

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年2月1日(01.02.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/024156 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/22 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01) A61K 47/28 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) A61P 1/16 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/009082

(22) 国際出願日: 2023年3月9日(09.03.2023)

(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 2022-121626 2022年7月29日(29.07.2022) JP

(71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).

(72) 発明者: 原島 秀吉(HARASHIMA, Hideyoshi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国

立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). マハモド アブバクル アハメド ヨニス(MAHMOUD, Abubakr Ahmed Younis); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 佐藤 悠介(SATO, Yusuke); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人鷲田国際特許事務所(WASHIDA & ASSOCIATES); 〒1600023 東京都新宿区西新宿1-23-7 新宿ファーストウエスト8階 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, 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, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) Title: LIPID NANOPARTICLE AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) 発明の名称: 脂質ナノ粒子および医薬組成物

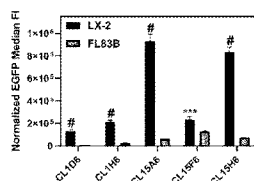


図3A

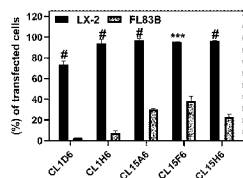


図3B

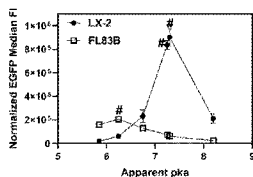


図3C

(57) Abstract: The present invention relates to lipid nanoparticles capable of delivering a target substance to hepatic stellate cells. The lipid nanoparticles are for delivering a target substance to hepatic stellate cells and comprise a pH-sensitive cationic lipid including a hydrophilic portion and two hydrophobic portions, wherein an acid dissociation constant pKa of a lipid membrane constituting the lipid nanoparticles is greater than or equal to 6.7 and less than 8.2.

(57) 要約: 本発明は、肝星細胞に目的物質を送達することができる脂質ナノ粒子に関する。脂質ナノ粒子は、肝星細胞に目的物質を送達するための脂質ナノ粒子であって、親水性部および2つの疎水性部を有するpH感受性カチオン性脂質を含み、前記脂質ナノ粒子を構成する脂質膜の酸解離定数pKaは、6.7以上8.2未満である。

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:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：脂質ナノ粒子および医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、肝星細胞に目的物質を送達するための脂質ナノ粒子、および肝線維化を予防または治療するための医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 肝線維症は、厚い細胞外マトリックスの過剰な沈着によって示される慢性進行性疾患である（非特許文献1）。活性化した肝星細胞（Hepatic Stellate cell: HSC）は、肝線維形成において極めて重要な役割を担っている（非特許文献2）。現在の肝線維症の治療は、選択性に乏しく毒性を有するビスモデギブや三酸化二ヒ素などの低分子阻害剤や、多くの患者にとって経済的でない肝移植に依存している（非特許文献3）。

[0003] 肝星細胞を標的とする遺伝子治療は、肝線維症の治療にとって有望な革新的戦略であると考えられる。しかしながら、肝星細胞を標的とする遺伝子治療は、細い肝類洞にナノ医薬品を導入しにくいことや、肝類洞に導入されたナノ医薬品が類洞外に拡散しにくいこと、肝クッパー細胞の過活性化、肝星細胞へのナノ医薬品の到達を妨げる厚い間質による物理的障壁、肝臓において肝星細胞が少ないこと、肝星細胞はトランスフェクションしにくい性質を有することなどの、多数の課題によって制限されている（非特許文献4および5）。肝星細胞を標的とする従来の送達システムは、ビタミンAやpPBペプチド、D-FNBペプチドなどの肝星細胞に親和性を有するリガンドを利用している（非特許文献6～8）。

[0004] 一方、近年、免疫細胞やがん細胞などにsiRNAを効率的に送達することができる、pH感受性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子が提案されている（特許文献1および2）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2018/230710号

特許文献2：特開2019-151589号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ramon Bataller and David A. Brenner, "Liver fibrosis", The Journal of Clinical Investigation, Vol. 115, pp. 209-218.

非特許文献2：Dakota R. Kamm and Kyle S. McCommis, "Hepatic stellate cells in physiology and pathology", The Journal of Physiology, Vol. 600, pp. 1825-1837.

非特許文献3：Zui Tan, et al., "Liver Fibrosis: Therapeutic Targets and Advances in Drug Therapy", Frontiers in Cell and Developmental Biology, Vol. 9, p. 730176.

非特許文献4：Mahmoud A. Younis, Ikramy A. Khalil and Hideyoshi Harashima, "Gene Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Highlighting the Journey from Theory to Clinical Applications", Vol. 3, p. 2000087.

非特許文献5：Claus Kordes, et al., "Hepatic stellate cells: current state and open questions", Biological Chemistry, Vol. 402, p. 1021-1032.

非特許文献6：Hirotaka Furuhashi, et al., "Vitamin A-coupled liposome system targeting free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells offers a beneficial therapeutic strategy for liver fibrosis", Hepatology Research, Vol. 48, pp. 397-407.

非特許文献7：Luying Huang, et al., "Highly Selective Targeting of Hepatic Stellate Cells for Liver Fibrosis Treatment Using a d-Enantiomeric Peptide Ligand of Fn14 Identified by Mirror-Image mRNA Display", Molecular Pharmaceutics, Vol. 14, pp. 1742-1753.

非特許文献8：Jinfang Zhang, et al., "Liver-Targeted siRNA Lipid Nanoparticles Treat Hepatic Cirrhosis by Dual Antifibrotic and Anti-inflammatory Activities", ACS Nano, Vol. 14, pp. 6305-6322.

非特許文献9: Mahmoud A. Younis, et al., "Clinical translation of nano medicines: Challenges, opportunities, and keys", Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 181, p. 114083.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、上記のリガンドを利用した送達システムは、安定性と臨床応用性に欠ける（非特許文献9）。このため、肝星細胞を標的とする新しい送達システムを開発することが期待されている。

[0008] 本発明の目的は、肝星細胞に目的物質を送達することができる脂質ナノ粒子を提供することである。また、本発明の別の目的は、肝線維化を予防または治療するための医薬組成物および方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の脂質ナノ粒子、医薬組成物、および予防または治療方法に関する。

[1] 肝星細胞に目的物質を送達するための脂質ナノ粒子であって、親水性部および2つの疎水性部を有するpH感受性カチオン性脂質を含み、前記脂質ナノ粒子を構成する脂質膜の酸解離定数 pK_a は、6.7以上8.2未満である、脂質ナノ粒子。

[2] 前記親水性部は、カルボニル基に結合している5～7員非芳香族ヘテロ環基を含む、[1]に記載の脂質ナノ粒子。

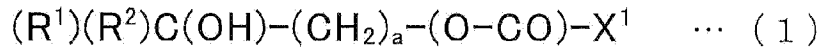
[3] 前記2つの疎水性部は、それぞれ独立に、炭素数が4～12のアルキレン基と、前記アルキレン基に結合した、0～2個の不飽和結合を有する炭素数が8～18の飽和または不飽和の脂肪族基、または0～2個の不飽和結合を有する炭素数が10～24の直鎖状または分岐鎖状の飽和または不飽和の脂肪酸エステル基と、を含む、[2]に記載の脂質ナノ粒子。

[4] 前記親水性部は、イオン化可能な第3級アミノ基を末端に含み、前記2つの疎水性部は、それぞれ独立に、炭素数が4～12のアルキレン基と、前記アルキレン基に結合した、炭素数が15以上の脂肪酸エステル基と、

を含む、[1]に記載の脂質ナノ粒子。

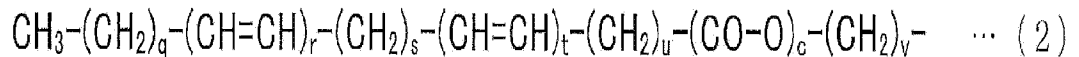
[5] 前記 pH 感受性カチオン性脂質は、下記一般式 (1) :

[化1]



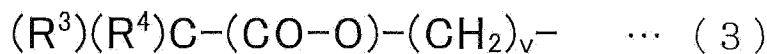
(式 (1) 中、a は 3 ~ 5 の整数を示し ; R¹ および R² はそれぞれ独立に下記一般式 (2) :

[化2]



(式 (2) 中、q は 1 ~ 9 の整数を示し ; r は 0 または 1 を示し ; s は 1 ~ 3 の整数を示し ; t は 0 または 1 を示し ; u は 1 ~ 8 の整数を示し ; c は 0 または 1 を示し ; v は 4 ~ 12 の整数を示す) で表される基、または下記一般式 (3) :

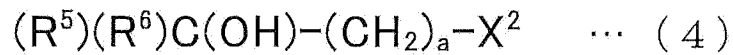
[化3]



(式 (3) 中、R³ および R⁴ はそれぞれ独立に C₃₋₁₁ アルキル基であり、v は 4 ~ 12 の整数を示す) で表される基を示し ; X¹ は 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環基 (ただし、当該基は炭素原子により (O-CO)- に結合し、当該環上には 1 または 2 個の C₁₋₄ アルキル基または C₂₋₄ アルケニル基が置換していてもよい) を示す) で表される、[3] に記載の脂質ナノ粒子。

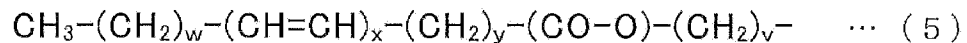
[6] 前記 pH 感受性カチオン性脂質は、下記一般式 (4) :

[化4]



(式(4)中、 a は3～5の整数を示し； R^5 および R^6 はそれぞれ独立に下記一般式(5)：

[化5]



(式(5)中、 w は1～15の整数を示し； x は0または1を示し； y は1～15の整数を示し； v は4～12の整数を示す)で表される基を示し； X^2 はイオン化可能な第3級アミノ基を示す)で表される、[4]に記載の脂質ナノ粒子。

[7] 前記 X^1 は、1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、または1-ピペラジニル基(ただし、当該1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、または1-ピペラジニル基は、1個の C_{1-4} アルキル基で置換されていてもよい)である、[5]に記載の脂質ナノ粒子。

[8] 前記脂質ナノ粒子を構成する脂質膜の酸解離定数 pK_a は、6.7～7.4の範囲内である、[1]～[7]のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[9] 動的光散乱法により測定された個数平均粒子径が100nm以下である、[1]～[8]のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[10] 前記脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対する前記pH感受性カチオン性脂質の割合が、20モル%以上である、[1]～[9]のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

〔１１〕前記脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対して２０～３０モル％のホスホエタノールアミン基を含むリン脂質と、前記脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対して２０～３０モル％のコレステロールと、前記脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対して３～５モル％のポリアルキレングリコール修飾脂質と、をさらに含む、〔１０〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔１２〕前記目的物質は、RNAである、〔１〕～〔１１〕のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

〔１３〕前記目的物質は、mRNAであり、前記脂質ナノ粒子の窒素／リン酸比は、６～１４の範囲内である、〔１２〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔１４〕前記目的物質は、siRNAであり、前記脂質ナノ粒子の窒素／リン酸比は、４～８の範囲内である、〔１２〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔１５〕肝星細胞に結合するためのリガンドを含まない、〔１〕～〔１４〕のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

〔１６〕肝星細胞への送達選択性を有する脂質ナノ粒子と、前記脂質ナノ粒子に包含された、SMO遺伝子またはSMOタンパク質の発現を抑制するか、またはSMOタンパク質を阻害する第１物質と、前記脂質ナノ粒子に包含された、TGF β １遺伝子またはTGF β １タンパク質の発現を抑制するか、またはTGF β １タンパク質を阻害する第２物質と、を含む、肝線維化を予防または治療するための医薬組成物。

〔１７〕前記脂質ナノ粒子は、〔１〕～〔１５〕のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子である、〔１６〕に記載の医薬組成物。

〔１８〕前記第１物質は、SMO遺伝子の発現を抑制することができる、siRNA、miRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはCRISPR-Casのコンポーネントであり、前記第２物質は、TGF β １遺伝子の発現を抑制することができる、siRNA、miRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはCRISPR-Casのコンポーネントである、〔１６〕または〔１７〕に記載の医薬組成物。

〔１９〕〔１６〕～〔１８〕のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与す

る工程を含む、肝線維化を予防または治療するための方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、肝星細胞に目的物質を送達することができる脂質ナノ粒子を提供することができる。また、本発明によれば、肝線維化を予防または治療するための医薬組成物および方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、pH感受性カチオン性脂質の構造を示す図である。

[図2]図2Aは、pH感受性カチオン性脂質の種類とmRNA送達効率との関係を示すグラフであり、図2Bは、pH感受性カチオン性脂質の種類とトランスフェクション効率との関係を示すグラフであり、図2Cは、pH感受性カチオン性脂質の種類と細胞生存率との関係を示すグラフである。

[図3]図3Aは、pH感受性カチオン性脂質の種類とmRNA送達効率との関係を示すグラフであり、図3Bは、pH感受性カチオン性脂質の種類とトランスフェクション効率との関係を示すグラフであり、図3Cは、pH感受性カチオン性脂質のpKaとmRNA送達効率との関係を示すグラフである。

[図4]図4Aは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子の粒子径とmRNAの送達効率との関係を示すグラフであり、図4Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子の粒子径とトランスフェクション効率との関係を示すグラフである。

[図5]図5Aは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のN/P比とmRNAの送達効率との関係を示すグラフであり、図5Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のN/P比とトランスフェクション効率との関係を示すグラフである。

[図6]図6Aは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のヘルパーリン脂質の種類とmRNAの送達効率との関係を示すグラフであり、図6Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のヘルパーリン脂質の種類とトランスフェクション効率との関係を示すグラフである。

[図7]図7Aは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のDOPEの割合とmR

NAの送達効率との関係を示すグラフであり、図7Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のDOPEの割合とトランスフェクション効率との関係を示すグラフである。

[図8]図8Aは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のDMG-PEG2Kの割合とmRNAの送達効率との関係を示すグラフであり、図8Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のDMG-PEG2Kの割合とトランスフェクション効率との関係を示すグラフである。

[図9]図9Aは、この脂質ナノ粒子の構成を示す模式図であり、図9Bは、この脂質ナノ粒子の透過電子顕微鏡であり、図9Cは、この脂質ナノ粒子の粒度分布を示すグラフである。

[図10]図10Aは、FLuc mRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与した後の肝臓のHSCsおよび肝細胞のルシフェラーゼ活性を示すグラフであり、図10Bは、mCherry mRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与した後の肝臓の組織切片の蛍光観察像である。

[図11]図11Aは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子を投与した後のマウスの主要臓器の組織像を示す写真であり、図11Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子を投与した後のマウスの血清中の肝臓または腎臓の毒性マーカーの測定値を示すグラフである。

[図12]図12は、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子を投与した場合のSMO mRNAの量の割合、CL15H6を用いた脂質ナノ粒子を投与した場合のSMO mRNAの量の割合、脂質ナノ粒子を投与しなかった場合のSMO mRNAの量の割合（コントロール）を示すグラフである。

[図13]図13は、CL15H6を用いた脂質ナノ粒子のN/P比とSMO mRNAの量の割合との関係を示すグラフである。

[図14]図14は、CL15H6を用いた脂質ナノ粒子の用量反応曲線を示すグラフである。

[図15]図15は、CL15H6を用いた脂質ナノ粒子を投与した場合の標的遺伝子のmRNAの量の割合、脂質ナノ粒子を投与しなかった場合の標的遺

伝子の mRNA の量の割合（コントロール）を示すグラフである。

[図16]図16は、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓の写真である。

[図17]図17Aは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓の切片の抗 α -SMA抗体の染色像であり、図17Bは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓におけるaHSCの割合を示すグラフである。

[図18]図18Aは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓の切片のマッソントリクローム染色像であり、図18Bは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓について視野内におけるコラーゲンの面積の割合を示すグラフである。

[図19]図19Aは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの血清中のIL-6の濃度を示すグラフであり、図19Bは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの血清中のTNF- α の濃度を示すグラフである。

[図20]図20Aは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの血清中のASTの濃度を示すグラフであり、図20Bは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの血清中のALTの濃度を示すグラフである。

[図21]図21Aは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの血清中のALPの濃度を示すグラフであり、図21Bは、siRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与したマウスの血清中のT-BILの濃度を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施の形態について具体的に説明する。

[0013] 本明細書において、「～」を用いて表される数値範囲は、「～」の前後に記載される数値を下限値および上限値として含む範囲を意味する。本明細書に段階的に記載されている数値範囲において、ある数値範囲で記載された上

限值または下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値または下限値に置き換えてもよい。

[0014] 1. 脂質ナノ粒子

本発明に係る脂質ナノ粒子は、肝星細胞に目的物質を送達するための脂質ナノ粒子であって、親水性部および2つの疎水性部を有する所定のpH感受性カチオン性脂質を含む。ここで、脂質ナノ粒子を構成する脂質膜の酸解離定数 pK_a は、6.7以上8.2未満である。

[0015] 本発明の一実施の形態に係る脂質ナノ粒子は、親水性部が、カルボニル基に結合している5～7員非芳香族ヘテロ環基を含むpH感受性カチオン性脂質を含む。このpH感受性カチオン性脂質では、2つの疎水性部が、それぞれ独立に、炭素数が4～12のアルキレン基と；前記アルキレン基に結合した、0～2個の不飽和結合を有する炭素数が8～18の飽和または不飽和の脂肪族基、または0～2個の不飽和結合を有する炭素数が10～24の直鎖状または分岐鎖状の飽和または不飽和の脂肪酸エステル基と、を含むことが好ましい。

[0016] ここで、上記脂肪族基の炭素数は、8～18の範囲内であれば特に限定されないが、10～16の範囲内が好ましく、10～14の範囲内がさらに好ましく、12が特に好ましい。また、上記脂肪族基は、不飽和の脂肪族基であることが好ましく、2個の不飽和結合を有する脂肪族基であることが特に好ましい。さらに、上記脂肪族基は、直鎖状の脂肪族基であることが好ましい。

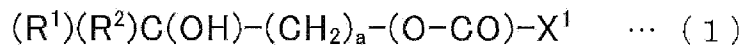
[0017] 上記脂肪酸エステル基の炭素数は、10～24の範囲内であれば特に限定されないが、12～22の範囲内が好ましく、14～20の範囲内がさらに好ましく、16～18が特に好ましい。また、上記脂肪酸エステル基は、直鎖状および分岐鎖状のいずれであってもよく、飽和および不飽和のいずれであってもよい。上記脂肪酸エステル基が分岐鎖状の脂肪酸エステル基である場合は、飽和の脂肪酸エステル基であることが好ましい。一方、上記脂肪酸エステル基が直鎖状の脂肪酸エステル基である場合は、不飽和の脂肪酸エス

テル基であることが好ましく、1個の不飽和結合を有する脂肪酸エステル基であることが特に好ましい。

[0018] また、上記2つの疎水性部は、上記脂肪族基を含む1つの疎水性部と、上記脂肪酸エステル基を含む1つの疎水性部との組み合わせであってもよいが、いずれも上記脂肪族基を含む2つの疎水性部の組み合わせ、またはいずれも上記脂肪酸エステル基を含む2つの疎水性部の組み合わせであることが好ましい。上記2つの疎水性部は、同一であってもよいし、互いに異なってもよいが、同一であることが好ましい。

[0019] たとえば、本発明の一実施の形態に係る脂質ナノ粒子は、上記pH感受性カチオン性脂質として、下記の一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質を含む。

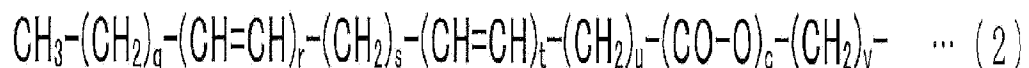
[化6]



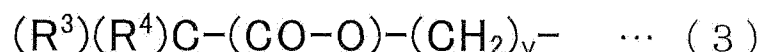
[0020] 上記式(1)において、aは3～5の整数を示し、好ましくは4である。

[0021] また、上記式(1)において、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に下記の一般式(2)または一般式(3)で表される基である。

[化7]



[化8]



[0022] 上記式(2)において、qは1～9の整数を示し、rは0または1を示し、sは1～3の整数を示し、tは0または1を示し、uは1～8の整数を示し、cは0または1を示し、vは4～12の整数を示す。

- [0023] 上記式(2)においてcが0の場合、 $1 + q + 2r + s + 2t + u$ は、8～18の範囲内であり、10～16の範囲内が好ましく、10～14の範囲内がさらに好ましく、12が特に好ましい。また、 $r + t$ は、1または2であることが好ましく、2であることが特に好ましい。
- [0024] 上記式(2)においてcが1の場合、 $1 + q + 2r + s + 2t + u + c$ は、10～24の範囲内であり、12～22の範囲内が好ましく、14～20の範囲内がさらに好ましく、16～18が特に好ましい。また、 $r + t$ は、1または2であることが好ましく、1であることが特に好ましい。
- [0025] 上記式(3)において、 R^3 および R^4 はそれぞれ独立に C_{3-11} アルキル基であり、 v は4～12の整数を示す。
- [0026] 上記式(3)において、 R^3 および R^4 の合計炭素数は、8～22の範囲内であれば特に限定されないが、10～20の範囲内が好ましく、12～18の範囲内がさらに好ましく、14～16が特に好ましい。
- [0027] また、上記式(1)において、 X^1 は5～7員非芳香族ヘテロ環基である。このヘテロ環基は、炭素原子により $(O-CO)-$ に結合する。また、ヘテロ環基の環上には1個または2個の C_{1-4} アルキル基(炭素数1～4のアルキル基)または C_{2-4} アルケニル基(炭素数2～4のアルケニル基)が置換していてもよい。ヘテロ環基に含まれるヘテロ原子の例には、窒素原子、酸素原子および硫黄原子が含まれる。ヘテロ環基は、1個のヘテロ原子を含んでもよいし、2個以上の同一または異なるヘテロ原子を含んでもよい。ヘテロ環基を構成するヘテロ環は、1個または2個以上の二重結合を含んでもよいが、芳香環となることはない。ヘテロ環は、飽和のヘテロ環であることが好ましい。また、ヘテロ環基中の1個または2個の水素原子が置換されている置換基のうち、 C_{1-4} アルキル基の例には、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 n -ブチル基、イソプロピル基、イソブチル基およびtert-ブチル基が含まれる。 C_{2-4} アルケニル基の例には、エテニル基(ビニル基)、プロペニル基およびブテニル基が含まれる。
- [0028] たとえば、 X^1 は、1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホ

リニル基または1-ピペラジニル基である。これらの場合、1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基または1-ピペラジニル基は、1個のC₁₋₄アルキル基で置換されていてもよい。

[0029] 上記式(1)の化合物のうち、上記式(2)で表される基を有する好ましい化合物としては、R¹およびR²が同一であり、aが4であり、qが4であり、rが1であり、sが1であり、tが1であり、uが2であり、cが0であり、vが6であり、X¹が1-メチルピペリジニル基である化合物が例示される。これは、後述する実施例で「CL15A6」と称されている化合物((14z, 17z)-5-ヒドロキシ-5-((9z, 12z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)トリコサ-14, 17-ジエン-1-イル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート)である。

[0030] 上記式(1)の化合物のうち、上記式(2)で表される基を有する他の好ましい化合物としては、R¹およびR²が同一であり、aが4であり、qが7であり、rが1であり、sが0であり、tが0であり、uが7であり、cが1であり、vが6であり、X¹が1-メチルピペリジニル基である化合物が例示される。これは、後述する実施例で「CL15H6」と称されている化合物(7-ヒドロキシ-7-(4-((1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ)ブチル)トリデカン-1, 13-ジイル ジオレアート)である。

[0031] 上記式(1)の化合物のうち、上記式(3)で表される基を有する好ましい化合物としては、R³がヘキシル基であり、R⁴がオクチル基であり、vが6であり、X¹が1-メチルピペリジニル基である化合物が例示される。これは、後述する実施例で「CL15F6」と称されている化合物(7-ヒドロキシ-7-(4-((1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ)ブチル)トリデカン-1, 13-ジイル ビス(2-ヘキシルデカノアート))である。

[0032] 本発明の他の実施の形態に係る脂質ナノ粒子は、親水性部が、イオン化可能な第3級アミノ基を末端に含み、2つの疎水性部が、それぞれ独立に、炭

素数が4～12のアルキレン基と、前記アルキレン基に結合した、炭素数が15以上の脂肪酸エステル基と、を含む。

[0033] ここで、上記脂肪酸エステル基の炭素数は、15以上であれば特に限定されないが、16以上であることが好ましい。また、上記脂肪酸エステル基の炭素数は、24以下であることが好ましく、22以下であることがさらに好ましく、20以下であることが特に好ましく、18以下であることが最も好ましい。上記脂肪酸エステル基は、直鎖状および分岐鎖状のいずれであってもよいが、直鎖状の脂肪酸エステル基であることが好ましい。上記脂肪酸エステル基は、飽和および不飽和のいずれであってもよい。

[0034] また、上記2つの疎水性部は、同一であってもよいし、互いに異なってもよいが、同一であることが好ましい。

[0035] たとえば、本発明の他の実施の形態に係る脂質ナノ粒子は、上記pH感受性カチオン性脂質として、下記の一般式(4)で表されるpH感受性カチオン性脂質を含む。

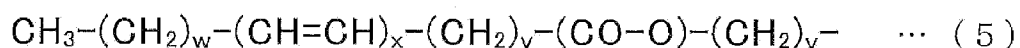
[化9]



[0036] 上記式(4)において、aは3～5の整数を示し、好ましくは4である。

[0037] 上記式(4)において、 R^5 および R^6 はそれぞれ独立に下記一般式(5)で表される基である。

[化10]



[0038] 上記式(5)において、wは1～15の整数を示し、xは0または1を示し、yは1～15の整数を示し、vは4～12の整数を示す。

[0039] 上記式(5)において、 $1+w+2x+y+1$ は、15以上であり、16

以上であることが好ましい。また、 $1 + w + 2x + y + 1$ は、24以下であることが好ましく、22以下であることがさらに好ましく、20以下であることが特に好ましく、18以下であることが最も好ましい。

[0040] また、上記式(5)において、 X^2 はイオン化可能な第3級アミノ基である。たとえば、 X^2 はジメチルアミノ基である。

[0041] 上記式(4)の化合物のうち、好ましい化合物としては、 R^5 および R^6 が同一であり、 a が4であり、 w が7であり、 x が0であり、 y が7であり、 v が6であり、 X^2 がジメチルアミノ基である化合物が例示される。これは、後述する実施例で「CL1D6」と称されている化合物(7-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシトリデカン-1, 13-ジイル ジパルミテート)である。

[0042] 上記式(4)の化合物のうち、好ましい化合物としては、 R^5 および R^6 が同一であり、 a が4であり、 w が7であり、 x が1であり、 y が7であり、 v が6であり、 X^2 がジメチルアミノ基である化合物が例示される。これは、後述する実施例で「CL1H6」と称されている化合物(7-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシトリデカン-1, 13-ジイル ジオレエート)である。

[0043] これらの化合物を含めて上記のpH感受性カチオン性脂質は、当業者であれば容易に製造することができる。たとえば、当業者は、特許文献1または2、あるいは後述の非特許文献10に記載されている製造方法を参照し、原料化合物や試薬、反応条件などを適宜選択することで、上記式(1)および式(4)の範囲に包含される任意の化合物を容易に製造することができる。特許文献1、特許文献2および非特許文献10の開示の全てを参照により本明細書の開示として含める。

[0044] 本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対する上記のpH感受性カチオン性脂質の割合は、特に限定されないが、20モル%以上であることが好ましい。たとえば、pH感受性カチオン性脂質の割合は、20~60モル%の範囲内であることが好ましく、35~60モル%の範囲内であることが

特に好ましい。

[0045] 本発明に係る脂質ナノ粒子の脂質膜を構成する脂質は、上記のpH感受性カチオン性脂質のみであってもよいが、上記のpH感受性カチオン性脂質と1種または2種以上の他の脂質との組み合わせであることが好ましい。上記のpH感受性カチオン性脂質と組み合わせて使用される脂質の種類は、特に限定されず、例えばリポソームを形成する際に使用される脂質を使用することができる。このような脂質の例には、リン脂質、糖脂質、ステロール、飽和または不飽和の脂肪酸エステル、および飽和または不飽和の脂肪酸などが含まれる。

[0046] リン脂質およびリン脂質誘導体の例には、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、セラミドホスホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルグリセロール、セラミドホスホリルグリセロールホスファート、プラスマロゲン、ホスファチジン酸などが含まれる。これらは単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせて用いてもよい。これら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12～20の飽和または不飽和の脂肪酸残基であってもよい。このような脂肪酸残基の例には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸などの脂肪酸由来のアシル基が含まれる。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。

[0047] リン脂質のより具体的な例には、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン(DPPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン(POPC)が含まれる。本発明に係る脂質ナノ粒子は、リン脂質を含むことが好ましく、DOPEやDSPEなどのホスホエタノールアミン基を含む

リン脂質を含むことがより好ましい。

[0048] 糖脂質の例には、スルホキシリボシルグリセリドや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などのグリセロ糖脂質；ガラクトシルセレブロシドやラクトシルセレブロシド、ガングリオシドなどのスフィンゴ糖脂質が含まれる。

[0049] ステロールの例には、コレステロールや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などの動物由来のステロール；スチグマステロールやシトステロール、カンペステロール、ブラシカステロールなどの植物由来のステロール（フィトステロール）；チモステロールやエルゴステロールなどの微生物由来のステロールが含まれる。本発明に係る脂質ナノ粒子は、ステロールを含むことが好ましく、コレステロールを含むことがより好ましい。脂質ナノ粒子を構成する脂質膜にコレステロールなどのステロールを含ませることで、脂質ナノ粒子の安定性を高めることができる。

[0050] 飽和または不飽和の脂肪酸の例には、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の飽和または不飽和の脂肪酸が含まれる。飽和または不飽和の脂肪酸エステル の例には、グリセロールの1個または2個の水酸基が脂肪酸とエステル結合したグリセリン脂肪酸エステルが含まれる。グリセリン脂肪酸エステル中の脂肪酸残基の例には、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の飽和または不飽和の脂肪酸由来のアシル基が含まれる。たとえば、脂肪酸エステルは、ジミリストイルグリセロール（DMG）またはジステアロイルグリセロール（DSG）である。

[0051] 本発明の脂質ナノ粒子は、表面修飾がなされていてもよい。たとえば、脂質ナノ粒子の核内移行を促進するために、脂質ナノ粒子の表面を三糖以上のオリゴ糖化合物で修飾してもよい。三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であり、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

化合物である。

[0052] オリゴ糖化合物の具体的な例には、セロトリオース (Cellotriose : β -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - D-グルコース)、カコトリオース (Chacotriose : α -L-ラムノピラノシルー (1 $\rightarrow$ 2) - [α -L-ラムノピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4)] - D-グルコース)、ゲンチアノース (Gentianose : β -D-フルクトフラノシルー β -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-グルコピラノシド)、イソマルトトリオース (Isomaltotriose : α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - D-グルコース)、イソパノース (Isopanose : α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - [α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6)] - D-グルコース)、マルトトリオース (Maltotriose : α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - D-グルコース)、マンニノトリオース (Manninotriose : α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - D-グルコース)、メレジトース (Melezitose : α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) - β -D-フルクトフラノシルー = α -D-グルコピラノシド)、パノース (Panose : α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - D-グルコース)、プランテオース (Planteose : α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - β -D-フルクトフラノシルー = α -D-グルコピラノシド)、ラフィノース (Raffinose : β -D-フルクトフラノシルー = α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-グルコピラノシド)、ソラトリオース (Solatriose : α -L-ラムノピラノシルー (1 $\rightarrow$ 2) - [β -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)] - D-ガラクトース)、ウンベリフェロース (Umbelliferose : β -D-フルクトフラノシルー = α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 2) - α -D-ガラクトピラノシド) などの三糖化合物 ; リコテトラオース (Lycotetraose : β -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 2) - [β -D-キシロピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)] - β -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-ガラクトース)

、マルトテトラオース (Maltotetraose : α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - D-グルコース)、スタキオース (Stachyose : β -D-フルクトフラノシル= α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-グルコピラノシド) などの四糖化合物 ; マルトペンタオース (Maltopentaose : α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - D-グルコース)、ベルバスコース (Verbascose : β -D-フルクトフラノシル= α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-ガラクトピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) - α -D-グルコピラノシド) などの五糖化合物 ; マルトヘキサオース (Maltohexaose : α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - α -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 4) - D-グルコース) などの六糖化合物が含まれる。

[0053] オリゴ糖化合物で脂質ナノ粒子の表面を表面する方法は、特に限定されない。たとえば、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りポソーム (特許文献3) 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。この手段はポリアルキレングリコール化脂質に単糖化合物を結合して脂質ナノ粒子の表面の修飾を行う方法であり、この手段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により同時に修飾することができるので好ましい。

[特許文献3] 国際公開第2007/102481号

[0054] 脂質ナノ粒子の表面をポリアルキレングリコールなどの親水性ポリマーで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。この方法については、例えば特許文献4~7に記載されている。親水性ポリマーとしては、ポリアルキレングリコールが好ましい。ポリアル

キレングリコールの例には、ポリエチレングリコール（PEG）、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およびポリヘキサメチレングリコールが含まれる。ポリアルキレングリコールの分子量は、例えば300～10000程度、好ましくは500～10000程度、さらに好ましくは1000～5000程度である。

[特許文献4] 特開平1-249717号公報

[特許文献5] 特開平2-149512号公報

[特許文献6] 特開平4-346918号公報

[特許文献7] 特開2004-10481号公報

[0055] ポリアルキレングリコールによる脂質ナノ粒子の表面の修飾は、例えばポリアルキレングリコール修飾脂質を脂質膜の構成脂質として用いることにより容易に行うことができる。たとえば、ポリエチレングリコールによる修飾を行う場合には、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-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、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-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、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-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、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-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、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-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン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。

[0056] また、ポリアルキレングリコールにオリゴ糖化合物を結合させることにより、ポリアルキレングリコールによる修飾およびオリゴ糖化合物による修飾を同時に行うことができる。ただし、脂質ナノ粒子をポリアルキレングリコ

ールまたはオリゴ糖化合物で修飾する方法は、上記の方法に限定されることはない。たとえば、ステアリル化されたポリアルキレングリコールやオリゴ糖化合物などの脂質化された化合物を脂質ナノ粒子の構成脂質として使用することによっても、脂質ナノ粒子の表面の修飾を行うことができる。

[0057] 本発明の脂質ナノ粒子には、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、スチレンー無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテルー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用いることもできる。

[0058] 本発明の脂質ナノ粒子は、ステロールや、グリセリン、グリセリンの脂肪酸エステルなどの膜安定化剤；トコフェロールや、没食子酸プロピル、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシトルエンなどの抗酸化剤；荷電物質；および膜ポリペプチド；などからなる群から選ばれる1種または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の例には、ステアリルアミン、オレイルアミンなどの飽和または不飽和脂肪族アミン；ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパンなどの飽和または不飽和カチオン性合成脂質；カチオン性ポリマーなどが含まれる。負電荷を付与する荷電物質の例には、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が含まれる。膜ポリペプチドの例には、例えば、膜表在性ポリペプチド、膜内在性ポリペプチドなどが含まれる。

[0059] また、本発明の脂質ナノ粒子には、例えば、温度変化感受性機能や、膜透過機能、遺伝子発現機能、pH感受性機能などのいずれか1つまたは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

、例えば脂質ナノ粒子の血液中での滞留性を向上させたり、標的細胞（肝星細胞）にエンドサイトーシスで取り込まれた後の脂質ナノ粒子をエンドソームから効率的に脱出させて核内に移行させたりすることができる。

[0060] 温度変化感受性機能を付与することができる温度変化感受性脂質誘導体の例には、ジパルミトイルホスファチジルコリンなどが含まれる。また、pH感受性機能を付与することができるpH感受性脂質誘導体の例には、ジオレオイルホスファチジリエタノールアミンなどが含まれる。

[0061] この後実施例で示すように、本発明に係る脂質ナノ粒子は、肝星細胞に結合するためのリガンドを含んでいなくても、標的細胞である肝星細胞に選択的に取り込まれることができる。すなわち、本発明に係る脂質ナノ粒子は、肝星細胞に結合するためのリガンドを含まない状態でも、内包する目的物質を肝星細胞に選択的に送達することができる。したがって、本発明に係る脂質ナノ粒子は、肝星細胞に結合するためのリガンドを含んでいなくてもよい。

[0062] 一方で、本発明に係る脂質ナノ粒子は、細胞表面の受容体や抗原に対して特異的に結合可能な抗体などの物質で修飾されていてもよい。当該修飾により、肝星細胞への送達効率を改善することができる。たとえば、肝星細胞に特異的に発現する生体成分に対するモノクローナル抗体を脂質ナノ粒子の表面に配置してもよい。脂質ナノ粒子の脂質膜の構成成分として、モノクローナル抗体やそのフラグメント（例えば、F a bフラグメント、F（a b'）₂フラグメント、又はF a b'フラグメントなど）中のメルカプト基と反応し得る脂質誘導体、例えばポリ（エチレングリコール）-α-ジステアロイルホスファチジリエタノールアミン-ω-マレインイミド、α-[N-(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリル-エチル)カルバミル]-ω-[3-[2-(2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-1-イル)エタンカルボキサミド]プロピル]-ポリ（オキシ-1,2-エタンジール）などのマレインイミド構造を有する脂質誘導体を含有させることにより、モノクローナル抗体を脂質ナノ粒子の脂質膜の表面に結合

させることができる。

[0063] 本発明の脂質ナノ粒子の表面を、連続した複数個のアルギニン残基を含むポリペプチド（以下、「ポリアルギニン」と呼ぶ。）で修飾してもよい。ポリアルギニンとしては、好ましくは4～20個の連続したアルギニン残基を含むポリペプチド、さらに好ましくは4～20個の連続したアルギニン残基のみからなるポリペプチド、特に好ましくはオクタアルギニンなどを用いることができる。脂質ナノ粒子の表面をオクタアルギニンなどのポリアルギニンで修飾することにより、脂質ナノ粒子に封入された目的物質の細胞内送達効率を向上させることができる。ポリアルギニンによる脂質ナノ粒子の表面の修飾は、例えばステアリル化オクタアルギニンなどの脂質修飾ポリアルギニンを脂質ナノ粒子の構成脂質として使用することにより容易に行うことができる。

[0064] また、本発明の脂質ナノ粒子にmRNAやsiRNAなどの核酸を封入する場合には、必要に応じて核酸導入機能を有する化合物を使用してもよい。このような化合物の例には、O, O' -N-ジドデカノイル-N- (α -トリメチルアンモニオアセチル) -ジエタノールアミンクロリド、O, O' -N-ジテトラデカノイル-N- (α -トリメチルアンモニオアセチル) -ジエタノールアミンクロリド、O, O' -N-ジヘキサデカノイル-N- (α -トリメチルアンモニオアセチル) -ジエタノールアミンクロリド、O, O' -N-ジオクタデセノイル-N- (α -トリメチルアンモニオアセチル) -ジエタノールアミンクロリド、O, O' , O'' -トリデカノイル-N- (ω -トリメチルアンモニオデカノイル) アミノメタンブロミド、N- [α -トリメチルアンモニオアセチル] -ジドデシル-D-グルタメート、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、2, 3-ジオレイルオキシ-N- [2- (スベルミンカルボキサミド) エチル] -N, N-ジメチル-1-ブロパンアンモニウムトリフルオロアセテート、1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、3- β - [N- (N' , N' -ジメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロ

ールなどが含まれる。これらの核酸導入機能を有する化合物は、脂質ナノ粒子の脂質膜の任意の位置に配置されていてもよいし、脂質ナノ粒子の内部に充填されていてもよい。

[0065] 本発明に係る脂質ナノ粒子が、脂質膜の構成成分として上記のpH感受性カチオン性脂質以外の成分を含む場合、各成分の割合は目的に応じて適宜調整される。たとえば、本発明に係る脂質ナノ粒子が、上記のpH感受性カチオン性脂質と、ホスホエタノールアミン基を含むリン脂質（例えばDOPE）と、ステロール（例えばコレステロール）と、ポリアルキレングリコール修飾脂質（例えばPEG修飾脂質）とを含む場合、脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対する各成分の割合は、pH感受性カチオン性脂質は20～57モル%（好ましくは35～57モル%）、ホスホエタノールアミン基を含むリン脂質（例えばDOPE）は20～30モル%、ステロール（例えばコレステロール）は20～30モル%、ポリアルキレングリコール修飾脂質（例えばPEG修飾脂質）は3～5モル%であることが好ましい。

[0066] 本発明の脂質ナノ粒子は、肝星細胞にmRNAやsiRNAなどの目的物質を送達するための脂質ナノ粒子であって、目的物質が内部に封入されており、かつ脂質成分として上記のpH感受性カチオン性脂質を含むことを特徴としている。標的細胞である肝星細胞は、動物の体内にある細胞であってもよく、培養細胞や初代培養細胞などの生体外で培養されている細胞であってもよい。

[0067] 本発明の脂質ナノ粒子に封入される目的物質の種類は、特に限定されない。目的物質の例には、メッセンジャーRNA（mRNA）や低分子干渉RNA（small interfering RNA、siRNA）、マイクロRNA（microRNA、miRNA）、低分子ヘアピン型RNA（small hairpin RNA、shRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、CRISPR-Casのコンポーネント（ガイドRNAおよびCas）、プラスミドなどの核酸類；抗腫瘍剤や抗炎症剤、抗菌剤、抗ウイルス剤などの任意の医薬の有効成分；糖類；ペプチド類；低分子化合物；金属化合物などが含まれる。

[0068] 本発明に係る脂質ナノ粒子の形態は、特に限定されない。水系溶媒に分散した脂質ナノ粒子の形態の例には、一枚膜リポソーム、多重層リポソーム、球状ミセル、ひも状ミセル、および不定型の層状構造物が含まれる。本発明に係る脂質ナノ粒子は、一枚膜リポソームまたは多重層リポソームであることが好ましい。

[0069] また、多機能性を付加したエンベロープ型ナノ構造体（MEND）が知られており、本発明の脂質ナノ粒子としても好適に使用することができる。MENDとしては、例えば、プラスミドDNAなどの核酸とプロタミンなどのカチオン性ポリマーとの複合体をコアとし、このコアがリポソーム形態の脂質エンベロープ膜の内部に封入された構造を有するものが報告されている。また、MENDの脂質エンベロープ膜には、必要に応じてpH応答性や膜透過性を調節するためのペプチドを配置することができ、脂質エンベロープ膜の外側表面はポリエチレングリコールなどのアルキレングリコールで修飾することができることも報告されている。MENDの脂質エンベロープの内部に凝縮化されたDNAおよびカチオン性ポリマーが封入され、効率的に遺伝子発現を達成できるように設計されたMENDも知られている。

[0070] 本発明に係る脂質ナノ粒子の脂質膜の酸解離定数 pK_a は、6.7以上8.2未満であれば特に限定されないが、6.7～7.4の範囲内であることがさらに好ましく、約7.0であることが特に好ましい。脂質ナノ粒子のエンドサイトーシスによる細胞への取り込みは、脂質ナノ粒子を構成する脂質の pK_a の影響を受ける。細胞の種類によって、エンドサイトーシスにより取り込まれやすい脂質の pK_a が異なる。このため、脂質の pK_a が標的細胞へ取り込まれやすい範囲となるように、置換基の種類を選択するなどして脂質膜の酸解離定数 pK_a を調整することが好ましい。本発明の場合、脂質膜の見かけの酸解離定数 pK_a を6.7以上8.2未満とすることで、脂質ナノ粒子が肝星細胞により選択的に取り込まれやすくなる（実施例参照）。脂質ナノ粒子の脂質膜の見かけの酸解離定数 pK_a は、6-p-Toluidino-2-naphthalenesulfonic acid（TNS）を用いて緩衝液中で37℃で測定される（

実施例参照)。

[0071] 本発明に係る脂質ナノ粒子の平均粒子径は、特に限定されないが、100 nm以下であることが好ましい。平均粒子径を100 nm以下とすることで、脂質ナノ粒子の血管外への拡散および線維化した肝臓の間質が多い微小環境での脂質ナノ粒子の浸透が促進されて、脂質ナノ粒子が肝星細胞により到達しやすくなる(実施例参照)。平均粒径の下限值も、特に限定されない。本発明に係る脂質ナノ粒子の平均粒子径は、例えば10 nm以上、20 nm以上または60 nm以上である。なお、本明細書では、脂質ナノ粒子の平均粒子径は、動的光散乱法(Dynamic light scattering: DLS)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DLS装置を用いて常法により行うことができる。脂質ナノ粒子の平均粒子径の調整は、例えば、所定の孔径を有するメンブランフィルターなどを用いて、高圧下でエクストルージョン(押し出し濾過)を行えばよい。また、後述の非特許文献11に記載のマイクロ流路デバイス(iLINPデバイス)を用いて脂質ナノ粒子を調製することで、脂質ナノ粒子の平均粒子径を容易に調整することもできる。具体的には、特許文献8に記載されているように、このマイクロ流路デバイスを用いて脂質ナノ粒子を調製する際に、水相と有機相の流量比、緩衝系、脂質/核酸比(N/P比)、pH感受性カチオン性脂質の割合、ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合などを調整すればよい。

[特許文献8] 特開2021-172597号公報

[0072] 本発明に係る脂質ナノ粒子の多分散度指数(PDI)は、特に限定されないが、例えば0.05~0.1程度、好ましくは0.06~0.08程度、さらに好ましくは0.07程度である。ゼータ電位は、特に限定されないが、例えば-16~+5 mVの範囲内が好ましく、-8~+5 mVの範囲内がさらに好ましく、0 mV付近が特に好ましい。

[0073] 本発明に係る脂質ナノ粒子がRNAなどの核酸を包含する場合、核酸に由来するリン酸に対する、pH感受性カチオン性脂質に由来する窒素原子のモ

ル比である窒素／リン酸（N／P）比は、特に限定されない。たとえば、脂質ナノ粒子がmRNAを包含する場合は、N／P比は、6～14の範囲内であることが好ましく、8～12の範囲内であることが特に好ましい。N／P比を上記範囲内とすると、脂質ナノ粒子のエンドソーム脱出能力が向上し、トランスフェクション効率が向上する。また、脂質ナノ粒子がsiRNAを包含する場合は、N／P比は、4～8の範囲内であることが好ましい。N／P比を上記範囲内とすると、標的遺伝子の発現を効率的に抑制できる。

[0074] 脂質ナノ粒子の状態は、特に限定されないが、例えば、水系溶媒（例えば水や生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水など）に分散した状態であってもよいし、この水性分散物を凍結乾燥した状態であってもよい。

[0075] 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。たとえば、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などを行うことによって脂質膜を形成した後、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や超音波乳化機、高圧噴射乳化機などを用いて乳化することで、本発明に係る脂質ナノ粒子を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、例えば逆相蒸発法やアルコール希釈法などによっても、本発明に係る脂質ナノ粒子を製造することができる。さらに、マイクロ流路デバイスを用いても、本発明に係る脂質ナノ粒子を製造することができる（実施例参照）。

[0076] 水系溶媒（分散媒）の種類は、特に限定されない。水系溶媒の例には、リン酸緩衝液やクエン酸緩衝液、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が含まれる。これらの水系溶媒は、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、グルコースやガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロースなどの単糖類、乳糖やショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトースなどの二糖類、ラフィノースや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、エリスリトールやキシリトール、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や；グリセリンやジグリセリン、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）などを添加されてもよい。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から8.0程度）に設定し、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。

[0077] 得られた脂質ナノ粒子の水性分散物を凍結乾燥または噴霧乾燥する場合には、例えば、グルコースやガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロースなどの単糖類；乳糖やショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトースなどの二糖類；ラフィノースや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；エリスリトールやキシリトール、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。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、グリセリンやジグリセリン、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を用いると安定性を改善できる。

[0078] 本発明に係る脂質ナノ粒子を用いることで、肝星細胞に選択的に目的物質を送達することができる。この方法は、ヒトを含む哺乳類動物の生体内において行うこともでき、生体から採取された細胞を用いてin vitroで行っても

よい。また、本発明に係る脂質ナノ粒子は、肝線維症の肝臓の肝星細胞にも目的物質を送達することができる。本発明に係る脂質ナノ粒子は、肝星細胞に結合するためのリガンドを含んでいなくても、上記機能を発揮することができる。したがって、本発明に係る脂質ナノ粒子を用いることで、迅速、経済的、拡張可能、かつ臨床応用可能な、肝星細胞に対する送達システムを実現することができる。

[0079] 2. 肝線維化を予防または治療するための医薬組成物および方法

本発明に係る医薬組成物および方法は、肝線維化を予防または治療するための医薬組成物および方法であって、肝星細胞において、Smoothered (SMO) 遺伝子またはSMOタンパク質を抑制または阻害するとともに、トランスフォーミング増殖因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) 遺伝子またはTGF $\beta 1$ タンパク質を抑制または阻害する。このようにSMOおよびTGF $\beta 1$ の両方を抑制または阻害することで、肝星細胞の活性を抑制し、肝線維化を抑制および改善することができる。

[0080] 肝線維化は、肝臓の損傷に反応して発症し、肝細胞の損傷とクッパー細胞の活性化を引き起こす。損傷した肝細胞はヘッジホッグリガンド(Hh)を放出し、肝星細胞のSMOシグナル経路を活性化し、肝星細胞を活性化させる。活性化されたクッパー細胞は、TGF $\beta 1$ を放出する。TGF $\beta 1$ は、肝星細胞のTGF $\beta 1$ シグナル経路を活性化し、肝星細胞をさらに活性化させる。したがって、SMO遺伝子およびTGF $\beta 1$ 遺伝子を同時にノックダウンすることで、肝星細胞を不活性化し、静止状態にすることが期待される。実際に、この後の実施例で示すように、SMO遺伝子およびTGF $\beta 1$ 遺伝子を同時にノックダウンすることで、肝線維化を抑制および改善することができる。

[0081] より具体的には、本発明に係る医薬組成物は、肝線維化を予防または治療するための医薬組成物であって、肝星細胞への送達選択性を有する脂質ナノ粒子と、脂質ナノ粒子に包含された第1物質および第2物質と、を含む。ここで、第1物質は、SMO遺伝子またはSMOタンパク質の発現を抑制する

か、またはSMOタンパク質を阻害する物質である。同様に、第2物質は、TGF β 1遺伝子またはTGF β 1タンパク質の発現を抑制するか、またはTGF β 1タンパク質を阻害する物質である。

[0082] また、本発明に係る方法は、肝線維化を予防または治療するための方法であって、上記本発明に係る医薬組成物を投与する工程を含む。

[0083] 脂質ナノ粒子は、肝星細胞への送達選択性を有するものであれば特に限定されず、例えば上記本発明に係る脂質ナノ粒子であってもよい。また、脂質ナノ粒子の代わりに、肝星細胞への送達選択性を有する他の送達媒体を用いてもよい。

[0084] 第1物質は、上記のとおり、SMO遺伝子またはSMOタンパク質の発現を抑制するか、またはSMOタンパク質を阻害する物質である。SMO遺伝子またはSMOタンパク質の発現を抑制する物質の例には、siRNAやmiRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、CRISPR-Casのコンポーネント（ガイドRNAおよびCas）などが含まれる。SMOタンパク質を阻害する物質の例には、抗体やアプタマーなどが含まれる。

[0085] 第2物質は、上記のとおり、TGF β 1遺伝子またはTGF β 1タンパク質の発現を抑制するか、またはTGF β 1タンパク質を阻害する物質である。TGF β 1遺伝子またはTGF β 1タンパク質の発現を抑制する物質の例には、siRNAやmiRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、CRISPR-Casのコンポーネント（ガイドRNAおよびCas）などが含まれる。TGF β 1タンパク質を阻害する物質の例には、抗体やアプタマーなどが含まれる。

[0086] siRNAは、RNAi作用により標的遺伝子（SMO遺伝子またはTGF β 1遺伝子）の発現を抑制することができる二本鎖RNAまたは上記二本鎖RNAをコードするDNAである。siRNAは、標的遺伝子から転写されるRNAの塩基配列中の連続する部分配列を有する二本鎖RNAまたは上記二本鎖RNAをコードするDNAであることが好ましい。より具体的には

、*siRNA*は、標的遺伝子から転写されるRNAの塩基配列中のCDSまたはUTRの、標的遺伝子の発現を抑制するために要求される塩基数の連続配列に相補的な配列を有していればよい。上記二本鎖RNAをコードするDNAは、例えば、標的遺伝子の部分配列の逆向き反復配列を有するDNAである。このような逆向き反復配列を有するDNAを哺乳動物の細胞に導入することにより、細胞内で標的遺伝子の部分配列の逆向き反復配列を発現させることができ、これによりRNAi作用により標的遺伝子の発現を抑制することができる。

[0087] *miRNA*は、*mRNA*の3' UTRに対合して標的遺伝子（SMO遺伝子またはTGF β 1遺伝子）の翻訳を抑制することができる。より具体的には、*miRNA*は、ヘアピン様構造のRNA前駆体として転写され、RNAse III切断活性を有するdsRNA切断酵素により切断され、RISCまたはRISC様タンパク質複合体に取り込まれ、*mRNA*の翻訳を抑制することができる。*miRNA*は、*pri-miRNA*（*primary miRNA*）、*pre-miRNA*、成熟*miRNA*のいずれであってもよい。*miRNA*は、標的遺伝子から転写されるRNAの3' UTR中の連続する部分配列またはそれに相補的な配列を含むことが好ましい。上記部分配列の長さとしては特に制限されず、7塩基以上が好ましく、8塩基以上がより好ましく、9塩基以上が更に好ましく、11塩基以上が更により好ましく、13塩基以上が特に好ましく、15塩基以上がとりわけ好ましく、17塩基以上が最も好ましい。上記部分配列の長さの上限としては特に制限されず、50塩基以下が好ましく、40塩基以下がより好ましく、30塩基以下が更に好ましく、25塩基以下が特に好ましく、23塩基以下が最も好ましい。*pri-miRNA*の長さは、通常数百～数千塩基であり、*pre-miRNA*の長さは、通常50～80塩基である。

[0088] *shRNA*は、標的遺伝子（SMO遺伝子またはTGF β 1遺伝子）から転写されるRNAの塩基配列中の部分配列およびそれに相補的な逆向きの配列を、ヘアピンループを形成し得る配列を介して並列している逆向き反復配

列を有する一本鎖RNAまたは上記RNAをコードするDNAである。shRNAは、上記siRNAと同様に機能することができる。shRNAは、標的遺伝子から転写されるRNAの塩基配列中のCDSまたはUTRの、標的遺伝子の発現を抑制するために要求される塩基数の連続配列に相補的な配列を有していればよい。ヘアピンループを形成しうる配列の長さは、ヘアピンループを形成できる限り特に限定されないが、好ましくは0～300bp、より好ましくは1～100bp、更に好ましくは2～75bp、特に好ましくは3～50bpである。この配列の中には、制限酵素部位が存在していてもよい。

[0089] アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子（SMO遺伝子またはTGFB1遺伝子）のエクソン中のCDSもしくはUTRまたはイントロン中の連続する配列、あるいは標的遺伝子の発現制御領域中の連続する配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。細胞内（好ましくは核内）において、標的遺伝子に含まれるオリゴヌクレオチドと、それと相補的な上記アンチセンスオリゴヌクレオチドとがハイブリッド形成することにより、生じたハイブリッド二本鎖に特異的なヌクレアーゼ（例えば、RNAアーゼH）によりヌクレオチド鎖を含む標的遺伝子のmRNAが分解され、標的遺伝子の転写または翻訳が抑制される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよいが、上記特異的なヌクレアーゼによりmRNAが切断される観点から、DNAであることが好ましい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子のCDSまたはUTR中に含まれるオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドがより好ましく、標的遺伝子のUTR中に含まれるオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有するものが更に好ましく、標的遺伝子の3'UTR中に含まれるオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有するものが特に好ましい。上記オリゴヌクレオチドの長さとしては特に制限されず、10塩基以上が好ましく、11塩基以上がより好ましく、12塩基以上が更に好ましく、13塩基以上が更に好ましく、14塩基以上が特に好ましい。上記オリゴヌクレ

オチドの長さの上限としては特に制限されず、40塩基以下が好ましく、30塩基以下がより好ましく、25塩基以下が更に好ましく、20塩基以下が特に好ましく、17塩基以下が最も好ましい。

[0090] CRISPR-Casのコンポーネントは、ガイドRNAおよびCasヌクレアーゼ（例えばCas9）を含む。ガイドRNAは、DNA切断酵素であるCasヌクレアーゼと結合して、Casヌクレアーゼを標的遺伝子（SMO遺伝子またはTGF β 1遺伝子）に導く機能を有するRNAである。ガイドRNAは、その5'末端に標的DNA（標的遺伝子中に含まれる配列）に相補的な配列を有し、この相補的な配列を介して標的DNAに結合することにより、Casヌクレアーゼを標的遺伝子に導く。Casヌクレアーゼは、DNAエンドヌクレアーゼとして機能し、標的DNAが存在する部位でDNAを切断し、例えば、標的遺伝子の発現を特異的に低下させることができる。標的DNAは、標的遺伝子（エクソン中のCDSもしくはUTRまたはイントロン）中、あるいは標的遺伝子の発現制御領域中に含まれるオリゴヌクレオチドである。標的DNAは、標的遺伝子の発現を確実に低下させる観点から、標的遺伝子（エクソン中のCDSまたはUTR）中、あるいは標的遺伝子の発現制御領域中に含まれるオリゴヌクレオチドが好ましく、標的遺伝子（エクソン中のCDS）中または標的遺伝子の発現制御領域中に含まれるオリゴヌクレオチドがより好ましく、標的遺伝子（エクソン中のCDS）中に含まれるオリゴヌクレオチドが更に好ましい。標的DNAとなる標的遺伝子中の部分配列は、15～25塩基であることが好ましく、17～22塩基がより好ましく、18～21塩基がさらに好ましく、20塩基であることが特に好ましい。標的遺伝子（SMO遺伝子またはTGF β 1遺伝子）に特異的なガイドRNAまたはガイドRNAをコードするDNAと、Casヌクレアーゼをコードする核酸またはCasヌクレアーゼとを、上記脂質ナノ粒子に包含させることにより、肝星細胞における標的遺伝子の発現を低下させることができる。

[0091] 標的タンパク質（SMOタンパク質またはTGF β 1タンパク質）に選択

的に結合する抗体は、標的タンパク質に特異的に結合できるものであれば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれでもよい。抗体をヒトに投与する目的で使用する場合は、免疫原性を低下させるために、ヒト型化抗体またはヒト化抗体を用いることが好ましい。これらのヒト型化抗体およびヒト化抗体は、トランスジェニックマウスなどの哺乳動物を用いて作製することができる。

[0092] 標的タンパク質（SMOタンパク質またはTGF β 1タンパク質）に選択的に結合するアプタマーは、一本鎖RNAまたはDNAで構成され、その立体構造により標的タンパク質に結合して機能を阻害する。アプタマーは、標的タンパク質に対する結合性および特異性が高く、免疫原性が低く、化学合成により製造することができ、保存安定性も高い。アプタマーの塩基長は、標的タンパク質に特異的に結合する限り特に限定されないが、15～60塩基であることが好ましく、20～50塩基であることがより好ましく、25～47塩基であることが更に好ましく、26～45塩基であることが特に好ましい。標的タンパク質に選択的に結合するアプタマーは、例えばSELEX法により取得することができる。

[0093] 本発明に係る医薬組成物は、肝線維症に罹患した、または罹患するおそれのある対象、例えばマウス、ラット、ハムスターおよびモルモットを含むげっ歯類、ヒト、チンパンジーおよびアカゲザルを含む霊長類、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマおよびヒツジを含む家畜、イヌおよびネコを含む愛玩動物といった哺乳動物に投与される。好ましい対象は、ヒトである。

[0094] 本発明に係る医薬組成物の剤形は、特に限定されないが、非経口製剤であることが好ましく、例えば注射剤、点滴剤等でありうる。また、本発明に係る医薬組成物の投与経路も、特に限定されない。非経口製剤である場合は、例えば血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与、標的部位への局所投与等を行うことができる。好ましい実施形態の一つにおいて、本発明に係る医薬組成物は、静脈内投与または局所投与により生体に投与される。また、本発明に係る医薬組成物の投与量は、用法、対

象者の年齢、性別、体重、肝線維化の程度などに応じて適宜選択される。

[0095] 本発明に係る医薬組成物および方法によれば、肝星細胞において SMO および TGF β 1 の両方を抑制または阻害することで、肝星細胞の活性を抑制し、肝線維化を抑制および改善することができる。

[0096] 以下の実施例によって、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。

実施例

[0097] [実施例 1]

実施例 1 では、肝星細胞に mRNA を送達する実験を行った。

[0098] 1. mRNA を包含した脂質ナノ粒子の調製および特性評価

(1) 脂質ライブラリーの準備

非特許文献 10、特許文献 1 および 2 に記載されているように 14 種類の pH 感受性カチオン性脂質からなるライブラリーを合成し、特性評価を行った。スクリーニングした脂質の呼称は、CL1A6、CL1C6、CL1D6、CL1H6、CL4C6、CL4D6、CL4F6、CL4G6、CL4H6、CL7A6、CL7H6、CL15A6、CL15F6、CL15H6 とした。「CL」はカチオン性脂質を意味し、「CL」に続く数字（1、4、7 または 15）は親水性頭部の構造を表し（図 1 参照）、その後続くアルファベット（A～H）は疎水性尾部の遠位領域の構造を表し（図 1 参照）、最後の数字（6）は疎水性尾部の近位領域の長さを示している。図 1 に、pH 感受性カチオン性脂質の具体的構造を示す。

[非特許文献 10] Yusuke Sato, 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 Control Release, Vol. 295, pp. 140-152.

[0099] ここでは、上記 14 種類の pH 感受性カチオン性脂質のうち、CL15A6（（14z, 17z）-5-ヒドロキシ-5-（（9z, 12z）-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル）トリコサ-14, 17-ジエン-1

ーイル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート)、CL15H6 (7-ヒドロキシ-7-(4-((1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ)ブチル)トリデカン-1,13-ジイル ジオレアート)、CL15F6 (7-ヒドロキシ-7-(4-((1-メチルピペリジン-4-カルボニル)オキシ)ブチル)トリデカン-1,13-ジイル ビス(2-ヘキシルデカノアート)、CL1D6 (7-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシトリデカン-1,13-ジイル ジパルミテート)、CL1H6 (7-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシトリデカン-1,13-ジイル ジオレエート)の調製方法についてのみ説明する。

[0100] (2) CL15A6の合成

4℃に冷却したテトラヒドロフラン (THF) 190 mLに、水素化リチウムアルミニウム 2.73 g (72 mmol)を懸濁した。そこへリノール酸 10 g (36 mmol)を滴下し、10分間攪拌した。その後、オイルバスで加熱しながら一晩還流した。これを冷却した後、1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液 100 mLを加えて反応を停止させた。次に、酢酸エチル 100 mLを加えて希釈した後、濾過し、濾液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて洗浄した。続いて、有機層を回収して、そこ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; ヘキサン: 酢酸エチル (連続勾配)) に供することにより精製して、(9z, 12z)-オクタデカジエン-1-オール 8.68 g (32.6 mmol)を無色オイルとして得た。

[0101] (9z, 12z)-オクタデカジエン-1-オール 8.68 g (32.6 mmol)を100 mLのジクロロメタンに溶解した後、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) 366 mg (3.26 mmol)、トリエチルアミン (TEA) 6.8 mL (48.9 mmol)を加えた。続いて、滴下ロートを用いて、50 mLのジクロロメタンで希釈したメタンスルホニルクロリド 3.03 mL (39.1 mmol)を滴下し、室温で一晩攪拌

した。反応液を回収して、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて洗浄した。続いて、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；ヘキサン：酢酸エチル（連続勾配））に供することにより精製して、（9 z, 12 z）-オクタデカジエン-1-メタンスルホネート 10.64 g（30.9 mmol）を無色オイルとして得た。

[0102] （9 z, 12 z）-オクタデカジエン-1-メタンスルホネート 10.64 g を 140 mL のジエチルエーテルに溶解した後、マグネシウムブロミドエチルエーテラート 16.0 g（61.8 mmol）を加え、室温で一晩撹拌した。反応液を回収して、100 mL の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて洗浄した。続いて、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；ヘキサン：酢酸エチル（連続勾配））に供することにより精製して、18-ブロモ-オクタデカー（6 z, 9 z）-ジエン 8.85 g（26.9 mmol）を無色オイルとして得た。

[0103] 1.5 mL のジエチルエーテルに 18-ブロモ-オクタデカー（6 z, 9 z）-ジエン 0.50 g（1.52 mmol）を溶解し、削り屑状マグネシウム 609 mg（25.1 mmol）を加え、続いてヨウ素 1 欠片を加えた。室温で 10 分間静置した後、オイルバスで 45℃ に加熱しながら撹拌し、6 mL のジエチルエーテルに溶解した 18-ブロモ-オクタデカー（6 z, 9 z）-ジエン 5.0 g（15.2 mmol）を滴下した。45℃ で 1 時間反応させた後、室温に冷却した。続いて、 δ -バレロラクトン 300 μ L（3.23 mmol）を添加し、室温で 1 時間反応させた。次に、4℃ に冷却し、濾過した後、濾液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。続いて、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；ヘキサン：酢酸エチル（連続勾配））に供することにより精製して、4-[(9z, 12z)-オクタデカジエニル]-(13z, 16z)-トリコサジエン-1, 4-ジオール 1.64 g (2.73 mmol) を無色オイルとして得た。

[0104] 4-[(9z, 12z)-オクタデカジエニル]-(13z, 16z)-トリコサジエン-1, 4-ジオール 842 mg (1.40 mmol) を 10 mL の 1, 2-ジクロロエタンに溶解した。この溶液に、1-メチル-4-カルボン酸 200 mg (1.40 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 383 mg (2.00 mmol) および N, N-ジメチル-4-アミノピリジン 17.1 mg (0.14 mmol) を加え、得られた混合液を室温で一晩攪拌した。次いで、この混合液を 50 mL の酢酸エチルで希釈した後、1 N 水酸化ナトリウム水溶液および飽和食塩水で分液洗浄した。続いて、洗浄後の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 (14z, 17z)-5-ヒドロキシ-5-((9z, 12z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イル)トリコサ-14, 17-ジエン-1-イル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート (CL15A6) 877 mg (1.21 mmol) を無色オイルとして得た。

[0105] (3) CL15H6 の合成

6-ブromoヘキサン-1-オール 20.0 g (110.5 mmol) を 150 mL の 1, 2-ジクロロエタンに溶解し、4℃に冷却した。tert-ブチルジメチルクロロシラン (TBSCl) 18.0 g (120 mmol) を加えた後、トリエチルアミン (TEA) 19.5 mL (140 mmol) を滴下し、室温で一晩攪拌した。ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去し、ヘキサン 300 mL を加えて懸濁させ、セライト濾過によって不溶物を除去することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフ

ィー（溶離溶媒；ヘキサン：酢酸エチル（連続勾配））に供することにより精製して、（（6-ブロモヘキシル）オキシ）（*tert*-ブチル）ジメチルシラン26.0g（88.0mmol）を無色オイルとして得た。

[0106] 4mLのジエチルエーテルに（（6-ブロモヘキシル）オキシ）（*tert*-ブチル）ジメチルシラン1.2g（4.06mmol）を溶解し、削り屑状マグネシウム2.43g（100mmol）を加え、続いてヨウ素1欠片を加えた。室温で10分静置した後、オイルバスで40℃に加熱しながら攪拌し、21mLのジエチルエーテルに溶解した（（6-ブロモヘキシル）オキシ）（*tert*-ブチル）ジメチルシラン24.8g（83.94mmol）を滴下した。40℃で2時間反応させた後、4℃に冷却した。続いて、 δ -バレロラクトン3.67mL（39.6mmol）を添加し、室温で一晩反応させた。次に、4℃に冷却し、5%硫酸を滴下することで残留したマグネシウムを溶解させた。この反応液をジエチルエーテルで希釈した後、水および飽和食塩水で分液洗浄した。続いて、洗浄後の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；ヘキサン：酢酸エチル（連続勾配））に供することにより精製して、11-（（*tert*-ブチルジメチルシリル）オキシ）-5-（6-（（*tert*-ブチルジメチルシリル）オキシ）ヘキシル）ウンデカン-1,5-ジオール14.0g（26.3mmol）を無色オイルとして得た。

[0107] 11-（（*tert*-ブチルジメチルシリル）オキシ）-5-（6-（（*tert*-ブチルジメチルシリル）オキシ）ヘキシル）ウンデカン-1,5-ジオール5.33g（10.0mmol）を50mLのジクロロメタンに溶解し、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン（DMAP）122mg（1.0mmol）と1-メチルピペリジン-4-カルボオキシ酸塩酸塩2.16g（12.0mmol）を加えた。続いて、1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（EDCI）2.49g（1

3. 0 mmol) を徐々に加えた後、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。ろ液を 0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液および飽和食塩水で分液洗浄した。洗浄後の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、11-((tert-butyl(dimethylsilyl)oxy)-5-(6-((tert-butyl(dimethylsilyl)oxy)hexyl)-5-hydroxyundecyl)-1-methylpiperidin-4-carboxylate 5.01 g (7.61 mmol) を無色オイルとして得た。

[0108] 11-((tert-butyl(dimethylsilyl)oxy)-5-(6-((tert-butyl(dimethylsilyl)oxy)hexyl)-5-hydroxyundecyl)-1-methylpiperidin-4-carboxylate 5.01 g (7.61 mmol) に酢酸 1.43 mL (25 mmol) および 20 mL の 1.0 M テトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン溶液を加え、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、逆相シリカゲルクロマトグラフィー（溶離溶媒；水（0.1% トリフルオロ酢酸）：アセトニトリル 0.1% トリフルオロ酢酸（連続勾配））に供することにより精製して、5,11-ジヒドロキシ 5-(6-ヒドロキシヘキシル)ウンデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート 2.34 g (5.45 mmol) を薄黄色オイルとして得た。

[0109] 5,11-ジヒドロキシ 5-(6-ヒドロキシヘキシル)ウンデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボキシレート 430 mg (1.00 mmol) を 10 mL のジクロロメタンに溶解した。続いて、オレイン酸 706 mg (2.50 mmol)、DMAP 24.4 mg (0.20 mmol) および EDCI 671 mg (3.5 mmol) を加え、室温で 2 時間反応させた。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。ろ液を0.5 N水酸化ナトリウム水溶液および飽和食塩水で分液洗浄した。洗浄後の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、7-ヒドロキシ-7-（4-（（1-メチルピペリジン-4-カルボニル）オキシ）ブチル）トリデカン-1, 13-ジイル ジオレアート（CL15H6）569 mg（0.594 mmol）を薄黄色オイルとして得た。

[0110] （4）CL15F6の合成

ジクロロメタン1.5 mL中の5, 11-ジヒドロキシ5-（6-ヒドロキシヘキシル）ウンデシル 1-メチルピペリジン-4-カルボオキシレート85.9 mg（0.20 mmol）に2-ヘキシルデカノイルクロリド220 mg（0.80 mmol）を加え、氷上で冷却した。混合物にトリエチルアミン（TEA）139 μ L（1.00 mmol）を添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。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。ろ液を0.5 N水酸化ナトリウム水溶液および飽和食塩水で分液洗浄した。洗浄後の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、7-ヒドロキシ-7-（4-（（1-メチルピペリジン-4-カルボニル）オキシ）ブチル）トリデカン-1, 13-ジイル ビス（2-ヘキシルデカノアート）（CL15F6）116 mgを薄黄色オイルとして得た。

[0111] （5）CL1D6の合成

6-ブロモヘキサノ-1-オール20.0 g（110.5 mmol）を150 mLの1, 2-ジクロロエタンに溶解し、4℃に冷却した。tert-

ブチルジメチルクロロシラン (TBSCl) 18.0 g (120 mmol) を加えた後、トリエチルアミン (TEA) 19.5 mL (140 mmol) を滴下し、室温で一晩攪拌した。ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去し、ヘキサン 300 mL を加えて懸濁させ、セライト濾過によって不溶物を除去することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (溶離溶媒; ヘキサン: 酢酸エチル (連続勾配)) に供することにより精製して、((6-ブromoヘキシル) オキシ) (tert-ブチル) ジメチルシラン 26.0 g (88.0 mmol) を無色オイルとして得た。

[0112] 4 mL のジエチルエーテルに ((6-ブromoヘキシル) オキシ) (tert-ブチル) ジメチルシラン 1.2 g (4.06 mmol) を溶解し、削り屑状マグネシウム 2.43 g (100 mmol) を加え、続いてヨウ素 1 欠片を加えた。室温で 10 分静置した後、オイルバスで 40°C に加熱しながら攪拌し、21 mL のジエチルエーテルに溶解した ((6-ブromoヘキシル) オキシ) (tert-ブチル) ジメチルシラン 24.8 g (83.94 mmol) を滴下した。40°C で 2 時間反応させた後、4°C に冷却した。続いて、 δ -バレロラクトン 3.67 mL (39.6 mmol) を添加し、室温で一晩反応させた。次に、4°C に冷却し、5% 硫酸を滴下することで残留したマグネシウムを溶解させた。ジエチルエーテルで希釈し、有機層を水及び飽和食塩水で分液洗浄した。続いて、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; ヘキサン: 酢酸エチル (連続勾配)) に供することにより精製して、11-((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ)-5-(6-((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ) ヘキシル) ウンデカン-1, 5-ジオール 14.0 g (26.3 mmol) を無色オイルとして得た。

[0113] 11-((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ)-5-(6-((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ) ヘキシル) ウンデカン-1, 5-ジオール 14.0 g (26.3 mmol) を 50 mL のジクロロメタンに

溶解し、N, N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) 321 mg (2.63 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (DIEA) 5.50 mL (39.5 mmol) を加え、4℃に冷却した。続いて、p-トルエンスルホニルクロリド (pTSCl) 6.02 g (31.6 mmol) を徐々に加えた後、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、酢酸エチルで懸濁し、水およ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; ヘキサン: 酢酸エチル (連続勾配)) に供することにより精製して、11-((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ)-5-(6-((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ) ヘキシル)-5-ヒドロキシウンデシル 4-メチルベンゼンスルホネート 12.4 g (28.0 mmol) を無色オイルとして得た。

[0114] 11-((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ)-5-(6-((tert-ブチルジメチルシリル) オキシ) ヘキシル)-5-ヒドロキシウンデシル 4-メチルベンゼンスルホネート 8.78 g (12.78 mmol) に50 mLの2.0 Mジメチルアミンのテトラヒドロフラン (THF) 溶液を加え、室温で6日間反応させた。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、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液およ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、11-(4-(ジメチルアミノ) ブチル)-2, 2, 3, 3, 19, 19, 20, 20-オクタメチル-4, 18-ジオキサー-3, 19-ジシラヘニコサン-11-オール 6.20 g (11.07 mmol) を無色オイルとして得た。

[0115] 11-(4-(ジメチルアミノ) ブチル)-2, 2, 3, 3, 19, 19

, 20, 20-オクタメチル-4, 18-ジオキサー-3, 19-ジシラヘニコサン-11-オール6.20g (11.07 mmol) に酢酸1.90 mL (33.21 mmol) および24.4 mLの1.0Mテトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン溶液を加え、室温で2時間反応させた。ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去した後、逆相シリカゲルクロマトグラフィー（溶離溶媒；水（0.1%トリフルオロ酢酸）：アセトニトリル0.1%トリフルオロ酢酸（連続勾配））に供することにより精製して、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2.86g (8.63 mmol) を薄黄色オイルとして得た。

[0116] 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431mg (1.30 mmol) を5 mLのジクロロメタンに溶解し、パルミチン酸800mg (3.12 mmol) およびN, N-ジメチル-4-アミノピリジン（DMAP）31.8mg (0.26 mmol) を加え、続いて1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（EDCI）748mg (3.90 mmol) 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。ろ液を0.5N水酸化ナトリウム水溶液およ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、7-（4-（ジメチルアミノ）ブチル）-7-ヒドロキシトリデカン-1, 13-ジイル ジパルミテート（CL1D6）557mg (0.689 mmol) を薄黄色オイルとして得た。

[0117] (6) CL1H6の合成

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1.99g (6.0 mmol) を20 mLのジクロロメタンに溶解し、オレイン酸4.07g (14.4 mmol) およびN, N-ジメチル-4

ーアミノピリジン (DMAP) 147 mg (1.20 mmol) を加え、続いて 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI) 3.45 g (18.0 mmol) 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。ろ液を 0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液およ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 7-(4-(ジメチルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシトリデカン-1,13-ジイル ジオレエート (CL1H6) 2.56 g (2.98 mmol) を薄黄色オイルとして得た。

[0118] (7) 脂質ナノ粒子の調製および特性評価

非特許文献 11 に記載のマイクロ流路デバイス (iLiNP デバイス) を用いて、mRNA を包含する脂質ナノ粒子を調製した。iLiNP デバイスを用いて、上記 pH 感受性カチオン性脂質を主成分として含む脂質組成物のエタノール溶液 (有機相) を mRNA を含む酸性緩衝液 (pH 4) (水相) にすばやく混合することで (合計流量: 500 μ L/分)、脂質ナノ粒子を調製した。上記脂質組成物は、上記 pH 感受性カチオン性脂質以外に、リン脂質 (ヘルパーリン脂質)、コレステロールおよび PEG 修飾脂質も含んでいた。脂質の種類、窒素/リン酸 (N/P) 比、水性緩衝液の種類、水相と有機相の流量比を調整して、脂質ナノ粒子の物理化学的特性を制御した。その後、脂質ナノ粒子をアミコンフィルターユニットで濃縮し、媒質を 10 mM HEPES 緩衝液 (pH = 7.4) または PBS (pH = 7.4) に交換して、脂質ナノ粒子を生理的条件下に置いた。

[非特許文献 11] Niko Kimura, et al., "Development of the iLiNP Device: Fine Tuning the Lipid Nanoparticle Size within 10 nm for Drug Delivery", ACS Omega, Vol. 3, pp. 5044-5051.

[0119] 脂質ナノ粒子の平均粒子径、粒度分布、ゼータ電位を、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd、イギリス) を用いて動的光散乱法で測定し、脂質ナノ粒子の形態を、非特許文献12に記載されているように透過電子顕微鏡を用いて測定した。mRNAカプセル化の効率を、非特許文献13に記載されているようにRiboGreen蛍光測定法によって見積もった。pH感受性カチオン性脂質の種類や脂質ナノ粒子を構成する脂質の組成、脂質ナノ粒子の調製条件などによってそれぞれの値は変化するが、脂質ナノ粒子の平均粒子径は80～350nmの範囲内であり、PDIは0.05～0.4の範囲内であり、ゼータ電位は-16～+5mVの範囲内であり、mRNAのカプセル化の効率は75～95%であった。

[非特許文献12] Mahmoud A. Younis, et al., "A Multifunctional Lipid-Based Nanodevice for the Highly Specific Codelivery of Sorafenib and Midkine siRNA to Hepatic Cancer Cells", *Molecular Pharmaceutics*, Vol. 16, pp. 4031-4044.

[非特許文献13] Mahmoud M. Abd Elwakil, et al., "Engineered ϵ -decalactone lipomers bypass the liver to selectively in vivo deliver mRNA to the lungs without targeting ligands", *Materials Horizons*, Vol. 8, pp. 2251-2259.

[0120] また、脂質ナノ粒子の見かけのpKaを、6-p-Toluidino-2-naphthalenesulfonic acid (TNS) を用いて測定した(非特許文献14参照)。具体的には、96ウェルプレートの各ウェルにおいて、脂質ナノ粒子の脂質(0.5mM)およびTNS(0.6mM)を200 μ Lの緩衝液(20mMクエン酸緩衝液(pH3.50～5.50)、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.00～8.00)または20mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.00～9.00);各緩衝液は150mMNaClを含む)に添加し、混合した。このとき、脂質の最終濃度が30 μ M、TNSの最終濃度が6 μ Mとなるように調整した。その後、プレートリーダー(Enspire 2300 multilabel reader、Perkin Elmer)を用いて、37℃で蛍光(励起波長321nm、蛍

光波長447nm)を測定した。pKaは、最大蛍光強度の50%の蛍光強度を示すpH値とした。

[非特許文献14] Nour Shobaki, Yusuke Sato, and Hideyoshi Harashima, "Mixing lipids to manipulate the ionization status of lipid nanoparticles for specific tissue targeting", International Journal of Nanomedicine, Vol. 13, pp. 8395-8410.

[0121] 使用したpH感受性カチオン性脂質の種類と、脂質ナノ粒子の見かけのpKaとの関係を以下の表1に示す。

[表1]

pH感受性カチオン性脂質	見かけのpKa
CL1A6	8.20
CL1C6	8.30
CL1D6	8.15
CL1H6	8.00
CL4C6	6.30
CL4D6	6.40
CL4F6	6.00
CL4G6	6.28
CL4H6	6.25
CL7A6	5.85
CL7H6	5.96
CL15A6	7.30
CL15F6	6.75
CL15H6	7.24

[0122] 2. In vitroでの評価

調製した14種類の脂質ナノ粒子を活性化肝星細胞株LX-2 (Merck、ドイツ) および肝細胞株FL83B (ATCC、アメリカ) でスクリーニングした。

[0123] 実験の24時間前に、細胞を6ウェルプレートに 1×10^5 細胞/ウェルの

密度で播種し、37℃でインキュベートした。培地を吸引し、細胞を（－）PBSで洗浄した後、1.5 mLの成長培地中でEGFP mRNA（TriLink BioTechnologies、アメリカ）を包含する脂質ナノ粒子で24時間処理した。1ウェルあたりのmRNA量は250 ngとした。その後、細胞を（－）PBSで洗浄し、さらに21時間新鮮な培地中でインキュベートした。EGFPの蛍光強度の中央値およびトランスフェクト細胞の割合（％）を、フローサイトメーター（Cytoflex、Beckman Coulter、アメリカ）を用いて蛍光活性化セルソーティング（FACS）により評価した。

[0124] また、調製した脂質ナノ粒子の細胞に対する細胞毒性を、非特許文献12に記載されているようにMTTアッセイ（Abcam、イギリス）によって評価した。

[0125] 図2A～Cは、各種pH感受性カチオン性脂質を用いたEGFP mRNA包含脂質ナノ粒子の、LX-2細胞を用いたスクリーニングの結果を示すグラフ（N=3）である。図2Aは、pH感受性カチオン性脂質の種類とmRNA送達効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフであり、図2Bは、pH感受性カチオン性脂質の種類とトランスフェクション効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフ（*** $P<0.001$ ）であり、図2Cは、pH感受性カチオン性脂質の種類と細胞生存率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフである。

[0126] 図2Aに示されるように、LX-2細胞へのmRNA送達効率は、pH感受性カチオン性脂質の種類によって顕著な違いが見られた。一方、図2Bに示されるように、トランスフェクトされた細胞の割合（％）は、pH感受性カチオン性脂質の種類によってほとんど違いが見られなかった。図2Cに示されるように、ほとんどのpH感受性カチオン性脂質はLX-2細胞に許容され、細胞生存率は80％以上であった。

[0127] mRNA送達効率が高かった5種類のpH感受性カチオン性脂質（CL1D6、CL1H6、CL15A6、CL15F6、CL15H6）について、LX-2細胞（肝星細胞）およびFL83B細胞（肝細胞）に対する選択

性を評価した。

[0128] 図3A～Cは、各種pH感受性カチオン性脂質を用いたEGFP mRNA 包含脂質ナノ粒子の、LX-2細胞およびFL83B細胞に対するmRNA 送達の実験結果を示すグラフ（N=3）である。図3Aは、pH感受性カチオン性脂質の種類とmRNA送達効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフ（*** $P<0.001$ 、# $P<0.0001$ ）であり、図3Bは、pH感受性カチオン性脂質の種類とトランスフェクション効率との関係を示すグラフ（*** $P<0.001$ 、# $P<0.0001$ ）であり、図3Cは、pH感受性カチオン性脂質のpKaとmRNA送達効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフである。

[0129] 図3AおよびBに示されるように、選択された5つの脂質は、いずれもFL83B細胞に比べてLX-2細胞に高い選択性を示した。また、図3Cに示されるように、FL83B細胞に対してmRNAの送達効率が高い脂質のpKaは5.8～6.7であったのに対し、LX-2細胞に対してmRNAの送達効率が高い脂質のpKaは6.7以上8.2未満（6.75～8.15）であった。この違いは、脂質ナノ粒子のエンドソーム脱出能力だけでなく、血清中で形成されるタンパク質コロナの変化も関連している可能性がある。

[0130] 図3A～Cに示されるように、CL15A6は、in vitroにおいてHSC に対する有望なmRNA送達効率およびトランスフェクション効率を示した。そこで、CL15A6をin vivoでの最適化プロセスのモデル脂質として選択した。

[0131] 3. In vivoでの評価

チオアセトアミド（TAA（TCI、日本））誘発肝線維化モデルを4週齢のオスのBALB/cマウス（Sankyo laboratories, 日本）で作製した。具体的には、生理食塩水に溶解させたTAAを、体重1kgあたりのTAAの量が200mg/kgとなるように腹腔内注射した。これを3日ごとに合計10回行った。肝線維化モデルマウスの肝臓を病理組織学およびヒドロキ

シプロリン定量アッセイ (Cell Biolabs Inc、アメリカ) により確認するとともに、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (q R T - P C R) により肝星細胞 (H S C s) の活性化を確認した。

[0132] C L 1 5 A 6 を用いた脂質ナノ粒子には前述の E G F P m R N A またはホタルルシフェラーゼ (F L u c) m R N A (TriLink BioTechnologies、アメリカ) を包含させており、体重 1 k g あたりの R N A の量が 1 m g / k g となるように脂質ナノ粒子を尾静脈からマウスに静脈内投与した。投与してから 2 4 時間後に、非特許文献 1 5 に記載されているようにマウスの肝臓から肝星細胞および肝細胞を回収した。E G F P m R N A の場合は、前述のように F A C S により送達効率およびトランスフェクション効率を評価し、F L u c m R N A の場合は、非特許文献 1 6 に記載されているようにルシフェラーゼアッセイにより送達効率を評価した。

[非特許文献 1 5] Ingmar Mederacke, et al., "High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers", Nature Protocols, Vol. 10, pp. 305-315.

[非特許文献 1 6] Ikramy A. Khalil, et al., "Synergism between a cell penetrating peptide and a pH-sensitive cationic lipid in efficient gene delivery based on double-coated nanoparticles", Journal of Controlled Release, Vol. 275, pp. 107-116.

[0133] まず、マイクロ流路デバイス (i L i N P デバイス) を異なる条件で動作させ、平均粒子径が異なる脂質ナノ粒子を調製した。具体的には、平均粒子径が 1 5 0 n m 超 (例えば 1 8 0 n m) の脂質ナノ粒子と、平均粒子径が 1 0 0 ~ 1 5 0 n m (例えば 1 3 0 n m) の脂質ナノ粒子と、平均粒子径が 1 0 0 n m 未満 (例えば 9 0 n m) の脂質ナノ粒子とを調製した。調製した脂質ナノ粒子を肝線維化マウスに静脈内投与し、2 4 時間後に肝星細胞および肝細胞に対する m R N A の送達効率およびトランスフェクション効率を評価した。

[0134] 図 4 A は、C L 1 5 A 6 を用いた脂質ナノ粒子の粒子径と m R N A の送達

効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフ（ $N=3$ 、 $\#P<0.0001$ ）であり、図4Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子の粒子径とトランスフェクション効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフ（ $N=3$ 、 $\#P<0.0001$ ）である。これらのグラフに示されるように、脂質ナノ粒子の粒子径を小さくすると、肝星細胞に対するmRNAの送達効率およびトランスフェクション効率の両方が直線的に向上した。これは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子が、線維化肝臓の間質に富む微小環境を透過していることを示唆している。

[0135] 次に、CL15A6を含む脂質組成物とmRNAとを異なる比率で混合して、窒素／リン酸（N／P）比が異なる脂質ナノ粒子を調製した。具体的には、N／P比が4、8、12、16および20の脂質ナノ粒子を調製した。調製した脂質ナノ粒子を肝線維化マウスに静脈内投与し、24時間後に肝星細胞および肝細胞に対するmRNAの送達効率およびトランスフェクション効率を評価した。

[0136] 図5Aは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のN／P比とmRNAの送達効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフ（ $N=3$ 、*** $P<0.001$ 、 $\#P<0.0001$ ）であり、図5Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のN／P比とトランスフェクション効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフ（ $N=3$ 、 $\#P<0.0001$ ）である。これらのグラフに示されるように、N／P比を4から8に上げると、肝星細胞へのmRNA送達が顕著に向上した。これは、脂質ナノ粒子のエンドソーム脱出能力が向上したためであると考えられる。また、脂質ナノ粒子の平均粒子径が80nmに減少し、脂質ナノ粒子が線維性肝臓の間質バリアーを透過しやすくなったためとも考えられる。肝星細胞に対するN／P比の好ましい範囲は6～14（最適な範囲は8～12）であり、肝細胞に対するN／P比の最適値は12であった。一方、N／P比を16～20まで増加させると、送達効率が低下した。これは、カチオンを多く含むために、脂質ナノ粒子からのmRNAの放出が減少したことを示しているのかもしれない。

[0137] 次に、CL15A6を含む脂質組成物中のヘルパーリン脂質の種類を変えて、異なる種類のヘルパーリン脂質を含む脂質ナノ粒子を調製した。不飽和ホスホエタノールアミンとしては、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)を使用した。不飽和ホスファチジルコリンとしては、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(DOPC)を使用した。飽和リン脂質としては、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(DSPC)を使用した。調製した脂質ナノ粒子を肝線維化マウスに静脈内投与し、24時間後に肝星細胞および肝細胞に対するmRNAの送達効率およびトランスフェクション効率を評価した。

[0138] 図6Aは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のヘルパーリン脂質の種類とmRNAの送達効率(平均値±標準偏差)との関係を示すグラフ(N=3、*** $P<0.001$ 、# $P<0.0001$)であり、図6Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のヘルパーリン脂質の種類とトランスフェクション効率(平均値±標準偏差)との関係を示すグラフ(N=3、* $P<0.05$ 、# $P<0.0001$)である。これらのグラフに示されるように、DOPEは、他のヘルパーリン脂質と比較して肝星細胞へのmRNA送達を顕著に向上させた。これは、脂質ナノ粒子のエンドソーム脱出能力が向上したためであると考えられる。

[0139] 次に、ヘルパーリン脂質(DOPE)のモル比を変えて、異なる割合でヘルパーリン脂質(DOPE)を含む脂質ナノ粒子を調製した。調製した脂質ナノ粒子を肝線維化マウスに静脈内投与し、24時間後に肝星細胞および肝細胞に対するmRNAの送達効率およびトランスフェクション効率を評価した。

[0140] 図7Aは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のDOPEの割合とmRNAの送達効率(平均値±標準偏差)との関係を示すグラフ(N=3、*** $P<0.001$)であり、図7Bは、CL15A6を用いた脂質ナノ粒子のDOPEの割合とトランスフェクション効率(平均値±標準偏差)との関係

を示すグラフ（ $N=3$ ）である。これらのグラフに示されるように、D O P Eの割合を20～30モル%とした場合、特に30モル%とした場合に、肝星細胞へのm R N A送達が顕著に向上した。一方、コレステロールの割合を減らしてD O P Eの割合を40モル%とした場合、肝星細胞へのm R N A送達が減少した。これは、脂質ナノ粒子のエンドソーム脱出能力および／または安定性の違いにより、m R N A送達効率が変化することを示唆している。

[0141] 次に、C L 1 5 A 6を含む脂質組成物中のP E G修飾脂質である1, 2-ジミリスチル-*r a c*-グリセロール-3-メトキシポリエチレングリコール-2000（DMG-P E G 2 K）のモル比を変えて、異なる割合でP E G修飾脂質（DMG-P E G 2 K）を含む脂質ナノ粒子を調製した。調製した脂質ナノ粒子を肝線維化マウスに静脈内投与し、24時間後に肝星細胞および肝細胞に対するm R N Aの送達効率およびトランスフェクション効率を評価した。

[0142] 図8 Aは、C L 1 5 A 6を用いた脂質ナノ粒子のDMG-P E G 2 Kの割合とm R N Aの送達効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフ（ $N=3$ 、 $*P<0.05$ ）であり、図8 Bは、C L 1 5 A 6を用いた脂質ナノ粒子のDMG-P E G 2 Kの割合とトランスフェクション効率（平均値±標準偏差）との関係を示すグラフ（ $N=3$ 、 $*P<0.05$ ）である。これらのグラフに示されるように、DMG-P E G 2 Kの割合を3～5モル%とした場合に、肝星細胞へのm R N A送達効率が高かった。DMG-P E G 2 Kの割合を1.5モル%とした場合は、粒子径が大きく（ $\sim 100\text{ nm}$ ）なり、m R N A送達効率が低下した。図8 Bに示されるように、DMG-P E G 2 Kの割合を3～5モル%とした場合は、*in vivo*において肝星細胞の80%以上をトランスフェクトすることができた。これは、肝臓の困難な微小環境や肝星細胞がトランスフェクトしにくいことなどを考慮すると、非常によい結果である。

[0143] 以上の結果から、脂質ナノ粒子の脂質膜を構成する脂質は、C L 1 5 A 6、D O P E、コレステロールおよびP E G修飾脂質を含むことが好ましいこ

とがわかった。そこで、これらを5 : 3 : 2 : 0.3 (CL15A6 : DOPPE : コレステロール : DMG-PEG2K) のモル比で含む、平均粒子径が80 nm (PDI < 0.1) の脂質ナノ粒子を、この後の実験で使用する
こととした。図9Aは、この脂質ナノ粒子の構成を示す模式図であり、図9Bは、この脂質ナノ粒子の透過電子顕微鏡であり、図9Cは、この脂質ナノ粒子の粒度分布を示すグラフである。

[0144] 4. mRNA送達のコバスト性と肝内選択性

CL15A6を用いた脂質ナノ粒子の臨床応用性を確認するため、長さおよび塩基配列が異なり、異なるタンパク質をコードするmRNAを用いて、*in vivo*で肝星細胞へのmRNA送達効率および肝内選択性のコバスト性を検証した。

[0145] まず、上記実験で用いたEGFP mRNA (996塩基、緑色蛍光のEGFPタンパク質をコード) を、FLuc mRNA (1929塩基、生物発光のホタルルシフェラーゼをコード) またはmCherry mRNA (996塩基、赤色蛍光のmCherryタンパク質をコード) に置き換えて、脂質ナノ粒子を調製した。調製した脂質ナノ粒子を肝線維化マウスに静脈内投与し、24時間後に肝星細胞および肝細胞に対するmRNAの送達効率およびトランスフェクション効率を評価した。

[0146] また、肝臓内におけるmRNAの送達を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いて観察した。mCherry mRNA (TriLink BioTechnologies、アメリカ) を包含させた脂質ナノ粒子を、体重1 kgあたりのRNAの量が1 mg/kgとなるようにマウスに静脈内注射した。投与してから23.5時間後に、FITC標識イソレクチンB4 (FITC-IB4) (Vector laboratories、アメリカ) 50 μgをマウスに静脈内投与して血管を緑色に染色した。30分後、肝臓を(一) PBSで灌流し、摘出した。肝臓の組織切片を作製し、10 μg/mLのHoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific、アメリカ) で30分間染色し、核を青色に染色した。その後、組織切片をCLSM (ニコン、日本) で観察し、mCherry陽性細胞を赤色で可

視化した。

[0147] 図10Aは、FLuc mRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与した後の肝臓の肝星細胞および肝細胞のルシフェラーゼ活性（平均値±標準偏差）を示すグラフ（N=3、#P<0.0001）であり、図10Bは、mCherry mRNAを包含した脂質ナノ粒子を投与した後の肝臓の組織切片の蛍光観察像（スケールバー：100μm）である。図10Bはグレースケール化されているが、本来は各細胞の核が青色に見えており（大きい粒子が青色に見えている）、mCherryタンパク質を発現している細胞は赤色に見えており（核の周囲にある小さい粒子が赤色に見えている）、肝類洞内皮細胞は緑色に見えている（網状に連続している部分が緑色に見えている）。

[0148] 図10AおよびBに示されるように、肝星細胞に対する高いmRNA送達効率および肝内選択性は、いずれのmRNAを用いた場合で維持されていた。また、図10Bに示されるように、肝臓の類洞周囲領域の蛍光観察像において、mCherry陽性細胞が分散していることは、肝星細胞がトランスフェクションされていることを示唆している。さらに、mCherry陽性細胞がFITC染色をした血管系と異なる領域で観察されたことは、肝類洞内皮細胞がトランスフェクションされる可能性が低いことを示唆している。

[0149] 5. 生物学的安全性

CL15A6を用いた脂質ナノ粒子の臨床応用性をさらに確認するため、mRNAの投与量を多くした場合における生物学的安全性をin vivoで評価した。

[0150] 肝線維化が肝機能や組織に与える影響を除外するために、正常マウスを用いてCL15A6を用いた脂質ナノ粒子の生体安全性を評価した。EGFP mRNAを包含させた脂質ナノ粒子を、体重1kgあたりのRNAの量が2mg/kgとなるようにマウスに静脈内投与した。投与してから24時間後にマウスを安楽死させ、血清および主要臓器を採取し、HEPES緩衝液で処理した対照マウスと比較して解析した。血漿中の肝臓または腎臓の機能マーカーであるアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、アラニンアミ

ノトランスフェラーゼ（ALT）およびクレアチニン（CRE）について、市販キット（Sigma-Aldrich）を用いて比色定量を行い、その結果を比較した。また、採取した臓器を固定し、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色し、非特許文献17に記載されているように組織病理学的に評価した。

[非特許文献17] Mahmoud A. Younis, et al., "Ultra-small lipid nanoparticles encapsulating sorafenib and midkine-siRNA selectively-eradicate sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma in vivo", J Control Release, Vol. 331, pp. 335-349.

[0151] 図11Aは、脂質ナノ粒子を投与した後のマウスの主要臓器の組織像を示す写真であり、図11Bは、脂質ナノ粒子を投与した後のマウスの血清中の肝臓または腎臓の毒性マーカーの測定値（平均値±標準偏差）を示すグラフ（N=3）である。

[0152] 図11Aに示されるように、検査した主要な臓器（肝臓、肺、心臓、腎臓）には傷害の兆候は見られなかった。また、図11Bに示されるように、AST、ALTおよびCREのいずれについても有意な上昇が認められず、高用量のmRNAを投与したにもかかわらず毒性がないことが示唆された。

[0153] [実施例2]

実施例2では、肝星細胞にsiRNAを送達する実験を行った。

[0154] 1. siRNAを包含した脂質ナノ粒子の調製

(1) 脂質ナノ粒子の調製

siRNAの標的としては、Smoothened (SMO) 遺伝子のmRNAを選択した。Patched 1 (PTCH1) タンパク質は、SMOタンパク質を抑制することで、肝星細胞の活性化を阻害し、静止状態 (qHSC) にする。肝臓が損傷した場合、傷害を受けた肝細胞から放出されるヘッジホッグリガンド (SHH、IHH、DHH) は、PTCH1を阻害することでSMOを活性化する。SMOは、グリオーマ関連転写因子 (GLI) を刺激し、静止HSC (qHSC) を、コラーゲンの産生と肝線維症の進行に関与する活性化肝星細胞 (aHSC) に変化させる。SMO遺伝子は、aHSCで過剰発現し

ており、a H S C の特徴的なマーカーであると考えられている。

[0155] 脂質ナノ粒子を構成するpH感受性カチオン性脂質としては、実施例1において肝星細胞に対して優れたmRNA送達効率およびトランスフェクション効率を示したCL15A6およびCL15H6を選択した。

[0156] 実施例1と同様の手順で、iLiNPデバイスを用いて、上記pH感受性カチオン性脂質を主成分として含み、以下の表2に示す配列を有するSMO-siRNA（配列番号1および2）を包含する脂質ナノ粒子を調製した。脂質ナノ粒子を構成する脂質は、pH感受性カチオン性脂質（CL15A6またはCL15H6）、DOPE、コレステロールおよびDMG-PEG2Kを5：3：2：0.3のモル比で含んでいた。

[表2]

配列番号		配列（5'→3'）
1	SMO-siRNA Sense	GGA GUC AUG ACU CUG UUC U[dT][dT]
2	SMO-siRNA Anti-sense	AGA ACA GAG UCA UGA CUC C[dT][dT]

[dT] = 2'-Deoxythymidine

[0157] 実施例1と同様の手順で、脂質ナノ粒子の平均粒子径、粒度分布およびゼータ電位を測定し、SMO-siRNAカプセル化の効率を見積もった。pH感受性カチオン性脂質としてCL15H6を使用した場合における、水相と有機相の流量比と、当該流量比で調製された脂質ナノ粒子の平均粒子径と、粒度分布、ゼータ電位およびSMO-siRNAカプセル化効率との関係を以下の表3に示す。以後の実験では、カプセル化効率が最も高く、平均粒子径が最も小さく、かつPDIが最も小さかった4：1（水相：有機相）で脂質ナノ粒子を調製した。

[表3]

水相：有機相	平均粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)	カプセル化効率 (%)
2:1	135.72	0.280	-6.81	66.12
3:1	72.5	0.192	-3.75	92.33
4:1	53.45	0.093	-3.35	94.06
5:1	57.12	0.169	-5.08	89.19
9:1	58.53	0.217	-8.2	75.55

[0158] また、実験 1 と同様の手順で、脂質ナノ粒子の見かけの pK_a を測定した。その結果、 pH 感受性カチオン性脂質として CL 15 A 6 を使用した脂質ナノ粒子の pK_a は 7.30 であった。また、 pH 感受性カチオン性脂質として CL 15 H 6 を使用した脂質ナノ粒子の pK_a は 7.24 であった。

[0159] 2. In vivo での評価

実施例 1 と同様の手順で作製した TAA 誘発肝線維化モデルマウスに、SMO-siRNA 包含脂質ナノ粒子を、体重 1 kg あたりの RNA の量が 0.5 mg/kg となるように尾静脈からマウスに静脈内投与した。投与してから 24 時間後に、マウスの肝臓を回収した。qRT-PCR により、肝臓組織における GAPDH mRNA の量に対する SMO mRNA の量の割合を確認した。なお、SMO 遺伝子は、肝臓中では肝星細胞でのみ発現する。

[0160] 図 12 は、CL 15 A 6 を用いた脂質ナノ粒子を投与した場合の SMO mRNA の量の割合、CL 15 H 6 を用いた脂質ナノ粒子を投与した場合の SMO mRNA の量の割合、脂質ナノ粒子の代わりに HEPES 緩衝液を投与した場合の SMO mRNA の量の割合（コントロール）を示すグラフ（ $N=3$ 、 $\#P<0.0001$ ）である。このグラフに示されるように、いずれの pH 感受性カチオン性脂質を用いた場合も、SMO mRNA の量が顕著に減少した。これは、CL 15 A 6 または CL 15 H 6 を用いた脂質ナノ粒子が、in vivo で SMO 遺伝子の発現を抑制できたことを示唆している。

[0161] CL 15 A 6 を用いた脂質ナノ粒子については実施例 1 で評価したので、実施例 2 の以後の実験では CL 15 H 6 を用いた脂質ナノ粒子を用いること

とした。

[0162] 次に、CL15H6を含む脂質組成物とSMO-siRNAとを異なる比率で混合して、窒素／リン酸（N／P）比が異なる脂質ナノ粒子を調製した。具体的には、N／P比が0.5、1、2、4、8、12、16および20の脂質ナノ粒子を調製した。調製した脂質ナノ粒子を肝線維化マウスに体重1kgあたりのRNAの量が0.5mg/kgとなるように静脈内投与し、24時間後に肝臓組織におけるGAPDH mRNAの量に対するSMO mRNAの量の割合を確認した。

[0163] 図13は、CL15H6を用いた脂質ナノ粒子のN／P比とSMO mRNAの量の割合との関係を示すグラフ（N=3、 $\#P<0.0001$ （N／P=0.5～1、2に対するN／P=4～8）、*** $P<0.001$ （N／P=20に対するN／P=8）、** $P<0.01$ （N／P=12に対するN／P=8））である。実施例1で示したように、mRNAの送達ではN／P比の好ましい範囲は6～14（最適な範囲は8～12）であったが（図5A参照）、siRNAの送達ではN／P比の好ましい範囲は4～8であった。おそらく、N／P比を4未満まで減少させると脂質ナノ粒子のエンドソーム脱出能力が不十分となり、N／P比を8超まで増加させると細胞内におけるsiRNAの放出が阻害されると考えられる。以後の実験では、N／P比を、SMO mRNAの量が最も少なくなった4とした。

[0164] 次に、SMO-siRNAの投与量と、肝臓組織におけるGAPDH mRNAの量に対するSMO mRNAの量の割合との関係を調べた。比較のため、コントロールのsiRNA（siCtrl）の投与量と、肝星細胞におけるGAPDH mRNAの量に対するSMO mRNAの量の割合との関係も調べた。

[0165] 図14は、CL15H6を用いた脂質ナノ粒子の用量反応曲線を示すグラフ（N=3、 $\#P<0.0001$ ）である。このグラフに示されるように、SMO-siRNAを投与した場合の50%効果用量（ED₅₀）は0.08mg/kg以下であり、この脂質ナノ粒子が高い効力を有することが示され

た。以後の実験では、SMO-s iRNAの投与量を、SMO mRNAの量が最も少なくなった0.25 mg/kgとした。

[0166] 3. 肝線維化の治療

前述のとおり、肝線維化は、肝臓の損傷に反応して発症し、肝細胞の損傷とクッパー細胞の活性化を引き起こす。損傷した肝細胞はヘッジホッグリガンド(Hh)を放出し、肝星細胞のSMOシグナル経路を活性化し、肝星細胞を活性化させる。活性化されたクッパー細胞は、トランスフォーミング増殖因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)を放出する。TGF $\beta 1$ は、肝星細胞のTGF $\beta 1$ シグナル経路を活性化し、肝星細胞をさらに活性化させる。したがって、SMO遺伝子およびTGF $\beta 1$ 遺伝子を同時にノックダウンすることで、HSCを不活性化し、静止状態にすることが期待される。そこで、CL15H6を用いた脂質ナノ粒子を用いて、SMO遺伝子およびTGF $\beta 1$ 遺伝子を同時にノックダウンすることを試みた。

[0167] SMO遺伝子のmRNAを標的とする前述のs iRNA(SMO-s iRNA; 配列番号1および2)およびTGF $\beta 1$ 遺伝子のmRNAを標的とする以下の表4に示す配列を有するs iRNA(TGF $\beta 1$ -s iRNA; 配列番号3および4)を1:1の比率で含むs iRNAの混合物を包含する、CL15H6を用いた脂質ナノ粒子を調製した。調製した脂質ナノ粒子を、肝線維化マウスに体重1 kgあたりのSMO-s iRNAの量およびTGF $\beta 1$ -s iRNAの量がそれぞれ0.25 mg/kgとなるように静脈内投与し、24時間後に肝臓組織におけるGAPDH mRNAの量に対するSMO mRNAの量の割合およびTGF $\beta 1$ mRNAの量の割合を確認した。

[表4]

配列番号		配列 (5'→3')
3	TGF $\beta 1$ -siRNA Sense	GCU GUA CAU UGA CUU UAG G[dT][dT]
4	TGF $\beta 1$ -siRNA Anti-sense	CCU AAA GUC AAU GUA CAG C[dT][dT]

[dT] = 2'-Deoxythymidine

[0168] 図15は、CL15H6を用いた脂質ナノ粒子を投与した場合の標的遺伝子のmRNAの量の割合、脂質ナノ粒子の代わりにHEPES緩衝液を投与した場合の標的遺伝子のmRNAの量の割合（コントロール）を示すグラフ（ $N=3$ 、 $\#P<0.0001$ ）である。このグラフに示されるように、SMO-siRNAおよびTGF β 1-siRNAを組み合わせることでSMO遺伝子およびTGF β 1遺伝子を同時にノックダウンすることができた。

[0169] 次に、2種類のsiRNAを包含するCL15H6を用いた脂質ナノ粒子を、体重1kgあたりのsiRNAの量がそれぞれ0.25mg/kgとなるように、肝線維化マウスに3日ごとに合計5回静脈内投与した。最後の投与をしてから3日後にマウスの肝臓を回収した。siRNAとしては、2種類のコントロールsiRNAの組み合わせ（siCtrl）と、SMO-siRNAおよびコントロールsiRNAの組み合わせ（SMO-siRNA）と、TGF β 1-siRNAおよびコントロールsiRNAの組み合わせ（TGF β 1-siRNA）と、SMO-siRNAおよびTGF β 1-siRNAの組み合わせ（siCocktail）とを用いた。

[0170] 図16は、それぞれの脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓の写真である。この写真からわかるように、SMO-siRNAおよびTGF β 1-siRNAの組み合わせ（siCocktail）を投与したマウスの肝臓は、他の組み合わせを投与したマウスの肝臓よりも健常なマウスの肝臓に近い外観を示していた。具体的には、他の組み合わせを投与したマウスの肝臓では、肝臓内に存在する多数の結節に起因して、肝臓の表面が微細な凹凸状であったが、SMO-siRNAおよびTGF β 1-siRNAの組み合わせ（siCocktail）を投与したマウスの肝臓では、結節が減少しており、肝臓の表面が平滑であった。

[0171] また、回収した肝臓の切片を作製した。一部の切片を、aHSCを検出するために抗 α 平滑筋アクチン（ α -SMA）抗体で染色し、HSC中のaHSCの割合を計測した。また、他の一部の切片を、コラーゲン線維を検出するためにマッソントリクローム染色をし、視野内におけるコラーゲンの面積

の割合を計測した。

[0172] 図17Aは、各マウスの肝臓の切片の抗 α -SMA抗体の染色像である。図17Aにおいて、CVは中心静脈を示し、矢印は α -SMA陽性の細胞を示し、スケールバーは100 μ mを示している。図17Bは、各マウスの肝臓におけるaHSCの割合を示すグラフ(N=5、**P<0.01(s i C n t r lまたはs i C o c k t a i lに対するSMO-s i RNAまたはTGF β 1-s i RNA)、#P<0.0001(s i C n t r lに対するs i C o c k t a i l))である。

[0173] 図18Aは、各マウスの肝臓の切片のマッソントリクローム染色像である。図18Aにおいて、矢印はコラーゲン線維を示し、スケールバーは100 μ mを示している。図18Bは、各マウスの肝臓について視野内におけるコラーゲンの面積の割合を示すグラフ(N=5、#P<0.0001(s i C n t r lに対するSMO-s i RNA、TGF β 1-s i RNAまたはs i C o c k t a i l)、*P<0.05(SMO-s i RNAまたはTGF β 1-s i RNAに対するs i C o c k t a i l))である。

[0174] 図17AおよびBに示されるように、コントロールs i RNAのみを投与したマウスの肝臓ではaHSCの割合が高かったのに対し、SMO-s i RNAまたはTGF β 1-s i RNAを投与したマウスの肝臓では顕著にaHSCの割合が減少した。さらに、SMO-s i RNAおよびTGF β 1-s i RNAの組み合わせ(s i C o c k t a i l)を投与したマウスの肝臓では劇的にaHSCの割合が減少した。

[0175] 図18AおよびBに示されるように、コントロールs i RNAのみを投与したマウスの肝臓ではコラーゲン線維が多く存在していたのに対し、SMO-s i RNA、TGF β 1-s i RNAまたはこれらの組み合わせを投与したマウスの肝臓では劇的にコラーゲン線維が減少した。特に、SMO-s i RNAおよびTGF β 1-s i RNAの組み合わせ(s i C o c k t a i l)を投与したマウスの肝臓において最もコラーゲン線維が減少した。

[0176] これらのマウスの血清中の炎症性サイトカイン(インターロイキン-6(

IL-6) および腫瘍壊死因子- α (TNF- α) の濃度をELISA法で測定した。図19Aは、各マウスの血清中のIL-6の濃度を示すグラフであり、図19Bは、各マウスの血清中のTNF- α の濃度を示すグラフである (N=5、*P<0.05、#P<0.0001)。

[0177] 図19AおよびBに示されるように、SMO-siRNAまたはTGF β 1-siRNAの一方のみを投与したマウスでは、炎症性サイトカインの量は少ししか減少しなかったが、これらの組み合わせを投与したマウスでは、炎症性サイトカインの量が健康な状態に近い値まで顕著に減少した。このことは、SMO-siRNAおよびTGF β 1-siRNAの組み合わせには顕著な抗炎症効果があることを示唆する。また、2元配置分散分析 (two-way ANOVA) による統計的検証の結果、SMO-siRNAおよびTGF β 1-siRNAがIL-6およびTNF- α の両方に対して相乗的な抗炎症効果を持つことが示唆された。

[0178] さらに、これらのマウスの血清中の肝機能マーカー (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP) および総ビリルビン (T-BIL)) の濃度を測定した。

[0179] 図20Aは、各マウスの血清中のASTの濃度を示すグラフであり (N=5、*P<0.05、***P<0.001 (siCtrlに対するsiCocktail)、**P<0.01 (SMO-siRNAまたはTGF β 1-siRNAに対するsiCocktail))、図20Bは、各マウスの血清中のALTの濃度を示すグラフである (N=5、*P<0.05 (siCtrlに対するSMO-siRNAまたはTGF β 1-siRNA、およびsiCocktailに対するSMO-siRNAまたはTGF β 1-siRNA)、**P<0.01 (siCtrlに対するsiCocktail))。図21Aは、各マウスの血清中のALPの濃度を示すグラフであり (N=5、*P<0.05 (siCtrlに対するsiCocktail))、図21Bは、各マウスの血清中のT-BILの濃度を示すグ

ラフである ($N=5$ 、 $*P<0.05$ (s i C n t r l に対する s i C o c k t a i l))。

[0180] 図20A～図21Bに示されるように、SMO-s i R N A または T G F $\beta 1$ -s i R N A の一方のみを投与したマウスでは、肝機能は部分的に改善したが、完全には回復しなかった。一方、これらの組み合わせを投与したマウスでは、肝機能が健康な状態に近いレベルまで回復した。

[0181] なお、本実験で用いたSMO-s i R N A および T G F $\beta 1$ -s i R N A の配列 (配列番号1～4) は一例であり、他の配列でも同様の効果を得ることができる。

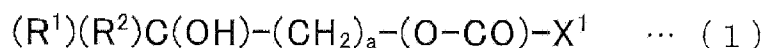
[0182] 本出願は、2022年7月29日出願の特願2022-121626に基づく優先権を主張する。当該出願明細書および図面に記載された内容は、すべて本願明細書に援用される。

産業上の利用可能性

[0183] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、R N A などの目的物質を肝星細胞に効率よく送達することができるため、肝線維症などの肝星細胞が関与する疾患の治療または予防のための医薬などに有用である。また、本発明に係る医薬組成物および方法は、肝線維症の予防または治療に有用である。

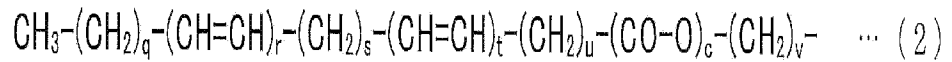
請求の範囲

- [請求項1] 肝星細胞に目的物質を送達するための脂質ナノ粒子であって、
親水性部および2つの疎水性部を有するpH感受性カチオン性脂質
を含み、
前記脂質ナノ粒子を構成する脂質膜の酸解離定数pKaは、6.7
以上8.2未満である、
脂質ナノ粒子。
- [請求項2] 前記親水性部は、カルボニル基に結合している5～7員非芳香族ヘ
テロ環基を含む、請求項1に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項3] 前記2つの疎水性部は、それぞれ独立に、
炭素数が4～12のアルキレン基と、
前記アルキレン基に結合した、0～2個の不飽和結合を有する炭素
数が8～18の飽和または不飽和の脂肪族基、または0～2個の不飽
和結合を有する炭素数が10～24の直鎖状または分岐鎖状の飽和ま
たは不飽和の脂肪酸エステル基と、
を含む、請求項2に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項4] 前記親水性部は、イオン化可能な第3級アミノ基を末端に含み、
前記2つの疎水性部は、それぞれ独立に、
炭素数が4～12のアルキレン基と、
前記アルキレン基に結合した、炭素数が15以上の脂肪酸エステル
基と、
を含む、
請求項1に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項5] 前記pH感受性カチオン性脂質は、下記一般式(1)：
- [化1]



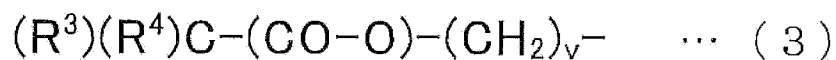
(式(1)中、 a は3～5の整数を示し； R^1 および R^2 はそれぞれ独立に下記一般式(2)：

[化2]



(式(2)中、 q は1～9の整数を示し； r は0または1を示し； s は1～3の整数を示し； t は0または1を示し； u は1～8の整数を示し； c は0または1を示し； v は4～12の整数を示す)で表される基、または下記一般式(3)：

[化3]



(式(3)中、 R^3 および R^4 はそれぞれ独立に C_{3-11} アルキル基であり、 v は4～12の整数を示す)で表される基を示し； X^1 は5～7員非芳香族ヘテロ環基(ただし、当該基は炭素原子により($\text{O}-\text{C}-\text{O}$)-に結合し、当該環上には1または2個の C_{1-4} アルキル基または C_{2-4} アルケニル基が置換していてもよい)を示す)で表される、請求項3に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項6]

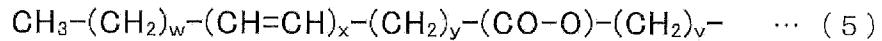
前記pH感受性カチオン性脂質は、下記一般式(4)：

[化4]



(式(4)中、 a は3～5の整数を示し； R^5 および R^6 はそれぞれ独立に下記一般式(5)：

[化5]



(式(5)中、 w は1～15の整数を示し； x は0または1を示し； y は1～15の整数を示し； v は4～12の整数を示す)で表される基を示し； X^2 はイオン化可能な第3級アミノ基を示す)で表される、請求項4に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項7] 前記 X^1 は、1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、または1-ピペラジニル基(ただし、当該1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、または1-ピペラジニル基は、1個の C_{1-4} アルキル基で置換されていてもよい)である、請求項5に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項8] 前記脂質ナノ粒子を構成する脂質膜の酸解離定数 pK_a は、6.7～7.4の範囲内である、請求項1～7のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項9] 動的光散乱法により測定された個数平均粒子径が100nm以下である、請求項1～8のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項10] 前記脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対する前記 pH 感受性カチオン性脂質の割合が、20モル%以上である、請求項1～9のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項11] 前記脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対して20～30モル%のホスホエタノールアミン基を含むリン脂質と、

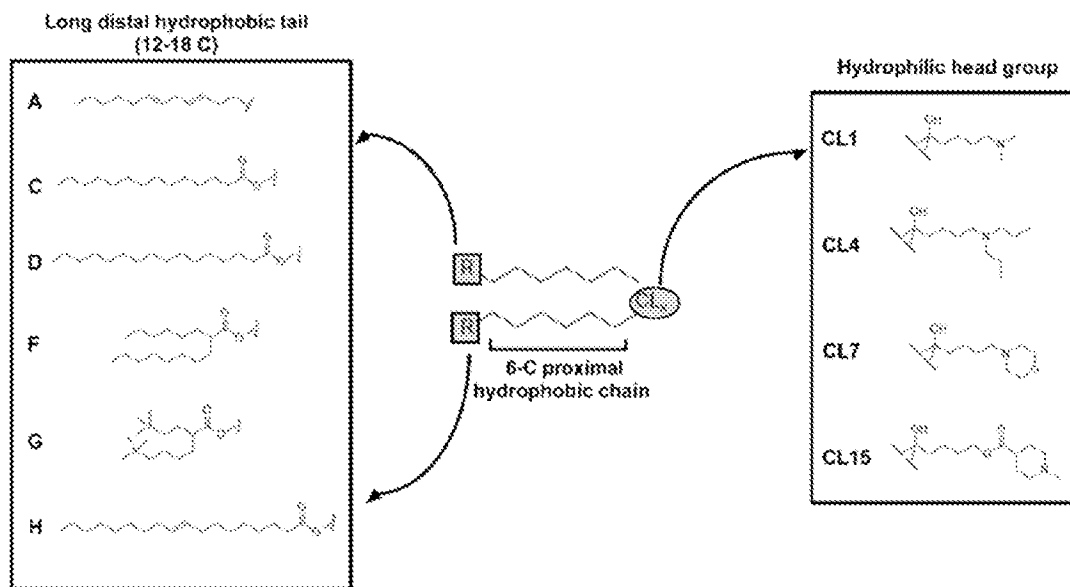
前記脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対して20～30モル%のコレステロールと、

前記脂質ナノ粒子を構成する全脂質に対して3～5モル%のポリアルキレングリコール修飾脂質と、

をさらに含む、請求項10に記載の脂質ナノ粒子。

- [請求項12] 前記目的物質は、RNAである、請求項1～11のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項13] 前記目的物質は、mRNAであり、
前記脂質ナノ粒子の窒素／リン酸比は、6～14の範囲内である、
請求項12に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項14] 前記目的物質は、siRNAであり、
前記脂質ナノ粒子の窒素／リン酸比は、4～8の範囲内である、
請求項12に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項15] 肝星細胞に結合するためのリガンドを含まない、請求項1～14のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項16] 肝星細胞への送達選択性を有する脂質ナノ粒子と、
前記脂質ナノ粒子に包含された、SMO遺伝子またはSMOタンパク質の発現を抑制するか、またはSMOタンパク質を阻害する第1物質と、
前記脂質ナノ粒子に包含された、TGF β 1遺伝子またはTGF β 1タンパク質の発現を抑制するか、またはTGF β 1タンパク質を阻害する第2物質と、
を含む、肝線維化を予防または治療するための医薬組成物。
- [請求項17] 前記脂質ナノ粒子は、請求項1～15のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子である、請求項16に記載の医薬組成物。
- [請求項18] 前記第1物質は、SMO遺伝子の発現を抑制することができる、siRNA、miRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはCRISPR-Casのコンポーネントであり、
前記第2物質は、TGF β 1遺伝子の発現を抑制することができる、siRNA、miRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはCRISPR-Casのコンポーネントである、
請求項16または請求項17に記載の医薬組成物。

[図1]



[図2]

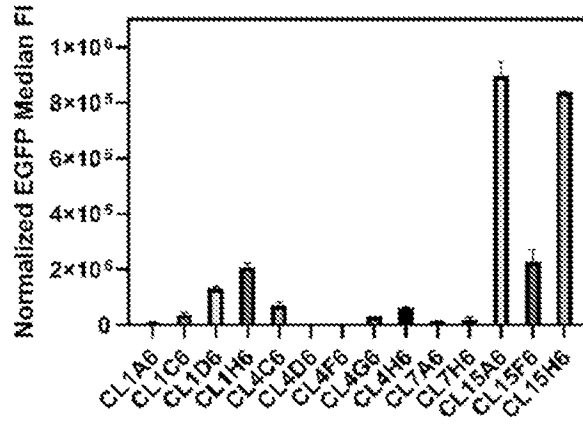


図2A

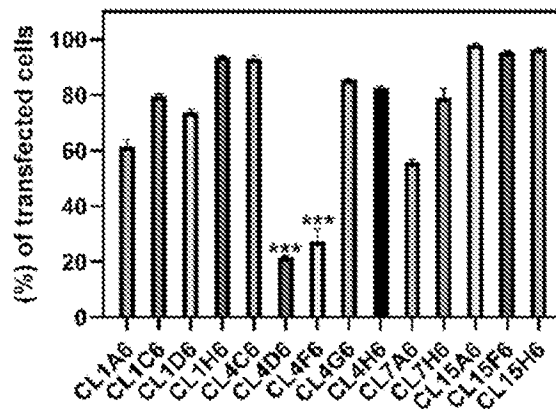


図2B

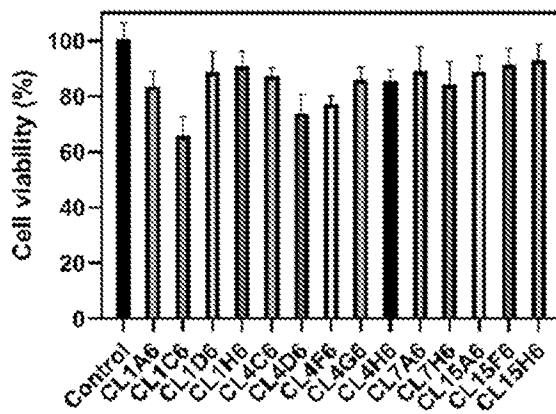


図2C

[図3]

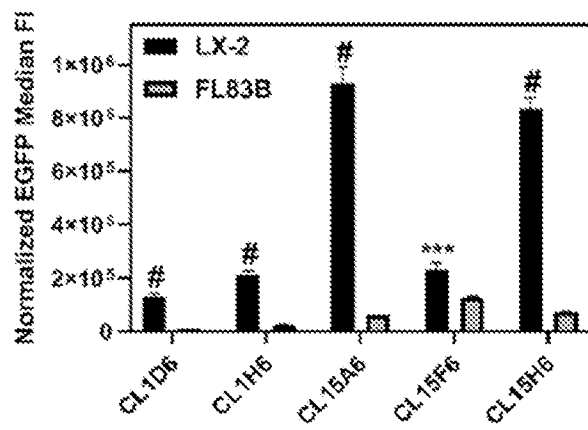


図3A

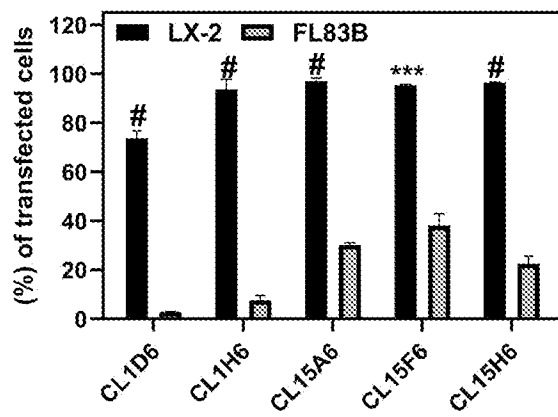


図3B

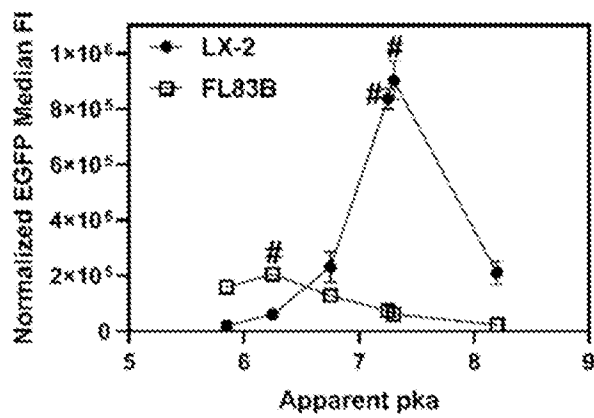


図3C

[図4]

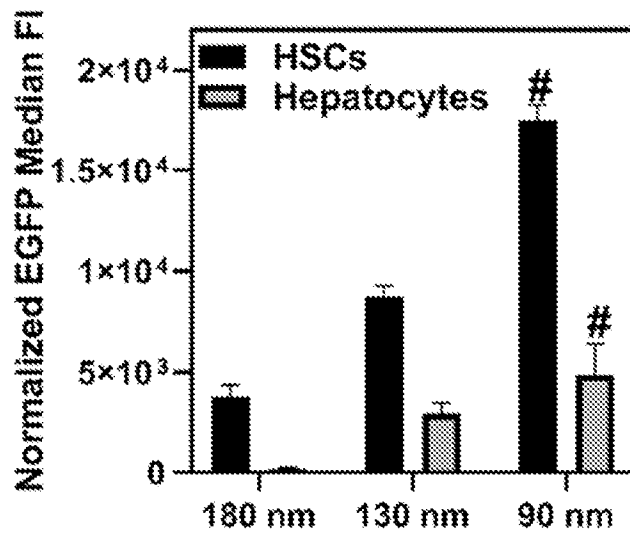


図4A

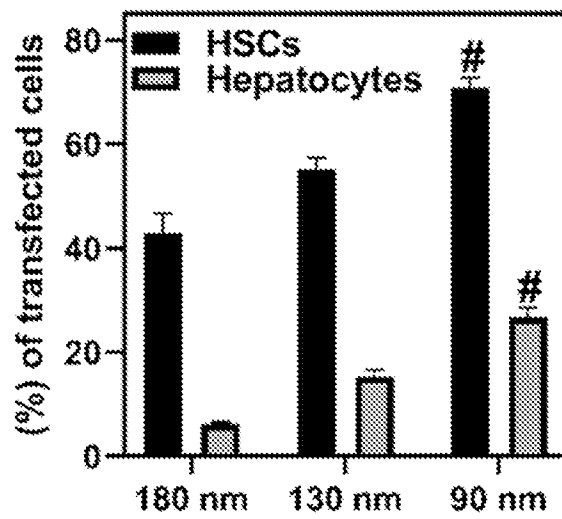


図4B

[図5]

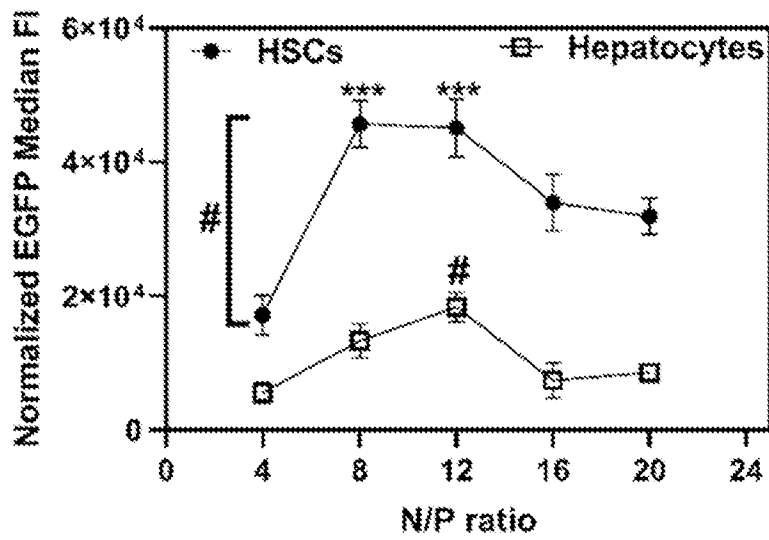


図5A

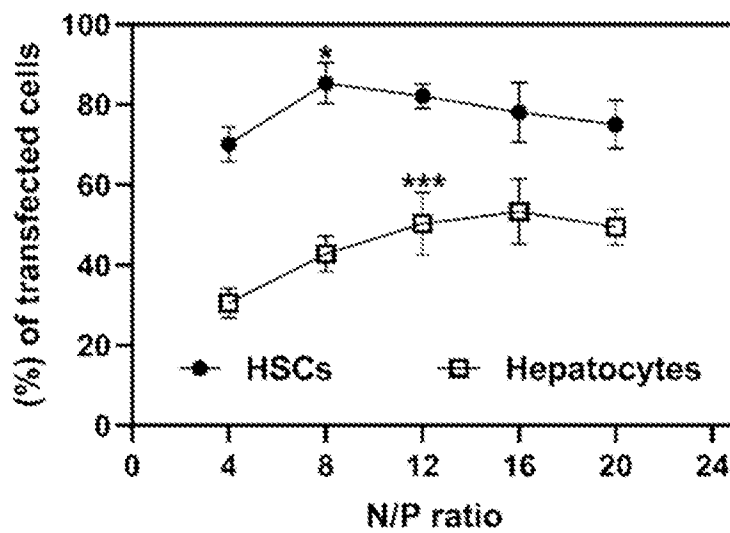


図5B

[図6]

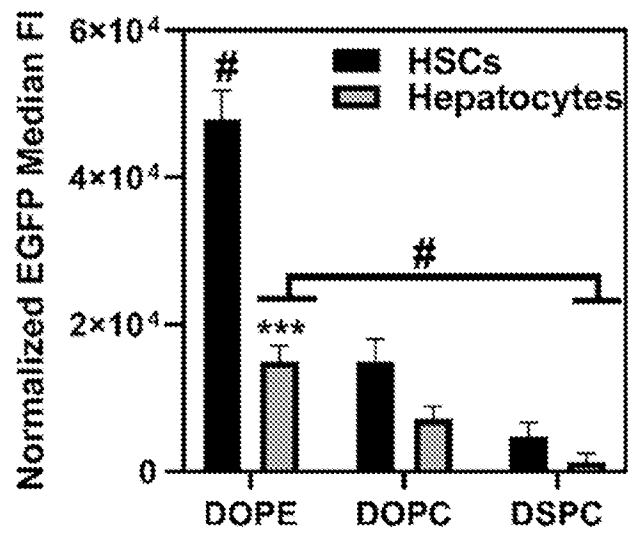


図6A

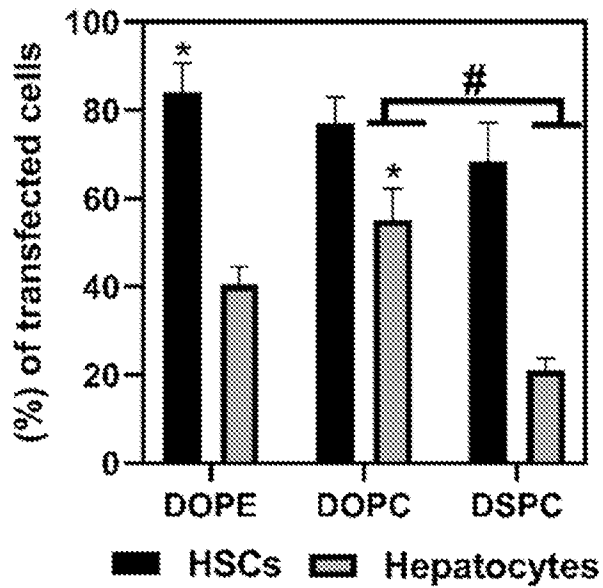


図6B

[図7]

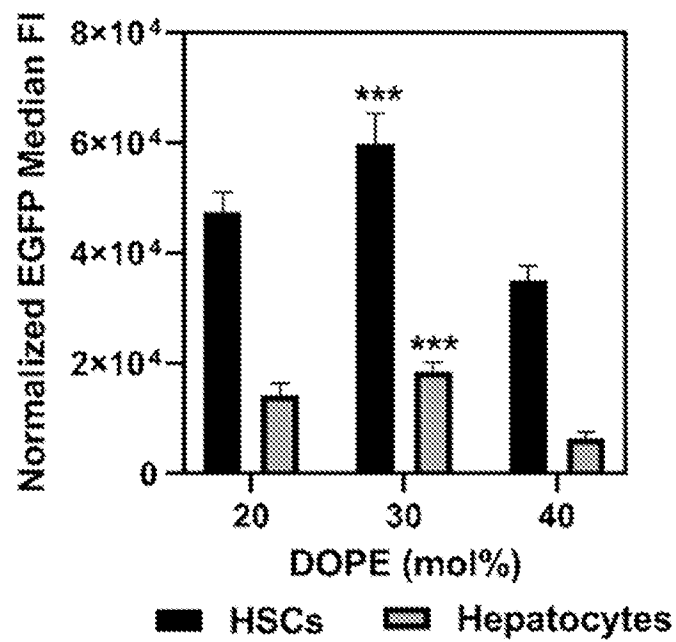


図7A

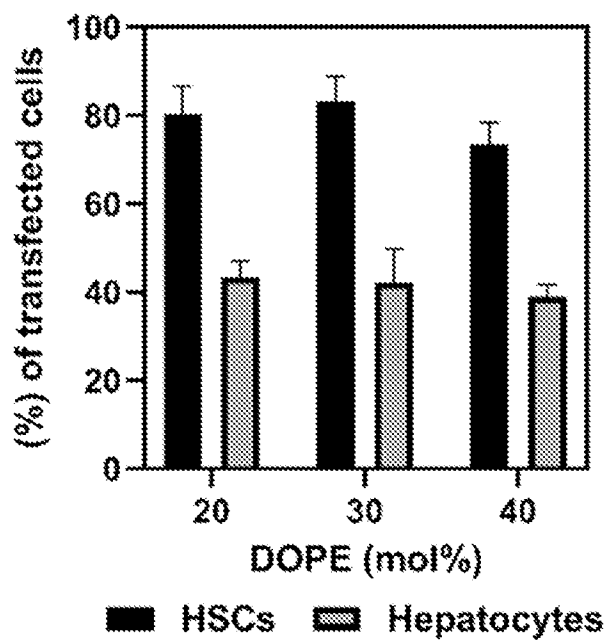


図7B

[図8]

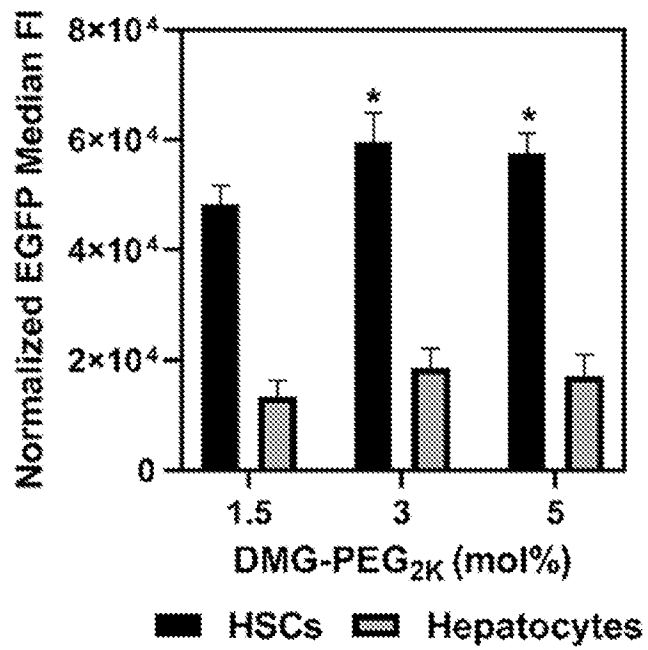


図8A

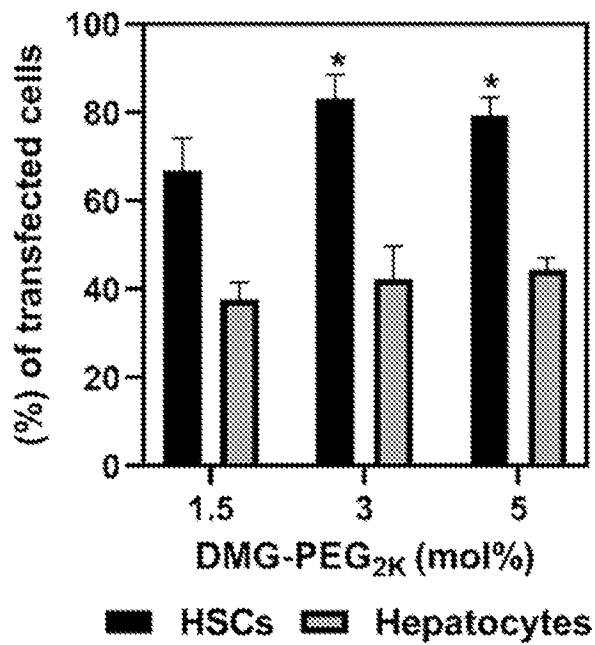


図8B

[図9]

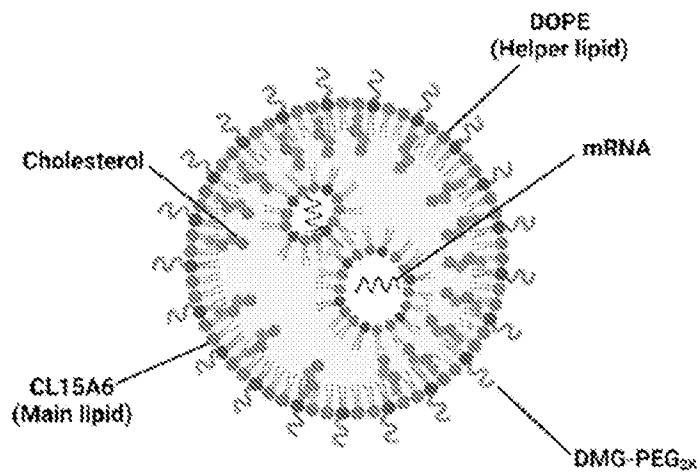


図9A

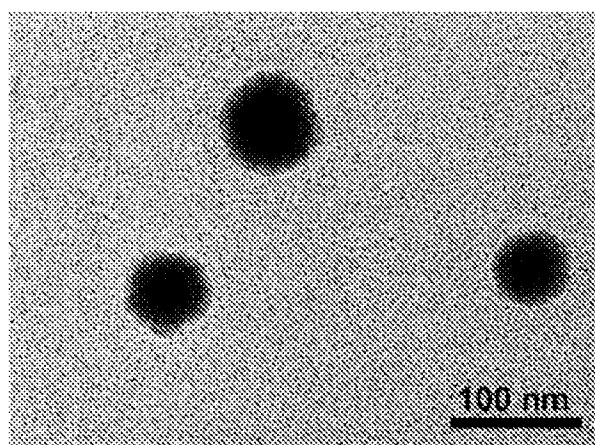


図9B

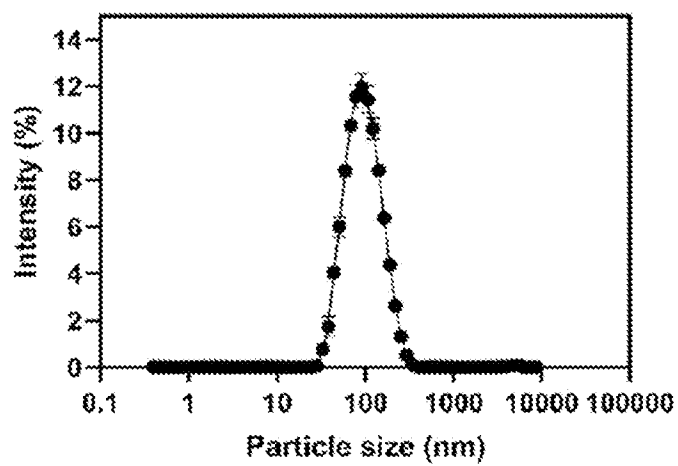
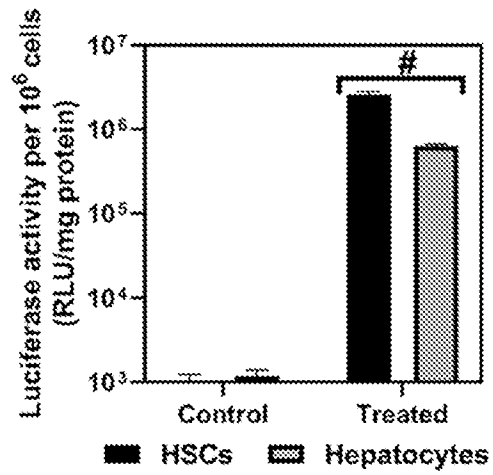
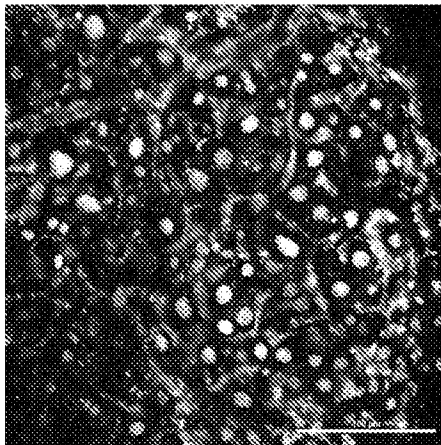


図9C

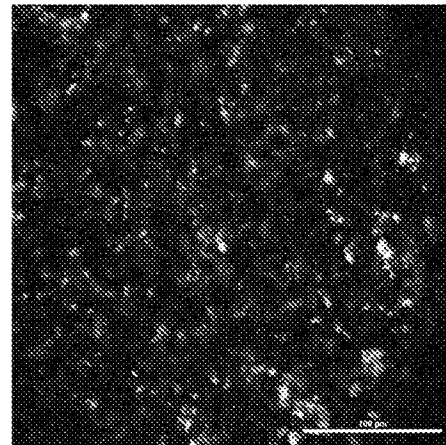
[図10]



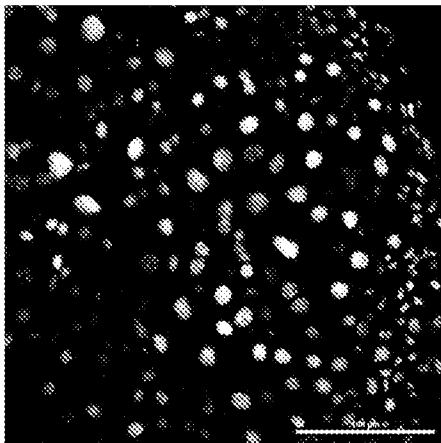
[図10A]



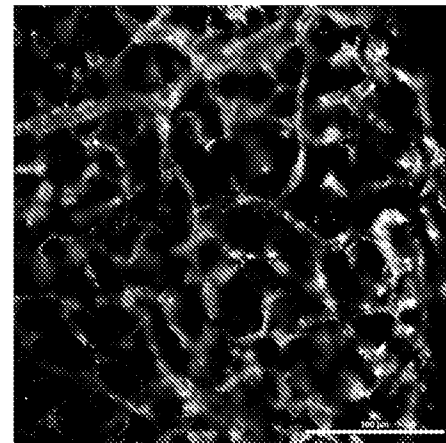
Merge



mCherry (red)



Hoechst 33342 (blue)



FITC (green)

[図10B]

[図11]

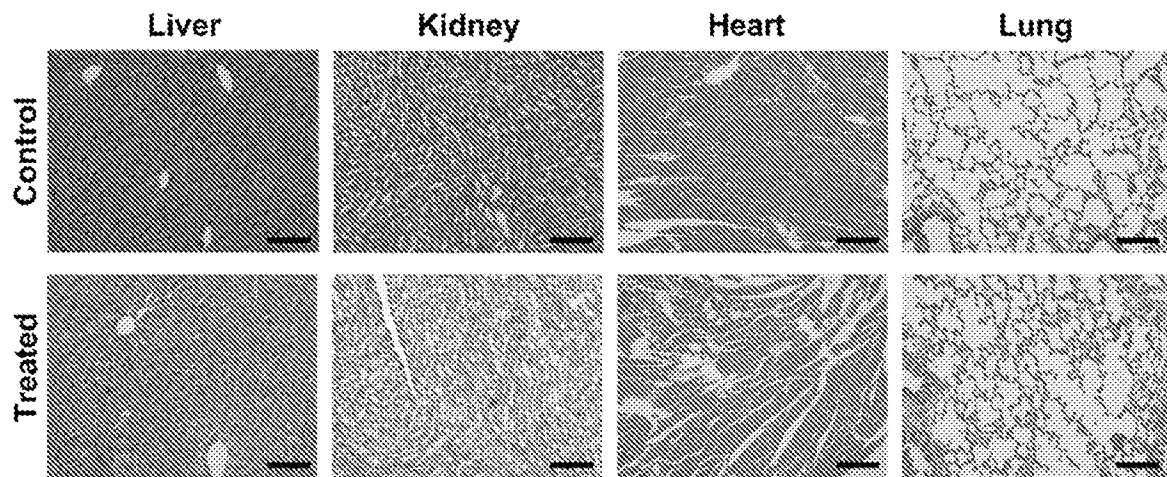


図11A

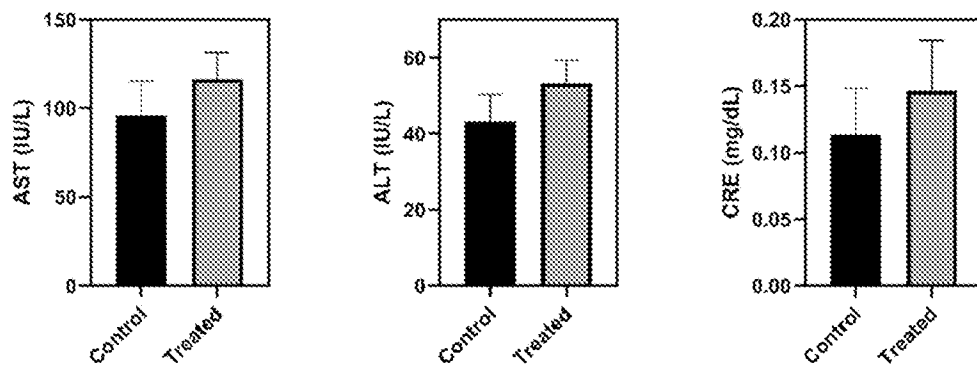
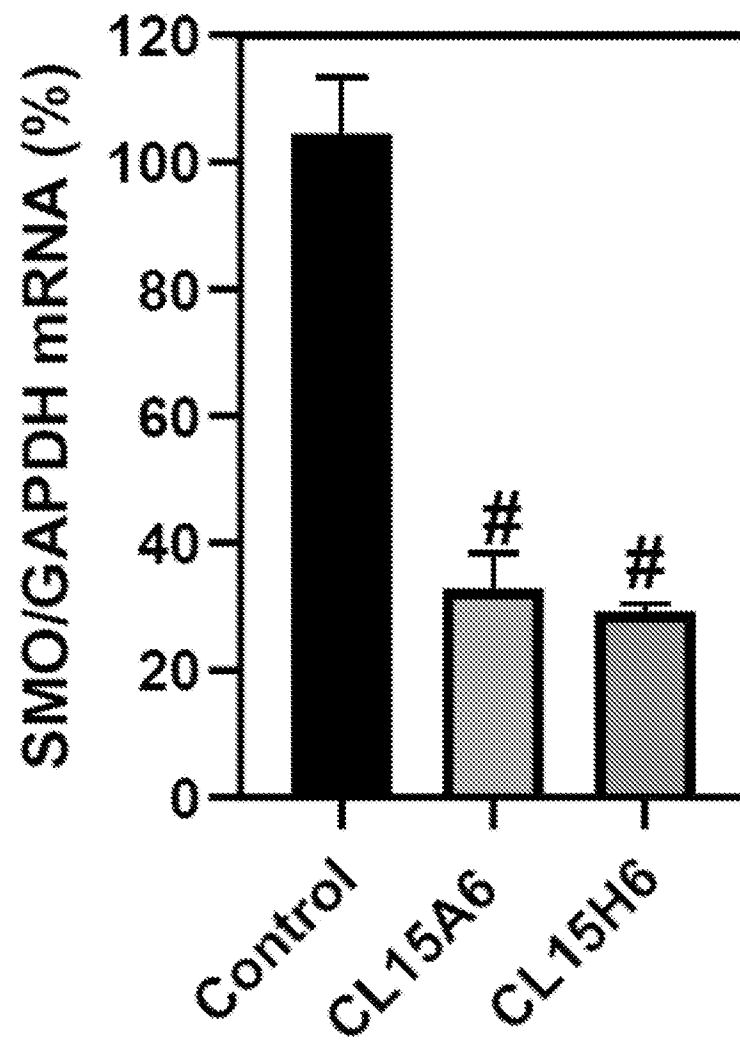
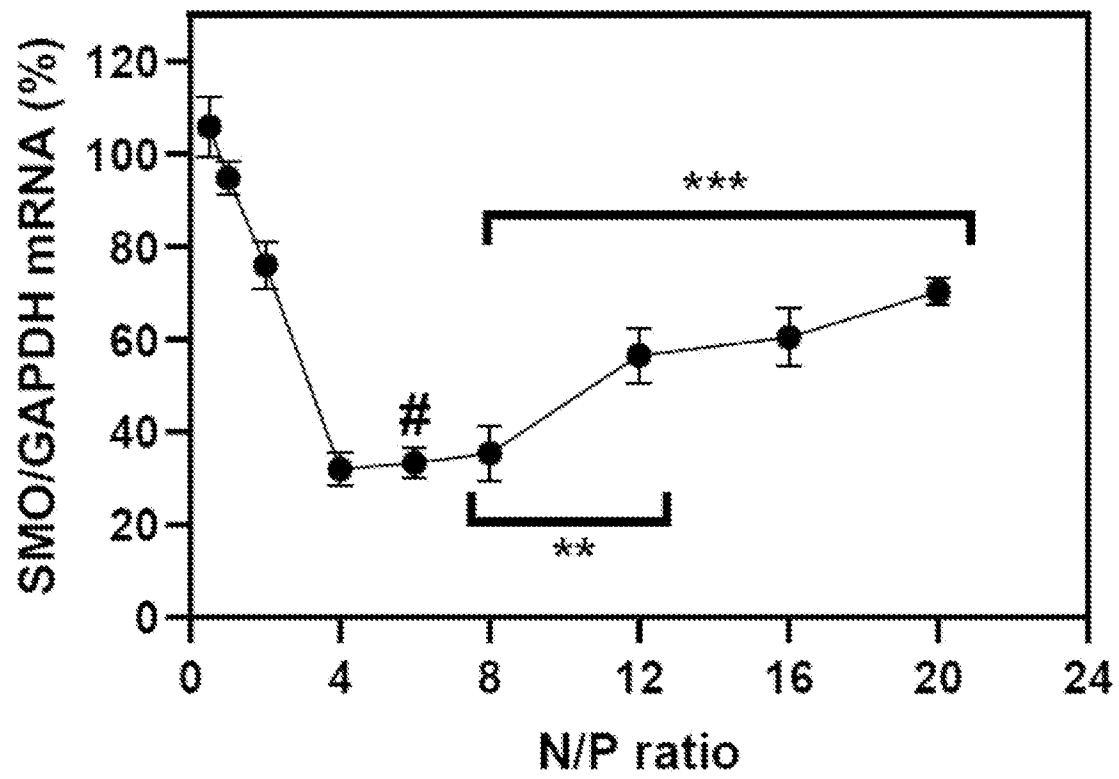


図11B

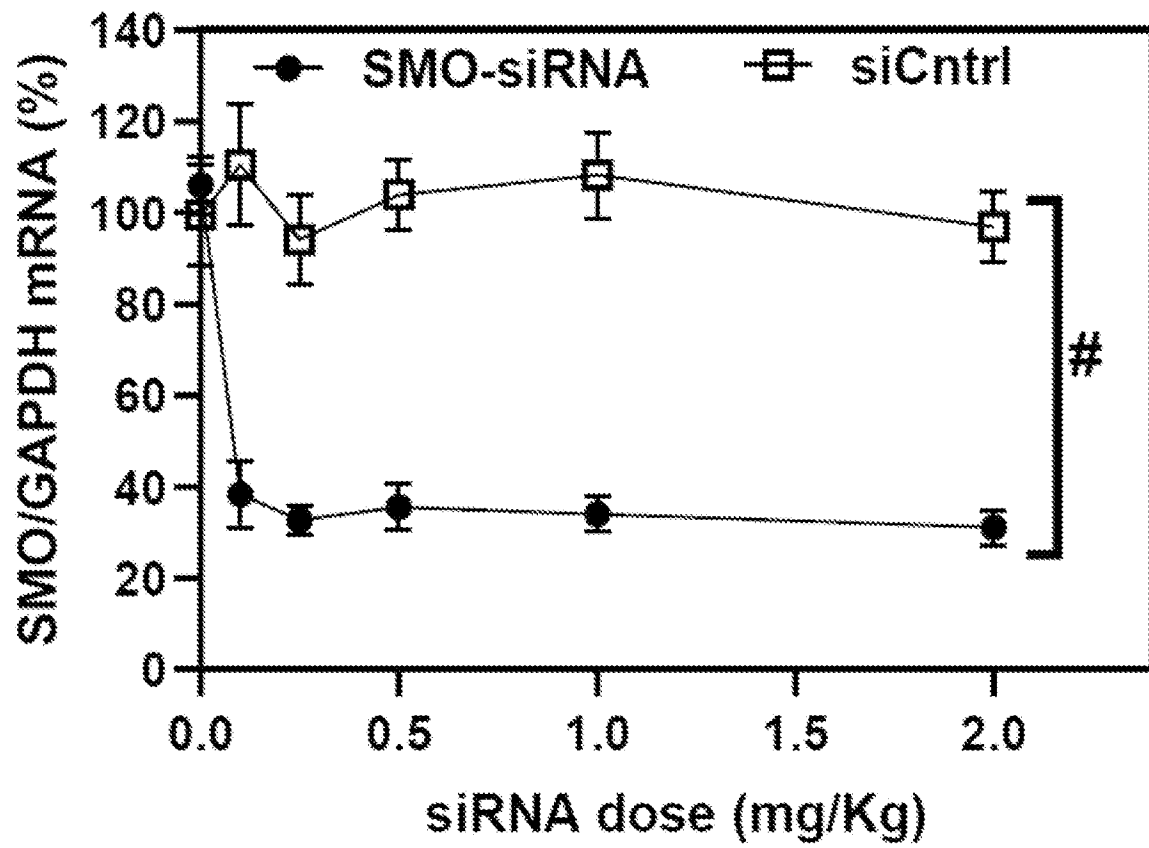
[図12]



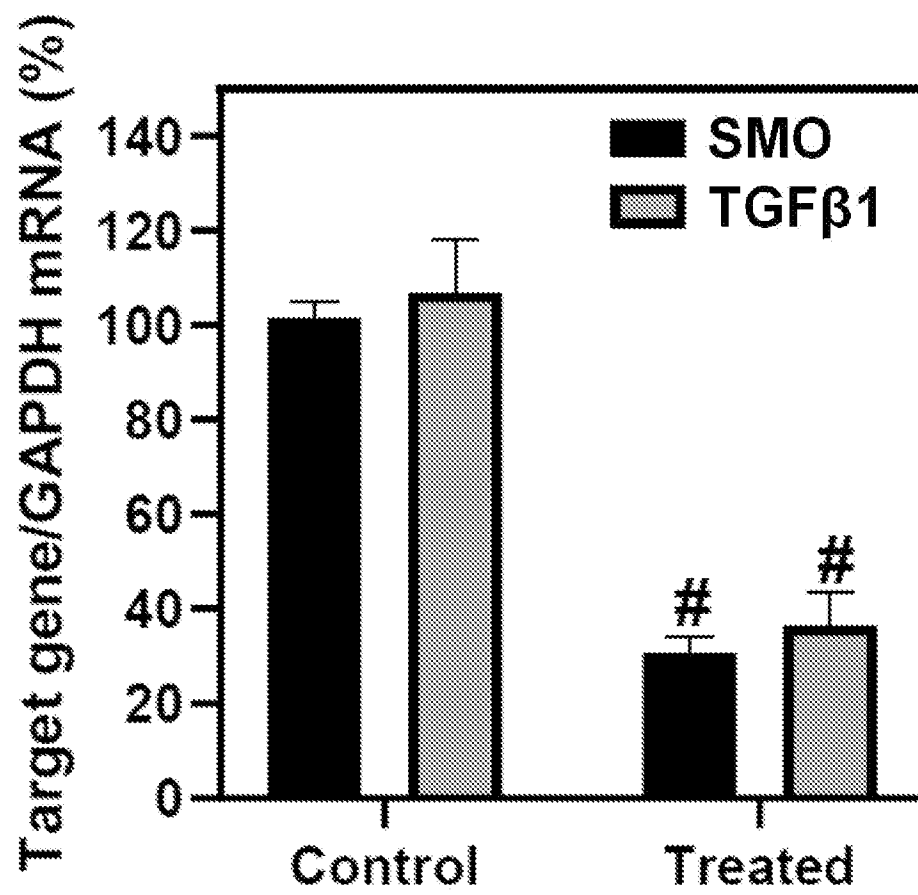
[図13]



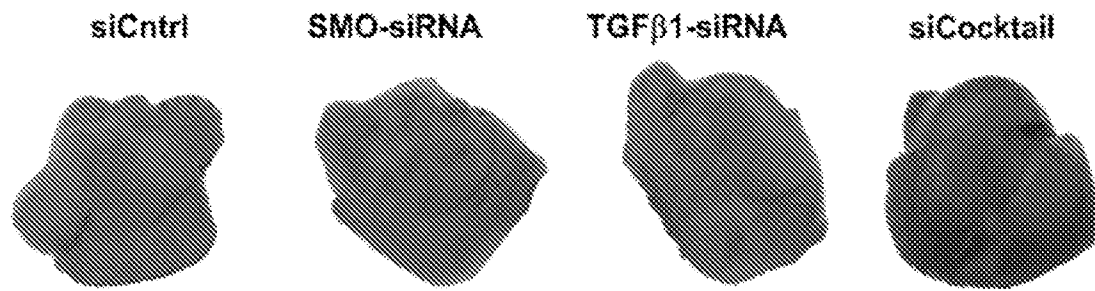
[図14]



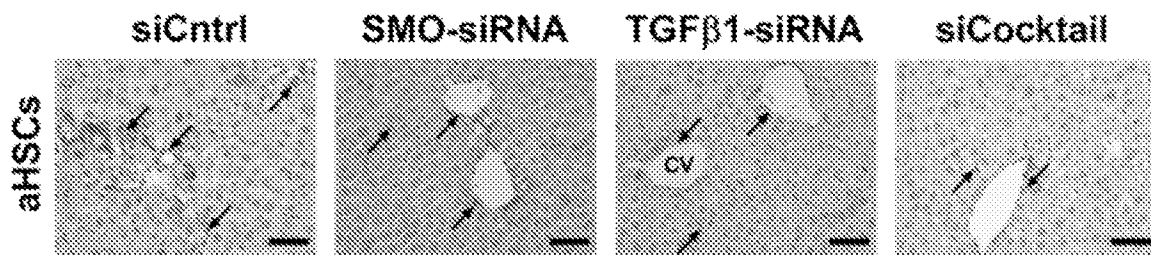
[図15]



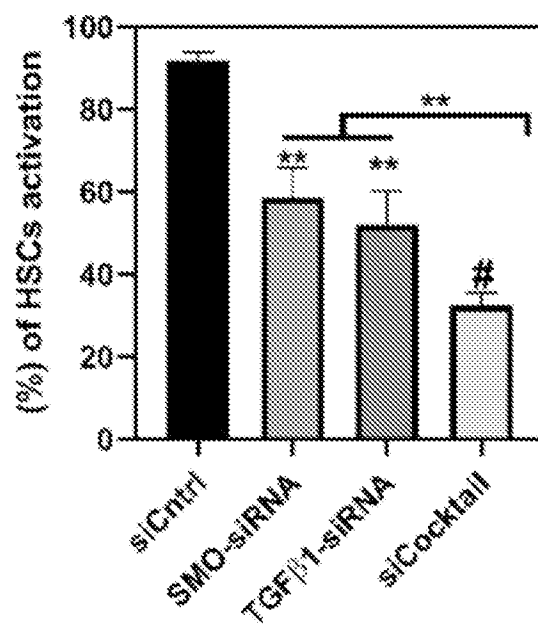
[図16]



[図17]

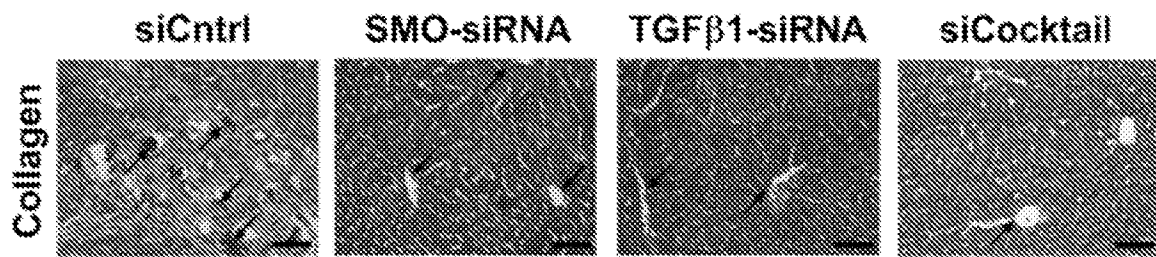


[図17A]

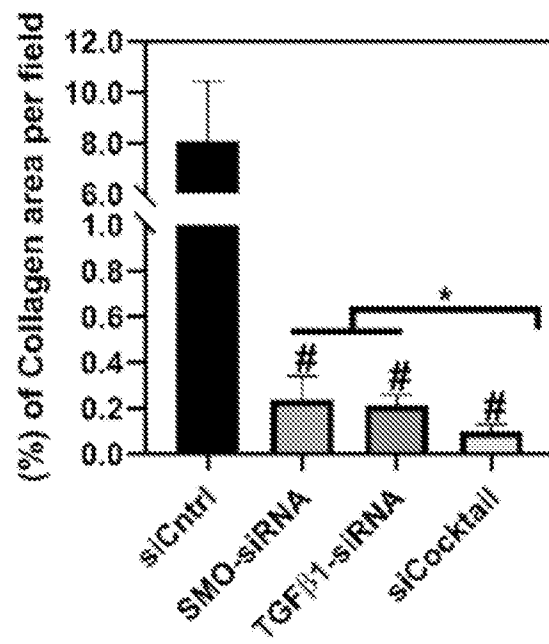


[図17B]

[図18]



[図18A]



[図18B]

[図19]

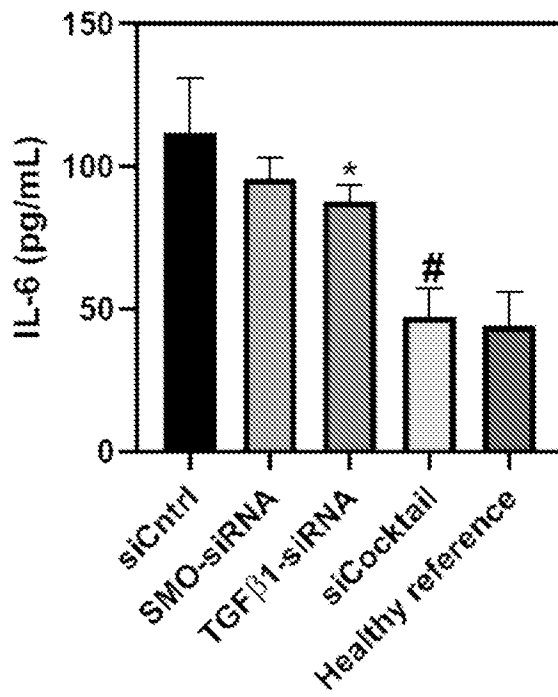


図19A

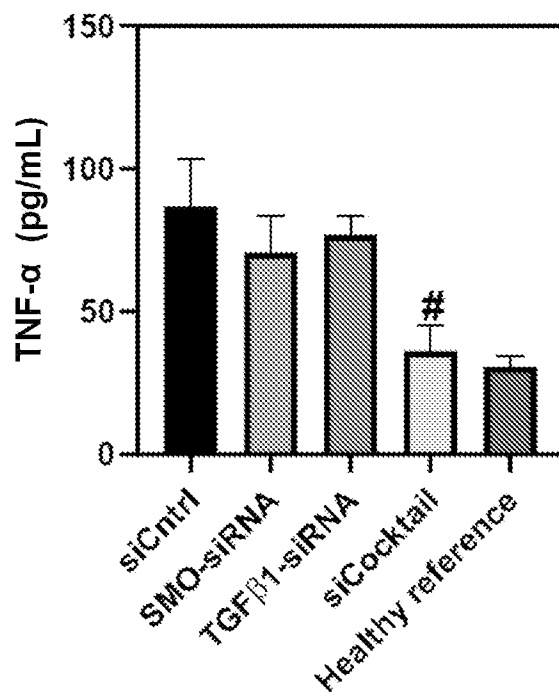


図19B

[図20]

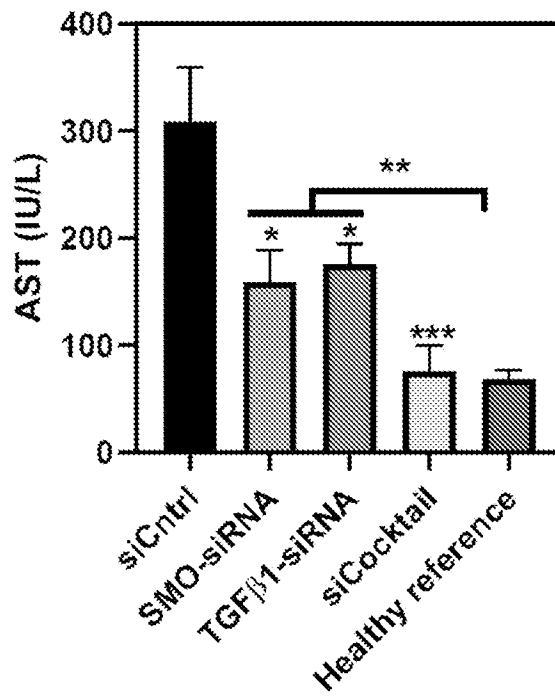


図20A

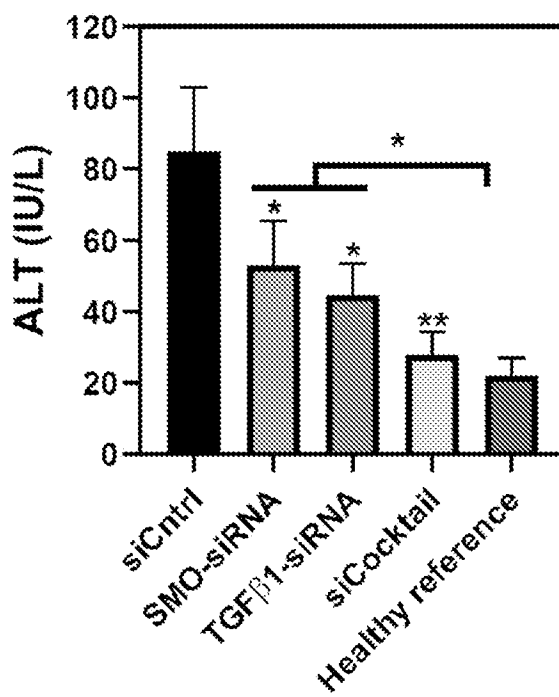


図20B

[図21]

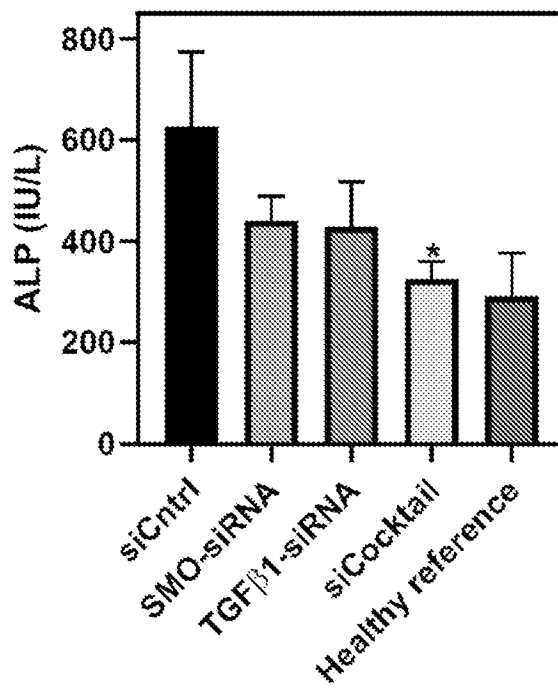


図21A

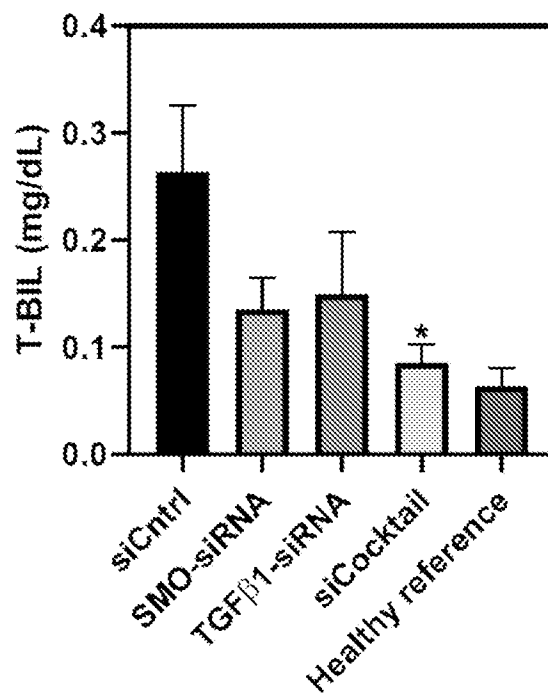


図21B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/009082

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127(2006.01)i; **A61K 31/7105**(2006.01)i; **A61K 47/10**(2017.01)i; **A61K 47/18**(2017.01)i; **A61K 47/22**(2006.01)i;
A61K 47/24(2006.01)i; **A61K 47/28**(2006.01)i; **A61P 1/16**(2006.01)i
 FI: A61K9/127; A61K47/18; A61K47/22; A61K47/24; A61K47/28; A61K47/10; A61P1/16; A61K31/7105 ZNA

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K9/127; A61K31/7105; A61K47/10; A61K47/18; A61K47/22; A61K47/24; A61K47/28; A61P1/16

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); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2022/071582 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORP. HOKKAIDO UNIVERSITY) 07 April 2022 (2022-04-07) claims, paragraphs [0129], [0130], table 7	1-18
Y	FERRARESSO, F. et al. Comparison of Dlin-MC3-DMA and ALC-0315 for siRNA delivery to hepatocytes and hepatic stellate cells. Molecular Pharmaceutics. 01 June 2022, 19, 2175-2182 abstract	1-18
Y	CN 111053757 A (JIYOUNUO (SHANGHAI) GENE TECHNOLOGY CO., LTD.) 24 April 2020 (2020-04-24) claim 1	1-18
Y	JP 2022-500396 A (METACRINE, INC.) 04 January 2022 (2022-01-04) claims 1, 5, paragraphs [0088], [0159], [0163], [0187], [0189], [0203]	16-18
A	WO 2018/230710 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORP. HOKKAIDO UNIVERSITY) 20 December 2018 (2018-12-20)	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “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

12 April 2023

Date of mailing of the international search report

23 May 2023

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/JP2023/009082**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SATO, Y. et al. Relationship Between the Physicochemical Properties of Lipid Nanoparticles and the Quality of siRNA Delivery to Liver Cells. Molecular Therapy. 2016, vol. 24, no. 4, 788-795 abstract	1-18
A	ALBERTSEN, C. H. et al. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. Advanced Drug Delivery Reviews. 03 July 2022, 188, 114416 abstract	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/009082

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

“In the form of an Annex C/ST.25 text file” above should be understood as “in ST.26 format”.

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 2: FERRARESSO, F. et al. Comparison of DLin-MC3-DMA and ALC-0315 for siRNA Delivery to Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. Molecular Pharmaceutics. 01 June 2022, 19, 2175-2182, abstract

The claims are classified into the following two inventions.

(Invention 1) Claims 1-15

Claims 1-15 have the special technical feature of a "lipid nanoparticle for delivering a substance of interest to a hepatic stellate cell, the lipid nanoparticle comprising a pH-sensitive cationic lipid having a hydrophilic moiety and two hydrophobic moieties, wherein the lipid nanoparticle is formed with a lipid membrane having an acid dissociation constant pKa of 6.7 or more and less than 8.2", and are thus classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 16-18

Claims 16-18 and claim 1 classified as invention 1 share the technical feature of a "lipid nanoparticle having a delivery selectivity towards hepatic stellate cells". However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosures in document 2 (in particular, see abstract), and thus is not considered to be a special technical feature. Moreover, there are no other same or corresponding special technical features between claims 16-18 and claim 1.

Furthermore, claims 16-18 are not dependent on claim 1. In addition, claims 16-18 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Accordingly, claims 16-18 cannot be classified as invention 1.

Claims 16-18 have the special technical feature of a "pharmaceutical composition for prevention or treatment of hepatic fibrogenesis, comprising a first substance, in a lipid nanoparticle, that suppresses expression of the SMO gene or SMO protein or inhibits the SMO protein and the second substance, in the lipid nanoparticle, that suppresses expression of the TGFβ1 gene or TGFβ1 protein or inhibits the TGFβ1 protein", and are thus classified as invention 2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/009082

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2022/071582	A1	07 April 2022	TW 202228652 A	
CN	111053757	A	24 April 2020	(Family: none)	
JP	2022-500396	A	04 January 2022	US 2022/0047553 A1	
				WO 2020/061114 A1 claims 1, 5, paragraphs [0094], [00164], [00167], [00192], [00194], [00209]	
				EP 3852735 A1	
				CN 113056266 A	
WO	2018/230710	A1	20 December 2018	US 2020/0129431 A1	
				EP 3640237 A1	
				CN 110740985 A	
				KR 10-2020-0018782 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 9/127(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 47/10(2017.01)i; A61K 47/18(2017.01)i; A61K 47/22(2006.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i FI: A61K9/127; A61K47/18; A61K47/22; A61K47/24; A61K47/28; A61K47/10; A61P1/16; A61K31/7105 ZNA																				
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K9/127; A61K31/7105; A61K47/10; A61K47/18; A61K47/22; A61K47/24; A61K47/28; A61P1/16 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 <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> 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/Biosis (STN)			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																			
C. 関連すると認められる文献 <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 2022/071582 A1 (国立大学法人北海道大学) 07.04.2022 (2022 - 04 - 07) 請求の範囲、[0129]、[0130]、表 7</td> <td>1 - 18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>FERRARESSO F. et al., Comparison of Dlin-MC3-DMA and ALC-0315 for siRNA Delivery to Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells, molecular Pharmaceutics, 2022.06.01, 19, 2175-2182 ABSTRACT</td> <td>1 - 18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 111053757 A (JIYOUNUO (SHANGHAI) GENE TECHNOLOGY CO., LTD.) 24.04.2020 (2020 - 04 - 24) 請求項 1</td> <td>1 - 18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2022-500396 A (メタクリン, インク.) 04.01.2022 (2022 - 01 - 04) 請求項 1、請求項 5, [0088]、[0159]、[0163]、[0187]、[0189]、[0203]</td> <td>16 - 18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018 - 12 - 20)</td> <td>1 - 18</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 2022/071582 A1 (国立大学法人北海道大学) 07.04.2022 (2022 - 04 - 07) 請求の範囲、[0129]、[0130]、表 7	1 - 18	Y	FERRARESSO F. et al., Comparison of Dlin-MC3-DMA and ALC-0315 for siRNA Delivery to Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells, molecular Pharmaceutics, 2022.06.01, 19, 2175-2182 ABSTRACT	1 - 18	Y	CN 111053757 A (JIYOUNUO (SHANGHAI) GENE TECHNOLOGY CO., LTD.) 24.04.2020 (2020 - 04 - 24) 請求項 1	1 - 18	Y	JP 2022-500396 A (メタクリン, インク.) 04.01.2022 (2022 - 01 - 04) 請求項 1、請求項 5, [0088]、[0159]、[0163]、[0187]、[0189]、[0203]	16 - 18	A	WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018 - 12 - 20)	1 - 18
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 2022/071582 A1 (国立大学法人北海道大学) 07.04.2022 (2022 - 04 - 07) 請求の範囲、[0129]、[0130]、表 7	1 - 18																		
Y	FERRARESSO F. et al., Comparison of Dlin-MC3-DMA and ALC-0315 for siRNA Delivery to Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells, molecular Pharmaceutics, 2022.06.01, 19, 2175-2182 ABSTRACT	1 - 18																		
Y	CN 111053757 A (JIYOUNUO (SHANGHAI) GENE TECHNOLOGY CO., LTD.) 24.04.2020 (2020 - 04 - 24) 請求項 1	1 - 18																		
Y	JP 2022-500396 A (メタクリン, インク.) 04.01.2022 (2022 - 01 - 04) 請求項 1、請求項 5, [0088]、[0159]、[0163]、[0187]、[0189]、[0203]	16 - 18																		
A	WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018 - 12 - 20)	1 - 18																		
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																				
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献																				
国際調査を完了した日 12.04.2023		国際調査報告の発送日 23.05.2023																		
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		権限のある職員（特許庁審査官） 山村 祥子 4C 9217 電話番号 03-3581-1101 内線 3439																		

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	SATO Y. et al., Relationship Between the Physicochemical Properties of Lipid Nanoparticles and the Quality of siRNA Delivery to Liver Cells, Molecular Therapy , 2016, vol. 24 no. 4 , 788-795 ABSTRACT	1 - 18
A	ALBERTSEN CH. et al., The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy, Advanced Drug Delivery Reviews, 2022.07.03, 188, 114416 ABSTRACT	1 - 18

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献2：FERRARESSO F. et al., Comparison of DLin-MC3-DMA and ALC-0315 for siRNA Delivery to Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells, molecular Pharmaceutics, 2022.06.01, 19, 2175-2182
ABSTRACT

請求の範囲は、以下の2つの発明に区分される。

（発明1）請求項1-15

請求項1-15は、「肝星細胞に目的物質を送達するための脂質ナノ粒子であって、親水性部および2つの疎水性部を有するpH感受性カチオン性脂質を含み、前記脂質ナノ粒子を構成する脂質膜の酸解離定数pKaは、6.7以上8.2未満である、脂質ナノ粒子。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

（発明2）請求項16-18

請求項16-18は、発明1に区分された請求項1と、「肝星細胞への送達選択性を有する脂質ナノ粒子」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献2の開示内容（特にABSTRACT参照）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項16-18と請求項1との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項16-18は請求項1の従属請求項ではない。また、請求項16-18は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項16-18は発明1に区分できない。

そして、請求項16-18は、「脂質ナノ粒子に包含された、SMO遺伝子またはSMOタンパク質の発現を抑制するか、またはSMOタンパク質を阻害する第1物質と、前記脂質ナノ粒子に包含された、TGFβ1遺伝子またはTGFβ1タンパク質の発現を抑制するか、またはTGFβ1タンパク質を阻害する第2物質と、を含む、肝線維化を予防または治療するための医薬組成物。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

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/JP2023/009082

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2022/071582	A1	07.04.2022	TW	202228652	A	
CN	111053757	A	24.04.2020	(ファミリーなし)			
JP	2022-500396	A	04.01.2022	US	2022/0047553	A1	
				WO	2020/061114	A1	
				請求項 1, 請求項 5, [0094]、[00164]、 [00167]、[00192]、 [00194]、[00209]			
				EP	3852735	A1	
				CN	113056266	A	
WO	2018/230710	A1	20.12.2018	US	2020/0129431	A1	
				EP	3640237	A1	
				CN	110740985	A	
				KR	10-2020-0018782	A	