(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월03일
(11) 등록번호 10-2283760
(24) 등록일자 2021년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/35 (2006.01) *A61K 47/30* (2017.01)
A61K 47/50 (2017.01) *A61K 9/16* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/35 (2013.01)
A61K 47/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7021560(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년06월21일
심사청구일자 2020년08월21일
(85) 번역문제출일자 2020년07월23일
(65) 공개번호 10-2020-0091506
(43) 공개일자 2020년07월30일
(62) 원출원 특허 10-2015-7001460
원출원일자(국제) 2013년06월21일
심사청구일자 2018년06월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/047079
(87) 국제공개번호 WO 2013/192532
국제공개일자 2013년12월27일
(30) 우선권주장
61/662,687 2012년06월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US04565696 B

(73) 특허권자
노쓰웨스턴유니버시티
미합중국일리노이주에반스톤클라크스트리트633
(72) 발명자
쉬아, 로니 디.
미국 60208 일리노이주 에반스턴 클락 스트리스 633
밀러, 스테펜 디.
미국 60208 일리노이주 에반스턴 클락 스트리트 633
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

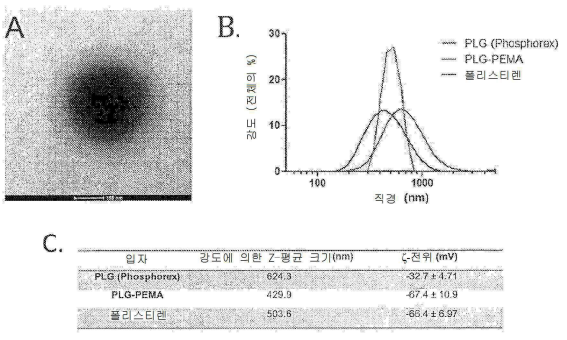
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **펩티드 접합된 입자**

(57) 요 약

본 발명은 펩티드-연계된 생물분해성 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLG) 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 특히, PLG 입자는 이들 입자의 표면에 펩티드 분자의 커플링 (가령, 면역 관용의 유도를 이끌어 내는데 이용하기 위한)을 허용하도록 표면-기능화된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/50 (2017.08)
A61K 9/16 (2013.01)
(72) 발명자
얍, 조나탄 운 텍
미국 60208 일리노이주 에반스턴 클락 스트리트 633
게츠, 다니엘 알.
미국 20018 디스트릭트 오브 콜롬비아 워싱턴 투웬티쓰 스트리트 엔이 3303
맥카티, 데릭
미국 60208 일리노이주 에반스턴 클락 스트리트 633

명 세 서

청구범위

청구항 1

-100 mV 내지 -30 mV의 음성 제타 전위를 갖는 카르복실산염 표면 기능화된 폴리(유산-코-글리콜산) 입자에 연계된 항원을 포함하며, 여기서 항원이 담체 입자 내에 피포된 것이고, 항원이 알레르겐, 이식 항원, 주사된 물질, 흡입된 물질, 효소 보상 요법에서 사용되는 효소, 또는 바이러스성 단백질인 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 입자가 0.1 μm 내지 10 μm, 0.3 μm 내지 5 μm, 0.5 μm 내지 3 μm, 0.5 μm 내지 1 μm, 또는 0.5 μm의 직경을 갖는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 입자가 생물분해성인 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 알레르겐이 식품 알레르겐인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식품 알레르겐이 땅콩 단백질인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 알레르겐이 환경 알레르겐인 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 항원이 바이아 그래스 화분, 복숭아 알레르겐 Pru p 3, 알파 s 1-카제인 우유 알레르겐, Apig1 셀러리 알레르겐, Bere1 브라질 호두 알레르겐, B-락토글로불린 우유 알레르겐, 소 혈청 알부민, Cor a 1.04 헤이즐넛 알레르겐, 땅콩 단백질 또는 난백알부민 알 알레르겐을 포함하는 군에서 선택되는 알레르겐을 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련된 출원의 진술

[0002] 본 출원은 2012년 6월 21자 제출된 U.S. 특허가출원 번호 61/662,687에 우선권을 주장하고, 이것은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

배 경 기 술

[0003] 연방 지원

[0004] 본 발명은 국립보건원에 의해 수여된 R01 EB013198 하에 정부 지원을 받아 만들어졌다. 정부는 본 발명에서 일정한 권리를 갖는다.

[0006] 발명의 배경

[0007] 염증성 질환과 장애는 비정상적인 또는 만약 그렇지 않으면, 비조절된 염증 반응이 질환의 병인 또는 심각도에 기여하는 상태이다. 실례는 자가면역 질환, 예를 들면, 1형 당뇨병과 소아 지방변증을 포함한다.

[0008] 이들 질환 중에서 다수는 조직 손상 또는 다른 손상의 부위에서 단핵 세포 침윤에 의해 특징된다. 이들 침윤에서 관찰된 단핵 세포의 실례는 림프구, 특히 T 림프구, 그리고 단핵 식세포계의 세포 (MPS 세포), 예를 들면, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 미세아교 세포 등을 포함한다.

[0009] 단핵 세포 침윤물에서 관찰된 이들 세포 중에서 다수는 이들 비정상적인 염증 반응에서 일정한 역할을 갖는 것으로 의심된다. 예로서, 질환, 예를 들면, 다발성 경화증에서, $CD4^+$ T 세포는 병리학적 자가면역 반응에서 중심 역할을 수행하는 것으로 널리 알려져 있다. T 세포 활성화에서 초기 시점에서, 수지상 세포와 기타 MPS 세포는 $CD4^+$ T 세포의 활성화를 책임질 수 있다. MPS 세포는 또한, 식균작용을 통해 염증에 기여할 수 있지만, 최소한 일부 염증성 질환에서 이런 세포가 $CD4^+$ T 세포의 부재에서 이것이 가능한 지가 명확하지 않다.

[0010] 말초혈 단핵구는 일정한 세포 표면 분자의 발현 여부에 따라 2가지 군 중에서 한 가지로 분류될 수 있다. 특히, 인간 "거주 단핵구" 또는 "성숙 단핵구"는 $CD14^{lo}CD16^+$ 표현형 (생쥐 대응물은 $CX_3CR1^{hi}CCR2^-Gr1^-$이다)을 갖는 것으로 이해된다. 세포의 다른 군, "염증성 단핵구" 또는 "미성숙 단핵구"는 $CD14^+CD16^-$ 표현형 (생쥐 대응물은 $CX_3CR1^{lo}CCR2^+Gr1^+$이다)을 갖는 것으로 이해된다. (Geissmann F. et al. 2003 Immunity 19: 71-82)

[0011] 중요하게는, 후자는 그들이 골수 유래된 말초혈 세포로부터 염증이 생긴 조직 내로 이주하는 것으로 관찰된다는 점에서 "염증성"인 것으로 이해되긴 하지만, 이들 세포는 직접적으로 또는 다른 세포의 작용을 통해 염증을 유발하는 것으로 밝혀지지 않았다. 게다가, 이들 세포가 분화할 때 형성될 수 있는 다양한 MPS 세포 역시 염증을 유발하는 것으로 밝혀지지 않았다.

[0012] 바람직하지 않은 면역 반응과 연관된 장애에서 일반적인 장기간 면역억제를 위한 전통적인 임상적 전략은 광범위한 작용 면역억제 약물, 예를 들면, 신호 1 차단제, 예를 들면, 시클로스포린 A (CsA), FK506 (타크롤리무스)과 코르티코스테로이드의 장기간 투여에 기초된다. 이들 약물의 높은 분량의 장기간 이용은 독성 부작용을 가질 수 있다. 게다가, 심지어 이들 약물을 용인할 수 있는 환자에서도, 평생 면역억제 약물 요법에 대한 필요는 종양, 심각한 감염, 신독성과 대사 장애를 비롯한 심각한 부작용의 유의미한 위험을 수반한다.

[0013] 항원 또는 펩티드의 세포 커플링을 포함하는, 항원-특이적 관용을 유도하는 방법이 개발되었다. 예로서, 한 가지 방법에서, 펩티드 유도된 세포 연계된 관용은 말초혈 세포의 수집, 말초혈 세포의 분리 및 무균 조건 하에 질환 특이적 자가항원과 에틸렌 카보디미드 (ECDI) 커플링 시약으로 말초혈 세포의 처리, 그리고 공여자/환자 내로 차후 재주입을 수반하였다. 이러한 과정은 값비싸고, 숙련된 의사에 의해 면밀하게 모니터링된 조건 하에 수행되어야 하고, 그리고 시술을 수행할 수 있는 센터의 숫자에서 제한된다. 공여자 세포 유형으로서 적혈구의 이용은 동종이계 공여자를 포함하도록 잠재적 공급원을 확장하고, 따라서 공급원 세포의 공급을 극적으로 증가시키고 이러한 요법의 전달을 수혈을 위한 증명된 임의의 세팅까지 잠재적으로 확장한다. 이들 접근법은 공급원 세포의 공급 및 공여자 세포에 대한 면역 반응을 최소화하기 위한 조직 유형 적합에 대한 필요의 면에서 유의미한 한계를 갖는다. 이에 더하여, EDCI를 통해 자가항원을 연계하는 이들 세포의 국소 치료는 유의미한 품질 관리 문제를 유발한다. 게다가, 이들 접근법은 또한, 면역 관용이 추구되는 병리학적 항원의 최소한 일부 지식을 필요로 한다.

[0014] 최근에, 공급원 세포의 공급에 대한 필요를 제거하고 기존 접근법의 조직 적합 검사 요건을 회피하는 펩티드-연계된 입자가 설명되었다. 본원에서 전체적으로 참조로서 편입되는 WO 2010/085509를 참조한다. 하지만, 이들 접

근법은 항원-특이적 면역 관용에 여전히 의존한다.

[0015] 항원-특이적 관용은 특이적 항원/에피토프가 일반적으로 인간 질환에서 알려져 있지 않기 때문에, 일반적으로 이상적이지 않다. 게다가, 항원은 항원 특이적 접근법이 효과적이기 위해 개체별로 변할 수 있고, 이런 이유로 각 개별 환자가 어떤 항원을 인식하는 지를 결정하는 것이 필요하거나, 또는 투여에 앞서 가능한 펩티드의 라이브러리를 이들 입자에 연계하는 것이 필요할 것이다. 이들 펩티드의 합성과 개별 커플링은 시간 소모가 클 뿐만 아니라 비싸다. 이런 이유로, 이들 문제 둘 모두를 해결하고, 따라서 조직 정합된 세포의 공급원에 대한 필요를 제거하고, 그리고 이와 동시에, 큰 패널의 펩티드를 합성하고 연계하는 필요를 제거하는 요법에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 발명의 요약

[0017] 일부 구체예에서, 본 발명은 항원성 펩티드에 부착된 담체 입자 (가령, PLG 입자)를 포함하는 조성물 (가령, 항원-특이적 관용의 유도를 위한)을 제공한다. 일정한 구체예에서, 담체 입자는 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLG) 입자이다.

[0018] 일부 구체예에서, 본 발명은 음성 제타 전위를 갖는 담체 입자에 연계된 항원을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, 입자의 제타 전위는 약 -100 mV 내지 약 0 mV이다. 일부 구체예에서, 입자의 제타 전위는 약 -50 mV 내지 약 -40 mV이다. 일부 구체예에서, 입자는 약 80:20 내지 약 100:0의 몰 비율을 갖는 공중합체이다. 일부 구체예에서, 공중합체 비율은 폴리스티렌:폴리(비닐 카르복실산염)/80:20, 폴리스티렌: 폴리(비닐 카르복실산염)/90:10, 폴리(비닐 카르복실산염):폴리스티렌/80:20, 폴리(비닐 카르복실산염):폴리스티렌/90:10, 폴리유산: 폴리글리콜산/80:20, 또는 폴리유산: 폴리글리콜산/90:10일 수 있지만 이들에 국한되지 않는다. 또 다른 구체예에서, 입자는 폴리스티렌 입자, 카르복실화된 폴리스티렌 입자, 또는 폴리(유산-코-글리콜산) 입자이다. 일부 구체예에서, 입자는 폴리(유산-코-글리콜산) 입자이다.

[0019] 일부 구체예에서, 입자는 약 0.1 μm 내지 약 10 μm의 직경을 갖는다. 일부 구체예에서, 입자는 약 0.3 μm 내지 약 5 μm의 직경을 갖는다. 일부 구체예에서, 입자는 약 0.5 μm 내지 약 3 μm의 직경을 갖는다. 일부 구체예에서, 입자는 약 0.5 μm 내지 약 1 μm의 직경을 갖는다. 일부 구체예에서, 입자는 약 0.5 μm의 직경을 갖는다.

[0020] 추가의 구체예에서, 항원은 자가면역 항원, 개체 내로 이식되는 조직 상에서 발현된 항원, 또는 알레르겐의 최소한 일부분을 포함한다. 일부 구체예에서, 항원은 수초 염기성 단백질, 아세틸콜린 수용체, 내인성 항원, 수초 희소돌기아교세포 당단백질, 췌장 베타-세포 항원, 인슐린, 글루탐산 탈카르복실화효소 (GAD), 콜라겐 유형 11, 인간 연골 gp39, fp130-RAPS, 단백지질 단백질, 피브릴라린, 작은 핵인 단백질, 갑상선 자극 인자 수용체, 히스톤, 당단백질 gp70, 피루브산염 탈수소효소 디히드로리포아미드 아세틸전달효소 (PCD-E2), 모낭 항원, A-글리아딘, 그리고 인간 트로포미오신 동종형 5, 바이아 그래스 화분 (BaGP), 복숭아 알레르겐 Pru p 3, 알파 s 1-카제인 우유 알레르겐, Apig1 셀러리 알레르겐, Bere1 브라질 호두 알레르겐, B-락토글로불린 우유 알레르겐, 소 혈청 알부민, Cor a 1.04 헤이즐넛 알레르겐, 또는 난백알부민 알 알레르겐의 최소한 일부분을 포함한다.

[0021] 추가의 구체예에서, 항원은 자가면역 항원, 개체 내로 이식되는 조직 상에서 발현된 항원, 또는 알레르겐을 포함한다. 무제한적 구체예에서, 항원은 예로서, 수초 염기성 단백질, 아세틸콜린 수용체, 내인성 항원, 수초 희소돌기아교세포 당단백질, 췌장 베타-세포 항원, 인슐린, 글루탐산 탈카르복실화효소 (GAD), 콜라겐 유형 11, 인간 연골 gp39, fp130-RAPS, 단백지질 단백질, 피브릴라린, 작은 핵인 단백질, 갑상선 자극 인자 수용체, 히스톤, 당단백질 gp70, 피루브산염 탈수소효소 디히드로리포아미드 아세틸전달효소 (PCD-E2), 모낭 항원, A-글리아딘, 또는 인간 트로포미오신 동종형 5, 바이아 그래스 화분 (BaGP), 복숭아 알레르겐 Pru p 3, 알파 s 1-카제인 우유 알레르겐, Apig1 셀러리 알레르겐, Bere1 브라질 호두 알레르겐, B-락토글로불린 우유 알레르겐, 소 혈청 알부민, Cor a 1.04 헤이즐넛 알레르겐, 또는 난백알부민 알 알레르겐을 포함한다.

[0022] 일부 구체예에서, 항원은 접합체 분자에 의해 상기 입자에 연계된다. 일부 구체예에서, 항원은 링커에 의해 상기 입자에 연계된다. 일부 구체예에서, 접합체 분자는 에틸렌 카르보디이미드 (ECDI)이다. 일부 구체예에서, 항원은 음성 제타 전위를 갖는 입자의 외측에 연계된다. 일부 구체예에서, 항원은 음성 표면 제타 전위를 갖는 입자 내에 피포된다.

[0023] 일부 구체예에서, 입자는 생물분해성이다. 일부 구체예에서, 입자는 표면 기능화된다. 일부 구체예에서, 입자는 카르복실산염 표면 기능화된다.

[0024] 일부 구체예에서, 본 발명은 개체에서 항원-특이적 관용을 유도하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 하기를 포함한다: 항원-연계된 입자를 포함하는 조성물의 효과량을 상기 개체에 투여하고, 여기서 상기 입자는 음성 제타 전위를 갖고, 그리고 여기서 상기 입자와 항원은 상기 개체에서 상기 항원의 관용을 유도한다. 일부 구체예에서, 투여는 질환 또는 장애를 치료하거나 또는 예방하기 위해 수행된다. 일부 구체예에서, 투여는 상기 항원에 의해 유발된 질환 또는 장애의 시작에 앞서 또는 시작 후에 수행된다. 일부 구체예에서, 질환 또는 장애는 자가면역 질환, 염증성 질환, 알레르기, 이식 거부반응, 그리고 과다면역 반응으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 질환 또는 장애는 다발성 경화증, 1형 당뇨병, 천식, 음식 알레르기, 환경 알레르기, 소아 지방변증, 그리고 상기 항원에 대한 과잉반응을 감소시키는 상기 개체에서 상기 항원에 의해 유발된 질환으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 방법은 상기 개체 내로 상기 조성물의 상기 투여를 반복하는 것을 더욱 포함한다.

[0025] 일부 구체예에서, 조성물은 정맥내 투여된다.

[0026] 일부 구체예에서, 본 발명은 음성 제타 전위를 갖는 면역 변형된 입자를 제조하기 위한 공정을 더욱 제공하고, 상기 공정은 하기를 포함한다: 음성 제타 전위를 갖는 면역 변형된 입자를 형성하는데 효과적인 조건 하에, 면역 변형된 입자 전구체를 완충액과 접촉시킨다. 일부 구체예에서, 면역 변형된 입자 전구체는 공중합화에 의해 형성된다. 일부 구체예에서, 완충액은 염기성 pH를 갖는다. 일부 구체예에서, 완충액은 중탄산나트륨, 중탄산칼륨, 중탄산리튬, 인산이수소칼륨, 인산이수소나트륨, 또는 인산이수소리튬이다.

[0027] 일부 구체예에서, 본 발명은 표면-기능화된 리포솜의 코어 내에 피포된 항원을 포함하는 조성물을 제공한다. 추가의 구체예에서, 리포솜은 30:30:40 비율의 포스파티딜콜린: 포스파티딜글리세롤: 콜레스테롤로 구성된다. 다른 추가의 구체예에서, 상기 항원은 자가면역 항원, 개체 내로 이식되는 조직 상에서 발현된 항원, 또는 알레르겐을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도면의 간단한 설명

도면 1은 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLG) 입자의 현미경사진 (A)을 보여준다. B와 C는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 동적 광 산란 분석에 의해 보여준다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 2.5 x 10^5 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 배치당 5-15% 변하지만, 일반적으로 567 nm의 Z-평균 직경, 670 nm의 피크 직경 및 0.209의 다분산성 지수를 가졌다.

도면 2는 PLG 나노입자가 항원-특이적 관용을 유도한다는 것을 보여준다. 면역우세 단백지질 단백질 $PLP_{139-151}$ 에피토프 (PLG-$PLP_{139-151}$)가 재발성 실험적 자가면역 뇌염 (R-EAE)의 예방을 위한 관용을 유도하는데 이용되었다. 생쥐는 면역화의 시기 (0 일)에 비하여 -7 일자에 $PLP_{139-151}$-PLGA (N=5), $OVA_{323-339}$-PLGA (N=5), 또는 접합되지 않은 PLGA (N=5)로 처리되었다. 피크 질환은 전형적으로, 12 일 내지 14 일자 정도에 관찰되었고, 그리고 생쥐는 임상적 질환에 대해 채점되었다. 펩티드가 없거나, 또는 대조 펩티드 $OVA_{323-339}$로 변형된 입자는 질환 유도를 예방하지 못하였다. 하지만, $PLP_{139-151}$로 변형된 PLGA 입자는 20 일과 30 일자 사이에 전시된 1 미만의 낮은 임상적 점수를 제외하고, 0의 임상적 점수 (질환 없음)를 산출하였다.

도면 3은 투여된 입자의 유형이 생쥐 모델에서 EAE의 진전에 대한 효과를 갖는다는 것을 보여준다. A)는 평균 임상적 점수를 보여주고, 그리고 B)는 EAE 동물의 평균 누적 점수를 보여준다. 생쥐는 면역화의 시기 (0 일)에 비하여 -7 일자에 $OVA_{323-339}$-PLS (N=5), $OVA_{323-339}$-$PLGA_{PHOSPOREX}$ (N=5), $OVA_{323-339}$-$PLGA_{PEMA}$ (N=5), $PLP_{139-151}$-PLA (N=5), $PLP_{139-151}$-$PLGA_{PHOSPOREX}$ (N=5), 또는 $PLP_{139-151}$-PLG_{PEMA} (N=5)로 처리되었다. 피크 질환은 전형적으로 12 일 내지 14 일자 정도에 관찰되었고, 그리고 생쥐는 임상적 질환에 대해 채점되었다. 대조 펩티드 $OVA_{323-339}$로 변형된 임의의 조성의 입자는 질환 유도를 예방하지 못하였다. 하지만, $PLP_{139-151}$ 연계된 PLG 비드는 $PLP_{139-151}$ 연계된

상업적인 (phosphorex) PLG 또는 폴리스티렌보다 R-EAE의 유도를 하향조절하는데 더욱 효과적이었다.

도면 4는 28 일자에 가용성 OVA로 처리된 생쥐가 OVA-PLG 입자로 처리된 동물과 비교하여 온도에서 감소를 전시한다는 것을 보여준다. 이들 입자를 전달하는 1 시간 이내에 체온에서 어떤 감소도 관찰되지 않았다.

도면 5는 관해 동안 PLP-PLG의 투여가 임의의 과민증-연관된 사망을 유발하지 않는다는 것을 보여준다. EAE는 CFA에서 $PLP_{139-151}$의 피하 주사에 의해 6 내지 8 주령 암컷 SJL/J 생쥐에서 유도되고, 그리고 임상적 질환의 진전이 모니터링되고 기록되었다 (B). 질환 유도에 비하여 21 일자에, 생쥐는 가용성 $PLP_{139-151}$ (투명한 사각형), 가용성 $OVA_{323-339}$ (투명한 원), 또는 PLG 나노입자에 연계된 동일한 펩티드 (속이 채워짐)의 iv 주사가 제공되었다. 동물의 온도는 주사 이후에 1 시간 동안 10 분마다 모니터링되고 기록되었다 (A).

도면 6은 질환 유도에 앞서 7 일 시점에 정맥내 투여된 $PLP_{139-151}$-PLG의 최적 투약을 보여준다. 임상적 질환의 진전은 $OVA_{323-339}$-PLG (A)로 처리된 SJL/J 생쥐와 비교하여 계량되었다. 6 내지 8 주령 암컷 SJL/J 생쥐는 $PLP_{139-151}$ (사각형)- 또는 $OVA_{323-339}$ (원)- 연계된 PLG 나노입자가 iv 주사되었다. EAE는 7 일 (B), 25 일 (C), 또는 50 일 (D) 후, CFA에서 $PLP_{139-151}$의 피하 주사에 의해 유도되었다. 패널 B로부터 동물은 100 일 동안 임상적 질환에 대해 추적되었다. 질환 유도에 비하여 8 일자에, 지연형 과민증 (DTH) 반응이 패널 B에서 도시된 생쥐의 부분집합에서 수행되었다 (E). 패널 B에서 $PLP_{139-151}$/CFA 기폭된 군 ($OVA_{323-339}$-PLG와 $PLP_{139-151}$-PLG)로부터 선별된 대표적인 동물은 기폭 $PLP_{139-151}$ 에피토프와 $OVA_{323-339}$ 대조 펩티드로 귀-공격되었다. DTH의 척도로서 귀 종창은 24 시간 후 결정되고, 그리고 공격에 앞서 반응이 감산되었다. 6 내지 8 주령 암컷 SJL/J 생쥐는 $PLP_{178-191}$ (삼각형)-, $OVA_{323-339}$ (원), 또는 $PLP_{139-151}$ (사각형)-연계된 PLG 나노입자, 또는 연계되지 않은 입자 단독 (개설된 원)이 정맥내 주사되었다 (F). EAE는 CFA에서 $PLP_{178-191}$의 피하 주사에 의해 7 일 후에 유도되고, 그리고 질환은 도시된 시점에서 모니터링되었다.

도면 7A-D는 PLG-$PLP_{139-151}$ 입자가 정맥내 또는 복강내 투여될 때, 예방적 관용이 가장 효율적이라는 것을 보여준다. 정맥내 투여된 $PLP_{139-151}$-PLG로 처리된 동물은 질환이 진전되지 않았고 대부분의 시점에서 0의 평균 임상적 점수를 가졌다.

도면 8A-F는 $OVA_{323-339}$-PLG 입자의 투여가 처리된 동물에서 Th1과 Th17 반응을 저해한다는 것을 보여준다.

도면 9A-C는 $PLP_{139-151}$-PLG로 처리된 동물의 척수 내에 면역 세포 침윤에서 감소를 보여주고, 그리고 $OVA_{323-339}$-PLG 처리된 동물로부터 조직보다 고유한 조직에 더욱 유사하다는 것을 보여준다. $OVA_{323-339}$-PLG 처리된 동물은 CD45, CD4, 그리고 CD11b에 대해 양성 염색을 가졌다; 반면, $PLP_{139-151}$-PLG 처리된 동물은 이들 인자에 대해 최소 염색을 가졌다.

도면 10A-C는 $PLP_{139-151}$-PLG 입자의 투여가 혈액 뇌 장벽 (BBB) 교란 및 처리된 생쥐의 척수에서 대식세포 활성화를 저해한다는 것을 보여준다. 동물은 완전한 프로인드 어쥬번트 (CFA), $OVA_{323-339}$ PLG 입자, 또는 $PLP_{139-151}$-PLG 입자로 처리되었다. EAE의 임상적 점수와 퍼센트 발생률이 결정되고 (B), 그리고 척수가 생체내 영상화에 의해 관찰되었다 (A와 C).

도면 11A와 B는 처리된 생쥐의 척수를 생체내 영상화에 의해 보여준다. C-D는 이미지 자료의 정량을 보여주는 그래프이다.

도면 12는 $PLP_{139-151}$이 피포된 PLG 입자의 투여가 생쥐에서 R-EAE의 유도를 저해한다는 것을 보여준다. 자가항원을 피포하는 능력은 표면 결합에서 가능하지 않은 단백질의 복합체 혼합물 또는 심지어 장기 균질액의 이용을 가능하게 하여 더욱 넓은 항원 범위를 허용하고, 따라서 에피토프 확산을 더욱 효과적으로 다룬다.

도면 13은 $PLP_{139-151}$-PLG 입자와 항-CD25 항체로 처리된 동물이 때때로, $PLP_{139-151}$-PLG 입자와 대조 IgG 항체로 처리된 동물보다 더욱 큰 평균 임상적 점수를 나타낸다는 것을 보여준다.

도면 14는 활동성 EAE와 입양 EAE에서 $PLP_{139-151}$-PLG 입자에 의해 유도된 치료 관용을 보여준다. 입양 EAE는

$2.5x10^6$ $PLP_{139-151}$-활성화된 모구의 입양 전달에 의해 6 내지 8 주령 암컷 SJL/J 생쥐에서 유도되었다. 생쥐는 질환 유도 이후에 2 일 (A) 또는 14 일 (C)에, 500nm PLG 나노입자에 연계된 $PLP_{139-151}$ (사각형) 또는 $OVA_{323-339}$ (원) 펩티드가 iv 주사되었다. 임상적 질환 점수는 항원-연계된 비장세포로 처리 이후에 것들과 비교되었다 (A). 뇌와 척수는 42 일자에 조직학적 분석을 위해 $PLP_{139-151}$ - 또는 $OVA_{323-339}$ -관용유도된 생쥐로부터 수집되었다. 패널 A로부터 생쥐로부터 절편은 PLP 단백질과 CD45에 대해 염색되었다 (B). 패널 (C)로부터 생쥐로부터 척수 절편은 Luxol Fast Blue로 염색되었다 (D). 탈수초와 세포 침윤의 구역은 화살표에 의해 지시된다.

도면 15는 $OVA_{323-339}$ 또는 $PLP_{139-151}$에 접합된 SP 또는 PLG 입자로 처리 후, 활동성 EAE와 입양 EAE를 앓는 생쥐의 평균 임상적 점수를 묘사하는 그래프를 보여준다. 생쥐는 질환 유도 이후에 10 일 (A) 또는 2 일 (B)에 500nm 나노입자에 연계된 $PLP_{139-151}$-SP, $PLP_{139-151}$-PLG, 또는 $OVA_{323-339}$-SP, 또는 $OVA_{323-339}$ - PLG 펩티드가 iv 주사되고, 그리고 평균 임상적 점수가 결정되었다. 양쪽 사례에서, $PLP_{139-151}$-PLG 입자의 투여는 이들 생쥐에서 관용을 유도한다.

도면 16은 중추신경계 면역 세포의 침윤 역시 PLP-PLG 관용유도된 생쥐에서 극적으로 감소된다는 것을 보여준다. SJL/J 생쥐는 입양 전달에 의한 EAE 유도 이후에 2 일에 $PLP_{139-151}$ (사각형) 또는 $OVA_{323-339}$ (원)과 연계된 500nm PLG 나노입자가 i.v. 주사되었다. 질환의 피크 (14 일)에서 뇌와 척수는 제거되고, 그리고 림프구 (B), APC (C), 소교세포 (D), 말초 수지상 세포 (E), 골수성 수지상 세포 (F)와 대식세포 (G)의 숫자가 유세포 분석법에 의해 계산되었다. 이들 개체군에 대한 게이팅 전략은 (A)에서 묘사된다. CNS 세포 제조물은 IL-17A와 IFN-γ에 대한 세포내 염색에 앞서 5 시간 동안 PMA과 이오노마이신으로 자극되었다 (H).

도면 17은 PLG 입자 내에 피포된 $PLP_{139-151}$ 펩티드의 투여가 상기 입자가 PBS와 함께 투여될 때, 관용을 유도한다는 것을 보여준다. 하지만, 항-PD-1 항체의 투여는 이러한 관용을 감소시킨다.

도면 18은 PLG 입자 내에 피포된 $PLP_{139-151}$ 펩티드의 투여가 상기 입자가 PBS와 함께 투여될 때 관용을 유도한다는 것을 보여준다. 항-CD40 항체의 투여는 이러한 관용을 감소시키지만, 관용에서 이러한 감소는 항-IL-12 항체의 첨가에 의해 반전된다.

도면 19A-G는 OVA-PLG의 예방적 투여가 IL-4, IL-5, IL-13과 IL-10의 분비를 감소시키고, 그리고 폐에서 혈청 OVA IgE와 호산구의 수준을 감소시킨다는 것을 보여준다.

도면 20은 PLG 입자 내에 피포된 OVA가 종격 림프절로부터 OVA-특이적 시험관내 회상 반응을 예방적으로 저해한다는 것을 보여준다. 25 μg OVA로 재자극 후에 관찰된 림프절 증식은 OVA-PLG로 처리된 동물에서 감소된다 (A). 게다가, OVA-PLG로 처리는 OVA로 재자극 후 사이토킨의 방출을 감소시킨다. IL-4, IL-5, IL-13, 그리고 IL-10의 수준은 OVA-PLG로 처리된 생쥐에서 감소된다 (B).

도면 21은 OVA-PLG의 치료적 투여가 IL-4, IL-5, IL-13과 IL-10의 분비를 감소시키고, 그리고 폐에서 혈청 OVA IgE와 호산구의 수준을 감소시킨다는 것을 보여준다.

도면 22는 PLG 입자 내에 피포된 OVA가 OVA-연계된 PLG 입자보다 더욱 우수하게, BAL 액체에서 OVA-특이적 Th2 사이토킨을 치료적으로 하향조절한다는 것을 보여준다. 생쥐는 0 일자와 14 일자에 10μg/생쥐의 분량에서 OVA/백반으로 복강내 처리되었다. 이들 생쥐는 28 일자와 42 일자에, PLG 입자에 연계된 OVA 또는 PLG 입자 내에 피포된 OVA가 정맥내 투여되었다. 56-58 일자 사이에, 이들 생쥐는 에어로졸화된 OVA로 3회 처리되었다. 그래프는 이들 동물이 PLG 입자에 연계된 OVA (A) 또는 PLG 입자 내에 피포된 OVA (B)로 처리될 때, 사이토킨 분비를 묘사한다.

도면 23은 p31-PLG 입자로 처리 후 1형 당뇨병성 동물의 혈당 수준을 보여준다. p31 펩티드 연계된 PLG 입자의 투여는 MOG_{35-55} 펩티드 연계된 입자로 투여 후 관찰된 것들과 비교하여 더욱 낮은 혈당 수준을 유발하였다 (A와 B). 이들 동물에서 관찰된 IFNγ 분비 세포의 퍼센트 역시 MOG_{35-55} 펩티드-PLG 처리된 생쥐와 비교하여, p31-PLG 처리된 생쥐에서 감소되었다 (C).

도면 24A-B는 p31-PLG 유도된 관용이 Tregs를 필요로 한다는 것을 보여준다. 1형 당뇨병은 입양 전달에 의해 생쥐에서 유도되었다. 활성화된 세포가 NOD.SCID 생쥐에 이전된 후 2 시간 시점에, 이들 생쥐는 p31-PLG 또는

MOG_{35-55} PLG 입자로 관용유도되었다. Tregs의 고갈은 p31-PLG 입자의 투여에 의해 유도된 관용을 제거한다.

도면 25는 인슐린 연계된 PLG 입자의 투여가 300여 일 동안 당뇨병이 진전되지 않은 생쥐의 백분율을 유의미하게 증가시킨다는 것을 보여준다 (22.7%와 비교하여 69.6%; p=0.0027). NOD 생쥐는 6, 8, 그리고 10 주령에서 정맥내 투여에 의해, BSA (N=22) 또는 인슐린 (N=23) 연계된 PLG 입자로 처리되었다. 이들 생쥐는 이후, 당뇨병의 진전에 대해 검정되었다.

도면 26은 수용자 생쥐에서 관찰된 CD45.1 공여자 세포의 퍼센트를 보여준다. 암컷 CD45.2 생쥐는 -7 일자에 OVA-PLG 또는 Dby-PLG로 관용유도되었다. -1 일자에, 이들 생쥐는 200 라드로 방사선조사되고, 그리고 이후, 0 일자에 수컷 CD45.1 생쥐로부터 $1x10^6$, $5x10^6$, 또는 $1x10^7$ 골수 세포로 이식되었다. 수용자 생쥐는 이후, 1 일자에 OVA-PLG, Dby-SP, 또는 Dby-PLG로 관용유도되고, 그리고 혈액이 키메라현상의 FACS 분석을 위해 수확되었다.

도면 27은 1 일자에 OVA-PLG, Dby-SP, 또는 Dby-PLG로 관용유도 후 수용자 생쥐에서 공여자 CD45.1 세포의 퍼센트를 보여준다. 1마리 양성 대조 생쥐는 유의미한 이식 (~10%)을 나타내지 않았다. 모든 음성 대조 생쥐는 공여자 세포를 이식하지 않았다. 1마리 Dby-SP 생쥐는 유의미한 이식 (~10%)을 나타내지 않았다. 2마리 OVA-PLG 생쥐는 공여자 세포를 이식하였다 (~10%): 하나는 16 주까지 완전하게 거부되었다. 1마리 Dby-PLG 생쥐는 12 주에서 거부를 시작하고 16 주까지 10%에 있었다. Dby-PLG 군은 16 주까지 10%-56% 이식의 범위에서 변하였다. OVA-PLG 생쥐는 1) 자발성 이식, 2) OVA323과 Dby 사이에 서열 상동성, 또는 3) 입자의 면역관용성 성질을 나타냈다. Dby-PLG는 Dby-SP와 OVA-PLG보다 더욱 많은 이식을 허용한다.

도면 28은 시간 관용이 수용자 생쥐에서 CD45.1 세포의 퍼센트에 대한 효과를 갖는다는 것을 보여준다. 양성 대조는 예상된 것 (~10%)보다 더욱 적은 이식 (~4%)을 보여준다. 1마리 음성 대조 생쥐는 5% 이식을 가졌다. 3가지 모든 OVA-PLG 군 중에서, -7 일, +1 일 군에서 1마리 생쥐는 이식 (12%)을 보였다. 1 일자에 관용은 -7 일자에 관용보다 임상적으로 더욱 유관하였다.

도면 29는 항원에 연계된 또는 항원 없는 쿠마린-6 PLGA 입자가 투여 후 3 시간 시점에 검출될 수 있지만, 투여 후 24 시간 시점에는 검출되지 않는다는 것을 보여준다. 이들 입자는 투여 후 3 시간 시점에 검출될 수 있지만, 투여 후 24 시간 시점에 검출되지 않았다. 경험 없는 주사되지 않은 생쥐 (위쪽 열)는 주사 후 3-시간 (중간 열) 및 주사 후 24-시간 (아래쪽 열) 시점에서 i.v. 형광 PLGA/PEMA 마이크로입자 주사된 생쥐 비장 (왼쪽 칼럼), 간 (중간 칼럼)과 폐 (왼쪽 칼럼) 절편과 비교하여, DAPI로 대비 염색되었다.

도면 30은 6 시간과 15 시간 후, 간에서 $F4/80^+$ 세포와 공동-국부화된 PLGA 입자를 보여준다.

도면 31은 변연대 대식세포가 정맥내 주입 후 24 시간 시점에 TAMRA-표지화된 $PLP_{139-151}$-연계된 입자를 주로 흡수한다는 것을 보여준다. $PLP_{139-151}$+ 세포의 가장 높은 백분율은 변연대 대식세포이다.

도면 32는 PLP139-151/CFA 기폭 일자의 숫자와 대비하여 일일 평균 임상적 점수를 묘사한다. PLP139-151/CFA-유도된 R-EAE는 코어 내에 가용성 PLP139-151을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자를 이용한 면역 관용의 유도에 의해 SJL/J 생쥐에서 저해된다.

도면 33은 피포된 OVA-PLG로 처리된 생쥐가 호산구 축적에서 최대 감소를 나타낸다는 것을 보여준다.

도면 34는 피포된 OVA-PLG로 처리된 생쥐가 처리되지 않은 또는 대조 처리된 동물과 비교하여 혈청 IgE 수준에서 최대 감소를 나타낸다는 것을 보여준다.

도면 35는 코어 내에 가용성 PLP139-151을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 동적 광 산란 분석에 의해 보여준다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 1.792 x 105 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 584 nm의 Z-평균 직경, 679 nm의 피크 직경 및 0.162의 다분산성 지수를 가졌다. 이들 결과는 상기의 서면 프로토콜에 따라, 합성의 6개 배치를 대표한다.

도면 36은 코어 내에 가용성 PLP139-151을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 ζ-전위 계량에 의해 보여준다. 표면 기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 6.67 x 104 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 -48.9 mV의 피크 ζ-전위 및 5.14 mV의 ζ

편차를 가졌다. 이들 결과는 상기의 서면 프로토콜에 따라, 합성의 6개 배치를 대표한다.

도면 37은 코어 내에 가용성 난백알부민을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 동적 광 산란 분석에 의해 보여준다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 1.822 x 105 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 569.7 nm의 Z-평균 직경, 700.3 nm의 피크 직경 및 0.230의 다분산성 지수를 가졌다. 이들 결과는 상기의 서면 프로토콜에 따라, 합성의 3개 배치를 대표한다.

도면 38은 코어 내에 가용성 난백알부민을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 ζ-전위 계량에 의해 보여준다. 표면 기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 2.67 x 104 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 -52.2 mV의 피크 ζ-전위 및 5.38 mV의 ζ 편차를 가졌다. 이들 결과는 상기의 서면 프로토콜에 따라, 합성의 3개 배치를 대표한다.

도면 39는 코어 내에 가용성 $PLP_{139-151}$ 펩티드를 내포하는 표면-기능화된 리포솜이 다발성 경화증의 뮤린 모델에서 면역 관용을 유도한다는 것을 증명하는 그래프를 도시한다. 동물은 코어 내에 가용성 $PLP_{139-151}$ 펩티드를 내포하는 표면-기능화된 리포솜 (원) 또는 가용성 $OVA_{323-339}$ 펩티드를 내포하는 표면-기능화된 리포솜 (사각형)으로 처리되었다. $PLP_{139-151}$ 펩티드 리포솜을 받는 동물의 평균 임상적 점수는 $OVA_{323-339}$ 펩티드 리포솜을 받는 동물의 것보다 더욱 낮았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 발명의 상세한 설명

[0030] 본 발명자들은 항원에 연계된 나노입자가 자가면역 질환에 대한 관용을 유도하고 면역 반응을 감소시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 이들 입자는 그들이 입자의 표면에 결합되거나 또는 입자 내에 피포되는 지에 상관없이, 관용을 유도할 수 있다. 이들 입자는 이런 이유로, 과잉의 염증성 면역 반응에 의해 특징되는 임의의 질환 또는 장애, 예를 들면, 자가면역 질환의 치료에서 유용할 수 있다.

[0031] "입자"는 본원에서 이용된 바와 같이, 임의의 비-조직 유래된 물질 조성물을 지칭하고, 이것은 구체 또는 구체-유사 실체, 비드, 또는 리포솜일 수 있다. 용어 "입자", 용어 "면역 변경 입자", 용어 "담체 입자", 그리고 용어 "비드"는 문맥에 따라, 교체가능하게 이용될 수 있다. 부가적으로, 용어 "입자"는 비드와 구체를 포괄하는데 이용될 수 있다.

[0032] "음성으로 하전된 입자"는 본원에서 이용된 바와 같이, 제로보다 적은 순 표면 전하를 소유하도록 변형된 입자를 지칭한다.

[0033] "카르복실화된 입자" 또는 "카르복실화된 비드" 또는 "카르복실화된 구체"는 표면 상에 카르복실 기를 내포하도록 변형된 임의의 입자를 포함한다. 일부 구체예에서, 카르복실 기의 첨가는 예로서, 스캐빈저 수용체, 예를 들면, MARCO와의 상호작용을 통해, 순환으로부터 이들 입자의 식세포/단핵구 흡수를 증강한다. 이들 입자의 카르복실화는 폴리(에틸렌-말레산 무수물) (PEMA)가 포함되지만 이에 국한되지 않는, 카르복실 기를 추가하는 임의의 화합물을 이용하여 달성될 수 있다.

[0034] "항원성 모이어티"는 본원에서 이용된 바와 같이, 숙주 면역계에 의해 인식되는 임의의 모이어티, 예를 들면, 펩티드를 지칭한다. 항원성 모이어티의 실례에는 자가항원 및/또는 세균 또는 바이러스성 단백질, 펩티드 또는 성분이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이론에 의해 한정됨 없이, 카르복실화된 비드 자체가 면역계에 의해 인식될 수도 있지만, 거기에 더욱 부착된 것이 없는 카르복실화된 비드는 본 발명을 위해 "항원성 모이어티"로서 고려되지 않는다.

[0035] "나신 비드" 또는 "나신 입자" 또는 "나신 구체"는 본원에서 이용된 바와 같이, 카르복실화되지 않은 비드, 입자 또는 구체를 지칭한다.

[0036] "친염증성 매개체" 또는 "친염증성 폴리펩티드"는 본원에서 이용된 바와 같이, 개체에서 염증을 유도하거나, 유지하거나, 또는 연장하는 폴리펩티드 또는 이의 단편을 지칭한다. 친염증성 매개체의 실례에는 사이토킨과 케모킨이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0037] 입자는 임의의 입자 모양 또는 입체형태를 가질 수 있다. 하지만, 일부 구체예에서, 생체내에서 군생할 가능성이 더욱 낮은 입자를 이용하는 것이 바람직하다. 이들 구체예 내에 입자의 실례는 구형 모양을 갖는 것들이다.

[0038] 본 발명의 다른 양상은 음성 제타 전위를 갖고 항원성 모이어티가 없는 면역 변형된 입자를 포함하는 조성물에 관계한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 항원에 연계된 음성 제타 전위를 갖는 면역 변형된 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 추가의 구체예에서, 항원은 입자의 외측에 연계된다. 다른 추가의 구체예에서, 항원은 입자 내에 피포된다.

[0039] 본 발명의 또 다른 양상은 음성 제타 전위를 갖고 항원성 모이어티가 없는 면역 변형된 입자를 제조하기 위한 공정에 관계한다. 상기 공정은 음성 제타 전위를 갖는 면역 변형된 입자를 형성하는데 효과적인 조건 하에, 면역 변형된 입자 전구체를 완충액과 접촉시키는 것을 수반한다. 본 발명의 일부 구체예에서, 면역 변형된 입자 전구체는 공중합화에 의해 형성된다. 입자 미세구조는 공중합화의 방법에 의존할 수 있다.

[0040] 일부 구체예에서, 항원성 펩티드 분자는 접합체 분자 및/또는 링커 기에 의해 담체 입자 (가령, 면역 변형된 입자)에 연계된다. 일부 구체예에서, 담체 (가령, PLG 입자)에 항원성 펩티드 및/또는 아폽토시스 신호전달 분자의 커플링은 하나 또는 그 이상의 공유 및/또는 비-공유 상호작용을 포함한다. 일부 구체예에서, 항원성 펩티드는 음성 제타 전위를 갖는 담체 입자의 표면에 부착된다. 일부 구체예에서, 항원성 펩티드는 음성 제타 전위를 갖는 담체 입자 내에 피포된다.

[0041] 한 구체예에서, 면역 변형된 입자와 접촉하는 완충액은 염기성 pH를 가질 수 있다. 염기성 용액에 적합한 염기성 pH는 7.1, 7.5, 8.0, 8.5, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 그리고 13.5를 포함한다. 완충액은 또한, 임의의 적절한 염기와 이의 접합체로 만들어질 수 있다. 본 발명의 일부 구체예에서, 완충액은 제한없이, 중탄산나트륨, 중탄산칼륨, 중탄산리튬, 인산이수소칼륨, 인산이수소나트륨, 또는 인산이수소리튬 및 이들의 접합체를 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 한 구체예에서, 면역 변형된 입자는 공중합체를 내포한다. 이들 공중합체는 변하는 몰 비율을 가질 수 있다. 존재하는 면역 변형된 입자의 적절한 공중합체 비율은 80:20, 81:19, 82:18, 83:17, 84:16, 85:15, 86:14, 87:13, 88:12, 89:11, 90:10, 91:9, 92:8, 93:7, 94:6, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1, 또는 100:0일 수 있다. 다른 구체예에서, 공중합체는 정기적, 통계적, 선형, 분지된 (별, 솔, 또는 빗 모양 공중합체 포함) 공중합체일 수 있다. 일부 구체예에서, 공중합체 비율은 제한 없이, 폴리스티렌:폴리(비닐 카르복실산염)/80:20, 폴리스티렌: 폴리(비닐 카르복실산염)/90:10, 폴리(비닐 카르복실산염):폴리스티렌/80:20, 폴리(비닐 카르복실산염):폴리스티렌/90:10, 폴리유산: 폴리글리콜산/80:20, 또는 폴리유산: 폴리글리콜산/90:10일 수 있다.

[0043] 한 구체예에서, 입자는 리포솜이다. 추가의 구체예에서, 입자는 하기 몰 비율에서 하기 지질로 구성된 리포솜이다 - 30:30:40 포스파티딜콜린: 포스파티딜글리세롤: 콜레스테롤. 다른 추가의 구체예에서, 입자는 리포솜 내에 피포된다.

[0044] 각 입자가 크기에서 균일한 필요는 않지만, 이들 입자는 일반적으로, 항원 제시 세포 또는 다른 MPS 세포에서 식균작용을 촉발할 만큼 충분한 크기이어야 한다. 바람직하게는, 이들 입자는 용해도를 증강하고, 생체내에서 응집에 의해 유발된 가능한 합병증을 방지하고, 그리고 포음작용을 용이하게 하기 위해, 현미경적 또는 나노유효범위 크기이다. 입자 크기는 간질성 공간으로부터 림프구 성숙의 구역 내로 흡수에 대한 인자일 수 있다. 약 0.1㎛ 내지 약 10 ㎛의 직경을 갖는 입자는 식균작용을 촉발할 수 있다. 따라서 한 구체예에서, 입자는 이들 한계 내에 직경을 갖는다. 다른 구체예에서, 입자는 약 0.3 ㎛ 내지 약 5 ㎛의 직경을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 입자는 약 0.5 ㎛ 내지 약 3 ㎛의 직경을 갖는다. 추가의 구체예에서, 입자는 약 0.1 ㎛, 또는 약 0.2 ㎛ 또는 약 0.3 ㎛ 또는 약 0.4 ㎛ 또는 약 0.5 ㎛ 또는 약 1.0 ㎛ 또는 약 1.5 ㎛ 또는 약 2.0 ㎛ 또는 약 2.5 ㎛ 또는 약 3.0 ㎛ 또는 약 3.5 ㎛ 또는 약 4.0 ㎛ 또는 약 4.5 ㎛ 또는 약 5.0 ㎛의 크기를 갖는다. 특정 구체예에서, 입자는 약 0.5 ㎛의 크기를 갖는다. 일부 구체예에서, 이들 입자의 전반적인 중량은 약 10,000 kDa보다 적거나, 약 5,000 kDa보다 적거나, 또는 약 1,000 kDa, 500 kDa, 400 kDa, 300 kDa, 200 kDa, 100 kDa, 50 kDa, 20 kDa, 10 kDa보다 적다. 조성물 내에서 이들 입자는 균일한 직경일 필요가 없다. 실례로서, 제약학적 제제는 복수의 입자를 내포할 수 있고, 이들 중에서 일부는 약 0.5 ㎛이고, 반면 다른 일부는 약 1.0 ㎛이다. 이들 소정의 범위 내에 입자 크기의 임의의 혼합물이 유용할 것이다.

[0045] 본 발명의 입자는 특정 제타 전위를 소유할 수 있다. 일정한 구체예에서, 제타 전위는 음성이다. 한 구체예에서, 제타 전위는 약 -100 mV보다 적다. 한 구체예에서, 제타 전위는 약 -50 mV보다 적다. 일정한 구체

예에서, 이들 입자는 -100 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 소유한다. 추가의 구체예에서, 이들 입자는 -75 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 소유한다. 추가의 구체예에서, 이들 입자는 -60 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 소유한다. 추가의 구체예에서, 이들 입자는 -50 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 소유한다. 또 다른 추가의 구체예에서, 이들 입자는 -40 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 소유한다. 추가의 구체예에서, 이들 입자는 -30 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 소유한다. 추가의 구체예에서, 이들 입자는 -20 mV 내지 +0 mV의 제타 전위를 소유한다. 추가의 구체예에서, 이들 입자는 -10 mV 내지 -0 mV의 제타 전위를 소유한다. 특정 구체예에서, 이들 입자는 -50 mV 내지 -40 mV의 제타 전위를 소유한다.

[0046] 일부 구체예에서, 담체의 전하 (가령, 양성, 음성, 중성)는 적용-특정한 이익 (가령, 생리학적 적합성, 유익한 표면-펩티드 상호작용 등)을 부여하도록 선별된다. 일부 구체예에서, 담체는 순 중성 또는 음성 전하를 갖는다 (가령, 일반적으로, 순 음성 전하를 갖는 세포 표면에 비특이적 결합을 감소시키기 위해). 일정한 구체예에서, 담체는 관용이 요망되는 항원 (또한, 본원에서 항원-특이적 펩티드, 항원성 펩티드, 자가항원, 유도 항원 또는 면역관용 항원으로 지칭됨)에 직접적으로 또는 간접적으로 접합될 수 있다. 일부 경우에, 담체는 항원-특이적 펩티드의 복수 사본, 또는 복수의 상이한 펩티드를 갖기 위해, 표면 상에 노출된 복수 결합 부위 (가령, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10… 20… 50… 100, 또는 그 이상)를 갖는다 (가령, 관용 반응의 가능성을 증가시키기 위해). 일부 구체예에서, 담체는 단일 유형의 항원성 펩티드를 전시한다. 일부 구체예에서, 담체는 표면 상에서 복수의 상이한 항원성 펩티드를 전시한다. 일부 구체예에서, 담체 표면은 선별된 모이어티 (가령, 항원성 펩티드)의 공유 부착을 위한 기능기를 전시한다. 일부 구체예에서, 담체 표면 기능기는 선별된 모이어티 (가령, 항원성 펩티드)와의 비-공유 상호작용을 위한 부위를 제공한다. 일부 구체예에서, 담체는 접합 모이어티가 화학적 결합 형성 없이 흡착될 수 있는 표면을 갖는다.

[0047] 일부 구체예에서, 입자는 비-금속성이다. 이들 구체예에서, 입자는 중합체로부터 형성될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 입자는 개체에서 생물분해성이다. 이러한 구체예에서, 이들 입자는 개체에서 입자의 축적 없이 개체에서 교차 복수 분량으로 제공될 수 있다. 적합한 입자의 실례는 폴리스티렌 입자, PLGA 입자, 그리고 다이아몬드 입자를 포함한다.

[0048] 바람직하게는, 입자 표면은 비특이적 또는 원치 않는 생물학적 상호작용을 최소화하는 물질로 구성된다. 입자 표면과 간질 사이에 상호작용은 림프 흡수에서 일정한 역할을 하는 인자일 수 있다. 입자 표면은 비특이적 상호작용을 예방하거나 또는 감소시키는 물질로 코팅될 수 있다. 입자를 친수성 층, 예를 들면, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)와 이의 공중합체, 예를 들면, PLURONICS (폴리(에틸렌 글리콜)-b1-폴리(프로필렌 글리콜)-b1-폴리(에틸렌 글리콜)의 공중합체 포함)으로 코팅함으로써 입체 안정화는 피하 주사 이후에 향상된 림프 흡수에 의해 증명된 바와 같이, 간질의 단백질과의 비특이적 상호작용을 감소시킬 수 있다. 이들 모든 사실은 림프 흡수의 면에서 이들 입자의 물리적 성질의 유의성을 지적한다. 중합체 및/또는 입자 및/또는 층의 전부 또는 일부를 만드는데 생물분해성 중합체가 이용될 수 있다. 생물분해성 중합체는 예로서, 용액 내에서 물과 반응하는 기능기의 결과에 의해 분해를 겪는다. 용어 "분해"는 본원에서 이용된 바와 같이, 분자량의 감소에 의해 또는 소수성 기의 친수성 기로의 전환에 의해 가용성이 된다는 것을 지칭한다. 에스테르 기를 갖는 중합체, 예를 들면, 폴리락티드와 폴리글리콜리드는 일반적으로, 자발성 가수분해에 종속된다.

[0049] 본 발명의 입자는 또한, 추가 성분을 내포할 수 있다. 예로서, 담체는 영상화 작용제가 담체에 통합되거나 또는 접합된다. 현재 상업적으로 가용한 영상화 작용제를 갖는 담체 나노스피어의 실례는 Kodak X-시야 나노스피어이다. 양자점 (QDs)으로서 알려져 있는 무기 양자-국한된 발광 나노결정은 FRET 적용에서 이상적인 공여자로서 부상하였다: 이들의 높은 양자 수율과 조정가능한 크기-의존성 스토크스 이동은 단일 자외선 파장에서 여기될 때, 상이한 크기가 청색에서부터 적외까지 방출할 수 있도록 허용한다. (Bruchez, et al., Science, 1998, 281, 2013; Niemeyer, C. M Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 5796; Waggoner, A. Methods Enzymol. 1995, 246, 362; Brus, L. E. J. Chem. Phys. 1993, 79, 5566). 양자점, 예를 들면, 덴드리머로서 알려져 있는 한 부류의 중합체에 기초된 하이브리드 유기/무기 양자점이 생물학적 표지화, 영상화, 그리고 광학 생물감지 시스템에서 이용될 수 있다. (Lemon, et al., J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 12886). 무기 양자점의 전통적인 합성과 달리, 이들 하이브리드 양자점 나노입자의 합성은 높은 온도 또는 고도로 독성, 불안정한 시약을 필요로 하지 않는다. (Etienne, et al., Appl. Phys. Lett. 87, 181913, 2005).

[0050] 입자는 넓은 범위의 물질로부터 형성될 수 있다. 입자는 바람직하게는, 생물학적 이용에 적합한 물질로 구성된다. 예로서, 입자는 유리, 실리카, 히드록시 카르복실산의 폴리에스테르, 디카르복실산의 폴리무수물, 또는 히드록시 카르복실산과 디카르복실산의 공중합체로 구성될 수 있다. 더욱 일반적으로, 담체 입자는 직쇄 또는 분지된, 치환된 또는 치환되지 않은, 포화된 또는 불포화된, 선형 또는 교차-연결된, 알카닐, 할로알킬,

티오알킬, 아미노알킬, 아릴, 아르알킬, 알케닐, 아르알케닐, 헤테로아릴, 또는 알콕시 히드록시 산의 폴리에스테르, 또는 직쇄 또는 분지된, 치환된 또는 치환되지 않은, 포화된 또는 불포화된, 선형 또는 교차-연결된, 알카닐, 할로알킬, 티오알킬, 아미노알킬, 아릴, 아르알킬, 알케닐, 아르알케닐, 헤테로아릴, 또는 알콕시 디카르복실산의 폴리무수물로 구성될 수 있다. 부가적으로, 담체 입자는 양자점이거나, 또는 양자점으로 구성될 수 있다, 예를 들면, 양자점 폴리스티렌 입자이다 (Joumaa et al. (2006) Langmuir 22: 1810-6). 에스테르와 무수물 결합의 혼합물 (가령, 글리콜산과 세바스산의 공중합체)을 포함하는 담체 입자 역시 이용될 수 있다. 예로서, 담체 입자는 폴리글리콜산 중합체 (PGA), 폴리유산 중합체 (PLA), 폴리세바스산 중합체 (PSA), 폴리(유산-코-글리콜산) 공중합체 (PLGA 또는 PLG; 이들 용어는 교체가능하다), [로]올리(유산-코-세바스산) 공중합체 (PLSA), 폴리(글리콜산-코-세바스산) 공중합체 (PGSA) 등을 포함하는 물질을 포함할 수 있다. 본 발명에서 유용한 다른 생체적합성, 생물분해성 중합체는 카프로락톤, 탄산염, 아미드, 아미노산, 오르토에스테르, 아세탈, 시아노아크릴레이트와 분해성 우레탄의 중합체 또는 공중합체뿐만 아니라 직쇄 또는 분지된, 치환된 또는 치환되지 않은, 알카닐, 할로알킬, 티오알킬, 아미노알킬, 알케닐, 또는 방향족 히드록시- 또는 디-카르복실산과 이들의 공중합체를 포함한다. 이에 더하여, 반응성 측쇄 기, 예를 들면, 리신, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 티로신과 시스테인, 또는 이들의 거울상이성질체를 갖는 생물학적으로 중요한 아미노산은 항원 펩티드와 단백질에 접합하기 위한 반응성 기 또는 접합 모이어티를 제공하기 위해, 임의의 전술한 물질과의 공중합체에 포함될 수 있다. 본 발명에 적합한 생물분해성 물질은 다이아몬드, PLA, PGA, 그리고 PLGA 중합체를 포함한다. 생체적합성이지만 비-생물분해성 물질 역시 본 발명의 담체 입자에서 이용될 수 있다. 예로서, 아크릴레이트, 에틸렌-비닐 아세트산염, 아실 치환된 셀룰로오스 아세트산염, 비-분해성 우레탄, 스티렌, 비닐 염화물, 비닐 불소, 비닐 이미다졸, 클로로술폰화된 올레핀, 에틸렌 산화물, 비닐 알코올, TEFLON® (DuPont, Wilmington, Del.), 그리고 나일론의 비-생물분해성 중합체가 이용될 수 있다.

[0051] 현재 상업적으로 가용한 적합한 비드는 폴리스티렌 비드, 예를 들면, FluoSpheres (Molecular Probes, Eugene, Oreg.)를 포함한다.

[0052] 일부 구체예에서, 본 발명은 (a) 개체에 화학적 및/또는 생물학적 작용제의 전달을 위해 형성된 전달 골격; 그리고 (b) 항원-특이적 관용의 유도를 위한 항원-연계된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자를 포함하는 시스템을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 전달 골격의 최소한 일부분은 미소다공성이다. 일부 구체예에서, 항원-연계된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 상기 골격 내에 피포된다. 일부 구체예에서, 화학적 및/또는 생물학적 작용제는 단백질, 펩티드, 소형 분자, 핵산, 세포, 그리고 입자로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 화학적 및/또는 생물학적 작용제는 세포를 포함하고, 그리고 상기 세포는 췌장 도세포를 포함한다.

[0053] 물리적 성질은 또한, 미성숙 림프구를 갖는 구역에서 흡수와 체류 후 나노입자의 유용성에 관련된다. 이들은 기계적 성질, 예를 들면, 경축 또는 고무같음을 포함한다. 일부 구체예는 PEG에서처럼, 최근에 개발되고 전신 (하지만 표적화되거나 또는 면역이 아님) 전달에 의해 특징화된 PPS-PEG 시스템에서처럼, 고무상 코어, 예를 들면, 덧층, 예를 들면, 친수성 덧층을 갖는 폴리(프로필렌 황화물) (PPS) 코어에 기초된다. 고무상 코어는 폴리스티렌 또는 금속 나노입자 시스템에서처럼 실제적으로 경직 코어에 대조적이다. 용어 고무상은 자연 또는 합성 고무 이외에 일정한 탄성 물질을 지칭하는데, 고무상은 중합체 분야의 당업자들에게 익숙한 용어이다. 예로서, 소수성 고무상 코어를 형성하기 위해 교차-연결된 PPS가 이용될 수 있다. PPS는 산화 조건 하에 폴리술폭시드 및 최종적으로 폴리술폰으로 분해되어, 소수성 고무에서 친수성, 수용성 중합체로 이행하는 중합체이다. 다른 황화물 중합체가 이용을 위해 적합될 수 있는데, 용어 황화물 중합체는 mer의 중추 내에 황을 갖는 중합체를 지칭한다. 이용될 수 있는 다른 고무상 중합체는 약 37℃보다 낮은, 수화된 조건 하에 유리 전이 온도를 갖는 폴리에스테르이다. 소수성 코어는 친수성 덧층과 함께 유리하게 이용될 수 있는데, 그 이유는 이러한 코어와 덧층이 섞이지 않는 경향이 있고, 따라서 덧층이 코어로부터 외부로 입체적으로 확장하는 경향이 있기 때문이다. 코어는 자신 위에 층을 갖는 입자를 지칭한다. 층은 코어의 최소한 일부분을 덮는 물질을 지칭한다. 층은 흡착되거나 또는 공유적으로 결합될 수 있다. 입자 또는 코어는 속이 차있거나 또는 속이 비어있을 수 있다. 고무상 소수성 코어는 소수성 약물의 더욱 높은 로딩이 고무상 소수성 코어를 갖는 이들 입자에 의해 운반될 수 있다는 점에서, 경직 소수성 코어, 예를 들면, 결정성 또는 유리질 (폴리스티렌의 경우에서처럼) 코어보다 유리하다.

[0054] 다른 물리적 성질은 표면의 친수성이다. 친수성 물질은 교차연결되지 않을 때, 물에서 리터당 최소한 1 그램의 용해도를 가질 수 있다. 친수성 중합체를 갖는 입자의 입체 안정화는 비특이적 상호작용을 감소시킴으로써 간질로부터 흡수를 향상시킬 수 있다; 하지만, 이들 입자의 증가된 잠행 성격은 또한, 미성숙 림프구를 갖는 구역에서 포식 세포에 의한 내재화를 감소시킬 수 있다. 하지만, 이들 경쟁하는 특질을 균형잡는 과제에 직면하였고, 그리고 본 출원은 림프절 내에 DC와 다른 APC에 효과적인 림프 전달을 위한 나노입자의 창출을 보도한다. 일부

구체예는 친수성 성분, 예를 들면, 친수성 물질의 층을 포함한다. 적합한 친수성 물질의 실례는 폴리알킬렌 산화물, 폴리에틸렌 산화물, 다당류, 폴리아크릴산, 그리고 폴리에테르 중에서 하나 또는 그 이상이다. 층 내에 중합체의 분자량은 생체내에서 유용한 정도의 입체 장해를 제공하기 위해 조정될 수 있다, 예를 들면, 약 1,000 내지 약 100,000 또는 그 이상일 수 있다; 당업자는 명백히 언급된 범위 내에 모든 범위와 값, 예를 들면, 10,000 내지 50,000이 예기된다는 것을 즉시 인지할 것이다.

[0055] 나노입자는 추가 반응을 위한 기능기를 함입할 수 있다. 추가 반응을 위한 기능기는 친전자체 또는 친핵체를 포함한다; 이들은 다른 분자와 반응하는데 편의하다. 친핵체의 실례는 일차 아민, 티올, 그리고 히드록실이다. 친전자체의 실례는 숙신이미딜 에스테르, 알데히드, 이소시아네이트, 그리고 말레이미드이다.

[0056] 항원성 펩티드와 단백질을 담체에 접합하기 위해, 당분야에서 널리 공지된 매우 다양한 수단이 이용될 수 있다. 이들 방법은 항원 펩티드와 단백질의 생물학적 활성을 파괴하거나 또는 심하게 제한하지 않고, 그리고 충분한 숫자의 항원 펩티드와 단백질이 이러한 항원 펩티드 또는 단백질과 동계 T 세포 수용체의 상호작용을 허용하는 방향으로 담체에 접합될 수 있도록 하는 임의의 표준 화학을 포함한다. 일반적으로, 항원 펩티드 또는 단백질의 C-말단 영역, 또는 항원 펩티드 또는 단백질 융합 단백질의 C-말단 영역을 소득자에 접합하는 방법이 바람직하다. 정확한 화학은 당연히, 소득자 물질의 성격, 항원 펩티드 또는 단백질에 C-말단 융합의 존재 또는 부재, 및/또는 접합 모이어티의 존재 또는 부재에 의존할 것이다.

[0057] 기능기는 이용가능성을 위해 필요에 따라, 입자 상에 위치될 수 있다. 한 위치는 코어 위에 층인 코어 중합체 또는 중합체들 상에서 또는 입자에 달리 묶인 중합체 상에서 측기 또는 말단일 수 있다. 예로서, 특정한 세포 표적화 또는 단백질과 펩티드 약물 전달을 위해 쉽게 기능화될 수 있는 나노입자를 안정시키는 PEG를 설명하는 실례가 본원에서 포함된다.

[0058] 접합체, 예를 들면, 에틸렌 카르보디이미드 (ECDI), 헥사메틸렌 디이소시아네이트, 2개의 에폭시 잔기를 내포하는 프로필렌글리콜 디-글리시딜에테르, 그리고 에피클로로히드린이 펩티드 또는 단백질을 담체 표면에 고정하는데 이용될 수 있다. 이론에 의해 한정됨 없이, ECDI는 관용의 유도를 위한 2가지 주요 기능을 수행하는 것으로 의심된다: (a) 이것은 유리 아미노와 유리 카르복실 기 사이에 펩티드 결합 형성의 촉매작용을 통해, 이들 단백질/펩티드를 세포 표면에 화학적으로 연계한다; 그리고 (b) 이것은 담체가 아폽토시스성 세포 사멸을 모방하도록 유도하고, 따라서 이들은 비장 내에 숙주 항원 제시 세포에 의해 수거되고 관용을 유도한다. 비-면역원성 방식에서 숙주 T-세포에 대한 이러한 표현은 자가반응성 세포에서 무반응의 직접적인 유도를 야기한다. 이에 더하여, ECDI는 특정한 조절 T 세포의 유도를 위한 유력한 자극으로서 역할한다.

[0059] 일련의 구체예에서, 이들 항원 펩티드와 단백질은 공유 화학 결합을 통해 담체에 결합된다. 예로서, 항원의 C-말단 인근에 반응성 기 또는 모이어티 (가령, C-말단 카르복실 기, 또는 아미노산 측쇄로부터 히드록실, 티올, 또는 아민 기)는 직접적인 화학 반응에 의해, 담체의 표면 상에서 반응성 기 또는 모이어티 (가령, PLA 또는 PGA 중합체의 히드록실 또는 카르복실 기, 덴드리머의 종말 아민 또는 카르복실 기, 또는 인지질의 히드록실, 카르복실 또는 인산염 기)에 직접적으로 접합될 수 있다. 대안으로, 항원 펩티드와 단백질 및 담체 둘 모두에 공유적으로 접합하고, 따라서 이들을 함께 연결하는 접합 모이어티가 있을 수도 있다.

[0060] 담체의 표면 상에서 반응성 카르복실 기는 이들을 예로서, 1-에틸-3-[3,9-디메틸 아미노프로필] 카르보디이미드 염산염 (EDC) 또는 N-히드록시숙신이미드 에스테르 (NHS)와 반응시킴으로써, 항원 펩티드 또는 단백질 상에 유리 아민 (가령, Lys 잔기로부터)에 결합될 수 있다. 유사하게, 동일한 화학이 담체의 표면 상에서 유리 아민을 항원 펩티드 또는 단백질 상에서 유리 카르복실 (가령, C-말단으로부터, 또는 Asp 또는 GIu 잔기로부터)과 접합하는데 이용될 수 있다. 대안으로, 담체의 표면 상에서 유리 아민 기는 Arano et al. (199I) Chem. 2:71-6에 의해 본질적으로 설명된 바와 같이, 술포-SIAB 화학을 이용하여 항원 펩티드와 단백질, 또는 항원 펩티드 또는 단백질 융합 단백질에 공유적으로 결합될 수 있다.

[0061] 다른 구체예에서, 항원 펩티드 또는 단백질에 결합된 리간드 및 담체에 부착된 항-리간드 사이에 비-공유 결합이 항원을 담체에 접합할 수 있다. 예로서, 비오틴 리가아제 인식 서열 태그는 항원 펩티드 또는 단백질의 C-말단에 결합될 수 있고, 그리고 이러한 태그는 비오틴 리가아제에 의해 비오틴화될 수 있다. 비오틴은 이후, 항원 펩티드 또는 단백질을 항-리간드로서 담체의 표면에 흡착되거나 또는 만약 그렇지 않으면 결합되는 아비딘 또는 스트렙타비딘에 비-공유적으로 접합하는 리간드로서 역할한다. 대안으로, 항원 펩티드와 단백질이 전술한 바와 같이, Fc 영역을 보유하는 면역글로불린 도메인에 융합되면, Fc 도메인은 리간드로서 기능하고, 그리고 담체의 표면에 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합된 단백질 A는 항원 펩티드 또는 단백질을 담체에 비-공유적으로 접합하기 위한 항-리간드로서 역할한다. 금속 이온 킬레이트화 기술 (가령, 항원 펩티드 또는 단백질 또는 항원

펩티드 또는 단백질 융합 단백질의 C-말단에서 폴리-His 태그, 그리고 Ni^{+}-코팅된 담체를 이용)을 비롯하여, 항원 펩티드와 단백질을 담체에 비-공유적으로 접합하는데 이용될 수 있는 다른 수단이 당분야에서 널리 공지되고, 그리고 이들 방법은 여기서 설명된 것들을 대신할 수 있다.

[0062] 플랫폼 분자에 핵산 모이어티의 접합은 많은 방식으로 달성될 수 있고, 핵산 모이어티와 플랫폼 분자 상에서 하나 또는 그 이상의 교차결합 작용제와 기능기를 전형적으로 필요로 한다. 연결기는 표준 합성 화학 기술을 이용하여 플랫폼에 첨가된다. 연결기는 표준 합성 기술을 이용하여 핵산 모이어티에 첨가될 수 있다. 의사는 본 발명의 조합에서 이용된 항원에 대한 다수의 선택을 갖는다. 조합으로 존재하는 유도 항원은 유도되는 면역관용성 반응의 특이성에 기여한다. 이것은 원치 않는 면역학적 반응에 대한 표적이고, 그리고 관용이 요망되는 치료되는 개체에서 존재하거나 또는 배치되는 항원인 표적 항원과 동일하거나 또는 동일하지 않을 수 있다.

[0063] 본 발명의 유도 항원은 점막 결합 성분과 합동될 때 이러한 설명에 따라 관용을 유도하는 능력을 갖는다면, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 탄수화물, 당지질, 또는 생물학적 공급원으로부터 단리된 다른 분자이거나, 또는 이것은 생물학적 물질의 화학적으로 합성된 소형 분자, 중합체, 또는 유도체일 수 있다.

[0064] 일부 구체예에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 펩티드, 폴리펩티드, 및/또는 단백질에 연계된 담체 (가령, 면역 변경 입자)를 제공한다. 일부 구체예에서, 담체 (가령, PLG 담체), 예를 들면, 본원에서 설명된 것들은 항원-특이적 관용을 유도하고 및/또는 면역 관련된 질환 (가령, 생쥐 모델에서 EAE)의 시작을 예방하고 및/또는 기존의 면역 관련된 질환의 심각도를 축소하는데 효과적이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 조성물과 방법은 T 세포가 T-세포 활성화와 연관된 초기 이벤트를 착수하도록 유발할 수 있지만, T-세포가 작동체 기능을 획득하는 것을 허용하지 않는다. 예로서, 본 발명의 조성물의 투여는 유사-활성화된 표현형, 예를 들면, CD69 및/또는 CD44 상향조절을 갖는 T-세포를 유발할 수 있지만, 예로서 IFN-γ 또는 IL-17 합성의 결여에 의해 지시되는 작동체 기능을 전시하지 않는다. 일부 구체예에서, 본 발명의 조성물의 투여는 경험 없는 항원-특이적 T-세포의 조절 표현형으로의 전환을 갖지 않는 유사-활성화된 표현형을 갖는 T-세포, 예를 들면, $CD25^{+/}Foxp3^{+}$ 표현형을 갖는 것들을 유발한다.

[0065] 일부 구체예에서, 담체 (가령, 입자)의 표면은 담체에 대한 항원성 펩티드 및/또는 다른 기능적 원소의 부착 (가령, 공유적으로, 비-공유적으로)을 허용하는 화학적 모이어티 및/또는 기능기를 포함한다. 일부 구체예에서, 담체 (가령, 입자) 상에서 화학적 모이어티 및/또는 기능기의 숫자, 방향, 이격 등은 담체 화학, 원하는 적용 등에 따라 변한다.

[0066] 일부 구체예에서, 담체는 담체에 부착된, 담체 상에 흡착된, 담체 내에 피포된, 및/또는 담체 전역에 내포된 하나 또는 그 이상의 생물학적 또는 화학적 작용제를 포함한다. 일부 구체예에서, 화학적 또는 생물학적 작용제는 이들 입자 내에 피포되고 및/또는 이들 입자 전역에 내포된다. 본 발명은 화학적 또는 생물학적 작용제의 성격에 의해 제한되지 않는다. 이런 작용제에는 단백질, 핵산 분자, 소형 분자 약물, 지질, 탄수화물, 세포, 세포 성분 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 일부 구체예에서, 2개 또는 그 이상 (가령, 3, 4, 5개 등)의 상이한 화학적 또는 생물학적 작용제가 담체 상에 또는 담체 내에 포함된다. 일부 구체예에서, 작용제는 특정한 방출 속도를 위해 형성된다. 일부 구체예에서, 복수의 상이한 작용제는 상이한 방출 속도를 위해 형성된다. 예로서, 첫 번째 작용제는 수시간의 기간에 걸쳐 방출되고, 반면 두 번째 작용제는 더욱 긴 기간 (가령, 수일, 수주, 수개월 등)에 걸쳐 방출된다. 일부 구체예에서, 담체 또는 이의 부분은 생물학적 또는 화학적 작용제의 느린-방출을 위해 형성된다. 일부 구체예에서, 느린 방출은 최소한 30 일 (가령, 40 일, 50 일, 60 일, 70 일, 80 일, 90 일, 100 일, 180 일 등)의 기간에 걸쳐 작용제의 생물학적으로 활동성 양의 방출을 제공한다. 일부 구체예에서, 담체 또는 이의 부분은 구멍 내로 세포의 내성장을 허용할 만큼 충분히 다공성이도록 형성된다. 구멍의 크기는 관심되는 특정 세포 유형 및/또는 원하는 내성장의 양에 대해 선별될 수 있다.

[0067] 본 발명의 입자에서 항원, 생물학적 작용제, 및/또는 화학적 작용제의 피포는 놀랍게도, 면역 관용을 유도하고 여러 이점을 갖는 것으로 밝혀졌다. 첫 번째, 피포된 입자는 더욱 느린 사이토킨 반응을 갖는다. 두 번째, 복수의 항원, 생물학적 작용제, 및/또는 화학적 작용제를 이용할 때, 피포는 이들 작용제가 입자의 표면에 부착되면 일어나지도 모르는 이들 다양한 분자 사이에 경쟁을 제거한다. 세 번째, 피포는 더욱 많은 항원, 생물학적 작용제, 및/또는 화학적 작용제가 입자에 통합되도록 허용한다. 네 번째, 피포는 복합체 단백질 항원 또는 장기 균질액 (가령, 1형 당뇨병의 경우에 췌장 균질액 또는 땅콩 알레르기에서 땅콩 추출물)의 더욱 쉬운 이용을 허용한다. 최종적으로, 입자의 표면에 접합 대신에 입자 내에 항원, 생물학적 작용제, 및/또는 화학적 작용제의 피포는 입자의 표면 상에서 순 음성 전하를 유지한다.

[0068] 일정한 구체예에서, 본 발명은 그 위에 (또는 그 안에) 세포 또는 다른 생물학적 또는 화학적 작용제를 갖는 담체를 제공한다. 세포가 이용되는 경우에, 담체는 특정 유형의 세포에 국한되지 않는다. 일부 구체예에서, 이들 담체는 그 위에 췌장 도세포를 갖는다. 일부 구체예에서, 미소다공성 담체는 그 위에 ECM 단백질 및/또는 엑센딘-4를 부가적으로 갖는다. 이들 담체는 특정 유형에 국한되지 않는다. 일부 구체예에서, 담체는 변하는 다공성(가령, 변하는 구멍 크기, 구멍 깊이, 및/또는 구멍 밀도)의 영역을 갖는다. 일부 구체예에서, 담체는 그 위에 (또는 그 안에) 제약학적 작용제, DNA, RNA, 세포외 기질 단백질, 엑센딘-4 등을 갖는다. 일정한 구체예에서, 본 발명은 췌장 도세포를 이런 담체에 이식하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 일정한 구체예에서, 유도 항원은 단일 단리된 또는 재조합적으로 생산된 분자이다. 표적 항원이 숙주 내에 다양한 위치에 파종성인 질환을 치료하기 위해, 유도 항원은 표적 항원과 동일하거나 또는 표적 항원에 면역학적으로 관련되는 것이 일반적으로 필요하다. 이런 항원의 실례는 대부분의 폴리뉴클레오티드 항원, 그리고 일부 탄수화물 항원 (가령, 혈액형 항원)이다.

[0069] 임의의 적절한 항원은 본 발명의 범위 내에서 용도를 발견한다. 일부 구체예에서, 유도 항원은 유도되는 면역관용성 반응의 특이성에 기여한다. 유도 항원은 원치 않는 면역학적 반응에 대한 표적이고, 그리고 관용이 요망되는 치료되는 개체에서 존재하거나 또는 배치되는 항원인 표적 항원과 동일하거나 또는 동일하지 않을 수 있다.

[0070] 표적 항원이 특정 장기, 세포, 또는 조직 유형 상에서 우선적으로 발현되는 경우에, 의사는 다시 한 번, 표적 항원과 동일하거나 또는 표적 항원에 면역학적으로 관련된 유도 항원을 이용하는 옵션을 갖는다. 하지만, 표적에 대해 방관자인 항원을 이용하는 추가 옵션이 또한 있다. 이것은 표적 항원에 면역학적으로 관련되지 않을 수도 있지만, 표적 항원이 발현되는 조직에서 우선적으로 발현되는 항원이다. 방관자 억제의 유용성에 관한 작업 이론은 억제가 표적 세포에서 면역 반응의 작동체 팔을 하향조절하는 활동성 세포-매개된 과정이라는 것이다. 억제세포는 구체적으로, 점막 표면에서 유도인자 항원에 의해 자극되고, 그리고 방관자 항원이 우선적으로 발현되는 조직 부위로 귀소한다. 상호작용 또는 사이토킨-매개된 기전을 통해, 국부적인 억제세포는 이후, 이들이 무엇에 대해 반응성 인지에 상관없이, 이웃에서 작동체 세포 (또는 작동체 세포의 유도인자)를 하향조절한다. 작동체 세포가 유도 항원과 상이한 표적에 대해 특이적이면, 그 결과는 방관자 효과이다. 방관자 반응 및 이러한 효과를 갖는 면역관용성 펩티드의 목록의 더욱 상세를 위해, 독자는 국제 특허 공개 WO 93/16724를 참조한다. 방관자 이론의 함의는 당업자가 본 발명을 실시하기 위해 관용이 요망되는 특정 표적 항원을 확인하거나 또는 단리할 필요가 없다는 것이다. 의사는 유도 항원으로서 이용을 위한 표적 부위에서 우선적으로 발현된 최소한 하나의 분자를 단지 획득할 수 있기만 하면 된다.

[0071] 본 발명의 일정한 구체예에서, 유도 항원은 치료되는 개체에서 발현된 것과 동일한 형태에 있지 않지만, 이의 단편 또는 유도체이다. 본 발명의 유도 항원은 적절한 특이성의 분자에 기초되지만, 단편화, 잔기 치환, 표지화, 접합, 및/또는 다른 기능적 성질을 갖는 펩티드와의 융합에 의해 적합된 펩티드를 포함한다. 적합은 임의의 바람직하지 않은 성질, 예를 들면, 독성 또는 면역원성을 제거하거나; 또는 임의의 바람직한 성질, 예를 들면, 점막 결합, 점막 침투, 또는 면역 반응의 면역관용성 팔의 자극을 증강하는 것이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 임의의 바람직한 목적을 위해 수행될 수 있다. 용어, 예를 들면, 인슐린 펩티드, 콜라겐 펩티드, 그리고 수초 염기성 단백질 펩티드는 본원에서 이용된 바와 같이, 무손상 아단위뿐만 아니라 알로타입과 합성 변이체, 단편, 융합 펩티드, 접합체, 그리고 그것이 유사체가 되는 개별 분자의 최소한 10개, 바람직하게는 20개 연속성 아미노산에 상동성 (아미노산 수준에서 바람직하게는 70% 동일한, 더욱 바람직하게는 80% 동일한, 이보다 더욱 바람직하게는 90% 동일한)인 영역을 내포하는 다른 유도체를 지칭하고, 여기서 유도체의 상동성 영역은 표적 항원에 대한 관용을 유도하는 능력을 개별 부모 분자와 공유한다.

[0072] 유도 항원의 면역관용성 영역은 종종, 항체 반응의 자극을 위한 면역우세 에피토프와 상이한 것으로 인식된다. 면역관용성 영역은 일반적으로, T 세포를 수반하는 특정 세포 상호작용에서 제시될 수 있는 영역이다. 면역관용성 영역은 무손상 항원의 제시 시에 존재하고 관용을 유도할 수 있다. 일부 항원은 고유한 항원의 처리와 제시가 관용을 정상적으로 촉발하지 않는다는 점에서, 잠재 면역관용성 영역을 내포한다. 잠재 항원과 이들의 확인에 관한 상세는 국제 특허 공개 WO 94/27634에서 발견된다.

[0073] 본 발명의 일정한 구체예에서, 2개, 3개, 또는 더욱 높은 복수의 유도 항원이 이용된다. 복수의 표적 항원이 있을 때 이들 구체예를 실행하거나, 또는 표적에 대한 복수의 방관자를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 예로서, 인슐린과 글루카곤 둘 모두 당뇨병의 치료에서 점막 결합 성분과 혼합될 수 있다. 여러 가능한 대안 표적을 커버하는 항원의 칵테일을 제공하는 것이 또한, 바람직할 수 있다. 예로서, 조직적합성 항원 단편의 칵테일은 알려지지 않은 표현형의 동종이식편으로 장래 이식을 기대하는 개체에서 면역관용을 유도하는데 이용될 수 있다. 인간 백혈구 항원의 알로변이체 (allovariant) 영역은 당분야에 공지된다: 가령, Immunogenetics 29:231,

1989. 다른 실례에서, 알레르겐의 혼합물이 아토피의 치료를 위한 유도 항원으로서 역할한다.

[0074] 유도 항원은 분자의 성격에 따라, 당분야에 공지된 다수의 기술에 의해 제조될 수 있다. 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 그리고 탄수화물 항원은 이들이 농축된 치료되는 종의 세포로부터 단리될 수 있다. 짧은 펩티드는 아미노산 합성에 의해 편의하게 제조된다. 공지된 서열의 더욱 긴 단백질은 인코딩 서열을 합성하고 또는 인코딩 서열을 자연 공급원 또는 벡터로부터 PCR-증폭하고, 그리고 이후, 인코딩 서열을 적합한 세균 또는 진핵 숙주 세포에서 발현함으로써 제조될 수 있다.

[0075] 본 발명의 일정한 구체예에서, 조합은 세포 또는 조직으로부터 획득된 항원의 복합체 혼합물을 포함하고, 이들 중에서 하나 또는 그 이상은 유도 항원의 역할을 수행한다. 이들 항원은 무손상이거나 또는 고정제, 예를 들면, 포름알데히드, 글루타르알데히드, 또는 알코올로 처리된 전체 세포의 형태일 수 있다. 이들 항원은 세포 또는 조직의 세정제 용해화 또는 기계적 파열, 그 이후에 명료화에 의해 창출된, 세포 용해물의 형태일 수 있다. 이들 항원은 또한, 세포이하 분별, 특히 분별 원심분리와 같은 기술에 의한 원형질막의 농축, 임의선택적으로 그 이후에 세정제 용해화와 투석에 의해 획득될 수도 있다. 다른 분리 기술, 예를 들면, 가용화된 막 단백질의 친화성 또는 이온 교환 크로마토그래피 역시 적합하다.

[0076] 한 구체예에서, 항원성 펩티드 또는 단백질은 자가항원, 동종항원 또는 이식항원이다. 또 다른 특정 구체예에서, 자가항원은 수초 염기성 단백질, 콜라겐 또는 이의 단편, DNA, 핵과 핵인 단백질, 미토콘드리아 단백질 및 췌장 β-세포 단백질로 구성된 군에서 선택된다.

[0077] 본 발명은 관용이 요망되는 항원을 투여함으로써, 자가면역 질환의 치료를 위한 자가항원에 대한 관용의 유도를 제공한다. 예로서, 수초 염기성 단백질 (MBP)에 대한 자가항체는 다발성 경화증을 앓는 환자에서 관찰되고, 그리고 따라서, MBP 항원성 펩티드 또는 단백질은 다발성 경화증을 치료하고 예방하기 위해 본 발명의 조성물을 이용하여 전달되도록 본 발명에서 이용될 수 있다.

[0078] 다른 무제한적 실례로서, 이란성 쌍둥이로부터 이식에 대한 후보인 개체는 이식된 항원이 수용자에 외래이기 때문에, 이들 이식된 세포, 조직 또는 장기의 거부를 겪는다. 의도된 이식편에 수용자 개체의 사전 관용은 추후 거부를 제거하거나 또는 감소시킨다. 만성 항거부 요법의 감소 또는 제거가 본 발명의 실시에 의해 달성될 수 있다. 다른 실례에서, 많은 자가면역 질환은 내인성 항원 또는 자가항원에 대한 세포 면역 반응에 의해 특징된다. 내인성 항원에 대한 면역계의 관용은 상기 질환을 제어하는데 바람직하다.

[0079] 추가의 실례에서, 산업 오염물 또는 화학물질에 대한 개체의 감작화는 예로서, 현장에서 목격되고, 면역 반응의 위험을 야기한다. 특히 개체의 내인성 단백질과 반응된 화학물질의 형태에서 화학물질에 대한 개체의 면역계의 사전 관용은 면역 반응의 추후 직업적 발달을 예방하는데 바람직할 수 있다.

[0080] 알레르겐은 거기에 대한 면역 반응의 관용이 또한 요망되는 다른 항원이다. 한 구체예에서, 항원은 글리아딘이다. 추가의 구체예에서, 항원은 A-글리아딘이다.

[0081] 특히, 병원성 자가항원이 알려지지 않은 질환에서도, 방관자 억제는 해부학적 인근에 존재하는 항원을 이용하여 유도될 수 있다. 예로서, 콜라겐에 대한 자가항체는 류마티스성 관절염에서 관찰되고, 그리고 따라서, 콜라겐-인코딩 유전자는 류마티스성 관절염을 치료하기 위한 항원-발현 유전자 모듈로서 활용될 수 있다 (가령, Choy (2000) Curr Opin Investig Drugs 1 : 58-62를 참조한다). 게다가, 베타 세포 자가항원에 대한 관용은 1형 당뇨병의 진전을 예방하는데 활용될 수 있다 (가령, Bach and Chatenoud (2001) Ann Rev Immunol 19: 131-161을 참조한다).

[0082] 다른 실례로서, 수초 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG)에 대한 자가항체는 자가면역 뇌척수염과 많은 다른 CNS 질환뿐만 아니라 다발성 경화증에서 관찰된다 (가령, Iglesias et al. (2001) Glia 36: 22-34를 참조한다). 따라서, 본 발명에서 MOG 항원 발현 구조체의 이용은 다발성 경화증뿐만 아니라 중추신경계의 관련된 자가면역질환의 치료를 허용한다.

[0083] 자가면역 질환을 치료하는데 이용하기 위한 후보 자가항원의 또 다른 실례는 췌장 베타-세포 항원, 인슐린 의존성 진성당뇨병을 치료하기 위한 인슐린과 GAD; 류마티스성 관절염을 치료하는데 이용하기 위한 콜라겐 유형 11, 인간 연골 gp 39 (HCgp39)와 gp130-RAPS; 다발성 경화증을 치료하기 위한 수초 염기성 단백질 (MBP), 단백지질 단백질 (PLP)과 수초 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG, 상기 참조); 피부경화증을 치료하기 위한 피브릴라린, 그리고 작은 핵인 단백질 (snoRNP); 그레이브스병을 치료하는데 이용하기 위한 갑상선 자극 인자 수용체 (TSH-R); 전신성 홍반성 루푸스를 치료하는데 이용하기 위한 핵 항원, 히스톤, 당단백질 gp70과 리보솜 단백질; 원발성 담즙성 간경변을 치료하는데 이용하기 위한 피루브산염 탈수소효소 디히드로리포아미드 아세틸전달효소

(PCD-E2); 원형탈모증을 치료하는데 이용하기 위한 모낭 항원; 그리고 궤양성 대장염을 치료하는데 이용하기 위한 인간 트로포미오신 동종형 5 (hTM5)를 포함한다.

[0084] 조합은 단리된 세포로 또는 동물 모델에서 실험을 수행함으로써 관용을 증진하는 그들의 능력에 대해 조사될 수 있다.

[0085] 일부 구체예에서, 본 발명의 관용 유도 조성물은 아폽토시스 신호전달 분자 (가령, 항원성 펩티드 또는 다른 항원성 분자에 추가하여)를 내포한다. 일부 구체예에서, 아폽토시스 신호전달 분자는 담체의 표면에 연계되고 및/또는 담체의 표면과 연관된다. 일부 구체예에서, 아폽토시스 신호전달 분자는 담체가 숙주의 항원 제시 세포, 예를 들면, 숙주 세망내피계의 세포에 의해 아폽토시스체로서 지각될 수 있도록 한다; 이것은 관용-유도 방식으로, 연관된 펩티드 에피토프의 제시를 허용한다. 이론에 의해 한정됨 없이, 이것은 면역 세포 자극에 관련된 분자, 예를 들면, MHC 클래스 I/II, 그리고 공동자극성 분자의 상향조절을 예방하는 것으로 추정된다. 이들 아폽토시스 신호전달 분자는 또한, 식균 마커로서 역할할 수 있다. 예로서, 본 발명에 적합한 아폽토시스 신호전달 분자는 US 특허 출원 번호 20050113297에서 설명되었는데, 이것은 본원에 전체적으로 참조로서 편입된다. 본 발명에 적합한 분자는 대식세포, 수지상 세포, 단핵구와 호중구를 포함하는 식세포를 표적으로 하는 분자를 포함한다.

[0086] 일부 구체예에서, 아폽토시스 신호전달 분자로서 적합한 분자는 연관된 펩티드의 관용을 증강하는 기능을 한다. 부가적으로, 아폽토시스 신호전달 분자에 결합된 담체는 아폽토시스 세포 인식에서 Clq에 의해 결합될 수 있다 (Paidassi et al., (2008) J. Immunol. 180:2329-2338; 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된). 예로서, 아폽토시스 신호전달 분자로서 유용한 분자는 포스파티딜 세린, 아넥신-1, 아넥신-5, 유지방구-EGF-인자 8 (MFG-E8), 또는 트롬보스폰딘의 패밀리 (가령, 트롬보스폰딘-1 (TSP-1))을 포함한다. 본 발명에서 아폽토시스 신호전달 분자로서 이용에 적합한 다양한 분자는 예로서, U.S. 특허 출원 2012/0076831; 본원에서 전체적으로 참조로서 편입됨)에서 논의된다.

[0087] 일부 구체예에서, 아폽토시스 신호전달 분자는 항원-특이적 펩티드에 접합될 수 있다. 일부 경우에, 아폽토시스 신호전달 분자와 항원-특이적 펩티드는 융합 단백질의 창출에 의해 접합된다. 예로서, 융합 단백질은 아폽토시스 신호전달 분자의 최소한 하나의 분자 (또는 이의 단편 또는 변이체)에 연계된 최소한 하나의 항원-특이적 펩티드 (또는 이의 단편 또는 변이체)를 포함할 수 있다. 융합 단백질의 창출을 위해, 용어 "융합 단백질," "융합 펩티드," "융합 폴리펩티드," 및 "키메라 펩티드"는 교체가능하게 이용된다. 항원-특이적 펩티드의 적절한 단편은 본 발명의 원하는 항원-특이적 관용 기능을 산출하는 기능을 보유하는 전장 펩티드의 임의의 단편을 포함한다. 융합 단백질은 당분야에서 이해되는 다양한 수단 (가령, 유전자 융합, 화학적 접합 등)에 의해 창출될 수 있다. 이들 두 단백질은 직접적으로 또는 아미노산 링커를 거쳐 융합될 수 있다. 융합 단백질을 형성하는 폴리펩티드는 비록 이들이 C-말단에서 C-말단, N-말단에서 N-말단, 또는 N-말단에서 C-말단 연결될 수도 있긴 하지만, 전형적으로 C-말단에서 N-말단 연결된다. 융합 단백질의 폴리펩티드는 임의의 순서로 있을 수 있다. 각 폴리펩티드가 이차와 삼차 구조로 접히도록 담보하는데 충분한 거리에 의해 첫 번째와 두 번째 폴리펩티드 성분을 분리하기 위해 펩티드 링커 서열이 이용될 수 있다. 링커로서 유용하게 이용될 수 있는 아미노산 서열은 Maratea et. al., Gene 40:39-46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986); U.S. 특허 번호 4,935,233 및 U.S. 특허 번호 4,751,180에서 개시된 것들을 포함한다; 본원에 전체적으로 참조로서 편입된다. 링커 서열은 일반적으로, 길이에서 1 내지 약 50 아미노산이다. 일부 구체예에서, 링커 서열은 예로서, 첫 번째와 두 번째 폴리펩티드가 기능적 도메인을 분리하고 입체 간섭을 예방하는데 이용될 수 있는 비필수적인 N-말단 아미노산 영역을 가질 때, 필요하지 않고 및/또는 활용되지 않는다.

[0088] 면역관용성 활성에 대한 프록시는 표적 부위에서 적절한 사이토킨의 생산을 자극하는 무손상 항원 또는 단편의 능력이다. 표적 부위에서 T 억제세포에 의해 방출된 면역조절성 사이토킨은 TGF-β인 것으로 생각된다 (Miller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:421, 1992). 관용 동안 생산될 수 있는 다른 인자는 사이토킨 IL4와 IL-10, 그리고 매개체 PGE이다. 대조적으로, 활성 면역 파괴를 겪는 조직에서 림프구는 사이토킨, 예를 들면, IL-I, IL-2, IL-6, 그리고 γ-IFN을 분비한다. 따라서, 후보 유도 항원의 효능은 사이토킨의 적절한 유형을 자극하는 능력을 계량함으로써 평가될 수 있다.

[0089] 이를 염두에 두고, 유도 항원의 면역관용성 에피토프, 효과적인 점막 결합 성분, 효과적인 조합, 또는 점막 투여의 효과적인 방식과 일정에 대한 신속한 선별 검사는 동계 동물을 시험관내 세포 검정을 위한 공여자로서 이용하여 수행될 수 있다. 동물은 점막 표면에서 시험 조성물로 치료되고, 그리고 어느 때에 완전한 프로인드 어쥬번트에서 표적 항원의 비경구 투여로 공격된다. 비장 세포는 단리되고, 그리고 약 50 μg/mL의 농도에서 표적

항원의 존재에서 시험관내 배양된다. 표적 항원은 면역관용성 에피토프의 위치를 맵핑하기 위해, 후보 단백질 또는 하위단편으로 치환될 수 있다. 배지 내로 사이토킨 분비는 표준 면역검정에 의해 정량될 수 있다.

[0090] 다른 세포의 활성을 억제하는 이들 세포의 능력은 표적 항원으로 면역화된 동물로부터 단리된 세포를 이용하여, 또는 표적 항원에 반응성인 세포주를 창출함으로써 결정될 수 있다 (Ben-Nun et al., Eur. J. Immunol. 11:195, 1981, 본원에서 전체적으로 참조로서 편입됨). 이러한 실험의 한 가지 변이에서, 억제세포 개체군은 증식을 예방하기 위해 가볍게 방사선조사 (약 1000 내지 1250 라드)되고, 이들 억제인자는 반응세포와 공동배양되고, 그리고 이후, 삼중수소 티미딘 함입 (또는 MTT)이 반응자의 증식성 활성을 정량하는데 이용된다. 다른 변이에서, 억제세포 개체군 및 반응세포 개체군은 이중 챔버 트랜스웰 배양시스템 (Costar, Cambridge Mass.)의 위쪽과 아래쪽 수준에서 배양되고, 이것은 이들 개체군이 폴리카보네이트 막에 의해 분리된, 서로 1 mm 이내에서 공동배양하도록 허용한다 (WO 93/16724). 이러한 접근법에서, 억제세포 개체군의 방사선조사는 불필요한데, 그 이유는 이들 반응자의 증식성 활성이 개별적으로 계량될 수 있기 때문이다.

[0091] 표적 항원이 개체 내에 이미 존재하는 본 발명의 구체예에서, 항원을 단리하거나 또는 이를 점막 결합 성분과 미리 합동하는 것이 필요가 없다. 예로서, 항원은 병리학적 장애 (가령, 염증성 장 질환 또는 소아 지방변증)의 결과로서 또는 식품 알레르겐의 소화를 통해 일정한 방식으로 개체에서 발현될 수 있다. 시험은 하나 또는 그 이상의 분량 또는 제제에서 점막 결합 성분을 제공하고, 그리고 원지에서 항원에 대한 관용유도를 증진하는 능력을 결정함으로써 수행된다.

[0092] 특정한 질환의 치료를 위한 조성물과 투여 방식의 유용성은 또한, 상응하는 동물 질환 모델에서 상술될 수 있다. 질환의 증후학을 축소하거나 또는 지연하는 치료의 능력은 질환의 순환하는 생화학적 홀마크와 면역학적 홀마크, 병든 조직의 면역조직학, 그리고 이용되는 모델에 대해 적절한 육안적 임상적 특질의 수준에서 모니터링된다. 시험을 위해 이용될 수 있는 동물 모델의 무제한적 실례는 하기 섹션에서 포함된다.

[0093] 본 발명은 TH1 반응, TH2 반응, TH17 반응, 또는 이들 반응의 조합을 조정함으로써 관용의 조정을 예기한다. TH1 반응을 조정하는 것은 예로서, 인터페론-감마의 발현을 변화시키는 것을 포괄한다. TH2 반응을 조정하는 것은 예로서, IL-4, IL-5, IL-10, 그리고 IL-13의 임의의 조합의 발현을 변화시키는 것을 포괄한다. 전형적으로, TH2 반응에서 증가 (감소)는 IL-4, IL-5, IL-10, 또는 IL-13 중에서 최소한 하나의 발현에서 증가 (감소)를 포함할 것이다; 더욱 전형적으로, TH2 반응에서 증가 (감소)는 IL-4, IL-5, IL-10, 또는 EL-13 중에서 최소한 2개의 발현에서 증가를 포함할 것이고, 가장 전형적으로 TH2 반응에서 증가 (감소)는 DL-4, IL-5, IL-10, 또는 IL-13 중에서 최소한 3개에서 증가를 포함할 것이고, 반면 이상적으로, TH2 반응에서 증가 (감소)는 IL-4, IL-5, IL-10, 그리고 IL-13 모두의 발현에서 증가 (감소)를 포함할 것이다. TH 17을 조정하는 것은 예로서, TGF-베타, IL-6, IL-21과 IL23의 발현, 그리고 IL-17, IL-21과 IL-22의 효과 수준을 변화시키는 포괄한다.

[0094] 본 발명의 조성물과 방법의 유용성을 사정하기 위한 다른 적합한 방법은 예로서, U.S. 특허 출원 2012/0076831 (본원에서 전체적으로 참조로서 편입됨)에서 논의된 바와 같이, 당분야에서 이해된다.

[0095] 본 발명의 일정한 구체예는 치료적 개입에 의해 이전에 관용유도되지 않은 개체에서 면역 관용의 기폭에 관계한다. 이들 구체예는 일반적으로, 항원과 점막 결합 성분의 조합의 복수의 투여를 수반한다. 비록 개체가 치료의 코스에서 초기에 관용의 소견을 보일수도 있지만, 전형적으로, 최소한 3회 투여, 빈번하게는 최소한 4회 투여, 그리고 때때로 최소한 6회 투여가 오래 지속되는 결과를 달성하기 위해 기폭 동안 수행된다. 수시로, 각 분량은 일시 투여로서 제공되지만, 점막 방출이 가능한 지속된 제제 역시 적합하다. 복수 투여가 수행되는 경우에, 투여 간에 시간은 일반적으로, 1 일 내지 3 주, 그리고 전형적으로 약 3 일 내지 2 주이다. 일반적으로, 동일한 항원과 점막 결합 성분은 동일한 농도에서 존재하고, 그리고 투여는 동일한 점막 표면에 제공되지만, 치료의 코스 동안 이들 변수 중에서 임의의 변이가 수용될 수 있다.

[0096] 본 발명의 다른 구체예는 추가접종하거나 또는 이전에 확립된 면역 관용의 존속을 확장하는 것에 관계한다. 이들 구체예는 일반적으로, 확립된 관용이 쇠퇴하거나 또는 쇠퇴하는 위험에 처해있는 시기에 1회 투여 또는 치료의 짧은 코스를 수반한다. 추가접종은 일반적으로, 기폭 또는 이전 추가접종 후 1 개월 내지 1 년, 그리고 전형적으로 2 내지 6 개월 시점에 수행된다. 본 발명은 또한, 주 2회, 주 1회, 격주, 또는 임의의 다른 규칙적인 일정에서 일어나는 투여 일정에서 관용의 규칙적인 유지를 수반하는 구체예를 포함한다.

[0097] 본 발명의 입자는 치료가 필요한 개체에서 염증성 면역 반응을 축소하거나 또는 치료가 필요한 개체에서 세균 또는 바이러스 감염을 치료하는데 효과적인 임의의 분량으로 제공될 수 있다. 일정한 구체예에서, 약 10^2 내지 약 10^{20} 입자가 개체에 제공된다. 추가의 구체예에서, 약 10^3 내지 약 10^{15} 입자가 제공된다. 다른 추가의 구체예

에서, 약 10^6 내지 약 10^{12} 입자가 제공된다. 또 다른 추가의 구체예에서, 약 10^8 내지 약 10^{10} 입자가 제공된다. 바람직한 구체예에서, 바람직한 분량은 0.1% 고체/ml이다. 이런 이유로, 0.5 μm 비드의 경우에, 바람직한 분량은 대략 4 x 10^9 비드이고, 0.05μm 비드의 경우에, 바람직한 분량은 대략 4 x 10^{12} 비드이고, 3μm 비드의 경우에, 바람직한 분량은 2 x 10^7 비드이다. 하지만, 치료되는 특정 질환을 치료하는데 효과적인 임의의 분량은 본 발명에 의해 포괄된다.

[0098] 본 발명은 면역 관련된 장애, 예를 들면, 자가면역 질환, 이식 거부반응 및 알레르기 반응의 치료에 유용하다. 면역 관용을 유도하기 위한 합성, 생체적합성 입자 시스템의 치환은 제조의 용이함, 치료제의 광범위한 이용가능성을 야기하고, 시료 간에 균일성을 증가시키고, 잠재적 치료 부위의 숫자를 증가시키고, 그리고 담체 세포에 대한 알레르기 반응의 잠재력을 극적으로 감소시킬 수 있다.

[0099] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "면역 반응"은 T 세포 매개된 및/또는 B 세포 매개된 면역 반응을 포함한다. 예시적인 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들면, 사이토킨 생산과 세포 세포독성을 포함한다. 이에 더하여, 용어 면역 반응은 T 세포 활성화에 의해 간접적으로 달성되는 면역 반응, 예를 들면, 항체 생산 (체액성 반응) 및 사이토킨 반응성 세포, 예를 들면, 대식세포의 활성화를 포함한다. 면역 반응에 관련된 면역 세포는 림프구, 예를 들면, B 세포와 T 세포 ($CD4^+$, $CD8^+$, Th1과 Th2 세포); 항원 제시 세포 (가령, 전문적인 항원 제시 세포, 예를 들면, 수지상 세포, 대식세포, B 림프구, 랑게르한스 세포, 그리고 비전문적 항원 제시 세포, 예를 들면, 각질형성세포, 내피 세포, 별아교세포, 섬유모세포, 희소돌기아교세포); 자연 살해 세포; 골수 세포, 예를 들면, 대식세포, 호산구, 비만 세포, 호염기구, 그리고 과립구를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 변형된 입자는 염증 부위로 염증 세포 트래피킹을 감소시키는데 효과적이다.

[0100] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "무반응," "관용," 또는 "항원-특이적 관용"은 T 세포 수용체-매개된 자극에 대한 T 세포의 무감응을 지칭한다. 이런 무감응은 일반적으로, 항원-특이적이고, 그리고 항원성 펩티드에 노출이 중단된 이후에도 존속한다. 예로서, T 세포에서 무반응은 사이토킨 생산, 예를 들면, IL-2의 결여에 의해 특징된다. T-세포 무반응은 T 세포가 항원에 노출되고, 그리고 두 번째 신호 (공동자극성 신호)의 부재에서 첫 번째 신호 (T 세포 수용체 또는 CD-3 매개된 신호)를 받을 때 일어난다. 이들 조건 하에, 동일한 항원에 이들 세포의 재노출 (재노출이 공동자극성 분자의 존재에서 일어난다하더라도)은 사이토킨 생산의 실패 및 차후에 증식 실패를 유발한다. 따라서, 사이토킨 생산의 실패는 증식을 예방한다. 무력성 T 세포는 하지만, 사이토킨 (가령, IL-2)과 함께 배양되면, 증식할 수 있다. 예로서, T 세포 무반응은 또한, ELISA에 의해 또는 지표 세포주를 이용한 증식 검정에 의해 계량될 때, T 림프구에 의한 IL-2 생산의 결여에 의해 관찰될 수 있다. 대안으로, 리포터 유전자 구조체가 이용될 수 있다. 예로서, 무력성 T 세포는 5' IL-2 유전자 인핸서의 제어 하에 이종유래 프로모터에 의해 또는 인핸서 내에서 발견될 수 있는 API 서열의 다합체에 의해 유도된 DL-2 유전자 전사의 개시를 실패한다 (Kang et al. 1992 Science. 257:1134).

[0101] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "면역 관용"은 치료되지 않은 개체 (여기서 a) 특정한 면역학적 반응 (항원-특이적 작동체 T 림프구, B 림프구, 항체, 또는 이들의 등가물에 의해 최소한 부분적으로 매개되는 것으로 생각됨)의 감소된 수준; b) 특정한 면역학적 반응의 시작 또는 진행에서 지연; 또는 c) 특정한 면역학적 반응의 시작 또는 진행의 감소된 위험)와 비교하여 치료된 개체의 비율에서 수행된 방법을 지칭한다. "특이적" 면역 관용은 면역 관용이 다른 것들과 비교하여 일정한 항원에 대해 우선적으로 적용될 때 일어난다. "비특이적" 면역 관용은 면역 관용이 염증성 면역 반응을 야기하는 항원에 대해 무차별적으로 적용될 때 일어난다. "유사-특이적" 면역 관용은 면역 관용이 병원성 면역 반응을 야기하는 항원에 대해서만 반차별적으로 적용되고 보호 면역 반응을 야기하는 다른 것들에는 적용되지 않을 때 일어난다.

[0102] 자가항원과 자가면역 질환에 대한 관용은 흉선에서 자기반응성 T 세포의 음성 선별 및 흉선 결실을 탈출하고 말초에서 발견되는 자가반응성 T 세포에 대한 말초 관용의 기전을 비롯한 다양한 기전에 의해 달성된다. 말초 T 세포 관용을 제공하는 기전의 실례는 자가항원의 "무시", 자가항원에 무반응 또는 불응, 사이토킨 면역 편위, 그리고 자가-반응성 T 세포의 활성화-유도된 세포 사멸을 포함한다. 이에 더하여, 조절 T 세포가 말초 관용을 매개하는데 관련되는 것으로 밝혀졌다. 예로서, Walker et al. (2002) Nat. Rev. Immunol. 2: 11-19; Shevach et al. (2001) Immunol. Rev. 182:58-67을 참조한다. 일부 상황에서, 자가항원에 대한 말초 관용이 상실되고 (또는 파괴되고), 그리고 자가면역 반응이 뒤따른다. 예로서, EAE에 대한 동물 모델에서, TLR 선천성 면역 수용체를 통한 항원 제시 세포 (APC)의 활성화는 자기관용을 깨뜨리고 EAE의 유도를 유발하는 것으로 밝혀졌다 (Waldner et al. (2004) J. Clin. Invest. 113:990-997).

[0103] 따라서, 일부 구체예에서, 본 발명은 TLR7/8, TLR9, 및/또는 TLR 7/8/9 의존성 세포 자극을 억제하거나 또는 감소시키면서, 항원 제시를 증가시키기 위한 방법을 제공한다. 본원에서 설명된 바와 같이, 특정 변형된 입자의 투여는 면역자극성 폴리뉴클레오티드와 연관된 TLR 7/8, TLR9, 및/또는 TLR7/8/9 의존성 세포 반응을 억제하면서, DC 또는 APC에 의한 항원 제시를 유발한다. 이런 억제는 하나 또는 그 이상의 TLR-연관된 사이토킨의 감소된 수준을 포함할 수 있다.

[0104] 앞서 논의된 바와 같이, 본 발명은 Mac-1과 LFA-1 매개된 장애의 치료에 유용한 생물학적 성질을 갖는 신규한 화합물을 제공한다.

[0105] 따라서, 본 발명의 다른 양상에서, 면역 변경 입자를 포함하고, 그리고 제약학적으로 허용되는 담체를 임의선택적으로 포함하는 제약학적 조성물이 제공된다. 일정한 구체예에서, 이들 조성물은 하나 또는 그 이상의 추가 치료제를 임의선택적으로 더욱 포함한다. 대안으로, 본 발명의 변형된 입자는 하나 또는 그 이상의 다른 치료제의 투여와 병용으로, 치료가 필요한 환자에 투여될 수 있다. 예로서, 본 발명의 화합물을 포함하는 제약학적 조성물에서 공동 투여 또는 포함을 위한 추가 치료제는 승인된 항염증성 작용제이거나, 또는 이것은 통제되지 않은 염증성 면역 반응 또는 세균 또는 바이러스 감염에 의해 특징되는 임의의 장애의 치료를 위한 승인을 궁극적으로 획득하는, 미국 식품의약국에서 승인을 받은 다수의 작용제 중에서 임의의 한 가지이다. 본 발명의 일정한 변형된 입자는 치료를 위한 자유로운 형태로, 또는 적절한 경우에, 이의 제약학적으로 허용되는 유도체로서 존재할 수 있는 것으로 또한, 인지될 것이다.

[0106] 본 발명의 제약학적 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체를 부가적으로 포함하고, 이것은 본원에서 이용된 바와 같이, 원하는 특정 약형에 적합한 임의의 모든 용매, 희석제, 또는 다른 액체 운반제, 분산 또는 현탁액 보조제, 표면 활성제, 등장성 작용제, 농화 또는 유화 작용제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등을 포함한다. Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)는 제약학적 조성물을 제조하는데 이용되는 다양한 담체 및 이들의 제조를 위한 공지된 기술을 공개한다. 예로서, 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하거나 또는 만약 그렇지 않으면, 제약학적 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 임의의 전통적인 담체 매체가 본 발명의 화합물과 양립할 수 없는 경우가 아닌 한에 있어서, 이의 이용은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 예기된다. 제약학적으로 허용되는 담체로서 역할할 수 있는 물질의 일부 실례에는 당, 예를 들면, 락토오스, 글루코오스와 수크로오스; 전분, 예를 들면, 옥수수 전분과 감자 전분; 셀룰로오스와 이의 유도체, 예를 들면, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스와 셀룰로오스 아세트산염; 분말화된 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 활석; 부형제, 예를 들면, 코코아 버터와 좌약 왁스; 기름, 예를 들면, 땅콩 기름, 목화씨 기름; 홍화 기름, 참기름; 올리브 기름; 옥수수 기름과 콩 기름; 글리콜; 예를 들면, 프로필렌 글리콜; 에스테르, 예를 들면, 에틸 올레산염과 에틸 라우린산염; 한천; 완충제, 예를 들면, 마그네슘 수산화물과 알루미늄 수산화물; 알긴산; 발열원제거 증류수; 등장성 식염수; 링거액; 에틸알코올, 그리고 인산염 완충액뿐만 아니라 다른 비독성 양립성 윤활제, 예를 들면, 나트륨 라우릴 황산염과 마그네슘 스테아르산염뿐만 아니라 착색제, 방출제, 코팅제, 감미제, 풍미제와 방향제가 포함되지만 이들에 국한되지 않고, 보존제와 항산화제 역시 제조자의 판단에 따라, 조성물 내에 존재할 수 있다.

[0107] 경구 투여를 위한 액체 약형에는 제약학적으로 허용되는 유제, 마이크로유제, 용액, 현탁액, 시럽과 엘릭시르가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 활성 화합물에 더하여, 액체 약형은 당분야에서 통상적으로 이용되는 비활성 희석제, 예를 들면, 예로서, 물 또는 다른 용매, 용해화제와 유화제, 예를 들면, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 탄산염, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조산염, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 기름 (특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 배아, 올리브, 피마자, 그리고 참깨 기름), 글리세롤, 테트라히드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜과 소르비탄의 지방산 에스테르, 그리고 이들의 혼합물을 내포할 수 있다. 비활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 또한, 어쥬번트, 예를 들면, 적심제, 유화제와 현탁제, 감미제, 풍미제, 그리고 방향제를 포함할 수 있다.

[0108] 본 발명의 입자는 경구, 코, 정맥내, 근육내, 안구, 경피, 복강내, 또는 피하 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 입자는 정맥내 투여된다.

[0109] 면역 반응의 조정을 위한 본 발명의 투여의 효과량과 방법은 개체, 치료되는 질환 및 당업자에 명백한 다른 인자에 기초하여 변할 수 있다. 고려되는 인자는 투여 루트 및 투여되는 분량의 숫자를 포함한다. 이런 인자는 당분야에 공지되어 있고, 그리고 과도한 실험 없이 이런 결정을 내리는 것은 당업자의 지식 범위 내에 있다. 적합한 용량 범위는 면역의 원하는 조절을 제공하는 것이다. 전달된 담체의 양으로 제시된, 담체의 유용한 용량 범

위는 예로서, 하기 중에서 한 가지일 수 있다: 약 0.5 내지 10 mg/kg, 1 내지 9 mg/kg, 2 내지 8 mg/kg, 3 내지 7 mg/kg, 4 내지 6 mg/kg, 5 mg/kg, 1 내지 10 mg/kg, 5 내지 10 mg/kg. 대안으로, 용량은 입자의 숫자에 기초하여 투여될 수 있다. 예로서, 전달된 담체의 양으로 제시된, 담체의 유용한 용량은 예로서, 분량당 약 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 또는 그 이상 숫자의 입자일 수 있다. 각 환자에 제공된 절대량은 약리학적 성질, 예를 들면, 생체이용률, 청소 속도와 투여 루트에 의존한다. 제약학적으로 허용되는 담체, 희석제와 부형제, 그리고 제약학적 조성물과 제제를 제조하는 방법의 상세는 Remmingtons Pharmaceutical Sciences 18th Edition, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA.에서 제공되고, 이것은 본원에 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0110] 특정 담체 제제의 효과량과 투여 방법은 개별 환자, 원하는 결과 및/또는 장애의 유형, 질환의 시기 및 당업자에게 명백한 다른 인자에 기초하여 변할 수 있다. 특정 적용에서 유용한 투여 루트(들)는 당업자에게 명백하다. 투여 루트에는 국소, 진피, 경피, 경점막, 표피, 비경구, 위장, 그리고 경기관지와 경폐포를 비롯한 비인두와 폐가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 용량 범위는 혈액 수준에 의해 계량될 때, 약 1-50 μM의 조직 농도를 획득하는데 충분한 IRP-내포 조성물을 제공하는 것이다. 각 환자에 제공된 절대량은 약리학적 성질, 예를 들면, 생체이용률, 청소 속도 및 투여 루트에 의존한다.

[0111] 본 발명은 생리학적으로 허용되는 이식물, 연고, 크림, 린스와 겔이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 국소 적용에 적합한 담체 제제를 제공한다. 피부 투여의 예시적인 루트는 최소 침습성인 것들, 예를 들면, 경피 전파, 표피 투여 및 피하 주사이다.

[0112] 경피 투여는 담체가 피부를 침투하고 혈류로 들어갈 수 있도록 하는 크림, 린스, 겔 등의 적용에 의해 달성된다. 경피 투여에 적합한 조성물에는 피부에 직접적으로 적용되거나 또는 보호 담체, 예를 들면, 경피 장치 (소위 "패치") 내로 통합된 제약학적으로 허용되는 현탁액, 기름, 크림과 연고가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 크림, 연고 등의 실례는 예로서, Physician's Desk Reference에서 찾아볼 수 있다. 경피 전파는 또한, 예로서 여러 일 또는 그 이상의 기간 동안 온전한 피부를 통해 연속적으로 산물을 전달하는 상업적으로 가용한 패치를 이용한 이온이동법에 의해 달성될 수도 있다. 이러한 방법의 이용은 상대적으로 큰 농도에서 제약학적 조성물의 제어된 전파를 가능하게 하고, 조합 약물의 주입을 허용하고, 그리고 흡수 프로모터의 동시 이용을 가능하게 한다.

[0113] 비경구 투여 루트에는 전기 (이온이동법) 또는 직접적인 주사, 예를 들면, 중심 정맥 라인 내로 직접적인 주사, 정맥내, 근육내, 복강내, 피내, 또는 피하 주사가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 비경구 투여에 적합한 담체의 제제는 일반적으로, USP 물 또는 주사용수에서 조제되고, 그리고 pH 완충액, 염 증량제, 보존제, 그리고 다른 제약학적으로 허용되는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 비경구 주사를 위한 면역조절성 폴리뉴클레오티드는 제약학적으로 허용되는 무균 등장성 용액, 예를 들면, 주사용 식염수와 인산염 완충된 식염수에서 조제될 수 있다.

[0114] 위장 투여 루트는 섭취와 직장 루트를 포함하지만 이들에 국한되지 않고, 그리고 예로서, 섭취를 위한 제약학적으로 허용되는 분말, 알약 또는 액체 및 직장 투여를 위한 좌약의 이용을 포함할 수 있다.

[0115] 비인두와 폐 투여는 흡입에 의해 달성되고, 그리고 전달 루트, 예를 들면, 비내, 경기관지와 경폐포 루트를 포함한다. 본 발명은 에어로졸을 형성하기 위한 액체 현탁액뿐만 아니라 건조 분말 흡입 전달 시스템을 위한 분말 형태가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 흡입에 의한 투여에 적합한 담체의 제제를 포함한다. 담체 제제의 흡입에 의한 투여에 적합한 장치에는 분무기, 기화기, 연무기, 그리고 건조 분말 흡입 전달 장치가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0116] 주사가능 제조물, 예를 들면, 무균 주사가능 수성 또는 유성 현탁액은 적합한 분산제 또는 적심제 및 현탁제를 이용하여 주지 기술에 따라 조제될 수 있다. 무균 주사가능 제조물은 또한, 비독성 비경구 허용되는 희석제 또는 용매에서 무균 주사가능 용액, 현탁액 또는 유제, 예를 들면, 1,3-부탄디올에서 용액일 수 있다. 이용될 수 있는 허용되는 운반제와 용매 중에는 물, 링거액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 이에 더하여, 무균, 고정유가 용매 또는 현탁 매체로서 전통적으로 이용된다. 이런 목적으로, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 비롯한 임의의 블랜드 고정유가 이용될 수 있다. 이에 더하여, 지방산, 예를 들면, 올레산이 주사가능물질의 제조에서 이용된다.

[0117] 주사가능 제제는 예로서, 세균-보류 필터를 통한 여과에 의해, 또는 이용에 앞서 무균수 또는 다른 무균 주사가능 매체에서 용해되거나 또는 분산될 수 있는 무균 고체 조성물의 형태로 살균제를 함입함으로써 살균될 수 있

다.

[0118] 약물의 효과를 연장하기 위해, 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 늦추는 것이 종종 바람직하다. 이것은 불량한 물 용해도를 갖는 액체 현탁액 또는 결정성 또는 무정형 물질의 이용에 의해 달성될 수 있다. 약물의 흡수 속도는 이후, 이의 용해 속도에 의존하고, 이것은 차례로, 결정 크기와 결정성 형태에 의존한다. 대안으로, 비경구 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 약물을 기름 운반제에 용해하거나 또는 현탁함으로써 달성된다. 주사가능 저장소 형태는 약물의 마이크로캡슐 매트릭스를 생물분해성 중합체, 예를 들면, 폴리락티드-폴리글리콜리드에서 형성함으로써 만들어진다. 약물 대 중합체의 비율 및 이용된 특정 중합체의 성격에 따라, 약물 방출의 속도가 제어될 수 있다. 다른 생물분해성 중합체의 실례는 (폴리(오르토에스테르)와 폴리(무수물)을 포함한다. 저장소 주사가능 제제는 또한, 신체 조직과 양립하는 리포솜 또는 마이크로유제에 약물을 가둠으로써 제조된다.

[0119] 일부 구체예에서, 본 발명의 합성, 생물분해성 입자는 제조의 용이함, 치료제의 광범위한 이용가능성, 그리고 증가된 치료 부위를 제공한다. 특정 구체예에서, 계면활성제 폴리(에틸렌-알트-말레산 무수물)을 이용하여 합성된, 고밀도의 표면 카르복실산염 기를 갖는 표면-기능화된 생물분해성 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 다른 담체 입자 및/또는 표면에 비하여 무수한 이점을 제공하는 담체를 제공한다. 본 발명의 구체예의 발달 동안 수행된 실험은 이들 입자에 펩티드 (가령, $PLP_{139-151}$ 펩티드)의 접합을 증명하였다. 이런 펩티드-연계된 입자는 그들이 질환 진전의 예방 및 면역 관용의 유도에 효과적이라는 것을 보였다 (가령, 다발성 경화증의 SJL/J $PLP_{139-151}$ /CFA-유도된 R-EAE 뮤린 모델에서). 본 발명의 펩티드 연계된 담체는 다른 관용 유도 구조에 비하여 무수한 이점를 제공한다. 일부 구체예에서, 이들 입자는 생물분해성이고, 그리고 이런 이유로, 체내에서 오랜 시간 동안 존속하지 않을 것이다. 완전한 분해를 위한 시간이 제어될 수 있다. 일부 구체예에서, 입자는 세포 활성화 없이 내재화를 용이하게 하기 위해 기능화된다 (가령, PLG 마이크로스피어 내로 적하된 포스파티딜세린). 일부 구체예에서, 입자는 특정한 세포 개체군에 대한 표적화 리간드를 함입한다. 일부 구체예에서, 항염증성 사이토킨, 예를 들면, IL-10과 TGF-β는 이들 입자를 내재화하는 세포 유형의 활성화를 제한하고, 그리고 에너지 및/또는 결실을 통한 관용의 유도 및 조절 T 세포의 활성화를 용이하게 하기 위해 입자 상에 또는 입자 내에 포함된다.

[0120] 경구 투여를 위한 고체 약형은 캡슐, 정제, 알약, 분말, 그리고 과립을 포함한다. 이런 고체 약형에서, 변형된 입자는 최소한 하나의 비활성, 제약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체, 예를 들면, 나트륨 구연산염 또는 인산이칼슘 및/또는 a) 충전물 또는 증량제, 예를 들면, 전분, 락토오스, 수크로오스, 글루코오스, 만니톨, 그리고 규산, b) 결합제, 예를 들면, 예로서, 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐피롤리디논, 수크로오스, 그리고 아카시아, c) 보습제, 예를 들면, 글리세롤, d) 붕해제, 예를 들면, 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 일정한 규산염, 그리고 탄산나트륨, e) 용해 지연제, 예를 들면, 파라핀, f) 흡수 촉진제, 예를 들면, 사차 암모늄 화합물, g) 적심제, 예를 들면, 예로서, 세틸 알코올과 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡수제, 예를 들면, 카올린과 벤토나이트 점토, 그리고 i) 윤활제, 예를 들면, 활석, 칼슘 스테아르산염, 마그네슘 스테아르산염, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 황산염, 그리고 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제와 알약의 경우에, 약형은 또한, 완충제를 포함할 수도 있다.

[0121] 유사한 유형의 고체 조성물은 또한, 락토오스 또는 유당과 같은 부형제뿐만 아니라 높은 분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 이용한 연성과 경성-충전된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 이용될 수도 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 알약, 그리고 과립의 고체 약형은 코팅과 껍질, 예를 들면, 장용 코팅 및 제약학적 조제 분야에서 널리 공지된 다른 코팅으로 제조될 수 있다. 이들은 불투명화제를 임의선택적으로 내포하고, 그리고 또한, 그들이 장관의 일정한 부분에서 단독으로 또는 우선적으로, 활성 성분(들)을 임의선택적으로, 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 이용될 수 있는 포매 조성물의 실례는 중합성 물질과 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한, 락토오스 또는 유당과 같은 부형제뿐만 아니라 높은 분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 이용한 연성과 경성-충전된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 이용될 수도 있다.

[0122] 변형된 입자는 또한, 전술한 바와 같은 하나 또는 그 이상의 부형제로 마이크로-피포된 형태일 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 알약, 그리고 과립의 고체 약형은 코팅과 껍질, 예를 들면, 장용 코팅, 방출 제어 코팅 및 제약학적 조제 분야에서 널리 공지된 다른 코팅으로 제조될 수 있다. 이런 고체 약형에서, 활성 화합물은 최소한 하나의 비활성 희석제, 예를 들면, 수크로오스, 락토오스와 전분과 혼합될 수 있다. 이런 약형은 또한, 통상의 관례에서처럼, 비활성 희석제 이외의 추가 물질, 예를 들면, 정제화 윤활제 및 다른 정제화 보조제, 예를 들면, 마그네슘 스테아르산염과 미정질 셀룰로오스를 포함할 수 있다. 캡슐, 정제와 알약의 경우에, 약형은 또한, 완

충제를 포함할 수 있다. 이들은 불투명화제를 임의선택적으로 내포하고, 그리고 또한, 그들이 장관의 일정한 부분에서 단독으로 또는 우선적으로, 변형된 입자를 임의선택적으로, 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 이용될 수 있는 포매 조성물의 실례는 중합성 물질과 왁스를 포함한다.

[0123] 본 발명은 본 발명의 변형된 입자의 제약학적으로 허용되는 국소 제제를 포괄한다. 용어 "제약학적으로 허용되는 국소 제제"는 본원에서 이용된 바와 같이, 표피에 제제의 적용에 의한 본 발명의 변형된 마이크로입자의 피내 투여를 위해 제약학적으로 허용되는 임의의 제제를 의미한다. 본 발명의 일정한 구체예에서, 국소 제제는 담체 시스템을 포함한다. 제약학적으로 효과적인 담체에는 용매 (가령, 알코올, 다가 알코올, 물), 크림, 로션, 연고, 기름, 고약, 리포솜, 분말, 유제, 마이크로유제, 그리고 완충된 용액 (가령, 저장성 또는 완충된 식염수) 또는 약제를 국소적으로 투여하기 위한 당분야에 공지된 임의의 다른 담체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 주지 담체의 더욱 완전한 목록은 당분야에서 표준인 참고 문서, 예를 들면, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, 1980과 17th Edition, 1985 (둘 모두 Mack Publishing Company, Easton, Pa.에 의해 공개된)에 의해 제공되고, 이들의 개시는 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다. 일정한 다른 구체예에서, 본 발명의 국소 제제는 부형제를 포함할 수 있다. 본 발명의 제약학적으로 허용되는 국소 제제를 제조하기 위해, 당분야에 공지된 임의의 제약학적으로 허용되는 부형제가 이용될 수 있다. 본 발명의 국소 제제 내에 포함될 수 있는 부형제의 실례에는 보존제, 항산화제, 보습제, 피부연화제, 완충제, 용해화제, 다른 침투 작용제, 피부 보호제, 계면활성제, 그리고 추진제, 및/또는 변형된 입자와 병용되는 추가 치료제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 보존제에는 알코올, 사차 아민, 유기산, 파라벤, 그리고 페놀이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 항산화제에는 아스코르브산과 이의 에스테르, 아황산수소나트륨, 부틸화된 히드록시톨루엔, 부틸화된 히드록시아니솔, 토코페롤, 그리고 EDTA와 구연산과 같은 킬레이트화제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 보습제에는 글리세린, 소르비톨, 폴리에틸렌 글리콜, 요소, 그리고 프로필렌 글리콜이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명에서 이용을 위한 적합한 완충제에는 구연산, 염화수소산, 그리고 젖산 완충액이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 용해화제에는 사차 염화암모늄, 시클로덱스트린, 벤질 벤조산염, 레시틴, 그리고 폴리소르베이트가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명의 국소 제제에서 이용될 수 있는 적합한 피부 보호제에는 비타민 E 기름, 알란토인, 디메티콘, 글리세린, 바셀린, 그리고 아연 산화물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0124] 일정한 구체예에서, 본 발명의 제약학적으로 허용되는 국소 제제는 최소한, 본 발명의 변형된 입자 및 침투 증강제를 포함한다. 국소 제제의 선택은 치료되는 질환, 발명 화합물 및 존재하는 다른 부형제의 물리화학적 특징, 제제에서 그들의 안정성, 가용한 제조 설비, 그리고 비용 압박을 비롯한 여러 인자에 의존할 것이다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "침투 증강제"는 바람직하게는, 전신 흡수가 거의 또는 전혀 없이, 약리학적으로 활성 화합물을 각질층을 통해, 그리고 표피 또는 피부 내로 수송할 수 있는 작용제를 의미한다. 넓은 다양한 화합물이 피부를 통한 약물의 침투 속도를 증강하는데 있어서 그들의 유용성에 대해 평가되었다. 예로서, 다양한 피부 침투 증강제의 이용과 시험을 조사하는 Percutaneous Penetration Enhancers, Maibach H. I. and Smith H. E. (eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995), 그리고 Buyuktimkin et al., Chemical Means of Transdermal Drug Permeation Enhancement in Transdermal and Topical Drug Delivery Systems, Gosh T. K., Pfister W. R., Yum S. I. (Eds.), Interpharm Press Inc., Buffalo Grove, Ill. (1997)을 참조한다. 일정한 예시적인 구체예에서, 본 발명에서 이용을 위한 침투 작용제에는 트리글리세리드 (가령, 콩 기름), 알로에 조성물 (가령, 알로에 베라 겔), 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 옥틸페닐폴리에틸렌 글리콜, 올레산, 폴리에틸렌 글리콜 400, 프로필렌 글리콜, N-데실메틸술폭시드, 지방산 에스테르 (가령, 이소프로필 미리스트산염, 메틸 라우린산염, 글리세롤 모노올레이트, 그리고 프로필렌 글리콜 모노올레이트) 및 N-메틸피롤리돈이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0125] 일정한 구체예에서, 조성물은 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치의 형태일 수 있다. 일정한 예시적인 구체예에서, 본 발명에 따른 조성물의 제제는 크림이고, 이들은 포화된 또는 불포화된 지방산, 예를 들면, 스테아르산, 팔미트산, 올레산, 팔미토-올레산, 세틸 또는 올레일 알코올, 특히 바람직하게는 스테아르산을 더욱 내포할 수 있다. 본 발명의 크림은 또한, 비이온성 계면활성제, 예를 들면, 폴리옥시-40-스테아르산염을 내포할 수도 있다. 일정한 구체예에서, 활성 성분은 무균 조건 하에, 제약학적으로 허용되는 담체 및 필요에 따라, 임의의 필요한 보존제 또는 완충액과 혼합된다. 안과 제제, 귀약, 그리고 점안약 역시 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 예기된다. 부가적으로, 본 발명은 경피 패치의 이용을 예기하고, 이들은 신체에 화합물의 제어된 전달을 제공하는 부가된 이점을 갖는다. 이런 약형은 화합물을 적절한 매체에 용해하거나 또는 분여함으로써 만들어진다. 앞서 논의된 바와 같이, 침투 증강제는 또한, 피부를 교차하여 화합물의 플럭스를 증가시키는데 이용될 수 있다. 상기 속도는 속도 제어 막을 제공함으로써 또는 화합물을 중합체 매트릭

스 또는 겔에 분산시킴으로써 제어될 수 있다.

[0126] 변형된 입자는 에어로졸에 의해 투여될 수 있다. 이것은 변형된 입자를 내포하는 수성 에어로졸, 리포솜 제조물 또는 고체 입자를 제조함으로써 달성된다. 비수성 (가령, 탄화플루오르 추진제) 현탁액이 이용될 수 있다.

[0127] 통상적으로, 수성 에어로졸은 작용제의 수용액 또는 현탁액을 전통적인 제약학적으로 허용되는 담체와 안정제와 함께 조제함으로써 만들어진다. 담체와 안정제는 특정 화합물의 필요에 따라 변하지만, 비이온성 계면활성제 (Tweens, Pluronics, 또는 폴리에틸렌 글리콜), 혈청 알부민과 같은 무해한 단백질, 소르비탄 에스테르, 올레산, 레시틴, 아미노산, 예를 들면, 글리신, 완충액, 염, 당 또는 당 알코올을 전형적으로 포함한다. 에어로졸은 일반적으로, 등장성 용액으로부터 제조된다.

[0128] 본 발명의 변형된 입자와 제약학적 조성물은 복합 요법으로 조제되고 이용될 수 있는 것으로 또한, 인지될 것이다, 다시 말하면, 이들 화합물과 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 다른 원하는 치료제 또는 의학적 절차와 동시에, 이들에 앞서, 또는 이들 이후에, 조제되거나 또는 투여될 수 있다. 조합 섭생에서 이용하기 위한 요법 (치료제 또는 절차)의 특정 조합은 원하는 치료제 및/또는 절차의 적합성 및 달성되는 원하는 치료적 효과를 고려할 것이다. 이용된 이들 요법은 동일한 장애에 대해 원하는 효과를 달성하거나 (예로서, 발명 화합물은 다른 항염증성 작용제와 동시에 투여될 수 있다), 또는 이들은 상이한 효과 (가령, 임의의 역효과의 제어)를 달성할 수 있는 것으로 또한, 인지될 것이다.

[0129] 일정한 구체예에서, 본 발명의 변형된 입자를 내포하는 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 추가 치료 활성 성분 (가령, 항염증성 및/또는 완화성)을 더욱 포함한다. 본 발명을 위해, 용어 "완화성"은 질환의 증상 및/또는 치료적 섭생의 부작용의 경감에 집중되지만, 치유력이 없는 치료를 지칭한다. 예로서, 완화성 치료는 진통제, 항구토 약제 및 멀미완화 약물을 포괄한다.

[0130] 본 발명은 개체, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에서 설명된 변형된 입자를 개체에 투여하는 것을 포함한다. 본 발명에 의해 제공된 면역조절의 방법은 면역자극성 폴리펩티드 또는 바이러스 또는 세균 성분에 의해 자극된 면역 반응이 포함되지만 이에 국한되지 않는 선천성 면역 반응 또는 적응성 면역 반응을 억제하고 및/또는 저해하는 것들을 포함한다.

[0131] 변형된 입자는 면역 반응을 조절하는데 충분한 양으로 투여된다. 본원에서 설명된 바와 같이, 면역 반응의 조절은 체액성 및/또는 세포성일 수 있고, 그리고 당분야에서 표준 기술을 이용하여 본원에서 설명된 바와 같이 계량된다.

[0132] 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 조성물은 이식물 (가령, 장치) 및/또는 이식조직 (가령, 조직, 세포, 장기)과 함께 (가령, 동시에, 이전에, 또는 이후에), 이들과 연관된 면역 반응을 매개하고, 무효화하고, 조절하고 및/또는 감소시키기 위해 투여된다.

[0133] 일정한 구체예에서, 개체는 원치 않는 면역 활성화와 연관된 장애, 예를 들면, 알레르기 질환 또는 장애, 알레르기와 천식을 앓는다. 알레르기 질환 또는 천식을 갖는 개체는 현존하는 알레르기 질환 또는 천식의 인지가능한 증상을 갖는 개체이다. 관용은 예로서, 알레르기 반응을 이끌어 내는 특정한 식품 (가령, 땅콩 단백질 등), 주사된 물질 (가령, 벌 독액 단백질 등), 또는 흡입된 물질 (가령, 돼지풀 화분 단백질, 애완동물 비듬 단백질 등)과 복합화된 입자에 의해 이런 개체에서 유도될 수 있다.

[0134] 일정한 구체예에서, 개체는 원치 않는 면역 활성화와 연관된 장애, 예를 들면, 자가면역 질환과 염증성 질환을 앓는다. 자가면역 질환 또는 염증성 질환을 갖는 개체는 현존하는 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 인지가능한 증상을 갖는 개체이다. 관용은 예로서, 특정 자가면역 질환을 주도하는 유관한 자가항원과 복합화된 입자에 의해 이런 개체에서 유도될 수 있다.

[0135] 일정한 구체예에서, 개체는 효소 보상 요법과 연관된 장애를 앓는다. 관용은 예로서, 특정 결함을 치료하기 위해 투여된 재조합적으로-생산된 효소에 대해 중화 항체 반응이 만들어지는 것을 예방하기 위해, 유전적 결함을 갖는 환자가 생산하지 못하는 효소와 복합화된 입자에 의해 이런 개체에서 유도될 수 있다, 예를 들면, 제8인자를 만드는 능력에서 유전적 결함에 기인한 혈우병을 앓는 환자에서 인간 제8인자에 대한 관용이 유도될 수 있다.

[0136] 일정한 구체예에서, 개체는 질환 요법과 연관된 장애를 앓는다. 재조합 항체의 경우에, 관용은 예로서, 환자에서 항체 치료제에 대한 중화 항체가 만들어지는 것을 예방하기 위한 치료적 배경에서 이용되는 인간화 항체에 대해 유도된다, 예를 들면, 자가면역 질환에 대한 치료제로서 이용되는 인간화 면역 부분집합 고갈성 항체 또는

항-사이토킨 항체에 대한 관용이 유도된다.

[0137] 자가면역 질환은 2가지 광범위한 범주로 나눠질 수 있다: 장기-특이적 및 전신. 자가면역 질환은 제한 없이, 류마티스성 관절염 (RA), 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), I형 진성당뇨병, II형 진성당뇨병, 다발성 경화증 (MS), 면역-매개된 불임, 예를 들면, 미숙 난소기능상실, 피부경화증, 쇼그렌병, 백반증, 탈모증 (대머리), 다선성 실패, 그레이브스병, 갑상선기능저하증, 다발근육염, 심상성 천포창, 낙엽 천포창, 크론병과 궤양성 대장염을 비롯한 염증성 장 질환, B형 간염 바이러스 (HBV)와 C형 간염 바이러스 (HCV)와 연관된 것을 비롯한 자가면역 간염, 뇌하수체저하증, 이식편-대-숙주 질환 (GvHD), 심근염, 애디슨병, 자가면역 피부 질환, 포도막염, 악성 빈혈, 소아 지방변증, 그리고 부갑상선저하증을 포함한다.

[0138] 자가면역 질환은 또한, 제한 없이, 하시모토 갑상선염, I형과 II형 자가면역 다선성 증후군, 부종양성 천포창, 수포성 유천포창, 포진성 피부염, 선형 IgA 질환, 후천성 수포성 표피박리증, 결절성 홍반, 천포창양 임신, 흉터 유천포창, 혼합성 본태성 한랭글로불린혈증, 아동기의 만성 수포성 질환, 용혈성 빈혈, 혈소판감소성 자반증, 굿파스튜어 증후군, 자가면역 호중구감소증, 중증근무력증, 이튼 람베르트 근무력 증후군, 강직 증후군, 급성 파종성 뇌척수염, 길랭 바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경근병증, 전도 차단을 동반한 다병소성 운동 신경병증, 단세포군 감마글로불린병증을 동반한 만성 신경병증, 안구간대경련-근간대경련 증후군, 소뇌 변성, 뇌척수염, 망막병증, 원발성 담도 경화증, 경화 담관염, 글루텐-민감성 소장병, 강직성 척추염, 반응성 관절염, 다발근육염/피부근염, 혼합결합조직병, 베쳇 증후군, 건선, 결정다발성동맥염, 알레르기성 혈관염과 육아종증 (처그스트라우스병), 다발혈관염 중첩 증후군, 과민혈관염, 베게너 육아종증, 측두 동맥염, 타카야수 동맥염, 가와사키병, 중추신경계의 고립 맥관염, 폐색혈전혈관염, 사르코이드증, 사구체신염, 그리고 한랭병증을 포함한다. 이들 질환은 의학계에서 널리 공지되고 예로서, Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th ed., Fauci A S et al., eds., New York: McGraw-Hill, 1998에서 설명된다.

[0139] 자가면역 질환의 연구를 위한 동물 모델은 당분야에 공지된다. 예로서, 인간 자가면역 질환과 가장 유사하게 보이는 동물 모델은 특정 질환의 높은 발생률이 자발적으로 진전하는 동물 균주를 포함한다. 이런 모델의 실례에는 1형 당뇨병과 유사한 질환이 진전하는 비만이 아닌 당뇨병성 (NOD) 생쥐, 그리고 루푸스-유사 질환 취약성 동물, 예를 들면, New Zealand 하이브리드, MRL-Fas^{lpr}과 BXSB 생쥐가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 자가면역 질환이 유도된 동물 모델에는 다발성 경화증에 대한 모델인 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE), 류마티스성 관절염에 대한 모델인 콜라겐-유도된 관절염 (CIA), 그리고 포도막염에 대한 모델인 실험적 자가면역 포도막염 (EAU)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 자가면역 질환에 대한 동물 모델은 또한, 유전자 조작에 의해 창출되었고, 그리고 예로서, 염증성 장 질환에 대한 IL-2/IL-10 녹아웃 생쥐, SLE에 대한 Fas 또는 Fas 리간드 녹아웃, 그리고 류마티스성 관절염에 대한 IL-I 수용체 길항제 녹아웃을 포함한다.

[0140] 일정한 구체예에서, 개체는 세균 또는 바이러스 감염을 앓는다. 세균 또는 바이러스 감염을 갖는 개체는 현존하는 세균 또는 바이러스 감염의 인지가능한 증상을 갖는 개체이다.

[0141] 본 발명의 변형된 입자로 치료가능한 바이러스 감염의 무제한적 목록은 헤르페스 바이러스 감염, 간염 바이러스 감염, 웨스트 나일 바이러스 감염, 플라비바이러스 감염, 인플루엔자 바이러스 감염, 리노바이러스 감염, 유두종 바이러스 감염, 파라믹소바이러스 감염, 파라인플루엔자 바이러스 감염, 그리고 레트로바이러스 감염을 포함한다. 선호되는 바이러스는 개체의 중추신경계를 감염시키는 바이러스이다. 가장 선호되는 바이러스는 뇌염 또는 수막염을 유발하는 바이러스이다.

[0142] 본 발명의 변형된 입자로 치료가능한 세균 감염의 무제한적 목록은 스타필로코커스 (Staphlococcus) 감염, 스트렙토코커스 (Streptococcus) 감염, 미코박테리아 감염, 바실루스 감염, 살모넬라 (Salmonella) 감염, 비브리오 (Vibrio) 감염, 스피로헤타 감염, 그리고 나이세리아 (Neisseria) 감염을 포함한다. 바람직하게는 개체의 중추신경계를 감염시키는 세균이다. 가장 바람직하게는 뇌염 또는 수막염을 유발하는 세균이다.

[0143] 일부 구체예에서, 본 발명은 질환의 시작에 앞서, 본 발명의 조성물의 용도에 관계한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 진행 중인 질환을 저해하기 위한 본 발명의 조성물의 용도에 관계한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 개체에서 질환을 개선하는 것에 관계한다. 개체에서 질환을 개선한다는 것은 개체에서 질환을 치료하거나, 예방하거나 또는 억제하는 것을 포함하는 것으로 의미된다.

[0144] 일부 구체예에서, 본 발명은 질환의 재발을 예방하는 것에 관계한다. 예로서, 원치 않는 면역 반응은 펩티드의 한 영역 (가령, 항원 결정인자)에서 일어날 수 있다. 원치 않는 면역 반응과 연관된 질환의 재발은 펩티드의 상이한 영역에서 면역 반응 공격을 받음으로써 일어날 수 있다. 본 발명의 면역 변경 입자가 부착된 펩티드 또는

항원성 모이어티가 없기 때문에, 이들 입자는 복수 에피토프에 대해 효과적일 것이다. MS와 다른 ThI /17-매개된 자가면역 질환을 비롯한 일부 면역 반응 장애에서 T-세포 반응은 동적이고 재발-이완성 및/또는 만성-진행성 질환의 코스 동안 진전할 수 있다. T-세포 레퍼토리의 동적 성격은 일정한 질환의 치료에 대한 함의를 갖는데, 그 이유는 표적이 질환이 진행됨에 따라서 변할 수 있기 때문이다. 이전에, 반응의 패턴에 관한 기존 지식이 질환의 진행을 예측하기 위해 필요하였다. 본 발명은 "에피토프 확산"의 함수인 동적 변화 질환의 효과를 예방할 수 있는 조성물을 제공한다. 재발에 대한 널리 알려진 모델은 다발성 경화증 (MS)에 대한 모델로서 단백지질 단백질 (PLP)에 대한 면역 반응이다. 초기 면역 반응은 PLP139-15에 대한 반응에 의해 일어날 수 있다. 차후 질환 시작은 PLP[pi]s-iβi에 대한 재발 면역 반응에 의해 일어날 수 있다.

[0145] 본 발명의 다른 구체예는 이식에 관계한다. 이것은 공여자 개체로부터 수용자 개체로 조직 시료 또는 이식편의 전달을 지칭하고, 그리고 조직에 의해 제공되는 생리학적 기능을 복원하기 위해 이러한 조직을 필요로 하는 인간 수용자에서 빈번하게 수행된다. 이식되는 조직에는 전체 장기, 예를 들면, 신장, 간, 심장, 폐; 장기 성분, 예를 들면, 피부 이식편 및 눈의 각막; 그리고 세포 현탁액, 예를 들면, 골수 세포 및 골수 또는 순환 혈액으로부터 선별되고 확대된 세포의 배양액, 그리고 전혈 주입이 포함된다 (하지만 이들에 국한되지 않는다).

[0146] 임의의 이식의 심각한 잠재적 합병증은 숙주 수용자와 이식된 조직 사이에 항원성 차이의 결과로 뒤따라 발생한다. 차이의 성격과 정도에 따라, 숙주에 의한 이식편의 면역학적 공격, 또는 이식편에 의한 숙주의 면역학적 공격, 또는 둘 모두 일어날 위험이 있을 수 있다. 위험의 정도는 유사한 표현형을 갖는 유사하게 치료된 개체의 개체군에서 반응 패턴을 추적하고, 그리고 널리 인정되는 임상적 절차에 따라 다양한 가능한 기여 인자를 상관함으로써 결정된다. 면역학적 공격은 기존 면역학적 반응 (가령, 미리 형성된 항체)의 결과이거나, 또는 대략 이식의 시기 (가령, TH 세포의 산출)에 시작되는 것이다. 항체, TH 세포, 또는 Tc 세포는 서로 및 다양한 작동체 분자와 세포와의 임의의 조합에 관련될 수 있다. 하지만, 면역 반응에 관련되는 항원은 일반적으로 알려지지 않고, 이런 이유로 항원-특이적 요법을 설계하거나 또는 항원-특이적 관용을 유도하는데 어려움을 유발한다.

[0147] 본 발명의 일정한 구체예는 수용자에 의한 조직 이식편의 거부를 야기하는 숙주 대 이식편 질환의 위험을 감소시키는 것에 관계한다. 치료는 초급성, 급성, 또는 만성 거부 반응의 효과를 예방하거나 또는 감소시키기 위해 수행될 수 있다. 치료는 관용이 이식편이 설치될 때 정위하도록, 이식보다 훨씬 앞서 우선적으로 시작된다; 하지만 이것이 가능하지 않은 경우에, 치료는 이식과 동시에 또는 이식 이후에 시작될 수 있다. 개시의 시기에 상관없이, 치료는 일반적으로, 이식 이후에 최소한 첫 1개월 동안 규칙적인 간격에서 계속될 것이다. 후속 분량은 이식편의 충분한 적응이 일어나면 필요하지 않을 수도 있지만, 이식편의 거부 또는 염증의 임의의 증거가 있으면 재개될 수 있다. 당연히, 본 발명의 관용유도 절차는 훨씬 낮은 수준의 위험을 달성하기 위해 다른 형태의 면역억제와 합동될 수 있다.

[0148] 일부 구체예에서, 본 발명의 조성물 (가령, 항원성 분자에 연계된 PLG 담체)은 하나 또는 그 이상의 골격, 매트릭스, 및/또는 전달 시스템에 용도를 발견한다 (가령, U.S. 특허 출원 2009/0238879; U.S. 특허 번호 7,846,466; U.S. 특허 번호 7,427,602; U.S. 특허 번호. 7,029,697; U.S. 특허 번호 6,890,556; U.S. 특허 번호 6,797,738; U.S. 특허 번호. 6,281,256을 참조한다; 본원에 전체적으로 참조로서 편입됨). 일부 구체예에서, 입자 (가령, 항원-연계된 PLG 입자)는 골격, 매트릭스, 및/또는 전달 시스템 (가령, 개체에 화학적/생물학적 물질, 세포, 조직, 및/또는 장기의 전달을 위한)과 연관되거나, 이것 위에 흡착되거나, 이것 내에 포매되거나, 이것에 접합되거나, 기타 등등이다. 일부 구체예에서, 골격, 매트릭스, 및/또는 전달 시스템 (가령, 개체에 화학적/생물학적 물질, 세포, 조직, 및/또는 장기의 전달을 위한)은 본원에서 설명된 물질 (가령, 하나 또는 그 이상의 항원성 펩티드에 접합된 PLG)을 포함하고 및/또는 이들로부터 만들어진다.

[0149] 일부 구체예에서, 미소다공성 골격 (가령, 생물학적 물질 (가령, 세포, 조직 등)을 개체 내로 이식하기 위한)이 제공된다. 일부 구체예에서, 미소다공성 골격은 그 위에 작용제 (가령, 세포외 기질 단백질, 엑센딘-4) 및 생물학적 물질 (가령, 췌장 도세포)을 갖도록 제공된다. 일부 구체예에서, 골격은 질환 (가령, 1형 당뇨병)의 치료, 그리고 관련된 방법 (가령, 진단 방법, 연구 방법, 약물 스크리닝)에서 이용된다. 일부 구체예에서, 골격은 골격 상에 및/또는 골격 내에 본원에서 설명된 항원-접합된 담체가 제공된다. 일부 구체예에서, 골격은 항원 접합된 물질 (가령, 항원 접합된 PLG)로부터 생산된다.

[0150] 일부 구체예에서, 골격 및/또는 전달 시스템은 하나 또는 그 이상의 층을 포함하고 및/또는 하나 또는 그 이상의 화학적 및/또는 생물학적 실체/작용제 (가령, 단백질, 펩티드-접합된 입자, 소형 분자, 세포, 조직 등)을 갖는다, 예로서 U.S. 특허 출원 2009/0238879를 참조한다; 본원에서 전체적으로 참조로서 편입됨. 일부 구체예에서, 항원-연계된 입자는 골격 및 연관된 물질에 대한 면역 관용의 유도를 이끌어 내기 위해 골격 전달 시스템과

공동-투여된다. 일부 구체예에서, 골격 상에 또는 골격 내에 본원에서 설명된 입자가 있는 미소다공성 골격이 개체에 투여된다. 일부 구체예에서, 항원-연계된 입자는 골격 전달 시스템에 연계된다. 일부 구체예에서, 골격 전달 시스템은 항원-연계된 입자를 포함한다.

[0151] 설명된 특질과 구체예의 다양한 변경, 재조합, 그리고 변이는 본 발명의 범위와 사상을 벗어나지 않으면서 당업자에게 명백할 것이다. 비록 특정한 구체예가 설명되긴 했지만, 청구된 발명은 이런 특정한 구체예에 부당하게 국한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 실제로, 당업자에게 명백한, 설명된 방식과 구체예의 다양한 변경은 하기 청구항의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 예로서, U.S. 특허 출원 2012/0076831, 2002/0045672, 2005/0090008, 2006/0002978과 2009/0238879 (이들 각각은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다), 그리고 U.S. 특허 번호 7,846,466; 7,427,602; 7,029,697; 6,890,556; 6,797,738과 6,281,256 (이들 각각은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다)은 본원에서 설명된 다양한 구체예에서 용도를 발견하는 상세, 변경, 그리고 변이를 제공한다.

[0152] 본 출원에서 언급되고 및/또는 하기에 열거된 모든 간행물과 특허는 본원에 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0154] 실시예

[0155] 하기 실시예 본 발명의 이점과 특질을 더욱 예증하기 위해 제공되지만, 본 개시의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0157] 재료와 방법

[0158] ***키메라 생쥐의 산출***

[0159] 6 내지 8주령 B6.SJL-Ptprc^{a}Pep3^{b}/BoyJ (CD45.1) 생쥐는 950 라드의 1회 선량으로 방사선조사되었다. 12 시간 후, 생쥐는 C57BL/6-7.2fms-EGFP 공여자로부터 10^{7} 골수 세포로 재구성되었다. 생쥐는 방사선조사 이후에 10 일 동안 음료수에 담긴 술파메톡사졸 (Sigma Aldrich)과 트리메토프림 (Sigma Aldrich)이 제공되었다. 생쥐는 전술한 바와 같이, 방사선조사 후 6 주 시점에 WNV로 감염되었다. 키메라현상은 유세포분석법을 이용하여 점검되고, 그리고 이전에 증명된 바와 같이 공여자 기원의 96-99%인 것으로 변함없이 밝혀졌다 (Getts et al., J Neurochem. 103: 1019, 2007).

[0160] ***면역조직학***

[0161] 생쥐는 마취되고 50mL 무균 PBS로 관류되었다. 파라핀 블록 내로 처리된 심장 (Getts et al., J. Neurochem 103:10919-1030, 2007)을 제외하고, 모든 장기는 단리되고 최적 절단 온도 화합물 (OCT; Tissue-Tek, Tokyo, Japan)에서 즉시 동결되었다. 8-마이크론 조직 절편은 저온조 마이크로톰에서 절단되고, 하룻밤 동안 기건되고, 그리고 이후, 필요할 때까지 -80℃에서 보관되었다. 동결 절편은 해동되고, 그리고 조직학 (표준 헤마톡실린과 에오신 염색) 또는 면역조직화학이 수행되었다 (Getts et al., J. Exp Med 205:2319-2337, 2008). MARCO, SIGN-R1과 SIGLEC-1에 대한 항체 (R&D systems, MN, USA), CD68 (Abcam, MA, USA) 및 Ki67 (Abcam)은 지시된 바와 같이 이용되었다. 이미지는 DP-70 카메라 및 DP manager 2.2.1 소프트웨어 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 Olympus BX-51 현미경에서 획득되었다.

[0162] ***현미경 및 이미지 획득***

[0163] 이미지는 DP-70 카메라 및 DP manager 2.2.1 소프트웨어 (Olympus)를 이용하여 Olympus BX-51 현미경 (Olympus, Japan)에서 획득되었다.

[0164] ***뇌와 간으로부터 백혈구의 단리***

[0165] 이전에 설명된 바와 같이 (Getts et al, J Exp Med. 29: 2319, 2007), 백혈구는 뇌를 PBS에서 37℃에서 60 분 동안 데옥시-리보핵산분해효소 (0.005 g/ml; Sigma Aldrich) 및 콜라겐분해효소 IV (0.05 g/ml; Sigma Aldrich)로 소화함으로써 PBS-관류된 생쥐의 뇌로부터 획득되었다. 소화는 10% FCS로 중지되고, 그리고 균질액은 70 μm 나일론 셀 스트레이너 (Becton Dickinson, NJ, USA)에 통과되었다. 340xg에서 10 분 원심분리 후 획득된 펠릿은 30% Percoll (Amersham, Norway)에서 재현탁되고 80% Percoll 위에서 층을 이루었다. 백혈구는 실온에서 25 분 동안 1140xg에서 원심분리 후 30%/80% 경계면으로부터 수집되었다. 동일한 프로토콜이 간으로부터 백혈구를 끌어내는 데에도 이용되고, 조직이 처리 이전에 칭량된다.

[0166] ***비장, 혈액과 골수로부터 백혈구의 단리***

[0167] 유세포 계측 분석을 위해, 오른쪽 대퇴골은 절개되고, 그리고 골수 세포는 PBS 적하된 주사기를 이용하여 분출되었다. 골수 전구체 단리를 위해, 최소한 4마리 생쥐로부터 대퇴골과 경골이 활용되었다. 분출 후 달성된 세포 현탁액은 70 μm 셀 스트레이너를 통해 여과되고 340g에서 5 분 동안 원심분리되었다. 결과의 펠릿에서 적혈구는 NH_4Cl-기초된 적색 세포 용해 완충액 (BD Pharm Lyse™; BD Pharmingen)에서 용해되고, 이후 340xg에서 5 분 동안 원심분리되었다. 말초혈의 경우에, 혈액은 심장 천자를 통해 수집되고 구연산염 완충액 (mMol, Sigma Alrich) 내로 즉시 이전되었다. 결과의 현탁액은 70% Percoll 위에서 층을 이루고, 그리고 브레이크 오프 (brake off)와 함께 실온에서 20 분 동안 1140xg에서 원심분리되었다. 경계면은 수집되고, 그리고 이들 세포는 PBS에서 1회 세척되고, 340xg에서 원심분리되었다. 비장 백혈구의 단리를 위해, 비장은 7070 μm 셀 스트레이너에 통과되고 340g에서 5 분 동안 원심분리되었다. 결과의 펠릿에서 적혈구는 NH_4Cl-기초된 적색 세포 용해 완충액 (BD Pharm Lyse™; BD Pharmingen)에서 용해되고, 이후 340xg에서 5 분 동안 원심분리되었다.

[0168] ***유세포분석법***

[0169] 뇌, 간, 혈액, 그리고 골수로부터 수집된 (전술한 바와 같이) 세포는 PBS에서 세척되고, 그리고 항-CD16/CD32 항체 (Biolegend)로 차단되었다. 생존가능한 세포는 트리판 블루 배제를 이용하여 계수되었는데, 이것은 >95% 세포 생존력을 일과적으로 보여주었다.

[0170] 세포 표면 분자 발현은 계량되고, 그리고 세포 분류가 아르곤 이온 및 HeNe 레이저가 장비된 FACS ARIA (Becton Dickinson)에서 수행되었다. 생존가능한 개체군은 전방과 측면 산란에 의해 게이팅되고, 그리고 확인된 형광 개체군은 그 후에, 전방 게이팅에 의해 결정되었다. 분류는 관심되는 개체군을 확인하는 특정한 형광과 산란 파라미터를 이용하여 수행되었다. 분류 엄격함은 골수 개체군에 대해 >98% 순도를 달성하는 순도로 설정되었다.

[0171] 획득된 FACS 자료 파일은 유세포분석법 프로그램, Flow Jo (FlowJo, Ashland, OR, USA)를 이용하여 분석되었다. 관심되는 세포 개체군의 정량은 분석에서 유세포분석법 백분율 및 각 장기로부터 절대 세포 계산에 기초하여 계산되었다.

[0172] ***입양 전달***

[0173] 실험은 입양 전달로 명명된 활성 질환의 두 번째 모델을 조사하기 위해 본 발명의 구체예의 발달 동안 수행되었다. 이들 동물을 펩티드로 면역하기 보다는, 활성 질환을 갖는 생쥐의 비장으로부터 림프구가 수용자에 이전되었는데, 상기 수용자는 차후에 질환이 진전될 것이다. 실험은 입양 전달된 활성화된 작동체 세포를 비활성화시키는 PLG 나노입자의 능력을 특징짓기 위해 본 발명의 구체예의 발달 동안 수행되었다. 입자 또는 대조 펩티드와 연계된 비장세포로 처리된 생쥐는 4 일자에 시작하여 임상적 점수에서 증가를 가졌다. 2 일자에 PLG-$PLP_{139-151}$ 입자로 처리된 생쥐는 40 일자까지 2개 시점을 제외하고, 0의 평균 임상적 점수를 가졌고, 그리고 이들 다른 시점에 대한 평균 임상적 점수는 0.25이었다.

[0174] ***다중 ELISA***

[0175] 다중화된 평판 ELISA는 제조업체 사용설명서 (Quansys Biosciences, Logan, Utah, USA)에 따라 수행되었다. 간단히 말하면, 뇌, 비장, 그리고 간 조직은 PBS에서 균질화되고, 1000xg 스핀에 의해 맑아지고, 그리고 검정이 수행될 때까지 -20℃에서 보관되었다. 혈청 시료 역시 이용되었다. 해동된 시료와 표준은 제공된 완충액에서 희석되고, 그리고 각각 30μl가 특정 가용성 단백질에 대한 포획 항체를 각각 내포하는 16개 반점을 내포하는 각 웰에서 도말되었다. 평판은 이후, 120 r.p.m에서 궤도 진탕기에서 1 시간 동안 배양되었다. 평판은 3 회 세척되고, 그리고 30μl의 검출 항체가 각 웰에 첨가되고 다른 1 시간 동안 배양되었다. 3 회 세척 후, 스트렙타비딘-HRP가 첨가되고 추가 15 분 동안 배양되었다. 평판은 이후, 6 회 세척되고, 그리고 기질 믹스가 첨가되었다. 평판은 CCD 영상장치 (Kodak, Rochester NY, USA)에서 즉시 판독되었다. 평판 이미지는 Quansys Q-view 소프트웨어 (Quansys Biosciences)를 이용하여 분석되었다.

[0176] ***실험적 자가면역 뇌염 (EAE)의 유도와 평가***

[0177] 생쥐는 0.1 mg MOG 펩티드 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (서열 번호:1); Auspep, Parkville, Victoria, Australia; >95% HPLC 정제됨)를 내포하는 유제 및 2 mg/mL 결핵균 (Mycobacterium tuberculosis) (Sigma Aldrich)을 내포하는 완전한 프로인드 어쥬번트가 피하 주사되었다. 2 일 후, 생쥐는 500μl 백일해 독소 (Sigma Aldrich)가 i.p 투여되었다. 생쥐는 질환 진행에 대해 모니터링되고, 그리고 하기 규모에서 등급이 매겨졌다: 1, 생기 없는 꼬리 및/또는 한쪽 뒷다리의 쇠약; 2, 하나 이상의 다리에서 쇠약, 보행 장애; 3, 한쪽 다리에서 마비; 4, 하나

이상의 다리에서 마비, 실금; 5, 빈사.

[0178] ***통계***

[0179] 그래프가 만들어지고, 그리고 컴퓨터화 통계학적 분석이 GraphPad Prism, 그리고 InStat (둘 모두 GraphPad 소프트웨어로부터 프로그램, San Diego, CA, USA) 각각에서 수행되었다. 자료에 따라, 비대칭, 양측 스튜던트 t 검증, 또는 터키-크래머 포스트 시험으로 일원 ANOVA가 수행되었고, $P < 0.05$가 유의미한 것으로 고려되었다.

[0180] 파라미터, 예를 들면, 체중 감소, 침윤, 그리고 바이러스 역가 사이에 상관 분석을 위해, 비-선형 회귀 (곡선 적합)가 이차 다항식 (Y=A + B*X + C*X^2)과 함께 이용되었다.

[0182] 실시예 1

[0183] *음성으로 하전된 면역 변경 입자 (IMPs)의 제조*

[0184] D_2O에서 폴리(에틸렌-말레산 무수물) (PEMA) (4 mL, 1% w/v)의 용액에 디클로로메탄 (DCM)에서 폴리(락티드-코-글리콜산) (PLG) (2 mL, 20% w/v)의 용액이 방울방울 첨가되었다. 혼합물은 VC 30 Ultrasonic Processor를 이용하여, 16 와트에서 30 초 동안 얼음 위에서 초음파처리되었다. 결과의 균질화된 미가공물은 이후, D_2O의 용액 (0.5% w/v의 PEMA를 내포하는 200 mL) 내로 부어졌다. 균질화된 슬러리는 Bellco Glass, Inc., Bellstir 다중-교반 9 자력 교반기를 이용하여 3.5의 속도 세팅에서 하룻밤 동안 교반되었다 (10 초 동안 10 W, 10 초 동안 16 W, 30 초 동안 16 W).

[0185] *결과*

[0186] 3 시간의 교반 후, 입자 크기 분석은 일회용 폴리스티렌 큐벳에서 동적 광 산란을 이용하여 수행되었다

[0187] a. 10 W, 10 초 - Z-평균 = 499.9 nm - PdI = 0.23, 피크 = 634.5 nm

[0188] b. 16 W, 10 초 - Z-평균 = 528.9 nm - PdI = 0.227, 피크 = 657.5 nm

[0189] c. 16 W, 30 초 - Z-평균 = 471.6 nm - PdI = 0.228, 피크 = 580.5 nm

[0190] d. 16 W, 60 초 - Z-평균 = 491.1 nm - PdI = 0.275, 피크 = 600.8 nm

[0192] 반응이 완결된 후, 결과의 미가공 현탁액은 이후, 정제되었다.

[0193] *정제*

[0194] 새로운 D_2O와 10x 중탄산나트륨 완충액은 하룻밤 동안 4℃까지 냉각되었다. 40 μm 셀 스트레이너를 이용하여, 36 mL의 입자 현탁액은 각 배치로부터, 4 mL 냉각된 10x 중탄산나트륨 완충액을 내포하는 적절하게-표지화된 50 mL 원심기 튜브 내로 여과되었다. 각 비커는 대략 6개의 이런 튜브를 생산하였다. 모든 튜브는 4℃에서 약 15 분 동안 7000g에서 원심분리되고, 그리고 상층액이 흡인되었다. 현탁액의 제조는 상기-언급된 절차를 이용하여 반복되고, 그리고 많은 입자 펠릿은 1 mL 냉각된 D_2O에서 가능한 현탁되었다.

[0195] 재현탁된 입자는 4 mL의 냉각된 10x 중탄산나트륨 완충액을 갖는 새로운 튜브 내로 이전되었다. (단계 1)

[0196] 입자의 재현탁은 전체 입자 펠릿이 성공적으로 재현탁될 때까지 반복되었다. (단계 2)

[0197] 6개 원심기 튜브는 이후, 1개의 원심기 튜브 (50 mL 튜브)로 합동되고, 그리고 상기 튜브는 40 mL의 냉각된 D_2O까지 나머지 부피로 충전되었다 (세척 1).

[0198] 튜브는 4℃에서 20 분 동안 7000g에서 원심분리되고, 그리고 상층액은 흡인되었다.

[0199] 결과의 입자의 단계 1과 2 및 세척 1은 매번 최소한 2회 더 반복되었다. 최종적으로, 결과의 입자 펠릿은 이후, 액체 질소에서 순간 동결에 종속되고 음성으로 IMP를 획득하기 위해 다양체에서 냉동건조되었다.

[0200] 도면 1은 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 동적 광 산란 분석에 의해 보여준다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 2.5×10^5 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 567 nm의 Z-평균 직경, 670 nm의 피크 직경 및 0.209의 다분산성 지수를 가졌다.

[0201] 표 1은 표면 기능화된 PLG-PEMA 입자에 대한 치수를 보여준다. 상기 표에서 자료는 대표적인데, 그 이유는 각

배치가 약간 상이하기 때문이다. 상기 표에서 숫자는 여러 배치의 입자를 합동하는 것에 기초되었다. 이중 유제 입자에 대한 치수는 표 1에서 치수와 유사하다.

표 1

[0202] 표 1 - 표면 기능화된 PLG-PEMA 입자에 대한 치수

입자	강도에 의한 Z-평균 크기 (nm)	ζ-전위 (mV)
PLG (Phosphorex)	624.3	-32.7 ± 4.71
PLG-PEMA	429.9	-67.4 ± 10.9

[0203] 실시예 2

[0204] *항원-연계된 PLGA 비드의 투여는 재발성 실험적 자가면역 뇌염을 예방한다*

[0205] PLG 나노입자는 재발성 실험적 자가면역 뇌염 (R-EAE)의 예방을 위한 관용을 유도하기 위해 면역우세 단백지질 단백질 $PLP_{139-151}$ 에피토프 (PLG-$PLP_{139-151}$)로 조사되었다. R-EAE 생쥐는 전술한 바와 같이 산출되었다.

[0206] 이들 동물에 투여된 펩티드는 500 nm의 평균 직경을 갖는 입자에 연계되었다. 생쥐는 면역화의 시기 (0 일)에 비하여 -7 일자에 $PLP_{139-151}$-PLGA (N=5), $OVA_{323-339}$-PLGA (N=5), 또는 접합되지 않은 PLGA (N=5)로 처리되었다. 피크 질환은 전형적으로 12 일 내지 14 일자 정도에 관찰되었고, 그리고 생쥐는 임상적 질환에 대해 채점된다. 펩티드가 없거나, 또는 대조 펩티드 $OVA_{323-339}$로 변형된 입자는 질환 유도를 예방하지 못하였다. 하지만, $PLP_{139-151}$로 변형된 PLGA 입자는 20 일과 30 일자 사이에 전시된 1 미만의 낮은 임상적 점수를 제외하고, 0의 임상적 점수 (질환 없음)를 산출하였다 (도면 2). 변형되지 않은 PLG로 또는 폴리스티렌 입자를 이용한 이전 연구는 이러한 효과적인 질환 감소를 산출하지 못하고, 폴리스티렌 결합된 입자가 통상적으로 과민증을 촉발하였다.

[0207] 게다가, 수초-특정한 $CD4^+$ T 세포의 특정한 불활성화는 양쪽 면역화 $PLP_{139-151}$ 에피토프에 대한 지연형 과민증 (DTH) 반응의 결여에 의해 증명되었다. 종합하면, -7 일자에 PLG-$PLP_{139-151}$로 예방적 처리는 EAE 진전을 특이적으로 예방하고, 그리고 질환을 예방하는 입자의 능력에서 향상을 나타낸다. 이들 입자로 산출된 점수는 항원-연계된 비장세포로 산출된 점수만큼 좋고, 그리고 아마도 이들 점수보다 우수하다.

[0208] 투여된 입자의 유형 역시 생쥐 모델에서 EAE의 진전에 대한 효과를 갖는다. 생쥐는 면역화의 시기 (0 일)에 비하여 -7 일자에 $OVA_{323-339}$-PLS (N=5), $OVA_{323-339}$-$PLGA_{PHOSPOREX}$ (N=5), $OVA_{323-339}$-$PLGA_{PEMA}$ (N=5), $PLP_{139-151}$-PLA (N=5), $PLP_{139-151}$-$PLGA_{PHOSPOREX}$ (N=5), 또는 $PLP_{139-151}$-PLG_{PEMA} (N=5)로 처리되었다. 피크 질환은 전형적으로 12 일 내지 14 일자 정도에 관찰되었고, 그리고 생쥐는 임상적 질환에 대해 채점된다. 대조 펩티드 $OVA_{323-339}$로 변형된 임의의 조성물의 입자는 질환 유도를 예방하지 못하였다. 하지만, $PLP_{139-151}$ 연계된 PLG 비드는 $PLP_{139-151}$ 연계된 상업적인 (Phosphorex) pLG 또는 폴리스티렌보다 R-EAE의 유도를 하향조절하는데 더욱 효과적이었다 (도면 3A와 3B).

[0210] 실시예 3

[0211] *항원 연계된 PLG 입자의 정맥내 주입은 OVA/백반 전감작화된 동물에서 과민증-유도된 온도 하락을 유도하지 않는다*

[0212] 활성 질환의 존재로 인해, 이들 항원에 대한 과민증이 우려되는데, 이것은 즉각적인 사망을 유발할 수 있고, 그리고 폴리스티렌 결합된 입자로 설명되었다. 과민증은 체온에서 유의미한 하락과 연관된다. OVA-PLG의 정맥내 투여가 전감작화된 동물에서 과민증-유도된 온도 하락을 유도하는 지를 시험하기 위해, 생쥐는 0 일자에 복강내 주사를 통해 10 μg OVA/백반으로 면역화되었다. 14 일자에, 이들 생쥐는 복강내 주사를 통해 10 μg OVA/백반으로 다시 한 번 면역화되고, 그리고 이후, 21 일자에 정맥내 투여된 OVA-PLG로 관용유도되었다. 28 일자에, 이들 생쥐는 정맥내 투여를 통해 OVA-PLG 입자 또는 OVA로 관용유도되었다.

[0213] 도면 4에 나타나 있는 바와 같이, 28 일자에 가용성 OVA로 처리된 생쥐는 OVA-PLG 입자로 처리된 동물과 비교하여, 온도에서 감소를 전시하였다. 이들 입자를 전달하는 1 시간 이내에 체온에서 어떤 감소도 관찰되지 않았다.

[0214] 도면 5는 관해 동안 PLP-PLG의 투여가 임의의 과민증-연관된 사망을 유발하지 않는다는 것을 보여준다. EAE는 CFA에서 $PLP_{139-151}$의 피하 주사에 의해 6 내지 8 주령 암컷 SJL/J 생쥐에서 유도되고, 그리고 임상적 질환의 진전이 모니터링되고 기록되었다 (도면 5B). 질환 유도에 비하여 21 일자에, 생쥐는 가용성 $PLP_{139-151}$ (투명한 사각형), 가용성 $OVA_{323-339}$ (투명한 원), 또는 PLG 나노입자에 연계된 동일한 펩티드 (속이 채워짐)의 iv 주사가 제공되었다. 동물의 온도는 주사 이후에 1 시간 동안 10 분마다 모니터링되고 기록되었다 (도면 5A).

[0216] 실시예 4

[0217] *PLP-PLG 입자로 예방적 처리는 장기간, 항원-특이적 관용을 유도한다*

[0218] 최적 투약은 질환 유도보다 7 일 앞서, 증가하는 농도의 $PLP_{139-151}$-PLG의 정맥내 투여에 의해 결정되고, 그리고 $OVA_{323-339}$-PLG로 처리된 SJL/J 생쥐와 비교하여 임상적 질환의 진전에 대해 모니터링되었다 (도면 6A). 6 내지 8 주령 암컷 SJL/J 생쥐는 $PLP_{139-151}$ (사각형)- 또는 $OVA_{323-339}$ (원)-연계된 PLG 나노입자가 iv 주사되었다. EAE는 7 일 (도면 6B), 25 일 (도면 6C), 또는 50 일 (도면 6D) 후, CFA에서 $PLP_{139-151}$의 피하 주사에 의해 유도되었다. 패널 B로부터 동물은 100 일 동안 임상적 질환에 대해 추적되었다. 도면 6E는 질환 유도에 비하여 8 일자에, 지연형 과민증 (DTH) 반응이 패널 B에서 도시된 생쥐의 부분집합에서 수행되었다는 것을 보여준다. 패널 B ($OVA_{323-339}$-PLG 및 $PLP_{139-151}$-PLG)에서 $PLP_{139-151}$/CFA 기폭된 군으로부터 선별된 대표적인 동물은 기폭 $PLP_{139-151}$ 에 피토프, 그리고 $OVA_{323-339}$ 대조 펩티드로 귀-공격되었다. DTH의 척도로서 귀 종창은 24 시간 후 결정되고, 그리고 공격에 앞선 반응은 감산되었다. 도면 6F는 6 내지 8 주령 암컷 SJL/J 생쥐가 $PLP_{178-191}$ (삼각형)-, $OVA_{323-339}$ (원), 또는 $PLP_{139-151}$ (사각형)-연계된 PLG 나노입자, 또는 연계되지 않은 입자 단독 (개설된 원)이 정맥내 주사되었다는 것을 보여준다. EAE는 CFA에서 $PLP_{178-191}$의 피하 주사에 의해 7 일 후에 유도되고, 그리고 질환은 도시된 시점에서 모니터링되었다.

[0220] 실시예 5

[0221] *항원-연계된 입자로 재발성 실험적 자가면역 뇌염의 치료*

[0222] 실험은 질환을 예방하기 보다는 질환을 *치료하는* PLG-$PLP_{139-151}$ 입자의 능력을 조사하고, 그리고 투여 루트가 질환의 진전에 영향을 주는 지를 결정하기 위해, 본 발명의 구체예의 발달 동안 수행되었다. 생쥐는 0 일자에 $PLP_{139-151}$ 및 어쥬번트로 면역화되었다. 생쥐는 정상적으로, 12-14 일자에 최대 임상적 점수를 갖는다. 이러한 모델에서, 생쥐는 10 일자에 정맥내 (iv) 투여, 복강내 (ip) 투여, 피하 (sc) 투여, 또는 경구 투여를 통해 PLG-$PLP_{139-151}$ 입자 또는 대조 PLG-$OVA_{323-339}$ 입자로 처리되었다. 도면 7에 나타나 있는 바와 같이, 예방적 관용은 PLG-$PLP_{139-151}$ 입자가 정맥내 또는 복강내 투여될 때 가장 효율적이다. 정맥내 투여된 $PLP_{139-151}$-PLG로 처리된 동물은 질환이 진전되지 않고 대부분의 시점에서 0의 평균 임상적 점수를 가졌다. 이것은 동물 중에서 >70%가 과민증으로 인해 사망하는 것으로 관찰된, $PLP_{139-151}$ 폴리스티렌 입자로 처리된 동물과 대조적이다.

[0223]

[0224] 실시예 6

[0225] *항원-연계된 입자 관용은 활동성 재발성 실험적 자가면역 뇌염에서 항원-특이적 Th1과 Th17 반응의 유도를 저해한다*

[0226] 항원-연계된 입자의 투여가 T-보조 세포의 유도를 저해하는 지를 결정하기 위해, MOG_{35-55}-PLG 또는 $OVA_{323-339}$-PLG 입자가 -7 일자에 BALB/c 생쥐에 정맥내 투여되었다. 0 일자에, $OVA_{323-339}$-PLG 입자 및 완전한 프로인드 어쥬번트 (CFA)가 이들 생쥐에 피하 투여되었다. 이들 동물은 10 일자에 MOG_{35-55}-PLG 또는 $OVA_{323-339}$-PLG 입자로 재자극되었고, 그리고 배수 림프절 세포가 단리되었다. IL-17, GM-CSF, IFN-γ, IL-10, 그리고 IL-4의 CPM과 수준이 10 일자에 계량되었다. 도면 8에 나타나 있는 바와 같이, $OVA_{323-339}$-PLG 입자의 투여는 처리된 동물에서 Th1과 Th17 반응을 저해하였다.

[0228] 실시예 7

[0229] *관용은 PLP-139$_{-151}$ 연계된 PLGA 입자에 의해 유도된다*

[0230] 추가적인 치료 관용 전략은 PLP$_{139-151}$-PLG 또는 OVA$_{323-339}$ PLG를 생쥐에 전달함으로써 수행되었다. 조직학적 분석은 PLP$_{139-151}$-PLG 입자의 투여가 경부 척수 염증과 탈수초를 저해한다는 것을 보여주었다. 생쥐는 PLP-PLG 또는 OVA$_{323-339}$-PLG로 처리되고, 그리고 조직은 40 일자에 회수되었다. 경부 척수는 CNS 내에 면역 반응을 조사하기 위해 단리되고 절개되었는데, 이것은 R-EAE와 다발성 경화증의 병리의 기초가 된다. 도면 9는 PLP$_{139-151}$-PLG로 처리된 동물의 척수 내에서 면역 세포 침윤에서 감소를 보여주고, 그리고 OVA$_{323-339}$-PLG 처리된 동물로부터 조직보다 고유한 조직에 더욱 유사하였다. OVA$_{323-339}$-PLG 처리된 동물은 CD45, CD4, 그리고 CD11b에 대한 양성 염색을 가졌다; 반면, PLP$_{139-151}$-PLG 처리된 동물은 이들 인자에 대해 최소 염색을 가졌다.

[0231] PLP$_{139-151}$-PLG 입자의 투여는 또한, 처리된 생쥐의 척수에서 혈액 뇌 장벽 (BBB) 교란 및 대식세포 활성화를 저해한다. 동물은 완전한 프로인드 어쥬번트 (CFA), OVA$_{323-339}$ PLG 입자, 또는 PLP$_{139-151}$-PLG 입자로 처리되었다. EAE의 임상적 점수와 퍼센트 발생률이 결정되고 (도면 10B), 그리고 척수가 생체내 영상화를 통해 관찰되었다 (도면 10A와 11). 안지오센스는 CNS에서 맥관 누출을 계량하고, 그리고 프로센스는 활성화된 대식세포를 보고한다 (카텝신 활성화는 리포터를 개열하고 형광 신호를 드러낸다). 막대 그래프는 뇌와 SC 스캔에서 도시된 신호 강도에 수치 번호를 제공한다.

[0232] 관용은 또한, 항원이 피포된 입자에 의해 유도될 수 있다. 도면 12는 PLP$_{139-151}$이 피포된 PLG 입자의 투여가 생쥐에서 R-EAE의 유도를 저해한다는 것을 보여준다. 자가항원을 피포하는 능력은 더욱 넓은 항원 범위를 달성하고, 따라서 에피토프 확산을 더욱 효과적으로 다루기 위한 단백질 또는 심지어 장기 균질액의 복합체 혼합물의 이용을 가능하게 한다.

[0234] 실시예 8

[0235] *PLP-139$_{-151}$ 연계된 PLGA 입자에 의해 유도된 관용은 조절 T-세포의 확장/활성화에 부분적으로 의존한다*

[0236] SJL/J 생쥐는 -9 일자에 조절 T 세포에 대한 통상적인 마커 (Tregs)인 항-CD25 항체로 처리되고, 그리고 이후, -7 일자에 OVA$_{323-339}$ PLG 입자와 항-CD25 항체, OVA$_{323-339}$ PLG 입자와 대조 IgG 항체, PLP$_{139-151}$-PLG 입자와 항-CD25 항체, 또는 PLP$_{139-151}$-PLG 입자와 대조 IgG 항체로 처리되었다. 도면 13에 나타나 있는 바와 같이, PLP$_{139-151}$-PLG 입자와 항-CD25 항체로 처리된 동물은 때때로, PLP$_{139-151}$-PLG 입자와 대조 IgG 항체로 처리된 동물보다 더욱 큰 평균 임상적 점수를 보였다. 이것은 Tregs, 또는 최소한 CD25를 발현하는 T 세포가 관용의 개시에서 일정한 역할을 수행한다는 것을 확증한다.

[0238] 실시예 9

[0239] *치료 관용은 활성과 입양 EAE에서 PLP$_{139-151}$-PLG 입자에 의해 유도된다*

[0240] PLP$_{139-151}$-PLG 입자에 의해 유도된 치료 관용은 활성과 입양 EAE에서 비교되었다. 입양 EAE는 2.5x10^{6} PLP$_{139-151}$-활성화된 모구의 입양 전달에 의해 6 내지 8 주령 암컷 SJL/J 생쥐에서 유도되었다. 생쥐는 질환 유도 이후에 2 일 (도면 14A) 또는 14 일 (도면 14C)에, 500nm PLG 나노입자에 연계된 PLP$_{139-151}$ (사각형) 또는 OVA$_{323-339}$ (원) 펩티드가 iv 주사되었다. 임상적 질환 점수는 항원-연계된 비장세포로 처리에 따른 것들과 비교되었다 (도면 14A). 뇌와 척수는 42 일자에 조직학적 분석을 위해 PLP$_{139-151}$ - 또는 OVA$_{323-339}$ -관용유도된 생쥐로부터 수집되었다. 패널 A로부터 생쥐로부터 절편은 PLP 단백질과 CD45에 대해 염색되었다 (도면 14B). 패널 C로부터 생쥐로부터 척수 절편은 Luxol Fast Blue로 염색되었다 (도면 14D). 탈수초와 세포 침윤의 구역은 화살표에 의해 지시된다. 이들 결과는 관용이 입양 EAE를 앓는 생쥐에서 PLP$_{139-151}$-PLG 입자에 의해 유도된다는 것을 보여준다.

[0241] 도면 15는 OVA$_{323-339}$ 또는 PLP$_{139-151}$에 접합된 SP 또는 PLG 입자로 처리 후, 활성 EAE와 입양 EAE를 앓는 생쥐의 평균 임상적 점수를 묘사하는 그래프를 보여준다. 생쥐는 질환 유도 이후에 10 일 (도면 15A) 또는 2 일 (도면 15B)에, 500nm 나노입자에 연계된 PLP$_{139-151}$-SP, PLP$_{139-151}$-PLG, 또는 OVA$_{323-339}$-SP, 또는 OVA$_{323-339}$ - PLG 펩티드가

iv 주사되고, 그리고 평균 임상적 점수가 결정되었다. 양쪽 사례에서, $PLP_{139-151}$-PLG 입자의 투여는 질환을 감소시키고, 관용 유도를 지시하였다.

[0242] 중추신경계 면역 세포의 침윤 역시 PLP-PLG 관용유도된 생쥐에서 극적으로 감소된다. SJL/J 생쥐는 입양 전달에 의한 EAE 유도 이후에 2 일에 $PLP_{139-151}$ (사각형) 또는 $OVA_{323-339}$ (원)와 연계된 500nm PLG 나노입자가 i.v. 주사되었다. 질환의 피크 (14 일자)에서, 뇌와 척수는 제거되고, 그리고 림프구 (도면 16B), APC (도면 16C), 소교세포 (도면 16D), 말초 수지상 세포 (도면 16E), 골수성 수지상 세포 (도면 16F)와 대식세포 (도면 16G)의 숫자는 유세포분석법에 의해 계산되었다. 이들 개체군에 대한 게이팅 전략은 (도면 16A)에서 묘사된다. CNS 세포 제조물은 IL-17A와 IFN-γ에 대한 세포내 염색에 앞서 5 시간 동안 PMA와 이오노마이신으로 자극되었다 (도면 16H).

[0244] 실시예 10

[0245] *항-PD-1 단클론 항체로 처리는 입양 전달 EAE에서 $PLP_{139-151}$을 피포하는 PLG 나노입자로 관용 유도를 제거한다*

[0246] 입양 EAE를 앓는 생쥐에서 $PLP_{139-151}$ 유도된 관용에 대한 항-PD-1 항체로 처리의 효과를 시험하기 위해, 0 일자에, 생쥐는 정맥내 투여를 통해 $3x10^6$ $PLP_{139-151}$ 활성화된 T-세포 모구를 받았다. 2 일자에, 이들은 PBS 또는 an 항-PD-1 항체로 정맥내 투여를 통해, PLG 입자 내에 피포된 $PLP_{139-151}$ 또는 $OVA_{323-339}$를 받았다. 4, 6, 8, 10, 그리고 12 일자에, 모든 동물은 250㎍ 항-PD-1 항체 또는 PBS를 받았다.

[0247] 도면 17에 나타나 있는 바와 같이, PLG 입자 내에 피포된 $PLP_{139-151}$ 펩티드의 투여는 상기 입자가 PBS와 함께 투여될 때, 관용을 유도한다. 하지만, 항-PD-1 항체의 투여는 이러한 관용을 감소시킨다.

[0249] 실시예 11

[0250] *효현성 항-CD40 단클론 항체로 처리는 입양 전달 EAE에서 $PLP_{139-151}$을 피포하는 PLG 나노입자로 관용 유도를 IL-12 의존성 방식으로 제거한다*

[0251] 입양 EAE를 앓는 생쥐에서 $PLP_{139-151}$ 유도된 관용에 대한 효현성 항-CD40 항체로 처리의 효과를 시험하기 위해, 0 일자에, 생쥐는 정맥내 투여를 통해 $3x10^6$ $PLP_{139-151}$ 활성화된 T-세포 모구를 받았다. 2 일자에, 이들 생쥐는 정맥내 투여를 통해, PLG 입자 내에 피포된 $PLP_{139-151}$ 또는 $OVA_{323-339}$를 받았다. 3 일자에, 이들 동물은 대조 IgG2a 항체, 항-CD40 항체, 또는 항-CD40 항체 및 항-Il-12 항체를 받았다.

[0252] 도면 18에 나타나 있는 바와 같이, PLG 입자 내에 피포된 $PLP_{139-151}$ 펩티드의 투여는 상기 입자가 PBS와 함께 투여될 때, 관용을 유도한다. 효현성 항-CD40 항체의 투여는 이러한 관용을 감소시키지만, 관용에서 이러한 감소는 항-IL-12 항체의 첨가에 의해 반전된다.

[0254] 실시예 12

[0255] *PLG 입자 내에 피포된 OVA는 알레르기성 기도 염증 및 생체내 OVA-특이적 Th2 반응을 예방적으로 저해한다*

[0256] 기도 염증에 대한 PLG 입자 내에 피포된 OVA의 예방적 효과를 시험하기 위해, 생쥐는 -7 일자에 OVA-PLG로 정맥내 처리되었다. 0 일자에, 이들 생쥐는 10㎍/생쥐의 분량에서 OVA/백반의 복강내 주사를 받았다. 7 일자에, 이들 생쥐는 다시 한 번, OVA-PLG로 정맥내 처리되고 14 일자에 OVA/백반의 다른 10㎍/생쥐 ip 주사를 받았다. 28 일과 30 일자 사이에, 이들 생쥐는 에어로졸화된 OVA로 3 회 처리되었다.

[0257] 도면 19에 나타나 있는 바와 같이, OVA-PLG의 예방적 투여는 IL-4, IL-5, IL-13과 IL-10의 분비를 감소시키고, 그리고 폐에서 혈청 OVA IgE와 호산구의 수준을 감소시켰다.

[0258] PLG 입자 내에 피포된 OVA는 종격 림프절로부터 OVA-특이적 시험관내 회상 반응을 예방적으로 저해한다. 도면 20A에 나타나 있는 바와 같이, 25 ㎍ OVA로 재자극 후 관찰된 림프절 증식은 OVA-PLG로 처리된 동물에서 감소된다. 게다가, OVA-PLG로 처리는 OVA로 재자극 후 사이토킨의 방출을 감소시킨다. 도면 20B는 IL-4, IL-5, IL-13, 그리고 IL-10의 수준이 OVA-PLG로 처리된 생쥐에서 감소된다는 것을 보여준다.

[0260] 실시예 13

[0261] *PLG 입자 내에 피포된 OVA는 알레르기성 기도 염증 및 생체내 OVA-특이적 Th2 반응을 치료적으로 저해한다*

[0262] 기도 염증에 대한 PLG 입자 내에 피포된 OVA의 치료적 효과를 시험하기 위해, 생쥐는 0 일과 14 일자에 10㎍/생쥐의 분량에서 OVA/백반으로 복강내 처리되었다. 이들 생쥐는 28 일과 42 일자에 OVA-PLG가 정맥내 투여되었다. 56-58 일자 사이에, 이들 생쥐는 에어로졸화된 OVA로 3 회 처리되었다.

[0263] 도면 21에 나타나 있는 바와 같이, OVA-PLG의 치료적 투여는 IL-4, IL-5, IL-13과 IL-10의 분비를 감소시키고, 그리고 폐에서 혈청 OVA IgE와 호산구의 수준을 감소시켰다.

[0264] 도면 22는 PLG 입자 내에 피포된 OVA가 OVA-연계된 PLG 입자보다 우수하게, BAL 액체에서 OVA-특이적 Th2 사이토킨을 치료적으로 하향조절한다는 것을 보여준다. 이들 동물은 28 일과 42 일자에, 생쥐가 PLG 입자 내에 피포된 OVA, 또는 PLG 입자에 연계된 OVA로 처리된 점을 제외하고, 전술한 바와 같이 처리되었다. 놀랍게도, 피포된 OVA는 PLG 입자의 표면에 연계된 OVA 펩티드보다 많이 Th2 사이토킨의 분비를 저해하였다.

[0266] 실시예 14

[0267] *크로모그라닌 A p31 펩티드-PLG 입자에 의해 유도된 관용은 1형 당뇨병을 저해한다*

[0268] 1형 당뇨병은 3 주에서 생쥐로부터 비장, 액와, 상완, 서혜부, 그리고 췌장 림프절 세포를 단리함으로써 BDC2.5 생쥐에서 유도되었다. 단리된 세포는 0.5μM p31 펩티드와 함께 $2x10^6$ 세포/mL를 96 시간 동안 배양함으로써 시험관내에서 배양되고 활성화되었다. $5x10^6$ 세포는 0 시에서 정맥내 투여를 통해 NOD.SCID 생쥐 (6-8 주)로 이전되었다. 이들 생쥐는 2 시간 내지 3 일 후, SP 또는 PLG에 연계된 p31 또는 MOG_{35-55} 펩티드로 정맥내 투여를 통해 관용유도되었다.

[0269] 도면 23A와 23B는 치료 후 이들 동물에서 혈당 수준을 보여준다. p31 펩티드 연계된 PLG의 투여는 MOG_{35-55} 펩티드 연계된 입자로 투여 후 관찰된 것들과 비교하여 더욱 낮은 혈당 수준을 야기하였다. 도면 23C는 이들 동물에서 관찰된 IFNγ 분비 세포의 퍼센트 역시 MOG_{35-55} 펩티드-PLG 처리된 생쥐와 비교하여 p31-PLG 처리된 생쥐에서 감소된다는 것을 보여준다.

[0270] p31-PLG 유도된 관용은 Tregs를 필요로 한다. 1형 당뇨병은 전술한 바와 같이 생쥐에서 유도되었고, 그리고 활성화된 세포가 NOD.SCID 생쥐로 이전된 후 2 시간 시점에, 이들 생쥐는 p31-PLG 또는 MOG_{35-55} PLG 입자로 관용유도되었다. 도면 24에 나타나 있는 바와 같이, Tregs의 고갈은 p31-PLG 입자의 투여에 의해 유도된 관용을 제거한다.

[0272] 실시예 15

[0273] *인슐린-연계된 PLG 입자에 의해 유도된 관용은 NOD 생쥐에서 자발성 1형 당뇨병의 진전을 저해한다*

[0274] NOD 생쥐는 6, 8, 그리고 10 주령에서 정맥내 투여를 통해, BSA (N=22) 또는 인슐린 (N=23) 연계된 PLG 입자로 처리되었다. 이들 생쥐는 이후, 혈당 >250 mg/dL로서 정의된 당뇨병의 진전에 대해 검정되었다. 도면 25에 나타나 있는 바와 같이, 인슐린 연계된 PLG 입자의 투여는 300여 일에 걸쳐 당뇨병이 진전되지 않는 생쥐의 백분율을 유의미하게 증가시켰다 (22.7%와 비교하여 69.6%; p=0.0027).

[0276] 실시예 16

[0277] *이식 동역학*

[0278] 암컷 CD45.2 생쥐는 -7 일자에 OVA-PLG 또는 대조 펩티드 Dby-PLG (수컷 C57BL/6 생쥐에 의해 발현된 주요 H-Y 항원)로 관용유도되었다. -1 일자에, 이들 생쥐는 200 라드로 방사선조사되고, 그리고 이후, 0 일자에 수컷 CD45.1 생쥐로부터 $1x10^6$, $5x10^6$, 또는 $1x10^7$ 골수 세포가 이식되었다. 수용자 생쥐는 이후, 1 일자에 OVA-PLG, Dby-SP, 또는 Dby-PLG로 관용유도되고, 그리고 키메라현상의 FACS 분석을 위해 혈액이 수확되었다. 도면 26은 수용자 생쥐에서 관찰된 CD45.1 공여자 세포의 퍼센트를 보여준다.

[0279] 도면 27은 1 일자에 OVA-PLG, Dby-SP, 또는 Dby-PLG로 관용유도 후 수용자 생쥐에서 공여자 CD45.1 세포의 퍼센트를 보여준다. 1마리 양성 대조 생쥐는 유의미한 이식 (~10%)을 나타내지 않았다. 모든 음성 대조 생쥐는 공여자 세포를 이식하지 않았다. 1마리 Dby-SP 생쥐는 유의미한 이식 (~10%)을 나타내지 않았다. 2마리 OVA-PLG 생쥐는 공여자 세포 (~10%)를 이식하였다: 1마리는 16 주까지 완전하게 거부되었다. 1마리 Dby-PLG 생쥐는 12

주에 거부하기 시작하고 16 주까지 10%에 있었다. Dby-PLG 군은 16 주까지 10%-56% 이식의 범위에서 변하였다. OVA-PLG 생쥐는 1) 자발성 이식, 2) OVA323과 Dby 사이에 서열 상동성 또는 3) 입자의 면역관용 성질을 증명하였다. Dby-PLG는 Dby-SP와 OVA-PLG보다 더욱 많은 이식을 허용한다.

[0280] 도면 28은 시간 관용이 수용자 생쥐에서 CD45.1 세포의 퍼센트에 대한 효과를 갖는다는 것을 보여준다. 양성 대조는 예상된 것 (~10%)보다 적은 이식 (~4%)을 보여준다. 1마리 음성 대조 생쥐는 5% 이식을 가졌다. 3가지 모든 OVA-PLG 군 중에서, -7 일, +1 일 군에서 1마리 생쥐는 이식 (12%)을 보였다. 1 일자에 관용은 -7 일자에 관용보다 임상적으로 더욱 유관하다.

[0282] 실시예 17

[0283] *쿠마린-6 PLGA 입자는 투여 후 24 시간 시점에 검출되지 않는다*

[0284] 생쥐는 항원에 연계되거나 또는 항원이 없는 쿠마린-6 PLGA 입자로 처리되었다. 도면 29에 나타나 있는 바와 같이, 이들 입자는 투여 후 3 시간 시점에 검출되지만, 투여 후 24 시간 시점에는 검출되지 않았다. 주사 후 3-시간 (중간 열) 및 주사 후 24-시간 (아래쪽 열)에서 i.v. 형광 PLGA/PEMA 마이크로입자 주사된 생쥐 비장 (왼쪽 칼럼), 간 (중간 칼럼)과 폐 (왼쪽 칼럼) 절편과 비교하여 경험 없는 주사되지 않은 생쥐 (위쪽 열)은 DAPI로 대비 염색되었다.

[0286] 실시예 18

[0287] *나노입자는 생체내에서 대식세포와 연관된다*

[0288] 투여 후 6 시간과 15 시간 시점에 간의 분석은 PLGA 입자가 간에서 $F4/80^{+}$ 세포와 공동-국부화된다는 것을 보여준다 (도면 30).

[0289] 변연대 대식세포는 정맥내 주입 후 24 시간 시점에, TAMRA-표지화된 $PLP_{139-151}$-연계된 입자를 주로 흡수한다. 도면 31에 나타나 있는 바와 같이, $PLP_{139-151}$+ 세포의 가장 높은 백분율은 변연대 대식세포이다.

[0291] 실시예 19

[0292] *코어 내에 가용성 PLP139-151을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자를 이용한 SJL/J 생쥐에서 R-EAE의 저해.*

[0293] SJL/J 생쥐의 군은 0 일자에 PLP139-151/CFA로 기폭에 상대적으로 앞서 -7 일자와 -1 일자에, 코어 내에 가용성 PLP139-151 펩티드를 갖는 2.5 mg 500 nm - 700 nm 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자가 iv 주사되었다. 대조 생쥐는 0 일자에 기폭되지만 -7 일 또는 -1 일자에 입자 처리를 받지 않았다. 생쥐는 추가 20 일 동안 R-EAE의 임상 징후에 대해 관찰되었다.

[0294] 도면 32에 묘사된 결과는 PLP139-151/CFA 기폭 일자의 숫자와 대비하여 일일 평균 임상적 점수를 묘사한다. PLP139-151/CFA-유도된 R-EAE는 코어 내에 가용성 PLP139-151을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자를 이용한 면역 관용의 유도에 의해 SJL/J 생쥐에서 저해되었다.

[0296] 실시예 20

[0297] *가용성 난백알부민을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자에 의한 알레르기성 기도 염증의 저해*

[0298] 알레르기성 기도 염증 (AIA)은 생쥐에서 유도되었다. Balb/c 생쥐의 군은 0 일과 +14 일자에 난백알부민/백반으로 기폭에 앞서 -7 일과 +7 일자에, 코어 내에 가용성 난백알부민 또는 가용성 소 혈청 알부민 (대조)을 갖는 2.5 mg 500 nm - 700 nm 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자가 정맥내 주사되었다. 생쥐는 +28-30 일자에 에어로졸화된 난백알부민으로 공격되었다. 생쥐는 이후, 희생되고, 그리고 기관지폐포 세척액이 획득되었다. 난백알부민 특이적 IgE의 혈청 수준 역시 계량되었다.

[0299] 기관지폐포 세척액 내에 호산구 계수는 AAI의 심각도를 지시한다 - 더욱 높은 계수는 더욱 나쁜 질환을 지시하였다. IgE의 혈청 수준은 AAI의 심각도를 지시한다 - 더욱 높은 수준은 더욱 나쁜 질환을 지시하였다.

[0300] 도면 33은 피포된 OVA-PLG로 처리된 생쥐가 호산구 축적에서 최대 감소를 나타낸다는 것을 보여준다. 도면 34는 피포된 OVA-PLG로 처리된 생쥐가 처리되지 않은 또는 대조 처리된 동물과 비교하여 혈청 IgE 수준에서 최대 감

소를 나타낸다는 것을 보여준다.

[0301] Balb/c 생쥐에서 난백알부민/백반-유도된 알레르기성 기도 염증은 코어 내에 가용성 난백알부민을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자를 이용한 면역 관용의 유도에 의해 저해되었다.

[0303] 실시예 21

[0304] *항원을 피포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 합성*

[0305] 본 실시예는 고밀도의 카르복실산염 기로 표면-기능화되고, 그리고 자가면역 질환에서 관용 유도 및 알레르기의 치료를 위해 폴리(락티드-코-글리콜리드)의 껍질에 의해 둘러싸인 코어 내에 가용성 항원을 내포하는 생물분해성 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 제제와 부분적인 특성화를 상술한다.

[0306] 고밀도의 카르복실산염 기는 카르복실산염 기가 중추 내로 통합된 중합체인 폴리(에틸렌-알트-말레산 무수물)(PEMA))을 유화 과정을 위한 계면활성제로서 이용함에 의해 달성되었다.

[0307] 전술한 바와 같이, 코어 내에 가용성 PLP139-151을 내포하고 고밀도의 카르복실산염 기로 표면-기능화된 생물분해성 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 다발성 경화증의 SJL/J PLP139-151/CFA-유도된 R-EAE 뮤린 모델에서 면역 관용의 유도에 효과적이다. 게다가, 코어 내에 가용성 난백알부민을 내포하고 고밀도의 카르복실산염 기로 표면-기능화된 생물분해성 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 알레르기성 천식의 Balb/c 난백알부민/백반-유도된 AAI 뮤린 모델에서 면역 관용의 유도에 효과적이다.

[0308] 코어 내에 가용성 난백알부민 또는 소 혈청 알부민을 내포하고 고밀도의 카르복실산염 기로 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 하기와 같이 이중 유제-용매 증발 방법을 이용하는 합성되었다:

[0309] 1. 내독소-자유수에서 150 μL의 200 mg/mL 난백알부민 또는 소 혈청 알부민은 20 mL 신틸레이션 바이알 내에 디클로로메탄에서 2 mL의 20% w/v 폴리(락티드-코-글리콜리드)에 방울방울 첨가되었다.

[0310] 2. 결과의 혼합물은 얼음 위에 배치되고, 그리고 프로브 초음파발생장치를 이용하여 10 와트에서 30 초 동안 초음파처리되었다.

[0311] 3. 물에서 10 mL의 1% w/v 폴리(에틸렌-알트-말레산 무수물)이 첨가되었다.

[0312] 4. 결과의 혼합물은 얼음 위에 배치되고, 그리고 프로브 초음파발생장치를 이용하여 16 와트에서 30 초 동안 초음파처리되었다.

[0313] 5. 결과의 유제는 600 mL 비커 내에 200 mL 0.5% w/v 폴리(에틸렌-알트-말레산 무수물) 내로 부어지고, 그리고 입자 경화를 허용하기 위해 하룻밤 동안 교반되었다.

[0314] 6. 경화된 입자는 이후, 원심분리에 의해 정제되고 중탄산염 완충액 pH 9.6로 3 회 세척되었다.

[0315] 7. 정제된 입자는 물에서 4% w/v 수크로오스와 3% w/v D-만니톨에서 재현탁되고, 액체 질소에서 순간 동결되고, 그리고 냉동건조되었다.

[0316] 도면 35는 코어 내에 가용성 PLP139-151을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 동적 광 산란 분석에 의해 보여준다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 1.792 x 105 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 584 nm의 Z-평균 직경, 679 nm의 피크 직경 및 0.162의 다분산성 지수를 가졌다. 이들 결과는 상기의 서면 프로토콜에 따라, 합성의 6개 배치를 대표한다.

[0317] 도면 36은 코어 내에 가용성 PLP139-151을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 ζ-전위 계량에 의해 보여준다. 표면 기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 6.67 x 104 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 -48.9 mV의 피크 ζ-전위 및 5.14 mV의 ζ 편차를 가졌다. 이들 결과는 상기의 서면 프로토콜에 따라, 합성의 6개 배치를 대표한다.

[0318] 도면 37은 코어 내에 가용성 난백알부민을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 동적 광 산란 분석에 의해 보여준다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 1.822 x 105 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 569.7 nm의 Z-평균 직경, 700.3 nm의

피크 직경 및 0.230의 다분산성 지수를 가졌다. 이들 결과는 상기의 서면 프로토콜에 따라, 합성의 3개 배치를 대표한다.

[0319] 도면 38은 코어 내에 가용성 난백알부민을 내포하는 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 특성화를 ζ-전위 계량에 의해 보여준다. 표면 기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 18.2 MΩ 물에서 초당 2.67 x 104 계수의 계수율에서 Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 분석되었다. 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자의 개체군은 -52.2 mV의 피크 ζ-전위 및 5.38 mV의 ζ 편차를 가졌다. 이들 결과는 상기의 서면 프로토콜에 따라, 합성의 3개 배치를 대표한다.

[0321] 실례 22

[0322] *코어 내에 가용성 $PLP_{139-151}$을 내포하는 표면-기능화된 리포솜은 다발성 경화증의 뮤린 R-EAE 모델에서 면역 관용을 유도한다*

[0323] 본 발명자들은 또한, 고밀도의 음성으로-하전된 기로 표면-기능화되고 코어 내에 가용성 항원을 내포하는 생물분해성 리포솜 전달 운반제가 다발성 경화증의 R-EAE 뮤린 모델에서 면역 관용을 유도한다는 것을 발견하였다.

[0324] 본 연구에서 이용된 리포솜은 하기 몰 비율에서 하기 지질로 구성되었다 - 30:30:40 포스파티딜콜린: 포스파티딜글리세롤: 콜레스테롤. SJL/J 생쥐의 군은 0 일자에 $PLP_{139-151}$/CFA로 기폭에 비하여 -7 일자에 코어 내에 가용성 $PLP_{139-151}$ 펩티드를 갖는 200 nm nm 표면-기능화된 리포솜 (생쥐마다 10 μmol 전체 지질)이 iv 주사되었다. 대조 생쥐는 0 일자에 기폭되고, 그리고 -7 일자에 코어 내에 가용성 $OVA_{323-339}$ 펩티드를 갖는 500 nm - 700 nm 표면-기능화된 리포솜 (생쥐마다 10 μmol 전체 지질)을 받았다. 생쥐는 추가 17 일 동안 R-EAE의 임상 징후에 대해 관찰되었다.

[0325] 이들 결과는 $PLP_{139-151}$/CFA 기폭 일자의 숫자와 대비하여 일일 평균 임상적 점수를 묘사한다. 도면 39에 나타나 있는 바와 같이, 코어 내에 가용성 $PLP_{139-151}$ 펩티드를 갖는 표면-기능화된 리포솜으로 처리된 동물은 가용성 $OVA_{323-339}$ 펩티드를 내포하는 표면-기능화된 리포솜으로 처리된 동물보다 더욱 낮은 임상적 점수를 가졌다.

[0326] 본 연구의 결과는 코어 내에 가용성 $PLP_{139-151}$을 내포하고 고밀도의 음성으로-하전된 기로 표면-기능화된 생물분해성 리포솜이 다발성 경화증의 SJL/J $PLP_{139-151}$/CFA-유도된 R-EAE 뮤린 모델에서 면역 관용의 유도에 효과적이라는 것을 증명한다.

[0327] 항원-연계된 또는 항원-피포된 입자에 의해 유도된 관용은 항원-특이적이고, 용량 의존성이고, 그리고 오래 지속된다 (>150 일). 관용은 제타 전위 ≤ -5- mV를 갖고 직경에서 500nm 내지 1 μm인 연계된 입자의 정맥내 투여에 의해 최선으로 유도된다. 관용의 유도는 다가음이온 표면을 갖는 MARCO 스캐빈저 수용체에 의한 이들 입자의 흡수에 의존한다 (가령, 카르복실화된 PS/PLG 입자). 관용은 무반응 (항-PD-1 및 효현성 항-CD40 항체에 의해 부분적으로 반전됨) 및 iTregs (항-CD25 항체에 의해 부분적으로 반전됨)의 조합에 의해 유도되고 유지된다. 본 발명의 입자는 주로 간과 비장 변연대 대식세포 ($CD11b^{hi}$ $CD11c^{lo}$ $MARCO^{+}$ Sign-$R1^{+}$ $Siglec\text{-}1^{-}$)에서 축적된다.

[0328] 항원-펄스된 또는 항원-지향된 미성숙 면역관용원 수지상 세포를 이용하거나 또는 항원-특이적 Tregs를 조작하기 것과 비교하여, 자가면역 질환의 치료를 위해 항원-연계된 입자를 이용하는 것은 무수한 이점이 있다. GMP 제조가능한, 표준 재고 보편적 면역관용원 담체를 이용한 면역관용원 제조와 유도의 신속과 단순함; 미성숙 수지상 세포 또는 Tregs를 탈체에서 단리하고 확장할 필요가 없다; 미성숙 수지상 세포가 탈체 조작 시에 활성화되고 면역관용성보다는 자극성이 되거나 또는 Tregs가 전달 후 Th1/17로 전환할 우려할 필요가 없다; 숙주 미성숙 변연대 APC가 진행되고 항원을 면역관용성 방식으로 나타내기 때문에, 숙주 APC는 무손상 자가항원 또는 조직 추출물을 피포하는 PLG 입자로부터 유관한 면역우세 자가 에피토프를 선별할 수 있다 (가령, OVA 피포된 PLG 입자는 OVA/백반-유도된 AAD를 예방한다); 그리고 상기 프로토콜은 방관자 억제 없이 항원-특이적이고, 안전하고, 고도로 효율적이고, 그리고 에피토프 확산과 관련된 작동체 T 세포 (Th1, Th2, Th17, 그리고 CD8)와 경험 없는 T 세포 둘 모두에서 불응을 유도할 수 있다.

[0329] 합성, 생물분해성 입자와 리포솜은 제조의 용이함, 치료제의 광범위한 이용가능성을 야기할 수 있고, 그리고 잠재적 치료 부위의 숫자를 증가시킬 수 있다. 이를 위해, 계면활성 폴리(에틸렌-알트-말레산 무수물)을 이용하여, 표면-기능화된 생물분해성 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자를 고밀도의 표면 카르복실산염 기로 특정적으로 조작하였다.

[0330] 또한, 30:30:40 비율의 포스파티딜콜린: 포스파티딜글리세롤: 콜레스테롤을 이용하여, 표면-기능화된 리포솜을 개발하였다.

[0331] 펩티드 또는 단백질의 표면-접합을 둘러싼 화학적 오염과 순도 문제를 회피하기 위해, 코어 내에 가용성 난백알부민을 내포하도록 이들 입자를 더욱 조작하였다. 코어 내에 가용성 난백알부민을 내포하는 이들 표면-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 질환 진전의 예방, 따라서 알레르기성 천식의 Balb/c 난백알부민 /백반-유도된 AAI 뮤린 모델에서 면역 관용의 유도에 효과적이다. EDC를 이용하여 카르복실산염-기능화된 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자에 접합된 펩티드 또는 단백질은 무차별적인 방식으로 부착되고, 동질 개체군으로 특징짓고 정화하기 어려운 항원 응집체 및 입자-항원-입자 응집체를 유발한다.

[0332] 코어 내에 가용성 난백알부민을 내포하고 항원의 표면 접합을 필요로 하지 않는 표면 기능화된 폴리(락티드 코-글리콜리드) 입자의 동질 개체군을 생산하였다.

[0333] 코어 내에 가용성 $PLP_{139-151}$을 내포하고 고밀도의 음성으로-하전된 기로 표면-기능화된 생물분해성 리포솜이 다발성 경화증의 SJL/J $PLP_{139-151}$/CFA-유도된 R-EAE 뮤린 모델에서 면역 관용의 유도에 효과적이라는 것을 더욱 증명하였다.

[0334] 본 발명의 리포솜과 폴리(락티드-코-글리콜리드) 입자는 무수한 이점을 제공한다. 이들 이점은 하기를 포함한다:

[0335] 1) 생물분해성 입자는 체내에서 오랜 시간 동안 존속하지 않을 것이고, 그리고 완전한 분해를 위한 시간이 제어될 수 있다.

[0336] 2) 입자와 리포솜은 세포 활성화 없이 내재화를 조장하도록 기능화될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 포스파티딜세린이 PLG 마이크로스피어 내로 적하되었다.

[0337] 3) 입자와 리포솜은 또한, 특정한 세포 개체군에 대한 표적화 리간드를 함입하도록 설계될 수 있다.

[0338] 4) 항염증성 사이토킨, 예를 들면, IL-10과 TGF-β 역시, 이들 입자를 내재화하는 세포 유형의 활성화를 제한하고, 그리고 무반응 및/또는 결실을 통한 관용의 유도 및 조절 T 세포의 활성화를 용이하게 하기 위해 포함될 수 있다.

[0339] 입자 또는 리포솜의 이러한 조합 기능은 복수 관점으로부터 관용 유도를 표적으로 할 수 있고, 따라서 디자이너 입자는 폴리스티렌 입자에 비하여 유의미한 진전이다. 이러한 관용 유도 기술의 잠재적 임상적 적용은 하기를 포함한다:

[0340] (1) T 세포-와 항체-매개된 자가면역 질환 (가령, 다발성 경화증, 1형 당뇨병, 류마티스성 관절염, 전신 루푸스 등) - 관용은 특정 자가면역 질환을 주도하는 유관한 자가항원과 복합화된 입자로 유도될 것이다.

[0341] (2) 식품과 폐 알레르기, 피부 알레르기, 그리고 천식 - 관용은 알레르기 반응을 이끌어 내는 특정한 식품 (가령, 땅콩 단백질 등), 주사된 물질 (벌 독액 단백질 등), 또는 흡입된 물질 (가령, 돼지풀 화분 단백질, 애완동물 비듬 단백질 등)과 복합화된 입자로 유도될 것이다.

[0342] (3) 이식 거부 - 관용은 수용자에 의한 거부를 예방하기 위해 장기 이식에 앞서, 공여자 장기 또는 세포 상에서 이식 항원에 대해 유도될 것이다.

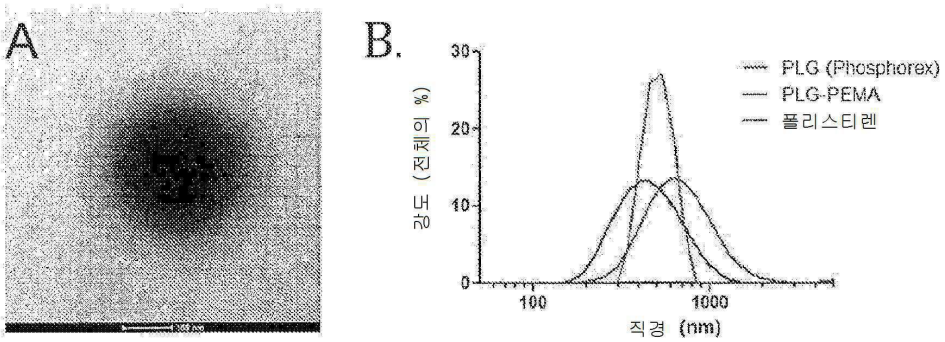
[0343] (4) 효소 보상 요법 - 관용은 유전적 결함을 갖는 환자가 생산하지 못하는 효소에 대해 유도되어, 이들 환자가 그들의 특정 결함을 치료하기 위해 투여된 재조합적으로-생산된 효소에 대한 중화 항체 반응을 만드는 것을 예방할 것이다.

[0344] 본 발명의 특정한 구체예가 설명되고 도해되긴 했지만, 이런 구체예는 단지 본 발명의 실례에 불과하고, 그리고 첨부된 청구항에 따라서 해석되는 본 발명을 제한하지 않는 것으로 고려되어야 한다.

[0345] 본원에서 인용된 모든 특허, 출원과 기타 참고문헌은 전체적으로 참조로서 편입된다.

도면

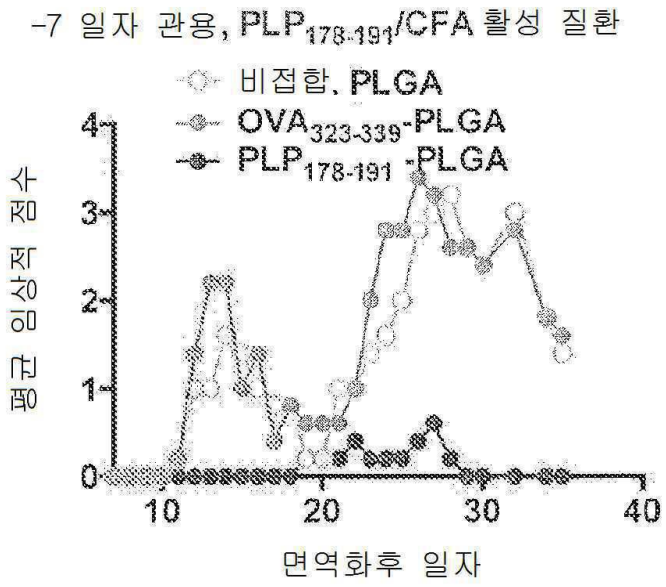
도면1



C.

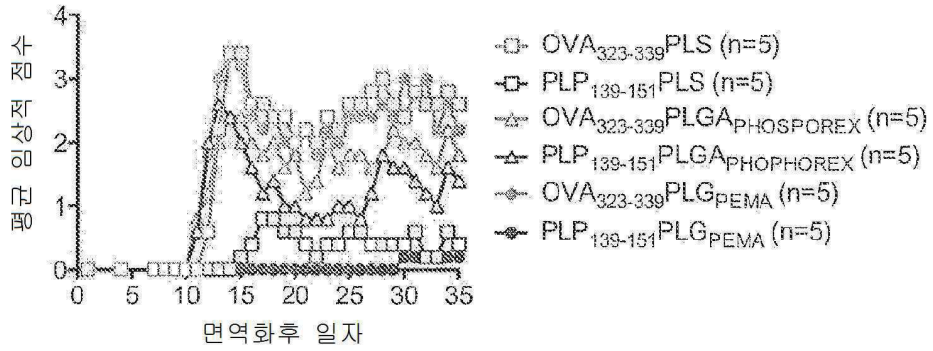
입자	강도에 의한 Z-평균 크기(nm)	ζ-전위 (mV)
PLG (Phosphorex)	624.3	-32.7 ± 4.71
PLG-PEMA	429.9	-67.4 ± 10.9
폴리스티렌	503.6	-66.4 ± 6.97

도면2

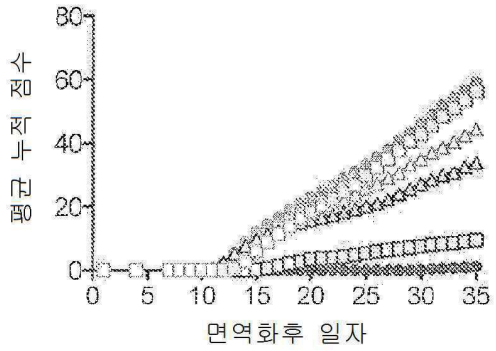


도면3

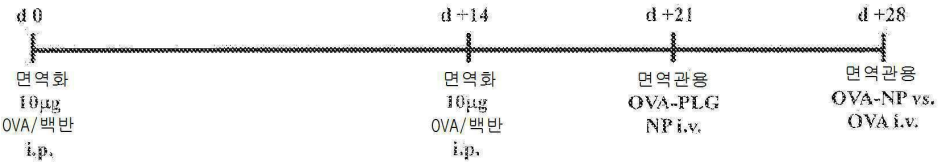
도 3A



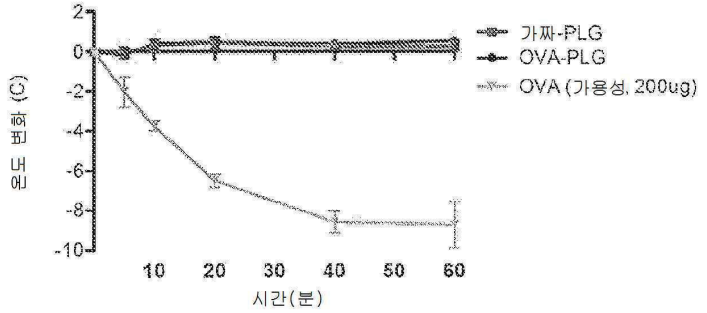
도 3B



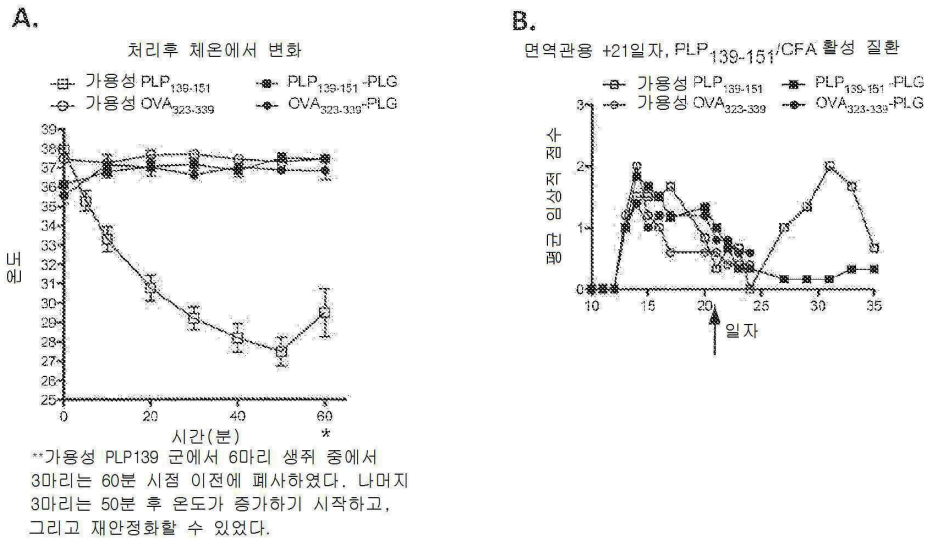
도면4



PLG 2차 분량 온도 변화

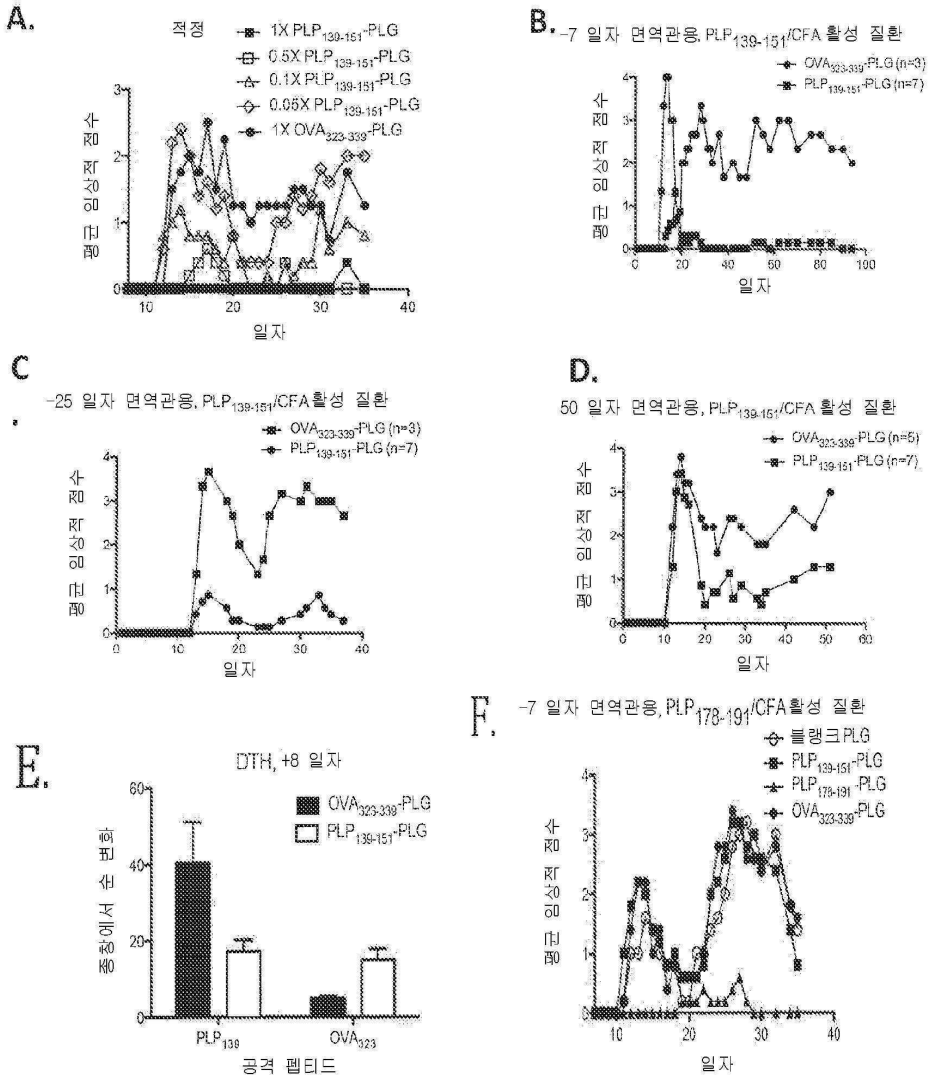


도면5

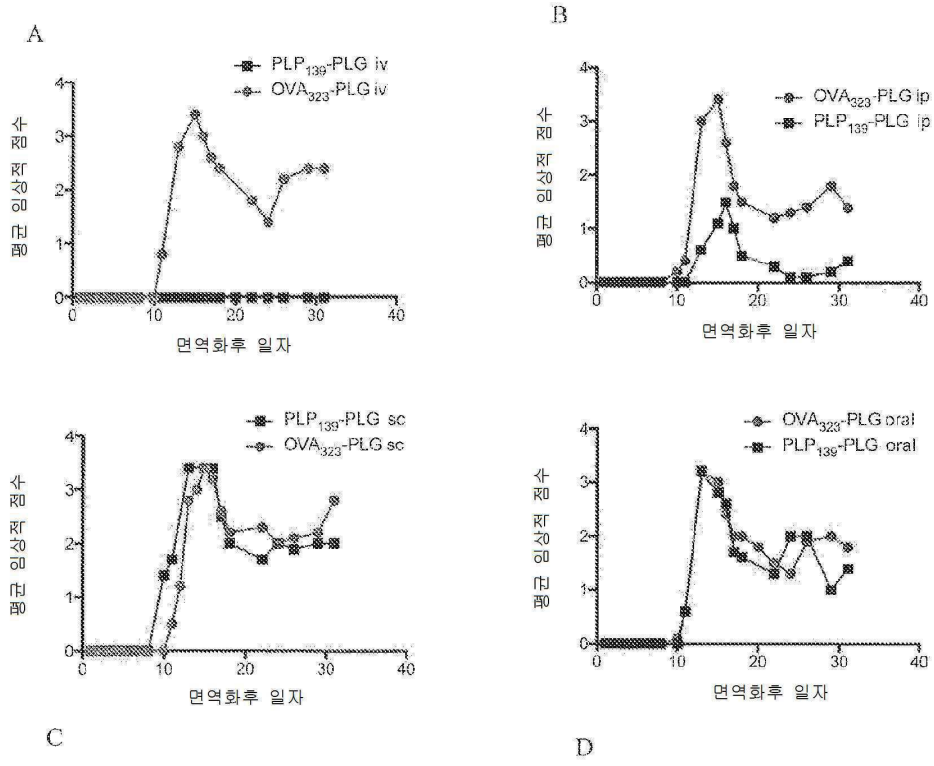


**가용성 PLP139 군에서 6마리 생쥐 중에서 3마리는 60분 시점 이전에 폐사하였다. 나머지 3마리는 50분 후 온도가 증가하기 시작하고, 그리고 재안정화할 수 있었다.

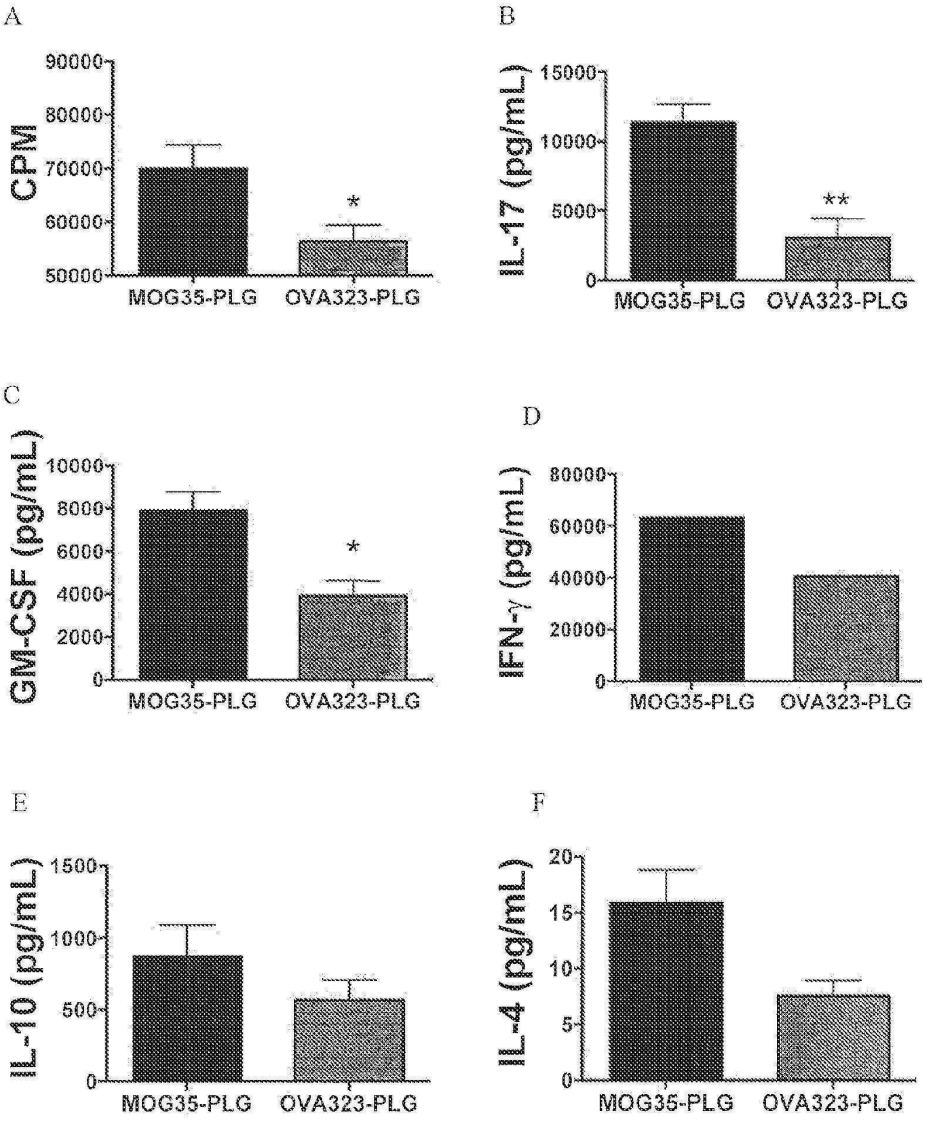
도면6



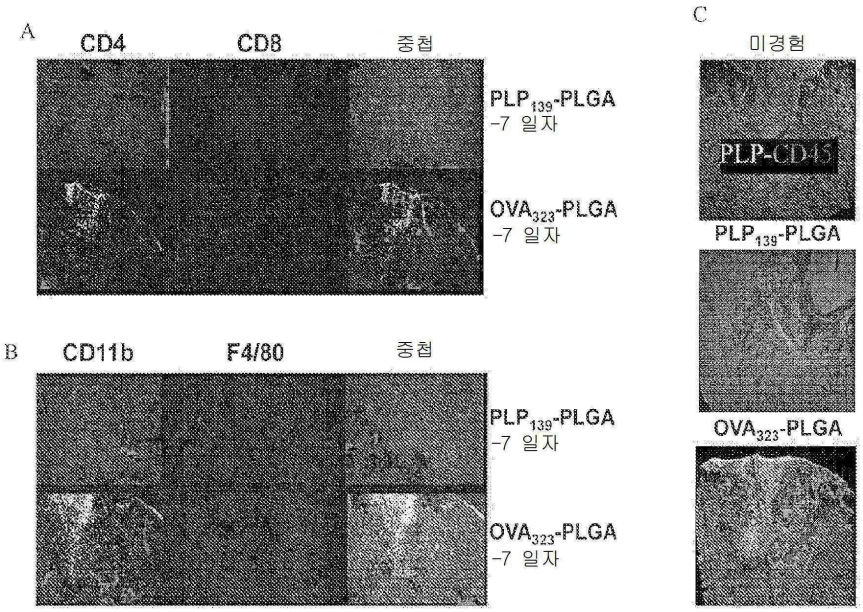
도면7


A
PLP139-PLG iv
OVA323-PLG iv
평균 임상적 점수
면역화후 일자
B
OVA323-PLG ip
PLP139-PLG ip
평균 임상적 점수
면역화후 일자
PLP139-PLG sc
OVA323-PLG sc
평균 임상적 점수
면역화후 일자
C
OVA323-PLG oral
PLP139-PLG oral
평균 임상적 점수
면역화후 일자
D

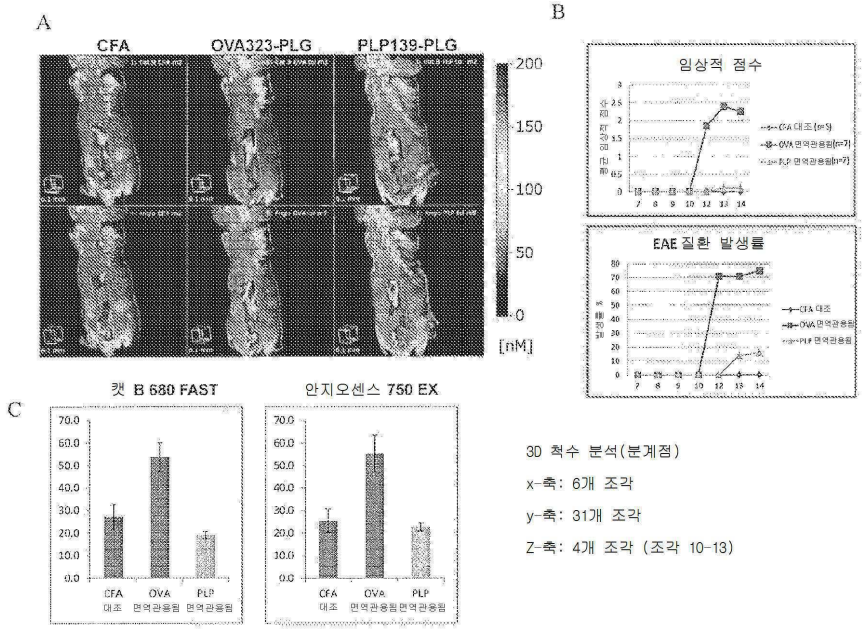
도면8


A
CPM
90000
80000
70000
60000
50000
*
MOG35-PLG
OVA323-PLG
B
IL-17 (pg/mL)
15000
10000
5000
0
**
MOG35-PLG
OVA323-PLG
C
GM-CSF (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
MOG35-PLG
OVA323-PLG
D
IFN-γ (pg/mL)
80000
60000
40000
20000
0
MOG35-PLG
OVA323-PLG
E
IL-10 (pg/mL)
1500
1000
500
0
MOG35-PLG
OVA323-PLG
F
IL-4 (pg/mL)
20
15
10
5
0
MOG35-PLG
OVA323-PLG

도면9



도면10



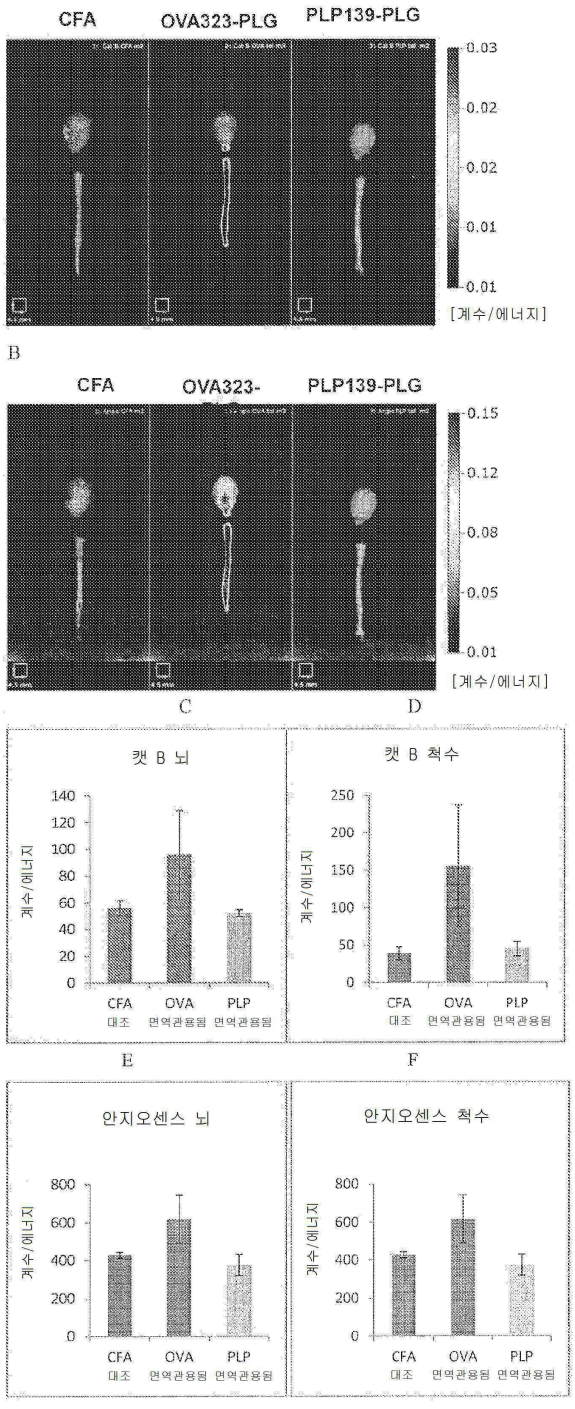
3D 척수 분석(분계점)

x-축: 6개 조각

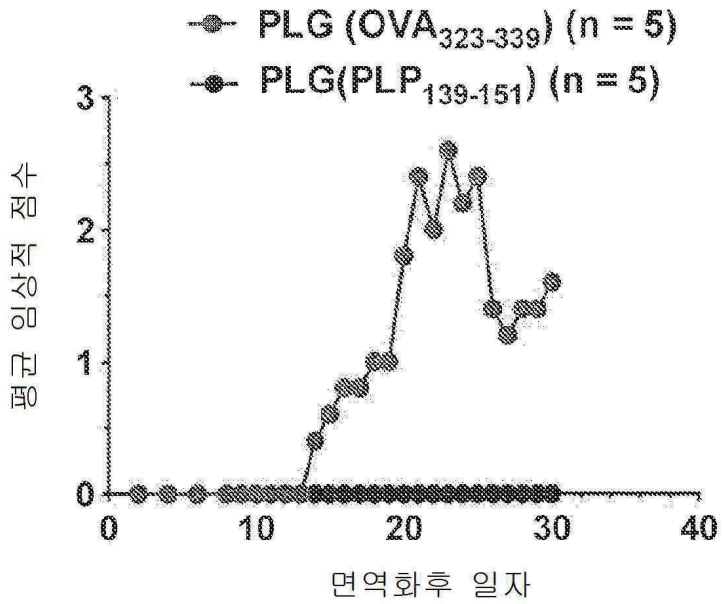
y-축: 31개 조각

Z-축: 4개 조각 (조각 10-13)

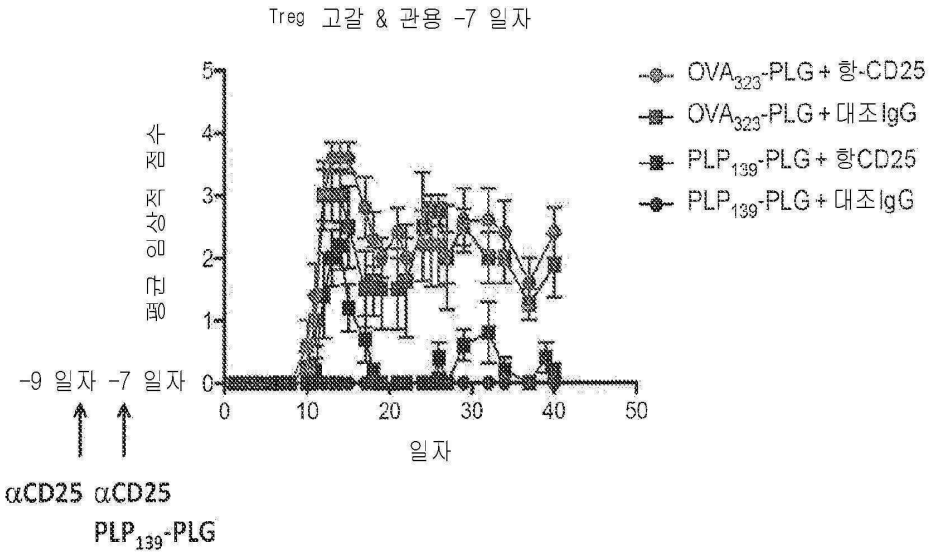
도면11


CFA
OVA323-PLG
PLP139-PLG
0.03
0.02
0.02
0.01
0.01
[계수/에너지]
B
CFA
OVA323-
PLP139-PLG
0.15
0.12
0.08
0.05
0.01
[계수/에너지]
C
D
캣 B 뇌
계수/에너지
140
120
100
80
60
40
20
0
CFA 대조
OVA 면역관용됨
PLP 면역관용됨
캣 B 척수
계수/에너지
250
200
150
100
50
0
CFA 대조
OVA 면역관용됨
PLP 면역관용됨
E
F
안지오센스 뇌
계수/에너지
800
600
400
200
0
CFA 대조
OVA 면역관용됨
PLP 면역관용됨
안지오센스 척수
계수/에너지
800
600
400
200
0
CFA 대조
OVA 면역관용됨
PLP 면역관용됨

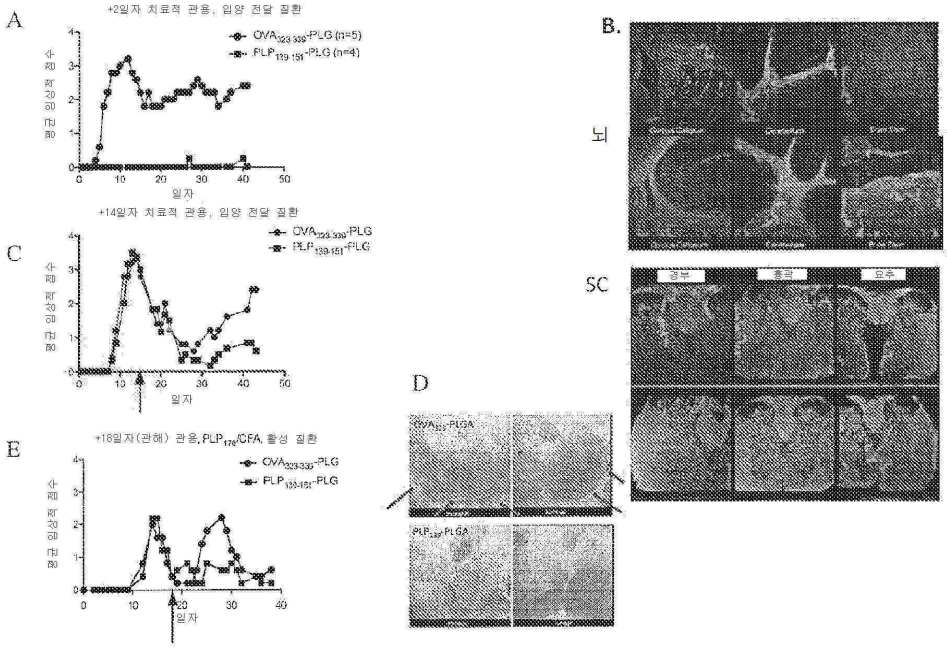
도면12


PLG (OVA323-339) (n = 5)
PLG(PLP139-151) (n = 5)
평균 임상적 점수
0
1
2
3
0
10
20
30
40
면역화후 일자

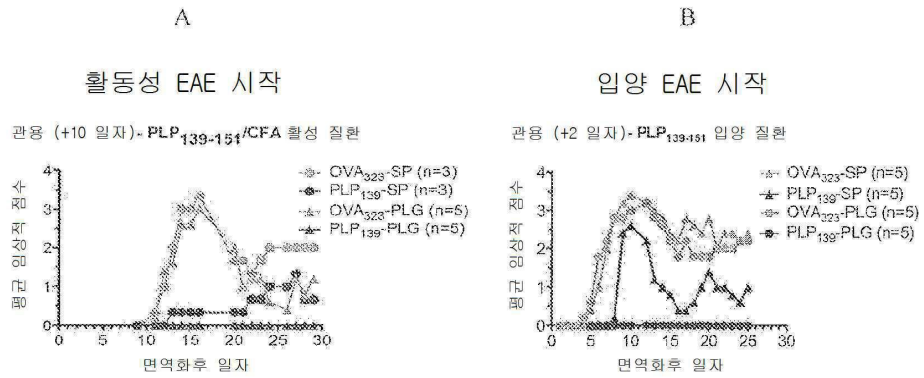
도면13


Treg 고갈 & 관용 -7 일자
OVA323-PLG + 항-CD25
OVA323-PLG + 대조IgG
PLP139-PLG + 항CD25
PLP139-PLG + 대조IgG
평균 임상적 점수
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
일자
-9 일자
-7 일자
αCD25
αCD25
PLP139-PLG

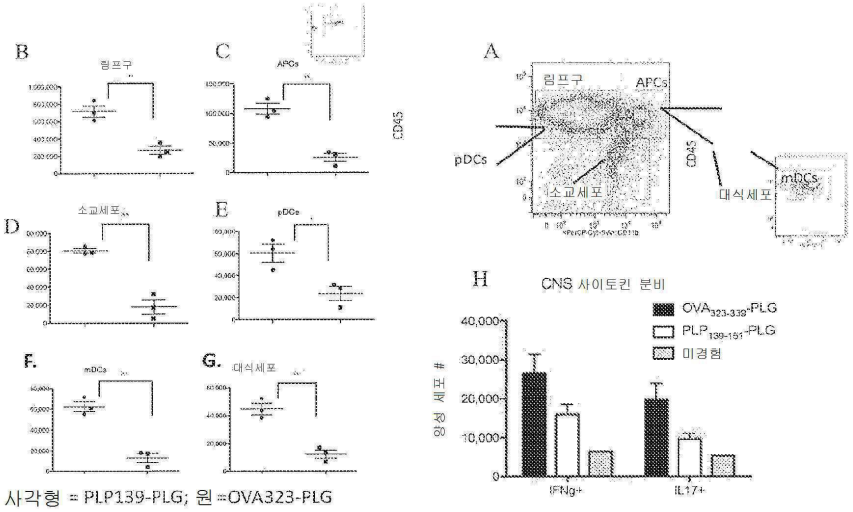
도면14



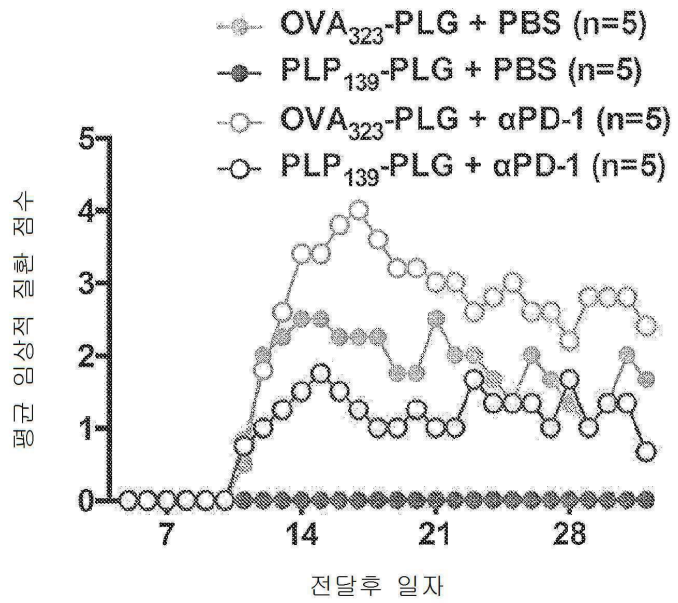
도면15



도면16

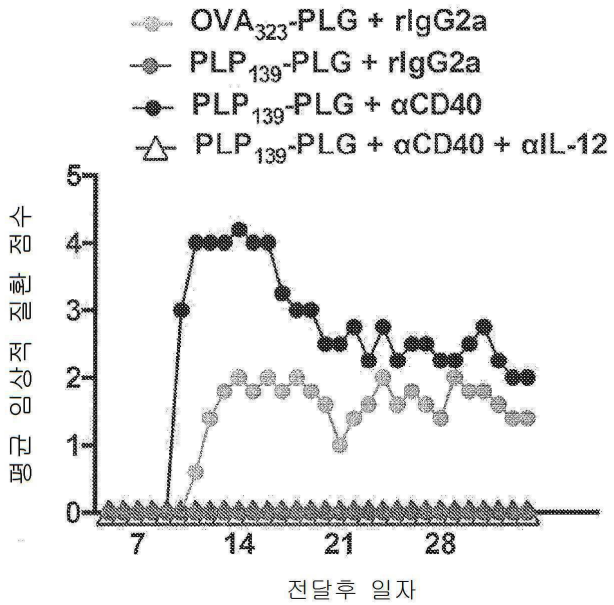


도면17



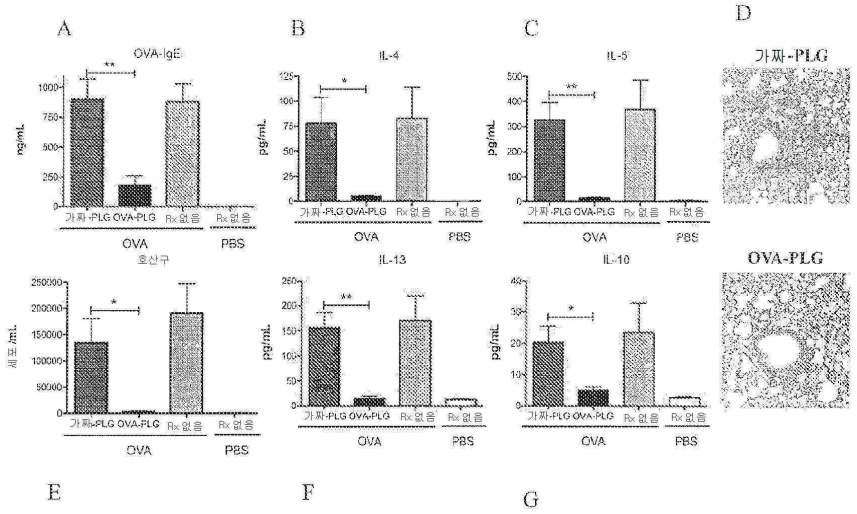
0 일자 – $3x10^6$ $PLP_{139-151}$ 활성화된 T 세포 모구 i.v.
+2 일자 – $PLP_{139-151}$-피포된 PLG NPs i.v.
+2, +4, +6, +8, +10, +12 일자 – 250 μg 항-PD-1

도면18

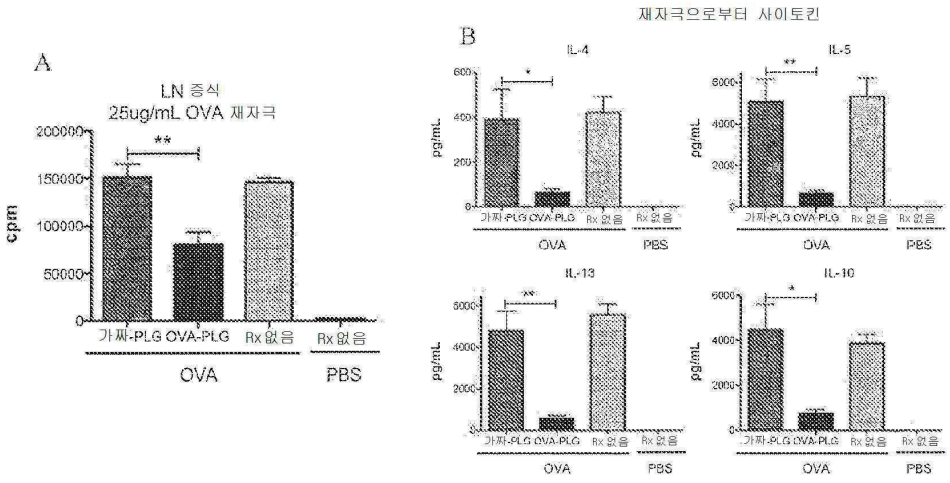


0 일자 – $3x10^6$ $PLP_{139-151}$ 활성화된 T 세포 모구 i.v.
+2 일자 – $PLP_{139-151}$-피포된 PLG NPs i.v.
+3 일자 – 100 μg 항-PD-1

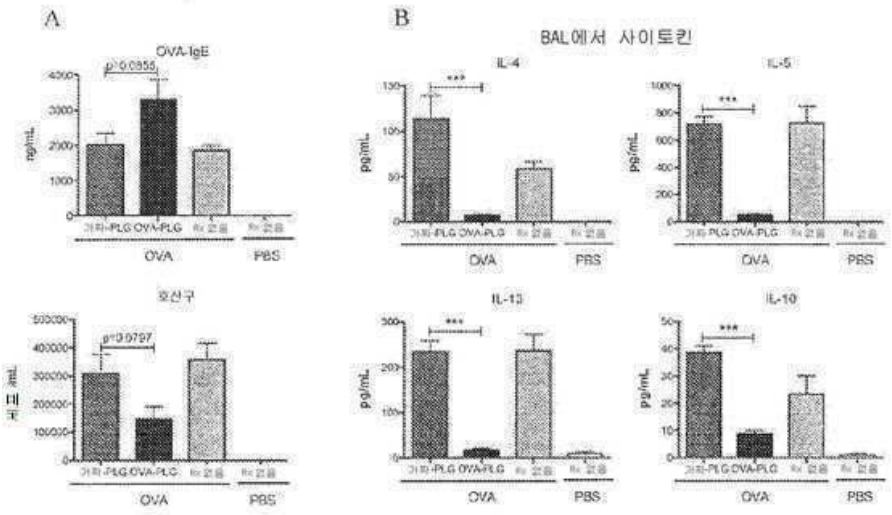
도면19



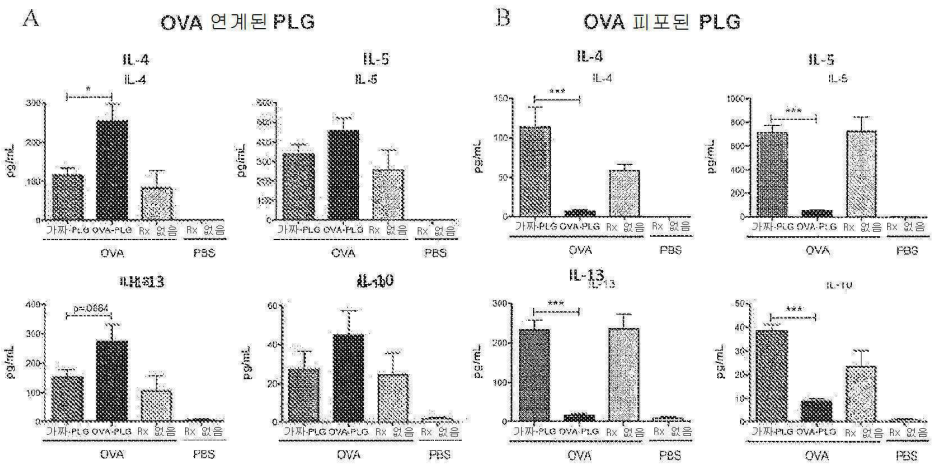
도면20



도면21

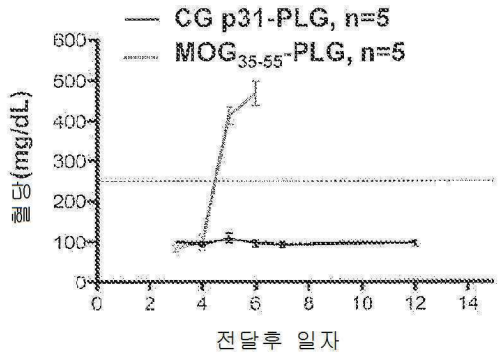


도면22

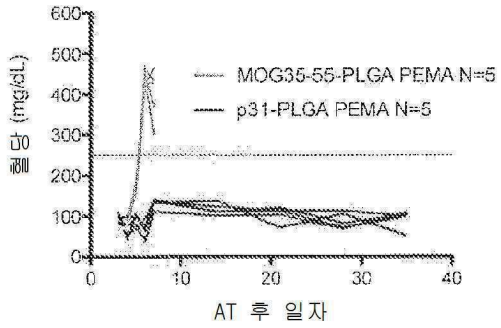

A
OVA 연계된 PLG
B
OVA 피포된 PLG
IL-4
IL-5
IL-13
IL-10
pg/mL
가짜-PLG
OVA-PLG
Rx
없음
OVA
PBS

도면23

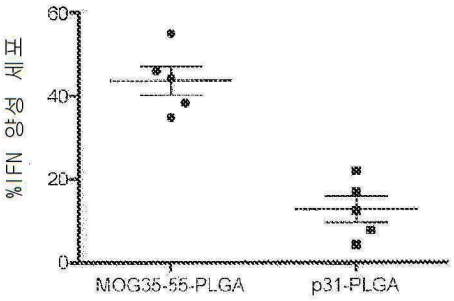
A


CG p31-PLG, n=5
MOG35-55-PLG, n=5
혈당(mg/dL)
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
전달후 일자

B

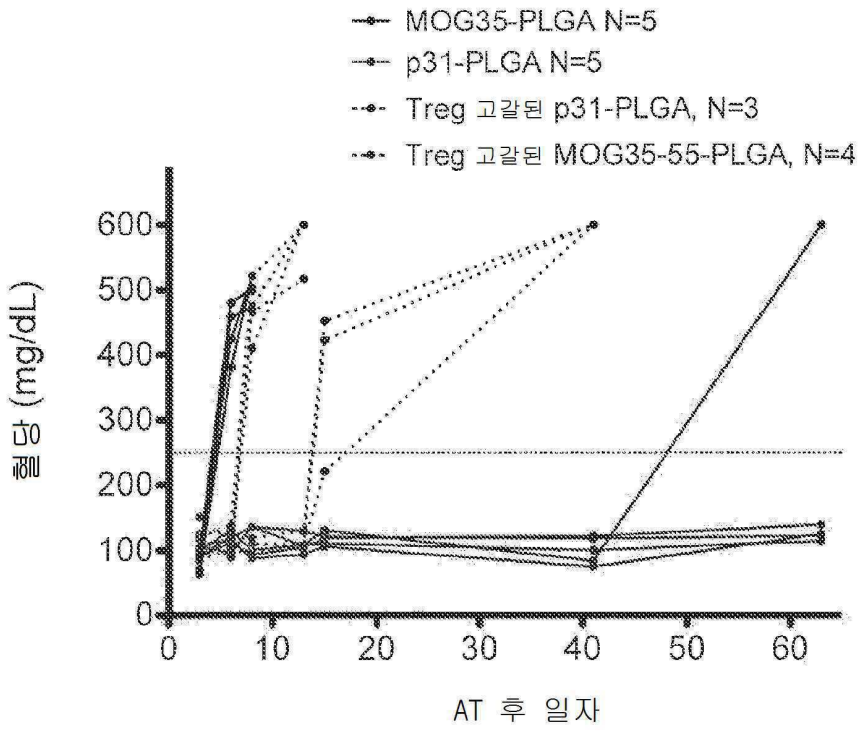

MOG35-55-PLGA PEMA N=5
p31-PLGA PEMA N=5
혈당 (mg/dL)
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
AT 후 일자

C

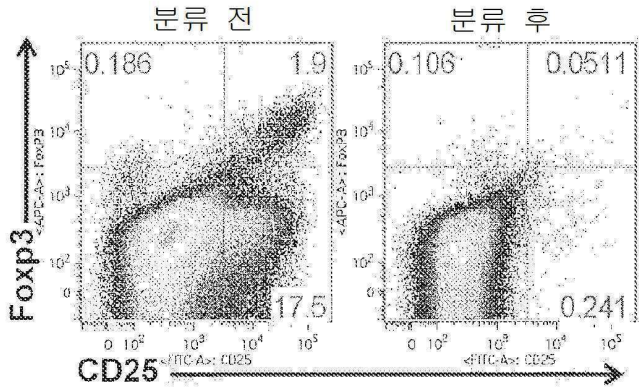

%IFN 양성 세포
60
40
20
0
MOG35-55-PLGA
p31-PLGA

도면24

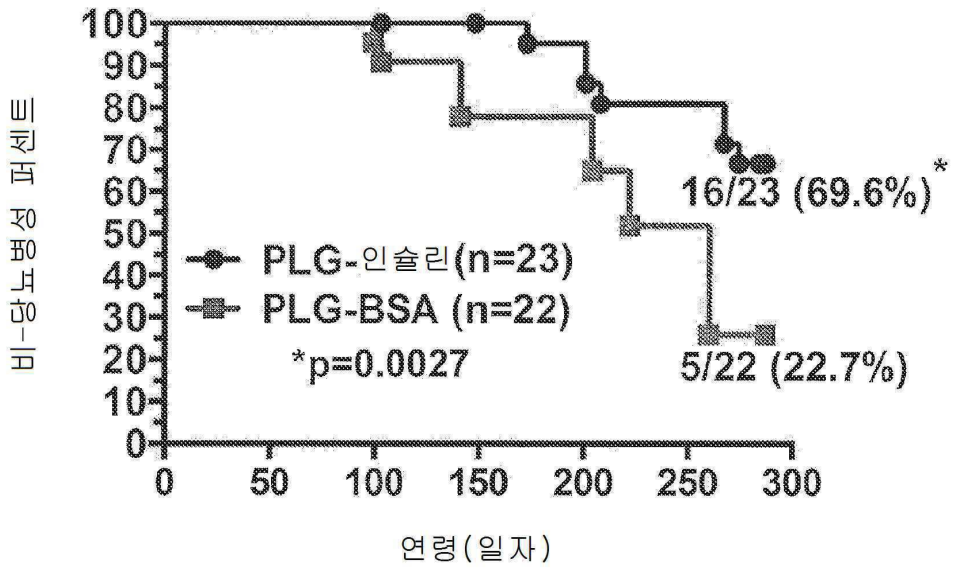
A


MOG35-PLGA N=5
p31-PLGA N=5
Treg 고갈된 p31-PLGA, N=3
Treg 고갈된 MOG35-55-PLGA, N=4
혈당 (mg/dL)
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
AT 후 일자

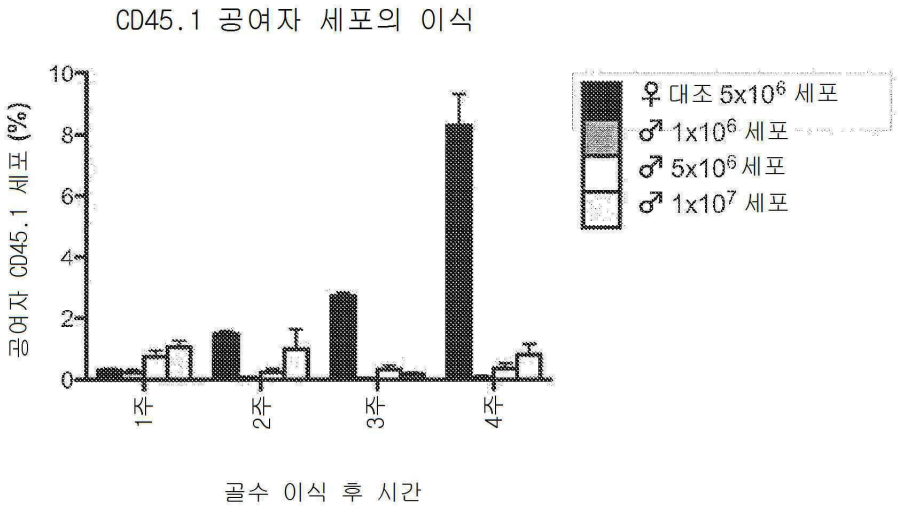
B


분류 전
분류 후
0.186
1.9
17.5
0.106
0.0511
0.241
Foxp3
CD25

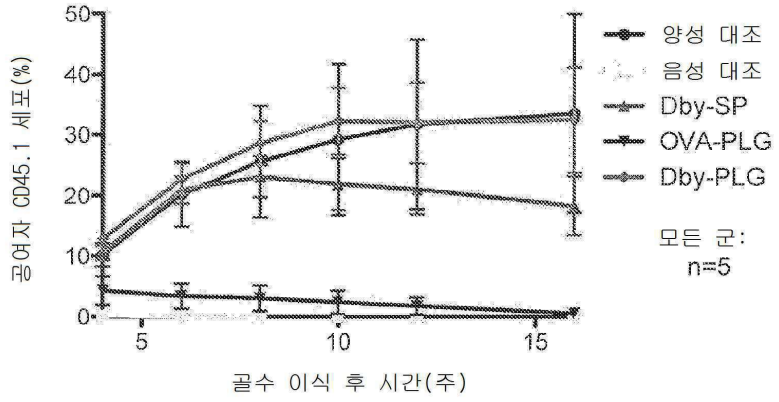
도면25



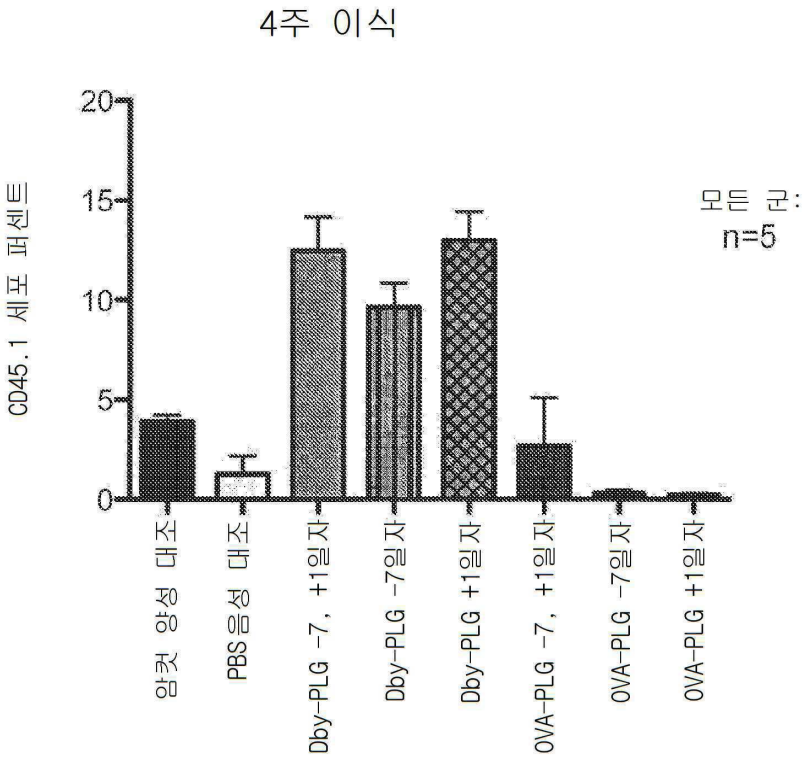
도면26



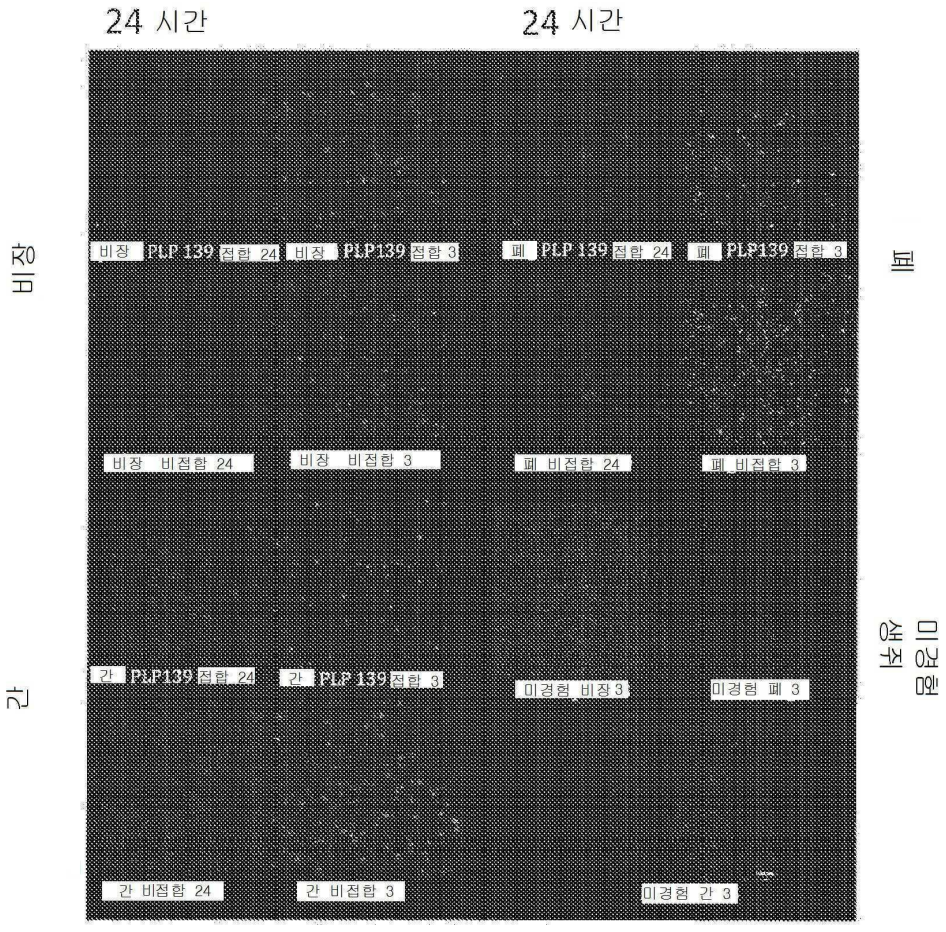
도면27



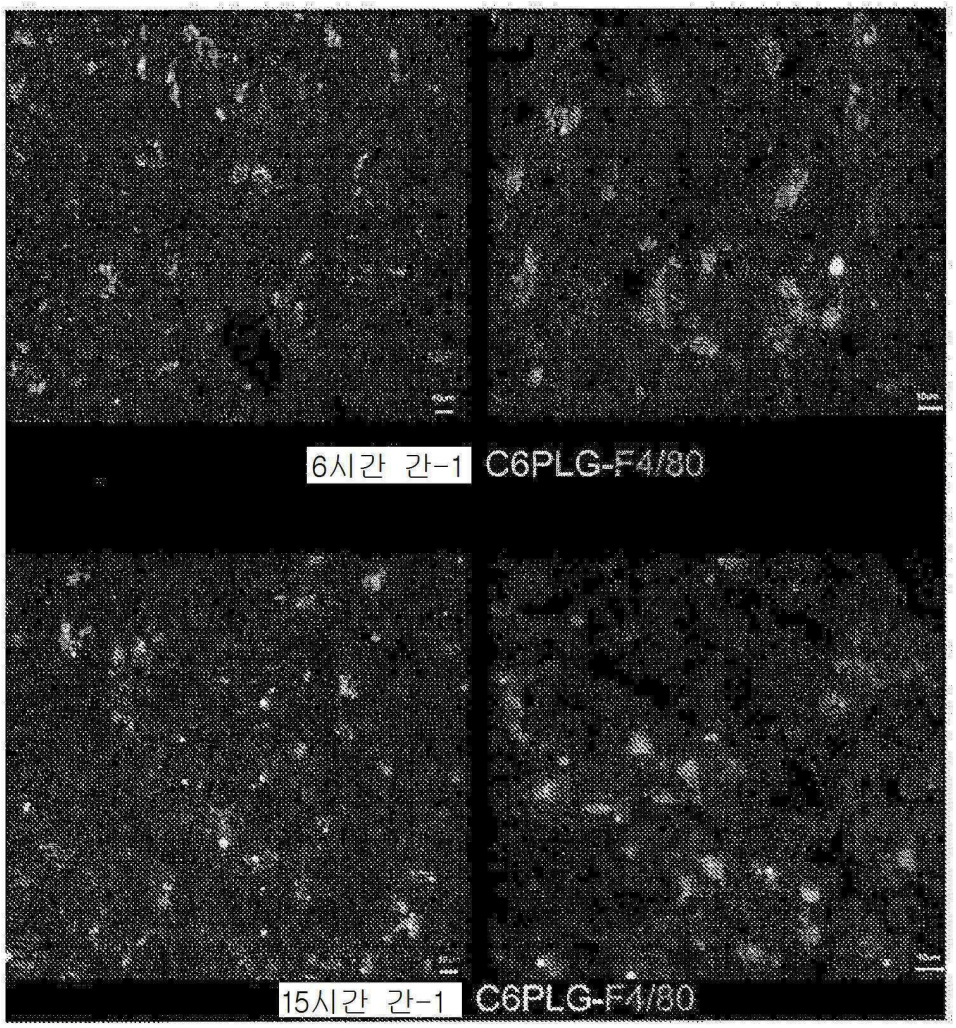
도면28


4주 이식
CD45.1 세포 퍼센트
20
15
10
5
0
모든 군:
n=5
암컷 양성 대조
PBS음성 대조
Dby-PLG -7, +1일자
Dby-PLG -7일자
Dby-PLG +1일자
OVA-PLG -7, +1일자
OVA-PLG -7일자
OVA-PLG +1일자

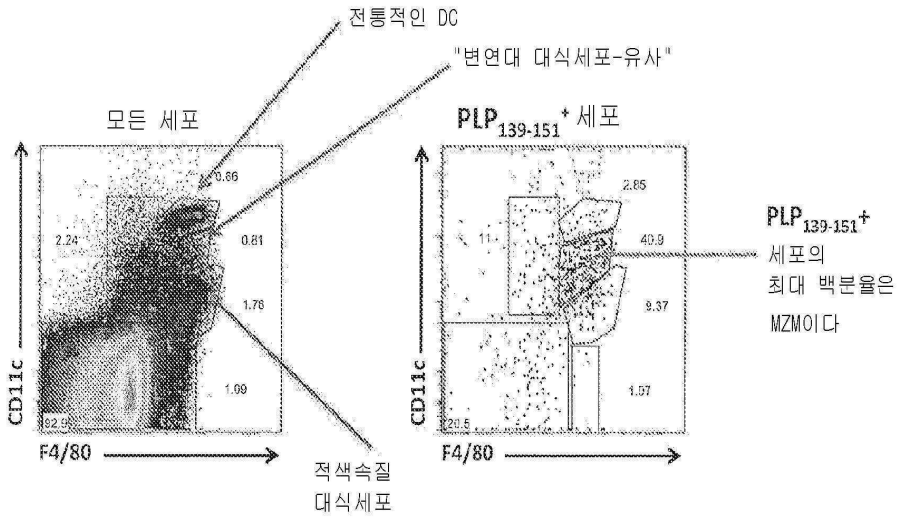
도면29


24 시간
24 시간
비장
폐
간
미경험 장기
비장 PLP 139 접합 24
비장 PLP139 접합 3
폐 PLP 139 접합 24
폐 PLP139 접합 3
비장 비접합 24
비장 비접합 3
폐 비접합 24
폐 비접합 3
간 PLP139 접합 24
간 PLP 139 접합 3
미경험 비장 3
미경험 폐 3
간 비접합 24
간 비접합 3
미경험 간 3

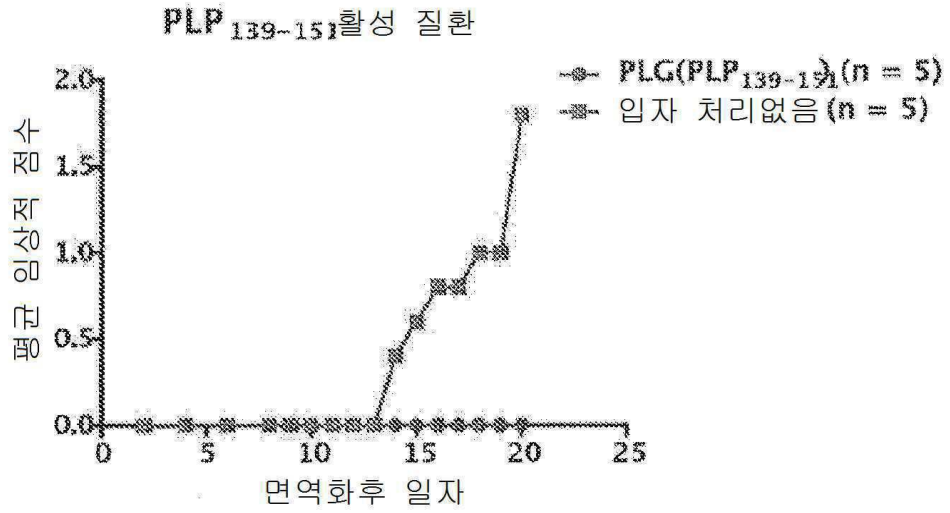
도면30


6시간 간-1 C6PLG-F4/80
15시간 간-1 C6PLG-F4/80

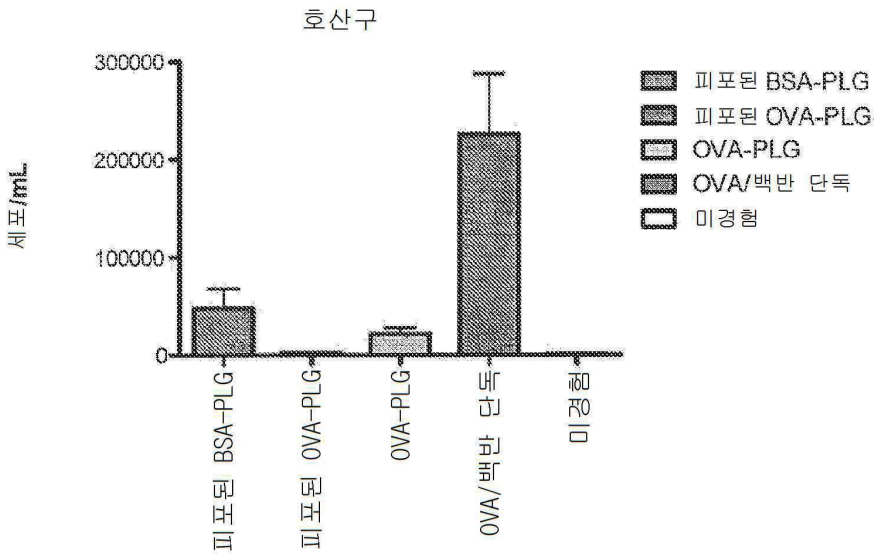
도면31


전통적인 DC
"변연대 대식세포-유사"
모든 세포
PLP139-151+ 세포
0.66
2.24
0.81
1.76
1.99
CD11c
F4/80
적색속질
대식세포
2.85
11
40.9
9.37
1.07
PLP139-151+
세포의
최대 백분율은
MZM이다

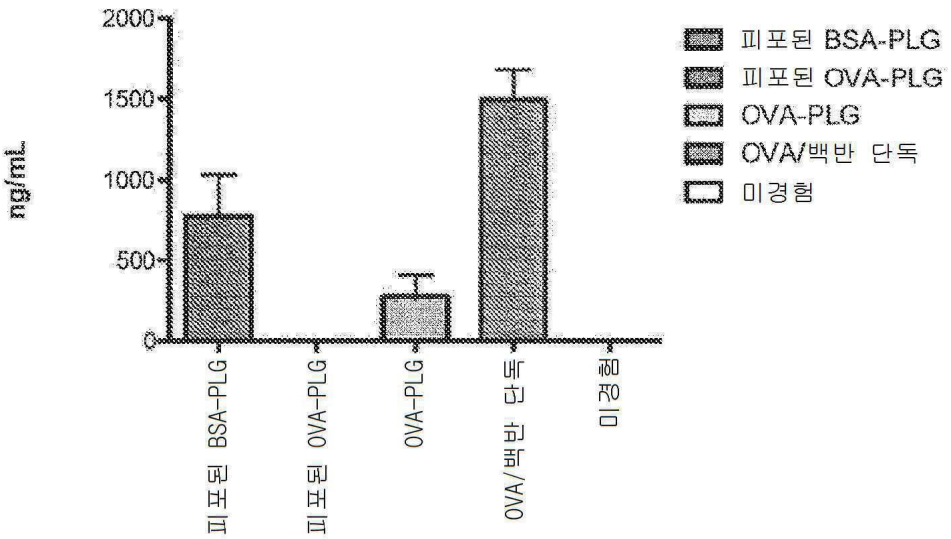
도면32


PLP 139-151활성 질환
PLG(PLP139-151)(n = 5)
입자 처리없음(n = 5)
평균 임상적 점수
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
5
10
15
20
25
면역화후 일자

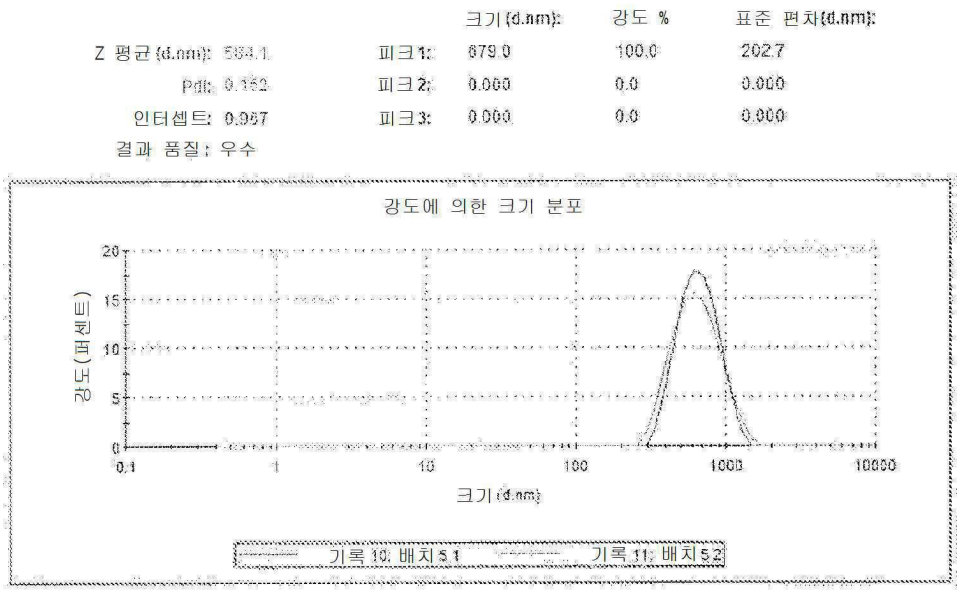
도면33


호산구
세포/mL
300000
200000
100000
0
피포된 BSA-PLG
피포된 OVA-PLG
OVA-PLG
OVA/백반 단독
미경험
피포된 BSA-PLG
피포된 OVA-PLG
OVA-PLG
OVA/백반 단독
미경험

도면34


2000
1500
1000
500
0
ng/ml
피포된 BSA-PLG
피포된 OVA-PLG
OVA-PLG
OVA/백반 단독
미경험
피포된 BSA-PLG
피포된 OVA-PLG
OVA-PLG
OVA/백반 단독
미경험

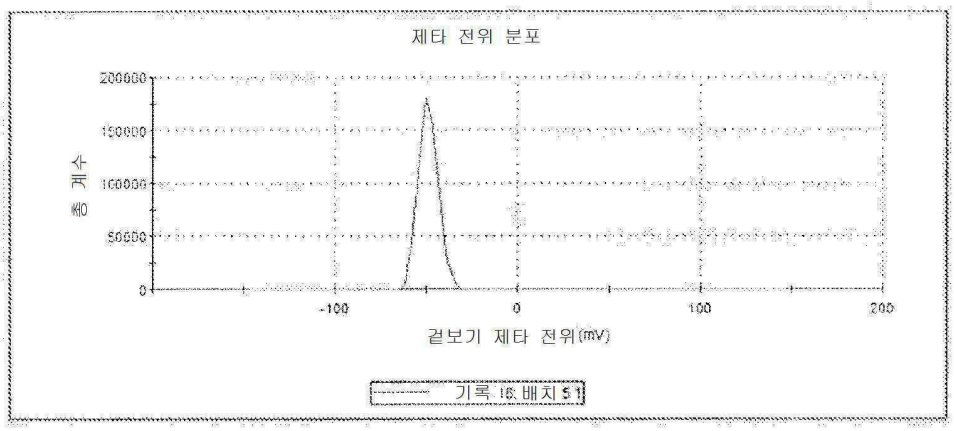
도면35


크기(d.nm): 강도 % 표준 편차(d.nm):
Z 평균(d.nm): 554.1
피크1: 879.0 100.0 202.7
PdI: 0.152
피크2: 0.000 0.0 0.000
인터셉트: 0.967
피크3: 0.000 0.0 0.000
결과 품질 : 우수
강도에 의한 크기 분포
강도(퍼센트)
20
15
10
5
0
0.1
1
10
100
1000
10000
크기(d.nm)
기록10; 배치5.1
기록11; 배치5.2

도면36

		평균(mV)	면적(%)	표준 편차(Dev(mV)
제타 전위(mV): -48.9	피크 1:	-48.9	100.0	5.14
제타 편차(mV): 5.14	피크 2:	0.00	0.0	0.00
전도도(mS/cm): 0.103	피크 3:	0.00	0.0	0.00

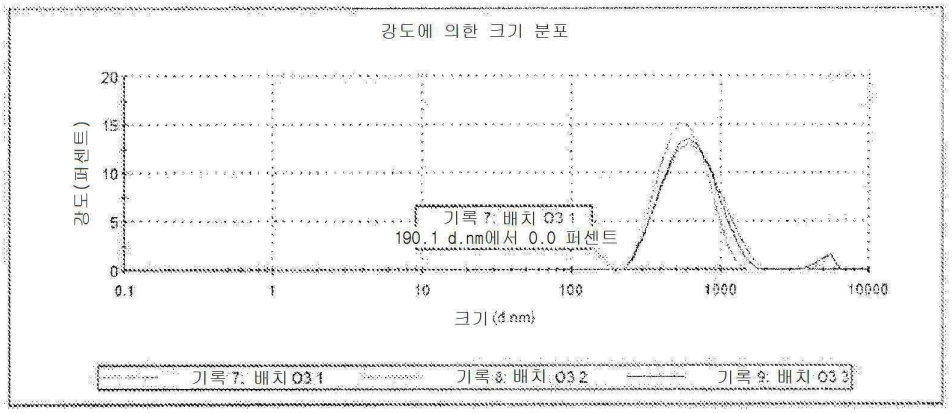
결과 품질: 우수



도면37

		크기(d.nm):	강도 %	표준 편차(d.nm):
Z 평균(d.nm): 569.7	피크 1:	700.3	100.0	301.2
PdI: 0.230	피크 2:	0.000	0.0	0.000
인터셉트: 0.961	피크 3:	0.000	0.0	0.000

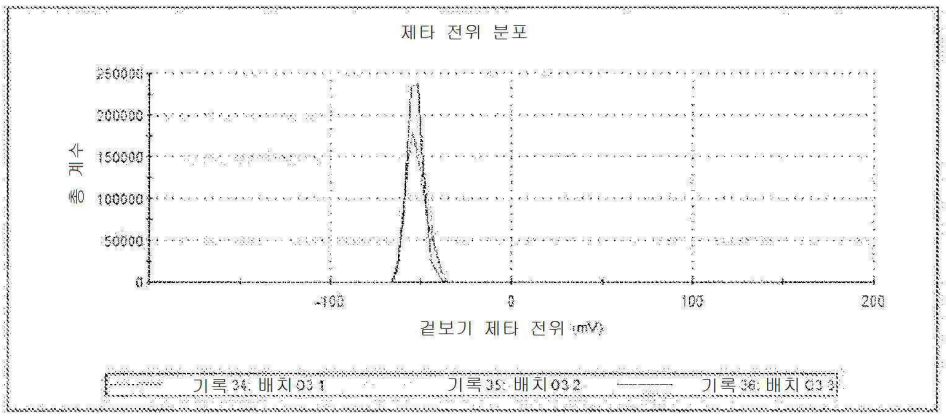
결과 품질: 우수



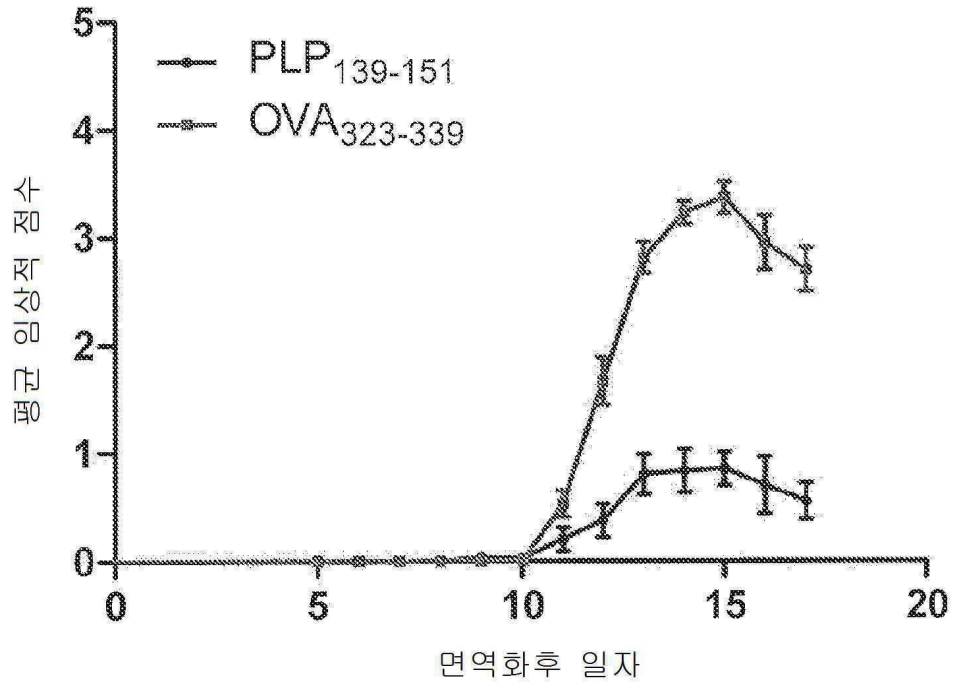
도면38

		평균(mV)	면적(%)	표준 편차(mV)
제타 전위(mV):	피크 1:	-52.2	100.0	5.38
제타 편차(mV): 5.33	피크 2:	0.00	0.0	0.00
전도도(mS/cm): 0.0937	피크 3:	0.00	0.0	0.00

결과 품질: 우수



도면39



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Cour Pharmaceuticals

<120> Peptide Conjugated Particles

<130> COUR-002/01WO

<150> 61/662,687

<151> 2012-06-21

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(21)

<400> 1

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys
20