

道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 西澤 和純, 外(NISHIZAWA Kazuyoshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 Tokyo (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))

(57) 要約: 本発明は、式(1) [式(1)中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立して、直鎖状の C_{10-14} アルキル基、1若しくは2個の不飽和結合を有する直鎖状の C_{10-20} アルケニル基、又は $-CH(R^5)(R^6)$ (R^5 及び R^6 はそれぞれ独立して、直鎖状の C_{5-10} アルキル基である)であり; p は3~8の整数を示し; R^3 及び R^4 はそれぞれ独立して、メチル基又はエチル基である] で表されるpH感受性カチオン性脂質を含有する、脂質ナノ粒子等を提供する。

明 細 書

発明の名称：脂質ナノ粒子

技術分野

[0001] 本発明は、ナチュラルキラー（NK）細胞に高効率に送達可能な遺伝子送達キャリアとして有用な脂質ナノ粒子に関する。

背景技術

[0002] 脂溶性薬物や、s i R N A（small interfering RNA）、m R N A等の核酸を封入し、標的細胞へ送達するためのキャリアとして、脂質ナノ粒子（L N P）が利用されている。例えば、s i R N Aなどの核酸を効率的に標的細胞内へ送達するためのキャリアとなる脂質ナノ粒子として、生理的p Hでは電氣的に中性であり、エンドソームなどの弱酸性p H環境下ではカチオン性に変化するp H感受性カチオン性脂質を構成脂質として含む脂質ナノ粒子が報告されている（特許文献1）。

[0003] キメラ抗原受容体T細胞療法（C A R－T療法）は、血液がんに対して顕著な治療効果を示し、がん治療に大きく貢献している。しかしながら、ウイルスキャリアによる遺伝子改変の安全性、製造の煩雑さ、T細胞の品質維持、高コストなどの多くの課題を抱えている。T細胞を用いた細胞療法に続くものとして、NK細胞療法が期待されている（非特許文献1）。NK細胞は、T細胞からの攻撃を回避するように変異したがんに対して有効なエフェクター細胞である。血液中のNK細胞はT細胞よりも少ないため、十分な数を確保することが困難であることから、ヒトNK細胞株NK－92を用いた臨床試験が進められている。セルラインを用いた場合には、十分な細胞数を確保でき、保存も可能であり、品質を一定に維持しやすいなどの多くのメリットがある（非特許文献2）。それ故、NK－92などのヒトNK細胞株を用いたNK細胞療法の今後の発展が期待されている。

[0004] 遺伝子改変や遺伝子発現制御は、NK細胞の機能を強化する重要な技術である。効率的な強化を行うためには、ウイルスキャリアを用いる必要がある

ため、安全面やコスト面での課題が残されている。本願出願人らは、ヒト免疫細胞株へと効率的に s i R N A を導入可能な脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle: L N P) の開発に成功した (非特許文献 3) 。当該脂質ナノ粒子は、構成脂質として p H 感受性カチオン性脂質 Y S K 1 2 - C 4 を有しているため、ヒトのリンパ球や単球等の細胞へ効率よく取り込まれる。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第 2 0 1 8 / 2 3 0 7 1 0 号

特許文献2：国際公開第 2 0 1 8 / 1 9 0 4 2 3 号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Shimasaki et al., Nature Reviews Drug Discovery, 2020, vol.19, p.200-218.

非特許文献2：Klingemann et al., Frontiers Immunology, 2016, vol.7, Article 91.

非特許文献3：Nakamura et al., Scientific Reports, 2016, 6:37849.

非特許文献4：Nakamura et al., Molecular Pharmaceutics, 2018, vol.15, p.2142-2150.

非特許文献5：Sato et al., Journal of Controlled Release, 2019, vol.295, p.140-152.

非特許文献6：Leung et al., Journal of Physical Chemistry C Nanomaterial Interfaces, 2012, vol.116(34), p.18440-18450.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] Y S K 1 2 - C 4 を含む脂質ナノ粒子は、NK-92細胞に対しても、市販試薬と比較して効率的に s i R N A を導入することができた初めての非ウイルスキャリアである。しかし、他の免疫細胞に比べて、NK細胞に対しては、送達効率が高くないことに加えて、毒性が認められるという問題がある

(非特許文献3)。脂質ナノ粒子のY S K 1 2 - C 4の含有量を減少させることによって毒性は軽減されたものの、遺伝子ノックダウン活性を増加させることはできない(非特許文献4)。

[0008] 本発明は、NK細胞に高効率で送達可能な遺伝子送達キャリアとなる脂質ナノ粒子を提供することを目的とする。

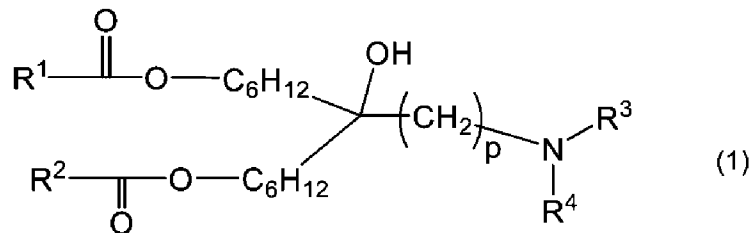
課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、核酸を封入する脂質ナノ粒子の構成脂質に、pKaが8.0~8.5程度であり、かつエステル構造を含む特定の構造の炭化水素鎖を有しているpH感受性カチオン性脂質を含有させることにより、ヒトNK細胞株への優れた核酸導入効率と低毒性を実現できることを見出し、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、以下の脂質ナノ粒子等を提供するものである。

[1] 下記の式(1)：

[0011] [化1]



[0012] [式(1)中、R¹及びR²はそれぞれ独立して、直鎖状のC₁₀₋₁₄アルキル基、1若しくは2個の不飽和結合を有する直鎖状のC₁₀₋₂₀アルケニル基、又は-CH(R⁵)(R⁶)(R⁵及びR⁶はそれぞれ独立して、直鎖状のC₅₋₁₀アルキル基である)であり；pは3~8の整数を示し；R³及びR⁴はそれぞれ独立して、メチル基又はエチル基である]

で表されるpH感受性カチオン性脂質を含有する、脂質ナノ粒子。

[2] さらに、ステロール及びポリアルキレングリコール修飾脂質を含有している、前記[1]の脂質ナノ粒子。

[3] 脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記pH感受性カチオン性脂質の量の割合が、20モル%以上である、前記[1]又は[2]の脂質

ナノ粒子。

[4] 核酸を含有する、前記[1]～[3]のいずれかの脂質ナノ粒子。

[5] 前記核酸が、siRNA又はmRNAである、前記[4]の脂質ナノ粒子。

[6] 前記核酸が、プラスミドDNAである、前記[4]の脂質ナノ粒子。

[7] 前記核酸が、NK細胞内で発現させる遺伝子、又は、NK細胞内の遺伝子の発現を制御する機能性核酸である、前記[4]～[6]のいずれかの脂質ナノ粒子。

[8] 前記[1]～[7]のいずれかの脂質ナノ粒子が導入された、NK細胞。

[9] 前記[1]～[7]のいずれかの脂質ナノ粒子、又は、前記[8]のNK細胞を有効成分とする、医薬用組成物。

[10] 遺伝子治療に用いられる、前記[9]の医薬用組成物。

[11] がん治療に用いられる、前記[9]の医薬用組成物。

[12] がん免疫療法に用いられる、前記[11]の医薬用組成物。

[13] 前記[1]～[7]のいずれかの脂質ナノ粒子とNK細胞とを含む、NK細胞の形質転換用キット。

[14] 前記[7]の脂質ナノ粒子を、NK細胞へ導入し、前記脂質ナノ粒子に含まれていた前記核酸によって前記NK細胞を形質転換させる、NK細胞の形質転換方法。

[15] 前記[14]のNK細胞の形質転換方法により得られた形質転換NK細胞を、がん組織を備える動物へ投与し、前記がん組織を縮小させる、又は、前記がん組織の増大を抑制する、がんの抑制方法。

[16] 前記[7]の脂質ナノ粒子を、被験動物へ投与し、前記被験動物のNK細胞内で前記脂質ナノ粒子に含有されていた遺伝子又は機能性核酸を発現させる、遺伝子又は機能性核酸の発現方法。

発明の効果

[0013] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、封入された遺伝子をNK細胞内で高発現させることができ、毒性も低い。このため、当該脂質ナノ粒子は、遺伝子治療に用いられるNK細胞特異的遺伝子送達キャリアとして有用である。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]実施例1において、各 *si* GAPDH封入脂質ナノ粒子を導入したNK-92細胞のGAPDH遺伝子のノックダウン活性を測定した結果を示した図である。

[図2]実施例1において、各 *si* GAPDH封入脂質ナノ粒子を導入したNK-92細胞の生存率(%)を測定した結果を示した図である。

[図3]実施例2において、各 *si* GAPDH封入脂質ナノ粒子(CL1H6-LNP)を導入したNK-92細胞のGAPDH遺伝子のノックダウン活性を測定した結果を示した図である。

[図4]実施例2において、各 *si* GAPDH封入脂質ナノ粒子(CL1H6-LNP)を導入したNK-92細胞の生存率(%)を測定した結果を示した図である。

[図5]実施例2において、各 *si* GAPDH封入脂質ナノ粒子(YSK12-LNP)を導入したNK-92細胞のGAPDH遺伝子のノックダウン活性を測定した結果を示した図である。

[図6]実施例2において、各 *si* GAPDH封入脂質ナノ粒子(YSK12-LNP)を導入したNK-92細胞の生存率(%)を測定した結果を示した図である。

[図7]実施例2において、横軸をトランスフェクション時の*si*RNA濃度、縦軸を遺伝子ノックダウン活性と細胞生存率(%)として、YSK12-LNP(85%) (図7(A))とCL1H6-LNP(25%) (図7(B))の遺伝子ノックダウン活性と細胞生存率をプロットした図である。

[図8]実施例2において、YSK12-LNP(25%)とCL1H6-LNP(25%)の半数効果濃度(EC₅₀) (nM) (図8(A))と半数致死温度(LC₅₀) (nM) (図8(B))を示した図である。

[図9]実施例2において、YSK12-LNP (85%)とYSK12-LNP (25%)とCL1H6-LNP (25%)の細胞生存率80%時の遺伝子ノックダウン活性(%)を示した図である。

[図10]実施例2において、横軸をYSK12-C4又はCL1H6の含有比率(モル%)、縦軸をEC₅₀(nM)として、プロットした図である。

[図11]実施例3において、各siGAPDH封入脂質ナノ粒子を導入したNK-92細胞のGAPDH遺伝子のノックダウン活性を測定した結果を示した図である。

[図12]実施例3において、各siGAPDH封入脂質ナノ粒子を導入したNK-92細胞の生存率(%)を測定した結果を示した図である。

[図13]実施例3において、各siGAPDH封入脂質ナノ粒子を導入したKHG-1細胞のGAPDH遺伝子のノックダウン活性を測定した結果を示した図である。

[図14]実施例3において、各siGAPDH封入脂質ナノ粒子を導入したKHG-1細胞の生存率(%)を測定した結果を示した図である。

[図15]実施例4において、siGAPDH又はsiSMAD3を封入したCL1H6-LNPを導入したNK-92MI細胞の遺伝子のノックダウン活性を測定した結果を示した図である。

[図16]実施例4において、siGAPDH又はsiSMAD3を封入したCL1H6-LNPを導入したNK-92MI細胞の生存率(%)を測定した結果を示した図である。

[図17]実施例5において、PBS、未処理のNK-92MI細胞又はSMAD3をノックダウンしたNK-92MI細胞を投与したマウスの、腫瘍体積の経時変化を測定した結果を示した図である。

[図18]実施例6において、Luc-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子を導入したNK-92細胞の、24時間後のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示した図である。

[図19]実施例6において、Luc-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子を導入

入したNK-92細胞の生存率(%)を測定した結果を示した図である。

[図20]実施例7において、Luc-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子を導入したNK-92M1細胞の、24時間後のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示した図である。

[図21]実施例8において、GFP-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子を導入したNK-92M1細胞の、24時間後のGFP発現を測定した結果を示すヒストグラムである。

[図22]実施例8において、GFP-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子を導入したNK-92M1細胞の、24時間後のGFP発現を測定した結果(蛍光強度のmedian値)を示す図である。

[図23]実施例8において、GFP-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子を導入したNK-92細胞の、24時間後のGFP発現を示す蛍光顕微鏡写真である。

[図24]実施例8において、GFP-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子を導入したNK-92M1細胞の生存率(%)を測定した結果を示した図である。

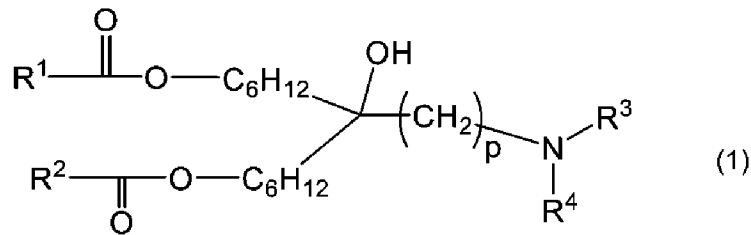
発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の実施態様について具体的に説明する。本願明細書において、「 $X_1 \sim X_2$ (X_1 と X_2 は、 $X_1 < X_2$ を満たす実数)」は、「 X_1 以上 X_2 以下」を意味する。

[0016] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、下記一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質(以下、「本発明のpH感受性カチオン性脂質」ということがある。)を含有する、脂質ナノ粒子である。脂質ナノ粒子の構成脂質として、一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質を備えることにより、本発明に係る脂質ナノ粒子は、NK細胞への送達効率が良好であり、毒性も低く抑えられる。

[0017]

[化2]



[0018] 一般式(1)において、 p は3~8の整数を示し、好ましくは4である。

[0019] 一般式(1)において、 R^3 及び R^4 はそれぞれ独立して、メチル基又はエチル基である。すなわち、 R^3 及び R^4 が共にメチル基であってもよく、 R^3 及び R^4 のいずれか一方がメチル基であり、他方がエチル基であってもよく、 R^3 及び R^4 が共にエチル基であってもよい。第3級アミノ基がこの構造をとることにより、一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質のpKaは、8.0~9.0程度、好ましくは8.0~8.5程度、より好ましくは8.0~8.3程度とすることができる。pKaがこの範囲内であることにより、一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質を構成脂質として含む脂質ナノ粒子は、NK細胞へ良好に取り込まれる。例えば、一般式(1)中、 R^3 及び R^4 が共にメチル基であるpH感受性カチオン性脂質のpKaは8.20程度であり、 R^3 及び R^4 のいずれか一方がメチル基であり、他方がエチル基であるpH感受性カチオン性脂質のpKaは8.05程度であり、 R^3 及び R^4 が共にエチル基であるpH感受性カチオン性脂質のpKaは8.10程度である。なお、 R^3 及び R^4 が共にイソプロピル基であるpH感受性カチオン性脂質のpKaは、一気に低くなり、6.25程度となる(非特許文献5)。

[0020] 一般式(1)において、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に、直鎖状の C_{10-14} アルキル基、1若しくは2個の不飽和結合を有する直鎖状の C_{10-20} アルケニル基、又は $-\text{CH}(\text{R}^5)(\text{R}^6)$ (R^5 及び R^6 はそれぞれ独立して、直鎖状の C_{5-10} アルキル基である)である。一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質のうち、足場となる R^1 及び R^2 が、比較的中鎖のアルキル基、アルケニル基、又は分岐鎖状アルキル基であることにより、足場の流動性

が高くなり、NK細胞への導入効率がより良好となり、かつ毒性もより低く抑えられる。

[0021] 直鎖状の C_{10-14} アルキル基（炭素数10～14のアルキル基）としては、 n -デシル基、 n -ウンデシル基、 n -ドデシル基、 n -トリデシル基、 n -テトラデシル基が挙げられる。 R^1 又は R^2 が直鎖状の C_{10-14} アルキル基の場合、一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質としては、 R^1 及び R^2 が共に直鎖状の C_{10-14} アルキル基であることが好ましく、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立に、 n -ウンデシル基、 n -ドデシル基、又は n -トリデシル基であることがより好ましく、 R^1 及び R^2 が共に n -ウンデシル基、 n -ドデシル基、又は n -トリデシル基であることがさらに好ましく、 R^1 及び R^2 が共に n -トリデシル基であることがよりさらに好ましい。

[0022] 1若しくは2個の不飽和結合を有する直鎖状の C_{10-20} アルケニル基（炭素数10～20のアルケニル基）としては、直鎖状の C_{10-20} アルキル基（炭素数10～20のアルキル基）のうち、アルキル鎖の炭素原子間飽和結合の1個又は2個が不飽和結合となった基であればよく、直鎖状の C_{10-20} アルキル基の中間付近の炭素原子間飽和結合の1個又は2個が不飽和結合となった基が好ましく、直鎖状の C_{13-18} アルキル基（炭素数13～18のアルキル基）の中間付近の炭素原子間飽和結合の1個又は2個が不飽和結合となった基がより好ましい。炭素数10～20のアルキル基としては、 n -デシル基、 n -ウンデシル基、 n -ドデシル基、 n -トリデシル基、 n -テトラデシル基、 n -ペンタデシル基、 n -ヘキサデシル基、 n -ヘプタデシル基、 n -オクタデシル基、 n -ノナデシル基、 n -エイコシル基が挙げられる。直鎖状の C_{13-18} アルキル基の中間付近の炭素原子間飽和結合の1個又は2個が不飽和結合となった基としては、 n -トリデシル基、 n -テトラデシル基、 n -ペンタデシル基、 n -ヘキサデシル基、 n -ヘプタデシル基、又は n -オクタデシル基の中間付近の炭素原子間飽和結合の1個又は2個が不飽和結合となった基であることがより好ましく、5-トリデセニル基、6-トリデセニル基、7-トリデセニル基、8-トリデセニル基、9-トリデセニル基、5

ーテトラデセニル基、6-テトラデセニル基、7-テトラデセニル基、8-テトラデセニル基、9-テトラデセニル基、6-ペンタデセニル基、7-ペンタデセニル基、8-ペンタデセニル基、9-ペンタデセニル基、10-ペンタデシル基、6-ヘキサデセニル基、7-ヘキサデセニル基、8-ヘキサデセニル基、9-ヘキサデセニル基、10-ヘキサデシル基、6-ヘプタデセニル基、7-ヘプタデセニル基、8-ヘプタデセニル基、9-ヘプタデセニル基、10-ヘプタデセニル基、11-ヘプタデセニル基、12-ヘプタデセニル基、9, 12-ヘプタデセニル基、7-オクタデセニル基、8-オクタデセニル基、9-オクタデセニル基、10-オクタデセニル基、11-オクタデセニル基、7-ノナデセニル基、8-ノナデセニル基、9-ノナデセニル基、10-ノナデセニル基、11-ノナデセニル基、8-エイコセニル基、9-エイコセニル基、10-エイコセニル基、11-エイコセニル基、12-エイコセニル基等が挙げられる。

[0023] R¹又はR²が直鎖状のC₁₀₋₂₀アルケニル基の場合、一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質としては、R¹及びR²が共に直鎖状のC₁₀₋₂₀アルケニル基であることが好ましく、R¹及びR²がそれぞれ独立に、直鎖状のC₁₃₋₁₈アルキル基の中間付近の炭素原子間飽和結合の1個又は2個が不飽和結合となった基であることがより好ましく、R¹及びR²がそれぞれ独立に、6-ヘキサデセニル基、7-ヘキサデセニル基、8-ヘキサデセニル基、9-ヘキサデセニル基、10-ヘキサデシル基、6-ヘプタデセニル基、7-ヘプタデセニル基、8-ヘプタデセニル基、9-ヘプタデセニル基、10-ヘプタデセニル基、11-ヘプタデセニル基、12-ヘプタデセニル基、9, 12-ヘプタデセニル基、7-オクタデセニル基、8-オクタデセニル基、9-オクタデセニル基、10-オクタデセニル基、又は11-オクタデセニル基であることがさらに好ましく、R¹及びR²がそれぞれ独立して、6-ヘプタデセニル基、7-ヘプタデセニル基、8-ヘプタデセニル基、9-ヘプタデセニル基、10-ヘプタデセニル基、11-ヘプタデセニル基、12-ヘプタデセニル基、又は9, 12-ヘプタデセニル基であることがより

さらに好ましく、 R^1 及び R^2 が共に8-ヘプタデセニル基であることが特に好ましい。

[0024] $-CH(R^5)(R^6)$ (R^5 及び R^6 はそれぞれ独立して、直鎖状の C_{5-10} アルキル基である)としては、例えば、 $-CH(-C_5H_{11})(-C_7H_{15})$ 、 $-CH(-C_6H_{13})(-C_8H_{17})$ 、 $-CH(-C_7H_{15})(-C_9H_{19})$ 、 $-CH(-C_8H_{17})(-C_{10}H_{21})$ 等が挙げられる。 R^1 又は R^2 が $-CH(R^5)(R^6)$ の場合、一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質としては、 R^1 及び R^2 が共に $-CH(R^5)(R^6)$ であることが好ましく、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立に、 $-CH(-C_5H_{11})(-C_7H_{15})$ 、 $-CH(-C_6H_{13})(-C_8H_{17})$ 、 $-CH(-C_7H_{15})(-C_9H_{19})$ 、又は $-CH(-C_8H_{17})(-C_{10}H_{21})$ であることがより好ましく、 R^1 及び R^2 が共に $-CH(-C_6H_{13})(-C_8H_{17})$ であることがさらに好ましい。

[0025] 一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質としては、 R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して直鎖状の C_{13-18} アルキル基の中間付近の炭素原子間飽和結合の1個又は2個が不飽和結合となった基のいずれかの基である、又は R^1 及び R^2 が、それぞれ独立してn-ウンデシル基、n-ドデシル基、若しくはn-トリデシル基であり、かつpが3~5である化合物が好ましく、 R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して直鎖状の C_{13-18} アルキル基の中間付近の炭素原子間飽和結合の1個又は2個が不飽和結合となった基のいずれかの基であり、かつpが3~5である化合物がより好ましく、 R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して、6-ヘプタデセニル基、7-ヘプタデセニル基、8-ヘプタデセニル基、9-ヘプタデセニル基、10-ヘプタデセニル基、11-ヘプタデセニル基、12-ヘプタデセニル基、又は9,12-ヘプタデセニル基であり、かつpが3~5である化合物がさらに好ましく、 R^1 及び R^2 が共に8-ヘプタデセニル基であり、かつpが3~5である化合物がよりさらに好ましく、 R^1 及び R^2 が共に8-ヘプタデセニル基であり、 R^3 及び R^4 が共にメチル基であり、かつpが4である化合物が特に好ましい。

[0026] 一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質としては、 R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して $-CH(R^5)(R^6)$ であり、かつpが3~5である化合物であることも好ましく、 R^1 及び R^2 が、それぞれ独立に、 $-CH(-C_5H_{11})(-C_7H_{15})$ 、 $-CH(-C_6H_{13})(-C_8H_{17})$ 、 $-CH(-C_7H_{15})(-C_9H_{19})$ 、又は $-CH(-C_8H_{17})(-C_{10}H_{21})$ であり、かつpが3~5である化合物がより好ましく、 R^1 及び R^2 が共に $-CH(-C_6H_{13})(-C_8H_{17})$ であり、かつpが3~5である化合物がさらに好ましく、 R^1 及び R^2 が共に $-CH(-C_6H_{13})(-C_8H_{17})$ であり、かつpが4である化合物がよりさらに好ましい。

[0027] 一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質は、例えば、本明細書の実施例に具体的に示した方法により容易に製造することができる。この製造方法を参照し、原料化合物、試薬、及び反応条件などを適宜選択することにより、当業者は一般式(1)の範囲に包含される任意の脂質を容易に製造することができる。

[0028] 本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明のpH感受性カチオン性脂質は、1種類のみであってもよく、2種類以上であってもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明のpH感受性カチオン性脂質が2種類以上である場合、本発明のpH感受性カチオン性脂質の量は、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子のうち、本発明のpH感受性カチオン性脂質に相当する脂質分子の合計量を意味する。

[0029] 脂質ナノ粒子を構成する脂質分子に占める本発明のpH感受性カチオン性脂質の割合が多いほど、標的細胞への脂質ナノ粒子の取り込み効率が高くなる。このため、本発明に係る脂質ナノ粒子においては、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のpH感受性カチオン性脂質の量の割合(〔本発明のpH感受性カチオン性脂質の量(mol)〕/〔脂質ナノ粒子を構成する全脂質量(mol)〕)×100%)は、20モル%以上であることが好ましい。一方で、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子に占めるpH感受性カチオン性脂質の割合が多すぎると、粒子径を十分に小さくすることが困

難な場合がある。標的細胞への脂質ナノ粒子の取り込み効率が十分であり、かつ粒子径が十分に小さい脂質ナノ粒子が得られることから、本発明に係る脂質ナノ粒子における脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のpH感受性カチオン性脂質の量の割合は、25モル%以上であることがより好ましく、25～60モル%がさらに好ましく、25～50モル%がよりさらに好ましく、25～45モル%が特に好ましい。

[0030] 本発明に係る脂質ナノ粒子の構成脂質のうち、本発明のpH感受性カチオン性脂質以外の脂質としては、一般的にリポソームを形成する際に使用される脂質を用いることができる。このような脂質としては、例えば、リン脂質、ステロール、糖脂質、又は飽和若しくは不飽和の脂肪酸等が挙げられる。これらは1種又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

[0031] リン脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファリジルコリン、カルジオリピン、プラスマロゲン、セラミドホスホリルグリセロールホスファート、ホスファチジン酸等のグリセロリン脂質；スフィンゴミエリン、セラミドホスホリルグリセロール、セラミドホスホリルエタノールアミン等のスフィンゴリン脂質；などを挙げることができる。また、卵黄レシチン、大豆レシチンなどの天然物由来のリン脂質を用いることもできる。グリセロリン脂質及びスフィンゴリン脂質における脂肪酸残基は、特に限定されないが、例えば、炭素数12～24の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を挙げることができ、炭素数14～20の飽和又は不飽和の脂肪酸残基が好ましい。具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸などの脂肪酸由来のアシル基を挙げることができる。これらのグリセロ脂質又はスフィンゴ脂質が2以上の脂肪酸残基を有する場合、全ての脂肪酸残基が同一の基であってもよく、互いに異なる基であってもよい。

[0032] ステロールとしては、例えば、コレステロール、コレステロールコハク酸

、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等の動物由来のステロール；スチグマステロール、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の植物由来のステロール（フィトステロール）；チモステロール、エルゴステロール等の微生物由来のステロールなどが挙げられる。糖脂質としては、例えば、例えば、スルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリド等のグリセロ糖脂質；ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシド等のスフィンゴ糖脂質；などが挙げられる。飽和又は不飽和の脂肪酸としては、例えば、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ミリスチン酸などの炭素数12～20の飽和又は不飽和の脂肪酸が挙げられる。

[0033] 本発明に係る脂質ナノ粒子の構成脂質としては、本発明のpH感受性カチオン性脂質に加えて、中性脂質を含むことが好ましく、リン脂質又はステロールを含むことがより好ましく、ステロールを含むことがさらに好ましく、コレステロールを含むことがよりさらに好ましい。

[0034] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質成分としてポリアルキレングリコール修飾脂質を含有することが好ましい。ポリアルキレングリコールは親水性ポリマーであり、ポリアルキレングリコール修飾脂質を脂質膜構成脂質として用いて脂質ナノ粒子を構築することにより、脂質ナノ粒子の表面をポリアルキレングリコールで修飾することができる。ポリアルキレングリコールで表面修飾することにより、脂質ナノ粒子の血中滞留性などの安定性を高めることができる場合がある。

[0035] ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリテトラメチレングリコール、ポリヘキサメチレングリコールなどを用いることができる。ポリアルキレングリコールの分子量は、例えば300～10,000程度、好ましくは500～10,000程度、さらに好ましくは1,000～5,000程度である。

[0036] 例えば、脂質のポリエチレングリコールによる修飾には、ステアリル化ポリエチレングリコール（例えばステアリン酸PEG45（STR-PEG45）など）を用いることができる。その他、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000]-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、n-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-5000]-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-750]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-5000]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000（PEG2k-DMG）などのポリエチレングリコール誘導体などを用いることもできるが、ポリアルキレングリコール化脂質はこれらに限定されることはない。

[0037] 本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する、ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合は、本発明のpH感受性カチオン性脂質によるNK細胞への高い導入効率、具体的には、本発明に係る脂質ナノ粒子を遺伝子キャリアとして用いる場合のNK細胞特異的遺伝子発現活性を損なわない量であれば特に限定されるものではない。例えば、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する、ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合は、0.5~3モル%とすることが好ましい。

[0038] 本発明に係る脂質ナノ粒子には、必要に応じて適宜の表面修飾などを行うことができる。

本発明に係る脂質ナノ粒子は、表面を親水性ポリマー等で修飾することにより、血中滞留性を高めることができる。これらの修飾基で修飾された脂質を脂質ナノ粒子の構成脂質として使用することにより、表面修飾を行なうこ

とができる場合もある。

[0039] 本発明に係る脂質ナノ粒子の製造にあたり、血中滞留性を高めるための脂質誘導体として、例えば、グリコフォリン、ガングリオシドGM1、ホスファチジルイノシトール、ガングリオシドGM3、グルクロン酸誘導体、グルタミン酸誘導体、ポリグリセリンリン脂質誘導体などを利用することもできる。また、血中滞留性を高めるための親水性ポリマーとして、ポリアルキレングリコールのほかにデキストラン、プルラン、フィコール、ポリビニルアルコール、スチレン-無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸交互共重合体、アミロース、アミロペクチン、キトサン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナンなどを表面修飾に用いることもできる。

[0040] また、本発明に係る脂質ナノ粒子の核内移行を促進するために、例えば、脂質ナノ粒子を3糖以上のオリゴ糖化合物で表面修飾することもできる。3糖以上のオリゴ糖化合物の種類は特に限定されないが、例えば、3~10個程度の糖ユニットが結合したオリゴ糖化合物を用いることができ、好ましくは3~6個程度の糖ユニットが結合したオリゴ糖化合物を用いることができる。中でも、好ましくはグルコースの3量体ないし6量体であるオリゴ糖化合物を用いることができ、さらに好ましくはグルコースの3量体又は4量体であるオリゴ糖化合物を用いることができる。より具体的には、イソマルトトリオース、イソパノース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、又はマルトヘキサオースなどを好適に用いることができ、これらのうち、グルコースが α 1-4結合したマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、又はマルトヘキサオースがさらに好ましい。特に好ましいのはマルトトリオース又はマルトテトラオースであり、最も好ましいのはマルトトリオースである。オリゴ糖化合物による脂質ナノ粒子の表面修飾量は特に限定されないが、例えば、総脂質量に対して1~30モル%程度、好ましくは2~20モル%程度、より好ましくは5~10モル%程度である。

[0041] オリゴ糖化合物で脂質ナノ粒子を表面修飾する方法は特に限定されないが、例えば、脂質ナノ粒子をガラクトースやマンノースなどの単糖で表面を修飾したリポソーム（国際公開第2007/102481号）が知られているので、この刊行物に記載された表面修飾方法を採用することができる。上記刊行物の開示の全てを参照により本願明細書の開示として含める。

[0042] また、本発明に係る脂質ナノ粒子には、例えば、温度変化感受性機能、膜透過機能、遺伝子発現機能、及びpH感受性機能などのいずれか1つ又は2つ以上の機能を付与することができる。これらの機能を適宜付加することにより、脂質ナノ粒子の血液中での滞留性を向上させ、標的細胞におけるエンドサイトーシスの後にエンドソームから効率的に脂質ナノ粒子を脱出させて、封入された核酸をNK細胞の細胞内でより効率よく発現させることができる。

[0043] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、トコフェロール、没食子酸プロピル、パルミチン酸アスコルビル、又はブチル化ヒドロキシトルエンなどの抗酸化剤、荷電物質、及び膜ポリペプチドなどからなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質を含んでいてもよい。正荷電を付与する荷電物質としては、例えば、ステアリルアミン、オレイルアミンなどの飽和若しくは不飽和脂肪族アミンなどを挙げることができ、負荷電を付与する荷電物質としては、例えば、ジセチルホスフェート、コレステリルヘミスクシネート、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸などを挙げることができる。膜ポリペプチドとしては、例えば、膜表在性ポリペプチド、又は膜内在性ポリペプチドなどが挙げられる。これらの物質の配合量は特に限定されず、目的に応じて適宜選択することができる。

[0044] 本発明に係る脂質ナノ粒子の大きさは、生体内のNK細胞に高い送達効率を得られやすいことから、平均粒子径が400nm以下であることが好ましく、平均粒子径が300nm以下であることがより好ましく、平均粒子径が200nm以下であることがさらに好ましく、150nm以下であることがよりさらに好ましい。なお、脂質ナノ粒子の平均粒子径とは、動的光散乱法

(Dynamic light scattering : D L S) により測定された個数平均粒子径を意味する。動的光散乱法による測定は、市販の D L S 装置等を用いて常法により行うことができる。

[0045] 本発明に係る脂質ナノ粒子の多分散度指数 (P D I) は 0. 0 1 ~ 0. 7 程度、好ましくは 0. 0 1 ~ 0. 5 程度、さらに好ましくは 0. 0 3 ~ 0. 2 程度である。ゼータ電位は 1 m V ~ 2 0 m V の範囲、好ましくは 5 m V ~ 1 5 m V の範囲とすることができる。

[0046] 本発明に係る脂質ナノ粒子の形態は特に限定されないが、例えば、水系溶媒に分散した形態として一枚膜リポソーム、多重層リポソーム、球状ミセル、又は不定型の層状構造物などを挙げることができる。本発明に係る脂質ナノ粒子としては、一枚膜リポソーム、多重層リポソームであることが好ましい。

[0047] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質膜で覆われた粒子内部に、標的の細胞内に送達する目的の成分を内包していることが好ましい。本発明に係る脂質ナノ粒子が粒子内部に内包する成分としては、内包可能な大きさであれば特に限定されるものではない。本発明に係る脂質ナノ粒子には、核酸、糖類、ペプチド類、低分子化合物、金属化合物など任意の物質を封入することができる。

[0048] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる成分としては、核酸が好ましい。核酸としては、DNA であってもよく、RNA であってもよく、これらの類似体又は誘導體 (例えば、ペプチド核酸 (PNA) やホスホロチオエート DNA など) であってもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸は、1 本鎖核酸であってもよく、2 本鎖核酸であってもよく、線状であってもよく、環状であってもよい。

[0049] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸は、標的細胞内で発現させるための外来遺伝子を含むことが好ましく、細胞内に取り込まれることによって外来遺伝子を細胞内で発現させるために機能する核酸であることがより好ましい。当該外来遺伝子は、標的細胞 (好ましくは NK 細胞) のゲノム DN

A中に本来含まれている遺伝子であってもよく、ゲノムDNA中に含まれていない遺伝子であってもよい。このような核酸としては、発現させる目的の遺伝子をコードする塩基配列からなる核酸を含む遺伝子発現ベクターが挙げられる。当該遺伝子発現ベクターは、導入された細胞内において、染色体外遺伝子として存在するものであってもよく、相同組換えによりゲノムDNA中に取り込まれるものであってもよい。

[0050] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる遺伝子発現ベクターとしては、特に限定されるものではなく、一般的に遺伝子治療等で使用されるベクターを用いることができる。本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる遺伝子発現ベクターとしては、プラスミドベクター等の核酸ベクターであることが好ましい。プラスミドベクターは、環状のままであってもよく、予め線状に切断した状態で本発明に係る脂質ナノ粒子に封入させてもよい。遺伝子発現ベクターは、発現させる対象の遺伝子の塩基配列情報に基づいて、一般的に使用される分子生物学的ツールを利用して常法により設計でき、公知の各種の方法で製造することができる。

[0051] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸は、標的細胞内に存在する標的遺伝子の発現を制御する機能性核酸であることも好ましい。当該機能性核酸としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、siRNA、microRNA、mRNA等が挙げられる。また、細胞内でsiRNAを発現させるsiRNA発現ベクターとなるプラスミドDNA (pDNA) であってもよい。siRNA発現ベクターとしては、市販のsiRNA発現ベクターから調製することができ、また、これを適宜改変してもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸としては、特にNK細胞への導入効率が良好であることから、mRNA又はpDNAであることが好ましい。

[0052] 本発明に係る脂質ナノ粒子の製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な任意の方法を採用することができる。一例を挙げれば、全ての脂質成分をクロロホルムなどの有機溶媒に溶解し、エバポレータによる減圧乾固や噴

霧乾燥機による噴霧乾燥を行うことによって脂質膜を形成した後、当該脂質ナノ粒子に封入させる成分、例えば核酸等を含む水系溶媒を乾燥した上記の混合物に添加し、さらにホモジナイザーなどの乳化機、超音波乳化機、又は高圧噴射乳化機などにより乳化することで製造することができる。また、リポソームを製造する方法としてよく知られている方法、例えば逆相蒸発法などによっても製造することができる。脂質ナノ粒子の大きさを制御したい場合には、孔径のそろったメンブランフィルターなどを用いて、高圧下でイクストルージョン（押し出し濾過）を行えばよい。

[0053] 水系溶媒（分散媒）の組成は特に限定されないが、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩液などの緩衝液、生理食塩水、細胞培養用の培地などを挙げることができる。これら水系溶媒（分散媒）は脂質ナノ粒子を安定に分散させることができるが、さらに、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース糖の単糖類、乳糖、ショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトースなどの二糖類、ラフィノース、メレジノースなどの三糖類、シクロデキストリンなどの多糖類、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトールなどの糖アルコールなどの糖（水溶液）や、グリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、エチレングリコールモノアルキルエーテル、ジエチレングリコールモノアルキルエーテル、1,3-ブチレングリコールなどの多価アルコール（水溶液）などを加えてもよい。この水系溶媒に分散した脂質ナノ粒子を安定に長期間保存するには、凝集抑制などの物理的安定性の面から水系溶媒中の電解質を極力排除することが望ましい。また、脂質の化学的安定性の面からは水系溶媒のpHを弱酸性から中性付近（pH 3.0～8.0程度）に設定し、及び／又は窒素バブリングなどにより溶存酸素を除去することが望ましい。

[0054] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、流路を用いたアルコール希釈法により製造

することもできる。当該方法は、アルコール溶媒に脂質成分を溶解させた溶液と、水系溶媒に脂質ナノ粒子に包含させる水溶性成分を溶解させた溶液とを、別々の流路から導入し、これを合流させることによって脂質ナノ粒子を製造する方法である。2液の瞬間混合を達成可能な三次元マイクロミキサー内蔵マイクロ流路を用いることにより、直径30nm程度の脂質ナノ粒子を再現良く製造可能である（非特許文献6）。製造に使用する流路としては、粒径制御性が高いナノサイズの脂質粒子形成システムを形成できることから、特許文献2に記載されているような、原料溶液を流すマイクロサイズの流路に、流路幅に対して一定幅のバッフル（邪魔板）を両側面より互い違いに配置した単純な二次元的構造の流路構造体を用いることが好ましい。アルコール希釈法において用いられる水系溶媒としては、前記のものを用いることができる。

[0055] 得られた脂質ナノ粒子の水性分散物を凍結乾燥又は噴霧乾燥する場合には、例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース糖の単糖類、乳糖、ショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトースなどの二糖類、ラフィノース、メレジノースなどの三糖類、シクロデキストリンなどの多糖類、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトールなどの糖アルコールなどの糖（水溶液）を用いると安定性を改善できる場合がある。また、上記水性分散物を凍結する場合には、例えば、前記の糖類やグリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、エチレングリコールモノアルキルエーテル、ジエチレングリコールモノアルキルエーテル、1,3-ブチレングリコールなどの多価アルコール（水溶液）を用いると安定性を改善できる場合がある。

[0056] このNK細胞に対する高選択的な遺伝子発現活性により、本発明に係る脂質ナノ粒子は、NK細胞を標的とする遺伝子発現キャリアとして機能する。例えば、本発明に係る脂質ナノ粒子は、NK細胞への送達効率が良好である

ことから、NK細胞を形質転換する方法に好適に用いられる。NK細胞の形質転換には、本発明に係る脂質ナノ粒子のうち、NK細胞内で発現させる目的の外来遺伝子や、NK細胞内の遺伝子の発現を制御する機能性核酸を含有する脂質ナノ粒子が用いられる。なお、以降において、NK細胞内で発現させる遺伝子と、NK細胞内の遺伝子の発現を制御する機能性核酸と、をまとめて、「NK細胞標的核酸」ということがある。NK細胞標的核酸を含有する本発明に係る脂質ナノ粒子をNK細胞に導入すると、当該脂質ナノ粒子に含まれていたNK細胞標的核酸によって、当該NK細胞が形質転換される。導入された脂質ナノ粒子に含まれていたNK細胞標的核酸がNK細胞内で発現させる遺伝子の場合には、形質転換されたNK細胞内では、当該遺伝子が発現する。導入された脂質ナノ粒子に含まれていたNK細胞標的核酸がNK細胞内の遺伝子の発現を制御する機能性核酸の場合には、形質転換されたNK細胞内では、当該機能性核酸の標的遺伝子の発現が抑制される。

[0057] NK細胞の形質転換に用いられる本発明に係る脂質ナノ粒子とNK細胞とをキット化して、NK細胞の形質転換用キットを製造することもできる。当該キットにより、NK細胞の形質転換をより簡便に実施することができる。

[0058] 本発明に係る脂質ナノ粒子に、NK細胞内で発現させる目的の外来遺伝子やNK細胞内の遺伝子の発現を制御する機能性核酸を封入した上で、被験動物へ投与することにより、当該被験動物のNK細胞内で当該脂質ナノ粒子に含有されていた外来遺伝子や機能性核酸を発現させることができる。遺伝子発現ベクターを封入した本発明に係る脂質ナノ粒子を動物個体に投与すると、当該脂質ナノ粒子に封入された遺伝子発現ベクターは、NK細胞において高効率で発現する。例えば、NK細胞内で発現させる目的の外来遺伝子を封入した本発明に係る脂質ナノ粒子を、被験動物へ投与すると、当該被験動物のNK細胞内で当該外来遺伝子を発現させることができる。同様に、機能性核酸やsiRNA発現ベクターを封入した本発明に係る脂質ナノ粒子を動物個体に投与すると、当該脂質ナノ粒子に封入された機能性核酸又はsiRNA発現ベクターは、当該動物の体内のNK細胞において高効率で発現し、こ

これらの核酸が標的とする遺伝子の発現が抑制される。

[0059] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、医薬用組成物の有効成分とすることができる。本発明に係る脂質ナノ粒子は、遺伝子キャリアとして優れていることから、遺伝子治療、特に、NK細胞を標的とする遺伝子治療に用いられる医薬用組成物の有効成分として有用である。また、がん治療に用いられる医薬用組成物の有効成分としても有用である。

[0060] NK細胞は免疫機能で重要な役割を果たす細胞であり、このため、NK細胞への選択性の高い遺伝子キャリアである本発明に係る脂質ナノ粒子は、免疫療法に用いられる医薬用組成物の有効成分とすることができ、特に、がん免疫療法に用いられる医薬用組成物の有効成分として好適である。当該がん免疫療法としては、NK細胞療法や、がんワクチン療法が挙げられる。

[0061] 本発明に係る脂質ナノ粒子が導入されたNK細胞（形質転換NK細胞）も、医薬用組成物の有効成分として有用である。当該形質転換NK細胞は、NK細胞療法で患者に投与されるNK細胞として用いることもできる。例えば、NK細胞の活性化に寄与するNK細胞標的核酸を含有させた本発明に係る脂質ナノ粒子を、*ex vivo*でNK細胞へ導入し、得られた形質転換NK細胞を、がん組織を備える動物へ投与する。当該形質転換NK細胞は、導入されたNK細胞標的核酸が発現することによって活性化しており、この活性化した形質転換NK細胞が、当該動物の体内でがん組織を攻撃する。この結果、当該動物の体内のがん組織が、縮小したり、増大が抑制されることによって、がんを抑制することができる。

[0062] 本発明に係る脂質ナノ粒子やこれが導入された形質転換NK細胞が投与される動物は、特に限定されるものではなく、ヒトであってもよく、ヒト以外の動物であってもよい。非ヒト動物としては、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等の哺乳動物や、ニワトリ、ウズラ、カモ等の鳥類等が挙げられる。また、本発明に係る脂質ナノ粒子を動物に投与する際の投与経路は、特に限定されるものではないが、経静脈投与、経腸投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮

投与、経鼻投与、経肺投与等の非経口投与であることが好ましい。

実施例

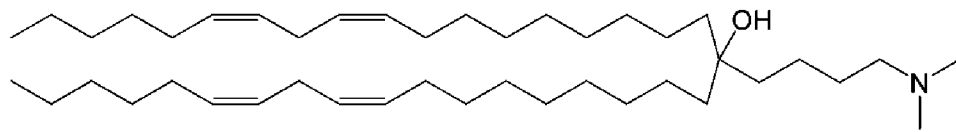
[0063] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0064] <脂質>

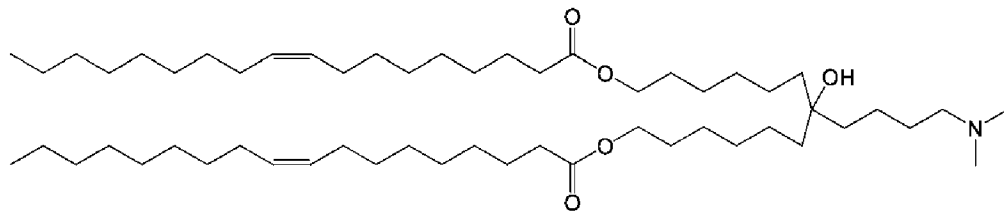
以降の実験において、pH感受性カチオン性脂質として以下の脂質を用いた。

[0065] [化3]

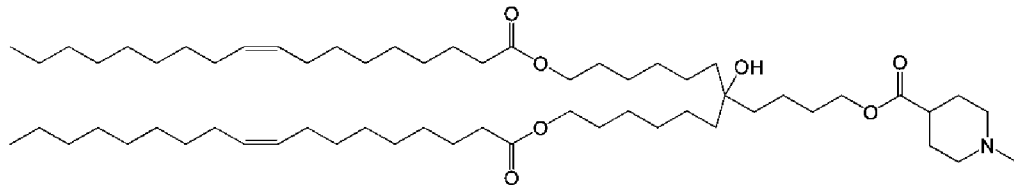
CL1A6 (YSK12-C4)



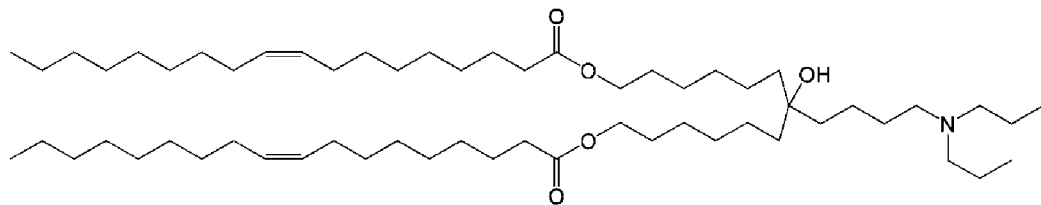
CL1H6



CL15H6



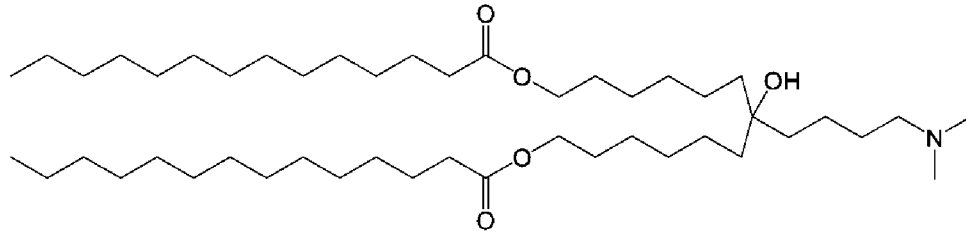
CL4H6



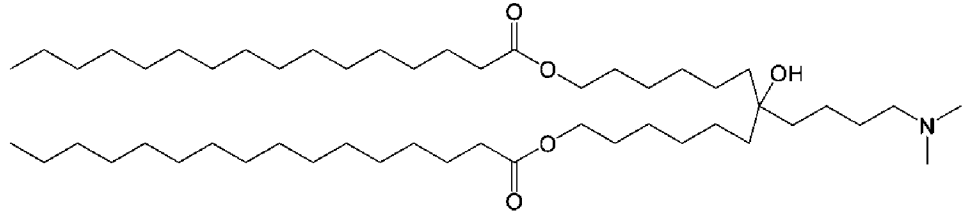
[0066]

[化4]

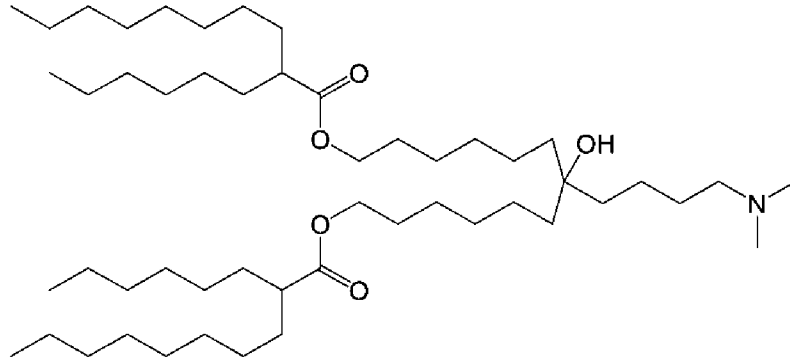
CL1C6



CL1D6



CL1F6



[0067] CL1A6 (YSK12-C4)、CL1H6、CL15H6、CL4H6、CL1C6、及びCL1D6は、特許文献1に記載の方法で合成したものをを用いた。

[0068] CL1F6は、特許文献1に記載の方法で合成された7-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)トリデカン-1,7,13-トリオール(1.30mmol)を5mLのジクロロメタンに溶解し、続いて、2-ヘキシルデカノイン酸(3.12mmol)、DMAP(N,N-ジメチル-4-アミノピリジン)(0.26mmol)及びEDCI(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)(3.9mmol)を加え、室温で一晩反応させた。ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去した後、酢酸エチルで懸濁し、濾過によって不溶物を除去した。濾液を0.5N酸化ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で分液洗浄した。有機層に無水硫酸ナトリウムを

加えて脱水した。これを濾過した後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去し、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー〔溶離溶媒；ジクロロメタン：メタノール（連続勾配）〕に供することにより精製して得たものを用いた。

[0069] さらに、中性脂質として、コレステロール（c h o l）及びポリエチレングリコール2000修飾ジミリスチルグリセロール（P E G 2 k - D M G）を使用した。

[0070] <脂質ナノ粒子の調製>

以降の実験において、特に記載のない限り、脂質ナノ粒子は、t-ブタノール希釈法を用いて調製した。

具体的には、まず、脂質溶液として、全ての脂質成分を含むt-ブタノール溶液を調製した。次いで、ボルテックスミキサーで攪拌しながら、調製した脂質溶液に、s i R N A又はm R N A溶液を少しずつ添加した。混合した溶液は、27G注射針を装着した1mL容シリンジに充填し、当該シリンジから、2mLの20mMクエン酸緩衝液（pH6.0）に注入した。その後、脂質溶液をシリンジから注入したクエン酸緩衝液を、D-PBS（-）（pH8.0）を加えて希釈しながら、アミコンウルトラ（Amicon Ultra）-15遠心式フィルターデバイス（M W C O 100,000）を用いて限外濾過（1000×g、20℃、8分間）を行った。続いて、12mLのD-PBS（-）（pH8.0）を加えて、再度限外濾過（1000×g、20℃、8分間）を行った。その後、D-PBS（-）で洗い込みしながら、1.5mL容チューブにリポソーム溶液を回収し、D-PBS（-）で1mLにメスアップし、これを脂質ナノ粒子溶液とした。

[0071] <Lipofectamine-mRNA complexの調製>

Lipofectamine Messenger Max Reagent及びmRNA溶液をそれぞれ培養培地（Opti-MEM）で所定の濃度に希釈し、それぞれを1：1の割合でボルテックスミキサーを用いて混合し、5分間室温で静置して調製した。

[0072] <脂質ナノ粒子の平均粒子径とゼータ電位の測定>

脂質ナノ粒子のPBS（-）中における平均粒子径（個数平均値）及び10 mM HEPES緩衝液（pH 7.4）中におけるゼータ電位を、動的光散乱法を利用した分析装置「Zetasizer Nano ZS ZEN3600」（Malvern社製）を用いて測定した。

[0073] <脂質ナノ粒子のpKaの測定>

脂質ナノ粒子のpKaは、p-Toluenesulfonic acid（TNS）を用いて測定した。まず、TNS（終濃度：0.75 mM）と脂質ナノ粒子（終濃度：30 mM）を各pHに調整した緩衝液中で混合した。調製された混合液の蛍光強度を、マイクロプレートリーダーで測定した。測定値のうち、最も高い値及び低い値をそれぞれ100%及び0%荷電率とし、50%荷電率を示すpHをpKaとして算出した。

[0074] <脂質ナノ粒子の核酸封入率>

脂質ナノ粒子の核酸（siRNA又はmRNA）の封入率は、RNAに選択的にインターカレーションを起こして蛍光を発光する「Quant-iT（登録商標）RiboGreen（登録商標）RNA」（Thermo Fisher Scientific社製）を用いたアッセイにより定量した。

96ウェルプレートの各ウェルに、調製した脂質ナノ粒子溶液に対して、10 mM HEPESバッファー、10% triton（tritonを添加しない場合は、等量の10 mM HEPESバッファーを添加する）、及びRiboGreenを混合して添加した後、振とう器用ミキサーで5分間振とうした。その後、当該プレートをマイクロプレートリーダー（「EnSpire」、PerkinElmer社製）に設置して、各ウェル中の溶液の蛍光強度を測定した。

核酸封入率は、下記式に基づいて算出した。

$$[0075] \quad [\text{封入率}(\%)] = ([\text{Triton}(+) \text{における核酸濃度}] - [\text{Triton}(-) \text{における核酸濃度}]) / [\text{Triton}(+) \text{における核酸濃度}] \times 100$$

[0076] <細胞培養>

ヒトNK細胞株NK-92は、培地の色が赤からオレンジに変色するのを

目安に、継代を行った。細胞を50 mL容チューブに回収し、遠心分離（130×g、4℃、5分間）して上清を除去し、細胞を計数した後、細胞を $2 \times 10^6 \text{ cells} / 10 \text{ mL}$ の濃度でフラスコに添加し、終濃度200 U/mLとなるようにヒト組換えIL-2を添加して、37℃、5%CO₂条件下で培養した。

[0077] ヒトNK細胞株KHYG-1は、培地の色が赤からオレンジに変色するのを目安に、継代を行った。細胞の継代は、単なる希釈により行った。具体的には、3～4倍に希釈した後、終濃度200 U/mLとなるようにヒト組換えIL-2を添加して、37℃、5%CO₂条件下で培養した。

[0078] ヒトNK細胞株NK-92MIは、培地にヒト組換えIL-2を添加しなかった以外は、NK-92細胞と同様にして培養した。

[0079] ヒト悪性黒色腫細胞株A375は、培地の色が赤からオレンジに変色するのを目安に、継代を行った。細胞を50 mL容チューブに回収し、遠心分離（130×g、4℃、5分間）して上清を除去し、継代比1：3～1：5で、10 cmのディッシュに播種し、37℃、5%CO₂条件下で培養した。

[0080] <siGAPDH又はsiSMAD3封入脂質ナノ粒子のノックダウン活性の評価>

各脂質ナノ粒子をNK細胞株（NK-92又はNK-92MI）にトランスフェクションし、24時間後の細胞から抽出したRNAを鋳型としたRT-qPCR法により、siGAPDH又はsiSMAD3封入脂質ナノ粒子のノックダウン活性を調べた。

まず、NK細胞株を50 mL容チューブに回収し、遠心分離（130×g、4℃、5分間）した。上清を除去し、10 mLの培養培地（Opti-MEM）に懸濁して細胞を計数した後、 $4 \times 10^6 \text{ cells} / \text{mL}$ となるように培養培地に再懸濁した。この細胞懸濁液にsiGAPDH又はsiSMAD3封入脂質ナノ粒子を、siRNA濃度が10 nM、30 nM、60 nM、又は90 nMとなるように添加し、さらにヒト組換えIL-2を終濃度200 U/mLとなるように添加した後、浮遊培養用プレート（MS-801

2 R) に、 4×10^5 又は 8×10^5 cells/well となるように分注した。当該プレートを 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 2 時間インキュベートした。その後、血清入り培地 (IL-2 : 200 U/mL) を $500 \mu\text{L}$ /ウェルで添加し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 22 時間インキュベートした。ただし、NK-92MI 細胞の場合は、培地に IL-2 を添加しなかった。

[0081] それぞれのウェルから細胞を 1.5 mL 容チューブに回収し、遠心分離 ($800 \times g$ 、 4°C 、3 分間) した。上清を除去した後、沈殿した細胞に 1 mL の D-PBS (-) を添加して、遠心分離 ($800 \times g$ 、 4°C 、3 分間) した。上清を除去した後、 $350 \mu\text{L}$ の RLT バッファー (1% β -メルカプトエタノール) を添加してボルツテクスミキサーで攪拌した後、2 mL 容セーフロックチューブに移した。次いで、RNA 精製用キット (「RNeasy Mini Kit」、QIAGEN 社製) を用いて RNA を精製した。その後、超微量分光光度計「Nano drop」(Thermo Scientific 社製) を用いて吸光度を測定することによって、RNA の濃度及び純度を測定した。

[0082] 回収した RNA を鋳型として、逆転写反应用キット (「PrimeScript RT reagent kit」、TaKaRa Bio 社製) のオリゴ dT プライマーとランダムプライマー (6 mers) を用いて、逆転写反応を行った。その後、得られた cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR により、 β -アクチン (ACTB) を内因性遺伝子として、 $\Delta\Delta Ct$ 法による相対定量を用いて、GAPDH 又は SMAD3 の mRNA 量を測定した。ACTB の mRNA 量に対する GAPDH 又は SMAD3 の mRNA 量の割合 ($[\text{GAPDH 又は SMAD3 の mRNA 量}] / [\text{ACTB の mRNA 量}]$) を、siGAPDH 又は siSMAD3 封入脂質ナノ粒子のノックダウン活性とした。

[0083] <siGAPDH 又は siSMAD3 封入脂質ナノ粒子の毒性の評価>

siGAPDH 又は siSMAD3 封入脂質ナノ粒子の毒性を、各脂質ナノ粒子を NK 細胞株 (NK-92 又は NK-92MI) にトランスフェクションし、WST-1 アッセイにより調べた。

まず、NK 細胞株を 50 mL 容チューブに回収し、遠心分離 ($130 \times g$

、4℃、5分間)した。上清を除去し、10mLの培養培地(Opti-MEM)に懸濁して細胞を計数した後、 $4 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ となるように培養培地に再懸濁した。この細胞懸濁液にsiGAPDH又はsiSMAD3封入脂質ナノ粒子を、siRNA濃度が10nM、30nM、60nM、又は90nMとなるように添加した後、96ウェルプレートに2ウェルずつ、 1.2×10^5 又は $2.4 \times 10^5 \text{ cells/well}$ となるように分注し、37℃、5%CO₂条件下で2時間インキュベートした。その後、血清入り培地(IL-2:200U/mL)を50μL/ウェルで添加し、37℃、5%CO₂条件下で22時間インキュベートした。ただし、NK-92MI細胞の場合は、培地にIL-2を添加しなかった。

[0084] 次いで、各ウェルに、10又は20μLの反应用プレミックス(「Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System」、TaKaRa Bio社製)を添加して、37℃、5%CO₂条件下で0.5~1時間インキュベートした後、プレートリーダー(「Varioskan LUX」、Thermo Scientific社製)を用いて吸光度を測定した。細胞の生存率(%)は、下記式で算出した。

[0085] [生存率(%)]=([siGAPDH又はsiSMAD3封入脂質ナノ粒子を添加した細胞の吸光度値]-[ベースの吸光度値])÷([siGAPDH又はsiSMAD3封入脂質ナノ粒子を添加しなかった細胞の吸光度値]-[ベースの吸光度値])×100(%)

[0086] <mRNA封入脂質ナノ粒子の毒性の評価>

NK-92細胞又はNK-92MI細胞を50mL容チューブに回収し遠心分離($130 \times g$ 、4℃、5分間)した。上清を除去し、10mLの培養培地(Opti-MEM)に懸濁して細胞を計数後、 $4 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ となるように培養培地(Opti-MEM)に再懸濁した。1.5mL容チューブを用いて、mRNA濃度が0.066μg/mL、0.2μg/mL、0.4μg/mL、又は0.6μg/mLとなるように、各mRNA封入脂質ナノ粒子又はLipofectamine-mRNA complexを調製し、96ウェルプレートに播種($1.2 \times 10^5 \text{ cells/well}$

1、n=2)し、37℃、5%CO₂条件下で2時間インキュベートした。その後、血清入り培地(IL-2:200U/mL)を50μL/wellで添加し、37℃、5%CO₂条件下で22時間インキュベートした。ただし、NK-92MI細胞の場合は、培地にIL-2を添加しなかった。

[0087] 次に、反作用プレミックス(「Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System」、TaKaRa Bio社製)を添加(10μL/well)し、37℃、5%CO₂条件下で1時間インキュベートし、プレートリーダー(Varioskan LUX)を用いて吸光度を測定した。細胞の生存率(%)は、下記式で算出した。

[0088] [生存率(%)]=([mRNA封入脂質ナノ粒子を添加した細胞の吸光度値]-[ベースの吸光度値])÷([mRNA封入脂質ナノ粒子を添加しなかった細胞の吸光度値]-[ベースの吸光度値])×100(%)

[0089] <Luc-mRNA送達能評価>

NK-92細胞又はNK-92MI細胞を50mL容チューブに回収し、遠心分離(130×g、4℃、5分間)した。上清を除去し、10mLの培養培地(Opti-MEM)に懸濁して細胞を計数後、4×10⁶cells/mLとなるように培養培地に再懸濁した。この細胞懸濁液に、mRNA濃度が0.066μg/mL、0.2μg/mL、又は0.4μg/mLとなるように、各Luc-mRNA(商品名:「CleanCap FLuc mRNA」、TriLink社製)封入脂質ナノ粒子又はLipofectamine-mRNA complexを添加し、浮遊培養用プレート(MS-8012R)に分注(4×10⁵cells/well、IL-2:200U/mL)し、37℃、5%CO₂条件下で、2時間インキュベートした。その後、血清入り培地(IL-2:200U/mL)を500μL/wellで添加し、37℃、5%CO₂条件下で22時間インキュベートした。ただし、NK-92MI細胞の場合は、培地にIL-2を添加しなかった。

[0090] それぞれのウェルから細胞を1.5mL容チューブに回収し、遠心分離(800×g、4℃、3分間)した。上清を除去後、1mLのD-PBS(-)を

添加し、遠心分離(800g、4℃、3分間)した。上清を除去後、100 μ LのPassive Lysis Bufferを各チューブに添加し、30秒間ボルテックスミキサーで攪拌後、遠心分離(17800 \times g、4℃、2分間)した。上清70 μ Lを別に用意した1.5mL容チューブに回収した。

ルシフェラーゼ発光量は、Luciferase Assay Systemを用いたLuciferase assayにより評価した。Luciferase Assay Bufferに溶解させた50 μ LのLuciferase Assay SubstrateをRohren Tubeに添加し、上述の遠心で得られた上清20 μ Lを添加し、ピペティング後にLuminometerで発光量を測定した。また、得られた上清はPierce BCA PROTEIN Assay Kitを用いたBCA assayにも使用し、各サンプルのタンパク質濃度を算出し、発光量をタンパク質量で補正した。

[0091] <GFP-mRNA送達能評価>

NK-92細胞又はNK-92MI細胞を50mL容チューブに回収し遠心分離(130 \times g、4℃、5分間)した。上清を除去し、10mLの培養培地(Opti-MEM)に懸濁して細胞を計数後、 4×10^6 cells/mLとなるように培養培地(Opti-MEM)に再懸濁した。この細胞懸濁液に、mRNA濃度が0.066 μ g/mL、0.2 μ g/mL、又は0.4 μ g/mLとなるように各GFP-mRNA(商品名:「CleanCap EGFP mRNA」、TriLink社製)封入脂質ナノ粒子又はLipofectamine-mRNA complexに添加し、浮遊培養用プレート(MS-8012R)に分注(4×10^5 cells/well、IL-2:200U/mL)し、37℃、5%CO₂条件下で2時間インキュベートした。その後、血清入り培地(IL-2:200U/mL)を500 μ L/wellで添加し、37℃、5%CO₂条件下で22時間インキュベートした。ただし、NK-92MI細胞の場合は、培地にIL-2を添加しなかった。

[0092] それぞれのウェルから細胞を1.5 mL容チューブに回収し遠心分離（800×g、4℃、3分間）した。上清を除去後、1 mLのD-PBS（-）を添加し、遠心分離（800×g、4℃、3分間）した。上清を除去後、1 mLのFACS Bufferを添加し、遠心分離（800×g、4℃、3分間）し、上清を除去した。その後、500～1000 μLのFACS Bufferに懸濁してCytometer FLEXによりGFPの発現を解析した。

[0093] <蛍光顕微鏡を用いたGFP観察>

NK-92MIを50 mL容チューブに回収し、遠心分離（130×g、4℃、5分間）した。上清を除去し、10 mLの培養培地（Opti-MEM）に懸濁して細胞を計数後、 4×10^6 cells/mLとなるように培養培地（Opti-MEM）に再懸濁した。この細胞懸濁液に、mRNA濃度が0.2 μg/mLとなるように各EGFP-mRNA（「CleanCap EGFP mRNA」、TriLink社製）封入脂質ナノ粒子を添加し、浮遊培養用プレート（MS-8012R）に分注（ 4×10^5 cells/well）し、37℃、5%CO₂条件下で2時間インキュベートした。その後、血清入り培地を500 μL/wellで添加し、37℃、5%CO₂条件下で22時間インキュベートした。

[0094] それぞれのウェルから細胞を1.5 mL容チューブに回収し、遠心分離（800×g、4℃、3分間）した。上清を除去後、1 mLのD-PBS（-）を添加し、遠心分離（800×g、4℃、3分間）した。上清を除去後、Prolong Diamondを添加（10 μL/tube）し、スライドガラスに移し、顕微鏡（BX-800）観察を行った。

[0095] [実施例1]

NK-92細胞へのsiRNA導入効率と細胞毒性に、脂質ナノ粒子を構成するpH感受性カチオン性脂質の見かけのpKaが与える影響を調べるために、YSK12-C4（pKa 8.2）、CL1H6（pKa 8.2）、CL15H6（pKa 7.3）、及びCL4H6（pKa 6.35）を用いて、siRNAを封入した脂質ナノ粒子を調製し、NK-92細胞へ導入し

た。

[0096] pH感受性カチオン性脂質の含有比率（ $[\text{pH感受性カチオン性脂質の量 (mol)}] / ([\text{脂質ナノ粒子を構成する全脂質の量 (mol)}]) \times 100\%$ ）が50モル%の脂質ナノ粒子に、GAPDHに対するsiRNA（siGAPDH）を封入した脂質ナノ粒子を調製した。具体的には、脂質溶液として、pH感受性カチオン性脂質、コレステロール、及びPEG2k-DMGをモル比50：50：1の組成で含む、総脂質濃度が1.25mMのトータノール溶液を用い、RNとして、3 μ M siGAPDH水溶液を用いて、前記<脂質ナノ粒子の調製>の方法で、siGAPDHを封入した脂質ナノ粒子を調製した。

比較対象として、非特許文献3に記載されている組成（YSK12/Cholesterol/PEG2k-DMG=85/15/1（モル比））のsiGAPDHを封入した脂質ナノ粒子も、同様にして調製した。

調製されたpH感受性カチオン性脂質の含有比率50モル%の脂質ナノ粒子の物性を測定した（n=2）。表1に示す。

[0097] [表1]

脂質	粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	siRNA 封入率 (%)	siRNA 回収率 (%)
CL1A6 (YSK12-C4)	143	0.051	9.9	97.6	103.4
CL1H6	141	0.095	10.1	102.3	102.8
CL15H6	134	0.068	6.38	95.1	108.8
CL4H6	116	0.075	4.69	94.5	99.3

[0098] 各siGAPDH封入脂質ナノ粒子をNK-92細胞へ導入し、ノックダウン活性（ $[\text{GAPDHのmRNA量}] / [\text{ACTBのmRNA量}]$ ）を測定した（n=1）。測定結果を図1に示す。図中、「YSK12-C4（85：15）」はYSK12-C4の含有比率85モル%のsiGAPDH封入脂質ナノ粒子（YSK12-LNP（85%））、「YSK12-C4（50：50）」はYSK12-C4の含有比率50モル%のsiGAPDH封入脂質ナノ粒子（YSK12-LNP（50%））、「CL1H6（50

：50）」はCL1H6の含有比率50モル%の*s i G A P D H*封入脂質ナノ粒子（CL1H6-LNP（50%））、「CL15H6（50：50）」はCL15H6の含有比率50モル%の*s i G A P D H*封入脂質ナノ粒子（CL15H6-LNP（50%））、「CL4H6（50：50）」はCL4H6の含有比率50モル%の*s i G A P D H*封入脂質ナノ粒子（CL4H6-LNP（50%））の結果をそれぞれ示す。

[0099] 図1に示すように、CL1H6-LNP（50%）は、YSK12-LNP（85%）よりも高い遺伝子ノックダウン活性を示した。これに対して、CL15H6-LNP（50%）及びCL4H6-LNP（50%）は、全く活性を示さなかった。これらの結果から、脂質ナノ粒子の構成脂質にCL1H6を用いることにより、NK細胞株に対する遺伝子ノックダウン活性を増強できる可能性が示唆された。

[0100] 続いて、各*s i G A P D H*封入脂質ナノ粒子をNK-92細胞にトランスフェクションし、24時間後の細胞毒性をWST-1アッセイにより調べた（ $n=1$ ）。各*s i G A P D H*封入脂質ナノ粒子を導入した細胞の生存率（%）の測定結果を図2に示す。この結果、CL1H6-LNP（50%）は、YSK12-LNP（85%）と同程度の細胞毒性を示した。これに対して、CL15H6-LNP（50%）及びCL4H6-LNP（50%）は、ほとんど毒性を示さなかった。CL15H6-LNP（50%）及びCL4H6-LNP（50%）は、ノックダウン活性と毒性のいずれも示さなかったことから、これらの脂質ナノ粒子は、そもそもNK細胞株へ取り込まれていないことが示唆された。

[0101] [実施例2]

実施例1で調製したCL1H6-LNP（50%）について、CL1H6とコレステロールの比率を変えた*s i G A P D H*封入脂質ナノ粒子を調製し、遺伝子ノックダウン活性と細胞毒性への影響を検証した。

[0102] 脂質溶液として、CL1H6、コレステロール、及びPEG2k-DMGをモル比15：85：1、25：75：1、35：65：1、又は50：5

0 : 1 の組成で含む、総脂質濃度が 1.25 mM の t-ブタノール溶液をそれぞれ用いた以外は実施例 1 と同様にして、siGAPDH 封入脂質ナノ粒子を調製した。

同様に、YSK12-C4、コレステロール、及びPEG2k-DMGをモル比 15 : 85 : 1、25 : 75 : 1、35 : 65 : 1、又は 50 : 50 : 1 の組成で含む、総脂質濃度が 1.25 mM の t-ブタノール溶液をそれぞれ用いた以外は実施例 1 と同様にして、siGAPDH 封入脂質ナノ粒子を調製した。

各 siGAPDH 封入脂質ナノ粒子の物性を表 2 (n = 3) 及び表 3 (n = 2 又は 3) に示す。

[0103] [表2]

脂質組成 (mol%) (CL1H6/ Chol)	粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	siRNA 封入率 (%)	siRNA 回収率 (%)
15 / 85	151 ± 5	0.39 ± 0.068	9.8 ± 0.7	95.6 ± 0.7	79.2 ± 7.4
25 / 75	127 ± 3	0.13 ± 0.008	11.6 ± 0.4	96.7 ± 0.9	105.4 ± 3.6
35 / 65	126 ± 3	0.15 ± 0.015	11.3 ± 1.2	96.4 ± 0.9	106.5 ± 2.1
50 / 50	152 ± 2	0.05 ± 0.011	13.5 ± 1.3	97.7 ± 0.6	112.0 ± 1.0

[0104] [表3]

脂質組成 (mol%) (YSK12- C4/Chol)	粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	siRNA 封入率 (%)	siRNA 回収率 (%)
15 / 85	203	0.49	5.5	96.6	55.2
25 / 75	167 ± 1.4	0.24 ± 0.03	7.6 ± 0.6	96.7 ± 1.0	91.7 ± 2.1
35 / 65	145	0.17	8.4	97.1	98.4
50 / 50	154	0.09	8.6	96.7	108.6

[0105] 各 siGAPDH 封入脂質ナノ粒子について、ノックダウン活性と細胞毒性を、実施例 1 と同様にして測定した。比較対象として、実施例 1 で調製した YSK12-LNP (85%) についても、同様にして測定した。CL1H6-LNP のノックダウン活性の結果を図 3 に、CL1H6-LNP の細胞毒性の結果を図 4 に、YSK12-LNP のノックダウン活性の結果を図 5 に、YSK12-LNP の細胞毒性の結果を図 6 に、それぞれ示す。図 3

($n=3$) 中、「**」は $P<0.01$ 、「*」は $P<0.05$ を表し、図4 ($n=4$) 中、「**」は $P<0.01$ を表す (ANOVAとそれに続く Tukey-Kramer法による)。

[0106] 図3に示すように、CH1H6を25モル%以上含むCL1H6-LNPは、YSK12-LNP (85%)と同程度かそれ以上の遺伝子ノックダウン活性を示した。また、図4に示すように、CL1H6が25モル%以下のCL1H6-LNPでは、ほとんど細胞毒性が認められなかった。これらの結果から、CL1H6/コレステロール (モル比) が25/75である脂質ナノ粒子を遺伝子キャリアとすることにより、高ノックダウン活性かつ低毒性なsiRNA導入を実現できることが明らかになった。

[0107] また、図5及び6に示すように、YSK12-LNPの場合は、YSK12-C4の比率を下げるほど、遺伝子ノックダウン活性が低下し、それに伴って細胞毒性も低下した。CL1H6-LNPにおいて観察された、CL1H6の含有比率を低下させることによって活性を損なうことなく毒性を下げられるという現象は、YSK12-LNPでは観察されなかった。

[0108] CL1H6-LNPのうち、遺伝子ノックダウン活性と細胞毒性の両方に優れていたCH1H6を25モル%含むCL1H6-LNP (25%)の結果と、YSK12-C4を85モル%含むYSK12-LNP (85%)の結果と、YSK12-C4を25モル%含むYSK12-LNP (25%)の結果とを解析して比較した。

[0109] 横軸にトランスフェクション時のsiRNA濃度、縦軸に遺伝子ノックダウン活性と細胞生存率 (%) をとり、YSK12-LNP (85%)とCL1H6-LNP (25%)の遺伝子ノックダウン活性と細胞生存率をプロットした。図7 (A) にYSK12-LNP (85%)の結果を示し、図7 (B) にCL1H6-LNP (25%)の結果を示す。図7に示すように、CL1H6-LNP (25%)では、遺伝子ノックダウン活性と細胞毒性の乖離に成功していることが明らかになった。

[0110] また、YSK12-LNP (25%)とCL1H6-LNP (25%)の

半数効果濃度 (EC_{50}) (nM) (図8 (A)) と半数致死温度 (LC_{50}) (nM) (図8 (B)) を比較したところ、CL1H6-LNP (25%) は、YSK12-LNP (25%) よりも EC_{50} を0.67倍程度にまで低下させ、 LC_{50} は約2.5倍にも上昇させた。細胞生存率80%時の遺伝子ノックダウン活性を比較すると、CL1H6-LNP (25%) は、最も高い70%以上の遺伝子ノックダウン活性を示した (図9)。さらに、横軸に、YSK12-C4又はCL1H6の含有比率 (モル%)、縦軸に EC_{50} (nM) とし、プロットしたところ、CL1H6は、少ない含有比率で高い遺伝子ノックダウン活性を示すことができることが明らかになった (図10)。

[0111] [実施例3]

実施例1に示すように、NK-92細胞において高い遺伝子ノックダウン活性を示した脂質ナノ粒子に含まれているpH感受性カチオン性脂質は、親水性部位が同じであるYSK12-C4とCL1H6であった。これらの結果から、NK細胞において高い遺伝子ノックダウン活性を達成するためには、脂質ナノ粒子の pK_a は8.2周辺が適していることが示唆された。そこで、CL1H6の足場部分の構造が、遺伝子ノックダウン活性に対する影響を調べた。

[0112] CL1H6に代えて、CL1C6又はCL1D6を用い、脂質溶液と siRNA 溶液の混合溶液をシリンジから注入する20mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) を5mM クエン酸緩衝液 (pH6.0、60°C) に置換し、希釈に用いるD-PBS (-) をD-PBS (-) (pH8.5、60°C) に置換した以外は、実施例2と同様にして、CL1C6の含有比率25モル%の siGAPDH封入脂質ナノ粒子 (CL1C6-LNP (25%)) 及びCL1D6の含有比率25モル%の siGAPDH封入脂質ナノ粒子 (CL1D6-LNP (25%)) を調製した。また、CL1C6-LNP (25%) とYSK-LNP (85%) は、実施例2と同様にして調製したものをを用いた。

各 si GAPDH 封入脂質ナノ粒子の物性を表 4 (n = 3) に示す。

[0113] [表4]

脂質	粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	siRNA 封入 率 (%)	siRNA 回収 率 (%)
CL1A6 (YSK12-C4)	152±8	0.055±0.006	10.5±0.3	96.7±0.4	114.9±1.4
CL1H6	127±3	0.130±0.008	11.6±0.4	96.7±0.9	105.4±3.6
CL1C6	138±9	0.120±0.013	11.0±0.9	85.8±0.5	120.9±7.4
CL1D6	142±7	0.120±0.003	11.3±0.4	83.0±1.2	109.2±2.5

[0114] 各 si GAPDH 封入脂質ナノ粒子について、ノックダウン活性と細胞毒性を、実施例 1 と同様にして NK-92 細胞を用いて測定した。各 si GAPDH 封入脂質ナノ粒子のノックダウン活性の結果を図 11 に、細胞毒性の結果を図 12 に、それぞれ示す。両図 (n = 3) 中、「**」は $P < 0.01$ 、「*」は $P < 0.05$ を表す (ANOVA とそれに続く Tukey-Kramer 法による)。

[0115] 図 11 に示すように、CL1H6-LNP (25%) が最も高い遺伝子ノックダウン活性を示した。また、CL1C6-LNP (25%) のほうが、CL1D6-LNP (25%) よりも遺伝子ノックダウン活性が高かったことから、足場が飽和炭化水素鎖の場合には、鎖の長さが遺伝子ノックダウン活性に影響することがわかった。また、図 12 に示すように、CL1H6-LNP (25%) が最も毒性軽減効果が高かった。

[0116] NK-92 細胞以外の NK 細胞株での有効性を検証するために、別のヒト NK 細胞株 KHYG-1 細胞を用いて、各 si GAPDH 封入脂質ナノ粒子について、ノックダウン活性と細胞毒性を同様にして測定した。各 si GAPDH 封入脂質ナノ粒子のノックダウン活性の結果を図 13 に、細胞毒性の結果を図 14 に、それぞれ示す。両図 (n = 3) 中、「**」は $P < 0.01$ 、「*」は $P < 0.05$ を表す (ANOVA とそれに続く Tukey-Kramer 法による)。

[0117] 図 13 に示すように、KHYG-1 細胞においても、CL1H6-LNP (25%) が最も高い遺伝子ノックダウン活性を示した。一方、細胞毒性評

価では、CL1H6-LNP（25%）では顕著な毒性は観察されなかった（図14）。これらの結果から、CL1H6-LNPは、様々なヒトNK細胞株において有用である可能性が示唆された。

[0118] [実施例4]

CL1H6（pKa 8.2）にsiGAPDH又はsiSMAD3を封入した脂質ナノ粒子をNK-92MI細胞へ導入して、NK-92MI細胞における遺伝子ノックダウン可能性及びNK-92MI細胞に対する細胞毒性を調べた。

[0119] (CL1H6-LNPの調製)

以下に示す溶液を混合して、siRNA溶液を調製した。

50 μM siSMAD3溶液又はsiGAPDH溶液	12
μL	
RNase free water	88
μL	

また、t-BuOHに溶解させた以下の溶液を混合して、脂質溶液を調製した。脂質組成は、CL1H6/Cholesterol/PEG2k-DMG=25/75/1である。

CL1H6 (10mM)	12.5 μL
Cholesterol (2mM)	187.5 μL
PEG2k-DMG (0.2mM)	25 μL
t-BuOH (90%)	175 μL

調製したsiRNA溶液及び脂質溶液を用いて、前記<脂質ナノ粒子の調製>の方法で、siGAPDH又はsiSMAD3を封入した脂質ナノ粒子を調製した。脂質ナノ粒子の物性（n=3、mean±SE）を表5に示す。

[0120]

[表5]

siRNA封入 CL1H6-LNP	粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	封入率 (%)	回収率 (%)
siGAPDH	127±3	0.130±0.008	11.6±0.4	96.7±0.9	105.4±3.6
siSMAD3	126±6	0.158±0.030	8.3±1.1	83.7±0.3	94.3±0.6

[0121] 各 siRNA 封入脂質ナノ粒子を NK-92MI 細胞へ導入し、ノックダウン活性（[GAPDH 又は SMAD3 の mRNA 量] / [ACTB の mRNA 量]）を測定した（n=1）。測定結果を図 15 に示す。図中、「siGAPDH」は siGAPDH 封入脂質ナノ粒子（CL1H6-LNP）の結果、「siSMAD3」は siSMAD3 封入脂質ナノ粒子（CL1H6-LNP）の結果を示す。

[0122] 図 15 に示すように、各 siRNA を封入した CL1H6-LNP は、NK-92MI 細胞においても高い遺伝子ノックダウン活性を示した。また、siGAPDH 封入 CL1H6-LNP 及び siSMAD3 封入 CL1H6 は、同じレベルのノックダウン活性を示した。

[0123] 続いて、各 siRNA 封入脂質ナノ粒子を NK-92MI 細胞にトランスフェクションし、24 時間後の細胞毒性を WST-1 アッセイにより調べた（n=1）。各 siRNA 封入脂質ナノ粒子を導入した細胞の生存率（%）の測定結果を図 16 に示す。図 16 に示すように、siGAPDH 封入 CL1H6-LNP 及び siSMAD3 封入 CL1H6 は、遺伝子ノックダウン活性が認められた濃度で細胞毒性を示さなかった。

[0124] [実施例 5]

A375 細胞をわき腹皮下に移植した BALB/c Slc-nu/nu マウス（ 5×10^6 cells / $70 \mu\text{L}$ ・マウス、26G 針）を用意した。PBS、未処理の NK-92MI 細胞、及び siSMAD3 封入 CL1H6-LNP（siSMAD3 濃度：30 nM）を前日にトランスフェクションした NK-92MI 細胞を、マウスの尾静脈内にそれぞれ投与した（ 5×10^6

cells / 200 μ L · マウス、26G針)。投与は週2回、計6回行なった。すなわち、腫瘍移植から7日目、10日目、14日目、17日目、21日目、24日目に投与を行った。腫瘍の長径及び短径を経時的に測定し、下記数式により、腫瘍体積を算出した。

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} \times 0.52$$

腫瘍の長径及び短径は、7日目、11日目、15日目、19日目、23日目、27日目に測定した。結果を図17に示す。図17に示すように、CL1H6-LNPを用いてSMAD3をノックダウンしたNK-92MI細胞を投与した群では、有意な抗腫瘍活性が認められた。

[0125] [実施例6]

YSK12-C4、CL1H6、CL1C6、CL1D6及びDilin-MC3を用いて、Luc-mRNAを封入した脂質ナノ粒子を調製した。

[0126] (YSK12-LNPの調製)

以下に示す溶液を混合して、Luc-mRNA溶液を調製した。

Luc-mRNA溶液 (1mg/mL)	3.95 μ L
RNase free water	186.05 μ L

また、t-BuOHに溶解させた以下の溶液を混合して、脂質溶液を調製した。脂質組成は、YSK12/Cholesterol/PEG2k-DMG=85/15/1である。

YSK12-C4 (10mM)	42.5 μ L
Cholesterol (2mM)	37.5 μ L
PEG2k-DMG (0.2mM)	25 μ L
t-BuOH (90%)	295 μ L

調製したLuc-mRNA溶液及び脂質溶液を用いて、前記<脂質ナノ粒

子の調製>に記載の方法で、ルシフェラーゼを封入した脂質ナノ粒子を調製した。脂質ナノ粒子の物性 ($n=3$ 、mean \pm SE) を表6に示す。

[0127] (CL1H6-LNPの調製)

以下に示す溶液を混合して、Luc-mRNA溶液を調製した。

Luc-mRNA溶液 (1mg/mL)	3.95 μ L
RNase free water	86.05 μ L

また、t-BuOHに溶解させた以下の溶液を混合して、脂質溶液を調製した。脂質組成は、CLH6/Cholesterol/PEG2k-DMG=25/75/1である。

CL1H6 (10mM)	12.5 μ L
Cholesterol (2mM)	187.5 μ L
PEG2k-DMG (0.2mM)	25 μ L
t-BuOH (90%)	175 μ L

調製したLuc-mRNA溶液及び脂質溶液を用いて、前記<脂質ナノ粒子の調製>に記載の方法で、ルシフェラーゼを封入した脂質ナノ粒子を調製した。脂質ナノ粒子の物性 ($n=3$ 、mean \pm SE) を表6に示す。

[0128] (CL1C6-LNP及びCL1D6-LNPの調製)

以下に示す溶液を混合して、Luc-mRNA溶液を調製した。

Luc-mRNA溶液 (1mg/mL)	3.95 μ L
RNase free water	86.05 μ L

また、t-BuOHに溶解させた以下の溶液を混合して、脂質溶液を調製した。脂質組成は、(CL1C6又はCL1D6)/Cholestero

I / PEG 2 k - DMG = 25 / 75 / 1である。

CL 1 C 6 又は CL 1 D 6 (10 mM)	12.5 μ
L	
Cholesterol (2 mM)	187.5
μ L	
PEG 2 k - DMG (0.2 mM)	25 μ L
t - BuOH (90%)	175 μ L

調製した Luc - mRNA 溶液及び脂質溶液を用いて、前記<脂質ナノ粒子の調製>に記載の方法で、ルシフェラーゼを封入した脂質ナノ粒子を調製した。脂質ナノ粒子の物性 (n = 3、mean \pm SE) を表6に示す。

[0129] (MC 3 - LNP (N / P = 8) の調製)

以下に示す溶液を混合して、Luc - mRNA 溶液を調製した。

Luc - mRNA 溶液 (1 mg / mL)	10 μ L
RNase free water	90 μ L

また、t - BuOH に溶解させた以下の溶液を混合して、脂質溶液を調製した。脂質組成は、Dlin - MC 3 / DSPC / Cholesterol / PEG 2 k - DMG = 25 / 75 / 1 である。

Dlin - MC 3 (10 mM)	25 μ L
Cholesterol (2 mM)	97.5 μ
L	
DSPC (2 mM)	25 μ L
PEG 2 k - DMG (0.5 mM)	15 μ L
t - BuOH (90%)	212.5
μ L	

調製した Luc - mRNA 溶液及び脂質溶液を用いて、前記<脂質ナノ粒子の調製>に記載の方法で、ルシフェラーゼを封入した脂質ナノ粒子を調製した。脂質ナノ粒子の物性 (n = 3、mean \pm SE) を表6に示す。

[0130]

[表6]

Luc-mRNA封入 LNP	粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	封入率 (%)	回収率 (%)
YSK12-LNP	145±16	0.141±0.047	8.1±1.8	73.0±3.4	117.5±6.0
CL1H6-LNP	132±11	0.301±0.081	11.9±1.7	70.8±5.9	125.7±16.2
CL1C6-LNP	182±7	0.256±0.007	13.6±0.5	75.3±3.1	121.4±1.9
CL1D6-LNP	172±7	0.234±0.042	9.5±2.4	63.0±2.4	86.7±9.2
MC3-LNP	116±0.5	0.074±0.004	-5.2±1.3	74.7±0.8	113.9±7.3

- [0131] (Lipofectamine-mRNA complexの調製)
mRNAとして、Luc-mRNAを用い、前記<Lipofectamine-mRNA complexの調製>に記載の方法で、Lipofectamine-mRNA complex (図中、「LF mMAX」)調製した。
- [0132] Luc-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子及びLipofectamine-mRNA complexをNK-92細胞にトランスフェクションし、前記<Luc-mRNA送達能評価>に記載の方法で、24時間後のルシフェラーゼ活性を調べた。測定結果を図18に示す。
- [0133] 図18に示すように、いずれのLuc-mRNA封入脂質ナノ粒子も、Lipofectamine-mRNA complexより高いルシフェラーゼ活性を示した。中でも、CL1H6-LNPが最も高いルシフェラーゼ活性を示した。
- [0134] 続いて、Luc-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子及びLipofectamine-mRNA complexをNK-92細胞にトランスフェクションし、前記<mRNA封入脂質ナノ粒子の毒性の評価>に記載の方法で、24時間後の細胞毒性を調べた。測定結果を図19に示す。
- [0135] 図19に示すように、CL1H6-LNP、CL1C6-LNP及びCL1D6-LNPは、ルシフェラーゼ活性が十分に得られる濃度で細胞生存率

が高く、細胞毒性を示さなかった。

[0136] [実施例7]

実施例6と同様な方法で、Luc-mRNAを封入したMC3-LNP、Luc-mRNAを封入したCL1H6-LNP、及びLipofectamine-mRNA complexを調製した。

Luc-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子及びLipofectamine-mRNA complexをNK-92MI細胞にトランスフェクションし、前記<Luc-mRNA送達能評価>に記載の方法で、24時間後のルシフェラーゼ活性を調べた。測定結果を図20に示す。

図20に示すように、CL1H6-LNPはMC3-LNPよりも高いルシフェラーゼ活性を示した。

[0137] [実施例8]

CL1H6及びDlin-MC3を用いて、GFP-mRNAを封入した脂質ナノ粒子を調製した。

(CL1H6-LNPの調製)

Luc-mRNAの代わりにGFP-mRNAを用いた以外は、実施例6のCL1H6-LNPの調製方法と同様にして、CL1H6-LNPを調製した。脂質ナノ粒子の物性 (n=3、mean±SE) を表7に示す。

(MC3-LNPの調製)

Luc-mRNAの代わりにGFP-mRNAを用いた以外は、実施例6のMC3-LNPの調製方法と同様にして、MC3-LNPを調製した。脂質ナノ粒子の物性 (n=3、mean±SE) を表7に示す。

[0138] [表7]

GFP-mRNA封入LNP	粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	封入率 (%)	回収率 (%)
CL1H6-LNP	122±6	0.152±0.036	9.2±0.4	70.7±1.1	74.1±4.3
MC3-LNP	117±3	0.090±0.029	-3.8±0.3	79.6±0.2	85.0±2.1

[0139] (Lipofectamine-mRNA complexの調製)

mRNAとして、GFP-mRNAを用い、前記<Lipofectamine-mRNA complexの調製>に記載の方法で調製した。

[0140] GFP-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子及びLipofectamine-mRNA complexをNK-92MI細胞にトランスフェクションし、前記<GFP-mRNA送達能評価>及び<蛍光顕微鏡を用いたGFP観察>に記載の方法で、24時間後のGFP発現を調べた。測定結果を図21（ヒストグラム）、図22（蛍光強度（FI）のmedian値）、及び図23（蛍光顕微鏡写真）に示す。

図21、図22及び図23に示すように、CL1H6-LNPはMC3-LNPよりも顕著に高いGFP発現を示した。

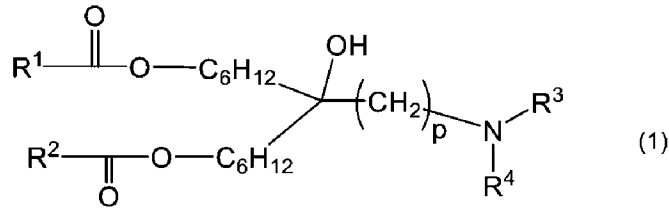
[0141] 続いて、GFP-mRNAを封入した各脂質ナノ粒子及びLipofectamine-mRNA complexをNK-92MI細胞にトランスフェクションし、前記<mRNA封入脂質ナノ粒子の毒性の評価>に記載の方法で、24時間後の細胞毒性を調べた。測定結果を図24に示す。

図24に示すように、GFP発現が十分に得られる濃度では細胞毒性を示さなかった。

請求の範囲

[請求項1] 下記の式（1）：

[化1]



[式（1）中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立して、直鎖状の C_{10-14} アルキル基、1若しくは2個の不飽和結合を有する直鎖状の C_{10-20} アルケニル基、又は $-\text{CH}(\text{R}^5)(\text{R}^6)$ （ R^5 及び R^6 はそれぞれ独立して、直鎖状の C_{5-10} アルキル基である）であり； p は3～8の整数を示し； R^3 及び R^4 はそれぞれ独立して、メチル基又はエチル基である]

で表されるpH感受性カチオン性脂質を含有する、脂質ナノ粒子。

[請求項2] さらに、ステロール及びポリアルキレングリコール修飾脂質を含有している、請求項1に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項3] 脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する前記pH感受性カチオン性脂質の量の割合が、20モル%以上である、請求項1又は2に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項4] 核酸を含有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

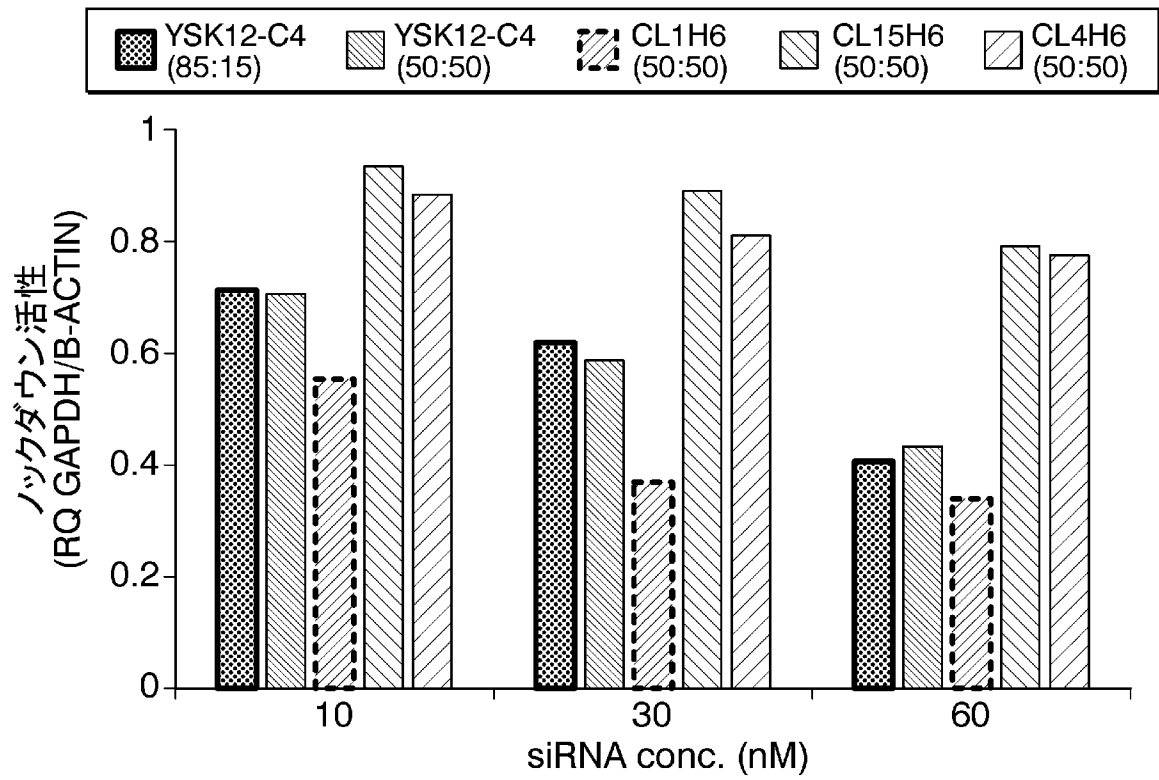
[請求項5] 前記核酸が、siRNA又はmRNAである、請求項4に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項6] 前記核酸が、プラスミドDNAである、請求項4に記載の脂質ナノ粒子。

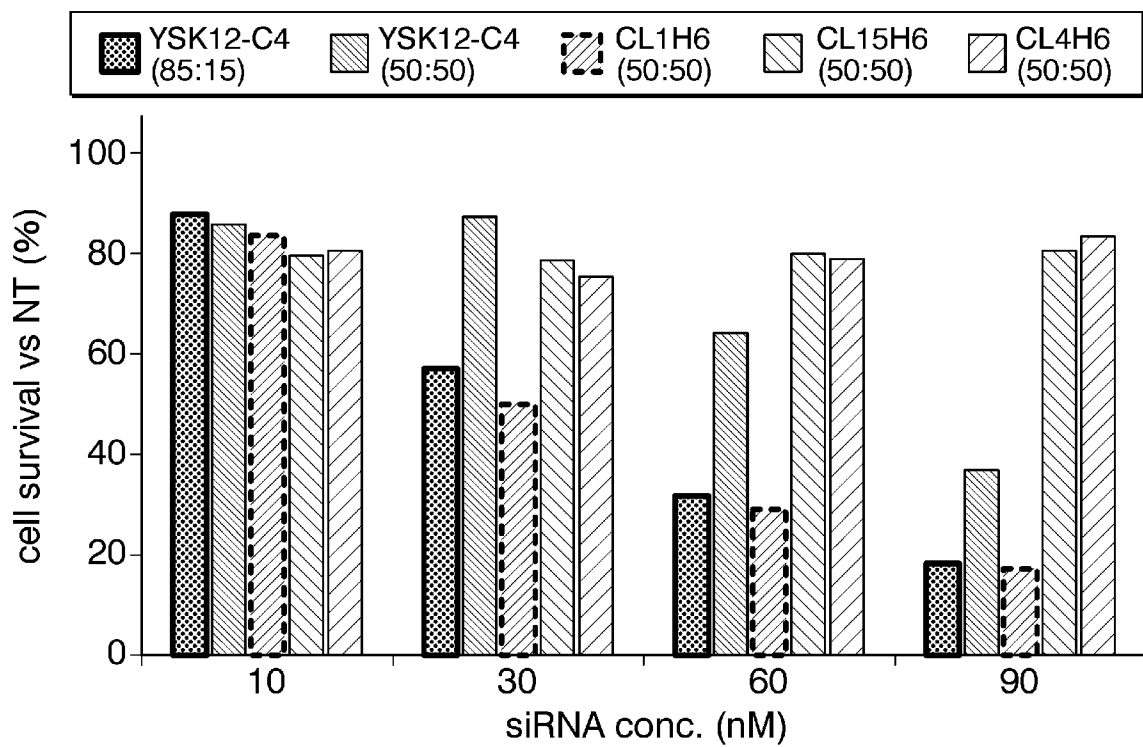
[請求項7] 前記核酸が、NK細胞内で発現させる遺伝子、又は、NK細胞内の遺伝子の発現を制御する機能性核酸である、請求項4～6のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

- [請求項8] 請求項1～7のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子が導入された、NK細胞。
- [請求項9] 請求項1～7のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子、又は、請求項8に記載のNK細胞を有効成分とする、医薬用組成物。
- [請求項10] 遺伝子治療に用いられる、請求項9に記載の医薬用組成物。
- [請求項11] がん治療に用いられる、請求項9に記載の医薬用組成物。
- [請求項12] がん免疫療法に用いられる、請求項11に記載の医薬用組成物。
- [請求項13] 請求項1～7のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子とNK細胞とを含む、NK細胞の形質転換用キット。
- [請求項14] 請求項7に記載の脂質ナノ粒子を、NK細胞へ導入し、前記脂質ナノ粒子に含まれていた前記核酸によって前記NK細胞を形質転換させる、NK細胞の形質転換方法。
- [請求項15] 請求項14に記載のNK細胞の形質転換方法により得られた形質転換NK細胞を、がん組織を備える動物へ投与し、前記がん組織を縮小させる、又は、前記がん組織の増大を抑制する、がんの抑制方法。
- [請求項16] 請求項7に記載の脂質ナノ粒子を、被験動物へ投与し、前記被験動物のNK細胞内で前記脂質ナノ粒子に含有されていた遺伝子又は機能性核酸を発現させる、遺伝子又は機能性核酸の発現方法。

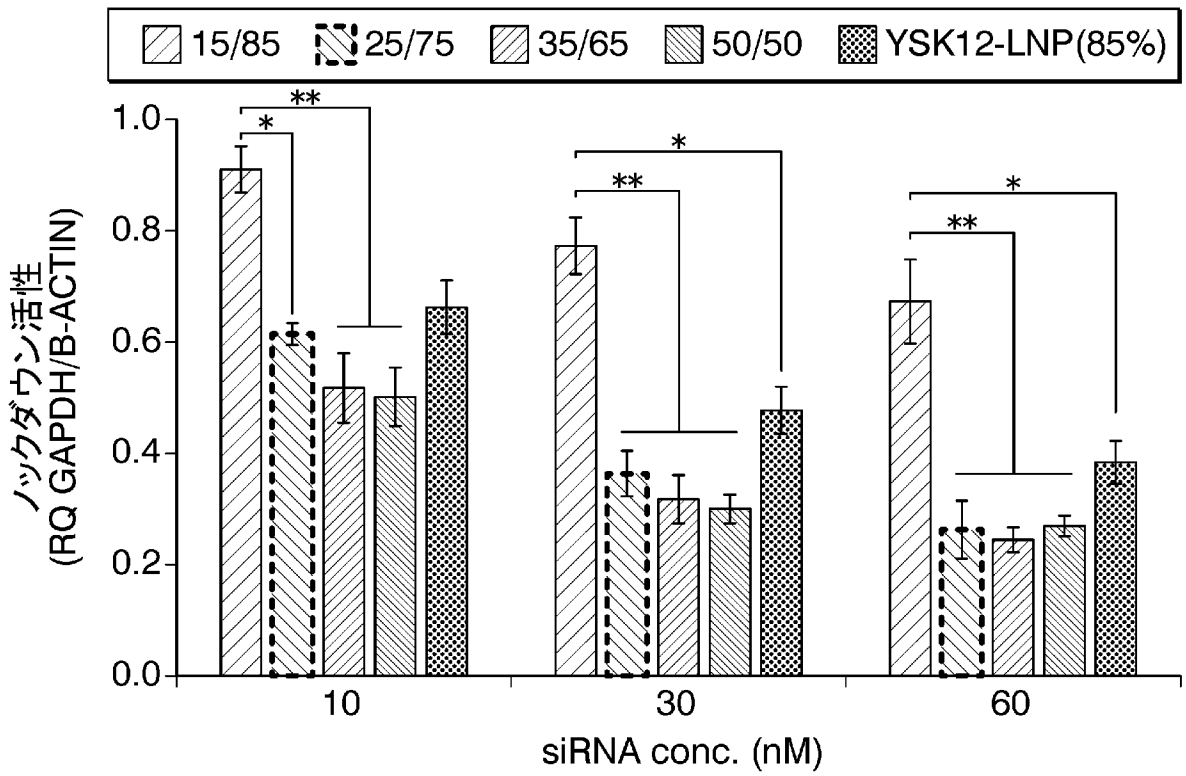
[図1]



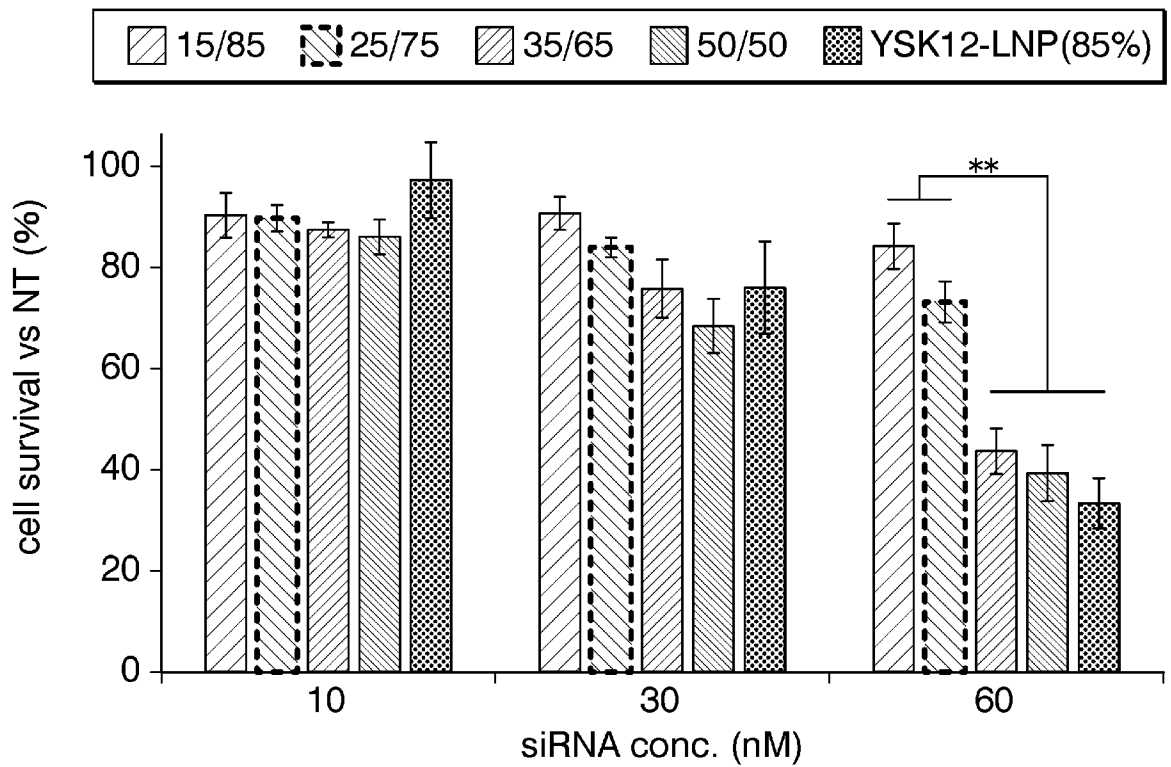
[図2]



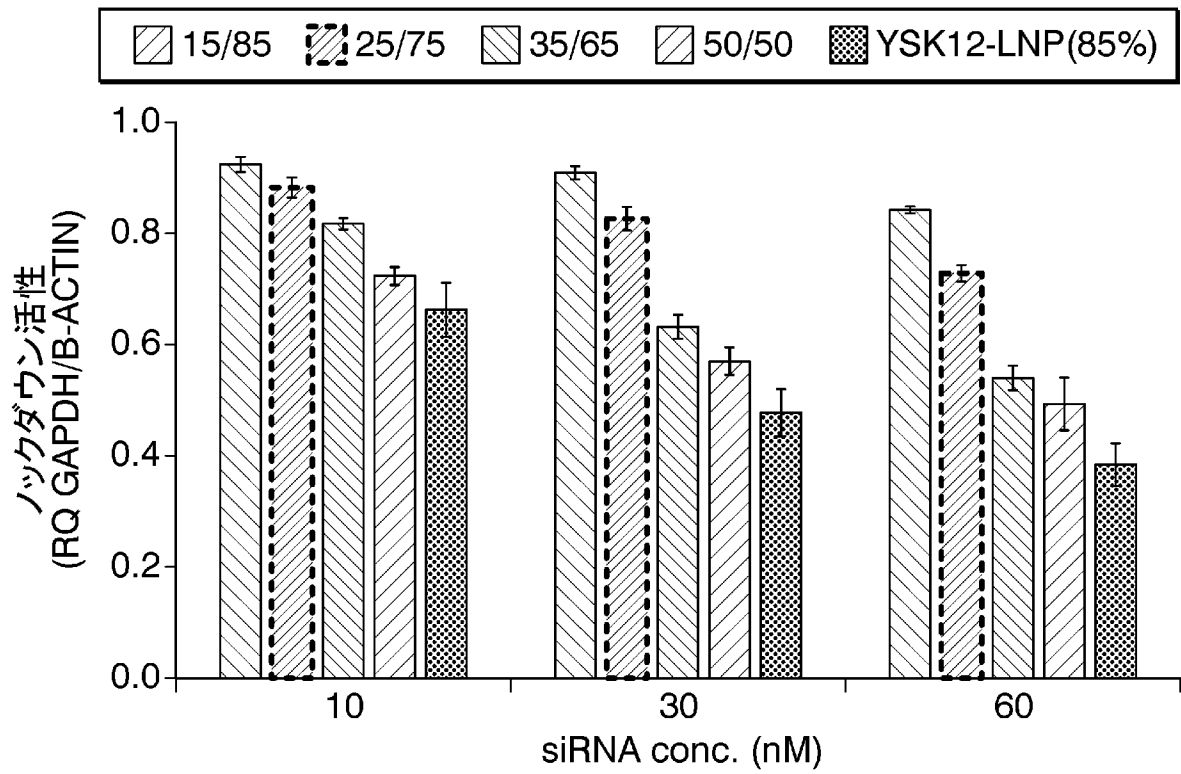
[図3]



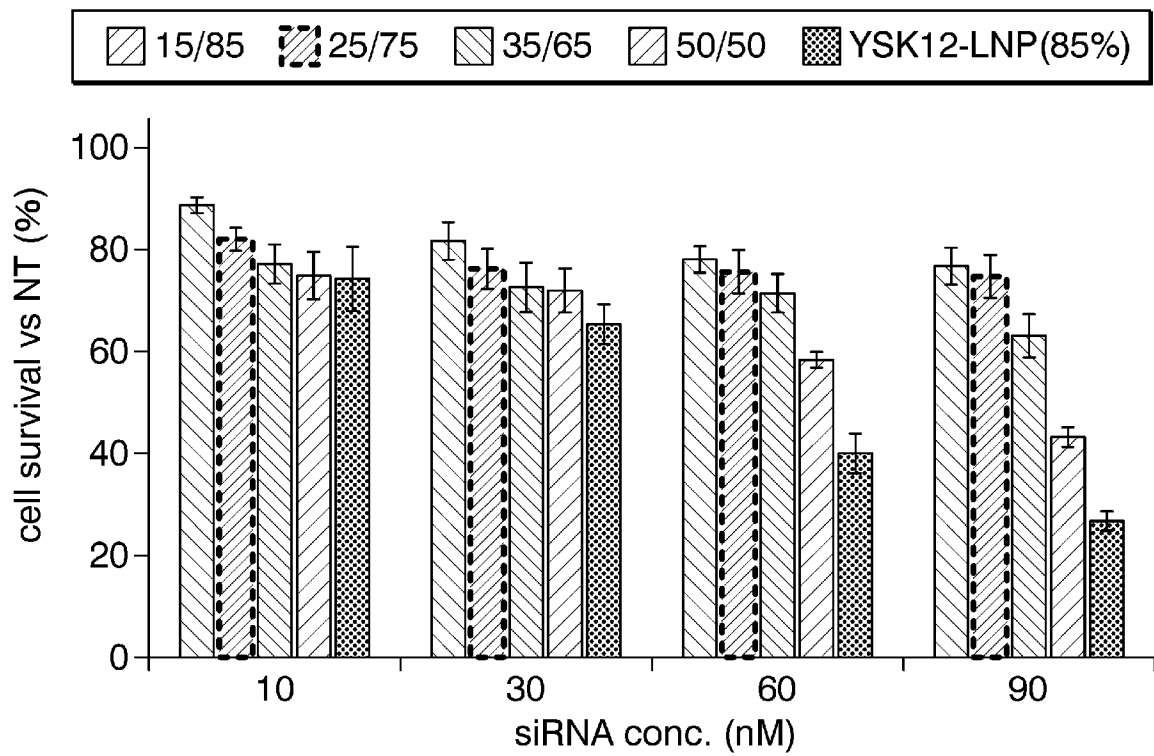
[図4]



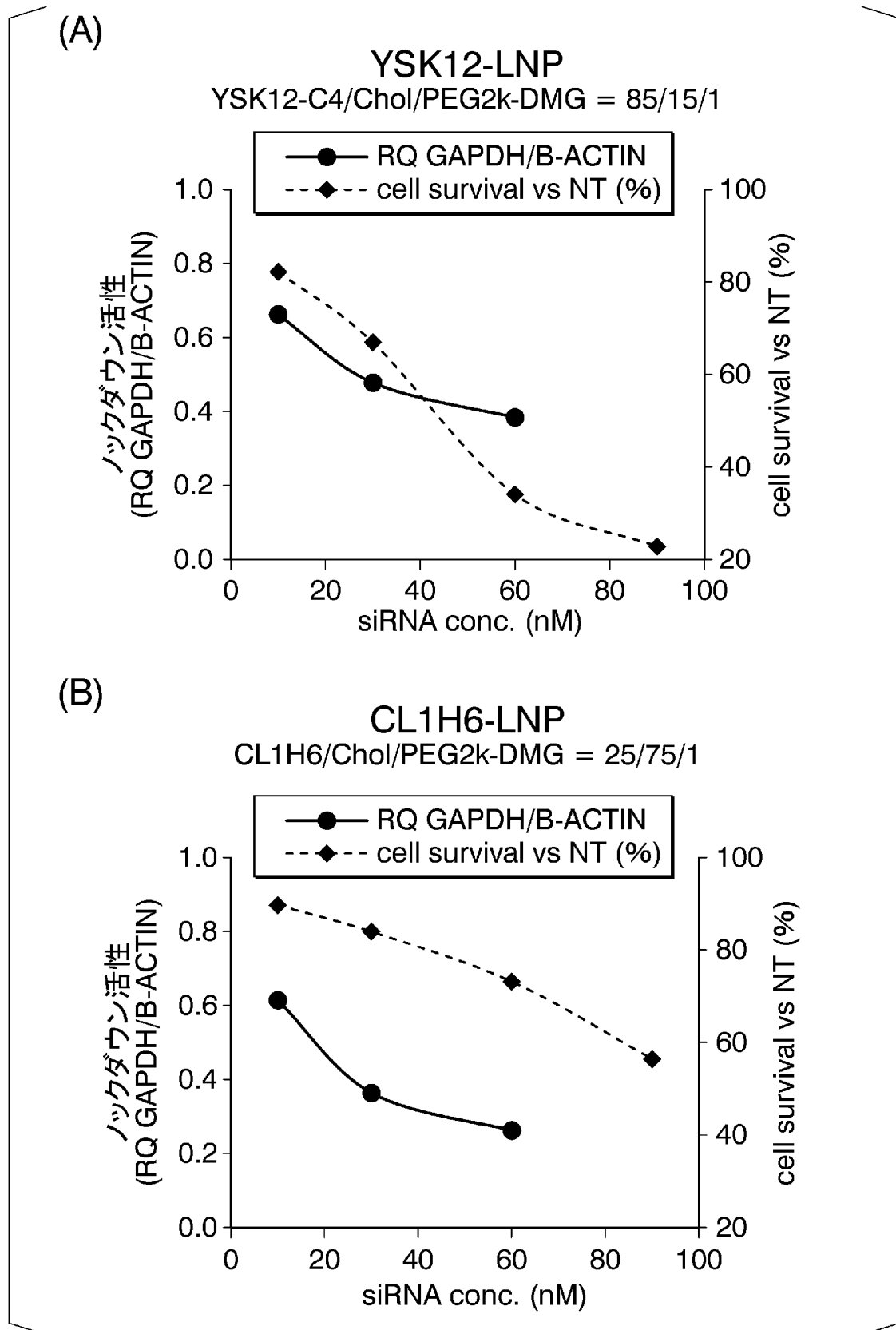
[図5]



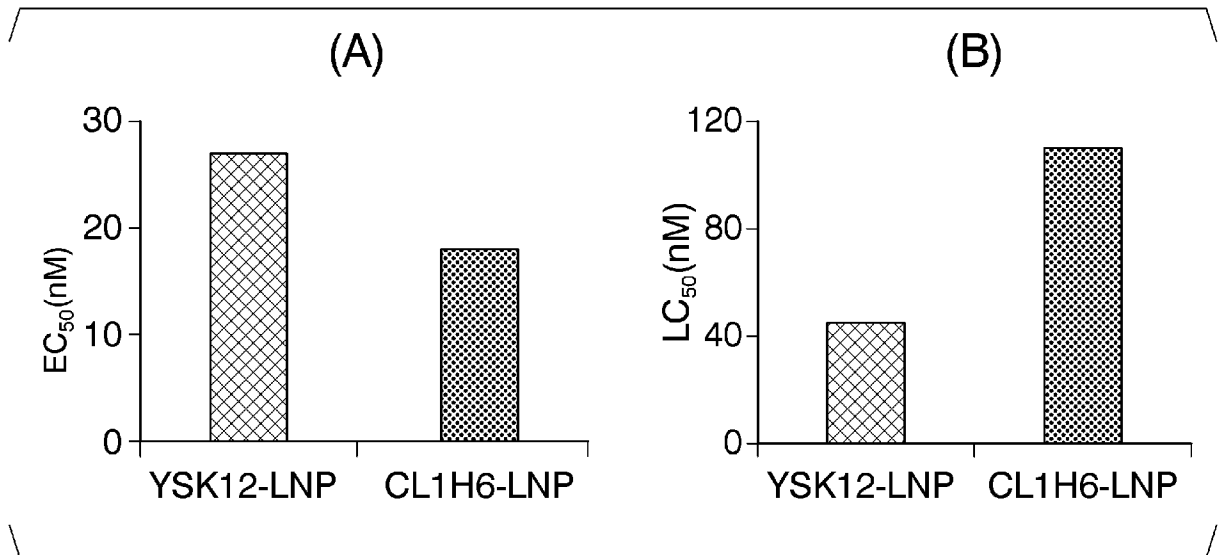
[図6]



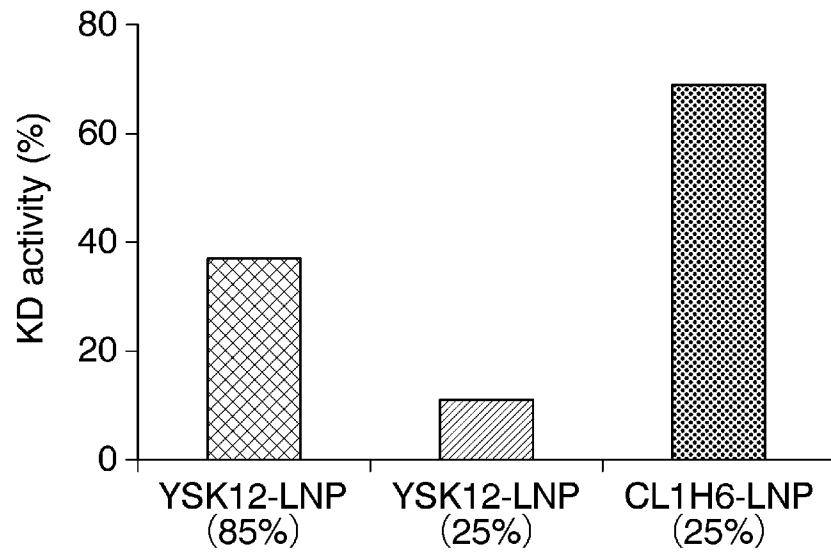
[図7]



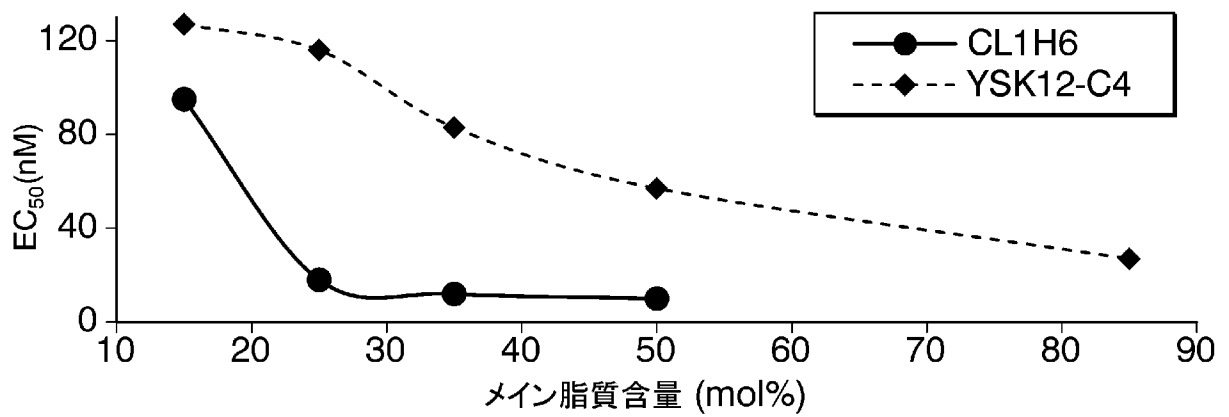
[図8]



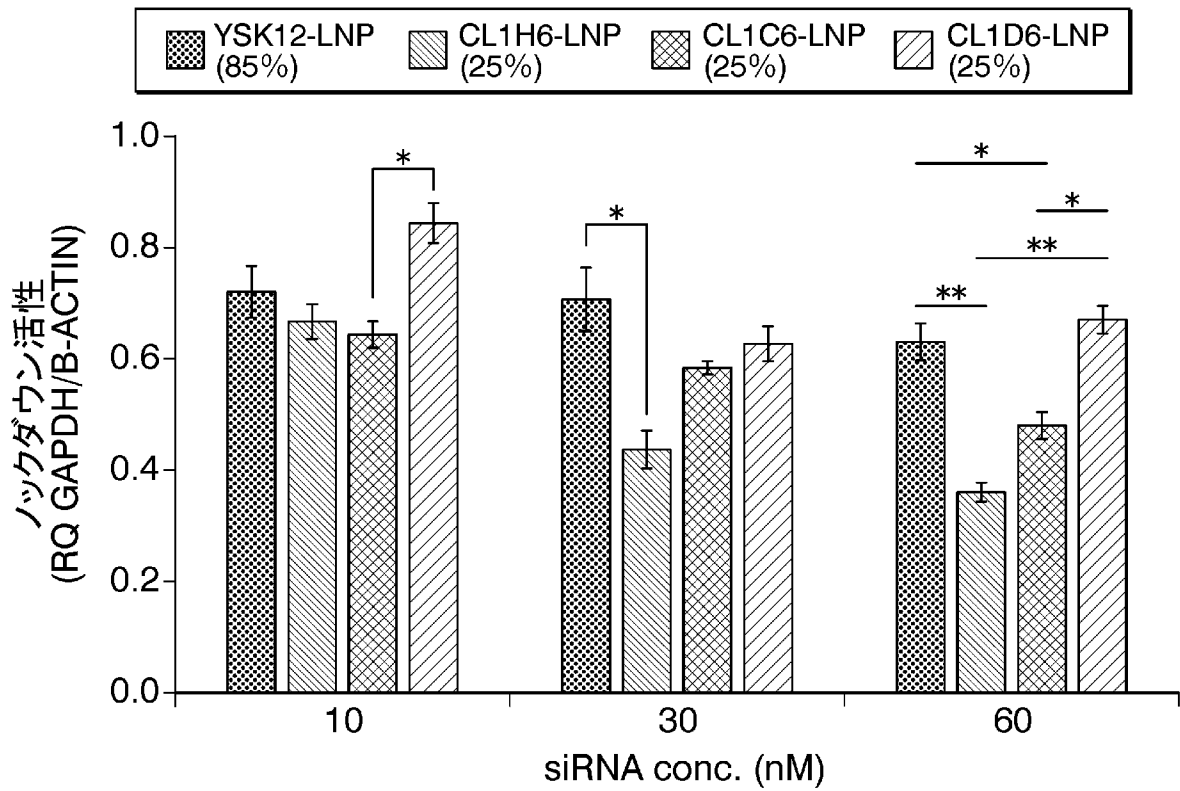
[図9]



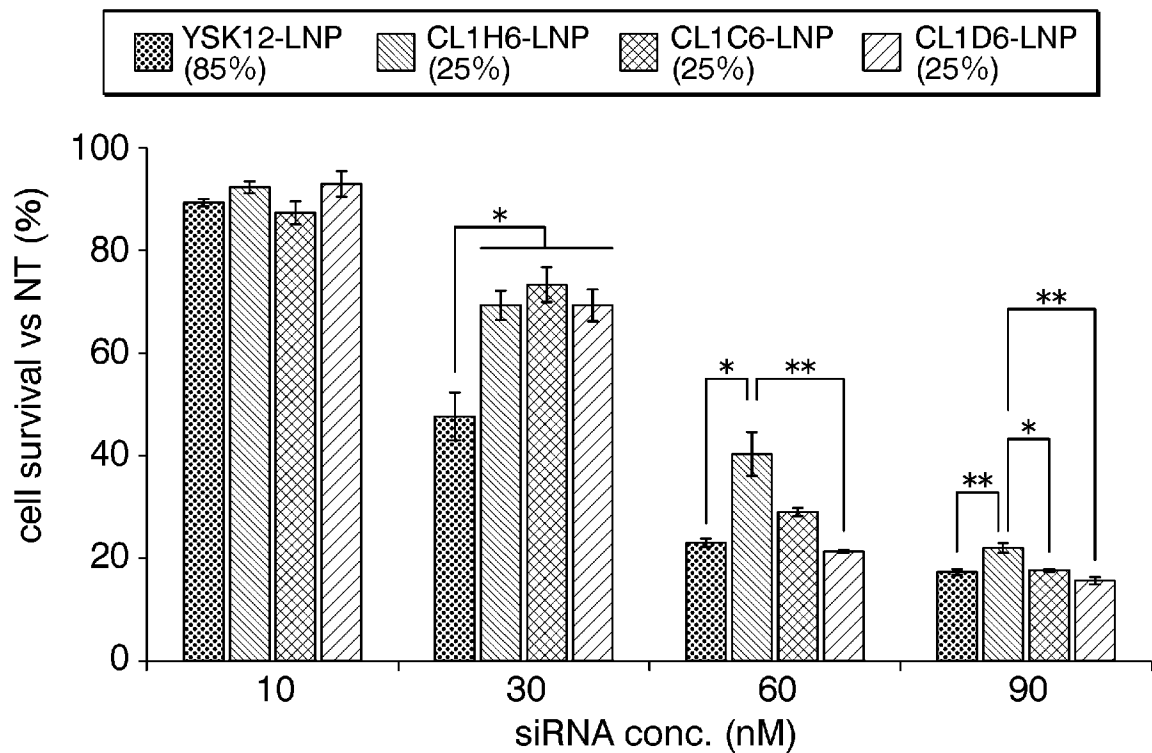
[図10]



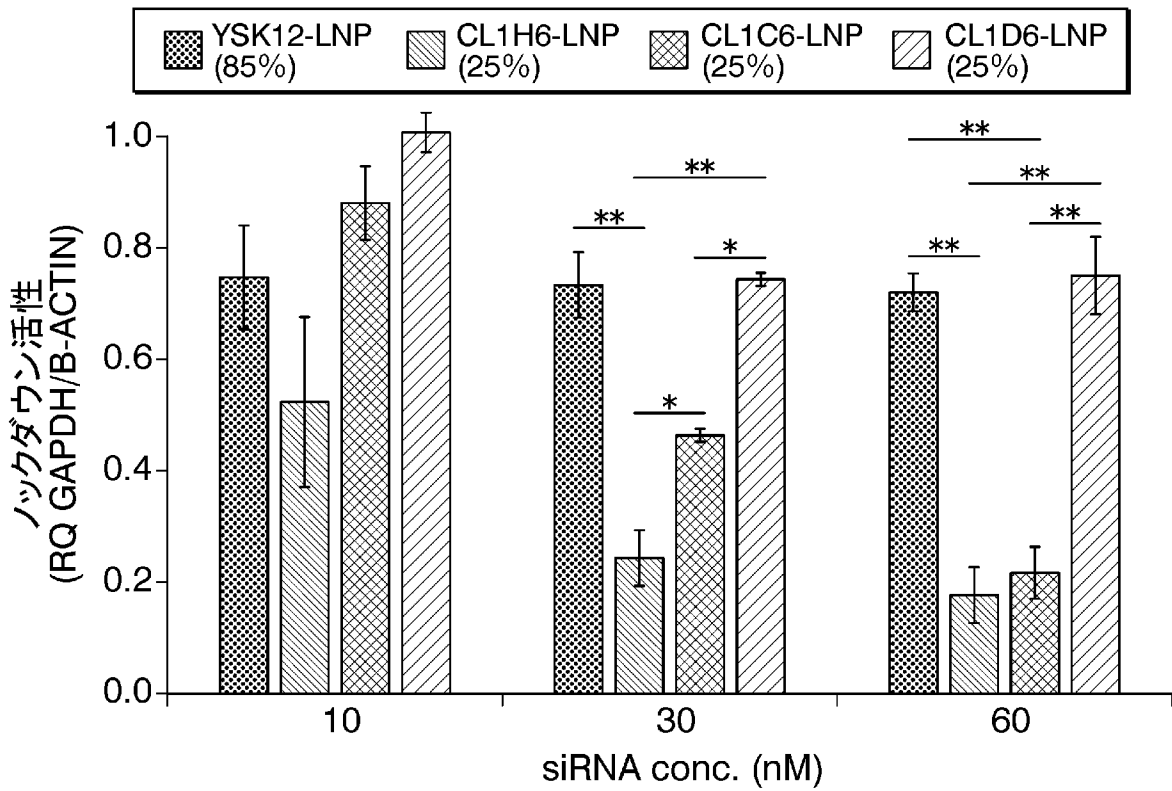
[図11]



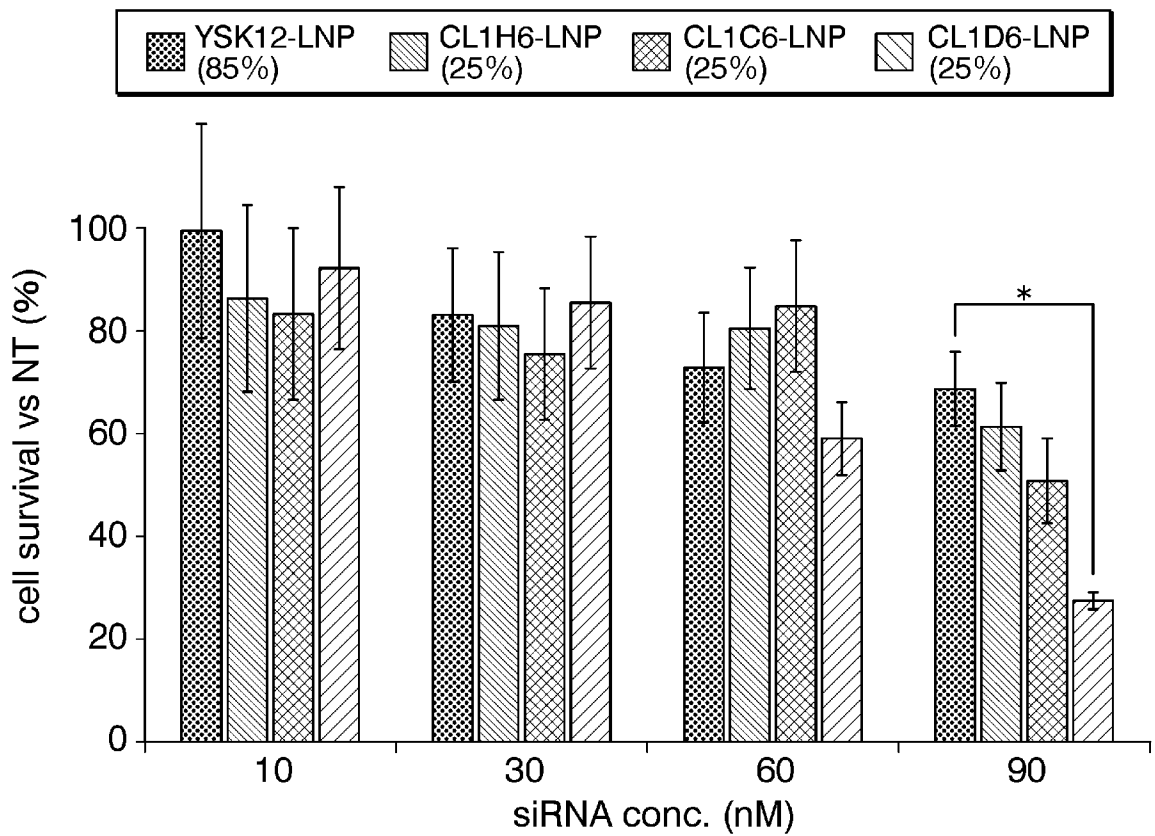
[図12]



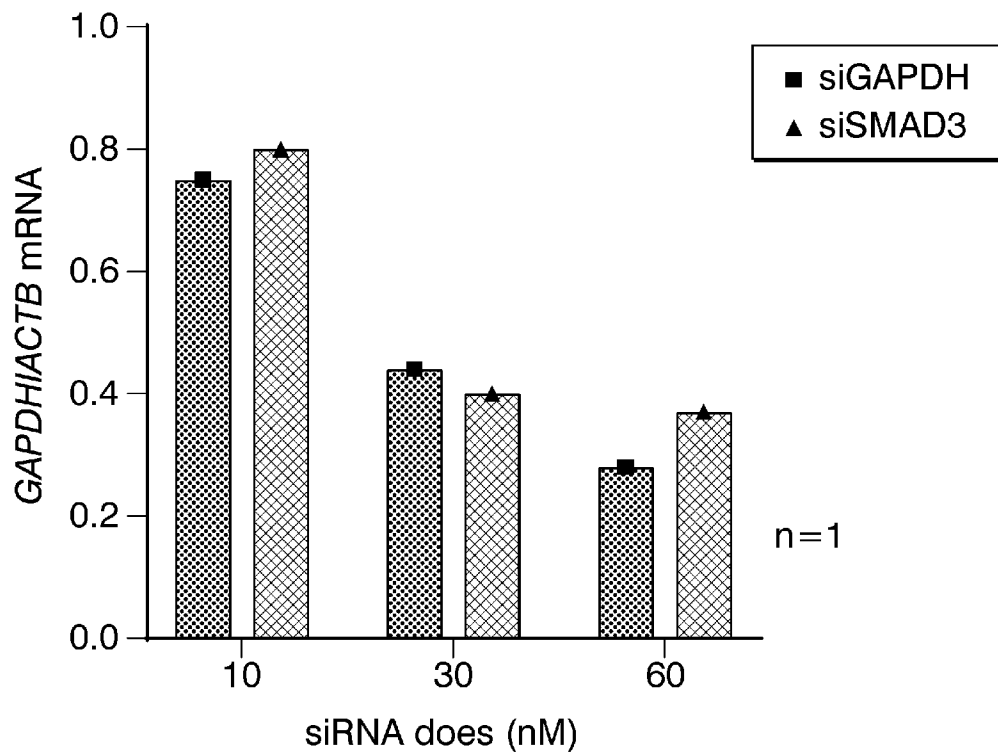
[図13]



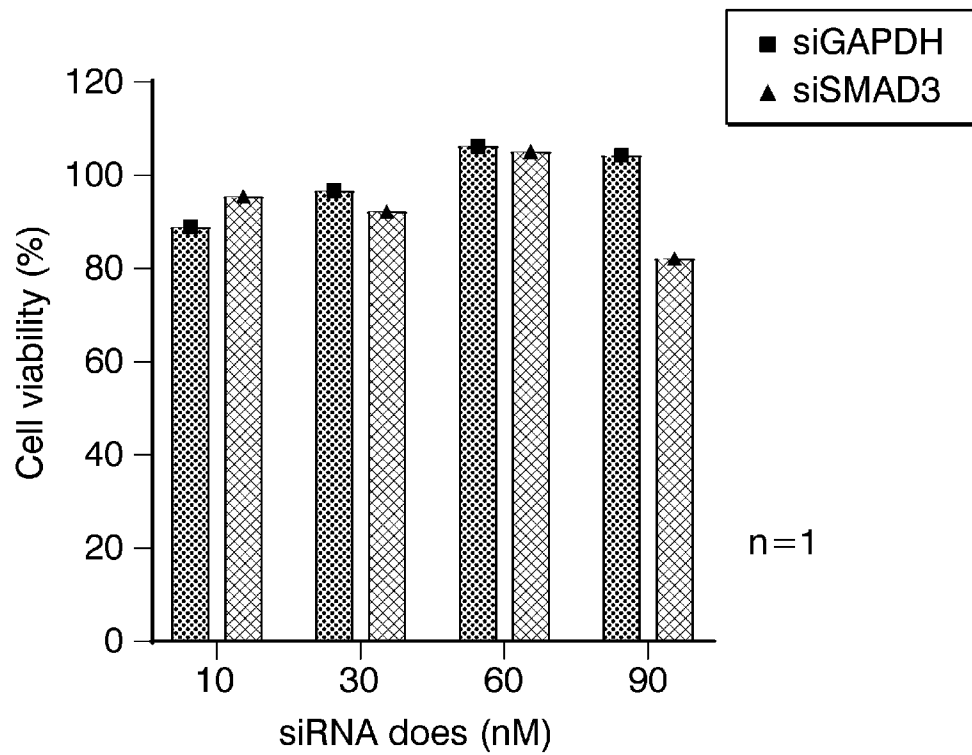
[図14]



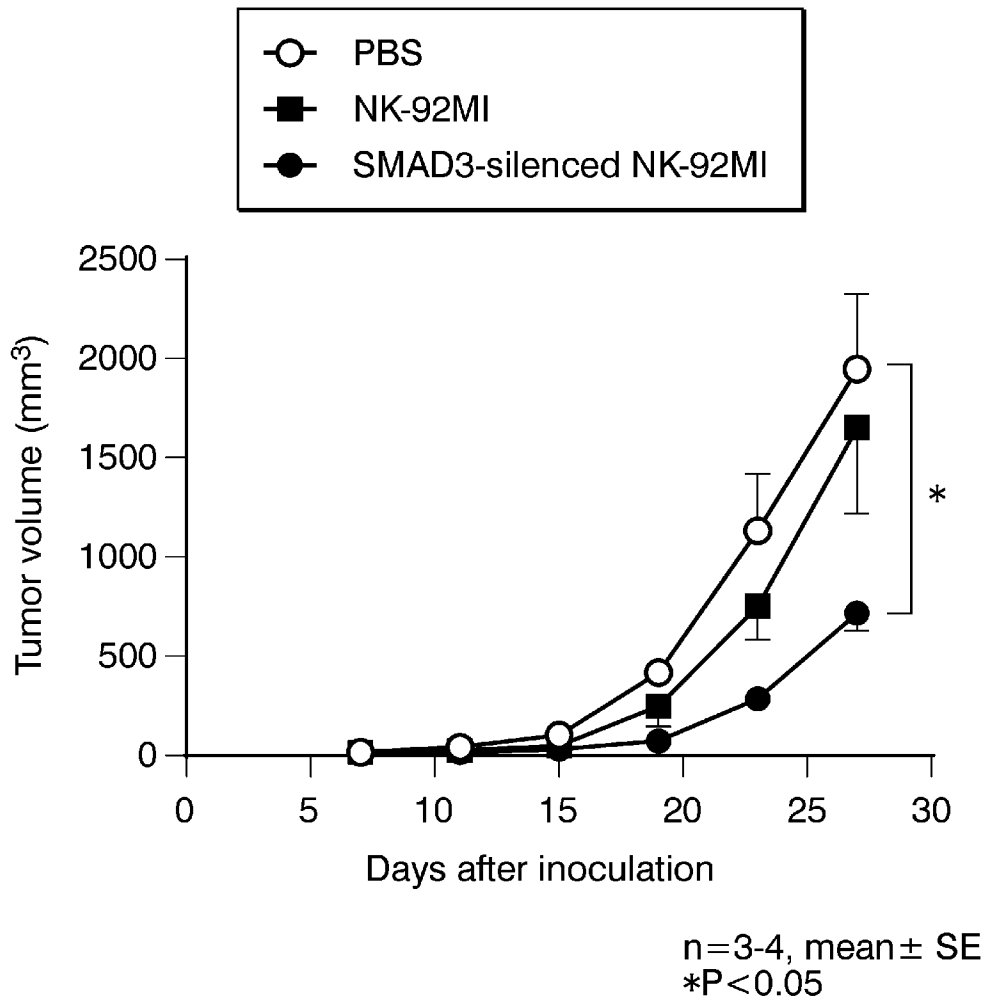
[圖15]



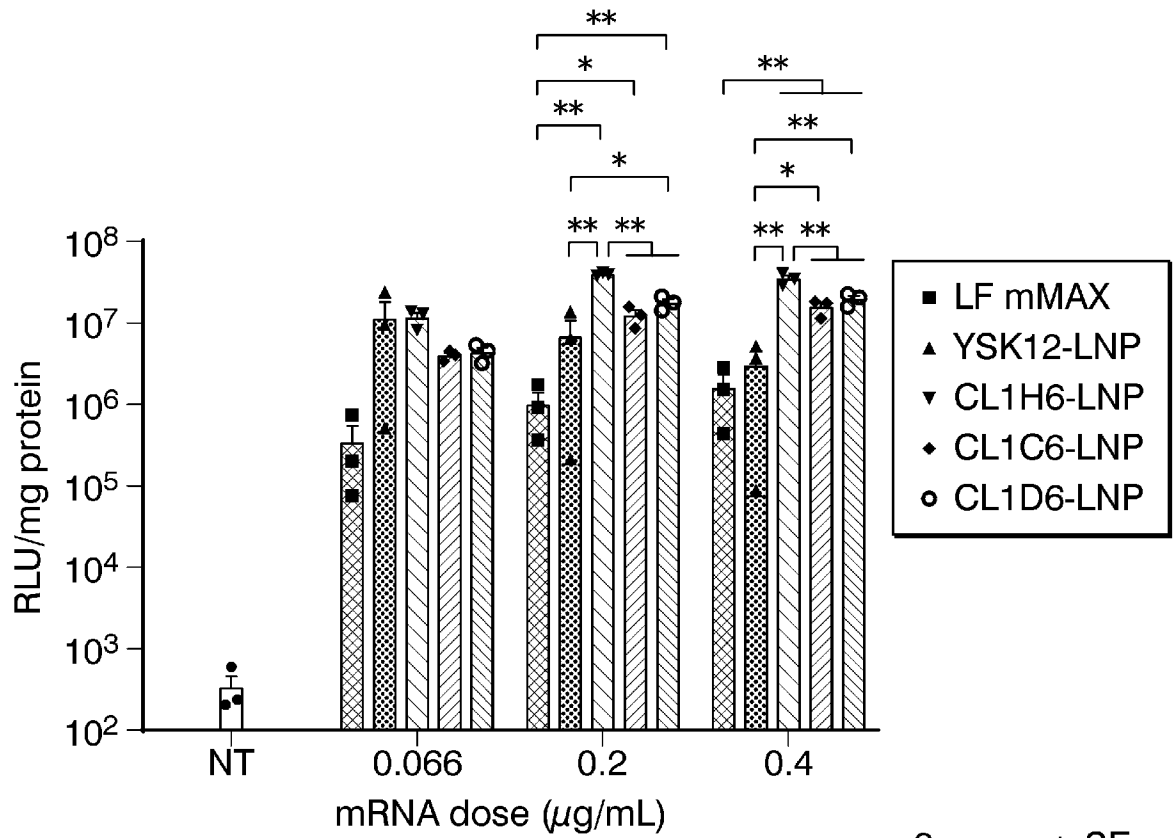
[圖16]



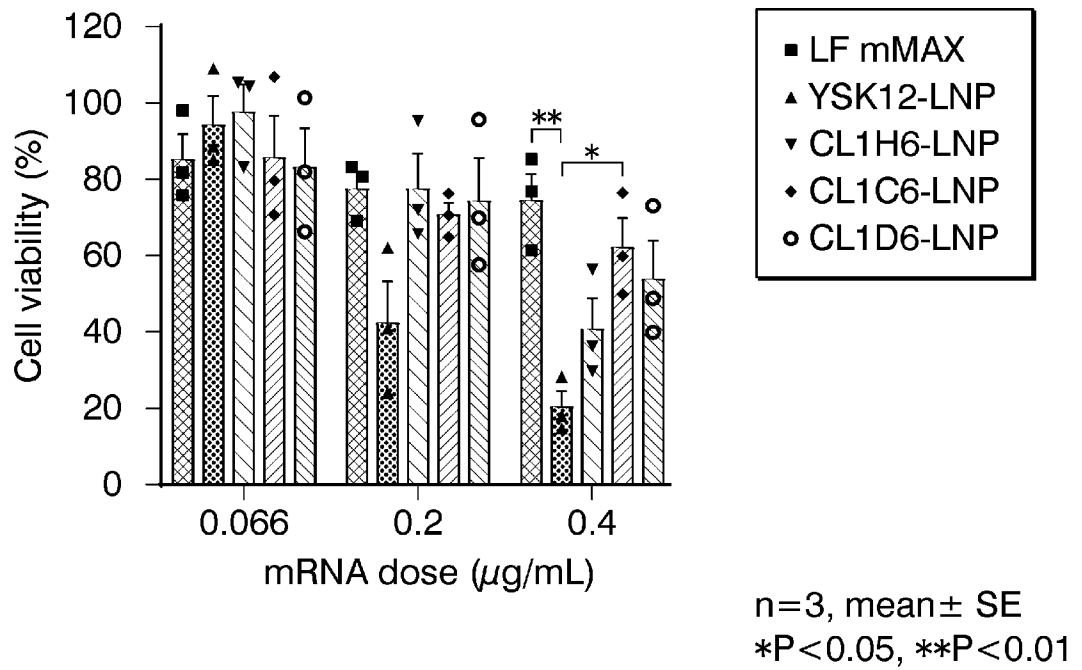
[図17]



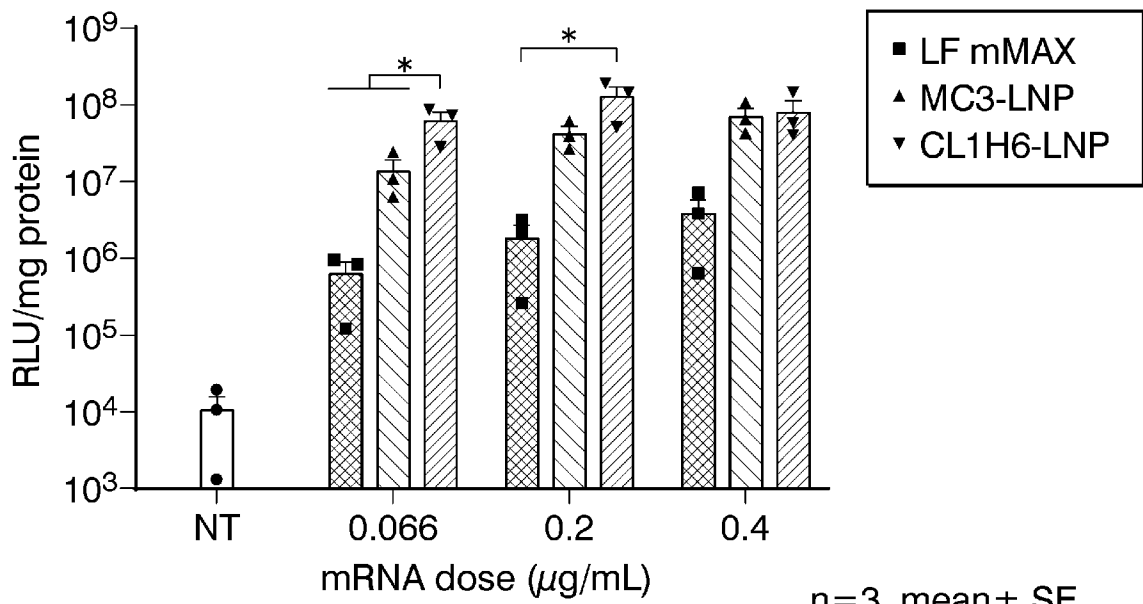
[図18]



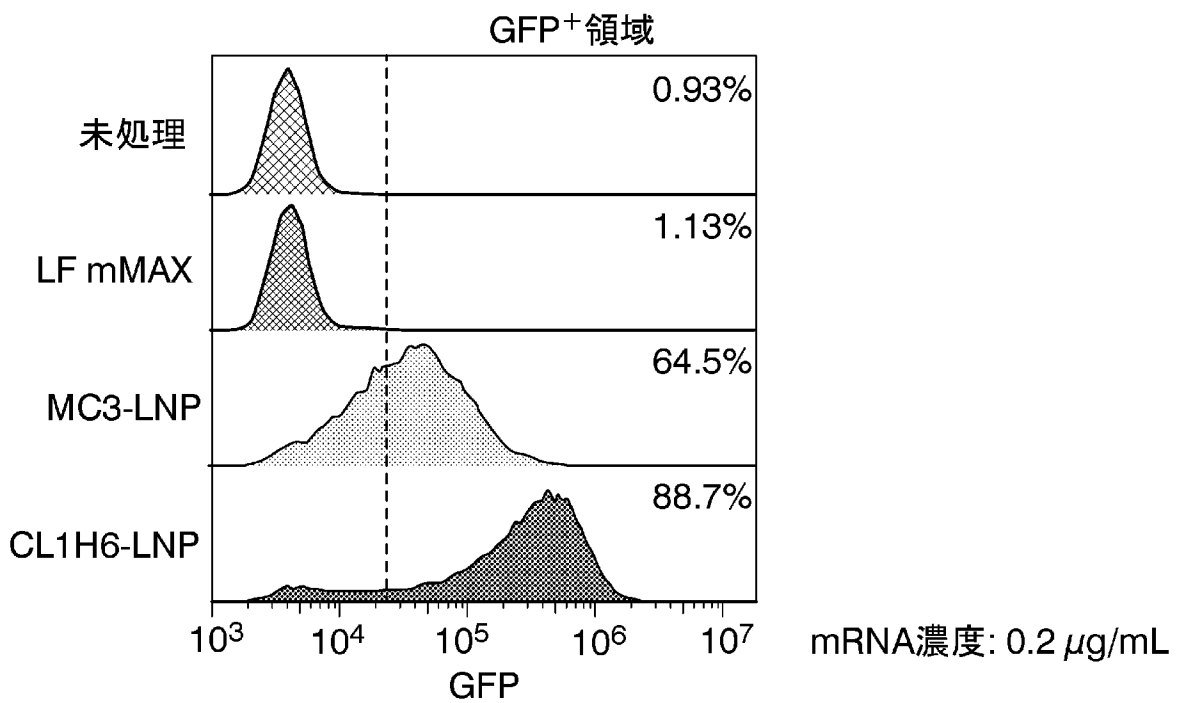
[図19]



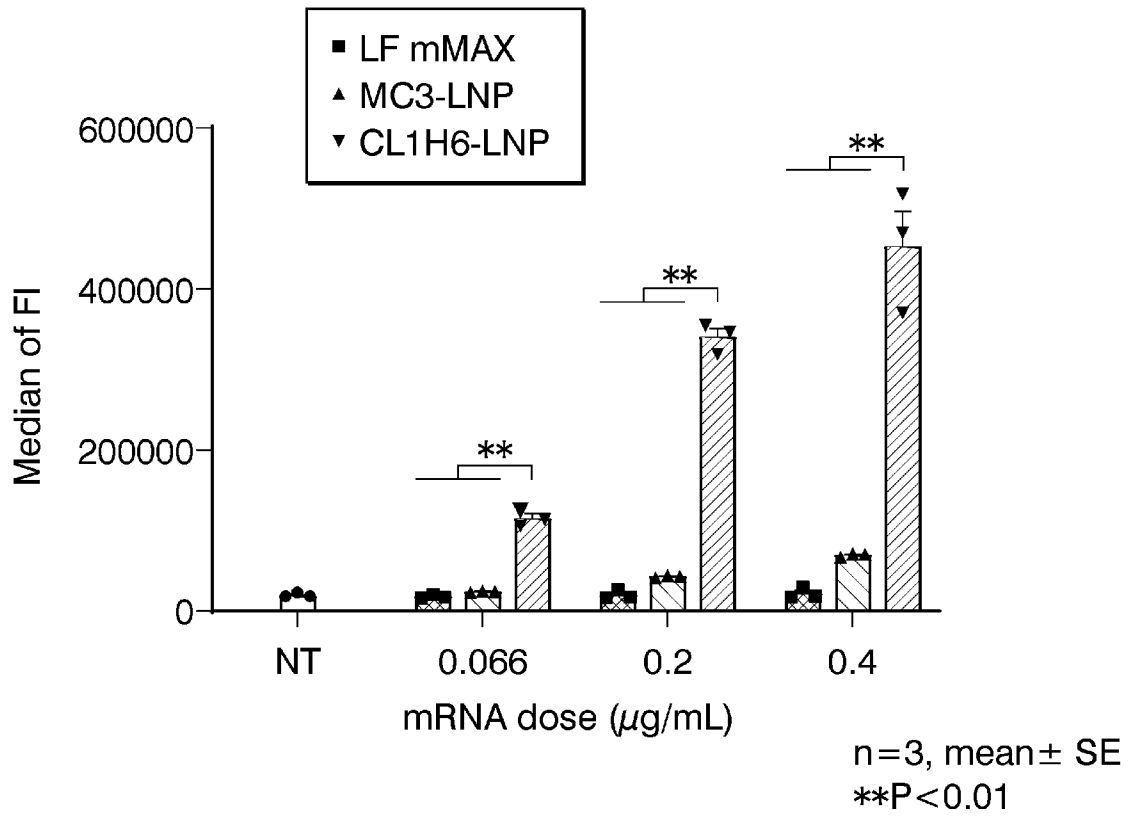
[図20]



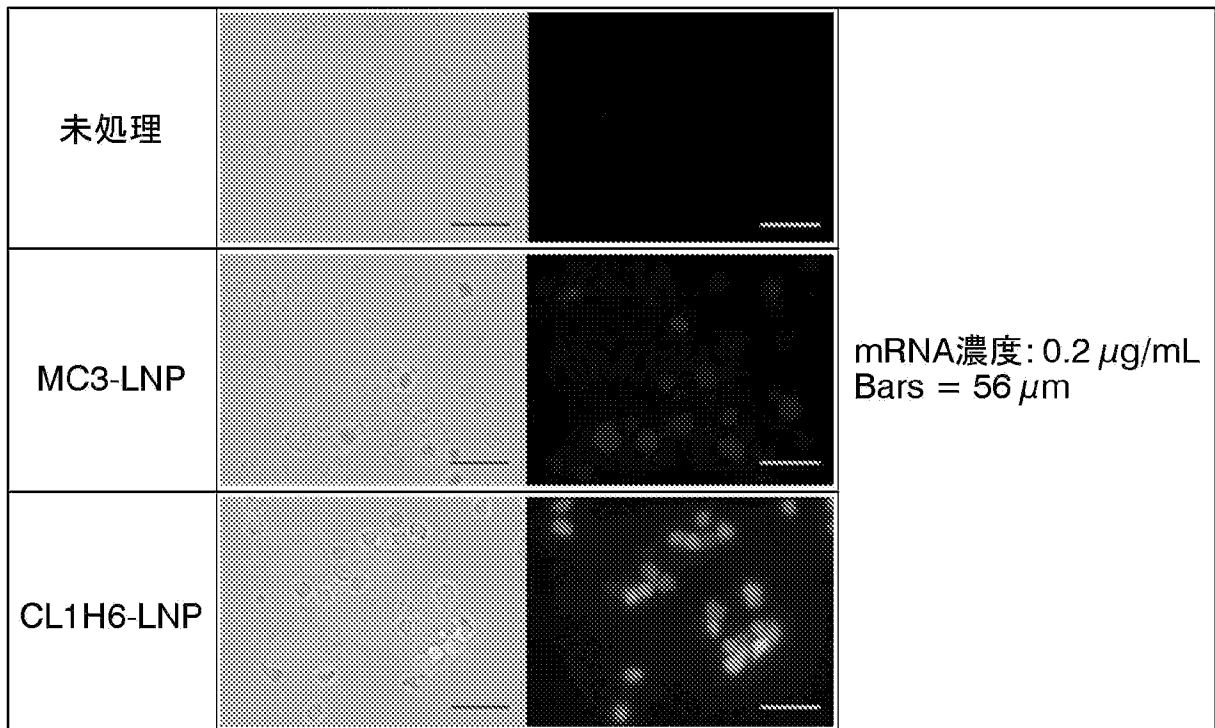
[図21]



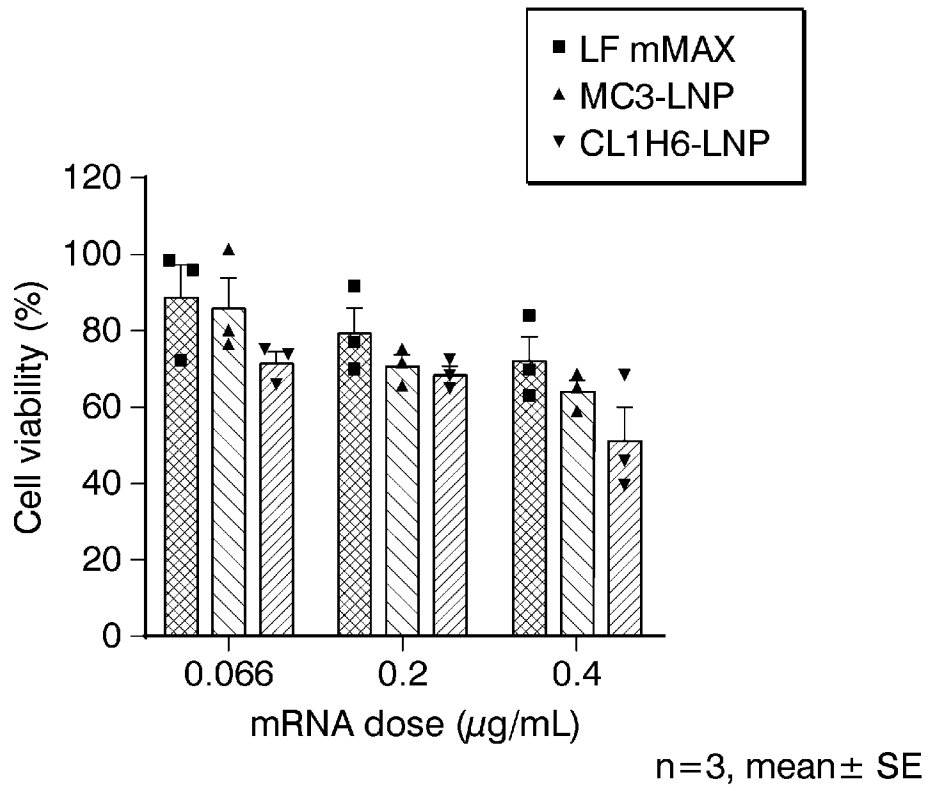
[図22]



[図23]



[図24]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/006427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 47/18(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 47/10(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i FI: A61K47/18; A61K9/14; A61K31/7088; A61K31/713; A61K47/10; A61K47/28; A61K48/00; C12N15/11 Z; C12N15/113 Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K47/18; A61K9/14; A61K31/7088; A61K31/713; A61K47/10; A61K47/28; A61K48/00; C12N15/11; C12N15/113		
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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2020/252375 A1 (DNALITE THERAPEUTICS, INC.) 17 December 2020 (2020-12-17) claim 1, paragraphs [0004], [0012], [0080], [0085], [0133]-[0136], [0171]	1-2, 4-6, 9-11 3, 7-8, 12-16
Y	WO 2019/131770 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICALS CO) 04 July 2019 (2019-07-04) claims 1, 2, paragraphs [0254]-[0261], [0263], [0309]	1-16
Y	WO 2018/230710 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT UNIV CORP) 20 December 2018 (2018-12-20) claim 1, paragraphs [0014]-[0016], [0088]-[0089], [0185], [0187], [0190]	1-16
A	SATO, Y. et al. Understanding structure-activity relationships of pH-sensitive cationic lipids facilitates the rational identification of promising lipid nanoparticles for delivering siRNAs in vivo. Journal of Controlled Release. 2019, 295, 140-152 fig. 8	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 “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 08 March 2022		Date of mailing of the international search report 22 March 2022
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/006427

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	NAKAMURA, T. et al. The hydrophobic tail of a pH-sensitive cationic lipid influences siRNA transfection activity and toxicity in human NK cell lines. International Journal of Pharmaceutics. 27 September 2021, 609, 121140 abstract	1-16
.....		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/006427

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/252375 A1	17 December 2020	(Family: none)	
WO 2019/131770 A1	04 July 2019	US 2021/0052646 A1 claims 1-2, paragraphs [0226]- [0236], [0241], [0293] EP 3733211 A1 CN 111542338 A KR 10-2020-0104360 A	
WO 2018/230710 A1	20 December 2018	US 2020/0129431 A1 claim 1, paragraphs [0046]-[0047], [0147], p. 16, paragraphs [0218], [0220], [0224] EP 3640237 A1 CN 110740985 A KR 10-2020-0018782 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 47/18(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 47/10(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i FI: A61K47/18; A61K9/14; A61K31/7088; A61K31/713; A61K47/10; A61K47/28; A61K48/00; C12N15/11 Z; C12N15/113 Z</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>A61K47/18; A61K9/14; A61K31/7088; A61K31/713; A61K47/10; A61K47/28; A61K48/00; C12N15/11; C12N15/113</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>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022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>CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年							
日本国実用新案公報	1922-1996年																
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																
日本国登録実用新案公報	1994-2022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>X A</td> <td>WO 2020/252375 A1 (DNALITE THERAPEUTICS, INC.) 17.12.2020 (2020-12-17) 請求項1, [0004], [0012], [0080], [0085], [0133]-[0136], [0171]</td> <td>1-2, 4-6, 9-11 3, 7-8, 12-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2019/131770 A1 (武田薬品工業株式会社) 04.07.2019 (2019-07-04) 請求項1, 請求項2, [0254]-[0261], [0263], [0309]</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018-12-20) 請求項1, [0014]-[0016], [0088]-[0089], [0185], [0187], [0190]</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SATO Y. et al., Understanding structure-activity relationships of pH-sensitive cationic lipids facilitates the rational identification of promising lipid nanoparticles for delivering siRNAs in vivo, Journal of Controlled Release, 2019, 295, 140-152 Fig.8</td> <td>1-16</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	X A	WO 2020/252375 A1 (DNALITE THERAPEUTICS, INC.) 17.12.2020 (2020-12-17) 請求項1, [0004], [0012], [0080], [0085], [0133]-[0136], [0171]	1-2, 4-6, 9-11 3, 7-8, 12-16	Y	WO 2019/131770 A1 (武田薬品工業株式会社) 04.07.2019 (2019-07-04) 請求項1, 請求項2, [0254]-[0261], [0263], [0309]	1-16	Y	WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018-12-20) 請求項1, [0014]-[0016], [0088]-[0089], [0185], [0187], [0190]	1-16	A	SATO Y. et al., Understanding structure-activity relationships of pH-sensitive cationic lipids facilitates the rational identification of promising lipid nanoparticles for delivering siRNAs in vivo, Journal of Controlled Release, 2019, 295, 140-152 Fig.8	1-16
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															
X A	WO 2020/252375 A1 (DNALITE THERAPEUTICS, INC.) 17.12.2020 (2020-12-17) 請求項1, [0004], [0012], [0080], [0085], [0133]-[0136], [0171]	1-2, 4-6, 9-11 3, 7-8, 12-16															
Y	WO 2019/131770 A1 (武田薬品工業株式会社) 04.07.2019 (2019-07-04) 請求項1, 請求項2, [0254]-[0261], [0263], [0309]	1-16															
Y	WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018-12-20) 請求項1, [0014]-[0016], [0088]-[0089], [0185], [0187], [0190]	1-16															
A	SATO Y. et al., Understanding structure-activity relationships of pH-sensitive cationic lipids facilitates the rational identification of promising lipid nanoparticles for delivering siRNAs in vivo, Journal of Controlled Release, 2019, 295, 140-152 Fig.8	1-16															
<p><input checked="" 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>“&” 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>08.03.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>22.03.2022</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>山村 祥子 4C 9217</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</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/JP2022/006427

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/252375 A1	17.12.2020	(ファミリーなし)	
WO 2019/131770 A1	04.07.2019	US 2021/0052646 A1 クレーム1-2, [0226]- [0236], [0241], [0293] EP 3733211 A1 CN 111542338 A KR 10-2020-0104360 A	
WO 2018/230710 A1	20.12.2018	US 2020/0129431 A1 請求項1, [0046]- [0047], [0147], p16, [0218], [0220], [0224] EP 3640237 A1 CN 110740985 A KR 10-2020-0018782 A	