

(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
2018年9月13日(13.09.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/164116 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/20 (2006.01) A61K 47/44 (2017.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61P 13/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/008560

(22) 国際出願日: 2018年3月6日(06.03.2018)

(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 2017-042228 2017年3月6日(06.03.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人筑波大学(UNIVERSITY OF TSUKUBA) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 Ibaraki (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 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 宮 ▲ 崎 ▼ 淳 (MIYAZAKI Jun); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 西山 博之(NISHIYAMA Hiroyuki); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 吉野 喬之(YOSHINO Takayuki); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 赤座 英之(AKAZA Hideyuki); 〒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 Tokyo (JP).

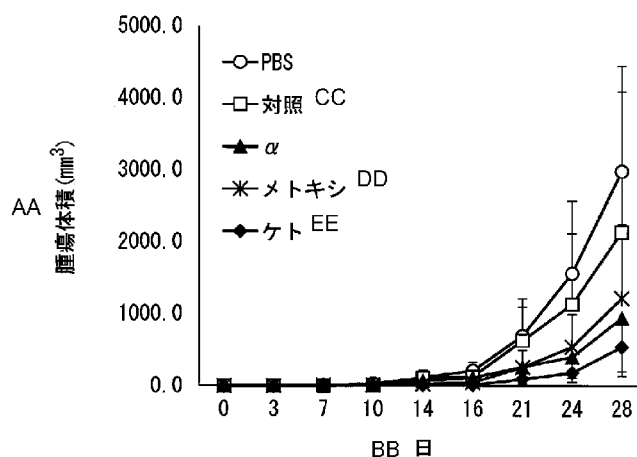
(74) 代理人: 棚 井 澄 雄, 外 (TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(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,

(54) Title: LIPOSOME, ANTICANCER AGENT AND CANCER THERAPY KIT

(54) 発明の名称: リポソーム、抗癌剤及び癌治療用キット

【図7】



AA Tumor volume (mm³)
BB Days
CC Control
DD Methoxy
EE Keto

(57) Abstract: A liposome that contains a mycolic acid and a sterol compound.

(57) 要約: ミコール酸及びステロール化合物を含有するリポソーム。

[続葉有]

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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、抗癌剤及び癌治療用キット

技術分野

[0001] 本発明は、リポソーム、抗癌剤及び癌治療用キットに関する。本願は、2017年3月6日に、日本に出願された特願2017-042228号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 膀胱癌は再発が多い癌として知られている。このため、筋層に浸潤していない筋層非浸潤性膀胱癌の治療法として、内視鏡手術で癌組織を切除した後に、再発を抑制するためにカルメット・ゲラン桿菌（BCG）を膀胱内に注入する治療法が標準的に行われている。膀胱内に投与されたBCGは、患者の癌細胞に侵入し、患者の免疫系を活性化して癌細胞を傷害させると考えられている。BCGは、膀胱癌以外の上皮内癌の治療にも用いられる場合がある。

[0003] BCGは、抗酸菌の一種であるマイコバクテリウム・ボビス由来の弱毒株であり、結核の予防ワクチン等としても使用されるものである。BCGを含む抗酸菌の免疫活性化成分として、細胞壁に存在するミコール酸が考えられている（例えば、非特許文献1を参照）。

[0004] ミコール酸は、抗酸菌に特徴的な細胞壁機能分子であり、炭素数60～90の長鎖脂肪酸である。ミコール酸は、結核菌をはじめ、抗酸菌細胞壁を構成する特徴的な大長鎖分子脂肪酸であり、その疎水性が細胞壁の安定性に寄与するとともに、抗酸性の保持に必須であると考えられている。

[0005] 一方、ミコール酸及びその誘導体（遊離ミコール酸を含め、トレハロース、グルコース、グリセロール等の糖エステル等）は、結核菌の病原因子として動物に投与したときに、肺に結核性病変（肉芽腫）を形成することから、病原因子としても注目されてきた。最近、ミコール酸及びその誘導体はすべての抗酸菌に分布し、サブクラスや炭素鎖の違いにより病原性が異なること

が明らかにされつつある。

[0006] ミコール酸には、極性の異なる α -ミコール酸、メトキシミコール酸、ケトミコール酸、ワックスエステルミコール酸、エポキシミコール酸、ジヒドロキシミコール酸等の多数のサブクラスが存在することが知られている。結核菌やBCG菌のミコール酸は、 α -ミコール酸、メトキシミコール酸、ケトミコール酸の3種類のサブクラスからなる。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Korf J., et al., The Mycobacterium tuberculosis cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses, Eur. J. Immunol., 35, 890-900, 2005.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] BCGは強力な抗腫瘍性を示すことが認められているにもかかわらず、生菌であるため、生体に投与すると感染症を引き起こす場合がある。また、バイオハザードの問題から、管理、供給搬送、廃棄等が煩雑である。一方、抗酸菌の免疫活性化成分と考えられているミコール酸そのものを使用すれば、バイオハザードの問題は生じないものの、ミコール酸をそのまま生体に投与しても免疫系を活性化することが困難である。このため、ミコール酸を臨床応用した例は知られていない。そこで、本発明は、ミコール酸を臨床応用する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は以下の態様を含む。

[1] ミコール酸及びステロール化合物を含有するリポソーム。

[2] カチオン性脂質を更に含有する、[1]に記載のリポソーム。

[3] 前記ミコール酸がケトミコール酸を含む、[1]又は[2]に記載のリポソーム。

〔４〕ゼータ電位がプラスである、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のリポソーム。

〔５〕直径が２００ｎｍ以下である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のリポソーム。

〔６〕多分散指数が０．３以下である、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のリポソーム。

〔７〕〔１〕～〔６〕のいずれかに記載のリポソームを有効成分とする抗癌剤。

〔８〕〔７〕に記載の抗癌剤と免疫チェックポイント阻害剤とを備える、癌治療用キット。

発明の効果

〔００１０〕 本発明によれば、ミコール酸を臨床応用する技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

〔００１１〕〔図１〕実験例１における、ミコール酸の薄層クロマトグラフィーの結果を示す写真である。

〔図２〕（ａ）～（ｃ）は、それぞれ、実験例２における、 α -ミコール酸、メトキシミコール酸、ケトミコール酸の質量分析の結果を示すマススペクトルである。

〔図３〕（ａ）～（ｄ）は、それぞれ、実験例５において、対照リポソーム、 α -ミコール酸含有リポソーム、メトキシミコール酸含有リポソーム、ケトミコール酸含有リポソームを接触させたＴ２４細胞の蛍光顕微鏡写真である。

〔図４〕実験例５において、対照リポソームを接触させたＴ２４細胞をフローサイトメトリーで解析した結果を示すグラフである。

〔図５〕（ａ）～（ｃ）は、それぞれ、実験例６における、Ｔ２４細胞、ＭＢＴ－２細胞、ＭＢ４９細胞の結果を示すグラフである。

〔図６〕実験例７の実験スケジュールを説明する図である。

〔図７〕実験例７において、マウスの腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグ

ラフである。

[図8]実験例8において、マウスの腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。

[図9]実験例10におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

[図10]実験例11において、マウスの腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。

[図11](a)及び(b)は、実験例12における、マウスの腫瘍組織の免疫染色の結果を示す代表的な写真である。(c)は、実験例12において、マウスの腫瘍組織に浸潤したCD4陽性T細胞をカウントした結果を示すグラフである。

[図12](a)及び(b)は、実験例12における、マウスの腫瘍組織の免疫染色の結果を示す代表的な写真である。(c)は、実験例12において、マウスの腫瘍組織に浸潤したCD8陽性T細胞をカウントした結果を示すグラフである。

[図13]実験例13の実験スケジュールを説明する図である。

[図14]実験例13において、マウスの腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。

[図15]実験例15において、マウスの腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。

[図16](a)～(d)は、実験例16において、骨髓由来樹状細胞の培地中に放出されたTNFの濃度を測定した結果を示すグラフである。

[図17](a)～(c)は、実験例16において、骨髓由来マクロファージの培地中に放出されたTNFの濃度を測定した結果を示すグラフである。

[図18]実験例18において、マウスの腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] [リポソーム]

1 実施形態において、本発明は、ミコール酸及びステロール化合物を含有

するリポソームを提供する。

[0013] 実施例において後述するように、本実施形態のリポソームを生体に投与することにより、免疫系を活性化させ、癌細胞を傷害させることができる。したがって、本実施形態のリポソームは、抗癌剤、免疫活性化剤、アジュバント等として使用することができる。

[0014] ミコール酸は、抗酸菌の菌表層バリアーを形成する疎水性分子であり、一方、宿主生体側には強力な免疫活性化を誘導する成分と考えられているものの、そのまま生体に投与しても免疫系を活性化することが困難である。これは、ミコール酸が疎水性が強く、細胞親和性が低いためであると考えられる。

[0015] これに対し、実施例において後述するように、本実施形態のリポソームは、細胞親和性が高く、ミコール酸を効率的に宿主細胞質内に送達することができる。その結果、ミコール酸を癌細胞に送達し、癌細胞に対する免疫を活性化し、癌細胞を傷害することができる。

[0016] (リポソーム)

リポソームとは、両親媒性物質により構成される人工的な小胞の1種である。両親媒性物質としては、リン脂質、糖脂質、界面活性剤等が挙げられる。

[0017] リン脂質としては、炭素数3～30の飽和又は不飽和脂肪酸を構成成分に有する、ホスファチジルコリン類（例えば、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジラウロイルホスファチジルコリン（DLPC）等）、ホスファチジルグリセロール類（例えば、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジラウロイルホスファチジルグリセロール等）、ホスファチジルエタノールアミン類（例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン等）、ホスファチジルセリン類（例えば、ジオレオイルホスファチジルセリン、ジパルミトイルホス

ファチジルセリン、ジラウロイルホスファチジルセリン等)、ホスファチジン酸類、ホスファチジルイノシトール類、カルジオリピン類、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、及びこれらの水素添加物等が挙げられる。中でも、DOPCは安価であり、生体に対する毒性が低いため好適である。

[0018] 糖脂質としては、例えば、スルホキノボシルジグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド等のグリセロ糖脂質；ガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシド等のスフィンゴ糖脂質等が挙げられる。また、界面活性剤としては、Span 80、Tween 80、Tween 20等が挙げられる。両親媒性物質は、1種を単独で用いてもよいし、2種以上を混合して用いてもよい。

[0019] リポソームは、超音波処理法、逆相蒸発法、凍結融解法、脂質溶解法、噴霧乾燥法等の従来公知の任意の方法により製造することができる。

[0020] (ミコール酸)

本実施形態のリポソームにおいて、ミコール酸としては、免疫系を活性化できるものであれば特に制限なく用いることができる。一般的に、ミコール酸は化学合成することが困難である。このため、抗酸菌から精製して用いることが好適である。

[0021] 結核菌やBCG菌のミコール酸には、 α -ミコール酸、メトキシミコール酸、ケトミコール酸の3種類のサブクラスが存在する。また、非結核性抗酸菌ミコール酸には α -ミコール酸、ケトミコール酸、ワックスエステルミコール酸が含まれ、いずれもトレハロースエステルの形で強力な免疫増強活性を示すことが知られている。実施例において後述するように、中でも、ケトミコール酸は、インビボにおいて癌を傷害する活性が高い傾向にあるため好適である。ミコール酸は、遊離ミコール酸の形態であってもよく、例えばトレハロースモノエステル、トレハロースジエステル、グルコースモノエステル、グリセロールモノエステル等のミコール酸の糖エステルの形態であってもよい。本実施形態のリポソームにおいて、ミコール酸としては、これらの

いずれか1種を用いてもよいし、2種以上の混合物を用いてもよい。

[0022] ミコール酸の含有量は、リポソームを基準とした乾燥重量で5～20質量%であることが好ましく、10～15質量%であることがより好ましい。

[0023] (ステロール化合物)

本実施形態のリポソームは、ステロール化合物を含有する。発明者らは、ミコール酸含有リポソームにステロール化合物を含有させることにより、リポソームの粒径を小さく揃え、安定性を高めることができることを明らかにした。

[0024] ステロール化合物としては、コレステロール、 3β -[N-(ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール、N-(トリメチルアンモニオエチル)カルバモイルコレステロール等が挙げられる。中でも、コレステロールを好適に用いることができる。

[0025] ステロール化合物の含有量は、リポソームを基準とした乾燥重量で5～20質量%であることが好ましく、10～15質量%であることがより好ましい。

[0026] (ゼータ電位)

本実施形態のリポソームは、ゼータ電位がプラスであることが好ましい。ゼータ電位がプラスであることにより、細胞親和性が向上し、細胞内にミコール酸を送達することが容易になる。リポソームのゼータ電位は1～20mVであることが好ましく、5～20mVであることがより好ましい。リポソームのゼータ電位は、例えば、電気泳動光散乱測定法等により測定することができる。

[0027] リポソームのゼータ電位をプラスにする方法として、リポソームを構成する両親媒性物質にカチオン性を有するものを添加することが挙げられる。例えば、リポソームの材料として、カチオン性脂質を添加してもよい。

[0028] カチオン性脂質としては、コレステロール骨格を有するもの、グルタミン酸骨格を有するもの、4級アンモニウム塩、デンドロン脂質等が挙げられる。

[0029] コレステロール骨格を有するカチオン性脂質としては、例えば、[N－(N', N'－ジメチルアミノエタン)－カルバモイル] コレステロール (DC－Chol) 等が挙げられる。

[0030] グルタミン酸骨格を有するカチオン性脂質としては、例えば、塩化N－(α －トリメチルアンモニオアセチル)－ジドデシル－D－グルタミン酸 (TMAG) 等が挙げられる。

[0031] 4級アンモニウム塩としては、例えば、N－(1－(2, 3－ジオレイロキシ)プロピル)－N, N, N－トリメチルアンモニウムブロマイド (DOTMA)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド (DDAB)、2, 3－ジオレイロキシ－N－[2 (スぺルミンカルボキシアミド) エチル]－N, N－ジメチル－1－プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオレオイル－D－グルタメート－N－2 (スぺルミンカルボキシアミド) エチル (DOGS)、1, 2－ジミリストイロキシプロピル－3－ジメチル－ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド (DMRIE) 等が挙げられる。

[0032] デンドロン脂質としては、例えば、デンドロン脂質 (型式「D1」、「D2」、「D3」、「D12」、「D22」、「D32」、いずれもヒュギエイアバイオサイエンス社製) 等が挙げられるがこれらに限定されない。中でも、デンドロン脂質 (型式「D22」、ヒュギエイアバイオサイエンス社製) が好ましい。

[0033] カチオン性脂質の含有量は、リポソームを基準とした乾燥重量で1～10質量%であることが好ましく、2～5質量%であることがより好ましい。

[0034] (直径)

本実施形態のリポソームは、カチオン性であることが好ましく、直径が200nm以下であることが好ましい。リポソームの直径は、例えば動的光散乱法により測定することができる。リポソームの直径が200nm以下であること、フィルター滅菌により簡便に滅菌することが可能である。このため、生体に投与しやすい。

[0035] (多分散指数)

本実施形態のリポソームは、多分散指数 (polydispersity index) が 0.3 以下であることが好ましい。多分散指数が小さいことはリポソームの粒径が揃っていることを意味する。リポソームの粒径が揃っていると、フィルター滅菌した場合等にロスを最小限に抑制することができる。

[0036] [抗癌剤]

1 実施形態において、本発明は、上述したリポソームを有効成分とする抗癌剤を提供する。実施例において後述するように、本実施形態の抗癌剤を生体に投与することにより、免疫系を活性化させ、癌細胞を傷害させることができる。したがって、本実施形態の抗癌剤は、免疫活性化剤、アジュバント等といいかえることもできる。

[0037] 本実施形態の抗癌剤は、従来の BCG 生菌と異なり、感染症を引き起こす心配がなく、管理、供給搬送、廃棄等も簡便である。

[0038] 本実施形態の抗癌剤が治療対象とする癌としては、薬剤を局所投与することが容易な癌が挙げられ、具体的には、膀胱癌、乳癌、メラノーマ等が挙げられる。本実施形態の抗癌剤を膀胱内に投与、あるいは局所注射等により局所投与することにより、本実施形態の抗癌剤が癌細胞に取り込まれる。その結果、本実施形態の抗癌剤を取り込んだ癌細胞が、免疫系により傷害される。これにより、癌を効果的に治療することができる。

[0039] [癌治療用キット]

1 実施形態において、本発明は、上述した抗癌剤と、免疫チェックポイント阻害剤とを備える、癌治療用キットを提供する。

[0040] 上述した抗癌剤を免疫チェックポイント阻害剤と併用して患者に投与することにより、患者の免疫系を活性化し、癌の治療効果を更に向上させることができる。免疫チェックポイント阻害剤としては、例えば、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA-4 抗体等が挙げられるがこれらに限定されない。抗 PD-1 抗体としては、例えば、ニボルマブ、ペンブロリズマブ

等が挙げられる。抗CTLA-4抗体としては、例えば、イピリマブ、トレメリマブ等が挙げられる。

[0041] [その他の実施形態]

1実施形態において、本発明は、癌の治療のためのリポソームであって、ミコール酸及びステロール化合物を含有するリポソームを提供する。ここで、リポソームはカチオン性であることが好ましい。ミコール酸、ステロール化合物としては、上述したものと同様のものを用いることができる。

[0042] 1実施形態において、本発明は、抗癌剤を製造するためのリポソームの使用であって、ミコール酸及びステロール化合物を含有するリポソームの使用を提供する。ここで、リポソームはカチオン性であることが好ましい。ミコール酸、ステロール化合物としては、上述したものと同様のものを用いることができる。

[0043] 1実施形態において、本発明は、ミコール酸及びステロール化合物を含有するリポソームの有効量を、治療を必要とする患者に投与することを含む、癌の治療方法を提供する。ここで、リポソームはカチオン性であることが好ましい。本実施形態の治療方法が治療対象とする癌は上述したものと同様である。また、ミコール酸、ステロール化合物としては、上述したものと同様のものを用いることができる。

[0044] 1実施形態において、本発明は、ミコール酸及びステロール化合物を含有するリポソームの有効量、及び、免疫チェックポイント阻害剤の有効量を、治療を必要とする患者に投与することを含む、癌の治療方法を提供する。ここで、リポソームはカチオン性であることが好ましい。本実施形態の治療方法が治療対象とする癌は上述したものと同様である。また、ミコール酸、ステロール化合物としては、上述したものと同様のものを用いることができる。また、免疫チェックポイント阻害剤としては上述したものと同様のものを用いることができる。

実施例

[0045] 以下、実験例により本発明を説明するが、本発明は以下の実験例に限定さ

れるものではない。

[0046] [実験例 1]

(BCGからのミコール酸の精製)

《BCGの培養》

マイコバクテリウム・ボビス BCG Tokyo 172株を、ソートン培地を用いて37℃で9日間表面培養した。続いて、培地を121℃で15分間オートクレーブ滅菌した後遠心分離し、BCG加熱死菌を回収した。

[0047] 《粗ミコール酸の抽出》

続いて、BCG加熱死菌20gに5N水酸化ナトリウム水溶液100mLを加え、121℃で20分間オートクレーブした。続いて、冷却後5N塩酸を加え、pHを2に調整した。続いてヘキサンを加え、ヘキサン層を回収して純水で洗浄後、乾固することにより、総脂肪酸を得た。続いて、総脂肪酸を1mLクロロホルムに溶解し、メタノール50mLを加え、粗ミコール酸の沈殿物を形成して回収した。

[0048] 《ミコール酸の精製》

続いて、粗ミコール酸100mgに、ヘキサン・メタノール（ヘキサン：メタノール=20：1，v/v）10mL、10%トリメチルシリルジアゾメタン250μLを加え、室温に30分静置し、ミコール酸をメチルエステル化した。得られたメチルエステルミコール酸を、シリカゲルコートガラス薄層クロマトグラフィー（TLC）プレート（20×20cm）、ヘキサン・酢酸エチル溶媒（ヘキサン：酢酸エチル=20：1，v/v）で4回展開し、ヨウ素で呈色させた。

[0049] 続いて、 α -ミコール酸、メトキシミコール酸、ケトミコール酸の3つのメチルエステル分画を回収した。続いて、回収した各ミコール酸メチルエステルに、トルエン3mL、5N水酸化ナトリウム水溶液5mL、エタノール2mLをそれぞれ加え、121℃で20分間オートクレーブした。続いて、冷却後5N塩酸で酸性化し、ヘキサンを加え、ヘキサン層の精製ミコール酸をそれぞれ回収した。

[0050] 図1は、4回展開したミコール酸メチルエステルの薄層クロマトグラフィーの結果を示す写真である。図1中、レーン1はヒトの結核菌であるマイコバクテリウム・ツベルクローシスから精製したミコール酸メチルエステルの結果である。また、レーン2はBCGから精製したミコール酸メチルエステルの結果である。また、レーン3はBCGから精製した α (Alpha) -ミコール酸メチルエステルの結果である。また、レーン4はBCGから精製したメトキシ (Methoxy) -ミコール酸メチルエステルの結果である。また、レーン5はBCGから精製したケト (Keto) -ミコール酸メチルエステルの結果である。

[0051] [実験例2]

(質量分析によるミコール酸のサブクラスの確認)

実験例1で精製した各サブクラスのみコール酸メチルエステルの分子量を、MALDI-TOF質量分析装置(型式「Voyager DE-STR」、アプライドバイオシステムズ社)により解析した。

[0052] 各サンプルをクロロホルム・メタノール(クロロホルム：メタノール＝2：1，v/v)に1mg/mLの濃度で溶解し、0.75mLの液滴としてサンプルプレートにアプライした。マトリックスとして、2，5-ジヒドロキシ安息香酸(2，5-DHB)を使用した。ポジティブリフレクションモードでTOFイオントラッピングを行い、加速電圧は20kVに設定した。

[0053] 図2(a)～(c)は、それぞれ、 α -ミコール酸、メトキシミコール酸、ケトミコール酸の解析結果を示すマススペクトルである。下記表1に、各サブクラスのみコール酸のMALDI-TOF質量分析の結果をまとめた。

[0054] 薄層クロマトグラフィーと質量分析の結果から、精製した各サブクラスのみコール酸が、炭素数78中心の α -ミコール酸、炭素数85中心のメトキシミコール酸、炭素数84及び86中心のケトミコール酸であることが確認された。

[0055]

[表1]

サブクラス		BCG-ミコール酸の合計炭素数															
		74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89
α	$\alpha 1$	1117		1145		1173		1201		1229							
	$\alpha 2$		1131		1159		1187		1215								
メトキシ	m1								1233		1261		1289		1317		1345
	m2									1247		1275	1287	1303		1331	
ケト	k1							1217		1245	1259	1273	1287	1301		1329	
	k2														1315		1343

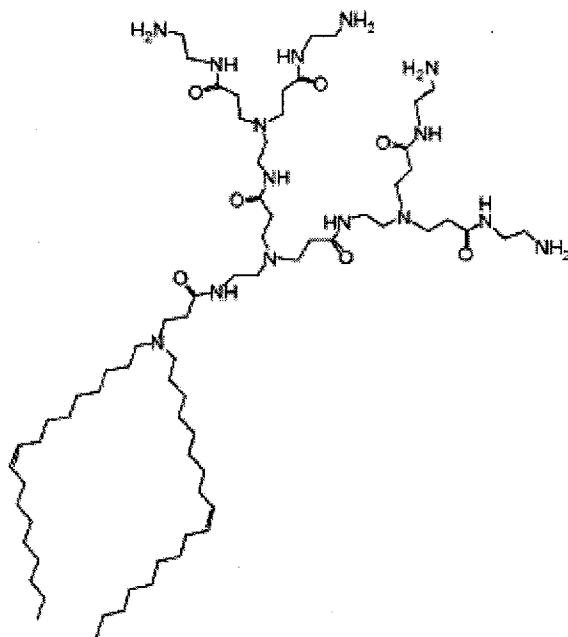
(ミコール酸含有リポソームの作製1)

実験例1で精製した、 α -ミコール酸、メトキシミコール酸、ケトミコール酸を用いて、表2に示す組成で製造例1～7のリポソームをそれぞれ作製した。表2中、DOPCはジオレオイルホスファチジルコリンを表す。また、カチオン性脂質として、下記化学式(1)で表されるデンドロン脂質(型式「D22」、ヒュギエイアバイオサイエンス社)を使用した。

[0057] [表2]

	製造例1	製造例2	製造例3	製造例4	製造例5	製造例6	製造例7
α -ミコール酸 (mg)	0.2	—	—	0.2	—	—	—
メトキシミコール酸 (mg)	—	0.2	—	—	0.2	—	—
ケトミコール酸 (mg)	—	—	0.2	—	—	0.2	—
DOPC (mg)	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
コレステロール (mg)	—	—	—	0.2	0.2	0.2	0.2
カチオン性脂質 (D22) (mg)	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.06

[0058] [化1]



(1)

[0059] 具体的には、まず、表2に示す組成で、ミコール酸、DOPC、コレステロール及びカチオン性脂質を、クロロホルム・メタノール（2：1、v／v）混合溶媒中で混合して60℃で加熱し、溶解した。続いて、減圧下で溶媒を完全に除去した。続いて、窒素気流下で乾固させ、脂質を薄層化させた。続いて、リン酸バッファー（PBS）1 mLを加えて超音波破碎装置（型式「Biorupter」、コスモバイオ社）で破碎した。続いて、得られた懸濁液を14,000 rpmで30分間遠心し、ペレットを回収した。続いて、回収したペレットを500 µLのPBSに溶解した。

[0060] 続いて、液体窒素を用いて凍結融解を10回繰り返した。続いて、得られた液体を、60℃に加熱したヒートブロック上で、エクストルーダー装置（型式「Mini Extruder」、アバンティポーラリピッド社）を用いて、21回ポリカーボネート膜（ポアサイズ200 nm）を通過させ、均一なリポソームを得た。作製したリポソームは使用するまで4℃で保存した。

[0061] [実験例4]

（ミコール酸含有リポソームの解析）

実験例3で作製した各リポソームについて、分子特性評価装置（型式「ZEN3600」、マルバーン社）を用いて、直径、多分散指数、ゼータ電位をそれぞれ測定した。

[0062] 表3に測定結果を示す。表3中、「α」はα-ミコール酸を表し、「メトキシ」はメトキシミコール酸を表し、「ケト」はケトミコール酸を表す。また、「作製後の時間」は、リポソームの作製後何日目に測定したかを表す。

[0063]

[表3]

	ミコール酸 の種類	コレステロー ルの有無	作製後の 時間(日)	直径 (nm)	多分散指数	ゼータ電位 (mV)
製造例1	α	なし	2	145.5	—	—
製造例1	α	なし	7	184.1	—	—
製造例2	メトキシ	なし	2	150.8	—	—
製造例2	メトキシ	なし	7	199.3	—	—
製造例3	ケト	なし	2	137.8	—	—
製造例3	ケト	なし	7	338.6	—	—
製造例4	α	あり	7	120.5	0.153	2.96
製造例5	メトキシ	あり	7	118.5	0.214	8.01
製造例6	ケト	あり	7	154.1	0.256	10.4
製造例7	—	あり	7	106	0.144	18.4

[0064] その結果、製造例1～3のリポソームの結果から明らかなように、ミコール酸含有リポソームがコレステロールを含まない場合、製造から2日後よりも製造から7日後の方が、直径が増大することが明らかとなった。

[0065] これに対し、製造例4～6のリポソームの結果から明らかなように、ミコール酸含有リポソームがコレステロールを含む場合、直径が安定しており、製造から7日後の測定においても直径200nm以下を維持できることが明らかとなった。

[0066] また、製造例4～6のリポソームの結果から明らかなように、ミコール酸、コレステロール及びカチオン性脂質を含有するリポソームは、直径200nm以下で、ゼータ電位がプラスであり、多分散指数が0.3以下となることが明らかとなった。多分散指数が小さいことは、リポソームの粒径が揃っていることを意味する。

[0067] また、発明者らは、ミコール酸、コレステロール及びカチオン性脂質の組成を変えることにより、ミコール酸含有リポソームのゼータ電位、直径を調整し、目的に応じたりポソームを作製できることも明らかにした。

[0068] [実験例5]

(ミコール酸含有リポソームの細胞への取り込みの検討1)

コレステロールとして、蛍光色素であるNBDで標識されたコレステロール(アバンティポーラリピッド社)を使用した以外は実験例3と同様にして、下記表4の組成で製造例8～11のリポソームを作製した。以下、製造例

8のリポソームを「 α -ミコール酸含有リポソーム」といい、製造例9のリポソームを「メトキシミコール酸含有リポソーム」といい、製造例10のリポソームを「ケトミコール酸含有リポソーム」といい、製造例11のリポソームを「対照リポソーム」という場合がある。

[0069] [表4]

	製造例8 (α -ミコール酸 含有リポソーム)	製造例9 (メトキシミコール酸 含有リポソーム)	製造例10 (ケトミコール酸 含有リポソーム)	製造例11 (対照リポソーム)
α -ミコール酸 (mg)	0.2	—	—	—
メトキシミコール酸 (mg)	—	0.2	—	—
ケトミコール酸 (mg)	—	—	0.2	—
DOPC (mg)	1.8	1.8	1.8	1.8
コレステロール (NBD標識) (mg)	0.2	0.2	0.2	0.2
カチオン性脂質 (D22) (mg)	0.066	0.066	0.066	0.06

[0070] 続いて、各リポソームを、ヒト膀胱癌細胞株T24の培地に $50\mu\text{g}/\text{mL}$ の終濃度で添加して 37°C で2時間静置し、共焦点顕微鏡で観察することにより、リポソームが細胞に取り込まれたか否かを検討した。NBDの蛍光はリポソームの局在を示す。また、細胞の核を4', 6-ジアミジノー2-フェニルインドール(DAPI)で蛍光染色した。

[0071] 図3(a)～(d)は、各リポソームを接触させたT24細胞の蛍光顕微鏡写真である。図3(a)は対照リポソームの結果を示し、図3(b)は α -ミコール酸含有リポソームの結果を示し、図3(c)はメトキシミコール酸含有リポソームの結果を示し、図3(d)はケトミコール酸含有リポソームの結果を示す。その結果、いずれのリポソームもT24細胞の細胞質に取り込まれたことが明らかとなった。

[0072] また、図4は、対照リポソームを接触させたT24細胞(リポソームあり)をフローサイトメトリーで解析した結果を示すグラフである。比較のために、リポソームを接触させなかったT24細胞(リポソームなし)を同様に

解析した。その結果、対照リポソームの蛍光を示す細胞のピークが観察され、対照リポソームがT24細胞に取り込まれたことが確認された。

[0073] [実験例6]

(ミコール酸含有リポソームの細胞傷害活性の検討)

実験例5と同様にして作製した、 α -ミコール酸含有リポソーム、メトキシミコール酸含有リポソーム、ケトミコール酸含有リポソーム及び対照リポソームを、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ の終濃度でヒト膀胱癌細胞株T24、マウス膀胱癌細胞株MBT-2及びマウス膀胱癌細胞株MB49の培地にそれぞれ添加し、細胞傷害活性を検討した。

[0074] 具体的には、血清不含培地に、PBS、対照リポソーム又は各ミコール酸含有リポソームをそれぞれ添加し、24時間後及び48時間後に生細胞数をそれぞれ測定した。生細胞数の測定は、水溶性テトラゾリウム塩であるWST-8を使用したキット（同仁化学）を使用して行った。

[0075] 図5(a)～(c)は生細胞数の測定結果を示すグラフである。図5(a)はT24細胞の結果を示し、図5(b)はMBT-2細胞の結果を示し、図5(c)はMB49細胞の結果を示す。図5(a)～(c)中、「PBS」はPBSを添加した結果を示し、「対照」は対照リポソームを添加した結果を示し、「 α 」は α -ミコール酸含有リポソームを添加した結果を示し、「メトキシ」はメトキシミコール酸含有リポソームを添加した結果を示し、「ケト」はケトミコール酸含有リポソームを添加した結果を示す。

[0076] その結果、いずれのリポソームもインビトロでは細胞傷害活性をほとんど有しないことが明らかとなった。

[0077] [実験例7]

(マウス皮下腫瘍モデルによるミコール酸含有リポソームの抗腫瘍効果の検討1)

マウス皮下腫瘍モデルを用いてミコール酸含有リポソームの抗腫瘍効果を検討した。図6は、実験スケジュールを説明する図である。まず、実験初日(0日目)に、実験例5と同様にして作製した、 α -ミコール酸含有リポソ

ーム、メトキシミコール酸含有リポソーム若しくはケトミコール酸含有リポソーム 0.44 mg、対照リポソーム 0.5 mg、又は PBS 0.1 mL を、それぞれ 500,000 個のマウス膀胱癌細胞株 MB49 と混合し、C57BL/6J マウスの背側の皮下に投与した ($n=5$ 又は 6)。続いて、腫瘍体積を経時的に測定した。また、実験開始後 3 日目、5 日目及び 7 日目に、各試薬のみ（実験例 5 と同様に作製した、 α -ミコール酸含有リポソーム、メトキシミコール酸含有リポソーム、ケトミコール酸含有リポソーム、対照リポソーム又は PBS）をそれぞれ追加で同じ部位に皮下投与した。

[0078] 図 7 は、腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。図 7 中、「PBS」は PBS 投与群の結果を示し、「対照」は対照リポソーム投与群の結果を示し、「 α 」は α -ミコール酸含有リポソーム投与群の結果を示し、「メトキシ」はメトキシミコール酸含有リポソーム投与群の結果を示し、「ケト」はケトミコール酸含有リポソーム投与群の結果を示す。

[0079] その結果、実験開始後 14 日目において、PBS 投与群とケトミコール酸含有リポソーム投与群との間で腫瘍体積に有意差が認められた ($p=0.0067$)。また、PBS 投与群とメトキシミコール酸含有リポソーム投与群との間でも腫瘍体積に有意差が認められた ($p=0.012$)。また、対照リポソーム投与群とケトミコール酸含有リポソーム投与群との間でも腫瘍体積に有意差が認められた ($p=0.0044$)。

[0080] また、実験開始後 21 日目において、PBS 投与群とケトミコール酸含有リポソーム投与群との間で腫瘍体積に有意差が認められた ($p=0.014$)。また、PBS 投与群とメトキシミコール酸含有リポソーム投与群との間でも腫瘍体積に有意差が認められた ($p=0.037$)。

[0081] また、実験開始後 28 日目において、PBS 投与群とケトミコール酸含有リポソーム投与群との間で腫瘍体積に有意差が認められた ($p=0.014$)。

[0082] この結果から、実験例 6 に示すように、ミコール酸含有リポソームは直接細胞傷害活性を有しないが、免疫系が関与する条件下では細胞傷害活性（抗

腫瘍活性)を示すことが明らかとなった。また、ケトミコール酸が最も高い細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。

[0083] [実験例 8]

(マウス皮下腫瘍モデルによるミコール酸含有リポソームの抗腫瘍効果の検討 2)

C57BL/6Jマウスの代わりにBeigeマウスを用いた以外は実験例 7 と同様に、マウス皮下腫瘍モデルを用いてミコール酸含有リポソームの抗腫瘍効果(抗腫瘍活性)を検討した。BeigeマウスはChedid ak-Higashi症候群のモデル動物として知られており、NK細胞が欠損している。

[0084] 図 8 は、腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。図 8 中、「PBS」はPBS投与群の結果を示し、「対照」は対照リポソーム投与群の結果を示し、「 α 」は α -ミコール酸含有リポソーム投与群の結果を示し、「メトキシ」はメトキシミコール酸含有リポソーム投与群の結果を示し、「ケト」はケトミコール酸含有リポソーム投与群の結果を示す。

[0085] その結果、実験開始後 24 日目において、PBS投与群とメトキシミコール酸含有リポソーム投与群との間で腫瘍体積に有意差が認められた($p=0.018$)。また、PBS投与群と α -ミコール酸含有リポソーム投与群との間でも腫瘍体積に有意差が認められた($p=0.045$)。また、PBS投与群とケトミコール酸含有リポソーム投与群との間でも腫瘍体積に有意差が認められた($p=0.045$)。

[0086] この結果から、ミコール酸含有リポソームの抗腫瘍効果発現へのNK細胞の関与は少ないものと考えられた。

[0087] [実験例 9]

(ミコール酸含有リポソームの作製 2)

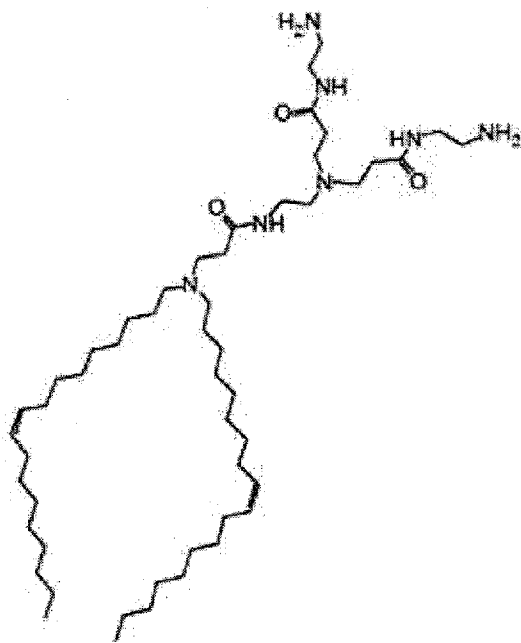
カチオン性脂質として、下記化学式(2)で表されるデンドロン脂質(型式「D12」、ヒュギエイアバイオサイエンス社)を用いた以外は実験例 3 と同様に、表 5 に示す組成で製造例 12 のリポソーム(以下、「D12

リポソーム」という場合がある。)を作製した。表5中、DOPCはジオレオイルホスファチジルコリンを表す。

[0088] [表5]

	製造例12 (D12リポソーム)
ケトミコール酸 (mg)	0.2
DOPC (mg)	1.8
コレステロール (mg)	0.2
カチオン性脂質(D12) (mg)	0.066

[0089] [化2]



(2)

[0090] 続いて、分子特性評価装置(型式「ZEN3600」、マルバーン社)を用いて、D12リポソームの直径、多分散指数、ゼータ電位をそれぞれ測定した。表6に測定結果を示す。測定は、リポソームの作製後11日目に行った。その結果、D12リポソームの直径、多分散指数、ゼータ電位は、それぞれ、カチオン性脂質として、上記化学式(1)で表されるデンドロン脂質(型式「D22」、ヒュギエイアバイオサイエンス社)を用いた製造例6の

リポソーム（以下、「D 2 2 リポソーム」という場合がある。）の各値と同程度であることが明らかとなった。

[0091] [表6]

	直径 (nm)	多分散指数	ゼータ電位 (mV)
製造例12 (D12リポソーム)	112.2	0.21	15.8

[0092] [実験例10]

（ミコール酸含有リポソームの細胞への取り込みの検討2）

コレステロールとして、蛍光色素であるNBDで標識されたコレステロール（アバンティポーラリピッド社）を使用した以外は実験例9と同様にして、下記表7の組成で製造例13のリポソームを作製した。表7中、DOPCはジオレオイルホスファチジルコリンを表す。

[0093] また、比較のために、実験例5の製造例10と同様にして調製したリポソーム（以下、「D 2 2 リポソーム」という場合がある。）を使用した。表7には、製造例10のリポソームの組成も示す。

[0094] [表7]

	製造例13 (D12リポソーム)	製造例10 (D22リポソーム)
ケトミコール酸 (mg)	0.2	0.2
DOPC (mg)	1.8	1.8
コレステロール(NBD標識) (mg)	0.2	0.2
カチオン性脂質(D12) (mg)	0.066	—
カチオン性脂質(D22) (mg)	—	0.066

[0095] 続いて、各リポソームを、マウス膀胱癌細胞株MB49の培地に50 μ g / mLの終濃度で添加して37℃で2時間静置し、フローサイトメトリーで解析した。図9は、フローサイトメトリーの結果を示すグラフである。比較のために、リポソームを接触させなかったMB49細胞を同様に解析した。図9中、「なし」はリポソームを接触させなかったMB49細胞の結果であ

り、「D 1 2」はD 1 2リポソームの結果であり、「D 2 2」はD 2 2リポソームの結果である。その結果、D 2 2、D 1 2リポソーム共、蛍光色素の発色の程度は等しく、D 1 2リポソームは、D 2 2リポソームと同程度にM B 4 9細胞に取り込まれたことが確認された。

[0096] [実験例 1 1]

(マウス皮下腫瘍モデルによるミコール酸含有リポソームの抗腫瘍効果の検討 3)

ミコール酸含有リポソームに含有させるカチオン性脂質として、上記化学式 (1) で表されるデンドロン脂質 (型式「D 2 2」、ヒュギエイアバイオサイエンス社) を用いた場合、及び上記化学式 (2) で表されるデンドロン脂質 (型式「D 1 2」、ヒュギエイアバイオサイエンス社) を用いた場合の抗腫瘍効果を検討した。

[0097] 具体的には、実験例 9 と同様にして調製した製造例 1 2 のリポソーム (以下、「D 1 2 リポソーム」という場合がある。)、実験例 3 の製造例 6 と同様にして調製したリポソーム (以下、「D 2 2 リポソーム」という場合がある。)、実験例 3 の製造例 7 と同様にして調製したリポソーム (以下、「対照リポソーム」という場合がある。)、及びリン酸バッファー (P B S) を、実験例 7 と同様のマウス皮下腫瘍モデルに投与し、抗腫瘍効果を検討した。下記表 8 に、各リポソームの組成を示す。表 8 中、D O P C はジオレオイルホスファチジルコリンを表す。

[0098] [表 8]

	製造例 12 (D 1 2 リポソーム)	製造例 6 (D 2 2 リポソーム)	製造例 7 (対照リポソーム)
ケトミコール酸 (mg)	0. 2	0. 2	—
D O P C (mg)	1. 8	1. 8	1. 8
コレステロール (mg)	0. 2	0. 2	0. 2
カチオン性脂質 (D 1 2) (mg)	0. 066	—	—
カチオン性脂質 (D 2 2) (mg)	—	0. 066	0. 06

[0099] 図6は、実験スケジュールを説明する図である。まず、実験初日（0日目）に、D12リポソーム0.44mg、D22リポソーム0.44mg、対照リポソーム0.5mg、又はPBS0.1mLを、それぞれ500,000個のマウス膀胱癌細胞株MB49と混合し、C57BL/6Jマウスの背側の皮下に投与した（n=5又は6）。続いて、腫瘍体積を経時的に測定した。また、実験開始後3日目、5日目及び7日目に、各試薬のみ（D12リポソーム、D22リポソーム、対照リポソーム又はPBS）をそれぞれ追加で同じ部位に皮下投与した。

[0100] 図10は、腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。図10中、「PBS」はPBS投与群の結果を示し、「対照」は対照リポソーム投与群の結果を示し、「D22」はD22リポソーム投与群の結果を示し、「D12」はD12リポソーム投与群の結果を示す。

[0101] その結果、カチオン性脂質としてデンドロン脂質（型式「D22」、ヒュギエイアバイオサイエンス社）を用いたD22リポソームのほうが、カチオン性脂質としてデンドロン脂質（型式「D12」、ヒュギエイアバイオサイエンス社）を用いたD12リポソームよりも抗腫瘍効果が高いことが明らかとなった。

[0102] [実験例12]

（腫瘍組織の組織学的検討）

実験例11のマウス皮下腫瘍モデルにおいて、実験開始後10日目のD22リポソーム投与群のマウス及び対照リポソーム投与群のマウスを用いて、腫瘍組織へのTリンパ球の浸潤を検討した。

[0103] まず、各マウスから摘出した腫瘍組織を固定してパラフィン包埋し、厚さ4μmの切片を作製した。続いて、抗CD4抗体及び抗CD8抗体を用いた免疫染色を行い、腫瘍組織へのTリンパ球の浸潤を検討した（n=3）。

[0104] 続いて、免疫染色した組織を顕微鏡観察し、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞の浸潤が多い領域を撮影した。続いて、撮影した顕微鏡写真に基づいて、腫瘍組織に浸潤したCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞をカウ

ントした。T細胞のカウントは一人の観察者が同一の領域について3回ずつ行い、その平均値を統計学的に解析した。

[0105] 図11(a)は、対照リポソーム投与群のマウスの腫瘍組織を抗CD4抗体で免疫染色した結果を示す代表的な写真である。また、図11(b)は、D22リポソーム投与群のマウスの腫瘍組織を抗CD4抗体で免疫染色した結果を示す代表的な写真である。また、図11(c)は、各群のマウスの腫瘍組織におけるCD4陽性T細胞をカウントした結果を示すグラフである。図11(c)中、「対照」は対照リポソーム投与群の結果を示し、「D22」はD22リポソーム投与群の結果を示す。

[0106] また、図12(a)は、対照リポソーム投与群のマウスの腫瘍組織を抗CD8抗体で免疫染色した結果を示す代表的な写真である。また、図12(b)は、D22リポソーム投与群のマウスの腫瘍組織を抗CD8抗体で免疫染色した結果を示す代表的な写真である。また、図12(c)は、各群のマウスの腫瘍組織におけるCD8陽性T細胞をカウントした結果を示すグラフである。図12(c)中、「対照」は対照リポソーム投与群の結果を示し、「D22」はD22リポソーム投与群の結果を示す。

[0107] 独立t検定により解析した結果、図11(c)に示すように、対照リポソーム投与群及びD22リポソーム投与群において、腫瘍組織に浸潤したCD4陽性T細胞数には有意差が認められなかった。これに対し、図12(c)に示すように、対照リポソーム投与群及びD22リポソーム投与群において、腫瘍組織に浸潤したCD8陽性T細胞数には有意差が認められた。

[0108] この結果から、D22リポソーム投与群のマウスでは、対照リポソーム投与群のマウスと比較して、腫瘍組織に浸潤するCD8陽性T細胞が有意に多いことが明らかとなった。また、この結果は、D22リポソームの投与により、CD8陽性T細胞が腫瘍組織に浸潤し、CD8陽性Tリンパ球依存的に抗腫瘍効果が発揮されることを示す。

[0109] [実験例13]

(マウス皮下腫瘍モデルによるミコール酸含有リポソームの抗腫瘍効果の検

討4)

実験例7、8、11のマウス皮下腫瘍抑制効果モデルでは、腫瘍細胞の接種と同時にミコール酸含有リポソームの投与を開始していた。そこで、腫瘍が形成された後にミコール酸含有リポソームの投与を開始した場合に腫瘍抑制効果が認められるか否かについて検討した。

[0110] 図13は、実験スケジュールを説明する図である。まず、実験初日(0日目)に、500,000個のマウス膀胱癌細胞株MB49を、C57BL/6Jマウスの背側の皮下に投与した($n=5$ 又は6)。続いて、実験開始後7日目以降、1~2日おきに合計9回、ミコール酸含有リポソームを同じ部位に皮下投与し、腫瘍体積を継続的に測定した。

[0111] ミコール酸含有リポソームとして、1匹1回の投与あたり、実験例5と同様にして作製したケトミコール酸含有リポソームを0.44mg投与した群を用意した。1匹1回の投与あたりのミコール酸の投与量は40 μ gであった。また、比較のために、1匹1回の投与あたり、実験例5と同様にして作製した対照リポソームを0.5mg又はPBSを0.1mL投与した群も用意した。

[0112] 図14は、腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。図14中、「PBS」はPBS投与群の結果を示し、「対照」は対照リポソーム投与群の結果を示し、「ケト」はケトミコール酸含有リポソーム投与群の結果を示す。

[0113] その結果、実験開始後17日目において、PBS投与群とケトミコール酸含有リポソーム投与群との間で腫瘍体積に有意差が認められた($p=0.048$)。また、対照リポソーム投与群とケトミコール酸含有リポソーム投与群との間でも腫瘍体積に有意差が認められた($p=0.015$)。

[0114] この結果、腫瘍が形成された後にミコール酸含有リポソームの投与を実施した場合においても抗腫瘍効果が認められることが明らかとなった。

[0115] [実験例14]

(ミコール酸含有リポソームの作製3)

ミコール酸として、トレハロースジミコール酸（TDM、ミコール酸のトレハロースジエステル）を用いたミコール酸含有リポソーム（以下、「TDMリポソーム」という場合がある。）を作製した。

[0116] まず、BCG（マイコバクテリウム・ボビス BCG Tokyo 172株）、マイコバクテリウム・フレイ（*Mycobacterium phlei*）、及びロドコッカス・テラエ（*Rhodococcus terrae*）の各菌を培養し、各菌体からそれぞれトレハロースジミコール酸を精製した。以下、各菌由来のトレハロースジミコール酸を、それぞれ、「BCG-TDM」、「M. phlei-TDM」、「R. terrae-TDM」という場合がある。

[0117] 続いて、実験例3と同様にして、表9に示す組成で、製造例14のリポソーム（以下、「BCG-TDMリポソーム」という場合がある。）、製造例15のリポソーム（以下、「M. phlei-TDMリポソーム」という場合がある。）及び製造例16のリポソーム（以下、「R. terrae-TDMリポソーム」という場合がある。）を作製した。表9中、DOPCはジオレオイルホスファチジルコリンを表す。カチオン性脂質としては、上記化学式（1）で表されるデンドロン脂質（型式「D22」、ヒュギエイアバイオサイエンス社製）を用いた。

[0118] [表9]

	製造例14 (BCG-TDM リポソーム)	製造例15 (M. phlei-TDM リポソーム)	製造例16 (R. terrae-TDM リポソーム)
BCG-TDM (mg)	0.2	—	—
M. phlei-TDM (mg)	—	0.2	—
R. terrae-TDM (mg)	—	—	0.2
DOPC (mg)	1.8	1.8	1.8
コレステロール (mg)	0.2	0.2	0.2
カチオン性脂質(D22) (mg)	0.066	0.066	0.066

[0119] 続いて、分子特性評価装置（型式「ZEN3600」、マルバーン社）を用いて、各TDMリポソームの直径、多分散指数、ゼータ電位をそれぞれ測定した。その結果、TDMリポソームの直径、多分散指数、ゼータ電位は、それぞれ、実験例3で作製した製造例6のリポソームの各値と同程度であることが明らかとなった。

[0120] [実験例15]

（マウス皮下腫瘍モデルによるミコール酸含有リポソームの抗腫瘍効果の検討5）

実験例13と同様のマウス皮下腫瘍モデルを用いて、実験例14で作製した各TDMリポソームの抗腫瘍効果を検討した。

[0121] TDMリポソームとしては、実験例14で作製した、BCG-TDMリポソーム、M. phlei-TDMリポソーム、R. terraе-TDMリポソームを、1匹1回の投与あたり0.44mg使用した。また、比較のために、1匹1回の投与あたり、実験例5と同様にして作製した対照リポソームを0.5mg又はPBSを0.1mL投与した群も用意した。

[0122] 図15は、腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。図15中、「PBS」はPBS投与群の結果を示し、「対照」は対照リポソーム投与群の結果を示し、「BCG」はBCG-TDMリポソーム投与群の結果を示し、「phlei」はM. phlei-TDMリポソーム投与群の結果を示し、「terra」はR. terraе-TDMリポソーム投与群の結果を示す。

[0123] その結果、実験開始後14日目において、PBS投与群とBCG-TDMリポソーム投与群との間で腫瘍体積に有意差が認められた（ $p=0.04$ ）。一方、PBS投与群とR. terraе-TDMリポソーム投与群との間、PBS投与群とM. phlei-TDMリポソーム投与群との間には腫瘍抑制傾向は認められるものの有意差が認められなかった。

[0124] また、実験開始後18日目において、PBS投与群とBCG-TDMリポソーム投与群との間で腫瘍体積に有意差が認められた（ $p=0.02$ ）。ま

た、対照リポソーム投与群とBCG-TDMリポソーム投与群との間においても腫瘍体積に有意差が認められた ($p = 0.02$)。

[0125] 以上の結果、TDMリポソームも抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。また、ミコール酸として、BCG由来のトレハロースジミコール酸 (TDM) を用いたリポソーム、マイコバクテリウム・フレイ (*Mycobacterium phlei*) 由来のTDMを用いたリポソーム、ロドコッカス・テラエ (*Rhodococcus terraе*) 由来のTDMを用いたリポソームの中では、BCG由来のTDMを用いたリポソームが最も抗腫瘍効果が高いことが明らかとなった。

[0126] [実験例16]

(TDMリポソームによるMincle依存的なサイトカイン産生の検討)
Macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) は、C型レクチン受容体の1種である。Mincleのリガンドとしては、損傷自己、真菌、結核菌由来のトレハロースジミコール酸 (TDM) 等が知られている。

[0127] TDMが結合したMincleは、FcR γ 鎖と会合し、Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を介して活性化シグナル伝達を行い、炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られている。

[0128] 本実験例では、野生型マウス又はMincle^{-/-}マウスから骨髓由来樹状細胞 (BDMC) 及び骨髓由来マクロファージ (BMM) を調製し、それぞれTDMリポソームで活性化して炎症性サイトカインの産生が誘導されるか否かを検討した。炎症性サイトカインとしては、Tumor Necrosis Factor (TNF) の産生を検討した。

[0129] 《骨髓由来樹状細胞 (BDMC) の検討1》

野生型マウス又はMincle^{-/-}マウスから調製した骨髓由来樹状細胞 (BDMC) を、それぞれ、96ウェルプレートに、 1×10^5 個/ウェルの細胞密度で播種した。続いて、各細胞の培地に、実験例14で作製したBCG

ーTDMリポソーム又はM. phle iーTDMリポソームをそれぞれ100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の終濃度となるように添加し、48時間培養した。また、比較のために、実験例5と同様にして作製した対照リポソームを100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の終濃度となるように添加した群、及び何も添加しなかった群も用意した。続いて、ELISA法により培地中に放出されたTNFの濃度を測定した。

[0130] 図16(a)は培地中に放出されたTNFの濃度を測定した結果を示すグラフである。図16(a)中、「BCG」はBCGーTDMリポソーム添加群の結果を示し、「M. phle i」はM. phle iーTDMリポソーム添加群の結果を示し、「対照」は対照リポソーム添加群の結果を示し、「なし」は何も添加しなかった群の結果を示し、「WT」は野生型マウスの骨髓由来樹状細胞の結果を示し、「Mincle^{-/-}」はMincle^{-/-}マウスの骨髓由来樹状細胞の結果を示す。

[0131] その結果、野生型マウス由来の骨髓由来樹状細胞においては、BCGーTDMリポソーム又はM. phle iーTDMリポソームの培地中への添加により、TNFの産生が誘導されたことが明らかとなった。

[0132] 一方、Mincle^{-/-}マウス由来の骨髓由来樹状細胞においては、BCGーTDMリポソーム又はM. phle iーTDMリポソームを培地中に添加しても、TNFの産生誘導が認められなかった。

[0133] この結果は、TDMリポソームの添加によるサイトカイン産生誘導がMincle依存的事であることを示す。

[0134] 《骨髓由来樹状細胞(BDMC)の検討2》

実験例14で作製したBCGーTDMリポソーム及びM. phle iーTDMリポソームを、96ウェルプレートに、それぞれ0.3 $\mu\text{g}/\text{ウェル}$ となるように添加してウェル表面をコートした。また、比較のために、実験例5と同様にして作製した対照リポソームを0.3 $\mu\text{g}/\text{ウェル}$ となるようにコートした群、何もコートしなかった群、市販のTDM(ナカライテスク社)を1 $\mu\text{g}/\text{ウェル}$ でコートした群、リポポリサッカライド(LPS)を1

0 ng/mLの終濃度で培地に添加した群も用意した。

[0135] 続いて、各ウェルに、野生型マウス又はMincle^{-/-}マウスから調製した骨髓由来樹状細胞（BDMC）を、それぞれ 1×10^5 個/ウェルの細胞密度で播種し、48時間培養した。続いて、ELISA法により培地中に放出されたTNFの濃度を測定した。

[0136] 図16（b）～（d）は培地中に放出されたTNFの濃度を測定した結果を示すグラフである。図16（b）中、「BCG」はBCG-TDMリポソームコート群の結果を示し、「M. phlei」はM. phlei-TDMリポソームコート群の結果を示し、「対照」は対照リポソームコート群の結果を示し、「なし」は何もコートしなかった群の結果を示す。また、図16（c）は、市販のTDMをコートした群の結果を示す。また、図16（d）は、LPSを添加した群の結果を示す。また、図16（b）～（d）中、「WT」は野生型マウスの骨髓由来樹状細胞の結果を示し、「Mincle^{-/-}」はMincle^{-/-}マウスの骨髓由来樹状細胞の結果を示す。

[0137] その結果、野生型マウス由来の骨髓由来樹状細胞においては、BCG-TDMリポソーム又はM. phlei-TDMリポソームでウェルをコートすることにより、TNFの産生が誘導されたことが明らかとなった。一方、Mincle^{-/-}マウス由来の骨髓由来樹状細胞においては、BCG-TDMリポソーム又はM. phlei-TDMリポソームでウェルをコートしても、TNFの産生誘導が認められなかった。

[0138] この結果は、TDMリポソームによる骨髓由来樹状細胞のサイトカイン産生誘導がMincle依存的事であることを更に支持するものである。

[0139] 《骨髓由来マクロファージ（BMM）の検討》

野生型マウス又はMincle^{-/-}マウスから調製した骨髓由来マクロファージ（BMM）を、それぞれ、96ウェルプレートに、 1×10^5 個/ウェルの細胞密度で播種した。続いて、各細胞の培地に、実験例14で作製したBCG-TDMリポソーム又はM. phlei-TDMリポソームをそれぞれ $100 \mu\text{g/mL}$ の終濃度となるように添加し、48時間培養した。また、

比較のために、実験例5と同様にして作製した対照リポソームを $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の終濃度となるように添加した群、何も添加しなかった群、市販のTDM（ナカライテスク社）を $1\mu\text{g}/\text{ウェル}$ でコートした群、リポポリサッカライド（LPS）を $10\text{ng}/\text{mL}$ の終濃度で培地に添加した群も用意した。続いて、ELISA法により培地中に放出されたTNFの濃度を測定した。

[0140] 図17（a）～（c）は培地中に放出されたTNFの濃度を測定した結果を示すグラフである。図17（a）中、「BCG」はBCG-TDMリポソーム添加群の結果を示し、「M. phlei」はM. phlei-TDMリポソーム添加群の結果を示し、「対照」は対照リポソーム添加群の結果を示し、「なし」は何も添加しなかった群の結果を示す。また、図17（b）は、市販のTDMをコートした群の結果を示す。また、図17（c）は、LPSを添加した群の結果を示す。また、図17（a）～（c）中、「WT」は野生型マウスの骨髄由来マクロファージの結果を示し、「Mincle^{-/-}」はMincle^{-/-}マウスの骨髄由来マクロファージの結果を示す。

[0141] その結果、野生型マウス由来の骨髄由来マクロファージにおいては、BCG-TDMリポソーム又はM. phlei-TDMリポソームの培地中への添加により、TNFの産生が誘導されたことが明らかとなった。一方、Mincle^{-/-}マウス由来の骨髄由来マクロファージにおいては、BCG-TDMリポソーム又はM. phlei-TDMリポソームを培地中に添加しても、TNFの産生誘導が認められなかった。

[0142] この結果は、TDMリポソームの添加による骨髄由来マクロファージのサイトカイン産生誘導がMincle依存的事であることを示す。

[0143] [実験例17]

（TDMリポソームの大量調製）

表10に示す組成で製造例17のTDMリポソームを工業的に大量調製した。TDMとしては、実験例14で精製したBCG-TDMを使用した。具体的には、BCG-TDM 15.0mg、コレステロール15.0mg、

カチオン性脂質（型式「D22」、ヒュギエイアバイオサイエンス社）5.0 mgを秤量し、ガラスバイアルへ投入した。

[0144] 続いて、DOPC-クロロホルム溶液（25 mg/mL）5.4 mLを添加し、常温で十分に攪拌して脂質成分を溶解させた。続いて、減圧乾燥により、クロロホルムを除去した。続いて、tert-ブチルアルコールを3.0 mL添加し、常温で攪拌して脂質成分を溶解させた。続いて、PBS 14 mLを添加し、58℃のウォーターバスで加温・攪拌した。続いて、脂質成分の溶解を確認した後、室温まで冷却した。続いて、0.2 μ mと0.1 μ mのシリンジフィルターを通過させ、透析液をPBSとして透析を行い、tert-ブチルアルコールを除去し、製造例17のTDMリポソームを得た。

[0145] [表10]

	製造例17
BCG-TDM (mg)	15.0
DOPC (mg)	135.0
コレステロール (mg)	15.0
カチオン性脂質(D22) (mg)	5.0

[0146] 続いて、分子特性評価装置（型式「ZETA SIZER Nano-ZS」、マルバーン社）を用いて、製造例17のTDMリポソームの直径、多分散指数、ゼータ電位をそれぞれ測定した。表11に測定結果を示す。その結果、製造例17のTDMリポソームの直径、多分散指数、ゼータ電位は、それぞれ、実験例3で作製した製造例6のリポソームの各値と同程度であることが明らかとなった。

[0147] [表11]

	直径 (nm)	多分散指数	ゼータ電位 (mV)
製造例17	199.3	0.102	28.6

[0148] [実験例18]

(マウス皮下腫瘍モデルによるミコール酸含有リポソームの抗腫瘍効果の検討6)

実験例7と同様のマウス皮下腫瘍モデルを用いて、実験例17で作製した製造例17のTDMリポソームの抗腫瘍効果を検討した。

[0149] 製造例17のTDMリポソームは、1匹1回の投与あたり0.44mg使用した。また、比較のために、1匹1回の投与あたり、実験例14の製造例14と同様にして作製したBCG-TDMリポソーム（以下、「TDM-D22」という場合がある。）を0.44mg、下記表12に示す組成で、実験例14と同様にして作製した製造例18のBCG-TDMリポソーム（以下、「TDM-D12」という場合がある。）を0.44mg、実験例5と同様にして作製した対照リポソームを0.5mg又はPBSを0.1mL投与した群も用意した。下記表12に、各リポソームの組成を示す。下記表12中、「D22」はデンドロン脂質（型式「D22」、ヒュギエイアバイオサイエンス社製）を表し、「D12」はデンドロン脂質（型式「D12」、ヒュギエイアバイオサイエンス社製）を表す。

[0150] [表12]

	製造例14 (TDM-D22)	製造例18 (TDM-D12)	製造例11 (対照リポソーム)
BCG-TDM (mg)	0.2	0.2	—
DOPC (mg)	1.8	1.8	1.8
コレステロール (mg)	0.2	0.2	0.2
カチオン性脂質(D22) (mg)	0.066	—	0.066
カチオン性脂質(D12) (mg)	—	0.066	—

[0151] 図18は、腫瘍体積を経時的に測定した結果を示すグラフである。図18中、「PBS」はPBS投与群の結果を示し、「対照」は対照リポソーム投与群の結果を示し、「TDM-D22」は上述したTDM-D22投与群の結果を示し、「TDM-D12」は上述したTDM-D12投与群の結果を示し、「製造例17」は製造例17のTDMリポソーム投与群の結果を示す

。

[0152] その結果、実験開始後25日目において、PBS投与群とTDM-D22投与群との間で腫瘍体積に有意差が認められた ($p = 0.02$)。また、PBS投与群、対照リポソーム投与群と比較して、製造例17のTDMリポソーム投与群において、腫瘍体積の減少傾向が認められた。

[0153] 以上の結果、製造例17のTDMリポソームが抗腫瘍効果を示すことが確認された。また、TDMリポソームにおいても、カチオン性脂質としてデンドロン脂質（型式「D22」、ヒュギエイアバイオサイエンス社）を用いたほうが、カチオン性脂質としてデンドロン脂質（型式「D12」、ヒュギエイアバイオサイエンス社）を用いた場合よりも抗腫瘍効果が高いことが明らかとなった。

産業上の利用可能性

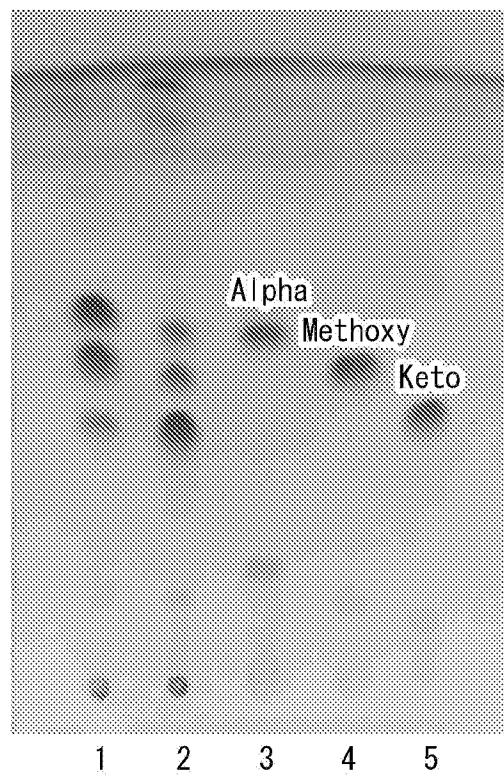
[0154] 本発明によれば、ミコール酸を臨床応用する技術を提供することができる

。

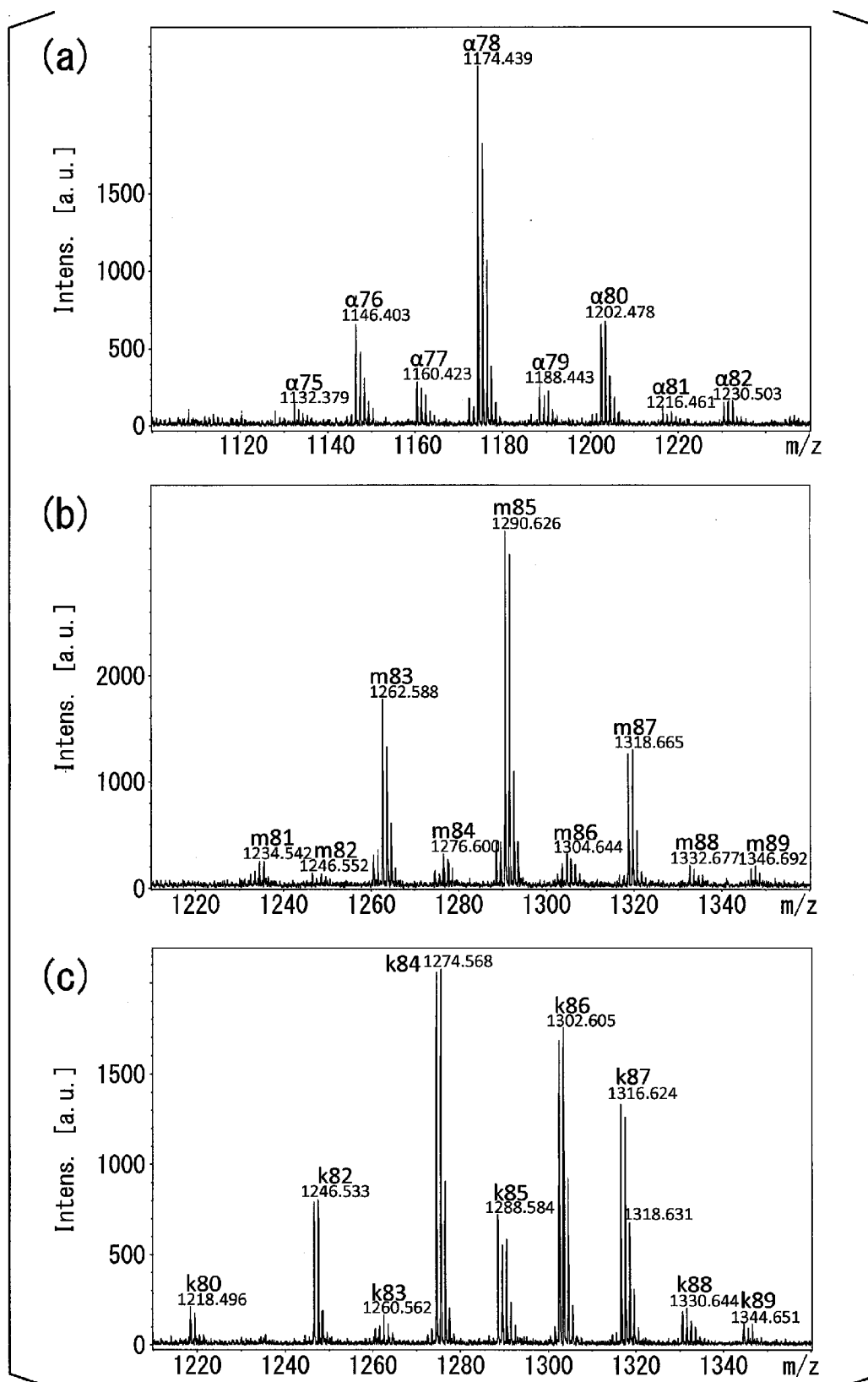
請求の範囲

- [請求項1] ミコール酸及びステロール化合物を含有するリポソーム。
- [請求項2] カチオン性脂質を更に含有する、請求項1に記載のリポソーム。
- [請求項3] 前記ミコール酸がケトミコール酸を含む、請求項1又は2に記載のリポソーム。
- [請求項4] ゼータ電位がプラスである、請求項1～3のいずれか一項に記載のリポソーム。
- [請求項5] 直径が200nm以下である、請求項1～4のいずれか一項に記載のリポソーム。
- [請求項6] 多分散指数が0.3以下である、請求項1～5のいずれか一項に記載のリポソーム。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載のリポソームを有効成分とする抗癌剤。
- [請求項8] 請求項7に記載の抗癌剤と免疫チェックポイント阻害剤とを備える、癌治療用キット。

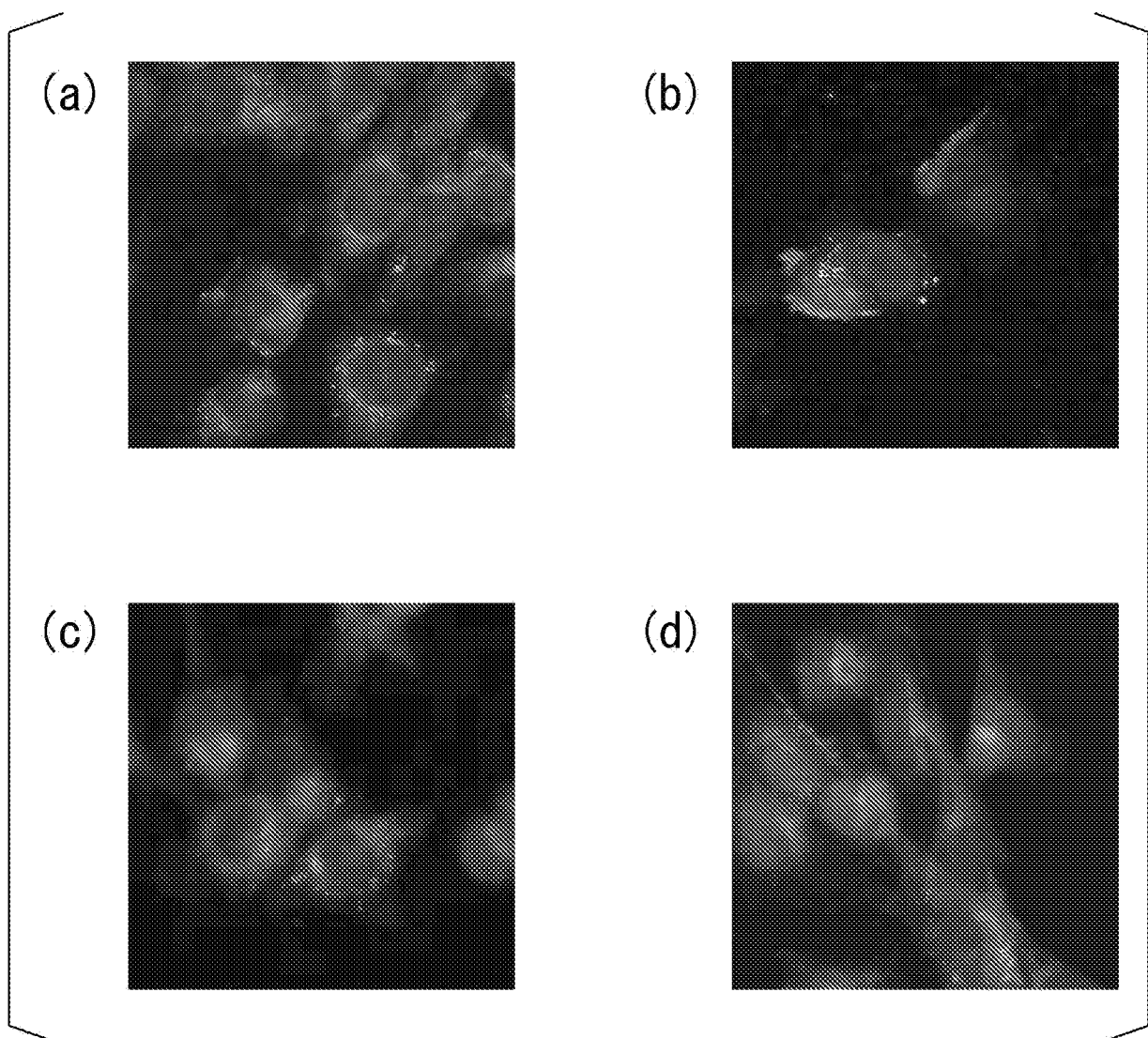
[図1]



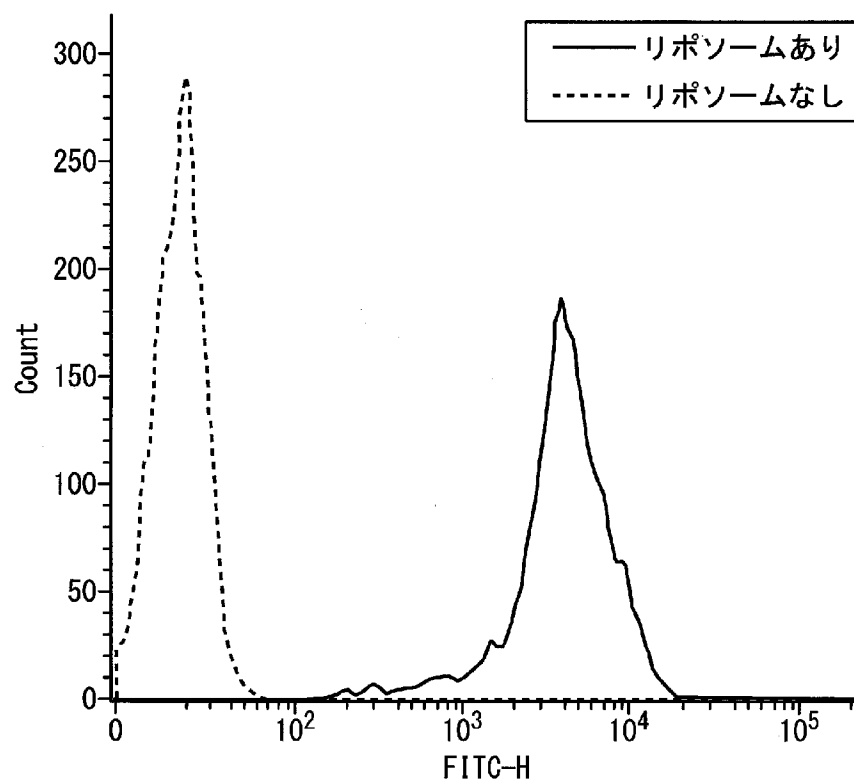
[図2]



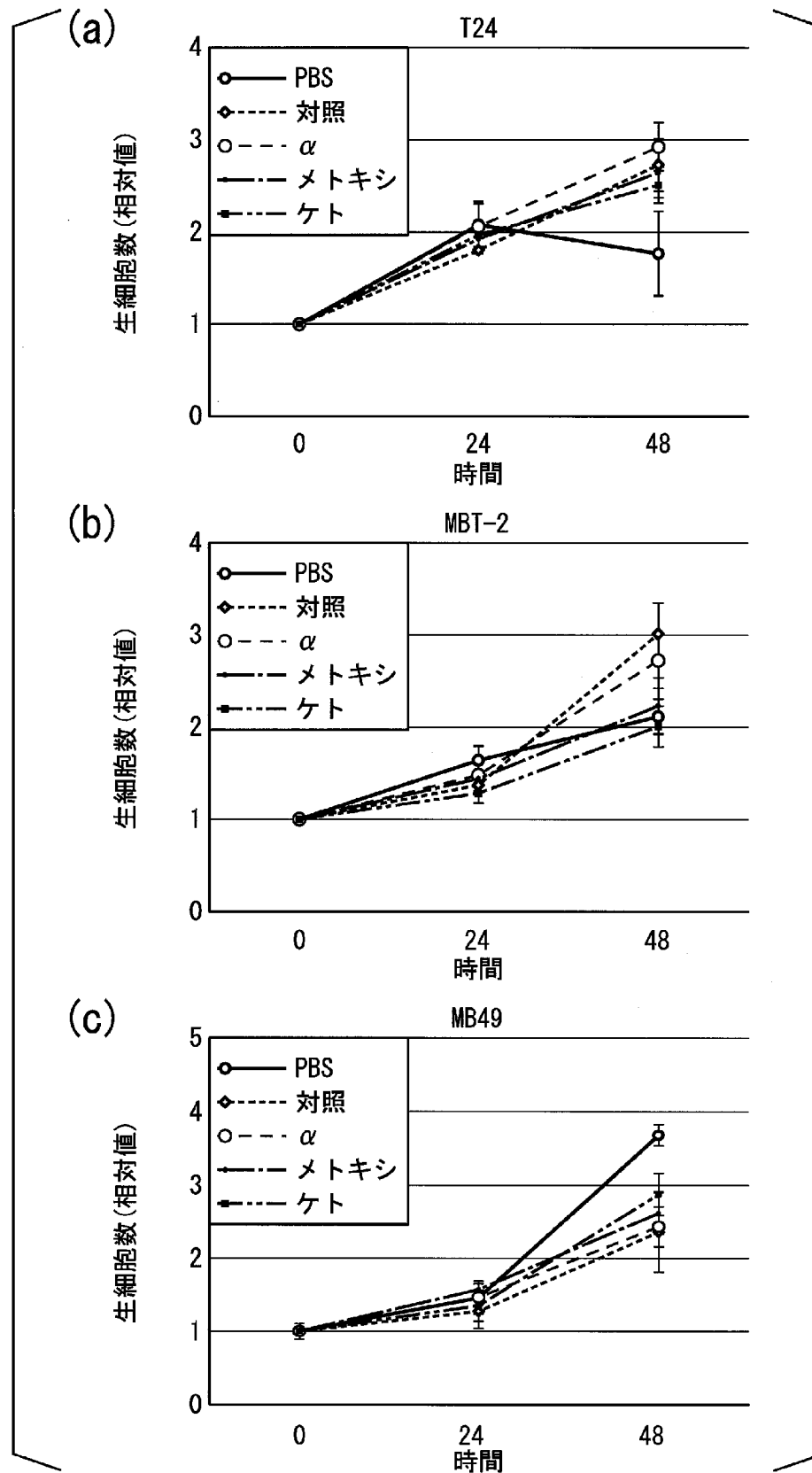
[図3]



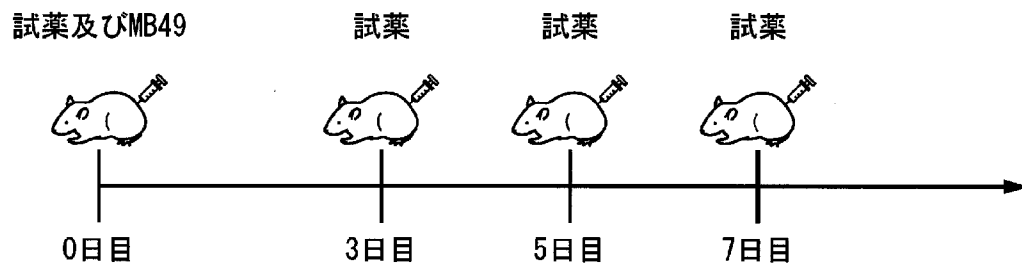
[図4]



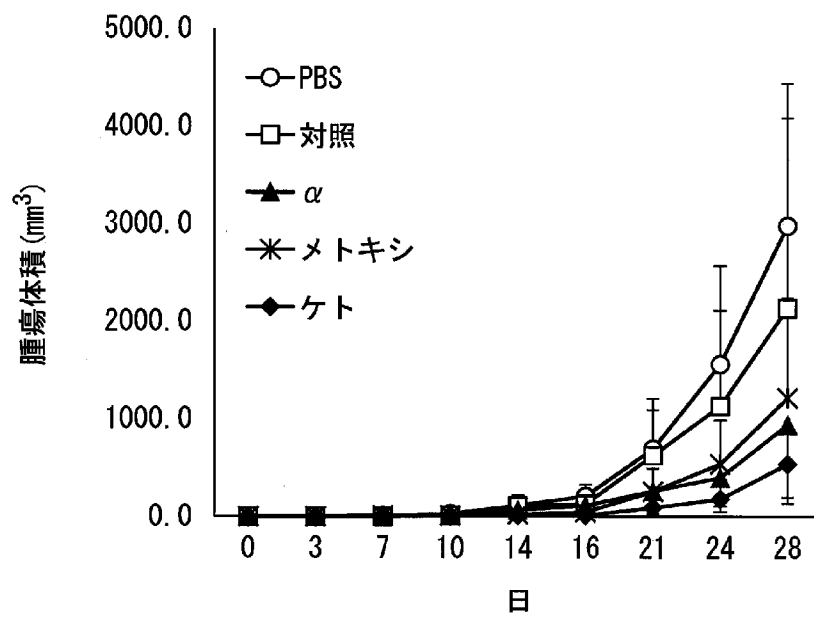
[図5]



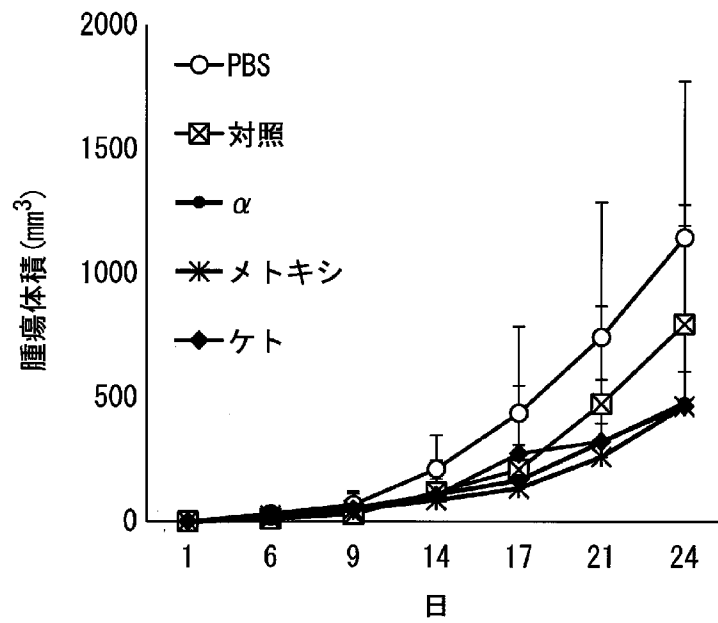
[図6]



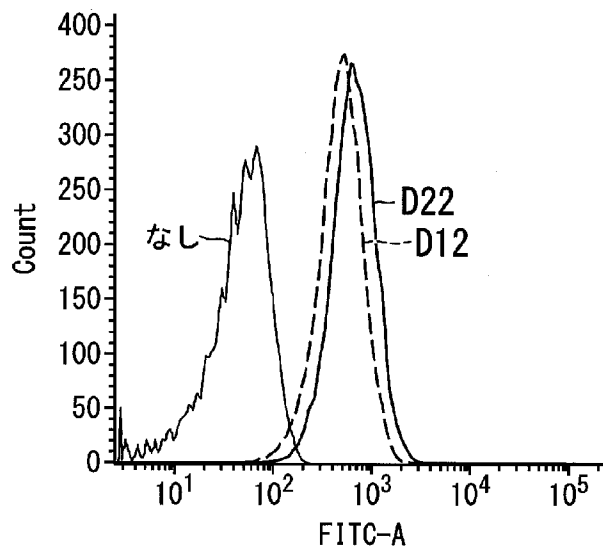
[図7]



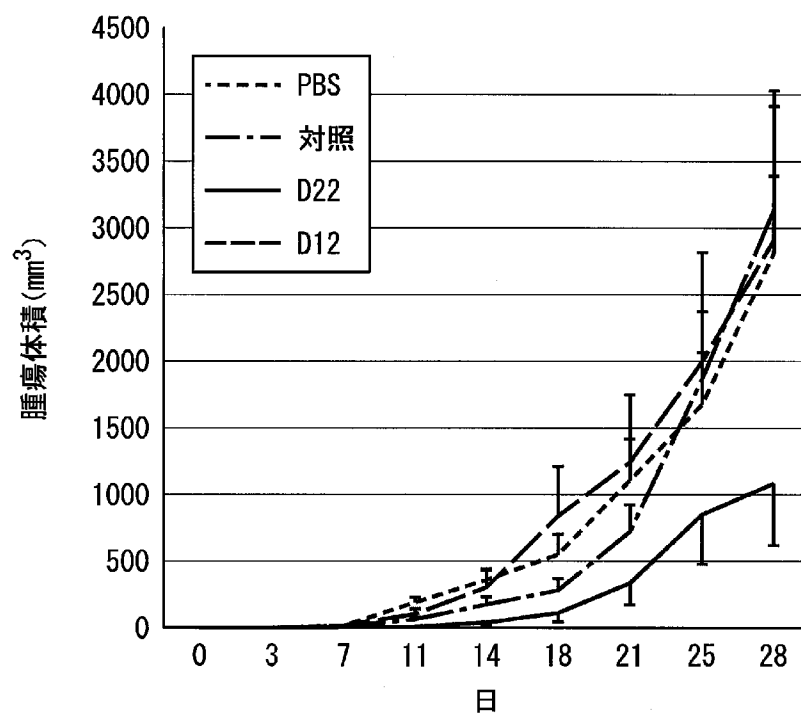
[図8]



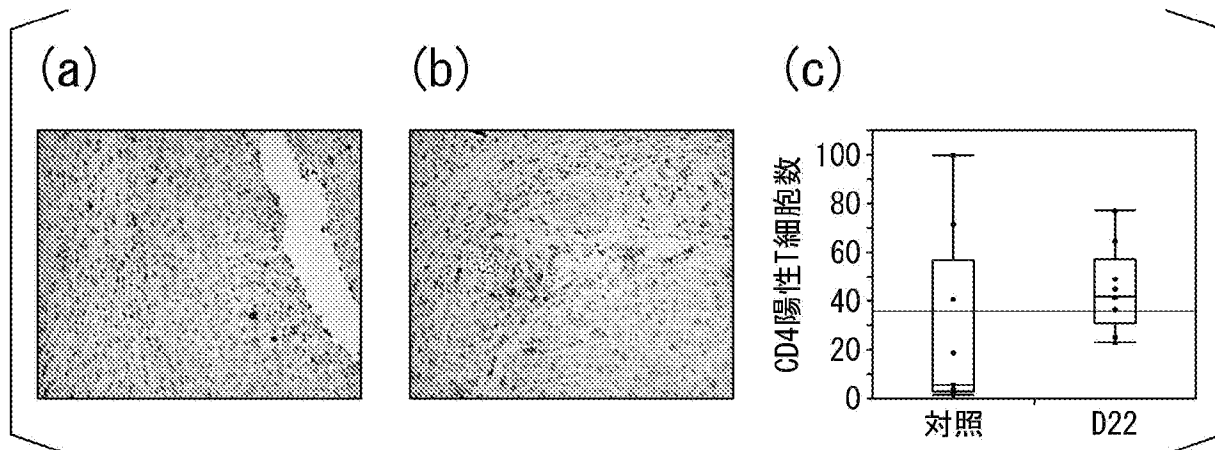
[図9]



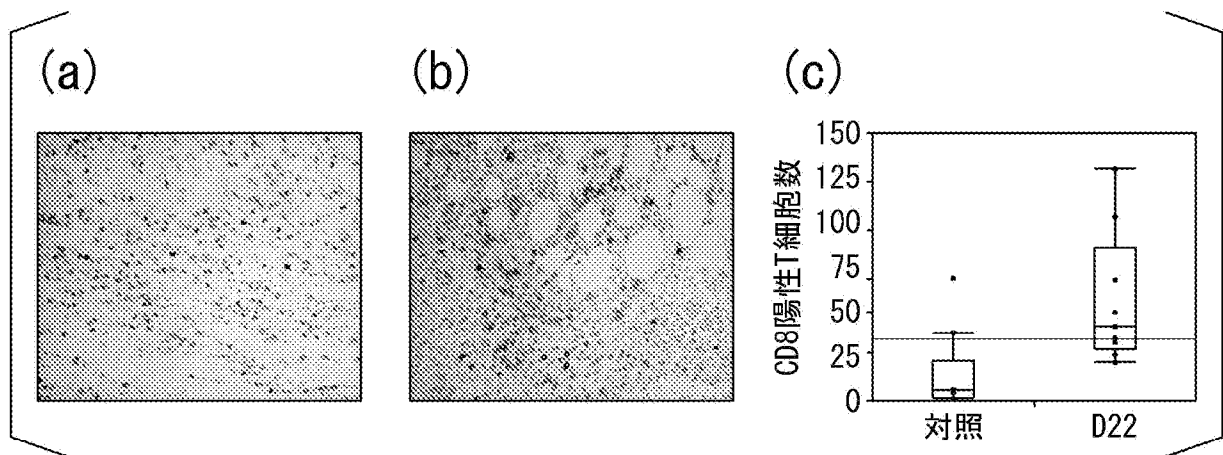
[図10]



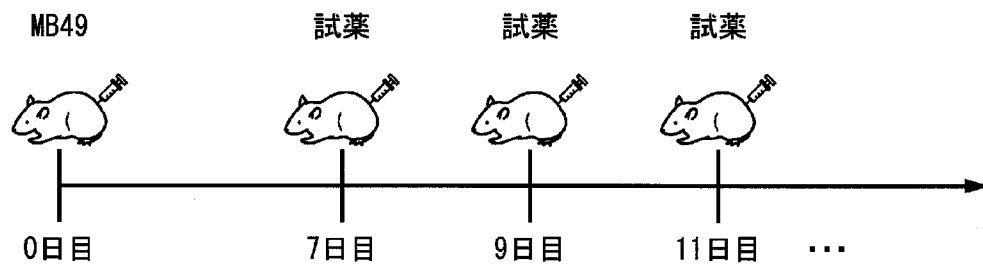
[図11]



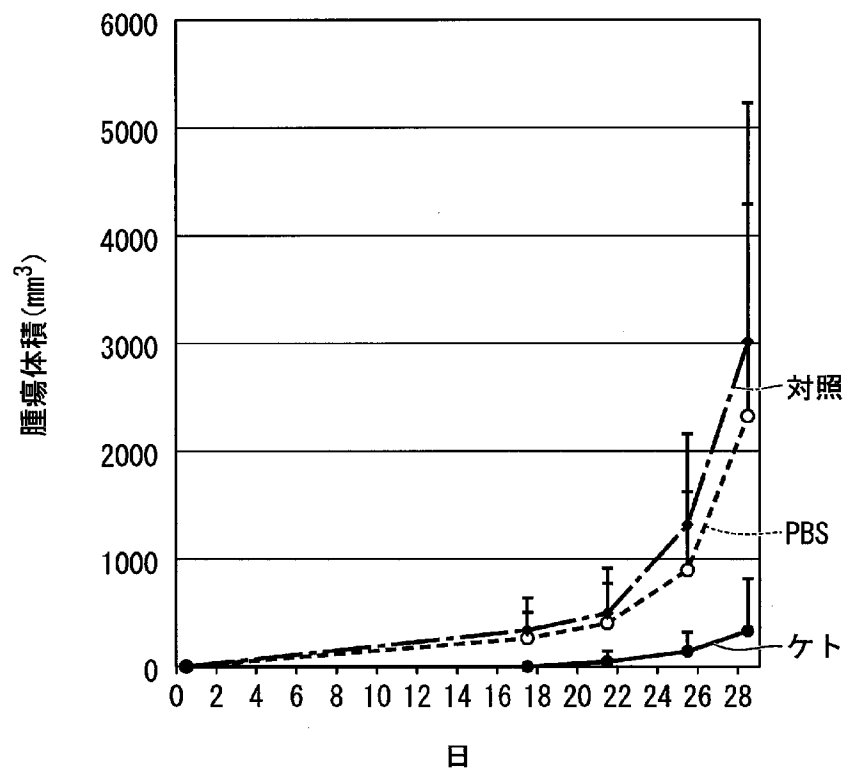
[図12]



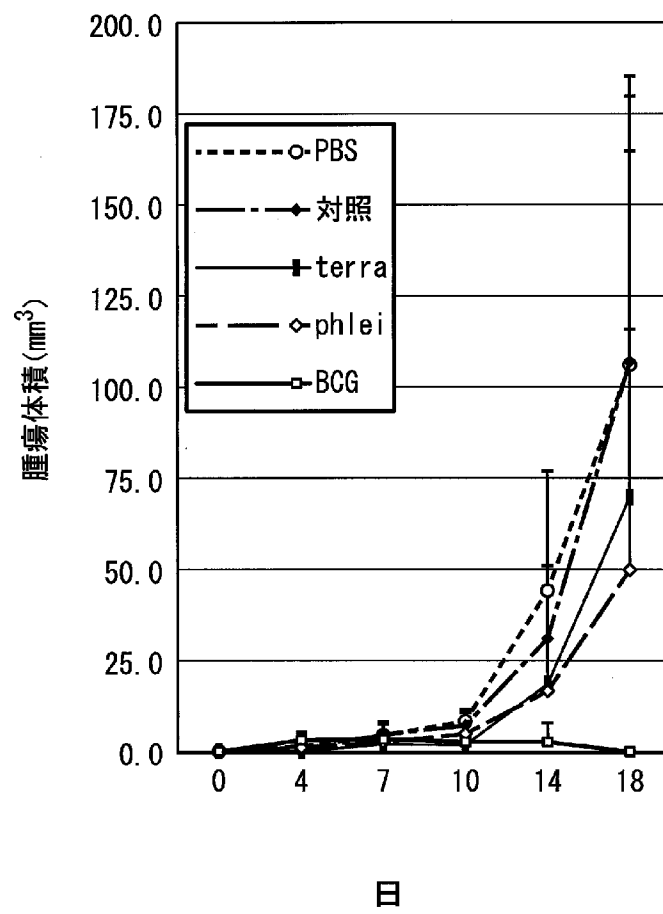
[図13]



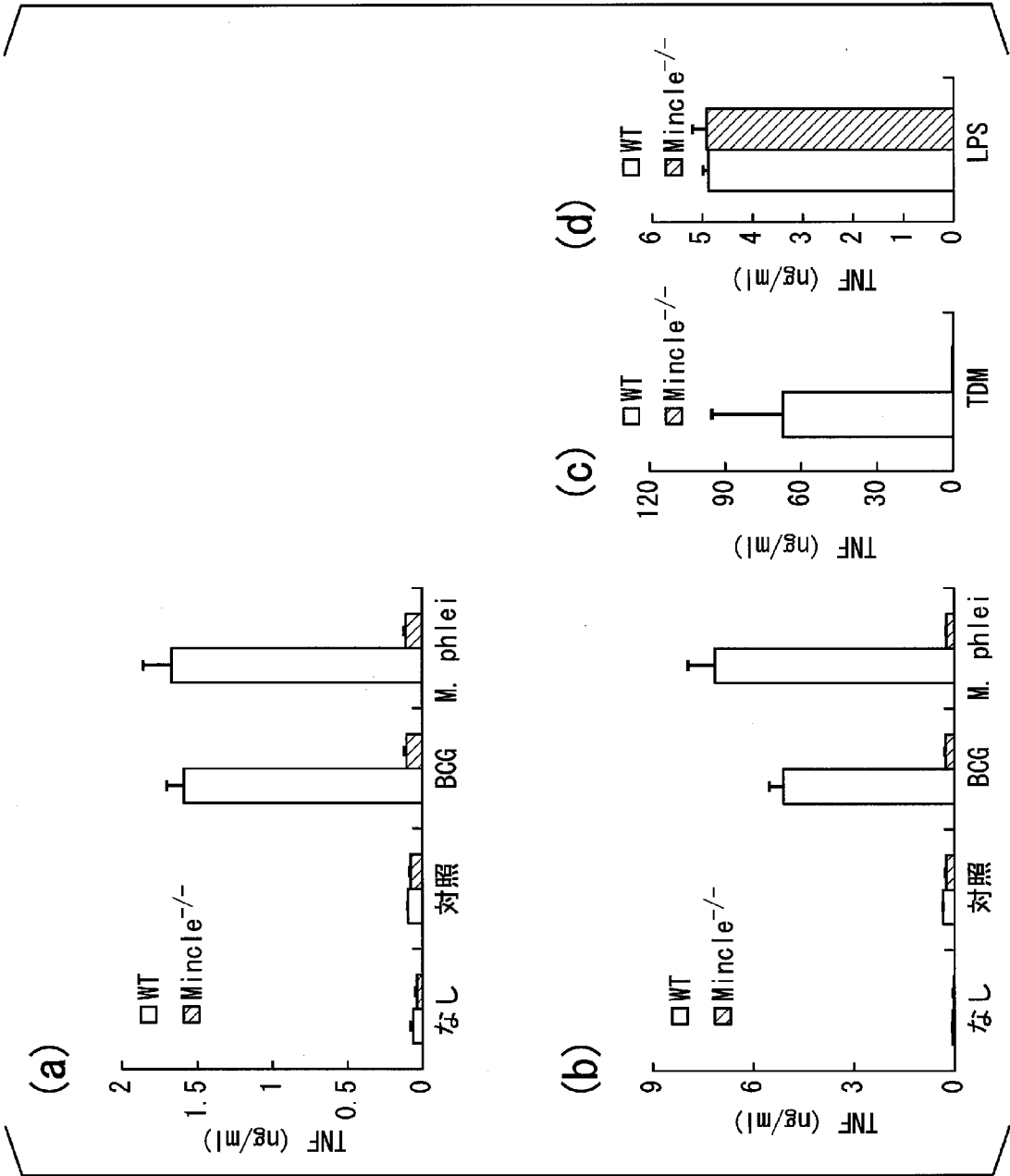
[図14]



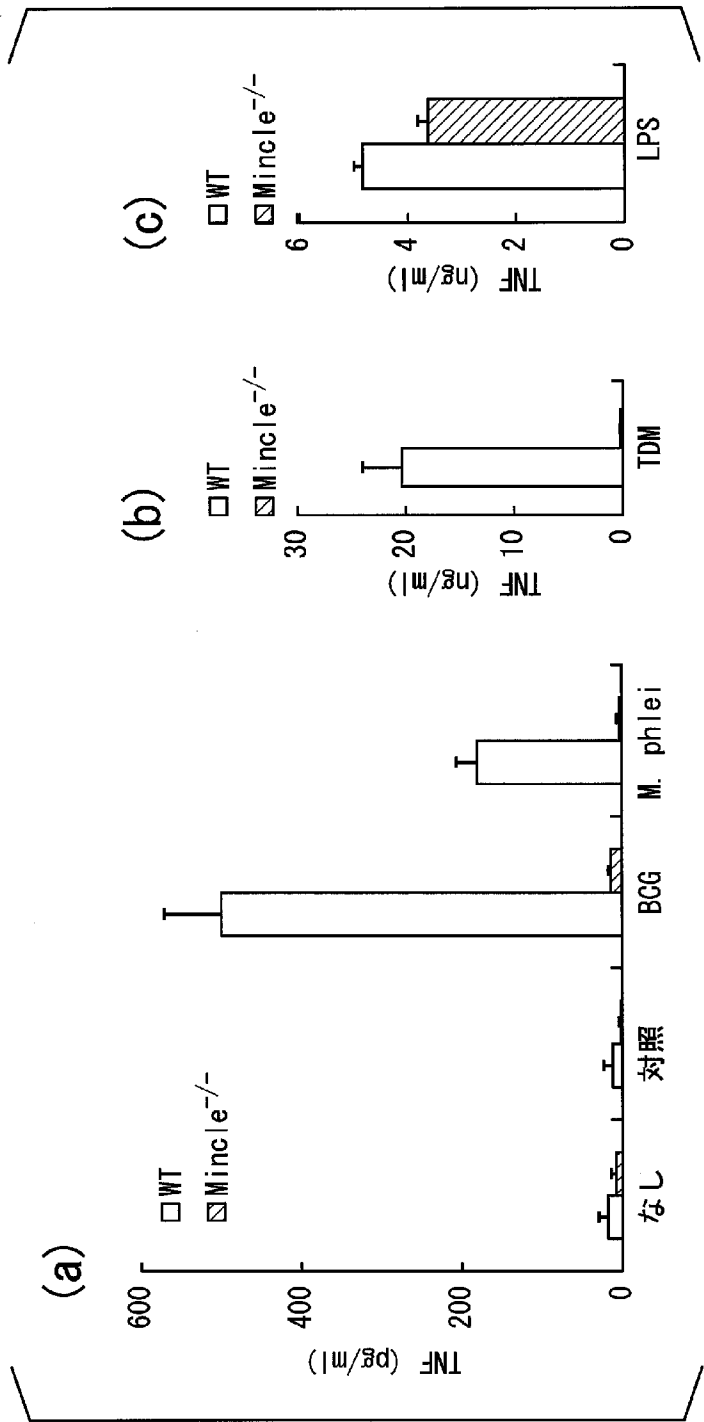
[図15]



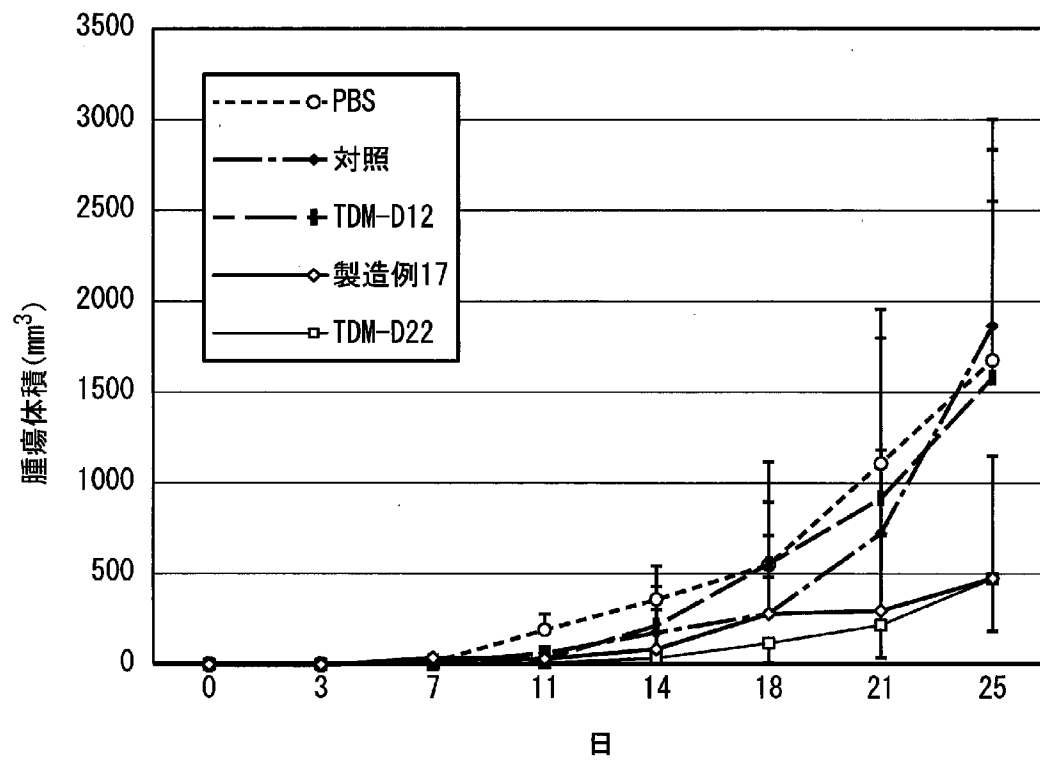
[図16]



[図17]



[図18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/008560

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K31/20 (2006.01) i, A61K9/127 (2006.01) i, A61K39/395 (2006.01) i,
A61K45/00 (2006.01) i, A61K47/28 (2006.01) i, A61K47/44 (2017.01) i,
A61P13/10 (2006.01) i, A61P35/00 (2006.01) i, A61P43/00 (2006.01) i

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)

Int.Cl. A61K31/20, A61K9/127, A61K39/395, A61K15/00, A61K17/28, A61K17/11, A61P13/10,
A61P35/00, A61P13/00

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 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/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	LEMMER, Y. et al., "Chapter five : Detection of antimycolic acid antibodies by liposomal biosensors", Methods in Enzymology, 2009, vol. 464, pp. 79-104, pp. 82-83, paragraphs [0001]-[0002] ("2. 3. Determination of MA carrying capacity of liposomes"), pp. 81-82, "2. 1 Purification of mycobacterial MA"	1, 3
A	JP 2015-187548 A (JEOL LTD.) 29 October 2015, paragraphs [0017]-[0020] (Family: none)	1, 3



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

"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

"I" 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
08 May 2018 (08.05.2018)

Date of mailing of the international search report
22 May 2018 (22.05.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/008560

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2-78623 A (SAWAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 19 March 1990, example 6 (Family: none)	1
X	KOMORI, T. et al., "A microbial glycolipid functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity", The journal of biological chemistry, 2011, vol. 286, no. 19, pp. 16800-16806, page 16801, "Preparation of Liposomes" ("EXPERIMENTAL PROCEDURES")	1-2, 4-5
Y	宮崎淳, BCG ミコール酸 (MA) 搭載リポソーム製剤投与による BBN 発がんラットの治療効果について, 泌尿器外科, 2012, vol. 25, no. 4, pp. 738-739, entire text, (Japanese Journal of Urological Surgery), non-official translation (MIYAZAKI, Atsushi, "Treatment effects on mouse of BBN-induced carcinogenesis by administration of liposome formulation integrated with mycolic acid")	1-8
Y	WO 2007/132790 A1 (HOKKAIDO UNIVERSITY) 22 November 2007, paragraphs [0020], [0023], [0026], [0046]-[0048], [0052]-[0053], [0066], examples 1, 3 & US 2010/0166840 A1, paragraphs [0028], [0033]-[0034], [0038], [0058]-[0060], [0064]-[0065], [0080], examples 1, 3 & EP 2027865 A1 & CA 2652475 A1	1-8
Y	牧野公子, リポソームの安定化と放出制御, FRAGRANCE JOURNAL, 1996, vol. 24, no. 4, pp. 85-93, pp. 86-87, "2-1. The stability of the particle diameter", non-official translation (MAKINO, Kimiko, "Stability of liposome and releasing control thereof")	1-8
Y	JP 2002-179577 A (CLUB COSMETICS CO., LTD.) 26 June 2002, claims 1-5, example 1, formulation example 2 (Family: none)	1-2, 4-8
A	WO 2013/172358 A1 (OSAKA PREFECTURE UNIV.) 21 November 2013, paragraph [0081] & JP 2013-237631 A & JP 2013-256493 A	1-8
A	JP 2009-269855 A (OSAKA PREFECTURE UNIV.) 19 November 2009, paragraph [0075] (Family: none)	1-8
A	SMET, M. et al., "Mycobacterium tuberculosis-associated synthetic mycolates differentially exert immune stimulatory adjuvant activity", Eur. J. Immunol., 2016, vol. 46, no. 9, pp. 2149-2154, entire text	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/20(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i,
A61K47/28(2006.01)i, A61K47/44(2017.01)i, A61P13/10(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i

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))

Int.Cl. A61K31/20, A61K9/127, A61K39/395, A61K45/00, A61K47/28, A61K47/44, A61P13/10, A61P35/00, A61P43/00

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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), Cplus/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	LEMMER, Y. et al., Chapter five : Detection of antimycolic acid antibodies by liposomal biosensors, Methods in Enzymology, 2009, Vol. 464, pp. 79-104, 第 82-83 頁「2.3. Determination of MA carrying capacity of liposomes」の 1-2 段落, 第 81-82 頁「2.1 Purification of mycobacterial MA」	1, 3
A	JP 2015-187548 A (日本電子株式会社) 2015. 10. 29, 段落[0017]-[0020] (ファミリーなし)	1, 3

☑ 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
「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矛盾するものではなく、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

08. 05. 2018

国際調査報告の発送日

22. 05. 2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鳥居 福代

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4 U

3 4 3 6

C (続き) . 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	JP 2-78623 A (沢井製薬株式会社) 1990.03.19, 実施例6 (ファミリーなし)	1
X	KOMORI, T. et al., Amicrobial glycolipid functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity, The journal of biological chemistry, 2011, Vol.286, No.19, pp.16800-16806, 第16801頁「EXPERIMENTAL PROCEDURES」の「Preparation of Liposomes」	1-2, 4-5
Y	宮崎淳, BCG ミコール酸(MA)搭載リポソーム製剤投与によるBBN発がん ラットの治療効果について, 泌尿器外科, 2012, Vol.25, No.4, pp.738-739, 全文	1-8
Y	WO 2007/132790 A1 (国立大学法人北海道大学) 2007.11.22, 段落[0020], [0023], [0026], 0046]-[0048], [0052]-[0053], [0066], 実施例1, 3 & US 2010/0166840 A1 [0028], [0033]-[0034], [0038], [0058]-[0060], [0064]-[0065], [0080], Example1, 3 & EP 2027865 A1 & CA 2652475 A1	1-8
Y	牧野公子, リポソームの安定化と放出制御, FRAGRANCE JOURNAL, 1996, Vol.24, No.4, pp.85-93, 第86-87頁「2-1.粒子径の安定性」	1-8
Y	JP 2002-179577 A (株式会社クラブコスメチックス) 2002.06.26, 請求項1-5, 実施例1, 製剤例2 (ファミリーなし)	1-2, 4-8
A	WO 2013/172358 A1 (公立大学法人大阪府立大学) 2013.11.21, 段落[0081] & JP 2013-237631 A & JP 2013-256493 A	1-8
A	JP 2009-269855 A (公立大学法人大阪府立大学) 2009.11.19, 段落[0075] (ファミリーなし)	1-8
A	SMET, M. et al., Mycobacterium tuberculosis-associated synthetic mycolates differentially exert immune stimulatory adjuvant activity, Eur. J. Immunol., 2016, Vol.46, No.9, pp.2149-2154, 全文	1-8