

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6422774号
(P6422774)

(45) 発行日 平成30年11月14日(2018.11.14)

(24) 登録日 平成30年10月26日(2018.10.26)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
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 39/35 (2006.01)	A 6 1 K 39/35
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34

請求項の数 15 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-508585 (P2014-508585)	(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2014-514333 (P2014-514333A)		SELECTA BIOSCIENCES, INC.
(43) 公表日	平成26年6月19日(2014.6.19)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 4 7 2、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 4 8 0
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/035383		4 8 0 Arsenal Street, Building One, Watertown, MA 02472, U. S. A.
(87) 国際公開番号	W02012/149268		
(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2017-3006 (P2017-3006/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, 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)		
(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)		

(54) 【発明の名称】 アレルギー治療用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) 免疫抑制剤に結合しているポリマー合成ナノキャリアの第1の集団と、
 (i i) アレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープに結合している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、

前記アレルゲンのB細胞エピトープを実質的に含まず、任意に、薬学的に許容できる賦形剤を更に含み、

前記合成ナノキャリアの第1の集団で平均した前記免疫抑制剤の負荷が、少なくとも2%であるが25%(重量/重量)以下であり、前記合成ナノキャリアの第2の集団で平均した前記エピトープの負荷が、1%~10%(重量/重量)であり、

前記免疫抑制剤が、mTOR阻害剤を含み、

前記第1の集団の前記合成ナノキャリアの少なくとも75%が、動的光散乱法を用いて得られる110nm超の最小寸法を有し、動的光散乱法を用いて得られる500nm以下の最大寸法を有し、および

前記第1の集団と第2の集団とが同じ集団である、前記組成物。

【請求項 2】

(a) 前記mTOR阻害剤が、ラパマイシンである；および/または

(b) 前記アレルゲンが、対象の望ましくない免疫応答を誘導する、例えば、前記望ましくない免疫応答がアレルゲン特異的抗体産生、あるいは、アレルゲン特異的CD4+ T

細胞の増殖および／または活性である；および／または

(c) 前記アレルゲンが、喘息抗原、枯草熱抗原、蕁麻疹抗原、湿疹抗原、植物アレルゲン、昆虫刺傷アレルゲン、昆虫アレルゲン、動物アレルゲン、真菌類アレルゲン、薬物アレルゲン、ペットアレルゲン、ラテックスアレルゲン、かびアレルゲン、化粧品アレルゲンまたは食物アレルゲンを含む、例えば、(i) 前記食物アレルゲンが、乳アレルゲン、卵アレルゲン、ナッツアレルゲン、魚アレルゲン、甲殻類アレルゲン、大豆アレルゲン、豆類アレルゲン、種子類アレルゲンまたは小麦アレルゲンを含む；(ii) 前記植物アレルゲンが、ブタクサアレルゲンである；(iii) 前記アレルゲンが、枯草熱またはアレルギー性喘息に関連する；および／または(iv) 前記組成物が、対象に投与されたとき前記アレルゲンに対する望ましくない免疫応答を低下させるのに有効な量で投与される、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項3】

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が、ポリマーナノ粒子を含み、例えば(i) 前記ポリマーナノ粒子が、非メトキシ末端ブルロニックポリマーであるポリマーを含む；および／または(ii) 前記ポリマーナノ粒子が、ポリエステル、ポリエーテルに結合したポリエステル、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、多糖類、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、例えば前記ポリエステルが、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-c o-グリコール酸)、またはポリカプロラク톤を含み、例えば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3に記載の組成物。

20

【請求項4】

(a) 前記第1および／または第2の集団のポリマー合成ナノキャリアの動的光散乱を使用して得られる粒度分布の平均が、直径(i) 150 nmを超える；(ii) 200 nmを超える；(iii) 250 nmを超える；または(iv) 300 nmを超える；および／または

(b) 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より大きい、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物を含む剤形。

30

【請求項6】

任意に前記アレルゲンに対する前記対象の望ましくない免疫応答を低下させるため、前記組成物または前記剤形を対象に投与する工程を含む方法における使用のための、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物または請求項5に記載の剤形。

【請求項7】

方法における使用のための、

(i) 免疫抑制剤に結合しているポリマー合成ナノキャリアの第1の集団と、

(ii) アレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープに結合しているポリマー合成ナノキャリアの第2の集団と、

40

を含み、前記アレルゲンのB細胞エピトープを実質的に含まない組成物であって、

前記合成ナノキャリアの第1の集団で平均した前記免疫抑制剤の負荷が、少なくとも2%であるが25%(重量/重量)以下であり、前記合成ナノキャリアの第2の集団で平均した前記エピトープの負荷が、1%～10%(重量/重量)であり、

前記免疫抑制剤が、mTOR阻害剤を含み、

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少なくとも75%が、動的光散乱法を用いて得られる110 nm超の最小寸法を有し、動的光散乱法を用いて得られる500 nm以下の最大寸法を有し、および

前記第1の集団と第2の集団とが同じ集団であり、

前記方法が、

50

(a) 前記組成物を、前記アレルゲンに対する前記対象の望ましくない免疫応答を低下させるのに有効な量で投与する工程を含み、前記対象が前記アレルゲンに対する望ましくない免疫応答を起こしているまたは起こすリスクがある；あるいは、

(b) 前記組成物を有効な量で投与することによって、前記アレルゲンに対する前記対象の望ましくない免疫応答を低下させる、ここで前記対象が前記アレルゲンに対する望ましくない免疫応答を起こしているまたは起こすリスクがある；あるいは

(c) 1人以上の被験者のアレルゲンに対する望ましくない免疫応答を低下させることが以前示されたプロトコルに従って対象に前記組成物を投与する工程を含む；ここで、前記組成物が、前記アレルゲンに対する前記対象の望ましくない免疫応答を低下させるのに有効な量で投与され、前記対象が前記アレルゲンに対する望ましくない免疫応答を起こしているまたは起こすリスクがある、
前記組成物。

10

【請求項 8】

(a) 前記第 1 の集団と第 2 の集団とが同じ集団である；および／または

(b) 前記対象を提供する工程または同定する工程を更に含む；および／または

(c) 前記 m T O R 阻害剤が、ラパマイシンである；および／または

(d) 前記アレルゲンが、前記対象の望ましくない免疫応答を誘導する；および／または

(e) 前記望ましくない免疫応答がアレルゲン特異的抗体産生である；および／または

(f) 前記望ましくない免疫応答が、アレルゲン特異的 C D 4 + T 細胞の増殖および／または活性である；および／または

20

(g) 前記食物アレルゲンが、請求項 2 の (d) に記載の通りである；および／または

(h) 前記合成ナノキャリアが、請求項 3 に記載の通りである；および／または

(i) 前記合成ナノキャリアの動的光散乱を使用して得られる粒度分布の平均が、請求項 4 に記載の通りである；および／または

(j) 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、請求項 4 に記載の通りである；および／または

(k) 前記合成ナノキャリアの第 1 の集団と第 2 の集団とを含む前記組成物の 1 つ以上の維持量が、前記対象に投与される；および／または

(l) 前記方法が、前記合成ナノキャリアの第 1 の集団と第 2 の集団とを含む組成物を投与する前および／または投与した後に、前記アレルゲンに対する前記対象の望ましくない免疫応答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、アレルゲン特異的抗体産生あるいはアレルゲン特異的 C D 4 + T 細胞の増殖および／または活性である；および／または

30

(m) 前記対象がアレルギーを有するまたは有するリスクがあり、任意に、前記アレルギーが、アレルギー性喘息、枯草熱、蕁麻疹、湿疹、植物アレルギー（例えばブタクサアレルギー）、昆虫刺傷アレルギー、昆虫アレルギー、動物アレルギー、真菌類アレルギー、薬物アレルギー、ペットアレルギー、ラテックスアレルギー、かびアレルギー、化粧品アレルギー、または食物アレルギー（例えば乳アレルギー、卵アレルギー、ナッツアレルギー、魚アレルギー、甲殻類アレルギー、大豆アレルギー、豆類アレルギー、種子類アレルギーまたは小麦アレルギー）である；および／または

40

(n) 前記投与が、静脈内投与、腹腔内投与、経粘膜投与、経口投与、皮下投与、経肺投与、鼻腔内投与、皮内投与、または筋肉内投与による、例えば吸入または静脈内投与、皮下投与または経粘膜投与による、請求項 6 または 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

(i) 免疫抑制剤に結合しているポリマー合成ナノキャリアの第 1 の集団を製造する工程と、

(i i) アレルゲンの M H C クラス I I 拘束性エピトープに結合しているポリマー合成ナノキャリアの第 2 の集団を製造する工程と、

(i i i) 前記合成ナノキャリアの第 2 の集団が前記アレルゲンの 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工程と、

50

を含む方法であって、

前記合成ナノキャリアの第1の集団で平均した前記免疫抑制剤の負荷が、少なくとも2%であるが25%（重量／重量）以下であり、前記合成ナノキャリアの第2の集団で平均した前記エピトープの負荷が、1%～10%（重量／重量）であり、

前記免疫抑制剤が、mTOR阻害剤を含み、

前記第1の集団の前記合成ナノキャリアの少なくとも75%が、動的光散乱法を用いて得られる110nm超の最小寸法を有し、動的光散乱法を用いて得られる500nm以下の最大寸法を有し、および

前記第1の集団と第2の集団とが同じ集団であり、

前記方法は任意に、

10

(a) 前記方法が、前記合成ナノキャリアの第1の集団および第2の集団を含む剤形を製造する工程を更に含む；および／または

(b) 前記方法が、前記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(a)に記載の剤形を対象に投与できるようにする工程を更に含む；および／または

(c) 前記製造される合成ナノキャリアの第1の集団および第2の集団が、請求項1～4のいずれか一項に記載の通りである；および／または

(d) 前記方法が、前記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を用いた場合の前記アレルゲンに対する望ましくない免疫応答を評価する工程を更に含む、前記方法。

【請求項10】

20

(i) ポリマー合成ナノキャリアの第1の集団を免疫抑制剤に結合させる工程と、

(ii) ポリマー合成ナノキャリアの第2の集団をアレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープに結合させる工程と、

(iii) 合成ナノキャリアの第2の集団が前記アレルゲンの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工程と、
を含み、

前記合成ナノキャリアの第1の集団で平均した前記免疫抑制剤の負荷が、少なくとも2%であるが25%（重量／重量）以下であり、前記合成ナノキャリアの第2の集団で平均した前記エピトープの負荷が、1%～10%（重量／重量）であり、

前記免疫抑制剤が、mTOR阻害剤を含み、

30

前記第1の集団の前記合成ナノキャリアの少なくとも75%が、動的光散乱法を用いて得られる110nm超の最小寸法を有し、動的光散乱法を用いて得られる500nm以下の最大寸法を有し、および

前記第1の集団と第2の集団とが同じ集団である、組成物または剤形の製造プロセス。

【請求項11】

請求項9に記載の方法に記載されている工程を含む、請求項10に記載のプロセス。

【請求項12】

治療または予防における使用のための、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物または請求項5に記載の剤形。

【請求項13】

40

前記アレルゲンに対する対象の望ましくない免疫応答を低下させる方法、前記アレルギーの治療若しくは予防、または、請求項6～8のいずれか一項に記載の方法における使用のための、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物または請求項5に記載の剤形。

【請求項14】

第1および／または第2の集団のポリマー合成ナノキャリアの少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%が、前記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1～4のいずれか一項に記載の組成物または請求項5に記載の剤形。

【請求項15】

第1および／または第2の集団のポリマー合成ナノキャリアの少なくとも80%、少な

50

くとも90%、または少なくとも95%が、前記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9～11に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【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。

10

【0002】

本発明は、アレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープを含む抗原と免疫抑制剤とを有する合成ナノキャリア組成物、並びに関連する方法に関する。本組成物および方法は、APCによる効率的且つ優先的な取り込みを可能にし、アレルゲンに特異的な寛容原性免疫応答の発現に有利なように免疫応答を変化させる。従って、提供される組成物および方法を使用して、アレルゲンに対するアレルギー応答を起こしているまたは起こすと予想される対象の寛容原性免疫応答を惹起することができる。

20

【背景技術】

【0003】

対象のアレルギー応答は一般に増強され、望ましくないが、免疫抑制薬の使用により低下させることができる。しかし、通常の免疫抑制薬は、広域性(broad-acting)である。更に、免疫抑制を維持するために、免疫抑制薬療法は、一般に、生涯継続しなければならない(life-long proposition)。残念ながら、広域性免疫抑制剤の使用は、腫瘍、感染症、腎毒性および代謝異常などの重篤な副作用のリスクを伴う。従って、新規な免疫抑制剤療法が有益であろう。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

一態様では、(i)免疫抑制剤に結合している合成ナノキャリアの第1の集団と、(ii)アレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープに結合している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、アレルゲンのB細胞エピトープを実質的に含まない組成物が提供される。別の実施形態では、合成ナノキャリアの第1の集団は、アレルゲンのMHCクラスI拘束性エピトープにも結合している。

40

【0005】

一実施形態では、第1の集団と第2の集団とが同じ集団である。別の実施形態では、第1の集団と第2の集団は異なる集団である。

【0006】

更に別の実施形態では、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阻害剤、P38阻害剤、NF- κ B阻害剤、アデノシン受容体作動薬、プロスタグランジンE2作動薬、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。更にまた別の実施形態では、mTOR阻害剤は、ラパマイシンまたはその類似体である。

50

【0007】

別の実施形態では、アレルゲンは、対象の望ましくない免疫応答を誘導する、または誘導すると予想される。一実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的抗体産生である。別の実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的CD4+T細胞の増殖および／または活性である。更にまた別の実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的B細胞の増殖および／または活性である。更に別の実施形態では、アレルゲンは、喘息抗原、枯草熱抗原、蕁麻疹抗原、湿疹抗原、植物アレルゲン、昆虫刺傷アレルゲン、昆虫アレルゲン、動物アレルゲン、真菌類アレルゲン、薬物アレルゲン、ハプテン、小分子化学物質、ペットアレルゲン、ラテックスアレルゲン、かびアレルゲン、化粧品アレルゲンまたは食物アレルゲンを含む。更にまた別の実施形態では、食物アレルゲンは、乳アレルゲン、卵アレルゲン、ナッツアレルゲン、魚アレルゲン、甲殻類（shellfish）アレルゲン、大豆アレルゲン、豆類（legume）アレルゲン、種子類アレルゲンまたは小麦アレルゲンを含む。別の実施形態では、ナッツアレルゲンは、落花生アレルゲンまたは堅果類（tree nut）アレルゲンである。別の実施形態では、植物アレルゲンは、ブタクサアレルゲンである。更に別の実施形態では、アレルゲンは、枯草熱またはアレルギー性喘息に関連する。

10

【0008】

一実施形態では、組成物は、対象に投与されたときアレルゲンに対する望ましくない免疫応答を低下させるのに有効な量で投与される。別の実施形態では、対象は、アレルギーを有するまたはアレルギーを有するリスクがある。別の実施形態では、アレルギーは、アレルギー性喘息、枯草熱、蕁麻疹、湿疹、植物アレルギー、ペットアレルギー、ラテックスアレルギー、かびアレルギー、化粧品アレルギー、食物アレルギー、昆虫刺傷アレルギー、昆虫アレルギー、動物アレルギー、真菌類アレルギー、薬物アレルギーまたはハプテン若しくは小分子化学物質に対するアレルギーである。更に別の実施形態では、食物アレルギーは、乳アレルギー、卵アレルギー、ナッツアレルギー、魚アレルギー、甲殻アレルギー、大豆アレルギー、豆類アレルギー、種子類アレルギーまたは小麦アレルギーである。更にまた別の実施形態では、ナッツアレルギーは落花生アレルギーまたは堅果アレルギーである。更に別の実施形態では、アレルギーは、枯草熱またはブタクサアレルギーである。

20

【0009】

一実施形態では、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団全体での平均の免疫抑制剤および／またはエピトープの負荷（load）は、0.0001%～50%である。別の実施形態では、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団全体での平均の免疫抑制剤および／またはエピトープの負荷は、0.1%～10%である。

30

【0010】

別の実施形態では、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ション、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、またはペプチド若しくはタンパク質粒子を含む。更に別の実施形態では、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を含む。更にまた別の実施形態では、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リポソームを含む。別の実施形態では、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金属ナノ粒子を含む。更に別の実施形態では、金属ナノ粒子は金ナノ粒子を含む。更にまた別の実施形態では、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ポリマーナノ粒子を含む。別の実施形態では、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。一実施形態では、ポリマーナノ粒子は、ポリエステル、ポリエーテルに結合したポリエステル、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、多糖類、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。別の実施形態では、ポリエステルは、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-c o -グリコール酸）、またはポリカプロラクトンを含む。更にまた別の実施形態では、ポリマーナノ

40

50

粒子は、ポリエステルおよびポリエーテルに結合したポリエステルを含む。別の実施形態では、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。

【0011】

別の実施形態では、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使用して得られる粒度分布の平均は、直径100nmを超える。一実施形態では、直径は150nmを超える。別の実施形態では、直径は200nmを超える。更にまた別の実施形態では、直径は250nmを超える。更に別の実施形態では、直径は300nmを超える。

【0012】

更に別の実施形態では、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より大きい。

【0013】

別の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される医薬品添加物を更に含む。

【0014】

別の態様では、本明細書で提供される組成物の何れかを含む剤形が提供される。

【0015】

更に別の態様では、提供される組成物または剤形の何れかを対象に投与することができる。一実施形態では、対象はアレルギーを有するまたは有するリスクがある。別の実施形態では、対象はアレルゲンに対する望ましくない免疫応答を有するまたは有するリスクがある。更にまた別の実施形態では、本組成物または剤形でアレルゲンに対する対象の望ましくない免疫応答を低下させる。一実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的抗体産生である。別の実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的CD4+T細胞の増殖および／または活性である。更にまた別の実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的B細胞の増殖および／または活性である。

【0016】

更に別の態様では、(i)免疫抑制剤に結合している合成ナノキャリアの第1の集団と、(ii)アレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープに結合している合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物を対象に投与する工程を含む方法であって、組成物がアレルゲンのB細胞エピトープを実質的に含まず、組成物がアレルゲンに対する対象の望ましくない免疫応答を低下させるのに有効な量で投与され、対象がアレルゲンに対する望ましくない免疫応答を起こしているまたは起こすリスクがある方法が提供される。更にまた別の態様では、(i)免疫抑制剤に結合している合成ナノキャリアの第1の集団と、(ii)アレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープに結合している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り、アレルゲンに対する対象の望ましくない免疫応答を低下させる工程を含む方法であって、組成物がアレルゲンのB細胞エピトープを実質的に含まず、組成物がアレルゲンに対する対象の望ましくない免疫応答を低下させるのに有効な量で投与され、対象がアレルゲンに対する望ましくない免疫応答を起こしているまたは起こすリスクがある方法が提供される。別の態様では、1人以上の被験者のアレルゲンに対する望ましくない免疫応答を低下させることが以前示されたプロトコルに従って対象に組成物を投与する工程を含む方法であって；

組成物が(i)免疫抑制剤に結合している合成ナノキャリアの第1の集団と、(ii)アレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープに結合している合成ナノキャリアの第2の集団とを含み、組成物がアレルゲンのB細胞エピトープを実質的に含まず、組成物がアレルゲンに対する対象の望ましくない免疫応答を低下させるのに有効な量で投与され、対象がアレルゲンに対する望ましくない免疫応答を起こしているまたは起こすリスクがある方法が提供される。

【0017】

一実施形態では、第1の集団と第2の集団とが同じ集団である。別の実施形態では、第

10

20

30

40

50

1の集団と第2の集団は異なる集団である。

【0018】

更に別の実施形態では、本方法は、対象を提供する工程または同定する工程を更に含む。

【0019】

更にまた別の実施形態では、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阻害剤、P38阻害剤、NF- κ B阻害剤、アデノシン受容体作動薬、プロスタグランジンE2作動薬、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。別の実施形態では、mTOR阻害剤はラパマイシンまたはその類似体である。

10

【0020】

一実施形態では、アレルゲンは、対象の望ましくない免疫応答を誘導する、または誘導すると予想される。一実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的抗体産生である。別の実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的CD4+T細胞の増殖および／または活性である。更にまた別の実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的B細胞の増殖および／または活性である。別の実施形態では、アレルゲンは、喘息抗原、枯草熱抗原、蕁麻疹抗原、湿疹抗原、植物アレルゲン、昆虫刺傷アレルゲン、昆虫アレルゲン、動物アレルゲン、真菌類アレルゲン、薬物アレルゲン、ペットアレルゲン、ラテックスアレルゲン、かびアレルゲン、化粧品アレルゲンまたは食物アレルゲンを含む。更に別の実施形態では、食物アレルゲンは、乳アレルゲン、卵アレルゲン、ナッツアレルゲン、魚アレルゲン、甲殻類アレルゲン、大豆アレルゲン、豆類アレルゲン、種子類アレルゲンまたは小麦アレルゲンを含む。更にまた別の実施形態では、ナッツアレルゲンは、落花生アレルゲンまたは堅果類アレルゲンである。更に別の実施形態では、植物アレルゲンはブタクサアレルゲンである。

20

【0021】

別の実施形態では、合成ナノキャリアの第1の集団はアレルゲンのMHCクラスI拘束性エピトープにも結合している。

【0022】

一実施形態では、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団全体での平均の免疫抑制剤および／またはエピトープの負荷は、0.0001%~50%である。別の実施形態では、合成ナノキャリアの第1および／または第2の集団全体での平均の免疫抑制剤および／またはエピトープの負荷は、0.1%~10%である。

30

【0023】

別の実施形態では、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ション、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、またはペプチド若しくはタンパク質粒子を含む。更に別の実施形態では、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を含む。更にまた別の実施形態では、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リポソームを含む。別の実施形態では、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金属ナノ粒子を含む。更に別の実施形態では、金属ナノ粒子は金ナノ粒子を含む。更にまた別の実施形態では、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ポリマーナノ粒子を含む。一実施形態では、ポリマーナノ粒子は非メトキシ末端プルロニック(pluronic)ポリマーを含む。一実施形態では、ポリマーナノ粒子は、ポリエステル、ポリエーテルに結合したポリエステル、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、多糖類、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。別の実施形態では、ポリエステルは、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-c-グリコール酸)、またはポリカプロラク톤を含む。更にまた別の実施形態では、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したポリエステルを含む。別の実施形態では、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。

40

50

【0024】

別の実施形態では、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使用して得られる粒度分布の平均は、直径100nmを超える。一実施形態では、直径は150nmを超える。別の実施形態では、直径は200nmを超える。更にまた別の実施形態では、直径は250nmを超える。更に別の実施形態では、直径は300nmを超える。

【0025】

更に別の実施形態では、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より大きい。

10

【0026】

一実施形態では、合成ナノキャリアの第1の集団と合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物の1つ以上の維持量が対象に投与される。別の実施形態では、本方法は、合成ナノキャリアの第1の集団と合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物の投与前および／または投与後に、アレルゲンに対する対象の望ましくない免疫応答を評価する工程を更に含む。一実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的抗体産生である。別の実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的CD4+T細胞の増殖および／または活性である。更にまた別の実施形態では、望ましくない免疫応答は、アレルゲン特異的B細胞の増殖および／または活性である。

20

【0027】

一実施形態では、対象はアレルギーを有するまたは有するリスクがある。別の実施形態では、アレルギーは、アレルギー性喘息、枯草熱、蕁麻疹、湿疹、植物アレルギー、昆虫刺傷アレルギー、昆虫アレルギー、動物アレルギー、真菌類アレルギー、薬物アレルギー、ペットアレルギー、ラテックスアレルギー、かびアレルギー、化粧品アレルギー、または食物アレルギーである。更に別の実施形態では、食物アレルギーは、乳アレルギー、卵アレルギー、ナッツアレルギー、魚アレルギー、甲殻類アレルギー、大豆アレルギー、豆類アレルギー、種子類アレルギーまたは小麦アレルギーである。更にまた別の実施形態では、ナッツアレルギーは落花生アレルギーまたは堅果類アレルギーである。別の実施形態では、植物アレルギーはブタクサアレルギーである。

30

【0028】

別の実施形態では、投与は、静脈内投与、腹腔内投与、経粘膜投与、経口投与、皮下投与、経肺投与、鼻腔内投与、皮内投与、または筋肉内投与による。更に別の実施形態では、投与は、吸入または静脈内投与、皮下投与または経粘膜投与による。

【0029】

別の態様では、(i)免疫抑制剤に結合している合成ナノキャリアの第1の集団を製造する工程と、(ii)アレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープに結合している合成ナノキャリアの第2の集団を製造する工程と、(iii)合成ナノキャリアの第2の集団がアレルゲンの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工程とを含む方法が提供される。

40

【0030】

一実施形態では、第1の集団と第2の集団とが同じ集団である。別の実施形態では、第1の集団と第2の集団は異なる集団である。

【0031】

更に別の実施形態では、本方法は、合成ナノキャリアの第1の集団と合成ナノキャリアの第2の集団とを含む剤形を製造する工程を更に含む。更にまた別の実施形態では、本方法は、合成ナノキャリアの第1の集団と合成ナノキャリアの第2の集団を含む組成物またはその剤形を対象に投与できるようにする工程を更に含む。

【0032】

別の実施形態では、製造される合成ナノキャリアの第1の集団と合成ナノキャリアの第2の集団は、本明細書で提供される方法の何れかに記載の通りである。別の実施形態では

50

、本方法は、合成ナノキャリアの第1の集団と合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物を用いた場合のアレルゲンに対する望ましくない免疫応答を評価する工程を更に含む。一実施形態では、対象の望ましくない免疫応答を評価する。

【0033】

更に別の実施形態では、合成ナノキャリアの第1の集団を免疫抑制剤に結合させる工程と；合成ナノキャリアの第2の集団をアレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープに結合させる工程と；合成ナノキャリアの第2の集団がアレルゲンの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工程とを含む、組成物または剤形の製造プロセスが提供される。一実施形態では、本プロセスは、本明細書で提供される方法の何れかの工程を含む。

10

【0034】

別の態様では、本明細書で提供される方法またはプロセスの何れかにより得ることができる組成物または剤形が提供される。

【0035】

更にまた別の態様では、本明細書で提供される組成物または剤形のいずれも治療または予防に使用され得る。

【0036】

更に別の態様では、本明細書で提供される組成物または剤形のいずれも、アレルゲンに対する対象の望ましくない免疫応答を低下させる方法、アレルギーの治療若しくは予防、または本明細書で提供される方法の何れかに使用され得る。

20

【0037】

別の態様では、アレルゲンに対する対象の望ましくない免疫応答を低下させる方法、アレルギーの治療若しくは予防、または本明細書で提供される方法の何れかに使用される医薬を製造するための本明細書で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。

【0038】

更に別の実施形態では、本明細書で提供される組成物の何れかを含む剤形が提供される。

【0039】

本明細書で提供される組成物および方法の何れかの一実施形態では、前述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していてもよい。別の実施形態では、エピトープの一端または両端に隣接する追加のアミノ酸を除く、前述のエピトープを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していてもよい。別の実施形態では、エピトープ自体が合成ナノキャリアに結合している。

30

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】Treeのフローサイトメトリー解析の結果を示す図である。

【図2】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を用いた場合の抗原特異的エフェクターT細胞数に対する効果を示す図である（単回注射後）。

40

【図3】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を用いた場合の膝窩リンパ節細胞数の減少を示す図である（複数回注射後）。

【図4】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5】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6】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様々な免疫細胞の総数の減少を示す。

【図7】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

50

の低下を示す。

【図8】抗原特異的 I g E 抗体産生の低下を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0041】

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。

【0042】

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。

【0043】

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。

【0044】

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。

【0045】

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）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。

【0046】

A. 導入部

前述のように、現在の通常の免疫抑制剤は広域性であり、一般に免疫系の全身的なダウンレギュレーションを引き起こす。本明細書で提供される本組成物および方法は、例えば、目的の免疫細胞への標的指向化された送達が可能になることによって、より標的指向性の高い免疫効果が可能となる。従って、本組成物および方法は、より指向性のある免疫抑制を達成することができる。免疫抑制剤およびアレルゲンのMHCクラスII拘束性エピ

10

20

30

40

50

トープをより直接的に目的の細胞、特に、A P Cに送達することにより、アレルゲンに特異的な抗体産生、C D 4 + T細胞の増殖および／または活性等の低下などの有益な寛容原性免疫応答が起こり得ることが判明した。このような免疫応答は、アレルギーに罹患する対象に有益となり得る。本発明は、例えば、アレルゲンに対する望ましくない免疫応答を起こしているまたは起こすリスクがある対象の寛容原性免疫応答を促進するのに有用である。このような対象としては、アレルギーを有するまたは有するリスクがある人が挙げられる。

【0047】

本発明者らは、予想外に且つ驚くべきことに、本明細書に開示される本発明を実施することにより前述の問題および制限を克服できることを発見した。特に、本発明者らは、予想外に、アレルゲンのM H CクラスI I拘束性エピトープを含むアレルゲン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発見した。このような組成物は、アレルゲンに対する望ましくない免疫応答を低下させることができる。本明細書に記載の組成物には、(i) 免疫抑制剤に結合している合成ナノキャリアの第1の集団と、(i i) アレルゲンのM H CクラスI I拘束性エピトープに結合している合成ナノキャリアの第2の集団とを含む組成物が含まれる。複数の実施形態では、M H CクラスI拘束性エピトープも合成ナノキャリアに結合していてもよい。幾つかの実施形態では、アレルゲンのB細胞エピトープは実質的に結合しておらず、このようなエピトープは、本明細書で提供される組成物および方法から明確に排除され得る。

【0048】

別の態様では、本明細書の組成物の何れかの剤形が提供される。このような剤形を、アレルゲン特異的な寛容原性免疫応答を必要とする対象などの対象に投与することができる。一実施形態では、対象は、アレルゲンに対する望ましくない免疫応答を有した、有している、または有すると予想される対象である。このような対象としては、アレルギーを有するまたは有するリスクがある人が挙げられる。

【0049】

別の態様では、本明細書で提供される組成物の何れかを対象に投与する。組成物は、アレルゲンに対する望ましくない免疫応答の惹起を低減するのに有効な量で投与されてもよい。一実施形態では、組成物は、1人以上の対象のアレルゲンに対する望ましくない免疫応答の惹起を低減することが以前示されたプロトコルに従って、対象に投与される。

【0050】

組成物は、対象がアレルゲンに暴露される前に、暴露されるのと同時に、または暴露された後に、対象に投与されてもよい。複数の実施形態では、提供される組成物はまた、アレルギーを有するまたは有するリスクがある対象に1つ以上の維持量として投与されてもよい。このような実施形態では、提供される組成物は、望ましくない免疫応答の惹起がある一定時間低減するように投与される。このような時間の長さの例については、本明細書の他の箇所に記載する。

【0051】

更に別の態様では、(i) 免疫抑制剤に結合している合成ナノキャリアの第1の集団を製造する工程、および(i i) アレルゲンのM H CクラスI I拘束性エピトープに結合している合成ナノキャリアの第2の集団を製造する工程からなる方法が提供される。複数の実施形態では、アレルゲンのM H CクラスI拘束性エピトープも合成ナノキャリアに結合してもよい。別の実施形態では、アレルゲンのB細胞エピトープは合成ナノキャリアに実質的に結合しない。

【0052】

ここで、本発明は、以下により詳細に説明される。

【0053】

B. 定義

「投与する (administering)」または「投与 (administrat

10

20

30

40

50

ion)」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。

【0054】

「アレルゲン特異的」とは、アレルゲン若しくはその一部の存在により起こる、またはアレルゲンを特異的に認識する若しくはアレルゲンに特異的に結合する分子を生成する任意の免疫応答を指す。例えば、免疫応答がアレルゲン特異的抗体産生である場合、アレルゲンに特異的に結合する抗体が産生される。別の例として、免疫応答がアレルゲン特異的B細胞またはCD4+T細胞の増殖および／または活性である場合、アレルゲンまたはその一部が単独でまたはMHC分子、B細胞などとの複合体として認識されることにより、増殖および／または活性が起こる。

【0055】

「アレルゲン」は、被験体における望ましくない（例えば、1型過敏）免疫応答（即ち、アレルギー応答または反応）を引き起こし得る任意の物質である。アレルゲンとしては、以下に限定はされないが、植物アレルゲン（例えば、花粉、ブタクサアレルゲン）、昆虫アレルゲン、昆虫刺傷アレルゲン（例えば、ハチ刺傷アレルゲン）、動物アレルゲン（例えば、動物の鱗屑またはネコFeld1抗原などのペットアレルゲン）、ラテックスアレルゲン、カビアレルゲン、真菌アレルゲン、化粧品アレルゲン、薬物アレルゲン、食物アレルゲン、粉塵、昆虫毒、ウイルス、細菌などが挙げられる。食物アレルゲンとしては、以下に限定はされないが、牛乳アレルゲン、卵アレルゲン、ナッツアレルゲン（例えば、ピーナッツまたは木堅果アレルゲンなど（例えば、クルミ、カシューナッツなど））、魚アレルゲン、甲殻類アレルゲン、大豆アレルゲン、豆類アレルゲン、種子アレルゲンおよび小麦アレルゲンが挙げられる。昆虫刺傷アレルゲンとしては、ハチ刺傷、カリバチ刺傷、ホーネット（hornet）刺傷、イエロージャケット（yellow jacket）刺傷などであるかこれらに関連するアレルゲンが挙げられる。昆虫アレルゲンとしては、イエダニアレルゲン（例えば、DerP1抗原）およびゴキブリアレルゲンも挙げられる。薬物アレルゲンとしては、抗生物質、NSAID、麻酔剤などであるかこれらに関連するアレルゲンが挙げられる。花粉アレルゲンとしては、草アレルゲン、樹木アレルゲン、雑草アレルゲン、花アレルゲンなどが挙げられる。本明細書に提供されるアレルゲンの何れかに対する望ましくない免疫応答を生じるかまたは生じるリスクがある被験体は、本明細書に提供される組成物および方法の何れかで治療され得る。提供される組成物および方法の何れかで治療され得る被験体は、提供されるアレルゲンの何れかに対するアレルギーを有するかまたは有するリスクがある被験体も含む。「アレルギーに関連するアレルゲン」は、単独でまたは他のアレルゲンとの組み合わせで、対象のアレルギー応答若しくは反応、またはアレルギー応答若しくは反応の症状を引き起こす、または引き起こすと開業医が予想するであろう望ましくない免疫応答を惹起するアレルゲンである。「アレルゲンの種類」は、望ましくない免疫応答に関して同じまたは実質的に同じ抗原性を有する分子を意味する。幾つかの実施形態では、アレルゲンは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、リポタンパク質であってもよく、細胞内に含有される若しくは発現する。

【0056】

MHCクラスII拘束性エピトープは、好ましくは本明細書で提供される合成ナノキャリアに結合しているものとする。エピトープ自体が合成ナノキャリアに結合していてもよく、またはこれらのエピトープを含むタンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどが合成ナノキャリアに結合していてもよい。従って、本明細書で提供される組成物中で、MHCクラスII拘束性エピトープを含むアレルゲン自体またはその一部が、合成ナノキャリアに結合していてもよい。幾つかの実施形態では、MHCクラスI拘束性エピトープも結合していてもよい。従って、幾つかの実施形態では、アレルゲン自体またはその一部がMHCクラスII拘束性エピトープとMHCクラスI拘束性エピトープの両方を含む。樹状細胞、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るものではない抗原提示細胞が提示するように、本明細書で提供される組成物および方法に使用されるエピトープを免疫系の細胞に認識されるように提示することができる。例えば、T細胞に認識されるように、エピトープを提示することができる。このようなエピトープは、通常、提示主要組織適

10

20

30

40

50

合遺伝子複合体分子（MHC）によりT細胞に認識され、T細胞の免疫応答を引き起し得るが、本明細書で提供される組成物中にこのようなエピトープが免疫抑制剤と共に存在することにより、代わりに寛容原性免疫応答が起こり得る。幾つかの実施形態では、B細胞エピトープを含むことにより望ましくない免疫応答が増悪する場合など、B細胞エピトープは合成ナノキャリアに実質的に結合されず、従って、アレルゲンまたはその一部がB細胞エピトープを含まないか、またはB細胞エピトープを含むがこのようなエピトープは所望の免疫応答に著しく悪影響を及ぼさない。

【0057】

アレルゲンは、望ましくない免疫応答を引き起こす、対象が暴露されるのと同じ形態で合成ナノキャリアに結合していてもよいが、アレルゲンはその断片または誘導体であってもよい。しかし、断片または誘導体の場合、このような対象が遭遇する形態に対する所望の免疫応答は、提供される本組成物および方法での好ましい結果である。

10

【0058】

「アレルギー」は、本明細書において「アレルギー状態」とも呼ばれ、ある物質に対する望ましくない（例えば、1型過敏）免疫応答（即ち、アレルギー応答または反応）がある任意の状態である。このような物質は、本明細書においてアレルゲンと呼ばれる。アレルギーまたはアレルギー状態としては、以下に限定はされないが、アレルギー性喘息、花粉症、じんま疹、湿疹、植物アレルギー、ハチ刺傷アレルギー、ペットアレルギー、ラテックスアレルギー、カビアレルギー、化粧品アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性鼻炎または鼻風邪、局所的アレルギー反応、アナフィラキシー、アトピー性皮膚炎、過敏性反応および他のアレルギー状態が挙げられる。アレルギー反応は、何らかのアレルゲンに対する免疫反応の結果であり得る。ある実施形態において、アレルギーは、食物アレルギーである。食物アレルギーとしては、以下に限定はされないが、牛乳アレルギー、卵アレルギー、ナッツアレルギー、魚アレルギー、甲殻類アレルギー、大豆アレルギーまたは小麦アレルギーが挙げられる。

20

【0059】

対象に投与される組成物または剤形に関する「有効量」とは、対象に1つ以上の所望の免疫応答、例えば、寛容原性免疫応答（例えば、アレルゲン特異的CD4+T細胞若しくはアレルゲン特異的B細胞の増殖、活性化、誘導、動員の減少、またはアレルゲン特異的抗体の産生の低下）の惹起をもたらす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、アレルゲン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。このような対象としては、アレルゲンに対するアレルギーまたはアレルギー応答を有するまたは有するリスクがある人が挙げられる。

30

【0060】

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、アレルゲン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。

40

【0061】

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他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

50

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、特定のアレルゲンに対する）の測定可能な減少をもたらす量である。

【0062】

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得ることが、当業者によって理解されるであろう。

10

【0063】

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。

20

【0064】

「抗原」は、B細胞抗原またはT細胞抗原を意味する。抗原としては、単独でまたは別の作用物質、担体などと共に免疫応答を惹起することができるアレルゲンまたはアレルゲンの断片若しくは誘導体が挙げられる。

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。

【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。

40

【0068】

「B細胞抗原」は、B細胞における免疫応答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、小分子、および炭水化物が挙げられる。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）。ある実施形態において、B細胞抗原は、アレルゲンから得られるかまたはこれらに由来する。

【0069】

50

「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、 π - π 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】

「誘導された（derived）」は、ある材料またはある材料に関する情報から製造されたことを意味するが、その材料から「得られた」のではない。このような材料は、生物材料から直接採取される材料の実質的に修飾されたまたは処理された形態であってもよい。このような材料には、生物材料に関する情報から製造された材料も含まれる。

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】

幾つかのエピトープが、当業者に公知であり、本発明の幾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, Emami H, Hoof I, Salimi N, Damle R, Sette A, Peters B. The immune epitope database 2.0. Nucleic 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

50

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; Sturniolo 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, Lamberth 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, Hughes 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】

本明細書で提供されるエピトープの他の例としては、配列番号: 1~516として記載されるアレルゲン関連MHCクラスII拘束性エピトープおよびB細胞エピトープの何れかが挙げられる。特定の理論に拘泥することを望むものではないが、MHCクラスII拘束性エピトープとしては配列番号: 1~338で記載されるものが挙げられ、B細胞エピトープとしては配列番号: 339~516で記載されるものが挙げられる。

【0077】

「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。

【0078】

「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。

【0079】

「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、免疫抑制即ち寛容原性効果は、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、アレルゲン特異的C D 4 + T細胞またはB細胞の産生、誘導、刺激または動員の抑制、アレルゲン特異的抗体の産生の抑制、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、刺激または動員などを特徴とし得る。これはC D 4 + T細胞またはB細胞の制御性表現型へ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。

【0080】

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。

【0081】

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

10

20

30

40

50

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。

【0082】

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。

【0083】

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。

【0084】

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。

【0085】

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。

【0086】

免疫抑制剤または抗原の「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、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、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/または抗原の負荷は、0.1%~10%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

【0087】

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得る：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

【0088】

「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、初期投与量の後には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

【0089】

「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を超える。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ペクト比は、1:1～1,000,000:1、好ましくは1:1～100,000:1

40

50

、より好ましくは1：1～10，000：1、より好ましくは1：1～1000：1、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 μm以下、より好ましくは2 μm以下、より好ましくは1 μm以下、より好ましくは800 nm以下、より好ましくは600 nm以下、更により好ましくは500 nm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、100 nm以上、より好ましくは120 nm以上、より好ましくは130 nm以上、より好ましくは140 nm以上、更により好ましくは150 nm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0.01～0.1 mg/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。

10

20

【0090】

「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。

30

【0091】

「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。

40

【0092】

「得られる」は、ある材料から直接採取され、修飾および／または処理を実質的に行わずに使用されることを意味する。

【0093】

「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。

【0094】

50

「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10
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。

【0095】

「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20
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。

【0096】

「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。

【0097】

「B細胞エピトープを実質的に含まない」とは、B細胞エピトープが、（アレルゲンに関して、単独で、担体と共にまたは本発明の組成物と共に）B細胞応答の実質的な活性化を刺激する量で存在しないことを指す。複数の実施形態では、B細胞エピトープを実質的に含まない組成物は、測定可能な量のアレルゲンのB細胞エピトープを含有しない。他の実施形態では、このような組成物は、測定可能な量のアレルゲンのB細胞エピトープを含み得るが、前記量は、（アレルゲンに関して、単独で、担体と共にまたは本発明の組成物と共に）測定可能なB細胞免疫応答、例えば、アレルゲン特異的抗体産生またはアレルゲン特異的B細胞の増殖および／または活性などを惹起するのに有効ではない、または（アレルゲンに関して、単独で、担体と共にまたは本発明の組成物と共に）測定可能な著しいB細胞免疫応答を惹起するのに有効ではない。幾つかの実施形態では、測定可能な著しいB細胞免疫応答は、対象に有害な臨床結果をもたらすまたはもたらすことが予想される応30
答である。他の実施形態では、測定可能な著しいB細胞免疫応答は、対照抗原（例えば、アレルゲンのB細胞エピトープを含まないまたはB細胞免疫応答を刺激しないことが知られているもの）により起こる同じ種類の免疫応答（例えば、アレルゲン特異的抗体産生またはアレルゲン特異的B細胞の増殖および／または活性）のレベルより大きい応答である。幾つかの実施形態では、抗体価の測定（例えば、ELISAによる）などの測定可能な著しいB細胞免疫応答は、対照（例えば、対照抗原）により起こる同じ種類の応答より240
倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、または20倍以上大きい。他の実施形態では、B細胞エピトープを実質的に含まない組成物は、（抗原に関して、単独で、担体と共にまたは本発明の組成物と共に）アレルゲン特異的抗体価をほとんど乃至全く生じない組成物である。このような組成物としては、500、400、30050

、200、100、50、40、30、20または10未満の抗体価（EC50値として）を生じる組成物が挙げられる。他の実施形態では、測定可能な著しいB細胞免疫応答は、対照により起こる同じ種類の応答より10%、25%、50%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、または20倍以上大きい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他の方法は当業者に公知である。

【0098】

複数の実施形態では、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、それらが本明細書で提供される合成ナノキャリアに結合するB細胞エピトープを含まないように選択される。他の実施形態では、組成物がアレルゲンの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、エピトープに結合した合成ナノキャリアを製造し、そのB細胞免疫応答（例えば、B細胞の増殖および／または活性、アレルゲン特異的抗体産生）を試験する。その後、所望の特性を示す組成物を選択することができる。

【0099】

「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。

【0100】

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 Nanoparticle that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles” Nanomedicine.

5 (6) : 8 4 3 - 8 5 3 (2 0 1 0) に開示されるナノ析出された (n a n o p r e c i p i t a t e d) ナノ粒子、または (1 1) 米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 8 6 0 4 9 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 : 1 0 を超えるアスペクト比を有し得る。

【 0 1 0 1 】

約 1 0 0 n m 以下、好ましくは 1 0 0 n m 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 1 0 0 n m 以下、好ましくは 1 0 0 n m 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 1 0 0 n m 以下、好ましくは 1 0 0 n m 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 : 1 0 を超えるアスペクト比を有し得る。

【 0 1 0 2 】

「T細胞抗原」は、C D 4 + T細胞抗原またはC D 8 + 細胞抗原を意味する。「C D 4 + T細胞抗原」は、C D 4 + 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 I 主要組織適合遺伝子複合体分子 (M H C) に結合された抗原またはその部分の提示によって、C D 4 + 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。幾つかの実施形態では、T細胞抗原である抗原はまたB細胞抗原でもある。他の実施形態では、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。

【 0 1 0 3 】

「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としては、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低下、遅延または抑制が挙げられる。このような免疫応答としてはまた、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所望の免疫応答における任意の刺激、産生、誘導、促進または動員が挙げられる。従って、寛容原性免疫応答としては、抗原反応性細胞により媒介され得る抗原に対する望ましくない免疫応答の欠如または低下、並びに抑制細胞の存在または促進が挙げられる。本明細書で提供される寛容原性免疫応答としては、免疫寛容が挙げられる。「寛容原性免疫応答を惹起する」とは、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前述の免疫応答の何れかの惹起を指す。寛容原性免疫応答は、M H C クラス I 拘束性提示および／またはM H C クラス I I 拘束性提示および／またはB細胞提示および／またはC D 1 d による提示の結果などであってもよい。

【 0 1 0 4 】

寛容原性免疫応答は、C D 4 + T細胞、C D 8 + 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、C D 4 + T r e g 細胞、C D 8 + T r e g 細胞、B r e g 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。

【 0 1 0 5 】

寛容原性免疫応答は、C D 4 + T r e g 細胞および／またはC D 8 + T r e g 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. 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。

【0106】

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）なども挙げられる。

【0107】

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。

10

【0108】

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、臨床の有効性、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。複数の実施形態では、望ましくない免疫（例えば、アレルギー）応答を監視または評価する方法としては、皮膚反応性および／またはアレルゲン特異的抗体産生による対象の免疫応答の評価が挙げられる。

20

30

【0109】

幾つかの実施形態では、対象の望ましくない免疫応答または寛容原性免疫応答の惹起の監視または評価は、本明細書で提供される合成ナノキャリアの組成物の投与前および／またはアレルゲンへの暴露前に行うことができる。他の実施形態では、望ましくない免疫応答または寛容原性免疫応答の惹起の評価は、本明細書で提供される合成ナノキャリアの組成物の投与後および／またはアレルゲンへの暴露後に行うことができる。幾つかの実施形態では、評価は、合成ナノキャリアの組成物の投与後、アレルゲンへの暴露前に行われる。他の実施形態では、評価は、アレルゲンへの暴露後、組成物の投与前に行われる。更にまた他の実施形態では、評価は、合成ナノキャリアの投与とアレルゲンへの暴露の両方の前に行われるが、更に他の実施形態では、評価は、合成ナノキャリアの投与とアレルゲンへの暴露の両方の後に行われる。別の実施形態では、評価は、合成ナノキャリアの投与および／またはアレルゲンへの暴露の前後両方とも行われる。更にまた他の実施形態では、評価は、アレルギーを有するまたは有するリスクがある対象などの、対象の望ましい免疫状態が維持されていることを確認するために対象で2回以上行われる。

40

【0110】

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

50

としては、抗体捕捉アッセイ、酵素結合免疫吸着法（E L I S A）、阻害液相吸着アッセイ（I L P A A）、ロケット免疫電気泳動（R I E）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。

【0111】

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晩付着させるために、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（セイヨウワサビペルオキシダーゼ）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）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。

【0112】

「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としては、抗原特異的抗体産生、抗原特異的B細胞の増殖および／または活性、または抗原特異的C D 4 + T細胞の増殖および／または活性が挙げられる。

【0113】

C. 本発明の組成物

免疫抑制剤とアレルゲンのM H CクラスI I拘束性エピートープと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で提供される。このような組成物および方法は、望ましくない免疫応答（例えば、望ましくないB細胞またはC D 4 + T細胞の増殖および／または活性、望ましくない抗体産生など）の惹起を低減し、アレルゲンに特異的な寛容原性免疫応答の惹起を促進するのに有用である。アレルゲンに対する寛容原性免疫応答が所望される対象に本組成物を投与することができる。このような対象としては、アレルゲンに暴露された、暴露されている、または暴露されることになる人が挙げられる。このような対象としては、本明細書に記載のアレルゲンの何れかに対する望ましくな

10

20

30

40

50

い免疫（例えば、アレルギー）応答を起こした、起こしている、または起こすことが予想される人が挙げられる。このような対象としては、本明細書に記載のアレルゲンの何れかに対するアレルギーを有するまたは有するリスクがある人も挙げられる。

【0114】

前述のように、合成ナノキャリアは、免疫抑制剤、および、幾つかの実施形態では、寛容原性効果が所望されるアレルゲンのMHCクラスII拘束性エピトープを含むように設計される。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

【0115】

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

【0116】

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。

【0117】

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

【0118】

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

【0119】

幾つかの実施形態では、合成ナノキャリアは、1種以上の両親媒性成分を任意選択により含んでもよい。幾つかの実施形態では、両親媒性成分は、安定性が向上した、均一性が改善された、または粘度が増加した合成ナノキャリアの製造を促進することができる。幾つかの実施形態では、両親媒性成分は、脂質膜の内面（例えば、脂質二分子膜、脂質単分子膜など）と結合することができる。当該技術分野で公知の多くの両親媒性成分は、本発明による合成ナノキャリアの製造に使用するのに好適である。このような両親媒性成分としては、ホスホグリセリド；ホスファチジルコリン類；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）；ジオレオイルホスファチジル

50

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コハク酸エステル；ジホスファチジルグリセロール（DPPG）；ヘキサデカノール；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-9-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界面活性脂肪酸；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）；モノステアリン酸ポリオキシエチレン；サーファクタン；ポロキソマー；ソルビタントリオレ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；ステアリルアミン；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；高い界面活性特性を有する合成および／または天然の洗剤；デオキシコール酸塩；シクロデキストリン；カオトロピック塩；イオンペア試薬；およびこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。両親媒性成分は、異なる両親媒性成分の混合物であってもよい。当業者には、これが界面活性を有する物質の例を列挙するものであって包括的に示すものではないことが分かるであろう。本発明に従って使用される合成ナノキャリアの製造に任意の両親媒性成分を使用することができる。

【0120】

幾つかの実施形態では、合成ナノキャリアは、1種類以上の炭水化物を任意選択により含んでもよい。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、誘導体化された天然炭水化物であってもよい。特定の実施形態では、炭水化物には、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、ガラクツロン酸、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るものではない単糖類または二糖類が含まれる。特定の実施形態では、炭水化物は、プルラン、セルロース、微結晶セルロース、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、ヒドロキシエチルスターチ、カラギーナン、グリコン、アミロース、キトサン、N，O-カルボキシルメチルキトサン、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、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るものではない多糖類である。複数の実施形態では、本発明の合成ナノキャリアは、多糖類などの炭水化物を含まない（または明確に排除する）。特定の実施形態では、炭水化物は、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、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るものではない糖アルコールなどの炭水化物誘導体を含んでもよい。

【0121】

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

【0122】

免疫抑制剤および／または抗原は、幾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

【0123】

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

【0124】

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。

【0125】

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幾つかにおいて、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。

40

50

【0126】

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。

【0127】

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

【0128】

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

【0129】

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

【0130】

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

【0131】

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。

【0132】

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。

【0133】

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。

【0134】

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。幾つかの実施形態では、本発明に従って使用されるPLGAは、乳酸：グリコール酸の比が約85：15、約75：25、約60：40、約50：50、約40：60、約25：75、または約15：85であることを特徴とする。

【0135】

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。

【0136】

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）。

【0137】

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。

【0138】

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。

【0139】

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

【0140】

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。

20

【0141】

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。

【0142】

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

【0143】

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

【0144】

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。

【0145】

アミドリリンカーは、1つの成分上のアミンと、第2の成分のカルボン酸基との間のアミ

50

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。

【0146】

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、別の活性化チオール基とのチオール交換、およびチオール／メルカプタン基を含有する別のものの、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。

【0147】

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】



（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、免疫抑制剤または抗原などの第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。

【0148】

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。

【0149】

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

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。

【0150】

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。

【0151】

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

【0152】

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。

【0153】

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。

【0154】

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

【0155】

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。

【0156】

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

【0157】

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。

【0158】

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。

【0159】

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。

【0160】

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

【0161】

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

【0162】

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

【0163】

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

【0164】

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。

【0165】

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。

【0166】

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。

【0167】

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。

【0168】

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。

【0169】

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。

【0170】

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。

【0171】

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。

【0172】

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））、ラニビズマブ（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。

【0173】

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。

【0174】

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（トレチノイン酸、RETIN-A（登録商標））、イソトレチノイン（ACUTANE（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であるアシトレチン（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））およびアダバレン（DIFFERIN（登録商標））が挙げられる。

【0175】

サイトカイン阻害薬の例としては、IL1ra、IL1受容体拮抗薬、IGFBP、TNF-BF、ウロモジュリン、 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。

【0176】

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。

【0177】

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。

【0178】

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）およびデブシペプチド、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。

【0179】

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。

【0180】

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、エチルー3, 4-デフォスタチン、フォストリエシナトリウム塩、MAZ51、メチルー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

【0181】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載の抗原も合成ナノキャリアに結合している。幾つかの実施形態では、抗原は、免疫抑制剤が結合しているのと同じまたは異なる合成ナノキャリアに結合している。他の実施形態では、抗原は、どの合成ナノキャリアにも結合していない。

【0182】

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。本明細書で提供される要素の何れかを単離してもよく、それを単離された形態で組成物中に含んでもよい。

20

【0183】

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)、流体チャン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

30

40

50

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)。

【0184】

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。

【0185】

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。

【0186】

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。

【0187】

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、DeSimon 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。

【0188】

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。

【0189】

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。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。

10

【0190】

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、ポロキシマー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。

20

【0191】

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。

30

【0192】

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。

40

【0193】

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るため、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。

【0194】

50

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

【0195】

本発明の組成物は、本明細書の他の箇所に記載の有効量などの有効量で投与することができる。剤形の用量は、本発明に従って、様々な量の合成ナノキャリア集団および／または様々な量の抗原および／または免疫抑制剤を含有する。本発明の剤形中に存在する合成ナノキャリアおよび／または抗原および／または免疫抑制剤の量は、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様々となり得る。複数の実施形態では、剤形中に存在する合成ナノキャリアの集団の最適治療量および抗原および／または免疫抑制剤の量を定めるために、用量範囲試験を行うことができる。複数の実施形態では、合成ナノキャリアおよび／または抗原および／または免疫抑制剤は、対象に投与されたとき抗原に対する寛容原性免疫応答を惹起するのに有効な量で剤形中に存在する。通常用量範囲試験および方法を対象に使用して、寛容原性免疫応答を惹起するのに有効な抗原および／または免疫抑制剤の量を決定することが可能となり得る。本発明の剤形は、様々な頻度で投与することができる。好ましい実施形態では、薬理学的に適切な応答を惹起するには、剤形を少なくとも1回投与すれば十分である。より好ましい実施形態では、薬理学的に適切な応答を確実にするために、剤形を少なくとも2回投与、少なくとも3回投与、または少なくとも4回投与する。

【0196】

本発明の組成物の予防的投与は疾患、障害または症状の発症前に開始されてもよく、または治療的投与は疾患、障害または症状の発症後に開始されてもよい。

【0197】

幾つかの実施形態では、例えば、アレルゲンへの暴露前に、合成ナノキャリアの投与を行う。例示的实施形態では、合成ナノキャリアは、アレルゲンへの暴露の30日前、25日前、20日前、15日前、14日前、13日前、12日前、11日前、10日前、9日前、8日前、7日前、6日前、5日前、4日前、3日前、2日前、1日前、または0日前を含むがこれらに限定されるものではない、1つ以上の時点で投与される。それに加えて、またはその代わりに、アレルゲンへの暴露後に対象に合成ナノキャリアを投与することができる。例示的实施形態では、合成ナノキャリアは、アレルゲンへの暴露の1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、7日後、8日後、9日後、10日後、11日後、12日後、13日後、14日後、15日後、20日後、25日後、30日後などを含むがこれに限定されるものではない、1つ以上の時点で投与される。

【0198】

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。

【0199】

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。本明細書に記載の組成物および方法は、アレルゲンに暴露された、暴露されている、または暴露されることになる対象の寛容原性免疫応答を惹起するために使用することができる。

【実施例】

【0200】

実施例1：卵白アルブミンペプチド（323～339）を含むおよび含まない、ラパマイシンが結合した合成ナノキャリアの免疫応答材料

10

卵白アルブミンタンパク質のT細胞エпитープおよびB細胞エпитープであることが知られているアミノ酸17個からなるペプチドである、卵白アルブミンペプチド323～339は、Bachem Americas Inc.（3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505；品番4065609）から購入した。ラパマイシンは、TSZ CHEM（185 Wilson Street, Framingham, MA 01702；製品カタログ番号R1017）から購入した。ラクチド：グリコリド比3：1および固有粘度0.75 dL/gのPLGAは、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）は、EMD Chemicals（製品番号1.41350.1001）から購入した。

20

【0201】

溶液1：卵白アルブミンペプチド323～339を希塩酸水溶液に溶解した溶液（20 mg/mL）。この溶液は、卵白アルブミンペプチドを0.13 M塩酸溶液に室温で溶解することにより調製した。

【0202】

溶液2：ラパマイシンの塩化メチレン溶液（50 mg/mL）。この溶液は、ラパマイシンを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

30

【0203】

溶液3：PLGAの塩化メチレン溶液（100 mg/mL）。この溶液は、PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0204】

溶液4：ポリビニルアルコールを100 mMのpH 8リン酸緩衝液に溶解した溶液（50 mg/mL）。

【0205】

ラパマイシンおよび卵白アルブミン（323～339）を含有する合成ナノキャリアの製造方法

まず、一次油中水型エマルジョンを調製した。溶液1（0.2 mL）、溶液2（0.2 mL）、および溶液3（1.0 mL）を小さい圧力管内で混合し、Branson Digital Sonifier 250を使用して50％の振幅で40秒間音波処理することにより、W1/O1を調製した。次いで、溶液4（3.0 mL）を一次W1/O1エマルジョンと混合し、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を使用して30％の振幅で60秒間音波処理することにより、二次エマルジョン（W1/O1/W2）を調製した。

40

【0206】

W1/O1/W2エマルジョンを、70 mMのpH 8リン酸緩衝溶液（30 mL）の入ったビーカーに添加し、室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させて合成ナノキャリアを形成した。合成ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し、21,000×gおよび4℃で

50

1時間遠心分離し、上清を除去して、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁することにより、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、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁して約10 mg/mLの最終合成ナノキャリア分散液を得た。

【0207】

合成ナノキャリア中のペプチドとラパマイシンの量はHPLC分析で測定した。懸濁液1 mL当たりの全乾燥合成ナノキャリア質量は重量法で測定した。

【0208】

ラパマイシンを含有する合成ナノキャリアの製造方法

まず、一次油中水型エマルジョンを調製した。0.13 M塩酸溶液(0.2 mL)、溶液2(0.2 mL)、および溶液3(1.0 mL)を小さい圧力管内で混合し、Branson Digital Sonifier 250を使用して50%の振幅で40秒間音波処理することにより、W1/O1を調製した。次いで、溶液4(3.0 mL)を一次W1/O1エマルジョンと混合し、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を使用して30%の振幅で60秒間音波処理することにより、二次エマルジョン(W1/O1/W2)を調製した。

【0209】

W1/O1/W2エマルジョンを、70 mMのpH 8リン酸緩衝溶液(30 mL)の入ったビーカーに添加し、室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させて合成ナノキャリアを形成した。合成ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し、21,000 × gおよび4℃で1時間遠心分離し、上清を除去して、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁することにより、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、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁して約10 mg/mLの最終合成ナノキャリア分散液を得た。

【0210】

合成ナノキャリア中のラパマイシンの量はHPLC分析で測定した。懸濁液1 mL当たりの全乾燥合成ナノキャリア質量は重量法で測定した。

【0211】

ラパマイシン負荷の測定方法

合成ナノキャリア約3 mgを回収し、遠心分離して合成ナノキャリアペレットから上清を分離した。アセトニトリルをペレットに添加し、試料を音波処理し、遠心分離して不溶性物質を除去した。上清とペレットをRP-HPLCに注入し、278 nmで吸光度を読み取った。ペレット中の実測μgを使用して、封入%(負荷)を算出し、上清およびペレット中のμgを使用して、全回収μgを算出した。

【0212】

卵白アルブミン(323~339)負荷の測定方法

合成ナノキャリア約3 mgを回収し、遠心分離して合成ナノキャリアペレットから上清を分離した。トリフルオロエタノールをペレットに添加し、試料を音波処理してポリマーを溶解し、0.2%トリフルオロ酢酸を添加し、試料を音波処理した後、遠心分離して不溶性物質を除去した。上清とペレットをRP-HPLCに注入し、215 nmで吸光度を読み取った。ペレット中の実測μgを使用して、封入%(負荷)を算出し、上清およびペレット中のμgを使用して、全回収μgを算出した。

【0213】

Treg細胞の発生に対する抗原特異的寛容原性樹状細胞(Tdc)の活性

本アッセイは、免疫優性卵白アルブミン(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マウスの使用を含む。抗原特異的tDCを作製するために、CD11c+脾細胞を単離し、1 μg/mLの卵白アルブミン(323~339)ペプチドをin vitroで添加した、または抗原を添加しなかった。次いで、可溶性またはナノキャリア封入ラパマイシンをDCに2時間添加した後、それを十分に洗浄して、培養物から遊離ラパマイシンを除去した。精製されたレスポンドーCD4+CD25-細胞をOTIIマウスから単離し、tDCに10:1のT対DC比で添加した。次いで、tDCとOTII T細胞との混合物を4~5日間培養し、図1に示すようにフローサイ

トメトリーでTreg細胞(CD4+CD25highFoxP3+)の頻度を解析した。領域は、アイソタイプ対照に基づいて選択した。

【0214】

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)(0.5g)を、脱イオン水(500mL)に溶解させ、次に、2MのNaOH水溶液(3.5mL)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)(2.5mL)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

【0215】

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(30mL)に懸濁させ、APTMS(50μL)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

【0216】

分離反応において、直径1~4nm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(45.5mL)を、100mLの丸底フラスコに加える。攪拌しながら、0.2MのNaOH水溶液(1.5mL)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(1.0mL)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10mg/mLの水溶液(2mL)を加える。金シードを水に対する透析によって精製する。

【0217】

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(1mg/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

【0218】

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)(32μmol)、コレステロール(32μmol)、およびシクロスポリンA(6.4μmol)を、純粋なクロロホルム(3mL)に溶解させる。この脂質溶液を、50mL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(2mL)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

【0219】

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

【0220】

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

【0221】

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

【0222】

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

【0223】

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。

【0224】

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。

【0225】

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。

【0226】

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。

【0227】

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。

【0228】

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。

【0229】

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。

【0230】

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。

【0231】

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）

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。

【0232】

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。

【0233】

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

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。

【0234】

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

【0235】

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

【0236】

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

【0237】

実施例11：In VivoにおけるDer P1抗原に対する寛容原性免疫応答の評価（予測的）

Balb/cマウスを不完全フロイントアジュバント中のDer P1抗原で免疫化して、CD4+T細胞の増殖を誘導し、そのレベルを評価する。その後、Der P1抗原のMHCクラスII拘束性エピトープと免疫抑制剤とを含む本発明の組成物を用量依存的に皮下投与する。次いで、同じマウスをDer P1抗原に暴露し、CD4+T細胞の増殖レベルを再度評価する。次いで、CD4+T細胞集団の変化を監視するが、後でDer P1抗原で攻撃したときのCD4+T細胞の増殖の低下は寛容原性免疫応答を示す。

40

【0238】

実施例12：In Vivoにおける免疫抑制剤とAPC提示可能な抗原とを含む合成ナノキャリアを用いた場合の寛容原性免疫応答の評価

合成ナノキャリアの製造材料および方法

ナノキャリア1

ラパマイシンは、TSZ CHEM（185 Wilson Street, Framingham, MA 01702；製品カタログ番号R1017）から購入した。ラク

50

チド：グリコリド比3：1および固有粘度0.75 dL/gのPLGAは、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ブロックとを有するPLA-PEGブロック共重合体は合成した。ポリビニルアルコール(85~89%加水分解)は、EMD Chemicals (製品番号1.41350.1001) から購入した。

【0239】

溶液は次のように調製した：

溶液1：ラパマイシンの塩化メチレン溶液(50 mg/mL)。この溶液は、ラパマイシンを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0240】

溶液2：PLGAの塩化メチレン溶液(100 mg/mL)。この溶液は、PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0241】

溶液3：PLA-PEGの塩化メチレン溶液(100 mg/mL)。この溶液は、PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0242】

溶液4：ポリビニルアルコールを100 mMのpH 8リン酸緩衝液に溶解した溶液(50 mg/mL)。

【0243】

水中油型エマルジョンを使用してナノキャリアを製造した。溶液1(0.2 mL)、溶液2(0.75 mL)、および溶液3(0.25 mL)および溶液4(3 mL)を小さい圧力管内で混合し、Branson Digital Sonifier 250を使用して30%の振幅で60秒間音波処理することにより、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リン酸緩衝溶液(30 mL)の入ったビーカーに添加し、室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させてナノキャリアを形成した。ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し、21,000 × gおよび4℃で45分間遠心分離し、上清を除去して、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁することにより、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁して約10 mg/mLの最終ナノキャリア分散液を得た。

【0244】

ナノキャリアサイズは動的光散乱で測定した。ナノキャリア中のラパマイシンの量はHPLC分析で測定した。懸濁液1 mL当たりの全乾燥ナノキャリア質量は重量法で測定した。

【0245】

【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

【0246】

ナノキャリア 2

卵白アルブミンタンパク質のT細胞エピトープおよびB細胞エピトープであることが知られているアミノ酸17個からなるペプチドである、卵白アルブミンペプチド323~339は、Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa St

reet, Torrance CA 90505; 品番4065609) から購入した。ラクチド：グリコリド比3：1および固有粘度0.75 dL/gのPLGAは、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ブロックとを有するPLA-PEGブロック共重合体は合成した。ポリビニルアルコール(85～89%加水分解)は、EMD Chemicals (製品番号1.41350.1001) から購入した。

【0247】

溶液は次のように調製した：

10

【0248】

溶液1：卵白アルブミンペプチド323～339を希塩酸水溶液に溶解した溶液(20 mg/mL)。この溶液は、卵白アルブミンペプチドを0.13 M塩酸溶液に室温で溶解することにより調製した。

【0249】

溶液2：PLGAの塩化メチレン溶液(100 mg/mL)。この溶液は、PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0250】

溶液3：PLA-PEGの塩化メチレン溶液(100 mg/mL)。この溶液は、PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

20

【0251】

溶液4：ポリビニルアルコールを100 mMのpH8リン酸緩衝液に溶解した溶液(50 mg/mL)。

【0252】

まず、一次油中水型エマルションを調製した。溶液1(0.2 mL)、溶液2(0.75 mL)、および溶液3(0.25 mL)を小さい圧力管内で混合し、Branson Digital Sonifier 250を使用して50%の振幅で40秒間音波処理することにより、W1/O1を調製した。次いで、溶液4(3.0 mL)を一次W1/O1エマルションと混合し、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を使用して30%の振幅で60秒間音波処理することにより、二次エマルション(W1/O1/W2)を調製した。

30

【0253】

W1/O1/W2エマルションを、70 mMのpH8リン酸緩衝溶液(30 mL)の入ったビーカーに添加し、室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させてナノキャリアを形成した。ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し、75,600×gおよび4℃で35分間遠心分離し、上清を除去して、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁することにより、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁して約10 mg/mLの最終ナノキャリア分散液を得た。

【0254】

ナノキャリアサイズは動的光散乱で測定した。ナノキャリア中のペプチドの量はHPLC分析で測定した。懸濁液1 mL当たりの全乾燥ナノキャリア質量は重量法で測定した。

40

【0255】

【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

【0256】

10

ナノキャリア 3

シンバスタチンは、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。ラクチド：グリコリド比 3：1 および固有粘度 0.75 dL/g の PLGA は、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 ブロックとを有する PLA-PEG ブロック共重合体は合成した。ポリビニルアルコール (85～89% 加水分解) は、EMD Chemicals (製品番号 1.41350.1001) から購入した。

20

【0257】

溶液は次のように調製した：

【0258】

溶液 1：シンバスタチンの塩化メチレン溶液 (50 mg/mL)。この溶液は、シンバスタチンを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0259】

溶液 2：PLGA の塩化メチレン溶液 (100 mg/mL)。この溶液は、PLGA を純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0260】

溶液 3：PLA-PEG の塩化メチレン溶液 (100 mg/mL)。この溶液は、PLA-PEG を純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

30

【0261】

溶液 4：ポリビニルアルコールを 100 mM の pH 8 リン酸緩衝液に溶解した溶液 (50 mg/mL)。

【0262】

水中油型エマルションを使用してナノキャリアを製造した。溶液 1 (0.15 mL)、溶液 2 (0.75 mL)、および溶液 3 (0.25 mL) および溶液 4 (3 mL) を小さい圧力管内で混合し、Branson Digital Sonifier 250 を使用して 30% の振幅で 60 秒間音波処理することにより、O/W エマルションを調製した。O/W エマルションを、70 mM の pH 8 リン酸緩衝溶液 (30 mL) の入ったビーカーに添加し、室温で 2 時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させてナノキャリアを形成した。ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し、75,600 × g および 4 °C で 35 分間遠心分離し、上清を除去して、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁することにより、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁して約 10 mg/mL の最終ナノキャリア分散液を得た。

40

【0263】

ナノキャリアサイズは動的光散乱で測定した。ナノキャリア中のシンバスタチンの量は HPLC 分析で測定した。懸濁液 1 mL 当たりの全乾燥ナノキャリア質量は重量法で測定した。

【0264】

50

【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

【0265】

10

ナノキャリア 4

卵白アルブミンタンパク質のT細胞エピトープおよびB細胞エピトープであることが知られているアミノ酸17個からなるペプチドである、卵白アルブミンペプチド323～339は、Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; 品番4065609) から購入した。ラパマイシンは、TSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; 製品カタログ番号R1017) から購入した。ラクチド：グリコリド比3：1および固有粘度0.75 dL/gのPLGAは、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ブロックとを有するPLA-PEGブロック共重合体は合成した。ポリビニルアルコール(85～89%加水分解)は、EMD Chemicals (製品番号1.41350.1001) から購入した。

20

【0266】

溶液は次のように調製した：

【0267】

溶液1：卵白アルブミンペプチド323～339を希塩酸水溶液に溶解した溶液(20 mg/mL)。この溶液は、卵白アルブミンペプチドを0.13 M塩酸溶液に室温で溶解することにより調製した。

30

【0268】

溶液2：ラパマイシンの塩化メチレン溶液(50 mg/mL)。この溶液は、ラパマイシンを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0269】

溶液3：PLGAの塩化メチレン溶液(100 mg/mL)。この溶液は、PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0270】

溶液4：PLA-PEGの塩化メチレン溶液(100 mg/mL)。この溶液は、PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0271】

40

溶液5：ポリビニルアルコールを100 mMのpH 8 リン酸緩衝液に溶解した溶液(50 mg/mL)。

【0272】

まず、一次油中水型エマルションを調製した。溶液1(0.2 mL)、溶液2(0.2 mL)、溶液3(0.75 mL)、および溶液4(0.25 mL)を小さい圧力管内で混合し、Branson Digital Sonifier 250を使用して50%の振幅で40秒間音波処理することにより、W1/O1を調製した。次いで、溶液5(3.0 mL)を一次W1/O1エマルションと混合し、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を使用して30%の振幅で60秒間音波処理することにより、二次エマルション(W1/O1/W2)を調製した。

50

【0273】

W1/O1/W2エマルジョンを、70mMのpH8リン酸緩衝溶液（30mL）の入ったビーカーに添加し、室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させてナノキャリアを形成した。ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し、21,000×gおよび4℃で45分間遠心分離し、上清を除去して、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁することにより、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁して約10mg/mLの最終ナノキャリア分散液を得た。

【0274】

ナノキャリアサイズは動的光散乱で測定した。ナノキャリア中のペプチドとラパマイシンの量はHPLC分析で測定した。懸濁液1mL当たりの全乾燥ナノキャリア質量は重量法で測定した。

【0275】

【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)
ナノキャリア 4	227	9.0	2.5

【0276】

ナノキャリア 5

卵白アルブミンタンパク質のT細胞エピトープおよびB細胞エピトープであることが知られているアミノ酸17個からなるペプチドである、卵白アルブミンペプチド323～339は、Bachem Americas Inc.（3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505；品番4065609）から購入した。シンバスタチンは、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。ラクチド：グリコリド比3：1および固有粘度0.75dL/gのPLGAは、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ブロックとを有するPLA-PEGブロック共重合体は合成した。ポリビニルアルコール（85～89%加水分解）は、EMD Chemicals（製品番号1.41350.1001）から購入した。

【0277】

溶液は次のように調製した：

【0278】

溶液1：卵白アルブミンペプチド323～339を希塩酸水溶液に溶解した溶液（20mg/mL）。この溶液は、卵白アルブミンペプチドを0.13M塩酸溶液に室温で溶解することにより調製した。

【0279】

溶液2：シンバスタチンの塩化メチレン溶液（50mg/mL）。この溶液は、シンバスタチンを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0280】

溶液3：PLGAの塩化メチレン溶液（100mg/mL）。この溶液は、PLGAを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0281】

溶液4：PLA-PEGの塩化メチレン溶液（100mg/mL）。この溶液は、PLA-PEGを純粋な塩化メチレンに溶解することにより調製した。

【0282】

10

20

30

40

50

溶液5：ポリビニルアルコールを100mMのpH8リン酸緩衝液に溶解した溶液（50mg/mL）。

【0283】

まず、一次油中水型エマルションを調製した。溶液1（0.2mL）、溶液2（0.15mL）、溶液3（0.75mL）、および溶液4（0.25mL）を小さい圧力管内で混合し、Branson Digital Sonifier 250を使用して50%の振幅で40秒間音波処理することにより、W1/O1を調製した。次いで、溶液5（3.0mL）を一次W1/O1エマルションと混合し、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を使用して30%の振幅で60秒間音波処理することにより、二次エマルション（W1/O1/W2）を調製した。

10

【0284】

W1/O1/W2エマルションを、70mMのpH8リン酸緩衝溶液（30mL）の入ったビーカーに添加し、室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させてナノキャリアを形成した。ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し、75,600×gおよび4℃で35分間遠心分離し、上清を除去して、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁することにより、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、ペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁して約10mg/mLの最終ナノキャリア分散液を得た。

【0285】

ナノキャリアサイズは動的光散乱で測定した。ナノキャリア中のペプチドとシンバスタチンの量はHPLC分析で測定した。懸濁液1mL当たりの全乾燥ナノキャリア質量は重量法で測定した。

20

【0286】

【表5】

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

【0287】

In vivo 投与1

B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J(OTII)マウスおよびC57BL/6(B6)マウスの脾臓を採取し、機械的に解離し、70μMの篩で濾過分離して、単細胞懸濁液を得た。次いで、精製されたCD4⁺CD25細胞を2段階プロセスで抽出した。Miltenyi Biotec AutoMACS磁気セルソーターを使用し、脾臓細胞をまずCD4⁺T細胞単離キットIIを用いて標識し、CD25除去キットを用いて非標識画分からCD25⁺細胞を除去した。精製されたB6細胞を細胞内染色色素であるカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)で染色した後、精製されたOTII細胞と同濃度で混合した。次いで、それらをB6.SJL-Ptprca/BoyAi(CD45.1)レシピエントマウスに静脈内注射(i.v.)した。

40

【0288】

翌日、レシピエントCD45.1マウスを、標的指向化された寛容原性合成ワクチン粒子(t²SVp)で処置した。粒子には、卵白アルブミンペプチド(323~339)(OVA^{323~339})、ラパマイシン(Rapa)および/またはシンバスタチン(Simva)の組み合わせが担持されており、それを皮下(s.c.)投与した。

【0289】

この注射は寛容誘導処置であり、その後更に4回の注射をそれぞれ2週間の間隔を空けて行った。処置計画の終了後、レシピエントCD45.1動物を屠殺して、その脾臓および膝窩リンパ節を採取し、機械的に解離し、70μMの篩で濾過分離して、単細胞懸濁液

50

を得た。RBC溶解バッファー (Stem Cell Technologies) と共にインキュベートすることにより、脾臓細胞から赤血球 (RBC) を除去し、脾臓とリンパ節の両方について細胞計数を行った。

【0290】

脾臓またはリンパ節細胞を、 10 U/ml IL-2を補ったCM (完全培地) 中で培養し、96ウェルの丸底 (RB) プレート内で 0.3×10^6 細胞/ウェルのOPPIで再刺激し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ でインキュベートした。2日目に細胞を分割し、5日目に回収した。上清を回収して凍結するとともに、細胞を染色してフローサイトメトリーによる表現型解析を行った。細胞は、Becton Dickinson FACS Canto フローサイトメーターで解析した。

10

【0291】

In vivo投与2

B6.Cg-Tg (TcraTcrb) 425Cbn/J (OTII) マウスおよびC57BL/6 (B6) マウスから脾臓を採取し、機械的に解離し、 $70\text{ }\mu\text{M}$ の篩で濾過分離して、単細胞懸濁液を得た。次いで、Miltenyi Biotec AutoMACS 磁気セルソーターを使用して、精製された $\text{CD}4^+ \text{CD}25^-$ 細胞を2段階プロセスで抽出した。Miltenyiの $\text{CD}4^+$ T細胞単離キットIIを使用して脾臓細胞を標識した。 $\text{CD}25$ 除去キットを用いて非標識 $\text{CD}4^+$ T細胞画分から $\text{CD}25^+$ 細胞を除去した。次いで、B6マウスの精製された $\text{CD}4$ 細胞を細胞内染色色素であるカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CFSE) で染色した後、精製されたOTII細胞と同濃度で混合した。次いで、それらをB6.SJL-Ptprca/BoyAi ($\text{CD}45.1$) レシピエントマウスに静脈内 (i.v.) 注射した。

20

【0292】

翌日、レシピエント $\text{CD}45.1$ マウスを、標的指向化された寛容原性合成ワクチン粒子で処置した。粒子は、卵白アルブミンペプチド (323~339) ($\text{OVA}^{323\sim339}$)、ラパマイシン (Rapa) およびシンバスタチン (Simva) の組み合わせを含み、それを皮下 (s.c.) 投与または静脈内 (i.v.) 投与した。

【0293】

処置計画の終了後、レシピエント $\text{CD}45.1$ 動物を屠殺して、その脾臓および膝窩リンパ節を採取し、機械的に解離し、 $70\text{ }\mu\text{M}$ の篩で濾過分離して、単細胞懸濁液を得た。RBC溶解バッファー (Stem Cell Technologies) と共に組み込むことにより、脾臓細胞から赤血球 (RBC) を除去し、脾臓とリンパ節の両方について細胞計数を行った。

30

【0294】

脾臓またはリンパ節細胞を、 10 U/ml IL-2を補ったCM中で培養し、96ウェルの丸底 (RB) プレート内で 0.3×10^6 細胞/ウェルの $1\text{ }\mu\text{M}$ OPPIで再刺激し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ でインキュベートした。2日目に細胞を分割し、5日目に回収した。上清を回収して凍結するとともに、細胞を染色してフローサイトメトリーによる表現型解析を行った。細胞は、Becton Dickinson FACS Canto フローサイトメーターで解析した。

40

【0295】

結果

結果を図2および図3に示す (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)。図はin vivo効果を示し、抗原と免疫抑制剤とを含む合成ナノキャリアを用いた場合、抗原単独、または抗原と免疫刺激分子を含む合成ナノキャリアおよび抗原を含むが免疫刺激分子は含まない合成ナノキャリアと比較して、エフェクター免疫細胞の抗原特異的増殖が低下することを実証する。

【0296】

実施例13: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

50

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。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。

10

【0297】

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。

20

【0298】

第1の油中水型エマルジョンをまず調製した。溶液1(0.25 mL)、溶液2(0.2 mL)、および溶液3(1.0 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。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、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。

30

【0299】

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バマイシンの量を、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。

【0300】

40

【表6】

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

【0301】

ナノキャリア 2

50

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0.75 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。

【0302】

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。

【0303】

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(0.2 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。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、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。

【0304】

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。

【0305】

【表7】

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

10

20

30

40

50

【0306】

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。

【0307】

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）：200μlのナノキャリアを、100μg/mlのOVA₃₂₃₋₃₃₉含量で与えた。

【0308】

IgGの測定

IgG抗体のレベルを測定した。このレベルは、アレルギーに特に関連する、IgEを含む、免疫グロブリン一般の指標である。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。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。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。

【0309】

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。

【0310】

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。

【0311】

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、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、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。0.5 mg/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。

【0312】

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。

10

【0313】

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。

20

【0314】

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。

【0315】

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450 nmで評価した (570 nm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

40

【0316】

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℃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

50

、オボアルブミン特異的 B C R を標識するために、細胞とともにインキュベートした。C D 1 9 + B 2 2 0 + O V A - A l e x a 6 4 7 + であったそれらの脾細胞を、C T O 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。C T O 染色濃度が低い (C T O l o w) 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、C T O 染色濃度が高い (C T O h i g h) オボアルブミン + B 細胞と比較した。

【0317】

結果

図 4 は、卵ペプチドと免疫抑制剤ラパマイシンとを含む合成ナノキャリアを投与した場合、抗原特異的 I g G レベルが低下することを示す。I g G 抗体のレベルは、一般に、I g E 抗体の産生を含む抗体産生を反映し、それらはアレルギーおよびアレルギー反応に関連している。図 5 はまた、合成ナノキャリアを用いた場合、抗原特異的 B 細胞数が減少することを示す。これらの結果は、卵ペプチド (M H C クラス I I 拘束性エピトープを含む) および免疫抑制剤に結合した合成ナノキャリアを用いた場合、アレルギーおよびアレルギー応答に関連する望ましくない免疫応答が低下することを示す。

【0318】

実施例 1 4 : 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 1 4) 。

【0319】

免疫化

ナノキャリアを解凍し、平衡化した。初期希釈は、1 0 倍ストック溶液であり、これを、O V A _{3 2 3 - 3 3 9} 中 1 0 0 μ g / m l 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 2 0 0 μ l で注射に使用した。動物を O V A タンパク質 (O V A) で免疫化し、O V A _{3 2 3 - 3 3 9} ペプチドで処理して、B 細胞抗原の非存在下でアレルギー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 B a l b / C マウスのそれぞれにつき 4 0 0 μ l で、1 0 μ g の O V A + 4 m g 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、C F S E または C T O を用いて抗原で再度刺激して、A g 特異的な増殖の量を測定した。

【0320】

特定の型の免疫細胞のレベル

F C S ファイルを、F l o w J o ソフトウェアを用いて分析した。7 A A D 陽性細胞 (死細胞を標識する核染料) 陽性細胞を、除外し、C D 4、C D 8、G r - 1、F 4 / 8 0、B 2 2 0、T C R b および C D 1 1 b 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 → 7 A A D - F 4 / 8 0 - G R - 1 - T C R b + C D 4 + / - C D 8 + / -

B 細胞サブセットについてのゲーティング法 → 7 A A D - B 2 2 0 + T C R b -

好酸球についてのゲーティング法 → 7 A A D - F 4 / 8 0 - G r - 1 + T C R b - C D 1 1 b + G r - 1 +

【0321】

分裂 C D 4 + T 細胞の % の測定

オボアルブミン反応性 C D 4 + 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 C F S E で染色し、オボアルブミンタンパク質とともに 5 % の C O ₂ の 3 7 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 C D 1 6 / 3 2 抗体でブロックし、次に、T C R C D 4 および C D 8 a に特異的な共役された抗体で染色した。T C R + C D 4 または T C R + C D 8 a + であったそれらの脾細胞を、C F S E 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。

【0322】

Ig 抗体の測定

MDBio productsにより提供されるMouse OVA-IgE ELISAキット（カタログ番号M036005）を製造業者の指示に従って使用し、IgE抗体を測定した。

【0323】

結果

図6および図7は、アレルギー性喘息の動物モデルにおけるナノキャリアの有効性を実証する。特に、図6は、OVA_{323~339}（MHCクラスII拘束性エピトープ）と免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアで処置した喘息モデル動物対象からの洗浄液試料中の様々な免疫細胞数が全体的に減少することを実証する。図7は、同じ処置の結果として分裂CD4⁺T細胞のパーセンテージが低下することを実証する。図8は、抗原特異的IgE抗体の産生が低下することを実証する。

10

【図1】

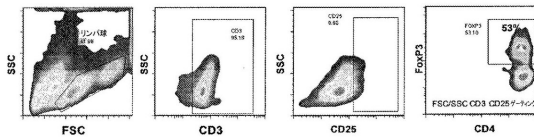


図1

【図3】

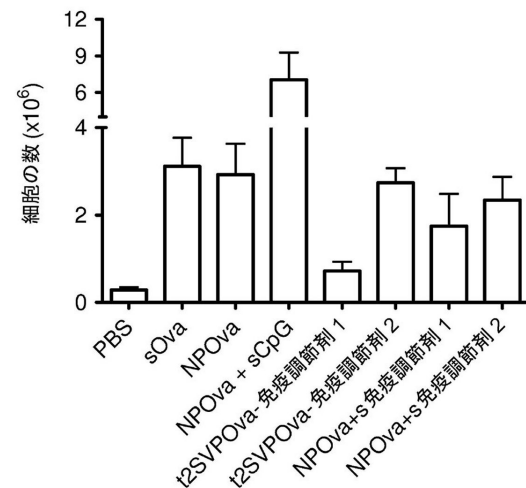


図3

【図2】

単回注射後のt2SVPのインビボ効果

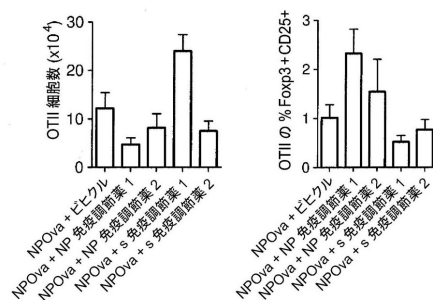


図2

【図 4】

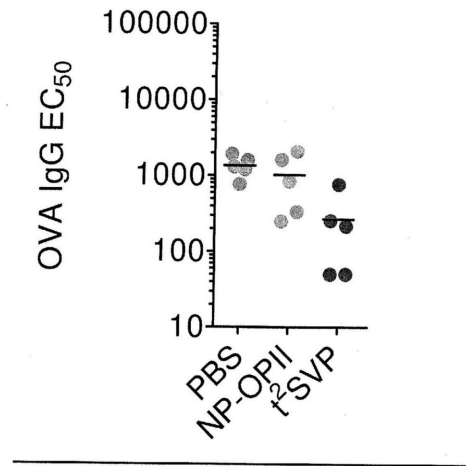


図 4

【図 5】

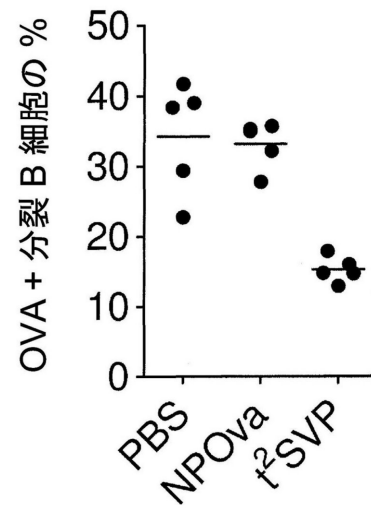
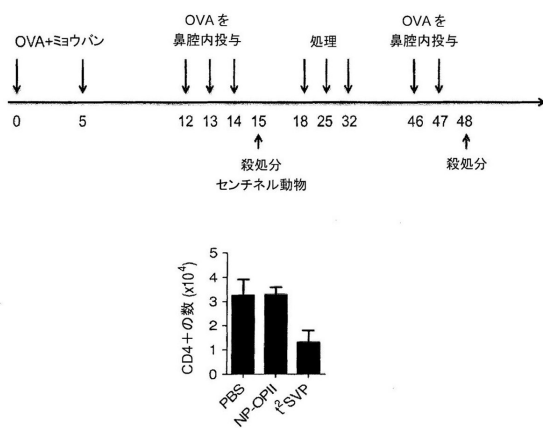


図 5

【図 6】



【図 8】

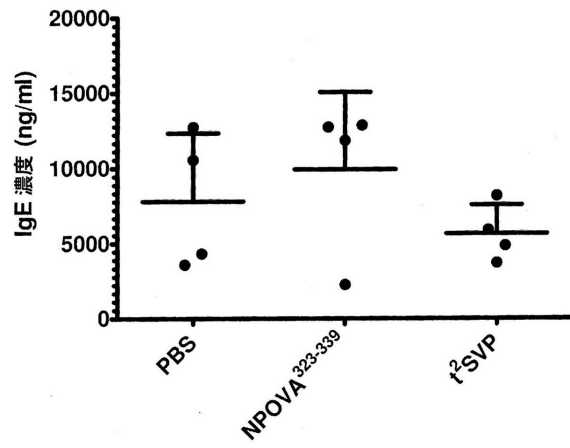


図 8

【配列表】

[0006422774000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08

(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 61/531,175
 (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 61/531,209
 (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 61/513,514
 (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 61/531,168
 (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 61/531,204
 (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)
 (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 61/531,194
 (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 61/531,164
 (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 61/531,180
 (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)

(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 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 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 国際公開第2010/042870 (WO, A1)

特表2010-514805 (JP, A)

特表2009-531068 (JP, A)

特表2010-533160 (JP, A)

特開2006-257095 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00

A61K 45/00

CAPLus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN)