

明 細 書

発明の名称：NK T細胞リガンド含有リボソーム組成物

技術分野

[0001] 本発明は、抗悪性腫瘍剤、抗感染症剤、NK T細胞活性化剤、IFN- γ 産生誘導剤、自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の活性化剤、及び長期免疫記憶誘導剤として有用な、NK T細胞リガンド（後述の糖脂質）を含有するリボソーム組成物に関する。

背景技術

[0002] ナチュラルキラー（以下NK）T細胞は、他のリンパ球系列（T、B、NK細胞）と異なる特徴を示す、新規リンパ球系列に属する免疫細胞である。NK T細胞内には細胞障害性パーフォリン顆粒が存在することからNK細胞と類縁である（非特許文献1）。しかしNK T細胞は、NK細胞マーカーのみならずT細胞受容体（TCR）をも発現していることから、決定的に異なる新たな細胞群である（非特許文献2）。NK T細胞は、免疫賦活作用を亢進させるヘルパーT（Th）-1型細胞によって産生されるTh-1型サイトカイン（主にインターフェロン（IFN）- γ ）と、免疫抑制作用を亢進させるTh-2型細胞によって産生されるTh-2型サイトカイン（主にインターロイキン（IL）-4、IL-10など）の両方を産生する能力を有している（非特許文献3）。即ちNK T細胞は免疫系の活性化も沈静化も誘導することができることから、免疫系のバランス調節役を担っている可能性が示唆されている（非特許文献4）。従ってNK T細胞の働きを制御することができれば、免疫系のバランス異常によって引き起こされる様々な疾患、特に癌、感染症を治療することが可能となる。

[0003] NK T細胞の特性として最も着目されているのは、NK T細胞に発現している抗原受容体 α 鎖が、ある1つの種の間では全個体で同一であるという点である。これは即ち、同種間の生物が持つNK T細胞は全て同一の物質を認識して活性化されるということを示している。この α 鎖はヒトではV α 24

J α 18、マウスではV α 14 J α 18であり、両種間で非常に高い相同性を持っている。また、 α 鎖と対をなす β 鎖もごく限られた種類しか知られていない。このため、このNK T細胞抗原受容体は「不可変型TCR」とも呼ばれていて、通常のT細胞は発現できない。さらに、T細胞の抗原受容体（TCR）が蛋白断片を認識するのに対して、NK T細胞の抗原受容体は糖脂質を認識することも特徴的である。

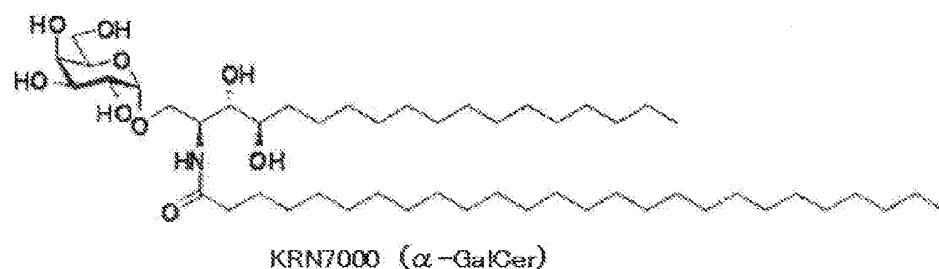
[0004] 生体内には、様々な種類のスフィンゴ糖脂質の存在が知られている。生体内の一般的なスフィンゴ糖脂質は、様々な糖あるいは糖鎖がセラミドに β 結合しており、様々な器官の細胞膜中に存在している。

[0005] 一方、糖がセラミドに α 結合しているスフィンゴ糖脂質が、強力な免疫賦活作用および抗腫瘍活性を有することが知られている。アゲラスフィン類に代表される α -ガラクトシルセラミドは、海綿の一種である*Agelas mauritianus*の抽出液より単離された糖脂質であり、NK T細胞を強く活性化することが報告された（非特許文献5）。 α -ガラクトシルセラミドは、樹状細胞（DC）などに代表される抗原提示細胞（APC）に取り込まれた後、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI分子に類似したCD1d分子によって細胞膜上に提示される。NK T細胞は、こうして提示されたCD1d分子と α -ガラクトシルセラミドとの複合体を、NK T細胞固有の抗原受容体を用いて認識することにより活性化され、様々な免疫反応を開始する。

[0006] これまでに様々な類縁体が合成され、その構造と活性との相関関係が調査されてきている。一連の合成類縁体の中ではキリンビール株式会社によって開発されたKRN7000（ α -GalCer）が非常に強い抗腫瘍活性を示すこと、さらには、対応する β -体（ β -GalCer）には免疫賦活活性は見られないことが明らかとなっている（非特許文献6）。なおKRN7000は、スフィンゴシン塩基が長鎖脂肪酸によりアシル化されて形成されたセラミドに、ガラクトースが α -配置で結合したスフィンゴ糖脂質である。

[0007]

[化1]

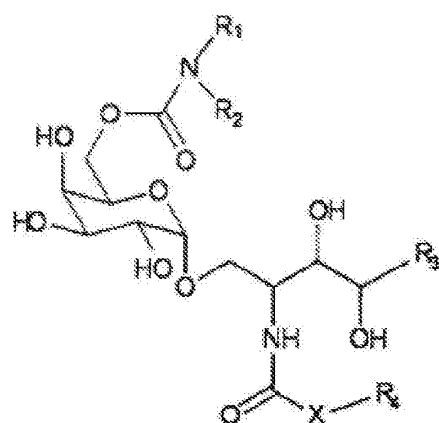


[0008] 近年、このようなNK T細胞の機能に着目し、KRN7000を有効成分として含有する癌の治療薬が開発されている。しかしながら、KRN7000の投与によって活性化されたNK T細胞は、癌、感染症治療のために有用であり免疫賦活活性を誘導するサイトカインであるIFN- γ を産生すると同時に、免疫抑制作用を誘導するサイトカインであるIL-4も同時に産生してしまう。その結果、両者の働きが相殺されてしまい、癌、感染症治療に対する効果が十分に得られないという問題があった。

[0009] 癌、感染症治療のために、NK T細胞を強力に活性化し、IL-4よりもIFN- γ を優先的に産生させる α -GalCer誘導体が多数開発されている（特許文献1、2）。

[0010] 特許文献1には、下記一般式で表される化合物又はその塩が記載されている。

[0011] [化2]



[0012] (式中、

Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

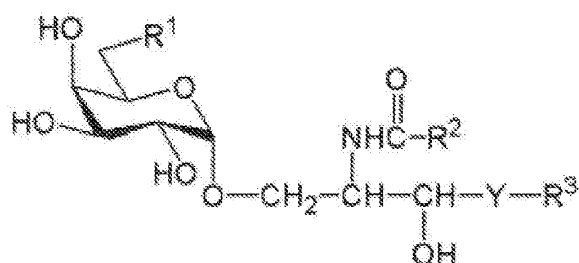
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す）

[0013] 特許文献2には、下記一般式で表される化合物又はその塩が記載されている。

[0014] [化3]



[0015] [式中、R¹は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、R²及びR³はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは—CH₂—、—CH(OH)—又は—CH=CH—を示す。但し、R¹が水素原子であるときは、R²は炭素数24～28の置換又は非置換の炭化水素基を示す。]

[0016] α-GalCer等のNK細胞リガンドは、糖脂質であるため、そのまま生体に投与すると疎水基部分でミセルを形成してしまい、効率よく目的細胞に到達させることができず、効果を発揮することができなかったが、抗原提示細胞に提示させて投与する細胞治療により、強力な抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。

上記研究を踏まえて、糖脂質であるNK細胞リガンドをパルスした抗原提示細胞（APC）製剤（細胞製剤）を投与することにより、生体内のNK細胞を人工活性化するがん治療薬の臨床試験が行われ、極めて有効性の高い効果が得られている（非特許文献7～9）。

しかしながら、上記のような細胞製剤は有効性が見られるものの様々な問題点（他家細胞製剤によるアナフィラキシーの危険、自家細胞の細胞分離の煩雑さ、患者細胞製剤の凍結融解不安定性など）が指摘されている。実際、細胞製剤は、製造過程においても細胞分離・精製、細胞分化培養、パルス培養、細胞製剤凍結・融解、死細胞凝集塊を除去して投与する事が必要など、極めて多くの時間と煩雑な手技及び高額な経費を必要とする。また他家細胞製剤を複数回投与した場合は、アナフィラキシーを発症する危険がある。従って、細胞を用いない新規概念のNK T細胞リガンド含有製剤の開発が望まれる。

- [0017] また、悪性腫瘍は自己組織から発生する細胞であるため、病原体とは異なりNK T細胞を活性化するアジュバント物質を持たないために、長期免疫記憶誘導に必須のNK T細胞を活性化できず、悪性腫瘍に対する免疫記憶誘導・維持は困難であった。従って、悪性腫瘍に対する免疫記憶誘導・維持し得る製剤の開発が望まれる。

先行技術文献

特許文献

- [0018] 特許文献1：WO 2013／162016
特許文献2：WO 2009／119692

非特許文献

- [0019] 非特許文献1：Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 5690-5693
非特許文献2：J. Immunol. 1995, 155, 2972-2983
非特許文献3：J. Immunol. 1998, 161, 3271-3281
非特許文献4：Science, 1997, 278, 1623-1626
非特許文献5：Science, 1997, 278, 1626-1629
非特許文献6：J. Med. Chem. 1995, 38, 2176-2187
非特許文献7：J Immunol 1999; 163: 2387-2391
非特許文献8：Ishikawa et al., Clin Cancer Res. 11: 1910-1917, 2005, 2

非特許文献9：Motohashi et al., J Immunol. 182:2492-501, 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0020] 本発明は、生体内のNK T細胞を人工活性化し得る、NK T細胞リガンド含有製剤を提供することを目的とする。

また本発明は、担悪性腫瘍生体内のNK T細胞の人工活性化により悪性腫瘍に対する長期免疫記憶を誘導・維持し、悪性腫瘍に対する免疫記憶による持続的な悪性腫瘍攻撃により、悪性腫瘍の進行、再発、転移を制御し得る、NK T細胞リガンド含有製剤を提供することを目的とする。

さらに本発明は、感染症においても、病原体に対する長期免疫記憶を誘導・維持し、アジュバント剤として感染症を治療、予防し得る、NK T細胞リガンド含有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

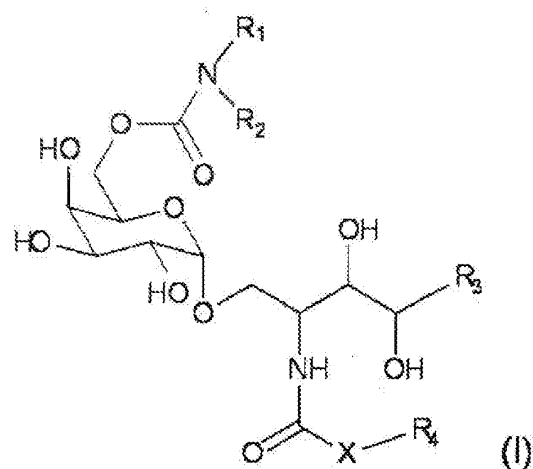
[0021] 本発明者らは、上記課題に対して鋭意検討したところ、NK T細胞リガンドである後述の糖脂質をリポソームに含有させて、それを生体内に投与することにより、効率よく生体内の抗原提示細胞に届けられることができ、それによってNK T細胞を人工活性化し、活性化NK T細胞から産生されるIFN- γ によって自然免疫系・獲得免疫系免疫細胞を活性化・増殖し、長期免疫記憶を誘導し得ることを見出した。かかる知見に基づいてさらに研究を進めることによって本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、下記の通りである。

[0022] [1] 式(1)で表される化合物、式(11)で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質(NK T細胞リガンド)を含有するリポソーム組成物。

式(1)：

[0023]

[化4]



[0024] [式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

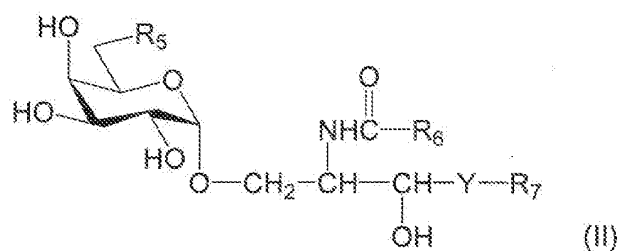
R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び R_2 は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

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。]

式 (I) :

[0025] [化5]



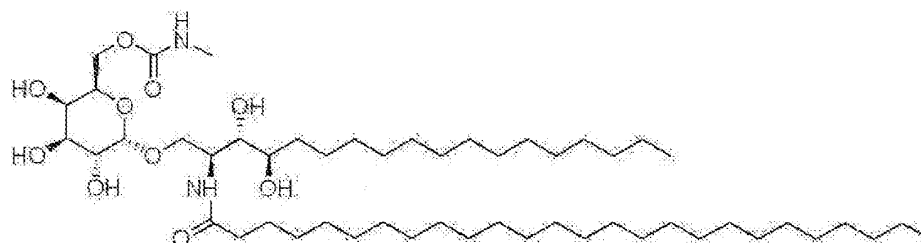
[0026] [式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは—CH₂—、—CH(OH)—又は—CH=CH—を示す。]

[2] 前記糖脂質が、式 (I) で表される化合物又はその塩である、上記 [

1] 記載の組成物。

[3] 前記糖脂質が、下記式：

[0027] [化6]



[0028] で表される化合物又はその塩である、上記 [2] 記載の組成物。

[4] 抗悪性腫瘍剤又は抗感染症剤である、上記 [1] ～ [3] のいずれかに記載の組成物。

[5] NK T細胞活性化剤である、上記 [1] ～ [3] のいずれかに記載の組成物。

[6] IFN- γ 産生誘導剤である、上記 [1] ～ [3] のいずれかに記載の組成物。

[7] 自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の活性化剤である、上記 [1] ～ [3] のいずれかに記載の組成物。

[8] 長期免疫記憶誘導剤である、上記 [1] ～ [3] のいずれかに記載の組成物。

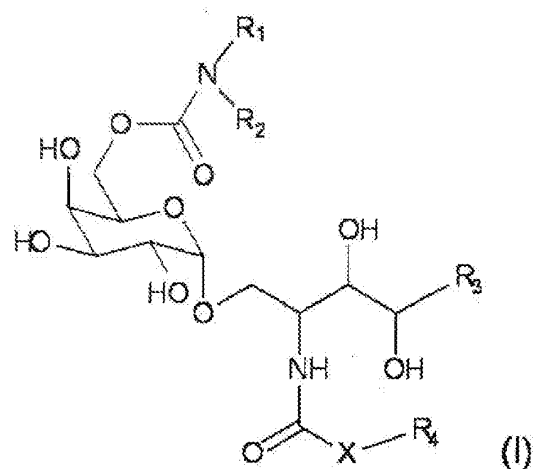
[9] 前記糖脂質を、抗原提示細胞に送達するための、上記 [1] ～ [3] のいずれかに記載の組成物。

[10] 式 (I) で表される化合物、式 (II) で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質 (NK T細胞リガンド) を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該糖脂質を抗原提示細胞に送達する方法。

式 (I) :

[0029]

[化7]



[0030] [式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

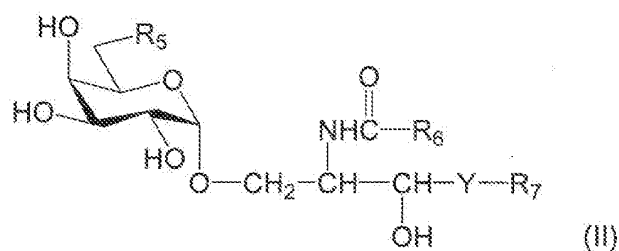
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す。]

式 (I I)：

[0031] [化8]



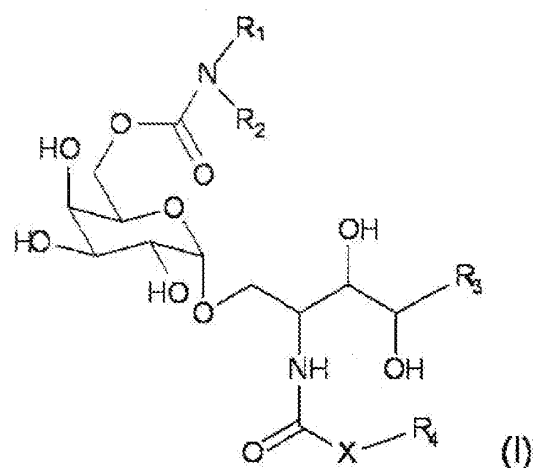
[0032] [式中、R₅は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、R₆及びR₇はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは—CH₂—、—CH(OH)—又は—CH=CH—を示す。]

[0033] [11] 式 (I) で表される化合物、式 (I I) で表される化合物、及びそ

これらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、悪性腫瘍又は感染症の治療方法。

式 (I) :

[0034] [化9]



[0035] [式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

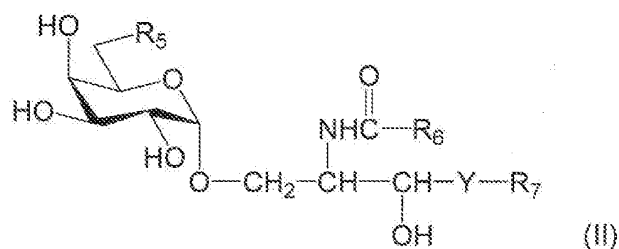
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す。]

式 (II) :

[0036] [化10]



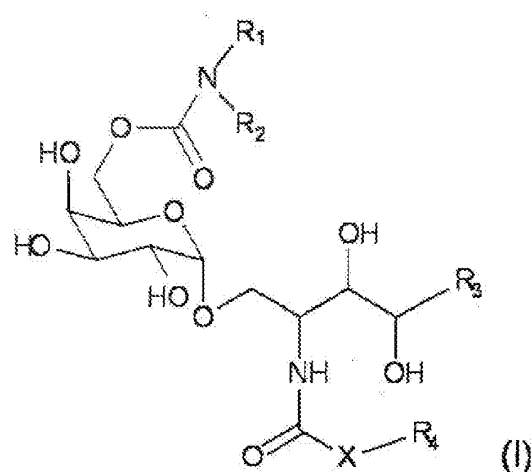
[0037] [式中、R₅は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、R₆及びR₇はそれぞれ独立に炭素数1～

28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-$ 又は $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示す。]

[12] 式(1)で表される化合物、式(11)で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象におけるNK細胞活性化方法。

式(1)：

[0038] [化11]



[0039] [式中、Xはアルキレン基あるいは $-\text{NH}-$ を示し；

R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び 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；

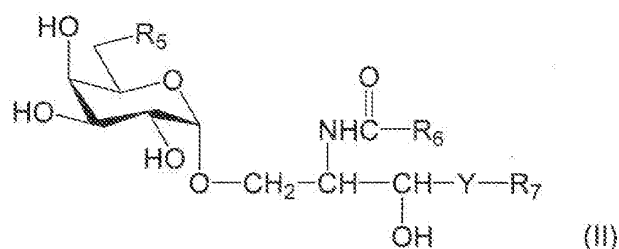
R_3 は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R_4 は炭素数1～30の炭化水素基を示す。]

式(11)：

[0040]

[化12]

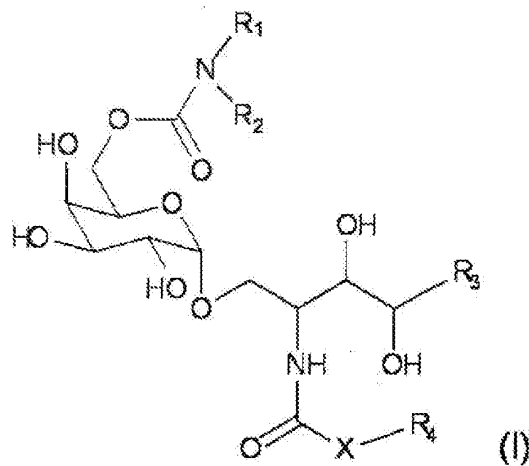


[0041] [式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[13] 式(1)で表される化合物、式(11)で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象におけるIFN- γ 産生誘導方法。

式(1)：

[0042] [化13]



[0043] [式中、 X はアルキレン基あるいは $-NH-$ を示し；

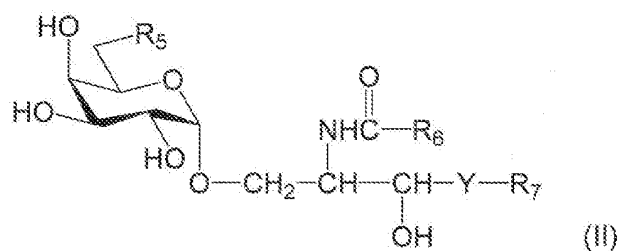
R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び R_2 は、隣接する窒素原子と一緒に5～6員環を形成してもよく；

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。]

式(ⅠⅠ)：

[0044] [化14]

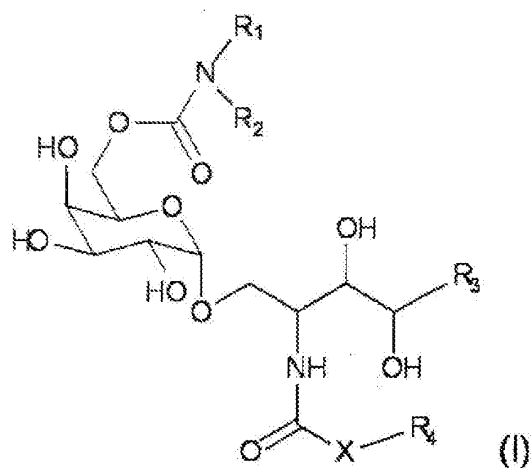


[0045] [式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[14] 式(Ⅰ)で表される化合物、式(ⅠⅠ)で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象における自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の活性化方法。

式(Ⅰ)：

[0046] [化15]



[0047] [式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

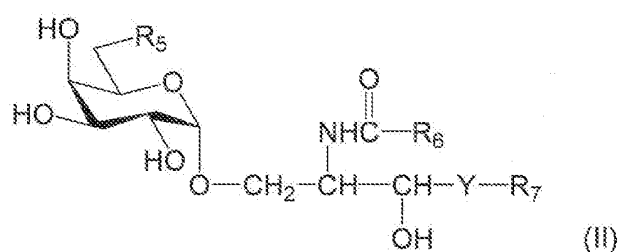
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す。]

式(ⅠⅠ)：

[0048] [化16]



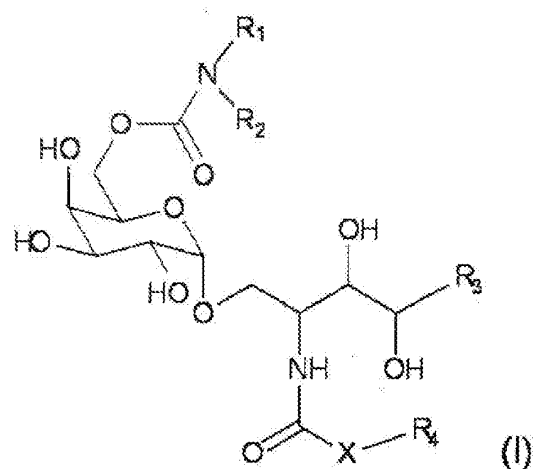
[0049] [式中、R₅は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、R₆及びR₇はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは—CH₂—、—CH(OH)—又は—CH=CH—を示す。]

[15] 式(Ⅰ)で表される化合物、式(ⅠⅠ)で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象における長期免疫記憶誘導方法。

式(Ⅰ)：

[0050]

[化17]



[0051] [式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

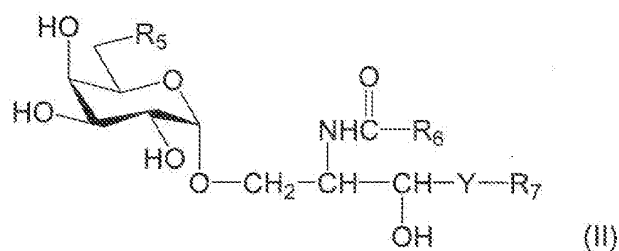
R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び R_2 は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

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。]

式 (I) :

[0052] [化18]



[0053] [式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは—CH₂—、—CH(OH)—又は—CH=CH—を示す。]

[0054] [16] 前記糖脂質の、抗原提示細胞への送達において使用するための、上

記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の組成物。

〔１７〕悪性腫瘍又は感染症の治療において使用するための、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の組成物。

〔１８〕ＮＫＴ細胞活性化において使用するための、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の組成物。

〔１９〕ＩＦＮ－ γ 産生誘導において使用するための、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の組成物。

〔２０〕自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の活性化において使用するための、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の組成物。

〔２１〕長期免疫記憶誘導において使用するための、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の組成物。

〔２２〕医薬として使用するための、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の組成物。

発明の効果

〔００５５〕 本発明の、式（Ⅰ）で表される化合物、式（ⅠⅠ）で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物（以下、本発明のリポソーム組成物ともいう。）は、生体内（特に担悪性腫瘍生体、又は感染症病原体を保有する生体）に投与することにより、効率よく生体内の抗原提示細胞に届けことができ、それによってＮＫＴ細胞を人工活性化し、活性化ＮＫＴ細胞から産生されるＩＦＮ－ γ によって自然免疫系・獲得免疫系免疫細胞を活性化・増殖し、長期免疫記憶を誘導することができる。

従って、本発明のリポソーム組成物は、抗悪性腫瘍剤、抗感染症剤、ＮＫＴ細胞活性化剤、ＩＦＮ－ γ 産生誘導剤、自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の活性化剤、及び長期免疫記憶誘導剤として有用である。

〔００５６〕 通常、がん細胞は抗原を発現しているがん細胞と抗原発現を失ったがん細胞の２種類があるが、本発明のリポソーム組成物は、自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の両方の細胞群を活性化することができるため、前者

は獲得免疫系リンパ球CD8キラーT細胞が、後者は自然免疫系NK細胞が攻撃して、両方のがん細胞を排除できる。患者体内の自然免疫系リンパ球及び獲得免疫リンパ球の活性化により、ひいては抗腫瘍増強効果が期待できる。

また、腫瘍細胞の分裂に際して変異がん抗原を発現するがん細胞が新規に生まれることが報告されており、従来の治療法ではこれに対処できなかったが、本発明のリポソーム組成物によれば、がん組織中で、変異がん細胞に対応する獲得免疫系リンパ球をも活性化できるので、変異がん細胞をも排除できる。

[0057] 本発明のリポソーム組成物（NK T細胞リガンド含有リポソーム）は、後述の試験例の結果に基づいて、生体内に投与後に、以下の効果が期待できる。

1. 極めて微量の本発明のNK T細胞リガンド（RK-163、RCAI-61、RCAI-137など）含有リポソーム（RK-163、RCAI-61、RCAI-137量にして1 ng/25 gマウス：体重60 kgのヒト換算ではRK-163、RCAI-61、RCAI-137量は2.4 mg）を静脈内投与しただけで、腫瘍組織外に存在する生体内NK T細胞を人工活性化した（後述の試験例5-1参照）。実際、本発明のNK T細胞リガンド（RK-163またはRCAI-61あるいはRCAI-137）含有リポソームを投与された後、人工活性化されたNK T細胞数は増加し、アジュバント物質であるIFN- γ を大量に産生し、それによって、自然免疫系・獲得免疫系免疫細胞群は強く活性化され、細胞増殖が誘導された（後述の試験例5-1、5-2、6、7、8、9参照）。また、本発明のNK T細胞リガンド（RK-163）含有リポソームは、ヒトNK T細胞を活性化することを確認した。

2. 人工活性化されたNK T細胞は、ケモカイン受容体CXCR6を強発現しているので、腫瘍組織から産生されるケモカインCXCL16により、その濃度勾配を利用して、がん組織内に効率よく浸潤する。人工活性化されて

ないNK T細胞も同様に腫瘍組織に浸潤するが、IFN- γ の産生は認められない。このことから、NK T細胞の存在だけでなく人工活性化されていることが必要である事がわかる（後述の試験例9の図9左図参照）。

3. 腫瘍組織内に到達した人工活性化NK T細胞は、アジュバント物質であるIFN- γ を大量に放出し、がん組織内に腫瘍細胞を攻撃するために集まっている自然免疫系NK細胞や獲得免疫系CD8キラーT細胞、CD4ヘルパーT細胞などを強力に活性化して、増殖を誘導するとともに、腫瘍細胞を攻撃可能である（後述の試験例9の図9右図参照）。

4. それと同時に長期免疫記憶を司り、腫瘍細胞攻撃の主体をなすCD8キラーT細胞群の免疫記憶細胞を誘導する（後述の試験例10、11参照）。これによって、持続的ながん攻撃が可能になる。実際、がん抗原存在下で、本発明のNK T細胞リガンド含有リポソームを1回投与し、以後無処置の状態で放置し、1年後、がん細胞移植実験を行った結果、移植がん細胞増殖は極めて強く抑制されたが、NK T細胞リガンドを含まないリポソームやNK T細胞を欠損した個体（NK T-KOマウス）ではがん細胞の増殖は抑制されなかったことから（後述の試験例12参照）、本発明のNK T細胞リガンド含有リポソームによる悪性腫瘍の増殖抑制は、NK T細胞の人工活性化に依存する長期免疫記憶誘導の結果であると言える。

[0058] 本発明は、担悪性腫瘍生体内での効率的なNK T細胞の人工活性化とそれに続く免疫細胞群の活性化・免疫記憶誘導による「悪性腫瘍に対する免疫記憶誘導治療技術」に関するものである。

より具体的には、本発明は、担悪性腫瘍生体にNK T細胞の人工活性化をおこす「NK T細胞リガンド含有リポソーム」の製造方法、該リポソーム投与により、担悪性腫瘍生体では、これまで誘導・維持するのが困難であった悪性腫瘍に対する長期免疫記憶を誘導・維持し、免疫記憶による持続的な抗腫瘍活性を誘導するという担悪性腫瘍個体の免疫系を活性化することにより、悪性腫瘍の種類を問わず、あらゆる悪性腫瘍の進行、再発、転移を制御できる悪性腫瘍治療の医薬とその用途等に関するものである。

また、この発明は感染症においても、病原体の長期免疫記憶を誘導・維持し、アジュバント剤として感染症を治療・予防する医薬（ワクチンなど）とその用途に関するものである。

図面の簡単な説明

[0059] [図1] 図1は、試験例1-1（左図）及び試験例1-2（右図）の結果を示す。図中、#1はRK-163含有カプチゾール液、#2～#8は、RK-163含有リポソーム投与群を示し、PBSは、PBS投与群（対照）を示す。

[図2] 図2は、試験例2の結果を示す。図中、RK-LIPOは、RK-163含有リポソーム（#7）投与群を示し、PBSは、PBS投与群（対照）を示す。右図上段のRK-LIPO投与量（RK量に換算）を、曲線グラフ（右図下段）に変換してED50を算出した。

[図3] 図3は、試験例3の結果を示す。図中、RK-LIPOは、RK-163含有リポソーム（#7）投与群を示し、RCAI-61-LIPOは、RCAI-61含有リポソーム（#9）投与群を示し、RCAI-137-LIPOは、RCAI-137含有リポソーム（#10）投与群を示す。PBSは、PBS投与群（対照）を示す。

[図4] 図4は、試験例4の結果を示す。図中、RK-LIPOは、RK-163含有リポソーム（#7）投与群を示し、LIPOは、RK-163を含有していないリポソーム投与群（対照）を示し、PBSは、PBS投与群（対照）を示す。

[図5-1] 図5-1は、試験例5-1の結果を示す。図中、RK-LIPOは、RK-163含有リポソーム（#7）投与群を示し、PBSは、PBS投与群（対照）を示す。

[図5-2] 図5-2は、試験例5-2の結果を示す。図中、RK-LIPOは、RK-163含有リポソーム（#7）投与群を示し、mediumは、培養液（medium）投与群（対照）を示す。

[図6] 図6は、試験例6の結果を示す。図中、RCAI-61-LIPOは、

RCAI-61含有リポソーム(#9)投与群を示し、RCAI-137-LIPOは、RCAI-137含有リポソーム(#10)投与群を示し、PBSは、PBS投与群(対照)を示す。

[図7]図7は、試験例7の結果を示す。図中、RK-LIPOは、RK-163含有リポソーム(#7)投与群を示し、PBSは、PBS投与群(対照)を示す。

[図8]図8は、試験例8の結果を示す。図中、左図のRCAI-61-LIPOは、RCAI-61含有リポソーム(#9)投与群を示し、PBSは、PBS投与群(対照)を示す。図中、右図のRCAI-137-LIPOは、RCAI-137含有リポソーム(#10)投与群を示し、PBSは、PBS投与群(対照)を示す。

[図9]図9は、試験例9の結果を示す。図中、RK-LIPOは、RK-163含有リポソーム(#7)投与群を示し、PBSは、PBS投与群(対照)を示す。

[図10]図10は、試験例10の結果を示す。図中、RK-LIPOは、RK-163含有リポソーム(#7)投与群を示す。OVAは疑似がん抗原を表す。

[図11]図11は、試験例11の結果を示す。図中、RCAI-61-LIPOは、RCAI-61含有リポソーム(#9)投与群を示し、RCAI-137-LIPOは、RCAI-137含有リポソーム(#10)投与群を示す。

[図12]図12は、試験例12の結果を示す。図中、RK-LIPO/WTは、C57BL/6マウスに、RK-163含有リポソーム(#7)を投与した群を示し、RK-LIPO/NKT-KOは、NKT-KO(NKT細胞欠損)マウスに、RK-163含有リポソーム(#7)を投与した群(対照)を示し、LIPO/WTは、C57BL/6マウスに、RK-163を含有していないリポソームを投与した群(対照)を示す。

発明を実施するための形態

[0060] 以下に、本発明を詳細に説明する。

[1. 糖脂質（本発明におけるNK T細胞リガンド）]

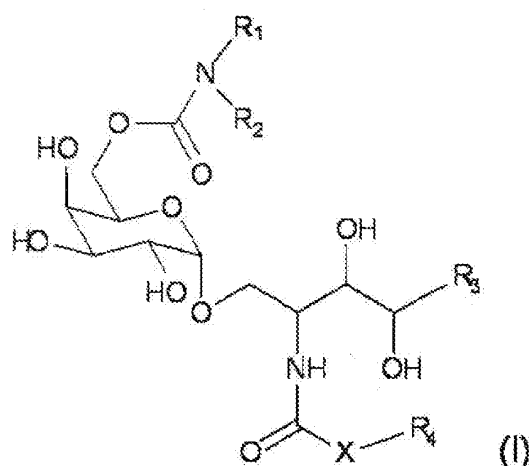
本発明のリボソーム組成物は、以下の、式（I）で表される化合物、式（II）で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有する。

式（I）で表される化合物、式（II）で表される化合物、及びそれらの塩はNK T細胞リガンドである。NK T細胞リガンドとは、CD1d分子上に提示されたときに、NK T細胞上のNK T細胞固有の抗原認識受容体（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をいう。本明細書において、式（I）で表される化合物、式（II）で表される化合物、及びそれらの塩をまとめて、「本発明におけるNK T細胞リガンド」ともいう。

[0061] まず、式（I）で表される化合物（本明細書において化合物（I）ともいう。）およびその塩について説明する。

式（I）：

[0062] [化19]



[0063] [式中、Xはアルキレン基あるいは－NH－を示し；

R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣

接する窒素原子と一緒にあって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。]

- [0064] Xはアルキレン基あるいは—NH—を示す。「アルキレン基」は、例えば、炭素数1～8の直鎖又は分岐状のアルキレン基であり、具体的にはメチレン、エチレン、トリメチレン、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、ヘプタメチレン、オクタメチレン、プロピレン、エチルエチレン、ジメチルメチレン、ジメチルトリメチレン等が挙げられる。
- [0065] R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び R_2 は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよい。
- [0066] 「アルキル基」は、例えば、 $C_{1\sim24}$ 、より好ましくは $C_{1\sim16}$ 、更に好ましくは $C_{1\sim10}$ 、特に好ましくは $C_{1\sim6}$ の直鎖又は分岐状のアルキル基であり、具体的にはメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル等が挙げられる。 R_1 及び R_2 のアルキル基として好ましくは $C_{1\sim6}$ アルキル基（例、メチル、エチル）である。
- [0067] 「アルコキシ基」は、例えば、 $C_{1\sim24}$ 、より好ましくは $C_{1\sim16}$ 、更に好ましくは $C_{1\sim10}$ 、特に好ましくは $C_{1\sim6}$ の直鎖又は分岐状のアルコキシ基であり、具体的には、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、*tert*-ブトキシ等が挙げられる。 R_1 及び R_2 のアルコキシ基として好ましくは $C_{1\sim6}$ アルコキシ基（例、メトキシ）である。
- [0068] 「置換基を有していても良いアリール基」における「アリール基」とは、例えば、 $C_{6\sim14}$ 、より好ましくは $C_{6\sim12}$ の単環～三環性のアリール基であり、具体的には、フェニル、ナフチル、アントリル、フェナントリル等が挙げられる。 R_1 及び R_2 のアリール基として好ましくは $C_{6\sim12}$ アリール基（例、

フェニル)である。該「アリール基」が有していても良い置換基としては、ハロゲン原子(例、塩素原子、フッ素原子、臭素原子、ヨウ素原子)；アルキル基(例、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシル)；ハロゲノアルキル基(例、トリフルオロメチル)；アルコキシ基(例、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、*tert*-ブトキシ)；水酸基；アミノ基；アルキルアミノ基(例、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ)；シクロアルキルアミノ基等が挙げられる。置換基の位置及び数は特に限定されず、置換可能な位置に、1個～置換可能な最大数の置換基を有していても良い。

[0069] R_1 及び R_2 が、隣接する窒素原子と一緒に形成してもよい5～6員環は、例えば、5～6員の含窒素飽和複素環であり、具体的には、ピロリジン、ピペリジン、モルホリン、チオモルホリン、ピペラジン等が挙げられる。好ましくはピロリジン、ピペリジン、及びモルホリンである。

[0070] R_3 は炭素数1～20の炭化水素基を示す。「炭素数1～20の炭化水素基」とは、 $C_{1\sim20}$ アルキル基、 $C_{2\sim20}$ アルケニル基、 $C_{2\sim20}$ アルキニル基、 $C_{3\sim20}$ シクロアルキル基、 $C_{3\sim20}$ シクロアルケニル基、 $C_{6\sim20}$ のアリール基をも包含する概念であり、直鎖状、分岐状及び環状のいずれの形態であってもよく、また飽和炭化水素基でも不飽和炭化水素基でもよく、不飽和結合を分子内及び末端のいずれに有していても良い。中でも、 R_3 としては、 $C_{1\sim20}$ アルキル基、 $C_{2\sim20}$ アルケニル基、及び $C_{2\sim20}$ アルキニル基が好ましく、 $C_{12\sim14}$ アルキル基が更に好ましい。 R_3 としては、具体的には、例えば、 $(CH_2)_{13}CH_3$ 等が挙げられる。

[0071] R_4 は炭素数1～30の炭化水素基を示す。「炭素数1～30の炭化水素基」とは、 $C_{1\sim30}$ アルキル基、 $C_{2\sim30}$ アルケニル基、 $C_{2\sim30}$ アルキニル基、 $C_{3\sim30}$ シクロアルキル基、 $C_{3\sim30}$ シクロアルケニル基、 $C_{6\sim30}$ アリール基をも包含する概念であり、直鎖状、分岐状及び環状のいずれの形態であってもよく、また飽和炭化水素基でも不飽和炭化水素基でもよく、不飽和結合を

分子内及び末端のいずれに有していても良い。中でも、 R_4 としては、 $C_{1\sim30}$ アルキル基、 $C_{2\sim30}$ アルケニル基、及び $C_{2\sim30}$ アルキニル基が好ましく、 $C_{10\sim30}$ アルキル基が更に好ましく、 $C_{15\sim25}$ アルキル基が更に好ましい。 R_4 としては、具体的には、例えば、 $-(CH_2)_{15}CH_3$ 、 $-(CH_2)_{23}CH_3$ 等が挙げられる。

[0072] R_3 及び R_4 で示される炭化水素基は、置換基を有していても良い。 R_3 及び R_4 で示される炭化水素基が置換基を有する場合、置換基としては、ハロゲン原子（好ましくは塩素原子、フッ素原子）；メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、*tert*-ブトキシ等のアルコキシ基（好ましくは炭素数1～24、より好ましくは炭素数1～16、更に好ましくは炭素数1～10、特に好ましくは炭素数1～4）；フェノキシ等のアリールオキシ基（好ましくは炭素数6～14）；水酸基；アミノ基；メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ等のアルキルアミノ基；シクロアルキルアミノ基；アセトアミド等のアルキルカルボニルアミノ基；シクロアルキルカルボニルアミノ基；ベンゾイルアミノ等のアリールカルボニルアミノ基（好ましくは、アリール部分の炭素数が6～14のアリール基である、アリールカルボニルアミノ基）等の電子供与性基、更にはカルボキシル基；アルコキシカルボニル基；アシル基（アシル基としては後述の通りである。好ましくはアルキル部分が炭素数1～24の直鎖又は分岐状のアルキル基である、アルキルーカルボニル基）；カルバモイル基；トリフルオロメチル等の電子求引性基が例示される。置換基の位置及び数は特に限定されず、置換可能な位置に、1個～置換可能な最大数の置換基を有していても良い。置換基が1以上存在する場合には、それらは同一であっても異なっても良い。

[0073] 本明細書において「アシル基」とは、例えば、ホルミル基；アルキルーカルボニル基（例えば、アルキル部分が、炭素数1～24（好ましくは炭素数1～12）の直鎖若しくは分岐状のアルキル基である、アルキルーカルボニル基（例えば、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリ

ル、ピバロイル、ヘキサノイル)) ; シクロアルキル-カルボニル基 (例えば、シクロアルキル部分が、炭素数 3 ~ 10 のシクロアルキル基である、シクロアルキル-カルボニル基) ; アルケニル-カルボニル基 (例えば、アルケニル部分が炭素数 2 ~ 12 の直鎖若しくは分岐状のアルケニル基である、アルケニル-カルボニル基 (例えば、アクリロイル、メタクリロイル)) ; アリール-カルボニル基 (例えば、アリール部分が、炭素数 6 ~ 14 のアリール基である、アリール-カルボニル基 (例えば、ベンゾイル、ナフトイル)) 等をいう。アリール-カルボニル基におけるアリール基とは、例えば、単環 ~ 3 環式芳香族炭化水素基を示し、具体的に例えば、フェニル、ナフチル、アントリル、フェナントリルが例示される。中でも、アシル基としては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ベンゾイル、ナフトイル等が好ましく、アセチル、ベンゾイルがより好ましい。

[0074] 上記アルキルアミノ基、アルキルカルボニルアミノ基のアルキル部分としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル等の直鎖又は分岐状のアルキル基 (好ましくは炭素数 1 ~ 24、より好ましくは炭素数 1 ~ 16、更に好ましくは炭素数 1 ~ 10、特に好ましくは炭素数 1 ~ 4) が例示される。上記シクロアルキルアミノ基、シクロアルキルカルボニルアミノ基のシクロアルキル部分としては、シクロペンチル、シクロヘキシル等のシクロアルキル基 (好ましくは炭素数 3 ~ 24、より好ましくは炭素数 3 ~ 16、更に好ましくは炭素数 3 ~ 10、特に好ましくは炭素数 3 ~ 6) が例示される。

上記アルコキシカルボニル基のアルコキシ部分としては上記アルコキシ基と同様のものが例示される。

[0075] 上記した置換基は、置換可能な位置に、更に、ハロゲン、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、フェニル基、アルコキシ基

、水酸基、アミノ基、アルキルアミノ基及びシクロアルキルアミノ基のうちの少なくとも1種で置換されていても良い。

該ハロゲン、アルコキシ基、アルキルアミノ基、シクロアルキルアミノ基としては上記と同様のものが例示される。

該アルキル基としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル等のアルキル基（好ましくは炭素数1～24、より好ましくは炭素数1～16、更に好ましくは炭素数1～10、特に好ましくは炭素数1～4）が例示される。

該シクロアルキル基としては、シクロペンチル、シクロヘキシル等のシクロアルキル基（好ましくは炭素数3～24、より好ましくは炭素数3～16、更に好ましくは炭素数3～10、特に好ましくは炭素数3～6）が例示される。

該アルケニル基としては、ビニル、プロペニル、ブテニル等のアルケニル基（好ましくは炭素数2～24、より好ましくは炭素数2～16、更に好ましくは炭素数2～10、特に好ましくは炭素数2～4）が例示される。

該アルキニル基としては、エチニル、プロパルギル、ブチニル、ペンチニル等のアルキニル基（好ましくは炭素数2～24、より好ましくは炭素数2～16、更に好ましくは炭素数2～10、特に好ましくは炭素数2～4）が例示される。

[0076] 本発明においては、糖（ガラクトピラノース）の環状構造に由来する立体異性体の中で α -体を採用する。

化合物（I）が糖の環状構造以外の構造（例えば、糖の環状構造以外の部分の不斉炭素等）に由来する立体異性体を有する場合には、いずれの異性体も本発明に包含され、2種以上の異性体の任意の割合の混合物（ラセミ体を含む）であっても良い。

特に、化合物（I）には、糖の環状構造以外の部分の不斉炭素に由来する光学異性体が存在するが、本発明においては、単一の光学活性体であっても、2種以上の光学活性体の任意の割合の混合物（ラセミ体を含む）であっても良い。 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{X}-\text{R}_4$ が結合する不斉炭素はS配置が好ましく、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{X}-\text{R}_4$ が結合する不斉炭素に隣接しOHが結合する不斉炭素はR配置が好ましい。 R_3 が結合する不斉炭素はR配置が好ましい。

[0077] 化合物（I）の塩としては、薬学的に許容され得る塩が好ましく、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；コハク酸塩、フマル酸塩、酢酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等の有機酸塩；ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩、アルキルアンモニウム塩等のアンモニウム塩等を挙げることができる。

[0078] 化合物（I）又はその塩の好適な例として、以下が挙げられる。

(a) 式（I）中、

X が $-\text{CH}_2-$ であり；

R_1 及び R_2 が、同一又は異なって、水素原子、 $\text{C}_{1\sim6}$ アルキル基、水酸基、又は $\text{C}_{1\sim6}$ アルコキシ基であり；

R_3 が、 $\text{C}_{1\sim20}$ アルキル基であり；

R_4 が $\text{C}_{1\sim30}$ アルキル基である、化合物又はその塩。

(b) 式（I）中、

X が $-\text{CH}_2-$ であり；

R_1 及び R_2 が、同一又は異なって、水素原子、 $\text{C}_{1\sim6}$ アルキル基、水酸基、又は $\text{C}_{1\sim6}$ アルコキシ基であり；

R_3 が、 $\text{C}_{12\sim14}$ アルキル基であり；

R_4 が $\text{C}_{15\sim25}$ アルキル基である、化合物又はその塩。

(c) 式（I）中、

X が $-\text{CH}_2-$ であり；

R_1 及び R_2 が、同一又は異なって、水素原子、 $\text{C}_{1\sim6}$ アルキル基、又は水酸基

であり；

R_3 が、 $C_{12\sim14}$ アルキル基であり；

R_4 が $C_{15\sim25}$ アルキル基である、化合物又はその塩。

(d) 式 (I) 中、

Xが $-CH_2-$ であり；

R_1 及び R_2 が、同一又は異なって、水素原子、メチル、又は水酸基であり；

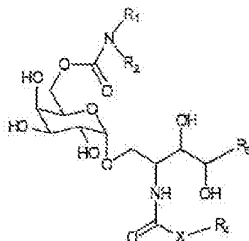
R_3 が、 $-(CH_2)_{13}CH_3$ であり；

R_4 が $-(CH_2)_{23}CH_3$ である、化合物又はその塩。

[0079] 本発明における好適な化合物 (I) の具体例を表 1 に示すが、これらに限定されるものではない。

[0080]

[表1]

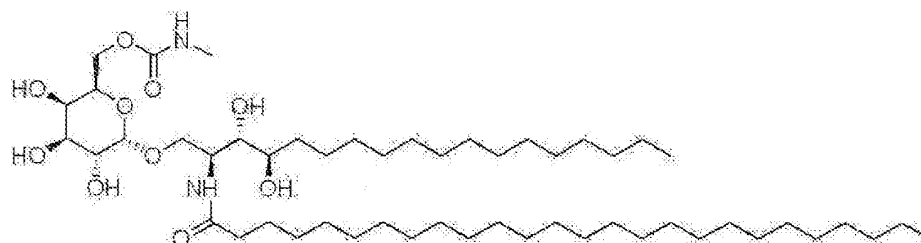
				
	-NR ₁ R ₂	-X-	-R ₃	-R ₄
RCAI-123	-NMe ₂	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-124	-NHMe	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-137	-NHOH	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-138	-NHOME	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-148	-NHet	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-149	-NEt ₂	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-121		-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-122		-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-131		-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-132		-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-139		-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-140		-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-141		-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-150	-NMe ₂	-NH-	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₁₆ H ₃₃

表中、-C₁₄H₂₉は-(CH₂)₁₃CH₃を示し、-C₂₄H₄₉は-(CH₂)₂₃CH₃を示し、
-C₁₆H₃₃は-(CH₂)₁₅CH₃を示す。

[0081] 中でも、以下の化合物が好ましい。

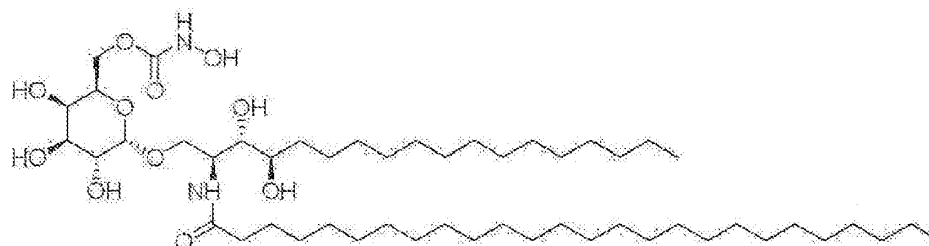
RCAI-124 (本明細書においてRK-163ともいう。)

[0082] [化20]



[0083] RCAI-137

[0084] [化21]

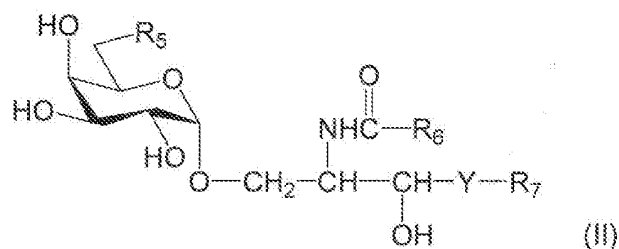


[0085] 式(I)で表される化合物またはその塩は、WO2013/162016 A1、US2015/152128 A1等の開示された方法により製造することができる。

[0086] 次に式(II)で表される化合物(本明細書において、化合物(II)ともいう。)およびその塩について説明する。

式(II)：

[0087] [化22]



[0088] [式中、R₅は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアル

コキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[0089] R_5 は水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示す。

R_5 で示される炭素数1～7のアルキル基としては、置換、又は非置換のアルキル基を示し、環を形成していても良い。例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、シクロプロピルメチル、 n -ブチル、イソブチル、 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、シクロヘキシルメチル等が挙げられ、メチル、エチルが好ましい。

R_5 で示される炭素数1～6のアルコキシ基としては、酸素原子に置換、又は非置換のアルキル基が結合したものを示し、そのアルキル部分は環を形成していても良い。例えば、メトキシ、エトキシ、 n -プロピルオキシ、イソプロピルオキシ、シクロプロピルオキシ、シクロプロピルメチルオキシ、 n -ブトキシ、イソブチルオキシ、 sec -ブチルオキシ、 $tert$ -ブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、シクロヘキシルオキシ等が挙げられ、メトキシ、エトキシ、 n -プロピルオキシが好ましい。

R_5 で示されるハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられ、フッ素原子、塩素原子が好ましい。

[0090] R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換基の炭化水素基を示す。本明細書において「炭化水素基」とは、置換又は非置換の、炭素数1～28のアルキル基、炭素数2～28のアルケニル基、炭素数2～28のアルキニル基、炭素数3～28のシクロアルキル基、炭素数3～28のシクロアルケニル基、炭素数6～14のアリール基、炭素数7～28のアリールアルキル基（例えば、 C_{6-14} アリール- C_{1-14} アルキル基）をも包含する概念であり、直鎖状、分岐状及び環状のいずれの形態であってもよく、また飽和炭化水素基でも不飽和炭化水素基でもよく、不飽和結合を分子内及び末端のいずれに有していてもよい。中でも、 R_6 及び R_7 としては、炭素数1

～28の置換又は非置換のアルキル基、炭素数7～28の置換又は非置換のアリールアルキル基が好ましい。

但し、R₅が水素原子であるときは、R₆は炭素数24～28の置換又は非置換の炭化水素基が好ましく、炭素数24～28の置換又は非置換のアルキル基がさらに好ましい。

[0091] R₆及びR₇で示される炭化水素基の置換基としては、ハロゲン原子（好ましくは塩素原子、フッ素原子）；メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、tert-ブトキシ基等のアルコキシ基（好ましくは炭素数1～24、より好ましくは炭素数1～16、更に好ましくは炭素数1～10、特に好ましくは炭素数1～4）；フェノキシ基等のアリールオキシ基（好ましくは炭素数6～14）；水酸基；アミノ基；メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、エチルアミノ基、ジエチルアミノ基等のアルキルアミノ基；シクロアルキルアミノ基；アセトアミド基等のアルキルカルボニルアミノ基；シクロアルキルカルボニルアミノ基；ベンゾイルアミノ基等のアリールカルボニルアミノ基（好ましくは、アリール部分の炭素数が6～14のアリール基である、アリールカルボニルアミノ基）等の電子供与性基、更にはカルボキシ基；アルコキシカルボニル基；アシル基（アシル基としては後述の通りである。好ましくはアルキル部分が炭素数1～24の直鎖又は分岐状のアルキル基である、アルキルカルボニル基）；カルバモイル基；トリフルオロメチル基等の電子求引性基が例示される。

[0092] 本明細書において「アシル基」とは、例えば、ホルミル基；アルキルカルボニル基（例えば、アルキル部分が、炭素数1～24（好ましくは炭素数1～12）の直鎖若しくは分岐状のアルキル基である、アルキルカルボニル基（例えば、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、ピバロイル基、ヘキサノイル基））；シクロアルキルカルボニル基（例えば、シクロアルキル部分が、炭素数3～10のシクロアルキル基である、シクロアルキルカルボニル基）；アルケニルカルボニル基（例えば、アルケニル部分が炭素数2～12の直鎖若しくは分岐状のアルケ

ニル基である、アルケニル-カルボニル基（例えば、アクリロイル基、メタクリロイル基）；アリール-カルボニル基（例えば、アリール部分が、炭素数6～14のアリール基である、アリール-カルボニル基（例えば、ベンゾイル基、ナフトイル基））等をいう。アリール-カルボニル基におけるアリール基とは、例えば、単環～3環式芳香族炭化水素基を示し、具体的に例えば、フェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基が例示される。中でも、アシル基としては、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ベンゾイル基、ナフトイル基等が好ましく、アセチル基、ベンゾイル基がより好ましい。

[0093] 上記アルキルアミノ基、アルキルカルボニルアミノ基のアルキル部分としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基等の直鎖又は分岐状のアルキル基（好ましくは炭素数1～24、より好ましくは炭素数1～16、更に好ましくは炭素数1～10、特に好ましくは炭素数1～4）が例示される。

上記シクロアルキルアミノ基、シクロアルキルカルボニルアミノ基のシクロアルキル部分としては、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等のシクロアルキル基（好ましくは炭素数3～24、より好ましくは炭素数3～16、更に好ましくは炭素数3～10、特に好ましくは炭素数3～6）が例示される。

上記アルコキシカルボニル基のアルコキシ部分としては上記アルコキシ基と同様のものが例示される。

[0094] 上記した置換基は、置換可能な位置に、さらに、ハロゲン、アルキル基、シクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、フェニル基、アルコキシ基、水酸基、アミノ基、アルキルアミノ基及びシクロアルキルアミノ基のうちの少なくとも1種で置換されていてもよい。

該ハロゲン、アルコキシ基、アルキルアミノ基、シクロアルキルアミノ基としては上記と同様のものが例示される。

該アルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基等のアルキル基（好ましくは炭素数1～24、より好ましくは炭素数1～16、更に好ましくは炭素数1～10、特に好ましくは炭素数1～4）が例示される。

該シクロアルキル基としては、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等のシクロアルキル基（好ましくは炭素数3～24、より好ましくは炭素数3～16、更に好ましくは炭素数3～10、特に好ましくは炭素数3～6）が例示される。

該アルケニル基としては、ビニル基、プロペニル基、ブテニル基等のアルケニル基（好ましくは炭素数2～24、より好ましくは炭素数2～16、更に好ましくは炭素数2～10、特に好ましくは炭素数2～4）が例示される。

該アルキニル基としては、エチニル基、プロパルギル基、ブチニル基、ペンチニル基等のアルキニル基（好ましくは炭素数2～24、より好ましくは炭素数2～16、更に好ましくは炭素数2～10、特に好ましくは炭素数2～4）が例示される。

[0095] 中でも、 R_6 としては、置換又は非置換のアルキル基が好ましく、また、直鎖状のアルキル基が好ましい。 R_6 としては、置換又は非置換のアリールアルキル基も好ましい。 R_5 が炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子であるときは、 R_6 の炭素数は、好ましくは18～26、より好ましくは24～26である。 R_5 が水素原子であるときは、 R_6 の炭素数は、好ましくは24～26である。 R_6 としては、具体的には例えば、 $-(CH_2)_{23}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{24}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{25}-CH_3$ 、

10-(4-フルオロフェニル)デシル等が挙げられる。

また、 R_7 としては、置換又は非置換のアルキル基が好ましく、また、直鎖状のアルキル基が好ましい。 R_7 の炭素数は好ましくは9~20、より好ましくは12~18である。 R_7 としては、具体的には例えば、 $-(CH_2)_{11}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{12}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{13}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{14}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{15}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{16}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{17}-CH_3$ 等が挙げられる。

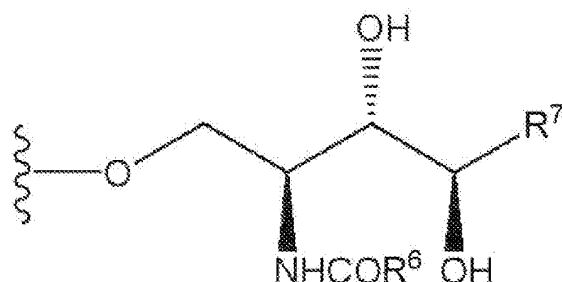
[0096] Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示し、中でも $-CH(OH)-$ が好適である。

[0097] 化合物(11)が立体異性体を有する場合には、いずれの異性体も本発明に包含され、2種以上の異性体の任意の割合の混合物(ラセミ体を含む)であってよい。

特に、化合物(11)には、脂質部分の不斉炭素に由来する光学異性体が存在するが、本発明においては、単一の光学活性体であっても、2種以上の光学活性体の任意の割合の混合物(ラセミ体を含む)であってもよい。 $-NHCO R_6$ が結合する不斉炭素はS配置が好適である。 $-NHCO R_6$ が結合する不斉炭素に隣接し $-OH$ を有する不斉炭素は、 $-NHCO R_6$ が結合する不斉炭素に対してantiの配置が好適である。 Y が $-CH(OH)-$ の場合、 Y で示される $-CH(OH)-$ 中の不斉炭素はR配置が好ましい。

[0098] 化合物(11)の脂質部分としては、

[0099] [化23]



[0100] (式中、各記号は、前述と同義を示す。)等が挙げられる。

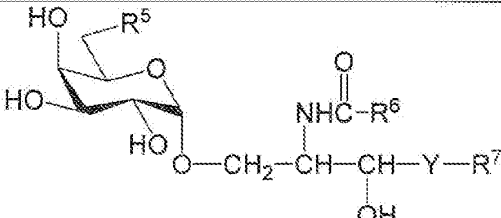
[0101] 化合物(11)の塩としては、薬理的に許容される塩が好ましく、例えば

、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；コハク酸塩、フマル酸塩、酢酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等の有機酸塩；ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩、アルキルアンモニウム塩等のアンモニウム塩等を挙げることができる。

[0102] 本発明における好適な化合物（ⅠⅠ）の具体例を表2に示すが、これらに限定されるものではない。

[0103]

[表2]

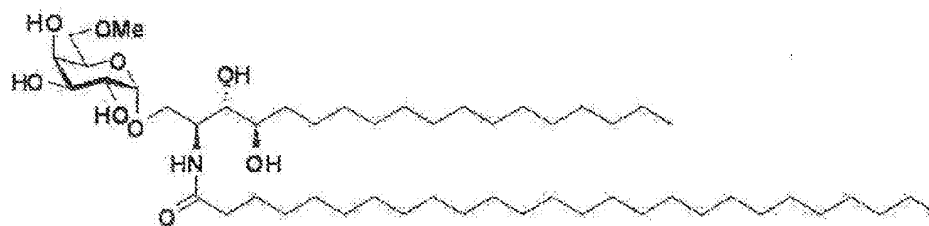
化合物 No.				
	R ⁵	R ⁶	Y	R ⁷
2-9'	-OCH ₃	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-4'	-CH ₃	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-7'	-F	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-10'	-H	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-13'	-OC ₂ H ₅	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-16'	-O(CH ₂) ₂ CH ₃	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
165'	-OCH ₃	-(CH ₂) ₁₃ - 		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃

[0104] 中でも、以下の化合物が好ましい。

表2の化合物No. 2-9'で示される化合物であって、立体構造が下記式で示される化合物(RCAI-61)：

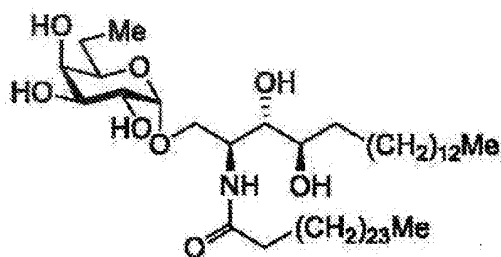
[0105]

[化24]



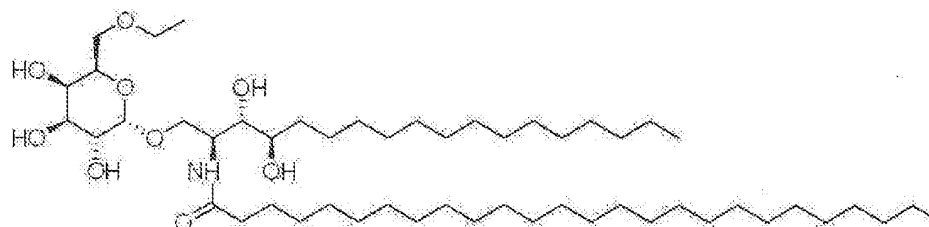
[0106] 表2の化合物No. 3-4'で示される化合物であって、立体構造が下記式で示される化合物(RCAI-64) :

[0107] [化25]



[0108] 表2の化合物No. 3-13'で示される化合物であって、立体構造が下記式で示される化合物(RCAI-85) :

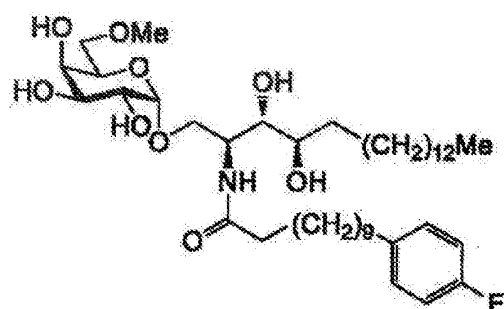
[0109] [化26]



[0110] 表2の化合物No. 165'で示される化合物であって、立体構造が下記式で示される化合物(RCAI-165) :

[0111]

[化27]



[0112] 式(11)で表される化合物またはその塩は、WO2009/119692A1、US Patent No. 8551959等に記載された方法により製造することができる。

[0113] [2. リポソーム]

本発明のリポソーム組成物は、上記糖脂質がリポソームに含有されている。

[0114] 本明細書においては、脂質等を主成分とした閉鎖小胞構造をとるもの（親水性領域と疎水性領域を含む両親媒性分子の凝集によって得られる水溶性粒子）をリポソームと呼ぶ。最近では脂質ナノ粒子(Lipid Nanoparticle; LNP)と呼ぶこともあるが、本明細書において、リポソームの概念には、上記構造をとるものである限り、脂質ナノ粒子と呼ばれるものも包含される。

本発明において、リポソーム成分としては、既知の方法で脂質閉鎖小胞構造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。本発明における脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン（例えば、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジラウロイルホスファチジルコリン、ジミリスティルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン）、ホスファチジルグリセロール（例えば、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジラウロイルホスファチジルグリセロール、ジミリスティルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール）、ホスファチジルエタノールアミン（例え

ば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン)、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、カルジオリピン等のリン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質、カチオン性脂質(例えば、DOTAP、DLin-MC3-DMA((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6, 9, 28, 31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate)、ALC-O315([4-ヒドロキシブチル)アザンジイル]ビス(ヘキサノ-6, 1-ジイル)ビス(2-ヘキシルデカン酸エステル))、SM-102(ヘプタデカン-9-イル8-((2-ヒドロキシエチル)(6-オキソ-6-(ウンデシルオキシ)ヘキシル)アミノ)オクタン酸エステル))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。

[0115] 本発明における、リポソームは、抗原提示細胞に親和性を有するリポソームであることが好ましい。

本発明における、リポソームの好適な例(抗原提示細胞に親和性を有するリポソームの例)として、下記の(#2)～(#8)のリポソームが挙げられる。

[0116] (#2) DOTAP、DOPE、及びコレステロールを含むリポソーム

(#2)のリポソームにおいて、DOTAP、DOPE、コレステロールの重量比(DOTAP:DOPE:コレステロール)は、例えば、1:0.1~10:0.1~10、好ましくは、1:0.3~3:0.2~2である。

本発明のリポソーム組成物において(#2)のリポソームを用いる場合、「本発明におけるNK T細胞リガンド」と「DOTAP、DOPE、コレステロールの合計」の重量比は、例えば、1:1~10,000、好ましくは

、1 : 1 ~ 1, 000である。

(#2) のリポソームを使用した本発明のリポソーム組成物の1態様として、例えば、後述のRK-163含有リポソーム(#2)が挙げられる。

[0117] (#3) DOTAP、DOPE、MPEG2000-DMPE, Na塩、及びコレステロールを含むリポソーム

(#3) のリポソームにおいて、DOTAP、DOPE、MPEG2000-DMPE, Na塩、コレステロールの重量比(DOTAP : DOPE : MPEG2000-DMPE, Na塩 : コレステロール)は、例えば、1 : 0.1 ~ 10 : 0.1 ~ 10 : 0.1 ~ 10、好ましくは、1 : 0.3 ~ 3 : 0.2 ~ 2 : 0.2 ~ 2である。

本発明のリポソーム組成物において(#3)のリポソームを用いる場合、「本発明におけるNKT細胞リガンド」と「DOTAP、DOPE、MPEG2000-DMPE, Na塩、コレステロールの合計」の重量比は、例えば、1 : 1 ~ 10, 000、好ましくは、1 : 1 ~ 1, 000である。

(#3) のリポソームを使用した本発明のリポソーム組成物の1態様として、例えば、後述のRK-163含有リポソーム(#3)が挙げられる。

[0118] (#4) DOTAP、DOPE、MPEG2000-DSPE, Na塩、及びコレステロールを含むリポソーム

(#4) のリポソームにおいて、DOTAP、DOPE、MPEG2000-DSPE, Na塩、コレステロールの重量比(DOTAP : DOPE : MPEG2000-DSPE, Na塩 : コレステロール)は、例えば、1 : 0.1 ~ 10 : 0.1 ~ 10 : 0.1 ~ 10、好ましくは、1 : 0.3 ~ 3 : 0.2 ~ 2 : 0.2 ~ 2である。

本発明のリポソーム組成物において(#4)のリポソームを用いる場合、「本発明におけるNKT細胞リガンド」と「DOTAP、DOPE、MPEG2000-DSPE, Na塩、コレステロールの合計」の重量比は、例えば、1 : 1 ~ 10, 000、好ましくは、1 : 1 ~ 1, 000である。

(#4) のリポソームを使用した本発明のリポソーム組成物の1態様とし

て、例えば、後述のRK-163含有リポソーム（#4）が挙げられる。

[0119]（#5）HSPC、DSPG、及びコレステロールを含むリポソーム

（#5）のリポソームにおいて、HSPC、DSPG、コレステロールの重量比（HSPC：DSPG：コレステロール）は、例えば、1：0.1～10：0.1～10、好ましくは、1：0.2～2：0.2～2である。

本発明のリポソーム組成物において（#5）のリポソームを用いる場合、「本発明におけるNK細胞リガンド」と「HSPC、DSPG、コレステロールの合計」の重量比は、例えば、1：1～10，000、好ましくは、1：1～1，000である。

（#5）のリポソームを使用した本発明のリポソーム組成物の1態様として、例えば、後述のRK-163含有リポソーム（#5）が挙げられる。

[0120]（#6）HSPC、DOPS、及びコレステロールを含むリポソーム

（#6）のリポソームと下記の（#7）のリポソームとは組成は同じだが、NK細胞リガンド含有リポソームの製造に用いる場合に、前者はNK細胞リガンドに対して比較的多く配合する態様の例であり、後者は、NK細胞リガンドに対して比較的少なく配合する態様の例である。

（#6）のリポソームにおいて、HSPC、DOPS、コレステロールの重量比（HSPC：DOPS：コレステロール）は、例えば、1：0.1～10：0.1～10、好ましくは、1：0.2～2：0.2～2である。

本発明のリポソーム組成物において（#6）のリポソームを用いる場合、「本発明におけるNK細胞リガンド」と「HSPC、DOPS、及びコレステロールの合計」の重量比は、例えば、1：1～100，000、好ましくは、1：1～10，000である。

（#6）のリポソームを使用した本発明のリポソーム組成物の1態様として、例えば、後述のRK-163含有リポソーム（#6）が挙げられる。

[0121]（#7）HSPC、DOPS、及びコレステロールを含むリポソーム

（#7）のリポソームにおいて、HSPC、DOPS、コレステロールの重量比（HSPC：DOPS：コレステロール）は、例えば、1：0.1～

10 : 0. 1 ~ 10、好ましくは、1 : 0. 2 ~ 2 : 0. 2 ~ 2である。

本発明のリポソーム組成物において（#7）のリポソームを用いる場合、「本発明におけるNK T細胞リガンド」と「HSPC、DOPS、及びコレステロールの合計」の重量比は、たとえば、1 : 1 ~ 10, 000、好ましくは、1 : 1 ~ 1, 000である。

（#7）のリポソームを使用した本発明のリポソーム組成物の1態様として、例えば、後述のRK-163含有リポソーム（#7）、RCAI-61含有リポソーム（#9）、RCAI-137含有リポソーム（#10）が挙げられる。

[0122] （#8）HSPC、MPEG2000-DSPE, Na塩、及びコレステロールを含むリポソーム

（#8）のリポソームにおいて、HSPC、MPEG2000-DSPE, Na塩、コレステロールの重量比（HSPC : MPEG2000-DSPE, Na塩 : コレステロール）は、例えば、1 : 0. 1 ~ 10 : 0. 1 ~ 10、好ましくは、1 : 0. 2 ~ 2 : 0. 2 ~ 2である。

本発明のリポソーム組成物において（#8）のリポソームを用いる場合、「本発明におけるNK T細胞リガンド」と「HSPC、MPEG2000-DSPE, Na塩、及びコレステロールの合計」の重量比は、例えば、1 : 1 ~ 10, 000、好ましくは、1 : 1 ~ 1, 000である。

（#8）のリポソームを使用した本発明のリポソーム組成物の1態様として、例えば、後述のRK-163含有リポソーム（#8）が挙げられる。

[0123] 本発明において、上記リポソームのなかでも、（#5）～（#8）が好ましく、（#7）、（#8）がより好ましく、（#7）がさらに好ましい。

[0124] [3. 糖脂質（本発明におけるNK T細胞リガンド）含有リポソーム組成物（本発明のリポソーム組成物）]

本発明のリポソーム組成物を構成するリポソームは、公知の方法に従っ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))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。

具体的には、実施例に示すように、リポソームの成分及びNK T細胞リガンドをそれぞれガラス製試験内で有機溶媒に溶解し、これに窒素ガスを吹き付けて有機溶媒を留去し、デシケーター（減圧）中で完全乾固させる。この乾固させたものに等張な水性溶媒（例えば、9%ショ糖水溶液、5%ブドウ糖水溶液、リン酸緩衝化生理食塩液等）を加え、ホモジナイザー等で乳化することによってNK T細胞リガンド含有リポソーム（本発明のリポソーム組成物）を得ることができる。更に、ポリカーボネート製メンブレンフィルター（孔径0.4 μm 、あるいは0.2 μm ）を用いて加温・加圧下で通すことにより粒子径の揃ったリポソームを得ることが可能となる。また、最後に無菌性保証のために、通常のろ過滅菌用フィルター（孔径0.22 μm ；例えばPVDFメンブレンフィルター）に通すことも可能である。

[0125] 本発明のリポソーム組成物において、「式（I）で表される化合物、式（II）で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質（本発明におけるNK T細胞リガンド）」と、「リポソームを構成する（主薬のNK T細胞リガンド以外の）他の脂質類合計」の重量比は、例えば1：1～100,000、好ましくは1：1～10,000、より好ましくは1：1～1,000、さらに好ましくは1：1～100である。

[0126] 本発明のリポソーム組成物の平均粒子径は、特に制限されないが、例えば10～1,000 nm、好ましくは10～500 nm、より好ましくは50～500 nmである。平均粒子径は通常の準弾性光散乱法により測定できる。

[0127] 本発明のリポソーム組成物は、単独で、又は通常使用される薬学的に許容される添加剤（例えば、溶剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤、緩衝剤、pH

調整剤)と共に公知の方法で製剤化して、用いることができる。

本発明のリポソーム組成物は、静脈注射剤とすることが好ましい。本発明のリポソーム組成物が注射剤等の液状製剤である場合は、凍結保存または凍結乾燥等により水分を除去して保存してもよい。凍結乾燥製剤は、使用時に注射用蒸留水等を加え、再度溶解して使用される。

[0128] 本発明のリポソーム組成物は、医薬の有効成分として用いることができる。

[0129] 本発明のリポソーム組成物は、抗悪性腫瘍剤として有効である。

該「悪性腫瘍」としては、例えば、肝臓がん、食道がん、胃がん、胆道癌、膵臓がん、大腸がん、乳がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、前立腺がん、膀胱がん、腎癌、腎盂尿管がん、陰茎がん、後腹膜腫瘍、副腎がん、頭頸部がん、甲状腺がん、卵巣がん、子宮がん、皮膚がん、悪性リンパ腫、脳腫瘍、悪性黒色腫、網膜芽細胞腫、脈絡膜悪性黒色腫、眼内リンパ腫、眼瞼腫瘍、涙腺がん、眼付属器リンパ腫、眼窩肉腫、視神経腫瘍、毛様細胞性星状細胞腫、びまん性星細胞腫、乏突起膠腫、膠芽腫、上衣腫、神経節膠腫、中枢性神経細胞腫、髄芽腫、胚腫、中枢神経系悪性リンパ腫、髄膜腫、神経鞘腫、下垂体腺腫、頭蓋咽頭腫、脊索腫、血管芽腫、類上皮腫、神経芽細胞腫、口腔がん、舌がん、腺様嚢胞がん、聴器がん、頭頸部肉腫、男性乳がん、特殊型乳がん、悪性心膜中皮腫、悪性胸膜中皮腫、胸腺腫、縦隔腫瘍、肺神経内分泌腫瘍、悪性腹膜中皮腫、肛門がん、消化管神経内分泌腫瘍、小腸がん、消化管膜腫瘍、膵・消化管神経内分泌腫瘍、褐色細胞腫、副腎皮質がん、パラガングリオーマ、悪性精巣鞘膜中皮腫、精巣鞘膜腫瘍、外陰がん、子宮肉腫、膣がん、尿膜管がん、腹膜がん、後腹膜肉腫、悪性黒色腫、基底細胞がん、乳房外パジェット病、皮膚血管肉腫、皮膚腫瘍、汗腺がん、脂腺がん、メルケル細胞がん、有棘細胞がん、子宮肉腫、骨肉腫、横紋筋腫、ユーイング肉腫、心内膜肉腫、血管肉腫、体幹肉腫、デスモイド腫瘍、頭頸部肉腫、軟部肉腫、骨嚢腫、頬骨骨腫、内軟骨腫、骨軟骨腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、脊索腫、粘膜繊維肉腫、脂肪肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉

腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、類上皮肉腫、明細胞肉腫、滑膜肉腫、悪性線維性組織球腫、胞巣状軟部肉腫、隆起性皮膚繊維肉腫、成人T細胞白血病リンパ腫、節外性NK／T細胞リンパ腫 鼻型、バーキットリンパ腫、皮膚リンパ腫、ホジキンリンパ腫、末梢性T細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、神経芽腫、腎腫瘍、胚細胞腫瘍、線維肉腫、髄様がん、淡明細胞肉腫、回腸がん、外耳道がん、胸腺がん、毛包がん、乏突起星細胞腫、ぶどう膜悪性黒色腫、粘液型線維肉腫、軟部肉腫、内軟骨腫、内膜間質肉腫、内耳道がん、動脈瘤様骨嚢腫、中耳道がん、神経膠腫、神経線維腫、脂肪腫、十二指腸がんが挙げられる。

[0130] 本発明のリボソーム組成物は、抗感染症剤として有効である。

該「感染症」としては、例えば、ウイルス性疾患（例えば、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルスによるウイルス性肝炎、ヘルペス症、流行性インフルエンザ、新型コロナ、エボラ出血熱、黄熱、狂犬病、ジカウイルス、SARS、MARS、デング熱、日本脳炎、ポリオ、ラッサ熱、水痘、肺炎球菌、麻しん）、細菌感染症（例えば、薬剤耐性結核、非定形抗酸菌感染症、コレラ、ジフテリア、チフス）、真菌症（例えば、カンジダ症、トキソプラズマ、トリパノソーマ）が挙げられる。

[0131] 本発明のリボソーム組成物は、NK T細胞活性化剤、NK T細胞からのIFN- γ 産生誘導剤、自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の活性化剤、長期免疫記憶誘導剤として有効である。

[0132] 本発明のリボソーム組成物は、ヒト、ヒト以外の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サル、ブタ等）に安全に投与することができる。

本発明のリボソーム組成物の投与対象は、好適には、悪性腫瘍を罹患しているヒト、ヒト以外の哺乳動物、或いは感染症を罹患している、又は初期感染症の恐れがあるヒト、ヒト以外の哺乳動物である。本発明のリボソーム製剤は、感染症、悪性腫瘍の転移又は再発の治療又は予防への適用も可能である。

NK T細胞は、生体内の悪性腫瘍細胞や病原体感染細胞に直接作用する働きを持つ様々な免疫細胞（例えば、細胞障害性T細胞、NK細胞等）を活性化できるため、本発明のリポソーム組成物は、悪性腫瘍や病原体の種類に関わらず、悪性腫瘍や感染症の治療に適応可能であり得る。

[0133] 本発明のリポソーム組成物の投与方法としては、本発明のリポソーム組成物を患部又はその周辺に存在する抗原提示細胞に到達させることができる方法であれば限定されない。例えば、主として静脈内投与、さらには動脈内投与、粘膜内投与、リンパ節内投与、患部組織内投与等が挙げられる。一般的には、リポソーム組成物を静脈内に投与することで、NK T細胞が多く存在する肺臓、肝臓に送達することでNK T細胞を人工活性化する。場合によっては、患者の疾患部位に注射針を通して直接リポソーム組成物を送達することができるし、動脈にカテーテルを通してリポソーム組成物を投与することもできる。

[0134] 本発明のリポソーム組成物の投与量は、投与経路、症状の重度、患者の年齢、副作用の程度等により適宜設定することができる。

本発明のリポソーム組成物の投与量は、「式（I）で表される化合物、式（II）で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質」の量として、例えば、1回目投与が、体重1kgあたり12～400ng程度、好ましくは40～400ng程度であり、これを1回目投与後4週間後に同量を再投与することで1クールとする。その後、経過観察によりCD8免疫記憶T細胞数をフォローアップし、治療前の以上の記憶細胞数を維持することを目安に継続的に「4週間隔で2回投与」を繰り返し行う。

[0135] 本発明のリポソーム組成物は、生体内に静脈投与することにより、効率よく生体内の抗原提示細胞（例えば樹状細胞）に届けることができる。従って、本発明はまた、「式（I）で表される化合物、式（II）で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該糖脂質を抗原提示細胞に送達する方法」に関する。

[0136] 以下、実施例、試験例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0137] 実施例で用いられているRK-163、RCAI-61、RCAI-137は、前述の化学構造式で示される化合物である。

本明細書において用いられている略号は以下の意味を示す。

HSPC : Hydrogenated soybean phosphatidycholine

DOTAP : 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane chloride

DOPE : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

MPEG2000-DMPE, Na塩 : N-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, sodium salt

MPEG2000-DSPE, Na塩 : N-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, sodium salt

DSPG : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine

PEG : polyethyleneglycol

PS : phosphatidylserine

OVA : Ovalbumin

PBS : phosphate buffered saline

[0138] [# 1 サンプル (RK-163含有カプチゾール水溶液(#1)) の調製]

表3に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の#1サンプルを調製した。

(調製したサンプルの組成)

・ 安全性試験用

15 ng/mL RK-163、177 ng/mL カプチゾール in 9%ショ糖水溶液

・ 主薬理試験用

1.5 ng/mL RK-163、17.7 ng/mL カプチゾール in 9%ショ糖水溶液

[0139]

[表3]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
カプチゾール (商品名)	CyDex Pharmaceuticals, Inc	-	NC-04A- 170167
クロロホルム	和光純薬工業株式会社(※)	038-02606	ESL3428
メタノール	和光純薬工業株式会社	130-16585	APF2160
RK-163	国立研究開発法人理化学研究所より提供		F-01
9%ショ糖水溶液	ショ糖を超純水にて9%となるように溶解させ、孔径0.22 μm のろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		

※ 和光純薬工業株式会社: 現富士フイルム和光純薬株式会社、以後同じ

[0140] (調製方法)

・安全性試験用

RK-163を100 ng/mLとなるようにメタノール：クロロホルム=1：2(体積比)の溶液にて溶解させた。その溶液1.5 mLをガラス瓶にとり、加温しながら窒素ガスを吹き付けることで乾固させ、その後デシケーターにて静置した。また、カプチゾールを177 ng/mLとなるようにショ糖水溶液に溶解させ、乾固させたRK-163が入っているガラス瓶に10 mL添加して、RK-163を可溶化させた。その溶液を孔径0.22 μm のろ過滅菌用フィルターに通し、スクリューキャップ付きのガラス瓶で4℃にて保存した。この溶液を#1サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

#1サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それにショ糖9%ショ糖水溶液9 mLを添加し混合希釈した。さらにその溶液を孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターに通し、スクリューキャップ付きのガラス瓶で4℃にて保存した。この溶液をこの#1サンプル(主薬理試験用)とした。

[0141] [#2サンプル(RK-163含有リポソーム(#2))の調製]

表4に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の#2サンプルを調製した。

(調製したサンプルの組成)

・安全性試験用

15 ng/mL RK-163、203 ng/mL 脂質合計 (RK-163以外の全脂質 ; 以下同様) in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: DOTAP 91.7 ng/mL、DOPE 73.2 ng/mL、コレステロール 38.1 ng/mL

・主薬理試験用

1.5 ng/mL RK-163、20.3 ng/mL 脂質合計 in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: DOTAP 9.17 ng/mL、DOPE 7.32 ng/mL、コレステロール 3.81 ng/mL

粒子径 : 141.4 nm PDI : 0.1218

[0142] [表4]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
クロロホルム	和光純薬工業株式会社	038-02606	ESL3428
メタノール	和光純薬工業株式会社	130-16585	APF2160
RK-163	国立研究開発法人理化学研究所より提供		F-01
DOTAP	Merck & Co.	CH2900029	MBR0005-01
DOPE	日本精化株式会社	-	ROK-MD061
Cholesterol	関東化学株式会社	07331-30	901B2144
9%ショ糖水溶液	ショ糖を超純水にて9%となるように溶解させ、孔径 0.22 μ m のろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		

[0143] (調製方法)

・安全性試験用

1つのフラスコにDOTAP、DOPE、コレステロールをそれぞれ 91.7mg、73.2 mgおよび38.1mg入れ、メタノール : クロロホルム = 1 : 2 (体積比)の溶液100 mLにて溶解させた。その溶液1.0 mLとRK-163 100 μ g/mL in メタノール : クロロホルム = 1 : 2の溶液1.5 mLを混合し、加温しながら窒素を吹き付けることで乾固させ、デシケーターにて静置した。乾固させたものに9%ショ糖ショ糖水溶液10 mLを添加し、テフロンホモジナイザーにて乳化させ、更にExtr

uder (50℃加温、孔径0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルター、1枚) にて整粒した。調製したリポソーム分散液はさらに9%シヨ糖水溶液にて1000倍希釈し、シヨ糖孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過した後、スクリューキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#2サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

#2サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに9%シヨ糖水溶液を9mL添加し混合希釈した。そのリポソーム分散液を孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリューキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#2サンプル(主薬理試験用)とした。

[0144] [#3サンプル(RK-163含有リポソーム(#3))の調製]

表5に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の#3サンプルを調製した。

(調製したサンプルの組成)

・安全性試験用

15 ng/mL RK-163、 247.2 ng/mL 脂質合計 in 9%シヨ糖水溶液
脂質組成: DOTAP 91.7 ng/mL、 DOPE 73.2 ng/mL、
MPEG2000-DMPE, Na塩 44.2 ng/mL、 コレステロール 38.1 ng/mL

・主薬理試験用

1.5 ng/mL RK-163、 24.7 ng/mL 脂質合計 in 9%シヨ糖水溶液
脂質組成: DOTAP 9.17 ng/mL、 DOPE 7.32 ng/mL、 MPEG2000-DMPE, Na塩 4.42
ng/mL、 コレステロール 3.81 ng/mL
粒子径: 126.7 nm PDI: 0.05407

[0145]

[表5]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
クロロホルム	和光純薬工業株式会社	038-02606	ESL3428
メタノール	和光純薬工業株式会社	130-16585	APF2160
RK-163	国立研究開発法人理化学研究所より提供		F-01
DOTAP	Merck & Co.	CH2900029	MBR0005-01
DOPE	日本精化株式会社	-	ROK-MD061
Cholesterol	関東化学株式会社	07331-30	901B2144
MPEG2000-DMPE, Na 塩	日油株式会社	PM-020CN	M195506
9%ショ糖水溶液	ショ糖を超純水にて9%となるように溶解させ、孔径0.22 μm のろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		

[0146] (調製方法)

・安全性試験用

1つのフラスコにDOTAP、DOPE、MPEG2000-DMPE、Na塩、コレステロールをそれぞれ 9.17mg、7.32 mg、4.42 mgおよび3.81 mg秤取し、メタノール：クロロホルム = 1 : 2 (体積比) の溶液10 mLにて溶解させた。その溶液1.0 mLとRK-163 100 $\mu\text{g/mL}$ in メタノール：クロロホルム = 1 : 2 の溶液1.5 mLを混合し、加温しながら窒素を吹き付けることで乾固させ、デシケーターにて静置した。乾固させたものに9%ショ糖水溶液10 mLを添加し、テフロンホモジナイザーにて乳化させ、さらにExtruder (50℃加温、孔径0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルター、1枚) にて整粒した。調製したリポソーム分散液は、さらに9%ショ糖水溶液にて1000倍希釈し、孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリーキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#3サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

#3サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに9%ショ糖水溶液を9mL添加し混合希釈した。そのリポソーム分散液を孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリーキャップ付

きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#3サンプル(主薬理試験用)とした。

[0147] [#4サンプル(RK-163含有リポソーム(#4))の調製]

表6に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の#4サンプルを調製した。

(調製したサンプルの組成)

・安全性試験用

15 ng/mL RK-163、249 ng/mL 脂質合計 in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: DOTAP 91.7 ng/mL、DOPE 73.2 ng/mL、MPEG2000-DSPE, Na塩 46 ng/mL、コレステロール 38.1 ng/mL

・主薬理試験用

1.5 ng/mL RK-163、24.9 ng/mL 脂質合計 in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: DOTAP 9.17 ng/mL、DOPE 7.32 ng/mL、MPEG2000-DSPE, Na塩 4.6 ng/mL、コレステロール 3.81 ng/mL

粒子径: 126.2 nm PDI: 0.09744

[0148] [表6]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
クロロホルム	和光純薬工業株式会社	038-02606	ESL3428
メタノール	和光純薬工業株式会社	130-16585	APF2160
RK-163	国立研究開発法人理化学研究所より提供		F-01
DOTAP	Merck & Co.	CH2900029	MBR0005-01
DOPE	日本精化株式会社	-	ROK-MD061
Cholesterol	関東化学株式会社	07331-30	901B2144
MPEG2000-DSPE, Na 塩	Lipoid	LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 Batch No. 588200-2190092-01/030	
9%ショ糖水溶液	ショ糖を超純水にて9%となるように溶解させ、孔径0.22 μmのろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		

[0149] (調製方法)

・安全性試験用

1つのフラスコにDOTAP、DOPE、MPEG2000-DSPE、Na塩、コレステロールをそれぞれ 9.17mg、7.32 mg、4.6 mgおよび3.81 mg入れ、メタノール：クロロホルム = 1 : 2 (体積比)の溶液10 mLにて溶解させた。その溶液1.0 mLとRK-163 100 μ g/mL in メタノール：クロロホルム = 1 : 2の溶液1.5 mLを混合し、加温しながら窒素を吹き付けることで乾固させ、デンケーターにて静置した。乾固させたものに9%シヨ糖水溶液10 mLを添加し、テフロンホモジナイザーにて乳化させ、さらにExtruder (50℃加温、孔径0.2 μ mのポリカーボネートメンブレンフィルター、1枚)にて整粒した。調製したリポソーム分散液はさらに9%シヨ糖水溶液にて1000倍希釈し、孔径0.22 μ mのろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリュキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#4サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

#4サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに9%シヨ糖水溶液を9mL添加し混合希釈した。そのリポソーム分散液を孔径0.22 μ mのろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリュキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#4サンプル(主薬理試験用)とした。

[0150] [#5サンプル (RK-163含有リポソーム(#5))の調製]

表7に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の#5サンプルを調製した。

(調製したサンプルの組成)

・安全性試験用

322 ng/mL RK-163、3222 ng/mL 脂質合計 in 10%シヨ糖水溶液

(各濃度は調製したサンプル中のコレステロールを定量し、仕込み時の重量比率より総脂質濃度に換算した値である。)

・主薬理試験用

32.2 ng/mL RK-163、322.2 ng/mL 脂質合計 in 10%ショ糖水溶液

・脂質組成（上記安全性試験用試料の脂質濃度）：

HSPC 1953 ng/mL

DSPG 792 ng/mL

コレステロール 475 ng/mL

（各濃度は調製したサンプル中のコレステロールを定量し、仕込み時の重量比率より各脂質濃度に換算した値である。）

平均粒子径：191.4 nm PDI：0.083

[0151] [表7]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
クロロホルム	SAJ	05-3400-5	G5835
メタノール	SAJ	19-2410-5	J4847
RK-163	国立開発法人理化学研究所より提供		F-01
HSPC	日油株式会社		150107
DSPG	日油株式会社		1112851L
Cholesterol	日油株式会社		1009CH02
10%ショ糖水溶液	ショ糖を超純水にて10%となるように溶解させ、孔径0.22 μ mのろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		

[0152] （調製方法）

・安全性試験用

1つのフラスコにHSPC、DSPG、コレステロールをそれぞれ 6.66 mg、2.7 mg、1.61 mg入れ、メタノール：クロロホルム = 1 : 1 (体積比)の溶液1.5 mLにて溶解させた。その溶液1.5 mLとRK-163 5 mg/mL in メタノール：クロロホルム = 1 : 1の溶液0.22 mLを混合し、加温しながら窒素を吹き付けることで乾固させ、デシケーターにて静置した。乾固させたものに10%ショ糖水溶液2.42 mLを添加し、Extruder（50℃加温、ポアサイズ400 nm、1回、ポアサイズ200 nm、2回）にて整粒し、0.22 μ mのPVDFメンブレンフィルターにてろ過および粒子径を調製した。調製したリポソーム分散液はスクリーキャップ付きのガラス瓶に入れた。

このリポソーム分散液をさらに10%シヨ糖水溶液にて1000倍希釈し、孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリューキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#5サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

#5サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに10%シヨ糖水溶液9 mLを添加し混合希釈した。そのリポソーム分散液を孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリューキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#5サンプル(主薬理試験用)とした。主薬理試験用試料のRK-163濃度が32.2 ng/mLになっているため、実験に際しては、さらにPBSで希釈し、RK-163量として1.5 ng/mL濃度で実験を行った。

[0153] [# 6 サンプル (RK-163含有リポソーム(#6)) の調製]

表8に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の#6サンプルを調製した。

[0154] (調製したサンプルの組成)

・安全性試験用

15 ng/mL RK-163、221 $\mu\text{g/mL}$ 脂質 合計in 9%シヨ糖水溶液

脂質組成: HSPC 103 $\mu\text{g/mL}$ DOPS 79.7 $\mu\text{g/mL}$ コレステロール 38.1 $\mu\text{g/mL}$

・主薬理試験用

1.5 ng/mL RK-163、22.1 $\mu\text{g/mL}$ 脂質 in 9%スクロース水溶液

脂質組成: HSPC 10.3 $\mu\text{g/mL}$ DOPS 7.97 $\mu\text{g/mL}$ コレステロール 3.81 $\mu\text{g/mL}$

L

粒子径 : 168.8 nm PDI : 0.1288

[0155]

[表8]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
クロロホルム	和光純薬工業株式会社	038-02606	ESL3428
メタノール	和光純薬工業株式会社	130-16585	APF2160
RK-163	国立研究開発法人理化学研究所 より提供		F-01
LIPID S PC 3[Hydrogenated soybean phosphatidyl- choline: HSPC]	Lipoid	LIPID S PC-3 Batch No. 525600- 2190668- 01/023	
DOPS	日本精化株式会社		RGF-NF 231
Cholesterol	関東化学株式会社	07331-30	901B2144
9%ショ糖水溶 液	ショ糖を超純水にて9%となるよう に溶解させ、孔径0.22 μm のろ過 滅菌用フィルターに通して調製し た。		

[0156] (調製方法)

・安全性試験

1つのフラスコにHSPC、DOPS、コレステロールをそれぞれ 10.3 mg、7.97 mgおよび3.81mg入れ、メタノール：クロロホルム = 1 : 2 (体積比)の溶液10 mLにて溶解させた。その溶液1.0 mLとRK-163 100 ng/mL in メタノール：クロロホルム = 1 : 2の溶液 1.5 mLを混合し、加温しながら窒素を吹き付けることで乾固させ、デシケーターにて静置した。乾固させたものに9%ショ糖水溶液10 mLを添加し、テフロンホモジナイザーにて乳化させ、さらにExtruder (50℃加温、孔径0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルター、1枚)にて整粒した。調製したリポソーム分散液は、孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリーキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#6サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

#6サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに9%ショ糖水溶液を9mL添加し混合希釈した。そのリポソーム分散液を孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリーキャップ付き

のガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を# 6 サンプル(主薬理試験用)とした。

[0157] [# 7 サンプル (RK-163含有リポソーム(#7)) の調製]

表 9 に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の# 7 サンプルを調製した。

(調製したサンプルの組成)

・ 安全性試験用

15 ng/mL RK-163、220.8 ng/mL 脂質合計 in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: HSPC 103 ng/mL、 DOPS 79.7 ng/mL、 コレステロール 38.1 ng/mL

・ 主薬理試験用

1.5 ng/mL RK-163、22.08 ng/mL 脂質合計 in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: HSPC 10.3 ng/mL、 DOPS 7.97 ng/mL、 コレステロール 3.81 ng/mL

粒子径 : 145.7 nm PDI : 0.06813

[0158] [表9]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
クロロホルム	和光純薬工業株式会社	038-02606	ESL3428
メタノール	和光純薬工業株式会社	130-16585	APF2160
RK-163	国立研究開発法人理化学研究所より提供		F-01
HSPC	Lipoid	LIPOID S PC-3 Batch No. 525600- 2190668- 01/023	
DOPS	日本精化株式会社	--	RGF-NF 231
Cholesterol	関東化学株式会社	07331-30	901B2144
9%ショ糖水溶液	ショ糖を超純水にて9%となるように溶解させ、孔径0.22μmのろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		

[0159] (調製方法)

・安全性試験

1つのフラスコにHSPC、DOPS、コレステロールをそれぞれ 10.3 mg、7.97 mgおよび3.81 mg入れ、メタノール：クロロホルム = 1 : 2 (体積比)の溶液10 mLにて溶解させた。その溶液1.0 mLとRK-163 100 μ g/mL in メタノール：クロロホルム = 1 : 2の溶液1.5 mLを混合し、加温しながら窒素を吹き付けることで乾固させ、デシケーターにて静置した。乾固させたものに9%ショ糖水溶液10mLを添加し、テフロンホモジナイザーにて乳化させ、さらにExtruder (50℃加温、孔径0.2 μ mのポリカーボネートメンブレンフィルター、1枚)にて整粒した。調製したリポソーム分散液は、さらに9%ショ糖水溶液にて1000倍希釈し、孔径0.22 μ mのろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリュウキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#7サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

#7サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに9%ショ糖水溶液を9 mL添加し混合希釈した。そのリポソーム分散液を孔径0.22 μ mのろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリュウキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#7サンプル(主薬理試験用)とした。

[0160] [# 8 サンプル (RK-163含有リポソーム(#8)) 調製]

表10に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の#8サンプルを調製した。

(調製したサンプルの組成)

・安全性試験用

15 ng/mL RK-163、242.6 ng/mL 脂質合計 in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: HSPC 145 ng/mL、 MPEG2000-DSPE, Na塩48.8 ng/mL、 コレステロール 48.8 ng/mL

・主薬理試験用

1.5 ng/mL RK-163、24.26 ng/mL 脂質合計 in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: HSPC 14.5 ng/mL、 MPEG2000-DSPE, Na塩4.88 ng/mL、 コレステロール 4.88 ng/mL

粒子径 : 143.0 nm PDI : 0.05755

[0161] [表10]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
クロロホルム	和光純薬工業株式会社	038-02606	ESL3428
メタノール	和光純薬工業株式会社	130-16585	APF2160
RK-163	国立研究開発法人理化学研究所より提供		F-01
HSPC	Lipoid	LIPID S PC-3 Batch No. 525600- 2190668-01/023	
MPEG2000- DSPE, Na 塩	Lipoid	LIPID PE 18:0/18:0-PEG 2000 Batch No. 588200- 2190092-01/030	
Cholesterol	関東化学株式会社	07331-30	901B2144
9%ショ糖水溶液	ショ糖を超純水にて9%となるように溶解させ、孔径0.22 μm のろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		

[0162] (調製方法)

・ 安全性試験用

1つのフラスコにHSPC、MPEG2000-DSPE, Na塩、コレステロールをそれぞれ14.5 mg、4.88 mgおよび4.88 mg入れ、メタノール：クロロホルム = 1 : 2 (体積比)の溶液10 mLにて溶解させた。その溶液1.0 mLとRK-163 100 $\mu\text{g/mL}$ in メタノール：クロロホルム = 1 : 2の溶液1.5 mLを混合し、加温しながら窒素を吹き付けることで乾固させ、デシケーターにて静置した。乾固させたものに9%ショ糖水溶液10 mLを添加し、テフロンホモジナイザーにて乳化させ、さらにExtruder (60℃加温、孔径0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルター、一枚)にて整粒した。調製したリポソーム分散液は、さらに9%ショ糖水溶液にて1000倍希釈し、孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリーキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#8サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

8 サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに9%シヨ糖水溶液を9 mL添加し混合希釈した。そのリポソーム分散液を孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリューキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を# 8 サンプル(主薬理試験用)とした。

[0163] [# 9 サンプル (RCAI-61含有リポソーム(#9)) の調製]

表 1 1 に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の# 9 サンプルを調製した。# 9 サンプルは、RK-163の代わりにRCAI-61を用いた以外は、# 7 サンプルと同じ調製方法で作成した。

(調製したサンプルの組成)

・安全性試験用

15 ng/mL RCAI-61、220.8 ng/mL 脂質合計 in 9%シヨ糖水溶液

脂質組成: HSPC 103 ng/mL、 DOPS 79.7 ng/mL、 コレステロール 38.1 ng/mL

・主薬理試験用

1.5 ng/mL RCAI-61、22.08 ng/mL 脂質合計 in 9%シヨ糖水溶液

脂質組成: HSPC 10.3 ng/mL、 DOPS 7.97 ng/mL、 コレステロール 3.81 ng/mL

粒子径 : 145.7 nm PDI : 0.06813

[0164]

[表11]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
クロロホルム	和光純薬工業株式会社	038-02606	ESL3428
メタノール	和光純薬工業株式会社	130-16585	APF2160
RCAI-61	国立研究開発法人理化学研究所より提供		
HSPC	Lipoid	LIPOID S PC-3 Batch No. 5256 00-2190668 -01/023	
DOPS	日本精化株式会社	-	RGF-NF 231
Cholesterol	関東化学株式会社	07331-30	901B2144
9%ショ糖水溶液	ショ糖を超純水にて9%となるように溶解させ、孔径0.22 μm のろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		

[0165] (調製方法)

・安全性試験用

1つのフラスコにHSPC、DOPS、コレステロールをそれぞれ 10.3 mg、7.97 mgおよび3.81 mg入れ、メタノール：クロロホルム = 1 : 2 (体積比)の溶液10 mLにて溶解させた。その溶液1.0 mLとRCAI-61 100 $\mu\text{g/mL}$ in メタノール：クロロホルム = 1 : 2の溶液1.5 mLを混合し、加温しながら窒素を吹き付けることで乾固させ、デシケーターにて静置した。乾固させたものに9%ショ糖水溶液10mLを添加し、テフロンホモジナイザーにて乳化させ、さらにExtruder (50℃加温、孔径0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルター、1枚)にて整粒した。調製したリポソーム分散液は、さらに9%ショ糖水溶液にて1000倍希釈し、孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリーキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#9サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

#9サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに9%ショ糖水溶液を9 mL添加し混合希釈した。そのリポソーム分散液を孔径0.22 μm

のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリーキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を# 9 サンプル(主薬理試験用)とした。

[0166] [# 1 0 サンプル (RCAI-137含有リポソーム(#10)) の調製]

表 1 2 に示す試薬、配合成分を用いて、下記調製方法に従って、安全性試験用および主薬理試験用の # 1 0 サンプルを調製した。# 1 0 サンプルは、R K-163の代わりにRCAI-137を用いた以外は、# 7 サンプルと同じ調製方法で作成した。

(調製したサンプルの組成)

・ 安全性試験用

15 ng/mL RCAI-137、220.8 ng/mL 脂質合計 in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: HSPC 103 ng/mL、 DOPS 79.7 ng/mL、 コレステロール 38.1 ng/mL

・ 主薬理試験用

1.5 ng/mL RCAI-137、22.08 ng/mL 脂質合計 in 9%ショ糖水溶液

脂質組成: HSPC 10.3 ng/mL、 DOPS 7.97 ng/mL、 コレステロール 3.81 ng/mL

粒子径 : 145.7 nm PDI : 0.06813

[0167]

[表12]

	製造会社又は調製方法	Cat No.	Lot No.
クロロホルム	和光純薬工業株式会社	038-02606	ESL3428
メタノール	和光純薬工業株式会社	130-16585	APF2160
RCAI-137	国立研究開発法人理化学研究所より提供		
HSPC	Lipoid	LIPOID S PC-3 Batch No. 5256 00-2190668-01/023	
DOPS	日本精化株式会社	~	RGF-NF 231
Cholesterol	関東化学株式会社	07331-30	901B2144
9%ショ糖水溶液	ショ糖を超純水にて9%となるように溶解させ、孔径0.22 μm のろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		

[0168] (調製方法)

・安全性試験用

1つのフラスコにHSPC、DOPS、コレステロールをそれぞれ 10.3 mg、7.97 mgおよび3.81 mg入れ、メタノール：クロロホルム = 1 : 2 (体積比)の溶液10 mLにて溶解させた。その溶液1.0 mLとRCAI-137 100 $\mu\text{g/mL}$ in メタノール：クロロホルム = 1 : 2の溶液1.5 mLを混合し、加温しながら窒素を吹き付けることで乾固させ、デシケーターにて静置した。乾固させたものに9%ショ糖水溶液10mLを添加し、テフロンホモジナイザーにて乳化させ、さらにExtruder (50°C加温、孔径0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルター、1枚)にて整粒した。調製したリポソーム分散液は、さらに9%ショ糖水溶液にて1000倍希釈し、孔径0.22 μm のろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリーキャップ付きのガラス瓶に入れ、4°Cにて保存した。この溶液を#10サンプル(安全性試験用)とした。

・主薬理試験用

#10サンプル(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに9%ショ糖水溶液を9 mL添加し混合希釈した。そのリポソーム分散液を孔径0.22 μm

mのろ過滅菌用PVDFメンブレンフィルターにてろ過し、スクリーキャップ付きのガラス瓶に入れ、4℃にて保存した。この溶液を#10サンプル(主薬理試験用)とした。

[0169] [試験例1] NKT細胞リガンド(RK-163)含有リポソームの抗腫瘍効果

リポソーム組成の異なるRK-163含有リポソーム(上記調製方法で製造した#2-#8サンプル)の有効性を調べるため、抗腫瘍活性に於いて有効性を検討した。

試験例1-1においてはRK-163含有リポソーム(#2-#5)サンプル(主薬理試験用))および試験例1-2においてはRK-163含有リポソーム(#5-#8)サンプル(主薬理試験用))の0.3 ng (RK-163量に換算)およびX線照射(50 Gy)した疑似腫瘍抗原OVAを発現したB16マウスメラノーマ細胞(M04) 1×10^6 cellsをC57BL/6マウス(10週齢)の尾静脈より投与し、その後、B16マウスメラノーマ細胞(M04) 3×10^5 cellsを同マウスの皮下に 3×10^5 cellsを移植した。移植後、7、10、14、17日目の腫瘍径を観察した。なお、全ての測定はデジタルノギスを用いて行った。腫瘍体積(mm^3)=長径(mm) x 短径(mm) x 高さ(mm)で算出した。

比較例として、RK-163含有リポソームの代わりに、RK-163含有カプチゾール水溶液(#1サンプル(主薬理試験用))を用いた以外は同じ方法で、試験を行った。対照群としてはRK-163含有リポソーム投与量と同量のPBSを投与した。

結果を図1に示す。

その結果、RK-163含有リポソーム(#2-#5)(試験例1-1)とRK-163含有リポソーム(#5-#8)(試験例1-2)を比較した場合、RK-163含有リポソーム(#7)、RK-163含有リポソーム(#8)が、有意な抗腫瘍効果を示した。

[0170] [試験例2] NKT細胞リガンド(RK-163)含有リポソームによる抗腫瘍活性(dose)とED50

RK-163含有リポソーム(#7)(RK-163量に換算して0.001 ng/25 g体重 ~ 1 ng/25 g体重を投与)とX線照射(50 Gy)した疑似腫瘍抗原OVA発現M04細胞

をC57BL/6マウス（10週齢）の尾静脈より投与し、その後、B16マウスメラノーマ細胞（M04） 3×10^5 cellsを同マウスの皮下に 3×10^5 cellsを移植した。移植後、7、11、14、17日目の腫瘍径を観察した。なお、全ての測定はデジタルノギスを用いて行った。腫瘍体積(mm^3)=長径(mm) x 短径(mm) x 高さ(mm)で算出した。RK-163含有リポソーム（#7）の代わりに同量のPBSを投与した群を対照とした。

結果を図2に示す。

その結果、RK-163含有リポソーム（#7）は強い抗腫瘍効果を示し、メラノーマ腫瘍細胞の増殖をRK-163量に比例して（即ち、用量依存的に）抑制した。有効量はRK-163量に換算して、0.3 ng/25 gマウス体重 ~ 1 ng/25 gマウス体重であった。ED50は0.01393であった。

[0171] [試験例3] NKT細胞リガンド(RCAI-61またはRCAI-137)含有リポソームの抗腫瘍効果

RK-163含有リポソーム（#7）、RCAI-61含有リポソーム（#9）またはRCAI-137含有リポソーム（#10）（RK-163量、RCAI-61量またはRCAI-137量に換算して0.003ng/25g体重~1ng/25g体重を投与）とX線照射(50 Gy)した疑似腫瘍抗原OVA発現M04細胞をC57BL/6マウス（10週齢）静脈より投与し、その後、B16マウスメラノーマ細胞（M04） 3×10^5 cellsを同マウスの皮下に 3×10^5 cellsを移植した。移植後、7、11、14、17日目の腫瘍径を観察した。なお、全ての測定はデジタルノギスを用いて行った。腫瘍体積(mm^3)=長径(mm) x 短径(mm) x 高さ(mm)で算出した。RK-163、RCAI-61またはRCAI-137含有リポソームの代わりに同量のPBSを投与した群を対照とした。

結果を図3に示す。

その結果、RCAI-61含有リポソーム（#9）およびRCAI-137含有リポソーム（#10）ともに、試験例1において有効性を示したRK-163含有リポソーム（#7）と同様に強い抗腫瘍効果を示した。

[0172] [試験例4] NKT細胞リガンド(RK-163)含有リポソームの肝臓毒性試験

試験例2の結果の図2で示した抗腫瘍効果の有効量（1 ng/マウス25 g体重

）の10倍量（10 ng/マウス25 g体重）を用いてRK-163含有リポソーム（#7）の肝臓毒性試験（肝臓毒性：ALT，AST，肝臓白斑）を行った。RK-163含有リポソーム（#7）10 ngをC57BL/6マウス（10週齢）（1群5匹）の尾静脈より投与し、投与3、7、17日目の血液を採取し、ELISAによりALT，ASTを測定した。また、投与17日目のマウスから肝臓を摘出し、肝白斑の有無を確認した。RK-163含有リポソーム（#7）の代わりに同量のRK-163を含まないリポソーム（LIP0）及び同量のPBSを投与した群を対照群とした。

結果を図4に示す。その結果、抗腫瘍効果の有効量の10倍量を含むRK-163含有リポソームを投与しても、肝細胞酵素であるAST、ALTの上昇及び肝臓白斑は認められず、安全性が確認された。

図4の「基準値上限」は、日本クレア社が10週齢正常C57BL/6マウスデータを統計学的に算出し、ALT(GPT)は34.4 IU/LおよびAST(GOT)は77.4 IU/Lとしたものである。したがって、「基準値上限」以下の数値、0～34.4 IU/L(ALT)および0～77.4 IU/L(AST)、が正常値となる。

[0173] 〔試験例5－1〕 NKT細胞リガンド(RK-163)含有リポソームによる腫瘍組織外NKT細胞の活性化

RK-163含有リポソーム（#7）の有効量(RK-163換算量1 ng/マウス)および擬似腫瘍抗原（OVA-パルスC57BL/6Jマウス脾細胞 2×10^7 cells）をC57BL/6マウス（10週齢）（1群5匹）の尾静脈に投与することにより、RK-163含有リポソーム（#7）を肝臓内抗原提示細胞（クッパー細胞など）に取り込ませ、CD1d分子上に抗原提示されたRK-163リガンドにより、肝臓内のNKT細胞を活性化した。その結果、マウスNKT細胞は、活性化マーカーであるKLRG1を細胞表面に発現するとともに、他の免疫細胞群を活性化するアジュバント物質であるIFN- γ を産生した。RK-163含有リポソーム（#7）の代わりに同量のPBSを投与した群を対照群とした。

結果を図5－1に示す（図5－1はRK-163含有リポソーム（#7）投与後3日目のデータである）。NKT細胞はRK-163含有リポソームによって活性化され、数を増やすとともに、活性化マーカーであるKLRG1の発現、及びIFN- γ の産

生を誘導した。

[0174] [試験例 5 - 2] NKT細胞リガンド(RK-163)含有リポソームによるヒトNKT細胞のin vitro活性化

RK-163含有リポソーム (#7) によるヒトNKT細胞の活性化(IFN- γ 産生)を検討した。

C57BL/6マウスのsplenocytesからNKT細胞を含むCD3⁺細胞群をMACSにより除去したのち、96wellプレートに 5.0×10^4 cells/well播種し、そこにRK-163含有リポソーム (#7) の有効量(RK-163換算量1 ng)を加え、24時間37°Cでパルス培養を行なった。その後、培養上清を除いたのち、ヒトNKTハイブリドーマ細胞 (ラウル細胞) を 5.0×10^4 cells/well播種し、さらに24時間37°Cで培養を行ない、培養上清を回収し、Human IFN- γ ELISAを用いることで、培養上清中のIFN- γ の産生量を測定した。RK-163含有リポソーム (#7) の代わりに同量の培養液 (medium) を添加した群を対照群とした。

結果を図5-2に示す。

その結果、RK-163含有リポソーム (#7) 投与群では、有意にIFN- γ の産生が増加した。これらの結果は、マウス抗原提示細胞にパルスされたRK-163含有リポソーム (#7) がヒトNKT細胞を活性化し、IFN- γ を産生することを示した。

このことから、(1) RK-163含有リポソームは、ヒトNKT細胞を活性化できること、(2) マウス抗原提示細胞に抗原提示されたRK-163含有リポソームでもヒトNKT細胞を活性化できることから、種を超えてNKT細胞を活性化できることを示した。

[0175] [試験例 6] NKT細胞リガンド(RCAI-61またはRCAI-137)含有リポソームによる腫瘍組織外NKT細胞の活性化

RCAI-61含有リポソーム (#9) またはRCAI-137含有リポソーム (#10) (RCAI-61またはRCAI-137換算量1ng/マウス) および擬似腫瘍抗原OVAパルス脾細胞をC57BL/6マウスの尾静脈に投与することにより、RCAI-61含有リポソーム (#9) またはRCAI-137含有リポソーム (#10) を肝臓内抗原提示細胞 (クッパー

細胞など）に取り込ませ、CD1d分子上に抗原提示されたRCAI-61またはRCAI-137リガンドにより、肝臓内のNKT細胞を活性化した。

結果を図6に示す。

その結果、RCAI-61含有リポソーム（#9）、RCAI-137含有リポソーム（#10）の投与により、NKT細胞は、著しく増殖するとともに（図6左図）、活性化マーカーであるKLRG1を細胞表面に発現するとともに、他の免疫細胞群を活性化させるアジュバント物質であるIFN- γ を産生した（図6右図）。

これらの結果は、腫瘍組織外で人工活性化されたNKT細胞が、腫瘍組織内に浸潤し、腫瘍組織内免疫細胞群を活性化できることを示した。

[0176] 〔試験例7〕NKT細胞リガンド(RK-163)含有リポソーム活性化NKT細胞による自然免疫系・獲得免疫系細胞群の活性化

RK-163含有リポソーム（#7）の有効量（RK-163換算量1 ng/マウス）と擬似腫瘍抗原としてOVAパルス脾細胞 2×10^7 個をC57BL/6マウス（10週齢）（1群5匹）の尾静脈投与することにより、肝臓内のNKT細胞を活性化した後、NKT細胞活性化によるアジュバント作用で、自然免疫系及び獲得免疫系細胞群に及ぼす影響を、PD-1発現を指標に解析した。RK-163含有リポソーム（#7）の代わりに同量のPBSを投与した群を対照群とした。

結果を図7に示す。

その結果、RK-163含有リポソーム（#7）によるNKT細胞の活性化（試験例5-1、図5-1参照）の後、獲得免疫系CD4T、CD8T細胞及び自然免疫系NK細胞は活性化され、細胞数の増加とともに活性化の指標としてのPD-1の発現が確認された。RK-163リポソームを投与によって、NKT細胞の活性化がされることにより、獲得免疫系CD4T細胞及びCD8T細胞だけでなく、自然免疫系NK細胞をも活性化した。

[0177] 〔試験例8〕NKT細胞リガンド(RCAI-61またはRCAI-137)含有リポソーム活性化NKT細胞による自然免疫系・獲得免疫系細胞群の活性化

RCAI-61含有リポソーム（#9）またはRCAI-137含有リポソーム（#10）および擬似腫瘍抗原OVAパルス脾細胞をC57BL/6マウスの尾静脈投与することによ

り、活性化されたNKT細胞によるアジュバント作用で、自然免疫系及び獲得免疫系細胞群を活性化することを検証するために、細胞数およびPD-1発現を解析した。

結果を図8に示す。

その結果、RACI-61含有リポソーム（#9）（図8左図）、RCAI-137含有リポソーム（#10）（図8右図）ともに、NKT細胞の活性化後、獲得免疫系CD4T、CD8T細胞および自然免疫系NK細胞は活性化され、細胞数の増加とともに活性化指標としてのPD-1の発現が確認された。

[0178] [試験例9] NKT細胞リガンド(RK-163)含有リポソームによる活性化NKT細胞による腫瘍組織内浸潤と腫瘍組織内の自然免疫系(NK)・獲得免疫系エフェクター(CD8T)細胞群の活性化

RK-163含有リポソーム（#7）の有効量(RK-163換算量1 ng/マウス体重)および擬似腫瘍抗原としてX線照射M04腫瘍細胞(OVA発現B16マウスメラノーマ細胞) 1×10^6 個をマウス（C57BL/6J, 10週齢）(1群5匹)の尾静脈投与し、その後、M04腫瘍細胞を、 3×10^5 個を皮下移植し、17日後の腫瘍内の免疫細胞解析を行った。RK-163含有リポソーム（#7）の代わりに同量のPBSを投与した群を対照群とした。

結果を図9に示す。

その結果、RK-163含有リポソーム（#7）投与群では、人工活性化されたNKT細胞は腫瘍組織に浸潤した後（図9の左図上図）、腫瘍組織内でIFN- γ を産生し（図9の左図下図）、腫瘍組織内に存在する獲得免疫系CD8T細胞を活性化するとともに、自然免疫系NK細胞を活性化した（図9の右図）。一方、PBS投与群では、人工活性化していないNKT細胞もほぼ同数が腫瘍組織内に浸潤するが（図9の左図上図）、IFN- γ を産生しないために（図9の左図下図）、自然免疫系・獲得免疫細胞群を活性化する事はなく、活性化マーカーとしてのPD-1の発現も見られなかった（図9右図）。このことからNKT細胞を人工活性化することが重要である事がわかる。

腫瘍組織外で人工活性化されたNKT細胞は腫瘍内に浸潤し、腫瘍組織内でも

活性化が維持され、他の免疫細胞群を活性化するIFN- γ を大量に産生し続ける結果、RK-163含有リポソーム（#7）投与群では、変異がんを含め抗原発現陽性がん細胞を攻撃するCD8T細胞、抗原発現を失ったがん細胞を攻撃するNK細胞群が活性化され、それらの免疫細胞群に活性化の指標としてのPD-1の発現を確認でき、免疫不全である腫瘍内の免疫細胞群活性化が示された。

[0179] [試験例 1 O] NKT細胞リガンド(RK-163)含有リポソームによる長期免疫記憶誘導・維持（30, 90日後）

RK-163含有リポソーム（#7）（RK-163換算量1 ng/マウス体重）と疑似腫瘍抗原（OVA）パルス脾臓細胞 2×10^7 個を静脈内投与により同時免疫したC57BL/6マウス（10週齢）（1群5匹）を、RK-163含有リポソーム（#7）投与後30日、90日目に、屠殺し、脾臓細胞を用いて解析を行った。

結果を図10に示す。

その結果、RK-163含有リポソーム投与により、OVA特異的CD8T細胞群の増殖と長期免疫記憶CD8T細胞群形成（OVA特異的CD8細胞のT_{cm}、T_{em}分画が有意に検出）が確認されると共に、RK-163含有リポソーム（#7）投与後30日、90日において長期記憶が形成・維持されていることを確認した。RK-163含有リポソーム投与により、がん特異的CD8T記憶細胞が形成され、30日、90日間維持されることが示された。

[0180] [試験例 1 1] NKT細胞リガンド(RCAI-61またはRCAI-137)含有リポソームによる長期免疫記憶誘導・維持（30, 90日後）

RCAI-61含有リポソーム（#9）またはRCAI-137含有リポソーム（#10）と疑似腫瘍抗原（OVA）パルス脾臓細胞を静脈内投与により免疫したC57BL/6マウスを、RCAI-61含有リポソーム（#9）、RCAI-137含有リポソーム（#10）投与後30日、90日目に、屠殺し、脾臓細胞を用いて解析を行った。

結果を図11に示す。

その結果、RCAI-61含有リポソーム（図11上図）またはRCAI-137含有リポソーム（図11下図）投与後、ともにOVA特異的CD8T細胞群の増殖と長期免疫記憶CD8T細胞群形成（OVA特異的CD8細胞のT_{cm}、T_{em}分画が有意に検出）が確

認められると共に、RCAI-61含有リポソーム（図11上図）またはRCAI-137含有リポソーム（図11下図）投与後30日、90日においても長期記憶が形成・維持されていることを確認した。

[0181] [試験例12] NKT細胞リガンド(RK-163)含有リポソームによる長期免疫記憶成立・維持1年後の抗腫瘍効果

RK-163含有リポソーム（#7）と疑似腫瘍抗原（OVA）パルス脾臓細胞 2×10^7 個をC57BL/6（10週齢）に同時免疫し、放置した。

その後1年を経過したのち、これら長期記憶誘導C57BL/6マウスの皮下にB16マウスメラノーマ細胞（M04） 3×10^5 cellsを移植し、7、10、14、17、21日目の腫瘍径を観察した。なお、全ての測定はデジタルノギスを用いて行った。腫瘍体積(mm^3)=長径(mm) x 短径(mm) x 高さ(mm)で算出した。

C57BL/6マウスの代わりにNKT細胞欠損NKT-K0マウスを用いて、同様に実験を行った。また、RK-163含有リポソーム（#7）の代わりに同量のRK-163を含まないリポソーム製剤（LIP0）を投与した群を対照群とした。

結果を図12に示す。

その結果、C57BL/6マウスにRK-163含有リポソーム（#7）を投与した群では、1回のRK-163含有リポソーム（#7）投与後1年を経た個体に、腫瘍細胞を移植した場合、強い抗腫瘍効果を発揮して、腫瘍増殖を抑制した。つまり、RK-163含有リポソーム（#7）を単回投与することで1年以上の免疫記憶が誘導され、腫瘍増殖を抑制できた。一方、対照群としての、RK-163を含有していないリポソームを投与した群、及びNKT細胞欠損NKT-K0マウスにRK-163含有リポソームを投与した群では、がんの発症を抑制することはできなかった。つまり、長期記憶を誘導することができなかった。

RK-163含有リポソーム（#7）は、投与1年後であるにも関わらず、強い抗腫瘍効果が得られ、がん治療にとって重要な、がん長期記憶を成立させる効果を有することが確認された。

対照群としてのLIP0投与群およびNKT細胞欠損NKT-K0マウスは、長期記憶を誘導することができず、その結果として、がんの発症を抑制することはでき

なかったことから活性化NKT細胞が長期免疫記憶に必須の細胞であることが証明された。

産業上の利用可能性

[0182] 本発明によれば、生体内のNK T細胞を人工活性化し得る、抗悪性腫瘍剤などとして有用なNK T細胞リガンド含有製剤を提供することができる。

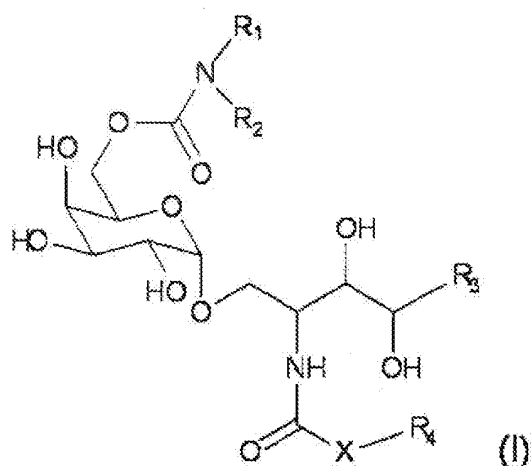
[0183] 本出願は、日本で出願された特願2022-020306を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含されるものである。

請求の範囲

〔請求項1〕 式（I）で表される化合物、式（I I）で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物。

式（I）：

〔化1〕



〔式中、Xはアルキレン基あるいは－NH－を示し；

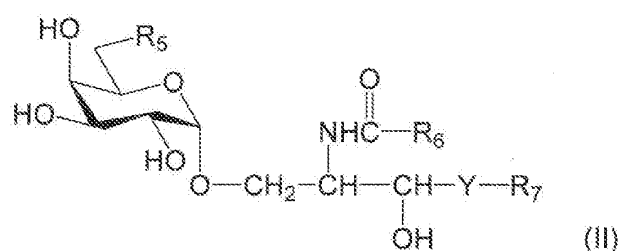
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒になって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す。〕

式（I I）：

[化2]

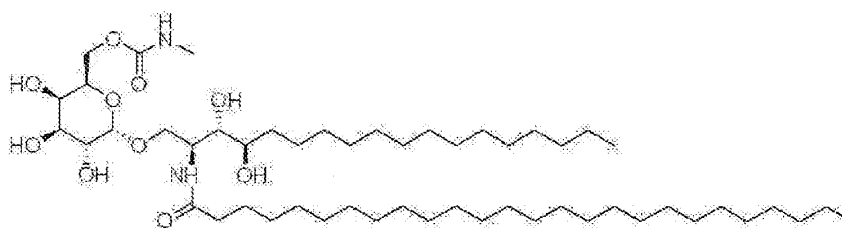


[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[請求項2] 前記糖脂質が、式(Ⅰ)で表される化合物又はその塩である、請求項1記載の組成物。

[請求項3] 前記糖脂質が、下記式：

[化3]



で表される化合物又はその塩である、請求項2記載の組成物。

[請求項4] 抗癌性腫瘍剤又は抗感染症剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

[請求項5] NKT細胞活性化剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

[請求項6] IFN- γ 産生誘導剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

[請求項7] 自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の活性化剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

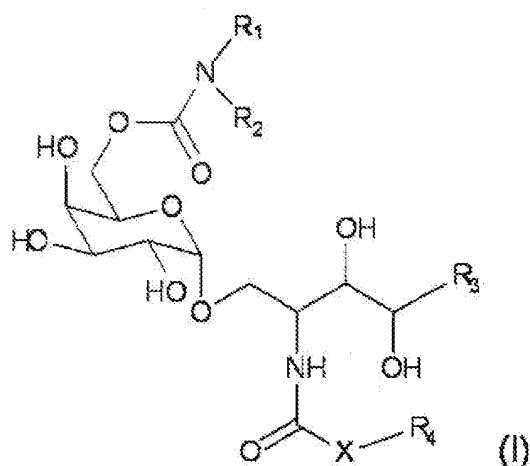
[請求項8] 長期免疫記憶誘導剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

[請求項9] 前記糖脂質を、抗原提示細胞に送達するための、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

[請求項10] 式(Ⅰ)で表される化合物、式(ⅠⅠ)で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該糖脂質を抗原提示細胞に送達する方法。

式(Ⅰ)：

[化4]



[式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

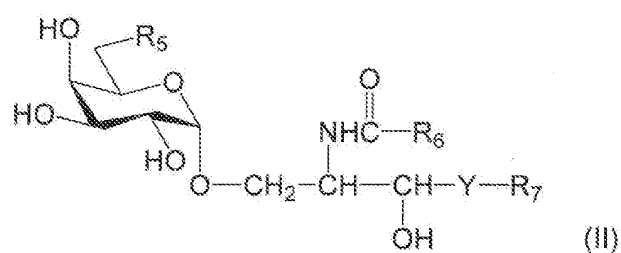
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒になって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す。]

式(ⅠⅠ)：

[化5]



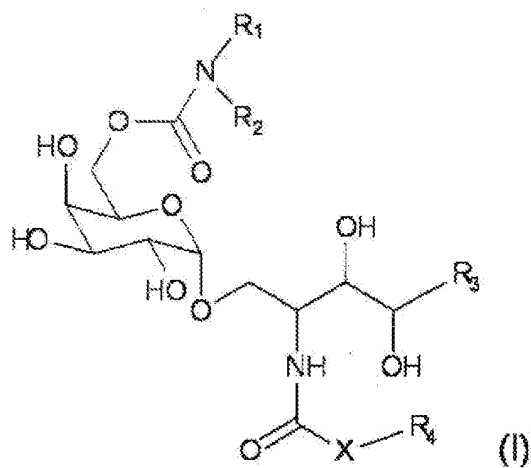
[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[請求項11]

式(Ⅰ)で表される化合物、式(ⅠⅠ)で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、悪性腫瘍又は感染症の治療方法。

式(Ⅰ)：

[化6]



[式中、 X はアルキレン基あるいは $-NH-$ を示し；

R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び 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

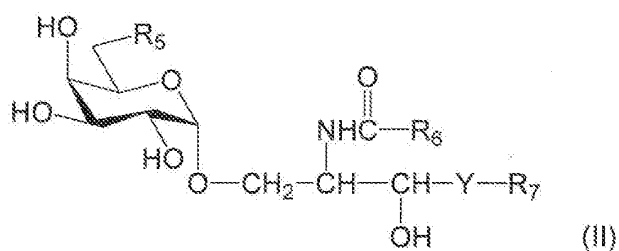
てもよく；

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。]

式（ⅠⅠ）：

[化7]



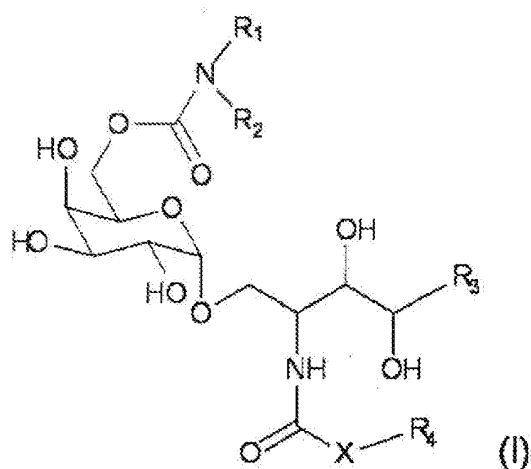
[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[請求項12]

式（Ⅰ）で表される化合物、式（ⅠⅠ）で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象におけるNK細胞活性化方法。

式（Ⅰ）：

[化8]



[式中、Xはアルキレン基あるいは－NH－を示し；

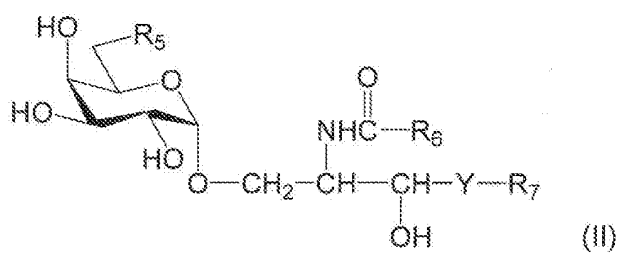
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒になって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す。]

式（I I）：

[化9]

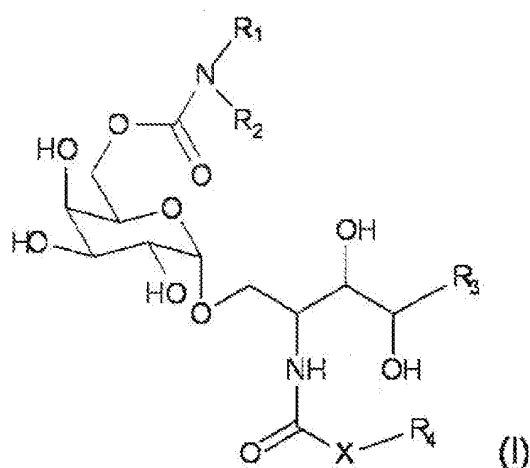


[式中、R₅は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、R₆及びR₇はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは－CH₂－、－CH(OH)－又は－CH＝CH－を示す。]

[請求項13] 式(Ⅰ)で表される化合物、式(ⅠⅠ)で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象におけるIFN- γ 産生誘導方法。

式(Ⅰ)：

[化10]



[式中、Xはアルキレン基あるいは-NH-を示し；

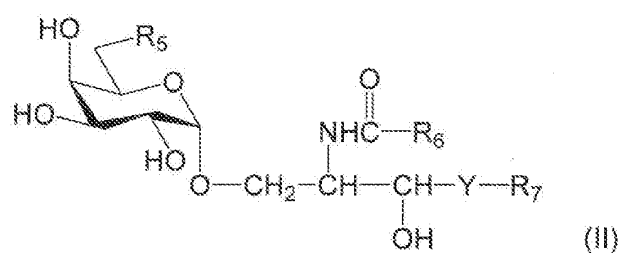
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒になって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す。]

式(ⅠⅠ)：

[化11]



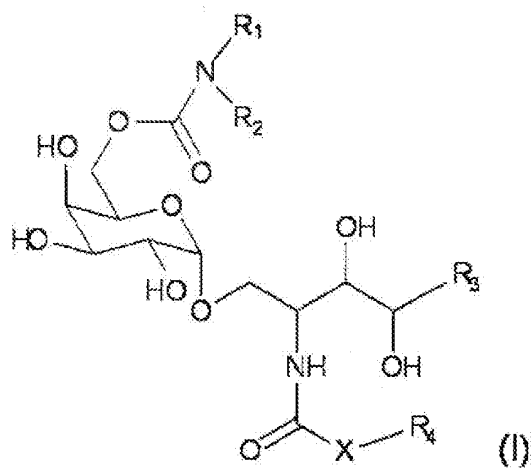
[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[請求項14]

式(Ⅰ)で表される化合物、式(ⅠⅠ)で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象における自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の活性化方法。

式(Ⅰ)：

[化12]



[式中、 X はアルキレン基あるいは $-NH-$ を示し；

R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリアル基を示し、 R

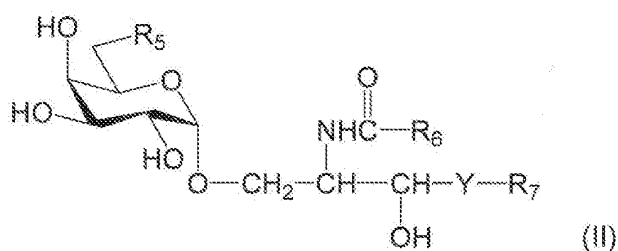
$_1$ 及び R_2 は、隣接する窒素原子と一緒になって 5 ～ 6 員環を形成してもよく；

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。]

式 (I I)：

[化13]



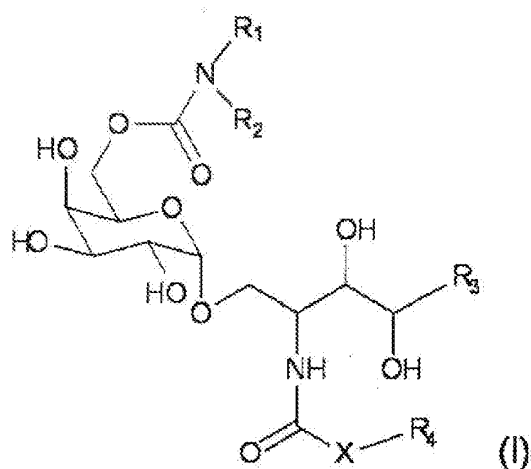
[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数 1 ～ 7 のアルキル基、炭素数 1 ～ 6 のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数 1 ～ 28 の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[請求項15]

式 (I) で表される化合物、式 (I I) で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質を含有するリポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象における長期免疫記憶誘導方法。

式 (I)：

[化14]



[式中、Xはアルキレン基あるいは－NH－を示し；

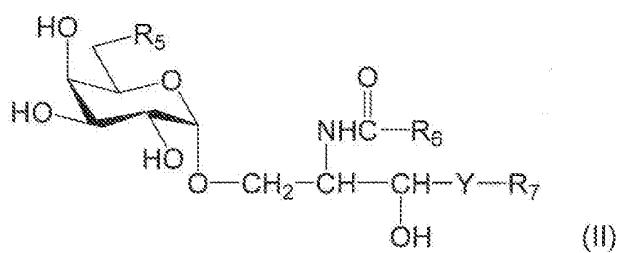
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す。]

式（I I）：

[化15]



[式中、R₅は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、R₆及びR₇はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは－CH₂－、－CH(OH)－又は－CH＝CH－を示す。]

- [請求項16] 前記糖脂質の、抗原提示細胞への送達において使用するための、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項17] 悪性腫瘍又は感染症の治療において使用するための、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項18] N K T細胞活性化において使用するための、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項19] I F N- γ 産生誘導において使用するための、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項20] 自然免疫系リンパ球及び獲得免疫系リンパ球の活性化において使用するための、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項21] 長期免疫記憶誘導において使用するための、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項22] 医薬として使用するための、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。