(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119255809 A
(43)申请公布日 2025.01.03

(21)申请号 202380034144.6
(22)申请日 2023.02.14
(30)优先权数据
2022-020306 2022.02.14 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/005048 2023.02.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/153527 JA 2023.08.17
(71)申请人 国立研究开发法人理化学研究所
地址 日本埼玉县
(72)发明人 谷口克 大野博司 对田尚
阵野原俊 高桥真澄 森山垒
桥本浩一 佐佐木友树 中野雄太
甘利裕邦 菊池宽
(74)专利代理机构 北京彩和律师事务所 11688
专利代理师 闫桑田
(51)Int.Cl.
*A61K 31/7032*(2006.01)
*A61K 9/127*(2025.01)
*A61K 39/00*(2006.01)
*A61P 31/00*(2006.01)
*A61P 35/00*(2006.01)
*A61P 37/04*(2006.01)

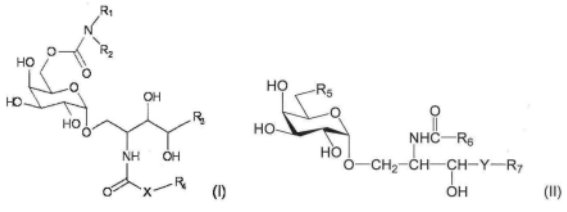
权利要求书7页 说明书43页 附图13页

(54)发明名称

# 含有NKT细胞配体的脂质体组合物

(57)摘要

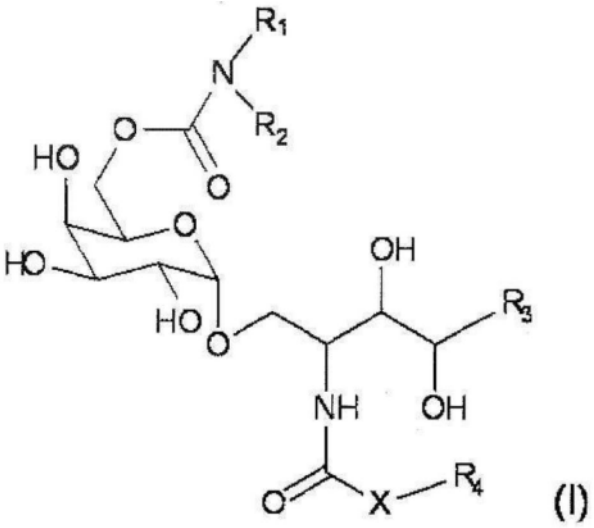
本发明的目的在于提供一种含有NKT细胞配体的制剂,其可以人工激活生物体内的NKT细胞并且可用作抗恶性肿瘤剂。一种脂质体组合物,其含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂。式(I):[式中,各符号的定义如说明书中所述。]式(II):[式中,各符号的定义如说明书中所述。]



CN 119255809 A

1.一种脂质体组合物,其含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂;

式(I):



(I)

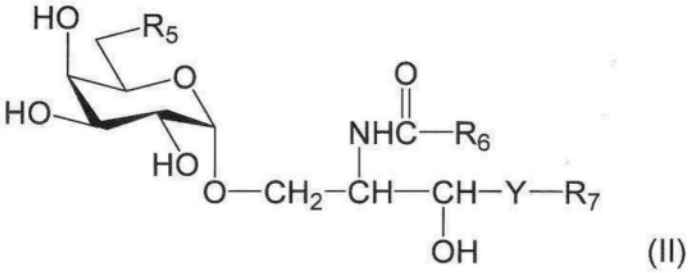
上式(I)中,X表示亚烷基或-NH-;

$R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5～6元环;

$R_3$表示碳原子数1～20的烃基;

$R_4$表示碳原子数1～30的烃基;

式(II):

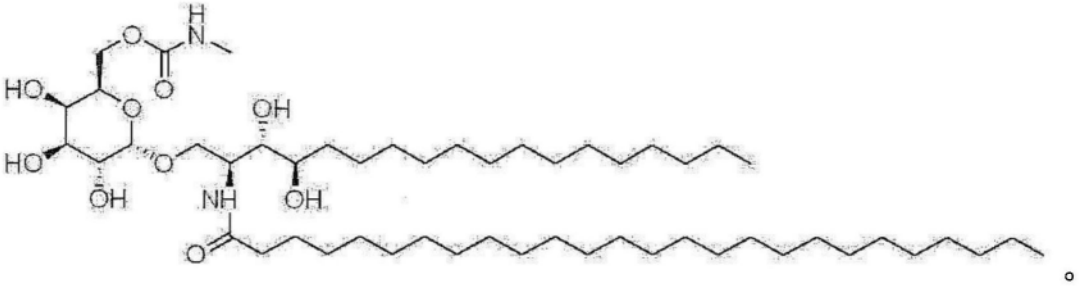


(II)

上式(II)中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1～7的烷基、碳原子数1～6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1～28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。

2.根据权利要求1所述的组合物,其中,所述糖脂为式(I)所示的化合物或其盐。

3.根据权利要求2所述的组合物,其中,所述糖脂为下式所示的化合物或其盐;



4.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其为抗恶性肿瘤剂或抗感染症剂。

5.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其为NKT细胞激活剂。

6.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其为IFN-γ产生诱导剂。

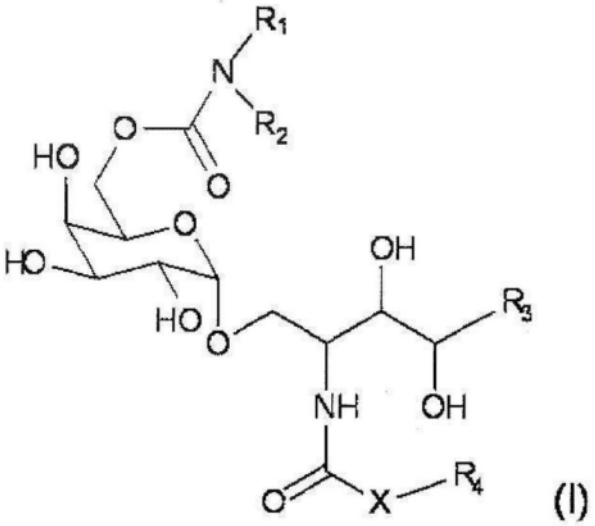
7.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其为先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞的激活剂。

8.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其为长期免疫记忆诱导剂。

9.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其用于将所述糖脂递送至抗原呈递细胞。

10.一种将糖脂递送至抗原呈递细胞的方法,其包括向受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物;

式(I):




(I)

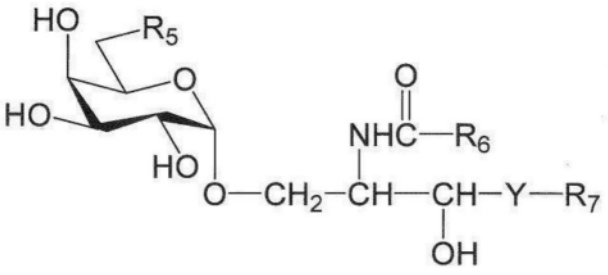
上式(I)中,X表示亚烷基或-NH-;

$R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

$R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

$R_4$表示碳原子数1~30的烃基;

式(II):

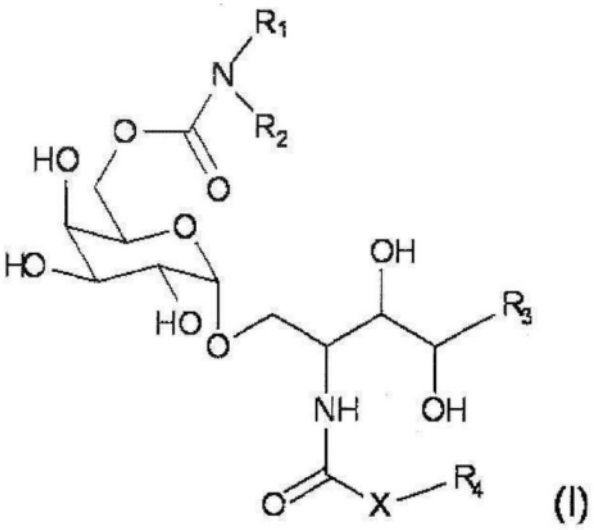



(II)

上式(II)中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1~7的烷基、碳原子数1~6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1~28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。

11.一种治疗恶性肿瘤或感染症的方法,其包括向受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物;

式(I)：



(I)

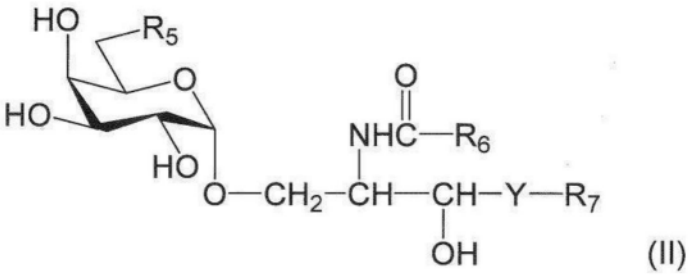
上式(I)中,X表示亚烷基或-NH-；

$R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5～6元环；

$R_3$表示碳原子数1～20的烃基；

$R_4$表示碳原子数1～30的烃基；

式(II)：

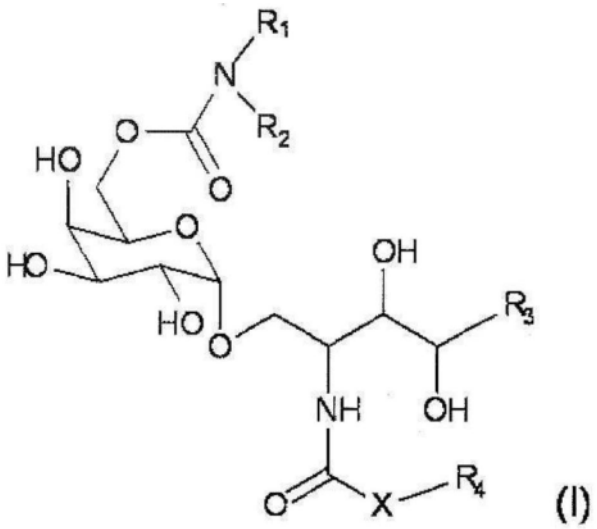


(II)

上式(II)中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1～7的烷基、碳原子数1～6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1～28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH＝CH-。

12.一种在受试者中激活NKT细胞的方法,其包括向该受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物；

式(I)：



(I)

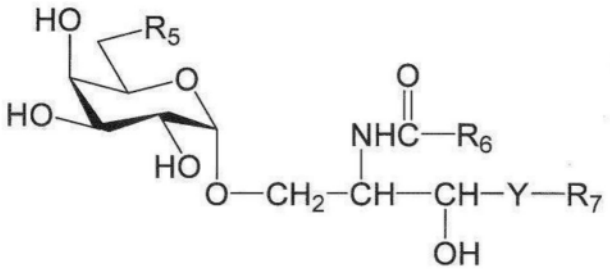
上式(I)中,X表示亚烷基或-NH-;

$R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

$R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

$R_4$表示碳原子数1~30的烃基;

式(II):

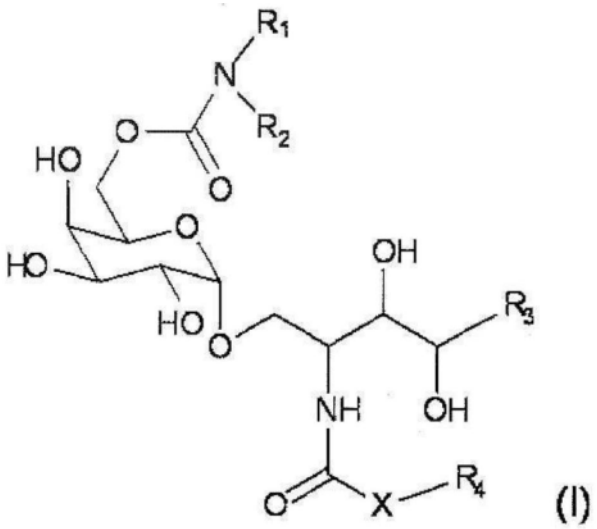


(II)

上式(II)中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1~7的烷基、碳原子数1~6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1~28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。

13.一种在受试者中诱导IFN-γ产生的方法,其包括向该受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物;

式(I):



(I)

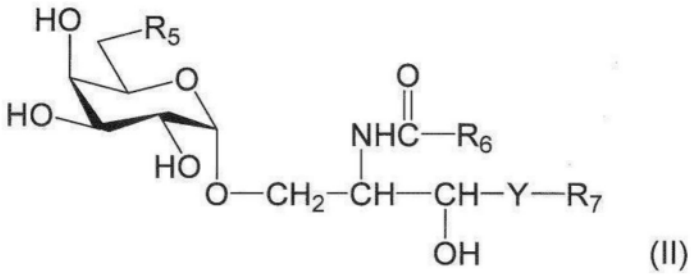
上式(I)中,X表示亚烷基或-NH-;

$R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

$R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

$R_4$表示碳原子数1~30的烃基;

式(II):

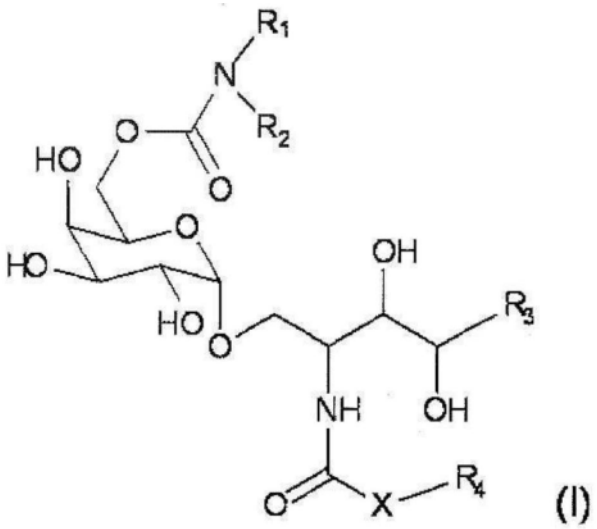


(II)

上式(II)中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1~7的烷基、碳原子数1~6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1~28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。

14.一种激活受试者中的先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞的方法,其包括向该受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物;

式(I):



(I)

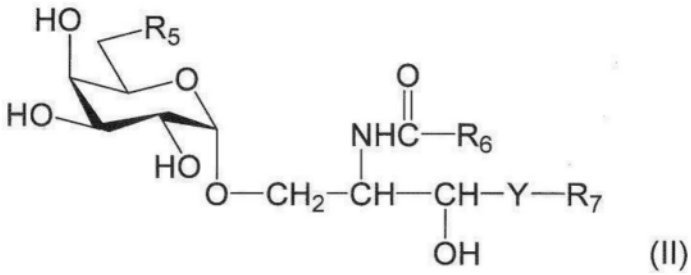
上式(I)中,X表示亚烷基或-NH-;

$R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

$R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

$R_4$表示碳原子数1~30的烃基;

式(II):

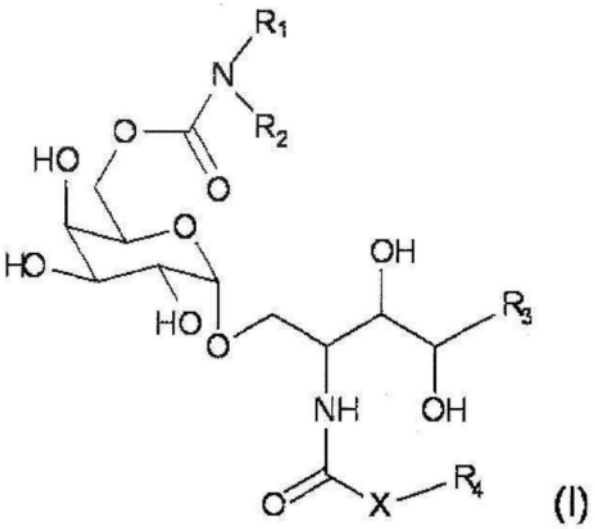


(II)

上式(II)中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1~7的烷基、碳原子数1~6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1~28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。

15.一种在受试者中诱导长期免疫记忆的方法,其包括向该受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物;

式(I):



(I)

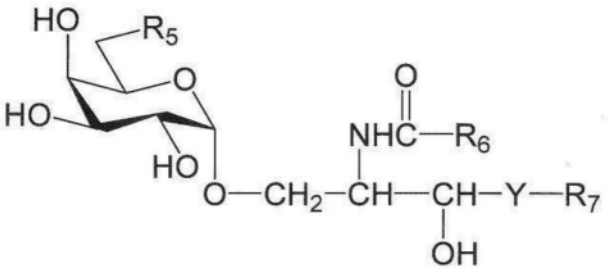
上式(I)中,X表示亚烷基或-NH-;

$R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

$R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

$R_4$表示碳原子数1~30的烃基;

式(II):



(II)

上式(II)中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1~7的烷基、碳原子数1~6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1~28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。

16.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其用于在所述糖脂向抗原呈递细胞的递送中使用。

17.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其用于在治疗恶性肿瘤或感染症中使用。

18.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其用于在激活NKT细胞中使用。

19.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其用于在诱导IFN-γ产生中使用。

20.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其用于在激活先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞中使用。

21.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其用于在诱导长期免疫记忆中使用。

22.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其用作药物。

# 含有NKT细胞配体的脂质体组合物

## 技术领域

[0001] 本发明涉及一种含有NKT细胞配体(下述的糖脂)的脂质体组合物,其可用作抗恶性肿瘤剂、抗感染症剂、NKT细胞激活剂、IFN-γ产生诱导剂、先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞的激活剂以及长期免疫记忆诱导剂。

## 背景技术

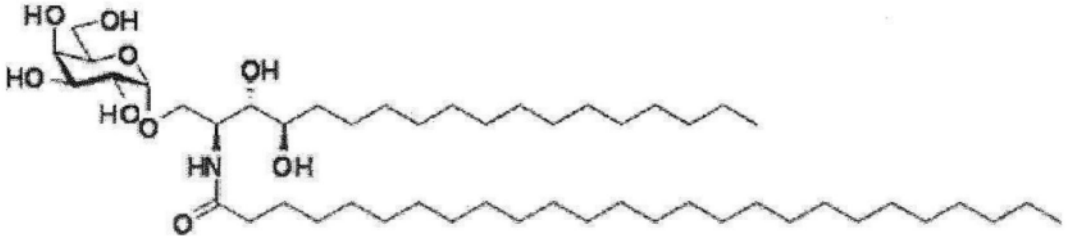
[0002] 自然杀伤(以下称NK)T细胞是属于新型淋巴细胞谱系的免疫细胞,显示出不同于其他淋巴细胞谱系(T、B、NK细胞)的特征。因为NKT细胞中存在细胞毒性穿孔素颗粒,因此与NK细胞相关(非专利文献1)。然而,由于NKT细胞不仅表达NK细胞标记物,还表达T细胞受体(TCR),因此它们是一种新的且完全不同的细胞群(非专利文献2)。NKT细胞具有由增强免疫刺激作用的辅助T(Th)-1型细胞所产生的Th-1型细胞因子(主要是干扰素(IFN)-γ)和由增强免疫抑制作用的Th-2型细胞所产生的Th-2型细胞因子(主要是白细胞介素(IL)-4、IL-10等)这两者的能力(非专利文献3)。即,由于NKT细胞可以诱导免疫系统的激活和镇静,因此启示它们可能起到免疫系统的平衡调节作用(非专利文献4)。因此,如果能够控制NKT细胞的功能,就有可能治疗因免疫系统失衡而引起的各种疾病,特别是癌症和感染症。

[0003] 作为NKT细胞的特性,最显著的是NKT细胞中表达的抗原受体α链在某一物种的所有个体中都是相同的。这表明同一物种的生物体所具有的所有NKT细胞都识别相同的物质并被激活。这条α链在人类中是Vα24Jα18,在小鼠中是Vα14Jα18,并且两个物种之间具有非常高的同源性。此外,仅已知非常有限种类的与α链形成配对的β链。因此,这种NKT细胞抗原受体也被称为“不变TCR”,正常T细胞无法表达。此外,特征还在于T细胞的抗原受体(TCR)识别蛋白质片段,而NKT细胞的抗原受体识别糖脂。

[0004] 已知生物体中存在多种鞘糖脂。生物体中常见的鞘糖脂中,各种糖或糖链通过β-键与神经酰胺连接,存在于各种器官的细胞膜中。

[0005] 另一方面,已知通过α键与神经酰胺连接的糖鞘脂具有强力的免疫刺激作用和抗肿瘤活性。以agelasphins类为代表的α-半乳糖神经酰胺是从一种海绵Agelas mauritianus的提取液中分离出的糖脂,被报道强力激活NKT细胞(非专利文献5)。α-半乳糖神经酰胺被以树突状细胞(DC)等为代表的抗原呈递细胞(APC)摄取后,通过类似于主要组织相容性复合体(MHC)I类分子的CD1d分子呈递到细胞膜上。NKT细胞通过使用NKT细胞固有的抗原受体识别由此呈递的CD1d分子和α-半乳糖神经酰胺的复合体而被激活,并引发各种免疫反应。

[0006] 迄今为止,已经合成了各种类似物,并研究了其结构和活性之间的相关性。在一系列合成类似物中,麒麟啤酒株式会社(Kirin Brewery Company,Limited)开发的KRN7000(α-GalCer)显示出非常强的抗肿瘤活性,此外,清楚的是相应的β-形式(β-GalCer)中未发现免疫刺激活性(非专利文献6)。KRN7000是半乳糖以α构型与神经酰胺结合而成的鞘糖脂,其中,神经酰胺是通过用长链脂肪酸酰化鞘氨醇碱基而形成的。

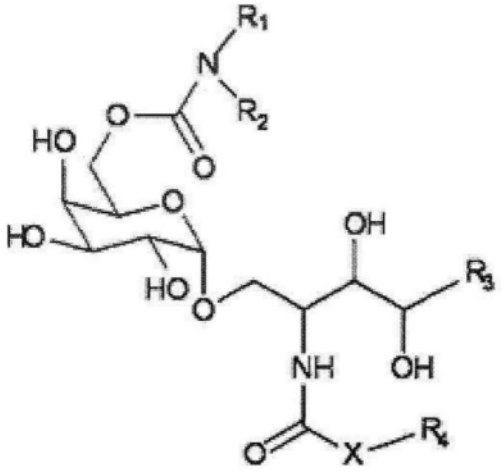
[0007] 

KRN7000 (α-GalCer)

[0008] 近年来,此类NKT细胞的功能受到关注,并且已经开发出含有KRN7000作为活性成分的癌症治疗药物。然而,通过施用KRN7000激活的NKT细胞在产生IFN-γ(可用于癌症和感染症治疗并诱导免疫刺激活性的细胞因子)的同时,还会产生诱导免疫抑制作用的细胞因子IL-4。其结果是,两者的效果相互抵消,存在对癌症、感染症治疗无法获得充分效果的问题。

[0009] 为了治疗癌症和感染症,已经开发了许多α-GalCer衍生物,其强力激活NKT细胞并相对于IL-4优先产生IFN-γ(专利文献1和2)。

[0010] 专利文献1中记载了下述通式所示的化合物或其盐。

[0011] 

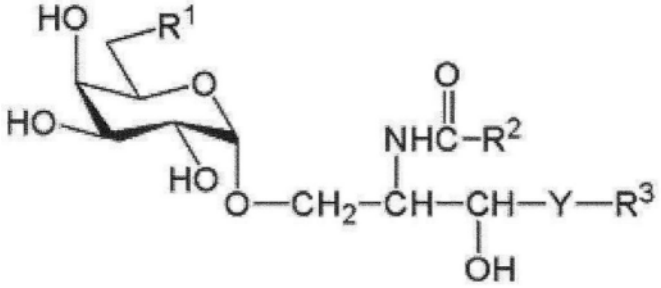
[0012] (式中,X表示亚烷基或-NH-;

[0013] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

[0014] $R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

[0015] $R_4$表示碳原子数1~30的烃基)。

[0016] 专利文献2中记载了下述通式所示的化合物或其盐。

[0017] 

[0018] [式中,$R^1$表示氢原子、碳原子数1~7的烷基、碳原子数1~6的烷氧基或卤素原子,$R^2$和$R^3$各自独立地表示碳原子数1~28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-

CH＝CH-]。但是,当$R^1$为氢原子时,$R^2$表示碳原子数24～28的取代或未取代的烃基。]

[0019] α-GalCer等NKT细胞配体是糖脂,因此如果直接施用于生物体,通过疏水基团形成胶束(micelle),使其无法有效到达靶细胞并且不会发挥效果,但是清楚的是,通过呈递在抗原呈递细胞以进行施用的细胞疗法可以发挥强力的抗肿瘤效果。

[0020] 基于上述研究,通过施用脉冲NKT细胞配体(糖脂)后的抗原呈递细胞(APC)制剂(细胞制剂),进行了人工激活生物体内的NKT细胞的癌症治疗药的临床试验,获得了有效性极其高的效果(非专利文献7～9)。

[0021] 然而,尽管上述细胞制剂已被证明是有效的,但也被指出了各种问题(例如异体细胞制剂引起过敏反应的风险、自体细胞细胞分离的复杂性以及患者细胞制剂的冻融不稳定性等)。事实上,细胞制剂的制造过程中,需要极其多的时间和烦杂的操作以及高额的费用,如需要细胞分离和纯化、细胞分化培养、脉冲培养、细胞制剂的冷冻和解冻以及施用前去除死细胞聚集体等。此外,如果多次施用异体细胞制剂,则存在发生过敏反应的风险。因此,期望开发一种不使用细胞的新概念的含有NKT细胞配体的制剂。

[0022] 另外,恶性肿瘤由于是由自身组织产生的细胞,与病原体不同,不具有激活NKT细胞的佐剂物质,因此无法激活对于诱导长期免疫记忆所必需的NKT细胞,诱导和维持针对恶性肿瘤的免疫记忆是困难的。因此,期望开发一种能够诱导和维持针对恶性肿瘤的免疫记忆的制剂。

[0023] 现有技术文献

[0024] 专利文献

[0025] 专利文献1:WO2013/162016

[0026] 专利文献2:WO2009/119692

[0027] 非专利文献

[0028] 非专利文献1:Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1998,95,5690-5693

[0029] 非专利文献2:J.Immunol.1995,155,2972-2983

[0030] 非专利文献3:J.Immunol.1998,161,3271-3281

[0031] 非专利文献4:Science,1997,278,1623-1626

[0032] 非专利文献5:Science,1997,278,1626-1629

[0033] 非专利文献6:J.Med.Chem.1995,38,2176-2187

[0034] 非专利文献7:J Immunol 1999;163:2387-2391

[0035] 非专利文献8:Ishikawa等人,Clin Cancer Res.11:1910-1917,2005,269

[0036] 非专利文献9:Motohashi等人,J Immunol.182:2492-501,2009

## 发明内容

[0037] 发明解决的问题

[0038] 本发明的目的在于提供一种含有NKT细胞配体的制剂,其能够人工激生物体内的NKT细胞。

[0039] 另外,本发明的目的在于提供一种含有NKT细胞配体的制剂,其通过人工激活患有恶性肿瘤的生物体内的NKT细胞,诱导并维持针对恶性肿瘤的长期免疫记忆,并通过针对恶性肿瘤的免疫记忆来持续攻击恶性肿瘤,从而能够控制恶性肿瘤的进展、复发和转移。

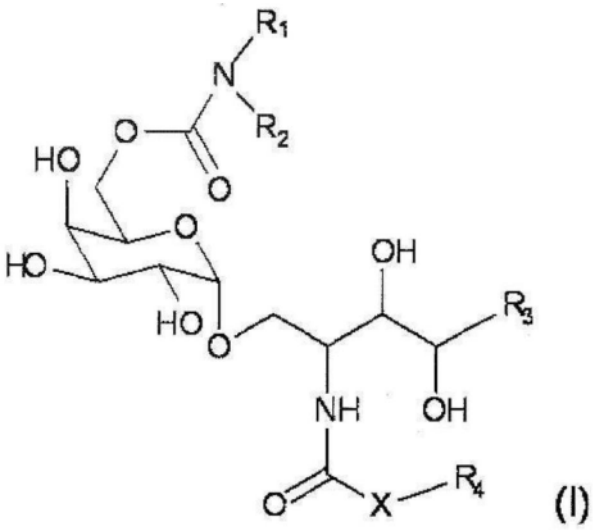
[0040] 此外,本发明的目的在于提供一种含有NKT细胞配体的制剂,其即使在感染症中,也能够诱导和维持针对病原体的长期免疫记忆,并且能够作为佐剂治疗和预防感染症。

[0041] 解决问题的方法

[0042] 本发明的发明人针对上述问题进行了深入研究,发现通过使脂质体中含有作为NKT细胞配体的下述糖脂并将其施用于生物体内,可以有效地到达生物体内的抗原呈递细胞,由此人工激活NKT细胞,通过激活的NKT细胞产生的IFN-γ,激活和增殖先天性和获得性免疫系统免疫细胞,并可以诱导长期免疫记忆。基于该见解进一步进行研究,从而完成了本发明。即,本发明如下述。

[0043] [1]一种脂质体组合物,其含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂(NKT细胞配体)。

[0044] 式(I):

[0045] 

(I)

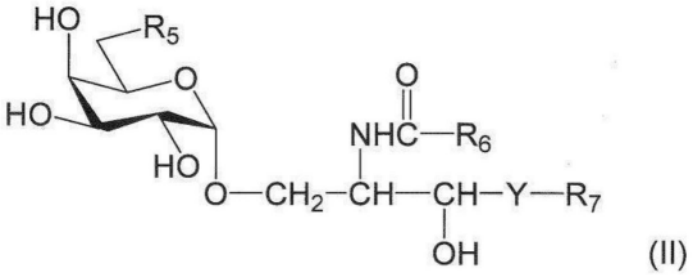
[0046] [式中,X表示亚烷基或-NH-;

[0047] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

[0048] $R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

[0049] $R_4$表示碳原子数1~30的烃基。]

[0050] 式(II):

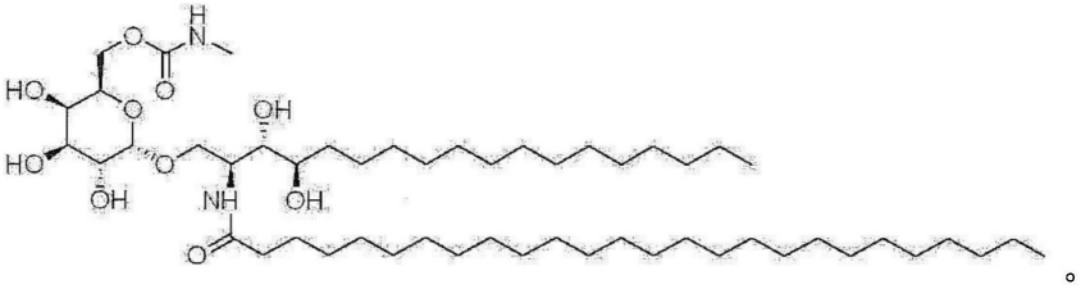
[0051] 

(II)

[0052] [式中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1~7的烷基、碳原子数1~6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1~28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。]

[0053] [2]根据上述[1]所述的组合物,其中,所述糖脂为式(I)所示的化合物或其盐。

[0054] [3]根据上述[2]所述的组合物,其中,所述糖脂为下式所示的化合物或其盐;

[0055] 

[0056] [4]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其为抗恶性肿瘤剂或抗感染症剂。

[0057] [5]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其为NKT细胞激活剂。

[0058] [6]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其为IFN-γ产生诱导剂。

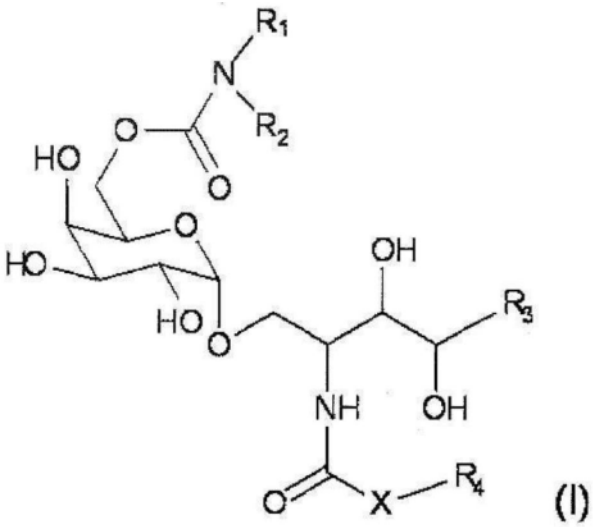
[0059] [7]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其为先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞的激活剂。

[0060] [8]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其为长期免疫记忆诱导剂。

[0061] [9]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其用于将所述糖脂递送至抗原呈递细胞。

[0062] [10]一种将糖脂递送至抗原呈递细胞的方法,其包括向受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂(NKT细胞配体)的脂质体组合物。

[0063] 式(I):

[0064] 

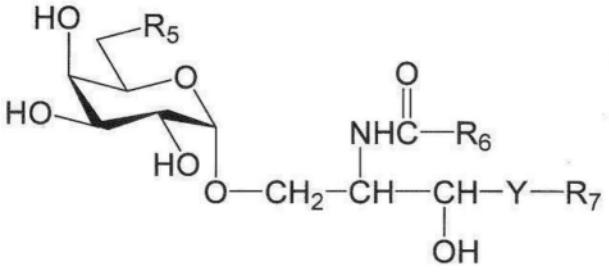
[0065] [式中,X表示亚烷基或-NH-;

[0066] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

[0067] $R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

[0068] $R_4$表示碳原子数1~30的烃基。]

[0069] 式(II):

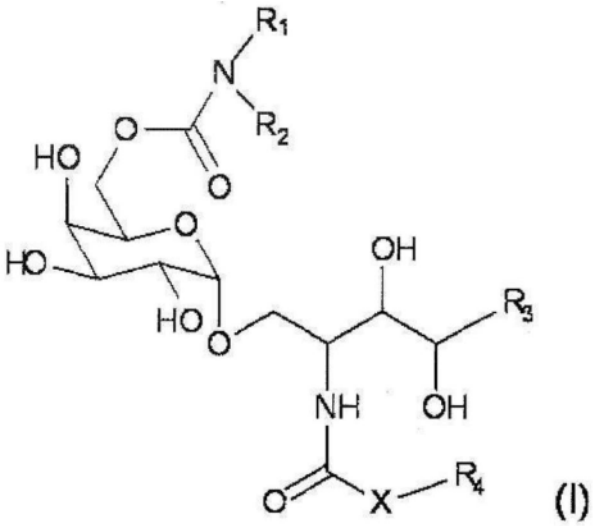
[0070] 

(II)

[0071] [式中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1～7的烷基、碳原子数1～6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1～28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。]

[0072] [11]一种治疗恶性肿瘤或感染症的方法,其包括向受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物。

[0073] 式(I):

[0074] 

(I)

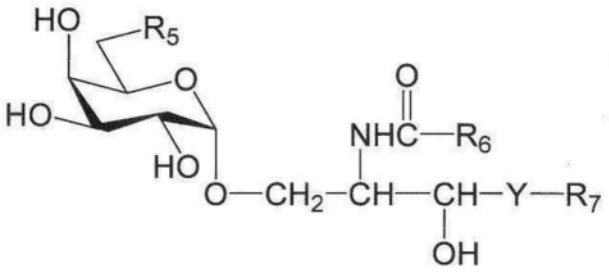
[0075] [式中,X表示亚烷基或-NH-;

[0076] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5～6元环;

[0077] $R_3$表示碳原子数1～20的烃基;

[0078] $R_4$表示碳原子数1～30的烃基。]

[0079] 式(II):

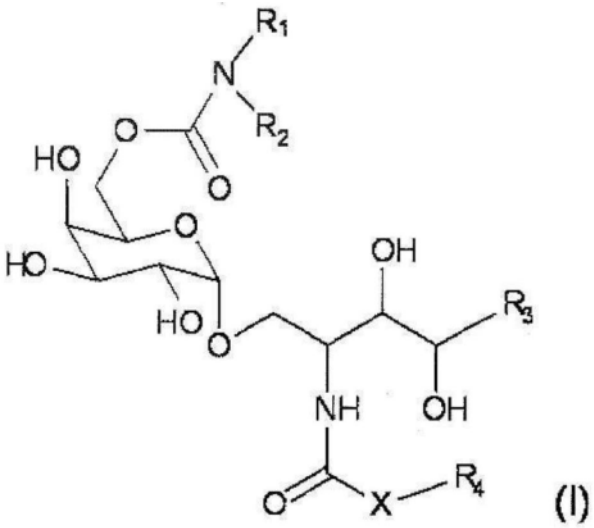
[0080] 

(II)

[0081] [式中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1～7的烷基、碳原子数1～6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1～28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。]

[0082] [12]一种在受试者中激活NKT细胞的方法,其包括向该受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物。

[0083] 式(I):

[0084] 

(I)

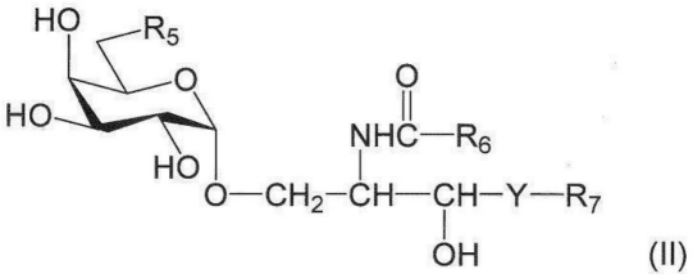
[0085] [式中,X表示亚烷基或-NH-;

[0086] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

[0087] $R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

[0088] $R_4$表示碳原子数1~30的烃基。]

[0089] 式(II):

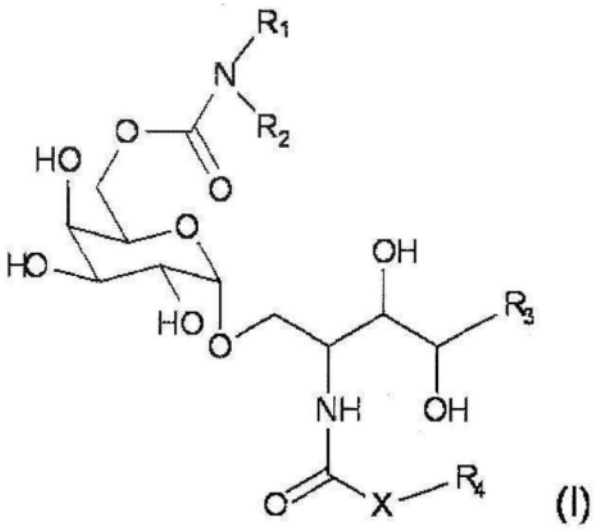
[0090] 

(II)

[0091] [式中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1~7的烷基、碳原子数1~6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1~28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。]。

[0092] [13]一种在受试者中诱导IFN-γ产生的方法,其包括向该受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物。

[0093] 式(I):

[0094] 

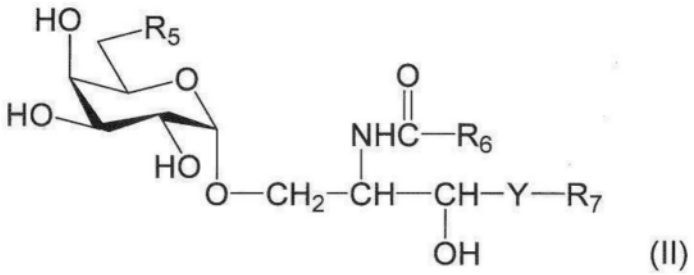
[0095] [式中,X表示亚烷基或-NH-;

[0096] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

[0097] $R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

[0098] $R_4$表示碳原子数1~30的烃基。]

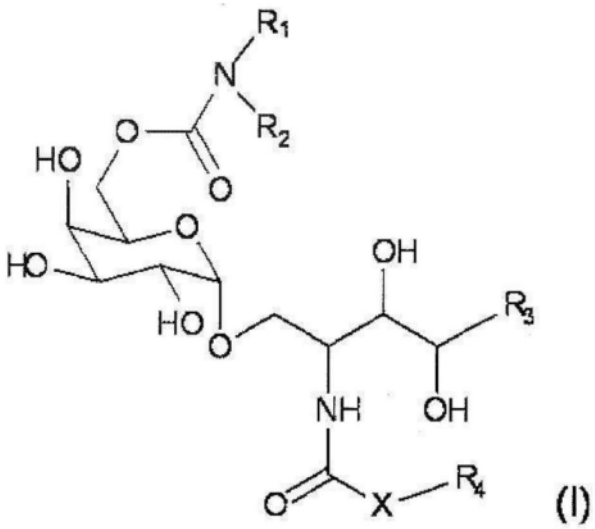
[0099] 式(II):

[0100] 

[0101] [式中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1~7的烷基、碳原子数1~6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1~28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。]。

[0102] [14]一种激活受试者中的先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞的方法,其包括向该受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物。

[0103] 式(I):

[0104] 

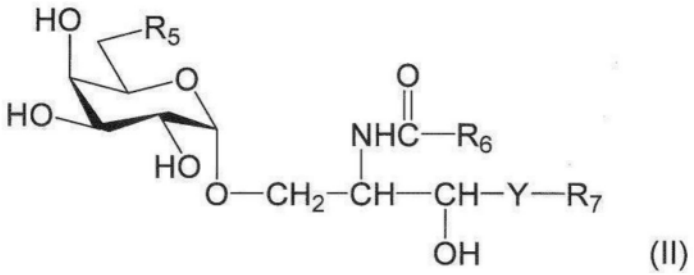
[0105] [式中,X表示亚烷基或-NH-;

[0106] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5～6元环;

[0107] $R_3$表示碳原子数1～20的烃基;

[0108] $R_4$表示碳原子数1～30的烃基。]

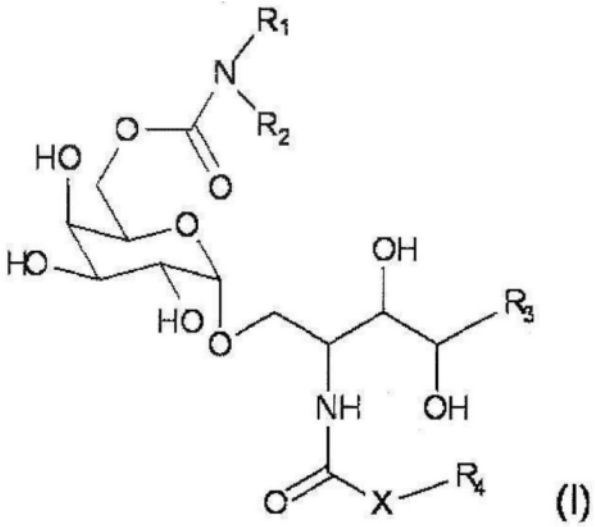
[0109] 式(II):

[0110] 

[0111] [式中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1～7的烷基、碳原子数1～6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1～28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。]

[0112] [15]一种在受试者中诱导长期免疫记忆的方法,其包括向该受试者施用含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物;

[0113] 式(I):

[0114] 

(I)

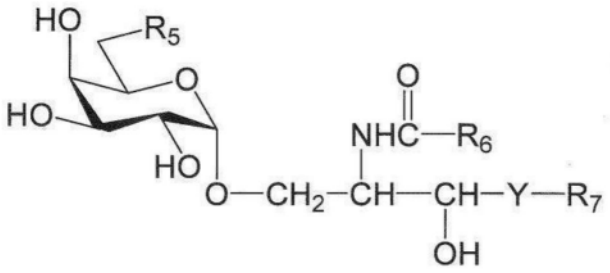
[0115] [式中,X表示亚烷基或-NH-;

[0116] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5～6元环;

[0117] $R_3$表示碳原子数1～20的烃基;

[0118] $R_4$表示碳原子数1～30的烃基。]

[0119] 式(II):

[0120] 

(II)

[0121] [式中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1～7的烷基、碳原子数1～6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1～28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。]

[0122] [16]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其用于在所述糖脂向抗原呈递细胞的递送中使用。

[0123] [17]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其用于在治疗恶性肿瘤或感染症中使用。

[0124] [18]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其用于在激活NKT细胞中使用。

[0125] [19]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其用于在诱导IFN-γ产生中使用。

[0126] [20]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其用于在激活先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞中使用。

[0127] [21]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其用于在诱导长期免疫记忆中使用。

[0128] [22]根据上述[1]至[3]中任一项所述的组合物,其用作药物。

[0129] 发明效果

[0130] 本发明的含有选自由式(I)所示的化合物、式(II)所示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物(以下也称为本发明的脂质体组合物)通过施用于生物体内(特别是患有恶性肿瘤的生物体或携带感染症病原体的生物体),可以有效地递送至生物体内的抗原呈递细胞,由此人工激活NKT细胞,通过由激活的NKT细胞产生的IFN-γ,激活和增殖先天性免疫系统和获得性免疫系统免疫细胞,并可以诱导长期免疫记忆。

[0131] 因此,本发明的脂质体组合物可以用作抗恶性肿瘤剂、抗感染症剂、NKT细胞激活剂、IFN-γ产生诱导剂、先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞的激活剂、以及长期免疫记忆诱导剂。

[0132] 一般来说,癌细胞有两种类型:表达抗原的癌细胞和失去抗原表达的癌细胞,本发明的脂质体组合物可以用激活先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞这两者的细胞群,因此获得性免疫系统淋巴细胞CD8杀伤T细胞攻击前者,先天性免疫系统NK细胞攻击后者,从而可以消除这两种癌细胞。通过激活患者体内的先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫淋巴细胞,进而可以预期增强抗肿瘤效果。

[0133] 另外,据报道,当肿瘤细胞分裂时,会新产生表达突变的癌抗原的癌细胞,常规治疗方法对此无法处理,但本发明的脂质体组合物,还可以在癌组织中激活与突变的癌细胞相对应的获得性免疫系统淋巴细胞,因此也能消除突变的癌细胞。

[0134] 基于下述试验例的结果,可以预期本发明的脂质体组合物(含有NKT细胞配体的脂质体)在向生物体内施用后具有以下效果。

[0135] 1.通过仅静脉内施用极少量的本发明的含有NKT细胞配体(RK-163、RCAI-61、RCAI-137等)的脂质体(1ng/25g小鼠作为RK-163、RCAI-61、RCAI-137的量:换算为体重60kg的人,RK-163、RCAI-61和RCAI-137的量为2.4mg),人工激活存在于肿瘤组织外的生物体内NKT细胞(参见下述的试验例5-1)。事实上,施用本发明的含有NKT细胞配体(RK-163或者RCAI-61或RCAI-137)的脂质体后,人工激活的NKT细胞的数量增加,产生大量作为佐剂物质的IFN-γ,由此,先天性免疫系统和获得性免疫系统免疫细胞群被强烈激活,并且诱导细胞增殖(参见下述的试验例5-1、5-2、6、7、8和9)。此外,已证实本发明的含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体可激活人NKT细胞。

[0136] 2.人工激活的NKT细胞强烈表达趋化因子受体CXCR6,因此通过利用肿瘤组织产生的趋化因子CXCL16的浓度梯度,有效地浸润到癌组织中。未经人工激活的NKT细胞也同样地浸润到肿瘤组织中,但没有确认到IFN-γ的产生。由此也可见,不仅NKT细胞的存在是必要的,而且人工激活也是必要的(参见下述的试验例9的图9中的左图)。

[0137] 3.到达肿瘤组织内的人工激活的NKT细胞释放大量的佐剂物质IFN-γ,强烈激活聚集在癌组织内以攻击肿瘤细胞的先天性免疫系统NK细胞和获得性免疫系统CD8杀伤T细胞、CD4辅助T细胞等,诱导增殖,同时可攻击肿瘤细胞(参见下述试验例9的图9中的右图)。

[0138] 4.与此同时,可诱导负责长期免疫记忆、形成攻击肿瘤细胞的主体的CD8杀伤T细胞群的免疫记忆细胞(参见下述的试验例10和11)。这使得可持续的癌攻击。事实上,在癌抗原存在下,一次施用本发明的含有NKT细胞配体的脂质体,然后不进行处理的状态下放置,一年后进行癌细胞移植实验,移植的癌细胞的增殖被极强地抑制,但在不含NKT细胞配体的脂质体或在缺乏NKT细胞的个体(NKT-KO小鼠)中癌细胞的增殖未受到抑制(参见下述的试

验例12),因此可以说,本发明的含有NKT细胞配体的脂质体对恶性肿瘤的增殖抑制是是依赖于NKT细胞的人工激活的长期免疫记忆诱导的结果。

[0139] 本发明涉及“针对恶性肿瘤的免疫记忆诱导治疗技术”,其包括在患有恶性肿瘤的生物体内有效人工激活NKT细胞,随后激活免疫细胞群并诱导免疫记忆。

[0140] 更具体地,本发明涉及一种引起人工激活患有恶性肿瘤的生物体中NKT细胞的“含有NKT细胞配体的脂质体”的制造方法,一种通过施用该脂质体,在患有恶性肿瘤的生物体中,诱导及维持迄今为止难以诱导及维持的对恶性肿瘤的长期免疫记忆,通过免疫记忆诱导持续的抗肿瘤活性这样的激活患有恶性肿瘤的个体的免疫系统,由此不论恶性肿瘤的种类,所有恶性肿瘤的进展、复发和转移均能控制的治疗恶性肿瘤的药物及其用途等,

[0141] 本发明还涉及在感染症中也诱导和维持病原体的长期免疫记忆,并作为佐剂治疗和与预防感染症的药物(疫苗等)及其用途。

## 附图说明

[0142] 图1表示试验例1-1(左图)和试验例1-2(右图)的结果。图中,#1表示含有RK-163的Captisol溶液,#2～#8表示含有RK-163的脂质体施用组,PBS表示PBS施用组(对照)。

[0143] 图2表示试验例2的结果。图中,RK-LIPO表示含有RK-163的脂质体(#7)施用组,PBS表示PBS施用组(对照)。将右图上半部分的RK-LIPO施用量(换算成RK量)转换成曲线图(右图下半部分),计算出ED50。

[0144] 图3表示试验例3的结果。图中,RK-LIPO表示含有RK-163的脂质体(#7)施用组,RCAI-61-LIPO表示含有RCAI-61的脂质体(#9)施用组,RCAI-137-LIPO表示含有RCAI-137的脂质体(#10)施用组。PBS表示PBS施用组(对照)。

[0145] 图4表示试验例4的结果。图中,RK-LIPO表示含有RK-163的脂质体(#7)施用组,LIPO表示不含RK-163的脂质体施用组(对照),PBS表示PBS施用组(对照)。

[0146] 图5-1表示试验例5-1的结果。图中,RK-LIPO表示含有RK-163的脂质体(#7)施用组,PBS表示PBS施用组(对照)。

[0147] 图5-2表示试验例5-2的结果。图中,RK-LIPO表示含有RK-163的脂质体(#7)施用组,培养基表示培养液(培养基)施用组(对照)。

[0148] 图6表示试验例6的结果。图中,RCAI-61-LIPO表示含有RCAI-61的脂质体(#9)施用组,RCAI-137-LIPO表示含有RCAI-137的脂质体(#10)施用组,PBS表示PBS施用组(对照)。

[0149] 图7表示试验例7的结果。图中,RK-LIPO表示含有RK-163的脂质体(#7)施用组,PBS表示PBS施用组(对照)。

[0150] 图8表示试验例8的结果。图中,左图的RCAI-61-LIPO表示含有RCAI-61的脂质体(#9)施用组,PBS表示PBS施用组(对照)。图中,右图的RCAI-137-LIPO表示含有RCAI-137的脂质体(#10)施用组,PBS表示PBS施用组(对照)。

[0151] 图9表示试验例9的结果。图中,RK-LIPO表示含有RK-163的脂质体(#7)施用组,PBS表示PBS施用组(对照)。

[0152] 图10表示试验例10的结果。图中,RK-LIPO表示含有RK-163的脂质体(#7)施用组。OVA表示假癌抗原。

[0153] 图11表示试验例11的结果。图中,RCAI-61-LIPO表示含有RCAI-61的脂质体(#9)施

用组,RCAI-137-LIPO表示含有RCAI-137的脂质体(#10)施用组。

[0154] 图12表示试验例12的结果。图中,RK-LIPO/WT表示对C57BL/6小鼠施用含有RK-163的脂质体(#7)的组,RK-LIPO/NKT-KO表示对NKT-KO(NKT细胞缺陷)小鼠施用含有RK-163的脂质体(#7)的组(对照),LIPO/WT表示对C57BL/6小鼠施用不含有RK-163的脂质体的组(对照)。

## 具体实施方式

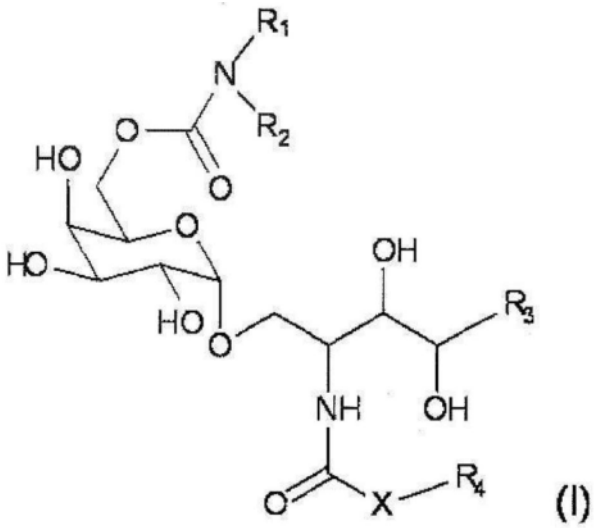
[0155] 下面对本发明进行详细说明。

[0156] [1.糖脂(本发明中的NKT细胞配体)]

[0157] 本发明的脂质体组合物含有选自由以下的式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂。

[0158] 式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐是NKT细胞配体。NKT细胞配体是指呈递在CD1d分子上时,被NKT细胞上的NKT细胞固有的抗原识别受体(NKT细胞受体)特异性识别,并可以特异性激活NKT细胞的化合物。在本说明书中,式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐也统称为“本发明中的NKT细胞配体”。

[0159] 首先,对式(I)表示的化合物(本文中也称为化合物(I))及其盐进行说明。

[0160] 

(I)

[0161] [式中,X表示亚烷基或-NH-;

[0162] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环;

[0163] $R_3$表示碳原子数1~20的烃基;

[0164] $R_4$表示碳原子数1~30的烃基。]

[0165] X表示亚烷基或-NH-。“亚烷基”例如为碳原子数1~8的直链或支链的亚烷基,具体地可列举出亚甲基、亚乙基、三亚甲基、四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基、七亚甲基、八亚甲基、亚丙基、乙基亚乙基、二甲基亚甲基、二甲基三亚甲基等。

[0166] $R_1$和$R_2$相同或不同,表示氢原子、烷基、羟基、烷氧基或任选具有取代基的芳基,$R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成5~6元环。

[0167] “烷基”例如为$C_{1-24}$、更优选为$C_{1-16}$、进一步优选为$C_{1-10}$、特别优选为$C_{1-6}$的直链或支链的烷基,具体地可列举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊

基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基等。作为$R_1$和$R_2$的烷基，优选为$C_{1-6}$烷基(例如甲基、乙基)。

[0168] “烷氧基”例如为$C_{1-24}$、更优选为$C_{1-16}$、进一步优选为$C_{1-10}$、特别优选为$C_{1-6}$的直链或支链的烷氧基，具体地可列举出甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、叔丁氧基等。作为$R_1$和$R_2$的烷氧基，优选为$C_{1-6}$烷氧基(例如甲氧基)。

[0169] “任选具有取代基的芳基”中的“芳基”例如为$C_{6-14}$、更优选$C_{6-12}$的单环至三环的芳基，具体地地可列举出苯基、萘基、蒽基、菲基等。作为$R_1$和$R_2$的芳基，优选为$C_{6-12}$芳基(例如苯基)。作为该“芳基”任选具有的取代基，可列举出卤素原子(例如氯原子、氟原子、溴原子、碘原子)；烷基(例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基)；卤代烷基(例如，三氟甲基)；烷氧基(例如，甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、叔丁氧基)；羟基；氨基；烷基氨基(例如甲氨基、二甲氨基、乙氨基、二乙氨基)；环烷基氨基。取代基的位置和数量没有特别限制，在可取代的位置，任选具有1个～可取代的最大数量的取代基。

[0170] $R_1$和$R_2$任选与相邻的氮原子一起形成的5～6元环，例如为5～6元的含氮饱和杂环，具体地可列举出吡咯烷、哌啶、吗啉、硫代吗啉、哌嗪等。优选的是吡咯烷、哌啶和吗啉。

[0171] $R_3$表示碳原子数1～20的烃基。“碳原子数1～20的烃基”是包含$C_{1-20}$烷基、$C_{2-20}$烯基、$C_{2-20}$炔基、$C_{3-20}$环烷基、$C_{3-20}$环烯基、$C_{6-20}$芳基的概念，可以是直链、支链或环状，或者可以是饱和烃基或不饱和烃基，在分子内或末端任选具有不饱和键。其中，作为$R_3$，优选为$C_{1-20}$烷基、$C_{2-20}$烯基和$C_{2-20}$炔基，更优选为$C_{12-14}$烷基。作为$R_3$，具体地例如，可列举出$-(CH_2)_{13}CH_3$等。

[0172] $R_4$表示碳原子数1～30的烃基。“碳原子数1～30的烃基”是包含$C_{1-30}$烷基、$C_{2-30}$烯基、$C_{2-30}$炔基、$C_{3-30}$环烷基、$C_{3-30}$环烯基、$C_{6-30}$芳基的概念，可以是直链、支链或环状，或者可以是饱和烃基或不饱和烃基，在分子内或末端任选具有不饱和键。其中，作为$R_4$，优选$C_{1-30}$烷基、$C_{2-30}$烯基和$C_{2-30}$炔基，更优选为$C_{10-30}$烷基，更优选为$C_{15-25}$烷基。作为$R_4$，具体地例如，可列举出$-(CH_2)_{15}CH_3$、$-(CH_2)_{23}CH_3$等。

[0173] 由$R_3$和$R_4$表示的烃基任选具有取代基。当$R_3$和$R_4$表示的烃基具有取代基时，作为取代基，可例示出卤素原子(优选氯原子、氟原子)；甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、叔丁氧基等烷氧基(优选碳原子数1～24、更优选碳原子数1～16、进一步优选碳原子数1～10、特别优选碳原子数1～4)，苯氧基等芳氧基(优选碳原子数6～14)；羟基；氨基；甲氨基、二甲氨基、乙氨基、二乙氨基等烷基氨基；环烷基氨基；乙酰氨等烷基羰基氨基；环烷基羰基氨基；苯甲酰氨基等芳基羰基氨基(优选地，芳基羰基氨基，其中芳基部分为碳原子数为6～14的芳基)等的供电子基，进一步地，羧基；烷氧基羰基；酰基(作为酰基，如下所述。优选地，烷基部分为碳原子数1～24的直链或支链的烷基的烷基羰基)；氨基甲酰基；和三氟甲基等吸电子基。取代基的位置和数量没有特别限制，在可取代的位置，任选具有1个～可取代的最大数量的取代基。当存在一个以上取代基时，它们可以相同或不同。

[0174] 在本说明书中“酰基”例如是指甲酰基；烷基-羰基(例如，烷基部分是碳原子数1～24(优选碳原子数1～12)的直链或支链烷基的烷基-羰基(例如，乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、新戊酰基、己酰基))；环烷基-羰基(例如，环烷基部分是碳原子数3～10的环烷基的环烷基-羰基)；烯基-羰基(例如，烯基部分是碳原子数2～12的直链或支链烯基的烯基-羰基(例如，丙烯酰基、甲基丙烯酰基))；芳基-羰基(例如，芳基部分为碳原子数6～14

的芳基的芳基-羰基(例如苯甲酰基、萘甲酰基))等。芳基-羰基中的芳基例如表示单环至三环芳香族烃基,具体地可例示出苯基、萘基、蒽基和菲基。其中,作为酰基,优选甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、萘甲酰基等,更优选乙酰基和苯甲酰基。

[0175] 作为上述烷基氨基和烷基羰基氨基的烷基部分,可例示出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基等直链或支链的烷基(优选碳原子数1～24、更优选碳原子数1～16、进一步优选碳原子数1～10、特别优选碳原子数1～4)。作为上述环烷基氨基和环烷基羰基氨基的环烷基部分,可例示出环戊基或环己基等环烷基(优选碳原子数3～24、更优选碳原子数3～16、进一步优选碳原子数3～10、特别优选碳原子数3～6)。

[0176] 作为上述烷氧基羰基的烷氧基部分,可例示出与上述烷氧基类似的那些。

[0177] 上述取代基可以进一步在可取代的位置被卤素、烷基、环烷基、烯基、炔基、苯基、烷氧基、羟基、氨基、烷基氨基和环烷基氨基中的至少一种取代。

[0178] 作为该卤素、烷氧基、烷基氨基和环烷基氨基,可例示出与上述烷氧基类似的那些。

[0179] 作为该烷基,可例示出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基等烷基(优选碳原子数1～24,更优选碳原子数1～16,进一步优选碳原子数1～10,特别优选碳原子数1～4)。

[0180] 作为该环烷基,可例示出环戊基和环己基等环烷基(优选碳原子数3～24,更优选碳原子数3～16,进一步优选碳原子数3～10,特别优选碳原子数3～6)。

[0181] 作为该烯基,可例示出乙烯基、丙烯基、丁烯基等烯基(优选碳原子数2～24,更优选碳原子数2～16,进一步优选碳原子数2～10,特别优选碳原子数2～4)。

[0182] 作为该炔基,可例示出乙炔基、炔丙基、丁炔基、戊炔基等炔基(优选碳原子数2～24,更优选碳原子数2～16,进一步优选碳原子数2～10,特别优选碳原子数2～4)。

[0183] 在本发明中,在源自糖(吡喃半乳糖)的环状结构的立体异构体中,采用α-构型。

[0184] 当化合物(I)具有源自糖的环状结构以外的结构(例如,糖的环状结构以外的部分中的不对称碳等)的立体异构体时,任何异构体都包括在本发明中,可以是两种以上的异构体以任意比例的混合物(包括外消旋体)。

[0185] 特别地,在化合物(I)中,存在源自糖的环状结构以外的部分的不对称碳的光学异构体,在本发明中,可以是单一的光学活性体,也可以是两种以上光学活性体以任意比例的混合物(包括外消旋体)。-NHC(=O)X-$R_4$结合的不对称碳优选是S构型。与-NHC(=O)X-$R_4$结合的不对称碳相邻、OH结合的不对称碳优选是R构型。$R_3$结合的不对称碳优选是R构型。

[0186] 作为化合物(I)的盐,优选为药学上可接受的盐,例如,可以列举出盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐等无机酸盐;琥珀酸盐、富马酸盐、乙酸盐、甲磺酸盐、甲苯磺酸盐等有机酸盐;钠盐、钾盐等碱金属盐;镁盐、钙盐等碱土金属盐;铵盐、烷基铵盐等铵盐等。

[0187] 作为化合物(I)或其盐的合适实例,可列举出以下。

[0188] (a)式(I)中,

[0189] X为-$CH_2$-；

[0190] $R_1$和$R_2$相同或不同，为氢原子、$C_{1-6}$烷基、羟基或$C_{1-6}$烷氧基；

[0191] $R_3$为$C_{1-20}$烷基；

[0192] $R_4$为$C_{1-30}$烷基的化合物或其盐。

[0193] (b)式(I)中，

[0194] X为-$CH_2$-；

[0195] $R_1$和$R_2$相同或不同，为氢原子、$C_{1-6}$烷基、羟基或$C_{1-6}$烷氧基；

[0196] $R_3$为$C_{12-14}$烷基；

[0197] $R_4$为$C_{15-25}$烷基的化合物或其盐。

[0198] (c)式(I)中，

[0199] X为-$CH_2$-；

[0200] $R_1$和$R_2$相同或不同，为氢原子、$C_{1-6}$烷基或羟基；

[0201] $R_3$为$C_{12-14}$烷基；

[0202] $R_4$为$C_{15-25}$烷基的化合物或其盐。

[0203] (d)式(I)中，

[0204] X为-$CH_2$-；

[0205] $R_1$和$R_2$相同或不同，为氢原子、甲基或$C_{1-6}$羟基；

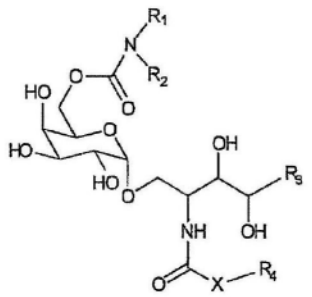
[0206] $R_3$为-$(CH_2)_{13}CH_3$；

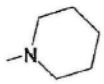
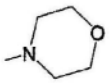
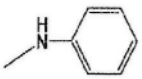
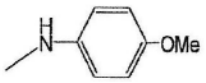
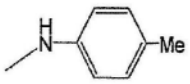
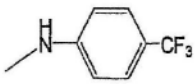
[0207] $R_4$为-$(CH_2)_{23}CH_3$的化合物或其盐。

[0208] 本发明中合适的化合物(I)的具体实例如表1所示，但不限于这些。

[0209] [表1]

[0210]

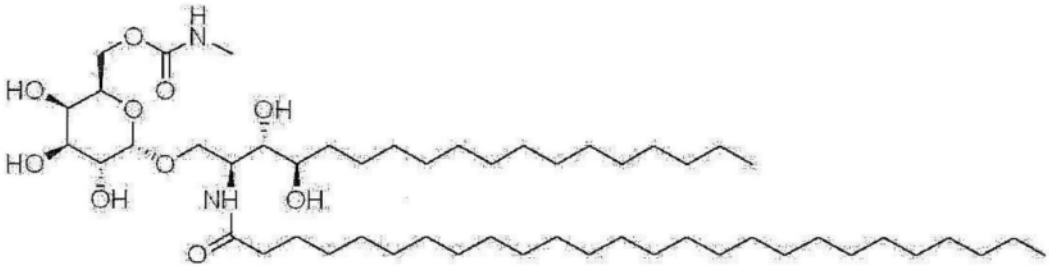


| | -$NR_1R_2$ | -X- | -$R_3$ | -$R_4$ |
|---|---|---|---|---|
| RCAI-123 | -$NMe_2$ | -$CH_2$- | -$C_{14}H_{29}$ | -$C_{24}H_{49}$ |
| RCAI-124 | -NHMe | -$CH_2$- | -$C_{14}H_{29}$ | -$C_{24}H_{49}$ |
| RCAI-137 | -NHOH | -$CH_2$- | -$C_{14}H_{29}$ | -$C_{24}H_{49}$ |
| RCAI-138 | -NHOMe | -$CH_2$- | -$C_{14}H_{29}$ | -$C_{24}H_{49}$ |
| 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- | -$C_{14}H_{29}$ | -$C_{16}H_{33}$ |

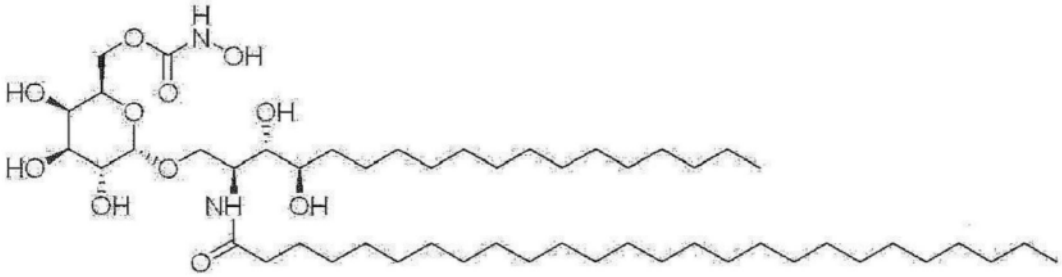
[0211] 在表中,-$C_{14}H_{29}$为-$(CH_2)_{13}CH_3$,-$C_{24}H_{49}$为-$(CH_2)_{23}CH_3$,以及-$C_{16}H_{33}$为-$(CH_2)_{15}CH_3$。

[0212] 其中,优选以下的化合物。

[0213] RCAI-124(在本说明书也称为RK-163)

[0214] 

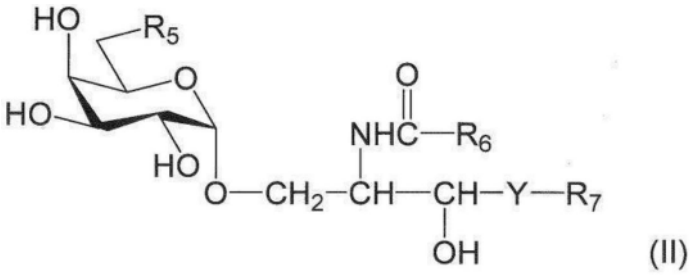
[0215] RCAI-137

[0216] 

[0217] 式(I)表示的化合物或其盐可以通过WO2013/162016A1、US2015/152128A1等中公开的方法来制造。

[0218] 接下来,对式(II)所示的化合物(在本说明书也称为化合物(II))及其盐进行说明。

[0219] 式(II):

[0220] 

[0221] [式中,$R_5$表示氢原子、碳原子数1～7的烷基、碳原子数1～6的烷氧基或卤素原子,$R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1～28的取代或未取代的烃基,Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-。]

[0222] $R_5$表示氢原子、碳原子数1～7的烷基、碳原子数1～6的烷氧基或卤素原子。

[0223] 作为由$R_5$表示的碳原子数1～7的烷基,表示取代或未取代的烷基,可以形成环。例如,可列举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、环丙基甲基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、环己基甲基等,优选甲基、乙基。

[0224] 作为由$R_5$表示的碳原子数1～6的烷氧基,表示取代或未取代的烷基与氧原子键合而成的基团,其烷基部分可以形成环。例如,可列举出甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、环丙氧基、环丙甲氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基、环己氧基等,优选甲氧基、乙氧基和正丙氧基。

[0225] 作为由$R_5$表示的卤素原子,例如,可列举出氟原子、氯原子、溴原子和碘原子,优选氟原子和氯原子。

[0226] $R_6$和$R_7$各自独立地表示碳原子数1～28的取代或未取代的烃基。在本说明书中"烃基"为还包含取代或未取代的碳原子数1～28的烷基、碳原子数2～28的烯基、碳原子数2～

28的炔基、碳原子数3～28的环烷基、碳原子数3～28的环烯基、碳原子数6～14的芳基、碳原子数7～28的芳基烷基(例如$C_{6-14}$芳基-$C_{1-14}$烷基)的概念,可以是直链状、支链状及环状的任何形态,也可以是饱和烃基或不饱和烃基,可以在分子内或末端具有不饱和键。其中,作为$R_6$和$R_7$,优选碳原子数1～28的取代或未取代的烷基、碳原子数7～28的取代或未取代的芳基烷基。

[0227] 但是,$R_5$为氢原子时,$R_6$优选碳原子数24～28的取代或未取代的烃基,更优选碳原子数24～28的取代或未取代的烷基。

[0228] 作为由$R_6$和$R_7$所表示的烃基的取代基,可以例示出卤素原子(优选氯原子、氟原子);甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、叔丁氧基等烷氧基(优选碳原子数1～24,更优选碳原子数1～16,进一步优选碳原子数1～10,特别优选碳原子数1～4);苯氧基等芳氧基(优选碳原子数6～14);羟基;氨基;甲基氨基、二甲基氨基、乙基氨基、二乙基氨基等烷基氨基;环烷基氨基;乙酰胺基等烷基羰基氨基;环烷基羰基氨基;苯甲酰氨基等芳基羰基氨基(优选芳基部分的碳原子数为6～14的芳基的芳基羰基氨基)等供电子基团,进一步地,羧基;烷氧基羰基;酰基(作为酰基,如下所述。优选烷基部分为碳原子数1～24的直链或支链状的烷基的烷基-羰基);氨基甲酰基;三氟甲基等电子吸电子基团。

[0229] 在本说明书中"酰基"例如是指甲酰基;烷基-羰基(例如,烷基部分为碳原子数1～24(优选碳原子数1～12)的直链或支链状的烷基的烷基-羰基(例如,乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁基、戊酰基、新戊酰基、已酰基);环烷基-羰基(例如,环烷基部分为碳原子数3～10的环烷基的环烷基-羰基);烯基-羰基(例如,烯基部分为碳原子数2～12的直链或支链状的烯基的烯基-羰基(例如,丙烯酰基、甲基丙烯酰基);芳基-羰基(例如,芳基部分为碳原子数6～14的芳基的芳基-羰基(例如,苯甲酰基、萘甲酰基)等。芳基-羰基中的芳基例如表示单环～3环的芳香族烃基,具体地可例示出例如苯基、萘基、蒽基、菲基。其中,作为酰基,优选甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、苯甲酰基、萘甲酰基等,更优选乙酰基、苯甲酰基。

[0230] 作为上述烷基氨基、烷基羰基氨基的烷基部分,可例示出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、已基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基等直链或支链状的烷基(优选碳原子数1～24、更优选碳原子数1～16、进一步优选碳原子数1～10、特别优选碳原子数1～4)。

[0231] 作为上述环烷基氨基、环烷基羰基氨基的环烷基部分,可例示出环戊基、环已基等环烷基(优选碳原子数3～24、更优选碳原子数3～16、进一步优选碳原子数3～10、特别优选碳原子数3～6)。

[0232] 作为上述烷氧基羰基的烷氧基部分,可例示出与上述烷氧基类似的那些。

[0233] 上述取代基在可取代位置可进一步地被卤素、烷基、环烷基、烯基、炔基、苯基、烷氧基、羟基、氨基、烷基氨基和环烷基氨基中的至少一种取代。

[0234] 作为该卤素、烷氧基、烷基氨基和环烷基氨基,可例示出与上述类似类似的那些。

[0235] 作为该烷基,可例示出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、已基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基等烷基(优选碳原子数1～24,更优选碳原子数1～16,进

一步碳原子数1～10,特别优选碳原子数1～4)。

[0236] 作为该环烷基,可例示出环戊基、环己基等环烷基(优选碳原子数3～24,更优选碳原子数3～16,进一步优选碳原子数3～10,特别优选碳原子数3～6)。

[0237] 作为该烯基,可例示出乙烯基、丙烯基和丁烯基等烯基(优选碳原子数2～24,更优选碳原子数2～16,进一步优选碳原子数2～10,特别优选碳原子数2～4)。

[0238] 作为炔基,可例示出乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基等炔基(优选碳原子数2～24,更优选碳原子数2～16,进一步优选碳原子数2～10,特别优选碳原子数2～4)。

[0239] 其中,作为$R_6$,优选为取代或未取代的烷基,并且优选为直链状的烷基。作为$R_6$,还优选取代或未取代的芳基烷基。当$R_5$为碳原子数1～7的烷基、碳原子数1～6的烷氧基或卤素原子时,$R_6$的碳原子数优选为18～26,更优选为24～26。当$R_5$为氢原子时,$R_6$的碳原子数优选为24～26。作为$R_6$,具体地例如,可列举出-$(CH_2)_{23}$-$CH_3$、-$(CH_2)_{24}$-$CH_3$、-$(CH_2)_{25}$-$CH_3$、10-(4-氟苯基)癸基等。

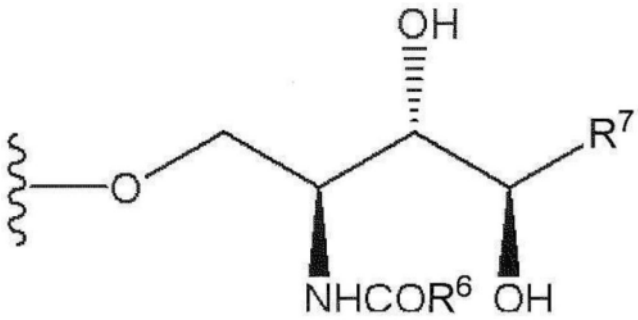
[0240] 此外,作为$R_7$,优选为取代或未取代的烷基,并且优选为直链状的烷基。$R_7$的碳原子数优选为9～20,更优选为12～18。作为$R_7$,具体地例如,可列举出-$(CH_2)_{11}$-$CH_3$、-$(CH_2)_{12}$-$CH_3$、-$(CH_2)_{13}$-$CH_3$、-$(CH_2)_{14}$-$CH_3$、-$(CH_2)_{15}$-$CH_3$,-$(CH_2)_{16}$-$CH_3$、-$(CH_2)_{17}$-$CH_3$等。

[0241] Y表示-$CH_2$-、-CH(OH)-或-CH=CH-,其中优选-CH(OH)-。

[0242] 当化合物(II)具有立体异构体时,任何异构体都包括在本发明中,并且其可以是两种以上的异构体以任何比例的混合物(包括外消旋体)。

[0243] 特别地,在化合物(II)中,存在源自脂质部分的不对称碳的光学异构体,但在本发明中,可以是单一的光学活性体,也可以是两种以上的光学活性体以任何比例的混合物(包括外消旋体)。与-$NHCOR_6$键合的不对称碳优选为S构型。与-$NHCOR_6$键合的不对称碳相邻、具有-OH的不对称碳相对于-$NHCOR_6$键合的不对称碳优选为反式构型。当Y为-CH(OH)-时,Y表示的-CH(OH)-中的不对称碳优选为R构型。

[0244] 作为化合物(II)的脂质部分,可列举出

[0245] 

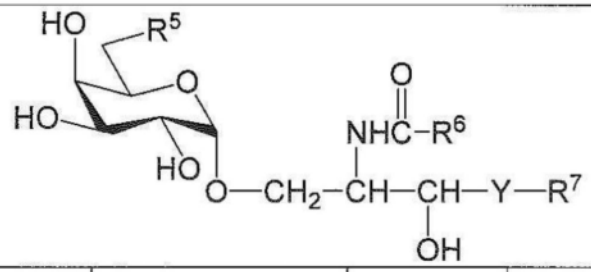
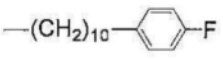

[0246] (式中,各符号表示与上述相同的含义。)等。

[0247] 作为化合物(II)的盐,优选为药学上可接受的盐,例如可以列举出盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐等无机酸盐;琥珀酸盐、富马酸盐、乙酸盐、甲磺酸盐、甲苯磺酸盐等有机酸盐;钠盐、钾盐等碱金属盐;镁盐、钙盐等碱土金属盐;铵盐、烷基铵盐等铵盐。

[0248] 本发明中优选的化合物(II)的具体实例如表2所示,但不限于这些。

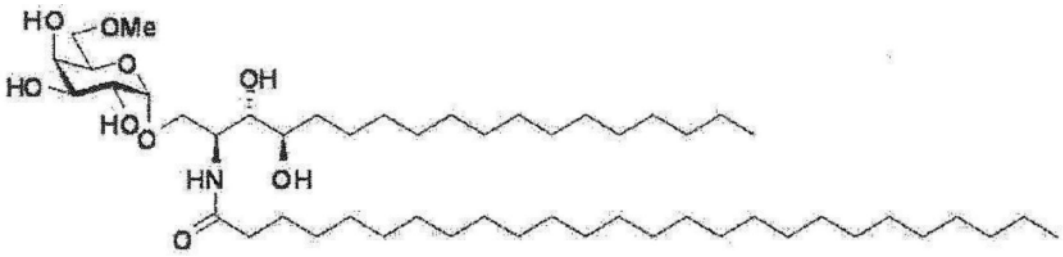
[0249] [表2]

[0250]

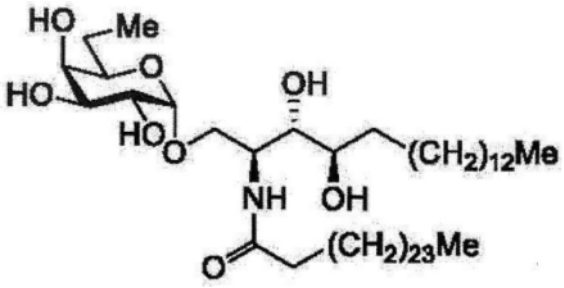
| 化合物No. |  | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $R^5$ | $R^6$ | Y | $R^7$ |
| 2-9' | $-OCH_3$ | $-(CH_2)_{24}CH_3$ | —CH(OH)— | $-(CH_2)_{13}CH_3$ |
| 3-4' | $-CH_3$ | $-(CH_2)_{24}CH_3$ | —CH(OH)— | $-(CH_2)_{13}CH_3$ |
| 3-7' | $-F$ | $-(CH_2)_{24}CH_3$ | —CH(OH)— | $-(CH_2)_{13}CH_3$ |
| 3-10' | $-H$ | $-(CH_2)_{24}CH_3$ | —CH(OH)— | $-(CH_2)_{13}CH_3$ |
| 3-13' | $-OC_2H_5$ | $-(CH_2)_{24}CH_3$ | —CH(OH)— | $-(CH_2)_{13}CH_3$ |
| 3-16' | $-O(CH)_2CH_3$ | $-(CH_2)_{24}CH_3$ | —CH(OH)— | $-(CH_2)_{13}CH_3$ |
| 165' | $-OCH_3$ |  | —CH(OH)— | $-(CH_2)_{13}CH_3$ |

[0251] 其中,优选以下的化合物。

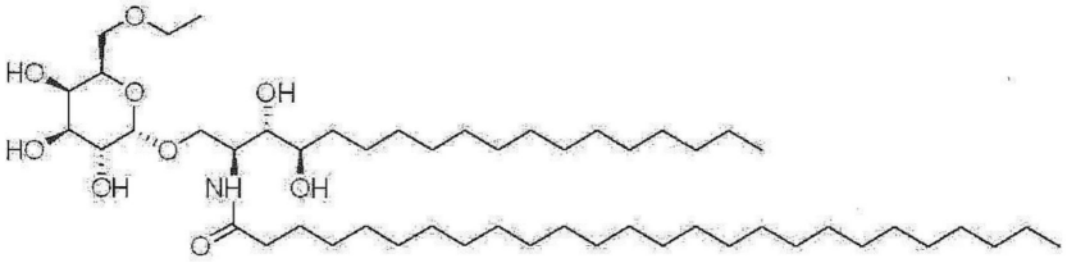
[0252] 由表2的化合物No.2-9'表示的化合物,立体结构由下式表示的化合物(RCAI-61):

[0253] 

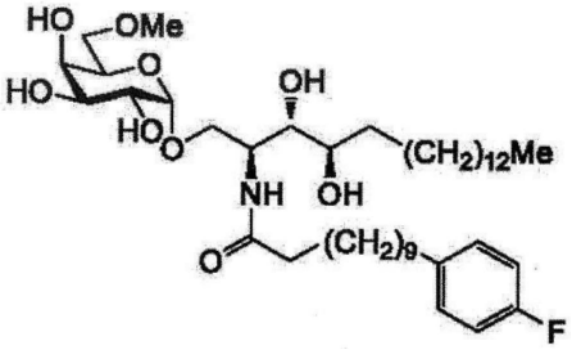
[0254] 由表2的化合物No.3-4'表示的化合物,立体结构由下式表示的化合物(RCAI-64):

[0255] 

[0256] 由表2的化合物No.3-13'表示的化合物,立体结构由下式表示的化合物(RCAI-85):

[0257] 

[0258] 由表2的化合物No.165表示的化合物,立体结构由下式表示的化合物(RCAI-165):

[0259] 

[0260] 由式(II)表示的化合物或其盐可以通过WO2009/119692A1,美国专利No.8551959等中公开的方法来制造。

[0261] 2.脂质体

[0262] 本发明的脂质体组合物中,脂质体中含有上述糖脂。

[0263] 在本说明书中,将具有以脂质为主要成分的封闭囊泡结构的物质(通过包含亲水性区域和疏水性区域的两亲性分子的聚集而获得的水溶性颗粒)称为脂质体。最近,有时称为脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle,LNP),但在本说明书中,脂质体的概念中还包括被称为脂质纳米颗粒的那些,只要它们具有上述结构。

[0264] 在本发明中,作为脂质体成分,可以是能够通过已知方法形成脂质封闭囊泡结构的任何两亲性分子,并且优选地可列举出脂质。作为本发明中的脂质,具有磷脂酰胆碱(例如,二油酰磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、磷脂酰甘油(例如,二油酰磷脂酰甘油、二月桂酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰甘油)、磷脂酰乙醇胺(例如,二油酰磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺)、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、心磷脂等磷脂、鞘糖脂、甘油糖脂、阳离子脂质(例如DOTAP、DLin-MC3-DMA((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,

28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯),ALC-0315([(4-羟基丁基)氮烷二基]双(己烷-6,1-二基))双(2-己基癸酸酯))、SM-102(十七烷-9-基8-((2-羟乙基)(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯))等,可将这些单独或二种以上地使用,或与胆固醇等非极性物质或聚乙二醇等水溶性聚合物与脂质结合的脂质衍生物等组合使用,以制作脂质体。

[0265] 在本发明中,脂质体优选为对抗原呈递细胞具有亲和性的脂质体。

[0266] 在本发明中,作为脂质体(对抗原呈递细胞具有亲和性的脂质体的实例)的优选实例,可列举出下述的脂质体(#2)～(#8)。

[0267] (#2)含有DOTAP、DOPE和胆固醇的脂质体

[0268] 在脂质体(#2)中,DOTAP、DOPE、胆固醇的重量比(DOTAP:DOPE:胆固醇)例如为1:0.1～10:0.1～10,优选1:0.3～3:0.2～2。

[0269] 当在本发明的脂质体组合物中使用脂质体(#2)时,“本发明中的NKT细胞配体”与“DOTAP、DOPE、胆固醇的总和”的重量比例如为1:1～10,000,优选1:1～1,000。

[0270] 作为使用脂质体(#2)的本发明的脂质体组合物的一个方式,例如可列举出下述的含有RK-163的脂质体(#2)。

[0271] (#3)含有DOTAP、DOPE、MPEG2000-DMPE,Na盐和胆固醇的脂质体

[0272] 在脂质体(#3)中,DOTAP、DOPE、MPEG2000-DMPE,Na盐、胆固醇的重量比(DOTAP:DOPE:MPEG2000-DMPE,Na盐:胆固醇)例如为1:0.1～10:0.1～10:0.1～10,优选1:0.3～3:0.2～2:0.2～2。

[0273] 当在本发明的脂质体组合物中使用脂质体(#3)时,“本发明中的NKT细胞配体”与“DOTAP、DOPE、MPEG2000-DMPE,Na盐、胆固醇的总和”的重量比例如为1:1～10,000,优选1:1～1,000。

[0274] 作为使用脂质体(#3)的本发明的脂质体组合物的一个方式,例如可列举出下述的含有RK-163的脂质体(#3)。

[0275] (#4)含有DOTAP、DOPE、MPEG2000-DSPE,Na盐和胆固醇的脂质体

[0276] 在脂质体(#4)中,DOTAP、DOPE、MPEG2000-DSPE,Na盐、胆固醇的重量比(DOTAP:DOPE:MPEG2000-DSP,Na盐:胆固醇)例如为1:0.1～10:0.1～10:0.1～10,优选1:0.3～3:0.2～2:0.2～2。

[0277] 当在本发明的脂质体组合物中使用脂质体(#4)时,“本发明中的NKT细胞配体”与“DOTAP、DOPE、MPEG2000-DSPE,Na盐、胆固醇的总和”的重量比例如为1:1～10,000,优选1:1～1,000。

[0278] 作为使用脂质体(#4)的本发明的脂质体组合物的一个方式,例如可列举出下述的含有RK-163的脂质体(#4)。

[0279] (#5)含有HSPC、DSPG和胆固醇的脂质体

[0280] 在脂质体(#5)中,HSPC、DSPG、胆固醇的重量比(HSPC:DSPG:胆固醇)例如为1:0.1～10:0.1～10,优选1:0.2～2:0.2～2。

[0281] 当在本发明的脂质体组合物中使用脂质体(#5)时,“本发明中的NKT细胞配体”与“HSPC、DSPG、胆固醇的总和”的重量比例如为1:1～10,000,优选1:1～1,000。

[0282] 作为使用脂质体(#5)的本发明的脂质体组合物的一个方式,例如可列举出下述的含有RK-163的脂质体(#5)。

[0283] (#6)含有HSPC、DOPS和胆固醇的脂质体

[0284] 脂质体(#6)和下述的脂质体(#7)具有相同的组成,但是当用于制造含有NKT细胞配体的脂质体时,前者是相对于NKT细胞配体,混合较多的方式的例子,后者是相对于NKT细胞配体,混合较少的方式的例子。

[0285] 在脂质体(#6)中,HSPC、DOPS、胆固醇的重量比(HSPC:DOPS:胆固醇)例如为1:0.1～10:0.1～10,优选1:0.2～2:0.2～2。

[0286] 当在本发明的脂质体组合物中使用脂质体(#6)时,“本发明中的NKT细胞配体”与“HSPC、DOPS和胆固醇的总和”的重量比例如为1:1～100,000,优选1:1～10,000。

[0287] 作为使用脂质体(#6)的本发明的脂质体组合物的一个方式,例如可列举出下述的含有RK-163的脂质体(#6)。

[0288] (#7)含有HSPC、DOPS和胆固醇的脂质体

[0289] 在脂质体(#7)中,HSPC、DOPS、胆固醇的重量比(HSPC:DOPS:胆固醇)例如为1:0.1～10:0.1～10,优选1:0.2～2:0.2～2。

[0290] 当在本发明的脂质体组合物中使用脂质体(#7)时,“本发明中的NKT细胞配体”与“HSPC、DOPS和胆固醇的总和”的重量比例如为1:1～10,000,优选1:1～1,000。

[0291] 作为使用脂质体(#7)的本发明的脂质体组合物的一个方式,例如可列举出下述的含有RK-163的脂质体(#7)、含有RCAI-61的脂质体(#9)、含有RCAI-137的脂质体(#10)。

[0292] (#8)含有HSPC、MPEG2000-DSPE,Na盐和胆固醇的脂质体在脂质体(#8)中,HSPC、MPEG2000-DSPE,Na盐、胆固醇的重量比(HSPC:MPEG2000-DSPE,Na盐:胆固醇)例如为1:0.1～10:0.1～10,优选1:0.2～2:0.2～2。

[0293] 当在本发明的脂质体组合物中使用脂质体(#8)时,“本发明中的NKT细胞配体”与“HSPC、MPEG2000-DSPE,Na盐和胆固醇的总和”的重量比例如为1:1～10,000,优选1:1～1,000。

[0294] 作为使用脂质体(#8)的本发明的脂质体组合物的一个方式,例如可列举下述的含有RK-163的脂质体(#8)。

[0295] 在本发明中,上述脂质体中,优选(#5)～(#8),更优选(#7)和(#8),进一步优选(#7)。

[0296] 3.含有糖脂(本发明中的NKT细胞配体)的脂质体组合物(本发明的脂质体组合物)

[0297] 构成本发明的脂质体组合物的脂质体可以根据已知的方法来制备。例如可以使用Liposome Technology,第1卷,第2版(Gregory Gregoriadis,CRC Press,Boca Raton,Ann Arbor,London,Tokyo),第4章,第67-80页,第10章,第167-184页和第17章,第261页-276(1993))。更具体地,可列举出超声波处理法、乙醇注射法、弗氏压碎法、乙醚注射法、胆酸法、钙融合法、冻融法、反相蒸发法等,但不限于这些。

[0298] 具体地,如实施例所示,将脂质体成分和NKT细胞配体分别溶解在玻璃试验管中的有机溶剂中,通过向其喷氮气而使有机溶剂蒸发,并在干燥器(减压)中使其完全干燥。将等渗水性溶剂(例如9％蔗糖水溶液、5％葡萄糖水溶液、磷酸盐缓冲盐水等)加入到该干燥后的材料中,并通过用均质器等进行乳化,可以得到含有NKT细胞配体的脂质体(本发明的脂质体组合物)。此外,通过使用并在加热和加压下通过聚碳酸酯膜过滤器(孔径:0.4μm或0.2μm),可以获得具有均匀粒径的脂质体。最后,为了保证无菌,也可以通过普通的过滤灭菌用

过滤器(孔径:0.22μm;例如PVDF膜过滤器)。

[0299] 在本发明的脂质体组合物中,“选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂(本发明中的NKT细胞配体)”和“构成脂质体的(主要药物NKT细胞配体以外的)其他脂质的总和”例如为1:1～100,000,优选1:1～10,000,更优选1:1～1,000,进一步优选1:1～100。

[0300] 本发明的脂质体组合物的平均粒径没有特别限制,例如为10～1000nm,优选为10～500nm,更优选为50～500nm。平均粒径可以通过通常的准弹性光散射法来测定。

[0301] 本发明的脂质体组合物可以单独使用或通过本领域已知的方法与常用的药学上可接受的添加剂(例如,溶剂、稳定剂、等渗剂、舒缓剂、缓冲剂、pH调节剂)一起配制和使用。

[0302] 本发明的脂质体组合物优选配制为静脉注射剂。当本发明的脂质体组合物为注射剂等液体制剂时,可以通过冷冻保存或冷冻干燥除去水分后保存。冻干制剂在使用时加入注射用蒸馏水等再溶解后使用。

[0303] 本发明的脂质体组合物可以用作药物的活性成分。

[0304] 本发明的脂质体组合物作为抗恶性肿瘤剂是有效的。

[0305] 作为该“恶性肿瘤”,例如可列举出肝癌、食道癌、胃癌、胆道癌、胰腺癌、大肠癌(colorectal cancer)、乳腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、肾盂癌和输尿管癌(renal pelvic and ureteral cancer)、阴茎癌、腹膜后肿瘤、肾上腺癌、头颈癌、甲状腺癌、卵巢癌、子宫癌、皮肤癌、恶性淋巴瘤、脑肿瘤、恶性黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、脉络膜黑色素瘤、眼内淋巴瘤、眼睑肿瘤、泪腺癌、眼附属器淋巴瘤、眼眶肉瘤、视神经肿瘤、毛细胞型星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、室管膜瘤、神经节胶质瘤、中枢神经细胞癌、髓母细胞瘤、胚胎瘤、中枢神经系统恶性淋巴瘤、脑膜瘤、神经鞘瘤、垂体腺瘤、颅咽管瘤、脊索瘤、血管母细胞瘤、表皮样瘤、神经母细胞瘤、口腔癌、舌癌、腺样囊性癌、耳癌、头颈肉瘤、男性乳腺癌、特殊型乳腺癌、恶性心包间皮瘤、恶性胸膜间皮瘤、胸腺瘤、纵隔肿瘤、肺神经内分泌肿瘤、恶性腹膜间皮瘤、肛门癌、胃肠道神经内分泌肿瘤、小肠癌、胃肠道膜肿瘤、胰腺/胃肠道神经内分泌肿瘤、嗜铬细胞瘤、肾上腺皮质癌、副神经节瘤、恶性睾丸鞘膜间皮瘤、睾丸鞘膜肿瘤、外阴癌、子宫肉瘤、阴道癌、脐尿管癌、腹膜癌、腹膜后肉瘤、恶性黑色素瘤、基底细胞癌、乳房外佩吉特病、皮肤血管肉瘤、皮肤肿瘤、汗腺癌、皮脂腺癌、默克尔细胞癌,鳞状细胞癌,子宫肉瘤,骨肉瘤,横纹肌瘤,尤因肉瘤,心内膜肉瘤,血管肉瘤,躯干肉瘤,硬纤维瘤,头颈肉瘤,软组织肉瘤,骨囊肿,颧骨骨瘤,内生软骨瘤,骨软骨瘤,骨巨细胞瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、黏液纤维肉瘤、脂肪肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、恶性周围神经鞘瘤、上皮样肉瘤、透明细胞肉瘤、滑膜肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、腺泡状软组织肉瘤、隆突性皮肤纤维肉瘤、成人T细胞白血病淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻型、伯基特淋巴瘤、皮肤淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、神经母细胞瘤、肾肿瘤、生殖细胞肿瘤、纤维肉瘤、髓样癌、透明细胞肉瘤、回肠癌、外耳道癌、胸腺癌、毛囊癌、少突星形细胞瘤、葡萄膜恶性黑色素瘤、黏液纤维肉瘤、软组织肉瘤、内生软骨瘤、内膜间质肉瘤、内耳道癌、动脉瘤样骨囊肿、中耳道癌、神经胶质瘤、神经纤维瘤、脂肪瘤、十二指肠瘤等。

[0306] 本发明的脂质体组合物作为抗感染症剂是有效的。

[0307] 作为“感染症”,例如可列举出病毒性疾病(例如乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁

型肝炎病毒引起的病毒性肝炎、疱疹、流行性流感、新型冠状病毒、埃博拉出血热、黄热病、狂犬病、寨卡病毒、SARS、MARS、登革热、日本脑炎、脊髓灰质炎、拉沙热、水痘、肺炎球菌、麻疹)、细菌感染病(例如耐药结核病、非典型分枝杆菌感染、霍乱、白喉、伤寒)、真菌病(例如、念珠菌病、弓形虫病、锥虫病)。

[0308] 本发明的脂质体组合物作为NKT细胞激活剂、来自NKT细胞的IFN-γ产生诱导剂、先天性免疫系统淋巴细胞和获得性免疫系统淋巴细胞的激活剂以及长期免疫记忆诱导剂是有效的。

[0309] 本发明的脂质体组合物可以安全地施用于人和非人哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、马、猴、猪等)。

[0310] 本发明的脂质体组合物的施用对象优选为患有恶性肿瘤的人、非人哺乳动物,或患有感染症或具有初期感染证风险的人、非人哺乳动物。本发明的脂质体制剂还可以应用于治疗或预防感染症、恶性肿瘤的转移或复发。

[0311] 由于NKT细胞可以激活生物体内具有直接作用于恶性肿瘤细胞和病原体感染细胞功能的各种免疫细胞(例如,细胞毒性T细胞、NK细胞等),因此本发明的脂质体组合物可以适用于治疗恶性肿瘤和感染症,无论恶性肿瘤或病原体的类型如何。

[0312] 作为本发明的脂质体组合物的给药方法,只要是能够使本发明的脂质体组合物到达存在于患部或其周围的抗原呈递细胞的方法即可,没有特别限制。例如主要地可列举出静脉内施用,进一步可列举出动脉内施用、粘膜内施用、淋巴结内施用、患部组织内施用等。通常,通过静脉内施用脂质体组合物并将其递送至存在许多NKT细胞的肺和肝来人工激活NKT细胞。在一些情况下,可以通过注射针将脂质体组合物直接递送至患者的患病部位,或者通过导管将脂质体组合物施用于动脉。

[0313] 本发明的脂质体组合物的施用量可以根据给药途径、症状的严重程度、患者的年龄、副作用的程度等适当确定。

[0314] 本发明的脂质体组合物的施用量作为“选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂”的量,例如第一次施用为每1Kg体重约12～400ng,优选约40～400ng,将其第一次施用后4周后再次施用相同量,从而为一个疗程。此后,将通过观察过程来追踪CD8免疫记忆T细胞的数量,重复进行“每隔4周施用两次”,目标是将记忆细胞的数量维持在治疗前水平以上。

[0315] 本发明的脂质体组合物通过静脉内施用于生物体内,可以有效地递送至生物体内的抗原呈递细胞(例如树突状细胞)。因此,本发明还涉及“将糖脂递送至抗原呈递细胞的方法,该方法包括将含有选自由式(I)表示的化合物、式(II)表示的化合物及它们的盐组成的组中的糖脂的脂质体组合物施用于受试者”。

[0316] 下面,基于实施例和试验例对本发明进行更详细的说明,但本发明并不限于此。

[0317] 实施例

[0318] 实施例中使用的RK-163、RCAI-61和RCAI-137是由上述化学结构式表示的化合物。

[0319] 本说明书中使用的缩写表示以下含义。

[0320] HSPC:氢化大豆磷脂酰胆碱

[0321] DOTAP:1,2-二油酰氧基-3-三甲基铵丙烷氯化物(1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane chloride)

[0322] DOPE:1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺

[0323] MPEG2000-DMPE,钠盐:N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺,钠盐

[0324] MPEG2000-DSPE,钠盐:N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺,钠盐

[0325] DSPG:1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)

[0326] DOPS:1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸

[0327] PEG:聚乙二醇

[0328] PS:磷脂酰丝氨酸

[0329] OVA:卵清蛋白

[0330] PBS:磷酸盐缓冲盐水

[0331] [#1样品(含有RK-163的Captisol水溶液(#1))的制备]

[0332] 使用表3所示的试剂和成分,根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#1样品。

[0333] (所制备样品的组成)

[0334] • 用于安全性试验

[0335] 9%蔗糖水溶液中的15ng/mL RK-163、177ng/mL Captisol

[0336] • 用于主要药理学试验

[0337] 9%蔗糖水溶液中的1.5ng/mL RK-163、17.7ng/mL Captisol

[0338] [[表3]

[0339]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| Captisol | CyDex Pharmaceuticals. Inc. | - | NC-04A-170167 |

[0340]

| (商品名) | | | |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | 和光纯药工业株式会社(※) | 038-02606 | ESL3428 |
| 甲醇 | 和光纯药工业株式会社 | 130-16585 | APF2160 |
| RK-163 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | F-01 |
| 9%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为9%的方式溶解,通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0341] ※和光纯药工业株式会社:现为富士胶片和光纯药株式会社,以下相同

[0342] (制备方法)

[0343] • 用于安全性试验

[0344] 将RK-163以100ng/mL溶解在甲醇:氯仿=1:2(体积比)的溶液中。将1.5mL该溶液放入玻璃瓶中,加热的同时吹入氮气来进行干燥,然后静置在干燥器中。另外,将Captisol以177ng/mL溶解在蔗糖水溶液中,并添加10mL到装有干燥的RK-163的玻璃瓶中以溶解RK-

163。将溶液通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器,并于4℃下保存于带螺帽的玻璃瓶中。将该溶液作为#1样品(用于安全性试验)。

[0345] • 用于主要药理学试验

[0346] 取1mL#1样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中,并向其中加入9mL9%蔗糖水溶液,进行混合稀释。再将溶液通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器,并于4℃保存于带螺帽的玻璃瓶中。将该溶液作为#1样品(用于主要药理学试验)。

[0347] [#2样品(含有RK-163的脂质体(#2))的制备]

[0348] 使用表4所示的试剂和成分,根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#2样品。

[0349] (所制备样品的组成)

[0350] • 用于安全性试验

[0351] 9%蔗糖水溶液中的15ng/mL RK-163、203ng/mL总脂质(RK-163以外的全部脂质;以下相同)

[0352] 脂质组成:DOTAP 91.7ng/mL,DOPE 73.2ng/mL,胆固醇38.1ng/mL

[0353] • 用于主要药理学试验

[0354] 9%蔗糖水溶液中的1.5ng/mL RK-163、20.3ng/mL总脂质

[0355] 脂质组成:DOTAP 9.17ng/mL,DOPE 7.32ng/mL,胆固醇3.81ng/mL

[0356] 粒径:141.4nm PDI:0.1218

[0357] [表4]

[0358]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | 和光纯药工业株式会社 | 038-02606 | ESL3428 |
| 甲醇 | 和光纯药工业株式会社 | 130-16585 | APF2160 |
| RK-163 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | F-01 |
| DOTAP | 默克公司(Merck & Co.) | CH2900029 | MBR0005-01 |
| DOPE | 日本精化株式会社 | | ROK-MD061 |
| 胆固醇 | 日本关东化学株式会社 | 07331-30 | 901B2144 |
| 9%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为9%的方式溶解,通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0359] (制备方法)

[0360] • 用于安全性试验

[0361] 将分别为91.7mg、73.2mg和38.1mg的DOTAP、DOPE和胆固醇放入1个烧瓶中,并溶解在100mL的甲醇:氯仿=1:2(体积比)的溶液中。将1.0mL该溶液与1.5mL 100μg/mL的RK-163在甲醇:氯仿=1:2中的溶液混合,加热的同时吹氮气来进行干燥,并在干燥器中静置。向干燥后的产物中加入10mL 9%蔗糖水溶液,用聚四氟乙烯均质器进行乳化,进一步地用挤出机(50℃加热,孔径为0.2μm的聚碳酸酯膜过滤器,1个)进行整粒。将制备好的脂质体分散液

进一步用9％蔗糖水溶液稀释1000倍,经蔗糖孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤后,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#2样品(用于安全性试验)。

[0362] • 用于主要药理学试验

[0363] 取1mL#2样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中,并向其中加入9mL9％蔗糖水溶液,进行混合稀释。将该脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#2样品(用于主要药理学试验)。

[0364] [#3样品(含有RK-163的脂质体(#3))的制备]

[0365] 使用表5所示的试剂和成分,根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#3样品。

[0366] (所制备样品的组成)

[0367] • 用于安全性试验

[0368] 9％蔗糖水溶液中的15ng/mL RK-163、247.2ng/mL总脂质

[0369] 脂质组成:DOTAP 91.7ng/mL,DOPE 73.2ng/mL

[0370] MPEG2000-DMPE,钠盐44.2ng/mL,胆固醇38.1ng/mL

[0371] • 用于主要药理学试验

[0372] 9％蔗糖水溶液中的1.5ng/mL RK-163、24.7ng/mL总脂质

[0373] 脂质组成:DOTAP 9.17ng/mL,DOPE 7.32ng/mL,MPEG2000-DMPE,钠盐4.42ng/mL,胆固醇3.81ng/mL

[0374] 粒径:126.7nm PDI:0.05407

[0375] [表5]

[0376]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | 和光纯药工业株式会社 | 038-02606 | ESL3428 |
| 甲醇 | 和光纯药工业株式会社 | 130-16585 | APF2160 |
| RK-163 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | F-01 |
| DOTAP | 默克公司（Merck & Co.） | CH2900029 | MBR0005-01 |
| DOPE | 日本精化株式会社 | - | ROK-MD061 |
| 胆固醇 | 日本关东化学株式会社 | 07331-30 | 901B2144 |
| MPEG2000-DMPE，钠盐 | 日油株式会社 | PM-020CN | M195506 |
| 9%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为9%的方式溶解，通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0377] (制备方法)

[0378] • 用于安全性试验

[0379] 分别称取9.17mg、7.32mg、4.42mg和3.81mg的DOTAP、DOPE、MPEG2000-DMPE,钠盐和

胆固醇放入1个烧瓶中,并溶解在10mL的甲醇:氯仿=1:2(体积比)的溶液中。将1.0mL该溶液与1.5mL 100μg/mL的RK-163在甲醇:氯仿=1:2中的溶液混合,加热的同时吹氮气来进行干燥,并在干燥器中静置。向干燥后的产物中加入10mL 9%蔗糖水溶液,用聚四氟乙烯均质器进行乳化,进一步地用挤出机(50℃加热,孔径为0.2μm的聚碳酸酯膜过滤器,1个)进行整粒。将制备好的脂质体分散液进一步用9%蔗糖水溶液稀释1000倍,经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#3样品(用于安全性试验)。

[0380] • 用于主要药理学试验

[0381] 取1mL#3样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中,并向其中加入9mL9%蔗糖水溶液,进行混合稀释。将该脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#3样品(用于主要药理学试验)。

[0382] [#4样品(含有RK-163的脂质体(#4))的制备]

[0383] 使用表6所示的试剂和成分,根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#4样品。

[0384] (所制备样品的组成)

[0385] • 用于安全性试验

[0386] 9%蔗糖水溶液中的15ng/mL RK-163、249ng/mL总脂质

[0387] 脂质组成:DOTAP 91.7ng/mL,DOPE 73.2ng/mL MPEG2000-DSPE,钠盐46ng/mL,胆固醇38.1ng/mL

[0388] • 用于主要药理学试验

[0389] 9%蔗糖水溶液中的1.5ng/mL RK-163、24.9ng/mL总脂质

[0390] 脂质组成:DOTAP 9.17ng/mL,DOPE 7.32ng/mL,MPEG2000-DSPE,钠盐4.6ng/mL,胆固醇3.81ng/mL

[0391] 粒径:126.2nm PDI:0.09744

[0392] [表6]

[0393]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | 和光纯药工业株式会社 | 038-02606 | ESL3428 |
| 甲醇 | 和光纯药工业株式会社 | 130-16585 | APF2160 |
| RK-163 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | F-01 |

[0394]

| | | | |
|---|---|---|---|
| DOTAP | 默克公司（Merck & Co.） | CH2900029 | MBR0005-01 |
| DOPE | 日本精化株式会社 | - | ROK-MD061 |
| 胆固醇 | 日本关东化学株式会社 | 07331-30 | 901B2144 |
| MPEG2000-DSPE，钠盐 | Lipoid | LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 批次号 588200-2190092-01/030 | |
| 9%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为9%的方式溶解，通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0395] (制备方法)

[0396] • 用于安全性试验

[0397] 将分别为9.17mg、7.32mg、4.6mg和3.81mg的DOTAP、DOPE、MPEG2000-DSPE,钠盐和胆固醇放入1个烧瓶中,并溶解在10mL的甲醇:氯仿＝1:2(体积比)的溶液中。将1.0mL该溶液与1.5mL 100μg/mL的RK-163在甲醇:氯仿＝1:2中的溶液混合,加热的同时吹氮气来进行干燥,并在干燥器中静置。向干燥后的产物中加入10mL 9%蔗糖水溶液,用聚四氟乙烯均质器进行乳化,进一步地用挤出机(50℃加热,孔径为0.2μm的聚碳酸酯膜过滤器,1个)进行整粒。将制备好的脂质体分散液进一步用9%蔗糖水溶液稀释1000倍,经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#4样品(用于安全性试验)。

[0398] • 用于主要药理学试验

[0399] 取1mL#4样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中,并向其中加入9mL9%蔗糖水溶液,进行混合稀释。将该脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#4样品(用于主要药理学试验)。

[0400] [#5样品(含有RK-163的脂质体(#5))的制备]

[0401] 使用表7所示的试剂和成分,根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#5样品。

[0402] (所制备样品的组成)

[0403] • 用于安全性试验

[0404] 10%蔗糖水溶液中的322ng/mL RK-163、3222ng/mL总脂质

[0405] (各浓度是对所制备的样品中的胆固醇进行定量并基于装料时的重量比换算成总脂质浓度后的值。)

[0406] • 用于主要药理学试验

[0407] 10%蔗糖水溶液中的32.2ng/mL RK-163、322.2ng/mL总脂质

[0408] 脂质组成(上述用于安全性试验的试料的脂质浓度):

[0409] HSPC 1953ng/mL

[0410] DSPG 792ng/mL

[0411] 胆固醇475ng/mL

[0412] (各浓度是对所制备的样品中的胆固醇进行定量并基于装料时的重量比换算成各脂质浓度后的值。)

[0413] 平均粒径:191.4nm PDI:0.083

[0414] [表7]

[0415]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | SAJ | 05-3400-5 | G5835 |
| 甲醇 | SAJ | 19-2410-5 | J4847 |
| RK-163 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | F-01 |
| HSPC | 日油株式会社 | | 150107 |
| DSPG | 日油株式会社 | | 1112851L |
| 胆固醇 | 日油株式会社 | | 1009CH02 |
| 10%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为10%的方式溶解，通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0416] (制备方法)

[0417] • 用于安全性试验

[0418] 将分别为6.66mg、2.7mg、1.61mg的HSPC、DSPG、胆固醇放入1个烧瓶中,并溶解在1.5mL的甲醇:氯仿=1:1(体积比)的溶液中。将1.5mL该溶液与0.22mL 5mg/mL的RK-163在甲醇:氯仿=1:1中的溶液混合,加热的同时吹氮气来进行干燥,并在干燥器中静置。向干燥后的产物中加入2.42mL 10％蔗糖水溶液,用挤出机(50℃加热,孔径400nm,1次,孔径200nm,2次)进行整粒,经0.22μm的PVDF膜过滤器进行过滤以及调节粒径。将制备得到的脂质体分散液放入带螺帽的玻璃瓶中。

[0419] 将该脂质体分散液进一步用10％蔗糖水溶液稀释1000倍,经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#5样品(用于安全性试验)。

[0420] • 用于主要药理学试验

[0421] 取1mL#5样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中,并向其中加入9mL10％蔗糖水溶液,进行混合稀释。将该脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#5样品(用于主要药理学试验)。由于用于主要药理学试验的试料的RK-163浓度为32.2ng/mL,因此实验时用PBS进一步稀释,并以1.5ng/mL的浓度作为RK-163的量进行实验。

[0422] [#6样品(含有RK-163的脂质体(#6))的制备]

[0423] 使用表8所示的试剂和成分,根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#6样品。

[0424] (所制备样品的组成)

[0425] • 用于安全性试验

[0426] 9%蔗糖水溶液中的15ng/mL RK-163、221μg/mL总脂质

[0427] 脂质组成:HSPC 103μg/mL DOPS 79.7μg/mL胆固醇38.1μg/mL

[0428] • 用于主要药理学试验

[0429] 9%蔗糖水溶液中的1.5ng/mL RK-163、22.1μg/mL总脂质

[0430] 脂质组成:HSPC 10.3μg/mL DOPS 7.97μg/mL胆固醇3.81μg/mL

[0431] 粒径:168.8nm PDI:0.1288

[0432] [表8]

[0433]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | 和光纯药工业株式会社 | 038-02606 | ESL3428 |
| 甲醇 | 和光纯药工业株式会社 | 130-16585 | APF2160 |
| RK-163 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | F-01 |
| LIPOID SPC | Lipoid | LIPOID S | |

[0434]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 3(氢化大豆磷脂酰胆碱: HSPC ) | | PC-3批次号 525600-2190668-01/023 | |
| DOPS | 日本精化株式会社 | | RGF-NF 231 |
| 胆固醇 | 日本关东化学株式会社 | 07331-30 | 901B2144 |
| 9%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为9%的方式溶解, 通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0435] (制备方法)

[0436] • 用于安全性试验

[0437] 将分别为10.3mg、7.97mg、3.81mg的HSPC、DOPS、胆固醇放入1个烧瓶中,并溶解在10mL的甲醇:氯仿=1:2(体积比)的溶液中。将1.0mL该溶液与1.5mL 100ng/mL的RK-163在甲醇:氯仿=1:2中的溶液混合,加热的同时吹氮气来进行干燥,并在干燥器中静置。向干燥后的产物中加入10mL 9%蔗糖水溶液,用聚四氟乙烯均质器进行乳化,进一步地用挤出机(50℃加热,孔径为0.2μm的聚碳酸酯膜过滤器,1个)进行整粒。将制备得到的脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#6样品(用于安全性试验)。

[0438] • 用于主要药理学试验

[0439] 取1mL#6样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中,并向其中加入9mL9%蔗糖水溶液,进行混合稀释。将该脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#6样品(用于主要药理学试验)。

[0440] [#7样品(含有RK-163的脂质体(#7))的制备]

[0441] 使用表9所示的试剂和成分,根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#7样品。

[0442] (所制备样品的组成)

[0443] • 用于安全性试验

[0444] 9%蔗糖水溶液中的15ng/mL RK-163、220.8ng/mL总脂质

[0445] 脂质组成:HSPC 103ng/mL,DOPS 79.7ng/mL,胆固醇38.1ng/mL

[0446] • 用于主要药理学试验

[0447] 9%蔗糖水溶液中的1.5ng/mL RK-163、22.08ng/mL总脂质

[0448] 脂质组成:HSPC 10.3ng/mL DOPS 7.97ng/mL胆固醇3.81ng/mL

[0449] 粒径:145.7nm PDI:0.06813

[0450] [表9]

[0451]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | 和光纯药工业株式会社 | 038-02606 | ESL3428 |
| 甲醇 | 和光纯药工业株式会社 | 130-16585 | APF2160 |
| RK-163 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | F-01 |
| HSPC | Lipoid | LIPOID S PC-3 批次号 525600-2190668-01/023 | |
| DOPS | 日本精化株式会社 | - | RGF-NF 231 |
| 胆固醇 | 日本关东化学株式会社 | 07331-30 | 901B2144 |
| 9%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为9%的方式溶解,通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0452] (制备方法)

[0453] • 安全性试验

[0454] 将分别为10.3mg、7.97mg、3.81mg的HSPC、DOPS、胆固醇放入1个烧瓶中,并溶解在10mL的甲醇:氯仿=1:2(体积比)的溶液中。将1.0mL该溶液与1.5mL 100μg/mL的RK-163在甲醇:氯仿=1:2中的溶液混合,加热的同时吹氮气来进行干燥,并在干燥器中静置。向干燥后的产物中加入10mL 9%蔗糖水溶液,用聚四氟乙烯均质器进行乳化,进一步地用挤出机(50℃加热,孔径为0.2μm的聚碳酸酯膜过滤器,1个)进行整粒。将制备得到的脂质体分散液进一步地用9%蔗糖水溶液稀释1000倍,经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#7样品(用于安全性试验)。

[0455] • 用于主要药理学试验

[0456] 取1mL#7样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中,并向其中加入9mL9%蔗糖水溶液,进行混合稀释。将该脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#7样品(用于主要药理学试验)。

[0457] [#8样品(含有RK-163的脂质体(#8))的制备]

[0458] 使用表10所示的试剂和成分,根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#8样品。

[0459] (所制备样品的组成)

[0460] • 用于安全性试验

[0461] 9%蔗糖水溶液中的15ng/mL RK-163、242.6ng/mL总脂质

[0462] 脂质组成:HSPC 145ng/mL、MPEG2000-DSPE,钠盐48.8ng/mL、胆固醇48.8ng/mL

[0463] • 用于主要药理学试验

[0464] 9%蔗糖水溶液中的1.5ng/mL RK-163、24.26ng/mL总脂质

[0465] 脂质组成:HSPC 14.5ng/mL、MPEG2000-DSPE,钠盐4.88ng/mL、胆固醇4.88ng/mL

[0466] 粒径:143.0nm PDI:0.05755

[0467] [表10]

[0468]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | 和光纯药工业株式会社 | 038-02606 | ESL3428 |
| 甲醇 | 和光纯药工业株式会社 | 130-16585 | APF2160 |
| RK-163 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | F-01 |
| HSPC | Lipoid | LIPOID S PC-3 批次号 525600-2190668-01/023 | |
| MPEG2000-DSPE, 钠盐 | Lipoid | LIPOID PE 18:0/18:0-PEG 2000 批次号 588200-2190092-01/030 | |
| 胆固醇 | 日本关东化学株式会社 | 07331-30 | 901B2144 |
| 9%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为9%的方式溶解,通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0469]

[0470] (制备方法)

[0471] • 用于安全性试验

[0472] 将分别为14.5mg、4.88mg和4.88mg的HSPC、MPEG2000-DSPE,Na盐和胆固醇放入1个烧瓶中,并溶解在10mL的甲醇:氯仿＝1:2(体积比)的溶液中。将1.0mL该溶液与1.5mL 100μg/mL的RK-163在甲醇:氯仿＝1:2中的溶液混合,加热的同时吹氮气来进行干燥,并在干燥器中静置。向干燥后的产物中加入10mL 9％蔗糖水溶液,用聚四氟乙烯均质器进行乳化,进一步地用挤出机(60℃加热,孔径为0.2μm的聚碳酸酯膜过滤器,1个)进行整粒。将制备得到的脂质体进一步地用9％蔗糖水溶液稀释1000倍,经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#8样品(用于安全性试验)。

[0473] • 用于主要药理学试验

[0474] 取1mL#8样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中,并向其中加入9mL9％蔗糖水溶液,进行混合稀释。将该脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#8样品(用于主要药理学试验)。

[0475] [#9样品(含有RCAI-61的脂质体(#9))的制备]

[0476] 使用表11所示的试剂和成分,根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#9样品。除了使用RCAI-61代替RK-163以外,使用与#7样品相同的制备方法制作#9样品。

[0477] • 用于安全性试验

[0478] 9％蔗糖水溶液中的15ng/mL RCAI-61、220.8ng/mL总脂质

[0479] 脂质组成:HSPC 103ng/mL,DOPS 79.7ng/mL,胆固醇38.1ng/mL

[0480] • 用于主要药理学试验

[0481] 9％蔗糖水溶液中的1.5ng/mL RCAI-61、22.08ng/mL总脂质

[0482] 脂质组成:HSPC 10.3ng/mL DOPS 7.97ng/mL胆固醇3.81ng/mL

[0483] 粒径:145.7nm PDI:0.06813

[0484] [表11]

[0485]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | 和光纯药工业株式会社 | 038-02606 | ESL3428 |
| 甲醇 | 和光纯药工业株式会社 | 130-16585 | APF2160 |
| RCAI-61 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | |
| HSPC | Lipoid | LIPOID S PC-3 批次号 525600-2190668-01/023 | |
| DOPS | 日本精化株式会社 | - | RGF-NF 231 |
| 胆固醇 | 日本关东化学株式会社 | 07331-30 | 901B2144 |
| 9%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为9%的方式溶解，通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0486] (制备方法)

[0487] • 安全性试验

[0488] 将分别为10.3mg、7.97mg、3.81mg的HSPC、DOPS、胆固醇放入1个烧瓶中，并溶解在10mL的甲醇:氯仿＝1:2(体积比)的溶液中。将1.0mL该溶液与1.5mL 100μg/mL的RK-163在甲醇:氯仿＝1:2中的溶液混合，加热的同时吹氮气来进行干燥，并在干燥器中静置。向干燥后的产物中加入10mL 9％蔗糖水溶液，用聚四氟乙烯均质器进行乳化，进一步地用挤出机(50℃加热，孔径为0.2μm的聚碳酸酯膜过滤器，1个)进行整粒。将制备得到的脂质体分散液进一步地用9％蔗糖水溶液稀释1000倍，经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤，放入带螺帽的玻璃瓶中，在4℃下保存。将该溶液作为#9样品(用于安全性试验)。

[0489] • 用于主要药理学试验

[0490] 取1mL#9样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中，并向其中加入9mL9％蔗糖水溶液，进行混合稀释。将该脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤，放入带螺帽的玻璃瓶中，在4℃下保存。将该溶液作为#9样品(用于主要药理学试验)。

[0491] [#10样品(含有RCAI-137的脂质体(#10))的制备]

[0492] 使用表12所示的试剂和成分，根据以下制备方法制备用于安全性试验和主要药理学试验的#10样品。除了使用RCAI-137代替RK-163以外，使用与#7样品相同的制备方法制作#10样品。

[0493] (所制备样品的组成)

[0494] • 用于安全性试验

[0495] 9％蔗糖水溶液中的15ng/mL RCAI-137、220.8ng/mL总脂质

[0496] 脂质组成:HSPC 103ng/mL,DOPS 79.7ng/mL,胆固醇38.1ng/mL

[0497] • 用于主要药理学试验

[0498] 9%蔗糖水溶液中的1.5ng/mL RCAI-137、22.08ng/mL总脂质

[0499] 脂质组成:HSPC 10.3ng/mL DOPS 7.97ng/mL胆固醇3.81ng/mL

[0500] 粒径:145.7nm PDI:0.06813

[0501] [表12]

[0502]

| | 制造公司或制备方法 | 目录号 | 批号 |
|---|---|---|---|
| 氯仿 | 和光纯药工业株式会社 | 038-02606 | ESL3428 |
| 甲醇 | 和光纯药工业株式会社 | 130-16585 | APF2160 |
| RCAI-137 | 由日本国立研究开发法人理化学研究所提供 | | |
| HSPC | Lipoid | LIPOID S PC-3 批次号 525600-2190668-01/023 | |
| DOPS | 日本精化株式会社 | - | RGF-NF 231 |
| 胆固醇 | 日本关东化学株式会社 | 07331-30 | 901B2144 |
| 9%蔗糖水溶液 | 将蔗糖以在超纯水中为9%的方式溶解，通过孔径为0.22μm的过滤灭菌用过滤器来制备 | | |

[0503] (制备方法)

[0504] • 用于安全性试验

[0505] 将分别为10.3mg、7.97mg、3.81mg的HSPC、DOPS、胆固醇放入1个烧瓶中,并溶解在10mL的甲醇:氯仿=1:2(体积比)的溶液中。将1.0mL该溶液与1.5mL 100μg/mL的RCAI-137在甲醇:氯仿=1:2中的溶液混合,加热的同时吹氮气来进行干燥,并在干燥器中静置。向干燥后的产物中加入10mL 9%蔗糖水溶液,用聚四氟乙烯均质器进行乳化,进一步地用挤出机(50℃加热,孔径为0.2μm的聚碳酸酯膜过滤器,1个)进行整粒。将制备得到的脂质体分散液进一步地用9%蔗糖水溶液稀释1000倍,经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#10样品(用于安全性试验)。

[0506] • 用于主要药理学试验

[0507] 取1mL#10样品(用于安全性试验)至另一个玻璃瓶中,并向其中加入9mL 9%蔗糖水溶液,进行混合稀释。将该脂质体分散液经孔径为0.22μm的过滤灭菌用PVDF膜过滤器进行过滤,放入带螺帽的玻璃瓶中,在4℃下保存。将该溶液作为#10样品(用于主要药理学试验)。

[0508] [试验例1]含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体的抗肿瘤效果

[0509] 为了检验脂质体组成不同的含有RK-163的脂质体(通过上述制备方法制备的#2-#

8样品)的有效性,研究在抗肿瘤活性方面的有效性。

[0510] 在试验例1-1中将0.3ng(换算为RK-163量)含有RK-163的脂质体(#2-#5)样品(用于主要药理学试验),以及在试验例1-2中将0.3ng(换算为RK-163量)含有RK-163的脂质体(#5-#8)样品(用于主要药理学试验)、和经X射线照射(50Gy)的$1x10^6$个表达假肿瘤抗原OVA的B16小鼠黑色素瘤细胞(MO4)细胞通过C57BL/6小鼠(10周龄)的尾静脉进行施用,然后,将$3x10^5$个B16小鼠黑色素瘤细胞(MO4)移植到相同小鼠的皮下。移植后第7、10、14、17天观察肿瘤直径。需要说明的是,所有测量均使用数显卡尺进行。采用肿瘤体积($mm^3$)=长轴(mm)x短轴(mm)x高度(mm)来进行计算。

[0511] 作为比较例,除了使用含有RK-163的Captisol水溶液(#1样品(用于主要药理学试验))代替含有RK-163的脂质体以外,以相同的方法进行试验。作为对照组,施用与含有RK-163的脂质体相同量的PBS。

[0512] 结果如图1所示。

[0513] 结果为,当将含有RK-163的脂质体(#2-#5)(试验例1-1)和含有RK-163的脂质体(#5-#8)(试验例1-2)进行比较时,含有RK-163的脂质体(#7)和含有RK-163的脂质体(#8)显示出显著的抗肿瘤效果。

[0514] [试验例2]通过含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体的抗肿瘤活性(剂量)和ED50

[0515] 将含有RK-163的脂质体(#7)(换算为RK-163的量,每25g体重施用0.001ng～1ng)和X射线照射(50Gy)的假肿瘤抗原OVA表达MO4细胞通过C57BL/6小鼠(10周龄)的尾静脉进行施用,然后,将$3x10^5$个B16小鼠黑色素瘤细胞(MO4)移植到相同小鼠的皮下。移植后第7、11、14、17天观察肿瘤直径。需要说明的是,所有测量均使用数显卡尺进行。采用肿瘤体积($mm^3$)=长轴(mm)x短轴(mm)x高度(mm)来进行计算。将施用等量PBS代替含有RK-163的脂质体(#7)的组用作对照。

[0516] 结果如图2所示。

[0517] 结果为,含有RK-163的脂质体(#7)显示出强的抗肿瘤效果,并与RK-163的量成比例地抑制黑色素瘤肿瘤细胞的增殖(即,以剂量依赖性方式)。有效量换算为RK-163的量,为0.3ng/25g小鼠体重～1ng/25g小鼠体重。ED50为0.01393。

[0518] [试验例3]含有NKT细胞配体(RCAI-61或RCAI-137)的脂质体的抗肿瘤效果

[0519] 将含有RK-163的脂质体(#7)、含有RCAI-61的脂质体(#9)或含有RCAI-137的脂质体(#10)(换算为RK-163的量、RCAI-61的量或RCAI-137的量,每25g体重施用0.003ng～1ng)和X射线照射(50Gy)的假肿瘤抗原OVA表达MO4细胞通过C57BL/6小鼠(10周龄)静脉进行施用,然后,将$3x10^5$个B16小鼠黑色素瘤细胞(MO4)移植到相同小鼠的皮下。移植后第7、11、14、17天观察肿瘤直径。需要说明的是,所有测量均使用数显卡尺进行。采用肿瘤体积($mm^3$)=长轴(mm)x短轴(mm)x高度(mm)来进行计算。将施用等量PBS代替含有RK-163、RCAI-61或RCAI-137的脂质体的组用作对照。

[0520] 结果如图3所示。

[0521] 结果为,与含有RCAI-61的脂质体(#9)和含有RCAI-137的脂质体(#10)均与试验例1中显示有效性的含有K-163的脂质体(#7)同样地显示强抗肿瘤效果。

[0522] [试验例4]含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体的肝毒性试验

[0523] 使用试验例2结果的图2中所示的抗肿瘤效果有效量(1ng/小鼠25g体重)的10倍量

(10ng/小鼠25g体重),进行含有RK-163的脂质体(#7)的肝毒性试验(肝毒性:ALT、AST、肝白斑)。通过C57BL/6小鼠(10周龄)(每组5只)的尾静脉施用10ng含有RK-163的脂质体(#7),并在施用后第3、7和17天收集血液,并通过ELISA测定ALT、AST。另外,在施用后第17天将肝脏从小鼠摘除,确认有无肝白斑。将施用等量不含RK-163的脂质体(LIPO)和等量PBS代替含有RK-163的脂质体(#7)的组用作对照组。

[0524] 结果如图4所示。其结果为,即使施用抗肿瘤效果的有效量的10倍量的含有RK-163的脂质体,也没有观察到肝细胞酶AST和ALT的增加以及肝白斑,确认了安全性。

[0525] 图4中的"基准值上限"是CLEA Japan对10周龄正常C57BL/6小鼠的数据统计计算出的,ALT(GPT)为34.4IU/L,AST(GOT)为77.4IU/L。因此,"基准值上限"以下的值,0～34.4IU/L(ALT)和0～77.4IU/L(AST),为正常值。

[0526] [试验例5-1]含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体对肿瘤组织外NKT细胞的激活

[0527] 通过将有效量(RK-163换算量1ng/小鼠)的含有RK-163的脂质体(#7)和假肿瘤抗原(OVA脉冲的C57BL/6J小鼠脾细胞,$2\times10^7$个细胞)施用于C57BL/6J小鼠(10周龄))(每组5只)的尾静脉,含有RK-163的脂质体(#7)被摄取到肝脏内抗原呈递细胞(库普弗(kupffer)细胞等)中,通过抗原呈递在CD1d分子上的RK-163配体激活肝脏内的NKT细胞。其结果为,小鼠NKT细胞在细胞表面表达激活标记KLRG1的同时产生激活其他免疫细胞群的佐剂物质IFN-γ。将施用等量PBS代替含有RK-163的脂质体(#7)的组用作对照组。

[0528] 结果如图5-1所示(图5-1为含有RK-163的脂质体(#7)施用后第三天的数据)。NKT细胞被含有RK-163的脂质体激活,增加数量并诱导激活标记KLRG1的表达和IFN-γ的产生。

[0529] [试验例5-2]含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体对人NKT细胞的体外激活

[0530] 研究含有RK-163的脂质体(#7)对人NKT细胞的激活(IFN-γ产生)。

[0531] 通过MACS从C57BL/6小鼠的脾细胞中去除包含NKT细胞的$CD3^+$细胞群后,以$5.0x10^4$个细胞/孔接种到96孔板中,在其中加入有效量(RK-163换算量1ng)的含有RK-163的脂质体(#7),并在37℃下进行脉冲培养24小时。然后,除去培养上清后,以$5.0\times10^4$细胞/孔接种人NKT杂交瘤细胞(拉乌尔(Raoult)细胞),在37℃下再培养24小时,收集培养上清,使用人IFN-γELISA来测量培养上清中IFN-γ的产生量。将添加等量培养液(medium)代替含有RK-163的脂质体(#7)的组用作对照组。

[0532] 结果如图5-2所示。

[0533] 其结果为,在含有RK-163的脂质体(#7)施用组中,IFN-γ的产生显著增加。这些结果表明,被脉冲至小鼠抗原呈递细胞的含有RK-163的脂质体(#7)可激活人NKT细胞并产生IFN-γ。

[0534] 由此表明,(1)含有RK-163的脂质体可以激活人NKT细胞,(2)被抗原呈递至小鼠抗原呈递细胞的含有RK-163的脂质体可以激活人NKT细胞,因此可以跨越物种激活NKT细胞。

[0535] [试验例6]含有NKT细胞配体(RCAI-61或RCAI-137)的脂质体对肿瘤组织外的NKT细胞的激活

[0536] 通过将含有RACI-61的脂质体(#9)和含有RCAI-137的脂质体(#10)(RCAI-61或RCAI-137换算量1ng/小鼠)和假肿瘤抗原OVA脉冲的脾细胞施用于C57BL/6小鼠的尾静脉,含有RACI-61的脂质体(#9)或含有RCAI-137的脂质体(#10)被摄取到肝脏内抗原呈递细胞(库普弗(kupffer)细胞等)中,通过抗原呈递至CD1d分子上的RCAI-61或RCAI-137配体,激

活肝脏内的NKT细胞。

[0537] 结果如图6所示。

[0538] 其结果为,通过施用含有RACI-61的脂质体(#9)和含有RCAI-137的脂质体(#10),NKT细胞显著增殖(图6的左图)并在细胞表面表达激活标记KLRG1,同时产生激活其他免疫细胞群的佐剂物质IFN-γ(图6的右图)。

[0539] 这些结果表明,在肿瘤组织外被人工激活的NKT细胞可以浸润到肿瘤组织中,并激活肿瘤组织内的免疫细胞群。

[0540] [试验例7]含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体激活的NKT细胞对先天性免疫系统和获得性免疫系统细胞群的激活

[0541] 通过C57BL/6小鼠(10周龄)(每组5只)的尾静脉施用有效量(RK-163换算量1ng/小鼠)的含有RK-163的脂质体(#7)和OVA脉冲的脾细胞$2\times10^7$个作为假肿瘤抗原,激活肝脏内的NKT细胞后,以PD-1表达为指标分析通过NKT细胞激活的辅助作用对先天性免疫系统和获得性免疫系统细胞群的影响。将施用等量PBS代替含有RK-163的脂质体(#7)的组用作对照组。

[0542] 结果如图7所示。

[0543] 其结果为,在通过含有RK-163的脂质体(#7)激活NKT细胞(参见试验例5-1,图5-1)后,获得性免疫系统CD4T和CD8T细胞以及先天性免疫系统NK细胞被激活。随着细胞数量的增加,确认了作为激活指标的PD-1的表达。通过施用RK-163脂质体激活NKT细胞,从而不仅获得性免疫系统CD4T细胞和CD8T细胞,而且先天性免疫系统NK细胞也被激活。

[0544] [试验例8]含有NKT细胞配体(RCAI-61或RCAI-137)的脂质体激活的NKT细胞对先天性免疫系统和获得性免疫系统细胞群的激活

[0545] 通过C57BL/6小鼠的尾静脉施用含有RACI-61的脂质体(#9)或含有RCAI-137的脂质体(#10)以及假肿瘤抗原OVA脉冲的脾细胞,为了验证通过激活的NKT细胞的辅助作用激活先天性免疫系统和获得性免疫系统的细胞群,对细胞数量和PD-1表达进行了分析。

[0546] 结果如图8所示。

[0547] 其结果为,含有RACI-61的脂质体(#9)(图8的左图)和含有RCAI-137的脂质体(#10)(图8的右图)均在NKT细胞激活后激活获得性免疫系统CD4T和CD8T细胞以及先天性免疫系统NK细胞,并且随着细胞数量的增加,确认了作为激活指标的PD-1的表达。

[0548] [试验例9]含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体激活的NKT细胞对肿瘤组织内浸润和肿瘤组织内的先天性免疫系统(NK)和获得性免疫系统效应(CD8T)细胞群的激活

[0549] 通过小鼠(C57BL/6,10周龄)(每组5只)的尾静脉施用有效量(RK-163换算量1ng/小鼠体重)的含有RK-163的脂质体(#7)和$1\times10^6$个X射线照射的MO4肿瘤细胞(表达OVA的B16小鼠黑色素瘤细胞)作为假肿瘤抗原,然后皮下移植$3x10^5$个MO4肿瘤细胞,17天后进行肿瘤内的免疫细胞分析。将施用等量PBS代替含有RK-163的脂质体(#7)的组用作对照组。

[0550] 结果如图9所示。

[0551] 其结果为,在含有RK-163的脂质体(#7)施用组中,人工激活的NKT细胞浸润在肿瘤组织后(图9中的左上图),在肿瘤组织内产生IFN-γ(图9中的左下图),激活肿瘤组织中存在的获得性免疫系统CD8T细胞,同时激活先天性免疫系统NK细胞(图9中的右图)。另一方面,在PBS施用组中,将差不多相同数量的未人工激活的NKT细胞也浸润到肿瘤组织中(图9

中的左上图),但因为未产生IFN-γ(图9中的左下图),所以没有激活先天性免疫系统或获得性免疫细胞群,并且也没有观察到作为激活标记的PD-1的表达(图9中的右图)。从此可知人工激活NKT细胞是非常重要的。

[0552] 在肿瘤组织外人工激活的NKT细胞浸润到肿瘤内,在肿瘤组织内也保持激活,并持续产生大量激活其他免疫细胞群的IFN-γ,结果为在含有RK-163的脂质体(#7)施用组中,攻击表达抗原的阳性癌细胞(包括突变癌细胞)的CD8T细胞和攻击失去抗原表达的癌细胞的NK细胞被激活,在它们的免疫细胞群中可以确认到作为激活指标的PD-1的表达,表明在免疫缺陷的肿瘤内的免疫细胞群的激活。

[0553] [试验例10]含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体对长期免疫记忆的诱导和维持(30天和90天后)

[0554] 将通过静脉内施用含有RK-163的脂质体(#7)(RK-163换算量1ng/小鼠体重)和$2x10^7$个假肿瘤抗原(OVA)脉冲的脾细胞进行同时免疫的C57BL/6小鼠(10周龄)(每组5只)在施用含有RK-163的脂质体(#7)后第30天和第90天处死,使用脾细胞进行分析。

[0555] 结果如图10所示。

[0556] 其结果为,通过施用含有RK-163的脂质体,确认到OVA特异性CD8T细胞群的增殖和长期免疫记忆CD8T细胞群的形成(显著检测到OVA特异性CD8细胞的Tcm和Tem分数),同时确认到在施用含有RK-163(#7)的脂质体后30天和90天形成并维持长期记忆。表明了通过施用含有RK-163的脂质体,可形成癌症特异性CD8T记忆细胞并维持30和90天。

[0557] [试验例11]含有NKT细胞配体(RCAI-61或RCAI-137)的脂质体对长期免疫记忆的诱导和维持(30天和90天后)

[0558] 将通过静脉内施用含有RCAI-61的脂质体(#9)或含有RCAI-137的脂质体(#10)和假肿瘤抗原(OVA)脉冲的脾细胞进行免疫的C57BL/6小鼠(每组5只)在施用含有RCAI-61的脂质体(#9)、含有RCAI-137的脂质体(#10)后第30天和第90天处死,使用脾细胞进行分析。

[0559] 结果如图11所示。

[0560] 其结果为,施用含有RCAI-61的脂质体(图11中的上图)或含有RCAI-137的脂质体(图11中的下图)后,同时确认到OVA特异性CD8T细胞群的增殖和长期免疫记忆CD8T细胞群形成(显著检测到OVA特异性CD8细胞的Tcm和Tem分数),同时确认到在施用含有RCAI-61的脂质体(图11中的上图)或含有RCAI-137的脂质体(图11中的下图)后30天和90天形成并维持长期记忆。

[0561] [试验例12]含有NKT细胞配体(RK-163)的脂质体建立并维持长期免疫记忆1年后的抗肿瘤效果

[0562] 用含有RK-163的脂质体(#7)和$2x10^7$个假肿瘤抗原(OVA)脉冲的脾细胞对C57BL/6小鼠(10周龄)进行同时免疫,静置。

[0563] 经过一年后,将$3x10^5$个B16小鼠黑色素瘤细胞(MO4)移植到这些长期记忆诱导的C57BL/6小鼠的皮下,并在第7、10、14、17和21天观察肿瘤直径。需要说明的是,所有测量均使用数显卡尺进行。采用肿瘤体积($mm^3$)=长轴(mm)x短轴(mm)x高度(mm)来进行计算。

[0564] 使用NKT细胞缺陷的NKT-KO小鼠代替C57BL/6小鼠进行类似的实验。另外,将施用等量不含RK-163的脂质体制剂(LIPO)代替含有RK-163的脂质体(#7)的组用作对照组。

[0565] 结果如图12所示。

[0566] 其结果为,在对C57BL/6小鼠施用含有RK-163的脂质体(#7)的组中,在单次施用含有RK-163的脂质体(#7)一年后将肿瘤细胞移植到个体中时,发挥强抗肿瘤效果并抑制肿瘤生长。即,通过单次施用含有RK-163的脂质体(#7)可诱导一年以上的免疫记忆并抑制肿瘤生长。另一方面,在作为对照组的施用了不含有RK-163的脂质体的组以及对NKT细胞缺陷的NKT-KO小鼠施用了含有RK-163的脂质体的组中,不能抑制癌症的发作。即,不能够诱导长期记忆。

[0567] 含有RK-163的脂质体(#7)即使在施用一年后,也能得到强抗肿瘤效果,确认到具有建立长期癌症记忆的效果,这对癌症治疗来说是重要的。

[0568] 作为对照组的LIPO施用组以及NKT细胞缺陷的NKT-KO小鼠,不能诱导长期记忆,作为其结果,无法抑制癌症的发作,因此,证明了激活的NKT细胞是对于长期免疫记忆是必须的细胞。

[0569] [产业上的可利用性]

[0570] 根据本发明,可以提供含有NKT细胞配体的制剂,其可以在生物体内人工激活NKT细胞并且可用作抗恶性肿瘤剂等。

[0571] 本申请基于在日本提交的专利申请2022-020306,其内容全部并入本文。

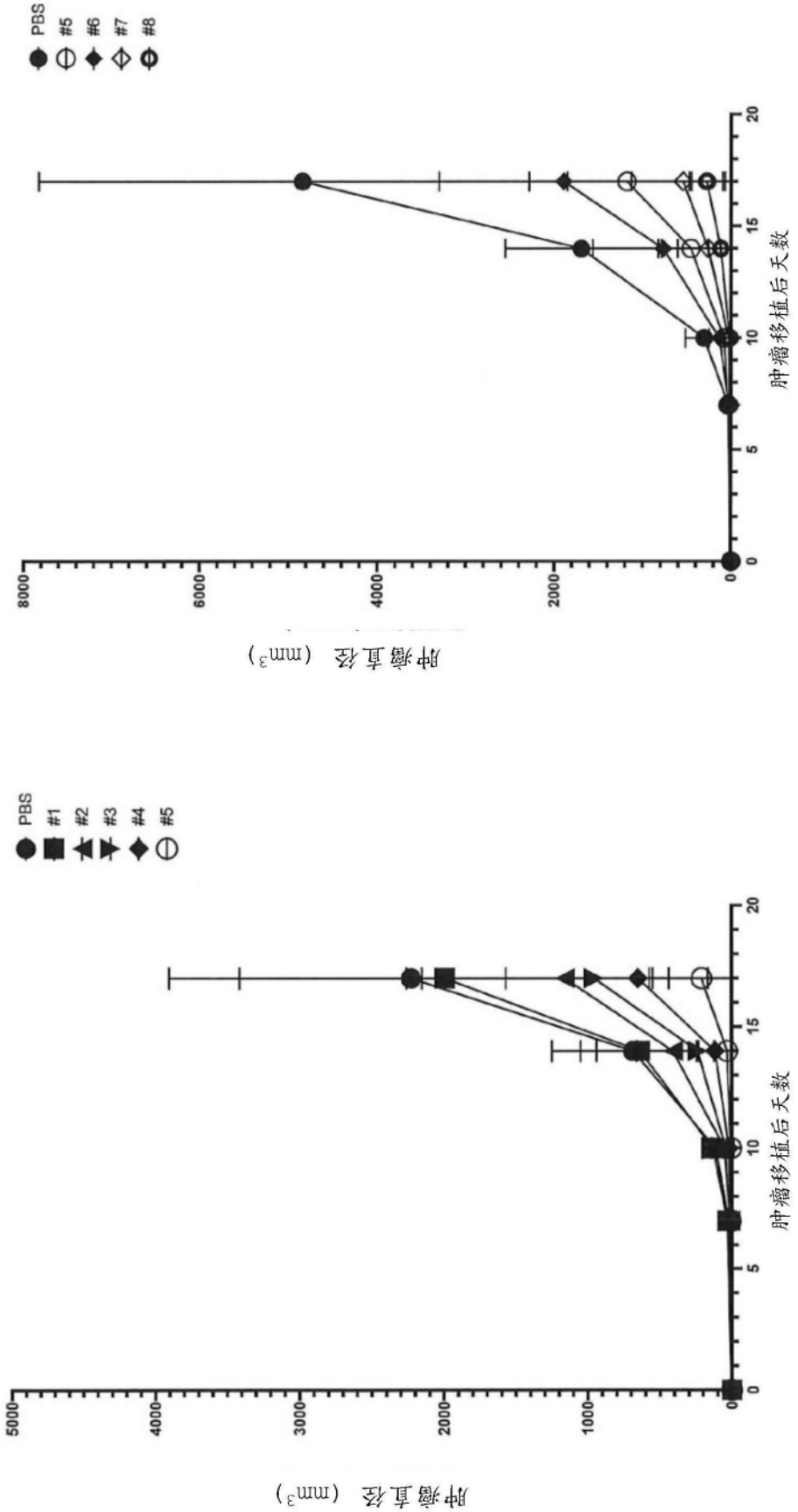

PBS
#1
#2
#3
#4
#5
肿瘤直径 (mm³)
0
1000
2000
3000
4000
5000
0
5
10
15
20
肿瘤移植后天数
PBS
#5
#6
#7
#8
肿瘤直径 (mm³)
0
2000
4000
6000
8000
0
5
10
15
20
肿瘤移植后天数

图1

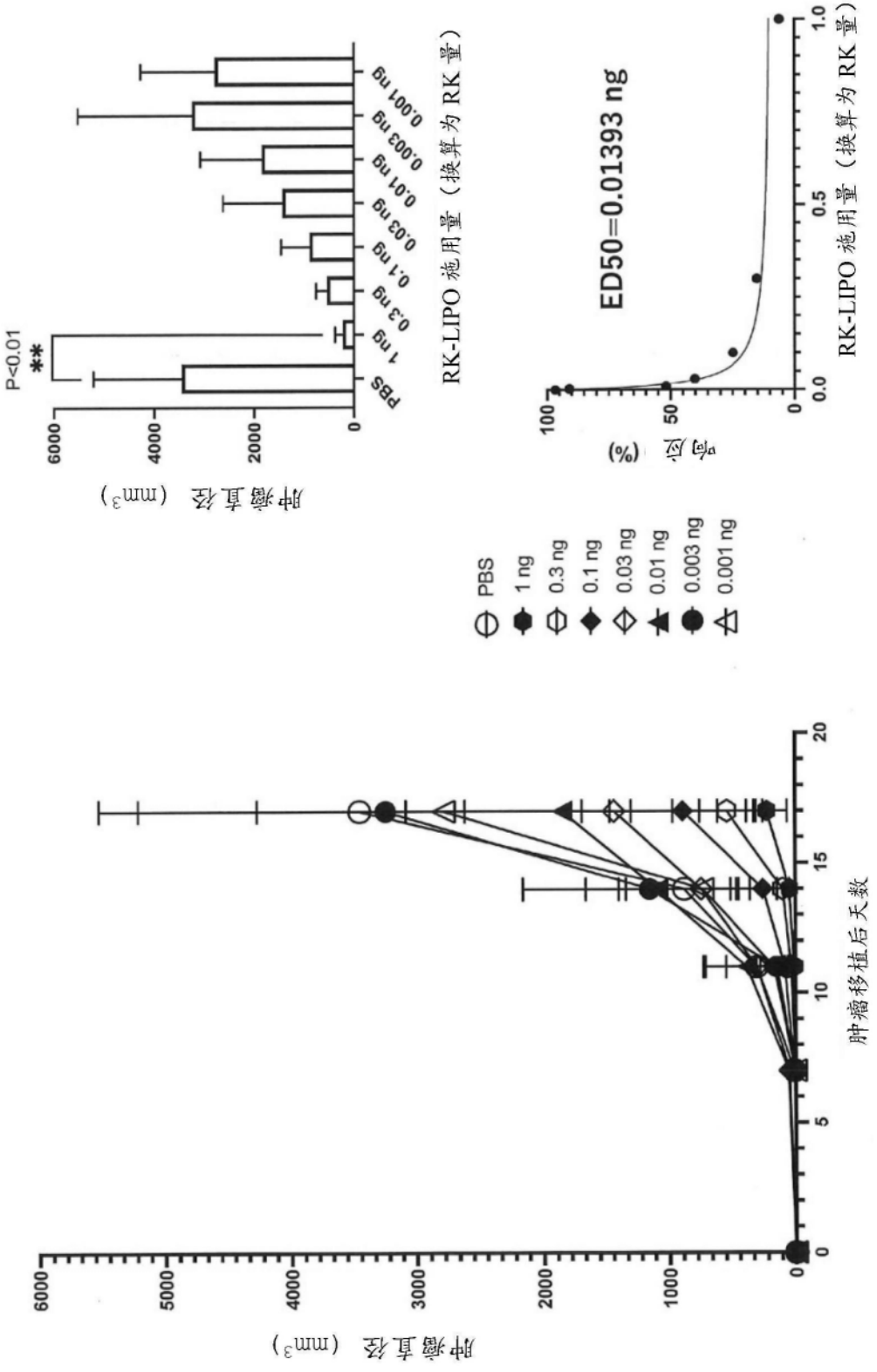

肿瘤直径 (mm³)
肿瘤移植后天数
PBS
1 ng
0.3 ng
0.1 ng
0.03 ng
0.01 ng
0.003 ng
0.001 ng
ED50=0.01393 ng
RK-LIPO 施用量（换算为 RK 量）
肿瘤直径 (mm³)
P<0.01
**
RK-LIPO 施用量（换算为 RK 量）

图2

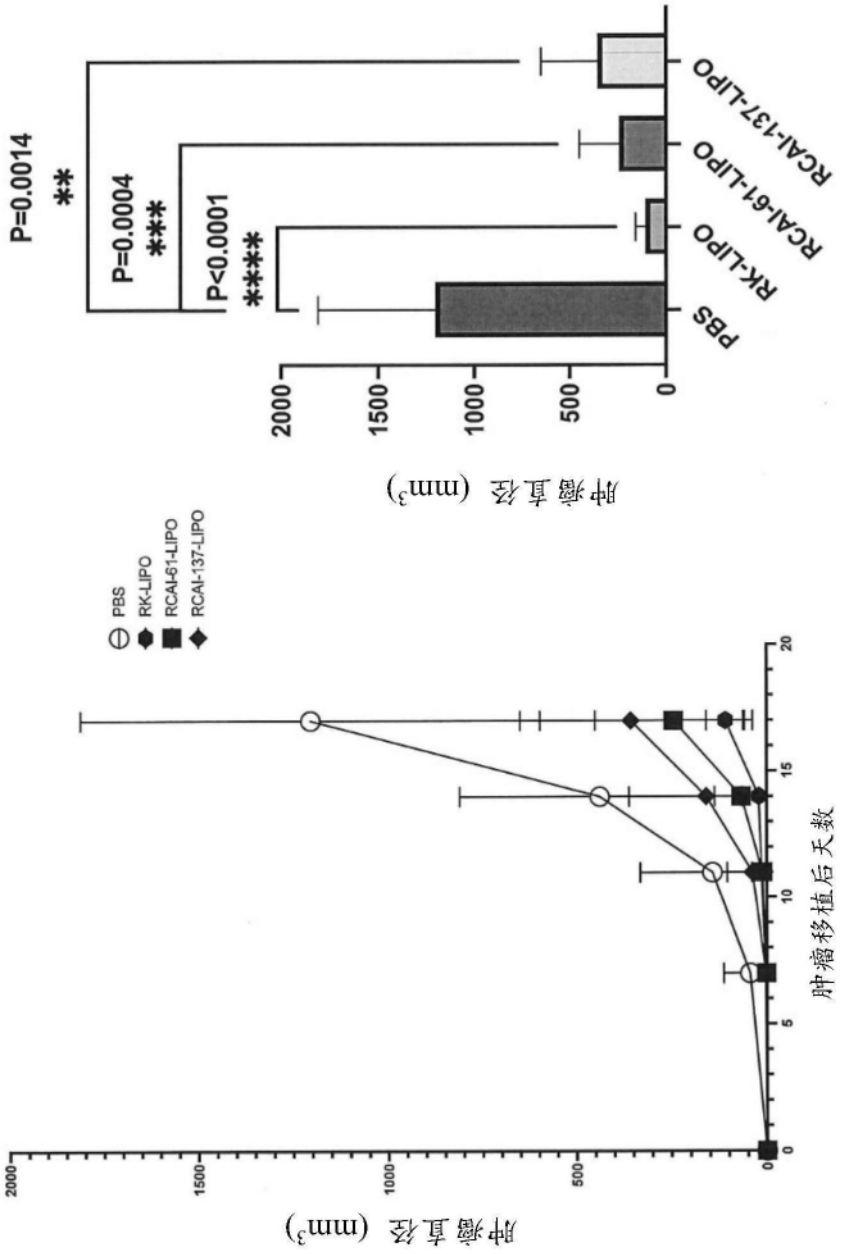

肿瘤直径 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
PBS
RK-LIPO
RCAI-61-LIPO
RCAI-137-LIPO
P=0.0014
**
P=0.0004
***
P<0.0001
****
肿瘤直径 (mm³)
肿瘤移植后天数
0
5
10
15
20

图3

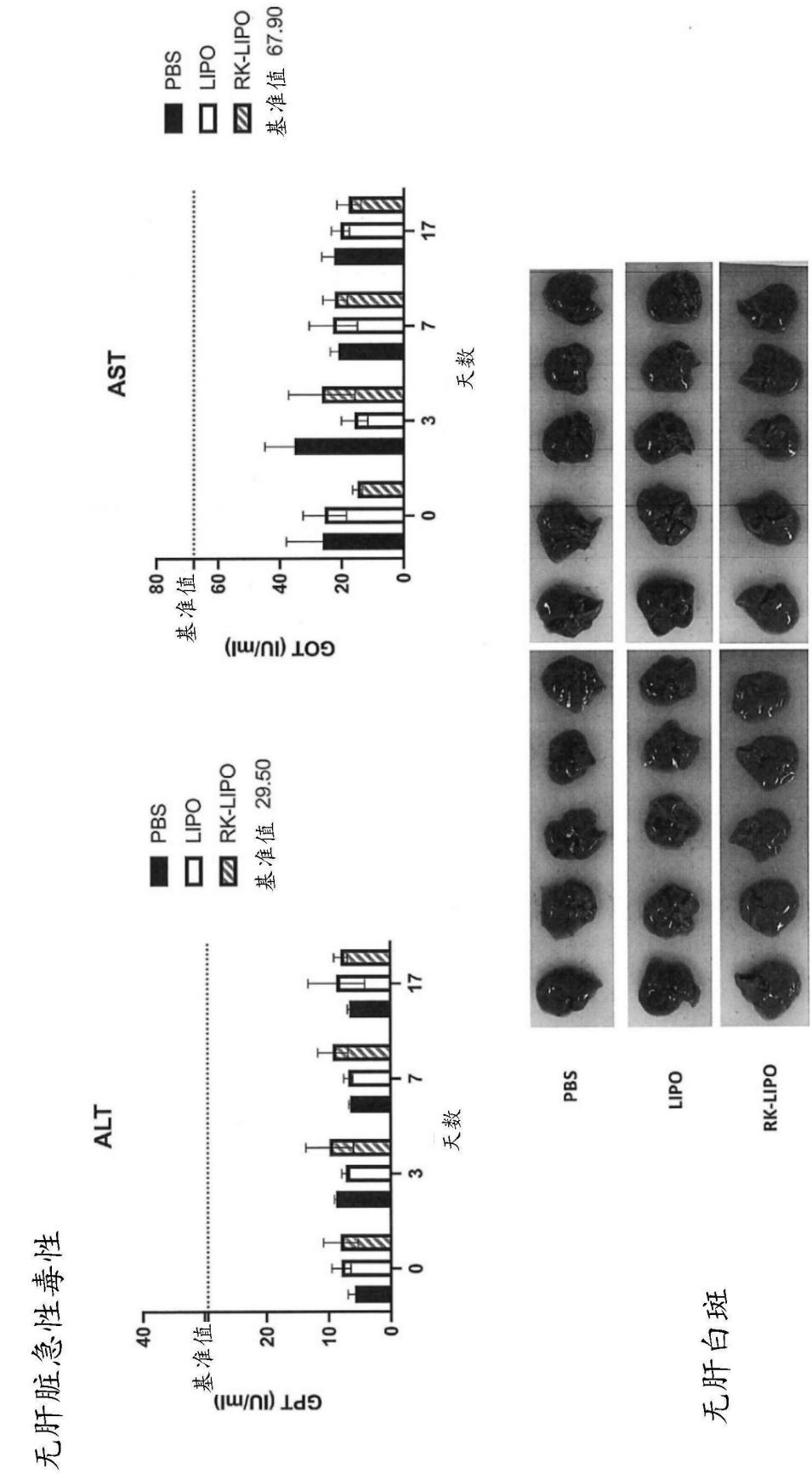

无肝脏急性毒性
ALT
GPT (IU/ml)
基准值
PBS
LIPO
RK-LIPO
基准值 29.50
天数
AST
GOT (IU/ml)
基准值
PBS
LIPO
RK-LIPO
基准值 67.90
天数
无肝白斑
PBS
LIPO
RK-LIPO

图4

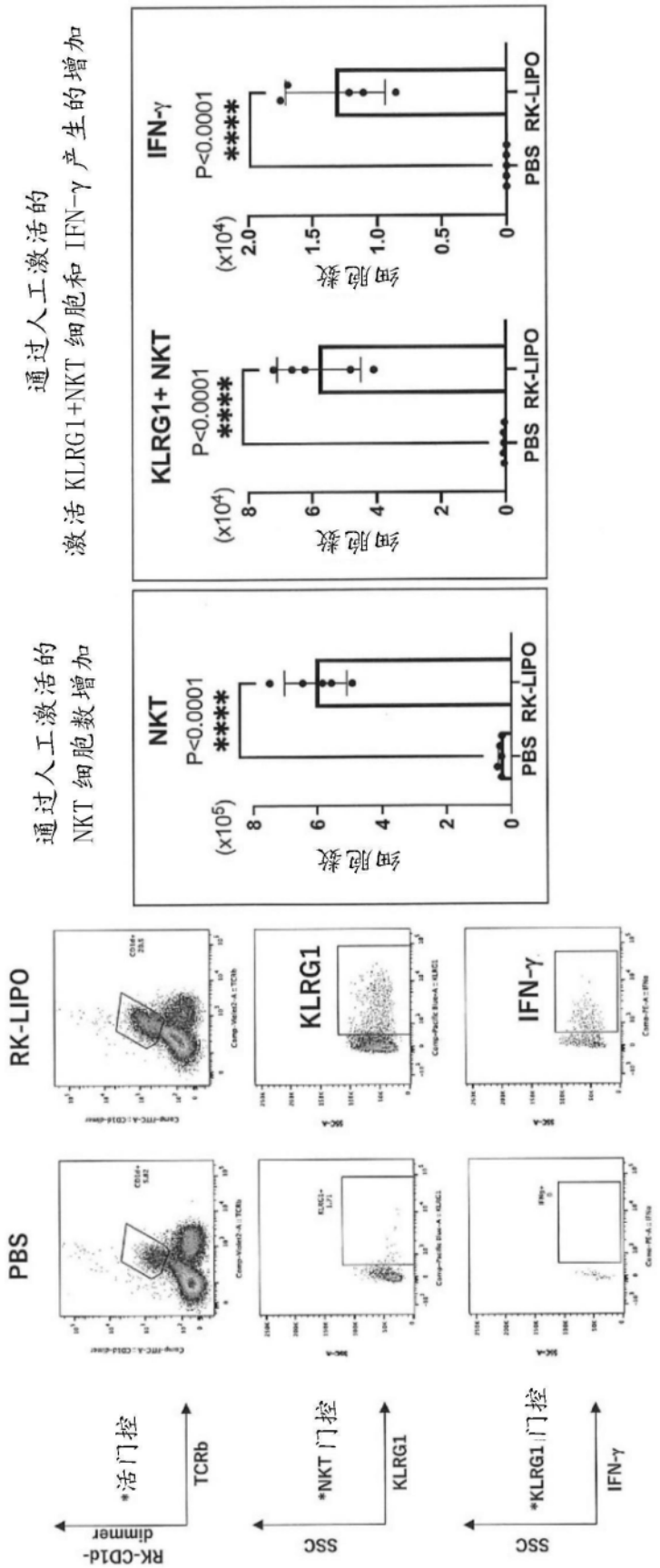

通过人工激活的
激活 KLRG1+NKT 细胞和 IFN-γ 产生的增加
通过人工激活的
NKT 细胞数增加
KLRG1+ NKT
IFN-γ
NKT
细胞数
(x10⁴)
(x10⁵)
P<0.0001
****
PBS
RK-LIPO
RK-LIPO
PBS
KLRG1
IFN-γ
*活门控
TCRb
RK-CD1d-dimmer
*NKT 门控
KLRG1
*KLRG1+门控
IFN-γ
SSC

图5-1

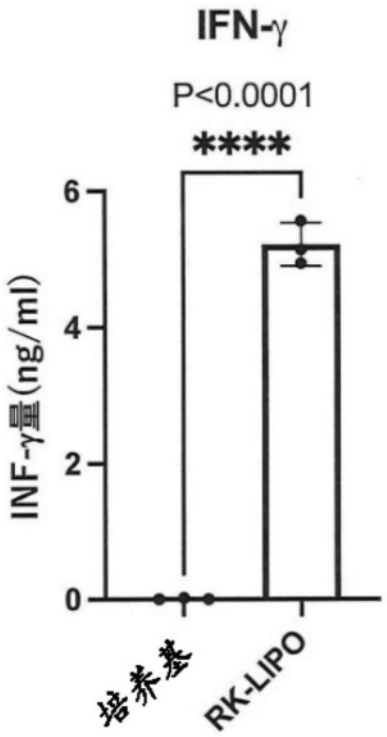



图5-2

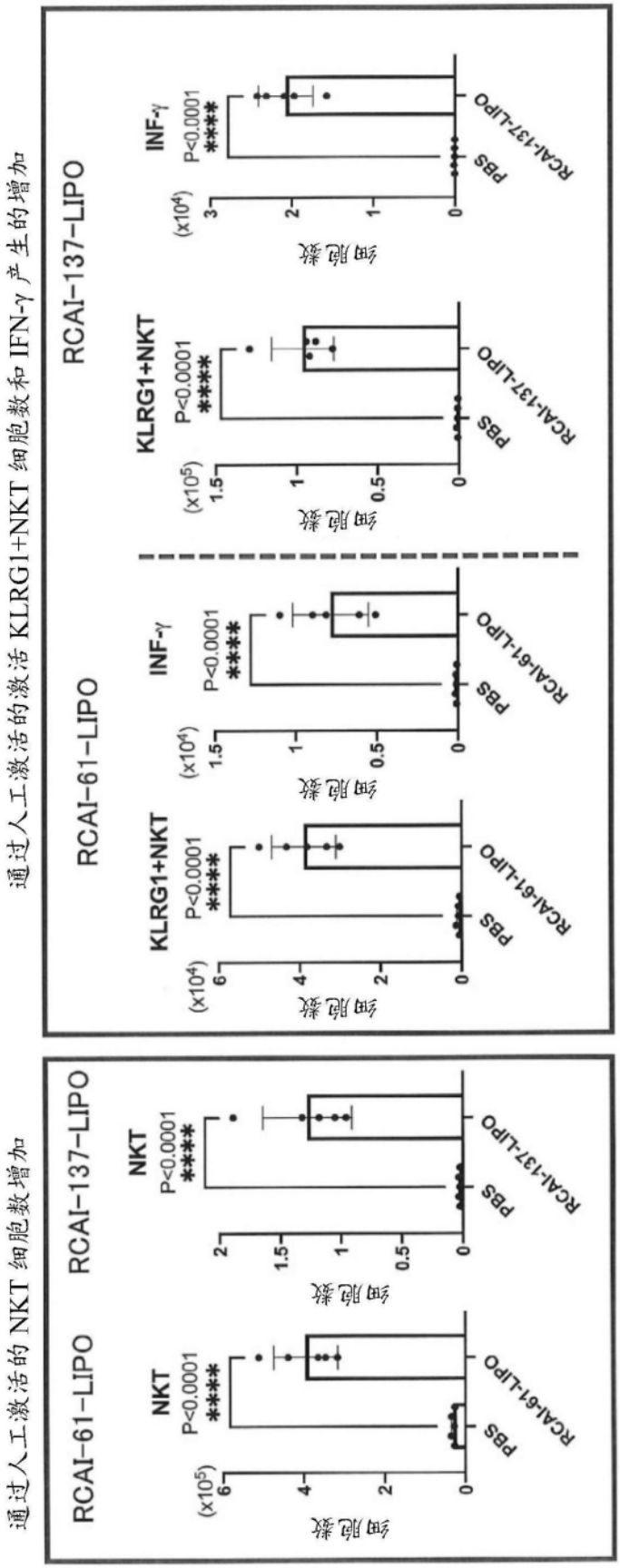

通过人工激活的 NKT 细胞数增加
RCAI-61-LIPO
RCAI-137-LIPO
NKT
P<0.0001
****
细胞数
(x10^5)
PBS
RCAI-61-LIPO
RCAI-137-LIPO
通过人工激活的激活 KLRG1+NKT 细胞数和 IFN-γ 产生的增加
RCAI-61-LIPO
RCAI-137-LIPO
KLRG1+NKT
INF-γ
P<0.0001
****
细胞数
(x10^4)
(x10^5)
PBS
RCAI-61-LIPO
RCAI-137-LIPO

图6

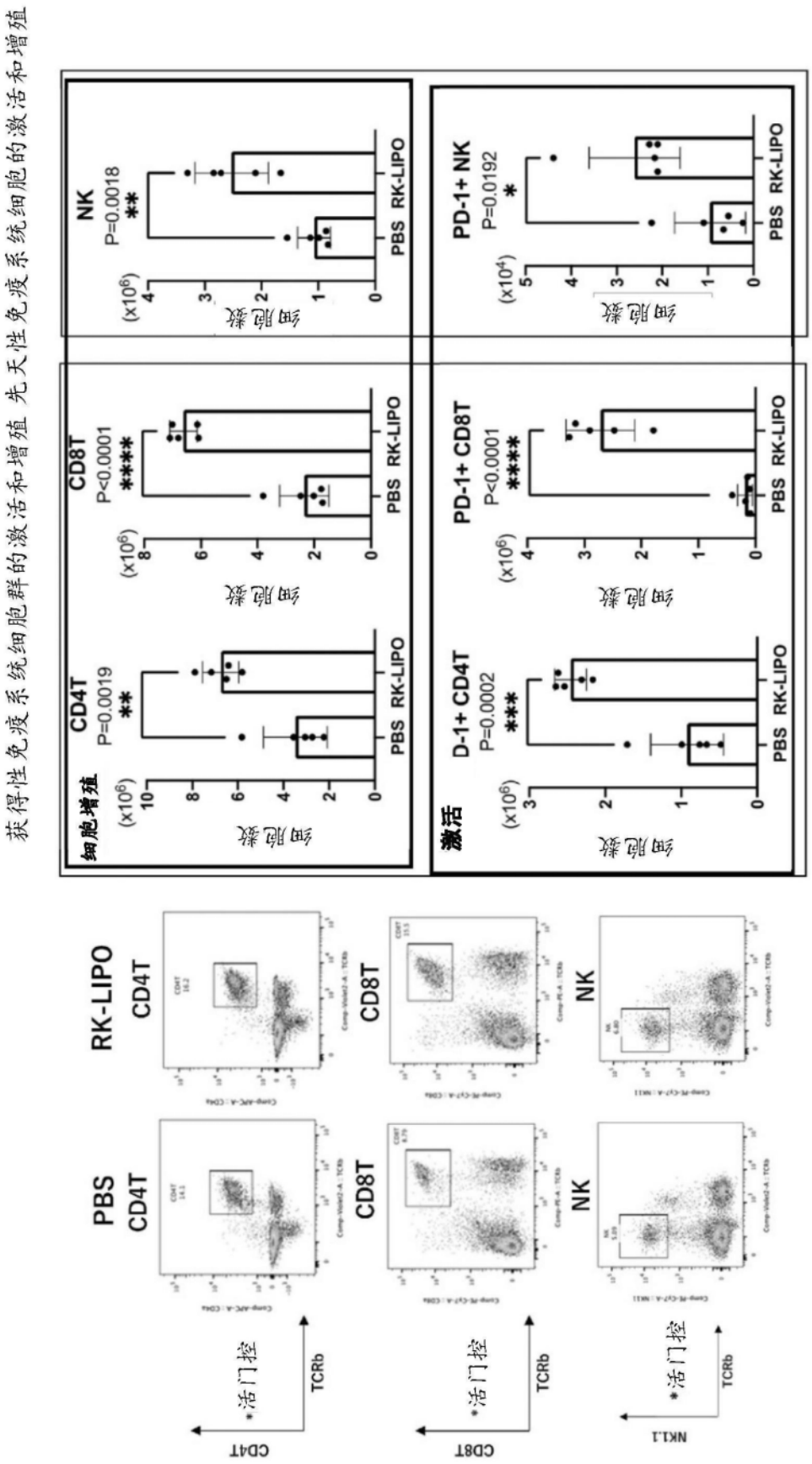

获得性免疫系统细胞群的激活和增殖 先天性免疫系统细胞的激活和增殖
细胞增殖
激活
CD4T
CD8T
NK
PD-1+ NK
D-1+ CD4T
PD-1+ CD8T
P=0.0019
P<0.0001
P=0.0018
P=0.0192
P=0.0002
细胞数
PBS
RK-LIPO
RK-LIPO
CD4T
CD8T
NK
*活门控
TCRb
CD4T
CD8T
NK1.1

图7

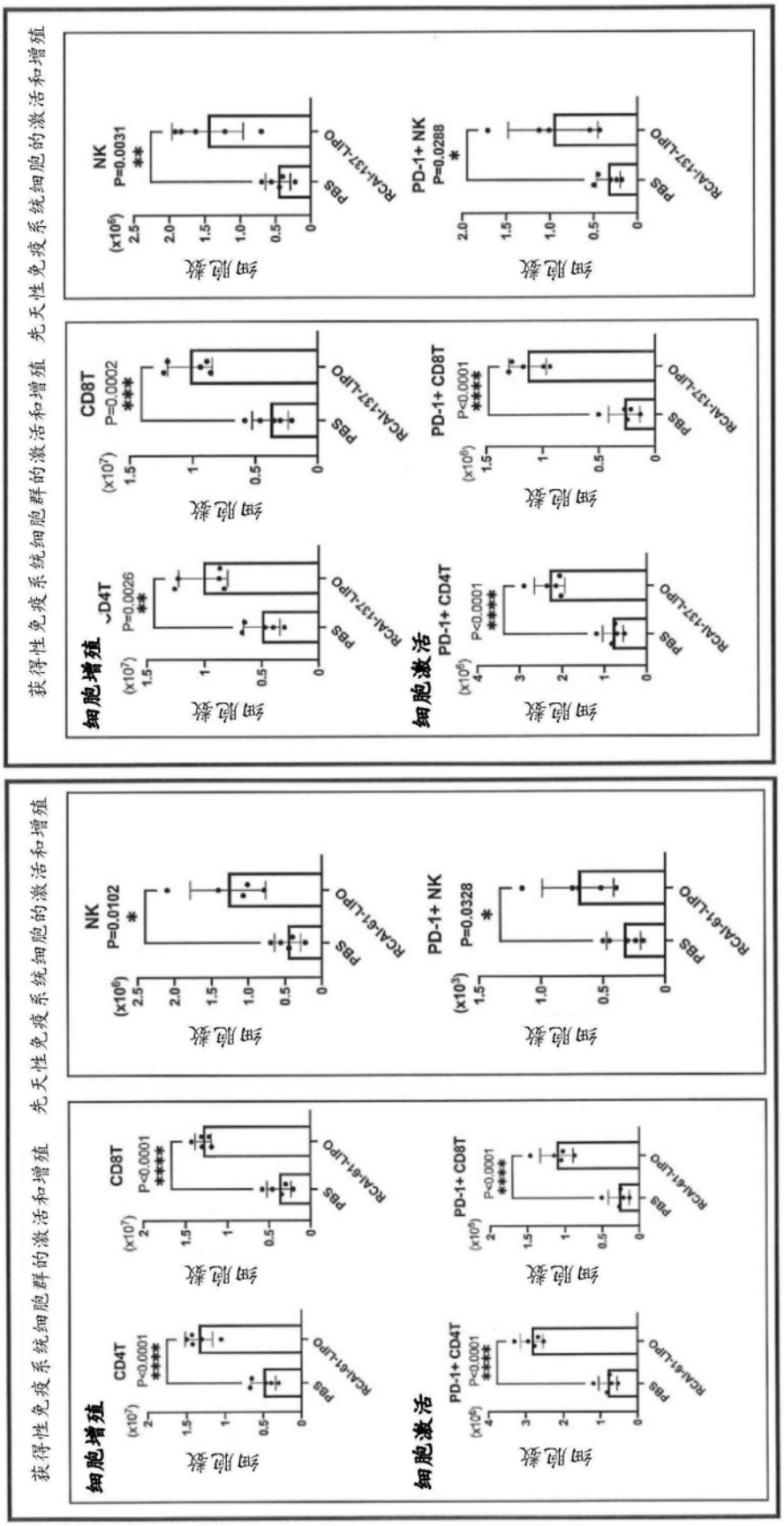

RCAI-137-LIPO 施用组
获得性免疫系统细胞群的激活和增殖 先天性免疫系统细胞的激活和增殖
细胞增殖
CD4T
CD8T
细胞激活
PD-1+ CD4T
PD-1+ CD8T
NK
PD-1+ NK
细胞数
PBS
RCAI-137-LIPO
RCAI-61-LIPO 施用组
获得性免疫系统细胞群的激活和增殖 先天性免疫系统细胞的激活和增殖

图8

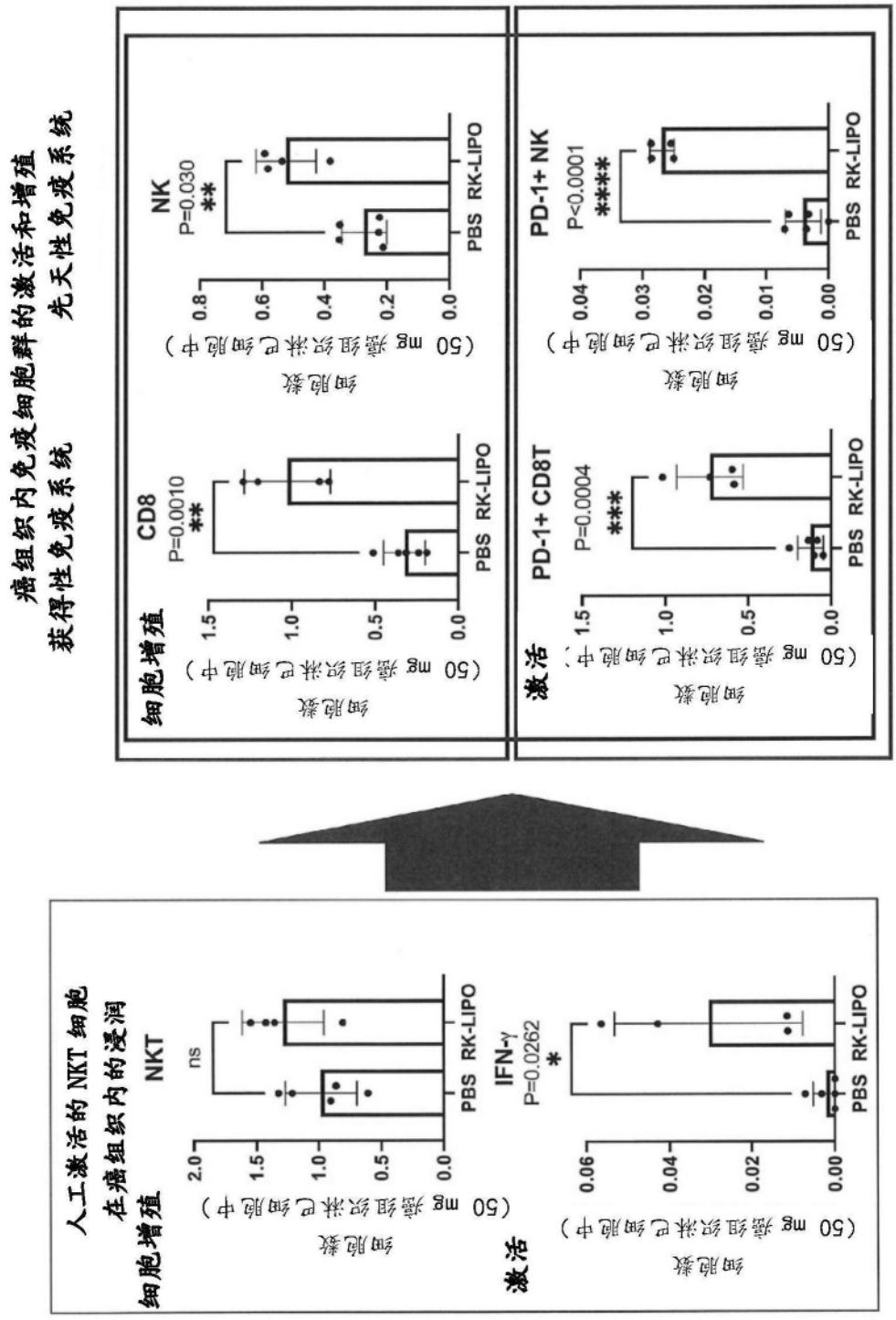

人工激活的 NKT 细胞
在癌组织内的浸润
细胞增殖
NKT
ns
IFN-γ
P=0.0262
*
激活
细胞数
(50 mg 癌组织淋巴细胞中)
PBS
RK-LIPO
癌组织内免疫细胞群的激活和增殖
获得性免疫系统
先天性免疫系统
细胞增殖
CD8
P=0.0010
**
NK
P=0.030
**
激活
PD-1+ CD8T
P=0.0004
***
PD-1+ NK
P<0.0001
****

图9

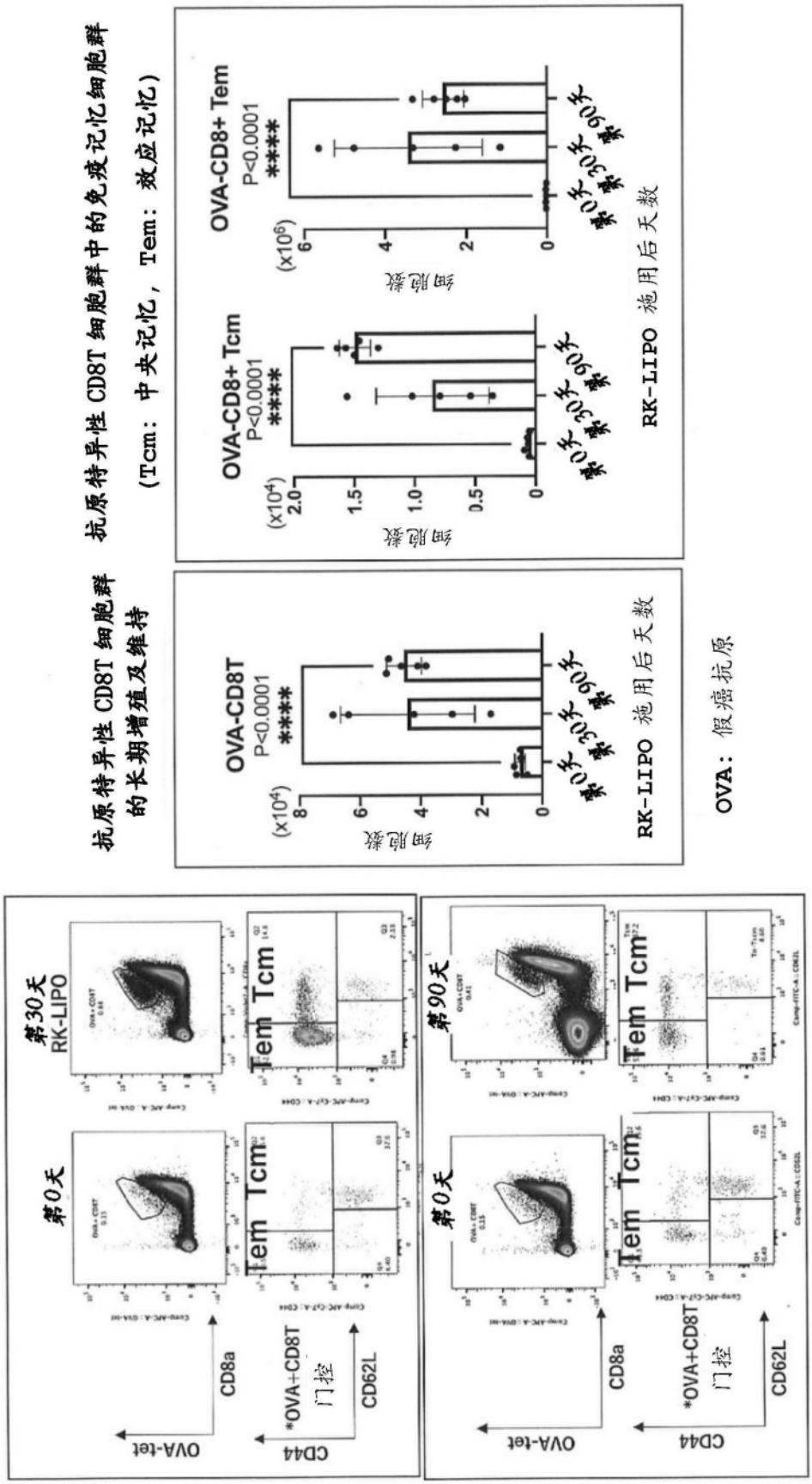

抗原特异性 CD8T 细胞群中的免疫记忆细胞群
(Tcm：中央记忆，Tem：效应记忆)
抗原特异性 CD8T 细胞群
的长期增殖及维持
OVA-CD8T
P<0.0001
****
OVA-CD8+ Tcm
P<0.0001
****
OVA-CD8+ Tem
P<0.0001
****
细胞数
RK-LIPO 施用后天数
OVA：假癌抗原
第30天
RK-LIPO
第0天
第90天
Tem Tcm
OVA-tet
CD8a
CD44
CD62L
*OVA+CD8T
门控

图10

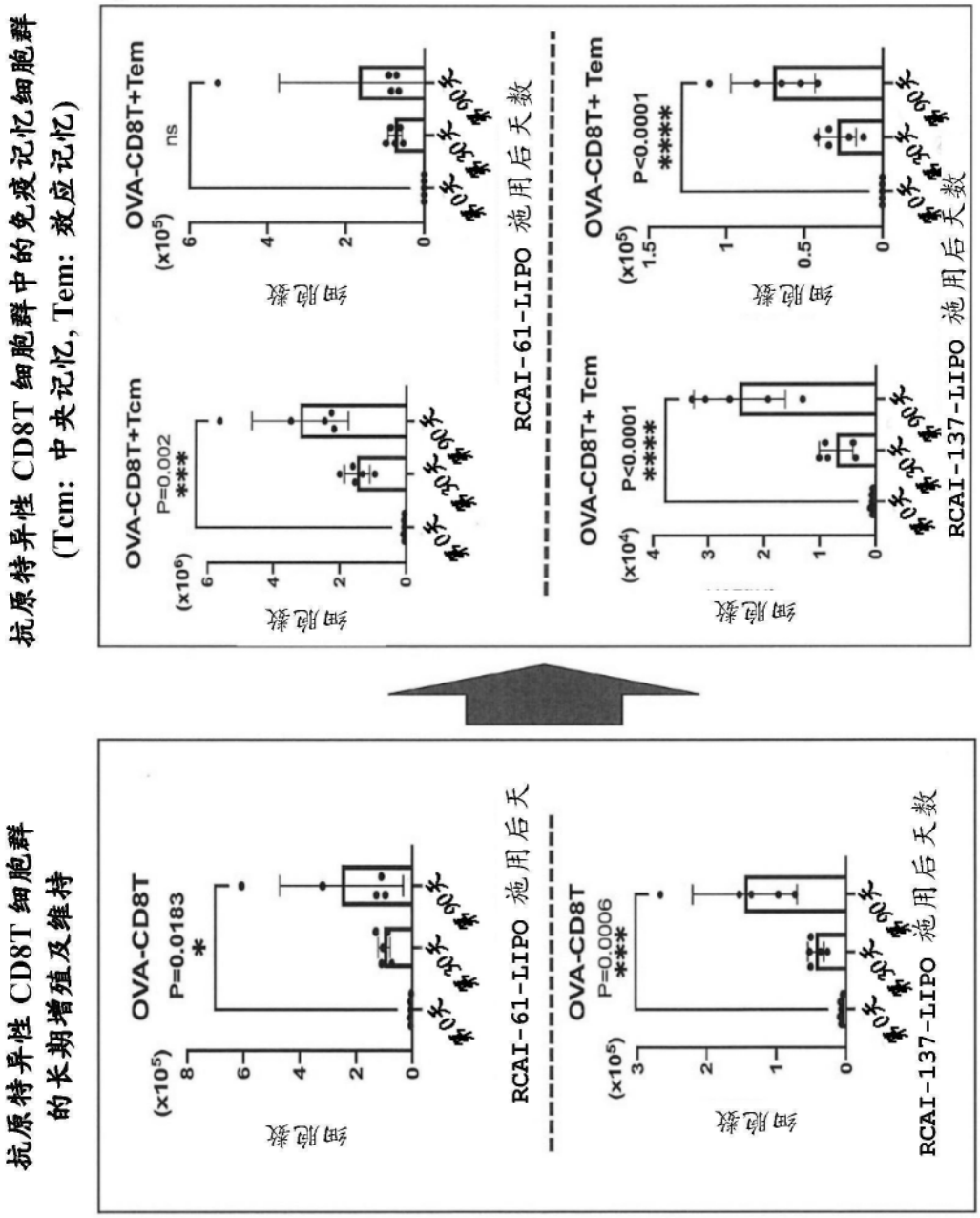

抗原特异性 CD8T 细胞群的长期增殖及维持
OVA-CD8T
P=0.0183
*
(×10⁵)
细胞数
RCAI-61-LIPO 施用后天
OVA-CD8T
P=0.0006
***
RCAI-137-LIPO 施用后天数
抗原特异性 CD8T 细胞群中的免疫记忆细胞群
(Tcm: 中央记忆, Tem: 效应记忆)
OVA-CD8T+Tcm
P=0.002
***
(×10⁶)
OVA-CD8T+Tem
ns
OVA-CD8T+ Tcm
P<0.0001
****
(×10⁴)
OVA-CD8T+ Tem
(×10⁵)
RCAI-61-LIPO 施用后天数
RCAI-137-LIPO 施用后天数

图11

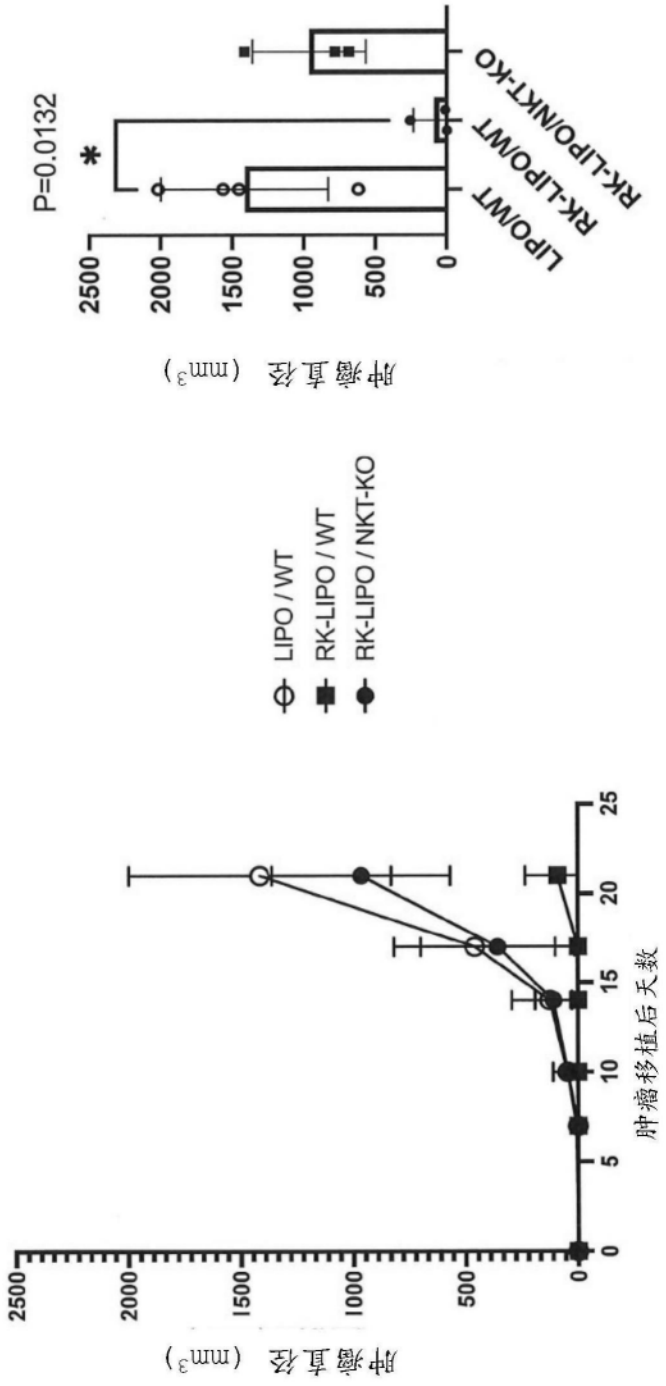

P=0.0132
*
LIPO/WT
RK-LIPO/WT
RK-LIPO/NKT-KO
0
500
1000
1500
2000
2500
肿瘤直径 (mm3)
LIPO / WT
RK-LIPO / WT
RK-LIPO / NKT-KO
肿瘤移植后天数
0
5
10
15
20
25
肿瘤直径 (mm3)

图12