

明 細 書

発明の名称：

NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物を含む抗がん剤

技術分野

[0001] 本発明は、

(1) 担がん生体においてNK T細胞人工活性化による抗腫瘍活性を有するNK T細胞リガンド(α -GalCer、RK-163、RCAL-61、RCAL-137など)を含有するリポソーム組成物と免疫チェックポイント阻害剤(例えば、抗PD-1抗体など)との組み合わせにより得られる医薬に関するもの(発明-1)、及び

(2) 長期免疫記憶誘導により、がんや感染症の発症を予防的に治療し得るNK T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソーム組成物に関するもの(発明-2)である。

背景技術

[0002] ナチュラルキラーT(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として発見(非特許文献1)された。NK T細胞の抗原受容体は、NK T細胞固有で、しかも唯一の抗原受容体(ヒトはVa24Ja18、マウスはVa24Ja18)しか発現できないことから、他の免疫細胞群とは決定的に異なる新規細胞で、その役割としては、自然免疫系および獲得免疫系の免疫細胞群の活性化を誘導して(非特許文献2)、抗腫瘍効果を増強する(非特許文献3、4、5)だけでなく、長期免疫記憶を誘導する(非特許文献6)ために必須の細胞である。

[0003] NK T細胞の特性で最も重要な点は、NK T細胞に発現しているただ一つの抗原受容体の α 鎖(ヒトではVa24Ja18、マウスはVa14Ja18)は、種属に1種類しかない主要組織適合抗原遺伝子複合体(MHC)クラスI分子類似のCD1d分子に結合した糖脂質抗原を認識し、活性化され

ることである（非特許文献7、8）。すなわち、NK T細胞抗原受容体とCD1d分子は共に、種属内ではただ一種類で、種属間でも、その配列は極めて酷似しており、機能においてもマウスNK T細胞抗原受容体が、ヒトCD1d結合NK T細胞リガンドを認識できる。その逆に、ヒトNK T細胞受容体も、マウスCD1dに結合したNK T細胞リガンドを認識できる。すなわち、ヒトNK T細胞受容体及びCD1d分子は全てのヒトに共通であることから、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物はあらゆるヒトに共通の薬剤となりうるだけでなく、犬、猫など多くの哺乳動物にも応用できる。

[0004] α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) は人工的にNK T細胞を強く活性化することが報告されている（非特許文献9）。 α -ガラクトシルセラミドよりも数十倍強力な活性を持つ化合物（RK-163、RCAI-61、RCAI-137など）も発見された（特許文献1～5、非特許文献10）。本発明者らは、他の発明者らとともに、それらを含有する新規NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物も開発している（国際出願番号PCT/JP2023/005048（WO2023/153527）：特許文献6）。

[0005] 新規NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物は、生体内に投与されると、抗原提示細胞（APC）に取り込まれた後、主要組織適合抗原遺伝子複合体（MHC）クラスI分子に類似したCD1d分子と結合し、抗原提示細胞膜上に提示される。NK T細胞は、抗原提示細胞に提示されたCD1d分子と新規NK T細胞リガンドとの複合体を、ヒトの場合、ヒトNK T細胞唯一のVa24Ja18抗原受容体 α 鎖を用いて認識することにより、人工活性化され、がん免疫細胞群の活性化・急激な増殖を誘導し、抗腫瘍効果を増強するとともに、がんに対する長期免疫記憶を誘導することが可能となり、それによってがんの進行、再発、転移抑制を可能にする。

[0006] 末梢血中のNK T細胞は非常に数が少なく、全白血球中の0.1～0.01%を占めるにすぎないが、NK T細胞は、正常時は肝臓、骨髄、肺に集まっているが、一旦、病変が生じると他の免疫細胞に先んじて、真っ先に病変

部位に到達する。これは、NK T細胞が活性化状態になくとも他のどの細胞よりもCXCL16ケモカイン受容体であるCXCR6を強発現しているため、病変部からNK T細胞を呼び寄せる「CXCL16」が、血液中に放出されると、すぐに現場に駆けつけるためである（非特許文献11）。その結果、肝臓や骨髄、肺に常在するNK T細胞は、CXCL16濃度が高いほうへと遊走し、真っ先に病変部にたどり着く。しかし、その時点ではNK T細胞は活性されていない。その病変部位が細菌などの病原体による感染の場合には、病変部に到着したNK T細胞は、病原体成分に含まれるアジュバント物質によって即座に活性化されるが、がんの場合には、がん細胞は自分が変異してできた細胞であるためNK T細胞を活性化するアジュバント物質がなく、NK T細胞を活性化できないため、抗腫瘍増強効果や、がんに対する長期免疫記憶を誘導できず、がん細胞に対しては無力であった。しかし、NK T細胞を人工活性化する事によって、がん細胞に対しても、抗腫瘍増強効果や、がんに対する長期免疫記憶を誘導できるようになるため、がん発症予防治療が可能となる。実際、NK T細胞の人工活性化により進行性肺がん症例の臨床試験では、極めて有効性が高い結果を得ている（非特許文献12）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：WO2008/102888

特許文献2：WO2009/119692

特許文献3：WO2010/030012

特許文献4：WO2011/096536

特許文献5：WO2013/162016

特許文献6：WO2023/153527

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87:5248-5252

非特許文献2：Nature Immunol 2003, 4: 1164-1165

非特許文献3：Cancer Sci 2008; 99: 638-645

- 非特許文献4 : Science, 1997, 278, 1623-1626
- 非特許文献5 : J Immunol 1999; 163: 2387-2391
- 非特許文献6 : Front. Immunol., 2017, 25 September
- 非特許文献7 : J. Immunol. 1998, 161, 3271-3281
- 非特許文献8 : Cancer Res 1999; 59: 5102-5105
- 非特許文献9 : Science, 1997, 278, 1626-1629
- 非特許文献10 : Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013, 21: 3066-3079
- 非特許文献11 : J Immunol., 2005, 175: 2051-2555
- 非特許文献12 : J Immunol 2009, 182: 2492-2501
- 非特許文献13 : Immunology 2012, 138:105-115
- 非特許文献14 : J.Exp.Med., 2003, 198:267-279
- 非特許文献15 : British J Cancer 2011, 105, 93-103
- 非特許文献16 : Oncotarget 2018; 9:6201-6212
- 非特許文献17 : Cytometry Research, 27(2): 39-44, 2017

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 免疫チェックポイント阻害剤は一部の難治性悪性腫瘍の標準治療となりつつあるが、奏効率は、がん種によって異なるものの約10-30%であり、全く効果の認められない患者も存在する。その理由は、腫瘍組織内が免疫不全状態であり、ごく一部のがん抗原で刺激されている免疫細胞群だけが活性化され、その最終段階としてPD-1を発現するからである。複数の免疫チェックポイント阻害剤との併用試験や、化学療法剤を含め、他の抗がん剤との併用試験が盛んに行われているが、必ずしも理論的にPD-1やそのリガンドであるPD-L1などの発現を誘導する治療法との併用でないために期待された併用の効果は見られていない（非特許文献17）。

また、腫瘍組織内の免疫細胞のPD-1発現を誘導し、腫瘍内にPD-1陽性免疫細胞を蓄積させること、さらに腫瘍細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子であるPD-L1リガンド分子などを強発現し、それによって

、抗PD-1抗体の効果を高めるという薬剤の開発は行われていない。

従って、免疫チェックポイント阻害剤の効果を高める薬剤の開発が望まれる（第1の課題）。

[0010] また、これまでのNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物は、担がん患者の生体内NK T細胞を人工活性化する事で、そのアジュバント作用により、患者体内に存在しているがん特異的免疫細胞群を更に活性化して抗腫瘍機能を増強し、長期免疫記憶を誘導して、がんを制御する組成物として開発された。これらは、担がん患者内にはすでに、がん抗原が存在している条件での使用であった。

従って、がん抗原が存在していない条件においても、効果を発揮し得る薬剤の開発が望まれる（第2の課題）。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題（第1の課題）を解決すべく鋭意検討の結果、NK T細胞リガンド含有リポソーム投与により、人工的にNK T細胞を活性化し、人工活性化NK T細胞が産生するIFN γ を介するアジュバント作用により、腫瘍組織内で十分な活性化が得られていない免疫細胞群を強力に活性化、増殖した結果、PD-1発現を亢進させることを見出した（後述の試験例1参照）。さらに、NK T細胞リガンド含有リポソーム投与により、腫瘍細胞のPD-L1リガンド分子の発現が亢進することを見出した（後述の試験例2～4参照）。実際、担癌動物モデルにNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物と抗PD-1抗体を組み合わせて投与すると、抗腫瘍効果が相乗的に発揮されそれぞれの単独投与の場合に比べて、ほぼ完全に腫瘍増殖を抑制することを可能にした（後述の試験例5参照）。これらの新知見に基づき、さらに検討を行って、本発明（発明-1）を完成するに至った。

[0012] また、本発明者らは、上記課題（第2の課題）を解決すべく鋭意検討の結果、NK T細胞リガンド及び抗原（例えば、がん抗原）を含有するリポソーム組成物を投与することにより、未だ抗原（例えば、がん抗原）が存在していない条件においても、優れた効果（例えば、抗腫瘍効果）を発揮し得るこ

とを見出した。すなわち、例えば、抗原ががん抗原の場合、NK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物を投与することにより、リポソーム組成物は抗原提示細胞に取り込まれたのち、がん抗原は、患者個別の主要組織適合抗原遺伝子複合体HLAクラスⅠおよびHLAクラスⅡ分子上に発現され、がん抗原特異的CD4 T／CD8 T細胞群を活性化する。同時に、リポソーム組成物に含まれるNK T細胞リガンドも抗原提示細胞のCD1d分子とともに発現され、それによって生体内NK T細胞を人工活性化する。投与されたがん抗原によって活性化されたがん抗原特異的T細胞群は、人工活性化NK T細胞のアジュバント作用により、更なる活性化増強と、それに続く長期がん免疫記憶を誘導し、この長期免疫細胞群によって、がんの発症、再発、転移を抑制することが可能となる。これらの新知見に基づき、さらに検討を行って、本発明（発明－2）を完成するに至った。

[0013] すなわち、本発明は、下記の通りである。

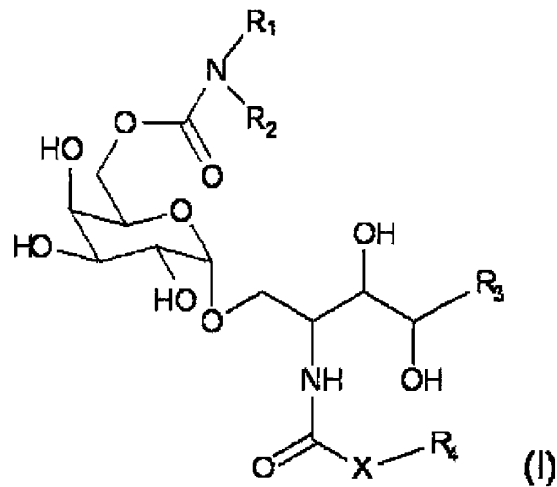
[0014] [1] 免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物とを組み合わせる抗腫瘍剤。

[2] NK T細胞リガンドが、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である、上記[1]記載の抗腫瘍剤。

式（Ⅰ）：

[0015]

[化1]



[0016] [式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

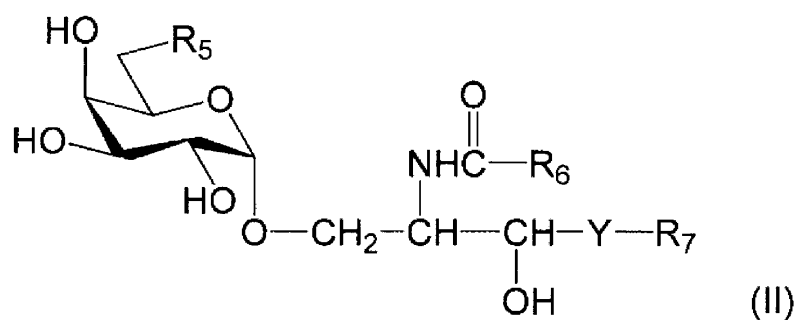
R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び R_2 は、隣接する窒素原子と一緒になって5～6員環を形成してもよく；

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 (I)：

[0017] [化2]



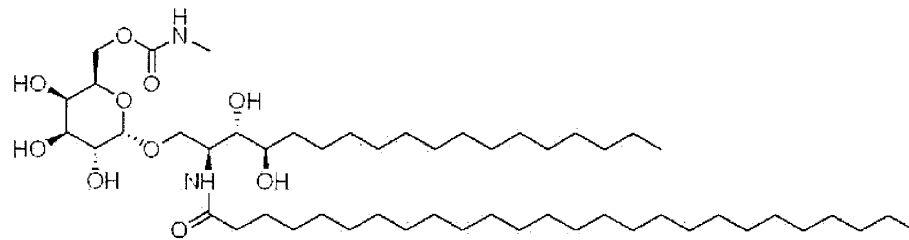
[0018] [式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～

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

[3] 前記糖脂質が、式(1)で表される化合物又はその塩である、上記[2]記載の抗腫瘍剤。

[4] 前記糖脂質が、下記式：

[0019] [化3]



[0020] で表される化合物又はその塩である、上記[3]記載の抗腫瘍剤。

[5] NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物を含有する、がん免疫細胞群の活性化による免疫チェックポイント分子の発現増強剤。

[6] NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物を含有する、NK T細胞人工活性化によるがん細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子の発現増強剤。

[7] 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を高めるための、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物。

[8] NK Tリガンド含有リポソーム組成物の治療効果を高めるための、免疫チェックポイント阻害剤。

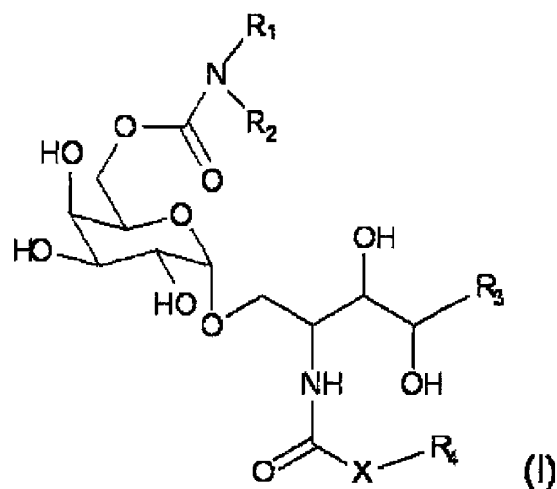
[0021] [9] 免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物とを、対象に投与することを含む、悪性腫瘍の治療方法。

[10] NK T細胞リガンドが、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である、上記[9]記載の治療方法。

式(1)：

[0022]

[化4]



[0023] [式中、Xはアルキレン基あるいは－NH－を示し；

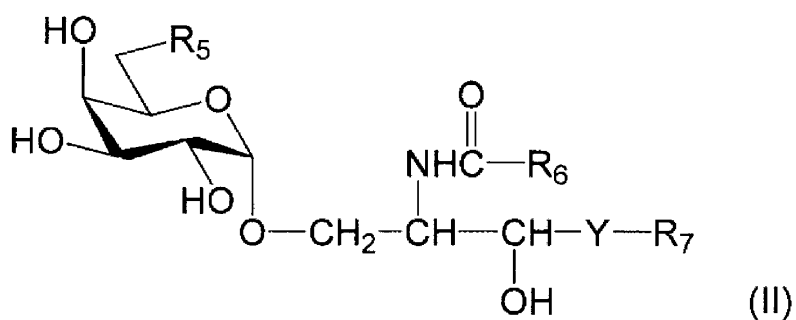
R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び R_2 は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

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）：

[0024] [化5]



[0025] [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～

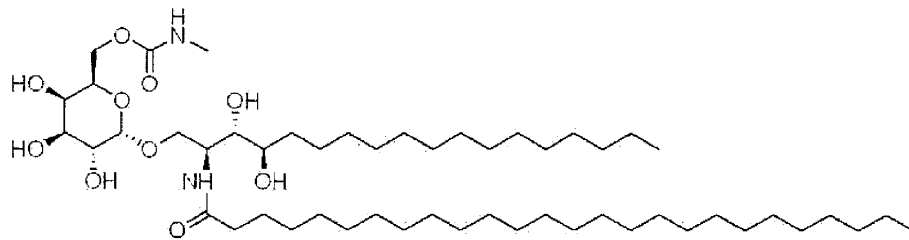
28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-$ 又は $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示す。]

[11] 前記糖脂質が、式(1)で表される化合物又はその塩である、上記

[10]記載の治療方法。

[12] 前記糖脂質が、下記式：

[0026] [化6]



[0027] で表される化合物又はその塩である、上記 [11] 記載の治療方法。

[13] NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象におけるがん免疫細胞群の活性化による免疫チェックポイント分子の発現増強方法。

[14] NK T細胞リガンド含有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 T細胞人工活性化によるがん細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子の発現増強方法。

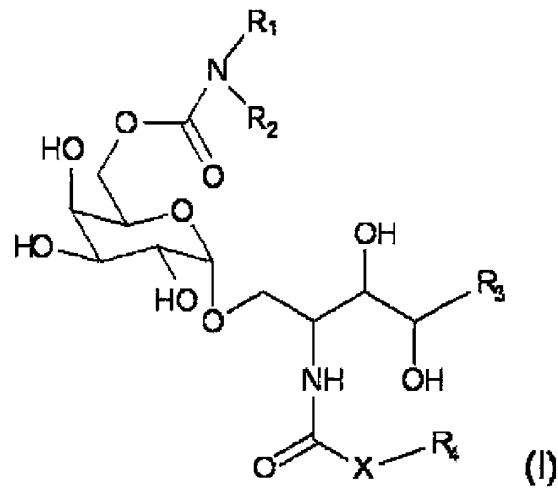
[0028] [15] 悪性腫瘍の治療において使用するための、免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物とを組み合わせる医薬。

[16] NK T細胞リガンドが、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である、上記 [15] 記載の使用のための医薬。

式(1)：

[0029]

[化7]



[0030] [式中、Xはアルキレン基あるいは-NH-を示し；

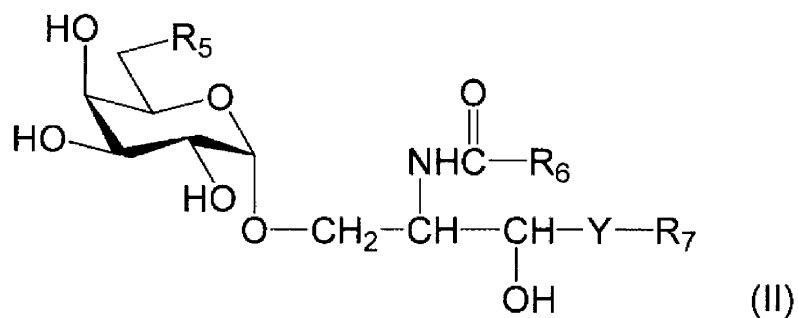
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

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）：

[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～

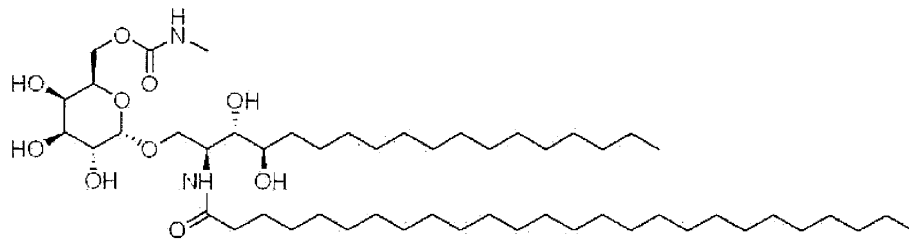
28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Yは $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[17] 前記糖脂質が、式(1)で表される化合物又はその塩である、上記

[16] 記載の使用のための医薬。

[18] 前記糖脂質が、下記式：

[0033] [化9]



[0034] で表される化合物又はその塩である、上記 [17] 記載の使用のための医薬。

[19] がん免疫細胞群の活性化による免疫チェックポイント分子の発現増強において使用するための、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物。

[20] NK T細胞人工活性化によるがん細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子の発現増強において使用するための、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物。

[21] 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果の向上において使用するための、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物。

[22] NK Tリガンド含有リポソーム組成物の治療効果の向上において使用するための、免疫チェックポイント阻害剤。

[23] 医薬として使用するための、免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物。

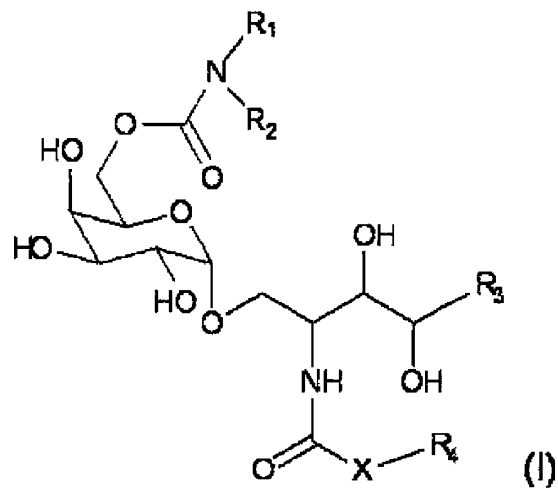
[0035] [24] 抗腫瘍剤の製造における、免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物との組み合わせの使用。

[25] NK T細胞リガンドが、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である、

上記〔24〕記載の使用。

式（I）：

[0036] [化10]



[0037] [式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

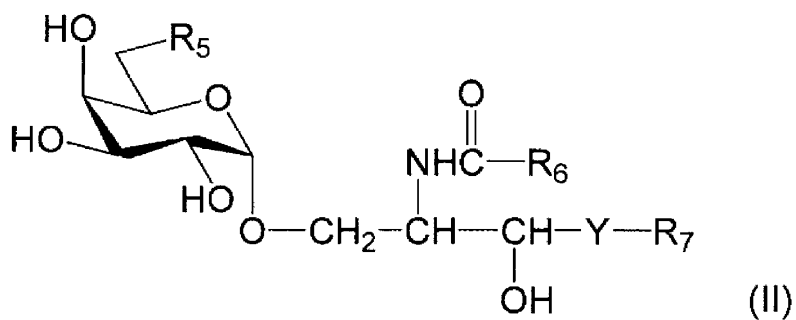
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒にあって5～6員環を形成してもよく；

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）：

[0038] [化11]

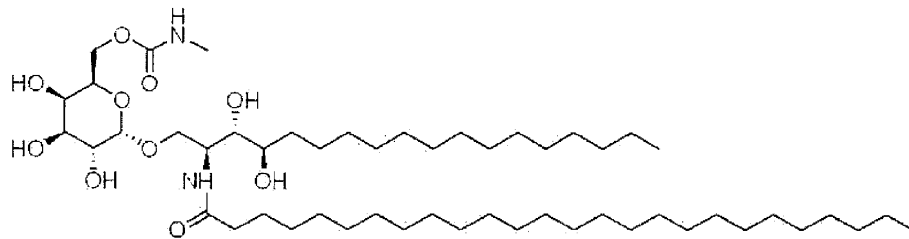


[0039] [式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[26] 前記糖脂質が、式(1)で表される化合物又はその塩である、上記[25]記載の使用。

[27] 前記糖脂質が、下記式：

[0040] [化12]



[0041] で表される化合物又はその塩である、上記[26]記載の使用。

[28] がん免疫細胞群の活性化による免疫チェックポイント分子の発現増強剤の製造における、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物の使用。

[29] NK T細胞人工活性化によるがん細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子の発現増強剤の製造における、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物の使用。

[30] 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果の向上剤の製造における、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物の使用。

[31] NK Tリガンド含有リポソーム組成物の治療効果の向上剤の製造における、免疫チェックポイント阻害剤の使用。

[32] 免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物との組み合わせを含有する医薬組成物。

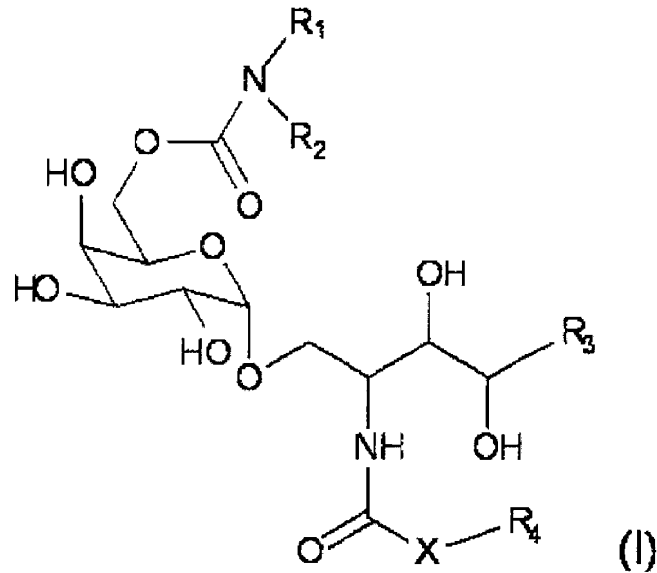
[0042] [33] NK T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソーム組成物。

[34] NK T細胞リガンドが、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である、

上記〔33〕記載の組成物。

式（I）：

[0043] [化13]



[0044] [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；

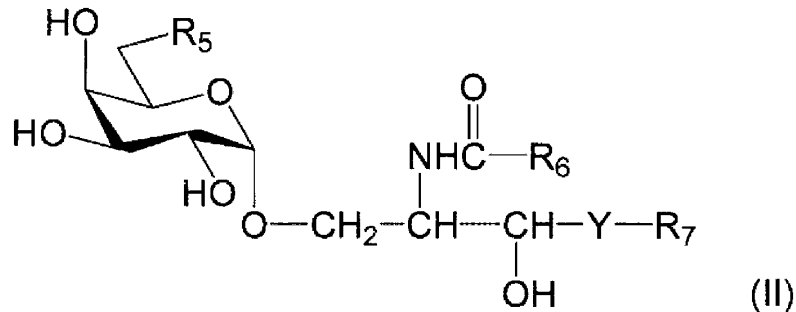
R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す。]

式（II）：

[0045]

[化14]

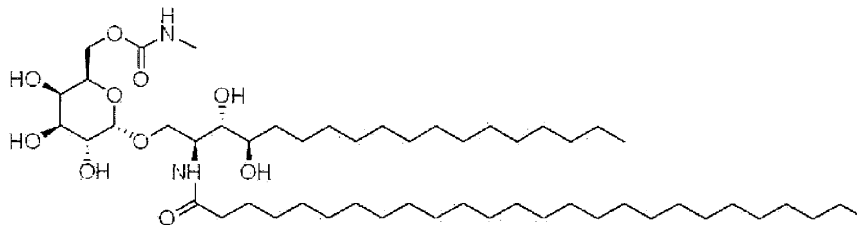


[0046] [式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[35] 前記糖脂質が、式(1)で表される化合物又はその塩である、上記[34]記載の組成物。

[36] 前記糖脂質が、下記式：

[0047] [化15]



[0048] で表される化合物又はその塩である、上記[35]記載の組成物。

[37] 免疫記憶を誘導するための、上記[33]～[36]のいずれかに記載の組成物。

[38] 抗原ががん抗原である、上記[33]～[36]のいずれかに記載の組成物。

[39] がんが存在しない状態でも、予防的にがん抗原を認識する免疫細胞群の活性化、及び増殖を誘導するための、上記[38]記載の組成物。

〔４０〕がんが存在しない状態でも、予防的にがんに対する免疫記憶を誘導するための、上記〔３８〕記載の組成物。

〔４１〕がんの発症、再発、及び転移の抑制効果を高めるための、上記〔３８〕記載の組成物。

[0049] 〔４２〕上記〔３３〕～〔３６〕のいずれかに記載の組成物を、対象に投与することを含む、免疫記憶の誘導方法。

〔４３〕上記〔３８〕記載の組成物を、対象に投与することを含む、該対象においてがんが存在しない状態でも、予防的にがん抗原を認識する免疫細胞群の活性化、及び増殖を誘導する方法。

〔４４〕上記〔３８〕記載の組成物を、対象に投与することを含む、該対象においてがんが存在しない状態でも、予防的にがんに対する免疫記憶を誘導する方法。

〔４５〕上記〔３８〕記載の組成物を、対象に投与することを含む、がんの発症、再発、及び転移の抑制方法。

[0050] 〔４６〕免疫記憶の誘導において使用するための、上記〔３３〕～〔３６〕のいずれかに記載の組成物。

〔４７〕がんが存在しない状態でも、予防的にがん抗原を認識する免疫細胞群の活性化、及び増殖の誘導において使用するための、上記〔３８〕記載の組成物。

〔４８〕がんが存在しない状態でも、予防的にがんに対する免疫記憶の誘導において使用するための、上記〔３８〕記載の組成物。

〔４９〕がんの発症、再発、及び転移の抑制効果の向上において使用するための、上記〔３８〕記載の組成物。

〔５０〕医薬として使用するための、上記〔３３〕～〔３６〕のいずれかに記載の組成物。

[0051] 〔５１〕免疫記憶の誘導剤を製造するための、上記〔３３〕～〔３６〕のいずれかに記載の組成物の使用。

〔５２〕がんが存在しない状態でも、予防的にがん抗原を認識する免疫細胞

群の活性化、及び増殖を誘導するための剤を製造するための、上記〔３８〕記載の組成物の使用。

〔５３〕がんが存在しない状態でも、予防的にがんに対する免疫記憶を誘導するための剤を製造するための、上記〔３８〕記載の組成物の使用。

〔５４〕がんの発症、再発、及び転移の抑制剤を製造するための、上記〔３８〕記載の組成物の使用。

発明の効果

[0052] 本発明（発明－１）によれば、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物と免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせることで、がんの治療、がんの転移や再発の治療として有用な治療剤となり得る。

[0053] NK T細胞リガンド含有リポソームは、担がん生体の腫瘍組織内に集積したがん免疫細胞群を活性化して、その結果として免疫チェックポイント分子であるPD-1分子などを強発現すると共に、腫瘍細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-L1など）の発現を高める働きがある。

これらの研究を踏まえて、新規NK T細胞リガンド含有リポソームと免疫チェックポイント阻害剤（発明－１）を投与することにより、生体内のNK T細胞を人工的に活性化し、がんに対する免疫系を活性化すると共に、腫瘍細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-L1など）の発現も上昇し、その結果、免疫チェックポイント阻害剤による阻害効果が向上し、強い抗腫瘍効果を誘導して、強力ながん治療を可能にする。さらに、この併用治療は、免疫チェックポイントリガンド分子の発現が弱く、免疫チェックポイント阻害剤単独ではもともと治療効果が少なく、これまで抗腫瘍効果が少ないがん種に対しても、より強い抗腫瘍効果を得ることが可能である。

[0054] PD-1は、活性化したリンパ球（獲得免疫系CD4 T細胞、CD8 T細胞及び自然免疫系NK細胞など）に発現するCD28ファミリー（T細胞の活性化を補助的に正と負に制御する分子群）に属する受容体分子である。PD-1はがん細胞に発現するPD-1リガンド（PD-L1及びPD-L2）と結合する事により、活性化リンパ球群（CD4 T、CD8 T、NK）に

抑制性シグナルを伝達してリンパ球の活性化状態を負に調節し、活性化リンパ球群機能を抑制し、がん細胞の生存を助けている。

すなわち、PD-1/PD-L1経路（免疫チェックポイントポイント経路）は、元々は免疫系からの自己細胞への攻撃回避のためのいわゆるフェールセーフ機構であるが、がん細胞は自己であるため、それを利用して、免疫系の攻撃等を回避する機序の一つとして考えられ、抗PD-1抗体あるいは抗PD-L1リガンド抗体をはじめとして、様々な免疫チェックポイント阻害剤を使用する事で腫瘍に対する活性化リンパ球群機能を長期に維持増強し、がん細胞への攻撃を増強する薬剤として臨床開発が行われている。

そこで、NK細胞リガンド含有リポソーム組成物を併用することによって、NK細胞を人工活性化し、その結果、がん攻撃リンパ球群を活性化、増殖を誘導するとともに腫瘍細胞上にPD-1リガンドであるPD-L1を強発現させることで、免疫チェックポイント阻害剤の効果を高め、より強い抗がん作用が期待できる。

腫瘍内には、がんを攻撃するリンパ球群（TIL）が集積し、TILの集積量と患者の予後が相関することが知られており（非特許文献15）、腫瘍内に集積したTILの中に、PD-1陽性のリンパ球が浸潤している量が多いほど予後が良いというデータも報告されている（非特許文献16）。

免疫チェックポイント阻害剤の中でも最初に製造販売承認された抗PD-1抗体は、現在、メラノーマ、非小細胞肺癌、腎細胞がん、ホジキンリンパ腫、頭頸部がんなど、さまざまながん種において化学療法を上回る腫瘍縮小効果と生存期間の延長が確認され、進行がんの標準治療となりつつあるが、がん種によっては有効でない場合も報告されている（非特許文献16）。

[0055] したがって、NK細胞リガンド含有リポソームと抗PD-1抗体との併用（発明1）によって、それぞれ単独で使用するよりも強い抗がん作用が期待されるとともに、がん種によっては抗PD-1抗体単独治療では効果の少ないがん種に対しても、NK細胞の人工活性化によりがん細胞上のPD-L1の発現増強を誘導することが可能で、それによって、抗PD-1抗体の

より強い抗腫瘍効果が期待できる（発明－１）。

[0056] また、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物を生体内に投与すると、以下の効果が期待できる。

（１）NK T細胞リガンドによって人工的に活性化された人工活性化NK T細胞が急速かつ大量に産生するインターフェロン- γ などのTh1サイトカインのアジュバント作用により、がん細胞膜上に、免疫細胞群の攻撃から自身を守るためのチェックポイントリガンド分子（PD-L1など）の発現を強く誘導する。（２）同時に、エフェクター免疫細胞群であるNK細胞、CD4 T細胞、CD8 T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などの活性化・急激な増殖を誘導し（非特許文献２）、抗腫瘍作用を高めるとともに、その結果として免疫細胞群は、PD-1を強く発現するようになる。（３）その結果、がんに対する免疫細胞群の活性化による抗腫瘍効果の増強、および一年にも亘る長期がん免疫記憶を誘導し、その結果、持続的な攻撃が可能になり、がんの進行・再発・転移を抑制することができる（非特許文献６）。（４）他の免疫細胞群の活性化だけでなく、NK T細胞自身が、パーフォリンなど様々な殺細胞誘導因子を発現することで、標的細胞に対して直接細胞傷害活性を示すこともできる（非特許文献８）。（５）その細胞障害活性で、がん細胞が免疫攻撃から自身を守るために誘導した免疫抑制マクロファージ（MDSC）や腫瘍随伴マクロファージ（TAM）を直接殺傷する働きを持ち、それによって、がん組織内の免疫環境を改善する（非特許文献１３）。（６）NK T細胞は抗原提示能力のない未熟樹状細胞とNK T細胞リガンドを介して相互作用を営むことが出来る免疫系の中で唯一の細胞で、未熟樹状細胞を成熟樹状細胞に分化誘導でき、がん組織内の免疫環境を改善できる唯一の細胞である（非特許文献１４）。

[0057] 本発明（発明－２）によれば、NK T細胞人工活性化能を有するNK T細胞リガンドとがん抗原を含有するリポソーム組成物は、がんの発症・再発・転移予防として有用な抗腫瘍ワクチン剤となり得る。用いるがん抗原のペプチドとしては、ほとんどのがん腫に発現しているWT-1抗原ペプチドが有

力で、その他、がん腫に特徴的な配列をもつペプチドも使用可能である。

また、がん抗原の代わりに病原体抗原を用いることで、感染症予防剤（ワクチン）ともなり得る。

[0058] NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物は、生体内にがん細胞、がん抗原が存在する場合、すなわち担がん状態を想定して開発された製剤であるが、一方、正常状態、すなわち、がん抗原が無い状態に対応できるように開発されたNK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物（発明－2）は、がん発症予防、再発、転移対策として、有効である。

がん抗原が生体内にない状態とは、例えば、正常状態、外科手術で腫瘍摘出を行ったが、取り残しや微小転移の可能性がある場合、遺伝的に家族性がんを発症する危険がある場合、腫瘍マーカーの上昇が認められるもがん病巣を発見できない場合などで、がん抗原がない、あるいは極端に少なく、がんの急速な増殖が懸念される場合に対して、NK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物（発明－2）は有効である。

[0059] NK T細胞リガンド及び抗原（例えば、がん抗原）を含有するリポソーム組成物（発明－2）は、NK T細胞リガンドと抗原（例えば、がん抗原）を同時に保有するリポソーム組成物で、NK T細胞リガンドはNK T細胞含有リポソーム表面に存在し、抗原（例えばがん抗原）はリポソーム内側部に封入したものである。すなわち、前述の新規NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物（国際出願番号PCT/JP2023/005048（WO2023/153527））にがん抗原を封入した状態のものであると言える。

したがって、NK T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソーム組成物（発明－2）が最も有効に効果を発揮するのは、例えば、抗原ががん抗原である場合、（1）家族性がんが発症する前の段階で、がんの発症抑制を期待する場合、（2）外科手術等によりがんを摘出し、がん抗原が体内から消失した場合のがん再発の抑制、あるいは（3）腫瘍マーカー上昇が認められるもののがん病巣を発見できない場合に予防的に治療する場合などである。すなわち、これら正常状態に近い患者状態では、がん抗原を認識するT細胞群は

生体内に存在するもののそれぞれのクローンサイズは小さく抗がん作用を期待することはできず、また、担がん状態だった時期にもがんに対する長期免疫記憶は成立しておらず、がんの発症を抑えるに十分な免疫細胞数を揃えることはできていない。しかし、このような状態でもあらかじめ、がん特異的免疫細胞群を増やし、長期がん免疫記憶を誘導しておけば、発がん、再発に対して、免疫系は対処できる。

図面の簡単な説明

[0060] [図1]図1は試験例1の結果を示す。図1中、RK-163-LIPOは、RK-163含有リポソーム組成物投与群を示し、RCAI-61-LIPOは、RCAI-61含有リポソーム組成物投与群を示し、RCAI-137-LIPOは、RCAI-137含有リポソーム組成物投与群を示し、PBSは、PBS投与群（対照）を示す。図1（A）はCD8T細胞の活性化によるPD-1発現、図1（B）はCD4T細胞の活性化によるPD-1発現、図1（C）はNK細胞の活性化によるPD-1発現の結果を示す。

[図2]図2は試験例2の結果を示す。図2中、RK-163-LIPOは、RK-163含有リポソーム組成物投与群を示し、RCAI-61-LIPOは、RCAI-61含有リポソーム組成物投与群を示し、RCAI-137-LIPOは、RCAI-137含有リポソーム組成物投与群を示し、PBSは、PBS投与群（対照）を示す。

[図3]図3は試験例3の結果を示す。図3中、RK-163-LIPOは、RK-163含有リポソーム組成物を混合培養に用いた群を示し、RCAI-61-LIPOは、RCAI-61含有リポソーム組成物を混合培養に用いた群を示し、RCAI-137-LIPOは、RCAI-137含有リポソーム組成物を混合培養に用いた群を示し、PBSは、PBSを用いた群（対照）を示す。

[図4]図4は試験例4の結果を示す。

[図5-1]図5-1は試験例5（NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物としてRK-163含有リポソーム組成物を使用）の結果を示す。図5-1中、

PBS+抗PD-1は、抗PD-1抗体単独投与群を示し、RK-163-LIPOは、RK-163含有リポソーム組成物単独投与群を示し、RK-163-LIPO+抗PD-1は、RK-163含有リポソーム組成物と抗PD-1抗体との併用投与群を示す。

[図5-2]図5-2は試験例5（NK細胞リガンド含有リポソーム組成物としてRCAI-61含有リポソーム組成物を使用）の結果を示す。図5-2中、PBS+抗PD-1は、抗PD-1抗体単独投与群を示し、RCAI-61-LIPOは、RCAI-61含有リポソーム組成物単独投与群を示し、RCAI-61-LIPO+抗PD-1は、RCAI-61含有リポソーム組成物と抗PD-1抗体との併用投与群を示す。

[図5-3]図5-3は試験例5（NK細胞リガンド含有リポソーム組成物としてRCAI-137含有リポソーム組成物を使用）の結果を示す。図5-3中、PBS+抗PD-1は、抗PD-1抗体単独投与群を示し、RCAI-137-LIPOは、RCAI-137含有リポソーム組成物単独投与群を示し、RCAI-137-LIPO+抗PD-1は、RCAI-137含有リポソーム組成物と抗PD-1抗体との併用投与群を示す。

[図6]図6は試験例6の結果を示す。図6中、「0.1ng」はNK細胞リガンド（RK-163）及び擬似がん抗原（OVA）を含有するリポソーム組成物（RK-LIPO-OVA）をRK-163量に換算して0.1ng/25g体重を投与した群、「1ng」はRK-LIPO-OVAをRK-163量に換算して1ng/25g体重を投与した群、「10ng」はRK-LIPO-OVAをRK-163量に換算して10ng/25g体重を投与した群、PBSは、PBS投与群（対照）を示す。図6中図は、左図の腫瘍移植17日間の腫瘍サイズプロットを棒グラフで示したものである。中図のRK-LIPO-OVA投与量（RK-163投与量に換算）依存性の腫瘍サイズを、曲線グラフ（右図）に変換してED50を算出した。

[図7]図7は試験例7の結果を示す。図7中、RK-LIPO-OVAは、NK細胞リガンド（RK-163）及び擬似がん抗原（OVA）を含有する

リポソーム組成物投与群を示し、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8中、RK-LIPO-OVAは、NK T細胞リガンド（RK-163）及び擬似がん抗原（OVA）を含有するリポソーム組成物投与群を示し、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10]図10は試験例10の結果を示す。図10中、RK-LIPO-OVAは、NK T細胞リガンド（RK-163）及び擬似がん抗原（OVA）を含有するリポソーム組成物投与群を示し、PBSは、PBS投与群（対照）を示す。

発明を実施するための形態

[0061] 1. 発明－1

以下に、本発明（発明－1）を詳細に説明する。

本発明は、免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物とを組み合わせる抗腫瘍剤（以下、本発明の併用剤ともいう。）に関する。

[0062] [1. NK T細胞リガンド]

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は、NK T細胞リガンドを含有する。

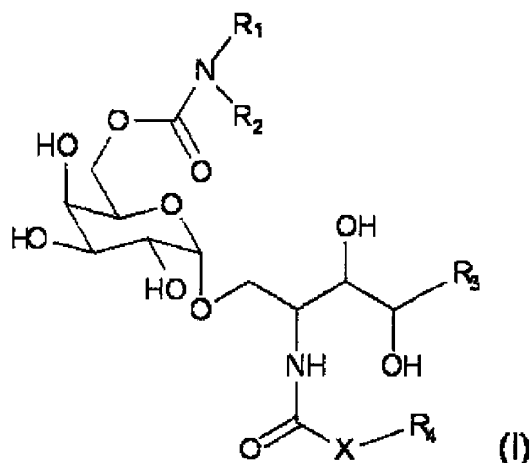
本発明において、NK T細胞リガンドは、以下の、式（I）で表される化合物、式（II）で表される化合物、及びそれらの塩からなる群から選択される糖脂質であることが好ましい。

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。

[0063] 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) :

[0064] [化16]



[0065] [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。]

[0066] 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。

[0067] 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い。

[0068] 「アルキル基」は、例えば、C_{1~24}、より好ましくはC_{1~16}、更に好ましくはC_{1~10}、特に好ましくはC_{1~6}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。R₁及びR₂のアルキル基として好ましくはC_{1~6}アルキル基（例、メチル、エチル）である。

[0069] 「アルコキシ基」は、例えば、C_{1~24}、より好ましくはC_{1~16}、更に好ましくはC_{1~10}、特に好ましくはC_{1~6}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。R₁及びR₂のアルコキシ基として好ましくはC_{1~6}アルコキシ基（例、メトキシ）である。

[0070] 「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_{6~14}、より好ましくはC_{6~12}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。R₁及びR₂のアリール基として好ましくはC_{6~12}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。

[0071] R₁及びR₂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。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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、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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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。 $-NHC(=O)X-R_4$ が結合する不斉炭素はS配置が好ましく、 $-NHC(=O)X-R_4$ 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。

[0079] 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。

[0080] 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、 $\text{C}_{12\sim14}$ 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。

(d) 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、メチル、又は水酸基であり；

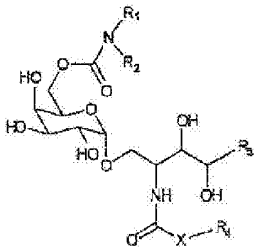
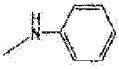
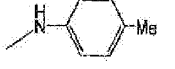
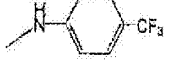
R_3 が、 $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ であり；

R_4 が $-(\text{CH}_2)_{23}\text{CH}_3$ である、化合物又はその塩。

[0081] 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。

[0082]

[表1]

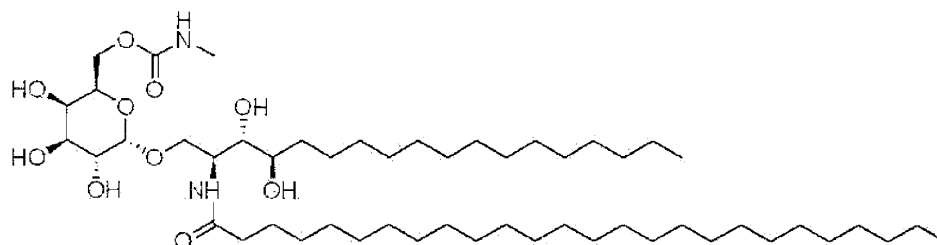
				
	-NR ₁ R ₂	-X-	-R ₃	-R ₄
RCAI-123	-NMe ₂	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-124	-NHMe	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-137	-NHOH	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-138	-NHOMe	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-148	-NHet	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-149	-NEt ₂	-CH ₂ -	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₂₄ H ₄₉
RCAI-121		-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。

[0083] 中でも、以下の化合物が好ましい。

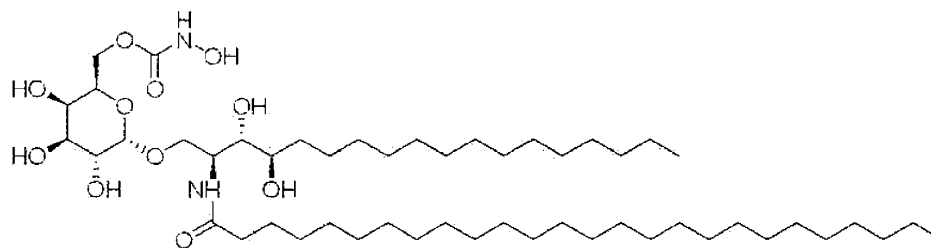
RCAI-124（本明細書においてRK-163ともいう。）

[0084] [化17]



[0085] RCAI-137

[0086] [化18]



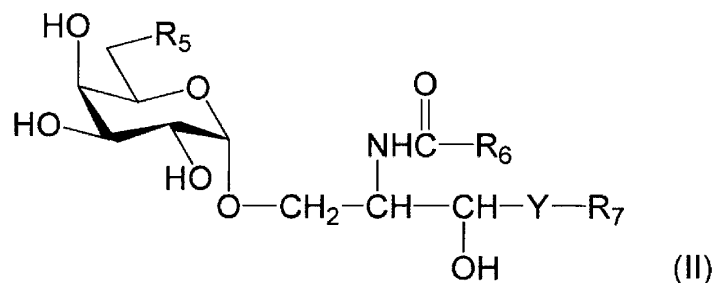
[0087] 式（I）で表される化合物またはその塩は、WO2013/162016 A1、US2015/152128 A1等の開示された方法により製造することができる。

[0088] 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）：

[0089]

[化19]



[0090] [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。]

[0091] 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。

[0092] 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} アリールー 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、 R_6 が水素原子であるときは、 R_6 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。

[0093] R_6 及び R_7 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、アルキルーカルボニル基）；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。

[0094] 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））；シクロアルキルーカルボニル基（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、シクロアルキルーカルボニル基）；アルケニルーカルボニル基（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、アルケニルーカルボニル基（例えば、アクリロイル基、メタクリロイル基））；アリールーカルボニル基（例えば、アリール部分が、炭素数6～14のアリール基である、アリールーカルボニル基（例えば、ベンゾイル基、ナフトイル基））等をいう。アリールー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。

[0095] 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。

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

[0096] 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。

[0097] 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、 $-(CH_2)_{23}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{24}-CH_3$ 、 $-(CH_2)_{25}-CH_3$ 、 $10-(4\text{-フルオロフェニル})$ 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。

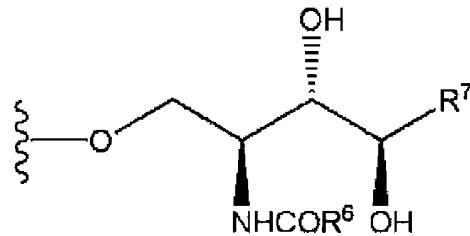
[0098] Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示し、中でも $-CH(OH)-$ が好適である。

[0099] 化合物 (I) 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) であってもよい。

特に、化合物 (I) 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。

[0100] 化合物（ⅠⅠ）の脂質部分としては、

[0101] [化20]



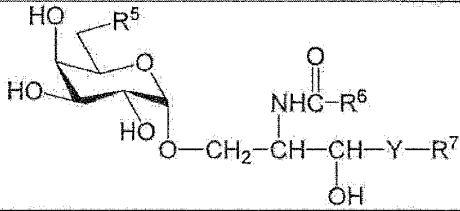
[0102] （式中、各記号は、前述と同義を示す。）等が挙げられる。

[0103] 化合物（ⅠⅠ）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。

[0104] 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。

[0105]

[表2]

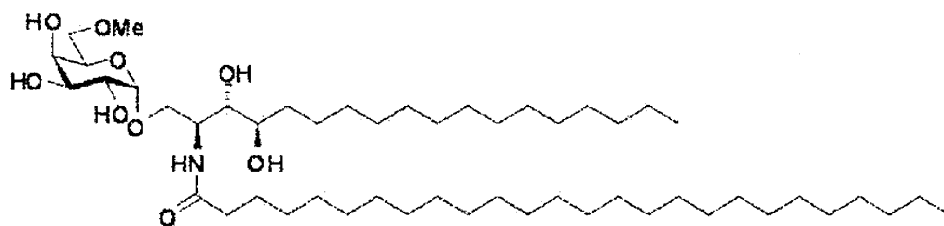
化合物 No.				
	R ⁵	R ⁶	Y	R ⁷
2-9'	-OCH ₃	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-4'	-CH ₃	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-7'	-F	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-10'	-H	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-13'	-OC ₂ H ₅	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃
3-16'	-O(CH) ₂ CH ₃	-(CH ₂) ₂₄ CH ₃		-(CH ₂) ₁₃ CH ₃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

[0106] 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）：

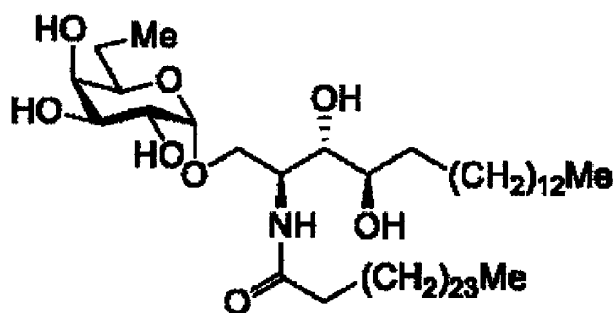
[0107]

[化21]



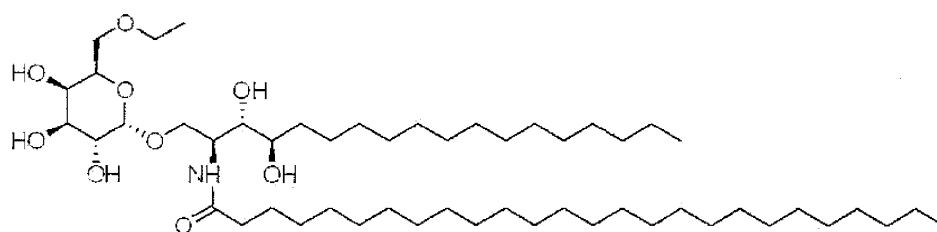
[0108] 表2の化合物No. 3-4'で示される化合物であって、立体構造が下記式で示される化合物(RCAI-64) :

[0109] [化22]



[0110] 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) :

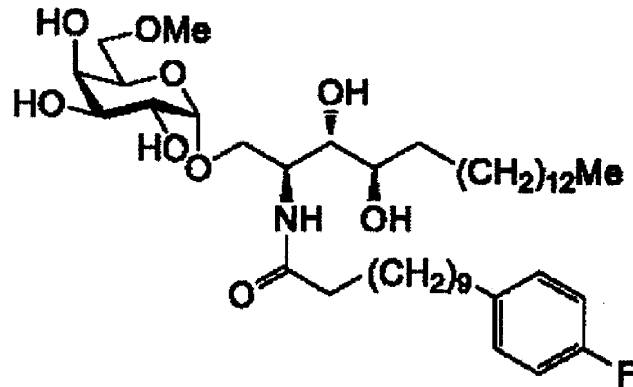
[0111] [化23]



[0112] 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) :

[0113]

[化24]



[0114] 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。

[0115] [2. リポソーム]

本発明における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。

[0116] 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 Toil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 Toil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-0315([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。

[0117] 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。

[0118] (#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。

本発明において(#2)のリポソームを用いる場合、「本発明におけるN

K 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。

[0119] (#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。

本発明において(#3)のリポソームを用いる場合、「本発明におけるN K T細胞リガンド」と「DOTAP、DOPE、MPEG2000-DMP E, 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。

[0120] (#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。

本発明において(#4)のリポソームを用いる場合、「本発明におけるN K T細胞リガンド」と「DOTAP、DOPE、MPEG2000-DSP E, 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。

[0121] (#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。

[0122] （＃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。

[0123] （＃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におけるリポソーム組成物の１態様として、例えば、後述の実施例１、２に記載の、RK-163含有リポソーム組成物、RCAI-61含有リポソーム組成物、RCAI-137含有リ

ポソーム組成物が挙げられる。

[0124] (#8) HSPC、MPEG2000-DSP E, 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-DSP E, Na塩、コレステロールの重量比 (HSPC : MPEG2000-DSP E, 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-DSP E, 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。

[0125] 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。

[0126] [3. NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物]

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。

[0127] 本発明において、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物としては、RK-163含有リポソーム組成物、RCAL-61含有リポソーム組成物、RCAL-137含有リポソーム組成物が好ましく、リポソームが前述の（#7）のリポソームである、RK-163含有リポソーム組成物、RCAL-61含有リポソーム組成物、RCAL-137含有リポソーム組成物がさらに好ましい。

[0128] 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。

[0129] 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。

[0130] 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。

本発明における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。

[0131] [4. 免疫チェックポイント阻害剤]

本発明で用いられる免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイント分子またはそのリガンドの機能を阻害する薬剤であり、例えば、抗PD-1抗体およびそのリガンド抗体である抗PD-L1抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

抗PD-1抗体としては、市販品を用いることができ、例えば、ニボルマブ（商品名オプジーボ）、ペムブロリズマブ（商品名キイトルーダ）を挙げることができる。ニボルマブはヒトPD-1に対する遺伝子組換えヒトIgG4モノクローナル抗体であり、重鎖221番目のアミノ酸残基がProに置換されている。チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される440個のアミノ酸残基からなる重鎖2本及び214個のアミノ酸残基からなる軽鎖2本で構成される糖タンパク質である（添付文書「オプジーボ（登録商標）点滴静注20mg」2023年6月改訂参照）。

抗PD-L1抗体としては、市販品を用いることができ、例えば、アテゾリズマブ（商品名テセントリク）、アベルマブ（商品名バベンシオ）、デュルバルマブ（商品名イミフィンジ）を挙げることができる。テセントリクは、アミノ酸214個のL鎖2本とアミノ酸448個のH鎖2本からなるタンパク質である（添付文書「テセントリク（登録商標）点滴静注1200mg」2022年5月改訂参照）。

[0132] [5. 免疫チェックポイント阻害剤とNK細胞リガンド含有リポソーム組成物との組み合わせ]

本発明においては、免疫チェックポイント阻害剤とNK細胞リガンド含有リポソームとを組み合わせることで、相乗的な抗腫瘍効果が期待できる。

[0133] 免疫チェックポイント阻害剤とNK細胞リガンド含有リポソーム組成物との組み合わせにより、治療効果が期待される腫瘍（悪性腫瘍）は、例えば、乳癌、大腸癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌

、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌、皮膚癌、黒色腫、血液腫瘍等が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、また複数の癌を同時に発症している場合にも、本剤の効果は期待される。

[0134] 投与方法としては、静脈内投与、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が、これらに限定されない。

免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物とは、同時に投与してもよく、時間差を空けて別々に投与してもよい。また、別経路で投与してもよい。

[0135] 一回に投与するNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物のNK T細胞リガンド量は、生体内NK T細胞を活性化し、目的とする疾患を治療するのに十分な数であれば良い。例えば、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物の場合には、通常、 $400\text{ ng/kg} \sim 4\text{ mg/kg}$ であるが、この範囲に限定されるものではない。また、被験体の状態や疾患の重篤度等に応じて、複数回行ってもよい。また、抗PD-1抗体は、実験では予備実験で単独投与では有効性が出ない量である 80 mg/マウス (3.2 mg/kg : 60 kg 換算では 192 mg)を投与した。人への投与ではNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物投与時に1回 480 mg を4週間間隔で投与するか、あるいは、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物投与時に、通常の成人投与方法として決められている1回 240 mg を2週間間隔で点滴静注することも可能である。

[0136] 本発明の抗腫瘍剤は、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。

[0137] 本発明はまた、以下（１）、（２）に関する。

（１）免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を高めるための、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物。

（２）NK Tリガンド含有リポソーム組成物の治療効果を高めるための、免

疫チェックポイント阻害剤。

(1)、(2)において、「NK T細胞リガンド」、「リポソーム」、「NK Tリガンド含有リポソーム組成物」、「免疫チェックポイント阻害剤」の定義、例示、製造方法（入手方法）は、前述の本発明の併用剤について説明した、「NK T細胞リガンド」、「リポソーム」、「NK Tリガンド含有リポソーム組成物」、「免疫チェックポイント阻害剤」の定義、例示、製造方法（入手方法）と同じである。

(1)、(2)において、「NK Tリガンド含有リポソーム組成物」、「免疫チェックポイント阻害剤」の投与方法、投与量、投与対象、これらを組み合わせたときの治療効果については、前述の本発明の併用剤の〔5. 免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物との組み合わせ〕で説明した投与方法、投与量、投与対象、これらを組み合わせたときの治療効果に準じて、適宜決定することができる。

[0138] 本発明はまた、以下(3)、(4)に関する。

(3) NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物を含有する、がん免疫細胞群の活性化による免疫チェックポイント分子の発現増強剤。

(4) NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物を含有する、NK T細胞人工活性化によるがん細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子の発現増強剤。

(3)、(4)において、「NK T細胞リガンド」、「リポソーム」、「NK Tリガンド含有リポソーム組成物」の定義、例示、製造方法（入手方法）は、前述の本発明の併用剤について説明した、「NK T細胞リガンド」、「リポソーム」、「NK Tリガンド含有リポソーム組成物」の定義、例示、製造方法（入手方法）と同じである。

[0139] 2. 発明－2

以下に、本発明（発明－2）を詳細に説明する。

本発明は、NK T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソーム組成物に関する。

[0140] [1. NK T細胞リガンド]

本発明において用いられるNK T細胞リガンドは、発明－1について説明したNK T細胞リガンドと同じNK T細胞リガンドを用いることができる。

[0141] [2. 抗原]

本発明において、抗原は、免疫系が認識できる物質であり、例えば、がん抗原などの自己成分、病原体抗原などの外来成分が挙げられる。

本発明において、がん抗原は、がん細胞が産生する自己成分あるいは自己成分から変化した免疫系が認識できるものである。

がん抗原は、遺伝子配列を基にペプチド合成により製造できる。また、がん抗原として、文献 (Jpn J Clin Oncol 2010 40:(5) 377-387) に記載のWT-1を用いることもできる。

[0142] [3. リポソーム]

本発明のリポソーム組成物は、上記糖脂質及び抗原がリポソームに含有されている。

本発明で用いられるリポソームは、発明－1について説明したリポソームと同じリポソームを用いることができる。

[0143] [4. NK T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソーム組成物]

本発明のNK T細胞リガンド及び抗原（例えば、がん抗原）を含有するリポソーム組成物は、NK T細胞リガンドと抗原（例えば、がん抗原）を含んでいる状態のリポソームであれば良い。

[0144] 本発明のNK T細胞リガンド及び抗原を含有する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、例えば、抗原ががん抗原である場合、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）に溶解したがん抗原溶液を加え、ホモジナイザー等で乳化することによって、NK T細胞リガンド及びがん抗原含有リポソーム（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。

[0145] 本発明のNK T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソーム組成物は、RK-163及び抗原を含有するリポソーム組成物、RCAL-61及び抗原を含有するリポソーム組成物、RCAL-137及び抗原を含有するリポソーム組成物が好ましく、リポソームが前述の（#7）のリポソームである、RK-163及び抗原を含有するリポソーム組成物、RCAL-61及び抗原を含有するリポソーム組成物、RCAL-137及び抗原を含有するリポソーム組成物がさらに好ましい。

本発明のNK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物は、RK-163及びがん抗原を含有するリポソーム組成物、RCAL-61及びがん抗原を含有するリポソーム組成物、RCAL-137及びがん抗原を含有するリポソーム組成物が好ましく、リポソームが前述の（#7）のリポソームである、RK-163及びがん抗原を含有するリポソーム組成物、RCAL-61及びがん抗原を含有するリポソーム組成物、RCAL-137及びがん抗原を含有するリポソーム組成物がさらに好ましい。

[0146] 本発明のNK T細胞リガンド及び抗原を含有する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。

[0147] 本発明のNK T細胞リガンド及び抗原を含有する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。

[0148] 本発明のNK T細胞リガンド及び抗原を含有する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。

[0149] 本発明のNK T細胞リガンド及び抗原（例えば、がん抗原）を含有するリポソーム組成物は、免疫記憶を誘導するための医薬として有用である。

本発明のNK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物は、抗腫瘍剤として有用である。

また、本発明のNK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物は、がんが存在しない状態でも、予防的にがん抗原を認識する免疫細胞群の活性化、増殖を誘導することが期待できる。

さらに、本発明のNK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物は、がんが存在しない状態でも、予防的にがんに対する免疫記憶を誘導することが期待できる。

さらにまた、本発明のNK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物は、がんの発症、再発、転移抑制効果を高めることが期待できる。

。

- [0150] NK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物により、予防的効果が期待される癌は、例えば、遺伝性のがんおよびそれらに類する主な例としては乳癌、大腸癌、卵巣癌、骨軟部腫瘍、皮膚癌、泌尿器癌、脳腫瘍、内分泌系腫瘍などがあるが、その他がん種、たとえば、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、皮膚癌、黒色腫、血液腫瘍等に適応でき、また、これらに限定されるものではなく、また複数の癌を同時に発症している場合にも、本剤の効果は期待される。
- [0151] 投与方法としては、静脈内投与、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が、これらに限定されない。
- [0152] 一回に投与するNK T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソーム組成物のNK T細胞リガンド量は、NK T細胞を活性化し、かつ抗原特異的CD8 T細胞の活性化増殖、長期記憶形成により疾患予防するのに十分な量であれば良い。通常、NK T細胞リガンド量として $400\text{ ng/kg} \sim 4\text{ mg/kg}$ 、抗原量として $2\text{ mg/kg} \sim 20\text{ mg/kg}$ を初回投与後4週間後に同量を再投与することで1クールとする。抗原の種類によっては免疫記憶の成立、維持は異なるため、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週間間隔で投与」を繰り返し行う。また、被験体の状態や疾患の重篤度等に応じて、複数回行ってもよい。
- [0153] 本発明のNK T細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物は、未だ体内にがん細胞が発生する前に様々な免疫細胞群を活性化し、がん免疫記憶を誘導できるため、がんの発症、再発、転移を予防することが可能となる。したがって、本発明のNK T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソームは、抗原の種類を変えるだけで、癌だけではなく、感染症の予防にも適応可能であり得る。
- [0154] 本発明のNK T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソーム組成物は、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。

[0155] 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

[0156] 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。

実施例においては、がん抗原の代わりに、擬似がん抗原オボアルブミン（OVA）を用いた。擬似がん抗原は生体に存在しないが、免疫系が反応できる外来人工物で、それをがん細胞株に発現させて、がん抗原のように振る舞わせることが可能なものである。

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

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

OVA : Ovalbumin

PBS : phosphate buffered saline

[0157] [実施例 1]

[NKT細胞リガンド含有リポソームの調製]

NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物（前述の(#7)のリポソームにNKT細胞リガンド(RK-163, RCAI-61あるいはRCAI-137)を含有するリポソーム組成物）は、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サンプルを調製した。

[0158] （調製したサンプルの組成）

・安全性試験用

15 ng/mL RK-163(あるいはRCAI-61, および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 RK-163(あるいはRCAI-61, および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

[0159] [表3]

	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、あるいは RCAI-61, RCAI-137	国立研究開発法人理化学研究所より提供		F-01
HSPC	Lipoid	LIPOID S P C-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。		

[0160] (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3.81mg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 (あるいはRCAI-61, 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 (登録商標) 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。この溶液をサンプル(安全性試験用)とした。

[0161] ・主薬理試験用

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。この溶液をサンプル(主薬理試験用)とした。このサンプルを、以下の試験例1～3及び5において、NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物として用いた。

[0162] [試験例1] NKT細胞リガンド(RK-163, RCAI-61、又はRCAI-137)含有リポソーム組成物投与による免疫細胞群の活性化とPD-1発現

NKT細胞リガント含有リポソーム組成物(RK-163含有リポソーム組成物(以下、RK-163-LIPOと記載する)、RCAI-61含有リポソーム組成物(以下、RCAI-61-LIPOと記載する)、又はRCAI-137含有リポソーム組成物(以下、RCAI-137-LIPOと記載する))の有効量(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、肝臓内の活性化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に及ぼす影響を、PD-1発現を指標に解析した。NKT細胞リガント含有リポソーム組成物の代わりに同量のPBSを投与した群を対照とした。

結果を図1に示す。

その結果、RK-163-LIPO、RCAI-61-LIPO及びRCAI-137-LIPOによる肝臓内NKT細胞の活性化の後、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、活性化の指標としてのPD-1の発現細胞数の増加が確認された。

NKT細胞リガント含有リポソーム組成物をマウス担癌モデル(皮下腫瘍モデル)に投与すると、各種免疫細胞群のPD-1の発現が亢進することが確認された。

[0163] [試験例2] NKT細胞リガンド(RK-163, RCAI-61、又はRCAI-137)含有リポ

ソーム組成物投与による生体内腫瘍細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）の発現増強

NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物（RK-163含有リポソーム組成物（RK-163-LIPO）、RCAI-61含有リポソーム組成物（RCAI-61-LIPO）、又はRCAI-137含有リポソーム組成物（RCAI-137-LIPO））の有効量（1 ng/マウス）およびX線照射M04腫瘍細胞（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、生きたM04腫瘍細胞 3×10^5 個を皮下移植し、17日後の腫瘍細胞（M04）の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）の発現解析を行った。NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物の代わりに同量の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-LIPO、RCAI-61-LIPO及びRCAI-137-LIPO投与マウスの生体内腫瘍細胞（M04）膜上の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）の発現細胞が優位に増加していた。

NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物をマウス担癌モデルに投与すると、腫瘍細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）の発現が亢進することが確認された。

[0164] [試験例3] 人工活性化NKT細胞による腫瘍細胞（M04）上のPD-1リガンド分子（PD-L1）発現増強

NKT細胞リガンド（RK-163，RCAI-61，又はRCAI-137）含有リポソーム組成物（RK-163含有リポソーム組成物（RK-163-LIPO）、RCAI-61含有リポソーム組成物（RCAI-61-LIPO）、又はRCAI-137含有リポソーム組成物（RCAI-137-LIPO））の有効量1 ngをNKT細胞株である2E10細胞 3×10^5 個と24時間混合培養したのち、2E10細胞（ 3×10^5 個）とM04細胞（ 3×10^5 個）と混合培養し、4時間、24時間、48時間後にM04細胞だけを回収し免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）発現を測定した。

結果を図3に示す。

その結果、RK-163-LIPOを用いた群、RCAI-61-LIPOを用いた群、RCAI-137-L

IP0を用いた群のいずれも、混合培養から24時間－48時間で、腫瘍細胞（M04）上の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）の発現細胞は有意に増加していた。

腫瘍細胞上のPD-L1発現亢進機序を確認するために、NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物で活性化したNKT細胞株（2E10）と腫瘍細胞（M04）を混合培養し、経時的に腫瘍細胞上のPD-L1発現を確認すると、混合培養開始24-48時間で免疫チェックポイントリガンド分子PD-L1発現は最高になることが確認された。

[0165] 〔試験例4〕 IFN γ による腫瘍細胞（M04）上の免疫チェックポイントリガンド分子PD-L1発現増強

腫瘍細胞（M04） 3×10^5 個にIFN γ リコンビナントタンパク質1 ngを添加培養し、0時間、4時間、24時間、48時間後にM04細胞だけを回収し免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）発現を測定した。

結果を図4に示す。

その結果、添加培養後24hおよび48hで腫瘍細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）の発現が顕著に増加していたことから、IFN γ が腫瘍細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）の発現に関与していたことが明らかになった。

腫瘍細胞（M04）にIFN γ リコンビナントタンパク質1 ng/mLを入れて培養し、経時的に腫瘍細胞M04を回収してPD-L1発現を解析したところ、培養開始24-48時間で腫瘍細胞上のPD-L1リガンド分子発現は優位に上昇したことから、試験例2（図2）及び試験例3（図3）の腫瘍細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子（PD-1リガンド分子：PD-L1）の発現亢進が、NKT細胞由来のIFN γ によるものであることを確認した。

[0166] 〔試験例5〕 抗PD-1抗体とNKT細胞リガンド（RK-163, RCAI-61、又はRCAI-137）含有リポソーム組成物との併用治療による強い抗腫瘍効果の誘導

NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物（RK-163含有リポソーム組成物（RK-163-LIPO）、RCAI-61含有リポソーム組成物（RCAI-61-LIPO）、又はRCAI-1

37含有リポソーム組成物(RCAI-137-LIPO)) (RK-163、RCAI-61、RCAI-137量に換算して1 ng/25 g体重を投与)とX線照射(50 Gy)したB16マウスメラノーマ(M04)細胞 1×10^6 個をC57BL/6マウス(10週齢)静脈より投与し、その後、生きたB16マウスメラノーマ細胞(M04) 3×10^5 個を同マウスの皮下に移植し、腫瘍増殖を経時的に観察した。

さらに移植後、3、14日目に抗PD-1抗体を80mg静脈より投与した。M04細胞を皮下に移植後、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。

結果を図5-1、5-2、5-3に示す。

その結果、NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物(RK-163-LIPO、RCAI-61-LIPO、又はRCAI-137-LIPO)と抗PD-1抗体の併用投与は、それぞれの単独投与に比べて、強い抗腫瘍効果を示した。

担癌モデルマウス(皮下腫瘍モデル)にNKT細胞リガンド含有リポソーム組成物と抗PD-1抗体を併用して投与することにより、NKT細胞リガンド含有リポソーム製剤あるいは抗PD-1抗体の単独投与よりも優位な抗腫瘍効果を得ることができることが確認された。

[0167] [実施例2]

[NKT細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソームの調製]

NKT細胞リガンド及びがん抗原含有リポソーム組成物(前述の(#7)のリポソームにNKTリガンド(RK-163、RCAI-61あるいはRCAI-137)及び擬似がん抗原(OVA)を含有するリポソーム組成物)は、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サンプルを調製した。

[0168] (調製したサンプルの組成)

・安全性試験用

15 ng/mL RK-163(あるいはRCAI-61、RCAI-137)、221 ng/mL 脂質 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

OVA: 100 mg/mL in 9%ショ糖水溶液

・ 主薬理試験用

1.5 ng/mL RK-163(あるいはRCAI-61, RCAI-137)、22.08 ng/mL 脂質 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

OVA: 10 mg/mL in 9%ショ糖水溶液

粒子径 : 145.7 nm PDI : 0.06813

[0169] [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 あるいは RCAI-61, 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. 525600-21906 68-01/023	
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 μ m のろ過滅菌用フィルターに通して調製した。		
OVA	和光純薬工業株式会社		LKP3544

[0170] (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 10.3mg、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1.5 mLとRK-163(あるいはRCAI-61, RCAI-137) 100 μ g/mL in メタノール：クロロホルム = 1 : 2 の溶液1 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、脂質フィルムを作成し、デシケ

ーターにて静置した。乾固させたものに、100 mg/mL OVA溶液 (in 9%ショ糖水溶液) 2.208 mLを添加した (脂質濃度5 mg/mL)。Extruder (40℃加温、孔径 0.4 μm $\rightarrow$ 0.2 μm) にて整粒した。攪拌式限外濾過により、未内包のOVAを除去した (メンブレンの分画分子量: 300 kDa, 外液: 9%ショ糖水溶液)。クリーンベンチ内で、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、粒子径を調製した。調製した溶液はスクリューキャップ付きのガラス瓶に入れた。この溶液をさらに9%ショ糖水溶液にて1000倍希釈し、0.22 μm の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NKT細胞リガンド(RK-163(あるいはRCAI-61, RCAI-137))及びがん抗原(OVA)を含有するリポソームサンプル(安全性試験用)とした。

[0171] ・主薬理試験用

NKT細胞リガンド(RK-163(あるいはRCAI-61, RCAI-137))及びがん抗原(OVA)を含有するリポソーム(安全性試験用)から別のガラス瓶に1 mLとり、それに9 mLショ糖溶液に添加し混合した。その溶液を0.2 μm のポリカーボネート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 NKT細胞リガンド(RK-163(あるいはRCAI-61, RCAI-137))及びがん抗原(OVA)を含有するリポソームサンプル(主薬理試験用)とした。このサンプルを、以下の試験例6～10において、NKT細胞リガンド及びがん抗原を含有するリポソーム組成物として用いた。

[0172] [試験例6] NKT細胞リガンド(RK-163)及び擬似がん抗原(OVA)を含有するリポソーム組成物 (以下、RK-LIPO-OVAと略称する) による抗腫瘍活性(dose)とED50

RK-LIPO-OVA (RK-163量に換算して0.1 ng-10 ng/25 g体重を投与) を何も感作していない正常C57BL/6マウス (10週齢) 静脈より投与し、その後、擬似がん抗原OVAを発現するB16マウスメラノーマ細胞 (M04) 3×10^5 cellsをRK-LIPO-OVA投与マウスの皮下に 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(mm³)=長径(mm) x 短径(mm) x 高さ(mm)で算出した。NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物の代わりに同量のPBSを投与した群を対照とした。

結果を図6に示す。

その結果、RK-LIPO-OVA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量に比例して抑制した。RK-163量に換算した有効量はRK-163量で1 ng/25 gマウス体重～10 ng/25 gマウス体重で、ED50は0.7797であった。

RK-LIPO-OVAを正常C57BL/6マウスに静脈投与し、その後、擬似がん抗原OVAを発現するB16マウスメラノーマ細胞(M04)をRK-LIPO-OVA投与マウスの皮下に移植した結果、RK-LIPO-OVAは強い抗腫瘍効果を示し、NKT細胞リガンド量に比例してM04腫瘍細胞の増殖を抑制することが確認された。

[0173] [試験例7] NKT細胞リガンド(RK-163)及び擬似がん抗原(OVA)を含有するリポソーム組成物(以下、RK-LIPO-OVAと略称する)によるNKT細胞の活性化と増殖

RK-LIPO-OVAの有効量(RK163換算量10 ng/マウス)を正常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-LIPO-OVA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細胞を人工活性化した。その結果、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。NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物の代わりに同量のPBSを投与した群を対照とした。

結果を図7に示す(図7はRK-LIPO-OVA投与後3日目のデータである)。NK細胞はRK-LIPO-OVA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。

RK-LIPO-OVAを正常C57BL/6マウスの尾静脈に投与することにより、肝臓内のNKT細胞が人工活性化、増殖することが確認された。

[0174] [試験例8] NKT細胞リガンド(RK-163)及び擬似がん抗原(OVA)を含有するリポソーム(以下、RK-LIPO-OVAと略称する)投与後の人工活性化NKT細胞による自然免疫系・獲得免疫系細胞群の活性化

RK-LIPO-OVA の有効量 (RK163換算量10 ng/マウス) 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細胞を人工活性化し、活性化NKT細胞から産生されるIFN γ の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解析した。NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物の代わりに同量のPBSを投与した群を対照とした。

結果を図8に示す。

その結果、RK-LIPO-OVA投与で人工活性化NKT細胞を誘導することにより、RK-LIPO-OVAに含まれる抗原 (OVA) によって正常マウスでありながら獲得免疫系の抗原 (OVA) 特異的CD4T, CD8T細胞の増殖を誘導すると共に、また人工活性化NKT細胞により自然免疫系NK細胞は活性化され、細胞数の増加が確認された。

RK-LIPO-OVAをC57BL/6マウスに静脈投与することにより、肝臓内のNKT細胞を人工活性化し、その結果、正常マウスでありながら獲得免疫系の抗原 (OVA) 特異的CD4T, CD8T細胞の増殖を誘導すると共に、自然免疫系NK細胞の増殖することが確認された。

[0175] [試験例9] NKT細胞リガンド(RK-163)及びがん抗原(OVA)を含有するリポソーム (以下、RK-LIPO-OVAと略称する) による長期免疫記憶成立

RK-LIPO-OVAの有効量 (10 ng/マウス) を静脈内投与したC57BL/6マウス (10週齢) (1群5匹) を、RK-LIPO-OVA投与後60日目に、屠殺し、脾臓細胞を用いて解析を行った。

結果を図9に示す。

その結果、RK-LIPO-OVA投与後60日において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特異的メモリーCD8T細胞) が確認され、長期がん免疫記憶が形成・維持されていることを確認した。

RK-LIPO-OVAを静脈内投与C57BL/6マウスは、RK-LIPO-OVA投与後60日目ににおいては擬似抗原OVA特異的メモリーCD8T細胞の形成が確認され、長期がん免疫記憶が形成・維持されていることが確認された。

[0176] [試験例10] NKT細胞リガンド(RK-163)及びがん抗原(OVA)を含有するリポ

ソーム（以下、RK-LIPO-OVAと略称する）による長期免疫記憶成立60日後の抗腫瘍効果

RK-LIPO-OVAの有効量（10 ng/マウス）を正常マウスに免疫し、その後無処置で60日経過した。これら擬似がん抗原OVA特異的長期記憶誘導C57BL/6マウスの皮下に擬似がん抗原OVA発現B16マウスメラノーマ細胞（M04） 3×10^5 個を移植し、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。NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物の代わりに同量のPBSを投与した群を対照とした。

結果を図10に示す。

その結果、RK-LIPO-OVA投与から、60日を経たRK-LIPO-OVA投与マウスでは、擬似がん抗原OVAに対する免疫記憶の誘導により、60日目に移植した擬似がん抗原OVA発現B16マウスメラノーマ細胞（M04）の増殖は有意に抑制された。なお、NKT細胞リガンド(RCAI-61、RCAI-137)及びがん抗原(OVA)を含有するリポソームRCAI-61-OVA、RCAI-137-OVAでも同様に擬似がん抗原OVA発現B16マウスメラノーマ細胞（M04）の増殖は有意に抑制された。

このことから、RK-LIPO-OVAの正常マウスにおける抗腫瘍効果の有用性が確認された。

RK-LIPO-OVAを正常マウスに投与し、60日を経過した時点で、擬似がん抗原OVA発現B16マウスメラノーマ細胞（M04）を移植した。その結果、RK-LIPO-OVA投与から、60日を経たRK-LIPO-OVA投与マウスに移植した擬似がん抗原OVA発現B16マウスメラノーマ細胞の増殖は有意に抑制され、正常マウスにおける擬似がん抗原OVA特異的免疫記憶の成立による抗腫瘍効果の有用性が確認された。

産業上の利用可能性

[0177] 本発明（発明－1）によれば、免疫チェックポイント阻害剤とNKT細胞リガンド含有リポソーム組成物を組み合わせにより得られる製剤は、PD-1リガンド分子であるPD-L1発現が低く単独では治療が困難で、免疫チ

チェックポイント阻害剤に抵抗性のあったがん腫やNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物に抵抗性のあるがんを含め、あらゆるがん種の治療のための製剤として有用であり得る。

[0178] 本発明（発明－２）によれば、NK T細胞リガンド及び抗原（例えば、がん抗原、病原体抗原）を含有するリポソーム組成物は、NK T細胞を人工的に活性化する機能を有するNK T細胞リガンド含有物質と抗原（例えば、がん抗原、病原体抗原）による特異的免疫細胞群を活性化し、長期免疫記憶を誘導することにより得られる製剤は、癌、感染症等の疾患の予防のための製剤として有用であり得る。

[0179] 本出願は、日本で出願された特願２０２３－１３２３６８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。

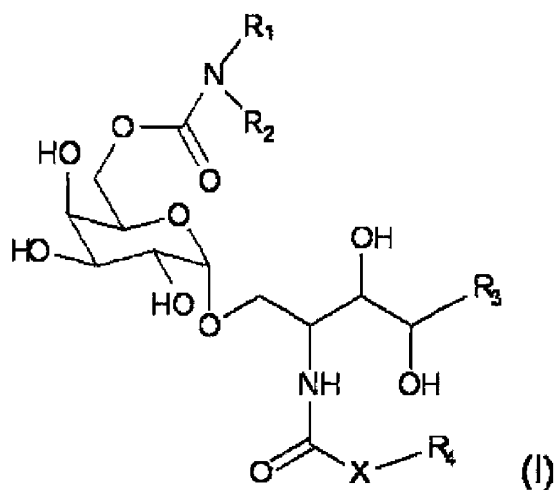
請求の範囲

[請求項1] 免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物とを組み合わせる抗腫瘍剤。

[請求項2] NK T細胞リガンドが、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である、請求項1記載の抗腫瘍剤。

式(Ⅰ)：

[化1]



[式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

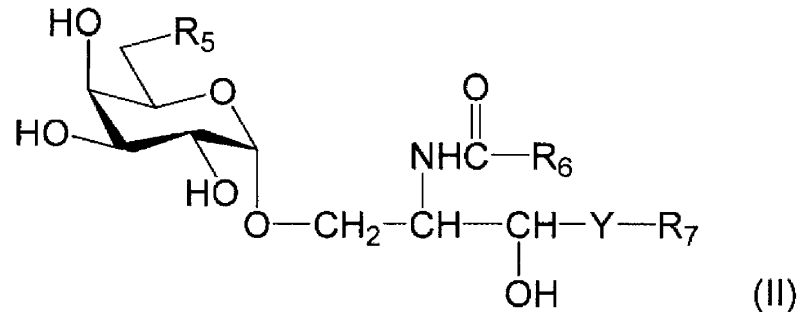
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒に5～6員環を形成してもよく；

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]

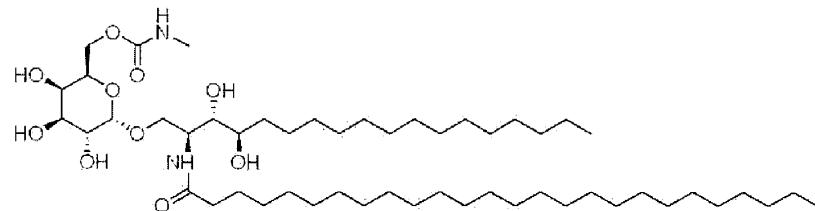


[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[請求項3] 前記糖脂質が、式(1)で表される化合物又はその塩である、請求項2記載の抗腫瘍剤。

[請求項4] 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3記載の抗腫瘍剤。

[請求項5] NKT細胞リガンド含有リボソーム組成物を含有する、がん免疫細胞群の活性化による免疫チェックポイント分子の発現増強剤。

[請求項6] NKT細胞リガンド含有リボソーム組成物を含有する、NKT細胞人工活性化によるがん細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子の発現増強剤。

[請求項7] 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を高めるための、NKT細胞

胞リガンド含有リポソーム組成物。

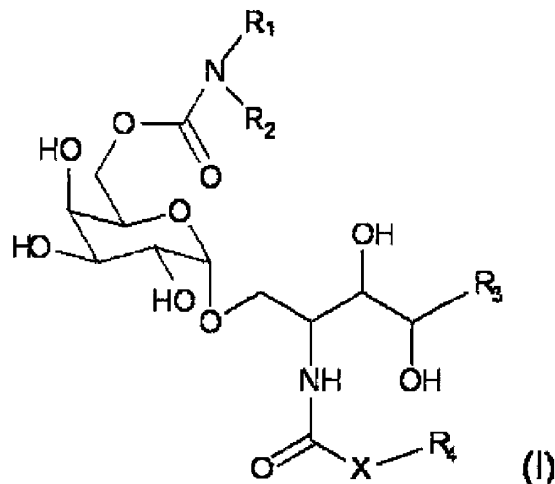
[請求項8] NK Tリガンド含有リポソーム組成物の治療効果を高めるための、免疫チェックポイント阻害剤。

[請求項9] 免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物とを、対象に投与することを含む、悪性腫瘍の治療方法。

[請求項10] NK T細胞リガンドが、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である、請求項9記載の治療方法。

式(Ⅰ)：

[化4]



[式中、Xはアルキレン基あるいは－NH－を示し；

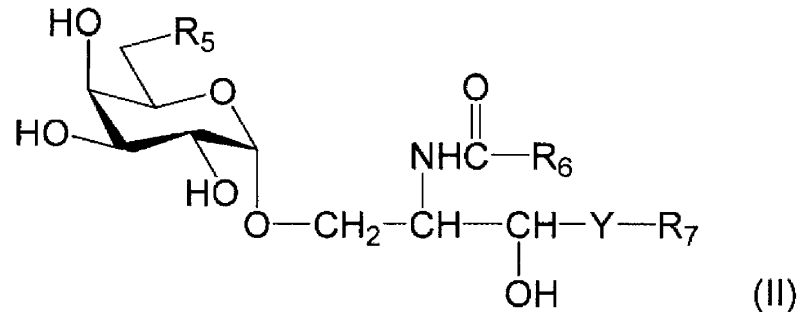
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒になって5～6員環を形成してもよく；

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]

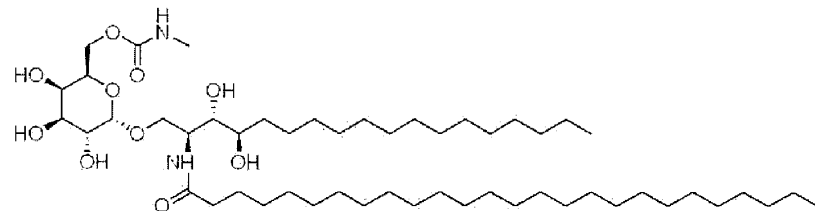


[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[請求項11] 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10記載の治療方法。

[請求項12] 前記糖脂質が、下記式：

[化6]



で表される化合物又はその塩である、請求項11記載の治療方法。

[請求項13] NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物を、対象に投与することを含む、該対象におけるがん免疫細胞群の活性化による免疫チェックポイント分子の発現増強方法。

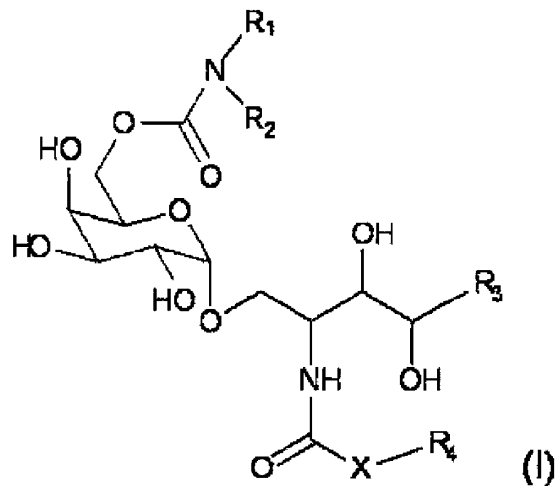
[請求項14] NKT細胞リガンド含有リポソーム組成物を対象に投与することを含む、該対象におけるNKT細胞人工活性化によるがん細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子の発現増強方法。

[請求項15] 悪性腫瘍の治療において使用するための、免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物とを組み合わせる医薬。

[請求項16] NK T細胞リガンドが、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である、請求項15記載の使用のための医薬。

式(Ⅰ)：

[化7]



[式中、Xはアルキレン基あるいは—NH—を示し；

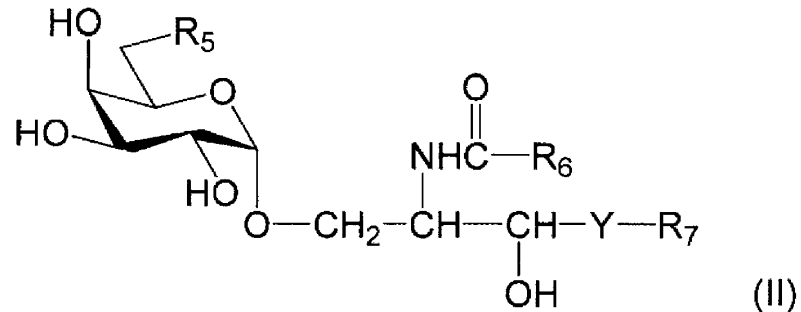
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒に5～6員環を形成してもよく；

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8]

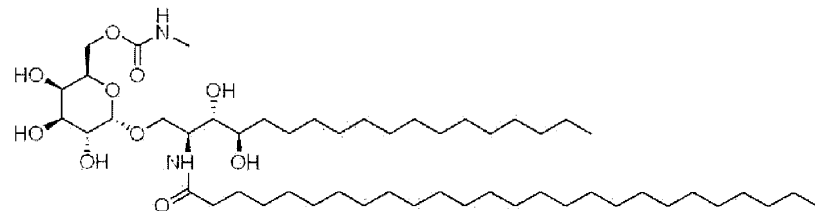


[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は— CH_2 —、— $CH(OH)$ —又は— $CH=CH$ —を示す。]

[請求項17] 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16記載の使用のための医薬。

[請求項18] 前記糖脂質が、下記式：

[化9]



で表される化合物又はその塩である、請求項17記載の使用のための医薬。

[請求項19] がん免疫細胞群の活性化による免疫チェックポイント分子の発現増強において使用するための、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物。

[請求項20] NK T細胞人工活性化によるがん細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子の発現増強において使用するための、NK T細胞リガンド

含有リポソーム組成物。

[請求項21] 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果の向上において使用するための、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物。

[請求項22] NK Tリガンド含有リポソーム組成物の治療効果の向上において使用するための、免疫チェックポイント阻害剤。

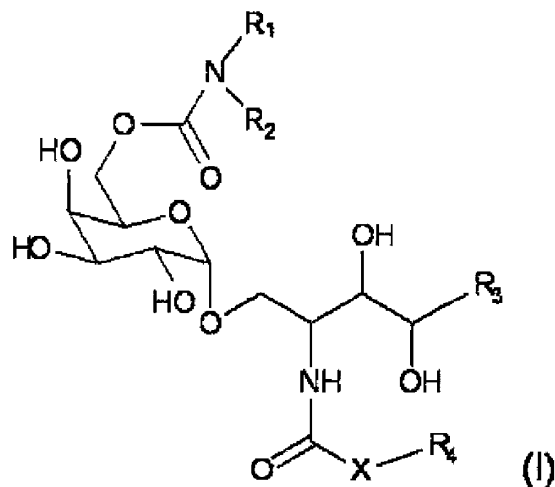
[請求項23] 医薬として使用するための、免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物。

[請求項24] 抗腫瘍剤の製造における、免疫チェックポイント阻害剤とNK T細胞リガンド含有リポソーム組成物との組み合わせの使用。

[請求項25] NK T細胞リガンドが、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である、請求項24記載の使用。

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

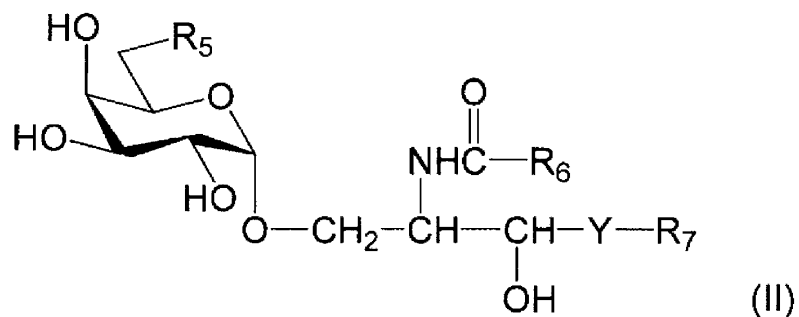
てもよく；

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)：

[化11]

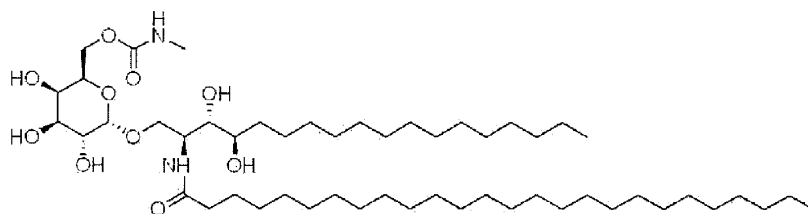


[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[請求項26] 前記糖脂質が、式(1)で表される化合物又はその塩である、請求項25記載の使用。

[請求項27] 前記糖脂質が、下記式：

[化12]



で表される化合物又はその塩である、請求項26記載の使用。

[請求項28] がん免疫細胞群の活性化による免疫チェックポイント分子の発現増強剤の製造における、NK T細胞リガンド含有リポソーム組成物の使

用。

[請求項29] N K T細胞人工活性化によるがん細胞上の免疫チェックポイントリガンド分子の発現増強剤の製造における、N K T細胞リガンド含有リポソーム組成物の使用。

[請求項30] 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果の向上剤の製造における、N K T細胞リガンド含有リポソーム組成物の使用。

[請求項31] N K Tリガンド含有リポソーム組成物の治療効果の向上剤の製造における、免疫チェックポイント阻害剤の使用。

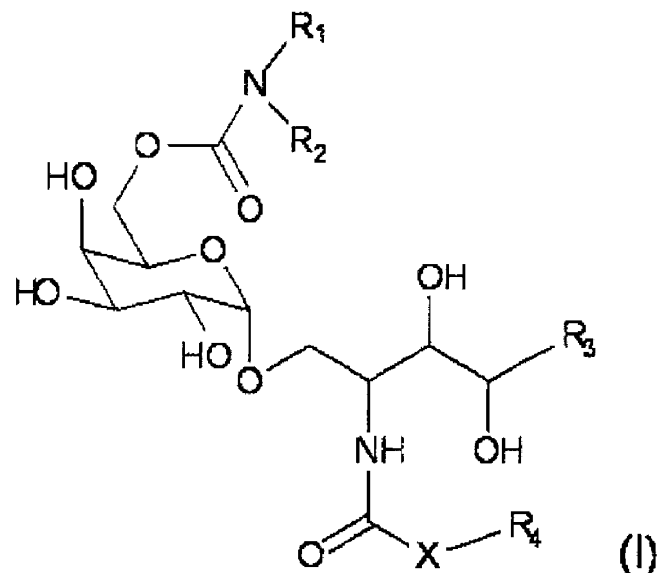
[請求項32] 免疫チェックポイント阻害剤とN K T細胞リガンド含有リポソーム組成物との組み合わせを含有する医薬組成物。

[請求項33] N K T細胞リガンド及び抗原を含有するリポソーム組成物。

[請求項34] N K T細胞リガンドが、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である、請求項33記載の組成物。

式（I）：

[化13]



[式中、Xはアルキレン基あるいは－NH－を示し；

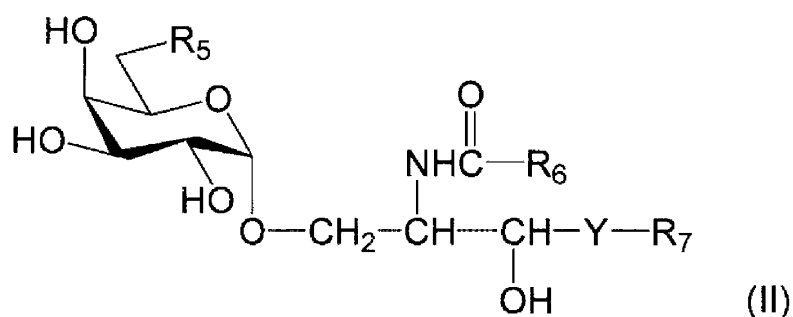
R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び R_2 は、隣接する窒素原子と一緒になって 5 ～ 6 員環を形成してもよく；

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 (I I)：

[化14]

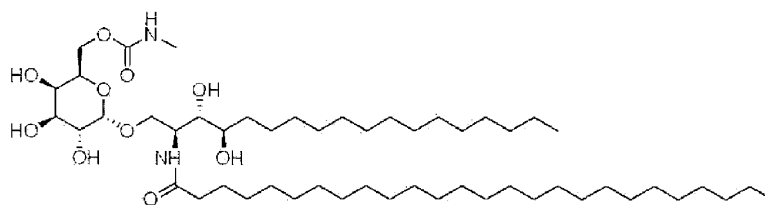


[式中、 R_5 は、水素原子、炭素数 1 ～ 7 のアルキル基、炭素数 1 ～ 6 のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R_6 及び R_7 はそれぞれ独立に炭素数 1 ～ 28 の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-CH_2-$ 、 $-CH(OH)-$ 又は $-CH=CH-$ を示す。]

[請求項35] 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 34 記載の組成物。

[請求項36] 前記糖脂質が、下記式：

[化15]



で表される化合物又はその塩である、請求項 35 記載の組成物。

- [請求項37] 免疫記憶を誘導するための、請求項33～36のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項38] 抗原ががん抗原である、請求項33～36のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項39] がんが存在しない状態でも、予防的にがん抗原を認識する免疫細胞群の活性化、及び増殖を誘導するための、請求項38記載の組成物。
- [請求項40] がんが存在しない状態でも、予防的にがんに対する免疫記憶を誘導するための、請求項38記載の組成物。
- [請求項41] がんの発症、再発、及び転移の抑制効果を高めるための、請求項38記載の組成物。
- [請求項42] 請求項33～36のいずれか1項に記載の組成物を、対象に投与することを含む、免疫記憶の誘導方法。
- [請求項43] 請求項38記載の組成物を、対象に投与することを含む、該対象においてがんが存在しない状態でも、予防的にがん抗原を認識する免疫細胞群の活性化、及び増殖を誘導する方法。
- [請求項44] 請求項38記載の組成物を、対象に投与することを含む、該対象においてがんが存在しない状態でも、予防的にがんに対する免疫記憶を誘導する方法。
- [請求項45] 請求項38記載の組成物を、対象に投与することを含む、がんの発症、再発、及び転移の抑制方法。
- [請求項46] 免疫記憶の誘導において使用するための、請求項33～36のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項47] がんが存在しない状態でも、予防的にがん抗原を認識する免疫細胞群の活性化、及び増殖の誘導において使用するための、請求項38記載の組成物。
- [請求項48] がんが存在しない状態でも、予防的にがんに対する免疫記憶の誘導において使用するための、請求項38記載の組成物。
- [請求項49] がんの発症、再発、及び転移の抑制効果の向上において使用するた

めの、請求項 38 記載の組成物。

- [請求項50] 医薬として使用するための、請求項 33～36 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- [請求項51] 免疫記憶の誘導剤を製造するための、請求項 33～36 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。
- [請求項52] がんが存在しない状態でも、予防的にがん抗原を認識する免疫細胞群の活性化、及び増殖を誘導するための剤を製造するための、請求項 38 記載の組成物の使用。
- [請求項53] がんが存在しない状態でも、予防的にがんに対する免疫記憶を誘導するための剤を製造するための、請求項 38 記載の組成物の使用。
- [請求項54] がんの発症、再発、及び転移の抑制剤を製造するための、請求項 38 記載の組成物の使用。