

(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
2022年4月7日(07.04.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/071582 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 47/18 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
A61K 47/28 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
A61K 47/44 (2017.01) C12N 15/88 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/036449

(22) 国際出願日: 2021年10月1日(01.10.2021)

(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 2020-167928 2020年10月2日(02.10.2020) JP

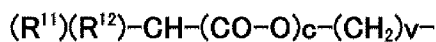
(71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP). 日東電工株式会社(NITTO DENKO

CORPORATION) [JP/JP]; 〒5678680 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 Osaka (JP).

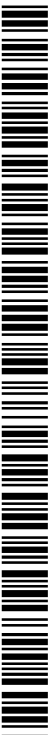
(72) 発明者: 佐藤 悠介(SATO, Yusuke); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 原島 秀吉(HARASHIMA, Hideyoshi); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 橋場 一毅(HASHIBA, Kazuki); 〒5678680 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電工株式会社内 Osaka (JP). 田口 将光(TAGUCHI, Masamitsu); 〒5678680 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電工株式会社内 Osaka (JP). 坂元 左知子(SAKAMOTO, Sachiko); 〒5678680 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電工株式会社内 Osaka (JP). 穴戸 卓矢(SHISHIDO, Takuya); 〒5678680 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電工株式会社内 Osaka (JP). 大津 彩夏(OTSU, Ayaka); 〒5678680 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電工株式会社内 Osaka (JP). 前田 佳己(MAEDA, Yoshiki); 〒5678680 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電工株式会社内 Osaka (JP).

(54) Title: LIPID NANOPARTICLE

(54) 発明の名称: 脂質ナノ粒子



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing lipid nanoparticles which function as gene transfer carriers capable of selective transfer to the liver or spleen. Lipid nanoparticles which contain a pH-sensitive cationic lipid represented by formula (I) [a represents an integer of 3-5; b represents 0 or 1; R¹ and R² each independently represent a group represented by general formula (A) (I) (R¹¹ and R¹² each independently represent a straight-chain or branched-chain C₂₋₁₅ alkyl group; c represents 0 or 1; v represents an integer of 4-12); and X represents a group represented by general formula (B) (d represents an integer of 0-3; and R³ and R⁴ each independently represent a C₁₋₄ alkyl group or C₂₋₄ alkenyl group, while R³ and R⁴ may form a 5- to 7-membered non-aromatic heterocycle) or represents a 5- to 7-membered non-aromatic heterocyclic group]. (I): (R¹)(R²)C(OH)-(CH₂)_a-(O-CO)_b-X. (A): (R¹¹)(R¹²)-CH-(CO-O)_c-(CH₂)_v-. (B): -(CH₂)_d-N(R³)(R⁴).



WO 2022/071582 A1

(74) 代理人：葛 和 清 司 (KUZUWA, Kiyoshi);
 〒1600023 東京都新宿区西新宿 6 丁目 2 4
 番 1 号西新宿三井ビルディング 1 7 階 葛
 和国际特許事務所 Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類：

- 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))

(57) 要約：本発明は、肝臓又は脾臓に選択的に送達可能な遺伝子送達キャリアとなる脂質ナノ粒子を提供
 することを課題とする。式 (1) [a は 3 ~ 5 の整数を示し； b は 0 又は 1 を示し； R¹ 及び R² はそれ
 ぞれ独立して一般式 (A) (R¹¹ 及び R¹² はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C₂₋₁₅ アルキ
 ル基を示し； c は 0 又は 1 を示し； v は 4 ~ 12 の整数を示す) で表される基を示し； X は一般式 (B)
 (d は 0 ~ 3 の整数を示し； R³ 及び R⁴ はそれぞれ独立に C₁₋₄ アルキル基又は C₂₋₄ アルケニル基を
 示すが、R³ 及び R⁴ は互いに結合して 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環を形成してもよい) で表される基又は
 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環基を示す] で表される pH 感受性カチオン性脂質を含有する、脂質ナノ粒子。
 (R¹)(R²)C(OH)-(CH₂)_a-(O-CO)_b-X (I) (R¹¹)(R¹²)-CH-(CO-O)_c-(CH₂)_v-(A) -(CH₂)_d-N(R³)(R⁴) (B)

明 細 書

発明の名称：脂質ナノ粒子

技術分野

[0001] 本発明は肝臓又は脾臓に選択的に送達可能な遺伝子送達キャリアとして有用な脂質ナノ粒子に関する。

背景技術

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

[0003] pH感受性カチオン性脂質としては、例えば、Jayaramanらは、DLin-*MC3-DMA*を開発し、マウス肝臓における第7因子(F7)ノックダウンにおいてED₅₀で0.005mg *siRNA*/kgを達成した(非特許文献2)。本発明者らもこれまでに独自のpH感受性カチオン性脂質YSK05及びYSK13-C3を開発しており、F7ノックダウンにおけるED₅₀としてそれぞれ0.06、0.015mg *siRNA*/kgを達成している(非特許文献3~5)。また、Maierらは、*MC3-DMA*に生分解性を付与したL319を開発し、ED₅₀で0.01mg *siRNA*/kgと高い安全性の両立について報告している(非特許文献6~8)。しかしながら、これらのpH感受性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子のエンドソーム脱出効率は、未だ数%程度に過ぎないことが明らかにされており(非特許文献9)、バイオアベイラビリティを更に向上させることが可能な技術の開発が望まれている。

[0004] さらに、Dongらは、ハイスループットスクリーニングを通して独自の脂質

様物質 c K K - E 1 2 を見出し、F 7 ノックダウンにおいて E D₅₀ で 0. 0 0 2 m g s i R N A / k g を達成した（非特許文献 1 0）。当該技術は、活性の面では文献上最も優れているが、高投与量における毒性や脂質の生分解性等の安全面における知見はない。

先行技術文献

特許文献

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

特許文献2：国際公開第 2 0 1 8 / 1 9 0 4 2 3 号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Sato et al., Journal of Controlled Release, 2019, vol.29 5, p.140-152.

非特許文献2：Jayaraman et al., Angewandte Chemie International Edition, 2012, vol.51, p.8529-8533.

非特許文献3：Watanabe et al., Scientific Reports, 2014, 4:4750, DOI: 10.1038/srep04750.

非特許文献4：Yamamoto et al., Journal of Hepatology, 2016, vol.64, p. 547-555.

非特許文献5：Sato et al., Molecular Therapy, 2016, vol.24, p.788-795.

非特許文献6：Maier et al., Molecular Therapy, 2013, vol.21(8), p.1570 -1578.

非特許文献7：Wittrup et al., Nature Biotechnology, 2015, vol.33(8), p .870-876.

非特許文献8：Xu et al., Molecular Pharmaceutics, 2014, vol.11, p.1424 -1434.

非特許文献9：Gilleron et al., Nature Biotechnology, 2013, vol.31(7), p.638-646.

非特許文献10：Dong, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, vol.111(11), p.3955-3960.

非特許文献11 : Leung et al., Journal of Physical Chemistry C Nanomater Interfaces, 2012, vol.116(34), p.18440-18450.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、肝臓又は脾臓に選択的に送達可能な遺伝子送達キャリアとなる脂質ナノ粒子を提供すること、及び安定性に優れた脂質ナノ粒子を提供することを目的とする。

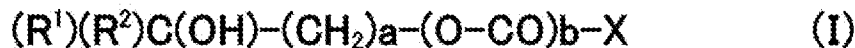
課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、分岐鎖型の炭化水素鎖を備えるpH感受性カチオン性脂質を構成脂質として含む脂質ナノ粒子が、肝臓又は脾臓への選択性が高く、肝臓又は脾臓に特異的に高発現する遺伝子送達キャリアとして有用であることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち、本発明は、以下の脂質ナノ粒子を提供するものである。

[1-1] 下記の式(1) :

[化1]



[式(1)中、aは3~5の整数を示し；bは0又は1を示し；R¹及びR²はそれぞれ独立して下記一般式(A) :

[化2]



(式(A)中、R¹¹及びR¹²はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状のC₅₋₁₅アルキル基を示し；cは0又は1を示し；vは4~12の整数を示す)で表される基を示し；Xは、下記一般式(B) :

[化3]



(式(B)中、dは0~3の整数を示し；R³及びR⁴はそれぞれ独立にC₁₋₄

アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基（該 C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい）を示すが、 R^3 及び R^4 は互いに結合して5～7員非芳香族ヘテロ環（該環の1個又は2個の水素原子が、 C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基に置換されていてもよい）を形成してもよい）で表される基又は5～7員非芳香族ヘテロ環基（ただし、該基は炭素原子により(0-C0)b-に結合し、該環の1個又は2個の水素原子が、 C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基に置換されていてもよい）を示す]

で表されるpH感受性カチオン性脂質を含有する、脂質ナノ粒子。

[0010] [1-2] さらに、ステロール及びポリアルキレングリコール修飾脂質を含有している、前記[1-1]の脂質ナノ粒子。

[1-3] 核酸を含有する、前記[1-1]又は[1-2]の脂質ナノ粒子。

[1-4] 前記核酸が、siRNAである、前記[1-3]の脂質ナノ粒子。

[1-5] 前記核酸が、mRNA又はプラスミドDNAである、前記[1-3]の脂質ナノ粒子。

[0011] [1-6] 前記核酸が、肝臓細胞内で発現させる遺伝子である、前記[1-3]～[1-5]のいずれかの脂質ナノ粒子。

[1-7] 前記[1-1]～[1-6]のいずれかの脂質ナノ粒子を有効成分とする、医薬用組成物。

[1-8] 遺伝子治療に用いられる、前記[1-7]の医薬用組成物。

[1-9] 前記[1-1]～[1-6]のいずれかの脂質ナノ粒子であって、肝臓細胞内で発現させる目的の外来遺伝子を封入した脂質ナノ粒子を、被験動物（但し、ヒトを除く）へ投与し、前記被験動物の肝臓内で前記外来遺伝子を発現させる、外来遺伝子の発現方法。

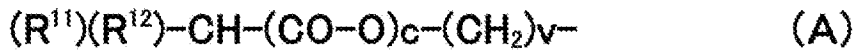
[0012] [2-1] 下記の式(1)：

[化4]



〔式（I）中、aは3～5の整数を示し；bは0又は1を示し；R¹及びR²はそれぞれ独立して下記一般式（A）：

[化5]



（式（A）中、R¹¹及びR¹²はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状のC₂₋₁₅アルキル基を示し；cは0又は1を示し；vは4～12の整数を示す）で表される基を示し；Xは、下記一般式（B）：

[化6]



（式（B）中、dは0～3の整数を示し；R³及びR⁴はそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基（該C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい）を示すが、R³及びR⁴は互いに結合して5～7員非芳香族ヘテロ環（該環の1個又は2個の水素原子が、C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されていてもよい）を形成してもよい）で表される基又は5～7員非芳香族ヘテロ環基（ただし、該基は炭素原子により(O-CO)_b-に結合し、該環の1個又は2個の水素原子が、C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されていてもよい）を示す]

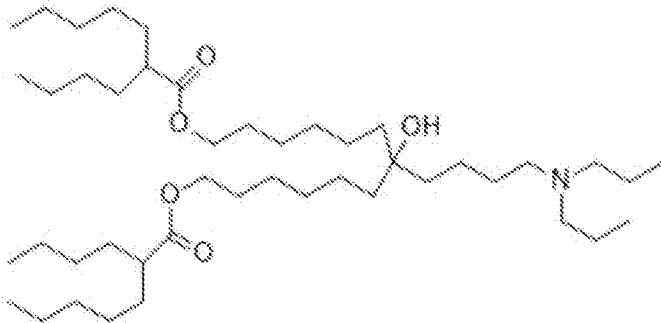
で表されるpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物、及び核酸

を含有する、脂質ナノ粒子であって、

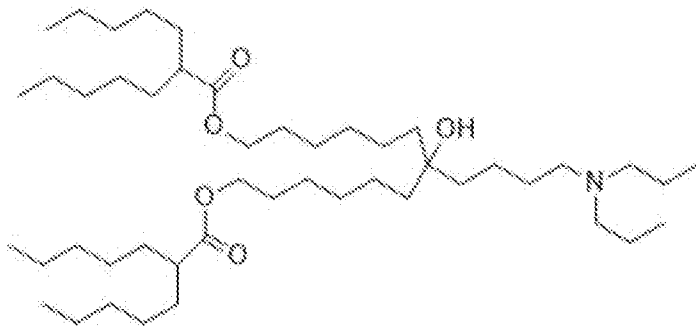
前記核酸が、mRNA又はプラスミドDNAである、前記脂質ナノ粒子。

[0013] [2-2] 前記pH感受性カチオン性脂質が、下記式で示される、[2-1]の脂質ナノ粒子：

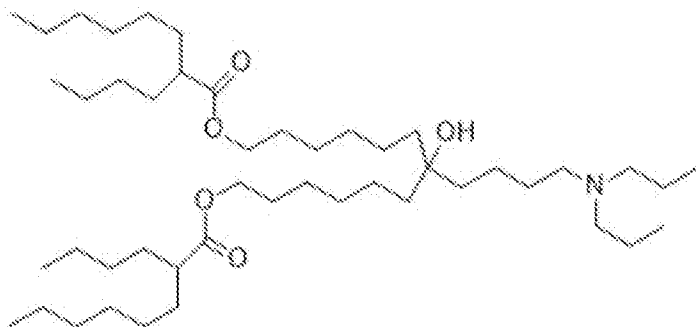
[化7-1]



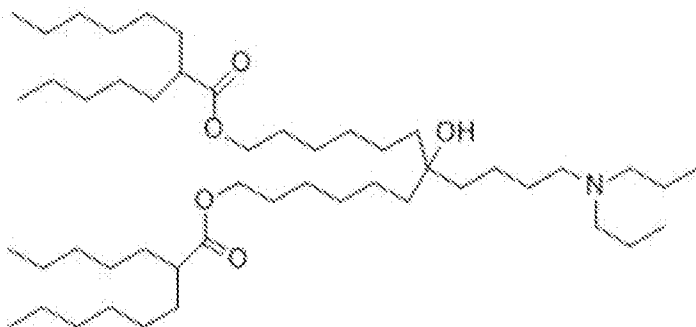
CL4F 7-4、



CL4F 7-5、

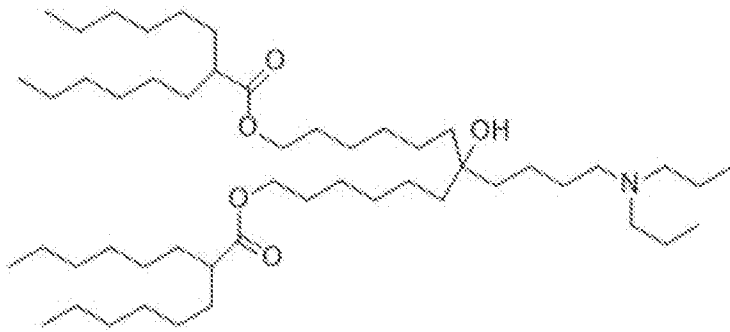


CL4F 8-4、

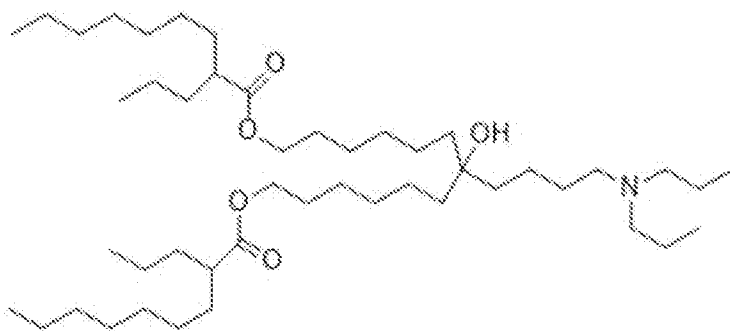


CL4F 8-5、

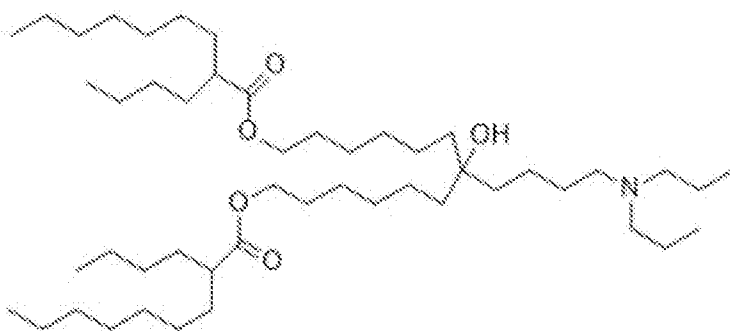
[化7-2]



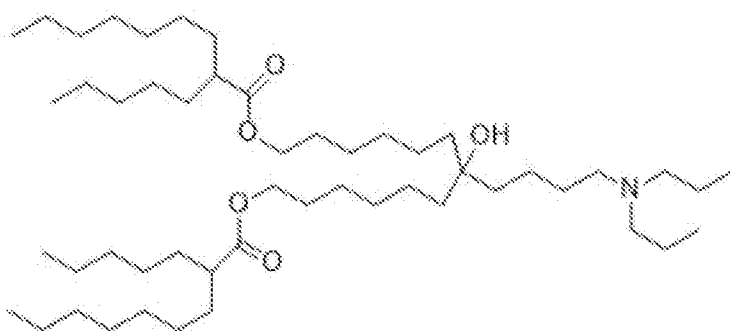
CL4F 8-6、



CL4F 9-3、

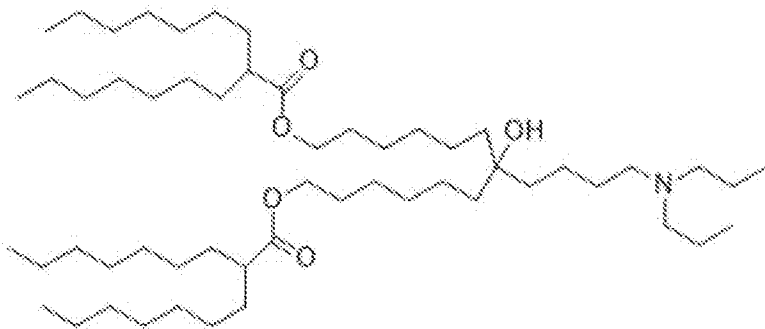


CL4F 9-4、

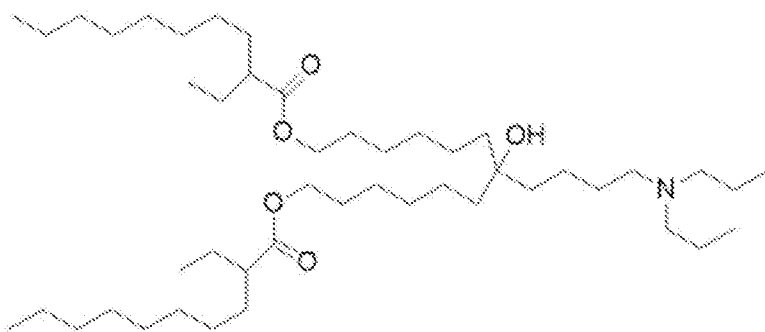


CL4F 9-5、

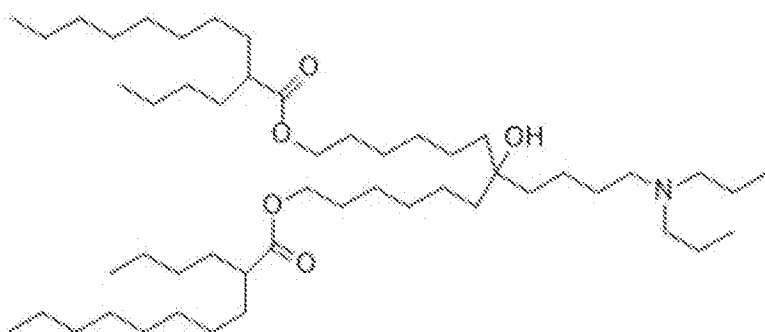
[化7-3]



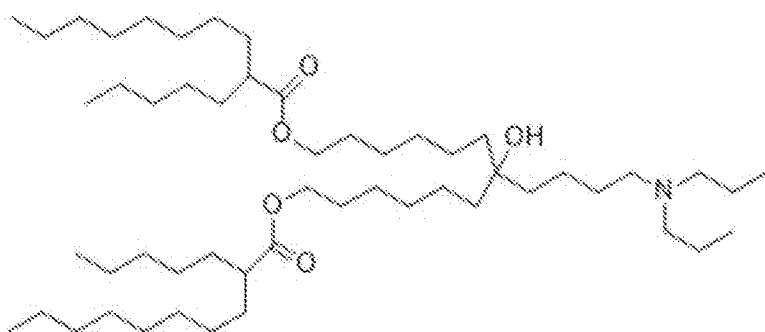
CL4F 9-7、



CL4F 10-2、

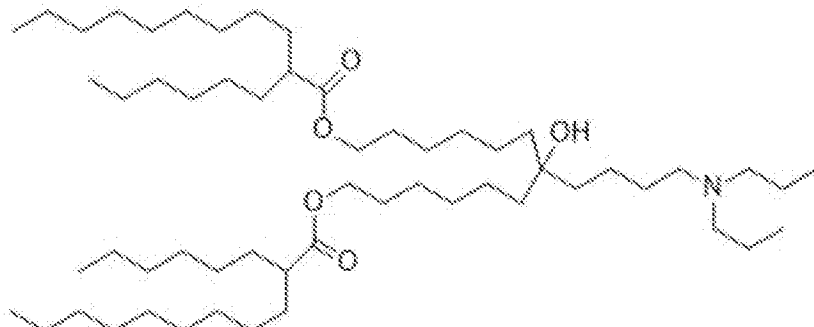


CL4F 10-4、

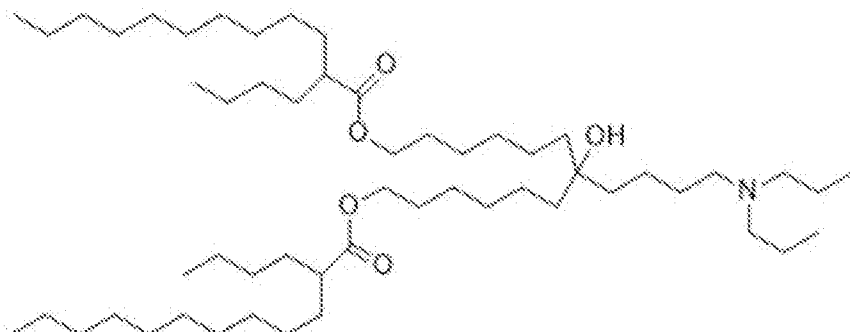


CL4F 10-5、

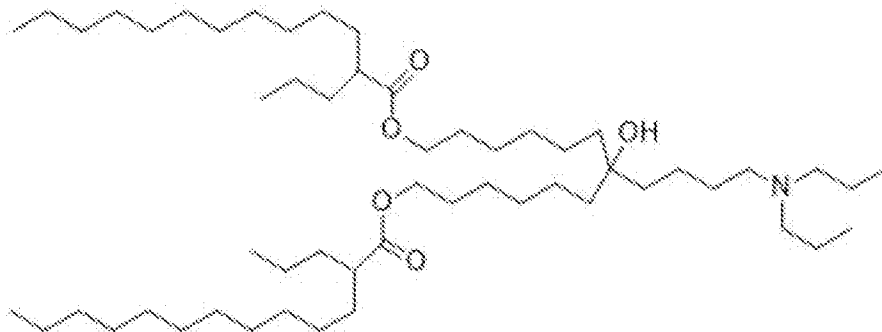
[化7-4]



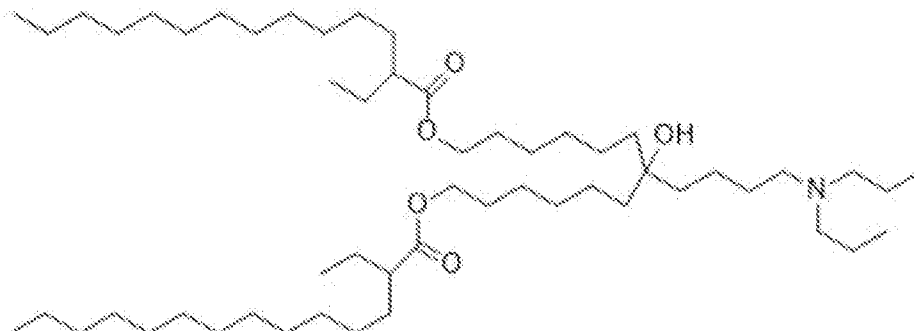
CL4F 11-6.



CL4F 12-4.

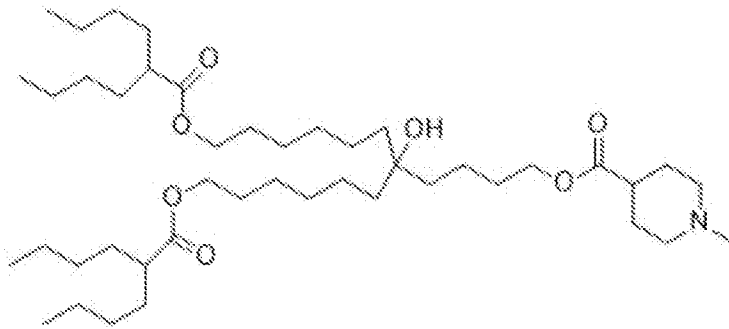


CL4F 13-3.

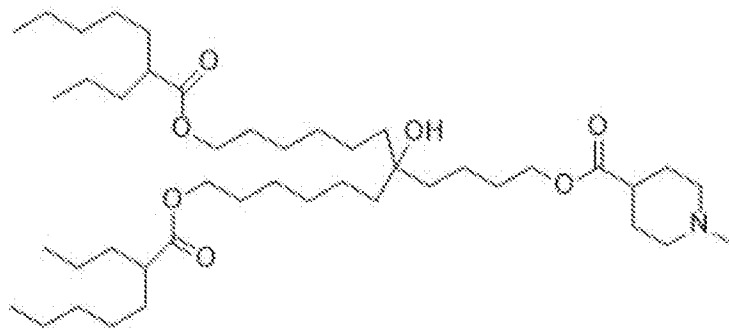


CL4F 14-2.

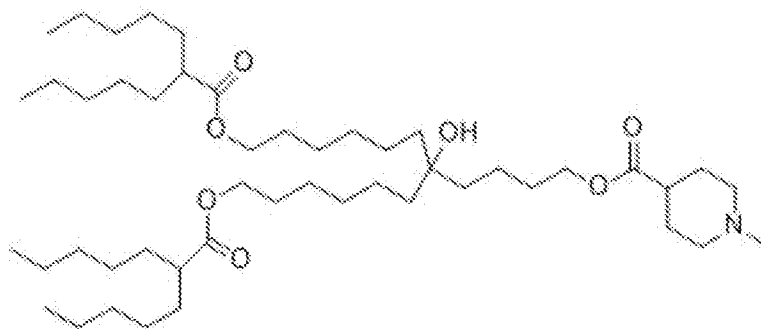
[化7-5]



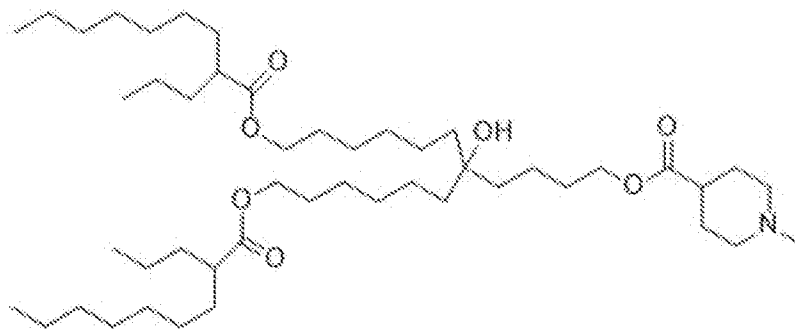
CL15F 6-4.



CL15F 7-3.

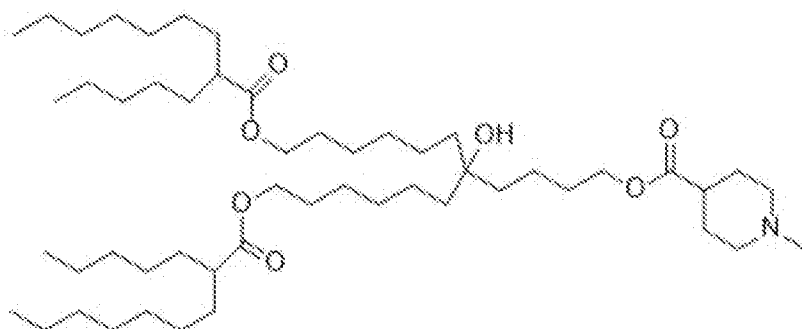


CL15F 7-5.

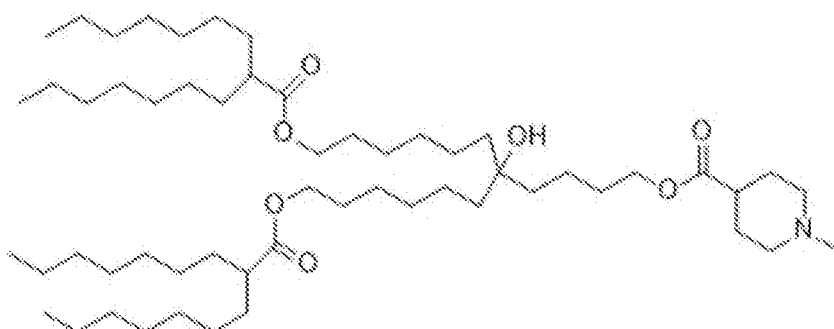


CL15F 9-3.

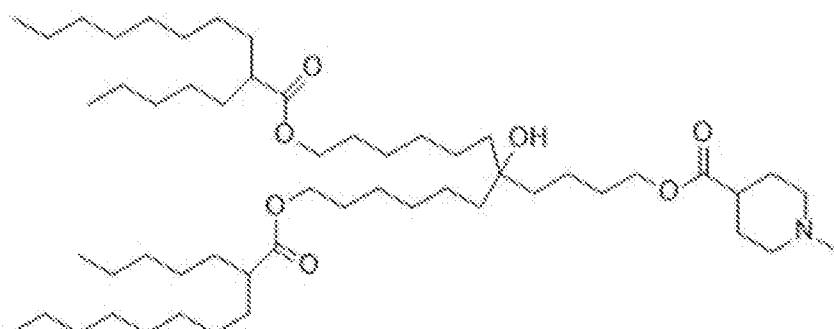
[化7-6]



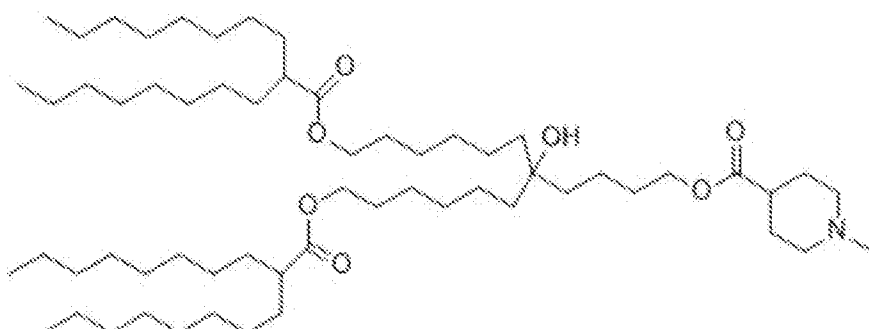
CL15F 9-5,



CL15F 9-7,

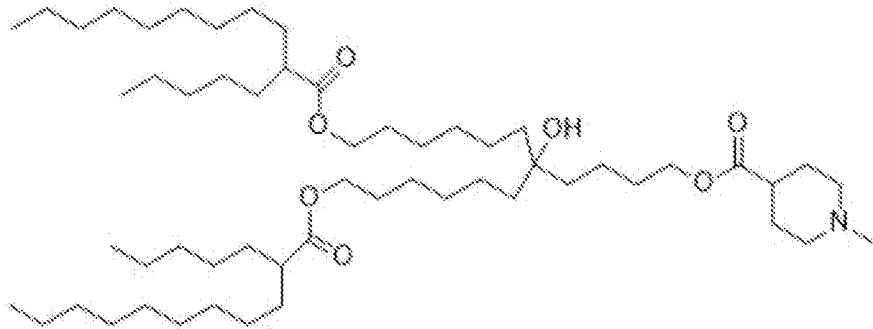


CL15F 10-5,

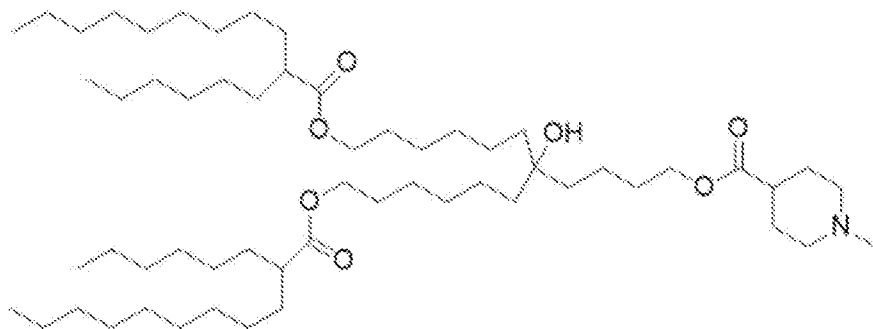


CL15F 10-8,

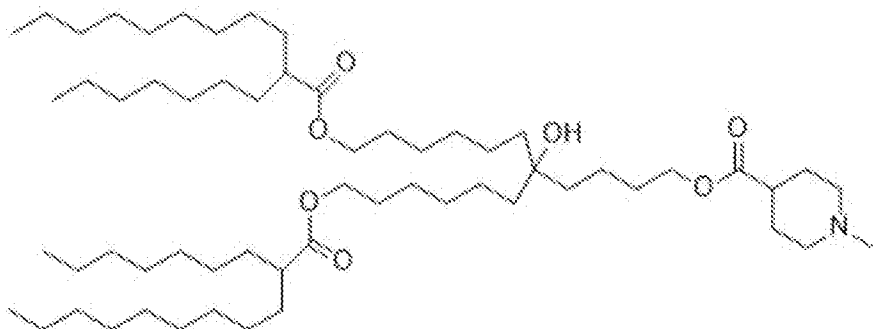
[化7-7]



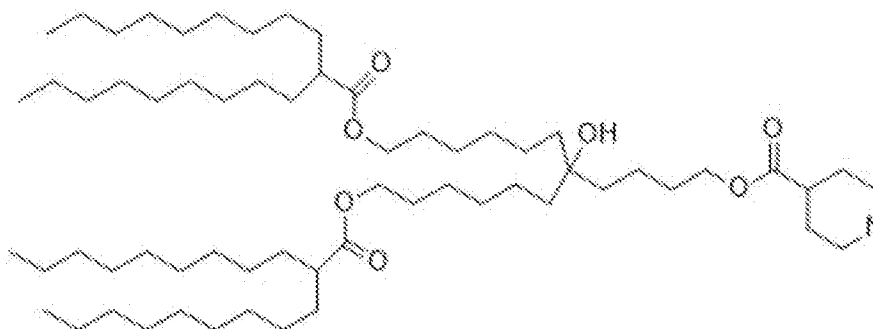
CL15F 11-5、



CL15F 11-6、

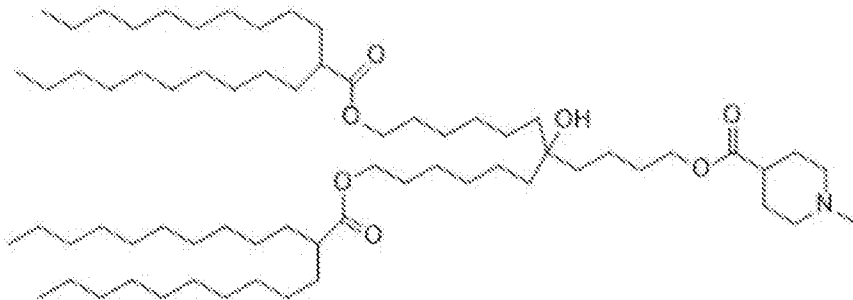


CL15F 11-7、

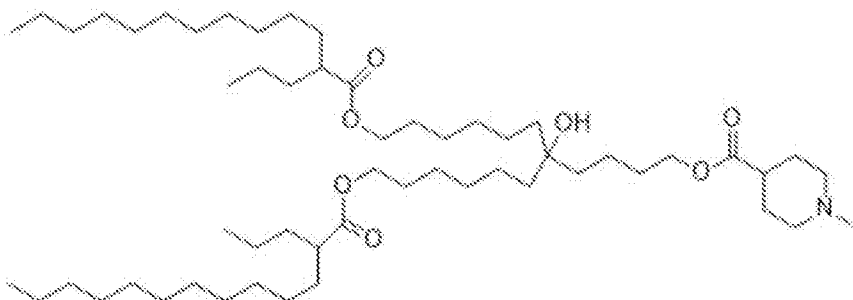


CL15F 11-9、

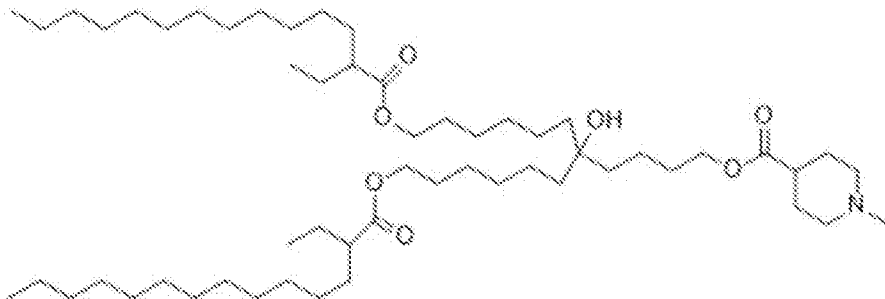
[化7-8]



CL15F 12-10.



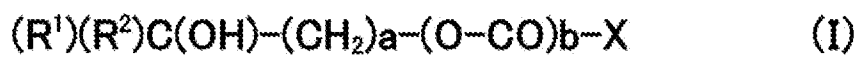
CL15F 13-3.



CL15F 14-2.

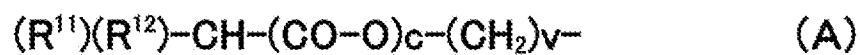
[0014] [3-1] 下記の式(1) :

[化8]



[式(1)中、aは3~5の整数を示し；bは0又は1を示し；R¹及びR²はそれぞれ独立して下記一般式(A) :

[化9]



(式 (A) 中、 R^{11} 及び R^{12} はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C_{2-15} アルキル基を示し； c は 0 又は 1 を示し； v は 4 ~ 12 の整数を示す) で表される基を示し； X は、下記一般式 (B) :

[化10]



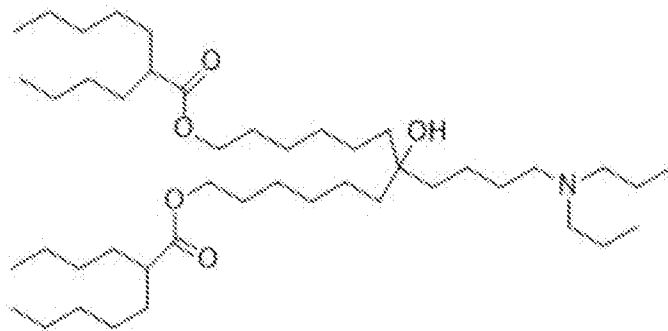
(式 (B) 中、 d は 0 ~ 3 の整数を示し； R^3 及び R^4 はそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基 (該 C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基は、1 個又は 2 個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい) を示すが、 R^3 及び R^4 は互いに結合して 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環 (該環の 1 個又は 2 個の水素原子が、 C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基に置換されていてもよい) を形成してもよい) で表される基又は 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環基 (ただし、該基は炭素原子により (0-C0)b- に結合し、該環の 1 個又は 2 個の水素原子が、 C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基に置換されていてもよい) を示す]

で表される pH 感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物

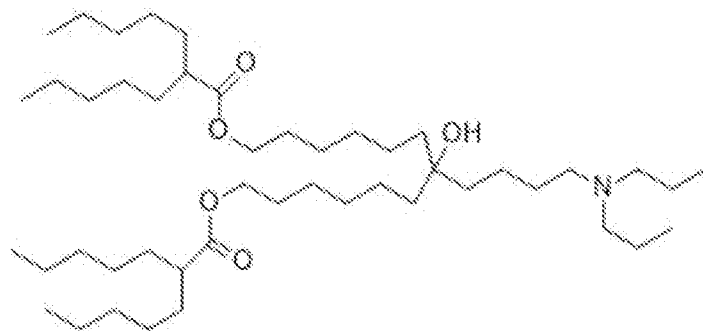
を含有する脾臓送達用の医薬組成物。

[0015] [3-2] 前記 pH 感受性カチオン性脂質が、下記式で示される、[3-1] の医薬組成物：

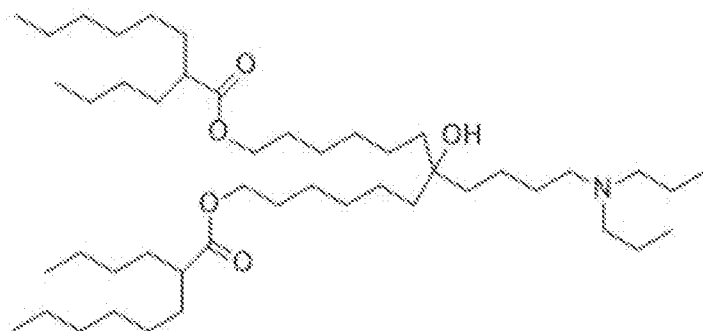
[化11-1]



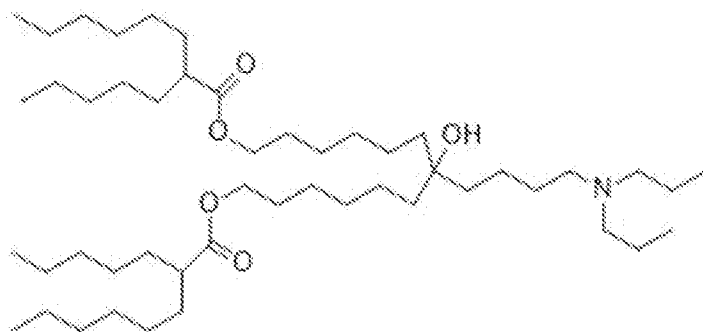
CL4F 7-4.



CL4F 7-5.

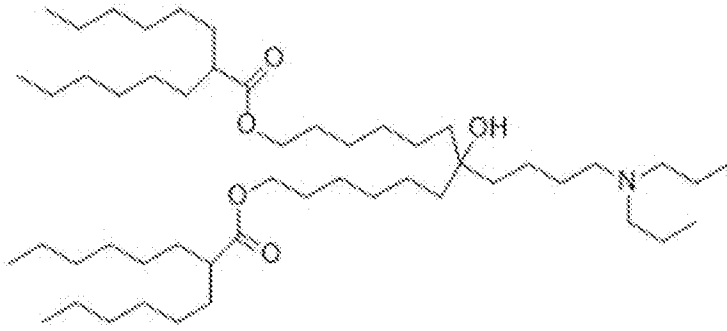


CL4F 8-4.

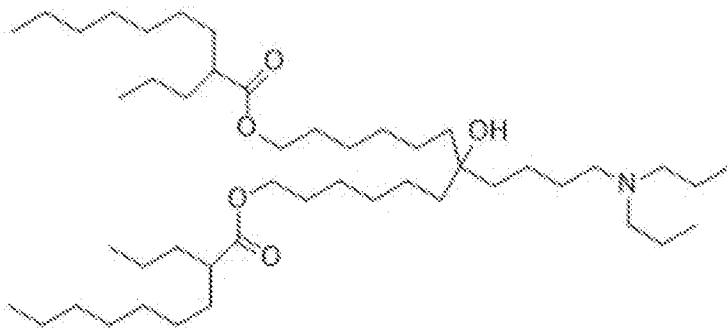


CL4F 8-5.

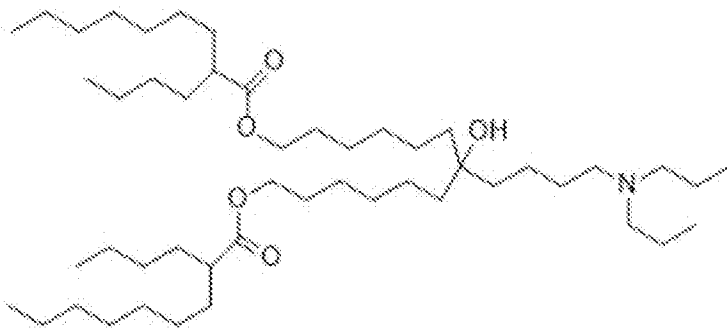
[化11-2]



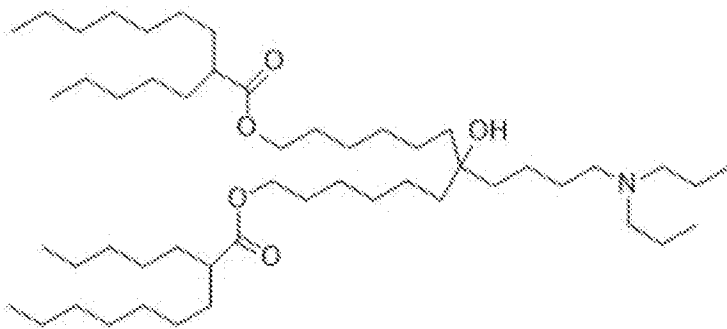
CL4F 8-6.



CL4F 9-3.

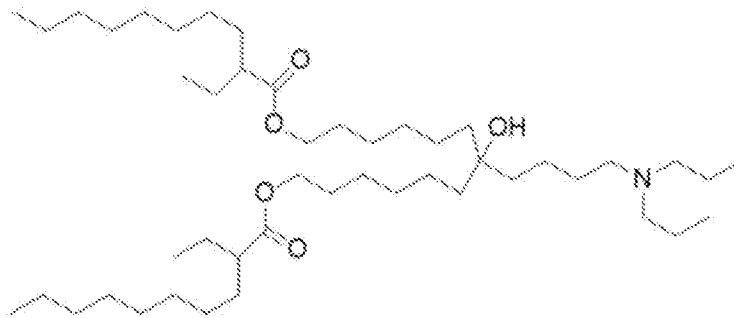


CL4F 9-4.

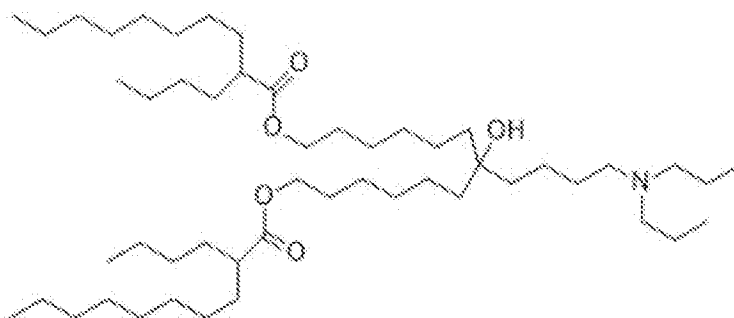


CL4F 9-5.

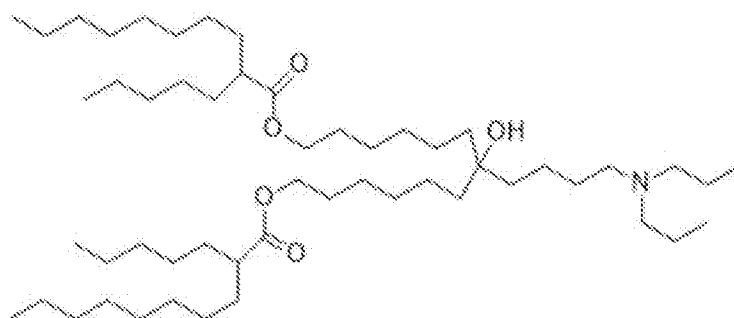
[化11-3]



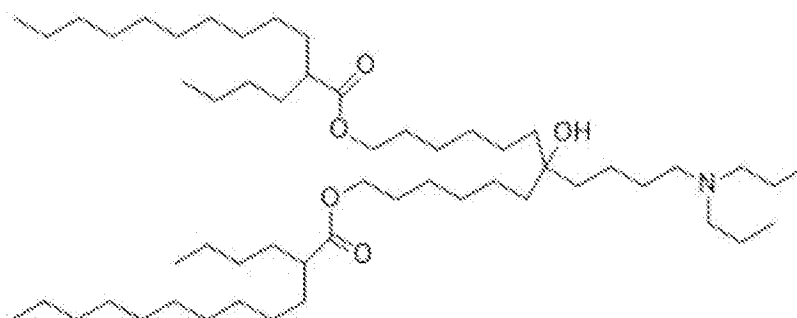
CL4F 10-2.



CL4F 10-4.

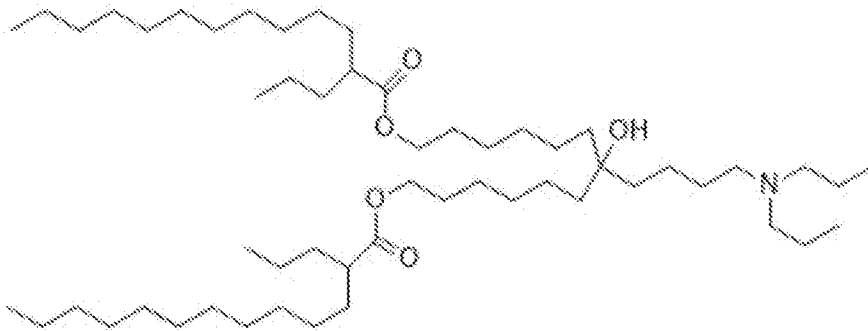


CL4F 10-5.

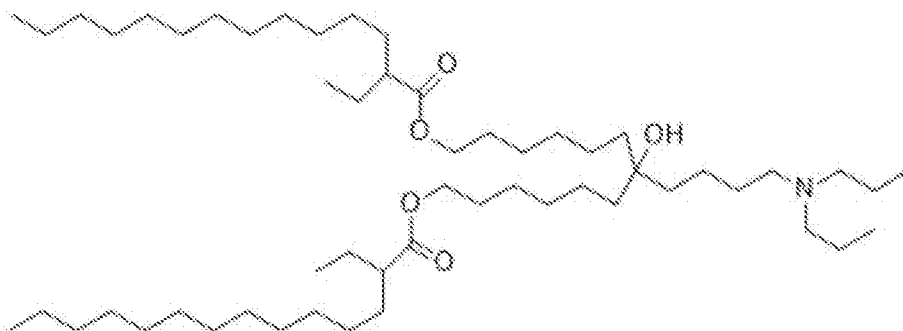


CL4F 12-4.

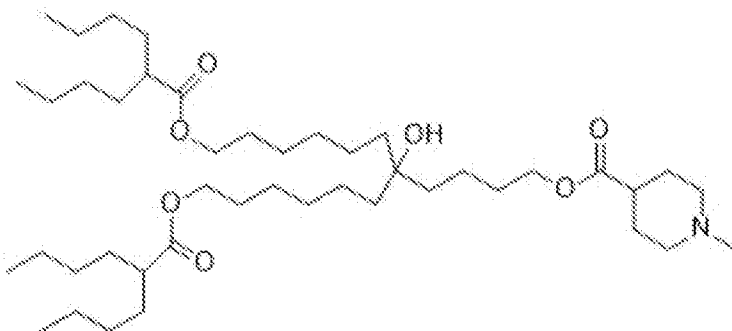
[化11-4]



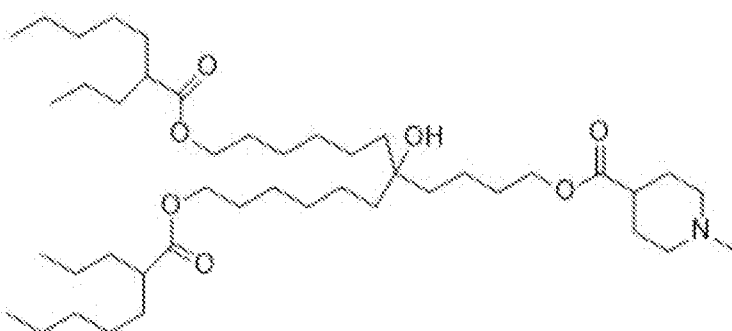
CL4F 13-3.



CL4F 14-2.

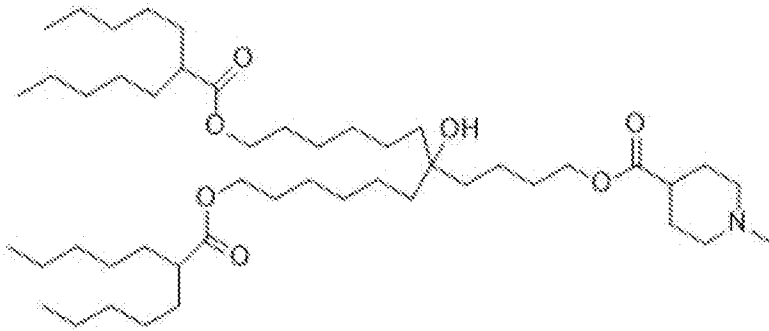


CL15F 6-4.

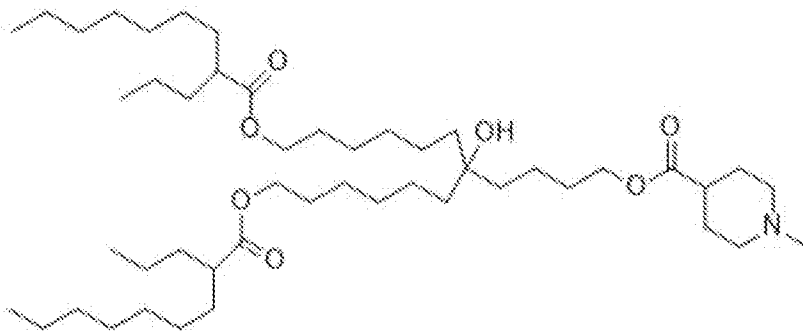


CL15F 7-3.

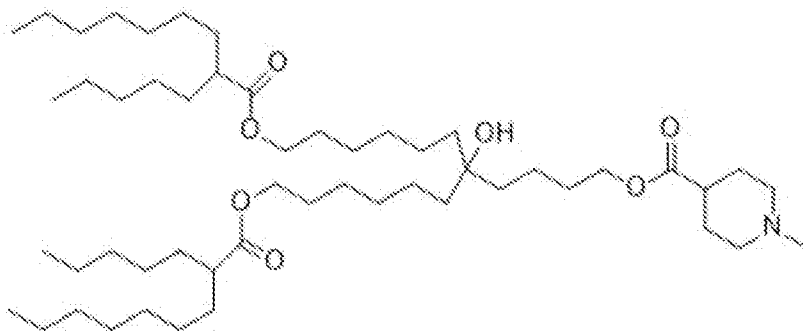
[化11-5]



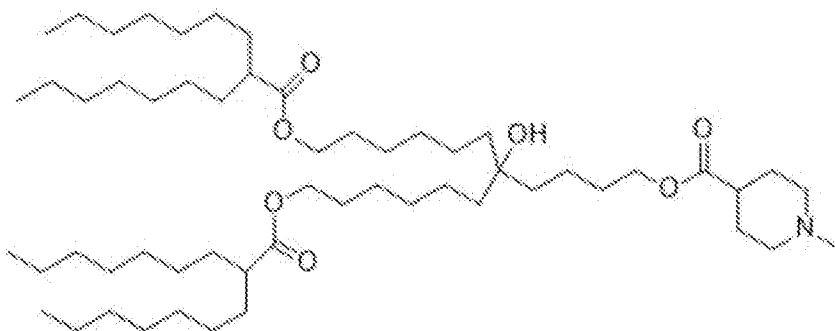
CL15F 7-5.



CL15F 9-3.

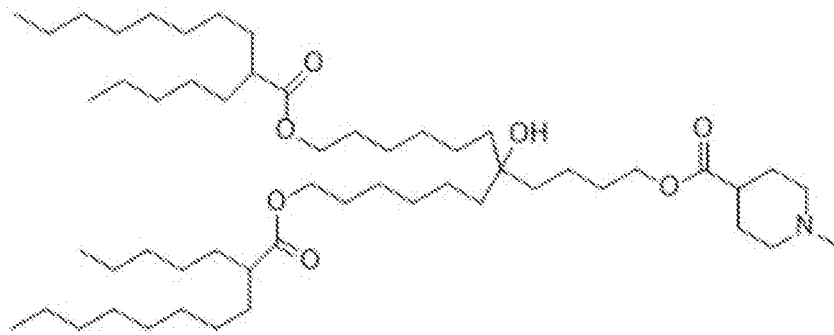


CL15F 9-5.

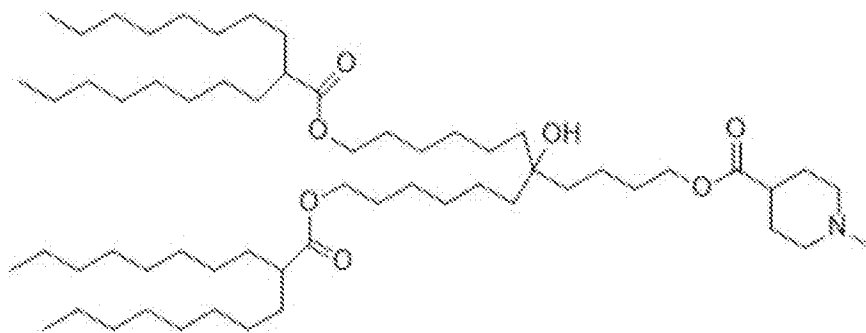


CL15F 9-7.

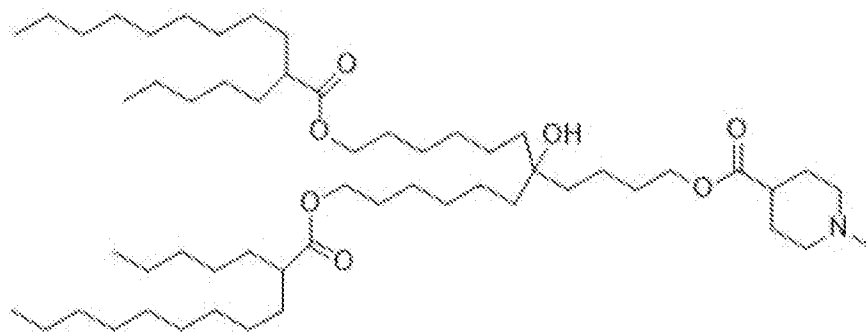
[化11-6]



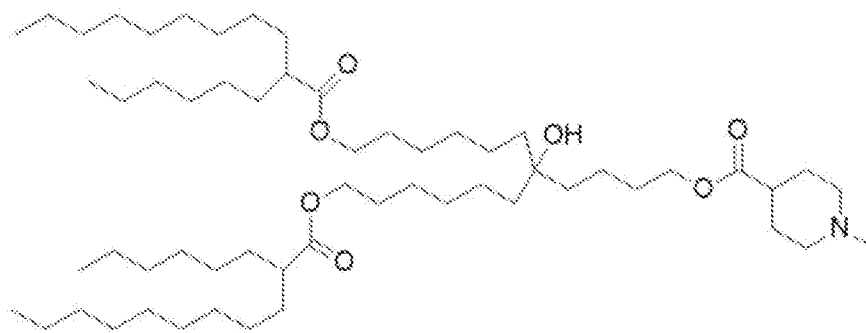
CL 15F 10-5.



CL 15F 10-8.

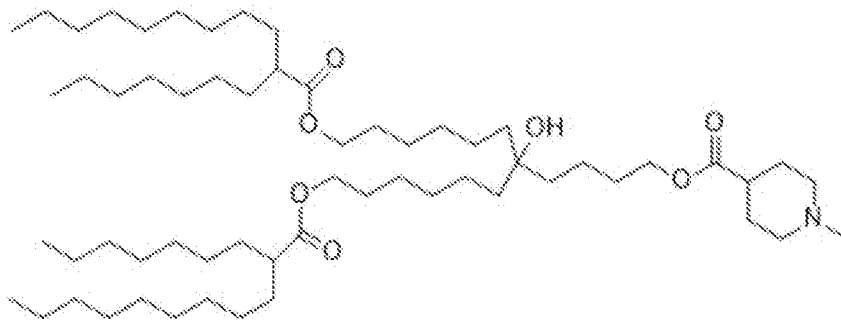


CL 15F 11-5.

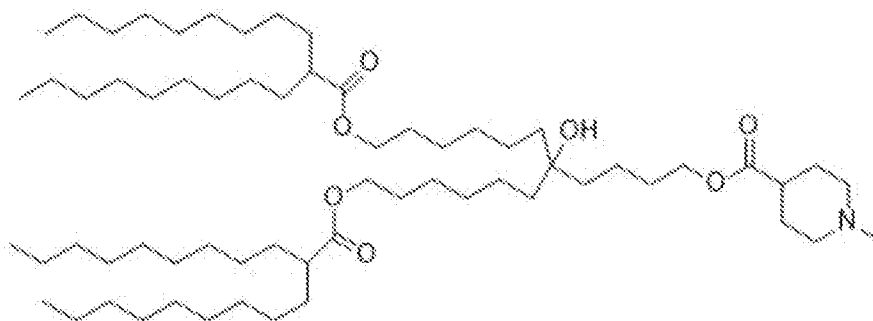


CL 15F 11-6.

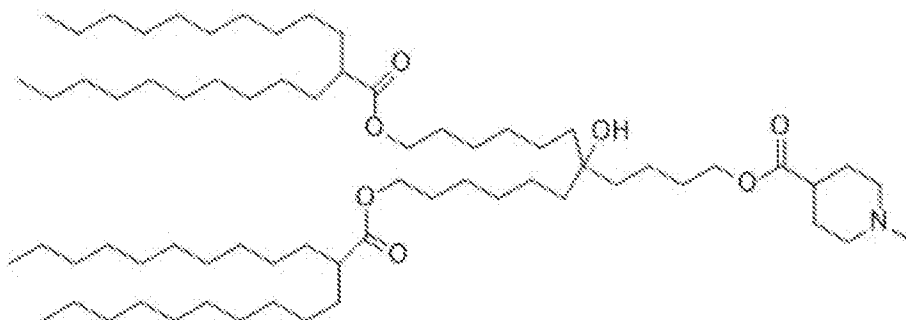
[化11-7]



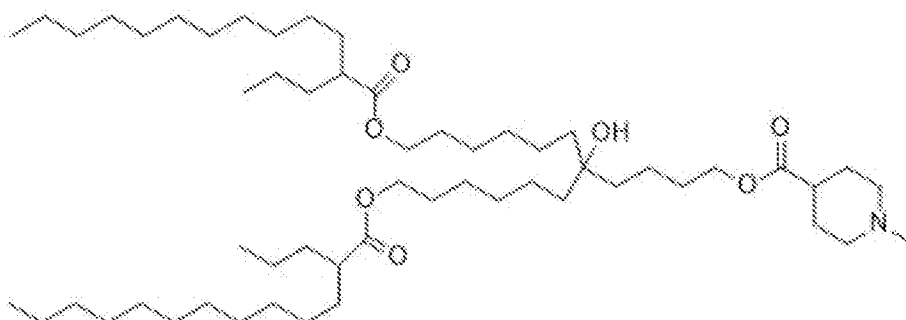
CL15F 11-7、



CL15F 11-9、

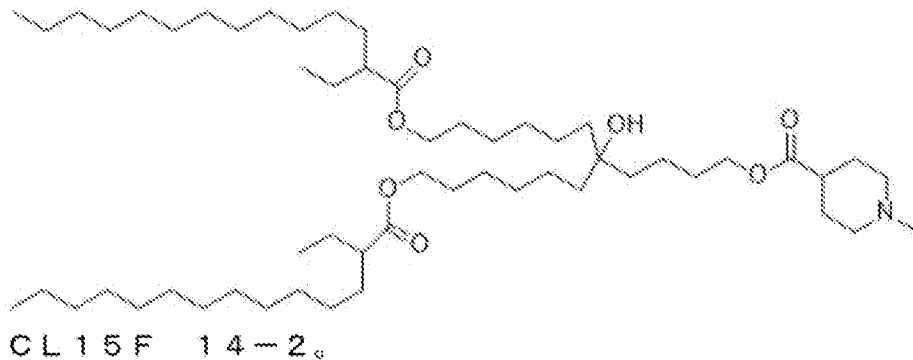


CL15F 12-10、



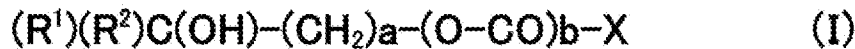
CL15F 13-3、

[化11-8]



[0016] [4-1] 下記の式(1)：

[化12]



[式(1)中、aは3～5の整数を示し；bは0又は1を示し；R¹及びR²はそれぞれ独立して下記一般式(A)：

[化13]



(式(A)中、R¹¹及びR¹²はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状のC₂₋₁₅アルキル基を示し；cは0又は1を示し；vは4～12の整数を示す)で表される基を示し；Xは、下記一般式(B)：

[化14]

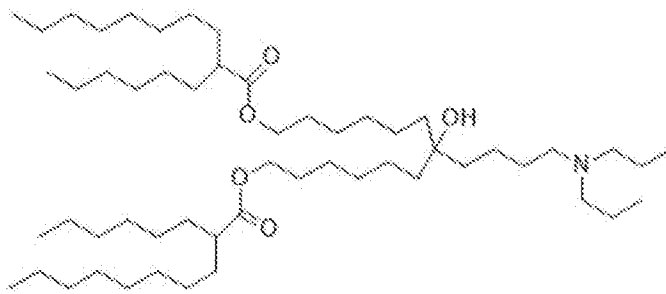


(式(B)中、dは0～3の整数を示し；R³及びR⁴はそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基(該C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい)を示すが、R³及びR⁴は互いに結合して5～7員非芳香族ヘテロ環(該環の1個又は2個の水素原子が、C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されていてもよい)を形成してもよい)で表される基又は5～7員非芳香族ヘテロ環基(ただし、該基は炭素原子により(O-CO)b-に結合し、該環の1個又

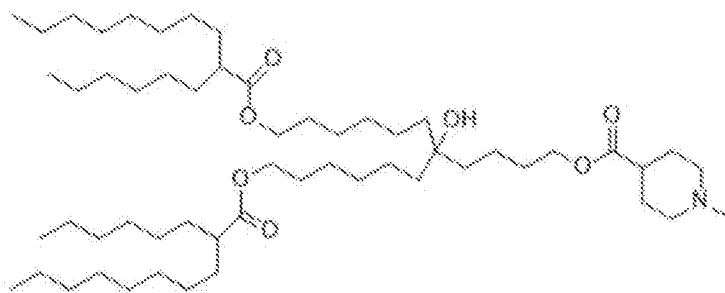
は2個の水素原子が、 C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基に置換されていてもよい)を示す]

で表されるpH感受性カチオン性脂質（但し下記式のpH感受性カチオン性脂質を除く）：

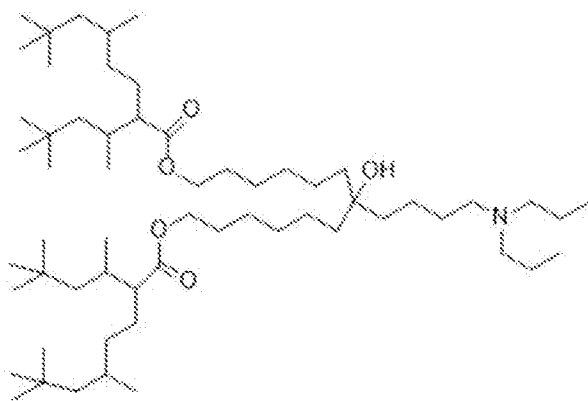
[化15]



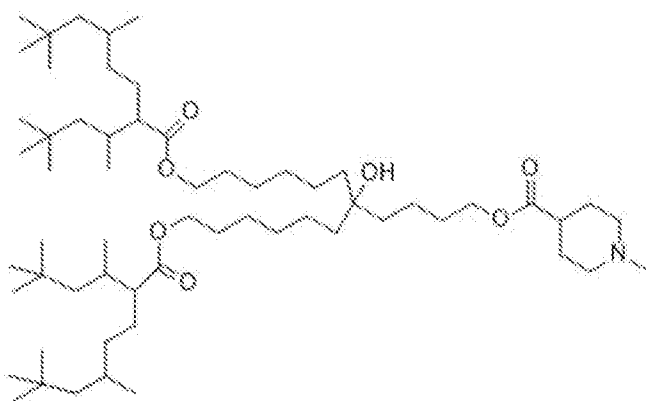
CL 4 F 6、



CL 15 F 6、



CL 4 G 6、

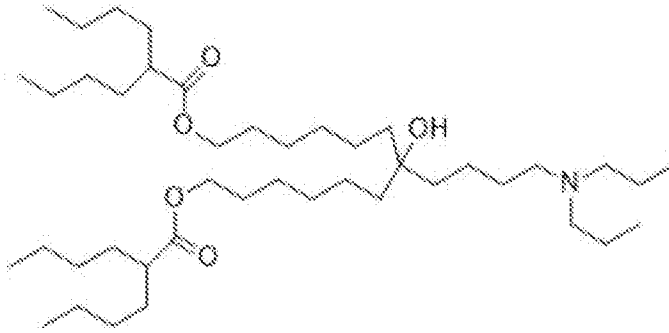


CL 15 G 6

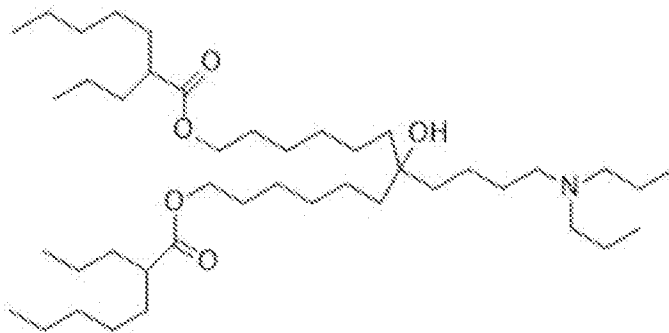
)、その立体異性体または立体異性体の混合物。

[0017] [4-2] 前記pH感受性カチオン性脂質が下記式で示される、[4-1]のpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物
:

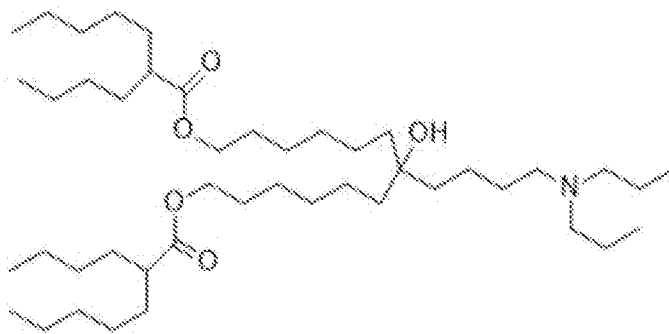
[化16-1]



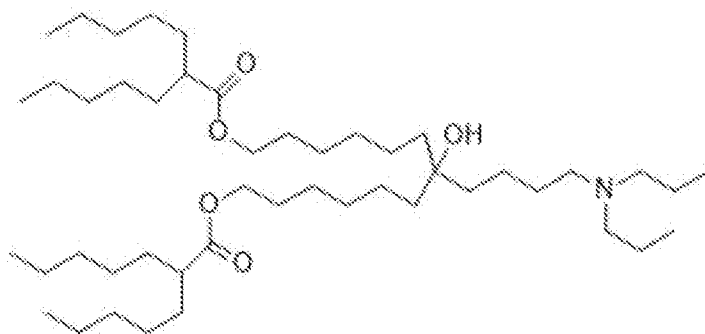
CL4F 6-4、



CL4F 7-3、

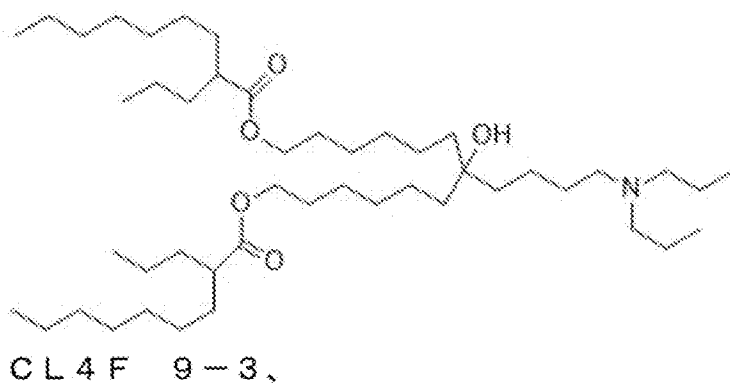
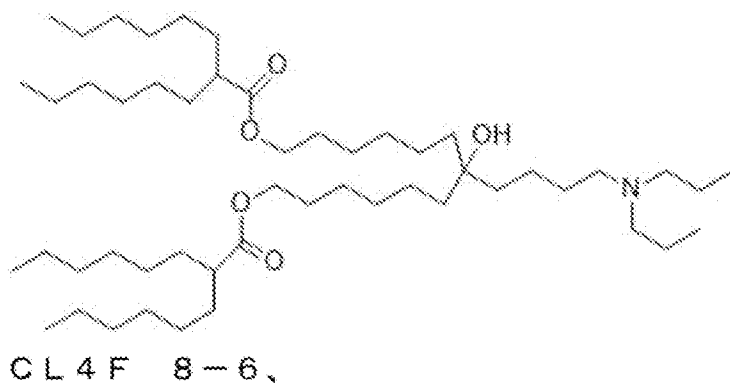
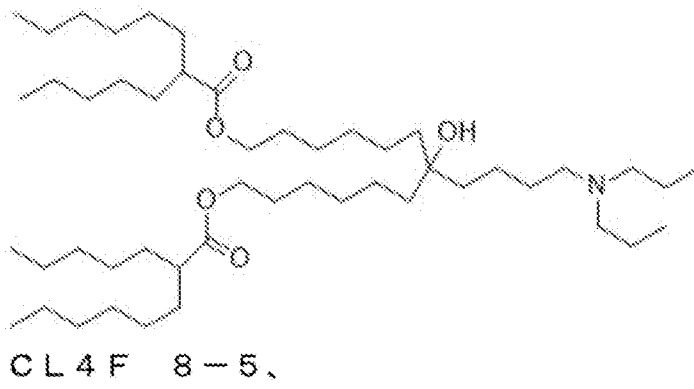
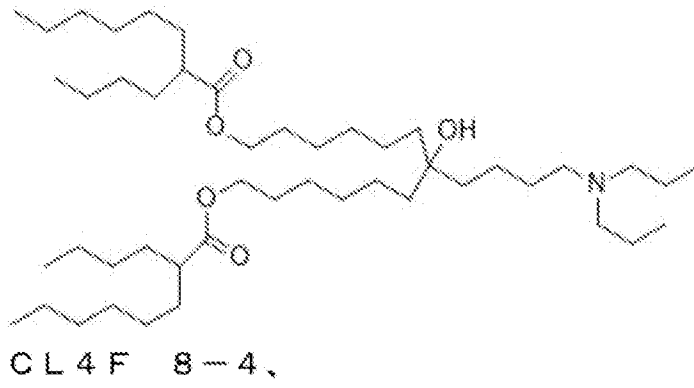


CL4F 7-4、

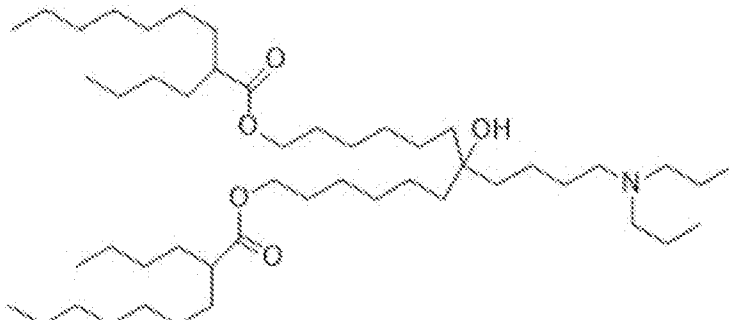


CL4F 7-5、

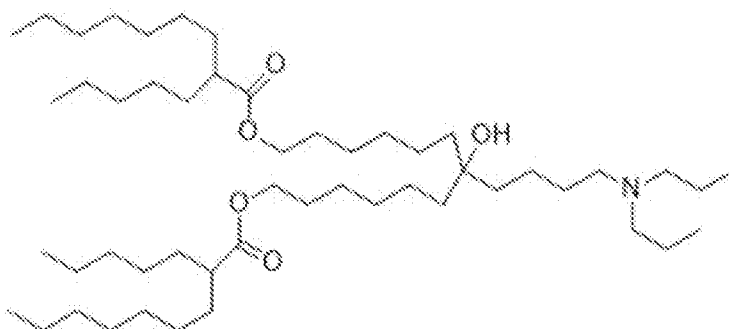
[化16-2]



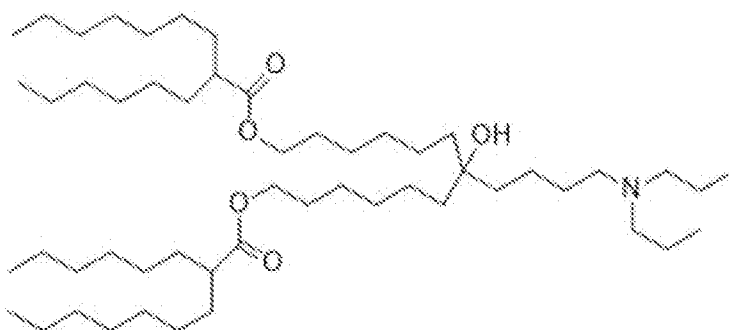
[化16-3]



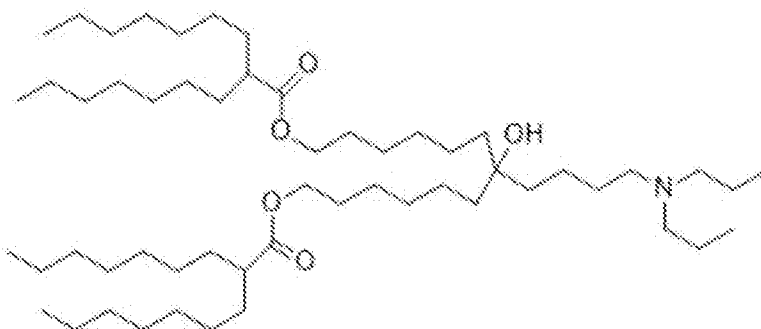
CL4F 9-4、



CL4F 9-5、

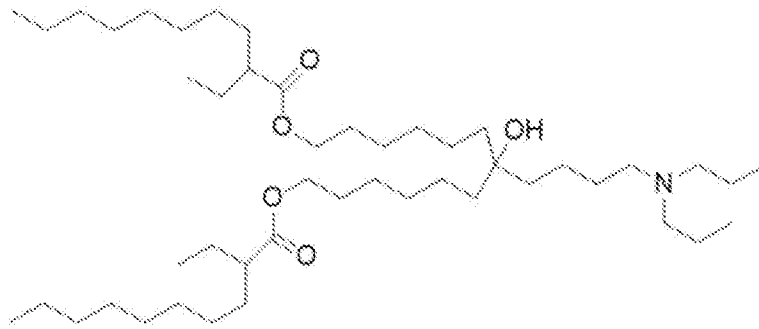


CL4F 9-6、

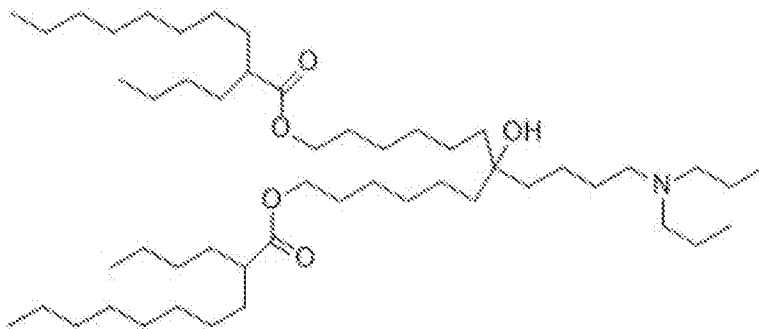


CL4F 9-7、

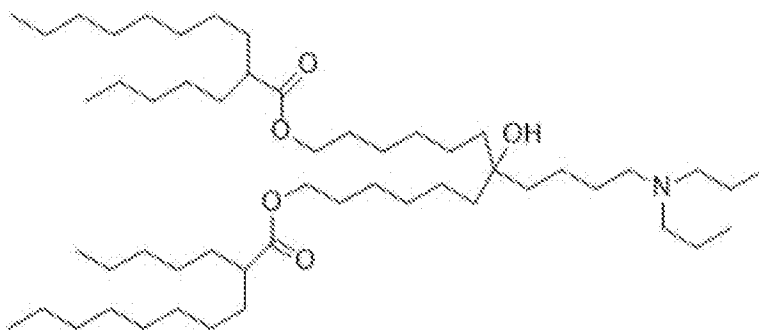
[化16-4]



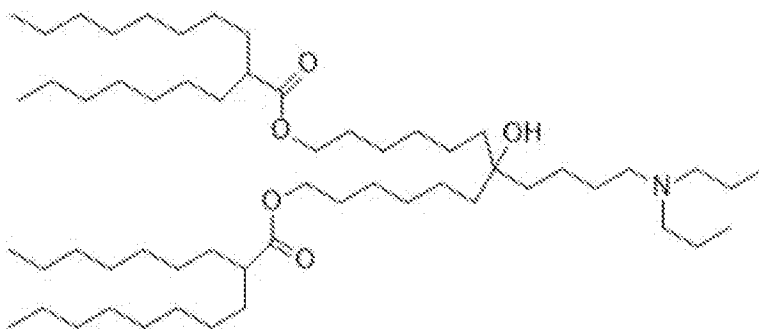
CL4F 10-2.



CL4F 10-4.

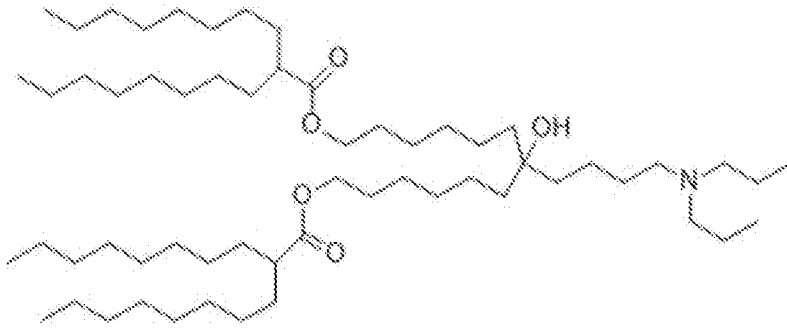


CL4F 10-5.

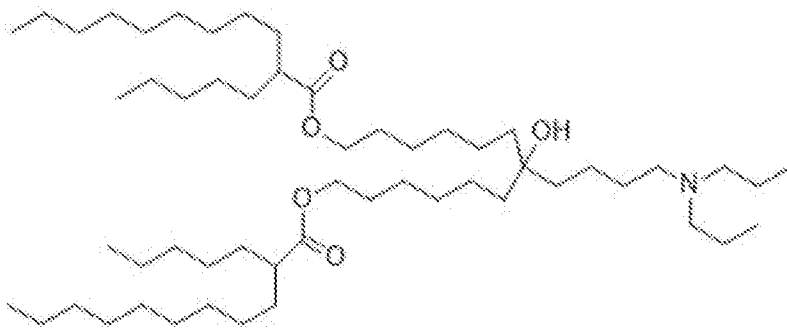


CL4F 10-7.

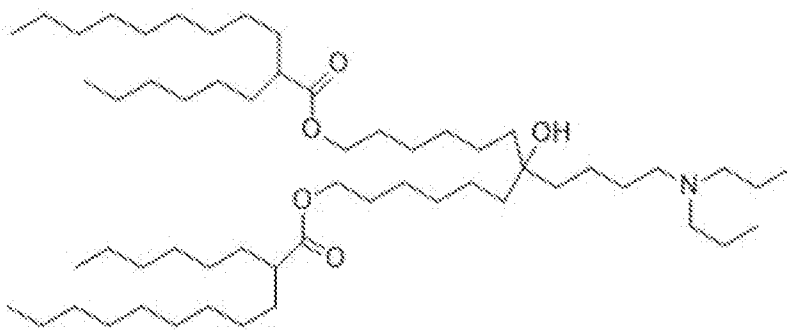
[化16-5]



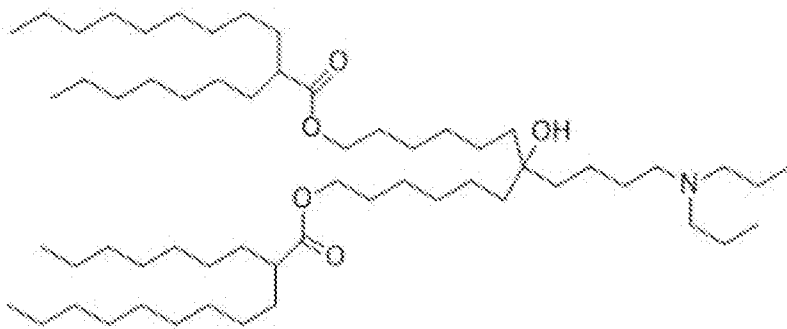
CL4F 10-8.



CL4F 11-5.

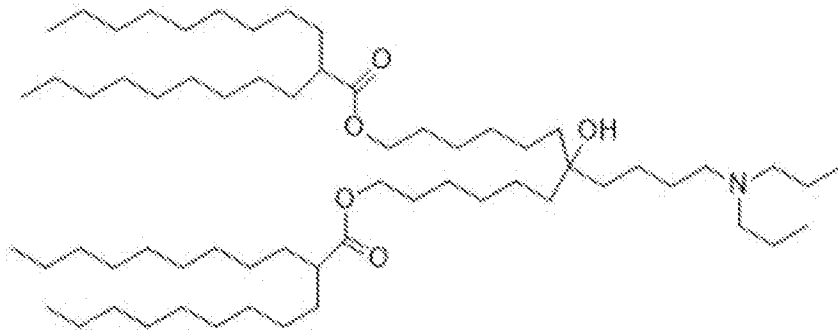


CL4F 11-6.

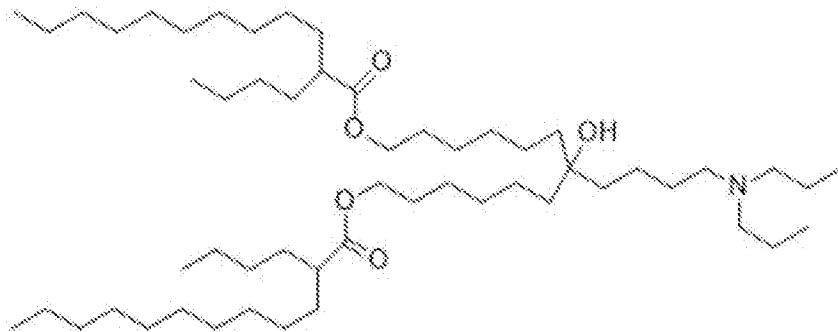


CL4F 11-7.

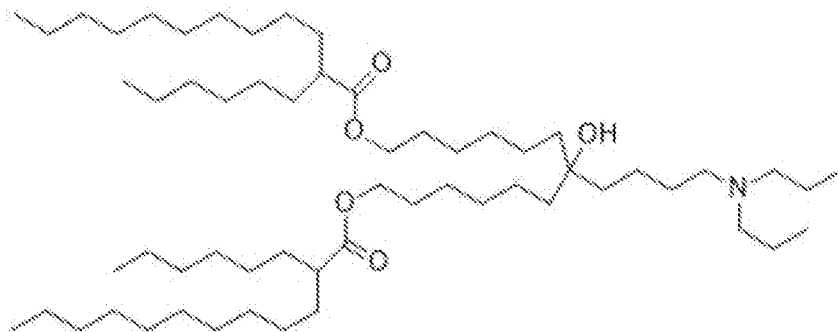
[化16-6]



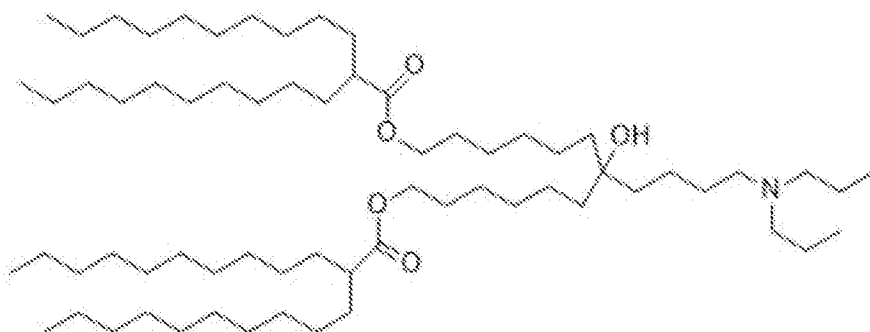
CL4F 11-9、



CL4F 12-4、

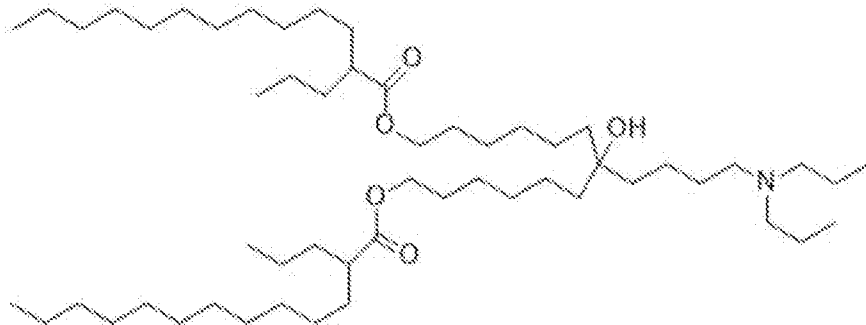


CL4F 12-6、

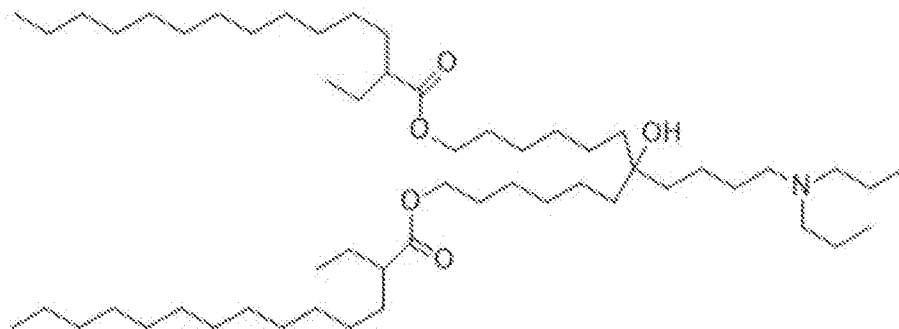


CL4F 12-10、

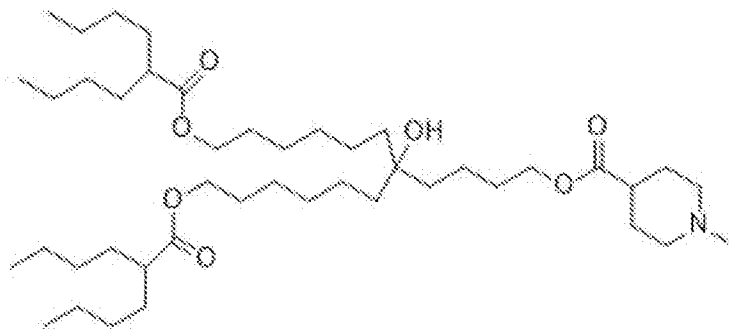
[化16-7]



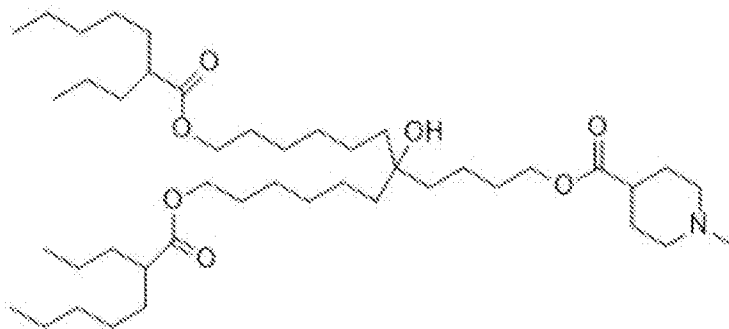
CL4F 13-3.



CL4F 14-2.

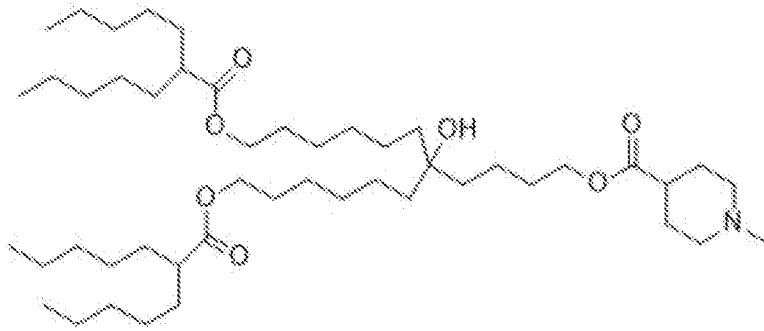


CL15F 6-4.

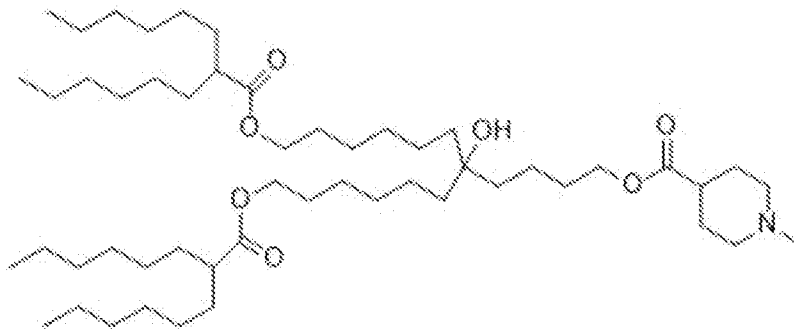


CL15F 7-3.

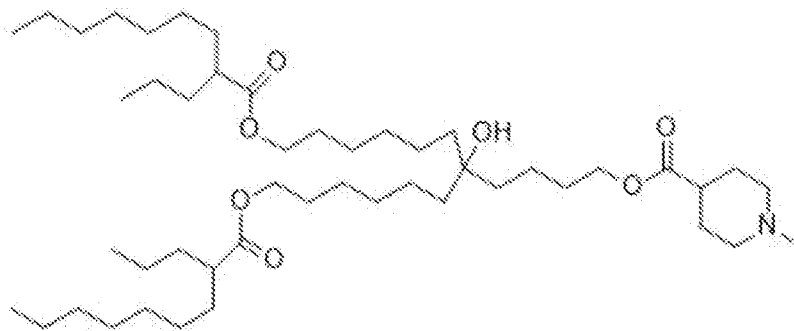
[化16-8]



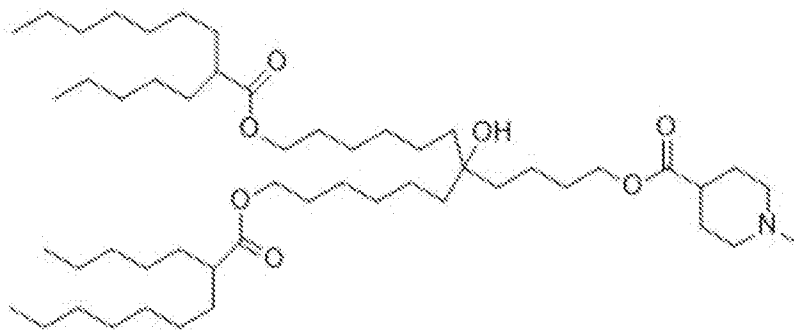
CL15F 7-5.



CL15F 8-6.

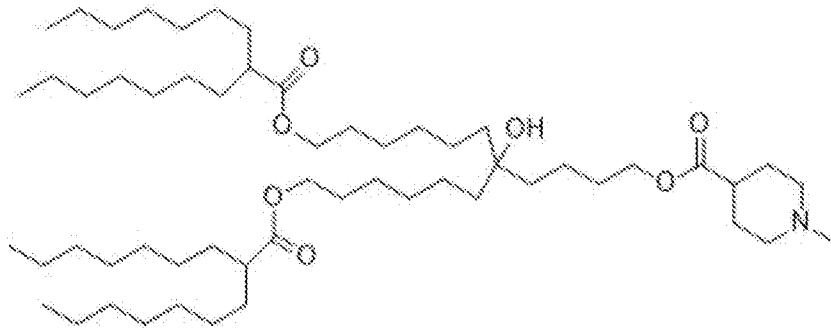


CL15F 9-3.

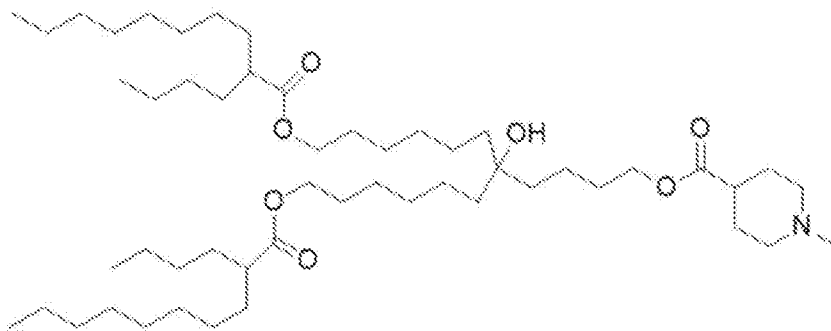


CL15F 9-5.

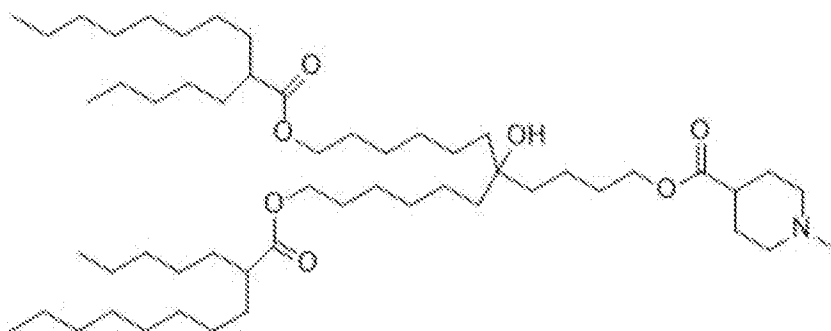
[化16-9]



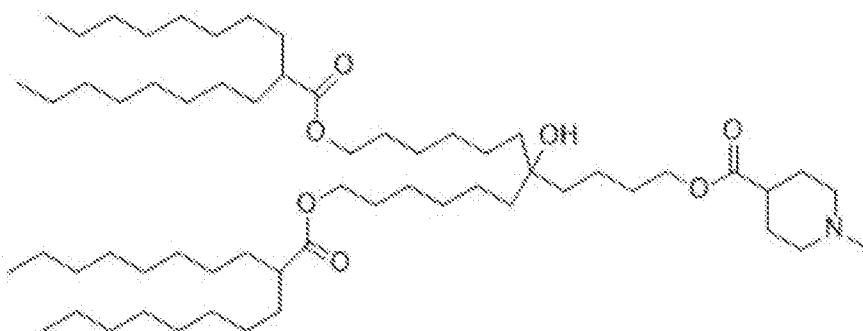
CL15F 9-7、



CL15F 10-4、

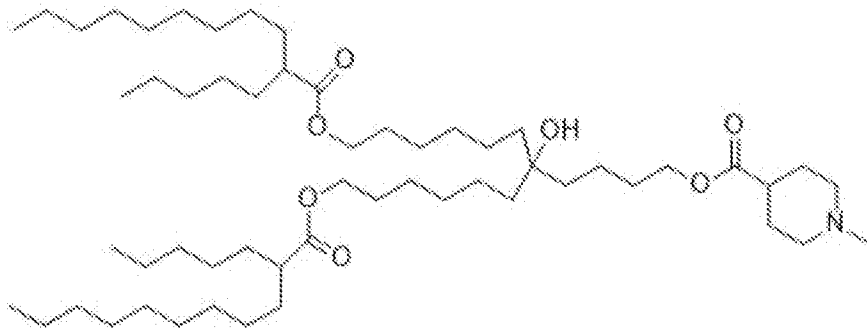


CL15F 10-5、

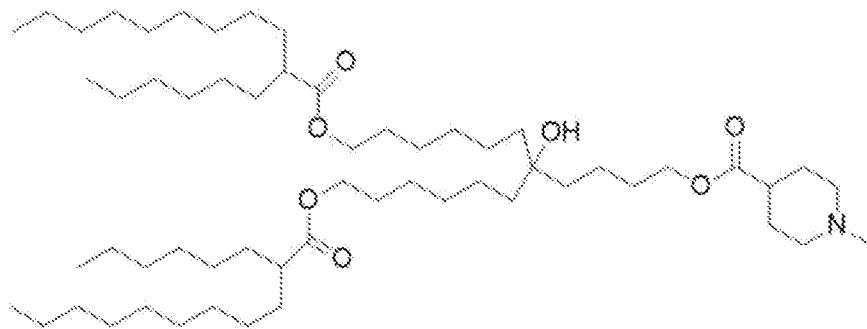


CL15F 10-8、

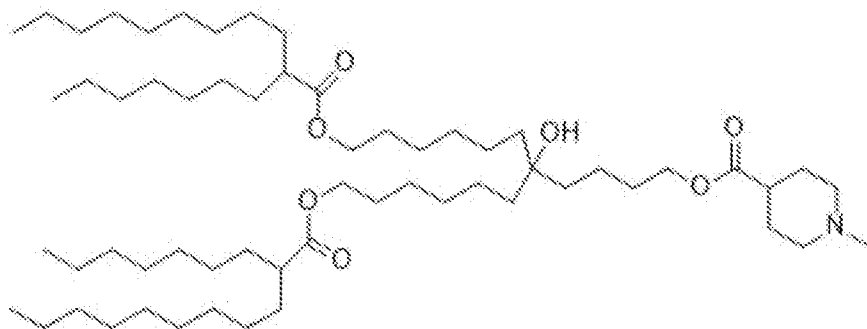
[化16-10]



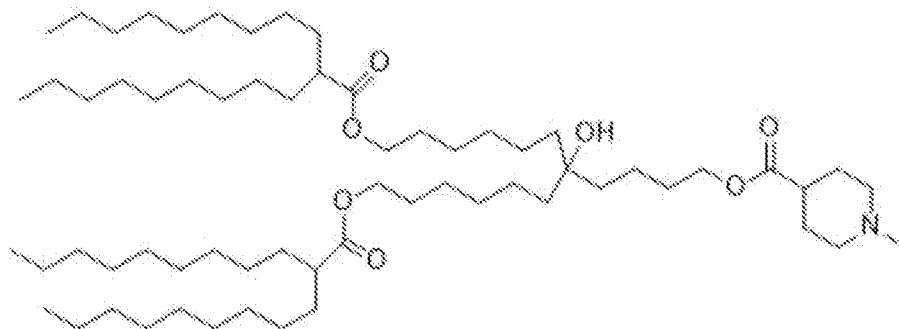
CL15F 11-5,



CL15F 11-6,

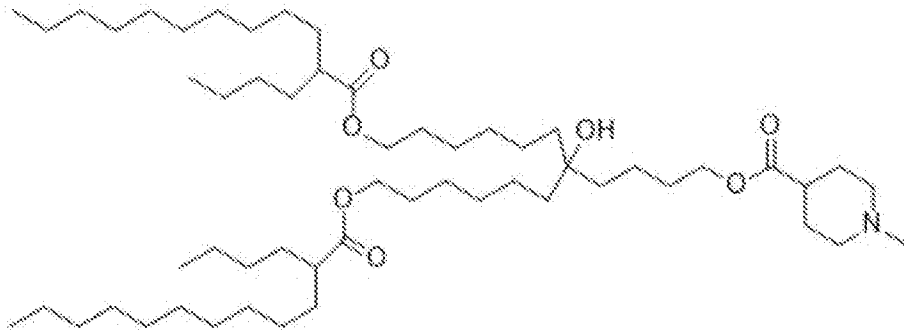


CL15F 11-7,

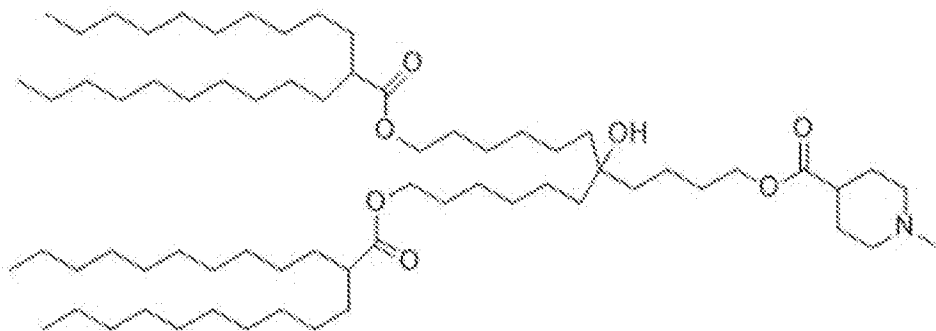


CL15F 11-9,

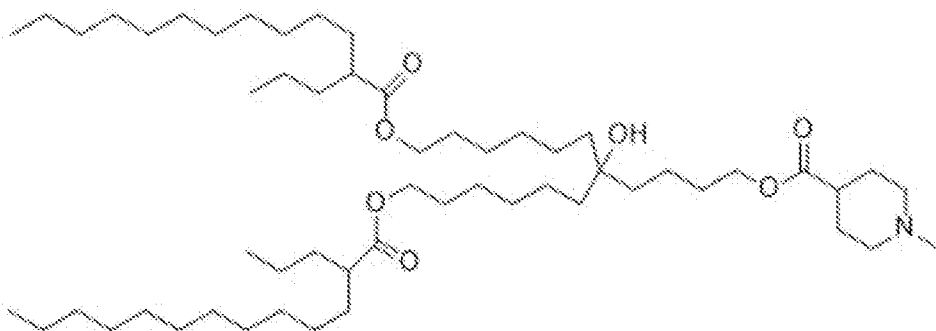
[化16-11]



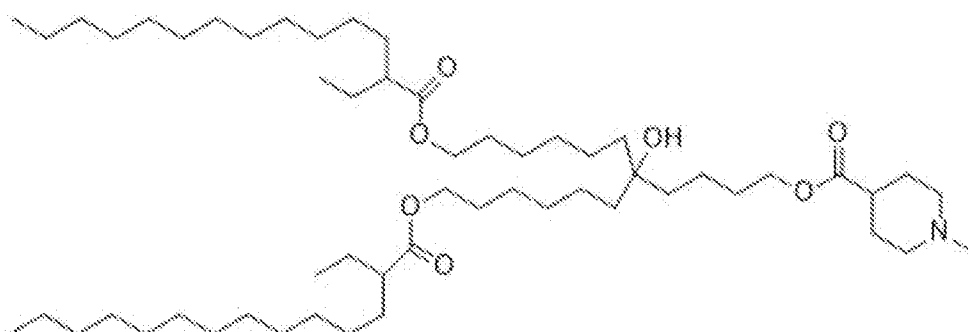
CL 15 F 12-4.



CL 15 F 12-10.



CL 15 F 13-3.



CL 15 F 14-2.

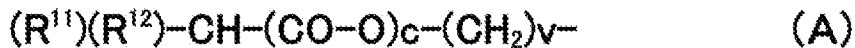
- [0018] [5-1] (i) ステロール又はステロール誘導体、
 (ii) ポリアルキレングリコール修飾脂質、
 (iii) 核酸、
 (iv) 緩衝剤、
 (v) 二糖及び
 (vi) 下記の式 (I) :

[化17]



[式 (I) 中、a は 3 ~ 5 の整数を示し ; b は 0 又は 1 を示し ; R¹ 及び R² はそれぞれ独立して下記一般式 (A) :

[化18]



(式 (A) 中、R¹¹ 及び R¹² はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C₂₋₁₅ アルキル基を示し ; c は 0 又は 1 を示し ; v は 4 ~ 12 の整数を示す) で表される基を示し ; X は、下記一般式 (B) :

[化19]



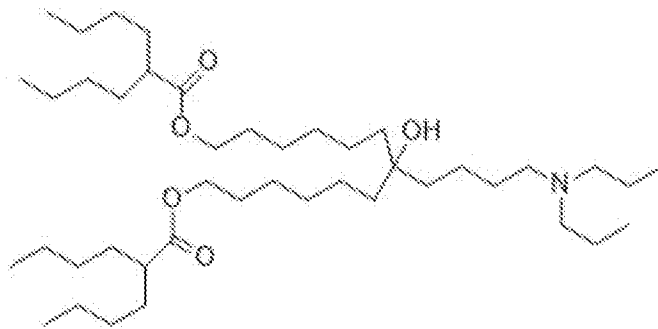
(式 (B) 中、d は 0 ~ 3 の整数を示し ; R³ 及び R⁴ はそれぞれ独立に C₁₋₄ アルキル基又は C₂₋₄ アルケニル基 (該 C₁₋₄ アルキル基又は C₂₋₄ アルケニル基は、1 個又は 2 個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい) を示すが、R³ 及び R⁴ は互いに結合して 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環 (該環の 1 個又は 2 個の水素原子が、C₁₋₄ アルキル基又は C₂₋₄ アルケニル基に置換されていてもよい) を形成してもよい) で表される基又は 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環基 (ただし、該基は炭素原子により (O-CO)_b- に結合し、該環の 1 個又は 2 個の水素原子が、C₁₋₄ アルキル基又は C₂₋₄ アルケニル基に置換されていてもよい) を示す]

で表される pH 感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物、

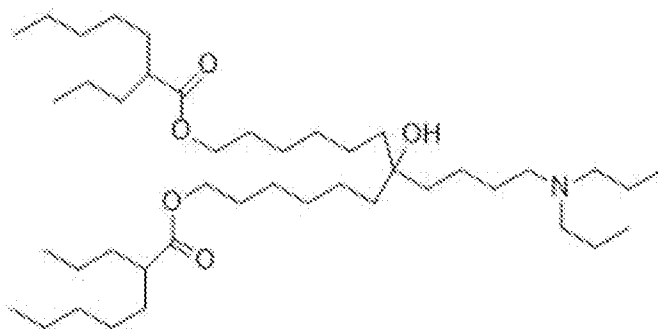
を含む脂質ナノ粒子製剤。

[0019] [5-2] 前記 pH 感受性カチオン性脂質が下記式で示される [5-1] の脂質ナノ粒子製剤：

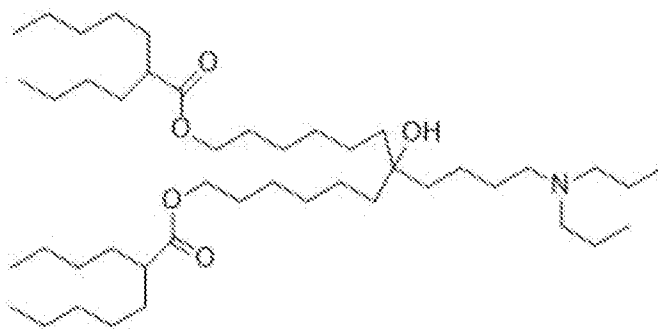
[化20-1]



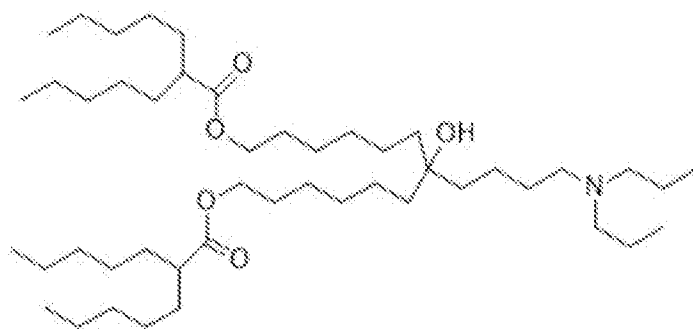
CL4F 6-4、



CL4F 7-3、

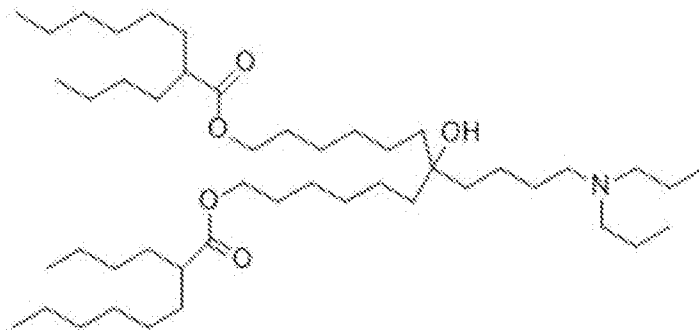


CL4F 7-4、

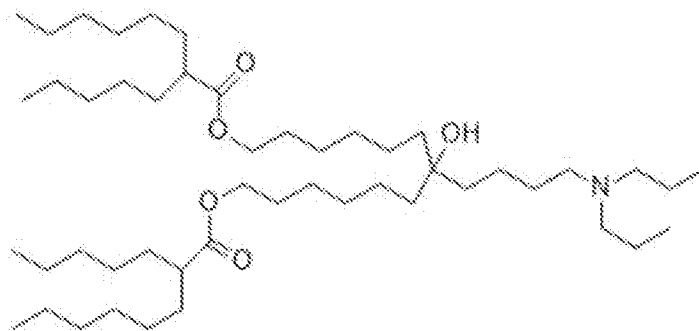


CL4F 7-5、

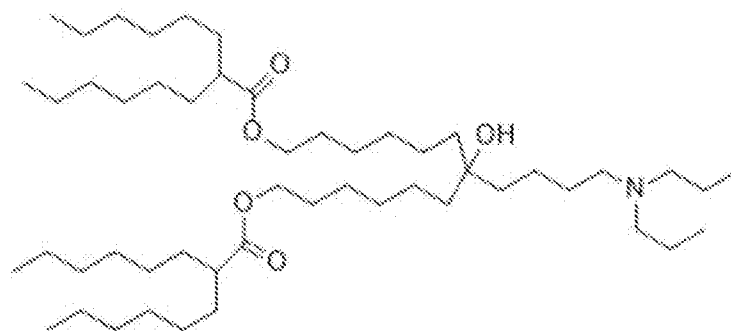
[化20-2]



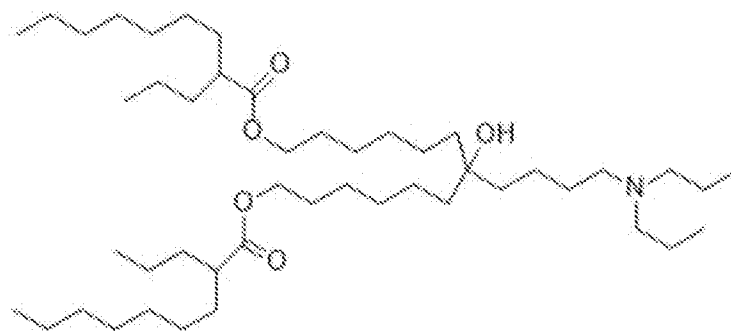
CL4F 8-4.



CL4F 8-5.

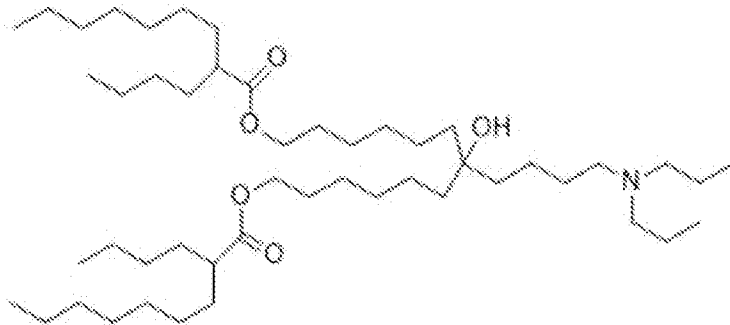


CL4F 8-6.

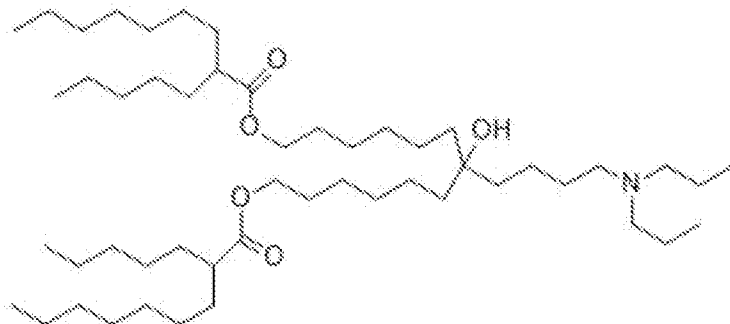


CL4F 9-3.

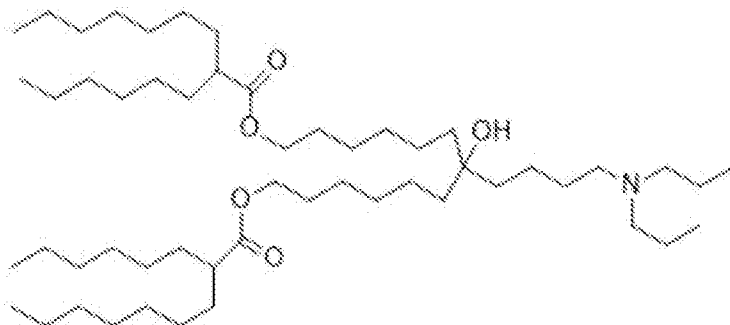
[化20-3]



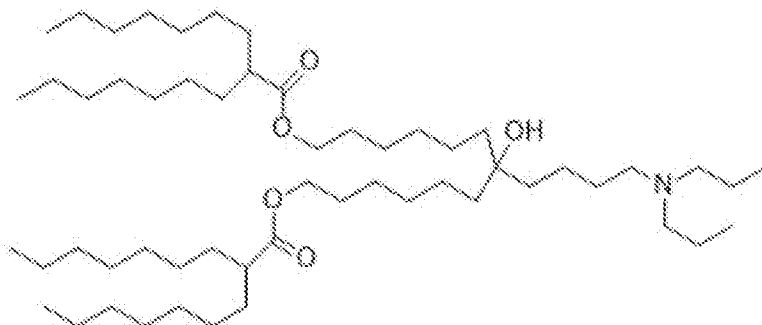
CL4F 9-4.



CL4F 9-5.

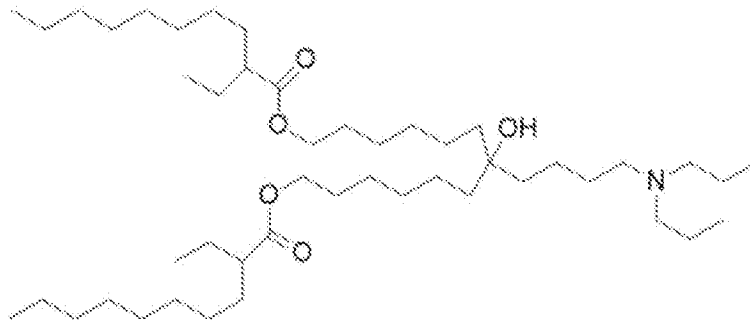


CL4F 9-6.

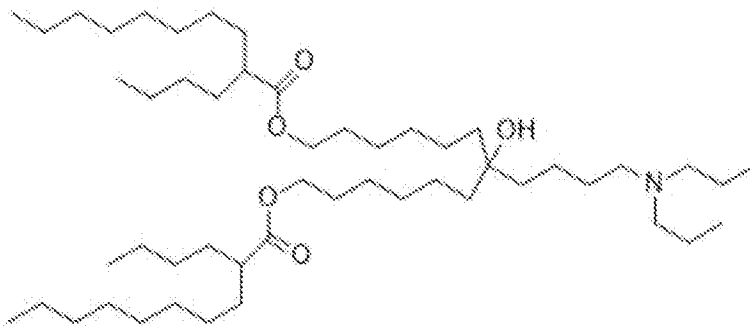


CL4F 9-7.

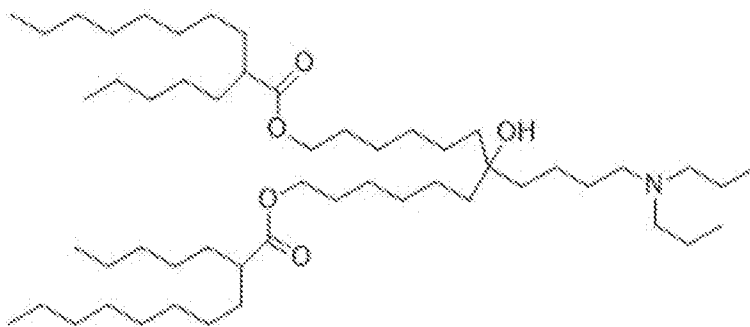
[化20-4]



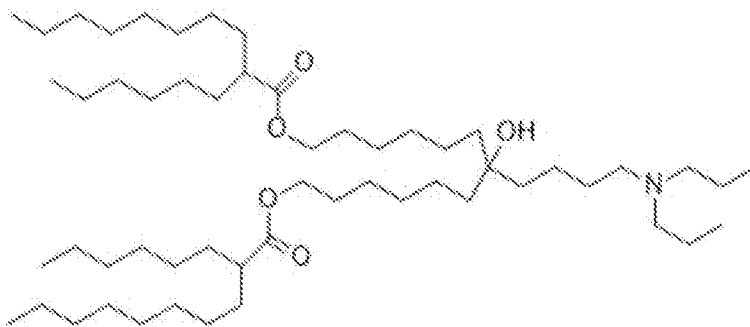
CL4F 10-2.



CL4F 10-4.

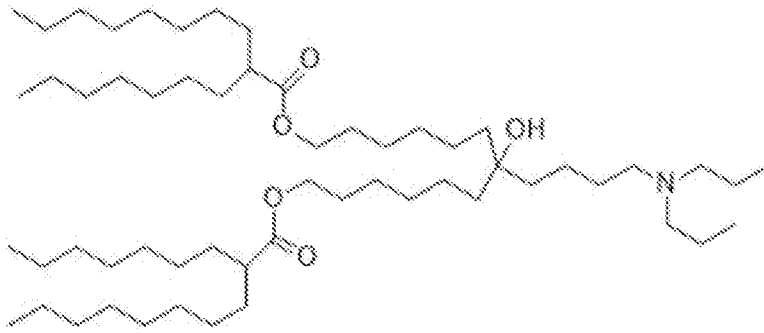


CL4F 10-5.

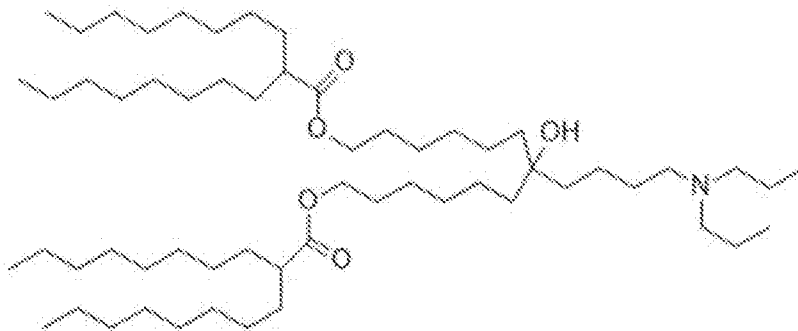


CL4F 6.

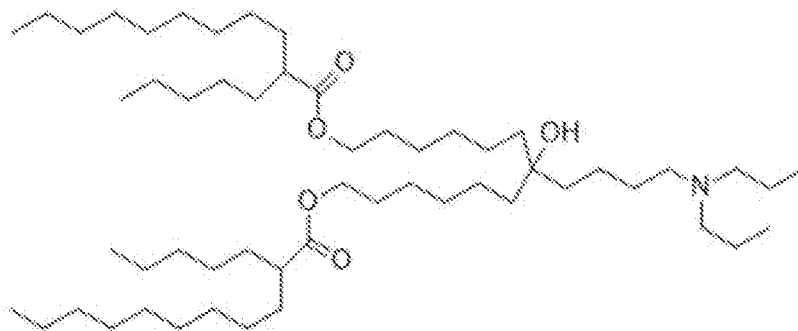
[化20-5]



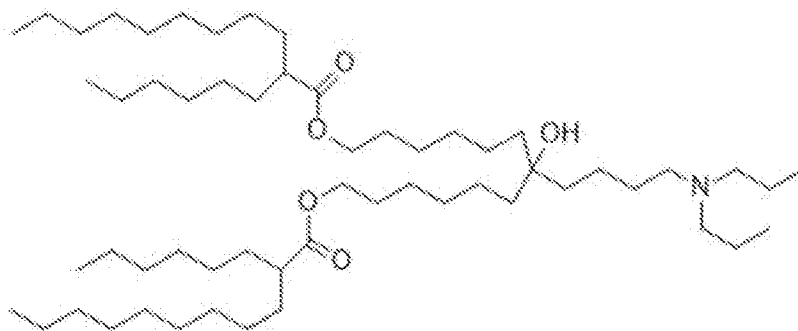
CL4F 10-7.



CL4F 10-8.

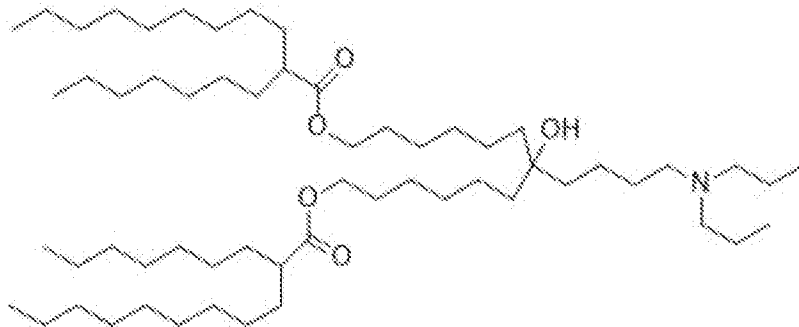


CL4F 11-5.

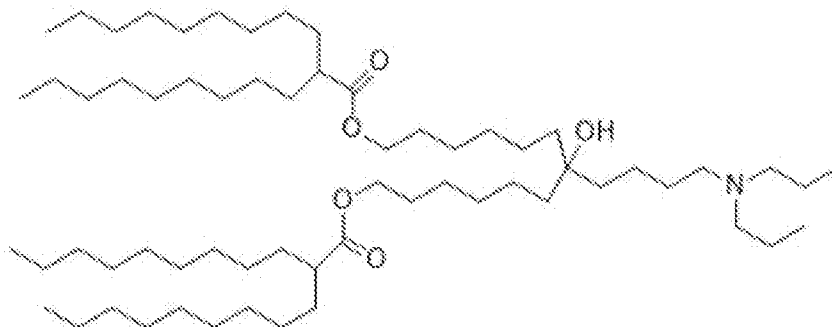


CL4F 11-6.

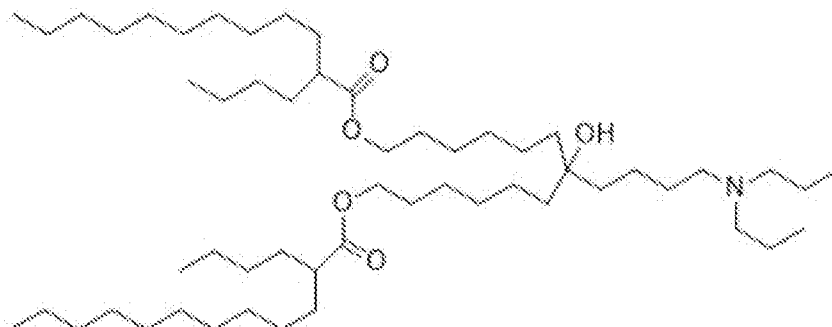
[化20-6]



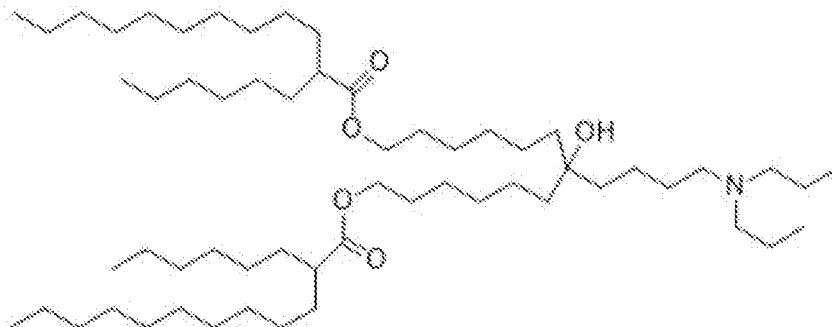
CL4F 11-7.



CL4F 11-9.

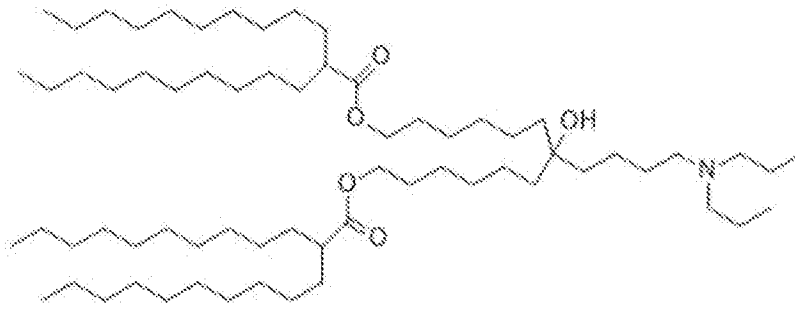


CL4F 12-4.

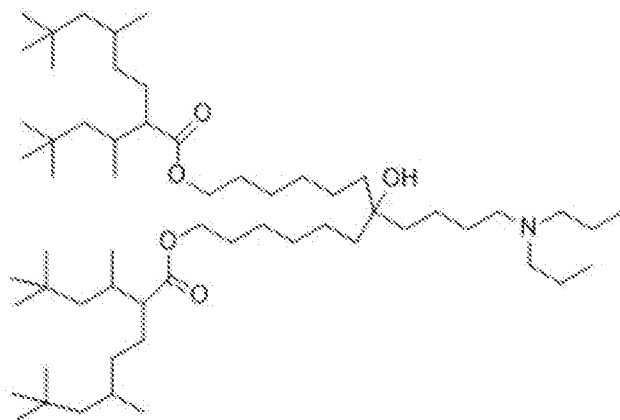


CL4F 12-6.

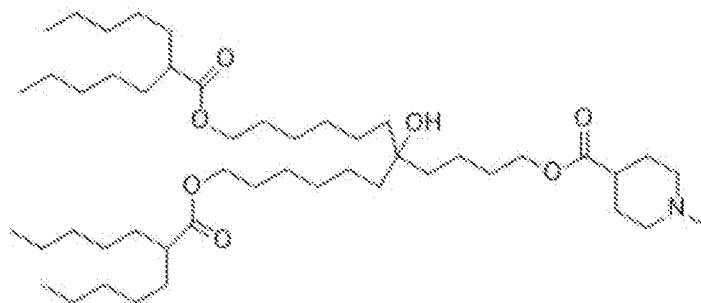
[化20-7]



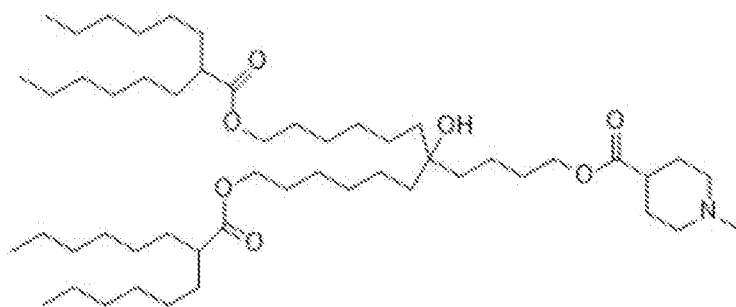
CL4F 12-10、



CL4G6、

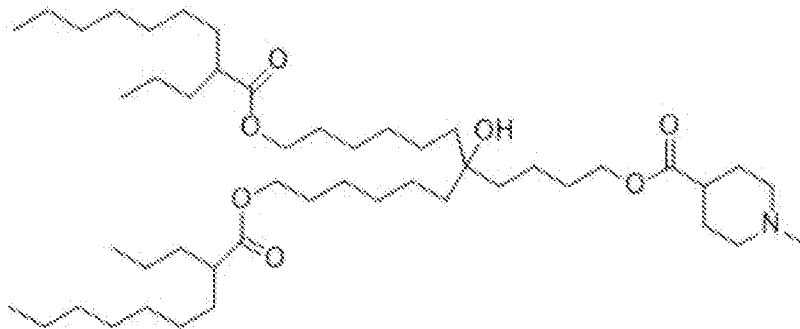


CL15F 7-5、

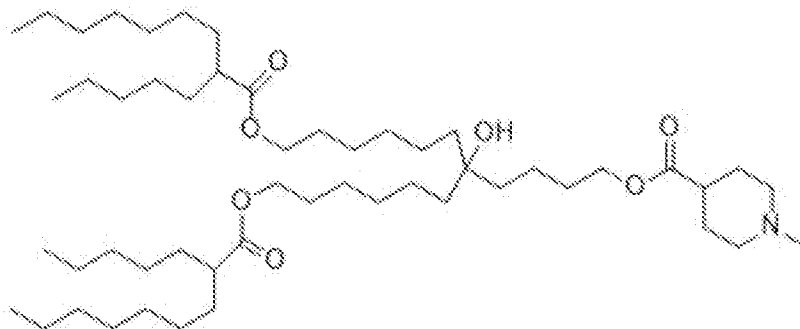


CL15F 8-6、

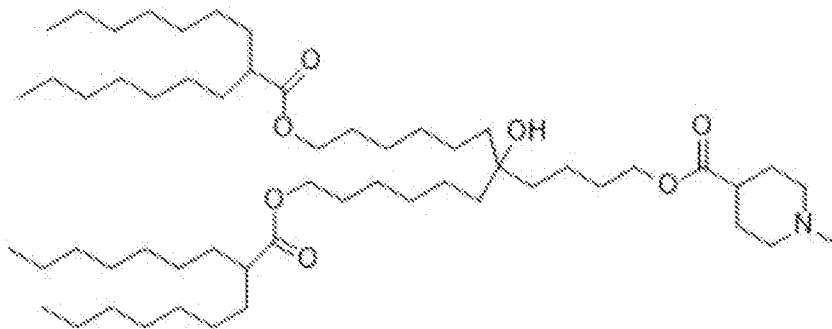
[化20-8]



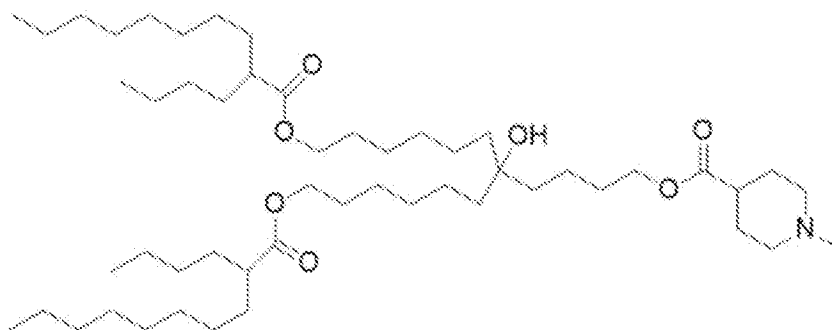
CL15F 9-3、



CL15F 9-5、

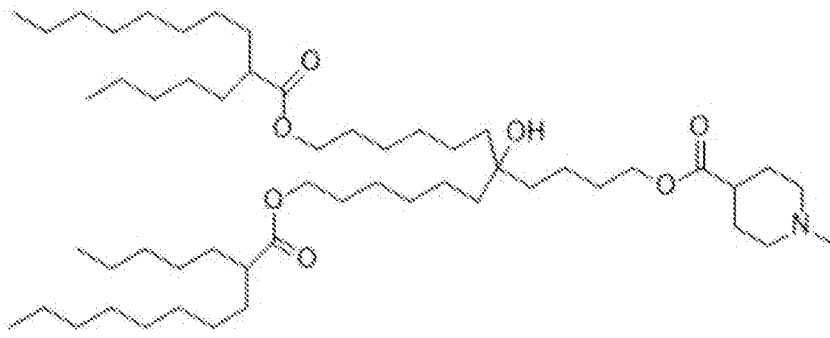


CL15F 9-7、

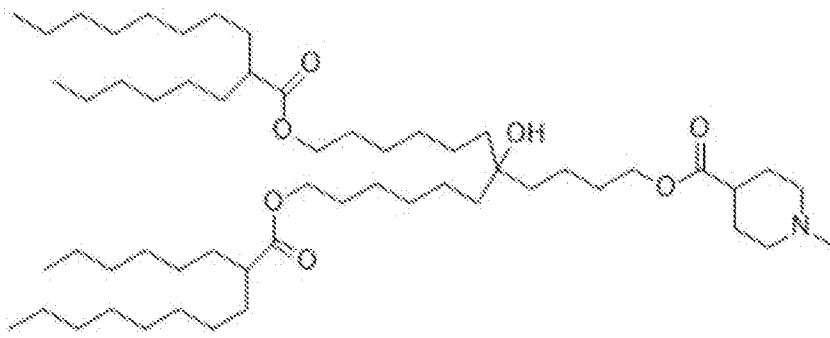


CL15F 10-4、

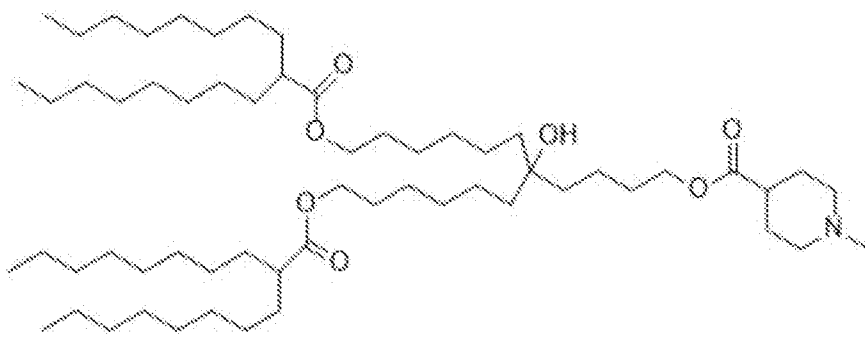
[化20-9]



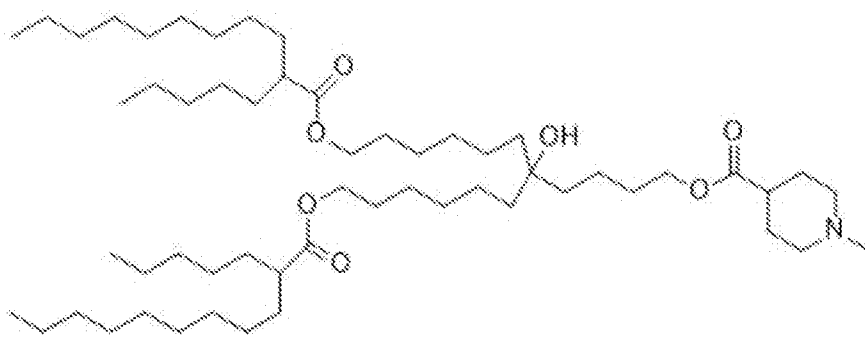
CL15F 10-5、



CL15F 6、

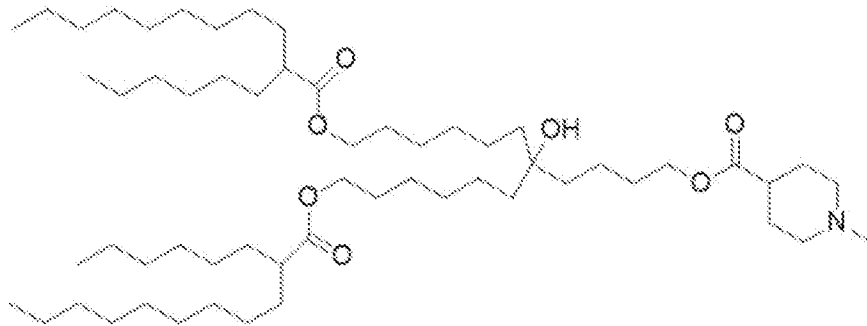


CL15F 10-8、

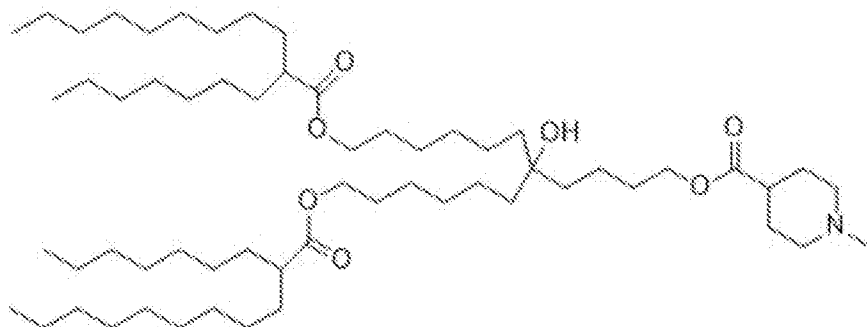


CL15F 11-5、

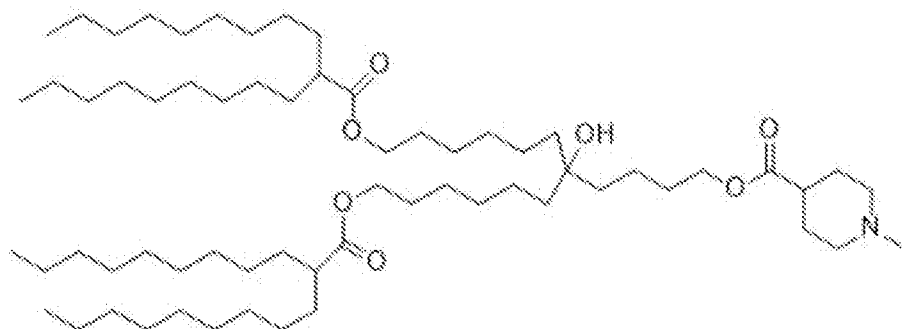
[化20-10]



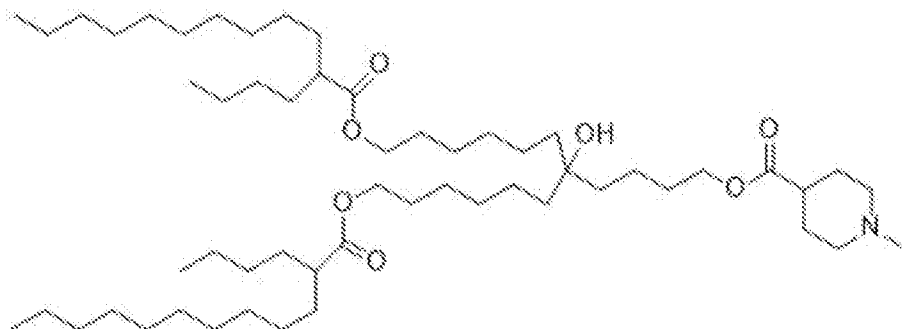
CL15F 11-6,



CL15F 11-7,

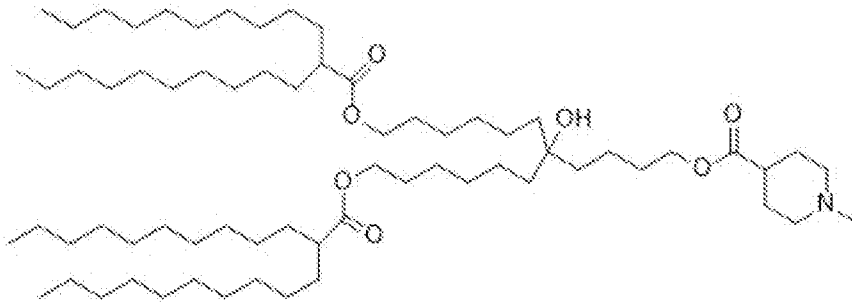


CL15F 11-9,

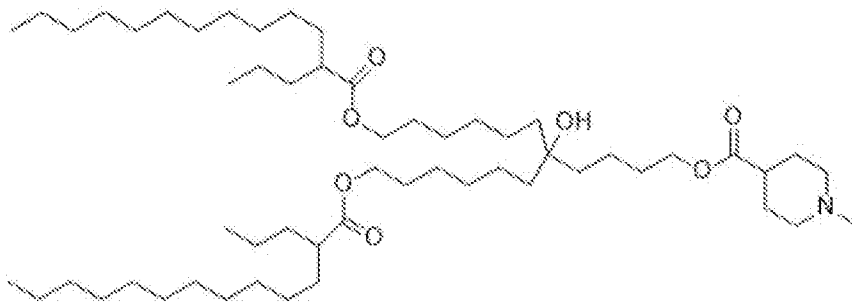


CL15F 12-4,

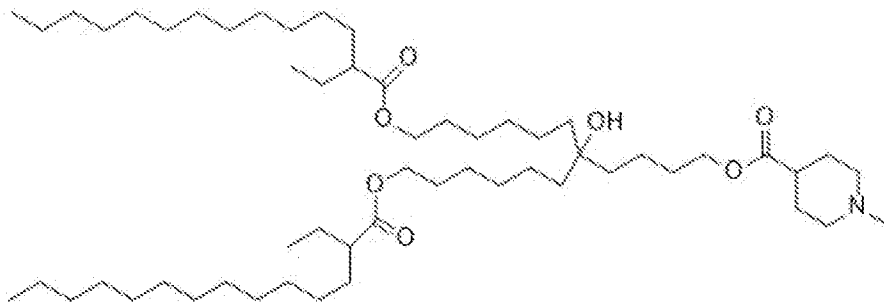
[化20-11]



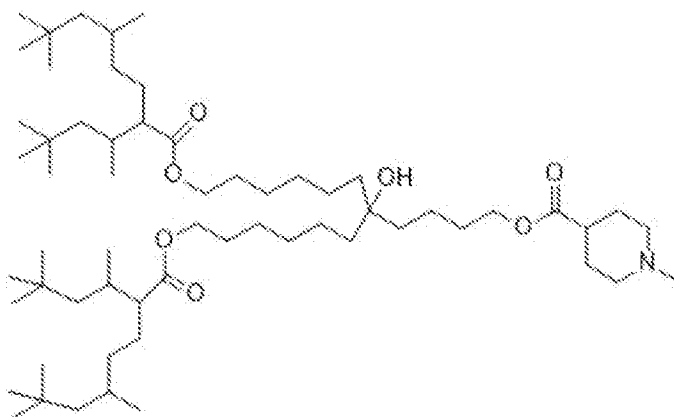
CL15F 12-10、



CL15F 13-3、



CL15F 14-2、



CL15G6、

[0020] [5-3] 前記核酸が、mRNAである、[5-1]又は[5-2]の脂質ナノ粒子製剤。

[5-4] 脂質ナノ粒子が水溶液に懸濁された、[5-1]～[5-3]のいずれかの脂質ナノ粒子製剤。

[5-5] 前記二糖の濃度が、1重量%～20重量%である[5-4]の脂質ナノ粒子製剤。

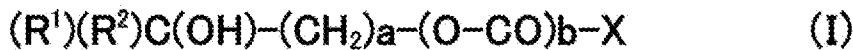
[0021] [5-6] 25℃においてpH6.8～pH8.0である[5-4]又は[5-5]のいずれかの脂質ナノ粒子製剤。

[5-7] 凍結乾燥された、[5-1]～[5-3]のいずれかの脂質ナノ粒子製剤。

[5-8] [5-7]の脂質ナノ粒子製剤に、水又は水溶液が添加された再懸濁製剤。

[0022] [6-1] 下記の式(1)：

[化21]



[式(1)中、aは3～5の整数を示し；bは0又は1を示し；R¹及びR²はそれぞれ独立して下記一般式(A)：

[化22]



(式(A)中、R¹¹及びR¹²はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状のC₂₋₁₅アルキル基を示し；cは0又は1を示し；vは4～12の整数を示す)

で表される基を示し；Xは、下記一般式(B)：

[化23]



(式(B)中、dは0～3の整数を示し；R³及びR⁴はそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基(該C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニ

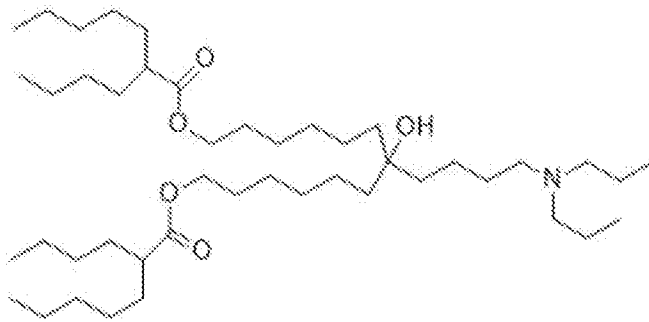
ル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい)を示すが、 R^3 及び R^4 は互いに結合して5～7員非芳香族ヘテロ環(該環の1個又は2個の水素原子が、 C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基に置換されていてもよい)を形成してもよい)で表される基又は5～7員非芳香族ヘテロ環基(ただし、該基は炭素原子により(O-CO)b-に結合し、該環の1個又は2個の水素原子が、 C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基に置換されていてもよい)を示す]

で表されるpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物

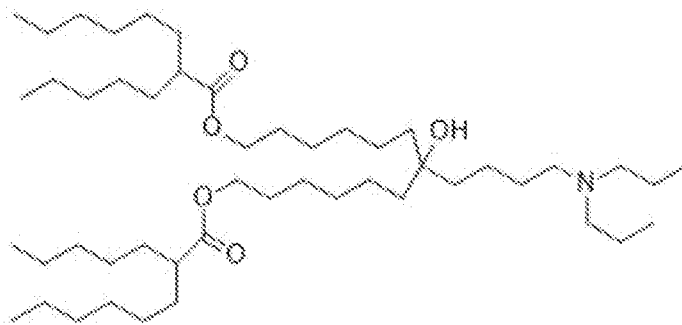
の製造方法であって、

前記pH感受性カチオン性脂質の化学式は下記式：

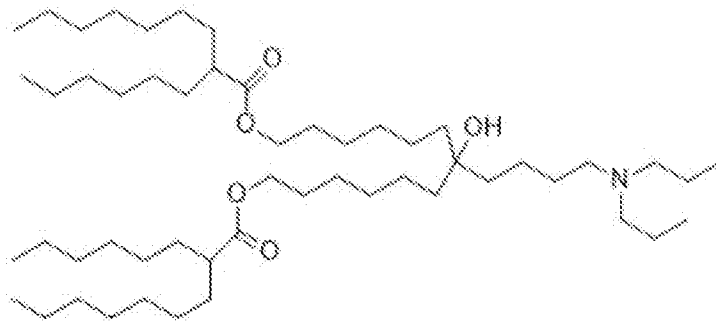
[化24]



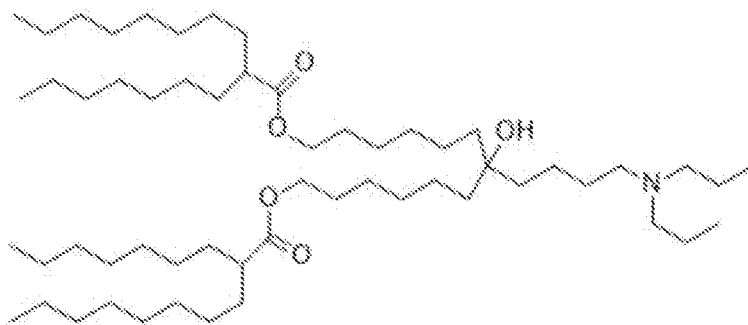
CL4F 7-4、



CL4F 8-5、



CL4F 9-6、



CL4F 10-7、

で表され、

アルキルカルボン酸とハロゲン化アルキルとを、有機リチウム、ジメチルプロピレンウレア（DMPU）及びテトラヒドロフラン（THF）の存在下で反応させて分岐脂肪酸を得る工程を少なくとも含む製造方法。

[0023] [6-2] 前記工程における前記テトラヒドロフラン（THF）と前記ジメチルプロピレンウレア（DMPU）との容積比が、10：1～1：1（v/v）

である、[6-1]の製造方法。

[6-3] 前記有機リチウムが、リチウムジイソプロピルアミド（LDA）である、[6-1]又は[6-2]の製造方法。

[6-4] 前記ハロゲン化アルキルが、ヨードアルキルである、[6-1]～[6-3]のいずれかの製造方法。

[6-5] 逆相クロマトグラフィにより分岐脂肪酸を精製する工程を更に含む、[6-1]～[6-4]のいずれかの製造方法。

[0024]

[6-6] 下記の式（I）：

[化25]



[式（I）中、aは3～5の整数を示し；bは0又は1を示し；R¹及びR²はそれぞれ独立して下記一般式（A）：

[化26]



（式（A）中、R¹¹及びR¹²はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状のC₂₋₁₅アルキル基を示し；cは0又は1を示し；vは4～12の整数を示す）

で表される基を示し；Xは、下記一般式（B）：

[化27]



(式 (B) 中、 d は 0 ~ 3 の整数を示し ; R^3 及び R^4 はそれぞれ独立に C 1 - 4 アルキル基又は C 2 - 4 アルケニル基 (該 C 1 - 4 アルキル基又は C 2 - 4 アルケニル基は、1 個又は 2 個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい) を示すが、 R^3 及び R^4 は互いに結合して 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環 (該環の 1 個又は 2 個の水素原子が、C 1 - 4 アルキル基又は C 2 - 4 アルケニル基に置換されていてもよい) を形成してもよい)

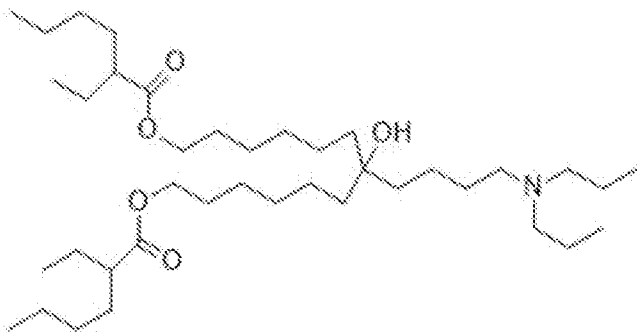
で表される基又は 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環基 (ただし、該基は炭素原子により (O-CO)b- に結合し、該環の 1 個又は 2 個の水素原子が、C 1 - 4 アルキル基又は C 2 - 4 アルケニル基に置換されていてもよい) を示す]

で表される pH 感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物

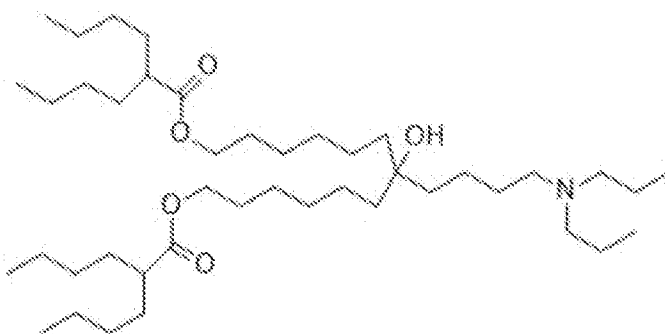
の製造方法であって、

前記 pH 感受性カチオン性脂質の化学式は下記式 :

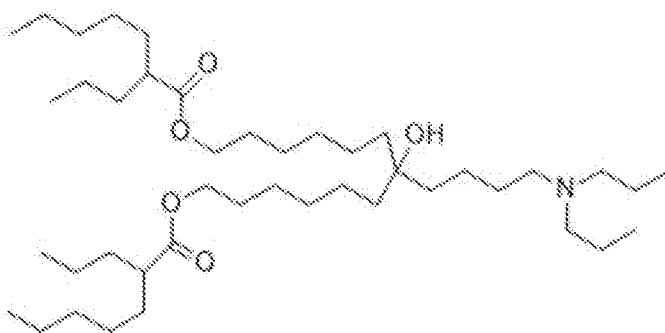
[化28-1]



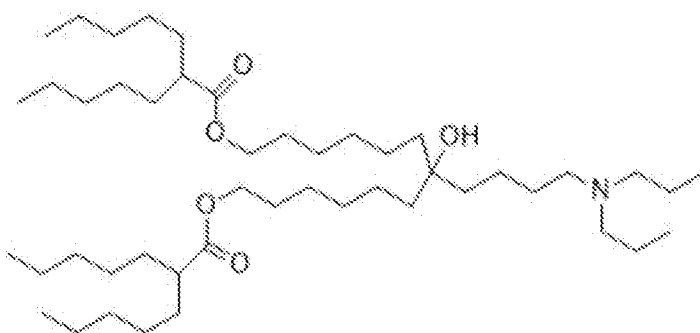
CL4F 6-2、



CL4F 6-4、

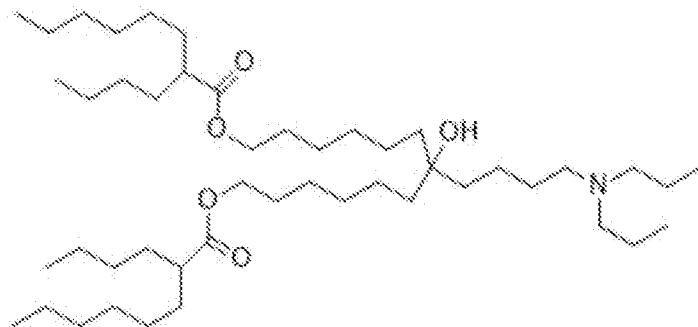


CL4F 7-3、

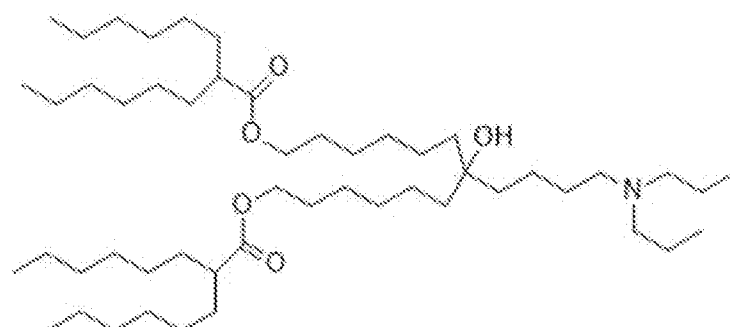


CL4F 7-5、

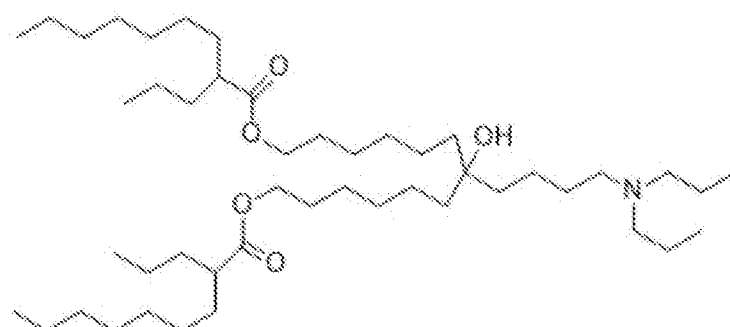
[化28-2]



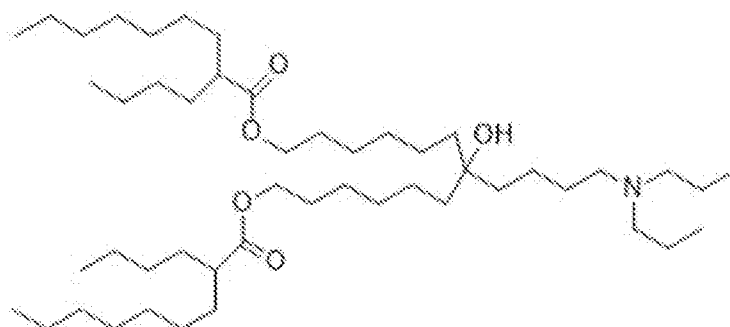
CL4F 8-4.



CL4F 8-6.

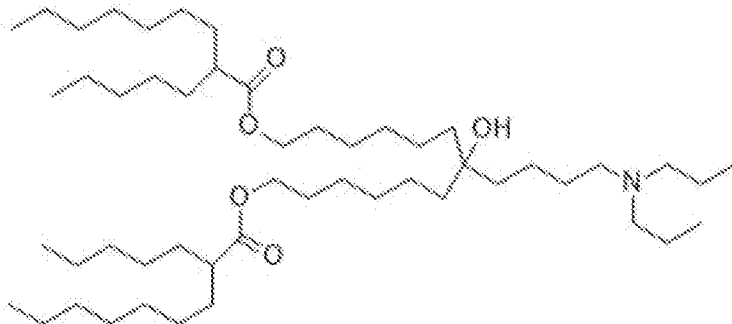


CL4F 9-3.

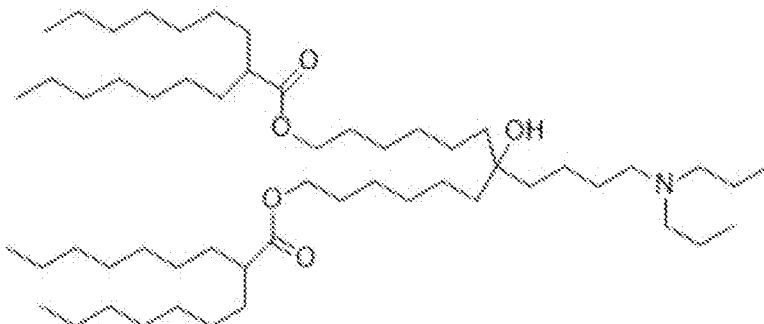


CL4F 9-4.

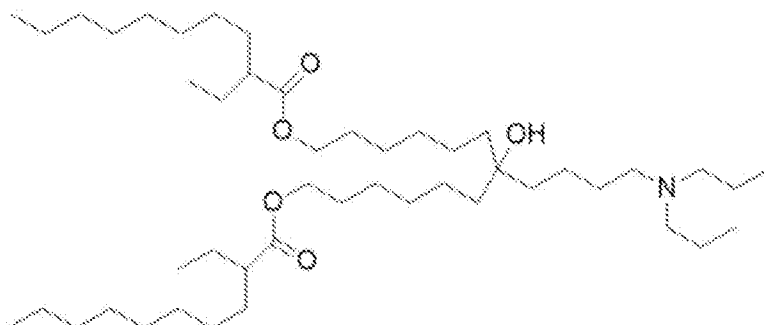
[化28-3]



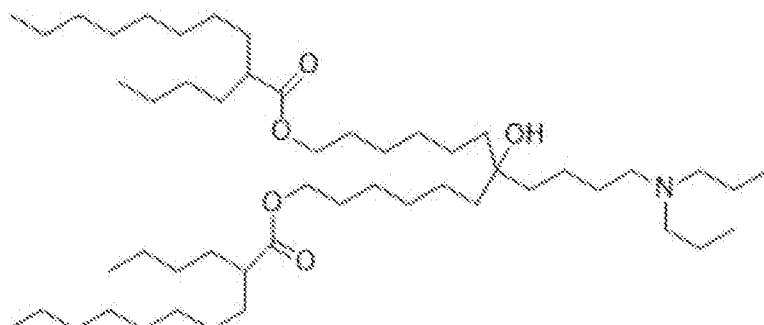
CL4F 9-5.



CL4F 9-7.

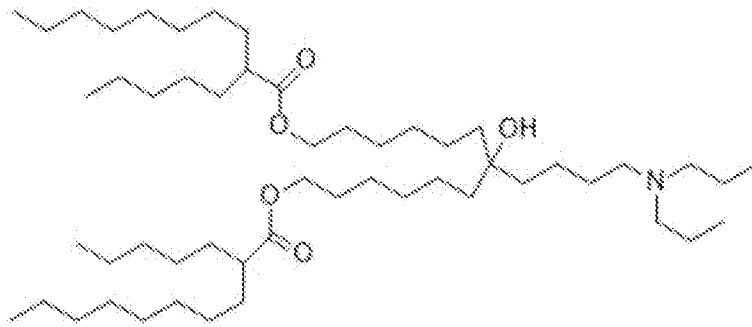


CL4F 10-2.

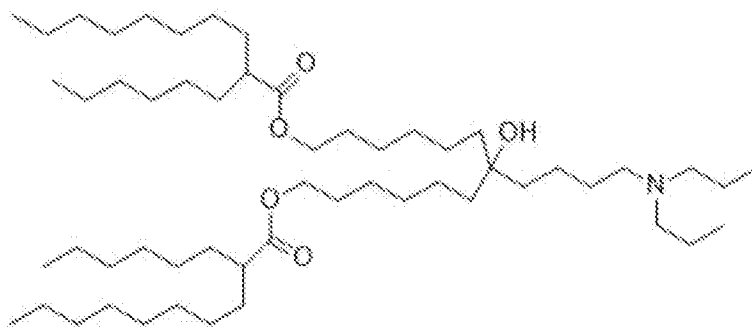


CL4F 10-4.

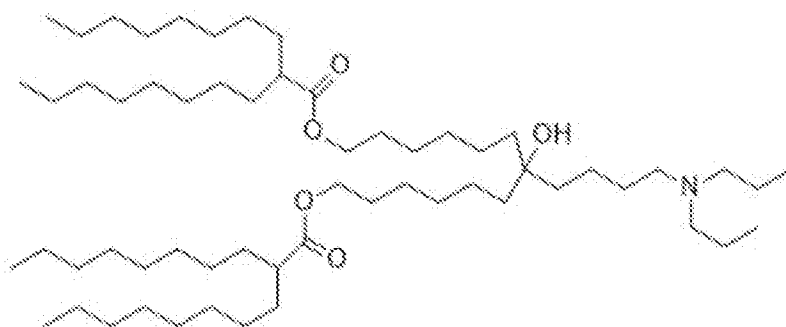
[化28-4]



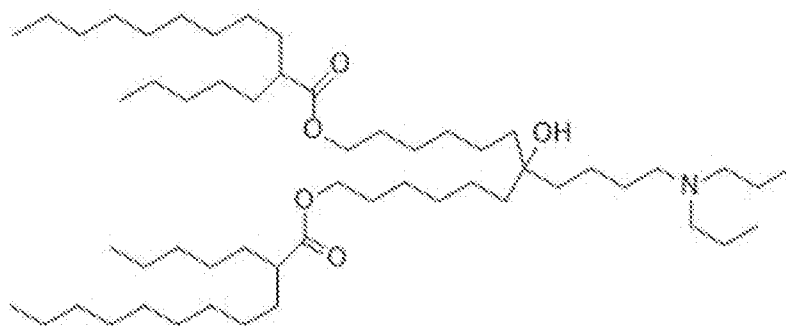
CL4F 10-5、



CL4F 6、

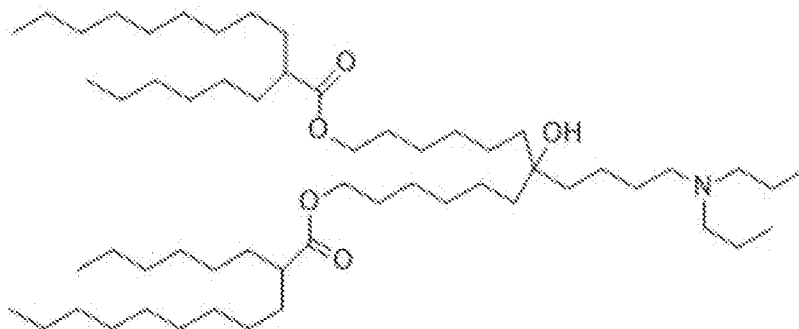


CL4F 10-8、

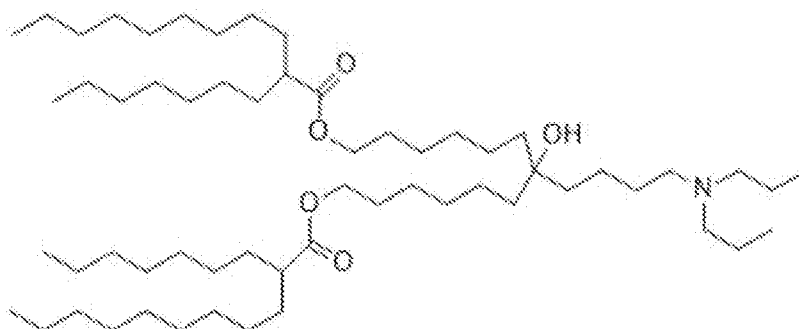


CL4F 11-5、

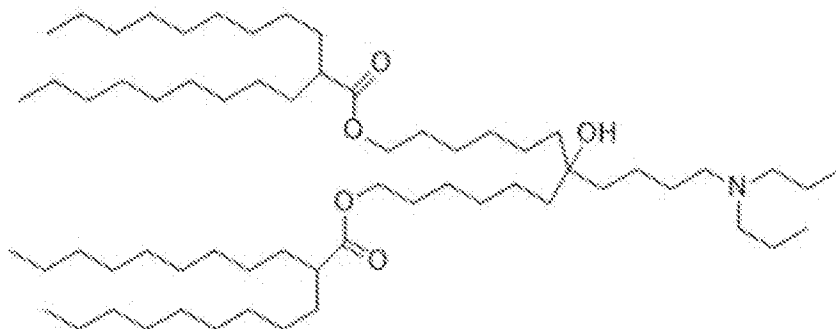
[化28-5]



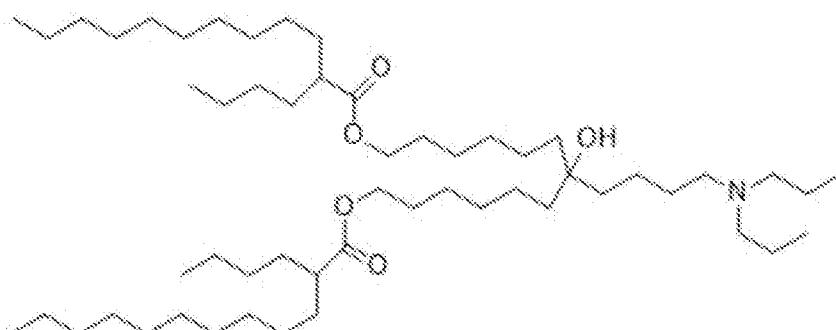
CL4F 11-6.



CL4F 11-7.

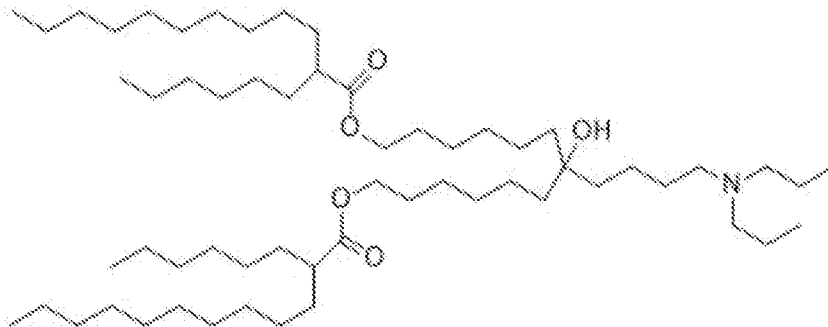


CL4F 11-9.

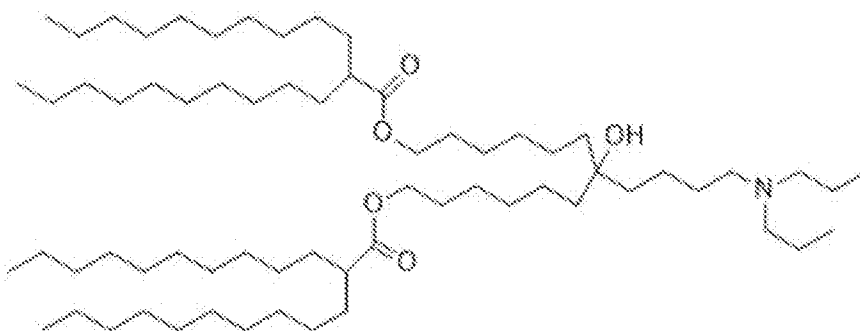


CL4F 12-4.

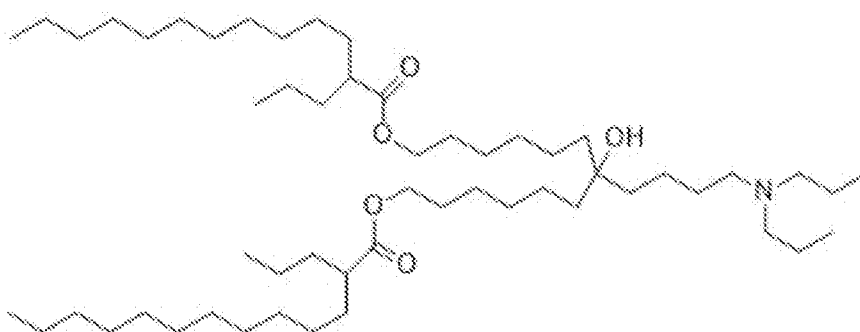
[化28-6]



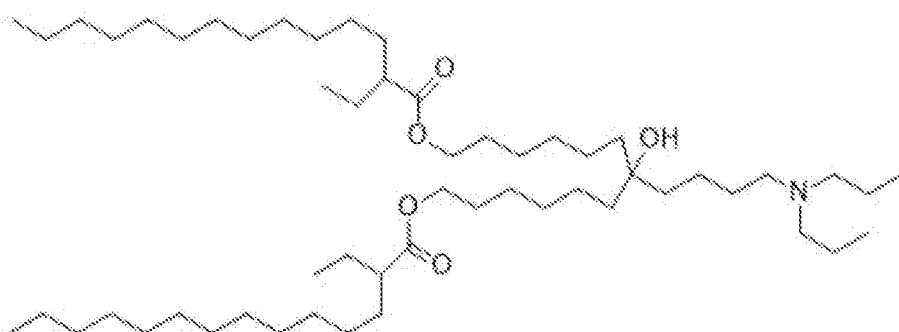
CL4F 12-6、



CL4F 12-10、

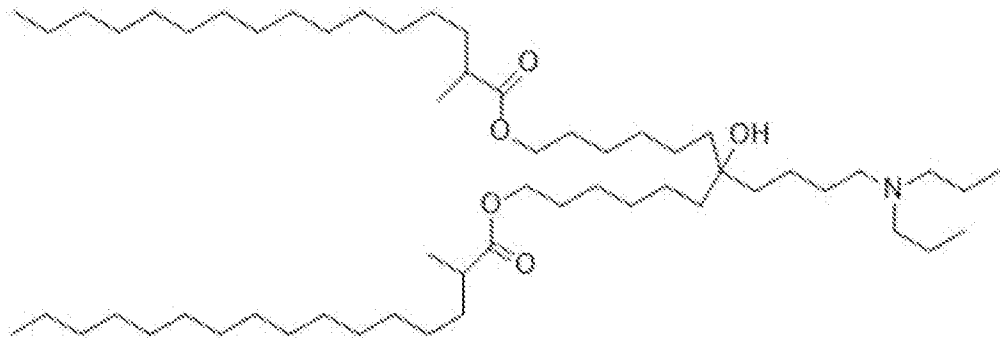


CL4F 13-3、

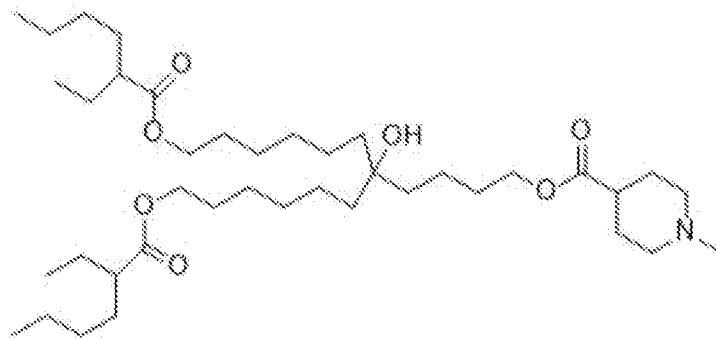


CL4F 14-2、

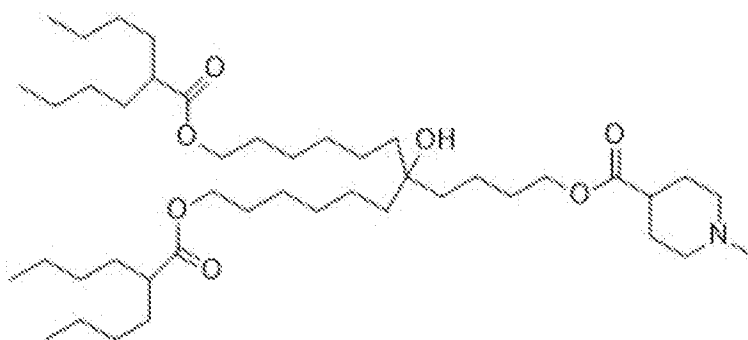
[化28-7]



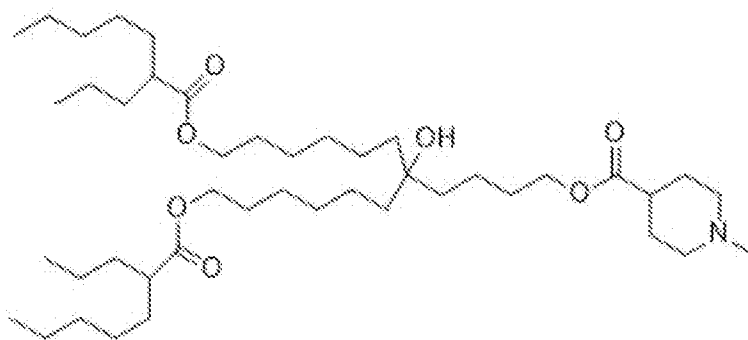
CL 4 F 16-1、



CL 15 F 6-2、

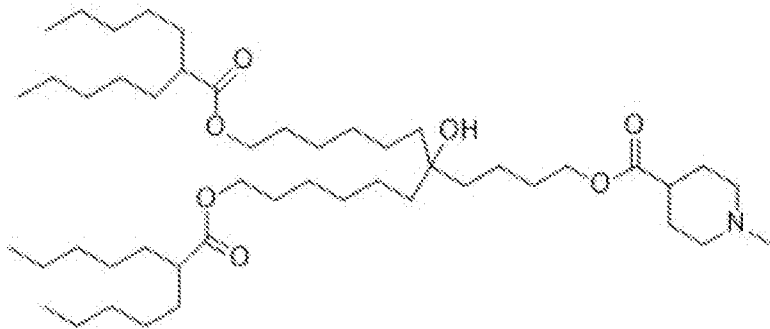


CL 15 F 6-4、

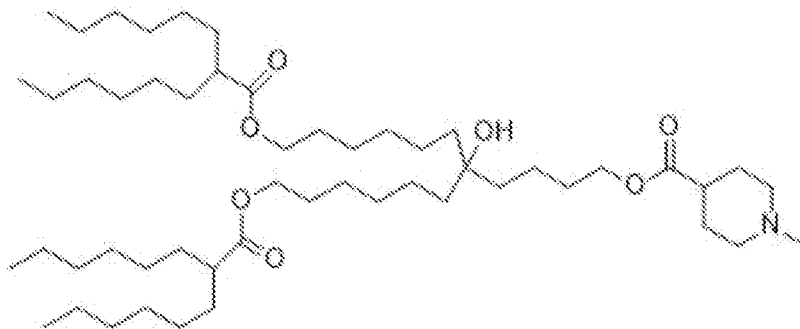


CL 15 F 7-3、

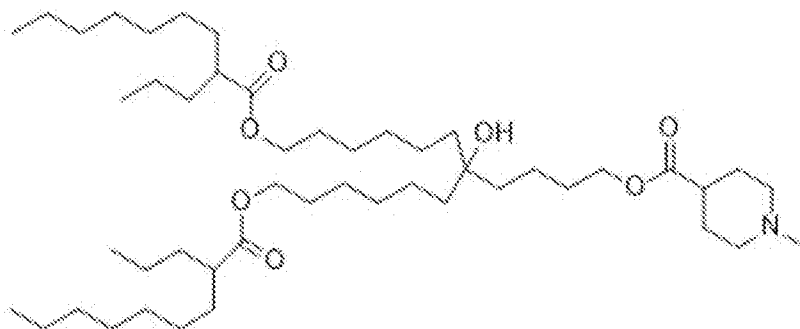
[化28-8]



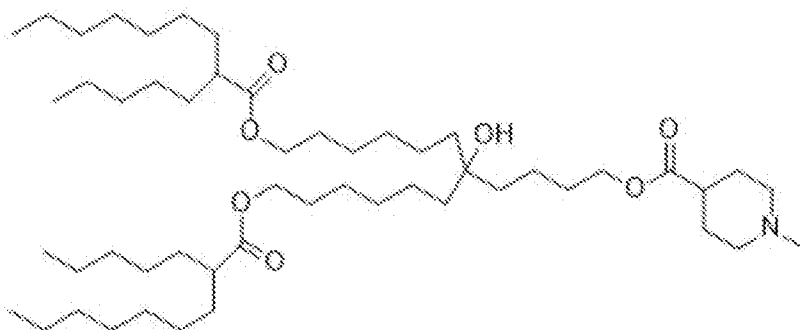
CL15F 7-5.



CL15F 8-6.

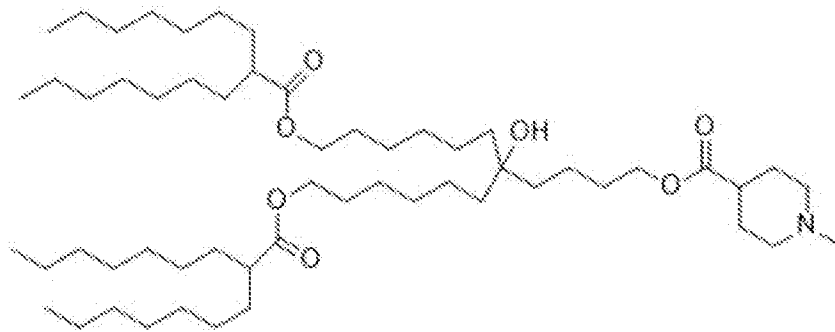


CL15F 9-3.

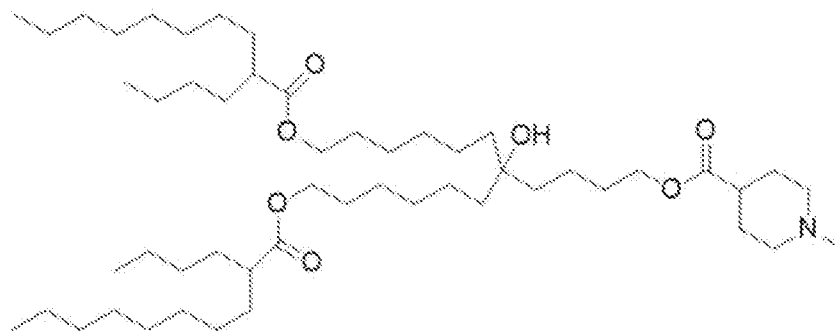


CL15F 9-5.

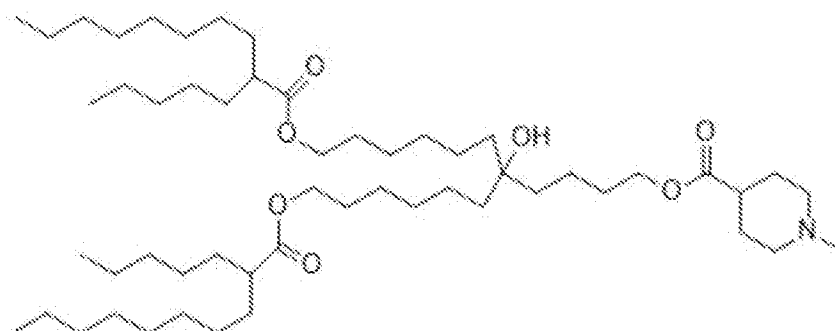
[化28-9]



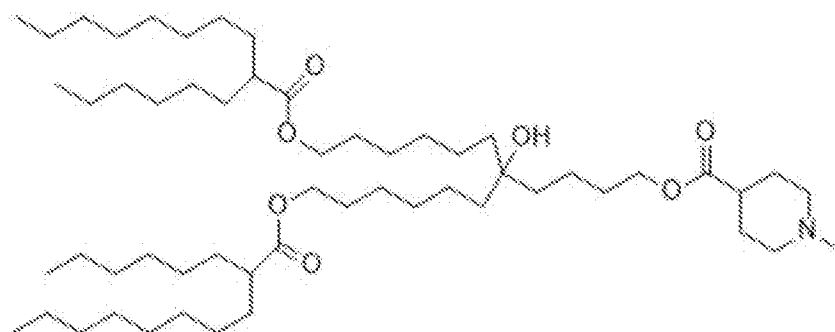
CL15F 9-7、



CL15F 10-4、

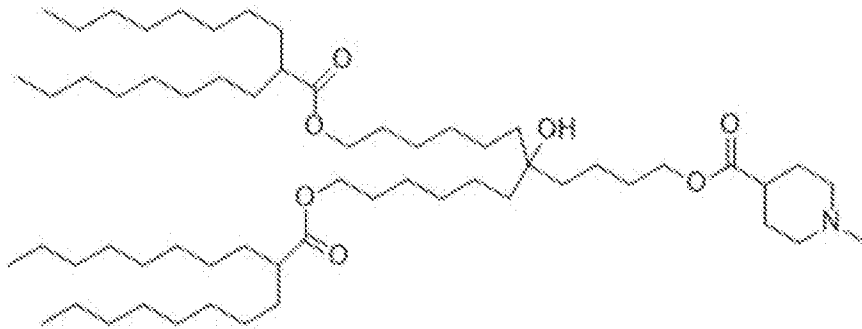


CL15F 10-5、

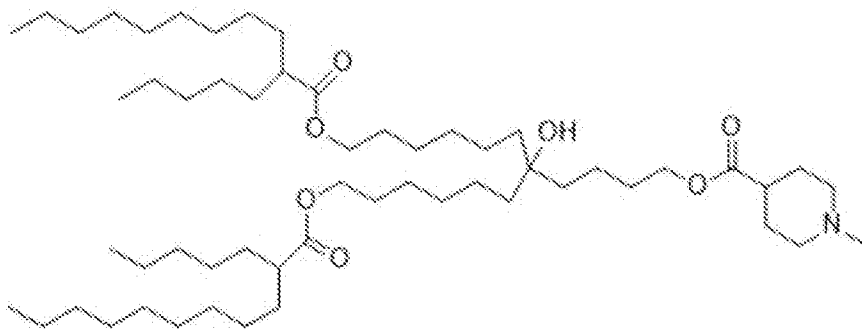


CL15F 6、

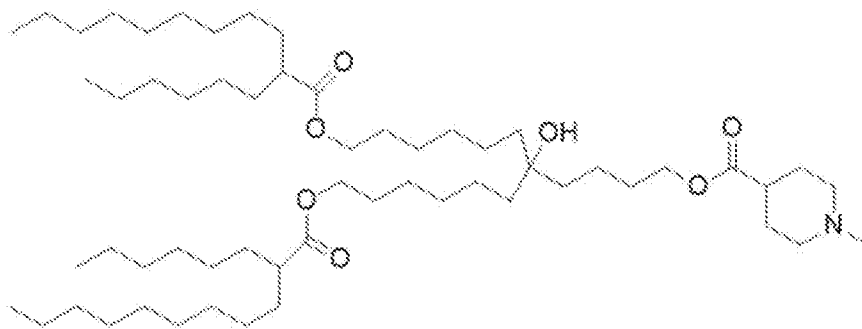
[化28-10]



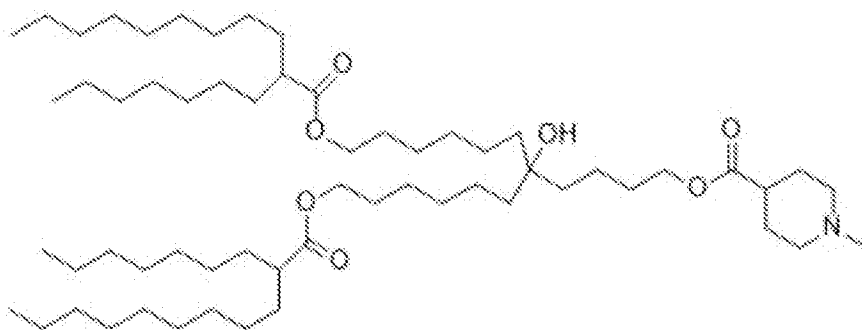
CL15F 10-8、



CL15F 11-5、

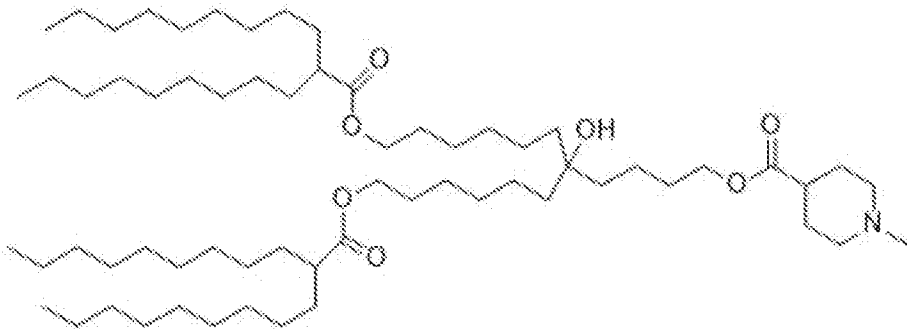


CL15F 11-6、

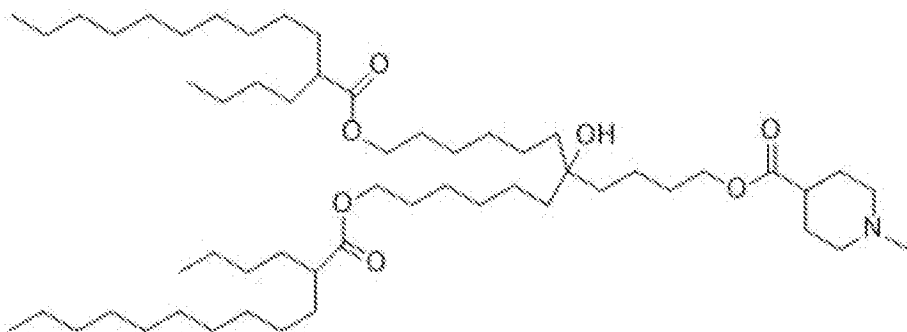


CL15F 11-7、

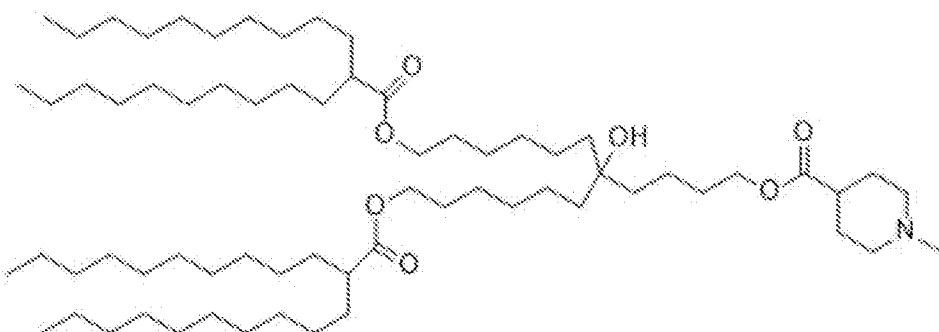
[化28-11]



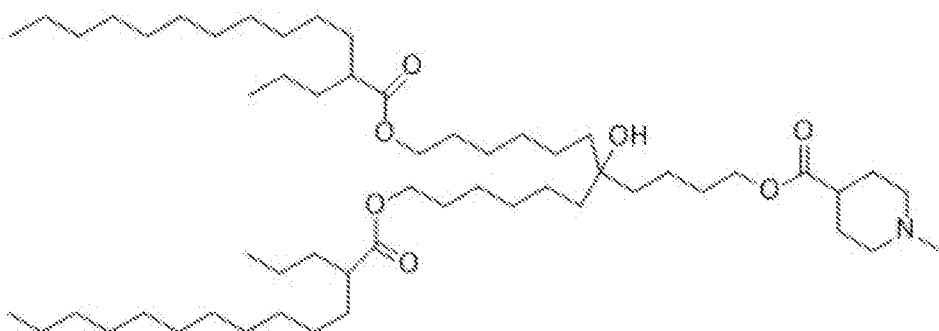
CL15F 11-9、



CL15F 12-4、

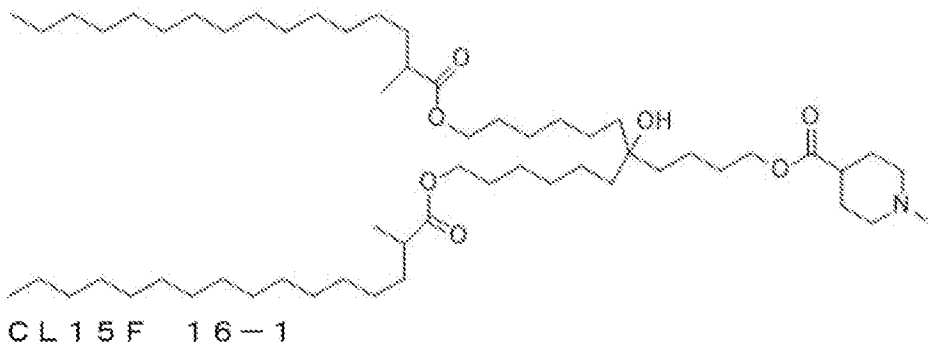
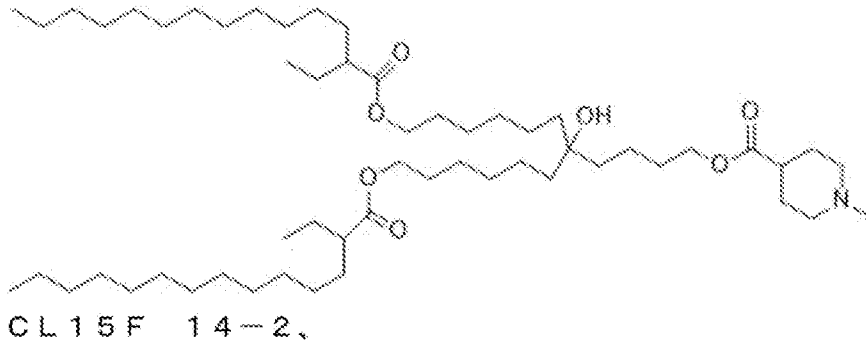


CL15F 12-10、



CL15F 13-3、

[化28-12]



で表され、

マロン酸エステルとハロゲン化アルキルとを塩基存在下で反応させて得られる反応液を加水分解処理及び加熱処理をして分岐脂肪酸を得る工程を少なくとも含む、製造方法。

[0025] [6-7] 前記マロン酸エステルが、マロン酸ジメチルである、[6-6]の製造方法。

[6-8] 前記ハロゲン化アルキルが、ヨードアルキルである、[6-6]又は[6-7]の製造方法。

[6-9] 前記塩基が、水素化ナトリウム、水素化カルシウム、ナトリウムエトキシド及びビス(トリスメチルシリル)アミドリチウムからなる群から選択される、[6-6]～[6-8]のいずれかの製造方法。

[6-10] 前記加水分解処理が、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム及び水酸化リチウムの何れかが用いられる、[6-6]～[6-9]のいずれかの製造方法。

[6-11] 前記加熱処理を、前記加水分解処理と同時及び／又は後に1

20℃～170℃で行う、[6-6]～[6-10]のいずれかの製造方法。

[6-12] 逆相クロマトグラフィにより分岐脂肪酸を精製する工程を更に含む、[6-6]～[6-11]のいずれかの製造方法。

発明の効果

[0026] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、封入された遺伝子を肝臓又は脾臓内で高発現させることができる。このため、当該脂質ナノ粒子は、遺伝子治療に用いられる肝臓特異的遺伝子送達キャリア又は脾臓特異的遺伝子送達キャリアとして有用である。また、本発明に係る脂質ナノ粒子は、安定性に優れている。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]実施例1において、各F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子のpKaを測定した結果を示した図である。図1(A)がCL4F6、CL4G6、又はCL4H6を用いて調製された脂質ナノ粒子の結果であり、図1(B)がCL15F6、CL15G6、又はCL15H6を用いて調製された脂質ナノ粒子の結果である。

[図2]実施例1において、各F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの相対血漿中F7酵素活性(%)を算出した結果を示した図である。図2(A)がCL4F6、CL4G6、又はCL4H6を用いて調製された脂質ナノ粒子を投与したマウスの結果であり、図2(B)がCL15F6、CL15G6、又はCL15H6を用いて調製された脂質ナノ粒子を投与したマウスの結果である。

[図3]実施例2において、各Nluc mRNA搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓と脾臓におけるNluc活性(RLU/mg protein)の測定結果を示した図である。

[図4]実施例3において、各pFluc搭載脂質ナノ粒子を導入したHeLa-GFP細胞のFluc活性の測定結果を示した図である。

[図5]実施例3において、各pFluc搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの

肝臓と脾臓におけるFluc活性 (RLU/mg protein) の測定結果を示した図である。

発明を実施するための形態

[0028] 以下、本発明の実施態様について具体的に説明する。本願明細書において、「X1～X2 (X1とX2は、X1<X2を満たす実数)」は、「X1以上X2以下」を意味する。

[0029] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、下記一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質(以下、「本発明のpH感受性カチオン性脂質」ということがある。)を含有する、脂質ナノ粒子である。脂質ナノ粒子の構成脂質として、一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質を備えることにより、本発明に係る脂質ナノ粒子は、肝臓又は脾臓への選択性が高い。

[0030] [化29]



[0031] 一般式(1)において、aは3～5の整数を示すが、好ましくは4である。

bは0又は1を示す。bが0の場合には-O-CO-基が存在せず、単結合であることを意味する。

[0032] 一般式(1)において、R¹及びR²はそれぞれ独立に下記一般式(A)で表される基を示す。一般式(A)において、R¹¹及びR¹²はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状のC₂₋₁₅アルキル基(炭素数2～15のアルキル基)を示し；cは0又は1を示し；vは4～12の整数を示す。

[0033] [化30]



[0034] 直鎖状又は分岐鎖状のC₂₋₁₅アルキル基としては、

n-エチル基；

n-プロピル基、1-メチルエチル基；

n-ブチル基、1-メチルプロピル基、2-メチルプロピル基、1, 1-ジ

メチルエチル基；

n-ペンチル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、3-メチルブチル基、1-エチルプロピル基、1, 1-ジメチルプロピル基、2, 2-ジメチルプロピル基；

n-ヘキシル基、1-メチルペンチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、4-メチルペンチル基、1-エチルブチル基、1, 1-ジメチルブチル基、2, 2-ジメチルブチル基、3, 3-ジメチルブチル基、1, 2-ジメチルブチル基、1-メチル-2, 2-ジメチルブチル基；

n-ヘプチル基、1-メチルヘキシル基、2-メチルヘキシル基、3-メチルヘキシル基、4-メチルヘキシル基、5-メチルヘキシル基、1-エチルペンチル基、1, 1-ジメチルペンチル基、2, 2-ジメチルペンチル基、3, 3-ジメチルペンチル基、4, 4-ジメチルペンチル基、1-メチル-3, 3-ジメチルブチル基、2-メチル-3, 3-ジメチルブチル基；

n-オクチル基、1-メチルヘプチル基、2-メチルヘプチル基、3-メチルヘプチル基、4-メチルヘプチル基、5-メチルヘプチル基、6-メチルヘプチル基、1-エチルヘキシル基、1, 1-ジメチルヘキシル基、2, 2-ジメチルヘキシル基、3, 3-ジメチルヘキシル基、4, 4-ジメチルヘキシル基、5, 5-ジメチルヘキシル基、1-メチル-4, 4-ジメチルペンチル基、2-メチル-4, 4-ジメチルペンチル基、3-メチル-4, 4-ジメチルペンチル基；

n-ノニル基、1-メチルオクチル基、2-メチルオクチル基、3-メチルオクチル基、4-メチルオクチル基、5-メチルオクチル基、6-メチルオクチル基、7-メチルオクチル基、1-エチルヘプチル基、1, 1-ジメチルヘプチル基、2, 2-ジメチルヘプチル基、3, 3-ジメチルヘプチル基、4, 4-ジメチルヘプチル基、5, 5-ジメチルヘプチル基、6, 6-ジメチルヘプチル基、1-メチル-5, 5-ジメチルヘキシル基、2-メチル-5, 5-ジメチルヘキシル基、3-メチル-5, 5-ジメチルヘキシル基、4-メチル-5, 5-ジメチルヘキシル基；

n-デシル基、1-メチルノニル基、2-メチルノニル基、3-メチルノニル基、4-メチルノニル基、5-メチルノニル基、6-メチルノニル基、7-メチルノニル基、8-メチルノニル基、1-エチルオクチル基、1, 1-ジメチルオクチル基、2, 2-ジメチルオクチル基、3, 3-ジメチルオクチル基、4, 4-ジメチルオクチル基、5, 5-ジメチルオクチル基、6, 6-ジメチルオクチル基、7, 7-ジメチルオクチル基、1-メチル-6, 6-ジメチルヘプチル基、2-メチル-6, 6-ジメチルヘプチル基、3-メチル-6, 6-ジメチルヘプチル基、4-メチル-6, 6-ジメチルヘプチル基、5-メチル-6, 6-ジメチルヘプチル基；

n-ウンデシル基、1-メチルデシル基、2-メチルデシル基、3-メチルデシル基、4-メチルデシル基、5-メチルデシル基、6-メチルデシル基、7-メチルデシル基、8-メチルデシル基、9-メチルデシル基、1-エチルノニル基、1, 1-ジメチルノニル基、2, 2-ジメチルノニル基、3, 3-ジメチルノニル基、4, 4-ジメチルノニル基、5, 5-ジメチルノニル基、6, 6-ジメチルノニル基、7, 7-ジメチルノニル基、8, 8-ジメチルノニル基、1-メチル-7, 7-ジメチルオクチル基、2-メチル-7, 7-ジメチルオクチル基、3-メチル-7, 7-ジメチルオクチル基、4-メチル-7, 7-ジメチルオクチル基、5-メチル-7, 7-ジメチルオクチル基、6-メチル-7, 7-ジメチルオクチル基；

n-ドデシル基、1-メチルウンデシル基、2-メチルウンデシル基、3-メチルウンデシル基、4-メチルウンデシル基、5-メチルウンデシル基、6-メチルウンデシル基、7-メチルウンデシル基、8-メチルウンデシル基、9-メチルウンデシル基、10-メチルウンデシル基、1-エチルデシル基、1, 1-ジメチルデシル基、2, 2-ジメチルデシル基、3, 3-ジメチルデシル基、4, 4-ジメチルデシル基、5, 5-ジメチルデシル基、6, 6-ジメチルデシル基、7, 7-ジメチルデシル基、8, 8-ジメチルデシル基、9, 9-ジメチルデシル基、1-メチル-8, 8-ジメチルノニル基、2-メチル-8, 8-ジメチルノニル基、3-メチル-8, 8-ジメ

チルノニル基、4-メチル-8, 8-ジメチルノニル基、5-メチル-8, 8-ジメチルノニル基、6-メチル-8, 8-ジメチルノニル基、7-メチル-8, 8-ジメチルノニル基；

n-トリデシル基、1-メチルドデシル基、2-メチルドデシル基、3-メチルドデシル基、4-メチルドデシル基、5-メチルドデシル基、6-メチルドデシル基、7-メチルドデシル基、8-メチルドデシル基、9-メチルドデシル基、10-メチルドデシル基、11-メチルドデシル基、1-エチルウンデシル基、1, 1-ジメチルウンデシル基、2, 2-ジメチルウンデシル基、3, 3-ジメチルウンデシル基、4, 4-ジメチルウンデシル基、5, 5-ジメチルウンデシル基、6, 6-ジメチルウンデシル基、7, 7-ジメチルウンデシル基、8, 8-ジメチルウンデシル基、9, 9-ジメチルウンデシル基、10, 10-ジメチルウンデシル基、1-メチル-9, 9-ジメチルデシル基、2-メチル-9, 9-ジメチルデシル基、3-メチル-9, 9-ジメチルデシル基、4-メチル-9, 9-ジメチルデシル基、5-メチル-9, 9-ジメチルデシル基、6-メチル-9, 9-ジメチルデシル基、7-メチル-9, 9-ジメチルデシル基、8-メチル-9, 9-ジメチルデシル基；

n-テトラデシル基、1-メチルトリデシル基、2-メチルトリデシル基、3-メチルトリデシル基、4-メチルトリデシル基、5-メチルトリデシル基、6-メチルトリデシル基、7-メチルトリデシル基、8-メチルトリデシル基、9-メチルトリデシル基、10-メチルトリデシル基、11-メチルトリデシル基、12-メチルトリデシル基、1-エチルドデシル基、1, 1-ジメチルドデシル基、2, 2-ジメチルドデシル基、3, 3-ジメチルドデシル基、4, 4-ジメチルドデシル基、5, 5-ジメチルドデシル基、6, 6-ジメチルドデシル基、7, 7-ジメチルドデシル基、8, 8-ジメチルドデシル基、9, 9-ジメチルドデシル基、10, 10-ジメチルドデシル基、11, 11-ジメチルドデシル基、1-メチル-10, 10-ジメチルウンデシル基、2-メチル-10, 10-ジメチルウンデシル基、3-

メチル-10, 10-ジメチルウンデシル基、4-メチル-10, 10-ジメチルウンデシル基、5-メチル-10, 10-ジメチルウンデシル基、6-メチル-10, 10-ジメチルウンデシル基、7-メチル-10, 10-ジメチルウンデシル基、8-メチル-10, 10-ジメチルウンデシル基、9-メチル-10, 10-ジメチルウンデシル基；

n-ペンタデシル基、1-メチルテトラデシル基、2-メチルテトラデシル基、3-メチルテトラデシル基、4-メチルテトラデシル基、5-メチルテトラデシル基、6-メチルテトラデシル基、7-メチルテトラデシル基、8-メチルテトラデシル基、9-メチルテトラデシル基、10-メチルテトラデシル基、11-メチルテトラデシル基、12-メチルテトラデシル基、13-メチルテトラデシル基、1-エチルトリデシル基、1, 1-ジメチルトリデシル基、2, 2-ジメチルトリデシル基、3, 3-ジメチルトリデシル基、4, 4-ジメチルトリデシル基、5, 5-ジメチルトリデシル基、6, 6-ジメチルトリデシル基、7, 7-ジメチルトリデシル基、8, 8-ジメチルトリデシル基、9, 9-ジメチルトリデシル基、10, 10-ジメチルトリデシル基、11, 11-ジメチルトリデシル基、12, 12-ジメチルトリデシル基、1-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基、2-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基、3-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基、4-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基、5-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基、6-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基、7-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基、8-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基、9-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基、10-メチル-11, 11-ジメチルドデシル基等が挙げられる。

[0035] 一般式 (A) において、 R^{11} 及び R^{12} は、それぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C_{2-12} アルキル基（炭素数 2～12 のアルキル基）であることが好ましく、直鎖状又は分岐鎖状の C_{5-12} アルキル基（炭素数 5～12 のアルキル基）であることがより好ましく、直鎖状又は分岐鎖状の C_{5-10} アルキル基（炭素数 5～10 のアルキル基）であることさらによりが好ましく、直鎖

状又は分岐鎖状のC₆₋₉アルキル基（炭素数6～9のアルキル基）であることが最も好ましい。また、本発明のpH感受性カチオン性脂質では、R¹及びR²は、一般式（A）で表される基であればよく、互いに同じ基であってもよく、異なる基であってもよい。

[0036] 一般式（I）において、Xは、下記一般式（B）で表される基又は5～7員非芳香族ヘテロ環基を示す。Xが示す5～7員非芳香族ヘテロ環基は、炭素原子により(0-C0)b-に結合する。

[0037] [化31]



[0038] 一般式（B）中、dは0～3の整数を示す。dが0の場合には-(CH₂)-基が存在せず、単結合であることを意味する。

一般式（B）中、R³及びR⁴はそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基（炭素数1～4のアルキル基）又はC₂₋₄アルケニル基（炭素数1～4のアルケニル基）を示す。R³及びR⁴が示すC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基で置換されていてもよい。R³及びR⁴は、C₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基であればよく、互いに同じ基であってもよく、異なる基であってもよい。

[0039] C₁₋₄アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基が挙げられる。C₂₋₄アルケニル基としては、ビニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-メチルビニル基、2-メチル-1-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、3-ブテニル基が挙げられる。

[0040] 一般式（B）中、R³及びR⁴は、互いに結合して5～7員非芳香族ヘテロ環を形成していてもよい。R³及びR⁴が互いに結合して形成される5～7員非芳香族ヘテロ環としては、例えば、1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、及び1-ピペラジニル基が挙げられる。R³及びR⁴が互いに結合して形成される5～7員非芳香族ヘテロ環は、環中の1個又は2個の水素原子がC₁₋₄アルキル基又はC₂₋₄アルケニル基に置換されてい

てもよい。該環中の2個の水素原子が C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基に置換されている場合、互いに同じ基により置換されていてもよく、互いに異なる基により置換されていてもよい。

[0041] 一般式(1)において、Xが5～7員非芳香族ヘテロ環基である場合、該ヘテロ環基に含まれるヘテロ原子としては、窒素原子、酸素原子、又は硫黄原子などを挙げることができる。該ヘテロ環基中のヘテロ環を構成するヘテロ原子は、1個でもよく、同一又は異なるヘテロ原子が2個以上でもよい。該ヘテロ環基中のヘテロ環は、飽和のヘテロ環であってもよく、1個又は2個以上の二重結合が含まれていてもよいが、ヘテロ環が芳香環となることはない。

[0042] 本発明のpH感受性カチオン性脂質としては、一般式(1)において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式(A)のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C_{2-12} アルキル基であり、cが1であり、vが6～10の整数である基であり、aが3～5の整数であり、bが1であり、Xが5～7員非芳香族ヘテロ環基(ただし、ヘテロ環基中の炭素原子により(0-C0)bに結合する。)、好ましくは1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、又は1-ピペラジニル基(環中の炭素原子により(0-C0)bに結合しており、1個の水素原子が C_{1-4} アルキル基若しくは C_{2-4} アルケニル基で置換されていてもよい。)である化合物や、一般式(1)において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式(A)のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C_{2-12} アルキル基であり、cが1であり、vが6～10の整数である基であり、aが3～5の整数であり、bが0であり、Xが一般式(B)のうち、dが0であり、 R^3 及び R^4 がそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基(R^3 及び R^4 が示す C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基で置換されていてもよい)である化合物が好ましい。また、一般式(1)において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式(A)のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C_{5-12} アルキル基で

あり、 c が1であり、 v が6～10の整数である基であり、 a が3～5の整数であり、 b が1であり、 X が5～7員非芳香族ヘテロ環基（ただし、ヘテロ環基中の炭素原子により(0-CO) b -に結合する。）、好ましくは1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、又は1-ピペラジニル基（環中の炭素原子により(0-CO) b -に結合しており、1個の水素原子が C_{1-4} アルキル基若しくは C_{2-4} アルケニル基で置換されていてもよい。）である化合物や、一般式(1)において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式(A)のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C_{5-12} アルキル基であり、 c が1であり、 v が6～10の整数である基であり、 a が3～5の整数であり、 b が0であり、 X が一般式(B)のうち、 d が0であり、 R^3 及び R^4 がそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基（ R^3 及び R^4 が示す C_{1-4} アルキル基又は C_{2-4} アルケニル基は、1個又は2個の水素原子がフェニル基で置換されていてもよい）である化合物が好ましい。なかでも、本発明のpH感受性カチオン性脂質としては、一般式(1)において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式(A)のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C_{6-9} アルキル基であり、 c が1であり、 v が6～10の整数である基であり、かつ、 a が3～5の整数であり、 b が1であり、 X が1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、又は1-ピペラジニル基（環中の炭素原子により(0-CO) b -に結合しており、1個の水素原子が C_{1-4} アルキル基若しくは C_{2-4} アルケニル基で置換されていてもよい。）である化合物や、一般式(1)において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式(A)のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C_{6-9} アルキル基であり、 c が1であり、 v が6～10の整数である基であり、かつ、 a が3～5の整数であり、 b が0であり、 X が一般式(B)のうち、 d が0であり、 R^3 及び R^4 がそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基である化合物が好ましい。

[0043] 本発明のpH感受性カチオン性脂質としては、より好ましくは、一般式(1)において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式(A)のうち、 R^{11}

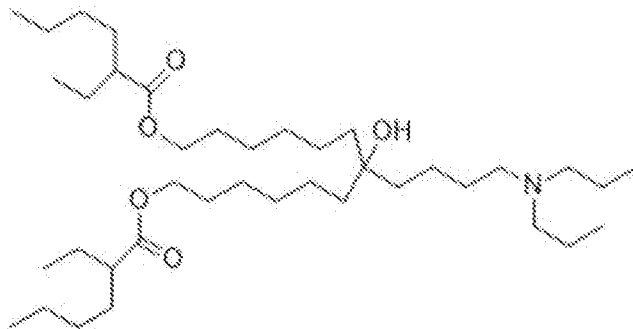
及び R^{12} がそれぞれ独立して直鎖状の C_{6-9} アルキル基であり、 c が1であり、 v が6~10の整数である基であり、かつ、 a が3~5の整数であり、 b が1であり、 X が1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、又は1-ピペラジニル基（環中の炭素原子により(0-C0) b -に結合しており、1個の水素原子が C_{1-4} アルキル基若しくは C_{2-4} アルケニル基で置換されていてもよい。）である化合物；一般式（1）において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式（A）のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して分岐鎖状の C_{6-9} アルキル基であり、 c が1であり、 v が6~10の整数である基であり、かつ、 a が3~5の整数であり、 b が1であり、 X が1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、又は1-ピペラジニル基（環中の炭素原子により(0-C0) b -に結合しており、1個の水素原子が C_{1-4} アルキル基若しくは C_{2-4} アルケニル基で置換されていてもよい。）である化合物；一般式（1）において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式（A）のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して直鎖状の C_{6-9} アルキル基であり、 c が1であり、 v が6~10の整数である基であり、かつ、 a が3~5の整数であり、 b が0であり、 X が一般式（B）のうち、 d が0であり、 R^3 及び R^4 がそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基である化合物；一般式（1）において、 R^1 及び R^2 がそれぞれ独立して、一般式（A）のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して分岐鎖状の C_{6-9} アルキル基であり、 c が1であり、 v が6~10の整数である基であり、かつ、 a が3~5の整数であり、 b が0であり、 X が一般式（B）のうち、 d が0であり、 R^3 及び R^4 がそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基である化合物；である。

[0044] 本発明のpH感受性カチオン性脂質としては、一般式（1）において、 R^1 及び R^2 が同じ基であり、かつ一般式（A）のうち、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立して直鎖状の C_{6-9} アルキル基であり、 c が1であり、 v が6~10の整数である基であり、かつ、 a が3~5の整数であり、 b が1であり、 X が1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、又は1-ピペラジニル基（環中の炭素原子により(0-C0) b -に結合しており、1個の水素

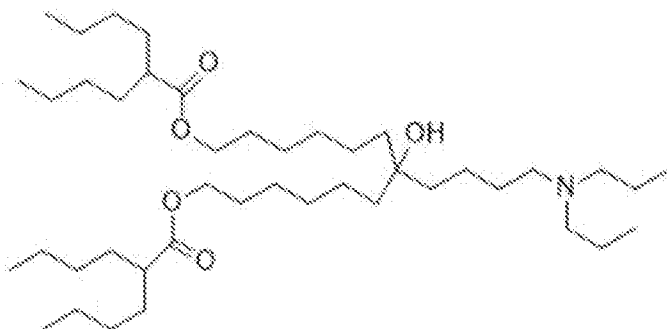
原子がC₁₋₄アルキル基若しくはC₂₋₄アルケニル基で置換されていてもよい。)である化合物;一般式(1)において、R¹及びR²が同じ基であり、かつ一般式(A)のうち、R¹¹及びR¹²がそれぞれ独立して分岐鎖状のC₆₋₉アルキル基であり、cが1であり、vが6~10の整数である基であり、かつ、aが3~5の整数であり、bが1であり、Xが1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、1-モルホリニル基、又は1-ピペラジニル基(環中の炭素原子により(0-C0)b-に結合しており、1個の水素原子がC₁₋₄アルキル基若しくはC₂₋₄アルケニル基で置換されていてもよい。)である化合物;一般式(1)において、R¹及びR²が同じ基であり、かつ一般式(A)のうち、R¹¹及びR¹²がそれぞれ独立して直鎖状のC₆₋₉アルキル基であり、cが1であり、vが6~10の整数である基であり、かつ、aが3~5の整数であり、bが0であり、Xが一般式(B)のうち、dが0であり、R³及びR⁴がそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基である化合物;一般式(1)において、R¹及びR²が同じ基であり、かつ一般式(A)のうち、R¹¹及びR¹²がそれぞれ独立して分岐鎖状のC₆₋₉アルキル基であり、cが1であり、vが6~10の整数である基であり、かつ、aが3~5の整数であり、bが0であり、Xが一般式(B)のうち、dが0であり、R³及びR⁴がそれぞれ独立にC₁₋₄アルキル基である化合物;が特に好ましい。

[0045] 本発明のpH感受性カチオン性脂質としては、例えば、下記の構造を有するpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物である:

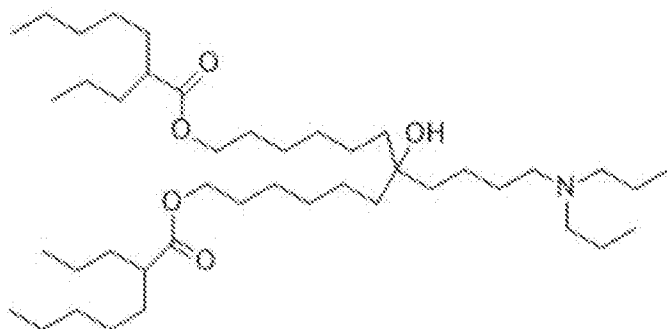
[化32-1]



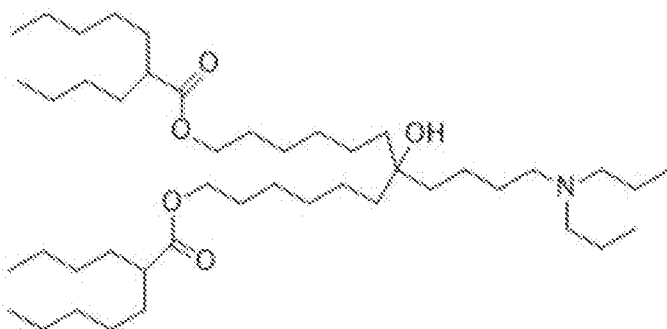
CL4F 6-2、



CL4F 6-4、

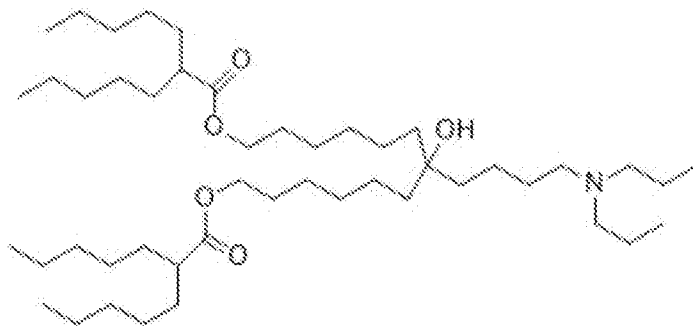


CL4F 7-3、

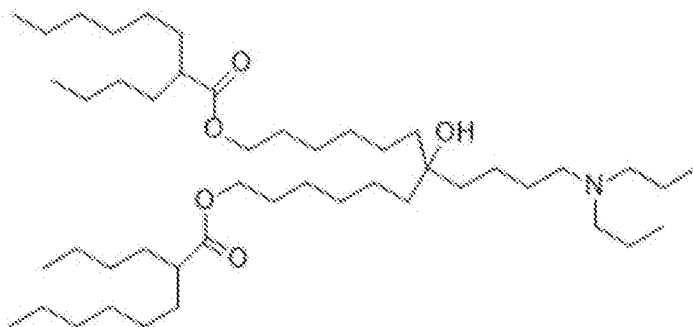


CL4F 7-4、

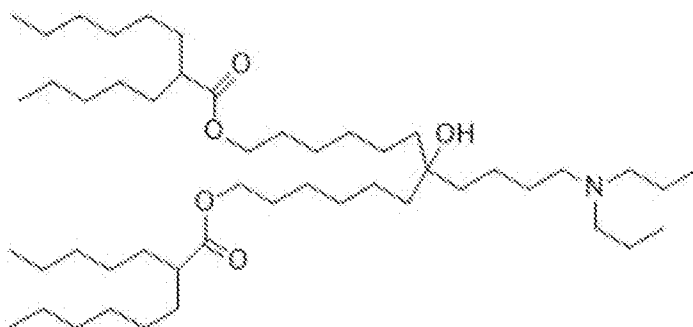
[化32-2]



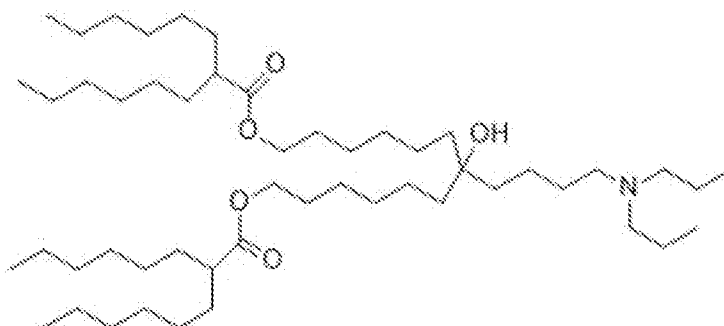
CL4F 7-5、



CL4F 8-4、

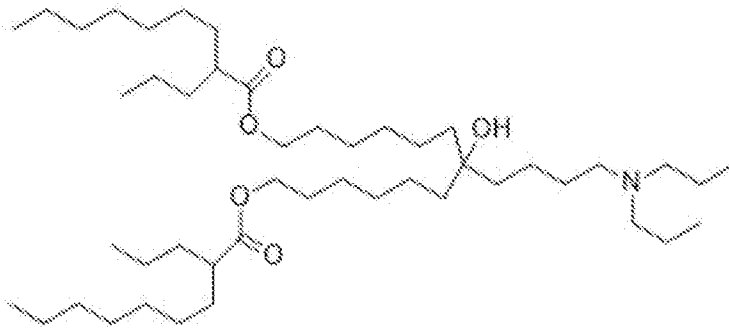


CL4F 8-5、

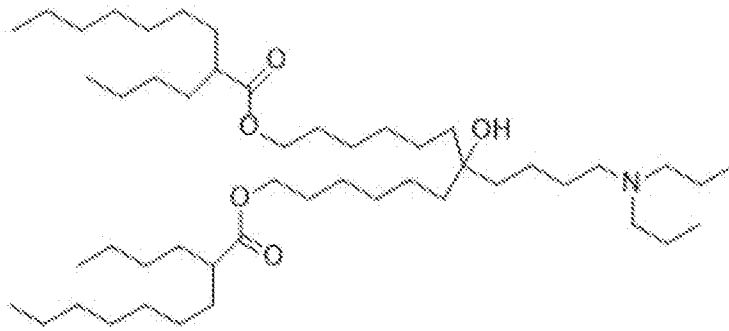


CL4F 8-6、

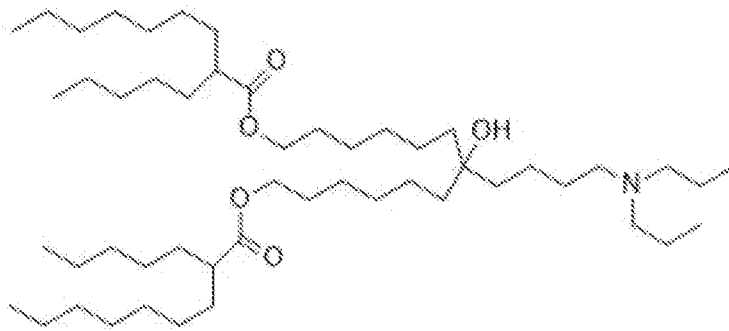
[化32-3]



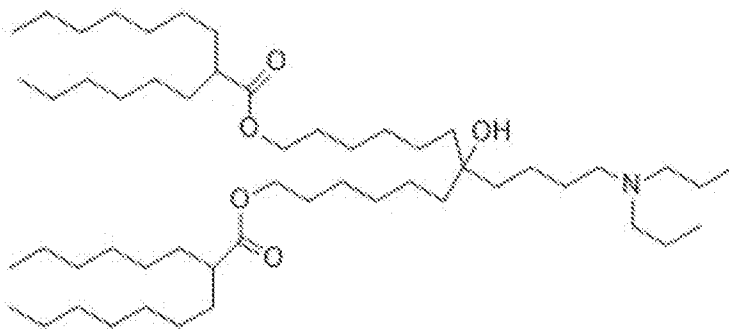
CL4F 9-3.



CL4F 9-4.

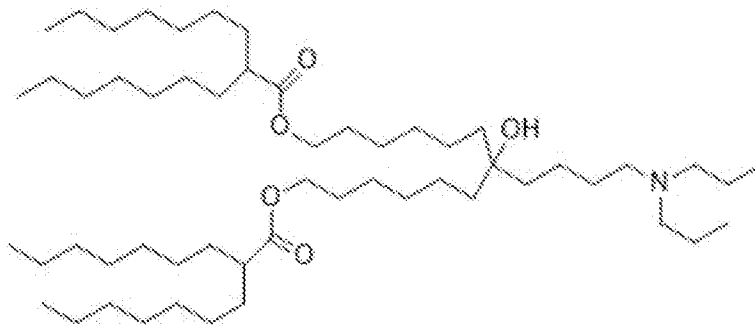


CL4F 9-5.

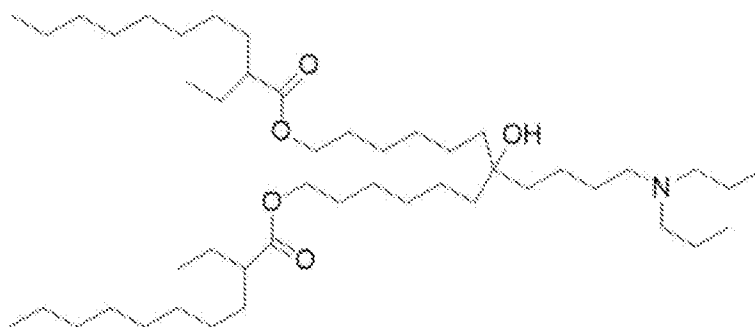


CL4F 9-6.

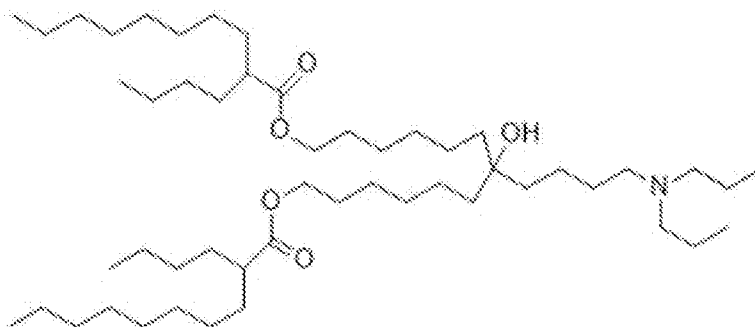
[化32-4]



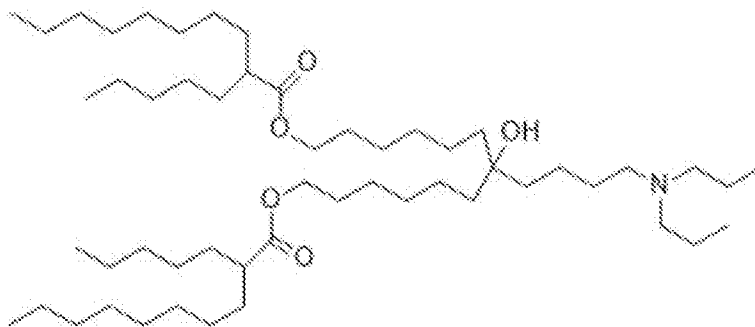
CL4F 9-7、



CL4F 10-2、

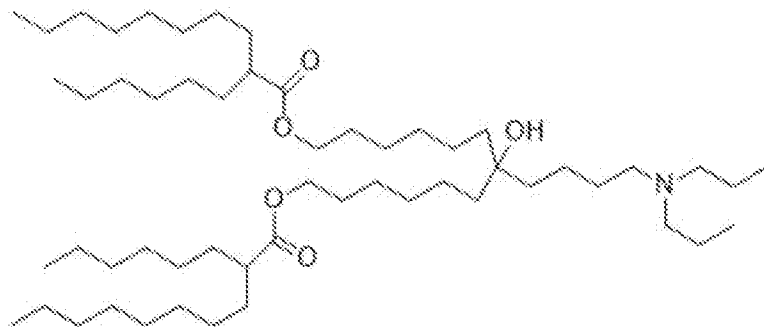


CL4F 10-4、

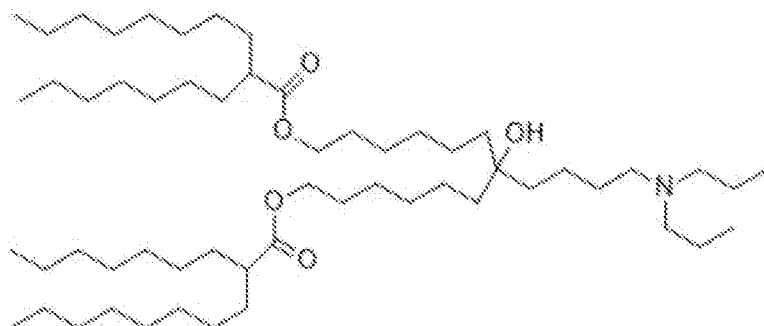


CL4F 10-5、

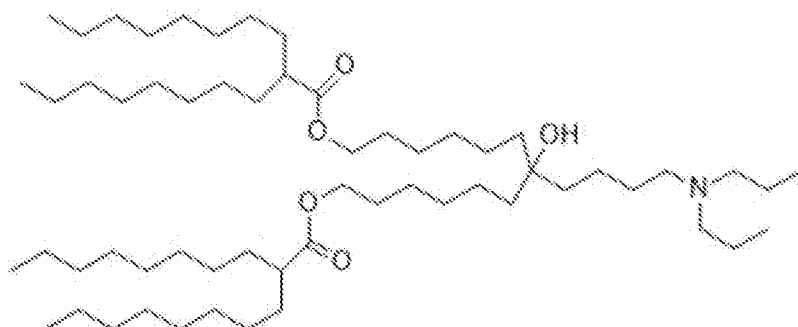
[化32-5]



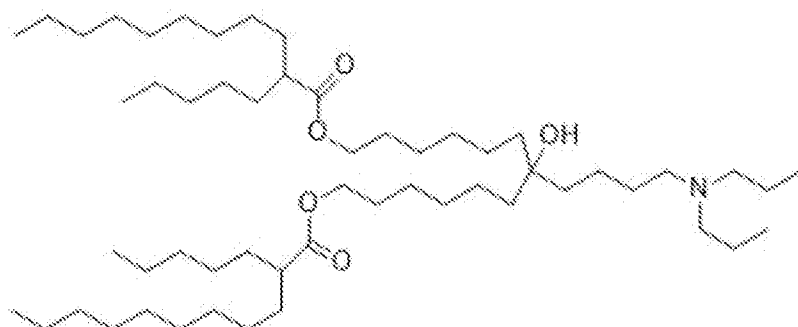
CL4F6,



CL4F 10-7,

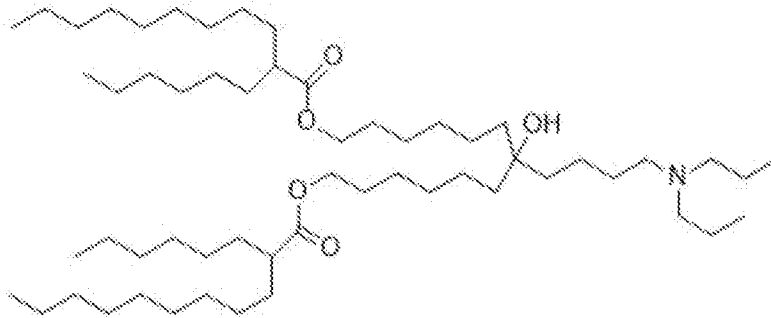


CL4F 10-8,

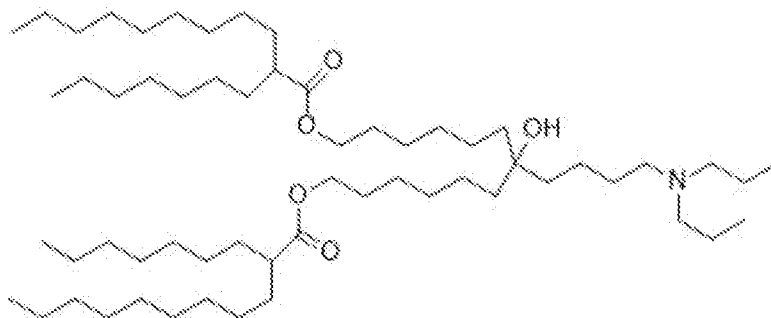


CL4F 11-5,

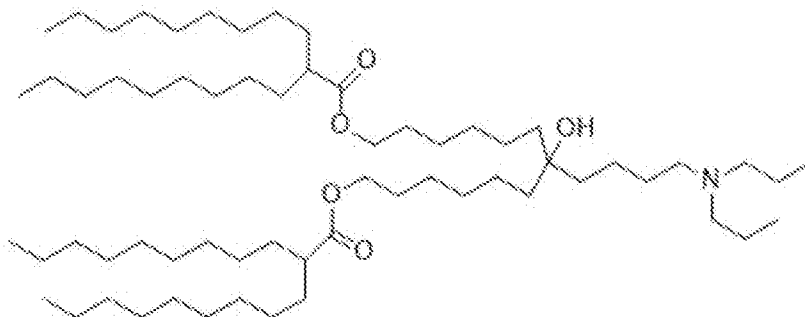
[化32-6]



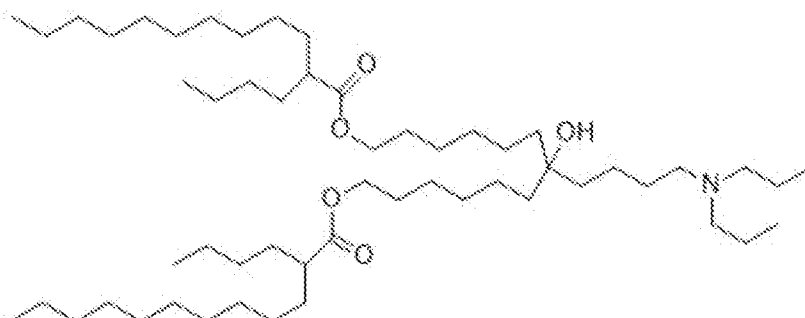
CL4F 11-6、



CL4F 11-7、

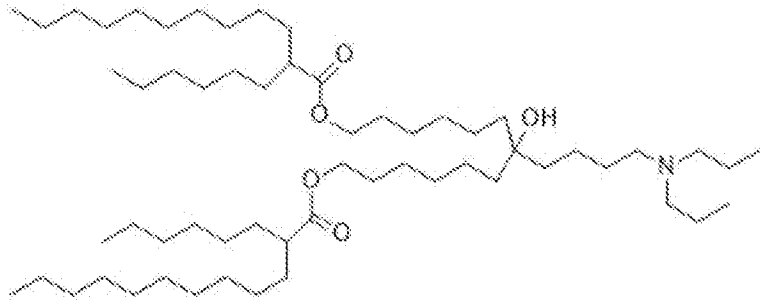


CL4F 11-9、

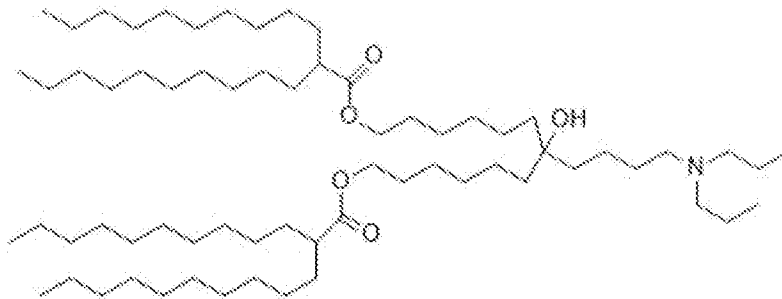


CL4F 12-4、

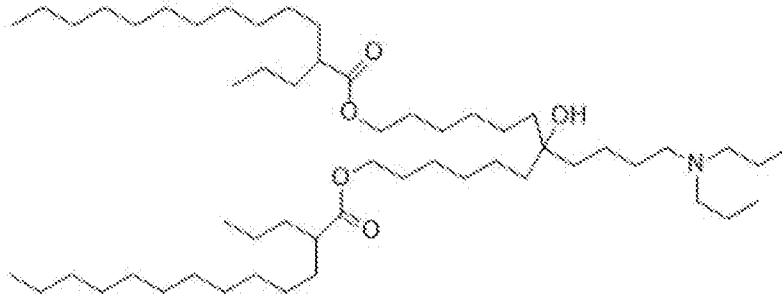
[化32-7]



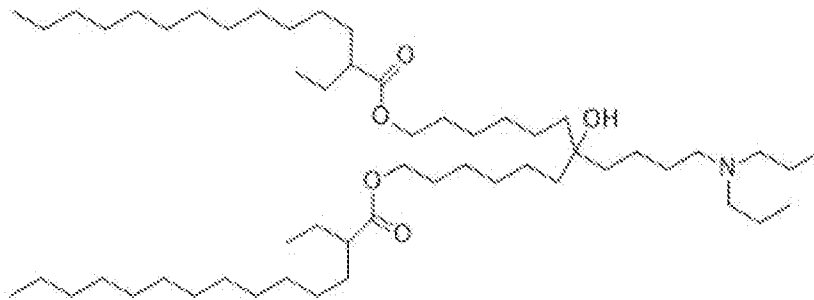
CL4F 12-6.



CL4F 12-10.

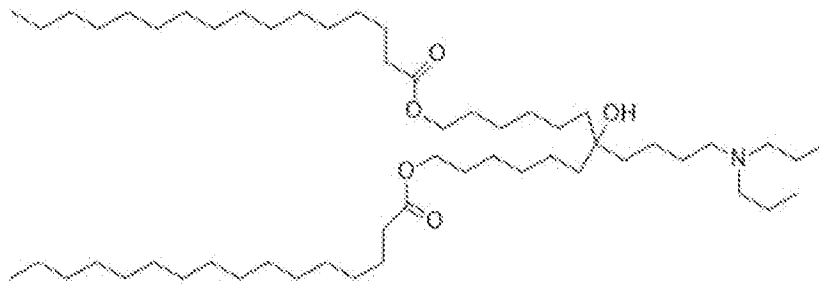


CL4F 13-3.

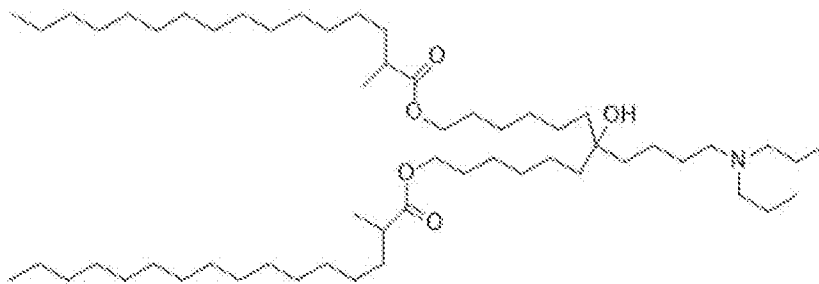


CL4F 14-2.

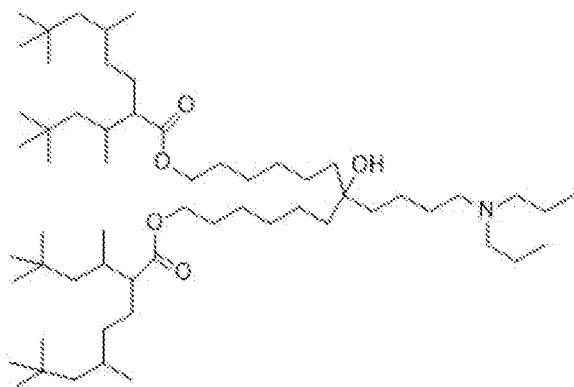
[化32-8]



CL4F 16-0.

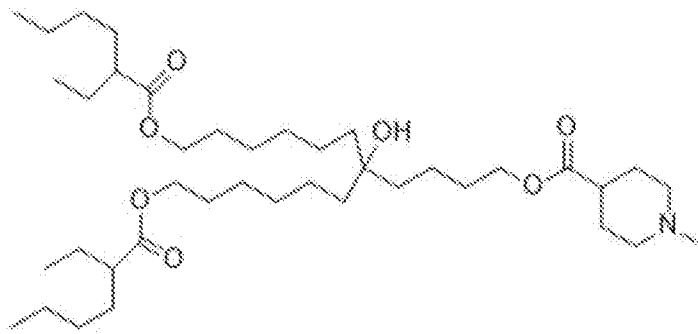


CL4F 16-1.

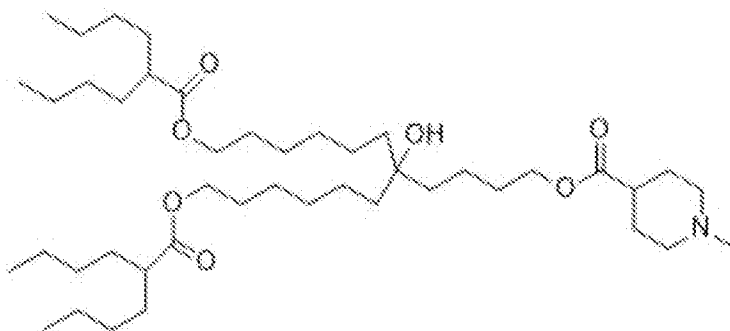


CL4G6.

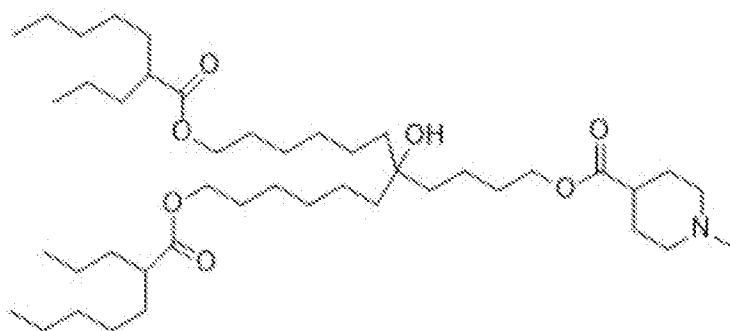
[化32-9]



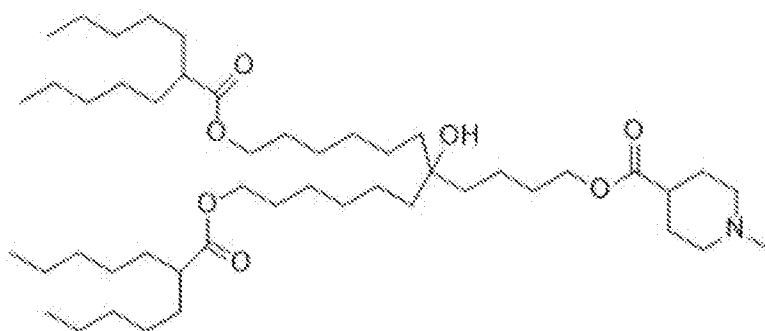
CL15F 6-2、



CL15F 6-4、

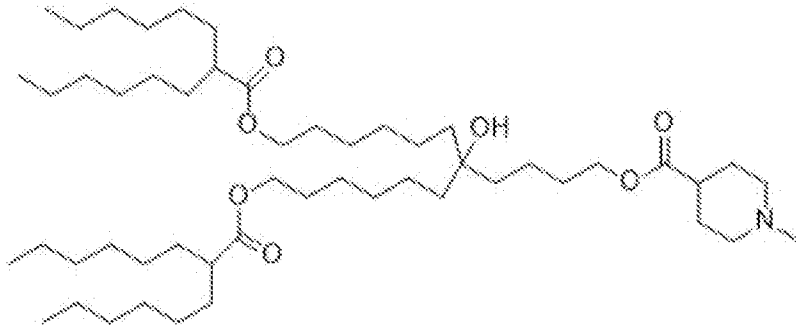


CL15F 7-3、

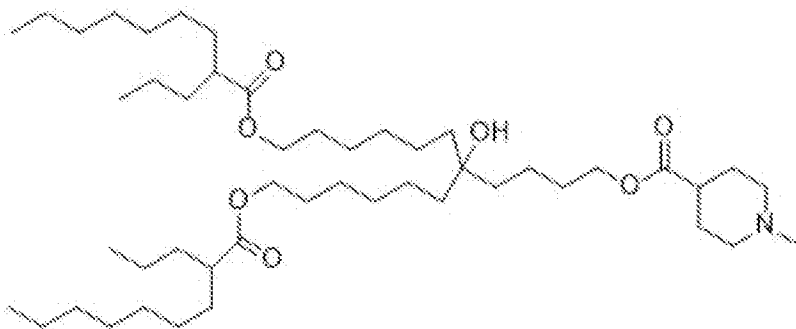


CL15F 7-5、

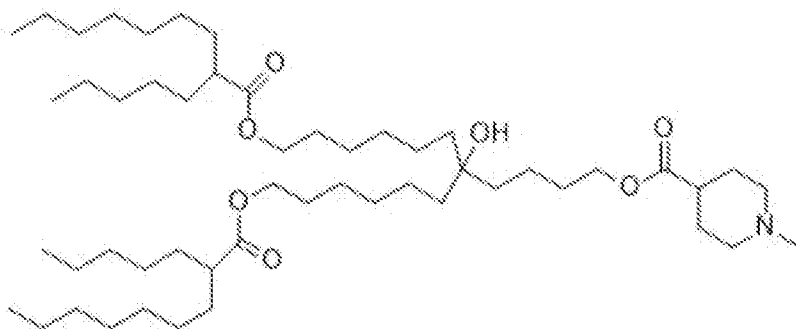
[化32-10]



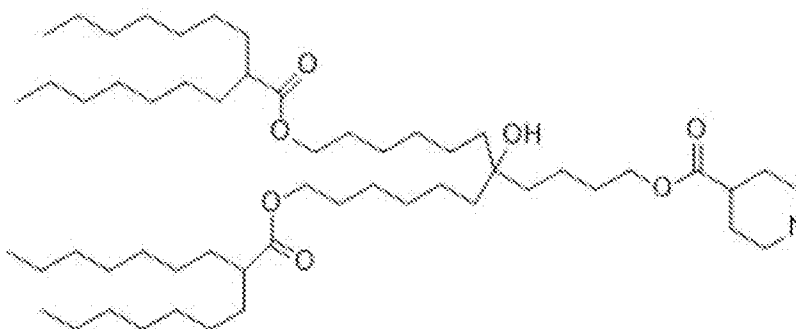
CL15F 8-6、



CL15F 9-3、

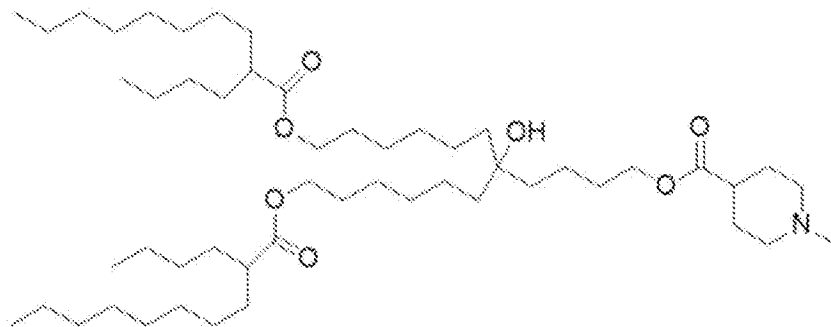


CL15F 9-5、

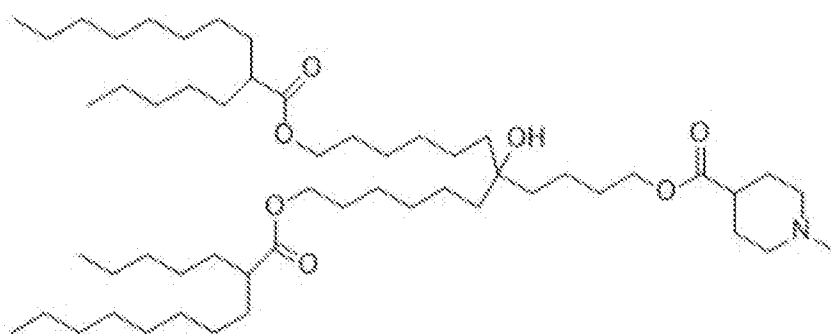


CL15F 9-7、

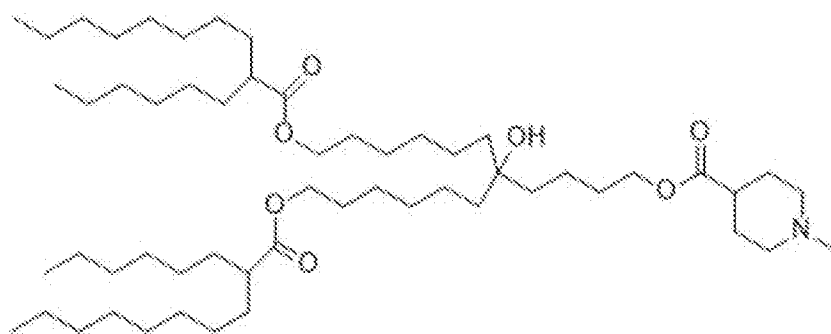
[化32-11]



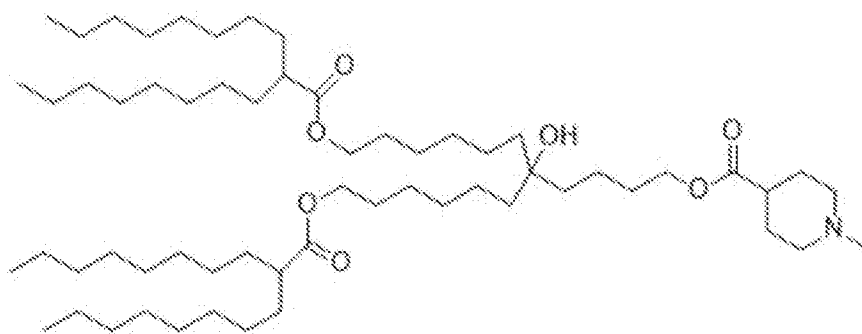
CL15F 10-4.



CL15F 10-5.

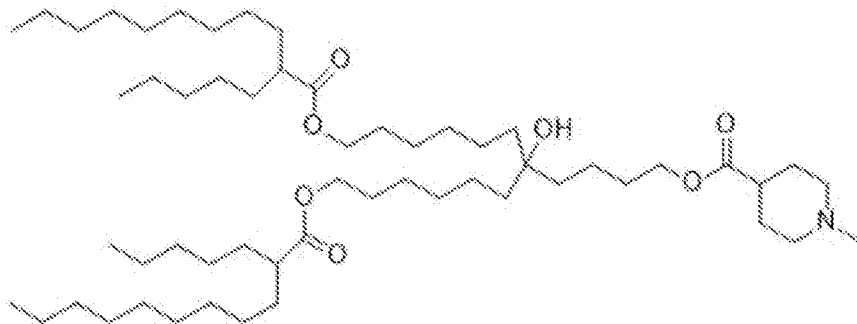


CL15F 6.

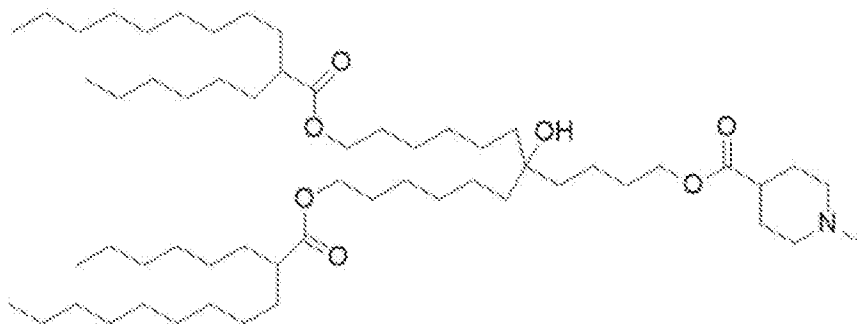


CL15F 10-8.

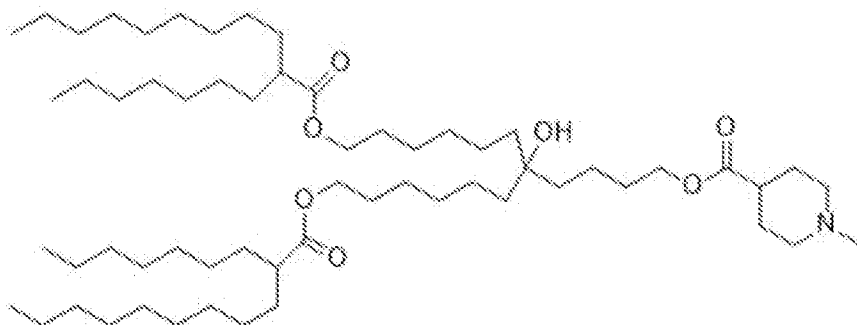
[化32-12]



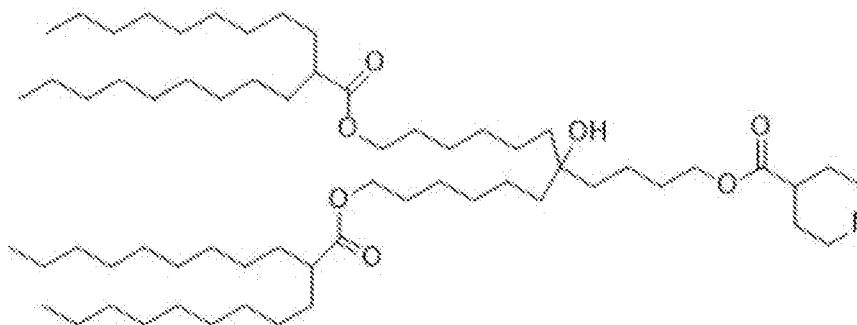
CL15F 11-5.



CL15F 11-6.

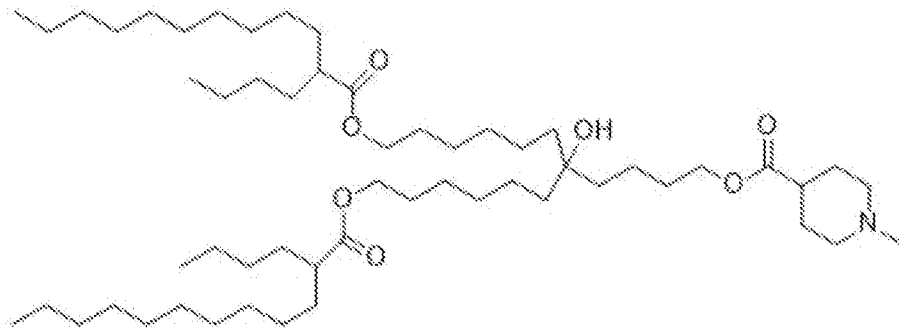


CL15F 11-7.

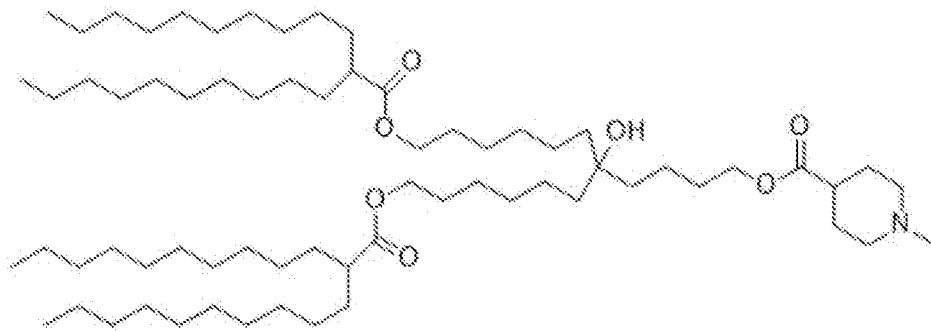


CL15F 11-9.

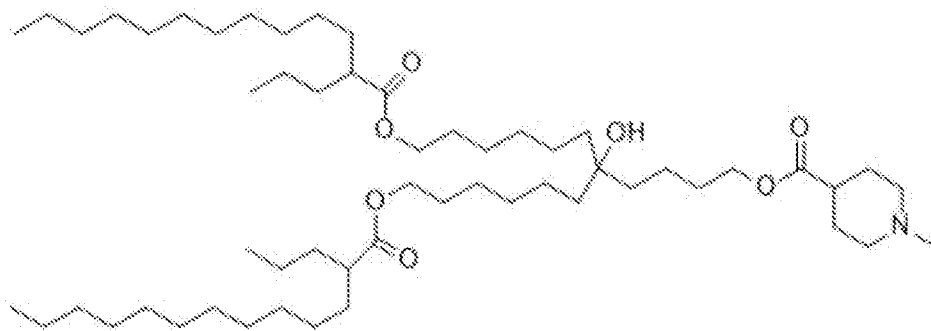
[化32-13]



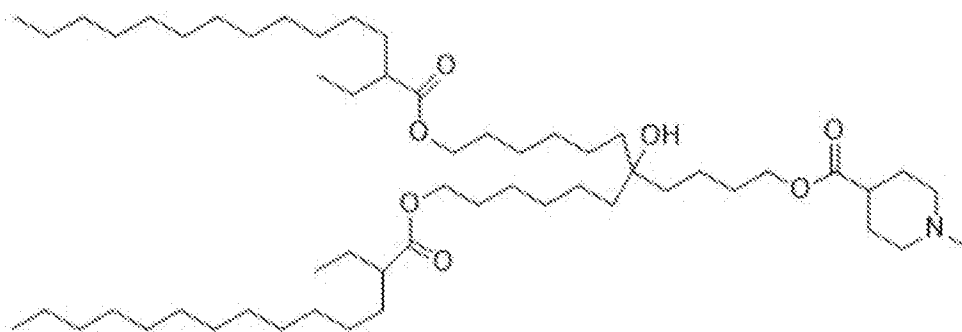
CL15F 12-4、



CL15F 12-10、

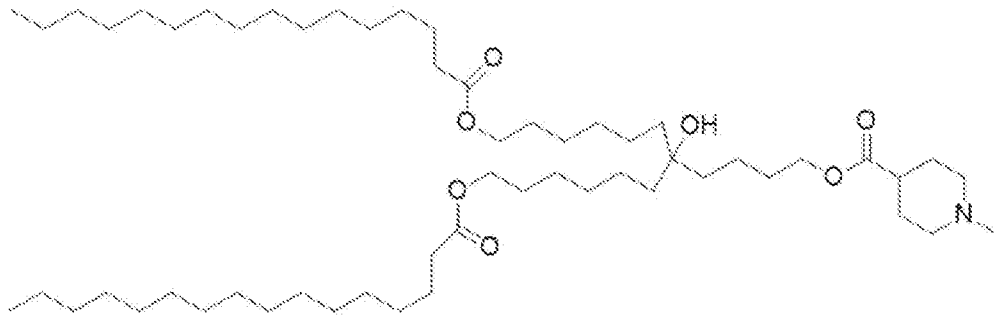


CL15F 13-3、

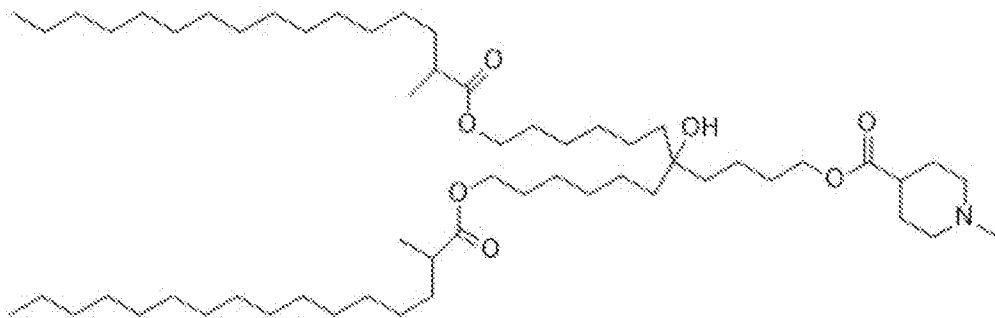


CL15F 14-2、

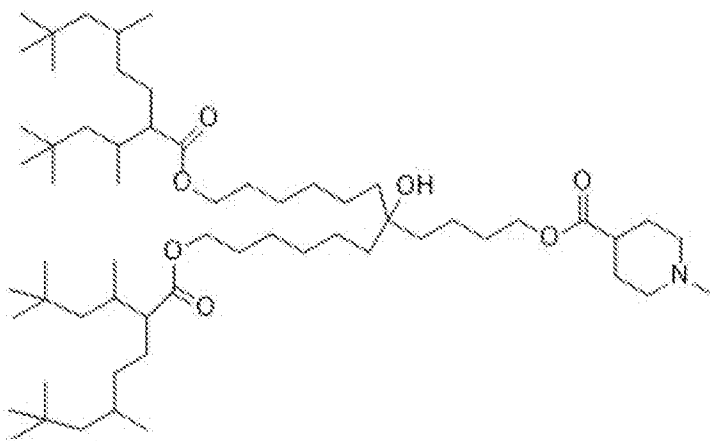
[化32-14]



CL15F 16-0、



CL15F 16-1



CL15G6。

本発明は、一側面において、本発明のpH感受性カチオン性脂質に関する

。

[0046] 一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質のpKaは特に限定されないが、例えば4.0~9.0程度、好ましくは4.5~8.5程度で選択することができ、この範囲のpKaを与えるように各置換基の種類を選択

することが好ましい。

[0047] 一般式(1)で表されるpH感受性カチオン性脂質は、例えば、本明細書の実施例に具体的に示した方法により容易に製造することができる。この製造方法を参照し、原料化合物、試薬、及び反応条件などを適宜選択することにより、当業者は一般式(1)の範囲に包含される任意の脂質を容易に製造することができる。

[0048] 一般式(A)で表される基は、-C(O)-O-基に2本の炭化水素鎖(R^{11} 及び R^{12})が連結した分岐構造を備える基である。すなわち、本発明のpH感受性カチオン性脂質では、2本の分岐鎖型の炭化水素鎖(R^1 及び R^2)を備えており、これらの炭化水素鎖は、脂質ナノ粒子の脂質膜中に埋め込まれる疎水性足場になる。本発明に係る脂質ナノ粒子は、分岐鎖型構造からなる疎水性足場を備える本発明のpH感受性カチオン性脂質を脂質の構成成分とすることにより、肝臓又は脾臓への選択性が高いという特徴を有する。

[0049] 本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明のpH感受性カチオン性脂質は、1種類のみであってもよく、2種類以上であってもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する本発明のpH感受性カチオン性脂質が2種類以上である場合、本発明のpH感受性カチオン性脂質の量は、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子のうち、本発明のpH感受性カチオン性脂質に相当する脂質分子の合計量を意味する。

[0050] 脂質ナノ粒子を構成する脂質分子に占める本発明のpH感受性カチオン性脂質の割合が多いほど、標的細胞への脂質ナノ粒子の取り込み効率が高くなる。このため、本発明に係る脂質ナノ粒子においては、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のpH感受性カチオン性脂質の量の割合(〔本発明のpH感受性カチオン性脂質の量(mol)〕/〔脂質ナノ粒子を構成する全脂質量(mol)〕)×100%)は、20モル%以上であることが好ましい。一方で、脂質ナノ粒子を構成する脂質分子に占めるpH感受性カチオン性脂質の割合が多すぎると、粒子径を十分に小さくすることが困難な場合がある。標的細胞への脂質ナノ粒子の取り込み効率が十分であり、

かつ粒子径が十分に小さい脂質ナノ粒子が得られることから、本発明に係る脂質ナノ粒子における脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する本発明のpH感受性カチオン性脂質の量の割合は、30モル%以上であることがより好ましく、30～70モル%がさらに好ましく、40～60モル%がよりさらに好ましい。

[0051] 本発明に係る脂質ナノ粒子の構成脂質のうち、本発明のpH感受性カチオン性脂質以外の脂質としては、一般的にリポソームを形成する際に使用される脂質を用いることができる。このような脂質としては、例えば、リン脂質、ステロール若しくはステロール誘導体、糖脂質、又は飽和若しくは不飽和の脂肪酸等が挙げられる。これらは1種又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

[0052] リン脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファリジルコリン、カルジオリピン、プラスマロゲン、セラミドホスホリルグリセロールホスファート、ホスファチジン酸等のグリセロリン脂質；スフィンゴミエリン、セラミドホスホリルグリセロール、セラミドホスホリルエタノールアミン等のスフィンゴリン脂質；などを挙げることができる。また、卵黄レシチン、大豆レシチンなどの天然物由来のリン脂質を用いることもできる。グリセロリン脂質及びスフィンゴリン脂質における脂肪酸残基は、特に限定されないが、例えば、炭素数12～24の飽和又は不飽和の脂肪酸残基を挙げることができ、炭素数14～20の飽和又は不飽和の脂肪酸残基が好ましい。具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸などの脂肪酸由来のアシル基を挙げることができる。これらのグリセロ脂質又はスフィンゴ脂質が2以上の脂肪酸残基を有する場合、全ての脂肪酸残基が同一の基であってもよく、互いに異なる基であってもよい。

[0053] ステロール又はステロール誘導体としては、例えば、コレステロール、コ

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

[0054] 本発明に係る脂質ナノ粒子の構成脂質としては、本発明のpH感受性カチオン性脂質に加えて、中性脂質を含むことが好ましく、リン脂質又はステロールを含むことがより好ましく、ステロールを含むことがさらに好ましく、コレステロールを含むことがよりさらに好ましい。

[0055] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質成分としてポリアルキレングリコール修飾脂質を含有することが好ましい。ポリアルキレングリコールは親水性ポリマーであり、ポリアルキレングリコール修飾脂質を脂質膜構成脂質として用いて脂質ナノ粒子を構築することにより、脂質ナノ粒子の表面をポリアルキレングリコールで修飾することができる。ポリアルキレングリコールで表面修飾することにより、脂質ナノ粒子の血中滞留性などの安定性を高めることができる場合がある。

[0056] ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリテトラメチレングリコール、ポリヘキサメチレングリコールなどを用いることができる。ポリアルキレングリコールの分子量は、例えば300～10,000程度、好ましくは500～10,000程度、さらに好ましくは1,000～5,000程度である。

[0057] 例えば、脂質のポリエチレングリコールによる修飾には、ステアリル化ポリエチレングリコール（例えばステアリン酸PEG45（STR-PEG45）など）を用いることができる。その他、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000]-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、n-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-5000]-1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-750]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、N-[カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-5000]-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフォエタノールアミン、1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000（PEG-DMG）などのポリエチレングリコール誘導体などを用いることもできるが、ポリアルキレングリコール化脂質はこれらに限定されることはない。

[0058] 本発明に係る脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する、ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合は、本発明のpH感受性カチオン性脂質による肝臓選択性又は脾臓選択性、具体的には、本発明に係る脂質ナノ粒子を遺伝子キャリアとして用いる場合の肝臓特異的遺伝子発現活性又は脾臓特異的遺伝子発現活性を損なわない量であれば特に限定されるものではない。例えば、脂質ナノ粒子を構成する全脂質量に対する、ポリアルキレングリコール修飾脂質の割合は、0.5~3モル%とすることが好ましい。

[0059] 本発明に係る脂質ナノ粒子には、必要に応じて適宜の表面修飾などを行うことができる。

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

とができる場合もある。

[0060] 本発明に係る脂質ナノ粒子の製造にあたり、血中滞留性を高めるための脂質誘導体として、例えば、グリコフォリン、ガングリオシドGM1、ホスファチジルイノシトール、ガングリオシドGM3、グルクロン酸誘導体、グルタミン酸誘導体、ポリグリセリンリン脂質誘導体などを利用することもできる。また、血中滞留性を高めるための親水性ポリマーとして、ポリアルキレングリコールのほかにデキストラン、プルラン、フィコール、ポリビニルアルコール、スチレン-無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸交互共重合体、アミロース、アミロペクチン、キトサン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナンなどを表面修飾に用いることもできる。

[0061] また、本発明に係る脂質ナノ粒子の核内移行を促進するために、例えば、脂質ナノ粒子を3糖以上のオリゴ糖化合物で表面修飾することもできる。3糖以上のオリゴ糖化合物の種類は特に限定されないが、例えば、3~10個程度の糖ユニットが結合したオリゴ糖化合物を用いることができ、好ましくは3~6個程度の糖ユニットが結合したオリゴ糖化合物を用いることができる。中でも、好ましくはグルコースの3量体ないし6量体であるオリゴ糖化合物を用いることができ、さらに好ましくはグルコースの3量体又は4量体であるオリゴ糖化合物を用いることができる。より具体的には、イソマルトトリオース、イソパノース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、又はマルトヘキサオースなどを好適に用いることができ、これらのうち、グルコースが α 1-4結合したマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、又はマルトヘキサオースがさらに好ましい。特に好ましいのはマルトトリオース又はマルトテトラオースであり、最も好ましいのはマルトトリオースである。オリゴ糖化合物による脂質ナノ粒子の表面修飾量は特に限定されないが、例えば、総脂質量に対して1~30モル%程度、好ましくは2~20モル%程度、より好ましくは5~10モル%程度である。

- [0062] オリゴ糖化合物で脂質ナノ粒子を表面修飾する方法は特に限定されないが、例えば、脂質ナノ粒子をガラクトースやマンノースなどの単糖で表面を修飾したリポソーム（国際公開第2007/102481号）が知られているので、この刊行物に記載された表面修飾方法を採用することができる。上記刊行物の開示の全てを参照により本願明細書の開示として含める。
- [0063] また、本発明に係る脂質ナノ粒子には、例えば、温度変化感受性機能、膜透過機能、遺伝子発現機能、及びpH感受性機能などのいずれか1つ又は2つ以上の機能を付与することができる。これらの機能を適宜付加することにより、脂質ナノ粒子の血液中での滞留性を向上させ、標的細胞におけるエンドサイトーシスの後にエンドソームから効率的に脂質ナノ粒子を脱出させて、封入された核酸を肝臓細胞内または肝臓細胞内でより効率よく発現させることができる。
- [0064] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、トコフェロール、没食子酸プロピル、パルミチン酸アスコルビル、又はブチル化ヒドロキシトルエンなどの抗酸化剤、荷電物質、及び膜ポリペプチドなどからなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質を含んでいてもよい。正荷電を付与する荷電物質としては、例えば、ステアリルアミン、オレイルアミンなどの飽和若しくは不飽和脂肪族アミンなどを挙げることができ、負電荷を付与する荷電物質としては、例えば、ジセチルホスフェート、コレステリルヘミスクシネート、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸などを挙げることができる。膜ポリペプチドとしては、例えば、膜表在性ポリペプチド、又は膜内在性ポリペプチドなどが挙げられる。これらの物質の配合量は特に限定されず、目的に応じて適宜選択することができる。
- [0065] 本発明に係る脂質ナノ粒子の大きさは、生体内の肝臓細胞又は脾臓細胞に高い送達効率を得られやすいことから、平均粒子径が400nm以下であることが好ましく、平均粒子径が300nm以下であることがより好ましく、平均粒子径が200nm以下であることがさらに好ましく、150nm以下であることがよりさらに好ましい。なお、脂質ナノ粒子の平均粒子径とは、

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

[0066] 本発明に係る脂質ナノ粒子の多分散度指数 (P D I) は 0.01~0.7 程度、好ましくは 0.01~0.6 程度、さらに好ましくは 0.03~0.3 程度である。p H 7.4 におけるゼータ電位は -50 m V ~ 5 m V の範囲、好ましくは -45 m V ~ 5 m V の範囲とすることができる。

[0067] 本発明に係る脂質ナノ粒子の形態は特に限定されないが、例えば、水系溶媒に分散した形態として一枚膜リポソーム、多重層リポソーム、球状ミセル、又は不定型の層状構造物などを挙げることができる。本発明に係る脂質ナノ粒子としては、一枚膜リポソーム、多重層リポソームであることが好ましい。

[0068] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、脂質膜で覆われた粒子内部に、標的の細胞内に送達する目的の成分を内包していることが好ましい。本発明に係る脂質ナノ粒子が粒子内部に内包する成分としては、内包可能な大きさであれば特に限定されるものではない。本発明に係る脂質ナノ粒子には、核酸、糖類、ペプチド類、低分子化合物、金属化合物など任意の物質を封入することができる。

[0069] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる成分としては、核酸が好ましい。核酸としては、DNA であってもよく、RNA であってもよく、これらの類似体又は誘導体 (例えば、ペプチド核酸 (PNA) やホスホロチオエート DNA など) であってもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸は、1 本鎖核酸であってもよく、2 本鎖核酸であってもよく、線状であってもよく、環状であってもよい。

本発明の一態様において、本発明に係る脂質ナノ粒子は、本発明の p H 感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物、及び核酸を含む。

[0070] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸は、標的細胞内で発現させる

ための外来遺伝子を含むことが好ましく、細胞内に取り込まれることによって外来遺伝子を細胞内で発現させるために機能する核酸であることがより好ましい。当該外来遺伝子は、標的細胞（好ましくは肝臓細胞及び脾臓細胞）のゲノムDNA中に本来含まれている遺伝子であってもよく、ゲノムDNA中に含まれていない遺伝子であってもよい。このような核酸としては、発現させる目的の遺伝子をコードする塩基配列からなる核酸を含む遺伝子発現ベクターが挙げられる。当該遺伝子発現ベクターは、導入された細胞内において、染色体外遺伝子として存在するものであってもよく、相同組換えによりゲノムDNA中に取り込まれるものであってもよい。

[0071] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる遺伝子発現ベクターとしては、特に限定されるものではなく、一般的に遺伝子治療等で使用されるベクターを用いることができる。本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる遺伝子発現ベクターとしては、プラスミドベクター等の核酸ベクターであることが好ましい。プラスミドベクターは、環状のままであってもよく、予め線状に切断した状態で本発明に係る脂質ナノ粒子に封入させてもよい。遺伝子発現ベクターは、発現させる対象の遺伝子の塩基配列情報に基づいて、一般的に使用される分子生物学的ツールを利用して常法により設計でき、公知の各種の方法で製造することができる。

[0072] 本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸は、標的細胞内に存在する標的遺伝子の発現を制御する機能性核酸であることも好ましい。当該機能性核酸としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、siRNA、microRNA、mRNA等が挙げられる。また、細胞内でsiRNAを発現させるsiRNA発現ベクターとなるプラスミドDNA（pDNA）であってもよい。siRNA発現ベクターとしては、市販のsiRNA発現ベクターから調製することができ、また、これを適宜改変してもよい。本発明に係る脂質ナノ粒子に内包させる核酸としては、特に肝臓又は脾臓への選択性が良好であることから、mRNA又はpDNAであることが好ましい。

本発明の一態様において、本発明に係る脂質ナノ粒子は、本発明のpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物、及び核酸を含み、ここで前記核酸は、mRNA又はプラスミドDNAである。

[0073] 本発明に係る脂質ナノ粒子の製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な任意の方法を採用することができる。一例を挙げれば、全ての脂質成分をクロロホルムなどの有機溶媒に溶解し、エバポレータによる減圧乾固や噴霧乾燥機による噴霧乾燥を行うことによって脂質膜を形成した後、当該脂質ナノ粒子に封入させる成分、例えば核酸等を含む水系溶媒を乾燥した上記の混合物に添加し、さらにホモジナイザーなどの乳化機、超音波乳化機、又は高圧噴射乳化機などにより乳化することで製造することができる。また、リポソームを製造する方法としてよく知られている方法、例えば逆相蒸発法などによっても製造することができる。脂質ナノ粒子の大きさを制御したい場合には、孔径のそろったメンブランフィルターなどを用いて、高圧下でイクスルージョン（押し出し濾過）を行えばよい。

[0074] 水系溶媒（分散媒）の組成は特に限定されないが、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩液などの緩衝液、生理食塩水、細胞培養用の培地などを挙げることができる。これら水系溶媒（分散媒）は脂質ナノ粒子を安定に分散させることができるが、さらに、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース糖の単糖類、乳糖、ショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトースなどの二糖類、ラフィノース、メレジノースなどの三糖類、シクロデキストリンなどの多糖類、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトールなどの糖アルコールなどの糖（水溶液）や、グリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、エチレングリコールモノアルキルエーテル、ジエチレングリコールモノアルキルエーテル、1,3-ブチレングリコールなどの多価アルコール（水溶液）などを加えてもよい。この水系溶媒に

分散した脂質ナノ粒子を安定に長期間保存するには、凝集抑制などの物理的安定性の面から水系溶媒中の電解質を極力排除することが望ましい。また、脂質の化学的安定性の面からは水系溶媒のpHを弱酸性から中性付近（pH 3.0～8.0程度）に設定し、及び／又は窒素バブリングなどにより溶存酸素を除去することが望ましい。

[0075] 本発明に係る脂質ナノ粒子は、流路を用いたアルコール希釈法により製造することもできる。当該方法は、アルコール溶媒に脂質成分を溶解させた溶液と、水系溶媒に脂質ナノ粒子に包含させる水溶性成分を溶解させた溶液とを、別々の流路から導入し、これを合流させることによって脂質ナノ粒子を製造する方法である。2液の瞬間混合を達成可能な三次元マイクロミキサー内蔵マイクロ流路を用いることにより、直径30nm程度の脂質ナノ粒子を再現良く製造可能である（非特許文献11）。製造に使用する流路としては、粒径制御性が高いナノサイズの脂質粒子形成システムを形成できることから、特許文献2に記載されているような、原料溶液を流すマイクロサイズの流路に、流路幅に対して一定幅のバッフル（邪魔板）を両側面より互い違いに配置した単純な二次元的構造の流路構造体を用いることが好ましい。アルコール希釈法において用いられる水系溶媒としては、前記のものを用いることができる。

[0076] 得られた脂質ナノ粒子の水性分散物を凍結乾燥又は噴霧乾燥する場合には、例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース糖の単糖類、乳糖、ショ糖、セロビオース、トレハロース、マルトースなどの二糖類、ラフィノース、メレジノースなどの三糖類、シクロデキストリンなどの多糖類、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトールなどの糖アルコールなどの糖（水溶液）を用いると安定性を改善できる場合がある。また、上記水性分散物を凍結する場合には、例えば、前記の糖類やグリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリ

エチレングリコール、エチレングリコールモノアルキルエーテル、ジエチレングリコールモノアルキルエーテル、1,3-ブチレングリコールなどの多価アルコール（水溶液）を用いると安定性を改善できる場合がある。

本発明の一態様において、本発明に係る脂質ナノ粒子は、凍結乾燥されている。

[0077] 本発明は、一側面において、本発明のpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体又は立体異性体の混合物を含む脂質ナノ粒子製剤に関する。本発明は、別の側面において、(i)ステロール又はステロール誘導体、(ii)ポリアルキレングリコール修飾脂質、(iii)核酸、(iv)緩衝剤、(v)二糖及び(vi)本発明のpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体又は立体異性体の混合物を含む脂質ナノ粒子製剤に関する。

ステロール又はステロール誘導体としては、例えば、コレステロール、シトステロールなどが挙げられ、好ましくは、コレステロールである。

ポリアルキレングリコール修飾脂質としては、例えば、ポリエチレングリコール修飾脂質、ポリプロピレングリコール修飾脂質などが挙げられ、好ましくは、ポリエチレングリコール修飾脂質である。

核酸としては、例えば、siRNA、pDNA、mRNAなどが挙げられ、好ましくは、mRNAである。

緩衝剤としては、例えば、HEPES緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリス緩衝剤などが挙げられる。

二糖としては、例えば、乳糖、スクロース、セロビオース、トレハロース、マルトースなどが挙げられ、好ましくは、スクロースである。脂質ナノ粒子製剤中の二糖の濃度は、例えば、1重量%~20重量%であり、好ましくは、5重量%~15重量%である。

ステロール又はステロール誘導体とpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物とのモル比は、例えば、68.5:20~28.5:60である。

[0078] 本発明において、脂質ナノ粒子製剤は、脂質ナノ粒子が、水溶液に懸濁さ

れることによって調製されてもよい。

本発明の脂質ナノ粒子製剤のpHは、25℃において、例えば5.5～8.5であり、好ましくは6.8～8.0である。

本発明は、一側面において、脂質ナノ粒子製剤が、水又は水溶液の添加により再懸濁された再懸濁製剤に関する。

[0079] 本発明の脂質ナノ粒子は、安定性に優れている。本発明の脂質ナノ粒子は、例えば、-80℃で保管した場合1週間若しくは1週間以上安定であり、及び／又は5℃で保管した場合1週間、2週間、3週間、4週間、5週間若しくは5週間以上安定であり、及び／又は25℃で保管した場合1週間、2週間、3週間、4週間、5週間若しくは5週間以上安定であり、及び／又は40℃で保管した場合3日間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間若しくは5週間以上安定である。

脂質ナノ粒子の品質については、例えば、脂質ナノ粒子を所定の温度で静置し、所定の期間保管後の、平均粒子径、PDI、及び核酸封入率を作成直後の値と比較し、平均粒子径が脂質ナノ粒子調製日を基準に±20nm以内を維持し、PDIが0.2以下で高い均一性を保ち、核酸封入率も80%以上を維持しているという3条件全て満たした脂質ナノ粒子を、品質が良好に保たれている脂質ナノ粒子と定義してもよい。

例えば、以下の基準に従って、評価されてもよい：

良好：粒子径は作成直後の粒子径±20nm以内、かつ、PDIが0.2以下、かつ、封入率80%以上；

良好でない：粒子径は作成直後の粒子径±20nm超、又は、封入率80%未満。

例えば、5℃での静置で1週間以上品質が良好に保たれている脂質ナノ粒子や40℃での静置で1週間以上品質が良好に保たれている脂質ナノ粒子を、安定性に優れている脂質ナノ粒子であると評価してもよい。

[0080] 遺伝子発現ベクターを封入した本発明に係る脂質ナノ粒子を動物個体に投与すると、当該脂質ナノ粒子に封入された遺伝子発現ベクターは、他の臓器

よりも肝臓又は脾臓において選択的に発現する。同様に、s i R N A 発現ベクターを封入した本発明に係る脂質ナノ粒子を動物個体に投与すると、当該脂質ナノ粒子に封入されたs i R N A 発現ベクターは、他の臓器よりも肝臓又は脾臓において選択的に発現し、当該発現ベクターが標的とする遺伝子の発現が抑制される。例えば、肝臓細胞内又は脾臓細胞内で発現させる目的の外来遺伝子を封入した本発明に係る脂質ナノ粒子を、被験動物へ投与すると、当該被験動物の肝臓又は脾臓内で当該外来遺伝子を発現させることができる。

[0081] この肝臓又は脾臓に対する高選択的な遺伝子発現活性により、本発明に係る脂質ナノ粒子は、肝臓又は脾臓を標的とする遺伝子発現キャリアとして機能する。本発明に係る脂質ナノ粒子に、肝臓細胞内又は脾臓細胞内で発現させる目的の外来遺伝子を封入した上で、被験動物へ投与することにより、当該被験動物の肝臓内又は脾臓内で当該外来遺伝子が発現する。このため、本発明に係る脂質ナノ粒子は、遺伝子治療に用いられる医薬用組成物の有効成分として有用であり、特に、肝臓又は脾臓を標的臓器とする遺伝子治療に用いられる医薬用組成物の有効成分として有用である。

本発明は、一側面において、本発明のpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体又は立体異性体の混合物を含有する肝臓送達用の医薬組成物に関する。

本発明は、別の側面において、本発明のpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体又は立体異性体の混合物を含有する脾臓送達用の医薬組成物に関する。

[0082] 本発明に係る脂質ナノ粒子が投与される動物は、特に限定されるものではなく、ヒトであってもよく、ヒト以外の動物であってもよい。非ヒト動物としては、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、サル、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等の哺乳動物や、ニワトリ、ウズラ、カモ等の鳥類等が挙げられる。

[0083] 本発明のpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の

混合物は、例えば、基本骨格である、7-(4-(ジプロピルアミノ)ブチル)トリデカン-1,7,13-トリオール又は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-カルボキシレートと分岐脂肪酸とを縮合することによって合成される。

本発明は、一側面において、本発明のpH感受性カチオン性脂質、その立体異性体または立体異性体の混合物の製造方法に関する。本発明の一態様において、本発明のpH感受性カチオン性脂質の製造方法は、アルキルカルボン酸とハロゲン化アルキルとを、有機リチウム、ジメチルプロピレンウレア(DMPU)及びテトラヒドロフラン(THF)の存在下で反応させて分岐脂肪酸を得る工程(工程A)を少なくとも含む。

当該方法において、アルキルカルボン酸は、例えば、オクタン酸、デカン酸、トリデカン酸、ヘキサン酸、ヘプタン酸、オクタン酸、ノナン酸、デカン酸、ウンデカン酸、ドデカン酸、トリデカン酸、テトラデカン酸、ペンタデカン酸、ヘキサデセン酸である。

当該方法において、ハロゲン化アルキルは、例えば、1-ヨードヘキサン、1-ヨードブタン、2-ヨードヘキサン、1-ブロモヘキサン、ヨードメタン、ヨードエタン、1-ヨードプロパン、1-ヨードブタン、1-ヨードペンタン、1-ヨードヘキサン、1-ヨードヘプタン、1-ヨードオクタン、1-ヨードノナン、1-ヨードドデカン、1-ヨードウンデカン、1-ヨードドデカン、1-ヨードトリデカン、1-ヨードテトラデカン、1-ヨードペンタデカン、1-ヨードヘキサデカンである。

当該方法において、有機リチウムは、例えば、リチウムジイソプロピルアミドリチウム(LDA)、t-ブチルリチウム、n-ブチルリチウムである。

[0084] 本発明の一態様において、本発明のpH感受性カチオン性脂質の製造方法は、マロン酸エステルとハロゲン化アルキルとを塩基存在下で反応させて得られる反応液を加水分解処理及び加熱処理をして分岐脂肪酸を得る工程(工程B)を少なくとも含む。

当該方法において、マロン酸エステルは、例えば、マロン酸ジメチル、マロン酸ジエチル、マロン酸ジイソプロピルであり、好ましくはマロン酸ジメチルである。

当該方法において、ハロゲン化アルキルは、例えば、ヨードアルキルであり、ヨードアルキルは、例えば、1-ヨードヘキサン、1-ヨードプロパン、2-ヨードヘキサンである。

当該方法において、塩基は、例えば、水素化ナトリウム、水素化カルシウム、ナトリウムエトキシド及びビス(トリスメチルシリル)アミドリチウムであり、好ましくは水素化ナトリウムである。

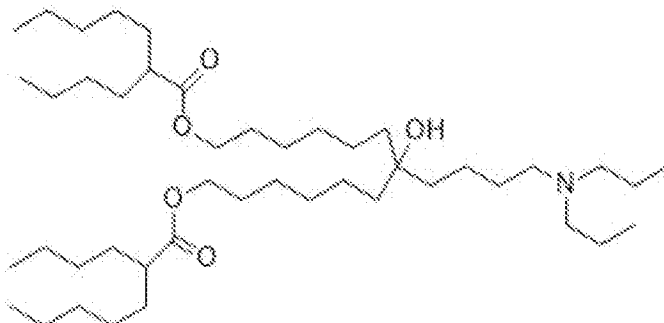
当該方法において、加水分解処理は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム及び水酸化リチウムの何れかを用いて行われる。

当該方法において、加熱処理は、加水分解処理と同時及び／又は後に、好ましくは120℃～170℃で、より好ましくは150℃～170℃で行われる。

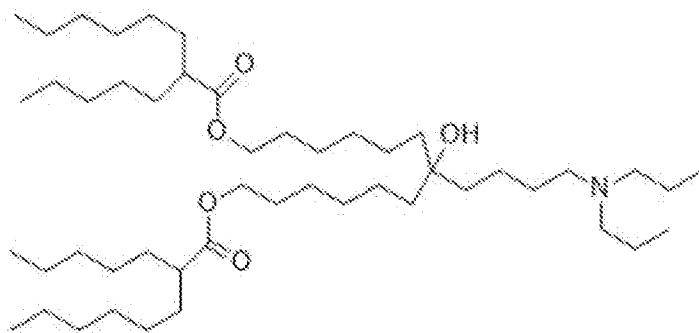
当該方法は、逆相クロマトグラフィにより分岐脂肪酸を精製する工程を更に含む。

以下の化合物：

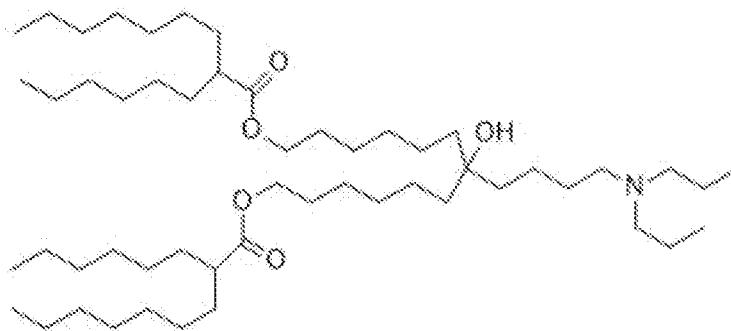
[化33]



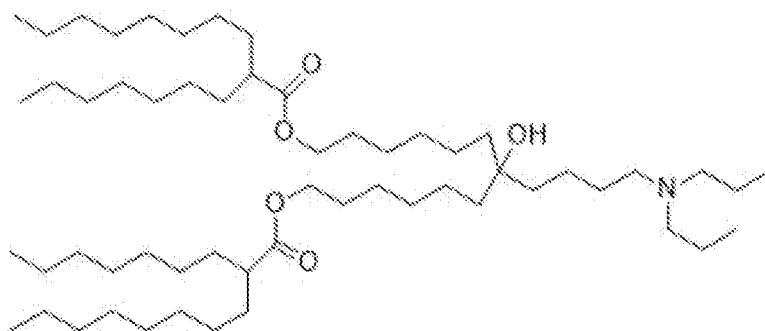
CL4F 7-4、



CL4F 8-5、



CL4F 9-6、

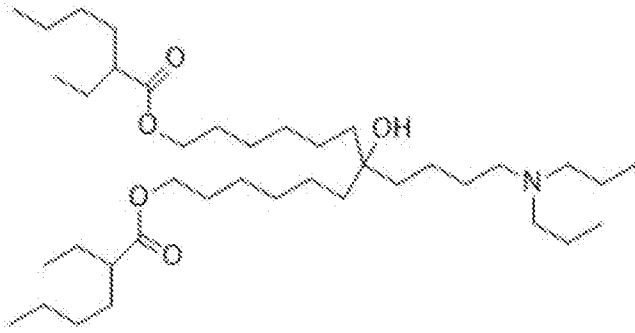


CL4F 10-7、

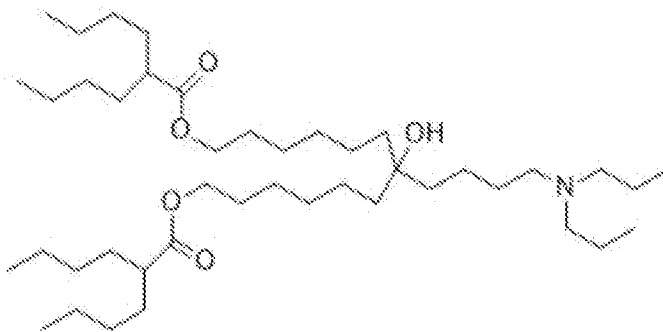
の合成に用いられる分岐脂肪酸においては、工程Bよりも工程Aによって行う方が収率よく分岐脂肪酸が得られる。

[0085] 以下の化合物：

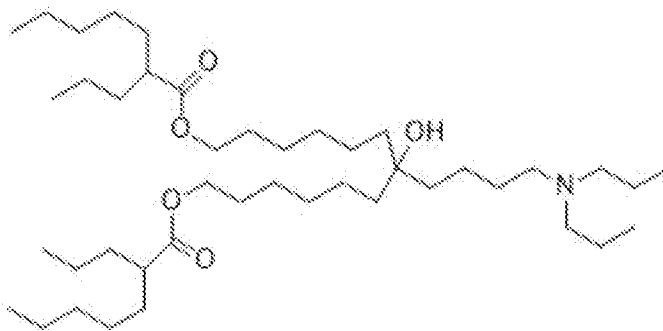
[化34-1]



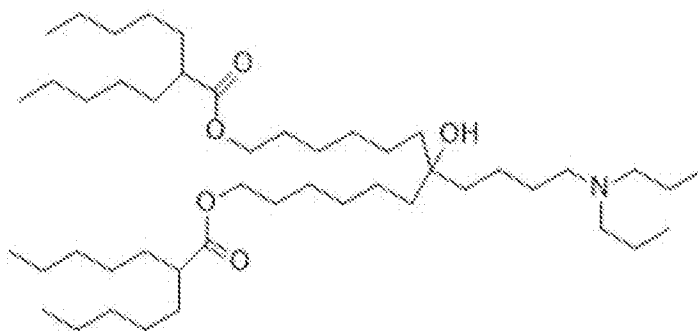
CL4F 6-2、



CL4F 6-4、

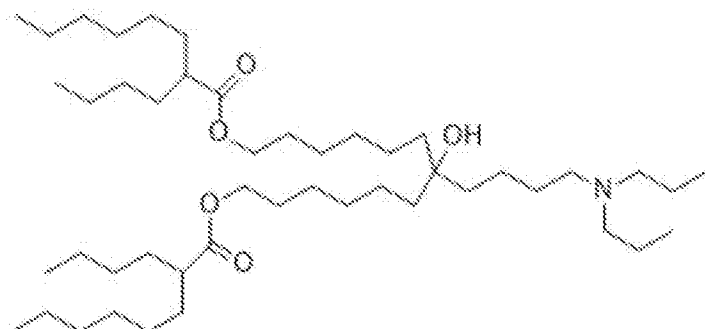


CL4F 7-3、

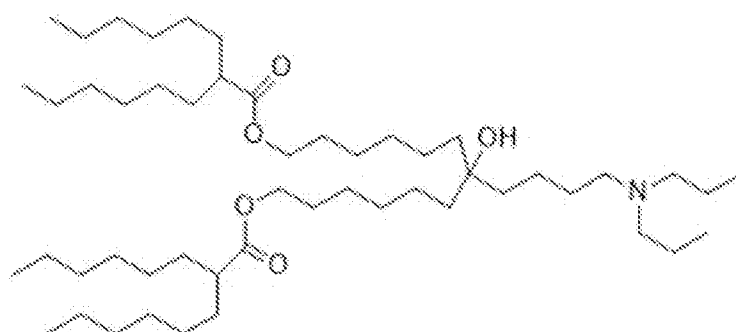


CL4F 7-5、

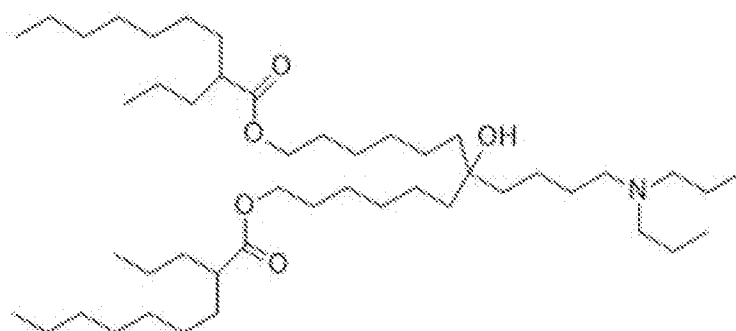
[化34-2]



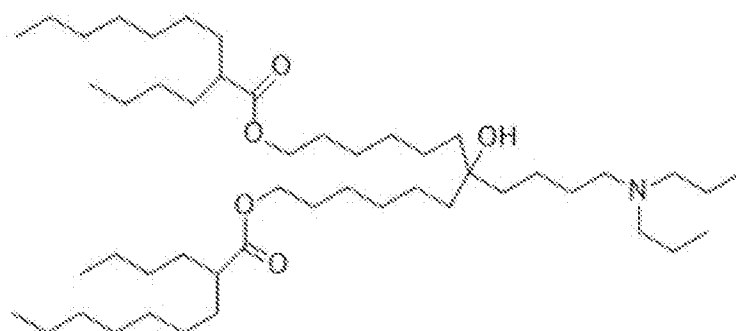
CL4F 8-4、



CL4F 8-6、

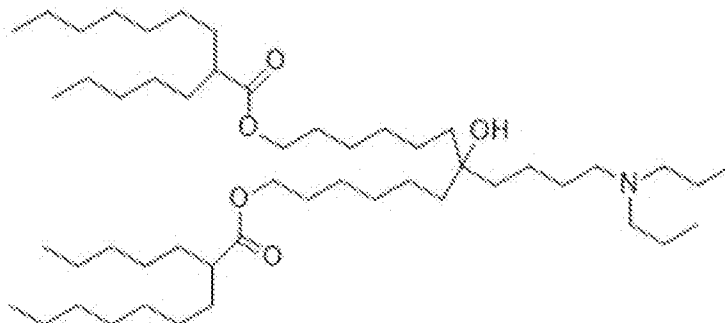


CL4F 9-3、

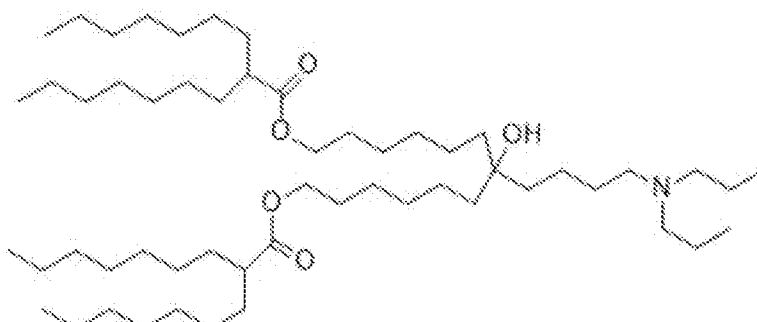


CL4F 9-4、

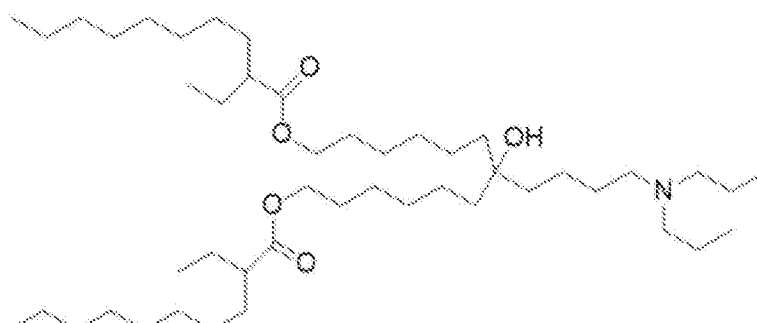
[化34-3]



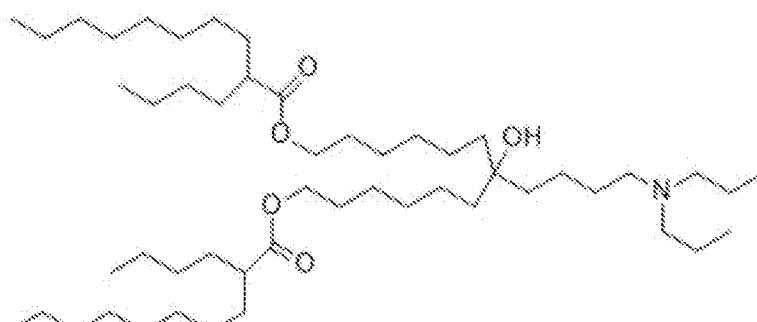
CL4F 9-5、



CL4F 9-7、

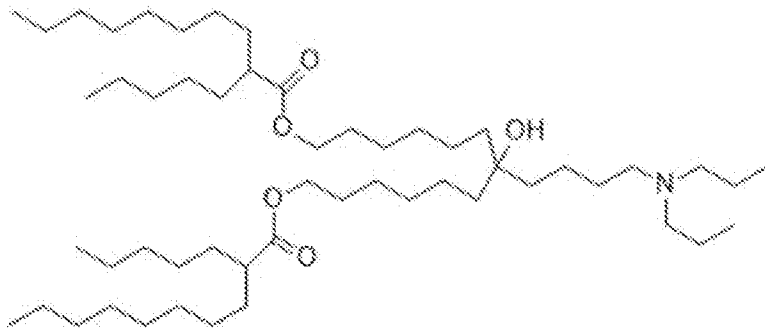


CL4F 10-2、

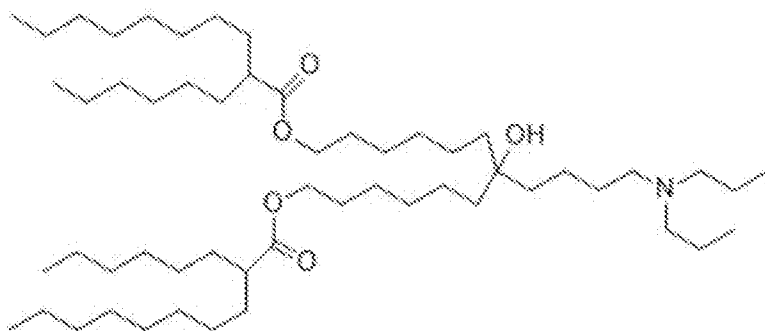


CL4F 10-4、

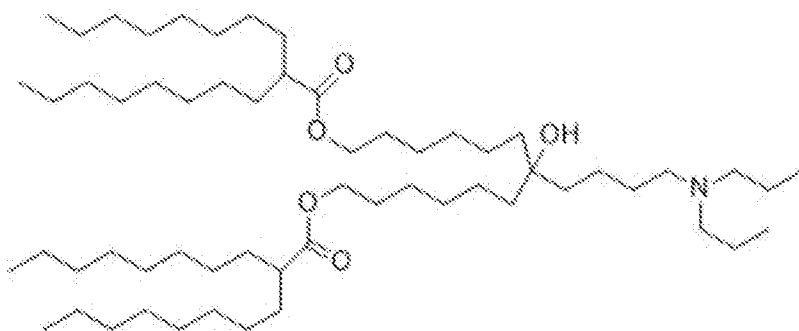
[化34-4]



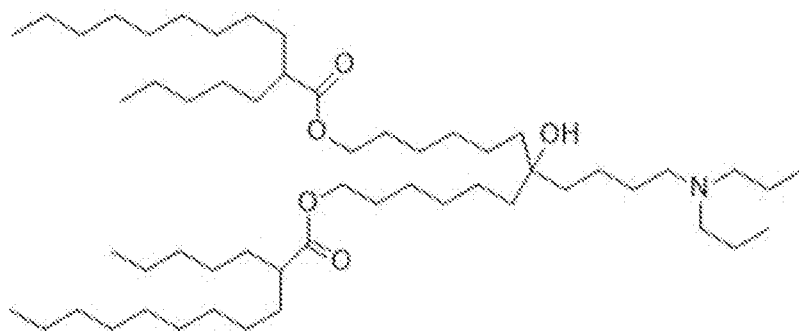
CL4F 10-5,



CL4F 6,

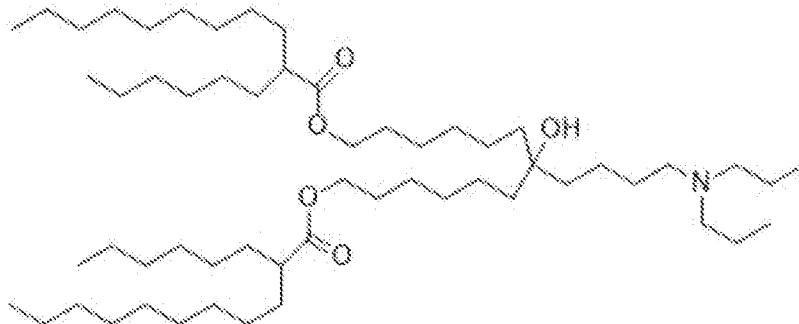


CL4F 10-8,

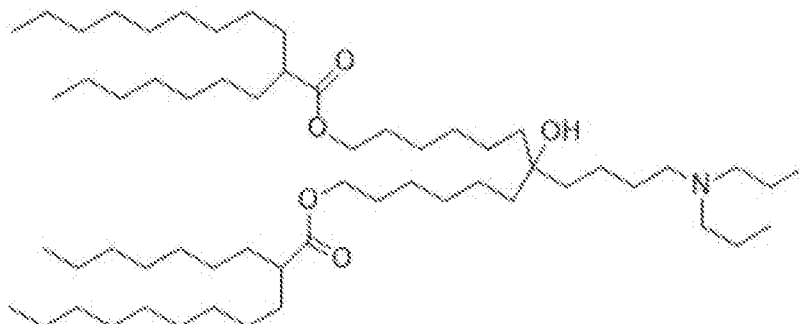


CL4F 11-5,

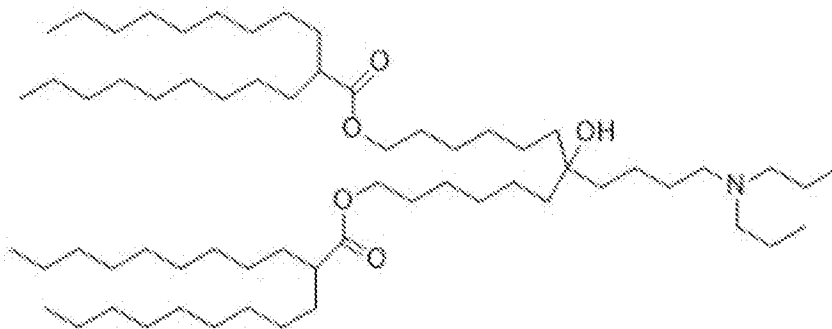
[化34-5]



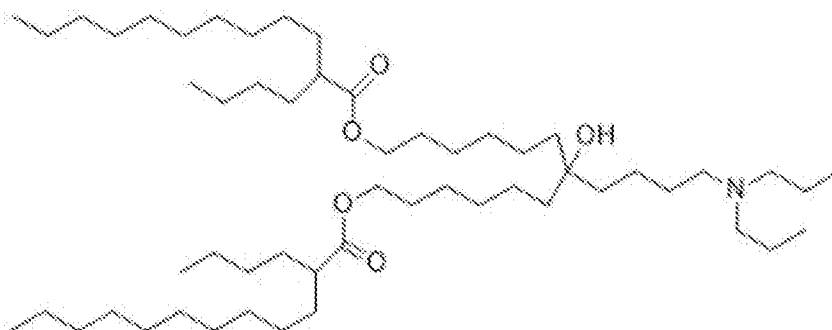
CL4F 11-6、



CL4F 11-7、

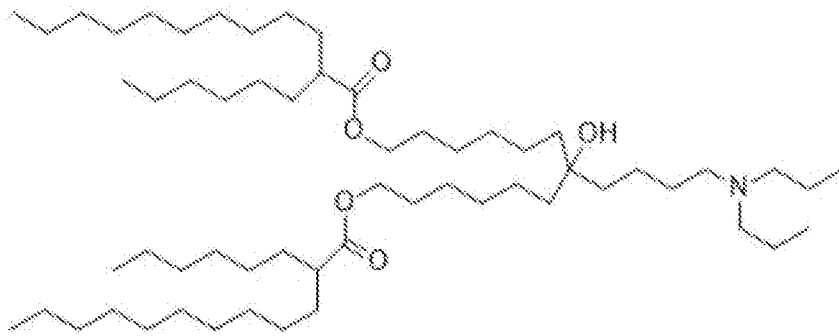


CL4F 11-9、

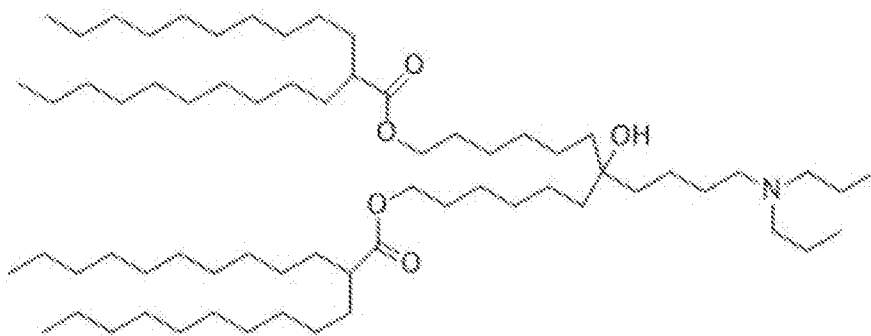


CL4F 12-4、

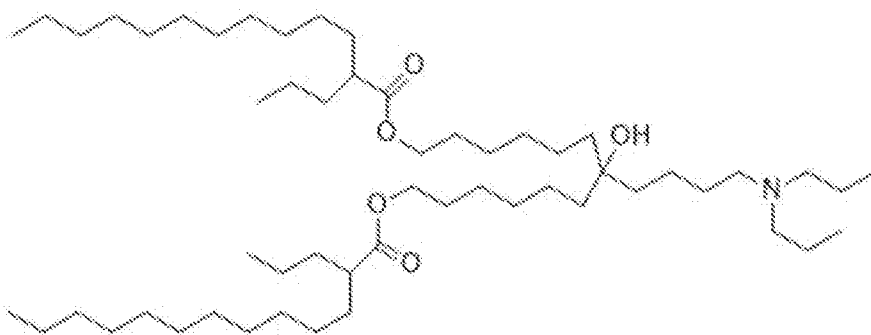
[化34-6]



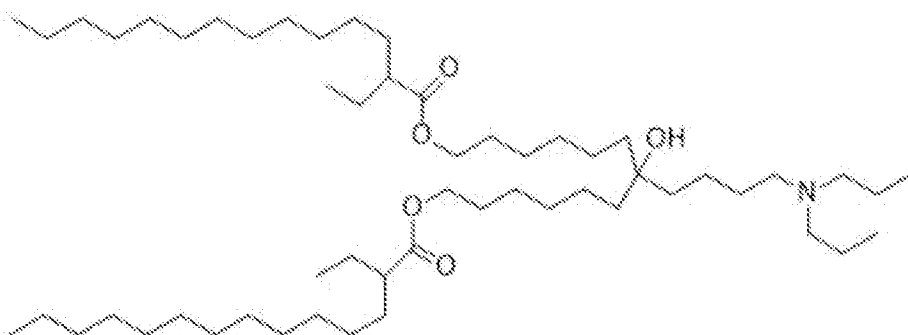
CL4F 12-6、



CL4F 12-10、

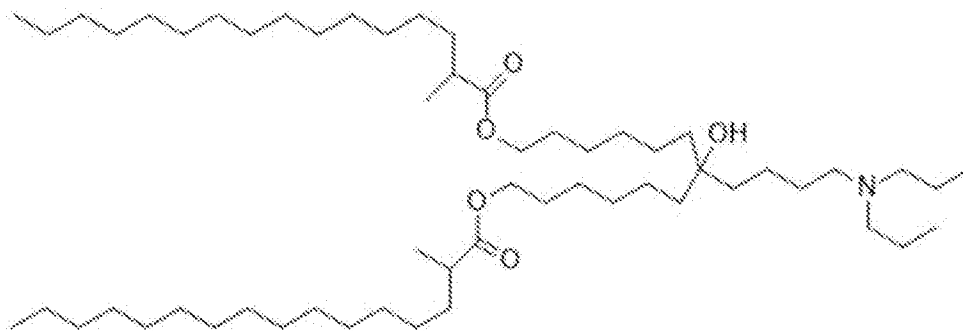


CL4F 13-3、

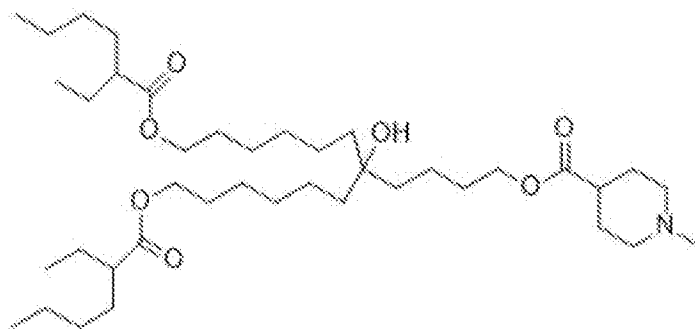


CL4F 14-2、

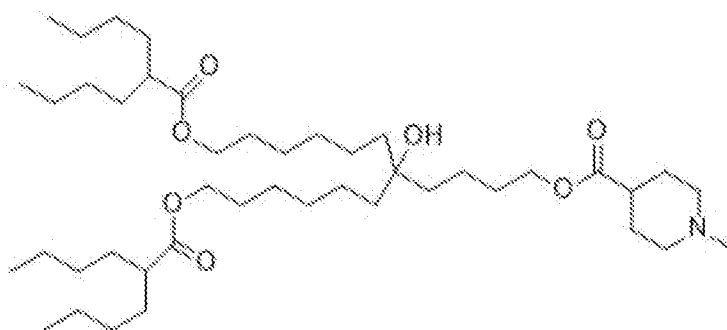
[化34-7]



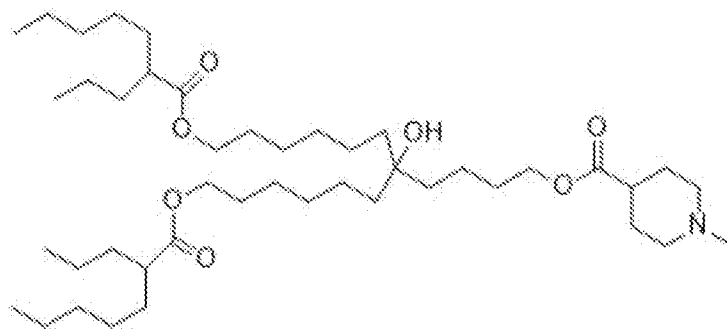
CL4F 16-1、



CL15F 6-2、

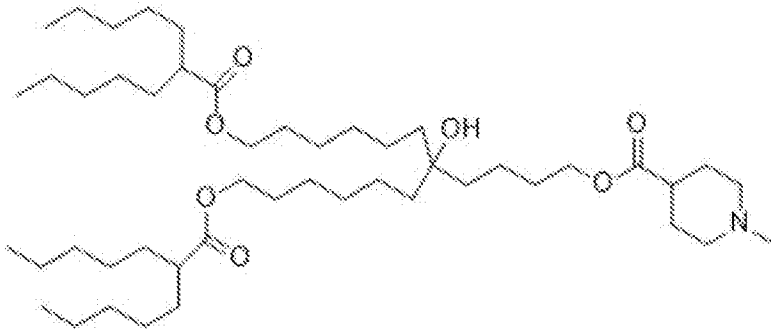


CL15F 6-4、

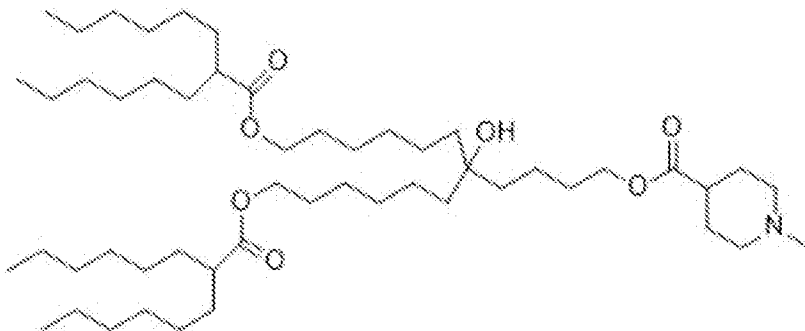


CL15F 7-3、

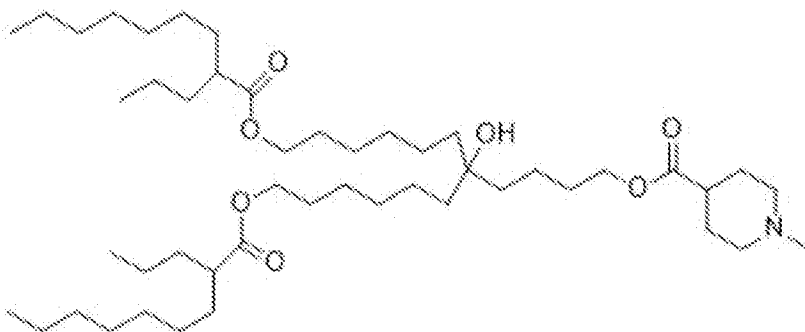
[化34-8]



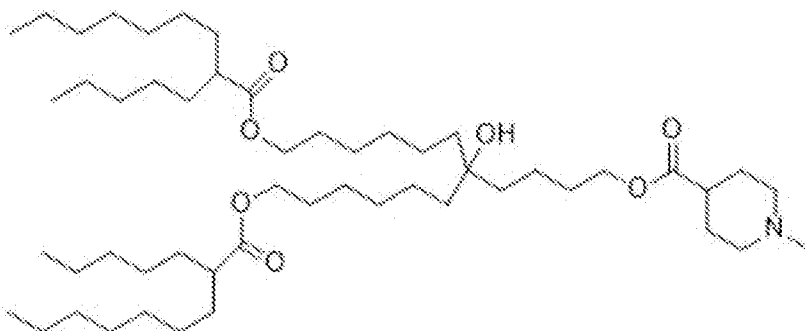
CL15F 7-5.



CL15F 8-6.

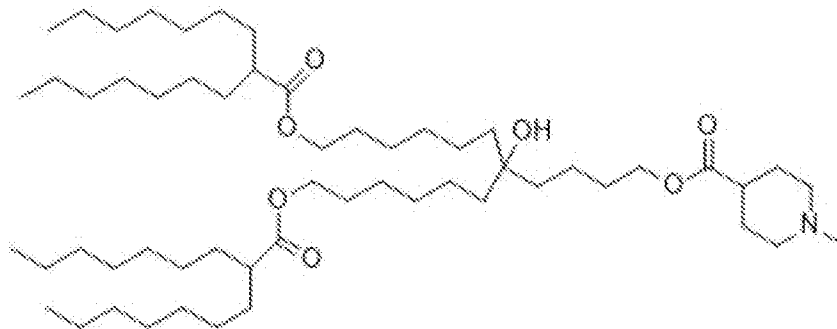


CL15F 9-3.

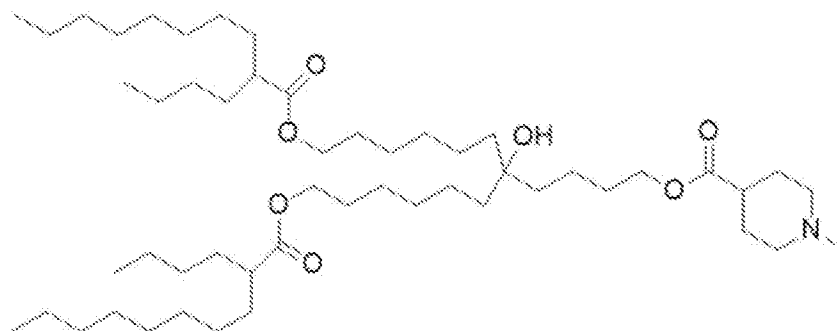


CL15F 9-5.

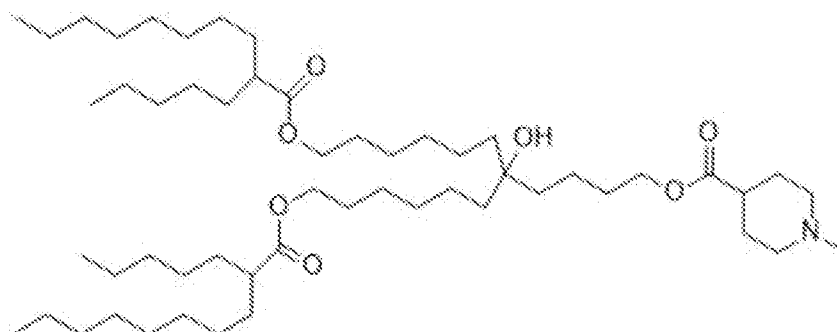
[化34-9]



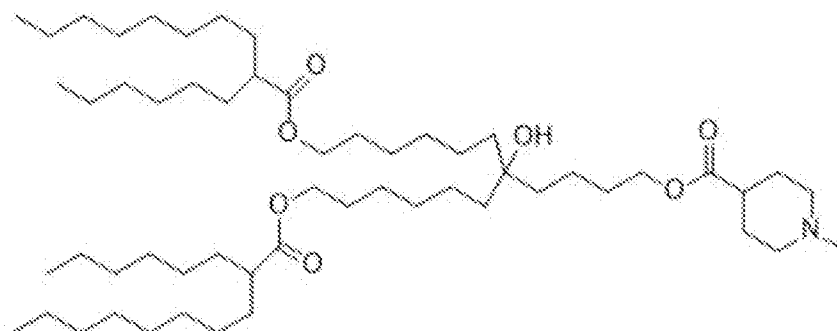
CL15F 9-7、



CL15F 10-4、

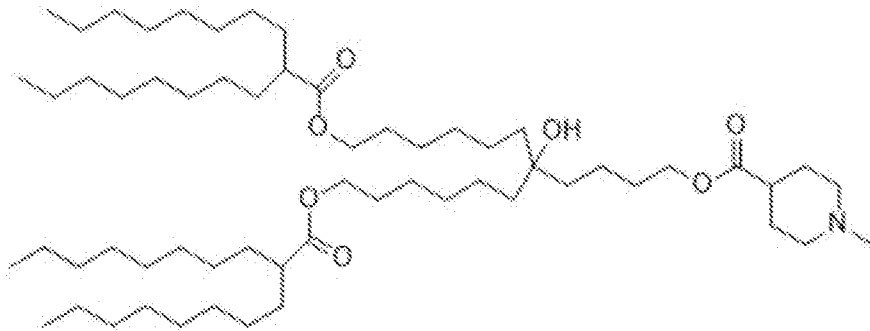


CL15F 10-5、

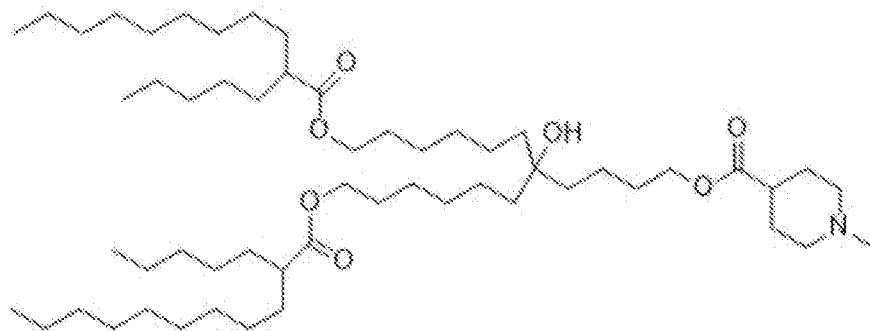


CL15F 6、

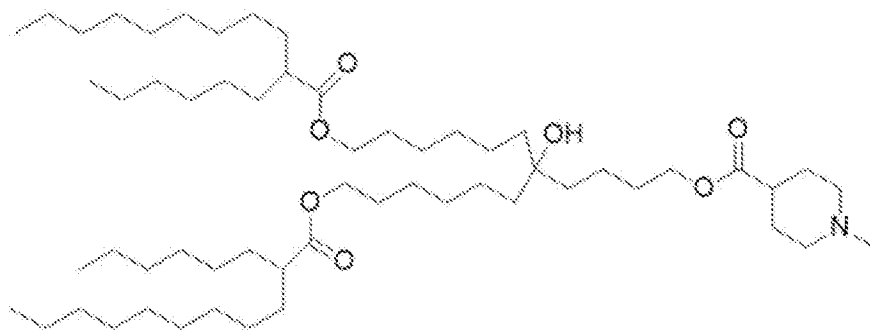
[化34-10]



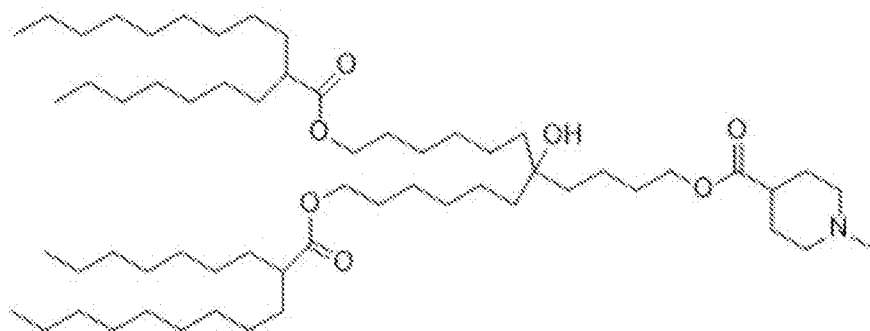
CL15F 10-8.



CL15F 11-5.

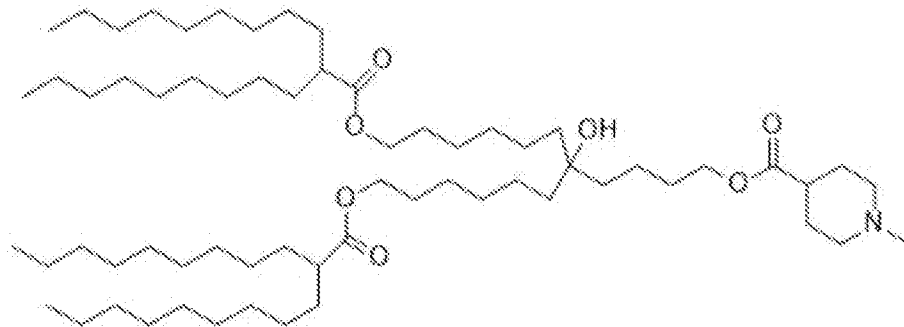


CL15F 11-6.

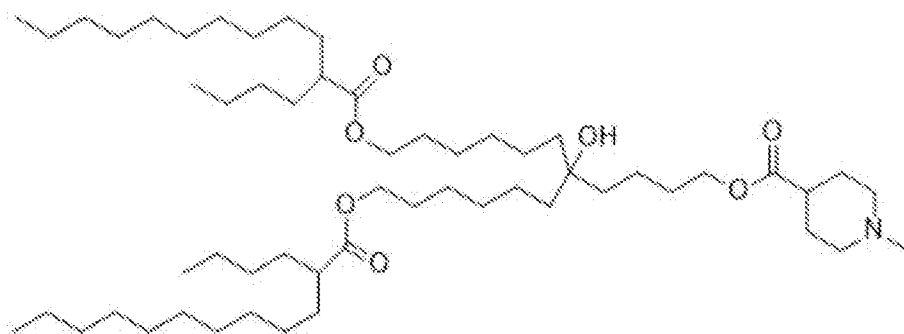


CL15F 11-7.

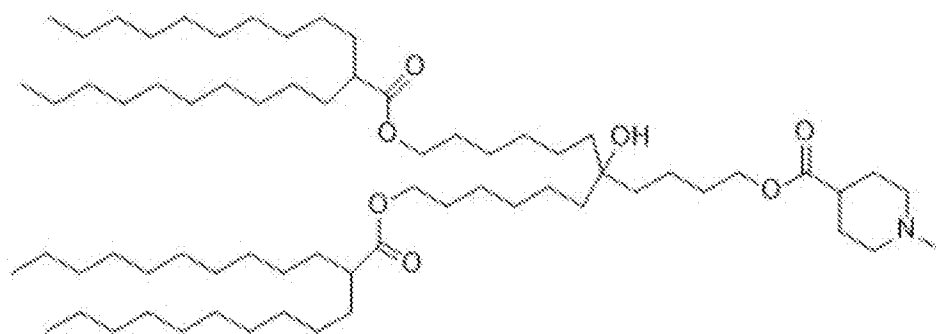
[化34-11]



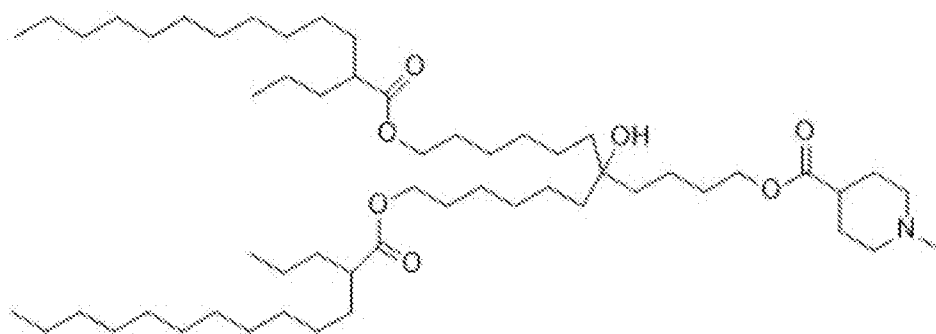
CL15F 11-9、



CL15F 12-4、

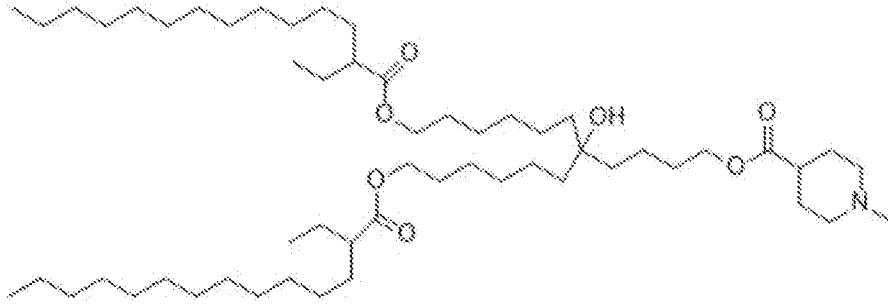


CL15F 12-10、

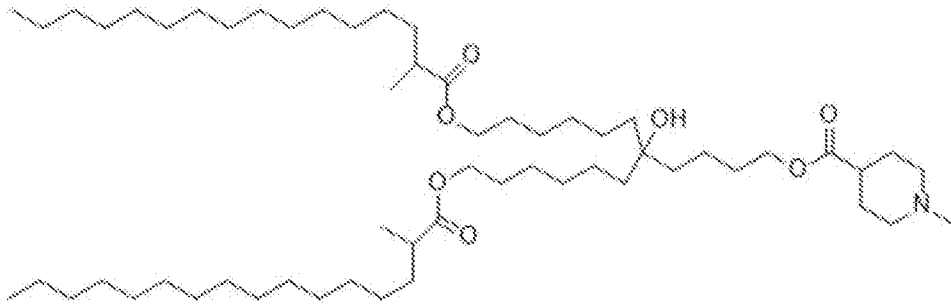


CL15F 13-3、

[化34-12]



CL15F 14-2、



CL15F 16-1

の合成に用いられる分岐脂肪酸においては、工程Aよりも工程Bによって行う方が収率よく分岐脂肪酸が得られる。

[0086] 本発明の一態様において、本発明のpH感受性カチオン性脂質の合成に用いられる分岐脂肪酸は、例えば、特許第2756756号に記載されている方法で得てもよい。

実施例

[0087] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0088] I. CL4F6、CL4G6、CL15F6及びCL15G6の合成

[合成例1] CL4F6の合成

特許文献1に記載の方法で合成された7-(4-(ジプロピルアミノ)ブチル)トリデカン-1,7,13-トリオール(1.0mmol)を5mLのジクロロメタンに溶解し、続いて、2-ヘキシルデカノイン酸(2.20mmol)、DMAP(N,N-ジメチル-4-アミノピリジン)(0.20

mmol) 及びEDCI (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド) (3.0mmol) を加え、室温で一晩反応させた。ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去した後、酢酸エチルで懸濁し、濾過によって不溶物を除去した。濾液を0.5N 酸化ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で分液洗浄した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。これを濾過した後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去し、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー [溶離溶媒; ジクロロメタン: メタノール (連続勾配)] に供することにより精製して、7-(4-(ジプロピルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシトリデカン-1, 13-ジイル ビス(2-ヘキシルデカノエート) (CL4F6) を得た。

[0089] [合成例2] CL4G6の合成

2-ヘキシルデカノイン酸に代えて、2-(4,4-ジメチルペンタン-2-イル)-5,7,7-トリメチルオクタノイン酸を用いた以外は合成例1と同様にして、7-(4-(ジプロピルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシトリデカン-1,13-ジイル ビス(2-(4,4-ジメチルペンタン-2-イル)-5,7,7-トリメチルオクタノエート) (CL4G6) を得た。

[0090] [合成例3] CL15F6の合成

特許文献1に記載の方法で合成された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 (1.00mmol) を10mLのジクロロメタンに溶解した。続いて、2-ヘキシルデカノイン酸 (2.20mmol)、DMAPI (0.20mmol) 及びEDCI (3.0mmol) を加え、室温で一晩反応させた。ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去した後、酢酸エチルで懸濁し、濾過によって不溶物を除去した。濾液を0.5N 酸化ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で分液洗浄した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。これを濾過した後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去し、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー [溶離溶媒; ジ

クロロメタン：メタノール（連続勾配）] に供することにより精製して、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-ヘキシルデカノエート)(CL15F6)を得た。

[0091] [合成例4] CL15G6の合成

2-ヘキシルデカノイン酸に代えて、2-(4,4-ジメチルペンタン-2-イル)-5,7,7-トリメチルオクタノイン酸を用いた以外は合成例3と同様にして、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-(4,4-ジメチルペンタン-2-イル)-5,7,7-トリメチルオクタノエート)(CL15G6)を得た。

[0092] 11. CL4F6、CL4G6、CL15F6、及びCL15G6を用いた脂質ナノ粒子の作製及び評価

<脂質ナノ粒子の調製>

以降の実験において、特に記載のない限り、脂質ナノ粒子は、流路を用いたアルコール希釈法により調製した。流路としては、ミキサー内蔵マイクロ流体デバイス「iLiNP」（ライラックファーマ社製）を用いた。

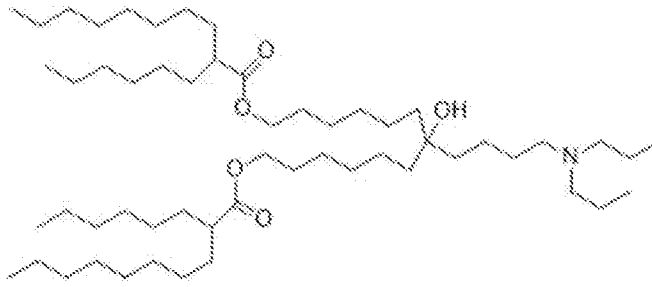
具体的には、まず、脂質濃度8mMに調整したエタノール溶液及びsiRNA濃度71.1µg/mLに調整した酢酸緩衝液(25mM、pH4.0)をそれぞれ0.375mL/分及び1.125mL/分でマイクロ流路内に送液し、流路から排泄された脂質ナノ粒子溶液を回収した。当該脂質ナノ粒子溶液を、透析膜(MWCO 12,000-14,000)に入れ、外水相を20mM MES緩衝液(pH6.0)として4℃、2時間以上透析した。その後、外水相をPBS(-)(pH7.4)に置換し、さらに4℃、2時間以上透析した後、透析膜から脂質ナノ粒子溶液を回収した。

[0093] <脂質ナノ粒子の構成脂質>

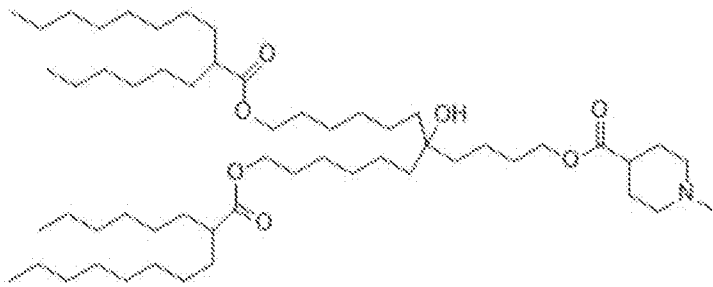
CL4F6、CL4G6、CL15F6、及びCL15G6は、合成例1~4で合成したものをを用いた。

7-(4-(ジプロピルアミノ)ブチル)-7-ヒドロキシトリデカン-1,13-ジイル ジオレアート (C₁₄H₂₆) 及び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 (C₁₅H₂₆) は、特許文献1に記載の方法で合成されたものを用いた。

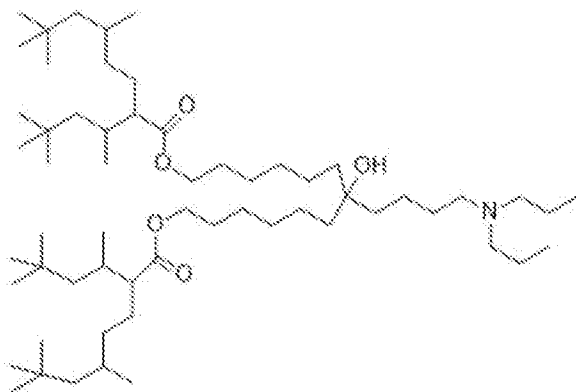
[化35-1]



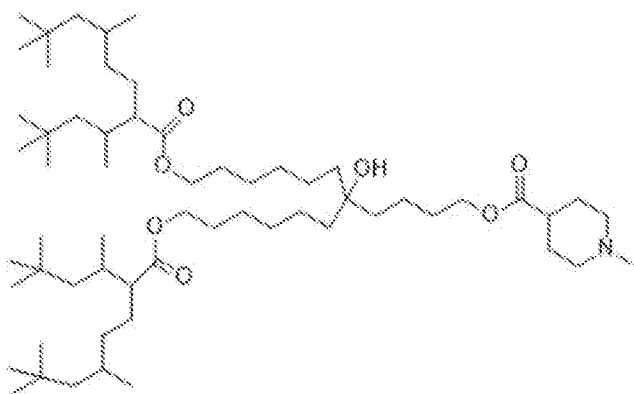
CL 4 F 6



CL 15 F 6

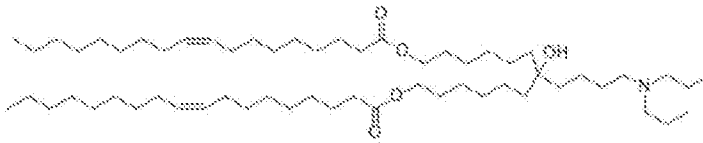


CL 4 G 6

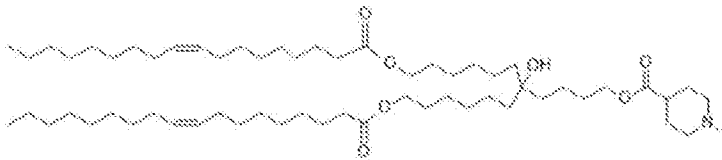


CL 15 G 6

[化35-2]



CL4H6



CL15H6

[0094] さらに、中性脂質として、コレステロール（cholesterol）及びポリエチレングリコール2000修飾ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG）を使用した。

[0095] <脂質ナノ粒子の平均粒子径、PDI（多分散指数）及びゼータ電位の測定>

脂質ナノ粒子のPBS（-）中における平均粒子径（個数平均値）及びPDIと10mM HEPES緩衝液（pH7.4）中におけるゼータ電位を、動的光散乱法を利用した分析装置「Zetasizer Nano ZS ZEN3600」（Malvern社製）を用いて測定した。

[0096] <脂質ナノ粒子のpKaの測定>

脂質ナノ粒子のpKaは、p-トルイジノ-2-ナフタレンスルホン酸（TNS）を用いて測定した。まず、TNS（終濃度：0.75μM）と脂質ナノ粒子（終濃度：30mM）を各pHに調整した緩衝液中で混合した。調製された混合液の蛍光強度を、マイクロプレートリーダーで測定した。測定値のうち、最も高い値及び低い値をそれぞれ100%及び0%荷電率とし、50%荷電率を示すpHをpKaとして算出した。

<脂質ナノ粒子の核酸封入率>

脂質ナノ粒子のsiRNA、mRNA、及びpDNAの封入率は、Ribogreen（life technologies社製）を用いて測定した。

[0097] [実施例1]

pH感受性カチオン性脂質、コレステロール、及びPEG-DMGをモル比50:50:1の組成で用いて、アルコール希釈法によって、F7に対するsiRNAを搭載させた脂質ナノ粒子（F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子）を作製した。pH感受性カチオン性脂質として、CL4F6、CL4G6、CL4H6、CL15F6、CL15G6、又はCL15H6を用いた。以下pH感受性カチオン性脂質Xを用いて製造された脂質ナノ粒子を、X-LNPという。例えば、pH感受性カチオン性脂質CL4F6、CL4G6、CL4H6、CL15F6、CL15G6、又はCL15H6を用いて製造された脂質ナノ粒子を、それぞれ、CL4F-LNP、CL4G6-LNP、CL4H6-LNP、CL15F-LNP、CL15G6-LNP、又はCL15H6-LNPという。また、F7に対するsiRNAの塩基配列を表1に示す。

表中、大文字は天然型RNA（Tのみ天然型DNA）、小文字は2'-fluoro修飾体、*はホスホロチオエート結合を、それぞれ表す。

[0098] [表1]

表1

F7に対するsiRNA	塩基配列	配列番号
Sense 鎖	GG <u>A</u> uc <u>A</u> uc <u>c</u> u <u>c</u> AA <u>G</u> uc <u>u</u> u <u>A</u> C* <u>T</u>	1
Antisense 鎖	Gu <u>A</u> AG <u>A</u> cu <u>u</u> G <u>A</u> Gu <u>G</u> A <u>u</u> cc <u>T</u> * <u>T</u>	2

[0099] 調製された各脂質ナノ粒子は、平均粒子径が80~120nmであり、siRNA封入率は90%以上であった。各脂質ナノ粒子のpKaを測定した結果を図1(A)及び図1(B)に示す。図1に示すように、足場構造が分岐鎖型であるCL4F6、CL4G6、CL15F6、又はCL15G6を用いて製造された脂質ナノ粒子は、足場構造が直鎖型であるCL4H6又はCL15H6を用いて製造された脂質ナノ粒子と比較して、低いpKaを示した。

[0100] 次いで、調製した各F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子をICRマウス（4週齢、雌性）に投与し、in vivo F7ノックダウン活性を調べた。具体的には、ICRマウスに、各F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子を0.0

0.3~0.1 mg siRNA/kgで静脈内投与し、24時間後における血漿中F7酵素活性を測定した。未処理マウスの血漿中F7酵素活性を100%として、各F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの相対血漿中F7酵素活性(%)を算出した。結果を図2(A)及び図2(B)に示す。図2(B)は、各F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子を0.1 mg siRNA/kgで静脈内投与した結果である。図2に示すように、足場構造が分岐鎖型であるCL4F6、CL4G6、CL15F6、又はCL15G6を用いて製造された脂質ナノ粒子は、足場構造が直鎖型であるCL4H6又はCL15H6を用いて製造された脂質ナノ粒子と比較して同等の*in vivo* F7ノックダウン活性を示した。これらの結果から、CL4F6、CL4G6、CL15F6、及びCL15G6を構成脂質とする脂質ナノ粒子が、siRNA送達キャリアとして有用であることが明らかとなった。

[0101] [実施例2]

siRNAに代えてmRNAを搭載させた脂質ナノ粒子を調製し、*in vivo* 遺伝子発現活性を調べた。mRNAは、NanoLuc(登録商標)ルシフェラーゼ(NLuc)(プロメガ社製)をコードしたpDNAに対して、*in vitro* 転写反応を行うことにより調製したもの(NLuc mRNA)を用いた。

[0102] まず、pH感受性カチオン性脂質、DSPC(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン)、コレステロール、及びPEG-DMGをモル比60:10:40:1の組成で用いて、アルコール希釈法によって、NLuc mRNAを搭載させた脂質ナノ粒子(NLuc mRNA搭載脂質ナノ粒子)を作製した。pH感受性カチオン性脂質として、CL4F6、CL4G6、CL4H6、CL15F6、CL15G6、又はCL15H6を用いた。

[0103]

[表2]

表 2

CL	ζ -Average (nm)	Pdi	ζ -potential (mV)	%mRNA encapsulation
CL4F6	127.2	0.157	-3.72	90
CL4G6	109.6	0.13	-1.76	91.7
CL4H6	113.4	0.139	-1.23	77.6
CL15F6	92.52	0.162	-2.16	90.3
CL15G6	71.65	0.201	0.419	91.8
CL15H6	94.34	0.495	0.123	90.5

[0104] 調製された脂質ナノ粒子の平均粒子径、PDI、ゼータ電位、及びmRNA封入率を調べた。測定結果を表2に示す。表2中、「CL」はカチオン性脂質を意味する。動的光散乱法によって算出された平均粒子径は、いずれも70~130nmであった(表2)。調製した脂質ナノ粒子のうち、CL15H6-LNPのみ、PDIが大きく、均一性の低い粒子が形成された(表2)。mRNA封入率は、CL4H6-LNPは80%を切った一方で、他のカチオン性脂質を含むLNPは、いずれも90%以上を示した。

[0105] 次に、調製した各NlucmRNA搭載脂質ナノ粒子をICRマウス(4週齢、雌性)に投与し、*in vivo*遺伝子発現活性を調べた。具体的には、ICRマウスに、各NlucmRNA搭載脂質ナノ粒子を0.04mg mRNA/kgで静脈内投与し、24時間後における肝臓及び脾臓におけるNluc活性を測定した。Nluc活性は、ルミノメーターにより測定し(RLU)、BCA法によって定量したタンパク質量で補正した。

[0106] 各NlucmRNA搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓と脾臓におけるNluc活性(RLU/mg protein)の測定結果を図3に示す。図3(A)は肝臓におけるNluc活性の測定結果であり、図3(B)は脾臓におけるNluc活性の測定結果である。さらに、肝臓における遺伝子発現活性を脾臓における遺伝子発現活性で除することで遺伝子発現の肝臓選択性を算出した。図3(C)は、各NlucmRNA搭載脂質ナノ粒子を

投与したマウスの [肝臓における N l u c 活性] / [脾臓における N l u c 活性] の算出結果を示した図である。図 3 (A) に示すように、肝臓において、CL 4 F 6 - L N P、CL 1 5 F 6 - L N P、及び CL 1 5 G 6 - L N P を投与したマウスでは、CL 4 H 6 - L N P を投与したマウスと同等の N l u c 活性を示した。また、図 3 (C) に示すように、CL 4 F 6 - L N P 及び CL 4 G 6 - L N P を投与したマウスは、CL 4 H 6 - L N P を投与したマウスと比較して、高い肝臓選択性を示した。同様に、CL 1 5 F 6 - L N P 及び CL 1 5 G 6 - L N P を投与したマウスは、CL 1 5 H 6 - L N P を投与したマウスと比較して、高い肝臓選択性を示した。これらの結果から、足場構造が分岐鎖型である pH 感受性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子は、m R N A を封入した場合に、足場構造が直鎖型である pH 感受性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子よりも、肝臓への選択性が高く、肝臓へ特異的に送達する送達キャリアとして有用であることがわかった。

[0107] [実施例 3]

s i R N A に代えて p D N A を搭載させた脂質ナノ粒子を調製し、i n v i v o 遺伝子発現活性を調べた。p D N A は、CMV プロモーター下にホタルルシフェラーゼ (F l u c) を発現するプラスミド (p F l u c) を用いた。

[0108] <i n v i t r o 遺伝子発現活性>

まず、pH 感受性カチオン性脂質、D S P C、コレステロール、及び P E G - D M G をモル比 5 0 : 1 0 : 4 0 : 1 . 5 の組成で用いて、アルコール希釈法によって、p F l u c を搭載させた脂質ナノ粒子 (p F l u c 搭載脂質ナノ粒子) を調製した。pH 感受性カチオン性脂質として、CL 4 F 6、CL 4 G 6、CL 4 H 6、CL 1 5 F 6、CL 1 5 G 6、又は CL 1 5 H 6 を用いた。また、マイクロ流路における N / P 比を 9 とした。

[0109]

[表3]

表 3

CL	ζ -Average (nm)	PDI	ζ -potential (mV)	%pDNA encapsulation
CL4F6	91.3 ± 11.2	0.19 ± 0.03	-1.7 ± 0.5	94.8 ± 3.3
CL4G6	90.6 ± 7	0.19 ± 0.05	-1.3 ± 0.7	94.5 ± 3.6
CL4H6	113.9 ± 4.2	0.2 ± 0.03	-0.4 ± 0.4	70 ± 5.2
CL15F6	105.7 ± 8.6	0.13 ± 0.02	-1.2 ± 0.4	93.1 ± 3.3
CL15G6	100.9 ± 10.7	0.12 ± 0.08	-1.9 ± 0.6	91.1 ± 2.1
CL15H6	149.9 ± 9.8	0.11 ± 0.01	0.9 ± 0.9	81.9 ± 3

[0110] 調製された脂質ナノ粒子の平均粒子径、PDI、ゼータ電位、及びmRNA封入率を調べた。測定結果を表3に示す。表3中、「CL」はカチオン性脂質を意味する。動的光散乱法によって算出された平均粒子径は、いずれも90~150nmであった(表3)。pDNA封入率については、CL4H6-LNP及びCL15H6-LNPはそれぞれ70%及び82%であった。一方で、他のカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子は、pDNA封入率は90%以上の良好な値を示した。

[0111] 培養細胞にpFluc搭載脂質ナノ粒子を導入し、*in vitro* 遺伝子発現活性を調べた。具体的には、96ウェルプレートに培養したHeLa-GFP細胞にpFluc搭載脂質ナノ粒子を0.0625 μ g pDNA/wellでトランスフェクションし、24時間後におけるFluc活性を測定した。ポジティブコントロールとして、pFlucを導入試薬「Lipofectamine 3000」(Thermo Fisher Scientific社製)を用いてHeLa-GFP細胞に導入した。Fluc活性は、ルミノメーターにより測定し(RLU)、BCA法によって定量したタンパク質量で補正した。

[0112] 各pFluc搭載脂質ナノ粒子を導入したHeLa-GFP細胞のFluc活性の測定結果を図4に示す。図中、「Lipo3K」は、Lipofectamine 3000を用いて遺伝子導入したポジティブコントロールを意味する。図4に示すように、CL15F6-LNPを導入した細胞は、CL4H6-LNP、

CL15H6-LNP、及びポジティブコントロールを導入した細胞よりも、高い活性を示した。

[0113] <in vitro 遺伝子発現活性>

マイクロ流路におけるN/P比を6とした以外は、前記と同様にして、pFluc搭載脂質ナノ粒子を調製した。

[0114] [表4]

表4

CL	ζ-Average (nm)	Pdl	ζ-potential (mV)	%pDNA encapsulation
CL4F6	79.91	0.08	-5.17	97.1
CL4G6	74.48	0.11	-2.46	97.6
CL4H6	105.6	0.14	-0.57	41.5
CL15F6	109.4	0.07	-2.02	95.4
CL15G6	86.39	0.03	-5.84	94.7
CL15H6	121.7	0.08	0.367	72.4

[0115] 調製された脂質ナノ粒子の平均粒子径、PDI、ゼータ電位、及びmRNA封入率を調べた。測定結果を表4に示す。表4中、「CL」はカチオン性脂質を意味する。動的光散乱法によって算出された平均粒子径は、いずれも70~125nmであった(表4)。pDNA封入率については、CL4F6-LNP、CL4G6-LNP、CL15F6-LNP、及びCL15G6-LNPは、いずれも90%以上の良好な値を示した。

[0116] 次いで、調製した各pFluc搭載脂質ナノ粒子をICRマウス(4週齢、雌性)に投与し、in vivo 遺伝子発現活性を調べた。具体的には、ICRマウスに、各pFluc搭載脂質ナノ粒子を0.5mg mRNA/kgで静脈内投与し、6時間後における肝臓及び脾臓におけるFluc活性を測定した。Fluc活性は、ルミノメーターにより測定し(RLU)、BCA法によって定量したタンパク質量で補正した。

[0117] 各pFluc搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓と脾臓におけるFluc活性(RLU/mg protein)の測定結果を図5に示す。図

5 (A) は肝臓における F l u c 活性の測定結果であり、図 5 (B) は脾臓における F l u c 活性の測定結果である。さらに、肝臓における遺伝子発現活性を脾臓における遺伝子発現活性で除することで遺伝子発現の肝臓選択性を算出した。図 5 (C) は、各 p F l u c 搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの [肝臓における F l u c 活性] / [脾臓における F l u c 活性] の算出結果を示した図である。図 5 (A) に示すように、肝臓における F l u c 活性は、CL 4 F 6 - L N P 及び CL 1 5 F 6 - L N P を投与したマウスは、CL 4 H 6 - L N P 及び CL 1 5 H 6 - L N P を投与したマウスよりも、優れていた。また、図 5 (C) に示すように、CL 4 F 6 - L N P 及び CL 4 G 6 - L N P を投与したマウスは、CL 4 H 6 - L N P を投与したマウスと比較して、高い肝臓選択性を示した。同様に、CL 1 5 F 6 - L N P 及び CL 1 5 G 6 - L N P を投与したマウスは、CL 1 5 H 6 - L N P を投与したマウスと比較して、高い肝臓選択性を示した。これらの結果から、同一の親水性部位を有する脂質間で比較すると、p D N A を封入した場合にも、足場構造が分岐鎖型である pH 感受性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子は、足場構造が直鎖型である pH 感受性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子よりも、肝臓への選択性が高く、肝臓へ特異的に送達する送達キャリアとして有用であることがわかった。

[0118] I I I . C L 4 F 6 誘導体及び C L 1 5 F 6 誘導体の合成

< C L 4 F 6 及び C L 4 F 6 誘導体の合成 >

C L 4 F 6 及び C L 4 F 6 誘導体である、C L 4 F 6 - 2、C L 4 F 6 - 4、C L 4 F 7 - 3、C L 4 F 7 - 4、C L 4 F 7 - 5、C L 4 F 8 - 4、C L 4 F 8 - 5、C L 4 F 8 - 6、C L 4 F 9 - 3、C L 4 F 9 - 4、C L 4 F 9 - 5、C L 4 F 9 - 6、C L 4 F 9 - 7、C L 4 F 1 0 - 2、C L 4 F 1 0 - 4、C L 4 F 1 0 - 5、C L 4 F 1 0 - 7、C L 4 F 1 0 - 8、C L 4 F 1 1 - 5、C L 4 F 1 1 - 6、C L 4 F 1 1 - 7、C L 4 F 1 1 - 9、C L 4 F 1 2 - 4、C L 4 F 1 2 - 6、C L 4 F 1 2 - 1 0、C L 4 F 1 3 - 3、C L 4 F

14-2、CL4F 16-0、及びCL4F 16-1の合成を以下のように行った。

特許文献1に記載の方法で合成された7-(4-(ジプロピルアミノ)ブチル)トリデカン-1,7,13-トリオール(1.0mmol)を5mLのジクロロメタンに溶解し、続いて、分岐脂肪酸(2.40mmol)、DMAP(N,N-ジメチル-4-アミノピリジン)(0.10mmol)及びEDCI(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)(3.0mmol)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たのち、0.5N水酸化ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で分液洗浄した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。これを濾過した後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去し、粗生成物を得た。粗生成物をODS化シリカゲルクロマトグラフィー[溶離溶媒;アセトニトリル/イソプロパノール(50:50):水(0.1% TFA)(連続勾配)]と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、CL4F6又はCL4F6誘導体を得た。

[0119] <CL15F6及びCL15F6誘導体の合成>

CL15F6及びCL15F6誘導体である、CL15F 6-2、CL15F 6-4、CL15F 7-3、CL15F 7-5、CL15F 8-6、CL15F 9-3、CL15F 9-5、CL15F 9-7、CL15F 10-4、CL15F 10-5、CL15F 10-8、CL15F 11-5、CL15F 11-6、CL15F 11-7、CL15F 11-9、CL15F 12-4、CL15F 12-10、CL15F 13-3、CL15F 14-2、CL15F 16-0、及びCL15F 16-1の合成を以下のように行った。

特許文献1に記載の方法で合成された5,11-ジヒドロキシー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(1.00mmol)を10mLのジクロロメタンに溶解した。

続いて、2-ヘキシルデカノイン酸 (2.40 mmol)、DMAP (0.10 mmol) 及び EDCI (3.0 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たのち、0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で分液洗浄した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。これを濾過した後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を留去し、粗生成物を得た。粗生成物を ODS 化シリカゲルクロマトグラフィー [溶離溶媒; アセトニトリル/イソプロパノール (50:50): 水 (0.1% TFA) (連続勾配)] と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、CL15F6 又は CL15F6 誘導体を得た。

[0120] 上記の分岐脂肪酸は、直鎖脂肪酸又はマロン酸ジメチルを原料として以下のように合成した。

<直鎖脂肪酸を原料とした分岐脂肪酸の合成>

直鎖脂肪酸 (10.28 mmol) を 36 mL の THF に溶解し、続いて、 -20°C 以下でリチウムジイソプロピルアミド (24 mmol) を滴下し、 0°C で 30 分攪拌させた。続いて、DMPU (18 mL) を加え、 0°C で 60 分攪拌させた。続いて、ヨードアルカン (23.2 mmol) を加え、 10°C で一晩反応させた。2 N 塩酸でクエンチしたのち、ジエチルエーテルで希釈し、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 ODS 化シリカゲルクロマトグラフィー [溶離溶媒; アセトニトリル/イソプロパノール (50:50): 水 (10 mM 酢酸アンモニウム) (連続勾配)] に供することにより精製して、分岐脂肪酸を得た。

[0121] <マロン酸ジメチルを原料とした分岐脂肪酸の合成>

NaH (7.56 mmol) を 18 mL の THF に溶解し、 0°C で 10 分攪拌させた。続いて、マロン酸ジメチル (7.56 mmol) を加え、 0°C

で10分攪拌させた。続いて、任意のヨードアルカン（7.56 mmol）を加え、室温で一晩反応させた。NaH（11.34 mmol）を加え、0℃で10分攪拌させた。続いて、任意のヨードアルカン（11.34 mmol）を加え、室温で一晩反応させた。酢酸でクエンチしたのち、酢酸エチルで希釈し、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た。溶媒除去の成分を16 mLのエタノールで溶解し、8 N 水酸化ナトリウム水溶液5 mLを加え、60℃で一晩反応させた。6 N 塩酸で中和したのち、酢酸エチルで希釈し、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たのち、160℃で2時間加熱し、粗生成物を得た。粗生成物をODS化シリカゲルクロマトグラフィー〔溶離溶媒；アセトニトリル／イソプロパノール（50：50）：水（10 mM酢酸アンモニウム）（連続勾配）〕に供することにより精製して、分岐脂肪酸を得た。

[0122] CL4F 7-4、CL4F 8-5、CL4F 9-6、及びCL4F 10-7の合成に用いられる分岐脂肪酸においては、マロン酸ジメチルを原料に用いる方法よりも直鎖脂肪酸を原料に用いる方法の方が、収率よく分岐脂肪酸を得られた。

CL4F 6-2、CL4F 6-4、CL4F 7-3、CL4F 7-5、CL4F 8-4、CL4F 8-6、CL4F 9-3、CL4F 9-4、CL4F 9-5、CL4F 9-7、CL4F 10-2、CL4F 10-4、CL4F 10-5、CL4F 6、CL4F 10-8、CL4F 11-5、CL4F 11-6、CL4F 11-7、CL4F 11-9、CL4F 12-4、CL4F 12-6、CL4F 12-10、CL4F 13-3、CL4F 14-2、CL4F 16-1、CL15F 6-2、CL15F 6-4、CL15F 7-3、CL15F 7-5、CL15F 8-6、CL15F 9-3、CL15F 9-5、CL15F 9-7、CL15F 10-4、CL15F 10-5

、CL15F6、CL15F 10-8、CL15F 11-5、CL15F 11-6、CL15F 11-7、CL15F 11-9、CL15F 12-4、CL15F 12-10、CL15F 13-3、CL15F 14-2、及びCL15F 16-1の合成に用いられる分岐脂肪酸においては、直鎖脂肪酸を原料に用いる方法よりもマロン酸ジメチルを原料に用いる方法の方が、収率よく分岐脂肪酸を得られた。

[0123] IV. CL4F6誘導体及びCL15F6誘導体を用いた脂質ナノ粒子の調製及び評価

1. mRNA搭載脂質ナノ粒子の調製及び評価

<mRNA搭載脂質ナノ粒子 (mRNA-LNP) の調製>

脂質ナノ粒子は、流路を用いたアルコール希釈法により調製した。流路としては、ミキサー内蔵マイクロ流体デバイス「NanoAssembler」(Precision NanoSystems社製)を用いた。

具体的には、まず、脂質濃度8mMに調整したエタノール溶液及びmRNA濃度46.1 μ g/mLに調整したクエン酸緩衝液(50mM、pH3.5)をそれぞれ3mL/分及び9mL/分でマイクロ流路内に送液し、流路から排泄された脂質ナノ粒子溶液を回収した。当該脂質ナノ粒子溶液を、20mM HEPES緩衝液(9%スクロース、pH7.45)で10倍希釈したのちに、限外濾過ユニットで濃縮し、脂質ナノ粒子溶液を回収した。

[0124] <脂質ナノ粒子の構成脂質>

pH感受性カチオン性脂質、DSPC(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン、油化産業)、コレステロール(ナカライテスク)、及びDMG-PEG2K(油化産業)をモル比50:10:38.5:1.5の組成で用いて、アルコール希釈法によって、FlucmRNAを搭載させた脂質ナノ粒子(FlucmRNA搭載脂質ナノ粒子)を作製した。FlucmRNAはTriLink Biotechnologies社のCleanCap(登録商標)FLucmRNA(5moU)を使用した。

[0125] <脂質ナノ粒子の平均粒子径及びPDIの測定>

脂質ナノ粒子のPBS（－）中における平均粒子径（ ζ -Average）及びPDIを、動的光散乱法を利用した分析装置「Zetasizer Nano ZSP」（Malvern社製）を用いて測定した。

[0126] <脂質ナノ粒子のpKaの測定>

脂質ナノ粒子のpKaは、p-トルイジノ-2-ナフタレンスルホン酸（TNS）を用いて測定した。まず、TNS（終濃度：0.75 μ M）と脂質ナノ粒子（終濃度：60 μ M）を各pHに調整した緩衝液中で混合した。調製された混合液の蛍光強度を、マイクロプレートリーダーで測定した。励起波長は測定値のうち、pH3.5における測定値を100%荷電率、pH9.5における測定値を0%荷電率とし、50%荷電率を示すpHをpKaとして算出した。

[0127] <脂質ナノ粒子の核酸封入率>

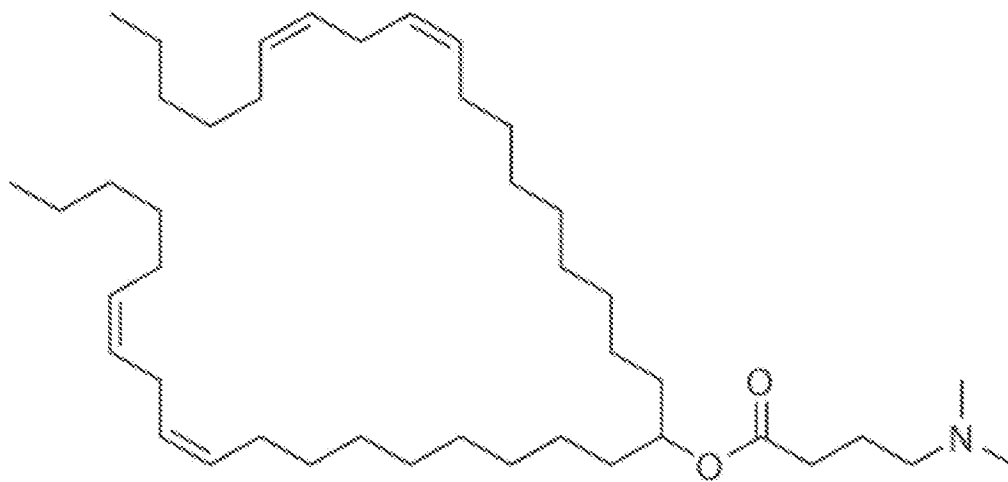
脂質ナノ粒子のsiRNA及びmRNAの封入率はRibogreen試薬で測定した。脂質ナノ粒子の濃度を核酸濃度として8 μ g/mLになるようにTE緩衝液で希釈した溶液をナノ粒子表面核酸濃度測定用溶液として用意した。また、脂質ナノ粒子の濃度を核酸濃度として1.2 μ g/mL X-triton100が1%（w/w）となるように添加して総核酸濃度測定用溶液を用意した。それぞれの溶液100 μ Lに対してRibogreen（登録商標）試薬（Quant-iTTM RibogreenTM RNA Reagent、ThermoFisher Scientific社製）100 μ Lを96ウェルマイクロプレート（黒色、ポリスチレン製、フラットボトム、Corning社製）のウェル内でよく混ぜて、励起波長485 nm、測定波長528 nmにおける蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した。核酸濃度の算出は、1% X-triton100含有の核酸溶液（核酸濃度：0~2.5 μ g/mL）を先記と同様にして蛍光強度を測定することにより作成した検量線により行った。次の計算式により、各脂質ナノ粒子の核酸封入率を算出した。

$$\text{封入率\%} = (\text{総核酸濃度測定用溶液の核酸濃度} (\mu\text{g/mL}) - \text{ナノ粒子表面核酸濃度測定用溶液の核酸濃度} (\mu\text{g/mL})) \div \text{総核酸濃度測定用溶液の核酸濃度} (\mu\text{g/mL}) \times 100$$

[0128] <結果>

調製された脂質ナノ粒子の平均粒子径、PDI、及びmRNA封入率、pKaを調べた。CL4F6誘導体ナノ粒子の測定結果を表5及び6に、CL15F6誘導体ナノ粒子の測定結果を表7に示す。対照として、以下の構造を有するD-Lin-MC3-DMA (MC3) (MedChemExpress社製) を用いた。

[化36]



動的光散乱法によって算出された表5のCL4F6誘導体ナノ粒子の平均粒子径は、いずれも60~220nmであり、CL4F16-0-LNP以外はPDIが小さく均一性の高い粒子が形成された。mRNA封入率は、CL4F6-2-LNPとCL4F16-1-LNPは80%を切った一方で、他のカチオン性脂質を含むLNPは、いずれも80%以上を示した。

表7のCL15F6誘導体ナノ粒子の平均粒子径は、CL15F6-4-LNP、CL15F7-3-LNPは300nmを超えていたが、他のカチオン性脂質を含むLNPはいずれも90~200nmであった。PDIは、CL15F6-4-LNP、CL15F7-3-LNP、CL15F16-0-LNP、CL15H6-LNP以外は、小さく均一性の高い粒子が形成された。mRNA封入率は、CL15F6-4-LNP、CL15F7-3-LNPは80%を切った一方で、他のカチオン性脂質を含むLNPは、いずれも80%以上を示した。

[0129] 次に、調製した各Fluc mRNA搭載脂質ナノ粒子をBalb/cマウス（日本チャールス・リバー、7週齢、雌性）に投与し、*in vivo* 遺伝子発現活性を調べた。具体的には、Balb/cマウスに、各Fluc mRNA搭載脂質ナノ粒子を0.1mg mRNA/kgで静脈内投与し、6時間後における肝臓及び脾臓におけるFluc活性を測定した。Fluc活性は、PBSで15mg/mLに溶かしたVivoGlo Luciferin, In Vivo Grade (Promega, P1041) をマウス1匹あたり1.5mgとなるように尾静脈から投与したのち、*in vivo* イメージングシステム (Perkin Elmer, IVIS200) により測定した。Fluc活性の単位は、最大発光波長約560nmにおける単位面積当たりの発光強度 (Avg Radiance [p/s/cm²/sr]) である。

[0130] 各Fluc mRNA搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの肝臓と脾臓におけるFluc活性 (Avg Radiance [p/s/cm²/sr]) の測定結果を表5～7に示す。

表5及び6のCL4F6誘導体ナノ粒子の肝臓におけるFluc活性は、CL4F 8-6、CL4F 9-7、又はCL4F 11-6含有のFluc mRNA搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスにおいて、CL4F6含有のFluc mRNA脂質ナノ粒子を投与したマウスよりも高いFluc活性を示した。一方で脾臓におけるCL4F6誘導体ナノ粒子のFluc活性は、CL4F 7-5、CL4F 8-4、CL4F 9-3、CL4F 10-2、CL4F 8-6、CL4F 10-4、CL4F 10-5、CL4F 12-4、CL4F 13-3、CL4F 14-2、CL4F 7-4、CL4F 8-5、CL4F 9-4、又はCL4F 9-5含有のFluc mRNA脂質ナノ粒子を投与したマウスにおいて、CL4F6含有のFluc mRNA脂質ナノ粒子を投与したマウスよりも高いFluc活性を示した。

表7のCL15F6誘導体ナノ粒子の肝臓におけるFluc活性は、CL15F 9-7、CL15F 11-5、CL15F 11-6、CL15F 10-8、CL15F 11-7、CL15F 11-9、CL15F

12-10、又はCL15F 14-2含有のFlucmRNA搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスにおいて、CL15F6含有のFlucmRNA脂質ナノ粒子を投与したマウスよりも高いFluc活性を示した。表7のCL15F6の脾臓におけるFluc活性は、CL15F 6-4、CL15F 7-3、CL15F 7-5、CL15F 9-3、CL15F 9-5、CL15F 10-5、CL15F 13-3、CL15F 11-6、CL15F 10-8、CL15F 11-7、CL15F 11-9、又はCL15F 14-2含有のFlucmRNA脂質ナノ粒子を投与したマウスにおいて、CL15F6含有のFlucmRNA脂質ナノ粒子を投与したマウスよりも高いFluc活性を示した。

[0131]

[表5]

表5

Lipid name	ζ - Average (nm)	PDI	% mRNA encapsulation	pKa	Fluc Activity in liver	Fluc Activity in spleen
CL4F 6-2	218.20	0.069	41.4	6.40	1.34E+03	1.24E+05
CL4F 7-5	109.80	0.057	99.9	6.27	4.56E+07	1.47E+07
CL4F 8-4	101.60	0.020	99.7	6.27	6.09E+07	1.41E+07
CL4F 9-3	102.80	0.030	99.6	6.34	2.96E+07	8.17E+06
CL4F 10-2	93.60	0.068	98.6	6.35	3.02E+07	6.40E+06
CL4F 8-6	88.78	0.022	99.4	6.14	1.80E+08	9.58E+06
CL4F 10-4	84.92	0.041	99.8	6.19	1.20E+08	6.70E+06
CL4F 10-5	84.62	0.021	99.7	6.07	1.06E+08	4.64E+06
CL4F 9-7	81.30	0.004	99.2	6.05	1.55E+08	2.43E+06
CL4F 11-5	81.81	0.019	99.6	6.19	4.50E+07	1.03E+06
CL4F 12-4	84.57	0.015	99.0	6.16	7.70E+07	3.19E+06
CL4F 13-3	83.05	0.044	96.3	6.22	7.34E+07	7.30E+06
CL4F 14-2	74.02	0.078	94.0	6.29	4.08E+07	3.66E+06
CL4F 10-7	79.68	0.039	99.8	5.99	1.19E+08	2.03E+06
CL4F 11-6	84.50	0.020	99.8	6.02	1.38E+08	2.54E+06
CL4F 16-0	158.30	0.225	86.2	7.46	2.32E+04	2.83E+05
CL4F 16-1	69.08	0.045	65.9	6.40	8.52E+06	1.93E+06
CL4F 10-8	81.99	0.021	99.8	5.99	5.14E+07	8.04E+05
CL4F 11-7	79.45	0.021	99.7	5.98	1.23E+08	2.03E+06
CL4F 11-9	81.13	0.014	99.8	5.92	6.86E+07	1.19E+06
CL4F 12-10	75.85	0.019	99.6	5.85	3.09E+07	2.77E+05
CL4F6	82.66	0.006	99.6	6.05	1.28E+08	2.81E+06
CL4G 6	81.21	0.030	99.8	6.02	4.58E+07	2.08E+06
CL4H 6	71.28	0.072	80.1	6.53	1.06E+07	2.10E+06
MC3	68.60	0.042	99.0	6.31	7.60E+06	6.48E+05

[0132]

[表6]

表 6

Lipid name	ζ -Average (nm)	PDI	% mRNA encapsulation	pKa	Fluc Activity in liver	Fluc Activity in spleen
CL4F 6-4	141.10	0.023	97.2	6.38	2.17E+05	2.95E+05
CL4F 7-3	133.90	0.025	98.1	6.39	3.43E+05	6.64E+05
CL4F 7-4	113.50	0.032	98.8	6.33	5.05E+06	7.43E+06
CL4F 8-5	94.65	0.043	99.1	6.23	4.80E+07	1.45E+07
CL4F 9-4	95.29	0.002	99.1	6.26	2.55E+07	8.69E+06
CL4F 9-5	89.41	0.048	99.0	6.16	6.84E+07	9.53E+06
CL4F 9-6	89.18	0.021	99.1	6.10	9.61E+07	3.89E+06
CL4F 12-6	82.84	0.017	99.7	6.03	5.86E+07	1.72E+06
CL4F6	88.07	0.020	99.4	6.05	1.25E+08	4.01E+06

[0133]

[表7]

表7

Lipid name	ζ -Average (nm)	PDI	% mRNA encapsulation	pKa	Fluc Activity in liver	Fluc Activity in spleen
CL15F 6-4	312.10	0.316	66.7	6.90	1.84E+06	3.39E+07
CL15F 7-3	370.30	0.369	64.2	6.85	5.34E+06	1.48E+07
CL15F 7-5	196.00	0.007	97.6	6.33	2.15E+06	1.37E+07
CL15F 9-3	196.80	0.044	95.5	6.62	1.16E+06	7.47E+06
CL15F 8-6	132.00	0.011	99.2	6.57	1.92E+06	5.02E+06
CL15F 9-5	135.00	0.037	99.1	6.57	1.86E+06	5.77E+06
CL15F 10-4	146.10	0.030	98.7	6.48	2.07E+06	3.97E+06
CL15F 10-5	113.90	0.047	99.4	6.59	2.70E+06	7.55E+06
CL15F 9-7	107.60	0.010	99.5	6.64	6.76E+06	4.23E+06
CL15F 11-5	108.90	0.010	99.8	6.71	9.38E+06	5.01E+06
CL15F 12-4	116.60	0.009	99.7	6.62	2.87E+06	5.10E+06
CL15F 16-0	195.90	0.234	100.1	7.15	1.97E+05	4.59E+05
CL15F 13-3	142.90	0.048	98.62	6.73	3.51E+06	6.11E+06
CL15F 11-6	106.50	0.007	99.75	6.48	9.09E+06	8.19E+06
CL15F 16-1	187.70	0.182	94.0	7.13	2.18E+05	1.27E+06
CL15F 10-8	99.84	0.026	99.78	6.24	1.35E+07	8.42E+06
CL15F 11-7	102.50	0.002	99.86	6.29	1.10E+07	7.13E+06
CL15F 11-9	99.31	0.023	99.78	6.60	3.66E+07	7.55E+06
CL15F 12-10	97.59	0.030	99.78	6.60	4.33E+07	5.58E+06
CL15F 14-2	158.90	0.117	95.70	7.00	1.03E+07	7.58E+06
CL15F6	115.50	0.002	99.69	6.39	6.28E+06	5.76E+06
CL15G6	102.40	0.012	100.24	6.15	6.52E+06	2.77E+06
CL15H6	180.90	0.238	83.8	7.14	1.17E+05	6.17E+05
MC3	71.49	0.072	99.04	6.31	5.69E+06	2.02E+05

[0134] 2. siRNA搭載脂質ナノ粒子の調製及び評価

<siRNA搭載脂質ナノ粒子の調製>

mRNAに代えてsiRNAを搭載させた脂質ナノ粒子を調製し、*in vivo* F7ノックダウン活性を調べた。siRNA搭載脂質ナノ粒子は、マイクロ流路におけるN/P比を6とした以外は、前記と同様にして調製した。F7に対するsiRNAの塩基配列を表8に示す。表中、大文字は天然型RNA（Tのみ天然型DNA）、小文字は2'-fluoro修飾体、*はホスホロチオエート結合を、それぞれ表す。

[表8]

表 8

F7に対する siRNA	塩基配列	配列番号
Sense 鎖	GGAucAucucCAAGucuuAC*T	1
Antisense 鎖	GuAAGAcuuGAGAuGAuccT*T	2

[0135] まず、pH感受性カチオン性脂質、DSPC（1，2-ジステアロイル-*s n*-グリセロ-3-ホスホコリン）、コレステロール、及びPEG-DMGをモル比50：10：38.5：1.5の組成で用いて、アルコール希釈法によって、F7に対するsiRNAを搭載させた脂質ナノ粒子（F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子）を作製した。

[0136] <結果>

調製された脂質ナノ粒子の平均粒子径、PDI、siRNA封入率、及びpKaを調べた。CL4F6誘導体ナノ粒子の測定結果を表9及び10に、CL15F6誘導体ナノ粒子の測定結果を表11に示す。CL4F6誘導体ナノ粒子の平均粒子径が60～280nmであり、siRNA封入率は、CL4F6-2-LNPは90%を切った一方で、他のカチオン性脂質を含むLNPは、いずれも90%以上を示した。CL4F16-2-LNP以外はPDIが小さく均一性の高い粒子が形成された。

CL15F6誘導体ナノ粒子の平均粒子径がCL15F6-2-LNPは300nmを超えていたが、他のカチオン性脂質を含むLNPはいずれも85～290nmであった。siRNA封入率は、全てのLNPで90%以上を示した。CL15F6-2-LNP、CL15F6-4-LNP、CL15F7-3-LNP、CL15F16-0-LNP以外はPDIが小さく均一性の高い粒子が形成された。

次いで、調製した各F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子をBalb/cマウス（日本チャールス・リバー、5週齢、雌性）に投与し、*in vivo* F7ノックダウン活性を調べた。具体的には、BALB/cマウスに、表9に記載の脂質を含有するF7 siRNA搭載脂質ナノ粒子は0.025mg siRNA/kgで、表10及び11に記載の脂質を含有するF7 siR

NA搭載脂質ナノ粒子は0.025mg siRNA/kgで静脈内投与し、24時間後における血漿中F7酵素活性をBIOPHEN FVII (Bio phen, A221304)を用いて測定した。未処理群マウスの血漿中F7酵素活性を100%として、各F7 siRNA搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの相対血漿中F7酵素活性(%)を算出した。さらにMC3含有のF7 siRNA搭載脂質ナノ粒子を投与したマウスの相対血漿中F7酵素活性(%)を1として、比率を算出した。CL4F6誘導体ナノ粒子の測定結果を表9及び10に、CL15F6誘導体ナノ粒子の測定結果を表11に示す。

表9及び10のCL4F10-4、CL4F8-5、CL4F9-5、又はCL4F12-6含有のF7 siRNA搭載脂質ナノ粒子では、MC3含有のF7 siRNA搭載脂質ナノ粒子よりも高いノックダウン活性を示した。

表11のCL15F9-7、CL15F11-5、CL15F12-4、CL15F11-6、CL15F10-8、CL15F11-7、CL15F11-9、又はCL15F12-10含有のF7 siRNA搭載脂質ナノ粒子では、MC3含有のF7 siRNA搭載脂質ナノ粒子よりも高いノックダウン活性を示した。

[0137]

[表9]

表9

Lipid name	ζ - Average (nm)	PDI	% siRNA encapsulation	pKa	F7 酵素活性 (%)
CL4F 6-2	274.50	0.298	56.9	6.34	54.8
CL4F 7-5	120.20	0.021	100.1	6.45	35.7
CL4F 8-4	110.00	0.006	100.0	6.43	5.6
CL4F 9-3	114.40	0.022	99.9	6.33	11.7
CL4F 10-2	115.60	0.024	99.6	6.46	11.4
CL4F 8-6	99.72	0.010	100.0	6.31	3
CL4F 10-4	95.37	0.021	100.1	6.36	1.7
CL4F 10-5	98.70	0.006	100.1	6.27	3
CL4F 9-7	97.03	0.020	99.9	6.31	4.3
CL4F 11-5	89.72	0.012	100.1	6.38	4.3
CL4F 12-4	94.55	0.011	100.1	6.40	5
CL4F 13-3	92.25	0.023	99.7	6.41	8.4
CL4F 14-2	80.87	0.076	98.0	6.38	7.9
CL4F 10-7	89.34	0.013	100.1	6.27	4.1
CL4F 11-6	92.98	0.034	99.9	6.29	6
CL4F 16-1	64.81	0.092	94.9	6.33	103.6
CL4F 10-8	91.44	0.007	99.9	6.14	8.1
CL4F 11-7	94.76	0.019	99.8	6.13	14.1
CL4F 12-6	92.28	0.012	99.3	6.21	6
CL4F 11-9	90.93	0.009	100.1	5.98	47.7
CL4F 12-10	85.62	0.015	99.2	5.87	80.6
CL4F6	92.27	0.014	99.9	6.22	6.8
CL4G6	85.14	0.048	100.1	6.14	7.6
CL4H6	68.86	0.102	96.1	6.53	47.2
MC3	81.68	0.048	99.1	6.28	2.5

[0138]

[表10]

表 1 0

Lipid name	ζ - Average (nm)	PDI	% siRNA encapsulation	pKa	F7 酵素活性 (MC3を1とした 時の比率)
CL4F 8-5	103.40	0.034	99.7	6.43	0.38
CL4F 9-5	99.72	0.032	99.9	6.40	0.43
CL4F 12-6	94.26	0.008	99.6	6.21	0.18
MC3	85.73	0.013	99.1	6.28	1

[0139]

[表11]

表 1 1

Lipid name	ζ -Average (nm)	PDI	% siRNA encapsulation	pKa	F7 酵素活性 (MC3 を 1 とした時の比率)
CL15F 6-2	390.7	0.534	100.4	7.35	1.87
CL15F 6-4	230.7	0.255	91.5	6.75	2.28
CL15F 7-3	287.9	0.398	95.7	6.93	2.08
CL15F 7-5	180.6	0.039	98.8	6.41	1.74
CL15F 9-3	200.4	0.172	98.3	6.73	1.50
CL15F 8-6	121.2	0.056	100.2	6.19	1.60
CL15F 9-5	129.5	0.035	100.1	6.29	1.11
CL15F 10-4	126.8	0.021	100.3	6.31	2.00
CL15F 10-5	111.7	0.003	100.5	6.23	1.33
CL15F 9-7	103.1	0.023	100.3	6.42	0.60
CL15F 11-5	109.6	0.017	100.3	6.48	0.78
CL15F 12-4	113.2	0.065	100.2	6.48	0.81
CL15F 16-0	109.6	0.238	101.0	7.60	1.48
CL15F 13-3	126.0	0.081	100.3	6.65	1.11
CL15F 11-6	101.2	0.025	100.3	6.36	0.81
CL15F 16-1	122.5	0.088	99.0	7.39	1.37
CL15F 10-8	99.44	0.041	100.6	6.41	0.52
CL15F 11-7	102.5	0.049	100.6	6.48	0.85
CL15F 11-9	104.9	0.029	101.1	6.14	0.50
CL15F 12-10	100.2	0.014	100.5	6.36	0.51
CL15F 14-2	143.9	0.13	100.2	7.14	1.82
CL15F6	105.9	0.044	100.5	6.23	1.52
CL15G6	97.73	0.021	100.7	5.76	2.69
CL15H6	123.50	0.142	100.2	7.57	1.99
MC3	87.69	0.048	97.6	6.28	1.00

[0140] 3. pDNA 搭載脂質ナノ粒子の調製及び評価

<pDNA 搭載脂質ナノ粒子の調製>

mRNA に代えて eGFP をコードした pDNA を搭載させた脂質ナノ粒子を調製し、*in vitro* における eGFP の発光を調べた。eGFP

をコードした pDNA は、pCMV-LacI from LacSwitch II Mammalian Expression System (Agilent社) に対して eGFP をコードした遺伝子を挿入することで作製した。

pDNA 搭載脂質ナノ粒子は、mRNA 搭載脂質ナノ粒子と同様にして調製した。

[0141] <脂質ナノ粒子の構成脂質>

pH 感受性カチオン性脂質、DSPC (1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン, 油化産業)、コレステロール (ナカライテスク)、及び DMG-PEG2K (油化産業) をモル比 50 : 10 : 38.5 : 1.5 の組成で用いた。

<脂質ナノ粒子の平均粒子径及び PDI の測定>

脂質ナノ粒子の平均粒子径及び PDI の測定は、mRNA-LNP の平均粒子径の測定と同じ方法で行った。

[0142] <脂質ナノ粒子の核酸封入率>

脂質ナノ粒子の pDNA の封入率は Picogreen (登録商標) 試薬 (Quant-iTTM dsDNA Assay Kit, broad range, Thermofisher Scientific 社製) を用いて測定した。pDNA の封入率測定では、ナノ粒子表面核酸濃度測定用溶液の核酸濃度は 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、総核酸濃度測定用溶液の核酸濃度は 24 ng/mL 、検量線に使用した核酸濃度は 0~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、測定試薬として Picogreen (登録商標) 試薬 (Quant-iTTM dsDNA Assay Kit, broad range, Thermofisher Scientific 社製) を用いる以外は siRNA 及び mRNA の封入率測定方法と同じ方法で行った。

封入率% = (総核酸濃度測定用溶液の核酸濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) - ナノ粒子表面核酸濃度測定用溶液の核酸濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) \div (総核酸濃度測定用溶液の核酸濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) $\times 100$

[0143] <結果>

結果を下の表に示す。調製した脂質ナノ粒子を 40°C で静置し、各期間保管後に、以下の基準に従って、品質が良好に保たれているかについて評価し

た：

良好（○）：粒子径は作成直後の粒子径±20nm以内、かつ、PDIが0.2以下、かつ、封入率80%以上；

良好でない（×）：粒子径は作成直後の粒子径±20nm超、又は、封入率80%未満。

40℃での静置で1週間以上品質が良好に保たれている脂質ナノ粒子については、安定性に優れていると評価することができる。

[表12]

表12

Lipid name	作成直後		40℃ 1W		40℃ 1M		品質	
	粒子径 (nm)	封入率 (%)	粒子径 (nm)	封入率 (%)	粒子径 (nm)	封入率 (%)	40℃ 1W	40℃ 1M
CL4F 10-5	101.6	98.2	101.0	98.3	104.2	98.5	○	○
CL4F 9-7	98.2	98.1	97.1	98.0	101.4	98.1	○	○
CL4F 8-4	104.7	98.0	109.1	97.8	116.4	98.1	○	○

[0144] 4. 脂質ナノ粒子の保存安定性評価

<脂質ナノ粒子の調製>

脂質ナノ粒子は、流路を用いたアルコール希釈法により調製した。流路としては、ミキサー内蔵マイクロ流体デバイス「NanoAssemblr」（Precision NanoSystems社製）を用いた。

具体的には、まず、脂質濃度8mMに調整したエタノール溶液及びmRNA濃度46.1μg/mLに調整したクエン酸緩衝液（50mM、pH3.5）をそれぞれ3mL/分及び9mL/分でマイクロ流路内に送液し、流路から排泄された脂質ナノ粒子溶液を回収した。当該脂質ナノ粒子溶液を、20mM HEPES緩衝液（9%スクロース、pH7.45）で10倍希釈したのちに、限外濾過ユニットで濃縮し、脂質ナノ粒子溶液を回収した。

[0145] <脂質ナノ粒子の構成脂質>

pH感受性カチオン性脂質、DSPC（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン）、コレステロール、及びPEG-DMGをモル比50:10:38.5:1.5の組成で用いて、アルコール希釈法によ

って、FlucmRNAを搭載させた脂質ナノ粒子（FlucmRNA搭載脂質ナノ粒子）を作製した。FlucmRNAはTriLink Biotechnologies社のCleanCap（登録商標）FlucmRNA（5mou）を使用した。

<脂質ナノ粒子の平均粒子径及びPDIの測定>

脂質ナノ粒子のPBS（-）中における平均粒子径（ ζ -Average）及びPDIを、動的光散乱法を利用した分析装置「Zetasizer Nano ZSP」（Malvern社製）を用いて測定した。

[0146] <脂質ナノ粒子の核酸封入率>

脂質ナノ粒子のmRNAの封入率は、Ribogreen（Life technologies社製）を用いて測定した。

<保存安定性評価>

脂質ナノ粒子を-80℃、5℃、25℃、40℃の各温度で静置し、各期間保管後に、平均粒子径、PDI、及び核酸封入率を測定した。平均粒子径がLNP調製日を基準に±20nm以内を維持し、PDIが0.2以下で高い均一性を保ち、核酸封入率も80%以上を維持しているという3条件全て満たした脂質ナノ粒子については、品質が良好に保たれていると判断した。

[0147] <結果>

各FlucmRNA搭載脂質ナノ粒子を-80℃、5℃、25℃、40℃でそれぞれ静置し、各期間保管後に、平均粒子径、PDI、及び核酸封入率を測定した結果、脂質ナノ粒子の品質が良好に保たれていると判断された期間を表13及び14に示す。5℃での静置で1週間以上品質が良好に保たれている脂質ナノ粒子については、安定性に優れていると評価することができる。

[0148]

[表13]

表 1.3

Lipid name ()内は最大保存期間	-80℃ (1 week)	5℃ (5 weeks)	25℃ (5 weeks)	40℃ (5 weeks)
CL4F 6-2	作成段階で「良好」の基準を満たさない			
CL4F 6-4	0 week	5 weeks	5 weeks	3 days
CL4F 7-3	0 week	5 weeks	5 weeks	0 day
CL4F 7-4	0 week	5 weeks	5 weeks	1 week
CL4F 7-5	1 week	2 weeks	5 weeks	1 week
CL4F 8-4	1 week	5 weeks	5 weeks	1 week
CL4F 8-5	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 8-6	1 week	5 weeks	5 weeks	1 week
CL4F 9-3	1 week	5 weeks	5 weeks	0 day
CL4F 9-4	1 week	5 weeks	5 weeks	1 week
CL4F 9-5	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 9-6	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 9-7	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 10-2	0 week	5 weeks	1 weeks	0 day
CL4F 10-4	1 week	5 weeks	5 weeks	0 day
CL4F 10-5	1 week	5 weeks	5 weeks	5 week
CL4F 10-7	1 week	5 weeks	5 week	5 weeks
CL4F 10-8	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 11-5	1 week	5 weeks	5 weeks	1 week
CL4F 11-6	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 11-7	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 11-9	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 12-4	1 week	5 weeks	5 weeks	1 week
CL4F 12-6	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 12-10	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4F 13-3	0 week	0 week	0 week	0 day
CL4F 14-2	0 week	0 week	0 week	0 day
CL4F 16-0	作成段階で「良好」の基準を満たさない			
CL4F 16-1	作成段階で「良好」の基準を満たさない			
CL4F6	1 week	5 weeks	5 week	5 weeks
CL4G6	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL4H6	0 week	0 week	1 week	0 day

[0149] [表14]

表 1 4

Lipid name	-80℃	5℃	25℃	40℃
()内は最大保存期間	(1 week)	(5 weeks)	(5 weeks)	(5 weeks)
CL15F 6-2	作成段階で「良好」の基準を満たさない			
CL15F 6-4	作成段階で「良好」の基準を満たさない			
CL15F 7-3	作成段階で「良好」の基準を満たさない			
CL15F 7-5	0 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 8-6	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 9-3	0 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 9-5	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 9-7	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 10-4	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 10-5	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 10-8	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 11-5	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 11-6	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 11-7	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 11-9	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 12-4	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 12-10	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 13-3	0 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 14-2	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15F 16-0	作成段階で「良好」の基準を満たさない			
CL15F 16-1	0 week	0 weeks	0 weeks	0 weeks
CL15F6	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15G	1 week	5 weeks	5 weeks	5 weeks
CL15H	作成段階で「良好」の基準を満たさない			
MC3	0 week	0 weeks	1 weeks	0 weeks

[0150] 5. 様々な組成を有する脂質ナノ粒子の作製及び評価

＜脂質ナノ粒子の調製＞

脂質ナノ粒子は、流路を用いたアルコール希釈法により調製した。流路と

しては、ミキサー内蔵マイクロ流体デバイス「NanoAssemblr」（Precision NanoSystems社製）を用いた。

具体的には、まず、脂質濃度 8 mM に調整したエタノール溶液及び核酸濃度 46.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整したクエン酸緩衝液（50 mM、pH 3.5）をそれぞれ 3 mL/分及び 9 mL/分でマイクロ流路内に送液し、流路から排泄された脂質ナノ粒子溶液を回収した。当該脂質ナノ粒子溶液を、20 mM HEPES 緩衝液（9%スクロース、pH 7.45）で 10 倍希釈したのちに、限外濾過ユニットで濃縮し、脂質ナノ粒子溶液を回収した。

[0151] <脂質ナノ粒子の構成脂質>

表 15～18 に記載の組成にて脂質を調製した。pH 感受性カチオン性脂質として、CL4F 10-5、CL4F 9-7、CL4F 8-4、CL4F 6、CL15 10-5 及び CL15F 6 を使用した。他の脂質としてコレステロール（ナカライテスク社）、 β シトステロール（22,23-Dihydro stigmasterol, beta-Sitosterol, 5-Stigmasten-3 β -ol, α -Dihydrofucosterol, 24 α -Ethylcholesterol, Sigma-Aldrich) DSPC (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3- phosphocholine, COATSOME MC-8080、油化産業)、DMG-PEG 2 K (1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-methylpolyoxyethylen, SUNBRIGHT GM-020、油化産業株) DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3- phosphocholine, COATSOME MC-8181、油化産業)、DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, COATSOME ME-8181、油化産業)、DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphocholine, COATSOME MC-6060、油化産業) を使用した。mRNA として Fluc 発現 mRNA (CleanCap Fluc mRNA (5moU)、TriLink Biotechnologies社)、mCherry 発現 mRNA (CleanCap mCherry mRNA (5moU)、TriLink Biotechnologies社) を使用した。

[0152] <保存安定性評価>

調製した脂質ナノ粒子を 40°C で静置し、各期間保管後に、平均粒子径、PDI、及び核酸封入率を測定した。以下の基準に従って、品質が良好に保たれているかについて評価した：

良好 (○) : 粒子径は作成直後の粒子径 ± 20 nm以内、かつ、PDIが0.2以下、かつ、封入率80%以上;

良好でない (×) : 粒子径は作成直後の粒子径 ± 20 nm超、又は、封入率80%未満。

40°Cでの静置で1週間以上品質が良好に保たれている脂質ナノ粒子について、安定性に優れていると評価することができる。

[0153] <in vitroにおけるルシフェラーゼ発現活性の測定>

細胞培養用培地としてE-MEM培地 (L-グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、1,500 mg/L 炭酸水素ナトリウム含有) (製品コード055-08975、和光純薬社) にウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum Characterized、コーニング社) を10%及び抗生物質 (Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)、Thermo Fisher社) を1%添加したものを使用した。ヒト胎児腎細胞293 (HEK293細胞) を 2.0×10^4 cells/wellで96ウェル白色プレート (SIGMA社) に添加し、37°C、5%CO₂雰囲気下で一晩培養した後、脂質ナノ粒子をmRNA含有量換算で100 ng/well添加した。同条件で24時間培養した後、300 µg/mLルシフェリン溶液 (Beetle luciferin、Promega社) を100 µg/well添加し、マルチプレートリーダー (EnSight multimode plate reader、Perkin Elmer社) で発光強度を測定した。その際、培地のみ添加したウェル、及び脂質ナノ粒子未添加の細胞ウェルに前述のルシフェリン溶液を添加し、同様に測定を行い、培地ウェルの発光強度をバックグラウンドとして差し引いた値を採用した。なお脂質ナノ粒子未添加の細胞ウェルの発光強度はバックグラウンド以下であった。

[0154] <in vitroにおけるmCherry発現活性の測定>

細胞培養用培地として、E-MEM培地 (L-グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、1,500 mg/L 炭酸水素ナトリウム含有) (製品コード055-08975、和光純薬社) にウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum Characterized、コーニング社) を10%及び抗生物質 (Penici

llin-Streptomycin (10,000 U/mL)、Thermo Fisher社) を1%添加したものを使用した。ヒト胎児腎細胞293 (HEK293細胞) を 2.0×10^4 cells/well で96ウェル黒色プレート (SIGMA社) に添加し、37°C、5%CO₂雰囲気下で一晩培養した後、脂質ナノ粒子をmRNA含有量換算で1000 ng/well 添加した。同条件で24時間培養した後、マルチプレートリーダー (Enight multimode plate reader、Perkin Elmer社) で蛍光強度 (励起波長587 nm/蛍光波長610 nm) を測定した。その際、培地のみ添加したウェル、及び脂質ナノ粒子未添加の細胞ウェルも準備し、同様に測定を行い、培地ウェルの発光強度をバックグラウンドとして差し引いた値を採用した。なお脂質ナノ粒子未添加の細胞ウェルの蛍光強度はバックグラウンド以下であった。

[0155] [表15]

表15

脂質	脂質組成(モル比)												
	5-1	5-2	5-3	5-4	5-5	5-6	5-7	5-8	5-9	5-10	5-11	5-12	5-13
CL4F 10-5	50	-	-	-	50	-	-	-	50	-	-	-	-
CL4F 9-7	-	50	-	-	-	50	-	-	-	50	-	-	-
CL4F 8-4	-	-	50	-	-	-	50	-	-	-	50	-	-
CL4F6	-	-	-	50	-	-	-	50	-	-	-	50	50
DOPC	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPPC	-	-	-	-	10	10	10	10	-	-	-	-	-
DOPE	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10	-
DSPC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
コレステロール	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5
DMG-PEG2K	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
合計	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
核酸	Fluc 発現 mRNA												

[0156]

[表16]

表 1 6

脂質	脂質組成(モル比)				
	5-14	5-15	5-16	5-17	5-18
CL4F 10-5	50	-	-	-	-
CL4F 9-7	-	50	-	-	-
CL4F 8-4	-	-	50	-	-
CL4F6	-	-	-	50	50
DSPC	10	10	10	10	10
コレステロール	-	-	-	-	38.5
β -シトステロール	38.5	38.5	38.5	38.5	-
DMG-PEG2K	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
合計	100	100	100	100	100
核酸	Fluc 発現 mRNA				

[0157] [表17]

表 1 7

脂質	脂質組成(モル比)				
	5-19	5-20	5-21	5-22	5-23
CL4F 9-7	20	30	40	50	60
CL4F6	-	-	-	-	-
DSPC	10	10	10	10	10
コレステロール	68.5	58.5	48.5	38.5	28.5
DMG-PEG2K	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
合計	100	100	100	100	100
核酸	Fluc 発現 mRNA				

[0158] [表18]

表 1 8

脂質	脂質組成(モル比)			
	5-24	5-25	5-26	5-27
CL4F 10-5	50	-	-	-
CL4F 9-7	-	50	-	-
CL15F 10-5	-	-	50	-
CL15F6	-	-	-	50
DSPC	10	10	10	10
コレステロール	38.5	38.5	38.5	38.5
DMG-PEG2K	1.5	1.5	1.5	1.5
合計	100	100	100	100
核酸	mCherry 発現 mRNA			

[0159] <結果>

結果を下の表 1 9 ~ 2 3 に示す。

[表19]

表 1 9

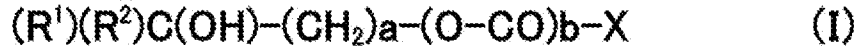
実施例	イオン性脂質	リン脂質	核酸	作成直後		40°C 1W		40°C 1M		品質		Fluc 発光強度
				粒子径 [nm]	封入率 [%]	粒子径 [nm]	封入率 [%]	粒子径 [nm]	封入率 [%]	40°C 1W	40°C 1M	
5-1	CL4F 10-5	DOPC	Fluc 発現 mRNA	92.9	99.1	100.5	98.7	102.8	99.1	○	○	4.2E+05
5-2	CL4F 9-7			94.0	99.2	101.7	99.0	100.9	99.5	○	○	4.1E+05
5-3	CL4F 8-4			113.9	98.3	126.4	97.3	154.8	95.0	○	×	1.9E+06
5-4	CL4F6			94.8	98.9	99.9	98.7	102.4	97.8	○	○	9.3E+05
5-5	CL4F 10-5	DPPC		117.1	98.4	121.1	98.1	124.1	96.1	○	○	4.9E+05
5-6	CL4F 9-7			103.4	99.3	105.2	99.6	103.0	99.4	○	○	3.2E+05
5-7	CL4F 8-4			163.0	96.6	175.2	84.6	184.8	77.1	○	×	1.7E+06
5-8	CL4F6			97.9	99.4	112.3	94.1	251.8	55.3	○	×	8.1E+05
5-9	CL4F 10-5	DOPE		90.9	99.2	94.3	99.2	93.8	99.2	○	○	1.4E+05
5-10	CL4F 9-7			89.7	99.2	92.7	99.2	91.4	99.4	○	○	1.9E+05
5-11	CL4F 8-4			98.8	98.6	104.0	98.9	108.6	98.9	○	○	2.3E+05
5-12	CL4F6			89.3	98.5	91.6	99.1	92.7	99.0	○	○	4.8E+05
5-13	CL4F6	DSPC		112.1	99.8	121.1	99.2	120.9	87.4	○	○	4.0E+05

[0160]

請求の範囲

[請求項1] 下記の式 (I) :

[化1]



[式 (I) 中、a は 3 ~ 5 の整数を示し ; b は 0 又は 1 を示し ; R¹ 及び R² はそれぞれ独立して下記一般式 (A) :

[化2]



(式 (A) 中、R¹¹ 及び R¹² はそれぞれ独立して、直鎖状又は分岐鎖状の C₅₋₁₅ アルキル基を示し ; c は 0 又は 1 を示し ; v は 4 ~ 12 の整数を示す)

で表される基を示し ; X は、下記一般式 (B) :

[化3]



(式 (B) 中、d は 0 ~ 3 の整数を示し ; R³ 及び R⁴ はそれぞれ独立に C₁₋₄ アルキル基又は C₂₋₄ アルケニル基 (該 C₁₋₄ アルキル基又は C₂₋₄ アルケニル基は、1 個又は 2 個の水素原子がフェニル基に置換されていてもよい) を示すが、R³ 及び R⁴ は互いに結合して 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環 (該環の 1 個又は 2 個の水素原子が、C₁₋₄ アルキル基又は C₂₋₄ アルケニル基に置換されていてもよい) を形成してもよい) で表される基又は 5 ~ 7 員非芳香族ヘテロ環基 (ただし、該基は炭素原子により (O-CO)_b- に結合し、該環の 1 個又は 2 個の水素原子が、C₁₋₄ アルキル基又は C₂₋₄ アルケニル基に置換されていてもよい) を示す]

で表される pH 感受性カチオン性脂質を含有する、脂質ナノ粒子。

[請求項2] さらに、ステロール及びポリアルキレングリコール修飾脂質を含有

している、請求項1に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項3] 核酸を含有する、請求項1又は2に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項4] 前記核酸が、s i R N Aである、請求項3に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項5] 前記核酸が、m R N A又はプラスミドD N Aである、請求項3に記載の脂質ナノ粒子。

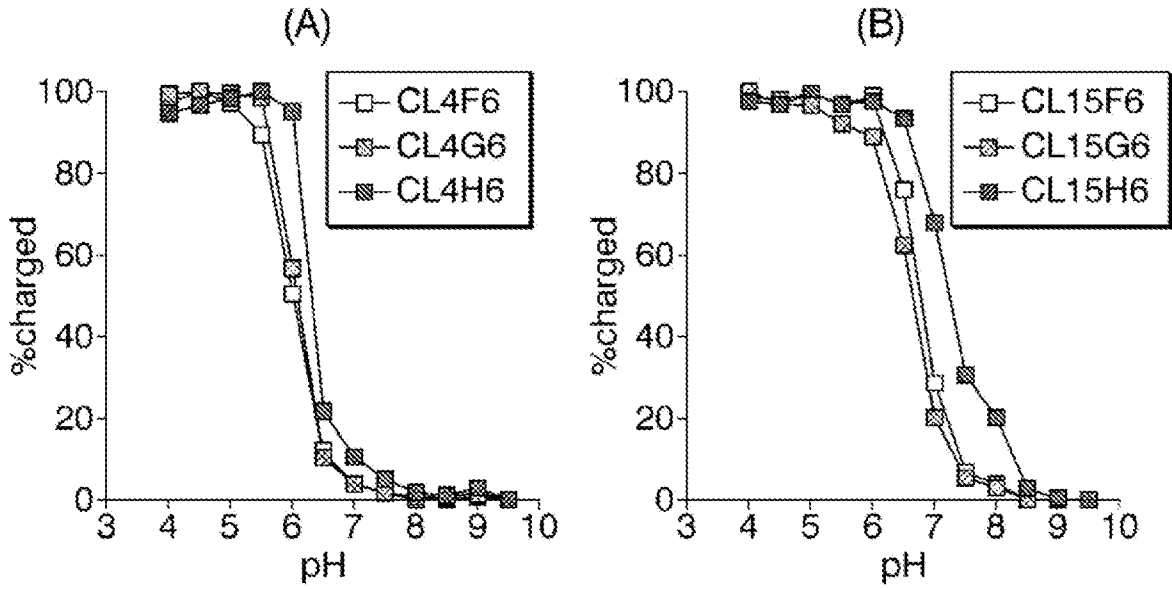
[請求項6] 前記核酸が、肝臓細胞内で発現させる遺伝子である、請求項3～5のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子を有効成分とする、医薬用組成物。

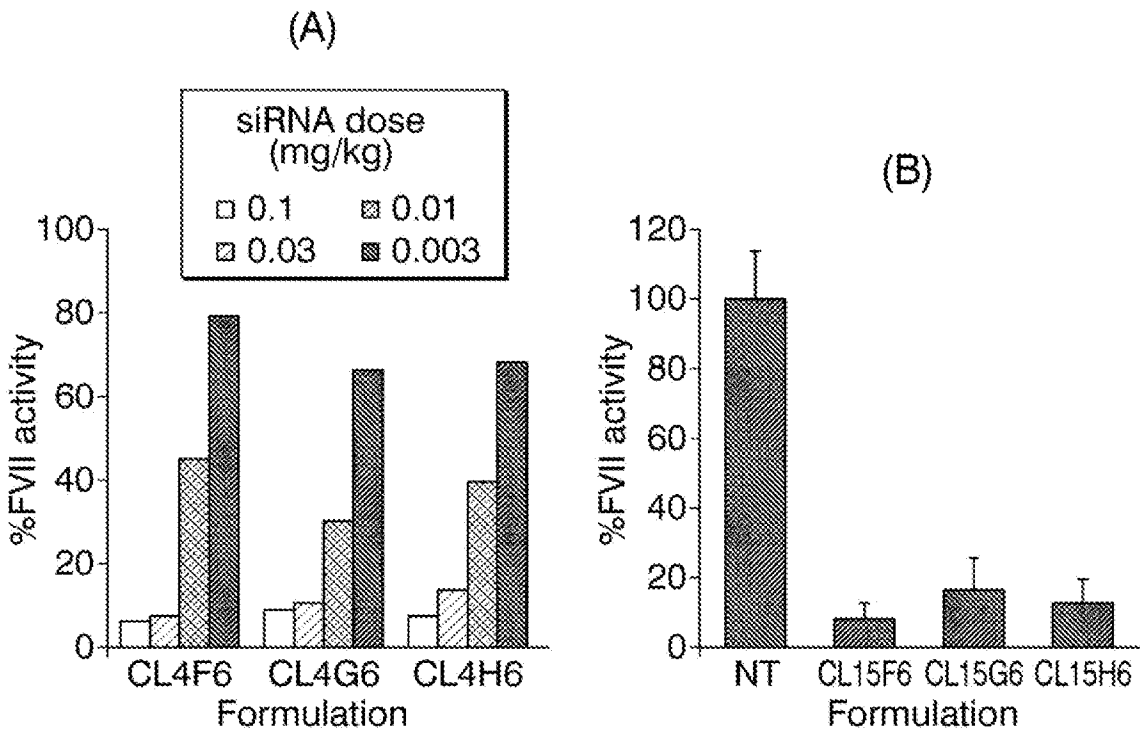
[請求項8] 遺伝子治療に用いられる、請求項7に記載の医薬用組成物。

[請求項9] 請求項1～6のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子であって、肝臓細胞内で発現させる目的の外来遺伝子を封入した脂質ナノ粒子を、被験動物（但し、ヒトを除く）へ投与し、前記被験動物の肝臓内で前記外来遺伝子を発現させる、外来遺伝子の発現方法。

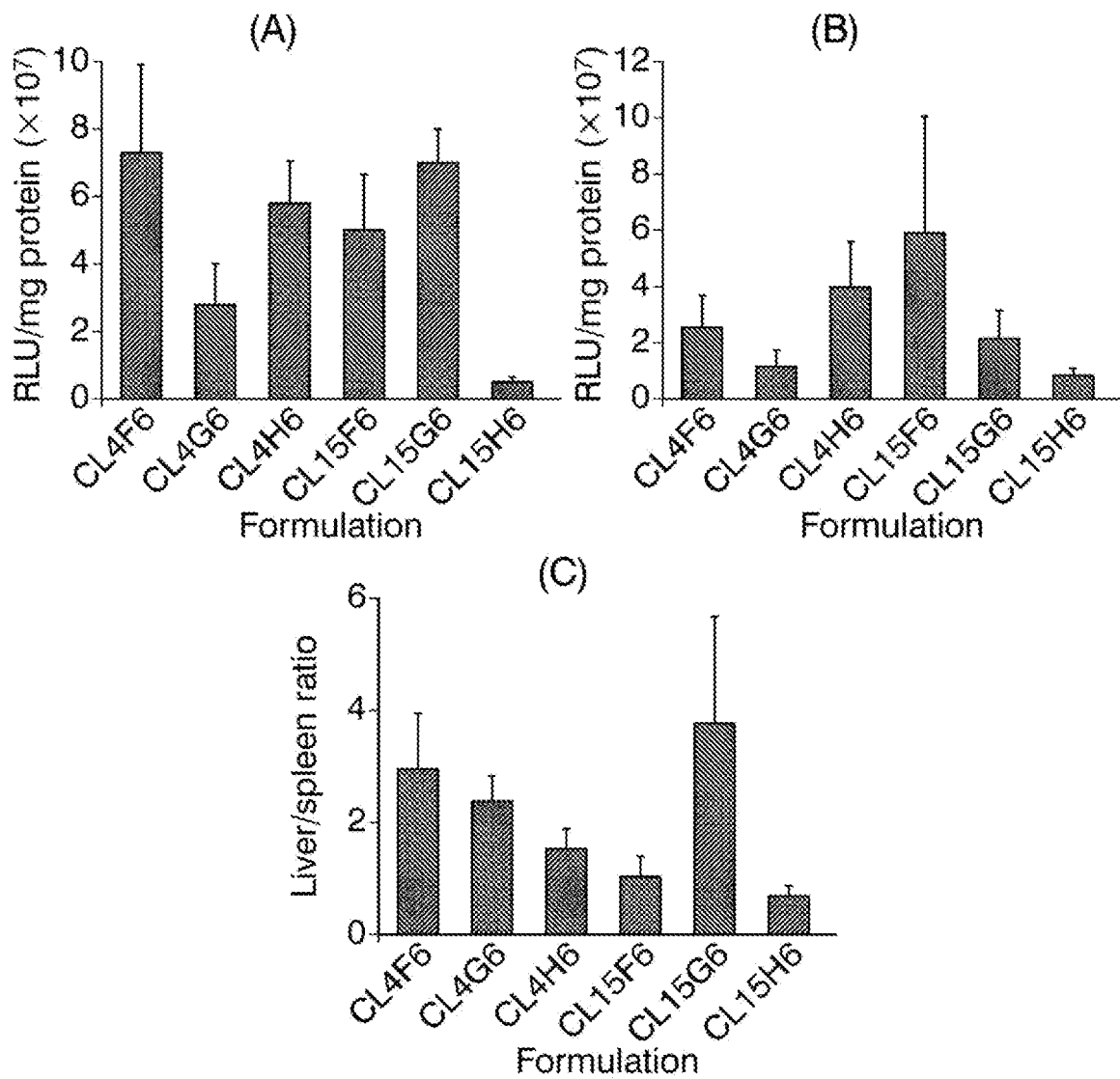
[圖1]



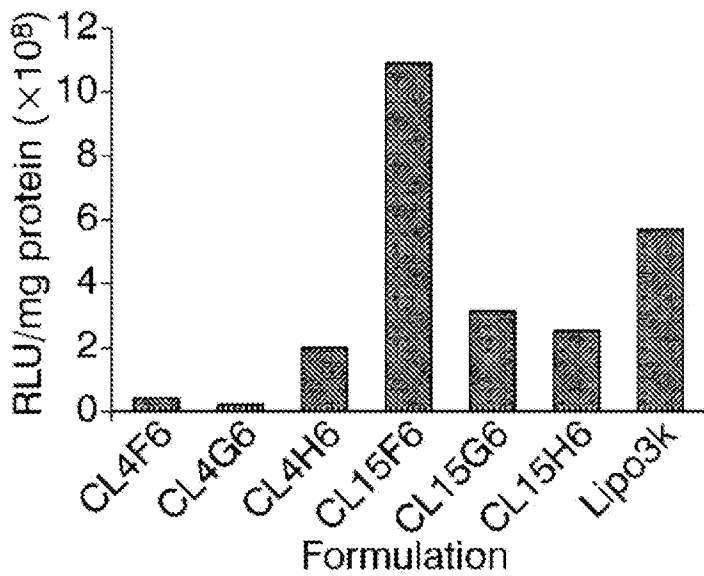
[圖2]



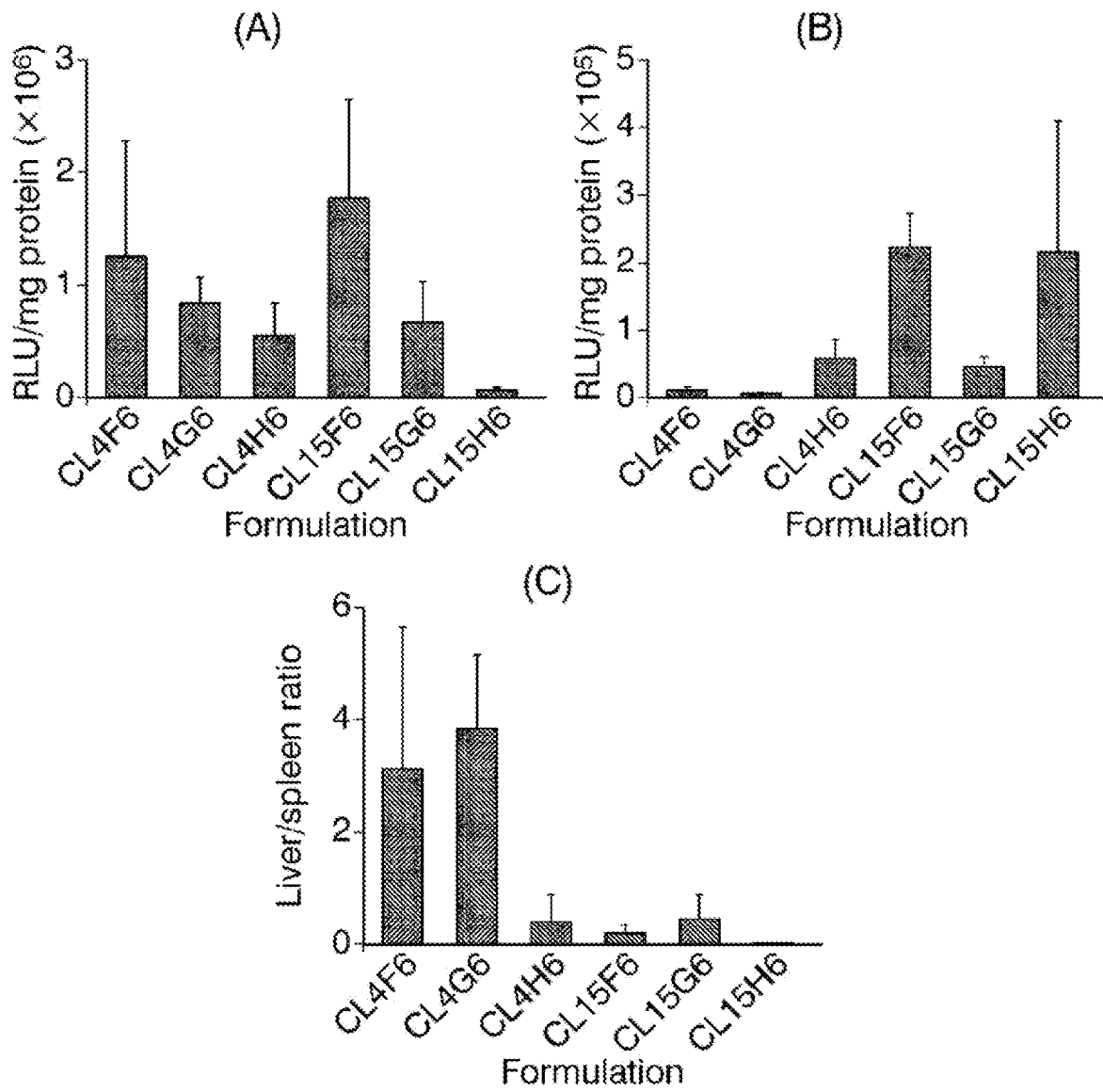
[圖3]



[圖4]



[5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/036449

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 47/18(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 47/22(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 47/44(2017.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/88(2006.01)i</p> <p>FI: A61K47/18; A61K9/14; A61K47/22; A61K47/28; A61K47/44; A61K31/713; A61K31/7105; A61K48/00; A61P1/16; A61P43/00 105; C12N15/11 Z; C12N15/113 Z; C12N15/63 Z; A01K67/027; C12N5/10; C12N15/88 Z ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K47/18; A01K67/027; A61K9/14; A61K31/7105; A61K31/713; A61K47/22; A61K47/28; A61K47/44; A61K48/00; A61P1/16; A61P43/00; C12N5/10; C12N15/11; C12N15/113; C12N15/63; C12N15/88		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2021</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2021</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/230710 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT UNIV CORP) 20 December 2018 (2018-12-20) entire text	1-9
A	JP 2019-151589 A (UNIV HOKKAIDO) 12 September 2019 (2019-09-12) entire text	1-9
A	WO 2015/178343 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT UNIV CORP) 26 November 2015 (2015-11-26) entire text	1-9
A	NAKAMURA, T. et al. Small-sized, stable lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to human immune cell lines. SCIENTIFIC REPORTS., 2016, 6, 37849(pp. 1-9), DOI:10.1038/srep37849 entire text	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 November 2021		22 November 2021
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		
		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NAKAMURA, T. et al. Lipid nanoparticles fuse with cell membranes of immune cells at low temperatures leading to the loss of transfection activity. International Journal of Pharmaceutics., 17 July 2020, 587, 119652(pp. 1-9), doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119652 entire text	1-9
A	NAKAMURA, T. et al. Reducing the Cytotoxicity of Lipid Nanoparticles Associated with a Fusogenic Cationic Lipid in a Natural Killer Cell Line by Introducing a Polycation-Based siRNA Core. Molecular Pharmaceutics., 2018, 15, pp. 2142-2150, DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.7b01166 entire text	1-9
A	中村孝司, 脂質ナノ粒子を基盤としたがん免疫療法のためのナノDDS開発, YAKUGAKU ZASSHI, 2018, 138, pp. 1443-1449 entire text, (NAKAMURA, Takashi. Development of a Nano DDS for Cancer Immunotherapy Based on Lipid Nanoparticles.)	1-9
A	JP 2015-505838 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC) 26 February 2015 (2015-02-26) entire text	1-9

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 13ter.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 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2021/036449

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2018/230710	A1	20 December 2018	US 2020/0129431 EP 3640237 CN 110740985 KR 10-2020-0018782	A1 A1 A A
JP	2019-151589	A	12 September 2019	(Family: none)	
WO	2015/178343	A1	26 November 2015	US 2017/0273905 EP 3147277	A1 A1
JP	2015-505838	A	26 February 2015	JP 2018-87250 US 2015/0005363 WO 2013/086322 EP 2788316	A A1 A1 A1

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 47/18(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 47/22(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 47/44(2017.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/88(2006.01)i FI: A61K47/18; A61K9/14; A61K47/22; A61K47/28; A61K47/44; A61K31/713; A61K31/7105; A61K48/00; A61P1/16; A61P43/00 105; C12N15/11 Z; C12N15/113 Z; C12N15/63 Z; A01K67/027; C12N5/10; C12N15/88 Z ZNA</p>																													
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K47/18; A01K67/027; A61K9/14; A61K31/7105; A61K31/713; A61K47/22; A61K47/28; A61K47/44; A61K48/00; A61P1/16; A61P43/00; C12N5/10; C12N15/11; C12N15/113; C12N15/63; C12N15/88</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021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 - 2021年																												
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年																												
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年																												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018 - 12 - 20) 全文</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2019-151589 A (国立大学法人北海道大学) 12.09.2019 (2019 - 09 - 12) 全文</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015/178343 A1 (国立大学法人北海道大学) 26.11.2015 (2015 - 11 - 26) 全文</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NAKAMURA, T. et al., Small-sized, stable lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to human immune cells, SCIENTIFIC REPORTS, 2016, 6, 37849(pp.1-9), DOI:10.1038/srep37849 全文</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td></td> </tr> </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	A	WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018 - 12 - 20) 全文	1-9	A	JP 2019-151589 A (国立大学法人北海道大学) 12.09.2019 (2019 - 09 - 12) 全文	1-9	A	WO 2015/178343 A1 (国立大学法人北海道大学) 26.11.2015 (2015 - 11 - 26) 全文	1-9	A	NAKAMURA, T. et al., Small-sized, stable lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to human immune cells, SCIENTIFIC REPORTS, 2016, 6, 37849(pp.1-9), DOI:10.1038/srep37849 全文	1-9	* 引用文献のカテゴリー	"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	"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	"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	"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	"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	"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）	"&" 同一パテントファミリー文献	"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	
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	WO 2018/230710 A1 (国立大学法人北海道大学) 20.12.2018 (2018 - 12 - 20) 全文	1-9																											
A	JP 2019-151589 A (国立大学法人北海道大学) 12.09.2019 (2019 - 09 - 12) 全文	1-9																											
A	WO 2015/178343 A1 (国立大学法人北海道大学) 26.11.2015 (2015 - 11 - 26) 全文	1-9																											
A	NAKAMURA, T. et al., Small-sized, stable lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to human immune cells, SCIENTIFIC REPORTS, 2016, 6, 37849(pp.1-9), DOI:10.1038/srep37849 全文	1-9																											
* 引用文献のカテゴリー	"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																												
"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	"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																												
"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	"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																												
"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）	"&" 同一パテントファミリー文献																												
"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																													
国際調査を完了した日	10.11.2021	国際調査報告の発送日	22.11.2021																										
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）	伊藤 幸司 4C 9450 電話番号 03-3581-1101 内線 3452																										

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	NAKAMURA, T. et al., Lipid nanoparticles fuse with cell membranes of immune cells at low temperatures leading to the loss of transfection activity, International Journal of Pharmaceutics, 2020.07.17, 587, 119652(pp.1-9), doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119652 全文	1-9
A	NAKAMURA, T. et al., Reducing the Cytotoxicity of Lipid Nanoparticles Associated with a Fusogenic Cationic Lipid in a Natural Killer Cell Line by Introducing a Polycation-Based siRNA Core, Molecular Pharmaceutics, 2018, 15, pp.2142-2150, DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.7b01166 全文	1-9
A	中村孝司, 脂質ナノ粒子を基盤としたがん免疫療法のためのナノDDS開発, YAKUGAKU ZASSHI, 2018, 138, pp.1443-1449 全文	1-9
A	JP 2015-505838 A (アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド) 26.02.2015 (2015 - 02 - 26) 全文	1-9

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:

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/JP2021/036449

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2018/230710	A1	20.12.2018	US	2020/0129431	A1	
				EP	3640237	A1	
				CN	110740985	A	
				KR	10-2020-0018782	A	

JP	2019-151589	A	12.09.2019	(ファミリーなし)			

WO	2015/178343	A1	26.11.2015	US	2017/0273905	A1	
				EP	3147277	A1	

JP	2015-505838	A	26.02.2015	JP	2018-87250	A	
				US	2015/0005363	A1	
				WO	2013/086322	A1	
				EP	2788316	A1	
