

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6490964号
(P6490964)

(45) 発行日 平成31年3月27日(2019.3.27)

(24) 登録日 平成31年3月8日(2019.3.8)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51
A 6 1 K 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/436
A 6 1 K 47/30 (2006.01)	A 6 1 K 47/30
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06

請求項の数 13 (全 78 頁)

(21) 出願番号	特願2014-508581 (P2014-508581)	(73) 特許権者	511254321
(86) (22) 出願日	平成24年4月27日(2012.4.27)		セレクト バイオサイエンス インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2014-513102 (P2014-513102A)		SELECTA BIOSCIENCES, INC.
(43) 公表日	平成26年5月29日(2014.5.29)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O2472、ウォータータウン、ビルディングワン、アーセナル ストリート 480
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/035366		480 Arsenal Street, Building One, Watertown, MA 02472, U. S. A.
(87) 国際公開番号	W02012/149255		
(87) 国際公開日	平成24年11月1日(2012.11.1)	(74) 代理人	100102842
審査請求日	平成27年4月27日(2015.4.27)		弁理士 葛和 清司
審判番号	不服2017-3076 (P2017-3076/J1)		
審判請求日	平成29年3月1日(2017.3.1)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	61/531, 168		
(32) 優先日	平成23年9月6日(2011.9.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/531, 153		
(32) 優先日	平成23年9月6日(2011.9.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 治療用タンパク質に対する免疫応答を減少させるための寛容原性合成ナノキャリア

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 免疫抑制剤に結合されたポリマー合成ナノキャリアの第1の集団と、

(ii) 治療用タンパク質 APC 提示可能抗原に結合されたポリマー合成ナノキャリアの第2の集団と

を含む、治療用タンパク質 APC 提示可能抗原に特異的な免疫応答を減少させる工程、および Fox P3 発現を誘導する工程を含む、被験体において寛容を誘導する方法における使用のための組成物であって、任意に、前記第1の集団および第2の集団が同じであり、および／または前記組成物が、薬学的に許容できる賦形剤を更に含み、

免疫抑制剤の負荷が、合成ナノキャリアの第1の集団全体を平均して、少なくとも2%であるが、25%以下(重量/重量)であり、および抗原の負荷が、合成ナノキャリアの第2の集団全体を平均して、1%~10%(重量/重量)であり；

免疫抑制剤がラパマイシンまたはラパマイシン類似体を含み；および

第1の集団の合成ナノキャリアの少なくとも75%が、動的光散乱を用いて得られる110nmを超える最小寸法を有し、かつ動的光散乱を用いて得られる500nm以下である最大寸法を有する、前記組成物。

【請求項 2】

免疫抑制剤がラパマイシンである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記治療用タンパク質 APC 提示可能抗原が、(a) 治療用タンパク質の MHC クラス

10

20

I 拘束性および／またはMHCクラスI I 拘束性エピトープを含む、(b) 治療用タンパク質のMHCクラスI I 拘束性エピトープを含む、(c) 治療用タンパク質のB細胞エピトープを含む、(d) 治療用タンパク質のB細胞エピトープを実質的に含まないで、(e) タンパク質補充療法またはタンパク質添加療法のための治療用タンパク質、またはその断片を含む、および／または(f) 不融性または注射用の治療用タンパク質(例えば、トシリズマブ、 α -1アンチトリプシン、Hematide、アルブインターフェロン α -2b、Rhucin、テサモレリン、オクレリズマブ、ベリムマブ、ペグロチカーゼ、タリグルセラーゼアルファ、アガルシダーゼアルファまたはベラグルセラーゼアルファ)、酵素(例えば、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼまたはリガーゼ、酵素補充療法のための酵素(例えば、リソソーム貯蔵障害、任意に、前記酵素が、イミグルセラーゼ、 α -ガラクトシダーゼA(α -gal A)、アガルシダーゼベータ、酸性 α -グルコシダーゼ(GAA)、アルグルコシダーゼアルファ、LUMIZYME、MYOZYME、アリアルスルファターゼB、ラロニダーゼ、ALDURAZYME、イデュルスルファーゼ、ELAPRASE、アリアルスルファターゼBまたはNAGLAZYME))、酵素補因子、ホルモン、血液または血液凝固因子(例えば、第I因子、第II因子、組織因子、第V因子、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン、フィブロネクチン、抗トロンビンIII、ヘパリン補因子II、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤(ZPI)、プラスミノーゲン、 α 2-抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子(tPA)、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1(PAI1)、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-2(PAI2)、癌由来凝血促進因子またはエポエチンアルファを含む)、サイトカイン(例えば、リンホカイン、インターロイキン、ケモカイン、1型サイトカインまたは2型サイトカインを含む)、インターフェロン、増殖因子、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはポンペ病に関連するタンパク質、またはその断片を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

前記組成物が、（a）前記治療用タンパク質A P C 提示可能抗原に対する寛容原性免疫応答を生成および／または（b）被験体に投与された場合に、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／またはC D 4 + T細胞増殖および／または活性および／またはB細胞増殖および／または活性を減少させるのに有効な量である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記ポリマーナノ粒子が、（a）非メトキシ末端プルロニックポリマーであるポリマーを含み、および／または、（b）ポリエステル（例えば、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-コグリコール酸）またはポリカプロラク톤を含む）、ポリエーテルに結合されたポリエステル、ポリアミノ酸、ポリカーボネート、ポリアセタール、ポリケタール、多糖、ポリエチルオキサゾリンまたはポリエチレンイミンを含み、および／または、（c）前記ポリマーナノ粒子が、ポリエステルおよびポリエーテルに結合されたポリエステルを含み、任意に、前記ポリエーテルが、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記第1および／または第2の集団の前記合成ナノキャリアの動的光散乱を用いて得られる粒度分布の平均が、(a) 100 nmを超える、(b) 150 nmを超える、(c) 200 nmを超える、(d) 250 nmを超える、または(e) 300 nmを超える直径である、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記第1の集団および／または第2の集団の前記合成ナノキャリアのアスペクト比が、 $1:1$ 、 $1:1.2$ 、 $1:1.5$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 、 $1:5$ 、 $1:7$ または $1:10$ を超える、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物を含む剤形。

【請求項 9】

少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 %の合成ナノキャリアの第 1 および／または第 2 の集団が、合成ナノキャリアの平均直径の 5 %、10 %、または 20 %の範囲内の最小寸法または最大寸法を有する、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物または請求項 8 に記載の剤形。

【請求項 10】

治療または予防に使用するための、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物または請求項 8 に記載の剤形であって、例えば、治療用タンパク質を投与されているかまたは投与される予定である被験体に前記組成物または前記剤形を投与する工程を含む方法においてであり、任意に、(a) 方法が、前記治療用タンパク質を前記被験体に投与する工程を更に含み、および／または (b) 前記治療用タンパク質が、前記組成物または剤形の前記投与の前に、前記投与と同時にまたは前記投与の後に投与され、および／または (c) 1 つ以上の維持投与量の前記組成物または剤形が、前記被験体に投与され、および／または (d) 前記方法が、前記組成物または剤形および／または前記治療用タンパク質の前記投与の前および／または前記投与の後に、前記被験体における望ましくない免疫応答の生成を評価する工程を更に含み、例えば、前記望ましくない免疫応答が、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／または CD4 + T 細胞増殖および／または活性および／または B 細胞増殖および／または活性であり、および／または (e) 前記治療用タンパク質が、タンパク質補充療法またはタンパク質添加療法のための治療用タンパク質を含み、および／または (f) 前記治療用タンパク質が、請求項 3 に規定されるとおりの不融性または注射用の治療用タンパク質を含み、および／または (g) 合成ナノキャリアの前記第 1 および／または第 2 の集団および／または治療用タンパク質の前記投与が、静脈内、腹腔内、経粘膜、経口、皮下、経肺、鼻腔内、皮内または筋肉内投与によって行われ、例えば、合成ナノキャリアの前記第 1 および／または第 2 の集団および／または治療用タンパク質の前記投与が、吸入或いは静脈内、皮下または経粘膜投与によって行われる、前記組成物または前記剤形。

【請求項 11】

治療用タンパク質 APC 提示可能抗原に特異的な免疫応答を減少させる工程、および FoxP3 発現を誘導する工程を含む、被験体において寛容を誘導する方法における使用のための、

(i) 免疫抑制剤に結合されたポリマー合成ナノキャリアの第 1 の集団と、

(ii) 治療用タンパク質 APC 提示可能抗原に結合されたポリマー合成ナノキャリアの第 2 の集団と
を含む組成物であって、前記方法は、被験体における望ましくない免疫応答の生成を減少させる工程を含み、

(a) 前記治療用タンパク質 APC 提示可能抗原に対する望ましくない免疫応答の生成を減少させるのに有効な量で、前記組成物を被験体に投与する工程；または

(b) 一体以上の被験体における治療用タンパク質 APC 提示可能抗原に対する望ましくない免疫応答の生成を減少させることが既に示されたプロトコルに従って組成物を被験体に投与する工程；をさらに含み、

免疫抑制剤の負荷が、合成ナノキャリアの第 1 の集団全体を平均して、少なくとも 2 %であるが、25 %以下（重量／重量）であり、および抗原の負荷が、合成ナノキャリアの第 2 の集団全体を平均して、1 %～10 %（重量／重量）であり；

免疫抑制剤がラパマイシンまたはラパマイシン類似体を含み；および

第 1 の集団の合成ナノキャリアの少なくとも 75 %が、動的光散乱を用いて得られる 110 nm を超える最小寸法を有し、かつ動的光散乱を用いて得られる 500 nm 以下である最大寸法を有し、

任意に、(i) 前記第 1 の集団および第 2 の集団が同じであり、および／または (ii)

前記被験体を提供または同定する工程を更に含み、および／または（i i i）前記方法が、前記組成物の前記投与の前におよび／または前記投与の後に、前記被験体における前記望ましくない免疫応答の生成を評価する工程を更に含み、例えば、前記望ましくない免疫応答が、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／またはCD4＋T細胞増殖および／または活性および／またはB細胞増殖および／または活性であり、および／または（i v）前記治療用タンパク質APC提示可能抗原が、治療用タンパク質のMHCクラスI拘束性および／またはMHCクラスII拘束性エピトープを含み、例えば、前記治療用タンパク質APC提示可能抗原が、治療用タンパク質のMHCクラスII拘束性エピトープを含み、および／または（v）前記治療用タンパク質APC提示可能抗原が、治療用タンパク質のB細胞エピトープを含み、および／または（v i）前記治療用タンパク質が、タンパク質補充療法またはタンパク質添加療法のための治療用タンパク質を含み、および／または（v i i）前記治療用タンパク質が、不融性または注射用の治療用タンパク質、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカイン、インターフェロン、増殖因子、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはポンペ病に関連するタンパク質を含み、例えば、請求項3に規定されたとおりの不融性または注射用の治療用タンパク質を含み、および／または（v i i i）前記組成物が、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／またはCD4＋T細胞増殖および／または活性および／またはB細胞増殖および／または活性を減少させるのに有効な量であり、および／または（i x）前記第1および／または第2の集団の前記合成ナノキャリアの動的光散乱を用いて得られる粒度分布の平均が、請求項6に規定されたとおりであり、および／または（x）前記第1の集団および／または第2の集団の前記合成ナノキャリアのアスペクト比が、1：1、1：1.2、1：1.5、1：2、1：3、1：5、1：7または1：10を超え、および／または（x i）前記組成物が、薬学的に許容できる賦形剤を更に含み、および／または（x i i）前記方法が、前記治療用タンパク質を前記被験体に投与する工程を更に含み、任意に、前記治療用タンパク質が、前記組成物の前記投与の前に、前記投与と同時にまたは前記投与の後に投与され、および／または（x i i i）1つ以上の維持投与量の前記組成物が、前記被験体に投与され、および／または（x i v）前記方法が、前記組成物および／または治療用タンパク質の前記投与の前におよび／または前記投与の後に、前記被験体における望ましくない免疫応答の生成を評価する工程を更に含み、例えば、前記望ましくない免疫応答が、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／またはCD4＋T細胞増殖および／または活性および／またはB細胞増殖および／または活性であり、および／または（x v）前記投与が、静脈内、腹腔内、経粘膜、経口、皮下、経肺、鼻腔内、皮内または筋肉内投与によって行われ、例えば、吸入または静脈内、皮下または経粘膜投与によって行われる、前記組成物。

【請求項12】

治療用タンパク質APC提示可能抗原に特異的な免疫応答を減少させる工程、およびFoxP3発現を誘導する工程を含む、被験体において寛容を誘導する方法における使用のためのポリマー合成ナノキャリアの集団を生成するプロセスであって、当該プロセスが、

（i）免疫抑制剤に結合されたポリマー合成ナノキャリアの第1の集団を生成する工程と、

（i i）治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合されたポリマー合成ナノキャリアの第2の集団を生成する工程とを含む；

免疫抑制剤の負荷が、合成ナノキャリアの第1の集団全体を平均して、少なくとも2％であるが、25％以下（重量／重量）であり、および抗原の負荷が、合成ナノキャリアの第2の集団全体を平均して、1％～10％（重量／重量）であり；

免疫抑制剤がラパマイシンまたはラパマイシン類似体を含み；および

第1の集団の合成ナノキャリアの少なくとも75％が、動的光散乱を用いて得られる110nmを超える最小寸法を有し、かつ動的光散乱を用いて得られる500nm以下である

最大寸法を有し、

任意に、(a) 前記第1の集団および第2の集団が同じであり、および／または(b) 生成される合成ナノキャリアの前記第1および第2の集団が、請求項1～7のいずれか一項に記載されるとおりであり、および／または(c) 生成される合成ナノキャリアの前記第1および第2の集団を含む組成物の剤形を生成する工程を更に含み、および／または(d) 合成ナノキャリアの前記第1の集団および第2の集団を含む組成物または前記剤形を、被験体が投与に利用できるようにする工程を更に含み、および／または(e) 合成ナノキャリアの前記第1の集団および第2の集団を含む組成物による、望ましくない免疫応答の減少を評価する工程を更に含み、例えば、前記望ましくない免疫応答が、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／またはCD4+T細胞増殖および／または活性および／またはB細胞増殖および／または活性であり、および／または(f) 前記プロセスが、免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアの第1の集団と、治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合された合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物または剤形を生成するためである、前記プロセス。

10

【請求項13】

治療または予防に使用するための、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物または請求項8に記載の剤形であって、任意に、治療用タンパク質抗原、細胞に基づいた療法、タンパク質補充療法、タンパク質添加療法に対する寛容原性免疫応答を誘導する方法または請求項10または11に記載の方法に使用するための、前記組成物または前記剤形。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第119条の下で、2011年4月29日に出願された米国仮特許出願第61/480,946号、2011年7月29日に出願された同第61/513,514号、2011年9月6日に出願された同第61/531,147号、2011年9月6日に出願された同第61/531,153号、2011年9月6日に出願された同第61/531,164号、2011年9月6日に出願された同第61/531,168号、2011年9月6日に出願された同第61/531,175号、2011年9月6日に出願された同第61/531,180号、2011年9月6日に出願された同第61/531,194号、2011年9月6日に出願された同第61/531,204号、2011年9月6日に出願された同第61/531,209号、2011年9月6日に出願された同第61/531,215号の利益を主張するものであり、これらの仮特許出願のそれぞれの内容全体が、参照により本明細書に援用される。

30

【0002】

本発明は、治療用タンパク質抗原提示細胞(APC)提示可能抗原および免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア組成物、および関連する方法に関する。この組成物および方法は、免疫応答を、治療用タンパク質に特異的な寛容原性免疫応答の発生に有利に変化させるために、APCによる効率的な取り込み(uptake)を可能にする。従って、提供される組成物および方法は、治療用タンパク質の投与が望ましくない免疫応答をもたらすかまたはもたらすことが予測される被験体における寛容原性免疫応答を生成するのに使用され得る。

40

【背景技術】

【0003】

タンパク質または酵素補充療法などの治療処置は、特定の治療剤に対する望ましくない免疫応答をもたらすことが多い。このような場合、免疫系の細胞は、治療剤を異物として認識し、細菌およびウイルスなどの感染微生物を破壊しようとするのと全く同じように、治療剤を破壊しようとする。このような望ましくない免疫応答は、免疫抑制剤の使用によって減少され得る。しかしながら、従来の免疫抑制剤は、広く作用する。更に、免疫抑制を維持するために、免疫抑制剤療法は、一般に、生涯にわたる計画である。残念ながら、

50

広く作用する免疫抑制剤の使用には、腫瘍、感染症、腎毒性および代謝異常などの重い副作用のリスクが伴う。従って、新規な免疫抑制剤療法が有益であろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

一態様において、(i) 免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアの第1の集団と、(ii) 治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合された合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物が提供される。一実施形態において、第1の集団および第2の集団は同じ集団である。別の実施形態において、第1の集団および第2の集団は異なる集団である。

【0005】

更に別の実施形態において、免疫抑制剤は、スタチン、mTOR阻害剤、TGF- β シグナル伝達剤、コルチコステロイド、ミトコンドリア機能の阻害剤、P38阻害剤、NF- κ B阻害剤、アデノシン受容体アゴニスト、プロスタグランジンE2アゴニスト、ホスホジエステラーゼ4阻害剤、HDAC阻害剤またはプロテアソーム阻害剤を含む。更に別の実施形態において、mTOR阻害剤は、ラパマイシンまたはラパマイシン類似体である。

【0006】

ある実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質を合成ナノキャリアに結合することによって提供される。他の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質から得られるかまたは治療用タンパク質に由来するポリペプチドまたはペプチドを結合することによって提供される。更なる実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質のMHCクラスI拘束性および/またはMHCクラスII拘束性エピトープおよび/またはB細胞エピトープを含む。別の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質のMHCクラスII拘束性エピトープを含む。別の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質のB細胞エピトープを実質的に含まない。別の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質のMHCクラスII拘束性エピトープを含み、治療用タンパク質のB細胞エピトープを実質的に含まない。

【0007】

一実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、タンパク質補充療法またはタンパク質添加療法のための治療用タンパク質、或いはその断片または誘導体を含む。別の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、不融性または注射用の治療用タンパク質、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカイン、インターフェロン、増殖因子、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはポンペ病に関連するタンパク質、或いは上記のものの何れかの断片または誘導体を含む。別の実施形態において、不融性または注射用の治療用タンパク質は、トシリズマブ、 α -1アンチトリプシン、Hematide、アルブインターフェロン α -2b、Rhucin、テサモレリン、オクレリズマブ、ベリムマブ、ペグロチカーゼ、タリグルセラーゼアルファ、アガルシダーゼアルファまたはベラグルセラーゼアルファを含む。別の実施形態において、酵素は、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼまたはリガーゼを含む。別の実施形態において、酵素は、リソソーム貯蔵障害のための酵素補充療法のための酵素を含む。別の実施形態において、リソソーム貯蔵障害のための酵素補充療法のための酵素は、イミグルセラーゼ、 α -ガラクトシダーゼA (α -gal A)、アガルシダーゼベータ、酸性 α -グルコシダーゼ (GAA)、アルグルコシダーゼアルファ、LUMIZYME、MYOZYME、アリアルスルファターゼB、ラロニダーゼ、ALDURAZYME、イデュルスルファターゼ、ELAPRASE、アリアルスルファターゼBまたはNAGLAZYMEを含む。別の実施形態において、サイトカインは、リンホカイン、インターロイキン、ケモカイン、1型サイトカインまたは2型サイトカインを含む。別の実施形態において、血液および血液凝固因子は、第I因子

10

20

30

40

50

、第ⅠⅠ因子、組織因子、第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子、第ⅠⅩ因子、第Ⅹ因子、第Ⅹa因子、第ⅩⅠⅠ因子、第ⅩⅠⅠⅠ因子、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン、フィブロネクチン、抗トロンビンⅠⅠⅠ、ヘパリン補因子ⅠⅠ、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤（ZPI）、プラスミノーゲン、α2-抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1（PAI1）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-2（PAI2）、癌由来凝血促進因子またはエポエチナルファを含む。更に別の実施形態において、治療用タンパク質は、細胞に基づいた療法の細胞中で、それによって、またはその上で発現される。

【0008】

10

一実施形態において、組成物は、抗原がそれから得られるかまたはそれに由来する治療用タンパク質APC提示可能抗原または治療用タンパク質に対する寛容原性免疫応答を生成するのに有効な量である。別の実施形態において、組成物は、被験体に投与された場合に、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成を減少させるのに有効な量である。

【0009】

別の実施形態において、免疫抑制剤および／または抗原の負荷は、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団全体を平均して、0.0001%～50%である。更に別の実施形態において、免疫抑制剤および／または抗原の負荷は、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団全体を平均して、0.1%～10%である。

【0010】

20

一実施形態において、第1の集団および／または第2の集団の合成ナノキャリアは、脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルジョン、デンドリマー、パッキボール、ナノワイヤ、ウイルス様粒子またはペプチド若しくはタンパク質粒子を含む。別の実施形態において、第1および／または第2の集団の合成ナノキャリアは、脂質ナノ粒子を含む。更に別の実施形態において、第1および／または第2の集団の合成ナノキャリアは、リボソームを含む。更に別の実施形態において、第1および／または第2の集団の合成ナノキャリアは、金属ナノ粒子を含む。更なる実施形態において、金属ナノ粒子は金ナノ粒子を含む。更に他の実施形態において、第1および／または第2の集団の合成ナノキャリアは、ポリマーナノ粒子を含む。別の実施形態において、ポリマーナノ粒子は、非メトキシ末端プルロニック（pluronic）ポリマーであるポリマーを含む。更に他の実施形態において、ポリマーナノ粒子は、ポリエステル、ポリエーテルに結合されたポリエステル、ポリアミノ酸、ポリカーボネート、ポリアセタール、ポリケタール、多糖、ポリエチルオキサゾリンまたはポリエチレンイミンを含む。別の実施形態において、ポリエステルは、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）またはポリカプロラクトンを含む。更に別の実施形態において、ポリマーナノ粒子は、ポリエステルおよびポリエーテルに結合されたポリエステルを含む。別の実施形態において、ポリエーテルは、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む。

30

【0011】

別の実施形態において、第1および／または第2の集団の合成ナノキャリアの動的光散乱を用いて得られる粒度分布の平均は、100nmを超える直径である。別の実施形態において、直径は、150nmを超える。別の実施形態において、直径は、200nmを超える。別の実施形態において、直径は、250nmを超える。別の実施形態において、直径は、300nmを超える。

40

【0012】

更なる実施形態において、第1の集団および／または第2の集団の合成ナノキャリアのアスペクト比は、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7または1:10を超える。

【0013】

更に別の実施形態において、組成物は、薬学的に許容できる賦形剤を更に含む。

50

【0014】

別の態様において、本明細書に提供される組成物の何れかを含有剤形が提供される。

【0015】

別の態様において、本明細書に提供される組成物または剤形の何れかを、治療用タンパク質を投与されているかまたは投与される予定である被験体に投与する工程を含む方法が提供される。一実施形態において、本方法は、治療用タンパク質を被験体に投与する工程を更に含む。別の実施形態において、治療用タンパク質は、組成物または剤形の投与の前に、投与と同時にまたは投与の後に投与される。更に別の実施形態において、1つ以上の維持投与量の組成物または剤形が、被験体に投与される。

【0016】

10

更に別の実施形態において、本方法は、組成物または剤形および／または治療用タンパク質の投与の前および／または投与の後に、被験体における望ましくない免疫応答の生成を評価する工程を更に含む。一実施形態において、望ましくない免疫応答は、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成である。別の実施形態において、望ましくない免疫応答は、治療用タンパク質に特異的なCD4+T細胞増殖および／または活性である。更に別の実施形態において、望ましくない免疫応答は、治療用タンパク質に特異的なB細胞増殖および／または活性である。

【0017】

一実施形態において、治療用タンパク質は、タンパク質補充療法またはタンパク質添加療法のための治療用タンパク質を含む。別の実施形態において、治療用タンパク質は、不融性または注射用の治療用タンパク質、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカイン、インターフェロン、増殖因子、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはポンペ病に関連するタンパク質を含む。別の実施形態において、不融性または注射用の治療用タンパク質は、トシリズマブ、 α -1アンチトリプシン、Hematide、アルブインターフェロン α -2b、Rhucin、テサモレリン、オクレリズマブ、ベリムマブ、ペグロチカーゼ、タリグルセラゼアルファ、アガルシダーゼアルファまたはベラグルセラゼアルファを含む。別の実施形態において、酵素は、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼまたはリガーゼを含む。別の実施形態において、酵素は、リソソーム貯蔵障害のための酵素補充療法のための酵素を含む。別の実施形態において、リソソーム貯蔵障害のための酵素補充療法のための酵素は、イミグルセラゼ、 α -ガラクトシダーゼA (α -gal A)、アガルシダーゼベータ、酸性 α -グルコシダーゼ (GAA)、アルグルコシダーゼアルファ、LUMIZYME、MYOZYME、アリアルスルファターゼB、ラロニダーゼ、ALDURAZYME、イデュルスルファターゼ、ELAPRASE、アリアルスルファターゼBまたはNAGLAZYMEを含む。別の実施形態において、サイトカインは、リンホカイン、インターロイキン、ケモカイン、1型サイトカインまたは2型サイトカインを含む。別の実施形態において、血液および血液凝固因子は、第I因子、第II因子、組織因子、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン、フィブロンectin、抗トロンビンIII、ヘパリン補因子II、プロテインC、40
プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤 (ZPI)、プラスミノーゲン、 α 2-抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子 (tPA)、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1 (PAI1)、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-2 (PAI2)、癌由来凝血促進因子またはエポエチンアルファを含む。更に別の実施形態において、治療用タンパク質は、細胞に基づいた療法の細胞中で、それによって、またはその上で発現される。

【0018】

一実施形態において、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団および／または治療用タンパク質の投与は、静脈内、腹腔内、経粘膜、経口、皮下、経肺、鼻腔内、皮内または筋肉内投与によって行われる。別の実施形態において、合成ナノキャリアの第1

50

および／または第2の集団および／または治療用タンパク質の投与は、吸入或いは静脈内、皮下または経粘膜投与によって行われる。

【0019】

更に別の態様において、(i)免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアの第1の集団と、(ii)治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合された合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物を被験体に投与する工程を含む方法であって、組成物が、治療用タンパク質APC提示可能抗原に対する望ましくない免疫応答の生成を減少させるのに有効な量である方法が提供される。更に別の態様において、(i)免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアの第1の集団と、(ii)治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合された合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物を投与することによって、被験体における望ましくない免疫応答の生成を減少させる工程を含む方法が提供される。更なる態様において、一人以上の被験体における治療用タンパク質APC提示可能抗原に対する望ましくない免疫応答の生成を減少させることが既に示されたプロトコルに従って組成物を被験体に投与する工程を含む方法であって；組成物が、(i)免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアの第1の集団と、(ii)治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合された合成ナノキャリアの第2の集団とを含む方法が提供される。一実施形態において、第1の集団および第2の集団は同じ集団である。別の実施形態において、第1の集団および第2の集団は異なる集団である。

10

【0020】

更に別の実施形態において、本方法は、被験体を提供または同定する工程を更に含む。更に別の実施形態において、本方法は、組成物の投与の前および／または投与の後に、被験体における望ましくない免疫応答の生成を評価する工程を更に含む。一実施形態において、望ましくない免疫応答は、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／または治療用タンパク質に特異的なCD4+T細胞増殖および／または活性および／または治療用タンパク質に特異的なB細胞増殖および／または活性である。

20

【0021】

別の実施形態において、免疫抑制剤は、スタチン、mTOR阻害剤、TGF- β シグナル伝達剤、コルチコステロイド、ミトコンドリア機能の阻害剤、P38阻害剤、NF- κ B阻害剤、アデノシン受容体アゴニスト、プロスタグランジンE2アゴニスト、ホスホジエステラーゼ4阻害剤、HDAC阻害剤またはプロテアソーム阻害剤を含む。更に別の実施形態において、mTOR阻害剤は、ラパマイシンまたはラパマイシン類似体である。

30

【0022】

ある実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質を合成ナノキャリアに結合することによって提供される。他の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質から得られるかまたは治療用タンパク質に由来するポリペプチドまたはペプチドを結合することによって提供される。更なる実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質のMHCクラスI拘束性および／またはMHCクラスII拘束性エピトープおよび／またはB細胞エピトープを含む。別の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質のMHCクラスII拘束性エピトープを含む。別の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質のB細胞エピトープを実質的に含まない。別の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、治療用タンパク質のMHCクラスII拘束性エピトープを含み、治療用タンパク質のB細胞エピトープを実質的に含まない。

40

【0023】

一実施形態において、治療用タンパク質は、タンパク質補充療法またはタンパク質添加療法のための治療用タンパク質を含む。別の実施形態において、治療用タンパク質は、不融性または注射用の治療用タンパク質、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカイン、インターフェロン、増殖因子、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはポンペ病に関連するタンパク質を含む。別の実施形態において、不融性ま

50

たは注射用の治療用タンパク質は、トシリズマブ、 α -1アンチトリプシン、Hematide、アルブインターフェロン α -2b、Rhucin、テサモレリン、オクレリズマブ、ベリムマブ、ペグロチカーゼ、タリグルセラーゼアルファ、アガルシダーゼアルファまたはベラグルセラーゼアルファを含む。別の実施形態において、酵素は、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼまたはリガーゼを含む。別の実施形態において、酵素は、リソソーム貯蔵障害のための酵素補充療法のための酵素を含む。別の実施形態において、リソソーム貯蔵障害のための酵素補充療法のための酵素は、イミグルセラーゼ、 α -ガラクトシダーゼA (α -gal A)、アガルシダーゼベータ、酸性 α -グルコシダーゼ (GAA)、アルグルコシダーゼアルファ、LUMIZYME、MYOZYME、アリアルスルファターゼB、ラロニダーゼ、ALDURAZYME、イデュルスルファターゼ、ELAPRASE、アリアルスルファターゼBまたはNAGLAZYMEを含む。別の実施形態において、サイトカインは、リンホカイン、インターロイキン、ケモカイン、1型サイトカインまたは2型サイトカインを含む。別の実施形態において、血液および血液凝固因子は、第I因子、第II因子、組織因子、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン、フィブロンネクチン、抗トロンビンIII、ヘパリン補因子II、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤 (ZPI)、プラスミノーゲン、 α 2-抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子 (tPA)、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1 (PAI1)、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-2 (PAI2)、癌由来凝血促進因子またはエポエチンアルファを含む。更に別の実施形態において、治療用タンパク質は、細胞に基づいた療法の細胞中で、それによって、またはその上で発現される。

【0024】

一実施形態において、組成物は、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／または治療用タンパク質に特異的なCD4+T細胞増殖および／または活性および／または治療用タンパク質に特異的なB細胞増殖および／または活性を減少させるのに有効な量である。

【0025】

別の実施形態において、免疫抑制剤および／または抗原の負荷は、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団全体を平均して、0.0001%~50%である。更に別の実施形態において、免疫抑制剤および／または抗原の負荷は、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団全体を平均して、0.1%~10%である。

【0026】

一実施形態において、第1の集団および／または第2の集団の合成ナノキャリアは、脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルジョン、 dendrimer、バッキーボール、ナノワイヤ、ウイルス様粒子またはペプチド若しくはタンパク質粒子を含む。別の実施形態において、第1および／または第2の集団の合成ナノキャリアは、脂質ナノ粒子を含む。更に別の実施形態において、第1および／または第2の集団の合成ナノキャリアは、金属ナノ粒子を含む。更に別の実施形態において、第1および／または第2の集団の合成ナノキャリアは、ポリマーナノ粒子を含む。別の実施形態において、ポリマーナノ粒子は、非メトキシ末端プルロニックポリマーであるポリマーを含む。更に別の実施形態において、ポリマーナノ粒子は、ポリエステル、ポリエーテルに結合されたポリエステル、ポリアミノ酸、ポリカーボネート、ポリアセタール、ポリケタール、多糖、ポリエチルオキサゾリンまたはポリエチレンイミンを含む。別の実施形態において、ポリエステルは、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)またはポリカプロラクトンを含む。更に別の実施形態において、ポリマーナノ粒子は、ポリエステルおよびポリエーテルに結合されたポリエステルを含む。更に別の実施形態において

、ポリエーテルは、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む。

【0027】

別の実施形態において、第1および／または第2の集団の合成ナノキャリアの動的光散乱を用いて得られる粒度分布の平均は、100nmを超える直径である。別の実施形態において、直径は、150nmを超える。別の実施形態において、直径は、200nmを超える。別の実施形態において、直径は、250nmを超える。別の実施形態において、直径は、300nmを超える。

【0028】

更なる実施形態において、第1の集団および／または第2の集団の合成ナノキャリアのアスペクト比は、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7または1:10を超える。

10

【0029】

更に他の実施形態において、組成物は、薬学的に許容できる賦形剤を更に含む。

【0030】

更に他の実施形態において、本方法は、治療用タンパク質を被験体に投与する工程を更に含む。一実施形態において、治療用タンパク質は、組成物の投与の前に、投与と同時にまたは投与の後に投与される。

【0031】

別の実施形態において、1つ以上の維持投与量の組成物が、被験体に投与される。

【0032】

20

更に別の実施形態において、本方法は、組成物および／または治療用タンパク質の投与の前および／または投与の後に、被験体における望ましくない免疫応答の生成を評価する工程を更に含む。別の実施形態において、望ましくない免疫応答は、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／または治療用タンパク質に特異的なCD4+T細胞増殖および／または活性および／または治療用タンパク質に特異的なB細胞増殖および／または活性である。

【0033】

一実施形態において、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団および／または治療用タンパク質の投与は、静脈内、腹腔内、経粘膜、経口、皮下、経肺、鼻腔内、皮内または筋肉内投与によって行われる。別の実施形態において、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団および／または治療用タンパク質の投与は、吸入或いは静脈内、皮下または経粘膜投与によって行われる。

30

【0034】

更なる態様において、(i)免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアの第1の集団を生成する工程と、(ii)治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合された合成ナノキャリアの第2の集団を生成する工程とを含む方法が提供される。一実施形態において、第1の集団および第2の集団は同じ集団である。別の実施形態において、第1の集団および第2の集団は異なる集団である。更に別の実施形態において、生成される合成ナノキャリアの第1および第2の集団は、本明細書のどこかに提供されるように規定されたとおりである。

40

【0035】

一実施形態において、本方法は、生成される合成ナノキャリアの第1および第2の集団を含む組成物の剤形を生成する工程を更に含む。更に別の実施形態において、本方法は、合成ナノキャリアの第1の集団および第2の集団を含む組成物または剤形を、被験体が投与に利用できるようにする工程を更に含む。更なる実施形態において、本方法は、合成ナノキャリアの第1の集団および第2の集団を含む組成物による、望ましくない免疫応答の減少を評価する工程を更に含む。一実施形態において、望ましくない免疫応答は、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成および／または治療用タンパク質に特異的なCD4+T細胞増殖および／または活性および／または治療用タンパク質に特異的なB細胞増殖および／または活性である。

50

【0036】

更に他の態様において、(i) 免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアの第1の集団と、(ii) 治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合された合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物または剤形を生成するためのプロセスであって、本明細書に提供される方法の何れかにおいて規定される工程を含むプロセスが提供される。

【0037】

別の態様において、本明細書に提供される方法またはプロセスの何れかによって得られる組成物または剤形が提供される。

【0038】

更に別の態様において、本明細書に提供される組成物または剤形の何れかが、治療または予防に使用するためのものであり得る。

10

【0039】

更に別の態様において、本明細書に提供される組成物または剤形の何れかが、治療用タンパク質抗原、細胞に基づいた療法、タンパク質補充療法、タンパク質添加療法に対する寛容原性免疫応答を誘導する方法または本明細書に提供される方法の何れかに使用するためのものであり得る。

【0040】

更なる態様において、治療用タンパク質抗原、細胞に基づいた療法、タンパク質補充療法、タンパク質添加療法に対する寛容原性免疫応答を誘導する方法または本明細書に提供される方法の何れかに使用するための薬剤の製造のための、本明細書に提供される組成物または剤形の何れかの使用が提供される。

20

【0041】

更に別の態様において、本明細書に提供される組成物の何れかを含む剤形が提供される。

【0042】

提供される組成物および方法の何れかのある実施形態において、本明細書に提供される組成物は、予防的に、免疫応答の初期に（例えば、IgM段階中）および／または十分な（mature）メモリー応答および／またはIgG抗体応答の確立の前に投与される。本明細書に提供される組成物および方法の何れかの実施形態において、この組成物および方法は、エフェクターT細胞が抗原に反応する頻度および／または炎症性サイトカインを生成するその能力を低下させ得る。本明細書に提供される組成物および方法の何れかの他の実施形態において、この組成物および方法は、望ましくない治療用タンパク質の免疫応答の発生を減少させる抑制性の制御性TまたはB細胞の頻度を増加させる。

30

【0043】

本明細書に提供される組成物および方法の何れかの一実施形態において、上記のエピトープを含むタンパク質である抗原が、合成ナノキャリアに結合され得る。別の実施形態において、上記のエピトープを含むが、エピトープの一端または両端に隣接する更なるアミノ酸も含むポリペプチドまたはペプチドが、合成ナノキャリアに結合され得る。別の実施形態において、エピトープ自体が、合成ナノキャリアに結合される。

【図面の簡単な説明】

40

【0044】

【図1】 Tregのフローサイトメトリー分析からの結果を示す。

【図2】（1回の注射の後の）免疫抑制剤（ラパマイシンまたはシンバスタチン）を含む本発明の合成ナノキャリアによる、抗原特異的なエフェクターT細胞の数に対する効果を示す。

【図3】（複数回の注射の後の）免疫抑制剤（ラパマイシンまたはシンバスタチン）を含む本発明の合成ナノキャリアによる、膝窩リンパ節細胞の数の減少を示す。

【図4】 免疫抑制剤ラパマイシンおよびOVA抗原を含む合成ナノキャリアによる、抗OVA IgG抗体の減少を示す。

【図5】 対照群および受動投与群（control and passive group）

50

p)における、免疫抑制剤ラパマイシンおよびOVA抗原を含む合成ナノキャリアによる、抗OVA IgG抗体の減少を示す。

【図6】ovaペプチドおよび免疫抑制剤ラパマイシンを含む合成ナノキャリアの投与による、抗原特異的なIgGレベルの低下を示す。

【図7】ovaペプチドおよび免疫抑制剤ラパマイシンを含む合成ナノキャリアによる、抗原特異的なB細胞の数の減少を示す。

【図8】ovaペプチドおよび免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアで処理された喘息モデル動物被験体からの洗浄試料におけるCD4+T細胞の数の減少を示す。

【図9】喘息モデル動物被験体におけるovaペプチドおよび免疫抑制剤ラパマイシンを含む合成ナノキャリアによる処理の結果としての、分割CD4+T細胞のパーセンテージの低下を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0045】

本発明を詳細に説明する前に、本発明が、具体的に例示される材料またはプロセスパラメータに限定されず、従って、当然ながら変化し得ることを理解されたい。本明細書に使用される専門用語が、本発明の特定の実施形態のみを説明するためのものであり、本発明を説明する別の専門用語の使用を限定するものであることは意図されていないことも理解されたい。

【0046】

本明細書に引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、上記または下記にかかわらず、あらゆる目的のために、全体が参照により本明細書に援用される。

20

【0047】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される際、単数形（「a」、「an」および「the」）は、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、複数の指示対象を含む。例えば、ポリマー（a polymer）」への言及は、2つ以上のこのような分子の混合物または異なる分子量の単一のポリマー種の混合物を含み、「合成ナノキャリア（a synthetic nanocarrier）」への言及は、2つ以上のこのような合成ナノキャリアまたは複数のこのような合成ナノキャリアの混合物を含み、「DNA分子（a DNA molecule）」への言及は、2つ以上のこのようなDNA分子または複数のこのようなDNA分子の混合物を含み、「免疫抑制剤（an immunosuppressant）」への言及は、2つ以上のこのような材料または複数の免疫抑制剤分子の混合物を含むなどである。

30

【0048】

本明細書において使用される際、「含む（comprise）」という用語或いは「含む（comprises）」または「含む（comprising）」などのその変化形は、任意の記載される整数（例えば、特徴、要素、特性、性質、方法／プロセス工程または制限）或いは整数（例えば、特徴、要素、特性、性質、方法／プロセス工程または制限）の群の包含を示すように読まれるべきであるが、任意の他の整数または整数の群を除外するものではない。従って、本明細書において使用される際、「含む（comprising）」という用語は、包含的なものであり、追加の記載されていない整数または方法／プロセス工程を除外するものではない。

40

【0049】

本明細書に提供される組成物および方法の何れかの実施形態において、「含む（comprising）」は、「から本質的になる（consisting essentially of）」または「からなる（consisting of）」と置き換えられることがある。「から本質的になる（consisting essentially of）」という語句は、本明細書において、規定の整数または工程並びに権利請求される発明の性質または機能に実質的に影響を与えない整数または工程を必要とするのに使用される。本明細書において使用される際、「からなる（consisting）」という用語は、記載される整数（例えば、特徴、要素、特性、性質、方法／プロセス工程または制限

50

）或いは整数（例えば、特徴、要素、特性、性質、方法／プロセス工程または制限）の群のみの存在を示すのに使用される。

【0050】

A. 導入部

上述されるように、現在の従来の免疫抑制剤は、広く作用し、一般に、免疫系の全体的な全身の下方制御をもたらす。本明細書に提供される組成物および方法は、例えば、対象とする免疫細胞への標的化した送達を可能にすることによって、より標的化した免疫効果を可能にする。従って、本組成物および方法により、より標的を絞った（directed manner）免疫抑制を得ることができる。免疫抑制剤およびMHCクラスII拘束性エピトープを含む抗原の送達、抗原特異的な抗体の生成を効果的に減少させるとともに、抗原特異的なCD4+T細胞およびB細胞の生成も減少させることができることが分かった。このような免疫応答は、治療用タンパク質による治療処置の際に生成される望ましくない免疫応答を抑えるのに有益であり得るため、本発明は、望ましくない免疫応答が生成されるかまたは生成されることが予測される治療用タンパク質を投与されたか、投与されているかまたは投与される予定である被験体における寛容原性免疫応答を促進するのに有用である。本発明は、ある実施形態において、特定の治療処置の有益な効果を相殺し得る望ましくない免疫応答を防止または抑制する。

10

【0051】

本発明者らは、上記の問題および制限が、本明細書に開示される本発明を実施することによって克服され得ることを予想外かつ意外にも発見した。特に、本発明者らは、治療用タンパク質に対する寛容原性免疫応答を誘導する合成ナノキャリア組成物、および関連する方法を提供することが可能であることを予想外にも発見した。本明細書に記載される組成物は、（i）免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアの第1の集団と、（ii）治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合された合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物を含む。

20

【0052】

別の態様において、本明細書の組成物の何れかの剤形が提供される。このような剤形は、必要としている被験体（例えば、治療用タンパク質に特異的な寛容原性免疫応答を必要としている）などの被験体に投与され得る。一実施形態において、被験体は、望ましくない免疫応答が生成されるかまたは生成されることが予測される治療用タンパク質で治療されたか、治療されているかまたは治療される予定である被験体である。

30

【0053】

別の態様において、本明細書に提供される組成物の何れかが、被験体に投与される。組成物は、1つ以上の治療用タンパク質に対する望ましくない免疫応答の生成を減少させるのに有効な量で投与され得る。一実施形態において、組成物が、一人以上の被験体における治療用タンパク質に対する望ましくない免疫応答の生成を減少させることが既に示されたプロトコルに従って被験体に投与される。望ましくない免疫応答は、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成、CD4+T細胞増殖および／または活性またはB細胞増殖および／または活性またはそれらの組合せであり得る。望ましくない免疫応答はまた、上記のものから下流の他の免疫応答の生成であり得る。実施形態において、有効な量、またはプロトコルが、望ましい免疫応答を生成するかまたは生成することが示された。このような免疫応答は、上記のもの何れか、または上記のもの組合せの減少を含む。このような免疫応答は、本明細書に記載されるものなどの任意の寛容原性免疫応答を含む。

40

【0054】

組成物は、被験体への治療用タンパク質の投与の前に、投与と同時にまたは投与の後に被験体に投与され得る。ある実施形態において、合成ナノキャリア組成物は、被験体における十分なメモリー応答の確立の前に投与される。提供される方法は、ある実施形態において、治療用タンパク質を投与する工程を更に含み得る。実施形態において、提供される組成物はまた、治療用タンパク質を投与されたか、投与されているかまたは投与される予定である被験体への1つ以上の維持投与量として投与され得る。このような実施形態にお

50

いて、提供される組成物は、望ましくない免疫応答の生成が、所定の時間の長さにわたって減少されるように投与される。このような時間の長さの例は、本明細書のどこかに提供される。

【0055】

更に別の態様において、(i) 免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアの第1の集団を生成する工程と、(ii) 治療用タンパク質APC提示可能抗原に結合された合成ナノキャリアの第2の集団を生成する工程とを含む方法が提供される。一実施形態において、本方法は、合成ナノキャリアの第1および第2の集団を含む剤形を生成する工程を更に含む。

【0056】

ここで、本発明は、以下により詳細に説明される。

【0057】

B. 定義

「投与する (administering)」または「投与 (administration)」は、薬理学的に有用な方法で被験体に材料を提供することを意味する。

【0058】

被験体への投与のための組成物または剤形の文脈における「有効量」は、被験体における1つ以上の望ましい免疫応答を生成する（例えば、寛容原性免疫応答の生成）（例えば、抗原特異的なCD4+T細胞または抗原特異的なB細胞の増殖、活性化、誘導、動員の減少或いは抗原特異的な抗体の生成の減少）、組成物または剤形の量を指す。従って、ある実施形態において、有効量は、これらの望ましい免疫応答のうちの1つ以上を生成する本明細書に提供される組成物の任意の量である。この量は、インビトロまたは生体内の目的のためのものであり得る。生体内の目的では、量は、抗原特異的な寛容化を必要とする被験体に対する臨床効果を有し得ると臨床医が考えるであろう量であり得る。

【0059】

有効量は、望ましくない免疫応答のレベルを低下させることのみに関与し得るが、ある実施形態において、有効量は、望ましくない免疫応答を完全に予防することに関与する。有効量は、望ましくない免疫応答の発生を遅延させることにも関与し得る。有効な量はまた、所望の治療エンドポイントまたは所望の治療結果をもたらす本明細書に提供される組成物の量であり得る。有効量は、好ましくは、抗原に対する被験体の寛容原性免疫応答をもたらす。上記の何れかの成果が、常法によって監視され得る。

【0060】

提供される組成物および方法の何れかのある実施形態において、有効量は、望ましい免疫応答が、被験体において、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも9ヶ月間、少なくとも1年間、少なくとも2年間、少なくとも5年間、またはそれ以上持続する量である。提供される組成物および方法の何れかの実施形態において、有効量は、測定可能な望ましい免疫応答、例えば、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも9ヶ月間、少なくとも1年間、少なくとも2年間、少なくとも5年間、またはそれ以上にわたる、免疫応答（例えば、特定の抗原に対する）の測定可能な減少をもたらす量である。

【0061】

有効量は、当然ながら、治療される特定の被験体；病態、疾病または疾患の重症度；年齢、健康状態、サイズおよび体重を含む個々の患者パラメータ；治療の持続期間；併用療法（もしあれば）の性質；特定の投与経路並びに医療関係者の知識および専門技術の範囲内の同様の要因に左右されるであろう。これらの要因は、当業者に周知であり、単なる日常の実験で対処され得る。最大投与量、即ち、妥当な医学的判断に従って安全な最高投与量が使用されることが一般に好ましい。しかしながら、患者が、医療上の理由、心理的な理由または実質的にあらゆる他の理由のために、より少ない投与量または耐量を要求し

10

20

30

40

50

得ることが、当業者によって理解されるであろう。

【0062】

一般に、本発明の組成物中の免疫抑制剤および／または抗原の投与量は、約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100,000\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲であり得る。ある実施形態において、投与量は、約 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であり得る。更に他の実施形態において、投与量は、約 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $25\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $25\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $50\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $75\text{mg}/\text{kg}$ または約 $75\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であり得る。或いは、投与量は、所望の量の免疫抑制剤および／または抗原が得られる合成ナノキャリアの数に基づいて投与され得る。例えば、有用な投与量は、投与量当たり 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 または 10^{10} 個を超える合成ナノキャリアを含む。有用な投与量の他の例は、投与量当たり約 1×10^6 ～約 1×10^{10} 個、約 1×10^7 ～約 1×10^9 個または約 1×10^8 ～約 1×10^9 個の合成ナノキャリアを含む。

10

【0063】

「抗原」は、B細胞抗原またはT細胞抗原を意味する。「抗原のタイプ」は、同じか、または実質的に同じ抗原的特徴を共有する分子を意味する。ある実施形態において、抗原は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、リボタンパク質、糖脂質、ポリヌクレオチド、多糖類であり得るか或いは細胞中に含まれるかまたは細胞中で発現される。抗原が明確に規定または特徴付けされていない場合などのある実施形態において、抗原は、細胞または組織標本、細胞残屑、細胞エキソソーム、馴化培地などの中に含まれていてもよい。抗原は、被験体が曝される望ましくない免疫応答を引き起こす形態と同じ形態で合成ナノキャリアと組み合わせられ得るが、その断片または誘導体であってもよい。しかしながら、断片または誘導体の場合、このような被験体が曝される形態に対する望ましい免疫応答が、提供される組成物および方法による好ましい結果である。

20

【0064】

「抗原特異的な」は、抗原、またはその部分の存在から得られるか、或いは抗原を特異的に認識または結合する分子を生成する任意の免疫応答を指す。例えば、免疫応答が、抗原特異的な抗体産生である場合、抗原を特異的に結合する抗体が産生される。別の例として、免疫応答が、抗原特異的なB細胞またはCD4+T細胞増殖および／または活性である場合、増殖および／または活性は、B細胞などによる、抗原、またはその部分のみの認識或いはMHC分子と複合した抗原、またはその部分の認識から得られる。

30

【0065】

「免疫応答の評価」は、インビトロまたは生体内の免疫応答のレベル、存在または非存在、減少、増加などの任意の測定または判定を指す。このような測定または判定は、被験体から得られる1つ以上の試料において行われ得る。このような評価は、本明細書に提供される方法または当該技術分野において公知の他の方法の何れかを用いて行われ得る。

【0066】

「リスクがある」被験体は、本明細書に提供される疾病、疾患または病態に罹患する可能性を有すると医療関係者が考える被験体、または本明細書に提供される望ましくない免疫応答を起こす可能性があると考えられる被験体である。

40

【0067】

本明細書において使用される際の「平均」は、特に断りのない限り、算術平均を指す。

【0068】

「B細胞抗原」は、B細胞における免疫応答によって認識されるかまたはそれを引き起こす任意の抗原（例えば、B細胞またはその上の受容体によって特に認識される抗原）を意味する。ある実施形態において、T細胞抗原である抗原は、B細胞抗原でもある。他の実施形態において、T細胞抗原はまた、B細胞抗原ではない。B細胞抗原としては、以下に限定はされないが、タンパク質、ペプチドなどが挙げられる。ある実施形態において、B細胞抗原は、非タンパク質抗原を含む（即ち、タンパク質またはペプチド抗原を含まない）。

50

【0069】

「同時に」は、時間的に相関される、好ましくは、免疫応答の調節を与えるのに十分に時間的に相関されるように、2種以上の物質を被験体に投与することを意味する。実施形態において、同時投与は、同じ剤形における2種以上の物質の投与によって行われ得る。他の実施形態において、同時投与は、異なる剤形における2種以上の物質の投与（但し、規定の期間内、好ましくは1ヶ月以内、より好ましくは1週間以内、更により好ましくは1日以内、更により好ましくは1時間以内の投与）を包含し得る。

【0070】

「結合」または「結合された」または「結合する」（など）は、物質（例えば部分）を互いに化学的に結合することを意味する。ある実施形態において、結合は、共有であり、これは、結合が、2つの物質間の共有結合が存在する状況で起こることを意味する。非共有の実施形態において、非共有結合には、電荷相互作用、親和性相互作用、金属配位、物理吸着、ホスト・ゲスト相互作用、疎水性相互作用、T Tスタッキング相互作用、水素結合相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用、磁気相互作用、静電相互作用、双極子間相互作用、および／またはそれらの組合せを含むがこれらに限定されない非共有相互作用が介在する。実施形態において、封入が、結合の形態である。

10

【0071】

「由来する（derived）」は、ある材料またはある材料に関連する情報から調製されることを意味するが、その材料から「得られる（obtained）」とは異なる。このような材料は、生体材料から直接採取された材料の実質的に改変またはプロセッシングされた形態であり得る。このような材料には、生体材料に関連する情報から生成される材料も含まれる。

20

【0072】

「剤形」は、被験体への投与に好適な、媒体、キャリア、ビヒクル、またはデバイス中の薬理学的におよび／または免疫学的に活性な材料を意味する。

【0073】

「封入する」は、物質の少なくとも一部を合成ナノキャリア中に入れることを意味する。ある実施形態において、物質が、合成ナノキャリア中に完全に入れられる。他の実施形態において、封入される物質の殆どまたは全てが、合成ナノキャリアの外部の局所環境に曝されない。他の実施形態において、50%、40%、30%、20%、10%または5%（重量／重量）以下が、局所環境に曝される。封入は、合成ナノキャリアの表面に物質の殆どまたは全てを配置し、物質を合成ナノキャリアの外部の局所環境に曝されたままにする吸収とは異なる。

30

【0074】

抗原決定基としても知られている「エピトープ」は、免疫系によって、特に、例えば、抗体、B細胞、またはT細胞によって認識される抗原の部分である。本明細書において使用される際、「MHCクラスI拘束性エピトープ」は、有核細胞において見られるMHCクラスI分子によって免疫細胞に提示されるエピトープである。「MHCクラスII拘束性エピトープ」は、抗原提示細胞（APC）において、例えば、マクロファージ、B細胞、および樹枝状細胞などのプロフェッショナル抗原提示免疫細胞において、または肝細胞などの非造血細胞において見られるMHCクラスII分子によって免疫細胞に提示されるエピトープである。「B細胞エピトープ」は、抗体またはB細胞によって認識される分子構造である。ある実施形態において、エピトープ自体が抗原である。

40

【0075】

いくつかのエピトープが、当業者に公知であり、本発明のいくつかの態様に係る好適な例示的なエピトープとしては、以下に限定はされないが、Immune Epitope Databaseに列挙されるものが挙げられる（www.immuneepitope.org, Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Esmaili H, Hoof I, Salimi N, Damle R, Sette A, Peters B. The immune epitope database 2.0. Nu

50

cleic Acids Res. 2010 Jan; 38 (Database issue) : D854-62; これらの内容全体並びにIEDB第2.4版(2011年8月)の全てのデータベースエントリ、具体的には、その中に開示される全てのエピトープが、参照により本明細書に援用される)。エピトープは、公表されているアルゴリズム、例えば、Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, Peters B. 2010. peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. BMC Bioinformatics 2010, 11:568; Wang P, Sidney J, Dow C, Mothe B, Sette A, Peters B. 2008. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. PLoS Comput Biol. 4(4):e1000048; Nielsen M, Lund O. 2009. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. BMC Bioinformatics. 10:296; Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. 2007. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. BMC Bioinformatics. 8:238; Bui HH, Sidney J, Peters B, Sathiamurthy M, Sinichi A, Purton KA, Mothe BR, Chisari FV, Watkins DI, Sette A. 2005. Immunogenetics. 57:304-314; Sturaniolo T, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. Nat Biotechnol. 17(6):555-561; Nielsen M, Lundegaard C, Wornig P, Lauemoller SL, Lambirth K, Buus S, Brunak S, Lund O. 2003. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. Protein Sci 12:1007-1017; Bui HH, Sidney J, Peters B, Sathiamurthy M, Sinichi A, Purton KA, Mothe BR, Chisari FV, Watkins DI, Sette A. 2005. Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools: ARB matrix applications. Immunogenetics 57:304-314; Peters B, Sette A. 2005. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. BMC Bioinformatics 6:132; Chou PY, Fasman GD. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 47:45-148; Emini EA, Hugh

es JV, Perlow DS, Boger J. 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol* 55:836-839; Karplus PA, Schulz GE. 1985. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72:212-213; Kolaskar AS, Tongaonkar PC. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276:172-174; Parker JM, Guo D, Hodges RS. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25:5425-5432; Larsen JE, Lund O, Nielsen M. 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2:2; Ponomarenko JV, Bourne PE. 2007. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Struct Biol* 7:64; Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. 2006. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* 15:2558-2567; Ponomarenko JV, Bui H, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, Peters B. 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 9:514; Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Peters B, Sette A, Justesen S, Buus S, and Lund O. 2008. PLoS Comput Biol. 4(7):e1000107. Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpanに記載されているアルゴリズムによって同定することもでき; これらのそれぞれの内容全体が、エピトープの同定のための方法およびアルゴリズムの開示のために、参照により本明細書に援用される。

【0076】

「生成」は、自分自身で直接、または、限定はされないが、人の言動に対する信頼によって行動を取る無関係な第三者などによって間接的に、免疫応答（例えば、寛容原性免疫応答）などの作用を起こさせることを意味する。

【0077】

「同定」は、臨床医が、被験体を、本明細書に提供される方法および組成物から利益を得られる被験体として認識するのを可能にする任意の行動または一連の行動である。好ましくは、同定される被験体は、本明細書に提供される寛容原性免疫応答を必要とする被験体である。行動または一連の行動は、自分自身で直接、または、限定はされないが、人の言動に対する信頼によって行動を取る無関係な第三者などによって間接的に行われるものであり得る。

【0078】

「免疫抑制剤」は、A P Cが、免疫抑制効果（例えば、寛容原性効果）を有するようにする化合物を意味する。免疫抑制効果は、一般に、望ましくない免疫応答を、減少、阻害若しくは防止するかまたは望ましい免疫応答を促進するA P Cによるサイトカインまたは他の因子の産生または発現を指す。A P Cが、A P Cによって提示される抗原を認識する免疫細胞に対する免疫抑制効果をもたらす場合、免疫抑制効果は、提示される抗原に特異的であると考えられる。このような効果は、本明細書において寛容原性効果とも呼ばれる。いかなる特定の理論にも制約されるものではないが、免疫抑制は、好ましくは、抗原（例えば、投与される抗原または生体内に既に存在する抗原）の存在下で、A P Cに送達される免疫抑制剤の結果であると考えられる。従って、免疫抑制剤は、同じ組成物または異なる組成物中に提供されてもまたは提供されなくてもよい、抗原に寛容原性免疫応答を与える化合物を含む。一実施形態において、免疫抑制剤は、A P Cに、1つ以上の免疫エフェクター細胞における制御性表現型を促進させるものである。例えば、制御性表現型は、抗原特異的なC D 4 + T細胞またはB細胞の産生、誘導、刺激または動員の阻害、抗原特異的な抗体の産生、T r e g細胞（例えば、C D 4 + C D 2 5 h i g h F o x P 3 + T r e g細胞）の産生、誘導、刺激または動員の阻害などによって特徴付けられ得る。これは、制御性表現型へのC D 4 + T細胞またはB細胞の変換の結果であり得る。これはまた、C D 8 + T細胞、マクロファージおよびi N K T細胞などの他の免疫細胞におけるF o x P 3の誘導の結果であり得る。一実施形態において、免疫抑制剤は、それが抗原を処理した後にA P Cの応答に影響を与えるものである。別の実施形態において、免疫抑制剤は、抗原の処理に干渉するものではない。更なる実施形態において、免疫抑制剤は、アポトーシスシグナル伝達分子ではない。別の実施形態において、免疫抑制剤は、リン脂質ではない。

【0079】

免疫抑制剤としては、以下に限定はされないが、スタチン；ラバマイシンまたはラバマイシン類似体などのm T O R阻害剤；T G F - β シグナル伝達剤；T G F - β 受容体アゴニスト；トリコスタチンAなどのヒストンデアセチラーゼ阻害剤；コルチコステロイド；ロテノンなどの、ミトコンドリア機能の阻害剤；P 3 8阻害剤；6 B i o、デキサメタゾン、T C P A - 1、I K K V I IなどのN F - κ β 阻害剤；アデノシン受容体アゴニスト；ミソプロストールなどのプロスタグランジンE 2アゴニスト（P G E 2）；ロリプラムなどのホスホジエステラーゼ4阻害剤（P D E 4）などのホスホジエステラーゼ阻害剤；プロテアソーム阻害剤；キナーゼ阻害剤；Gタンパク質共役受容体アゴニスト；Gタンパク質共役受容体アンタゴニスト；糖質コルチコイド；レチノイド；サイトカイン阻害剤；サイトカイン受容体阻害剤；サイトカイン受容体活性化剤；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤；カルシニューリン阻害剤；ホスファターゼ阻害剤；T G X - 2 2 1などのP I 3 K B阻害剤；3 - メチルアデニンなどの自食作用阻害剤；アリール炭化水素受容体阻害剤；プロテアソーム阻害剤I（P S I）；およびP 2 X受容体遮断薬などの酸化A T Pが挙げられる。免疫抑制剤としては、I D O、ビタミンD 3、シクロスポリンAなどのシクロスポリン、アリール炭化水素受容体阻害剤、レスベラトロール、アザチオプリン（A z a）、6 - メルカプトプリン（6 - M P）、6 - チオグアニン（6 - T G）、F K 5 0 6、サングリフェリンA、サルメテロール、ミコフェノール酸モフェチル（M M F）、アスピリンおよび他のC O X阻害剤、ニフルム酸、エストリオールおよびトリプトリドも挙げられる。実施形態において、免疫抑制剤は、本明細書に提供される薬剤の何れかを含み得る。

【0080】

免疫抑制剤は、A P Cに対する免疫抑制（例えば、寛容原性）効果を直接与える化合物であり得るか、または免疫抑制（例えば、寛容原性）効果を間接的に（即ち、投与後に何らかの方法で処理された後）与える化合物であり得る。従って、免疫抑制剤は、本明細書に提供される化合物の何れかのプロドラッグ形態を含む。

【0081】

免疫抑制剤は、免疫抑制（例えば、寛容原性）免疫応答をもたらす、本明細書に提供されるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も含む。従って、実施形態において、免疫抑制剤は、免疫抑制（例えば、寛容原性）免疫応答をもたらすペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸であり、合成ナノキャリアに結合される核酸である。

【0082】

核酸は、DNA、またはmRNAなどのRNAであり得る。実施形態において、本発明の組成物は、本明細書に提供される核酸の何れかの全長補体などの補体、または変質組織（遺伝子コードの変質による）を含む。実施形態において、核酸は、細胞株へとトランスフェクトされるときに転写され得る発現ベクターである。実施形態において、発現ベクターは、特に、プラスミド、レトロウイルス、またはアデノウイルスを含み得る。核酸は、標準的な分子生物学的手法を用いて、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、核酸断片を産生し、次にそれを精製し、発現ベクターへとクローニングすることによって、単離または合成され得る。本発明の実施に有用な更なる技術が、John Wiley and Sons, Inc. によるCurrent Protocols in Molecular Biology 2007; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition) Joseph Sambrook, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia; David Russell, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Cold Spring Harborに見出され得る。

【0083】

実施形態において、本明細書に提供される免疫抑制剤は、合成ナノキャリアに結合される。好ましい実施形態において、免疫抑制剤は、合成ナノキャリアの構造を構成する材料に加えられる要素である。例えば、一実施形態において、合成ナノキャリアが、1つ以上のポリマーで構成される場合、免疫抑制剤は、1つ以上のポリマーに加えられ、結合される化合物である。別の例として、一実施形態において、合成ナノキャリアが、1つ以上の脂質で構成される場合、免疫抑制剤は、同様に、1つ以上の脂質に加えられ、結合される。合成ナノキャリアの材料が免疫抑制（例えば、寛容原性）効果ももたらす場合などの実施形態において、免疫抑制剤は、免疫抑制（例えば、寛容原性）効果をもたらす合成ナノキャリアの材料に加えて存在する要素である。

【0084】

他の例示的な免疫抑制剤としては、以下に限定はされないが、小分子薬剤、天然産物、抗体（例えば、CD20、CD3、CD4に対する抗体）、生物製剤ベースの薬剤、炭水化物ベースの薬剤、ナノ粒子、リポソーム、RNAi、アンチセンス核酸、アプタマー、メトトレキサート、NSAID；フィンゴリモド；ナタリズマブ；アレムツズマブ；抗CD3；タクロリムス（FK506）などが挙げられる。更なる免疫抑制剤が、当業者に公知であり、本発明は、これに関して限定されない。

【0085】

免疫抑制剤または治療用タンパク質APC提示可能抗原の「負荷」は、全合成ナノキャリア中の材料の総重量（重量／重量）を基準にした、合成ナノキャリアに結合される免疫抑制剤または治療用タンパク質APC提示可能抗原の量である。一般に、負荷は、合成ナノキャリアの集団全体の平均として計算される。一実施形態において、免疫抑制剤の負荷は、合成ナノキャリアの第1の集団全体を平均して、0.0001%～50%である。別の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原の負荷は、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団全体を平均して、0.0001%～50%である。更に別の実施形態において、免疫抑制剤および／または治療用タンパク質APC提示可能抗原の負荷は、0.01%～20%である。更なる実施形態において、免疫抑制剤および／または治療用タンパク質APC提示可能抗原の負

荷は、1%～10%である。更に別の実施形態において、免疫抑制剤および／または治療用タンパク質APC提示可能抗原の負荷は、合成ナノキャリアの集団全体を平均して、少なくとも0.1%、少なくとも0.2%、少なくとも0.3%、少なくとも0.4%、少なくとも0.5%、少なくとも0.6%、少なくとも0.7%、少なくとも0.8%、少なくとも0.9%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも11%、少なくとも12%、少なくとも13%、少なくとも14%、少なくとも15%、少なくとも16%、少なくとも17%、少なくとも18%、少なくとも19%または少なくとも20%である。更に他の実施形態において、免疫抑制剤および／または治療用タンパク質APC提示可能抗原の負荷は、合成ナノキャリアの集団全体を平均して、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%または20%である。上記の実施形態のある実施形態において、免疫抑制剤および／または治療用タンパク質APC提示可能抗原の負荷は、合成ナノキャリアの集団全体を平均して、25%以下である。実施形態において、負荷は、実施例に記載されるように計算される。

10

【0086】

提供される組成物および方法の何れかの実施形態において、負荷は以下のように計算される：約3mgの合成ナノキャリアを収集し、遠心分離して上清を合成ナノキャリアペレットから分離する。アセトニトリルをペレットに加え、試料を超音波で分解し、遠心分離して、あらゆる不溶性材料を除去する。上清およびペレットをRP-HPLCに注入し、吸光度を278nmで読み取る。ペレット中に見られたμgを用いて、取り込み%（負荷）を計算し、上清およびペレット中のμgを用いて、回収された合計μgを計算する。

20

【0087】

「維持投与量」は、望ましい免疫抑制（例えば、寛容原性）応答を持続するために、初期投与量が被験体における免疫抑制（例えば、寛容原性）応答をもたらした後、被験体に投与される投与量を指す。維持投与量は、例えば、初期投与量の後に得られる寛容原性効果を維持し、被験体における望ましくない免疫応答を防止し、または被験体が、免疫応答の望ましくないレベルを含む望ましくない免疫応答を起こすリスクがある被験体になることを防止する投与量であり得る。ある実施形態において、維持投与量は、望ましい免疫応答の適切なレベルを持続するのに十分な投与量である。

30

【0088】

「合成ナノキャリアの最大寸法」は、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定されるナノキャリアの最大寸法を意味する。「合成ナノキャリアの最小寸法」は、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定される合成ナノキャリアの最小寸法を意味する。例えば、球状合成ナノキャリアでは、合成ナノキャリアの最大および最小寸法は、実質的に同一であり、その直径のサイズであろう。同様に、立方体状合成ナノキャリアでは、合成ナノキャリアの最小寸法は、その高さ、幅または長さのうち最小である一方、合成ナノキャリアの最大寸法は、その高さ、幅または長さのうち最大であろう。一実施形態において、試料中の合成ナノキャリアの総数を基準にして、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法が、100nm以上である。一実施形態において、試料中の合成ナノキャリアの総数を基準にして、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法が、5μm以下である。好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの総数を基準にして、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法が、110nm超、より好ましくは120nm超、より好ましくは130nm超、更により好ましくは150nm超である。本発明の合成ナノキャリアの最大および最小寸法のアスペクト比は、実施形態に応じて変化し得る。例えば、合成ナノキャリアの最小寸法に対する最大寸法のアス

40

50

ペクト比は、1：1～1,000,000：1、好ましくは1：1～100,000：1、より好ましくは1：1～10,000：1、より好ましくは1：1～1,000：1、更により好ましくは1：1～100：1、なおより好ましくは1：1～10：1で変化し得る。好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの総数を基準にして、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法が、3 μ m以下、より好ましくは2 μ m以下、より好ましくは1 μ m以下、より好ましくは800nm以下、より好ましくは600nm以下、更により好ましくは500nm以下である。好ましい実施形態において、試料中の合成ナノキャリアの総数を基準にして、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法が、100nm以上、より好ましくは120nm以上、より好ましくは130nm以上、より好ましくは140nm以上、更により好ましくは150nm以上である。合成ナノキャリア寸法（例えば、直径）の測定は、合成ナノキャリアを液体（通常、水性）媒体中に懸濁させ、動的光散乱（DLS）を使用する（例えば、Brookhaven ZetaPALS機器を使用する）ことによって得られる。例えば、合成ナノキャリアの懸濁液が、水性緩衝液から精製水中へと希釈されて、約0.01～0.1mg/mLの最終的な合成ナノキャリア懸濁液濃度が得られる。希釈された懸濁液は、直接中で調製されても、またはDLS分析のために好適なキュベットに移されてもよい。次に、キュベットを、DLS中に入れ、制御された温度へと平衡化してから、十分な時間にわたって走査して、媒体の粘度および試料の屈折率についての適切な入力に基づいて安定した再現可能な分布を得る。次に、有効直径、または分布の平均が報告される。合成ナノキャリアの「寸法」または「サイズ」または「直径」は、動的光散乱を用いて得られる粒度分布の平均を意味する。

【0089】

「MHC」は、細胞表面における加工タンパク質の断片またはエピトープを示すMHC分子をコードする、殆どの脊椎動物に見られる、主要組織適合性複合体、大きいゲノム領域または遺伝子ファミリーを指す。細胞表面におけるMHC：ペプチドの提示は、免疫細胞、通常、T細胞による監視を可能にする。MHC分子の2つの一般的なクラス、即ちクラスIおよびクラスIIがある。一般に、クラスI MHC分子は、有核細胞に見られ、ペプチドを細胞毒性T細胞に提示する。クラスII MHC分子は、特定の免疫細胞、主に、総称してプロフェッショナルAPCとして知られているマクロファージ、B細胞および樹枝状細胞に見られる。MHC領域中の最もよく知られている遺伝子は、細胞表面における抗原提示タンパク質をコードするサブセットである。ヒトにおいて、これらの遺伝子は、ヒト白血球抗原（HLA）遺伝子と呼ばれる。

【0090】

「非メトキシ末端ポリマー」は、メトキシ以外の部分で終端する少なくとも1つの末端を有するポリマーを意味する。ある実施形態において、ポリマーは、メトキシ以外の部分で終端する少なくとも2つの末端を有する。他の実施形態において、ポリマーは、メトキシで終端する末端を有さない。「非メトキシ末端プルロニック（pluronic）ポリマー」は、両方の末端にメトキシを有する直鎖状のプルロニックポリマー以外のポリマーを意味する。本明細書に提供されるポリマーナノ粒子は、非メトキシ末端ポリマーまたは非メトキシ末端プルロニックポリマーを含み得る。

【0091】

「得られる」は、材料から直接採取され、改変および／またはプロセッシングを実質的に行わずに使用されることを意味する。

【0092】

「薬学的に許容できる賦形剤」は、本発明の組成物を製剤化するために、記載される合成ナノキャリアと一緒に使用される薬理学的に不活性な材料を意味する。薬学的に許容できる賦形剤は、糖類（グルコース、ラクトースなど）、抗菌剤などの保存剤、再構成助剤、着色剤、生理食塩水（リン酸緩衝生理食塩水など）、および緩衝液を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において公知の様々な材料を含む。

【0093】

「プロトコル」は、被験体への1種以上の物質の任意の投与計画を指す。投与計画は、投与の量、頻度および／または形態を含み得る。ある実施形態において、このようなプロトコルは、本発明の1つ以上の組成物を一人以上の被験体に投与するのに使用され得る。次に、これらの被験体における免疫応答は、プロトコルが望ましくない免疫応答の減少または望ましい免疫応答の生成（例えば、寛容原性効果の促進）に有効であったか否かを判定するために評価され得る。任意の他の治療および／または予防効果も、上記の免疫応答の代わりにまたはそれに加えて評価され得る。プロトコルが所望の効果を有していたか否かは、本明細書に提供されるか或いは当該技術分野において公知の方法の何れかを用いて判定され得る。特定の免疫細胞、サイトカイン、抗体などが減少、生成、活性化されたか否かなどを判定するために、例えば、細胞の集団が、本明細書に提供される組成物が特定のプロトコルに従って投与された被験体から取得され得る。免疫細胞の存在および／または数を検出するための有用な方法としては、以下に限定はされないが、フローサイトメトリ法（例えば、FACS）および免疫組織化学法が挙げられる。免疫細胞マーカーの特定の染色のための抗体および他の結合剤が市販されている。このようなキットは、通常、不均一な細胞集団からの所望の細胞集団のFACSに基づいた検出、分離および／または定量を可能にする複数の抗原のための染色試薬を含む。

10

【0094】

「被験体の提供」は、臨床医に被験体と接触させ、本明細書に提供される組成物を被験体に投与させるかまたは本明細書に提供される方法を被験体に対して行わせる任意の行動または一連の行動である。好ましくは、被験体は、本明細書に提供される寛容原性免疫応答を必要とする被験体である。行動または一連の行動は、自分自身で直接、または、限定はされないが、人の言動に対する信頼によって行動を取る無関係な第三者などによって間接的に、行われ得る。

20

【0095】

「被験体」は、ヒトおよび霊長類などの温血哺乳動物；鳥類；ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマおよびブタなどの、家庭用の動物または家畜；マウス、ラットおよびモルモットなどの実験動物；魚類；は虫類；動物園の動物および野生動物などを含む動物を意味する。

【0096】

「B細胞エピトープを実質的に含まない」は、（抗原の文脈の中で、単独で、キャリアと合わせてまたは本発明の組成物と合わせて）B細胞応答の実質的な活性化を刺激する量のB細胞エピトープの非存在を指す。実施形態において、B細胞エピトープを実質的に含まない組成物は、抗原の測定可能な量のB細胞エピトープを含有しない。他の実施形態において、このような組成物は、抗原の測定可能な量のB細胞エピトープを含み得るが、前記量は、（抗原の文脈の中で、単独で、キャリアと合わせてまたは本発明の組成物と合わせて）抗原特異的な抗体産生または抗原特異的なB細胞増殖および／または活性などの測定可能なB細胞免疫応答を生成するのに有効でなく、或いは（抗原の文脈の中で、単独で、キャリアと合わせてまたは本発明の組成物と合わせて）実質的に測定可能なB細胞免疫応答を生成するのに有効でない。ある実施形態において、実質的に測定可能なB細胞免疫応答は、被験体における有害な臨床結果を生成するか生成することが予測され得る免疫応答である。他の実施形態において、実質的に測定可能なB細胞免疫応答は、対照抗原（例えば、抗原のB細胞エピトープを含まないかまたはB細胞免疫応答を刺激しないことが公知であるもの）によって生成される同じタイプの免疫応答（例えば、抗原特異的な抗体産生または抗原特異的なB細胞増殖および／または活性）のレベルより大きい免疫応答である。ある実施形態において、（例えば、ELISAによる）抗体力価の測定などの、実質的に測定可能なB細胞免疫応答は、対照（例えば、対照抗原）によって生成される同じタイプの応答より2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍またはそれ以上大きい。他の実施形態において、B細胞エピトープを実質的に含まない組成物は、（抗原の文脈の中で、単独で、キャリアと合わせてまたは本発明の組成物と

30

40

50

合わせて) 抗原特異的な抗体力価を殆どまたは全く生成しない組成物である。このような組成物は、500、400、300、200、100、50、40、30、20または10未満の(EC50値としての) 抗体力価を生成するものを含む。他の実施形態において、実質的に測定可能なB細胞免疫応答は、対照によって生成される同じタイプの応答より10%、25%、50%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍またはそれ以上多いB細胞の数または増殖の測定である。B細胞応答を測定するための他の方法は、当業者に公知である。

【0097】

実施形態において、組成物がB細胞エピトープを実質的に含まないことを確実にするために、抗原は、本明細書に提供される合成ナノキャリアに結合するためのB細胞エピトープを含まないように選択される。他の実施形態において、組成物が抗原のB細胞エピトープを実質的に含まないことを確実にするために、抗原に結合された合成ナノキャリアが生成され、B細胞免疫応答(例えば、抗原特異的な抗体産生、B細胞増殖および/または活性)について試験される。その際、所望の特性を示す組成物が選択され得る。

【0098】

「合成ナノキャリア」は、自然界に見られず、サイズが5 μm以下の少なくとも1つの寸法を有する個別の物体を意味する。アルブミンナノ粒子は、一般に、合成ナノキャリアとして含まれるが、特定の実施形態において、合成ナノキャリアは、アルブミンナノ粒子を含まない。実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、キトサンを含まない。他の実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、脂質ベースのナノ粒子ではない。更なる実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、リン脂質を含まない。

【0099】

合成ナノキャリアは、以下に限定はされないが、1つまたは複数の脂質ベースのナノ粒子(本明細書において脂質ナノ粒子とも呼ばれる、即ち、構造を構成する材料の大部分が脂質であるナノ粒子)、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルジョン、デンドリマー、バッキーボール、ナノワイヤ、ウイルス様粒子(即ち、主にウイルス構造タンパク質から構成されるが、感染性でないかまたは低い感染性を有する粒子)、ペプチドまたはタンパク質ベースの粒子(本明細書においてタンパク質粒子とも呼ばれる、即ち、構造を構成する材料の大部分がペプチドまたはタンパク質である粒子)(アルブミンナノ粒子など)および/または脂質-ポリマーナノ粒子などのナノ材料の組合せを用いて形成されるナノ粒子であり得る。合成ナノキャリアは、球状、立方体状、錐体、楕円形(oblong)、円筒形、ドーナツ形などを含むがこれらに限定されない様々な異なる形状であり得る。本発明に係る合成ナノキャリアは、1つ以上の表面を含む。本発明の実施に使用するために適合され得る例示的な合成ナノキャリアは:

(1) Gref et al. に付与された米国特許第5, 543, 158号明細書に開示される生分解性ナノ粒子、(2) Saltzman et al. への米国特許出願公開第20060002852号明細書のポリマーナノ粒子、(3) DeSimone et al. への米国特許出願公開第20090028910号明細書のリソグラフィー的に(lithographically)構成されたナノ粒子、(4) von Andrian et al. への国際公開第2009/051837号パンフレットの開示内容、(5) Penades et al. への米国特許出願公開第2008/0145441号明細書に開示されるナノ粒子、(6) de los Rios et al. への米国特許出願公開第20090226525号明細書に開示されるタンパク質ナノ粒子、(7) Sebbel et al. への米国特許出願公開第20060222652号明細書に開示されるウイルス様粒子、(8) Bachmann et al. への米国特許出願公開第20060251677号明細書に開示される核酸結合ウイルス様粒子、(9) 国際公開第2010047839A1号パンフレットまたは国際公開第2009106999A2号パンフレットに開示されるウイルス様粒子、(10) P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Del

10

20

30

40

50

iver Virus-like Particles” Nanomedicine. 5 (6) : 843-853 (2010) に開示されるナノ析出された (nanoprecipitated) ナノ粒子、または (11) 米国特許出願公開第 2002/0086049 号明細書に開示されるアポトーシス細胞、アポトーシス小体または合成若しくは半合成類似体を含む。実施形態において、合成ナノキャリアは、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7 を超える、または 1:10 を超えるアスペクト比を有し得る。

【0100】

約 100 nm 以下、好ましくは 100 nm 以下の最小寸法を有する本発明に係る合成ナノキャリアは、補体を活性化するヒドロキシル基を有する表面を含まず、または代わりに補体を活性化するヒドロキシル基ではない部分から本質的になる表面を含む。好ましい実施形態において、約 100 nm 以下、好ましくは 100 nm 以下の最小寸法を有する本発明に係る合成ナノキャリアは、補体を実質的に活性化する表面を含まないかまたは代わりに補体を実質的に活性化しない部分から本質的になる表面を含む。より好ましい実施形態において、約 100 nm 以下、好ましくは 100 nm 以下の最小寸法を有する本発明に係る合成ナノキャリアは、補体を活性化する表面を含まないかまたは代わりに補体を活性化しない部分から本質的になる表面を含む。実施形態において、合成ナノキャリアは、ウイルス様粒子を除外する。実施形態において、合成ナノキャリアは、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7 を超える、または 1:10 を超えるアスペクト比を有し得る。

【0101】

「T細胞抗原」は、CD4+T細胞抗原またはCD8+細胞抗原を意味する。「CD4+T細胞抗原」は、CD4+T細胞における免疫応答によって認識され、それを引き起こす任意の抗原、例えば、クラスII主要組織適合遺伝子複合体分子(MHC)に結合された抗原またはその部分の提示によって、CD4+T細胞におけるT細胞受容体によって特に認識される抗原を意味する。「CD8+T細胞抗原」は、CD8+T細胞における免疫応答によって認識され、それを引き起こす任意の抗原、例えば、クラスI主要組織適合遺伝子複合体分子(MHC)に結合された抗原またはその部分の提示によって、CD8+T細胞におけるT細胞受容体によって特に認識される抗原を意味する。ある実施形態において、T細胞抗原である抗原は、B細胞抗原でもある。他の実施形態において、T細胞抗原はまた、B細胞抗原ではない。T細胞抗原は、一般に、タンパク質またはペプチドである。

【0102】

「治療用タンパク質」は、被験体に投与され、治療効果を有し得る任意のタンパク質またはタンパク質に基づいた療法を指す。このような療法は、タンパク質補充療法およびタンパク質添加療法を含む。このような療法は、外因性または異種タンパク質の投与、抗体療法、および細胞療法または細胞に基づいた療法も含む。治療用タンパク質は、酵素、酵素補助因子、ホルモン、血液凝固因子、サイトカイン、増殖因子、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む。他の治療用タンパク質の例が、本明細書のどこかに提供される。治療用タンパク質は、細胞中で、細胞上でまたは細胞によって産生されてもよく、このような細胞から得られるかまたはこのような細胞の形態で投与され得る。実施形態において、治療用タンパク質は、哺乳類細胞、昆虫細胞、酵母細胞、細菌細胞、植物細胞、トランスジェニック動物細胞、トランスジェニック植物細胞などの中で、その上で、またはそれによって産生される。治療用タンパク質は、このような細胞中で組み換え技術によって産生され得る。治療用タンパク質は、ウイルス的に形質転換された(virally transformed)細胞中で、その上でまたはそれによって産生され得る。治療用タンパク質はまた、それを発現するようにトランスフェクトされたか、形質導入されたかまたは他の方法で操作された自己細胞中で、その上で、またはそれによって産生され得る。或いは、治療用タンパク質は、核酸としてまたは核酸を、ウイルス、VLP、リボソームなどに導入することによって投与され得る。或いは、治療用タンパク質は、このよ

うな形態から得られ、治療用タンパク質自体として投与され得る。従って、被験体は、上記のものの何れかを投与されたか、投与されているかまたは投与される予定である任意の被験体を含む。このような被験体は、遺伝子治療；治療用タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを発現するようにトランスフェクトされたか、形質導入されたかまたは他の方法で操作された自己細胞；或いは治療用タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを発現する細胞を投与されたか、投与されているかまたは投与される予定である被験体を含む。

【0103】

「治療用タンパク質APC提示可能抗原」は、治療用タンパク質と関連する抗原を意味する（即ち、治療用タンパク質またはその断片は、治療用タンパク質に対する免疫応答を生成させ得る（例えば、治療用タンパク質に特異的な抗体の生成））。一般に、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、免疫系（例えば、樹枝状細胞、B細胞またはマクロファージを含むがこれらに限定されない抗原提示細胞によって提示されるような免疫系の細胞）による認識について提示され得る。治療用タンパク質APC提示可能抗原は、例えば、T細胞による認識について提示され得る。このような抗原は、クラスIまたはクラスII主要組織適合遺伝子複合体分子（MHC）に結合された抗原のエピトープの提示によって、T細胞における免疫応答によって認識され、それを引き起こし得る。治療用タンパク質APC提示可能抗原は、一般に、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、リポタンパク質を含むか、或いは細胞中に、細胞上に、または細胞によって含まれるかまたは発現される。治療用タンパク質抗原は、ある実施形態において、合成ナノキャリアに結合され、MHCクラスI拘束性エピトープおよび／またはMHCクラスII拘束性エピトープおよび／またはB細胞エピトープを含む。他の実施形態において、B細胞エピトープの包含が望ましくない免疫応答を悪化させ得る場合などに、抗原は、B細胞エピトープを含まない。他の実施形態において、抗原は、MHCクラスII拘束性エピトープを含み、B細胞エピトープを実質的に含まない。好ましくは、治療用タンパク質に特異的な1つ以上の寛容原性免疫応答は、本明細書に提供される組成物によって得られる。

【0104】

「寛容原性免疫応答」は、抗原またはこのような抗原を発現する細胞、組織、臓器などに特異的な免疫抑制をもたらし得る任意の免疫応答を意味する。このような免疫応答は、抗原またはこのような抗原を発現する細胞、組織、臓器などに特異的な望ましくない免疫応答の任意の減少、遅延または阻害を含む。このような免疫応答は、抗原またはこのような抗原を発現する細胞、組織、臓器などに特異的な望ましい免疫応答の任意の刺激、生成、誘導、促進または動員も含む。従って、寛容原性免疫応答は、抗原反応性細胞によって媒介され得る抗原に対する望ましくない免疫応答の非存在または減少並びに抑制細胞の存在または促進を含む。本明細書に提供される寛容原性免疫応答は、免疫寛容を含む。「寛容原性免疫応答を生成する」は、抗原またはこのような抗原を発現する細胞、組織、臓器などに特異的な上記の免疫応答の何れかの生成を指す。寛容原性免疫応答は、MHCクラスI拘束性提示および／またはMHCクラスII拘束性提示および／またはB細胞提示および／またはCD1dによる提示などの結果であり得る。

【0105】

寛容原性免疫応答は、CD4+T細胞、CD8+T細胞またはB細胞増殖および／または活性の任意の減少、遅延または阻害を含む。寛容原性免疫応答は、抗原特異的な抗体産生の減少も含む。寛容原性免疫応答は、CD4+Treg細胞、CD8+Treg細胞、Breg細胞などの制御性細胞の刺激、誘導、産生または動員をもたらす任意の応答も含み得る。ある実施形態において、寛容原性免疫応答は、制御性細胞の産生、誘導、刺激または動員によって特徴付けられる制御性表現型への変換をもたらすものである。

【0106】

寛容原性免疫応答は、CD4+Treg細胞および／またはCD8+Treg細胞の刺激、産生または動員をもたらす任意の応答も含む。CD4+Treg細胞は、転写因子FoxP3を発現し、炎症反応および自己免疫炎症性疾患を阻害し得る（Human regulatory T cells in autoimmune diseases.

10

20

30

40

50

Cvetanovich GL, Hafler DA. Curr Opin Immunol. 2010 Dec; 22 (6): 753-60. Regulatory T cells and autoimmunity. Vila J, Isaacs JD, Anderson AE. Curr Opin Hematol. 2009 Jul; 16 (4): 274-9)。このような細胞はまた、T細胞がB細胞を助けるのを抑制し、自己抗原および外来抗原の両方に対する寛容を誘導する (Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. Miyara M, Wing K, Sakaguchi S. J Allergy Clin Immunol. 2009 Apr; 123 (4): 749-55)。CD4+Treg細胞は、APCにおけるクラスIIタンパク質によって提示されるときに抗原を認識する。クラスI (およびQa-1) によって提示される抗原を認識するCD8+Treg細胞はまた、T細胞がB細胞を助けるのを抑制し、自己抗原および外来抗原の両方に対する寛容を誘導する抗原特異的な抑制の活性化をもたらし得る。CD8+Treg細胞とのQa-1の相互作用の破壊は、免疫応答を調節不全にすることが示されており、自己抗体の形成および自己免疫を破壊する全身性エリテマトーデスの発生をもたらす (Kim et al., Nature. 2010 Sep 16, 467 (7313): 328-32)。CD8+Treg細胞は、関節リウマチおよび大腸炎を含む自己免疫炎症性疾患のモデルを阻害することも示されている (CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune arthritis. Oh S, Rankin AL, Caton AJ. Immunol Rev. 2010 Jan; 233 (1): 97-111. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. Boden EK, Snapper SB. Curr Opin Gastroenterol. 2008 Nov; 24 (6): 733-41)。ある実施形態において、提供される組成物は、両方のタイプの応答を有効にもたらし得る (CD4+TregおよびCD8+Treg)。他の実施形態において、FoxP3は、マクロファージ、iNKT細胞などの他の免疫細胞中で誘導され得、本明細書に提供される組成物は、同様にこれらの応答の1つ以上をもたらし得る。

【0107】

寛容原性免疫応答としては、以下に限定はされないが、Tregサイトカインなどの制御性サイトカインの誘導；抑制性サイトカインの誘導；炎症性サイトカイン (例えば、IL-4、IL-1b、IL-5、TNF- α 、IL-6、GM-CSF、IFN- γ 、IL-2、IL-9、IL-12、IL-17、IL-18、IL-21、IL-22、IL-23、M-CSF、C反応性タンパク質、急性期タンパク質、ケモカイン (例えば、MCP-1、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIG、ITACまたはIP-10) の阻害、抗炎症性サイトカイン (例えば、IL-4、IL-13、IL-10など)、ケモカイン (例えば、CCL-2、CXCL8)、プロテアーゼ (例えば、MMP-3、MMP-9)、ロイコトリエン (例えば、CysLT-1、CysLT-2)、プロスタグランジン (例えば、PGE2) またはヒスタミンの産生；Th17、Th1またはTh2免疫応答への偏り (polarization) の阻害；エフェクター細胞特異的サイトカイン：Th17 (例えば、IL-17、IL-25)、Th1 (IFN- γ)、Th2 (例えば、IL-4、IL-13) の阻害；Th1-、Th2-またはTH17-特異的転写因子の阻害；エフェクターT細胞の増殖の阻害；エフェクターT細胞のアポトーシスの阻害；寛容原性樹枝状細胞特異的遺伝子の誘導、FoxP3発現の誘導、IgE誘導またはIgE媒介性の免疫応答の阻害；抗体応答 (例えば、抗原特異的な抗体産生) の阻害；Tヘルパー細胞応答の阻害；TGF- β および/またはIL-10の産生；自己抗体のエフェクター機能の阻害 (例えば、細胞の枯渇、細胞若しくは組織の損傷または補体活性化の阻害) など挙げられる。

【0108】

上記のいずれも、1つ以上の動物モデルにおいて生体内で測定されてもまたはインビトロで測定されてもよい。当業者には、このような生体内またはインビトロの測定が周知である。望ましくない免疫応答または寛容原性免疫応答が、例えば、免疫細胞の数および／または機能を評価する方法、四量体分析、ELISPOT、サイトカイン発現、サイトカイン分泌、サイトカイン発現プロファイリング、遺伝子発現プロファイリング、タンパク質発現プロファイリングのフローサイトメトリーに基づいた分析、細胞表面マーカーの分析、免疫細胞受容体遺伝子使用のPCRに基づいた検出などを用いて監視され得る（T. Clay et al., "Assays for Monitoring Cellular Immune Response to Active Immunotherapy of Cancer" *Clinical Cancer Research* 7:1127-1135 (2001) を参照されたい）。望ましくない免疫応答または寛容原性免疫応答はまた、例えば、血漿または血清中のタンパク質レベルを評価する方法、免疫細胞増殖および／または機能アッセイなどを用いて監視され得る。ある実施形態において、寛容原性免疫応答は、FoxP3の誘導を評価することによって監視され得る。更に、具体的な方法が、実施例により詳細に記載されている。

【0109】

好ましくは、寛容原性免疫応答は、本明細書に記載される疾病、疾患または病態の発症、進行または病状（pathology）の阻害をもたらす。本発明の組成物が、本明細書に記載される疾病、疾患または病態の発症、進行または病状の阻害をもたらす得るかが、このような疾病、疾患または病態の動物モデルを用いて測定され得る。ある実施形態において、望ましくない免疫応答の減少または寛容原性免疫応答の生成は、臨床的エンドポイント、臨床的有効性、臨床症状、疾病のバイオマーカーおよび／または臨床スコアを測定することによって評価され得る。望ましくない免疫応答または寛容原性免疫応答はまた、本明細書に提供される疾病、疾患または病態の存在または非存在を評価するための診断試験を用いて評価され得る。望ましくない免疫応答は、被験体における治療用タンパク質レベルおよび／または機能を測定する方法によって更に評価され得る。

【0110】

ある実施形態において、被験体における望ましくない免疫応答または寛容原性免疫応答の生成の監視または評価は、本明細書に提供される合成ナノキャリアの組成物の投与の前および／または治療用タンパク質の投与の前であり得る。他の実施形態において、望ましくない免疫応答または寛容原性免疫応答の生成の評価は、本明細書に提供される合成ナノキャリアの組成物の投与の後および／または治療用タンパク質の投与の後であり得る。ある実施形態において、評価は、合成ナノキャリアの組成物の投与の後であるが、治療用タンパク質の投与の前に行われる。他の実施形態において、評価は、治療用タンパク質の投与の後であるが、組成物の投与の前に行われる。更に他の実施形態において、評価は、合成ナノキャリアおよび治療用タンパク質の両方の投与の前に行われる一方、更に他の実施形態において、評価は、合成ナノキャリアおよび治療用タンパク質の両方の投与の後に行われる。更なる実施形態において、評価は、合成ナノキャリアおよび／または治療用タンパク質の投与の前および後の両方に行われる。更に他の実施形態において、望ましい免疫状態が、治療用タンパク質を投与されたか、投与されているかまたは投与される予定である被験体などの被験体において維持されていることを判定するために、評価は、被験体につき2回以上行われる。

【0111】

抗体応答は、1つ以上の抗体力価を測定することによって評価され得る。「抗体力価」は、抗体産生の測定可能なレベルを意味する。抗体力価を測定するための方法が、当該技術分野において公知であり、酵素結合免疫吸着法（ELISA）を含む。実施形態において、抗体応答は、例えば、抗体の数、抗体の濃度または力価として定量化され得る。値は、絶対値であってもまたは相対値であってもよい。抗体応答を定量化するためのアッセイとしては、抗体捕捉アッセイ、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、阻害液相吸着アッセイ（ILPAA）、ロケット免疫電気泳動（RIE）アッセイおよび直線免疫電気泳動（

L I E) アッセイが挙げられる。抗体応答が、別の抗体応答と比較されるとき、同じタイプの定量値（例えば、力価）および測定方法（例えば、E L I S A）が、比較を行うのに好ましくは使用される。

【0112】

抗体力価を測定するためのE L I S A法、例えば、典型的なサンドイッチE L I S Aは、以下の工程（i）対象とする抗体標的が基質ポリマーまたは他の好適な材料に結合されるようにE L I S Aプレートコーティング材料を調製する工程、（i i）コーティング材料を水溶液（P B Sなど）中で調製し、コーティングをマルチウェルプレート上に一晚付着させるために、コーティング材料溶液を、マルチウェルプレートのウェルに送達する工程、（i i i）洗浄緩衝液（P B S中0.05%のT w e e n - 2 0など）でマルチウェルプレートを十分に洗浄して、過剰なコーティング材料を除去する工程、（i v）希釈剤溶液（P B S中10%のウシ胎仔血清など）を塗布することによって、非特異的結合用のプレートをブロッキングする工程、（v）プレートからのブロッキング／希釈剤溶液を、洗浄緩衝液で洗浄する工程、（v i）抗体および適切な標準物質（陽性対照）を含有する血清試料を、必要に応じて希釈剤で希釈して、E L I S A応答を好適に満たす濃度を得る工程、（v i i）E L I S A応答曲線を生成するのに好適な濃度の範囲をカバーするように、マルチウェルプレートにおける血漿試料を連続希釈する工程、（v i i i）抗体一標的結合を得るようにプレートをインキュベートする工程、（i x）プレートを洗浄緩衝液で洗浄して、抗原に結合されていない抗体を除去する工程、（x）一次抗体を結合することが可能なビオチン結合検出抗体などの二次検出抗体を同じ希釈剤中に適切な濃度で加える工程、（x i）プレートを、塗布された検出抗体とともにインキュベートした後、洗浄緩衝液で洗浄する工程、（x i i）ビオチン化抗体に見られる、ビオチンに結合し得るストレプトアビジン-H R P（セイヨウワサビエルオキシダーゼ）などの酵素を加え、インキュベートする工程、（x i i i）マルチウェルプレートを洗浄する工程、（x i v）基質（T M B溶液など）をプレートに加える工程、（x v）発色が完了したら停止液（2 Nの硫酸など）を適用する工程、（x v i）基質の特定の波長でプレートウェルの光学密度を読み取る工程（450 nmでの読み取り値から570 nmでの読み取り値を差し引く）、（x v i i）好適な多重パラメータ曲線適合をデータに適用し、プレートの標準についてのO Dの最大値の半値が得られる曲線における濃度として半数効果濃度（E C 5 0）を定義する工程からなり得る。

【0113】

「望ましくない免疫応答」は、抗原への曝露から生じ、本明細書に提供される疾病、疾患または病態（またはその症状）を促進または悪化させるか、或いは本明細書に提供される疾病、疾患または病態の兆候を示す任意の望ましくない免疫応答を指す。このような免疫応答は、一般に、被験体の健康に悪影響を与えるかまたは被験体の健康に対する悪影響の兆候を示す。望ましくない免疫応答は、抗原特異的な抗体産生、抗原特異的なB細胞増殖および／または活性または抗原特異的なC D 4 + T細胞増殖および／または活性を含む。

【0114】

C. 本発明の組成物

免疫抑制剤および治療用タンパク質A P C提示可能抗原を含む寛容原性合成ナノキャリア組成物および関連する方法が本明細書に提供される。このような組成物および方法は、望ましくない免疫応答の生成を減少させ、治療用タンパク質に特異的な寛容原性免疫応答の生成を促進するのに有用である。組成物は、治療用タンパク質に対する寛容原性免疫応答が必要とされる被験体に投与され得る。このような被験体は、治療用タンパク質を投与されたか、投与されているかまたは投与される予定である被験体を含む。実施形態において、被験体は、本明細書に提供される合成ナノキャリアを投与され、次に、1つ以上の治療用タンパク質を投与される。他の実施形態において、被験体は、治療用タンパク質を投与され、次に、合成ナノキャリアを提供される。更に他の実施形態において、合成ナノキャリアおよび1つ以上の治療用タンパク質は同時に投与される。

【0115】

上述されるように、合成ナノキャリアは、免疫抑制剤および、ある実施形態において、寛容原性効果が望ましい抗原を含むように設計される。実施形態において、抗原は、免疫抑制剤とともに提示される場合に、抗原特異的なCD4+T細胞増殖および／または活性の減少などの寛容原性効果をもたらし得るMHCクラスII拘束性エピトープを含む。得られる寛容原性効果も、抗原特異的なB細胞増殖および／または活性の減少および／または抗原特異的な抗体産生の減少を含む。様々な合成ナノキャリアが、本発明に従って使用され得る。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、球体または回転楕円体である。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、平坦または板状である。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、立方体または立方体状である。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、楕円形または長円形である。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、円筒形、円錐形、または角錐形である。

10

【0116】

ある実施形態において、各合成ナノキャリアが類似の特性を有するようにサイズ、形状、および／または組成に関して比較的均一な合成ナノキャリアの集団を使用するのが望ましい。例えば、合成ナノキャリアの総数を基準にして、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の合成ナノキャリアが、合成ナノキャリアの平均直径または平均寸法の5%、10%、または20%の範囲内の最小寸法または最大寸法を有し得る。ある実施形態において、合成ナノキャリアの集団は、サイズ、形状、および／または組成に関して不均一であってもよい。

20

【0117】

合成ナノキャリアは、中実または中空であり得、1つ以上の層を含み得る。ある実施形態において、各層は、他の層と比べて独自の組成および独自の特性を有する。一例に過ぎないが、合成ナノキャリアは、コア／シェル構造を有してもよく、ここで、コアは1つの層（例えば、高分子コア）であり、シェルは第2の層（例えば、脂質二重層または単層）である。合成ナノキャリアは、複数の異なる層を含み得る。

【0118】

ある実施形態において、合成ナノキャリアは、任意に1つ以上の脂質を含み得る。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、リポソームを含み得る。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、脂質二重層を含み得る。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、脂質単層を含み得る。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、ミセルを含み得る。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、脂質層（例えば、脂質二重層、脂質単層など）によって囲まれるポリマーマトリクスを含むコアを含み得る。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、脂質層（例えば、脂質二重層、脂質単層など）によって囲まれた非高分子コア（例えば、金属粒子、量子ドット、セラミック粒子、骨粒子、ウイルス粒子、タンパク質、核酸、炭水化物など）を含み得る。

30

【0119】

他の実施形態において、合成ナノキャリアは、金属粒子、量子ドット、セラミック粒子などを含み得る。ある実施形態において、非高分子合成ナノキャリアは、金属原子（例えば、金原子）の集合体などの、非高分子成分の集合体である。

40

【0120】

ある実施形態において、合成ナノキャリアは、任意に、1つ以上の両親媒性物質を含み得る。ある実施形態において、両親媒性物質は、増大した安定性、向上した均一性、または増大した粘度を有する合成ナノキャリアの生成を促進することができる。ある実施形態において、両親媒性物質は、脂質膜（例えば、脂質二重層、脂質単層など）の内面と結合され得る。当該技術分野において公知の多くの両親媒性物質が、本発明に従って合成ナノキャリアを作製するのに使用するのに好適である。このような両親媒性物質としては、以下に限定はされないが、ホスホグリセリド；ホスファチジルコリン；ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）；ジオレイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）；ジオレイルオキシプロピルトリエチルアンモニウム（DOTMA）；ジオレイルホス

50

ファチジルコリン；コレステロール；コレステロールエステル；ジアシルグリセロール；
 ジアシルグリセロールスクシネート；ジホスファチジルグリセロール（DPPG）；ヘキ
 サンデカノール；ポリエチレングリコール（PEG）などの脂肪アルコール；ポリオキシ
 エチレンー９ーラウリルエーテル；パルミチン酸またはオレイン酸などの表面活性脂肪酸
 ；脂肪酸；脂肪酸モノグリセリド；脂肪酸ジグリセリド；脂肪酸アミド；ソルビタントリ
 オレエート（Span（登録商標）85）グリココレート；ソルビタンモノラウレート（
 Span（登録商標）20）；ポリソルベート20（Tween（登録商標）20）；ポリ
 ソルベート60（Tween（登録商標）60）；ポリソルベート65（Tween（
 登録商標）65）；ポリソルベート80（Tween（登録商標）80）；ポリソルベート
 85（Tween（登録商標）85）；ポリオキシエチレンモノステアレート；サーフ
 ファクチン；ポロキサマー；ソルビタントリオレエートなどのソルビタン脂肪酸エステル；
 レシチン；リゾレシチン；ホスファチジルセリン；ホスファチジルイノシトール；スフィ
 ンゴミエリン；ホスファチジルエタノールアミン（セファリン）；カルジオリピン；ホス
 ファチジン酸；セレブロシド；ジセチルホスフェート；ジパルミトイルホスファチジルグ
 リセロール；ステアシルアミン；ドデシルアミン；ヘキサデシルアミン；パルミチン酸
 アセチル；リシノール酸グリセロール；ステアリン酸ヘキサデシル；ミリスチン酸イソプ
 ロピル；チロキサポール；ポリ（エチレングリコール）5000－ホスファチジルエタノ
 ールアミン；ポリ（エチレングリコール）400－モノステアレート；リン脂質；高い界
 面活性剤特性を有する合成および／または天然洗剤；デオキシコレート；シクロデキスト
 リン；カオトロピック塩；イオン対形成剤；およびそれらの組合せが挙げられる。両親媒
 性物質成分は、異なる両親媒性物質の混合物であってもよい。当業者は、これが、界面活
 性剤活性を有する物質の包括的ではなく例示的な一覧であることを認識するであろう。任
 意の両親媒性物質が、本発明に従って使用される合成ナノキャリアの生成に使用され得る
 。

【0121】

ある実施形態において、合成ナノキャリアは、任意に、1つ以上の炭水化物を含み得る
 。炭水化物は、天然であってもまたは合成であってもよい。炭水化物は、誘導体化天然炭
 水化物であってもよい。特定の実施形態において、炭水化物は、グルコース、フルクトー
 ス、ガラクトース、リボース、ラクトース、スクロース、マルトース、トレハロース、セ
 ロビオース、マンノース、キシロース、アラビノース、グルクロン酸、ガラクトン酸、
 マンヌロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、およびノイラミン酸を含むがこれらに限
 定されない単糖または二糖を含む。特定の実施形態において、炭水化物は、プルラン、セ
 ルロース、微結晶性セルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒ
 ドロキシセルロース（HC）、メチルセルロース（MC）、デキストラン、シクロデキス
 トラン、グリコーゲン、ヒドロキシエチルデンプン、カラギーナン、グリコン（glyc
 on）、アミロース、キトサン、N，O－カルボキシメチルキトサン、アルギンおよびアル
 ギン酸、デンプン、キチン、イヌリン、コンニャク、グルコマンナン、プスツラン（p
 ustulan）、ヘパリン、ヒアルロン酸、カードラン、およびキサンタンを含むがこれ
 らに限定されない多糖である。実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、多糖
 などの炭水化物を含まない（または特に除外する）。特定の実施形態において、炭水化物
 は、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリトリトール、マルチトール、およ
 びラクチトールを含むがこれらに限定されない、糖アルコールなどの炭水化物誘導体を含
 み得る。

【0122】

ある実施形態において、合成ナノキャリアは、1つ以上のポリマーを含み得る。ある実
 施形態において、合成ナノキャリアは、非メトキシ末端プルロニックポリマーである1つ
 以上のポリマーを含む。ある実施形態において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの
 少なくとも1％、2％、3％、4％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、
 35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、
 85％、90％、95％、97％、または99％（重量／重量）が、非メトキシ末端プル

ロニックポリマーである。ある実施形態において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの全てが、非メトキシ末端プルロニックポリマーである。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、非メトキシ末端ポリマーである1つ以上のポリマーを含む。ある実施形態において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%（重量／重量）が、非メトキシ末端ポリマーである。ある実施形態において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの全てが、非メトキシ末端ポリマーである。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、プルロニックポリマーを含まない1つ以上のポリマーを含む。ある実施形態において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%（重量／重量）が、プルロニックポリマーを含まない。ある実施形態において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの全てが、プルロニックポリマーを含まない。ある実施形態において、このようなポリマーは、コーティング層（例えば、リポソーム、脂質単層、ミセルなど）によって囲まれ得る。ある実施形態において、合成ナノキャリアの様々な要素が、ポリマーと結合され得る。

10

【0123】

免疫抑制剤および／または抗原は、いくつかの方法の何れかによって合成ナノキャリアに結合され得る。一般に、結合は、免疫抑制剤および／または抗原と合成ナノキャリアとの結合の結果であり得る。この結合により、免疫抑制剤および／または抗原が、合成ナノキャリアの表面に結合されるか、および／または合成ナノキャリア中に含まれ（封入され）得る。しかしながら、ある実施形態において、免疫抑制剤および／または抗原は、合成ナノキャリアへの結合ではなく、合成ナノキャリアの構造の結果として、合成ナノキャリアによって封入される。好ましい実施形態において、合成ナノキャリアは、本明細書に提供されるポリマーを含み、免疫抑制剤および／または抗原は、ポリマーに結合される。

20

【0124】

結合が、免疫抑制剤および／または抗原と合成ナノキャリアとの結合の結果として起こる場合、結合は、結合部分を介して起こり得る。結合部分は、免疫抑制剤および／または抗原が合成ナノキャリアに結合された任意の部分であり得る。このような部分は、アミド結合またはエステル結合などの共有結合、並びに免疫抑制剤および／または抗原を合成ナノキャリアに（共有または非共有）結合する別個の分子を含む。このような分子は、リンカーまたはポリマーまたはその単位を含む。例えば、結合部分は、免疫抑制剤および／または抗原が静電的に結合する荷電ポリマーを含み得る。別の例として、結合部分は、それが共有結合されるポリマーまたはその単位を含み得る。

30

【0125】

好ましい実施形態において、合成ナノキャリアは、本明細書に提供されるポリマーを含む。これらの合成ナノキャリアは、完全にポリマーであり得るかまたはポリマーと他の材料との混合物であり得る。

【0126】

40

ある実施形態において、合成ナノキャリアのポリマーは、ポリマーマトリクスを形成するために結合する。これらの実施形態のいくつかにおいて、免疫抑制剤または抗原などの成分が、ポリマーマトリクスの1つ以上のポリマーと共有結合され得る。ある実施形態において、共有結合は、リンカーを介して行われ得る。ある実施形態において、成分は、ポリマーマトリクスの1つ以上のポリマーと非共有結合され得る。例えば、ある実施形態において、成分は、ポリマーマトリクス中に封入されるか、それによって囲まれるか、および／またはその全体にわたって分散され得る。その代わりにまたはそれに加えて、成分は、疎水性相互作用、電荷相互作用、ファン・デル・ワールス力などによって、ポリマーマトリクスの1つ以上のポリマーと結合され得る。ポリマーマトリクスを形成するための様々なポリマーおよび方法が、従来から知られている。

50

【0127】

ポリマーは、天然または非天然（合成）ポリマーであり得る。ポリマーは、2つ以上のモノマーを含むホモポリマーまたはコポリマーであり得る。配列に関して、コポリマーは、ランダム、ブロックであってもよく、またはランダム配列とブロック配列との組合せを含んでいてもよい。通常、本発明に係るポリマーは有機ポリマーである。

【0128】

ある実施形態において、ポリマーは、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアミド、またはポリエーテル、或いはそれらの単位を含む。他の実施形態において、ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）（PEG）、ポリプロピレングリコール、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）、またはポリカプロラクトン、或いはそれらの単位を含む。ある実施形態において、ポリマーは生分解性であるのが好ましい。従って、これらの実施形態において、ポリマーが、ポリ（エチレングリコール）またはポリプロピレングリコールなどのポリエーテル或いはそれらの単位を含む場合、ポリマーは、ポリマーが生分解性であるように、ポリエーテルと生分解性ポリマーとのブロックコポリマーを含むのが好ましい。他の実施形態において、ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）またはポリプロピレングリコール或いはそれらの単位などの、ポリエーテルまたはその単位のみを含まない。

10

【0129】

本発明に使用するのに好適なポリマーの他の例としては、以下に限定はされないが、ポリエチレン、ポリカーボネート（例えばポリ（1, 3-ジオキサソ-2オン））、ポリ無水物（例えばポリ（セバシン酸無水物））、ポリプロピルマレート、ポリアミド（例えばポリカプロラクタム）、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル（例えば、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリラクチド-コ-グリコリド、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシ酸（polyhydroxy acid）（例えばポリ（β-ヒドロキシアルカノエート））、ポリ（オルトエステル）、ポリシアノアクリレート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリ尿素、ポリスチレン、およびポリアミン、ポリリジン、ポリリジン-PEGコポリマー、およびポリ（エチレンイミン）、ポリ（エチレンイミン）-PEGコポリマーが挙げられる。

20

【0130】

ある実施形態において、本発明に係るポリマーとしては、ポリエステル（例えば、ポリ乳酸、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）、ポリカプロラクトン、ポリバレロラクトン、ポリ（1, 3-ジオキサソ-2オン））；ポリ無水物（例えば、ポリ（セバシン酸無水物））；ポリエーテル（例えば、ポリエチレングリコール）；ポリウレタン；ポリメタクリレート；ポリアクリレート；およびポリシアノアクリレートを含むがこれらに限定されない、米国連邦規則21（21 C. F. R.）§ 177. 2600の下で米国食品医薬品局（FDA）によってヒトへの使用が承認されたポリマーが挙げられる。

30

【0131】

ある実施形態において、ポリマーは、親水性であり得る。例えば、ポリマーは、アニオン性基（例えば、リン酸基、硫酸基、カルボン酸基）；カチオン性基（例えば、第四級アミン基）；または極性基（例えば、ヒドロキシル基、チオール基、アミン基）を含み得る。ある実施形態において、親水性ポリマーマトリクスを含む合成ナノキャリアは、合成ナノキャリア内に親水性環境を生成する。ある実施形態において、ポリマーは、疎水性であり得る。ある実施形態において、疎水性ポリマーマトリクスを含む合成ナノキャリアは、合成ナノキャリア内に疎水性環境を生成する。ポリマーの親水性または疎水性の選択は、合成ナノキャリア内に組み込まれる（例えば、結合される）材料の性質に影響を与え得る。

40

【0132】

ある実施形態において、ポリマーは、1つ以上の部分および／または官能基で変性され得る。様々な部分または官能基が、本発明に従って使用され得る。ある実施形態において

50

、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）、炭水化物、および／または多糖類に由来するアクリルポリアセタールで変性され得る（Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301）。特定の実施形態は、Gref et al. に付与された米国特許第5543158号明細書、またはVon Andrian et al. による国際公開公報の国際公開第2009/051837号パンフレットの一般的な教示を用いて作製され得る。

【0133】

ある実施形態において、ポリマーは、脂質または脂肪酸基で変性され得る。ある実施形態において、脂肪酸基は、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、またはリグノセリン酸のうちの1つ以上であり得る。ある実施形態において、脂肪酸基は、パルミトレイン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、 α -リノール酸、 γ -リノール酸、アラキドン酸、ガドレイン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、またはエルカ酸のうちの1つ以上であり得る。

【0134】

ある実施形態において、ポリマーは、本明細書において「PLGA」と総称される、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）およびポリ（ラクチド-コ-グリコリド）などの、乳酸およびグリコール酸単位を含むコポリマー；並びに本明細書において「PGA」と呼ばれるグリコール酸単位と、本明細書において「PLA」と総称される、ポリ-L-乳酸、ポリ-D-乳酸、ポリ-D, L-乳酸、ポリ-L-ラクチド、ポリ-D-ラクチド、およびポリ-D, L-ラクチドなどの乳酸単位とを含むホモポリマーを含むポリエステルであり得る。ある実施形態において、例示的なポリエステルとしては、例えば、ポリヒドロキシ酸；PEGコポリマーおよびラクチドとグリコリドとのコポリマー（例えば、PLA-PEGコポリマー、PGA-PEGコポリマー、PLGA-PEGコポリマー、およびそれらの誘導体が挙げられる。ある実施形態において、ポリエステルとしては、例えば、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（カプロラクトン）-PEGコポリマー、ポリ（L-ラクチド-コ-L-リジン）、ポリ（セリンエステル）、ポリ（4-ヒドロキシー-L-プロリンエステル）、ポリ[α -(4-アミノブチル)-L-グリコール酸]、およびそれらの誘導体が挙げられる。

【0135】

ある実施形態において、ポリマーは、PLGAであり得る。PLGAは、乳酸とグリコール酸との生体適合性および生分解性コポリマーであり、様々な形態のPLGAが、乳酸：グリコール酸の比率によって特徴付けられる。乳酸は、L-乳酸、D-乳酸、またはD, L-乳酸であり得る。PLGAの分解速度は、乳酸：グリコール酸の比率を変更することによって調整され得る。ある実施形態において、本発明に従って使用されるPLGAは、約85：15、約75：25、約60：40、約50：50、約40：60、約25：75、または約15：85の乳酸：グリコール酸比を特徴とする。

【0136】

ある実施形態において、ポリマーは、1つ以上のアクリルポリマーであり得る。特定の実施形態において、アクリルポリマーとしては、例えば、アクリル酸およびメタクリル酸コポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、メタクリル酸アルキルアミドコポリマー、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（無水メタクリル酸）、メチルメタクリレート、ポリメタクリレート、ポリ（メチルメタクリレート）コポリマー、ポリアクリルアミド、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、グリシジルメタクリレートコポリマー、ポリシアノアクリレート、および上記のポリマーのうちの1つ以上を含む組合せが挙げられる。アクリルポリマーは、低い含量の第四級アンモニウム基を有するアクリル酸およびメタクリル酸エステルの完全重合したコポリマーを含み得る。

【0137】

ある実施形態において、ポリマーは、カチオン性ポリマーであり得る。一般に、カチオン性ポリマーは、核酸（例えばDNA、またはその誘導体）の負に帯電した鎖を縮合および／または保護することができる。ポリ（リジン）などのアミン含有ポリマー（Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; およびKabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7）、ポリ（エチレンイミン）（PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297）、およびポリ（アミドアミン）デンドリマー（Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; およびHaensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372）は、生理的pHで正に帯電しており、核酸とイオン対を形成し、様々な細胞株におけるトランスフェクションを媒介する。実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、カチオン性ポリマーを含まなくてもよい（即ち除外し得る）。

【0138】

ある実施形態において、ポリマーは、カチオン性側鎖を有する分解性ポリエステルであり得る（Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; およびZhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399）。これらのポリエステルの例としては、ポリ（L-ラクチド-コ-L-リジン）（Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010）、ポリ（セリンエステル）（Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399）、ポリ（4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル）（Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; およびLim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633）、およびポリ（4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル）（Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; およびLim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633）が挙げられる。

【0139】

これらのおよび他のポリマーの特性並びにそれらのポリマーを調製するための方法が、当該技術分野において周知である（例えば、米国特許第6, 123, 727号明細書；同第5, 804, 178号明細書；同第5, 770, 417号明細書；同第5, 736, 372号明細書；同第5, 716, 404号明細書；同第6, 095, 148号明細書；同第5, 837, 752号明細書；同第5, 902, 599号明細書；同第5, 696, 175号明細書；同第5, 514, 378号明細書；同第5, 512, 600号明細書；同第5, 399, 665号明細書；同第5, 019, 379号明細書；同第5, 010, 167号明細書；同第4, 806, 621号明細書；同第4, 638, 045号明細書；および同第4, 946, 929号明細書；Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; およびUhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181を参照されたい）。より一般に、特定の好適なポリマーを合成するための様々な方法が、Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, Jo

hn Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386; 並びに米国特許第6,506,577号明細書、同第6,632,922号明細書、同第6,686,446号明細書、および同第6,818,732号明細書に記載されている。

【0140】

ある実施形態において、ポリマーは、直鎖状または分枝鎖状ポリマーであり得る。ある実施形態において、ポリマーは、デンドリマーであり得る。ある実施形態において、ポリマーは、互いに実質的に架橋された状態であり得る。ある実施形態において、ポリマーは、実質的に架橋がなくてもよい。ある実施形態において、ポリマーは、架橋工程を行わずに本発明に従って使用され得る。本発明の合成ナノキャリアが、上記のおよび他のポリマーの何れかのブロックコポリマー、グラフトコポリマー、ブレンド、混合物、および／または付加物を含み得ることが更に理解されるべきである。当業者は、本明細書に挙げられるポリマーが、本発明に従って使用され得るポリマーの包括的ではなく例示的な一覧を表すことを認識するであろう。

10

【0141】

ある実施形態において、合成ナノキャリアは、ポリマー成分を含まない。ある実施形態において、合成ナノキャリアは、金属粒子、量子ドット、セラミック粒子などを含み得る。ある実施形態において、非高分子合成ナノキャリアは、金属原子（例えば、金原子）の集合体などの、非高分子成分の集合体である。

20

【0142】

本発明に係る組成物は、保存剤、緩衝液、生理食塩水、またはリン酸緩衝生理食塩水などの薬学的に許容できる賦形剤と組み合わせて、合成ナノキャリアを含む。組成物は、有用な剤形に達するために従来の薬剤製造および配合技術を用いて作製され得る。一実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、保存剤とともに注射するために滅菌生理食塩溶液中に懸濁される。

【0143】

実施形態において、キャリアとしての合成ナノキャリアを調製する場合、成分を合成ナノキャリアに結合するための方法が有用であり得る。成分が小分子である場合、合成ナノキャリアの組み立ての前に成分をポリマーに結合するのが有利であり得る。実施形態において、成分をポリマーに結合してから、このポリマー複合体を合成ナノキャリアの構成に使用するのはではなく、表面基（これらの表面基の使用によって成分を合成ナノキャリアに結合するのに使用される）を有する合成ナノキャリアを調製するのも有利であり得る。

30

【0144】

特定の実施形態において、結合は、共有結合リンカーであり得る。実施形態において、本発明に係るペプチドは、ナノキャリアの表面上のアジド基と、アルキン基を含有する抗原または免疫抑制剤との1,3-双極性環状付加反応によって、またはナノキャリアの表面上のアルキンと、アジド基を含有する抗原または免疫抑制剤との1,3-双極性環状付加反応によって形成される1,2,3-トリアゾールリンカーを介して外面に共有結合され得る。このような環状付加反応は、好ましくは、好適なCu(I)リガンドおよびCu(II)化合物を触媒活性Cu(I)化合物へと還元するための還元剤とともに、Cu(I)触媒の存在下で行われる。このCu(I)触媒によるアジド-アルキン環状付加(CuAAC)は、クリック反応とも呼ばれることもある。

40

【0145】

更に、共有結合は、アミドリリンカー、ジスルフィドリリンカー、チオエーテルリンカー、ヒドラゾンリンカー、ヒドラジドリリンカー、イミンまたはオキシムリンカー、尿素またはチオ尿素リンカー、アミジンリンカー、アミンリンカー、およびスルホンアミドリリンカーを含む共有結合リンカーを含み得る。

【0146】

50

アミドリンカーは、抗原または免疫抑制剤などの1つの成分上のアミンと、ナノキャリアなどの第2の成分のカルボン酸基との間のアミド結合を介して形成される。リンカーにおけるアミド結合は、好適に保護されたアミノ酸および活性化カルボン酸（N-ヒドロキシスクシンイミドで活性化されたエステルなど）との従来のアミド結合形成反応の何れかを用いて作製され得る。

【0147】

ジスルフィドリンカーは、例えば、 $R_1-S-S-R_2$ の形態の2個の硫黄原子間のジスルフィド（S-S）結合の形成によって作製される。ジスルフィド結合は、チオール／メルカプタン基（-SH）を含有する成分の、ポリマーまたはナノキャリアにおける別の活性化チオール基とのチオール交換、またはチオール／メルカプタン基を含有するナノキャリアの、活性化チオール基を含有する成分とのチオール交換によって形成され得る。

10

【0148】

トリアゾールリンカー、特に、以下の形態の1, 2, 3-トリアゾール

【化1】



20

（式中、 R_1 および R_2 が、任意の化学物質であってもよい）は、ナノキャリアなどの第1の成分に結合されたアジドと、抗原または免疫抑制剤などの第2の成分に結合された末端アルキンとの1, 3-双極性環状付加反応によって作製される。1, 3-双極性環状付加反応は、触媒を用いてまたは用いずに、好ましくは、1, 2, 3-トリアゾール官能基によって2つの成分を結合するCu(I)触媒を用いて行われる。この化学作用は、Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41 (14), 2596, (2002)および Meldal, et al., Chem. Rev., 2008, 108 (8), 2952-3015に詳細に記載され、「クリック」反応またはCuAACと呼ばれることが多い。

30

【0149】

実施形態において、ポリマー鎖の末端にアジド基またはアルキン基を含有するポリマーが調製される。次に、このポリマーは、複数のアルキン基またはアジド基が該当するナノキャリアの表面上に配置されるように合成ナノキャリアを調製するのに使用される。或いは、合成ナノキャリアは、別の経路によって調製され、その後、アルキンまたはアジド基で官能化され得る。成分は、アルキン基（ポリマーがアジド基を含有する場合）またはアジド基（ポリマーがアルキン基を含有する場合）の何れかの存在によって調製される。次に、成分は、1, 4-二置換1, 2, 3-トリアゾールリンカーによって成分を粒子に共有結合する触媒を用いてまたは用いずに、1, 3-双極性環状付加反応によってナノキャリアと反応される。

40

【0150】

チオエーテルリンカーは、例えば、 R_1-S-R_2 の形態の硫黄-炭素（チオエーテル）結合の形成によって作製される。チオエーテルは、1つの成分におけるチオール／メルカプタン（-SH）基の、第2の成分におけるハロゲン化物またはエポキシドなどのアルキル化基によるアルキル化の何れかによって作製され得る。チオエーテルリンカーはまた、1つの成分におけるチオール／メルカプタン基の、マイケル受容体としてマレイミド基またはビニルスルホン基を含有する第2の成分における電子不足アルケン基へのマイケル

50

付加によって形成され得る。別の方法では、チオエーテルリンカーは、1つの成分におけるチオール／メルカプタン基と、第2の成分におけるアルケン基とのラジカルチオールエン反応によって調製され得る。

【0151】

ヒドラゾンリンカーは、1つの成分におけるヒドラジド基と、第2の成分におけるアルデヒド／ケトン基との反応によって作製される。

【0152】

ヒドラジドリンカーは、1つの成分におけるヒドラジン基と、第2の成分におけるカルボン酸基との反応によって形成される。このような反応は、一般に、カルボン酸が活性化試薬で活性化されるアミド結合の形成と同様の化学作用を用いて行われる。

10

【0153】

イミンまたはオキシムリンカーは、1つの成分におけるアミンまたはN-アルコキシアミン（またはアミノオキシ）基と、第2の成分におけるアルデヒドまたはケトン基との反応によって形成される。

【0154】

尿素またはチオ尿素リンカーは、1つの成分におけるアミン基と、第2の成分におけるイソシアネートまたはチオイソシアネート基との反応によって調製される。

【0155】

アミジンリンカーは、1つの成分におけるアミン基と、第2の成分におけるイミドエステル基との反応によって調製される。

20

【0156】

アミンリンカーは、1つの成分におけるアミン基と、第2の成分におけるハロゲン化物、エポキシド、またはスルホン酸エステル基などのアルキル化基とのアルキル化反応によって作製される。或いは、アミンリンカーはまた、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたは水素化トリアセトキシホウ素ナトリウムなどの好適な還元試薬を用いた、1つの成分におけるアミン基と、第2の成分におけるアルデヒドまたはケトン基との還元的アミノ化によって作製され得る。

【0157】

スルホンアミドリンカーは、1つの成分におけるアミン基と、第2の成分におけるハロゲン化スルホニル基（塩化スルホニルなど）との反応によって作製される。

30

【0158】

スルホンリンカーは、ビニルスルホンへの求核試薬のマイケル付加によって作製される。ビニルスルホンまたは求核試薬の何れかが、ナノキャリアの表面にあるかまたは成分に結合され得る。

【0159】

成分はまた、非共有結合方法によってナノキャリアに結合され得る。例えば、負に帯電した抗原または免疫抑制剤が、静電吸着によって正に帯電したナノキャリアに結合され得る。金属リガンドを含有する成分はまた、金属リガンド錯体を介して、金属錯体を含有するナノキャリアに結合され得る。

【0160】

40

実施形態において、成分は、合成ナノキャリアの組立の前に、ポリマー、例えばポリ乳酸-ブロッカーポリエチレングリコールに結合され得るか、または合成ナノキャリアは、その表面における反応性または活性化可能な基を用いて形成され得る。後者の場合、成分は、合成ナノキャリアの表面によって提示される結合化学作用と適合する基を用いて調製され得る。他の実施形態において、ペプチド成分が、好適なリンカーを用いてVLPまたはリポソームに結合され得る。リンカーは、2個の分子を一緒に結合することが可能な化合物または試薬である。一実施形態において、リンカーは、Hermanson 2008に記載されるように、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性の試薬であり得る。例えば、表面にカルボン酸基を含有するVLPまたはリポソーム合成ナノキャリアが、EDCの存在下で、ホモ二官能性リンカー、アジピン酸ジヒドラジド（ADH）で処理されて、AD

50

Hリンカーによって対応する合成ナノキャリアが形成され得る。次に、得られるADH結合合成ナノキャリアは、NCにおけるADHリンカーの他端を介して酸性基を含有するペプチド成分と結合されて、対応するVLPまたはリポソームペプチド複合体が生成される。

【0161】

利用可能な結合方法の詳細な説明については、Hermanson G T “Bioconjugate Techniques”, 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008を参照されたい。共有結合に加えて、成分は、予め形成された合成ナノキャリアへの吸着によって結合され得るかまたは成分は、合成ナノキャリアの形成中の封入によって結合され得る。

10

【0162】

本明細書に提供される任意の免疫抑制剤は、合成ナノキャリアに結合され得る。免疫抑制剤としては、以下に限定はされないが、スタチン；ラパマイシンまたはラパマイシン類似体などのmTOR阻害剤；TGF- β シグナル伝達剤；TGF- β 受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤；コルチコステロイド；ロテノンなどのミトコンドリア機能の阻害剤；P38阻害剤；NF- κ B阻害剤；アデノシン受容体アゴニスト；プロスタグランジンE2アゴニスト；ホスホジエステラーゼ4阻害剤などのホスホジエステラーゼ阻害剤；プロテアソーム阻害剤；キナーゼ阻害剤；Gタンパク質共役受容体アゴニスト；Gタンパク質共役受容体アンタゴニスト；糖質コルチコイド；レチノイド；サイトカイン阻害剤；サイトカイン受容体阻害剤；サイトカイン受容体活性化剤；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤；カルシニューリン阻害剤；ホスファターゼ阻害剤、および酸化ATPが挙げられる。免疫抑制剤としては、IDO、ビタミンD3、シクロスポリンA、アリール炭化水素受容体阻害剤、レスベラトロール、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アスピリン、ニフルム酸、エストリオール、トリプトリド、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-10）、シクロスポリンA、siRNA標的化サイトカインまたはサイトカイン受容体なども挙げられる。

20

【0163】

スタチンの例としては、アトルバスタチン（LIPITOR（登録商標）、TORVAST（登録商標））、セリバスタチン、フルバスタチン（LESCOL（登録商標）、LESCOL（登録商標）XL）、ロバスタチン（MEVACOR（登録商標）、ALTOCOR（登録商標）、ALTOPREV（登録商標））、メバスタチン（COMPACTIN（登録商標））、ピタバスタチン（LIVALO（登録商標）、PIAVA（登録商標））、ロスバスタチン（PRAVACHOL（登録商標）、SELEKTINE（登録商標）、LIPOSTAT（登録商標））、ロスバスタチン（CRESTOR（登録商標））、およびシンバスタチン（ZOCOR（登録商標）、LIPLEX（登録商標））が挙げられる。

30

【0164】

mTOR阻害剤の例としては、ラパマイシンおよびその類似体（例えば、CCL-779、RAD001、AP23573、C20-メタアリルラパマイシン（C20-Marap）、C16-（S）-ブチルスルホンアミドラパマイシン（C16-BSrap）、C16-（S）-3-メチルインドールラパマイシン（C16-iRap）（Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107））、AZD8055、BEZ235（NVP-BEZ235）、クリソファン酸（クリソファノール）、デフォロリムス（MK-8669）、エベロリムス（RAD0001）、KU-0063794、PI-103、PP242、テムシロリムス、およびWYE-354（Selleck（Houston, TX, USA）から入手可能）が挙げられる。

40

【0165】

TGF- β シグナル伝達剤の例としては、TGF- β リガンド（例えば、アクチビンA

50

、GDF1、GDF11、骨形態形成タンパク質、nodal、TGF- β s) およびそれらの受容体 (例えば、ACVR1B、ACVR1C、ACVR2A、ACVR2B、BMPR2、BMPR1A、BMPR1B、TGF β RI、TGF β RII)、R-SMADS/コ-SMADS (例えば、SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD5、SMAD8)、およびリガンド阻害剤 (例えば、ホリスタチン、ノギン、コーディン、DAN、lefty、LTBP1、THBS1、デコリン (Decorin)) が挙げられる。

【0166】

ミトコンドリア機能の阻害剤の例としては、アトラクチロシド (二カリウム塩)、ボンクレキン酸 (三アンモニウム塩)、カルボニルシアニドm-クロロフェニルヒドラゾン、カルボキシアトラクチロシド (例えば、アトラクチリス・グミフェラ (Attractylis gummifera) 由来)、CGP-37157、(-)-デグエリン (例えば、ムンドウレア・セリセア (Mundulea sericea) 由来)、F16、ヘキソキナーゼII、VDAC結合ドメインペプチド、オリゴマイシン、ロテノン、Ru360、SFK1、およびバリノマイシン (例えば、ストレプトマイセス・フルビシムス (Streptomyces fulvissimus) 由来) (EMD4 Biosciences, USA) が挙げられる。

【0167】

P38阻害剤の例としては、SB-203580 (4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル) 1H-イミダゾール)、SB-239063 (トランス-1-(4ヒドロキシシクロヘキシル)-4-(フルオロフェニル)-5-(2-メトキシ-ピリミジン-4-イル) イミダゾール)、SB-220025 (5-(2-アミノ-4-ピリジニル)-4-(4-フルオロフェニル)-1-(4-ピペリジニル) イミダゾール)、およびARRY-797が挙げられる。

【0168】

NF (例えば、NK- κ β) 阻害剤の例としては、IFRD1、2-(1,8-ナフチリジン-2-イル)-フェノール、5-アミノサリチル酸、BAY 11-7082、BAY 11-7085、CAPE (コーヒー酸フェネチルエステル)、マレイン酸ジエチル、IKK-2阻害剤IV、IMD 0354、ラクタシスチン、MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO]、NF κ B活性化阻害剤III、NF- κ B活性化阻害剤II、JSH-23、パルテノリド、フェニルアルシンオキシド (PAO)、PPM-18、ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム塩、QNZ、RO 106-9920、ロカグラミド、ロカグラミドAL、ロカグラミドC、ロカグラミドI、ロカグラミドJ、ロカグラオール、(R)-MG-132、サリチル酸ナトリウム、トリプトリド (PG490)、ウェデロラクトンが挙げられる。

【0169】

アデノシン受容体アゴニストの例としては、CGS-21680およびATL-146eが挙げられる。

【0170】

プロスタグランジンE2アゴニストの例としては、E-プロスタノイド2およびE-プロスタノイド4が挙げられる。

【0171】

ホスホジエステラーゼ阻害剤 (非選択的および選択的阻害剤) の例としては、カフェイン、アミノフィリン、IBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン)、パラキサンチン、ペントキシフィリン、テオブロミン、テオフィリン、メチル化キサンチン、ビンボセチン、EHNA (エリトロ-9-(2-ヒドロキシ-3-ノニル) アデニン)、アナグレリド、エノキシモン (PERFANTM)、ミルリノン、レボシメンダン、メセンブリン、イブジラスト、ピクラミラスト、ルテオリン、ドロタバリン、ロフルミラスト (DAXASTM、DALIRESPTM)、シルデナフィル (REVATION (登録商標)、VIAGRA (登録商標))、タダラフィル (ADCIRCA (登録商標)、CIAL

10

20

30

40

50

IS（登録商標））、バルデナフィル（LEVITRA（登録商標）、STAXYN（登録商標））、ウデナフィル、アバナフィル、イカリイン、4-メチルピペラジン、およびピラゾロピリミジン-7-1が挙げられる。

【0172】

プロテアソーム阻害剤の例としては、ボルテゾミブ、ジスルフィラム、エピガロカテキン-3-ガラクト、およびサリノスポラミドAが挙げられる。

【0173】

キナーゼ阻害剤の例としては、ベバシズマブ、BIBW 2992、セツキシマブ（ERBITUX（登録商標））、イマチニブ（GLEEVEC（登録商標））、トラスツマブ（HERCEPTIN（登録商標））、ゲフィチニブ（IRESSA（登録商標））、ラニズマブ（LUCENTIS（登録商標））、ペガプタニブ、ソラフェニブ、ダサチニブ、スニチニブ、エルロチニブ、ニロチニブ、ラパチニブ、パニツムマブ、バンデタニブ、E7080、パゾパニブ、ムブリチニブが挙げられる。

【0174】

糖質コルチコイドの例としては、ヒドロコルチゾン（コルチゾール）、酢酸コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、ベクロメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、酢酸デオキシコルチコステロン（DOCA）、およびアルドステロンが挙げられる。

【0175】

レチノイドの例としては、レチノール、レチナール、トレチノイン（レチノイン酸、RETIN-A（登録商標））、イソトレチノイン（ACCU-TANE（登録商標）、AMNESTHEM（登録商標）、CLARAVIS（登録商標）、SOTRET（登録商標））、アリトレチノイン（PANRETIN（登録商標））、エトレチナート（TEGISON（商標））およびその代謝産物のアシトレチン（SORIATANE（登録商標））、タザロテン（TAZORAC（登録商標）、AVAGE（登録商標）、ZORAC（登録商標））、ベキサロテン（TARGRETIN（登録商標））、およびアダパレン（DIFFERIN（登録商標））が挙げられる。

【0176】

サイトカイン阻害剤の例としては、IL1ra、IL1受容体アンタゴニスト、IGF-BP、TNF-BF、ウロモデュリン、 α -2-マクログロブリン、シクロスポリンA、ペンタミジン、およびペントキシフィリン（PENTOPAK（登録商標）、PENTOXIL（登録商標）、TRENTAL（登録商標））が挙げられる。

【0177】

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アンタゴニストの例としては、GW9662、PPAR γ アンタゴニストIII、G335、T0070907（EMD4Biosciences, USA）が挙げられる。

【0178】

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アゴニストの例としては、ピオグリタゾン、シグリタゾン、クロフィブラート、GW1929、GW7647、L-165, 041、LY171883、PPAR γ 活性化因子、Fmoc-Leu、トログリタゾン、およびWY-14643（EMD4Biosciences, USA）が挙げられる。

【0179】

ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の例としては、トリコスタチンAなどのヒドロキサム酸（またはヒドロキサメート）、環状テトラペプチド（トラポキシニンBなど）およびデプシペプチド、ベンズアミド、求電子性ケトン、フェニルブチレートおよびバルプロ酸などの脂肪酸化合物、ボリノスタット（SAHA）、ペリノスタット（PXD101）、LAQ824、およびパノビノスタット（LBH589）などのヒドロキサム酸、エンチノスタット（MS-275）、CI994、およびモセチノスタット（MGCD0103）などのベンズアミド、ニコチンアミド、NADの誘導体、ジヒドロクマリン、ナフトピラノン、および2-ヒドロキシナフタルアルデヒドが挙げられる。

【0180】

カルシニューリン阻害剤の例としては、シクロスポリン、ピメクロリムス、ボクロスポリン、およびタクロリムスが挙げられる。

【0181】

ホスファターゼ阻害剤の例としては、BN82002塩酸塩、CP-91149、カリクリンA、カンタリジン酸、カンタリジン、シペルメトリン、エチル-3, 4-デフォスタチン、フォストリエシナトリウム塩、MAZ51、メチル-3, 4-デフォスタチン、NSC 95397、ノルカンタリジン、プロロセントラム・コンカバム (prolocentrum concavum) に由来するオカダ酸アンモニウム塩、オカダ酸、オカダ酸カリウム塩、オカダ酸ナトリウム塩、フェニルアルシンオキシド、様々なホスファターゼ阻害剤混合物、タンパク質ホスファターゼ1C、タンパク質ホスファターゼ2A阻害剤タンパク質、タンパク質ホスファターゼ2A1、タンパク質ホスファターゼ2A2、オルトバナジウム酸ナトリウムが挙げられる。

10

【0182】

ある実施形態において、本明細書に記載される治療用タンパク質APC提示可能抗原はまた、合成ナノキャリアに結合される。ある実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、どの免疫抑制剤が結合されるかに応じて、同じかまたは異なる合成ナノキャリアに結合される。他の実施形態において、治療用タンパク質APC提示可能抗原は、いずれの合成ナノキャリアにも結合されない。治療用タンパク質APC提示可能抗原は、本明細書に提供される治療用タンパク質、或いはその断片または誘導体の何れかを含む。

20

【0183】

治療用タンパク質の例としては、以下に限定はされないが、不融性治療用タンパク質、酵素、酵素補助因子、ホルモン、血液凝固因子、サイトカインおよびインターフェロン、増殖因子、モノクローナル抗体、およびポリクローナル抗体（例えば、補充療法として被験体に投与されるもの）、およびポンペ病に関連するタンパク質（例えば、アルグルコシダーゼアルファ、rhGAA（例えば、MyozymeおよびLumizyme (Genzyme)）が挙げられる。治療用タンパク質は、血液凝固カスケードに関与するタンパク質も含む。治療用タンパク質の例としては、以下に限定はされないが、第VII因子、第VII因子、第IX因子、第V因子、フォン・ヴィレブランド因子、フォン・ヘルデブラント因子 (von Heldebrant Factor)、組織プラスミノゲン活性化因子、インスリン、成長ホルモン、エリスロポエチン α 、VEGF、トロンボポエチン、リゾチーム、抗トロンビンなどが挙げられる。治療用タンパク質は、レプチンおよびアディポネクチンなどのアディポカインも含む。治療用タンパク質の他の例は、以下および本明細書のどこかに記載されているとおりである。抗原として提供される治療用タンパク質の何れかの断片または誘導体も含まれる。

30

【0184】

リソソーム貯蔵障害に罹患した被験体の酵素補充療法に使用される治療用タンパク質の例としては、以下に限定はされないが、ゴーシェ病の治療のためのイミグルセラゼ（例えば、CEREZYME（商標））、ファブリー病の治療のための α -ガラクトシダーゼA (α -gal A)（例えば、アガルシダーゼベータ、FABRYZYME（商標））、ポンペ病の治療のための酸性 α -グルコシダーゼ (GAA)（例えば、アルグルコシダーゼアルファ、LUMIZYME（商標）、MYOZYME（商標））、ムコ多糖症の治療のためのアリアルスルファターゼB（例えば、ラロニダーゼ、ALDURAZYME（商標））、イデュルスルファターゼ、ELAPRASE（商標）、アリアルスルファターゼB、NAGLAZYME（商標）が挙げられる。

40

【0185】

酵素の例としては、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、およびリガーゼが挙げられる。

【0186】

50

ホルモンの例としては、メラトニン（N-アセチル-5-メトキシトリプタミン）、セロトニン、チロキシン（またはテトラヨードチロニン）（甲状腺ホルモン）、トリヨードチロニン（甲状腺ホルモン）、エピネフリン（またはアドレナリン）、ノルエピネフリン（またはノルアドレナリン）、ドパミン（またはプロラクチン抑制ホルモン）、抗ミューラー管ホルモン（またはミューラー管抑制因子またはホルモン）、アディポネクチン、副腎皮質刺激ホルモン（またはコルチコトロピン）、アンギオテンシノーゲンおよびアンジオテンシン、抗利尿ホルモン（またはバソプレシン、アルギニンバソプレシン）、心房性ナトリウム利尿ペプチド（またはアトリオペプチン）、カルシトニン、コレシストキニン、コルチコトロピン放出ホルモン、エリスロポエチン、卵胞刺激ホルモン、ガストリン、グレリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド（GLP-1）、GIP、ゴナドトロピン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤性ラクtoゲン、成長ホルモン、インヒビン、インスリン、インスリン様成長因子（またはソマトメジン）、レプチン、黄体形成ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、オレキシン、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、プロラクチン、レラキシン、セクレチン、ソマトスタチン、トロンボポエチン、甲状腺刺激ホルモン（またはサイロトロピン）、サイロトロピン放出ホルモン、コルチゾール、アルドステロン、テストステロン、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、ジヒドロテストステロン、エストラジオール、エストロン、エストリオール、プロゲステロン、カルシトリオール（1, 25-ジヒドロキシビタミンD3）、カルシジオール（25-ヒドロキシビタミンD3）、プロスタグランジン、ロイコトリエン、プロスタサイクリン、トロンボキサン、プロラクチン放出ホルモン、リポトロピン、脳性ナトリウム利尿ペプチド、神経ペプチドY、ヒスタミン、エンドセリン、膵臓ポリペプチド、レニン、およびエンケファリンが挙げられる。

【0187】

血液および血液凝固因子の例としては、第I因子（フィブリノゲン）、第II因子（プロトロンビン）、組織因子、第V因子（プロアクセレリン、不安定因子）、第VII因子（安定因子、プロコンバーチン）、第VIII因子（抗血友病グロブリン）、第IX因子（クリスマス因子または血漿トロンボプラスチン成分）、第X因子（スチュアート・プロワー因子）、第XI因子、第XII因子（ハーゲマン因子）、第XIII因子（フィブリン安定化因子）、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン（フレクチャー因子）、高分子量キニノーゲン（HMWK）（フィッツジェラルド因子）、フィブロンネクチン、フィブリン、トロンビン、抗トロンビンIII、ヘパリン補因子II、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤（ZPI）、プラスミノーゲン、 α 2-抗プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-1（PAI1）、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤-2（PAI2）、癌由来凝血促進因子、およびエポエチンアルファ（EpoGen、Procrit）が挙げられる。

【0188】

サイトカインの例としては、リンホカイン、インターロイキン、およびケモカイン、IFN- γ 、TGF- β などの1型サイトカイン、並びにIL-4、IL-10、およびIL-13などの2型サイトカインが挙げられる。

【0189】

増殖因子の例としては、アドレノメデュリン（AM）、アンジオポエチン（Ang）、自己分泌型運動因子、骨形成タンパク質（BMP）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、上皮成長因子（EGF）、エリスロポエチン（EPO）、線維芽細胞成長因子（FGF）、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、増殖分化因子-9（GDF9）、肝細胞増殖因子（HGF）、肝細胞癌由来増殖因子（HDGF）、インスリン様成長因子（IGF）、遊走刺激因子、ミオスタチン（GDF-8）、神経成長因子（NGF）および他の神経栄養因子、血小板由来増殖因子（PDGF）、トロンボポエチン（TPO）、形質転換成長因子 α （TGF- α ）、形質転換成長因子 β （TGF- β ）、腫瘍壊

10

20

30

40

50

死因子- α (TNF- α)、血管内皮成長因子 (VEGF)、Wnt シグナル経路、胎盤増殖因子 (PLGF)、[(ウシ胎仔ソマトトロピン)] (FBS)、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、および IL-7 が挙げられる。

【0190】

モノクローナル抗体の例としては、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アダリムマブ、アダカツムマブ、アフエリモマブ、アフツズマブ、アラシズマブペゴール、ALD、アテムツズマブ、ペンテト酸アルツモマブ、アナツモマブマフェナトクス、アンルキンズマブ、抗胸腺細胞グロブリン、アポリズマブ、アルシツモマブ、アセリズマブ、アトリズマブ (トシリズマブ)、アトロリムマブ、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、ベクツモマブ、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ、ベシレソマブ、ベバシズマブ、ビシロマブ、ビバツズマブメルタンシン、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カプロマブペンデチド、カツマキソマブ、セデリズマブ、セルトリズマブペゴール、セツキシマブ、シタツズマブボガトクス、シクスツムマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、コナツムマブ、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デノスマブ、デツモマブ、ドルリモマブアリトクス、ドルリキシズマブ、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エフングマブ、エロツズマブ、エルシリモマブ、エンリモマブペゴール、エピツモマブシツキセタン、エプラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ、エクスビビルマブ、ファノレソマブ、ファラリモマブ、ファルレツズマブ、フェルビズマブ、フェザキヌマブ、フィギツムマブ、フォントリズマブ、フォラビルマブ、フレソリムマブ、ガリキシマブ、ガンテネルマブ、ガビリモマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、GC1008、ギレンツキシマブ (Girentuximab)、グレムバツムマブベドチン (Glembatumumab vedotin)、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ、イムシロマブ、インフリキシマブ、インテツムマブ、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ、イラツムマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ、レブリキズマブ、レマレソマブ、レルデリムマブ、レクサツムマブ、リビビルマブ、リンツズマブ、ロルボツズマブメルタンシン、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マパツズマブ、マスリモマブ、マツズマブ、メポリズマブ、メテリムマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミツモマブ、モロリムマブ、モタビズマブ、ムロモナブーCD3、ナコロマブタフェナトクス、ナブツモマブエスタフェナトクス、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネレリモマブ、ニモツズマブ、ノフェツモマブメルペンタン、オクレリズマブ、オズリモマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オマリズマブ、オボルツズマブモナトクス、オレゴボマブ、オテリキシズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、パノバクマブ、パスコリズマブ、ペムツモマブ、パーツズマブ、ペキセリズマブ、ピンツモマブ、プリリキシマブ、プリツムマブ、ラフィビルマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レガビルマブ、レスリズマブ、リロツムマブ、リツキシマブ、ロバツムマブ、ロンタリズマブ、ロベリズマブ、ルプリズマブ、サツモマブペンデチド、セビルマブ、シブロツズマブ、シファリムマブ、シルツキシマブ、シプリズマブ、ソラネズマブ、ソネブシズマブ、ソンツズマブ、スタムルマブ、スレソマブ、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、タネズマブ、タプリツモマブパプトクス、テフィバズマブ、テリモマブアリトクス、テナツモマブ、テネリキシマブ、テプリズマブ、チシリムマブ (トレメリムマブ)、ティガツズマブ、トシリズマブ (アトリズマブ)、トラリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バパリキシマブ、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ビジリズマブ、ボロシキシマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ジラリムマブ、およびゾリモマブアリトクスが挙げられる。

【0191】

注入療法または注射用の治療用タンパク質の例としては、例えば、トシリズマブ (Roche/Actemra (登録商標))、 α -1 アンチトリプシン (Kamada/AA

10

20

30

40

50

T)、Hematide (登録商標) (Affymaxおよび武田薬品 (Takeda)、合成ペプチド)、アルブインターフェロン α -2b (Novartis/Zalbin (商標))、Rhucin (登録商標) (Pharming Group、C1阻害剤補充療法)、テサモレリン (Theratechnologies/Egrifta、合成成長ホルモン放出因子)、オクレリズマブ (Genentech、RocheおよびBiogen)、ベリムマブ (GlaxoSmithKline/Benlysta (登録商標))、ペグロチカーゼ (Savient Pharmaceuticals/Krystexxa (商標))、タリグルセラーゼアルファ (Protalix/Uplyso)、アガルシダーゼアルファ (Shire/Replagal (登録商標))、ベラグルセラーゼアルファ (Shire) が挙げられる。

10

【0192】

本発明の態様に従って有用な更なる治療用タンパク質は、当業者に明らかであり、本発明は、これに関して限定されない。

【0193】

ある実施形態において、抗原または免疫抑制剤などの成分が、単離され得る。「単離される」は、要素が、その天然の環境から分離され、その同定または使用を可能にするのに十分な量で存在することを指す。これは、例えば、要素が、(i) 発現クローニングによって選択的に生成され得るかまたは(ii) クロマトグラフィーまたは電気泳動によって精製され得ることを意味する。単離された要素は、実質的に純粋であり得るが、実質的に純粋である必要はない。単離された要素は、医薬製剤中で薬学的に許容できる賦形剤と混合され得るため、要素は、製剤のほんのわずかな重量パーセントを占め得る。それにもかかわらず、要素は、生物系中でそれと関連し得る物質から分離されたという点で単離される、即ち、他の脂質またはタンパク質から単離される。本明細書に提供される要素のいずれも単離されてもよく、単離された形態で組成物中に含まれ得る。

20

【0194】

D. 本発明の組成物を作製および使用するための方法並びに関連する方法

合成ナノキャリアは、当該技術分野において公知の様々な方法を用いて調製され得る。例えば、合成ナノキャリアは、ナノ析出 (nanoprecipitation)、流体チャネルを用いたフローフォーカシング (flow focusing)、噴霧乾燥、単一および二重乳化溶媒蒸発、溶媒抽出、相分離、ミリング、マイクロエマルジョン法、マイクロ加工、ナノ加工 (nanofabrication)、犠牲層、単純コアセルベーションおよび複合コアセルベーション、並びに当業者に周知の他の方法のような方法によって形成され得る。その代わりにまたはそれに加えて、単分散半導体ナノ材料、伝導性ナノ材料、磁性ナノ材料、有機ナノ材料、および他のナノ材料のための水性および有機溶媒合成が、記載されている (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; および Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843)。更なる方法が、文献に記載されている (例えば、Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; および Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755; 米国特許第5578325号明細書および同第6007845号明細書; P. Paolice lli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5 (6):843-853 (2010) を参照されたい)。

30

40

【0195】

50

様々な材料が、C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8-21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)を含むがこれらに限定されない様々な方法を用いて、所望により合成ナノキャリアへと封入され得る。2003年10月14日にUngerに付与された米国特許第6,632,671号明細書に開示される方法を含むがこれに限定されない、材料を合成ナノキャリア中に封入するのに好適な他の方法が使用され得る。

10

【0196】

20

特定の実施形態において、合成ナノキャリアは、ナノ析出プロセスまたは噴霧乾燥によって調製される。合成ナノキャリアを調製するのに使用される条件は、所望のサイズまたは特性（例えば、疎水性、親水性、外的形態、「粘性」、形状など）の粒子を得るために変更され得る。合成ナノキャリアを調製する方法および使用される条件（例えば、溶媒、温度、濃度、空気流量など）は、合成ナノキャリアに結合される材料および／またはポリマーマトリクスの組成に左右され得る。

【0197】

上記の方法の何れかによって調製される粒子が、所望の範囲を外れたサイズ範囲を有する場合、粒子は、例えば、ふるいを用いてサイズ分けされ得る。

【0198】

30

本発明の合成ナノキャリアの要素（即ち、成分）（免疫特徴表面を構成する部分、標的部分、ポリマーマトリクス、抗原、免疫抑制剤など）が、合成ナノキャリア全体に、例えば、1つ以上の共有結合によって結合されてもよく、または1つ以上のリンカーによって結合されてもよい。合成ナノキャリアを官能化する更なる方法が、Saltzman et al. への米国特許出願公開第2006/0002852号明細書、DeSimone et al. への米国特許出願公開第2009/0028910号明細書、またはMurthy et al. の公開された国際特許出願の国際公開第/2008/127532 A1号パンフレットから適合され得る。

【0199】

その代わりにまたはそれに加えて、合成ナノキャリアは、成分に、直接または非共有相互作用を介して間接的に結合され得る。非共有の実施形態において、非共有結合には、電荷相互作用、親和性相互作用、金属配位、物理吸着、ホスト-ゲスト相互作用、疎水性相互作用、TTスタッキング相互作用、水素結合相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用、磁気相互作用、静電相互作用、双極子間相互作用、および／またはそれらの組合せを含むがこれらに限定されない非共有相互作用が介在する。このような結合は、本発明の合成ナノキャリアの外表面または内面にあるように配置され得る。実施形態において、封入および／または吸収が、結合の形態である。実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、同じビヒクルまたは送達系中で混合することによって、抗原と組み合わせられ得る。

40

【0200】

合成ナノキャリアの集団は、従来の薬剤混合方法を用いて、本発明に係る医薬剤形を形

50

成するように組み合わせられ得る。これらには、ナノキャリアの1つ以上のサブセットをそれぞれが含有する2つ以上の懸濁液が直接組み合わせられるかまたは希釈剤を含む1つ以上の容器によって合わされる液-液混合が含まれる。また、合成ナノキャリアが、粉末形態で製造または貯蔵され得る際、2つ以上の粉末の再懸濁が共通の媒体中で行われ得るように粉末同士の乾式混合が行われ得る。ナノキャリアの特性およびそれらの相互作用ポテンシャルに応じて、1つまたは別の混合経路に与えられる利点があり得る。

【0201】

合成ナノキャリアを含む典型的な本発明の組成物は、無機または有機緩衝液（例えば、リン酸の、炭酸の、酢酸の、またはクエン酸のナトリウム塩またはカリウム塩）およびpH調整剤（例えば、塩酸、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウム、クエン酸のまたは酢酸の塩、アミノ酸およびその塩）酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、 α -トコフェロール）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン9-10ノニルフェノール、デソキシコール酸ナトリウム）、溶液および／または冷凍／溶解安定剤（例えば、スクロース、ラクトース、マンニトール、トレハロース）、浸透圧調整剤（例えば、塩または糖）、抗菌剤（例えば、安息香酸、フェノール、ゲンタマイシン）、消泡剤（例えば、ポリジメチルシロキサン）、保存剤（例えば、チメロサル、2-フェノキシエタノール、EDTA）、ポリマー安定剤および粘度調整剤（例えば、ポリビニルピロリドン、ポロキサマー488、カルボキシメチルセルロース）および共溶媒（例えば、グリセリロール、ポリエチレングリコール、エタノール）を含み得る。

【0202】

本発明に係る組成物は、薬学的に許容できる賦形剤と組み合わせて、本発明の合成ナノキャリアを含む。組成物は、有用な剤形に達するために従来の薬剤製造および配合技術を用いて作製され得る。本発明を実施する際に使用するのに好適な技術は、Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Edited by Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; およびPharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstoneに見出され得る。一実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、保存剤とともに注射するために滅菌生理食塩溶液中に懸濁される。

【0203】

本発明の組成物は、任意の好適な方法で作製され得、本発明は、本明細書に記載される方法を用いて製造され得る組成物に決して限定されないことを理解されたい。適切な方法の選択は、関連する特定の部分の特性に配慮することを必要とし得る。

【0204】

ある実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、滅菌条件下で製造されるかまたは最終的に滅菌される。これにより、得られる組成物を確実に無菌かつ非感染性にすることができ、非無菌組成物と比較した際に安全性が向上される。これは、特に、合成ナノキャリアを投与される被験体が、免疫不全を有するか、感染症に罹患しているか、および／または感染症に罹患しやすい場合、有益な安全対策を提供する。ある実施形態において、本発明の合成ナノキャリアは、活性を失うことなく、長期間にわたって、製剤化手法に応じて懸濁液中にまたは凍結乾燥粉末として、凍結乾燥され、貯蔵され得る。

【0205】

本発明の組成物は、皮下、鼻腔内、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、経粘膜、経粘膜、舌下、直腸、点眼、経肺、皮内、経真皮（transdermal）、経皮（transcutaneous）または皮内を含むがこれらに限定されない様々な経路によって或いはこれらの経路の組合せによって投与され得る。投与経路は、吸入または経肺エアゾールによる投与も含む。エアゾール送達系を調製するための技術が、当業者に周知である（例えば、参照により援用される、Sciarra and Cutie, "Aerosol

s, " in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp. 1694-1712を参照されたい)。

【0206】

本発明の細胞に基づいた療法として提供される治療用タンパク質は、非経口、動脈内、鼻腔内または静脈内投与によって、或いはリンパ節または前眼房への注射によって、或いは対象とする臓器または組織への局所投与によって投与され得る。投与は、皮下、髄腔内、脳室内、筋肉内、腹腔内、冠動脈内、脾臓内、肝臓内または気管支内注射によって行われ得る。

【0207】

本発明の組成物は、本明細書のどこかに記載される有効量などの、有効量で投与され得る。剤形の投与量は、本発明に係る、様々な量の合成ナノキャリアの集団および／または様々な量の、免疫抑制剤および／または抗原を含有する。本発明の剤形中に存在する合成ナノキャリアおよび／または免疫抑制剤および／または抗原の量は、抗原および／または免疫抑制剤の性質、達成される治療効果、および他のこのようなパラメータに応じて変更され得る。実施形態において、投与量決定試験が、合成ナノキャリアの集団の最適な治療量並びに剤形中に存在する免疫抑制剤および／または抗原の量を確定するために行われ得る。実施形態において、合成ナノキャリアおよび／または免疫抑制剤および／または抗原は、被験体への投与の際に、抗原に対する寛容原性免疫応答を生成するのに有効な量で剤形中に存在する。被験体における従来の投与量決定試験および技術を用いて寛容原性免疫応答を生成するのに有効な免疫抑制剤および／または抗原の量を決定することが可能であり得る。本発明の剤形は、様々な頻度で投与され得る。好ましい実施形態において、剤形の少なくとも1回の投与が、薬理学的に関連する応答を生成するのに十分である。より好ましい実施形態において、剤形の少なくとも2回の投与、少なくとも3回の投与、または少なくとも4回の投与が、薬理学的に関連する応答を確実にするのに用いられる。

【0208】

本発明の組成物の予防的投与が、疾病、疾患または病態の発症の前に開始され得、または治療的投与が、疾患、疾患または病態が定着した後開始され得る。

【0209】

ある実施形態において、合成ナノキャリアの投与は、例えば、治療用タンパク質の投与の前に行われる。例示的实施形態において、合成ナノキャリアは、治療用タンパク質の投与の30、25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、または0日前などに、1回以上投与される。それに加えてまたはその代わりに、合成ナノキャリアは、治療用タンパク質の投与の後、被験体に投与され得る。例示的实施形態において、合成ナノキャリアは、治療用タンパク質の投与の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30日後などに、1回以上投与される。

【0210】

ある実施形態において、(例えば、本明細書に提供される合成ナノキャリアの)維持投与量は、例えば、初期投与量の後に得られる寛容原性効果を維持するために、被験体における望ましくない免疫反応を防止するために、または被験体が、望ましくない免疫応答または望ましくないレベルの免疫応答を起こすリスクがある被験体になるのを防止するために、初期投与が被験体における寛容原性応答をもたらした後に被験体に投与される。ある実施形態において、維持投与量は、被験体に投与された初期投与量と同じ投与量である。ある実施形態において、維持投与量は、初期投与量より低い投与量である。例えば、ある実施形態において、維持投与量は、初期投与量の約3/4、約2/3、約1/2、約1/3、約1/4、約1/8、約1/10、約1/20、約1/25、約1/50、約1/100、約1/1,000、約1/10,000、約1/100,000、または約1/1,000,000(重量/重量)である。

【0211】

本明細書に記載される組成物および方法は、寛容原性免疫応答を誘導または促進し、および／または免疫抑制のために望ましくない免疫応答を抑制し、調節し、指向し（direct）または指向し直す（redirect）ために使用され得る。本明細書に記載される組成物および方法は、治療用タンパク質を投与されたか、投与されているかまたは投与される予定である被験体における寛容原性免疫応答の生成のために使用され得る。

【実施例】

【0212】

実施例1：オボアルブミンペプチド（323-339）を用いたおよび用いない結合ラパマイシンを含む合成ナノキャリアの免疫応答

材料

オボアルブミンタンパク質のTおよびB細胞エпитープであることが知られている17アミノ酸のペプチドであるオボアルブミンペプチド323-339を、Bachem Americas Inc.（3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505；パーツ番号4065609）から購入した。ラパマイシンを、TSZ CHEM（185 Wilson Street, Framingham, MA 01702；製品カタログ番号R1017）から購入した。3：1のラクチド：グリコリド比および0.75dL/gの固有粘度を有するPLGAを、SurModics Pharmaceuticals（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211；製品コード7525 DLG 7A）から購入した。ポリビニルアルコール（85～89%加水分解されたもの）を、EMD Chemicals（製品番号1.41350.1001）から購入した。

【0213】

溶液1：希塩酸水溶液中20mg/mLのオボアルブミンペプチド323-339。オボアルブミンペプチドを0.13Mの塩酸溶液に室温で溶解させることによって溶液を調製した。

溶液2：塩化メチレン中50mg/mLのラパマイシン。ラパマイシンを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液3：塩化メチレン中100mg/mLのPLGA。PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液4：100mMのpH8のリン酸緩衝液中50mg/mLのポリビニルアルコール。

【0214】

ラパマイシンおよびオボアルブミン（323-339）を含有する合成ナノキャリアを調製するための方法

第1の油中水型エマルジョンをまず調製した。溶液1（0.2mL）、溶液2（0.2mL）、および溶液3（1.0mL）を、小型の圧力管中で組み合わせて、Bransonic Digital Sonifier 250を用いて、50%の振幅で40秒間、超音波で分解することによって、W1/O1を調製した。次に、溶液4（3.0mL）を、第1のW1/O1エマルジョンと組み合わせて、10秒間ボルテックスし、Bransonic Digital Sonifier 250を用いて、30%の振幅で60秒間、超音波で分解することによって、第2のエマルジョン（W1/O1/W2）を調製した。

【0215】

W1/O1/W2エマルジョンを、70mMのpH8のリン酸緩衝液（30mL）を含むビーカーに加え、室温で2時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、合成ナノキャリアを形成させた。合成ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、21,000×gおよび4℃で1時間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、合成ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終的な合成ナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

【0216】

合成ナノキャリア中のペプチドおよびラパマイシンの量を、HPLC分析によって測定

した。懸濁液mL当たりの、乾燥した合成ナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0217】

ラパマイシンを含有する合成ナノキャリアのための方法

第1の油中水型エマルジョンをまず調製した。0.13Mの塩酸溶液(0.2mL)、溶液2(0.2mL)、および溶液3(1.0mL)を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250を用いて、50%の振幅で40秒間、超音波で分解することによって、W1/O1を調製した。次に、溶液4(3.0mL)を、第1のW1/O1エマルジョンと組み合わせて、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を用いて、30%の振幅で60秒間、超音波で分解することによって、第2のエマルジョン(W1/O1/W2)を調製した。

10

【0218】

W1/O1/W2エマルジョンを、70mMのpH8のリン酸緩衝液(30mL)を含むビーカーに加え、室温で2時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、合成ナノキャリアを形成させた。合成ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、21,000×gおよび4℃で1時間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、合成ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終的な合成ナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

20

【0219】

合成ナノキャリア中のラパマイシンの量を、HPLC分析によって測定した。懸濁液mL当たりの、乾燥した合成ナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0220】

ラパマイシン負荷を測定するための方法

約3mgの合成ナノキャリアを収集し、遠心分離して、上清を合成ナノキャリアペレットから分離した。アセトニトリルをペレットに加え、試料を超音波で分解し、遠心分離して、あらゆる不溶性材料を除去した。上清およびペレットをRP-HPLCに注入し、278nmでの吸光度を読み取った。ペレットに見られたμgを用いて、取り込み%(負荷)を計算し、上清およびペレットのμgを用いて、回収された合計μgを計算した。

30

【0221】

オボアルブミン(323-339)負荷を測定するための方法

約3mgの合成ナノキャリアを収集し、遠心分離して、上清を合成ナノキャリアペレットから分離した。トリフルオロエタノールをペレットに加え、試料を超音波で分解して、ポリマーを溶解させ、0.2%のトリフルオロ酢酸を加え、試料を超音波で分解し、次に、遠心分離して、あらゆる不溶性材料を除去した。上清およびペレットをRP-HPLCに注入し、吸光度を215nmで読み取った。ペレットに見られたμgを用いて、取り込み%(負荷)を計算し、上清およびペレットのμgを用いて、回収された合計μgを計算した。

【0222】

40

Treg細胞発生に対する抗原特異的な寛容原性樹枝状細胞(Tdc)活性

このアッセイには、免疫優性(immune-dominant)オボアルブミン(323-339)に特異的なトランスジェニックT細胞受容体を有するOTIIマウスの使用が含まれていた。抗原特異的なtDCを生成するために、CD11c+脾細胞を単離し、オボアルブミン(323-339)ペプチドをインビトロで1μg/mlでまたは抗原なしで加えた。次に、可溶性またはナノキャリア封入ラパマイシンを、2時間にわたってDCに加え、次に、それを十分に洗浄して、遊離ラパマイシンを培養物から除去した。精製されたレスポンダーCD4⁺CD25⁻細胞を、OTIIマウスから単離し、10:1のT対DC比でtDCに加えた。次に、tDCとOTII T細胞との混合物を4~5日間培養し、Treg細胞(CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺)の頻度を、図1に示さ

50

れるようにフローサイトメトリーによって分析した。アイソタイプコントロールに基づいて領域を選択した。

【0223】

実施例2：イブプロフェンが結合されたメソ多孔質シリカナノ粒子（理論実験例）

メソ多孔質SiO₂ナノ粒子コアを、ゾル・ゲル法によって生成する。ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）（0.5 g）を、脱イオン水（500 mL）に溶解させ、次に、2 MのNaOH水溶液（3.5 mL）を、CTAB溶液に加える。溶液を30分間攪拌し、次に、テトラエトキシシラン（TEOS）（2.5 mL）を溶液に加える。得られたゲルを、80℃の温度で3時間攪拌する。生じる白色の沈殿物を、ろ過によって捕捉した後、脱イオン水で洗浄し、室温で乾燥させる。次に、残っている界面活性剤を、HClのエタノール溶液中で一晩懸濁させることによって粒子から抽出する。粒子を、エタノールで洗浄し、遠心分離し、超音波処理により再分散させる。この洗浄手順を更に2回繰り返す。

10

【0224】

次に、SiO₂ナノ粒子を、（3-アミノプロピル）-トリエトキシシラン（APTMS）を用いてアミノ基で官能化する。これを行うために、粒子をエタノール（30 mL）に懸濁させ、APTMS（50 μL）を懸濁液に加える。懸濁液を室温で2時間静置し、次に、4時間沸騰させて、エタノールを定期的に加えることによって体積を一定に保つ。残っている反応剤を、遠心分離による洗浄および純粋エタノール中への再分散の5回のサイクルによって除去する。

20

【0225】

分離反応において、直径1～4 nmの金シードが生成される。この反応に使用される全ての水を、まず脱イオン化し、次に、ガラスから蒸留する。水（45.5 mL）を、100 mLの丸底フラスコに加える。攪拌しながら、0.2 MのNaOH水溶液（1.5 mL）を加えた後、テトラキス（ヒドロキシメチル）ホスホニウムクロリド（THPC）の1%の水溶液（1.0 mL）を加える。THPC溶液の添加の2分後、少なくとも15分間熟成させたクロロ金酸の10 mg/mLの水溶液（2 mL）を加える。金シードを水に対する透析によって精製する。

【0226】

コア-シェルナノキャリアを形成するために、上で形成されたアミノ官能化SiO₂ナノ粒子を、まず、室温で2時間、金シードと混合する。金で装飾されたSiO₂粒子を、遠心分離によって収集し、クロロ金酸および炭酸水素カリウムの水溶液と混合して、金シェルを形成する。次に、粒子を、遠心分離によって洗浄し、水に再分散させる。ナトリウムイブプロフェン（1 mg/L）の溶液中で粒子を72時間懸濁させることによって、イブプロフェンを充填する。次に、遊離イブプロフェンを、遠心分離によって粒子から洗浄し、水に再分散させる。

30

【0227】

実施例3：シクロスポリンAを含有するリポソーム（理論実験例）

リポソームを、薄膜水和（thin film hydration）を用いて形成する。1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）（32 μmol）、コレステロール（32 μmol）、およびシクロスポリンA（6.4 μmol）を、純粋なクロロホルム（3 mL）に溶解させる。この脂質溶液を、50 mLの丸底フラスコに加え、溶媒を、60℃の温度でロータリーエバポレータにおいて蒸発させる。次に、フラスコを、窒素ガスでフラッシュして、残りの溶媒を除去する。リン酸緩衝生理食塩水（2 mL）および5つのガラスビーズをフラスコに加え、60℃で1時間振とうすることによって脂質膜を水和して、懸濁液を形成する。懸濁液を小型の圧力管に移し、各パルス間に30秒の遅延を伴う30秒のパルスの4回のサイクルにわたって、60℃で、超音波で分解する。次に、懸濁液を室温で2時間そのままにしておき、完全に水和させる。リポソームを、遠心分離によって洗浄した後、新鮮なリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させる。

40

50

【0228】

実施例4：ポリマー-ラパマイシンコンジュゲートを含有するポリマーナノキャリア（理論実験例）

PLGA-ラパマイシンコンジュゲートの調製：

酸性末端基を有するPLGAポリマー（7525 DLG1A、酸価0.46mmol/g、Lakeshore Biomaterials；5g、2.3mmol、1.0当量）を、30mLのジクロロメタン（DCM）に溶解させる。N，N-ジシクロヘキシルカルボジイミド（1.2当量、2.8mmol、0.57g）を加えた後、ラパマイシン（1.0当量、2.3mmol、2.1g）および4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）（2.0当量、4.6mmol、0.56g）を加える。混合物を室温で2日間攪拌する。次に、混合物をろ過して、不溶性ジシクロヘキシル尿素を除去する。ろ液を、約10mLの体積に濃縮し、100mLのイソプロピルアルコール（IPA）に加えて、PLGA-ラパマイシンコンジュゲートを析出させる。IPA層を除去し、次に、ポリマーを、50mLのIPAおよび50mLのメチルtertブチルエーテル（MTBE）で洗浄する。次に、ポリマーを、35℃で2日間、真空下で乾燥させて、白色の固体としてPLGA-ラパマイシン（約6.5g）を得る。

10

【0229】

PLGA-ラパマイシンコンジュゲートおよびオボアルブミンペプチド（323-339）を含有するナノキャリアの調製：

PLGA-ラパマイシンを含有するナノキャリアを、実施例1に記載される手順に従って、以下のとおりに調製する：

20

【0230】

ナノキャリア形成のための溶液を以下のとおりに調製する：

溶液1：希塩酸水溶液中20mg/mLのオボアルブミンペプチド323-339。オボアルブミンペプチドを0.13Mの塩酸溶液に室温で溶解させることによって溶液を調製する。溶液2：塩化メチレン中100mg/mLのPLGA-ラパマイシン。PLGA-ラパマイシンを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製する。溶液3：塩化メチレン中100mg/mLのPLA-PEG。PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製する。溶液4：100mMのpH8のリン酸緩衝液中50mg/mLのポリビニルアルコール。

30

【0231】

第1の油中水型エマルジョンをまず調製する。溶液1（0.2mL）、溶液2（0.75mL）、および溶液3（0.25mL）を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250を用いて、50%の振幅で40秒間、超音波で分解することによって、W1/O1を調製する。次に、溶液4（3.0mL）を、第1のW1/O1エマルジョンと組み合わせて、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を用いて、30%の振幅で60秒間、超音波で分解することによって、第2のエマルジョン（W1/O1/W2）を調製する。W1/O1/W2エマルジョンを、70mMのpH8のリン酸緩衝液（30mL）を含むビーカーに加え、室温で2時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させる。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、75,600×gおよび4℃で35分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄する。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させる。

40

【0232】

実施例5：ラパマイシンを含有する金ナノキャリア（AuNC）の調製（理論実験例）

HS-PEG-ラパマイシンの調製：

乾燥DMF中のPEG酸ジスルフィド（1.0当量）、ラパマイシン（2.0～2.5当量）、DCC（2.5当量）およびDMAP（3.0当量）の溶液を、室温で一晩攪拌する。不溶性ジシクロヘキシル尿素を、ろ過によって除去し、ろ液をイソプロピルアルコ

50

ール（IPA）に加えて、PEG-ジスルフィド-ジラパマイシンエステルを析出させ、IPAで洗浄し、乾燥させる。次に、ポリマーを、DMF中のトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩で処理して、PEG-ジスルフィドを還元して、チオールPEGラパマイシンエステル（HS-PEG-ラパマイシン）にする。得られたポリマーを、IPAからの沈殿によって回収し、上述されるように乾燥させ、¹H-NMRおよびGPCによって分析する。

【0233】

金NC（AuNC）の形成：

500 mLの1 mMのHAuCl₄の水溶液を、凝縮器を備えた1 Lの丸底フラスコ中で激しく攪拌しながら、10分間加熱還流させる。次に、50 mLの40 mMのクエン酸三ナトリウムの溶液を、攪拌溶液に素早く加える。得られた濃いワインレッドの溶液を、25～30分間還流状態に保ち、熱を取り除いて、溶液を室温に冷ます。次に、溶液を、0.8 μmの薄膜フィルタを通してろ過して、AuNC溶液を得る。AuNCを、可視分光法および透過電子顕微鏡法を用いて特性評価する。AuNCは、直径が約20 nmであり、クエン酸塩でキャッピングされ、520 nmでピーク吸収を有する。

【0234】

HS-PEG-ラパマイシンとのAuNCコンジュゲート：

150 μLのHS-PEG-ラパマイシン（10 mMのpH 9.0の炭酸緩衝液中10 μM）の溶液を、1 mLの20 nmの直径のクエン酸塩でキャッピングされた金ナノキャリア（1.16 nM）に加えて、2500：1のチオール対金のモル比を得る。混合物を、アルゴン下で、室温で1時間攪拌して、金ナノキャリア上でチオールとクエン酸塩との完全な交換を可能にする。次に、表面におけるPEG-ラパマイシンと複合したAuNCを、12,000 gで30分間の遠心分離によって精製する。上清をデカントし、次に、AuNC-S-PEG-ラパマイシンを含有するペレットを、1×PBS緩衝液で洗浄する。次に、精製された金-PEG-ラパマイシンナノキャリアを、更なる分析およびバイオアッセイのために、好適な緩衝液に再懸濁させる。

【0235】

実施例6：オボアルブミンを含有するメソ多孔質シリカー金コア-シェルナノキャリア（理論実験例）

メソ多孔質SiO₂ナノ粒子コアを、ゾル・ゲル法によって生成する。ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）（0.5 g）を、脱イオン水（500 mL）に溶解させ、次に、2 MのNaOH水溶液（3.5 mL）を、CTAB溶液に加える。溶液を30分間攪拌し、次に、テトラエトキシシラン（TEOS）（2.5 mL）を溶液に加える。得られたゲルを、80℃の温度で3時間攪拌する。生じる白色の沈殿物を、ろ過によって捕捉した後、脱イオン水で洗浄し、室温で乾燥させる。次に、残っている界面活性剤を、HClのエタノール溶液中で一晩懸濁させることによって粒子から抽出する。粒子を、エタノールで洗浄し、遠心分離し、超音波処理により再分散させる。この洗浄手順を更に2回繰り返す。

【0236】

次に、SiO₂ナノ粒子を、（3-アミノプロピル）-トリエトキシシラン（APTMS）を用いてアミノ基で官能化する。これを行うために、粒子をエタノール（30 mL）に懸濁させ、APTMS（50 μL）を懸濁液に加える。懸濁液を室温で2時間静置し、次に、4時間沸騰させて、エタノールを定期的に加えることによって体積を一定に保つ。残っている反応剤を、遠心分離による洗浄および純粋エタノール中への再分散の5回のサイクルによって除去する。

【0237】

分離反応において、直径1～4 nmの金シードが生成される。この反応に使用される全ての水を、まず脱イオン化し、次に、ガラスから蒸留する。水（45.5 mL）を、100 mLの丸底フラスコに加える。攪拌しながら、0.2 MのNaOH水溶液（1.5 mL）を加えた後、テトラキス（ヒドロキシメチル）ホスホニウムクロリド（THPC）の1

10

20

30

40

50

%の水溶液（1.0 mL）を加える。THPC溶液の添加の2分後、少なくとも15分間熟成させたクロロ金酸の10 mg/mLの水溶液（2 mL）を加える。金シードを水に対する透析によって精製する。

【0238】

コアシェルナノキャリアを形成するために、上で形成されたアミノ官能化SiO₂ナノ粒子を、まず、室温で2時間、金シードと混合する。金で装飾されたSiO₂粒子を、遠心分離によって収集し、クロロ金酸および炭酸水素カリウムの水溶液と混合して、金シェルを形成する。次に、粒子を、遠心分離によって洗浄し、水に再分散させる。チオール化オボアルブミン（オボアルブミンを2-イミノチオラン塩酸塩で処理することによって作製される）を、粒子をチオール化オボアルブミン（1 mg/L）の溶液に72時間懸濁させることによって充填する。次に、粒子を、1×PBS（pH 7.4）でペレット洗浄して、遊離タンパク質を除去する。次に、オボアルブミンを含有する得られたシリカー金コアシェルナノキャリアを、更なる分析およびアッセイのために、1×PBSに再懸濁させる。

10

【0239】

実施例7：ラパマイシンおよびオボアルブミンを含有するリポソーム（理論実験例）

リポソームを、薄膜水和によって形成する。1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン（DPPC）（32 μmol）、コレステロール（32 μmol）、およびラパマイシン（6.4 μmol）を、純粋なクロロホルム（3 mL）に溶解させる。この脂質溶液を、10 mLのガラス管に加え、溶媒を窒素ガス流下で除去し、真空下で6時間乾燥させる。過剰量のオボアルブミンを含有する2.0 mLの25 mMのMOPS緩衝液（pH 8.5）による薄膜の水和によって、多重膜ベシクルを得る。脂質薄膜が管表面から剥がれるまで、管をボルテックスする。多重膜ベシクルを単層膜へと分解するために、10回のサイクルの凍結（液体窒素）および解凍（30℃の水浴）を行う。次に、試料を25 mMのMOPS緩衝液（pH 8.5）中で1 mLまで希釈する。200 nmの細孔のポリカーボネートフィルタに試料を10回通すことによって、得られたリポソームのサイズを、押出しによって均一にする。次に、得られたリポソームを、更なる分析およびバイオアッセイのために使用する。

20

【0240】

実施例8：表面共役オボアルブミンで修飾されたポリアミノ酸から構成されたポリマーナノキャリア（理論実験例）

30

工程1。L-フェニルアラニンエチルエステル（L-PAE）で修飾されたポリ（γ-グルタミン酸）（γ-PGA）の調製：4.7 mmol単位のγ-PGA（Mn = 300 kD）を、0.3 NのNaHCO₃水溶液（50 mL）に溶解させる。L-PAE（4.7 mmol）およびEDC・HCl（4.7 mmol）を溶液に加え、4℃で30分間攪拌する。次に、溶液を24時間攪拌しながら室温に維持する。低分子量の化学物質を、50 kDのMWCOを有する透析膜を用いて透析によって除去する。得られたγ-PGA-グラフト-L-PAEは、凍結乾燥によって得られる。

【0241】

工程2。γ-PGA-グラフト-L-PAEポリマーからのナノ粒子の調製：γ-PGA-グラフト-L-PAEから構成されるナノ粒子を、沈殿および透析方法によって調製する。γ-PGA-グラフト-L-PAE（20 mg）を、2 mLのDMSOに溶解させた後、2 mLの水を加えて、半透明の溶液を形成した。次に、溶液を、セルロース膜管（50,000 MWCO）を用いて蒸留水に対して透析して、ナノ粒子を形成し、室温で72時間有機溶媒を除去する。蒸留水を、12時間の間隔で交換する。次に、得られたナノ粒子溶液（水中10 mg/mL）を、抗原の共役使用する。

40

【0242】

工程3。γ-PGAナノ粒子へのオボアルブミン共役：γ-PGAナノ粒子（10 mg/mL）の表面カルボン酸基を、周囲温度で2時間、EDCおよびNHS（リン酸緩衝液中それぞれ10 mg/mL、pH 5.8）によってまず活性化する。過剰なEDC/NH

50

Sを除去するためのペレット洗浄の後、活性化されたナノ粒子を、リン酸緩衝生理食塩水（PBS、pH 7.4）中の1 mLのオボアルブミン（10 mg/mL）と混合し、混合物を4～8℃で24時間インキュベートする。得られたオボアルブミン共役γ-PGAナノ粒子を、PBSで2回洗浄し、更なる分析およびバイオアッセイのために、PBS中5 mg/mLで再懸濁させる。

【0243】

実施例9：エリスロポエチン（EPO）封入γ-PGAナノ粒子（理論実験例）

EPO封入γ-PGAナノ粒子を調製するために、0.25～4 mgのEPOを、1 mLのPBS（pH 7.4）に溶解させ、1 mLのγ-PGA-グラフト-L-PAE（DMO中10 mg/mL）をEPO溶液に加える。得られた溶液を、14,000×gで15分間遠心分離し、PBSで繰り返しすすぐ。次に、得られたEPO封入γ-PGAナノ粒子を、更なる分析およびバイオアッセイのためにPBS（5 mg/mL）に再懸濁させる。

10

【0244】

実施例10：オボアルブミンを含有する金ナノキャリア（AuNC）の調製（理論実験例）

工程1. 金NC（AuNC）の形成：500 mLの1 mMのHAuCl₄の水溶液を、凝縮器を備えた1 Lの丸底フラスコ中で激しく攪拌しながら、10分間加熱還流させる。次に、50 mLの40 mMのクエン酸三ナトリウムの溶液を、攪拌溶液に素早く加える。得られた濃いワインレッドの溶液を、25～30分間還流状態に保ち、熱を取り除いて、溶液を室温に冷ます。次に、溶液を、0.8 μmの薄膜フィルタを通してろ過して、AuNC溶液を得る。AuNCを、可視分光法および透過電子顕微鏡法を用いて特性評価する。AuNCは、直径が約20 nmであり、クエン酸塩でキャッピングされ、520 nmでピーク吸収を有する。

20

【0245】

工程2. AuNCへのオボアルブミンの共役：150 μlのチオール化オボアルブミン（10 mMのpH 9.0の炭酸緩衝液中10 μM）の溶液を、1 mLの20 nmの直径のクエン塩でキャッピングされた金ナノキャリア（1.16 nM）に加えて、2500:1のチオール対金のモル比を生成する。混合物を、アルゴン下で、室温で1時間攪拌して、金ナノキャリア上でチオールとクエン酸塩との完全な交換を可能にする。次に、表面におけるオボアルブミンとAuNCを、12,000 gで30分間にわたる遠心分離によって精製する。上清をデカントし、次に、AuNC-オボアルブミンを含有するペレットを、1×PBS緩衝液でペレット洗浄する。次に、精製された金-オボアルブミンナノキャリアを、更なる分析およびバイオアッセイのために、好適な緩衝液に再懸濁させる。

30

【0246】

実施例11：生体内のエポエチンアルファに対する寛容原性免疫応答の評価（理論実験例）

Balb/cマウスに、不完全フロイントアジュバント中のエポエチンアルファで免疫を与えて、CD4+T細胞増殖を誘導し、そのレベルを評価する。その後、エポエチンアルファのMHCクラスII拘束性エピトープおよび免疫抑制剤を含む本発明の組成物を、用量依存的に皮下投与する。次に、同じマウスをエポエチンアルファに再度曝露し、CD4+T細胞増殖のレベルを再度評価する。次に、CD4+T細胞集団の変化を、寛容原性免疫応答を誘導するエポエチンアルファを引き続き負荷した際のCD4+T細胞増殖の減少によって監視する。

40

【0247】

実施例12：生体内の免疫抑制剤およびAPC提示可能抗原を含む合成ナノキャリアによる寛容原性免疫応答の評価

合成ナノキャリア製造の材料および方法

ナノキャリア1

ラパマイシンを、TSZ CHEM（185 Wilson Street, Fram

50

ingham, MA 01702; 製品カタログ番号 R1017) から購入した。3:1 のラクチド:グリコリド比および 0.75 dL/g の固有粘度を有する PLGA を、SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 製品コード 7525 DLG 7A) から購入した。約 5,000 Da の PEG ブロックと約 20,000 Da の PLA ブロックとの PLA-PEG ブロックコポリマーを合成した。ポリビニルアルコール (85~89% 加水分解されたもの) を、EMD Chemicals (製品番号 1.41350.1001) から購入した。

【0248】

溶液を以下のとおりに調製した:

溶液 1: 塩化メチレン中 50 mg/mL のラパマイシン。ラパマイシンを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 2: 塩化メチレン中 100 mg/mL の PLGA。PLGA を純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 3: 塩化メチレン中 100 mg/mL の PLA-PEG。PLA-PEG を純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 4: 100 mM の pH 8 のリン酸緩衝液中 50 mg/mL のポリビニルアルコール。

【0249】

水中油型エマルジョンを用いて、ナノキャリアを調製した。溶液 1 (0.2 mL)、溶液 2 (0.75 mL)、溶液 3 (0.25 mL)、および溶液 4 (3 mL) を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250 を用いて、30% の振幅で 60 秒間、超音波で分解することによって、O/W エマルジョンを調製した。O/W エマルジョンを、70 mM の pH 8 のリン酸緩衝液 (30 mL) を含むビーカーに加え、室温で 2 時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、21,000 × g および 4°C で 45 分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約 10 mg/mL の最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

【0250】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱によって測定した。ナノキャリア中のラパマイシンの量を、HPLC 分析によって測定した。懸濁液の mL 当たりの、乾燥したナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0251】

【表 1】

ナノキャリア ID	有効径 (nm)	ラパマイシン含量 (% w/w)
ナノキャリア 1	215	9.5

【0252】

ナノキャリア 2

オボアルブミンタンパク質の T および B 細胞エпитープであることが知られている 17 アミノ酸のペプチドであるオボアルブミンペプチド 323-339 を、Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; パーツ番号 4065609) から購入した。3:1 のラクチド:グリコリド比および 0.75 dL/g の固有粘度を有する PLGA を、SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 製品コード 7525 DLG 7A) から購入

した。約 5,000 Da の PEG ブロックと約 20,000 Da の PLA ブロックとの PLA-PEG ブロックコポリマーを合成した。ポリビニルアルコール（85～89%加水分解されたもの）を、EMD Chemicals（製品番号 1.41350.1001）から購入した。

【0253】

溶液を以下のとおりに調製した：

溶液 1：希塩酸水溶液中 20 mg/mL のオボアルブミンペプチド 323-339。オボアルブミンペプチドを 0.13 M の塩酸溶液に室温で溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 2：塩化メチレン中 100 mg/mL の PLGA。PLGA を純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 3：塩化メチレン中 100 mg/mL の PLA-PEG。PLA-PEG を純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 4：100 mM の pH 8 のリン酸緩衝液中 50 mg/mL のポリビニルアルコール。

【0254】

第 1 の油中水型エマルジョンをまず調製した。溶液 1（0.2 mL）、溶液 2（0.75 mL）、および溶液 3（0.25 mL）を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250 を用いて、50% の振幅で 40 秒間、超音波で分解することによって、W1/O1 を調製した。次に、溶液 4（3.0 mL）を、第 1 の W1/O1 エマルジョンと組み合わせて、10 秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250 を用いて、30% の振幅で 60 秒間、超音波で分解することによって、第 2 のエマルジョン（W1/O1/W2）を調製した。

【0255】

W1/O1/W2 エマルジョンを、70 mM の pH 8 のリン酸緩衝液（30 mL）を含むビーカーに加え、室温で 2 時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、75,600 × g および 4℃ で 35 分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約 10 mg/mL の最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

【0256】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱によって測定した。ナノキャリア中のペプチドの量を、HPLC 分析によって測定した。懸濁液の mL 当たりの、乾燥したナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0257】

【表 2】

ナノキャリア ID	有効径 (nm)	ペプチド含量 (% w/w)
ナノキャリア 2	234	2.1

【0258】

ナノキャリア 3

シンバスタチンを、LKT Laboratories, Inc.（2233 University Avenue West, St. Paul, MN 55114；製品カタログ番号 S3449）から購入した。3：1 のラクチド：グリコリド比および 0.75 dL/g の固有粘度を有する PLGA を、SurModics Pharmaceuticals（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL

35211；製品コード7525 DLG 7A）から購入した。約5,000DaのPEGブロックと約20,000DaのPLAブロックとのPLA-PEGブロックコポリマーを合成した。ポリビニルアルコール（85～89%加水分解されたもの）を、EMD Chemicals（製品番号1.41350.1001）から購入した。

【0259】

溶液を以下のとおりに調製した：

溶液1：塩化メチレン中50mg/mLのシンバスタチン。シンバスタチンを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液2：塩化メチレン中100mg/mLのPLGA。PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液3：塩化メチレン中100mg/mLのPLA-PEG。PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液4：100mMのpH8のリン酸緩衝液中50mg/mLのポリビニルアルコール。

【0260】

水中油型エマルジョンを用いて、ナノキャリアを調製した。溶液1（0.15mL）、溶液2（0.75mL）、溶液3（0.25mL）、および溶液4（3mL）を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250を用いて、30%の振幅で60秒間、超音波で分解することによって、O/Wエマルジョンを調製した。O/Wエマルジョンを、70mMのpH8のリン酸緩衝液（30mL）を含むビーカーに加え、室温で2時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、75,600×gおよび4℃で35分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

【0261】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱によって測定した。ナノキャリア中のシンバスタチンの量を、HPLC分析によって測定した。懸濁液のmL当たりの、乾燥したナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0262】

【表3】

ナノキャリア ID	有効径 (nm)	シンバスタチン含量 (% w/w)
ナノキャリア 3	196	8.0

【0263】

ナノキャリア 4

オボアルブミンタンパク質のTおよびB細胞エピトープであることが知られている17アミノ酸のペプチドであるオボアルブミンペプチド323-339を、Bachem Americas Inc.（3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505；パーツ番号4065609）から購入した。ラパマイシンを、TSZ CHEM（185 Wilson Street, Framingham, MA 01702；製品カタログ番号R1017）から購入した。3：1のラクチド：グリコリド比および0.75dL/gの固有粘度を有するPLGAを、SurModics Pharmaceuticals（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211；製品コード7525 DLG 7A）から購入した。約5,000DaのPEGブロックと約20,000DaのPLAブロックとのPLA-P

EGブロックコポリマーを合成した。ポリビニルアルコール（85～89%加水分解されたもの）を、EMD Chemicals（製品番号1.41350.1001）から購入した。

【0264】

溶液を以下のとおりに調製した：

溶液1：希塩酸水溶液中20mg/mLのオボアルブミンペプチド323-339。オボアルブミンペプチドを0.13Mの塩酸溶液に室温で溶解させることによって溶液を調製した。

溶液2：塩化メチレン中50mg/mLのラパマイシン。ラパマイシンを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液3：塩化メチレン中100mg/mLのPLGA。PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液4：塩化メチレン中100mg/mLのPLA-PEG。PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液5：100mMのpH8のリン酸緩衝液中50mg/mLのポリビニルアルコール。

【0265】

第1の油中水型エマルジョンをまず調製した。溶液1（0.2mL）、溶液2（0.2mL）、溶液3（0.75mL）、および溶液4（0.25mL）を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250を用いて、50%の振幅で40秒間、超音波で分解することによって、W1/O1を調製した。次に、溶液5（3.0mL）を、第1のW1/O1エマルジョンと組み合わせて、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を用いて、30%の振幅で60秒間、超音波で分解することによって、第2のエマルジョン（W1/O1/W2）を調製した。

【0266】

W1/O1/W2エマルジョンを、70mMのpH8のリン酸緩衝液（30mL）を含むビーカーに加え、室温で2時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、21,000×gおよび4℃で45分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

【0267】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱によって測定した。ナノキャリア中のペプチドおよびラパマイシンの量を、HPLC分析によって測定した。懸濁液のmL当たりの、乾燥したナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0268】

【表4】

ナノキャリア ID	有効径 (nm)	ラパマイシン含量 (% w/w)	ペプチド含量 (% w/w)
4	227	9.0	2.5

【0269】

ナノキャリア5

オボアルブミンタンパク質のTおよびB細胞エピトープであることが知られている17アミノ酸のペプチドであるオボアルブミンペプチド323-339を、Bachem Americas Inc.（3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505；パーツ番号4065609）から購入した。シンバスタチンを、

LKT Laboratories, Inc. (2233 University Avenue West, St. Paul, MN 55114; 製品カタログ番号 S3449) から購入した。3:1 のラクチド:グリコリド比および 0.75 dL/g の固有粘度を有する PLGA を、SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 製品コード 7525 DLG 7A) から購入した。約 5,000 Da の PEG ブロックと約 20,000 Da の PLA ブロックとの PLA-PEG ブロックコポリマーを合成した。ポリビニルアルコール (85~89% 加水分解されたもの) を、EMD Chemicals (製品番号 1.41350.1001) から購入した。

【0270】

溶液を以下のとおりに調製した:

溶液 1: 希塩酸水溶液中 20 mg/mL のオボアルブミンペプチド 323-339。オボアルブミンペプチドを 0.13 M の塩酸溶液に室温で溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 2: 塩化メチレン中 50 mg/mL のシンバスタチン。シンバスタチンを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 3: 塩化メチレン中 100 mg/mL の PLGA。PLGA を純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 4: 塩化メチレン中 100 mg/mL の PLA-PEG。PLA-PEG を純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。

溶液 5: 100 mM の pH 8 のリン酸緩衝液中 50 mg/mL のポリビニルアルコール。

【0271】

第 1 の油中水型エマルジョンをまず調製した。溶液 1 (0.2 mL)、溶液 2 (0.15 mL)、溶液 3 (0.75 mL)、および溶液 4 (0.25 mL) を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250 を用いて、50% の振幅で 40 秒間、超音波で分解することによって、W1/O1 を調製した。次に、溶液 5 (3.0 mL) を、第 1 の W1/O1 エマルジョンと組み合わせて、10 秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250 を用いて、30% の振幅で 60 秒間、超音波で分解することによって、第 2 のエマルジョン (W1/O1/W2) を調製した。

【0272】

W1/O1/W2 エマルジョンを、70 mM の pH 8 のリン酸緩衝液 (30 mL) を含むビーカーに加え、室温で 2 時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、75,600 × g および 4°C で 35 分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約 10 mg/mL の最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

【0273】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱によって測定した。ナノキャリア中のペプチドおよびシンバスタチンの量を、HPLC 分析によって測定した。懸濁液の mL 当たりの、乾燥したナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0274】

【表 5】

ナノキャリア ID	有効径 (nm)	シンバスタチン含量 (% w/w)	ペプチド含量 (% w/w)
ナノキャリア 5	226	2.7	1.9

【0275】

生体内投与 1

B6．Cg-Tg (TcraTcrb) 425Cbn/J (OTII) およびC57BL/6 (B6) マウスから脾臓を採取し、機械的に解離させ、70 μ Mのふるいを通して別々にろ過して、単細胞懸濁液を得た。次に、精製されたCD4⁺CD25⁻細胞を、2工程プロセスで抽出した。Miltenyi Biotec AutoMACS磁気細胞選別機 (magnetic cell sorter) を用いて、脾臓細胞を、CD4⁺T細胞単離キットIIでまず標識し、CD25除去キットを用いて、標識されない画分からCD25⁺細胞を取り除いた。精製されたB6細胞を、細胞色素、カルボキシフルオセインサクシニミジルエステル (CFSE) で染色してから、精製されたOTII細胞と等しい濃度で混合した。次に、それらを、B6．SJL-Ptprca/BoyAi (CD45．1) レシピエントマウスへと静脈内注射した。

10

【0276】

翌日、レシピエントCD45．1マウスを、標的化された寛容原性合成ワクチン粒子 (t²SVP) で処置した。それらは、オボアルブミンペプチド (323-339) (OVA³²³⁻³³⁹)、ラパマイシン (Rapamycin) および/またはシンバスタチン (Simvastatin) の組合せを負荷され、皮下投与された。

【0277】

この注射は、寛容原性治療剤であり、続いて、それぞれ2週間の間隔を空けて更に4回の注射を行った。治療スケジュールが完了した後、レシピエントCD45．1動物を殺処分し、それらの脾臓および膝窩リンパ節を採取し、機械的に解離させ、70 μ Mのふるいを通して別々にろ過して、単細胞懸濁液を得た。RBC溶解緩衝液 (Stem Cell Technologies) を用いたインキュベーションによって脾臓細胞から赤血球 (RBC) を取り除き、脾臓およびリンパ節の両方において細胞計数を行った。

20

【0278】

脾臓またはリンパ節細胞を、10 U/mlのIL-2が補充されたCM (完全培地) 中で培養し、96ウェル丸底 (RB) プレート中でウェル当たり0.3 $\times$ 10⁶ 個の細胞で、OPIIを用いて再度刺激し、37℃、5%のCO₂でインキュベートした。細胞を、2日目に分割し、5日目に採取した。上清を収集し、凍結させる一方、フローサイトメトリによる表現型分析のために細胞を染色した。細胞を、Becton Dickinson FACS Cantoフローサイトメータにおいて分析した。

30

【0279】

生体内投与 2

B6．Cg-Tg (TcraTcrb) 425Cbn/J (OTII) およびC57BL/6 (B6) マウスから脾臓を採取し、機械的に解離させ、70 μ Mのふるいを通して別々にろ過して、単細胞懸濁液を得た。次に、精製されたCD4⁺CD25⁻細胞を、Miltenyi Biotec AutoMACS磁気細胞選別機を用いて、2工程プロセスで抽出した。脾臓細胞を、MiltenyiのCD4⁺T細胞単離キットIIを用いて標識した。次に、CD25除去キットを用いて、標識されていないCD4⁺T細胞画分からCD25⁺細胞を取り除いた。次に、B6マウスからの精製されたCD4細胞を、細胞色素、カルボキシフルオセインサクシニミジルエステル (CFSE) で染色してから、精製されたOTII細胞と等しい濃度で混合した。次に、それらを、B6．SJL-Ptprca/BoyAi (CD45．1) レシピエントマウスへと静脈内注射した。

40

【0280】

翌日、レシピエントCD45．1マウスを、標的化された寛容原性合成ワクチン粒子で処置した。それらは、オボアルブミンペプチド (323-339) (OVA³²³⁻³³⁹) と、ラパマイシン (Rapamycin) と、シンバスタチン (Simvastatin) との組合せを含み、皮下または静脈内投与された。

【0281】

治療スケジュールが完了した後、レシピエントCD45．1動物を殺処分し、それらの脾臓および膝窩リンパ節を採取し、機械的に解離させ、70 μ Mのふるいを通して別々に

50

ろ過して、単細胞懸濁液を得た。RBC溶解緩衝液 (Stem Cell Technologies) による組み込みによって脾臓細胞から赤血球 (RBC) を取り除き、脾臓およびリンパ節の両方において細胞計数を行った。

【0282】

脾臓またはリンパ節細胞を、 10 U/ml の IL-2 が補充された CM 中で培養し、96 ウェル丸底 (RB) プレート中でウェル当たり 0.3×10^6 個の細胞で、 $1\text{ }\mu\text{M}$ の OPII を用いて再度刺激し、 37°C 、5% の CO_2 でインキュベートした。細胞を、2 日目に分割し、5 日目に採取した。上清を収集し、凍結させる一方、フローサイトメトリーによる表現型分析のために細胞を染色した。細胞を、Becton Dickinson FACS Canto フローサイトメータにおいて分析した。

10

【0283】

結果

結果が、図 2 および 3 (免疫調節剤 1: ラパマイシン; 免疫調節剤 2: シンバスタチン) に示される。これらの図は、生体内の効果を示し、エフェクター免疫細胞の抗原特異的な増加 (expansion) が、免疫刺激分子を伴うかまたは伴わずに、抗原のみまたは抗原を含む合成ナノキャリアと比較して、抗原および免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアによって減少されることを示す。

【0284】

実施例 13: 合成ナノキャリアによる寛容原性免疫応答

材料および方法

20

ナノキャリア 1

オボアルブミンタンパク質を、Worthington Biochemical Corporation (730 Vassar Avenue, Lakewood, NJ 08701; 製品コード 3048) から購入した。3:1 のラクチド:グリコリド比および 0.75 dL/g の固有粘度を有する PLGA を、SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 製品コード 7525 DLG 7A) から購入した。ポリビニルアルコール (85~89% 加水分解されたもの) を、EMD Chemicals (製品番号 1.41350.1001) から購入した。約 5,000 Da の PEG ブロックと約 20,000 Da の PLA ブロックとの PLA-PEG ブロックコポリマーを合成した。コール酸ナトリウム水和物を、Sigma-Aldrich Corp. (3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103; 製品コード C6445) から購入した。

30

【0285】

溶液を以下のとおりに調製した:

溶液 1: リン酸緩衝生理食塩溶液中 50 mg/mL のオボアルブミン。オボアルブミンをリン酸緩衝生理食塩溶液に室温で溶解させることによって溶液を調製した。溶液 2: 塩化メチレン中 100 mg/mL の PLGA。PLGA を純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液 3: 塩化メチレン中 100 mg/mL の PLA-PEG。PLA-PEG を純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液 4: 100 mM の pH 8 のリン酸緩衝液中 50 mg/mL のポリビニルアルコールおよび 10 mg/mL のコール酸ナトリウム水和物。

40

【0286】

第 1 の油中水型エマルジョンをまず調製した。溶液 1 (0.2 mL)、溶液 2 (0.75 mL)、および溶液 3 (0.25 mL) を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250 を用いて、50% の振幅で 40 秒間、超音波で分解することによって、W1/O1 を調製した。次に、溶液 4 (3.0 mL) を、第 1 の W1/O1 エマルジョンと組み合わせて、10 秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250 を用いて、30% の振幅で 60 秒間、超音波で分解することによって、第 2 のエマルジョン (W1/O1/W2) を調製した

50

。W1／O1／W2エマルジョンを、70mMのpH8のリン酸緩衝液（30mL）を含むビーカーに加え、室温で2時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、75,600×gおよび4℃で35分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

【0287】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱によって測定した。ナノキャリア中のタンパク質の量を、オーフタルアルデヒド蛍光測定法によって測定した。懸濁液のmL当たりの、乾燥したナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0288】

【表6】

ナノキャリア ID	有効径 (nm)	タンパク質含量 (% w/w)
1	191	10.1

【0289】

ナノキャリア2

オボアルブミンタンパク質を、Worthington Biochemical Corporation（730 Vassar Avenue, Lakewood, NJ 08701；製品コード3048）から購入した。ラパマイシンを、TSZ CHEM（185 Wilson Street, Framingham, MA 01702；製品カタログ番号R1017）から購入した。3：1のラクチド：グリコリド比および0.75dL/gの固有粘度を有するPLGAを、SurModics Pharmaceuticals（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211；製品コード7525 DLG 7A）から購入した。約5,000DaのPEGブロックと約20,000DaのPLAブロックとのPLA-PEGブロックコポリマーを合成した。ポリビニルアルコール（85～89%加水分解されたもの）を、EMD Chemicals（製品番号1.41350.1001）から購入した。コール酸ナトリウム水和物を、Sigma-Aldrich Corp.（3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103；製品コードC6445）から購入した。

【0290】

溶液を以下のとおりに調製した：

溶液1：リン酸緩衝生理食塩溶液中50mg/mLのオボアルブミン。オボアルブミンをリン酸緩衝生理食塩溶液に室温で溶解させることによって溶液を調製した。溶液2：塩化メチレン中50mg/mLのラパマイシン。ラパマイシンを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液3：塩化メチレン中100mg/mLのPLGA。PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液4：塩化メチレン中100mg/mLのPLA-PEG。PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液5：100mMのpH8のリン酸緩衝液中50mg/mLのポリビニルアルコールおよび10mg/mLのコール酸ナトリウム水和物。

【0291】

第1の油中水型エマルジョンをまず調製した。溶液1（0.2mL）、溶液2（0.2mL）、溶液3（0.75mL）、および溶液4（0.25mL）を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250を用いて、

50%の振幅で40秒間、超音波で分解することによって、W1/O1を調製した。次に、溶液5(3.0mL)を、第1のW1/O1エマルジョンと組み合わせて、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を用いて、30%の振幅で60秒間、超音波で分解することによって、第2のエマルジョン(W1/O1/W2)を調製した。W1/O1/W2エマルジョンを、70mMのpH8のリン酸緩衝液(30mL)を含むビーカーに加え、室温で2時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、75,600×gおよび4℃で35分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

10

【0292】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱によって測定した。ナノキャリア中のラパマイシンの量を、HPLC分析によって測定した。ナノキャリア中のタンパク質の量を、オーフタルアルデヒド蛍光測定法によって測定した。懸濁液のmL当たりの、乾燥したナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0293】

【表7】

ナノキャリア ID	有効径 (nm)	ラパマイシン含量 (% w/w)	タンパク質含量 (% w/w)
2	172	7.4	7.6

20

【0294】

免疫化

この実験の目的は、抗原特異的な免疫グロブリンを測定することによって、進行中の抗体応答に対する封入(t^2 SV P)免疫抑制剤の効果を評価することであった。1つの群の動物を、対照として免疫化しないままとした。2つの群の動物に、オボアルブミンの「受動投与(passive administration)」または3回の注射(0日目、14日目および28日目)によるOVAおよびCpGによる能動免疫化を用いて免疫を与えた後、抗体力価を評価し、1週間または2週間休薬した。更に2つの群に、同じ免疫化を行ったが、治療を行うと同時に、2週間ごとに動物にブースト(boost)を行った。これらの群のそれぞれを、誘導されたIg力価を調節するための様々な治療剤の能力を試験するために3つのサブグループに分けた。対照サブグループには、寛容原性治療剤を投与しなかった。OVAタンパク質のみを有するかまたは免疫抑制剤と組み合わせられたNPを含む2つの他の治療剤を、他のサブグループに適用した。

30

【0295】

免疫化のために、動物に、1肢当たり20 μ lのOVA+CpG(12.5 μ gのOVA+10 μ gのCpG)を、両方の後肢に皮下投与するかまたは100 μ l中25 μ gのOVAを静脈内投与した。寛容原性治療剤は、10 μ gのOVAを用いた200 μ lの t^2 SV Pの静脈内投与を含んでいた。ナノ粒子を、500 μ g/mLのOVA含量で提供した。同じ量のOVAが全ての群に注射されるように t^2 SV Pを希釈した。

40

【0296】

IgGの測定

IgG抗体のレベルを測定した。PBS中のBlocker Casein(Thermo Fisher、カタログ番号37528)を、希釈剤として使用した。10mLのTween-20(Sigma、カタログ番号P9416-100mL)を、2リットルの10×PBSストック(PBS:OmniPur(登録商標)10×PBS液体濃縮物、4L、EMD Chemicals、カタログ番号6505)および18リットルの脱

50

イオン水に加えることによって調製されたPBS中0.05%のTween-20を、洗浄緩衝液として使用した。

【0297】

5mg/mlのストック濃度におけるOVAタンパク質を、コーティング材料として使用した。5μg/mlへの1:1000の希釈を、作用濃度として使用した。アッセイプレートの各ウェルを、ウェル当たり100μlの希釈されたOVAでコーティングし、プレートを、密封フィルム(VWRカタログ番号60941-120)で密封し、4℃で一晩インキュベートした。Costar9017の96ウェル平底プレートを、アッセイプレート、Costar9017として使用した。

【0298】

低結合ポリプロピレン96ウェルプレートまたは管を、セットアッププレートとして使用し、セットアッププレートにおいて、アッセイプレートに移す前に試料を調製した。セットアッププレートは、抗原を全く含有しないため、血清抗体は、試料のセットアップ中にプレートに結合しなかった。セットアッププレートを試料の調製に使用して、抗原でコーティングされたプレートを用いて試料を調製した場合に試料の調製またはピペット操作中に起こり得る結合を最小限に抑えた。セットアッププレートにおいて試料を調製する前に、ウェルを希釈剤で被覆して、あらゆる非特異的な結合を阻止し、プレートを密封し、4℃で一晩インキュベートした。

【0299】

アッセイプレートを、洗浄緩衝液で3回洗浄し、洗浄緩衝液を、最後の洗浄の後、ウェルから完全に吸引した。洗浄後、300μlの希釈剤を、アッセイプレートの各ウェルに加えて、非特異的な結合を阻止し、プレートを、室温で少なくとも2時間インキュベートした。血清試料を、適切な出発希釈でセットアッププレートにおいて調製した。出発希釈を、希釈剤を用いて1.5mlの管中で調製した場合もあった。適切な出発希釈を、利用できる場合には以前のデータに基づいて決定した。以前のデータを利用できない場合、最低出発希釈は、1:40であった。希釈後、200μlの出発希釈の血清試料を、セットアッププレートの適切なウェルから移した。

【0300】

例示的なセットアッププレートの配置が以下のとおりに記載される：カラム2および11は、1μg/mL(1:4000の希釈率)に希釈された、抗オボアルブミンモノクローナルIgG2bアイソタイプ(AbCam、a b 1 7 2 9 1)標準を含んでいた。カラム3~10は、(適切な希釈率で)血清試料を含んでいた。カラム1および12は、周辺効果による測定の変りを避けるために、試料または標準に使用しなかった。その代わりに、カラム1および12は、200μlの希釈剤を含んでいた。1:40で希釈された正常なマウスの血清を陰性対照として使用した。0.5mg/mLのストック(BD Bioscience)から1:500で希釈された抗マウスIgG2aを、アイソタイプ対照として使用した。

【0301】

全ての試料をセットアッププレートにおいて調製してから、プレートを密封し、アッセイプレートのブロックが完了するまで4℃で貯蔵した。アッセイプレートを、洗浄緩衝液で3回洗浄し、最後の洗浄後、洗浄緩衝液を完全に吸引した。洗浄後、100μLの希釈剤を、アッセイプレートの行B~Hにおいて全てのウェルに加えた。12チャンネルピペットを用いて、試料をセットアッププレートからアッセイプレートに移した。150μlの希釈された血清を上下に3回ピペット操作することによって、試料を移動前に混合した。混合後、150μlの各試料を、セットアッププレートから移し、それぞれのアッセイプレートの行Aに加えた。

【0302】

各試料の出発希釈を、セットアッププレートから、アッセイプレートの行Aへと移してから、連続希釈を、アッセイプレートにおいて以下のようにピペット操作した：50μlの各血清試料を、12チャンネルピペットを用いて行Aから取り出し、行Bの各ウェルに

10

20

30

40

50

予め加えられた100 μ lの希釈剤と混合した。この工程を、プレート全体に至るまで繰り返した。最終行の希釈をピペット操作した後、50 μ lの流体を最終行のウェルから除去し、廃棄し、アッセイプレートのウェルごとに100 μ lの最終的な体積を得た。試料希釈をアッセイプレートにおいて調製してから、プレートを室温で少なくとも2時間インキュベートした。

【0303】

インキュベーションの後、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。検出抗体（HRPを共役させたヤギ抗マウス抗IgG、AbCam ab98717）を、希釈剤中1:1500（0.33 μ g/mL）で希釈し、100 μ lの希釈された抗体を各ウェルに加えた。プレートを室温で1時間インキュベートし、次に、洗浄緩衝液で3回洗浄し、各洗浄工程は少なくとも30秒間の浸漬時間を含んでいた。

10

【0304】

洗浄後、検出基質をウェルに加えた。等しい部の基質Aおよび基質B（BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set、カタログ番号555214）を、アッセイプレートへの添加の直前に組み合わせて、100 μ lの混合基質溶液を各ウェルに加え、暗所で10分間インキュベートした。10分後に50 μ lの停止液（2NのH₂SO₄）を各ウェルに加えることによって、反応を停止させた。停止液を加えた直後のウェルの光学密度（OD）を、プレートリーダーにおいて450nmで評価した（570nmにおける読み取り値を差し引く）。Molecular DeviceのソフトウェアSoftMax Pro v5.4を用いて、データ分析を行った。場合によっては、希釈率をx軸（対数目盛り）におよびOD値をy軸（線形目盛り）にとって、4つのパラメータのロジスティック曲線適合グラフを作成し、各試料についての最大値の半値（EC50）を決定した。配置の上部におけるプレートテンプレートを、各試料の希釈率（カラム当たり1）を反映するように調整した。

20

【0305】

結果

図4は、ペプチドのみを含むナノキャリアと比較した際の、ペプチド抗原および免疫抑制剤を含むナノキャリアによる抗原特異的な抗体産生の減少を示す。パネル3は、強力な免疫促進剤であるCpGの使用が、場合によってはラパマイシンを含む合成ナノキャリアの寛容原性効果を打ち消したことを示す。

30

【0306】

実施例14：合成ナノキャリアによる寛容原性免疫応答

材料および方法

ナノキャリアを、上記の実施例（実施例13）と同様に調製した。

【0307】

免疫化

この実験の目的は、免疫原およびNP治療を同時に受けた動物における抗原特異的な免疫グロブリンを測定することによって、起こっている抗体応答に対する封入（t²SVp）免疫抑制剤の効果を評価することであった。1つの群の動物を、対照として免疫化しないままとした（但し、治療を行った）。第2の群の動物に、オボアルブミンの「受動投与」を用いて免疫を与え、第3の群の肩甲下領域に、OVAおよびCpGで免疫を与えた。これらの群のそれぞれに、ナノ粒子（NP）の2週間に1回の注射（biweekly injection）を与え、ブーストの前日に、抗OVA Igレベルを監視した。免疫化のために、動物に、100 μ lのOVA+CpGを皮下（肩甲下）投与するかまたは100 μ l中25 μ gのOVAを静脈内投与した。寛容原性治療剤は、100 μ lのt²SVpの静脈内投与を含んでいた。ナノキャリアを5mg/mLで提供した。同じ量のOVAが全ての群に注射されるようにt²SVpを希釈した。注射を、0日目、14日目、28日目、42日目、56日目に行った。

40

【0308】

IgGの測定

50

I g G 抗体のレベルを測定した。P B S 中の B l o c k e r C a s e i n (T h e r m o F i s h e r 、カタログ番号 3 7 5 2 8) を、希釈剤として使用した。1 0 m l の T w e e n - 2 0 (S i g m a 、カタログ番号 P 9 4 1 6 - 1 0 0 m L) を、2 リットルの 1 0 × P B S ストック (P B S : O m n i P u r (登録商標) 1 0 × P B S 液体濃縮物、4 L 、E M D C h e m i c a l s 、カタログ番号 6 5 0 5) および 1 8 リットルの脱イオン水に加えることによって調製された P B S 中 0 . 0 5 % の T w e e n - 2 0 を、洗浄緩衝液として使用した。

【0309】

5 m g / m l のストック濃度における O V A タンパク質を、コーティング材料として使用した。5 μ g / m l への 1 : 1 0 0 0 の希釈を、作用濃度として使用した。アッセイプレートの各ウェルを、ウェル当たり 1 0 0 μ l の希釈された O V A でコーティングし、プレートを、密封フィルム (V W R カタログ番号 6 0 9 4 1 - 1 2 0) で密封し、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。C o s t a r 9 0 1 7 の 9 6 ウェル平底プレートを、アッセイプレート、C o s t a r 9 0 1 7 として使用した。

【0310】

低結合ポリプロピレン 9 6 ウェルプレートまたは管を、セットアッププレートとして使用し、セットアッププレートにおいて、アッセイプレートに移す前に試料を調製した。セットアッププレートは、抗原を全く含有しないため、血清抗体は、試料のセットアップ中にプレートに結合しなかった。セットアッププレートを試料の調製に使用して、抗原でコーティングされたプレートを用いて試料を調製した場合に試料の調製またはピペット操作中に起こり得る結合を最小限に抑えた。セットアッププレートにおいて試料を調製する前に、ウェルを希釈剤で被覆して、あらゆる非特異的な結合を阻止し、プレートを密封し、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。

【0311】

アッセイプレートを、洗浄緩衝液で 3 回洗浄し、洗浄緩衝液を、最後の洗浄の後、ウェルから完全に吸引した。洗浄後、3 0 0 μ l の希釈剤を、アッセイプレートの各ウェルに加えて、非特異的な結合を阻止し、プレートを、室温で少なくとも 2 時間インキュベートした。血清試料を、適切な出発希釈でセットアッププレートにおいて調製した。出発希釈を、希釈剤を用いて 1 . 5 m l の管中で調製した場合もあった。適切な出発希釈を、利用できる場合には以前のデータに基づいて決定した。以前のデータを利用できない場合、最低出発希釈は、1 : 4 0 であった。希釈後、2 0 0 μ l の出発希釈の血清試料を、セットアッププレートの適切なウェルから移した。

【0312】

例示的なセットアッププレートの配置が以下のとおりに記載される：カラム 2 および 1 1 は、1 μ g / m L (1 : 4 0 0 0 の希釈率) に希釈された、抗オポアルブミンモノクローナル I g G 2 b アイソタイプ (A b C a m 、 a b 1 7 2 9 1) 標準を含んでいた。カラム 3 ~ 1 0 は、(適切な希釈率で) 血清試料を含んでいた。カラム 1 および 1 2 は、周辺効果による測定の偏りを避けるために、試料または標準に使用しなかった。その代わりに、カラム 1 および 1 2 は、2 0 0 μ l の希釈剤を含んでいた。1 : 4 0 で希釈された正常なマウスの血清を陰性対照として使用した。0 . 5 m g / m L のストック (B D B i o s c i e n c e) から 1 : 5 0 0 で希釈された抗マウス I g G 2 a を、アイソタイプ対照として使用した。

【0313】

全ての試料をセットアッププレートにおいて調製してから、プレートを密封し、アッセイプレートのブロックが完了するまで 4 $^{\circ}$ C で貯蔵した。アッセイプレートを、洗浄緩衝液で 3 回洗浄し、最後の洗浄後、洗浄緩衝液を完全に吸引した。洗浄後、1 0 0 μ L の希釈剤を、アッセイプレートの行 B ~ H において全てのウェルに加えた。1 2 チャンネルピペットを用いて、試料をセットアッププレートからアッセイプレートに移した。1 5 0 μ l の希釈された血清を上下に 3 回ピペット操作することによって、試料を移動前に混合した。混合後、1 5 0 μ l の各試料を、セットアッププレートから移し、それぞれのアッセイ

プレートの行Aに加えた。

【0314】

各試料の出発希釈を、セットアッププレートから、アッセイプレートの行Aへと移してから、連続希釈を、アッセイプレートにおいて以下のようにピペット操作した：50 μ lの各血清試料を、12チャンネルピペットを用いて行Aから取り出し、行Bの各ウェルに予め加えられた100 μ lの希釈剤と混合した。この工程を、プレート全体に至るまで繰り返した。最終行の希釈をピペット操作した後、50 μ lの流体を最終行のウェルから除去し、廃棄し、アッセイプレートのウェルごとに100 μ lの最終的な体積を得た。試料希釈をアッセイプレートにおいて調製してから、プレートを室温で少なくとも2時間インキュベートした。

10

【0315】

インキュベーションの後、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。検出抗体（HRPを共役させたヤギ抗マウス抗IgG、AbCam ab98717）を、希釈剤中1：1500（0.33 μ g/mL）で希釈し、100 μ lの希釈された抗体を各ウェルに加えた。プレートを室温で1時間インキュベートし、次に、洗浄緩衝液で3回洗浄し、各洗浄工程は少なくとも30秒間の浸漬時間を含んでいた。

【0316】

洗浄後、検出基質をウェルに加えた。等しい部の基質Aおよび基質B（BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set、カタログ番号555214）を、アッセイプレートへの添加の直前に組み合わせて、100 μ lの混合基質溶液を各ウェルに加え、暗所で10分間インキュベートした。10分後に50 μ lの停止液（2NのH₂SO₄）を各ウェルに加えることによって、反応を停止させた。停止液を加えた直後のウェルの光学密度（OD）を、プレートリーダーにおいて450nmで評価した（570nmにおける読み取り値を差し引く）。Molecular DeviceのソフトウェアSoftMax Pro v5.4を用いて、データ分析を行った。場合によっては、希釈率をx軸（対数目盛り）におよびOD値をy軸（線形目盛り）にとって、4つのパラメータのロジスティック曲線適合グラフを作成し、各試料についての最大値の半値（EC₅₀）を決定した。配置の上部におけるプレートテンプレートを、各試料の希釈率（カラム当たり1）を反映するように調整した。

20

【0317】

結果

図5は、抗原のみを含むナノキャリアと比較した際の、抗原および免疫抑制剤を含むナノキャリアによる抗原特異的な抗体産生の減少を示す。同様に、データはまた、強力な免疫促進剤であるCpGの使用が、場合によってはラパマイシンを含む合成ナノキャリアの寛容原性効果を打ち消したことを示す。

30

【0318】

実施例15：免疫応答に対する抗原および免疫抑制剤を含むナノキャリアの効果の評価
材料および方法

ナノキャリア1

オボアルブミンタンパク質のTおよびB細胞エпитープであることが知られている17アミノ酸のペプチドであるオボアルブミンペプチド323-339を、Bachem Americas Inc.（3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505；パーツ番号4065609）から購入した。3：1のラクチド：グリコリド比および0.75dL/gの固有粘度を有するPLGAを、SurModics Pharmaceuticals（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211；製品コード7525 DLG 7A）から購入した。約5,000DaのPEGブロックと約20,000DaのPLAブロックとのPLA-PEGブロックコポリマーを合成した。ポリビニルアルコール（85～89%加水分解されたもの）を、EMD Chemicals（製品番号1.41350.1001）から購入した。

40

50

【0319】

溶液を以下のとおりに調製した：

溶液1：希塩酸水溶液中20mg/mLのオボアルブミンペプチド323-339。オボアルブミンペプチドを0.13Mの塩酸溶液に室温で溶解させることによって溶液を調製した。溶液2：塩化メチレン中100mg/mLのPLGA。PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液3：塩化メチレン中100mg/mLのPLA-PEG。PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液4：100mMのpH8のリン酸緩衝液中50mg/mLのポリビニルアルコール。

【0320】

第1の油中水型エマルジョンをまず調製した。溶液1（0.2mL）、溶液2（0.75mL）、および溶液3（0.25mL）を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250を用いて、50%の振幅で40秒間、超音波で分解することによって、W1/O1を調製した。次に、溶液4（3.0mL）を、第1のW1/O1エマルジョンと組み合わせて、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を用いて、30%の振幅で60秒間、超音波で分解することによって、第2のエマルジョン（W1/O1/W2）を調製した。W1/O1/W2エマルジョンを、70mMのpH8のリン酸緩衝液（30mL）を含むビーカーに加え、室温で2時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、75,600×gおよび4℃で35分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

【0321】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱によって測定した。ナノキャリア中のペプチドの量を、HPLC分析によって測定した。懸濁液のmL当たりの、乾燥したナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

【0322】

【表8】

ナノキャリア ID	有効径 (nm)	ペプチド含量 (% w/w)
1	234	2.1

【0323】

ナノキャリア2

オボアルブミンタンパク質のTおよびB細胞エпитープであることが知られている17アミノ酸のペプチドであるオボアルブミンペプチド323-339を、Bachem Americas Inc.（3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505；パーツ番号4065609）から購入した。ラパマイシンを、TSZ CHEM（185 Wilson Street, Framingham, MA 01702；製品カタログ番号R1017）から購入した。3：1のラクチド：グリコリド比および0.75dL/gの固有粘度を有するPLGAを、SurModics Pharmaceuticals（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211；製品コード7525 DLG 7A）から購入した。約5,000DaのPEGブロックと約20,000DaのPLAブロックとのPLA-PEGブロックコポリマーを合成した。ポリビニルアルコール（85～89%加水分解されたもの）を、EMD Chemicals（製品番号1.41350.1001）から購

入した。

【0324】

溶液を以下のとおりに調製した：

溶液1：希塩酸水溶液中20mg/mLのオボアルブミンペプチド323-339。オボアルブミンペプチドを0.13Mの塩酸溶液に室温で溶解させることによって溶液を調製した。溶液2：塩化メチレン中50mg/mLのラパマイシン。ラパマイシンを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液3：塩化メチレン中100mg/mLのPLGA。PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液4：塩化メチレン中100mg/mLのPLA-PEG。PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解させることによって溶液を調製した。溶液5：100mMのpH8のリン酸緩衝液中50mg/mLのポリビニルアルコール。

10

【0325】

第1の油中水型エマルジョンをまず調製した。溶液1（0.2mL）、溶液2（0.2mL）、溶液3（0.75mL）、および溶液4（0.25mL）を、小型の圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250を用いて、50%の振幅で40秒間、超音波で分解することによって、W1/O1を調製した。次に、溶液5（3.0mL）を、第1のW1/O1エマルジョンと組み合わせて、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を用いて、30%の振幅で60秒間、超音波で分解することによって、第2のエマルジョン（W1/O1/W2）を調製した。W1/O1/W2エマルジョンを、70mMのpH8のリン酸緩衝液（30mL）を含むビーカーに加え、室温で2時間攪拌して、塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心分離管に移し、21,000×gおよび4℃で45分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させることによって、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終的なナノキャリア分散体のために、ペレットを、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させた。

20

【0326】

ナノキャリアのサイズを、動的光散乱によって測定した。ナノキャリア中のペプチドおよびラパマイシンの量を、HPLC分析によって測定した。懸濁液のmL当たりの、乾燥したナノキャリアの総質量を、重量法によって測定した。

30

【0327】

【表9】

ナノキャリア ID	有効径 (nm)	ラパマイシン含量 (% w/w)	ペプチド含量 (% w/w)
2	227	9.0	2.5

【0328】

免疫化

動物に治療を行うと同時に、2週間ごとに動物に免疫を与えた。これらの群のそれぞれを、誘導されたIg力価を調節するための様々な治療剤の能力を試験するためにサブグループに分けた。対照サブグループには、寛容原性治療剤を投与しなかった。2つのサブグループに、OVA₃₂₃₋₃₃₉ペプチドのみを有するかまたはラパマイシンと組み合わせられたナノキャリアを投与した。

40

【0329】

免疫化を、以下の経路を介して行った（値は動物ごとの値である）：1肢当たり20μLのOVA+CpG（12.5μgのOVA+10μgのCpG）を、両方の後肢に皮下投与。寛容原性治療剤を、以下の経路を介して投与した（値は動物ごとの値である）：2

50

00 μ l のナノキャリアを、100 μ g/ml のOVA₃₂₃₋₃₃₉ 含量で与えた。

【0330】

IgG の測定

IgG 抗体のレベルを測定した。PBS 中の Blocker Casein (Thermo Fisher、カタログ番号 37528) を、希釈剤として使用した。10ml の Tween-20 (Sigma、カタログ番号 P9416-100mL) を、2 リットルの 10×PBS ストック (PBS: Omni Pur (登録商標) 10×PBS 液体濃縮物、4L、EMD Chemicals、カタログ番号 6505) および 18 リットルの脱イオン水に加えることによって調製された PBS 中 0.05% の Tween-20 を、洗浄緩衝液として使用した。

10

【0331】

5mg/ml のストック濃度における OVA タンパク質を、コーティング材料として使用した。5 μ g/ml への 1:1000 の希釈を、作用濃度として使用した。アッセイプレートの各ウェルを、ウェル当たり 100 μ l の希釈された OVA でコーティングし、プレートを、密封フィルム (VWR カタログ番号 60941-120) で密封し、4℃で一晩インキュベートした。Costar 9017 の 96 ウェル平底プレートを、アッセイプレート、Costar 9017 として使用した。

【0332】

低結合ポリプロピレン 96 ウェルプレートまたは管を、セットアッププレートとして使用し、セットアッププレートにおいて、アッセイプレートに移す前に試料を調製した。セットアッププレートは、抗原を全く含有しないため、血清抗体は、試料のセットアップ中にプレートに結合しなかった。セットアッププレートを試料の調製に使用して、抗原でコーティングされたプレートを用いて試料を調製した場合に試料の調製またはピペット操作中に起こり得る結合を最小限に抑えた。セットアッププレートにおいて試料を調製する前に、ウェルを希釈剤で被覆して、あらゆる非特異的な結合を阻止し、プレートを密封し、4℃で一晩インキュベートした。

20

【0333】

アッセイプレートを、洗浄緩衝液で 3 回洗浄し、洗浄緩衝液を、最後の洗浄の後、ウェルから完全に吸引した。洗浄後、300 μ l の希釈剤を、アッセイプレートの各ウェルに加えて、非特異的な結合を阻止し、プレートを、室温で少なくとも 2 時間インキュベートした。血清試料を、適切な出発希釈でセットアッププレートにおいて調製した。出発希釈を、希釈剤を用いて 1.5ml の管中で調製した場合もあった。適切な出発希釈を、利用できる場合には以前のデータに基づいて決定した。以前のデータを利用できない場合、最低出発希釈は、1:40 であった。希釈後、200 μ l の出発希釈の血清試料を、セットアッププレートの適切なウェルから移した。

30

【0334】

例示的なセットアッププレートの配置が以下のとおりに記載される：カラム 2 および 11 は、1 μ g/mL (1:4000 の希釈率) に希釈された、抗オボアルブミンモノクローナル IgG2b アイソタイプ (AbCam、ab17291) 標準を含んでいた。カラム 3~10 は、(適切な希釈率で) 血清試料を含んでいた。カラム 1 および 12 は、周辺効果による測定の偏りを避けるために、試料または標準に使用しなかった。その代わりに、カラム 1 および 12 は、200 μ l の希釈剤を含んでいた。1:40 で希釈された正常なマウスの血清を陰性対照として使用した。0.5mg/mL のストック (BD Bioscience) から 1:500 で希釈された抗マウス IgG2a を、アイソタイプ対照として使用した。

40

【0335】

全ての試料をセットアッププレートにおいて調製してから、プレートを密封し、アッセイプレートのブロックが完了するまで 4℃で貯蔵した。アッセイプレートを、洗浄緩衝液で 3 回洗浄し、最後の洗浄後、洗浄緩衝液を完全に吸引した。洗浄後、100 μ L の希釈剤を、アッセイプレートの行 B~H において全てのウェルに加えた。12 チャンネルピペ

50

ットを用いて、試料をセットアッププレートからアッセイプレートに移した。150 μ l の希釈された血清を上下に3回ピペット操作することによって、試料を移動前に混合した。混合後、150 μ l の各試料を、セットアッププレートから移し、それぞれのアッセイプレートの行Aに加えた。

【0336】

各試料の出発希釈を、セットアッププレートから、アッセイプレートの行Aへと移してから、連続希釈を、アッセイプレートにおいて以下のようにピペット操作した：50 μ l の各血清試料を、12チャンネルピペットを用いて行Aから取り出し、行Bの各ウェルに予め加えられた100 μ l の希釈剤と混合した。この工程を、プレート全体に至るまで繰り返した。最終行の希釈をピペット操作した後、50 μ l の流体を最終行のウェルから除去し、廃棄し、アッセイプレートのウェルごとに100 μ l の最終的な体積を得た。試料希釈をアッセイプレートにおいて調製してから、プレートを室温で少なくとも2時間インキュベートした。

10

【0337】

インキュベーションの後、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。検出抗体（HRPを共役させたヤギ抗マウス抗IgG、AbCam ab98717）を、希釈剤中1：1500（0.33 μ g/mL）で希釈し、100 μ l の希釈された抗体を各ウェルに加えた。プレートを室温で1時間インキュベートし、次に、洗浄緩衝液で3回洗浄し、各洗浄工程は少なくとも30秒間の浸漬時間を含んでいた。

【0338】

20

洗浄後、検出基質をウェルに加えた。等しい部の基質Aおよび基質B（BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set、カタログ番号555214）を、アッセイプレートへの添加の直前に組み合わせて、100 μ l の混合基質溶液を各ウェルに加え、暗所で10分間インキュベートした。10分後に50 μ l の停止液（2NのH₂SO₄）を各ウェルに加えることによって、反応を停止させた。停止液を加えた直後のウェルの光学密度（OD）を、プレートリーダーにおいて450nmで評価した（570nmにおける読み取り値を差し引く）。Molecular DeviceのソフトウェアSoftMax Pro v5.4を用いて、データ分析を行った。場合によっては、希釈率をx軸（対数目盛り）におよびOD値をy軸（線形目盛り）にとって、4つのパラメータのロジスティック曲線適合グラフを作成し、各試料についての最大値の半値（EC50）を決定した。配置の上部におけるプレートテンプレートを、各試料の希釈率（カラム当たり1）を反映するように調整した。

30

【0339】

OVA+分裂B細胞の%の測定

オボアルブミン+B細胞分裂を、フローサイトメトリーによって評価した。実験動物からの脾細胞を、長期間の細胞標識に好適なチオール反応性の蛍光プローブであるCell Tracker Orange（CTO）で染色し、オボアルブミンタンパク質またはペプチドとともに5%のCO₂で37°Cの完全培地において3日間培養した。3日目に、細胞を洗浄し、抗CD16/32抗体でブロックし、次に、B220およびCD19に特異的な共役された抗体で染色した。Alexa 647共役オボアルブミンタンパク質も、オボアルブミン特異的BCRを標識するために、細胞とともにインキュベートした。CD19+B220+OVA-Alexa647+であったそれらの脾細胞を、CTO染色の差を比較することによって、増殖について評価した。CTO染色濃度が低い（CTO low）ものを、増殖オボアルブミン+B細胞として標識し、パーセンテージを定量化するために、CTO染色濃度が高い（CTO high）オボアルブミン+B細胞と比較した。

40

【0340】

結果

図6は、ovaペプチドおよび免疫抑制剤ラパマイシンを含む合成ナノキャリアの投与による、抗原特異的なIgGレベルの減少を示す。図7も、合成ナノキャリアによる減少

50

(但し、抗原特異的なB細胞の数の減少)を示す。これらの結果は、ovaペプチド(MHCクラスII拘束性エピトープを含む)および免疫抑制剤に結合された合成ナノキャリアによる望ましくない免疫応答の減少を示す。これらの結果は、抗原特異的なB細胞の減少が利益をもたらす得るあらゆる状況に関連する。

【0341】

実施例16：アレルギー性喘息に対する抗原および免疫抑制剤を含むナノキャリアの効果の評価

ナノキャリア

ナノキャリアを、上で提供される方法に従って調製した(実施例15)。

【0342】

免疫化

ナノキャリアを解凍し、平衡化した。初期希釈は、10倍ストック溶液であり、これを、OVA₃₂₃₋₃₃₉中100μg/mlの濃度に、即ち1倍溶液へと更に希釈した。この1倍溶液を、静脈注射当たり200μlで注射に使用した。動物をOVAタンパク質(OVA)で免疫化し、OVA₃₂₃₋₃₃₉ペプチドで処理して、B細胞抗原の非存在下で免疫応答を制御するナノキャリアの能力を評価した。免疫化経路は以下のとおりであった：免疫学的にナイーブな雌のBalb/Cマウスのそれぞれにつき400μlで、10μgのOVA+4mgのミョウバンの腹腔内投与。実験群は、それぞれ5匹の動物からなっていた。脾臓細胞を、CFSEまたはCTOを用いて抗原で再度刺激して、Ag特異的な増殖の量を測定した。

【0343】

特定の型の免疫細胞のレベル

FCSSファイルを、FlowJoソフトウェアを用いて分析した。7AAD陽性細胞(死細胞を標識する核染料)陽性細胞を、除外し、CD4、CD8、Gr-1、F4/80、B220、TCRbおよびCD11bの細胞形態に依存する発現を定量化した。

T細胞サブセットについてのゲーティング法→7AAD-F4/80-GR-1-TCRb+CD4+/-CD8+/-

B細胞サブセットについてのゲーティング法→7AAD-B220+TCRb-

好酸球についてのゲーティング法→7AAD-F4/80-Gr-1+TCRb-CD11b+Gr-1+

【0344】

分裂CD4+T細胞の%の測定

オボアルブミン反応性CD4⁺T細胞の頻度を、フローサイトメトリーによって計算した。実験動物からの脾細胞を、長期間の細胞標識に好適なチオール反応性の蛍光プローブであるCFSEで染色し、オボアルブミンタンパク質とともに5%のCO₂の37℃の完全培地において3日間培養した。3日目に、細胞を洗浄し、抗CD16/32抗体でブロックし、次に、TCR-CD4およびCD8aに特異的な共役された抗体で染色した。TCR+CD4またはTCR+CD8a+であったそれらの脾細胞を、CFSE染色の差を比較することによって、増殖について評価した。

【0345】

結果

図8および9は、動物モデルにおけるナノキャリアの有効性を示す。具体的には、図8は、OVA₃₂₃₋₃₃₉(MHCクラスII拘束性エピトープ)および免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアで処理された動物被験体からの洗浄試料におけるCD4+T細胞の数の減少を示す。図9は、同じ処理の結果としての分裂CD4+T細胞のパーセンテージの低下を示す。

10

20

30

40

【図 1】

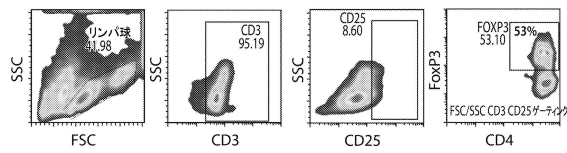


図 1

【図 2】

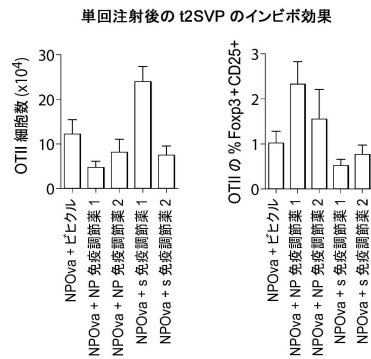


図 2

【図 3】

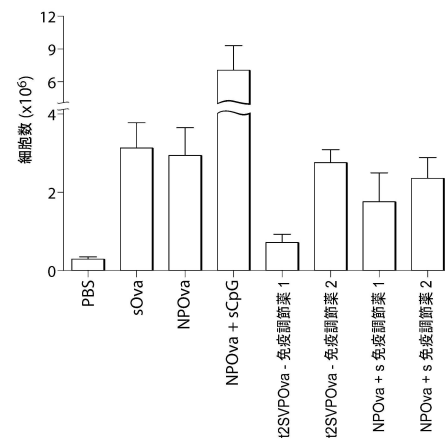


図 3

【図 4】

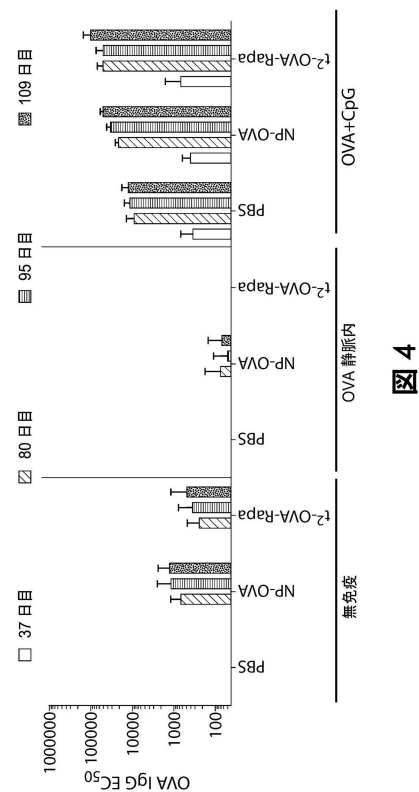


図 4

【図 5】

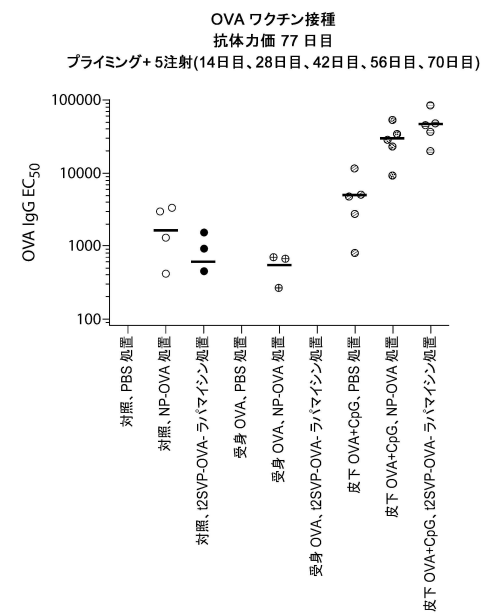


図 5

【図 6】

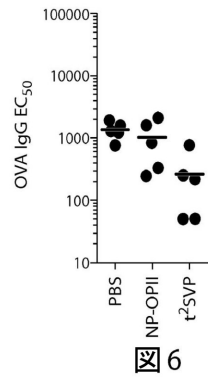


図 6

【図 7】

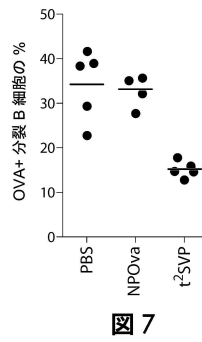


図 7

【図 8】

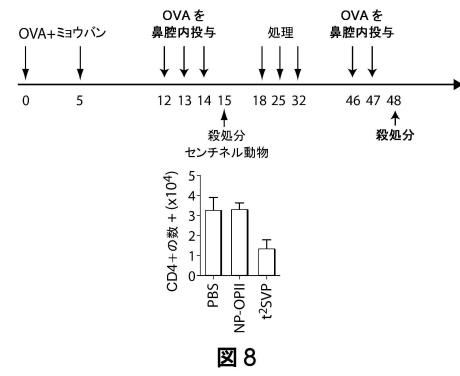


図 8

【図 9】

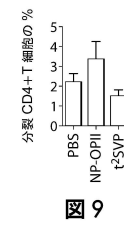


図 9

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/531,180
(32)優先日 平成23年9月6日(2011.9.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/531,147
(32)優先日 平成23年9月6日(2011.9.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/480,946
(32)優先日 平成23年4月29日(2011.4.29)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/531,215
(32)優先日 平成23年9月6日(2011.9.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/531,209
(32)優先日 平成23年9月6日(2011.9.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/531,175
(32)優先日 平成23年9月6日(2011.9.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/531,194
(32)優先日 平成23年9月6日(2011.9.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/513,514
(32)優先日 平成23年7月29日(2011.7.29)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/531,164
(32)優先日 平成23年9月6日(2011.9.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/531,204
(32)優先日 平成23年9月6日(2011.9.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (72)発明者 フレイザー, クリストファー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02476、アーリントン、ポール リヴィア ロード
88、ユニット #2
- (72)発明者 キシモト, タカシ, ケイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02420、レキシントン、クーリッジ アヴェニュー
46
- (72)発明者 マルドナド, ロバート, エイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02130、ジャマイカ プレイン、ローブソン ストリ
ート 38 #1

合議体

審判長 關 政立

審判官 富永 みどり

審判官 田村 聖子

- (56)参考文献 特表2009-527566 (JP, A)
国際公開第2010/042870 (WO, A1)

国際公開第2007/087341 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00

A61K 45/00

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN)