

明 細 書

発明の名称：

リポソーム剤、NK細胞活性化剤、医薬組成物、およびこれらの用途
技術分野

[0001] 本発明は、リポソーム剤、NK細胞活性化剤、医薬組成物、およびこれらの用途に関する。

背景技術

[0002] 免疫系について、以下のようなメカニズムが知られている。すなわち、未熟樹状細胞は、抗原を取り込み、リンパ節に移動すると、成熟樹状細胞に分化し、前記抗原を提示する。そして、CD8陽性T細胞（キラーT細胞）は、前記抗原を提示する成熟樹状細胞により活性化され、細胞障害活性を獲得し、前記抗原を有する細胞を攻撃する。しかしながら、がんを発症した生体においては、がん細胞によって、前記未熟樹状細胞から成熟細胞への分化が抑制されてしまうため、前記メカニズムを利用した、がん細胞への攻撃が阻害されるという問題がある。このため、がん等の疾患に対して、免疫系を活性化させる治療方法（いわゆる免疫治療）が一般的となっている。

[0003] 免疫系の活性化として、近年、患者自身が体内に備えているナチュラルキラーT細胞（以下、NK細胞という）の活性化が試みられている。この方法では、例えば、NK細胞が特異的に認識するリガンド（以下、NK細胞活性化リガンドともいう）を薬剤として投与することで、体内の抗原提示細胞に、CD1dを介して前記リガンドを提示させる。NK細胞は、前記提示されたリガンドを特異的に認識し且つ結合することで活性化される。NK細胞が活性化されると、がん細胞によって分化が抑制されている未熟樹状細胞に対して、成熟樹状細胞への分化が誘導される。このため、成熟樹状細胞によってがん抗原が提示され、細胞障害活性を獲得したキラーT細胞によって、がん細胞への攻撃が可能となる。また、活性化されたNK細胞は、インターロイキン4（IL-4）、インターフェロンγ（IFN-γ）等のサ

イトカインの放出により、キラーT細胞、ナチュラルキラー細胞（以下、NK細胞という）等の他の免疫系細胞を活性し、免疫反応を増強することもできる。このように、NK細胞を標的とする免疫治療は、例えば、NK細胞標的治療ともいう。

[0004] 前記NK細胞活性化リガンドについては、すでに様々な化合物について研究がなされており、例えば、 α -ガラクトシルセラミド（ α -GalCer）およびそのアナログについては、NK細胞を活性化することが報告されている（特許文献1～4、非特許文献1）。

[0005] 一方、薬剤に関しては、実用化において、薬効だけでなく、安定性や効果的なデリバリーも重要となる。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：WO94/09020号

特許文献2：WO94/02168号

特許文献3：WO94/24142号

特許文献4：WO98/44928号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Science, 278, p. 1626-1629, 1997

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] そこで、本発明は、NK細胞を活性化するリガンドについて、より実用化に優れた組成物の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 前記目的を達成するために、本発明のリポソーム剤は、PEG化リポソームを含み、前記PEG化リポソームが、NK細胞活性化リガンドとリポソーム構成脂

質とを含み、

前記NK T細胞活性化リガンドが、NK T細胞上のNK T細胞受容体が特異的に認識する、 α -ガラクトシルセラミドまたはそのアナログであり、前記リポソーム構成脂質が、コリン含有リン脂質、PEG化脂質、およびコレステロール系脂質を含むことを特徴とする。

[0010] 本発明のNK T細胞活性化剤は、前記本発明のリポソーム剤を含むことを特徴とする。

[0011] 本発明の医薬組成物は、前記本発明のリポソーム剤を含むことを特徴とする。

[0012] 本発明のNK T細胞の活性化方法は、前記本発明のリポソーム剤をNK T細胞に接触させる工程を含むことを特徴とする。

発明の効果

[0013] 本発明のリポソーム剤によれば、例えば、保存時の安定性に優れ、体内において、NK T細胞の活性化による効果を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、実施例2において、B7リポソームの長期保存安定性の結果を示すグラフである。

[図2A]図2Aは、実施例3において、血清およびリンパ節上清におけるIFN- γ 濃度を示すグラフである。

[図2B]図2Bは、実施例3において、血清およびリンパ節上清におけるIL-10濃度を示すグラフである。

[図3]図3Aは、リンパ節におけるNK T細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるNK1.1陽性且つCD3陽性の細胞について、CD3陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図3Bは、リンパ節におけるNK1.1陽性且つCD陽性のNK T細胞の量を定量化したグラフである。

[図4]図4Aは、脾臓におけるNK T細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるNK1.1陽性且つCD3陽性の細胞について、前記相対蛍光強度によ

て細胞数の分布を表したグラフである。図4 Bは、脾臓におけるNK 1. 1陽性且つCD陽性のNK T細胞の量を定量化したグラフである。

[図5]図5 Aは、リンパ節におけるNK T細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるNK 1. 1陽性且つCD 3陽性の細胞について、CD陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図5 Bは、リンパ節におけるNK細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるNK 1. 1陽性のNK細胞について、NK 1. 1陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図5 Cは、リンパ節におけるT細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるCD 3陽性のT細胞について、CD 3陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図5 Dは、リンパ節におけるNK T細胞のヒストグラムである。図5 Eは、リンパ節におけるNK 1. 1陽性且つCD 3陽性のNK T細胞の量を定量化したグラフである。

[図6]図6 Aは、脾臓におけるNK T細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるNK 1. 1陽性且つCD 3陽性の細胞について、CD 3陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図6 Bは、脾臓におけるNK細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるNK 1. 1陽性のNK細胞について、NK 1. 1陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図6 Cは、脾臓におけるT細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるCD 3陽性のT細胞について、CD 3陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図6 Dは、脾臓におけるNK T細胞のヒストグラムである。図6 Eは、脾臓におけるNK 1. 1陽性且つCD 3陽性のNK T細胞の量を定量化したグラフである。

[図7]図7 Aは、リンパ節における樹状細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるCD 11c陽性細胞について、CD 11c陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数分布を示したグラフである。図7 Bは、リンパ節における樹状細胞のヒストグラムである。図7 Cは、リンパ節におけるマクロファージのヒストグラムであり、リンパ節におけるCD 68陽性細胞について、CD

68陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を示したグラフである。図7Dは、リンパ節におけるCD11c陽性の樹状細胞の量を定量化したグラフである。図7Eは、リンパ節におけるCD68陽性のマクロファージの量を定量化したグラフである。

[図8]図8Aは、脾臓における樹状細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるCD11c陽性細胞について、CD11c陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数分布を示したグラフである。図8Bは、脾臓における樹状細胞のヒストグラムである。図8Cは、リンパ節におけるマクロファージのヒストグラムであり、脾臓におけるCD68陽性細胞について、CD68陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を示したグラフである。図8Dは、脾臓におけるCD11c陽性の樹状細胞の量を定量化したグラフである。図8Eは、脾臓におけるCD68陽性のマクロファージの量を定量化したグラフである。

[図9A]図9Aは、投与後24時間のマウスの各臓器における蛍光を示す画像である。

[図9B]図9Bは、投与後24時間のマウスの各臓器における相対的な蛍光強度を示すグラフである。

[図10]図10は、マウスの腫瘍体積（V）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[図11]図11は、マウスの生存率と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[図12]図12は、マウスの体重（g）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[図13]図13は、マウスの腫瘍体積（V）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[図14]図14は、マウスの生存率と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[図15]図15は、マウスの体重（g）と投与開始からの日数との関係を示す

グラフである。

[図16A]図16Aは、マウスの腫瘍体積（V）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[図16B]図16Bは、マウスの体重（g）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[図17]図17は、マウスの腫瘍体積（V）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[図18A]図18Aは、リンパ節における蛍光を示す画像である。

[図18B]図18Bは、摘出した全リンパ節における蛍光強度を示すグラフである。

[図19]図19は、がん細胞を接種した部位のがんと脾臓における蛍光を示す画像である。

[図20]図20は、がんが転移した肝臓における蛍光を示す画像である。

[図21A]図21Aは、FITCの蛍光強度とCy5の蛍光強度とによって細胞の分布を示したグラフである。

[図21B]図21Bは、FITCの蛍光強度によって細胞の分布を示したグラフである。図21Cは、CD11c陽性細胞の割合を定量化したグラフである。図21Dは、Cy5蛍光強度によりCD11c陽性細胞の分布を示したグラフである。図21Eは、CD11c陽性且つCy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[図22A]図22Aは、FITCの蛍光強度とCy5の蛍光強度とによって細胞の分布を示したグラフである。

[図22B]図22Bは、FITCの蛍光強度によって細胞の分布を示したグラフである。図22Cは、CD68陽性細胞の割合を定量化したグラフである。図22Dは、Cy5蛍光強度によりCD68陽性細胞の分布を示したグラフである。図22Eは、CD68陽性且つCy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[図23A]図23Aは、NK1.1の蛍光強度とCy5の蛍光強度とによって細

胞の分布を示したグラフである。

[図23B]図23Bは、FITCの蛍光強度によって細胞の分布を示したグラフである。図23Cは、NK1.1陽性細胞の割合を定量化したグラフである。図23Dは、Cy5蛍光強度によりNK1.1陽性細胞の分布を示したグラフである。図23Eは、NK1.1陽性且つCy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[図24A]図24Aは、FITCの蛍光強度とCy5の蛍光強度とによって細胞の分布を示したグラフである。

[図24B]図24Bは、FITCの蛍光強度によって細胞の分布を示したグラフである。図24Cは、CD3陽性細胞の割合を定量化したグラフである。図24Dは、Cy5蛍光強度によりCD3陽性細胞の分布を示したグラフである。図24Eは、CD3陽性且つCy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[図25]図25Aは、FITC蛍光強度により、CD3陽性且つNK1.1陽性のダブル陽性細胞（NK T細胞）の分布を示したグラフである。図25Bは、CD3陽性且つNK1.1陽性のダブル陽性細胞（NK T細胞）の割合を定量化した結果である。図25Cは、Cy5蛍光強度により、CD陽性且つNK1.1陽性のダブル陽性細胞（NK T細胞）の分布を示したグラフである。図25Dは、CD陽性／NK1.1陽性／Cy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[図26]図26は、マウスのがんの切片スライドの免疫組織化学染色顕微鏡写真である。

[図27A]図27Aは、B7リポソームの投与サンプルを投与したマウスについて、投与後12時間の各臓器の写真に蛍光強度を重ねた図である。

[図27B]図27Bは、リンパ節における蛍光強度を定量化したグラフである。

[図28]図28は、投与サンプルの電子顕微鏡写真である。

[図29A]図29Aは、マウスのリンパ節へのB7リポソームの集積量を蛍光強度で示した図である。

[図29B]図29Bは、マウスのリンパ節へのB7リポソームの集積量を示す蛍光強度を定量化したグラフである。

[図30]図30は、細胞内へのB7リポソームの取り込みを、B7リポソームに由来するCy5の蛍光強度により示すグラフである。

[図31]図31は、樹状細胞内へのB7リポソームの取り込みを、B7リポソームに由来するCy5の蛍光強度により示すグラフである。

[図32]図32は、樹状細胞へのB7リポソームの取り込みを、B7リポソームに由来するCy5の蛍光強度により示すグラフである。

[図33]図33は、マウスのリンパ節の切片の蛍光顕微鏡観察画像である。

[図34]図34Aは、マウスの腫瘍体積（V）と投与開始からの日数との関係を示すグラフであり、図34Bは、マウスの生存率と投与開始からの日数との関係を示すグラフであり、図34Cは、マウスの体重と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[図35]図35Aは、マウスの腫瘍体積（V）とがんの皮下摂取日からの日数との関係を示すグラフであり、図35Bは、マウスの生存率とがんの皮下摂取日からの日数との関係を示すグラフであり、図35Cは、マウスの体重とがんの皮下摂取日からの日数との関係を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0015] [1] PEG化リポソームを含み、
前記PEG化リポソームが、NK細胞活性化リガンドとリポソーム構成脂質を含み、
前記NK細胞活性化リガンドが、NK細胞上のNK細胞受容体が特異的に認識する、 α -ガラクトシルセラミドまたはそのアナログであり、
前記リポソーム構成脂質が、コリン含有リン脂質、PEG化脂質、およびコレステロール系脂質を含むことを特徴とする、リポソーム剤。
- [2] 前記コリン含有リン脂質が、ホスファチジルコリンである、[1]に記載のリポソーム剤。
- [3] 前記ホスファチジルコリンにおける2つの脂肪酸が、それぞれ独立

して、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である、〔２〕に記載のリポソーム剤。

〔４〕 前記ホスファチジルコリンにおける２つの脂肪酸が、それぞれ独立して、炭素数８～２７の脂肪酸である、〔２〕または〔３〕に記載のリポソーム剤。

〔５〕 前記ホスファチジルコリンが、ジパルミトイル ホスファチジルコリン、ジオレオイル ホスファチジルコリン、パルミトイル オレオイル ホスファチジルコリン、およびステアロイル オレオイル ホスファチジルコリンからなる群から選択された少なくとも一つである、〔２〕から〔４〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

〔６〕 前記ＰＥＧ化脂質における脂肪酸が、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である、〔１〕から〔５〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

〔７〕 前記ＰＥＧ化脂質における脂肪酸が、炭素数８～７０の脂肪酸である、〔１〕から〔６〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

〔８〕 前記ＰＥＧ化脂質が、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ、ＤＭＧ－ＰＥＧ、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ、ＤＳＧ－ＰＥＧ、ＤＯＰＥ－ＰＥＧ、セラミド－ＰＥＧ、およびステアリン酸－ＰＥＧからなる群から選択された少なくとも一つである、〔１〕から〔７〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

〔９〕 前記ＰＥＧ化脂質におけるＰＥＧの平均分子量が、１６０～４４，０００Ｄａである、〔１〕から〔８〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

〔１０〕 前記ＰＥＧ化脂質において、ＰＥＧの末端が水酸基である、〔１〕から〔９〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

〔１１〕 前記コレステロール系脂質が、コレステロールである、〔１〕から〔１０〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

〔１２〕 前記ＰＥＧ化リポソームの大きさが、平均粒径１０～５００ｎｍの範囲である、〔１〕から〔１１〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

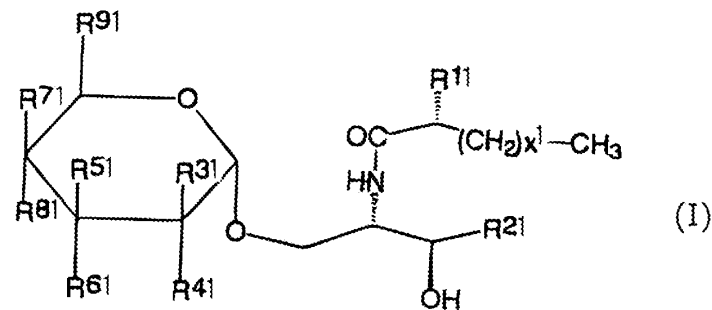
〔１３〕 前記ＰＥＧ化リポソームにおいて、前記コリン含有リン脂質（Ｘ

）、前記PEG化脂質（Y）、および前記コレステロール系脂質（Z）のm o l %の比率が、 $X : Y : Z = 1 : (0.03 \sim 0.176) : (0.34 \sim 1.35)$ である

、[1] から [12] のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

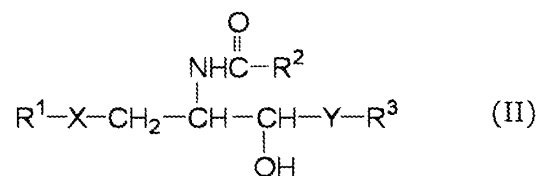
[14] 前記 α -ガラクトシルセラミドおよびそのアナログが、式（I）で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、[1] から [13] のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[化1]



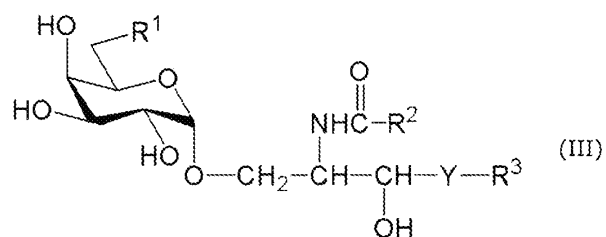
[15] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式（II）で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、[1] から [13] のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[化2]



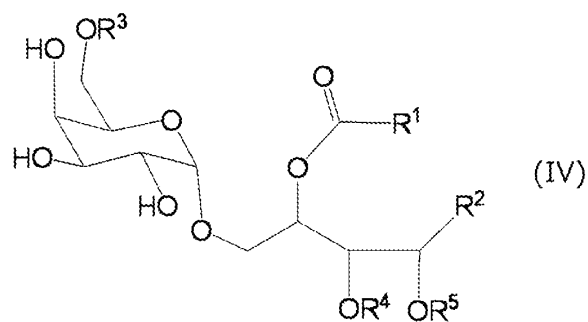
[16] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式（III）で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、[1] から [13] のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[化3]



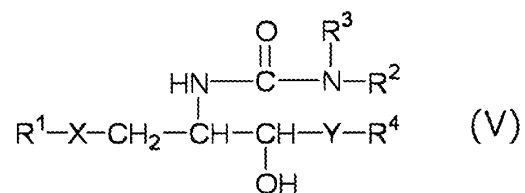
[17] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式 (IV) で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、[1] から [13] のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[化4]



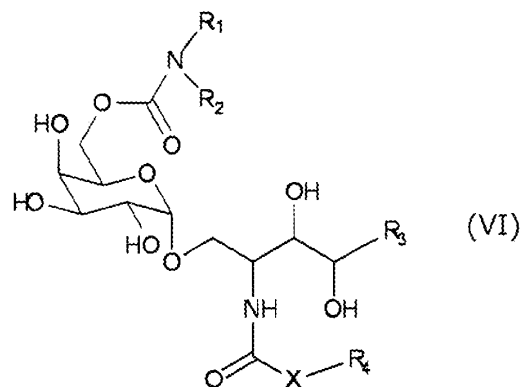
[18] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式 (V) で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、[1] から [13] のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[化5]



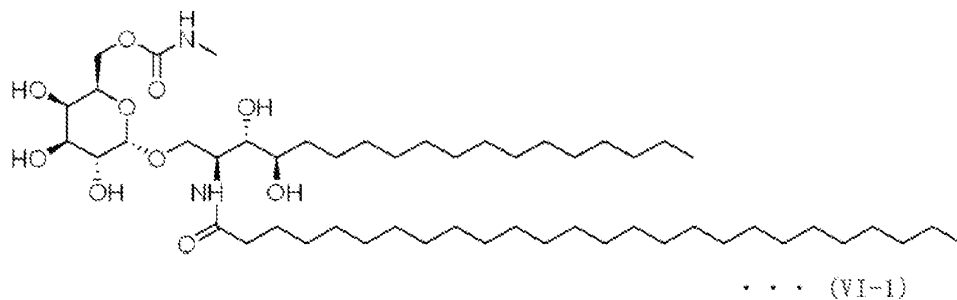
[19] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式(VI)で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、[1]から[13]のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[化6]



[20] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式(VI-1)で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、[19]に記載のリポソーム剤。

[化7]



[21] 前記PEG化リポソームが、条件1、2および3を満たす、[1]から[20]のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

(条件1) 前記PEG化リポソームの大きさが、平均粒径60~140nmの範囲である

(条件2) 前記PEG化脂質において、PEGの末端が水酸基である

(条件3) 前記PEG化リポソームの表面電荷が、負電荷である

[22] 前記条件3において、前記PEG化リポソームの表面電荷が、 $-80 \sim 5 \text{ mV}$ である、[21]に記載のリポソーム剤。

[0016] [23] [1] から [22] のいずれか一項に記載のリポソーム剤を含むことを特徴とするNK細胞活性化剤。

[24] [1] から [22] のいずれか一項に記載のリポソーム剤を含むことを特徴とする医薬組成物。

[25] 抗がん用である、[24]に記載の医薬組成物。

[26] 対象がんが、乳がん、皮膚がん、血液がん、大腸がん、前立腺がん、および卵巣がんである、[25]に記載の医薬組成物。

[27] 注射剤である、[24] から [26] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[28] 抗がん用であり、対象がんが、トリプルネガティブ乳がんであり、

前記リポソーム剤に含まれるPEG化リポソームが、条件1、2および3を満たす、[24] から [27] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(条件1) 前記PEG化リポソームの大きさが、平均粒径 $60 \sim 140 \text{ nm}$ の範囲である

(条件2) 前記PEG化脂質において、PEGの末端が水酸基である

(条件3) 前記PEG化リポソームの表面電荷が、負電荷である

[29] 前記条件3において、前記PEG化リポソームの表面電荷が、 $-80 \sim 5 \text{ mV}$ である、[28]に記載の医薬組成物。

[0017] [30] 被検体に、[1] から [22] のいずれか一項に記載のリポソーム剤、または [24] から [29] のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、NK細胞の活性化方法。

[31] 前記被検体が、ヒトまたは非ヒト動物である、[30]に記載のNK細胞の活性化方法。

[32] 被検体に、[1] から [22] のいずれか一項に記載のリポソーム

ム剤、または〔24〕から〔29〕のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与する工程を含むことを特徴とするがんの治療方法。

〔33〕 被検体が、トリプルネガティブ乳がんの被検体であり、前記投与工程において、〔28〕または〔29〕に記載の医薬組成物を投与する、〔32〕に記載のがんの治療方法。

〔34〕 前記被検体が、ヒトまたは非ヒト動物である、〔32〕または〔33〕に記載のがんの治療方法。

〔35〕 NK T細胞の活性化に使用するための、〔1〕から〔22〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

〔36〕 医薬組成物の製造に使用するための、〔1〕から〔22〕のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[0018] 本明細書で使用する用語は、特に言及しない限り、当該技術分野で通常用いられる意味で用いることができる。

[0019] リポソームとは、脂質二重層を形成した脂質小胞である。

[0020] 1. リポソーム剤

本発明のリポソーム剤は、前述のように、PEG化リポソームを含み、前記PEG化リポソームが、NK T細胞活性化リガンドとリポソーム構成脂質とを含み、前記NK T細胞活性化リガンドが、NK T細胞上のNK T細胞受容体が特異的に認識する、 α -ガラクトシルセラミドまたはそのアナログであり、前記リポソーム構成脂質が、コリン含有リン脂質、PEG化脂質、およびコレステロール系脂質を含むことを特徴とする。本発明のリポソーム剤について、以下、例をあげて説明するが、本発明は、これらの例示には限定されない。また、本発明のリポソーム剤は、他の実施形態の記載を援用できる。

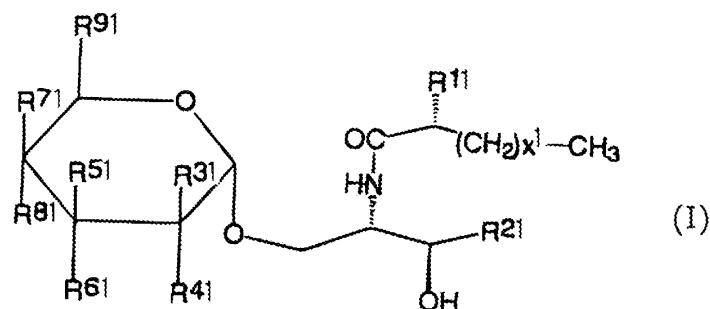
[0021] (1) NK T細胞活性化リガンド

前記NK T細胞活性化リガンドは、通常、NK T細胞上のNK T細胞固有のT細胞受容体（NK T細胞受容体）により特異的に認識され、NK T細胞を特異的に活性化させ得る化合物である。前記NK T細胞活性化リガンドは

、例えば、CD1d分子上に提示される。本発明における「NK細胞活性化リガンド」は、例えば、前記NK細胞受容体により特異的に認識され、NK細胞を特異的に活性化できる化合物であればよい。本発明において、前記NK細胞活性化リガンドは、特に制限されず、NK細胞に対する特異的な活性化機能がすでに知られている糖脂質、すなわち、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) およびその誘導体（そのアナログ）があげられる。以下に、前記NK細胞活性化リガンドとして、 α -GalCer およびその誘導体を例示する。

[0022] (1-1) 式 (I) の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化1]



[0023] 式 (I) 中、

R^{11} は、H または OH であり、

X^1 は、7 ~ 27 のいずれかの整数であり、

R^{21} は、下記 (a) ~ (e) からなる群から選択される置換基である (Y^1 は、5 ~ 17 のいずれかの整数である)。

(a) $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{Y^1}\text{CH}_3$

(b) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_{Y^1}\text{CH}_3$

(c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_{Y^1}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

(d) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{Y^1}\text{CH}_3$

(e) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_{Y^1}\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$

[0024] 式 (I) 中、 $R^{31} \sim R^{91}$ は、下記 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) 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) 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) 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') から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、

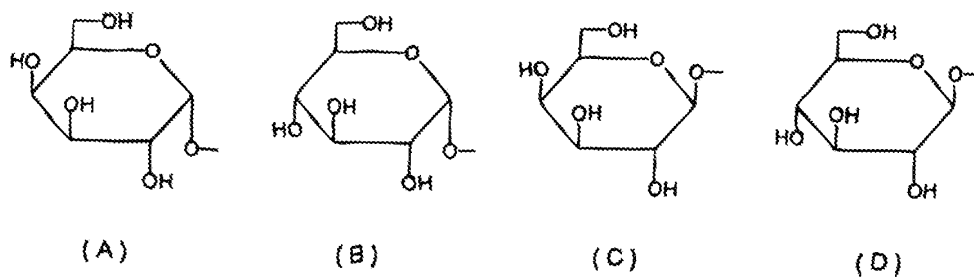
$R^{4'}$ は、H、OH、 NH_2 、 $NHCOCH_3$ 、または下記基 (A) ~ (D) からなる群から選択される置換基であり、

$R^{5'}$ は、OH、または下記基 (E) および (F) からなる群から選択される置換基であり、

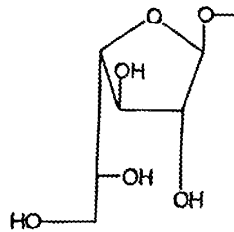
$R^{8'}$ は、OH、または下記基 (A) ~ (D) からなる群から選択される置換基であり、

$R^{9'}$ は、H、 CH_3 、 CH_2OH または下記基 (A') ~ (D') からなる群から選択される置換基である。

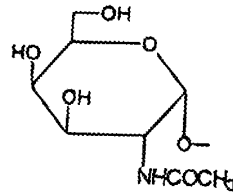
[0025] [化8]



[化9]

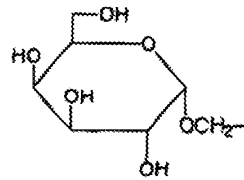


(E)

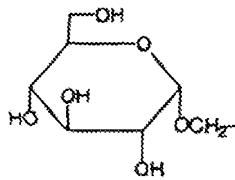


(F)

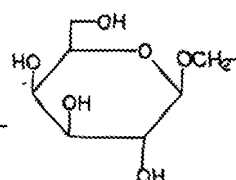
[化10]



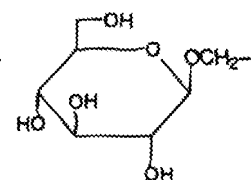
(A')



(B')



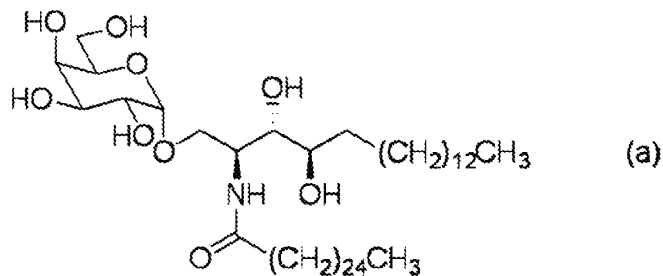
(C')



(D')

[0026] 前記式(1)の化合物としては、例えば、下記式(a)に示す α -GalCer (α -ガラクトシルセラミド)が好ましい。 α -GalCerは、化学名は、(2S, 3S, 4R)-1-O-(α -D-ガラクトピラノシル)-2-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である。

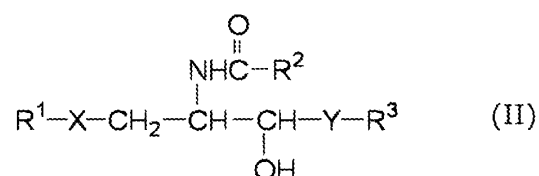
[0027] [化11]



[0028] 前記式 (I) の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報 (WO 94/09020、WO 94/02168、WO 94/24142、WO 98/44928等) および論文 (Science, 278, p. 1626-1629, 1997) 等に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式 (I) の化合物が前記NK T細胞活性化リガンドの機能を有することは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0029] (1-2) 式 (II) の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化2]



[0030] 式 (II) 中、 R^1 は、 α -カルバ糖残基を示し、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、炭素数1~28の置換または非置換の炭化水素基を示し、Xは、酸素原子、硫黄原子、 $-\text{CH}_2-$ または $\text{NH}-$ を示し、Yは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-$ または $\text{CH}=\text{CH}-$ を示す。

[0031] 前記式 (II) の化合物は、中でも以下の化合物が好ましい。

[1] (2S, 3S, 4R) - 1 - (5 α -カルバー α -D-ガラクトピラノシルオキシ) - 2 - (ヘキサコサノイルアミノ) - 3, 4-オクタデカンジオール

[2] (2S, 3S, 4R) - 1 - (5 α -カルバー α -D-ガラクトピラノシルチオ) - 2 - (ヘキサコサノイルアミノ) - 3, 4-オクタデカンジオール

[3] (2S, 3S, 4R) - 1 - (5 α -カルバー α -D-グルコピラノシルオキシ) - 2 - (ヘキサコサノイルアミノ) - 3, 4-オクタデカンジオール

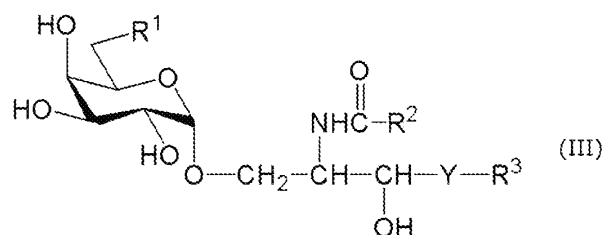
[4] (2S, 3S, 4R) - 1 - (5a-カルバー α -D-グルコピラノシルチオ) - 2 - (ヘキサコサノイルアミノ) - 3, 4-オクタデカンジオール

[5] (2S, 3S, 4R) - 1 - (5a-カルバー α -D-フコピラノシルオキシ) - 2 - (ヘキサコサノイルアミノ) - 3, 4-オクタデカンジオール

[0032] 前記式 (II) の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報 (WO 2008/102888、米国特許 No. 8299223 等) に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式 (II) の化合物等が前記 NKT 細胞活性化リガンドの機能を有することは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0033] (1-3) 式 (III) の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化3]

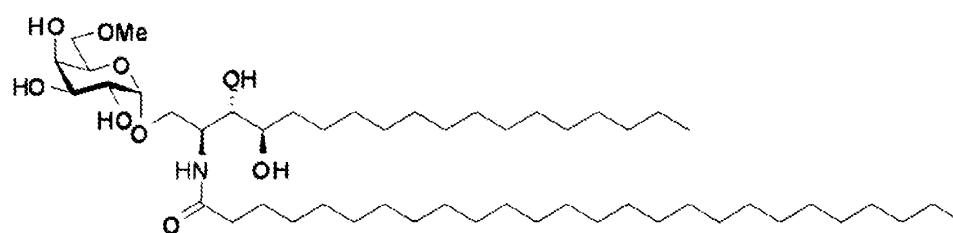


[0034] 式 (III) 中、 R^1 は、水素原子、炭素数 1～7 のアルキル基、炭素数 1～6 のアルコキシ基またはハロゲン原子を示し、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、炭素数 1～28 の置換または非置換の炭化水素基を示し、Y は、 $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ または $CH=CH-$ を示す。ただし、 R^1 が水素原子であるとき、 R^2 は、炭素数 24～28 の置換または非置換の炭化水素基を示す。

[0035] 前記式 (III) の化合物は、中でも以下の化合物 A12、A13、A14、および A15 が好ましい。

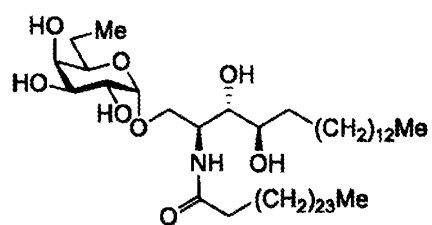
[0036] A12

[化12]



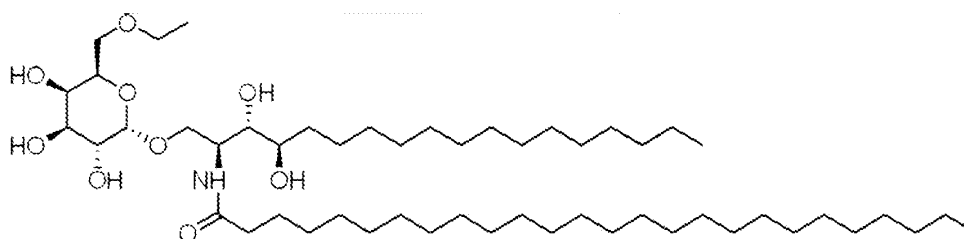
[0037] A 1 3

[化13]



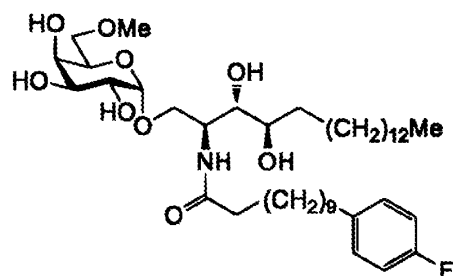
[0038] A 1 4

[化14]



[0039] A 1 5

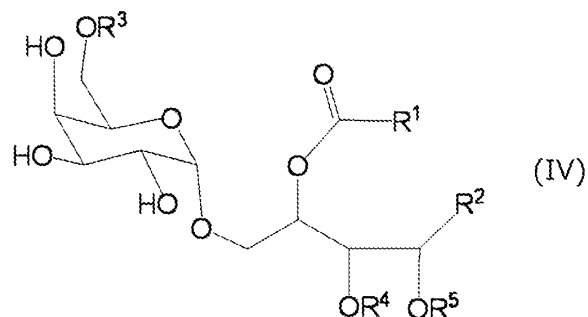
[化15]



[0040] 前記式 (III) の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報 (WO 2009/119692、米国特許 No. 8551959 等) に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式 (III) の化合物等が前記 NKT 細胞活性化リガンドの機能を有することは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0041] (1-4) 式 (IV) の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化4]



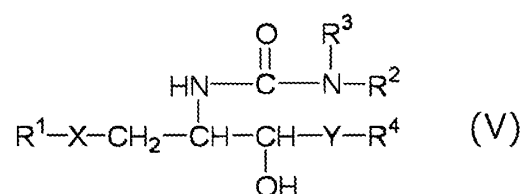
[0042] 式 (IV) 中、 R^1 は、炭素数 1～30 の炭化水素基を示し、 R^2 は、炭素数 1～20 の炭化水素基を示し、 R^3 は、水素原子または炭素数 1～5 の炭化水素基を示す。式 (IV) 中、 R^4 および R^5 は、同一または異なって、水素原子または炭素数 1～5 の炭化水素基を示してもよいし、または、 R^4 と R^5 とが一緒になって、炭素数 1～5 の 2 価の炭化水素基となり、隣接するエチレンジオキシと共に環構造を形成していてもよい。

[0043] 前記式 (IV) の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報 (

WO 2010/030012、米国特許No. 8580751等）に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式（IV）の化合物等が前記NK T細胞活性化リガンドの機能を有することは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0044] （1-5）式（V）の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化5]



[0045] 式（V）中、R¹は、アルドピラノース残基を示し、6位水酸基がアルキル化されていてもよく、R²は、炭素数1～26の炭化水素基を示し、置換基を有していてもよく、R³は、炭素数1～26の炭化水素基を示し、水素原子または置換基を有していてもよく、R⁴は、炭素数1～21の炭化水素基を示し、置換基を有していてもよく、Xは、酸素原子またはCH₂-を示し、Yは、-CH₂-、-CH(OH)-またはCH=CH-を示す。

[0046] 前記式（V）の化合物は、中でも以下の化合物が好ましい。

[1] （2S, 3S, 4R）-1-（α-D-ガラクトピラノシルオキシ）-2-（テトラコサニルウレイド）-3, 4-オクタデカンジオール

[2] （2S, 3S, 4R）-1-（α-D-ガラクトピラノシルオキシ）-2-（ヘキサデカニルウレイド）-3, 4-オクタデカンジオール

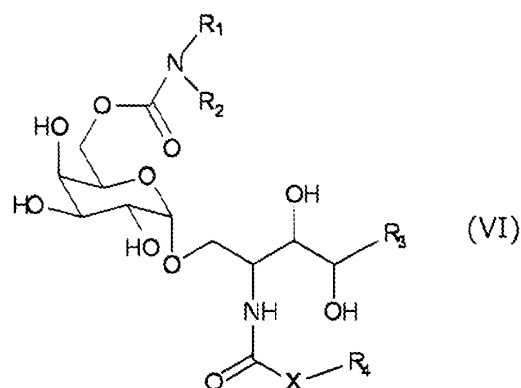
[3] （2S, 3S, 4R）-1-（6-O-メチル-α-D-ガラクトピラノシルオキシ）-2-（テトラコサニルウレイド）-3, 4-オクタデカンジオール

[0047] 前記式（V）の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報（WO 2011/552842、米国特許No. 8853173等）に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式（V）の化合物等が前記NK T細胞活性化リガンドの機能を有す

ることは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0048] (1-6) 式 (VI) の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化6]



[0049] 式 (VI) 中、

X は、アルキレン基または $-NH-$ を示し、

R_1 および R_2 は、同一または異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、またはアリール基を示し、置換基を有していてもよく、

R_1 および R_2 は、隣接する窒素原子と一緒になって 5 ～ 6 員環を形成してもよく、

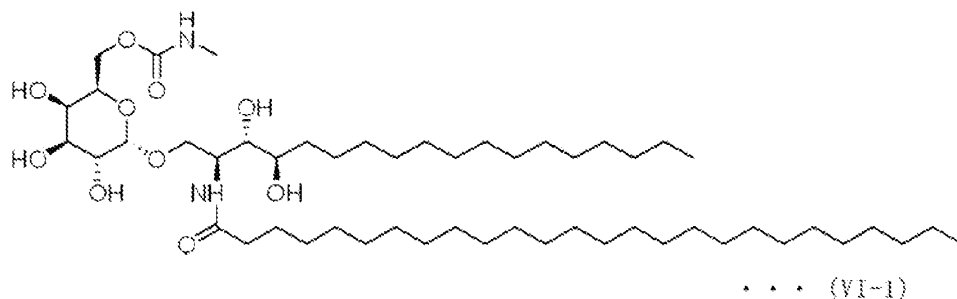
R_3 は、炭素数 1 ～ 20 の炭化水素基を示し、

R_4 は、炭素数 1 ～ 30 の炭化水素基を示す。

[0050] 前記式 (VI) の化合物は、中でも以下の化合物が好ましい。

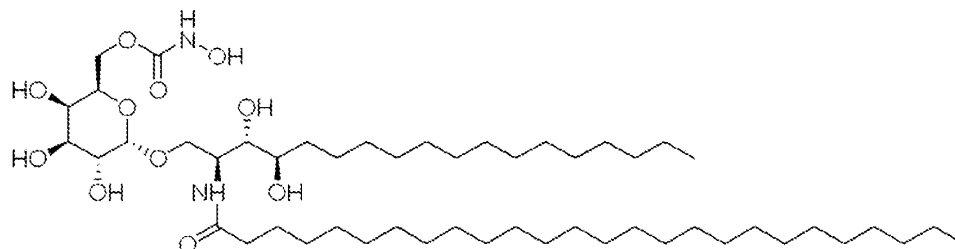
[0051] B 7

[化7]



[0052] B 1 6

[化16]



[0053] 前記式 (VI) の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報 (WO 2013/162016 A1、米国特許 No. 2015/152128 A1 等) に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式 (VI) の化合物等が前記 NK T 細胞活性化リガンドの機能を有することは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0054] 前記 NK T 細胞活性化リガンドの中でも、例えば、より強力に NK T 細胞の IFN- γ 産生を誘導する観点から、例えば、前記式 (III) または前記式 (VI) の化合物が好ましく、より好ましくは、A14、B16、B7 であり、特に好ましくは、B7 である。

[0055] (2) リポソーム構成脂質

前記リポソーム構成脂質は、コリン含有リン脂質、PEG 化脂質、およびコレステロール系脂質を含む。前記リポソーム構成脂質は、例えば、前記コリン含有リン脂質、前記 PEG 化脂質、および前記コレステロール系脂質のみを含んでもよいし、さらにその他の成分を含んでもよい。その他の成分は、例えば、前記リポソーム構成脂質によるリポソーム形成を阻害しない成分および量であればよい。

[0056] (2-1) コリン含有リン脂質

前記コリン含有リン脂質は、疎水部としてグリセロール骨格に 2 つの脂肪酸がエステル結合し、親水部としてグリセロール骨格にコリンがリン酸エステル結合した構造である。前記コリン含有リン脂質は、例えば、ホスファチ

ジルコリンがあげられる。前記コリン含有リン脂質は、例えば、PEG化されてもよいし、PEG化されていなくてもよく（非PEG化）、好ましくは、非PEG化コリン含有リン脂質である。

- [0057] 前記脂肪酸は、例えば、炭素鎖の末端にカルボキシル基を有する構造であり、炭素鎖が飽和した飽和脂肪酸でも、炭素鎖に二重結合を有する不飽和脂肪酸でもよい。前記コリン含有リン脂質において、2つの脂肪酸は、それぞれ独立して、飽和脂肪酸でも、不飽和脂肪酸でもよい。2つの脂肪酸の組合せは、例えば、飽和脂肪酸の組合せ、不飽和脂肪酸の組合せ、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸との組合せ等があげられる。2つの脂肪酸は、例えば、それぞれ独立して、分岐のある脂肪酸でもよいし、分岐のない脂肪酸でもよい。2つの脂肪酸は、例えば、同じ炭素数でもよいし、異なる炭素数でもよいし、同じ長さの炭素鎖（主鎖）を有してもよいし、異なる長さの炭素鎖（主鎖）を有してもよい。
- [0058] 前記脂肪酸の炭素数は、例えば、8〜70、24〜70、42〜58である。前記脂肪酸の主鎖の炭素数は、例えば、4〜35、12〜35、21〜29である。
- [0059] 前記コリン含有リン酸脂質は、例えば、下記表のような脂肪酸の組合せがあげられ、具体例として、以下のホスファチジルコリンがあげられる。

[0060] [表1]

コリン含有リン脂質		
脂肪酸の組合せ		具体例
脂肪酸 1	脂肪酸 2	ホスファチジルコリン
パルミチン酸 C 1 6 飽和	パルミチン酸 C 1 6 飽和	1,2 - dipalmitoyl - sn - glycer o - 3 - phosphocholin (DPPC) 16:0 - 16:0
オレイン酸 C 1 8 不飽和	オレイン酸 C 1 8 不飽和	1,2 - Dioleoyl - sn - glycer o - 3 - phosphocholine (DOPC) 18:1 - 18:1
パルミチン酸 C 1 6 飽和	オレイン酸 C 1 8 不飽和	1 - Palmitoyl - 2 - oleoyl - sn - glycer o - 3 - phosphocholine (DOPC) 16:0 - 18:1
オレイン酸 C 1 8 不飽和	ステアリン酸 C 1 8 飽和	1 - stearoyl - 2 - oleoyl - sn - glycer o - 3 - phosphocholine (PC) 18:0-18:1

- [0061] (2-2) PEG化脂質

前記PEG化脂質は、PEGで修飾されたリン脂質である。前記PEG化脂質は、疎水部としてグリセロール骨格に2つの脂肪酸がエステル結合し、親水部としてグリセロール骨格にPEGがエステル結合した構造である。

[0062] 前記脂肪酸は、例えば、飽和脂肪酸でも、不飽和脂肪酸でもよい。前記脂肪酸は、例えば、分岐のある脂肪酸でもよいし、分岐のない脂肪酸でもよい。

[0063] 前記脂肪酸の炭素数は、例えば、8～70、24～70、42～58である。前記脂肪酸の主鎖の炭素数は、例えば、4～35、12～35、21～29である。

[0064] 前記PEG化脂質において、PEG（ポリエチレングリコール）の平均分子量は、例えば、下限が、160Da、162Da、1,800Da、4,500Daであり、上限が、44,000Da、5,500Da、2,200Da、であり、範囲が、160～44,000Da、162～44,000Da、1,800～5,500Da、1,800～2,200Daである。前記平均分子量は、例えば、数平均分子量であり、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、NMR等により測定できる。

[0065] 前記PEG化脂質の具体例を下記表に例示する。下記表に、前記PEG化脂質における脂質およびその脂肪酸を、あわせて例示する。前記脂質は、例えば、リン脂質でもよい。前記リン脂質は、例えば、ホスファチジルコリン、ホスフォエタノールアミンを有するリン脂質等があげられる。下記表に例示した脂肪酸は、例えば、炭素数がC8～C22の範囲で変化してもよい。

[0066]

[表2]

脂肪酸	脂質	P E G 化脂質
ステアリン酸 C 1 8 飽和/ ステアリン酸 C 1 8 飽和	DSPE 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	DSPE-PEG 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol
ミリスチン酸 C 1 6 飽和/ ミリスチン酸 C 1 6 飽和	DMG 1, 2-Dimyristoyl-rac-glycerol	DMG-PEG 1, 2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol
ミリスチン酸 C 1 6 飽和/ ミリスチン酸 C 1 6 飽和	DPPE 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine	DPPE-PEG N-(Methylpolyoxyethylene oxycarbonyl)-1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
ステアリン酸 C 1 8 飽和/ ステアリン酸 C 1 8 飽和	DSG 1, 2-distearoyl-rac-glycerol	DSG-PEG 1, 2-distearoyl-rac-glycero-3-methylpolyoxyethylene
オレイン酸 C 1 8 不飽和/ オレイン酸 C 1 8 不飽和	DOPE 1, 2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	DOPE-PEG 1, 2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol methoxy
カプリル酸 C 8 飽和	Ceramide N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine	Ceramide-PEG N-octanoyl-sphingosine-1-[succinyl[methoxy(polyethylene glycol)2000]]
ステアリン酸 C 1 8 飽和	Stearic acid Ethyl octadecanoate stearic acid ethyl ester	Stearic acid-PEG Ethyl octadecanoate stearic acid ethyl ester-polyethylene glycol methoxy

[0067] (2-3) コレステロール系脂質

前記コレステロール系脂質としては、例えば、論文Konrad B. et al. (Science、1965年、150巻、3692頁)、Nsairat H. et al. (J. Liposome Res. , 2023年)等が参照でき、具体例として、コレステロール、 β -シトステロール (β -sitosterol)、コール酸ナトリウム (sodium cholate)、ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulphate) 等を使用できる。

[0068] 前記コレステロール脂質は、例えば、PEG化されたコレステロール系脂質でもよい、非PEG化のコレステロール系脂質でもよく、好ましくは前者

である。

[0069] (3) PEG化リポソーム

本発明のリポソーム剤は、前述のように、リポソームとして、PEG化リポソームを含む。本発明のリポソーム剤に含まれるリポソームは、前述のように、前記リポソーム構成脂質によりリポソーム化されており、前記リポソーム構成脂質は、前記PEG化リン脂質を含むことから、PEG化リポソームという。

[0070] 本発明のリポソーム剤は、例えば、前記PEG化リポソームを、1個含んでもよいし、2個以上含んでもよい。後者の場合、前記PEG化リポソームは、例えば、単一の分子量の分子を含む単分散リポソームでもよいし、異なる分子量の分子を含む多分散リポソームでもよい。

[0071] 前記PEG化リポソームの大きさおよび分散は、特に制限されない。前記PEG化リポソームの大きさおよび分散は、例えば、動的光散乱法(DLS)、レーザー回折法、SEM、TEM等の分析方法により測定できる。本発明のリポソーム剤に含まれる前記PEG化リポソームの大きさは、例えば、粒度分布(粒子径分布)により表すことができ、前記分析方法が利用できる。前記粒度分布は、例えば、頻度(%)と粒子径との関係を示す頻度分布で表すこともでき、累積(%)と粒子径との関係を示す積算分布により表すこともできる。

[0072] 動的光散乱法により大きさを評価する場合、例えば、ダイオードレーザー(例えば、 $\lambda = 532\text{nm}$)を備えたゼータ電位測定装置(例えば、商品名Zetasizer、Malvern Instruments Ltd.製)等が使用できる。評価の条件は、特に制限されず、例えば、検出温度 $22 \sim 28^\circ\text{C}$ (具体例: 25°C)である。強度平均流体力学的直径および多分散性指数は、例えば、キュムラント法に従って求めることができる。

[0073] 本発明のリポソーム剤に含まれる前記PEG化リポソームの大きさは、例えば、平均値(平均粒径)、メディアン値(中央値またはD50ともいう)、最頻値(modeまたはピークともいう)、分布幅等により表すことがで

きる。具体例として、前記PEG化リポソームは、例えば、動的光散乱法により大きさを確認した際、以下のような大きさであることが好ましい。なお、本発明において、前記PEG化リポソームの大きさの分析方法は、動的光散乱法には制限されない。

[0074] 前記PEG化リポソームは、例えば、前記ゼータ電位測定装置を用いた動的散乱法によって測定したZ平均流体力学的直径（Z-Average）が、所定の範囲に収まっていることが好ましい。Z平均流体力学的直径（Z-Average）は、その下限が、例えば、10nm以上、30nm以上、50nm以上、80nm以上、90nm以上であり、その上限が、例えば、500nm以下、400nm以下、300nm以下、200nm以下、150nm以下、140nm以下、130nm以下、120nm以下、110nm以下であり、その範囲が、例えば、10～500nm、30～500nm、10～400nm、30～400nm、30～300nm、50～200nm、80～120nmであり、また、 100 ± 50 nm、 100 ± 40 nm、 100 ± 30 nm、 100 ± 20 nm、 100 ± 10 nmである。

[0075] Z平均流体力学的直径（Z-Average）は、ISO標準に基づく流体力学径であり、累積法（cumulants method）によって決定できる。Z-Averageは、例えば、動的光散乱（DLS）の測定データから得られる相関関数と下記式とを用いて算出できる。

[0076] [数1]

$$\ln G_1(\tau) = \ln A - \Gamma \cdot \tau + \left(\frac{\mu_2}{2!} \right) \cdot \tau^2 - \left(\frac{\mu_3}{3!} \right) \cdot \tau^3$$

Aは、相関関数の切片であり、信号対ノイズ比を表す。

Γ は、平均減衰率であり、 $\Gamma = q^2 D$ の式に代入することで、粒子の拡散係数Dを算出する。

拡散係数Dをストークス・アインシュタイン方程式に代入することで、平均粒子径 D_H 、すなわちZ平均流体力学径が算出される。

[0077] 前記PEG化リポソームの大きさは、例えば、正規分布の場合、標準偏差が ± 2 STD以内、 ± 1 STD以内である。

[0078] 前記PEG化リポソームの大きさの分布は、例えば、多分散性指数（PDI）で表すことができる。PDIは、粒度分布の幅を評価する指標である。前記PEG化リポソームのPDIは、例えば、1、または、0.1～0.5、0.15～0.35、0.2～0.3である。PDIは、例えば、前記動的光散乱法によって測定した分布について、キュムラント法に従ったフィッティング解析から求めることができる。

[0079] 前記PEG化リポソームにおいて、前記コリン含有リン脂質（X）、前記PEG化脂質（Y）、および前記コレステロール系脂質（Z）の比率（X：Y：Z）は、特に制限されない。具体例として、m o l %の比率の場合、以下のように例示できる。

$$\begin{aligned} X : Y : Z &= 1 : 0.03 \sim 0.176 : 0.34 \sim 1.35, \\ &1 : 0.05 \sim 0.176 : 0.34 \sim 0.675, \\ &1 : 0.06 \sim 0.088 : 0.5 \sim 0.675 \end{aligned}$$

また、これらのリポソーム構成脂質（X+Y+Z）に対する前記NKトリガンド（L）の比率（X+Y+Z：L）は、特に制限されない。具体例として、m o l %の比率の場合、以下のように例示できる。

$$(X+Y+Z) : L = 1 : (0.05 \sim 2), 1 : (0.2 \sim 1), 1 : (0.5 \sim 1)$$

[0080] PEG化リポソームにおいて、前記NKトリガンドの量は、特に制限されない。PEG化リポソームの量を総脂質として換算した場合、PEG化リポソームの総脂質1mgあたりの前記NKトリガンドの量は、特に制限されず、下限は、例えば、0μgを超え、5μg以上、10μg以上、20μg以上、50μg以上、100μg以上、上限は、例えば、1000μg以下、900μg以下、800μg以下、700μg以下、600μg以下、500μg以下、範囲は、例えば、0を超え1000μg、5～900μg、10～900μg、20～900μg、20～800μg、50から700μg、50～600μg、100～500μgである。

[0081] (4) PEG化リポソームの調製方法

前記PEG化リポソームの調製方法は、特に制限されず、前記NK細胞活性化リガンドと前記リポソーム構成脂質とを原料として使用すればよく、脂質原料を使用した一般的なリポソーム化の方法を採用できる。リポソーム化の方法は、例えば、論文（O. H. voss et al., Curr. Protoc. Immunol., 2018、120の14の44巻、1-21頁）等が援用できる。以下に調製方法を例示するが、本発明は、これらの記載には制限されない。

[0082] 前記NK細胞活性化リガンドおよび前記リポソーム構成脂質を原料として、原料液を調製する。前記原料液は、例えば、前記NK細胞活性化リガンドを含むリガンド液と、前記コリン含有リン脂質、前記PEG化リン脂質、および前記コレステロール系脂質を含む脂質混合液とをそれぞれ別個に調製してもよいし、前記リガンド液、前記コリン含有リン脂質の含有液、前記PEG化リン脂質の含有液、および前記コレステロール系脂質の含有液を、それぞれ別個に調製してもよい。前記原料液の溶媒は、特に制限されず、例えば、有機溶媒があげられる。前記有機溶媒は、例えば、メタノール等のアルコール、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトニトリル等が例示でき、いずれ一種類の溶媒でもよいし、二種類以上の混合溶媒でもよい。前記原料液は、例えば、前記有機溶媒で希釈した希釈液でもよい。

[0083] つぎに、前記各種原料液を混合する。例えば、前記リガンド液と前記脂質混合液とを混合してもよいし、前記リガンド液、前記コリン含有リン脂質含有液、PEG化リン脂質含有液、およびコレステロール系脂質含有液を混合してもよい。この際、前記コリン含有リン脂質（X）、前記PEG化脂質（Y）、および前記コレステロール系脂質（Z）の混合比率（X：Y：Z）、および、これらのリポソーム構成脂質（X+Y+Z）に対する前記NK細胞リガンド（L）の混合比率（X+Y+Z：L）は、特に制限されず、前述のようなmol%の比率が例示できる。

[0084] そして、前記各原料を混合した原料混合液から溶媒画分を蒸発させる。溶媒画分の蒸発は、例えば、前記原料混合液を、フラスコ等の容器内にいれ、

エバポレーターに供することで行える。前記溶媒画分の蒸発によって、前記容器の内面に脂質膜を形成できる。この脂質膜が、前記N K T細胞活性化リガンドを含有するP E G化リポソームで構成される脂質膜である。

[0085] そして、前記容器の内面に形成された脂質膜を、例えば、水性溶媒に懸濁し、超音波処理する。超音波処理によって前記脂質膜を破砕することで、前記N K T細胞活性化リガンドを含むP E G化リポソームに分解できる。前記水性溶媒は、特に制限されず、例えば、水、生理食塩水、緩衝生理食塩水、緩衝液等があげられる。

[0086] 前記脂質膜の分解物（P E G化リポソームの混合物）は、例えば、所望の孔径の膜を用いてろ過することによって、所望の大きさおよび分散のリポソーム画分に分類できる。

[0087] （５）リポソーム剤の形態

本発明のリポソーム剤の形態は、特に制限されず、液体でも固体でもよい。前記液体の場合、例えば、溶媒に分散された分散液である。前記溶媒は、例えば、前記P E G化リポソームが溶解しない溶媒であり、具体例としては、前述の水性溶媒があげられる。固体の場合、例えば、前記分散液から前記水性溶媒を除去した状態、前記水性溶媒を除去後、乾燥させた状態（乾燥体）である。

[0088] 本発明のリポソーム剤が前記液体の場合、前記P E G化リポソームの濃度は、特に制限されない。前記本発明のリポソーム剤において、前記P E G化リポソームの濃度は、例えば、前記P E G化リポソームの脂質量を用いて表すことができる。前記本発明のリポソーム剤におけるP E G化リポソーム剤の濃度は、前記P E G化リポソームの脂質量に換算して、例えば、下限が、 0.05 mg/mL 、 0.1 mg/mL 、 0.5 mg/mL であり、上限が、 1 mg/mL 、 5 mg/mL 、 25 mg/mL であり、範囲が、 $0.05\sim 25\text{ mg/mL}$ 、 $0.1\sim 5\text{ mg/mL}$ 、 $0.5\sim 1\text{ mg/mL}$ である。前記濃度は、例えば、本発明のリポソーム剤の保存時の濃度でもよいし、使用時の濃度でもよい。

[0089] 前記本発明のリポソーム剤を保存する場合、その条件は、特に制限されない。保存温度は、例えば、 $2 \sim 15^{\circ}\text{C}$ 、 $3 \sim 5^{\circ}\text{C}$ であり、保存期間は、例えば、90日以下、30日以下、14日以下である。

[0090] 本発明のリポソーム剤は、例えば、前記PEG化リポソームの他に、その他の添加剤を含んでもよい。前記添加剤は、例えば、後述する本発明のNK T細胞活性化剤における添加剤を援用できる。本発明のリポソーム剤は、例えば、後述する本発明のNK T細胞活性化剤および本発明の医薬組成物の記載を援用できる。

[0091] (6) リポソーム剤の性質

本発明のリポソーム剤は、例えば、安定性に優れる。本発明のリポソーム剤の安定性は、例えば、前記リポソーム剤に含まれる前記PEG化リポソームの経時的な粒度分布の変化により表すことができる。前記安定性は、例えば、保存期間に対する安定性（安定性1）、保存後の希釈による安定性（安定性2）等で評価できる。

[0092] 前記保存期間に対する安定性1は、例えば、一定期間経過後の前記分散液における凝集体の有無または量により、評価できる。具体的には、一定期間経過の前記分散液（ D_1 ）が、同条件で調製した直後の分散液（ D_0 ）と比較して、凝集体が発生しているか否か、凝集体が発生している場合は、どの程度の凝集体の発生であるか、等によって評価できる。

[0093] 保存後の希釈による安定性2は、例えば、一定期間経過後の前記分散液を希釈した希釈液における凝集体の有無または量により、評価できる。具体的には、一定期間経過の前記分散液（ D_1 ）を希釈した希釈液（ d_1 ）が、同条件で分散液（ D_0 ）を調製し且つ希釈した直後の希釈液（ d_0 ）と比較して、凝集体が発生しているか否か、凝集体が発生している場合は、どの程度の凝集体の発生であるか、等によって評価できる。

[0094] 本発明のリポソーム剤において、前記PEG化リポソームの表面電荷は、特に制限されない。前記表面電荷は、例えば、後述の例示を援用でき、例えば、 $-80\text{ mV} \sim 5\text{ mV}$ であり、また、負電荷が好ましい。

[0095] (7) リポソーム剤の用途

本発明のリポソーム剤は、例えば、後述する本発明のNK細胞活性化剤およびNK細胞の活性化方法、本発明の医薬組成物および治療方法等に使用できる。本発明のリポソーム剤の使用方法は、後述する各実施形態の記載を援用できる。

[0096] 2. NK細胞活性化剤およびNK細胞の活性化方法

本発明のNK細胞活性化剤は、前述のように、前記本発明のリポソーム剤を含むことを特徴とする。また、本発明のNK細胞の活性化方法は、前述のように、前記本発明のリポソーム剤を使用することを特徴とする。本発明のNK細胞活性化剤および活性化方法は、前記本発明のリポソーム剤を使用することが特徴であり、その他の条件は、特に制限されない。また、本発明のNK細胞活性化剤および活性化方法は、他の実施形態の記載を援用できる。

[0097] (1) NK細胞活性化剤

本発明のNK細胞活性化剤は、前記本発明のリポソーム剤を含む。本発明のNK細胞活性化剤は、例えば、前記本発明のリポソーム剤のみを含んでもよいし、その他の添加剤を含んでもよい。前記添加剤は、例えば、薬学的に許容できる添加剤が好ましい。薬学的に許容できる添加剤とは、例えば、製薬分野において公知であるものがあげられる。

[0098] 前記添加剤は、例えば、キャリア、希釈剤、溶媒、賦形剤、安定化剤、等張剤等があげられる。前記キャリアは、例えば、スクロース等の単糖、セルロース等の多糖、前記水性溶媒等があげられる。前記希釈剤および賦形剤は、例えば、前記キャリアと同様のものがあげられる。前記溶媒は、例えば、前記水性溶媒等があげられる。また、前記添加剤として、例えば、PD-L1 (Programmed cell Death ligand 1)、抗体等のタンパク質薬剤、細胞性薬剤等の薬剤も併用できる。なお、前記添加剤は、例えば、親水性、弱疎水性等が好ましい。

[0099] 本発明のNK細胞活性化剤は、例えば、前記PEG化リポソームが使用

時の濃度に調整されてもよいし、それよりも濃い濃度であり、使用時に希釈される濃度でもよい。本発明のNK T細胞活性化剤における前記PEG化リポソームの濃度は、特に制限されず、例えば、前記本発明のNK T細胞活性化剤で例示した濃度が援用できる。

[0100] (2) NK T細胞の活性化方法

本発明のNK T細胞活性化方法は、本発明のリポソーム剤の使用により、NK T細胞を活性化する方法である。本発明において、前記リポソーム剤は、前記本発明のNK T細胞活性化剤、後述する本発明の医薬組成物に読み替え可能である。

[0101] 本発明において、本発明のリポソーム剤の使用は、例えば、*in vivo*でもよいし、*in vitro*でもよい。

[0102] 本発明のリポソーム剤を*in vivo*で使用する場合、本発明のNK T細胞の活性化方法は、被検体に、前記リポソーム剤を投与する工程を含む。

[0103] 前記被検体は、例えば、ヒト、または非ヒト動物である。前記非ヒト動物は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サル、ブタ、ヤギ、ヒツジ等の非ヒト哺乳動物があげられる。

[0104] 前記投与方法は、特に制限されず、経口投与または非経口投与であり、非経口投与が好ましい。前記非経口投与は、例えば、注射、点滴等である。投与部位は、例えば、皮下、静脈内、動脈内、粘膜内、リンパ節内、局所である。前記局所は、例えば、目的の患部組織でもよいし、前記患部に前記リポソーム剤をデリバリーできる部位等でもよい。本発明のリポソーム剤の形態は、前述のように特に制限されず、投与形態に応じて、適宜決定できる。前記形態は、例えば、注射剤、点滴剤等である。

[0105] 本発明のリポソーム剤の投与条件は、特に制限されず、投与対象の動物種、年齢、性別、健康状態、体重等に応じて、適宜設定できる。投与対象がヒト成人男性の場合、例えば、1回あたりの前記PEG化リポソームの投与量は、0.005～50mg/体重kg、0.15～15mg/体重kg、1～15mg/体重kgである。投与回数は、例えば、1～28日ごと、1日

あたり1～2回である。

[0106] 本発明のリポソーム剤を皮下投与した場合、例えば、腋窩リンパ節等のリンパ節、肝臓、乳房等に、効率良く前記PEG化リポソームをデリバリーすることができる。また、本発明のリポソーム剤を脇腹の皮下に投与した場合、例えば、12～48時間以内（具体例として約24時間後）に、前記PEG化リポソームを腋窩リンパ節に集積させることができる。

[0107] 本発明のリポソーム剤をin vivoで使用する場合、本発明のNK細胞の活性化方法は、例えば、前記リポソーム剤をNK細胞に接触させる工程を含む。

[0108] 3. 医薬組成物およびがんの治療方法

本発明の医薬組成物は、前述のように、前記本発明のリポソーム剤を含むことを特徴とする。また、本発明のがんの治療方法は、前述のように、被検体に前記本発明のリポソーム剤または前記本発明の医薬組成物を投与する工程を含むことを特徴とする。本発明の医薬組成物および治療方法は、前記本発明のリポソーム剤を使用することが特徴であり、その他の条件は、特に制限されない。また、本発明の医薬組成物および治療方法は、他の実施形態の記載を援用できる。本発明において、前記リポソーム剤および前記医薬組成物は、前記本発明のNK細胞活性化剤に読み替え可能である。

[0109] (1) 医薬組成物

本発明の医薬組成物は、前記本発明のリポソーム剤を含む。本発明の医薬組成物は、例えば、前記本発明のリポソーム剤のみを含んでもよいし、その他の添加剤を含んでもよい。前記添加剤は、例えば、前記本発明のNK細胞活性化剤における記載を援用できる。

[0110] 本発明の医薬組成物は、例えば、NK細胞の活性化により予防または治療が可能な疾患に利用できる。前記疾患は、例えば、がんがあげられる。対象となるがんは、乳がん、皮膚がん、血液がん、大腸がん、前立腺がん、卵巣がん等があげられる。また、対象となる癌は、例えば、転移性の強いがんがあげられ、具体例としては、他への転移が生じやすい血液がん、肺がん、

乳がん、大腸がん、前立腺がん等のがんがあげられる。

[0111] (2) がんの治療方法

本発明のがんの治療方法は、被検体に本発明のリボソーム剤または前記医薬組成物を投与する工程を含むことを特徴とする。前記被検体は、特に制限されず、前述のような、ヒト、非ヒト動物である。

[0112] 4. 用途

本発明は、NK T細胞の活性化に使用するための前記リボソーム剤である。また、本発明は、NK T細胞活性化剤の製造に使用するための前記リボソーム剤である。

[0113] 本発明は、がん等の疾患の治療に使用するための前記リボソーム剤である。また、本発明は、抗がん剤等の医薬組成物の製造に使用するための前記リボソーム剤である。

[0114] [実施形態1]

本発明のリボソーム剤は、特に、難治がんに対するNK T細胞標的治療に適用することが好ましい。本実施形態では、前記難治がんに対するNK T細胞標的治療に使用するリボソーム剤を例示する。なお、特に示さない限り、前述の例示を援用できる。

[0115] 本実施形態における難治がんは、従来の免疫がん治療剤であるPD-1抗体 (anti-PD1) およびPD-L1抗体 (anti-PDL1) 等が効かないがん種であり、具体例として、トリプルネガティブ乳がんがあげられる。トリプルネガティブ乳がんとは、乳がん細胞表面に発現するホルモン受容体であるエストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、およびHER2 (ヒト表皮成長因子受容体2型) との免疫反応が全てネガティブである乳がんのことを意味する。乳がんのうち、トリプルネガティブのがん種としては、例えば、4T1、Hs578T、BT-20、HCC70等があげられる。本実施形態におけるリボソーム剤は、難治性がんの中でも、トリプルネガティブ乳がんに対するNK T細胞標的治療に適用することが好ましい。

- [0116] 本実施形態のリポソーム剤は、例えば、前述のように、トリプルネガティブ乳がんの患者に対して好ましく使用できる。トリプルネガティブ乳がんの患者は、例えば、免疫治療に効果を示し難く、前述のような前記PD-1抗体または前記PD-L1抗体による治療効果が得られにくい。このため、本実施形態のリポソーム剤は、例えば、前記PD-1抗体または前記PD-L1抗体を投与しても、がんの成長が抑制できなかった患者、前記PD-1抗体または前記PD-L1抗体を投与しても、がんの成長が抑制できないと推測される患者に対して、特に好ましく使用できる。
- [0117] 本実施形態のリポソーム剤は、トリプルネガティブ乳がんの他、いわゆるコールドがん（cold tumors）にも適用できる。コールドがんは、がん免疫学において、免疫系がほとんど反応を示さない腫瘍を意味する。コールドがんは、一般的に、免疫系による攻撃が弱いため、治療が難しいとされており、主な特徴は、腫瘍内に免疫細胞（特にT細胞）が少なく、低い免疫細胞浸潤、抗原提示の欠如、免疫抑制環境等があげられる。また、4T1細胞株は、主にマウスの乳がん研究に使用される、高度な転移性の腫瘍細胞株であり、一般的には「コールドがん」に分類される。これは、4T1腫瘍が、自然免疫系の細胞および獲得免疫系の細胞による免疫応答が弱く、免疫細胞の浸潤が乏しい特徴を持っていることに起因し、4T1腫瘍は、免疫抑制的な微小環境を持ち、免疫系の攻撃を回避しやすいとされている。
- [0118] 本実施形態のリポソーム剤は、以下の条件を満たすことが好ましい。具体的に、本実施形態のリポソーム剤は、以下の全ての条件（条件1、条件2、および条件3）を満たすことが好ましい。これらの条件を満たすことによって、例えば、前記リポソーム剤をより効率良くリンパ節に集積させることができ、また、前記リポソーム剤をより効率良く樹状細胞等の抗原提示細胞に取り込ませることができる。そして、これによって、さらに効果的にNK細胞を活性化できることから、患者が、前述のようなPD-1抗体等が効かない患者であっても、がんの成長を抑制することが可能である。
- [0119] （条件1）

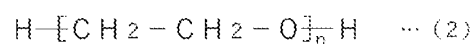
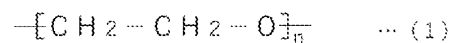
本実施形態のリポソーム剤は、前記PEG化リポソームの直径が、以下の条件であることが好ましい。すなわち、Z平均流体力学直径（Z-average）で表す場合、下限が、例えば、10nm以上、50nm以上、60nm、80nm以上、90nm以上であり、上限が、例えば、400nm以下、200nm以下、150nm以下、140nm以下、130nm以下、120nm以下、110nm以下であり、範囲が、例えば、10～400nm、50～200nm、60～140nm、60～130nm、80～120nmである。本実施形態において、より好ましくは、 100 ± 40 nm、 100 ± 30 nmであり、特に好ましくは、 100 ± 20 nm、 100 ± 10 nmである。

[0120]（条件2）

本実施形態のリポソーム剤は、前記リポソーム構成脂質として含まれる前記（2-2）のPEG化脂質において、リン脂質を修飾するPEGの末端が水酸基であることが好ましい。末端が水酸基のPEGを、以下、PEG-OHともいい、PEG-OHで修飾されたリン脂質を、以下、PEG-OH化脂質ともいう。

[0121] PEGは、下記（1）の構造式で表すことができ、nは、正の整数である。本実施形態において、前記PEG脂質のPEGは、下記式（2）の構造式に示すように、両端が水素原子であり、右端は、水酸基であることが好ましい。下記式（2）のPEG-OHで修飾されたPEG-OH化リン脂質を使用した場合、本実施形態のリポソーム剤において、リポソーム粒子は、PEG-OHに由来する水酸基に富む表面を有する。

[0122] [化17]



[0123] 本実施形態のリポソーム剤は、前記条件2を満たすことによって、例えば、樹状細胞等の抗原提示細胞に、より効率良く取り込ませることができる。

[0124] (条件3)

本実施形態のリポソーム剤は、前記PEG化リポソームの表面電荷が、負電荷であることが好ましく、前記PEG化リポソームが負に帯電しているともいう。

[0125] 前記PEG化リポソームの電荷(単位:クーロン)は、下限が、例えば、 -80 mV 以上、 -60 mV 以上、 -45 mV 以上、 -40 mV 以上、 -30 mV 以上であり、上限が、例えば、 5 mV 以下、 0 mV 以下、 0 mV 未満、 -5 mV 以下、 -10 mV 以下、 -20 mV 以下であり、範囲が、例えば、 $-80\sim 5\text{ mV}$ 、 $-80\sim 0\text{ mV}$ 、 $-60\sim 0\text{ mV}$ 、 $-80\sim 0\text{ mV}$ 未満、 $-60\sim 0\text{ mV}$ 未満、 $-80\sim -5\text{ mV}$ 、 $-45\sim -5\text{ mV}$ 、 $-40\sim -5\text{ mV}$ 、 $-40\sim -10\text{ mV}$ 、 $-40\text{ mV}\sim -20\text{ mV}$ 、 $-30\pm 20\text{ mV}$ 、 $-30\pm 10\text{ mV}$ 、 $-20\pm 10\text{ mV}$ である。また、前記PEGリポソームの電荷は、例えば、前述のように、負電荷が好ましく、具体例として、 $-80\sim -5\text{ mV}$ が好ましく、 $-30\pm 20\text{ mV}$ 、 $-30\pm 10\text{ mV}$ がより好ましい。本実施形態のリポソーム剤は、複数の前記PEG化リポソームを含む。このため、本実施形態のリポソーム剤において、例えば、全ての前記PEG化リポソームが、同じ電荷でもよく、異なる電荷でもよい。また、全ての前記PEG化リポソームのうち、例えば、 50% 以上、 80% 以上、 95% 以上が、前記電荷を満たしてもよい。また、本発明のリポソーム剤全体として、前記電荷を満たしてもよい。

[0126] 以下、実施例等により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0127] [試薬等]

コリン含有リン脂質:

ホスファチジルコリン (1,2-ジエルコイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、東京化成工業株式会社)

コレステロール系脂質:

コレステロール（和光純薬株式会社）

正電荷脂質：

ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド（DDAB, sigma aldrich社）

PEG化リン脂質：

・末端が水酸基のPEGで修飾されたリン脂質

HO-PEG-DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol、ブロードファーム社)

・末端がメチル基のPEGで修飾されたリン脂質

METHYL-PEG-DSPC (1,2-Distearoyl-phosphatidyl Ethanolamine-Methyl-Polyethyleneglycol Conjugate、東京化成工業株式会社)

NKT細胞活性化リガンド：

B7（株式会社ナードケミカルズ）

α -GalCer（株式会社ナードケミカルズ）

[0128] 多孔質膜：

商品名ポリカーボネート膜（サイティバ社）

1：孔径1000nm、回収粒径1000nm

2：孔径400nm、回収粒径400

3：孔径200nm、回収粒径200nm

4：孔径100nm、回収粒径100nm

5：孔径50nm、回収粒径50nm

RPMI-1640培地（RPMI、sigma aldrich社）

緩衝液PBS（-）（タカラバイオ社）

ウシ胎児血清（FBS、バイオロジカルインダストリー社）

ペニシリンーストレプトマイシン（ライフテクノロジー社）

スルホシアニン5スクシンイミジルエステル（Sulfo-Cy5-NHS、ルミプローブ社）

[0129] [細胞等]

実施例の細胞は、いずれも理研バイオリソースセンターから入手した。各細胞の培養は、10% FBSおよび1×ペニシリンーストレプトマイシンを含有するRPMI培地を使用し、培養条件は、37℃、5% CO₂雰囲気下とした。BALB/cマウスおよびC57BL/6jマウスは、日本チャールズリバー社から購入した。動物実験手順は、東京大学における実験動物の飼育と使用のためのガイドラインに従って実行した。

[0130] [実施例1]

PEG化リポソームを調製した。調製は、使用する試薬および添加量等を除いて、基本的に、論文 (O. H. voss et al., Curr. Protoc. Immunol., 2018) に従い、以下のように行った。

[0131] まず、各成分の液体試薬を調製した。前記NKトリガンド (B7または α -GalCer) は、混合溶媒 (MeOH:クロロホルム=4:6、体積比) に1mg/mLとなるように溶解した。 α -GalCerは、混合溶媒 (MeOH:クロロホルム=4:6、体積比) に1mg/mLとなるように溶解した。ホスファチジルコリンは、クロロホルムに5mg/mLとなるように溶解した。前記PEG化リン酸脂質 (HO-PEG-DSPEまたはMETHYL-PEG-DSPE) は、クロロホルムに5mg/mLとなるように溶解した。前記正電荷脂質 (DDAB) は、クロロホルムに10mg/mLとなるように溶解した。コレステロールは、クロロホルムに5mg/mLとなるように溶解した。

[0132] 前記各成分の液体試薬を、以下の組成となるように容量20mLのフラスコ内で混合し、トータル1mLの混合液を調製した。下記混合液において、50%および0%との記載は、前記混合液における前記NK細胞活性化リガンドの質量%である。前記NK細胞活性化リガンド以外の成分は、前記混合液の間でモル比を一定とし、各混合液において全体の脂質濃度は、1mg/mLとなるように設定した。以下の50%B7/中性PEG末端-OHリポソーム用混合液および50%B7/正電荷PEG末端-OHリポソーム用混合液は、形成するリポソームの表面電荷を正電荷または中性とするため

に、前記正電荷脂質（DDAB）を添加した。

[0133] [NK T細胞活性化リガンド：B7]

(50% B7 / 負電荷PEG末端-OHリポソーム用混合液)

B7液	500 μ L
ホスファチジルコリン液	34 μ L
コレステロール液	40 μ L
HO-PEG-DSPE液	27 μ L
クロロホルム	残分

(10% B7 / 負電荷PEG末端-OHリポソーム用混合液)

B7液	100 μ L
ホスファチジルコリン液	114 μ L
コレステロール液	40 μ L
HO-PEG-DSPE液	27 μ L
クロロホルム	残分

(2% B7 / 負電荷PEG末端-OHリポソーム用混合液)

B7液	20 μ L
ホスファチジルコリン液	130 μ L
コレステロール液	40 μ L
HO-PEG-DSPE液	27 μ L
クロロホルム	残分

(50% B7 / 負電荷PEG末端-Meリポソーム用混合液)

B7液	500 μ L
ホスファチジルコリン液	34 μ L
コレステロール液	40 μ L
METHYL-PEG-DSPE	27 μ L
クロロホルム	残分

(50% B7 / 中性PEG末端-OHリポソーム用混合液)

B7液	500 μ L
-----	-------------

ホスファチジルコリン液	23.4 μ L
コレステロール液	40 μ L
HO-PEG-DSPE液	27 μ L
DDAB液	5.3 μ L
クロロホルム	残分

(50% B7 / 正電荷PEG末端-OHリポソーム用混合液)

B7液	500 μ L
ホスファチジルコリン液	12.8 μ L
コレステロール液	40 μ L
HO-PEG-DSPE液	27 μ L
DDAB液	10.6 μ L
クロロホルム	残分

[0134] [NK T細胞活性化リガンド: α -GalCer]

(50% α -GalCer / 負電荷PEG末端-OHリポソーム用混合液)

α -GalCer液	500 μ L
ホスファチジルコリン液	32.7 μ L
コレステロール液	41 μ L
HO-PEG-DSPE液	28 μ L
クロロホルム	残分

[0135] [NK T細胞活性化リガンド: 未添加]

(0%コントロール / 負電荷PEG末端-OHリポソーム用混合液)

NK Tリガンド液	0 μ L
ホスファチジルコリン液	134 μ L
コレステロール液	40 μ L
HO-PEG-DSPE液	27 μ L
クロロホルム	残分

(0%コントロール / 負電荷PEG末端-Meリポソーム用混合液)

NK Tリガンド液	0 μ L
-----------	-----------

ホスファチジルコリン液	134 μ L
コレステロール液	40 μ L
METHYL-PEG-DSPC液	27 μ L
クロロホルム	残分

[0136] エバポレーター（東京理化器械株式会社）を用いて、30 hPaの真空中、30℃、10分間、前記フラスコを回転させ、前記混合液中の溶媒を完全に乾燥させた。その結果、前記フラスコの内面に脂質の薄膜が形成された。そして、前記フラスコにPBS 1 mLを添加して再懸濁した。この懸濁液を、超音波バス（アイワメディカルインダストリー株式会社）を用いて、28 kHz、5分間処理し、さらに、超音波ホモジナイザー（タイテック株式会社）を用いて、20 kHz、30秒間処理した。これによって、前記脂質薄膜を破碎し、小さな破片に分解されたPEG化リポソームを得た。

[0137] 前記分解されたPEG化リポソームを、さらに、前記多孔質膜と押出機（商品名AE-10、Bio-Equip社）とを用いて、所定範囲の粒径となるように処理した。処理時の溶媒には、PBSを使用した。具体的には、まず、前記多孔質膜1（回収粒径1000 μ m）を前記押出機にセットし、前記分解されたPEG化リポソームを3回以上通過させた。つぎに、前記多孔質膜2（回収粒径400 nm）を前記押出機にセットし、前記多孔質膜1を通過したPEG化リポソーム画分を3回以上通過させた。これにより、粒径400 nm程度のPEG化リポソームを、PEG化リポソーム画分Aとして回収した。続いて、前記多孔質膜3（回収粒径200 nm）を前記押出機にセットし、前記多孔質膜2を通過したPEG化リポソーム画分を3回以上通過させた。これにより、粒径200 nm程度のPEG化リポソームを、PEG化リポソーム画分Bとして回収した。続いて、前記多孔質膜4（回収粒径100 nm）を2枚重ねて前記押出機にセットし、前記多孔質膜3を通過したPEG化リポソーム画分を3回以上通過させた。これにより、粒径100 nm程度のPEG化リポソームを、PEG化リポソーム画分Cとして回収した。さらに、前記多孔質膜5（回収粒径50 nm）を前記押出機にセット

し、前記多孔質膜4を通過したPEG化リポソームを15回以上通過させた。これにより、粒径50nm程度のPEG化リポソームを、PEG化リポソーム画分Dとして回収した。

[0138] 回収した前記PEG化リポソーム画分（以下、リポソームサンプルともいう）を、それぞれPBSに懸濁し、PEG化リポソームの粒径（Z平均流体力学的直径（Z-average））および多分散指数（PDI）、ゼータ電位を確認した。

[0139] 具体的には、ダイオードレーザー（ $\lambda = 532\text{ nm}$ ）を備えたゼータ電位測定装置（商品名Zetasizer、Malvern Instruments Ltd. 社）を用い、25℃で検出角173°の動的光散乱（DLS）により、前記PEG化リポソームの粒径（Z平均流体力学的直径（Z-average））およびPDI、ゼータ電位を評価した。前記粒径およびPDIは、キュムラント法に従って求めた。

[0140] 前記リポソームサンプル（前記PEG化リポソーム画分）について、リポソームの粒径（Z平均流体力学的直径（Z-average））およびPDI、ゼータ電位の結果を下記表に示す。

(1-1)

50%B7／負電荷PEG末端-OHリポソーム 画分C（粒径：約100nm）

(1-2)

50% α -GalCer／負電荷PEG末端-OHリポソーム 画分C（粒径：約100nm）

(1-3)

50%B7／負電荷PEG末端-OHリポソーム 画分D（粒径：約50nm）

(1-4)

50%B7／負電荷PEG末端-OHリポソーム 画分B（粒径：約200nm）

(1-5)

50%B7／負電荷PEG末端-OHリポソーム 画分A (粒径: 約400nm)

(1-6)

10%B7／負電荷PEG末端-OHリポソーム 画分C (粒径: 約100nm)

(1-7)

2%B7／負電荷PEG末端-OHリポソーム 画分C (粒径: 約100nm)

(1-8)

50%B7／負電荷PEG末端-Meリポソーム 画分C (粒径: 約100nm)

(1-9)

50%B7／中性PEG末端-OHリポソーム 画分C (粒径: 約100nm)

(1-10)

50%B7／正電荷PEG末端-OHリポソーム 画分C (粒径: 約100nm)

(1-11)

0%コントロール／負電荷PEG末端-OHリポソーム 画分C (粒径: 約100nm)

(1-12)

0%コントロール／負電荷PEG末端-Meリポソーム 画分C (粒径: 約100nm)

[0141]

[表3]

PEG化 リポソーム画分 サンプルNo.	NKTリガンド		PEG末端	粒径 Z-average (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
	%	種類				
1-1	50%	B7	-OH	108.6	0.203	-36.2
1-2	50%	α -GalCer	-OH	117.7	0.147	-22.4
1-3	50%	B7	-OH	33.36	0.255	-34.8
1-4	50%	B7	-OH	208.6	0.378	-37.2
1-5	50%	B7	-OH	405.5	0.484	-39.5
1-6	10%	B7	-OH	101.0	0.221	-30.9
1-7	2%	B7	-OH	110.5	0.198	-35.6
1-8	50%	B7	-Me	102.1	0.219	-36.0
1-9	50%	B7	-OH	115.4	0.199	-0.36
1-10	50%	B7	-OH	111.6	0.246	+34.5
1-11	0%	-	-OH	102.4	0.165	-30.2
1-12	0%	-	-Me	103.6	0.151	-39.4

[0142] また、PBSに代えて、色素含有PBSを使用した以外は、PBSを使用したと同様の方法により、各種リポソーム画分を、リポソームサンプルとして調製した。前記色素含有PBSは、以下のように調製した。すなわち、色素試薬（Sulfo-cyanine 5 succinimidyl ester、商品名：Sulfo-Cy5（登録商標）-NHS、Lumiprobe社）をPBSに0.1mg/mLとなるように混合し、24時間放置した。PBS中で前記色素試薬を放置することで、加水分解により前記色素試薬から-NHSをはずし、濃度0.1mg/mLでSulfo-Cy5（登録商標）を含む色素含有PBSを調製した。前記色素含有PBSを使用して調製した各PEG化リポソームは、色素非含有のPBSを使用して調製した前記PEG化リポソームと、同様の粒径およびPDIであることは確認済みである。

[0143] 以下、特に示さない限り、PBSとは、色素非含有のPBSのことをいう。また、色素非含有PBSを使用して調製したPEG化リポソームは、リポソームとし、色素含有PBSを使用して調製したPEG化リポソームは、リポソーム（色素含有PBS）とする。

[0144] [実施例2]

実施例1で調製したPEG化リポソームについて安定性を確認した。

[0145] (1) 長期保存安定性

前記実施例1で調製したB7リポソーム（サンプルNo. 1-1）、 α -GCリポソーム（サンプルNo. 1-2）、NKTリガンド（-）リポソーム（サンプルNo. 1-11）を、PEG化リポソーム濃度1mg/mL（

脂質量に換算、以下同様。)に調整し、リポソームサンプルとして使用した。なお、PEG化リポソーム濃度の調整には、PBSを使用した。前記リポソームサンプルにおけるNKTリガンド濃度は、蛍光修飾したボロン酸による従来の糖脂質検出法 (https://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/5634/)により、ピレン-1-ボロン酸 (sigma aldrich社)を利用して、測定した。前記50%B7の混合液から調製したリポソームサンプル (PEG化リポソーム濃度1mg/mL)のB7濃度は、0.471mg/mL (約0.5mg/mL)であり、前記50%α-GalCerの混合液から調製したリポソームサンプル (PEG化リポソーム濃度1mg/mL)のGalCer濃度は、0.472mg/mL (約0.5mg/mL)であった。

[0146] 前記リポソームサンプルを、4℃で保存した。保存開始前 (Day 0) のリポソームサンプルと、保存開始から10日後 (Day 10) および90日後 (Day 90) のリポソームサンプルについて、それぞれ、動的光散乱 (DLS) の測定で得られる粒度分布図に基づき粒径 (数平均流体力学的直径) および多分散指数 (PDI) を求めた。そして、粒径は、保存開始時前 (Day 0) の粒径を基準として、保存後の粒径の変化率 (%) を算出した。粒径の変化率とPDIから、保存安定性を評価した。

[0147] 前記B7リポソームおよび前記コントロールリポソームの長期保存安定性の結果を、下記表に示す。表4Aは、粒径の変化率であり、表4Bは、多分散指数 (PDI) である。

[0148] [表4A]

サンプル		粒径変化率 (%)			
	No.	0 Days	10 Days	45 Days	90 Days
NKTリガンド (-) リポソーム	1-11	0	0.997	2.89	15.9
B7 リポソーム	1-1	0	-1.01	-6.87	-2.22
α-GC リポソーム	1-2	0	3.70	-13.1	-8.50

[表4B]

サンプル	No.	PDI			
		0 Days	10 Days	45 Days	90 Days
NKTリガンド（－） リポソーム	1-11	0.120	0.176	0.230	0.420
B7 リポソーム	1-1	0.170	0.153	0.245	0.190
α-GC リポソーム	1-2	0.142	0.116	0.364	0.308

[0149] 前記表に示すように、10Days～90DaysでのB7リポソームの粒径変化率は、Day0（0％）に対して、－1.01％～－6.87％の範囲にとどまり、10Days～90Daysでのα-GarCerの粒径変化率も、Day0（0％）に対して、－13.1％～＋3.70％にとどまった。一方、10Days～90DaysでのコントロールのNKTリガンド（－）リポソームの粒径変化率は、Day0（0％）に対して、＋0.997％～＋15.9％にまで経時的に増加した。また、前記表に示すように、10Days～90DaysでのB7リポソームのPDIは、Day0（0.170）に対して、0.153～0.245の範囲での変動にとどまり、10Days～90Daysでのα-GarCerのPDIも、Day0（0.142）に対して、0.116～0.364の範囲での変動にとどまった。これに対して、10Days～90DaysでのコントロールのNKTリガンド（－）リポソームのPDIは、Day0（0.120）に対して、0.176～0.420の範囲にまで経時的に増加した。これらの結果から、B7リポソームおよびα-GCリポソームは、コレステロールおよびPEG化リン脂質（PEG-DSPC）を使用することで、リポソームを安定化でき、例えば、90日間の長期保存においてはNKTリガンド（－）のコントロールリポソームより安定であり、例えば、1000nm以上の凝集体の生成を防止できることがわかった。

[0150] （2）希釈後安定性

前記（1）の保存開始から14日後のB7リポソームのサンプル（Day14）を、PBSで様々な倍率（2倍～1024倍）に希釈し、複数の希釈サンプルを調製した。そして、保存後の希釈していない未希釈サンプルと前

記希釈サンプルとについて、粒径（Z平均流体力学的直径（Z-average））および多分散指数（PDI）から、安定性を評価した。

[0151] B7リポソームの結果を、図1に示す。図1は、希釈安定性の結果を示すグラフであり、左図が、B7リポソームの希釈サンプルの粒径を示し、右図が、B7リポソームの希釈サンプルのPDIを示す。同図に示すように、B7リポソームは、例えば、約1000倍（ $1/2^{10}$ ）に薄めても、粒径が1000nmを超えるような凝集体の生成は確認されなかった。

[0152] [実施例3]

実施例1で調製したPEG化リポソームを投与して、その機能を確認した。

[0153] (1) 免疫活性能

PEG化リポソームの免疫活性能を確認した。

[0154] 前記実施例1で調製したB7リポソーム（サンプルNo. 1-1）、NKTRリガンド（-）リポソーム（サンプルNo. 1-11）を、PEG化リポソーム濃度1mg/mL（総脂質換算）に調整し、投与サンプルとして使用した。前記PEG化リポソーム濃度の調整には、PBSを使用した。投与のコントロールサンプルとしては、リポソーム化していないフリーのB7、およびPBSを、それぞれ使用した。

[0155] BALB/cマウス（6週齢、雌）の左脇に、投与サンプルを皮下投与した。投与から48時間後のマウスを犠牲にし、血液およびリンパ節を採取した。前記リンパ節は、右副腋窩、右上腕腋窩、左副腋窩、および左上腕腋窩を採取した。前記採取した血液を2000gで15分間遠心分離して、血清を回収した。なお、前記右副腋窩のリンパ節と前記右上腕腋窩のリンパ節とをあわせて右腋窩リンパ節とし、前記左副腋窩のリンパ節と前記左上腕腋窩のリンパ節とをあわせて左腋窩リンパ節とした。採取したリンパ節は、重量を測定し、50μg/μLとなるようにPBSを添加し、ダウンス型ホモジナイザーで均質化した。均質化したものを、2000gで15分間遠心分離し、上清を回収した。前記血清および前記リンパ節上清をサンプルとし、前

記サンプル中のIFN- γ およびIL-10を、IFN- γ ELISAキット (BioLegend社、カタログ番号430804) を用い、メーカーの説明書に従って測定した。

[0156] この結果を、図2Aに示す。図2Aは、血清およびリンパ節上清におけるIFN- γ 濃度を示すグラフであり、図2Bは、血清およびリンパ節上清におけるIL-10濃度を示すグラフである。図2Aおよび2Bにおいて、左は、左腋窩リンパ節上清の結果、真ん中は、右腋窩リンパ節上清の結果、右は、血清の結果である。図2Aの各グラフにおいて、縦軸は、サンプルのIFN- γ 濃度 (ng/mL) であり、図2Bの各グラフにおいて、縦軸は、サンプルのIL-10濃度 (ng/mL) である。また、図2Aおよび図2Bにおいて、バーは、左から、PBS、NKTリガンド (-) リポソーム (0%Ctrl Lipid-OH (-) 100nm)、フリーのB7 (Free B7)、B7リポソーム (50%B7 Lipid-OH (-) 100nm) を投与した結果である。

[0157] 図2Aに示すように、B7リポソームを投与することによって、左腋窩リンパ節上清では、投与後48時間において、著しいIFN- γ の増加が確認された。これに対して、B7をフリーで投与した場合は、PBS等のコントロールと同程度であり、免疫の活性化は見られなかった。また、右腋窩リンパ節上清では、左腋窩リンパ節よりは低いものの、IFN- γ の増加が確認された。これは、投与した左脇の所属リンパ節のみでなく、体全体のリンパ節を活性化できることを示しており、体全体への治療効果が見込められることがわかった。また、B7リポソームは、投与後24時間程度でリンパ節に集積し、投与後48時間程度で活性化され、投与後72時間程度でがんに作用すると考えられる。このため、例えば、投与後96時間程度で、リンパ節におけるIFN- γ の低下が考えられるが、その場合、最初の投与から4～5日後に、再度、前記B7リポソームを投与することで、継続的な効果を維持できると考えられる。

[0158] また、図2Aに示すように、血清においては、B7リポソームを投与して

も、免疫活性化が、リンパ節における免疫活性化より低かった。このことから、B7リポソーム投与は、例えば、脾臓や他の免疫機関において、リンパ節に対する免疫活性が著しく高いことがわかった。

[0159] α -GalCerを反復的に投与すると、アナルジー効果が生じ、免疫制御が起きることが知られている（Sci. Rep.、2018、8巻、8225頁）。さらに、このような免疫制御がIL-10の分泌と関連することも知られており（JCI、2014、124（9）巻、3725頁）、IL-10の量を測定することで、免疫活性化物質の反復投与の可否の判断ができる。そこで、IL-10を確認したところ、図2（B）に示すように、B7リポソームを皮下投与した結果、投与後48時間において、IL-10の増加は見られなかった。

[0160] このように、B7リポソームの皮下投与によっても、IL-10の分泌増加が見られないことから、B7リポソームによれば、アナルジー効果を抑制できることがわかった。また、これらの結果から、例えば、従来のNK T活性化リガンドの反復投与における問題、すなわち反復投与によってその効果が減少するという問題も回避できると考えられる。

[0161] （2）in vitroにおける免疫活性

PEG化リポソームを樹状細胞に添加後、前記樹状細胞をリンパ節細胞（Lymphocytes）または脾臓細胞（Spleenocyte）と共培養して、NK T細胞の数の変化を調べた。

[0162] 前記実施例1で調製したB7リポソーム（サンプルNo. 1-1）を、PEG化リポソーム濃度1mg/mL（総脂質換算）に調整し、投与サンプルとして使用した。なお、PEG化リポソーム濃度の調整には、PBSを使用した。投与のコントロールサンプルとしては、PBSを使用した。

[0163] リンパ節細胞および脾臓細胞は、以下のように調製した。まず、BALB/cマウス（7週齢、雌）から、脾臓およびリンパ節を採取した。前記リンパ節は、右副腋窩、右上腕腋窩、左副腋窩、および左上腕腋窩を採取した。前記採取した各リンパ節は、みじん切りにし、セルストレイナーに入れ、1

% FBS入りRPMI中でやさしくすりつぶすことで、単一細胞にした。前記単一細胞は、400gで4分間遠心分離し、生存しているリンパ節細胞のみを回収した。脾臓も同様にして、セルストレイナーにより単一細胞にし、遠心分離により細胞を回収した。10% RBC Lysis Buffer (10X、ThermoFisher社)を1xになるようにPBS (1% FBS含有)に添加し、この混合液に、前記脾臓の単一細胞を再懸濁し、5分間静置することで、赤血球を取り除いた。そして、赤血球を除去した後の画分を、400gで4分間遠心分離し、生存している脾臓細胞を回収した。

[0164] マウス樹状細胞であるDC2.4 (sigma aldrich社)をRPMI中で培養した。6ウェルプレートの各ウェルに、新たなRPMIと、培養した前記樹状細胞 5×10^5 個を播種し、前記B7リポソームを添加し、24時間培養した。前記B7リポソームは、各ウェルにおいて、最終総脂質換算で0.1mg/mLとなるように添加した。そして、24時間の培養後、さらに、ウェルあたり 7.5×10^5 個の前記リンパ節細胞または前記脾臓細胞を添加し、24時間共培養した。24時間の共培養後、全細胞を回収した。回収した細胞群について、ブロッキング試薬を使用して、4℃、45分間の処理でブロッキングを行った。前記ブロッキング試薬は、CD16/CD32 Monoclonal Antibody (ThermoFisher社)入りのBlocking one (ナカライテスク社)を使用した。

[0165] つぎに、ブロッキングした細胞群に対してラベリング処理を行い、NK細胞のラベリングとT細胞のラベリングとを同時に行った。前記NK細胞のラベリング処理には、試薬として、Anti-mouse NK1.1-InVivo (Seileck社)およびFlexAble CoraLite (登録商標) Plus 488 Antibody Labeling Kit for mouse IgG (プロテインテック社)を含むPBS (1% FBS含有)を使用し、前記T細胞のラベリング処理には、試薬として、PE anti-mouse CD3 Antibody (バイオレゼンド社)を含むPBS (1% FBS含有)を使用した。前記ブロッキングした細胞群に、それぞれのラベリング試薬を同時に添加し、4℃、45分間静置することにより、前記細胞群に対して前記NK細胞

をラベリングすると同時に前記 T 細胞をラベリングした。ラベリング処理した細胞群は、P B S（1 % F B S 含有）で3度洗浄してから、フローサイトメトリー（BD FACSAria（商標） III セルソーター、D B バイオサイエンス社）により測定した。なお、ラベリングの際、各抗体の染色濃度は、メーカーの説明書に従って行った（以下、同様）。

[0166] また、前記 B 7 リポソームに代えて、P B S（1 % F B S 含有）をウェルあたり培養液の 1 / 1 0（体積比）で添加した以外は、同様に共培養および測定を行った。

[0167] まず、リンパ節の結果を、図 3 に示す。図 3 A は、リンパ節における N K T 細胞のヒストグラムであり、リンパ節における N K 1 . 1 陽性且つ C D 3 陽性の細胞について、C D 3 陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図 3 A において、X 軸は、C D 3 に対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Y 軸は、その蛍光を示す事象数（細胞数）である。図 3 A において、2 つのピークのうち、右側のピークが N K 1 . 1 陽性且つ C D 3 陽性の細胞、すなわち N K T 細胞を示す。図 3 B は、図 3 A に基づいて、3 つの投与群について、リンパ節における N K 1 . 1 陽性且つ C D 陽性の N K T 細胞の量を n = 4（マウス）で定量化したグラフである。

[0168] 図 3 A に示すように、B 7 リポソーム群（B 7 l i p o）は、B 7 リポソームを投与した樹状細胞とリンパ節細胞とを共培養することによって、P B S を投与した群（P B S）と比較して、N K 1 . 1 陽性且つ C D 3 陽性の N K T 細胞（図 3 A において右側のピーク）の量が増加した。

[0169] つぎに、脾臓の結果を、図 4 に示す。図 4 A は、脾臓における N K T 細胞のヒストグラムであり、脾臓における N K 1 . 1 陽性且つ C D 3 陽性の細胞について、前記相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図 4 A において、X 軸は、C D 3 に対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Y 軸は、その蛍光を示す事象数（細胞数）である。図 4 A において、2 つのピークのうち、右側のピークが N K 1 . 1 陽性且つ C D 3 陽性の

細胞、すなわちNK T細胞を示す。図4 Bは、脾臓におけるNK 1. 1 陽性且つCD陽性のNK T細胞の量を $n = 4$ （マウス）で定量化したグラフである。

[0170] 図4 Aに示すように、脾臓についても、リンパ節と同様に、B 7 リポソーム（B 7 l i p o）群は、PBSを投与した群（PBS）と比較して、NK 1. 1 陽性且つCD 3 陽性のNK T細胞（図4 Aにおいて右側のピーク）の量が増加した。

[0171] （3）免疫細胞数の変化

PEG化リポソーム投与後の体内における免疫細胞数の変化を調べた。

[0172] 前記実施例1で調製したB 7 リポソーム（サンプルNo. 1-1）を、PEG化リポソーム濃度 1 mg/mL （総脂質換算）に調整し、投与サンプルとして使用した。投与のコントロールサンプルとしては、PBSを使用した（NK Tリガンド未添加）。

[0173] BALB/cマウス（6週齢、雌）の左脇に、投与サンプルを皮下投与した。投与から所定時間（12、24、48、72時間）経過後のマウスを犠牲にし、臓器として、脾臓およびリンパ節を採取した。前記リンパ節は、右副腋窩、右上腕腋窩、左副腋窩、および左上腕腋窩を採取した。採取した各臓器の大きさを観察した。前記採取した前記各リンパ節は、みじん切りにし、セルストレイナーに入れ、1% FBS入りRPMI中でやさしくすりつぶすことで、単一細胞にした。前記単一細胞は、 400 g で4分間遠心分離し、生存しているリンパ節細胞のみを回収した。脾臓も同様にして。セルストレイナーにより単一細胞にし、遠心分離により細胞を回収した。10% RBC Lysis Buffer（10X、ThermoFisher社）を1xになるようにPBS（1% FBS含有）に添加し、この混合液に、前記脾臓細胞を再懸濁し、5分間静置することで、赤血球を取り除いた。赤血球を除去した後の画分を、 400 g で4分間遠心分離し、生存している脾臓細胞を回収した。

[0174] 回収したリンパ節細胞群および脾臓細胞群のそれぞれに対して、前記（2

）と同じ方法により、ブロッキング、ならびに、NK細胞およびT細胞の同時ラベリングを行った。ラベリングした細胞は、前記（2）と同様に、洗浄し、フローサイトメトリーにより測定した。

[0175] また、回収したリンパ節細胞群および脾臓細胞群に対して、前記（2）と同じ方法により、ブロッキングを行い、さらに、樹状細胞のラベリングを行った。樹状細胞のラベリングには、試薬として、FITC anti-mouse CD11c Antibody（バイオレゼンド社）を含むPBS（1% FBS含有）を使用した。すなわち、前記細胞群に前記試薬を添加し、4℃、45分間静置することにより、前記細胞群における樹状細胞をラベリングした。同時に、樹状細胞のラベリングを行った前記各細胞群に対して、さらに、マクロファージラベリングを行った。マクロファージのラベリングには、試薬として、Anti-mouse CD68（Miltenyi社）およびFlexAble CoraLite（登録商標） Plus 555 Antibody Labeling Kit for rabbit IgG（プロテインテック社）を含むPBS（1% FBS含有）を使用した。すなわち、前記細胞群に前記試薬を添加し、4℃、45分間静置することにより、樹状細胞ラベリングと同時にマクロファージをラベリングした。ラベリングした細胞は、前記（2）と同様に、洗浄し、フローサイトメトリーにより測定した。

[0176] まず、リンパ節におけるT細胞、NK細胞、NKT細胞の数の割合の変化を、図5に示す。

図5Aは、リンパ節におけるNKT細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるNK1.1陽性且つCD3陽性の細胞について、CD陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図5Aにおいて、X軸は、CD3に対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Y軸は、その蛍光を示す事象数（細胞数）である。また、図5Aにおいて、時間（h）は、前記投与サンプルを投与した後の処理時間であり、投与群ごとのヒストグラムを示した。

図5Bは、リンパ節におけるNK細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるNK1.1陽性のNK細胞について、NK1.1陽性を示す相対蛍光強

度によって細胞数の分布を表したグラフである。図 5 B においては、5 つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

図 5 C は、リンパ節における T 細胞のヒストグラムであり、リンパ節における C D 3 陽性の T 細胞について、C D 3 陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図 5 C においては、5 つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

図 5 D は、リンパ節における N K T 細胞のヒストグラムであり、図 5 A における 5 つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

図 5 B、5 C、5 D のラインは、色が濃いほど、前記投与サンプルを投与した後の処理時間が長い投与群の結果である。

図 5 E は、図 5 A に基づいて、5 つの投与群について、リンパ節において N K 1 . 1 陽性且つ C D 3 陽性の N K T 細胞の量を $n = 4$ (マウス) で定量化したグラフである。具体的には、図 5 A における P B S 投与群のリンパ節細胞中の N K T 細胞の割合が 5 % を示す相対蛍光強度を基準として、同じ相対蛍光強度での他の投与群の N K T 細胞の割合 (%) を示すグラフである。

[0177] 図 5 A、D、E に示すように、B 7 リポソーム群において、リンパ節における N K T 細胞の数は、投与後 1 2 時間、投与後 2 4 時間と経時的に増加し、投与後 4 8 時間、投与後 7 2 時間には、増加した N K T 細胞の数が維持されることが確認できた。また、図 5 B、C に示すように、N K 細胞および T 細胞の数も同様に、投与後、経時的に増加し、投与後 2 4 時間～4 8 時間でピークになり、その後、それらの細胞数が維持されることが確認できた。これらの結果から、*i n v i v o* において、B 7 リポソームを投与することで、投与後 1 2 時間～2 4 時間の間に徐々に免疫活性が起こり、それが投与後 7 2 時間まで維持されることがわかった。

[0178] 次に、脾臓における T 細胞、N K 細胞、N K T 細胞の数の割合の変化を、図 6 に示す。

図 6 A は、脾臓における N K T 細胞のヒストグラムであり、脾臓における N K 1 . 1 陽性且つ C D 3 陽性の細胞について、C D 3 陽性を示す相対蛍光強

度によって細胞数の分布を表したグラフである。図 6 A において、X 軸は、CD 3 に対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Y 軸は、その蛍光を示す事象数（細胞数）である。また、図 6 A において、時間（h）は、前記投与サンプルを投与した後の処理時間であり、投与群ごとのヒストグラムを示した。

図 6 B は、脾臓における NK 細胞のヒストグラムであり、脾臓における NK 1. 1 陽性の NK 細胞について、NK 1. 1 陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図 6 B においては、5 つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

図 6 C は、脾臓における T 細胞のヒストグラムであり、脾臓における CD 3 陽性の T 細胞について、CD 3 陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図 6 C においては、5 つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

図 6 D は、脾臓における NK T 細胞のヒストグラムであり、図 6 A における 5 つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

図 6 B、6 C、6 D のラインは、色が濃いほど、前記投与サンプルを投与した後の処理時間が長い投与群の結果である。

図 6 E は、図 6 A に基づいて、5 つの投与群について、脾臓において NK 1. 1 陽性且つ CD 3 陽性の NK T 細胞の量を $n = 4$ （マウス）で定量化したグラフである。具体的には、図 6 A における PBS 投与群の脾臓細胞中の NK T 細胞の割合が 5 % を示す相対蛍光強度を基準として、同じ相対蛍光強度での他の投与群の NK T 細胞の割合（%）を示すグラフである。

[0179] 図 6 A、D、E に示すように、B 7 リポソーム群において、脾臓における NK T 細胞の数は、投与後 7 2 時間まで経時的に増加することが確認できた。また、図 6 E に示すように、PBS 投与群に対して、B 7 リポソーム投与群の投与後 1 2 時間は、NK T 細胞の増加が確認されたが有意差がなかったこと、B 7 リポソーム投与群は、投与後 7 2 時間まで継続的に NK T 細胞の数が増加したことから、脾臓における免疫活性は、リンパ節に比べてゆっく

り起こり、リンパ節に比べてより長い時間継続することが示唆された。これは、例えば、皮下に投与された薬剤が、隣接するリンパ節へ最初に吸収され、その後、脾臓に移動したことによると考えられる。

[0180] 図6Bに示すように、NK細胞の数もNK T細胞と同様に、投与後、経時的に増加することが確認できた。一方、図6Cに示すように、T細胞の数に関しては、CD3陽性の細胞（右側のピーク）が経時的に減少し、CD3陰性である細胞（左側のピーク）が経時的に増えて、投与後48時間でピークに到達した。このことから、脾臓における免疫活性と共に、T細胞の数の割合が減少していることがわかった。これは、B7リポソームの初回投与によって引き起こされた免疫活性が自然免疫活性であり、主にNK細胞およびNK T細胞の増加が行われたためであると考えられる。

[0181] 次に、リンパ節における樹状細胞およびマクロファージの数の割合の変化を、図7に示す。

図7Aは、リンパ節における樹状細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるCD11c陽性細胞について、CD11c陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数分布を示したグラフである。図7Aにおいて、X軸は、CD11cに対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Y軸は、その蛍光を示す事象数（細胞数）である。

図7Bは、リンパ節における樹状細胞のヒストグラムであり、図7Aにおける5つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

図7Cは、リンパ節におけるマクロファージのヒストグラムであり、リンパ節におけるCD68陽性細胞について、CD68陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を示したグラフである。図7Cにおいて、X軸は、CD68に対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Y軸は、その蛍光を示す事象数（細胞数）である。

図7Dは、図7Bに基づいて、5つの投与群について、リンパ節においてCD11c陽性の樹状細胞の量を $n=4$ （マウス）で定量化したグラフである。具体的には、図7BにおけるPBS投与群のリンパ節細胞中の樹状細胞の

割合が5%を示す相対蛍光強度を基準として、同じ相対蛍光強度での他の投与群の樹状細胞の割合(%)を示すグラフである。

図7Eは、図7Cに基づいて、5つの投与群について、リンパ節においてCD68陽性のマクロファージの量をn=4(マウス)で定量化したグラフである。具体的には、図7CにおけるPBS投与群のリンパ節細胞中のマクロファージの割合が5%を示す相対蛍光強度を基準として、同じ相対蛍光強度での他の投与群の樹状細胞の割合(%)を示すグラフである。

[0182] 図7A、B、Dで示すように、B7リポソーム投与群では、リンパ節における樹状細胞の割合が、投与後48時間まで徐々に増加してPBS投与群の約2倍まで達して、投与後72時間で少々減少した。一方、図7C、Eに示すように、B7リポソーム投与群では、マクロファージの割合が、B7リポソームの投与後、少々増加したが、PBS投与群と比較して有意差はなかった。

[0183] 次に、脾臓における樹状細胞およびマクロファージの数の割合の変化を、図8に示す。

図8Aは、脾臓における樹状細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるCD11c陽性細胞について、CD11c陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数分布を示したグラフである。図8Aにおいて、X軸は、CD11cに対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Y軸は、その蛍光を示す事象数(細胞数)である。

図8Bは、脾臓における樹状細胞のヒストグラムであり、図8Aにおける5つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

図8Cは、脾臓におけるマクロファージのヒストグラムであり、脾臓におけるCD68陽性細胞について、CD68陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を示したグラフである。図8Cにおいて、X軸は、CD68に対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Y軸は、その蛍光を示す事象数(細胞数)である。

図8Dは、図8Bに基づいて、5つの投与群について、脾臓においてCD1

1 c 陽性の樹状細胞の量を $n = 4$ (マウス) で定量化したグラフである。具体的には、図 8 B における P B S 投与群の脾臓細胞中の樹状細胞の割合が 5 % を示す相対蛍光強度を基準として、同じ相対蛍光強度での他の投与群の樹状細胞の割合 (%) を示すグラフである。

図 8 E は、図 8 C に基づいて、5 つの投与群について、脾臓において C D 6 8 陽性のマクロファージの量を $n = 4$ (マウス) で定量化したグラフである。具体的には、図 8 C における P B S 投与群の脾臓細胞中のマクロファージの割合が 5 % を示す相対蛍光強度を基準として、同じ相対蛍光強度での他の投与群の樹状細胞の割合 (%) を示すグラフである。

[0184] 図 8 A、B、D に示すように、B 7 リポソーム投与群では、リンパ節と同様に、脾臓における樹状細胞の割合が、P B S 投与群の約 2 倍までに増加した。一方、図 8 C、E に示すように、B 7 リポソーム投与群では、マクロファージの割合には、前記樹状細胞のような大きな変化は見られなかった。このように、脾臓細胞においては、樹状細胞の増加が、リンパ節における増加よりも顕著にみられた。

[0185] [実施例 4]

実施例 1 で調製した P E G 化リポソームについて、生体内分布を確認した。

[0186] (1) B 7 リポソームの生体内分布

前記実施例 1 で前記色素含有 P B S を用いて調製した以下のリポソームサンプルを使用した。

(1-1) 50% B 7 / 負電荷 P E G 末端 - O H リポソーム 100 nm

(1-11) 0% コントロール / 負電荷 P E G 末端 - O H リポソーム 100 nm

前記リポソームサンプルを、P E G 化リポソーム濃度 1 mg / mL (総脂質換算) に調整し、投与サンプルとして使用した。P E G 化リポソーム濃度の調整には、前記色素含有 P B S を使用した。前記 (1-1) から調製した投与サンプルを、実施例の B 7 リポソーム投与サンプル (B 7 l i p o) とし

、前記（１－１１）から調製した投与サンプルをコントロールリポソーム投与サンプル（C t r l l i p o）とした。

[0187] 乳がん（４Ｔ１、平均腫瘍量１５０mm³）を有するBALB／cマウス（６週齢、雌）および乳がんを有さないBALB／cマウス（６週齢、雌）に、前記投与サンプル３０μLを左脇腹に皮下投与した。各投与サンプルの投与量は、以下のとおりとした。

前記B7リポソーム投与サンプル３０μL：３０μL／マウス１体、B7の量１５μg

前記コントロールリポソーム投与サンプル３０μL：３０μL／マウス１体投与から２４時間後のマウスを犠牲にし、左腋窩リンパ節、脾臓、腎臓、肝臓を採取した。

[0188] そして、６５０nm／６８０nmの蛍光チャンネルを持つI V I S イメージングシステム（商品名I V I S S p e c t r u m、住商ファーマインターナショナル株式会社）を用いて、採取した各組織を可視化した。

[0189] この結果を図９に示す。図９Ａは、投与後２４時間のマウスの各臓器における蛍光を示す画像（白黒に変換）である。図９Ａにおいて、矢印の矢先で示す部位が、特に蛍光強度が強く表示された領域である。なお、図９Ａは、蛍光を示すカラーの画像を白黒で表示したものであるため、その色は、蛍光領域の蛍光の強度を示すものではない。図９Ｂは、投与後２４時間のマウスの各臓器における相対的な蛍光強度を示すグラフである。図９Ｂにおいて、相対蛍光強度は、各臓器における蛍光強度を各臓器の重さで割り、C t r l l i p の値を１でノーマライズした値である。

[0190] 図９Ａに示すように、前記B7リポソームの投与群（B7 l i p o）では、投与から２４時間後において、左腋窩リンパ節に強い蛍光が検出され、多くのB7リポソームの集積が確認された。肝臓にも、蛍光が検出され、一部のB7リポソームの集積が確認された。一方、図９Ａに示すように、脾臓、および腎臓、その他の臓器（胸腺、肺、心臓。図示せず）等には、強い蛍光が検出されなかった。これらの結果から、B7リポソームによれば、特にリ

リンパ節への選択的なデリバリーが可能であることがわかった。一方、前記コントロールリポソームの投与群 (C t r l l i p o) では、肝臓において蛍光が検出されたが、その他の臓器ではほとんど蛍光が検出されなかった。また、図 9 B においても、リンパ節における相対蛍光強度は、前記コントロールリポソームの投与群 (C t r l l i p o) よりも、前記 B 7 リポソームの投与群 (B 7 l i p o) が、高い値を示したことから、前記 B 7 リポソームは、効果的にリンパ節に集積することが確認できた。

[0191] [実施例 5]

実施例 1 で調製した PEG 化リポソームについて、反復皮下投与により、乳がん細胞に対する抗腫瘍効果を確認した。

[0192] 前記実施例 1 で P B S を用いて調製した以下のリポソームサンプルを使用した。

(1-1) 50% B 7 / 負電荷 PEG 末端-OH リポソーム 100 nm

(1-11) 0% コントロール / 負電荷 PEG 末端-OH リポソーム 100 nm

前記リポソームサンプルを、PEG 化リポソーム濃度 1 mg / mL (総脂質換算) に調整し、投与サンプルとして使用した。PEG 化リポソーム濃度の調整には、P B S を使用した。前記 (1-1) から調製した投与サンプルを、実施例の B 7 リポソーム投与サンプル (B 7 l i p o)、前記 (1-11) から調製した投与サンプルをコントロールリポソーム投与サンプル (C t r l l i p o) とした。また、この他に、リポソーム化していないフリーの B 7 を P B S に懸濁したフリー B 7 サンプル (F r e e B 7)、および P B S を、それぞれ投与サンプルとして使用した。

[0193] (1) 抗腫瘍効果

乳がん細胞として、トリプルネガティブ乳がん細胞 4 T 1 を使用した。B A L B / c マウス (5 週齢、雌、n = 6 ~ 7) の左胸における上から 2 番目の乳頭 (s e c o n d b r e a s t) 付近に、4 T 1 細胞 ($5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 個 / マウス) を皮下接種した。平均腫瘍量が 30 ~ 180 mm

m³に達した時点で、マウスを無作為にグループ分けした。そして、後述する投与条件Aまたは投与条件Bにより、マウスの左脇の皮下または両脇の下に前記投与サンプルを皮下注射した（Day 0）。各投与サンプルの投与量は、以下のとおりとした。

前記B7リポソーム投与サンプル30 μL：30 μL／マウス1体、B7の量15 μg、総脂質量30 μg

前記コントロールリポソーム投与サンプル30 μL：30 μL／マウス1体、総脂質量30 μg

フリーB7サンプル30 μL：30 μL／マウス1体、B7の量15 μg

PBSサンプル：30 μL／マウス1体

- [0194] 投与開始から2日ごと、マウスにおける腫瘍の成長およびマウスの体重をモニターした。腫瘍をノギスで測定し、腫瘍体積Vを、以下のように計算した。ここで、Lは、腫瘍の長さ、Wは、腫瘍の幅である。

$$V = \pi / 6 \times L \times W^2$$

また、マウスの生存をモニターし、生存率をKaplan-Meier法で解析した。腫瘍体積が2000 mm³を超えたマウスは、安楽死させ、その日をマウスの死亡日として記録した。

- [0195] （投与条件A）

前記4T1細胞の接種から8日後に、前記投与サンプルについて、左脇腹への最初の投与（1st）を行い、これをDay 0として、左脇腹へのさらなる皮下注射を、同条件で6日ごとに4回行った（合計5回）。

- [0196] （A1）抗腫瘍効果

抗腫瘍効果の結果を、図10に示す。図10は、マウスの腫瘍体積（V）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図10に示すように、Day 0の腫瘍体積は、100 mm³であった。そして、図10に示すように、PBS単独の投与群、および前記コントロールリポソームの投与群（Ctrl lipo）では、Day 0と比較して、Day 30における腫瘍体積の増加は、約1.2～2.0倍を示した。また、フリーB7の投与群（Free B

7) では、Day 0と比較して、Day 30における腫瘍体積の増加は、約10倍を示し、前記PBS投与群および前記投与群(Ctrl lipo)よりも腫瘍の増加が抑制された。これに対して、前記B7リポソームの投与群(B7 lipo)では、Day 0と比較して、Day 30における腫瘍体積の増加は、約5倍にとどまり、腫瘍体積の増加を著しく抑制することが確認できた。この結果から、B7をPEG化リポソームとして投与することによって、乳がんの成長を効果的に抑制できることがわかった。

[0197] 次に、生存率の結果を、図11に示す。図11は、マウスの生存率と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図11に示すように、前記B7リポソーム投与群では、マウスの生存率が著しく増加し、具体的には、PBS投与群と比較して、生存期間が約4倍長くなった。この結果から、B7リポソームの投与により免疫活性が起こり、それによってがんの成長が抑制され、結果として、マウスの生存期間が延長したと考えられる。

[0198] (A2) 忍容性／安全性

忍容性および安全性の結果を、図12に示す。図12は、マウスの体重と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図12に示すように、PBS単独の投与群と比較して、前記コントロールリポソームの投与群(Ctrl lipo)、フリーB7の投与群(Free B7)、前記B7リポソームの投与群(B7 lipo)では、マウスの体重に顕著な減少は見られなかった。この結果から、前記B7リポソーム、前記コントロールリポソーム、フリーのB7のいずれもが、PBSと同様に、マウスに対して顕著な副作用を与えないことが確認できた。

[0199] (投与条件B)

前記4T1細胞の接種から5日後に、前記投与サンプルについて、両脇腹への最初の投与(1st)をDay 0として、5日後(Day 5)、2回目の両脇腹への皮下注射を、同条件で行った(合計2回)。

[0200] (B1) 抗腫瘍効果

抗腫瘍効果の結果を、図13に示す。図13は、マウスの腫瘍体積(V)

と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図13に示すように、Day 0の腫瘍体積は、 36 mm^3 であった。そして、図13に示すように、PBS単独の投与群、および前記コントロールリポソームの投与群（Ctrl lipo）では、Day 0と比較して、Day 32における腫瘍体積の増加は、約30～40倍を示した。また、フリーB7の投与群（Free B7）では、Day 0と比較して、Day 32における腫瘍体積の増加は約27倍を示し、前記PBS投与群および前記投与群（Ctrl lipo）よりも腫瘍の増加が抑制された。これに対して、前記B7リポソームの投与群（B7 lipo）では、Day 0と比較して、Day 32における腫瘍体積の増加は、約7倍にとどまり、腫瘍体積の増加を著しく抑制することが確認できた。この結果から、B7をPEG化リポソームとして投与することによって、乳がんの成長を効果的に抑制できることがわかった。

[0201] 次に、生存率の結果を、図14に示す。図14は、マウスの生存率と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図14に示すように、前記B7リポソーム投与群では、他の投与群と比較して、マウスの生存率を著しく維持できた。

[0202] 前述した投与条件Aの皮下投与と、この投与条件Bの皮下投与とでは、同様の結果が得られたことから、B7リポソームは、これらの投与条件の違いに影響を受けることなく、皮下投与によって免疫系を活性化し、それによって優れた抗腫瘍効果および生命延長効果を示すことがわかった。

[0203] (B2) 忍容性／安全性

忍容性および安全性の結果を、図15に示す。図15は、マウスの体重と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。また、図15に示すように、PBS単独の投与群と比較して、前記コントロールリポソームの投与群（Ctrl lipo）、フリーB7の投与群（Free B7）、前記B7リポソームの投与群（B7 lipo）では、マウスの体重に顕著な減少は見られなかった。

[0204] [実施例6]

実施例1で調製したPEG化リポソームについて、反復皮下投与により、皮膚がん細胞に対する抗腫瘍効果を確認した。

[0205] 前記実施例5と同じ以下の投与サンプルを使用した。

前記B7リポソーム投与サンプル(B7 lip o) 30 μ L : 30 μ L / マウス1体、PEG化リポソーム濃度1 mg / mL (総脂質換算)、B7の量15 μ g

前記コントロールリポソーム投与サンプル(Ct r l lip o) 30 μ L : 30 μ L / マウス1体、PEG化リポソーム濃度1 mg / mL (総脂質換算)

前記フリーB7サンプル30 μ L : 30 μ L / マウス1体、B7の量15 μ g

PBSサンプル : 30 μ L / マウス1体

[0206] 皮膚がん細胞として、B16F10を使用した。C57BL/6jマウス(5週齢、雌、n=6~7)の左胸における上から2番目の乳頭付近に、B16F10細胞(1.0×10^6 個/マウス)を皮下接種した。そして、前記実施例5と同様にして、前記投与サンプル30 μ Lを投与して、抗腫瘍効果、および安全性・忍容性を確認した。

[0207] 抗腫瘍効果の結果を、図16に示す。図16Aは、マウスの腫瘍体積(V)と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図16Bは、マウスの体重(g)と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図16Aに示すように、PBS投与群(黒丸)、フリーB7投与群(黒四角)では、Day 0と比較して、Day 6における腫瘍体積の増加は、約40~50倍を示した。これに対して、前記B7リポソーム投与群(白四角)では、Day 0と比較して、Day 6における腫瘍体積の増加は、約15倍にとどまり、腫瘍体積の増加を著しく抑制することが確認できた。この結果から、B7をPEG化リポソームとして投与することによって、皮膚がんの成長を効果的に抑制できることがわかった。また、図16Bに示すように、Day 0~Day 10において、いずれの投与群も、著しい体重の減少は確認されな

った。この結果から、B7リポソームは、フリーB7と同様に、深刻な毒性を示さないことが確認できた。

[0208] [実施例7]

実施例1で調製したPEG化リポソームについて、反復皮下投与により、乳がん細胞に対する抗腫瘍効果を確認した。

[0209] 前記実施例1でPBSを用いて調製した以下のリポソームサンプルを使用した。

(1-2) 50% α -GalCer/負電荷PEG末端-OHリポソーム 100nm

(1-11) 0%コントロール/負電荷PEG末端-OHリポソーム 100nm

前記リポソームサンプルを、PEG化リポソーム濃度1mg/mL（総脂質換算）に調整し、投与サンプルとして使用した。PEG化リポソーム濃度の調整には、PBSを使用した。前記(1-2)から調製した投与サンプルを、実施例の α -GalCerリポソーム投与サンプル(α -Gal lipo)とし、前記(1-11)から調製した投与サンプルをコントロールリポソーム投与サンプル(Ctrl lipo)とした。また、この他に、リポソーム化していないフリーの α -GalCerをPBSに懸濁したフリーGalCerサンプル(Free α -Gal)、およびPBSを、それぞれ投与サンプルとして使用した。

[0210] 乳がん細胞として、トリプルネガティブ乳がん細胞4T1を使用した。BALB/cマウス（5週齢、雌、n=2）の左胸における上から2番目の乳頭付近に、4T1細胞（ $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 個/マウス）を皮下接種した。平均腫瘍量が40~100mm³に達した時点で、マウスを無作為にグループ分けした。そして、マウスの左脇の皮下に、前記投与サンプルを皮下注射した（Day 0）。各投与サンプルの投与量は、以下のとおりとした。

前記 α -GalCerリポソーム投与サンプル30 μ L：30 μ L/マウス

1 体、 α -GalCer の量 $15 \mu\text{g}$ 、総脂質量 $30 \mu\text{g}$

前記コントロールリポソーム投与サンプル $30 \mu\text{L}$: $30 \mu\text{L}$ / マウス 1 体
、総脂質量 $30 \mu\text{g}$

フリー α -GalCer サンプル $30 \mu\text{L}$: $30 \mu\text{L}$ / マウス 1 体、 α -GalCer の量 $15 \mu\text{g}$

PBS : $30 \mu\text{L}$ / マウス 1 体

[0211] そして、前記投与サンプルの左脇腹への最初の投与 (1st) を Day 0 として、左脇腹へのさらなる皮下注射を、同条件で 5 日ごとに 3 回行った (合計 4 回)。そして、前記実施例 5 と同様にして、抗腫瘍効果、および安全性・忍容性を確認した。

[0212] 抗腫瘍効果の結果を、図 17 に示す。図 17 は、各投与群のマウス (それぞれ $n=2$) の腫瘍体積 (V) と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図 17 に示すように、PBS 投与群 (PBS)、前記コントロールリポソーム投与群 (Ctrl lip) では、日数の経過にしたがって、著しく腫瘍体積が増加した。これらの投与群と比較して、フリー GalCer 投与群 (Free α Gal) では、腫瘍体積の増加が抑制された。一方、 α -GalCer リポソームの投与群 (α Gal lip) では、フリー GalCer 投与群 (Free α Gal) よりも、腫瘍体積の増加に対してさらに著しい抑制を示し、がんの成長の顕著な抑制が確認された。この結果から、 α -GalCer を PEG 化リポソームとして投与することによって、乳がんの成長を効果的に抑制できることがわかった。なお、図 17 には、各群について $n=2$ の結果を示したが、各群のその他のマウスについても同様の挙動を示した。

[0213] [実施例 8]

癌細胞を移植したマウスに対して、実施例 1 で調製した PEG 化リポソームを投与し、生体内分布を確認した。

[0214] (1) 担癌マウスにおける B7 リポソーム投与後の生体内分布

前記実施例 1 で前記色素含有 PBS を用いて調製した以下のリポソームサ

ンプルを使用した。

(1-1) 50% B7 / 負電荷 PEG 末端-OH リポソーム 100 nm

(1-11) 0% コントロール / 負電荷 PEG 末端-OH リポソーム 100 nm

前記リポソームサンプルを、PEG 化リポソーム濃度 1 mg/mL (総脂質換算) に調整し、投与サンプルとして使用した。PEG 化リポソーム濃度の調整には、前記色素含有 PBS を使用した。前記 (1-1) から調製した投与サンプルを、実施例の B7 リポソーム投与サンプル (B7 lip o)、前記 (1-11) から調製した投与サンプルをコントロールリポソーム投与サンプル (Ctrl lip o) とした。

[0215] 乳がん細胞として、トリプルネガティブ乳がん細胞 4 T 1 を使用した。がんを有さない BALB/c マウス (5 週齢、メス) に対して、左胸における上から 2 番目の乳頭付近に、4 T 1 細胞 ($5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 個 / マウス) を皮下接種した (Day 0)。平均腫瘍量が 100 mm^3 に達した時点で (Day 8)、マウスの左脇の皮下または両脇の下に、前記投与サンプル $30 \mu\text{L}$ を皮下注射した。各投与サンプルの投与量は、以下のとおりとした。

前記 B7 リポソーム投与サンプル $30 \mu\text{L}$: $30 \mu\text{L}$ / マウス 1 体、B7 の量 $15 \mu\text{g}$

前記コントロールリポソーム投与サンプル $30 \mu\text{L}$: $30 \mu\text{L}$ / マウス 1 体

[0216] 投与から 12 時間後、24 時間後、48 時間後、各投与群のマウスを安楽死させ、リンパ節、がん細胞、肝臓、脾臓を摘出して、生体における B7 リポソームの分布を確認した。特に示さない限り、前記実施例 4 と同様に行った。

[0217] これらの結果を図 18 ~ 図 20 に示す。図 18 A は、リンパ節における蛍光を示す画像 (白黒に変換) であり、AL は、固有腋窩リンパ節であり、BL は、副腋窩リンパ節である。図 18 B は、摘出した全リンパ節における蛍光強度を示すグラフである。図 19 は、がん細胞を接種した部位のがんと脾

臓とにおける蛍光を示す画像（白黒に変換）である。図20は、がんが転移した肝臓における蛍光を示す画像（白黒に変換）である。図20において、下の図は、採取した臓器の写真であり、上の図は、前記写真に蛍光分布を重ねた図である。図18～20の蛍光を示す画像については、B7リポソーム投与群（B7 lip o）において、コントロール投与群（C t r l l i p o）と比較して蛍光強度が強い部分を白い矢印で示した。また、図20の下図の肝臓の写真において、がんのひどい転移が起きている部分を黒い矢印で示した。

[0218] 図18および19に示すように、コントロールリポソーム投与群（C t r l l i p o）は、リンパ節およびがんにおいて、蛍光が確認できず、リポソームの局在は認められなかった。これに対して、B7リポソーム投与群（B7 lip o）は、図18（リンパ節）および図19（がん）に示すように、蛍光が確認され、B7リポソームの局在が認められた。また、B7リポソーム投与群は、リンパ節におけるB7リポソーム分布が、投与後12時間～24時間で確認され（図18）、がんにおけるB7リポソームの分布は、投与後24時間～48時間で確認された（図19、図20）。さらに、B7リポソーム投与群は、肝臓へのがん転移が多く起きているマウスにおいて、肝臓へのB7リポソームの集積も高くなった（図20の上図、B7 lip o／48時間／左から1番目、2番目、および5番目の肝臓）。一方、コントロールリポソーム投与群（C t r l l i p o）では、転移が起きている肝臓においても、蛍光色素の集積が見られなかった。これらの結果から、B7をリポソームに含有させることで、例えば、EPR（Enhanced Permeability and Retention）効果のような非特異的集積ではなく、それよりも強い選択的な相互作用を引き起こし、効果的にリポソーム内の物質（すなわちB7および蛍光色素）をがんへ集積させたことが示唆される。そして、投与されたB7リポソームは、リンパ節に取り込まれ、さらに樹状細胞に取り込まれた後、B7リポソームを取り込んだ樹状細胞ががんに移動したと考えられる。

[0219] （2）担癌マウスにおけるB7リポソームのがん細胞内の分布およびがん細

胞内の免疫細胞数の変化

[0220] (2A)

B7リポソームを投与したときに、どのような細胞ががんまでリポソームを届けたかを調べるために、蛍光標識したリポソームについてがんにおける細胞との共局在を、フローサイトメトリーを利用して測定した。

[0221] 投与サンプルは、前記(1)と同じものを使用し、各投与サンプルの投与条件は、以下のとおりとした。

前記B7リポソーム投与サンプル30 μ L : 30 μ L / マウス1体、B7の量15 μ g

前記コントロールリポソーム投与サンプル30 μ L : 30 μ L / マウス1体

[0222] 乳がん細胞として、トリプルネガティブ乳がん細胞4T1を使用した。がんを有さないBALB/cマウス(5週齢、メス、n=4)に対して、左胸における上から2番目の乳頭付近に、4T1細胞(5.0 $\times$ 10⁵~1.0 $\times$ 10⁶個/マウス)を皮下接種した(Day 0)。平均腫瘍量が100mm³に達した時点で(Day 8)、マウスの左脇の皮下または両脇の下に、前記投与サンプル30 μ Lを皮下注射した。投与から24時間後、各投与群のマウスを安楽死させ、がんを摘出した。前記採取したがんをみじん切りにし、0.2%コラゲナーゼ(富士フィルム和光社)入りRPMI中で、30分間、37℃、500RPMで振動させた。その後、これらの混合物をセルストレイナーに入れ、1%FBS入りRPMI中でやさしくすりつぶすことで、単一細胞にした。前記単一細胞は、400gで4分間遠心分離し、生存細胞のみを回収した。

[0223] 回収した細胞群について、前記実施例3(3)と同様の方法により、ブロッキングを行った。つぎに、ブロッキングした細胞群に対して、NK細胞のラベリングとT細胞のラベリングとを同時に行った。前記NK細胞のラベリング処理には、試薬として、Anti-mouse NK1.1-InVivo(Seileck社)およびFlexAble CoraLite(登録商標) Plus 488 Antibody Labeling Kit for mouse IgG(プロテインテック社)を含むPBS(1%FBS含有)を使用

しT細胞のラベリング処理には、試薬として、PE anti-mouse CD3 Antibody (バイオレゼンド社)を含むPBS (1% FBS)を使用した。前記ブロッキングした細胞群に、それぞれのラベリング試薬を同時に添加して、4℃、45分間静置することにより、前記細胞群に対して前記NK細胞をラベリングすると同時に前記T細胞をラベリングした。

[0224] また、回収した細胞群に対して、FITC anti-mouse CD11c Antibody (バイオレゼンド社)を含むPBS (1% FBS含有)を添加し、4℃、45分間静置することにより、前記細胞群における樹状細胞をラベリングした。また、前記細胞群に対して、Anti-mouse CD68 (Miltenyi社)およびFlexAble CoraLite (登録商標) Plus 488 Antibody Labeling Kit for rabbit IgG (プロテインテック社)を含むPBS (1% FBS)を添加し、4℃、45分間静置することにより、前記細胞群におけるマクロファージをラベリングした。

[0225] ラベリング処理した細胞群は、PBS (1% FBS含有)で3度洗浄してから、フローサイトメトリー (BD FACSAria (商標) III セルソーター、DBバイオサイエンス社)により測定した。これらの結果を図21-25に示す (n=4)。

[0226] 図21は、がんにおける樹状細胞とリポソームとの共局在を示すフローサイトメトリーの結果である。樹状細胞は、そのCD11cに対するFITC染色に基づく蛍光強度、リポソームは、前記色素含有PBSのCy5に基づく蛍光強度により、それぞれ、フローサイトメトリーにより検出できる。

[0227] 図21Aは、FITCの蛍光強度とCy5の蛍光強度とによって細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、FITCの蛍光強度であり、縦軸は、Cy5の蛍光強度である。

図21Bは、FITCの蛍光強度によって細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、FITCの蛍光強度であり、縦軸は、細胞数の割合である。各投与群において、左側のピークが、CD11c陰性細胞、右のピークが、CD11陽性細胞 (樹状細胞)を示す。

図21Cは、図21BのCD11c陽性細胞（右側のピーク）の割合を定量化したグラフである。

図21Dは、図21BのCD11c陽性細胞（右側のピーク）のみをゲーティングして、Cy5蛍光強度によりCD11c陽性細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、Cy5の蛍光強度であり、縦軸は、細胞数の割合である。

図21Eは、図21DのCD11c陽性且つCy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[0228] 図22は、がんにおけるマクロファージとリポソームとの共局在を示すフローサイトメトリーの結果である。マクロファージは、そのCD68に対するFITC染色に基づく蛍光強度、リポソームは、前記色素含有PBSのCy5に基づく蛍光強度により、それぞれ、フローサイトメトリーにより検出できる。

[0229] 図22Aは、FITCの蛍光強度とCy5の蛍光強度とによって細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、FITCの蛍光強度であり、縦軸は、Cy5の蛍光強度である。

図22Bは、FITCの蛍光強度によって細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、FITCの蛍光強度であり、縦軸は、細胞数の割合を示したグラフである。各投与群において、左側のピークが、CD68陰性細胞、右のピークが、CD68陽性細胞（マクロファージ）を示す。

図22Cは、図22BのCD68陽性細胞（右側のピーク）の割合を定量化したグラフである。

図22Dは、図22BのCD68陽性細胞のみをゲーティングして、Cy5蛍光強度によりCD68陽性細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、Cy5の蛍光強度であり、縦軸は、細胞数の割合である。

図22Eは、図22DのCD68陽性且つCy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[0230] 図23は、がんにおけるNK細胞とリポソームとの共局在を示すフローサ

イトメトリーの結果である。NK細胞は、そのNK1.1に対するFITC染色に基づく蛍光強度、リポソームは、前記色素含有PBSのCy5に基づく蛍光強度により、それぞれ、フローサイトメトリーにより検出できる。

[0231] 図23Aは、NK1.1の蛍光強度とCy5の蛍光強度とによって細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、NK1.1の蛍光強度であり、縦軸は、Cy5の蛍光強度である。

図23Bは、FITCの蛍光強度によって細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、NK1.1の蛍光強度であり、縦軸は、細胞数の割合である。各投与群において、左側のピークが、NK1.1陰性細胞、右のピークが、NK1.1陽性細胞（NK細胞）を示す。

図23Cは、図23BのNK1.1陽性細胞（右側のピーク）の割合を定量化したグラフである。

図23Dは、図23BのNK1.1陽性細胞（右側のピーク）のみをゲーティングし、Cy5蛍光強度によりNK1.1陽性細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、Cy5の蛍光強度であり、建地基は、細胞数の割合である。

図23Eは、図23DのNK1.1陽性且つCy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[0232] 図24は、がんにおけるT細胞とリポソームとの共局在を示すフローサイトメトリーの結果である。T細胞は、そのCD3に対するPE染色に基づく蛍光強度、リポソームは、前記色素含有PBSのCy5に基づく蛍光強度により、それぞれ、フローサイトメトリーにより検出できる。

[0233] 図24Aは、FITCの蛍光強度とCy5の蛍光強度とによって細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、CD3の蛍光強度であり、縦軸は、Cy5の蛍光強度である。

図24Bは、FITCの蛍光強度によって細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、FITCの蛍光強度であり、縦軸は、細胞数の割合である。各投与群において、左側のピークが、CD3陰性細胞、右のピークが、CD3陽

性細胞（T細胞）を示す。

図24Cは、図24BのCD3陽性細胞（右側のピーク）の割合を定量化したグラフである。

図24Dは、図24BのCD3陽性細胞（右側のピーク）のみをゲーティングして、Cy5蛍光強度によりCD3陽性細胞の分布を示したグラフであり、横軸は、Cy5の蛍光強度であり、縦軸は、細胞数の割合である。

図24Eは、図24DのCD3陽性且つCy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[0234] 図25は、がんにおけるCD3陽性且つNK1.1陽性のダブル陽性細胞（NKT細胞）とリポソームとの共局在を示すフローサイトメトリーの結果である。

図25Aは、FITC蛍光強度により、CD3陽性且つNK1.1陽性のダブル陽性細胞（NKT細胞）の分布を示したグラフであり、横軸は、FITCの蛍光強度であり、縦軸は、細胞数の割合である。

図25Bは、図25AのCD3陽性且つNK1.1陽性のダブル陽性細胞（NKT細胞）の割合を定量化した結果である。

図25Cは、図25BのCD陽性且つNK1.1陽性のダブル陽性細胞（NKT細胞）について、Cy5蛍光強度により分布を示したグラフである。

図25Dは、図25CのCD陽性／NK1.1陽性／Cy5陽性の細胞の割合を定量化した結果である。

[0235] まず、樹状細胞に関する図21A、21B、21Cに示すように、B7リポソーム投与群（B7 lipo）は、コントロールリポソーム投与群（Ctrl lipo）と比較して、がんにおける樹状細胞の数が増加した。さらに、図21D、21Eに示すように、B7リポソーム投与群（B7 lipo）は、B7をB7リポソームとして投与することにより、樹状細胞（CD11c陽性）とリポソーム（Cy5陽性）との共局在が、B7リポソーム投与群（B7 lipo）よりも増加することが確認できた。特に、B7リポソーム投与群（B7 lipo）は、コントロールリポソーム投与群（Ctrl lipo）よりも増加することが確認できた。

i p o)と比較して、がんにおける樹状細胞数の割合が20%程増加したのに対して、リポソームを含む樹状細胞(CD11c陽性且つCy5陽性の細胞)の数は、100%程増加した。この結果から、樹状細胞が、リポソームをがんまで運んできたと推測される。また、マクロファージに関する図22A、22B、22C、22Eは、樹状細胞に関する前述した図21と同様の結果が得られた。これらのことから、樹状細胞およびマクロファージ等の抗原表示貪食細胞が、リポソームをがんまで運んできたと推測される。

[0236] 同様に、NK細胞、T細胞、およびNK T細胞に関する図23(23A~23E)、図24(24A~24E)、図25(25A~25E)に示すように、これらの細胞についても、がんにおける細胞数と、リポソームを含む細胞(Cy5陽性の細胞)の数の増加が確認できた。特に、図25に示すNK T細胞については、B7リポソーム投与群(B7 l i p o)は、コントロールリポソーム投与群(C t r l l i p o)と比較して、がんにおけるリポソームを含む細胞(Cy5陽性の細胞)の数が200%の増加を示し、顕著に高い増加率を示した。しかしながら、T細胞、NK細胞およびNK T細胞は、貪食作用を有さないため、これらの細胞が、直接リポソームを取り込んだとは考えにくい。このため、前述した貪食細胞(樹状細胞およびマクロファージ)がリポソームを取り組み、その内部に含まれていたCy5を吸収し、その状態で、T細胞、NK細胞およびNK T細胞と相互作用し、前記貪食細胞からT細胞、NK細胞およびNK T細胞にCy5が移ったと推測される。特に、前述した図9に示したリンパ節における蛍光強度の増加、図5-8に示した投与後12時間~24時間でのリンパ節における樹状細胞およびNK T細胞の増加、ならびにマクロファージの増加なしの結果を踏まえると、さらに、以下のような仮説が立てられる。すなわち、B7リポソームが投与されると、前記B7リポソームはリンパ節に取り込まれ、樹状細胞に貪食、吸収される。そして、リンパ節において、樹状細胞がB7の抗原表示を行い、それがNK T細胞を活性化させる。この際、樹状細胞に取り込まれていたCy5が、NK T細胞に移る。その後、活性化された免疫システム(例えば

、NK細胞、樹状細胞等）が、がんへ移動して、抗がん作用を引き起こすと考えられる。

[0237] (2B)

前記(2A)で摘出したがんを、20%ホルムアルデヒドで48時間固定し、固定した組織をパラフィン包埋し、5 μ mの切片を作製した。前記パラフィン包埋は、Abcam社が提供する機材とプロトコルに従った。前記切片をスライドグラスに載せ、脱パラフィンを行い（キシレン、エタノール、水の順序で処理）、切片スライドをクエン酸緩衝液（pH6.0）で98℃、20分間処理することにより、抗原賦活化を行った。

[0238] 前記切片スライドに対して、前記(2A)と同様にして、4℃、30分間でブロッキングを行った。次に、ブロッキングした切片に対して、1次抗体染色を行い、続いて、2次抗体染色を行った。1次抗体染色には、試薬として、CD56 (NCAM) Antibodies (ThermoFisher社) 入りのPBS（1%FBS含有）、IBA1 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (ThermoFisher社) 入りのPBS（1%FBS含有）、または、CD3 Antibodies (ThermoFisher社) 入りのPBS（1%FBS含有）を使用し、処理条件は、25℃、45分間のインキュベートとした。また、2次抗体染色は、試薬として、Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (ThermoFisher社) を使用し、処理条件は、室温、30分～1時間のインキュベートとした。そして、前記切片スライドに、AEC（(3-Amino-9-ethylcarbazole), Peroxidase substrate）基質溶液（Abcam社）を添加し、5分間静置し、対象のタンパク質を赤色に染色した。その後、前記切片スライドに蒸留水を添加して染色反応を停止し、前記切片スライドに、さらにヘマトキシリン染色を行い、核を青色に染色した。前記切片スライドにおける染色した組織を、顕微鏡で観察した。

[0239] これらの結果を図26に示す。図26は、切片スライドの顕微鏡写真であり、具体的には、マーカータンパク質であるIBA1、CD56、CD3の染色により、それぞれ、マクロファージ、NK細胞、T細胞が可視化された

写真である。図26に示すように、PBS投与群と比較して、B7リポソーム投与群（B7 lip o）は、がんにおいて、マクロファージ、NK細胞、およびT細胞の数が増加した。これは、B7リポソームの投与によって、免疫系全体が活性化され、それが抗がん作用へ影響したことを示唆する。

[0240] [実施例9]

前記実施例1で調製した各種B7リポソームについて、条件の変化による、生体内分布および免疫活性への影響を確認した。

[0241] (1) B7リポソームのサイズ変化による、リンパ節内の樹状細胞への取り込みへの影響

[0242] (1A)

前記実施例1で前記色素含PBSを用いて調製した以下のリポソームサンプルを使用した。

(1-1) 50%B7/負電荷PEG末端-OHリポソーム 100nm

(1-3) 50%B7/負電荷PEG末端-OHリポソーム 50nm

(1-4) 50%B7/負電荷PEG末端-OHリポソーム 200nm

(1-5) 50%B7/負電荷PEG末端-OHリポソーム 400nm

前記リポソームサンプルを、PEG化リポソーム濃度1mg/mL（総脂質換算）に調整し、投与サンプルとして使用した。PEG化リポソーム濃度の調整には、前記色素含有PBSを使用した。前記投与サンプルは、B7の量が15μg/30μLである。

[0243] がんを有さないBALB/cマウス（5週齢、メス）の左脇に、前記投与サンプル30μLを皮下注射した。投与から12時間後、24時間後にマウスを安楽死させ、リンパ節、脾臓、腎臓、肺、心臓、胸腺、肝臓を摘出した。

[0244] 摘出した各臓器におけるB7リポソームの分布を、特に示さない限り、前記実施例4と同様に確認した。

[0245] これらの結果を図27に示す。図27Aは、B7リポソームの投与サンプルを投与したマウスについて、投与後12時間の各臓器の写真に蛍光強度を

重ねた図である。図 2 7 A において、特に蛍光強度の強い部分を白い矢印で示した。図 2 7 B は、リンパ節における蛍光強度を定量化したグラフである。

[0246] 図 2 7 に示すように、リンパ節は、リンパ節以外の他の臓器よりも高い蛍光強度を示した。例えば、他の臓器の中でも蛍光強度が最も高い 5 0 n m の肺の蛍光強度が、リンパ節での 2 0 0 n m の蛍光強度と同等かそれ以下であった。さらに、臓器の重量で蛍光強度を割り、グラム当たりの蛍光強度にノーマライズした場合、リンパ節における集積量は、他の臓器より 1 0 倍以上高かった。

[0247] 図 2 7 B に示すように、前記 B 7 リポソーム投与群は、いずれのサイズであっても、投与後 1 2 時間において、効果的にリンパ節に集積し、特にサイズが小さいリポソームが、より効果的にリンパ節に集積するという結果であった。また、従来技術として、5 0 n m 以上の粒子はリンパ節に集積しないとの報告があるのに対して、本実施例においては、5 0 n m 以上のリポソーム（例えば、1 0 0 n m のリポソーム）であってもリンパ節に集積することが確認できた。

[0248] (1 B)

つぎに、前記投与サンプル（1 - 1、1 0 0 n m）をクライオ資料とし、透過型電子顕微鏡を使用して、観察した（C r y o T E M）。C r y o T E M 資料は、Leica microsystem社の提供するプロトコルに従って、L E I C A E M G P（Leica microsystem社）を使用して作成した。C r y o T E M は、J E M 2 1 0 0（日本電子株式会社）を使用して測定した。

[0249] この結果を図 2 8 に示す。図 2 8 は、投与サンプル（1 - 1）の電子顕微鏡写真である。電子顕微鏡での観察により、図 2 8 に示すように、球状の B 7 リポソームが多く確認され、一部、長く伸びた構造の B 7 リポソームも存在し、その短辺の長さは 2 5 n m 程度であった。後者のリポソームの構造は、前記投与サンプルを乗せたグリットの縁との相互作用で柔らかく伸びたことによると思われる。この結果から、本実施例の B 7 リポソームは、例えば、

平均粒径が50 nmより大きくても、柔らかくて形状変形できることにより、効果的にリンパ節へ取り込まれたと考えられる。

[0250] (1C)

次に、図29に、B7リポソームの投与サンプルを投与したマウスについて、投与後24時間のリンパ節へのB7リポソームの集積量の結果を示す。図29Aは、投与後12時間および投与後24時間のマウスのリンパ節へのB7リポソームの集積量を蛍光強度で示した図である。そして、投与後12時間から投与後24時間での蛍光強度の増減を矢印で示した。右下がりの矢印は、投与後12時間から投与後24時間で減少したことを示し、右上がりの矢印は、投与後12時間から投与後24時間で増加したことを示す。図29Bは、図29Aに基づいて、投与後12時間および投与後24時間のマウスのリンパ節へのB7リポソームの集積量を示す蛍光強度を定量化したグラフである。図29に示すように、B7リポソームの投与後12時間において、B7リポソームの粒径が異なる投与群は、同程度の集積量を示した。そして、前記(1-1)の投与サンプル(平均径100 nm)の投与群は、投与後12時間から投与後24時間で集積量が著しく増加し、全ての投与群の中で最も高い集積量を示した。

[0251] (1D)

次に、ヒト樹状細胞株DC2.4細胞を、8ウェルガラスボトムチャンバーに20000細胞/ウェルとなるように播種し、10%V/V FBSおよび1%V/V ペニシリン・ストレプトマイシンを含むRPMI中で、37℃で一晩インキュベートした。そして、前記(1A)と同じ前記投与サンプル(B7濃度15 μg/30 μL)を、最終B7濃度0.05 mg/mLとなるように、前記ウェルに添加して、6時間インキュベートした。インキュベート後、ウェル中の細胞を、新鮮な培地(前記RPMI)で洗浄して、余剰の前記投与サンプルを除去し、前記ウェルに染色試薬(0.1 mg/mL Hoechst 33342)を添加し、15分間のインキュベーションにより細胞の核を染色した。つぎに、ウェル中の細胞を、新鮮な培地(前記RPMI

1) で洗浄した後、ウェル中の細胞を、室温で15分間、4% PFA (4% パラホルムアルデヒド含有PBS溶液) で固定した。固定した細胞試料を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) (LSM 880、カールツァイス社) で観察した。各蛍光は、以下のように異なる励起 (ex.) および発光 (em.) フィルターを用いて観察した。

Hoechst 33342 : ex. 405 nm / em. 410–485 nm
スルホ-Cy5 : ex. 633 nm / em. 638–746 nm

[0252] これらの結果を図30に示す。図30は、細胞内へのB7リポソームの取り込みを、B7リポソームに由来するCy5の蛍光強度により示すグラフである。図30に示すように、樹状細胞へのB7リポソームの取り込みは、平均粒径が200 nmに近づくにつれて高くなり、平均粒径200 nmの投与サンプルが最も高かった。前記(1A)と(1D)の結果から、リンパ節への取り込みは、リポソームの平均径が小さいほど起こりやすいのに対して、樹状細胞への取り込みは、リポソームの平均径が200 nmに近いほど起こりやすいことがわかった。

[0253] また、前記(1A)～(1D)の結果に基づくと、以下のように考えられるが、本発明は、これらの記載には制限されない。すなわち、平均粒径50 nmの小さいサイズのリポソームは、リンパ節へ効果的に素早く集積するが、その中の樹状細胞には取り込まれづらいため、時間の経過に伴って排除されと考えられる。また、平均粒径が200 nmおよび400 nmの大きなサイズのリポソームは、リンパ節に取り込まれづらいことから、リンパ節内の樹状細胞に集積されにくかったと考えられる。これに対して、平均粒径100 nmのサイズのリポソームは、比較的容易にリンパ節に取り込まれ、さらにその中の樹状細胞に効果的に取り込まれるため、投与後24時間には、他のサイズのリポソームと比較して、リンパ節内の樹状細胞への集積量が約4倍に増加したと考えられる。

[0254] 前記(1A)～(1D)の結果に基づくと、リンパ節への集積および樹状細胞への集積の観点から、前記(1-1)のリポソームサンプル(100 nm

m) が好ましいことがわかった。このことから、本発明におけるNK T細胞活性化リガンドを含むPEG化リポソームは、その平均粒径が、 $100\text{ nm} \pm 40\text{ nm}$ 、 $100 \pm 30\text{ nm}$ が好ましく、より好ましくは、 $100 \pm 20\text{ nm}$ 、 $100 \pm 10\text{ nm}$ 、または $100 \pm 5\text{ nm}$ であるといえる。

[0255] (2) B7リポソームの表面PEG末端の変化、および表面電荷の変化による、リンパ節内の樹状細胞への集積量の影響

[0256] (2A)

前記実施例1で前記色素含有PBSを用いて調製した以下のリポソームサンプルを使用した。各サンプルの略語において、リポソームの表面の帯電を示し、(−)は負電荷、(+)は正電荷、(n)は中性(neutral)を意味する。

(1-1) 50%B7/負電荷PEG末端-OHリポソーム 100 nm (B7 lip o-OH (−))

(1-8) 50%B7/負電荷PEG末端-Meリポソーム 100 nm (B7 lip o-Me (−))

(1-11) 0%コントロール/負電荷PEG末端-OHリポソーム 100 nm (Ctrl lip o-OH (−))

(1-12) 0%コントロール/負電荷PEG末端-Meリポソーム 100 nm (Ctrl lip o-Me (−))

(1-9) 50%B7/中性PEG末端-OHリポソーム 100 nm (B7 lip o-OH (n))

(1-10) 50%B7/正電荷PEG末端-OHリポソーム 100 nm (B7 lip o-OH (+))

前記リポソームサンプルを、PEG化リポソーム濃度 1 mg/mL (総脂質換算)に調整し、投与サンプルとして使用した。前記投与サンプルは、B7の量が $15\text{ }\mu\text{g}/30\text{ }\mu\text{L}$ である。

[0257] 前記投与サンプルを使用した以外は、前記(1D)と同様にして、ヒト樹状細胞株DC2.4細胞への前記投与サンプルの添加、インキュベート、染

色、顕微鏡による核酸を行った。

[0258] これらの結果を、図31および図32に示す。図31は、樹状細胞内へのB7リポソームの取り込みを、B7リポソームに由来するCy5の蛍光強度により示すグラフである。図31において、縦軸は、B7リポソームを示すCy5の蛍光強度を、細胞核の量を示すHOECHST 33342の蛍光強度でノーマライズした値であり、樹状細胞におけるB7リポソームの取り込み量に相当する。図31には、左から、前記Ctrl lip o-OH (-)投与群、前記Ctrl lip o-Me (-)投与群、B7 lip o-OH (-)投与群、B7 lip o-Me (-)投与群の結果を示す。

[0259] 図31に示すように、NKTリガンドを含まないコントロールリポソームの投与群、すなわち、前記Ctrl lip o-OH (-)投与群と前記Ctrl lip o-Me (-)投与群とでは、蛍光強度が同程度であった。そして、B7リポソームのPEG末端がメチル基である前記B7 lip o-Me (-)投与群も、前記コントロールリポソームの投与群と同程度の蛍光強度であった。このように、NKT細胞活性化リガンドを含まないコントロールリポソームCtrl lip o-OH (-)の場合、末端が水酸基のPEGでPEG化されたリン脂質を使用しても、樹状細胞への取り込みが向上しなかったのに対して、リガンドとしてB7を含み且つPEG末端が水酸基である前記B7 lip o-OH (-)投与群は、前記コントロールリポソームの投与群と比較して、樹状細胞へのリポソーム取り込み量を示す蛍光強度が著しく高い値を示した。また、前記B7 lip o-OH (-)投与群は、PEGの末端がメチル基である前記B7 lip o-Me (-)投与群と比較しても、樹状細胞におけるリポソームの取り込み量を示す蛍光強度が、著しく高い値を示した。

[0260] 図32は、樹状細胞へのB7リポソームの取り込みを、B7リポソームに由来するCy5の蛍光強度により示すグラフである。図32において、縦軸は、B7リポソームを示すCy5の蛍光強度を、細胞核の量を示すHOECHST 33342の蛍光強度でノーマライズした値であり、樹状細胞におけ

るB7リポソームの取り込み量に相当する。図32には、B7リポソームの表面電荷が、負電荷(−)であるB7 lip o −OH (−)投与群、中性(n)であるB7 lip o −OH (n)投与群、正電荷(+)であるB7 lip o −OH (+)投与群の結果を示す。

[0261] 投与サンプルである前記B7 lip o −OH (−)、前記B7 lip o −OH (n)、前記B7 lip o −OH (+)は、いずれも末端が水酸基のPEGでPEG化されたリン脂質を使用しているが、前記B7 lip o −OH (n)、および前記B7 lip o −OH (+)は、前記正電荷脂質(DDAB)の添加により、リポソームの電荷を、それぞれ中性(n)、正電荷(+)とした。その結果、図32に示すように、リポソームが負電荷である前記B7 lip o −OH (−)投与群は、リポソームの電荷が中性または正電荷である前記B7 lip o −OH (n)投与群および前記B7 lip o −OH (+)投与群と比較して、樹状細胞の取り込み量を示す蛍光強度が高い値を示した。

[0262] これらの結果から、本発明におけるPEG化リポソームは、末端が水酸基のPEGでPEG化されたリン脂質を使用することが好ましく、また、リポソームの電荷が負電荷となることが好ましいことがわかった。

[0263] (2B)

前記(2A)と同じ下記投与サンプル30μLを使用した以外は、前記(1A)と同様にして、がんを有さないBALB/cマウス(5週齢、メス)の左脇の皮下に、前記投与サンプルを皮下注射し、投与後24時間に、リンパ節を摘出した。

前記B7 lip o −Me (−)

前記B7 lip o −OH (−)

前記B7 lip o −OH (n)

前記B7 lip o −OH (+)

[0264] 摘出したリンパ節を薄くスライスし、得られた切片における細胞の核を前記染色試薬(0.1mg/mL Hoechst 33342)で染色した。そ

して、前記染色した切片について、リンパ節内におけるB7リポソームの分布を確認した。前記B7リポソームの分布は、共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM）（LSM 880、カールツァイス社）を使用し、前記（1D）と同様にして観察した。

[0265] これらの結果を図33に示す。図33は、前記切片の顕微鏡観察画像であり、上から1段目が、Hoechst 33342染色の画像、2段目が、リポソームに由来するCy5の蛍光画像、3段目が、1段目の染色画像に2段目の蛍光分布を重ね合わせた画像である。図33に示すように、表面電荷が負に帯電したB7リポソームB7-lipo-OH（-）が、最もリンパ節へ吸収されやすいことが確認できた。これに対して、表面電荷が負に帯電するものの、PEGの末端がメチル基の前記B7-lipo-Me（-）は、前記B7リポソームB7-lipo-OH（-）と比較して、リンパ節への取り込みが著しく減少した。また、表面電荷が中性または正荷電の前記B7-lipo-OH（n）および前記B7-lipo-OH（+）は、前記B7-lipo-OH（-）と比較して、リンパ節の集積が低かった。

[0266] 前記（1A）～（2B）の結果から、リンパ節へ集積させ、リンパ節における樹状細胞を最も効率的にターゲットとするには、本発明におけるNK T細胞活性化リガンドを含むPEG化リポソームは、以下の条件であることが好ましい。すなわち、前記リポソームは、例えば、その平均粒径が、 $100\text{ nm} \pm 40\text{ nm}$ 、 $100 \pm 30\text{ nm}$ 、 $100 \pm 20\text{ nm}$ 、 $100 \pm 10\text{ nm}$ 、または $100 \pm 5\text{ nm}$ であり、その表面電荷が負の帯電であり、リポソーム表面のPEG末端が、ヒドロキシ基であることが好ましい。

[0267] （3）B7リポソームの表面PEG末端の変化による抗がん効果への影響次に、リポソームの表面特性を変化による免疫活性への影響を確認した。

[0268] 前記実施例1でPBSを用いて調製した以下のリポソームサンプルを使用した。

（1-1）50％B7／負電荷PEG末端-OHリポソーム 100 nm （B7-lipo-OH（-））

(1-8) 50% B7 / 負電荷 PEG 末端-Me リポソーム 100 nm (B7 lip o-Me (-))

(1-11) 0% コントロール / 負電荷 PEG 末端-OH リポソーム 100 nm (Ctrl lip o-OH (-))

(1-12) 0% コントロール / 負電荷 PEG 末端-Me リポソーム 100 nm (Ctrl lip o-Me (-))

前記リポソームサンプルを、PEG 化リポソーム濃度 1 mg / mL (総脂質換算) に調整し、投与サンプルとして使用した。前記投与サンプルは、B7 の量が 15 μ g / 30 μ L である。また、リポソーム化していない B7 を PBS に懸濁した 15 μ g / 30 μ L の投与サンプル (Free B7)、および PBS 単独の投与サンプル (PBS) を使用した。

[0269] 前記実施例 5 (1) [抗腫瘍効果] と同様にして、BALB / c マウス (5 週齢、雌、n = 6 ~ 7) の左胸における上から 2 番目の乳頭付近に、4 T1 細胞 (5.0 $\times 10^5$ ~ 1.0 $\times 10^6$ 個 / マウス) を皮下接種した。平均腫瘍量が 30 mm³ に達した時点で、マウスを無作為にグループ分けした。そして、前記投与サンプル 30 μ L を使用する以外は、前記実施例 5 (1) の投与条件 B により、マウスの両脇の下に、前記投与サンプルを皮下注射した (Day 0)。そして、前記実施例 5 (1) と同様にして、腫瘍の成長、マウスの体重、および生存をモニターした。

[0270] 抗腫瘍効果の結果を、図 34 に示す。図 34 A は、マウスの腫瘍体積 (V) と投与開始からの日数との関係を示すグラフであり、図 34 B は、マウスの生存率と投与開始からの日数との関係を示すグラフであり、図 34 C は、マウスの体重 (g) と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。

[0271] 図 34 A に示すように、PBS 投与群 (PBS)、Ctrl lip o-OH 投与群、Free B7 投与群、B7 lip o-Me 投与群、Ctrl lip o-Me 投与群は、Day 0 (30 mm³) に対して Day 30 において、腫瘍体積は約 20 ~ 40 倍に増加し、がんの早い成長が確認された。これに対して、B7 lip o-OH 投与群は、Day 0 に対して Day 30 にお

いて、腫瘍体積の増加は約6倍にとどまり、腫瘍体積の増加に対して著しい抑制を確認できた。この結果から、B7リポソームにおいて、PEG末端をヒドロキシ基にすることで、がん抑制効果を著しく向上できることがわかった。

[0272] 図34Bに示すように、前記B7 liposome-OH投与群は、他の投与群と比較して、マウスの生存率が著しく維持できた。この結果から、B7リポソームにおいて、PEG末端をヒドロキシ基にすることで、生存延命効果を著しく向上できることがわかった

[0273] 図34Cに示すように、いずれの投与群も、体重の著しい減少は確認されなかった。この結果から、前記B7 liposome-OHは、忍容性および安全性の問題はなく、毒性の影響はないと考えられる。

[0274] (4) B7リポソームにおけるB7の濃度の変化による免疫活性への影響
前記B7リポソームにおけるB7の濃度によって免疫の活性が変化するかを調べた。

[0275] 前記実施例1でPBSを用いて調製した以下のリポソームサンプルを使用した。

(1-1) 50%B7/負電荷PEG末端-OHリポソーム 100nm (50%B7 liposome)

(1-6) 10%B7/負電荷PEG末端-OHリポソーム 100nm (10%B7 liposome)

(1-7) 2%B7/負電荷PEG末端-OHリポソーム 100nm (2%B7 liposome)

(1-11) 0%コントロール/負電荷PEG末端-OHリポソーム 100nm (0%B7 liposome)

前記リポソームサンプルを、PEG化リポソーム濃度1mg/mL（総脂質換算）に調整し、投与サンプルとして使用した。前記(1-1)を使用した投与サンプルは、B7の量が15μg/30μL、前記(1-6)を使用した投与サンプルは、B7の量が3μg/30μL、前記(1-7)を使用

した投与サンプルは、B7の量が $0.6\mu\text{g}/30\mu\text{L}$ 、前記(1-1)を使用した投与サンプルは、B7の量が $0\mu\text{g}/30\mu\text{L}$ である。

[0276] 前記実施例5(1)〔抗腫瘍効果〕と同様にして、BALB/cマウス(5週齢、雌、 $n=6\sim7$)の左胸における上から2番目の乳頭付近に、4T1細胞($5.0\times10^5\sim1.0\times10^6$ 個/マウス)を皮下接種した(Day 0)。平均腫瘍量が 46mm^3 に達した時点で、マウスを無作為にグループ分けした。そして、前記投与サンプル $30\mu\text{L}$ を使用する以外は、前記実施例5(1)の投与条件Aにより、マウスの左脇の下に、前記投与サンプルを皮下注射した(Day 4)。そして、前記実施例5(1)と同様にして、腫瘍の成長、マウスの体重、および生存をモニターした。

[0277] 抗腫瘍効果の結果を、図35に示す。図35Aは、マウスの腫瘍体積(V)とがんの皮下摂取日からの日数との関係を示すグラフであり、図35Bは、マウスの生存率とがんの皮下摂取日からの日数との関係を示すグラフであり、図35Cは、マウスの体重とがんの皮下摂取日からの日数との関係を示すグラフである。

[0278] 図35A示すように、0%B7 liposome投与群および2%B7 liposome投与群は、Day 0(46mm^3)に対してDay 36において、腫瘍体積は約20~30倍に増加し、がんの早い成長が確認された。これに対して、10%B7 liposome投与群は、Day 0に対してDay 36において、腫瘍体積の増加は約10倍にとどまり、腫瘍体積の増加に対して優れた抑制が確認できた。また、50%B7 liposome投与群は、Day 0に対してDay 36において、腫瘍体積の増加は約7倍にとどまり、腫瘍体積の増加に対してより顕著な抑制が確認できた。これらの結果から、B7リポソームのB7濃度の増加に伴い、がん成長抑制効果を増加できることがわかった。

[0279] 図35Bに示すように、B7リポソームのB7濃度の増加に伴って、生命延長効果が増大することが確認できた。この結果から、B7リポソームに含めるB7濃度が高いほど、免疫活性がより効果的に起き、抗腫瘍効果および生命延長効果が生じると考えられる。

[0280] 図35Cに示すように、いずれの投与群も、体重の著しい減少は確認されなかった。この結果から、B7リボソームのB7濃度は、毒性に影響はないと考えられる

[0281] 以上、実施形態を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をすることができる。

[0282] この出願は、2023年12月4日に出願された日本出願特願2023-204574を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

産業上の利用可能性

[0283] 本発明のリボソーム剤によれば、例えば、保存時の安定性に優れ、体内において、NK細胞の活性化による効果を得ることができる。

請求の範囲

- [請求項1] PEG化リポソームを含み、
前記PEG化リポソームが、NK細胞活性化リガンドとリポソーム構成脂質を含み、
前記NK細胞活性化リガンドが、NK細胞上のNK細胞受容体が特異的に認識する、 α -ガラクトシルセラミドまたはそのアナログであり、
前記リポソーム構成脂質が、コリン含有リン脂質、PEG化脂質、およびコレステロール系脂質を含むことを特徴とする、リポソーム剤。
- [請求項2] 前記コリン含有リン脂質が、ホスファチジルコリンである、請求項1に記載のリポソーム剤。
- [請求項3] 前記ホスファチジルコリンにおける2つの脂肪酸が、それぞれ独立して、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である、請求項2に記載のリポソーム剤。
- [請求項4] 前記ホスファチジルコリンにおける2つの脂肪酸が、それぞれ独立して、炭素数8～27の脂肪酸である、請求項2または3に記載のリポソーム剤。
- [請求項5] 前記ホスファチジルコリンが、ジパルミトイル ホスファチジルコリン、ジオレオイル ホスファチジルコリン、パルミトイル オレオイル ホスファチジルコリン、およびステアロイル オレオイル ホスファチジルコリンからなる群から選択された少なくとも一つである、請求項2から4のいずれか一項に記載のリポソーム剤。
- [請求項6] 前記PEG化脂質における脂肪酸が、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である、請求項1から5のいずれか一項に記載のリポソーム剤。
- [請求項7] 前記PEG化脂質における脂肪酸が、炭素数8～70の脂肪酸である、請求項1から6のいずれか一項に記載のリポソーム剤。
- [請求項8] 前記PEG化脂質が、DSPE-PEG、DMG-PEG、DPPE-PEG、DSG-PEG、DOPE-PEG、セラミド-PEG、

およびステアリン酸－PEGからなる群から選択された少なくとも一つである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[請求項9] 前記PEG化脂質におけるPEGの平均分子量が、160～44,000Daである、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[請求項10] 前記PEG化脂質において、PEGの末端が水酸基である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

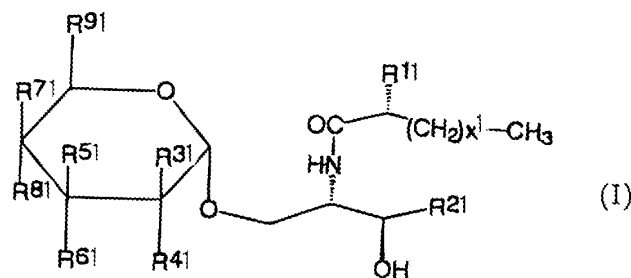
[請求項11] 前記コレステロール系脂質が、コレステロールである、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[請求項12] 前記PEG化リポソームの大きさが、平均粒径10～500nmの範囲である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[請求項13] 前記PEG化リポソームにおいて、前記コリン含有リン脂質(X)、前記PEG化脂質(Y)、および前記コレステロール系脂質(Z)のmol%の比率が、 $X:Y:Z=1:(0.03\sim0.176):(0.34\sim1.35)$ である、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[請求項14] 前記 α -ガラクトシルセラミドおよびそのアナログが、式(I)で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

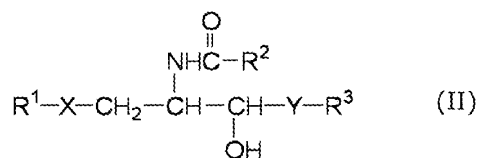
[化1]



[請求項15] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式(II)で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、請求項 1 から 13 のいずれか

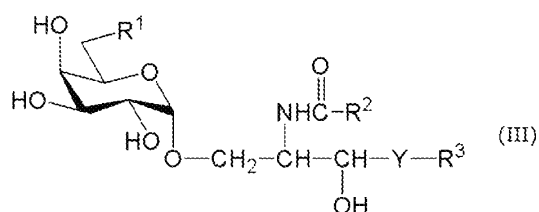
一項に記載のリポソーム剤。

[化2]



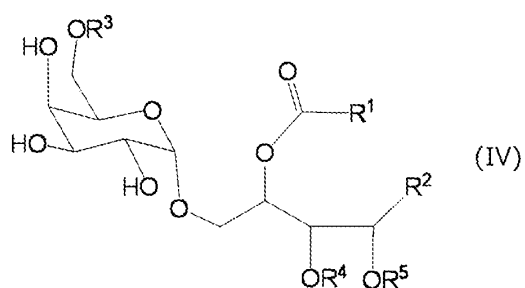
[請求項16] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式(III)で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、請求項1から13のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[化3]



[請求項17] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式(IV)で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、請求項1から13のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

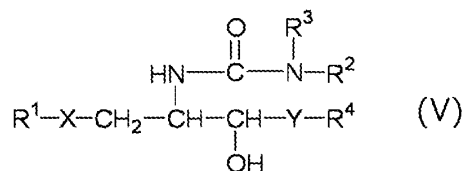
[化4]



[請求項18] 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式(V)で表される化

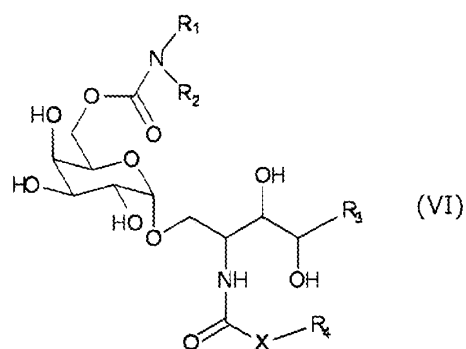
合物、その塩、または溶媒和物である、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[化5]



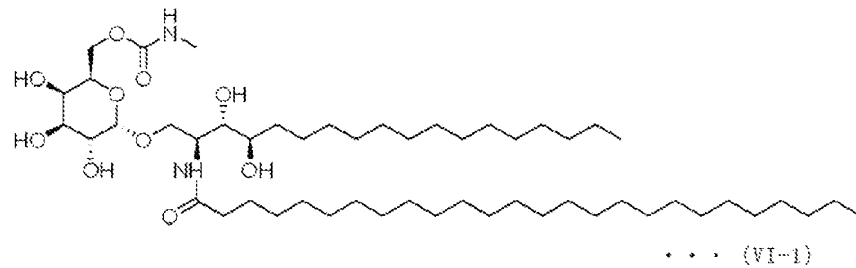
〔請求項19〕 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、式(VI)で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、請求項1から13のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

[化6]



〔請求項20〕 前記 α -ガラクトシルセラミドのアナログが、下記式（VI-1）で表される化合物、その塩、または溶媒和物である、請求項19に記載のリポソーム剤。

[化7]



- [請求項21] 前記PEG化リポソームが、条件1、2および3を満たす、請求項1から20のいずれか一項に記載のリポソーム剤。
- (条件1) 前記PEG化リポソームの大きさが、平均粒径60～140 nmの範囲である
- (条件2) 前記PEG化脂質において、PEGの末端が水酸基である
- (条件3) 前記PEG化リポソームの表面電荷が、負電荷である
- [請求項22] 前記条件3において、前記PEG化リポソームの表面電荷が、-80～-5 mVである、請求項21に記載のリポソーム剤。
- [請求項23] 請求項1から22のいずれか一項に記載のリポソーム剤を含むことを特徴とするNK細胞活性化剤。
- [請求項24] 請求項1から22のいずれか一項に記載のリポソーム剤を含むことを特徴とする医薬組成物。
- [請求項25] 抗がん用である、請求項24に記載の医薬組成物。
- [請求項26] 対象がんが、乳がん、皮膚がん、血液がん、大腸がん、前立腺がん、および卵巣がんである、請求項25に記載の医薬組成物。
- [請求項27] 注射剤である、請求項24から26のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項28] 抗がん用であり、対象がんが、トリプルネガティブ乳がんであり、前記リポソーム剤に含まれるPEG化リポソームが、条件1、2および3を満たす、請求項24から27のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(条件1) 前記PEG化リポソームの大きさが、平均粒径60～140 nmの範囲である

(条件2) 前記PEG化脂質において、PEGの末端が水酸基である

(条件3) 前記PEG化リポソームの表面電荷が、負電荷である

[請求項29] 前記条件3において、前記PEG化リポソームの表面電荷が、 $-80 \sim 5$ mVである、請求項28に記載の医薬組成物。

[請求項30] 被検体に、請求項1から22のいずれか一項に記載のリポソーム剤、または請求項24から29のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、NK細胞の活性化方法。

[請求項31] 前記被検体が、ヒトまたは非ヒト動物である、請求項30に記載のNK細胞の活性化方法。

[請求項32] 被検体に、請求項1から22のいずれか一項に記載のリポソーム剤、または請求項24から29のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与する工程を含むことを特徴とする、がんの治療方法。

[請求項33] 被検体が、トリプルネガティブ乳がんの被検体であり、前記投与工程において、請求項28または29に記載の医薬組成物を投与する、請求項30に記載のがんの治療方法。