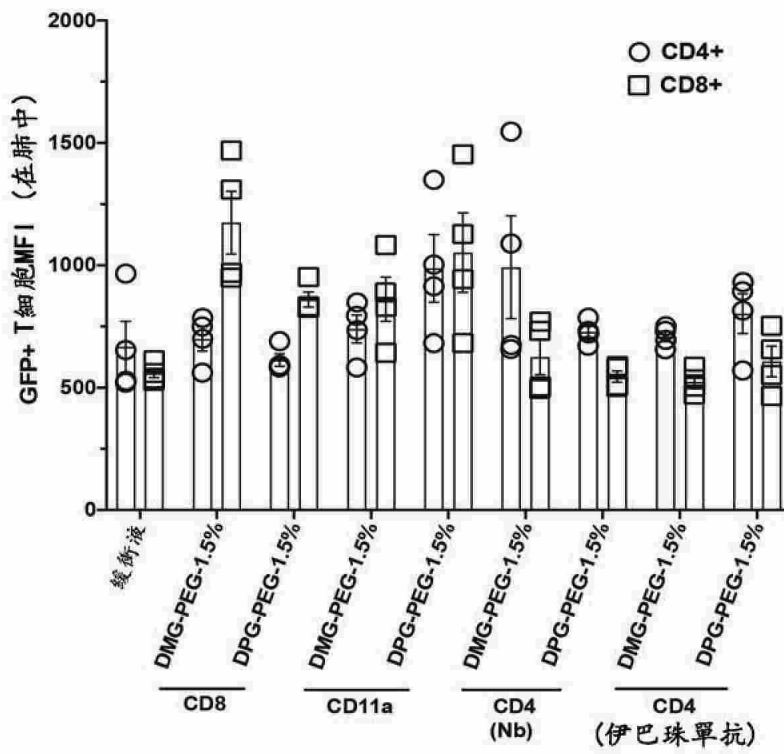
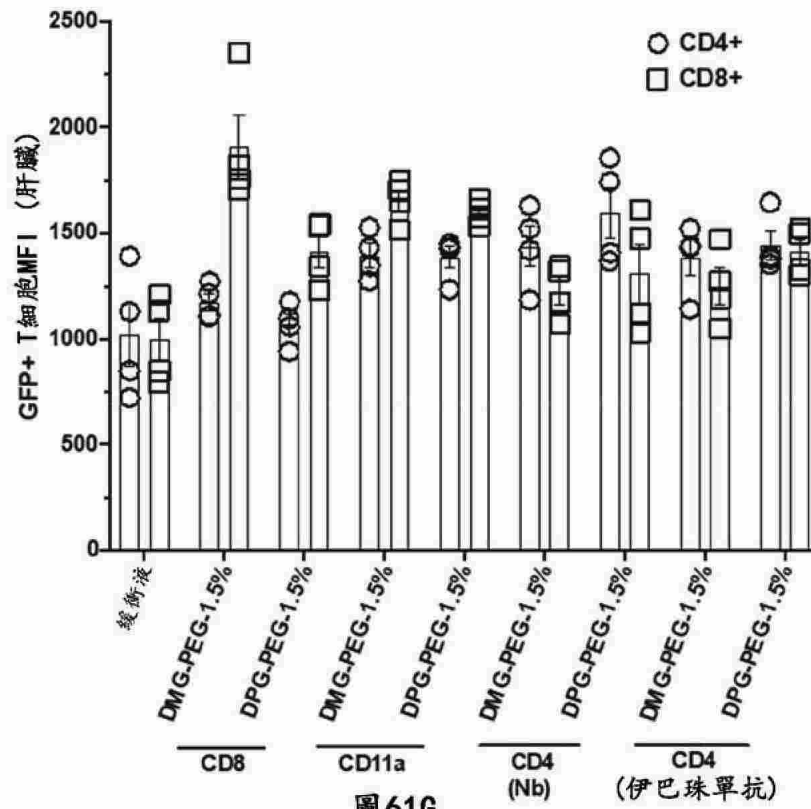


圖61F





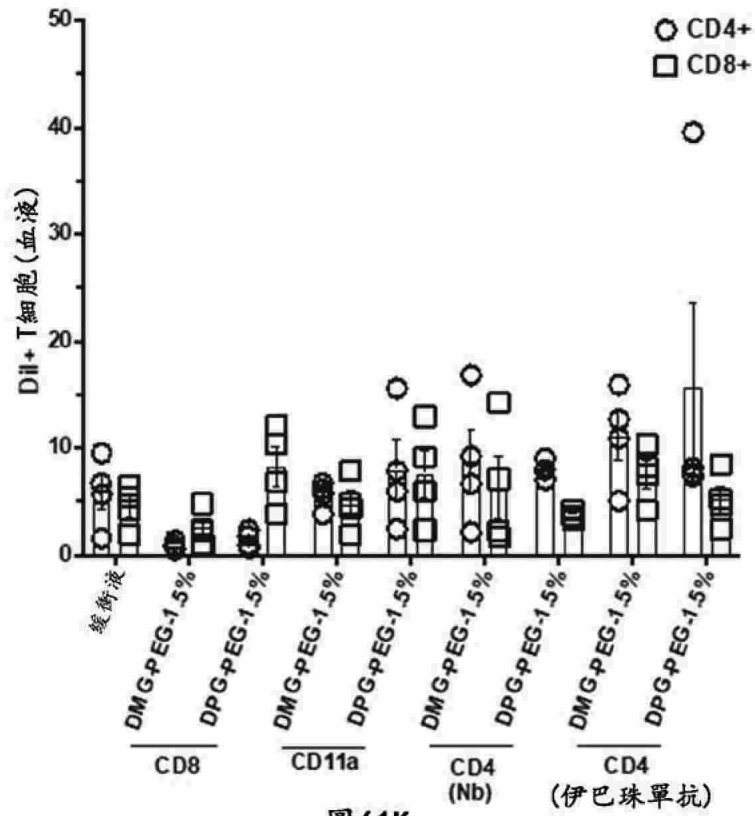


圖61K

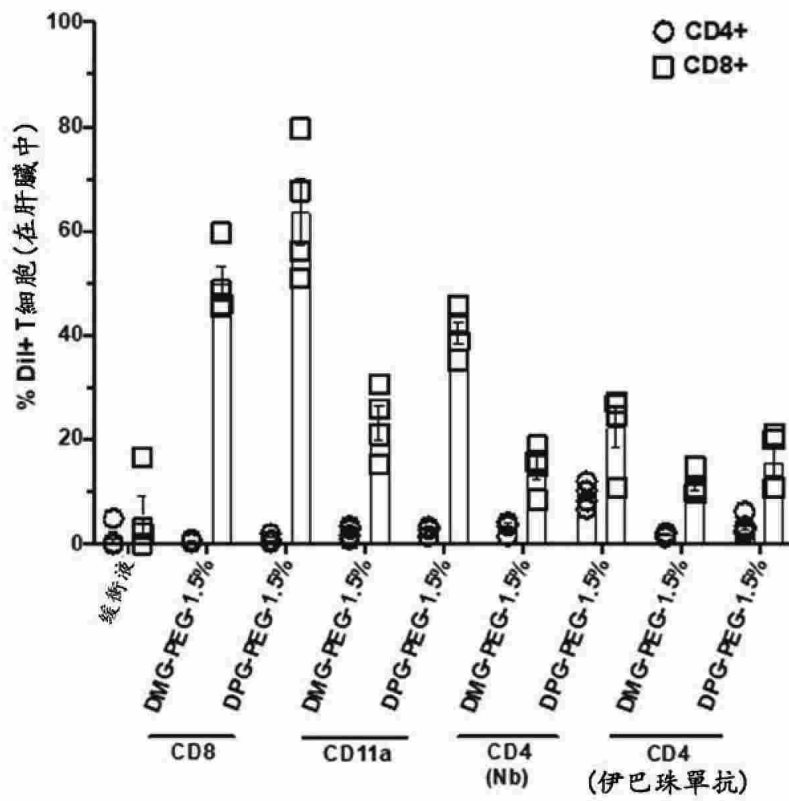


圖61L

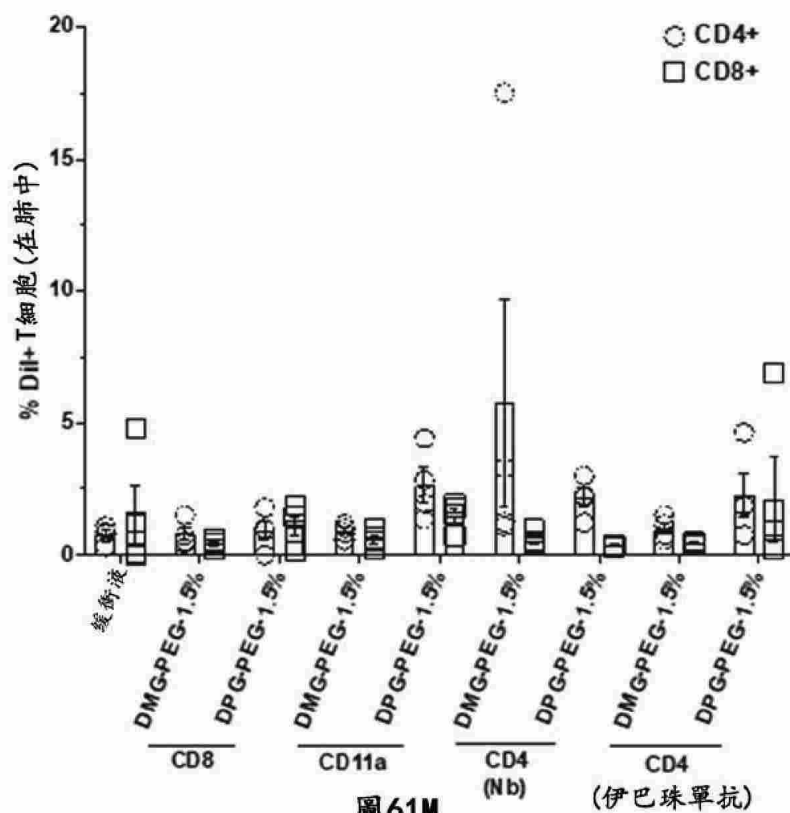


圖61M

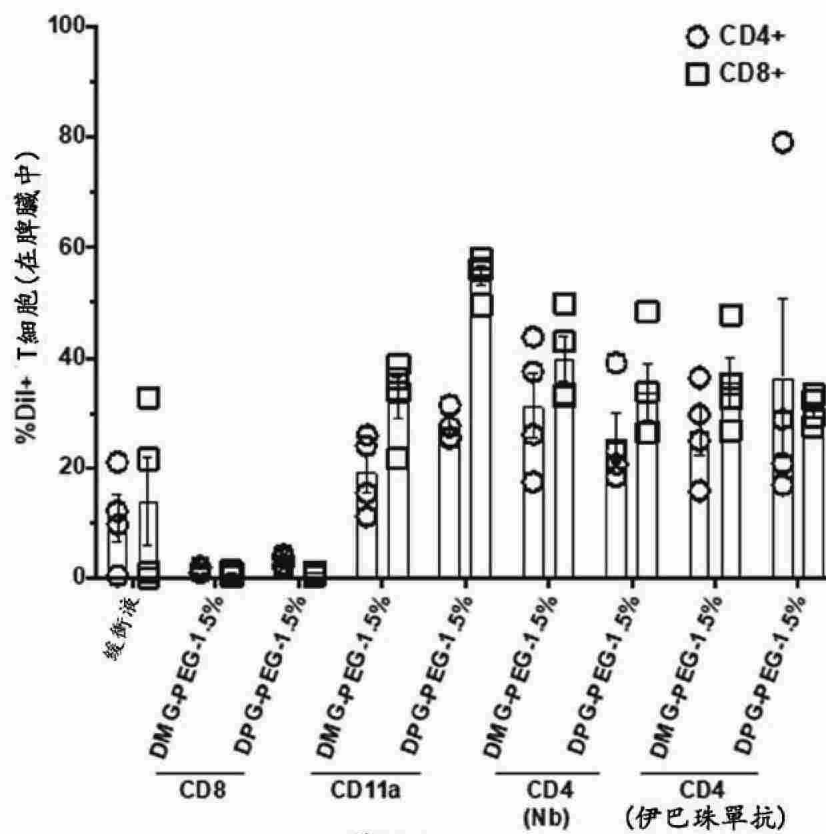


圖61N

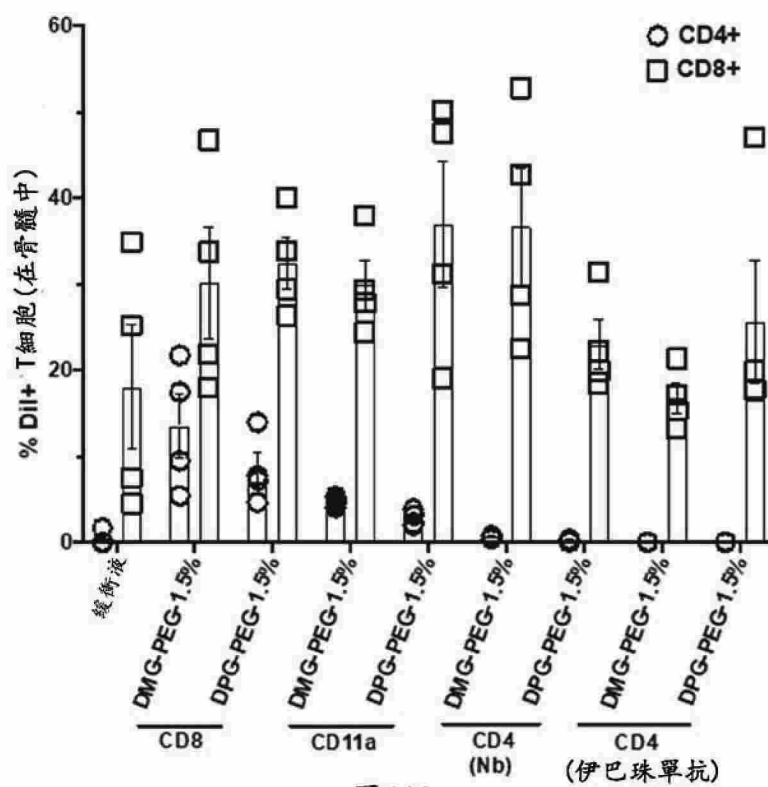


圖610

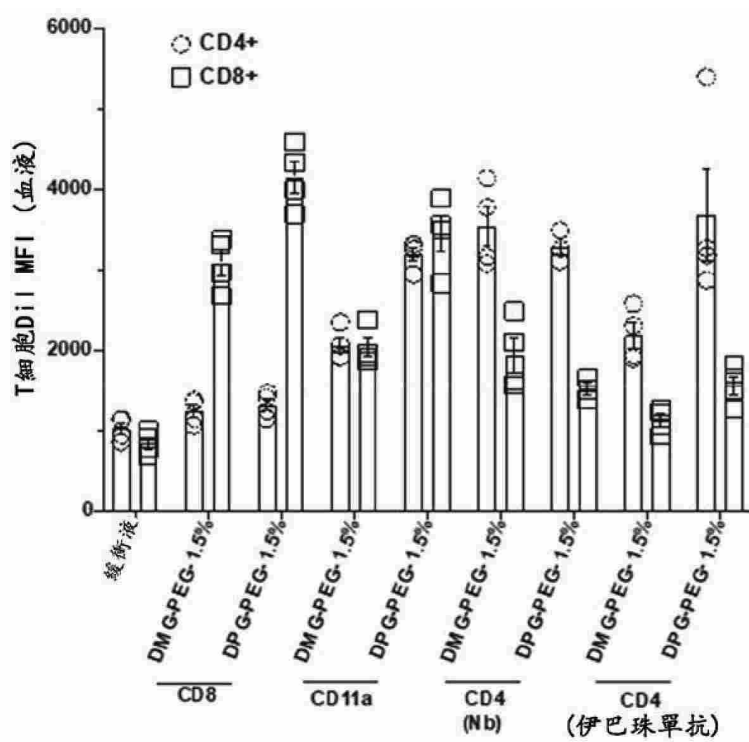


圖61P

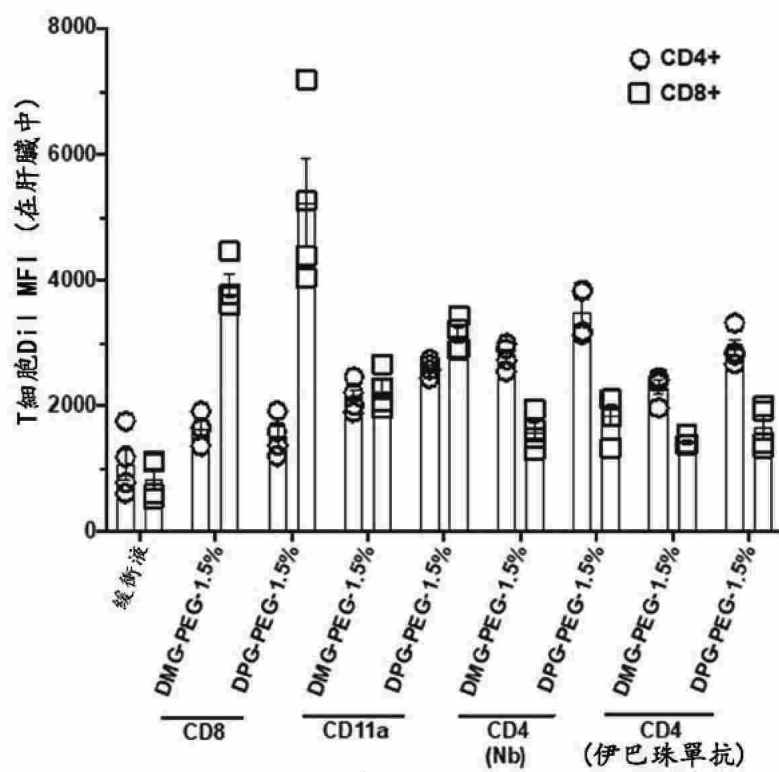


圖 61Q

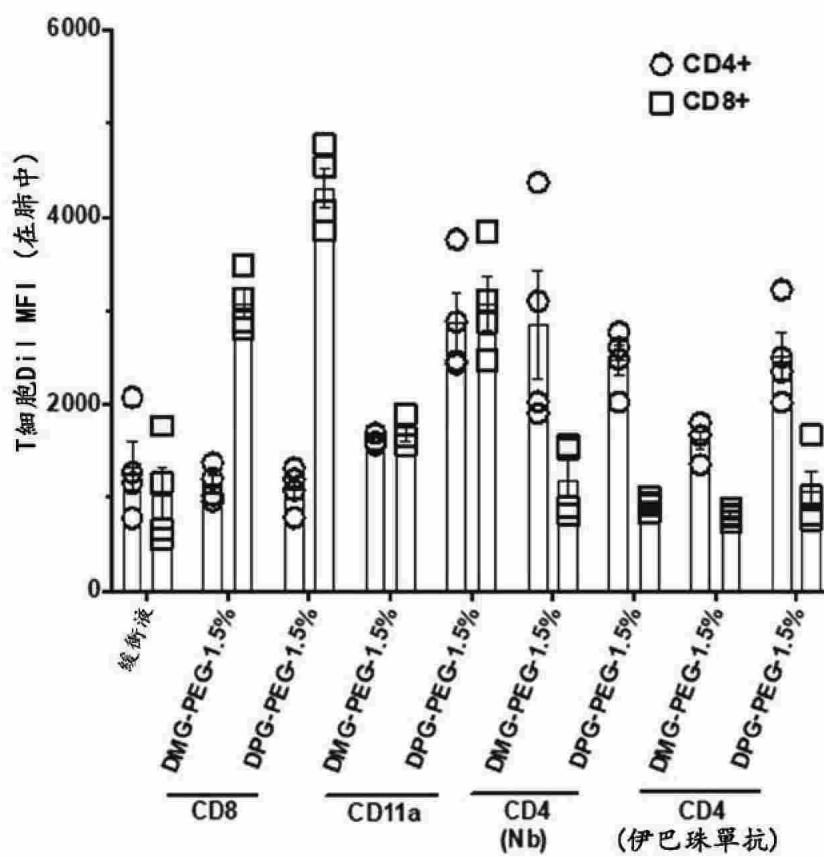


圖 61R

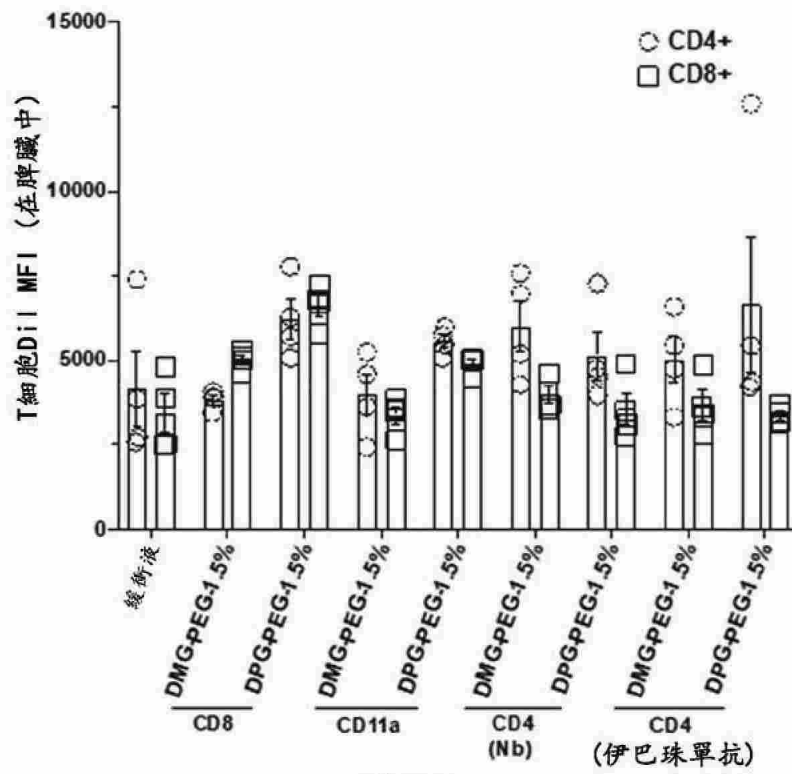


圖61S

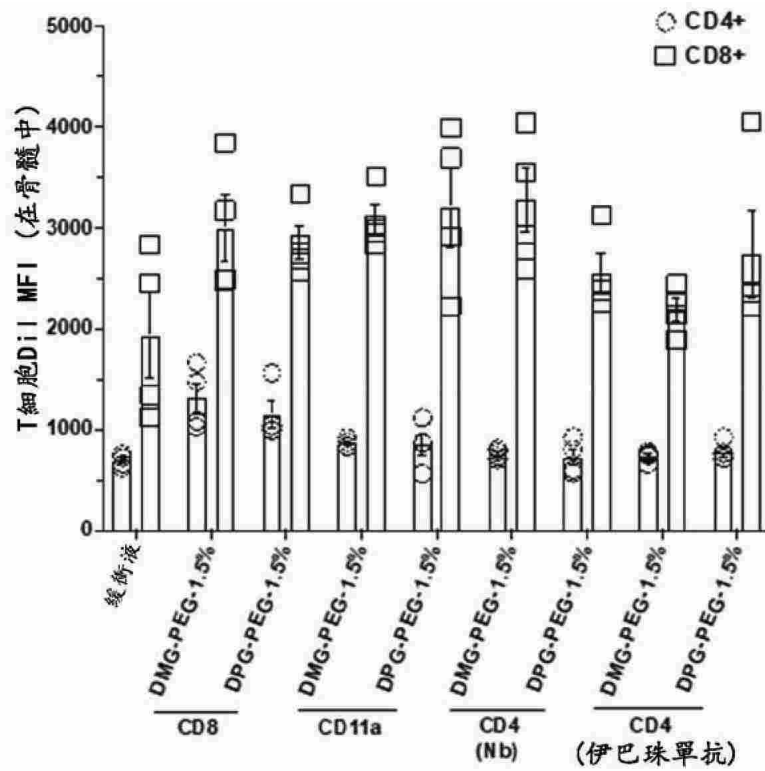


圖61T

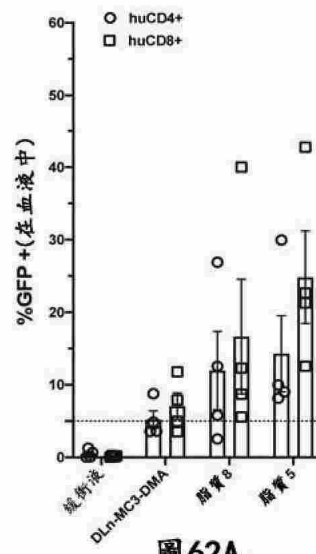


圖 62A

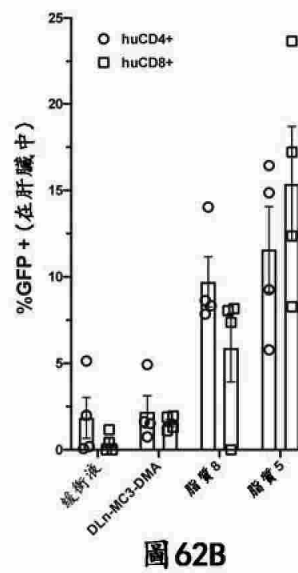


圖 62B

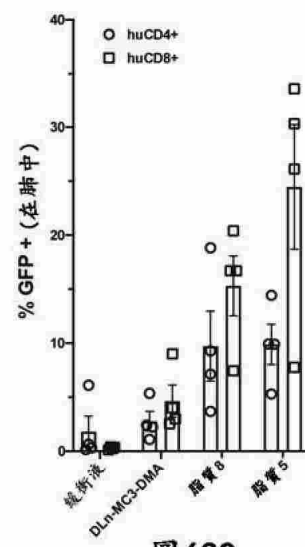


圖 62C

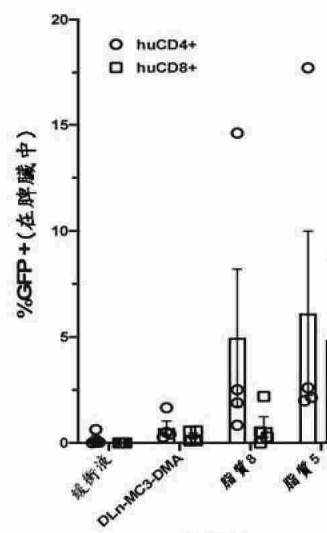


圖 62D

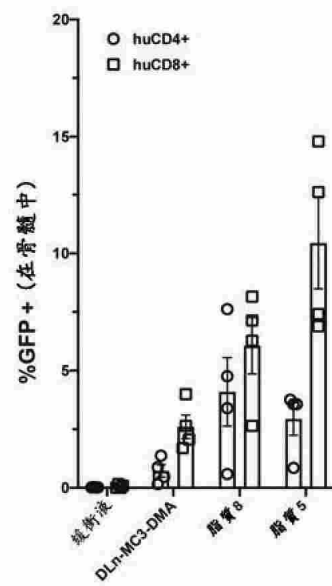


圖 62E

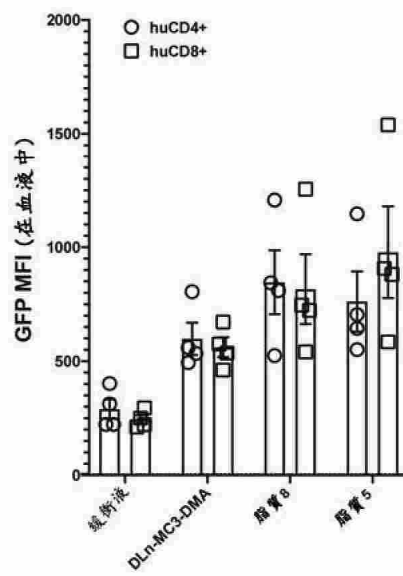


圖 62F

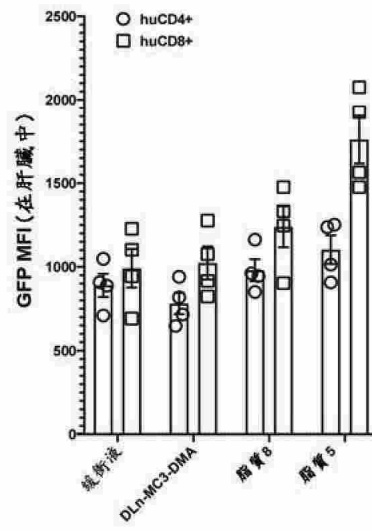


圖 62G

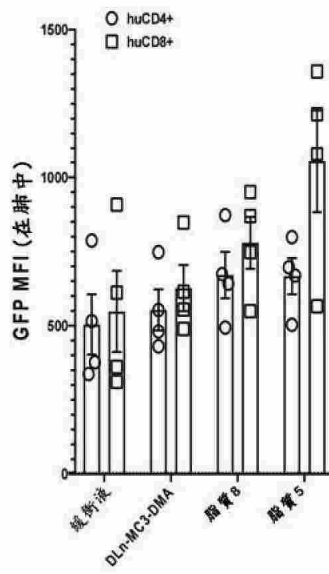


圖 62H

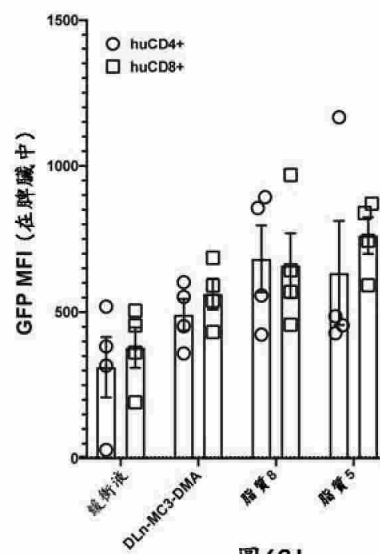


圖 62I

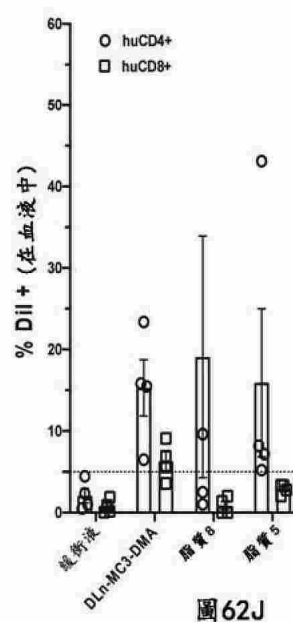
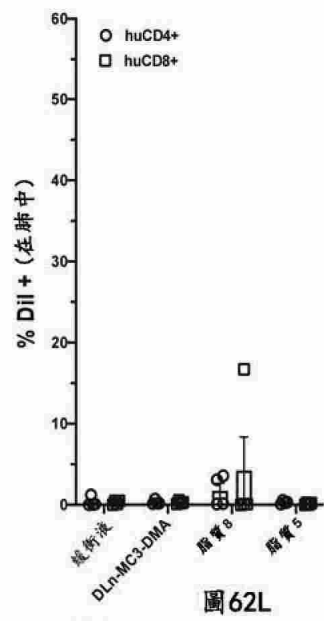
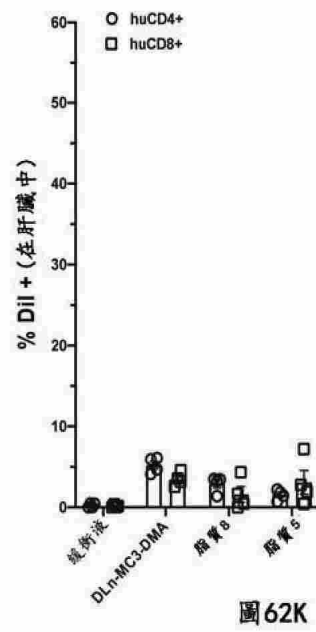


圖 62J



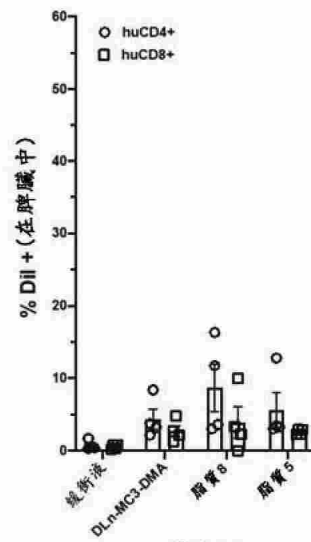


圖 62M

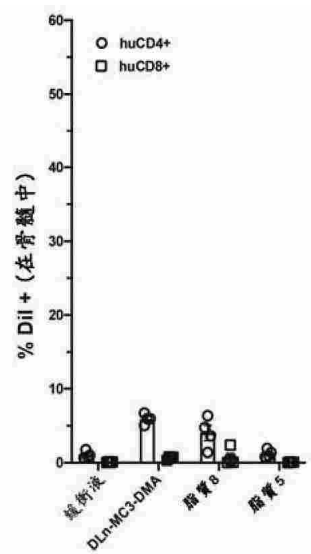


圖 62N

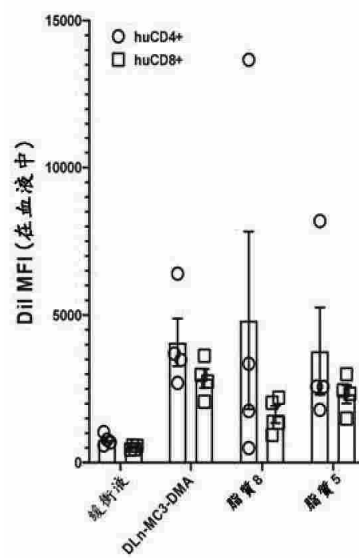


圖 62O

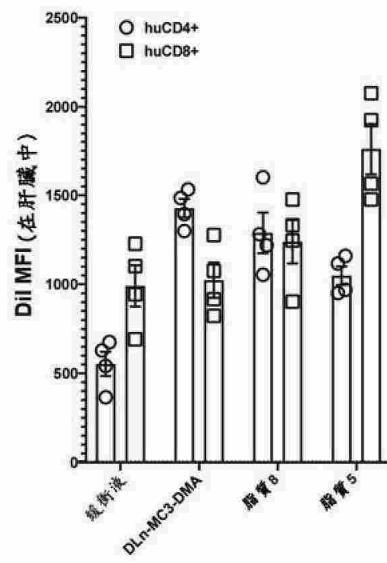


圖 62P

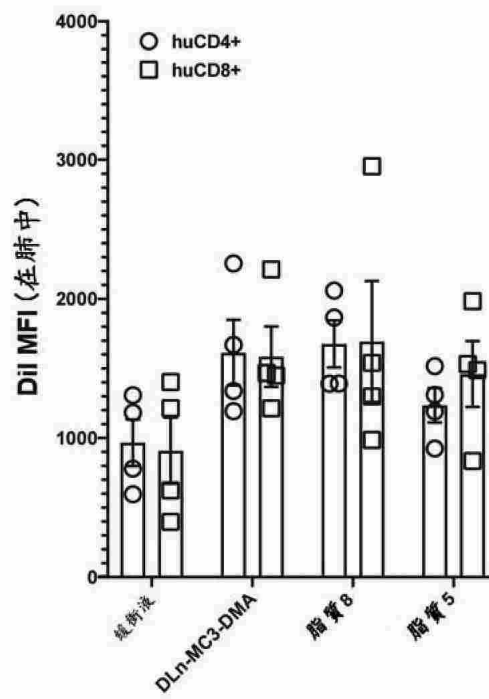


圖 62Q

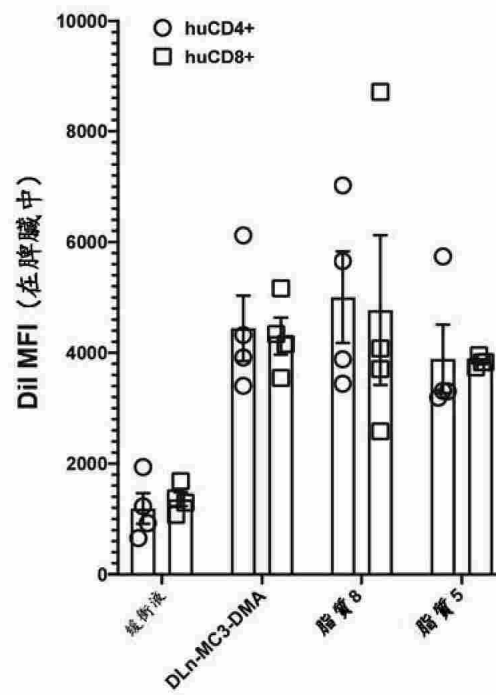


圖 62R

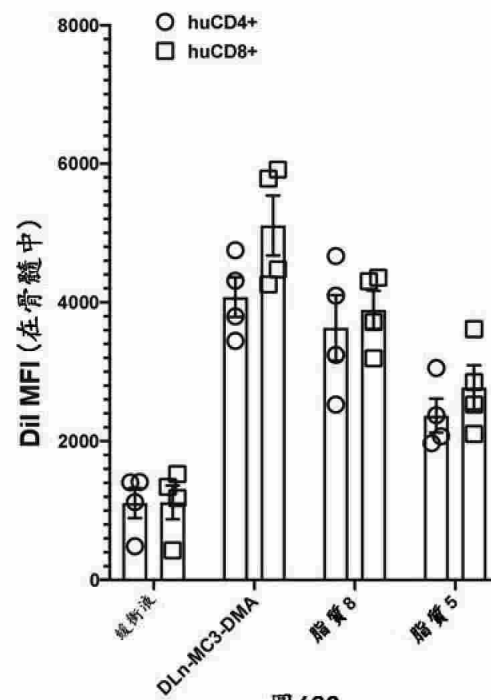
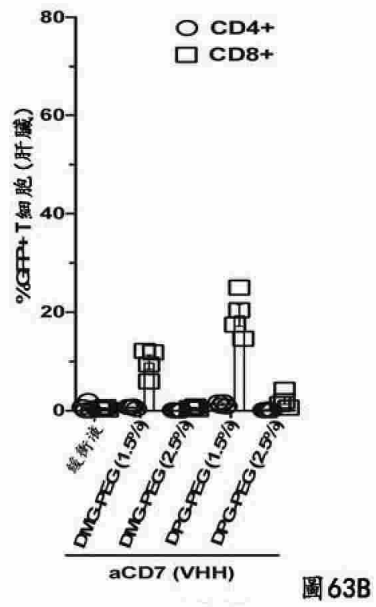
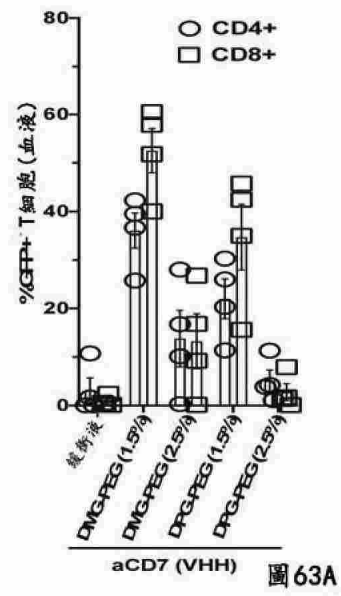
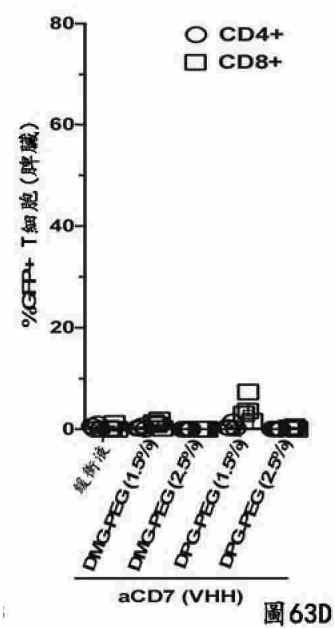
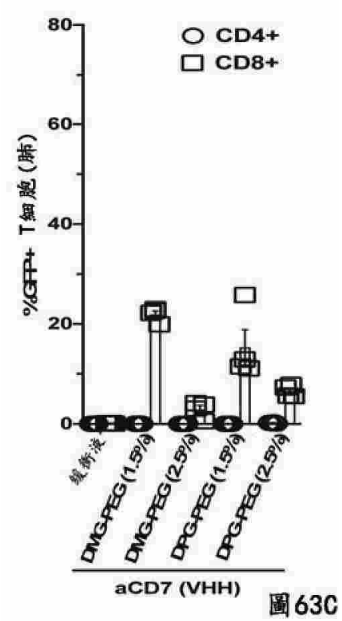


圖 62S





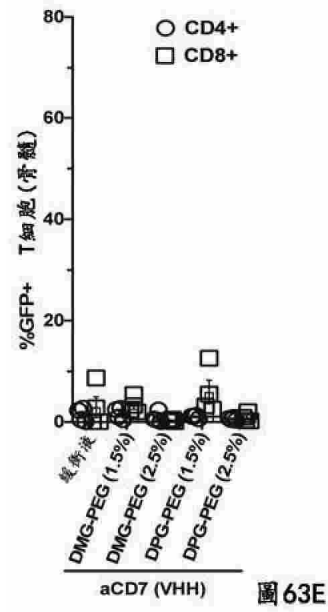


圖 63E

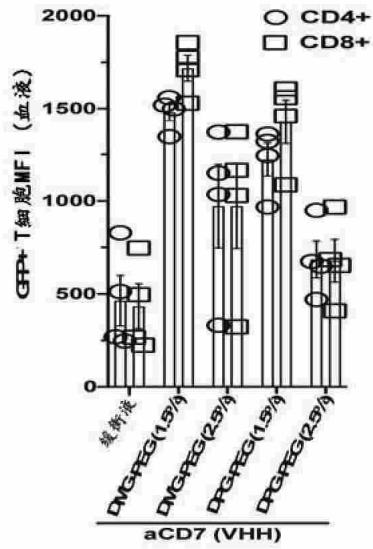


圖 63F

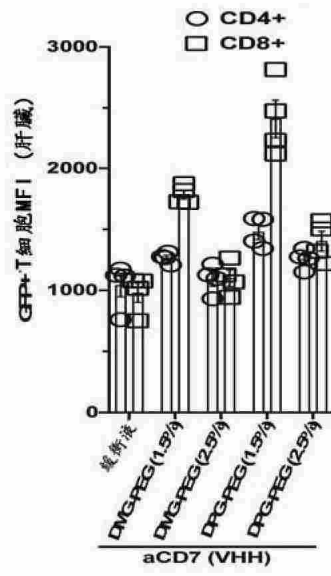


圖 63G

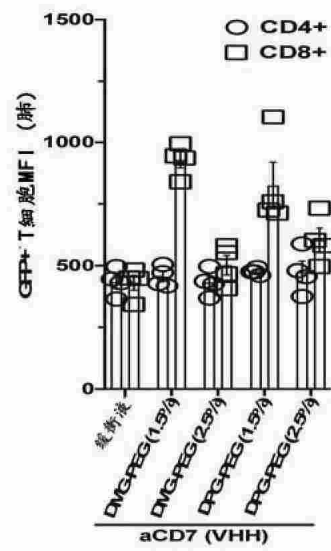


圖 63H

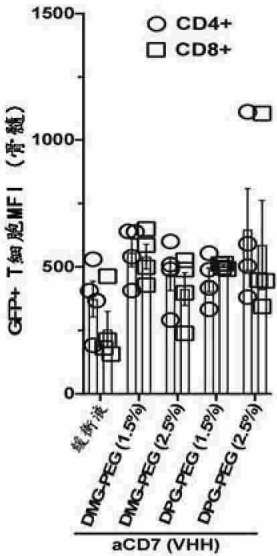


圖 63I

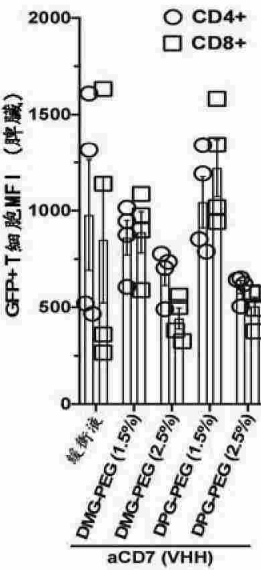


圖 63J

圖 63K

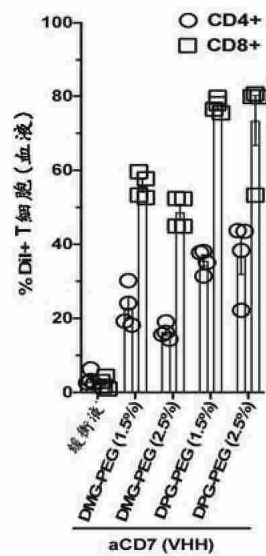


圖 63L

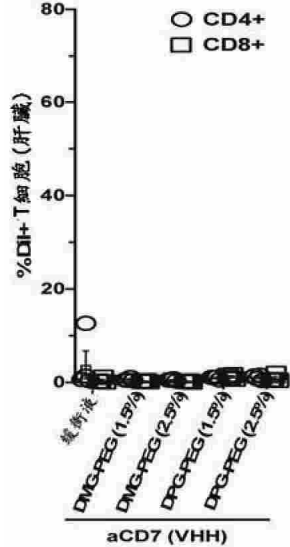


圖 63M

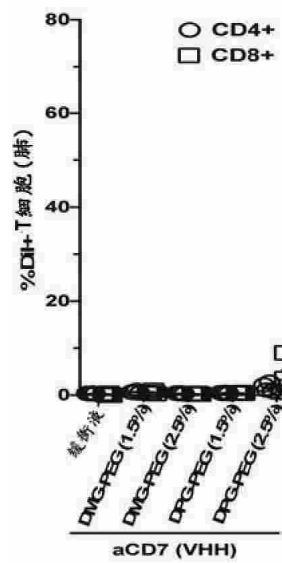
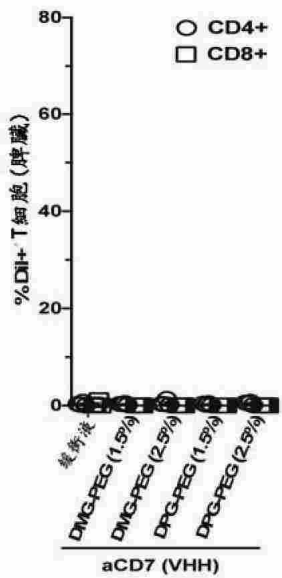


圖 63N



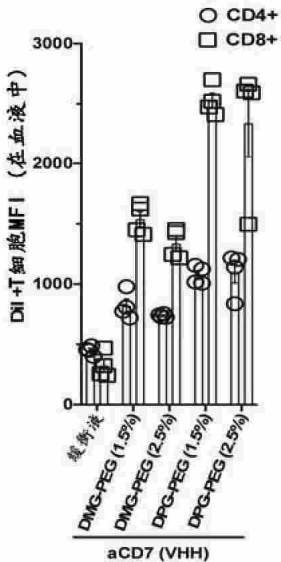
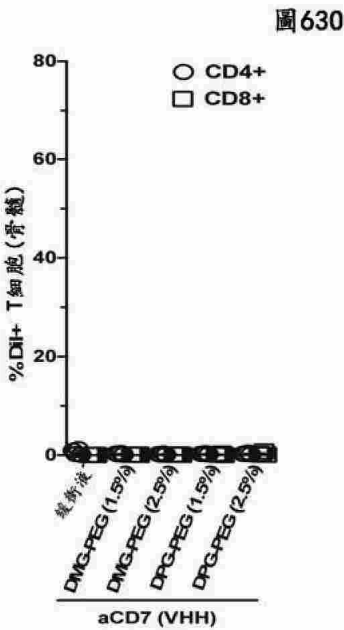


圖63P

(127)

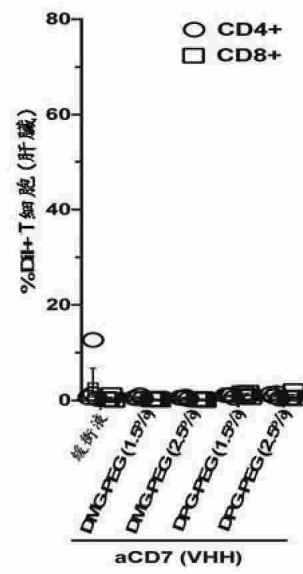


圖63Q

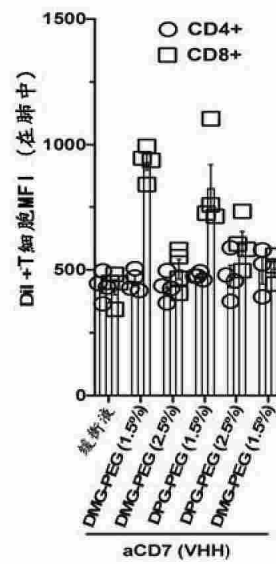


圖63R

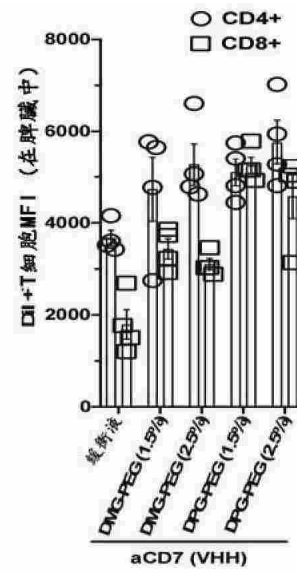


圖 63S

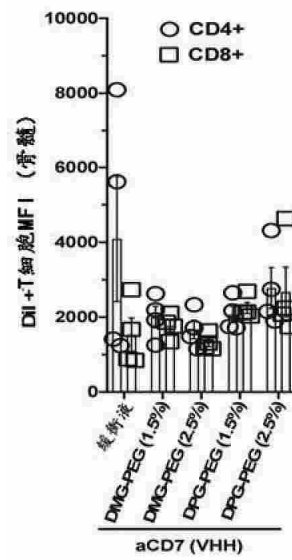


圖 63T

## 人T細胞和NK細胞的轉染

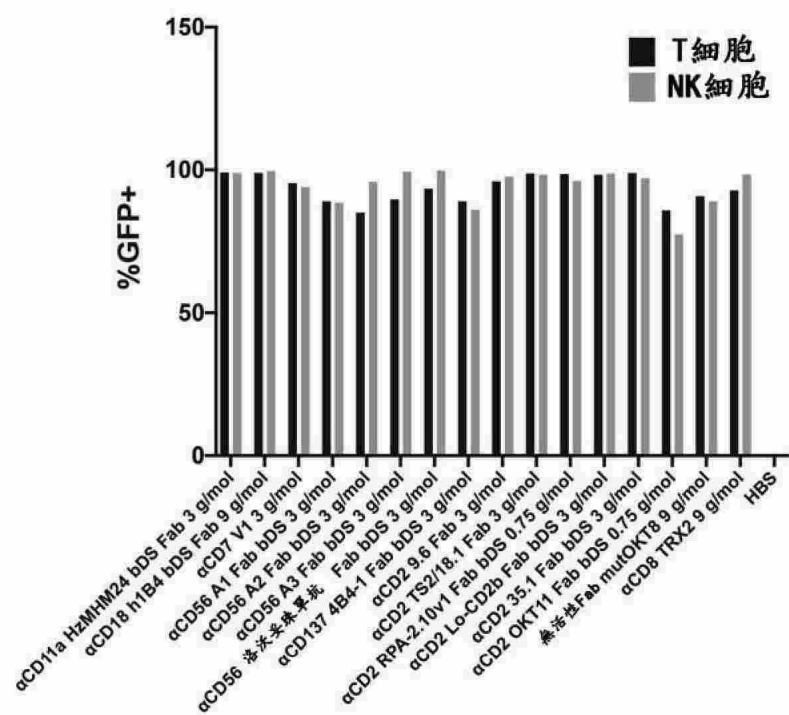


圖64A

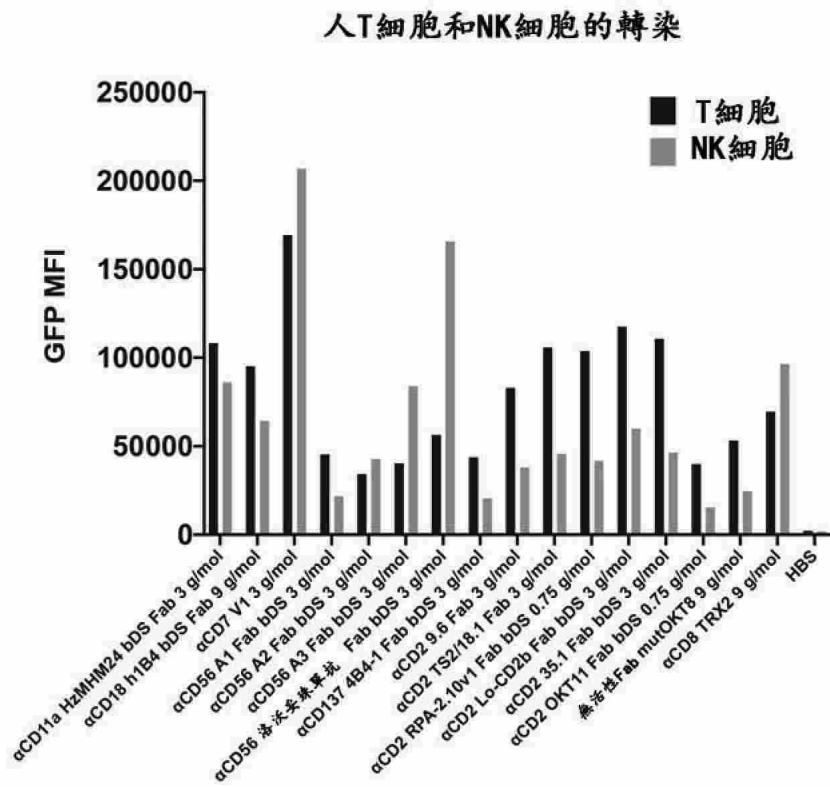


圖64B

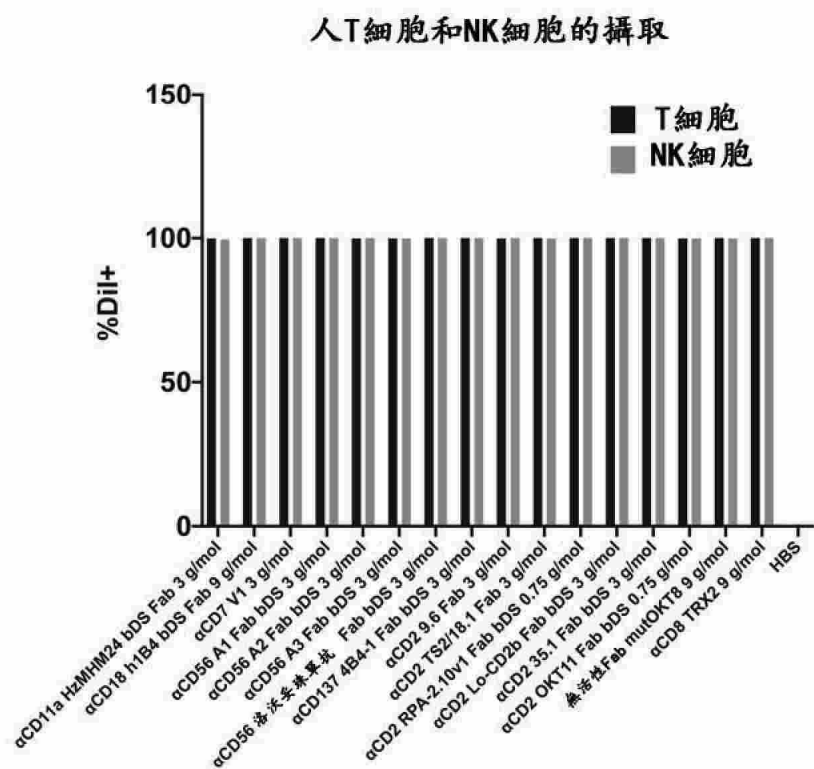


圖 64C

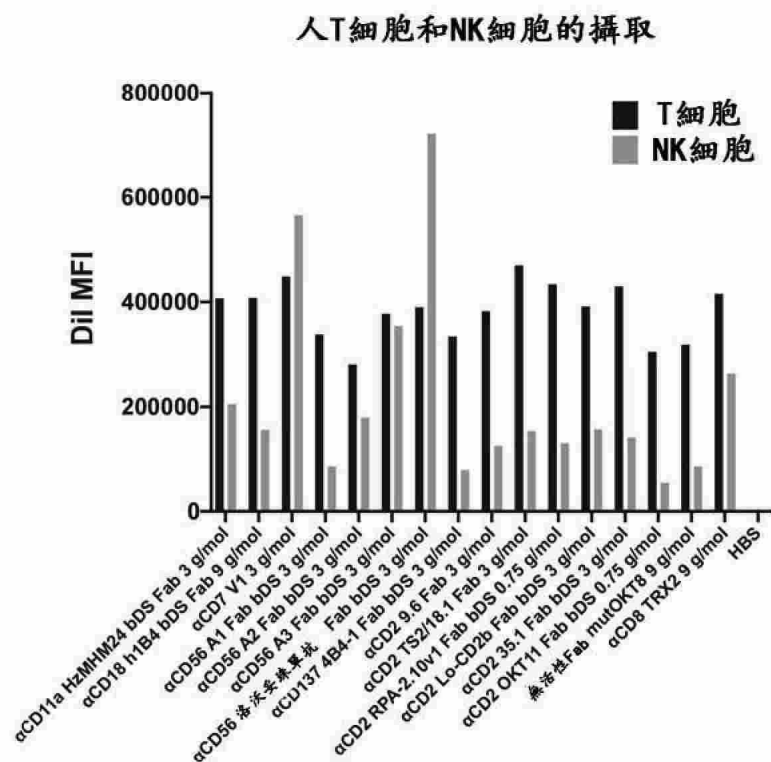


圖 64D

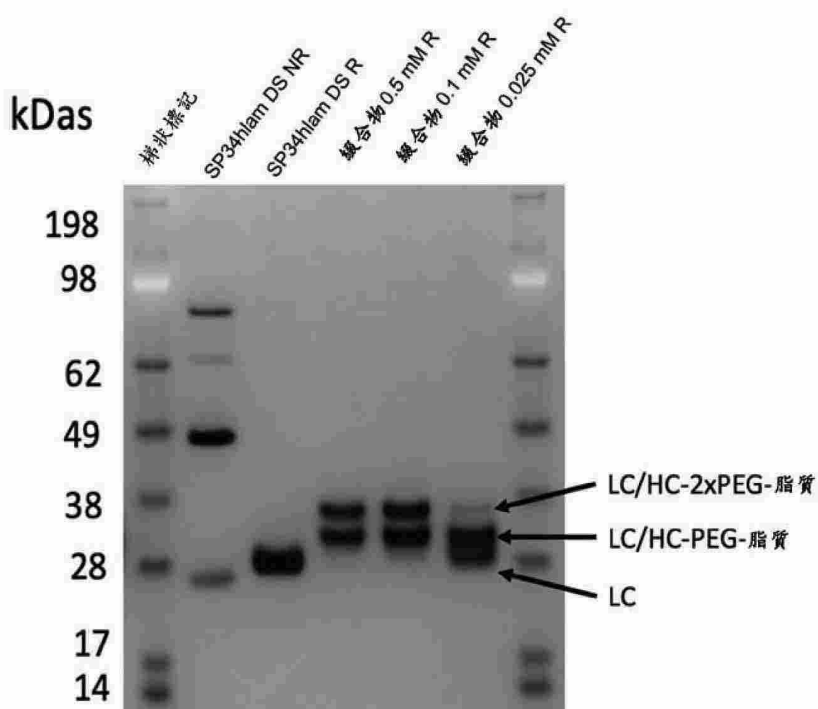


圖 65A

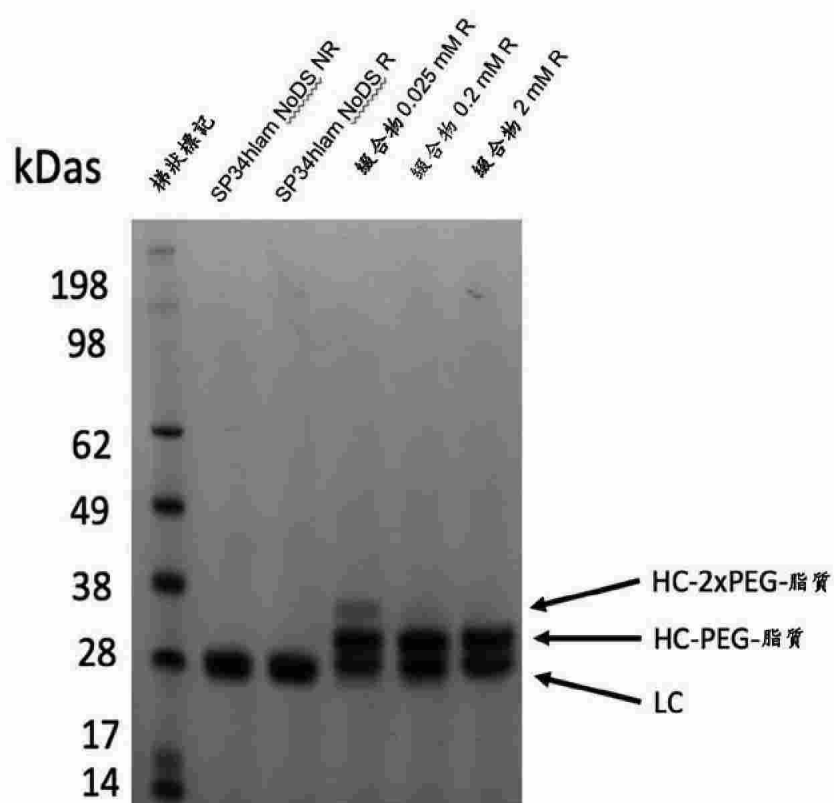
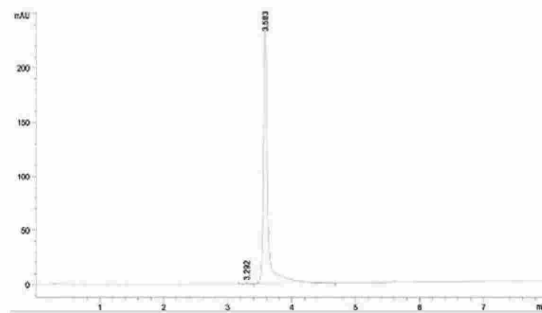


圖 65B

(134)

hSP34-hIam DS  
Fab 未緩合



hSP34-hIam DS  
Fab緩合物  
0.025 mM TCEP

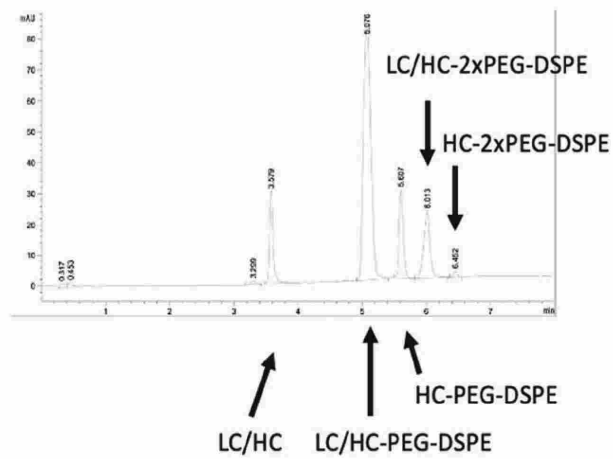
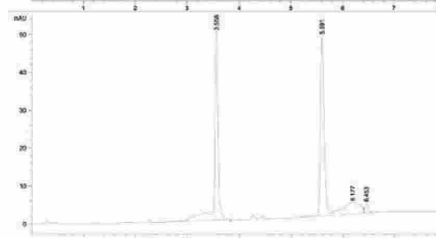


圖 65C

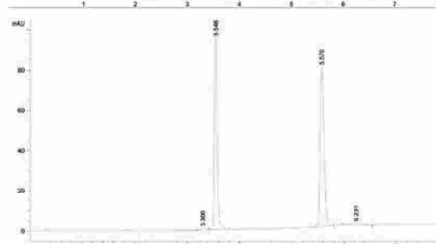
hSP34-hlam NoDS  
Fab 未緩合



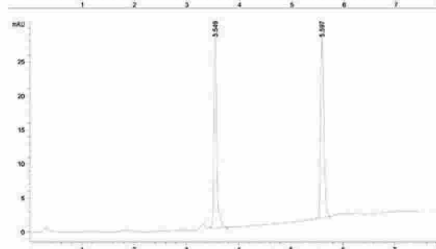
hSP34-hlam NoDS  
Fab緩合物  
0.025 mM TCEP



hSP34-hlam NoDS  
Fab緩合物  
0.2 mM TCEP



hSP34-hlam NoDS  
Fab緩合物  
2 mM TCEP



LC/HC

HC-PEG-DSPE

圖 65D

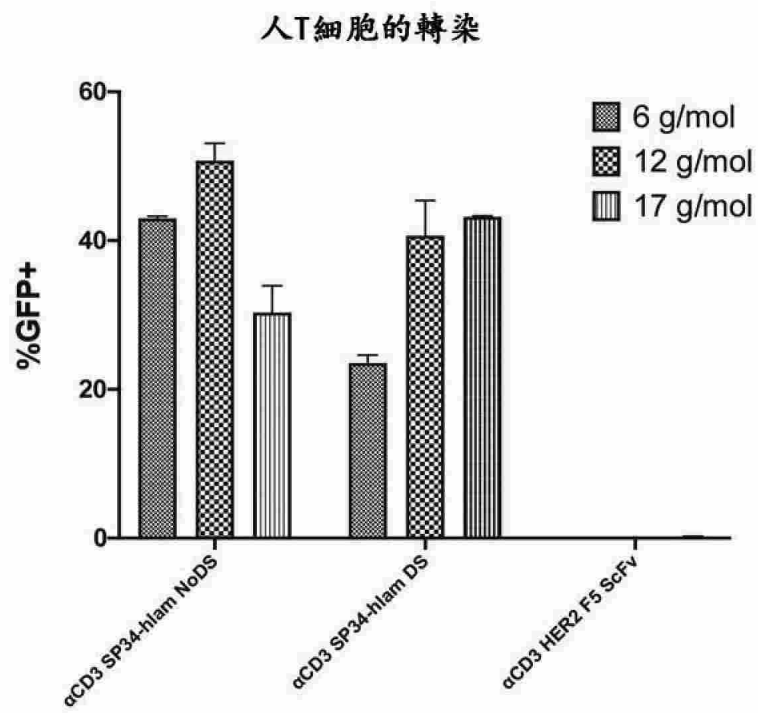


圖65E

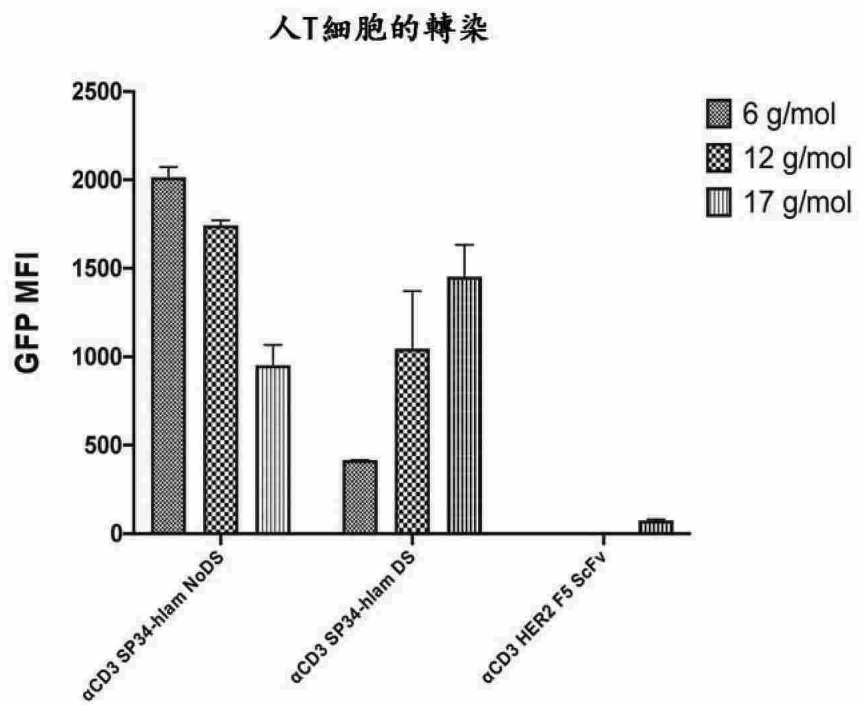


圖65F

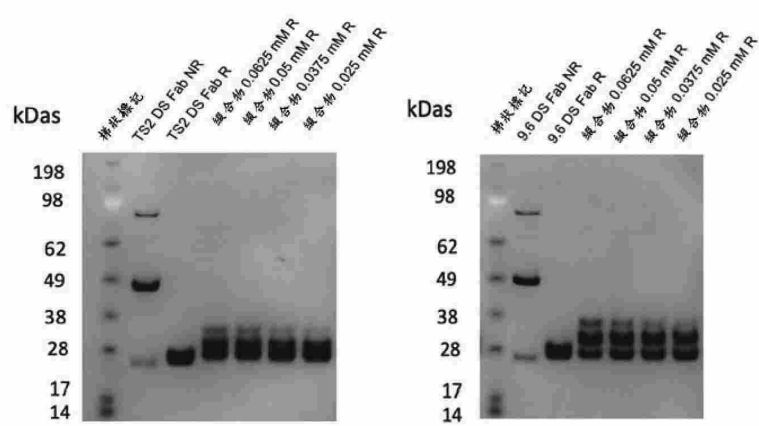


圖66A

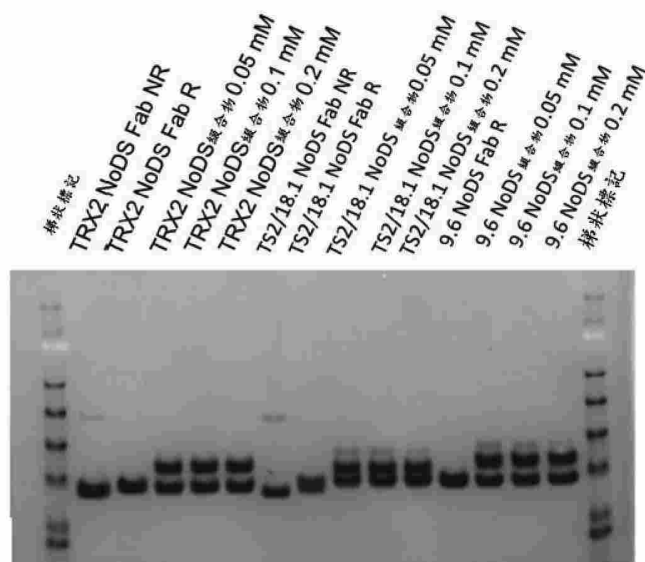


圖 66B

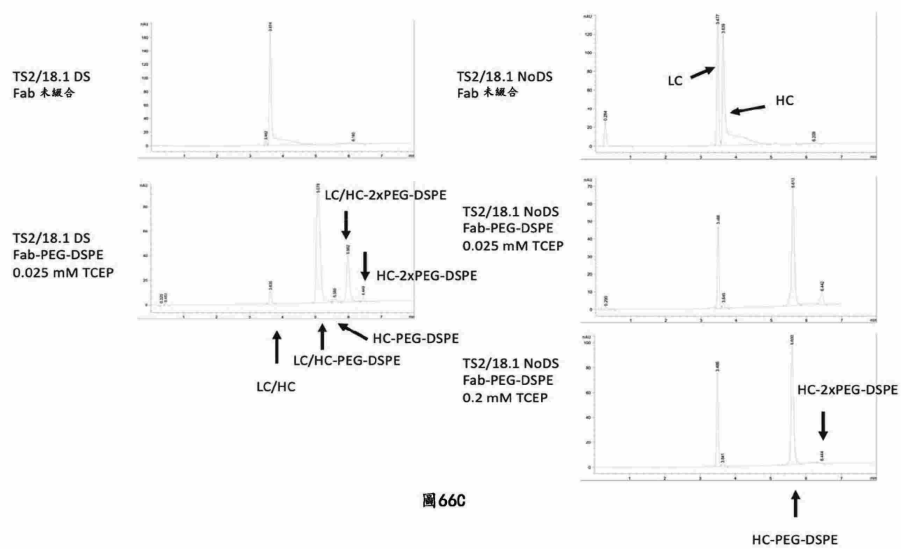


圖 66C

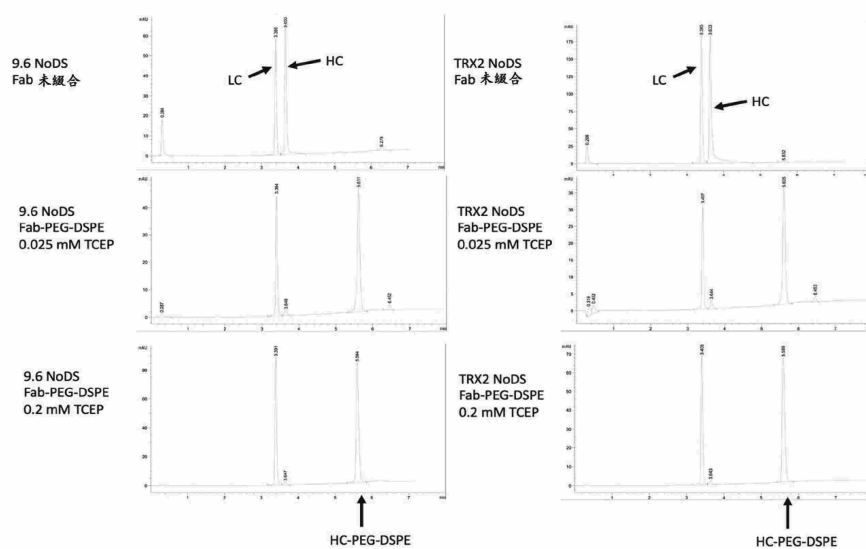


圖 66D

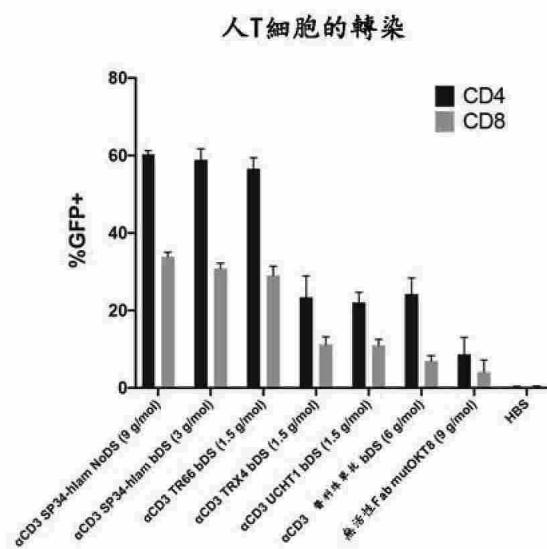


圖 67A

## 人T細胞的轉染

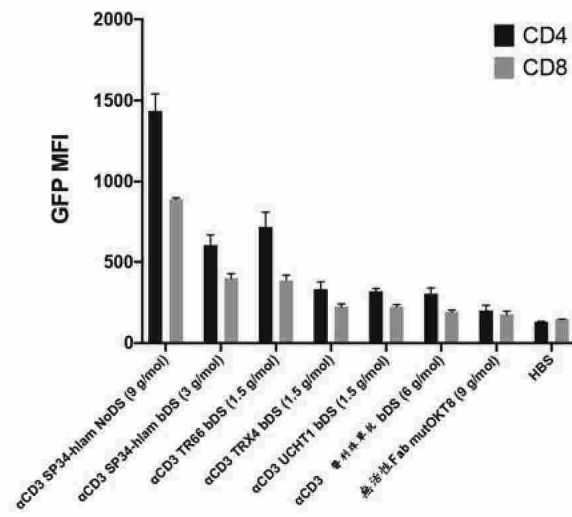


圖 67B

## 人T細胞的細胞因子分泌

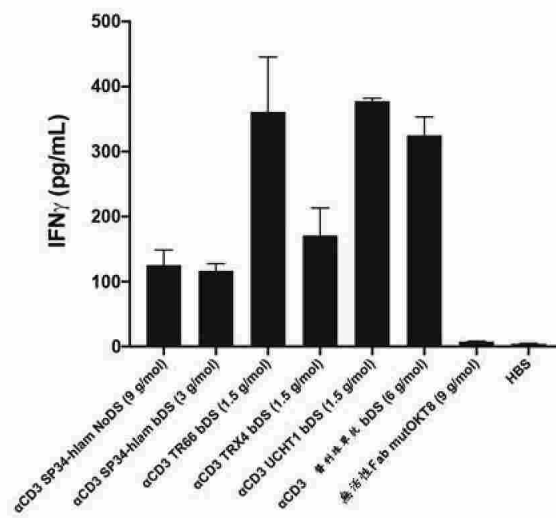


圖 67C

## 人CD8 T細胞的轉染

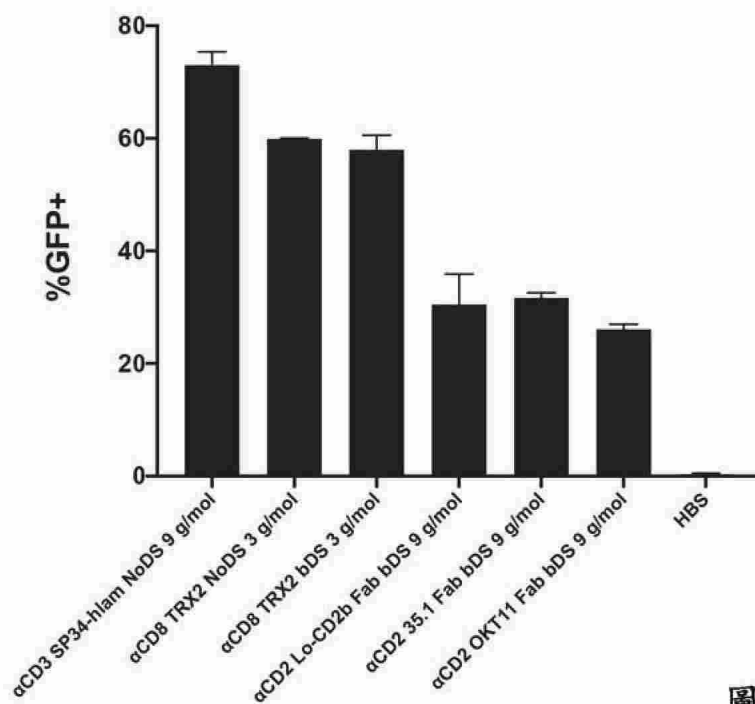


圖68A

## 人CD8 T細胞的轉染

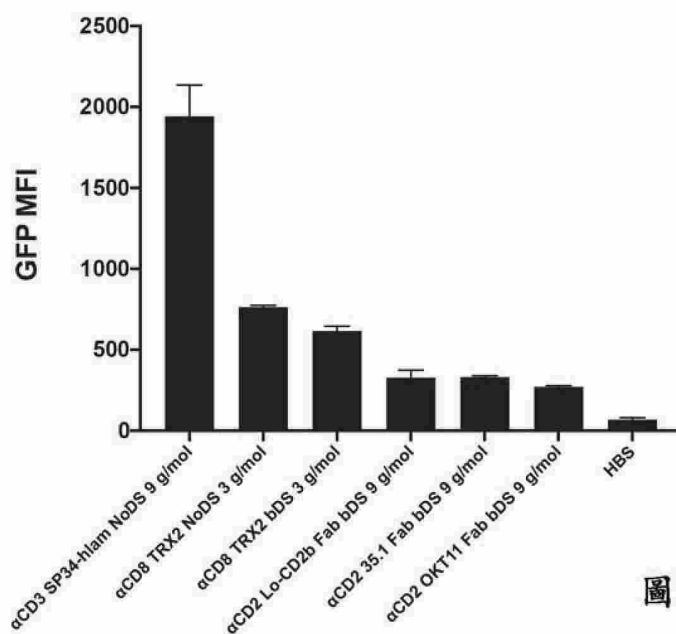


圖68B

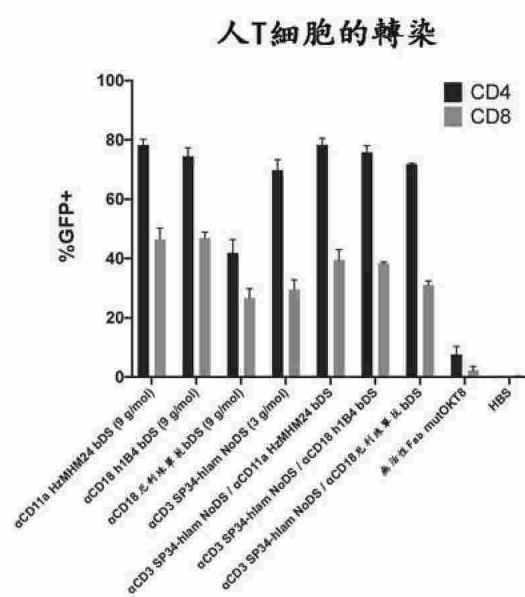


圖 69A

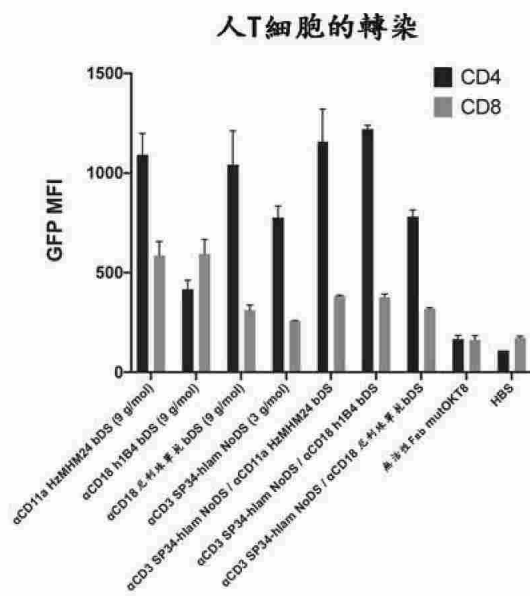


圖 69B

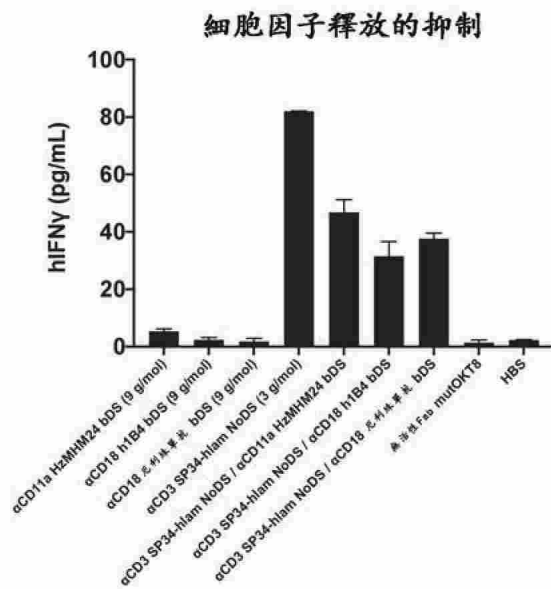


圖 69C

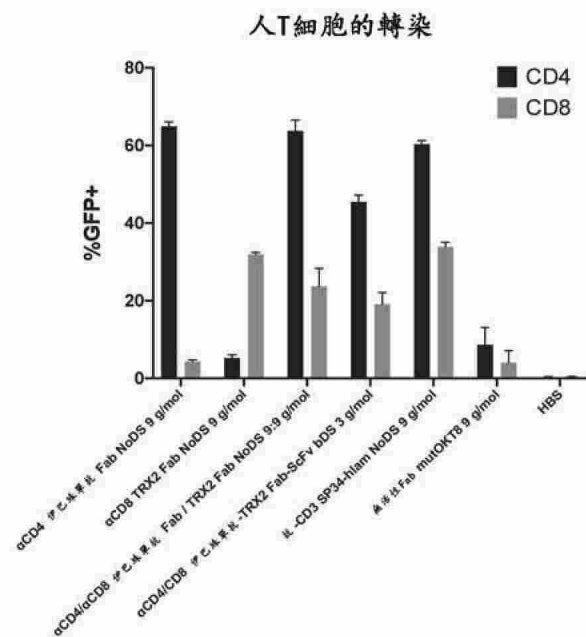


圖 70A

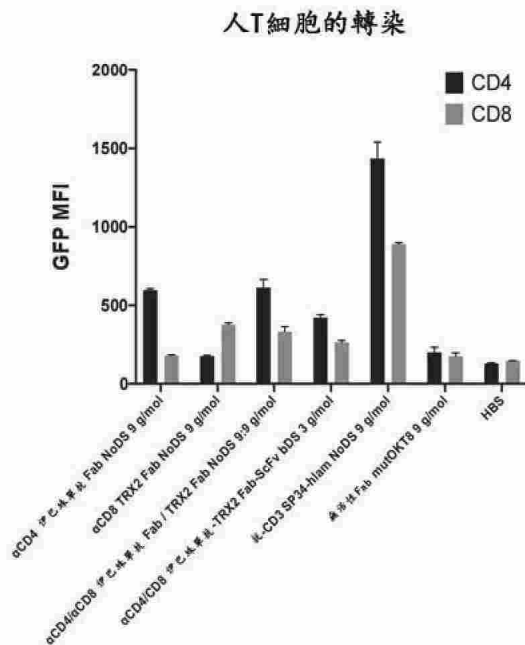


圖 70B

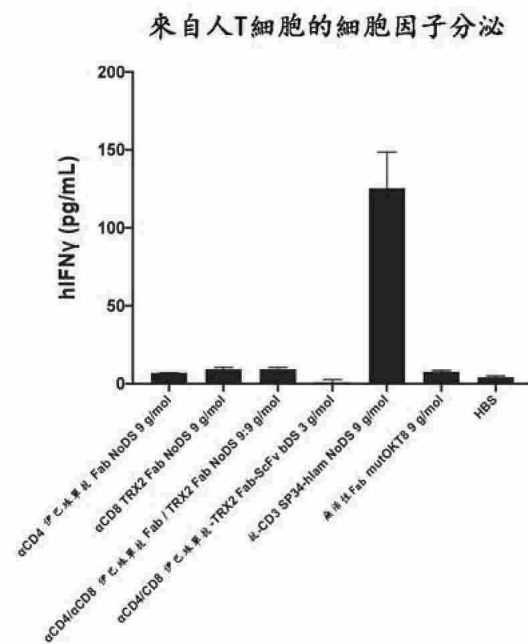


圖70C

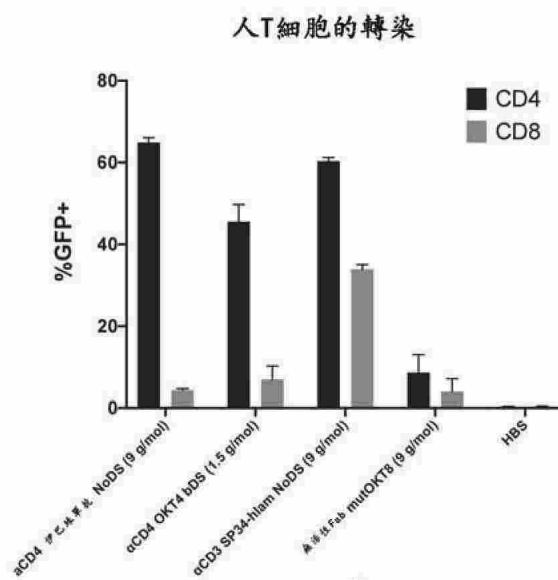


圖71A

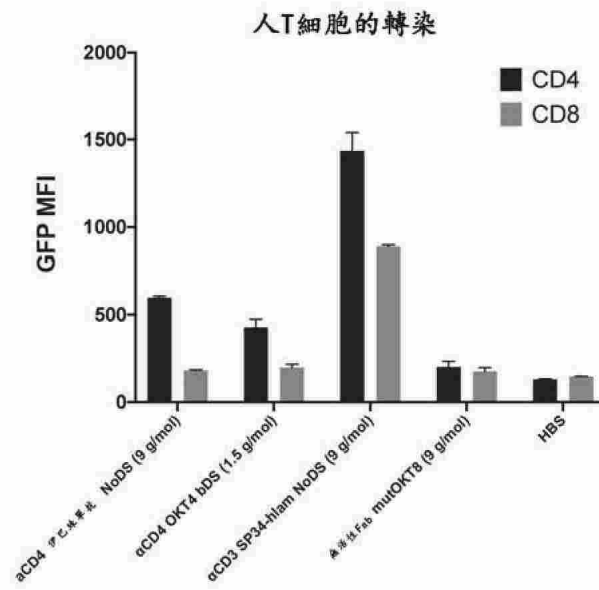


圖71B

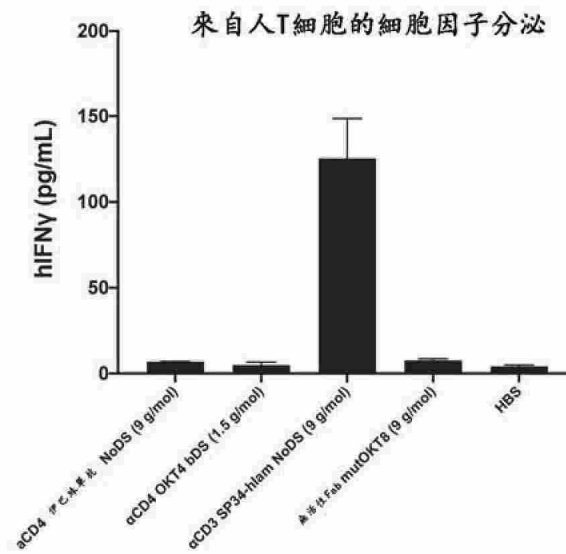
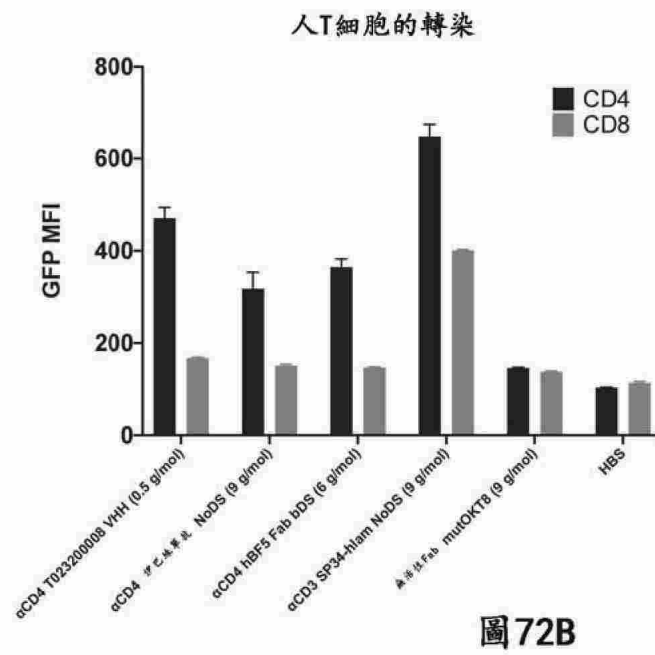
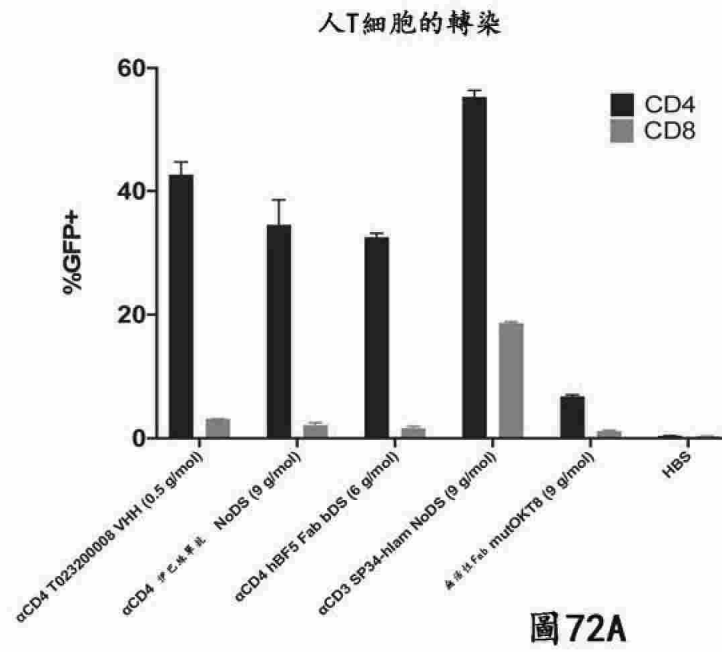


圖71C



(148)

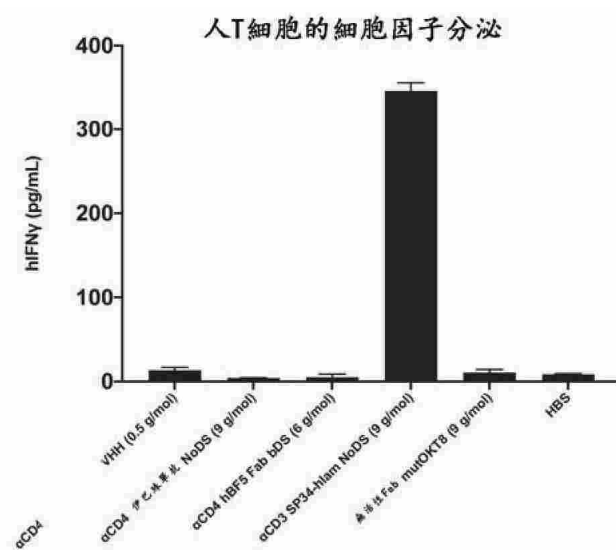


圖72C

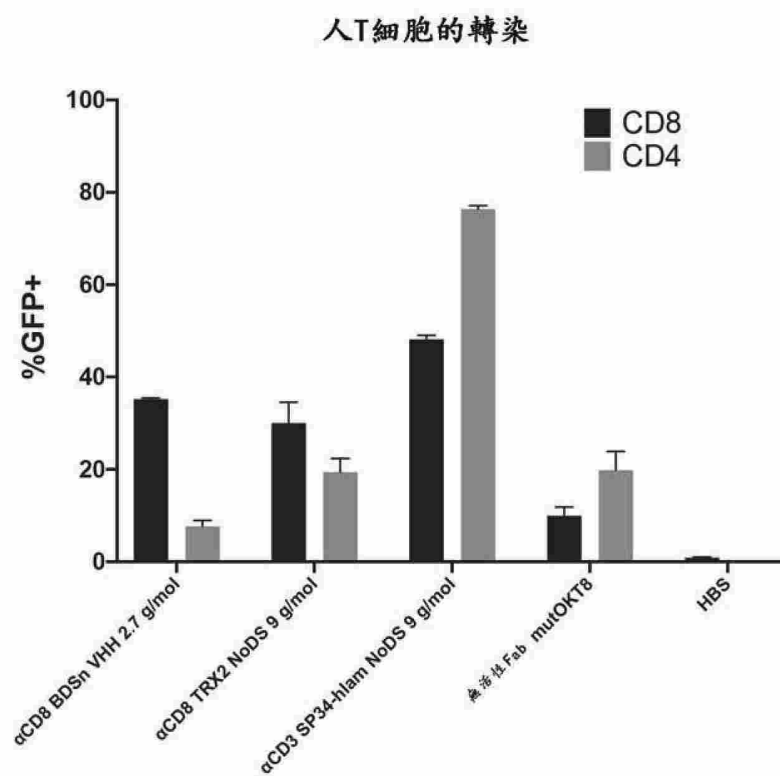


圖73A

人T細胞的轉染

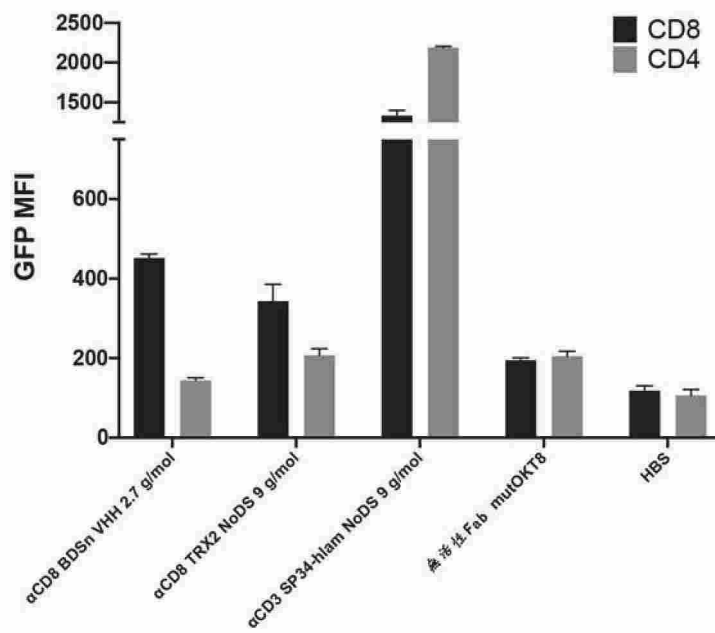


圖 73B

來自人T細胞的細胞因子分泌

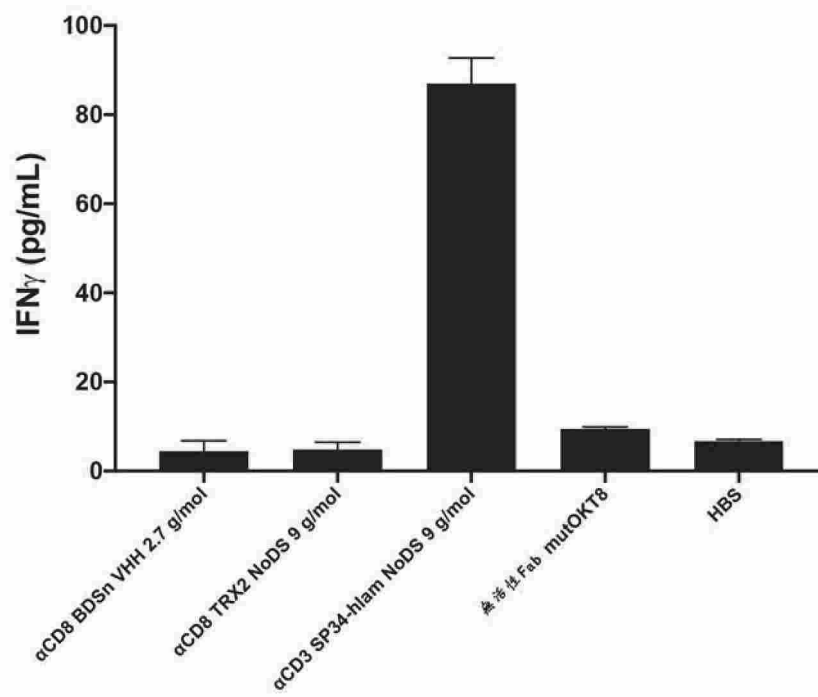


圖73C

人T細胞的轉染

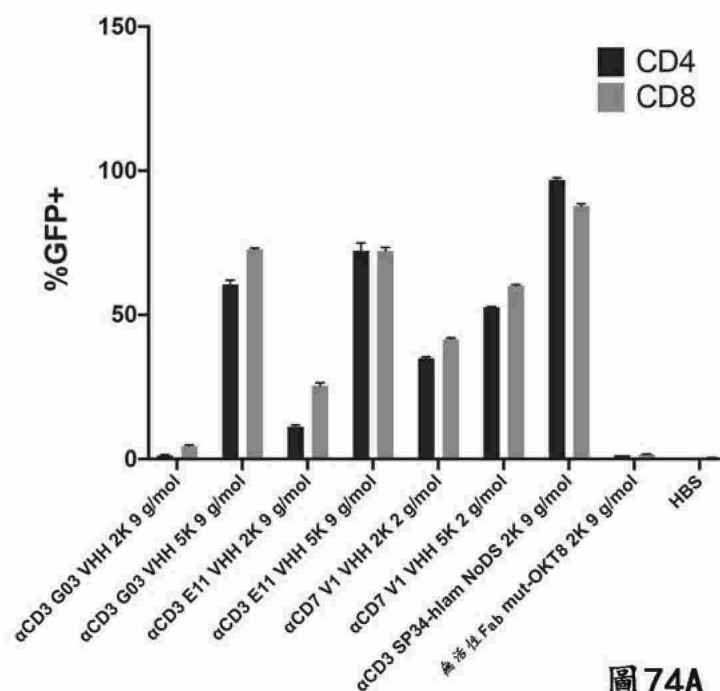


圖74A

人T細胞的轉染

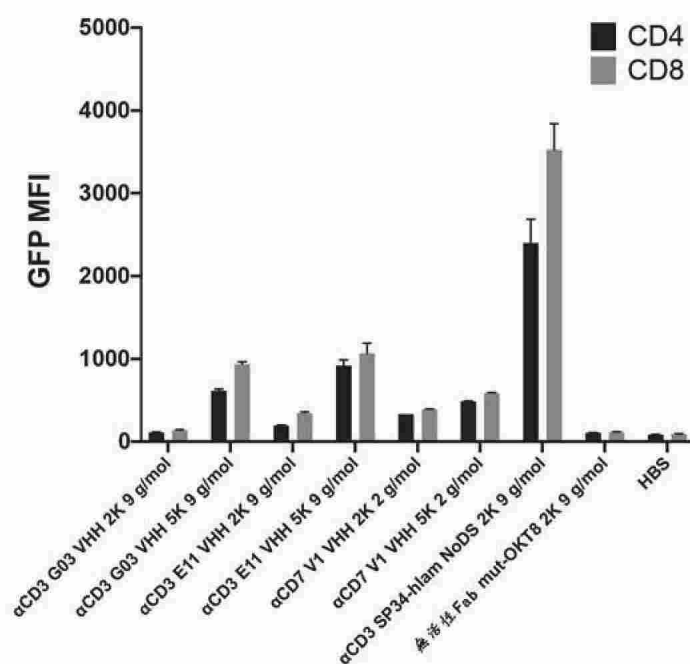


圖74B

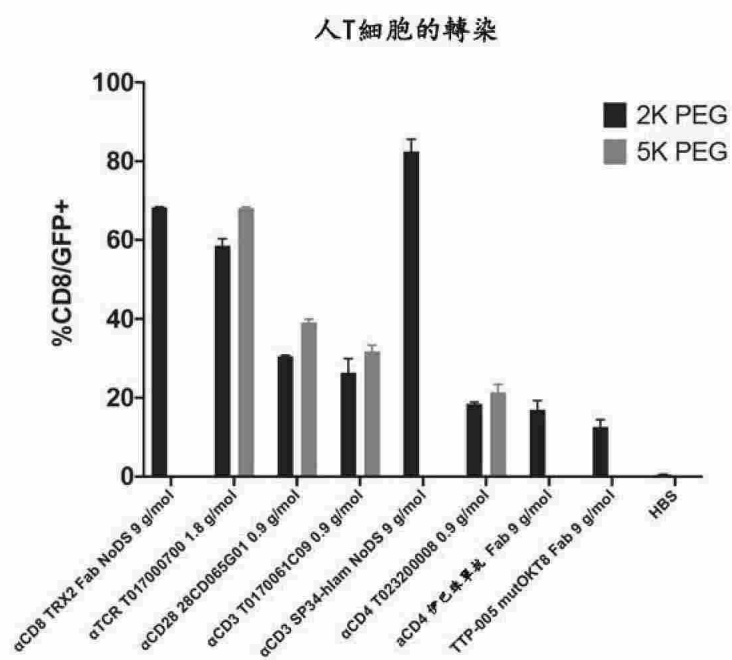


圖 75A

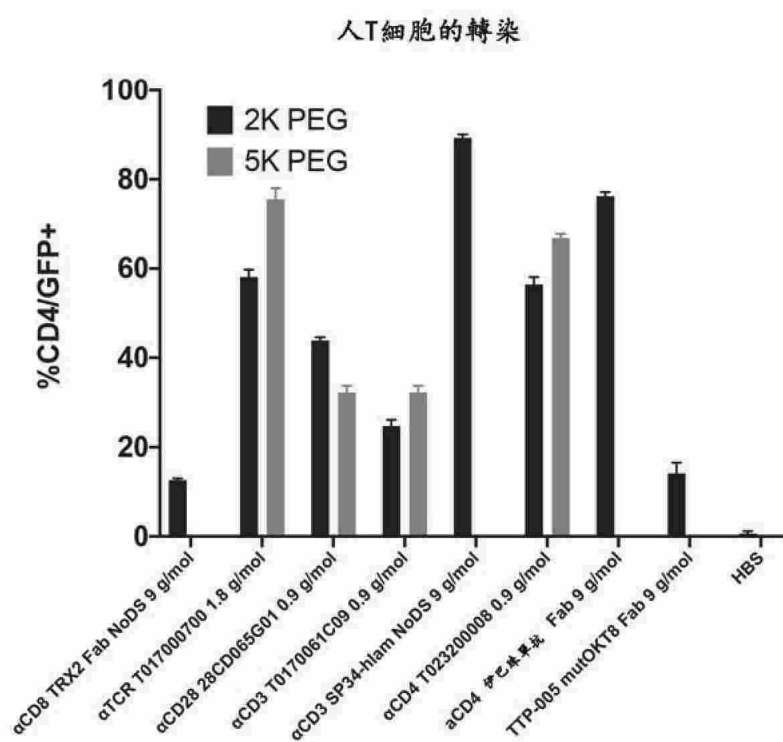


圖 75B

## 人T細胞的轉染

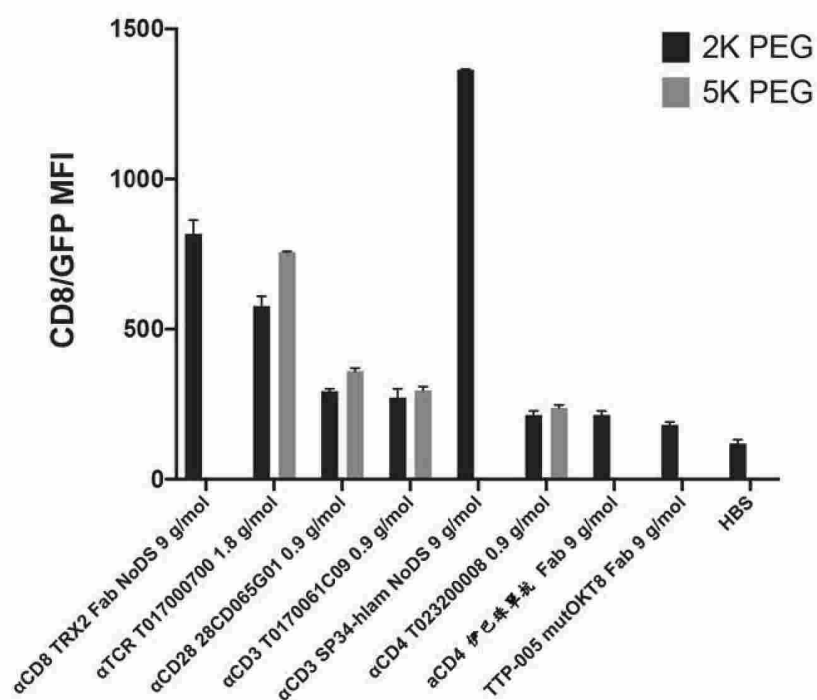


圖 75C

## 人T細胞的轉染

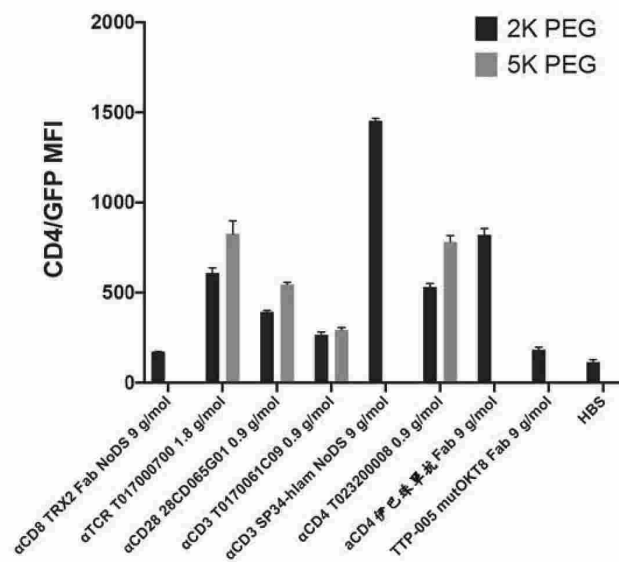


圖 75D

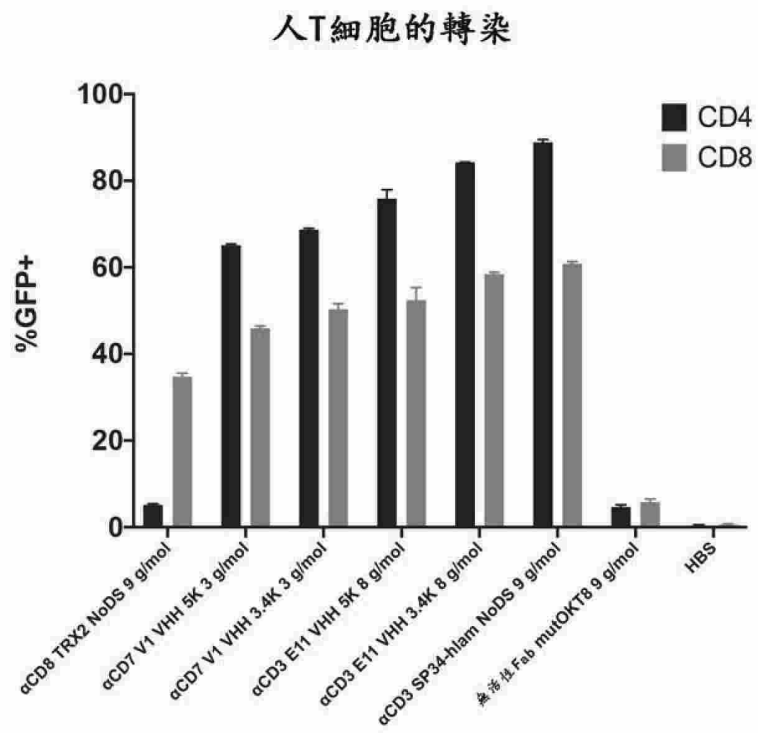


圖 76A

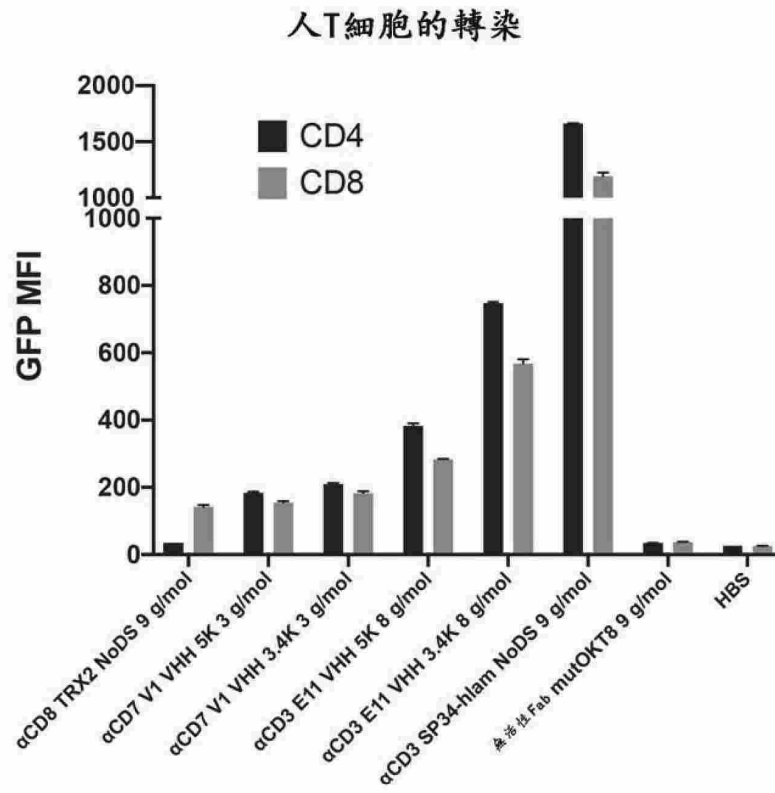


圖 76B

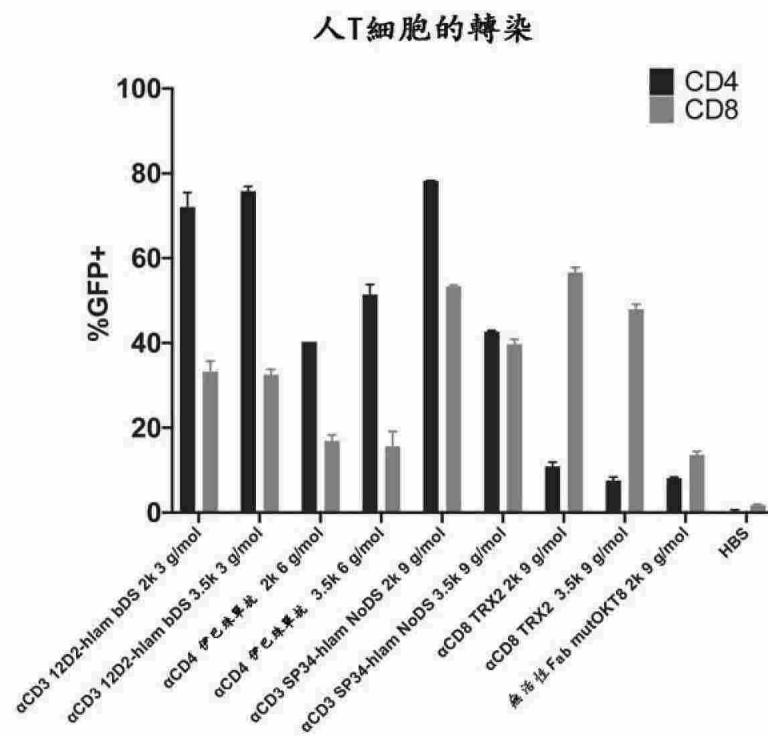


圖77A

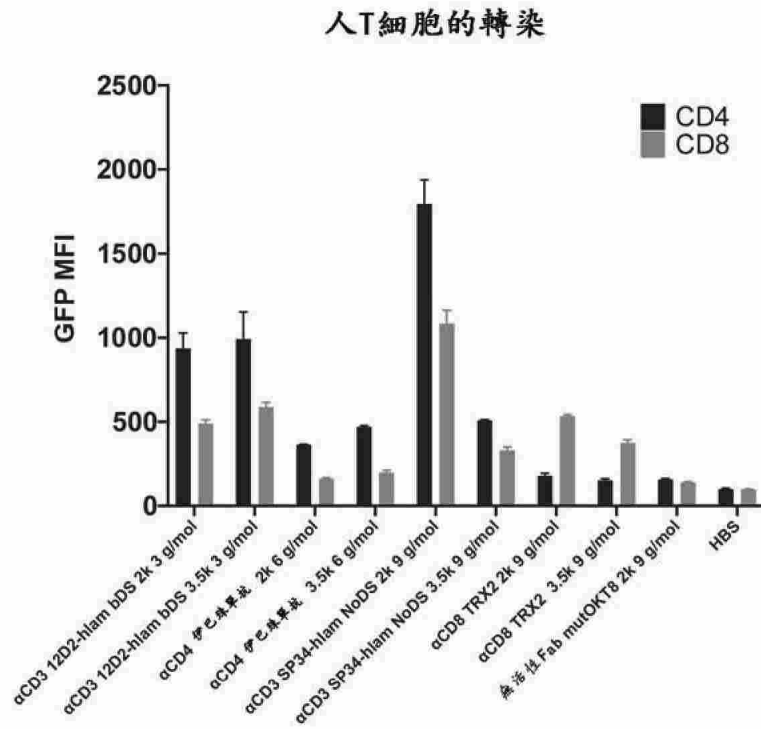


圖77B

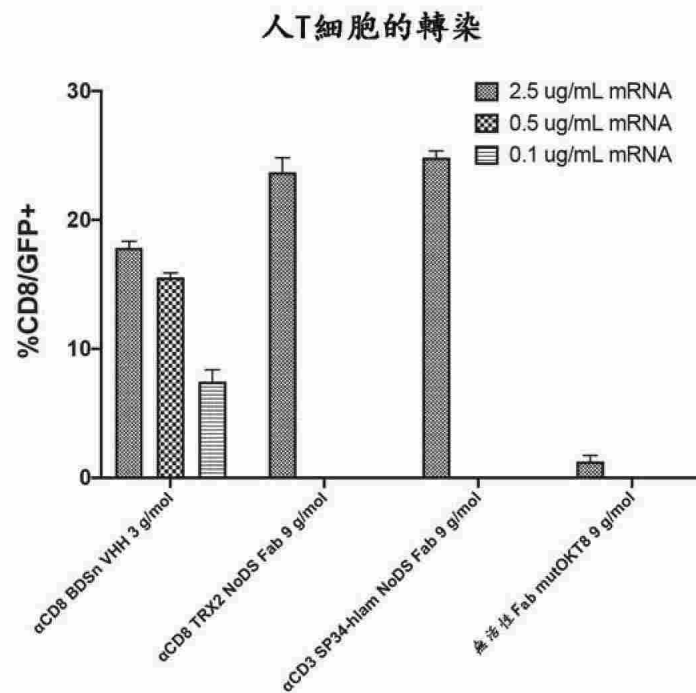


圖78A

## 人T細胞的轉染

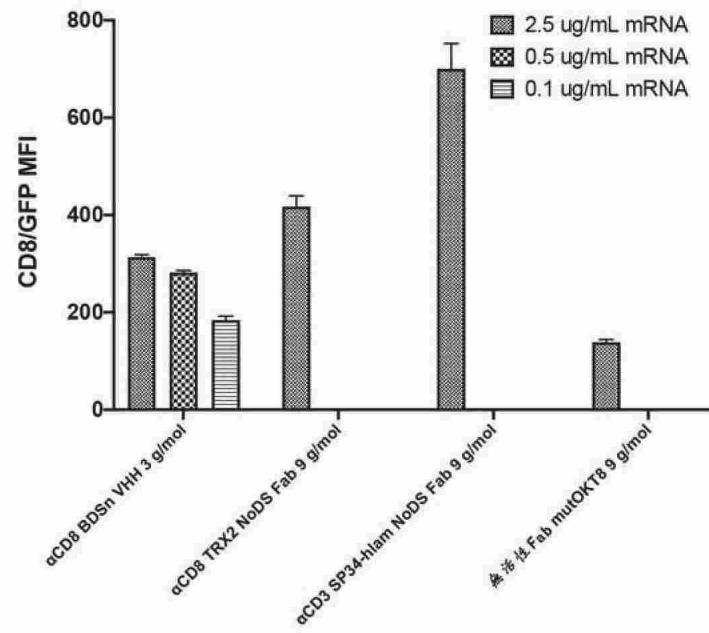


圖78B

## 人T細胞的轉染

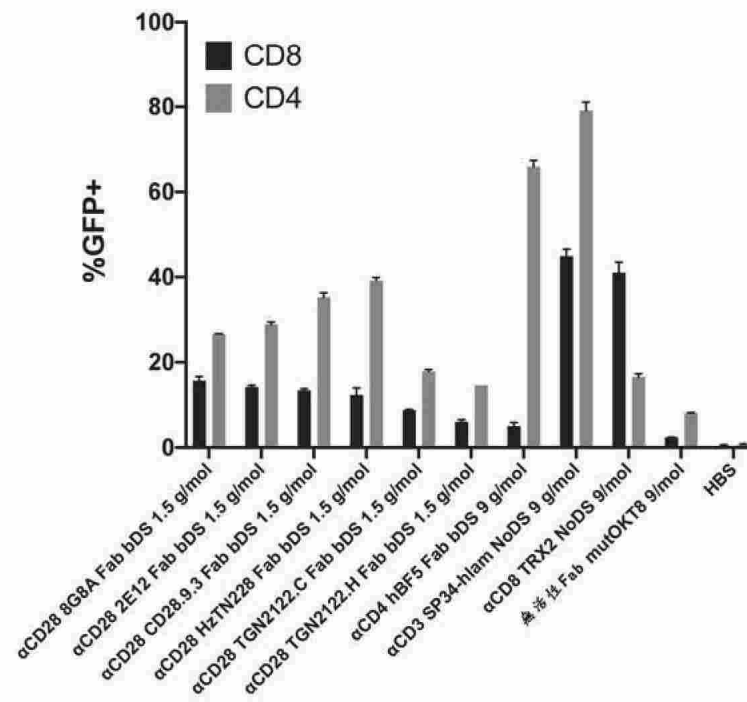


圖79A

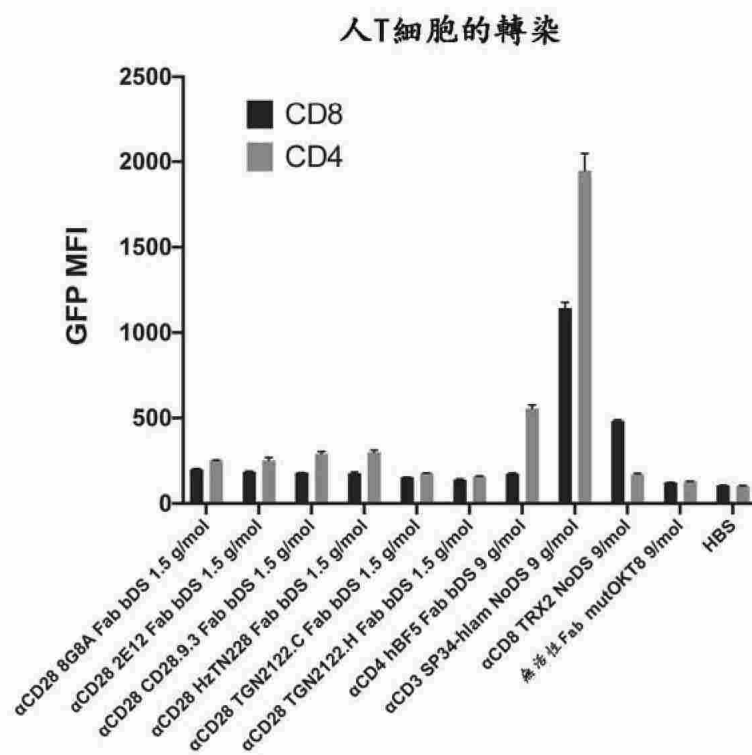


圖 79B

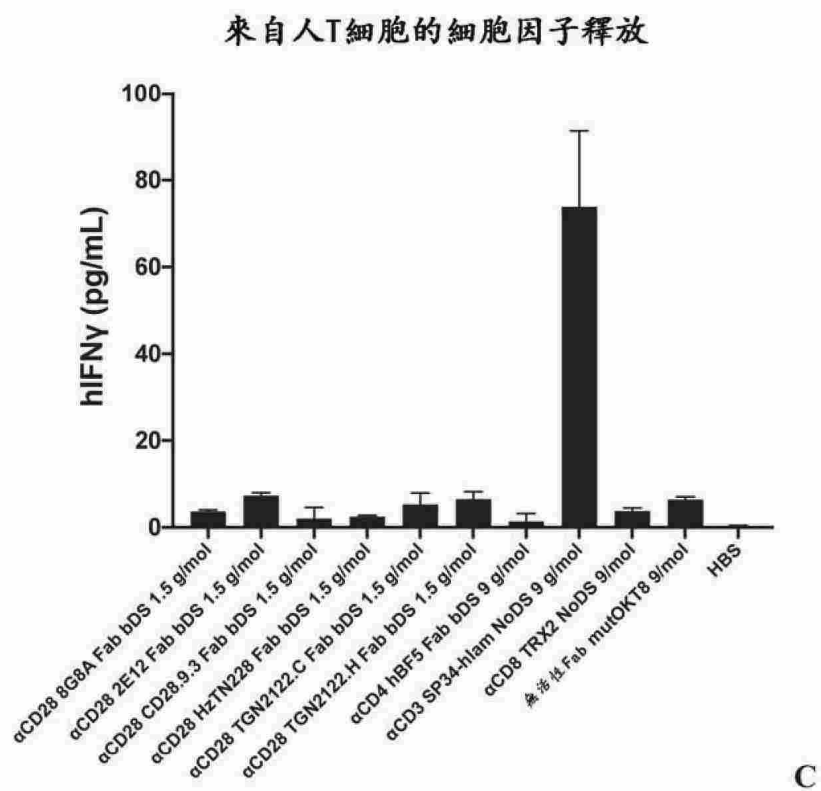


圖79C

## 人T細胞的轉染

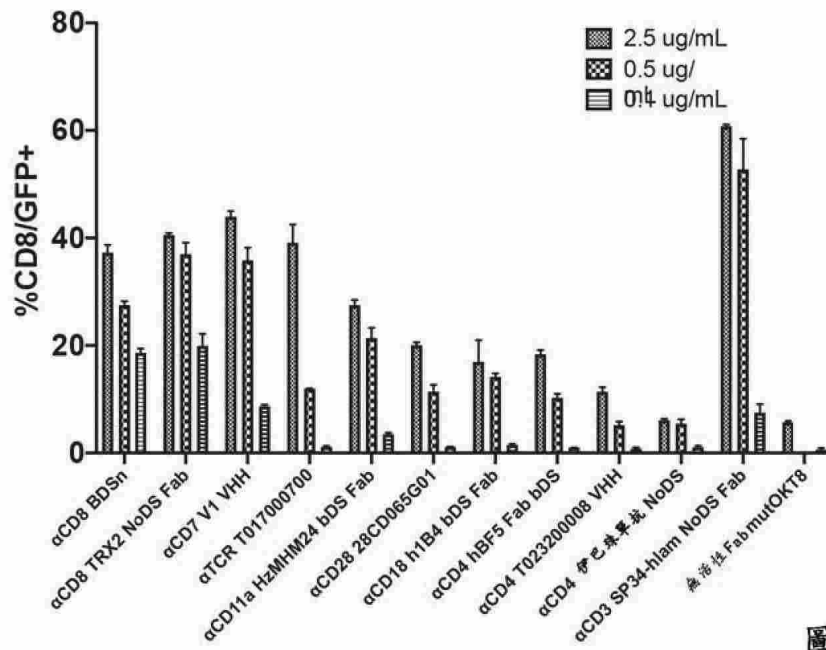


圖 80A

## 人T細胞的轉染

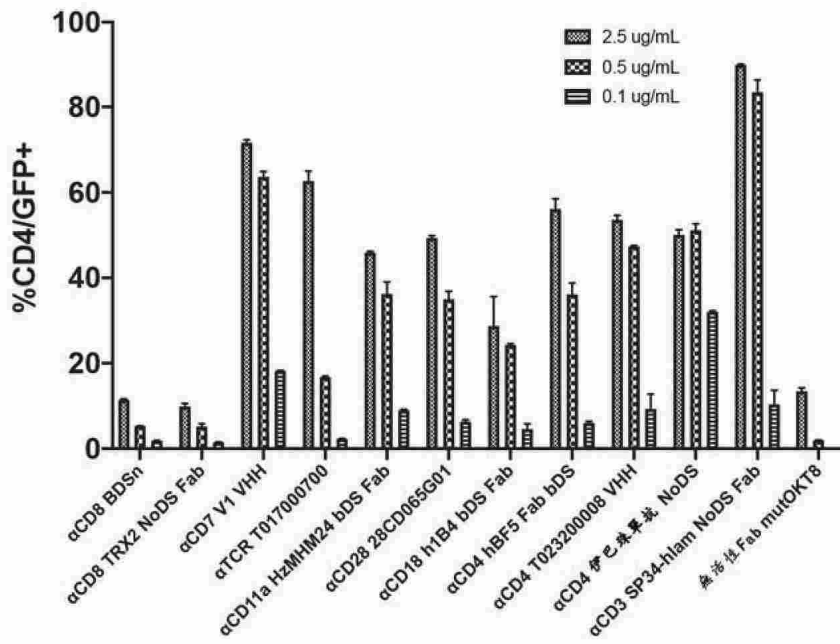


圖 80B

## 人T細胞的轉染

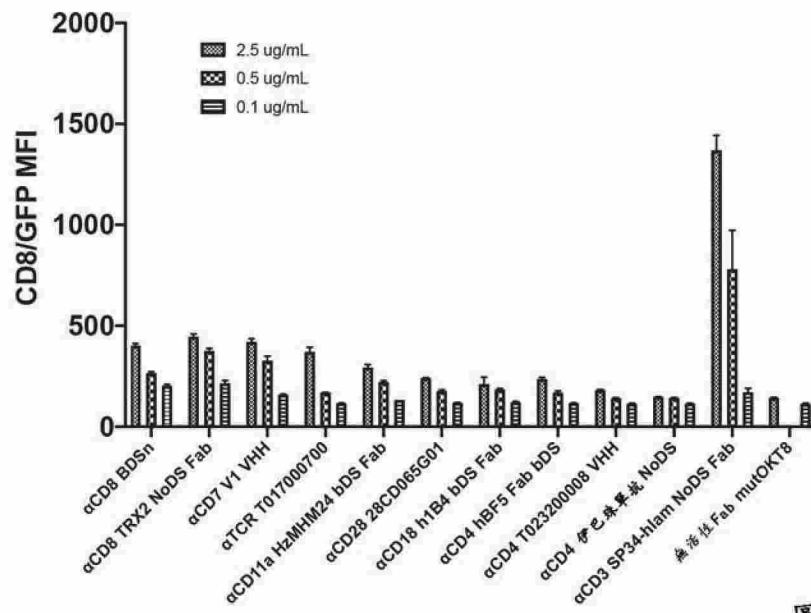


圖 80C

## 人T細胞的轉染

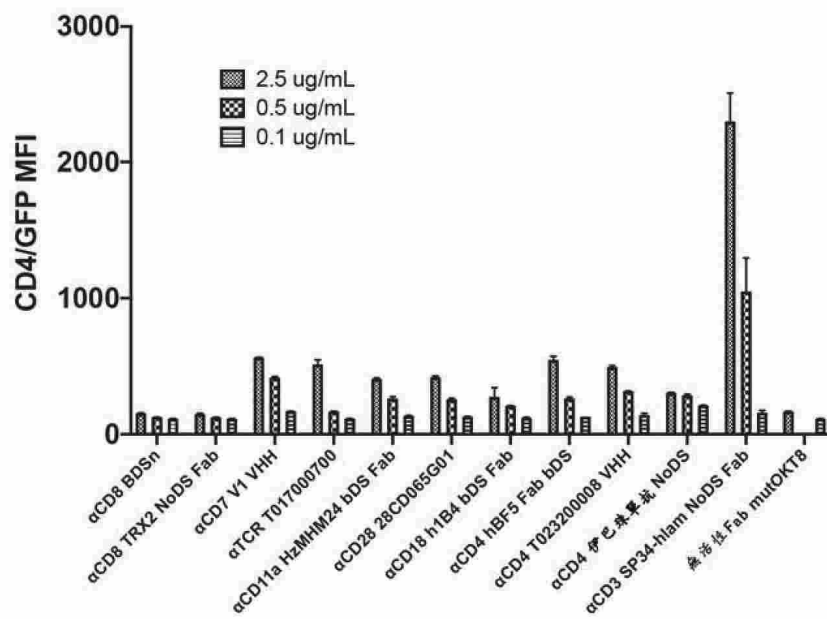


圖 80D

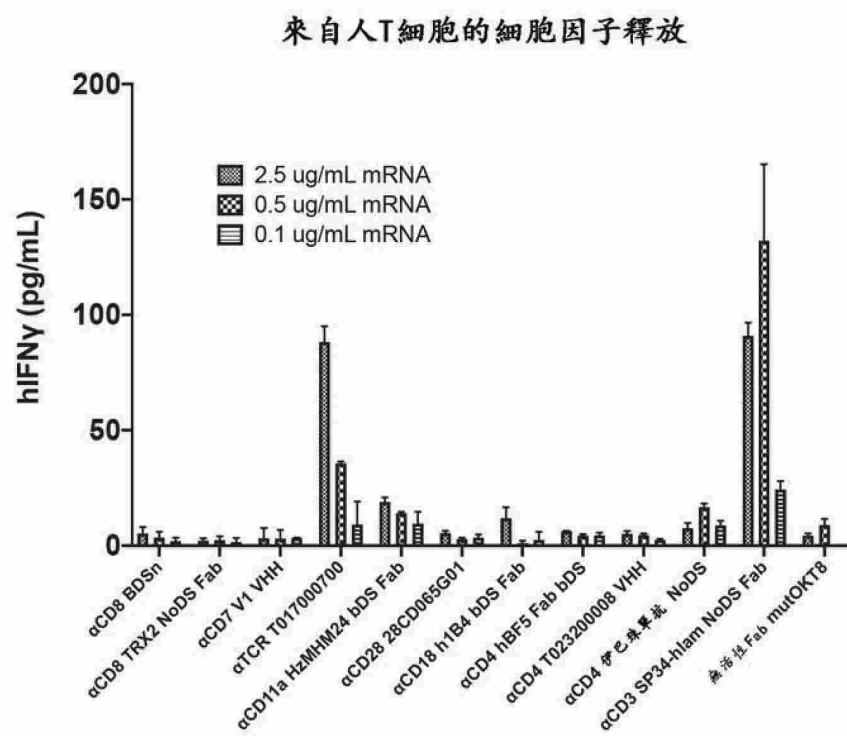


圖 80E

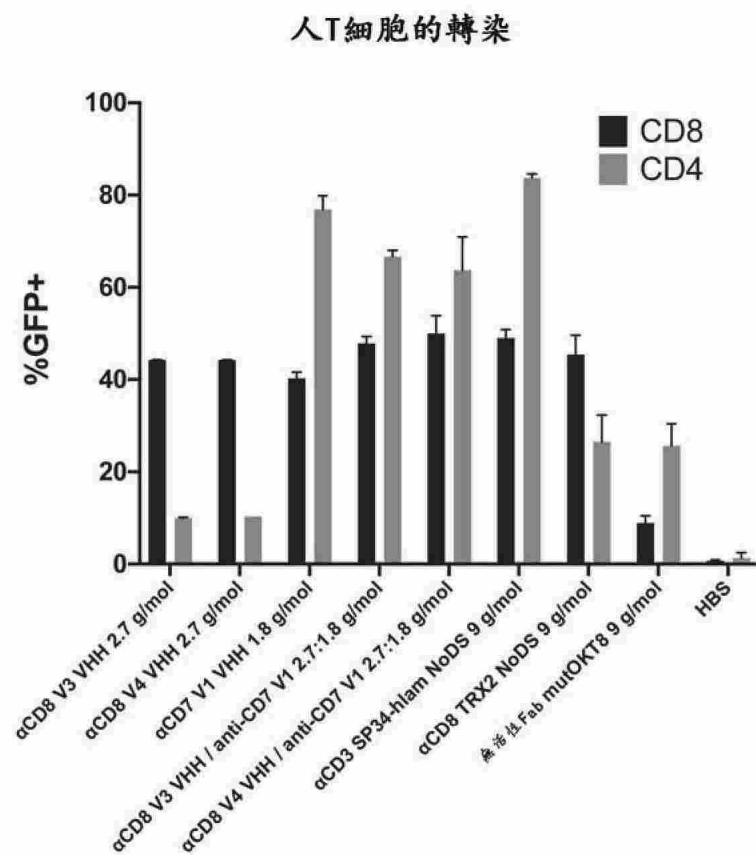


圖81A

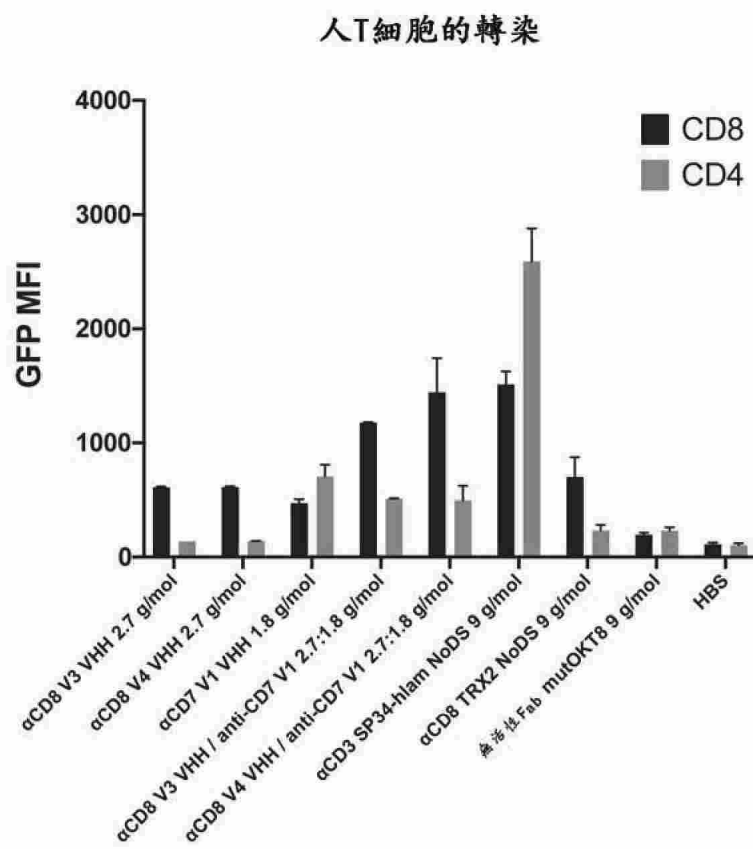


圖81B

## 來自人T細胞的細胞因子釋放

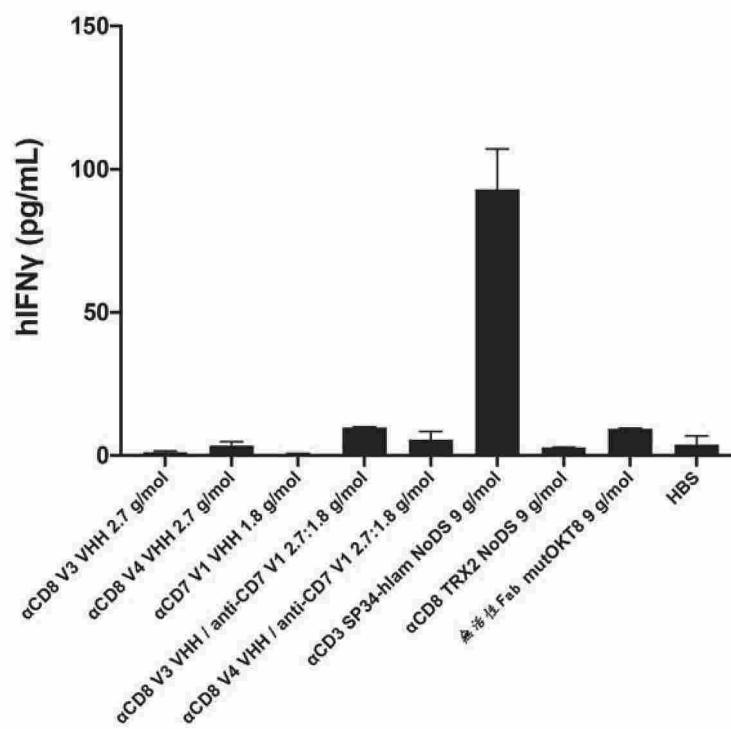


圖81C

## 人T細胞的轉染

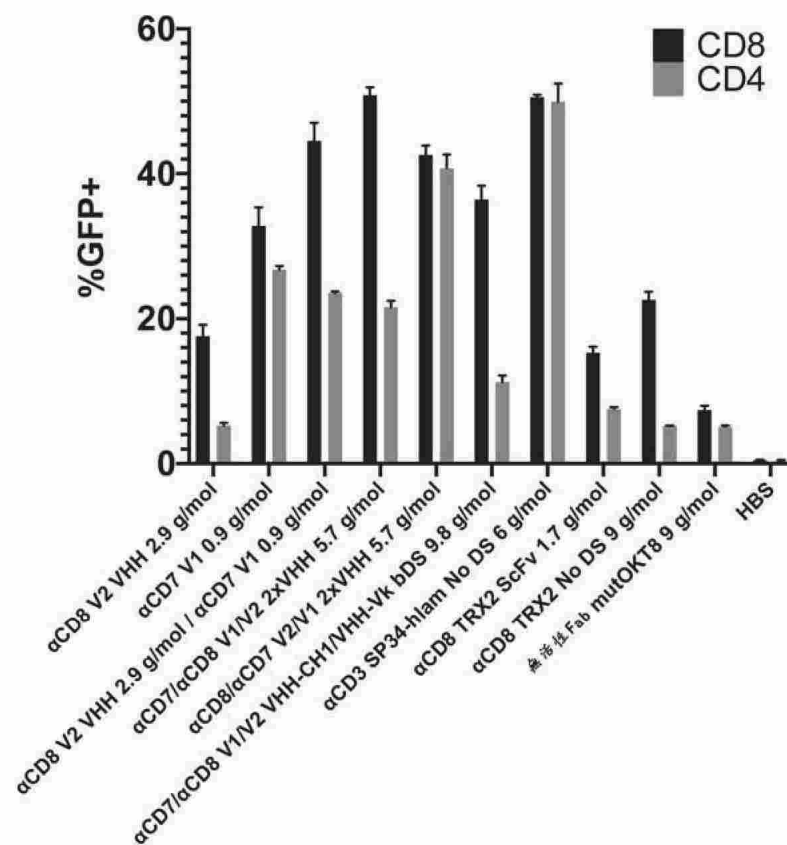


圖 82A

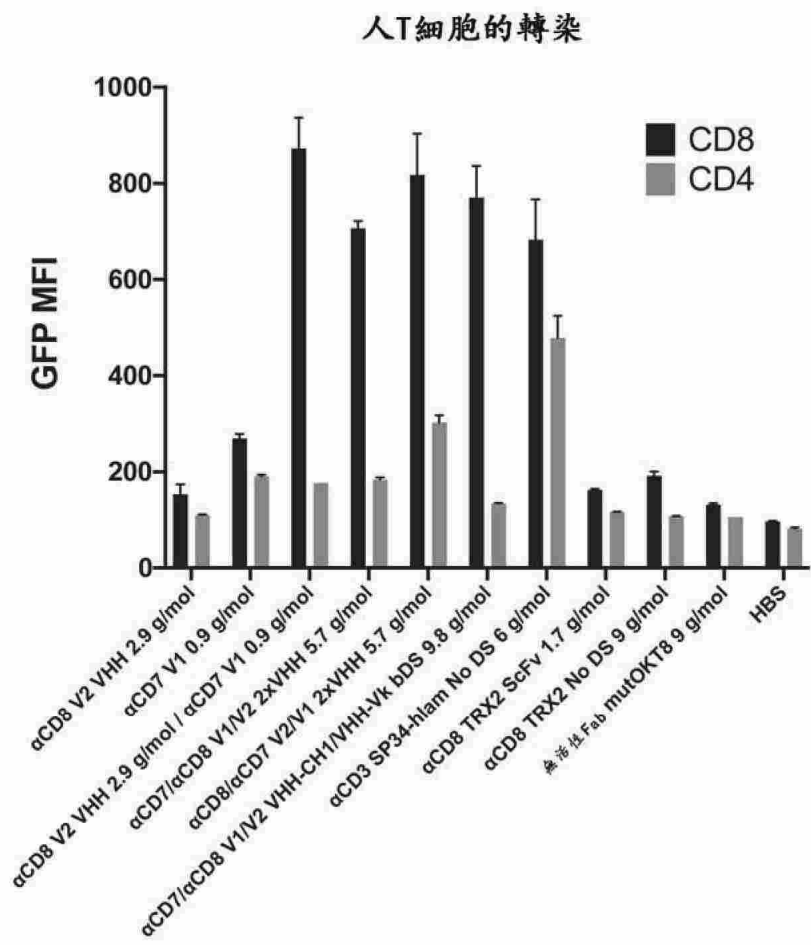
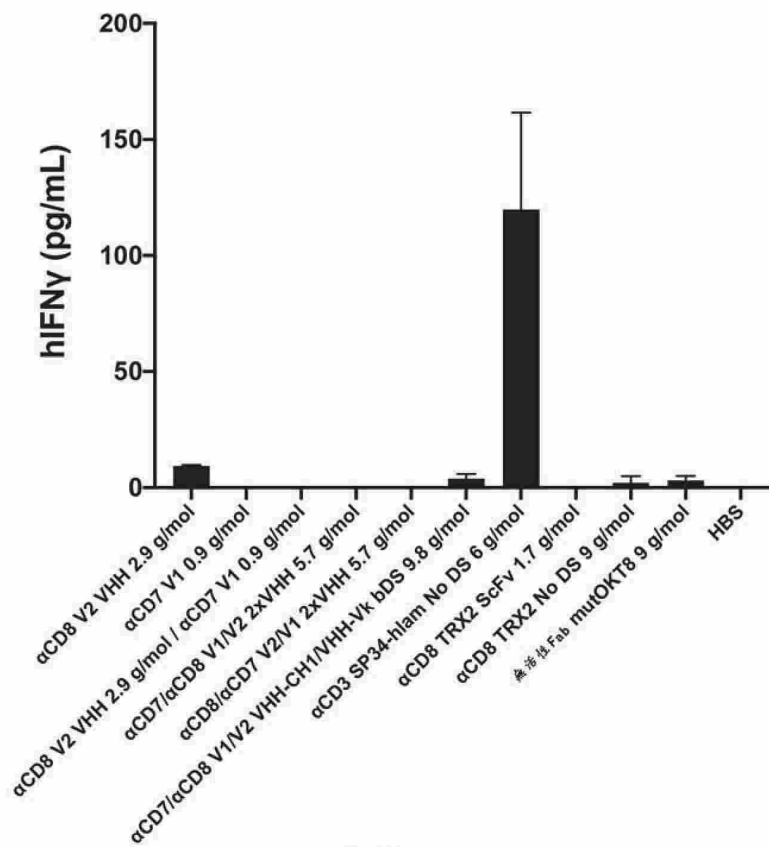


圖 82B

## 來自人T細胞的細胞因子釋放



82C

C

親本LNP和插入抗體的LNP尺寸  
EXP21003810

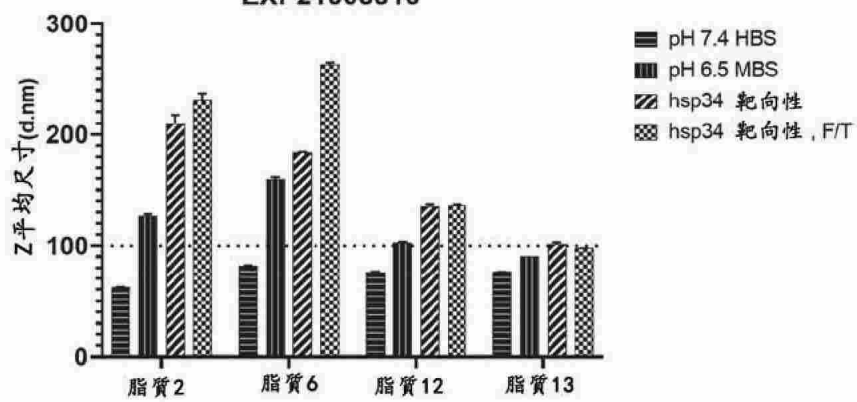


圖 83A

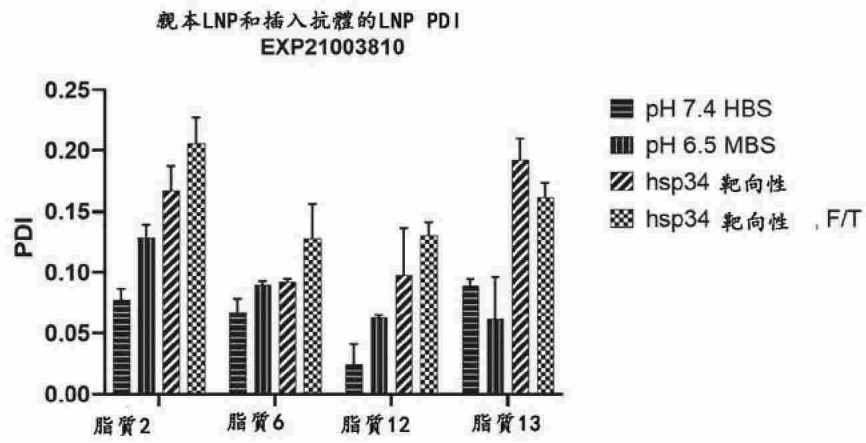


圖83B

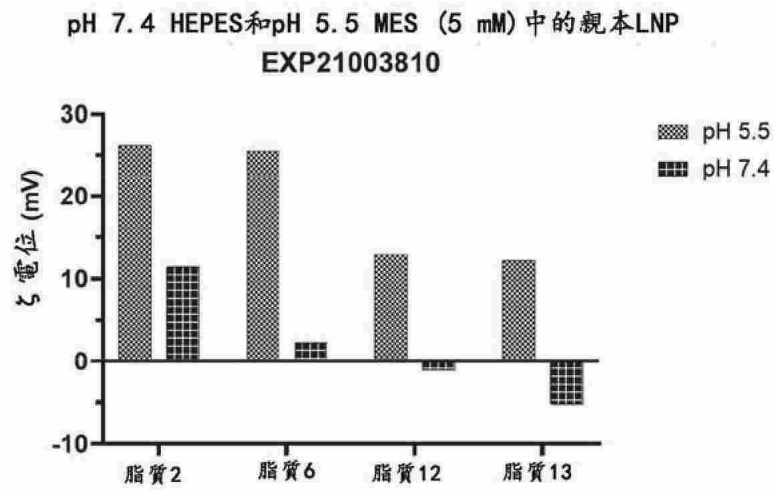


圖83C

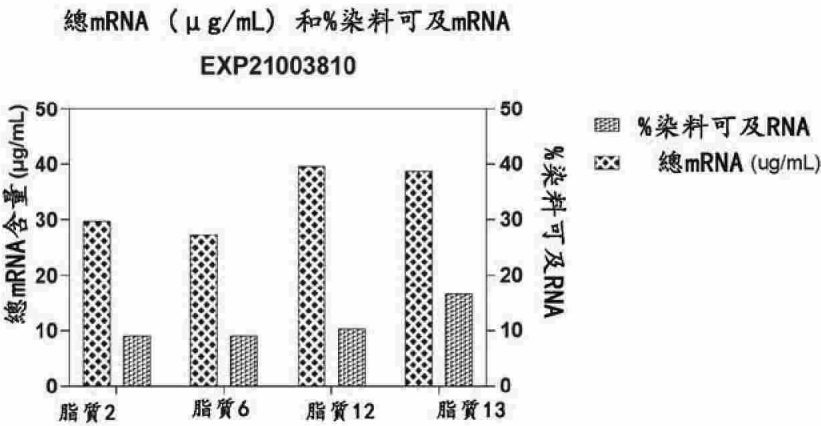


圖83D

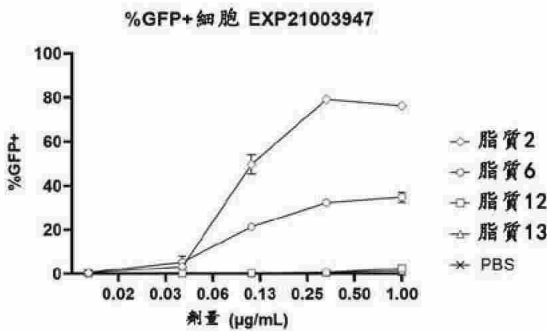


圖84A

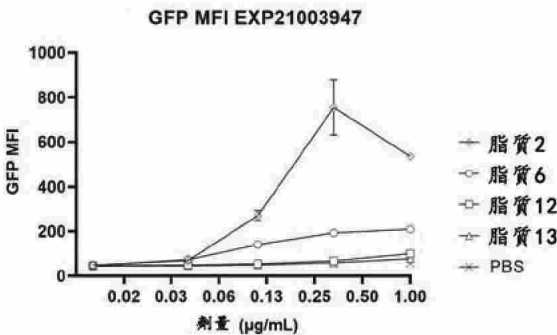


圖84B

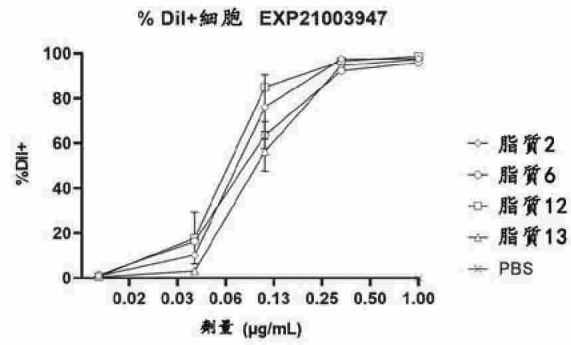


圖84C

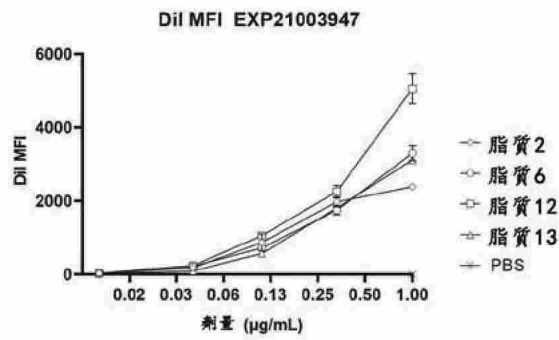


圖84D

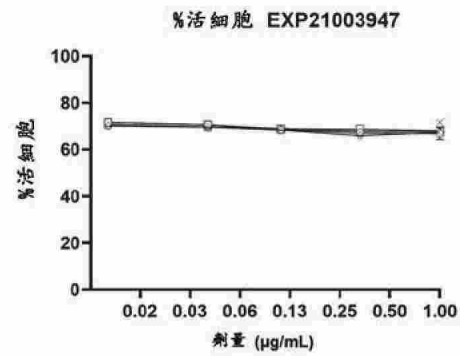


圖84E

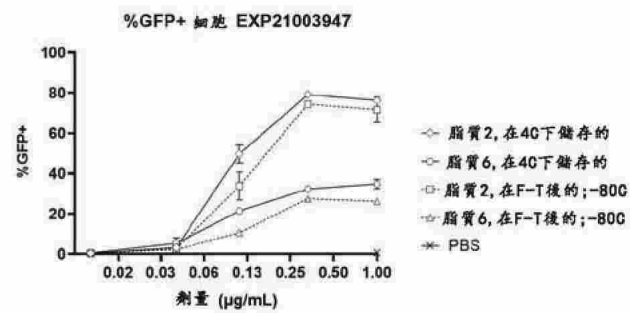


圖85A

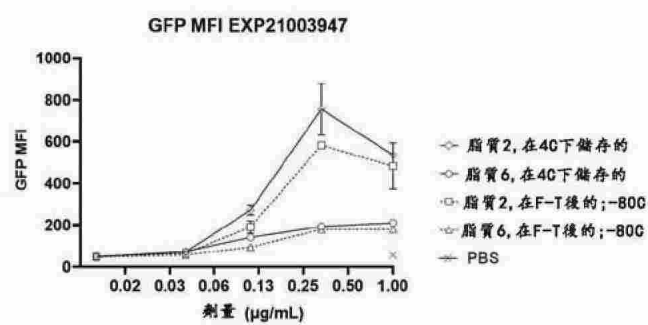


圖 85B

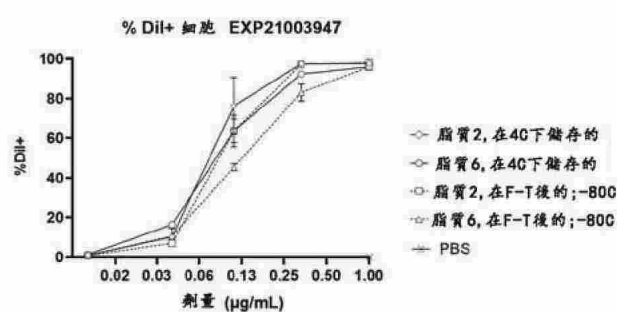


圖 85C

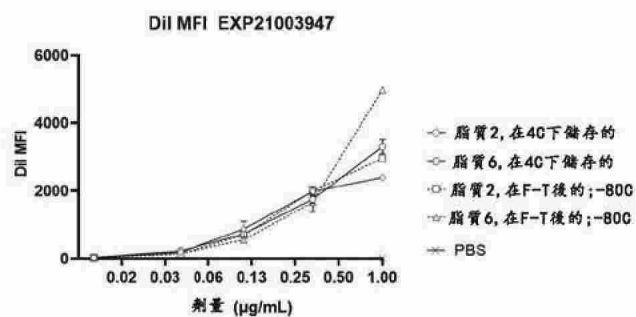


圖 85D

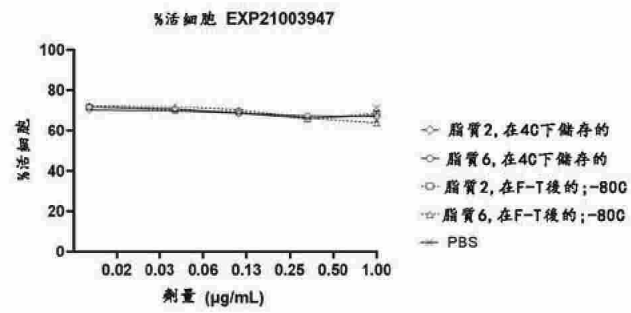


圖85E