

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年9月19日(19.09.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/190865 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 47/36 (2006.01) A61K 47/24 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) A61K 47/28 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01) A61K 47/34 (2017.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7084 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) A61P 37/06 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/009979

(22) 国際出願日: 2024年3月14日(14.03.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-040536 2023年3月15日(15.03.2023) JP

(71) 出願人: ユナイテッド・イミュニティ株式会社(UNITED IMMUNITY, CO., LTD.) [JP/JP];

〒1030022 東京都中央区日本橋室町一丁目12番3号 Tokyo (JP).

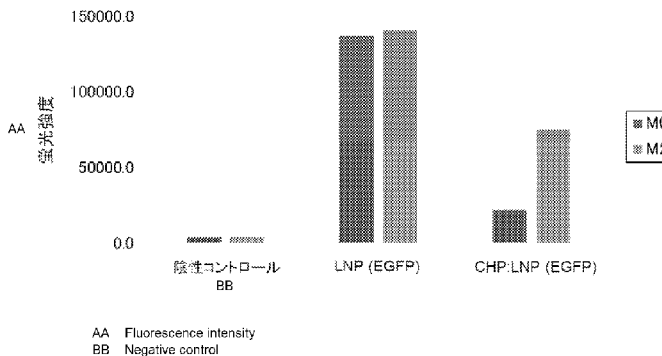
(72) 発明者: 原田 直純 (HARADA, Naozumi);
〒1030022 東京都中央区日本橋室町一丁目12番3号 ユナイテッド・イミュニティ株式会社内 Tokyo (JP). 井上 義(INOUE, Tadashi);
〒1030022 東京都中央区日本橋室町一丁目12番3号 ユナイテッド・イミュニティ株式会社内 Tokyo (JP). 曾我 孝利(SOGA, Takatoshi);
〒1030022 東京都中央区日本橋室町一丁目12番3号 ユナイテッド・イミュニティ株式会社内 Tokyo (JP). 五十嵐 友香(IGARASHI, Yuka);
〒1030022 東京都中央区日本橋室町一丁目12番3号 ユナイテッド・イミュニティ株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル Osaka (JP).

(54) Title: LIPID PARTICLE

(54) 発明の名称: 脂質粒子

[図1]



(57) **Abstract:** To provide lipid particles that can be produced without relying on PEG-modified lipids, that are superior in medicinal effect, safety, or stability to lipid particles that rely on PEG-modified lipids, or that have different immunodynamics than lipid particles that rely on PEG-modified lipids. Provided is a lipid particle, wherein the lipid particle contains an ionized lipid, a phospholipid, and a sterol as lipids constituting the lipid particle and contains a modified polysaccharide that includes a hydrophobic group.

(57) 要約: PEG修飾脂質に依拠せずに製造可能であり、又は、PEG修飾脂質に依拠した脂質粒子よりも薬効、安全性、又は安定性に優れ、若しくはPEG修飾脂質に依拠した脂質粒子とは免疫動態が異なる脂質粒子を提供すること。脂質粒子であって、脂質粒子構成脂質としてイオン化脂質、リン脂質、及びステロールを含有し、且つ疎水性基を含む修飾多糖類を含有する、脂質粒子。

[続葉有]

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：脂質粒子

技術分野

[0001] 本発明は、脂質粒子等に関する。

背景技術

[0002] 脂質ナノ粒子（LNP：Lipid Nano Particle）は、種々の薬剤を内包することが可能であり、ドラッグデリバリー担体として用いられている。近年のCOVID-19の流行に伴い、LNPを利用した感染症予防用ワクチンが広く利用されるに至っている。

[0003] 現在ワクチンに利用されているLNPにおいては、粒子の凝集を阻害するためにポリエチレングリコール（PEG）修飾脂質が含まれている（特許文献1）。PEG修飾脂質を使用しない場合はLNPを得ることができないのが現状である。しかしながら、PEGはアレルギー性を有しており、また日常的に又は医療目的で使用される各種製品に含まれているため接触頻度が高いので、PEGに起因するアナフィラキシー反応の懸念がある。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許第8058069号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、PEG修飾脂質に依拠せずに製造可能であり、又は、PEG修飾脂質に依拠した脂質粒子よりも薬効、安全性、又は安定性に優れ、若しくはPEG修飾脂質に依拠した脂質粒子とは免疫動態が異なる脂質粒子を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は上記課題に鑑み得て鋭意研究を進めた結果、驚くべきことに、脂質粒子であって、脂質粒子構成脂質としてイオン化脂質、リン脂質、及び

ステロールを含有し、且つ疎水性基を含む修飾多糖類を含有する、脂質粒子、であれば、上記課題を解決できることを見出した。本発明者はこの知見に基づいてさらに研究を進めた結果、本発明を完成させた。即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

[0007] 項 1. 脂質粒子であって、脂質粒子構成脂質としてイオン化脂質、リン脂質、及びステロールを含有し、且つ疎水性基を含む修飾多糖類を含有する、脂質粒子。

[0008] 項 2. 前記イオン化脂質の含有量が、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して35～70モル%であり、
前記リン脂質の含有量が、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して4～25モル%であり、且つ
前記ステロールの含有量が、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して15～55モル%である、
項 1 に記載の脂質粒子。

[0009] 項 3. 前記修飾多糖類の構成多糖類がプルランを含む、項 1 又は 2 に記載の脂質粒子。

[0010] 項 4. 前記疎水性基がステロール骨格を有する疎水性基を含む、項 1 ～ 3 のいずれかに記載の脂質粒子。

[0011] 項 5. 前記修飾多糖類の重量平均分子量が5000～2,000,000である、項 1 ～ 4 のいずれかに記載の脂質粒子。

[0012] 項 6. 薬剤を含有する、項 1 ～ 5 のいずれかに記載の脂質粒子。

[0013] 項 7. 前記薬剤が核酸である、項 6 に記載の脂質粒子。

[0014] 項 8. 前記核酸が、mRNA、免疫刺激性二本鎖RNA、 siRNA、 miRNA、 リボザイム、 CpGオリゴDNA、 アンチセンスオリゴDNA、 核酸アプタマー、 デゴイ、 遺伝子発現用二本鎖DNA、 及びジヌクレオチドから選択される少なくとも1つである、項 7 に記載の脂質粒子。

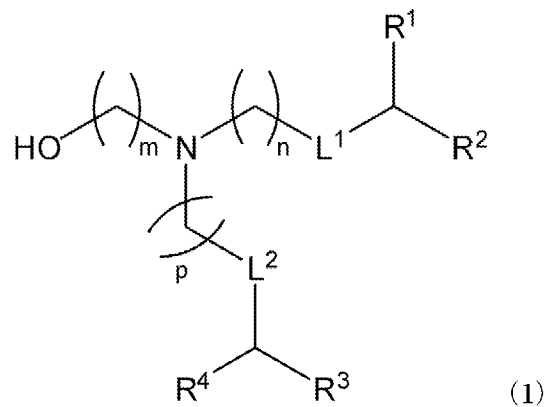
[0015] 項 9. 前記核酸がmRNAまたはCpGオリゴDNAである、項 7 又は 8 に記載の脂質粒子。

[0016] 項 1 0. 前記核酸がmRNAである、項 7～9 のいずれかに記載の脂質粒子。

[0017] 項 1 1. 前記核酸がCpGオリゴDNAである、項 7～9 のいずれかに記載の脂質粒子。

[0018] 項 1 2. 前記イオン化脂質が一般式 (1) :

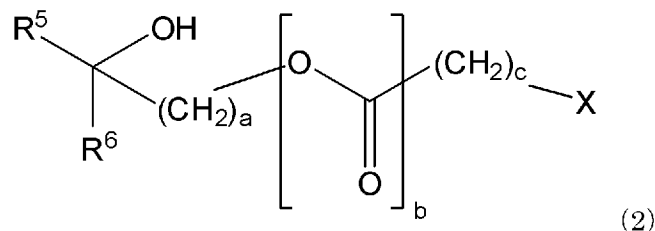
[0019] [化1]



[0020] [式中：R¹はアルキル基を示す。R²はアルキル基を示す。R³はアルキル基を示す。R⁴はアルキル基又は水素原子を示す。L¹は-O-C(=O)-又は-C(=O)-O-を示す。L²は-O-C(=O)-又は-C(=O)-O-を示す。mは1～8の整数を示す。nは3～10の整数を示す。pは3～10の整数を示す。]

であらわされるアミノ脂質、一般式 (2) :

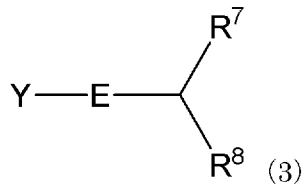
[0021] [化2]



[0022] [式中：aは3～5の整数を示す。bは0又は1を示す。cは0～4の整数を示す。R⁵及びR⁶は同一又は異なって、アルキル基又はアルケニル基を示す。Xは置換されていてもよい非芳香族窒素含有ヘテロ環基又は置換されていてもよいアミノ基を示す。]

で表されるアミノ脂質、及び一般式 (3)

[0023] [化3]



[0024] [式中：R⁷及びR⁸は同一又は異なって、アルキル基又はアルケニル基を示す。Yは置換されていてもよい非芳香族窒素含有ヘテロ環基又は置換されていてもよいアミノ基を示す。Eはリンカーを示す。]

で表されるアミノ脂質からなる群より選択される少なくとも1種である、項1～11のいずれかに記載の脂質粒子。

[0025] 項13. さらに、粒子の凝集を阻害する複合化脂質を含む項1に記載の粒子。

[0026] 項14. 前記複合化脂質の含有量が、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して0～2モル%である、項1～13のいずれかに記載の脂質粒子。

[0027] 項15. 前記複合化脂質がポリエチレングリコール-脂質コンジュゲートである、項13又は14に記載の脂質粒子。

[0028] 項16. 質量平均粒子径が10～200nmである、項1～15のいずれかに記載の脂質粒子。

[0029] 項17. 項1～16のいずれかに記載の脂質粒子を含有する、医薬。

[0030] 項18. がん、免疫疾患、中枢性疾患等の治療薬、感染症ワクチン又はがんワクチンである、項17に記載の医薬。

[0031] 項18A. 項1～16のいずれかに記載の脂質粒子を対象（例えば患者）（好ましくはがんを有する対象、免疫疾患を有する対象、中枢性疾患を有する対象、感染症を有する対象、或いはがんの予防を必要とする対象、免疫疾患の予防を必要とする対象、中枢性疾患の予防を必要とする対象、感染症の予防を必要とする対象）に投与することを含む、がん、免疫疾患、中枢性疾患、又は感染症の予防又は治療方法。

[0032] 項18B. がん、免疫疾患、中枢性疾患等の治療薬、或いは感染症ワクチン又はがんワクチンとしての使用のための、項1～16のいずれかに記載の

脂質粒子。

[0033] 項 1 8 C. 項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載の脂質粒子の、がん、免疫疾患、中枢性疾患等の治療薬、或いは感染症ワクチン又はがんワクチンの製造のための使用。

項 1 8 D. 項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載の脂質粒子の、がん、免疫疾患、中枢性疾患等の治療薬、或いは感染症ワクチン又はがんワクチンとしての使用。

[0034] 項 1 9. 皮下投与、経静脈投与、筋肉内投与、経鼻投与又は気道内投与に用いるための、項 1 7 又は 1 8 に記載の医薬。

発明の効果

[0035] 本発明によれば、PEG修飾脂質に依拠せずに製造可能であり、又は、PEG修飾脂質に依拠した脂質粒子よりも薬効、安全性、又は安定性に優れ、若しくはPEG修飾脂質に依拠した脂質粒子とは免疫動態が異なる脂質粒子を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0036] [図1]試験例5において、LNP添加後、4℃での処理を経ずに37℃一晩インキュベートした場合の結果を示す。LNP (EGFP) (参考例2) またはCHP:LNP (EGFP) (実施例2) を添加した場合の結果を示し、陰性コントロールはLNPを添加しない場合の結果を示す。M0はM0マクロファージを用いた場合の結果を示し、M2はM2様マクロファージを用いた場合の結果を示す。

[図2]試験例5において、LNP添加後、4℃で2時間処理後、培地を置換してさらに37℃一晩インキュベートした場合の結果を示す。図中の各表記の意味については図 1 と同様である。

[図3]試験例5において、LNP添加後、4℃での処理を経ずに37℃一晩インキュベートした場合の結果を示す。図中の各表記の意味については図 1 と同様である。

[図4]試験例8において、LNP添加後、4℃での処理を経ずに37℃一晩インキュベートした場合の結果を示す。図中の各表記の意味については図 1 と同様である。

ある。

[図5]試験例9において、LNP投与後の血中PEG抗体の測定結果を示す。陰性コントロールはLNPを投与しない場合の結果を示す。

[図6]試験例10における投与局所の代表例の結果を示す。陰性コントロールはLNPを投与しない場合の結果を示す。

[図7]試験例10において摘出した近傍リンパ節（鼠経リンパ節）の代表例の結果を示す。陰性コントロールはLNPを投与しない場合の結果を示す。

[図8]試験例12例におけるLNP投与後の経時的な体重推移の結果を示す。比較対象は、LNPを投与しない場合の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0037] 本明細書中において、「含有」及び「含む」なる表現については、「含有」、「含む」、「実質的にからなる」及び「のみからなる」という概念を含む。

[0038] 1. 脂質粒子

本発明は、その一態様において、脂質粒子であって、脂質粒子構成脂質としてイオン化脂質、リン脂質、及びステロールを含有し、且つ疎水性基を含む修飾多糖類を含有する、脂質粒子（本明細書において、「本発明の脂質粒子」と示すこともある。）、に関する。以下にこれについて説明する。

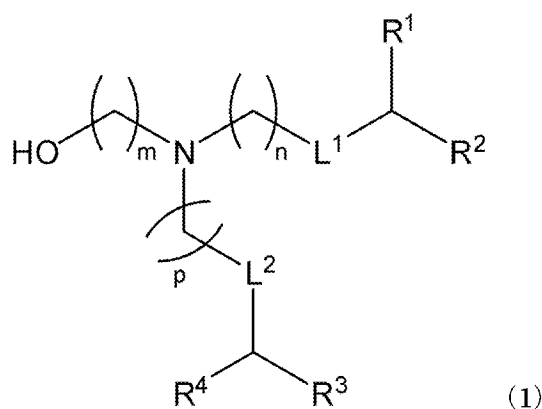
[0039] イオン化脂質は、脂質粒子を構成可能であり且つ脂質粒子内で正電荷を示す脂質である限りにおいて特に制限されない。イオン化脂質としては、例えば [4-ヒドロキシブチル) アザンジイル] ジ (ヘキサン-6, 1-ジイル) ビス (2-ヘキシルデカノエート) (ALC-0315)、9-ヘプタデカニル 8- { (2-ヒドロキシエチル) [6-オキソ-6- (ウンデシロキシ) ヘキシル] アミノ } オクタノエート (SM-102)、(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-Heptatriaconta-6, 9, 28, 31-tetraen-19-yl 4-(dimethylamino)butanoate (D-Lin-MC3-DMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLenDMA)、2,2-ジリノレイル-4- (2-ジメチルアミノエチル) -[1,3]-ジオキサラン (DLin-K-C2-DMA; 「XTC2」)、2,2-ジリ

ノレイル-4- (3-ジメチルアミノプロピル) -[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-C3-DMA)、2,2-ジリノレイル-4- (4-ジメチルアミノブチル) -[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-C4-DMA)、2,2-ジリノレイル-5-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキサソ (DLin-K6-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-N-メチルペピアジノ (methylpepiazzino) -[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-MPZ)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン (DLin-K-DMA)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイルオキシ (dilinoleyoxy) -3- (ジメチルアミノ) アセトキシプロパン (DLin-DAC)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-モルホリノプロパン (DLin-MA)、1,2-ジリノレイル-3-ジメチルアミノプロパン (DLinDAP)、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-S- DMA)、1-リノレイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-2-DMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DLin-TMA.Cl)、1,2-ジリノレイル-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (DLin-TAP.Cl)、1,2-ジリノレイルオキシ-3- (N-メチルピペラジノ) プロパン (DLin-MPZ)、3- (N,N-ジリノレイルアミノ) -1,2-プロパンジオール (DLinAP)、3- (N,N-ジオレイルアミノ) -1,2-プロパンジオ (propanedio) (DOAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3- (2-N,N-ジメチルアミノ) エトキシプロパン (DLin-EG-DMA)、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DODMA)、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DSDMA)、N- (1- (2,3-ジオレイルオキシ) プロピル) -N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド (DDAB)、N- (1- (2,3-ジオレイルオキシ) プロピル) -N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTAP)、3- (N- (N',N'-ジメチルアミノエタン) -カルバモイル) コレステロール (DC-Chol)、N- (1,2-ジミリスチルオキシプロパ-3-イル) -N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2 (スベルミン-カルボキサミド) エチル]-N,N-ジメチル-1-

プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (D0SPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン (D0GS)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスタ-5-エン-3-β-オキシブタン-4-オキシ)-1-(cis,cis-9,12-オクタデカジエノキシ)プロパン (CLinDMA)、2-[5'-(コレスタ-5-エン-3-β-オキシ)-3'-オキサペントキシ)-3-ジメチル-1-(cis,cis-9',12'-オクタデカジエノキシ)プロパン (CpLinDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (D0carbDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbDAP)、1,1'-[7-[4-(ジプロピルアミノ)ブチル]-7-ヒドロキシ-1,13-トリデカネジイル]ジ-(9Z)-9-オクタデセノエート (CL 4H6)、5-ヒドロキシ-11-[[[(9Z)-1-オキソ-9-オクタデセン-1-イル]オキシ]-5-[6-[[[(9Z)-1-オキソ-9-オクタデセン-1-イル]オキシ]ヘキシル]ウンデシル 1-メチル-4-ピペリジンカルボキシレート (CL 15H6)、1,1'-[7-[4-(ジメチルアミノ)ブチル]-7-ヒドロキシ-1,13-トリデカンジイル]ジ-(9Z)-9-オクタデカネート (CL 1 H6) 等が挙げられる。

[0040] イオン化脂質は、本発明の脂質粒子の細胞、好ましくは、抗原提示細胞での発現の観点から、好ましくは一般式 (1) :

[0041] [化4]

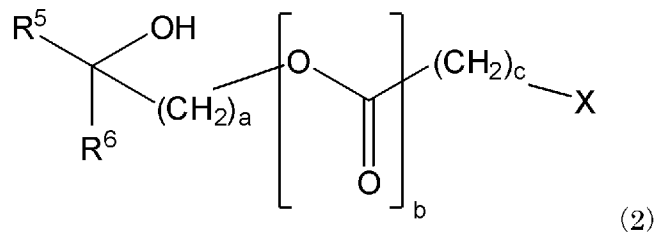


[0042] [式中: R¹はアルキル基を示す。R²はアルキル基を示す。R³はアルキル基を示す。R⁴はアルキル基又は水素原子を示す。L¹は-O-C(=O)-又は-C(=O)-O-を示す。L²は-O-C(=O)-又は-C(=O)-O-を示す。mは1~8の

整数を示す。nは3～10の整数を示す。pは3～10の整数を示す。]

で表されるアミノ脂質、一般式 (2) :

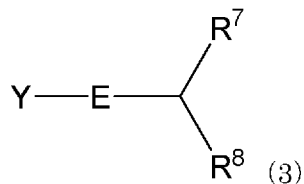
[0043] [化5]



[0044] [式中：aは3～5の整数を示す。bは0又は1を示す。cは0～4の整数を示す。R⁵及びR⁶は同一又は異なって、アルキル基又はアルケニル基を示す。Xは置換されていてもよい非芳香族窒素含有ヘテロ環基又は置換されていてもよいアミノ基を示す。]

で表されるアミノ脂質、及び一般式 (3)

[0045] [化6]



[0046] [式中：R⁷及びR⁸は同一又は異なって、アルキル基又はアルケニル基を示す。Yは置換されていてもよい非芳香族窒素含有ヘテロ環基又は置換されていてもよいアミノ基を示す。Eはリンカーを示す。]

で表されるアミノ脂質からなる群より選択される少なくとも1種である。当該アミノ脂質を用いることにより、上記集積性をより顕著に発揮させることが可能である。

[0047] アルキル基、アルケニル基は、直鎖状又は分岐鎖状であり、特に好ましくは直鎖状である。アルキル基、アルケニル基の炭素原子数の下限は、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10であることができる。アルキル基、アルケニル基の炭素原子数の上限は、例えば30、25、20、18、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、又は4であることができる。炭素原子数は、上記の上限及び下限を任意に組み合わせてなる範囲であることができる。

- [0048] R^1 で示されるアルキル基の炭素原子数は、一般式(1)の化合物が脂質となる限りにおいて特に制限されず、例えば3~20である。当該炭素原子数は、上記集積性の観点から、好ましくは3~12、より好ましくは3~10、さらに好ましくは4~8、よりさらに好ましくは5~7、特に好ましくは6である。
- [0049] R^2 で示されるアルキル基の炭素原子数は、一般式(1)の化合物が脂質となる限りにおいて特に制限されず、例えば3~20である。当該炭素原子数は、上記集積性の観点から、好ましくは4~15、より好ましくは5~12、さらに好ましくは6~10、よりさらに好ましくは7~9、特に好ましくは8である。
- [0050] R^3 で示されるアルキル基の炭素原子数は、一般式(1)の化合物が脂質となる限りにおいて特に制限されず、例えば3~20である。当該炭素原子数は、上記集積性の観点から、好ましくは3~12、より好ましくは3~10、さらに好ましくは4~8、よりさらに好ましくは5~7、特に好ましくは6である。
- [0051] R^4 は、上記集積性の観点から、好ましくはアルキル基である。
- [0052] R^4 で示されるアルキル基の炭素原子数は、一般式(1)の化合物が脂質となる限りにおいて特に制限されず、例えば3~20である。当該炭素原子数は、上記集積性の観点から、好ましくは4~15、より好ましくは5~12、さらに好ましくは6~10、よりさらに好ましくは7~9、特に好ましくは8である。
- [0053] L^1 は、上記集積性の観点から、好ましくは $-O-C(=O)-$ (当該2価の基の $-O-$ 側が一般式(1)におけるヒドロキシ基側を示す。)である。
- [0054] L^2 は、上記集積性の観点から、好ましくは $-O-C(=O)-$ (当該2価の基の $-O-$ 側が一般式(1)におけるヒドロキシ基側を示す。)である。
- [0055] m は、上記集積性の観点から、好ましくは2~6、より好ましくは3~5、特に好ましくは4である。
- [0056] n は、上記集積性の観点から、好ましくは4~8、より好ましくは5~7、特に好ましくは6である。
- [0057] p は、上記集積性の観点から、好ましくは4~8、より好ましくは5~7、特に好ましくは6である。
- [0058] R^5 で示されるアルキル基の炭素原子数は、一般式(2)の化合物が脂質とな

る限りにおいて特に制限されず、例えば12～24である。

[0059] R^6 で示されるアルキル基の炭素原子数は、一般式(2)の化合物が脂質となる限りにおいて特に制限されず、例えば12～24である。

[0060] R^7 で示されるアルキル基の炭素原子数は、一般式(2)の化合物が脂質となる限りにおいて特に制限されず、例えば12～24である。

[0061] R^8 で示されるアルキル基の炭素原子数は、一般式(2)の化合物が脂質となる限りにおいて特に制限されず、例えば12～24である。

[0062] 非芳香族窒素含有ヘテロ環基、アミノ基が置換されている場合、その置換基はアルキル基であることが好ましい。当該アルキル基としては、例えば炭素原子数1～4のアルキル基が挙げられる。

[0063] 非芳香族窒素含有ヘテロ環基は非芳香族窒素含有ヘテロ環から一つの水素原子を除いてなる一価の基である。非芳香族窒素含有ヘテロ環としては、例えばピロリジニル基、ピペリジニル基、モルホリニル基、ピペラジニル基等が挙げられる。

[0064] Eで示されるリンカーとしては、鎖構成原子数が例えば1～10、好ましくは3～8のリンカーであることができる。当該リンカーは、好ましくは鎖中に $-O-C(=O)-$ 又は $-C(=O)-O-$ が介在していてもよいアルキル基である。

[0065] イオン性脂質は、1種単独であることができ、2種以上の組み合わせであることもできる。

[0066] イオン性脂質の含有量は、脂質粒子形成性、上記集積性、安定性等の観点から、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して、好ましくは35～70モル%、より好ましくは40～65モル%、さらに好ましくは45～60モル%、よりさらに好ましくは45～55モル%である。

[0067] イオン性脂質は、市販品を購入して準備することができるし、公知の方法に従って又は準じて製造することができる。製造については、例えばW02018/230710、W02010/129687を参照することができる。

[0068] リン脂質としては、脂質粒子を構成可能なものである限り特に制限されないが、例えばホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホ

スファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチド酸、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン等が挙げられる。より具体的な例としては、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、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)、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-ホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジエライドイル-ホスファチジルエタノールアミン (DEPE)、ステアロイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (SOPE)、卵ホスファチジルコリン (EPC) 等が挙げられる。

[0069] リン脂質は、脂質粒子形成性、安定性等の観点から、好ましくはホスファチジルコリン、より好ましくはDSPC、DPPC等、さらに好ましくはDSPCである。

[0070] リン脂質は、1種単独であることができ、2種以上の組み合わせであることもできる。

[0071] リン脂質の含有量は、脂質粒子形成性、安定性等の観点から、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して、好ましくは4~25モル%、より好ましくは4~20モル%、さらに好ましくは4~15モル%、よりさらに好ましくは6~12モル%、とりわけ好ましくは8~11モル%である。

[0072] ステロールとしては、ステロール骨格を有し、脂質粒子を構成可能なものである限り特に制限されないが、例えばコレステロール、コレステリルヘミスクシネート、ラノステロール、ジヒドロラノステロール、デスモステロール、ジヒドロコレステロール、フィトステロール、フィトステロール、スチグマステロール、チモステロール、エルゴステロール、シトステロール、カンペステロール、ブラシカステロール等が挙げられる。また、これら以外に

も、コレスタノール、コレスタノン、コレステノン、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等のコレステロールの誘導体も挙げられる。

[0073] ステロールは、脂質粒子形成性、安定性等の観点から、好ましくはコレステロールである。

[0074] ステロールは、1種単独であることができ、2種以上の組み合わせであることもできる。

[0075] ステロールの含有量は、脂質粒子形成性、安定性等の観点から、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して、好ましくは15～55モル%、より好ましくは25～50モル%、さらに好ましくは30～45モル%、よりさらに好ましくは35～45モル%である。

[0076] 修飾多糖類は、多糖類が修飾してなる化合物であって、修飾基として疎水性基を含む限り、特に制限されない。本発明では、修飾多糖類を用いることにより、PEG修飾脂質に依拠せず（好ましくは当該脂質を使用しないものであるが、PEGに起因する副反応等を回避したものであれば多少のPEGを含んでいてもよい）、脂質粒子（特に、各脂質を上記含有量で含有する脂質粒子）を形成可能であることを見出した。

[0077] 修飾多糖類を構成する多糖類（すなわち、修飾前の多糖類）としては、糖残基がグリコシド結合した高分子であれば特に限定されることはない。多糖類を構成する糖残基としては、例えば、グルコース、マンノース、ガラクトース、フコース等の単糖類、または二糖類またはオリゴ糖類などの糖類に由来する残基を採用することができる。糖残基は1,2-、1,3-、1,4-又は1,6-グリコシド結合していてもよく、その結合は α -または β -型結合のいずれであってもよい。また、多糖類は直鎖状でも分枝鎖状のいずれでもよい。糖残基としてはグルコース残基が好ましく、多糖類としては、例えば天然または合成由来のプルラン、マンナン、デキストラン、アミロース、アミロペクチン等が挙げられる。これらの中でも、脂質粒子形成性、安定性等の観点から、好ましくはプルラン、マンナン、デキストラン等、より好ましくはプルラ

ン、マンナン等、特に好ましくはプルラン等が用いられる。

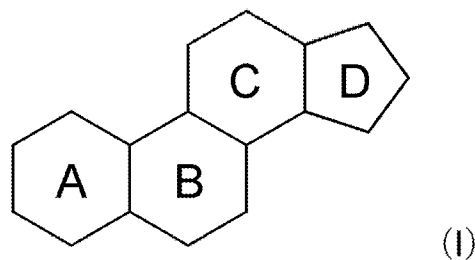
[0078] 多糖類の重量平均分子量は、修飾多糖類がゲル化粒子を構成可能な限り特に制限されないが、例えば5,000～2,000,000である。該重量平均分子量は、好ましくは10,000～1,000,000、より好ましくは20,000～500,000、さらに好ましくは40,000～250,000、よりさらに好ましくは80,000～125,000である。

[0079] 多糖類としては、市販品を使用することができ、或いは公知の製造方法に従って得られたものを使用することができる。

[0080] 疎水性基は、疎水性を有する基である限り特に制限されない。疎水性基としては、脂質粒子形成性、安定性等の観点から、好ましくはステロール骨格を有する疎水性基、炭化水素基等が挙げられ、特に好ましくはステロール骨格を有する疎水性基が挙げられる。

[0081] ステロール骨格は、式 (I) に示すシクロペンタヒドロフェナントレン環にヒドロキシ基が結合したアルコールである。式 (I) のA～Dの記号は、シクロペンタヒドロフェナントレン環を構成する各環を表す。

[0082] [化7]



[0083] ステロール骨格においては、シクロペンタヒドロフェナントレン環に二重結合を有していてもよく、水酸基の結合する位置も特段限定されない。好ましくは、C-3位の位置にヒドロキシ基が結合し、B環に二重結合を有するステロール類、又は、C-3位の位置にヒドロキシ基が結合し、飽和環で構成されたスタノール類である。ステロール骨格を有する疎水性基は、ステロール骨格が修飾されてなる、例えば、環構成炭素において炭化水素基（例えば炭素原子数1～20の直鎖状又は分岐鎖状のアルキル基等）に置換されてなる化合物に由来する基が挙げられる。ここで、「由来する基」とは、ある化合物におい

て、水素原子、又は水酸基等の官能基が除かれてなる基を示す。

[0084] ステロール骨格を有する疎水性基としては、例えばコレステロール由来の基、コレスタノール由来の基、ラノステロール由来の基、エルゴステロール由来の基、 β -シトステロール由来の基、カンペステロール由来の基、ステイグマステロール由来の基、ブラシカステロール由来の基等が挙げられる。これらの中でも、好ましくはコレステロール由来の基、コレスタノール由来の基、ラノステロール由来の基、エルゴステロール由来の基等のステロール由来の基が挙げられ、より好ましくはコレステロール由来の基が挙げられる。

[0085] 疎水性基としての炭化水素基としては、特に制限されず、例えば炭素原子数8~50（好ましくは10~30、より好ましくは12~20）の鎖状（好ましくは直鎖状）炭化水素基（好ましくはアルキル基）が挙げられる。

[0086] 修飾多糖類の重量平均分子量は、修飾多糖類がゲル化粒子を構成可能な限り特に制限されないが、例えば5,000~2,000,000である。該重量平均分子量は、好ましくは10,000~1,000,000、より好ましくは20,000~500,000、さらに好ましくは40,000~250,000、よりさらに好ましくは80,000~125,000である。

[0087] 修飾多糖類が含む疎水性基の数は、修飾多糖類がゲル化粒子を構成可能な限り特に制限されず、例えば多糖類を構成する糖残基100個当たり、例えば1~10個、好ましくは1~5個である。

[0088] 疎水性基は、多糖類に、直接又は間接的に（例えばリンカーを介して）連結することができる。

[0089] 修飾多糖類としては、例えば、多糖類を構成する糖残基100個当たり例えば1~10個（好ましくは1~5個）の糖単位の1級水酸基が、式（II）： $-O-(CH_2)_xCONH(CH_2)_yNH-CO-O-R$ （II）（式中、Rはステロール骨格を有する疎水性基又は炭化水素基を示し；xは0又は1を示し；yは任意の正の整数を示す）で表されるものが好ましい。yは好ましくは1~8である。

[0090] 修飾多糖類は、公知の方法（例えば国際公開第W000/12564号）に従って又

は準じて、合成することができる。一例として次の方法は挙げられる。最初に、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素又はステロールと、 $\text{OCN-R}^{\text{A}}\text{NCO}$ （式中、 R^{A} は炭素数1～50の炭化水素基である。）で表されるジイソシアナート化合物を反応させて、炭素数12～50の水酸基含有炭化水素又はステロールが1分子反応したイソシアナート基含有疎水性化合物を製造する。次いで、得られたイソシアナート基含有疎水性化合物と多糖類とをさらに反応させて、疎水性基として炭素数12～50の炭化水素基又はステリル基を含有する疎水性基含有多糖類を製造する。得られた反応生成物をケトン系溶媒で精製して高純度疎水性基含有多糖類の製造が可能である。

[0091] 修飾多糖類は、1種単独であることもできるし、2種以上の組合せであることもできる。

[0092] 修飾多糖類の含有量は、脂質粒子形成性、安定性等の観点から、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して、例えば0.5～15モル%、好ましくは1～10モル%である。

[0093] 本発明の脂質粒子は、粒子の凝集を阻害する複合化脂質（以下、単に「複合化脂質」と示す。）を含有することができる。複合化脂質としては、脂質粒子の凝集を阻害することができ、且つ脂質粒子を構成可能なものである限り特に制限されないが、例えばポリエチレングリコール（PEG）-脂質コンジュゲート、ポリアミド（ATTA）-脂質コンジュゲート、陽イオン性ポリマー-脂質コンジュゲート（CPL）等が挙げられる。より具体的には、例えば、PEG-ジアシルグリセロール（DAG）、PEGジアルキルオキシプロピル（DAA）、PEG-リン脂質、PEG-セラミド（Cer）、またはそれらの混合物を含めたPEG-脂質を含みうる。PEG-脂質コンジュゲートのPEG部分の分子量は、特に制限されないが、例えば200～10000、好ましくは500～7000、より好ましくは500～4000、さらに好ましくは1000～3000、よりさらに好ましくは1500～2500である。

[0094] 複合化脂質は、1種単独であることもできるし、2種以上の組合せであることもできる。

[0095] 複合化脂質の含有量は、脂質粒子形成性、安定性及びアナフィラキシーシ

ヨックを回避する等の観点から、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して、例えば0~2モル%である。当該含有量は、好ましくは0~1モル%、より好ましくは0~0.5モル%、さらに好ましくは0~0.2モル%、よりさらに好ましくは0~0.1モル%、とりわけ好ましくは0~0.01モル%、特に好ましくは0モル%（複合化脂質を含有しないこと）である。

[0096] 本発明の脂質粒子は、薬剤を含有することが好ましい。薬剤としては、特に制限されないが、例えば核酸アジュバント、及び抗がん剤等が挙げられ、それらを組み合わせて含有することができる。

[0097] 本発明の好ましい一態様において、薬剤は、本発明の脂質粒子の内側に（脂質粒子の外部と隔てられた状態で）配置されている。好ましくは、薬剤（特に、核酸）は、本発明の脂質粒子の内側に、イオン化脂質と複合化した状態で配置されている。

[0098] 本発明の核酸は特に制限されず、例えばmRNA、免疫刺激性二本鎖RNA（poly-IC RNAなど）、siRNA、miRNA、リボザイム、CpGオリゴDNA、アンチセンスオリゴDNA、核酸アプタマー、デゴイ、遺伝子発現用二本鎖DNA、及びジヌクレオチド等が挙げられる。核酸は、DNA、RNAのみならず、医薬有効成分と成り得るものであればそれでよく、これらに、次に例示するように、公知の化学修飾が施されたものも包含する。ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各リボヌクレオチドの糖（リボース）の2位の水酸基を、-OR（Rは、例えばCH₃（2'-O-Me）、CH₂CH₂OCH₃（2'-O-MOE）、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN等を示す）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。さらには、リン酸部分やヒドロキシル部分が、例えば、ビオチン、アミノ基、低級アルキルアミン基、アセチル基等で修飾されたものなどを挙げ

ることができるが、これに限定されない。また、「核酸」の語は、BNA (Bridged Nucleic Acid)、LNA (Locked Nucleic Acid)、PNA (Peptide Nucleic Acid) 等の何れも包含する。

[0099] 本発明の核酸は、好ましくはCpGオリゴDNA、又はmRNA、特に後述の微生物抗原、がん抗原をコードするmRNAであることができる。

[0100] CpGオリゴDNAの具体例は以下の通りである。

クラスA : D35-CpG、ODN1585、ODN2216、ODN2336等

クラスB : K3-CpG、ODNBW006、ODN D-SL01、ODN1668、OND1826、OND2006 (CpG7909、PF-3512676)、ODN2007、ODN684等

クラスC : ODN D-SL03、ODN 2395、ODN M362等

が挙げられる。

[0101] また、その他、例えばCpG-28、CpG-685 (GNKG-168)、CpG-ODN C274、KSK-13 (KSK-CpG)、CpG ODN 10104 (CpG-10104)、CpG ODN-1585、ODN-5890、1018-ISS、EMD-1201081 (HYB-2055、IMO-2055) 等が挙げられる。

[0102] CpGオリゴDNAとしては、市販品を使用することができ、或いは公知の製造方法に従って得られたものを使用することができる。例えば、US2022/0111061 A1の内容に基づき、ステロール骨格を有する疎水性基Aを含む修飾されたものであっても良いが、好ましくはステロール骨格を有する疎水性基Aを含む修飾されたものではない。

[0103] mRNAの場合にそれがコードする微生物抗原としては、例えばウイルス抗原、菌抗原等が挙げられる。ウイルス抗原の由来ウイルスとしては、特に制限されないが、例えばインフルエンザウイルス（例えばA型、B型等）、風疹ウイルス、エボラウイルス、コロナウイルス、麻疹ウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス、ムンプスウイルス、アルボウイルス、RSウイルス、SARSウイルス、肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス等）、黄熱ウイルス、エイズウイルス、狂犬病ウイルス、ハンタウイルス、デングウイルス、ニパウイルス、リッサウイルス等のエンベロープウイルス（エンベロープを有するウイルス）； アデノウイルス、ノロウ

イルス、ロタウイルス、ヒトパピローマウイルス、ポリオウイルス、エンテロウイルス、コクサッキーウイルス、ヒトパルボウイルス、脳心筋炎ウイルス、ライノウイルス等の非エンベロープウイルス（エンベロープを有さないウイルス）等が挙げられる。菌抗原の由来菌としては、特に制限されないが、例えば百日咳菌、破傷風菌、ジフテリア菌、サルモネラ菌、ピロリ菌、ウエルシュ菌、ボツリヌス菌、カンピロバクター、大腸菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌、セレウス菌、腸炎ビブリオ、アクネ菌、フェカーリス菌、ディフィシル菌、肺炎球菌、インフルエンザ桿菌、モラキセラ菌、肺炎桿菌、コイネバクテリウム、溶連菌、緑膿菌、ブドウ球菌、マイコプラズマ、カンジダ菌、アスペルギルス菌等が挙げられる。

[0104] mRNAの場合にそれがコードするがん抗原は、限定されないが、ERK1、ERK2、MART-1/Melan-A、gp100、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ADA bp）、FAP、シクロフィリンb、結腸直腸関連抗原（CRC）-C017-1A/GA733、がん胎児性抗原（CEA）、CAP-1、CAP-2、etv6、AML1、前立腺特異的抗原（PSA）、PSA-1、PSA-2、PSA-3、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、T細胞受容体/CD3-ゼータ鎖、CD20、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2（MAGE-B2）、MAGE-Xp3（MAGE-B3）、MAGE-Xp4（MAGE-B4）、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8およびGAGE-9、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -フェトプロテイン、E-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、 γ -カテニン、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、大腸腺腫症タンパク質（APC）、フォドリン、コネキシン37、Igイディオタイプ、p15、gp75、GM2ガングリオシド、GD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質、腫瘍抗原のSmadファミリー、Irf-1、P1A、EBVがコードする核抗原（EBNA）-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2（HOM-MEL-40）、SSX-1、S

SX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7、CD20、c-erbB-2、これらの部分ペプチドから選択され得る。

[0105] 対象がんとしては、特に制限されず、例えば白血病（慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病を含む）、リンパ腫（非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、T細胞系リンパ腫、B細胞系リンパ腫、バーキットリンパ腫、悪性リンパ腫、びまん性リンパ腫、濾胞性リンパ腫を含む）、骨髄腫（多発性骨髄腫を含む）、乳がん、大腸がん、腎臓がん、胃がん、卵巣がん、膵臓がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、食道がん、肝臓がん、頭頸部扁平上皮がん、皮膚がん、悪性黒色腫、尿路がん、前立腺がん、絨毛がん、咽頭がん、喉頭がん、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起膠腫、髓芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、膠芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺肉腫及びウィルムス腫瘍等が挙げられる。

[0106] アジュバントとしては、主剤の有効成分と併用することにより有効成分が有する本来の機能を補助したり増強したりするアジュバント機能を発揮するものであれば特に制限されないが、具体的には核酸、リポ多糖、リポペプチド、合成低分子化合物などから選択することができ、好ましくはCpGオリゴDNA、ポリIC RNA、イミダゾキノリン（例えばR848やイミキモドなど）、STINGアゴニスト（例えばサイクリックdi-GMPなど）、モノホスホリルリピッドやリポペプチドなどが用いられる。また、上記以外にも、アジュバントとしては、例えば、タキサン系の薬物、アントラサイクリン系の薬物、JAK/STATの阻害物質、インドールデオキシゲナーゼ（IDO）の阻害物質、トリプトファンデオキシゲナーゼ（IDO）の阻害物質などが挙げられる。これらの阻害物質には、当該因子に対して拮抗作用を持つ化合物の他、当該因子の中和抗体やsiRNAやアンチセンスDNAも含まれる。

[0107] 抗がん剤としては、例えばアルキル化剤、代謝拮抗剤、微小管阻害剤、抗生物質抗がん剤、トポイソメラーゼ阻害剤、白金製剤、分子標的薬、ホルモ

ン剤、生物製剤などが挙げられる。

[0108] 薬剤は、1種単独であることもできるし、2種以上の組合せであることもできる。

[0109] 本発明の脂質粒子において、脂質粒子構成成分であるCHPに対する薬剤の質量比（CHP/mRNA質量）は、200以下、より好ましくは、100以下、さらに好ましくは90以下である。当該質量比の上限は、例えば70、50、40、30、20、10、又は8であることができ、当該質量比の下限は、例えば0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、又は1であることができる。上記の上限及び下限は任意に組み合わせることができる。

[0110] 本発明の一態様において、本発明の脂質粒子を含む液体は、薬剤（好ましくは核酸、より好ましくはmRNA）を、例えば1～1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは5～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは15～400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは30～300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、よりさらに好ましくは50～200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含有することができる。

[0111] 本発明の脂質粒子は、上記以外にも他の成分（溶媒以外）を含んでいてもよい。他の成分としては、脂質粒子に配合することが公知の各種成分が挙げられ、具体的には例えば抗酸化剤、膜タンパク質等が挙げられる。

[0112] 抗酸化剤は、膜の酸化防止のために含有させることができ、膜の構成成分として必要に応じて使用される。膜の構成成分として使用される抗酸化剤としては、例えば、ブチル化ヒドロキシトルエン、没食子酸プロピル、トコフェロール、酢酸トコフェロール、濃縮混合トコフェロール、ビタミンE、アスコルビン酸、L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル、パルミチン酸アスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、エリソルビン酸、クエン酸等が例示される。

[0113] 膜タンパク質は、膜への機能付加又は膜の構造安定化を目的として含有させることができ、膜構成成分として必要に応じて使用される。膜タンパク質としては、例えば、膜表在性タンパク質、膜内在性タンパク質、アルブミン、組換えアルブミン等が挙げられる。

- [0114] 他の成分の含有量は、本発明の脂質粒子100質量%に対して、例えば10質量%以下、好ましくは5質量%以下、より好ましくは2質量%以下、さらに好ましくは1質量%以下である。
- [0115] 本発明の脂質粒子の質量平均粒子径は、例えば200nm以下、好ましくは10～200nm、より好ましくは20～200nm、さらに好ましくは40～190nm、よりさらに好ましくは40～180nm、とりわけ好ましくは40～160nmである。該粒子径は、動的光散乱法により測定することができる。
- [0116] 本発明の脂質粒子は、通常、水系溶液中で形成されている。水系溶液としては、例えば各種緩衝液（例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ギ酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液等）が挙げられる。
- [0117] 本発明の脂質粒子は、好適には、脂質粒子構成脂質を含有するアルコール溶液と、修飾多糖類を含有する（好ましくはさらに薬剤を含有する）水系溶液とを混合する工程、又は脂質粒子構成脂質を含有するアルコール溶液と、水系溶液（好ましくはさらに薬剤を含有する）と、修飾多糖類を含有する水系溶液とを混合する工程（工程1）を含む方法によって、製造することができる。当該方法を採用することにより、簡便且つ効率的に、PEG修飾脂質に依拠せずに、又は、PEGに起因する副反応等を回避した本発明の脂質粒子を得ることができる。
- [0118] アルコール溶液の溶媒であるアルコールとしては、脂質を溶解可能なアルコールである限り特に制限されない。アルコールとしては、エタノールが好ましく挙げられる。
- [0119] アルコール溶液は、脂質粒子構成脂質を上述のモル比となるように含有することが好ましい。これにより、脂質粒子構成脂質の上述のモル比で含む脂質粒子を得ることができる。
- [0120] アルコール溶液中の脂質濃度は、例えば2～20mM、好ましくは4～12Mである。
- [0121] 水系溶液は、溶媒が水を含有する（好ましくは水の含有割合が80%以上、90%以上、95%以上、又は100%である）溶媒である溶液である。

- [0122] 水系溶液中の修飾多糖類の濃度は、例えば0.2～5mg/mL、好ましくは0.4～3mg/mL、より好ましくは0.6～1.5mg/mLである。
- [0123] 水系溶液とアルコール溶液との混合比（水系溶液／アルコール溶液、v/v）は、例えば1～20、好ましくは2～4である。
- [0124] 混合態様は、脂質粒子の形成が可能な態様である限り特に制限されないが、通常は、ボルテックス等で激しく攪拌する態様である。或いは、マイクロ流路を用いた反応系で行う場合は、反応系内で混合される。
- [0125] 工程1は、通常、室温下又は加温下で実行される。
- [0126] 本発明の脂質粒子は、PEG修飾脂質に依拠せずに製造可能であり、及び／又は、PEG修飾脂質に依拠した脂質粒子よりも薬効、安全性、又は安定性に優れ、若しくはPEG修飾脂質に依拠した脂質粒子とは免疫動態が異なる点において有用である。
- [0127] また、本発明の脂質粒子の別の態様では、PEG修飾脂質等の粒子の凝集を阻害する複合化脂質をさらに含むことができるが、PEG修飾脂質に依拠した脂質粒子よりも薬効、安全性、又は安定性に優れ、若しくはPEG修飾脂質に依拠した脂質粒子とは免疫動態が異なる点において有用である。
- [0128] 安全性は、例えば抗PEG抗体誘導の低下、投与部位の炎症の低下、投与後発熱の低下等であることができる。
- [0129] 安定性は、製剤としての安定性であり、例えば凍結融解による粒子径の増大が抑制されている。具体的には、COVID-19ワクチンに代表される従来のPEG修飾脂質等を含む脂質粒子は、凍結融解に耐えることが出来ず、等張化剤(Sucrose)の有無に関わらず、凍結融解を繰り返すことで、粒子径が大きくなるが、本発明の脂質粒子は、CHP等の修飾多糖類を含むことにより、脂質粒子製剤の安定性を向上させることができ、また、後述の実施例4 (Method2) の作製方法で作られたPEG修飾脂質を含まない本発明の脂質粒子は、凍結融解に対する安定性は、さらに向上し、Sucroseが無くても、粒子径増大を抑えることが出来る。
- [0130] 免疫動態は、例えば誘導される細胞免疫の質の違い等であることができる

。

[0131] 2. 用途

本発明の脂質粒子は、薬剤を内包することができ、またDC-SIGN (CD209) 発現細胞（例えばM2様マクロファージや抗原提示細胞）へ選択的集積性を有する。このため、本発明の脂質粒子は、例えば医薬、試薬等（本明細書において、「本発明の薬剤」と示すこともある。）に、より具体的には、例えば、がん、免疫疾患、糖尿病起因性疾患、中枢性等の治療薬や、感染症ワクチン又はがんワクチンに利用することが可能である。感染症ワクチンとしては、感染症に対して使用されるワクチンであれば特に制限されず、予防用のワクチンだけでなく、治療用のワクチンも含まれる。

[0132] 本発明の薬剤は、本発明の脂質粒子を含有する限りにおいて特に制限されず、必要に応じてさらに添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、例えば基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、保湿剤、着色料、香料、キレート剤等が挙げられる。

[0133] 本発明の薬剤の使用態様は、特に制限されず、その種類に応じて適切な使用態様を採ることができる。本発明の薬剤は、その用途に応じて、例えばin vitroで使用する（例えば、培養細胞の培地に添加する。）こともできるし、in vivoで使用する（例えば、動物に投与する。）こともできる。

[0134] 本発明の薬剤の適用対象は特に限定されないが、哺乳動物では、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、シカ等が挙げられる。また、細胞としては、動物細胞等が挙げられる。細胞の種類も特に制限されず、例えば血液細胞、造血幹細胞・前駆細胞、配偶子（精子、卵子）、線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、神経細胞、肝細胞、ケラチン生成細胞、筋細胞、表皮細胞、内分泌細胞、ES細胞、iPS細胞、組織幹細胞、がん細胞等が挙げられる。

[0135] 本発明の薬剤は、任意の剤形、例えば錠剤（口腔内側崩壊錠、咀嚼可能錠、発泡錠、トローチ剤、ゼリー状ドロップ剤などを含む）、丸剤、顆粒剤、

細粒剤、散剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、ドライシロップ剤、液剤（ドリンク剤、懸濁剤、シロップ剤を含む）、ゼリー剤などの経口製剤形態や、注射用製剤（例えば、点滴注射剤（例えば点滴静注用製剤等）、静脈注射剤、筋肉注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤）、外用剤（例えば、軟膏剤、パップ剤、ローション剤）、坐剤吸入剤、点眼剤、眼軟膏剤、点鼻剤、点耳剤、リポソーム剤等の非経口製剤形態を取ることができる。

[0136] 本発明の薬剤の投与経路としては、所望の効果が得られる限り特に制限されず、経口投与； 経管栄養、注腸投与等の経腸投与； 経静脈投与、経動脈投与、筋肉内投与、心臓内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、経鼻投与、気道内投与、点眼投与等の非経口投与等が挙げられる。

[0137] 本発明の薬剤中の本発明の脂質粒子の含有量は、使用態様、適用対象、適用対象の状態等に左右されるものであり、限定はされないが、例えば0.0001～100重量%、好ましくは0.001～50重量%とすることができる。

[0138] 本発明の薬剤を動物に投与する場合の投与量は、薬効を発現する有効量であれば特に限定されず、通常は、本発明の脂質粒子の重量として、一般に経口投与の場合には一日あたり0.1～1000 mg/kg体重、好ましくは一日あたり0.5～500 mg/kg体重であり、非経口投与の場合には一日あたり0.01～100 mg/kg体重、好ましくは0.05～50 mg/kg体重である。上記投与量は、年齢、病態、症状等により適宜増減することもできる。

実施例

[0139] 以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0140] 調製例1. プルランナノゲルの調製

既報（Macromolecules 1993, 23, 3062-3068）の記載に従って、重量平均分子量100,000のプルランに100単糖あたりコレステロールが1.2個導入されたコレステロール修飾プルラン（CHP）を作製した。作製されたCHPを用いて、既知の方法で、プルランナノゲル溶液を調整した。

[0141] 参考例1. LNPの作製1（mRNA：オボアルブミン（OVA） mRNA）

OVA mRNA水溶液 (mRNA濃度 : $70 \mu\text{g/mL}$ 、溶媒 : 25mM NaAc , 154mM NaCl , $\text{pH}=4.5$) を調製した (A液)。ALC-0315 ([$(4\text{-Hydroxybutyl})\text{azanediyldi}(\text{hexane-6,1-diyl})\text{bis}(2\text{-hexyldecanoate})$) : DSPC (Distearoylphosphatidylcholine) : DMG-PEG200 ($1,2\text{-Dimyristoyl-sn-glycerol-3-methoxypolyethylene glycol}$) : Cholesterol = $50 : 10 : 1.5 : 38.5$ の割合 (モル比) で混合した脂質のエタノール溶液 (脂質濃度 : 8mM) を調製した (B液)。調製したそれぞれの溶液を、iLiNPマイクロ流路チップ (ライラックファーマ)、或いは、NanoAssemblr (Precision NanoSystems) を用いて、流速 $500 \mu\text{L/min}$ (iLiNPマイクロ流路チップ) あるいは、流速 12mL/min (NanoAssemblr) (Flow Rate Ratio ; A : B = 3) で混合した。混合した溶液を、透析膜 (MWCO ; 3.5K) を用いて、PBSへ溶媒置換した。回収した溶液を、アミコンチューブ (MWCO ; 30K) を用いて5倍濃縮し、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターに通し、LNP (OVA) 溶液を得た (質量平均粒子径 : 81nm 、ELSZ-2000ZS大塚電子株式会社)。Ribo Green Assay (Invitrogen) を行い、mRNA濃度として、 $185 \mu\text{g/mL}$ を算出した。

[0142] 参考例2. LNPの作製2 (mRNA : EGFP mRNA)

OVA mRNAに代えて蛍光タンパク質であるEGFPのmRNAを用いる以外は参考例1と同様にしてLNP (EGFP) 溶液を得た (質量平均粒子径 : 75nm 、mRNA濃度 : $186 \mu\text{g/mL}$)。

[0143] 参考例3. LNPの作製3 (mRNA : HPV E7 mRNA)

OVA mRNAに代えてヒトパピローマウイルスのE7タンパク質のmRNAを用いる以外は参考例1と同様にしてLNP (HPV E7) 溶液を得る。

[0144] 実施例1. CHP:LNPの作製1 (mRNA : OVA mRNA)

LNP (OVA) 溶液 (参考例1) 1mL に対し、同量の 10mg/mL CHP水溶液を加え、30分間攪拌した。 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターに通し、CHP:LNP (OVA) 溶液を得た (質量平均粒子径 : 122nm 、mRNA濃度 : $93 \mu\text{g/mL}$)。(Method 1)。

[0145] 実施例2. CHP:LNPの作製2 (mRNA : EGFP mRNA)

LNP (OVA) 溶液 (参考例1) に代えてLNP (EGFP) 溶液 (参考例2) を用いる以外は実施例1と同様にしてCHP:LNP (EGFP) 溶液を得た (質量平均粒子径 : 1

17nm、mRNA濃度：95 μ g/mL)。(Method 1)。

[0146] 実施例3. CHP:LNPの作製3 (mRNA：HPV E7 mRNA)

LNP (OVA) 溶液 (参考例1) に代えてLNP (HPV E7) 溶液 (参考例3) を用いる以外は実施例1と同様にしてCHP:LNP (HPV E7) 溶液を得る。(Method 1)。

[0147] 実施例4. CHP:LNPの作製4 (mRNA：OVA mRNA)

OVA mRNA水溶液 (mRNA濃度：70 μ g/mL、溶媒：1mg/mL CHP in 25mM NaAc, 154mM NaCl, pH=4.0) を調製した (A液)。MC3：DSPC：Cholesterol=50：10：40の割合 (モル比) で混合した脂質のエタノール溶液 (脂質濃度：8mM) を調製した (B液)。調製したそれぞれの溶液を、iLiNPマイクロ流路チップ、或いは、NanoAssemblrを用いて、流速500 μ L/min (iLiNPマイクロ流路チップ)、或いは、流速12mL/min (NanoAssemblr) (Flow Rate Ratio；A：B=3) で混合した。混合した溶液を、透析膜 (MWC0；3.5K) を用いて、PBSへ溶媒置換した。回収した溶液を、アミコンチューブ (MWC0；30K) を用いて5倍濃縮し、0.45 μ mのフィルターに通し、CHP：LNP (OVA) 溶液を得た (質量平均粒子径：155nm、mRNA濃度：70 μ g/mL)。(Method 2)。

[0148] 実施例5. CHP:LNPの作製5 (mRNA：EGFP mRNA)

EGFP mRNA水溶液 (mRNA濃度：70 μ g/mL、溶媒：2mg/mL CHP in 25mM NaAc, 154mM NaCl, pH=4.0) を調製した (A液)。ALC-0315：DSPC：Cholesterol=45.5：9：45.5の割合 (モル比) で混合した脂質のエタノール溶液 (脂質濃度：8mM) を調製した (B液)。調製したそれぞれの溶液を、iLiNPマイクロ流路チップ、或いは、NanoAssemblrを用いて、流速500 μ L/min (iLiNPマイクロ流路チップ)、或いは、流速12mL/min (NanoAssemblr) (Flow Rate Ratio；A：B=3) で混合した。混合した溶液を、透析膜 (MWC0；3.5K) を用いて、PBSへ溶媒置換した。回収した溶液を、アミコンチューブ (MWC0；30K) を用いて5倍濃縮し、0.45 μ mのフィルターに通し、CHP:LNP (EGFP) 溶液を得た (重量平均粒子径：135nm、mRNA濃度：82 μ g/mL)。(Method 2)。

[0149] 実施例6. CHP:LNPの作製6 (mRNA：HPV E7 mRNA)

OVA mRNAに代えてHPV E7 mRNAを用いる以外は実施例4と同様にしてCHP:LNP

(HPV E7) 溶液を得る。(Method 2)。

[0150] 実施例7～23. CHP: LNPの作製7

以下の表1に示す方法(Method1、Method2)、核酸、イオン化脂質、脂質割合を採用して、CHP: LNPを作製した。実施例1～23で作製したCHP:LNPの作製組成と物性値を以下の表に示す。

[0151] [表1]

実施例	Method	核酸	イオン化脂質 IL	脂質割合 IL:PL:PEG:Chol	粒子径 nm	mRNA濃度 mg/mL	内包率 %	CHP濃度 mg/mL
1	1	OVA	ALC-0315	50:10:1.5:38.5	122	0.09	83	5
2	1	EGFP	ALC-0315	50:10:1.5:38.5	117	0.095	90	5
3	1	HPV E7	ALC-0315	50:10:1.5:38.5				
4	2	OVA	ALC-0315	50:10:0:40	155	0.07	92	2
5	2	EGFP	ALC-0315	45.5:9:0:45.5	135	0.082	94	4
6	2	HPV E7	ALC-0315	50:10:0:40				
7	1	EGFP	DOTAP	50:10:0:40	188	0.069	85	5
8	1	EGFP	DOTAP	50:10:1.5:38.5	154	0.09	95	5
9	1	GFP	DOTAP	50:10:0:40	181	0.079	90	5
10	1	GFP	DOTAP	50:10:1.5:38.5	134	0.084	96	5
11	1	GFP	ALC-0315	50:10:1.5:38.5	126	0.1	92	5
12	1	EGFP	MC3	50:10:1.5:38.5	126	0.072	90	5
13	1	EGFP	SM-102	50:10:1.5:38.5	142	0.077	90	5
14	1	EGFP	DODAP	50:10:1.5:38.5	145	0.075	76	5
15	1	OVA	MC3	50:10:1.5:38.5	130	0.093	91	5
16	2	OVA	MC3	50:10:0:40	105	0.1	28	2
17	2	EGFP	ALC-0315	62.5:13:0:25	182	0.07	74	10
18	1	CpG2395	DOTAP	50:19.5:0.5:30	193	0.095	96	5
19	1	EGFP	CL4H6	50:10:1.5:38.5	188	0.06	34	5
20	2	EGFP	CL4H6	45.5:9:0:45.5	142	0.035	88	4
21	2	CpG2395	ALC-0315	45.5:9:0:45.5	124	0.048	96	4
22	1	EGFP	CL15H6	50:10:1.5:38.5	166	0.059	82	5
23	2	EGFP	CL15H6	45.5:9:0:45.5	148	0.057	95	4

[0152] 実施例58. CHP:LNPの作製8 (mRNA : mCherry mRNA)

mCherry mRNA水溶液 (mRNA濃度: 70 μ g/mL、溶媒 25mM NaAc, 154mM NaCl, pH=4.0) を調製した (A液)。SM-102 : DSPC : Cholesterol=45.5 : 9 : 45.5 の割合 (モル比) で混合した脂質のエタノール溶液 (脂質濃度: 8mM) を調製した (B液)。さらに、調整例1で示した方法で、プルランナノゲル溶液 (CHP 濃度: 2mg/mL、溶媒 PBS) を調整した (C液)。調製したそれぞれの溶液を、NanoAssemblr (Precision NanoSystems) を用いて、流速12mL/min (Flow Rate Ratio; A : B=1:3:2.46) で混合した。混合した溶液を、透析膜 (MWC0; 10K) を用いて、PBSへ溶媒置換した。回収した溶液を、アミコンチューブ (MWC0 ; 100K) を用いて7倍濃縮し、0.45 μ mのフィルターに通し、CHP:LNP (mCherr

y) 溶液を得た（重量平均粒子径：131nm、mRNA濃度：135 μ g/mL）。（Method 3）。

[0153] 実施例24～57及び59～62. CHP:LNPの作製9

以下の表2及び表3に示す作製方法（Method1、Method2、Method3）、核酸、イオン化脂質、リン脂質、PEG修飾脂質、脂質割合、CHP濃度を採用して、CHP:LNPをそれぞれ作製した。実施例24～62で作製したCHP:LNPの作製組成と物性値を、実施例1～23と併せて以下の表に示す。

[0154] [表2]

実施例	Method	核酸	イオン化脂質	リン脂質	PEG脂質	脂質割合	粒子径 nm	mRNA濃度 mg/mL	内包率 %	CHP濃度 mg/mL
			IL	PL	PEG	IL:PL:PEG:Chol				
1	1	OVA	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	122	0.09	83	5.00
2	1	EGFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	117	0.095	90	5.00
3	1	HPV E7	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5				
4	2	OVA	ALC-0315	DSPC	—	50:10:0:40	155	0.07	92	2.00
5	2	EGFP	ALC-0315	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	135	0.082	94	4.00
6	2	HPV E7	ALC-0315	DSPC	—	50:10:0:40				
7	1	EGFP	DOTAP	DSPC	—	50:10:0:40	188	0.069	85	5.00
8	1	EGFP	DOTAP	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	154	0.09	95	5.00
9	1	GFP	DOTAP	DSPC	—	50:10:0:40	181	0.079	90	5.00
10	1	GFP	DOTAP	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	134	0.084	96	5.00
11	1	GFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	126	0.1	92	5.00
12	1	EGFP	MC3	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	126	0.072	90	5.00
13	1	EGFP	SM-102	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	142	0.077	90	5.00
14	1	EGFP	DODAP	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	145	0.075	76	5.00
15	1	OVA	MC3	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	130	0.093	91	5.00
16	2	OVA	MC3	DSPC	—	50:10:0:40	105	0.1	28	2.00
17	2	EGFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	2.562.5:13:0:25	182	0.07	74	10.00
18	1	CpG2395	DOTAP	DSPC	DMG-PEG2000	50:19.5:0.5:30	193	0.095	96	5.00
19	1	EGFP	CL 4H6	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	188	0.06	34	5.00
20	2	EGFP	CL 4H6	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	143	0.035	88	4.00
21	2	CpG2395	ALC-0315	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	124	0.048	96	4.00
22	1	EGFP	CL 15H6	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	166	0.059	82	5.00
23	2	EGFP	CL 15H6	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	148	0.057	95	4.00
24	1	mCherry	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	123	0.069	89	5.00
25	2	mCherry	ALC-0315	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	128	0.078	92	4.00
26	1	EGFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	82	0.144	95	0.03
27	1	EGFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	85	0.141	96	0.06
28	1	EGFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	85	0.138	97	0.12
29	1	EGFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	90	0.114	98	0.21
30	2	EGFP	ALC-0315	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	207	0.068	92	0.15
31	2	EGFP	ALC-0315	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	147	0.115	93	1.50

[0155]

[表3]

実施例	Method	核酸	イオン化脂質	リン脂質	PEG脂質	脂質割合	粒子径 nm	mRNA濃度 mg/mL	内包率 %	CHP濃度 mg/mL
			IL	PL	PEG	IL:PL:PEG:Chol				
32	1	mCherry	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	94	0.080	96	0.03
33	1	mCherry	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	97	0.076	97	0.06
34	1	mCherry	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	103	0.057	97	0.12
35	1	mCherry	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	102	0.053	97	0.21
36	1	EGFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	109	0.096	99	0.62
37	1	EGFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	111	0.097	99	1.14
38	1	EGFP	ALC-0315	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	116	0.087	98	1.90
39	1	mCherry	ALC-0315	DSPC	ALC-0159	46.3:9.4:1.6:42.7	101	0.130	99	0.62
40	1	mCherry	ALC-0315	DSPC	ALC-0159	46.3:9.4:1.6:42.7	105	0.125	99	1.14
41	1	mCherry	ALC-0315	DSPC	ALC-0159	46.3:9.4:1.6:42.7	111	0.113	98	1.90
42	1	mCherry	CL 15H6	DSPC	ALC-0159	46.3:9.4:1.6:42.7	152	0.122	92	0.62
43	1	mCherry	CL 15H6	DSPC	ALC-0159	46.3:9.4:1.6:42.7	155	0.117	92	1.14
44	1	Cy5-Luc	ALC-0315	DSPC	ALC-0159	46.3:9.4:1.6:42.7	106	0.061	97	1.50
45	1	mCherry	CL 1H6	DSPC	ALC-0159	46.3:9.4:1.6:42.7	143	0.101	99	1.50
46	1	Cyclic EGFP	ALC-0315	DSPC	ALC-0159	46.3:9.4:1.6:42.7	107	0.169	98	1.41
47	1	Luc	ALC-0315	DSPC	ALC-0159	46.3:9.4:1.6:42.7	113	0.203	96	1.45
48	1	mCherry	MC3	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	129	0.203	98	1.50
49	1	mCherry	SM-102	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	124	0.204	97	1.41
50	1	mCherry	SM-102	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	116	0.140	99	1.46
51	1	mCherry	SM-102	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	122	0.136	98	2.52
52	1	mCherry	SM-102	DSPC	DMG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	124	0.092	95	4.04
53	2	mCherry	SM-102	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	170	0.241	97	0.75
54	1	mCherry	SM-102	DSPC	DSG-PEG2000	50:10:1.5:38.5	123	0.229	98	1.41
55	1	mCherry	SM-102	DSPC	DSG-PEG2000	50:6.5:5:38.5	92	0.175	94	1.41
56	1	mCherry	SM-102	DOPE	DSG-PEG2000	50:25:2.5:22.5	105	0.219	96	1.41
57	2	mCherry	ALC-0315	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	217	0.152	95	1.5
58	3	mCherry	SM-102	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	131	0.135	98	0.761
59	3	mCherry	SM-102	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	144	0.107	99	0.38
60	1	mCherry	SM-102	DSPC	DMG-PEG2000	50:25:2.5:22.5	102	0.223	94	1.4
61	3	mCherry	CL 15H6	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	114	0.089	95	0.911
62	3	mCherry	SM-102	DSPC	—	45.5:9:0:45.5	111	0.149	83	1.521

なお、特にPEG修飾脂質を加えない、或いは少量の場合は、析出して製造することができなかつたり、粒子径が200nm以上の非常に大きな粒子となることが多く、体内への投与に資するLNPが作成できないが、予想外にも、CHPを付与することによって、本願発明の実施例1～62では何れも理想的な粒子径のLNPを製造することができた。

[0156] 試験例1. マウスへの免疫による抗原性評価試験

C57BL/6マウス（日本エスエルシー）に、CHP:LNP（OVA）（実施例1、実施例4）、またはLNP（OVA）（参考例1）を、mRNA量として10 μ gずつ皮下投与を行う。また、比較対象として、別のマウスに、それぞれ同用量にて筋肉内投与を行う。3週後に再び同じ用量と投与方法で投与を行い、さらに1週間後に採血と脾臓細胞、所属リンパ節を採取する。

[0157] 速やかに脾臓細胞を回収し、OVAのCD4エピトープペプチド（ROCOLAND、Ova

lbumin 323-339-OH) とOVAのCD8エピトープペプチド (ROCOLAND、OVA 257-264) で刺激し、分泌されるIFN- γ をELISA法で、細胞内のIFN- γ 、IL-2、TNF α を細胞内サイトカイン染色法で測定する。

また、所属リンパ節由来細胞と回収した脾臓細胞について、複数細胞表面マーカー (CD3、CD4、CD8、CD127、CD62L、CD44、KLRG1、Tim-3、Lag-3、PD-1) で発現解析を行い、T細胞の状態を解析する。

[0158] OVA抗原とMHC複合体を認識する抗体 (BioLegend) を用いて、抗原提示細胞の頻度と提示されたOVA抗原量を測定する。この際、細胞表面マーカーとしてCD11b, CD11c, F4/80, B220, CD8aなどを共染色することで抗原提示細胞の特定を行う。また、SIGN-R1に対する抗体を用いて抗原提示細胞への取り込みが受容体依存的であるか評価する。

[0159] 血清中のOVA特異的抗体をELISA法で測定する。

[0160] 試験例2. CHP:LNP (OVA) とLNP (OVA) の毒性比較試験

(1) サイトカイン放出症候群

C57BL/6マウスに、CHP:LNP (OVA) (実施例1、実施例4)、またはLNP (OVA) (参考例1) を、mRNA量として10 μ gずつ皮下投与を行う。経時的に採血を行い、IL-6やIL-1 β 等の血中濃度をELISA法またはmultiplex bead-based assay panel (BioLegend) で測定する。

[0161] (2) 投与部位局所の皮膚炎症

C57BL/6マウスに、CHP:LNP (OVA) (実施例1、実施例4)、またはLNP (OVA) (参考例1) を、mRNA量として10 μ gずつ皮下投与を行う。24時間後に投与部位の皮膚を摘出する。皮膚の紅潮を観察した後、浸潤しているリンパ球数を測定する。

[0162] (3) 体重変動

C57BL/6マウスに、CHP:LNP (OVA) (実施例1、実施例4)、またはLNP (OVA) (参考例1) を、mRNA量として10 μ gずつ皮下投与を行う。その後、経時的に体重変化を測定する。

[0163] (4) 体温変動

C57BL/6マウスに、CHP:LNP (OVA) (実施例1、実施例4)、またはLNP (OVA) (参考例1) を、mRNA量として10 μ gずつ皮下投与を行う。その後、経時的に直腸体温を測定する。

[0164] 試験例3. マウスへの免疫によるワクチン評価試験

C57BL/6マウスに、CHP:LNP (HPV E7) (実施例6)、またはLNP (HPV E7) (参考例3) を、mRNA量として10 μ gずつ皮下投与にて免疫する。2または3週間後、同用量にて2回目の免疫を行い、その同日に1x10⁵個のHPV E7タンパク安定発現マウス肺癌細胞株 (TC-1細胞) を皮下に移植する。その後、腫瘍の大きさを経時的に測定する。

[0165] 試験例4. 免疫原性試験

C57BL/6マウスに、CHP:LNP (OVA) (実施例1、実施例4)、またはLNP (OVA) (参考例1) を、mRNA量として10 μ gずつ皮下投与する。その後、2または3週間隔で同用量にて複数回 (2回~5回) の皮下投与を行う。その後、血中の抗PEG抗体量と抗CHP抗体量をELISA法で測定する。

[0166] 試験例5. ヒト末梢血リンパ球由来マクロファージでの機能評価試験

ヒトの末梢血からCD14陽性単球を単離し、24穴Tissue culture plateに、2 x 10⁵ 個/ウェルで500 μ Lの基礎培地 (RPMI、10%ウシ胎児血清、50 ng/mL M-CSF) で播種し、37°C、5%CO₂のインキュベーターで3日間培養した。その後、500 μ Lの基礎培地で交換してさらに3日間培養した。M0マクロファージの分化誘導は、500 μ Lの基礎培地で交換し、一方、M2様マクロファージへの分化誘導は、基礎培地に50 ng/mL IL-4、50 ng/mL IL-6、50 ng/mL IL-10、50 ng/mL IL-13を添加した、500 μ Lの分化誘導用培地で交換し、二日間培養した。mRNA量として0.5 μ gずつ含有したCHP:LNP (EGFP) (実施例2、実施例5)、またはLNP (EGFP) (参考例2) を、基礎培地に添加し、4°C条件のみ、2時間培養後、500 μ Lの培地に置換し、一晩37°C、5%CO₂でインキュベートした。その後、PBSで洗浄後、200 μ LのCell Dissociation 溶液 (Biological Industries) を添加して、20分間、37°Cでインキュベートし、200 μ LのWash溶液 (Miltenyi) を加え、ピペティングにて細胞を剥がし、500gで5

分間遠心して細胞を回収した。その後、PB450標識抗CD206抗体（BD Biosciences）と、APC標識抗DC-SIGN抗体（R&D Systems）で染色し、フローサイトメーターで解析した。

[0167] <試験結果>

CHP:LNP（EGFP）（実施例2）またはLNP（EGFP）添加後、4℃での処理を経ずに37℃一晩インキュベートした場合の結果を図1に示す。また、CHP:LNP（EGFP）（実施例2）またはLNP（EGFP）添加後、4℃で2時間処理後、培地を交換し、37℃一晩インキュベートした場合の結果を図2に示す。また別実験で、CHP:LNP（EGFP）（実施例2）、PEGを含まないCHP:LNP（EGFP）（実施例5）またはLNP（EGFP）添加後、37℃一晩インキュベートした場合の結果を図3に示す。

[0168] 試験例6. マウス皮下投与による抗原提示細胞での発現確認実験

C57BL/6マウスに、CHP:LNP（EGFP）（実施例5）、またはLNP（EGFP）（参考例2）を、mRNA量として10μgずつ皮下投与を行う。24時間後に鼠経リンパ節を摘出し、細胞を回収して、フローサイトメーターで解析を行う。

[0169] 試験例7. 凍結融解前後の粒子径の測定

CHP:LNP（実施例19, 20, 23, 26~54, 57~62）を-30℃で一度凍結し、その後融解させ、凍結融解前後での粒子径を測定した。また、その比較対象としてCHPを含まない同じ組成のLNP（参考例19, 26, 32, 36, 39, 42, 44~50, 54, 60）についても同様に、-30℃で一度凍結し、その後融解させ、凍結融解前後の粒子径を測定した。

[0170] <試験結果>

得られた結果を以下の表4に示す。比較対象のCHPを含まないLNPは、凍結融解を一度行うだけで粒子径が増大するが、予想外にも、CHP:LNPは凍結融解前後で粒子径の増大が抑制されていた。以上から、CHPはLNPの安定性を向上する効果があるといえる。

[0171]

[表4]

CHP:LNP				LNP			
実施例	粒子径 (nm)		増加率	参考例	粒子径 (nm)		増加率
	凍結融解前	凍結融解後	(%)		凍結融解前	凍結融解後	(%)
19	188	226	120	19	142	414	291
20	143	142	99	—			
23	148	149	100				
26	82	103	125				
27	85	92	108	26	78	121	155
28	85	90	106				
29	90	91	101				
30	207	205	99				
31	147	147	100	—			
32	94	94	99				
33	97	96	99				
34	103	103	100	32	79	114	145
35	102	102	100				
36	109	108	99				
37	111	113	101	36	83	105	126
38	116	114	99				
39	101	103	102	39	73	93	127
40	105	111	105				
41	111	112	101				
42	152	162	106	42	129	177	136
43	155	161	104				
44	106	108	102	44	75	100	133
45	146	159	108	45	114	139	122
46	107	109	102	46	77	108	141
47	113	114	101	47	82	142	173
48	129	132	102	48	97	155	159
49	121	128	106	49	92	133	145
50	116	118	102	50	85	120	141
51	122	122	100				
52	124	127	102				
53	170	162	95	—			
54	123	125	102	54	91	163	179
57	217	203	94	—			
58	131	129	98				
59	144	144	100				
60	102	106	104	60	80	95	119
61	114	119	104	—			
62	111	113	102				

[0172] 試験例8. ヒト末梢血リンパ球由来マクロファージでの機能評価試験-2

試験例5と同様の方法で、M0マクロファージとM2様マクロファージを準備し、mRNA量として0.5 μ gずつ含有したCHP:LNP (mCherry) (実施例51、58、61

）、または、LNP（mCherry）（参考例50）を基礎培地に添加し、一晚37℃、5%CO₂でインキュベートした。その後、PBSで洗浄後、200 μLのCell Dissociation 溶液(Biological Industries)を添加して、20分間、37℃でインキュベートし、200 μLのWash溶液（Miltenyi）を加え、ピペッティングにて細胞を剥がし、500gで5分間遠心して細胞を回収した。その後、PB450標識抗CD206抗体（BD Biosciences）と、APC標識抗DC-SIGN抗体（R&D Systems）で染色し、フローサイトメーターで解析した。

[0173] <試験結果>

結果を図4に示す。CHPを付与したLNP（CHP:LNP）でのみ、DC-SIGN陰性細胞であるM0マクロファージに比べ、DC-SIGN陽性細胞であるM2様マクロファージで高発現していた。以上から、CHPを付与したLNPは、イオン化脂質に依らずDC-SIGN陽性細胞に選択的にmRNAの送達が可能であり、搭載したmRNAからタンパク質を発現できる性能があることが判った。

[0174] 試験例9. 免疫原性試験-2

C57BL/6マウスに、CHP:LNP（mCherry）（実施例40）、PEG修飾脂質を含まないCHP:LNP（mCherry）（実施例57）、または、LNP（mCherry）（参考例39）を、mRNA量として10 μgずつ皮下投与をした。試験群は各n=5とした。さらに3週間後に同用量にて再度皮下投与を行った。その1週間後に、血中の抗PEG抗体の量をELISA法（Life Diagnostics）で測定した。陰性コントロールとしては溶媒のみ（PBS）を投与した。

[0175] <試験結果>

得られた結果を図5に示す。陰性コントロール、CHPを付与したLNP（CHP:LNP（mCherry））、CHPを付与したPEG修飾脂質を含まないLNP（CHP:LNP（mCherry）PEG Free）投与群と比較して、LNP（mCherry）投与群は、有意に抗PEG抗体（IgM）が検出された（*；p<0.05, unpaired t検定）。以上の結果から、CHPを付与したLNPは、PEG修飾脂質を含んでいても、抗PEG抗体に起因する副反応、例えば、アナフィラキシーや、繰り返し投与によって薬効が減弱するAccelerated blood clearance（ABC）現象を回避できる可能性を示唆して

いる。

[0176] 試験例10. マウス皮下投与による近傍リンパ節での発現確認実験-1

C57BL/6マウスに、CHP:LNP (mCherry) (実施例40)、またはLNP (mCherry) (参考例39) を、mRNA量として5 μ gずつを、右側背臀部周囲の皮内に投与した。投与後17時間目にin vivo イメージング機器 (Vilber Bio Imaging) を用いて、mCherryタンパク質の蛍光強度を検出し、投与局所および近傍リンパ節 (鼠経リンパ節) での発現を測定した。また、摘出した近傍リンパ節 (鼠経リンパ節) を、同機器を用いて、同波長で蛍光タンパクを検出した。

[0177] <試験結果>

投与局所の代表例の結果を図6に示す。また、摘出した近傍リンパ節 (鼠経リンパ節) の代表例の結果を図7に示す。投与局所では、LNP (mCherry) は広く発現が確認できたが、CHP:LNP (mCherry) の発現は低く、一方、近傍リンパ節では、CHP:LNP (mCherry) のほうがLNP (mCherry) に比べて発現が高かった。また、摘出した近傍リンパ節では、LNP (mCherry) に比して、CHP:LNP (mCherry) で高い発現が確認できた。以上の結果は、皮内投与した場合、CHPを付与したLNPは、LNPに比べて近傍のリンパ節への送達能が優れていることを示している。

[0178] 試験例11. 投与部位局所の皮膚炎症評価-2

C57BL/6マウスを剃毛後、CHP:LNP (EGFP) (実施例2)、またはLNP (EGFP) (参考例2) を、mRNA量として9.8 μ gずつを、背臀部周囲の皮内に投与した。投与後3、5日目後に、それぞれ皮膚組織を採取し、4%パラホルムアルデヒドで48時間固定後、70%エタノール溶液に置換した。その後、HE染色と抗IBA1抗体による免疫染色を行い、病理観察を行った。

[0179] <試験結果>

得られた結果を表5に示す。LNP (EGFP) の投与群では、炎症性細胞の浸潤、活性化マクロファージの指標であるIBA1陽性細胞の増加が、CHP:LNP (EGFP) 投与群に比べて高かった。以上の結果は、脂質ナノ粒子の局所投与によって誘発される炎症が、CHPを付与したLNP (CHP:LNP) ではLNPに比べて抑制さ

れることを示している。

[0180] [表5]

被験者 個体No.	Day3						Day5					
	Vehicle		LNP		CHP:LNP		Vehicle		LNP		CHP:LNP	
	1	2	5	6	9	10	3	4	7	8	11	12
【HE染色】												
表皮の肥厚	—	—	—	—	±	—	—	—	+	±	—	—
真皮の炎症性細胞浸潤	—	—	+	+	±	+	—	—	+	+	±	±
皮下組織脂肪層の炎症性細胞浸潤	—	—	+	+	±	±	—	—	+	+	±	±
筋膜下組織の炎症性細胞浸潤	—	—	+	+	±	+	—	—	±	+	+	±
【Iba1染色】												
真皮のIba1陽性マクロファージの増加	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+
皮下組織脂肪層のIba1陽性マクロファージの増加	—	—	+	+	+	±	—	—	+	+	+	+
筋膜下組織のIba1陽性マクロファージの増加	—	—	+	+	±	+	—	—	+	+	+	+

—：異常所見なし ±：軽度 +：軽度 ++：中程度 +++：高度

試験例12. 体重に及ぼす影響の評価

C57BL/6マウスに、CHP:LNP (OVA) (実施例1)、または、LNP (OVA) (参考例1) を、mRNA量として10 μ gずつを皮下投与した(0日目)。さらに、初回投与から3週間後(21日目)に、同用量にて再度皮下投与した。体重測定は、各投与日とその直後2日間は連続して測定し、さらに初回投与から28日目まで、週一回の頻度で行った。試験群は各n=3とした。比較対象群は薬液を何も投与を行わなかった。

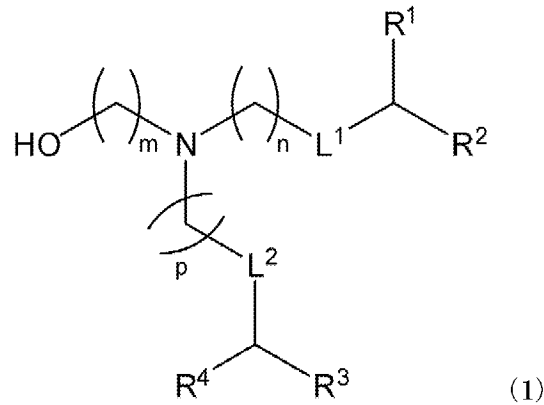
[0181] <試験結果>

得られた結果を図8に示す。各群の投与初日(0日目)の体重を100%と換算し、各群の平均値を用いてグラフ化した。なお、図中の矢印はLNPを投与した日を示す。その結果、LNP投与群では、各投与の翌日に体重減少が認められたが、一方、CHPを付与したLNP投与群では、その変化は軽微であり、薬剤未投与群と近い体重推移を示した。以上から、LNPにCHPを付与することによって、LNPに起因する体重減少という副作用を軽減できることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] 脂質粒子であって、脂質粒子構成脂質としてイオン化脂質、リン脂質、及びステロールを含有し、且つ疎水性基を含む修飾多糖類を含有する、脂質粒子。
- [請求項2] 前記イオン化脂質の含有量が、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して35～70モル%であり、
前記リン脂質の含有量が、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して4～25モル%であり、且つ
前記ステロールの含有量が、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して15～55モル%である、
請求項1に記載の脂質粒子。
- [請求項3] 前記修飾多糖類の構成多糖類がプルランを含む、請求項1に記載の脂質粒子。
- [請求項4] 前記疎水性基がステロール骨格を有する疎水性基を含む、請求項1に記載の脂質粒子。
- [請求項5] 前記修飾多糖類の重量平均分子量が5000～2,000,000である、請求項1に記載の脂質粒子。
- [請求項6] 薬剤を含有する、請求項1に記載の脂質粒子。
- [請求項7] 前記薬剤が核酸である、請求項6に記載の脂質粒子。
- [請求項8] 前記核酸が、mRNA、免疫刺激性二本鎖RNA、 siRNA、 miRNA、 リボザイム、 CpGオリゴDNA、 アンチセンスオリゴDNA、 核酸アプタマー、 デゴイ、 遺伝子発現用二本鎖DNA、 及びジヌクレオチドから選択される少なくとも1つである、請求項7に記載の脂質粒子。
- [請求項9] 前記核酸がmRNAまたはCpGオリゴDNAである、請求項7に記載の脂質粒子。
- [請求項10] 前記核酸がmRNAである、請求項7に記載の脂質粒子。
- [請求項11] 前記核酸がCpGオリゴDNAである、請求項7に記載の脂質粒子。
- [請求項12] 前記イオン化脂質が一般式(1)：

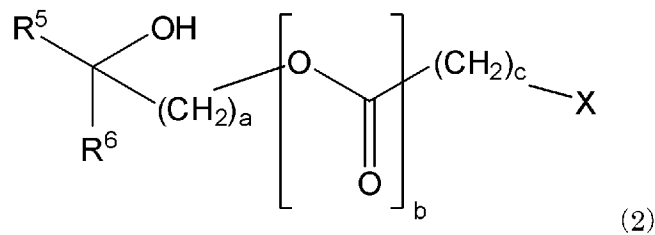
[化1]



[式中：R¹はアルキル基を示す。R²はアルキル基を示す。R³はアルキル基を示す。R⁴はアルキル基又は水素原子を示す。L¹は－O－C(＝O)－又は－C(＝O)－O－を示す。L²は－O－C(＝O)－又は－C(＝O)－O－を示す。mは1～8の整数を示す。nは3～10の整数を示す。pは3～10の整数を示す。]

であらわされるアミノ脂質、一般式(2)：

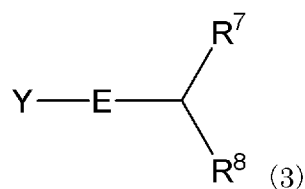
[化2]



[式中：aは3～5の整数を示す。bは0又は1を示す。cは0～4の整数を示す。R⁵及びR⁶は同一又は異なって、アルキル基又はアルケニル基を示す。Xは置換されていてもよい非芳香族窒素含有ヘテロ環基又は置換されていてもよいアミノ基を示す。]

で表されるアミノ脂質、及び一般式(3)

[化3]



[式中：R⁷及びR⁸は同一又は異なって、アルキル基又はアルケニル基を示す。Yは置換されていてもよい非芳香族窒素含有ヘテロ環基又は置換されていてもよいアミノ基を示す。Eはリンカーを示す。]

で表されるアミノ脂質からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1に記載の脂質粒子。

[請求項13] さらに、粒子の凝集を阻害する複合化脂質を含む請求項1に記載の粒子。

[請求項14] 前記複合化脂質の含有量が、前記脂質粒子構成脂質100モル%に対して0～2モル%である、請求項13に記載の脂質粒子。

[請求項15] 前記複合化脂質がポリエチレングリコール-脂質コンジュゲートである、請求項13に記載の脂質粒子。

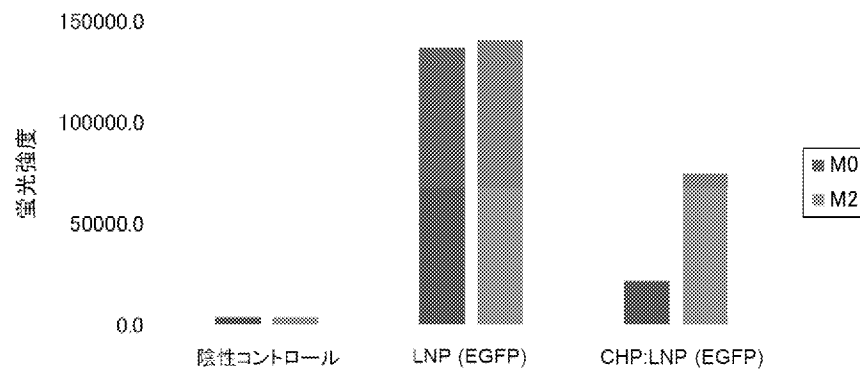
[請求項16] 質量平均粒子径が10～200nmである、請求項1に記載の脂質粒子。

[請求項17] 請求項1～16のいずれかに記載の脂質粒子を含有する、医薬。

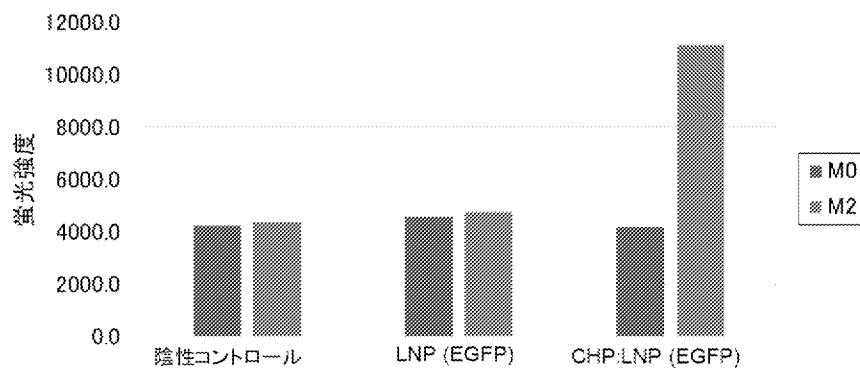
[請求項18] がん、免疫疾患、中枢性疾患等の治療薬、感染症ワクチン又はがんワクチンである、請求項17に記載の医薬。

[請求項19] 皮下投与、経静脈投与、筋肉内投与、経鼻投与又は気道内投与に用いるための、請求項17に記載の医薬。

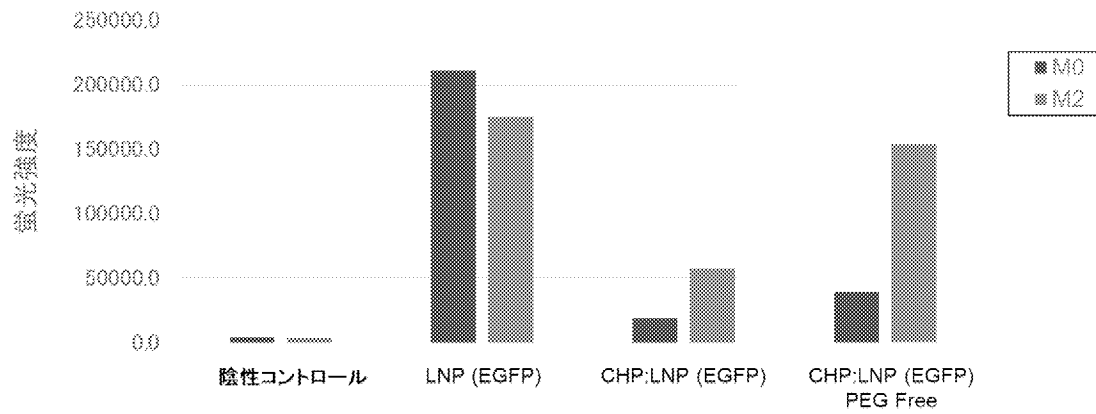
[図1]



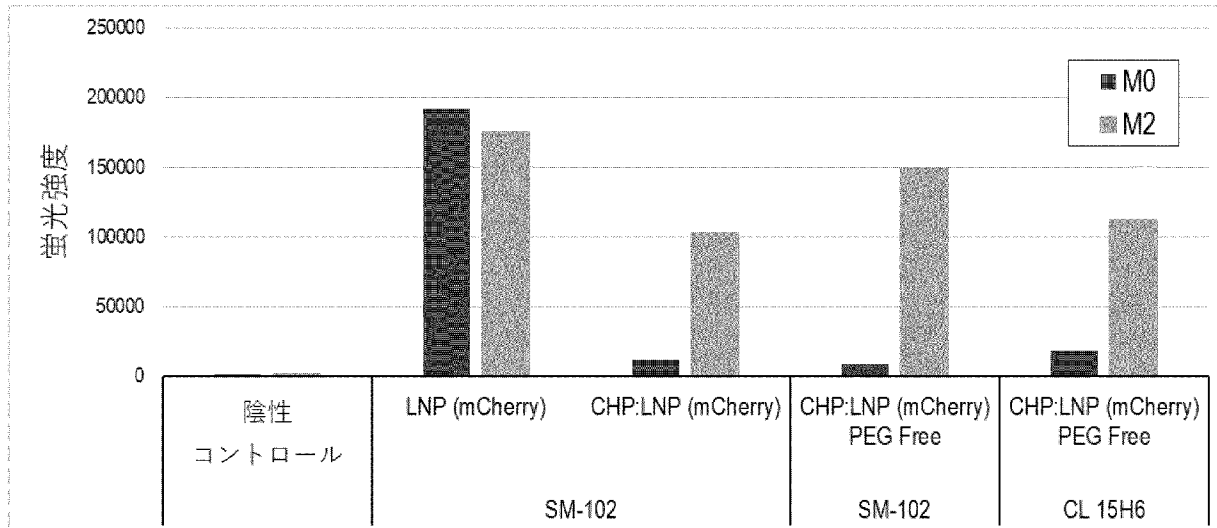
[図2]



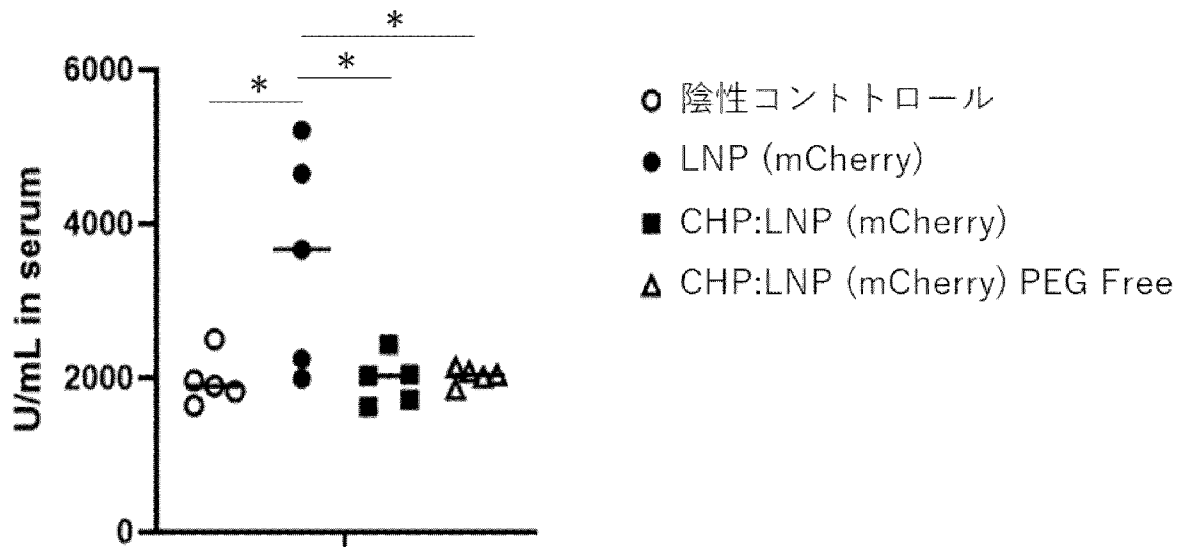
[図3]



[図4]



[図5]



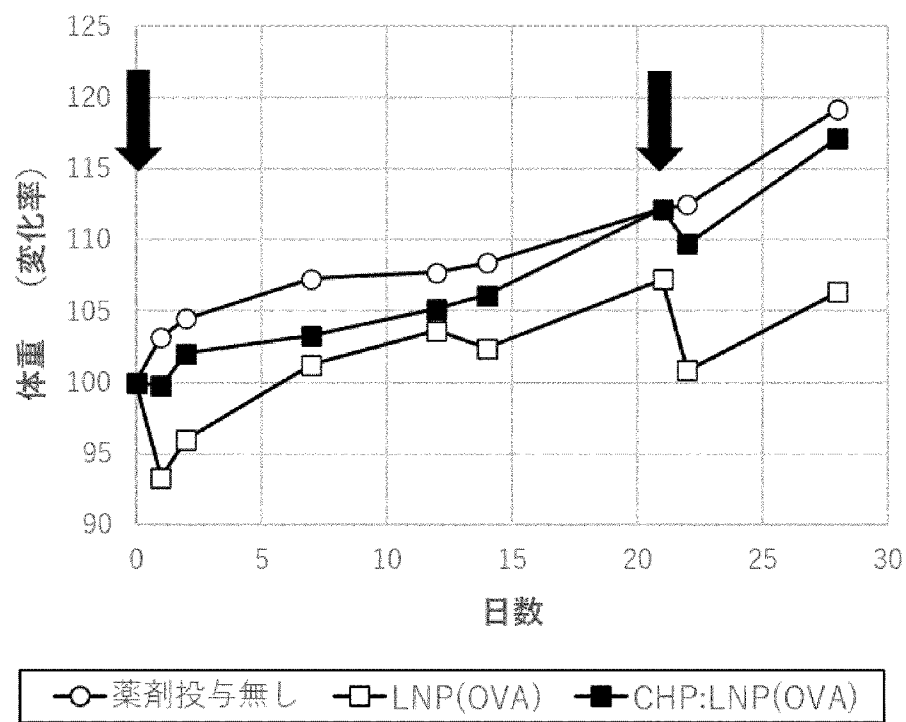
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/009979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/36(2006.01)i; **A61K 9/14**(2006.01)i; **A61K 31/711**(2006.01)i; **A61K 31/713**(2006.01)i; **A61K 31/7084**(2006.01)i; **A61K 31/7088**(2006.01)i; **A61K 31/7105**(2006.01)i; **A61K 45/00**(2006.01)i; **A61K 47/18**(2017.01)i; **A61K 47/24**(2006.01)i; **A61K 47/28**(2006.01)i; **A61K 47/34**(2017.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **A61P 25/00**(2006.01)i; **A61P 31/00**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **A61P 37/04**(2006.01)i; **A61P 37/06**(2006.01)i

FI: A61K47/36; A61K45/00; A61K48/00; A61P25/00; A61P31/00; A61P37/04; A61K31/7105; A61K31/711; A61K31/7088; A61K31/713; A61K31/7084; A61P37/06; A61P35/00; A61K9/14; A61K47/24; A61K47/34; A61K47/18; A61K47/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K47/36; A61K9/14; A61K31/711; A61K31/713; A61K31/7084; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K45/00; A61K47/18; A61K47/24; A61K47/28; A61K47/34; A61K48/00; A61P25/00; A61P31/00; A61P35/00; A61P37/04; A61P37/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIZUTA, R. et al. Reversible conjugation of biomembrane vesicles with magnetic nanoparticles using a self-assembled nanogel interface: single particle analysis using imaging flow cytometry. Nanoscale Advances. 2022, vol. 4, no. 8, pp. 1999-2010. abstract, fig. 1-4, Electronic Supplementary Information, section "liposome preparation"	1-19
Y	JP 58-201711 A (EISAI CO., LTD.) 24 November 1983 (1983-11-24) claims 1-2, 6, p. 3, upper right column, lines 6-7, examples 1-4	1-19
Y	JP 2005-298644 A (AKIYOSHI, Kazunari) 27 October 2005 (2005-10-27) paragraph [0002], examples 1, 3.1	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 May 2024

Date of mailing of the international search report

04 June 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-507421 A (MEDIGENE AG) 11 March 2010 (2010-03-11) paragraphs [0056]-[0057]	1-19
Y	JP 2012-529464 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A) 22 November 2012 (2012-11-22) paragraphs [0022]-[0029]	1-19
Y	JP 2010-540498 A (UNIVERSITAETSSPITAL BASEL) 24 December 2010 (2010-12-24) paragraphs [0091]-[0096]	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/009979

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	58-201711	A	24 November 1983	US 4636381 A claims 1-2, column 3, lines 13-15, examples 6-7, experimental examples 1-4 EP 94692 A1 KR 10-1984-0004512 A	
JP	2005-298644	A	27 October 2005	(Family: none)	
JP	2010-507421	A	11 March 2010	US 2010/0297214 A1 paragraphs [0059]-[0060] WO 2008/049633 A2 EP 1915987 A1	
JP	2012-529464	A	22 November 2012	US 2012/0087976 A1 paragraphs [0030]-[0037] WO 2010/142685 A1 EP 2440242 A1 CN 102458457 A KR 10-2012-0031497 A	
JP	2010-540498	A	24 December 2010	US 2010/0239652 A1 paragraphs [0091]-[0096] WO 2009/040426 A1 EP 2197917 A1 CN 101878229 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

A61K 47/36(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/711(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i;
A61K 31/7084(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i;
A61K 47/18(2017.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i;
A61K 48/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i;
A61P 37/04(2006.01)i; A61P 37/06(2006.01)i
FI: A61K47/36; A61K45/00; A61K48/00; A61P25/00; A61P31/00; A61P37/04; A61K31/7105; A61K31/711;
A61K31/7088; A61K31/713; A61K31/7084; A61P37/06; A61P35/00; A61K9/14; A61K47/24; A61K47/34;
A61K47/18; A61K47/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

A61K47/36; A61K9/14; A61K31/711; A61K31/713; A61K31/7084; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K45/00;
A61K47/18; A61K47/24; A61K47/28; A61K47/34; A61K48/00; A61P25/00; A61P31/00; A61P35/00; A61P37/04;
A61P37/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報1922-1996年
日本国公開実用新案公報1971-2024年
日本国実用新案登録公報1996-2024年
日本国登録実用新案公報1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	MIZUTA, R. et al., Reversible conjugation of biomembrane vesicles with magnetic nanoparticles using a self-assembled nanogel interface: single particle analysis using imaging flow cytometry, Nanoscale Advances, 2022, Vol. 4, No. 8, pp.1999-2010. Abstract, Figures 1-4, Electronic Supplementary Informationの「liposome preparation」の項	1-19
Y	JP 58-201711 A（エーザイ株式会社）24.11.1983（1983-11-24） 請求項1-2, 6, 第3ページ右上欄第6-7行, 例6-7, 実施例1-4	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引
用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな
いと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
24.05.2024

国際調査報告の発送日
04.06.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

梅田 隆志 4C 1785

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2005-298644 A (秋吉 一成) 27.10.2005 (2005 - 10 - 27) 段落[0002], 実施例1, 3.1	1-19
Y	JP 2010-507421 A (メディゲーネ アクチエンゲゼルシャフト) 11.03.2010 (2010 - 03 - 11) 段落[0056]-[0057]	1-19
Y	JP 2012-529464 A (グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム) 22.11.2012 (2012 - 11 - 22) 段落[0022]-[0029]	1-19
Y	JP 2010-540498 A (ユニヴェルズイテーツシュピタル パーゼル) 24.12.2010 (2010 - 12 - 24) 段落[0091]-[0096]	1-19

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/009979

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	58-201711	A	24.11.1983	US	4636381	A	
				Claims 1-2, Column 3, lines 13-15, Examples 6-7, Experimental Examples 1-4			
				EP	94692	A1	
				KR	10-1984-0004512	A	

JP	2005-298644	A	27.10.2005	(ファミリーなし)			

JP	2010-507421	A	11.03.2010	US	2010/0297214	A1	
				Paragraphs [0059]-[0060]			
				WO	2008/049633	A2	
				EP	1915987	A1	

JP	2012-529464	A	22.11.2012	US	2012/0087976	A1	
				Paragraphs [0030]-[0037]			
				WO	2010/142685	A1	
				EP	2440242	A1	
				CN	102458457	A	
				KR	10-2012-0031497	A	

JP	2010-540498	A	24.12.2010	US	2010/0239652	A1	
				Paragraphs [0091]-[0096]			
				WO	2009/040426	A1	
				EP	2197917	A1	
				CN	101878229	A	
