

明 細 書

発明の名称：

4－アミノピペリジン化合物、その脂質ナノ粒子、及び、それを含む医薬組成物

技術分野

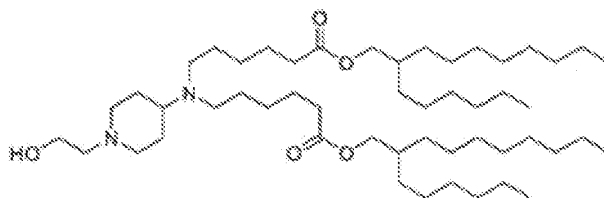
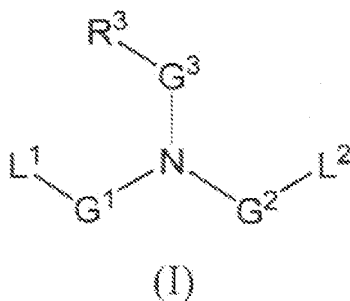
[0001] 本発明は、脂質ナノ粒子の構成成分として有用なカチオン性脂質（以下、化合物又はその塩ともいう）、その脂質ナノ粒子、その中に核酸を内包する脂質ナノ粒子（以下、核酸脂質ナノ粒子ともいう）、予防及び/又は治療に有用な核酸を内包する脂質ナノ粒子、並びに核酸脂質ナノ粒子を含む医薬組成物を提供する。

背景技術

[0002] 近年、核酸が疾病の予防及び/又は治療ために用いられ、又は用いられようとしている。例えば、生体内においてタンパクはメッセンジャーRNA(mRNA)を基に合成されることから、所望のタンパクを標的細胞内で発現させる目的で用いる医薬品としてmRNAが注目されている。一方で、mRNA等の核酸そのものを単体で細胞内に送達させることは困難であるため、標的細胞中へ核酸、とくにmRNAを送達するためのデリバリー技術の一つとして脂質ナノ粒子(LNP)が用いられている。核酸脂質ナノ粒子の応用例としてCOVID-19ワクチンやガンワクチンが上市または臨床開発されている。各々の核酸脂質ナノ粒子において、その構成成分の一つであるカチオン性脂質として様々な脂質が用いられている（特許文献1～3）。

[0003] 特許文献1及び2において、式(I)の化合物又はその塩がカチオン性脂質として脂質ナノ粒子に使用できることが記載されている。その実施例には、下記化合物が記載されている。

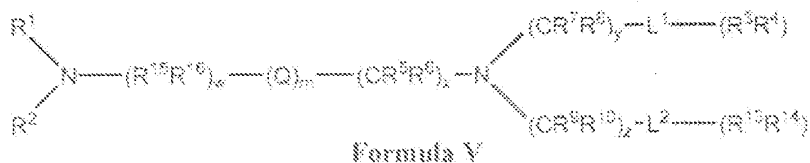
[化1]



(式中の記号は、当該特許文献を参照のこと。)

[0004] 特許文献3において、下記式の化合物又はその塩がカチオン性脂質として脂質ナノ粒子に使用できることが記載されている。

[化2]



(式中の記号は、当該特許文献を参照のこと。)

[0005] アストロサイトは中枢に最も多く存在する細胞の1つであり、正常環境下では血液脳関門の恒常性や神経細胞のシナプス形成に重要な働きをしており、正常な脳機能をサポートする重要な働きを持つ(Frontiers in Cellular Neuroscience、2022年、vol.16、850866。Toxicologic Pathology、2011年、vol.39(1)、115-123)。

しかしながら、脳障害時においては、アストロサイトは活性化状態となり、障害部位に集積しグリオシスを形成する。グリオシスは神経再生を阻害する要因として考えられており、脊髄損傷、アルツハイマー病をはじめとした神経変性疾患、てんかんなどの広い中枢神経系疾患において報告がある(*Neuron*, 2014年, vol.81, P229-248)。よってアストロサイトに取り込まれて作用する効果的な薬剤を開発することができれば、広い中枢神経系疾患に対して新たな治療法を提供できる可能性がある。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2021/204175号

特許文献2：国際公開第2021/204179号

特許文献3：国際公開第2022/081750号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の主な課題は、脂質ナノ粒子の構成成分の一つとなりうる新たなカチオン性脂質を提供するとともに、核酸を細胞中へデリバリーするための脂質ナノ粒子を創出することである。また、本発明の課題は、核酸（例えばmRNA）を内包する核酸脂質ナノ粒子、及びそれを含む医薬組成物を提供することである。

さらに、本発明の課題としては例えば、アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸（例えばmRNA）を内包する脂質ナノ粒子を含む医薬組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

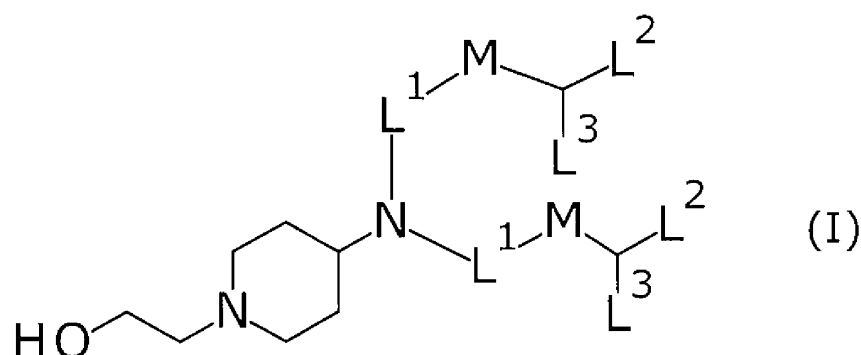
[0008] 本発明者らは、鋭意検討した結果、本発明の式(I)の化合物又はその塩を見出し、これをカチオン性脂質として用いて、新規かつ有用な脂質ナノ粒子を作成できることを見出した。また、脂質ナノ粒子の構成成分の割合(カチオン性脂質、中性脂質、及びPEG化脂質等)を検討することにより適切な組成比を

見出した。本発明は、このようなカチオン性脂質、脂質ナノ粒子、核酸脂質ナノ粒子、及び核酸脂質ナノ粒子を含む医薬組成物などを提供できる。

[0009] すなわち、本発明は、以下の〔1〕～〔21〕に関する。

〔1〕 式(I)の化合物又はその塩：

[化3]



(式中、

L^1 は、 C_{5-10} アルキレン、

L^2 及び L^3 は、それぞれ独立して、 C_{5-15} アルキル、

M は、 $-C(=O)O-$ 、又は、 $-OC(=O)-$ である)。

〔2〕 式(I)における L^1 が、 C_{6-9} アルキレンである、〔1〕に記載の化合物又はその塩。

〔3〕 式(I)における L^2 及び L^3 が、それぞれ独立して、 C_{6-10} アルキルである、〔1〕又は〔2〕に記載の化合物又はその塩。

〔4〕 化合物が、 $8,8'$ -{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)、

$9,9'$ -{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン酸)ジ(トリデカン-7-イル)、及び、

ビス(2-ヘキシルデカン酸){[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン-9,1-ジイル)からなる群より選択される、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の化合物又はその塩。

〔5〕 化合物が、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)である〔4〕に記載の化合物又はその塩。

〔6〕 化合物が、9,9'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン酸)ジ(トリデカン-7-イル)である〔4〕に記載の化合物又はその塩。

〔7〕 化合物が、ビス(2-ヘキシルデカン酸){[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン-9,1-ジイル)である〔4〕に記載の化合物又はその塩。

[0010] 〔8〕 〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の化合物又はその塩を含む、脂質ナノ粒子。

〔9〕 中性脂質及びPEG化脂質をさらに含む、〔8〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔9-1〕 〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の化合物又はその塩、中性脂質及びPEG化脂質を含む、脂質ナノ粒子。

〔10〕 核酸を内包する、〔9〕又は〔9-1〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔11〕 核酸がmRNAである、〔10〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔12〕 アストロサイト内において、タンパクを発現可能な〔10〕～〔11〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔13〕 核酸が、アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸である、〔10〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔13-1〕 アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸を内包する、〔9-1〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔14〕 核酸が、NeuroD1 タンパクをコードするmRNAであり、

式(I)の化合物又はその塩が、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)、9,9'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン酸)ジ(トリデカン-7-イル)、及び、ビス(2-ヘキシルデカン酸){[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン-9,1-ジイル)からなる群より選

択される化合物又はその塩であり、

中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、

PEG化脂質がDMG-PEG2000である、〔11〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔15〕核酸が、NeuroD1 タンパクをコードするmRNAであり、

式(I)の化合物又はその塩が8,8' -[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩であり、

中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、

PEG化脂質がDMG-PEG2000である、〔14〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔16〕核酸が、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパクをコードする塩基配列を含むNeuroD1 タンパクをコードするmRNAである、〔11〕又は〔14〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔17〕脂質ナノ粒子の全量を基準として、〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の化合物又はその塩を20.0～70.0モル%、中性脂質を27.0～79.5モル%、PEG化脂質を0.5～3.0モル%、の組成比で含む、〔9〕～〔16〕に記載の脂質ナノ粒子。

〔18〕脂質ナノ粒子の全量を基準として、〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の化合物又はその塩を35.0～70.0モル%、中性脂質を27.5～64.0モル%、PEG化脂質を1.0～2.5モル%の組成比で含む、〔9〕～〔16〕に記載の脂質ナノ粒子。

[0011] 〔19〕〔8〕～〔18〕のいずれかに記載の脂質ナノ粒子を含む医薬組成物。

〔20〕〔8〕～〔18〕に記載の脂質ナノ粒子、及び1以上の製薬学的に許容される医薬品添加物を含む医薬組成物。

〔21〕アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療のための〔19〕又は〔20〕に記載の医薬組成物。

〔22〕〔14〕又は〔15〕に記載の脂質ナノ粒子、及び1以上の製薬学的に許容される医薬品添加物を含む医薬組成物。

[0012] また、本発明は、

式(I)の化合物又はその塩を含む〔8〕～〔18〕に記載の脂質ナノ粒子を含

有するアストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療用医薬組成物に関する。

なお、当該医薬組成物は式(I)の化合物又はその塩を含む〔8〕～〔18〕に記載の脂質ナノ粒子を含有するアストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療剤を包含する。

また、本発明は、

アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療用医薬組成物の製造のための式(I)の化合物又はその塩を含む〔8〕～〔18〕に記載の脂質ナノ粒子の使用、

アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に使用するための式(I)の化合物又はその塩を含む〔8〕～〔18〕に記載の脂質ナノ粒子、

アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療のための式(I)の化合物又はその塩を含む〔8〕～〔18〕に記載の脂質ナノ粒子の使用、及び、

式(I)の化合物又はその塩を含む〔8〕～〔18〕に記載の脂質ナノ粒子の有効量を対象に投与することからなるアストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療方法、にも関する。

[0013] また本発明は、式(I)の化合物又はその塩を含む核酸脂質ナノ粒子を用いることにより、生体内の細胞、特にアストロサイトに核酸（例えば、アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸）を送達する方法に関する。

[0014] 「アストロサイトの関連する疾患」とは、脳梗塞、脳出血、外傷性脳損傷、脊髄損傷、神経変性疾患、てんかん、筋萎縮性側索硬化症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、アレキサンダー病、多発性硬化症及び視神経脊髄炎が挙げられる。ある態様としては、脳出血、外傷性脳損傷、脊髄損傷、神経変性疾患、てんかん、筋萎縮性側索硬化症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、アレキサンダー病、多発性硬化症及び視神経脊髄炎が挙げられる。

ここで脳梗塞は、ある態様として、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞、ある態様として、亜急性期の脳梗塞、ある態様として、亜

急性期から慢性期の脳梗塞、ある態様として、慢性期の脳梗塞、ある態様として、重症度が高い運動機能障害を呈する脳梗塞、ある態様として、modified Rankin Scale (mRS)が2以上の脳梗塞、mRSが4以上の脳梗塞、ある態様として、それらの組み合わせの脳梗塞、ある態様として、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞及び亜急性期から慢性期の脳梗塞及び重症度が高い運動機能障害を呈する脳梗塞である。「急性期」とは症状が悪化する可能性がある、脳梗塞発症後72時間から1か月未満までの期間である。「亜急性期」とは脳梗塞発症後72時間から1か月未満までの期間である。「亜急性期から慢性期」とは、脳梗塞発症の72時間後以降である。「慢性期」とは脳梗塞発症の1か月後以降の期間である。

[0015] また、本発明は上記の態様に限定されるものではなく、明細書の詳細な発明に記載された内容を適宜組み合わせた態様も含む。

[0016] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2022-211994号及び日本国特許出願番号2023-041432号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0017] 式(I)の化合物又はその塩である脂質は、脂質ナノ粒子の構成成分の1つとなることにより、脂質ナノ粒子を形成させることができ、それにより形成された脂質ナノ粒子は、対象の細胞、例えばアストロサイトなどに核酸を送達することができる。

このような脂質ナノ粒子により、核酸（例えば、アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸）を対象の細胞中に送達することができ、それにより、アストロサイトの関連する疾患の予防又は治療に有用な医薬組成物を提供できる。すなわち、本発明の核酸脂質ナノ粒子を含む医薬組成物は、アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療剤として使用できる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図1は、試験例5に記載のNeuroD1 (ND1)核酸脂質ナノ粒子群(ND1 mRNA)及びコントロール群(Control mRNA)のエンドセリン-1処置(脳虚血誘導)後の運

動機能障害の経日的変化をmodified Rankin Scale(mRS)で評価した結果を示す。横軸はエンドセリン-1注入後の日数を、縦軸はmRSの値(最大値6)を示す。白丸は、ND1核酸脂質ナノ粒子群の各評価時点におけるmRSの平均値を示す。なお、エンドセリン-1注入後28日目以降は2週間毎にmRSを評価したが、56日目の結果は57、58又は59日目にそれぞれの個体を評価した結果の平均値を示す。エラーバーは標準誤差(SEM)を示す。黒丸はコントロール群1個体の各評価時点におけるmRSを示す。なお、56日目の結果は、58日目に評価した結果を示す。エンドセリン-1処置後21日目に核酸脂質ナノ粒子を投与した。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書中では、下記の用語は特段の記載がない限り、以下の意味を有する。下記の定義は、定義された用語を明確にするためのものであり、限定するものではない。ここで使用される用語が具体的に定義されていない場合、当該用語は、当業者に一般的に受け入れられている意味で使用されている。特に記載がない限り、本明細書中のある化学式中の記号が、他の化学式においても用いられる場合、同一の記号は同一の意味を示す。

[0020] 「アルキル」とは、直鎖又は分岐のアルキルである。 C_{5-10} アルキルとは炭素数が5~10のアルキルである。ある態様として、アルキルは C_{5-10} アルキルである。ある態様として、アルキルは C_{5-15} アルキルである。ある態様として、アルキルは C_{6-10} アルキルである。ある態様として、アルキルは C_{6-8} アルキルである。ある態様として、アルキルはn-ヘキシル、n-オクチル又はn-デシルである。ある態様として、アルキルはn-ヘキシル又はn-オクチルである。

[0021] 「アルキレン」とは、直鎖又は分岐のアルキレンである。 C_{5-10} アルキレンとは、炭素数が5~10のアルキレンであり、 C_{1-6} アルキレンとは、炭素数が1~6のアルキレンである。ある態様として、アルキレンは C_{5-10} アルキレンである。ある態様として、アルキレンは C_{6-9} アルキレンである。ある態様として、アルキレンは C_{7-9} アルキレンである。ある態様として、アルキレンは C_{6-8} アルキレンである。ある態様として、アルキレンはヘキサンジイル、ヘプタンジイル、オ

クタンジイル又はノナンジイルである。ある態様として、アルキレンはヘプタンジイル、オクタンジイル又はノナンジイルである。ある態様として、アルキレンはヘプタン-1,7-ジイル、オクタン-1,8-ジイル又はノナン-1,9-ジイルである。

[0022] 「ハロゲン」とは、F、Cl、Br、Iである。

[0023] 「脂質ナノ粒子」とは、脂質を主成分とするナノ粒子である。通常、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性脂質、PEG化脂質を含む。ある態様として、更に核酸を内包する核酸脂質ナノ粒子である。また、「核酸脂質ナノ粒子」とは、疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸を内包する脂質ナノ粒子であり、ある態様として、アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸を内包する脂質ナノ粒子、ある態様として、mRNAを内包する脂質ナノ粒子である。

[0024] 「粒子径」とは、脂質ナノ粒子の粒子径である。静置の状態の分散液について、粒子径測定装置(Zetasizer Nano ZSP、Malvern Panalytical社製)で、Dynamic Light Scattering (DLS)の手法を用いて、流体力学的径(Hydrodynamic diameter、Dh)として測定される。ISO22412に準拠する。脂質ナノ粒子の「粒子径」は、Z平均粒子径として算出される。脂質ナノ粒子の粒子径は、ある態様として、10nm～1000nmであり、ある態様として30nm～500nmであり、ある態様として、30nm～250nmである。ある態様として、80nm～110nmである。ある態様として、60nm～180nmである。ある態様として、70nm～110nmである。

[0025] 「カチオン性脂質」とは、pHに応答して分子内にカチオン(正電荷)を帯びることができ、直鎖又は分岐する脂肪酸鎖、又は脂肪酸エステルを有する化合物又はその塩である。ある態様として、側鎖部分(L²及びL³側)に α 分岐構造を有している化合物又はその塩である。ある態様として、式(I)の化合物又はその塩である。ここで α 分岐構造とは、Mに結合する側鎖側(L²及びL³側)炭素原子のうち、1番目の炭素原子で炭化水素基分岐していることを示し、 β 分岐構造とは、Mに結合する炭素原子のうち、側鎖側(L²及びL³側)の炭素原子から

数えて2番目の炭素原子で炭化水素基が分岐していることを示す。

- [0026] 「中性脂質」とは、「リン脂質」及び「ステロール」である。ある態様として、中性脂質はリン脂質及びステロールであり、ある態様として、中性脂質はリン脂質であり、ある態様として、中性脂質はステロールである。
- [0027] 「リン脂質」とは、リン酸エステル基を有する脂質である。例えば、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、1,2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DEPC)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジウンデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DUPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POP)、1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(SOPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール)ナトリウム塩(DOPG)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール)ナトリウム塩(DMPG)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール)ナトリウム塩(DPPG)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール)ナトリウム塩(DSPG)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DMPE)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(POPE)、1,2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DEPE)、又は1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-L-セリン(DOPS)およびスフィンゴリエリン等である。ある態様として、リン脂質はDSPCである。ある態様として、リン脂質はDOPEである。
- [0028] 「ステロール」とは、ステロイドアルコールの一つであり、ステロイド骨格のA環にヒドロキシ基を有する化合物である。ある態様として、ステロールは、コレステロール及びコルチコステロイドである。ある態様として、フェ

コステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、ステグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、 α -トコフェロール、又はそれらの混合物等である。またそれは2種類以上の組み合わせである。ある態様として、ステロールは、コレステロールである。

[0029] 「PEG化脂質」とは、ポリエチレングリコール(PEG)を有する脂質を示す。PEG化脂質は、ポリエチレングリコールで修飾された脂質である。PEG化脂質は、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、およびそれらの混合物等である。例えば、PEG化脂質は、1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシPEG(DMG-PEG2000、別名DMG-PEG)、1,2-ジパルミトイル-rac-グリセロ-3-PEG (DPG-PEG)、1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-PEG (DSG-PEG)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-PEG(DLPE-PEG)、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-PEG(DMPE-PEG)、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン-PEG(DPPC-PEG)、または1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-PEG(DSPE-PEG)である。ある態様として、PEG化脂質はDMG-PEG2000である。

[0030] 「内包率」とは、脂質ナノ粒子分散液中に存在する核酸の総量に対する、脂質ナノ粒子内に取り込まれる核酸の量を指す。例えば、総量100 mgの核酸のうち98 mgの核酸が、脂質ナノ粒子に取り込まれる場合、内包率は98 %として示され得る。本明細書において使用される際、「内包」は、完全に、あるいは実質的に内部に含まれること、又は包含を示す。mRNAなどの核酸脂質ナノ粒子において、核酸の内包率は詳細を後述する方法で測定される。核酸の内包率の値は、ある態様として70%以上であり、ある態様として80%以上であり、ある態様として90%以上であり、ある態様として93%以上であり、ある態様として95%以上である。

[0031] 「N/P比」とは、核酸脂質ナノ粒子中のカチオン性脂質のアミノ基のモル数

(N)をRNAのリン酸のモル数(P)で除した値である。ある態様としてN/P比は1～12であり、ある態様としてN/P比は6～12であり、ある態様としてN/P比は6又は12であり、ある態様としてN/P比は6である。

[0032] 「核酸」とは、デオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA)であり、核酸の例としては、メッセンジャーRNA(mRNA)、マイクロRNA(miRNA)、短鎖干渉RNA(siRNA)、短ヘアピンRNA(shRNA)、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチドがあげられる。ある態様として、mRNAが挙げられる。ある態様として、siRNAが挙げられる。ある態様として、核酸は、Ascl1のmRNA(Ascl1タンパクをコードするmRNAをAscl mRNAともいい、以下xxxタンパクをコードするmRNAをxxx mRNAともいう)。Dlx2 mRNA、NeuroD1 mRNA(NeuroD1タンパクをコードするmRNA)、Ngn2 mRNA、BDNF mRNA、NGF mRNA、又はNT-3 mRNA等が挙げられる。ある態様として、核酸は、NeuroD1 mRNAである。ある態様として、mRNAは、Ascl1 mRNAである。ある態様として、核酸が、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパクをコードする塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである。ある態様として、核酸が、配列番号1に示す塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである。ある態様として、核酸が、配列番号3に示す塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである。ある態様として、核酸が、配列番号4に示す塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである。ある態様として、核酸が、配列番号5に示す塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである。ある態様として、核酸が、キャップ付加のための配列を含むNeuroD1タンパクをコードするmRNAである。ある態様として、核酸が、5'末端配列がCleanCap(登録商標)Reagent AG(TriLink BioTechnologies社)を用いたキャッピングの方法に適した5'末端配列であるNeuroD1タンパクをコードするmRNAである。ある態様として、核酸が、5'末端配列がAGGであるNeuroD1タンパクをコードするmRNAである。ある態様として、核酸が、5'末端配列が(配列番号4の1位～3位)であるNeuroD1タンパクをコードするmRNAである。ある態様として核酸は、BDNF mRNAが挙げられる。ある態様として、脂質ナノ粒子に含まれる核酸は、2種類以上であり、ある態様として、脂質ナノ粒子に含まれる核酸は、1種類である。核酸を内包する脂質ナノ粒子においては、脂質ナノ粒

子の全重量を基準として、ある態様として、0.001～60重量%の核酸が含まれ、ある態様として0.1～40重量%、ある態様として1.0～25重量%、ある態様として3.0～10重量%の核酸が含まれる。mRNAは、天然核酸又は人工核酸（例えば、天然の核酸塩基及び／又は人工の核酸塩基を含む核酸）であってもよい。

[0033] 本明細書において、「xxxタンパクをコードするmRNA」は、xxxタンパクをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含み、xxxタンパクに翻訳されるRNAを意味する。本明細書ではxxxタンパクをコードするmRNAをxxx mRNAともいう。すなわち、xxxタンパクを発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドを含んでいる。ある態様として、本発明における、xxxタンパクをコードするmRNAは、xxxタンパクを発現させるための機能性配列（例えばCDS、5' UTR、3' UTR、5' キャップ構造、及びポリA配列が含まれるがこれに限らない）を含むxxxタンパクをコードするポリヌクレオチドである。

[0034] 本明細書のポリヌクレオチドは、代表的なDNA配列として「T」を含む塩基配列として記載されることがあるが、例えば、特定の配列番号によって特定される塩基配列を含むRNA（例えば、mRNA）において、当該特定の配列番号によって特定される塩基配列がDNA配列を表している場合は、当該塩基配列は、DNA配列の各「T」を「U」で置き換えたRNA配列として理解される。塩基配列（例えば、配列番号1及び3に示す塩基配列）を構成する塩基「アデニン(A)」、「チミン(T)」、「グアニン(G)」、「シトシン(C)」、及び「ウラシル(U)」、並びにそれらを含むヌクレオシド及びヌクレオチドは、配列表において特に記載がない場合、個々の塩基、ヌクレオシド及びヌクレオチド毎に、天然型又は修飾型であってよく、及び/又は他の修飾（メチル化など）を有していてもよい。

[0035] 「mRNA」とは、メッセンジャーリボ核酸であり、所望のタンパクに翻訳されるものであればよく、構造に、5' キャップ、5' 非翻訳領域（以下、非翻訳領域をUTRともいう）、コーディング領域(CDS)、3' UTR、およびポリA鎖を含む。

- [0036] 「5' キャップ」とは、5' 末端に見られる修飾構造で、成熟mRNAの安定性と翻訳開始などに関与している。7-メチルグアノシン(m^7G ともいう)とmRNAが5' と5' で三リン酸(pppともいう)を介して結合する構造をCap-0という。Cap-0の構造に加えて更にmRNAの1番目のヌクレオシドにおけるリボースの2' 位がメチル化されている構造をCap-1、1番目と2番目のヌクレオシドのリボースの2' 位がメチル化されている構造をCap-2という。Cap-0、Cap-1、Cap-2はそれぞれ m^7GpppN_p 、 m^7GpppN_1mp 、 $m^7GpppN_1mpN_2mp$ と呼ばれることもある(N_1 、 N_2 はそれぞれヌクレオシドを示す。 m は2' -Oメチル基を示す)(Nature Reviews Molecular Cell Biology 2014年, vol.15(5), p313-326)。ある態様として、Cap-0、Cap-1、又はCap-2である。ある態様として、Cap-0である。ある態様として、Cap-1である。ある態様として、Cap-2である。
- [0037] 「UTR」とは、非翻訳領域、untranslated regionsであり、5' UTR及び3' UTRが存在する。5' UTR及び3' UTRは、発現させたい遺伝子由来でも、異種遺伝子由来でもよい。UTRは、天然型であってもよく、天然型UTRに対して1個又は数個(例えば、2、3、4、5、又は6個)のヌクレオチドの挿入、欠失、置換、及び/又は付加により、配列が変更された改変型であってもよい。本明細書における「遺伝子由来のUTR」には、天然型UTRだけでなく、このような改変型UTRも含まれる。UTRは、複数のUTRが直接またはスペーサー配列を介して連なっているもよい。5' UTRは、コザック配列の一部(例えば、コザック配列中の開始コドンより5' 側の配列)を含んでもよい。ある態様として、 α グロビン遺伝子由来のUTRである。ある態様として、ヒト α グロビン遺伝子由来のUTRである。ある態様として、 β グロビン遺伝子由来のUTRである。ある態様として、ヒト β グロビン遺伝子由来のUTRである。ある態様として、5' UTR及び3' UTRはヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び3' UTRである。
- [0038] 「CDS」とは、コーディング配列(coding sequence)であり、タンパクに翻訳されるDNA配列領域を意味し、そのコドンが最適化されていてもよい。CDSの3' 末端に位置する終止コドンはTAA、TGA、TAGのいずれの終止コドンでもよく、また複数の終止コドンを連続して用いてもよい(例えば、TAATGATAG)。

[0039] 「修飾ヌクレオチド」とは、修飾されたヌクレオチドである。例えばメチル化、原子交換、二重結合の飽和、脱アミノ化、又は酸素原子等が硫黄原子に置換されるなどの修飾を受けたヌクレオチドである。ある態様として、核酸塩基の修飾されたヌクレオチドである。ある態様として、リボースの修飾されたヌクレオチドである。ある態様として、リン酸基の修飾されたヌクレオチドである。ある態様として、1-メチルアデノシン、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン(1-メチルシュードウリジンともいう)、ジヒドロウリジン、5-メトキシシチジン、5-メチルシチジン、7-メチルグアノシン、N6-メチルアデノシン、イノシン、又はチオウリジンを含むヌクレオチドである。ある態様として、1-メチルアデノシンを含むヌクレオチドである。ある態様として、修飾ウリジンを含むヌクレオチドである。ある態様として、シュードウリジン又はN1-メチルシュードウリジンを含むヌクレオチドである。ある態様として、シュードウリジンを含むヌクレオチドである。ある態様として、N1-メチルシュードウリジンを含むヌクレオチドである。ある態様として、ジヒドロウリジンを含むヌクレオチドである。ある態様として、イノシンを含むヌクレオチドである。ある態様として、4-チオウリジンを含むヌクレオチドである。なお、本明細書において修飾ヌクレオチドに「一部又は全て」と記載したものは修飾ヌクレオチド全配列のうち所定の修飾ヌクレオチドのうち一部置換されていないものも含み得る。全配列において特定のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドに置換されている残基数の割合は、1～100%、1～90%、1～80%、1～70%、1～60%、1～50%、1～40%、1～30%、1～20%、1～10%、1～5%、75～99%、50～75%、25～50%、10～25%が挙げられる。ある態様として、全残基数に対して修飾ヌクレオチドに置換されている残基数の割合として「一部」とは、例えば、60～99%、70～99%、80～99%、90～99%、95～99%、60～99.9%、70～99.9%、80～99.9%、90～99.9%、又は95～99.9%が挙げられる。

[0040] 「ポリA鎖」とは、mRNAの安定化、核外輸送、翻訳等への機能を有するポリアデニル酸鎖である。ポリA配列ともいう。ある態様としてはポリA鎖長が20

～1000塩基である。ある態様としてはポリA鎖長が30～500塩基、50～200塩基、60～150塩基、70～130塩基、70～120塩基、70～80塩基、120塩基又は79塩基である。ある態様としてはポリA鎖長が30～500塩基(ある態様として40～200、50～200、50～150、50～100、50～90、60～150、60～100、60～90、70～130、70～120、70～100、70～90、70～85、70～80、75～130、75～120、75～100、75～90、ある態様として74～84、75～85、75～83、又は76～82塩基)。ある態様として、ポリA鎖長が120塩基である。ある態様として、ポリA鎖長が79塩基である。ある態様として、ポリA鎖長が74～84塩基である。ある態様として、ポリA鎖長が75～85塩基である。

[0041] 「発現」とは、核酸配列に基づいてポリペプチド又はタンパクが合成されることであり、例えば、mRNAのポリペプチドまたはタンパクへの翻訳や、ポリペプチド・タンパクの翻訳後修飾により所望のタンパクが合成されることを示す。

[0042] 「NeuroD1」とは、神経原性分化タンパク(Neural differentiation 1)であり、NeuroDファミリーに属する塩基性ヘリックスループヘリックス(bHLH)転写因子である。NeuroD1タンパクはE-boxとして知られる特異的なDNA配列を含む遺伝子の転写を活性化する(転写因子活性ともいう)。NeuroD1は神経幹細胞から神経細胞への分化を誘導する中心的な機能をもつ。グリア細胞はアストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、又はミクログリアの4種類の細胞に分類される。NG2細胞等のグリア細胞やアストロサイトにおいてNeuroD1を異所発現することで、グリア細胞を神経に変換できることが知られている(国際公開第2014/015261号)。ある態様として、NeuroD1は配列番号2に示すアミノ酸配列に対して90%以上(例えば、95%以上、98%以上、99%以上、99.4%以上又は99.5%以上)の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパクである。ある態様として、NeuroD1は配列番号2に示すアミノ酸配列において1～50個(例えば、1～2個、1～3個、1～5個、1～7個、1～10個、又は1～30個)のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパクであ

る。ある態様として、NeuroD1は配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパクである。

[0043] 「転写因子活性」とは、あるタンパクがその関連遺伝子の転写を活性する能力（すなわち、転写活性化能）を意味する。あるタンパクが転写因子活性を有するか否かは、具体的には例えば組み換えベクターについて、当該ベクターを導入しない細胞と比較して、その関連遺伝子の発現量が増大するか減少するかにより判定できる。なお、組み換えベクターは、任意のプロモーターを有するベクターにあるタンパクをコードするポリヌクレオチドを組み込んで作製し、細胞に導入してタンパクを発現させることができる。例えば、NeuroD1タンパクをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを導入した細胞において、その関連遺伝子の発現が増大している場合、NeuroD1タンパクは転写因子活性を有すると判断できる。

[0044] 「配列同一性」とは、基準とする生物学的配列（塩基配列又はアミノ酸配列等）と目的の生物学的配列とをアラインメントしたときに、配列間で一致する残基の割合（%）（通常は、目的の配列の全長に対する一致する残基の割合%）を意味する。「配列同一性」は、例えば、EMBOSS Needle(Nucleic Acids Res., 2015; Vol. 43: pW580-W584)を用いて、デフォルトで用意されているパラメータによって得られた同一性(Identity)の値として算出できる。のパラメータは以下のとおりである(Gap Open Penalty = 10、Gap Extend Penalty = 0.5、Matrix = EBLSUM62、End Gap Penalty = false)

[0045] 「穿通枝梗塞」とは、穿通枝に支配される視床、尾状核、被殻、淡蒼球及び/又は内包に梗塞が起こり、梗塞が起きた部位の機能が損傷されている疾患である。「穿通枝」とは脳主幹動脈を構成する中大脳動脈から分岐した細い動脈であり、大脳基底核・視床領域及び内包を支配している。なお脳内領域が血管により「支配される」とは、その血管によって当該脳内領域に血液が供給されていることを意味し、当該脳内領域はその血管の血管支配領域(vascular territory)内にある。

[0046] 「穿通枝支配領域」とは、穿通枝に支配される領域であり、大脳基底核・

視床領域及び内包を意味する。

[0047] 「穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞」とは、梗塞により生じた脳障害(brain damage)が主に穿通枝支配領域に生じている脳梗塞をいう。穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞には、穿通枝支配領域に生じた梗塞によって穿通枝支配領域に脳障害が生じた脳梗塞だけでなく、例えば、穿通枝支配領域周辺に生じた梗塞によって引き起こされた細胞の壊死が穿通枝支配領域に広がることでその部位の機能が損傷された場合のように、二次的に穿通枝支配領域に脳障害が生じた脳梗塞も含まれる。本明細書において脳障害とは、梗塞により生じた細胞壊死による脳の機能障害(functional damage)を意味する。脳障害は、通常、当該脳障害を有する領域における細胞壊死を有する。「穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞」は、穿通枝支配領域に細胞壊死を有する脳梗塞であってよい。

[0048] 本発明化合物である式(I)の化合物又はその塩、それを含む脂質ナノ粒子、及び医薬組成物のある態様を以下に示す。なお、全ての態様は矛盾しない任意の二以上の組み合わせであれば、自由に組み合わせることができる。組み合わせが具体的に記載されていなくても、1又は2以上の態様は、ある態様に組み合わせることができる。

[0049] 1. カチオン性脂質

(1)本発明化合物である式(I)の化合物又はその塩のある態様を以下に示す。

(カチオン性脂質の態様)

(1a)L¹がC₆₋₁₀アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₇₋₉アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₆₋₉アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₇₋₈アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₇アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₆アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₉₋₁₁アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₈₋₁₂アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₇₋₁₃アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₆₋₁₄アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₆₋₈アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。L¹がC₈アルキレンである式(I)

の化合物又はその塩。L¹がC₉アルキレンである式(I)の化合物又はその塩。

(1b) L²がC₆₋₁₀アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₆₋₈アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₉アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₈アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₆アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₉₋₁₁アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₈₋₁₂アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₇₋₁₃アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₆₋₁₄アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₅₋₁₅アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₁₀アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L²がC₆アルキル、C₈アルキル、又はC₁₀アルキルである式(I)の化合物又はその塩。

(1c) L³がC₆₋₁₀アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L³がC₆₋₈アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L³がC₉アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L³がC₆アルキルである式(I)の化合物又はその塩。L³がC₆アルキル、C₈アルキル、又はC₁₀アルキルである式(I)の化合物又はその塩。

(1d) Mが、-C(=O)O-である式(I)の化合物又はその塩。Mが、-OC(=O)-である式(I)の化合物又はその塩。

(1e) 上記(1a)～(1d)に記載の態様のうち、二以上の矛盾ない組み合わせである式(I)の化合物又はその塩。

[0050] (1e)の組み合わせの例として具体的には以下の態様が挙げられる。

(2) L¹がC₆₋₉アルキレンであり、L²及びL³がそれぞれ独立してC₆₋₁₀アルキルである、式(I)に記載の化合物又はその塩。

(2a) L¹がC₆₋₉アルキレンであり、L²及びL³がそれぞれ独立してC₆アルキル、C₈アルキル、又はC₁₀アルキルである、式(I)に記載の化合物又はその塩。

(3) L¹がC₆₋₉アルキレンであり、L²及びL³がそれぞれ独立して、C₆₋₁₀アルキルであり、Mが-C(=O)O-である式(I)の化合物又はその塩。

(3a) L¹がC₆₋₈アルキレンであり、L²及びL³がそれぞれ独立して、C₆アルキル、C₈アルキル、又はC₁₀アルキルであり、Mが-C(=O)O-である式(I)の化合物又はその塩。

(3b) L^1 が C_{6-9} アルキレンであり、 L^2 及び L^3 がそれぞれ独立して、 C_{6-10} アルキルであり、 M が $-OC(=O)-$ である式(I)の化合物又はその塩。

(3c) L^1 が C_9 アルキレンであり、 L^2 及び L^3 がそれぞれ独立して、 C_6 アルキル、又は C_8 アルキルであり、 M が $-OC(=O)-$ である式(I)の化合物又はその塩。

[0051] (4)本発明に包含される具体的化合物のある態様として、以下の化合物又はその塩が挙げられる。

8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩。

9,9'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン酸)ジ(トリデカン-7-イル) 又はその塩。

ビス(2-ヘキシルデカン酸){[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン-9,1-ジイル) 又はその塩。

[0052] 本明細書中、式(I)の化合物又はその塩が異性体の一形態のみで記載されることがあるが、本発明は、それ以外の異性体も包含し、異性体の分離されたもの、あるいはそれらの混合物も包含する。

[0053] また、式(I)の化合物又はその塩は、不斉中心又は軸不斉を有する場合があり、これに基づくエナンチオマー(光学異性体)が存在しうる。式(I)の化合物又はその塩は、単離された個々の(R)体、(S)体などのエナンチオマー、それらの混合物(ラセミ混合物又はラセミでない混合物を含む)のいずれも包含する。ある態様では、エナンチオマーは、「立体化学的に純粋」である。「立体化学的に純粋」とは、当業者が、実質的に立体化学的に純粋と認識できる程度に純度をいう。ある態様として、エナンチオマーは、例えば、90% ee(enantiomeric excess)以上、95% ee以上、98% ee以上、99% ee以上の立体化学的純度を持つ化合物である。

[0054] また、式(I)の化合物の塩とは、製薬学的に許容される塩であり、置換基の種類によって、酸付加塩を形成する場合がある。具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、

リンゴ酸、マンデル酸、酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、ジトルオイル酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩等が挙げられる。

[0055] さらに、本発明は、式(I)の化合物又はその塩の各種の水和物や溶媒和物、及び結晶多形の物質も包含する。

[0056] また、本発明は、製薬学的に許容される、1以上の放射性又は非放射性の同位体でラベルされた式(I)の化合物又はその塩を包含する。本発明化合物の同位体ラベルに使用される好適な同位体の例としては、水素(^2H 及び ^3H 等)、炭素(^{11}C 、 ^{13}C 及び ^{14}C 等)、窒素(^{13}N 及び ^{15}N 等)、酸素(^{15}O 、 ^{17}O 及び ^{18}O 等)、フッ素(^{18}F 等)、塩素(^{36}Cl 等)、ヨウ素(^{123}I 及び ^{125}I 等)、リン(^{32}P 等)、硫黄(^{35}S 等)の同位体が含まれる。同位体でラベルされた本願発明の化合物、薬物及び／又は基質の組織分布研究等の研究等に使用しうる。例えば、トリチウム(^3H)、炭素 14 (^{14}C)等の放射性同位体は、ラベルの容易さ及び検出の簡便さから、本目的で使用しうる。より重い同位体への置換、例えば、水素の重水素(^2H)への置換は、代謝安定性が向上することにより治療上有利(例えば、in vivoでの半減期の増加、必要用量の減少、薬物相互作用の減少)な場合がある。陽電子放出同位体(^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 及び ^{13}N 等)への置換は、基質受容体占有率を試験するためにポジトロン断層法(PET)試験で使用しうる。本発明の同位体でラベルされた化合物は、一般的に、当業者に知られた従来の手法により、又は、ラベルされていない試薬の代わりに同位体ラベルされた適切な試薬を用いて、実施例又は製造例と同様の製法等により製造することができる。

[0057] 2. 脂質ナノ粒子

本発明化合物である式(I)の化合物又はその塩をカチオン性脂質として含む脂質ナノ粒子のある態様を以下に示す。

(脂質ナノ粒子の態様)

(5) 中性脂質及びPEG化脂質を含む、式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子。

(5a) 中性脂質が、リン脂質及びステロールである、(5)に記載の脂質ナノ粒子。

(5b) リン脂質が、DSPCである、(5a)に記載の脂質ナノ粒子。

(5c) ステロールが、コレステロールである、(5a)に記載の脂質ナノ粒子。

(5d) PEG化脂質が、DMG-PEG2000である、(5)に記載の脂質ナノ粒子。

[0058] (5e) 式(I)の化合物又はその塩の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、20.0～70.0モル%である、(5)に記載の脂質ナノ粒子。式(I)の化合物又はその塩の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、30.0～70.0モル%である式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子。式(I)の化合物又はその塩の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、35.0～50.0モル%である(5)に記載の脂質ナノ粒子。

(5f) 中性脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、27.0～79.5モル%である(5)に記載の脂質ナノ粒子。中性脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、28.5～78.5モル%である(5)に記載の脂質ナノ粒子。中性脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、27.5～69.0モル%である(5)に記載の脂質ナノ粒子。中性脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、47.5～64.0モル%である(5)に記載の脂質ナノ粒子。

(5g) リン脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、0～16.0モル%である(5a)に記載の脂質ナノ粒子。リン脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、0～14.0モル%である(5a)に記載の脂質ナノ粒子。リン脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、0～13.0モル%である(5a)に記載の脂質ナノ粒子。

(5h) ステロールの組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、22.5～62.5モル%である(5a)に記載の脂質ナノ粒子。ステロールの組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、22.5～58.5モル%である(5a)に記載の脂質ナノ粒子。ステロールの組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、38.5～58.5モル%である(5a)に記載の脂質ナノ粒子。

(5i) PEG化脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、0.5～3.0モル%である(5)に記載の脂質ナノ粒子。PEG化脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、1.0～2.5モル%である(5)に記載の脂質ナノ粒子。

[0059] (6) 核酸を内包する、式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子。核酸、特にアストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸を内包する、式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子。

(7) 中性脂質及びPEG化脂質を含む、(6)記載の脂質ナノ粒子。

(7a) 核酸がmRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸がアストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸である(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸がアストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用なmRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸がAscl1 mRNA、Dlx2 mRNA、NeuroD1 mRNA、Ngn2 mRNA、BDNF mRNA、NGF mRNA、又はNT-3 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、BDNF mRNA又はNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、NeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。

(7b) 核酸が、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパクに対して90%以上(例えば、95%以上、98%以上、99%以上、99.4%以上又は99.5%以上)の配列同一性を有するタンパクをコードする塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、(i)配列番号2に示すアミノ酸配列、又は配列番号2に示すアミノ酸配列に対して98%以上、好ましくは99%以上、より好ましくは99.4%以上又は99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパクをコードする塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである、又は、(ii)配列番号2に示すアミノ酸配列において1～10個(例えば、1～2個、1～3個、1～5個、又は1～7個)のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパクをコードする塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号1又は3に示す塩基配列に対して70%以上(例えば、80%以上、90%以上、95%以上)の配列同一性を有する塩基配列を含むNeuro

D1 mRNAであり、さらに配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号1に示す塩基配列に対して70%以上(例えば、80%以上、90%以上、95%以上)の配列同一性を有する塩基配列を含むNeuroD1 mRNAであり、さらに配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号3に示す塩基配列に対して70%以上(例えば、80%以上、90%以上、95%以上)の配列同一性を有する塩基配列を含むNeuroD1 mRNAであり、さらに配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号4の44~1114位に示す塩基配列に対して70%以上(例えば、80%以上、90%以上、95%以上)の配列同一性を有する塩基配列を含むNeuroD1 mRNAであり、さらに配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号5の44~1114位に示す塩基配列に対して70%以上(例えば、80%以上、90%以上、95%以上)の配列同一性を有する塩基配列を含むNeuroD1 mRNAであり、さらに配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号5の44~1114位に示す塩基配列に対して70%以上(例えば、80%以上、90%以上、95%以上)の配列同一性を有する塩基配列を含むNeuroD1 mRNAであり、さらに配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号5の44~1114位に示す塩基配列に対して70%以上(例えば、80%以上、90%以上、95%以上)の配列同一性を有する塩基配列を含むNeuroD1 mRNAであり、さらに配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする、(7)に記載の脂質ナノ粒子。

(7c) 核酸が、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパクをコードする塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号1に示す塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号3に示す塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号4に示す塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、配列番号5に示す塩基配列を含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。

[0060] (7d) 核酸が、5' キャップがCap-0、Cap-1、又はCap-2であるNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、5' キャップがCap-1であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。

(7e) 核酸が、5' UTRがコザック配列を含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、5' UTR又は3' UTRが α グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、5' UTR又は3' UTRがヒト α グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、5' UTR又は3' UTRが β グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、5' UTR又は3' UTRがヒト β グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、5' UTRが α グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、5' UTRがヒト α グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、5' UTRが β グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、5' UTRがヒト β グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、3' UTRがヒト α グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、3' UTRが α グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、3' UTRがヒト β グロビン遺伝子由来であるNeuroD1 mRNAである(7)に記載の脂質ナノ粒子。

(7f) 核酸が、修飾ヌクレオチドを含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、N1-メチルシュードウリジンを含むNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、その一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンであるNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、その一部のウリジンをN1-メチルシュードウリジンに置換したNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、その全てのウリジンをN1-メチルシュードウリジンに置換したNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。

(7g) 核酸が、ポリA鎖が20～1000塩基であるNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、ポリA鎖が30～500塩基、50～200塩基、60～150塩基、70～130塩基、70～120塩基、70～80塩基、120塩基、又は79塩基のNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、ポリA鎖が120塩基のNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。核酸が、ポリA鎖が79塩基のNeuroD1 mRNAである、(7)に記載の脂質ナノ粒子。

(8) (1)～(7)に記載の態様のうち、カチオン性脂質(1)～(4)、及び脂質ナノ粒子(5)の二以上の矛盾ない組み合わせである脂質ナノ粒子。(1)～(7)に記載の態様のうち、カチオン性脂質(1)～(4)、及び核酸を内包する脂質ナノ粒子(6), (7)の二以上の矛盾ない組み合わせである脂質ナノ粒子。

[0061] 上記(8)の組み合わせとして具体的には例えば以下の態様が挙げられる。

(8a) 核酸が、NeuroD1 タンパクをコードするmRNAであり、

式(I)化合物又はその塩が8,8'-[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩であり、中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、PEG化脂質がDMG-PEG2000である、

核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質、及び式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子。

(8b) 核酸が、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパクをコードする塩基配列を含むNeuroD1 タンパクをコードするmRNAである、(8a)に記載の脂質ナノ粒子。

(8c) 核酸が、配列番号1に示す塩基配列を含む(8b)に記載のNeuroD1 タンパクをコードするmRNAである、(8a)に記載の脂質ナノ粒子。

(8d) 核酸が、配列番号3に示す塩基配列を含む(8b)に記載のNeuroD1 タンパクをコードするmRNAである、(8a)に記載の脂質ナノ粒子。

(8e) 核酸が、配列番号4に示す塩基配列を含む(8b)に記載のNeuroD1 タンパクをコードするmRNAである、(8a)に記載の脂質ナノ粒子。

(8f) 核酸が、配列番号5に示す塩基配列を含む(8b)に記載のNeuroD1 タンパ

クをコードするmRNAである、(8a)に記載の脂質ナノ粒子。

(8g) (8a)～(8f)において、脂質ナノ粒子の全量を基準として、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩を20.0～70.0モル%、DSPC及びコレステロールを27.0～79.5モル%、DMG-PEG2000を0.5～3.0モル%の組成比で含む、脂質ナノ粒子。

(8h) (8a)～(8f)において、脂質ナノ粒子の全量を基準として、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩を35.0～50.0モル%、DSPC及びコレステロールが47.5～64.0モル%、DMG-PEG2000を1.0～2.5モル%の組成比で含む、脂質ナノ粒子。

(8i) 核酸が、塩基配列中、ヌクレオチド1～3位がCleanCap(登録商標)Reagent AG(TriLink BioTechnologies社)を用いたキャッピングの方法に適した5'末端配列であり、4～43位が5' UTRであり、44～1114位がヒトNeuroD1遺伝子のCDS(配列番号3)であり、1115～1120位が連続する2つの終止コドンであり、1121～1231位が3' UTRであり、1232～1310位がポリA鎖に相当するNeuroD1タンパクをコードするmRNAである、

核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質及び式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子。

[0062] 本発明に包含される具体的な脂質ナノ粒子のある態様として、以下が挙げられる。

(9a) 核酸が、5' キャップ構造がCap-1であり、CDSがヒトNeuroD1(ここで、本明細書で、NeuroD1はND1ともいう)遺伝子のCDS(配列番号1)であり、ポリA鎖が120塩基である、ヒトND1をコードするmRNAであり、

式(I)の化合物又はその塩が8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩であり、中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、PEG化脂質がDMG-PEG2000である、

核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質及び式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子。

(9b) 核酸が、5' キャップ構造がCap-1であり、5' UTRがヒト α グロビン遺伝子由来であり、CDSがヒトND1遺伝子のCDS(配列番号3)であり、3' UTRがヒト α グロビン遺伝子由来であり、ポリA鎖が79塩基を含む塩基配列(配列番号4)において全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンである塩基配列(配列番号5)からなる、ヒトND1をコードするmRNAであり、ここで、配列番号4又は配列番号5に示す塩基配列中、ヌクレオチド1～3位がAGG、4～43位が5' UTR、44～1114位がヒトNeuroD1遺伝子のCDS(配列番号3)、1115～1120位が連続する2つの終止コドン、1121～1231位が3' UTR、1232～1310位がポリA配列に相当し、

式(I)の化合物又はその塩が8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩であり、中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、PEG化脂質がDMG-PEG2000である、

核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質及び式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子。

(9c) 脂質ナノ粒子の全量を基準として、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩を50モル%、DSPC及びコレステロールが48.5モル%、DMG-PEG2000を1.5モル%の組成比で含む、

核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質及び式(I)の化合物又はその塩を含む(9a)又は(9b)記載の脂質ナノ粒子。

(9d) (9a)～(9b)において、脂質ナノ粒子の全量を基準として、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩を40モル%、DSPC及びコレステロールを58.5モル%、DMG-PEG2000を1.5モル%の組成比で含む、

核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質及び式(I)の化合物又はその塩を含む(

9a)又は(9b)記載の脂質ナノ粒子。

[0063] 3. 医薬組成物

本発明化合物である式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子、及び1以上の製薬学的に許容される医薬品添加物を含む医薬組成物のある態様を以下に示す。

(医薬組成物の態様)

(10a) (5)～(5i)、(6)、(7)～(7g)、(8a)～(8i)、(9a)～(9d)のいずれかに記載の脂質ナノ粒子、及び1以上の製薬学的に許容される医薬品添加物を含む医薬組成物。

(10b) アストロサイトの関連する疾患の予防又は治療のための(10a)に記載の医薬組成物。

(10c) (8a)に記載の脂質ナノ粒子、及び1以上の製薬学的に許容される医薬品添加物を含む医薬組成物。

(10d) (8b)に記載の脂質ナノ粒子、及び1以上の製薬学的に許容される医薬品添加物を含む医薬組成物。

[0064] 本発明に包含される具体的医薬組成物のある態様として、以下が挙げられる。

(10e) 核酸が、NeuroD1 タンパクをコードするmRNAであり、

式(I)化合物又はその塩が8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩であり、

中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、

PEG化脂質がDMG-PEG2000である、

核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質及び式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子、を含む医薬組成物。

(10f) 核酸が、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパクをコードする塩基配列を含むNeuroD1 タンパクをコードするmRNAであり、

式(I)化合物又はその塩が8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-

イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩であり、

中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、

PEG化脂質がDMG-PEG2000である、

核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質及び式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子、を含む医薬組成物。

(10g) 核酸が、5' キャップ構造がCap-1であり、CDSがヒトND1遺伝子のCDS(配列番号1)であり、ポリA鎖が120塩基である、ヒトND1をコードするmRNAであり、

式(I)の化合物又はその塩が8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩であり、

中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、

PEG化脂質がDMG-PEG2000である、

核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質及び式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子、を含む医薬組成物。

(10h) 核酸が、5' キャップ構造がCap-1であり、5' UTRがヒト α グロビン遺伝子由来であり、CDSがヒトND1遺伝子のCDS(配列番号3)であり、3' UTRがヒト α グロビン遺伝子由来であり、ポリA鎖が79塩基を含む塩基配列(配列番号4)において全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンである塩基配列(配列番号5)からなる、ヒトND1をコードするmRNAであり、ここで、配列番号4又は配列番号5に示す塩基配列中、ヌクレオチド1～3位がAGG、4～43位が5' UTR、44～1114位がヒトNeuroD1遺伝子のCDS(配列番号3)、1115～1120位が連続する2つの終止コドン、1121～1231位が3' UTR、1232～1310位がポリA配列に相当し、

式(I)の化合物又はその塩が8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩であり、

中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、
PEG化脂質がDMG-PEG2000である、
核酸を内包する、中性脂質、PEG化脂質及び式(I)の化合物又はその塩を含む
脂質ナノ粒子、を含む医薬組成物。

- [0065] 医薬組成物の投与形態は限定されないが、例えば脳内、関節内、静脈内、筋肉内、皮下等の注射剤、経粘膜液剤、吸入剤等による非経口投与が挙げられる。通常脳内に投与すると、中枢神経系に送達される。ある態様として、投与は脳実質内投与である。ある態様として、投与は脳室内投与である。ある態様として、投与は脊髄内投与である。ある態様として、投与は髄腔内投与である。ある態様として、投与は脊髄実質内投与である。
- [0066] 通常、脳内投与する場合、本発明の脂質ナノ粒子を含む医薬組成物は、ある態様として脳1kgあたり約0.001～10 mg、ある態様として脳1kgあたり約0.001～50 mg、ある態様として脳1kgあたり約0.001～100 mg、1日1回～複数回に分けて投与する。投与量は疾患、症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に依じて適宜決定される。
- [0067] 通常、筋肉内投与される場合は、本発明の医薬組成物の1日の投与量は、体重当たり約0.00001～10 mg/kgが適当で、1日1回～複数回に分けて投与する。投与量は疾患、症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に依じて適宜決定される。
- [0068] 投与経路、剤形、投与部位、賦形剤や添加剤の種類によって異なるが、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の全重量を基準として、ある態様としては5～50重量%の脂質ナノ粒子が含まれ、脂質ナノ粒子等の含有量は、ある態様としては3～70重量%、ある態様としては10～50重量%である。
- [0069] 本発明の医薬組成物は、当該医薬組成物が有効性を示すと考えられる疾患の種々の治療剤又は予防剤と併用することができる。当該併用は、同時投与、或いは別個に連続して、若しくは所望の時間間隔をおいて投与してもよい。同時投与製剤は、配合剤であっても別個に製剤化されていてもよい。
- [0070] 4. カチオン性脂質の製造法

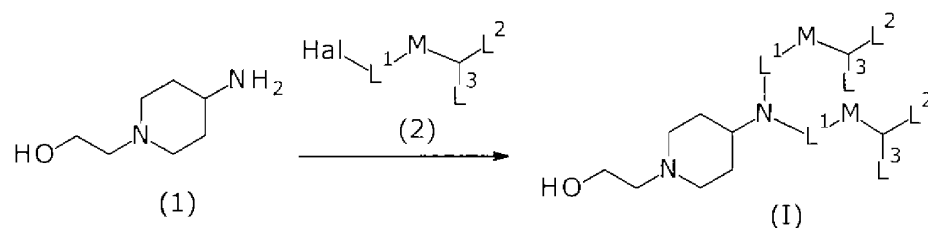
本発明化合物である式(I)の化合物又はその塩は、その基本構造あるいは置換基の種類に基づく特徴を利用し、種々の公知の合成法を適用して製造することができる。その際、官能基の種類によっては、当該官能基を原料から中間体へ至る段階で適当な保護基(容易に当該官能基に転化可能な基)に置き換えておくことが製造技術上効果的な場合がある。このような保護基としては、例えば、ウッツ(P. G. M. Wuts)及びグリーン(T. W. Greene)著、「Greene's Protective Groups in Organic Synthesis(第5版、2014年)」に記載の保護基等を挙げることができ、これらの反応条件に応じて適宜選択して用いればよい。このような方法では、当該保護基を導入して反応を行なったあと、必要に応じて保護基を除去することにより、所望の化合物を得ることができる。

[0071] 以下、式(I)の化合物又はその塩の代表的な製造法を説明する。各製法は、当該説明に付した参考文献を参照して行うこともできる。なお、本発明の製造法は以下に示した例には限定されない。

[0072] (第1製法)

本発明化合物又はその塩は、以下の製法により製造できる。

[化4]



(式中、Halはハロゲンを示す。)

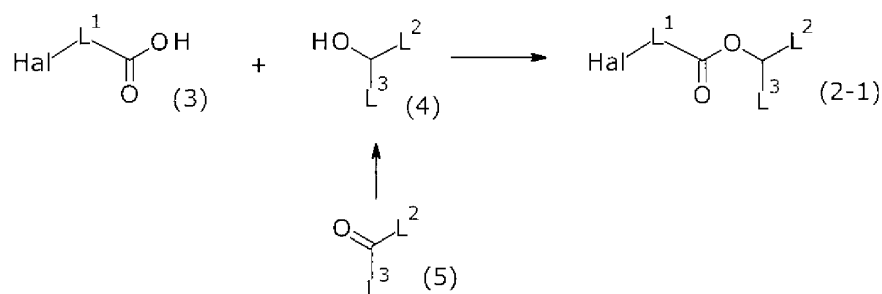
本発明化合物(I)は、原料化合物(1)と原料化合物(2)との反応により製造できる。この反応では、化合物(1)と化合物(2)とを等量若しくは化合物(2)を過剰量用い、これらの混合物を、反応に不活性な溶媒中、又は無溶媒下、冷却下から加熱還流下、ある態様として0℃から80℃において、ある態様として60℃～100℃、ある態様としてマイクロウェーブを用いて100～160℃で反応し、

通常0.1時間～5日間攪拌する。溶媒の例としては、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、THF、ジオキサン、ジメトキシエタン、シクロペンチルメチルエーテル等のエーテル類、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、DMF、DMSO、酢酸エチル、アセトニトリル、N, N-ジメチルアセトアミド及びこれらの混合物が挙げられる。TEA、DIPEA若しくはN-メチルモルホリン等の有機塩基、又は炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、若しくは水酸化カリウム等の無機塩基の存在により、反応が促進する場合がある。ヨウ化カリウム等の無機塩の存在により、反応が促進する場合がある。

〔文献〕S. R. Sandler及びW. Karo著、「Organic Functional Group Preparations」、第2版、第1巻、Academic Press Inc.、1991年、日本化学会編「実験化学講座(第5版)」14巻(2005年)(丸善)

[0073] (原料第1製法)

[化5]



(式中、Halはハロゲンを示す。)

化合物(2-1)は、化合物(2)のうちMが-C(=O)O-の化合物であり、化合物(3)と化合物(4)との反応により製造できる。

この反応では、化合物(3)と化合物(4)とを等量若しくは一方を過剰量用い、これらの混合物を、縮合剤の存在下、反応に不活性な溶媒中、冷却下から加熱下、ある態様としては-20℃～60℃において、通常0.1時間～5日間攪拌する。溶媒の例としては、ベンゼン、トルエン若しくはキシレン等の芳香族炭化水素類、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン若しくはクロロホルム等の

ハロゲン化炭化水素類、THF、ジエチルエーテル、ジオキサン、ジメトキシエタン等のエーテル類、DMF、DMSO、又はアセトニトリル、及びこれらの混合物が挙げられる。縮合剤の例としては、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1,1'-カルボニルジイミダゾール、ジフェニルリン酸アジド、オキシ塩化リン等が挙げられる。添加剤(例えば、DMAP、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)が反応を促進する場合がある。TEA、DIPEA若しくはN-メチルモルホリン等の有機塩基の存在が反応を促進する場合がある。

[0074] また、カルボン酸(3)を反応性誘導体へ変換した後に化合物(4)と反応させる方法も用いることができる。カルボン酸(3)の反応性誘導体の例としては、オキシ塩化リン、塩化チオニル等のハロゲン化剤と反応して得られる酸ハロゲン化物、クロロギ酸イソブチル等と反応して得られる混合酸無水物、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール等と縮合して得られる活性エステル等が挙げられる。これらの反応性誘導体と化合物(4)との反応は、ハロゲン化炭化水素類、芳香族炭化水素類、エーテル類等の反応に不活性な溶媒中、冷却下～加熱下、ある態様としては-20℃～60℃で行うことができる。

〔文献〕S. R. Sandler及びW. Karo著、「Organic Functional Group Preparations」、第2版、第1巻、Academic Press Inc.、1991年、日本化学会編「実験化学講座(第5版)」16巻(2005年)(丸善)

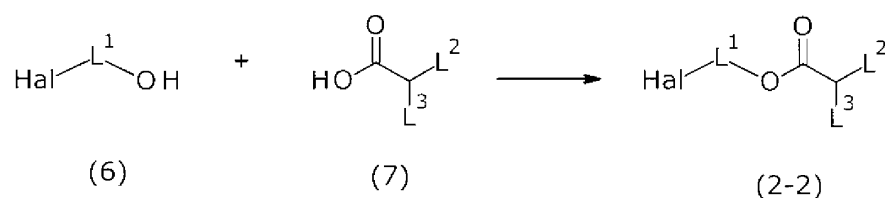
[0075] 化合物(4)は、化合物(5)の還元反応により製造できる。この反応では、反応に不活性な溶媒中、冷却下から加熱下、ある態様としては-20℃から80℃で、化合物(5)を等量若しくは過剰量の還元剤で、通常0.1時間～3日間処理する。溶媒の例としては、ジエチルエーテル、THF、ジオキサン、ジメトキシエタン等のエーテル類、メタノール、エタノール、2-プロパノール等のアルコール類、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、DMF、DMSO、酢酸エチル及びこれらの混合物が挙げられる。還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム若しくはジイソブチルアルミニウムヒドリド等のヒドリド還元剤、ナトリウム

、亜鉛、鉄等の金属還元剤、その他、下記文献中の還元剤が好適に用いられる。

〔文献〕 M. Hudlicky著、「Reductions in Organic Chemistry, 2nd ed (ACS Monograph :188)」、ACS、1996年、R. C. Larock著、「Comprehensive Organic Transformations」、第2版、VCH Publishers, Inc.、1999年、T. J. Donohoe著、「Oxidation and Reduction in Organic Synthesis (Oxford Chemistry Primers 6)」、Oxford Science Publications、2000年、日本化学会編「実験化学講座(第5版)」14巻(2005年)(丸善)

[0076] (原料第2製法)

[化6]



(式中、Halはハロゲンを示す。)

化合物(2-2)は、化合物(2)のうちMが-O-C(=O)-であり化合物(6)及び化合物(7)から製造できる。本製法は、化合物(3)及び化合物(4)から化合物(2-1)を製造する製法と同様の方法を用いることができる。

[0077] 式(I)の化合物又はその塩は、遊離化合物、その塩、水和物、溶媒和物、あるいは結晶多形の物質として単離され、精製される。式(I)の化合物又はその塩は、常法の造塩反応に付すことにより製造することもできる。単離、精製は、抽出、分別結晶化、各種分画クロマトグラフィー(シリカゲルクロマトグラフィー等)通常の操作を適用して行なわれる。

各種の異性体は、適当な原料化合物を選択することにより製造でき、あるいは異性体間の物理化学的性質の差を利用して分離することができる。例えば、光学異性体は、ラセミ体の一般的な光学分割法(例えば、光学活性な塩基又は酸とのジアステレオマー塩に導く分別結晶化や、キラルカラム等を用いたクロマトグラフィー等)により得られ、また、適当な光学活性な原料化合

物から製造することもできる。

[0078] 5. 脂質ナノ粒子の製造法

脂質ナノ粒子は、式(I)の化合物又はその塩、中性脂質、及びPEG化脂質の成分に、核酸などの成分を添加し、媒体中に分散させることで製造できる。

例えば、式(I)の化合物又はその塩、DSPC、ステロール及びPEG化脂質などを溶媒に溶解させて油相とし、核酸を含むバッファー溶液などの水相と混合、あるいは懸濁させる。その後、混合溶液中の溶媒を、透析、限外ろ過などの手法で除去することにより、脂質ナノ粒子が得られる。

また、医薬組成物については、核酸脂質ナノ粒子に上述の賦形剤などの添加剤を用いて、公知の方法により製造できる。

[0079] 6. 医薬組成物の製造法

医薬組成物は、当分野において通常用いられている医薬品添加物(賦形剤等)、即ち、薬剤用賦形剤等を用いて、通常使用されている方法によって調製することができる。医薬品添加物は、医薬組成物に含まれる成分は限定されないが、賦形剤の他にも、保存剤、安定剤、酸化防止剤、防腐剤、などの添加剤を含有していてもよい。また、医薬組成物にその他の添加剤を加えてもよい。

また、医薬組成物において、薬学的に許容される媒体を添加してもよい。

[0080] 医薬組成物は、貯蔵および／または輸送のために冷蔵または冷凍される。温度は、ある態様として、約-150℃～約0℃であり、ある態様として、約-80℃～約-20℃であり、約-40℃～約-20℃であり、ある態様として4℃以下である。溶液は、ある態様として、PBSである。

[0081] 注射剤は、無菌の水性又は非水性的の溶液剤、懸濁剤又は乳濁剤を含有することが好ましい。水性の溶剤としては、例えば注射用蒸留水又は生理食塩液が含まれる。非水性的の溶剤としては、例えばエタノールのようなアルコール類がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、又は溶解補助剤を含んでもよい。これらは、例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化

される。また、これらは無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解又は懸濁して使用することもできる。

[0082] 吸入剤や経鼻剤等の経粘膜剤は、液体のものが用いられ、従来公知の方法に従って製造することができる。例えば公知の賦形剤や、更に、pH調整剤、防腐剤、界面活性剤、滑沢剤、安定剤や増粘剤等が適宜添加されていてもよい。投与は、適当な吸入又は吹送のためのデバイスを使用することができる。例えば、計量投与吸入デバイス等の公知のデバイスや噴霧器を使用して、化合物を単独で又は処方された混合物の粉末として、もしくは医薬的に許容し得る医薬品添加物と組み合わせて溶液又は懸濁液として投与することができる。乾燥粉末吸入器等は、単回又は多数回の投与用のものであってもよい。適当な駆出剤、例えば、クロロフルオロアルカン又は二酸化炭素等の好適な気体を使用した加圧エアゾールスプレー等の形態であってもよい。

[0083] 7. 核酸の製造法

核酸、例えばmRNAは、当該分野における公知技術を用いて製造できる。以下に例を挙げるがこれらに限らない。mRNAは、直線形プラスミドをDNA鋳型として、*in vitro* 転写(IVT)により製造できる。製造法として、(i)転写後キャッピング法(その工程はプラスミド作製、*in vitro* 転写、5' キャッピングの順に行う)と(ii)共転写キャッピング法(その工程はプラスミド作製、*in vitro* 転写と同時に5' キャッピングの順に行う)等が知られている。共転写キャッピング法において、アンチリバースキャップアナログ(ARCA)技術を用いると、RNAの5' 末端にCap-0が付加され、CleanCap (登録商標、TriLink社)キャッピング技術を用いると、RNAの5' 末端にCap-1が付加できる。

[0084] (*in vitro* 転写)

IVTにおいて、反応には、通常、転写緩衝液、ヌクレオシド三リン酸(NTP)、RNase阻害剤、及びポリメラーゼ(例:T7 RNAポリメラーゼ)を用いることができる。NTPは、天然型でも非天然型(修飾型)でもよい。

[0085] (キャッピング)

キャッピングは、ワクシニアキャッピング酵素、2' O-メチルトランスフェ

ラーゼ、又はCleanCap等の方法等に倣い行うことができる。IVTにより転写された配列がポリA配列を含まない場合、ポリA付加反応を行うこともできる。なお、配列に関して、CleanCap(登録商標) Reagent AG(TriLink BioTechnologies社)を用いたキャッピングの方法を用いる場合、CleanCap(登録商標) Reagent AG(TriLink BioTechnologies社)を用いたキャッピングの方法に適した5'末端配列は例えばAGG(配列番号4の1位～3位)である。

[0086] (プラスミド作製)

直線形プラスミドは以下の工程で作製できる。プラスミド(例:大腸菌用のhigh copyプラスミド(pUC18又はpCU18等))に、任意のUTR、及び任意の塩基配列(例:NeuroD1タンパクをコードする塩基配列)を挿入したプラスミドを作製でき、大腸菌等を用いて増幅できる。精製後、プラスミドは、制限酵素及び緩衝液を用いて直線形プラスミドを製造できる。精製後、直線形プラスミドはそのままDNA鋳型として使用できる。又は、直線形プラスミドにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をした後にDNA鋳型として使用できる。

(精製)

mRNA及びその製造工程での中間体は、当該分野で公知の方法により精製できる。以下に例を挙げるがこれらに限らない。DNA鋳型はデオキシリボヌクレアーゼI(DNase I)により除去できる。転写されたRNAは、シリカゲルカラム等を用いて精製できる。ポリA配列を含むRNAは、Oligo dTカラムで精製できる。直線形プラスミドは、PureLink(登録商標)(Thermo Fisher Scientific)等を用いて精製できる。

試験例

[0087] 式(I)の化合物又はその塩から構成される核酸脂質ナノ粒子の薬理活性は以下の試験により確認した。本明細書の下記試験例等において、下記の略号を用いることがある。

(略号)

B-27 : B-27無血清サプリメント、BDNF : 脳由来神経栄養因子、DMEM : ダルベッコ改変イーグル培地、eGFP : 増強緑色蛍光タンパク、eGFP核酸脂質ナノ

粒子：eGFP mRNAを内包する脂質ナノ粒子、FLuc核酸脂質ナノ粒子：FLuc mRNAを内包する脂質ナノ粒子、ND1核酸脂質ナノ粒子：NeuroD1 mRNAを内包する脂質ナノ粒子、FBS：ウシ胎児血清、FLuc：ルシフェラーゼ(ホタル)、LNP：脂質ナノ粒子、mRNA：メッセンジャーリボ核酸、ND1:NeuroD1、PBS：リン酸緩衝生理食塩水、PFA：パラホルムアルデヒド、RLU：相対発光量、RGFP：相対GFP発現量

[0088] (マウスプライマリーアストロサイトを用いた脂質ナノ粒子の導入評価)

マウスプライマリーアストロサイトへの核酸(mRNA)脂質ナノ粒子の導入効率を評価することにより、脂質ナノ粒子を構成する式(I)の化合物又はその塩の効果を評価した。mRNAとしてFLuc mRNA、eGFP mRNA (TriLink BioTechnologies社)を使用し、NanoAssemblr(Precision NanoSystems社)を用いて核酸脂質ナノ粒子を作成した。被験薬(核酸脂質ナノ粒子)の導入効率は、mRNAにコードされたLuciferase、eGFPの発現量を評価することで算出した。なお、各群3ウェルで実施した。その方法と結果を試験例1～2に示す。

[0089] 試験例1 in vitro luciferase assay

(マウスプライマリーアストロサイトの取得)

Lynette C. Foo., Purification of Rat and Mouse Astrocytes by Immunopanning, Cold Spring Harbor Protocols, 2013年, vol.5, p.421-432.に従ってマウスプライマリーアストロサイトを取得した。マウスはC57BL/6J(日本チャールスリバー)の新生仔P1-P10を用いた。ただし、細胞のリカバリーは、5% CO₂下で行った。

[0090] (試験方法)

ポリ-D-リジンコート96ウェルプレート(IWAKI社)に上述の方法で取得したマウスプライマリーアストロサイトを2000個/ウェルで播種し、5%CO₂下、37℃で一晩培養した。培地として2% B-27(登録商標)サプリメント(Thermo Fisher Scientific社)、10% FBS (Hyclone社)及び1% ペニシリンーストレプトマイシン(PS)(Thermo Fisher Scientific社)を含有するDMEM/F-12培地(Thermo Fisher Scientific社)を100 µL/ウェル使用した。翌日、PBSで希釈した被験薬

(FLuc核酸脂質ナノ粒子)の分散液を培地で希釈して、最終濃度0.8 μg/mLとなるように100 μL添加し、200 μL/ウェルで一晩培養した。翌日に培地をすべて除去した後、ONE-Glo Luciferase assay system(Promega社)をPBSで2倍希釈し、100 μLずつ各ウェルに添加した。1分間混和した後、80 μLずつ96ウェルホワイトプレート(Nunc社)へトランスファーし、Envision(Perkin Elmer社)にてその発光を検出した。活性指標としてRLUを使用した。

[0091] (発現の評価)

上記試験の結果、本発明の代表的な実施例化合物を構成成分として含む核酸脂質ナノ粒子において、Luciferase活性が観測された。これによりFLuc mRNAを内包する脂質ナノ粒子がアストロサイト、すなわち細胞内に取り込まれ、翻訳され、Luciferaseタンパクを発現していることが示唆された。実施例化合物を含む核酸脂質ナノ粒子の結果を下記表に示した。表では各群のRLU値の平均を示す。下記表のNUMに記載したEx1-L0～Ex5-L0とは、それぞれEx1-L0-FLuc mRNA～Ex5-L0-FLuc mRNAを示す。すなわち、Ex1-L0～Ex5-L0とは、それぞれFLuc mRNAを内包するEx1-L0と同じ脂質組成(カチオン性脂質 | DSPC | コレステロール | DMG-PEG2000=50 | 10 | 38.5 | 1.5 (mol%))である実施例化合物Ex1、Ex2、Ex3、Ex4、Ex5を含む脂質ナノ粒子である。

[表1]

NUM	RLU
Ex1-L0	10645733
Ex2-L0	4290933
Ex3-L0	3928667
Ex4-L0	10920800
Ex5-L0	10392533

[0092] 試験例2 in vitro eGFP を用いたLNP assay

(試験方法)

ポリ-D-リジンコート96ウェルプレート(Corning社)に先述の方法で取得し

たマウスプライマリーアストロサイトを10,000個/ウェル で播種し、5%CO₂下、37℃で一晩培養した。培地として2% B-27(登録商標)サプリメント(Thermo Fisher Scientific社)、10% FBS(Cytiva社)及び1% ペニシリンーストレptomycin(PS)(Thermo Fisher Scientific社)を含有するDMEM/F-12培地(Thermo Fisher Scientific社)を200 μ L/ウェル使用した。翌日、培地を半量(100 μ L)除去し、濃度1.6 μ g/mLとなるように培地で希釈した被験薬(eGFP核酸脂質ナノ粒子)を 100 μ L添加し、最終濃度0.8 μ g/mLとして一晩培養した。翌日に培地を全て除去し、50 μ Lの 4% PFA (WAKO社)で10分間静置し、細胞固定処理した。その後、PBS (WAKO社)で洗浄し、PBS で1000倍希釈したHoechst (Thermo Fisher Scientific社)を100 μ Lを添加し、5分静置した。その後、PBSで2回洗浄し、150 μ LのPBS を添加した状態でIN Cell Analyzer 6000 (Cytiva社)を用いてeGFPの発現強度を蛍光シグナルとして検出した。また細胞核は、Hoechstの蛍光シグナルとして検出した。活性指標としては、各ウェル当たりの蛍光強度を細胞核の面積で除した値を使用した。

[0093] (発現の評価)

上記試験の結果、本発明の代表的な実施例化合物Ex1を含む核酸脂質ナノ粒子(Ex1-L1~Ex1-L17)において、eGFPの蛍光が観測された。これによりeGFP mRNAが実施例脂質を構成成分として含む脂質ナノ粒子によって細胞内に取り込まれ、翻訳され、eGFPタンパクを発現したことが示唆された。下記表に核酸脂質ナノ粒子の発現の各群の活性指標の平均値を算出し、Ex1-L1を1とした時の相対値をRGFPとして示した。下記表のNUMに記載したEx1-L1~Ex1-L17とは、それぞれEx1-L1-eGFP mRNA~Ex1-L17-eGFP mRNAを示す。すなわち、Ex1-L1~Ex1-L17とは、それぞれeGFP mRNAを内包する、後記の実施例10に記載の各脂質組成を有する実施例化合物Ex1を含む脂質ナノ粒子である。

[表2]

NUM	RGFP
Ex1-L1	1.00
Ex1-L2	0.13
Ex1-L3	0.66
Ex1-L4	0.81
Ex1-L5	4.63
Ex1-L6	2.56
Ex1-L7	0.96
Ex1-L8	1.15
Ex1-L9	2.13

NUM	RGFP
Ex1-L10	5.82
Ex1-L11	0.21
Ex1-L12	2.90
Ex1-L13	3.73
Ex1-L14	2.12
Ex1-L15	0.59
Ex1-L16	2.24
Ex1-L17	2.08

[0094] 試験例3 in vivo luciferase assay

(試験方法)

脳における核酸脂質ナノ粒子の導入効率をIVIS spectrum(PerkinElmer社)を用いて評価した。6-12週のBALB/c系統マウス(日本チャールス・リバー、n=3)に、イソフルラン(イソフルラン吸入麻酔液「VTRS」；マイラン製薬株式会社、以下同様)麻酔下において核酸脂質ナノ粒子を脳実質内投与した。脳実質内投与に際し、投与座標はマウスブレインアトラス(Academic press社)をもとに、Bregmaから前後0.0 mm、左に2.0 mm、深さ2.5 mmと決定した。イソフルラン麻酔下において、バリカンによる毛ぞり後、脳定位固定装置(KOPF社)により頭蓋骨を固定しドリル(Foredom社)で直径1 mm程度の穴を開けた。イトーシリンジ(伊藤製作所)に被験薬(FLuc核酸脂質ナノ粒子)0.3 mg/mLを充填し、設定した座標にインジェクションポンプ(ナリシゲ社)を用いて流速0.2 μ L/minで1 μ L投与した。投与後1分静置し、ゆっくりと針を引き上げ、頭皮を縫い合わせた。1日後、イソフルラン麻酔下にて15 mg/mLルシフェリン(Promega社)を250 μ L/匹で腹腔内投与し20分後にIVIS spectrumを用いて発光を確認した。取得した発光値はLiving imageソフトウェア上でphotons/secの単位で数値化し、解析に用いた。(なお、例えば、本発明の代表的な実施例の核酸脂質ナノ粒子は、実施例化合物を[化1]に記載された対照化合物に置き換えた核酸脂質ナノ粒子、と比較もした。対照化合物は開示されている方法で製造した。)

(発現の評価)

上記試験の結果、本発明の代表的な実施例の核酸脂質ナノ粒子(Ex1-L01-FLuc mRNA)において、Luciferase活性が観測された。これによりFLuc mRNAを内包する脂質ナノ粒子が脳内において細胞内に取り込まれ、翻訳され、Luciferaseタンパクを発現していることが示唆された。下記表に核酸脂質ナノ粒子の発現のデータを示した。表では評価したEx1-L01-FLuc mRNA の3個体の平均値を示す。下記表のNUMに記載したEx1-L01とは、Ex1-L01-FLuc mRNAを示す。すなわち、Ex1-L01とは、FLuc mRNAを内包する、Ex1-L0と同じ脂質組成である実施例化合物Ex1を含む脂質ナノ粒子である。

[表3]

NUM	Bioluminescence imaging (photons/sec)
Ex1-L01	129900000.00

[0095] 試験例4 in vitroにおけるラットプライマリーアストロサイトから神経細胞への変換

(核酸脂質ナノ粒子のラットプライマリーアストロサイトへの添加)

ラットプライマリーアストロサイトは試験例1に記載したのと同様に Lynette C. Foo., Purification of Rat and Mouse Astrocytes by Immunopanning, Cold Spring Harbor Protocols, 2013年, vol. 5, p. 421-432.に従って取得し使用した。ラットはウイスターラットの新生仔(日本クレア, P1-P10)を使用した。ただし、細胞のリカバリーは、5% CO₂下で行った。ポリ-D-リジンコートされた96ウェルプレート(Corning, 356640)に、取得したラットプライマリーアストロサイトを10,000~40,000細胞/ウェルで播種し、5%CO₂下、37℃で一晩培養した。培養には、2% B-27(登録商標)サプリメント(Thermo Fisher Scientific社, A1895601)、10% ウシ胎児血清(FBS, Cytiva社、SH30084.03)及び1% ペニシリン-ストレプトマイシン(PS)(Thermo Fisher Scientific社、15070063)を含有するDMEM/F-12培地(Thermo Fisher Scientific社、11320-033)を200 μL/ウェルで使用した。なお、B-27(登録商標)サプリメント、FBS

及びPSを含有するこのDMEM/F-12培地を、下記においても、培養培地として用いた。翌日、後記実施例10で調製した、PBSで希釈したND1核酸脂質ナノ粒子(Ex1-L1-ND1-1又はEx1-L6-ND1-2)分散液を培養培地で希釈して、終濃度0.5 μ g/mLとなるように添加し24時間培養した。コントロールにはPBS及び培養培地を添加した。なお、各群3ウェルで実施した。

[0096] (ND1タンパクの発現確認)

上記のND1核酸脂質ナノ粒子添加の24時間後に、培養培地を除去し、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定処理した。その後PBSで洗浄し、免疫細胞染色を行った。ND1タンパクの発現を抗ND1抗体(Santa Cruz Biotechnology社、sc46684)にて確認したところ、Ex1-L1-ND1-1又はEx1-L6-ND1-2のいずれを添加したアストロサイトにおいても、ND1タンパク陽性細胞が、PBSを添加したアストロサイト(コントロール)に比べて顕著に増加していることが示された。

[0097] (神経細胞マーカーの発現確認)

上記のND1核酸脂質ナノ粒子添加の24時間後に、培養培地を除去し分化転換培地に変更し、2～3日ごとに培地交換した。分化転換培地は2% B-27(登録商標)サプリメント、1% GlutaMAX(商標)サプリメント(Thermo Fisher Scientific社、35050-061)、1% PS及び0.02% BDNF溶液を含有するDMEM/F-12培地であり、当該培地を200 μ L/ウェル添加した。BDNF溶液は、100 μ g/mLとなるようにBDNF粉末(PeproTech、450-02)を純水で溶解することにより調製した。ND1核酸脂質ナノ粒子添加後6～7日目において分化転換培地をすべて除去し、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定処理した。その後PBSで洗浄し、未成熟な神経細胞マーカーであるダブルコルチン(Doublecortin; DCX)の発現を確認するため、抗DCX抗体(Cell Signaling Technology社、4604S)を用いて免疫細胞染色を行った。

Ex1-L1-ND1-1又はEx1-L6-ND1-2のいずれを添加したアストロサイトにおいても、DCXが、PBSを添加したアストロサイト(コントロール)に比べて顕著に発現していることが明らかになった。この結果は、ND1 mRNAによりラットプ

ライマリーアストロサイトが神経細胞へ変換されたことを示唆する。

[0098] 試験例5 ND1核酸脂質ナノ粒子のカニクイザル脳梗塞モデルに対する作用
(カニクイザル脳梗塞モデルの作製)

雄性カニクイザル(3歳以上、新日本科学)4個体に対して、約10 mg/kgとなる量の塩酸ケタミン(ケタラール筋注用500 mg; 第一三共プロファーマ)を用いて筋肉内注射(i.m.)による導入麻酔を行った。麻酔下にあるカニクイザルに気管挿管し、人工呼吸又は自発呼吸下にて、気管からのイソフルラン(イソフルラン吸入麻酔液「VTRS」; マイラン製薬株式会社)吸入による維持麻酔を行った。麻酔下のカニクイザルの頭部の毛をバリカンで剃毛した後、当該カニクイザルを脳定位固定装置(ナリシゲ社)に固定した。その後、出血に配慮しながらカニクイザルの頭部皮膚を切開し、頭蓋骨表面の前方にある矢状縫合と冠状縫合との交差点であるブレグマを確認した。注入部位はブレグマ(B: 0mm、ML座標: 0mm(正中))を基点として下記のように示す。

- ・ B: ブレグマを基点とした前後軸方向の距離(プラスの数値は前方の距離を表す。)
- ・ L: ML座標の基点から左方の距離
- ・ D: 硬膜から鉛直下向き方向への脳内での深さ

[0099] 雄性カニクイザル4個体に対してエンドセリン-1(ペプチド研究所 code 419 8-v)溶液を注入した。具体的には、カニクイザルの頭蓋骨に対し、ブレグマを注入部位の基点として、(i)B:2.0 mm、L:8.0 mm、(ii)B:5.0 mm、L:8.0 mm、(iii)B:9.0 mm、L:5.0 mm、及び(iv)B:9.0 mm、L:12.0 mmの位置にドリルで直径1 mm程度の穴を開けた(合計4か所)。各々の穴からマイクロインジェクター(ナリシゲ社)に接続したマイクロシリンジ(HAMILTON社)を挿入し、硬膜からの深さ(D)19.0 mm(上記(i)及び(ii))、深さ(D)13.0 mm(上記(iii))、又は深さ(D)15.0 mm(上記(iv))に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、1個体あたり上記の各位置に対応する合計4か所にエンドセリン-1を注入した。エンドセリン-1は、2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で、30 μL /部位の量を、注入速度1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で注入した。注入終了後、液漏れを防止するた

めに約20分間シリンジを静置した。上記(i)～(iv)の注入部位は、それぞれ(i)視床外側腹側核及び視床後腹側核、(ii)淡蒼球、(iii)尾状核、(iv)被殻を標的としている。これらの注入部位に上記のようにエンドセリンを注入することにより、標的とした部位に加えて内包にも障害を生じさせた。このようにして大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する脳梗塞モデルを作製した。

[0100] (ND1核酸脂質ナノ粒子のモデルへの投与)

上記の方法で作製した脳梗塞モデルの4個体を、エンドセリン-1注入処置後21日目(慢性期)に、mRSサル用(下記表参照)に関して群間で差が生じないように2群(コントロール群n=1、ND1核酸脂質ナノ粒子群n=3)に振り分けた。なお、コントロール群(1個体)には、後記実施例10で調製したEx1-L1c-eGFP mRNAを投与、ND1核酸脂質ナノ粒子群(3個体)には、後記実施例10で調製したEx1-L1-ND1-1を投与した。

[0101] ヒト脳卒中診療においては、表4に記載のmRS(ヒト臨床用)が身体障害の指標として広く使われている。mRS(サル用)は、mRS(ヒト臨床用)をサル用に修正した指標である。サルの運動機能障害スコアリングに用いられる指標としては、ヒトの脳卒中神経学的重症度の評価スケールであるNational Institutes of Health Stroke Scale(NIHSS)を非ヒト霊長類モデルに適合させた評価スケールであるNon-Human Primate Stroke Scale(NHPSS)が知られている。mRS(サル用)は、NHPSSと同様に運動機能障害の持続性が評価できていることから、本モデルの運動機能障害の持続性の評価には、mRSを用いることができる。

[0102]

[表4]

スコア	mRS(ヒト臨床用)	mRS(サル用)
0	まったく症候がない	まったく症候がない
1	症候はあっても明らかな障害はない：日常の勤めや活動は行える	障害側の前肢又は後肢の軽度麻痺 ¹
2	軽度の障害： 発症以前の活動がすべて行えるわけではないが、自分の身の回りのことは介助なしに行える	軽度自発運動低下 ³ 、又は障害側の前後肢(前肢及び後肢の両方)の軽度麻痺
3	中等度の障害： 何らかの介助を必要とするが、歩行は介助なしに行える	(i)自発運動低下 ⁴ 、又は(ii)座位姿勢(起立不全含む)、又は(iii)障害側の前後肢の麻痺 ² 。意識レベル ⁵ の低下なし
4	中等度から重度の障害： 歩行や身体的要求には介助が必要である	(i)自発運動低下及び(ii)座位姿勢／横臥位姿勢 ⁶ (起立不全含む)、並びに(iii)障害側の前後肢の麻痺若しくは意識レベルの軽度低下 ⁷
5	重度の障害： 寝たきり、失禁状態、常に介護と見守りを必要とする	横臥位姿勢(起立不全含む)、及び障害側の前後肢の麻痺、及び意識レベルの低下 ⁸
6	死亡	死亡

[0103] ¹軽度麻痺：明らかな麻痺は認められないが、麻痺の症候がわずかに認められる場合。

²麻痺：明らかな麻痺が認められる場合。

³軽度自発運動低下：明らかな自発運動の低下は認められないが、自発運動低下の症候がわずかに認められる場合。

⁴自発運動低下：明らかな自発運動の低下が認められる場合。

⁵意識レベル(サル)：ヒトに対する反応性レベルに基づいて判断。

⁶座位姿勢／横臥位姿勢：座位姿勢又は横臥位姿勢の少なくとも一方。

⁷意識レベルの軽度低下：明らかな意識レベルの低下は認められないが、意識レベルの低下の症候がわずかに認められる場合。

⁸意識レベルの低下：明らかな意識レベルの低下が認められる場合。

[0104] 各群の脳梗塞モデル個体に、15～50 mg/0.3～1.0 mL/headの塩酸ケタミンi.m.による導入麻酔及びイソフルラン吸入による維持麻酔を行った。麻酔持続下にて頭部の毛をバリカンで剃毛した後、モデル個体を脳定位固定装置に固定した。次に、術野を消毒し、出血に配慮しながら頭部皮膚を切開してブルグマを露出した。

[0105] 各群の脳梗塞モデル個体において、試験例5で脳梗塞モデル作製時にエンドセリン-1を注入した合計4か所の穴のそれぞれに、試験例5と同じ深さ(D)に針先端が来るようにマイクロシリンジを留置し、3個体にEx1-L1-ND1-1、1個体にEx1-L1c-eGFP mRNAを投与した。各核酸脂質ナノ粒子は、PBSで0.3 mg/mLとなるように調製し、30 μ L/部位、投与速度1.5 μ L/minで投与した。投与終了後、約20分間シリンジを静置した。

[0106] (運動機能の観察)

上記(核酸脂質ナノ粒子のモデルへの投与)においてND1核酸脂質ナノ粒子群及びコントロール群の各個体に関して、エンドセリン-1注入処置前(0日目)、並びにエンドセリン-1注入処置後1、7、14、21、22、28、42、56、70及び84日目に、mRS(表4)に基づく観察を実施した。なお、前述のように、エンドセリン-1注入処置後28日目以降は2週間毎に行動評価を実施することとしたが、エンドセリン-1注入処置後56日目(核酸脂質ナノ粒子投与後35日目)の行動評価としては、各個体をエンドセリン-1注入処置後57、58又は59日目(核酸脂質ナノ粒子投与後36、37又は38日目)にそれぞれ評価した。コントロール群のエンドセリン-1注入処置後56日目(核酸脂質ナノ粒子投与後35日目)の行動評価としては、コントロール群の1個体をエンドセリン-1注入処置後58日目(核酸脂質ナノ粒子投与後37日目)に評価した。これらの結果を、本実施例においてはエンドセリン-1注入後56日目(核酸脂質ナノ粒子投与後35日目)の結果とした。

その結果、ND1核酸脂質ナノ粒子群及びコントロール群のいずれにおいても、投与後1日目は運動機能に差がなく核酸脂質ナノ粒子投与前と同様の運動機能障害が認められた。しかしながら、コントロール群ではエンドセリン-1注入後84日目(核酸脂質ナノ粒子投与後63日目)時点においても運動機能が改善されなかったのに対し、ND1核酸脂質ナノ粒子群ではエンドセリン-1注入後56日目(核酸脂質ナノ粒子投与後35日目)以降より運動機能の回復を示し、エンドセリン-1注入後84日目(核酸脂質ナノ粒子投与後63日目)時点では運動機能の顕著な回復が確認された(図1)。このことから、ND1核酸脂質ナノ粒子の投

与により、脳障害に伴う運動機能障害を回復させることができることが明らかになった。

[0107] また、試験例4においてEx1-L1-ND1-1と同様にEx1-L6-ND1-2もアストロサイトを神経細胞へ変換したことが示唆されていることから、Ex1-L6-ND1-2を投与した場合においてもEx1-L1-ND1-1と同様にND1による同様の効果が示されることが期待される。

[0108] 以上の結果から、ND1核酸脂質ナノ粒子の投与により、脳梗塞(特に、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は、重症度が高い運動機能障害を呈する脳梗塞)に対しても治療効果を示すことが明らかになった。

[0109] 上記の試験例の結果より、式(I)の化合物又はその塩をカチオン性脂質として用いることで、アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療のための医薬組成物に好適な脂質ナノ粒子を作成できる。

実施例

[0110] 以下、実施例に基づき、式(I)の化合物又はその塩の製造法をさらに詳細に説明する。なお、本発明は、下記実施例に記載の化合物に限定されるものではない。また、原料化合物の製法を製造例にそれぞれ示す。また、式(I)の化合物又はその塩の製造法は、以下に示される具体的実施例の製造法のみに限定されるものではなく、式(I)の化合物又はその塩はこれらの製造法の組み合わせ、あるいは当業者に自明である方法によっても製造されうる。

[0111] また、本明細書、実施例、製造例、及び表中で以下の略号を使用することがある。

核酸脂質ナノ粒子：核酸を内包する脂質ナノ粒子、DCM：ジクロロメタン、DMAP：N,N-ジメチル-4-アミノピリジン（別名4-(ジメチルアミノ)ピリジン）、DIPEA：N,N-ジイソプロピルエチルアミン、DMF：N,N-ジメチルホルムアミド、DMG-PEG2000：1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシPEG（別名1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール、又は、DMG-PEG）、DMSO：ジメチルスルホキシド、TEA：トリエチルアミン、THF

：テトラヒドロフラン、DSPC：1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、TEバッファー：10 mM Tris/1 mM EDTAバッファー(pH 7.5~8.0)。NUM：実施例番号又は製造例番号、PEX：製造例化合物、Ex：実施例化合物(「Ex数字」：実施例化合物)。「Ex数字-L数字-*** mRNA」：「*** mRNA」を内包し、「Ex数字」を含む、「L数字」の脂質組成及び組成比である脂質ナノ粒子。「Ex数字-L数字」(末尾に「-*** mRNA」が記載されていないもの)：蛍光タンパクを発現するmRNAを内包し、「Ex数字」を含む、「L数字」の脂質組成及び組成比である脂質ナノ粒子。(例えば、表中Ex1-L1とは、蛍光タンパクを発現するmRNAを内包し、実施例化合物Ex1を含み、Ex1-L1の脂質組成及び組成比の実施例脂質ナノ粒子)。REF：参考にした実施例又は製造例。(例えば、後記表でEx4のREFの欄のEx2とは、実施例化合物4(Ex4)が実施例化合物2(Ex2)の文章実施例と同様の方法で製造できることを示す)。STR：化学構造式、DAT：物理化学的データ、ESI+：ESI-MS+におけるm/z値、NMR：測定溶媒としてCDCl₃を用いた¹H-NMR(500MHz)のδ値(ppm)を示す。NMRのシグナルは代表的なシグナルを示す。s：一重線、d：二重線、t：三重線、q：四重線、quin：五重線、td：三重二重線、m：多重線、br：ブロード、brd：ブロード二重線、brt：ブロード三重線、なお、本明細書において、化合物の命名にACD/Name(登録商標、Advanced Chemistry Development, Inc.)等の命名ソフトを使用している場合がある。また、便宜上、濃度mol/LをMとして表す。例えば、1M水酸化ナトリウム水溶液は1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液であることを意味する。

[0112] 製造例 1

窒素雰囲気下にて、氷冷下、8-ブロモオクタン酸(75.5 g)及び9-ヘプタデカノール(86.8 g)のDMF(755 mL)混合物に、DMAP(61.9 g)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(97.2 g)を加えた。その後、室温で28時間攪拌した。反応混合物を氷水に加え、トルエンで抽出した。水層をトルエンで抽出し、合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。洗液をトルエンおよび酢酸エチルで抽出し、合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。有機層を減圧下で濃縮した後、ヘキサンを加

え、再び減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製して8-クロロオクタン酸ヘプタデカン-9-イル(80.3 g)を得た。

[0113] 実施例 1

窒素雰囲気下にて、2-(4-アミノ-1-ピペリジニル) エタノール二塩酸塩(672 mg)、8-クロロオクタン酸ヘプタデカン-9-イル(3.0 g)及びN, N-ジメチルアセトアミド(6.7 mL)の混合物に、炭酸カリウム(1.7 g)及びヨウ化カリウム(51 mg)を加えた。内温100℃で24時間撹拌した後、反応混合物を室温で放冷し、不溶物を濾別、トルエンにて洗浄した。濾液に水を加え、有機層を抽出した。水層をトルエンおよび酢酸エチルで抽出し、合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。水層を酢酸エチルで抽出し、合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。有機層を減圧下で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)およびシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール)で精製した。得られた粗精製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(塩基性シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル)で精製し、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)(540 mg)を得た。

[0114] 製造例 2

窒素雰囲気下にて、氷冷下、7-トリデカノール(273 g)、9-ブロモノナン酸(324 g)、DMF(3.24 L)の混合物にDMAP(250 g)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(392 g)を順次加えた。その後、室温で3日間撹拌した。反応混合物を飽和塩化ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、氷の混液に加え、(ヘキサン/酢酸エチル)=(1:1)で抽出した。水層を(ヘキサン/酢酸エチル)=(1:1)で抽出し、合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した後、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製して9-クロロノナン酸トリデカン-7-イル(293

g)を得た。

[0115] 実施例 2

アルゴン雰囲気下にて、2-(4-アミノ-1-ピペリジニル)エタノール(175 mg)、9-クロロノナン酸トリデカン-7-イル(1.17 g)、ヨウ化カリウム(40 mg)、炭酸カリウム(402 mg)、DIPEA(415 μ L)、シクロペンチルメチルエーテル(5 mL)、アセトニトリル(5 mL)の混合物を、マイクロ波照射下、160°Cで12時間撹拌した。反応混合物中の不溶物を濾別し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(塩基性シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル)で粗精製した後、混合物の画分をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール)で精製して9,9'-[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン酸)ジ(トリデカン-7-イル)(141.8 mg)を得た。

[0116] 製造例 3

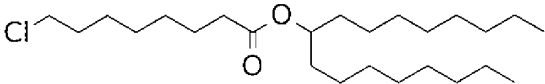
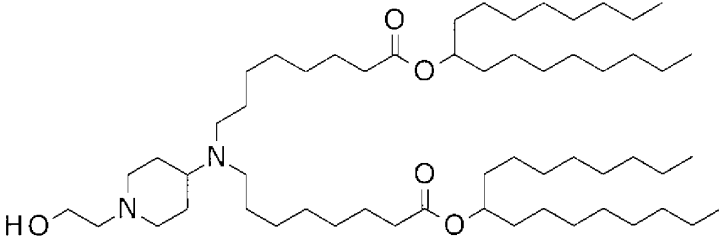
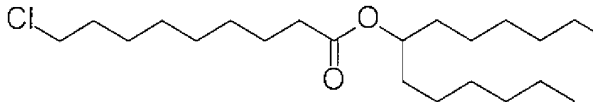
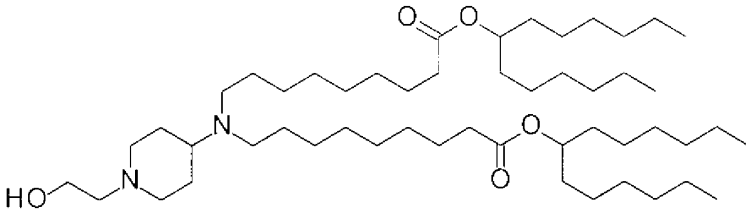
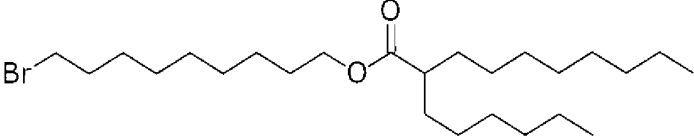
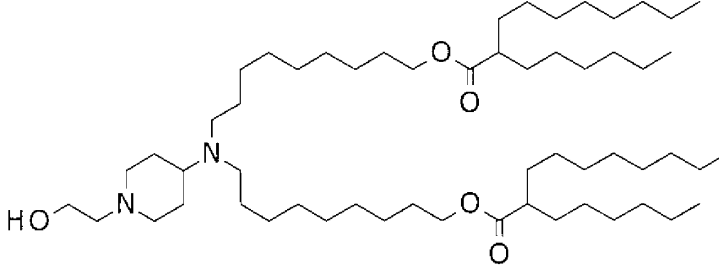
2-ヘキシルデカン酸(10 g)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(8.3 g)、9-ブロモ-1-ノナノール(16.5 g)、DMAP(0.96 g)、ジクロロメタン(200 mL)の混合物を室温で終夜撹拌した。反応混合物にジクロロメタンを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて分液した。有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製して2-ヘキシルデカン酸9-ブロモノニル(16.8 g)を得た。

[0117] 実施例 3

アルゴン雰囲気下にて、2-(4-アミノ-1-ピペリジニル)エタノール二塩酸塩(299 mg)、2-ヘキシルデカン酸9-ブロモノニル(1.41 g)、ヨウ化カリウム(46 mg)、炭酸カリウム(609 mg)、シクロペンチルメチルエーテル(0.7 mL)、アセトニトリル(0.7 mL)の混合物をマイクロ波照射下、120°Cにて6時間撹拌し、さらにマイクロ波照射下、100°Cにて10時間撹拌した。反応混合物をセライト濾過し、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラ

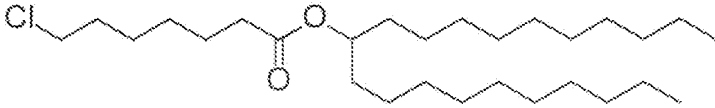
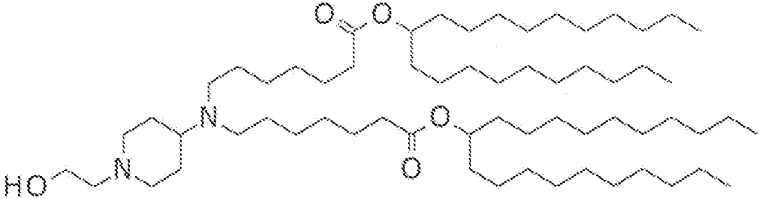
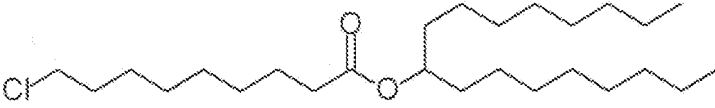
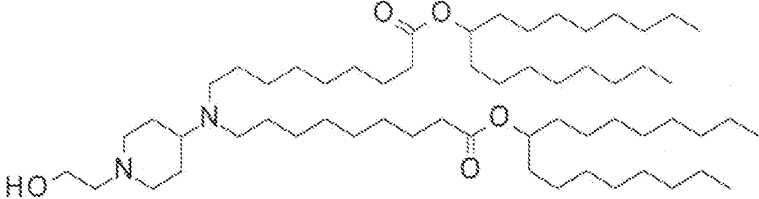
フィー(塩基性シリカゲル、ヘキサン／酢酸エチル)で精製してビス(2-ヘキシルデカン酸){[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン-9,1-ジイル)(348 mg)を得た。

[0118] [表5]

NUM	STR
PEx1	
Ex1	
PEx2	
Ex2	
PEx3	
Ex3	

[0119]

[表6]

NUM	STR
PEx4	
Ex4	
PEx5	
Ex5	

[0120]

[表7]

Num	REF	DAT
PEX1	PEX1	ESI+:440
Ex1	Ex1	ESI+:906 NMR:0.88(t,J=7.00Hz,12H),1.23-1.42(m,66H),1.45-1.74(m,14H),2.04(td, J=11.80,1.98Hz,2H),2.27(t,J=7.57Hz,4H),2.36-2.52(m,7H),2.94 (brd J= 11.47Hz, 2H),3.58(t,J=5.43Hz,2H),4.86(quin,J=6.23Hz,2H)
PEX2	PEX2	ESI+:397
Ex2	Ex2	ESI+:822 NMR:0.88(t,J=6.98Hz,12H),1.20-1.44(m,54H),1.46-1.75(m,14H),2.00-2.09 (m,2H),2.27(t,J=7.50Hz,4H),2.36-2.55(m,7H),2.95(brd,J=11.47Hz, 2H),3.59(t, J=5.43Hz,2H),4.87(quin,J=6.27Hz,2H)
PEX3	PEX3	ESI+:463
Ex3	Ex3	ESI+:906 NMR:0.88(td,J=7.00,1.30Hz,12H),1.15-1.79(m,80H),2.04(td,J=11.78, 1.99Hz, 2H),2.31(t,J=8.99,5.24Hz,2H),2.38-2.44(m,4H),2.45-2.53(m, 3H) ,2.95(brd, J=11.47Hz,2H),3.58(t,J=5.35Hz,2H),4.06(brd,J=6.68Hz, 4H)
PEX4	PEX1	ESI+:481
Ex4	Ex2	ESI+:990 NMR:0.89(t,J=6.90Hz,12H),1.19-1.75(m,88H),2.00-2.08(m,2H),2.28(t, J= 7.57Hz,4H),2.42(brt,J=7.34Hz,4H),2.51(t,J=5.43Hz,2H),2.96(brd,J= 11.63Hz, 2H),3.59 (t,J=5.43Hz,2H),4.87(quin,J=6.23Hz,2H)
PEX5	PEX1	ESI+:453
Ex5	Ex2	ESI+:934 NMR:0.89(t,J=6.93Hz,12H),1.17-1.80(m,96H),2.05(brt,J=11.09Hz,2H), 2.28 (t,J=7.57Hz,4H),2.42(brs,4H),2.51(t,J=5.35Hz,2H),2.96(brd,J= 11.47Hz, 2H), 3.59(t,J=5.35Hz,2H),4.87(quin,J=6.27Hz,2H)

[0121] 実施例 1 O 核酸脂質ナノ粒子の製造

(核酸脂質ナノ粒子の原料)

以下の核酸脂質ナノ粒子の調製において、以下の原料を用いた。すなわち、DSPCはNOF corporation社製(製品名:COATSOME(登録商標)MC-8080)、コレステロールは日本精化株式会社製(製品名:Cholesterol HP)、DMG-PEG2000はNOF corporation社製(SUNBRIGHT(登録商標)GM-020)、mRNAはTriLink BioTechnologies社製(製品名:CleanCap(登録商標)FLuc mRNAまたはCleanCap(登録商標)eGFP mRNA)であった。

[0122] (核酸脂質ナノ粒子の調製)

実施例1~5で得られたカチオン性脂質、DSPC、コレステロール、及びDMG-PEG2000を任意の脂質組成比およびN/P比でエタノールに溶解させ、油相を得た。mRNAを含む6.25mM 酢酸バッファー(pH5)、10mM クエン酸バッファー(pH4)

または10mM クエン酸バッファー(pH6)を水相とし、水相と油相の体積比が水相：油相=3：1となるようにマイクロ流体デバイス(NanoAssemblr, Precision NanoSystems社製)で混合し、混合液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈して核酸脂質ナノ粒子の分散液を得た。この分散液の透析または限外ろ過によりエタノールの除去を行った。続いて、限外ろ過により濃縮して任意の濃度に調製した。

なお、Ex1-L0～Ex5-L0およびEx1-L1～Ex1-L17は酢酸バッファーまたはクエン酸バッファーを用いて調製したものである。詳細を示すと、Ex1-L0～Ex3-L0において水相はFLuc mRNAを含む6.25mM 酢酸バッファー(pH5)を、油相はカチオン性脂質 | DSPC | コレステロール | DMG-PEG2000=50 | 10 | 38.5 | 1.5 (mol%)をN/P比=6となるように調製して核酸脂質ナノ粒子を調製した。Ex4-L0～Ex5-L0において水相はFLuc mRNAを含む10mM クエン酸バッファー(pH4)を、油相はカチオン性脂質 | DSPC | コレステロール | DMG-PEG2000=50 | 10 | 38.5 | 1.5 (mol%)をN/P比=6となるように調製して核酸脂質ナノ粒子を調製した。Ex1-L01において水相はFLuc mRNAを含む10mM クエン酸バッファー(pH6)を、油相はカチオン性脂質 | DSPC | コレステロール | DMG-PEG2000=50 | 10 | 38.5 | 1.5 (mol%)をN/P比=6となるように調製して核酸脂質ナノ粒子を調製した。Ex1-L1～Ex1-L17において水相はeGFP mRNAを含む10mM クエン酸バッファー(pH6)を、油相は以下の表の脂質組成比およびN/P比となるように調製して核酸脂質ナノ粒子を調製した。下記表のNUMに記載したEx1-L1～Ex1-L17とは、それぞれEx1-L1-eGFP mRNA～Ex1-L17-eGFP mRNAを示す。

[0123]

[表8]

NUM	脂質組成 (モル%)				N/P 比
	Ex1	DSPC	コレステロール	DMG-PEG2000	
Ex1-L1	50	10	38.5	1.5	6
Ex1-L2	20	16	62.5	1.5	6
Ex1-L3	25	15	58.5	1.5	6
Ex1-L4	30	14	54.5	1.5	6
Ex1-L5	35	13	50.5	1.5	6
Ex1-L6	40	12	46.5	1.5	6
Ex1-L7	60	8	30.5	1.5	6
Ex1-L8	70	6	22.5	1.5	6
Ex1-L9	40	0	58.5	1.5	6
Ex1-L10	40	5	53.5	1.5	6
Ex1-L11	40	12	47.5	0.5	6
Ex1-L12	40	12	47	1	6
Ex1-L13	40	12	46	2	6
Ex1-L14	40	12	45.5	2.5	6
Ex1-L15	40	12	45	3	6
Ex1-L16	50	10	38.5	1.5	12
Ex1-L17	40	12	46.5	1.5	12

[0124] Ex1-L1-eGFP mRNAについて試験例2で薬理評価し、その蛍光強度を基準1とした場合に、その蛍光強度が0.1以上、1.0以上である各構成成分の比率を算出した。その結果、Ex1の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、20.0～70.0モル%、35.0～70.0モル%であった。リン脂質の組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、0～16.0モル%、0～13.0モル%であった。ステロールの組成比が、脂質ナノ粒子の全量を基準として、22.5～62.5モル%、22.5～58.5モル%であった。PEG化脂質の組成比は、脂質ナノ粒子の全量を基準として、0.5～3.0モル%、1.0～2.5モル%であった。

[0125] (ND1核酸脂質ナノ粒子の原料)

ヒトND1をコードする2種のND1 mRNA((i)TriLink BioTechnologies社が提

供する5' UTR及び3' UTR、ヒトND1遺伝子のCDS(配列番号1)及び120塩基のポリA配列を含む塩基配列からなり、且つ5' キャップ構造がCap-1であるmRNA(以下「ND1-1」と称する)と、(ii)ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR、ヒト α グロビン遺伝子由来の3' UTR、ヒトND1遺伝子のCDS(配列番号3)及び79塩基のポリA配列を含む塩基配列(配列番号4)において全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されている塩基配列(配列番号5)からなり、且つ5' キャップ構造がCap-1であるmRNA(以下「ND1-2」と称する))を作製した(TriLink BioTechnologies社に委託)。なお、配列番号4又は配列番号5に示す塩基配列中、ヌクレオチド1～3位がAGG、4～43位が5' UTR、44～1114位がヒトNeuro D1遺伝子のCDS(配列番号3)、1115～1120位が連続する2つの終止コドン、1121～1231位が3' UTR、1232～1310位がポリA配列に相当する。コントロールとして、eGFP mRNA(TriLink BioTechnologies社、L-7601)を用いた。

[0126] (ND1核酸脂質ナノ粒子の調製)

カチオン性脂質であるEx1、DSPC、コレステロール、DMG-PEG2000をN/P比=6でエタノールに溶解させ、油相を得た。mRNAを含む10mM クエン酸バッファー(pH4または6)を水相とし、水相と油相の体積比が水相:油相=3:1となるようにマイクロ流体デバイス(NanoAssemblr、Precision NanoSystems社)で混合し、混合液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈して核酸脂質ナノ粒子の分散液を得た。この分散液の透析または限外ろ過によりエタノールの除去を行った。続いて、限外ろ過により濃縮して任意の濃度に調製した。

水相にクエン酸バッファー(pH4)を用いて、ND1-1を内包した脂質ナノ粒子Ex1-L1をEx1-L1-ND1-1と称し、水相にクエン酸バッファー(pH6)を用いてND1-2を内包した脂質ナノ粒子Ex1-L6をEx1-L6-ND1-2と称する。同様に、水相にクエン酸バッファー(pH4)を用いてeGFP mRNAを内包したEx1-L1に記載された脂質組成の脂質ナノ粒子をEx1-L1c-eGFP mRNAと称する。

[0127] (粒子径の測定)

核酸脂質ナノ粒子の粒子径は、核酸脂質ナノ粒子分散液について、粒子径測定装置(Zetasizer Nano ZSP、Malvern Panalytical社製)を用いて測定した。

。

[0128] (mRNAの内包率の評価)

核酸脂質ナノ粒子について、mRNA濃度がおよそ400～3500 ng/mLとなるように希釈した核酸脂質ナノ粒子分散液中のmRNAの内包率を測定した。具体的には、上記「(核酸脂質ナノ粒子の調製)」に従って得られたEx1-L0～Ex5-L0、Ex1-L1～Ex1-L17の核酸脂質ナノ粒子をTEバッファ(10 mM Tris/1 mM EDTA, pH 7.5～8.0)で希釈し、Quant-iT RiboGreen RNA Reagent(Thermo Fisher Scientific社製)を使用して測定したmRNA濃度(A)を、核酸脂質ナノ粒子外液に存在するmRNAとした。また、核酸脂質ナノ粒子を2% Triton X-100で希釈して測定したmRNA濃度(B)を組成物中の全mRNA濃度とした。続いて、次式(F1)により、mRNAの内包率を算出した。

$$\text{内包率(\%)} = 100 - (A/B) \times 100 \cdots (F1)$$

以下の表に、核酸脂質ナノ粒子の粒子径およびmRNAの内包率を示す。下記表のNUMに記載したEx1-L0～Ex5-L0とは、それぞれEx1-L0-FLuc mRNA～Ex5-L0-FLuc mRNAを示し、Ex1-L1～Ex1-L17とは、それぞれEx1-L1-eGFP mRNA～Ex1-L17-eGFP mRNAを示す。

[0129] [表9]

NUM	粒子径(nm)	内包率(%)
Ex1-L0	116.0	95.6
Ex2-L0	98.5	99.0
Ex3-L0	111.5	97.1
Ex4-L0	96.1	98.9
Ex5-L0	91.1	98.8

[0130]

[表10]

NUM	粒子径(nm)	内包率(%)
Ex1-L1	108.9	96.0
Ex1-L2	64.0	93.8
Ex1-L3	66.6	95.5
Ex1-L4	68.0	94.8
Ex1-L5	76.5	96.4
Ex1-L6	84.7	95.9
Ex1-L7	141.9	95.3
Ex1-L8	175.3	86.9
Ex1-L9	111.6	94.8
Ex1-L10	91.1	94.9
Ex1-L11	109.5	94.9
Ex1-L12	96.5	96.0
Ex1-L13	78.3	96.1
Ex1-L14	73.2	96.0
Ex1-L15	65.5	94.9
Ex1-L16	109.3	95.6
Ex1-L17	94.1	94.2

産業上の利用可能性

[0131] 式(I)の化合物又はその塩を用いて、脂質ナノ粒子を形成させることができ、そのような脂質ナノ粒子は、細胞、例えばアストロサイトに取り込まれる。このような式(I)の化合物又はその塩を用いて製造した脂質ナノ粒子を用いて、医薬組成物も製造できる。mRNA等を用いた脂質ナノ粒子及び医薬組成物は、アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用であると期待される。

配列表フリーテキスト

[0132] 配列番号1：ヒトNeuroD1遺伝子(CDS)

配列番号2：ヒトNeuroD1タンパク

配列番号3：ヒトNeuroD1遺伝子(CDS)

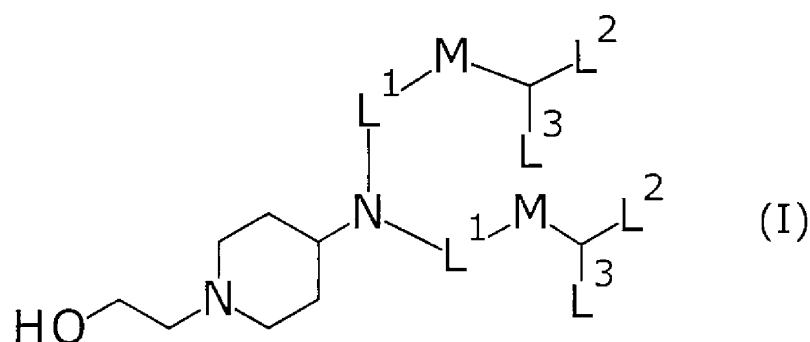
配列番号4：ヒトNeuroD1 mRNA配列(ND1-2)

配列番号5：修飾ヌクレオチドを含むヒトNeuroD1 mRNA配列(ND1-2)

請求の範囲

[請求項1] 式(I)の化合物又はその塩:

[化1]



(式中、

L^1 は、 C_{5-10} アルキレン、

L^2 及び L^3 は、それぞれ独立して、 C_{5-15} アルキル、

Mは、 $-C(=O)O-$ 、又は、 $-OC(=O)-$ である)。

[請求項2] 式(I)における L^1 が C_{6-9} アルキレンである、請求項1に記載の化合物又はその塩。

[請求項3] 式(I)における L^2 及び L^3 が、それぞれ独立して、 C_{6-10} アルキルである、請求項2に記載の化合物又はその塩。

[請求項4] 化合物が、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)、
9,9'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン酸)ジ(トリデカン-7-イル)、及び、
ビス(2-ヘキシルデカン酸){[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン-9,1-ジイル)からなる群より選択される、請求項3に記載の化合物又はその塩。

[請求項5] 化合物が、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)である請求項4

に記載の化合物又はその塩。

- [請求項6] 化合物が、9,9'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン酸)ジ(トリデカン-7-イル)である請求項4に記載の化合物又はその塩。
- [請求項7] 化合物が、ビス(2-ヘキシルデカン酸){[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン-9,1-ジイル)である請求項4に記載の化合物又はその塩。
- [請求項8] 請求項1に記載の化合物又はその塩を含む、脂質ナノ粒子。
- [請求項9] 請求項1に記載の化合物又はその塩、中性脂質及びPEG化脂質を含む、脂質ナノ粒子
- [請求項10] 核酸を内包する、請求項9に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項11] 核酸がmRNAである、請求項10に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項12] アストロサイト内においてタンパクを発現可能な請求項11に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項13] 核酸が、アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に有用な核酸である、請求項10に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項14] 核酸が、NeuroD1 タンパクをコードするmRNAであり、
請求項1に記載の化合物又はその塩が、8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)、9,9'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン酸)ジ(トリデカン-7-イル)、及び、ビス(2-ヘキシルデカン酸){[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン-9,1-ジイル)からなる群より選択される化合物又はその塩であり、
中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、
PEG化脂質がDMG-PEG2000である、請求項11に記載の脂質ナノ粒子。
- [請求項15] 核酸が、NeuroD1 タンパクをコードするmRNAであり、
請求項1に記載の化合物又はその塩が8,8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)、9,9'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン酸)ジ(トリデカン-7-イル)、及び、ビス(2-ヘキシルデカン酸){[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(ノナン-9,1-ジイル)からなる群より選択される化合物又はその塩であり、
中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、
PEG化脂質がDMG-PEG2000である、請求項11に記載の脂質ナノ粒子。

ル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩であり、

中性脂質がDSPC及びコレステロールであり、

PEG化脂質がDMG-PEG2000である、請求項14に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項16] 核酸が、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパクをコードする塩基配列を含むNeuroD1 タンパクをコードするmRNAである、請求項11又は15に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項17] 脂質ナノ粒子の全量を基準として、請求項1に記載の化合物又はその塩を20.0～70.0モル%、中性脂質を27.0～79.5モル%、PEG化脂質を0.5～3.0モル%、の組成比で含む、請求項11に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項18] 脂質ナノ粒子の全量を基準として、請求項1に記載の化合物又はその塩を35.0～70.0モル%、中性脂質を27.5～64.0モル%、PEG化脂質を1.0～2.5モル%、の組成比で含む、請求項11に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項19] 請求項8, 14又は15に記載の脂質ナノ粒子を含む、医薬組成物。

[請求項20] 請求項8, 14又は15に記載の脂質ナノ粒子、及び1以上の製薬学的に許容される医薬品添加物を含む医薬組成物。

[請求項21] アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療のための請求項19又は20に記載の医薬組成物。

[請求項22] アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療用医薬組成物の製造のための請求項8, 14又は15に記載の式(I)の化合物又はその塩を含む脂質ナノ粒子の使用。

[請求項23] アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療に使用するための式(I)の化合物又はその塩を含む請求項8, 14又は15に記載の脂質ナノ粒子。

[請求項24] アストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療のための式(I)の化合物又はその塩を含む請求項8, 14又は15に記載の脂質ナノ粒子の使用。

[請求項25] 式(I)の化合物又はその塩を含む請求項8, 14又は15に記載の脂質ナノ粒子。

ノ粒子の有効量を対象に投与することからなるアストロサイトの関連する疾患の予防及び／又は治療方法。