

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6783652号  
(P6783652)

(45) 発行日 令和2年11月11日 (2020. 11. 11)

(24) 登録日 令和2年10月26日 (2020. 10. 26)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/198 (2006. 01)	A 6 1 K 31/198 ZMD
A 6 1 K 35/15 (2015. 01)	A 6 1 K 35/15 Z
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 Z
A 6 1 P 37/02 (2006. 01)	A 6 1 P 37/02

請求項の数 9 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2016-516601 (P2016-516601)	(73) 特許権者	515004810
(86) (22) 出願日	平成26年9月24日 (2014. 9. 24)		
(65) 公表番号	特表2016-531853 (P2016-531853A)		ザ リサーチ ファウンデーション フォー
(43) 公表日	平成28年10月13日 (2016. 10. 13)		ー ザ ステイト ユニバーシティー オブ
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/057234		ブ ニューヨーク
(87) 国際公開番号	W02015/048145		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 4 2
(87) 国際公開日	平成27年4月2日 (2015. 4. 2)		2 8 - 2 5 6 7、アムハースト、スウィー
審査請求日	平成29年8月14日 (2017. 8. 14)		ト ホーム ロード 1 5 7 6、スウィー
審判番号	不服2019-7115 (P2019-7115/J1)		ト 1 1 1、ベアード リサーチ パーク
審判請求日	令和1年5月31日 (2019. 5. 31)		、テクノロジー トランスファー アンド
(31) 優先権主張番号	61/881, 857		エコノミック アウトリーチ、オフィス
(32) 優先日	平成25年9月24日 (2013. 9. 24)		オブ サイエンス、ユニバーシティ ア
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	110000475
			特許業務法人みのり特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原特異的免疫原性を低減するための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原への免疫寛容を誘導するための医薬組成物であって、

a) O-ホスホ-L-セリン (O P L S) を含有し、前記抗原を実質的に含まない第一組成物；及び、

b) 前記抗原を含有し、O P L S を実質的に含まない第二組成物；

を含み、前記第一及び第二組成物は、個体に皮膚経路により別々に、且つ、互いに2インチ (5 . 0 8 c m) 以内の近接した部位に投与されるものであり、

前記第一及び第二組成物は、互いから60分以内に投与されるものであり、

O P L S と前記抗原の投与が、前記個体において前記抗原への免疫寛容の誘導をもたらす、医薬組成物。

10

【請求項 2】

前記第一及び第二組成物が同時に投与されるものである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記第一及び第二組成物が連続して投与されるものである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記第一組成物が前記第二組成物の前に投与されるものであるか、又は、前記第一組成物が前記第二組成物の後に投与されるものである、請求項 3 に記載の医薬組成物。

20

**【請求項 5】**

前記第一及び第二組成物が皮下にあるいは皮内に投与されるものである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 6】**

O P L S の濃度が 2 0 m M 以上である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 7】**

O P L S の濃度が 2 0 ~ 3 0 0 m M である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

前記第一及び第二組成物の浸透圧が、3 0 0 ~ 1 1 0 0 m m o l e / k g である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 9】**

前記第一及び第二組成物が、少なくとも週に 1 度、最大で 1 2 週まで投与されるものである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【連邦支援研究に関する声明】****【0 0 0 1】**

本発明は、国立衛生研究所によって授与された契約番号 HL-70227 の下での政府支援を受けて完成した。政府は、本発明に所定の権利を有する。

**【0 0 0 2】****[ 関連出願の相互参照 ]**

本願は、2013年9月24日に出願された、米国仮出願第 61/881,857 号に基づく優先権を主張し、その開示は、参照により本明細書中に包含される。

**【技術分野】****【0 0 0 3】**

本開示は、一般に、抗原タンパク質の免疫原性の分野に関する。より具体的には、本発明は、( i ) 免疫原性の低減、( ii ) 薬物動態の改善、及び( iii ) 生物学的治療薬(治療用のタンパク質、ペプチド及び抗体を含む)に対する寛容の誘導：のための組成物及び方法に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 4】**

組換えタンパク質、ペプチド及び抗体を含む、生物学的治療薬は、医薬品の成長部門を代表する。この部門は、すでに、広範な疾患を治療するために使用されている。これらの剤を使用する治療は高い効果を示す一方、そのようは治療は、しばしば安定性と免疫原性に関する問題に直面する。治療用タンパク質が凝集体を形成するのは珍しいことではなく、当該凝集体内では変性した治療用タンパク質が互いに会合し、望まない免疫応答を引き起こしうる複合体を形成する。同様に、少なくとも、抗体に基づく免疫応答(それらの安全性及び有効性に影響を与える)をよく引き起こす、そのような治療本来の免疫原性が懸念されている。例えば、抗体に基づく免疫応答(例えば、抗-薬物抗体)は、薬物動態(例えば、クリアランス速度の増加/循環時間の減少)を変えうるだけでなく、そのタンパク質の薬理活性を抑制しうる。後者は、抗体に基づく免疫応答が中和抗体の発生に関与する場合に生じる。時間とともに中和抗体の力価が増加するにつれて、その治療の有効性は低くなり、さらなる罹患率及び時には死亡率さえ引き起こしうる(特に代替療法が存在しない場合)。

**【0 0 0 5】**

生物学的治療薬の「免疫原性」は、投与ルート、併用薬物、薬物用量及び治療のスケジュール、遺伝学、年齢、性別、免疫及び栄養の状態、疾患の特性、薬物のサイズ及び構造、その薬物がどれだけ「ヒト型」か、免疫複合体のクリアランス速度及び薬物溶解性を含む、様々なファクターによって影響される。免疫原性を誘導する非常に多くのファクターが存在するため、異なる研究の間で、特定の生物学的治療薬について広範な「免疫原性」が存在し得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 6 】

生物学的治療薬に対する抗-薬物抗体の発生の多数の例が存在する。多くの例が、モノクローナル抗体(キメラ、ヒト化及び完全なヒト抗体も含みうる)に關与する。具体例は、自己免疫疾患を治療するために使用される、アダリムマブ(ヒュミラ[登録商標])及びインフリキシマブ(レミケード[登録商標])等の生物学的な抗腫瘍壊死因子(抗-TNF)治療である。抗-薬物抗体の形成は、関節リウマチ(RA)治療の抗-TNF生物学的治療薬の失敗を説明するメカニズムとして認識されている。抗-TNF治療薬に対して発生した抗-薬物抗体は、これらの治療薬の臨床効果を減じ、且つ、より高い投与量又は中断を必要とする。中和抗体は、12%～44%のRA患者に、抗-TNF剤への抵抗性又は有害反応を発生させる。抗-薬物抗体の形成により、RA患者の少なくとも3分の1が、治療に応答しなくなるか、初期の反応性を失う。現在販売されている抗-TNF生物学的治療薬(レミケード[登録商標](インフリキシマブ)、ヒュミラ[登録商標](アダリムマブ)、シンボニー[登録商標](ゴリムマブ)、エンブレル[登録商標](エタネルセプト)、及びシムジア[登録商標](PEG化セルトリズマブ))はそれぞれ、個々の範囲の「免疫原性」を有する。

10

## 【 0 0 0 7 】

他の例は、タンパク質ベースの補充療法(血友病等の血液凝固障害のための補充療法(例えば、VIII因子)及びポンペ病等のリソソーム蓄積症のための酵素補充療法を含むがこれに限定されない)を含む。具体例では、ポンペ病の患者は、酵素である酸性グルコシダーゼ(GAA)が欠損している。この疾患の現在の治療は、マイオザイム[登録商標]及びルミザイム[登録商標]として販売されているアルグルコシダーゼアルファを用いた酵素補充療法である。上述した抗-TNF生物学的治療薬のように、これらの薬物は、免疫原性であり、しばしば望ましくない免疫応答をもたらし、最終的に治療を低有効性又は無効にさえする。

20

## 【 0 0 0 8 】

複数のアプローチが、生物学的治療薬の免疫原性を最小化するために使用及び/又は研究されてきた：これらは免疫原性のより少ない製剤の開発、治療レジメンの修正、ステロイドの使用(すなわち、全般的な免疫の抑制)、及び様々な送達アプローチの開発を含むがそれらに限定されない。各アプローチは、それ自身の欠点と限界を有している。

## 【 0 0 0 9 】

免疫原性に加えて、生物学的治療薬の皮下投与ルートに関する別の懸念は、それらの不完全な生物学的利用率であり、それはおそらく一部は、注射部位で又はその付近での生物学的治療薬の分解に起因している。

30

## 【 0 0 1 0 】

それゆえ、免疫原性を最小化し、薬物動態を改善し、抗原特異的免疫寛容を誘導する安全で効果的なアプローチが望まれている。

## 【発明の概要】

## 【 0 0 1 1 】

本開示は、抗原(例えば、生物学的治療薬)の免疫原性を低減し、それらの薬物動態学的特性を改善し、そのような抗原に対する特異的免疫寛容を誘導するための、方法及び組成物について記載する。

40

## 【 0 0 1 2 】

本開示は、ある特定の脂質粒子又はOPLSと抗原の同時又は連続的な投与が、当該抗原とOPLSの会合又は脂質粒子中への当該抗原の取り込み(及び/又は免疫原性エピトープの遮蔽)(すなわち、複合体の形成)の不存在下でさえ、当該抗原に対する免疫低応答性とその薬物動態学的特性の改善の両方をもたらすという驚くべき観察に基づく。これは、特に、多量の樹状細胞の存在により免疫原性が高くなると広く信じられている(すなわち、高免疫暴露の)皮下ルートにより投与が行われた場合でさえ、免疫原性の減少が見られることを考慮すると、驚くべきことである。

## 【 0 0 1 3 】

50

免疫寛容は、抗原への免疫低応答性から非応答性に及ぶ連続した状態とみなされることができる。治療目的のためには、全般的な免疫抑制から生じる合併症を避けるために、免疫寛容は問題になっている抗原に特異的であることが一般的に好ましい。本開示の関連において、抗原に対する「免疫寛容」は、以下のいずれか1つ又は組み合わせによって証明される：(a)以下の一以上を増加する：(i)制御性T細胞、(ii)TGF- $\beta$ 、及び/又は(iii)IL-10、及び/又は(b)以下の一以上を減少する：(i)抗原特異的抗体価、(ii)B細胞(抗原特異的メモリーB細胞を含む)、(iii)IL-6、(iv)IL-17、(v)CD40、(vi)CD80、及び/又は(vii)CD86、及び/又は(c)当該抗原を用いた再負荷(re-challenge)に続く低応答性。これらの識別子の一以上は、培養条件によって評価できる。「特異的」とは、関連のない抗原(本開示の脂質組成物と複合体を形成しなかった抗原、又は本開示の脂質組成物と共投与(同時に又は連続的に)されなかった抗原)に対する免疫応答が影響を受けないことを意味する。

10

#### 【0014】

一面では、本開示は、抗原(治療剤など)に対する免疫寛容を誘導する方法を提供する。前記剤は、OPLSの投与と組み合わせて投与される。一実施形態では、前記剤とOPLSは別々の組成物として投与される。前記投与は、同じ時間に(同時に)実施されてもよく、順に(連続的に)実施されてもよい。一実施形態では、前記OPLSと前記剤は、投与前に組み合わされてもよいが、当該OPLSと当該剤の会合は低いか存在しない(すなわち、検出不可能)。

#### 【0015】

一実施形態では、前記生物学的治療薬の生物学的利用率は、皮下投与後のリンパ取り込みの向上によって増加する。増量剤として働く剤(例えば、アルブミン)が過去に調査されたが、これらの剤は、同時投与された生物学的製剤の免疫原性を低下させる能力を有さない。本開示では、高張バッファ中の生物学的製剤の投与が、生物学的利用率を増加でき且つ免疫寛容を誘導できることが観察された。

20

#### 【0016】

一実施形態では、前記治療薬は、OPLSと組み合わせて、治療量以下の用量で投与される。この用量では、前記治療薬は、対象とする適応症に対し、臨床的に意義のある効果を発揮しない。しかしながら、本開示において記載されるように、驚くべきことに、それは、前記剤に対する特異的免疫寛容を誘導することができる。前記治療薬及びOPLSは、同じ組成物中で投与されてもよく、別々に(同時に又は連続して)投与されてもよい。

30

#### 【0017】

一実施形態では、前記抗原(治療薬など)は、OPLSと併せて投与され(単一の製剤として、又は別々の製剤として - 同時に又は連続して投与される)、ここで、前記剤は治療量である。一実施形態では、単一の製剤として投与される場合、前記OPLS及び前記剤は、緩く結合している( $10\mu\text{M}$ 以上の $K_d$ 、 $500\mu\text{M}$ を含む)か、結合していない( $500\mu\text{M}$ より高い $K_d$ )。一実施形態では、単一の製剤として投与される場合、OPLSと前記抗原の検出可能な複合体形成が生じないように、前記剤とOPLSは、投与の直前に一緒にされる。

#### 【0018】

一実施形態では、前記剤とOPLSの投与は、皮膚経路で行われる。前記皮膚経路は、皮下注射、経皮又は皮内送達、局所投与あるいは皮膚を経る何らかの他の送達方法であってもよい。

40

#### 【0019】

一面では、本開示は、治療抗原及びOPLSへの生体外暴露によって免疫寛容を誘導する方法を提供する。前記方法は、個体から樹状細胞を採取すること、インビトロで当該樹状細胞を、OPLSと前記抗原に接触させること、及び当該樹状細胞をホストに戻すことを含む。

#### 【0020】

一面では、本開示は、免疫寛容を誘導するキットを提供する。前記キットは、以下の一以上を含む：OPLS又は他のセリン含有脂質製剤、治療薬、高張バッファ、投与装置及び剤、様々な組成物を投与するための指示。

#### 【図面の簡単な説明】

50

## 【 0 0 2 1 】

【図 1】OPLSが、骨髓由来樹状細胞(BMDC)のサイトカインプロファイルに与える影響。TG F-、TNF- 及びIL-6濃度が、OPLS濃度の関数として示される。

## 【 0 0 2 2 】

【図 2】生物学的治療薬へのOPLS結合。解離定数( $K_d$ )は、FVIIIに対する8.4uM(強い結合)から、OVAに対する2573uM(本質的に結合していない)に及ぶ。

## 【 0 0 2 3 】

【図 3】FVIII単独(5IU) vs. FVIIIとOPLS(0.4mg/5IU及び5mg/5IU)の皮下同時投与後のマウスの抗体価。OPLSとFVIIIは、室温で投与直前に混合され、抗原とOPLSの検出可能な複合体は存在しなかった。

10

## 【 0 0 2 4 】

【図 4】マウスでの静脈内投与後の時間の関数としての、平均FVIII生物活性(血漿)。

## 【 0 0 2 5 】

【図 5】マウスでのFVIII及びOPLS-FVIIIの皮下投与後の(A)血漿中濃度及び(B)リンパ液中濃度

## 【 0 0 2 6 】

【図 6】タンパク質の皮下投与 vs. タンパク質と脂質の皮下同時投与後のマウス抗体価レベル。(a)卵白アルブミン投与 vs. 卵白アルブミンと5mg OPLSの同時投与、(b)FVIIIの投与 vs. 様々な濃度でのFVIIIとOPLSの同時投与、(c)酸性 グルコシダーゼ(GAA)タンパク質の投与 vs. GAAタンパク質と、O-ホスホ-D-セリン(“OPDS”)又はOPLSのどちらかの同時投与、(d)ヒュミラ[登録商標](アダリムマブ)の投与 vs. ヒュミラ[登録商標](アダリムマブ)と5mg OPLSの同時投与。

20

## 【 0 0 2 7 】

【図 7】ヒトIgGとOPLS(0.4 mg/1ug)の皮下同時投与 vs. IgG単独の皮下投与後のマウス抗体価。図 7 のように、5 mg以上のOPLS量では、より大きい効果が予期される。この実施例におけるヒトIgGは、ヒト血漿IgG分離株である。

## 【 0 0 2 8 】

【図 8】リツキシマブ(RXT)とOPLS(0.4mg/1ug及び5mg/1ug)の皮下同時投与 vs. リツキシマブ単独の皮下投与後のマウス抗体価。

## 【 0 0 2 9 】

【図 9】酸性 グルコシダーゼ(GAA)ペプチド(SEQ: YIFLGPEPKSVVQ)の皮下投与 vs. GAAペプチドと、PS-リポソーム(以下に記載の通り、1:10,000)又は5mg OPLSの皮下同時投与後のマウス抗体価。GAAペプチドは、完全長GAAの最も顕著なT細胞エピトープである(Molecular Genetics and Metabolism, 2012. 106(2): p.189-195)ことに留意すべきである。

30

## 【 0 0 3 0 】

【図 10】GAAタンパク質の皮下投与 vs. GAAタンパク質と脂質の皮下同時投与後のマウスの抗体価レベル。使用された脂質は、PS-リポソーム(PS/PC)及びPG30であった。

## 【 0 0 3 1 】

【図 11】O-ホスホ-L-セリン(以後“OPLS”と称する)を用いたFVIII-特異的寛容/低応答性。(a)ベースラインは、以下の皮下同時投与後のマウスの抗-FVIII抗体価の比較を示す：FVIII単独投与と比較した、(i)FVIII及びOPLS、(ii)FVIII及びO-ホスホ-D-セリン(以後“OPDS”と称する)、(iii)FVIII及びデキサメタゾン(“Dex”)。(b)再負荷(再誘導)は、遊離FVIIIでの皮下再負荷後の各グループにおけるマウス抗-FVIII抗体価の比較を示す。FVIIIとOPLSの同時投与(s.c.)は、再負荷の際、抗原-(FVIII-)特異的低応答性を引き起こしたが、他方、FVIIIとOPDS又はデキサメタゾン(一般的な免疫抑制剤)のどちらかとの同時投与(s.c.)は、引き起こさなかった。

40

## 【 0 0 3 2 】

【図 12】PS-リポソームを用いたFVIII-特異的寛容/低応答性。(a)遊離FVIII及びFVIII+デキサメタゾン(Dex)と比較した、様々な脂質組成物(ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルグリセロール(PG))を用いたリバースワクチン

50

接種(reverse vaccination)後のマウス抗-FVIII中和抗体価；(b)リバースワクチン接種手順後、Ovaに対してマウスが正常に応答することを示す、Ovaによる再負荷後の各グループにおけるマウス抗-卵白アルブミン(Ova)力価

【0033】

【図13】GAA及びGAA+OPLSで治療された動物のGAA再負荷後の抗GAA力価。

【0034】

【図14】GAA及びGAA+OPLSで治療された動物のGAA再負荷後の抗GAA力価。PS-リボソームによるGAA寛容データ。

【0035】

【図15】PS-リボソームを用いたヒュミラ[登録商標](アダリムマブ)寛容データ。マウスモデルは、(a)遊離ヒュミラ及び(b)ヒュミラとホスファチジルセリン(PS)リボソームにさらされた。(a)遊離ヒュミラ及び(b)ヒュミラとPSリボソームにそれぞれ暴露された後、前記モデルは遊離ヒュミラで再負荷され、免疫力価が任意単位で測定された。ヒュミラとPSリボソームによる治療計画を最初に受けたものは、遊離型ヒュミラのみを最初に受けたものと比べ、統計的に有意に減少した免疫力価を生じた。

10

【0036】

【図16】第VIII因子とPSリボソームの併用投与は、CD4+FoxP3+制御性T細胞の発現上昇を誘導する。実験グループは、(a)遊離第VIII因子又は(b)第VIII因子とPSリボソームのどちらかを投与された。(b)第VIII因子とPSリボソームを投与されたグループは、遊離型第VIII因子を投与されたグループより、統計的に有意な相対的に高いCD4+FoxP3+制御性T細胞の発現上昇を有した。

20

【0037】

【図17】PS媒介低応答性におけるメモリーB細胞の役割。PS-FVIII治療を受けたドナーマウスからメモリーB細胞を受け取ったマウスは、有意に低下した抗-FVIII抗体価を示した。

【0038】

【図18】4週間の寛容誘導アプローチを受けたマウスの中和力価データ(抗原と脂質粒子は互いから遠位に投与され、その後4週間にわたる遊離FVIII再負荷が行われた)。

【0039】

【図19】寛容誘導アプローチを経験したマウスの総抗-FVIII力価データ(抗原と脂質粒子は互いから遠位に投与された)。

30

【0040】

【図20】CD-1マウスで実施された短期間、反復投与(28日毎日投与)TDAR研究から得られた抗-KLH IgG力価レベル。どのOPLS治療グループとビヒクル治療グループの平均力価レベルの間にも、統計学的有意性は見られなかった。前記データは、評価された最も高用量でさえ、OPLSは、動物の通常の免疫能力の状態を変化させないことを示す。

【0041】

【図21】CD-1マウスの血漿化学マーカーに対する、様々なOPLS量の28日間連日注射の影響。サンプルは、投薬終了後1日目に動物から採取された。データは、所定のOPLS量が、OPLSの最も高い評価用量でさえ、腎臓及び肝臓機能に影響を与えないことを示す。

40

【0042】

【図22】CD-1マウスへのOPLSの28日間連日s.c.注射後の、血漿クレアチンキナーゼ(CK：筋細胞中に高発現する酵素、血漿CKの上昇は、筋組織に対する損傷の指標である)活性レベル。どのOPLS治療グループでも、部検の際、注射部位組織の肉眼での評価の間、眼に見える注射部位の病変は観察されなかった。どのOPLS治療グループとビヒクル治療グループの平均血漿CK活性レベルの間にも、統計学的有意性は見られなかった。データは、評価された最も高用量でさえ、OPLSが注射部位で筋肉破壊を引き起こさないことを示す。

【0043】

【図23】アカゲザルの末梢血中のリンパ球サブセットに対する、25 mg/kg OPLSの21日間連日投与の影響。サンプルは、ベースライン(0日目)、治療の中間時点(8日目)及び

50

投薬終了後 1 日目(22 日目)に動物から採取され、フローサイトメトリーを使用して免疫表現型が確認された。B 細胞の % における一過性の増加を除いて、ベースラインと治療後のレベルの間に、有意な変化は観察されなかった(\*P 値 < 0.05)。このデータは、OPLS が所定の用量において、動物の通常の免疫能力の状態を変化させないことを示す。

【0044】

【図 24】アカゲザルの血漿化学マーカーに対する、25 mg/kg OPLS の 21 日間連日投与の影響。サンプルは、ベースライン(0 日目)、治療の中間時点(8 日目)及び投薬終了後 1 日目(22 日目)に動物から採取された。このデータは、所定の OPLS 量が、腎臓及び肝臓機能に影響を与えないことを示す。

【0045】

【図 25】タンパク質と OPLS のモル比を示す表。

【0046】

【図 26】OPLS と GAA の別々の組成物投与後の、6 週目-伏在静脈サンプリング。

【0047】

【図 27】再負荷後-終末サンプリング-11 週目。

【0048】

【図 28】6 週目と 11 週目の比較。

【0049】

【図 29】SW マウスにおける  $i v$  (オープンサークル: ) 及び  $s c$  (オープンダイヤモンド: ) 投与後の、リツキシマブの血漿(オープンシンボル)及びリンパ節(クローズドシンボル)濃度-時間特性。1  $\mu g/g$  のリツキシマブは、 $s c$  又は  $i v$  注射され、血漿中濃度が、120 時間モニターされた。実線は、 $i v$  データの 2 コンパートメントモデルへのフィッティング(適合)を表し、破線は、 $s c$  データのモデルへのフィッティングを表す。クローズドダイヤモンド( ) は、皮下投与後のリツキシマブの鼠径リンパ節濃度を表す。値は平均値  $\pm$  SD で表される。

【0050】

【図 30】等張バッファー(バッファー A: ) 及び高張バッファー(バッファー B: ) 中で  $s c$  投与されたリツキシマブの血漿(オープンシンボル)及びリンパ節(クローズドシンボル)濃度-時間特性。等張バッファー(バッファー A: ) 及び高張バッファー(バッファー B: ) 中で  $s c$  投与されたリツキシマブのリンパ節濃度。値は平均値  $\pm$  SD で表される。実線は、図 2 で示されるモデルへの、データのフィッティングを表す。このデータは、等張バッファーと比較して、高張バッファーでのリツキシマブの皮下投与後に増加した血漿及びリンパ節暴露を示す。

【0051】

【図 31】様々な高張バッファー中で  $s c$  投与されたリツキシマブの血漿(オープンシンボル)及びリンパ節(クローズドシンボル)濃度-時間特性。31A バッファー C 及び E は、NaCl のみを含む高張バッファー(バッファー B: ) と比べて、低及び高用量の OPLS (20 mM: ) と 270 mM ( ) を表し、これに対応して、バッファー C と E のリツキシマブのリンパ節濃度(それぞれ と ) は、NaCl のみを含む高張バッファー(バッファー B: ) と比較される。値は平均値  $\pm$  SD で表される。実線は、データのモデルへのフィッティングを表す。データは、用量依存様式にて、OPLS とともに投与されたリツキシマブの血漿中濃度の増加を示す。これは、特にバッファー E についての増加したリンパ節暴露にも対応する。モデルは、バッファー E に関するほぼ完全な生物学的利用率を予測する。31B バッファー D 及び F は、NaCl のみを含む高張バッファー(バッファー B: ) と比較した、低及び高用量のマンニトール(20 mM: ) と 270 mM ( ) を表し、これに対応して、バッファー D と F のリツキシマブのリンパ節濃度(それぞれ と ) は、NaCl のみを含む高張バッファー(バッファー B: ) と比較される。値は平均値  $\pm$  SD で表される。実線は、データのモデルへのフィッティングを表す。データは、マンニトールとともに投与されたリツキシマブの血漿中濃度の増加を示す。これは、増加したリンパ節暴露にも対応する。モデルは、バッファー D 及び F に関するほぼ完全な生物学的利用率を予測する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 2 】

【図 3 2】週 1 回・4 度の FVIII の s c 注射で積極的に再負荷された H A マウスの抗-FVIII 力価。マウスは、FVIII 単独、FVIII/OPLS 又は FVIII-デキサメタゾン(Dex) s c で 4 週間前処置され、続いて 2 週間の休薬期間を置き、その後動物は F V 単独で再負荷された。FVIII 及び FVIII-Dex で前処置されたグループの動物は、再負荷後に、強い抗-FVIII 抗体応答を示した。応答は、FVIII/OPLS 前処置グループにおいては、同じほど強くはなかった。

## 【 0 0 5 3 】

【図 3 3】OPLS の存在下及び不存在下で FVIII に暴露された BMDC の特性化。パネル A 及び B は、50mM OPLS が BMDC の表現型成熟に与える影響を示す。OPLS の存在下及び不存在下で FVIII に暴露された BMDC の CD40 発現のフローサイトメトリー分析は、OPLS 治療グループにおける CD40 発現の有意な減少を示す。代表的なデータのセットが、上パネル(A)に示され、CD40+細胞のパーセント及び MFI が 3 3 B の上パネルに提示される(n=3、\*p<0.05 スチューデント t 検定)。50mM OPLS の存在下及び不存在下で FVIII に暴露された BMDC における MHCII 発現が、図 3 3 A 及び 3 3 B の下パネルに提示される。データは、OPLS に応答して、MHCII 発現レベルに変化がないことを示す。パネル C 及び D は、BMDC によるサイトカイン産生に対する、OPLS の用量依存的影響を示す。漸増用量の OPLS と併用された FVIII に暴露された BMDC は、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  及び IL-12p70 の用量依存的減少を示した(パネル C、n=4)。これは、制御性サイトカインである TGF- $\beta$  の用量依存的増加を伴った(パネル D、n=4)。パネル E、F 及び G は、FVIII 単独又は 50mM OPLS と併用で生体外処理された、BMDC の蛍光標識及び BMDC の遊走性ポテンシャルである。FVIII(パネル E)又は FVIII/OPLS(パネル F)グループの DiIC18(5)染料による BMDC の良好な標識。宿主 H A マウスの鼠径リンパ節内で回収された DiIC18(5)で標識された BMDC の蛍光曲線下面積(パネル G)。

## 【 0 0 5 4 】

【図 3 4】OPLS は、宿主 H A マウスにおいて、生体外で FVIII に暴露された BMDC の免疫学的ポテンシャルを削減する。生体外で FVIII 単独又は FVIII/OPLS(50mM)に暴露された BMDC を週に 1 度 3 回皮下投与された後の宿主 H A マウスの総抗-FVIII 抗体。データは、OPLS 治療グループにおいて、抗-FVIII 力価の統計的に有意な減少を示す。未処置の H A マウスの血漿は、ELISA のためのカットオフ値を計算するために使用された。

## 【 0 0 5 5 】

【図 3 5】OPLS/FVIII 治療への生体内での用量依存的応答。高用量の OPLS(5 mg)で処置された H A マウスは、FVIII 単独又は低用量 OPLS(0.4 mg)と比較して、抗-FVIII 力価の統計的に有意な減少を示した。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 5 6 】

本開示は、一以上の抗原と併せて又は連続的方法で投与された際、前記抗原の免疫原性の低下、その薬物動態学的特性の改善及び/又は前記抗原への免疫寛容の誘導をもたらす、OPLS 又は脂質粒子を含む組成物を提供する。

## 【 0 0 5 7 】

ここで使用される、生物学的治療薬という用語は、組換えタンパク質、ペプチド、治療的/予防的抗体(例えば、モノクローナル抗体)及びそのフラグメントを含む、生物学に基づく治療薬を意味する。生物学的治療薬は、この明細書において、抗原としての機能を果たし、時に抗原と称される。

## 【 0 0 5 8 】

前記剤(治療薬等)は、O-ホスホ-L-セリン(OPLS)；又は脂質粒子のような免疫寛容誘導剤と併用して送達され、前記脂質粒子は(a)ホスファチジルセリン(PS)と一以上のリン脂質から構成される単層膜又は多重膜のリポソーム(PS-リポソーム)；又は(b)ミセル、凝集構造、及び渦巻き型を含む、セリンから構成される非-リポソーム構造であってもよい。OPLS は市販されている。前記リン脂質は PS を含み、天然と合成両方の様々なソースから得ることができる。例えば、PS はブタの脳 PS 又は植物由来の大豆(soya bean)PS から得る



ことができる。卵PC並びにPS及び合成PCも市販されている。脂質組成物という用語は、脂質粒子だけでなくOPLSも含む。

【0059】

本開示は、薬物動態学的(PK)特性を改善する組成物及び方法を提供する。一実施形態において、薬物動態学的特性の「改善」は、抗原の向上した半減期又は生物学的利用率を意味する。例えば、OPLS又は脂質組成物が、抗原(第VIII因子等)と共に皮下投与された場合、皮下投与された遊離タンパク質の投与と比べて、リンパ取り込み及び血漿PK特性が改善された。リンパ取り込み及び血漿中濃度の改善は、抗原としてリツキシマブを使用した際にも観察され、これが広く適用できるアプローチであることのさらなる証拠を提供する。

10

【0060】

一実施形態では、前記免疫寛容誘導剤は、OPLSを含むか、本質的にOPLSからなるか、又はOPLSからなる。一実施形態では、前記脂質組成物中の唯一の免疫寛容誘導剤はOPLSである。OPLS濃度は、1 mM~100 mM(その間の全ての整数及び範囲を含む)であってもよい。一実施形態では、前記OPLS量は、100~300 nMである(その間の全ての整数及び範囲を含む)。一実施形態では、前記mM濃度は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、又は100である。別の実施形態では、前記OPLS濃度は、21 mMと100 mM(その間の全ての整数を含む)の間である。別の実施形態では、それは25 mMと75 mM(その間の全ての整数を含む)の間である。別の実施形態では、前記OPLS濃度は、35 mMと65 mM(その間の全ての整数を含む)の間である。また別の実施形態では、前記OPLS濃度は、45 mMと55 mM(その間の全ての整数を含む)の間である。一例では、前記OPLS濃度は50 mMである。一実施形態では、前記OPLSは、125、150、175、200、225、250又は275 mMである。また、ここに開示された方法を実施するために必要とされるOPLSの量は、用量の観点から記載されていてもよい。前記用量は、1 mgを超えるいかなる量であってもよい。一実施形態では、前記OPLSの用量は、1 mg~1,000 mg(その間の全ての整数を含む)であってもよい。特定の例では、前記用量は5 mgである。

20

【0061】

一般には、いかなる適切なバッファーが使用されてもよい。例えば、何らかのリン酸バッファー(リン酸緩衝生理食塩水を含む)又はTRISバッファーを使用してもよい。一実施形態において、米国特許第8,349,794号に記載された再構成培地が使用される。前記バッファーのpHは5~8であってもよい。一実施形態では、前記バッファーのpHは、5.5~8又は5.5~7.6、又は6.0~7.6であってもよい。別の実施形態では、前記バッファーのpHは、6~8、又は7.2~7.6もしくは7.4であってもよい。

30

【0062】

一実施形態では、同時にあるいは連続して投与された抗原のリンパ取り込み及び/又は血漿中濃度を改善するための方法は、OPLSを含む高張液の使用を通じて達成される。一実施形態では、前記組成物はOPLSとNaClを含む。一実施形態では、前記組成物は、OPLSとマンニトール、及び任意でNaClを含む。浸透圧の増加は、OPLS、マンニトール、及びNaClの一以上の任意の量の任意の組み合わせによって達成できる。

【0063】

別の実施形態では、同時にあるいは連続して投与された抗原のリンパ取り込み及び/又は血漿中濃度を改善するための方法は、OPLSとマンニトールの少なくとも1つを含む高張液(本明細書では、300 mmol/kgより大きい浸透圧を有するものと定義される)の使用を通じて達成される。一実施形態では、前記溶液の浸透圧は、300 mmol/kgと1,100 mmol/kg(その間の全ての整数及び範囲を含む)の間にわたる。一実施形態では、前記溶液の浸透圧は、300 mmol/kgと800 mmol/kg(その間の全ての整数を含む)の間にわたる。一実施形態では、前記浸透圧は、301~1,100 mmol/kg又は500~600 mmol/kgである。一実施形態では、前記浸透圧は、290~300 mmol/kg(その間の全ての整数及び範囲を含む)である。OPLSを含む高張液の特定の実施形態では、前記溶液の浸透圧は、300 mmol/kgと1,100 mmol/kgの間にわたり、より高い濃度のOPLS(例えば、>100 mM)は、より低い濃度のOPLS(例えば、<1

40

50

00 mM)よりも、大きいリンパ取り込み及び/又は血漿中濃度をもたらす。同様に、マンニトールを含む高張液の特定の実施形態では、前記溶液の浸透圧は、300 mmol/kgと1,100 mmol/kgの間にわたり、より高い濃度のマンニトール(例えば、>100 mM)は、より低い濃度のマンニトール(例えば、<100 mM)より大きいリンパ取り込み及び/又は血漿中濃度をもたらす。

#### 【0064】

O-ホスホ-D-セリン(OPDS)を含む、又は本質的にOPDSからなる、又はOPDSからなる脂質組成物は、本明細書に開示される特定の実施例において使用されたが、OPLSを使用して得られるものと同様の効果が観察されたことに留意すべきである。何らかの特定の理論に拘束されることを意図しないが、OPDSの観察された効果は、少なくとも一部は、OPDSが非常に不安定であり、OPDSの一部が生体内でOPLSに変換されるという事実に起因すると考えられる。

10

#### 【0065】

別の実施形態では、前記脂質粒子は、ホスファチジルセリン(PS)及びホスファチジルコリン(PC)及び任意にコレステロールから構成されたりポソームである(ときに"PS/PC"と称する)。一実施形態では、前記脂質組成物中の前記リン脂質は、10:90~30:70及びその間の全ての比で存在するPS及びPCを含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。一実施形態では、前記脂質粒子中のリン脂質は、上述したPS及びPCのみである。複数の実施形態において、コレステロールが存在してもよいが、本明細書中に記載された方法を実行するために必須ではない。しかしながら、前記抗原が、前記脂質粒子と複合体を形成し(vs. 同時投与)、抗原のリリースが望まれるケースでは、1~33%のコレステロール(PS及びPC併用の%)を含むことが好ましい。

20

#### 【0066】

他の実施形態では、前記脂質組成物中のリン脂質は、PS、ホスファチジルイノシトール(PI)及びPC、及び任意にコレステロールを含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる(ときに"PS/PI"と称する)。PSとPIの組み合わせは、好ましくは60 mol%以下であり、PCは少なくとも40 mol%である。PS/PIリポソームのPI成分は、1 mol%~30 mol%及びその間の全ての整数mol%である。PSリポソーム(PS/PC及びPS/PIリポソーム)にとって、PSは少なくとも1 mol%は存在すべきである。一実施形態では、PSは少なくとも10 mol%である。

30

#### 【0067】

PS、PC及びPIは、アシル鎖中に0~22の炭素原子を有していてもよい。例えば、PSで前記炭素原子が0の場合、前記分子はO-ホスホ-L-セリン(OPLS)である。一実施形態では、前記アシル鎖は、1~22、2~22、6~22の炭素を有する(その間の炭素の全ての整数値及び範囲を含む)。前記アシル鎖は飽和でも不飽和でもよく、同じ又は異なる長さであってもよい。アシル鎖のいくつかの例は、以下の通りである：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、オレイン酸、パルミトレイン酸、リノール酸及びアラキドン酸。前記PCは1又は2のアシル鎖を有していてもよい。例えば、前記PCは、リゾホスファチジルコリン(LPC)を含んでもよい。例えば、一実施形態では、前記PSリポソームの組成は、PS:LPC:PC=30:10:70 mol%であった。前記LPSは0 mol%~20 mol%であってもよい。一実施形態では、それは1 mol%~20 mol%及びその間の全ての整数mol%値及び範囲である。

40

#### 【0068】

本発明の脂質粒子は、適切なバッファー中で、適切なモル比のPS、PC及び任意にコレステロール；又は適切な比のPS、PC及びPI、及び任意にコレステロールを使用する脂質薄膜水和(thin lipid film hydration)によって調製することができる。前記脂質は、クロロホルム中に溶解され、溶媒は乾燥される。得られた多重膜ベシクル(MLV=multilamellar vesicle)を、高圧下、望ましい大きさのフィルター(サイジング装置)を通して押し出して本発明の脂質構造体を得られる。一実施形態では、50、60、70、80、90、95又は100%(50と100の間の全ての%を含む)の脂質粒子のサイズが、40 nm~4ミクロン(nm及びµm範囲に

50

てその間の全てのサイズを含む)である。別の実施形態では、粒子サイズは60～140 nmである。もう一つの実施形態では、前記粒子が細網内皮系(RES)内で濾去されずに、免疫系反応に利用可能となるよう、前記粒子は140 nm未満である(顕微鏡写真及び動的光散乱測定から計算される)。したがって、一実施形態では、少なくとも50%の前記粒子が140 nm未満である。例えば、前記粒子は40から100nmのように120 nm未満である。様々な実施形態では、前記粒子の50、60、70、80、90、95又は100%が、140 nm未満である(40から100 nm又は60から100 nm等)。

#### 【0069】

OPLSを含む、本質的にOPLSからなる、又はOPLSからなる脂質組成物の調製は、バッファの調製と同様シンプルであってもよい。所望の量のOPLSが秤量され、任意のバッファに添加される。そのようなOPLSバッファのpHは、その後、当該分野で既存の方法を使用して所望の値(7.4等)に調節できる。

#### 【0070】

前記抗原はペプチド(一般的に50アミノ酸以下)、ポリペプチド(一般的に100アミノ酸以下)又はタンパク質(100アミノ酸より大きい)であってもよい。前記剤は、治療抗原であってもよく、あるいは個体がその抗原ですでに刺激されているが、その抗原に対する免疫寛容が望まれている(アレルギー反応又は移植状態等)抗原であってもよい。前記タンパク質又はペプチドは、中性であっても帯電(負に又は正に)していてもよい。そのようなタンパク質は、血液凝固カスケードに関与するタンパク質(第VIII因子(FVIII)、第VII因子(FVII)、第IX因子(FIX)、第V因子(FV)、及びフォン・ヴィレブランド因子(vWF)を含む)、フォンヘルデブランド因子(von Heldebrant Factor)、組織プラスミノゲンアクチベーター、インスリン、成長ホルモン、エリスロポエチンアルファ、VEG-F、トロンボポエチン、リゾチーム、酸性 グルコシダーゼ(GAA)、アダリムマブ等のモノクローナル抗体を含む治療抗体、ミエリン鞘タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、グルタミン酸脱炭酸酵素65(GAD)、インスリン受容体及び同様のものを含む。一実施形態では、前記抗原はモノクローナル抗体又はそのフラグメント(Fc部など)である。一実施形態では、前記抗原は、通常比較的マイルドなアレルギー反応(例えば、典型的には、花粉、動物のフケ、ハウスダスト等によって引き起こされるような)を誘導するもの、又は通常個体に重度のアレルギー反応を誘導する抗原(例えば、虫刺されによる毒液中の成分、ナッツアレルギー、特定の抗生物質、及び問題になっている特定の個体に重篤なアレルギー反応を引き起こし得る他の組成物)であってもよく、又は移植関連抗原であってもよい。

#### 【0071】

複数の実施形態において、前記抗原と前記脂質組成物を会合させること(すなわち、複合体を形成させること)が望ましい。抗原と前記脂質構造体の会合をもたらす(すなわち、複合体を形成)するために、適切なバッファ中の抗原が前記脂質構造体に添加される。遊離抗原はその後、密度勾配遠心分離等の遠心分離法によって、脂質構造体から分離される。様々な実施形態において、前記抗原と前記脂質粒子の会合効率は、少なくとも30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90及び95%である。必要であれば、会合抗原を有する前記脂質粒子は、将来の使用のために凍結乾燥されてもよい。一実施形態では、本発明の脂質構造体は、抗原との会合前に凍結乾燥され保存されることができる。必要に応じて、使用前に抗原と脂質構造体の会合をもたらすために、前記脂質構造体は再構成され、その後、抗原と組み合わせて使用される。

#### 【0072】

前記抗原がPS-リポソームと会合している複数の実施形態において、前記会合は、抗原と脂質のモル比が1:10(抗原:脂質)～1:30,000(抗原:脂質)及びその間の全ての比の間となるように形成されることができる。一実施形態では、それは約1:10,000(抗原:脂質)である。抗原の治療量が増加するにつれて、前記比は減少する。他の実施形態では、前記比は約1:2,000又は1:4,000(抗原:脂質)である。本開示の最大の「抗原:脂質比」は1:30,000である。様々なタンパク質の投薬は異なるので、要求される投薬の量が前記比

10

20

30

40

50

を変えるであろう。

【0073】

いくつかの実施形態において、前記脂質組成物は抗原と複合体を形成していない。一実施形態では、本発明の脂質粒子は投与前に凍結乾燥され保管されてもよい。必要に応じて、前記脂質粒子は再構築され、その後個体に投与されることができる。

【0074】

OPLSが使用される複数の実施形態において、前記抗原とOPLSのモル比は、 $1:1 \sim 1:1 \times 10^7$ 及びその間の全ての比であってもよい。一実施形態では、それは $1:1 \sim 1:1 \times 10^6$ 及びその間の全ての比である。一実施形態では、抗原とOPLSの比は、 $1:1 \sim 1:1,000$ 及びその間の全ての比である。

10

【0075】

我々が、複合体、又は抗原と脂質組成物が会合している(すなわち複合体を形成している)と記載する場合、それは前記抗原と前記脂質組成物の $K_d$ が $10 \mu M$ 未満であることを意味する。一実施形態では、前記 $K_d$ は $8.4 \mu M$ である。我々が抗原と脂質組成物が複合体を形成していないと記載する場合、前記抗原と前記脂質組成物の $K_d$ が $10 \mu M$ 以上であることを意味する。結合-遊離の範囲は、以下の通りである：解離定数( $K_d$ )が $10 \mu M$ 未満の場合、タンパク質は結合又は複合体形成していると考えられ； $K_d$ が $10 \mu M \sim 500 \mu M$ の場合、タンパク質は非特異的相互作用を伴って、緩く結合していると考えられ； $K_d$ が $500 \mu M$ 以上である場合、タンパク質は結合していない(遊離)である。一実施形態では、 $K_d$ は $10 \mu M$ より大きい。一実施形態では、 $K_d$ は $10 \mu M \sim 5,000 \mu M$ (その間の全ての整数を含む)であって

20

様々な実施形態において、 $K_d$ は少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90及び $100 \mu M$ である。他の実施形態では、 $K_d$ は10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、1000、1500、2000、2500、又は $3000 \mu M$ である。

【0076】

いくつかの実施形態において、前記抗原の少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は99%が、前記脂質組成物(OPLS等)と結合せずに、又は緩く結合して存在している。例えば、複数の実施形態において、組成物は皮膚経路で投与されてもよく、その際、前記組成物は、OPLSに緩く結合した又は結合していない治療薬を含む。

【0077】

一実施形態では、前記OPLS又は他の脂質組成物は、投与の直前(投与時間の1分未満又は1~5分以内など)に、抗原と組み合わせられてもよい。一実施形態では、前記の組み合わせ(combining)は、OPLSと抗原の複合体形成が存在しないように、又はわずかとなるように、投与の直前に、室温( $20 \sim 26$  及びその間の全ての整数温度、又は $20$  未満など)で行われる。特定の実施形態では、組み合わせられたOPLSと抗原は、複合体形成の機会がないよう、22、23、24、25又は26 を超える温度にはさらされない。

30

【0078】

本開示において記載される組成物は、任意の個体(例えば、ヒト又は非ヒト哺乳類)のために使用することもできる。例えば、それらは前記抗原を以前に投与された及び/又は前記抗原に曝されたが、以前には前記抗原への免疫寛容を生じなかった個体に投与されることができる。また別の例では、それらは前記抗原を以前に投与された及び/又は前記抗原に曝され、前記抗原への免疫寛容を生じた個体に投与されることができる。前記個体は、最近の免疫寛容の徴候を示していてもよく、示していなくてもよい。それらは、未処置の個体(すなわち、前記抗原を以前に投与されておらず及び/又は前記抗原に曝されていない個体)への投与にも有用である。本明細書で使用される免疫寛容は、前記個体が測定可能な(ELISA又は活性アッセイ等の標準的な方法によって)抗体産生を有することを意味する。逆に、免疫寛容の欠如は、前記個体が測定可能な抗体を有さないことを意味する。「投与される」又は「投与」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、粘膜、皮下、経皮、皮内、経口又は同様のもの等の何らかの送達手段又はルートによって、前記抗原及び前記脂質粒子が、個体に送達され、又は個体の体内に導入されることを意味する。一実施形態では、前記抗原及び前記脂質粒子は、皮下等の皮膚経路によって投与される。

40

50

## 【0079】

一面では、本開示は、免疫原性を低減する及び／又は抗原の薬物動態学的特性を改善するための方法であって、a)個体に前記抗原を含む組成物を投与する；及び、b) a)における組成物の投与と連続して又は同時に、前記個体に本明細書に開示された一以上の脂質組成物を含む組成物を投与する；工程を含む方法を提供する。一実施形態では、前記一以上の脂質組成物は、本明細書に規定されるOPLS及びPSリポソームからなる群より選択される。一実施形態では、前記PSリポソームは、本明細書に規定されるPS/PC及びPS/PIからなる群より選択される。一実施形態では、前記抗原及び前記脂質組成物の $K_d$ は、 $10\mu\text{M}$ 以上である。一実施形態では、脂質組成物及び抗原のいずれか又は両方が、皮膚経路で送達される。

10

## 【0080】

他の実施形態では、免疫原性を低減する及び／又は抗原の薬物動態学的特性を改善するための前記方法は、さらに、以下の一つ又は両方を含んでもよい：(i)前記個体から生物学的サンプルを得て、以下の一以上を測定する：制御性T細胞、TGF- $\beta$ 、IL-10、抗原特異的抗体価、B細胞(抗原特異的メモリーB細胞を含む)、IL-6、IL-17、CD40、CD80、及び／又はCD86、及び／又は(ii)前記抗原及びOPLS又は別の脂質組成物の投与に続いて、前記個体から生物学的サンプルを得て、以下の一以上を測定する：制御性T細胞、TGF- $\beta$ 、IL-10、抗原特異的抗体価、B細胞(抗原特異的メモリーB細胞を含む)、IL-6、IL-17、CD40、CD80、及び／又はCD86。(i)及び(ii)の両方が行われる実施形態では、上述した細胞及び／又はバイオマーカーのレベルが、前記方法の有効性を評価するために比較されてもよい。

20

## 【0081】

さらに他の実施形態では、免疫原性を低減する及び／又は上述した抗原(FVIII、GAA及びアダリムマブ等)の薬物動態学的特性を改善するための前記方法は、発現される免疫寛容の程度をより高くする目的で、1週間に1回～1週間に3回以上、不確定に、又は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週間又はそれ以上の期間のどちらかで、繰り返されてもよい。適切な期間(最終プライマー後、少なくとも4日間等)の後、前記個体は、抗原を遊離形態で含む、又は、以前に投与された組成物(プライミング組成物)とは異なる組成を有する脂質粒子と複合化された、又は組み合わされた抗原を含む、又はPEG、あるいはサーファクタントあるいはマイクロスフェア及び同様なものに複合化(共有結合的に又は非共有結合的に)された抗原を含む第二の組成物を投与されてもよい(一以上の投与)。前記脂質構造は、ミセル、渦巻き型、脂質分子アセンブリ及び同様なものを含んでもよい。一実施形態では、前記個体は、最後のプライミング組成物投与の4～30日(その間の全ての日数の整数値及び範囲を含む)後、第二組成物(治療用組成物でもよい)を投与される。一実施形態では、前記個体は、最後のプライミング組成物投与の、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14及び15日後、第二組成物を投与される。低免疫原性製剤は、米国特許及び特許出願、第7,351,688；7,875,288；7,875,289；7,625,584；20090053297、PCT/US2010/041196に開示されており、それらの関連する開示は、参照により本明細書中に包含される。

30

## 【0082】

第二組成物(治療用組成物であってもよい)中の脂質粒子のリン脂質組成は、第一組成物(プライミング組成物)の脂質粒子のリン脂質組成と同じであっても異なってもよい。前記リン脂質組成変化は、リン脂質の種類又は様々なリン脂質の比を含んでもよい。一実施形態では、前記治療用組成物は、LPC及びスフィンゴシンを含む。

40

## 【0083】

一実施形態では、プライミング組成物の投与頻度は、皮下ルートにて、1週間に1回・4週間である。一実施形態では、寛容を誘導するために、少なくとも週1回・4度の投与が使用される。抗原及び脂質組成物の投与は、ここに記載されるように、同時に又は連続して行われてもよい。必要であれば、PS-リポソーム又はOPLSのどちらかと組み合わせられた又は複合化された抗原のより多くの投与量が使用されてもよい。

50

## 【 0 0 8 4 】

「追加免疫(ブースター)」ワクチンの現在の投与プラクティスと同様、この方法は、前記抗原への将来の暴露後、時間と共に前記個体が免疫学的に応答性になる場合は、繰り返されることができる。

## 【 0 0 8 5 】

一面では、本開示は、個体において(a)抗原特異的B免疫記憶細胞の増加を誘導することなく、あるいは(b)抗原特異的B免疫記憶細胞の数を減らす、抗原を投与する方法であって、個体に抗原と一以上の脂質組成物を投与する工程を含む方法を提供する。一実施形態では、前記抗原及び/又は脂質組成物は、皮膚経路によって投与される。例えば、OPLS及び前記抗原組成物の一つ又は両方が、皮下に、皮内に又は経皮的に、及び/又は局所ルートにより、投与されてもよい。一実施形態では、前記一以上の脂質組成物は、OPLS及びPSリボソームからなる群より選択される。一実施形態では、前記PSリボソームは、本明細書に記載される、PS/PC及びPS/PIからなる群より選択される。いくつかの実施形態では、前記抗原及び前記一以上の脂質組成物は、同じ製剤中に存在する。他の実施形態では、前記抗原及び前記一以上の脂質組成物は、異なる製剤中に存在する。前記抗原及び前記一以上の脂質組成物が、同じ製剤中に存在する実施形態では、前記抗原及び前記一以上の脂質組成物の $K_d$ は、 $10\mu\text{M}$ 以上である。前記脂質組成物と前記抗原の投与は、同時に又は別々に行われてもよい。

10

## 【 0 0 8 6 】

前記抗原及び脂質組成物が同時に投与される実施形態では、前記脂質組成物と前記抗原は、同じ製剤内に、又は異なる製剤内に存在してもよい。

20

## 【 0 0 8 7 】

前記抗原及び脂質組成物が同じ製剤中に存在する実施形態では、それらは複合体を形成していても、複合体を形成していなくてもよい。一実施形態では、前記抗原と前記脂質成分(OPLS等)は、緩く結合されているか、又は結合されていない。

## 【 0 0 8 8 】

前記抗原及び脂質組成物が連続して投与される実施形態では、どちらの成分が2番目に投与される場合も、それらが一緒に存在できるように、1番目からごく接近して(場所や時間両方の観点で)投与されるのであれば、抗原又は脂質組成物のどちらが最初に投与されてもよい。投与の順序は無関係である。一実施形態では、前記抗原及び前記脂質組成物は、互いから2インチ未満しか離れていない解剖学的位置に投与される。第二成分の投与は、第一成分の投与部位から、0.5、1、1.5又は2インチ以内で実施されることができる。一実施形態では、前記抗原及び前記脂質組成物は、お互いから24時間以内に投与される。第二成分の投与は、第一成分が投与された時間から、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、120、240、300、480、600、720、1080又は1440分以内に実施されることができる。好ましい実施形態では、それらは、同じ又は同様の皮膚経路によって投与される。例えば、両方が皮下に投与、又は抗原が皮下に投与及び脂質組成物が経皮的に投与される。

30

## 【 0 0 8 9 】

一実施形態では、前記抗原(例えば、タンパク質、ペプチド又はポリペプチド)は皮下に投与され(皮下注射によって等)、OPLSは局所ルートによって同じ又は近い部位に送達される。局所又は経皮送達のために、OPLSは薬学的に許容されるキャリアー、及び適切な保存剤、バッファー、又は噴霧剤と無菌状態で混合されてもよい。局所製剤は、動物及び植物性脂肪、オイル、ワックス、パラフィン、スターチ、トラガント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルク、酸化亜鉛、又はそれらの混合物等のさらなる賦形剤を含んでもよい。局所製剤は、液剤、乳剤、スプレー又はフォーム剤であってもよい。前記製剤は、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム及びポリアミド粉末、又はこれらの物質の混合物等のさらなる賦形剤を含んでもよい。スプレー又はフォーム剤は、さらに、クロロフルオロ炭化水素、ブタンやプロパン等の揮発性非置換型炭化水素等の通例の噴霧剤を含んでもよい。一実

40

50

施形態では、皮膚パッチが使用されてもよい。これらは、当該部位へ制御された送達を提供するというさらなる利点を有する。そのような剤形は、OPLSを適切な媒質に溶解又は分散させ、その製剤をパッチの一部に塗布することによって作ることができる。吸収促進薬は、皮膚内に及び皮膚を超えたOPLSの流動を増加させるために使用することができる。そのような流動の速度は、律速膜を用意するか、活性成分をポリマーマトリクスあるいはゲルに分散させるかによって制御できる。一実施形態では、OPLS組成物は、皮膚パッチ、包帯、絆創膏、ガーゼ、又は、所望の部位に直接適用できる他の同様の材料に、塗布される。その上にOPLS組成物が存在する皮膚パッチ(絆創膏等)の一部は、使用まで、密閉用の、除去可能な被覆剤で保護されていてもよい。粘着表面は、同じ又は異なる除去可能な被覆剤によって保護されていてもよい。使用時に、一つの被覆剤又は複数の被覆剤は除去され、OPLSの皮膚への又は皮膚を通した送達が望まれる場所に、前記ストリップ又はパッチが適用される。

#### 【0090】

本開示の一面では、抗原の免疫原性を低下させる、又は抗原の薬物動態学的特性を改善するため、又は抗原特異的B免疫記憶細胞の数を減少させるために有用なキットが提供される。一実施形態では、前記キットは、OPLS及び抗原と組み合わせてOPLSを投与するための指示、及び任意で、OPLS及び/又は抗原の投与のための投与装置を含む。前記キットは、任意で一以上の抗原を含んでもよい。OPLSと抗原の投与の指示は、これらが皮膚経路によって投与されるべきことを示してもよい。前記指示は、投与部位及び投与の時間的又は空間的な隔離を示してもよい。一実施形態では、前記指示は、OPLSと抗原を投与の直前(投与の1分以内又は1~5分以内等)に混ぜてもよいこと、及び、OPLSと抗原を混ぜる温度範囲(20~26 等)を示してもよい。

#### 【0091】

一実施形態では、キットは抗原(例えば、タンパク質、ペプチド又はポリペプチド)成分と脂質組成成分を含む。前記キットは、成分の調製及び使用のための一連の指示を含んでもよい。一実施形態では、前記脂質組成物は、OPLSとPSリポソームからなる群より選択される。一実施形態では、前記PSリポソームは、本明細書に記載される、PS/PC(任意でPEも、その際PC濃度は1~10 mol%であり、PEのmol%はPC量に取って代わる)及びPS/PIからなる群より選択される。一実施形態では、前記キットは、凍結乾燥形態の抗原(第VIII因子等)、投与(皮下投与等)のための抗原及び/又は脂質組成物(OPLS等)を調製するための再構成培地のバイアル、脂質組成物送達物、及び、様々な成分の、貯蔵、調製、及び/又は使用のための一連の指示を含む。いくつかの実施形態では、前記再構成培地は、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン及びそれらの組み合わせからなる群より選択される脂質からなる。他の実施形態では、前記再構成培地はOPLS溶液である。前記再構成培地はバッファーであるが、本開示にて規定される再構成培地は、脂質を含んでもよく、含んでいなくてもよい。前記再構成培地が脂質を含まない場合、キット内の他のバイアルが、必要な脂質を提供する。この場合には、それは、OPLSを含む任意のホスファチジルセリン含有溶液であってもよい。脂質組成物送達物は、脂質組成物(OPLS及びPSリポソーム等)からなる液体又は凍結乾燥製剤、脂質組成物があらかじめ入っているシリンジ、局所投与用の脂質組成物製剤を含むスプレー又はフォーム用の缶、又は脂質製剤を含む局所用パッチを備えた容器であってもよい。局所投与が実施される実施形態では、OPLSは、その皮膚への浸透力のため好ましい脂質組成物である。一連の指示は、印刷物であっても、サムドライブ、電子カード等の電子情報記憶媒体であってもよい。一連の指示は、成分を投与する部位、順序、頻度に関する指示、及び、意図される使用に関する他の情報を提供してもよい。キットの様々な成分は、キット内の別々のバイアル又は容器で提供されてもよく、又は一つのユニットとして提供されてもよい(一つのブリスターパッケージ内の分かれた区画内など)。

#### 【0092】

一実施形態では、本開示は、a)抗原を実質的に含まない、OPLSを含む第一組成物、及び、実質的にOPLSを含まない、抗原を含む第二組成物を提供すること、及びb)前記第一

10

20

30

40

50

及び第二組成物を皮膚経路によって別々に個体に投与し、その際、前記2つの組成物は、互いから2インチ以内の場所に投与される；ことを含む、抗原への免疫寛容を誘導するための方法を提供する。前記抗原とOPLSは、等張液(270~300 mmole/kg)中、又は高張液(300 mmol/kgより高い)中で投与されてもよい。様々な実施形態において、前記剤は、治療用であってもよく、治療量又は治療量以下の用量で存在してもよい。一又は両方の組成物は、1週間に1度又はそれ以上で、1~12週間又はそれ以上投与されてもよい。本開示で使用する「実質的に含まない」という用語は、組成物中に存在する特定の物質の量が、検出可能な臨床的に意義のある生物学的効果を有するのに十分ではないことを意味する。例えば、OPLS組成物は、抗原が0.5 mole%未満で存在する場合は、実質的に抗原を含まない。同様に、抗原組成物は、OPLS(又は脂質成分)が0.5 mole%未満で存在する場合は、OPLS(又は他の脂質成分)を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05 mole%未満のOPLS又は抗原が、抗原又はOPLS組成物中にそれぞれ存在している。

10

#### 【0093】

一実施形態では、本開示は、抗原への免疫寛容を誘導するための方法であって、個体にOPLSと治療量以下の量の抗原を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。前記OPLSと治療量以下の用量の抗原は、別々の組成物中であっても同じ組成物中であってもよい。同じ組成物中に存在する場合、前記OPLSと抗原は、緩く結合されているか結合されていない。前記組成物は、同じ又は異なる皮膚経路によって送達されてもよい。治療量以下の用量の治療用抗原は、許容される最小の治療量より少なくとも50%少ない(すなわち、その1/2であってもよい)用量と定義される。様々な治療薬の治療量は、臨床医及び当業者に周知である。様々な実施形態において、治療量以下の用量は、治療量の1/2~1/100のいかなる分数であってもよい。一実施形態では、それは、治療量の1/100~1/500であってもよい。一例として、FVIIIの治療量は、40 IU/kg~400 IU/kgであると考えられ、治療量以下の用量は、20 IU/kg以下である。一実施形態では、治療量以下の用量は、約10 IU/kgである。別の実施例として、GAAの臨床又は治療量は20 mg/kgであり、治療量以下の用量は、10 mg/kgである。一実施形態では、治療量以下の用量は、1 µg~1 mg/kgである。

20

#### 【0094】

一実施形態では、本開示は、抗原への免疫寛容を誘導する方法であって、個体に、OPLSと治療量の抗原を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。前記OPLSと治療量の抗原は、別々の組成物中であっても同じ組成物中であってもよい。同じ組成物中に存在する場合、前記OPLSと抗原は、緩く結合されているか(10 µM~500 µMの $K_d$ )又は結合されていない(500 µMより大きい $K_d$ )。前記組成物は、同じ又は異なる皮膚経路により送達されてもよい。一実施形態では、前記剤は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、抗体のフラグメント、又はそれらの組み合わせであってもよい抗体である。

30

#### 【0095】

一実施形態では、本開示は、個体に抗原への免疫寛容を誘導する方法であって、a)前記個体から樹状細胞を採取すること、b)前記樹状細胞をインビトロでOPLSと抗原に接触させること、c)前記樹状細胞を前記個体に戻すことを含む方法を提供する。前記樹状細胞は、同時に又は連続してOPLSと抗原に暴露されてもよい。前記抗原は、治療量又は治療量以下の用量で使用されてもよい。一実施形態では、前記樹状細胞は、二以上の抗原に暴露されてもよい。

40

#### 【0096】

一面では、本開示は免疫寛容を誘導するキットを提供する。前記キットは、以下の一以上を含んでもよい：OPLSを含む組成物(抗原を実質的に含まないか、完全に含まない)；一以上の抗原を含む組成物(OPLS又は他の脂質成分を実質的に含まないか、完全に含まない)；皮膚経路によって投与するための指示；又はインビトロで細胞を暴露するための指示；任意に、前記組成物を投与するための一以上の投与装置。前記投与装置は、シリンジ、注射ペン、皮膚パッチ及び同様のものであってもよい。

#### 【0097】

50



以下の実施例は、本発明を説明するために存在する。それらはいかなる方法による限定も意図しない。

#### 【0098】

##### [実施例1]

本実施例は、投与されたOPLS抗原組成物の特性化を提供する。

#### 【0099】

物質：完全長組換えヒトFVIII(カルフォルニア州、カールズバッド、Baxter Biosciences社)は、西ニューヨーク州血友病基金から提供を受けた。Ova及びヒトIgGは、Sigma(ミズーリ州、セントルイス)から、ヒュミラとリツキシマブは市販されている。本開示のために、ヒュミラは、薬局から購入した。O-ホスホ-L-セリン(OPLS)は、Sigma社(ミズーリ州、セントルイス)から購入した。全ての溶媒と緩衝塩は、Fisher Scientific社(ニュージャージー州、フェアローン)から、又はSigma社(ミズーリ州、セントルイス)から得た。抗-FVIIIモノクローナル抗体ESH8は、American Diagnostica社(コネティカット州、グリニッチ)から得た。ヤギ抗-マウスIgGは、Southern Biotechnology Associates社(アラバマ州、バーミングハム)から購入した。ウシ血清アルブミン(BSA)は、Sigma社(ミズーリ州、セントルイス)から購入し、ホスファターゼ基質系(ジエタノールアミンバッファー及びp-ニトロフェニルリン酸)は、KPL社(メリーランド州、ゲイサースパーク)から購入した。Chromogenix Coamatic FVIIIアッセイキットは、血漿中のFVIIIの検出のため、DiaPharmaグループ(オハイオ州、ウェストチェスター)から購入した。抗-Ova IgG力価分析キットは、alphadiagnostic international社から得た。

#### 【0100】

インビボ皮下投与後のFVIIIの免疫原性に対するOPLSの影響：6～8週齢の21匹のHAマウスは、3つのグループに分割された。グループ1は、腹部皮下に1ug FVIIIを受けた。グループ2は、腹部皮下に1ug FVIII + 0.4mg OPLSを受け、グループ3は、腹部皮下に1ug FVIII + 5mg OPLSを受けた。FVIIIとOPLSの37・30分間のインキュベーションは、複合体形成を確実にするが、この例では、OPLSとFVIIIは、室温(22)にて所望の濃度で混ぜ合わされ、直ちに投与された(1分以内)。この治療は、1, 8, 10及び12日に行われた。最後の注射の3日後、前記動物は屠殺された。血液は、7500 rpmにて5分間4で遠心分離された。血漿はその後回収され、-80で分析まで貯蔵された。結果を図3に示す。

#### 【0101】

総力価は、古典的標準ELISAによって測定された。抗-FVIII抗体(ESH8)は、コントロールとして使用された。統計は、対数変換されたデータの算術平均で行われ、グラフは幾何平均で報告される。非応答者は、均一性のため、プレート特異的ファクター値を与えられた。

#### 【0102】

O-ホスホ-L-セリンの存在及び不存在下のHAマウスにおけるFVIIIのPK：6～8週齢の60匹のHAマウスが、それぞれ動物30匹の2グループに分割された。第一グループは、各注射後60秒のマッサージ付きで、5IU/g FVIIIを腹部に受けた。第二グループは、腹部にFVIII + OPLS(5IU/g FVIII + 0.4mg OPLS)を受け、その後上述のようにマッサージを受けた。各グループから3匹の動物が、以下のプリセット時点4、6、9、12、15、18、24、33及び44時間に屠殺された。全血及び鼠径リンパ節が採取された。血液は、7500 rpmにて5分間4で遠心分離された。全サンプルは、-80で分析まで貯蔵された。サンプルは、Coamatic Factor VIIIキット(米国、オハイオ州、ウェストチェスター、DiaPharma社)アッセイを使用して、製造者の指示に従って分析された。

#### 【0103】

OPLSと生物学的治療薬(例えば、FVIII)の静脈内同時投与は、薬物動態にほとんど影響を与えない：血漿暴露におけるわずかな増加のみが見られた(図4)。しかしながら、生物学的治療薬とOPLS又はPS-リボソームの皮下同時投与は、巨大タンパク質の重要な取り込み経路である皮下スペースからのリンパ取り込みを向上させ、生物学的治療薬単独の皮下

投与と比較してそれらの生物学的利用率を向上させる。皮下投与された場合、OPLSは、生物学的治療薬が体から急速に除去されるのを効果的に止めることができる。向上したリンパ取り込みとリンパ管内での滞留時間の延長は、血漿暴露の延長に変わる(図5)。

#### 【0104】

タンパク質抗原(FVIII)の存在及び不存在下における、骨髓由来樹状細胞(BMDC)のサイトカインプロファイルに対するOPLSの影響：骨髓は、6～8週齢の2匹のH Aマウスから単離された。手短に説明とすると、骨髓は、ウシ胎児アルブミン、2-メルカプトエタノール、ペンノストリップ及びGM-CSFを補充されたRPMI培地で培養された。培地は、培養の3、6及び8日目に換えられ、DCは9又は10日目に使用された。この長期培養方法は、9又は10日目に70～80%の未熟DCをもたらす。DCは回収後すぐ、以下の治療群の一つにかけられた：未処置(ネガティブコントロール)、FVIII単独(ポジティブコントロール)、FVIIIと漸増用量のOPLS(10 mM、50 mM及び100 mM OPLS)、OPLS単独(100nM)、及びリボ多糖(炎症応答のためのポジティブコントロール)。細胞は、三つ組で蒔かれ、2セットが作られた。一つはサイトカイン分析のために使用され、培地がサイトカイン分析のために収集される前の72時間培地中に置かれた。TGF-、TNF- 及びIL-6濃度は、標準ELISA(DuoSet ELISA kit; 米国、ミネソタ州、ミネアポリス、R&D System社)を使用して測定された。他方のセットは、培地が除去される前の24時間培地中に置かれ、DCは、以下のようにFVIIIを用いた積極的免疫化スケジュールにかけられたH Aマウスの脾臓から単離されたCD4<sup>+</sup>T細胞と共培養された：1週目：月曜日に皮下で与えられた1ugのFVIII 2週目：月曜日、水曜日及び金曜日の各日に皮下で与えられた1ugのFVIII。最終免疫の72時間後に、動物は屠殺され、脾臓が収集され、粉碎され、CD4<sup>+</sup>T細胞は、ネガティブ単離キット(米国、カルフォルニア州、オーバーン、Miltenyi Biotec社)を使用して、製造者のプロトコル通りに単離された。DCとの共培養の72時間後、上清が除去され、T細胞によるTFG-及びIL-17産生を測定するために、サイトカイン分析が標準ELISAを使用して行われた(DuoSet ELISA kit; 米国、ミネソタ州、ミネアポリス、R&D System社)。結果を図1に示す。

#### 【0105】

OPLSの複数の治療用タンパク質への結合は、蛍光分光法を使用して評価された(図2)。蛍光発光はOPLSの濃度が増加するにつれて減少した。蛍光強度の変化は、GAAとOVAに比べ、FVIIIで最も高かった。分光学的滴定に基づいて推定される結合定数は、FVIIIがOPLSに高親和性で結合し、GAA及びOVAは親和性が低いことを示した。FVIIIへの高い親和性結合は、推定上の脂質結合ドメインの存在と一致している。

#### 【0106】

##### [実施例2]

本実施例は、インビボ皮下投与後の卵白アルブミン(Ova)の免疫原性に対するOPLSの影響を説明する。

#### 【0107】

方法：6～8週齢の14匹のS Wマウスは、2つのグループに分割された。グループ1は、腹部皮下に1ug OVAを受けた。グループ2は、腹部皮下に1ug OVA / 5mg OPLSを受けた。この治療は、1, 8, 10及び12日に行われた。最後の注射の3日後、前記動物は屠殺された。血液は、7500 rpmにて5分間4 で遠心分離された。血漿はその後回収され、-80で分析まで貯蔵された。力価は抗-Ova IgG力価分析キットを製造者(alphadiagnostic international社)の指示通りに使用して得られた。統計は、対数変換されたデータの算術平均で行われ、グラフは幾何平均で報告される。非応答者は、均一性のため、プレート特異的ファクター値を与えられた。

#### 【0108】

図6(a)に示すように、抗-Ova抗体価は、OPLS(Sigma)(5mg量)とOva(Sigma)(1ug)を皮下ルートにより同時投与されたマウスにおいて、Ova(1ug)単独を投与された(同じく皮下ルートで)マウスより低かった。このケースでは、OPLSとOva間に結合がないことが、OPLSとOvaが同時投与される際に見られる免疫原性の低下は、上述した免疫学的機序(寛容誘導

とは異なる)に起因することを提案する。

【0109】

[実施例3]

本実施例は、酸性 グルコシダーゼプロテイン(GAA)の免疫原性に対するOPLSの影響を説明する。

【0110】

物質及び方法

GAA源：完全長組換えrhGAAは、我々の使用のために、Creative Biomart社(ニューヨーク州、シャーリー)によって、ヒト腎臓胚細胞内で産生された；OPLS源：Sigma-Aldrich社(ミズーリ州、セントルイス)。n = 8 動物 / グループは、遊離グループのための無菌TRIS 又はOPLS-GAAグループのための無菌TRIS中の5mg OPLSのどちらか100ul中の1ug GAAの週 1 回・4度の皮下注射で免疫化された。1グループ8匹のマウスは、ネガティブコントロールとして、5mg O-ホスホ-D-セリン(OPDS)溶液中の同量のCBrhGAAを受ける。2週間の休止期間後、伏在静脈から血液サンプルが採取される。サンプルは、分析まで - 80 で貯蔵された。これらのサンプルはその後、抗-GAA Ab力価のために分析された。抗-GAA抗体価は以下のように測定された：ELISAプレート(maxisorp, NUNC)は、炭酸ナトリウム-炭酸水素バッファー(pH=9.6)中の5ug/mlの無菌rhGAA、50ulで被覆された。プレートは、4で一晩インキュベートされた。プレートは、自動プレート洗浄機を使用して、0.05% Tween 20含有PBS(PBS-T、250ul/ウェル)で6回洗浄された。プレートは、ブロックバッファーとして、1%BSA含有PBS(300ul/ウェル)で、37・2時間ブロックされた。プレートは、PBS-Tで6回洗浄された。サンプルの連続希釈(100ul/ウェル)は、その後二つ組で前記プレートに添加された。サンプルは37で1時間インキュベートされた。プレートは、PBS-Tで6回洗浄された。ブロックバッファー中の検出抗体(1:10000希釈及び100ul/ウェル)が、ウェルに添加され、室温で1時間インキュベートされた。プレートは、PBS-Tで6回洗浄された。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン基質(100ul/ウェル)が、ウェルに添加され、室温で30分間インキュベートされた。反応は2N硫酸で停止され、直ちにマイクロプレートリーダーを用いて450 nmで読み取られた。力価は、Freyらによって記述されている統計エンドポイント法を使用して定量化される。コントロールの血漿サンプルは、各プレート上で実行された。統計解析：統計的有意差(p<0.05)一元配置ANOVA、その後Grampad Prismを使用するダネット事後多重比較検定(Frey et al., J. Immunol. Methods, 1998, 221(1-2): p.35-41)。

【0111】

図6(c)に示されるように、抗-GAA抗体価は、(a)皮下ルートによるOPLS(5mg量)とGAA、又は(b)皮下ルートによるOPDS(5mg量)とGAAのどちらかを同時投与されたマウスにおいて、GAAを単独投与されたマウスより(同じく皮下ルート)低かった。抗-GAA力価レベルは、OPLSとGAAを同時投与されたマウスで最も低かった。OPDSとGAAを同時投与されたマウスで見られた抗-GAA抗体価のわずかな減少は、生体内でOPLSがOPDSへ変換することに起因する可能性がある。このケースでは、OPLSとGAA間に結合がないことが、OPLSとGAAが同時投与される際に見られる免疫原性の低下は、上述した免疫学的機序(寛容誘導とは異なる)に起因することを提案する。同様の知見が、PS-リボソームとGAAの同時投与後に観察された(図10)。

【0112】

[実施例4]

本実施例は、アダリムマブの免疫原性に対するOPLSの影響を説明する。

【0113】

方法：n = 8 動物 / グループは、遊離グループのための無菌TRIS又はOPLS-アダリムマブグループのための無菌TRIS中の5mg OPLSのどちらか100ul中の10 ug アダリムマブの週 1 回・4度の皮下注射で免疫化された。2週間の休止期間後、伏在静脈から血液サンプルが、力価分析のために採取された。力価は、古典的サンドイッチELISAによって得られた。手短に説明すると、Nunc-Maxisorb 96-ウェルプレートは、50 µl / ウェルの2.5 µg/ml ヒ

ユミラで4 にて一晚被覆された。プレートはその後洗浄され、1%ウシ血清アルブミン(ブロッキングバッファー)でブロックされた。様々な希釈サンプルが50 µl / ウェルで前記プレートに添加され、室温で2時間インキュベートされた。動物の血漿サンプルはコントロールとして役立つ偽治療(バッファーのみ)にかけられる。前記プレートはその後洗浄され、50 µlのヤギ抗-マウス抗体-HRP複合体で、ブロッキングバッファー中1:50000希釈にて、室温で1時間インキュベートされた。100 µlのTMB溶液で20分間発色が行われた。100 µlの2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>が反応を停止するために使用された。405 nmにおける光学濃度がプレートリーダーを用いて測定された。非応答者は、均一性のため、プレート特異的ファクター値を与えられた。

【0114】

図6(d)に示すように、抗-ヒュミラ抗体価は、皮下ルートによって、OPLS(5 mg量)とヒュミラ[登録商標](10 mg/g)を同時投与されたマウスにおいて、ヒュミラ[登録商標]単独(10 mg/g)を投与された(同様に、皮下ルートにより)マウスより低かった(週1回・4度の注射に続く2週間の休薬期間の後)。力価は、古典的サンドイッチELISAによって得られ、前記プレートは血漿サンプルを用いた希釈物とインキュベートされる前にヒュミラで被覆され、抗-ヒュミラ抗体はラット抗-マウス-HRP複合抗体で検出された。このケースでは、OPLSとヒュミラ[登録商標]間の弱い結合が、OPLSとヒュミラ[登録商標]が同時投与される際に見られる免疫原性の低下は、上述した免疫学的機序(寛容誘導とは異なる)に起因することを提案する。ここでみられる弱い結合が免疫学的エピトープを「遮蔽(shielding)」していることは極めて疑わしい。

【0115】

[実施例5]

本実施例は、ヒトIgG免疫原性に対するOPLSの影響を説明する。

【0116】

物質及び方法：8匹の動物がこの予備研究のために使用され、4匹の動物がヒト-IgG(Sigma)単独(1ug)を又はヒトIgG + OPLS(1ug ヒトIgG + 0.4mg OPLS)を注射された。この研究は、以下のように2週間の期間にわたる4回の注射とともに行われた；1日目、8日目、10日目及び12日目、続いて3日の休薬期間。ELISAは、総力価を測定するために実施された。手短に説明すると、Nunc-Maxisorb 96-ウェルプレートは、50 µl / ウェルの2.5 µg / mlヒトIgGで4 にて一晚被覆された。プレートはその後洗浄され、1%ウシ血清アルブミン(ブロッキングバッファー)でブロックされた。様々な希釈サンプルが50 µl / ウェルで前記プレートに添加され、室温で2時間インキュベートされた。動物の血漿サンプルはコントロールとして役立つ偽治療(バッファーのみ)にかけられる。前記プレートはその後洗浄され、50 µlのヤギ抗-マウス抗体-HRP複合体で、ブロッキングバッファー中1:50000希釈にて、室温で1時間インキュベートされた。100 µlのTMB溶液で20分間発色が行われた。100 µlの2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>が反応を停止するために使用された。405 nmにおける光学濃度がプレートリーダーを用いて測定された。非応答者は、均一性のため、プレート特異的ファクター値を与えられた。

【0117】

この予備研究では、動物はヒトIgG(Sigma)単独(1ug)を又はOPLS(5mg)を注射された。この研究は、以下のように2週間の期間にわたる4回の注射とともに行われた；1日目、8日目、10日目及び12日目、続いて3日の休薬期間。力価は上述の通り古典的ELISAによって得られた。図7に示されるように、抗-IgG抗体価は、皮下ルートによって、OPLS(0.4mg量)とIgGを同時投与されたマウスにおいて、IgG単独を投与された(同様に、皮下ルートにより)マウスより低かった。試験された他の生物学的治療薬で見られたように、より多量のOPLS(5mg以上)が、IgGと同時に投与された場合、力価レベルにさらにいっそう明白な影響を示すことが予想される。

【0118】

[実施例6]

本実施例は、リツキシマブ免疫原性(RXT)に対するOPLSの影響を説明する。

## 【0119】

物質及び方法：6～8週齢の30匹のSWマウスは、3つのグループに分割された。グループ1は、腹部皮下に1ug RXTを受けた。グループ2は、腹部皮下に1ug RXT / 0.4mg OPLSを受け、グループ3は、腹部皮下に1ug RXT / 5mg OPLSを受けた。この治療は、1, 8, 10及び12日に行われた。最後の注射の3日後、前記動物は屠殺された。血液は、7500 rpmにて5分間4で遠心分離された。血漿はその後回収され、-80で分析まで貯蔵された。総力価は、古典的標準ELISAによって測定された。手短に説明すると、Nunc-Maxisorb 96-ウェルプレートは、50 µl / ウェルの2.5 µg/ml RXTで4にて一晚被覆された。プレートはその後洗浄され、1%ウシ血清アルブミン(ブロッキングバッファー)でブロックされた。様々な希釈サンプルが50 µl / ウェルで前記プレートに添加され、室温で2時間インキュベートされた。動物の血漿サンプルはコントロールとして役立つ偽治療(バッファーのみ)にかけられる。前記プレートはその後洗浄され、50 µlのヤギ抗-マウスFc-特異的抗体-HRP複合体で、ブロッキングバッファー中1:50000希釈にて、室温で1時間インキュベートされた。100 µlのTMB溶液で20分間発色が行われた。100ulの2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>が反応を停止するために使用された。405 nmにおける光学濃度がプレートリーダーを用いて測定された。非応答者は、均一性のため、プレート特異的ファクター値を与えられた。統計は、対数変換されたデータの算術平均で行われ、グラフは幾何平均で報告される。非応答者は、均一性のため、プレート特異的ファクター値を与えられた。

10

## 【0120】

図8に示されるように、抗-RXT抗体価は、皮下ルートによって、用量依存的様式でOPLS (5mg vs 0.4mg)とRXT(1ug)を同時投与されたマウスにおいて、RXT(1ug)単独を投与された(同様に、皮下ルートにより)マウスより低かった。

20

## 【0121】

## [実施例7]

本実施例は、酸性 グルコシダーゼ(GAA)ペプチド免疫原性に対するOPLSとPS-リボソームの影響を説明する。

## 【0122】

## 物質及び方法

GAAペプチド源：このGAAペプチドは、American Peptide Company社(カリフォルニア州、サニーベール)によって製造された。彼らは、我々のために、完全長GAA配列の339-352のアミノ酸 YIFLGPE P K SVVQを含む13アミノ酸長のペプチドを製造した。OPLS源：Sigma-Aldrich(ミズーリ州、セントルイス) ペプチド濃縮用量：10ug / 注射 遊離GAAペプチド(n=4)、PS-GAAペプチド(n=4)、OPLS-GAAペプチド(n=5) 各マウスは、各治療の100 µl / 注射を、尾の付け根付近に週1回・4度皮下(s.c.)注射された。最後の注射の2週間後に、後眼窩の血液サンプルが各マウスから採取された。サンプルは分析まで-80で貯蔵された。これらのサンプルはその後、抗-GAAペプチドAb力価のために分析された。抗-GAA抗体価は以下のように測定された：ELISAプレート(maxisorp, NUNC)は、炭酸ナトリウム-炭酸水素バッファー(pH=9.6)中の10ug/mlの無菌rhGAA、100ulで被覆された。プレートは、4で一晚インキュベートされた。プレートは、自動プレート洗浄機を使用して、0.05%Tween 20含有PBS(PBS-T、250ul / ウェル)で6回洗浄された。プレートは、ブロックバッファーとして、1%BSA含有PBS(300ul / ウェル)で、37・2時間ブロックされた。プレートは、PBS-Tで6回洗浄された。サンプルの連続希釈(100ul / ウェル)は、その後二つ組で前記プレートに添加された。サンプルは37で1時間インキュベートされた。プレートは、PBS-Tで6回洗浄された。ブロックバッファー中の検出抗体(1:10000希釈及び100ul / ウェル)が、ウェルに添加され、室温で1時間インキュベートされた。プレートは、PBS-Tで6回洗浄された。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン基質(100ul / ウェル)が、ウェルに添加され、室温で30分間インキュベートされた。反応は2N硫酸で停止され、直ちにマイクロプレートリーダーを用いて450 nmで読み取られた。力価は、Freyらによって記述されている統計エンドポイント法を使用して定量化される。コントロールの血漿サンプルは、各プレート上で実行された。統計解析：統計的有意差(p<0.05)一元配置ANOVA

30

40

50

、その後GraphPad Prismを使用するダネット事後多重比較検定。

【0123】

図9に示されるように、抗-GAAペプチド抗体価は、(a)皮下ルートによるOPLS(5mg量)とGAAペプチド、又は(b)皮下ルートによるPS-リボソーム(PS/PC、タンパク質の分子量に基づくタンパク質：脂質比1：10,000)とGAAペプチドのどちらかを同時投与されたマウスにおいて、GAAペプチドを単独投与されたマウスより(同じく皮下ルート)低かった。抗-GAAペプチド力価レベルは、OPLSとGAAを同時投与されたマウスで最も低かった。

【0124】

GAAペプチドはOPLSに結合しなかった。GAAペプチドは内部蛍光を持たないので、我々は他のタンパク質-OPLS結合研究とは異なる方法を使用する必要があった。結合を検出するために蛍光を使用する代わりに、紫外/可視分光法が使用された。

10

【0125】

[実施例8]

本実施例は、OPLS及びPS-リボソームを使用する、GAAタンパク質への寛容誘導を説明する。

【0126】

物質：完全長組換えrhGAAは、我々の使用のために、Creative Biomart社(ニューヨーク州、シャーリー)によって、ヒト腎臓胚細胞内で産生された；ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)、ホスファチジルグリセロール(PG)及び脳ホスファチジルセリン(PS)は、Avanti Polar Lipids社(アラバマ州、アラバスター)から購入した。O-ホスホ-L-セリン(OPLS)、ヤギ-抗-マウスIgG西洋わさびペルオキシダーゼ、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質は、Sigma-Aldrich社(ミズーリ州、セントルイス)から購入した。動物：ポンベ病マウスのつがいは、Jackson Laboratory社(メイン州、バー・ハーバー)から購入した。ノックアウト遺伝子のためのコロニーホモ接合が樹立され、8~12週齢の動物が生体内研究のために使用された。

20

【0127】

OPLSによるGAA寛容

方法：n = 8 動物/グループは、遊離グループのための無菌TRIS又はOPLS-GAAグループのための無菌TRIS中の5mg OPLSのどちらか100ul中の1ug GAAの週1回・4度の皮下注射で免疫化された。1グループ8匹のマウスは、ネガティブコントロールとして5mg O-ホスホ-D-セリン(OPDS)溶液中の同量のGAAを受ける。2週間の休止期間後、伏在静脈から血液サンプルが採取される。マウスはその後無菌TRIS中の遊離GAA 1ugで4週間再負荷された。マウスはさらに2週間の休止期間後に屠殺され、血漿が採取され、ELISAによる抗-GAA Ab力価の分析まで - 80 °C で貯蔵された。

30

【0128】

PS-リボソームによるGAA寛容

方法：n = 8 動物/グループは、遊離グループのための無菌TRIS又はPSグループのためのPSリボソーム製剤(30%PC、70%DMPC)どちらか100ul中の1ug GAAの週1回・4度の皮下注射で免疫化された。1グループ8匹のマウスは、ネガティブ負荷対応コントロールとしてPG30リボソーム製剤(30%PG、70%DMPC)中の同量のGAAを受けた。2週間の休止期間後、伏在静脈から血液サンプルが採取される。マウスはその後無菌TRIS中の1ugの遊離GAAで4週間再負荷された。マウスはさらに2週間の休止期間後に屠殺され、血漿が採取され、ELISAによる抗-GAA Ab力価の分析まで - 80 °C で貯蔵された。

40

【0129】

抗-GAA抗体価

ELISAプレート(maxisorp, NUNC)は、炭酸ナトリウム-炭酸水素バッファー(pH=9.6)中の5ug/mlの無菌GAA、50ulで被覆された。プレートは、4 °Cで一晩インキュベートされた。プレートは、自動プレート洗浄機を使用して、0.05%Tween 20含有PBS(PBS-T、250ul/ウェル)で6回洗浄された。プレートは、ブロックバッファーとして、1%BSA含有PBS(300ul/ウェル)で、37 °C・2時間ブロックされた。プレートは、PBS-Tで6回洗浄された。サン

50

プルの連続希釈(100ul/ウェル)は、その後二つ組で前記プレートに添加された。サンプルは37℃で1時間インキュベートされた。プレートは、PBS-Tで6回洗浄された。ブロックバッファー中の検出抗体(1:10000希釈及び100ul/ウェル)が、ウェルに添加され、室温で1時間インキュベートされた。プレートは、PBS-Tで6回洗浄された。TMB基質(100ul/ウェル)が、ウェルに添加され、室温で30分間インキュベートされた。反応は2N硫酸で停止され、直ちにマイクロプレートリーダーを用いて450 nmで読み取られた。力価は、Freyらによって記述されている統計エンドポイント法を使用して定量化される(Journal of Immunological Methods, 1998, 221(1-2): p.35-41)。コントロールの血漿サンプルは、各プレート上で実行された。統計解析:統計的有意差( $p < 0.05$ )一元配置ANOVA、その後にGraphPad Prismを使用するダネット事後多重比較検定。

10

#### 【0130】

結果:GAA再負荷後の抗-GAA抗体価は、図13に示されるように、遊離GAAで処置された動物と比較して、OPLS-GAAで処置した動物で有意に低いことが見出された。GAA再負荷後の抗-GAA抗体価は、図14に示されるように、遊離GAAで処置された動物と比較して、GAA-PSリポソームで処置した動物で有意に低いことが見出された。

#### 【0131】

##### [実施例9]

本実施例は、PS媒介低応答性における制御性T細胞(Treg)について説明する。

#### 【0132】

方法論:免疫化研究は、血友病Aマウスモデルで実施された。動物( $n=3$ /処置グループ)は、12週間毎週、遊離FVIII又はFVIII-PS(FVIII 2 $\mu$ g)のどちらかの皮下注射を受けた。最後の注射の2週間後、CD4+T細胞が免疫化動物の脾臓から単離され、CD4抗体に複合化されたFITC及び抗FoxP3抗体に複合化されたPEで染色された。二重陽性細胞が、フローサイトメトリーを使用して分析された。FITCとPEのスペクトルの重複を説明するために、個々に標識されたFITCとPEコントロールを使用する補正が取得され、FlowJOソフトウェアを使用して補正が実施された。統計解析は、Minitabソフトウェアを使用する片側対応t検定を使用して実施された。

20

#### 【0133】

結果:FoxP3発現が、制御性T細胞のバイオマーカーとして分析された。CD4+FoxP3+二重陽性細胞は、FVIII単独処置グループと比較してFVIII-PS処置グループで有意に高かった(図16)。

30

#### 【0134】

##### [実施例11]

本実施例は、PS媒介低応答性におけるメモリーB細胞の役割を説明する。

#### 【0135】

方法論:免疫化研究は、GFP-FoxP3ノックイン血友病Aマウスモデルで実施された。動物( $n=7$ 又は $8$ /処置グループ)は、12週間毎週、遊離FVIII又はFVIII-PS又はFVIII-PG30(FVIII 2 $\mu$ g)のどちらかの皮下注射を受けた。1グループの動物( $n=5$ )は、未処置のままにされ、未処置コントロールとして役立つ。最後の注射の2週間後に、全ての動物が屠殺され、メモリーB細胞が脾臓から単離された。全マウスからの約 $0.1 \times 10^6$ メモリーB細胞が、陰茎静脈を経て、対応する個々の未処置GFP-FoxP3血友病マウスに養子導入された。48時間の待機時間の後、全てのレシピエント動物は、1 $\mu$ gの遊離FVIII/注射による週1回・4度の皮下注射で積極的に免疫化された。最後の注射の2週間後、全ての動物は屠殺され、抗体価レベルの分析のために血漿サンプルが採取された。

40

#### 【0136】

結果:血漿サンプルは、総抗-FVIII抗体価レベルの存在のために分析された。FVIII処置マウス又は未処置(未治療)のマウスのメモリーB細胞を受けたマウスは、強いFVIII免疫応答を生じた。比較すると、PS-FVIII処置ドナーマウスのメモリーB細胞を受けたマウスは、有意に低下した抗-FVIII抗体価を示した。しかしながら、別の負電荷PG脂質と会合したFVIII(FVIII-PG)で処置されたマウスから導入されたメモリーB細胞は、抗体価を有意

50

に減少しなかった(図17)。

【0137】

[実施例11]

本実施例は、免疫寛容を誘導するための近接の必要性について説明する。

【0138】

マウスは、4週間の間、一方の側腹部に無負荷のPSリボソームを注射され、他方の側腹部に遊離FVIIIを注射され、その後、屠殺前に4週間以上、遊離FVIIIで再負荷された。空間的な近接が重要でなければ、空間的に分離されたPSとFVIIIによる処置は、力価の減少をもたらすはずである。しかしながら、データは、中和( $425 \pm 100$  SEM,  $n=5$ )と総抗-FVIII( $8197 \pm 1235$  SEM,  $n=5$ )の力価の両方が、遊離FVIIIコントロール( $469 \pm 63.3$  SEM( $n=5$ ))の中和力価、及び $5153 \pm 893$  SEM( $n=5$ )の総抗-FVIII力価を有する)と有意に異なることを示した(それぞれ、図18及び図19)。有意な差は、2つの処置グループの間で観察されなかった。これは、空間的な近接が、PS製剤によるFVIIIへの永続的な低応答性の誘導のために必要であることを示唆する。

10

【0139】

外来性FVIII投与に対する免疫応答の発生は、大きな臨床的問題である。補充療法を受けている患者の15~30%に中和抗体が発生し、血友病Aの患者において、この治療の効力を減じている。この免疫原性を元に戻すための現在の戦略は、長い期間、しばしば1年までの間、免疫抑制剤と多量のFVIIIの併用投与を必要とする。この戦略は、コストが高く、且つ、治療の間低下した免疫系を有するであろう患者にとって、相当なリスクを伴う。このように、FVIIIの免疫原性を低下させる新しい方法の開発は、極めて重要である。

20

【0140】

従前の研究は、FVIIIとPSの複合体形成が、血友病マウスにおいてFVIIIに対する免疫応答を低下させることを示した。PS-FVIII製剤によるFVIIIへの低応答性の誘導は、「リバースワクチン接種」戦略であると考えられることができる。抗原に対する免疫応答を樹立するための試みよりむしろ、治療の目的は、抗原に対し患者を脱感作させることである。これが達成されるメカニズムが、アポトーシス細胞がそれらの細胞内タンパク質への寛容を誘導する方法と似ている場合、この低応答性は抗原特異的であるはずである。非特異的応答は、免疫抑制の原因となるので、臨床的にも望ましくない。

【0141】

30

アポトーシスは細胞レベルで発生する局所的現象であるので、この低応答性が発生するためには、FVIIIとPSの間に空間的な近接が要求されるはずである。これを試験するために、一方の側腹部に無負荷PSリボソームを受け、反対の側腹部に遊離FVIIIを受けたマウスが、遊離FVIIIで再負荷された。これらのマウスは、遊離FVIIIコントロールと比較したとき、FVIIIへの免疫応答に違いを示さなかった。このデータは、低応答性を発生させるために、解剖学的な近接が要求されることを示唆する。この観察は、PS-FVIIIが、FVIIIへの寛容を誘導するためにアポトーシス模倣を採用するという理論を支持する。

【0142】

結論として、このデータから、PS-FVIIIリボソーム製剤の免疫学的効果が、抗原としてのFVIII及びPS含有リボソームへのFVIIIの解剖学的近接の両方に特異的であることが明確である。これらの結論は、アポトーシス模倣による寛容誘導が、リバースワクチン接種PS-FVIII治療の結果として観察された免疫応答低下のメカニズムであるという仮説と一致する。今後の研究は、確立された力価を覆すため、及び、FVIII以外の抗原への低応答性を誘導するPS含有リボソーム製剤の可能性に取り組むべきである。

40

【0143】

[実施例12]

本実施例は、樹状細胞におけるアポトーシス誘導を説明する。

【0144】

ホスファチジルセリンは天然起源の脂質であり、アポトーシス性及び他の細胞種によって放出される小胞の一部であり、エキソソーム、エクソソーム(ectosomes)、微小胞、膜

50



粒子及びアポトーシス小体を含む。一実施形態において、タンパク質は、単離後にこれらの粒子に負荷されることができ、及び、免疫原性の低下及び／又は寛容の誘導のために使用されることができる。樹状細胞は、第VIII因子欠損マウスの骨髓前駆細胞から単離された。手短に説明すると、骨髓細胞は、大腿骨及び脛骨から採取された。細胞は8日間培養され、2日ごとに培地が交換された。8日目に、懸濁RPMI培地から細胞が収集され、遠心分離され、新しいプレートに蒔かれた。未熟樹状細胞はその後、アポトーシス誘導のために使用された。

#### 【0145】

樹状細胞におけるアポトーシス誘導が複数の方法で試験された。試験した方法のいくつかは、1時間/5分時点ごとの8W UV トランスイルミネーターを使用するUV照射、5mM 酪酸ナトリウム総濃度を添加することによる、45 1時間の熱ショック、及び24時間の血清枯渇であった。細胞は、細胞破片を除去するために10分間300gでの48時間のインダクション後にペレット状に沈降し、続いて20分間2000~10,000g及び100,000gがエキソソームのために要求される。アポトーシス誘導効率は、蛍光顕微鏡を使用して、Sigma社のアネキシンV/ヨウ化プロピジウムキットを使用してその後試験された。これらのアポトーシス小体と小胞は、免疫原性を低下させ寛容を誘導するために、タンパク質(FVIII、GAA、ヒュミラなど)を負荷されることができ。

#### 【0146】

##### [実施例13]

本実施例はOPLSの安全性の特性化を説明する。

#### 【0147】

ここに記載される方法が、5 mg以上の用量のOPLSでもっとも良く機能すると思われることを考えれば、高用量のOPLSの安全性及び毒性を理解することは重要である。図11~14に示されるように、頻回の、高用量(最大950 mgまで)のOPLSは、げっ歯類と霊長類モデルの両方において耐容性が良い。

#### 【0148】

##### [実施例14]

本実施例は、OPLS-GAAの連続投与研究について記載する。分離した空間の注射、同じ注射部位で2つが投与された場合、OPLSがGAAへの免疫応答に対し、その免疫調節性作用を発揮できるかどうかを決定するために、以下の実験が実施された。マウス(n=6の動物/グループ)が、以下のように週1回・4度の皮下注射で免疫化された。動物の1つのグループは、5mg OPLSと1ug rhGAA(100ul体積)の単一の複合注射を受けた。組換えヒトGAAは、Creative Biomart社によって製造された。第二グループは、5mg OPLS(100ul体積)の注射を受け、5分間待った後、同じ注射部位に無菌TRIS(100ul体積)中の1ug rhGAAの第二の注射を受けた。最後のコントロールグループは、無菌TRIS(100ul体積)の注射を受け、5分間待った後、同じ注射部位に無菌TRIS(100ul体積)中の1ug rhGAAの第二の注射を受けた。2週間の休止期間の後、伏在静脈の血液サンプルが採取された。全てのマウスは、その後、100ul無菌TRIS中の1ug rhGAA(単一の注射)の週1回・4度の注射で再負荷された。総力価について、分析がELISAによって行われた。結果を図26~28に示す。6週間後の平均遊離GAAは $3135 \pm 910$ であり、同時投与された場合、GAAは $787 \pm 155$ であり、別々に(連続して)投与された場合、GAAは $926 \pm 202$ であった(図26)。再負荷後、最終のサンプリングは11週目に行われた。結果を図27に示す。11週間後の平均遊離GAAは $8775 \pm 2363$ であり、同時投与された場合、GAAは $895 \pm 335$ であり、別々に(連続して)投与された場合、GAAは $1884 \pm 761$ であった。これは、5mg OPLSと同時投与されたGAA又は、5mg OPLSの注射の5分後同じ場所にGAA投与を受けたマウスの力価が、遊離GAAを受けた動物の力価と比較して、再負荷後に有意に低いことを示す。どちらの投与方法もGAAへの低応答性を誘導することができた。6週と11週の結果をまとめて図28に示す。

#### 【0149】

##### [実施例15]

本実施例において、我々は高張バッファの効果を試験した。我々は、3つの異なる賦

10

20

30

40

50

形剤を使用する高張バッファー系を作製した：NaCl、マンニトール及びO-ホスホ-L-セリン(OPLS)。NaClは浸透圧を調節するための一般的な塩として選択された。マンニトールはタンパク質製剤において使用される一般的なGRAS(一般的に安全とみなされている)賦形剤である。OPLSは免疫調節脂質ホスファチジルセリン(PS)の代表グループである。3つの賦形剤は全て水溶性媒体に高溶解性である。我々は、Swiss Websterマウスへの皮下投与後に、これらのバッファーがリツキシマブの薬物動態に与える影響を試験した。

#### 【0150】

物質と方法：Swiss Websterマウス(19~22 g)(SW)は、Charles River Laboratories社から得た(マサチューセッツ州、ウィルミントン)。全ての動物実験は、ニューヨーク州立大学バッファロー校にある施設内動物管理使用委員会によって確立されたガイドラインに従って行われた。

#### 【0151】

リツキシマブ(RXT)の市販製剤が使用された。ラット抗-リツキシマブ抗体は、AbD Sero tec社(ノースカロライナ州、ローリー)から購入した。ヤギ抗-マウスFC-特異的HRP複合抗体、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質系、ウシ血清アルブミン(BSA)、O-ホスホ-L-セリン(OPLS)及びマンニトールはSigma社(ミズーリ州、セントルイス)から購入した。全ての他の溶媒及び緩衝塩は、Fisher Scientific社(ニュージャージー州、フェアローン)又はSigma社(ミズーリ州、セントルイス)から得た。

#### 【0152】

注射用バッファーの調製と特性化：1つの等張及び6つの異なる高張TRISバッファーが、リツキシマブのリンパ取り込みと血漿暴露に対する、高浸透圧性及びバッファー組成の影響を調査するために調製された(表1)。

#### 【表1】

表1

バッファー	組成					
	Tris mM	NaCl mM	OPLS mM	マンニトール mM	pH	浸透圧 mmol/kg
A	25	150	-	-	7.5	300
B	25	300	-	-	7.5	600
C	25	300	20	-	7.5	600
D	25	300	-	20	7.5	600
E	25	150	270	-	7.5	600
F	25	150	-	270	7.5	600

#### 【0153】

等張TRISバッファーは、25mM TRISと150mM NaClを使用して調製された(バッファーA)。高張(600 mmol/kg)TRISバッファーは、300mM NaClを含有するTRIS 25mMで調製された(バッファーB)。バッファー「C」と「E」はNaClと20mMのOPLS又はマンニトールを含有した。さらに、リンパ取り込みに対するバッファー組成の影響を明らかにするために、我々は270mMのOPLS(バッファーD)又はマンニトール(バッファーF)を用いて600 mmol/kgの2つのバッファーを調製した。これらのバッファーの浸透圧はバッファー「C」及び「E」と同じであるため、リンパ取り込みの何らかの変化は、OPLSとマンニトール濃度の増加に起因するだろう。pHは7.5に調節された。浸透圧は、5500 Vapor Pressure Osmometer(米国、ユタ州、ローゲン、Wescor社)を使用して、製造者の指示に従って測定された。

#### 【0154】

リツキシマブ薬物動態研究：126匹のオスのSWマウスは7つのグループに分割された。各グループは18匹の動物(PK特性の各時点に3匹)からなった。各動物は、上述した

製剤の一つに製剤化されたRXT 1ug/gを投与された(表1)。全ての皮下注射は、鼠径リンパ節から等距離の腹部に行われた。吸収は5日までに完了すると予想されたので、以下のプレセット時点1、5、15、24、48及び120時間が、屠殺とサンプル採取のために選択された。総血液と両方の鼠径リンパ節が採取された。RXTの体内動態は、静注PK特性から決定され、皮下研究から作成された吸収データと関連付けられる。静注PK研究のために、動物はベースバッファー(バッファーA)中の1ug/g RXTを、陰茎静脈より投与された。総血液は、以下の時点で採取された：0.5、2、15、24、48及び120時間。血液は、7500 rpmにて5分間4で遠心分離された。全サンプルは分析まで-80で貯蔵された。分析の直前に、鼠径リンパ節は氷上の300 µlのPBS中で均質化され、その後分析された。

#### 【0155】

血漿及びリンパ節サンプル中のRXTの分析：PK研究からの血漿及びリンパ節サンプルの分析は、標準ELISAで行われた。手短に説明すると、Nunc-Maxisorb 96-ウェルプレートは、100 µl/ウェルの1 µg/ml 抗-RXT抗体(ノースカロライナ州、ローリー、AbD Serotec社)で4にて一晩被覆された。プレートはその後洗浄され、1%ウシ血清アルブミン(ブロッキングバッファー)でブロックされた。サンプルは、必要に応じて、ブロッキングバッファー中で1:100又は1:1000の最終希釈まで希釈され、前記プレートに添加された。ブロッキングバッファー中で連続希釈されたRXTも、検量線のために、前記プレートに添加された。100 µlのヤギ抗-ヒト-HRP複合抗体が5ug/mlにて検出抗体として使用された。100 µlのTMB溶液で20分間発色が行われた。50 µlの2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>が反応を停止するために使用された。450 nmにおける光学濃度がプレートリーダーを用いて測定された。

#### 【0156】

結果：静脈注射及び皮下投与後のSWマウス中のリツキシマブの薬物動態：等張バッファーA中の用量1ug/gでの静脈注射及び皮下投与後のリツキシマブの血漿中濃度-時間特性を図29に示す。データに基づくと、バッファーA中のリツキシマブの皮下・生物学的利用率は0.29(29%)である。リンパ節に取り込まれた用量の割合は、0.05(総吸収量の5%)と推定される。

#### 【0157】

高張バッファー組成がリツキシマブのリンパ取り込みに与える影響：高張バッファーがリンパ取り込みに与える影響を解明するために、我々は、SWマウスにおいて、等張バッファー(バッファーA)及び高張バッファー(バッファーB)中の1ug/gリツキシマブの皮下投与後、切除された鼠径リンパ節中のリツキシマブの濃度を比較した。図30に示されるように、我々は、バッファーAと比較して、高張バッファーB中で投与されたリツキシマブについてリンパ節濃度の増加を観察した。リツキシマブは、バッファーAグループで最初の2時点における動物のリンパ節から回収され、残りの時点における動物のリンパ節中のリツキシマブ量は、我々のELISAの検出限界以下であった。しかしながら、バッファーBグループの全ての動物は、研究の全過程にわたりリンパ節中にリツキシマブを有していた。

#### 【0158】

高張バッファー組成がリンパ取り込みに与える影響をさらに明らかにするために、我々は、表1の残りの5つのバッファーで投与されたリツキシマブのリンパ節濃度を、バッファーBから得られた結果と比較した。図31Aに示されるように、20mM OPLS高張バッファー(バッファーC)で投与されたリツキシマブのリンパ節濃度は、バッファーBと比較して実質的な増加を示さないが、270mM OPLS(バッファーE)は、バッファーB及びCと比較してリンパ節濃度の増加を示した。3つ全てのバッファー中の浸透圧は同じである(600 mOsmol)ので、リンパ節に取り込まれた量の割合に生じた増加、及び、リンパ節濃度に生じた増加は、バッファーEにおける増加した(B及びCと比べて)OPLS濃度に起因している可能性がある。

#### 【0159】

興味深いことに、マンニトールが使用された場合(バッファーDとF)、我々は、マンニトールを含まないバッファーBと比較して、どちらかのマンニトール含有バッファーで投

10

20

30

40

50

与されたリツキシマブのリンパ節濃度の増加を観察した(図3 1 B)。OPLSとは異なり、この増加はマンニトールの量に依存しなかった。前記モデルは、リンパ節に取り込まれた量の割合が、バッファードとF両方で同等であることを推定した；これは高用量OPLS(バッファードE)で得られた推定値とも同等であった。浸透圧が3つ全てのバッファードで一定に保たれていたため、このデータはさらに、バッファード組成がリンパ節取り込みにおいて役割を果たすという考えをサポートする。

#### 【0160】

高張バッファード組成がリツキシマブの血漿中濃度及び生物学的利用率に与える影響：改善されたリンパ取り込みが改善されたリツキシマブの生物学的利用率につながるかどうかを調査するために、血漿サンプルがリツキシマブの濃度を測定するために分析され、その後上述のようにモデル化された。図29に示されるように、我々は、等張バッファードAと比較して、高張バッファードBで投与されたリツキシマブの血漿中濃度が増加することを観察した。次に我々は、残りの5つのバッファードで投与されたリツキシマブの血漿中濃度-時間特性を、バッファードBのものと比較することによって、バッファード組成が生物学的利用率と血漿暴露に与える影響を比較した。図3 1 Aは、OPLS含有バッファード(CとE)で得られた結果を示す。データは、特に後の時点にて、バッファードBに比べて、両方のバッファードでリツキシマブ血漿中濃度が増加したことを示す。同様に、マンニトール含有バッファードDとFは、バッファードBと比較して、より高いリツキシマブの血漿中濃度をもたらした。

#### 【0161】

全体的に見て高張バッファードは、等張バッファードと比較して、より高いリツキシマブの生物学的利用率をもたらした。さらに、バッファード組成は生物学的利用率に影響を与えた。

#### 【0162】

我々のデータは、リツキシマブが高張(600 mmol/Kg)で投与された場合、リンパ取り込みが向上したことを示す。さらに、バッファードの組成は、リンパ取り込みにおいて役割を果たし、マンニトールとOPLSは、NaClのみを含む浸透圧が対応するバッファードよりも良い結果を示した。向上したリンパ取り込みは、リツキシマブの向上した血漿暴露と向上した生物学的利用率と密接に関連した。

#### 【0163】

いかなる特定の理論に拘束されることも意図しないが、皮下スペース中の高張バッファードは、間質環境における環境を変化させると考えられる。この環境は間質液の形成の原動力である。正常なコンディション下では、血液は毛細血管床の細動脈末端に染み透り、毛細血管の細動脈末端と比較して、その末端における増加した静水圧によってプロセスが駆動される。毛細血管の下流で、膠質浸透圧が毛細血管内で増加し、組織からの廃棄物と副生物を輸送する血中に濾液を戻す再吸収を支持する。高張バッファードがもたらした間質中の高-浸透圧は、間質環境における浸透圧コンディションを変化させ、間質容積を増加させ、結果としてリンパ排出の増加をもたらす。皮下スペースにおける高張バッファードによる容積増大の影響は、浸透圧が回復するまで続くと予想される。これは、マンニトールと高用量OPLSの、NaClを超える利点を説明するかもしれない。

#### 【0164】

##### [実施例16]

本実施例は、樹状細胞における免疫寛容原性特性を誘導することによって、OPLSが免疫原性を低下させることを実証する。

#### 【0165】

物質及び方法：完全長組換えヒトFVIII(カリフォルニア州、カールズバッド、Baxter Biosciences社)が使用された。O-ホスホ-L-セリン(OPLS)は、Sigma社(ミズーリ州、セントルイス)から購入した。全ての溶媒と緩衝塩は、Fisher Scientific社(ニュージャージー州、フェアローン)から、又はSigma社(ミズーリ州、セントルイス)から得た。抗-FVIIIモノクローナル抗体ESH8は、American Diagnostica社(コネティカット州、グリニッチ)から得た

。熱失活高品質ウシ血清アルブミン(BSA)は、Lonza Walkersville社(メリーランド州、ウォーカースビル)から得た。RPMI-1640培地は、Gibco Life Technologies社(カリフォルニア州、カールズバッド)から得た。Endosafe Endochrome-K[登録商標]キットは、Charles River Laboratories社(サウスカロライナ州、チャールストン)から購入した。NUNC MaxiSorp 96ウェルプレートは、Thermoscientific社(マサチューセッツ州、ウォルサム)から得た。サイトカインELISAキットは、R&D System社(DuoSet)(米国、ミネソタ州、ミネアポリス)から、又はInvitrogen社(カリフォルニア州、カマリロ)から得た。DiIC18(5)はSigma社(ミズーリ州、セントルイス)から得た。BD FC-block、抗-CD40-PE、及び抗-MHCII-FITC抗体及びそれぞれのアイソタイプは、BD Biosciences社(カリフォルニア州、サンノゼ)又はeBiosciences社(カリフォルニア州、サンノゼ)から購入した。

10

#### 【0166】

H Aマウスにおける寛容誘導研究：エクソン16ノックアウト・トランスジェニック血友病マウス(H A)のつがいを使用された。全ての動物実験は、ニューヨーク州立大学バッファロー校にある施設内動物管理使用委員会によって認可されたプロトコルに従って行われた。

#### 【0167】

免疫化及び再負荷スケジュール：抗体価のOPLS媒介性減少が、免疫寛容又は免疫抑制に起因するかどうかを明らかにするために、我々は再負荷実験を行った。40匹のH Aマウスが、図1に示すように、1 $\mu$ gのFVIII単独、又は5 mgのOPLSあるいは200 ngのデキサメタゾン(Dex)を加えたエンドトキシンフリー製剤の皮下注射によって、FVIII、FVIII + OPLS又はFVIII + デキサメタゾンで、週1回連続4週間、前処置された。注射は、25mM TRIS及び150mM NaClを含むpH 7.5のTRISバッファーで調製された。OPLS含有製剤のために、OPLSは前記バッファーに添加され、pHが7.5に調節された。プレ注射におけるFVIIIとOPLS間の複合体形成を防止するために、適量のFVIIIが注射の直前に添加された。リンパ球活性の重度の免疫抑制を避けるために、低量のデキサメタゾン(200 ng/注射)の頻回投与が好まれた。この後、2週間の休薬期間が続いた。動物はその後1 $\mu$ gの遊離FVIIIの週1回・4度の皮下投与で積極的に再負荷された。11週目に、動物は屠殺され、血液は10%クエン酸デキストロース(ACD)中に採取され、遠心分離され、血漿が単離された。サンプルは分析まで-80で貯蔵された。総抗-FVIII力価がELISAで測定された。

20

#### 【0168】

OPLSの存在下及び不存在下においてFVIIIに暴露されたBMDCの特性化：この一式の実験において、我々は、OPLSの存在下及び不存在下においてFVIIIに暴露された骨髄由来樹状細胞(BMDC)の表現型成熟、サイトカインプロファイル及び遊走性ポテンシャルに対するOPLSの影響を試験した。

30

#### 【0169】

骨髄由来樹状細胞(BMDC)の産生：骨髄は、6~8週齢の未処置H Aから単離された。手短に説明とすると、骨髄は、ウシ胎児アルブミン(低エンドトキシン)、2-メルカプトエタノール、ペンノストリップ及び200IU/mlのGM-CSFを補充されたRPMI培地で培養された。培地は、培養の3、6及び8日目に変えられ、DCは9日目に使用された。BMDCはその後回収され、必要に応じて使用された。骨髄細胞のDCへの分化を検証するために、CD11c表面発現が、適切なアイソトープ・コントロール付きの抗-CD11c-FITC抗体を使用してフローサイトメトリーによって確認された。

40

#### 【0170】

BMDCの表現型成熟に対するOPLSの影響：次に我々は、BMDCの表現型成熟に対するOPLSの影響を調べた。BMDCは、OPLSの存在下及び不存在下において24時間、1 $\mu$ g/mlのFVIIIに暴露された。細胞はその後回収され、氷冷無菌PBSで2度洗浄され、約 $1 \times 10^6$ 細胞/mLに懸濁された。細胞は、抗-CD40-PE又は抗-MHCII-FITC抗体で標識される前に、BD Fc-ブロック抗体を使用してブロックされた。細胞は、FACSCaliburフローサイトメーター(カリフォルニア州、サンノゼ、BD Biosciences社)を使用して分析された。この研究は三つ組で実施された。

50

## 【 0 1 7 1 】

インビトロでのBMDCのサイトカインプロファイルに対するOPLSの影響：樹状細胞によるサイトカイン分泌に対するOPLSの影響が研究された。上述のように産生された、9日目のBMDCが、漸増用量のOPLSの存在下で、抗原としてのFVIIIで処理された。炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ 及びIL12p70、並びに制御性サイトカインTGF- $\beta$ の産生における変化が、用量の関数としてモニターされた。BMDCは、漸増用量のOPLS(0、0.5、1、10、25、50 mM)を伴う1ug/mlのFVIIIに暴露された。1 MストックのOPLSが、RPMI培地に適量のOPLSを直接添加することによって調製され、pHが無菌の3N及び1NのNaOHを使用して調製された。エンドトキシンフリー・ストックが使用された(Endosafe Endochrome-K[登録商標]キット、サウスカロライナ州、チャールストン、Charles River Laboratories社)。細胞は、四つ組(n=4)で蒔かれ、48時間培養された。培地は、インキュベーション期間の最後に、サイトカイン分析のために回収された。TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及びIL-12p70濃度は、標準ELISA(米国、ミネソタ州、ミネアポリス所在のR&D System社、又はカリフォルニア州、アマリコ所在のInvitrogen社)を使用して測定された。

10

## 【 0 1 7 2 】

BMDCの遊走性ポテンシャルに対するOPLSの影響：FVIII又はFVIII/OPLSで生体外で処理されたBMDCのインビボ遊走性ポテンシャルに対するOPLSの影響が調査された。9日目に、 $3 \times 10^6$ 細胞が、5ug FVIII又は5ug/50mM FVIII/OPLSとともに一晚インキュベートされた。翌日、非付着性細胞が回収され、氷冷無菌PBSで2度洗浄され、DiIC(18)5色素(ミズーリ州、セントルイス、Sigma社)で標識された。細胞は37℃で5分間、2ug/mlのDiIC(18)5(ミズーリ州、セントルイス、Sigma社)とともにインキュベートされた。5分後、細胞は氷冷無菌PBSで2度洗浄された。色素の取り込みは、細胞サンプルを、AxiocamMRC有色カメラとLEPモーター駆動ステージコントローラーを備えたZeiss Axiovert 200M倒立顕微鏡を用いて画像化することによって確認された。励起はCy5チャンネルにより、発光フィルターは695/655 nmであった(ニューヨーク州、ソーニウッド、Carl Zeiss Microscopy社)。9匹のH Aマウスは3つのグループ(未処置、FVIII及びFVIII/OPLS)に分割された。上方から回収された総非付着性細胞は、各処置グループの3匹のマウス間で等しく分割され、下腹部の皮下に(sc)注射された。注射の3時間後、動物は屠殺され、鼠径リンパ節が回収され、24時間10%のparaホルムアルデヒド中で固定された。リンパ節はその後、ImgeLab 4.0.1ソフトウェアパッケージを有するBio-Rad ChemiDoc MPイメージングシステムを使用して、全体が画像化された(サンノゼ、ハーキュリーズ、Bio-Rad Laboratories社)。

20

30

## 【 0 1 7 3 】

FVIII及びOPLS/FVIIIに暴露されたBMDCの免疫原性ポテンシャル：BMDCがインビボで強い免疫応答を惹起する能力に、OPLSが与える影響を確認するために、我々は、50mM OPLSの存在下及び不存在下におけるFVIIIへの生体外暴露後のBMDCの免疫原性ポテンシャルを試験した。9日目に、BMDCは、5ug FVIII又は5ug/50mM FVIII-OPLSで24時間処理された。その後、培地が除去され、細胞が氷冷無菌PBSで2度洗浄された。約 $5 \times 10^5$ 細胞/マウスがその後、2つのグループ(FVIII及びFVIII-OPLSグループ)のH Aマウスに皮下注射された。これは、週に1度、3週間行われ、その後に2週間の休薬期間が続いた。休薬期間の最後に、動物は屠殺され、血漿が収集された。総抗-FVIII力価レベルは、未処置動物の血漿から計算したプレート特異的カットオフ値を用いてELISAによって測定された。

40

## 【 0 1 7 4 】

FVIIIのインビボ免疫原性に対するOPLSの影響：6～8週齢の21匹のH Aマウスが3つのグループに分割された。グループ1は腹部皮下に1ug FVIIIを受けた。グループ2及び3は、腹部皮下に1ug FVIII及び0.4mg OPLS/注射(グループ2)又は5mg OPLS/注射(グループ3)を受けた。この治療は、1、8、10及び12日目に行われた。最後の注射の3日後、動物は屠殺された。血液が採取され、7500 rpmにて5分間4℃で遠心分離された。血漿はその後回収され、-80℃で分析まで貯蔵された。

## 【 0 1 7 5 】

統計：チューキー事後分析によるノンパラメトリック一元配置ANOVAが、必要に応じて力

50

価の分析のために使用された。スチューデント t 検定が、フローサイトメトリーデータの平均蛍光強度(MIF)を比較するために使用された。クラスカル・ワリス事後分析によるノンパラメトリック一元配置ANOVAが、必要に応じて力価の分析のために使用された。

#### 【0176】

結果：OPLSはH A マウスにおいてFVIII再負荷への低応答性を誘導する：OPLSが、寛容誘導の原因となる重要な構成成分であるかどうかを調査するために、再負荷試験が行われた。前処置段階の間、予想通り、OPLSとデキサメタゾンの両方が、抗-FVIII抗体応答を低下させた。FVIIIによる再負荷により、FVIII、及びFVIII-デキサメタゾンで前処置された動物は、FVIII-OPLSで前処置された動物( $14712 \pm 1853$ 逆希釈ファクター、平均値 $\pm$ SEM、図32)と比較して、強い抗-FVIII抗体応答を示した( $25438 \pm 5275$ 及び $33694 \pm 7598$ 、それぞれ逆希釈ファクター、平均値 $\pm$ SEM)。OPLS前処置グループのみが、OPLSによる処置が中止された後でさえ、より低い力価を示したが、そのような効果は、デキサメタゾン処置グループでは観察されなかった。

10

#### 【0177】

インビトロにおけるBMDC成熟化に関するOPLS媒介性変化：抗原プロセッシングと提示のメカニズムは、以下の逐次ステップを伴う；樹状細胞による抗原取り込みは、有効な免疫応答を開始する最初のステップである。この後、表現型成熟、サイトカイン産生、及び、T細胞提示のために輸入リンパ管への遊走が続く。OPLSがDCによる抗原プロセッシングと提示を妨害するかどうかを決定するために、我々は、BMDC表現型成熟、サイトカイン分泌及び遊走性ポテンシャルへのその効果をモニターした。

20

#### 【0178】

OPLSは、インビトロでBMDCにおいて共刺激マーカーCD40の発現を低下させた。FVIIIへのBMDCの暴露は、CD40の発現の増加をもたらした。50mM OPLSの存在下で、CD40発現BMDCの数は、FVIII処理細胞における平均47.8%から、FVIII-OPLS処理細胞における26.5%に低下し( $n=3$ 、 $p<0.05$ 、図33Bの上部パネル)、これはFVIII処理細胞における平均 $14.4 \times 10^3$ (任意蛍光単位)からOPLS存在下で $9.45 \times 10^3$ (任意蛍光単位)に低下した平均蛍光強度(MFI)にも反映された( $n=3$ 、 $p<0.05$ 、図33Bの上部パネル)。

#### 【0179】

MHCII発現レベルは、図33A及び33B(下部パネル)に示されるように、BMDCのOPLSへの暴露によって影響を受けなかった。MHCII発現BMDCの存在は、50mM OPLSの不存在下及び存在下で、それぞれ89.8%と89.5%であった( $n=3$ )。これは平均蛍光強度(MFI)にも反映された。3つの実験の平均MFIは、FVIII処理細胞及びFVIII-OPLS処理細胞で、 $468 \times 10^3$ 及び $449 \times 10^3$ (任意蛍光単位)であった( $n=3$ )。この発見は、OPLSが、BMDCにおいてプロセッシング及びMHCII複合体によるFVIIIの提示を妨害しないことを示唆する。

30

#### 【0180】

OPLSは、BMDCによる炎症性サイトカインの用量依存的減少及び制御性サイトカイン産生の増加を誘導する。OPLSの存在下でFVIIIに暴露されたDCは、炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ 及びIL-12p70の用量依存的減少を示した( $n=4$ )。50mMで、IL-12p70サイトカイン産生のトータルシャットダウン及びTNF- $\alpha$ の実質的減少(図33C)が観察された。これは、制御性サイトカインTGF- $\beta$ の用量依存的増加を伴った( $n=4$ )(図33D)。このデータは、FVIIIと10mM以上のOPLSで刺激されたBMDCが、免疫寛容原性DCと同様のサイトカインプロファイルを生じることを示唆する(図33C及び33D)。

40

#### 【0181】

BMDCの遊走ポテンシャルに対するOPLSの影響：抗原取り込みとプロセッシングの次のステップは、組織から輸入リンパ管へのDCの遊走を伴った。免疫寛容原性DCは、輸入リンパ管への増大した遊走を有すると予期される。我々は、FVIII又はFVIII/OPLSに生体外で暴露されたBMDCの宿主H A マウスにおける遊走を、蛍光膜標識DiIC18(5)を取り込ませることによって、観察した。この色素は、細胞膜の疎水性環境においてのみ蛍光を発し、検出された蛍光は、DiIC(18)5/BMDC複合体に起因し、遊離染料には起因しない。図33E及び33Fは、FVIII(E上部パネル)又はFVIII/OPLS(F上部パネル)に暴露されたBMDCの明

50

視野画像を示し、下側のパネルは、Cy5チャンネルによる同じ画像を示す(発光フィルターは695/655にセット)。BMDCの膜において観察された蛍光は、DiIC(18)5による標識が成功したことを示す。DiIC18(5)標識BMDC細胞のH Aマウスへの皮下注射により、我々は、OPLS/FVIIIで処理されたBMDCを注射されたマウスの鼠径リンパ節において回収された蛍光の量(蛍光曲線下面積によって測定)が、FVIII処理と比較して増加することを観察した(OPLS/FVIIIについて $45254 \pm 4240$  vs. FVIII処理グループについて $26709 \pm 5018$ )(図3 3 G)。この増加は、OPLS刺激樹状細胞の遊走性ポテンシャルに起因してリンパ管に到達したBMDCの数を直接反映する。

#### 【0182】

OPLSは、FVIIIに生体外で暴露されたBMDCの免疫学的ポテンシャルを、H Aマウスにおいて削減する：この研究において、我々は生体外処理されたBMDCの再導入後、ホストH Aマウスにおいて抗体産生をモニターすることによって、免疫応答を惹起するBMDCの能力に対するOPLSの影響を研究した。我々の研究は、生体外でFVIII処理されたBMDCを注射されたマウスにおいて、FVIII/OPLS処理BMDCを注射されたマウスと比較して、統計的に高い抗-FVIII力価を示す( $1894 \pm 667$  vs.  $81 \pm 15.6$ 、それぞれ任意力価単位)(平均値  $\pm$  SEM  $p = 0.03$  図3 4)。各グループにおけるマウスが、FVIIIに直接暴露されず、生体外でFVIII又はFVIII-OPLSに暴露されたBMDCに暴露されたことは注目すべきである。発生した応答は、生体外で成熟したBMDCが、ホストの免疫系にFVIII抗原を提示した結果である。このデータは、OPLSが、有効な適応応答に貢献する様式で、DCが抗原を提示する能力を障害することを示す。

#### 【0183】

インビボにおけるFVIIIの免疫原性に対するOPLSの影響：図3 5は、漸増用量のOPLSの存在下及び不存在下での、H AマウスにおけるFVIIIへのインビボ免疫応答の結果を示す。FVIII処置グループにおける総抗-FVIII力価は、高用量OPLSで処置された動物における抗-FVIII力価よりも、統計的に高かった(それぞれ、 $285 \pm 3.3$ 任意単位 vs.  $5.34 \pm 5.8$ 任意単位)(幾何平均  $\pm$  幾何平均の標準偏差)( $p < 0.05$ )。低用量OPLS処置グループの力価は、FVIII単独より低かった。この減少はしかしながら、統計的に有意ではなかった( $137 \pm 1.4$  vs.  $285 \pm 3.3$  それぞれ任意力価単位)。

#### 【0184】

このデータは、OPLSへのインビボ用量依存性応答を明確に示す。現在の研究では、OPLSはFVIIIと複合化されなかった。これは免疫系を刺激するためにOPLSが最初に投与され、その後生物学的製剤が二番目に投与される連続投与を可能にする。

#### 【0185】

寛容は免疫寛容原性DCによって誘導される。免疫寛容原性の樹状細胞は、アポトーシス性事象に応答して生体内で発生すると思われる。それらは組織常在性の未熟DCとは表現型的に異なる。それらは、制御性サイトカイン産生の増加と低下した炎症性サイトカイン分泌を特徴とする。それらは、ある程度の成熟化と接着分子の減少を示す。後者は、組織から輸入リンパ管への遊走のために要求される。輸入リンパ管において、これらのDCは、共刺激マーカーの不存在下でT細胞に抗原を提示することができ、T細胞非反応性をもたらす。我々のデータ(図3 3)は、OPLSへの応答における免疫寛容原性DCの形成をサポートする。これは、変化したサイトカインプロファイル及び共刺激マーカーCD40の下方制御、その一方でMHCII発現レベルは維持され、そのすべてが免疫寛容原性DC特性に一致しているという我々の観察に基づく。

#### 【0186】

免疫原性及び免疫寛容原性DCはどちらも輸入リンパ管に遊走できる。図3 3 Gにおいて、我々は、FVIII単独と比較して、FVIII/OPLSに暴露されたBMDCを注射されたマウスの鼠径リンパ節で回収された蛍光標識BMDCの量の増加を観察した。リンパ管に到達すると、DCはMHC I又はMHC IIによりT細胞に抗原を提示すると予期される。この提示の状況は、この相互作用の成果を決定づける。免疫寛容原性DCはCD40等の共刺激マーカーの不存在下でT細胞に抗原を提示でき、寛容をもたらす。寛容はインビボにおける減少した免疫原



性ポテンシャルに言い換えられる。図3に提示したデータはこの考えをサポートする。生体外でFVIII単独に暴露されたBMDCは、ホストH Aマウスに戻された際、それらの免疫原性ポテンシャルを失わなかった。これはFVIII/OPLSで処理されたBMDCの場合は見られなかった。これは、OPLSへの暴露がBMDCの免疫学的ポテンシャルを削減したことを示す。

【0187】

本開示で提示されたデータは、OPLS/FVIIIで処置されたH Aマウスの抗-FVIII力価において観察された減少が、OPLSによる免疫調節の結果であり免疫抑制ではないことを示す。さらに、我々のデータは、デキサメタゾンで前処置された動物とは異なり、OPLSで前処置された動物は、遊離FVIIIによる再負荷に対し低反応性であることを示した。これは、OPLSが免疫調節因子であることを示すだけでなく、FVIIIへの低応答性が抗原特異的であったことも示す。この抗原特異性は、OPLSに应答したDCによる増加したTGF- $\beta$  産生と減少したTNF- $\alpha$  及びIL-12p70産生を伴う、低下したCD40発現という状況で、DCによるFVIIIのプロセッシングと提示を必要とする。これはさらに、OPLSに応じてMHCII発現に変化がないことを示す我々のフローサイトメトリーのデータによってサポートされる。これは免疫寛容原性DCの特性を模倣する。これは、OPLSに应答したDCの遊走性ポテンシャルの増加及びDCの低下した免疫原性ポテンシャルを伴う。総合すると、我々のデータは、OPLSが、DCの成熟化を変化させるために必要とされる重要な構造特性を有し、免疫寛容原性特性を有するDCの産生をもたらすことを示す。

【0188】

OPLSの免疫寛容原性特性は、リバースワクチン接種戦略(低用量の治療用タンパク質とOPLSの投与が、患者の免疫系をその後のタンパク質投与に対して脱感作させ、治療用タンパク質の免疫原性を効果的に減少させる)に利用できる。我々は、このアプローチが、マウスのポンペ病モデルにおいて酸性グルコシダーゼ(GAA)への寛容及び低下した免疫原性を誘導するために使用できることを観察し、これはこのアプローチが一般化できることを示唆する。OPLSを用いたリバースワクチン戦略は、一般的な免疫抑制とは対照的な抗原特異的寛容を提供することによって、デキサメタゾン等の随伴免疫抑制治療を超える利点を提供する。

【0189】

本発明は、特定の実施形態を通じて説明されてきたが、通常の変更は当業者に自明である。そのような変更は本開示の範囲内であることが意図されている。

10

20

30

【 図 1 】

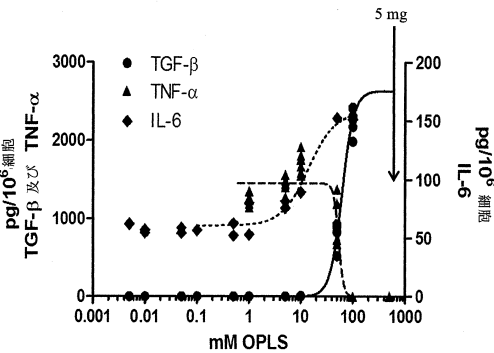
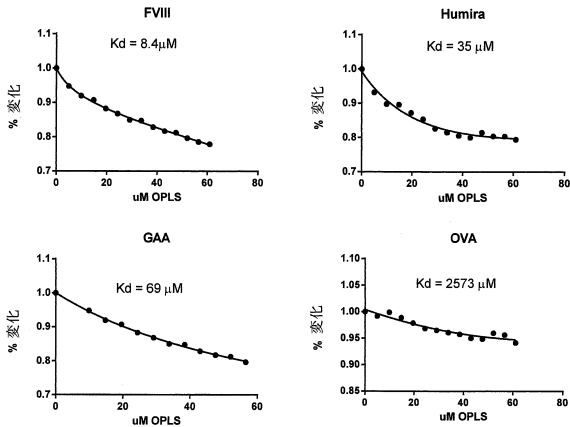


Figure 1

【 図 2 】



蛋白質	Kd (uM)
FVIII	8.4
Humira	35
Gaa	69
OVA	2573

Figure 2

【 図 3 】

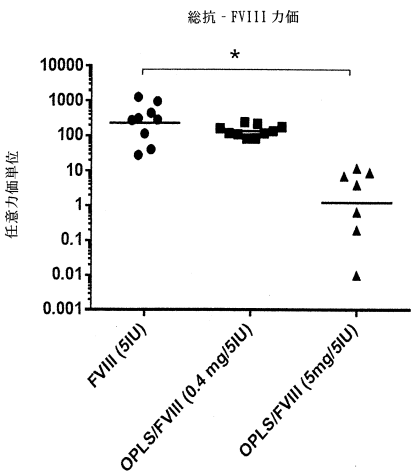


Figure 3

【 図 4 】

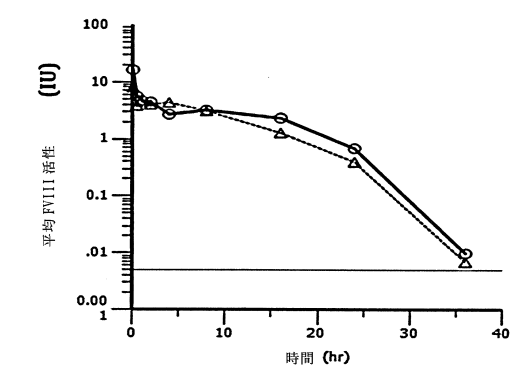


Figure 4

【 図 5 】

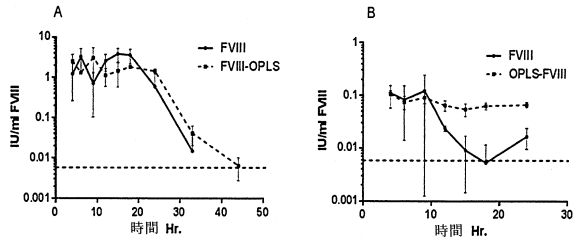


Figure 5

【図 6】

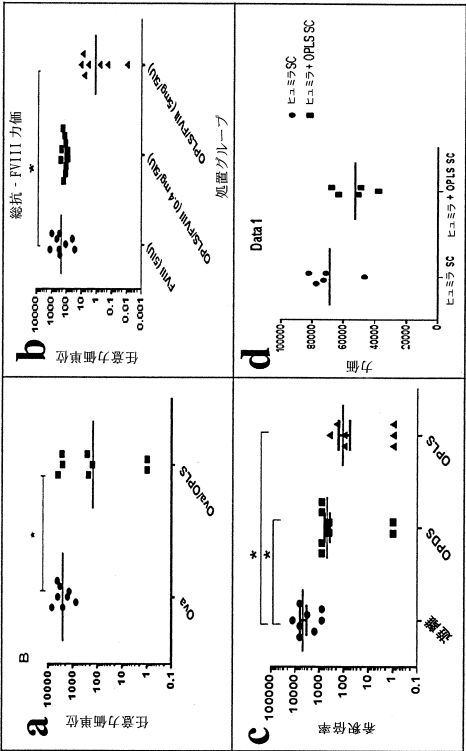


Figure 6

【図 7】

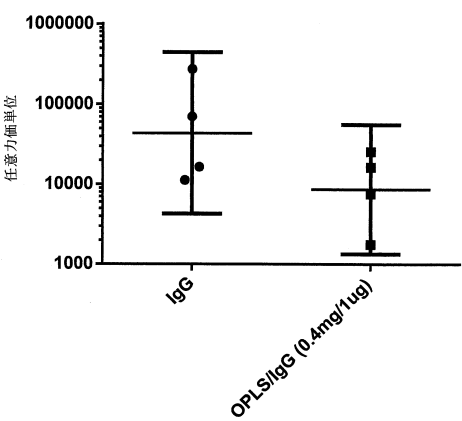


Figure 7

【図 8】

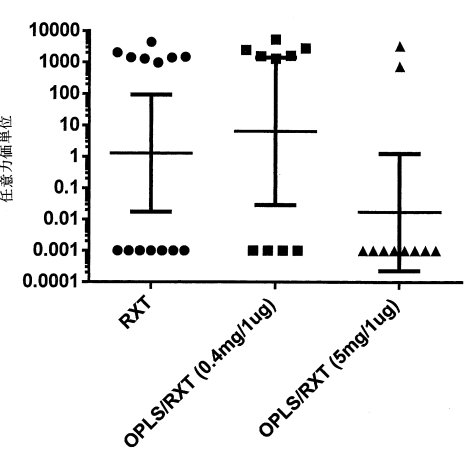


Figure 8

【図 9】

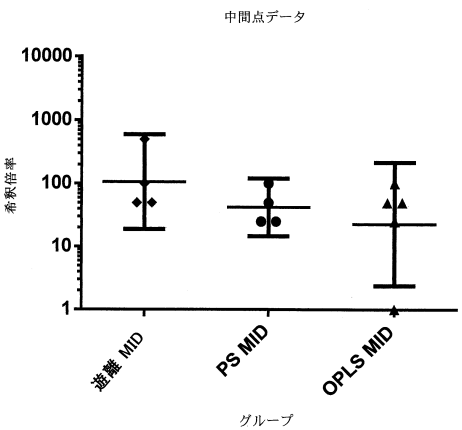


Figure 9

【図 10】

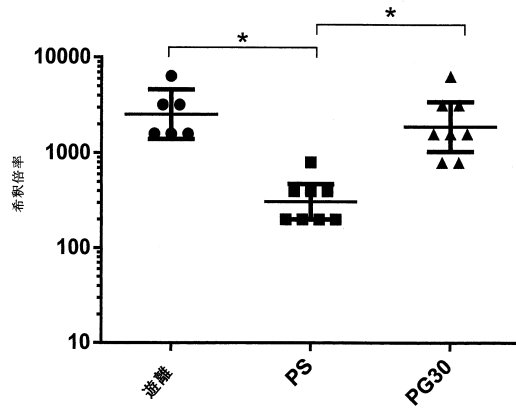


Figure 10

【図 11】

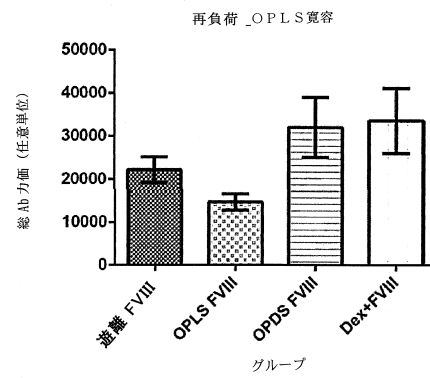


Figure 11

【図 12】

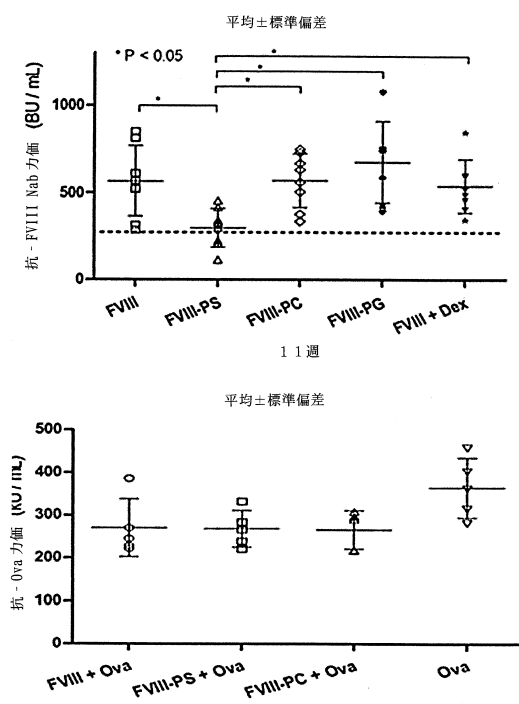


Figure 12

【図 13】

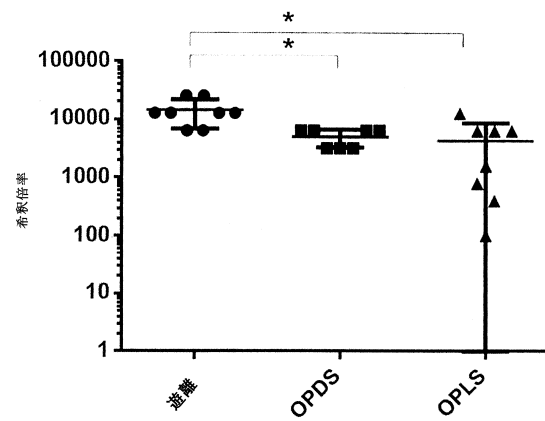


Figure 13

【図 14】

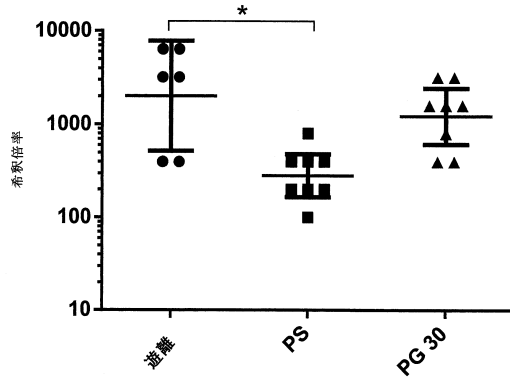


Figure 14

【図 16】

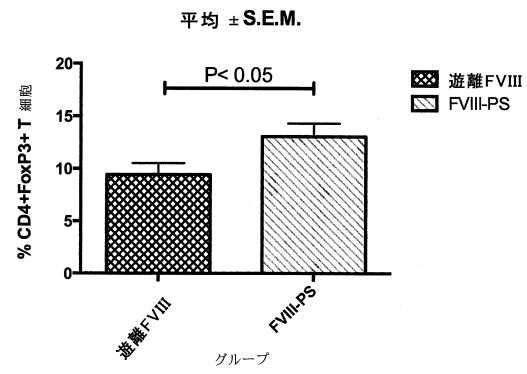


Figure 16

【図 15】

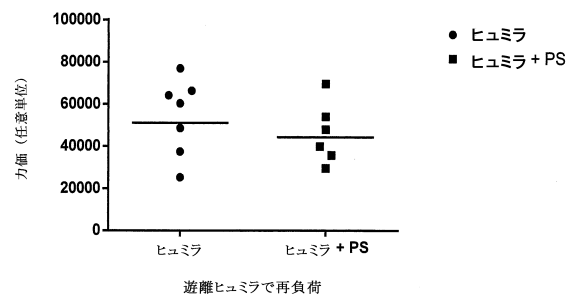


Figure 15

【図 17】

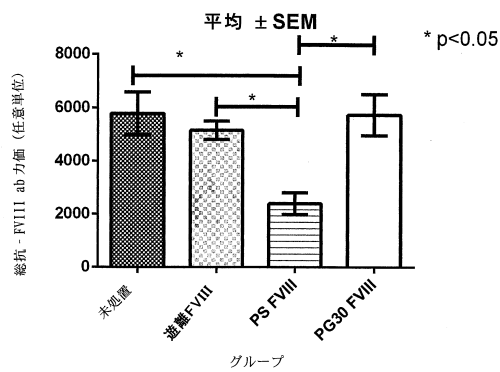


Figure 17

【図 18】

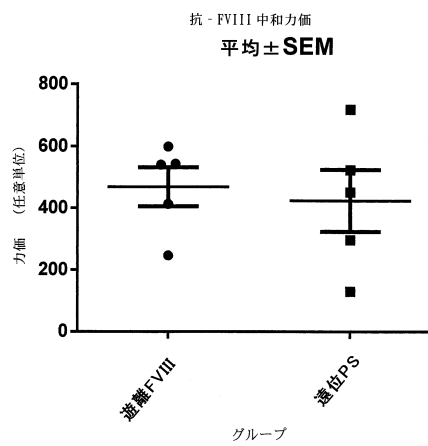


Figure 18

【図 19】

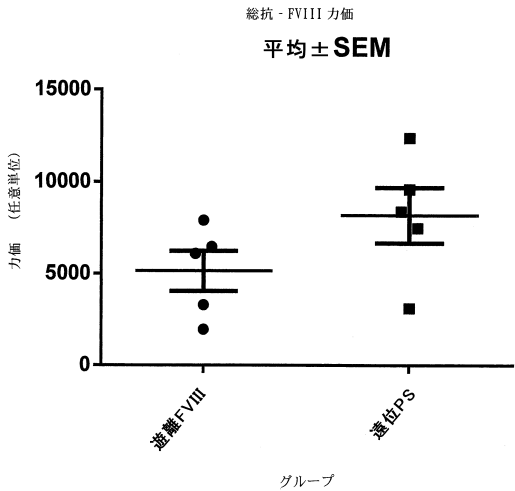


Figure 19

【図 20】

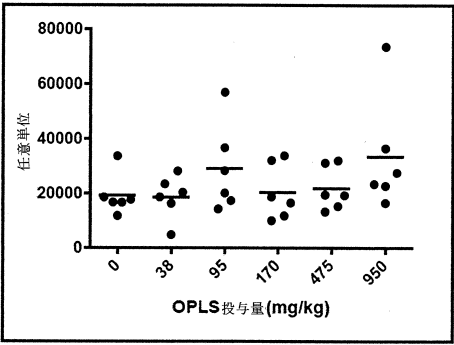


Figure 20

【図 21】

	平均 (SD)					
	38 mg/kg OPLS	95 mg/kg OPLS	190 mg/kg OPLS	475 mg/kg OPLS	950 mg/kg OPLS	950 mg/kg OPLS
ビリル						
ALB(g/dL)	2.57(0.06)	2.93(0.15)	2.90(0.20)	2.87(0.23)	2.93(0.12)	2.67(0.06)
ALP(U/L)	35.67(5.51)	64.00(14.53)	67.00(26.89)	48.67(18.15)	28.03(23.54)	49.67(11.93)
ALT(U/L)	31.00(5.08)	35.67(17.67)	26.67(6.03)	37.67(10.07)	46.00(25.71)	32.33(9.81)
AMY(U/L)	1014(149.5)	1043(29.51)	996.00(25.46)	989.67(62.40)	1048.00(58.81)	969.33(42.16)
TBL(mg/dL)	0.30(0)	0.33(0.06)	0.30(0.00)	0.33(0.06)	0.33(0.06)	0.30(0.00)
BUN(mg/dL)	16.67(1.15)	18.00(2.00)	16.67(2.08)	15.00(3.46)	15.67(3.21)	12.67(2.89)
CA(mg/dL)	5.53(0.29)	5.57(0.21)	5.77(0.21)	5.73(0.25)	5.93(0.70)	5.03(0.12)
PHOS(mg/dL)	5.70(0.60)	5.77(0.67)	5.83(0.90)	5.50(0.95)	5.67(1.03)	5.70(0.85)
K(mg/dL)	3.67(0.15)	3.33(0.25)	3.70(0.20)	3.90(0.30)	3.87(0.25)	3.80(0.00)
TP(mg/dL)	4.60(0.14)	4.60(0.20)	4.70(0.10)	4.80(0.20)	4.80(0.17)	4.67(0.15)

Figure 21

【図 22】

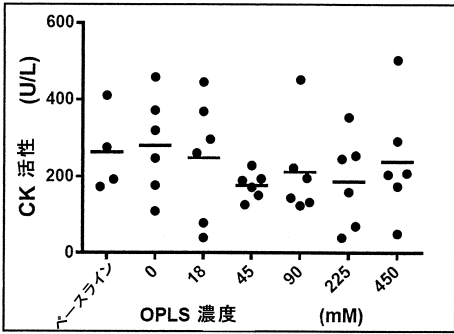


Figure 22

【 図 2 3 】

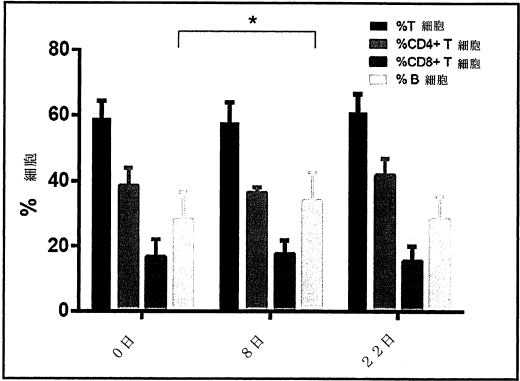


Figure 23

【 図 2 4 】

	平均 (SD)	0 日	8 日	2 2 日
ナトリウム (mEq/L)	148(2.65)	149(1.41)	149(2.83)	149(2.83)
カリウム (mEq/L)	4.17(0.72)	4(0.14)	4.05(0.07)	4.05(0.07)
塩素 (mEq/L)	110(1)	112.50(0.71)	110(2.83)	110(2.83)
総蛋白量 (g/dL)	6.17(0.35)	6.95(0.07)	6.70(0.14)	6.70(0.14)
アルブミン (g/dL)	4.20(0.26)	4.4(0)	4.30(0.14)	4.30(0.14)
グロブリン (g/dL)	1.97(0.15)	2.55(0.07)	2.40	2.40
A/G 比	2.17(0.15)	1.75(0.07)	1.8(0)	1.8(0)
カルシウム (mg/dL)	0.13(0.06)	0.14(0.04)	0.09(0.02)	0.09(0.02)
総ビリルビン (mg/dL)	15.33(2.52)	15(0)	15.5(2.12)	15.5(2.12)
BUN (mg/dL)	77.3(16.77)	66.50(3.54)	79.5(17.68)	79.5(17.68)
クレアチニン (mg/dL)	0.63(0.11)	0.64(0.03)	0.69(0.11)	0.69(0.11)
リン (mg/dL)	6.13(0.45)	6.25(0.07)	4.90(0.14)	4.90(0.14)
ALP (mg/dL)	517(112.93)	525.50(10.61)	376(18.38)	376(18.38)
ALT (SGPT) (U/L)	34(13.23)	53.50(19.09)	45(2.83)	45(2.83)
AST (SGOT) (U/L)	72.67(68.25)	51(29.7)	44(5.66)	44(5.66)
LDH (U/L)	852.33(729.29)	443.50(79.90)	463.5(31.82)	463.5(31.82)
コレステロール (mg/dL)	160.67(58.77)	185(35.36)	176(35.36)	176(35.36)
BUN/Creat 比	25.27(8.95)	23.45(1.06)	22.7(0.42)	22.7(0.42)

Figure 24

【 図 2 5 】

表		
OPLS に対する蛋白質比率		
蛋白質	およそのモル比	
FVIII/OPLS 1ug/5mg	1:8.00E+06	
FVIII/OPLS 1ug/0.4mg	1:6.00E+05	
ヒュミラ /OPLS 10ug/5mg	1:5.00E+05	
ヒュミラ IgG/OPLS 1ug/0.4OPLS	1:3.25E+05	
リツキシマブ/OPLS 1ug/5mg	1:4.00E+06	
リツキシマブ/OPLS 1ug/0.4mg OPLS	1:3.25E+05	
GAA ペプチド	1:4.00E+03	
GAA	1:3.00E+06	
OVA	1:1.5E+06	

Figure 25

【 図 2 7 】

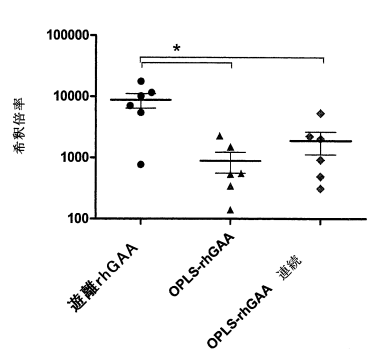


Figure 27

【 図 2 6 】

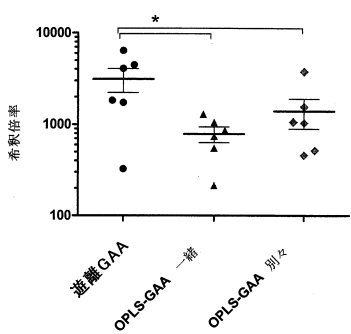


Figure 26

【図 28】

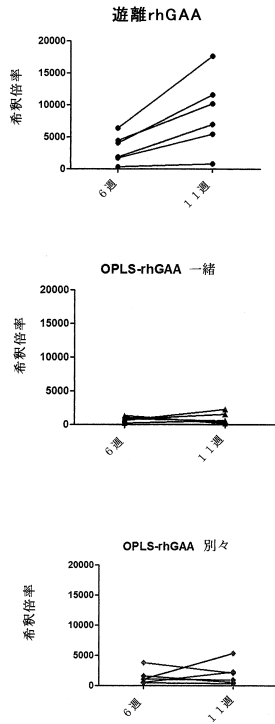


Figure 28

【図 29】

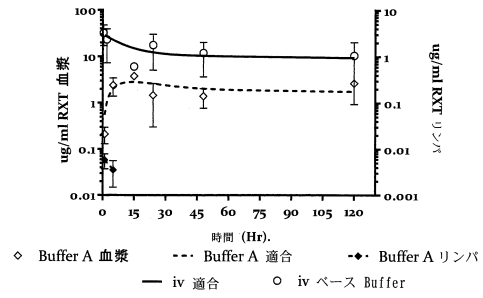


Figure 29

【図 30】

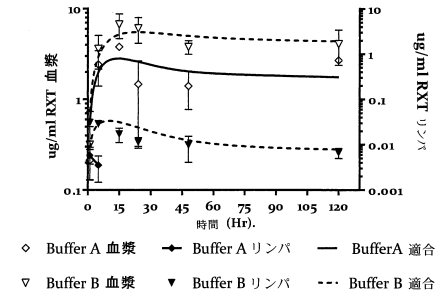


Figure 30

【図 31】

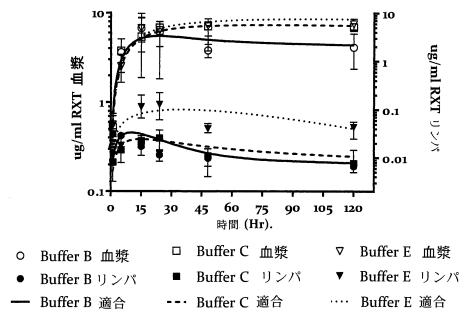


Figure 31A

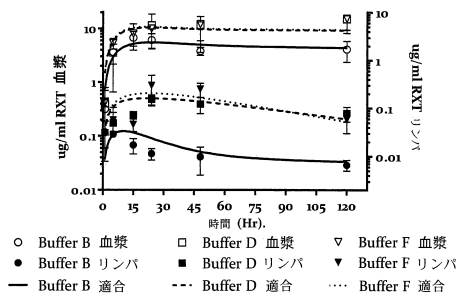


Figure 31B

【図 32】

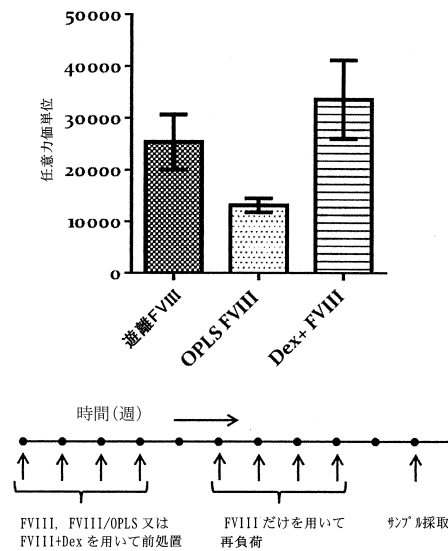
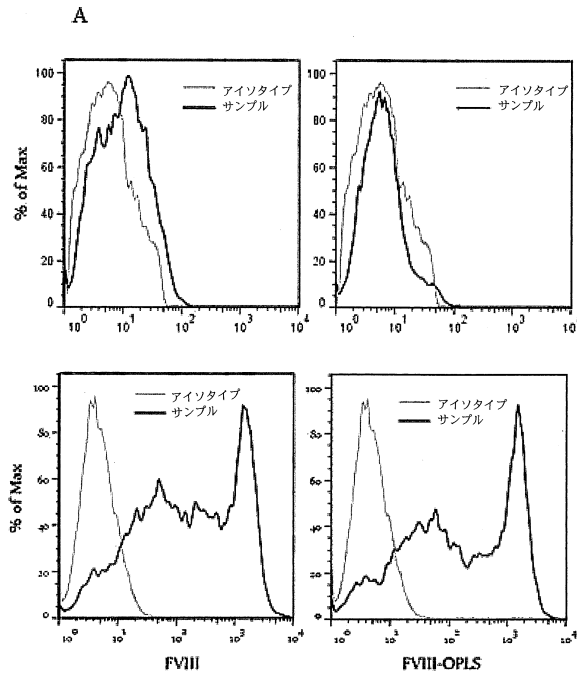


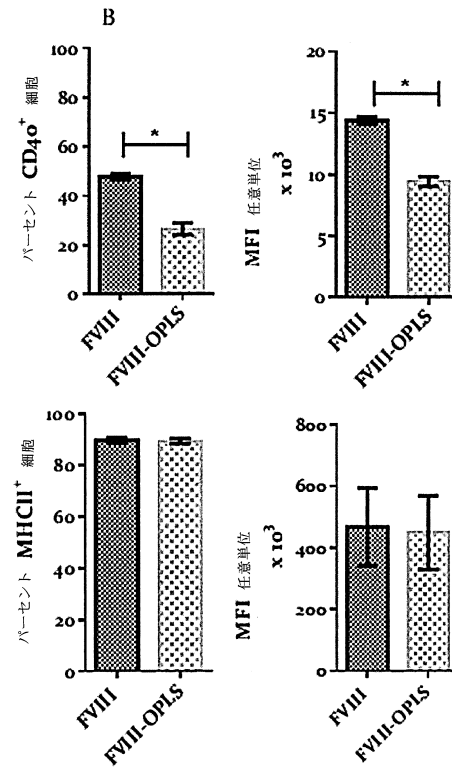
Figure 32



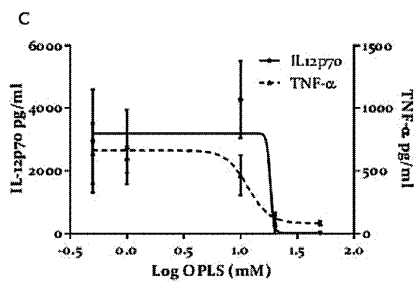
【図 3 3 A】



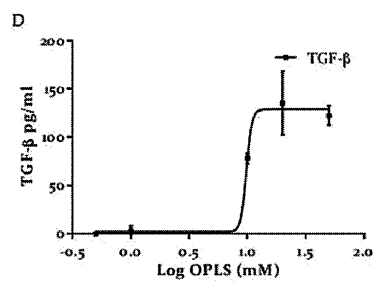
【図 3 3 B】



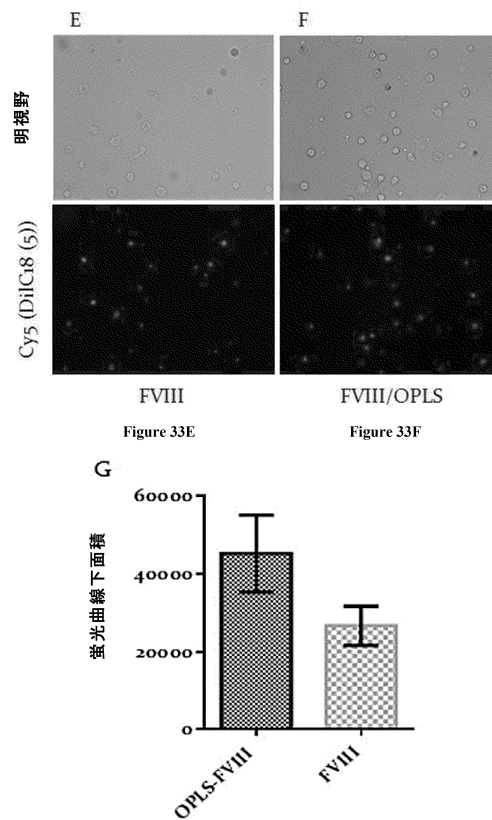
【図 3 3 C】



【図 3 3 D】



【図 3 3 E F G】



【図 34】

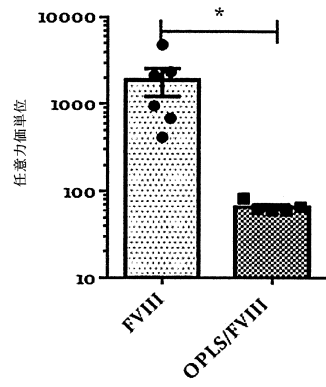


Figure 34

【図 35】

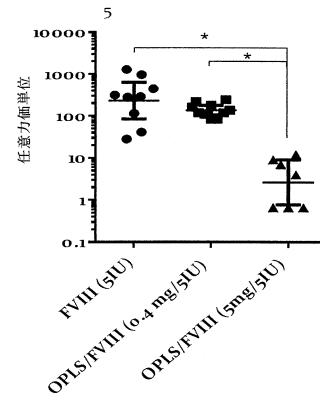


Figure 35

---

フロントページの続き

- (72)発明者 バルー アイヤー, サティ  
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 14228、アムハースト、サウス パリッシュ ドライブ  
29
- (72)発明者 コスロスキ, マシュー, ピー.  
アメリカ合衆国、イリノイ州 60091、ウィルメット、オーク サークル 322
- (72)発明者 シェティ, クリティカ, アルン  
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 14214、バッファロー、アパートメント 1、ショーショ  
ン ストリート 131
- (72)発明者 シュナイダー, ジェニファー, リー  
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 14201、バッファロー、カレッジ ストリート 115
- (72)発明者 ファタラー, アナス  
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 92101、サンディエゴ、ナインス アベニュー ナンバ  
ー912 1281

## 合議体

審判長 藤原 浩子  
審判官 前田 佳与子  
審判官 渕野 留香

- (56)参考文献 国際公開第2011/005850(WO, A1)  
特表2009-532371(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E / R E G I S T R Y ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )