

明 細 書

発明の名称：

体内動態が改善されたCD1dリガンド化合物含有リポソーム製剤

技術分野

[0001] 本発明は、体内動態が改善されたCD1dリガンド化合物含有リポソーム製剤に関する。より詳細には、本発明は、粒子径を均一に調整することにより、体内動態が改善されたCD1dリガンド化合物含有リポソーム製剤に関する。

背景技術

[0002] 移植片対宿主病（GVHD）は同種異系造血幹細胞移植に伴う合併症のひとつであり、ドナー由来のリンパ球が受容者の臓器を異物とみなして攻撃する疾患である。移植による血液提供者の免疫機構が、受血者の全身組織を攻撃、破壊する疾患で、移植前期の急性GVHDと移植後期の慢性GVHDがある。またGVHDは輸血によっても発症することが知られている。

[0003] CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T細胞（Treg）は、中枢及び末梢での免疫寛容を維持するキープレイヤーだと考えられている。動物実験により、この細胞が自己抗原はもちろんアロ抗原に対する免疫寛容を復元することにより、自己免疫疾患や移植片拒絶等のT細胞媒介疾患を予防又は改善することが示されてきた。ヒト及びマウスの両方における試験において、GVHDの制御におけるTregsの極めて重要な役割が実証されている。しかしながらこの細胞集団が少数であることから、Tregを基礎とする治療様式の開発は妨げられてきた。機能的なTregsを生体内で効率的に増やす分子の発見はGVHDのみならず他の免疫疾患を治療するための新規治療法の開発に寄与し得る。In situにおいてTregsを活性化し増やす多様な戦略が登場しつつある。

[0004] α -ガラクトシルセラミド（ α -GalCer）は、抗原提示細胞上に発現するCD1d分子のリガンドとして機能している。CD1d分子は、脂質抗原の提示のために採用された抗原結合性の溝を有する非多型の腫瘍組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI様抗原提示分子である。樹状細胞（DCs）、マクロファージ、及びB細

胞等の多様な細胞種上に発現したCD1d分子に α -GalCerが提示されると、インバリアントNKT (iNKT) 細胞上に発現したインバリアントT細胞 (TCR) により認識され、CD1d拘束的にiNKT細胞を活性化する。CD1d拘束的なiNKT細胞活性化は、Th1及びTh2サイトカインの両方の速やかで大量の放出をきたし、これはiNKT細胞を従来のT細胞から区別し、自然免疫及び獲得免疫の両方における重要な免疫制御機能を示唆するユニークな特徴である。KRN7000 ((2S, 3S, 4R)-1-o-(α -D-ガラクトピラノシル)-2-(N-ヘキセコサノイルアミノ)-1, 3, 4-オクタデカントリオール) は、元々海綿から発見された α -GalCerの合成誘導体である。

[0005] KRN7000は水性形態では免疫刺激剤として作用することが示されてきたが、KRN7000のリポソーム製剤は抗原特異的な免疫抑制又は寛容を誘導することが見出された(特許文献1、非特許文献1、2)。以前の試験において、リポソーム化KRN7000により異なる細胞を標的化すると、異なる免疫調節性反応がもたらされることが示唆された。即ち、水性のKRN7000は主にDCsに提示され、その結果、DCsにより分泌されたIL-12の存在中でiNKT細胞を刺激した。対照的に、リポソーム化KRN7000は主にB細胞上に提示され、iNKT細胞との相互作用により、iNKT細胞及びB細胞の両方からのIL-10の産生が誘導され、免疫寛容性のDCsの増殖が引き起こされた(非特許文献1)。その後、モデル抗原であるオボアルブミンの存在中で抗原特異的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の産生誘導が認められた(非特許文献1、2)。リポソームの脂質組成は、B細胞によるリポソーム化KRN7000の取り込みを増強し、その結果免疫反応が寛容性の方向へと歪められたと考えられた。

[0006] 本発明者らは、リポソーム化KRN7000 (RGI-2001)が、Treg誘導を通して、アロ抗原特異的寛容を誘導できることを示した(非特許文献3)。マウス急性GVHDモデルにおいて、RGI-2001の単回投与によりマウスの生存が顕著に延長した。ドナー由来のCD4⁺Foxp3⁺ Tregsの強化された増殖が鍵となるメカニズムであることが分かった。骨髓移植(BMT)後早期に宿主アロ抗原特異的免疫抑制が誘導されたが、第三者のアロ抗原や白血球細胞への応答は抑制されな

かった。さらにRGI-2001はマウス慢性GVHDモデルにおいても症状の軽減効果が認められたことから、これらの結果から、RGI-2001が急性GVHDと慢性GVHDの両方を予防する新たな治療法となり得ることが示された（非特許文献4）。

[0007] RGI-2001のGVHDへの適用可能性は、ヒトの臨床試験においても確認されている（非特許文献5）。同種異系造血幹細胞移植を受けた29名の患者の治療において、day 0でRGI-2001を単回静脈内投与する第1/2a相臨床試験を行った。RGI-2001により治療された何人かの患者において、移植後1～3週間以内に、Tregs（CD4+CD25+CD127^{lo}Foxp3⁺）の数が著しく上昇した。Tregs数の増加を伴う応答のある患者においては、非応答者と比較してGVHDがより強く低下した。

[0008] RGI-2001の臓器移植への適用可能性が、マウス心臓移植モデルにおいて確認されている（非特許文献6、7）。レシピエントマウスに亜致死量の放射線を照射後、ドナーマウスの脾臓細胞と骨髄細胞を移植する際に、RGI-2001とCD40-CD40L遮断抗体を同時投与することにより、レシピエントマウスに骨髄キメラが成立し、ドナー由来心臓や皮膚の拒絶抑制が長期間維持された。

[0009] 特許文献2には、中空糸透析カラムを用いて透析する工程において、簡易に透析後の被透析液（例えば、リポソーム液）の濃度を制御し、所望の濃度を有する被透析液（例えば、リポソーム液）を得ることのできるリポソーム製造技術が開示されている。

[0010] 特許文献3には、脂質を溶解したアルコール含有溶液を、脂質粒子が不安定化するアルコール濃度で1次希釈を行った後、さらに2次希釈を行うことで安定化した粒子を得て、ここで、1次希釈から2次希釈までの保持時間を調整することにより、均一な粒度分布を保ったまま脂質粒子の粒子径を制御することが可能な、脂質粒子の製造技術が開示されている。

[0011] 非特許文献8には、PET技術を用いて様々な粒子径のリポソームの体内動態を解析した結果が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1 : W02005/120574 A1

特許文献2 : W02016/024510 A1

特許文献3 : W02019/088193 A1

非特許文献

[0013] 非特許文献1 : Tamura Y et al., Biochem Biophys Res Commun 369: 485-492, 2008

非特許文献2 : Ishii Y et al., Front Biosci 13: 6214-6228, 2008

非特許文献3 : Duramad O et al., Biol Blood Marrow Transplant 17: 1154-1168, 2011

非特許文献4 : Du Jing et al., Blood 129: 3121-3125, 2017

非特許文献5 : Chen YB et al., Biol Blood Marrow Transplant 23: 625-634, 2017

非特許文献6 : Hirai et al., Am J Transplant 14: 1154-1168, 2014

非特許文献7 : Hirai et al., Am J Transplant 16: 426-439, 2016

非特許文献8 : Oku, N et al., Biochim. Biophys. Acta, 1238:86-90, 1995

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 上述の通り、GVHD予防を目的とするリポソーム化KRN7000の第1/2a相臨床試験においては、顕著な治療的応答を示す患者が認められた一方で、十分な応答が見出せない患者も認められた。そこで、その原因について検討したところ、薬物動態が不安定であり、血漿中KRN7000濃度が投与直後から低値で、その後一旦は上昇するが再度低下することが分かった。この結果から、リポソーム化KRN7000の薬効を十分に発揮させるためには投与直後から長期間の血中滞留が重要であり、第1/2a相臨床試験で用いた製剤（RGI-2001-001）はその条件を満たしていない可能性が示唆された。

[0015] 本発明は、長期間の血中滞留が可能で、高い血中 CD1dリガンド濃度を長い期間維持することが可能な、CD1dリガンド含有リポソーム製剤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

[0016] 本発明者らは上記課題を解決するべく鋭意検討したところ、血中動態の不安定性の要因が第1/2a相臨床試験に使用したリポソームの粒子径にあることをつきとめた。第1/2a相臨床試験に使用したリポソーム化KRN7000製剤（RGI-2001-001）中のリポソームの平均粒子径は約120 nmであったが、KRN7000含有量及び脂質組成をRGI-2001-001から変えずに、平均粒子径を100 nm前後に収束させたリポソーム製剤（RGI-2001-003）を新たに調製し、造血幹細胞移植後患者に静脈内投与すると、驚くべきことに、薬物動態が改善され、KRN7000の最高血中濃度を上昇させ、血中半減期を伸ばすことに成功した。これらの製剤をマウスへ静脈内投与し、血漿中のIFN- γ 及びIL-4濃度を測定したところ、IL-4はRGI-2001-001投与群よりもRGI-2001-003投与群で高かったが、IFN- γ はRGI-2001-001投与群よりもむしろRGI-2001-003投与群で低く、RGI-2001-003がより効果的にTregを誘導する特性を有する可能性が示された。本発明者らは、これらの知見に基づき、更に検討を進め、本発明を完成した。

[0017] 即ち、本発明は以下に関する。

[1] CD1dリガンド化合物を含有するリポソームの集団を含むリポソーム製剤であって、該リポソームの集団の平均粒子径が90～110 nmであり、粒子径分布の多分散度が0.2以下である、リポソーム製剤。

[2] 平均粒子径が92.9～101.0 nmである、[1] のリポソーム製剤。

[3] 粒子径分布の多分散度が0.133以下である、[1] 又は [2] のリポソーム製剤。

[4] 粒子径が50 nm未満のリポソームの数が該リポソームの集団の全体の10%以下である、[1] ～ [3] のいずれかのリポソーム製剤。

[5] 粒子径が450 nm超のリポソームの数が該リポソームの集団の全体の10%以下である、[1] ～ [4] のいずれかのリポソーム製剤。

[6] 温度25℃、相対湿度60%RHの条件にて、平均粒子径が90～110 nmで少なくとも1ヶ月間維持される、[1] ～ [5] のいずれかのリポソーム製剤。

[7] CD1dリガンド化合物が α -ガラクトシルセラミドである、[1] ～ [6]

のいずれかのリポソーム製剤。

[8] α -ガラクトシルセラミドが(2S, 3S, 4R)-1-o-(α -D-ガラクトピラノシル)-2-(N-ヘキセコサノイルアミノ)-1, 3, 4-オクタデカントリオールである、[7] のリポソーム製剤。

[9] 該リポソームの集団がリポソーム懸濁液として含まれる、[1] ~ [8] のいずれかのリポソーム製剤。

[10] リポソーム懸濁液のpHが5.8~6.8である、[9] のリポソーム製剤。

[11] 該リポソームの集団が凍結乾燥物として含まれる、[1] ~ [8] のいずれかのリポソーム製剤。

[12] 注射投与用である、[1] ~ [11] のいずれかのリポソーム製剤。

[13] 移植片対宿主病の予防又は治療用である、[1] ~ [12] のいずれかのリポソーム製剤。

[14] 移植片対宿主病が同種異系造血幹細胞移植により引き起こされたものである、[13] のリポソーム製剤。

[15] 臓器移植拒絶の予防又は治療用である、[1] ~ [12] のいずれかのリポソーム製剤。

[16] 臓器移植が同種異系臓器又は細胞の移植である、[15] のリポソーム製剤。

[17] 臓器移植が異種臓器又は細胞の移植である、[15] のリポソーム製剤。

[18] 移植片対宿主病の発症リスクを有する対象に、[1] ~ [12] のいずれかのリポソーム製剤の有効量を投与することを含む、該対象における移植片対宿主病の発症リスクを低減する方法。

[19] 移植片対宿主病の発症リスクを有する対象が、同種異系の組織又は細胞の移植を受けた対象、或いは同種異系の組織又は細胞の移植を受けることが予定されている対象である、[18] の方法。

[20] 移植片対宿主病を発症した対象に、[1] ~ [12] のいずれかのリポソーム製剤の有効量を投与することを含む、該対象における移植片対宿主病の

治療方法。

[21] 移植片対宿主病が同種異系造血幹細胞移植により引き起こされたものである、[18] ～ [20] のいずれかの方法。

[22] 臓器移植拒絶の発症リスクを有する対象に、[1] ～ [12] のいずれかのリポソーム製剤の有効量を投与することを含む、該対象における臓器移植拒絶の発症リスクを低減する方法。

[23] 臓器移植拒絶の発症リスクを有する対象が、同種異系又は異種の臓器又は細胞の移植を受けた対象、或いは同種異系又は異種の臓器又は細胞の移植を受けることが予定されている対象である、[22] の方法。

[24] 臓器移植拒絶を発症した対象に、[1] ～ [12] のいずれかのリポソーム製剤の有効量を投与することを含む、該対象における臓器移植拒絶の治療方法。

[25] 臓器移植が同種異系臓器又は細胞の移植である、[22] ～ [24] のいずれかの方法。

[26] 臓器移植が異種臓器又は細胞の移植である、[22] ～ [24] のいずれかの方法。

[27] 移植片対宿主病の予防又は治療において使用するための、[1] ～ [12] のいずれかのリポソーム製剤。

[28] 移植片対宿主病が同種異系造血幹細胞移植により引き起こされたものである、[27] のリポソーム製剤。

[29] 臓器移植拒絶の予防又は治療において使用するための、[1] ～ [12] のいずれかのリポソーム製剤。

[30] 臓器移植が同種異系臓器又は細胞の移植である、[29] のリポソーム製剤。

[31] 臓器移植が異種臓器又は細胞の移植である、[29] のリポソーム製剤。

[32] 移植片対宿主病の予防又は治療用医薬の製造における、[1] ～ [12] のいずれかのリポソーム製剤の使用。

[33] 移植片対宿主病が同種異系造血幹細胞移植により引き起こされたものである、[32]の使用。

[34] 臓器移植拒絶の予防又は治療用医薬の製造における、[1]～[12]のいずれかのリポソーム製剤の使用。

[35] 臓器移植が同種異系臓器又は細胞の移植である、[34]の使用。

[36] 臓器移植が異種臓器又は細胞の移植である、[34]の使用。

発明の効果

[0018] 本発明により、長期間の血中滞留が可能で、高い血中CD1dリガンド濃度を長い期間維持することが可能な、CD1dリガンド含有リポソーム製剤が提供される。本発明のリポソーム製剤は、効果的にTregを誘導し得るので、GVHD、臓器移植拒絶、自己免疫疾患等に対する優れた予防又は治療効果が期待できる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図1は、造血幹細胞移植後、RGI-2001を投与した患者における血中KRN7000濃度の推移を示す。

[図2]図2は、RGI-2001を投与したマウスの血中IFN- γ 及びIL-4濃度を示す。

[図3]図3は、RGI-2001を投与したマウスの血中IL-10濃度を示す。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明は、CD1dリガンド化合物を含有するリポソームの集団を含む、リポソーム製剤（本発明のリポソーム製剤）を提供するものである。

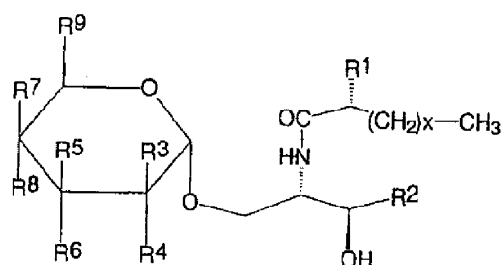
[0021] 「リポソーム製剤」とは、リポソームに封入した有効成分を含有する医薬組成物を意味する。

[0022] 「リポソームの集団」とは、複数のリポソームの集合をいう。本発明のリポソームの集団を構成するリポソームの数は、通常 10^3 以上（例えば、 10^4 以上、 10^5 以上、 10^6 以上、 10^7 以上、 10^8 以上、 10^9 以上、 10^{10} 以上、 10^{11} 以上、 10^{12} 以上）である。本発明のリポソームの集団を構成するリポソームの数の上限値は特に限定されないが、例えば、 10^{21} 以下、 10^{20} 以下、 10^{19} 以下、 10^{18} 以下、 10^{17} 以下、 10^{16} 以下であってもよい。

[0023] 「CD1dリガンド化合物」とは、抗原提示細胞（樹状細胞（DCs）、マクロファージ、B細胞等）上に発現したCD1d分子上に提示されたときに、インバリアントNKT（iNKT）細胞上のインバリアントT細胞受容体（NKT細胞受容体）により認識され、CD1d拘束的にiNKT細胞を活性化する化合物をいう。本発明において使用することのできるCD1dリガンド化合物としては、例えば、 α -グリコシルセラミド、イソグロボトリヘキソシルセラミド（Science, 306, p.1786-1789, 2004）、OCH（Nature 413:531, 2001）等を挙げることができるが、これらに限定されない。 α -グリコシルセラミドは、ガラクトース、グルコースなどの糖類とセラミドとが α 配位にて結合したスフィンゴ糖脂質である。糖部分がガラクトースである α -グリコシルセラミドを α -ガラクトシルセラミドという。 α -グリコシルセラミドとしては、W093/05055、W094/02168、W094/09020、W094/24142、W098/44928、Science, 278, p.1626-1629, 1997 等に開示されているものを挙げることができるが、これらに限定されない。

[0024] α -グリコシルセラミドとしては、例えば下記の式（I）の化合物またはその塩もしくは溶媒和物を挙げることができる。

[0025] [化1]



(I)

[0026] （上記式中、 R^1 はHまたはOHであり、
 X は7～27のいずれかの整数であり、
 R^2 は下記（a）～（e）からなる群から選択される置換基であり（ここで、 Y は5～17のいずれかの整数である）、
 （a） $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_Y\text{CH}_3$ 、

(b) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}_3$ 、

(c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、

(d) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}_3$ 、

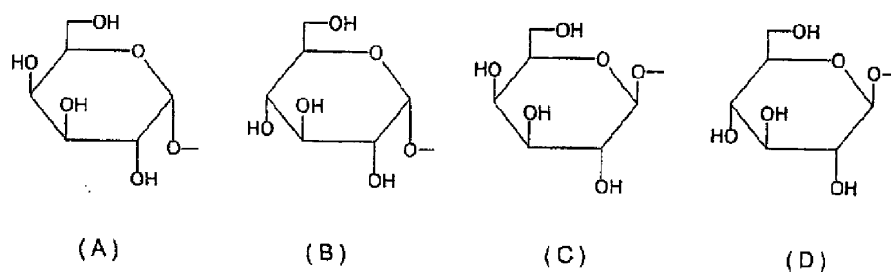
(e) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_\gamma\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、そして

$\text{R}^3 \sim \text{R}^9$ は下記のi) またはii) で定義される置換基である：

i) R^3 、 R^6 、および R^8 がHのとき

R^4 はH、OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 、または下記基 (A) ~ (D)：

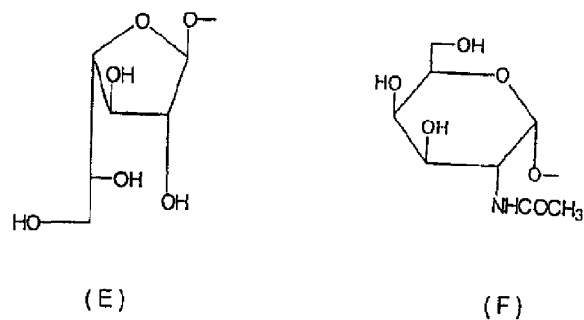
[0027] [化2]



[0028] からなる群から選択される置換基であり、

R^5 はOH、または下記基 (E) および (F)：

[0029] [化3]

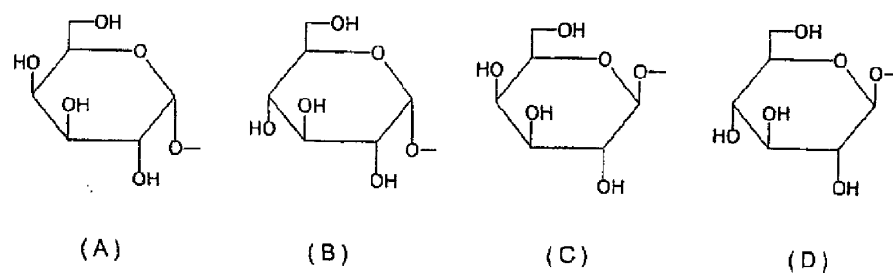


[0030] からなる群から選択される置換基であり、

R^7 は、OHまたは下記基 (A) ~ (D)：

[0031]

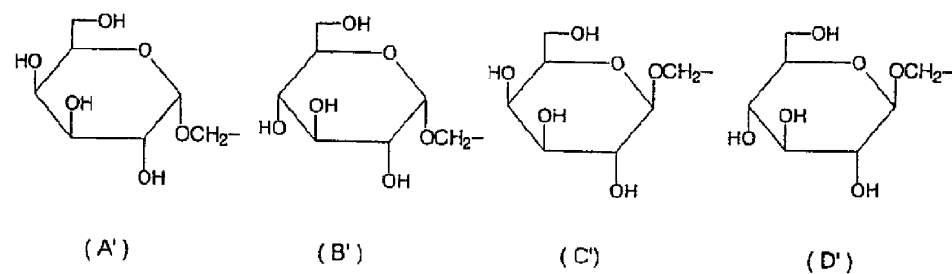
[化4]



[0032] かなる群から選択される置換基であり、

 R^9 はH、 CH_3 、 CH_2OH 、または下記基 (A') ~ (D') :

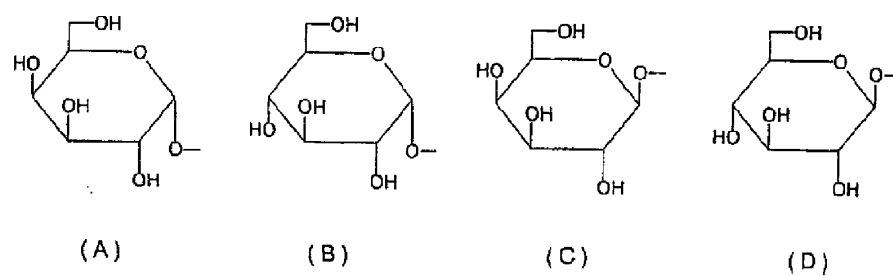
[0033] [化5]



[0034] かなる群から選択される置換基である ;

ii) R^3 、 R^6 および R^7 がHのとき R^4 はH、OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 、または下記基 (A) ~ (D) :

[0035] [化6]

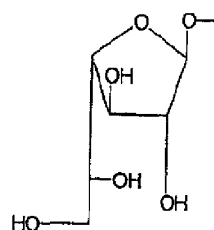


[0036] かなる群から選択される置換基であり、

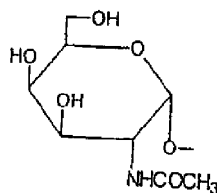
 R^5 はOH、または下記基 (E) および (F) :

[0037]

[化7]



(E)

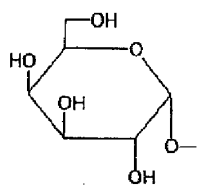


(F)

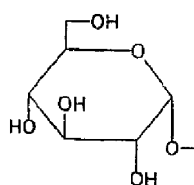
[0038] からなる群から選択される置換基であり、

 R^8 はOH、または下記基 (A) ~ (D) :

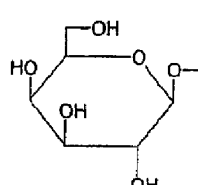
[0039] [化8]



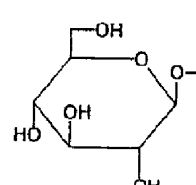
(A)



(B)



(C)

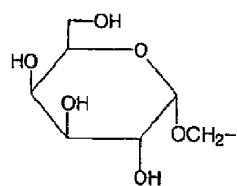


(D)

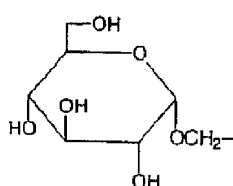
[0040] からなる群から選択される置換基であり、

 R^9 はH、 CH_3 、 CH_2OH または下記基 (A') ~ (D') :

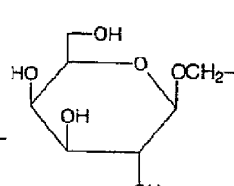
[0041] [化9]



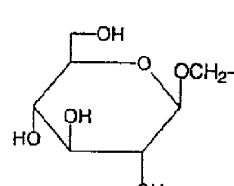
(A')



(B')



(C')



(D')

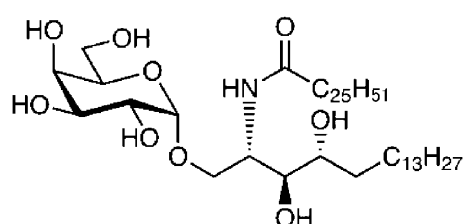
[0042] からなる群から選択される置換基である。)

[0043] α -ガラクトシルセラミドとしては、 R^3 、 R^6 及び R^8 がHであり、 R^4 、 R^5 及び R^7 がOHであり、 R^9 が CH_2OH である、上記式 (I) 化合物またはその塩もしくは溶媒和

物を挙げるができる。

[0044] α -ガラクトシルセラミドは、好ましくは、(2S, 3S, 4R)-1-o-(α -D-ガラクトピラノシル)-2-(N-ヘキサコサノイルアミノ)-1, 3, 4-オクタデカントリオール ((2S, 3S, 4R)-1-O-(α -D-ガラクトシル)-N-ヘキサコサノイル-2-アミノ-1, 3, 4-オクタデカントリオール、又はKRN7000ともいう。) である。KRN7000は、以下の化学構造を有する。

[0045] [化10]



[0046] 本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団は、平均粒子径が90～110 nmであり、且つ粒子径分布の多分散度 (PdI) が0.2以下であることを特徴とする。本発明は、KRN7000含有リポソームの粒子径を100 nm前後に収束させると、患者に投与されたりポソームの薬物動態が改善され、KRN7000の最高血中濃度が上昇し及び血中半減期が伸びるとの知見に基づくものである。本発明のリポソームの集団の平均粒子径は、90 nm以上（好ましくは、91.0 nm以上、92.0 nm以上、92.5 nm以上、92.9 nm以上、93.0 nm以上、93.1 nm以上、93.5 nm以上、94.0 nm以上、94.5 nm以上、94.6 nm以上、95.0 nm以上、95.5 nm以上、95.7 nm以上、95.8 nm以上、95.9 nm以上、96.0 nm以上、又は96.2 nm以上）であり得る。本発明のリポソームの集団の平均粒子径は、110 nm以下（好ましくは、109.0 nm以下、108.5 nm以下、108.0 nm以下、107.5 nm以下、107.0 nm以下、106.5 nm以下、106.0 nm以下、105.5 nm以下、105.0 nm以下、104.5 nm以下、104.0 nm以下、103.5 nm以下、103.0 nm以下、102.5 nm以下、102.0 nm以下、101.5 nm以下、101.0 nm以下）であり得る。一態様において、本発明のリポソームの集団の平均粒子径は、92.9～101.0 nm、93.1～101.0 nm、93.5～101.0 nm、94.6～101.0 nm、95.7～101.0 nm、95.8～10

1.0 nm、95.9～101.0 nmであり得る。

[0047] 本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団は、その粒子径に関して均質であり、粒子径分布の多分散度が0.2以下（好ましくは、0.190以下、0.180以下、0.170以下、0.160以下、0.150以下、0.140以下、0.135以下、0.133以下、0.130以下、0.127以下、0.125以下、0.124以下、0.120以下、0.116以下、0.115以下、0.112以下、0.110以下、0.105以下、0.102以下）であり得る。

[0048] 本明細書において「粒子径」とは、当該分野において使用される通常の意味で用いられる通り、粒子の大きさを表すために使用される尺度であり、粒子を完全な球体と仮定した場合に、その直径に相当する便宜的な値である。本明細書において「平均粒子径」とは、数平均粒径またはZ-平均粒子径のいずれを指す場合にも使用され得るが、特に断らなければ、測定した粒子径から算出されるZ-平均粒子径を指す。本明細書において「粒子径分布」とは、当該分野において使用される通常の意味で用いられ、粒子の大きさの広がり指す。粒子径分布を表す尺度として多分散度（PDI）が使用される。リポソームの集団の平均粒子径、及び粒子径分布の多分散度は、Malvern社ZetaSizer Nano ZSを用いて、DLS（動的光散乱、後方散乱）により測定することができる（例えば、試験例5の条件1）。必要に応じ製剤をPBS（Ca²⁺不含）で希釈してもよい。

[0049] 好ましい態様において、本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団においては、粒子径が50 nm未満のリポソームの数が全体の10%以下（例えば、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下）にとどまる。

[0050] 好ましい態様において、本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団においては、粒子径が450 nm超のリポソームの数が全体の10%以下（例えば、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下）にとどまる。

[0051] 本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団を構成するリポソームは、CD1dリガンド化合物（例、KRN7000）を必須の構成成分として含む。CD

1dリガンド化合物の含有量は、本発明のリポソーム製剤を対象哺乳動物に投与したときに、該対象哺乳動物内のiNKT細胞を活性化する量である限り、特に限定されない。本発明のリポソームの集団を構成するリポソーム中のCD1dリガンド化合物（例、KRN7000）の含有量（重量）は、該リポソームを形成するCD1dリガンド化合物以外の成分（即ち脂質）の総重量の、例えば1～21%（w/w）、好ましくは5～15%（w/w）、より好ましくは7～13%（w/w）、更に好ましくは9～11%（w/w）（ $10 \pm 1\%$ （w/w））であり得る。尚、本明細書において、「リポソームを形成する成分」とは、特に断りのない限り、リポソームを形成する脂質二重膜の構成成分及びリポソームに内封されたCD1dリガンド化合物を意味し、これ以外のリポソームの内水相及び外水相中の成分はこれに含まれない。

[0052] リポソームを形成するCD1dリガンド化合物以外の成分は、ミセルを形成できる両親媒性分子であれば如何なるものであってもよく、好ましくは脂質が挙げられる。脂質としては、例えば、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)]ナトリウム塩（DOPG-Na）、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-Na）等のリン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等があり、これらを単独または二種以上、あるいはコレステロール等の非極性物質やポリエチレングリコール等の水溶性高分子が脂質に結合した脂質誘導体等と組み合わせてリポソームの作製に使用される。一態様において、本発明のリポソームの集団を構成するリポソームは、CD1dリガンド化合物に加えて、

1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、

1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)]ナトリウム塩（DOPG-Na）、

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-Na)、及び
コレステロール (Cho)
を含む。

- [0053] 本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団を構成するリポソームが、DOPC、DOPG-Na、DPPC、DPPG-Na及びChoを含む場合、その構成比は、特に限定されないが、DOPC : DOPG-Na : DPPC : DPPG-Na : Choのモル比が、好ましくは、 $15 \pm 6 : 15 \pm 6 : 15 \pm 6 : 15 \pm 6 : 40 \pm 16$ 、より好ましくは、 $15 \pm 3 : 15 \pm 3 : 15 \pm 3 : 15 \pm 3 : 40 \pm 8$ 、更に好ましくは、 $15 \pm 1.5 : 15 \pm 1.5 : 15 \pm 1.5 : 15 \pm 1.5 : 40 \pm 4$ である。

- [0054] 一態様において、本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団を構成するリポソームは、脂質二重膜形成成分として、CD1dリガンド化合物（例、KRN7000）、DOPC、DOPG-Na、DPPC、DPPG-Na及びChoを含む。一態様において、本発明のリポソームの集団を構成するリポソームの脂質二重膜形成成分は、CD1dリガンド化合物（例、KRN7000）、DOPC、DOPG-Na、DPPC、DPPG-Na及びChoからなる。これらの態様において、各成分の相対含有量（重量）は、好ましくは、以下の通りである。

KRN7000 : 5.0 ± 0.5

DOPC : 9.6 ± 2.4

DOPG-Na : 9.7 ± 2.4

DPPC : 9.0 ± 2.3

DPPG-Na : 9.1 ± 2.3

Cho : 12.6 ± 3.2

- [0055] リポソームの構造は、脂質二重層膜構造を持つ小水泡体（ベシクル）となったものであれば特に限定されず、ユニラメラ、マルチラメラなどいかなるリポソームであってもよい。

- [0056] リポソームの内部に内包される溶液（内部溶液）としては、水のほか、緩衝液、生理食塩水などを用いることができる。これらに水溶性有機溶媒（例えばグリセリンなど）を適宜の量加えて用いることも可能である。リポソーム

の内部溶液には、浸透圧調整剤、安定化剤、酸化防止剤、pH調整剤などの添加剤が含まれていてもよい。

[0057] 浸透圧調整剤としては、特に限定されないが、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウムのような無機塩類、グリセロール、マンニトール、ソルビトールのようなポリオール類、グルコース、フルクトース、ラクトース、マルトースまたはスクロースのような糖類が挙げられる。

[0058] 安定化剤としては、特に限定されないが、例えば、グリセロール、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、またはスクロースのような糖類、コレステロールなどのステロールが挙げられる。

[0059] 酸化防止剤としては、特に限定されないが、例えば、アスコルビン酸、尿酸、トコフェロール同族体（例えば、ビタミンE）が挙げられる。なお、トコフェロールには、 α 、 β 、 γ 、 δ の4個の異性体が存在するが本発明においてはいずれも使用できる。

[0060] pH調整剤としては、任意の塩基性または酸性化合物、例えば、水酸化ナトリウム、クエン酸、酢酸、トリエタノールアミン、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、L-ヒスチジン及びその塩酸塩などが挙げられる。

[0061] リポソームの内部溶液は、好ましくは、浸透圧調整剤及びpH調整剤を含む緩衝水溶液である。浸透圧調整剤は、好ましくはスクロース又はマルトースであり、より好ましくはスクロースである。pH調整剤は、好ましくはL-ヒスチジン及びその塩酸塩である。リポソームの内部溶液はヒト体液（血漿）と等張又は略等張（例、 285 ± 50 mOsm/L）となるように調整することが好ましい。浸透圧調整剤としてスクロースを用いる場合、リポソームの内部溶液のスクロース濃度は、例えば、 $9.0 \sim 11.0$ (10.0 ± 1.0) % (w/v) 程度である。浸透圧調整剤としてマルトースを用いる場合、リポソームの内部溶液のマルトース濃度は、例えば、 $9.0 \sim 11.0$ (10.0 ± 1.0) % (w/v) 程度である。リポソームの内部溶液のpHは、例えば $5.3 \sim 7.3$ (6.3 ± 1.0) であり、好ましくは $5.8 \sim 6.8$ (6.3 ± 0.5) に調整される。一態様において、リポソームの内部溶液は、

スクロース、L-ヒスチジン及びL-ヒスチジン塩酸塩を含むpH 5.8~6.8 (6.3 ± 0.5) のヒト体液（血漿）と等張又は略等張（例、 285 ± 50 mOsm/L）の緩衝水溶液であり、スクロース濃度は、好ましくは9.0~11.0 (10.0 ± 1.0) % (w/v) である。一態様において、リポソームの内部溶液は、マルトース、L-ヒスチジン及びL-ヒスチジン塩酸塩を含むpH 5.8~6.8 (6.3 ± 0.5) のヒト体液（血漿）と等張又は略等張（例、 285 ± 50 mOsm/L）の緩衝水溶液であり、マルトース濃度は、好ましくは9.0~11.0 (10.0 ± 1.0) % (w/v) である。

[0062] 本発明のリポソーム製剤は、公知のリポソーム製造技術を用いて調製することができる。例えば、Liposome Technology, vol. 1, 2nd edition (by Gregory Gregoriadis (CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo), Chapter 4, pp67- 80, Chapter 10, pp167- 184 and Chapter 17, PP261-276 (1993))等に記載された方法を用いることができる。より具体的には、超音波処理法、エタノール注入法、フレンチプレス法、エーテル注入法、コール酸法、カルシウム融合法、凍結融解法、逆相蒸発法等が挙げられるが、これに限られるものではない。WO 2016/024510やWO 2019/088193等に記載されたインラインリポソーム製造技術を用いることにより、閉鎖された細管内で連続的に本発明のリポソームの集団を調製することも出来る。

[0063] 均一な粒子径のリポソームの集団を製造する観点から、本発明のリポソーム製剤は、WO 2019/088193に記載された方法に準じて製造することが好ましい。本発明はこのような本発明のリポソーム製剤の製造方法をも提供する。

[0064] 本発明の製造方法は、例えば、以下の工程を含む。

- A) 第1の混合領域内で、CD1dリガンド（例、KRN7000）、脂質およびアルコールを含む第1の溶液と、水を含む第2の溶液とを混合して一次希釈溶液を調製する工程；
- B) 該一次希釈溶液を、送液管を通して該第1の混合領域から第2の混合領域へと所定の時間で送液する工程；
- C) 該第2の混合領域内で、該一次希釈溶液と、水を含む第3の溶液とを混合して二次希釈溶液を調製する工程；

D) 二次希釈溶液を、送液管を通して第2の混合領域から第3の混合領域へと所定の時間で送液する工程；及び

E) 第3の混合領域内で、二次希釈溶液と、水を含む第4の溶液（第1、第2および第3の溶液のいずれかと同様に定義され得る）とを混合して三次希釈溶液を調製する工程。

ここで、製造されるリポソームの集団の平均粒子径は、該一次希釈溶液中の該アルコールの濃度、該脂質の濃度、該所定の時間、および該混合時の温度からなる群より選択される少なくとも1つの条件を調整することによって、上述の所望の範囲（代表的には、平均粒子径が90～110 nmであり、且つ粒子径分布の多分散度（PdI）が0.2以下）に制御される。

1つの実施形態では、CD1dリガンド（例、KRN7000）、脂質およびアルコールを含む溶液の調製において、CD1dリガンド（例、KRN7000）及び脂質をアルコールに溶解する工程が含まれ得る。溶解の際には加温してもよい。

[0065] 一次希釈溶液中のアルコールの濃度、脂質の濃度、送液の所定の時間、および混合時の温度の少なくとも1つを調整することで、リポソームの集団の平均粒子径を調節できる。アルコールの濃度を段階的に調節することで、リポソームの集団の平均粒子径を微細に調節することができる。また、アルコールの濃度を段階的に調節し、その上で、送液の所定の時間することで、所望の平均粒子径を有するリポソームの集団を製造できる。その際、その粒子径の粒度分布が製薬レベルとしても通用する程度に狭いものであることが達成され得る。さらに、混合時の温度を調節することで、リポソームの集団の平均粒子径をさらに詳細に調整することができる。

[0066] 第1の溶液に含まれる脂質としては、本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団を構成するリポソームを形成するCD1dリガンド化合物以外の成分として、上記したものを使用することが出来る。一態様において、第1の溶液に含まれる脂質は、DOPC、DOPG-Na、DPPC、DPPG-Na及びChoを含む。一態様において、第1の溶液に含まれる脂質は、DOPC、DOPG-Na、DPPC、DPPG-Na及びChoからなる。第1の溶液が、DOPC、DOPG-Na、DPPC、DPPG-Na及びChoを含む

場合、その構成比は、特に限定されないが、DOPC : DOPG-Na : DPPC : DPPG-Na : Choのモル比が、

好ましくは、 $15 \pm 6 : 15 \pm 6 : 15 \pm 6 : 15 \pm 6 : 40 \pm 16$ 、

より好ましくは、 $15 \pm 3 : 15 \pm 3 : 15 \pm 3 : 15 \pm 3 : 40 \pm 8$ 、

更に好ましくは、 $15 \pm 1.5 : 15 \pm 1.5 : 15 \pm 1.5 : 15 \pm 1.5 : 40 \pm 4$ である。

第1の溶液中のCD1dリガンド化合物（例、KRN7000）の含有量（重量）は、リポソームを形成するCD1dリガンド化合物（例、KRN7000）以外の成分（即ち脂質）の総重量の、例えば1～21%（w/w）、好ましくは5～15%（w/w）、より好ましくは7～13%（w/w）、更に好ましくは9～11%（w/w）（ $10 \pm 1\%$ （w/w））であり得る。

- [0067] 一態様において、第1の溶液は、アルコール以外の成分として、CD1dリガンド化合物（例、KRN7000）、DOPC、DOPG-Na、DPPC、DPPG-Na及びChoを含む。一態様において、第1の溶液のアルコール以外の成分が、CD1dリガンド化合物（例、KRN7000）、DOPC、DOPG-Na、DPPC、DPPG-Na及びChoからなる。これらの態様において、各成分の相対含有量（重量）は、好ましくは、以下の通りである。

CD1dリガンド化合物（例、KRN7000） : 5.0 ± 0.5

DOPC : 9.6 ± 2.4

DOPG-Na : 9.7 ± 2.4

DPPC : 9.0 ± 2.3

DPPG-Na : 9.1 ± 2.3

Cho : 12.6 ± 3.2

- [0068] 第1の溶液に含まれるアルコールは、1～6個の炭素原子を含む一価または二価のアルコールを含む。あるいは、第1の溶液に含まれるアルコールは、一価または二価のアルコールを含む。別の実施形態では、第1の溶液に含まれるアルコールは、一価のアルコールを含む。特定の実施形態では、第1の溶液に含まれるアルコールは、1～3個の炭素原子を含む一価のアルコールを含む。具体的な実施形態では、第1の溶液に含まれるアルコールは、メタノール、エタ

ノールまたはイソプロピルアルコール、あるいはそれらの組合せを含む。好ましくは、第1の溶液に含まれるアルコールはエタノールである。

[0069] 1つの実施形態では、第2の溶液および／または第3の溶液は、第1の溶液に含まれるアルコールを第1の溶液より低濃度で含んでもよい。

[0070] 第1の溶液、第2の溶液および第3の溶液を含め、本発明の製造方法において使用する溶液には、水およびアルコール以外の溶媒が含まれていてもよい。このような溶媒の例は、W0 2019/088193に記載の通りである。

[0071] 第1の溶液、第2の溶液および第3の溶液を含め、本発明の製造方法において使用される任意の溶液には、必要に応じて、浸透圧調整剤、安定化剤、酸化防止剤、pH調整剤などの添加剤が含まれていてもよい。浸透圧調整剤、安定化剤、酸化防止剤、pH調整剤などの添加剤の例は、上述の通りである。

[0072] 第2の溶液および第3の溶液は、好ましくは、緩衝水溶液である。第2の溶液および第3の溶液は、好ましくは浸透圧調整剤及びpH調整剤を含む。浸透圧調整剤は、好ましくはスクロースである。pH調整剤は、好ましくはL-ヒスチジン及びその塩酸塩である。第2の溶液および第3の溶液は、ヒト体液（血漿）と等張又は略等張（例、 285 ± 50 mOsm/L）となるように調整することが好ましい。浸透圧調整剤としてスクロースを用いる場合、リポソームの内部溶液のスクロース濃度は、例えば、 $9.0 \sim 11.0$ (10.0 ± 1.0) % (w/v) 程度である。浸透圧調整剤としてマルトースを用いる場合、リポソームの内部溶液のマルトース濃度は、例えば、 $9.0 \sim 11.0$ (10.0 ± 1.0) % (w/v) 程度である。一態様において、第2の溶液および第3の溶液は、スクロース、L-ヒスチジン及びL-ヒスチジン塩酸塩を含むヒト体液（血漿）と等張又は略等張（例、 285 ± 50 mOsm/L）の緩衝水溶液であり、スクロース濃度は、好ましくは $9.0 \sim 11.0$ (10.0 ± 1.0) % (w/v) である。一態様において、第2の溶液および第3の溶液は、マルトース、L-ヒスチジン及びL-ヒスチジン塩酸塩を含むヒト体液（血漿）と等張又は略等張（例、 285 ± 50 mOsm/L）の緩衝水溶液であり、マルトース濃度は、好ましくは $9.0 \sim 11.0$ (10.0 ± 1.0) % (w/v) である。一態様において、第2の溶液および第3の溶液のpHは、例えば $5.3 \sim 7.3$ (6.3 ± 1.0)、好ましく

は5.8～6.8 (6.3 ± 0.5) である。一態様において、第1の溶液、第2の溶液および第3の溶液を含め、本発明の製造方法において使用される水を含む任意の溶液のpHは例えば5.3～7.3 (6.3 ± 1.0)、好ましくは5.8～6.8 (6.3 ± 0.5) である。このようにすることにより、最終的に得られる本発明のリポソームの集団の懸濁液やリポソームの内部溶液のpHを例えば5.3～7.3 (6.3 ± 1.0)、好ましくは5.8～6.8 (6.3 ± 0.5) に調整することができる。

[0073] 一次希釈溶液中のアルコール濃度（重量%）が特定の値（「流動性変動点」とも呼ぶ）以上に調整されている場合、リポソームの集団の平均粒子径は経時的に変化する状態になり、逆に流動性変動点未満のアルコール濃度ではリポソームの粒子径がほとんど変化しない。1つの実施形態では、流動性変動点は、リポソームの組成、温度および圧力によって変動し得る。1つの実施形態では、流動性変動点は、一次希釈溶液中のアルコールの種類によって変動し得る。1つの実施形態では、流動性変動点は、リポソームの組成、温度および圧力によって変動し得る。1つの実施形態では、流動性変動点は、一次希釈溶液中のアルコールの種類が同じであれば、リポソームの組成および／またはリポソームに担持させる薬物の有無で変動しない。

[0074] 1つの実施形態では、一次希釈溶液を、送液管を通して該第1の混合領域から第2の混合領域へと所定の時間で送液する工程において、一次希釈溶液中のアルコール濃度が流動性変動点以上となるように、アルコール濃度及び温度が調整される。例えば、送液管を $85 \pm 5^\circ\text{C}$ に加熱する。更に、二次希釈溶液を、送液管を通して第2の混合領域から第3の混合領域へと所定の時間で送液する工程においては、二次希釈溶液中のアルコール濃度が流動性変動点以下または流動性変動点未満となるように、アルコール濃度及び温度が調整される。例えば、送液管を $20 \pm 5^\circ\text{C}$ に設定する。即ち、一次希釈溶液を、送液管を通して該第1の混合領域から第2の混合領域へと所定の時間で送液する工程は、一次希釈溶液中の脂質の相転移温度以上で実施し、二次希釈溶液を、送液管を通して第2の混合領域から第3の混合領域へと所定の時間で送液する工程は、二次希釈溶液の相転移温度未満で実施する。このように反応条件を制御す

ることにより、一次希釈溶液中では、リポソームまたはその膜が不安定化し、相転移温度以上の加温で脂質の流動性が高まるため、ブラウン運動等により互いに接触した際に融合を起こす頻度が高まる。そのため、時間経過とともに生成したリポソーム同士の融合が均一に進み、一定の粒度分布を維持したまま粒子径が大きくなる。一方、二次希釈溶液中では、相転移温度未満に調整することで、一次希釈溶液中で制御されたリポソームの粒子径分布が変化しないように固定される。

[0075] 工程B及び工程Dにおける送液管としては、ステンレス製キャピラリーチューブ（SSCT）を用いることができ、インラインミキサーで反応液を混合してもよい。

[0076] 1つの実施形態では、一次希釈溶液が第1の混合領域から第2の混合領域に到達するまでの所定の時間（保持時間）（ある場合には、二次希釈溶液が第2の混合領域から第3の混合領域に到達するまでの所定の時間）を調整することで、リポソームの集団の平均粒子径を上述の所望の範囲（代表的には、平均粒子径が90～110 nmであり、且つ粒子径分布の多分散度（PdI）が0.2以下）に制御し得る。1つの実施形態では、一次希釈溶液が第1の混合領域から第2の混合領域に到達するまでに送液管内に保持される所定の時間（ある場合には、二次希釈溶液が第2の混合領域から第3の混合領域に到達するまでに送液管内に保持される時間）は、混合領域間の流路の長さおよび流速の少なくとも1つによって制御される。1つの実施形態では、一次希釈溶液が第1の混合領域から第2の混合領域に到達するまでに送液管内に保持される時間は、第1の混合領域と第2の混合領域との間の流速によって制御される。

[0077] その他、本発明の製造方法の各工程における温度、一次希釈溶液に含まれる脂質濃度、各工程における圧力等を制御することによっても、リポソームの集団の平均粒子径を上述の所望の範囲（代表的には、平均粒子径が90～110 nmであり、且つ粒子径分布の多分散度（PdI）が0.2以下）に制御し得る。

[0078] 1つの実施形態では、本発明の製造方法は、リポソームの集団を作製した後、に溶液の組成を調整する工程を含む。1つの実施形態では、本発明の製造方法

は、リポソームの集団を作製した後にリポソーム濃度を調整する工程を含む。溶液の組成を調整する工程と、リポソーム濃度を調整する工程とは、同時に実施されてもよいし、別々に実施されてもよい。例えば、国際公開第2016/024510号に開示されるように中空糸膜カラムを使用することで溶液の組成を調整する工程およびリポソーム濃度を調整する工程を同時に実施することができる。作製されたりポソームの集団を含む溶液中のリポソーム濃度および溶液組成を調整する手段として、限外濾過および透析などが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、この工程により、作製されたりポソームの集団を含む溶液（リポソーム懸濁液）のpHを5.3～7.3（ 6.3 ± 1.0 ）、好ましくは5.8～6.8（ 6.3 ± 0.5 ）に調整する。

[0079] 1つの実施形態では、本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団を構成するリポソームの表面は、修飾剤で修飾されていてもよい。修飾剤として、例えばポリエチレングリコール（PEG）、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、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタアクリルアミド、ポリメタアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタアクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリアスパルトアミド、合成ポリアミノ酸およびこれらの誘導体などが挙げられるがこれらに限定されない。リポソームは、PEGまたはPEG誘導体で修飾されることで、血中に長時間滞留し易くなり得る。また、特定の組織と親和性である標的化分子（例えば、抗体）でリポソームを修飾することにより、リポソームが標的組織に到達され易くなり得る。1つの実施形態において、本発明のリポソーム製剤に含まれるリポソームの集団を構成するリポソームの表面は、修飾剤で修飾されていない。

[0080] 一態様において、本発明のリポソーム製剤は、安定であり、温度25℃、相

対湿度60%RHの条件（加速試験条件）において、該製剤に含まれるリポソームの集団の平均粒子径が90～110 nm（好ましくは、92.9～101.0 nm、93.1～101.0 nm、93.5～101.0 nm、94.6～101.0 nm、95.7～101.0 nm、95.8～101.0 nm、95.9～101.0 nm）で少なくとも1ヶ月間（例えば、2ヶ月以上、3ヶ月以上、又は6ヶ月以上）維持される。

[0081] 本発明のリポソーム製剤は、どのような形態で提供されてもよく、例えば、リポソームの集団が水性溶媒中に懸濁されたりポソーム懸濁液（即ち、懸濁剤）として、或いは凍結乾燥された固体の状態（即ち、凍結乾燥製剤）として提供されてもよい。

[0082] 一態様において、該リポソームの集団はリポソーム懸濁液として本発明のリポソーム製剤に含まれる。即ち、本発明のリポソーム製剤は、懸濁液製剤として提供され得る（本発明のリポソーム懸濁液製剤という。）。本発明のリポソーム懸濁液製剤は、水性溶媒中に懸濁された上述したリポソームの集団を含む。本発明のリポソーム懸濁液製剤は、CD1dリガンド含有リポソームの集団をヒト等の対象へ注射により投与するために好適に用いられる。水性溶媒としては、特に限定されないが、水、水と水溶性有機溶媒との混合溶媒が挙げられる。水溶性有機溶媒としては、特に限定されないが、アルコールが挙げられる。アルコールは、好ましくは、1～6個（好ましくは1～3個）の炭素原子を含む一価または二価のアルコールである。アルコールとしては、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、あるいはそれらの組合せを挙げることができる。アルコールは、好ましくは、エタノールである。水性溶媒は、好ましくは水である。

[0083] 水性溶媒には、必要に応じて、浸透圧調整剤、安定化剤、酸化防止剤、pH調整剤などの医薬的に許容可能な添加剤が含まれていてもよい。

[0084] 浸透圧調整剤としては、特に限定されないが、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウムのような無機塩類、グリセロール、マンニトール、ソルビトールのようなポリオール類、グルコース、フルクトース、ラクトース、マルト

ースまたはスクロースのような糖類が挙げられる。

[0085] 安定化剤としては、特に限定されないが、例えば、グリセロール、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、またはスクロースのような糖類、コレステロールなどのステロールが挙げられる。

[0086] 酸化防止剤としては、特に限定されないが、例えば、アスコルビン酸、尿酸、トコフェロール同族体（例えば、ビタミンE）が挙げられる。なお、トコフェロールには、 α 、 β 、 γ 、 δ の4個の異性体が存在するが本発明においてはいずれも使用できる。

[0087] pH調整剤としては、任意の塩基性または酸性化合物、例えば、水酸化ナトリウム、クエン酸、酢酸、トリエタノールアミン、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、L-ヒスチジン及びその塩酸塩などが挙げられる。

[0088] 水性溶媒は、好ましくは、浸透圧調整剤及びpH調整剤を含む緩衝水溶液である。浸透圧調整剤は、好ましくはスクロース又はマルトースであり、より好ましくはスクロースである。pH調整剤は、好ましくはL-ヒスチジン及びその塩酸塩である。

[0089] 水性溶媒には、上記の添加剤の他、無痛化剤、防腐剤等の添加剤を必要に応じて添加することができる。

[0090] 無痛化剤としては、例えば、グルコース、ベンジルアルコール、塩酸メピバカイン、塩酸キシロカイン、塩酸プロカイン、塩酸カルボカイン等が挙げられる。

[0091] 防腐剤としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

[0092] 本発明のリポソーム懸濁液製剤を凍結乾燥させて凍結乾燥製剤を調製する場合においては、リポソームの凝集や融合、或いは脂質膜の崩壊を抑制するため、水性溶媒に凍結保護剤を添加することが好ましい。凍結保護剤としては、ラクトース、グルコース、マンノース、マルトース、ガラクトース、フルクトース、ソルボース、ラフィノース、ノイラミン酸、グルコサミン、ガ

ラクトサミン、N-メチルグルコサミン、マンニトール、ソルビトール、トレハロース、スクロース等の糖類、グリシン、アラニン、リジン、アルギニン等のアミノ酸、グリセリン、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、デキストラン等を挙げることができる。

- [0093] スクロース等の糖類は、1つの成分で、浸透圧調整剤、安定化剤、及び凍結保護剤を含む多様な機能を有するので、水性溶媒は、好ましくはスクロース等の糖類を含有する。
- [0094] 水性溶媒（即ち、リポソーム懸濁液）はヒト体液（血漿）と等張又は略等張（例、 285 ± 100 mOsm/L）となるように調整することが好ましい。浸透圧調整剤としてスクロースを用いる場合、水性溶媒のスクロース濃度は、 $9.0 \sim 11.0$ (10.0 ± 1.0) % (w/v) 程度とすることが好ましい。
- [0095] 水性溶媒（即ち、リポソーム懸濁液）のpHは、例えば $5.3 \sim 7.3$ (6.3 ± 1.0) であり、好ましくは $5.8 \sim 6.8$ (6.3 ± 0.5) に調整される。一態様において、水性溶媒は、スクロース、L-ヒスチジン及びL-ヒスチジン塩酸塩を含むpH $5.8 \sim 6.8$ (6.3 ± 0.5) のヒト体液（血漿）と等張又は略等張（例、 285 ± 50 mOsm/L）の緩衝水溶液であり、スクロース濃度は、好ましくは $9.0 \sim 11.0$ (10.0 ± 1.0) % (w/v) である。一例として、L-ヒスチジン（15mM）、L-ヒスチジン塩酸塩（5mM）及びスクロース（10.0% (w/v)）を含む緩衝水溶液の浸透圧の理論値は 311.6 mOsm/Lである。
- [0096] 本発明のリポソーム懸濁液製剤中に含まれる、CD1dリガンド化合物含有リポソームの含有量は、特に限定されないが、例えば、CD1dリガンド化合物（例、KRN7000）濃度として、 $0.01 \sim 100$ mg/ml、好ましくは $0.5 \sim 50$ mg/ml、より好ましくは $1.0 \sim 10$ mg/ml（例、 $4.5 \sim 5.5$ (5.0 ± 0.5) mg/ml）である。
- [0097] 一態様において、該リポソームの集団が凍結乾燥物として本発明のリポソーム製剤に含まれる。即ち、本発明のリポソーム製剤は、凍結乾燥製剤として提供され得る（本発明のリポソーム凍結乾燥製剤という。）。本発明の凍結乾燥物は、水性溶媒中に懸濁された上述したリポソームの集団（即ち、上述の本発明のリポソーム懸濁液製剤）を凍結乾燥工程に付すことにより得る

ことができる。

[0098] 例えば、本発明のリポソーム懸濁液をバイアル等の容器に小分け充填した後、 $-20\sim-80^{\circ}\text{C}$ 程度の温度にて凍結させることにより、凍結組成物を得て、その凍結組成物を減圧条件（例、 10Pa 以下）に付して水を昇華させることにより、本発明のリポソーム凍結乾燥製剤を得ることが出来る。凍結乾燥時のリポソームの凝集や融合、或いは脂質膜の崩壊を抑制するため、リポソーム懸濁液には、上述の凍結保護剤を添加することが好ましい。

[0099] 本発明のリポソーム凍結乾燥製剤を水性溶媒（例、水）で分散することにより、上述の条件を満たす本発明のリポソーム懸濁液製剤が再構成され得る。再構成された本発明のリポソーム懸濁液製剤が投与に供される。

[0100] 本明細書において、凍結乾燥製剤に含まれるリポソームの集団の平均粒子径及び粒子径分布の多分散度は、該凍結乾燥製剤を水性溶媒（例、水）で分散して再構成することにより得られる懸濁液製剤に含まれるリポソームの集団の平均粒子径及び粒子径分布の多分散度を意味する。

[0101] 本発明のリポソーム製剤は、経口又は非経口のいずれでも投与可能であるが、特に注射により投与した際の生体内の薬物動態が改善されており、従来の製剤と比較してCD1dリガンド化合物（例、KRN7000）の最高血中濃度が上昇し及び血中半減期が伸びているため、注射投与用に好適に用いられる。本発明のリポソーム製剤は、例えば、静脈内注射投与用、筋肉内注射投与用、皮内注射投与用、皮下注射投与用又は臓器内注射投与用として用いることができ、静脈内注射投与用として用いることが好ましい。

[0102] 本発明のリポソーム製剤を注射投与用製剤として用いる場合、これを容器に充填した態様で保存・使用することができる。容器は、密閉容器であることが望ましい。密閉容器の形態としては、アンプル、バイアルあるいはバッグ等が挙げられる。容器の材質としては、ガラス、プラスチック等が挙げられる。本発明のリポソーム製剤をアンプルやバイアル等の容器に充填する場合、容器空間の気相部を不活性ガスで置換してもよい。不活性ガスの好ましい例としては窒素を挙げることができる。例えば、1つの容器につき、1回注

射投与用量のCD1dリガンド化合物（例、KRN7000）を含有するリポソームが充填される。例えば、CD1dリガンド化合物としてKRN7000を用いる場合、1つの容器につきKRN7000として0.5～100mg（例、 5.0 ± 0.5 mg、 11.5 ± 0.5 mg）が含まれるように、本発明のリポソーム製剤が容器へ充填される。

[0103] 本発明のリポソーム製剤は、生体内の薬物動態が改善されており、従来の製剤と比較してCD1dリガンド化合物（例、KRN7000）の最高血中濃度が上昇し及び血中半減期が伸びている。また、本発明のリポソーム製剤は、IL-4誘導能が高い一方でIFN- γ 誘導能が低く、効果的にTregを誘導し得るので、優れた免疫抑制又は免疫寛容誘導効果が期待できる。従って、本発明のリポソーム製剤は、移植片対宿主病（GVHD）、臓器移植拒絶、自己免疫疾患等の予防又は治療に有用である。自己免疫疾患としては、特に限定されないが、例えば全身性エリテマトーデス、強皮症、多発動脈炎、重症筋無力症、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、1型糖尿病、関節リウマチ、シェーグレン症候群、ANCA関連血管炎、高安病、ベーチェット病、成人still病、再発性多発性軟骨炎、IgA血管炎、リウマチ性多発性筋痛症、抗リン脂質抗体症候群、強直性脊椎炎、川崎病、クローン病、潰瘍性大腸炎、尋常性乾癬、類天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、特発性間質性肺炎等が挙げられる。

[0104] 本発明のリポソーム製剤の有効量を、これらを必要としている対象（例、ヒト）に投与することにより、該対象における該対象におけるGVHD、臓器移植拒絶、自己免疫疾患等の発症を予防したり、GVHD、臓器移植拒絶、自己免疫疾患等を治療したりすることが出来る。GVHDを予防又は治療する場合、これらを必要としている対象としては、同種異系の組織（骨髄、血液等）や細胞（造血幹細胞等）の移植を既に受け、現時点ではGVHDを発症していないものの、将来GVHDを発症するリスクが高いヒト、同種異系の組織（骨髄、血液等）や細胞（造血幹細胞等）の移植を受けていて、GVHDを発症したヒト、同種異系の組織（骨髄、血液等）や細胞（造血幹細胞等）の移植を受けることが予定されているヒト等が挙げられる。臓器移植拒絶を予防又は治療する場合、これらを必要としている対象としては、同種異系又は異種の臓器や細胞

の移植を既に受け、現時点では拒絶反応を発症していないものの、将来拒絶反応を発症するリスクが高いヒト、同種異系又は異種の組織や細胞の移植を受けていて、拒絶反応を発症したヒト、同種異系又は異種の組織や細胞の移植を受けることが予定されているヒト等が挙げられる。本発明は、GVHD、臓器移植拒絶、自己免疫疾患等の予防又は治療において用いるための、本発明のリボソーム製剤を提供する。一態様において、GVHDは、同種異系造血幹細胞移植により引き起こされたものであり得る。

[0105] 本明細書において、「有効量」とは、対象に目的とする効果（例、治療効果）をもたらす量を意味し、例えば、この量を投与された対象において、この量を投与されなかった対象と比較して、疾患の症状または状態が緩和され、軽減され、若しくは除去され、またはその進展が遅延若しくは抑制されることを意味する。有効量は、医師が対象の年齢、体重、性別および症状の重さなどに応じて適宜決定することができる。

[0106] 本明細書において「予防」とは、ある疾患または障害（例えば、GVHD、臓器移植拒絶）について、そのような状態になる前に、そのような状態にならないようにすること、そのような状態になるリスクを低減させること、又はそのような状態が緩和され、軽減されるようにすることをいう。

[0107] 刊行物、特許文献等を含む、本明細書に引用されたすべての参考文献は、引用により、それらが個々に具体的に参考として援用されかつその内容全体が具体的に記載されているのと同程度まで、本明細書に援用される。

[0108] 以下に、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。

実施例

[0109] [試験例1] 比較製剤（以下、RGI-2001-001と称する。）の製造及び安定性の評価

RGI-2001-001の製造工程を以下に記載する。

工程1：RGI-2001-001中間体（KRN7000/脂質混合物の凍結乾燥物）

工程1a) 90 % (重量/重量) tert-ブタノール溶液の調製

注射用水をビーカーに入れ55～60℃に熱した。tert-ブタノールをホットプレート上で攪拌しながら溶解した。tert-ブタノールをパイロジェンフリーのガラス容器（Pyrex）に注ぎ入れ、最終濃度が90%（重量/重量）になるように注射用水を添加して、55～60℃に熱しながら10±5分間攪拌した。

[0110] 工程1b) 脂質混合物の溶解

以下の脂質；

1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）、

1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)]ナトリウム塩（DOPG-Na）、

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-Na）、及び

コレステロール

を含む脂質混合物（モル比15:15:15:15:40）に最終濃度が100 g/Lになるようにtert-ブタノールを添加し、45±5℃で透明になるまで攪拌した。

[0111] 工程1c) KRN7000/シクロヘキサン溶液の調製

KRN7000（(2S, 3S, 4R)-1-o-(α -D-ガラクトピラノシル)-2-(N-ヘキセコサノイルアミノ)-1,3,4-オクタデカントリオール）（レグイミューン社製）の粉末をパイロジェンフリーガラス容器（Pyrex）に秤量し、最終濃度 10g/Lになるようにシクロヘキサンを添加した。溶液は47±1℃で20±5分間攪拌した。

[0112] 工程1d) KRN7000/脂質混合物溶液の調製

脂質混合物溶液をKRN7000/シクロヘキサン溶液に添加し、47±1℃で透明になるまで攪拌することによりKRN7000/脂質混合物溶液を得た。

[0113] 工程1e) 凍結乾燥

KRN7000/脂質混合物溶液を入れたガラス容器をドライアイス/アセトン槽内で慎重に回転させて均一に容器内壁に凍結させた。凍結後ガラス容器はドライアイスに最低1時間（最長24時間以内）に静置した。KRN7000/脂質混合物を凍結させたガラス容器を凍結乾燥器に装着し、以下の工程を進めた。

- ・ 製造物の温度センサーが -40°C 以下に達した後、最低 2 ± 0.5 時間凍結させた。
- ・ 凍結完了後、凍結した製造物の温度を -40°C 以下に維持した。
- ・ 真空度を250ミクロン以下に設定した。
- ・ 棚温度を 6 ± 0.5 時間以上かけて -40°C 以下から $-35 \pm 3^{\circ}\text{C}$ まで上昇させた。
- ・ 棚温度を $-35 \pm 3^{\circ}\text{C}$ で 12 ± 0.5 時間維持した。
- ・ 棚温度を 4 ± 0.5 時間以上かけて $-35 \pm 3^{\circ}\text{C}$ から $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ まで上昇させた。
- ・ 製造物の温度センサーをソレノイド型ブリードバルブが無効になるまで $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ で 12 ± 0.5 時間維持した。
- ・ 真空度が最高に達した後は、製造物を $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ で最低83時間維持した。
- ・ 凍結乾燥が完了し、チャンバー内圧が大気圧に達した後速やかに製造物が入ったガラス容器をキャップで密封し、 -20°C に保管した。
- ・ 凍結乾燥製造物の総重量がKRN7000/脂質混合物の総重量の102%以上の場合には、さらに $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ で24時間の凍結乾燥を実施した。

[0114] 工程2 : RGI-2001-001原薬の製造

工程2a) 製剤用緩衝液の調製

注射用水にショ糖を最終濃度10%、L-ヒスチジンを最終濃度15 mM、L-ヒスチジン塩酸塩水和物を最終濃度5 mMになるように添加した後15分間攪拌し、最終pH 6.5 ± 0.2 に調整した。次の工程の前に得られた緩衝液を滅菌フィルター（ポアサイズ $0.2 \mu\text{m}$ ）へ通した。

[0115] 工程2b) RGI-2001-001中間体の水和

凍結保管したRGI-2001-001中間体（KRN7000/脂質混合物）を室温に戻し30分放置した。使用する製剤用緩衝液の量を、緩衝液密度（1.04 g/mL）と最終溶液密度（0.055 g/mL）から換算した。製剤用緩衝液をRGI-2001-001中間体が入ったガラス容器に無菌条件下で添加し、 $30-45^{\circ}\text{C}$ で完全に水和するまで約60分間攪拌した。

[0116] 工程2c) 高圧エクストルージョン

水和されたRGI-2001-001中間体溶液を無菌条件下に目標圧力（600 psiを超

えない) 200-300 psiでポリカーボネイト膜フィルター (ポアサイズ0.2 μm) を装着したエクストルーダーを5回通過させた。次に、得られたろ液を、ポリカーボネイト膜フィルター (ポアサイズ0.1 μm) を装着したエクストルーダーを1回通過させた。最終工程として、得られたろ液を、ポリカーボネイト膜フィルター (ポアサイズ0.1 μm) を2枚装着したエクストルーダーを10回通過させた。最終回収物を滅菌フィルター (ポアサイズ0.2 μm) に通し、RGI-2001-001原薬として2-8°Cに保管した。

[0117] RGI-2001-001の加速 (25°C) 試験の結果を以下の表に記載する。

[0118] [表1]

RGI-2001薬物
保存条件: 25 $\pm$ 2°C、60 $\pm$ 5% 相対湿度、倒立した

試験	規格	0M	1M	2M	3M	6M
性状	不透明な懸濁物、 白色乃至淡黄色の液体	不透明な懸濁物、 白色	不透明な懸濁物、 白色の液体	不透明な懸濁物、 白色の液体	不透明な懸濁物、 白色の液体	不透明な懸濁物、 白色の液体
pH	6.8 $\pm$ 0.5	6.8	6.6	6.6	6.6	6.8
浸透圧	報告値	369 mOsm/Kg	348 mOsm/Kg	359 mOsm/Kg	349 mOsm/Kg	366 mOsm/Kg
HPLCによる含有量	KRN7000	5.0 $\pm$ 0.5 mg/mL	4.8 mg/mL	4.7 mg/mL	4.7 mg/mL	4.6 mg/mL
	コレステロール	12.6 $\pm$ 3.2 mg/mL	12.3 mg/mL	12.3 mg/mL	12.7 mg/mL	11.6 mg/mL
	DOPC	9.6 $\pm$ 2.4 mg/mL	8.2 mg/mL	8.6 mg/mL	8.4 mg/mL	7.5 mg/mL
	DPPC	9.0 $\pm$ 2.3 mg/mL	8.5 mg/mL	8.5 mg/mL	8.7 mg/mL	7.9 mg/mL
	DPPG-Na	9.1 $\pm$ 2.3 mg/mL	8.9 mg/mL	8.7 mg/mL	8.6 mg/mL	8.2 mg/mL
薬物純度	DOPG-Na	9.7 $\pm$ 2.4 mg/mL	8.7 mg/mL	8.7 mg/mL	8.4 mg/mL	7.7 mg/mL
	KRN7000	報告値	N/A 報告されず	10.9%	10.9%	10.8%
	コレステロール	報告値		80.5%	79.7%	77.3%
	DOPC	報告値		1.6%	N/A	N/A
	DPPC	報告値		7.0%	7.5%	7.0%
粒子径	不明	報告値	不純物検出なし	不純物検出なし	1.9% (RRT 0.32)	4.9% (RRT 0.32)
	平均	110 $\pm$ 30 nm	124 $\pm$ 4 nm	118 nm	120 nm	122 nm
	<50 nm	NMT 10%	<1%	1%	1%	1%
	>450 nm	NMT 10%	<1%	0%	0%	0%

[0119] RGI-2001-001の平均粒子径は製造直後で124 nmであり、その後の6ヶ月の加速試験期間中も120 nm前後で維持された。さらに6ヶ月後のDOPG-Na含有量は規格を逸脱した。これらの結果から、比較製剤 (RGI-2001-001) は平均粒子径が120 nm前後で均一で安定していることが示唆された。

[0120] [試験例2] 実施例製剤 (以下、RGI-2001-003と称する。) の製造方法及び安定性の評価

RGI-2001-003の製造工程を以下に記載する。

工程1) 製剤用緩衝液の調製

シングルユース滅菌バッグに、ショ糖、L-ヒスチジン、L-ヒスチジン塩酸

塩水和物と注射用水を添加し、混合物を室温で完全に溶解した。最終シヨ糖濃度（重量/体積）が10%、最終シヨ糖密度が1.038 g/mLになるように注射用水を添加した後、混合物を滅菌フィルター（ポアサイズ0.2 μm ）に通し、滅菌したプラスチック容器に回収した。

[0121] 工程2a) RGI-7000と脂質類の溶解

KRN7000（レグイミューン社製）（最終濃度5 mg/mL）、
1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DOPC）（最終濃度15 mol %）
）、
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-Na）（最終濃度15 mol %）、
1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）（最終濃度15 mol %）
）、
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-Na）（最終濃度15 mol %）、及び
コレステロール（最終濃度40 mol %）
をエタノールに添加し、85 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$ で溶解し、溶液が透明になるまで超音波処理を続けた。

[0122] 工程2b) RGI-2001-003原薬溶液の作製

KRN7000及び脂質類を含むエタノール溶液と製剤用緩衝液を、85 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$ に設定したステンレス製キャピラリーチューブ（SSCT）を通過させ、インラインミキサーで混合しRGI-2001-003原薬溶液の粗生成物を得た。粗生成物を別のインラインミキサーで製剤用緩衝液と混合した後、20 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$ に設定したSSCTを通過させて冷却した。RGI-2001-003原薬のリポソーム粒子径をポンプ速度の変化によって平均粒子径を約100 nmに微調整した。

[0123] 工程2c) 濃縮と透析濾過

RGI-2001-003原薬をポリエーテルサルホン樹脂中空糸膜モジュール（500 kDa未満排除）で60%に濃縮し、10倍重量の製剤緩衝液で透析濾過した。

[0124] 工程2d) RGI-2001-003原薬濃度の調整

RGI-2001-003原薬中のKRN7000含有重量を高速液体クロマトグラフィーで確認した後、注射用水での希釈と透析濾過による濃縮によって最終濃度 5.0 ± 0.5 mg/mLに調整した。平均粒子径を動的光散乱法で約100 nmに調整した。

[0125] 工程2e) RGI-2001-003原薬の滅菌

製造物を、滅菌用フィルター ($0.2 \mu\text{m}$) を通し滅菌したプラチックバッグに回収した。RGI-2001-003原薬はバイアル充填まで遮光下に冷蔵 ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) 保存した。

[0126] RGI-2001-003の加速 (25°C) 試験の結果を以下の表に記載する。

[0127] [表2]

1. 試験条件

検体保存形態	スードバイアル 倒立保存
検体保存条件	温度: $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 相対湿度: $60 \pm 5\% \text{RH}$
検体保存場所	25°C 安定性試験倉庫 1号

2. 試験結果

試験項目	判定基準		IN※	1M	2M	3M	6M
性状	白色～淡黄色の懸濁液		白色の懸濁液	白色の懸濁液	白色の懸濁液	白色の懸濁液	白色の懸濁液
pH	6.3±0.5		6.3	6.4	6.4	6.3	6.4
浸透圧	報告値 (mOsm)		353	355	356	344	343
KRN7000含量	5.0±0.5 mg/mL		5.4	5.2	5.3	5.2	5.1
脂質含量	DOPC	9.6±2.4 mg/mL	10.7	10.2	9.8	9.5	8.3
	DOPG-Na	9.7±2.4 mg/mL	10.5	10.1	9.7	9.4	8.1
	DPPC	9.0±2.3 mg/mL	10.0	9.2	9.1	9.0	7.8
	DPPG-Na	9.1±2.3 mg/mL	9.9	9.5	9.1	8.8	7.6
	コレステロール	12.6±3.2 mg/mL	14.1	14.1	14.0	14.1	14.0
平均粒子径	110±30 nm		96	101	99	99	96
	50 nm未満	全体の10%	5	4	3	3	3
	450 nm超	全体の10%	0	0	0	0	0
懸濁物質 (Drug Product Purity)	個々：報告値	RRT 0.21	N.D.	0.24	N.D.	N.D.	0.90
		RRT 0.40	N.D.	N.D.	0.79	1.24	2.65
	総量：報告値		N.D.	0.24	0.79	1.24	3.55
			-	6	6	6	6

※ IN: 本品の品質試験の結果を用いた

[0128] RGI-2001-003は、特許文献2と3に記載される技術に準じ、リポソーム平均粒子径を100 nmに設定して製造された。なお、RGI-2001-003のKRN7000含有量及び脂質組成はRGI-2001-001と同一である。平均粒子径は、製造直後において約96 nmで設定値に極めて近く、加速試験終了まで100 nm前後で維持された。また規格からの逸脱は認められなかった。以上の結果から、RGI-2001-003リポソーム製剤は目標の設定平均粒子径 (100 nm) を有し、長期安定性が優れていることが示唆された。

[0129] [試験例3] ヒト臨床試験での薬物動態の分析

第1相臨床試験において、RGI-2001-001を造血幹細胞移植を受けた患者6名に移植後30分以内にKRN7000として100 μ g/kg用量で静脈内に投与した。移植前と移植の0.5、1、2、4、6、8、24、48、72、96時間後に、それぞれ2 mLの末梢血を採取し、血漿成分を回収した。各血漿中KRN7000を液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）で分離同定した。

同様に、RGI-2001-003を造血幹細胞移植を受けた7名の患者に移植後30分以内にKRN7000として100 μ g/kg用量で静脈内に投与し、移植前と移植の0.5、2、4、6、8、24、48時間後にそれぞれ2 mLの末梢血を採取し、血漿成分を回収し、血漿中KRN7000をLC-MS/Mで分離同定した。これらの患者には、1週間に1回の頻度で5～6回連続して、KRN7000として100 μ g/kg用量のRGI-2001-003を静脈内に投与した。14日目の投与においても、投与前と投与の0.5、4時間後にそれぞれ2 mLの末梢血を採取し、血漿成分を回収し、血漿中KRN7000をLC-MS/Mで分離同定した。また、RGI-2001-003の投与を受けた患者におけるNKT反応及び活性化Treg数（Ki-67+ %）を経時的にモニターした。

[0130] その結果、最高血中濃度（C_{max}）と血中半減期（t_{1/2}）がRGI-2001-001投与群では187.6 ng/mLと23.4時間であるのに対して、RGI-2001-003投与群では881 ng/mLと35.8時間であった。この結果から、RGI-2001-003投与群はRGI-2001-001投与群と比較して、最高血中濃度（C_{max}）が顕著に高く、血中半減期（t_{1/2}）も顕著に長いことが示された（表3）。また薬物動態の経時的な変化においても、RGI-2001-003は典型的な減衰カーブを示しているのに対して、RGI-2001-001は不規則な推移を示した（図1）。RGI-2001-003の最初の投与と複数回投与では、KRN7000の血漿中レベルは同様であり、RGI-2001-003の週毎の繰り返し投与を受けても、患者のKRN7000への曝露は0日目と14日目で同様であった（表4、図1）。RGI-2001-003投与により、NKT細胞反応と制御性T細胞数の上昇が誘導された（表5）

[0131]

[表3]

最高血中濃度 (C_{max}) と血中半減期 (t_{1/2})

	C _{max} (ng/mL)	t _{1/2} (h)
RGI-2001-001	187.6	23.4
RGI-2001-003	881	35.8

[0132] [表4]

KRN7000 PK Parameters	Day 0	Day 14
C _{max} (ng/mL)	881 (42%)	570 (63%)
C _{min} (ng/mL)	NA	34.1 (130%)
AUC ₀₋₄ (ng*h/mL)	3000 (48%)	1890 (63%)
*Est. AUC _{0-inf} (ng*h/mL)	42500 (80%)	NA
t _{1/2} (h)	35.8 (40%)	NA

[0133] [表5]

患者 ID	RGI-2001用量 毎週100 μ g/kg 投与された全用量	14日目における NKT反応	14日目における CD4+T細胞中のTreg %	活性化Treg (ki-67+)%
01-101	6	↑ ↑	11	↑
01-102	5	↑	12	↑ ↑ ↑
01-103	6	↑ ↑	11	↑
01-104	6	↑ ↑	19	↑ ↑ ↑
02-101	6	↑ ↑ ↑	7	↑
02-102	6	↑	8	↑ ↑
06-101	6	↑ ↑ ↑	4	→

[0134] [試験例4] マウスにおける薬効評価

RGI-2001は、静脈内投与後に脾臓辺縁帯B細胞に取り込まれた後、細胞内でKRN7000を放出し、KRN7000がCD1d分子に結合した後、細胞表面に提示され、iNKT細胞のIL-4産生を誘導し、制御性T細胞（Treg）を誘導する作用機序が報告されている（非特許文献1）。一方、樹状細胞がRGI-2001を取り込むと、iNKT細胞のIFN- γ 産生の誘導に働く。

[0135] C57BL/6マウス（♀、8週齢；クレア）の尾静脈にRGI-2001-001またはRGI-2001-003をKRN7000用量として2 μ g投与し、2時間後と24時間後に眼窩採血を実施した。血漿中のIFN- γ 、IL-4及びIL-10濃度をCytometric Bead Array法（BD Biosciences社）で測定した。その結果、IFN- γ はRGI-2001-001投与群よりもRGI-2001-003投与群で低く、逆にIL-4はRGI-2001-001投与群よりもRGI-2001-003投与群で高かった（図2）。一方、IL-10産生は2群で同等か、RGI-2001-003投与群がRGI-2001-001投与群よりもやや高かった（図3）。以上の結果から、RGI-2001-003はRGI-2001-001に比べて、平均粒子径を100 nm前後に調整したことにより辺縁帯B細胞に取り込まれ易く、その結果としてRGI-2001-003はiNKT細胞のIL-4産生をより強力に誘導し、Tregをより効果的に誘導することが示唆された。一方、IL-4とは対照的に、iNKT細胞のIFN- γ 産生を誘導する活性については、RGI-2001-003はRGI-2001-001よりもむしろ低いことが示唆された。

[0136] [試験例5] 粒子径の測定

試験例2で製造したリポソーム製剤の粒子径及び多分散度を、動的光散乱法により、測定した。

<条件1>

試験例2で製造したリポソーム製剤をPBS（Ca²⁺不含）で1000倍に希釈後、Malvern社ZetaSizer Nano ZSを用いて、25℃の温度下でDLS（動的光散乱、後方散乱）により粒子径及び多分散度を解析した。結果を表6に示す。

[0137] [表6]

				平均
Z 平均粒子径 (nm)	95.74	96.23	95.79	95.9
Pdl	0.112	0.102	0.133	0.116

[0138] <条件2>

試験例2で製造したリポソーム製剤をPBS（Ca²⁺不含）で1000倍に希釈後し、DLS（動的光散乱、90℃散乱）により粒子径及び多分散度を解析した。結果を表7に示す。

[0139]

[表7]

				平均
Z 平均粒子径 (nm)	93.05	92.89	94.55	93.5
PdI	0.125	0.127	0.124	0.125

[0140] これらの試験の結果から、試験例3及び4を実施した際のRGI-2001-003リボソーム製剤の平均粒子径は92.9～101.0 nmの範囲内と見積もられた。

[0141] [試験例7]

試験例3において、RGI-2001-003を投与した7名の患者について経過観察を行った。その結果、7名中1名がgrade IIの急性GVHDを、1名がgrade I (GVHDにカウントされない) の急性GVHDを、それぞれ一過性に発症したが、その他の5名の患者については急性GVHDの発症が認められなかった。grade IIの急性GVHDを発症した患者は、皮膚のみに病変が認められた軽症で、症状も一過性であり、その後、造血幹細胞移植から1年以上経過した時点までGVHDの再発は認められなかった。これらの結果から、RGI-2001-003の優れたGVHD発症抑制効果が示唆された。

[0142] [表8]

#	患者 ID	診断	aGvHD* /発症
1	01-101/M	MDS	No
2	02-101/M	ALL	No
3	01-102/F	ALL	Gr 1 Day 28
4	02-102/F	AML	No
5	01-103/F	CMML	No
6	06-101/F	MDS	No
7	01-104/M	ALL	Gr 2 Day 42

*プライマリーエンドポイント, Grade 2+ GvHD @100days

産業上の利用可能性

[0143] 本発明により、長期間の血中滞留が可能で、高い濃度の血中KRN7000濃度を長い期間維持することが可能な、KRN7000含有リボソーム製剤が提供される。本発明のリボソーム製剤は、GVHDに対する優れた予防又は治療効果が期待で

きる。

[0144] 本出願は日本で出願された特願2020-201802（出願日：2020年12月4日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] CD1dリガンド化合物を含有するリポソームの集団を含むリポソーム製剤であって、該リポソームの集団の平均粒子径が90～110 nmであり、粒子径分布の多分散度が0.2以下である、リポソーム製剤。
- [請求項2] 平均粒子径が92.9～101.0 nmである、請求項1記載のリポソーム製剤。
- [請求項3] 粒子径分布の多分散度が0.133以下である、請求項1又は2記載のリポソーム製剤。
- [請求項4] 粒子径が50 nm未満のリポソームの数が該リポソームの集団の全体の10%以下である、請求項1～3のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項5] 粒子径が450 nm超のリポソームの数が該リポソームの集団の全体の10%以下である、請求項1～4のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項6] 温度25℃、相対湿度60%RHの条件にて、平均粒子径が90～110 nmで少なくとも1ヶ月間維持される、請求項1～5のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項7] CD1dリガンド化合物が α -ガラクトシルセラミドである、請求項1～6のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項8] α -ガラクトシルセラミドが(2S, 3S, 4R)-1-o-(α -D-ガラクトピラノシル)-2-(N-ヘキセコサノイルアミノ)-1, 3, 4-オクタデカントリオールである、請求項7記載のリポソーム製剤。
- [請求項9] 該リポソームの集団がリポソーム懸濁液として含まれる、請求項1～8のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項10] リポソーム懸濁液のpHが5.8～6.8である、請求項9記載のリポソーム製剤。
- [請求項11] 該リポソームの集団が凍結乾燥物として含まれる、請求項1～8のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項12] 注射投与用である、請求項1～11のいずれか1項記載のリポソーム製

剤。

- [請求項13] 移植片対宿主病の予防又は治療用である、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項14] 移植片対宿主病が同種異系造血幹細胞移植により引き起こされたものである、請求項13記載のリポソーム製剤。
- [請求項15] 臓器移植拒絶の予防又は治療用である、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項16] 臓器移植が同種異系臓器又は細胞の移植である、請求項15記載のリポソーム製剤。
- [請求項17] 臓器移植が異種臓器又は細胞の移植である、請求項15記載のリポソーム製剤。
- [請求項18] 移植片対宿主病の発症リスクを有する対象に、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤の有効量を投与することを含む、該対象における移植片対宿主病の発症リスクを低減する方法。
- [請求項19] 移植片対宿主病の発症リスクを有する対象が、同種異系の組織又は細胞の移植を受けた対象、或いは同種異系の組織又は細胞の移植を受けることが予定されている対象である、請求項18記載の方法。
- [請求項20] 移植片対宿主病を発症した対象に、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤の有効量を投与することを含む、該対象における移植片対宿主病の治療方法。
- [請求項21] 移植片対宿主病が同種異系造血幹細胞移植により引き起こされたものである、請求項18～20のいずれか1項記載の方法。
- [請求項22] 臓器移植拒絶の発症リスクを有する対象に、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤の有効量を投与することを含む、該対象における臓器移植拒絶の発症リスクを低減する方法。
- [請求項23] 臓器移植拒絶の発症リスクを有する対象が、同種異系又は異種の臓器又は細胞の移植を受けた対象、或いは同種異系又は異種の臓器又は細胞の移植を受けることが予定されている対象である、請求項22記載

の方法。

- [請求項24] 臓器移植拒絶を発症した対象に、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤の有効量を投与することを含む、該対象における臓器移植拒絶の治療方法。
- [請求項25] 臓器移植が同種異系臓器又は細胞の移植である、請求項22～24のいずれか1項記載の方法。
- [請求項26] 臓器移植が異種臓器又は細胞の移植である、請求項22～24のいずれか1項記載の方法。
- [請求項27] 移植片対宿主病の予防又は治療において使用するための、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項28] 移植片対宿主病が同種異系造血幹細胞移植により引き起こされたものである、請求項27記載のリポソーム製剤。
- [請求項29] 臓器移植拒絶の予防又は治療において使用するための、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤。
- [請求項30] 臓器移植が同種異系臓器又は細胞の移植である、請求項29記載のリポソーム製剤。
- [請求項31] 臓器移植が異種臓器又は細胞の移植である、請求項29記載のリポソーム製剤。
- [請求項32] 移植片対宿主病の予防又は治療用医薬の製造における、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤の使用。
- [請求項33] 移植片対宿主病が同種異系造血幹細胞移植により引き起こされたものである、請求項32記載の使用。
- [請求項34] 臓器移植拒絶の予防又は治療用医薬の製造における、請求項1～12のいずれか1項記載のリポソーム製剤の使用。
- [請求項35] 臓器移植が同種異系臓器又は細胞の移植である、請求項34記載の使用。
- [請求項36] 臓器移植が異種臓器又は細胞の移植である、請求項34記載の使用。