

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6580558号
(P6580558)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 47/69 (2017.01)	A 61 K 47/69
A 61 K 31/7088 (2006.01)	A 61 K 31/7088
A 61 K 38/00 (2006.01)	A 61 K 38/00
A 61 K 39/00 (2006.01)	A 61 K 39/00
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00

請求項の数 14 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-512094 (P2016-512094)
(86) (22) 出願日	平成26年5月2日(2014.5.2)
(65) 公表番号	特表2016-518392 (P2016-518392A)
(43) 公表日	平成28年6月23日(2016.6.23)
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/036700
(87) 国際公開番号	W02014/179773
(87) 国際公開日	平成26年11月6日(2014.11.6)
審査請求日	平成29年4月24日(2017.4.24)
(31) 優先権主張番号	61/948,313
(32) 優先日	平成26年3月5日(2014.3.5)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/948,384
(32) 優先日	平成26年3月5日(2014.3.5)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者 511254321
セレクタ バイオサイエンシーズ インコ
ーポレーテッド
S E L E C T A B I O S C I E N C E S
, I N C.
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 48
O
4 8 0 A r s e n a l S t r e e t ,
B u i l d i n g O n e , W a t e r t
o w n , M A 0 2 4 7 2 , U . S . A .
(74) 代理人 100102842
弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD4+制御性T細胞を増強するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (i) 免疫抑制剤に付着された合成ナノ担体、および、
(ii) 治療用高分子

を対象に投与することによって、CD4+制御性T細胞の数または割合を増大させることを含む方法における使用のための前記免疫抑制剤に付着されている合成ナノ担体を含む組成物であって、

ここで治療用高分子が、免疫抑制剤に付着された合成ナノ担体と投与前に同時処方されず；および

ここで治療用高分子が、治療用タンパク質または治療用ポリヌクレオチドである、前記組成物。

【請求項2】

- (a) 免疫抑制剤に付着された合成ナノ担体および治療用高分子が、対象に併用投与され；
(b) 投与前に治療用高分子が合成ナノ担体と同時処方されないとき、CD4+制御性T細胞の増大された数または割合をもたらすことが以前に実証されたプロトコルに投与が従い、

任意に、ここで方法が、プロトコルを決定することをさらに含み；

(c) 方法が、投与の前および／または後の対象におけるCD4+制御性T細胞の数または割合を査定することをさらに含み；

(d) CD4+制御性T細胞の増大された数または割合が、投与前のCD4+制御性T細胞

10

20

の数または割合と比較して、少なくとも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍または 6 倍の増加であり；

(e)投与が、静脈内、腹腔内または皮下投与によるものであり；および / または

(f)方法が、投与後の C D 4 + 制御性 T 細胞の数または割合の増加を記録することをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

免疫抑制剤が、スタチン、m T O R インヒビター、T G F - シグナル剤、コルチコステロイド、ミトコンドリア機能のインヒビター、P 3 8 インヒビター、N F - インヒビター、アデノシン受容体アゴニスト、プロスタグランジン E 2 アゴニスト、ホスホジエステラーゼ 4 インヒビター、H D A C インヒビターまたはプロテアソームインヒビターを含み、任意に、ここで m T O R インヒビターが、ラバマイシンである、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

治療用タンパク質が、(a)タンパク質補強治療のタンパク質補充用であり、(b)点滴可能または注射可能な治療用のタンパク質、酵素、酵素補助因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカイン、インターフェロン、成長因子、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または、ポンペ病に関連するタンパク質を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項 に記載の組成物。

20

【請求項 5】

点滴可能または注射可能な治療用のタンパク質が、

20

(a)トリシリズマブ、アルファ - 1 アンチトリプシン、ヘマタイト、アルブインターフェロンアルファ - 2 b、ルシン、テサモレリン、オクレリズマブ、ベリムマブ、ベグロチカゼ、タリグルセラーゼアルファ、アガルシダーゼアルファまたはベラグルセラーゼアルファを含み；

(b)酵素が、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼまたはリガーゼを含み；

(c)酵素が、リソソーム蓄積障害のための酵素補充治療用の酵素を含み、任意に、リソソーム蓄積障害のための補充治療用の酵素が、イミグルセラーゼ、a - ガラクトシダーゼ A (a - g a l A)、アガルシダーゼベータ、酸性 グルコシダーゼ (G A A)、アルグルコシダーゼアルファ、LUMIZYME、MYOZYME、アリールスルファターゼ B 、ラロニダーゼ、A LDURAZYME、イデュルスルファーゼ、ELAPRASE、アリールスルファターゼ B 、ベグロチカーゼ、ペグシチカーゼまたはNAGLAZYMEを含み；

30

(d)サイトカインが、リンホカイン、インターロイキン、ケモカイン、タイプ 1 サイトカインまたはタイプ 2 サイトカインを含み；または

(e)血液または血液凝固因子が、第 I 因子、第 I I 因子、組織因子、第 V 因子、第 V I I 因子、第 V I I I 因子、第 I X 因子、第 X 因子、第 X a 因子、第 X I I 因子、第 X I I I 因子、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン、高分子量キニノゲン、フィプロネクチン、アンチトロンビン I I I 、ヘパリン補助因子 I I 、プロテイン C 、プロテイン S 、プロテイン Z 、プロテイン Z 関係プロテアーゼインヒビター (Z P I) 、プラスミノーゲン、アルファ 2 - アンチプラスミン、組織プラスミノーゲンアクチベーター (t P A) 、ウロキナーゼ、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター - 1 (P A I 1) 、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター - 2 (P A I 2) 、がんプロコアグラントまたはエポエチンアルファを含む、請求項 4 に記載の組成物。

40

【請求項 6】

合成ナノ担体に付着された免疫抑制剤の積載量が、合成ナノ担体にわたる平均で、0 . 1 % と 5 0 % との間である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

積載量が、0 . 1 % と 2 0 % との間である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

合成ナノ担体が、脂質ナノ粒子、リポソーム、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、界面

50

活性物質系エマルション、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、ペプチドまたはタンパク質粒子を含み、任意に、ここで金属ナノ粒子が、金ナノ粒子を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

合成ナノ担体が、非メトキシ末端のフルロニックポリマーであるポリマーを含む、ポリマーナノ粒子を含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

ポリマーナノ粒子が、ポリエステル、ポリエーテルに付着されたポリエステル、ポリアミノ酸、ポリカーボネート、ポリアセタール、ポリケタール、多糖、ポリエチルオキサゾリンまたはポリエチレンイミンを含む、請求項9に記載の組成物。 10

【請求項11】

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トンを含む、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】

ポリマーナノ粒子が、ポリエステル、および、ポリエーテルに付着されたポリエステルを含む、請求項10または11に記載の組成物。

【請求項13】

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10～12のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項14】

(a)合成ナノ担体の動的光散乱を使用して得られる粒子サイズ分布の平均値が(i)100nm；(ii)150nm；(iii)200nm；(iv)250nm；または(v)300nmよりも大きな径であり；および/または

(b)合成ナノ担体のアスペクト比が、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7または1:10よりも大きい、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願 30

本願は、米国特許法第119条の下で、2013年5月3日出願の米国仮出願第61/819517号、2013年9月24日出願の同第61/881851号、2013年9月24日出願の同第61/881913号、2013年9月24日出願の同第61/881921号、2013年11月21日出願の同第61/907177号、2014年3月5日出願の同第61/948313号、および2014年3月5日出願の同第61/948384号の利益を主張するものであり、これらの各々の内容全体を参照によって本明細書に組み込む。

【0002】

本発明の分野

本発明は、治療用高分子に特異的なものなどのCD4+制御性T細胞を増強するための免疫抑制剤および治療用高分子を投与することに関する。本明細書で提供される方法および組成物は、寛容原性免疫応答の発達、特にCD4+制御性T細胞の産生または発達への移行を可能とする。したがって、提供される方法および組成物は、治療用高分子の投与が望ましくない免疫応答をもたらし得る対象における寛容原性免疫応答を生成するために使用することができる。方法および組成物は、好ましくは、CD4+制御性T細胞の増強から恩恵を受けるであろう対象のために使用される。 40

【背景技術】

【0003】

本発明の背景

タンパク質または酵素補充治療などの治療処置は多くの場合、具体的な治療剤に対して

50

望ましくない免疫応答をもたらす。かかる望ましくない免疫応答は、免疫抑制薬の使用を通じて低減され得る。しかし従来の免疫抑制薬は広域作用性である。加えて、免疫抑制を維持するために、免疫抑制薬物療法は、一般に、生涯の命題である。残念ながら、広域作用性の免疫抑制剤の使用は、腫瘍、感染、腎毒性および代謝障害などの重篤な副作用のリスクと関連する。したがって、新たな寛容原性療法が有益であろう。

【発明の概要】

【0004】

本発明の概要

一側面において、免疫抑制剤に付着された合成ナノ担体および治療用高分子を対象に投与することにより、CD4+制御性T細胞（治療用高分子に特異的なものなど）の数または割合（または比）を高めること、ここで治療用高分子が免疫抑制剤に付着された合成ナノ担体と投与前に同時処方(co-formulated)されていない、を含む方法提供される。

10

本明細書で提供される方法のいずれか1つの態様において、免疫抑制剤および治療用高分子に付着された合成ナノ担体は、対象に併用投与される。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、治療用高分子が、投与前に、合成ナノ担体と同時処方されないとき、投与は、CD4+制御性T細胞の増大した数または割合（または比）をもたらすことが以前に実証されたプロトコルに従う。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、方法はさらに、プロトコルを決定することを含む。

【0005】

20

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、方法は、対象におけるCD4+制御性T細胞の数または割合（または比）を投与の前および/または後に査定することをさらに含む。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、CD4+制御性T細胞の増大した数または割合（または比）は、投与前のCD4+制御性T細胞の数または割合に比べて、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍または6倍の増加である。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、投与は、静脈内、腹腔内または皮下投与によるものである。

【0006】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、方法は、投与後のCD4+制御性T細胞の数または割合（または比）の増大を記録することをさらに含む。

30

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、免疫抑制剤は、スタチン、mTORインヒビター、TGF-βシグナル剤、コルチコステロイド、ミトコンドリア機能のインヒビター、P38インヒビター、NF-κBインヒビター、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インヒビター、HDACインヒビターまたはプロテアソームインヒビターを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、mTORインヒビターはラバマイシンである。

【0007】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、治療用高分子は、治療用タンパク質または治療用ポリヌクレオチドである。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、治療用タンパク質は、タンパク質補強治療のタンパク質補充用である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、治療用タンパク質は、点滴可能または注射可能な治療用タンパク質、酵素、酵素補助因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカイン、インターフェロン、成長因子、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または、ポンペ病に関連するタンパク質を含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、点滴可能または注射可能な治療用タンパク質は、トリリズマブ、アルファ-1アンチトリプシン、ヘマタイト、アルブミンインターフェロンアルファ-2b、ルシン(Rhucin)、テサモレリン、オクレリズマブ、ベリムマブ、ペグロチカーゼ、タリグルセラーゼアルファ、アガルシダーゼアルファ、またはベラ

40

50

グルセラーゼアルファを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、酵素は、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼまたはリガーゼを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、酵素は、リソソーム蓄積障害のための酵素補充治療用の酵素を含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、リソソーム蓄積障害のための補充治療用の酵素は、イミグルセラーゼ、a-ガラクトシダーゼA(a-gal A)、アガルシダーゼベータ、酸性-グルコシダーゼ(GAA)、アルグルコシダーゼアルファ、LUMIZYME、MYOZYME、アリールスルファターゼB、ラロニダーゼ、ALDURAZYME、イデュルスルファーゼ、ELAPRASE、アリールスルファターゼB、ペグロチカーゼ、ペグシチカーゼまたはNAGLAZYMEを含む。

10

【0008】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、サイトカインは、リンホカイン、インターロイキン、ケモカイン、タイプ1サイトカインまたはタイプ2サイトカインを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、血液または血液凝固因子は、第I因子、第II因子、組織因子、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第Xa因子、第XII因子、第XIII因子、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン、高分子量キニノゲン、フィブロネクチン、アンチトロンビンIII、ヘパリン補助因子II、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関係プロテアーゼインヒビター(ZPI)、プラスミノーゲン、アルファ2-アンチプラスミン、組織プラスミノーゲンアクチベーター(tPA)、ウロキナーゼ、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター-1(PAI1)、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター-2(PAI2)、がんプロコアグラントまたはエポエチンアルファを含む。

20

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、合成ナノ担体に付着される免疫抑制剤の積載量(load)は、合成ナノ担体にわたる平均で、0.1%と50%との間である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、積載量は0.1%と20%との間である。

【0009】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、合成ナノ担体は、脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、界面活性物質系エマルション、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、ペプチドまたはタンパク質粒子を含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、合成ナノ担体は、脂質ナノ粒子を含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、合成ナノ担体はリポソームを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、合成ナノ担体は金属ナノ粒子を含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、金属ナノ粒子は金ナノ粒子を含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、合成ナノ担体はポリマーナノ粒子を含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、ポリマーナノ粒子は、非メトキシ末端のブルロニックポリマーであるポリマーを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、ポリマーナノ粒子は、ポリエステル、ポリエーテルに付着されたポリエステル、ポリアミノ酸、ポリカーボネット、ポリアセタール、ポリケタール、多糖、ポリエチルオキサゾリンまたはポリエチレンイミンを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、ポリエステルは、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)またはポリカプロラクトンを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、ポリマーナノ粒子は、ポリエステル、および、ポリエーテルに付着されたポリエステルを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、ポリエーテルは、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む。

30

【0010】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、合成ナノ担体の動的光

40

50

散乱を使用して得られる粒子サイズ分布の平均値は、100 nmよりも大きな径である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、径は150 nmよりも大きい。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、径は200 nmよりも大きい。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、径は250 nmよりも大きい。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、径は300 nmよりも大きい。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、合成ナノ担体のアスペクト比は1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7、または1:10よりも大きい。

【0011】

10

別の側面において、本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの製造方法が提供される。一態様において、製造方法は、治療用高分子の用量または剤形を生成すること、および、免疫抑制剤の用量または剤形を生成することを含む。提供される製造方法のいずれか1つの別の態様において、免疫抑制剤の用量または剤形を生成するステップは、免疫抑制剤を合成ナノ担体に付着させることを含む。提供される製造方法のいずれか1つの別の態様において、方法はさらに、免疫抑制剤の用量または剤形と治療用高分子の用量または剤形とを、キットにおいて組み合わせることを含む。本明細書で提供される製造方法のいずれか1つの別の態様において、治療用高分子は、免疫抑制剤と同時処方されない。

【0012】

20

別の側面において、対象における、治療用高分子特異的なCD4+制御性T細胞などのCD4+制御性T細胞の数または割合（または比）を増大させるための医薬の製造のための本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの使用が提供される。一態様において、組成物またはキットは、同時処方されない免疫抑制剤および治療用高分子を含む。本明細書で提供される使用のいずれか1つの別の態様において、免疫抑制剤は合成ナノ担体に付着されている。

別の側面において、本明細書で提供される組成物のいずれか1つは、本明細書で提供される方法のいずれか1つにおける使用のために提供される。一態様において、該方法は、免疫抑制剤および治療用高分子を対象に投与すること、ここで治療用高分子は、投与前に免疫抑制剤と同時処方されない、を含む。別の態様において、免疫抑制剤は、合成ナノ担体に付着されている。なお別の態様において、投与は併用投与である。

30

別の側面において、治療用高分子特異的CD4+制御性T細胞などのCD4+制御性T細胞の数または割合（または比）を増強する代わりに、医薬を製造する方法が提供される。一態様において、医薬は、同時処方されない免疫抑制剤および治療用高分子を含む。本明細書で提供される製造方法のいずれか1つの別の態様において、免疫抑制剤は合成ナノ担体に付着されている。

【図面の簡単な説明】

【0013】

図の簡単な説明

【図1】図1は、示された処置の投与後のフローサイトメトリーによって査定したCD4+およびCD25+Fox3p+（制御性T細胞）の割合を示す。

40

【図2】図2は、示された処置の投与後のポリエチレングリコール（PEG）に対する抗体形成の低減を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明の詳細な説明

本発明を詳細に説明する前に、発明は、具体的に例示された材料またはプロセスパラメータが当然変化し得るので、かかるものに限定されないということを理解すべきである。本明細書で使用する用語法は本発明の具体的な態様を記載するためのものにすぎず、本発明を記載するための代替的用語法の使用を限定することを意図しないということもまた理

50

解されるべきである。

上記または下記のいずれにおいても本明細書で引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、全ての目的において、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0015】

本明細書および添付のクレームで使用する場合、その内容が別途明確に指定していない限り、単数形の「a」、「an」および「the」は複数の言及物を包含する。例えば、「ポリマー(a polymer)」への言及は、2つまたは3つ以上のかかる分子の混合物または単一のポリマー種の異なる分子量の混合物を包含し、「合成ナノ担体」への言及は2つまたは3つ以上のかかる合成ナノ担体の混合物または複数のかかる合成ナノ担体を包含し、「RNA分子」への言及は、2つまたは3つ以上のかかるRNA分子の混合物または複数のかかるRNA分子を包含し、「免疫抑制剤」への言及は、2つまたは3つ以上のかかる材料または複数のかかる免疫抑制剤分子を包含する、等。

本明細書で使用するとき、用語「含む(comprise)」、または「comprises」もしくは「comprising」などの変形形態は、いずれか列挙された完全体(integer)(例えば特長、要素、特徴、特性、方法 / プロセスステップまたは限定)または完全体の群(例えば複数の特長、要素、特徴、特性、方法 / プロセスステップまたは限定)の包含を表示すると読むべきであって、いずれか他の完全体または完全体の群の排除を表示すると読むべきではない。ゆえに、本明細書で使用するとき、用語「含む(comprising)」は包括的であり、追加の、列挙されない完全体または方法 / プロセスステップを排除しない。

【0016】

本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つのある態様において、「含む(comprising)」は「本質的にからなる(consisting essentially of)」または「からなる(consisting of)」で置換されてもよい。語句「本質的にからなる」は、明記された完全体(単数または複数)またはステップを、クレームされる発明の性質または機能に重大な影響を及ぼさないものと共に要するために、本明細書で使用される。本明細書で使用するとき、用語「からなる(consisting)」は、列挙された完全体(例えば特長、要素、特徴、特性、方法 / プロセスステップまたは限定)または完全体の群(例えば複数の特長、要素、特徴、特性、方法 / プロセスステップまたは限定)のみの存在を表示するために使用される。

【0017】

A. 序文

前述したように、現在の従来の免疫抑制剤は広域作用性であり、一般に、免疫系の全体的な全身の下方制御をもたらす。本明細書で提供される方法および組成物は、より多くの標的化された免疫効果を可能にし、特に、驚くべきことに、治療用高分子特異的CD4+制御性T細胞などのCD4+制御性T細胞の産生の増大を可能にする。治療用高分子特異的CD4+制御性T細胞の増大した数または割合(または比)は、記載された方法を実行することによって、または本明細書で提供される組成物を投与することによって達成することができる事が見出された。したがって、かかる方法および組成物は、治療用高分子の投与に関連する望ましくない免疫応答の減少をもたらすことができ、および/または治療用高分子を用いた処置を必要とする対象のために有益であり得る。

本発明者らは、意外かつ驚くべきことに、上記の問題および制限は、本明細書に開示された発明を実施することによって克服できることを発見した。本発明は、以下の例に示される。

ここで、以下に本発明をより詳細に説明する。

【0018】

B. 定義

「投与すること」または「投与」または「投与する」は、薬理学的に有用なやり方で対象へ材料を提供することを意味する。該用語は、いくつかの態様において投与させること(Causing to be administered)を包含することが意図される。「投与させること」とは、他の当事者に材料を投与するよう直接的または間接的に、させること、促すこと、奨励す

10

20

30

40

50

ること、援助すること、誘導すること、または、指示することを意味する。

「有効量」は、対象への投与のための組成物または剤形の文脈において、対象における1つまたは2つ以上の望ましい免疫応答、例えば、治療用高分子特異的なものなどのCD4+制御性T細胞の產生または発達の増強などの寛容原性免疫応答の発生を生じさせる組成物または剤形の量をいう。したがって、いくつかの態様において、有効量は、CD4+制御性T細胞の数または割合（または比）の増加などの1つまたは2つ以上の所望の免疫応答を生成する、本明細書で提供される組成物の量である。有効量は、in vitroまたはin vivoの目的とすることができます。in vivoの目的のために、量は、臨床医が治療用高分子の投与の結果として望ましくない免疫応答が発生し得る対象のための臨床的有用性を有し得ると考えるだろうものになり得る。

10

【0019】

有効量は、望ましくない免疫応答のレベルを低減させることに関与し得るが、いくつかの態様において、それは望ましくない免疫応答を完全に防止することに関与する。有効量はまた、望ましくない免疫応答が起こることを遅延させることにも関与し得る。有効量はまた、治療用高分子特異的CD4+制御性T細胞などのCD4+制御性T細胞の產生または発達の増加をもたらす本明細書で提供される組成物の量であり得る。具体的には、產生または発達の増加は、かかる細胞の数または割合（または比）の増加であり得る。有効量は、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量でもあり得る。有効量は好ましくは、対象において、治療用高分子などの抗原に対する寛容原性免疫応答をもたらす。上述のもののいずれかの達成は、ルーチンな方法によってモニタリングされ得る。

20

【0020】

提供される組成物および方法のいずれか1つのいくつかの態様において、有効量は、望ましい免疫応答が少なくとも1週間、少なくとも2週間、または少なくとも1か月間、対象において存続する量である。提供される組成物および方法のいずれか1つの他の態様において、有効量は、測定可能な望ましい免疫応答、例えば（例えば特定の抗原に対する）免疫応答の測定可能な減少、を少なくとも1週間、少なくとも2週間、または少なくとも1か月間、生じさせる量である。

有効量は当然、医療従事者の知識と経験の範囲内で、処置されている具体的な対象；状態、疾患または障害の重篤性；年齢、体調、サイズおよび体重を包含する個々の患者パラメータ；処置の持続期間；（存在する場合）併用治療の特質；投与の具体的な経路および同種の因子に依存するであろう。これらの因子は当業者には周知であり、ルーチンな実験法程度のことで対処し得る。一般に好ましくは、最大用量、すなわち、健全な医療的判断に従う最も高い安全な用量を使用することである。しかしながら、患者はより少ない用量、または耐容用量を、医療的理由、心理学的理由、または事実上あらゆる他の理由で主張し得るということは、当業者には理解されよう。

30

【0021】

一般に、本発明の組成物における免疫抑制剤および/または治療用高分子の用量は、免疫抑制剤および/または治療用高分子の量をいう。代替的に、用量は、免疫抑制剤および/または抗原の望ましい量を提供する合成ナノ担体の数に基づいて投与され得る。

「抗原特異的」は、抗原またはその一部分の存在によりもたらされるか、または、抗原を特異的に認識または結合する分子を発生させる、いずれかの免疫応答をいう。例えば、免疫応答が抗原特異的抗体產生である場合、抗原に特異的に結合する抗体が產生される。別の例として、免疫応答は、APCによって提示されたときに、抗原を提示することが可能な治療用高分子の抗原提示細胞（APC）に結合するCD4+制御性T細胞であってもよい、CD4+制御性T細胞の產生である。

40

【0022】

「免疫応答を査定すること」は、in vitroまたはin vivoでの免疫応答のレベル、存非、低減、増加等いずれかの測定または決定をいう。かかる測定または決定は、対象から得た1つまたは2つ以上のサンプルで行われ得る。かかる査定は、本明細書で提供されるか、またはそうでなければ、当該分野において知られている方法のいずれかで行われ得る。

50

査定は、対象からのサンプル中などの治療用高分子に特異的なものなどの C D 4 + 制御性 T 細胞の数または割合を査定してもよい。

「付着する」または「付着されている」または「連結する」または「連結されている」(等)は、1つの実体(例えば部位)をもう1つと化学的に関連させることを意味する。いくつかの態様において、付着は共有結合性であり、それは付着が2つの実体間の共有結合の存在の文脈下で起こることを意味する。非共有結合性の態様において、非共有結合性付着は、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-双極子相互作用および/またはそれらの組み合わせを包含するが、それらに限定されない非共有結合性相互作用により媒介される。ある態様において、カプセル化が付着の形態である。ある態様において、治療用高分子および免疫抑制剤は互いに付着されず、それは治療用高分子と免疫抑制剤とが一方をもう一方と化学的に関連させるように具体的に意図されたプロセスに供されないことを意味する。ある態様において、治療用高分子および/または免疫抑制剤は合成ナノ担体に付着されず、それは治療用高分子(および/または免疫抑制剤)と合成ナノ担体とが一方をもう一方と化学的に関連させるように具体的に意図されたプロセスに供されないことを意味する。

【0023】

「平均」は、本明細書で使用するとき、特に注記しない限り算術平均値をいう。

「同時処方」は、示されている材料が、材料が密接に物理的に接触しているか、または共有結合または非共有結合で化学的に付着している、充填し終えた医薬剤形を製造するように処理されることを意味する。本明細書では、「同時処方しない」は、示された材料(例えば、治療用高分子および免疫抑制剤(または免疫抑制剤に付着された合成ナノ担体))が、密接に物理的に接触しておらず、化学的に付着されていないことを意味する。いくつかの態様において、本明細書に記載のように治療用高分子および免疫抑制剤(または免疫抑制剤に付着された合成ナノ担体)は、対象への投与前に同時処方されない。

「組み合わせ」は、2つまたは3つ以上の材料および/または剤(本明細書において構成成分とも言う)に適用するとき、その2つまたは3つ以上の材料/剤が関連されている材料を定義することが意図される。構成成分は、例えば第1構成成分、第2構成成分、第3構成成分等、別個に識別され得る。本文脈における用語「組み合わされた」および「組み合わせること」はこれに従い解釈されるものとする。

【0024】

組み合わせにおける2つまたは3つ以上の材料/剤の関連は、物理的であっても、非物理的であってもよい。物理的に関連された材料/剤の例としては、以下が挙げられる:

- ・2つまたは3つ以上の材料/剤を混和物中に(例えば同じ単位用量内に)含む組成物(例えば単位製剤);
- ・2つまたは3つ以上の材料/剤が化学的/物理化学的に結び付けられた(例えば架橋、分子凝集または共通のビヒクル部位への結合)、材料を含む組成物;
- ・2つまたは3つ以上の材料/剤が化学的/物理化学的に共パッケージ化された(co-packaged)(例えば、脂質ベシクル、粒子(例えばマイクロまたはナノ粒子)または乳化液滴の上または内に配置された)、材料を含む組成物;
- ・2つまたは3つ以上の材料/剤が共パッケージ化または一括提供(co-presented)された(例えば、一連の単位用量の一部として)、医薬キット、医薬パックまたは患者用パック。

【0025】

非物理的に関連され組み合わされた材料/剤の例としては、以下が挙げられる:

- ・2つまたは3つ以上の材料/剤の少なくとも1つを、その2つまたは3つ以上の材料/剤の物理的関連を形成するための、その少なくとも1つの化合物/剤の即席の関連のための使用説明書と一緒に含む、材料(例えば単位製剤);
- ・2つまたは3つ以上の材料/剤の少なくとも1つを、その2つまたは3つ以上の材料/剤による組み合わせ治療のための使用説明書と一緒に含む、材料(例えば単位製剤);

10

20

30

40

50

- ・ 2つまたは3つ以上の材料／剤の少なくとも1つを、その2つまたは3つ以上の材料／剤の他のもの（単数または複数）が投与された（または投与されている）患者集団に投与するための使用説明書と一緒に含む、材料；
- ・ 2つまたは3つ以上の材料／剤の少なくとも1つを、その2つまたは3つ以上の材料／剤の他のもの（単数または複数）と組み合わせて使用するように具体的に適合された量または形態で含む、材料。

【0026】

本明細書で使用するとき、用語「組み合わせ治療」は、2つまたは3つ以上の材料／剤の組み合わせ（上記で定義）の使用を含む治療を定義することが意図される。ゆえに、本出願における「組み合わせ治療」、「組み合わせ」および材料／剤の「組み合わせた」使用への言及は、同じ全体的な処置レジメンの一部として投与される材料／剤をいう場合がある。したがって、2つまたは3つ以上の材料／剤の各々の薬量学は異なる場合があり、各々は同時に投与されてもよいし、異なる時刻に投与されてもよい。それゆえ、組み合わせの材料／剤は、逐次に（例えば、前または後に）または同時に、同じ医薬製剤において（即ち一緒に）または異なる医薬製剤において（すなわち別個に）のいずれかで、投与されてよいことが分かるであろう。同じ製剤において同時にとは、統一化製剤としてということであり、一方、異なる医薬製剤において同時に非統一化ということである。組み合わせ治療における2つまたは3つ以上の材料／剤の各々の薬量学は、投与経路に関しても異なっていてよい。

【0027】

「併用（して）」は、2つまたは3つ以上の材料／剤を、時間的に相関された、好ましくは免疫応答におけるモジュレーションを提供するように時間的に充分に相関された、さらにより好ましくはその2つまたは3つ以上の材料／剤が組み合わせて投与される、やり方で、対象に投与することを意味する。ある態様において、併用投与は、明記された期間内、好ましくは1か月以内、より好ましくは1週間以内、なおより好ましくは1日以内、さらにより好ましくは1時間以内の、2つまたは3つ以上の材料／剤の投与を網羅し得る。ある態様において、材料／剤は繰り返し併用投与されてよく、すなわち、例において提供される併用投与などの、1回よりも多い機会における併用投与であってよい。

【0028】

「決定すること」または「決定する」は事実関係を確かめることを意味する。決定することは、実験を行うことまたは予測を立てるることを包含するがそれらに限定されない、数々の方式で遂行され得る。例として、免疫抑制剤または治療用高分子の用量は、試験用量で開始し、投与のための用量を決定するための公知のスケーリング技術（アロメトリックまたはアイソメトリックスケーリングなど）を使用することにより決定され得る。かかるものを使用して本明細書に提供されるプロトコルを決定もまたし得る。別の態様において、用量は対象において種々の用量を試験することによって、すなわち経験およびガイドラインに基づく直接実験を通して、決定されてもよい。ある態様において、「決定すること」または「決定する」は、「決定させること」を含む。「決定させること」は、実体に事実関係を確かめるように、させること、促すこと、奨励すること、援助すること、誘導することまたは指示すること、または、その実体と協力して行動することを意味し、直接もしくは間接的に、または明示的にもしくは默示的に、を包含する。

【0029】

「剤形」は、対象への投与に好適な媒体、担体、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。本明細書で提供される組成物または用量のいずれか1つは、剤形中にあってよい。

「用量」は、所与の時間にわたり対象に投与するための薬理学的および／または免疫学的に活性な材料の具体的な分量(quantity)をいう。

「カプセル化する」は、合成ナノ担体内の物質の少なくとも一部分を封入することを意味する。いくつかの態様において、物質は合成ナノ担体内に完全に封入される。他の態様において、カプセル化される物質の大部分または全てが、合成ナノ担体の外部の局所環境

10

20

30

40

50

に曝露されない。他の形態において、局所環境に曝露されるのが 50%、40%、30%、20%、10% または 5% (重量 / 重量) を超えない。カプセル化は、吸収 (吸収は、物質の大部分または全てを合成ナノ担体の表面上に置き、その物質を合成ナノ担体の外部の局所環境に曝した状態にする) とは区別される。

【 0 0 3 0 】

「 C D 4 + 制御性 T 細胞の数または割合を強化すること」は、対象 (単数) または対象 (複数) からサンプルを採取し、次いで適切な試験方法を使用してサンプルを分析することによって決定されるとおり、対象 (単数) または対象 (複数) における前記細胞の (T 細胞または C D 4 + T 細胞の総数のような細胞の種類の総数などの) 数または割合 (または比) を増大させることをいう。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法を実施すること、または本明細書に記載の組成物の投与に従うことにより、治療用高分子に特異的なものなどの C D 4 + 制御性 T 細胞の割合は、少なくとも 2、3、4、5 または 6 倍以上増加する。

10

【 0 0 3 1 】

C D 4 + 制御性 T 細胞は、C D 4 + C D 2 5 + F o x 3 p + 細胞として特徴付けることができる。C D 4 + 制御性 T 細胞の数または割合は、本明細書に記載のまたは当該分野において知られているいずれかの方法によって査定することができる。例えば、対象からの末梢血のサンプルを得、遺伝子発現、タンパク質の存在、および / または、C D 2 5 、 F o x p 3 、 C C R 4 、 C C R 8 、 C C R 5 、 C T L A 4 、 C D 1 3 4 、 C D 3 9 および / または G I T R を制限なしで含む、C D 4 + 制御性 T 細胞と関連する 1 つまたは 2 以上の分子の局在を評価することによって、対象の末梢血における C D 4 + 制御性 T 細胞を定量することができる。前記の分子のいずれかは、定量的 R T - P C R 、ノーザンプロッティング、マイクロアレイ、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション、または R N A s e q などの転写分析によって評価することができる。タンパク質は、ウェスタンプロッティング、免疫蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーまたは E L I S A によって検出することができる。C D 2 5 、 C C R 4 、 C C R 8 、 C C R 5 、 C T L A 4 、 C D 1 3 4 、 C D 3 9 および / または G I T R などの細胞表面分子は、フローサイトメトリー、細胞表面染色、免疫蛍光顕微鏡、E L I S A 法などによって評価することができる。

20

【 0 0 3 2 】

いくつかの態様において、C D 4 + 制御性 T 細胞は、アネルギー性表現型 (例えば、T C R 刺激後の増殖の欠如) に基づいて検出される。いくつかの態様において、C D 4 + 制御性 T 細胞は、活性化誘導細胞死に対する抵抗性またはサイトカイン欠乏により誘導される死に対する感受性に基づいて同定される。いくつかの態様において、C D 4 + 制御性 T 細胞は、F o x p 3 をコードする遺伝子のメチル化状態に基づいて同定することができる。例えば、C D 4 + 制御性 T 細胞において、F o x p 3 遺伝子の一部は脱メチル化されることが見出されており、これは、P C R または他の D N A 系の方法による D N A メチル化分析によって検出することができる。C D 4 + 制御性 T 細胞は、I L - 9 、 I L - 1 0 または T G F - を含む免疫抑制サイトカインの産生に基づいてさらに同定または定量することができる。当該分野において知られているいずれかの方法、例えば、治療用高分子に由来する抗原を負荷した抗原提示細胞を用いて ex vivo で細胞を刺激し、C D 4 + 制御性 T 細胞の活性化を査定すること、または、C D 4 + 制御性 T 細胞の T 細胞受容体を評価することによって、治療用高分子特異的 C D 4 + 制御性 T 細胞を同定し、定量することができる。治療用高分子特異的 C D 4 + 制御性 T 細胞の数または割合 (または比) は、治療用高分子またはその抗原性部分の投与後に、活性化 C D 4 + 制御性 T 細胞の 1 つまたは 2 以上の機能または活性を評価することによって間接的に定量することができる。

30

【 0 0 3 3 】

「発生させること」は、免疫応答などの作用 (例えば寛容原性免疫応答) を、それ自体で直接的または間接的に起こさせることを意味する。

「対象を識別すること」は、対象を本明細書で提供される方法、組成物またはキットから効果が得られ得る対象として臨床医に認識せしめるいずれかの行動または行動のセット

40

50

である。好ましくは、識別された対象は、治療用高分子特異的 C D 4 + 制御性 T 細胞の產生または発達など、増大された C D 4 + 制御性 T 細胞の產生または発達を必要とする対象などの、本明細書で提供される寛容原性免疫応答を必要とするものである。行動または行動のセットは、それ自体の直接的なものであっても、または間接的なものであってもよい。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、本明細書で提供される方法、組成物またはキットを必要としている対象を識別することを含む。

【 0 0 3 4 】

「免疫抑制剤」は、 A P C に免疫抑制効果（例えば寛容原性効果）を持たせるか、または、 T 細胞または B 細胞が抑制され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低減、阻害または防止するか、または、制御性免疫応答（例えば C D 4 + 制御性 T 細胞の產生または発達）などの望ましい免疫応答を促進する、サイトカインまたは他の因子の A P C による產生または発現をいう。 A P C が、この 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して（免疫抑制効果の下）免疫抑制機能を獲得するとき、免疫抑制効果は、提示された抗原に特異的であると言われる。いかなる具体的な理論にも拘泥しないが、免疫抑制効果は、好ましくは抗原の存在下、免疫抑制剤が A P C に送達されることの結果であると思われる。一態様において、免疫抑制剤は、 1 つまたは 2 つ以上の免疫エフェクター細胞において A P C に制御性表現型を促進させるものである。例えば制御性表現型は、抗原特異的 C D 4 + T 細胞または B 細胞の產生、誘導、刺激または動員の阻害、抗原特異的抗体の產生の阻害、 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）の產生、誘導、刺激または動員、等により特徴付けられ得る。これは C D 4 + T 細胞または B 細胞の制御性表現型への転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 の誘導の結果でもあり得る。一態様において、免疫抑制剤は、抗原を処理した後の A P C の応答に影響を与えるものである。別の態様において、免疫抑制剤は、抗原の処理に干渉するものではない。さらなる態様において、免疫抑制剤はアボトーシスシグナル分子ではない。別の態様において、免疫抑制剤はリン脂質ではない。

【 0 0 3 5 】

免疫抑制剤としては、スタチン；ラパマイシンまたはラパマイシン類縁体などの m T O R インヒビター； T G F - β シグナル剤； 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インヒビター；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インヒビター； P 3 8 インヒビター； 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 B インヒビター；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 インヒビター（ P D E 4 ）などのホスホジエステラーゼインヒビター；プロテアソームインヒビター；キナーゼインヒビター； 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；グルココルチコイド；レチノイド；サイトカインインヒビター；サイトカイン受容体インヒビター；サイトカイン受容体アクチベーター；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インヒビター；カルシニユーリンインヒビター；ホスファターゼインヒビター； T G X - 2 2 1 などの P I 3 K B インヒビター； 3 - メチルアデニンなどのオートファジーインヒビター；アリールハイドロカーボン受容体インヒビター；プロテアソームインヒビター I (P S I) ；および P 2 X 受容体プロッカーなどの酸化 A T P が挙げられるが、これらに限定されない。免疫抑制剤としてはまた、 I D O 、ビタミン D 3 、シクロスボリン A などのシクロスボリン、アリールハイドロカーボン受容体インヒビター、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、マイコフェノレートモフェチル（ M M F ）、アスピリンおよび他の C O X インヒビター、ニフルミン酸、エストリオール、および、トリプトリドも挙げられる。ある態様において、免疫抑制剤は本明細書で提供される薬剤のいずれかを含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0036】

免疫抑制剤は、A P C に免疫抑制効果を直接提供する化合物であっても、免疫抑制効果を間接的に（すなわち投与後に何らかの方式で処理された後に）提供する化合物であってもよい。したがって、免疫抑制剤は、本明細書で提供される化合物のいずれかのプロドラッグ形態を包含する。

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つのある態様において、本明細書で提供される免疫抑制剤は、合成ナノ担体に付着されている。好ましい態様において、免疫抑制剤は、合成ナノ担体の構造を構成する材料に追加された要素である。例えば、合成ナノ担体が1つまたは2つ以上のポリマーで構成されている一態様において、免疫抑制剤は、1つまたは2つ以上のポリマーに追加されて付着された化合物である。別の例として、合成ナノ担体が1つまたは2つ以上の脂質で構成されている一態様において、免疫抑制剤はやはり、1つまたは2つ以上の脂質に追加されて付着された化合物である。合成ナノ担体の材料がまた、免疫抑制効果をもたらす場合などのある態様において、免疫抑制剤は、免疫抑制効果をもたらす合成ナノ担体の材料に追加されて存在する要素である。

10

【0037】

他の例示的な免疫抑制剤としては、低分子薬物、天然製品、抗体（例えばC D 2 0、C D 3、C D 4に対する抗体）、生物製剤系薬物、炭水化物系薬物、ナノ粒子、リポソーム、R N A i、アンチセンス核酸、アプタマー、メトトレキサート、N S A I D；フィンゴリモド；ナタリズマブ；アレムツズマブ；抗C D 3；タクロリムス（F K 5 0 6）；等が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる免疫抑制剤は当業者に知られており、本発明はこの点において限定されない。

20

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つのある態様において、免疫抑制剤はナノ結晶性形態などの形態にあり、それにより免疫抑制剤自体の形態は粒子または粒子様である。ある態様において、こうした形態はウイルスまたは他の外来病原体を模擬している。多くの薬物はナノ化されており、こうした薬物の形態を生じさせるための適切な方法は当業者に知られているであろう。ナノ結晶性ラパマイシンなどの薬物ナノ結晶は当業者に知られている（Katteboinaa, et al. 2009, International Journal of PharmTech Research; Vol. 1, No. 3; pp682-694）。本明細書で使用するとき、「薬物ナノ結晶」は、担体またはマトリックス材料を包含しない、薬物（例えば免疫抑制剤）の形態をいう。いくつかの態様において、薬物薬物ナノ結晶は、9 0 %、9 5 %、9 8 %または9 9 %、または、それ以上の薬物を含む。薬物ナノ結晶の生成方法としては、限定されないが、摩碎(milling)、高圧均質化、沈殿、噴霧乾燥、超臨界溶体急速膨張（RESS）、N anoedge（登録商標）技術（Baxter Healthcare）およびNanocrystal Technology（商標）（Elan Corporation）が挙げられる。いくつかの態様において、薬物ナノ結晶の立体または静電安定性のために、界面活性物質または安定剤を使用してもよい。いくつかの態様において、免疫抑制剤のナノ結晶またはナノ結晶性形態は、免疫抑制剤、特に不溶性のまたは不安定な(labile)免疫抑制剤、の溶解性、安定性および/または生物学的利用能を増大させるために使用され得る。いくつかの態様において、治療用高分子のナノ結晶性形態の免疫抑制剤との併用投与は、治療用高分子に特異的なものなどのC D 4 + 制御性T細胞の数または割合（または比）の増大をもたらす。

30

【0038】

合成ナノ担体に付着されるときの「積載量」は、合成ナノ担体全体における材料の総乾燥処方重量に基づく、合成ナノ担体に付着される免疫抑制剤および/または治療用高分子の量（重量/重量）である。一般に、かかる積載量は、合成ナノ担体の集団にわたる平均として算出される。一態様において、積載量は、合成ナノ担体にわたって平均して、0.1 %と9 9 %との間である。別の態様において、積載量は、0.1 %と5 0 %との間である。別の態様において、積載量は、0.1 %と2 0 %との間である。さらなる態様において、積載量は0.1 %と1 0 %との間である。なおさらなる態様において、積載量は1 %と1 0 %との間である。なおさらなる態様において、積載量は7 %と2 0 %との間である

40

50

。さらに別の態様において、積載量は、合成ナノ担体の集団にわたって平均して、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%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%である。またさらなる態様において、積載量は、合成ナノ担体の集団にわたって平均して、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。上記の態様のいくつかの態様において、積載量は、合成ナノ担体の集団にわたって平均して、25%を超えない。ある態様において、積載量は例に記載され得るとおりであるか、またはそうでなければ、当該分野において知られているように、算出される。

【0039】

いくつかの態様において、免疫抑制剤の形態が、ナノ結晶性免疫抑制剤などの、それ自体粒子または粒子様であるとき、免疫抑制剤の積載量は粒子等における免疫抑制剤の量（重量 / 重量）である。かかる態様において、積載量は97%、98%、99%またはそれ以上に届き得る。

「合成ナノ担体の最大寸法」は、合成ナノ担体のいずれかの軸に沿って測定されたナノ担体の最も長い寸法を意味する。「合成ナノ担体の最小寸法」は、合成ナノ担体のいずれかの軸に沿って測定された合成ナノ担体の最も小さい寸法を意味する。例えば、回転橢円状合成ナノ担体において、合成ナノ担体の最大および最小寸法は、実質的に同一であって、その径のサイズとなるであろう。同様に立方体様の合成ナノ担体において、合成ナノ担体の最小寸法は、その高さ、幅または長さのうち最小のものとなり、一方合成ナノ担体の最大寸法は、その高さ、幅または長さのうち最大のものとなろう。

【0040】

一態様において、サンプル中の合成ナノ担体の総数に基づいてサンプル中の合成ナノ担体の少なくとも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%の最小寸法は、100nm以上である。一態様において、サンプル中の合成ナノ担体の総数に基づいてサンプル中の合成ナノ担体の少なくとも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%の最大寸法は、5μm以下である。好ましくは、サンプル中の合成ナノ担体の総数に基づいてサンプル中の合成ナノ担体の少なくとも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%の最小寸法は、110nmよりも大きく、より好ましくは120nmよりも大きく、より好ましくは130nmよりも大きく、より好ましくは150nmよりもなお大きい。合成ナノ担体の最大寸法と最小寸法とのアスペクト比は、態様によって変化し得る。例えば、合成ナノ担体の最大寸法の最小寸法に対するアスペクト比は、1:1~1,000,000:1、好ましくは1:1~100,000:1、より好ましくは1:1~10,000:1、より好ましくは1:1~1000:1、なおより好ましくは1:1~100:1、さらにより好ましくは1:1~10:1で変化し得る。好ましくは、サンプル中の合成ナノ担体の総数に基づいてサンプル中の合成ナノ担体の少なくとも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%の最大寸法は、3μm以下、より好ましくは2μm以下、より好ましくは1μm以下、より好ましくは800nm以下、より好ましくは600nm以下、なおより好ましくは500nm以下である。

【0041】

10

20

30

40

50

好ましい態様において、サンプル中の合成ナノ担体の総数に基づいてサンプル中の合成ナノ担体の少なくとも 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% の最小寸法は、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、なおより好ましくは 150 nm 以上である。合成ナノ担体寸法（例えば有効寸法）の測定は、いくつかの態様において、合成ナノ担体を液体（通常は水性）媒体中に懸濁し、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、得てもよい。例えば、合成ナノ担体の懸濁液は、水性緩衝剤から純水中に希釈されておよそ 0.01 ~ 0.1 mg / mL の最終合成ナノ担体懸濁濃度を達成し得る。希釈懸濁液は、DLS 分析のために好適なキュベットの内部で直接調製されても、またはそれに移してもよい。次いでキュベットを DLS 中に置き、制御された温度に平衡化し、次いで充分な時間スキャンして、媒体の粘度およびサンプルの屈折率に関する適切な入力に基づき、安定で再現可能な分布を獲得し得る。次いで有効径または分布の平均値を報告する。高アスペクト比または非回転橍円状の合成ナノ担体の有効サイズの決定は、より正確な測定を得るために電子顕微鏡などの拡大技術 (augmentative techniques) を要する場合がある。合成ナノ担体の「寸法」または「サイズ」または「径」は、例えば動的光散乱を使用して得られる、粒子サイズ分布の平均値を意味する。

【0042】

「非メトキシ末端のポリマー」は、メトキシ以外の部位で終端する少なくとも 1 つの末端部を有するポリマーを意味する。いくつかの態様において、ポリマーはメトキシ以外の部位で終端する少なくとも 2 つの末端部を有する。他の態様において、ポリマーはメトキシで終端する末端部を有さない。「非メトキシ末端のプルロニックポリマー」は、両末端部にメトキシを有する直鎖プルロニックポリマー以外のポリマーを意味する。本明細書で提供されるポリマーナノ粒子は、非メトキシ末端のポリマーまたは非メトキシ末端のプルロニックポリマーを含み得る。

「薬学的に許容し得る賦形剤」または「薬学的に許容し得る担体」は、組成物を処方するため薬理学的に活性な材料と一緒に使用される薬理学的に不活性な材料を意味する。薬学的に許容し得る賦形剤は、糖（例えばグルコース、ラクトース等）、抗菌剤などの保存剤、再構成助剤、着色剤、食塩水（リン酸緩衝化食塩水等）および緩衝剤を包含するが、これらに限定されない、当該分野において知られている種々の材料を含む。

【0043】

「プロトコル」は、対象への投与のパターンを意味し、1つまたは2つ以上の物質の対象へのいずれかの投薬レジメンを包含する。プロトコルは要素（または変数）で構成され；ゆえにプロトコルは1つまたは2つ以上の要素を含む。プロトコルのかかる要素は、投薬量、投薬頻度、投与経路、投薬期間、投薬速度、投薬の間隔、上記のいずれかの組み合わせ、等を含み得る。いくつかの態様において、かかるプロトコルは、本発明の1つまたは2つ以上の組成物を1つまたは2以上の試験対象に投与するために使用され得る。これらの試験対象における免疫応答は次いで、望ましい、または望ましいレベルの免疫応答または治療効果を発生させることにおいて、そのプロトコルが有効か否かを決定するために査定され得る。いずれかの治療効果および/または免疫効果はまた査定されてもよい。プロトコルの要素の1つまたは2つ以上が、非ヒト対象などの試験対象において予め実証された後、ヒトプロトコルに移行されてもよい。例えば、非ヒト対象において実証された投与量を、アロメトリックスケーリングまたは他のスケーリング方法などの確立された技術を使用してヒトプロトコルの要素としてスケーリングしてもよい。プロトコルが望ましい効果を有していたか否かは、本明細書で提供されるか、または、その他の当該分野において知られている方法のうちのいずれかを使用して決定され得る。例えば、サンプルは、具体的な免疫細胞、サイトカイン、抗体、等が低減されたか、発生されたか、活性化されたか否か、等を決定するために、本明細書で提供される組成物が具体的なプロトコルに従って投与された対象から得てもよい。

【0044】

10

20

30

40

50

好ましい態様において、治療用高分子特異的なものなどの C D 4 + 制御性 T 細胞の数または割合（または比）が決定される。典型的なプロトコルは、投与前に治療用高分子が免疫抑制剤（合成ナノ担体に付着されていない免疫抑制剤）と同時処方されないとき、（1つまたは2つ以上の試験対象におけるプロトコルに従って投与前の C D 4 + 制御性 T 細胞の数または割合を比較して） C D 4 + 制御性 T 細胞の増大された数または割合（または比）をもたらすことが以前に実証されているものである。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、フローサイトメトリー法（例えば F A C S ）、 E L I S p o t 、増殖応答、サイトカイン産生および免疫組織化学法が挙げられるが、これらに限定されない。免疫細胞マーカーの特異的染色のための抗体および他の結合剤は市販されている。かかるキットは典型的に、細胞の不均質な集団からの望ましい細胞集団の F A C S に基づく検出、分離および / または定量を可能にする、抗原のための染色試薬を包含する。ある態様において、本明細書で提供される数々の組成物が、プロトコルを含む要素の1つまたは2つ以上、または、全てまたは実質的に全てを使用して別の対象に投与される。いくつかの態様において、プロトコルは、治療用高分子特異的であるもの、および本明細書で提供される治療用高分子などの免疫抑制剤で C D 4 + 制御性 T 細胞の発達または産生をもたらすことが実証されている。

【 0 0 4 5 】

「提供すること」は、本発明を実行するために必要とされる物品もしくは物品のセットまたは方法を供給する、個人が行う行動または行動のセットを意味する。行動または行動のセットは、自身で直接的または間接的に取られ得る。

「対象を提供する」とは、臨床医に対象と接触させて本明細書で提供される組成物をその対象に投与させるか、または、本明細書で提供される方法をその対象において行わせる、いずれかの行動または行動のセットである。好ましくは、対象は、抗原特異的免疫寛容または治療用高分子特異的なものなどの C D 4 + 制御性 T 細胞の増大された産生または発達を必要としている対象である。行動または行動のセットは、自身で直接的または間接的に取られ得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに対象を提供することを含む。

【 0 0 4 6 】

「記録すること」は、本明細書で提供される方法または組成物が、治療用高分子特異的なものなどの C D 4 + 制御性 T 細胞の増大された産生または発達を達成した、いずれかの書面によるか、または電子形態で、メモするか、またはかかるメモが行われるであろうと予期される活動を直接的または間接的に引き起こすことを意味する。いくつかの態様において、記録は、治療用高分子と組み合わされた免疫抑制剤が、本明細書で提供される方法に従って、またはその後のいくつかの点で対象に投与されるときに起こる。「書面の形態」は、本明細書で使用するとき、紙などの媒体上のいずれかの記録をいう。「電子形態」は、本明細書で使用するとき、電子媒体上のいずれかの記録をいう。

「対象」は、ヒトおよび靈長類などの温血動物；トリ；ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマおよびブタなどのペットまたは家畜；マウス、ラットおよびモルモットなどの実験動物；魚；爬虫類；動物園のおよび野生の動物；等を包含する動物を意味する。

「合成ナノ担体（単数または複数）」は、自然界には見られずサイズにおいて5ミクロン以下の少なくとも1つの寸法を所有する離散性の物体を意味する。アルブミンナノ粒子は一般に、合成ナノ担体として包含されるが、特定の態様において、合成ナノ担体はアルブミンナノ粒子を含まない。ある態様において、合成ナノ担体はキトサンを含まない。他の態様において、合成ナノ担体は脂質系ナノ粒子ではない。さらなる態様において、合成ナノ担体はリン脂質を含まない。

【 0 0 4 7 】

合成ナノ担体は、1つまたは複数の脂質系ナノ粒子（本明細書において脂質ナノ粒子ともいわれ、すなわちその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、界面活性物質系エマルション、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（すなわち、主にウイルス構造タンパク質で構成されるが

10

20

30

40

50

、感染性ではなくまたは感染性が低い粒子)、ペプチドまたはタンパク質系粒子(本明細書においてタンパク質粒子ともいわれ、すなわち、その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み合わせを使用して開発されたナノ粒子であつてよいが、これらに限定されない。合成ナノ担体は、回転構円状、立方体様、ピラミッド状、構円状、円筒状、ドーナツ状等を包含するが、これらに限定されない種々の異なる形状であり得る。本発明に従う合成ナノ担体は1つまたは2つ以上の表面を含む。

【0048】

本発明の実行に使用するように適合され得る例示的な合成ナノ担体は、(1)米国特許第5,543,158号(Gref et al.)に開示された生分解性ナノ粒子、(2)公開された米国特許出願第20060002852号(Saltzman et al.)のポリマーナノ粒子、(3)公開された米国特許出願第20090028910号(DeSimone et al.)のリソグラフィーにより構築したナノ粒子、(4)国際出願公開第2009/051837号(von Andrian et al.)の開示、(5)公開された米国特許出願第2008/0145441号(Penades et al.)に開示されたナノ粒子、(6)公開された米国特許出願第20090226525号(de los Rios et al.)に開示されたタンパク質ナノ粒子、(7)公開された米国特許出願第20060222652号(Sebbel et al.)に開示されたウイルス様粒子、(8)公開された米国特許出願第20060251677号(Bachmann et al.)に開示された核酸付着ウイルス様粒子、(9)国際公開第2010047839A1号または同第2009106999A2号に開示されたウイルス様粒子、(10)P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles", *Nanomedicine*. 5(6): 843-853 (2010)に開示されたナノ沈殿ナノ粒子、(11)米国特許公開第2002/0086049号に開示されたアポトーシス細胞、アポトーシス体、または、合成または半合成模倣物、または(12)Look et al., "Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice", *J. Clinical Investigation* 123(4): 1741-1749 (2013)に開示されたものを含む。ある態様において、合成ナノ担体は、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7よりも大きな、または1:10よりも大きなアスペクト比を有し得る。

【0049】

約100nm以下、好ましくは100nm以下の最小寸法を有する本発明に従う合成ナノ担体は、補体を活性化するヒドロキシル基を有する表面を含まないか、または代替的に補体を活性化するヒドロキシル基ではない部位から本質的になる表面を含む。好ましい態様において、約100nm以下、好ましくは100nm以下の最小寸法を有する本発明に従う合成ナノ担体は、補体を実質的に活性化する表面を含まないか、または代替的に補体を実質的に活性化しない部位から本質的になる表面を含む。より好ましい態様において、約100nm以下、好ましくは100nm以下の最小寸法を有する本発明に従う合成ナノ担体は、補体を活性化する表面を含まないか、または代替的に補体を活性化しない部位から本質的になる表面を含む。ある態様において、合成ナノ担体は、ウイルス様粒子を排除する。ある態様において、合成ナノ担体は1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7よりも大きな、または1:10よりも大きなアスペクト比を有し得る。

【0050】

「治療用高分子」は、対象に投与されて治療効果を有し得るいずれかのタンパク質、炭水化物、脂質または核酸をいう。いくつかの態様において、対象への治療用高分子の投与は、望ましくない免疫応答をもたらし得る。本明細書で記載する場合、免疫抑制剤と併用した治療用高分子の投与は、それへの望ましくない免疫応答を低減させることなどにより、治療用高分子特異的なものなどのCD4+制御性T細胞などの產生または発達、および/または治療用高分子の治療有効性を向上させ得る。いくつかの態様において、治療用高分子は治療用ポリヌクレオチドまたは治療用タンパク質であり得る。

【0051】

「治療用ポリヌクレオチド」は、対象に投与されて治療効果を有し得るいずれかのポリ

10

20

30

40

50

スクレオチドまたはポリスクレオチドに基づく治療を意味する。かかる治療は遺伝子サイレンシングを包含する。かかる治療のためのかかるコンストラクトの例は当該分野において知られており、ネイキッドRNA（メッセンジャーRNA、修飾メッセンジャーRNAおよびRNAiの形態を包含する）が挙げられるが、これらに限定されない。他の治療用ポリスクレオチドの例は本明細書中に別記する。治療用ポリスクレオチドは、細胞中、細胞上または細胞によって、產生されてもよいし、また細胞フリーの方法、または完全に合成によるin vitro法を使用して得てもよい。対象はそれゆえ、前述のいずれかによる処置を必要としているいずれかの対象を包含する。かかる対象には、前述のいずれかを受けるであろう対象が包含される。

【0052】

10

「治療用タンパク質」は、対象に投与されて治療効果を有し得るいずれかのタンパク質またはタンパク質に基づく治療を意味する。かかる治療としては、タンパク質補充治療およびタンパク質補強治療が挙げられる。かかる療法にはまた、外因性または外来性のタンパク質の投与、抗体治療および細胞または細胞に基づく治療も包含される。治療用タンパク質としては、酵素、酵素補助因子、ホルモン、血液凝固因子、サイトカイン、成長因子、モノクローナル抗体、抗体-薬物複合体およびポリクローナル抗体が挙げられるが、これらに限定されない。他の治療用タンパク質の例は本明細書中に別記する。治療用タンパク質は、細胞中で、細胞上で、または細胞によって、產生されてもよく、かかる細胞から得られるか、または、かかる細胞の形態で投与されてもよい。ある態様において、治療用タンパク質は、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、細菌細胞、植物細胞、トランスジェニック動物細胞、トランスジェニック植物細胞、等中で、これらの細胞上で、またはこれらの細胞によって產生される。治療用タンパク質は、かかる細胞中で遺伝子組換えにより產生されてもよい。治療用タンパク質は、ウイルスで形質転換した細胞中、該細胞上、または該細胞により產生されてもよい。対象はそれゆえ、前述のいずれかによる処置を必要とするいずれかの対象を包含する。かかる対象には前述のいずれかを受けるであろう対象が包含される。

【0053】

20

「治療用高分子のAPC提示可能抗原」は、治療用高分子（すなわち、治療用高分子、または、治療用高分子に対する免疫応答（例えば抗治療用高分子特異的抗体の產生）を発生し得るその断片）と関連する抗原を意味する。一般に、治療用高分子の抗原提示細胞（APC）提示可能抗原は、免疫系（例えば、樹状細胞、B細胞またはマクロファージを包含するが、それらに限定されない抗原提示細胞により提示されるものなどの免疫系の細胞）による認識のために提示され得る。治療用高分子のAPC提示可能抗原は、例えば、T細胞による認識のために提示され得る。かかる抗原は、クラスIまたはクラスII主要組織適合遺伝子複合体分子（MHC）に結合された抗原のエピトープの提示を介して、T細胞により認識されてT細胞中で免疫応答をトリガーし得る。治療用高分子のAPC提示可能抗原は一般に、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリスクレオチド、リボタンパク質を包含するか、または、細胞中に、細胞上に、または細胞により含有または発現される。治療用高分子抗原は、いくつかの態様において、MHCクラスI拘束性エピトープおよび/またはMHCクラスII拘束性エピトープおよび/またはB細胞エピトープを含む。好ましくは、治療用高分子に特異的な寛容原性免疫応答が、本明細書で提供される方法、組成物またはキットによりもたらされる。ある態様において、合成ナノ担体の集団は、加えられた治療用高分子のAPC提示可能抗原を含まず、このことは、合成ナノ担体の製造の間に、実質的な量の治療用高分子のAPC提示可能抗原が意図的に合成ナノ担体に加えられることはないということを意味する。

30

【0054】

40

「望ましくない免疫応答」は、抗原への曝露によりもたらされ、本明細書で提供される疾患、障害または状態（またはそれらの徴候）を促進または悪化させるか、または、本明細書で提供される疾患、障害または状態の徴候であるいずれかの望ましくない免疫応答をいう。かかる免疫応答は一般に、対象の健康に悪影響を有するか、または、対象の健康に

50

に対する悪影響の徵候となる。

C. 組成物

免疫抑制剤および治療用高分子に特異的なものなどの C D 4 + 制御性 T 細胞の產生または発達を増強するための治療用高分子の投与における使用のための組成物、ならびに関連する方法およびキットが本明細書で提供される。かかる組成物、キット、および方法は、治療用高分子治療を受けるだろうものなど、治療用高分子治療を必要とする対象に有用である。

種々多様な合成ナノ担体を本発明に従い使用し得る。いくつかの態様において、合成ナノ担体は、球状または回転橈円状である。いくつかの態様において、合成ナノ担体は平坦または平板形状である。いくつかの態様において、合成ナノ担体は立方体または立方体状である。いくつかの態様において、合成ナノ担体は卵形または長円である。いくつかの態様において、合成ナノ担体は円筒、円錐またはピラミッドである。

【 0 0 5 5 】

いくつかの態様において、各合成ナノ担体が同様の性質を有するようにサイズまたは形状の点で比較的均一である合成ナノ担体の集団を使用することが望ましい。例えば、合成ナノ担体の総数に基づいて少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % の合成ナノ担体は、合成ナノ担体の平均径または平均寸法の 5 %、1 0 % または 2 0 % 以内に入る最小寸法または最大寸法を有し得る。

合成ナノ担体は、中実または中空であってよく、1 つまたは 2 つ以上の層を含み得る。いくつかの態様において、各層が、他の層（単数または複数）に対して、独自の組成物および独自の性質を有する。例を挙げると、合成ナノ担体は、コアが 1 つの層（例えばポリマーコア）でありシェルが第 2 の層（例えば脂質二分子層または脂質单分子層）であるコア／シェル構造を有していてもよい。合成ナノ担体は複数の異なる層を含んでいてもよい。

【 0 0 5 6 】

いくつかの態様において、合成ナノ担体は任意で、1 つまたは 2 つ以上の脂質を含む。いくつかの態様において、合成ナノ担体はリポソームを含んでいてもよい。いくつかの態様において、合成ナノ担体は脂質二分子層を含んでいてもよい。いくつかの態様において、合成ナノ担体は脂質单分子層を含んでいてもよい。いくつかの態様において、合成ナノ担体はミセルを含んでいてもよい。いくつかの態様において、合成ナノ担体は脂質層（例えば、脂質二分子層、脂質单分子層、等）に囲まれたポリマーマトリックスを含むコアを含んでいてもよい。いくつかの態様において、合成ナノ担体は、脂質層（例えば、脂質二分子層、脂質单分子層、等）に囲まれた非ポリマーコア（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、等）を含んでいてもよい。

他の態様において、合成ナノ担体は金属粒子、量子ドット、セラミック粒子、等を含んでいてもよい。いくつかの態様において、非ポリマー合成ナノ担体は、金属原子（例えば金原子）の凝集体などの非ポリマー構成成分の凝集体である。

【 0 0 5 7 】

いくつかの態様において、合成ナノ担体は任意で、1 つまたは 2 つ以上の両親媒性の実体を含んでいてもよい。いくつかの態様において、両親媒性の実体は安定性が増大されているか、均一性が改善されているか、または、粘度が増大されている合成ナノ担体の生成を促進し得る。いくつかの態様において、両親媒性の実体は、脂質膜（例えば、脂質二分子層、脂質单分子層、等）の内部表面に関連され得る。当該分野において知られている多くの両親媒性の実体は、本発明に従う合成ナノ担体を作ることにおける使用に好適である。かかる両親媒性の実体としては、ホスホグリセリド；ホスファチジルコリン；ジパルミトイロホスファチジルコリン（D P P C）；ジオレイルホスファチジルエタノールアミン（D O P E）；ジオレイルオキシプロピルトリエチルアンモニウム（D O T M A）；ジオレオイルホスファチジルコリン；コレステロール；コレステロールエステル；ジアシルグリセロール；ジアシルグリセロールスクシネット；ジホスファチジルグリセロール（D P

10

20

30

40

50

P G) ; ヘキサンデカノール ; ポリエチレングリコール (P E G) などの脂肪族アルコール ; 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表面活性脂肪酸 ; 脂肪酸 ; 脂肪酸モノグリセリド ; 脂肪酸ジグリセリド ; 脂肪酸アミド ; ソルビタントリオレエート (Span (登録商標) 85) グリココレート ; ソルビタンモノラウレート (Span (登録商標) 20) ; ポリソルベート 20 (Tween (登録商標) 20) ; ポリソルベート 60 (Tween (登録商標) 60) ; ポリソルベート 65 (Tween (登録商標) 65) ; ポリソルベート 80 (Tween (登録商標) 80) ; ポリソルベート 85 (Tween (登録商標) 85) ;

【 0058 】

ポリオキシエチレンモノステアレート ; サーファクチン ; ポロキソマー (poloxomer) ; ソルビタントリオレエートなどのソルビタン脂肪酸エステル ; レシチン ; リゾレシチン ; ホスファチジルセリン ; ホスファチジルイノシトール ; スフィンゴミエリン ; ホスファチジルエタノールアミン (ケファリン) ; 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 ; アセチルパルミテート ; グリセロールリシノレエート ; ヘキサデシルステアレート ; イソプロピルミリストート ; 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 ; 高い界面活性物質活性を有する合成および / または天然洗剤 ; デオキシコレート ; シクロデキストリン ; カオトロピック塩 ; イオンペア剤 ; および、これらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。両親媒性実体構成成分は、異なる両親媒性実体の混合物であってもよい。これが界面活性物質活性を有する物質の包括的ではない例示的なリストであるということを当業者は認識するであろう。いずれかの両親媒性実体を、本発明に従って使用される合成ナノ担体の生成に使用してよい。

【 0059 】

いくつかの態様において、合成ナノ担体は任意で、1つまたは2つ以上の炭水化物を含んでいてもよい。炭水化物は天然または合成であってもよい。炭水化物は誘導天然炭水化物であってもよい。特定の態様において、炭水化物は、グルコース、フルクトース、ガラクトース、リボース、ラクトース、スクロース、マルトース、トレハロース、セルビオス、マンノース、キシロース、アラビノース、グルコン酸、ガラクトン酸、マンヌロン酸、グルコサミン、ガラトサミンおよびノイラミン酸が挙げられるが、これらに限定されない单糖または二糖を含む。特定の態様において、炭水化物は、フルラン、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 (H P M C) 、ヒドロキシセルロース (H C) 、メチルセルロース (M C) 、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、カラギーナン、グリコン、アミロース、キトサン、 - カルボキシメチルキトサン、アルギンおよびアルギン酸、デンプン、キチン、イヌリン、こんにゃく、グルコマンナン、ブツラン、ヘパリン、ヒアルロン酸、カードランおよびキサンタンが挙げられるが、これらに限定されない多糖である。ある態様において、合成ナノ担体は多糖などの炭水化物を含まない (または具体的に排除される) 。特定の態様において、炭水化物は、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトールおよびラクチトールが挙げられるが、これらに限定されない糖アルコールなどの炭水化物誘導体を含んでいてもよい。

【 0060 】

いくつかの態様において、合成ナノ担体は1つまたは2つ以上のポリマーを含み得る。いくつかの態様において、合成ナノ担体は、非メトキシ末端のフルロニックポリマーである1つまたは2つ以上のポリマーを含む。いくつかの態様において、合成ナノ担体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) が非メトキシ末端のフルロニックポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノ担体を構成す

10

20

30

40

50

るポリマーの全てが非メトキシ末端のプルロニックポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノ担体は非メトキシ末端のポリマーである1つまたは2つ以上のポリマーを含む。いくつかの態様において、合成ナノ担体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）が非メトキシ末端のポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノ担体を構成するポリマーの全てが非メトキシ末端のポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノ担体はプルロニックポリマーを含まない1つまたは2つ以上のポリマーを含む。いくつかの態様において、合成ナノ担体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。いくつかの態様において、合成ナノ担体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。いくつかの態様において、かかるポリマーは、コーティング層（例えば、リポソーム、脂質单分子層、ミセル、等）で囲まれていてもよい。いくつかの態様において、合成ナノ担体の種々の要素はポリマーに付着されていてもよい。

【0061】

免疫抑制剤は、多くの方法のいずれかによって合成ナノ担体に付着され得る。一般に付着は、免疫抑制剤と合成ナノ担体との間の結合の結果であり得る。この結合は、免疫抑制剤が合成ナノ担体の表面に付着されおよび/または合成ナノ担体内に含有され（カプセル化され）ることをもたらし得る。しかしながら、いくつかの態様において、免疫抑制剤は、合成ナノ担体への結合ではなくむしろ合成ナノ担体の構造の結果として、合成ナノ担体によってカプセル化される。好ましい態様において、合成ナノ担体は、本明細書で提供されるポリマーを含み、免疫抑制剤はポリマーに付着される。

【0062】

付着が免疫抑制剤と合成ナノ担体との間の結合の結果として起こるとき、付着は連結部位を介して起こり得る。連結部位は免疫抑制剤および/または治療用高分子がその部位を通して合成ナノ担体に結合されるいのちかの部位であり得る。かかる部位には、アミド結合またはエステル結合などの共有結合ならびに免疫抑制剤を合成ナノ担体に（共有結合的にまたは非共有結合的に）結合する別個の分子が包含される。かかる分子は、リンカー、または、ポリマーまたはそれらの単位を包含する。例えば、連結部位は、免疫抑制剤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、連結部位は、それが共有結合的に結合するポリマーまたはその単位を含み得る。

好ましい態様において、合成ナノ担体は本明細書で提供されるポリマーを含む。これらの合成ナノ担体は完全にポリマー性であってもよく、ポリマーと他の材料との混合であってもよい。

【0063】

いくつかの態様において、合成ナノ担体のポリマー同士が関連してポリマーマトリックスを形成する。これらの態様のうちのいくつかにおいて、免疫抑制剤などの構成成分はポリマーマトリックスの1つまたは2つ以上のポリマーと共有結合的に関連され得る。いくつかの態様において、共有結合的関連はリンカーによって媒介される。いくつかの態様において、構成成分は、ポリマーマトリックスの1つまたは2つ以上のポリマーと非共有結合的に関連され得る。例えば、いくつかの態様において、構成成分は、高分子マトリックス内にカプセル化され、それによって囲まれ、および/または、その全体にわたって分散され得る。代替的または追加的に、構成成分は、ポリマーマトリックスの1つまたは2つ以上のポリマーと、疎水性の相互作用、電荷相互作用、ファンデルワールス力、等によって関連され得る。ポリマーマトリックスを形成するための多種多様なポリマーおよび方法は従来、知られている。

【0064】

ポリマーは、天然または非天然（合成）ポリマーであり得る。ポリマーはホモポリマー

または2つまたは3つ以上のモノマーを含むコポリマーであり得る。並びの点で、コポリマーはランダム、ブロックであっても、ランダムとブロックとの並びの組み合わせを含んでもよい。典型的には、本発明に従うポリマーは、有機ポリマーである。

いくつかの態様において、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、または、これらの単位を含む。他の態様において、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-*c*o-グリコール酸)またはポリカプロラクトン、または、これらの単位を含む。いくつかの態様において、ポリマーは生分解性であることが好みしい。それゆえ、これらの態様において、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またはこれらの単位などのポリエーテルを含む場合、ポリマーは、生分解性となるように、ポリエーテルのブロックコポリマーおよび生分解性ポリマーを含むことが好みしい。他の態様において、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またはこれらの単位などの、ポリエーテルまたはこれらの単位を、それだけでは含まない。

【0065】

本発明で使用するのに好適なポリマーの他の例としては、ポリエチレン、ポリカーボネート(例えばポリ(1,3-ジオキサン-2オン))、ポリ酸無水物(例えばポリ(セバシン酸無水物))、ポリプロピルフルマラート、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-*c*o-グリコリド、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシ酸(例えばポリ(-ヒドロキシアルカノアート)))、ポリ(オルトエステル)、ポリシアノアクリラート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリラート、ポリメタクリラート、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共重合体およびポリ(エチレンイミン)、ポリ(エチレンイミン)-PEG共重合体が挙げられるが、これらに限定されない。

いくつかの態様において、本発明に従うポリマーは、ポリエステル(例えば、ポリ乳酸、ポリ(乳酸-*c*o-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-ジオキサン-2オン))；ポリ酸無水物(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；ポリメタクリラート；ポリアクリラート；およびポリシアノアクリラートを包含するが、これらに限定されない、米国医薬品局(FDA)により21C.F.R. § 177.2600の下でヒトにおける使用が認証されたポリマーを包含する。

【0066】

いくつかの態様において、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(例えばホスファート基、スルファート基、カルボキシラート基)；カチオン性基(例えば四級アミン基)；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。いくつかの態様において、親水性ポリマーマトリックスを含む合成ナノ担体は、合成ナノ担体内に親水性環境を発生させる。いくつかの態様において、ポリマーは疎水性であり得る。いくつかの態様において、疎水性ポリマーマトリックスを含む合成ナノ担体は、合成ナノ担体内に疎水性環境を発生させる。ポリマーの親水性または疎水性の選択は、合成ナノ担体内に組み込まれた(例えば、付着された)材料の特質に影響を有し得る。

【0067】

いくつかの態様において、ポリマーは1つまたは2つ以上の部位および/または官能基で修飾され得る。種々の部位または官能基を本発明に従い使用し得る。いくつかの態様において、ポリマーはポリエチレングリコール(PEG)で、炭水化物で、および/または、多糖から誘導された非環式ポリアセタールで、修飾され得る(Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301)。特定の態様は、米国特許第5543158号(Gref et al.)または国際公開第2009/051837号(Von Andrian et al.)の一般的教示を使用してなされ得る。

いくつかの態様において、ポリマーは脂質または脂肪酸基で修飾され得る。いくつかの

10

20

30

40

50

態様において、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、アラキドン酸、ベヘン酸またはリグノセリン酸の1つまたは2つ以上であり得る。いくつかの態様において、脂肪酸基は、パルミトレン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、アルファ-リノール酸、ガンマ-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シン酸の1つまたは2つ以上であり得る。

【0068】

いくつかの態様において、ポリマーは、本明細書において集合的に「PLGA」と呼ばれる、ポリ(乳酸-*c*o-グリコール酸)およびポリ(ラクチド-*c*o-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；および本明細書において「PGA」¹⁰と呼ばれるグリコール酸単位を含むホモポリマー；および本明細書において集合的に「PLA」と呼ばれるポリ-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を含むホモポリマー、を包含するポリエステルであってもよい。いくつかの態様において、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コポリマーおよびこれらの誘導体)が挙げられる。いくつかの態様において、ポリエステルは、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-*c*o-L-リジン)、ポリ(セリンエステル)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)、ポリ[-(4-アミノブチル)-L-グリコール酸]およびこれらの誘導体を包含する。²⁰

【0069】

いくつかの態様において、ポリマーはPLGAである。PLGAは、乳酸とグリコール酸との生体適合性かつ生分解性のコポリマーであり、乳酸：グリコール酸の比によってPLGAの種々の形態が特徴付けられる。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：グリコール酸比を変えることによって調節され得る。いくつかの態様において、本発明に従い使用されるPLGAは、およそ85:15、およそ75:25、およそ60:40、およそ50:50、およそ40:60、およそ25:75、または、およそ15:85の乳酸：グリコール酸比によって特徴付けられる。³⁰

【0070】

いくつかの態様において、ポリマーは1つまたは2つ以上のアクリルポリマーであってもよい。特定の態様において、アクリルポリマーは、例えば、アクリル酸およびメタクリル酸のコポリマー、メチルメタクリラートコポリマー、エトキシエチルメタクリラート、シアノエチルメタクリラート、アミノアルキルメタクリラートコポリマー、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(メチルメタクリラート)、ポリ(無水メタクリル酸)、メチルメタクリラート、ポリメタクリラート、ポリ(メチルメタクリラート)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ラートコポリマー、グリシジルメタクリラートコポリマー、ポリシアノアクリラートおよび上記のポリマーの1つまたは2つ以上を含む組み合わせを包含する。アクリルポリマーは、四級アンモニウム基の含有量の低いアクリルおよびメタクリル酸エステルの十分にポリマー化されたコポリマーを含み得る。⁴⁰

【0071】

いくつかの態様において、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、核酸の負に荷電されたストランドを濃縮および/または保護する能力がある。ポリ(リジン)(Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; 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; Haensler et al., 1993, Biocon⁵⁰

jugate Chem., 4:372)などのアミン含有ポリマーは、生理学的なpHで正に荷電されて核酸とイオン対を形成する。ある態様において、合成ナノ担体はカチオン性ポリマーを含まなくてもよい(または排除してもよい)。

【0072】

いくつかの態様において、ポリマーはカチオン性の側鎖を持つ生分解性ポリエステル(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; Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399)であり得る。これらのポリエステルの例としては、ポリ(L-ラクチド-*c*o-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; 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; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633)が挙げられる。

【0073】

これらのおよび他のポリマーの特性およびそれらの調製方法は当該分野において周知である(例えば、米国特許第6,123,727号; 5,804,178号; 5,770,417号; 5,736,372号; 5,716,404号; 6,095,148号; 5,837,752号; 5,902,599号; 5,696,175号; 5,514,378号; 5,512,600号; 5,399,665号; 5,019,379号; 5,010,167号; 4,806,621号; 4,638,045号; および4,946,929号; 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; Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181参照)。より一般には、特定の好適なポリマーを合成するための種々の方法が、Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386; および米国特許第6,506,577号、同第6,632,922号、同第6,686,446号および同第6,818,732号に記載されている。

【0074】

いくつかの態様において、ポリマーは直鎖状または分枝状ポリマーであり得る。いくつかの態様において、ポリマーはデンドリマーであり得る。いくつかの態様において、ポリマーは実質的に、互いに架橋されていてよい。いくつかの態様において、ポリマーは実質的に架橋を含まなくてよい。いくつかの態様において、ポリマーは架橋ステップを経験せずに本発明に従い使用され得る。合成ナノ担体は、ブロックコポリマー、グラフトコポリマー、前述のおよび他のポリマーのいずれかのブレンド、混合物および/または付加物を含み得ることをさらに理解すべきである。本明細書中に列挙されるポリマーは、本発明に従い使用され得る包括的でない例示的なポリマーのリストを表すものであることを当業者は認識するであろう。

【0075】

いくつかの態様において、合成ナノ担体はポリマー構成成分を含まない。いくつかの態様において、合成ナノ担体は金属粒子、量子ドット、セラミック粒子等を含み得る。いくつかの態様において、非ポリマー合成ナノ担体は、金属原子(例えば金原子)の凝集体などの非ポリマー構成成分の凝集体である。

本発明に従う組成物は、免疫抑制剤などの要素を、保存剤、緩衝剤、食塩水またはリン酸緩衝化食塩水などの薬学的に許容し得る賦形剤と組み合わせて含み得る。組成物は、有用な剤形に到達するように従来の医薬製造および配合技術を使用して作られ得る。ある態様において、免疫抑制剤を含むものなどの組成物は、保存剤と一緒に注射用の滅菌食塩水溶液に懸濁される。

ある態様において、担体として合成ナノ担体を調製するとき、合成ナノ担体に構成成分

10

20

30

40

50

を付着する方法が有用であり得る。構成成分が小さな分子である場合、合成ナノ担体の組み立ての前にその構成成分をポリマーに付着することが有利である場合がある。ある態様において、構成成分をポリマーに付着し、次いでこのポリマー複合体を合成ナノ担体の構築に使用するというよりはむしろ、それらの表面基の使用を通して構成成分を合成ナノ担体に付着させるために使用される表面基を有する合成ナノ担体を調製することも有利である場合がある。

【0076】

特定の態様において、付着は共有結合性リンカーであり得る。ある態様において、本発明に従う免疫抑制剤は、ナノ担体の表面のアジド基とアルキン基を含有する免疫抑制剤との1,3-双極子環状付加反応により、または、ナノ担体の表面のアルキンとアジド基を含有する免疫抑制剤との1,3-双極子環状付加反応により、形成される、1,2,3-トリアゾールリンカーを介して外部表面に共有結合的に付着され得る。かかる環状付加反応は好ましくは、好適なCu(I)リガンドと、Cu(II)化合物を触媒活性なCu(I)化合物に還元するための還元剤と共に、Cu(I)触媒の存在下で行われる。このCu(I)触媒アジド-アルキン環状付加(CuAAC)はまた、クリック反応といわれることもある。

【0077】

加えて、共有結合的連結は、アミドリンカー、ジスルフィドリンカー、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ンカーを含む共有結合性リンカーを含み得る。

アミドリンカーは、免疫抑制剤などの一方の構成成分上のアミンとナノ担体などの第2の構成成分のカルボン酸基との間のアミド結合を介して形成される。リンカー中のアミド結合は、好適に保護されたアミノ酸および活性化されたカルボン酸(N-ヒドロキシクシンイミド活性化エカルボン酸など)との従来のアミド結合形成反応のいずれかを使用して作られ得る。

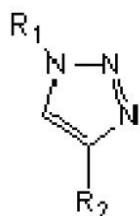
【0078】

ジスルフィドリンカーは、例としてR1-S-S-R2の形態の2つの硫黄原子間のジスルフィド(S-S)結合の形成を介して作られ得る。ジスルフィド結合は、チオール/メルカプタン基(-SH)を含有する構成成分とポリマーまたはナノ担体上の別の活性化チオール基との、または、チオール/メルカプタン基を含有するナノ担体と活性化チオール基を含有する構成成分との、チオール交換によって形成され得る。

【0079】

トリアゾールリンカー、具体的には、下記の形態

【化1】



(式中R₁およびR₂が、いずれかの化学的実体であり得る)の1,2,3-トリアゾールは、ナノ担体などの第1構成成分に付着されたアジドの、免疫抑制剤などの第2構成成分に付着された末端アルキンとの1,3-双極子環状付加反応により作られる。1,3-双極子環状付加反応は、触媒の有無で、好ましくはCu(I)触媒を使用して、行われ、これにより2つの構成成分が1,2,3-トリアゾール官能性を通してつながれる。この化学は、Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002) および Meldal, et al., Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015により詳細に記載され、「クリック」反応またはCuAACと呼ばれることが多い。

10

20

30

40

50

【0080】

ある態様において、ポリマー鎖の末端にアジドまたはアルキン基を含有するポリマーが調製される。このポリマーは次いで、複数のアルキンまたはアジド基がナノ担体の表面上に位置するような様式で合成ナノ担体を調製するのに使用される。代替的に、合成ナノ担体は、別の経路により調製され、その後にアルキンまたはアジド基で官能化されてもよい。構成成分は、アルキン（ポリマーがアジドを含有する場合）またはアジド（ポリマーがアルキンを含有する場合）基のどちらかの存在により調製される。構成成分は次に、触媒の有無で1, 3-双極子環状付加反応を介してナノ担体と反応され、これにより1, 4-二置換1, 2, 3-トリアゾールリンカーを通して構成成分が粒子に共有結合的に付着される。

10

【0081】

チオエーテルリンカーは、例としてR1-S-R2の形態の硫黄-炭素（チオエーテル）結合の形成によって作られる。チオエーテルは、1つの構成成分上のチオール/メルカプタン(-SH)基の、第2構成成分上の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によって作られる。チオエーテルリンカーはまた、1つの構成成分上のチオール/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の構成成分上の電子不足アルケン基へのマイケル付加によっても形成され得る。別的方式において、チオエーテルリンカーは、1つの構成成分上のチオール/メルカプタン基と、第2構成成分上のアルケン基とのラジカルチオール-エン反応により調製され得る。

20

【0082】

ヒドラゾンリンカーは、1つの構成成分上のヒドラジド基と、第2構成成分上のアルデヒド/ケトン基との反応によって作られる。

ヒドラジドリンカーは、1つの構成成分上のヒドラジン基と第2構成成分上のカルボン酸基との反応により形成される。かかる反応は一般に、カルボン酸が活性化試薬で活性化される場合のアミド結合の形成と同様の化学を使用して行われる。

イミンまたはオキシムリンカーは、1つの構成成分上のアミンまたはN-アルコキシアミン（またはアミノオキシ）基と、第2構成成分上のアルデヒドまたはケトン基との反応により形成される。

【0083】

30

尿素またはチオ尿素リンカーは、1つの構成成分上のアミン基と、第2構成成分上の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り調製される。

アミジンリンカーは、1つの構成成分上のアミン基と、第2構成成分上のイミドエステル基との反応により調製される。

アミンリンカーは、1つの構成成分上のアミン基と、第2構成成分上のハロゲン化物、エポキシドまたはスルホナート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り作られる。代替的に、アミンリンカーはまた、1つの構成成分上のアミン基と第2の構成成分上のアルデヒドまたはケトン基との、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムなどの好適な還元試薬を使用した還元アミノ化により作られてもよい。

40

【0084】

スルホアミドリンカーは、1つの構成成分上のアミン基と、第2構成成分上のスルホニルハライド（スルホニルクロリド等）基との反応によって作られてもよい。

スルホンリンカーは、求核基のビニルスルホンへのマイケル付加により作られる。ビニルスルホンまたは求核基のいずれかは、ナノ担体の表面上にあってもよいし、構成成分に付着されていてもよい。

構成成分はまた、非共有結合性複合化法を介してナノ担体に複合化されていてもよい。例えば、負に荷電された免疫抑制剤は、静電吸着を通して正に荷電されたナノ担体に複合化されてもよい。金属リガンドを含有する構成成分はまた、金属-リガンド錯体を介して金属錯体を含有するナノ担体に複合化されてもよい。

50

【0085】

ある態様において、構成成分は、合成ナノ担体の組み立ての前に、ポリマー、例えばポリ乳酸 - ブロック - ポリエチレングリコールに付着されてもよいし、合成ナノ担体がその表面上に反応性のまたは活性化可能な基を有するように形成されてもよい。後者の場合、構成成分は、合成ナノ担体の表面によって提示される付着化学と適合可能な基を有するように調製されてもよい。他の態様において、ペプチド構成成分は、好適なリンカーを使用してVLPまたはリポソームに付着されてもよい。リンカーは、2つの分子同士を連結し得る化合物または試薬である。一態様において、リンカーは、Hermanson 2008に記載のホモ二官能性またはヘテロ二官能性試薬であってもよい。例えば、表面上にカルボキシル基を含有するVLPまたはリポソーム合成ナノ担体を、EDCの存在下でホモ二官能性リンカーや、アジピン酸ジヒドラジド(ADH)で処置してADHリンカーを有する対応する合成ナノ担体を形成し得る。結果としてもたらされるADHにつながれた合成ナノ担体は次いで、ナノ担体上のADHリンカーや他の端部を介して酸基を含有するペプチド構成成分と複合化されて対応するVLPまたはリポソームペプチド複合体を生成する。

【0086】

利用可能な複合化方法の詳細な記載に関しては、Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008を参照のこと。共有結合性の付着に加えて、構成成分は、予め形成された合成ナノ担体への吸着によって付着されてもよいし、合成ナノ担体形成中のカプセル化によって付着されてもよい。

【0087】

本明細書で提供されるいづれかの免疫抑制剤は、提供される方法または組成物において使用され得、いくつかの態様においては、合成ナノ担体に付着されてもよい。免疫抑制剤としては、スタチン；ラパマイシンまたはラパマイシン類縁体などのmTORインヒビター；TGF-シグナル剤；TGF-受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)インヒビター；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インヒビター；P38インヒビター；NF-インヒビター；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インヒビターなどのホスホジエステラーゼインヒビター；プロテアソームインヒビター；キナーゼインヒビター；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；グルココルチコイド；レチノイド；サイトカインインヒビター；サイトカイン受容体インヒビター；サイトカイン受容体アクチベーター；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インヒビター；カルシニューリンインヒビター；ホスファターゼインヒビターおよび酸化ATPが挙げられるがこれらに限定されない。免疫抑制剤としてはまた、IDO、ビタミンD3、シクロスボリンA、アリールハイドロカーボン受容体インヒビター、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、ニフルミン酸、エストリオール、トリポリド、インターロイキン(例えばIL-1、IL-10)、シクロスボリンA、サイトカインまたはサイトカイン受容体を標的とするsiRNA、等が挙げられる。

【0088】

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)、LIPEX(登録商標))が挙げられる。

mTORインヒビターの例としては、ラパマイシンおよびその類縁体(例えば、CCL-779、RAD001、AP23573、C20-メタリルラパマイシン(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

10

20

30

40

50

)) 、 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 、 テムシリムスおよびWYE-354 (Selleck 、 Houston 、 TX 、 USA から入手可能) が挙げられる。

【 0089 】

TGF - シグナル剤の例としては、 TGF - リガンド (例えは、アクチビン A 、 GDF1 、 GDF11 、骨形態形成タンパク質、ノーダル、 TGF -) およびそれらの受容体 (例えは、 ACVR1B 、 ACVR1C 、 ACVR2A 、 ACVR2B 、 BMPR2 、 BMPR1A 、 BMPR1B 、 TGF RI 、 TGF RII) 、 R - SMADS / c 10 o - SMADS (例えは、 SMAD1 、 SMAD2 、 SMAD3 、 SMAD4 、 SMAD5 、 SMAD8) およびリガンドインヒビター (例えは、 フォリストチン、ノギン、コルジン、 DAN 、 レフティ、 LTBP1 、 THBS1 、 デコリン) が挙げられる。

ミトコンドリア機能のインヒビターの例としては、アトラクチロシド (ジカリウム塩) 、ボングクレキック酸 (トリアンモニウム塩) 、カルボニルシアニド m - クロロフェニルヒドラゾン、カロボキシアトラクチロシド (例えはアトラクチリス属から) 、 CGP - 37157 、 (-) - デゲエリン (例えは Mundulea sericea から) 、 F16 、ヘキソキナーゼ IIVD A C 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 (例えは Streptomyces fulvissimus から) (EMD4Biosciences 、 USA) が挙げられる。

【 0090 】

P38 インヒビターの例としては、 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 - ピリミジニル) - 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。

NF (例えは、 - -) インヒビターの例としては、 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、 BAY11-7082 、 BAY11-7085 、 CAPE (カフェイン酸フェネチルエステル) 、ジエチルマレート、 I KK - 2 インヒビタ - I V 、 IMD0354 、ラクタシスチン、 MG-132 [Z - Leu - Leu - Leu - CHO] 、 NF - B 活性化インヒビター I II 、 NF - B 活性化インヒビター I I 、 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 、 R0106-9920 、ロカグラミド、ロカグラミド A L 、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) およびウェデロラクトンが挙げられる。

【 0091 】

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。

プロスタグランジン E 2 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。

ホスホジエステラーゼインヒビター (非選択的および選択的インヒビター) 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、ビンポセチン、 EHNA (エリスロ - 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 (PERFAN (商標)) 、ミルリノン、レボシメンダン (levosimendan) 、メセンブリン、イブジラスト、ピクラミラスト、ルテオリン、ドロタベリン、ロフルミラスト (DAXAS (商標) 、 DALIRESP (商標)) 、シルデナフィル (REVATIO N (登録商標) 、 VIAGRA (登録商標)) 、タダラフィル (ADCIRCA (登録商標) 、 CIALIS (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。

【 0092 】

10

20

30

40

50

プロテアソームインヒビターの例としては、ボルテゾミブ、ジスルフィラム、エピガロカテキン-3-ガラートおよびサリノスボラミドAが挙げられる。

キナーゼインヒビターの例としては、ベバシズマブ、BIBW2992、セツキシマブ(ERBITUX(登録商標))、イマチニブ(GLEEVEC(登録商標))、トラスツズマブ(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))、ペガブタニブ、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、パゾパニブおよびムブリチニブが挙げられる。

【0093】

グルコ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)、コルチゾンアセタート、ブレドニゾン、ブレドニゾロン、メチルブレドニゾロン、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、フルドロコルチゾンアセテート、デオキシコルチコステロンアセテート(DOCA)およびアルドステロンが挙げられる。

レチノイドの例としては、レチノール、レチナール、トレチノイン(レチノイン酸、RETIN-A(登録商標))、イソトレチノイン(ACCUTANE(登録商標)、AMNESTEEM(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。

【0094】

サイトカインインヒビターの例としては、IL1ra、IL1受容体アンタゴニスト、IGFBP、TNF-BF、ウロモジュリン、アルファ-2-マクログロブリン、シクロスボリンA、ペニ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。

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アンタゴニストIII、G335およびT0070907(EMD4Biosciences、USA)が挙げられる。

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、クロフィブレート、GW1929、GW7647、L-165,041、LY171883、PPARアクチベーター、Fmoc-Leu、トログリタゾンおよびWY-14643(EMD4Biosciences、USA)が挙げられる。

【0095】

ヒストンデアセチラーゼインヒビターの例としては、トリコスタチンA、環状テトラペチド(トラポキシンBなど)およびデブシペチドなどのヒドロキサム酸(またはヒドロキサメート)、ベンズアミド、求電子性ケトン、酪酸フェニルおよびバルプロ酸などの脂肪族酸化合物、ボリノスタット(SAHA)、ベリノスタット(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)、C1994およびモセチノスタット(MGCD0103)などのベンズアミド、ニコチニアミド、NADの誘導体、ジヒドロクマリン、ナフトピラノンおよび2-ヒドロキシナファルデヒド(hydroxy naphthaldehyde)が挙げられる。

【0096】

カルシニューリンインヒビターの例としては、シクロスボリン、ピメクロリムス、ボクロスボリンおよびタクロリムスが挙げられる。

ホスファターゼインヒビターの例としては、BN82002ヒドロクロリド、CP-91149、カリクリンA、カンタリジン酸、カンタリジン、サイバーメスリン、エチル-3,4-デホスタチン、フォストリエシンナトリウム塩、MAZ51、メチル-3,4-デホスタチン、NSC95397、ノルカンタリジン、prorocentrum concavumからの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、種々のホスファートインヒビター混液、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インヒビータンパク質、タンパク質ホスファターゼ2A1、タンパク質ホスファ

10

20

30

40

50

ターゼ 2 A 2 およびオルトバナジン酸ナトリウムが挙げられる。

【 0 0 9 7 】

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、本明細書に記載される治療用高分子もまた合成ナノ担体に付着されている。他の態様において、治療用高分子はいずれの合成ナノ担体にも付着されていない。これらの場面のいずれかのいくつかの態様において、治療用高分子は、治療用高分子そのものまたはそれらの断片または誘導体の形態で送達され得る。

治療用高分子は、治療用タンパク質または治療用ポリヌクレオチドを包含し得る。治療用タンパク質としては、点滴可能な治療用のタンパク質、酵素、酵素補助因子、ホルモン、血液凝固因子、サイトカインおよびインターフェロン、成長因子、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体（例えば補充治療として対象に投与されるもの）およびポンペ病に関連するタンパク質（例えば酸性グルコシダーゼアルファ、r h G A A（例えばミオザイムおよびルミザイム（Genzyme））が挙げられるが、これらに限定されない。治療用タンパク質はまた、血液凝固カスケードに関与するタンパク質も包含する。治療用タンパク質としては、第 V I I I 因子、第 V I I 因子、第 I X 因子、第 V 因子、フォン・ヴィレブランド因子、フォン・ヘルデブラント因子、組織プラスミノーゲンアクチベーター、インスリン、成長ホルモン、エリスロポエチンアルファ、V E G F、トロンボポエチン、リゾチーム、アンチトロンビン等が挙げられるが、これらに限定されない。治療用タンパク質はまた、レプチンおよびアディポネクチンなどのアディポカインも包含する。治療用タンパク質の他の例は以下に記載し、および本明細書中に別記するとおりである。

【 0 0 9 8 】

リソソーム蓄積障害を有する対象の酵素補充治療に使用される治療用タンパク質の例としては、ゴーシェ病の処置のためのイミグルセラーゼ（例えばCEREZYME（商標））、ファブリー病の処置のための a - ガラクトシダーゼ A（a - g a l A）（例えば、アガルシダーゼベータ、FABRYZYME（商標））、ポンペ病の処置のための酸性 グルコシダーゼ（G A A）（例えば、酸性グルコシダーゼアルファ、LUMIZYME（商標）、MYOZYME（商標））、ムコ多糖症の処置のためのアリールスルファターゼ B（例えば、ラロニダーゼ、ALDURA ZYME（商標）、イデュルスルファーゼ、ELAPRASE（商標）、アリールスルファターゼ B、NAGLAZYME（商標））、ペグロチカーゼ（KRYSTEXXA）およびペグシチカーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 9 】

酵素の例としては、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、グリコシダーゼ、アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ヘパリナーゼ、ヘパラナーゼ、リジンおよびリガーゼが挙げられる。

治療用タンパク質はまた、いずれかの細菌性の、真菌性の、またはウイルス性の供給源から単離されるか、または誘導された酵素、毒素、または、他のタンパク質またはペプチドを包含してもよい。

【 0 1 0 0 】

ホルモンの例としては、メラトニン（N - アセチル - 5 - メトキシトリプトアミン）、セロトニン、チロキシン（またはテトラヨードチロニン）（甲状腺ホルモン）、トリヨードチロニン（甲状腺ホルモン）、エピネフリン（またはアドレナリン）、ノルエピネフリン（またはノルアドレナリン）、ドーパミン（またはプロラクチン阻害ホルモン）、抗ミュラー管ホルモン（またはミュラー管阻害因子またはホルモン）、アディポネクチン、副腎皮質刺激ホルモン（またはコルチコトロピン）、アンジオテンシノーゲンおよびアンジオテンシン、抗利尿性ホルモン（またはバソプレシン、アルギニンバソプレシン）、心房性ナトリウム利尿ペプチド（またはアトリオペプチド）、カルシトニン、コレシストキニン、コルチコトロピン放出ホルモン、エリスロポエチン、卵胞刺激ホルモン、ガストリシン、グレリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド（G L P - 1）、G I P、ゴナドトロピン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ヒト総毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤性ラ

10

20

30

40

50

クトゲン、成長ホルモン、インヒビン、インスリン、インスリン様成長因子（またはソマトメジン）、レプチン、黄体形成ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、オレキシン、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、プロラクチン、レラキシン、セクレチン、ソマトスタチン、トロンボポエチン、甲状腺刺激ホルモン（またはチロトロピン）、チロトロピン放出ホルモン、コルチゾール、アルドステロン、テストステロン、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、ジヒドロテストステロン、エストラジオール、エストロン、エストリオール、プロゲステロン、カルシトリオール（1,25-ジヒドロキシビタミンD3）、カルシジオール（25-ヒドロキシビタミンD3）、プロスタグランジン、ロイコトリエン、プロスタサイクリン、トロンボキサン、プロラクチン放出ホルモン、リポトロピン、脳性ナトリウム利尿ペプチド、神経ペプチドY、ヒスタミン、エンドセリン、膵ポリペプチド、レニンおよびエンケファリンが挙げられる。

10

[0 1 0 1]

血液または血液凝固因子の例としては、第Ⅰ因子（フィブリノゲン）、第Ⅱ因子（プロトロンビン）、組織因子、第Ⅴ因子（プロアクセレリン、不安定因子）、第ⅧⅡⅠ因子（安定因子またはプロコンベルチン）、第ⅧⅡⅠⅠ因子（抗血友病性グロブリン）、第Ⅸ因子（クリスマス因子または血漿トロンボプラスチン構成成分）、第Ⅹ因子（スチュアート・プローワー因子）、第Ⅹa因子、第ⅩⅠ因子、第ⅩⅡ因子（ハーゲマン因子）、第ⅩⅡⅠ因子（フィブリン安定化因子）、フォン・ヴィレブランド因子、プレカリクレイン（フレッチャー因子）、高分子量キニノゲン（HMWK）（フィッツジェラルド因子）、フィブロネクチン、フィブリン、トロンビン、アンチトロンビンⅢ、ヘパリン補助因子Ⅱ、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関係プロテアーゼインヒビター（ZPI）、プラスミノーゲン、アルファ2-アンチプラスミン、組織プラスミノーゲンアクチベーター（tPA）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター-1（PAI1）、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター-2（PAI2）、がんプロコアグラントまたはエポエチンアルファ（Epogen、Procrit）が挙げられる。

20

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

[0 1 0 2]

30

成長因子の例としては、アドレノメデュリン（AM）、アンジオポエチン（Ang）、自己分泌型細胞運動刺激因子、骨形成タンパク質（BMP）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、上皮増殖因子（EGF）、エリスロポエチン（EPO）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、増殖分化因子-9（GDF9）、肝細胞増殖因子（HGF）、肝がん由来増殖因子（HDGF）、インスリン様増殖因子（IGF）、マイグレーション刺激因子、ミオスタチン（GDF-8）、神経成長因子（NGF）および他のニューロトロфин、血小板由来増殖因子（PDGF）、トロンボポエチン（TPO）、トランスフォーミング増殖因子アルファ（TGF-）、トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF-）、腫瘍壞死因子アルファ（TNF-）、血管内皮増殖因子（VEGF）、Wntシグナル経路、胎盤増殖因子（PIGF）、（ウシ胎児ソマトトロピン）（FBS）、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6 および IL-7 が挙げられる。

40

[0 1 0 3]

モノクローナル抗体の例としては、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アダリムマブ、アデカツムマブ、アフェリモマブ、アフツズマブ、アラシズマブペゴル(Alacizumab pegol)、ALD、アレムツズマブ、アルツモマブペンテテート(Altumomab pentetate)、アナツモマブマフェナトックス(Anatumomab mafenatox)、アンルキンズマブ、抗胸腺細胞グロブリン、アポリズマブ、アルシツモマブ、アセリズマブ(Aselizumab)、アトリズマブ(トリリズマブ)、アトロリムマブ(Atorolimumab)、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツ

50

キシマブ、ベクトモマブ(Bectumomab)、ペリムマブ、ベンラリズマブ、ペルチリムマブ、ベシレソマブ、ベバシズマブ、ビシロマブ、ビバツズマブメルタンシン(Bivatuzumab mertansine)、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、カントツズマブメルタンシン、カプロマブペンデチド、カツマキソマブ、セデリズマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、シタツズマブボガトクス(Citatumab bogatox)、シクスツムマブ、クレノリキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、コナツムマブ、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デノスマブ、デツモマブ、ドルリモマブアリトクス(Dorlimomab aritox)、ドルリキシズマブ(Dorlizumab)、エクロメキシマブ(Ecromeximab)、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エフングマブ(Efungumab)、エロツズマブ、エルシリモマブ(Elsilimomab)、エンリモマブペゴル、エピツモマブシツキセタン(Epitumomab cituxetan)、エプラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ(Ertumaxomab)、エタラシズマブ、エクスピビルマブ(Exbivirumab)、

【0104】

ファノレソマブ、ファラリモマブ(Faralimomab)、ファルレツズマブ、フェルビズマブ(Fevalizumab)、フェザキヌマブ、フィジツムマブ(Figitumumab)、フォントリズマブ、フォラビルマブ(Foravirumab)、フレソリムマブ(Fresolimumab)、ガリキシマブ、ガンテネルマブ、ガンビリモマブ、ゲムツマブオゾガマイシン、GC1008、ギレンツキシマブ、グレムバツムマブベドチン(Glembatumumab vedotin)、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ(Gomiliximab)、イバリズマブ、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ(Igovomab)、イムシロマブ、インフリキシマブ、インテツムマブ(Intetumumab)、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ、イラツムマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ、レブリキズマブ、レマレソマブ(Lemalesomab)、レルデリムマブ、レキサツムマブ、リビビルマブ(Libivirumab)、リンツズマブ、ロボツズマブメルタンシン(Lorvotuzumab mertansine)、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マパツムマブ、マスリモマブ(Maslimomab)、マツズマブ、メボリズマブ、メテリムマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ(Minretumomab)、ミツモマブ、モロリムマブ(Morolimumab)、モタビズマブ、ムロモナブ-CD3、ナコロマブタフェナトクス(Nacolomab tafenatox)、ナブツモマブエスタフェナトクス(Naptumomab estafenatox)、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネレリモマブ(Nerelimomab)、ニモツズマブ、ノフェツモマブメルペンタン(Nofetumomab merpentan)、オクレリズマブ、オデユリモマブ(Odulimomab)、オファツムマブ、オララツマブ(Olaratumab)、オマリズマブ、オポルツズマブモナトクス(Oportuzumab monatox)、オレゴボマブ、オテリキシズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、パノバクマブ、パスコリズマブ(Pascolizumab)、ペムツモマブ、ペルツズマブ、ペキセリズマブ、

【0105】

ベンツモマブ(Pintumomab)、ブリリキシマブ、ブリツムマブ(Pritumumab)、ラフィビルマブ(Rafivirumab)、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レガビルマブ、レスリズマブ、リロツムマブ、リツキシマブ、ロバツムマブ(Robatumumab)、ロンタリズマブ、ロベリズマブ、ルプリズマブ、サツモマブペンデチド(Satumomab pendetide)、セビルマブ(Sevumab)、シブロツズマブ(Sibrotuzumab)、シファリムマブ、シルツキシマブ、シブリズマブ、ソラネズマブ、ソネプシズマブ(Sonepcizumab)、ソンツズマブ(Sontuzumab)、スタムルマブ、スレソマブ、タカツズマブテトラキセタン(Tacatumab tetraxetan)、タドシズマブ、タリズマブ、タネズマブ、タブリツモマブペプトクス(Taplitumomab paptotox)、テフィバズマブ、テリモマブアリトクス(Telimumab aritox)、テナツモマブ(Tenatumomab)、テネリキシマブ、テプリズマブ、チシリムマブ(トレメリムマブ)、チガツズマブ、トリリズマブ(アトリズマブ)、トラリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ(Tuvirumab)、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バパリキシマブ(Vapaliximab)、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ビシリズマブ、ボロシキシマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ジラリムマブ(Ziralimumab)およびズリモマブアリタオクス(Zolimomab aritox)が挙げられる。モノクローナル抗体はさらに、抗TNF-抗体を包含する。

10

20

30

40

50

【0106】

点滴治療または注射可能治療用タンパク質の例としては、例えば、トリリツマブ (Roch 10 e/Actemra (登録商標))、アルファ-1アンチトリプシン (Kamada/AAT)、ヘマタイト (登録商標) (AffymaxおよびTakeda、合成ペプチド)、アルブインターフェロンアルファ-2b (Novartis/Zalbin (商標))、ルシン (登録商標) (Pharming Group、C1イシビター補充治療)、テサモレリン (Theratechnologies/Egrifta、合成成長ホルモン放出因子)、オクレリズマブ (Genentech、RocheおよびBiogen)、ベリムバブ (GlaxoSmithKline/Benlysta (登録商標))、ペグロチカーゼ (Savient Pharmaceuticals/Krystexxa (商標))、ペグシチカーゼ、タリグルセラーゼアルファ (Protalix/Uplyso)、アガルシダーゼアルファ (Shire/Replagal (登録商標))、ベラグルセラーゼアルファ (Shire) およびキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) が挙げられる。

追加の治療用タンパク質としては、例えば、Fc融合タンパク質などの遺伝子操作タンパク質、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ナノボディ、抗原結合タンパク質、抗体フラグメントおよび抗体薬物複合体などのタンパク質複合体が挙げられる。

【0107】

治療用ポリヌクレオチドとしては、ペガブタニブ (マクゲン、ペグ化された抗VEGFアブタマー) などの核酸アブタマー、アンチセンスポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド (例えば、抗ウイルス薬物フォミビルセン (Fomivirsen) またはミポメルセン、コレステロール値を低減させるためにアポリボタンパク質BのためのメッセンジャーRNAを標的にするアンチセンス治療剤) などのアンチセンス治療剤；低分子干渉RNA (siRNA) (例えば、RNAiを極めて高い効力で媒介する25~30塩基対の非対称二重鎖RNAである、ダイサー基質siRNA分子 (DsiRNA))；または米国特許出願第2013/0115272号 (Fougerolles et al.) および公開された米国特許出願第2012/0251618号 (Schrum et al.) に開示されたもののような修飾型メッセンジャーRNA (mmRNA) が挙げられるが、これらに限定されない。

本発明の側面に従って有用な追加の治療用高分子は、当業者には明らかであり、本発明はこの点において限定されない。

【0108】

いくつかの態様において、治療用高分子または免疫抑制剤などの構成成分は、単離されてもよい。「単離されている」は、その本来の環境から分離されて、その同定または使用を許すのに充分な分量で存在する要素である。これは例えば、その要素が、(i)発現クローニングによって選択的に產生され得るか、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ということを意味する。単離された要素は、実質的に純粋であってもよいが、純粋である必要はない。単離された要素は医薬調製物中で薬学的に許容し得る賦形剤と混和されてもよいので、要素は、調製物にごくわずかな重量割合で含まれてもよい。要素はそれでもなお、生体系において関連され得る物質から分離された、すなわち、他の脂質またはタンパク質から単離されたという点で単離されている。本明細書で提供される要素のいずれも、単離されて組成物に包含されても、単離された形態で方法において使用されてもよい。

【0109】

D. 組成物を作りおよび使用する方法ならびに関係する方法

本発明のある側面は、本明細書で提供される投与の方法のためのプロトコルを決定することに関する。プロトコルは、治療用高分子および免疫抑制剤の投与の頻度、用量および他の側面を変更し、その後にかかる変更に基づいて、治療用高分子特異的なものなどのCD4+制御性T細胞の数または割合 (または比)、および/またはいずれかの望ましいまたは望ましくない免疫応答を査定することによって、決定され得る。本発明の実行のための好みのプロトコルは、治療用高分子特異的CD4+制御性T細胞などのCD4+制御性T細胞の数または割合 (または比) を増大させる。

【0110】

合成ナノ担体は当該分野において知られている種々多様な方法を使用して調製され得る

10

20

30

40

50

。例えば、合成ナノ担体は、ナノ沈殿、流体チャンネルを使用するフローフォーカシング、噴霧乾燥、シングルおよびダブルエマルション溶媒蒸留、溶媒抽出、相分離、ミリング、マイクロエマルション手順、ミクロ加工、ナノ加工、犠牲層、単純および複合コアセルベーションなどの方法、および、当業者に周知の他の方法によって形成され得る。代替的または追加的に、単分散半伝導体または伝導性、磁性、有機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; Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843)。追加の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; Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755; 米国特許第5578325号および6007845号; P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6): 843-853 (2010)を参照)。 10

【0111】

必要に応じて、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)が挙げられるが、これらに限定されない種々の方法を使用して、種々の材料を合成ナノ担体中にカプセル化してもよい。材料を合成ナノ担体中にカプセル化するのに好適な、米国特許第6,632,671号 (Unger、2003年10月14日発行) に開示された方法を包含するが、これらに限定されない他の方法を使用してもよい。 20

【0112】

特定の態様において、合成ナノ担体は、ナノ沈殿プロセスまたは噴霧乾燥によって調製される。合成ナノ担体の調製に使用される条件は、望ましいサイズまたは特性 (例えば、疎水性、親水性、外部形態学、「粘着性」、形状、等) の粒子を産出するために変え得る。合成ナノ担体の調製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、等) は、合成ナノ担体に付着すべき材料および/またはポリマーマトリックスの組成に依存し得る。 30

上記の方法のいずれかによって調製される合成ナノ担体が望ましい範囲を外れるサイズ範囲を有する場合、合成ナノ担体は、例えば、篩いを使用して分粒されてもよい。

【0113】

合成ナノ担体の要素 (すなわち構成成分) は、例えば、1つまたは2つ以上の共有結合によって合成ナノ担体全面的に付着されてもよいし、1つまたは2つ以上のリンカーを使用して付着されてもよい。合成ナノ担体を官能化する追加の方法は、公開された米国特許出願第2006/0002852号 (Saltzman et al.) 、公開された米国特許出願第2009/0028910号 (DeSimone et al.) または公開された国際特許出願WO/2008/127532AI (Murthy et al.) から適合されてもよい。 40

代替的または追加的に、合成ナノ担体は、直接的に、または非共有結合的相互作用を介して間接的に、構成成分に付着されてよい。非共有結合的な態様において、非共有結合的付着は、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-双極子相互作用および/またはそれらの組み合わせを包含するが、それらに限定されない、非共有結合的相互作用により媒介される。かかる付着は、合成ナノ担体の外部表面または内部表面上に配列されてもよい。 50

る態様において、カプセル化および／または吸収が付着の形態である。ある態様において、合成ナノ担体は、同じビヒクルまたは送達系中で混和することによって抗原と組み合わされてもよい。

【0114】

本明細書で提供される組成物は、無機または有機緩衝剤（例えば、リン酸、カルボン酸、酢酸またはクエン酸のナトリウムまたはカリウム塩）およびpH調節剤（例えば、塩酸、水酸化ナトリウムまたはカリウム、クエン酸または酢酸の塩、アミノ酸およびそれらの塩）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、アルファ-トコフェロール）、界面活性物質（例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン9-10ノニルフェノール、デオキシコール酸ナトリウム）、溶解および／または冷凍／凍結乾燥安定剤(cryo/lyo stabilizer)（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）、浸透圧調節剤（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、ポリジメチルシロゾン(polydimethylsilozone)）、保存剤（例えば、チメロサール、2-フェノキシエタノール、EDTA）、高分子安定剤および粘度調節剤（例えば、ポリビニルピロリドン、ポロキサマー488、カルボキシメチルセルロース）ならびに共溶媒（例えば、グリセロール、ポリエチレングリコール、エタノール）を含んでいてもよい。

【0115】

本発明に従う組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤を含んでもよい。組成物は、有用な剤形に到達するように従来の医薬製造および配合技術を使用して作られ得る。本発明の実行における使用に好適な技術は、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.; and Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstoneに見出され得る。ある態様において、組成物は保存剤と一緒に注射用滅菌食塩水溶液中に懸濁される。

本発明の組成物はいずれかの好適な様式で作り得、本発明は本明細書に記載される方法を使用して生成され得る組成物になんら限定されないということを理解すべきである。適切な製造方法の選択は、関連している具体的な部位の性質に対する注意を要する場合がある。

【0116】

いくつかの態様において、組成物は、滅菌条件下で製造されるか、または最終的に滅菌される。このことは、結果としてもたらされる組成物が滅菌され、および非感染性であることを確実にし得、こうして非滅菌の組成物と比較したとき安全性を改善する。このことは、とりわけ組成物を受ける対象が免疫欠如を有する、感染症を患う、および／または、感染されやすいときには、価値のある安全対策を提供する。いくつかの態様において、組成物は凍結乾燥されて、製剤戦略に依存して懸濁液中で、または凍結乾燥粉末として、活性を失うことなく長期間保管されてもよい。

【0117】

本発明に従う投与は、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、経粘膜、経皮(transdermal)、経皮(transcutaneous)または皮内経路を包含するが、これらに限定されない種々の経路によってよい。好ましい態様において、投与は皮下経路の投与を介する。本明細書で参照される組成物は、従来の方法を使用して、投与、いくつかの態様において併用投与のために製造され、および調製され得る。

本発明の組成物は、本明細書中に別記した有効量などの有効量で投与され得る。剤形の用量は、本発明に従い、変化する量の免疫抑制剤および／または治療用高分子を含有してよい。剤形中に存在する免疫抑制剤および／または治療用高分子の量は、治療用高分子および／または免疫抑制剤の特質、遂行されるべき治療効果ならびに他のかかるパラメータに従い変化されられ得る。ある態様において、剤形中に存在すべき免疫抑制剤および／または治療用高分子の最適な治療量を確立するために、用量範囲の研究を行い得る。ある態様において、免疫抑制剤および／または治療用高分子は、対象への投与の際、治療用高分子

10

20

30

40

50

子に対する寛容原性免疫応答を発生するのに有効な量で剤形中に存在する。好ましい態様において、免疫抑制剤および/または治療用高分子は、対象に併用投与されるときなど、CD4+制御性T細胞の產生または発達を増強させる有効量で剤形中に存在する。対象における従来の用量範囲の研究および技術を使用して、望ましい免疫応答を発生させるのに有効な免疫抑制剤および/または治療用高分子の量を決定することが可能であり得る。剤形は、種々の頻度で投与され得る。

【0118】

いくつかの態様において、合成ナノ担体に付着されたものなどの免疫抑制剤と治療用高分子との投与は、例えば治療用高分子のその後のさらなる投与の前に、行われる。

本開示の別の側面はキットに関する。いくつかの態様において、キットは、いくつかの態様において合成ナノ担体に付着されている、免疫抑制剤、および治療用高分子を含む。免疫抑制剤および治療用高分子は、キットにおいて別個の容器内に含有され得る。いくつかの態様において、容器はバイアルまたはアンプルである。いくつかの態様において、治療用高分子または免疫抑制剤は、容器とは別の溶液内に含有されて、治療用高分子または免疫抑制剤がその後の時点で容器に加えられるようになされていてもよい。好ましい態様において、治療用高分子は、投与前に免疫抑制剤とともに同時処方されない。いくつかの態様において、治療用高分子または免疫抑制剤は、それぞれ別の容器中に凍結乾燥された形態であって、それらがその後の時点で再構成されるようになされていてもよい。いくつかの態様において、キットはさらに、再構成、混合、投与、等のための使用説明書を含む。いくつかの態様において、使用説明書は本明細書に記載された方法の記載を包含する。使用説明書は、例えば印刷されたインサートまたはラベルのような、いずれか好適な形態であってよい。いくつかの態様において、キットはさらに、1つまたは2つ以上のシリジまたは免疫抑制剤および治療用高分子を投与するための他の手段を含む。

【0119】

例

例1：ポリマー-ラパマイシン複合体を含有するポリマーナノ担体（予言的）

P L G A - ラパマイシン複合体の調製：

酸末端基を有するP L G Aポリマー（7525 DLG1A、酸価0.46mmol/gで、Lake shore Biomaterials; 5g、2.3mmol、1.0当量）を30mLのジクロロメタン（DCM）に溶解する。N,N-ジシクロヘキシカルボジイミド（1.2当量、2.8mmol、0.57g）を加え、続いてラパマイシン（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）を添加する。混合物を2日間rtで攪拌する。次いで混合物をろ過し、不溶性ジシクロヘキシル尿素を除去する。ろ液を約10mLの体積まで濃縮し、100mLのイソプロピルアルコール（IPA）に添加し、P L G A - ラパマイシン複合体を沈殿させる。IPA層が除去され、次いでポリマーを50mLのIPAおよび50mLのメチルt-ブチルエーテル（MTBE）で洗浄する。次いでポリマーを、2日間35の真空下で乾燥させ、P L G A - ラパマイシンを白色固体（約6.5g）として得る。

【0120】

以下のようにP L G A - ラパマイシンを含むナノ担体を調製する：

以下のようにナノ担体形成のための溶液を調製する：

溶液1：塩化メチレン中の100mg/mLのP L G A - ラパマイシン。溶液を、純粋な塩化メチレン中にP L G A - ラパマイシンを溶解することにより調製する。溶液2：塩化メチレン中の100mg/mLのP L A - P E G。溶液を、純粋な塩化メチレン中にP L A - P E Gを溶解することにより調製する。溶液3：100mMのpH8のリン酸緩衝液中の50mg/mLのポリビニルアルコール。

一次油中水エマルションをまず調製する。W1/O1は、小型圧力チューブ内に溶液1（0.75mL）および溶液2（0.25mL）を組み合わせ、Branson Digital Sonifier 250を使用して40秒間50%の振幅で超音波処理することによって調製する。W1/O1/W2エマルションを70mMのpH8のリン酸緩衝溶液（30mL）を含有するビ

10

20

30

40

50

一カ一に加え、室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させ、ナノ担体を形成させる。ナノ担体の一部は、ナノ担体の懸濁液を遠心分離管に移し、75600×gで35分間4で遠心分離し、上清を除去し、リン酸緩衝生理食塩水でペレットを再懸濁することによって洗浄する。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLのナノ担体の最終分散のためにペレットをリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁する。

【0121】

例2：ラパマイシンを含有する金ナノ担体(AuNC)の調製(予言的)

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)の溶液を室温で終夜攪拌する。不溶性ジシクロヘキシル尿素をろ過により除去し、ろ液をイソプロピルアルコール(IPA)に添加し、PEG-ジスルフィド-ジ-ラパマイシンエステルを沈殿させ、IPAで洗浄し、乾燥させる。次いでポリマーを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、PEGジスルフィドをチオールPEGラパマイシンエステル(HS-PEG-ラパマイシン)へ還元させる。得られたポリマーを、IPAから沈殿により回収し、上記のとおり乾燥させ、¹H NMRおよびGPCにより分析する。

【0122】

AuNC(AuNC)の形成：

1mMのHAuCl₄の500mLの水溶液を、コンデンサーを備えた1Lの丸底フラスコ中で激しく攪拌しながら10分間加熱還流する。次いで40mMのクエン酸三ナトリウムの50mLの溶液を急速に攪拌溶液に添加する。得られた深いワインレッドの溶液を25~30分間還流で保持し、熱を回収し、溶液を室温に冷却する。次いで溶液を0.8μmのメンブレンフィルターでろ過してAuNC溶液を得る。AuNCは、可視分光法および透過電子顕微鏡を使用することによって特徴付けられる。AuNCは約20nmの径があり、520nmで吸収ピークを有するクエン酸によってキャップされる。

【0123】

AuNCとHS-PEG-ラパマイシンとの複合体：

HS-PEG-ラパマイシン(10mMのpH9.0の炭酸緩衝液中で10μl)150μlの溶液を径20nmのクエン酸でキャップした金ナノ担体(1.16nM)1mLに加え、金に対するチオールのモル比を2500:1とする。混合物を、1時間、アルゴン下、室温で攪拌し、チオールを金ナノ担体上のクエン酸と完全に交換する。次いで、表面上でPEG-ラパマイシンを有するAuNCを30分間12000gで遠心分離により精製する。上清を傾瀉し、次いでAuNC-S-PEG-ラパマイシンを含有するペレットは、1×PBS緩衝液で洗浄したペレットである。精製された金-PEG-ラパマイシンナノ担体は、次いでさらなる分析やバイオアッセイのために好適な緩衝液中に再懸濁する。

【0124】

例3：付着イブプロフェンを有するメソポーラスシリカナノ粒子(予言的)

メソポーラスSiO₂ナノ粒子コアを、ゾル-ゲルプロセスを介して作製する。ヘキサデシルトリメチル-アンモニウムプロミド(CTAB)(0.5g)を脱イオン水(500mL)に溶解し、次いで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、次いで、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3h攪拌する。形成した白色沈殿物をろ過によって捕捉し、その後は脱イオン水で洗浄し、室温で乾燥させる。次いで残りの界面活性物質をHClのエタノール溶液中に終夜懸濁す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、超音波処理下で再分散する。この洗浄手順をさらに2回繰り返す。

次いでSiO₂のナノ粒子を、(3-アミノプロピル)トリエトキシシラン(APTMS)を使用し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2h静置し、

次いで定期的にエタノールを添加することにより体積を一定に保ちながら、4 h ボイルする。残りの反応物は、遠心分離および純粋なエタノール中での再分散の洗浄の5サイクルによって除去する。

【0125】

別の反応では、1 ~ 4 nm の径の金種が作成される。この反応で使用される全ての水をまず脱イオン化し、次いで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、その後テトラキス(ヒドロキシメチル)ホスホニウムクロリド (THPC) (1.0 mL) の1%水溶液を加える。THPC溶液の添加から2分後、少なくとも15 min エージングされた塩化金酸の10 mg / mL の水溶液 (2 mL) を加える。金種を水に対して透析によって精製する。

コア - シェルナノ担体を形成するために、上記形成されたアミノ官能化 SiO₂ ナノ粒子をまず室温で2 h、金種と混合する。金装飾のSiO₂ 粒子を、遠心分離によって収集し、塩化金酸および炭酸水素カリウムの水溶液と混合して金のシェルを形成させる。次いで粒子を遠心分離および水中の再分散によって洗浄する。イブプロフェンは、72 h、イブプロフェンナトリウムの溶液 (1 mg / L) で粒子を懸濁させることによって積載する。フリーのイブプロフェンを遠心分離および水中の再分散によって粒子から洗浄する。

【0126】

例4：シクロスボリンAを含有するリポソーム(予言的)

リポソームを、薄膜水和を用いて形成する。1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC) (32 μmol)、コレステロール (32 μmol) およびシクロスボリンA (6.4 μmol) を、純粋なクロロホルム (3 mL) に溶解する。この脂質溶液を、50 mL 丸底フラスコに加え、溶媒を60 の温度で、ロータリー-エバポレーターで蒸発させる。次いでフラスコを窒素ガスでフラッシュし、残りの溶媒を除去する。リン酸緩衝生理食塩水 (2 mL) および5つのガラスピーブをフラスコに加え、脂質膜を1時間60 で振とうすることにより水和させ、懸濁液を形成させる。懸濁液を小型圧力チューブに移し、各パルス間に30 s の遅延で30 s パルスの4サイクル、60 で超音波処理する。次いで懸濁液を2 h 室温で静置し、完全に水和させる。リポソームを遠心分離し、次いで新鮮なリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁することによって洗浄する。

【0127】

例5：ラバマイシンを含有する合成ナノ担体

材料

ラバマイシンはTSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702) から購入した(製品カタログ# R1017)。76% ラクチドおよび24% グリコリド含有量ならびに固有粘度0.69 dL / g のPLGAをSurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211) から購入した(製品コード7525 DLG 7A)。およそ5,000 Da のPEGブロックおよびおよそ40,000 Da のPLAブロックを有するPLA-PEGブロックコポリマーをSurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211) から購入した(製品コード100 DL mPEG 5000 5CE)。ポリビニルアルコール (85 ~ 89% 加水分解) はEMD Chemicalsから購入した(製品番号1.41350.1001)。

方法

以下のとおりに溶液を調製した:

溶液1: 塩化メチレン中、75 mg / mL のPLGAおよび25 mg / mL のPLA-PEG。この溶液は、純粋な塩化メチレン中にPLGAおよびPLA-PEGを溶解することにより調製した。

溶液2: ラバマイシン、塩化メチレン中100 mg / mL。この溶液は、純粋な塩化メチレン中にラバマイシンを溶解することにより調製した。

溶液3: ポリビニルアルコール、100 mM のpH 8 リン酸緩衝剤中50 mg / mL。

【0128】

10

20

30

40

50

水中油エマルションを使用してナノ担体を調製した。溶液1(1mL)、溶液2(0.1mL)および溶液3(3mL)を小圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250を使用して30%振幅で60秒間超音波処理することによってO/Wエマルションを調製した。このO/Wエマルションを70mMのpH8リン酸緩衝溶液(30mL)を含有するビーカーに加えて室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させてナノ担体を形成させた。ナノ担体懸濁液を遠心分離管に移して75,600×gおよび4で35min遠心分離し、上清を除去して、リン酸緩衝化食塩水中にペレットを再懸濁することによって、ナノ担体の一部分を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、約10mg/mLの最終ナノ担体分散液となるようにペレットをリン酸緩衝化食塩水中に再懸濁した。

【0129】

10

ナノ担体のサイズは動的光散乱によって決定した。ナノ担体中のラバマイシンの量はHPLC分析によって決定した。懸濁液1mL当たりの総乾燥ナノ担体質量は比重測定法により決定した。

【表1】

有効径 (nm)	ラバマイシン含有量 (% w/w)
227	6.4

20

【0130】

例6: GSK1059615を含有する合成ナノ担体

材料

GSK1059615は、MedChem Express (11 Deer Park Drive, Suite 102D Monmouth Junction, NJ 08852) から購入した(製品コードHY-12036)。ラクチド:グリコリド比1:1および固有粘度0.24dL/gのPLGAを、Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211) から購入した(製品コード5050 DLG 2.5A)。およそ5,000Daのメチルエーテル末端PEGブロックおよび0.26dL/gの全体的な固有粘度を有するPLA-PEG-OMeブロックコポリマーを、Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211) から購入した(製品コード100 DL mPE G 5000 5K-E)。Cellgro Phosphate-buffered saline 1X pH 7.4 (PBS 1×)は、Corning (9345 Discovery Blvd. Manassas, VA 20109) から購入した(製品コード21-040-CV)。

30

【0131】

方法

以下のとおりに溶液を調製した:

溶液1: PLGA(125mg)およびPLA-PEG-OMe(125mg)を10mLのアセトンに溶解した。溶液2: GSK1059615を、1mLのN-メチル-2-ピロリジノン(NMP)中10mgで調製した。

40

溶液1(4mL)および溶液2(0.25mL)を小ガラス圧力管中で組み合わせ、この混合物を、20mLの超純水を含有する250mLの丸底フラスコに攪拌下、滴下して加えることにより、ナノ担体を調製した。このフラスコをロータリーエバポリーション装置に取り付け、減圧下アセトンを除去した。ナノ担体懸濁液を遠心分離管に移し、75,600rcfおよび4で50分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットをPBS 1×中に再懸濁することによって、ナノ担体の一部分を洗浄した。洗浄手順を繰り返し、ペレットをPBS 1×に再懸濁して、ポリマー基準で10mg/mLの公称濃度を有するナノ担体懸濁液を達成した。洗浄したナノ担体溶液を、次いでPallの1.2μm PESメンブランシリングフィルター(部品番号4656)を使用してろ過した。同一のナノ担体溶液を上記のとおりに調製し、ろ過ステップ後に最初のものと共に貯蔵した。この均質な懸濁液は、

50

-20で凍結して保管した。

【0132】

ナノ担体のサイズは動的光散乱により決定した。ナノ担体中のGSK1059615の量は351nmにおけるUV吸収により決定した。懸濁液1mL当たりの総乾燥ナノ担体質量は比重測定法により決定した。

【表2】

有効径 (nm)	GSK1059615 含有量 (% w/w)
143	1.02

10

【0133】

実施例7：合成ナノ担体を用いたCD4+制御性T細胞の誘導

材料

ラバマイシンはTSZ CHEM (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; 製品コードR10 17) から購入した。3:1のラクチド：グリコリド比および0.75dL/gの固有粘度を有するPLGAは、SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 製品コード7525 DLG 7A) から購入した。メチルエーテルで終了した約5,000DaのPEGブロックおよび0.5dL/gの全体の固有粘度を有するPLA-PEG-O-Meのブロックコポリマーは、Lakeshore Biochemicals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 製品コード100 DL mPEG 5000 5CE) から購入した。EMPROVE (登録商標) ポリビニルアルコール4-88、USP (85~89%加水分解、3.4~4.6mPa·sの粘度) は、EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027. 製品コード1.41350) から購入した。

20

【0134】

方法

以下のように溶液を調製した。

溶液1：塩化メチレン中の75mg/mLのPLGA、25mg/mLのPLA-PEG-O-Me、および12.5mg/mLのラバマイシン。溶液は、純粋な塩化メチレン中のPLGA、PLA-PEG-O-Me、およびラバマイシンを溶解することにより調製した。溶液2：100mMのpH8のリン酸緩衝液中に50mg/mLのポリビニルアルコール。

30

水中油エマルションを使用してナノ担体を調製した。O/Wエマルションを、小型圧力チューブ内の溶液1(1.0mL)および溶液2(3.0mL)を組み合わせ、Branson Digital Sonifier 250を使用して60秒間、30%の振幅で超音波処理することによって調製した。O/Wエマルションを70mMのpH8のリン酸緩衝液を含有するビーカーに加え、室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させ、ナノ担体を形成させた。ナノ担体の一部を、ナノ担体の懸濁液を遠心分離管に移し、75,600×gで50分間4で遠心分離し、上清を除去し、リン酸緩衝生理食塩水でペレットを再懸濁することによって洗浄した。洗浄手順を繰り返した後、ペレットを、約10mg/mLの最終ナノ担体の分散のためにリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。

40

【0135】

ナノ担体のサイズは、動的光散乱によって決定した。ナノ担体におけるラバマイシンの量は、HPLC分析によって決定した。懸濁液1mL当たりの総乾燥ナノ担体の質量を比重測定法により決定した。

【表3】

有効径 (nm)	ラパマイシン含有量 (% w/w)
241	11.1

合成ナノ担体に付着された免疫抑制剤のCD4+制御性T細胞の発達における効果をモニタリングし決定するために、CD4+T細胞を、磁気活性化細胞ソーティング(MACS)によるネガティブ選択を使用することによってトランスジェニックマウス株OTIIから精製した。OTIIマウスは、ニワトリオボアルブミンペプチドOVA_{323~333}に特異的なT細胞受容体を発現する。単離後、4×10⁶個のCD4+OTII細胞を、汎白血球マーカーCD45.1(Ptprc^a)をコンジェニックに発現するSJLマウスに移植した(SJL-Prprc^a/BoyAiTac)。レシピエント動物は、未処置のまま(PBS注射)か、またはラパマイシン含有ナノ担体単独(NP[ラパ])、フリーOVA_{323~333}ペプチド(fOPII.323)またはラパマイシン含有ナノ担体とOVA_{323~333}ペプチドとの両方の組み合わせを後肢の皮下に注射することによって第1日および第5日に処置した。

【0136】

示された処置の第2の投与から5日後の第10日、動物を屠殺し、注射部位を排出する膝窩リンパ節を採取し、発達の状態を分析し、フローサイトメトリーによってSJLマウスに移入されたCD4+OTII細胞を定量化した。

図1に示すように、未処置(PBS)であるか、またはラパマイシン含有ナノ担体(NP[ラパ])のみを受けた動物は、抗CD25抗体および抗Foxp3抗体で染色することによって特徴付けられる制御性T細胞の表現型(CD25+Fox3p+)を獲得した検出不可能なレベルのOTII細胞をいくつか有した。フリーOVAペプチド(fOPII.323)の投与は、CD25+Fox3p+細胞の割合において検出可能であるが統計的に有意でない増加をもたらした。対照的に、ラパマイシン含有ナノ担体のOVAペプチドとの併用投与は、CD25+Fox3p+細胞の強固な集団をもたらし、この組み合わせ処置が、移植されたCD4+OTIIの大部分を誘導し、制御性T細胞(Treg)へと発達させることを示した。

これらの結果は、本明細書で提供される免疫抑制剤が、抗原と併用投与されたとき、抗原に特異的なCD4+制御性T細胞の割合の増大などの制御性免疫応答の形成を誘導し得ることを示す。

【0137】

実施例8：抗PEG免疫応答の評価

材料

ラパマイシンはTSZ CHEM(185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; 製品コードR1017)から購入した。3:1のラクチド:グリコリド比および0.75dL/gの固有粘度を有するPLGAは、SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 製品コード7525 DLG 7A)から購入した。メチルエーテルで終了した約5,000DaのPEGブロックおよび0.5dL/gの全体の固有粘度を有するPLA-PEG-Omのブロックコポリマーは、Lakeshore Biochemicals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 製品コード100 DL mPEG 5000 5CE)から購入した。EMPROVE(登録商標)ポリビニルアルコール4-88、USP(85~89%加水分解、3.4~4.6mPa·sの粘度)は、EMD Chemicals Inc.(480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027. 製品コード1.41350)から購入した。

【0138】

方法

10

20

30

40

50

以下のように溶液を調製した：

溶液1：塩化メチレン中の75mg/mLのPLGA、25mg/mLのPLA-PEG-O-Me、および12.5mg/mLのラパマイシン。溶液は、純粋な塩化メチレン中のPLGA、PLA-PEG-O-Me、およびラパマイシンを溶解することにより調製した。溶液2：100mMのpH8のリン酸緩衝液中に50mg/mLのポリビニルアルコール。

水中油エマルションを使用してナノ担体を調製した。O/Wエマルションを、小型圧力チューブ内の溶液1(1.0mL)および溶液2(3.0mL)を組み合わせ、Branson Digital Sonifier 250を使用して60秒間、30%の振幅で超音波処理することによって調製した。O/Wエマルションを70mMのpH8のリン酸緩衝液を含有するビーカーに加え、室温で2時間攪拌し、塩化メチレンを蒸発させ、ナノ担体を形成させた。ナノ担体の一部を、ナノ担体の懸濁液を遠心分離管に移し、75,600×gで、50分間4で遠心分離し、上清を除去し、リン酸緩衝生理食塩水でペレットを再懸濁することによって洗浄した。洗浄手順を繰り返した後、ペレットを、約10mg/mLの最終ナノ担体の分散のためにリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。

【0139】

ナノ担体のサイズは、動的光散乱によって決定した。ナノ担体におけるラパマイシンの量は、HPLC分析によって決定した。懸濁液1mL当たりの総乾燥ナノ担体の質量を比重測定法により決定した。

【表4】

10

20

有効径 (nm)	ラパマイシン含有量 (% w/w)
238	10.6

C57BL/6同齢(5~6週間)雌に、250μgのキーホールリンペットヘモシアニンおよびポリエチレングリコールの複合体(KLH-PEG)を尾静脈内に毎週i.v.注射し(第0、7、14、21、28、35、42、49日)、最初の5回の注射(NP[ラパ]、50μgのラパマイシン含有量)については0.47mgのラパマイシン含有ナノ担体も合わせるか、または合わせないで注射した(第0、7、14、21、28日)。次の3回の注射は、同じ量でただKLH-PEGからなった。PEGに対するIgM抗体応答は、これらの動物の血液中で毎週モニタリングした(第12、20、34、40、47、54日)。

30

【0140】

図2に示すように、同じ溶液中のKLH-PEGをi.v.併用投与された合成ナノ担体の5用量は、PEGに対する抗体形成を防止するのに有効だった。これらの結果は、PEG化タンパク質と併用投与されたラパマイシン含有ナノ担体が、PEGに対する抗体形成を低減または防止できることを示す。したがって、本明細書で提供される処置の方法の使用は、ペグ化治療用タンパク質などの治療用タンパク質に対する望ましくない免疫応答を低減するために使用できる。データはまた、かかる効果を達成するための投与スケジュールを実証する。

40

【0141】

実施例9：合成ナノ担体を使用した第VIII因子特異的CD4+Tregの増大(予想的)

パイロット試験は、第VIII因子および投与前に同時処方されない合成ナノ担体とともに、可溶性の第VIII因子を使用して、非ヒト靈長類の対象および実施例1の合成ナノ担体において行われる。50の非ヒト靈長類の対象は、5つのアーム：プラセボ、次いで用量範囲のために選択された合成ナノ担体の4用量レベル、に無作為に割り当てられる

50

。用量範囲は、第V I I I因子に特異的であろうC D 4 + T r e g (C D 4 + 制御性T細胞)の最適な増大を選択するように確立される。第0日において、各活性アームの対象は全て、合成ナノ担体の用量を皮下に投与され、合成ナノ担体の用量の24時間以内に、第V I I I因子の標準注入用量の注入を得る。2週間後、各動物は、可溶性の第V I I I因子の標準用量で負荷され、第V I I I因子特異的C D 4 + T r e g の数または割合は、標準的な技術を使用して測定される。第V I I I因子特異的C D 4 + T r e g の有意な増大を示す4つの活性アーム間から合成ナノ担体の最低用量を試験用量として選択する。

合成ナノ担体の試験用量は、次いで非比例的にヒト対象への投与のためにスケーリングされ、可溶性の第V I I I因子の標準用量で使用される合成ナノ担体の投与用量レベルの範囲を決定するために、ヒト臨床試験において使用される。ここでも、第V I I I因子および合成ナノ担体は、投与前に同時処方されない。合成ナノ担体および第V I I I因子の同時処方されない投与用量は、次いで通常の臨床実践のために利用可能なものとなる。

【0142】

実施例10：合成浸透圧ポンプを使用した第V I I I因子特異的C D 4 + T r e g の増大（予言的）

パイロット試験は、第V I I I因子を、可溶性の第V I I I因子および浸透圧ポンプ（例6に従い一般に調製されるが、例6のGSK1059615をラパマイシンで置き換える）を使用して、非ヒト靈長類対象において実施され、可溶性の第V I I I因子および浸透圧ポンプは投与前に同時処方されない。50の非ヒト靈長類の対象は、5つのアーム：プラセボ、次いで浸透圧ポンプによって送達され、範囲用量のために選択されるGSK1059615の4用量レベル、に無作為に割り当てられる。用量範囲は、第V I I I因子特異的であろうC D 4 + T r e g の最適な増大を選択するように確立される。第0日において、各活性アームの対象はすべて、合成ナノ担体の用量を皮下投与され、合成ナノ担体用量の24時間以内に第V I I I因子の標準注入用量の注入を得る。2週間後、各動物は、可溶性の第V I I I因子の標準用量で負荷され、第V I I I因子特異的C D 4 + T r e g の数または割合は、標準的な技術を使用して測定される。第V I I I因子特異的C D 4 + T r e g の中に有意な増大を示す4つの活性アーム間からの浸透圧ポンプによって送達されるGSK1059615の最低用量は、試験用量として選択される。

【0143】

浸透圧ポンプによって送達されるGSK1059615の試験用量は、次いで非比例的にヒト対象への投与のためにスケーリングされ、可溶性の第V I I I因子の標準用量で使用される浸透圧ポンプによって送達されるGSK1059615の投与用量レベルの範囲を決定するために、ヒト臨床試験において使用される。ここでも、第V I I I因子および浸透圧ポンプは、投与前に同時処方されない。浸透圧ポンプによって送達されるGSK1059615および第V I I I因子の同時処方されない投与用量は、次いで通常の臨床実践のために利用可能なものとなる。

【0144】

実施例11：治療用ポリヌクレオチドを使用した特定のC D 4 + T r e g の増大（予言的）

パイロット試験を、アスパラギナーゼm m R N A（一般に米国特許出願第2013/0115272号（Fougerolles et al.）（「m m R N A」）に従って調製する）および例1の合成ナノ担体を使用して非ヒト靈長類対象において実施し、m m R N Aおよび合成ナノ担体は投与前に同時処方されない。50の非ヒト靈長類対象を無作為に5つのアーム：プラセボ、次いで用量範囲について選択される4つの用量の合成ナノ担体に割り当てる。用量範囲はm m R N A特異的であろうC D 4 + T r e g の最適な増大を選択するように確立される。第0日において、各活性アームの対象は全て、合成ナノ担体の用量を皮下投与され、合成ナノ担体用量の24時間以内に第V I I I因子の標準注入用量の注入を得る。2週間後、各動物をm m R N Aの標準用量で負荷し、m m R N A特異的C D 4 + T r e g の数または割合は、標準的な技術を使用して測定される。m m R N A特異的C D 4 + T r e g の中に有意な増大を示す4つの活性アーム間からの合成ナノ担体の最低用量は、試験用量として選

10

20

30

40

50

択される。

【0145】

合成ナノ担体の試験用量は、次いで非比例的にヒト対象への投与のためにスケーリングされ、ヒト臨床試験で使用されて標準用量レベルのmmRNAとともに使用される合成ナノ担体の投与用量の範囲を決定する。ここでも、mmRNAと合成ナノ担体は、投与前に同時処方されない。合成ナノ担体およびmmRNAの同時処方されない投与用量は、次いで通常の臨床実践のために利用可能なものとなる。

【0146】

実施例12：抗PEG免疫応答の評価（予言的）

C57BL/6同齢（5～6週間）雌に、250μgのキーホールリンペットヘモシアニンおよびポリエチレングリコールの複合体（KLH-PEG）を尾静脈内に毎週i.v.注射し（第0、7、14、21、28、35、42、49日）、最初の5回の注射については（第0、7、14、21、28日）、0.47mgのナノ結晶性ラバマイシンも合わせるか、または合わせないで注射した。次の3回の注射は、同じ量でただKLH-PEGからなる。PEGに対するIgM抗体応答は、これらの動物の血液中で毎週モニタリングした（第12、20、34、40、47、54日）。

KLH-PEG（ナノ結晶性ラバマイシンなし）のみを受ける動物と比較して、KLH-PEGと併用してナノ結晶性ラバマイシンの用量を受ける動物において、KLH特異的IgM抗体の力値の低減は、ラバマイシンのナノ結晶性形態が、PEG化タンパク質と併用投与したとき、抗体の形成を低減または防止することができることを示す。

【0147】

実施例13：合成ナノ担体を使用した第VIII因子特異的CD4+Tregの増大（予言的）

パイロット試験は、可溶性の第VIII因子およびナノ結晶性ラバマイシンを使用して、非ヒト靈長類対象に行われ、第VIII因子およびナノ結晶性ラバマイシンは投与前に同時処方されない。50の非ヒト靈長類の対象を無作為に5つのアーム：プラセボ、次いで用量範囲のために選択されたナノ結晶性ラバマイシンの4つの用量レベル、に割り当てる。用量範囲は、第VIII因子に特異的であろうCD4+Treg（CD4+制御性T細胞）の最適な増大を選択するように確立される。第0日において、各活性アームの対象はすべて、ナノ結晶性ラバマイシンの用量を皮下投与され、ナノ結晶性ラバマイシン用量の24時間以内に第VIII因子の標準注入用量の注入を得る。2週間後、各動物は、可溶性の第VIII因子の標準用量で負荷され、第VIII因子特異的CD4+Tregの数または割合は、標準的な技術を使用して測定される。第VIII因子特異的CD4+Tregの中で有意な増大を示す4つの活性アーム間からナノ結晶性ラバマイシンの最低用量は、試験用量として選択される。

【0148】

ナノ結晶性ラバマイシンの試験用量は、次いで非比例的にヒト対象への投与のためにスケーリングされ、ヒトの臨床試験で使用され、可溶性の第VIII因子の標準用量で使用されるナノ結晶性ラバマイシンの投与用量レベルの範囲を決定する。ここでも、第VIII因子およびナノ結晶性ラバマイシンは、投与前に同時処方されない。ナノ結晶性ラバマイシンおよび第VIII因子の同時処方されない投与用量は、次いで通常の臨床実践のために利用可能なものとなる。

10

20

30

40

【図1】

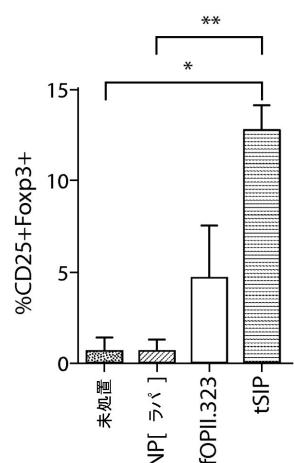


図1

【図2】

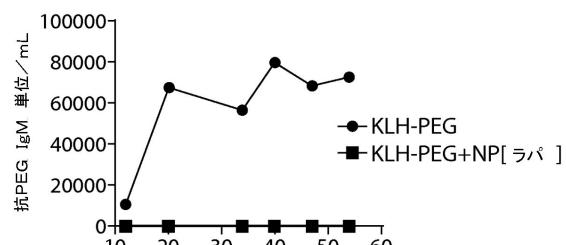


図2

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	31/436	(2006.01)	A 6 1 K	9/10
			A 6 1 K	31/436

(31)優先権主張番号 61/881,913

(32)優先日 平成25年9月24日(2013.9.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 61/881,921

(32)優先日 平成25年9月24日(2013.9.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 61/907,177

(32)優先日 平成25年11月21日(2013.11.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 61/881,851

(32)優先日 平成25年9月24日(2013.9.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 61/819,517

(32)優先日 平成25年5月3日(2013.5.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

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 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、ガートランド スト
リート 44 #1

審査官 参鍋 祐子

(56)参考文献 国際公開第2012/149393 (WO, A1)

国際公開第2012/149411 (WO, A1)

Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009年, Vol.7, pp.1523-1532

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 47/69

A 6 1 K 9/10

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 31/436

A 6 1 K 31/7088

A 61K 38/00
A 61K 39/00
A 61K 48/00
A 61P 37/06
A 61P 43/00

JSTPplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)