

(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  
2023年10月5日(05.10.2023)



(10) 国際公開番号  
**WO 2023/190176 A1**

(51) 国際特許分類:

A61K 47/20 (2006.01) A61K 47/24 (2006.01)  
A61K 9/10 (2006.01) A61K 47/28 (2006.01)  
A61K 9/14 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)  
A61K 47/14 (2017.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/011850

(22) 国際出願日: 2023年3月24日(24.03.2023)

(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 2022-051918 2022年3月28日(28.03.2022) JP

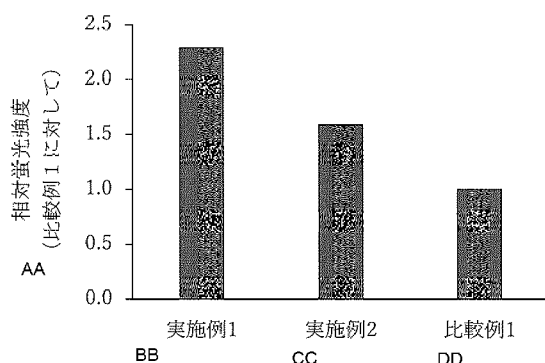
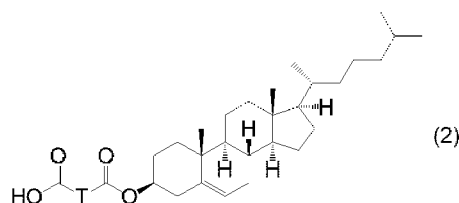
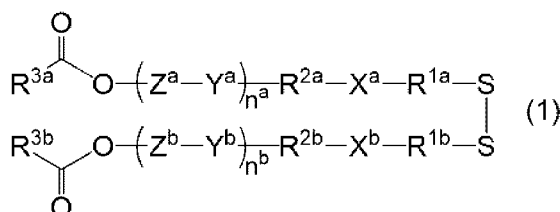
(71) 出願人: 日油株式会社 (NOF CORPORATION)

[JP/JP]; 〒1506019 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号 Tokyo (JP). 国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP). 国立大学法人千葉大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).

(72) 発明者: 中井 悠太 (NAKAI, Yuta); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町3-3 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 丹下 耕太 (TANGE, Kota); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町3-3 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 櫻井 遊

(54) Title: LIPID NANOPARTICLES FOR DELIVERING NUCLEIC ACID TO SPLENIC TISSUE, AND METHOD FOR DELIVERING NUCLEIC ACID TO SPLENIC TISSUE USING SAME

(54) 発明の名称: 脾臓組織へ核酸を送達するための脂質ナノ粒子およびこれを用いて脾臓組織へ核酸を送達する方法



AA Relative fluorescence intensity (compared with Comparative example 1)  
BB Example 1  
CC Example 2  
DD Comparative example 2

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: lipid nanoparticles for delivering a nucleic acid to splenic tissue, which can improve the efficiency of delivery of a nucleic acid to splenic tissue cells; and a method for delivering a nucleic acid to splenic tissue using the lipid nanoparticles. Provided are: lipid

WO 2023/190176 A1

(SAKURAI, Yu); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 秋田英万(AKITA, Hidetaka); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 田中 浩揮(TANAKA, Hiroki); 〒2608675 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学 大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 堀 瑞歩(HORI, Mizuho); 〒2608675 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学 薬学部内 Chiba (JP). 五味 昌樹(GOMI, Masaki); 〒2608675 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学薬学府内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 鎌田 光宜, 外(KAMADA, Mitsunori et al.); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル 高島国際特許事務所 Osaka (JP).

(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))

nanoparticles that are used for the delivery of a nucleic acid to splenic tissue, each of the lipid nanoparticles comprising (A) an ionic lipid represented by formula (1), (B) an anionic lipid or a compound represented by formula (2), (C) cholesterol, and (D) dimyristoyl glycerol PEG represented by the formula  $CH_2(OR^6)-CH(OR^7)-CH_2(OR^8)$  (In the formulae, the definitions for the symbols are as described in the description.); and a method for delivering a nucleic acid to splenic tissue using the lipid nanoparticles.

(57) 要約: 本発明は、脾臓組織細胞への核酸送達効率を改善できる脾臓組織へ核酸を送達するための脂質ナノ粒子およびこれを用いて脾臓組織へ核酸を送達する方法を提供する。(A) 式(1)で表されるイオン性脂質、(B) アニオン性リン脂質または式(2)で表される化合物、(C) コレステロー

ル、および (D) 式:  $\text{CH}_2(\text{OR}^6) - \text{CH}(\text{OR}^7) - \text{CH}_2(\text{OR}^8)$  で表されるジミリストイルグリセロールPEG を含む核酸を脾臓組織へ送達するために用いられる脂質ナノ粒子 (式中の記号の定義は明細書に記載の通りである)、およびこれを用いて脾臓組織へ核酸を送達する方法。

## 明 細 書

発明の名称：

脾臓組織へ核酸を送達するための脂質ナノ粒子およびこれを用いて脾臓組織へ核酸を送達する方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、脾臓組織へ核酸を送達するために用いられる脂質ナノ粒子、およびこれを用いて脾臓組織へ核酸を送達する方法に関する。

### 背景技術

[0002] siRNAなどのオリゴ核酸を用いた核酸治療やmRNAやpDNA等を用いた遺伝子治療を実用化するために、効果的で安全な核酸送達キャリアが求められている。ウイルスベクターは、発現効率のよい核酸送達キャリアであるが、安全性の観点から実用上問題がある。そのため、より安全に使用できる非ウイルス核酸送達キャリアの開発が進められている。そのなかでもイオン性脂質を用いたキャリアである脂質ナノ粒子は、現在最も一般的に使用されている非ウイルス核酸送達キャリアである。

[0003] イオン性脂質は、大別してアミン部位と脂質部位とから構成されている。例えば、イオン性脂質は、酸性条件下でプロトン化するアミン部位とポリアニオンである核酸とが静電的に相互作用し、脂質ナノ粒子を形成することで、細胞への取り込みを促進し、核酸を細胞内へ送達するものである。

[0004] 一般に広く用いられている公知のイオン性脂質としては、1, 2-ジオレオイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DODAP) が挙げられる。このような公知のイオン性脂質と、リン脂質、コレステロール及びPEG脂質を組み合わせることによって、脂質ナノ粒子を形成し、細胞内に核酸を送達し得ることが知られている（例えば、非特許文献1参照）。

[0005] 例えば、特許文献1では、一つまたは二つのアミン部位と一つの脂質部位とからなる化合物同士を、生分解性を示すジスルフィド結合で繋いだ構造を有するイオン性脂質について述べられている。この特許文献1では、当該イ

オン性脂質が血中安定性や腫瘍標的性などの体内動態を改善することが示されている。また、アミン部位周辺の構造を変更することで、脂質膜構造体としてのpKaを細胞内でのエンドソーム脱出に有利な値に調整できる他、細胞内でジスルフィド結合が切断されることを利用し、核酸を脂質膜構造体から解離させる効果を有することが示されている。実際、公知のイオン性脂質であるDODAPと比較して、高い核酸送達効率を示すことから、当該イオン性脂質は核酸の細胞質内への送達効率の向上などの細胞内動態を改善できることが明らかとなっている。

[0006] 例えば、特許文献2では、3級アミン部位、ジスルフィド結合に加えて、脂質部位近傍に芳香環を導入したイオン性脂質を用いることで、エンドソーム膜との融合能を高め、細胞質への核酸送達効率をさらに高めた脂質膜構造体が示されている。

[0007] 上述のようにエンドソーム脱出効率や膜融合能を高めることで、細胞内動態を改善したイオン性脂質が開発されている一方で、イオン性脂質からなる脂質ナノ粒子が、核酸送達キャリアとして生体内でより実用的な効果を発揮するためには、標的とする臓器や細胞への指向性が求められている。

[0008] 脂質ナノ粒子に広く用いられているPEG脂質の一つにジミリスチルグリセロールPEG (DMG-PEG)がある。これを用いた脂質ナノ粒子は血中に投与された際、血中で徐々にPEG脂質が脂質ナノ粒子から解離し、血中に存在するアポリipoprotein E (ApoE)が脂質ナノ粒子に接着することで、ApoEの受容体を発現する肝臓への集積性が高まることが知られている(例えば、非特許文献2参照)。

[0009] 肝臓以外への臓器への指向性を付与した例としては、PEG脂質としてミリスチン酸に由来する疎水性基を有するDMG-PEGではなく、ステアリン酸に由来する疎水性基を有するジステアロイルグリセロールPEG (DSG-PEG)を用いることで、腫瘍への集積性を高めた例がある(非特許文献3)。DSG-PEGはDMG-PEGと比較して血中で脂質ナノ粒子から解離しがたいことから、血中でのApoEの接着を回避し、肝臓への集積

を抑制し、高い血中滞留性を示し、結果として腫瘍への集積性が高まる。

[0010] 肝臓以外への臓器への指向性を付与したその他の例としては、脂質ナノ粒子の粒子径を140～230nmにコントロールすることで、脾臓への核酸導入効率を高めた例がある（例えば、特許文献3参照）。200nmの粒子径の脂質ナノ粒子が100nmの粒子径の脂質ナノ粒子と比較して、肝臓への核酸導入を回避し、脾臓への核酸導入効率を高めていることが示されている。

[0011] 上述のように、細胞内動態を改善した脂質ナノ粒子を用いて核酸導入効率を高められ、かつ脂質ナノ粒子の構成成分であるPEG脂質の変更や脂質ナノ粒子の粒子径の調節することで、核酸を肝臓や脾臓などの標的組織へ効率良く送達することも可能である。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0012] 特許文献1：米国特許第9708628号明細書

特許文献2：国際公開第2019/188867号

特許文献3：米国特許出願公開第2020/0345641号明細書

### 非特許文献

[0013] 非特許文献1：Molecular Therapy, 25(7)：1467-1475 (2017)

非特許文献2：J. Control. Release, 235：236-244 (2016)

非特許文献3：J. Control. Release, 200：97-105 (2015)

非特許文献4：Biomater. Sci, 9：1449-1463 (2021)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0014] ところで、脾臓は、免疫細胞が多く存在する臓器であるため、核酸ワクチン用途での標的対象となり得るが、当該分野での進歩にも関わらず、従来の脂質ナノ粒子を用いた脾臓への核酸送達効率は十分ではなく、改善の余地がある。

[0015] また、特許文献1に記載の脂質ナノ粒子では、肝臓への核酸送達効率は高いことが示されているものの、脾臓への核酸送達に関しては示されていない。

[0016] この点、非特許文献4および特許文献3のそれぞれには、脾臓送達用の脂質ナノ粒子に関して、構造的特徴の異なるイオン性脂質を用いることが示されている。しかしながら、これらの文献では、それぞれ異なるリン脂質が脂質ナノ粒子の構成成分として使用されており、イオン性脂質の構造毎にリン脂質との最適な組み合わせが異なっている。

[0017] 上述のように、脂質ナノ粒子を用いて脾臓への核酸導入効率を高めた例はあるが、イオン性脂質の構造ごとに適切なリン脂質が異なることから、実用化に向けては十分に満足されるものではなく、さらなる核酸送達効率の改善が求められている。

[0018] 本発明は、上記課題を鑑み、脾臓組織細胞への核酸送達効率を改善できる脾臓組織へ核酸を送達するための脂質ナノ粒子およびこれを用いて脾臓組織へ核酸を送達する方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0019] 上述のように、脂質ナノ粒子ではイオン性脂質の構造毎にリン脂質の適切な組み合わせが異なっており、効率良い核酸の送達には、イオン性脂質とリン脂質などとの組合せを最適化することが求められる。

[0020] 発明者らは上記課題に鑑み鋭意検討した結果、エンドソーム脱出に適したpKaを有し、かつ細胞内の還元的環境下で特異的に分解するイオン性脂質と、アニオン性リン脂質または式(2)で表されるアニオン性コレステロールとを用いて製造された脂質ナノ粒子が、効率良く脾臓組織へ核酸導入できることを見出した。この知見に基づく本発明は、以下の通りである。

[0021] [1] (A) 式(1) :

[0022]



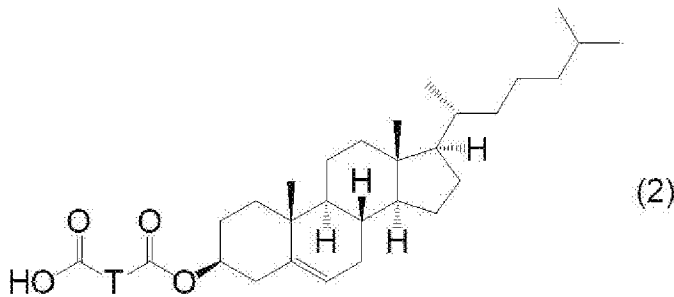
R<sup>9</sup>は炭素数2～20の脂肪族炭化水素基を表し、  
aは2～10の整数を表す。)

で表される基を表す。)

で表されるイオン性脂質、

(B) アニオン性リン脂質または式(2) :

[0024] [化2]



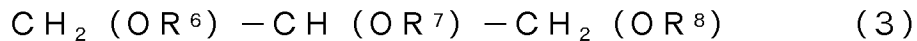
[0025] (式(2)中、

Tは炭素数1～8の2価の脂肪族炭化水素基を表す。)

で表される化合物、

(C) コレステロール、および

(D) 式(3) :



(式(3)中、

R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>およびR<sup>8</sup>のいずれか二つはミリスチル基を表し、残りの一つは  
数平均分子量1,000～3,000のポリエチレングリコール鎖を介して  
連結される炭素数1～6のアルキル基を表す。)

で表されるジミリスチルグリセロールPEG

を含む核酸を脾臓組織へ送達するために用いられる脂質ナノ粒子。

[0026] [2] 前記アニオン性リン脂質が1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-  
-ホスホグリセロールまたは1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホス  
ホセリンである[1]に記載の脂質ナノ粒子。

[0027] [3] 前記アニオン性リン脂質が1,2-ジミリスチル-sn-グリセ  
ロ-3-ホスホグリセロール(DMPG)、1,2-ジパルミトイル-sn

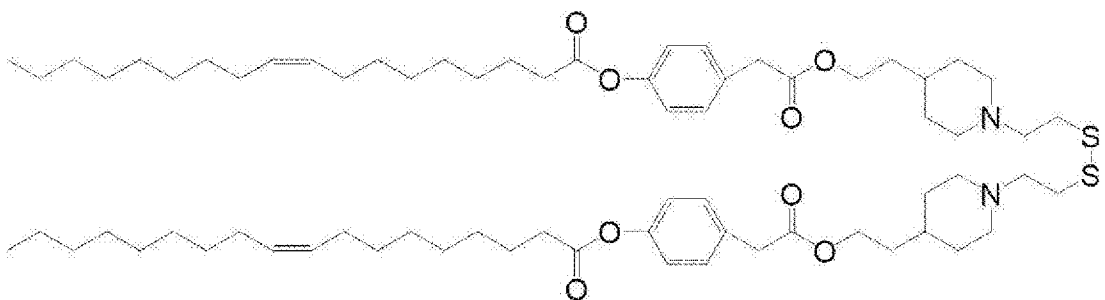
ーグリセロ-3-ホスホグリセロール (DPPG)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (POPG)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DOPG)、1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (SOPG)、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DSPG)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン (DPPS)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン (POPS)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン (DOPS)、1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン (DL oPS)、1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン (SOPS)、および1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン (DSPS) からなる群から選ばれる少なくとも一つである [1] または [2] に記載の脂質ナノ粒子。

[0028] [4] 前記アニオン性リン脂質が1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (POPG)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DOPG)、または1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン (DL oPS) である [1] ~ [3] のいずれか一つに記載の脂質ナノ粒子。

[0029] [5] 式 (2) 中のTが炭素数1~3の2価の脂肪族炭化水素基である [1] ~ [4] のいずれか一つに記載の脂質ナノ粒子。

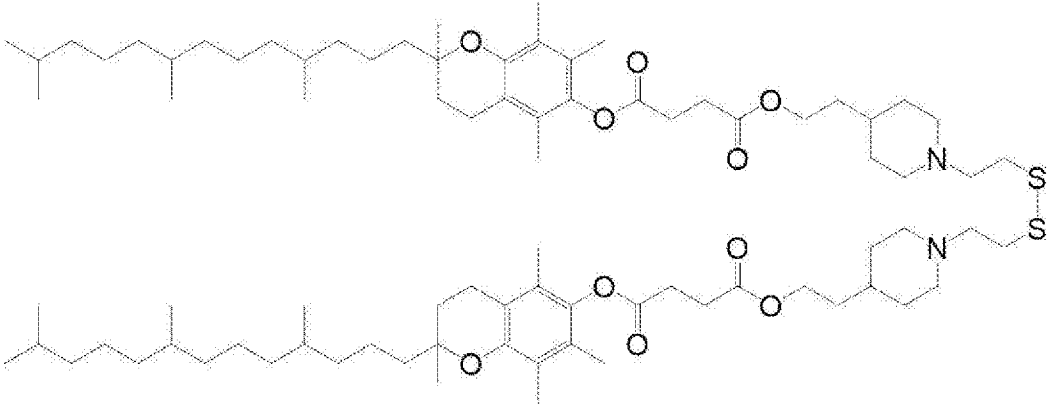
[0030] [6] 式 (1) で表されるイオン性脂質が、下記式：

[0031] [化3]



[0032] または

[0033] [化4]



[0034] で表されるいずれかのイオン性脂質である [1] ~ [5] のいずれか一つに記載の脂質ナノ粒子。

[0035] [7] 前記脂質ナノ粒子の成分として中性リン脂質が含まれていてもよい [1] ~ [6] のいずれか一つに記載の脂質ナノ粒子。

[0036] [8] 前記中性リン脂質が 1, 2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンまたは 1, 2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンである [7] に記載の脂質ナノ粒子。

[0037] [9] 前記中性リン脂質が 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1, 2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DEPC)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (SOPC)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、および 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (POPE) からなる群から選ばれる少なくとも一つである [7] または [8] に記載の脂質ナノ粒子。

[0038] [10] 前記アニオン性リン脂質または前記式 (2) で表される化合物と

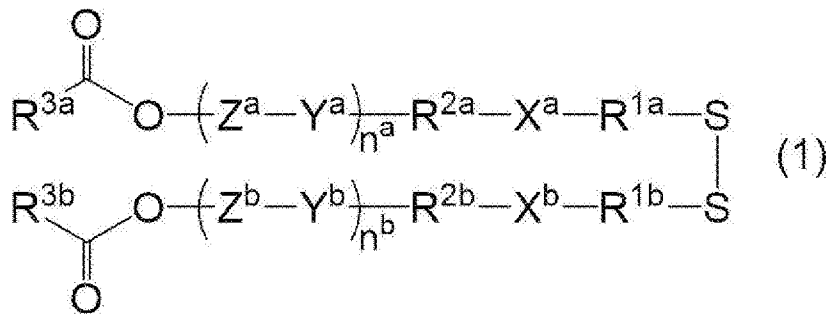
前記中性リン脂質との比率が100:0~25:75mol%である[7]~[9]のいずれか一つに記載の脂質ナノ粒子。

[0039] [11] 前記イオン性脂質、前記アニオン性リン脂質または前記式(2)で表される化合物、前記中性リン脂質、および前記コレステロールの合計に対して、前記イオン性脂質が30~70mol%であり、前記アニオン性リン脂質または前記式(2)で表される化合物が2.5~15mol%であり、前記中性リン脂質が0~15mol%であり、前記コレステロールが20~60mol%であり、ジミリスチルグリセロールPEGが0.5~1.5mol%である[7]~[10]のいずれか一つに記載の脂質ナノ粒子。

[0040] [12] 核酸を封入した[1]~[11]のいずれか一つに記載の脂質ナノ粒子を生体に静脈内投与することを含む、脾臓組織へ核酸を送達する方法。

[0041] [13] (A)式(1)：

[0042] [化5]

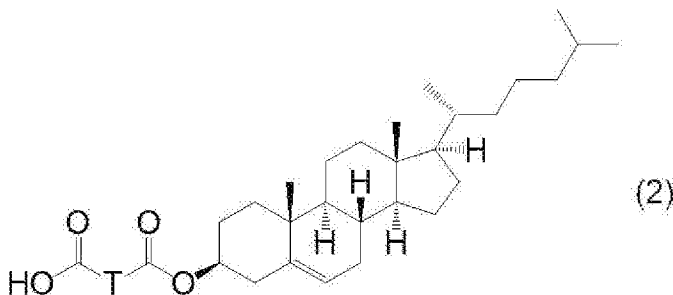


[0043] (式(1)中、各記号は[1]で定義した通りである。)

で表されるイオン性脂質、

(B) アニオン性リン脂質または式(2)：

[0044] [化6]

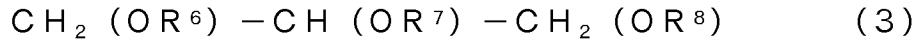


[0045] (式(2)中、Tは[1]で定義した通りである。)

で表される化合物、

(C) コレステロール、および

(D) 式(3) :



(式(3)中、各記号は[1]で定義した通りである。)

で表されるジミリスティルグリセロールPEG

を含む脂質ナノ粒子の、核酸を脾臓組織へ送達するために用いられる医薬を製造するための使用。

[0046] [14] 前記アニオン性リン脂質が1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスホグリセロールまたは1, 2-ジアシル-s n-グリセロール-3-ホスホセリンである[13]に記載の使用。

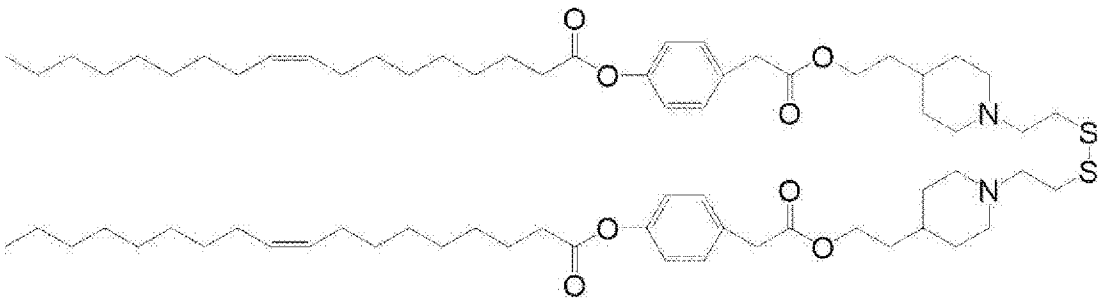
[0047] [15] 前記アニオン性リン脂質が1, 2-ジミリスティル-s n-グリセロール-3-ホスホグリセロール(DMPG)、1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール-3-ホスホグリセロール(DPPG)、1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロール-3-ホスホグリセロール(POPG)、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロール-3-ホスホグリセロール(DOPG)、1-ステアロイル-2-オレオイル-s n-グリセロール-3-ホスホグリセロール(SOPG)、1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロール-3-ホスホグリセロール(DSPG)、1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロール-3-ホスホセリン(DPPS)、1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロール-3-ホスホセリン(POPS)、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロール-3-ホスホセリン(DOPS)、1, 2-ジリノレオイル-s n-グリセロール-3-ホスホセリン(DLOPS)、1-ステアロイル-2-オレオイル-s n-グリセロール-3-ホスホセリン(SOPS)、および1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロール-3-ホスホセリン(DSPS)からなる群から選ばれる少なくとも一つである[13]または[14]に記載の使用。

[0048] [16] 前記アニオン性リン脂質が1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (POPG)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DOPG)、または1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン (DLoPS) である [13] ~ [15] のいずれか一つに記載の使用。

[0049] [17] 式(2)中のTが炭素数1~3の2価の脂肪族炭化水素基である [13] ~ [16] のいずれか一つに記載の使用。

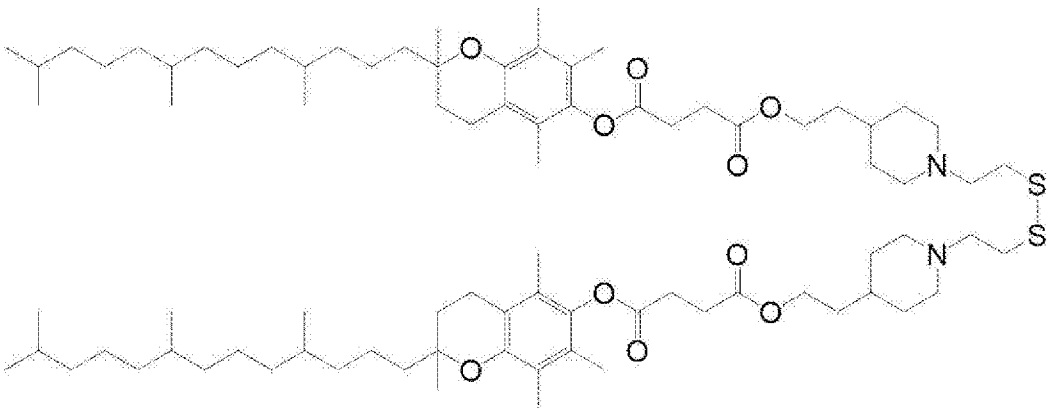
[0050] [18] 式(1)で表されるイオン性脂質が、下記式：

[0051] [化7]



[0052] または

[0053] [化8]



[0054] で表されるいずれかのイオン性脂質である [13] ~ [17] のいずれか一つに記載の使用。

[0055] [19] 前記脂質ナノ粒子の成分として中性リン脂質が含まれていてもよい [13] ~ [18] のいずれか一つに記載の使用。

[0056] [20] 前記中性リン脂質が1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホ

スホコリンまたは1, 2-ジオシル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンである [19] に記載の使用。

[0057] [21] 前記中性リン脂質が1, 2-ジオレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、1, 2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1, 2-ジエルコイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン (DEPC)、1, 2-ジパルミトイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、1-ステアロイル-2-オレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン (SOPC)、1, 2-ジオレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、および1-パルミトイル-2-オレオイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (POPE) からなる群から選ばれる少なくとも一つである [19] または [20] に記載の使用。

[0058] [22] 前記アニオン性リン脂質または前記式 (2) で表される化合物と前記中性リン脂質との比率が100:0~25:75 mol%である [19] ~ [21] のいずれか一つに記載の使用。

[0059] [23] 前記イオン性脂質、前記アニオン性リン脂質または前記式 (2) で表される化合物、前記中性リン脂質、および前記コレステロールの合計に対して、前記イオン性脂質が30~70 mol%であり、前記アニオン性リン脂質または前記式 (2) で表される化合物が2.5~15 mol%であり、前記中性リン脂質が0~15 mol%であり、前記コレステロールが20~60 mol%であり、ジミリストイルグリセロールPEGが0.5~1.5 mol%である [19] ~ [22] のいずれか一つに記載の使用。

### 発明の効果

[0060] 本発明の脂質ナノ粒子は、エンドソーム脱出に適したpKaを有し、かつ細胞内の還元的環境下で特異的に分解するイオン性脂質とアニオン性リン脂質またはアニオン性コレステロールとの組合せ、および脂質組成を最適化したことで、従来技術の脂質組成と比較して脾臓組織へ効率良く核酸を送達できる

。

### 図面の簡単な説明

[0061] [図1]実施例1および2の脂質ナノ粒子(LNP)ならびに肝臓移行用の組成である比較例1のLNPの脾臓における遺伝子発現活性を示す図である。

[図2]実施例3のLNPおよび肝臓移行用の組成である比較例2のLNPの脾臓におけるLNPの集積性を示す図である。

[図3]実施例3のLNPおよび肝臓移行用の組成である比較例2のLNPの脾臓における遺伝子発現活性を示す図である。

[図4]実施例1および4から10のLNPならびに肝臓移行用の組成である比較例1のLNPの脾臓における遺伝子発現活性を示す図である。

[図5]実施例5および11から24のLNPの脾臓における遺伝子発現活性を示す図である。

[図6]実施例18および25から29のLNPの脾臓における遺伝子発現活性を示す図である。

[図7]実施例30のLNPおよび肝臓送達用の組成である比較例3のLNPの脾臓における遺伝子発現活性を示す図である。

[図8]OVA-mRNAを封入した実施例18および24のLNPならびに肝臓送達用の組成である比較例1のLNPをマウスに投与した際のCTL活性を示す図である。

[図9]OVA-mRNAを封入した実施例30のLNP、肝臓送達用の組成である比較例3のLNP、および脾臓送達用の組成である比較例4のLNPをマウスに投与した際のCTL活性を示す図である。

[図10]OVA-mRNAを封入した実施例31のLNPおよび脾臓送達用の組成である比較例4のLNPをマウスに投与した際のCTL活性を示す図である。

[図11]MOG-mRNAもしくはLuc-mRNAを封入した実施例32のLNPまたはPBSを投与したマウスの病態スコアを示す図である。

[図12]MOG-mRNAもしくはLuc-mRNAを封入した実施例32の

LNPまたはPBSを投与したマウスの体重変動(%) (Day 10に対して)を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0062] 以下、本発明の実施形態を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。本発明は、式(1)で表されるイオン性脂質(即ち、3級アミノ基、脂質部位、そして生分解性基であるジスルフィド結合を有するイオン性脂質)、アニオン性リン脂質または式(2)で表されるアニオン性コレステロール、コレステロール、および式(3)で表されるジミリストイルグリセロールPEGを含む脂質ナノ粒子、並びにこれを用いて脾臓細胞に核酸を送達する方法に関するものである。

#### [0063] 脂質ナノ粒子

本明細書中、「脂質ナノ粒子」(Lipid Nanoparticle、本明細書中「LNP」と略称することがある)とは、両親媒性脂質の親水性基が界面の水相側に向かって配列した膜構造を有し、粒子径が1 $\mu$ m未満である粒子を意味し、「両親媒性脂質」とは、親水性基および疎水性基の両方を有する脂質を意味する。

[0064] 本発明の脂質ナノ粒子の粒子径は、好ましくは10nm~500nmであり、より好ましくは30nm~300nmである。粒子径の測定は、例えばZetasizer Nano (Malvern社)などの粒度分布測定装置を用いて行うことができる。脂質ナノ粒子の粒子径は、脂質ナノ粒子の製造方法により、適宜調整することができる。本明細書中、「粒子径」とは、動的光散乱法により測定した平均粒子径(ゼータ平均)を意味する。

[0065] 両親媒性脂質としては、例えば、イオン性脂質、リン脂質、PEG脂質等を挙げるることができる。本明細書中、「PEG」とは、ポリエチレングリコールを意味し、「PEG脂質」とは、PEGで修飾した脂質を意味し、「Xで修飾したY」(例えば、X:PEG、Y:脂質)とは、Xが結合したYを意味する。言い換えると、「PEG脂質」とは、PEGが結合した脂質を意味する。

[0066] 本発明の脂質ナノ粒子は、式（１）で表されるイオン性脂質、アニオン性リン脂質または式（２）で表されるアニオン性コレステロール、中性リン脂質、コレステロール、および式（３）で表されるジミリストイルグリセロールPEG以外の脂質（以下「他の脂質」と記載することがある）を含んでいてもよい。他の脂質としては、例えば、コレステロール以外のステロール、式（３）で表されるジミリストイルグリセロールPEG以外のPEG脂質が挙げられる。

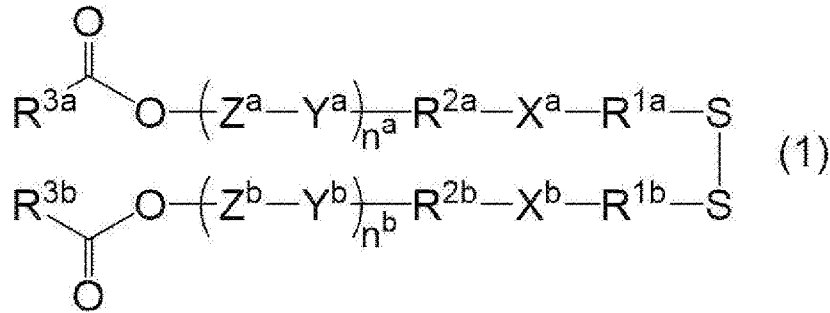
[0067] 本発明の脂質ナノ粒子中の他の脂質の量は、脂質ナノ粒子中の脂質の総量に対して、好ましくは0～50mol%、より好ましくは0～30mol%、さらに好ましくは0～10mol%である。ここで、「脂質ナノ粒子中の脂質の総量」とは、例えば、脂質ナノ粒子が、式（１）で表されるイオン性脂質、リン脂質、コレステロール、および式（３）で表されるジミリストイルグリセロールPEGおよび他の脂質を構成成分として含有する場合、「式（１）で表されるイオン性脂質、リン脂質、コレステロール、および式（３）で表されるジミリストイルグリセロールPEGおよび他の脂質の合計量」を意味する。また、本明細書中、「Aに対するBの量（mol%）」とは、「 $100 \times B \text{の量 (mol)} / A \text{の量 (mol)}$ 」を意味する。例えば「脂質の総量に対する他の脂質の量（mol%）」とは、「 $100 \times \text{他の脂質の量 (mol)} / \text{脂質の総量 (mol)}$ 」を意味する。

[0068] 本発明において他の脂質を使用しないこと、即ち、本発明の脂質ナノ粒子を構成する脂質は、式（１）で表されるイオン性脂質、アニオン性リン脂質または式（２）で表されるアニオン性コレステロール、中性リン脂質、コレステロール、および式（３）で表されるジミリストイルグリセロールPEGからなることが最も好ましい。

#### [0069] イオン性脂質

本発明で使用するイオン性脂質は、下記式（１）で表されるイオン性脂質（本明細書中「イオン性脂質（１）」と略称することがある）である。イオン性脂質（１）は、１種のみを使用してもよく、２種以上を併用してもよい

[0070] [化9]



[0071] (式(1)中、

R<sup>1a</sup>およびR<sup>1b</sup>はそれぞれ独立して、炭素数1～6のアルキレン基を表し

X<sup>a</sup>およびX<sup>b</sup>はそれぞれ独立して、炭素数が1～6であり、かつ3級アミノ基の数が1の非環状のアルキル3級アミノ基、または炭素数が2～5であり、かつ3級アミノ基の数が1～2の環状のアルキレン3級アミノ基を表し

R<sup>2a</sup>およびR<sup>2b</sup>はそれぞれ独立して、炭素数8以下のアルキレン基またはオキシジアルキレン基を表し、

Y<sup>a</sup>およびY<sup>b</sup>はそれぞれ独立して、エステル結合、アミド結合、カーバメート結合、エーテル結合またはウレア結合を表し、

Z<sup>a</sup>およびZ<sup>b</sup>はそれぞれ独立して、炭素数が3～16であり、少なくとも一つの芳香環を有し、かつヘテロ原子を有していてもよい芳香族化合物から誘導される2価の基を表し、

n<sup>a</sup>およびn<sup>b</sup>はそれぞれ独立して、0または1であり、

R<sup>3a</sup>およびR<sup>3b</sup>はそれぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミンとコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、水酸基を有するステロール誘導體とコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、炭素数1～40の脂肪族炭化水素基、シクロプロパン環を有する炭素数3～40のアルキル基、または式(4)：



(式(4)中、

$R^a$ は炭素数2~20の脂肪族炭化水素基を表し、

$a$ は2~10の整数を表す。)

で表される基を表す。)

[0072]  $R^{1a}$ および $R^{1b}$ はそれぞれ独立して、炭素数1~6のアルキレン基を表し、直鎖状であっても良く、分岐を有していても良いが、好ましくは直鎖状である。該アルキレン基の炭素数は、好ましくは1~4であり、より好ましくは1~2である。炭素数1~6のアルキレン基としては、具体的にはメチレン基、エチレン基、トリメチレン基、イソプロピレン基、テトラメチレン基、イソブチレン基、ペンタメチレン基、ネオペンチレン基等を挙げることができる。 $R^{1a}$ および $R^{1b}$ は、好ましくはそれぞれ独立して、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、イソプロピレン基またはテトラメチレン基であり、最も好ましくはそれぞれエチレン基である。

[0073]  $R^{1a}$ は $R^{1b}$ と同一であっても異なってもよいが、好ましくは、 $R^{1a}$ は $R^{1b}$ と同一の基である。

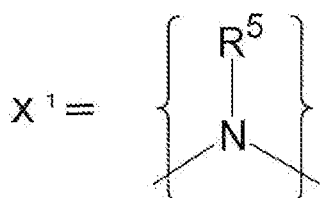
[0074]  $X^a$ および $X^b$ はそれぞれ独立して、炭素数が1~6であり、かつ3級アミノ基の数が1の非環状のアルキル3級アミノ基、または炭素数が2~5であり、かつ3級アミノ基の数が1~2の環状のアルキレン3級アミノ基を表し、好ましくはそれぞれ独立して、炭素数が2~5であり、かつ3級アミノ基の数が1~2の環状のアルキレン3級アミノ基である。

[0075] 炭素数が1~6であり、かつ3級アミノ基の数が1の非環状のアルキル3級アミノ基中の炭素数1~6のアルキル基は、直鎖状であっても分岐状であっても環状であっても良い。該アルキル基の炭素数は、好ましくは1~3である。炭素数1~6のアルキル基としては、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、*tert*-ペンチル基、1,2-ジメチルプロピル基、2-メチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、2,2-ジメチルブ

チル基、2, 3-ジメチルブチル基、シクロヘキシル基等を挙げることができ、好ましくはメチル基、エチル基、プロピル基またはイソプロピル基であり、最も好ましくはメチル基である。

[0076] 炭素数が1～6であり、かつ3級アミノ基の数が1の非環状のアルキル3級アミノ基の好ましい具体的な構造は、X<sup>1</sup>で示される。

[0077] [化10]



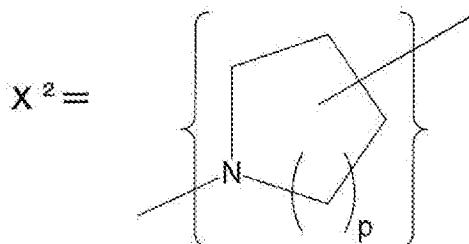
[0078] X<sup>1</sup>のR<sup>5</sup>は炭素数1～6のアルキル基を表し、直鎖状であっても分岐状であっても環状であっても良い。該アルキル基の炭素数は、好ましくは1～3である。炭素数1～6のアルキル基としては、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基、1, 2-ジメチルプロピル基、2-メチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、2, 2-ジメチルブチル基、2, 3-ジメチルブチル基、シクロヘキシル基等を挙げることができ、好ましくはメチル基、エチル基、プロピル基またはイソプロピル基であり、最も好ましくはメチル基である。

[0079] 炭素数が2～5であり、かつ3級アミノ基の数が1～2の環状のアルキレン3級アミノ基中の炭素数は、好ましくは4～5である。炭素数が2～5であり、かつ3級アミノ基の数が1～2の環状のアルキレン3級アミノ基としては、具体的にはアジリジレン基、アゼチジレン基、ピロリジレン基、ピペリジレン基、イミダゾリジレン基、ピペラジレン基であり、好ましくはピロリジレン基、ピペリジレン基、ピペラジレン基であり、最も好ましくはピペリジレン基である。

[0080] 炭素数が2～5であり、かつ3級アミノ基の数が1の環状のアルキレン3

級アミノ基の好ましい具体的な構造は $X^2$ で示される。

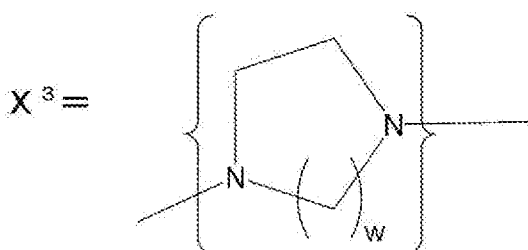
[0081] [化11]



[0082]  $X^2$ の $p$ は1または2である。 $p$ が1のとき $X^2$ はピロリジレン基であり、 $p$ が2のとき $X^2$ はピペリジレン基である。好ましくは、 $p$ は2である。

[0083] 炭素数が2～5であり、かつ3級アミノ基の数が2の環状のアルキレン3級アミノ基の好ましい具体的な構造は $X^3$ で示される。

[0084] [化12]



[0085]  $X^3$ の $w$ は1または2である。 $w$ が1のとき $X^3$ はイミダゾリジレン基であり、 $w$ が2のとき $X^3$ はピペラジレン基である。

[0086]  $X^a$ は $X^b$ と同一であっても異なってもよいが、好ましくは、 $X^a$ は $X^b$ と同一の基である。

[0087]  $R^{2a}$ および $R^{2b}$ はそれぞれ独立して、炭素数8以下のアルキレン基またはオキシアルキレン基を表し、好ましくはそれぞれ独立して、炭素数8以下のアルキレン基である。

[0088] 炭素数8以下のアルキレン基は、直鎖状であっても、分岐を有していても良いが、好ましくは直鎖状である。該アルキレン基に含まれる炭素数は、好ましくは6以下であり、最も好ましくは4以下である。炭素数8以下のアルキレン基としては、具体的にはメチレン基、エチレン基、トリメチレン基、イソプロピレン基、テトラメチレン基、イソブチレン基、ペンタメチレン基

、ヘキサメチレン基、ヘプタメチレン基、オクタメチレン基等を挙げることができ、好ましくはメチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基であり、最も好ましくはエチレン基である。

[0089] 本明細書中、「炭素数8以下のオキシジアルキレン基」とは、エーテル結合を介したアルキレン基（アルキレン-O-アルキレン、言い換えると「アルキレンオキシアルキレン基」）であって、二つ存在するアルキレン基の炭素数の合計が8以下の基を意味する。ここで、二つ存在するアルキレンは同一でも異なってもよいが、好ましくは同一である。炭素数8以下のオキシジアルキレン基としては、具体的にはオキシジメチレン基、オキシジエチレン基、オキシジ（トリメチレン）基（即ち、トリメチレンオキシトリメチレン基）、オキシジ（テトラメチレン）基（即ち、テトラメチレンオキシテトラメチレン基）等を挙げることができる。好ましくは、オキシジメチレン基、オキシジエチレン基、オキシジ（トリメチレン）基であり、最も好ましくはオキシジエチレン基である。

[0090]  $R^{2a}$ は $R^{2b}$ と同一であっても異なってもよいが、好ましくは、 $R^{2a}$ は $R^{2b}$ と同一の基である。

[0091]  $Y^a$ および $Y^b$ はそれぞれ独立して、エステル結合、アミド結合、カーバメート結合、エーテル結合またはウレア結合であり、好ましくはそれぞれ独立して、エステル結合、アミド結合またはカーバメート結合であり、より好ましくはそれぞれ独立して、エステル結合またはアミド結合であり、最も好ましくはそれぞれエステル結合である。 $Y^a$ および $Y^b$ の結合の向きは制限されないが、 $Y^a$ および $Y^b$ がエステル結合の場合、好ましくは、 $-Z^a-CO-O-O-R^{2a}-$ および $-Z^b-CO-O-O-R^{2b}-$ の構造を呈する。

[0092]  $Y^a$ は $Y^b$ と同一であっても異なってもよいが、好ましくは、 $Y^a$ は $Y^b$ と同一の基である。

[0093]  $Z^a$ および $Z^b$ はそれぞれ独立して、炭素数が3~16であり、少なくとも一つの芳香環を有し、かつヘテロ原子を有していてもよい芳香族化合物から誘導される2価の基を表す。該芳香族化合物に含まれる炭素数は好ましくは

6～12であり、最も好ましくは6～7である。また、該芳香族化合物に含まれる芳香環は、好ましくは一つである。

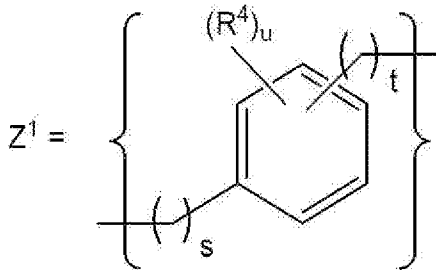
[0094] 炭素数3～16の芳香族化合物に含まれる芳香環の種類として、芳香族炭化水素環については、ベンゼン環、ナフタレン環、アントラセン環、芳香族ヘテロ環についてはイミダゾール環、ピラゾール環、オキサゾール環、イソオキサゾール環、チアゾール環、イソチアゾール環、トリアジン環、ピロール環、フランチオフェン環、ピリミジン環、ピリダジン環、ピラジン環、ピリジン環、プリン環、プテリジン環、ベンズイミダゾール環、インドール環、ベンゾフラン環、キナゾリン環、フタラジン環、キノリン環、イソキノリン環、クマリン環、クロモン環、ベンゾジアゼピン環、フェノキサジン環、フェノチアジン環、アクリジン環等を挙げることができ、好ましくは、ベンゼン環、ナフタレン環、アントラセン環であり、最も好ましくは、ベンゼン環である。

[0095] 芳香環は置換基を有してもよく、その置換基としては、炭素数2～4のアシル基、炭素数2～4のアルコキシカルボニル基、炭素数2～4のカルバモイル基、炭素数2～4のアシルオキシ基、炭素数2～4のアシルアミノ基、炭素数2～4のアルコキシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、炭素数1～4のアルキルスルファニル基、炭素数1～4のアルキルスルホニル基、炭素数6～10のアリールスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、炭素数1～4のアルキル基、炭素数1～4のウレイド基、炭素数1～4のアルコキシ基、炭素6～10のアリール基、炭素数6～10のアリールオキシ基等を挙げることができ、好ましい例としてはアセチル基、メトキシカルボニル基、メチルカルバモイル基、アセトキシ基、アセトアミド基、メトキシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、メチルスルファニル基、フェニルスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、tert-ブチル基、ウレイド基、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、tert-ブトキ

シ基、フェニル基およびフェノキシ基等が挙げられる。

[0096]  $Z^a$ および $Z^b$ の好ましい具体的な構造としては、 $Z^1$ が挙げられる。

[0097] [化13]



[0098] 式中、 $s$ は0～3の整数を表し、 $t$ は0～3の整数を表し、 $u$ は0～4の整数を表し、 $u$ 個の $R^4$ はそれぞれ独立して置換基を表す。

[0099]  $Z^1$ の $s$ は、好ましくは0～1の整数であり、より好ましくは0である。

$Z^1$ の $t$ は、好ましくは0～2の整数であり、より好ましくは1である。

$Z^1$ の $u$ は、好ましくは0～2の整数であり、より好ましくは0～1の整数である。

[0100]  $Z^1$ の $R^4$ は、該イオン性脂質の合成過程における反応を阻害しない、炭素数3～16の芳香族化合物に含まれる芳香環（ベンゼン環）の置換基である。該置換基としては、炭素数2～4のアシル基、炭素数2～4のアルコシカルボニル基、炭素数2～4のカルバモイル基、炭素数2～4のアシルオキシ基、炭素数2～4のアシルアミノ基、炭素数2～4のアルコシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、炭素数1～4のアルキルスルファニル基、炭素数1～4のアルキルスルホニル基、炭素数6～10のアリールスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、炭素数1～4のアルキル基、炭素数1～4のウレイド基、炭素数1～4のアルコキシ基、炭素6～10のアリール基、炭素数6～10のアリールオキシ基等を挙げることができ、好ましい例としてはアセチル基、メトシカルボニル基、メチルカルバモイル基、アセトキシ基、アセトアミド基、メトシカルボニルアミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、メチルスルファニル基、フェニルスルホニル基、ニトロ基、トリフルオロ

メチル基、シアノ基、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*tert*-ブチル基、ウレイド基、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、*tert*-ブトキシ基、フェニル基およびフェノキシ基等が挙げられる。R<sup>4</sup>が複数個存在する場合、各R<sup>4</sup>は同一であっても異なってもよい。

[0101] Z<sup>a</sup>はZ<sup>b</sup>と同一であっても異なってもよいが、好ましくは、Z<sup>a</sup>はZ<sup>b</sup>と同一の基である。

[0102] n<sup>a</sup>およびn<sup>b</sup>はそれぞれ独立して、0または1である。

[0103] n<sup>a</sup>はn<sup>b</sup>と同一であっても異なってもよいが、好ましくは、n<sup>a</sup>はn<sup>b</sup>と同一である。

[0104] R<sup>3a</sup>およびR<sup>3b</sup>はそれぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミンとコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、水酸基を有するステロール誘導体とコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、炭素数1~40の脂肪族炭化水素基、シクロプロパン環を有する炭素数3~40のアルキル基、または式(4)：



(式(4)中、

R<sup>9</sup>は炭素数2~20の脂肪族炭化水素基を表し、

aは2~10の整数を表す。)

で表される基を表し、好ましくはそれぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミンとコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、または炭素数12~22の脂肪族炭化水素基であり、最も好ましくはそれぞれ独立して、炭素数12~22の脂肪族炭化水素基である。

[0105] 水酸基を有する脂溶性ビタミンとコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基とは、水酸基を有する脂溶性ビタミンの水酸基が\*  
O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-または\*  
O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-に置き換えられた構造を有する基を表す。\*は脂溶性ビタミンとの結合位置を表す。水酸基を有するステロール誘導体とコハク酸無水物またはグルタル酸無

水物との反応物由来の残基とは、水酸基を有するステロール誘導体の水酸基が\*—O—CO—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—または\*—O—CO—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—に置き換えられた構造を有する基を表す。\*はステロール誘導体との結合位置を表す。

[0106] 水酸基を有する脂溶性ビタミンとしては、例えばレチノール、エルゴステロール、7-デヒドロコレステロール、カルシフェロール、コルカルシフェロール、ジヒドロエルゴカルシフェロール、ジヒドロタキステロール、トコフェロール、トコトリエノール等を挙げることができる。水酸基を有する脂溶性ビタミンは、好ましくはトコフェロールである。

[0107] 水酸基を有するステロール誘導体としては、例えばコレステロール、コレスタノール、スチグマステロール、β-シトステロール、ラノステロール、およびエルゴステロール等が挙げられ、好ましくはコレステロール、またはコレスタノールである。

[0108] 炭素数1～40の脂肪族炭化水素基は、直鎖状であっても、分岐を有していてもよい。該脂肪族炭化水素基は、飽和であっても不飽和であってもよい。不飽和脂肪族炭化水素基の場合、該脂肪族炭化水素基に含まれる不飽和結合の数は通常1～6個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個である。不飽和結合には炭素-炭素二重結合および炭素-炭素三重結合が含まれるが、好ましくは炭素-炭素二重結合である。該脂肪族炭化水素基に含まれる炭素数は、好ましくは12～22であり、より好ましくは13～19であり、最も好ましくは13～17である。脂肪族炭化水素基には、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基等が含まれるが、好ましくはアルキル基またはアルケニル基が含まれる。炭素数1～40の脂肪族炭化水素基としては、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタ

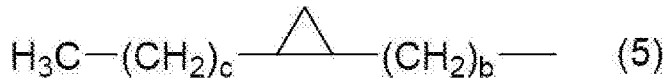
デシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、イコシル基、ヘンイコシル基、ドコシル基、トリコシル基、テトラコシル基、ペンタコシル基、ヘキサコシル基、ヘプタコシル基、オクタコシル基、ノナコシル基、トリアコンチル基、テトラコンチル基、ドデセニル基、トリデセニル基、テトラデセニル基、ペンタデセニル基、ヘキサデセニル基、ヘプタデセニル基、オクタデセニル基、ノナデセニル基、イコセニル基、ヘンイコセニル基、ドコセニル基、ドデカジエニル基、トリデカジエニル基、テトラデカジエニル基、ペンタデカジエニル基、ヘキサデカジエニル基、ヘプタデカジエニル基、オクタデカジエニル基、ノナデカジエニル基、イコサジエニル基、ヘンイコサジエニル基、ドコサジエニル基、オクタデカトリエニル基、イコサトリエニル基、イコサテトラエニル基、イコサペンタエニル基、ドコサヘキサエニル基、イソステアリル基、1-ヘキシルヘプチル基、1-ヘキシルノニル基、1-オクチルノニル基、1-オクチルウンデシル基、1-デシルウンデシル基等を挙げることができる。炭素数1~40の脂肪族炭化水素基は、好ましくはトリデシル基、ペンタデシル基、ヘプタデシル基、ノナデシル基、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基、1-ヘキシルノニル基であり、特に好ましくはトリデシル基、ヘプタデシル基、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基である。

[0109] 本発明の一態様において、 $R^{3a}$ および $R^{3b}$ で表される炭素数1~40（好ましくは炭素数12~22）の脂肪族炭化水素基は脂肪酸由来である。この場合、脂肪酸由来のカルボニル炭素は式(1)中の-CO-O-に含まれる。脂肪族炭化水素基の具体例としては、脂肪酸としてリノール酸を用いた場合ではヘプタデカジエニル基となり、脂肪酸としてオレイン酸を用いた場合ではヘプタデセニル基となる。

[0110]  $R^{3a}$ および $R^{3b}$ におけるシクロプロパン環を有する炭素数3~40のアルキル基は、アルキル鎖中に少なくとも一つのシクロプロパン環を有する、炭素数3~40のアルキル基を意味する。アルキル基の炭素数3~40はシクロプロパン環の炭素数を含まない。該アルキル基が有するシクロプロパン環

の数は、好ましくは一つである。R<sup>3a</sup>およびR<sup>3b</sup>におけるシクロプロパン環を有する炭素数3～40のアルキル基は、好ましくは式(5)：

[0111] [化14]



[0112] (式(5)中、bおよびcはそれぞれ独立して整数であり、bおよびcの合計が2～39である。)

で表される基である。好ましくは、bは1～20の整数であり、cは1～19の整数である。bはより好ましくは2～18の整数であり、さらに好ましくは3～17の整数であり、さらにより好ましくは4～12の整数である。cはより好ましくは3～15の整数であり、さらに好ましくは3～11の整数であり、さらにより好ましくは3～9の整数である。式(5)で表される基としては、例えば、7-(2-オクチルシクロプロピル)ヘプチル等が挙げられる。

[0113] 式(4)において、R<sup>9</sup>で表される炭素数2～20の脂肪族炭化水素基は、直鎖状であっても、分岐を有していてもよい。該脂肪族炭化水素基は、飽和であっても不飽和であってもよい。不飽和脂肪族炭化水素基の場合、該脂肪族炭化水素基に含まれる不飽和結合の数は通常1～6個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個である。不飽和結合には炭素-炭素二重結合および炭素-炭素三重結合が含まれるが、好ましくは炭素-炭素二重結合である。該脂肪族炭化水素基に含まれる炭素数は、好ましくは8～20であり、より好ましくは9～19であり、さらに好ましくは13～19であり、最も好ましくは13～17である。脂肪族炭化水素基には、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基等が含まれるが、好ましくはアルキル基またはアルケニル基が含まれ、より好ましくはアルキル基である。炭素数2～20の脂肪族炭化水素基としては、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペン

チル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、イコシル基、ドデセニル基、トリデセニル基、テトラデセニル基、ペンタデセニル基、ヘキサデセニル基、ヘプタデセニル基、オクタデセニル基、ノナデセニル基、イコセニル基、ヘンイコセニル基、ドコセニル基、ドデカジエニル基、トリデカジエニル基、テトラデカジエニル基、ペンタデカジエニル基、ヘキサデカジエニル基、ヘプタデカジエニル基、オクタデカジエニル基、ノナデカジエニル基、イコサジエニル基、イコサトリエニル基、イコサテトラエニル基、イコサペンタエニル基、イソステアリル基、1-ヘキシルヘプチル基、1-エチルノニル基、1-ブチルノニル基、1-ヘキシルノニル基、1-オクチルノニル基、1-オクチルウンデシル基、3-オクチルウンデシル基等を挙げることができる。炭素数2~20の脂肪族炭化水素基は、好ましくはトリデシル基、ペンタデシル基、ヘプタデシル基、ノナデシル基、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基、1-ヘキシルノニル基であり、特に好ましくはトリデシル基、ヘプタデシル基、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基である。

[0114] 式(4)において、 $a$ は好ましくは3~9の整数であり、より好ましくは3~7の整数であり、さらに好ましくは5~7の整数であり、最も好ましくは5または7である。

[0115]  $R^{3a}$ は $R^{3b}$ と同一であっても異なってもよいが、好ましくは、 $R^{3a}$ は $R^{3b}$ と同一の基である。

[0116] 本発明の一態様において、 $R^{1a}$ は $R^{1b}$ と同一であり、 $X^a$ は $X^b$ と同一であり、 $R^{2a}$ は $R^{2b}$ と同一であり、 $Y^a$ は $Y^b$ と同一であり、 $Z^a$ は $Z^b$ と同一であり、 $R^{3a}$ は $R^{3b}$ と同一である。

[0117] イオン性脂質(1)の好適な例としては、以下のイオン性脂質が挙げられる。

[イオン性脂質(1-1)]

$R^{1a}$ および $R^{1b}$ がそれぞれ独立して、炭素数1～6のアルキレン基（例、メチレン基、エチレン基）であり；

$X^a$ および $X^b$ がそれぞれ独立して、炭素数が1～6であり、かつ3級アミノ基の数が1の非環状のアルキル3級アミノ基（例、 $-N(CH_3)-$ ）、または炭素数が2～5であり、かつ3級アミノ基の数が1～2の環状のアルキレン3級アミノ基（例、ピペリジレン基）であり；

$R^{2a}$ および $R^{2b}$ がそれぞれ独立して、炭素数8以下のアルキレン基（例、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基）であり；

$Y^a$ および $Y^b$ がそれぞれ独立してエステル結合またはアミド結合であり；

$Z^a$ および $Z^b$ がそれぞれ独立して、炭素数が3～16であり、少なくとも一つの芳香環を有し、かつヘテロ原子を有していてもよい芳香族化合物から誘導される2価の基（例、 $-C_6H_4-CH_2-$ 、 $-CH_2-C_6H_4-CH_2-$ ）であり；

$n^a$ および $n^b$ がそれぞれ独立して、0または1であり；

$R^{3a}$ および $R^{3b}$ がそれぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミン（例、トコフェロール）とコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、または炭素数12～22の脂肪族炭化水素基（例、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基、1-ヘキシルノニル基）である；

イオン性脂質（1）。

[0118] [イオン性脂質（1-2）]

$R^{1a}$ および $R^{1b}$ がそれぞれ独立して、炭素数1～4のアルキレン基（例、メチレン基、エチレン基）であり；

$X^a$ および $X^b$ がそれぞれ独立して、炭素数が1～3であり、かつ3級アミノ基の数が1の非環状のアルキル3級アミノ基（例、 $-N(CH_3)-$ ）、または炭素数が2～5であり、かつ3級アミノ基の数が1の環状のアルキレン3級アミノ基（例、ピペリジレン基）であり；

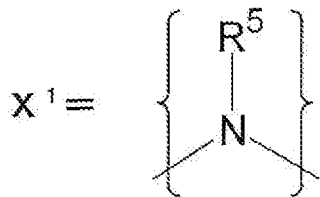
$R^{2a}$ および $R^{2b}$ がそれぞれ独立して、炭素数6以下のアルキレン基（例、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基）であり；

Y<sup>a</sup>およびY<sup>b</sup>がそれぞれ独立してエステル結合またはアミド結合であり；  
 Z<sup>a</sup>およびZ<sup>b</sup>がそれぞれ独立して、炭素数が6～12であり、1つの芳香環を有し、かつヘテロ原子を有していてもよい芳香族化合物から誘導される2価の基（例、 $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ ）であり；  
 n<sup>a</sup>およびn<sup>b</sup>がそれぞれ独立して、0または1であり；  
 R<sup>3a</sup>およびR<sup>3b</sup>がそれぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミン（例、トコフェロール）とコハク酸無水物との反応物由来の残基、または炭素数13～19の脂肪族炭化水素基（例、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基、1-ヘキシルノニル基）である；  
 イオン性脂質（1）。

## [0119] [イオン性脂質（1-3）]

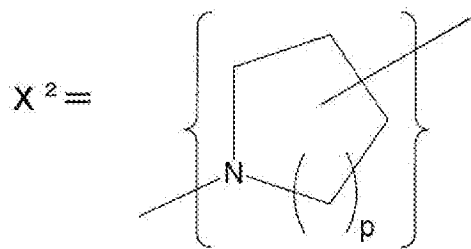
R<sup>1a</sup>およびR<sup>1b</sup>がそれぞれ独立して、炭素数1～2のアルキレン基（即ち、メチレン基またはエチレン基）であり；  
 X<sup>a</sup>およびX<sup>b</sup>がそれぞれ独立して、X<sup>1</sup>：

## [0120] [化15]



[0121] （式中、R<sup>5</sup>は炭素数1～3のアルキル基（例、メチル基）である。）、またはX<sup>2</sup>：

## [0122] [化16]



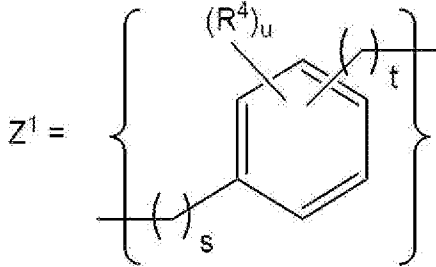
[0123] （式中、pは1または2である。）  
 であり；

$R^{2a}$ および $R^{2b}$ がそれぞれ独立して、炭素数4以下のアルキレン基（例、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基）であり；

$Y^a$ および $Y^b$ がそれぞれ独立してエステル結合またはアミド結合であり；

$Z^a$ および $Z^b$ がそれぞれ独立して、 $Z^1$ ：

[0124] [化17]



[0125] (式中、 $s$ は0～1の整数であり、 $t$ は0～2の整数であり、 $u$ は0～2の整数（好ましくは0）であり、 $u$ 個の $R^4$ は、それぞれ独立して置換基を表す。)

であり；

$n^a$ および $n^b$ がそれぞれ独立して、0または1であり；

$R^{3a}$ および $R^{3b}$ がそれぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミン（例、トコフェロール）とコハク酸無水物との反応物由来の残基、または炭素数13～17の脂肪族炭化水素基（例、ヘプタデセニル基、ヘプタデカジエニル基、1-ヘキシルノニル基）である；

イオン性脂質（1）。

[0126] イオン性脂質（1）の具体例として、以下のO-Ph-P3C1、O-Ph-P4C1、O-Ph-P4C2、O-Bn-P4C2、E-Ph-P4C2、L-Ph-P4C2、HD-Ph-P4C2、O-Ph-amide-P4C2、O-Ph-C3M、TS-P4C2を挙げることができる。

[0127] また、イオン性脂質（1）の具体例として、WO 2021/195529 A2に記載のLipid1からLipid20を挙げることができ、特に、以下のLipid1、Lipid5、Lipid8を挙げることができる。

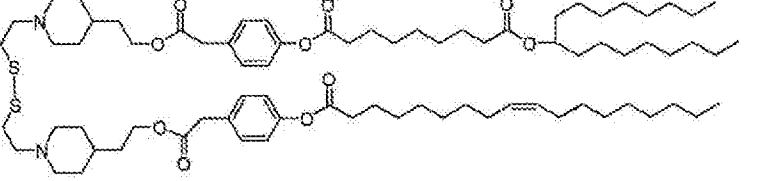
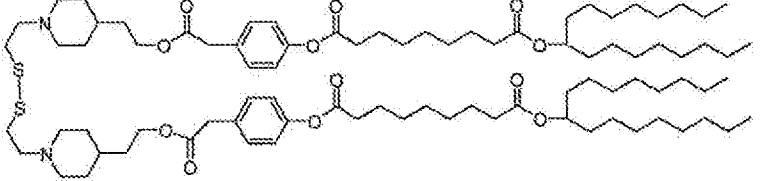
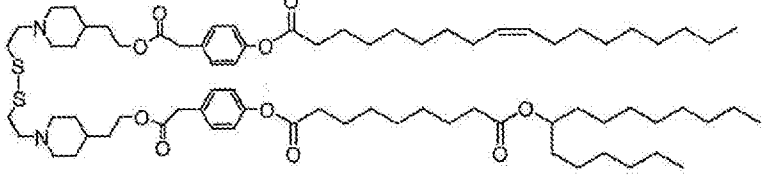
[0128] [表1-1]

イオン性 脂質の名称	構造
O-Ph-P3C1	
O-Ph-P4C1	
O-Ph-P4C2 (または SS- OP)	
O-Bn-P4C2	
E-Ph-P4C2 (または SS- EP)	

[0129]

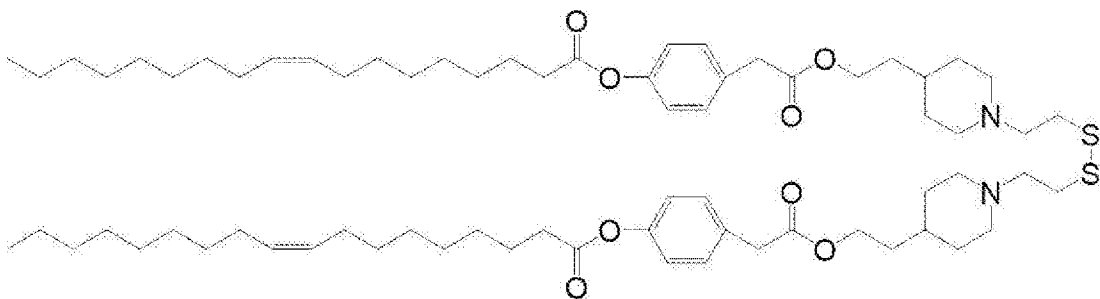


[表1-3]

イオン性 脂質の名称	構造
Lipid 1	
Lipid 5	
Lipid 8	

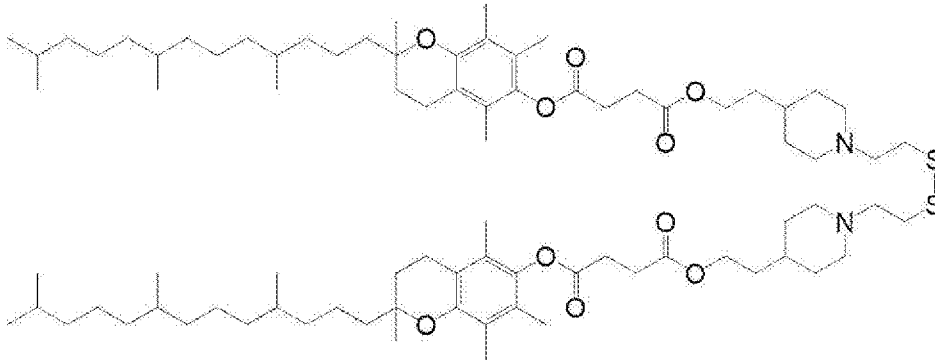
[0131] イオン性脂質（1）の具体例の中でも、SS-OPまたはSS-ECが好ましい。即ち、イオン性脂質（1）は、好ましくは下記式で表されるイオン性脂質である。

[0132] [化18]



[0133]

[化19]



[0134] 本発明の脂質ナノ粒子中のイオン性脂質（１）の量は、核酸の内封効率、細胞内での核酸の放出効率および脂質ナノ粒子の安定性の観点から、イオン性脂質（１）、アニオン性リン脂質または式（２）で表される化合物、中性リン脂質、およびコレステロールの合計に対して、好ましくは３０～７０ｍｏｌ％、より好ましくは４０～６５ｍｏｌ％、さらに好ましくは５０～６０ｍｏｌ％である。

[0135] イオン性脂質（１）は、公知の方法（例えば、WO 2019/188867 A1、US 9708628 B2、WO 2021/195529 A2に記載の方法）によって製造することができる。

[0136] リン脂質

本発明の脂質ナノ粒子は、リン脂質としてアニオン性リン脂質を含む。リン脂質はアニオン性リン脂質のみを使用してもよく、アニオン性リン脂質とその他、中性リン脂質とを併用してもよい。

[0137] アニオン性リン脂質の具体例としては、１，２－ジアシル－sn－グリセロール－３－ホスホセリン（PS）、１，２－ジアシル－sn－グリセロール－３－ホスホグリセロール（PG）、１，２－ジアシル－sn－グリセロール－３－ホスファチジン酸（PA）、これらのリゾ体等が挙げられる。

[0138] １，２－ジアシル－sn－グリセロール－３－ホスホセリン（PS）の具体例としては、

１，２－ジデカノイル－sn－グリセロール－３－ホスホセリン（DDPS）、  
 １，２－ジラウロイル－sn－グリセロール－３－ホスホセリン（DLPS）、

1, 2-ジミリストイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DMPS)  
 、  
 1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DPPS)  
 、  
 1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DSPS)  
 、  
 1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DOPS)、  
 1, 2-ジリノレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DL oPS  
 )、  
 1, 2-ジエルコイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DEPS)、  
 1-ミリストイル-2-パルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン  
 (MPPS)、  
 1-ミリストイル-2-ステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン  
 (MSPS)、  
 1-パルミトイル-2-ミリストイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン  
 (PMPS)、  
 1-パルミトイル-2-ステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン  
 (PSPS)、  
 1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (POPS)、  
 1-ステアロイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (SOPS)

が挙げられる。なお、本明細書中、リン脂質をその略号で記載することがある。例えば、1, 2-ジアシル-s n-グリセロ-3-ホスホセリンをPSと記載し、1, 2-ジデカノイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリンをDDPSと記載することがある。

[0139] 1, 2-ジアシル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (PG) の具体例としては、

- 1, 2-ジデカノイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DDPG)、
- 1, 2-ジラウロイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DLP G)、
- 1, 2-ジミリストイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DM PG)、
- 1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DP PG)、
- 1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DSP G)、
- 1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DOP G)、
- 1, 2-ジリノレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DLoPG)、
- 1, 2-ジエルコイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DEPG)、
- 1-ミリストイル-2-パルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (MPPG)、
- 1-ミリストイル-2-ステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (MSPG)、
- 1-パルミトイル-2-ミリストイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (PMPG)、
- 1-パルミトイル-2-ステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (PSPG)、
- 1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (POPG)、
- 1-ステアロイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (SOPG)

が挙げられる。

[0140] 1, 2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (PA) の具体例としては、

1, 2-ジデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (DDPA)、

1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (DLPA)、

1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (DMPA)、

1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (DPPA)、

1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (DSPA)、

1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (DOPA)、

1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (DLOPA)、

1, 2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (DEPA)、

1-ミリストイル-2-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (MPPA)、

1-ミリストイル-2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (MSPA)、

1-パルミトイル-2-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (PMPA)、

1-パルミトイル-2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 (PSPA)、

1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン

酸 (POPA)、

1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン

酸 (SOPA)

が挙げられる。

[0141] アニオン性リン脂質は、好ましくは1, 2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロールであり、より好ましくはDMPG、DPPG、POPG、DOPG、SOPGおよびDSPGからなる群から選ばれる少なくとも一つであり、さらに好ましくはPOPGまたはDOPGである。これらのリン脂質は類似のアシル鎖構造であることから同様の効果を奏すると考えられる。

[0142] アニオン性リン脂質のその他の形態としては、好ましくは1, 2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホセリンであり、より好ましくはDPPS、POPS、DOPS、DLPS、SOPSおよびDSPSからなる群から選ばれる少なくとも一つであり、さらに好ましくはDLPSである。これらのリン脂質は類似のアシル鎖構造であることから同様の効果を奏すると考えられる。

[0143] その他の中性リン脂質の例としては、1, 2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (PC)、1, 2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (PE)、これらのリゾ体等が挙げられる。

[0144] 1, 2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (PC) の具体例としては、

1, 2-ジデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DDPC)、

1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLPC)、

1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)

、

1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)

、

1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)

、  
1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、  
1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLoPC)  
)、  
1, 2-ジアラキドイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DAPC)  
1, 2-ジエイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DEIPC)  
C)、  
1, 2-ジベヘノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DBPC)、  
1, 2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DEPC)、  
1, 2-ジリグノセロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DLIPC)  
C)、  
1, 2-ジネルボノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DNPC)  
、  
1-ミリストイル-2-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン  
(MPPC)、  
1-ミリストイル-2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン  
(MSPC)、  
1-パルミトイル-2-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン  
(PMPC)、  
1-パルミトイル-2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン  
(PSPC)、  
1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、  
1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (SOPC)  
が挙げられる。

[0145] 1, 2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (PE)  
) の具体例としては、

1, 2-ジデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DPE)、

1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DLPE)、

1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DMPE)、

1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DPPE)、

1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DSPE)、

1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、

1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DL<sub>o</sub>PE)、

1, 2-ジェルコイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DEPE)、

1-ミリストイル-2-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (MPPE)、

1-ミリストイル-2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (MSPE)、

1-パルミトイル-2-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (PMPE)、

1-パルミトイル-2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (PSPE)、

1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (POPE)、

1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (SOPE)

が挙げられる。

[0146] その他の中性リン脂質は、特に限定されないが、好ましくはDPPC、DOPC、DSPC、DEPC、POPC、SOPC、POPEおよびDOP Eからなる群から選ばれる少なくとも一つであり、より好ましくは、DSP C、DOPCおよびDEPCからなる群から選ばれる少なくとも一つであり、最も好ましくはDEPCである。

[0147] アニオン性リン脂質とその他の中性リン脂質を併用する場合は、アニオン性リン脂質と中性リン脂質の比率は、好ましくは100：0～25：75 m o l %であり、より好ましくは75：25～25：75 m o l %であり、さらに好ましくは50：50 m o l %である。

[0148] 本発明の脂質ナノ粒子中のアニオン性リン脂質の総量は、核酸の内封効率、細胞内での核酸の放出効率および脂質ナノ粒子の安定性の観点から、イオン性脂質（1）、アニオン性リン脂質または式（2）で表される化合物、中性リン脂質、およびコレステロールの合計に対して、好ましくは1～20 m o l %であり、より好ましくは2.5～15 m o l %であり、さらに好ましくは2.5～10 m o l %である。

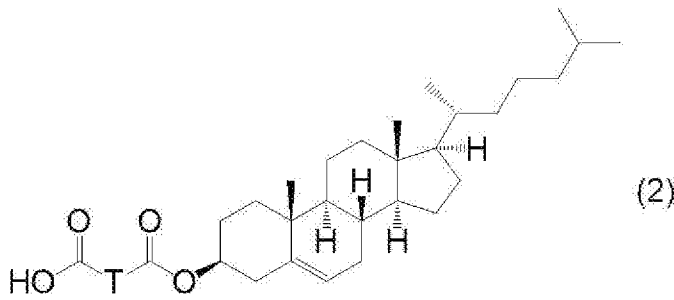
[0149] 本発明の脂質ナノ粒子中の中性リン脂質の総量は、核酸の内封効率、細胞内での核酸の放出効率および脂質ナノ粒子の安定性の観点から、イオン性脂質（1）、アニオン性リン脂質または式（2）で表される化合物、中性リン脂質、およびコレステロールの合計に対して、好ましくは0～15 m o l %であり、より好ましくは2～10 m o l %であり、さらに好ましくは2.5～7.5 m o l %である。

[0150] コレステロール

本発明の脂質ナノ粒子は、アニオン性リン脂質の代わりに式（2）のアニオン性コレステロール（本明細書中「アニオン性コレステロール（2）」と略称することがある）を含んでもよい。

[0151]

[化20]



[0152] (式(2)中、

Tは炭素数1～8の2価の脂肪族炭化水素基を表す。)

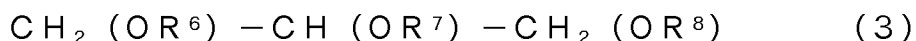
[0153] Tで表される炭素数1～8の2価の脂肪族炭化水素基は直鎖であっても分岐であっても不飽和を含んでいてもよい。Tは好ましくは炭素数1～6の直鎖の2価の飽和脂肪族炭化水素基であり、より好ましくは炭素数1～3の直鎖の2価の飽和脂肪族炭化水素基である。アニオン性コレステロール(2)の具体例としては、コレステリルヘミスクシネートが挙げられる。

[0154] 本発明の脂質ナノ粒子中のアニオン性コレステロール(2)の総量は、核酸の内封効率、細胞内での核酸の放出効率および脂質ナノ粒子の安定性の観点から、イオン性脂質(1)、アニオン性リン脂質またはアニオン性コレステロール(2)、中性リン脂質、およびコレステロールの合計に対して、好ましくは1～20mol%であり、より好ましくは2.5～15mol%であり、さらに好ましくは2.5～10mol%である。

[0155] 本発明の脂質ナノ粒子は、コレステロールを含む。本発明の脂質ナノ粒子中のコレステロールの量は、核酸の内封効率、細胞内での核酸の放出効率および脂質ナノ粒子の安定性の観点から、イオン性脂質(1)、アニオン性リン脂質またはアニオン性コレステロール(2)、中性リン脂質、およびコレステロールの合計に対して、好ましくは20～60mol%、より好ましくは25～50mol%、さらに好ましくは30～40mol%である。

[0156] ジミリストイルグリセロールPEG

本発明の脂質ナノ粒子は、式(3)：



(式 (3) 中、

$R^6$ 、 $R^7$ および $R^8$ のいずれか二つはミリストイル基を表し、残りの一つは数平均分子量 1,000~3,000のポリエチレングリコール鎖 (PEG鎖) を介して連結される炭素数 1~6のアルキル基を表す。)

で表されるジミリストイルグリセロールPEG (本明細書中「ジミリストイルグリセロールPEG (3)」と略称することがある) を含む。

[0157] 式 (3) 中のPEG鎖の数平均分子量は 1,000~3,000であり、好ましくは 1,500~2,500である。このPEG鎖を形成するために用いられるPEGの数平均分子量は、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) によって測定することができる。

[0158] 炭素数 1~6のアルキル基は、直鎖状であっても分岐状であっても環状であってもよい。該アルキル基の炭素数は、好ましくは 1~3である。炭素数 1~6のアルキル基としては、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、*tert*-ペンチル基、1,2-ジメチルプロピル基、2-メチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、2,2-ジメチルブチル基、2,3-ジメチルブチル基、シクロヘキシル基等を挙げることができる。好ましくはメチル基である。

[0159] 本発明の脂質ナノ粒子中のジミリストイルグリセロールPEG (3) の量は、核酸の内封効率、細胞内での核酸の放出効率および脂質ナノ粒子の安定性の観点から、イオン性脂質 (1)、アニオン性リン脂質またはアニオン性コレステロール (2)、中性リン脂質、およびコレステロールの合計に対して、好ましくは 0.5~1.5 mol%、より好ましくは 1.0 mol% である。

[0160] 最適組成

本発明の脂質ナノ粒子におけるイオン性脂質 (1) : アニオン性リン脂質またはアニオン性コレステロール (2) : 中性リン脂質 : コレステロール :

ジミリストイルグリセロールPEG (3) の最適のモル比は、55 : 5 : 5 : 35 : 1.0である。

[0161] 脂質ナノ粒子の製造方法

本発明の脂質ナノ粒子は、イオン性脂質(1)、アニオン性リン脂質またはアニオン性コレステロール(2)、コレステロール、およびジミリストイルグリセロールPEG(3)を含む脂質原料を適当な分散媒(例えば水性分散媒、アルコール性分散媒)中に分散させ、必要に応じて組織化を誘導する操作を行うことにより製造することができる。

[0162] 本発明の脂質ナノ粒子を製造するための「組織化を誘導する操作」としては、例えば、マイクロ流路またはボルテックスを用いたアルコール(例えば、エタノール、tert-ブタノールなど)希釈法、単純水和法、超音波処理、加熱、ボルテックス、エーテル注入法、フレンチ・プレス法、コール酸法、Ca<sup>2+</sup>融合法、凍結-融解法、逆相蒸発法等の自体公知の方法が挙げられ、好ましくはマイクロ流路またはボルテックスを用いたアルコール希釈法であり、さらに好ましくはマイクロ流路を用いたアルコール希釈法である。マイクロ流路を用いたアルコール希釈法では、例えばNanoAssembler(登録商標)(Precision NanoSystems社)を用いて、核酸を含む酸性緩衝液と、脂質のエタノール溶液とを混合することによって脂質ナノ粒子を含む分散液を製造することができる。この方法で製造した分散液は、脂質ナノ粒子と、分散媒(酸性緩衝液およびアルコール)とを含むが、限外ろ過、透析、希釈等の操作によって分散媒(特にアルコール)の除去、分散媒(特に緩衝液)の交換等を行うことができる。

[0163] 脾臓細胞への核酸送達方法

本発明は、核酸を内封した本発明の脂質ナノ粒子を対象に投与することを含む、脾臓細胞に核酸を送達する方法も提供する。この方法では、脂質ナノ粒子を、対象に静脈内投与することが好ましい。

[0164] 核酸としては、例えば、DNA、RNA、RNAのキメラ核酸、DNA/RNAのハイブリッド等を挙げることができるが、これらに限定されない。

また、核酸は1～3本鎖のいずれも用いることができるが、好ましくは1本鎖または2本鎖である。核酸は、例えば、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドを有するヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するオリゴマー（例えば、市販のペプチド核酸（PNA）等）、または特殊な結合を有するオリゴマー（但し、該オリゴマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置を有するヌクレオチドを含有する）等であってもよい。

[0165] さらに核酸は、例えば、公知の修飾が付加された核酸、該分野で知られた標識のある核酸、キャップの付いた核酸、メチル化された核酸、1個以上の天然ヌクレオチドを類縁物で置換した核酸、ヌクレオチドが修飾された核酸、非荷電結合（例えば、メチルスルホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カーバメート等）を有する核酸、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）を有する核酸、例えば蛋白質（例えば、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリジン等）や糖（例えば、モノサッカライド等）等の側鎖基を有している核酸、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレン等）を含有する核酸、キレート化合物（例えば、金属、放射活性を有する金属、ホウ素、酸化性の金属等）を含有する核酸、アルキル化剤を含有する核酸、修飾された結合を有する核酸（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸等）等であってもよい。

[0166] 本発明において使用できるDNAの種類は特に制限されず、使用の目的に応じて適宜選択することができる。DNAとしては、例えば、プラスミドDNA、cDNA、アンチセンスDNA、染色体DNA、PAC、BAC、CpGオリゴ等が挙げられ、好ましくはプラスミドDNA、cDNA、アンチセンスDNAであり、より好ましくはプラスミドDNAである。プラスミドDNA等の環状DNAは適宜制限酵素等により消化され、線形DNAとして用いることもできる。

[0167] 本発明において使用できるRNAの種類は特に制限されず、使用の目的に

応じて適宜選択することができる。RNAとしては、例えば、siRNA、miRNA、shRNA、アンチセンスRNA、メッセンジャーRNA (mRNA)、一本鎖RNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、RNAレプリコン、トランスファーRNA、リボゾーマルRNA等が挙げられ、好ましくは、siRNA、miRNA、shRNA、mRNA、アンチセンスRNA、RNAレプリコンである。

- [0168] 本発明において用いられる核酸は、当業者が通常用いる方法により精製されていることが好ましい。
- [0169] 本発明において用いられる核酸は、ある所定の疾患に対して予防および／または治療活性を有するもの（予防・治療用核酸）が好ましい。そのような核酸としては、例えば、いわゆる遺伝子治療に用いられる核酸などが挙げられる。
- [0170] 核酸を内封した脂質ナノ粒子の粒子径は、特に制限は無いが、好ましくは10nm～500nmであり、より好ましくは30nm～300nmである。粒子径の測定は、例えばZetasizer Nano (Malvern社)などの粒度分布測定装置を用いて行うことができる。核酸を内封した脂質ナノ粒子の粒子径は、その製造方法により、適宜調整することができる。
- [0171] 脾臓細胞へ核酸を導入するための核酸を内封した脂質ナノ粒子の表面電位（ゼータ電位）は、好ましくは-30～+10mV、さらに好ましくは-25～0mVである。従前の遺伝子導入においては、表面がプラスに荷電された粒子が主に用いられてきた。これは、負電荷を有する細胞表面のヘパリン硫酸との静電的相互作用を促進し、細胞への取り込みを促進するための方法としては有用である。しかし、正の表面電位によって、(a)細胞内において送達核酸との相互作用によるキャリアからの核酸の放出の抑制、(b)mRNAと送達核酸との相互作用によるタンパク質合成の抑制が生じる可能性がある。表面電位（ゼータ電位）を上記の範囲内に調整することにより、この問題を解決し得る。表面電位（ゼータ電位）の測定は、例えばZetasizer Nanoなどのゼータ電位測定装置を用いて行うことができる。

脂質ナノ粒子の表面電位（ゼータ電位）は、脂質ナノ粒子の構成成分の組成により、調整することができる。

[0172] 核酸を内封した本発明の脂質ナノ粒子を生体に投与することにより、当該脂質ナノ粒子が脾臓組織へ到達・接触し、生体内で当該脂質ナノ粒子に内封された核酸が脾臓組織へ送達される。当該脂質ナノ粒子を投与可能な対象としては、特に限定されず、例えば、哺乳類（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウシ等）、鳥類（例えば、ニワトリ、ダチョウ等）、両生類（例えば、カエル等）、魚類（例えば、ゼブラフィッシュ、メダカ等）等の細胞を挙げることができる。該脂質ナノ粒子を導入させる対象は、好ましくはヒトまたは他の哺乳類の細胞である。

[0173] 核酸を内封した脂質ナノ粒子の対象への投与方法としては、当該脂質ナノ粒子が脾臓細胞に核酸を送達できれば特に限定はされず、自体公知の投与方法（例えば、経口投与、非経口投与（例えば、経鼻投与、静脈内投与、筋肉内投与、局所投与、経皮投与、皮下投与、腹腔内投与、スプレー等）等）を適宜選択することができる。投与方法としては、静脈内投与が好ましい。当該脂質ナノ粒子の投与量は、投与対象の種類、投与方法、等を考慮して適宜選択することができる。

[0174] 本発明の脂質ナノ粒子は、そのまま、あるいは薬学的に許容される担体と混合して、経口剤（例えば、錠剤、カプセル剤等）あるいは非経口剤（例えば、経鼻剤、注射剤、吸入剤等）として、好ましくは非経口剤（より好ましくは、経鼻剤）として製造することができる。

[0175] 薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用されているものが用いられ、例えば、固形製剤においては、賦形剤、滑沢剤、結合剤及び崩壊剤等が用いられ、液状製剤においては、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、及び無痛化剤等が用いられる。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を用いることもできる。

例えば、経鼻剤の場合、点鼻液またはスプレーの形態で使用される。

## 実施例

[0176] 以下に本発明の実施例について更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に何ら限定されない。

[0177] 以下の実施例等では、イオン性脂質（1）を、上述の表に記載の名称で示した。また、以下の実施例等において使用する略号の意味は、それぞれ以下の通りである。

Chol : コレステロール

CHEMS : コレステリル ヘミスクシネート

POPC : 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン

DOPC : 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン

DSPC : 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン

SOPC : 1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン

DEPC : 1, 2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン

POPE : 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン

DOPE : 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン

DOPG : 1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール

DMPG : 1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール

DPPG : 1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール

DSPG : 1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール

POPG : 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール

SOPG : 1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール

DLOPS : 1, 2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン

DMG-PEG2000 : 1, 2-ジミリストイル-rac-グリセロール, メトキシポリエチレングリコール (PEGの数平均分子量 (Mn) : 2000)

MES : 2-モルホリノエタンスルホン酸

DiR : 1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドトリカルボシアニン, ヨウ化物

PBS : リン酸緩衝生理食塩水

脂質組成のmol%は、イオン性脂質(1)、アニオン性リン脂質またはアニオン性コレステロール(2)、中性リン脂質、およびコレステロールの合計に対するmol%を示す。

[0178] [製造例1] mRNA封入LNPの調製

(1) 脂質のアルコール溶液の調製

10mMのSS-OP、5mMのリン脂質、5mMのCHEMS、10mMのChol、1mMのDMG-PEG2000となるように各脂質をエタノールで溶解した。これらの溶液から、総mol量が1000nmolとなるように選択した各脂質を任意の比率で混合し、そこへ1mMのDMG-PEG2000のエタノール溶液を目的の割合となるように添加した。最後に全量が450μLとなるようにエタノールを加えることで脂質のエタノール溶液を調製した。

脂質のtert-ブタノール溶液を使用する場合も同様の方法で調製した。

[0179] (2) 核酸の酸性バッファー溶液の調製

核酸の酸性バッファー溶液は、0.0067μg/μLとなるようにルシフェラーゼ遺伝子をコードしたmRNA (Luc-mRNA) を30mMのNaClを含む20mMの酸性リンゴ酸バッファー (pH3.0) に混合し

た。

[0180] (3) アルコール希釈法によるLNPの調製

NanoAssembler (登録商標) 超高速ナノ医薬作製装置 (Precision NanoSystems製) を用いて、核酸の酸性バッファー溶液 1200  $\mu$ L と脂質のアルコール溶液 300  $\mu$ L をそれぞれ 3 mL/min および 1 mL/min の流速で混合し、1 mL の LNP 溶液を回収した。得られた LNP を 3 mL の 20 mM の MES バッファー (pH 6.5) で希釈し、Amicon Ultra 4 (Millipore社) へ移した。移した LNP 溶液を、遠心条件 (25°C, 1000g, 約10分) で限外濾過を行って、約 500  $\mu$ L まで濃縮した。得られた濃縮物を、PBS を用いて 4 mL まで希釈し、再度、遠心条件 (25°C, 1000g, 約10分) で限外濾過を行って約 200  $\mu$ L まで濃縮した。最後に核酸濃度として 10  $\mu$ g/mL となるように PBS でメスアップした。

[0181] [試験例1] 各種 mRNA 封入 LNP の粒子径および表面電位の測定

製造例1で調製した脂質組成の異なる実施例1から10までの mRNA 封入 LNP ならびに比較例1および比較例2の mRNA 封入 LNP について、粒子径および粒子の表面電位を、動的散乱法 (Zetasizer Nano; Malvern社) により測定した。結果を表2に示す。いずれの LNP も好ましい粒子径であり、-3 mV ~ -15 mV の表面電荷を有していた。実施例11から32および比較例3および4の LNP は表3に示す組成で作成した。

[0182]

[表2]

	脂質組成	粒子径 (nm)	PdI	ゼータ電位 (mV)
実施例 1	SS-OP/DOPG/Chol/DMG-PEG2000 =52.5/7.5/40/1.0	112	0.01	-11
実施例 2	SS-OP/DOPC/CHEMS/Chol/DMG-PEG2000 =52.5/7.5/7.5/32.5/1.0	99	0.08	-8
実施例 3	SS-OP/DLoPS/Chol/DMG-PEG2000 =52.5/7.5/40/1.0 + DiR 0.2%	107	0.05	-12
実施例 4	SS-OP/DOPG/DOPC/Chol/DMG-PEG2000 =50/2.5/7.5/40/1.0	140	0.11	-14
実施例 5	SS-OP/DOPG/DSPC/Chol/DMG-PEG2000 =50/2.5/7.5/40/1.0	133	0.14	-15
実施例 6	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000 =50/2.5/7.5/40/1.0	140	0.13	-15
実施例 7	SS-OP/DOPG/POPC/Chol/DMG-PEG2000 =50/2.5/7.5/40/1.0	143	0.15	-13
実施例 8	SS-OP/DOPG/SOPC/Chol/DMG-PEG2000 =50/2.5/7.5/40/1.0	133	0.11	-14
実施例 9	SS-OP/DOPG/DOPE/Chol/DMG-PEG2000 =50/2.5/7.5/40/1.0	160	0.09	-12
実施例 10	SS-OP/DOPG/POPE/Chol/DMG-PEG2000 =50/2.5/7.5/40/1.0	147	0.16	-13
比較例 1	SS-OP/DOPC/Chol/DMG-PEG2000 =52.5/7.5/40/1.0	112	0.09	-3
比較例 2	SS-OP/DOPC/Chol/DMG-PEG2000 =52.5/7.5/40/1.0 + DiR 0.2%	103	0.06	-3

(表中、組成比はm o 1 %、粒子径はゼータ平均)

[0183]

[表3]

	脂質組成
実施例 11	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=60/5/5/30/1.0
実施例 12	SS-OP/DOPG/DOPC/Chol/DMG-PEG2000=50/5/5/40/0.5
実施例 13	SS-OP/DOPG/DSPC/Chol/DMG-PEG2000=45/3.75/11.25/40/1.0
実施例 14	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=45/11.25/3.75/40/1.5
実施例 15	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=50/7.5/2.5/40/1.5
実施例 16	SS-OP/DOPG/DSPC/Chol/DMG-PEG2000=40/5/15/40/1.0
実施例 17	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=30/5/15/50/0.5
実施例 18	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=55/5/5/35/1.0
実施例 19	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=50/5/5/40/1.0
実施例 20	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=40/5/5/50/1.0
実施例 21	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=60/2.5/2.5/35/1.0
実施例 22	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=50/7.5/7.5/35/1.0
実施例 23	SS-OP/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=45/10/10/35/1.0
実施例 24	Lipid1/DOPG/DEPC/Chol/DMP-PEG2000=55/5/5/35/1.0
実施例 25	SS-OP/DMPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=55/5/5/35/1.0
実施例 26	SS-OP/DPPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=55/5/5/35/1.0
実施例 27	SS-OP/DSPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=55/5/5/35/1.0
実施例 28	SS-OP/POPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=55/5/5/35/1.0
実施例 29	SS-OP/SOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=55/5/5/35/1.0
実施例 30	SS-EC/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=55/5/5/35/1.0
実施例 31	SS-OP/SS-EC/DOPG/DEPC/Chol/DMG-PEG2000=35/20/5/5/35/1.0
実施例 32	SS-OP/DLoPS/Chol/DMG-PEG2000=52.5/7.5/40/1.0
比較例 3	SS-EC/DOPC/Chol/DMG-PEG2000=52.5/7.5/40/1.5
比較例 4	SS-EC/DOPE/Chol/DSG-PEG2000=64/8/27.5/0.5

(表中、組成比はm o l %)

[0184] [試験例 2] 脾臓での遺伝子発現活性評価 1 (アニオン性リン脂質またはアニオン性コレステロールとの組み合わせ評価)

(1) マウスへのI.V.投与

製造例 1 に記載の方法に従い調製した l u c - m R N A 封入 L N P を m R N A の濃度で 5 . 0  $\mu$  g / m L となるように P B S で希釈した。希釈した m R N A 封入 L N P を、6 週齢の雌の B A L B / c マウスに 1 匹あたり 2 0 0  $\mu$  L となるように静脈内投与した (m R N A の投与量として 1 匹あたり 1 .

0  $\mu$ g)。

## (2) 遺伝子発現活性の測定

投与から6時間後にマウスから脾臓を採取し、細胞破碎用ビーズを入れたホモジェナイズ用チューブで $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。凍結保存したチューブを取り出し、Lysis buffer (77mM Tris、2mM EDTA 2Na、0.1% Triton X-100含有MQ pH 7.8)を800  $\mu$ L加えた。Micro Smash (TOMY)を用いて、 $-2^{\circ}\text{C}$ にて4500 rpmで30秒間ホモジェナイズを2度繰り返した。上清500  $\mu$ Lを別のチューブに移し、遠心 ( $4^{\circ}\text{C}$ 、13000 rpm、10分)し、上清300  $\mu$ Lを回収した。Lysis buffer 20  $\mu$ Lにメーカープロトコルに従い調製したLuciferase Substrate (Promega)を50  $\mu$ L加え、Glomax 20/20 ルミノメーター (Promega)を用いてLuminescenceを測定し、これをbackgroundとした。同様に、各サンプル20  $\mu$ LにLuciferase Substrateを50  $\mu$ L加え、発光を測定した。上清10  $\mu$ LをMQで100倍希釈して1mLの希釈液を調製し、希釈液25  $\mu$ Lを用いてBCA法にてタンパク質濃度を測定した。Luminescence / (タンパク濃度  $\times$  0.02) で相対発光量 (RLU)として遺伝子発現活性を算出した。その遺伝子発現活性を比較例1に対する相対値として図1に示した。結果として、実施例1および実施例2のLNPは肝臓移行用の組成である比較例1のLNPと比較して脾臓において、遺伝子発現活性が高いことを確認した。遺伝子発現活性は標的細胞内への核酸送達効率に依存するため、当該LNPは脾臓へ効率良く核酸送達できていることを示している。

[0185] [試験例3] 脾臓での遺伝子発現活性の評価2 (PSとの組み合わせ評価)

## (1) 蛍光標識化LNPの調製

製造例1に記載の脂質アルコール溶液に総脂質量に対して0.2 mol%となるようにDiRのアルコール溶液を添加した蛍光色素入りの脂質アルコ

ール溶液を調製した。この脂質アルコール溶液を用いて製造例1に記載の手順に従い、LNPを調製することで、蛍光標識化LNPを得た。

(2) マウスへのI.V.投与

製造例1に記載の方法に従い調製したLuc-mRNA封入LNPをmRNAの濃度で $5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにPBSで希釈した。希釈したmRNA封入LNPを、6週齢の雌のBALB/cマウスに1匹あたり $200 \mu\text{L}$ となるように静脈内投与した(mRNAの投与量として1匹あたり $1.0 \mu\text{g}$ )。

(3) LNPの集積性および遺伝子発現活性の評価

投与5時間55分後に、PBSで $15 \text{mg}/\text{mL}$ となるように希釈したルシフェリンをマウスに1匹あたり $200 \mu\text{L}$ となるように腹腔内投与した。ルシフェリン投与の5分後(LNP投与の6時間後)、マウスを安楽死させ、シャーレ上に取り出した脾臓と肝臓をIVIS(PerkinElmer)によりイメージングした。画像定量を用いて、LNPの集積をDIRの蛍光強度により、遺伝子の発現をルシフェリンの発光強度により測定した。図2は、各LNPの蛍光強度を表す図であり、蛍光標識化したLNPの脾臓での集積量を示している。また図3は脾臓での遺伝子発現活性を表す図であり、核酸送達効率を示している。実施例3のLNPは肝臓移行用組成のLNPである比較例2のLNPと比較して、脾臓におけるLNPの集積性や核酸送達効率が高いことを確認した。

[0186] [試験例4] 脾臓での遺伝子発現活性評価3 (中性リン脂質との組合せ評価)

(1) マウスへのI.V.投与

製造例1に記載の方法に従い調製したLuc-mRNA封入LNPを試験例1と同様の条件でマウスに静脈内投与した(mRNAの投与量として1匹あたり $1.0 \mu\text{g}$ )。

(2) 遺伝子発現活性の測定

試験例2に記載の方法で測定を実施し、比較例1に対する相対値として遺

伝子発現活性を算出した。結果として、リン脂質にアニオン性リン脂質であるDOPG単体を用いた系やDOPGと中性リン脂質（1, 2-ジアシル-sn-グリセロール-3-ホスホコリンまたは1, 2-ジアシル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン）とを組み合わせた何れのLNPにおいても肝臓移行用の組成である比較例1のLNPと比較して、脾臓における遺伝子発現活性が高いことを確認した（図4）。

[0187] [試験例5] 脾臓での遺伝子発現活性評価4（各種脂質組成での評価）

(1) マウスへのI.V.投与

製造例1に記載の方法に従い調製したLuc-mRNA封入LNPを試験例1と同様の条件でマウスに静脈内投与した（mRNAの投与量として1匹あたり1.0 $\mu$ g）。

(2) 遺伝子発現活性の測定

試験例2に記載の方法で測定を実施し、実施例5に対する相対値として遺伝子発現活性を算出した。いずれの脂質組成のLNPでも脾臓での遺伝子発現が確認された。実施例11、18、19および21は、実施例5に対して特に高い遺伝子発現活性を示した（図5）。

[0188] [試験例6] 脾臓での遺伝子発現活性評価5（各種PGを用いた評価）

(1) マウスへのI.V.投与

製造例1に記載の方法に従い調製したLuc-mRNA封入LNPを試験例1と同様の条件でマウスに静脈内投与した（mRNAの投与量として1匹あたり1.0 $\mu$ g）。

(2) 遺伝子発現活性の測定

試験例2に記載の方法で測定を実施し、実施例18に対する相対値として遺伝子発現活性を算出した。いずれのPGを用いたLNPでも脾臓での遺伝子発現活性が確認された。DOPGやPOPGいた脂質組成のLNPは、特に高い遺伝子発現活性を示した（図6）。

[0189] [試験例7] 脾臓での遺伝子発現活性評価6（SS-ECを用いた評価）

(1) マウスへのI.V.投与

製造例 1 に記載の方法に従い調製した l u c - m R N A 封入 L N P を試験例 1 と同様の条件でマウスに静脈内投与した ( m R N A の投与量として 1 匹あたり 1 . 0  $\mu$  g ) 。

(2) 遺伝子発現活性の測定

試験例 2 に記載の方法で測定を実施し、比較例 3 に対する相対値として遺伝子発現活性を算出した。肝臓送達用の組成の L N P である比較例 3 に対して、実施例 3 0 の L N P は脾臓での高い遺伝子発現活性を示した ( 図 7 ) 。

[0190] [試験例 8] L N P を用いた C T L 活性の評価

(1) マウスへの I . V . 投与

製造例 1 に記載の方法に従い調製したオボアルブミン遺伝子 ( 以下、O V A と称する ) をコードした m R N A ( 以下、O V A - m R N A と称する ) を封入した L N P を m R N A の濃度で 5 . 0  $\mu$  g / m L となるように P B S で希釈した。希釈した m R N A 封入 L N P を、6 週齢の雌の C 5 7 B L / 6 J マウスに 1 匹あたり 2 0 0  $\mu$  L となるように静脈内投与した ( m R N A の投与量として 1 匹あたり 1 . 0  $\mu$  g ) 。

(2) C T L 活性の評価

投与から一週間後に、次に記す C T L アッセイを行い O V A 特異的な細胞傷害性 T 細胞 ( C T L ) 活性を評価した。脾細胞の培養培地として次の組成 : R P M I 1 6 4 0 5 0 0 m L , F B S 5 0 m L , 1 0 0 m M ピルビン酸ナトリウム 5 m L , 1 M H E P E S 5 m L , 5 5 m M 2 - メルカプトエタノール 5 0 0  $\mu$  L , ペニシリン / ストレプトマイシン 5 m L ( 以下、培地と称する ) を用いた。未処置マウスを頸椎脱臼で安楽死させ、脾臓を採取した。脾臓を中央から切断し、ピンセットを用いて切断面から脾臓細胞をとりだし培地中に懸濁した。細胞懸濁培地を、4 0  $\mu$  m セルストレーナーを通して 5 0 m L チューブに回収し遠心した ( 4  $^{\circ}$  C , 5 0 0 g , 5 分 ) 。上清を捨て、R e d B l o o d C e l l L y s i s B u f f e r ( S I G M A ) を一匹分あたり 1 m L 加え 5 分静置した。培地で 5 倍に希釈した後、遠心した ( 4  $^{\circ}$  C , 5 0 0 g , 5 分 ) 。さらに 1 0 m L の培地に懸濁

し遠心した（4℃、500g、5分）。30mLの培地へ懸濁し細胞数を計測した。その後、40 $\mu$ mセルストレイナーを通して2本の50mLチューブに等量分割し、遠心した（4℃、500g、5分）。 $1.0 \times 10^7$ 細胞/mLとなるように培地で懸濁した。（1）片方の細胞懸濁液には細胞懸濁液の1/400量の2mM OVAエピトープ（OVAの257-264位のアミノ酸配列からなる）溶液を加え培養インキュベータ内で1時間静置した。このエピトープパルス群を遠心した（4℃、500g、5分）。10mLの培地で洗浄した後、10mLのPBSで洗浄し、再度細胞数を計測してから $3.0 \times 10^7$ 細胞/mLとなるよう懸濁し、終濃度5 $\mu$ MのCFSEで染色することで『ターゲット細胞』を得た。（2）もう片方の細胞懸濁液はエピトープを加えずインキュベーションし、培地およびPBSで洗浄した。 $3.0 \times 10^7$ 細胞/mLとなるよう懸濁し、終濃度0.5 $\mu$ MのCFSEで染色することで『コントロール細胞』を得た。ターゲット細胞、コントロール細胞をともに培地で2回、PBSで二回洗浄し、 $5.0 \times 10^7$ 細胞/mLとなるように懸濁した。100 $\mu$ Lの『ターゲット細胞』と100 $\mu$ Lの『コントロール細胞』とを混合し、免疫したマウスへ投与した。両者はCFSEの蛍光の強さから区別することができる。細胞混合液の投与から20時間後、マウスから脾臓を採取しフローサイトメトリー解析を行った。『ターゲット細胞』の存在量を『コントロール細胞』により補正することで、エピトープに特異的なCTL活性を定量した。

[0191] 評価結果を図8および9に示した。実施例18および実施例24の組成のLNPは、肝臓送達用の組成のLNPである比較例1の組成のLNPに対して3倍程度のCTL活性を示した。また、実施例30の組成のLNPは、肝臓送達用の組成のLNPである比較例3や脾臓送達用の組成のLNPである比較例4のLNPよりも高いCTL活性を示した。CTL活性は獲得免疫が得られるかを評価するための指標であり、CTL活性が高い程、獲得免疫を得られることを表している。そのため、実施例18、24および30のLNPは比較例よりも獲得免疫を高められることが示された。

## [0192] [試験例9] LNPを用いたCTL活性の評価2

## (1) マウスへのI.V.投与

製造例1に記載の方法に従い調製したOVA-mRNA封入LNPをmRNAの濃度で $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにPBSで希釈した。希釈したmRNA封入LNPを、6週齢の雌のC57BL/6Jマウスに1匹あたり $200\mu\text{L}$ となるように静脈内投与した(mRNAの投与量として1匹あたり $0.2\mu\text{g}$ )。

## (2) CTL活性の評価

[試験例8]に記載の方法でCTL活性を評価した。結果を図10に示す。

実施例31の組成のLNPは比較例4に対して高いCTL活性を示した。

## [0193] [試験例10] マウスでの多発性硬化症治療効果の評価

## (1) モデルマウスの作成

10週齢の雌のC57BL/6Jマウスを1週間予備飼育し、飼育環境に馴化させた。多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(以下、EAEと称する)を誘導するキット製品(Hooke Laboratories)のメーカープロトコルに従い、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(以下、MOGと称する)の自己抗原ペプチド(MOGの35-55位のアミノ酸配列からなる)と完全フロイントアジュバントの混合エマルジョンをマウスの頸部および腰部に $100\mu\text{L}$ ずつ皮下投与した。キット製品に含まれる百日咳毒素ストックを $165\text{ng}/100\mu\text{L}$ となるようにPBSで希釈した。希釈した百日咳毒素を、混合エマルジョンの投与当日と翌日の2回、1匹あたり $100\mu\text{L}$ ずつ腹腔内投与した。

## (2) マウスへのI.V.投与

製造例1に記載の方法に従い調製したLuc-mRNA封入LNPまたはMOGペプチド(MOGの27-63位のアミノ酸配列からなる)をコードしたmRNA(以下、MOG-mRNAと称する)を封入したLNPを、mRNAの濃度で $1.0\mu\text{g}/200\mu\text{L}$ となるようにPBSで希釈した。希

釈したmRNA封入LNPを、EAEマウスに対してEAE誘導日から7日目、10日目、13日目の3回、1匹あたり200 $\mu$ Lずつ静脈内投与した。

### (3) 多発性硬化症治療効果の評価

EAE誘導日から10日目以降、マウスの病態スコアと体重を毎日測定した。病態スコアは以下の基準で決定した。0：無症状、1：尾を根元から持ち上げたときに垂れ下がる、2：片後肢の麻痺・歩行異常、3：両後肢の麻痺、3.5：スコア3かつ明らかな運動量低下、4：前肢の麻痺、5：瀕死・死亡。スコアの測定にバイアスが生じるのを避けるため、LNPの投与とスコアの測定を別の実験者が実施し、盲検下にてスコアを測定した。

[0194] 評価結果を図11および図12に示した。MOG-mRNAを封入した実施例32のLNPはEAE症状の軽減が確認された。またLuc-mRNAを封入した実施例32のLNPにおいてもEAE症状が軽減しており、実施例32のLNP自体がEAE症状の軽減に寄与していることが示唆された。

### 産業上の利用可能性

[0195] 本発明の脂質ナノ粒子は、核酸を脾臓細胞に送達するために有用である。

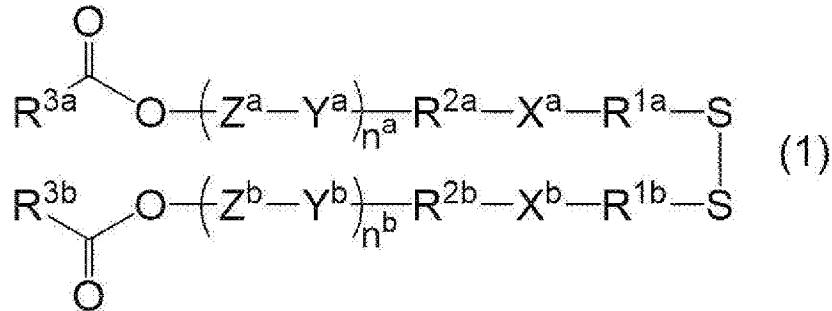
[0196] 本出願は、日本で出願された特願2022-051918を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含されるものである。

## 請求の範囲

[請求項1]

(A) 式 (1) :

[化1]



(式 (1) 中、

$\text{R}^{1a}$  および  $\text{R}^{1b}$  はそれぞれ独立して、炭素数 1 ~ 6 のアルキレン基を表し、

$\text{X}^a$  および  $\text{X}^b$  はそれぞれ独立して、炭素数が 1 ~ 6 であり、かつ 3 級アミノ基の数が 1 の非環状のアルキル 3 級アミノ基、または炭素数が 2 ~ 5 であり、かつ 3 級アミノ基の数が 1 ~ 2 の環状のアルキレン 3 級アミノ基を表し、

$\text{R}^{2a}$  および  $\text{R}^{2b}$  はそれぞれ独立して、炭素数 8 以下のアルキレン基またはオキシジアルキレン基を表し、

$\text{Y}^a$  および  $\text{Y}^b$  はそれぞれ独立して、エステル結合、アミド結合、カーバメート結合、エーテル結合またはウレア結合を表し、

$\text{Z}^a$  および  $\text{Z}^b$  はそれぞれ独立して、炭素数が 3 ~ 16 であり、少なくとも一つの芳香環を有し、かつヘテロ原子を有していてもよい芳香族化合物から誘導される 2 価の基を表し、

$n^a$  および  $n^b$  はそれぞれ独立して、0 または 1 であり、

$\text{R}^{3a}$  および  $\text{R}^{3b}$  はそれぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミンとコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、水酸基を有するステロール誘導体とコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、炭素数 1 ~ 40 の脂肪族炭化水素基、シクロプロパン環を有する炭素数 3 ~ 40 のアルキル基、または式

(4) :



(式(4)中、

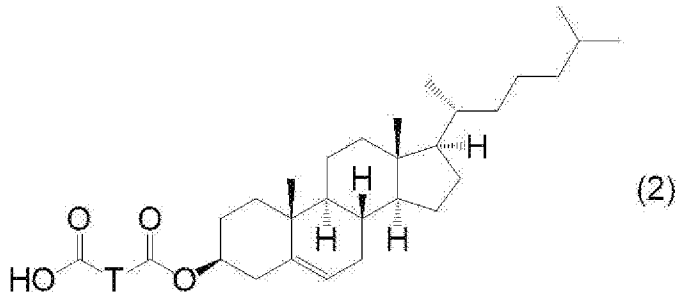
$R^9$ は炭素数2~20の脂肪族炭化水素基を表し、  
 $a$ は2~10の整数を表す。)

で表される基を表す。)

で表されるイオン性脂質、

(B) アニオン性リン脂質または式(2) :

[化2]



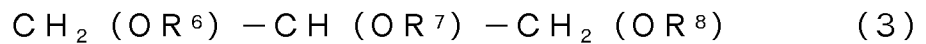
(式(2)中、

$T$ は炭素数1~8の2価の脂肪族炭化水素基を表す。)

で表される化合物、

(C) コレステロール、および

(D) 式(3) :



(式(3)中、

$R^6$ 、 $R^7$ および $R^8$ のいずれか二つはミリストイル基を表し、残りの一つは数平均分子量1,000~3,000のポリエチレングリコール鎖を介して連結される炭素数1~6のアルキル基を表す。)

で表されるジミリストイルグリセロールPEG

を含む核酸を脾臓組織へ送達するために用いられる脂質ナノ粒子。

[請求項2]

前記アニオン性リン脂質が1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロールまたは1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-

ーホスホセリンである請求項1に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項3]

前記アニオン性リン脂質が1, 2-ジミリストイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DMPG)、1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DPPG)、1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (POPG)、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DOPG)、1-ステアロイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (SOPG)、1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DSPG)、1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DPPS)、1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (POPS)、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DOPS)、1, 2-ジリノレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DL oPS)、1-ステアロイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (SOPS)、および1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DSPS) からなる群から選ばれる少なくとも一つである請求項1または2に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項4]

前記アニオン性リン脂質が1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (POPG)、1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホグリセロール (DOPG)、または1, 2-ジリノレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホセリン (DL oPS) である請求項1~3のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

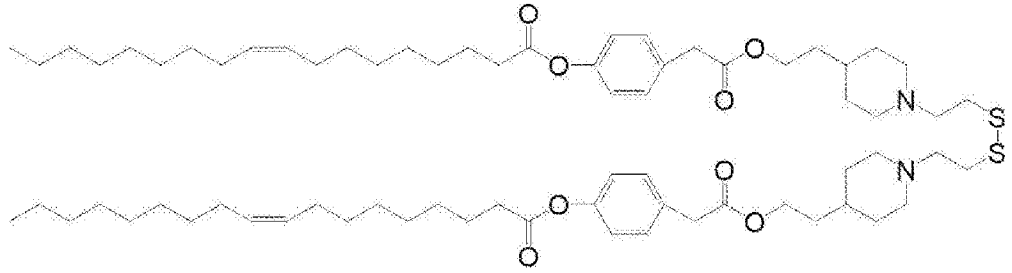
[請求項5]

式(2)中のTが炭素数1~3の2価の脂肪族炭化水素基である請求項1~4のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項6]

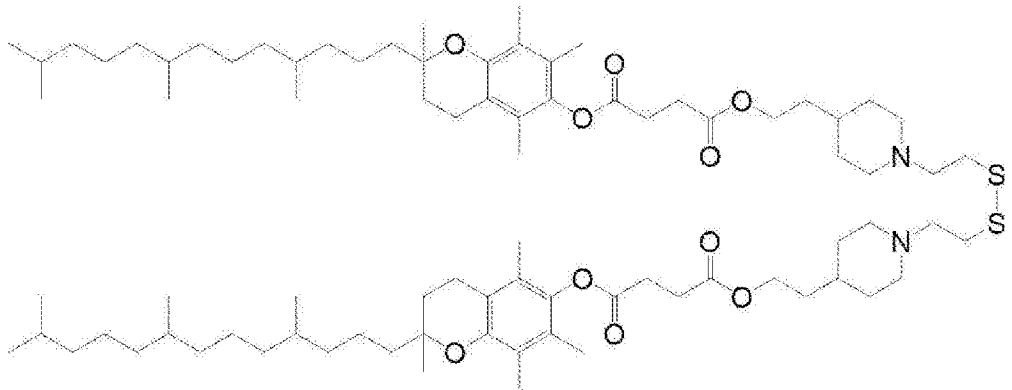
式(1)で表されるイオン性脂質が、下記式：

[化3]



または

[化4]



で表されるいずれかのイオン性脂質である請求項1～5のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項7] 前記脂質ナノ粒子の成分として中性リン脂質が含まれていてもよい請求項1～6のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項8] 前記中性リン脂質が1, 2-ジアシル-s n-グリセロ-3-ホスホコリンまたは1, 2-ジアシル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンである請求項7に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項9] 前記中性リン脂質が1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC)、1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)、1, 2-ジェルコイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DEPC)、1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、1-ステアロイル-2-オレオイル-s n-グリセロ-3-ホス



基を表し、

$X^a$ および $X^b$ はそれぞれ独立して、炭素数が1～6であり、かつ3級アミノ基の数が1の非環状のアルキル3級アミノ基、または炭素数が2～5であり、かつ3級アミノ基の数が1～2の環状のアルキレン3級アミノ基を表し、

$R^{2a}$ および $R^{2b}$ はそれぞれ独立して、炭素数8以下のアルキレン基またはオキシジアルキレン基を表し、

$Y^a$ および $Y^b$ はそれぞれ独立して、エステル結合、アミド結合、カーバメート結合、エーテル結合またはウレア結合を表し、

$Z^a$ および $Z^b$ はそれぞれ独立して、炭素数が3～16であり、少なくとも一つの芳香環を有し、かつヘテロ原子を有していてもよい芳香族化合物から誘導される2価の基を表し、

$n^a$ および $n^b$ はそれぞれ独立して、0または1であり、

$R^{3a}$ および $R^{3b}$ はそれぞれ独立して、水酸基を有する脂溶性ビタミンとコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、水酸基を有するステロール誘導体とコハク酸無水物またはグルタル酸無水物との反応物由来の残基、炭素数1～40の脂肪族炭化水素基、シクロプロパン環を有する炭素数3～40のアルキル基、または式(4)：



(式(4)中、

$R^9$ は炭素数2～20の脂肪族炭化水素基を表し、

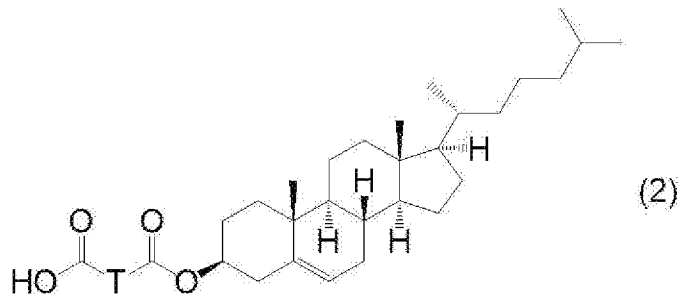
$a$ は2～10の整数を表す。)

で表される基を表す。)

で表されるイオン性脂質、

(B) アニオン性リン脂質または式(2)：

[化6]



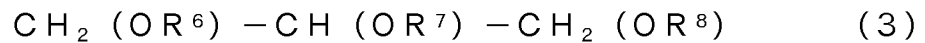
(式 (2) 中、

T は炭素数 1 ～ 8 の 2 価の脂肪族炭化水素基を表す。)

で表される化合物、

(C) コレステロール、および

(D) 式 (3) :



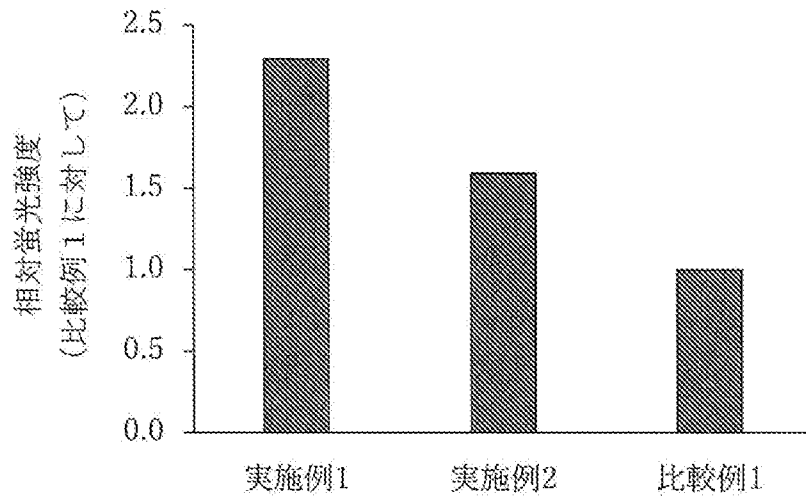
(式 (3) 中、

$\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$  および  $\text{R}^8$  のいずれか二つはミリストイル基を表し、残りの一つは数平均分子量 1,000 ～ 3,000 のポリエチレングリコール鎖を介して連結される炭素数 1 ～ 6 のアルキル基を表す。)

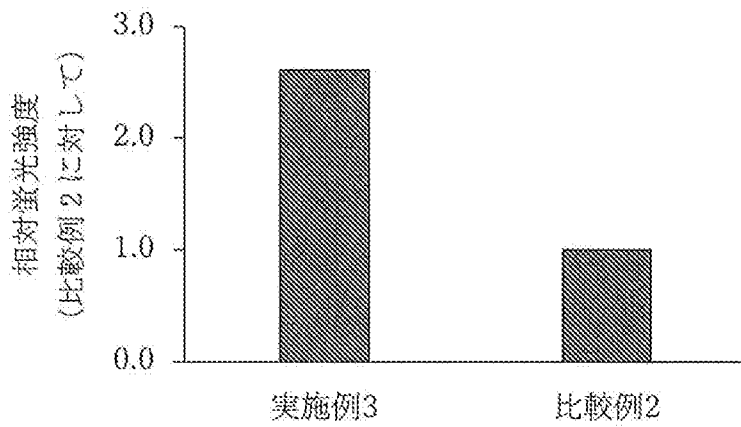
で表されるジミリストイルグリセロール PEG

を含む脂質ナノ粒子の、核酸を脾臓組織へ送達するために用いられる医薬を製造するための使用。

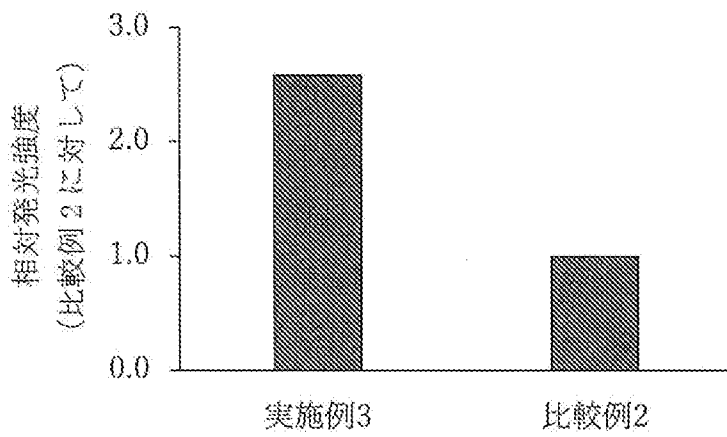
[図1]



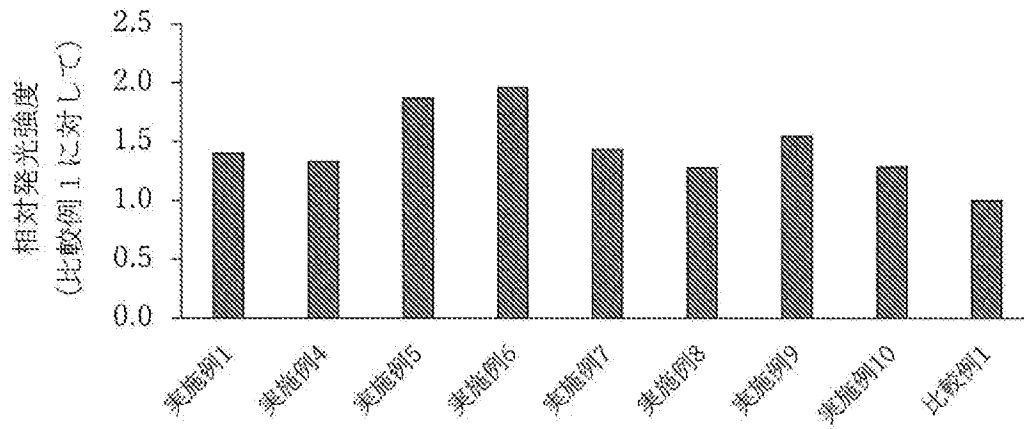
[図2]



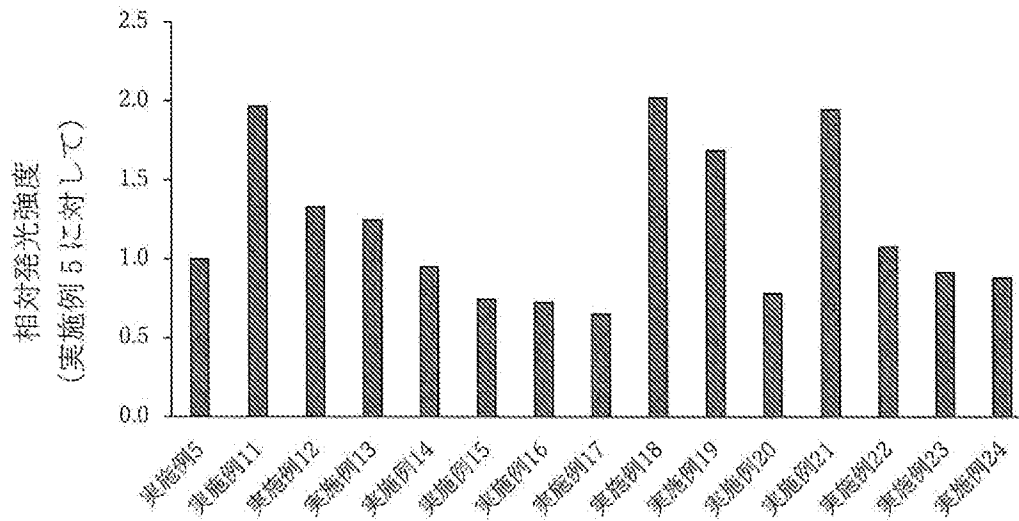
[図3]



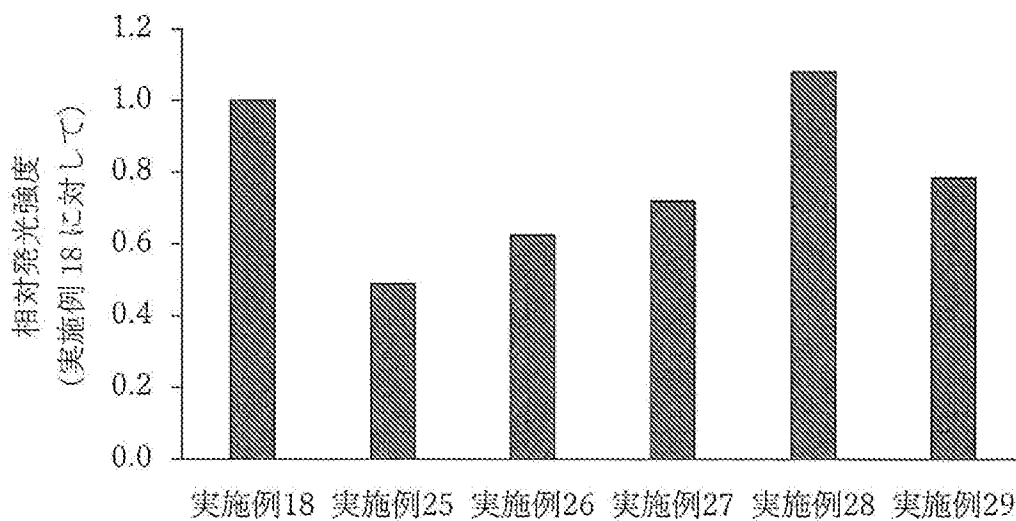
[図4]



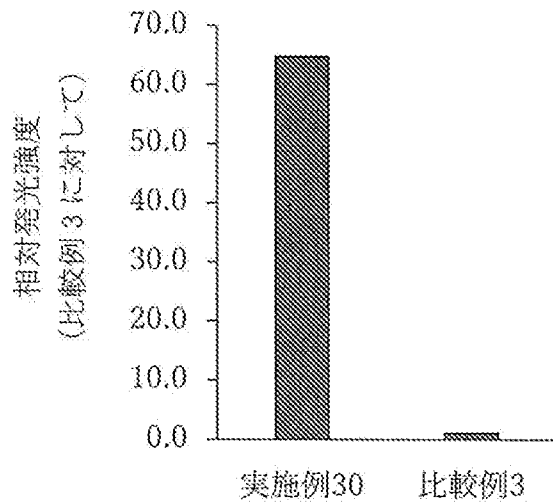
[図5]



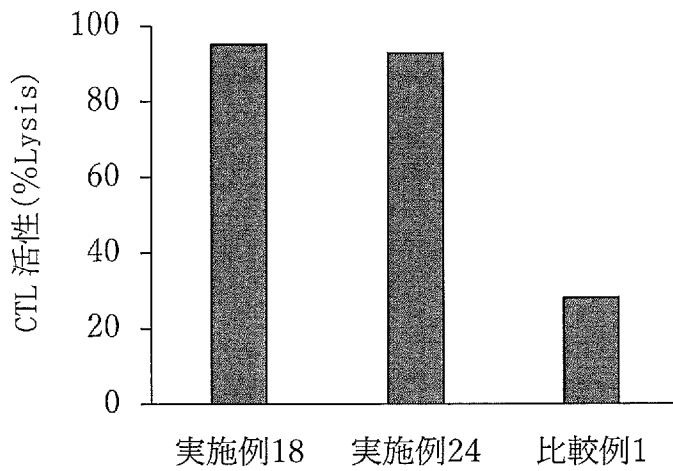
[図6]



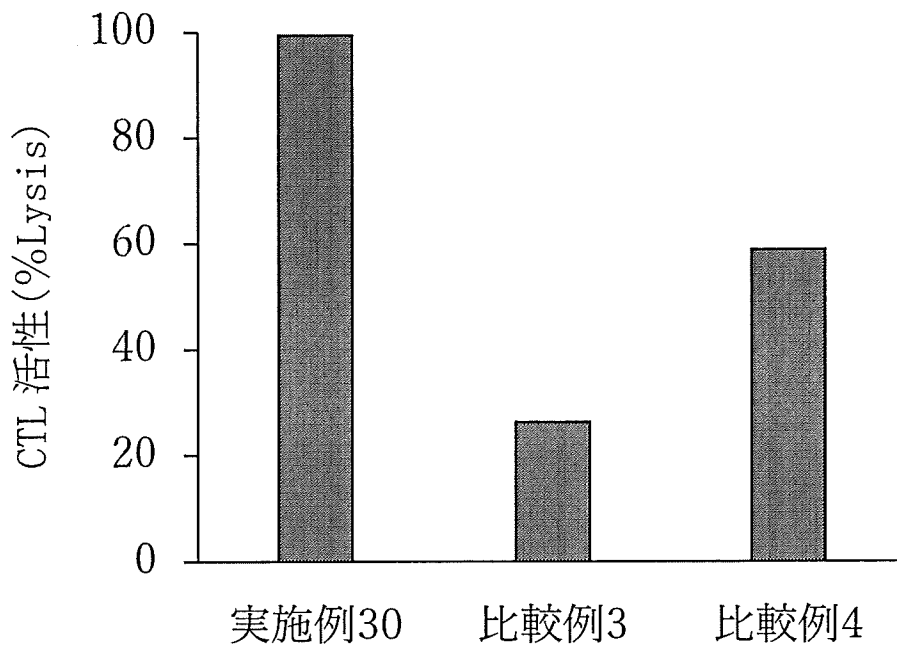
[図7]



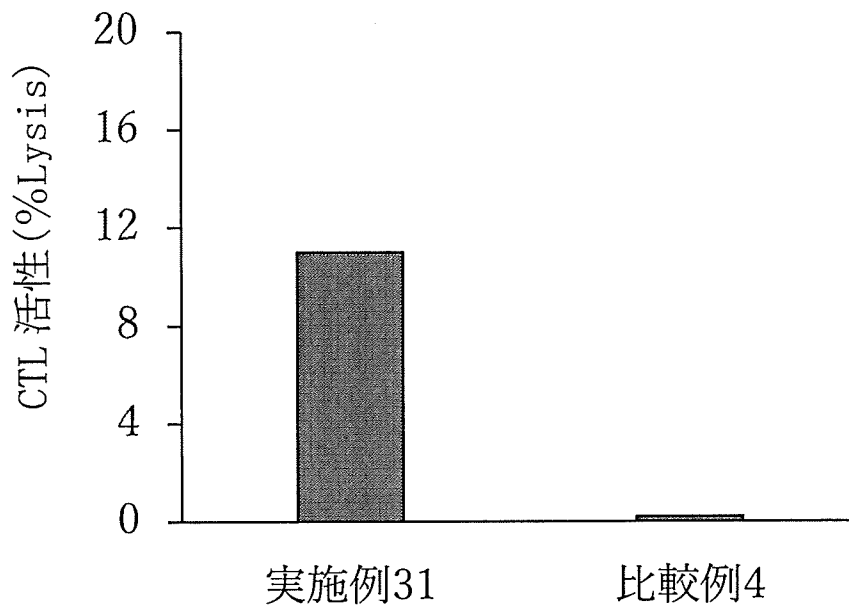
[図8]



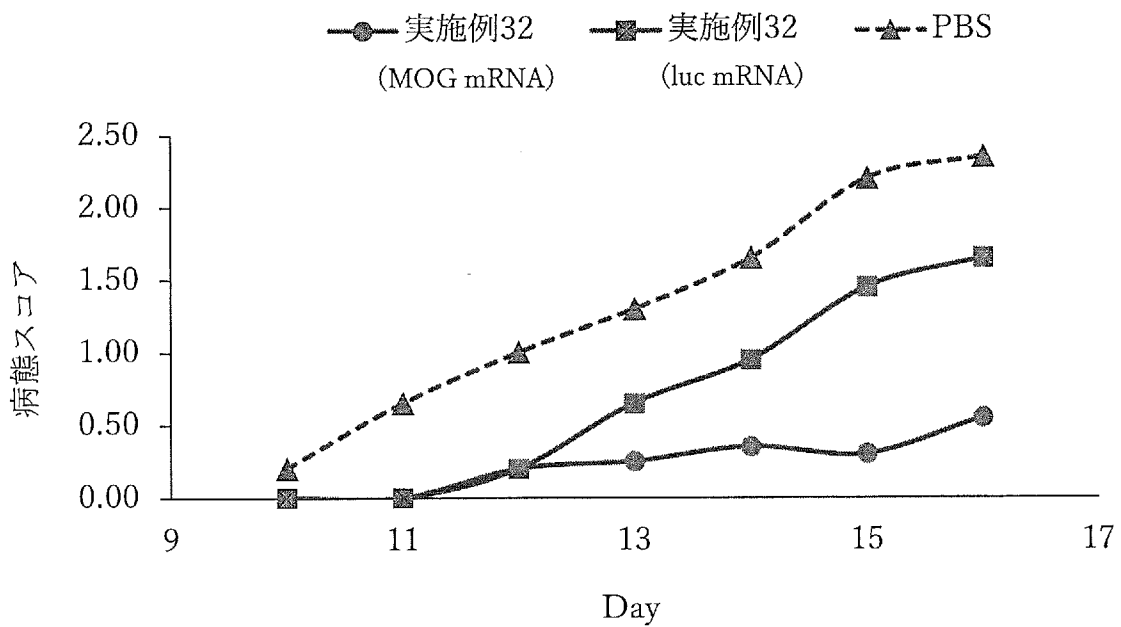
[図9]



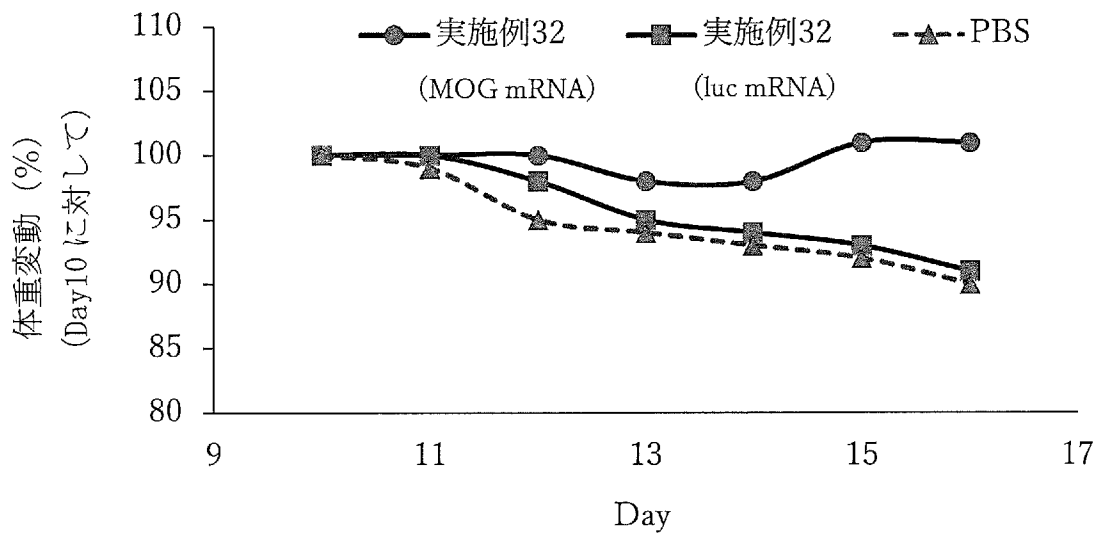
[図10]



[図11]



[図12]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/011850

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><b>A61K 47/20</b>(2006.01)i; <b>A61K 9/10</b>(2006.01)i; <b>A61K 9/14</b>(2006.01)i; <b>A61K 31/7088</b>(2006.01)i; <b>A61K 47/14</b>(2017.01)i; <b>A61K 47/24</b>(2006.01)i; <b>A61K 47/28</b>(2006.01)i; <b>A61K 48/00</b>(2006.01)i; <b>A61P 37/04</b>(2006.01)i  FI: A61K47/20; A61K9/14; A61K47/24; A61K47/28; A61K31/7088; A61K48/00; A61P37/04; A61K9/10; A61K47/14</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K47/20; A61K9/10; A61K9/14; A61K31/7088; A61K47/14; A61K47/24; A61K47/28; A61K48/00; A61P37/04		
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 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/060440 A1 (NOF CORPORATON) 01 April 2021 (2021-04-01) claims 9, 11, 13, paragraphs [0104], [0155], [0157], [0159], [0186]	1-13
Y	LOPRESTI, S. T. et al. The replacement of helper lipids with charged alternatives in lipid nanoparticles facilitates targeted mRNA delivery to the spleen and lungs. Journal of Controlled Release. 26 March 2022, vol. 345, pp. 819-831 abstract, p. 820, left column the last paragraph to right column, 5th paragraph, fig. 1	1-13
Y	GUO, W. et al. Efficient Gene Delivery Using Anionic Liposome-Complexed Polyplexes (LPDII). Bioscience Reports. 2000, vol. 20, no. 5, pp. 419-432 abstract, p. 424, 2nd paragraph	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>18 May 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>06 June 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/011850**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021/060440	A1	01 April 2021	US	2022/0354793	A1	
				claims 9, 11, 13, paragraphs [0169], [0204]-[0205], [0217], [0220], [0255]			
				EP	4035686	A1	
				KR	10-2022-0070251	A	
				CN	114727964	A	
.....							

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 47/20(2006.01)i; A61K 9/10(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i;                  A61K 47/14(2017.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i;                  A61P 37/04(2006.01)i                  FI: A61K47/20; A61K9/14; A61K47/24; A61K47/28; A61K31/7088; A61K48/00; A61P37/04; A61K9/10; A61K47/14</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K47/20; A61K9/10; A61K9/14; A61K31/7088; A61K47/14; A61K47/24; A61K47/28; A61K48/00; A61P37/04</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table> <p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2021/060440 A1 (日油株式会社) 01.04.2021 (2021-04-01) 請求項9、11、13、[0104]、[0155]、[0157]、[0159]、[0186]</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>LOPRESTI ST. et al., The replacement of helper lipids with charged alternatives in lipid nanoparticles facilitates targeted mRNA delivery to the spleen and lungs, Journal of Controlled Release, 2022.03.26, Vol.345, pp.819-831 アブストラクト部分、第820頁左欄最終段落～右欄第5段落、図1</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>GUO W. et al., Efficient Gene Delivery Using Anionic Liposome-Complexed Polyplexes (LPDII), Bioscience Reports, 2000, Vol.20, No.5, pp.419-432 アブストラクト部分、第424頁第2段落</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			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	WO 2021/060440 A1 (日油株式会社) 01.04.2021 (2021-04-01) 請求項9、11、13、[0104]、[0155]、[0157]、[0159]、[0186]	1-13	Y	LOPRESTI ST. et al., The replacement of helper lipids with charged alternatives in lipid nanoparticles facilitates targeted mRNA delivery to the spleen and lungs, Journal of Controlled Release, 2022.03.26, Vol.345, pp.819-831 アブストラクト部分、第820頁左欄最終段落～右欄第5段落、図1	1-13	Y	GUO W. et al., Efficient Gene Delivery Using Anionic Liposome-Complexed Polyplexes (LPDII), Bioscience Reports, 2000, Vol.20, No.5, pp.419-432 アブストラクト部分、第424頁第2段落	1-13
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	WO 2021/060440 A1 (日油株式会社) 01.04.2021 (2021-04-01) 請求項9、11、13、[0104]、[0155]、[0157]、[0159]、[0186]	1-13												
Y	LOPRESTI ST. et al., The replacement of helper lipids with charged alternatives in lipid nanoparticles facilitates targeted mRNA delivery to the spleen and lungs, Journal of Controlled Release, 2022.03.26, Vol.345, pp.819-831 アブストラクト部分、第820頁左欄最終段落～右欄第5段落、図1	1-13												
Y	GUO W. et al., Efficient Gene Delivery Using Anionic Liposome-Complexed Polyplexes (LPDII), Bioscience Reports, 2000, Vol.20, No.5, pp.419-432 アブストラクト部分、第424頁第2段落	1-13												
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>18.05.2023</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>06.06.2023</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>長谷川 茜 4C 3228</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>													

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/JP2023/011850

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2021/060440 A1	01.04.2021	US 2022/0354793 A1 請求項9、11、13、 [0169]、[0204] ~ [0205]、[0217]、[0220]、 [0255] EP 4035686 A1 KR 10-2022-0070251 A CN 114727964 A	