(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年6月12日(12.06.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/121339 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/7032 (2006.01) *A61K 47/24* (2006.01)
A61K 9/1271 (2025.01) *A61K 47/28* (2006.01)
A61K 47/14 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/042812

(22) 国際出願日： 2024年12月4日(04.12.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-204574 2023年12月4日(04.12.2023) JP

(71) 出願人: 株式会社アンビシオン (**AMBICION CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1600017 東京都新宿区左門町２番６ ワコービル５階 (JP). 国立大学法人 東京大学 (**THE UNIVERSITY OF TOKYO**) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 (JP).

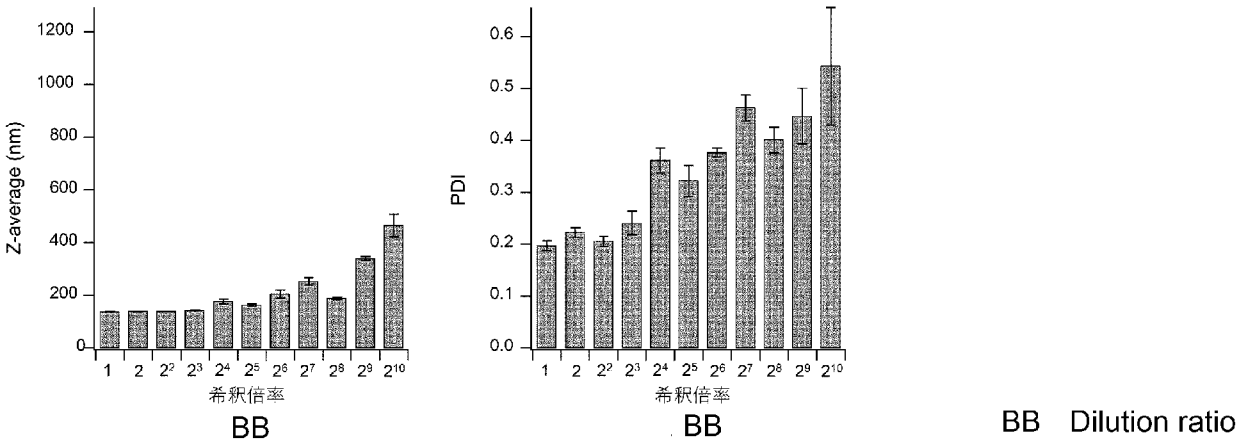
(72) 発明者: ホン テーフン (**HONG Taehun**); 〒1010047 東京都千代田区内神田１丁目３－６ (JP). 五十嵐 一紀(**IGARASHI Kazunori**); 〒1120002 東京都文京区小石川４－４－１１ (JP). カブラル オラシオ(**CABRAL Horacio**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 (JP).

(74) 代理人: 中山 ゆみ (**NAKAYAMA Yumi**); 〒6008009 京都府京都市下京区函谷鉾町１０１ アーバンネット四条烏丸ビル７Ｆ (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) **Title:** LIPOSOME AGENT, NKT CELL ACTIVATOR, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, AND USES OF THESE

(54) 発明の名称： リポソーム剤、ＮＫＴ細胞活性化剤、医薬組成物、およびこれらの用途



(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a composition that is superior for practical use with regard to a ligand for activating NKT cells. A liposome agent according to the present invention is characterized by containing a PEGylated liposome, and is also characterized in that: the PEGylated liposome contains an NKT cell ligand and a liposome-constituting lipid; the NKT cell ligand is an α-galactosylceramide, or an analog thereof, that is specifically recognized by an NKT cell receptor on an NKT cell; and the liposome-constituting lipid contains a choline-containing phospholipid, a PEGylated phospholipid, and a cholesterol-based lipid.

(57) 要約：本発明は、ＮＫＴ細胞を活性化するリガンドについて、より実用化に優れた組成物の提供を目的とする。本発明のリポソーム剤は、ＰＥＧ化リポソームを含み、前記ＰＥＧ化リポソームが、ＮＫＴ細胞リガンドとリポソーム構成脂質とを含み、前記ＮＫＴ細胞リガンドが、ＮＫＴ細胞上のＮＫＴ細胞受容体が特異的に認識する、αーガラクトシルセラミドまたはそのアナログであり、前記リポソーム構成脂質が、コリン含有リン脂質、ＰＥＧ化リン脂質、およびコレステロール系脂質を含むことを特徴とする。

WO 2025/121339 A1

［続葉有］

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能):ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一　国際調査報告(条約第21条(3))

明　細　書

発明の名称 ：

リポソーム剤、ＮＫＴ細胞活性化剤、医薬組成物、およびこれらの用途

技術分野

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

背景技術

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

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

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

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

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

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：ＷＯ９４／０９０２０号

特許文献2：ＷＯ９４／０２１６８号

特許文献3：ＷＯ９４／２４１４２号

特許文献4：ＷＯ９８／４４９２８号

非特許文献

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

発明の概要

発明が解決しようとする課題

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

課題を解決するための手段

[0009] 前記目的を達成するために、本発明のリポソーム剤は、

ＰＥＧ化リポソームを含み、

前記ＰＥＧ化リポソームが、ＮＫＴ細胞活性化リガンドとリポソーム構成脂

質とを含み、

前記ＮＫＴ細胞活性化リガンドが、ＮＫＴ細胞上のＮＫＴ細胞受容体が特異的に認識する、α－ガラクトシルセラミドまたはそのアナログであり、

前記リポソーム構成脂質が、コリン含有リン脂質、ＰＥＧ化脂質、およびコレステロール系脂質を含むことを特徴とする。

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

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

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

発明の効果

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

図面の簡単な説明

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

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

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

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

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

て細胞数の分布を表したグラフである。図４Ｂは、脾臓におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ陽性のＮＫＴ細胞の量を定量化したグラフである。

[図5]図５Ａは、リンパ節におけるＮＫＴ細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性の細胞について、ＣＤ陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図５Ｂは、リンパ節におけるＮＫ細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるＮＫ１．１陽性のＮＫ細胞について、ＮＫ１．１陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図５Ｃは、リンパ節におけるＴ細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるＣＤ３陽性のＴ細胞について、ＣＤ３陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図５Ｄは、リンパ節におけるＮＫＴ細胞のヒストグラムである。図５Ｅは、リンパ節におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性のＮＫＴ細胞の量を定量化したグラフである。

[図6]図６Ａは、脾臓におけるＮＫＴ細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性の細胞について、ＣＤ３陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図６Ｂは、脾臓におけるＮＫ細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるＮＫ１．１陽性のＮＫ細胞について、ＮＫ１．１陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図６Ｃは、脾臓におけるＴ細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるＣＤ３陽性のＴ細胞について、ＣＤ３陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図６Ｄは、脾臓におけるＮＫＴ細胞のヒストグラムである。図６Ｅは、脾臓におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性のＮＫＴ細胞の量を定量化したグラフである。

[図7]図７Ａは、リンパ節における樹状細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるＣＤ１１ｃ陽性細胞について、ＣＤ１１ｃ陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数分布を示したグラフである。図７Ｂは、リンパ節における樹状細胞のヒストグラムである。図７Ｃは、リンパ節におけるマクロファージのヒストグラムであり、リンパ節におけるＣＤ６８陽性細胞について、ＣＤ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[図15]図１５は、マウスの体重（ｇ）と投与開始からの日数との関係を示す

グラフである。

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

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

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

[図18A]図１８Ａは、リンパ節における蛍光を示す画像である。

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

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

[図20]図２０は、がんが転移した肝臓における蛍光を示す画像である。

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

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

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

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

[図23A]図２３Ａは、ＮＫ１．１の蛍光強度とＣｙ５の蛍光強度とによって細

胞の分布を示したグラフである。

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

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

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

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

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

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

[図27B]図２７Ｂは、リンパ節における蛍光強度を定量化したグラフである。

[図28]図２８は、投与サンプルの電子顕微鏡写真である。

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

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

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

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

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

[図33]図３３は、マウスのリンパ節の切片の蛍光顕微鏡観察画像である。

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

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

発明を実施するための形態

[0015] ［１］　ＰＥＧ化リポソームを含み、

前記ＰＥＧ化リポソームが、ＮＫＴ細胞活性化リガンドとリポソーム構成脂質を含み、

前記ＮＫＴ細胞活性化リガンドが、ＮＫＴ細胞上のＮＫＴ細胞受容体が特異的に認識する、α－ガラクトシルセラミドまたはそのアナログであり、

前記リポソーム構成脂質が、コリン含有リン脂質、ＰＥＧ化脂質、およびコレステロール系脂質を含むことを特徴とする、リポソーム剤。

［２］　前記コリン含有リン脂質が、ホスファチジルコリンである、［１］に記載のリポソーム剤。

［３］　前記ホスファチジルコリンにおける２つの脂肪酸が、それぞれ独立

して、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である、［２］に記載のリポソーム剤。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

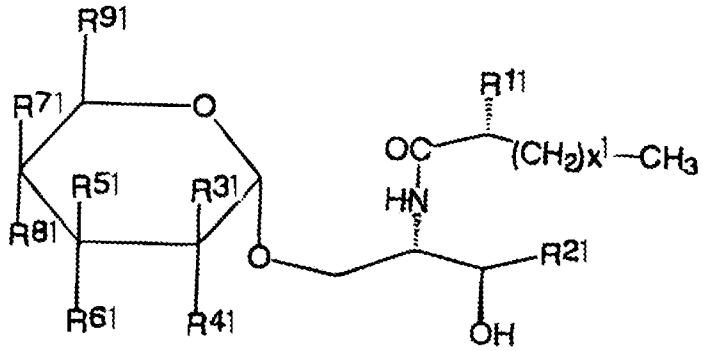
［１３］　前記ＰＥＧ化リポソームにおいて、前記コリン含有リン脂質（Ｘ

）、前記ＰＥＧ化脂質（Ｙ）、および前記コレステロール系脂質（Ｚ）のｍｏｌ％の比率が、Ｘ：Ｙ：Ｚ＝１：（０．０３～０．１７６）：（０．３４～１．３５）である

、［１］から［１２］のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

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

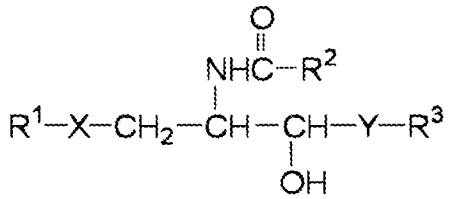
[化1]



(I)

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

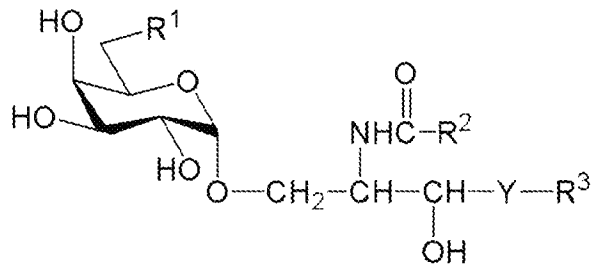
[化2]



(II)

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

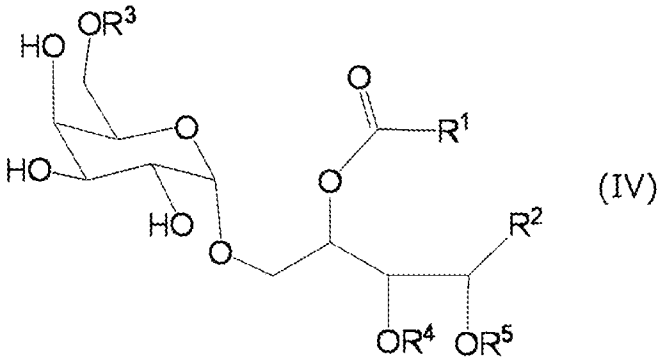
[化3]



(III)

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

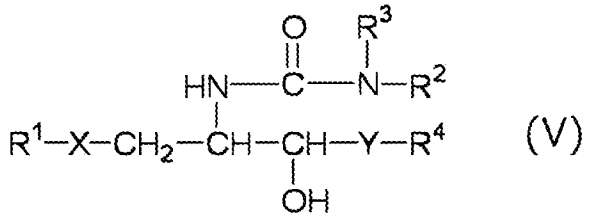
[化4]



(IV)

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

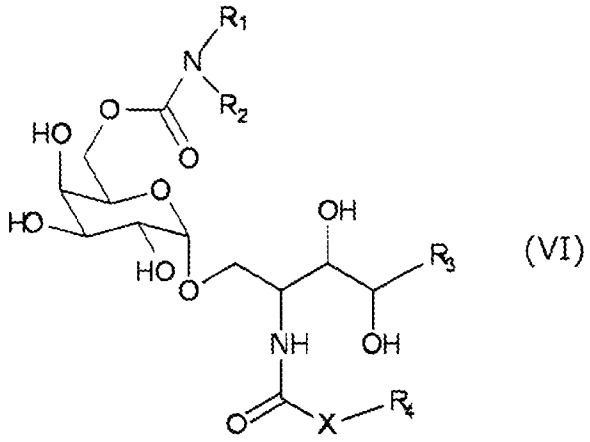
[化5]



(V)

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

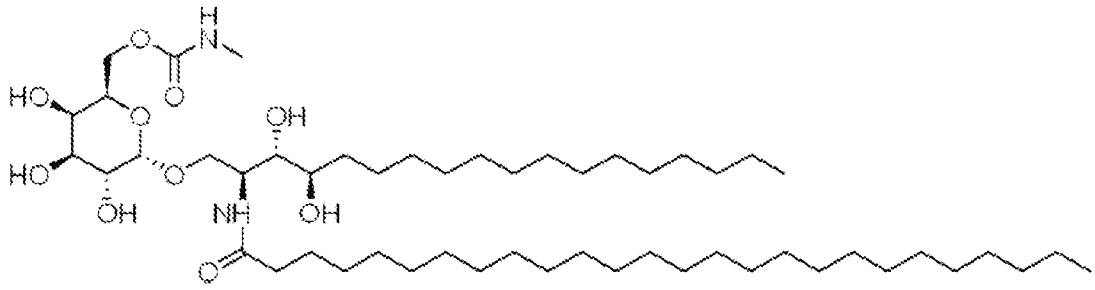
[化6]



(VI)

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

[化7]



・・・（VI-1）

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

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

（条件２）前記ＰＥＧ化脂質において、ＰＥＧの末端が水酸基である

（条件３）前記ＰＥＧ化リポソームの表面電荷が、負電荷である

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

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

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

［２５］　抗がん用である、［２４］に記載の医薬組成物。

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

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

［２８］　抗がん用であり、対象がんが、トリプルネガティブ乳がんであり、

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

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

（条件２）前記ＰＥＧ化脂質において、ＰＥＧの末端が水酸基である

（条件３）前記ＰＥＧ化リポソームの表面電荷が、負電荷である

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

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

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

［３２］　被検体に、［１］から［２２］のいずれか一項に記載のリポソー

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

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

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

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

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

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

[0019]　リポソームとは、脂質二重層を形成した脂質小胞である。

[0020] １．リポソーム剤

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

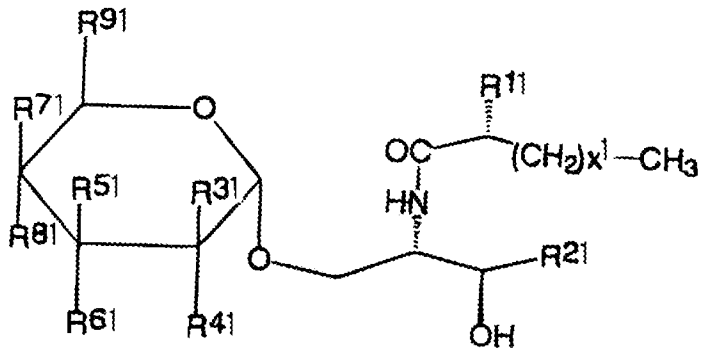
[0021] （１）ＮＫＴ細胞活性化リガンド

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

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

[0022] （１－１）式（Ｉ）の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化1]



(I)

[0023] 式（Ｉ）中、

R^{11}は、ＨまたはＯＨであり、

X^{1}は、７～２７のいずれかの整数であり、

R^{21}は、下記（ａ）～（ｅ）からなる群から選択される置換基である（Ｙ１は、５～１７のいずれかの整数である）。

（ａ） $-CH_2(CH_2)_{Y1}CH_3$

（ｂ） $-CH(OH)(CH_2)_{Y1}CH_3$

（ｃ） $-CH(OH)(CH_2)_{Y1}CH(CH_3)_2$

（ｄ） $-CH=CH(CH_2)_{Y1}CH_3$

（ｅ） $-CH(OH)(CH_2)_{Y1}CH(CH_3)CH_2CH_3$

[0024] 式（Ｉ）中、R^{31}～R^{91}は、下記ｉ）またはｉｉ）で定義される置換基で

ある。

ｉ）　R^{31}、R^{61}、およびR^{81}がＨのとき、

R^{41}は、Ｈ、ＯＨ、NH_2、$NHCOCH_3$、または下記基（Ａ）～（Ｄ）からなる群から選択される置換基であり、

R^{51}はＯＨ、または下記基（Ｅ）および（Ｆ）からなる群から選択される置換基であり、

R^{71}は、ＯＨまたは下記基（Ａ）～（Ｄ）からなる群から選択される置換基であり、

R^{91}は、Ｈ、CH_3、CH_2OH、または下記基（Ａ’）～（Ｄ’）からなる群から選択される置換基である。

ｉｉ）　R^{31}、R^{61}およびR^{71}がＨのとき、

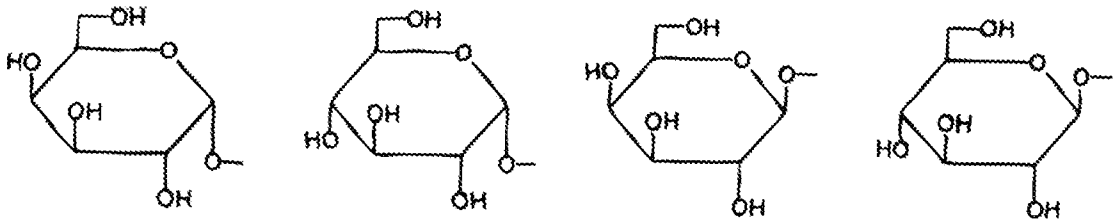
R^{41}は、Ｈ、ＯＨ、NH_2、$NHCOCH_3$、または下記基（Ａ）～（Ｄ）からなる群から選択される置換基であり、

R^{51}は、ＯＨ、または下記基（Ｅ）および（Ｆ）からなる群から選択される置換基であり、

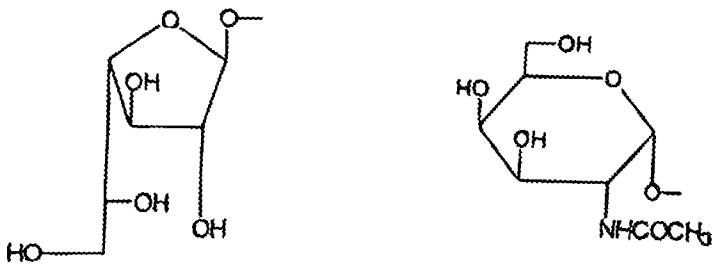
R^{81}は、ＯＨ、または下記基（Ａ）～（Ｄ）からなる群から選択される置換基であり、

R^{91}は、Ｈ、CH_3、CH_2OHまたは下記基（Ａ’）～（Ｄ’）からなる群から選択される置換基である。

[0025] [化8]

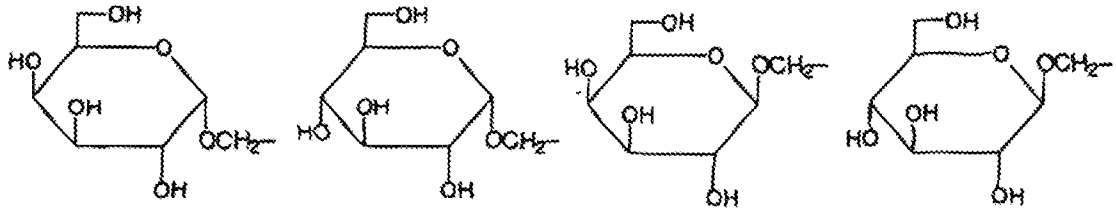


[化9]



(E) (F)

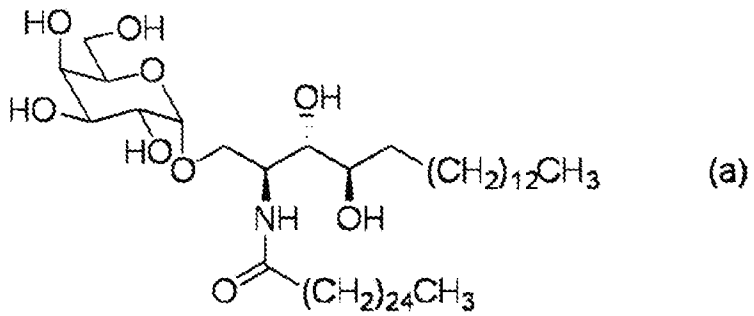
[化10]



(A') (B') (C') (D')

[0026] 前記式（Ｉ）の化合物としては、例えば、下記式（ａ）に示すα－ＧａｌＣｅｒ（α－ガラクトシルセラミド）が好ましい。α－ＧａｌＣｅｒは、化学名は、（２Ｓ，３Ｓ，４Ｒ）－１－Ｏ－（α－Ｄ－ガラクトピラノシル）－２－ヘキサコサノイルアミノ－１，３，４－オクタデカントリオールである。

[0027] [化11]

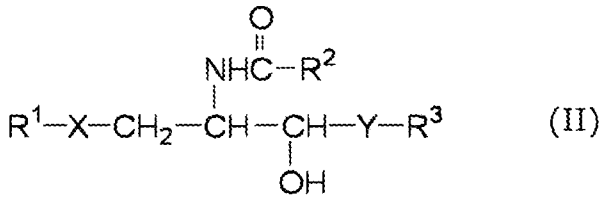


(a)

[0028] 前記式（Ｉ）の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報（ＷＯ９４／０９０２０、ＷＯ９４／０２１６８、ＷＯ９４／２４１４２、ＷＯ９８／４４９２８等）および論文（Ｓｃｉｅｎｃｅ，　２７８，　ｐ．１６２６－１６２９，　１９９７）等に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式（Ｉ）の化合物が前記ＮＫＴ細胞活性化リガンドの機能を有することは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0029] （１－２）式（II）の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化2]



(II)

[0030] 式（II）中、R^1は、α－カルバ糖残基を示し、R^2およびR^3は、それぞれ独立に、炭素数１～２８の置換または非置換の炭化水素基を示し、Ｘは、酸素原子、硫黄原子、－CH_2－またはＮＨ－を示し、Ｙは、－CH_2－、－ＣＨ（ＯＨ）－またはＣＨ＝ＣＨ－を示す。

[0031] 前記式（II）の化合物は、中でも以下の化合物が好ましい。

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

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

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

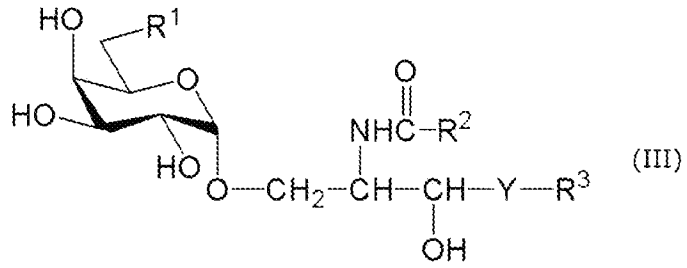
［４］　（２Ｓ，３Ｓ，４Ｒ）－１－（５ａ－カルバ－α－Ｄ－グルコピラノシルチオ）－２－（ヘキサコサノイルアミノ）－３，４－オクタデカンジオール

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

[0032]　前記式（II）の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報（ＷＯ２００８／１０２８８８、米国特許Ｎｏ．８２９９２２３等）に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式（II）の化合物等が前記ＮＫＴ細胞活性化リガンドの機能を有することは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0033]（１－３）式（III）の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化3]



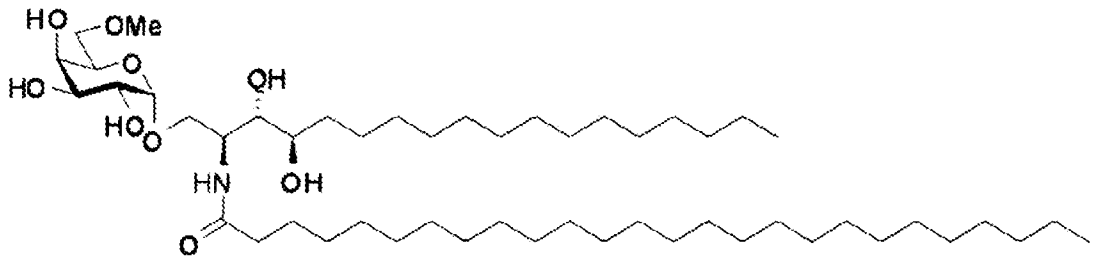
(III)

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

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

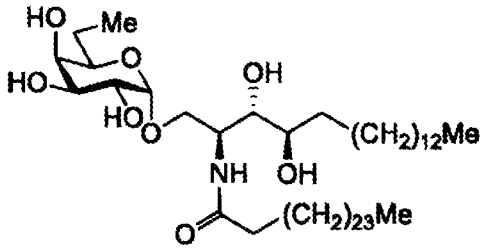
[0036] Ａ１２

[化12]



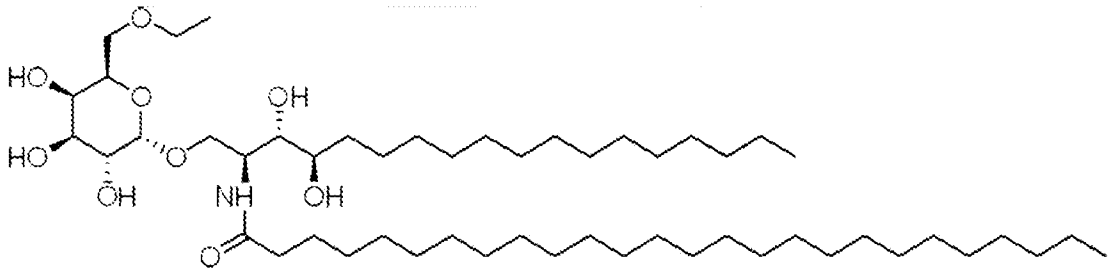
[0037] A13

[化13]



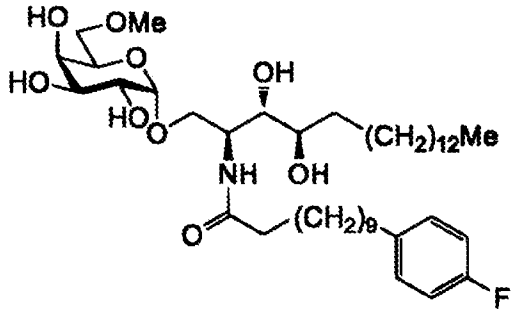
[0038] A14

[化14]



[0039] A15

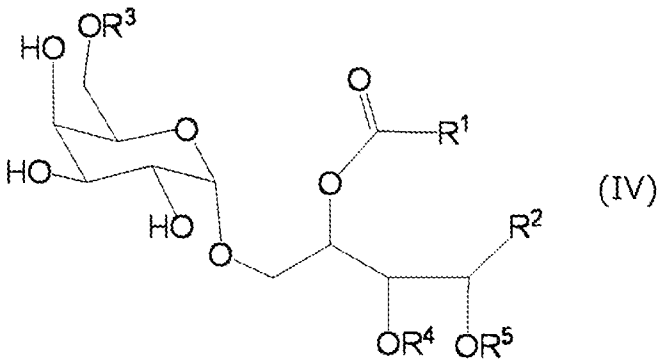
[化15]



[0040] 前記式（III）の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報（ＷＯ２００９／１１９６９２、米国特許Ｎｏ．８５５１９５９等）に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式（III）の化合物等が前記ＮＫＴ細胞活性化リガンドの機能を有することは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0041] （１－４）式（IV）の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化4]



(IV)

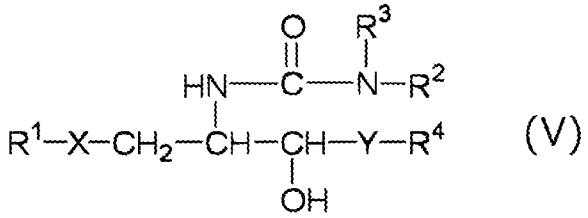
[0042] 式（IV）中、Ｒ^{1}は、炭素数１～３０の炭化水素基を示し、Ｒ^{2}は、炭素数１～２０の炭化水素基を示し、Ｒ^{3}は、水素原子または炭素数１～５の炭化水素基を示す。式（IV）中、Ｒ^{4}およびＲ^{5}は、同一または異なって、水素原子または炭素数１～５の炭化水素基を示してもよいし、または、Ｒ^{4}とＲ^{5}とが一緒になって、炭素数１～５の２価の炭化水素基となり、隣接するエチレンジオキシと共に環構造を形成していてもよい。

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

ＷＯ２０１０／０３００１２、米国特許Ｎｏ．８５８０７５１等）に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式（IV）の化合物等が前記ＮＫＴ細胞活性化リガンドの機能を有することは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0044] （１－５）式（Ｖ）の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化5]



(V)

[0045] 式（Ｖ）中、R^1は、アルドピラノース残基を示し、６位水酸基がアルキル化されていてもよく、R^2は、炭素数１～２６の炭化水素基を示し、置換基を有していてもよく、R^3は、炭素数１～２６の炭化水素基を示し、水素原子または置換基を有していてもよく、R^4は、炭素数１～２１の炭化水素基を示し、置換基を有していてもよく、Ｘは、酸素原子またはCH_2－を示し、Ｙは、－CH_2－、－ＣＨ（ＯＨ）－またはＣＨ＝ＣＨ－を示す。

[0046] 前記式（Ｖ）の化合物は、中でも以下の化合物が好ましい。

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

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

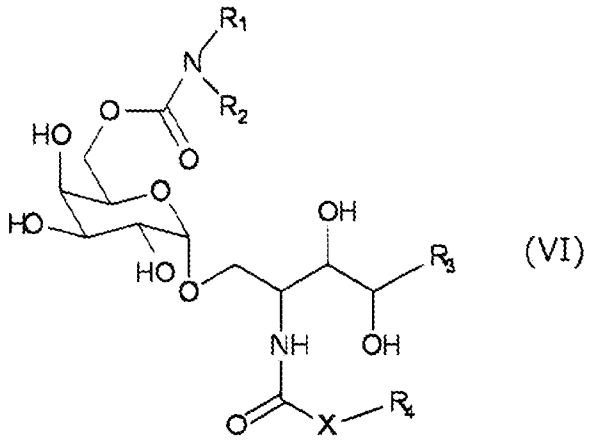
［３］ （２Ｓ，３Ｓ，４Ｒ）－１－（６－Ｏ－メチル－α－Ｄ－ガラクトピラノシルオキシ）－２－（テトラコサニルウレイド）－３，４－オクタデカンジオール

[0047] 前記式（Ｖ）の化合物、その塩、または溶媒和物は、例えば、特許公報（ＷＯ２０１１／５５２８４２、米国特許Ｎｏ．８８５３１７３等）に記載されたものが使用でき、また、これらに記載された方法により製造できる。なお、前記式（Ｖ）の化合物等が前記ＮＫＴ細胞活性化リガンドの機能を有す

ることは、これらの文献等においてすでに確認済である。

[0048] （１－６）式（VI）の化合物、その塩、または溶媒和物。

[化6]



(VI)

[0049] 式（VI）中、

Ｘは、アルキレン基または－ＮＨ－を示し、

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

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

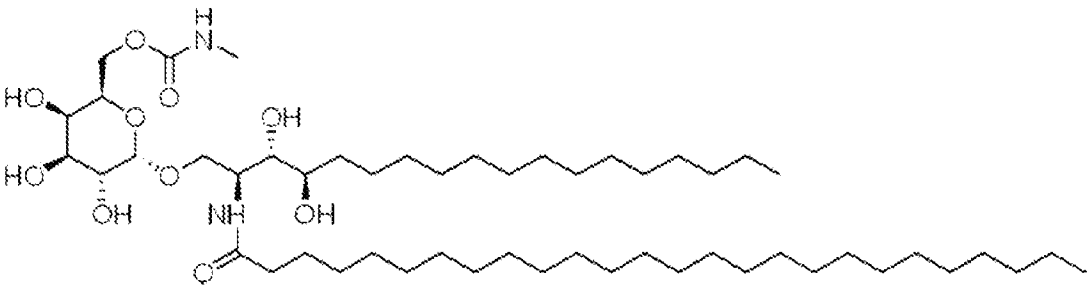
R_3は、炭素数１～２０の炭化水素基を示し、

R_4は、炭素数１～３０の炭化水素基を示す。

[0050] 前記式（VI）の化合物は、中でも以下の化合物が好ましい。

[0051] Ｂ７

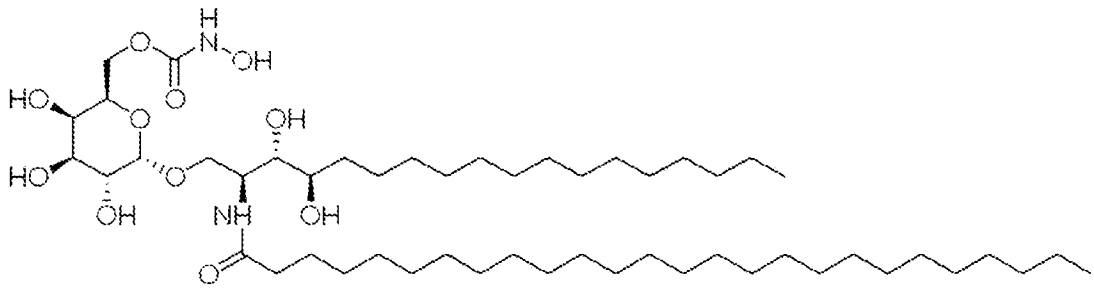
[化7]



・・・ (VI-1)

[0052] Ｂ１６

[化16]



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

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

[0055] （２）リポソーム構成脂質

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

[0056] （２－１）コリン含有リン脂質

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

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

[0057] 前記脂肪酸は、例えば、炭素鎖の末端にカルボキシル基を有する構造であり、炭素鎖が飽和した飽和脂肪酸でも、炭素鎖に二重結合を有する不飽和脂肪酸でもよい。前記コリン含有リン脂質において、２つの脂肪酸は、それぞれ独立して、飽和脂肪酸でも、不飽和脂肪酸でもよい。２つの脂肪酸の組合せは、例えば、飽和脂肪酸の組合せ、不飽和脂肪酸の組合せ、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸との組合せ等があげられる。２つの脂肪酸は、例えば、それぞれ独立して、分岐のある脂肪酸でもよいし、分岐のない脂肪酸でもよい。２つの脂肪酸は、例えば、同じ炭素数でもよいし、異なる炭素数でもよいし、同じ長さの炭素鎖（主鎖）を有してもよいし、異なる長さの炭素鎖（主鎖）を有してもよい。

[0058] 前記脂肪酸の炭素数は、例えば、８～７０、２４～７０、４２～５８である。前記脂肪酸の主鎖の炭素数は、例えば、４～３５、１２～３５、２１～２９である。

[0059] 前記コリン含有リン酸脂質は、例えば、下記表のような脂肪酸の組合せがあげられ、具体例として、以下のホスファチジルコリンがあげられる。

[0060] [表1]

コリン含有リン脂質		
脂肪酸の組合せ		具体例
脂肪酸１	脂肪酸２	ホスファチジルコリン
パルミチン酸 Ｃ１６ 飽和	パルミチン酸 Ｃ１６ 飽和	1,2 - dipalmitoyl - sn - glycero - 3 - phosphocholin (DPPC) 16:0 - 16:0
オレイン酸 Ｃ１８ 不飽和	オレイン酸 Ｃ１８ 不飽和	1,2 - Dioleoyl - sn - glycero - 3 - phosphocholine (DOPC) 18:1 - 18:1
パルミチン酸 Ｃ１６ 飽和	オレイン酸 Ｃ１８ 不飽和	1 - Palmitoyl - 2 - oleoyl - sn - glycero - 3 - phosphocholine (DOPC) 16:0 - 18:1
オレイン酸 Ｃ１８ 不飽和	ステアリン酸 Ｃ１８ 飽和	1 - stearoyl - 2 - oleoyl - sn - glycero - 3 - phosphocholine (PC) 18:0-18:1

[0061] （２－２）ＰＥＧ化脂質

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

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

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

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

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

[0066]

[表2]

脂肪酸	脂質	ＰＥＧ化脂質
ステアリン酸 Ｃ１８ 飽和/ ステアリン酸 Ｃ１８ 飽和	DSPE 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	DSPE-PEG 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol
ミリスチン酸 Ｃ１６ 飽和/ ミリスチン酸 Ｃ１６ 飽和	DMG 1,2-Dimyristoyl-rac-glycerol	DMG-PEG 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol
ミリスチン酸 Ｃ１６ 飽和/ ミリスチン酸 Ｃ１６ 飽和	DPPE 1,2-Dipalmitoryl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine	DPPE-PEG N-(Methylpolyoxyethylene oxycarbonyl)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
ステアリン酸 Ｃ１８ 飽和/ ステアリン酸 Ｃ１８ 飽和	DSG 1,2-distearoyl-rac-glycerol	DSG-PEG 1,2-distearoyl-rac-glycero-3-methylpolyoxyethylene
オレイン酸 Ｃ１８ 不飽和/ オレイン酸 Ｃ１８ 不飽和	DOPE 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	DOPE-PEG 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol methoxy
カプリル酸 Ｃ８ 飽和	Ceramide N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine	Ceramide-PEG N-octanoyl-sphingosine-1-{succinyl[methoxy(polyethylene glycol)2000]}
ステアリン酸 Ｃ１８ 飽和	Stearic acid Ethyl octadecanoate stearic acid ethyl ester	Stearic acid-PEG Ethyl octadecanoate stearic acid ethyl ester-polyethylene glycol methoxy

[0067] （２－３）コレステロール系脂質

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

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

である。

[0069] （３）ＰＥＧ化リポソーム

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

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

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

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

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

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

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

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

[0076] [数1]

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

Ａは、相関関数の切片であり、信号対ノイズ比を表す。
Γは、平均減衰率であり、$\Gamma = q^2 D$ の式に代入することで、粒子の拡散係数D を算出する。
拡散係数D をストークス・アインシュタイン方程式に代入することで、平均粒子径D_H、すなわち Ｚ平均流体力学径 が算出される。

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

[0078] 前記ＰＥＧ化リポソームの大きさの分布は、例えば、多分散性指数（ＰＤＩ）で表すことができる。ＰＤＩは、粒度分布の幅を評価する指標である。前記ＰＥＧ化リポソームのＰＤＩは、例えば、１、または、０．１～０．５、０．１５～０．３５、０．２～０．３である。ＰＤＩは、例えば、前記動的光散乱法によって測定した分布について、キュムラント法に従ったフィッティング解析から求めることができる。

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

Ｘ：Ｙ：Ｚ＝１：０．０３～０．１７６：０．３４～１．３５、
１：０．０５～０．１７６：０．３４～０．６７５、
１：０．０６～０．０８８：０．５～０．６７５

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

（Ｘ＋Ｙ＋Ｚ）：Ｌ＝１：（０.０５～２）、１：（０．２～１）、１：（０．５～１）

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

[0081] （４）ＰＥＧ化リポソームの調製方法

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

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

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

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

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

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

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

[0087]（５）リポソーム剤の形態

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

[0088] 本発明のリポソーム剤が前記液体の場合、前記ＰＥＧ化リポソームの濃度は、特に制限されない。前記本発明のリポソーム剤において、前記ＰＥＧ化リポソームの濃度は、例えば、前記ＰＥＧ化リポソームの脂質量を用いて表すことができる。前記本発明のリポソーム剤におけるＰＥＧ化リポソーム剤の濃度は、前記ＰＥＧ化リポソームの脂質量に換算して、例えば、下限が、０．０５ｍｇ／ｍＬ、０．１ｍｇ／ｍＬ、０．５ｍｇ／ｍＬであり、上限が、１ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ、２５ｍｇ／ｍＬであり、範囲が、０．０５～２５ｍｇ／ｍＬ、０．１～５ｍｇ／ｍＬ、０．５～１ｍｇ／ｍＬである。前記濃度は、例えば、本発明のリポソーム剤の保存時の濃度でもよいし、使用時の濃度でもよい。

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

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

[0091] （６）リポソーム剤の性質

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

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

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

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

[0095] （７）リポソーム剤の用途

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

[0096] ２．ＮＫＴ細胞活性化剤およびＮＫＴ細胞の活性化方法

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

[0097] （１）ＮＫＴ細胞活性化剤

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

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

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

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

[0100] （２）ＮＫＴ細胞の活性化方法

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

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

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

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

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

[0105] 本発明のリポソーム剤の投与条件は、特に制限されず、投与対象の動物種、年齢、性別、健康状態、体重等に応じて、適宜設定できる。投与対象がヒト成人男性の場合、例えば、１回あたりの前記ＰＥＧ化リポソームの投与量は、０．００５～５０ｍｇ／体重ｋｇ、０．１５～１５ｍｇ／体重ｋｇ、１～１５ｍｇ／体重ｋｇである。投与回数は、例えば、１～２８日ごと、１日

あたり１～２回である。

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

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

[0108] ３．医薬組成物およびがんの治療方法

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

[0109] （１）医薬組成物

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

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

乳がん、大腸がん、前立腺がん等のがんがあげられる。

[0111] （２）がんの治療方法

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

[0112] ４．用途

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

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

[0114] ［実施形態１］

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

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

[0116] 本実施形態のリポソーム剤は、例えば、前述のように、トリプルネガティブ乳がんの患者に対して好ましく使用できる。トリプルネガティブ乳がんの患者は、例えば、免疫治療に効果を示し難く、前述のような前記ＰＤ－１抗体または前記ＰＤ－Ｌ１抗体による治療効果が得られにくい。このため、本実施形態のリポソーム剤は、例えば、前記ＰＤ－１抗体または前記ＰＤ－Ｌ１抗体を投与しても、がんの成長が抑制できなかった患者、前記ＰＤ－１抗体または前記ＰＤ－Ｌ１抗体を投与しても、がんの成長が抑制できないと推測される患者に対して、特に好ましく使用できる。

[0117] 本実施形態のリポソーム剤は、トリプルネガティブ乳がんの他、いわゆるコールドがん（ｃｏｌｄ　ｔｕｍｏｒｓ）にも適用できる。コールドがんは、がん免疫学において、免疫系がほとんど反応を示さない腫瘍を意味する。コールドがんは、一般的に、免疫系による攻撃が弱いため、治療が難しいとされており、主な特徴は、腫瘍内に免疫細胞（特にＴ細胞）が少なく、低い免疫細胞浸潤、抗原提示の欠如、免疫抑制環境等があげられる。また、４Ｔ１細胞株は、主にマウスの乳がん研究に使用される、高度な転移性の腫瘍細胞株であり、一般的には「コールドがん」に分類される。これは、４Ｔ１腫瘍が、自然免疫系の細胞および獲得免疫系の細胞による免疫応答が弱く、免疫細胞の浸潤が乏しい特徴を持っていることに起因し、４Ｔ１腫瘍は、免疫抑制的な微小環境を持ち、免疫系の攻撃を回避しやすいとされている。

[0118] 本実施形態のリポソーム剤は、以下の条件を満たすことが好ましい。具体的に、本実施形態のリポソーム剤は、以下の全ての条件（条件１、条件２、および条件３）を満たすことが好ましい。これらの条件を満たすことによって、例えば、前記リポソーム剤をより効率良くリンパ節に集積させることができ、また、前記リポソーム剤をより効率良く樹状細胞等の抗原提示細胞に取り込ませることができる。そして、これによって、さらに効果的にＮＫＴ細胞を活性化できることから、患者が、前述のようなＰＤ－１抗体等が効かない患者であっても、がんの成長を抑制することが可能である。

[0119] （条件１）

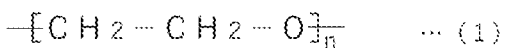
本実施形態のリポソーム剤は、前記ＰＥＧ化リポソームの直径が、以下の条件であることが好ましい。すなわち、Ｚ平均流体力学直径（Ｚ－ａｖｅｒａｇｅ）で表す場合、下限が、例えば、１０ｎｍ以上、５０ｎｍ以上、６０ｎｍ、８０ｎｍ以上、９０ｎｍ以上であり、上限が、例えば、４００ｎｍ以下、２００ｎｍ以下、１５０ｎｍ以下、１４０ｎｍ以下、１３０ｎｍ以下、１２０ｎｍ以下、１１０ｎｍ以下であり、範囲が、例えば、１０～４００ｎｍ、５０～２００ｎｍ、６０～１４０ｎｍ、６０～１３０ｎｍ、８０～１２０ｎｍである。本実施形態において、より好ましくは、１００±４０ｎｍ、１００±３０ｎｍであり、特に好ましくは、１００±２０ｎｍ、１００±１０ｎｍ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

[0120] （条件２）

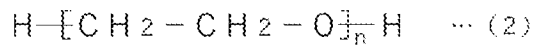
本実施形態のリポソーム剤は、前記リポソーム構成脂質として含まれる前記（２－２）のＰＥＧ化脂質において、リン脂質を修飾するＰＥＧの末端が水酸基であることが好ましい。末端が水酸基のＰＥＧを、以下、ＰＥＧ－ＯＨともいい、ＰＥＧ－ＯＨで修飾されたリン脂質を、以下、ＰＥＧ－ＯＨ化脂質ともいう。

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

[0122] [化17]



… (1)



… (2)

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

[0124]（条件３）

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

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

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

実施例

[0127] ［試薬等］

コリン含有リン脂質：

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

コレステロール系脂質：

コレステロール（和光純薬株式会社）

正電荷脂質：

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

ＰＥＧ化リン脂質：

・末端が水酸基のＰＥＧで修飾されたリン脂質

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

・末端がメチル基のＰＥＧで修飾されたリン脂質

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

ＮＫＴ細胞活性化リガンド：

Ｂ７（株式会社ナードケミカルズ）

α－ＧａｌＣｅｒ（株式会社ナードケミカルズ）

[0128] 多孔質膜：

商品名ポリカーボネート膜（サイティバ社）

１：孔径１０００ｎｍ、回収粒径１０００ｎｍ

２：孔径４００ｎｍ、回収粒径４００

３：孔径２００ｎｍ、回収粒径２００ｎｍ

４：孔径１００ｎｍ、回収粒径１００ｎｍ

５：孔径５０ｎｍ、回収粒径５０ｎｍ

ＲＰＭＩ－１６４０培地（ＲＰＭＩ、ｓｉｇｍａ ａｌｄｒｉｃｈ社）

緩衝液ＰＢＳ（－）（タカラバイオ社）

ウシ胎児血清（ＦＢＳ、バイオロジカルインダストリー社）

ペニシリン－ストレプトマイシン（ライフテクノロジー社）

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

[0129] ［細胞等］

実施例の細胞は、いずれも理研バイオリソースセンターから入手した。各細胞の培養は、１０％ＦＢＳおよび１×ペニシリン－ストレプトマイシンを含有するＲＰＭＩ培地を使用し、培養条件は、３７℃、５％ CO_2雰囲気下とした。ＢＡＬＢ／ｃマウスおよびＣ５７ＢＬ／６ｊマウスは、日本チャールズリバー社から購入した。動物実験手順は、東京大学における実験動物の飼育と使用のためのガイドラインに従って実行した。

[0130] ［実施例１］

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

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

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

に、前記正電荷脂質（ＤＤＡＢ）を添加した。

[0133] ［ＮＫＴ細胞活性化リガンド：Ｂ７］

（５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム用混合液）

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

（１０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム用混合液）

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

（２％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム用混合液）

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

（５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－Ｍｅリポソーム用混合液）

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

（５０％Ｂ７／中性ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム用混合液）

Ｂ７液	５００μＬ

ホスファチジルコリン液　　２３．４μＬ

コレステロール液　　４０μＬ

ＨＯ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ液　２７μＬ

ＤＤＡＢ液　　５．３μＬ

クロロホルム　　残分

（５０％Ｂ７／正電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム用混合液）

Ｂ７液　　５００μＬ

ホスファチジルコリン液　　１２．８μＬ

コレステロール液　　４０μＬ

ＨＯ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ液　２７μＬ

ＤＤＡＢ液　　１０．６μＬ

クロロホルム　　残分

[0134] ［ＮＫＴ細胞活性化リガンド：α－ＧａｌＣｅｒ］

（５０％α－ＧａｌＣｅｒ／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム用混合液）

α－ＧａｌＣｅｒ液　　５００μＬ

ホスファチジルコリン液　　３２．７μＬ

コレステロール液　　４１μＬ

ＨＯ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ液　２８μＬ

クロロホルム　　残分

[0135] ［ＮＫＴ細胞活性化リガンド：未添加］

（０％コントロール／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム用混合液）

ＮＫＴリガンド液　　０μＬ

ホスファチジルコリン液　　１３４μＬ

コレステロール液　　４０μＬ

ＨＯ－ＰＥＧ－ＤＳＰＥ液　２７μＬ

クロロホルム　　残分

（０％コントロール／負電荷ＰＥＧ末端－Ｍｅリポソーム用混合液）

ＮＫＴリガンド液　　０μＬ

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

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

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

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

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

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

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

（１－１）

５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　画分Ｃ（粒径：約１００ｎｍ）

（１－２）

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

（１－３）

５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　画分Ｄ（粒径：約５０ｎｍ）

（１－４）

５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　画分Ｂ（粒径：約２００ｎｍ）

（１－５）

５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　画分Ａ（粒径：約４００ｎｍ）

（１－６）

１０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　画分Ｃ（粒径：約１００ｎｍ）

（１－７）

２％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　画分Ｃ（粒径：約１００ｎｍ）

（１－８）

５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－Ｍｅリポソーム　画分Ｃ（粒径：約１００ｎｍ）

（１－９）

５０％Ｂ７／中性ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　画分Ｃ（粒径：約１００ｎｍ）

（１－１０）

５０％Ｂ７／正電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　画分Ｃ（粒径：約１００ｎｍ）

（１－１１）

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

（１－１２）

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

[0141]

[表3]

ＰＥＧ化リポソーム画分	ＮＫＴリガンド		ＰＥＧ末端	粒径 Z-average	ＰＤＩ	Zeta potential
サンプルNo.	%	種類		（ｎｍ）		（ｍＶ）
１－１	５０％	Ｂ７	－ＯＨ	１０８．６	０．２０３	－３６．２
１－２	５０％	α－ＧａｌＣｅｒ	－ＯＨ	１１７．７	０．１４７	－２２．４
１－３	５０％	Ｂ７	－ＯＨ	３３．３６	０．２５５	－３４．８
１－４	５０％	Ｂ７	－ＯＨ	２０８．６	０．３７８	－３７．２
１－５	５０％	Ｂ７	－ＯＨ	４０５．５	０．４８４	－３９．５
１－６	１０％	Ｂ７	－ＯＨ	１０１．０	０．２２１	－３０．９
１－７	２％	Ｂ７	－ＯＨ	１１０．５	０．１９８	－３５．６
１－８	５０％	Ｂ７	－Ｍｅ	１０２．１	０．２１９	－３６．０
１－９	５０％	Ｂ７	－ＯＨ	１１５．４	０．１９９	－０．３６
１－１０	５０％	Ｂ７	－ＯＨ	１１１．６	０．２４６	＋３４．５
１－１１	０％	－	－ＯＨ	１０２．４	０．１６５	－３０．２
１－１２	０％	－	－Ｍｅ	１０３．６	０．１５１	－３９．４

[0142] また、ＰＢＳに代えて、色素含有ＰＢＳを使用した以外は、ＰＢＳを使用したのと同様の方法により、各種リポソーム画分を、リポソームサンプルとして調製した。前記色素含有ＰＢＳは、以下のように調製した。すなわち、色素試薬（Sulfo-cyanine 5 succinimidyl ester、商品名：Sulfo-Cy5（登録商標）-NHS、Lumiprobe社）をＰＢＳに０．１ｍｇ／ｍＬとなるように混合し、２４時間放置した。ＰＢＳ中で前記色素試薬を放置することで、加水分解により前記色素試薬から－ＮＨＳをはずし、濃度０．１ｍｇ／ｍｌでSulfo-Cy5（登録商標）を含む色素含有ＰＢＳを調製した。前記色素含有ＰＢＳを使用して調製した各ＰＥＧ化リポソームは、色素非含有のＰＢＳを使用して調製した前記ＰＥＧ化リポソームと、同様の粒径およびＰＤＩであることは確認済みである。

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

[0144] ［実施例２］

実施例１で調製したＰＥＧ化リポソームについて安定性を確認した。

[0145] （１）長期保存安定性

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

脂質量に換算、以下同様。）に調整し、リポソームサンプルとして使用した。なお、ＰＥＧ化リポソーム濃度の調整には、ＰＢＳを使用した。前記リポソームサンプルにおけるＮＫＴリガンド濃度は、蛍光修飾したボロン酸による従来の糖脂質検出法（https://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/5634/）により、ピレン－１－ボロン酸（ｓｉｇｍａ　ａｌｄｒｉｃｈ社）を利用して、測定した。前記５０％Ｂ７の混合液から調製したリポソームサンプル（ＰＥＧ化リポソーム濃度１ｍｇ／ｍＬ）のＢ７濃度は、０．４７１ｍｇ／ｍＬ（約０．５ｍｇ／ｍＬ）であり、前記５０％α－ＧａｒＣｅｒの混合液から調製したリポソームサンプル（ＰＥＧ化リポソーム濃度１ｍｇ／ｍＬ）のＧａｌＣｅｒ濃度は、０．４７２ｍｇ／ｍＬ（約０．５ｍｇ／ｍＬ）であった。

[0146] 前記リポソームサンプルを、４℃で保存した。保存開始前（Ｄａｙ０）のリポソームサンプルと、保存開始から１０日後（Ｄａｙ１０）および９０日後（Ｄａｙ９０）のリポソームサンプルについて、それぞれ、動的光散乱（ＤＬＳ）の測定で得られる粒度分布図に基づき粒径（数平均流体力学的直径）および多分散指数（ＰＤＩ）を求めた。そして、粒径は、保存開始時前（Ｄａｙ０）の粒径を基準として、保存後の粒径の変化率（％）を算出した。粒径の変化率とＰＤＩから、保存安定性を評価した。

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

[0148] [表4A]

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

[表4B]

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

[0149] 前記表に示すように、１０Ｄａｙｓ～９０ＤａｙｓでのＢ７リポソームの粒径変化率は、Ｄａｙ０（０％）に対して、－１．０１％～－６．８７％の範囲にとどまり、１０Ｄａｙｓ～９０Ｄａｙｓでのα－ＧａｒＣｅｒの粒径変化率も、Ｄａｙ０（０％）に対して、－１３．１％～＋３．７０％にとどまった。一方、１０Ｄａｙｓ～９０Ｄａｙｓでのコントロールの ＮＫＴリガンド（－）リポソームの粒径変化率は、Ｄａｙ０（０％）に対して、＋０．９９７％～＋１５．９％にまで経時的に増加した。また、前記表に示すように、１０Ｄａｙｓ～９０ＤａｙｓでのＢ７リポソームのＰＤＩは、Ｄａｙ０（０．１７０）に対して、０．１５３～０．２４５の範囲での変動にとどまり、１０Ｄａｙｓ～９０Ｄａｙｓでのα－ＧａｒＣｅｒのＰＤＩも、Ｄａｙ０（０．１４２）に対して、０．１１６～０．３６４の範囲での変動にとどまった。これに対して、１０Ｄａｙｓ～９０Ｄａｙｓでのコントロールの ＮＫＴリガンド（－）リポソームのＰＤＩは、Ｄａｙ０（０．１２０）に対して、０．１７６～０．４２０の範囲にまで経時的に増加した。これらの結果から、Ｂ７リポソームおよびα－ＧＣリポソームは、コレステロールおよびＰＥＧ化リン脂質（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）を使用することで、リポソームを安定化でき、例えば、９０日間の長期保存においてはＮＫＴリガンド（－）のコントロールリポソームより安定であり、例えば、１０００ｎｍ以上の凝集体の生成を防止できることがわかった。

[0150] （２）希釈後安定性

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

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

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

[0152] ［実施例３］

実施例１で調製したＰＥＧ化リポソームを投与して、その機能を確認した。

[0153] （１）免疫活性能

ＰＥＧ化リポソームの免疫活性能を確認した。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0161] （２）ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける免疫活性

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

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

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

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

[0164] マウス樹状細胞であるＤＣ２．４（ｓｉｇｍａ ａｌｄｒｉｃｈ社）をＲＰＭＩ中で培養した。６ウェルプレートの各ウェルに、新たなＲＰＭＩと、培養した前記樹状細胞５ｘ１０^{5}個を播種し、前記Ｂ７リポソームを添加し、２４時間培養した。前記Ｂ７リポソームは、各ウェルにおいて、最終総脂質換算で０．１ｍｇ／ｍＬとなるように添加した。そして、２４時間の培養後、さらに、ウェルあたり７．５ｘ１０^{5}個 の前記リンパ節細胞または前記脾臓細胞を添加し、２４時間共培養した。２４時間の共培養後、全細胞を回収した。回収した細胞群について、ブロッキング試薬を使用して、４℃、４５分間の処理でブロッキングを行った。前記ブロッキング試薬は、ＣＤ１６／ＣＤ３２ Monoclonal Antibody（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）入りのＢｌｏｃｋｉｎｇ ｏｎｅ（ナカライテスク社）を使用した。

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

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

[0166] また、前記Ｂ７リポソームに代えて、ＰＢＳ（１％ＦＢＳ含有）をウェルあたり培養液の１／１０（体積比）で添加した以外は、同様に共培養および測定を行った。

[0167] まず、リンパ節の結果を、図３に示す。図３Ａは、リンパ節におけるＮＫＴ細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性の細胞について、ＣＤ３陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図３Ａにおいて、Ｘ軸は、ＣＤ３に対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Ｙ軸は、その蛍光を示す事象数（細胞数）である。図３Ａにおいて、２つのピークのうち、右側のピークがＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性の細胞、すなわちＮＫＴ細胞を示す。図３Ｂは、図３Ａに基づいて、３つの投与群について、リンパ節におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ陽性のＮＫＴ細胞の量をｎ＝４（マウス）で定量化したグラフである。

[0168] 図３Ａに示すように、Ｂ７リポソーム群（Ｂ７ ｌｉｐｏ）は、Ｂ７リポソームを投与した樹状細胞とリンパ節細胞とを共培養することによって、ＰＢＳを投与した群（ＰＢＳ）と比較して、ＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性のＮＫＴ細胞（図３Ａにおいて右側のピーク）の量が増加した。

[0169] つぎに、脾臓の結果を、図４に示す。図４Ａは、脾臓におけるＮＫＴ細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性の細胞について、前記相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図４Ａにおいて、Ｘ軸は、ＣＤ３に対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Ｙ軸は、その蛍光を示す事象数（細胞数）である。図４Ａにおいて、２つのピークのうち、右側のピークがＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性の

細胞、すなわちＮＫＴ細胞を示す。図４Ｂは、脾臓におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ陽性のＮＫＴ細胞の量をｎ＝４（マウス）で定量化したグラフである。

[0170] 図４Ａに示すように、脾臓についても、リンパ節と同様に、Ｂ７リポソーム（Ｂ７ ｌｉｐｏ）群は、ＰＢＳを投与した群（ＰＢＳ）と比較して、ＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性のＮＫＴ細胞（図４Ａにおいて右側のピーク）の量が増加した。

[0171] （３）免疫細胞数の変化

ＰＥＧ化リポソーム投与後の体内における免疫細胞数の変化を調べた。

[0172] 前記実施例１で調製したＢ７リポソーム（サンプルＮｏ．１－１）を、ＰＥＧ化リポソーム濃度１ｍｇ／ｍＬ（総脂質換算）に調整し、投与サンプルとして使用した。投与のコントロールサンプルとしては、ＰＢＳを使用した（ＮＫＴリガンド未添加）。

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

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

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

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

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

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

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

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

図５Ｃは、リンパ節におけるＴ細胞のヒストグラムであり、リンパ節におけるＣＤ３陽性のＴ細胞について、ＣＤ３陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図５Ｃにおいては、５つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

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

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

図５Ｅは、図５Ａに基づいて、５つの投与群について、リンパ節においてＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性のＮＫＴ細胞の量をｎ＝４（マウス）で定量化したグラフである。具体的には、図５ＡにおけるＰＢＳ投与群のリンパ節細胞中のＮＫＴ細胞の割合が５％を示す相対蛍光強度を基準として、同じ相対蛍光強度での他の投与群のＮＫＴ細胞の割合（％）を示すグラフである。

[0177] 図５Ａ、Ｄ、Ｅに示すように、Ｂ７リポソーム群において、リンパ節におけるＮＫＴ細胞の数は、投与後１２時間、投与後２４時間と経時的に増加し、投与後４８時間、投与後７２時間には、増加したＮＫＴ細胞の数が維持されることが確認できた。また、図５Ｂ、Ｃに示すように、ＮＫ細胞およびＴ細胞の数も同様に、投与後、経時的に増加し、投与後２４時間～４８時間でピークになり、その後、それらの細胞数が維持されることが確認できた。これらの結果から、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて、Ｂ７リポソームを投与することで、投与後１２時間～２４時間の間に徐々に免疫活性が起こり、それが投与後７２時間まで維持されることがわかった。

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

図６Ａは、脾臓におけるＮＫＴ細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性の細胞について、ＣＤ３陽性を示す相対蛍光強

度によって細胞数の分布を表したグラフである。図６Ａにおいて、Ｘ軸は、ＣＤ３に対する前記ラベリング試薬の相対蛍光強度であり、Ｙ軸は、その蛍光を示す事象数（細胞数）である。また、図６Ａにおいて、時間（ｈ）は、前記投与サンプルを投与した後の処理時間であり、投与群ごとのヒストグラムを示した。

図６Ｂは、脾臓におけるＮＫ細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるＮＫ１．１陽性のＮＫ細胞について、ＮＫ１．１陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図６Ｂにおいては、５つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

図６Ｃは、脾臓におけるＴ細胞のヒストグラムであり、脾臓におけるＣＤ３陽性のＴ細胞について、ＣＤ３陽性を示す相対蛍光強度によって細胞数の分布を表したグラフである。図６Ｃにおいては、５つの投与群のヒストグラムを重ねて示した。

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

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

図６Ｅは、図６Ａに基づいて、５つの投与群について、脾臓においてＮＫ１．１陽性且つＣＤ３陽性のＮＫＴ細胞の量をｎ＝４（マウス）で定量化したグラフである。具体的には、図６ＡにおけるＰＢＳ投与群の脾臓細胞中のＮＫＴ細胞の割合が５％を示す相対蛍光強度を基準として、同じ相対蛍光強度での他の投与群のＮＫＴ細胞の割合（％）を示すグラフである。

[0179] 図６Ａ、Ｄ、Ｅに示すように、Ｂ７リポソーム群において、脾臓におけるＮＫＴ細胞の数は、投与後７２時間まで経時的に増加することが確認できた。また、図６Ｅに示すように、ＰＢＳ投与群に対して、Ｂ７リポソーム投与群の投与後１２時間は、ＮＫＴ細胞の増加が確認されたが有意差がなかったこと、Ｂ７リポソーム投与群は、投与後７２時間まで継続的にＮＫＴ細胞の数が増加したことから、脾臓における免疫活性は、リンパ節に比べてゆっく

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

図８Ｄは、図８Ｂに基づいて、５つの投与群について、脾臓においてＣＤ１

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

図８Ｅは、図８Ｃに基づいて、５つの投与群について、脾臓においてＣＤ６８陽性のマクロファージの量をｎ＝４（マウス）で定量化したグラフである。具体的には、図８ＣにおけるＰＢＳ投与群の脾臓細胞中のマクロファージの割合が５％を示す相対蛍光強度を基準として、同じ相対蛍光強度での他の投与群の樹状細胞の割合（％）を示すグラフである。

[0184] 図８Ａ、Ｂ、Ｄに示すように、Ｂ７リポソーム投与群では、リンパ節と同様に、脾臓における樹状細胞の割合が、ＰＢＳ投与群の約２倍までに増加した。一方、図８Ｃ、Ｅに示すように、Ｂ７リポソーム投与群では、マクロファージの割合には、前記樹状細胞のような大きな変化は見られなかった。このように、脾臓細胞においては、樹状細胞の増加が、リンパ節における増加よりも顕著にみられた。

[0185] ［実施例４］

実施例１で調製したＰＥＧ化リポソームについて、生体内分布を確認した。

[0186] （１）Ｂ７リポソームの生体内分布

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

（１－１）５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム １００ｎｍ

（１－１１）０％コントロール／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム １００ｎｍ

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

、前記（１－１１）から調製した投与サンプルをコントロールリポソーム投与サンプル（Ｃｔｒｌ　ｌｉｐｏ）とした。

[0187] 乳がん（４Ｔ１、平均腫瘍量１５０ｍｍ^3）を有するＢＡＬＢ／ｃマウス（６週齢、雌）および乳がんを有さないＢＡＬＢ／ｃマウス（６週齢、雌）に、前記投与サンプル３０μＬを左脇腹に皮下投与した。各投与サンプルの投与量は、以下のとおりとした。

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

前記コントロールリポソーム投与サンプル３０μＬ：３０μＬ／マウス１体

投与から２４時間後のマウスを犠牲にし、左腋窩リンパ節、脾臓、腎臓、肝臓を採取した。

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

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

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

ンパ節への選択的なデリバリーが可能であることがわかった。一方、前記コントロールリポソームの投与群（Ｃｔｒｌ　ｌｉｐｏ）では、肝臓において蛍光が検出されたが、その他の臓器ではほとんど蛍光が検出されなかった。また、図９Ｂにおいても、リンパ節における相対蛍光強度は、前記コントロールリポソームの投与群（Ｃｔｒｌ　ｌｉｐｏ）よりも、前記Ｂ７リポソームの投与群（Ｂ７　ｌｉｐｏ）が、高い値を示したことから、前記Ｂ７リポソームは、効果的にリンパ節に集積することが確認できた。

[0191] ［実施例５］

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

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

（１－１）５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　１００ｎｍ

（１－１１）０％コントロール／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　１００ｎｍ

前記リポソームサンプルを、ＰＥＧ化リポソーム濃度１ｍｇ／ｍＬ（総脂質換算）に調整し、投与サンプルとして使用した。ＰＥＧ化リポソーム濃度の調整には、ＰＢＳを使用した。前記（１－１）から調製した投与サンプルを、実施例のＢ７リポソーム投与サンプル（Ｂ７　ｌｉｐｏ）、前記（１－１１）から調製した投与サンプルをコントロールリポソーム投与サンプル（Ｃｔｒｌ　ｌｉｐｏ）とした。また、この他に、リポソーム化していないフリーのＢ７をＰＢＳに懸濁したフリーＢ７サンプル（Ｆｒｅｅ　Ｂ７）、およびＰＢＳを、それぞれ投与サンプルとして使用した。

[0193] （１）抗腫瘍効果

乳がん細胞として、トリプルネガティブ乳がん細胞４Ｔ１を使用した。ＢＡＬＢ／ｃマウス（５週齢、雌、ｎ＝６～７）の左胸における上から２番目の乳頭（ｓｅｃｏｎｄ　ｂｒｅａｓｔ）付近に、４Ｔ１細胞（５．０×10^{5}～１．０×10^{6}個／マウス）を皮下接種した。平均腫瘍量が３０～１８０ｍ

m^3に達した時点で、マウスを無作為にグループ分けした。そして、後述する投与条件Ａまたは投与条件Ｂにより、マウスの左脇の皮下または両脇の下に前記投与サンプルを皮下注射した（Ｄａｙ０）。各投与サンプルの投与量は、以下のとおりとした。

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

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

フリーＢ７サンプル３０μＬ：３０μＬ／マウス１体、Ｂ７の量１５μｇ

ＰＢＳサンプル：３０μＬ／マウス１体

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

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

また、マウスの生存をモニターし、生存率をＫａｐｌａｎ－Ｍｅｉｅｒ法で解析した。腫瘍体積が２０００mm^3を超えたマウスは、安楽死させ、その日をマウスの死亡日として記録した。

[0195]（投与条件Ａ）

前記４Ｔ１細胞の接種から８日後に、前記投与サンプルについて、左脇腹への最初の投与（１ｓｔ）を行い、これをＤａｙ０として、左脇腹へのさらなる皮下注射を、同条件で６日ごとに４回行った（合計５回）。

[0196]（Ａ１）抗腫瘍効果

抗腫瘍効果の結果を、図１０に示す。図１０は、マウスの腫瘍体積（Ｖ）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図１０に示すように、Ｄａｙ０の腫瘍体積は、１００mm^3であった。そして、図１０に示すように、ＰＢＳ単独の投与群、および前記コントロールリポソームの投与群（Ｃｔｒｌ ｌｉｐｏ）では、Ｄａｙ０と比較して、Ｄａｙ３０における腫瘍体積の増加は、約１２～２０倍を示した。また、フリーＢ７の投与群（Ｆｒｅｅ Ｂ

７）では、Ｄａｙ０と比較して、Ｄａｙ３０における腫瘍体積の増加は、約１０倍を示し、前記ＰＢＳ投与群および前記投与群（Ｃｔｒｌ　ｌｉｐｏ）よりも腫瘍の増加が抑制された。これに対して、前記Ｂ７リポソームの投与群（Ｂ７　ｌｉｐｏ）では、Ｄａｙ０と比較して、Ｄａｙ３０における腫瘍体積の増加は、約５倍にとどまり、腫瘍体積の増加を著しく抑制することが確認できた。この結果から、Ｂ７をＰＥＧ化リポソームとして投与することによって、乳がんの成長を効果的に抑制できることがわかった。

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

[0198] （Ａ２）忍容性／安全性

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

[0199] （投与条件Ｂ）

前記４Ｔ１細胞の接種から５日後に、前記投与サンプルについて、両脇腹への最初の投与（１ｓｔ）をＤａｙ０として、５日後（Ｄａｙ５）、２回目の両脇腹への皮下注射を、同条件で行った（合計２回）。

[0200] （Ｂ１）抗腫瘍効果

抗腫瘍効果の結果を、図１３に示す。図１３は、マウスの腫瘍体積（Ｖ）

と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図１３に示すように、Ｄａｙ０の腫瘍体積は、３６ｍｍ^{3}であった。そして、図１３に示すように、ＰＢＳ単独の投与群、および前記コントロールリポソームの投与群（Ｃｔｒｌ ｌｉｐｏ）では、Ｄａｙ０と比較して、Ｄａｙ３２における腫瘍体積の増加は、約３０～４０倍を示した。また、フリーＢ７の投与群（Ｆｒｅｅ Ｂ７）では、Ｄａｙ０と比較して、Ｄａｙ３２における腫瘍体積の増加は約２７倍を示し、前記ＰＢＳ投与群および前記投与群（Ｃｔｒｌ ｌｉｐｏ）よりも腫瘍の増加が抑制された。これに対して、前記Ｂ７リポソームの投与群（Ｂ７ ｌｉｐｏ）では、Ｄａｙ０と比較して、Ｄａｙ３２における腫瘍体積の増加は、約７倍にとどまり、腫瘍体積の増加を著しく抑制することが確認できた。この結果から、Ｂ７をＰＥＧ化リポソームとして投与することによって、乳がんの成長を効果的に抑制できることがわかった。

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

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

[0203] （Ｂ２）忍容性／安全性

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

[0204] ［実施例６］

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

[0205] 前記実施例５と同じ以下の投与サンプルを使用した。

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

前記コントロールリポソーム投与サンプル（Ｃｔｒｌ ｌｉｐｏ）３０μＬ：３０μＬ／マウス１体、ＰＥＧ化リポソーム濃度１ｍｇ／ｍＬ（総脂質換算）

前記フリーＢ７サンプル３０μＬ：３０μＬ／マウス１体、Ｂ７の量１５μｇ

ＰＢＳサンプル：３０μＬ／マウス１体

[0206] 皮膚がん細胞として、Ｂ１６Ｆ１０を使用した。Ｃ５７ＢＬ／６ｊマウス（５週齢、雌、ｎ＝６～７）の左胸における上から２番目の乳頭付近に、Ｂ１６Ｆ１０細胞（１．０×１０^{6}個／マウス）を皮下接種した。そして、前記実施例５と同様にして、前記投与サンプル３０μＬを投与して、抗腫瘍効果、および安全性・忍容性を確認した。

[0207] 抗腫瘍効果の結果を、図１６に示す。図１６Ａは、マウスの腫瘍体積（Ｖ）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図１６Ｂは、マウスの体重（ｇ）と投与開始からの日数との関係を示すグラフである。図１６Ａに示すように、ＰＢＳ投与群（黒丸）、フリーＢ７投与群（黒四角）では、Ｄａｙ０と比較して、Ｄａｙ６における腫瘍体積の増加は、約４０～５０倍を示した。これに対して、前記Ｂ７リポソーム投与群（白四角）では、Ｄａｙ０と比較して、Ｄａｙ６における腫瘍体積の増加は、約１５倍にとどまり、腫瘍体積の増加を著しく抑制することが確認できた。この結果から、Ｂ７をＰＥＧ化リポソームとして投与することによって、皮膚がんの成長を効果的に抑制できることがわかった。また、図１６Ｂに示すように、Ｄａｙ０－Ｄａｙ１０において、いずれの投与群も、著しい体重の減少は確認されなか

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

[0208] ［実施例７］

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

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

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

（１－１１）０％コントロール／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム １００ｎｍ

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

[0210] 乳がん細胞として、トリプルネガティブ乳がん細胞４Ｔ１を使用した。ＢＡＬＢ／ｃマウス（５週齢、雌、ｎ＝２）の左胸における上から２番目の乳頭付近に、４Ｔ１細胞（５．０×１０^{5}～１．０×１０^{6}個／マウス）を皮下接種した。平均腫瘍量が４０～１００ｍｍ^{3}に達した時点で、マウスを無作為にグループ分けした。そして、マウスの左脇の皮下に、前記投与サンプルを皮下注射した（Ｄａｙ０）。各投与サンプルの投与量は、以下のとおりとした。

前記α－ＧａｌＣｅｒリポソーム投与サンプル３０μＬ：３０μＬ／マウス

１体、α－ＧａｌＣｅｒの量１５μｇ、総脂質量３０μｇ

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

フリーα－ＧａｌＣｅｒサンプル３０μＬ：３０μＬ／マウス１体、α－ＧａｌＣｅｒの量１５μｇ

ＰＢＳ：３０μＬ／マウス１体

[0211] そして、前記投与サンプルの左脇腹への最初の投与（１ｓｔ）をＤａｙ０として、左脇腹へのさらなる皮下注射を、同条件で５日ごとに３回行った（合計４回）。そして、前記実施例５と同様にして、抗腫瘍効果、および安全性・忍容性を確認した。

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

[0213] ［実施例８］

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

[0214] （１）担癌マウスにおけるＢ７リポソーム投与後の生体内分布

前記実施例１で前記色素含有ＰＢＳを用いて調製した以下のリポソームサ

ンプルを使用した。

（１－１）５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　１００ｎｍ

（１－１１）０％コントロール／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　１００ｎｍ

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

[0215]　乳がん細胞として、トリプルネガティブ乳がん細胞４Ｔ１を使用した。がんを有さないＢＡＬＢ／ｃマウス（５週齢、メス）に対して、左胸における上から２番目の乳頭付近に、４Ｔ１細胞（５．０×１０^{5}～１．０×１０^{6}個／マウス）を皮下接種した（Ｄａｙ０）。平均腫瘍量が１００ｍｍ^{3}に達した時点で（Ｄａｙ８）、マウスの左脇の皮下または両脇の下に、前記投与サンプル３０μＬを皮下注射した。各投与サンプルの投与量は、以下のとおりとした。

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

前記コントロールリポソーム投与サンプル３０μＬ：３０μＬ／マウス１体

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

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

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

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

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

胞内の免疫細胞数の変化

[0220] （２Ａ）

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

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

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

前記コントロールリポソーム投与サンプル３０μＬ：３０μＬ／マウス１体

[0222] 乳がん細胞として、トリプルネガティブ乳がん細胞４Ｔ１を使用した。がんを有さないＢＡＬＢ／ｃマウス（５週齢、メス、ｎ＝４）に対して、左胸における上から２番目の乳頭付近に、４Ｔ１細胞（５．０×10^5～１．０×10^6個／マウス）を皮下接種した（Ｄａｙ０）。平均腫瘍量が１００mm^3に達した時点で（Ｄａｙ８）、マウスの左脇の皮下または両脇の下に、前記投与サンプル３０μＬを皮下注射した。投与から２４時間後、各投与群のマウスを安楽死させ、がんを摘出した。前記採取したがんをみじん切りにし、０．２％コラゲナーゼ（富士フィルム和光社）入りＲＰＭＩ中で、３０分間、３７℃、５００ＲＰＭで振動させた。その後、これらの混合物をセルストレイナーに入れ、１％ＦＢＳ入りＲＰＭＩ中でやさしくすりつぶすことで、単一細胞にした。前記単一細胞は、４００ｇで４分間遠心分離し、生存細胞のみを回収した。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

性細胞（Ｔ細胞）を示す。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0237]（２Ｂ）

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

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

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

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

[0240] [実施例９]

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

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

[0242] （１Ａ）

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

（１－１）５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　１００ｎｍ

（１－３）５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　５０ｎｍ

（１－４）５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　２００ｎｍ

（１－５）５０％Ｂ７／負電荷ＰＥＧ末端－ＯＨリポソーム　４００ｎｍ

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

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

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

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

重ねた図である。図２７Ａにおいて、特に蛍光強度の強い部分を白い矢印で示した。図２７Ｂは、リンパ節における蛍光強度を定量化したグラフである。

[0246] 図２７に示すように、リンパ節は、リンパ節以外の他の臓器よりも高い蛍光強度を示した。例えば、他の臓器の中でも蛍光強度が最も高い５０ｎｍの肺の蛍光強度が、リンパ節での２００ｎｍの蛍光強度と同等かそれ以下であった。さらに、臓器の重量で蛍光強度を割り、グラム当たりの蛍光強度にノーマライズした場合、リンパ節における集積量は、他の臓器より１０倍以上高かった。

[0247] 図２７Ｂに示すように、前記Ｂ７リポソーム投与群は、いずれのサイズであっても、投与後１２時間において、効果的にリンパ節に集積し、特にサイズが小さいリポソームが、より効果的にリンパ節に集積するという結果であった。また、従来技術として、５０ｎｍ以上の粒子はリンパ節に集積しないとの報告があるのに対して、本実施例においては、５０ｎｍ以上のリポソーム（例えば、１００ｎｍのリポソーム）であってもリンパ節に集積することが確認できた。

[0248] （１Ｂ）

つぎに、前記投与サンプル（１－１、１００ｎｍ）をクライオ資料とし、透過型電子顕微鏡を使用して、観察した（ＣｒｙｏＴＥＭ）。ＣｒｙｏＴＥＭ資料は、Leica microsystem社の提供するプロトコルに従って、ＬＥＩＣＡ ＥＭ ＧＰ（Leica microsystem社）を使用して作成した。ＣｒｙｏＴＥＭは、ＪＥＭ２１００（日本電子株式会社）を使用して測定した。

[0249] この結果を図２８に示す。図２８は、投与サンプル（１－１）の電子顕微鏡写真である。電子顕微鏡での観察により、図２８に示すように、球状のＢ７リポソームが多く確認され、一部、長く伸びた構造のＢ７リポソームも存在し、その短辺の長さは２５ｎｍ程度であった。後者のリポソームの構造は、前記投与サンプルを乗せたグリットの縁との相互作用で柔らかく伸びたことによる思われる。この結果から、本実施例のＢ７リポソームは、例えば、

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

[0250] （１Ｃ）

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

[0251] （１Ｄ）

次に、ヒト樹状細胞株ＤＣ２．４細胞を、８ウェルガラスボトムチャンバーに２００００細胞／ウェルとなるように播種し、１０％Ｖ／Ｖ ＦＢＳおよび１％Ｖ／Ｖ ペニシリン－ストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ中で、３７℃で一晩インキュベートした。そして、前記（１Ａ）と同じ前記投与サンプル（Ｂ７濃度１５μｇ／３０μＬ）を、最終Ｂ７濃度０．０５ｍｇ／ｍＬとなるように、前記ウェルに添加して、６時間インキュベートした。インキュベート後、ウェル中の細胞を、新鮮な培地（前記ＲＰＭＩ）で洗浄して、余剰の前記投与サンプルを除去し、前記ウェルに染色試薬（０．１ｍｇ／ｍＬ Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２）を添加し、１５分間のインキュベーションにより細胞の核を染色した。つぎに、ウェル中の細胞を、新鮮な培地（前記ＲＰＭ

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

Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２：ｅｘ．４０５ｎｍ／ｅｍ．４１０－４８５ｎｍ

スルホ－Ｃｙ５：ｅｘ．６３３ｎｍ／ｅｍ．６３８－７４６ｎｍ

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

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

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

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

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

[0256] （２Ａ）

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

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

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

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

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

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

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

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

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

色、顕微鏡による核酸を行った。

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

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

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

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

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

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

[0263]（２Ｂ）

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

前記Ｂ７　ｌｉｐｏ－Ｍｅ（－）

前記Ｂ７　ｌｉｐｏ－ＯＨ（－）

前記Ｂ７　ｌｉｐｏ－ＯＨ（ｎ）

前記Ｂ７　ｌｉｐｏ－ＯＨ（＋）

[0264]　摘出したリンパ節を薄くスライスし、得られた切片における細胞の核を前記染色試薬（０．１ｍｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２）で染色した。そ

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

[0265] これらの結果を図３３に示す。図３３は、前記切片の顕微鏡観察画像であり、上から１段目が、Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２染色の画像、２段目が、リポソームに由来するＣｙ５の蛍光画像、３段目が、１段目の染色画像に２段目の蛍光分布を重ね合わせた画像である。図３３に示すように、表面電荷が負に帯電したＢ７リポソームＢ７ ｌｉｐｏ－ＯＨ（－）が、最もリンパ節へ吸収されやすいことが確認できた。これに対して、表面電荷が負に帯電するものの、ＰＥＧの末端がメチル基の前記Ｂ７ ｌｉｐｏ－Ｍｅ（－）は、前記Ｂ７リポソームＢ７ ｌｉｐｏ－ＯＨ（－）と比較して、リンパ節への取り込みが著しく減少した。また、表面電荷が中性または正荷電の前記Ｂ７ ｌｉｐｏ－ＯＨ（ｎ）および前記Ｂ７ ｌｉｐｏ－ＯＨ（＋）は、前記Ｂ７ ｌｉｐｏ－ＯＨ（－）と比較して、リンパ節の集積が低かった。

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

[0267] （３）Ｂ７リポソームの表面ＰＥＧ末端の変化による抗がん効果への影響

次に、リポソームの表面特性を変化による免疫活性への影響を確認した。

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

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

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

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

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

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

[0269] 前記実施例５（１）［抗腫瘍効果］と同様にして、ＢＡＬＢ／ｃマウス（５週齢、雌、ｎ＝６～７）の左胸における上から２番目の乳頭付近に、４Ｔ１細胞（５．０×１０^{5}～１．０×１０^{6}個／マウス）を皮下接種した。平均腫瘍量が３０ｍｍ^{3}に達した時点で、マウスを無作為にグループ分けした。そして、前記投与サンプル３０μＬを使用する以外は、前記実施例５（１）の投与条件Ｂにより、マウスの両脇の下に、前記投与サンプルを皮下注射した（Ｄａｙ０）。そして、前記実施例５（１）と同様にして、腫瘍の成長、マウスの体重、および生存をモニターした。

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

[0271] 図３４Ａに示すように、ＰＢＳ投与群（ＰＢＳ）、Ｃｔｒｌ ｌｉｐｏ－ＯＨ投与群、Ｆｒｅｅ Ｂ７投与群、Ｂ７ ｌｉｐｏ－Ｍｅ投与群、Ｃｔｒｌ ｌｉｐｏ－Ｍｅ投与群は、Ｄａｙ０（３０ｍｍ^{3}）に対してＤａｙ３０において、腫瘍体積は約２０～４０倍に増加し、がんの早い成長が確認された。これに対して、Ｂ７ ｌｉｐｏ－ＯＨ投与群は、Ｄａｙ０に対してＤａｙ３０にお

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

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

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

[0274] （４）Ｂ７リポソームにおけるＢ７の濃度の変化による免疫活性への影響

前記Ｂ７リポソームにおけるＢ７の濃度によって免疫の活性が変化するかを調べた。

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

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

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

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

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

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

した投与サンプルは、Ｂ７の量が０．６μｇ／３０μＬ、前記（１－１）を使用した投与サンプルは、Ｂ７の量が０μｇ／３０μＬである。

[0276] 前記実施例５（１）［抗腫瘍効果］と同様にして、ＢＡＬＢ／ｃマウス（５週齢、雌、ｎ＝６～７）の左胸における上から２番目の乳頭付近に、４Ｔ１細胞（５．０×１０^{5}～１．０×１０^{6}個／マウス）を皮下接種した（Ｄａｙ０）。平均腫瘍量が４６ｍｍ^{3}に達した時点で、マウスを無作為にグループ分けした。そして、前記投与サンプル３０μＬを使用する以外は、前記実施例５（１）の投与条件Ａにより、マウスの左脇の下に、前記投与サンプルを皮下注射した（Ｄａｙ４）。そして、前記実施例５（１）と同様にして、腫瘍の成長、マウスの体重、および生存をモニターした。

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

[0278] 図３５Ａ示すように、０％Ｂ７ ｌｉｐｏ投与群および２％Ｂ７ ｌｉｐｏ投与群は、Ｄａｙ０（４６ｍｍ^{3}）に対してＤａｙ３６において、腫瘍体積は約２０～３０倍に増加し、がんの早い成長が確認された。これに対して、１０％Ｂ７ ｌｉｐｏ投与群は、Ｄａｙ０に対してＤａｙ３６において、腫瘍体積の増加は約１０倍にとどまり、腫瘍体積の増加に対して優れた抑制が確認できた。また、５０％Ｂ７ ｌｉｐｏ投与群は、Ｄａｙ０に対してＤａｙ３６において、腫瘍体積の増加は約７倍にとどまり、腫瘍体積の増加に対してより顕著な抑制が確認できた。これらの結果から、Ｂ７リポソームの Ｂ７濃度の増加に伴い、がん成長抑制効果を増加できることがわかった。

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

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

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

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

産業上の利用可能性

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

請求の範囲

[請求項1] ＰＥＧ化リポソームを含み、

前記ＰＥＧ化リポソームが、ＮＫＴ細胞活性化リガンドとリポソーム構成脂質を含み、

前記ＮＫＴ細胞活性化リガンドが、ＮＫＴ細胞上のＮＫＴ細胞受容体が特異的に認識する、α－ガラクトシルセラミドまたはそのアナログであり、

前記リポソーム構成脂質が、コリン含有リン脂質、ＰＥＧ化脂質、およびコレステロール系脂質を含むことを特徴とする、リポソーム剤。

[請求項2] 前記コリン含有リン脂質が、ホスファチジルコリンである、請求項１に記載のリポソーム剤。

[請求項3] 前記ホスファチジルコリンにおける２つの脂肪酸が、それぞれ独立して、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である、請求項２に記載のリポソーム剤。

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

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

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

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

[請求項8] 前記ＰＥＧ化脂質が、ＤＳＰＥ－ＰＥＧ、ＤＭＧ－ＰＥＧ、ＤＰＰＥ－ＰＥＧ、ＤＳＧ－ＰＥＧ、ＤＯＰＥ－ＰＥＧ、セラミド－ＰＥＧ、

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

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

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

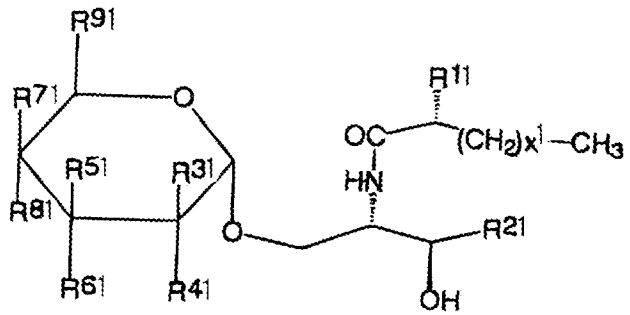
[請求項11] 前記コレステロール系脂質が、コレステロールである、請求項１から１０のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

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

[請求項13] 前記ＰＥＧ化リポソームにおいて、前記コリン含有リン脂質（Ｘ）、前記ＰＥＧ化脂質（Ｙ）、および前記コレステロール系脂質（Ｚ）のｍｏｌ％の比率が、Ｘ：Ｙ：Ｚ＝１：（０．０３～０．１７６）：（０．３４～１．３５）である、請求項１から１２のいずれか一項に記載のリポソーム剤。

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

[化1]

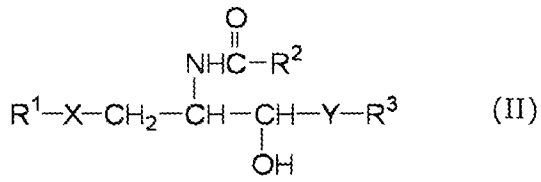


(I)

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

一項に記載のリポソーム剤。

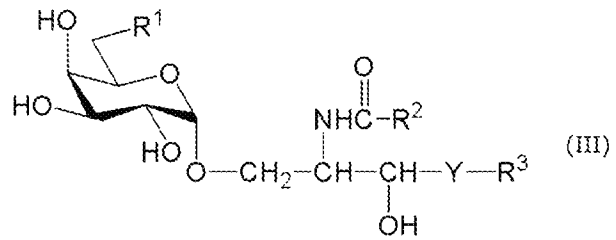
[化2]



(II)

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

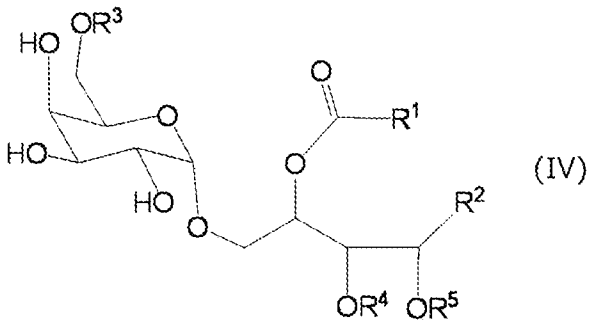
[化3]



(III)

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

[化4]

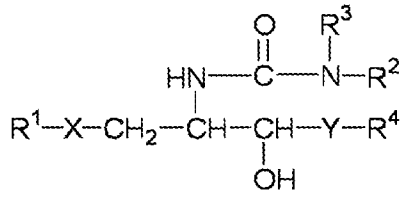


(IV)

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

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

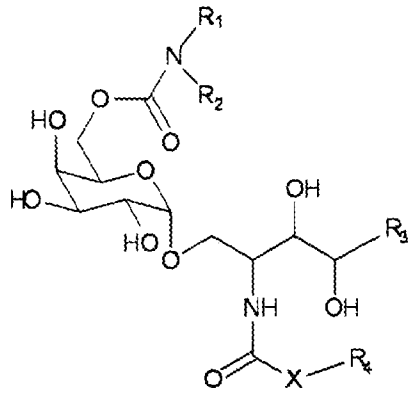
[化5]



(V)

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

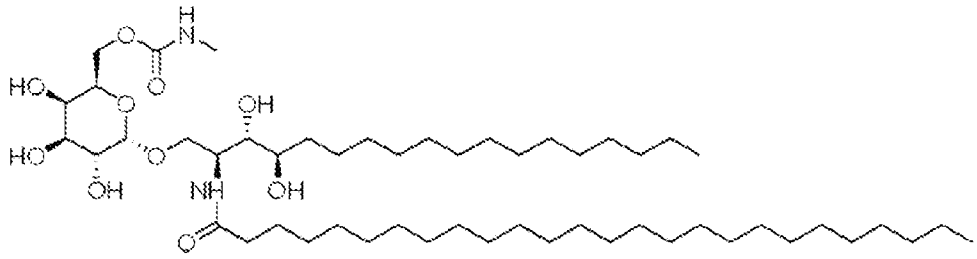
[化6]



(VI)

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

[化7]



・・・ (VI-1)

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

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

（条件２）前記ＰＥＧ化脂質において、ＰＥＧの末端が水酸基である

（条件３）前記ＰＥＧ化リポソームの表面電荷が、負電荷である

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

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

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

[請求項25] 抗がん用である、請求項２４に記載の医薬組成物。

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

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

[請求項28] 抗がん用であり、対象がんが、トリプルネガティブ乳がんであり、前記リポソーム剤に含まれるＰＥＧ化リポソームが、条件１、２および３を満たす、請求項２４から２７のいずれか一項に記載の医薬組成物。

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

（条件２）前記ＰＥＧ化脂質において、ＰＥＧの末端が水酸基である

（条件３）前記ＰＥＧ化リポソームの表面電荷が、負電荷である

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

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

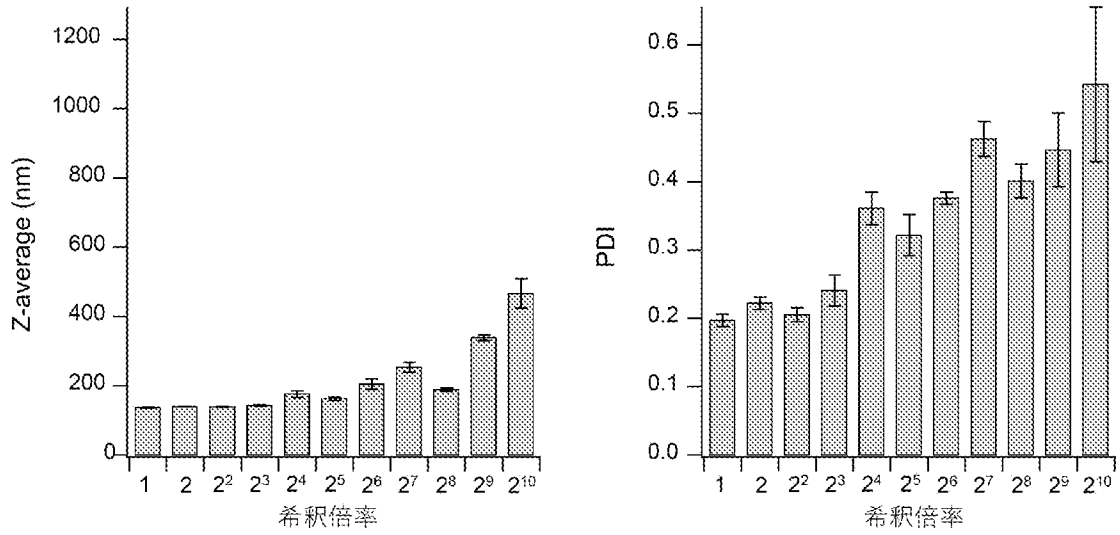
[請求項31] 前記被検体が、ヒトまたは非ヒト動物である、請求項３０に記載のＮＫＴ細胞の活性化方法。

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

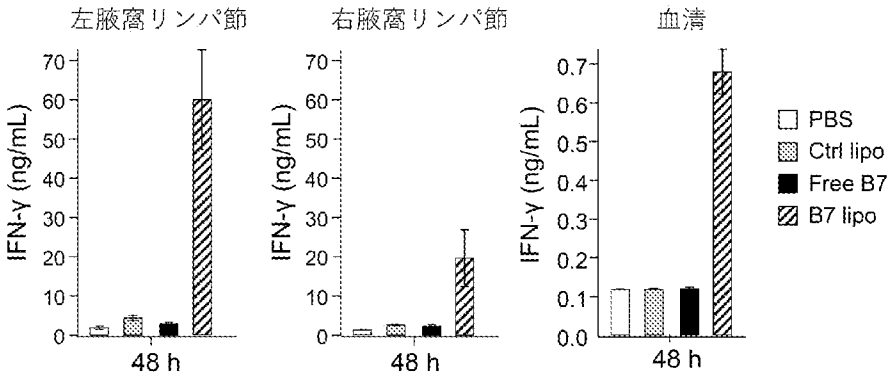
[請求項33] 被検体が、トリプルネガティブ乳がんの被検体であり、

前記投与工程において、請求項２８または２９に記載の医薬組成物を投与する、請求項３０に記載のがんの治療方法。

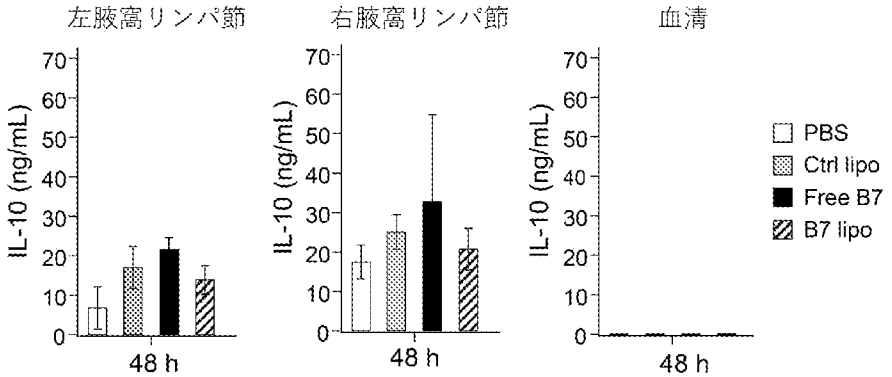
[図1]


Z-average (nm)
1200
1000
800
600
400
200
0
1 2 2² 2³ 2⁴ 2⁵ 2⁶ 2⁷ 2⁸ 2⁹ 2¹⁰
希釈倍率
PDI
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
1 2 2² 2³ 2⁴ 2⁵ 2⁶ 2⁷ 2⁸ 2⁹ 2¹⁰
希釈倍率

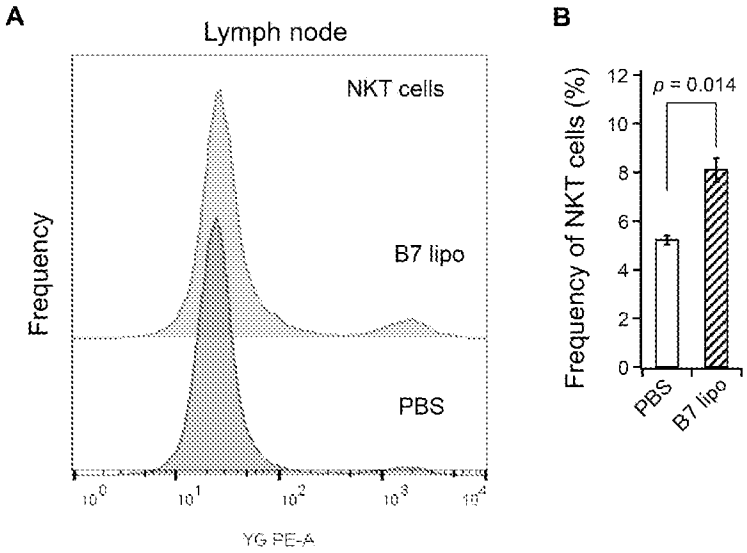
[図2A]


左腋窩リンパ節
右腋窩リンパ節
血清
IFN-γ (ng/mL)
48 h
PBS
Ctrl lipo
Free B7
B7 lipo

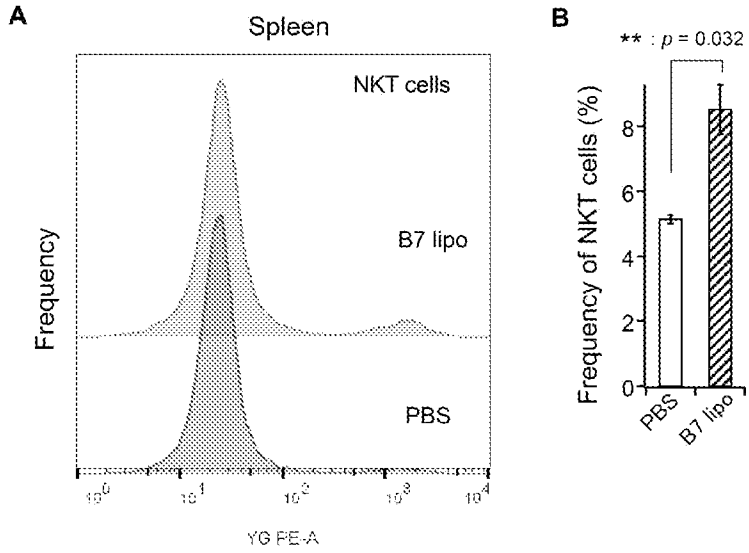
[図2B]


左腋窩リンパ節
右腋窩リンパ節
血清
IL-10 (ng/mL)
48 h
PBS
Ctrl lipo
Free B7
B7 lipo

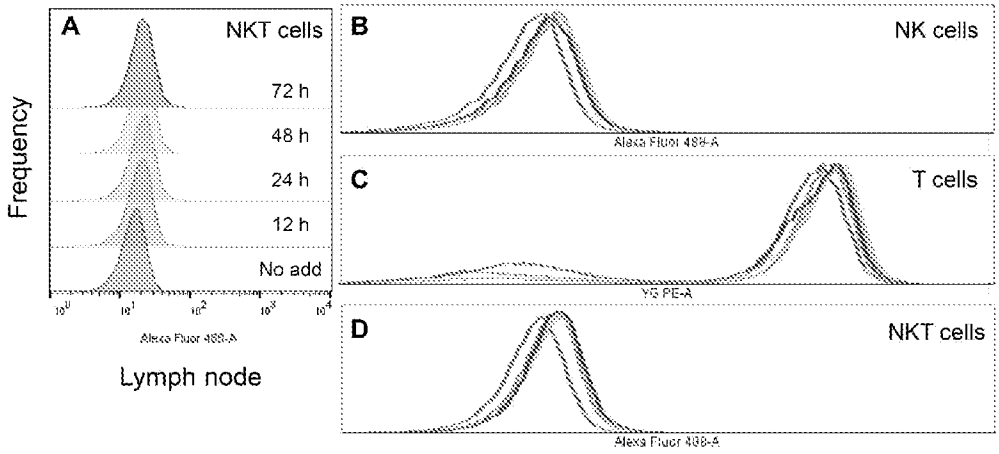
[図3]

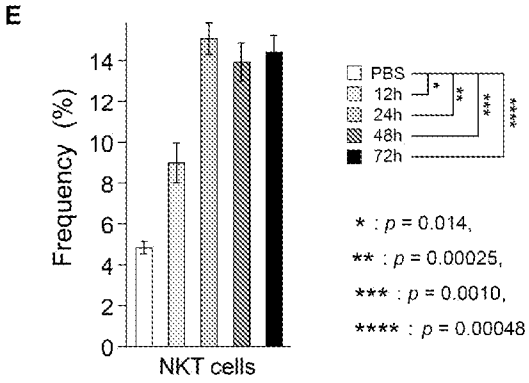

A
Lymph node
NKT cells
B7 lipo
PBS
Frequency
YG PE-A
B
Frequency of NKT cells (%)
p = 0.014
PBS
B7 lipo

[図4]


A
Spleen
NKT cells
B7 lipo
PBS
Frequency
YG PE-A
B
** : p = 0.032
Frequency of NKT cells (%)
PBS
B7 lipo

[図5]





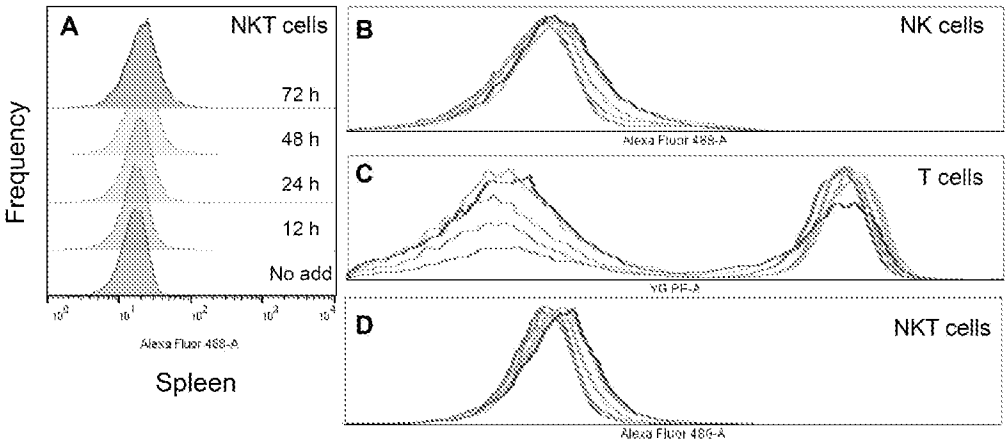
* : $p = 0.014$,

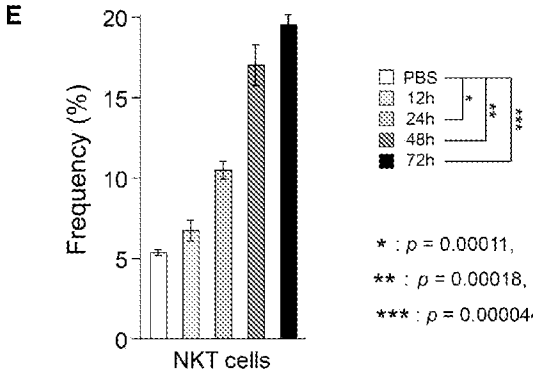
** : $p = 0.00025$,

*** : $p = 0.0010$,

**** : $p = 0.00048$

[図6]



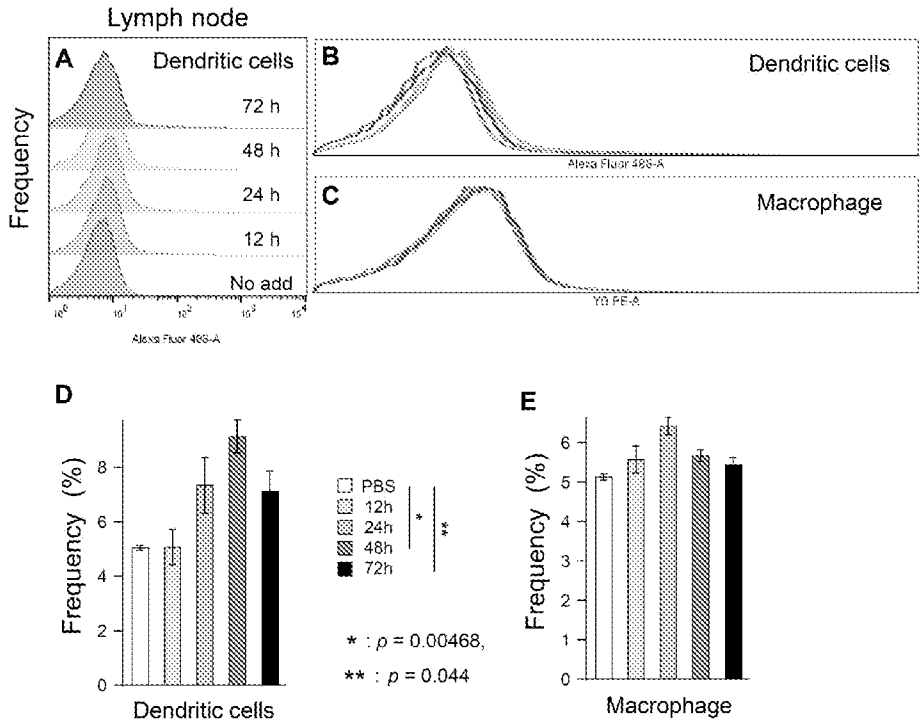


* : $p = 0.00011$,

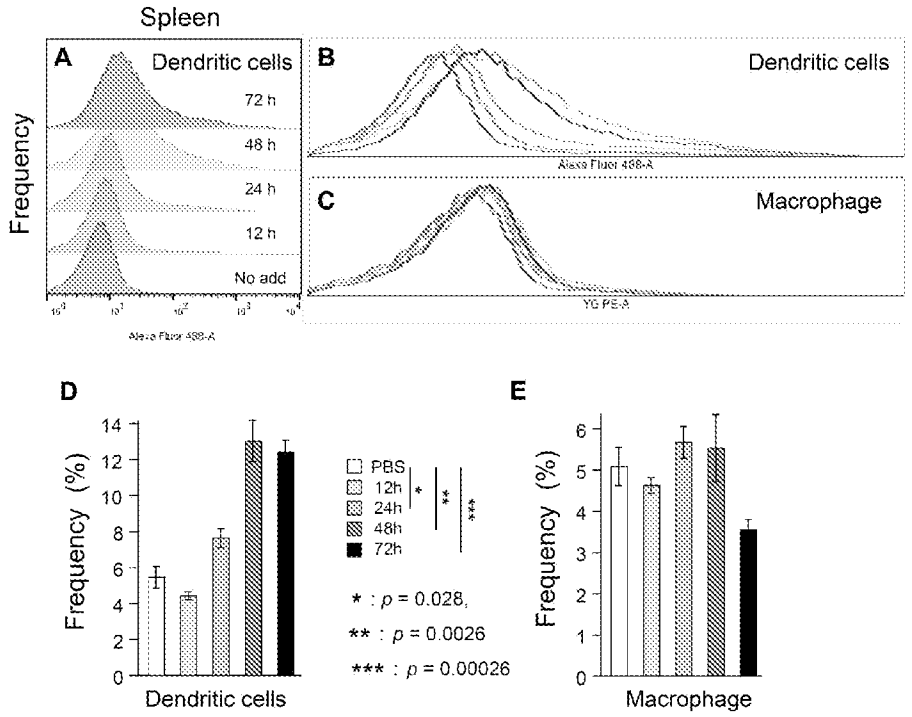
** : $p = 0.00018$,

*** : $p = 0.000044$

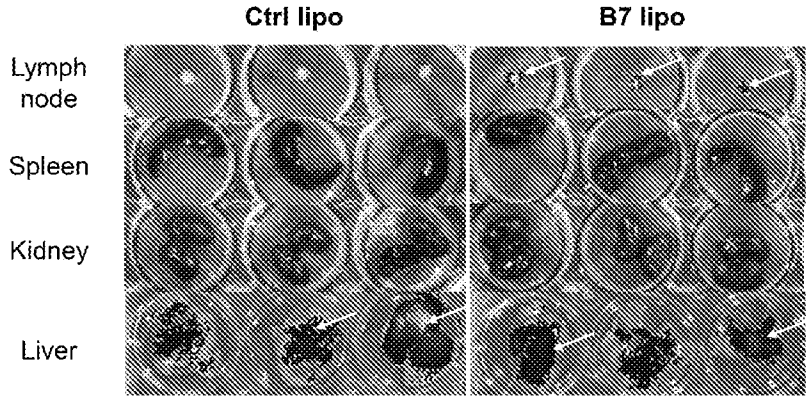
[図7]


Lymph node
A
Dendritic cells
72 h
48 h
24 h
12 h
No add
Frequency
Alexa Fluor 488-A
B
Dendritic cells
Alexa Fluor 488-A
C
Macrophage
YG PE-A
D
Frequency (%)
Dendritic cells
PBS
12h
24h
48h
72h
* : p = 0.00468,
** : p = 0.044
E
Frequency (%)
Macrophage

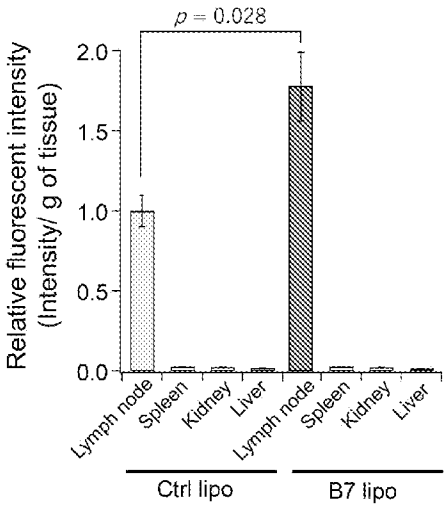
[図8]


Spleen
A
Dendritic cells
72 h
48 h
24 h
12 h
No add
Frequency
Alexa Fluor 488-A
B
Dendritic cells
Alexa Fluor 488-A
C
Macrophage
YG PE-A
D
Frequency (%)
Dendritic cells
PBS
12h
24h
48h
72h
* : p = 0.028,
** : p = 0.0026
*** : p = 0.00026
E
Frequency (%)
Macrophage

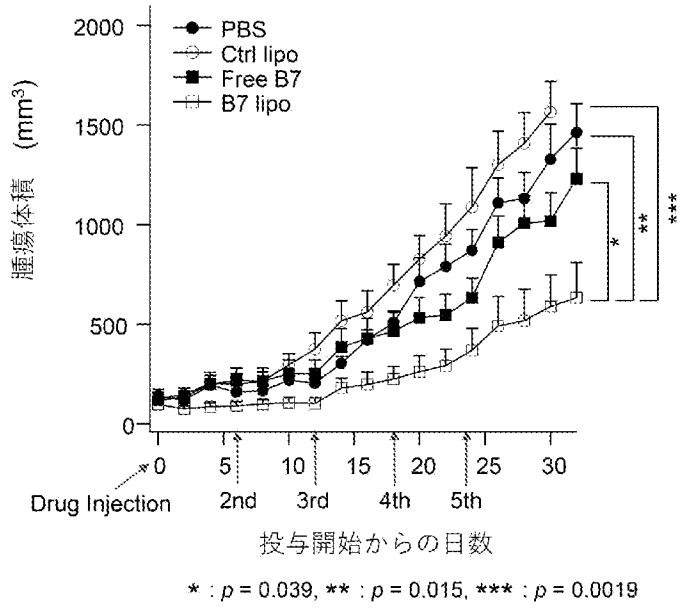
[図9A]



[図9B]

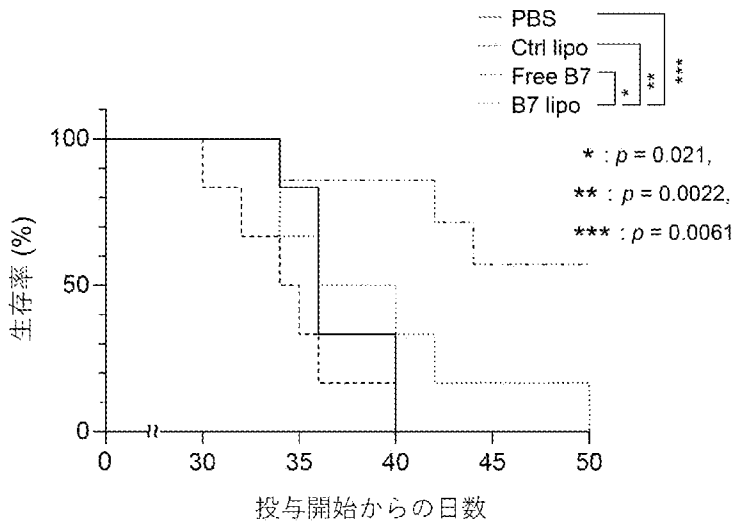


[図10]

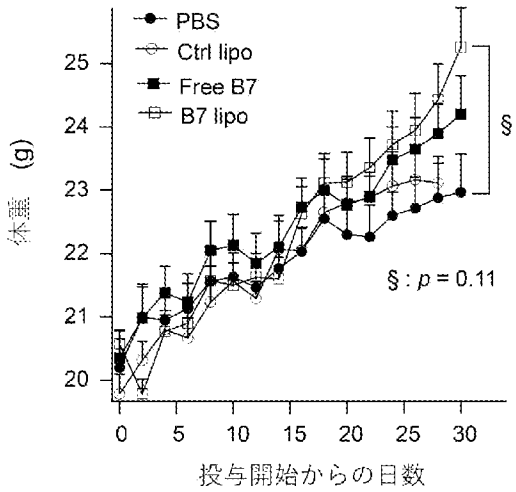


* : $p = 0.039$, ** : $p = 0.015$, *** : $p = 0.0019$

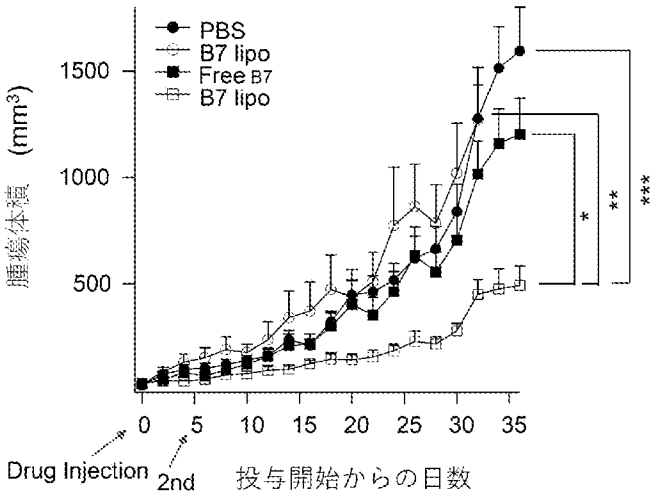
[図11]



[図12]

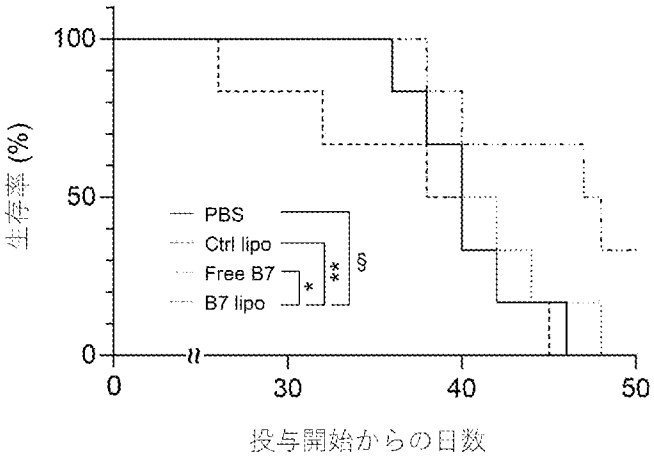


[図13]



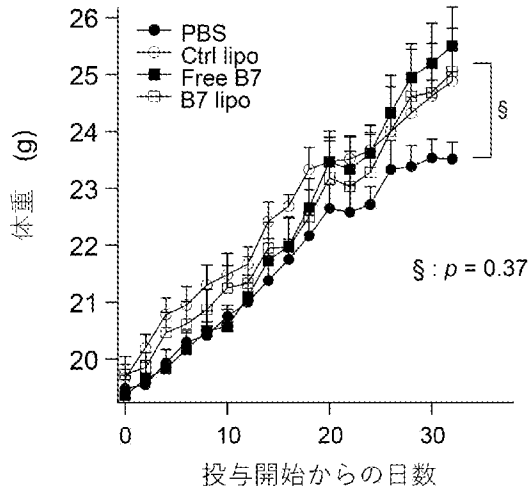
* : $p = 0.0255$, ** : $p = 0.0482$, *** : $p = 0.00752$

[図14]

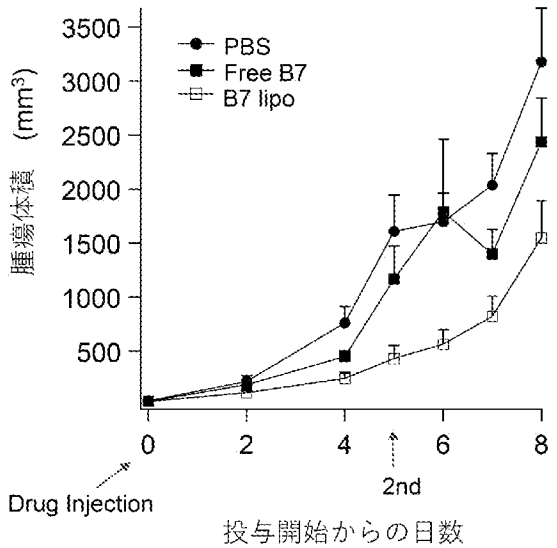


* : p = 0.033, ** : p = 0.023, § : p = 0.10

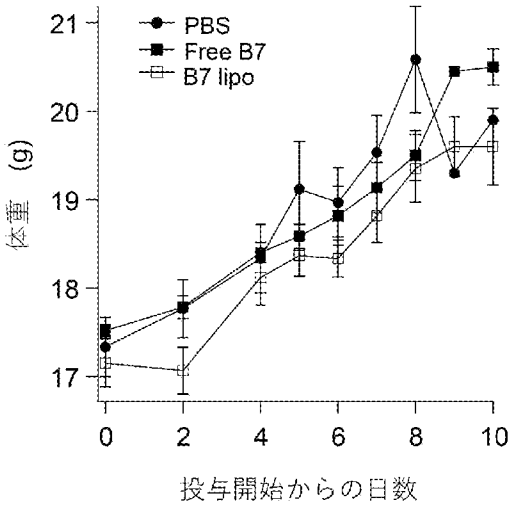
[図15]



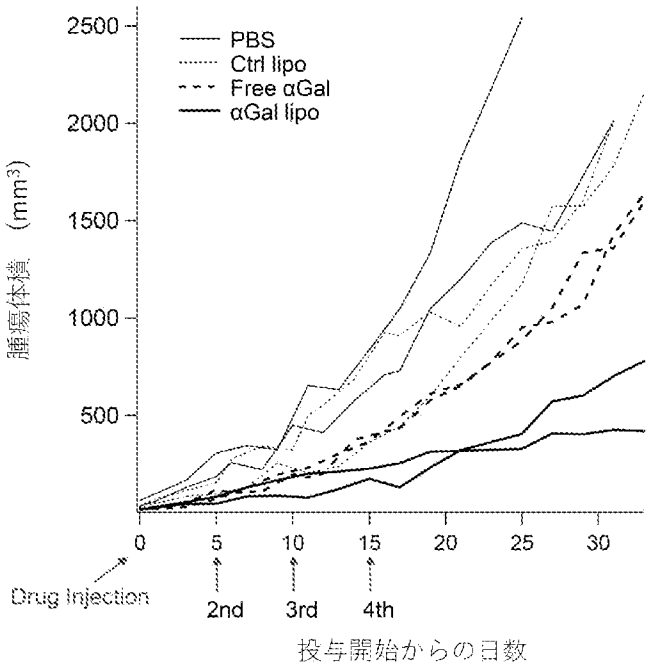
[図16A]



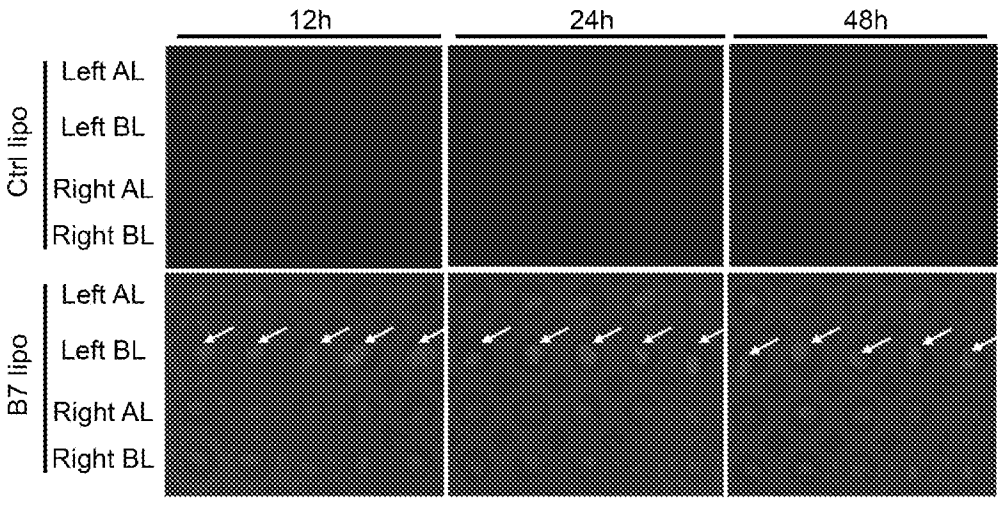
[図16B]



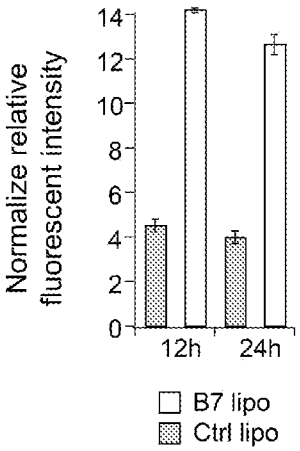
[図17]



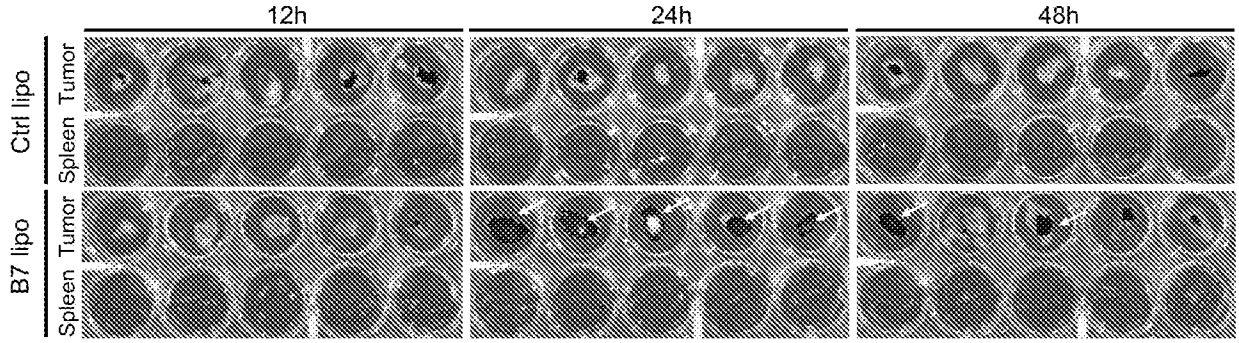
[図18A]



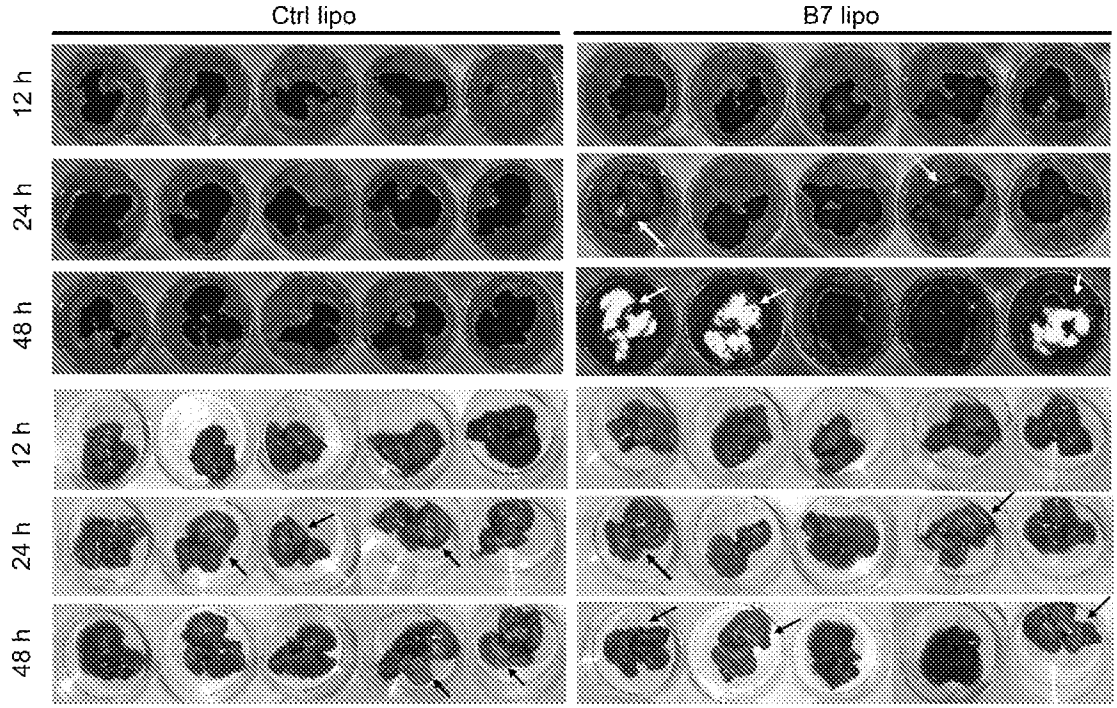
[図18B]


Normalize relative fluorescent intensity
14
12
10
8
6
4
2
0
12h
24h
B7 lipo
Ctrl lipo

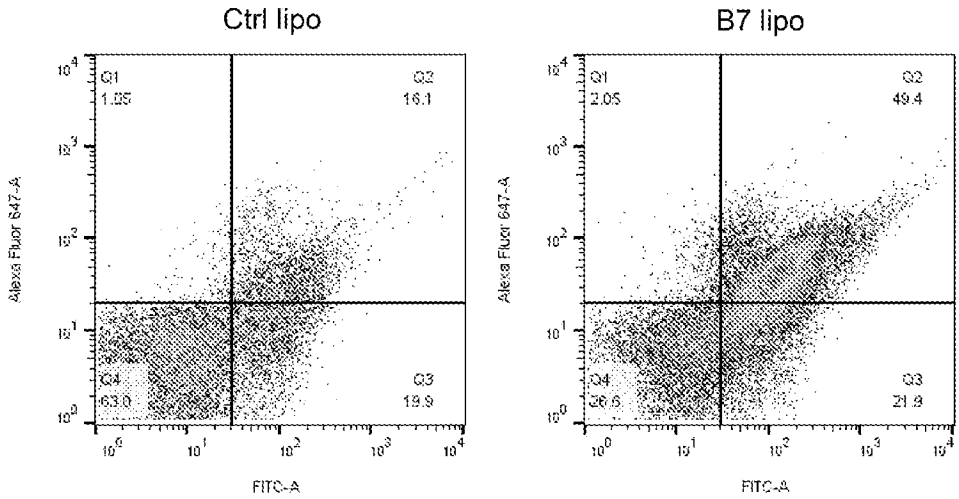
[図19]


12h
24h
48h
Ctrl lipo
Tumor
Spleen
B7 lipo
Tumor
Spleen

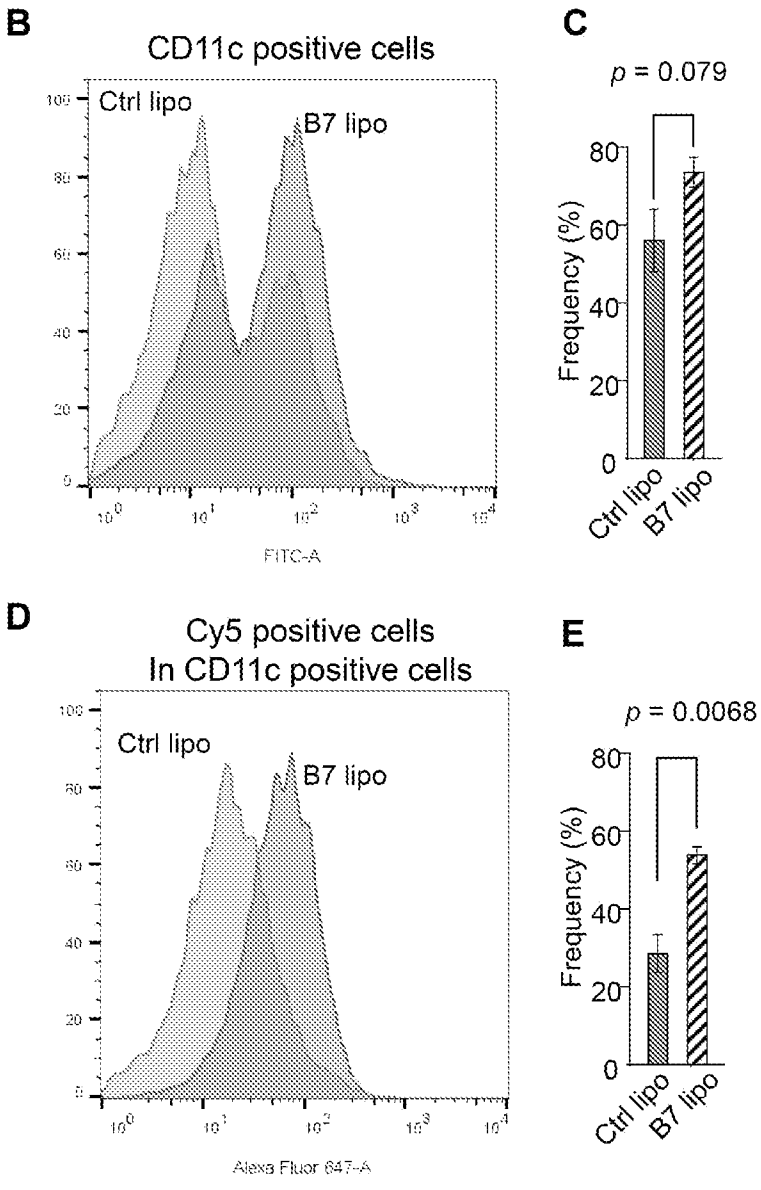
[図20]


Ctrl lipo
B7 lipo
12 h
24 h
48 h
12 h
24 h
48 h

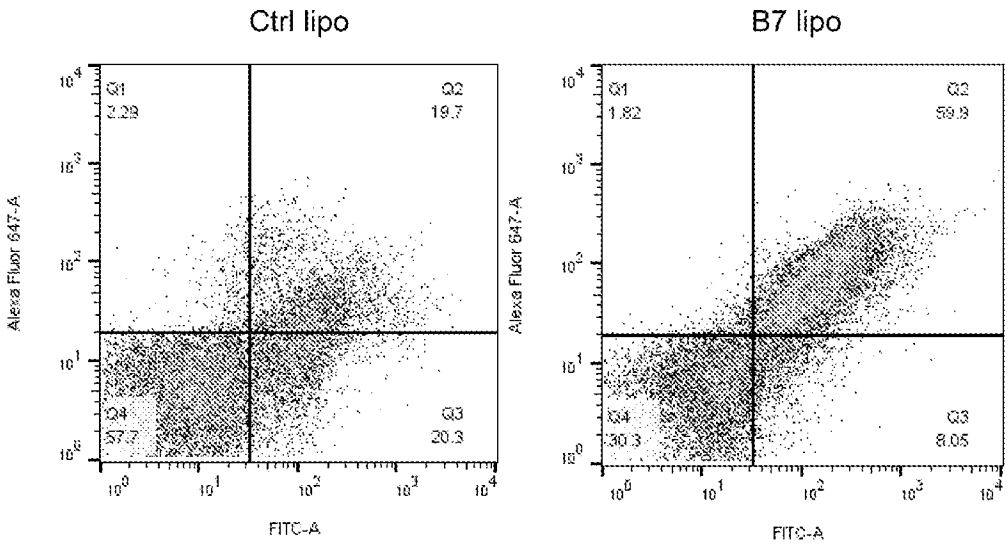
[図21A]


Ctrl lipo
B7 lipo
Q1
1.05
Q2
16.1
Q4
63.0
Q3
19.9
Q1
2.05
Q2
49.4
Q4
26.6
Q3
21.9
Alexa Fluor 647-A
FITC-A

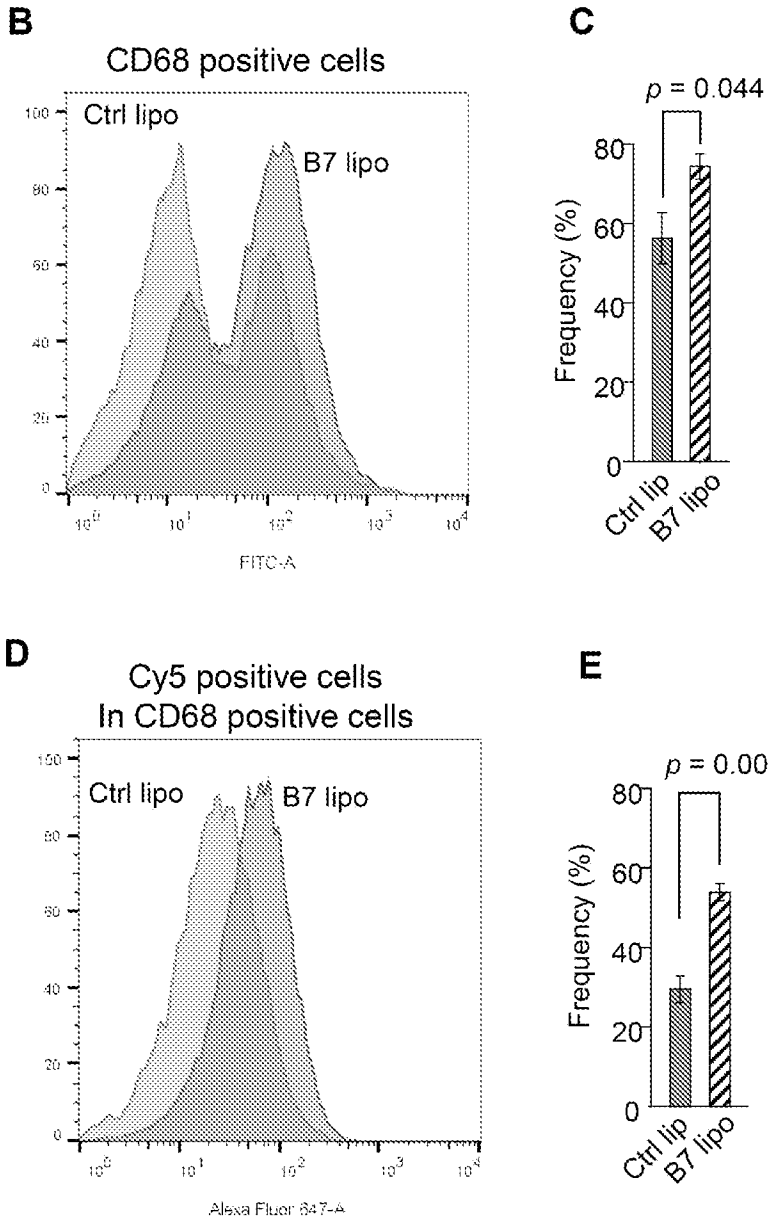
[図21B]


B
CD11c positive cells
Ctrl lipo
B7 lipo
FITC-A
C
p = 0.079
Frequency (%)
Ctrl lipo
B7 lipo
D
Cy5 positive cells
In CD11c positive cells
Ctrl lipo
B7 lipo
Alexa Fluor 647-A
E
p = 0.0068
Frequency (%)
Ctrl lipo
B7 lipo

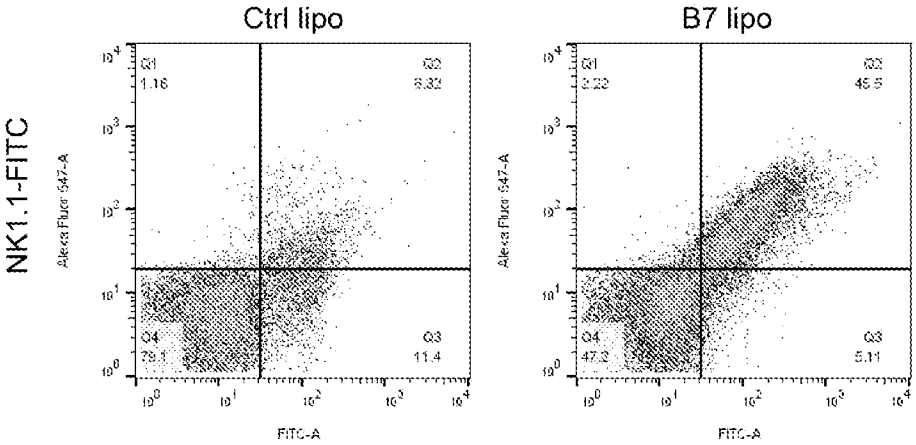
[図22A]


Ctrl lipo
B7 lipo
Q1
2.29
Q2
19.7
Q4
57.7
Q3
20.3
Q1
1.82
Q2
59.8
Q4
30.3
Q3
8.05
Alexa Fluor 647-A
FITC-A

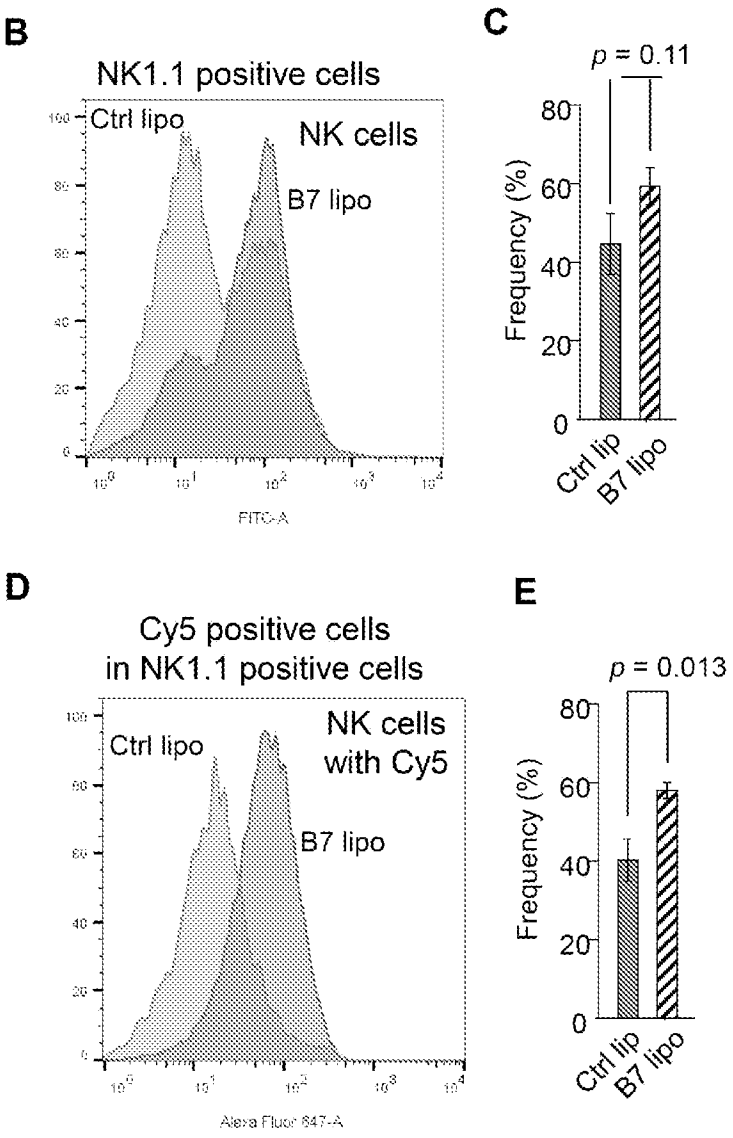
[図22B]


B
CD68 positive cells
Ctrl lipo
B7 lipo
FITC-A
C
p = 0.044
Frequency (%)
Ctrl lip
B7 lipo
D
Cy5 positive cells
In CD68 positive cells
Ctrl lipo
B7 lipo
Alexa Fluor 647-A
E
p = 0.0014
Frequency (%)
Ctrl lip
B7 lipo

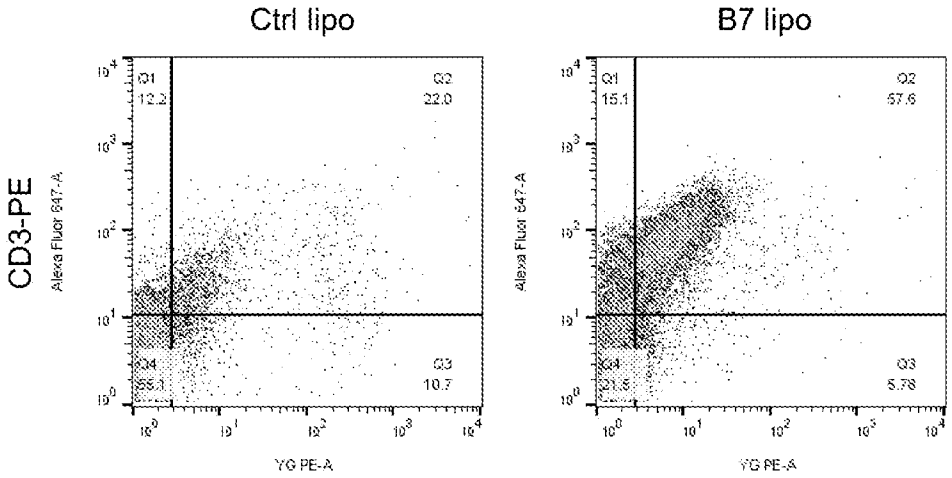
[図23A]


Ctrl lipo
B7 lipo
NK1.1-FITC
Alexa Fluor 647-A
FITC-A
Q1
1.16
Q2
8.32
Q4
79.1
Q3
11.4
Q1
3.22
Q2
45.5
Q4
47.2
Q3
5.11

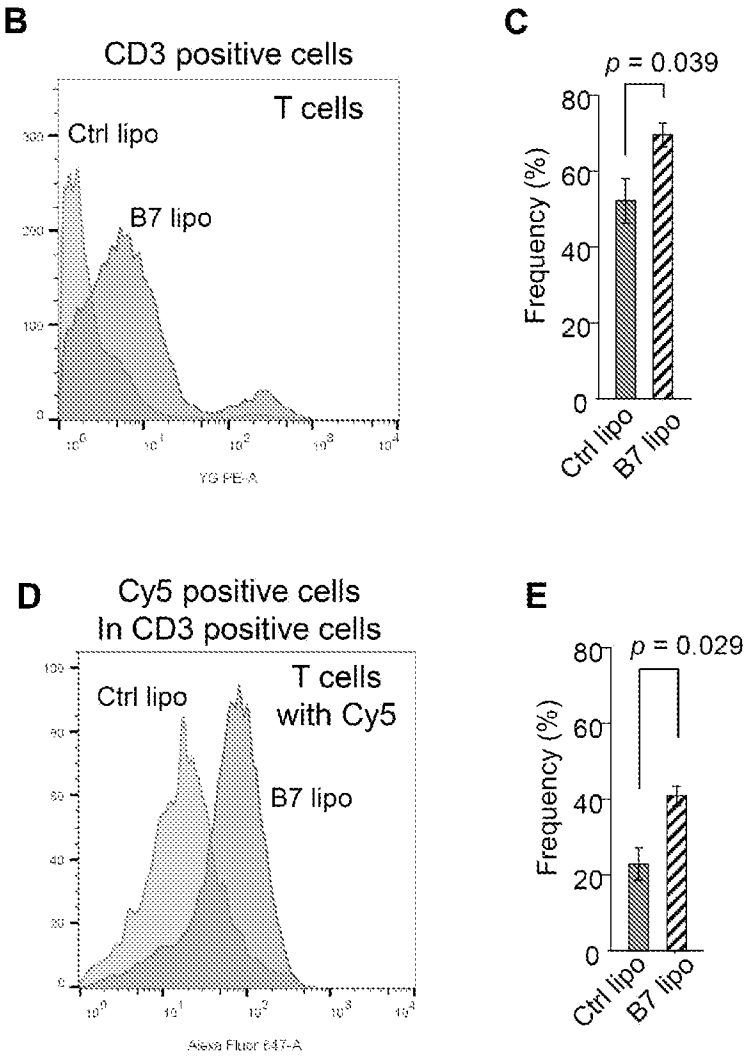
[図23B]


B
NK1.1 positive cells
Ctrl lipo
NK cells
B7 lipo
FITC-A
C
p = 0.11
Frequency (%)
80
60
40
20
0
Ctrl lip
B7 lipo
D
Cy5 positive cells
in NK1.1 positive cells
Ctrl lipo
NK cells
with Cy5
B7 lipo
Alexa Fluor 647-A
E
p = 0.013
Frequency (%)
80
60
40
20
0
Ctrl lip
B7 lipo

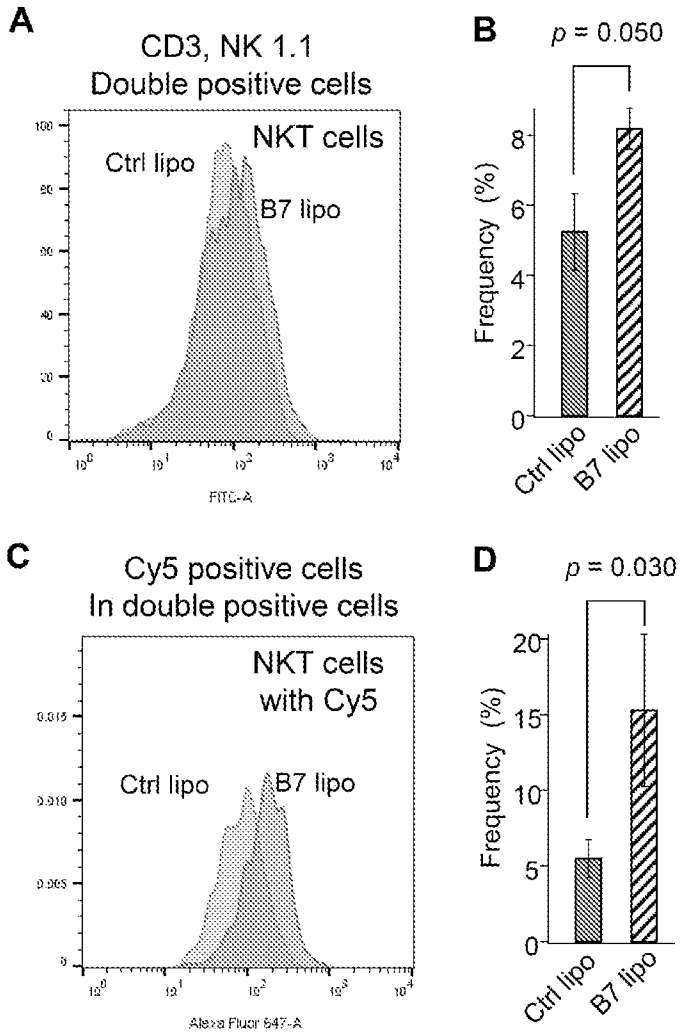
[図24A]


Ctrl lipo
B7 lipo
CD3-PE
Alexa Fluor 647-A
YG PE-A
Q1
12.2
Q2
22.0
Q4
55.1
Q3
10.7
Q1
15.1
Q2
67.6
Q4
21.3
Q3
5.78

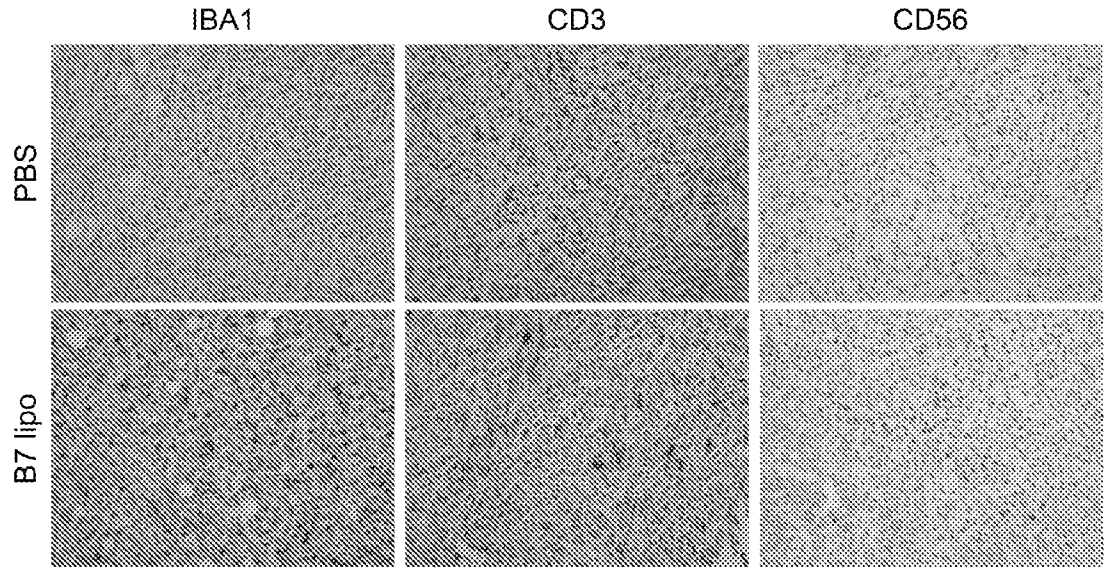
[図24B]


B
CD3 positive cells
T cells
Ctrl lipo
B7 lipo
YG PE-A
C
p = 0.039
Frequency (%)
Ctrl lipo
B7 lipo
D
Cy5 positive cells
In CD3 positive cells
T cells
with Cy5
Ctrl lipo
B7 lipo
Alexa Fluor 647-A
E
p = 0.029
Frequency (%)
Ctrl lipo
B7 lipo

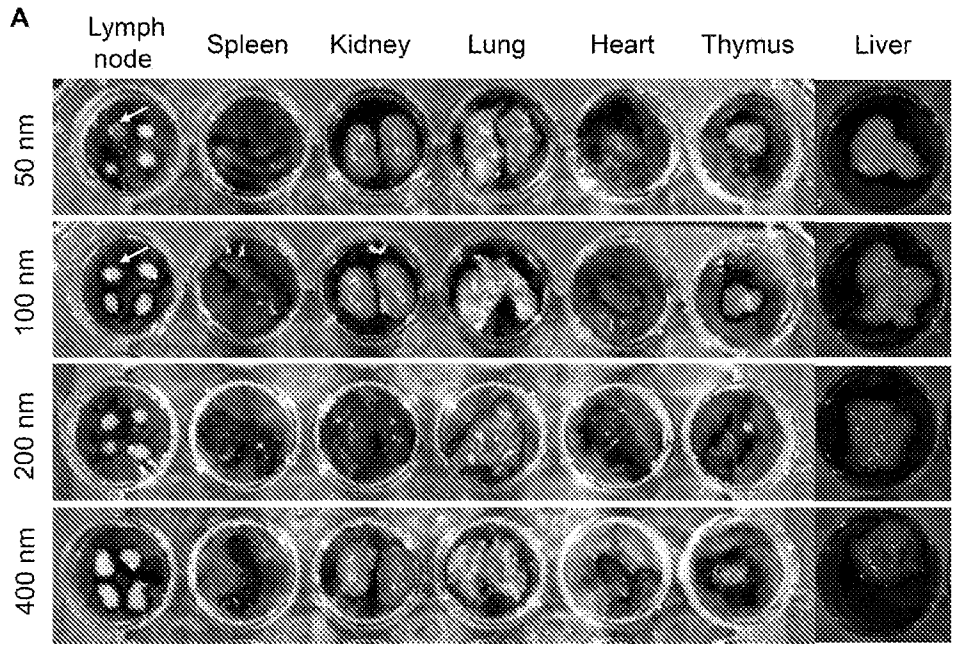
[図25]


A
CD3, NK 1.1
Double positive cells
NKT cells
Ctrl lipo
B7 lipo
FITC-A
B
p = 0.050
Frequency (%)
Ctrl lipo
B7 lipo
C
Cy5 positive cells
In double positive cells
NKT cells
with Cy5
Ctrl lipo
B7 lipo
Alexa Fluor 647-A
D
p = 0.030
Frequency (%)
Ctrl lipo
B7 lipo

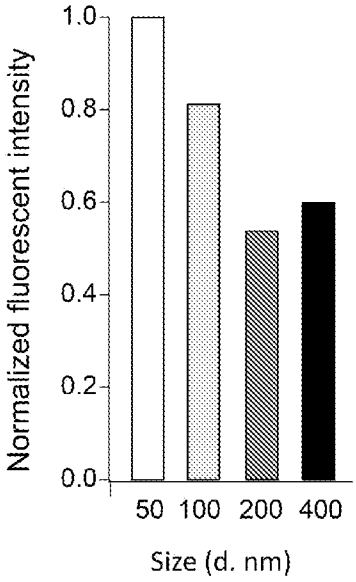
[図26]


IBA1
CD3
CD56
PBS
B7 lipo

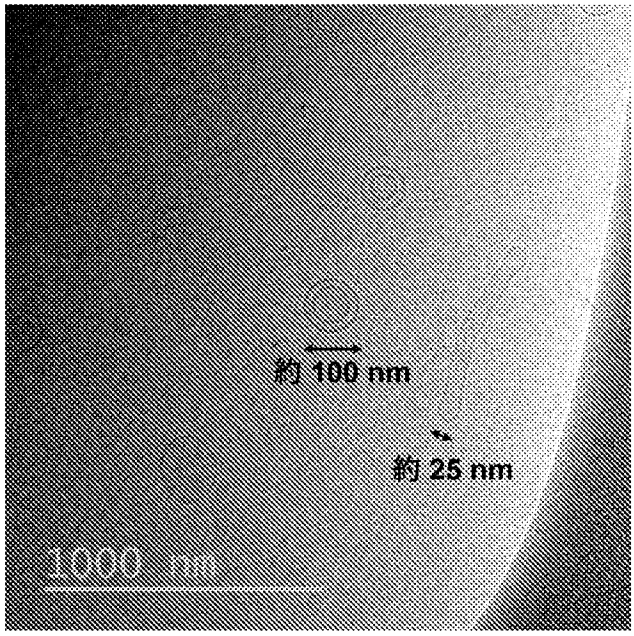
[図27A]


A
Lymph node
Spleen
Kidney
Lung
Heart
Thymus
Liver
50 nm
100 nm
200 nm
400 nm

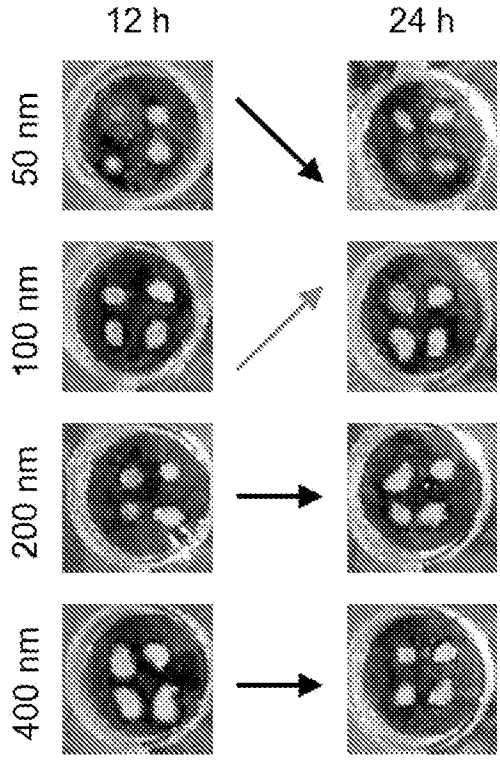
[図27B]


Normalized fluorescent intensity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
50
100
200
400
Size (d. nm)

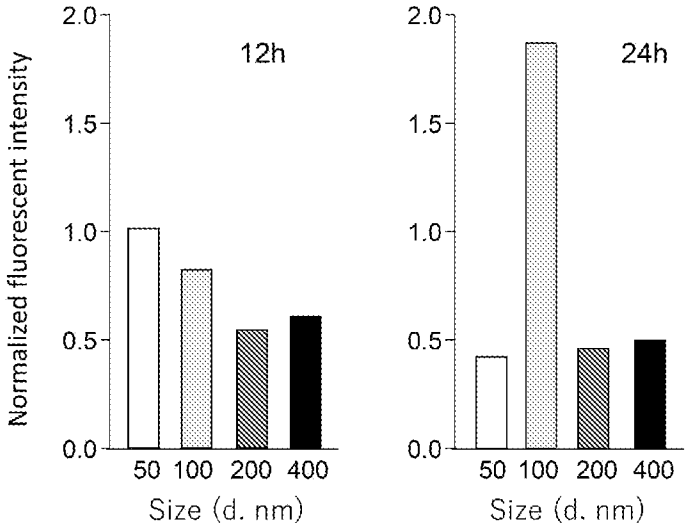
[図28]



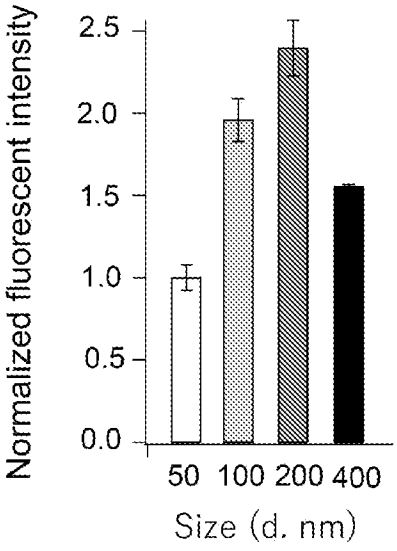
[図29A]



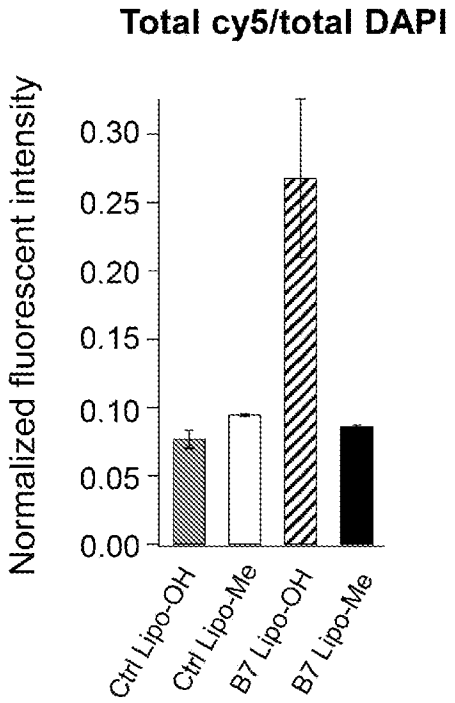
[図29B]


Normalized fluorescent intensity
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
12h
24h
50 100 200 400
Size (d. nm)

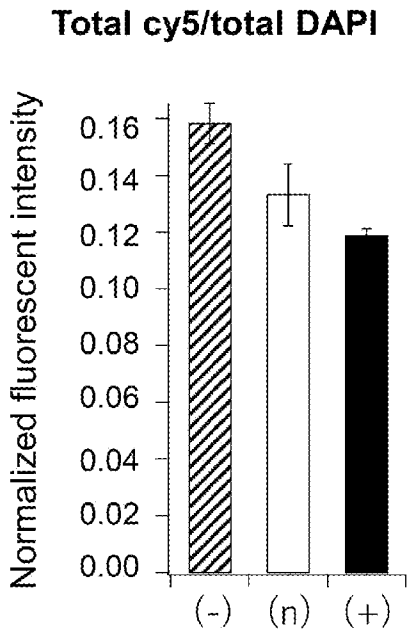
[図30]


Normalized fluorescent intensity
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
50 100 200 400
Size (d. nm)

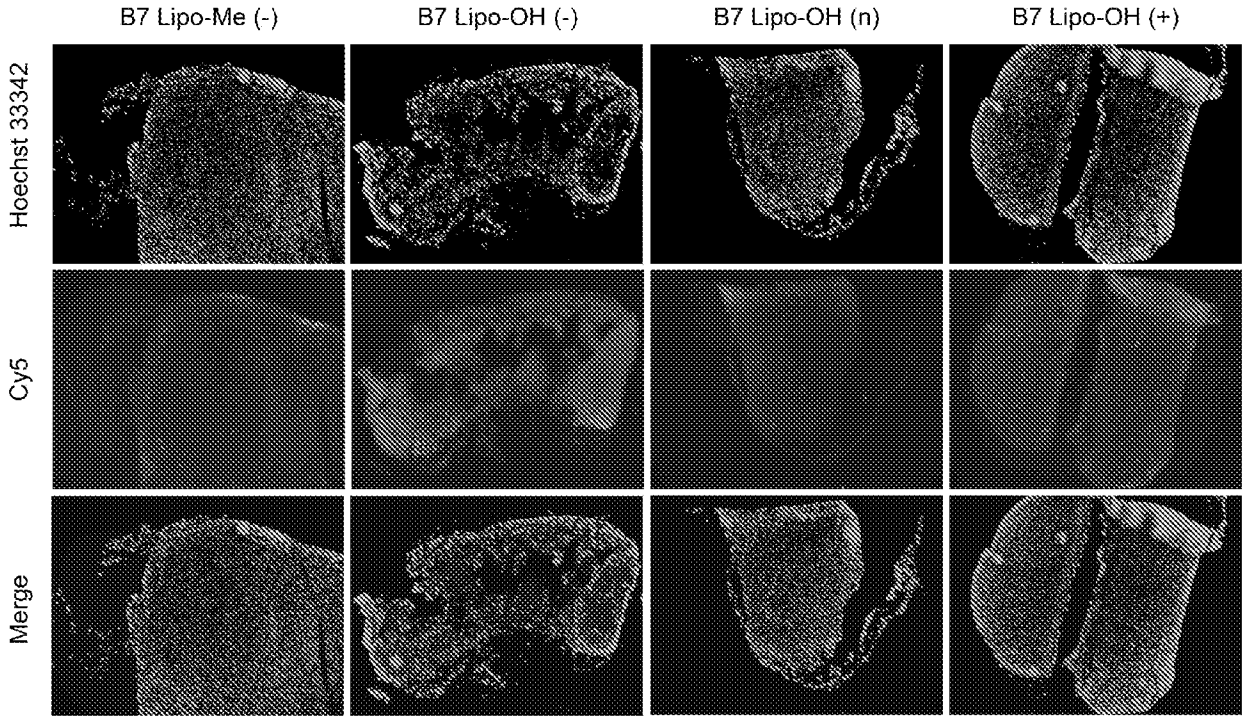
[図31]


Total cy5/total DAPI
Normalized fluorescent intensity
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Ctrl Lipo-OH
Ctrl Lipo-Me
B7 Lipo-OH
B7 Lipo-Me

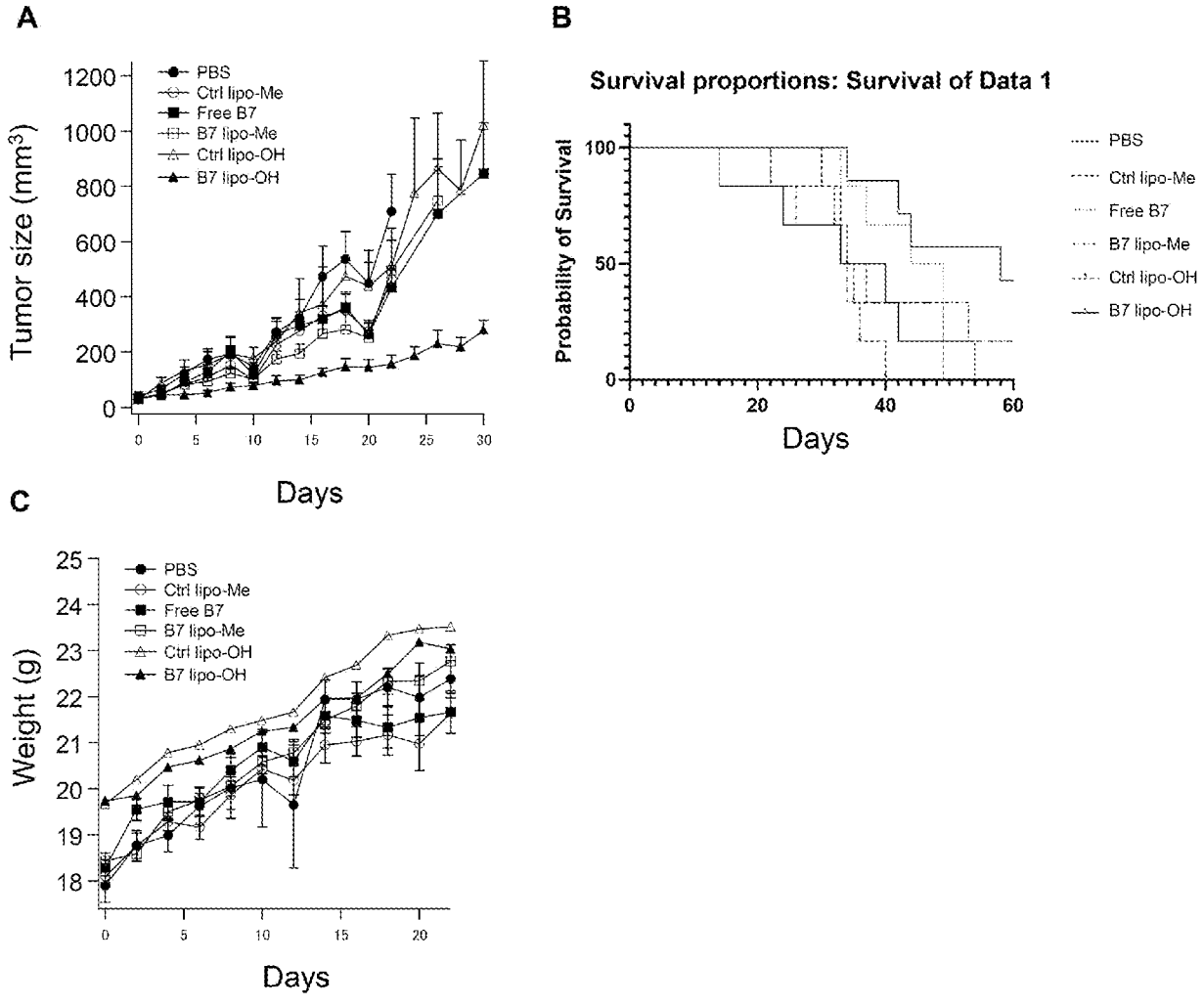
[図32]


Total cy5/total DAPI
Normalized fluorescent intensity
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
(-)
(n)
(+)

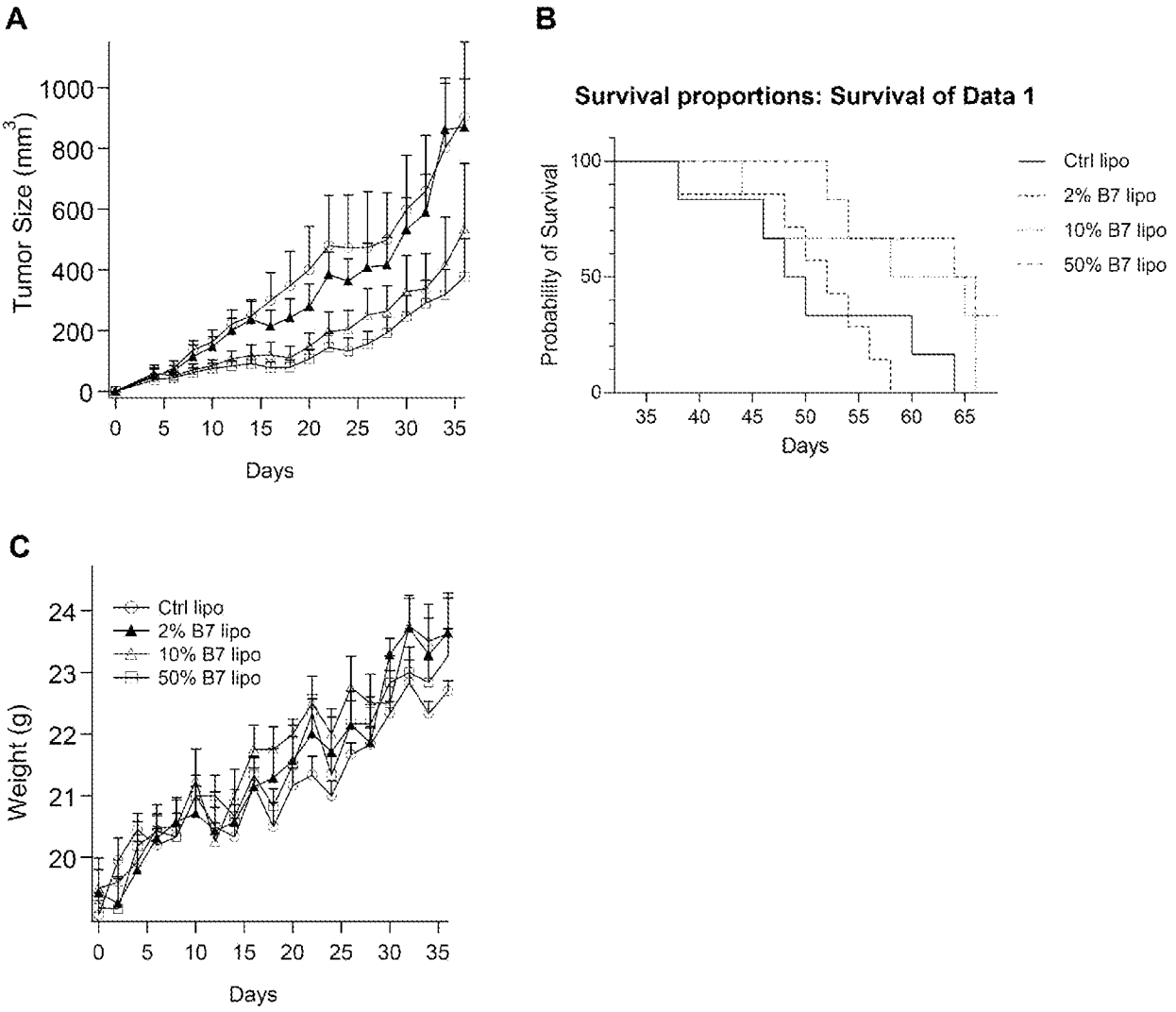
[図33]


B7 Lipo-Me (-)
B7 Lipo-OH (-)
B7 Lipo-OH (n)
B7 Lipo-OH (+)
Hoechst 33342
Cy5
Merge

[図34]


A
Tumor size (mm³)
Days
PBS
Ctrl lipo-Me
Free B7
B7 lipo-Me
Ctrl lipo-OH
B7 lipo-OH
B
Survival proportions: Survival of Data 1
Probability of Survival
Days
C
Weight (g)
Days

[図35]


A
Tumor Size (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35
Days
B
Survival proportions: Survival of Data 1
Probability of Survival
100
50
0
35 40 45 50 55 60 65
Days
Ctrl lipo
2% B7 lipo
10% B7 lipo
50% B7 lipo
C
Weight (g)
24
23
22
21
20
0 5 10 15 20 25 30 35
Days
Ctrl lipo
2% B7 lipo
10% B7 lipo
50% B7 lipo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/042812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7032(2006.01)i; ***A61K 9/1271***(2025.01)i; ***A61K 47/14***(2017.01)i; ***A61K 47/18***(2017.01)i; ***A61K 47/24***(2006.01)i; ***A61K 47/28***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i
FI: A61K31/7032; A61K9/1271; A61K47/14; A61K47/18; A61K47/24; A61K47/28; A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/7032; A61K9/1271; A61K47/14; A61K47/18; A61K47/24; A61K47/28; A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2025
Registered utility model specifications of Japan 1996-2025
Published registered utility model applications of Japan 1994-2025

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAMURA, Takashi et al., The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves α-galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration, J. Control. Release, 2013, vol. 171, pp. 216-224 title, abstract, p. 217, right column, 2.3., p. 219, 3.3., fig. 3-5, etc., drawings	1-13, 20-33
X	JP 2023-502182 A (NAMMI THERAPEUTICS, INC.) 20 January 2023 (2023-01-20) examples 9, 15, etc., drawings	1-13, 20-33
X	JP 2023-507322 A (NAMMI THERAPEUTICS, INC.) 22 February 2023 (2023-02-22) claims, paragraph [0515], examples 6, 12, etc.	1-13, 20-33
X	JP 2022-501421 A (UNIVERSITEIT GENT) 06 January 2022 (2022-01-06) paragraphs [0035], [0057], [0058], [0082], [0097] onwards	1-13, 20-33
X	JP 2018-70576 A (ISHIDA, Tatsuhiro) 10 May 2018 (2018-05-10) claims, paragraph [0014], example 1, etc.	1-13, 20-33

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 February 2025	**25 February 2025**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/042812

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/133106 A1 (RIKEN) 04 September 2014 (2014-09-04) claims, table 1, reference example 2, etc.	20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/042812

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☑ Claims Nos.: **14-19**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The invention in claim 14 is considered to specify the "α-galactosyl ceramide or analog thereof" in claim 1 as having the structural formula of formula [chem 1].

However, since there is absolutely no indication of the definitions of Rn, X, etc. in said formula in [chem 1], it is not possible to understand what compounds having what chemical structures are encompassed or not encompassed in the claim.

Accordingly, the invention in claim 14 is very unclear. The same is true of the invention in claims 15-19.

Therefore, since it cannot be said that a meaningful search can be carried out for the invention in claims 14-19, the search was not conducted.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/042812

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2023-502182 A	20 January 2023	US 2021/0163418 A1 example 9, 15, etc., drawings WO 2021/096542 A1 EP 4041402 A1 KR 10-2022-0100904 A CN 115135385 A	
JP 2023-507322 A	22 February 2023	US 2021/0187066 A1 claims, paragraph [0563], examples 6, 12, etc. WO 2021/126281 A1 EP 4076445 A1 KR 10-2022-0119085 A CN 114901275 A	
JP 2022-501421 A	06 January 2022	US 2021/0369862 A1 paragraphs [0051], [0080], [0081], [0116], [0133] onwards WO 2020/058239 A1 EP 3852727 A1 CN 112702994 A KR 10-2021-0061393 A	
JP 2018-70576 A	10 May 2018	(Family: none)	
WO 2014/133106 A1	04 September 2014	TW 201442739 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/042812

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 31/7032(2006.01)i; A61K 9/1271(2025.01)i; A61K 47/14(2017.01)i; A61K 47/18(2017.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i
FI: A61K31/7032; A61K9/1271; A61K47/14; A61K47/18; A61K47/24; A61K47/28; A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K31/7032; A61K9/1271; A61K47/14; A61K47/18; A61K47/24; A61K47/28; A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	NAKAMURA, Takashi et al., The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves α-galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration, J. Control. Release, 2013, Vol.171, pp.216-224 標題、要約、２１７頁右欄２．３．、２１９頁３．３．、図３－５等各図	1-13,20-33
X	JP 2023-502182 A (ナミ セラピューティクス, インコーポレイテッド) 20.01.2023 (2023-01-20) 実施例９、１５等、各図	1-13,20-33
X	JP 2023-507322 A (ナミ セラピューティクス, インコーポレイテッド) 22.02.2023 (2023-02-22) 特許請求の範囲、【０５１５】、実施例６、１２等	1-13,20-33
X	JP 2022-501421 A (ユニベルシテイト ゲント) 06.01.2022 (2022-01-06) 【００３５】、【００５７】、【００５８】、【００８２】、【００９７】以降	1-13,20-33
X	JP 2018-70576 A (石田　竜弘) 10.05.2018 (2018-05-10) 特許請求の範囲、【００１４】、実施例１等	1-13,20-33

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
14.02.2025	25.02.2025

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
鈴木　理文 4C 4431
電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2014/133106 A1 (独立行政法人理化学研究所) 04.09.2014 (2014-09-04) 特許請求の範囲、表１、参考例２等	20

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/042812

第Ⅱ欄　　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項
は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. ☑ 請求項 14-19
は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

請求項１４に係る発明は、請求項１の「α－ガラクトシルセラミドまたはそのアナログ」を式［化１］なる構造式であると特定するものと認められる。
しかしながら、該式［化１］中のＲｎやＸ等の定義が一切記載されていないから、如何なる化学構造を有する化合物が包含され又はされないか理解できない。
したがって、請求項１４に係る発明は著しく不明確である。請求項１５－１９に係る発明についても同様である。
よって、請求項１４－１９に係る発明は、有意義な調査ができるとはいえないから、調査を行わなかった。

3. ☐ 請求項
は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/042812

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2023-502182 A	20.01.2023	US 2021/0163418 A1 実施例９、１５等、各図 WO 2021/096542 A1 EP 4041402 A1 KR 10-2022-0100904 A CN 115135385 A	
JP 2023-507322 A	22.02.2023	US 2021/0187066 A1 特許請求の範囲、[0563]、 実施例６、１２等 WO 2021/126281 A1 EP 4076445 A1 KR 10-2022-0119085 A CN 114901275 A	
JP 2022-501421 A	06.01.2022	US 2021/0369862 A1 [0051]、[0080]、[0081]、 [0116]、[0133]以降 WO 2020/058239 A1 EP 3852727 A1 CN 112702994 A KR 10-2021-0061393 A	
JP 2018-70576 A	10.05.2018	（ファミリーなし）	
WO 2014/133106 A1	04.09.2014	TW 201442739 A	