



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0105243  
(43) 공개일자 2018년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/385 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/36 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)  
A61P 37/08 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 39/385 (2013.01)  
A61K 39/36 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-7025977  
(22) 출원일자(국제) 2017년02월09일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2018년09월07일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/017248  
(87) 국제공개번호 WO 2017/139498  
국제공개일자 2017년08월17일  
(30) 우선권주장  
62/293,261 2016년02월09일 미국(US)

(71) 출원인  
코어 파마슈티칼스 디벨롭먼트 컴퍼니 인크.  
미국 일리노이 노쓰브룩 샌더스 로드 2215  
(72) 발명자  
게츠, 다니엘 알.  
미국 60062 일리노이주 노쓰브룩 스위트 425 샌더스 로드 2215  
(74) 대리인  
양영준, 김영

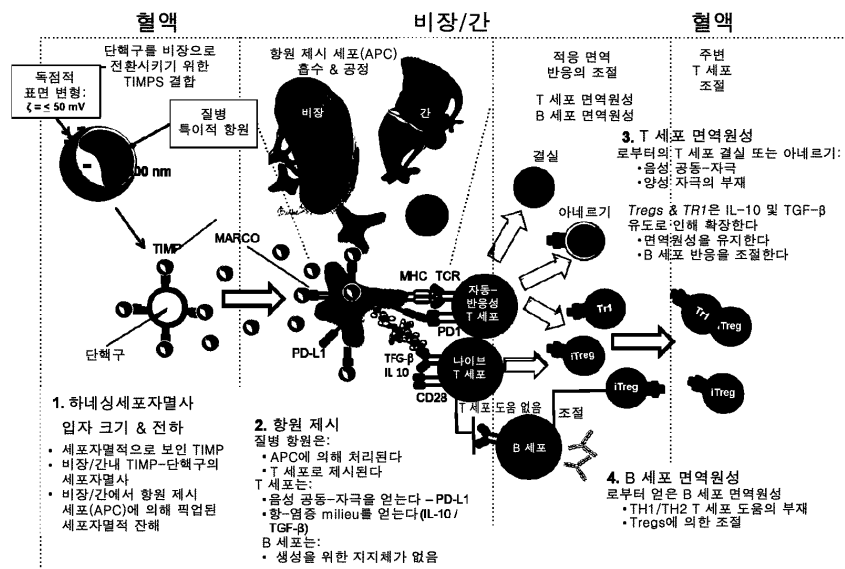
전체 청구항 수 : 총 55 항

(54) 발명의 명칭 일본 삼나무 꽃가루 에피토프를 캡슐화하는 TIMPS

(57) 요약

본 발명은 일본 삼나무 꽃가루와 관련된 하나 이상의 에피토프를 캡슐화하는 음성 제타 전위를 갖는 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 입자를 투여하여 일본 삼나무 꽃가루에 대한 면역학적 반응을 유도하는 방법이 또한 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 9/5153** (2013.01)

**A61P 37/08** (2018.01)

A61K 2039/577 (2013.01)

A61K 2039/58 (2013.01)

A61K 2039/6093 (2013.01)

A61K 2039/62 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프를 포함하는 생분해성 입자를 포함하는 조성물로서, 상기 생분해성 입자가 음성 제타 전위를 갖는, 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 생분해성 입자가 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드)(PLG)를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 생분해성 입자가 폴리락트산:폴리글라이콜산의 코폴리머 비가 약 50:50인 PLG를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 생분해성 입자의 표면이 카복실화된, 조성물.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 카복실화는 폴리(에틸렌-alt-말레산 무수물), (PEMA)폴리(아크릴산) 또는 소듐 데옥시콜레이트를 사용하여 달성되는, 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 -100 mV 내지 약 0 mV의 제타 전위를 갖는, 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 -50 mV 내지 약 -40 mV의 제타 전위를 갖는, 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 -75 mV 내지 약 -50 mV의 제타 전위를 갖는, 조성물.

#### 청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 -50 mV의 제타 전위를 갖는, 조성물.

#### 청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 -30 mV의 제타 전위를 갖는, 조성물.

#### 청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 -40 mV의 제타 전위를 갖는, 조성물.

#### 청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 0.1  $\mu\text{m}$  내지 약 10  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는, 조성물.

#### 청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 0.3  $\mu\text{m}$  내지 약 5  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는, 조성물.

#### 청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$  내지 약 3  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는, 조성물.

#### 청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$  내지 약 1  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는, 조성물.

#### 청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 0.2  $\mu\text{m}$  내지 약 0.7  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는, 조성물.

#### 청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 0.7  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는, 조성물.

#### 청구항 18

청구항 16에 있어서, 상기 생분해성 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는, 조성물.

#### 청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프는 CRYJ1 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 20

청구항 19에 있어서, CRYJ1은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

#### 청구항 21

청구항 20에 있어서, CRYJ1의 단편은 SEQ ID NO: 1과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 또는 적어도 50개의 연속적인 아미노산을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 22

청구항 20에 있어서, CRYJ1의 변이체는 SEQ ID NO: 1과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

#### 청구항 23

청구항 20에 있어서, CRYJ1의 단편은 p16-30, p81-95, p106-120, p111-125, p211-225 및 p301-315로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

#### 청구항 24

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프는 CRYJ2 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 25

청구항 24에 있어서, CRYJ2는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

#### 청구항 26

청구항 25에 있어서, CRYJ2의 단편은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 적어도 10, 적어도 20,

적어도 30, 적어도 40, 또는 적어도 50개의 연속적인 아미노산을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 27

청구항 25에 있어서, CRYJ2의 변이체는 SEQ ID NO: 2와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

#### 청구항 28

청구항 25에 있어서, CRYJ2의 단편은 p66-80, p81-95, p141-155, p186-200, p236-250, p346-360, p351-365 및 p336-350으로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

#### 청구항 29

청구항 1 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  내지 15  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 폴리머에 대한 항원의 비율을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 생분해성 입자는 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  내지 15  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 폴리머에 대한 항원의 비율을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 31

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 적어도 약 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 폴리머에 대한 항원의 비율을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 32

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생분해성 입자는 일본 삼나무 꽃가루 단백질로부터의 2종 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 2종 이상의 캡슐화된 에피토프는 융합 단백질에 함유되며, 여기서 융합 단백질 내의 2종 이상의 캡슐화된 에피토프는 절단가능한 링커에 의해 분리되는, 조성물.

#### 청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 절단가능한 링커의 아미노산 서열은 세포의 파고리소좀에 위치한 프로테아제 및/또는 세포의 사이토솔에 위치한 프로테아제에 의해 절단가능한, 조성물.

#### 청구항 35

청구항 34에 있어서, 상기 절단가능한 링커의 아미노산 서열은 세포의 파고리소좀에 위치한 프로테아제 및 세포의 사이토솔에 위치한 프로테아제에 의해 절단가능한, 조성물.

#### 청구항 36

청구항 34 또는 35에 있어서, 상기 절단가능한 링커는 퓨린 감수성 링커 또는 카텡신 감수성 링커인, 조성물.

#### 청구항 37

청구항 34 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단가능한 링커는 퓨린 감수성 링커인, 조성물.

#### 청구항 38

청구항 34 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단가능한 링커는 카텡신 감수성 링커인, 조성물.

#### 청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 카텡신 감수성 링커는 카텡신 A, 카텡신 B, 카텡신 C, 카텡신 D, 카텡신 E, 카텡신

F, 카텡신 G, 카텡신 H, 카텡신 K, 카텡신 L, 카텡신 O, 카텡신 W, 및/또는 카텡신 Z 중 하나 이상에 의한 절단에 민감한, 조성물.

#### 청구항 40

청구항 34에 있어서, 상기 링커의 아미노산 서열은 Gly-Ala-Val-Val-Arg-Gly-Ala(SEQ ID NO: 3)인, 조성물.

#### 청구항 41

청구항 1 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프는 생분해성 입자에 공유결합되는, 조성물.

#### 청구항 42

청구항 41에 있어서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프는 콘주게이트 분자에 의해 생분해성 입자에 공유결합되는, 조성물.

#### 청구항 43

청구항 42에 있어서, 상기 콘주게이트 분자는 카보디이미드 화합물을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 44

청구항 43에 있어서, 상기 카보디이미드 화합물은 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(EDC)를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 45

일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프를 포함하는 생분해성 입자를 포함하는 조성물로서, 상기 생분해성 입자가 적어도 약 -30 mV의 음성 제타 전위, 약 0.7  $\mu\text{m}$ 의 직경, 적어도 약 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 폴리머에 대한 항원의 비율을 갖는, 조성물.

#### 청구항 46

청구항 1 내지 45 중 어느 한 항의 생분해성 입자를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 47

청구항 46에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 48

청구항 47에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 49

청구항 1 내지 45 중 어느 한 항의 생분해성 입자를 포함하는 동결건조된 조성물.

#### 청구항 50

청구항 46 내지 49 중 어느 한 항의 유효량의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루에 대한 항원-특이적 내성을 유도하는 방법.

#### 청구항 51

청구항 46 내지 49 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루 알러지를 치료하는 방법.

#### 청구항 52

청구항 46 내지 49 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루 알러지를 예방하는 방법.

### 청구항 53

청구항 49의 동결건조된 입자를 재구성하여 재구성된 약제학적 조성물을 수득하는 단계 및 상기 재구성된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루에 대한 항원-특이적 내성을 유도하는 방법.

### 청구항 54

청구항 49의 동결건조된 입자를 재구성하여 재구성된 약제학적 조성물을 수득하는 단계 및 상기 재구성된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루 알러지를 치료하는 방법.

### 청구항 55

청구항 49의 동결건조된 입자를 재구성하여 재구성된 약제학적 조성물을 수득하는 단계 및 상기 재구성된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루 알러지를 예방하는 방법.

## 발명의 설명

## 기술 분야

### 관련 출원에 대한 교차 참조

본 출원은 2016년 2월 9일에 출원된 미국 가출원 제62/293,261호에 우선권을 청구하며, 그의 전체 내용이 본 명세서에 참고로 편입되어 있다.

### 전자 제출된 텍스트 파일에 대한 설명

본 명세서에 전자적으로 제출된 텍스트 파일의 내용은 그 전체가 참고로 본 명세서에 편입된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능한 포맷 복사본(파일명: COUR\_014\_02WO\_SeqList\_ST25.txt, 기록일: 2017년 2월 9일, 파일 크기: 12kb).

## 배경 기술

일본 삼나무 꽃가루 과민증은 일본 삼나무(*크립토메리아 야포니카*(*Cryptomeria japonica*))의 꽃가루를 흡입함으로써 야기되는 일본의 일반적인 알러지성 질환이다. 일본의 삼나무 꽃가루 과민증의 유병률은 학교, 공장 및 지역 사회의 개인이 아닌 무작위화된 모집단에서 30%까지 높을 수 있으며, 최대 2천만명이 이 질병에 걸릴 수 있을 것으로 추산된다. 따라서, 이 질병은 증상의 중증도, 높은 유병률, 자발적인 회복률 저하 및 질병 통제와 관련된 높은 의료 비용 때문에 부분적으로 일본의 주요 공중 보건 문제이다.

일본 삼나무 꽃가루 과민증은 심각한 I형 알러지성 질환이다. I형 알러지성 질환은 알러지항원-특이적 면역글로불린 E(IgE)의 전신 수준 상승, 비만 세포 탈과립화 및 히스타민 및 알러지의 다른 화학적 매개체의 방출을 특징으로 하는 무해한 환경적 항원(예를 들어, 일본 삼나무 꽃가루)에 대한 비정상적인 Th2-극성화된 면역 반응에 의해 매개된다. 알러지성 질환의 치료에 대한 주요 임상 접근법은 일반적으로 항히스타민제, 류코트리엔 억제제 또는 광범위한-작용성 글루코코르티코이드와 같은 약물로 급성 효과기 분자를 표적화함으로써 항원(Ag) 회피(예를 들어, 알러지항원 회피) 및 증상 제어로 구성된다. 그러나 이러한 치료법은 알러지성 염증을 일으키는 근본적인 비정상적인 Th2-편향된 면역 반응의 발달을 다루지 못한다. 점막 또는 피하로 전달되는 가용성 Ag의 서서히 증가하는 용량에 환자가 노출되는 특정 면역 요법(SIT)과 같은 대안적인 접근법도 또한 임상적으로 사용된다. SIT는 Th2 반응을 억제하는 조절 및 Th1 반응을 모두 유도한다. 이와 같이, SIT는 환경 알러지항원에 대한 면역 반응의 편차가 병리적, Th2-편향된 반응을 벗어나 보호성 또는 조절성 Th1/T 조절 반응쪽으로 향하는 결과를 초래할 수 있다. 그러나 민감화된 환자에게 가용성 Ag를 투여할 경우 부작용의 위험이 상당하므로, 오말리주맙(omalizumab)과 같은 과민증을 최소화하는 추가 약물과 항원의 병용 투여 또는 느린 용량 단계적 확대가 필요하다.

따라서, Ag-특이적 내성을 안전하고 효과적으로 유도하는 개선된 방법은 사전-민감화된 대상체에서 알러지성 질환의 치료를 위한 임상 도구로 남아있다. 알러지항원성 펩타이드를 캡슐화하는 나노입자는 생체내 모델에서 알

러지항원-유도된 Th2 반응을 감소시키는 것으로 이미 실증되었다(미국 공보 제2015-0209293호 참조, 그 전문이 본 명세서에 참고로 편입됨). 따라서, 다양한 환경 공급원에서 유래된 꽃가루를 일본 삼나무 꽃가루 과민증과 같은 알러지성 질환을 치료하는데 사용하기 위한 나노입자로 캡슐화하는 것이 가능하다. 또한, 일본 삼나무 꽃가루 항원 CRYJ1은 산 삼나무의 Jun a 1 항원, 일본 사이프러스(cypress)의 Cha o 1 항원 및 *큐프레서스 아리조니카(Cupressus arizonica)*의 Cup a 1 항원에 대하여 고도의 유사성을 나타내며, 이는 일본 삼나무 꽃가루에서 추출한 특정 항원이 여러 침엽수 꽃가루에 걸쳐 교차-반응성인 알러지성 항체 반응을 매개할 수 있음을 시사한다.

[0008] 그러나, 일본 삼나무 꽃가루를 알러지성 질환의 치료에 적합한 입자로 캡슐화하려는 시도는 부분적으로만 성공적이었다. 이는 일본 삼나무 꽃가루가 저농도에서도 매우 점성이 높기 때문일 수 있다. 따라서, 삼나무 꽃가루 과민증을 위한 SIT 치료 방법은 제한적이다. 특히 침엽수 꽃가루 사이의 항체 교차-반응성의 가능성뿐만 아니라 일본 및 인접국에서의 질병의 실질적인 유병률을 감안할 때, 일본 삼나무 꽃가루 과민증을 앓고 있는 대상체 또는 일본 삼나무 꽃가루 과민증 발병 위험이 있는 대상체에서 삼나무 꽃가루 항원(예를 들어, CRYJ1 및 CRYJ2)에 대한 내성을 유도하는 안전하고 효과적인 수단에 대한 필요성이 있다.

# [0009] 발명의 요약

[0010] 일부 구현예에서, 본 발명은 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 에피토프를 삽입하거나 부착된 캐리어 입자(예를 들어, PLG 입자)를 포함하는 (예를 들어, 항원-특이적 내성의 유도를 위한) 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 캐리어 입자는 음성 제타 전위를 갖는 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드)(PLG) 입자이다.

[0011] 본 발명의 특정 구현예는 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프를 포함하는 생분해성 입자를 포함하는 조성물로서, 상기 생분해성 입자가 음성 제타 전위를 갖는, 조성물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 생분해성 입자는 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드)(PLG)를 포함한다. 일부 구현예에서, 생분해성 입자는 폴리락트산:폴리글라이콜산의 코폴리머 비가 약 50:50인 PLG를 포함한다. 특정 구현예에서, 생분해성 입자의 표면은 카복실화된다. 일부 구현예에서, 카복실화는 폴리(에틸렌-말레산 무수물)(PEMA) 또는 폴리(아크릴산)(PAA)를 사용하여 달성된다.

[0012] 특정 구현예에서, 생분해성 입자는 약 -100 mV 내지 약 0 mV의 제타 전위를 갖는다. 특정 구현예에서, 생분해성 입자는 약 -50 mV 내지 약 -40 mV의 제타 전위를 갖는다. 일부 구현예에서, 생분해성 입자는 약 -75 mV 내지 약 -50 mV의 제타 전위를 갖는다. 특정 구현예에서, 생분해성 입자는 약 -50 mV의 제타 전위를 갖는다.

[0013] 특정 구현예에서, 생분해성 입자는 약 0.1  $\mu\text{m}$  내지 약 10  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 생분해성 입자는 약 0.3  $\mu\text{m}$  내지 약 5  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 특정 구현예에서, 생분해성 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$  내지 약 3  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 특정 구현예에서, 생분해성 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$  내지 약 1  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 생분해성 입자는 약 0.2  $\mu\text{m}$  내지 약 0.7  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 특정 구현예에서, 생분해성 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다.

[0014] 본 발명의 특정 구현예는 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프를 포함하는 음성 제타 전위를 갖는 생분해성 입자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프는 Cry j 1, Cry j 2, Cry j 3, Cry j 4, Cry j IFR, Cry j 키티나제(Chitinase), Cry j Asp, Cry j LTP 및/또는 Cry j CPA9를 포함한다. 특정 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프는 CRYJ1 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 구현예에 있어서, CRYJ1은

MDNPIDSSWRGDSNWAQNRMKLADSAVGFGSSTMGGKGGDLTYTVTNSDDDPVNP  
APGTLRYGATRDRPLWIIFSGNMNIKLMKMPMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPSVFI  
KRVSNNVHHGLHLYGSSTSVLGNVLINESFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFS  
NSSDGLVDVTLSTGVTISNNLFFNHKVMMLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPN  
SGQRMPRARYGLVHVANNNDPWTIY AIGGSSNPTILSEGNSTAPNESYKKQVTIRI  
GSKTSSSSSNWVWQSTQDVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFN (SEQ ID NO: 1).

[0015]

의 아미노산 서열을 갖는다.

[0016]

[0017] 일부 구현예에서, CRYJ1의 단편은 SEQ ID NO: 1과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 적어도 10, 적어도 20, 적



어도 30, 적어도 40, 또는 적어도 50개의 연속적인 아미노산을 포함한다. 특정 구현예에서, CRYJ1의 변이체는 SEQ ID NO: 1과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, CRYJ1의 단편은 p16-30, p81-95, p106-120, p111-125, p211-225 및 p301-315로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0018] 특정 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프는 CRYJ2 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, CRYJ2는

VENGNATPQLTKNAGVLTSSLSKRCRKVEHSRHDAINIFNVEKYGAVGDGKHDSTE  
AFSTAWQAASKKPSAMLLVPGNKKFVVNNLFFNGPSQPHFTFKVDGIIAAYQNPAS  
WKNNRWLQFAKLTGFTLMGKGVIDGQKGQWWAGQSKWVNGREISNDRDRPTAIK  
FDFSTGLIIQGLKLMNSPEFHLVFGNSEGVKIIIGISITAPRDSPTNDGIDIFASKNFHLQK  
NTIGTGDDSV AIGTGSSNIVIEDLISGPGHGHSIGSLGRENSRAEVSYPVHVNGAKFIDTQ  
NGLRIKTWQGGSGMASHIYENVEMINSENPILINQFYSTSASASQNQRSASVQIQDVT  
YKNIRGTSATAAAIQLKSSDSMPKDIKLSDISLKLTSKGIIASSL (SEQ ID NO: 2).

[0019]

[0020] 의 아미노산 서열을 갖는다.

[0021]

일부 구현예에 있어서, CRYJ2의 단편은 SEQ ID NO: 2와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 또는 적어도 50개의 연속적인 아미노산을 포함한다. 특정 구현예에서, CRYJ2의 변이체는 SEQ ID NO: 2와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, CRYJ2의 단편은 p66-80, p81-95, p141-155, p186-200, p236-250, p346-360, p351-365 및 p336-350으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0022]

특정 구현예에서, 본원에 기술된 생분해성 입자는 일본 삼나무 꽃가루 단백질로부터의 2종 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프를 포함한다. 일부 구현예에서, 2종 이상의 캡슐화된 에피토프는 융합 단백질에 함유되며, 여기서 융합 단백질 내의 2종 이상의 캡슐화된 에피토프는 절단가능한 링커에 의해 분리된다. 특정 구현예에서, 절단가능한 링커의 아미노산 서열은 세포의 파고리소좀에 위치한 프로테아제 및/또는 세포의 사이토솔에 위치한 프로테아제에 의해 절단가능하다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커의 아미노산 서열은 세포의 파고리소좀에 위치한 프로테아제 및 세포의 사이토솔에 위치한 프로테아제에 의해 절단가능하다. 특정 구현예에서, 절단가능한 링커는 퓨린 감수성 링커 또는 카텝신 감수성 링커이다. 특정 구현예에서, 절단가능한 링커는 퓨린 감수성 링커이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 카텝신 감수성 링커이다. 특정 구현예에서, 카텝신 감수성 링커는 카텝신 A, 카텝신 B, 카텝신 C, 카텝신 D, 카텝신 E, 카텝신 F, 카텝신 G, 카텝신 H, 카텝신 K, 카텝신 L, 카텝신 O, 카텝신 W, 및/또는 카텝신 Z 중 하나 이상에 의한 절단에 민감하다. 일부 구현예에서, 링커의 아미노산 서열은 Gly-Ala-Val-Val-Arg-Gly-Ala(SEQ ID NO: 3)이다.

[0023]

특정 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프는 생분해성 입자에 공유 결합된다. 특정 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 하나 이상의 캡슐화된 항원성 에피토프는 콘주게이트 분자에 의해 생분해성 입자에 공유 결합된다. 일부 구현예에서, 콘주게이트 분자는 카보디이미드 화합물을 포함한다. 특정 구현예에서, 카보디이미드 화합물은 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(EDC)를 포함한다.

[0024]

특정 구현예는 본원에 기재된 생분해성 입자를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함한다. 특정 구현예는 본원에 기술된 생분해성 입자를 포함하는 동결건조된 조성물에 관한 것이다.

[0025]

특정 구현예는 본 명세서에 기술된 유효량의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루에 대한 항원-특이적 내성을 유도하는 방법에 관한 것이다. 특정 구현예는 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루 알러지를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예는 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루 알러지를 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0026]

특정 구현예는 본원에 기술된 동결건조된 입자를 재구성하여 재구성된 약제학적 조성물을 수득하는 단계 및 상기 재구성된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루에 대한

항원-특이적 내성을 유도하는 방법에 관한 것이다. 특정 구현에는 본 명세서에 기술된 동결건조된 입자를 재구성하여 재구성된 약제학적 조성물을 수득하는 단계 및 상기 재구성된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루 알러지를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현에는 본 명세서에 기술된 동결건조된 입자를 재구성하여 재구성된 약제학적 조성물을 수득하는 단계 및 상기 재구성된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 일본 삼나무 꽃가루 알러지를 예방하는 방법에 관한 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 일본 삼나무 꽃가루로부터의 항원성 에피토프를 캡슐화하는 음성 제타 전위를 갖는 생분해성 입자의 투여가 일본 삼나무 꽃가루 알러지의 효과적인 치료를 제공하는 방법의 모델을 도시한다.
- 도 2는 JCP 추출물의 점도(도 2a), 일본 삼나무 꽃가루의 항원성 에피토프를 캡슐화하는 음성 제타 전위를 갖는 생분해성 입자(TIM-P-JCP)의 예시적인 도시(도 2b), 및 이중-에멀전 공정의 개략도(도 2c)를 나타낸다.
- 도 3은 JCP 추출물 및 재조합 JCP 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸다.
- 도 4는 TIMP 캡슐화 JCP 추출물에 대한 입자 특징을 보여준다.
- 도 5는 급성 염증성 마우스 모델의 개략도(도 5a) 및 민감화 후 21일째의 항체 반응(도 5b-5d)을 도시한다.
- 도 6은 JCP 민감화, TIMP 처리 및 JCP 챌린지 후의 체온 변화를 나타낸다.
- 도 7은 JCP 민감화, TIMP 처리 및 JCP 챌린지 후의 급기, 재채기 및 기침 점수를 나타낸다.
- 도 8은 TIMP-JCP 또는 TIMP-OVA로 처리된 JCP 민감화된 및 챌린지된 마우스로부터의 비장 세포로부터의 사이토카인 생성을 나타낸다.
- 도 9는 JCP에 의한 민감화 후 30일째의 항체 반응을 나타낸다.
- 도 10은 히스타민(도 10a) 및 MCPT-1(도 10b)의 혈청 수준을 나타낸다.
- 도 11은 수득한 면역 반응에 대한 투여 경로의 효과를 설명한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명자들은 항원이 포매된 나노입자가 자가면역 질병에 대한 내성을 유도할 수 있고 면역 반응을 감소시킬 수 있음을 발견하였다. 따라서, 이들 입자는 일본 삼나무 꽃가루에 대한 알러지와 같은 과도한 염증성 면역 반응을 특징으로 하는 임의의 질병 또는 질환의 치료에 유용할 수 있다.
- [0029] 본원에서 사용된 바와 같이, "입자"는 물질의 임의의 비-조직 유래된 조성물을 지칭하며, 구형체 또는 구형체-유사 독립체, 비드 또는 리포솜일 수 있다. 용어 "입자", 용어 "면역 변형 입자", 용어 "캐리어 입자" 및 용어 "비드"는 문맥에 따라 상호교환적으로 사용될 수 있다. 또한, "입자"라는 용어는 비드와 구형체를 포함하여 사용될 수 있다.
- [0030] 본원에서 사용된 바와 같이, "음으로 하전된 입자"는 0보다 작은 순 표면 전하를 갖도록 변형된 입자를 지칭한다.
- [0031] "카복실화된 입자" 또는 "카복실화된 비드" 또는 "카복실화된 구형체"는 그의 표면 상에 카복실기를 함유하도록 변형된 임의의 입자를 포함한다. 일부 구현예에서, 카복실기의 첨가는 예를 들어 MARCO와 같은 포착제 수용체와의 상호작용을 통한 순환으로부터의 입자의 식균세포/단핵구 흡수를 향상시킨다. 입자의 카복실화는 폴리(에틸렌-알트-말레산 무수물)(PEMA)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 카복실기를 첨가하거나 혼입하는 임의의 화합물을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0032] 본원에서 사용된 바와 같이, "항원성 모이어티"는 임의의 모이어티, 예를 들어 숙주의 면역계에 의해 인식되는 펩타이드를 지칭한다. 항원성 모이어티의 예로는 자가항원, 효소 및/또는 박테리아 또는 바이러스성 단백질, 펩타이드, 약물 또는 성분이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이론에 구속됨이 없이, 카복실화된 비드 자체가 면역계에 의해 인식될 수 있지만, 그에 아무것도 부착되어 있지 않는 카복실화된 비드는 본 발명의 목적상 "항원성 모이어티"로 간주되지 않는다.
- [0033] 본원에서 사용된 바와 같이, "네이키드(naked) 비드" 또는 "네이키드 입자" 또는 "네이키드 구형체"는 카복실화

되지 않은 비드, 입자 또는 구형체를 지칭한다.

- [0034] 본원에서 사용된 바와 같이, "전-염증 매개체" 또는 "전-염증 폴리펩타이드"는 대상체에서 염증을 유도, 유지 또는 연장시키는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 지칭한다. 전-염증 매개체의 예는 사이토카인 및 케모카인을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "염증성 단핵구"는 CD14/CD26 및 CCR2의 임의의 조합을 발현하는 임의의 골수 세포를 지칭한다.
- [0036] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "억제성 중성구"는 억제 세포를 유도하는 중성구 및/또는 단핵구를 지칭한다.
- [0037] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "Th 세포" 또는 "헬퍼 T 세포"는  $CD4^+$  세포를 지칭한다.  $CD4^+$  T 세포는 B 세포의 형질 세포 및 메모리 B 세포로의 성숙, 및 세포독성 T 세포 및 대식세포의 활성화를 포함하는, 면역적 과정을 통해 다른 백혈구를 돕는다. T 세포는 항원-제시 세포(APCs)의 표면 상에 발현되는 MHC 부류 II 분자에 의해 펩타이드 항원에 의해 제시될 때 활성화된다.
- [0038] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Th1 세포"는 전-염증 매개체를 생성하는 Th 세포의 서브셋을 지칭한다. Th1 세포는 면역 반응을 촉진시키는 사이토카인을 분비하고, 감염된 조직에 대한 중성구 및 대식세포의 동원을 중재함으로써 부분적으로 병원체에 대한 숙주 방어에 역할을 한다. Th1 세포는 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 및 TNF  $\alpha/\beta$ 를 비롯한 사이토카인을 분비하여, 바이러스 및 일부 박테리아와 같은 세포 내 병원체에 대한 방어를 조정한다.
- [0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "Th2 세포"는 세포의 기생충, 박테리아, 알러지항원 및 독소에 대한 항체-매개된 면역 반응의 활성화 및 유지를 매개하는 Th 세포의 서브셋을 지칭한다. Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 및 IL-17E(IL-25)와 같은 다양한 사이토카인을 생산함으로써 항체 생산, 호산구 활성화, 및 여러 가지 대식세포 기능의 억제가 가능하도록 상기 기능을 매개하여 식균세포-독립적인 보호성 반응을 제공한다.
- [0040] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "Th17 세포"는 Th 세포의 서브셋을 지칭한다. Th17 세포는 면역 반응을 촉진하기 위해 사이토카인을 분비하고, 감염된 조직에 중성구 및 대식세포의 동원을 중재함으로써 병원체에 대한 숙주 방어에 역할을 한다. TH17 세포는 진균 및 박테리아를 포함한 세포외 병원체에 대한 방어를 조정하기 위해 IL-17, IL-21, IL-22, IL-24, IL-26 및 TNF  $\alpha$ 와 같은 사이토카인을 분비한다.
- [0041] 본원에서 사용된 바와 같이, "커플링된"은 입자 외부에 고정되거나 입자 내에 캡슐화된 항원을 지칭한다. 따라서, 입자에 커플링된 항원은 입자내 캡슐화뿐만 아니라 표면 커플링을 모두 포함한다.
- [0042] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "IMP"는 항원에 커플링되지 않은 면역-변형 입자를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "TIMP"는 항원에 커플링된 면역 변형된 입자를 용인하는 것을 지칭한다. 일부 구현예에서, 항원은 TIMP의 표면에 부착된다. 다른 구현예에서, 항원은 TIMP 내에 캡슐화된다.
- [0043] 입자는 임의의 입자 형상 또는 형태를 가질 수 있다. 그러나, 일부 구현예에서, 생체내에서 덜 응집하는 입자를 사용하는 것이 바람직하다. 이들 구현예의 입자의 예는 구형 형상을 갖는 입자이다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 양태는 음성 제타 전위를 갖고 항원성 모이어티가 없는 면역 변형된 입자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 추가의 구현예에서, 본 발명은 항원에 커플링된 음성 제타 전위를 갖는 면역 변형된 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 추가의 구현예에서, 항원은 입자의 외부에 커플링된다. 바람직한 구현예에서, 항원은 입자 내에 캡슐화된다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태는 음성 제타 전위를 갖고 항원성 모이어티가 없는 면역 변형된 입자의 제조 방법에 관한 것이다. 이 방법은 음성 제타 전위를 갖는 면역 변형된 입자를 형성시키는데 효과적인 조건하에 면역 변형된 입자 전구체를 완충액과 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 일부 구현예에서, 면역 변형된 입자 전구체는 공중합을 통해 형성된다. 입자 미세구조는 공중합의 방법에 의존할 수 있다.
- [0046] 일부 구현예에서, 항원성 펩타이드 분자는 콘쥬게이트 분자 및/또는 링커 그룹에 의해 캐리어 입자(예를 들어, 면역 변형된 입자)에 커플링된다. 일부 구현예에서, 항원성 펩타이드 및/또는 세포자멸적 신호전달 분자를 캐리어(예를 들어, PLG 입자)에 커플링시키는 단계는 하나 이상의 공유 및/또는 비-공유 상호작용을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원성 펩타이드는 음성 제타 전위를 갖는 캐리어 입자의 표면에 부착된다. 일부 구현예에서, 항원성 펩타이드는 음성 제타 전위를 갖는 캐리어 입자 내에 캡슐화된다.
- [0047] 일 구현예에서, 면역 변형된 입자와 접촉하는 완충액은 염기성 pH를 가질 수 있다. 염기성 용액에 적합한 염기성 pH는 7.1, 7.5, 8.0, 8.5, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0 및 13.5를 포함한다. 완충액은

또한 임의의 적합한 염기 및 그의 콘쥬게이트로 제조될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 완충액은 중탄산 나트륨, 중탄산 칼륨, 중탄산 리튬, 인산이수소 칼륨, 인산이수소 나트륨 또는 인산이수소 리튬 및 이의 콘쥬게이트를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0048] 본 발명의 일 구현예에서, 면역 변형된 입자는 코폴리머를 함유한다. 이들 코폴리머는 다양한 몰비를 가질 수 있다. 본 발명의 면역 변형된 입자의 적절한 코폴리머 비는 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 81:19, 82:18, 83:17, 84:16, 85:15, 86:14, 87:13, 88:12, 89:11, 90:10, 91:9, 92:8, 93:7, 94:6, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1, 또는 100:0일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 코폴리머는 기간적, 통계적, 선형, 분지형(스타, 브러시 또는 콤(comb) 코폴리머 포함) 코폴리머일 수 있다. 일부 구현예에서, 코폴리머 비는 폴리스티렌:폴리(비닐 카복실레이트)/80:20, 폴리스티렌:폴리(비닐 카복실레이트)/90:10, 폴리(비닐 카복실레이트):폴리스티렌/80:20, 폴리(비닐 카복실레이트):폴리스티렌/90:10, 폴리락트산:폴리글라이콜산/50:50, 폴리락트산:폴리글라이콜산/80:20, 또는 폴리락트산:폴리글라이콜산/90:10일 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0049] 일 구현예에서, 본 발명의 입자는 폴리(에틸렌-말레산 무수물)(PEMA)의 용액에 폴리머(예를 들어, PLGA)를 포함하는 조성물을 첨가함으로써 제조된다. 용액 중의 PEMA의 농도는 약 0.1% 내지 약 10%일 수 있다. 일 구현예에서, 용액내 PEMA의 농도는 약 0.2% 내지 약 5%이다. 또 다른 구현예에서, 용액내 PEMA의 농도는 약 0.1% 내지 4%이다. 또 다른 구현예에서, 용액내 PEMA의 농도는 약 0.1% 내지 2%이다. 또 다른 구현예에서, 용액내 PEMA의 농도는 약 0.5% 내지 1%이다. 일 구현예에서, 용액내 PEMA의 백분율은 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5% 또는 10%이다. 일 구현예에서, 용액내 PEMA의 백분율은 약 0.5%이다. 또 다른 구현예에서, 용액내 PEMA의 백분율은 약 1.0%이다. 사용될 수 있는 다른 화합물은 폴리(에틸렌-*alt*-말레산 무수물), 폴리(이소부틸렌-*co*-말레산), 폴리(메틸 비닐 에테르-*alt*-말레산), 폴리(메틸 비닐 에테르-*alt*-말레산 모노에틸 에스테르), 폴리(메틸 비닐 에테르-*alt*-말레산 무수물), 1,9-데카디엔 분말과 가교결합된 폴리(메틸 비닐 에테르-*alt*-말레산 무수물), 폴리(스티렌-*alt*-말레산) 나트륨 염, 폴리(비닐 알코올), 폴리(아크릴산) 및/또는 나트륨 데옥시콜레이트를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0050] 일 구현예에서, 입자는 리포솜이다. 추가의 구현예에서, 입자는 30:30:40 포스파티딜콜린:포스파티딜글리세롤:콜레스테롤과 같은 몰비의 하기 지질로 구성된 리포솜이다. 또 다른 구현예에서, 입자는 리포솜 내에 캡슐화된다.

[0051] 입자는 일반적으로 비장 또는 간에서 격리하기에 충분한 크기이어야 하지만, 각각의 입자는 크기가 균일해야 할 필요는 없고, 내피 세포 또는 다른 MPS 세포를 포함하는 항원 제시 세포에 의한 수용체 또는 비-수용체 매개된 기전을 통한 식균작용 또는 흡수를 유발한다. 바람직하게는, 입자는 용해도를 향상시키고, 생체내 응집에 의해 야기될 수 있는 합병증을 회피하고, 음세포작용(pinocytosis)을 용이하게 하기 위해 현미경적 또는 나노범위 크기이다. 입자 크기는 틱새 공간으로부터 림프구 성숙 영역으로의 흡수에 대한 인자일 수 있다. 약 0.1  $\mu\text{m}$  내지 약 10  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는 입자는 식균작용을 유발할 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 입자는 이러한 제한 범위 내의 직경을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 입자는 약 0.3  $\mu\text{m}$  내지 약 5  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$  내지 약 3  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 입자는 약 0.2  $\mu\text{m}$  내지 약 2  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 갖는다. 추가의 구현예에서, 입자는 약 0.1  $\mu\text{m}$ , 또는 약 0.2  $\mu\text{m}$  또는 약 0.3  $\mu\text{m}$  또는 약 0.4  $\mu\text{m}$  또는 약 0.5  $\mu\text{m}$  또는 약 1.0  $\mu\text{m}$  또는 약 1.5  $\mu\text{m}$  또는 약 2.0  $\mu\text{m}$  또는 약 2.5  $\mu\text{m}$  또는 약 3.0 또는 약 3.5  $\mu\text{m}$  또는 약 4.0  $\mu\text{m}$  또는 약 4.5  $\mu\text{m}$  또는 약 5.0  $\mu\text{m}$ 의 평균 크기를 갖는다. 특정 구현예에서, 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$ 의 평균 크기를 갖는다. 일부 구현예에서, 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$  내지 약 0.95  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 갖는다. 예를 들어, 이러한 구현예에서, 입자는 약 0.5  $\mu\text{m}$ , 0.55  $\mu\text{m}$ , 0.6  $\mu\text{m}$ , 0.65  $\mu\text{m}$ , 0.7  $\mu\text{m}$ , 0.75  $\mu\text{m}$ , 0.8  $\mu\text{m}$ , 0.85  $\mu\text{m}$ , 0.9  $\mu\text{m}$  또는 약 0.95  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 갖는다. 특정 구현예에서, 입자는 약 0.7  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 입자의 전체 중량은 적어도 약 1000 kDa이다. 일부 구현예에서, 입자의 전체 중량은 약 1000 kDa, 1100 kDa, 1200 kDa, 1300 kDa, 1400 kDa, 1500 kDa, 1600 kDa, 1700 kDa, 1800 kDa, 1900 kDa, 2000 kDa, 2500 kDa, 3000 kDa, 3500 kDa, 4000 kDa, 4500 kDa, 5000 kDa, 또는 그 이상이다.

[0052] 일부 구현예에서, 입자의 전체 중량은 약 10,000 kDa 미만, 약 5,000 kDa 미만, 또는 약 1,000 kDa, 500 kDa, 400 kDa, 300 kDa, 200 kDa, 100 kDa, 50 kDa, 20 kDa, 10 kDa 미만이다. 조성물 내의 입자는 균일한 직경을 가질 필요는 없다. 예를 들어, 약제학적 제형은 다수의 입자를 함유할 수 있지만, 그중 일부는 약 0.5  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖고, 다른 입자들은 약 1.0  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 추가적인 예로서, 약제학적 제형은 다수의 입자를 함유할 수 있는데, 그중 일부는 약 0.7  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는 반면, 다른 입자들은 약 0.5  $\mu\text{m}$  내지 약 0.95  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖



는다. 이들 주어진 범위 내의 임의의 입자 크기의 혼합물이 유용할 것이다.

[0053] 본 발명의 입자는 특정 제타 전위를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 제타 전위는 음성이다. 일 구현예에서, 제타 전위는 약 -100 mV 미만이다(예를 들어, 보다 음수). 일 구현예에서, 제타 전위는 약 -50 mV 미만이다(예를 들어, 보다 음수). 특정 구현예에서, 입자는 -100 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 갖는다. 추가의 구현예에서, 입자는 -75 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 갖는다. 추가의 구현예에서, 입자는 -60 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 갖는다. 추가의 구현예에서, 입자는 -50 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 입자는 -40 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 갖는다. 추가의 구현예에서, 입자는 -30 mV 내지 0 mV의 제타 전위를 갖는다. 추가의 구현예에서, 입자는 -20 mV 내지 +0 mV의 제타 전위를 갖는다. 추가의 구현예에서, 입자는 -10 mV 내지 -0 mV의 제타 전위를 갖는다. 추가의 구현예에서, 입자는 -100mV 내지 -50mV의 제타 전위를 갖는다. 또 다른 특정 구현예에서, 입자는 -75mV 내지 -50mV의 제타 전위를 갖는다. 특정 구현예에서, 입자는 -50 mV 내지 -40 mV의 제타 전위를 갖는다. 또 다른 특정 구현예에서, 입자는 약 -40mV 미만(예를 들어, 보다 음수)의 제타 전위를 갖는다. 또 다른 특정 구현예에서, 입자는 적어도 약 -30 mV의 제타 전위를 갖는다. 또 다른 특정 구현예에서, 입자는 약 -30mV 미만(예를 들어, 보다 음수)의 제타 전위를 갖는다.

[0054] 본 발명의 입자는 폴리머에 대한 항원의 비율(예를 들어, 항원  $\mu\text{g}$ /폴리머 mg)을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리머에 대한 항원의 비율은 약 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  내지 적어도 약 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 폴리머에 대한 항원의 비율은 약 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 1.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 2.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 3.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 3.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 4  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 4.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 또는 약 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이다. 일부 구현예에서, 폴리머에 대한 항원의 비율은 적어도 약 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 폴리머에 대한 항원의 비율은 적어도 약 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 5.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 6  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 6.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 7  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 7.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 8.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 9.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 9.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 10.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 11  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 11.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 12  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 12.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 13  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 13.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 14  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 14.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  또는 약 15  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이다.

[0055] 일부 구현예에서, 캐리어의 전하(예를 들어, 양성, 음성, 중성)는 적용-특이적 이점(예를 들어, 생리적 혼용성, 유익한 표면-펩타이드 상호작용 등)을 부여하도록 선택된다. 일부 구현예에서, 캐리어는 (예를 들어, 일반적으로 순 음전하를 띠는 세포 표면에 대한 비특이적 결합을 감소시키기 위해) 순 중성 또는 음전하를 갖는다. 특정 구현예에서, 캐리어는 내성이 요구되는 항원(본원에서 항원-특이적 펩타이드, 항원성 펩타이드, 자가항원, 유도 항원 또는 내성 항원으로 지칭됨)에 직접 또는 간접적으로 콘주게이트될 수 있다. 일부 사례에서, 캐리어는 표면 상에 노출된 항원-특이적 펩타이드 또는 다수의 상이한 펩타이드의 다중 복제를 갖기 위해, (예를 들어, 내성 반응의 가능성을 증가시키기 위해), (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10... 20... 50... 100 이상의) 다중 결합 부위를 보유한다. 일부 구현예에서, 캐리어는 단일 유형의 항원성 펩타이드를 나타낸다. 일부 구현예에서, 캐리어는 표면 상에 다수의 상이한 항원성 펩타이드를 나타낸다. 일부 구현예에서, 캐리어 표면은 선택된 모이어티(예를 들어, 항원성 펩타이드)의 공유부착을 위한 작용기를 나타낸다. 일부 구현예에서, 캐리어 표면 작용기는 선택된 모이어티(예를 들어, 항원성 펩타이드)와의 비-공유 상호작용을 위한 부위를 제공한다. 일부 구현예에서, 캐리어는 화학 결합 형성없이 콘주게이팅 모이어티가 흡착될 수 있는 표면을 갖는다.

[0056] 입자의 크기 및 전하는 내성 유도에 중요하다. 입자는 그 안에 캡슐화된 항원에 기초하여 크기 및 전하가 상이할 것이지만, 일반적으로 본 발명의 입자는 약 100 나노미터 내지 약 1500 나노미터이고, 0 내지 약 -70mV의 전하를 가질 때 내성을 유도하는데 효과적이며, 400 내지 800 나노미터이고, 약 -25mV 내지 -70mV의 전하를 가질 때 내성을 유도하는데 가장 효과적이다. 또한, 동결건조 공정에서 부분적으로, 입자의 농도 및 수크로스 및 D-만니톨의 존재로 인해, 입자의 평균 입자 크기 및 전하가 동결건조 공정에서 약간 변경될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "후-합성 크기" 및 "합성 후 전하"는 동결건조 전의 입자의 크기 및 전하를 지칭한다. 용어 "후 동결건조 크기" 및 "후 동결건조 전하"는 동결건조 후 입자의 크기 및 전하를 지칭한다.

[0057] 일부 구현예에서, 입자는 비-금속이다. 이들 구현예에서, 입자는 폴리머로부터 형성될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 입자는 개체에서 생분해성이다. 이 구현예에서, 입자는 개체 내에 입자가 축적되는 일없이 다중 용량에 걸쳐 개체에 제공될 수 있다. 적합한 입자의 예는 폴리스티렌 입자, PLGA 입자, PLURIONICS 안정화된 폴리프로필렌 설페이트 입자 및 다이아몬드 입자를 포함한다. 바람직하게는, 입자 표면은 비-특이적이거나 원하지 않는 생물학적 상호작용을 최소화하는 물질로 구성된다. 입자 표면과 간질 사이의 상호작용은 림프 흡수에 중요한 역할을 하는 요소일 수 있다. 입자 표면은 비-특이적 상호작용을 방지하거나 감소시키는 물질로 코팅될 수 있다. 친수성 층, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 및 그의 코폴리머, 예컨대 PLURONICS®(폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)의 코폴리머를 포함)에 의해 입자를 코팅함에 의한 입체 안정화는 피하 주사 후 개선된 림프 흡수에 의해 입증된 바와 같이 간질의 단백질과의 비-특이적 상호작용을 감소시

킬 수 있다. 이러한 모든 사실은 림프 흡수와 관련하여 입자의 물리적 특성의 유의성을 지적한다. 생분해성 폴리머는 폴리머 및/또는 입자 및/또는 층의 전부 또는 일부를 생성하는데 사용될 수 있다. 생분해성 폴리머는 예를 들어, 용액내 물과 반응하는 작용기의 결과에 의해 분해될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "분해"는 분자량의 감소 또는 소수성 기의 친수성 기로의 전환에 의해 가용성이 되는 것을 지칭한다. 에스테르기를 갖는 폴리머는 일반적으로 자발적인 가수분해, 예를 들어, 폴리락타이드 및 폴리글라이콜라이드에 적용된다.

[0058] 본 발명의 입자는 또한 추가의 성분을 함유할 수 있다. 예를 들어, 캐리어는 캐리어에 편입되거나 콘주게이트된 조영제를 가질 수 있다. 현재 상업적으로 입수가 가능한 조영제를 갖는 캐리어 나노구형체의 예는 코닥(Kodak) X-사이트 나노구형체이다. 양자점(quantum dot, QDs)으로 알려진 무기 양자-국한된 발광성 나노결정은 FRET 응용 분야에서 이상적인 공여체로 부각되었으며: 높은 양자 수율과 가변 크기-의존성 스톡스 시프트(Stockes Shift)는 단일 자외선 파장에서 여기되면 청색에서 적외선으로 방출되는 크기가 서로 다르다.(Bruchez, et al., Science, 1998, 281, 2013; Niemeyer, C. M Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 5796; Waggoner, A. Methods Enzymol. 1995, 246, 362; Brus, L. E. J. Chem. Phys. 1993, 79, 5566). 덴드리머로 알려진 폴리머 부류에 기반한 하이브리드 유기/무기 양자점과 같은 양자점은 생물학적 라벨링, 이미징형성 및 광학 바이오감지 시스템에 사용될 수 있다. (Lemon, 등, J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 12886). 무기 양자점의 전통적인 합성과 달리, 이러한 하이브리드 양자점 나노입자의 합성은 고온 또는 매우 독성이 강한 불안정한 시약을 필요로 하지 않는다. (Etienne, et al., Appl. Phys. Lett. 87, 181913, 2005).

[0059] 입자는 광범위한 물질로부터 형성될 수 있다. 입자는 생물학적 이용에 적합한 물질로 구성되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 입자는 유리, 실리카, 하이드록시 카복실산의 폴리에스테르, 디카복실산의 폴리무수물, 또는 하이드록시 카복실산과 디카복실산의 코폴리머로 이루어질 수 있다. 보다 일반적으로, 캐리어 입자는 직쇄 또는 분지형, 치환된 또는 치환되지 않은, 포화 또는 불포화된, 선형 또는 가교결합된 알카닐, 할로알킬, 티오알킬, 아미노알킬, 아릴, 아랄킬, 알케닐, 아르알케닐, 헤테로아릴 또는 알콕시 하이드록시 산의 폴리에스테르, 또는 직쇄 또는 분지형, 치환된 또는 치환되지 않은, 포화 또는 불포화된, 선형 또는 가교결합된 알카닐, 할로알킬, 티오알킬, 아미노알킬, 아릴, 아랄킬, 알케닐, 아르알케닐, 헤테로아릴 또는 알콕시 디카복실산의 폴리무수물로 조성될 수 있다. 또한, 캐리어 입자는 양자점일 수 있거나, 또는 양자점 폴리스티렌 입자와 같은 양자점으로 구성될 수 있다(Joumaa et al. (2006); Langmuir 22: 1810-6). 에스테르 및 무수물 결합의 혼합물을 포함하는 캐리어 입자(예를 들어, 글라이콜산 및 세박산의 코폴리머)가 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 캐리어 입자는 폴리글라이콜산 폴리머(PGA), 폴리락트산 폴리머(PLA), 폴리세박산 폴리머(PSA), 폴리(락트-co-글라이콜)산 코폴리머(PLGA 또는 PLG; 이 용어들은 상호교환가능함), [p]올리(락트-코-세박)산 코폴리머(PLSA), 폴리(글라이콜-co-세박)산 코폴리머(PGSA), 폴리프로필렌 설파이드 폴리머, 폴리(카프로락톤), 키토산 등을 포함하는 물질을 포함할 수 있다. 본 발명에서 유용한 기타 생체적합성, 생분해성 폴리머는 카프로락톤, 카보네이트, 아미드, 아미노산, 오르토에스테르, 아세탈, 시아노아크릴레이트 및 분해성 우레탄의 폴리머 또는 코폴리머뿐만 아니라 직쇄 또는 분지형, 치환 또는 치환되지 않은 알카닐, 할로알킬, 티오알킬, 아미노알킬, 알케닐 또는 방향족 하이드록시- 또는 디-카복실산과의 코폴리머를 포함한다. 또한, 라이신, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 티로신 및 시스테인과 같은 반응성 측쇄 기를 갖는 생물학적으로 중요한 아미노산 또는 그의 거울상 이성질체는 항원성 펩타이드 및 단백질 또는 콘주게이트팅 모이어티에 콘주게이트시키기 위한 반응성기를 제공하기 위해, 상기 언급된 물질 중 임의의 것과의 코폴리머에 포함될 수 있다. 본 발명에 적합한 생분해성 물질은 다이아몬드, PLA, PGA, 폴리프로필렌 설파이드 및 PLGA 폴리머를 포함한다. 생체적합성이지만 비-생분해성 물질도 본 발명의 캐리어 입자에 사용될 수 있다. 예를 들어, 아크릴레이트들의 비-생분해성 폴리머, 에틸렌-비닐 아세테이트, 아실 치환된 셀룰로스 아세테이트, 비-분해성 우레탄, 스티렌, 비닐 클로라이드, 비닐 플루오라이드, 비닐 이미다졸, 클로로설포네이트 올레핀, 에틸렌 옥사이드, 비닐 알콜, TEFLON®(DuPont, Wilmington, Del) 및 나일론이 사용될 수 있다.

[0060] 본 발명의 입자는 당 업계에 통상적으로 알려진 임의의 수단에 의해 제조될 수 있다. 입자를 제조하는 예시적인 방법은 마이크로에멀전 중합, 계면 중합, 침전 중합, 에멀전 증발, 에멀전 확산, 용매 변위 및 염석(salting out)을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다(Astete and Sabliov, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 17:247-289(2006)). PLGA 입자에 대한 제조 공정의 조작은 입자 특성(예를 들어, 크기, 크기 분포, 제타 전위, 형태, 소수성/친수성, 폴리펩타이드 포획 등)을 조절할 수 있다. 입자의 크기는 PLGA의 농도, 입자의 제조에 사용된 용매, 유기상의 성질, 제조에 사용된 계면활성제, 연속 및 불연속상의 점도, 사용된 용매의 성질, 사용된 물의 온도, 초음파처리, 증발 속도, 첨가제, 전단 응력, 멸균 및 임의의 캡슐화된 항원 또는 폴리펩타이드의 성질을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 다수의 인자에 의해 영향을 받는다.

- [0061] 입자 크기는 폴리머 농도에 의해 영향을 받으며; 더 높은 입자는 보다 높은 폴리머 농도로부터 형성된다. 예를 들어, PLGA 농도가 1%에서 4%(w/v)로 증가하면 용매 프로필렌 카보네이트가 사용될 때 평균 입자 크기가 약 205nm에서 약 290nm로 증가할 수 있다. 대안적으로, 에틸 아세테이트 및 5% 플루로닉(Pluronic) F-127에서 PLGA 농도를 1%에서 5%(w/v)로 증가시키면 평균 입자 크기가 120nm에서 230nm로 증가한다.
- [0062] 연속 및 불연속상의 점도는 확산 공정에 영향을 미치는 중요한 파라미터이며, 이는 보다 작은 입자를 형성하는 주요 단계이다. 입자의 크기는 분산상의 점도가 증가함에 따라 증가하는 반면, 입자의 크기는 보다 점성이 강한 연속 상으로 감소한다. 일반적으로, 수성 용매에 대한 유기 용매의 상 비율이 낮을수록 입자 크기는 더 작아진다.
- [0063] 균질기 속도 및 교반은 또한 입자 크기에 영향을 미치며; 일반적으로 속도가 높아지고 교반되면 입자 크기가 줄어들지만 속도와 교반이 추가로 증가해도 입자 크기가 줄어들지 않는 지점이 존재한다. 에멀전이 단지 높은 교반과 비교하여, 고압 균질기로 균질화될 때 크기 감소에 양호한 영향이 있다. 예를 들어, 5% PVA에서 20%의 상 비율에서, 교반시 평균 입자 크기는 288nm이고 균질화(300bar의 고압)에 의한 평균 입자 크기는 231nm이다.
- [0064] 입자의 중요한 크기 감소는 용매의 확산을 개선시키기 위해 첨가되는 물의 온도를 변화시킴으로써 달성될 수 있다. 평균 입자 크기는 수온의 증가에 따라 감소한다.
- [0065] 입자 내에 캡슐화된 폴리펩타이드의 성질은 또한 입자 크기에 영향을 미친다. 일반적으로, 소수성 폴리펩타이드의 캡슐화는 보다 친수성인 폴리펩타이드의 캡슐화에 비해 더 작은 입자의 형성을 유발시킨다. 이중 에멀전 공정에서, 보다 친수성인 폴리펩타이드의 포획은 고 분자량 PLGA 및 보다 높은 내부 상 점도를 야기하는 제1 계면활성제의 고 분자량을 사용함으로써 개선된다. 용매, 폴리머 및 폴리펩타이드 사이의 상호작용은 폴리펩타이드를 입자에 혼입시키는 효율에 영향을 미친다.
- [0066] PLGA 분자량은 최종 평균 입자 크기에 영향을 미친다. 일반적으로 분자량이 높을수록 평균 입자 크기가 커진다. 예를 들어, PLGA의 조성과 분자량이 다양하기 때문에(예를 들어, 50:50 PLGA의 경우 12 내지 48 kDa; 75:25 PLGA의 경우 12 내지 98 kDa), 평균 입자 크기는 다양하다(약 102 nm - 154 nm, 약 132 nm 내지 152 nm). 입자가 동일한 분자량일지라도, 그 조성은 평균 입자 크기에 영향을 줄 수 있으며; 예를 들어, 50:50 비율의 입자는 일반적으로 75:25 비율의 입자보다 작은 입자를 형성한다. 폴리머상의 말단 기는 또한 입자 크기에 영향을 미친다. 예를 들어, 에스테르 말단 기로 제조된 입자는 산 PLGA 말단 기의 평균 크기가 240nm( $PI = 0.225$ )인 것과 비교하여, 평균 크기가 740nm( $PI = 0.394$ )인 입자를 형성한다.
- [0067] 사용된 용매는 또한 입자 크기에 영향을 줄 수 있으며; 용액의 표면 장력을 감소시키는 용매는 또한 입자 크기를 감소시킨다.
- [0068] 폴리머 및 폴리펩타이드 손상을 피하고 최종 입자 크기 감소를 촉진시키기 위해 진공에서 증발시켜 유기 용매가 제거된다. 진공 하에서 유기 용매를 증발시키는 것이 보다 작은 입자를 형성하는데 보다 효율적이다. 예를 들어, 진공에서의 증발은 정상적인 증발 속도 하에서 생성된 평균 입자 크기보다 약 30% 더 작은 평균 입자 크기를 생성한다.
- [0069] 초음파처리 파장의 진폭 또한 입자 특징에 영향을 미친다. 파장의 진폭은 액적 크기가 더 이상 변하지 않는 세이블 미니(sable mini) 에멀전을 형성하기 위해 600 내지 800초의 초음파처리로 20% 이상이어야 한다. 그러나, 초음파처리의 주된 단점은 형성된 에멀전의 단분산성의 부족이다.
- [0070] 본 발명의 입자의 제조에 사용될 수 있는 유기상은 에틸 아세테이트, 메틸 에틸 케톤, 프로필렌 카보네이트 및 벤질 알콜을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 사용될 수 있는 연속상은 계면활성제 폴록사머 188을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0071] 다양한 계면활성제가 본 발명의 입자의 제조에 사용될 수 있다. 계면활성제는 음이온성, 양이온성 또는 비이온성일 수 있다. 폴록사머 및 폴록사민 계열의 계면활성제는 통상적으로 입자 합성에 사용된다. 사용될 수 있는 계면활성제는 PEG, Tween-80, 젤라틴, 텍스트란, 플루로닉 L-63, PVA, 메틸셀룰로스, 레시틴 및 DMAB를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 비타민 E TPGS(D- $\alpha$ -토코페릴 폴리메틸렌 글라이콜 1000 석시네이트)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 생분해성 및 생체적합성 계면활성제. 특정 구현예에서, 2개의 계면활성제가 필요하다(예를 들어 이중 에멀전 증발 방법에서). 이들 두 계면활성제는 제1 에멀전을 위한 소수성 계면활성제 및 제2 에멀전을 위한 소수성 계면활성제를 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 입자의 제조에 사용될 수 있는 용매는 아세톤, 테트라하이드로푸란(THF), 클로로포름 및 염소산염 계

열의 구성원인 메틸 염화물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 유기 용매의 선택에는 두 가지 선택 기준이 필요하다: 즉, 폴리머는 이 용매에 가용성이어야 하며, 용매는 수성상과 완전히 불혼화성이어야 한다.

[0073] 본 발명의 입자의 제조에 사용될 수 있는 염은 염화 마그네슘 헥사하이드레이트, 마그네슘 아세테이트 테트라하이드레이트를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0074] 통상적인 염석제는 전해질(예를 들어, 염화나트륨, 아세트산 마그네슘, 염화 마그네슘), 또는 비-전해질(예를 들어, 수크로스)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0075] 본 발명의 입자의 안정성 및 크기는 지방산 또는 탄소의 짧은 사슬을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 화합물의 첨가에 의해 개선될 수 있다. 라우르산의 더 긴 탄소 사슬의 첨가는 입자 특징의 개선과 관련된다. 또한, 소수성 첨가제의 첨가는 입자 크기, 입자 내 폴리펩타이드의 편입 및 방출 프로파일을 개선시킬 수 있다. 동결건조로 입자의 준비가 안정화될 수 있다. 트레할로스와 같은 동결보호제의 첨가는 동결건조시 입자의 응집을 감소시킬 수 있다.

[0076] 현재 상업적으로 이용가능한 적합한 비드는 FluoSpheres(Molecular Probes, Eugene, Oreg.)와 같은 폴리스티렌 비드를 포함한다.

[0077] 일부 구현예에서, 본 발명은 (a) 화학적 및/또는 생물학적 제제를 대상체에게 전달하도록 구성된 전달 스캐폴드; 및 (b) 항원-특이적 내성의 유도를 위한 항원-커플링된 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드) 입자를 포함하는 시스템을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 전달 스캐폴드의 적어도 일부는 미세다공성이다. 일부 구현예에서, 항원-커플링된 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드) 입자는 상기 스캐폴드 내에 캡슐화된다. 일부 구현예에서, 화학적 및/또는 생물학적 제제는: 단백질, 펩타이드, 소분자, 핵산, 세포 및 입자로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 화학적 및/또는 생물학적 제제는 세포를 포함하고, 상기 세포는 체장 소도세포를 포함한다.

[0078] 물리적 특성은 또한 미성숙 림프구를 갖는 영역에서의 흡수 및 유지 후의 나노입자의 유용성과 관련이 있다. 여기에는 강성 또는 고무성(rubberiness)과 같은 기계적 특성이 포함된다. 일부 구현예는 PEG에서와 같이, 전신(그러나, 표적화된 또는 면역은 아님) 전달을 위해 최근 개발되고 특정규명된 PPS-PEG 시스템에서와 같이, 고무질 코어, 예를 들어 오버레이어, 예를 들어 친수성 오버레이어를 갖는 폴리(프로필렌 설파이드)(PPS) 코어에 기초한다. 고무질 코어는 폴리스티렌 또는 금속 나노입자 시스템에서와 같이 실질적으로 강성인 코어와는 대조적이다. 고무라는 용어는 천연 또는 합성 고무 이외의 특정 회복력있는 물질을 지칭하며, 고무는 폴리머 기술 분야의 사람들에게 친숙한 용어이다. 예를 들어, 가교결합된 PPS는 소수성 고무질 코어를 형성하는데 사용될 수 있다. PPS는 산화적 조건 하에 폴리설푸라이드, 마지막으로 폴리설푼으로 분해되어 소수성 고무로부터 친수성, 수용성 폴리머로 전이되는 폴리머이다. 다른 설파이드 폴리머가 사용하기에 적합할 수 있으며, 설파이드 폴리머라는 용어는 머(mer)의 골격에 황을 갖는 폴리머를 지칭한다. 사용될 수 있는 다른 고무질 폴리머는 약 37°C 미만의 수화된 조건 하에서 유리전이 온도를 갖는 폴리에스테르이다. 코어 및 오버레이어가 섞이지 않는 경향이 있기 때문에 소수성 코어는 친수성 오버레이어와 함께 유리하게 사용될 수 있어서, 오버레이어는 코어로부터 입체적으로 팽창하는 경향이 있다. 코어는 층이 그 위에 있는 입자를 지칭한다. 층은 코어의 적어도 일부분을 덮는 물질을 지칭한다. 층은 흡착되거나 공유결합될 수 있다. 입자 또는 코어는 단단하거나 중공일 수 있다. 고무질 소수성 코어는 결정성 또는 유리질(예를 들어, 폴리스티렌의 경우) 코어와 같이 단단한 소수성 코어보다 유리하며, 소수성 약물의 고무하가 고무질 소수성 코어를 갖는 입자에 의해 전달될 수 있다는 점에서 유리하다.

[0079] 또 다른 물리적 특성은 표면의 친수성이다. 친수성 물질은 그것이 가교되지 않을 때 물에서 적어도 1 g/L의 수용해도를 가질 수 있다. 친수성 폴리머로 입자를 입체 안정화시키면 비-특이적 상호작용을 감소시킴으로써 간질로부터의 흡수를 개선시킬 수 있지만; 입자의 증가된 스텔스(stealth) 성질은 또한, 미성숙 림프구가 있는 부위의 식균세포에 의한 내재화를 감소시킬 수 있다. 그러나 이러한 경쟁 기능의 균형을 맞추는 문제는 충족되었으며, 본 명세서는 림프질의 DC 및 기타 APC에 효과적인 림프 전달을 위한 나노입자 생성을 문서화한다. 일부 구현예는 친수성 성분, 예를 들어 친수성 물질의 층을 포함한다. 적합한 친수성 물질의 예는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리에틸렌 옥사이드, 다당류, 폴리아크릴산 및 폴리에테르 중 하나 이상이다. 층에서 폴리머의 분자량은 생체내 유용한 정도의 입체 장애, 예를 들어, 약 1,000 내지 약 100,000 또는 그 이상을 제공하도록 조절될 수 있으며; 당업자는 명시적으로 언급된 범위, 예를 들어 10,000 내지 50,000 내의 모든 범위 및 값이 고려되는 것을 즉시 인식할 것이다.

[0080] 나노입자는 추가 반응을 위한 작용기를 혼입시킬 수 있다. 추가 반응을 위한 작용기는 친전자체 또는 친핵체를



포함하며; 이들은 다른 분자와 반응하는데 편리하다. 친핵체의 예는 1차 아민, 티올 및 하이드록실이다. 친전자체의 예는 석신이미딜 에스테르, 알데하이드, 이소시아네이트 및 말레이미드이다.

[0081] 당 업계에 널리 공지된 많은 수단이 항원성 펩타이드 및 단백질을 캐리어에 콘주게이트시키는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 항원성 펩타이드 및 단백질의 생물학적 활성을 파괴시키지 않거나 심각하게 제한하지 않고, 항원성 펩타이드 또는 단백질의 동족 T 세포 수용체와의 상호작용을 허용하는 방향으로 충분한 수의 항원성 펩타이드 및 단백질이 캐리어에 콘주게이트되도록 하는 임의의 표준 화학을 포함한다. 일반적으로, 항원성 펩타이드 또는 단백질의 C-말단 영역, 또는 항원성 펩타이드 또는 단백질 융합 단백질의 C-말단 영역을 어너(earner)에 콘주게이트시키는 방법이 바람직하다. 정확한 화학은 물론, 어너 물질의 성질, 항원성 펩타이드 또는 단백질에 대한 C-말단 융합의 존재 또는 부재, 및/또는 콘주게이트하는 모이어티의 존재 또는 부재에 의존할 것이다.

[0082] 작용기는 필요에 따라 이용가능성을 위해 입자 상에 위치할 수 있다. 하나의 위치는 코어 또는 폴리머 상의 층, 또는 그렇지 않으면 입자에 결합된 코어 폴리머 또는 폴리머들 상의 측면 기 또는 말단으로 있을 수 있다. 예를 들어, 특정 세포 표적화 또는 단백질 및 펩타이드 약물 전달을 위해 용이하게 기능화될 수 있는 나노입자를 안정화시키는 PEG를 기술하는 예가 여기에 포함된다.

[0083] 펩타이드 또는 단백질을 캐리어 표면에 고착시키기 위해, 콘주게이트, 예컨대 에틸렌 카보디이미드(ECDI), 헥사메틸렌 디이소시아네이트, 2개의 에폭시 잔기를 함유하는 프로필렌글리콜 디-글리시딜에테르 및 에피클로로하이드린이 사용될 수 있다. 이론에 구속됨이 없이 ECDI는 내성의 유도를 위한 두 가지 주요 기능을 수행하는 것으로 의심된다: (a) 유리 아미노와 유리 카복실 기 사이의 펩타이드 결합 형성의 촉매 작용을 통해 단백질/펩타이드를 세포 표면에 화학적으로 커플링시키고; 및 (b) 항체가 세포자멸적 세포사를 모방하도록 유도하여 비장내 숙주 항원 제시 세포(내피 세포를 포함할 수 있음)에 의해 포획되어 내성을 유도하게 된다. 자가반응성 세포에서 아네르기(anergy)를 직접 유도하는 비-면역원성 방식으로 숙주 T-세포에 대한 제시이다. 또한, ECDI는 특정 조절 T 세포의 유도에 대한 강력한 자극제 역할을 한다.

[0084] 일련의 구현예에서, 항원성 펩타이드 및 단백질은 공유 화학 결합을 통해 캐리어에 결합된다. 예를 들어, 항원의 C-말단 근처의 반응성 기 또는 모이어티(예를 들어, C-말단 카복실기 또는 아미노산 측쇄의 하이드록실, 티올 또는 아민 기)는 직접적인 화학 반응에 의해 캐리어의 표면 상의 반응성 기 또는 모이어티(예를 들어, PLA 또는 PGA 폴리머의 하이드록실 또는 카복실 기, 덴드리머의 말단 아민 또는 카복실 기, 또는 인지질의 하이드록실, 카복실 또는 포스페이트 기)에 직접 콘주게이트될 수 있다. 대안적으로, 항원성 펩타이드와 단백질 및 캐리어 모두에 공유결합하는 접합 모이어티가 있을 수 있으며, 이에 의해 그들을 연결한다.

[0085] 캐리어 표면상의 반응성 카복실기는 항원성 펩타이드 또는 단백질 상의 유리 아민(예를 들어, Lys 잔기로부터)을, 예를 들어 1-에틸-3-[3,9-디메틸 아미노프로필]카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) 또는 N-하이드록시석신이미드 에스테르(NHS)와 반응시킴으로써 유리 아민에 연결될 수 있다. 유사하게, 항원성 펩타이드 또는 단백질상의 유리 카복실(예를 들어, C-말단으로부터 또는 Asp 또는 Glu 잔기로부터)을 갖는 캐리어의 표면 상의 유리 아민을 콘주게이트하는데 동일한 화학 작용이 사용될 수 있다. 대안적으로, 캐리어의 표면상의 유리 아민 기는 본질적으로 Arano et al. (1991) Chem. 2:71-6에 의해 기재된 바와 같이 설포-SIAB 화학을 사용하여 항원성 펩타이드 및 단백질, 또는 항원성 펩타이드 또는 단백질 융합 단백질에 공유결합될 수 있다.

[0086] 또 다른 구현예에서, 항원성 펩타이드 또는 단백질에 결합된 리간드와 캐리어에 부착된 항-리간드 사이의 비-공유결합이 항원을 캐리어에 콘주게이트시킬 수 있다. 예를 들어, 바이오틴 리가제 인식 서열 태그는 항원성 펩타이드 또는 단백질의 C-말단에 연결될 수 있으며, 이 태그는 바이오틴 리가제로 바이오티닐화될 수 있다. 이어서, 바이오틴은 항원성 펩타이드 또는 단백질을 항-리간드로서 캐리어의 표면에 흡착 또는, 그렇지 않으면 결합된 아비딘 또는 스트렙타비딘에 비-공유적으로 콘주게이트하는 리간드로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 항원성 펩타이드 및 단백질이 상기 기재된 바와 같이 Fc 영역을 갖는 면역글로불린 도메인에 융합되는 경우, Fc 도메인은 리간드로서 작용할 수 있고, 캐리어의 표면에 공유결합 또는 비-공유결합된 단백질 A는, 항원성 펩타이드 또는 단백질을 캐리어에 비-공유결합시키는 항-리간드로서 작용할 수 있다. 다른 방법은 당 업계에 공지되어 있으며, 항원성 펩타이드 및 단백질을 캐리어에 비-공유적으로 콘주게이트시키는데 사용될 수 있으며, 금속 이온 킬레이트화 기술(예를 들어, 항원성 펩타이드 또는 단백질, 또는 항원성 펩타이드 또는 단백질 융합 단백질의 C-말단에서의 폴리-His 태그, 및  $Ni^{+}$ -코팅된 캐리어를 사용)를 포함할 수 있으며, 이들 방법은 본원에서 기술된 것들로 대체될 수 있다.

[0087] 플랫폼 분자에 대한 핵산 모이어티의 콘주게이션은 핵산 모이어티 및 플랫폼 분자상의 하나 이상의 가교결합체

및 작용기를 전형적으로 포함하는 임의의 여러 방식으로 영향을 받을 수 있다. 연결 기는 표준 합성 화학 기술을 사용하여 플랫폼에 추가된다. 연결기는 표준 합성 기술을 사용하여 핵산 모이어티에 첨가될 수 있다. 종사자는 본 발명의 조합에 사용되는 항원에 대해 수많은 선택을 갖는다. 조합에 존재하는 유도 항원은 유도된 면역원성 반응의 특이성에 기여한다. 원하지 않는 면역학적 반응의 표적 및 내성이 요구되는 표적이 되고 치료될 대상체에 존재하거나 배치되는 항원인 표적 항원과 동일하거나 동일하지 않을 수 있다.

[0088] 본 발명의 유도 항원은 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 탄수화물, 당지질 또는 생물학적 공급원으로부터 단리된 다른 분자일 수 있거나, 또는 화학적으로 합성된 소분자, 폴리머 또는 생물학적 물질의 유도체일 수 있으며, 점막 결합 성분과 결합될 때 이 설명에 따른 내성을 유도하는 능력을 갖는다.

[0089] 일부 구현예에서, 본 발명은 하나 이상의 펩타이드, 폴리펩타이드 및/또는 단백질에 커플링된 캐리어(예를 들어, 면역 변형 입자)를 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 것들과 같은 캐리어(예를 들어, PLG 캐리어)는 항원-특이적 내성을 유도하고, 및/또는 면역 관련 질환(예컨대, 마우스 모델에서 EAE)의 개시를 예방하고, 및/또는 기존의 면역 관련 질환의 중증도를 줄이는데 효과적이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 T-세포가 T-세포 활성화와 관련된 초기 사건을 수행하게 할 수 있지만, T-세포가 효과기 기능을 획득하는 것을 허용하지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 조성물의 투여는 CD69 및/또는 CD44 상향 조절과 같은 준-활성화된 표현형을 갖는 T-세포를 유도할 수 있지만, IFN- $\gamma$ 의 결핍 또는 IL-17 합성에 의해 지시되는 것과 같은 효과기 기능을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물의 투여는 순수한(naive) 항원-특이적 T-세포를 CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> 표현형을 갖는 것과 같은 조절 표현형으로 전환시키지 않고 준-활성화된 표현형을 갖는 T-세포를 유도한다.

[0090] 일부 구현예에서, 캐리어(예를 들어, 입자)의 표면은 항원성 펩타이드 및/또는 다른 기능성 요소를 캐리어에 부착(예를 들어, 공유적으로, 비-공유적으로)시킬 수 있는 화학적 모이어티 및/또는 작용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 캐리어(예를 들어, 입자)상의 화학적 모이어티 및/또는 작용기의 수, 배향, 간격 등은 캐리어 화학, 원하는 적용 등에 따라 다양하다.

[0091] 일부 구현예에서, 캐리어는 캐리어에 부착되거나, 흡착되거나, 캐리어내에 캡슐화되고/되거나 캐리어 전체에 함유되는 하나 이상의 생물학적 또는 화학적 제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 화학적 또는 생물학적 제제가 입자 전체에 캡슐화되고, 및/또는 입자 전체에 걸쳐 함유된다. 본 발명은 화학적 또는 생물학적 제제의 특성에 의해 제한되지 않는다. 이러한 제제는 단백질, 핵산 분자, 소분자 약물, 지질, 탄수화물, 세포, 세포 성분 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 2종 이상의(예를 들어, 3, 4, 5 등) 상이한 화학적 또는 생물학적 제제가 캐리어 상에 또는 캐리어 내에 포함된다. 일부 구현예에서, 제제는 특정 방출 속도로 구성된다. 일부 구현예에서, 다수의 상이한 제제가 상이한 방출 속도로 구성된다. 예를 들어, 제1 제제는 제2 제제가 보다 긴 기간(예를 들어, 일, 주, 개월 등)에 걸쳐 방출하는 동안 몇 시간에 걸쳐 방출할 수 있다. 일부 구현예에서, 캐리어 또는 그의 일부는 생물학적 또는 화학적 제제의 서방형 방출을 위해 구성된다. 일부 구현예에서, 서방형 방출은 적어도 30일(예를 들어, 40일, 50일, 60일, 70일, 80일, 90일, 100일, 180일 등)의 기간에 걸쳐 제제의 생물학적 활성 양의 방출을 제공한다. 일부 구현예에서, 캐리어 또는 그의 일부분은 공극으로 세포가 내부로 들어가도록 충분히 다공성이도록 구성된다. 공극의 크기는 관심있는 특별한 세포 유형 및/또는 원하는 내재화 양을 위해 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 입자는 약물 또는 면역조절물질과 같은 다른 비-펩타이드 활성제없이 관심있는 항원을 포함한다. 또한, 일부 구현예에서, 본 발명의 입자는 관심 항원 이외에 면역자극성 또는 면역억제성 펩타이드를 함유하지 않는다. 또한, 일부 구현예에서, 입자는 표면 상에 또는 입자 내에 캡슐화된 다른 단백질 또는 펩타이드(예를 들어, 공동자극 분자, MHC 분자, 면역자극성 펩타이드 또는 면역억제성 펩타이드)를 함유하지 않는다.

[0092] 본 발명의 입자에서의 항원, 생물학적 및/또는 화학적 제제의 캡슐화는 놀랍게도 면역학적 관용을 유도하는 것으로 밝혀졌으며, 몇 가지 이점이 있다. 첫째, 캡슐화된 입자는 보다 느린 사이토카인 반응을 갖는다. 둘째로, 여러 항원, 생물학적 및/또는 화학적 제제를 사용하는 경우, 캡슐화는 제제가 입자 표면에 부착된 경우 발생할 수 있는 다양한 분자 간의 경쟁을 제거한다. 셋째, 캡슐화는 보다 많은 항원, 생물학적 및/또는 화학적 제제가 입자와 함께 편입되도록 한다. 넷째, 캡슐화는 복합 단백질 항원 또는 장기 균질물(예를 들어, 1형 당뇨병의 경우 췌장 균질물 또는 망콩 알러지의 망콩 추출물)의 보다 용이한 사용을 허용한다. 마지막으로, 입자의 표면에 콘주게이션 대신에 입자 내에 항원, 생물학적 및/또는 화학적 제제를 캡슐화하여 입자의 표면 상에 순 음전하를 유지시킨다. 본 발명의 입자내 항원, 생물학적 및/또는 화학적 제제의 캡슐화는 당 업계에 공지된 임의의 방법으로 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 폴리펩타이드 항원은 이중-에멀전 공정에 의해 입자 내에 캡슐화된다. 추

가의 구현예에서, 폴리펩타이드 항원은 수용성이다.

[0093] 또 다른 구현예에서, 폴리펩타이드 항원은 단일-에멀전 공정에 의해 입자 내에 캡슐화된다. 추가의 구현예에서, 폴리펩타이드 항원은 보다 소수성이다. 때때로, 이중 에멀전 공정은 큰 입자의 형성을 유도하여, 친수성 활성 성분의 누출 및 낮은 포착 효율을 초래할 수 있다. 유착 및 Ostwald 숙성은 이중-에멀전 액적을 불안정하게할 수 있는 두 가지 기전이며, 친수성 활성 성분의 유기상을 통한 확산은 포획된 활성 성분의 낮은 수준을 초래하는 주요 기전이다. 일부 구현예에서, 나노입자 크기를 감소시키는 것이 유익할 수 있다. 이것을 달성하기 위한 하나의 전략은 두 번째 강한 전단율을 적용하는 것이다. 누출 효과는 높은 폴리머 농도 및 높은 폴리머 분자량을 사용하여 내부 수성 상의 점도 증가 및 계면활성제 분자량의 증가를 수반함으로써 감소될 수 있다.

[0094] 특정 구현예에서, 본 발명은 세포 또는 다른 생물학적 또는 화학적 체제를 그 안에(또는 그 위에) 갖는 캐리어를 제공한다. 세포가 사용되는 경우, 캐리어는 특별한 유형의 세포로 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 캐리어는 그 위에 채장 소도세포를 갖는다. 일부 구현예에서, 미세다공성 캐리어는 ECM 단백질 및/또는 엑센딘-4를 추가로 갖는다. 캐리어는 특별한 유형으로 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 캐리어는 다양한 다공성의 영역(예를 들어, 변화하는 공극 크기, 공극 깊이 및/또는 공극 밀도)을 갖는다. 일부 구현예에서, 캐리어는 약제, DNA, RNA, 세포외 기질 단백질, 엑센딘-4 등을 그 위에(또는 그 안에) 갖는다. 특정 구현예에서, 본 발명은 채장 소도세포를 상기 캐리어로 이식하는 방법을 제공한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 유도 항원은 단일의 단리된 또는 재조합적으로 생산된 분자이다. 표적 항원이 숙주의 다양한 위치에 전파되는 병태를 치료하기 위해, 일반적으로 유도 항원이 표적 항원과 동일하거나 면역학적으로 관련될 필요가 있다. 그러한 항원의 예로는 대부분의 폴리뉴클레오타이드 항원과 일부 탄수화물 항원(예컨대, 혈액형 항원)이 있다.

[0095] 임의의 적합한 항원이 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유도 항원은 유도된 면역원성 반응의 특이성에 기여한다. 유도 항원은 원하지 않는 면역학적 반응을 위한 표적이고 내성이 요구되는, 치료될 대상체에 존재하거나 배치되는 항원인 표적 항원과 동일하거나 같지 않을 수 있다.

[0096] 본 발명의 특정 구현예에서, 유도 항원은 꽃가루에서 발견되는 것, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 폴리펩타이드와 동일한 형태가 아니지만, 그의 단편 또는 유도체이다. 본 발명의 유도 항원은 적절한 특이성의 분자에 기반을 두지만 단편화, 잔기 치환, 라벨링, 콘주게이션 및/또는 다른 기능적 특성을 갖는 펩타이드와의 융합에 의해 적응된 펩타이드를 포함한다. 적응은 독성 또는 면역원성과 같은 임의의 바람직하지 않은 특성의 제거; 또는 점막 결합, 점막 침투 또는 면역 반응의 면역원성 아암의 자극과 같은 임의의 바람직한 특성 개선을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 임의의 바람직한 목적을 위해 수행될 수 있다. 본원에 사용된 CRYJ1 또는 CRYJ2와 같은 용어는 유사체인 각각의 분자의 적어도 10개 및 바람직하게는 20개의 연속적인 아미노산에 대하여 온전한 하위단위 뿐만 아니라 상동성(아미노산 수준이 바람직하게는 70% 동일한, 보다 바람직하게는 80% 동일하고, 더욱더 바람직하게는 90% 동일함) 영역을 함유하는 동종형 및 합성 변이체, 단편, 융합 펩타이드, 콘주게이트 및 기타 유도체를 지칭하며, 상기 유도체의 상동성 영역은 표적 항원에 대한 내성을 유도하는 능력을 각각의 모체 분자와 공유한다.

[0097] 유도 항원의 면역원성 영역은 종종 항체 반응의 자극을 위한 면역우성 에피토프와 상이하다는 것이 인식된다. 면역원성 영역은 일반적으로 T 세포를 포함하는 특정 세포 상호작용에서 나타날 수 있는 영역이다. 면역원성 영역은 존재할 수 있고, 온전한 항원의 제시시 내성을 유도할 수 있다. 일부 항원은 원상태 항원의 처리 및 제시가 정상적으로 내성을 유발하지 않는다는 점에서 잠적 면역원성 영역을 함유한다. 잠적 항원의 정교화 및 그의 동정은 국제 특허 공보 WO 94/27634에서 발견된다.

[0098] 본 발명의 특정 구현예에서, 2개, 3개 또는 그 이상의 복수의 유도 항원이 사용된다. 복수의 표적 항원이 존재할 때 이들 구현예를 실시하거나, 또는 표적에 대해 복수의 방관자를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 또한 가능한 여러 가지 다른 표적을 다루기 위해 항원 각테일을 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, CRYJ1 및 CRYJ2 단편의 각테일 뿐만 아니라 일본 삼나무 꽃가루에서 유래된 다른 에피토프를 사용하여 대상체를 관용화시킬 수 있었다. 또 다른 예에서, 알러지항원의 혼합물은 아토피 치료를 위한 항원을 유도하는 역할을 할 수 있다.

[0099] 유도 항원은 분자의 성질에 따라 당 업계에 공지된 다수의 기술에 의해 제조될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드 및 탄수화물 항원은 풍부한 처리 대상 중의 세포로부터 단리될 수 있다. 짧은 펩타이드는 아미노산 합성에 의해 편리하게 제조된다. 공지된 서열의 더 긴 단백질은 인코딩 서열을 합성하거나, 천연 공급원 또는 벡터로부터의 인코딩 서열을 PCR-증폭시킨 다음, 적절한 박테리아 또는 진핵 숙주 세포에서 인코딩 서열을 발현시킴으로써 제조될 수 있다.



[0100] 본 발명의 특정 구현예에서, 조합물은 꽃가루 입자로부터 수득된 항원의 복합 혼합물을 포함하며, 이들 중 하나 또는 그 이상은 항원을 유도하는 역할을 한다. 항원은 온전하거나, 포름알데하이드, 글루타르알데하이드 또는 알코올과 같은 고정액으로 처리되는 전체 세포의 형태일 수 있다. 항원은 세포 또는 조직의 제제 가용화 또는 기계적 파열에 의해 생성된 후 정화된 용해물의 형태일 수 있다. 항원은 또한 세포하 분별화, 특히 차별적인 원심분리와 같은 기술에 의한 원형질막의 농축, 임의로 제제 가용화 및 투석에 의해 수득될 수 있다. 가용화된 막 단백질의 친화성 또는 이온 교환 크로마토그래피와 같은 다른 분리 기술도 적합하다.

[0101] 알러지항원은 이에 대한 면역 반응의 면역원성이 또한 바람직한 다른 항원이다. 일 구현예에서, 항원은 일본 삼나무 꽃가루와 관련된 폴리펩타이드이다. 일부 구현예에서, 항원은 CRYJ1이다. 특정 구현예에서, 항원은 CRYJ2이다.

[0102] 일 구현예에서, 본 발명의 입자는 알러지, 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 에피토프를 포함하는 항원에 커플링된다. 항원은 하나 이상의 에피토프의 복제본을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 항원은 하나의 질환 또는 장애와 관련된 단일 에피토프를 포함한다. 추가의 구현예에서, 항원은 동일한 질환 또는 장애와 관련된 하나 초과에 에피토프를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항원은 상이한 질환 또는 장애와 관련된 하나 초과에 에피토프를 포함한다. 추가의 구현예에서, 항원은 하나 이상의 알러지와 관련된 하나 이상의 에피토프를 포함한다.

[0103] 일본 삼나무 꽃가루에 대한 알러지와 관련된 에피토프의 추가의 비-한정적인 예는 표 1에 개시되어 있다.

[표 1]

일본 삼나무 꽃가루와 관련된 폴리펩타이드 항원

폴리펩타이드	대표적인 에피토프
CRYJ1	MDNPIDSSWRGDSNWAQNRMKLADSAVGFGSSTMGGKGGDLYT VTNSDDDPVNPAPGTLRYGATRDRPLWIIFSGNMNIKLMKPMYIAG YKTFDGRGAQVYIGNGGSPSVFIKRVSNVHHGLHLYGSSTSVLGNVL INESFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLSS TGVITISNNLFFNHKKVMLLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNSG QRMPRARYGLVHVANNNDPWITIYAIGSSNPITLSEGNSTAPNE SYKKQVTIRIGSKTSSSSSNWVWQSTQDVFYNGAYFVSSGKYEGGN IYTKKEAFN (SEQ ID NO: 1)
CRYJ2	VENGNATPQLTKNAGVLTSSLSKRCRKVEHSRHDAINIFNVEKYGA VGDGKHDSSTAFSTAWQAASKKPSAMLLVPGNKKFVVNNLFFNGP SQPHFTFKVDGIIAAYQNPASWKNNRIWLQFAKLTGFTLMGKGVID GQGKQWWAGQSKWVNGREISNDRDRPTAIKFDFSTGLIIQGLKLM NSPEFHLVFGNSEGVKIIGISITAPRDSPTNDGIDIFASKNFHLQKNTI GTGDDSVAGTGGSSNIVIEDLISGPGHGISIGSLGRENSRAEVSYYHV NGAKFIDTQNGRLRIKTWQGGSGMASHIYENVEMINSENPIINQFY STSASASQNRSAVQIQDVTYKNIRGTSATAAAIQLKSSDSMPKDI KLSDISLKLTSKGIASSL (SEQ ID NO: 2)

[0104]

[0105] 알러지와 관련된 임의의 적합한 항원이 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 입자는 알러지와 관련된 하나 이상의 항원 또는 에피토프로 캡슐화된다. 특정 구현예에서, 항원 또는 에피토프는 분진, 애완동물 알러지항원, 수목 꽃가루, 풀 꽃가루, 곰팡이, 식물성 알러지항원, 열매 알러지항원, 너트 알러지항원, 종자 알러지항원, 향신료 알러지항원, 곡물 알러지항원, 해산물 알러지항원, 육류 알러지항원, 선충 알러지항원, 라텍스 알러지항원 및/또는 독 알러지항원과 관련되어 있다.

[0106] 일부 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 항원성 에피토프는 Cry j 1, Cry j 2, Cry j 3, Cry j 4, Cry j IFR, Cry j 키틴나제(Chitinase), Cry j Asp, Cry j LTP, 및/또는 Cry j CPA9, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 항원성 에피토프는 CRYJ1 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, CRYJ1 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 항원성 에피토프는 CRYJ1의 단편이다. 일부 구현예에서, CRYJ1의 단편은 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 또는 적어도 50개의 연속적인 아미노산을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원성 에피토프는 CRYJ1의 변이체이다. 특정 구현예에서, 변이체는 SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99% 초과와 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0107] 일부 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 항원성 에피토프는 p16-30, p81-95, p106-120, p111-125, p211-225, 및 p301-315로 구성된 그룹으로부터 선택된 CRYJ1의 단편이며, 이는 Sone 등, J. Immunol, vol. 161(1) 448-457 (1998)에 기재되어 있으며; 그 전문이 본원에 참고로 편입되어있다.
- [0108] 일부 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 항원성 에피토프는 CRYJ2 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, CRYJ2 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 항원성 에피토프는 CRYJ2의 단편이다. 일부 구현예에서, CRYJ2의 단편은 SEQ ID NO: 2에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 또는 적어도 50개의 연속적인 아미노산을 포함한다. 특정 구현예에서, 항원성 에피토프는 CRYJ2의 변이체이다. 특정 구현예에서, 변이체는 SEQ ID NO: 2에 대해 적어도 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99% 초과와 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0109] 일부 구현예에서, 일본 삼나무 꽃가루로부터의 항원성 에피토프는 p66-80, p81-95, p141-155, p186-200, p236-250, p346-360, p351-365, 및 p336-350으로 구성된 그룹으로부터 선택된 CRYJ2의 단편이며, 이들은 Sone et al(1998)에 기술되어있다.
- [0110] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 입자는 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 15개 이상, 또는 20개 또는 그 이상의 일본 삼나무 꽃가루로부터의 항원성 에피토프를 캡슐화한다. 특정 구현예에서, 2개 이상의 항원성 에피토프는 융합 단백질에 함유된다. 일부 구현예에서, 융합 단백질에 함유된 항원성 에피토프는 절단가능한 링커에 의해 연결된다. 본원에서 사용되는 절단가능한 링커는 특정 절단 부위를 함유하는 아미노산 서열을 지칭한다.
- [0111] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 길이가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10 초과, 15 초과, 20 초과, 25 초과와 아미노산이다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 특정 부위의 프로테아제에 의해 절단된다. 특정 구현예에서, 절단가능한 링커는 프로테아제에 의해 절단되는 하나 이상의 특정 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 하나 이상의 특정 부위를 함유하며, 여기서 특정 부위는 상이한 프로테아제에 의해 절단된다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 하나 이상의 특정 부위를 함유하며, 여기서 특정 부위는 동일한 프로테아제에 의해 절단된다.
- [0112] 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 퓨린 감수성 링커 및/또는 카텝신 감수성 링커이다. 특정 구현예에서, 절단가능한 링커는 링커 상의 특정 부위에서 퓨린, 카텝신 A, 카텝신 B, 카텝신 C, 카텝신 D, 카텝신 E, 카텝신 F, 카텝신 G, 카텝신 H, 카텝신 K, 카텝신 L, 카텝신 O, 카텝신 W 및/또는 카텝신 Z 중 하나 이상에 의해 절단된다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0113] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 동일한 단백질로부터의 2종 이상의 에피토프를 함유한다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 상이한 단백질로부터의 2종 이상의 에피토프를 함유한다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 CRYJ1의 2종 이상의 에피토프를 포함한다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 CRYJ2로부터의 2종 이상의 에피토프를 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 CRYJ1 및 CRYJ2로부터의 에피토프를 포함한다.
- [0114] 항원 및/또는 에피토프의 조합은 단리된 세포 또는 동물 모델로 실험을 수행함으로써 면역원성을 증진시키는 능력에 대해 시험될 수 있다.
- [0115] 일부 구현예에서, 본 발명의 면역원성 유도 조성물은 (예를 들어, 항원성 펩타이드 또는 다른 항원성 분자에 추가하여) 세포자멸적 신호전달 분자를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포자멸적 신호전달 분자는 캐리어의 표면과 커플링 및/또는 연합된다. 일부 구현예에서, 세포자멸적 신호전달 분자는 숙주의 항원 제시 세포, 예를 들어 숙주 세망내피 시스템의 세포에 의해 캐리어가 세포자멸체로 감지되도록 하며; 이것은 면역원성-유도 방식으로 상기 연합된 펩타이드 에피토프의 제시를 허용한다. 이론에 구속됨이 없이, 이것은 MHC 부류 I/II 및 공동 자극 분자와 같은 면역 세포 자극에 관여하는 분자의 상향 조절을 방지하는 것으로 추정된다. 이러한 세포자멸적 신호전달 분자는 또한 식균세포 마커로서 작용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 적합한 세포자멸적 신호전달 분자는 미국 특허 출원 제20050113297호에 기재되어 있으며, 상기 특허는 본원에서 참고로 편입된다. 본 발명에 적합한 분자는 대식세포, 수지상 세포, 단핵구, 과립구 및 중성구를 포함하는 식균세포를 표적으로 하는 분자를 포함한다.

- [0116] 일부 구현예에서, 세포자멸적 신호전달 분자로서 적합한 분자는 상기 연합된 펩타이드의 면역원성을 향상시키는 작용을 한다. 또한, 세포자멸적 신호전달 분자에 결합된 캐리어는 세포자멸적 세포 인식에서 Clq에 의해 결합될 수 있다(Paidassi 등, (2008) J. Immunol. 180:2329-2338; 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함됨). 예를 들어, 세포자멸적 신호전달 분자로서 유용할 수 있는 분자는 포스포티딜 세린, 아넥신-1, 아넥신-5, 유지방 구상체-EGF 인자 8(MFG-E8) 또는 트롬보스폰틴 계열(예를 들어, 트롬보스폰틴-1(TSP-1))을 포함한다. 본 발명에 의해 세포자멸적 신호전달 분자로서 사용하기에 적합한 다양한 분자가 예를 들어, 미국 특허 공보 제2012/0076831호에 논의되어 있으며; 그 전체가 참고문헌으로 본 명세서에 포함된다).
- [0117] 일부 구현예에서, 세포자멸적 신호전달 분자는 항원-특이적 펩타이드에 콘주게이트될 수 있다. 일부 사례에서, 세포자멸적 신호전달 분자 및 항원-특이적 펩타이드는 융합 단백질의 생성에 의해 콘주게이트된다. 예를 들어, 융합 단백질은 세포자멸적 신호전달 분자 (또는 그의 단편 또는 변이체)의 적어도 하나의 분자에 커플링된 적어도 하나의 항원-특이적 펩타이드(또는 그의 단편 또는 변이체)를 포함할 수 있다. 융합 단백질의 생성을 위해, "융합 단백질", "융합 펩타이드", "융합 폴리펩타이드" 및 "키메라 펩타이드"라는 용어는 상호교환적으로 사용된다. 항원-특이적 펩타이드의 적합한 단편은 본 발명의 원하는 항원-특이적 면역원성 기능을 생성시키는 기능을 보유하는 전장 펩타이드의 임의 단편을 포함한다. 융합 단백질은 당 업계에서 이해되는 다양한 수단(예를 들어, 유전적 융합, 화학적 콘주게이션 등)에 의해 생성될 수 있다. 두 단백질은 직접 또는 아미노산 링커를 통해 융합될 수 있다. 융합 단백질을 형성하는 폴리펩타이드는 C-말단을 C-말단에, N-말단을 N-말단에, 또는 N-말단을 C-말단에 연결할 수 있지만, 일반적으로 C-말단을 N-말단에 연결한다. 융합 단백질의 폴리펩타이드는 임의의 순서로 존재할 수 있다. 펩타이드 링커 서열은 각각의 폴리펩타이드가 그의 2차 및 3차 구조로 폴딩되는 것을 보장하기에 충분한 거리만큼 제1 및 제2 폴리펩타이드 성분을 분리하는데 사용될 수 있다. 링커로서 유용하게 사용될 수 있는 아미노산 서열은 Maratea 등, Gene 40:39-46 (1985); Murphy 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986); 미국 특허 제4,935,233호 및 미국 특허 제4,751,180호에 기재된 것들을 포함하며; 그 전체 내용이 본 명세서에 참고 문헌으로 포함된다. 링커 서열은 일반적으로 길이가 1 내지 약 50개의 아미노산일 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 제1 및 제2 폴리펩타이드가 기능적 도메인을 분리하고 입체 간섭을 방지하는데 사용될 수 있는 비-필수적 N-말단 아미노산 영역을 가질 때, 링커 서열은 요구되지 않고 및/또는 이용되지 않는다.
- [0118] 면역원성 활성을 위한 프록시는 표적 부위에서 적절한 사이토카인의 생산을 자극하기 위해 온전한 항원 또는 단편의 능력이다. 표적 부위에서 T 억제 세포에 의해 방출되는 면역조절 사이토카인은 TGF- $\beta$ 로 생각된다(Miller 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:421, 1992). 관용 기간 동안 생성될 수 있는 다른 인자는 사이토카인 IL4 및 IL-10 및 매개체 PGE이다. 대조적으로, 활성 면역 파괴를 겪고있는 조직의 림프구는 IL-1, IL-2, IL-6 및 IFN- $\gamma$ 와 같은 사이토카인을 분비한다. 따라서, 항원을 유도하는 후보 물질의 효능은 적절한 유형의 사이토카인을 자극하는 능력을 측정함으로써 평가될 수 있다.
- [0119] 이러한 점을 염두에 두고, 유도 항원의 면역원성 에피토프, 효과적인 점막 결합 성분, 효과적인 조합, 또는 점막 투여의 효과적인 방식 및 스케줄에 대한 신속한 선별 시험은 동계의 동물을 시험관내 세포 검정을 위한 공여체로서 사용하여 수행할 수 있다. 동물을 시험 조성물로 점막 표면에서 처리하고, 때때로 완전한 프로인트 아주반트에서 표적 항원의 비경구 투여를 시도한다. 비장 세포를 단리하고, 약 50 $\mu$ g/mL의 농도로 표적 항원 존재 하에서 시험관내에서 배양한다. 면역원성 에피토프의 위치를 매핑하기 위해 표적 항원을 후보 단백질 또는 하위-단편으로 대체할 수 있다. 매체로의 사이토카인 분비는 표준 면역검정으로 정량화될 수 있다.
- [0120] 세포가 다른 세포의 활성을 억제하는 능력은 표적 항원으로 면역화된 동물로부터 단리된 세포를 사용하거나 표적 항원에 반응하는 세포주를 생성함으로써 결정될 수 있다(Ben-Nun 등, Eur. J. Immunol. 11 : 195, 1981, 그 전체가 본원에 참고로 포함됨). 이 실험의 한 변형예에서, 증식을 방지하기 위해 억제제 세포 모집단을 약하게 조사하고(약 1000 내지 1250 rads), 억제제를 반응군 세포와 공동 배양한 다음, 삼중체화된 티미딘 도입(또는 MTT)을 사용하여 반응군의 증식성 활성을 정량화한다. 또 다른 변형예에서, 억제제 세포 모집단 및 반응군 세포 모집단을 이중 챔버 트랜스웰 배양 시스템(Costar, Cambridge Mass.)의 상부 및 하부 수준에서 배양하여, 모집단을 서로 1mm 내에서 동시화시키고, 폴리카보네이트 막에 의해 분리시킨다(WO 93/16724). 이 접근법에서, 억제제 세포 모집단의 조사는 반응군의 증식성 활성이 별도로 측정될 수 있기 때문에 불필요하다.
- [0121] 표적 항원이 개체 내에 이미 존재하는 본 발명의 구현예에서, 항원을 단리하거나 점막 결합 성분과 미리 조합할 필요가 없다. 예를 들어, 항원은 병리 상태(예를 들어, 염증성 장 질환 또는 소아지방변증)의 결과로서 또는 음식 알러지항원의 소화를 통해 특정 방식으로 개체에서 발현될 수 있다. 시험은 점막 결합 성분을 하나 이상의



용량 또는 제형으로 제공하고 인시츄로 항원에 대한 관용화를 촉진시키는 능력을 측정함으로써 수행된다.

[0122] 특정 질환의 치료를 위한 조성물 및 투여 방식의 유효성은 상응하는 동물 질환 모델에서 또한 정교화될 수 있다. 질병의 징후를 감소시키거나 지연시키는 치료의 능력은 질환의 생화학적 및 면역적 특징, 감염된 조직의 면역조직학 및 사용되는 모델에 적합한 총 임상 특징의 순환 수준에서 모니터링된다. 테스트에 사용할 수 있는 동물 모델의 비-제한적인 예가 다음 섹션에 포함되어 있다. 본 발명은 TH1 반응, TH2 반응, TH17 반응 또는 이들 반응의 조합을 조절함으로써 면역원성의 조절을 고려한다. TH1 반응의 조절은 예를 들어, 인터페론-감마의 발현을 변경시키는 것을 포함한다. TH2 반응을 조절하는 것은 예를 들어, IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-13의 임의의 조합의 발현을 변경시키는 것을 포함한다. 전형적으로 TH2 반응의 증가(감소)는 IL-4, IL-5, IL-10 또는 IL-13 중 적어도 하나의 발현의 증가(감소)를 포함할 것이며; 더욱 전형적으로 TH2 반응의 증가(감소)는 IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-13 중 적어도 2종의 발현의 증가를 포함할 것이고, 가장 전형적으로 TH2 반응의 증가(감소)는 IL-4, IL-5, IL-10 또는 IL-13 중 적어도 3종의 발현의 증가를 포함할 것이고, 반면 이상적으로 TH2 반응의 증가(감소)는 IL-4, IL-5, IL-10 또는 IL-13 모두의 발현의 증가(감소)를 포함할 것이다. TH17의 조절은 예를 들어 TGF-베타, IL-6, IL-21 및 IL23의 발현 변화 및 IL-17, IL-21 및 IL-22의 수준의 영향을 포함한다. 일부 구현 예에서, 본 발명은 한 유형의 면역 반응을 다른 유형(예를 들어, 면역-스위칭 또는 면역 편차) 이상으로 촉진함으로써 내성의 조절을 고려한다. 이러한 구현예에서, 한 표현형의 확립된 면역 반응은 억제되거나 감소되고, 상이한 표현형의 면역 반응이 증가되거나 증진된다. 예를 들어, 알리지 면역 반응의 맥락에서 Th2 반응에서 Th1 반응으로 면역-스위칭하면 IgG2a 항체 반응의 생성과 IFN $\gamma$  및/또는 IL-12의 생산이 촉진되어 알리지항원-특정 IgE 반응의 감소 및 Th2 세포에 대한 T 세포 분극화의 감소를 유도한다. 본 발명의 조성물 및 방법의 유효성을 평가하기 위한 다른 적합한 방법은 예를 들어, 미국 특허 공보 제2012/0076831호(본 명세서에서 그 전체가 참고로 편입됨)에서 논의된 바와 같이 당 업계에 이해되어있다.

[0123] 본 발명의 특정 구현예는 치료 중재에 의해 이전에 관용되지 않은 개체에서의 면역 관용의 프라이밍(priming)에 관한 것이다. 이들 구현예는 일반적으로 항원 및 점막 결합 성분의 조합을 복수 투여하는 것을 포함한다. 치료의 초기에 대상체가 관용의 징후를 나타낼 수 있지만, 전형적으로 오래 지속되는 결과를 얻기 위해 프라이밍동안 적어도 3회 투여, 빈번하게 적어도 4회 투여, 때로는 적어도 6회 투여가 수행된다. 대부분의 경우, 각각의 용량은 볼러스(bolus) 투여로 주어지지만, 점막 방출이 가능한 지속된 제형 또한 적합하다. 다중 투여가 수행되는 경우, 투여 시간간격은 일반적으로 1일 내지 3주, 전형적으로 약 3일 내지 2주이다. 일반적으로, 동일한 항원 및 점막 결합 성분이 동일한 농도로 존재하고, 투여는 동일한 점막 표면에 주어지지만, 치료 과정 동안 이들 변수 중 임의의 변화가 수용될 수 있다. 본 발명의 다른 구현예는 이전에 확립된 면역 관용의 지속성을 증가시키거나 연장시키는 것에 관한 것이다. 이들 구현예는 일반적으로 확립된 면역원성이 감소하거나 감소할 위험이 있는 시점에서, 한 번의 투여 또는 단기간의 치료 과정을 포함한다. 부스팅은 일반적으로 1개월에서 1년 사이에 수행되며, 전형적으로 프라이밍 또는 이전의 부스트 후 2개월 내지 6개월 사이에 수행된다. 또한, 본 발명은 주 2회, 주1회, 격주 또는 임의의 다른 규칙적 스케줄에 따라 행해지는 투여 스케줄에 대한 면역원성의 규칙적인 유지를 포함하는 구현예를 포함한다.

[0124] 본 발명의 입자는 이를 필요로 하는 대상체에서 염증성 면역 반응을 약화시키거나, 또는 이를 필요로 하는 대상체에서 박테리아 또는 바이러스성 감염을 치료하는데 효과적인 임의의 용량으로 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, 약  $10^2$  내지 약  $10^{20}$ 개의 입자가 개체에게 제공된다. 추가의 구현예에서, 약  $10^3$  내지 약  $10^{15}$ 개의 입자가 제공된다. 또 다른 구현예에서, 약  $10^6$  내지 약  $10^{12}$ 개의 입자가 제공된다. 또 다른 구현예에서, 약  $10^8$  내지 약  $10^{10}$ 개의 입자가 제공된다. 바람직한 구현예에서, 바람직한 용량은 0.1% 고형물/ml이다. 따라서, 0.5  $\mu$ m 비드에 대해, 바람직한 용량은 0.05  $\mu$ m 비드에 대해 약  $4 \times 10^9$ 개의 비드이고, 바람직한 용량은 3  $\mu$ m 비드에 대해 약  $4 \times 10^{12}$ 개의 비드이고, 바람직한 용량은  $2 \times 10^7$ 개의 비드이다. 그러나, 치료될 특정 상태의 치료에 효과적인 임의의 용량이 본 발명에 포함된다.

[0125] 본 발명은 자가면역 질환, 이식 거부, 효소 결핍 및 알리지성 반응과 같은 면역 관련된 장애의 치료에 유용하다. 면역 관용을 유도하기 위한 합성 생체적합성 입자 시스템의 치환은 제조의 용이성, 치료제의 광범위한 이용가능성, 샘플 간의 균일성 증가, 잠재적 치료 부위의 수 증가 및 캐리어 세포에 대한 알리지성 반응의 가능성의 극적 감소를 유도할 수 있었다.

[0126] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역 반응"은 T 세포 매개된 및/또는 B 세포 매개된 면역 반응을 포함한다. 예시적인 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들어, 사이토카인 생산 및 세포독성을 포함한다. 또한, 용어 면역 반응

은 T 세포 활성화, 예를 들어 항체 생성(체액성 반응) 및 사이토카인 반응성 세포화, 예를 들어, 대식세포의 활성화에 의해 간접적으로 영향을 받는 면역 반응을 포함한다. 면역 반응과 관련된 면역 세포는 B 세포 및 T 세포 ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , Th1 및 Th2 세포)와 같은 림프구; 항원 제시 세포(예를 들어, 전문 항원 제시 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식 세포, B 림프구, 랑게르한스 세포, 및 비전문 항원 제시 세포, 예컨대 케라틴생성 세포, 내피 세포, 성상 세포, 섬유아세포, 회소돌기 아교 세포); 천연 살해 세포; 골수 세포, 예컨대 대식세포, 호산구, 비만 세포, 호염기구 및 과립구를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 변형된 입자는 염증 부위로의 염증 세포 이동조절을 감소시키는데 효과적이다.

[0127] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "아네르기", "내성" 또는 "항원-특이적 내성"은 T 세포 수용체-매개된 자극에 대한 T 세포의 무감각을 지칭한다. 이러한 무감각은 일반적으로 항원-특이적이며, 항원성 펩타이드에의 노출이 중단된 후에도 지속된다. 예를 들어, T 세포에서의 아네르기는 사이토킨, 예를 들어, IL-2 생산의 결핍을 특징으로 한다. T-세포 아네르기는 T 세포가 항원에 노출되고, 제2 신호(공동자극 신호)가 부재시에 제1 신호(T 세포 수용체 또는 CD-3 매개된 신호)를 수신할 때 발생한다. 이러한 조건 하에서, (심지어 제-노출이 공동자극 분자의 존재 하에서 발생하더라도) 동일한 항원에 세포를 다시 노출시키면 사이토카인을 생산하지 못하고 결과적으로 증식에 실패하게 된다. 따라서, 사이토카인 생산에 실패하면 증식을 예방할 수 있다. 그러나, 아네르기 T 세포는 사이토카인(예를 들어, IL-2)과 함께 배양되면 증식될 수 있다. 예를 들어, T 세포 아네르기는 또한, ELISA 또는 지표 세포주를 사용한 증식 검정으로 측정된 T 림프구에 의한 IL-2 생산의 결핍으로도 관찰될 수 있다. 대안적으로, 리포터 유전자 작제물이 사용될 수 있다. 예를 들어, 아네르기 T 세포는 5' IL-2 유전자 인핸서의 조절하에 이중성 프로모터에 의해 또는 이 인핸서 내에서 발견될 수 있는 API 서열의 다량체에 의해 유도된 DL-2 유전자 전사를 개시하지 못한다(Kang et al. 1992 Science. 257:1134).

[0128] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역학적 관용"은 하기의 경우, 치료되지 않은 대상체와 비교하여 치료된 대상체의 비율에 대해 수행되는 방법을 지칭한다: a) 특정 면역학적 반응의 감소된 수준(적어도 부분적으로 항원-특이적으로 효과적 T 림프구, B 림프구, 항체 또는 이들의 동등물); 특정 면역학적 반응의 개시 또는 진행 지연; 또는 c) 특정 면역학적 반응의 개시 또는 진행의 위험 감소. "특정" 면역학적 관용은 다른 면역계와 비교하여 특정 항원에 대해 면역학적 관용이 우선적으로 발동될 때 발생한다. "비-특이적" 면역학적 관용은 염증성 면역 반응을 일으키는 항원에 대해 면역학적 관용이 무차별적으로 유발될 때 발생한다. "준-특정" 면역학적 관용은 면역학적 관용이 병원성 면역 반응을 유도하는 항원에 대해 반-차별적으로 발생되지만, 보호성 면역 반응을 유도하는 다른 항원에는 반대로는 발생하지 않는다.

[0129] 자가항원 및 자가면역 질환에 대한 내성은 흉선내 자가-반응성 T 세포의 음성 선택 및 흉선 결실을 피하고 주변에서 발견되는 자가반응성 T 세포에 대한 주변 내성의 기전을 포함하는 다양한 기전에 의해 달성된다. 주변 T 세포 내성을 제공하는 기전의 예로는 자기-항원의 "무지", 자가항원에 대한 아네르기 또는 무 반응성, 사이토카인 면역 편차 및 자기-반응성 T 세포의 활성화 유도된 세포사 등이 있다. 또한, 조절 T 세포는 말초 내성을 매개하는데 관여하는 것으로 나타났다. 예를 들어, Walker et al. (2002) Nat. Rev. Immunol. 2: 11 -19; Shevach et al. (2001) Immunol. Rev. 182:58-67을 참조한다. 일부 상황에서, 자가항원에 대한 주변 내성이 없어지고(또는 파손됨), 자가면역 반응이 일어난다. 예를 들어, EAE 동물 모델에서, TLR 선천성 면역 수용체를 통한 항원 제시 세포(APCs)의 활성화는 자기-내성을 파괴하여 EAE의 유도를 초래하는 것으로 나타났다(Waldner et al. (2004) J. Clin. Invest. 113 :990-997 참조).

[0130] 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명은 TLR7/8, TLR9 및/또는 TLR 7/8/9 의존적 세포 자극을 억제 또는 감소시키면서 항원 전달을 증가시키는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 바와 같이, 특정 변형된 입자의 투여는 면역자극성 폴리뉴클레오타이드와 관련된 TLR 7/8, TLR9 및/또는 TLR7/8/9 의존적 세포 반응을 억제하면서 DC 또는 APC에 의한 항원 전달을 초래한다. 이러한 억제는 하나 이상의 TLR-관련 사이토카인의 감소된 수준을 포함할 수 있다.

[0131] 상기 논의된 바와 같이, 본 발명은 Mac-1 및 LFA-1 매개된 장애의 치료에 유용한 생물학적 특성을 갖는 신규한 화합물을 제공한다.

[0132] 따라서, 본 발명의 다른 양태에서, 면역 변형 입자를 포함하고 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 이들 조성물은 선택적으로 하나 이상의 추가의 치료제를 추가로 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 변형된 입자는 하나 이상의 다른 치료제의 투여와 조합하여 이를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물과 함께 약제학적 조성물에 합동 투여 또는 포함시키기 위한 추가의 치료제는 승인된 항-염증제일 수 있거나, 조절되지 않는 염증성 면역 반응 또는 박테리



아 또는 바이러스성 감염을 특징으로 하는 임의의 장애의 치료에 대한 승인을 최종적으로 얻는, 식품 의약품 안전청(Food and Drug Administration)의 승인을 받고있는 다수의 약제 중 임의의 하나일 수 있다. 또한, 본 발명의 변형된 입자의 특징은 치료를 위해 유리 형태 또는 적절한 경우 약제학적으로 허용가능한 그것의 유도체로서 존재할 수 있음을 이해할 것이다.

[0133] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 캐리어를 추가로 포함하며, 본원에서 사용되는 바와 같이, 원하는 특정한 투약 형태에 적합하게 임의의 및 모든 용매, 희석제 또는 다른 액체 비히클, 분산제 또는 현탁 보조제, 계면활성제, 등장제, 증점제 또는 유화제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등을 포함한다. Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)은 약제학적 조성물을 제제화하는데 사용되는 다양한 캐리어 및 그의 제조를 위한 공지된 기술을 개시한다. 임의의 통상적인 캐리어 매질이 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 생성시키거나 달리 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 본 발명의 화합물과 양립할 수 없다면, 그의 용도는 본 발명의 범위내에 있는 것으로 고려된다. 약제학적으로 허용가능한 캐리어로 작용할 수 있는 물질의 일부 예로는 당류, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그의 유도체, 예를 들어 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말화된 트라가칸스; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; 오일, 예컨대 땅콩 오일, 면실유; 잇꽃 오일, 참기름; 올리브유; 옥수수 기름 및 콩기름; 글라이콜; 예컨대 프로필렌 글라이콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 수산화 마그네슘 및 수산화 알루미늄; 알긴산; 발열 원없는 물; 등장성 염수; 링거액; 에틸 알콜 및 포스페이트 완충액뿐만 아니라 다른 무독성 양립가능한 윤활제, 예컨대 소듐 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아르산마그네슘, 뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미료, 향료 및 방향제, 방부제 및 산화 방지제를 포함하지만, 이에 한정되지 않으며, 조제자의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다.

[0134] 경구 투여를 위한 액체 투약 형태는 약제학적으로 허용가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 활성 화합물 이외에, 액체 투약 형태는 당 분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글라이콜, 1,3-부틸렌 글라이콜, 디메틸포름아미드, 오일(특히 목화씨, 땅콩, 옥수수, 세균, 올리브, 피마자 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로프루피릴 알코올, 폴리에틸렌 글라이콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 외에도, 경구 조성물은 아췌반트, 예컨대 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 풍미제 및 방향제를 포함할 수 있다.

[0135] 본 발명의 입자는 경구, 비강, 정맥 내, 근육 내, 안구 내, 경피 내, 복강 내 또는 피하로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 입자는 정맥 내 투여된다.

[0136] 면역 반응의 조절을 위한 본 발명의 유효량 및 투여 방법은 개체, 치료하고자하는 상태 및 당업자에게 명백한 다른 요인에 따라 기초하여 다양할 수 있다. 고려해야 할 인자는 투여 경로와 투여될 용량의 수를 포함한다. 이러한 요인은 당 업계에 공지되어 있으며, 과도한 실험없이 이러한 결정을 내리는 것은 당업자의 기술 범위 내에 있다. 적합한 투여량 범위는 면역의 원하는 조절을 제공하는 범위이다. 전달되는 캐리어의 양으로 주어진 캐리어의 유용한 투여량 범위는 예를 들어 하기 중 약 임의의 범위이다: 약 0.5 내지 10 mg/kg, 1 내지 9 mg/kg, 2 내지 8 mg/kg, 3 내지 7 mg/kg, 4 내지 6 mg/kg, 5 mg/kg, 1 내지 10 mg/kg, 5 내지 10 mg/kg. 대안적으로, 투여량은 입자의 수를 기준으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 전달된 캐리어의 양으로 주어진 캐리어의 유용한 투여량은, 예를 들어, 투여량 당 약  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  또는 그보다 많은 수의 입자일 수 있다. 각 환자에게 주어진 절대량은 생체이용률, 청소율 및 투여 경로와 같은 약리적 특성에 좌우된다. 약제학적으로 허용가능한 캐리어, 희석제 및 부형제의 세부사항 및 약제학적 조성물 및 제형의 제조 방법은 Remington's Pharmaceutical Sciences 18<sup>th</sup> Edition, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA에 제공되며, 이들은 그 전문이 본 명세서에 참고로 편입되어 있다.

[0137] 특정 캐리어 제형의 유효량 및 투여 방법은 개별 환자, 원하는 결과 및/또는 장애 유형, 질환의 단계 및 당업자에게 자명한 다른 인자에 따라 달라질 수 있다. 특정 응용에서 유용한 투여 경로(들)은 당업자에게 명백하다. 투여 경로는 국소, 진피, 경피, 경점막, 표피, 비경구, 위장 및 비-인두 및, 폐(경기관지(transbronchial) 및 경폐포(transalveolar)를 포함하지만 이에 한정되지 않음)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 투여량 범위는 혈중 농도에 의해 측정된 약 1-50  $\mu$ M의 조직 농도를 달성하기에 충분한 IRP-함유 조성물을 제공하는 투

여량 범위이다. 각 환자에게 주어진 절대량은 생체이용률, 청소율 및 투여 경로와 같은 약리적 특성에 좌우된다.

- [0138] 본 발명은 생리적으로 허용가능한 임플란트, 연고, 크림, 린스 및 겔을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 국소 적용에 적합한 캐리어 체계를 제공한다. 진피 투여의 예시적인 경로는 경피 전달, 표피 투여 및 피하 주사와 같은 침습성이 가장 적은 경로이다.
- [0139] 경피 투여는 캐리어가 피부를 관통하여 혈류로 들어가게 할 수 있는 크림, 린스(rinse), 겔 등의 도포에 의해 달성된다. 경피 투여에 적합한 조성물은 피부에 직접 도포되거나 경피 장치(소위 "패치")와 같은 보호성 캐리어에 편입된 약제학적으로 허용가능한 현탁액, 오일, 크림 및 연고를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 적합한 크림, 연고 등의 예는 Physician's Desk Reference에서 찾을 수 있다. 경피 전달은 또한 이온침투요법(iontophoresis)에 의해 달성될 수 있는데, 예를 들어 며칠 또는 그 이상의 기간 동안 손상되지 않은 피부를 통해 지속적으로 그것의 생성물을 전달하는 상업적으로 입수가 가능한 패치를 사용한다. 이 방법을 사용함으로써 비교적 큰 농도의 약제학적 조성물의 제어된 전달이 가능하게 되고, 복합 약물의 주입을 가능하게 하고 흡수 촉진제의 동시 사용을 허용한다.
- [0140] 비경구 투여 경로는 전기(이온침투요법) 또는 중심 정맥 라인으로의 직접 주사, 정맥내, 근육내, 복강내, 진피내 또는 피하 주사와 같은 직접적인 주사를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 비경구 투여에 적합한 캐리어의 제형은 일반적으로 주사용 USP 물 또는 물에 제형화되고, pH 완충제, 염 증량제, 보존제 및 기타 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 비경구 주사용 면역조절 폴리뉴클레오타이드는 주사를 위한 약제학적으로 허용가능한 멸균된 등장액, 예컨대 식염수 및 인산 완충 식염수에 제형화될 수 있다.
- [0141] 위장 투여 경로는 섭취 및 직장 경로를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 예를 들어 섭취를 위한 약제학적으로 허용가능한 분말, 환제 또는 액체 및 직장 투여를 위한 좌약의 사용을 포함할 수 있다.
- [0142] 비-인두 및 폐 투여는 흡입에 의해 달성되며, 비강내, 경기관지(transbronchial) 및 경폐포(transalveolar) 경로와 같은 전달 경로를 포함한다. 본 발명은 에어로졸을 형성하기 위한 액체 현탁액뿐만 아니라 건조 분말 흡입 전달 시스템을 위한 분말 형태를 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 흡입에 의한 투여에 적합한 캐리어의 제형을 포함한다. 캐리어 제형의 흡입에 의한 투여에 적합한 장치는 아토마이저, 증발기, 분무기 및 건조 분말 흡입 전달 장치를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0143] 주사가 가능한 제제, 예를 들어 멸균된 주사가 가능한 수성 또는 유성 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사가 가능한 제제는 또한 비독성 비경구적으로 허용가능한 희석제 또는 용매 중 멸균된 주사가 가능한 용액, 현탁액 또는 에멀전, 예를 들어 1,3-부탄디올 중의 용액일 수 있다. 사용될 수 있는 허용가능한 비히클 및 용매는 물, 링거액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 멸균된 고정유가 용매 또는 분산매로서 통상적으로 사용된다. 이 목적을 위해 합성 모노- 또는 디-글리세라이드를 포함하여 임의의 무자극 고정유가 사용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산이 주사제의 제조에 사용된다.
- [0144] 주사가 가능한 제형은 예를 들어, 박테리아-고정 필터를 통한 여과에 의해, 또는 멸균수 또는 사용전에 다른 멸균 주사가 가능한 매체에 용해 또는 분산될 수 있는 멸균된 고체 조성물의 형태로 살균제를 혼입시킴으로써 멸균될 수 있다.
- [0145] 약물의 효과를 연장시키기 위해, 종종 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 늦추는 것이 바람직하다. 이는 물에 대한 용해도가 낮은 액체 현탁액 또는 결정성 또는 비정질 물질의 사용에 의해 달성될 수 있다. 약물의 흡수율은 용해 속도에 의존하며, 이어서 이는 결정 크기 및 결정 형태에 의존할 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 약물을 오일 비히클에 용해 또는 현탁시킴으로써 달성된다. 주사가 가능한 데포(depot) 형태는 폴리락타이드-폴리글라이콜라이드와 같은 생분해성 폴리머에서 약물의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성함으로써 제조된다. 약물 대 폴리머의 비율 및 사용된 특정 폴리머의 성질에 따라, 약물 방출 속도가 제어될 수 있다. 다른 생분해성 폴리머의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 데포 주사가 가능한 제형은 또한 신체 조직과 양립할 수 있는 리포솜 또는 마이크로에멀전에 약물을 포획함으로써 제조된다.
- [0146] 일부 구현예에서, 본 발명의 합성 생분해성 입자는 제조의 용이성, 치료제의 광범위한 이용가능성 및 증가된 치료 부위를 제공한다. 특정 구현예에서, 계면활성제 폴리(에틸렌- $\alpha$ -말레산 무수물)를 사용하여 합성된, 표면 카복실레이트 기의 고밀도를 갖는 표면-작용화된 생분해성 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드) 입자는 다른 캐리어 입자 및/또는 표면에 비해 많은 이점을 제공하는 캐리어를 제공한다. 본 발명의 구현예를 개발하는 동안 수행된

실험은 펩타이드(예를 들어, PLP<sub>139-151</sub> 펩타이드)와 이들 입자의 콘주게이션을 실증했다. 이러한 펩타이드-커플링된 입자는 질환 진전의 예방 및 면역학적 관용의 유도(예를 들어, 다발성 경화증의 SJL/J PLP<sub>139-151</sub>/CFA-유도된 R-EAE 류린 모델에서)에 효과적이라는 것을 보여 주었다. 본 발명의 펩타이드에 커플링된 캐리어는 다른 내성 유도 구조에 비해 많은 이점을 제공한다. 일부 구현예에서, 입자는 생분해성이며, 따라서, 장시간 동안 신체에 잔류하지 않을 것이다. 완전한 분해 시간이 제어될 수 있다. 일부 구현예에서, 입자는 세포 활성화(예를 들어, 포스포티딜세린이 PLG 마이크로스피어에 장입됨)없이 내재화를 촉진하기 위해 작용화된다. 일부 구현예에서, 입자는 특정 세포 모집단에 대한 표적 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, IL-10 및 TGF- $\beta$ 와 같은 항-염증성 사이토카인은 입자를 내재화시키는 세포 유형의 활성화를 제한하고 에너지 및/또는 결실을 통한 내성의 유도 및 조절 T 세포의 활성화를 촉진시키기 위해 입자 상에 또는 입자 내에 포함된다. 입자의 조성은 입자가 체내에서 지속되는 시간의 길이에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌으며, 내성은 신속한 입자 흡수 및 청소능/분해를 필요로 한다. 50:50을 초과하는 비율의 락타이드:글라이콜라이드가 분해 속도를 늦추므로, 본 발명의 입자는 약 50:50 이하의 락타이드:글라이콜라이드 비를 갖는다. 일 구현예에서, 본 발명의 입자는 약 50:50 D,L-락타이드:글라이콜라이드 비를 갖는다.

[0147] 경구 투여용 고체 투약 형태는 캡슐, 정제, 환제, 분말 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 투약 형태에서, 변형된 입자는 적어도 하나의 불활성, 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 캐리어, 예컨대 시트르산 나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는 a) 충전제 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산, b) 결합제, 예컨대 카복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리디논, 수크로스 및 아카시아, c) 습윤제, 예컨대 글리세롤, d) 봉해제, 예컨대 한천, 탄산 칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염 및 탄산나트륨, e) 용액 지연제, 예컨대 파라핀, f) 흡수 촉진제, 예컨대 4차 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예컨대 예를 들어, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡수제, 예컨대, 카올린 및 벤토나이트 점토, 및 i) 윤활제, 예컨대 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글라이콜, 소듐 라우릴 설페이트 및 이들의 혼합물이다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 투약 형태는 또한 완충제를 포함할 수 있다.

[0148] 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글라이콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐 내의 충전제로서 사용될 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 환제 및 과립의 고형 투약 형태는 약제학적 제형 기술에 널리 공지된 장용 코팅물 및 기타 코팅물과 같은 코팅물 및 셸로 제조될 수 있다. 이들은 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 선택적으로, 지연된 방식으로 활성 성분(들)만을 또는 우선적으로 장의 특정 부분에서 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 폴리머 물질 및 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글라이콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐에 충전제로서 사용될 수 있다.

[0149] 변형된 입자는 또한 전술한 바와 같은 하나 이상의 부형제와 함께 마이크로-캡슐화된 형태일 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 환제 및 과립의 고형 투약 형태는 장용성 코팅물, 방출 제어 코팅 및 약제학적 제형 기술 분야에 잘 공지된 다른 코팅과 같은 코팅 및 외피로 제조될 수 있다. 이러한 고체 투여 형태에서, 활성 화합물은 수크로스, 락토스 및 전분과 같은 적어도 하나의 불활성 희석제와 혼합될 수 있다. 이러한 투약 형태는 또한 통상적인 실시에서와 같이 불활성 희석제 이외의 추가의 물질, 예를 들어 정제화 윤활제 및 기타 정제화 보조제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트 및 미세결정성 셀룰로스를 포함할 수 있다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 투약 형태는 또한 완충제를 포함할 수 있다. 이들은 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있고, 임의로 지연된 방식으로 변형된 입자만을 또는 바람직하게는 장의 특정 부분에서 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 폴리머 물질 및 왁스를 포함한다.

[0150] 본 발명은 본 발명의 변형된 입자의 약제학적으로 허용가능한 국소 제형을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용가능한 국소 제형"은 제형을 표피에 도포하여 본 발명의 변형된 극미립자의 진피내 투여에 약제학적으로 허용가능한 임의의 제형을 의미한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 국소 제형은 캐리어 시스템을 포함한다. 약제학적으로 효과적인 캐리어는 용매(예를 들어, 알콜, 폴리알콜, 물), 크림, 로션, 연고, 오일, 플라스터, 리포솜, 분말, 에멀전, 마이크로에멀전 및 완충 용액(예를 들어, 저삼투압 또는 완충 식염수) 또는 약제를 국소 투여하기 위해 당 업계에 공지된 임의의 다른 캐리어를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 당 분야에 공지된 캐리어의 보다 완전한 목록은 당해 분야에서 표준인 참고 텍스트, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, 1980 and 17th Edition, 1985, both published by Mack Publishing Company, Easton, Pa.에 제공되며, 이의 전문은 이후에 본 명세서에 참고로 편입된다. 특정 다른 구현예에서, 본 발명의 국소 제형은 부형제를 포함할 수 있다. 당 업계에 공지된 임의의 약제학적으로 허용가능한 부형제를



사용하여 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 국소 제형을 제조할 수 있다. 본 발명의 국소 제형에 포함될 수 있는 부형제의 예는 보존제, 산화방지제, 보습제, 완화제, 완충제, 가용화제, 다른 침투제, 피부 보호제, 계면활성제 및 추진제 및/또는 변형된 입자에 조합하여 사용되는 추가의 치료제를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 적합한 보존제는 알콜, 4차 아민, 유기산, 파라벤 및 페놀을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 적합한 산화방지제는 아스코르브 산 및 그의 에스테르, 아황산수소나트륨, 부틸화된 하이드록시 톨루엔, 부틸화된 하이드록시아니솔, 토코페롤 및 EDTA 및 시트르산과 같은 킬레이트제를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 적합한 보습제는 글리세린, 소르비톨, 폴리에틸렌 글라이콜, 우레아 및 프로필렌 글라이콜을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 완충제는 시트르산, 염산 및 락트산 완충액을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 가용화제는 4차 암모늄 염화물, 사이클로텍스트린, 벤질 벤조에이트, 레시틴 및 폴리소르베이트를 포함 하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 국소 제형에 사용될 수 있는 적합한 피부 보호제는 비타민 E 오일, 알라토인(allatoin), 디메티콘, 글리세린, 바셀린 및 산화 아연을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0151] 특정 구현예에서, 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 국소 제형은 적어도 본 발명의 변형된 입자 및 침투 향상제를 포함한다. 국소 제형의 선택은 치료될 병태, 본 발명의 화합물 및 다른 부형제의 물리화학적 특성, 제형내 안정성, 이용가능한 제조설비 및 비용 제약을 포함하는 몇개의 인자에 좌우될 것이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "침투 향상제"라는 용어는 바람직하게는 전신 흡수가 거의 없거나 전혀없는, 각질층 및 표피 또는 진피로 약리학적으로 활성인 화합물을 수송할 수 있는 제제를 의미한다. 다양한 화합물이 피부를 통한 약물의 침투 속도를 향상시키는데 있어 효과가 있는지 평가되었다. 예를 들어 다양한 피부 침투 향상제의 사용 및 시험을 조사한, 경피 피부 향상제, Maibach H. I. and Smith H. E. (eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995) 및 Buyuktimkin et al., Buyuktimkin et al., 경피 및 국소 약물 전달 시스템의 경피 약물 침투 개선의 화학적 수단, Gosh T. K., Pfister W. R., Yum S. I. (Eds.), Interpharm Press Inc., Buffalo Grove, 111. (1997)를 참조한다. 특정 예시적인 구현예에서, 본 발명에서 사용하기 위한 침투제는 트리글리세라이드(예를 들어, 대두유), 알로에 조성물(예를 들어, 알로에-베라 겔), 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 옥톨리(octoly)페닐폴리에틸렌 글라이콜, 올레산, 폴리에틸렌 글라이콜 400, 프로필렌 글라이콜, N-데실메틸설폭사이드, 지방산 에스테르(예를 들어, 이소프로필 미리스테이트, 메틸 라우레이트, 글리세롤 모노올레에이트 및 프로필렌 글라이콜 모노올레에이트) 및 N-메틸피롤리돈을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0152] 특정 구현예에서, 조성물은 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치의 형태일 수 있다. 특정 예시적인 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물의 제형은 크림이며, 특히 바람직한 포화 또는 불포화 지방산, 예를 들어 스테아르산, 팔미트산, 올레산, 팔미토-올레산, 세틸 또는 올레일 알코올, 스테아르산을 추가로 함유할 수 있다. 본 발명의 크림은 또한 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 폴리옥시-40-스테아레이트를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 활성 성분은 약제학적으로 허용가능한 캐리어 및, 요구될 수 있는 임의의 필요한 보존제 또는 완충제와 함께 멸균 조건 하에서 혼합된다. 안과 제형, 귀약 및 안약 또한 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 고려된다. 또한, 본 발명은 경피 패치의 사용을 고려하며, 경피 패치는 신체에 대한 화합물의 제어된 전달을 제공한다는 추가적인 이점을 갖는다. 이러한 투여 형태는 화합물을 적절한 매질에 용해 또는 분배하여 제조된다. 상기 논의된 바와 같이, 침투 향상제는 또한 피부를 가로지르는 화합물의 플럭스를 증가시키는데 사용될 수 있다. 속도는 속도 조절 막을 제공하거나 폴리머 매트릭스 또는 겔에 화합물을 분산시킴으로써 제어될 수 있다.

[0153] 변형된 입자는 에어로졸에 의해 투여될 수 있다. 이는 수성 에어로졸, 리포솜 제제 또는 변형된 입자를 함유하는 고체 입자를 제조함으로써 달성된다. 비 수성(예를 들어, 플루오로카본 추진제) 현탁액이 사용될 수 있다.

[0154] 통상적으로, 수성 에어로졸은 종래의 약제학적으로 허용가능한 캐리어 및 안정화제와 함께 약제의 수용액 또는 현탁액을 제형화하여 제조된다. 캐리어 및 안정화제는 특정 화합물의 요건에 따라 다르지만, 일반적으로 비이온성 계면활성제(Tweens, Pluronic® 또는 폴리에틸렌 글라이콜), 혈청 알부민, 소르비탄 에스테르, 올레산, 레시틴과 같은 무해한 단백질, 글리신과 같은 아미노산, 완충액, 염류, 당류 또는 당 알코올을 포함한다. 에어로졸은 일반적으로 등장성 용액으로부터 제조된다.

[0155] 또한, 본 발명의 변형된 입자 및 약제학적 조성물이 조합 요법으로 제형화 및 사용될 수 있으며, 즉, 화합물 및 약제학적 조성물은 하나 이상의 다른 원하는 치료제 또는 의학적 처치와 동시에, 이전에, 또는 이후에, 제형화 또는 투여될 수 있다. 조합 요법에 사용하기 위한 치료법(치료제 또는 절차)의 특별한 조합은 원하는 치료제 및/또는 절차의 혼용성 및 달성될 원하는 치료 효과를 고려할 것이다. 사용된 치료법이 동일한 질환(예를 들어, 본 발명의 화합물이 다른 항-염증제와 동시에 투여될 수 있음)에 대해 원하는 효과를 달성할 수 있거나, 또는

상이한 효과(예를 들어, 임의의 역효과 제어)를 달성할 수 있다는 것이 인정될 것이다.

- [0156] 특정 구현예에서, 본 발명의 변형된 입자를 함유하는 약제학적 조성물은 하나 이상의 추가의 치료적 활성 성분(예를 들어, 항염증제 및/또는 완화제)을 추가로 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, "완화성(palliative)"이란 용어는 질병의 증상 완화 및/또는 치료 요법의 부작용에 집중된 치료법이지만 치유적이 아닌 치료를 지칭한다. 예를 들어, 완화 치료에는 진통제, 항 메스꺼움 약물 및 항-정신병 약물이 포함된다.
- [0157] 본 발명은 개체, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에서 면역 반응을 조절하는 방법으로서, 본원에 기재된 변형된 입자를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의해 제공되는 면역조절 방법은 면역자극성 폴리펩타이드 또는 바이러스성 또는 박테리아 성분에 의해 자극되는 면역 반응을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 선천적 면역 반응 또는 적응 면역 반응을 억제 및/또는 저해하는 단계를 포함한다.
- [0158] 변형된 입자는 면역 반응을 조절하기에 충분한 양으로 투여된다. 본원에 기재된 바와 같이, 면역 반응의 조절은 체액성 및/또는 세포성일 수 있으며, 본원에 기재된 바와 같은 당해 기술 분야의 표준 기술을 이용하여 측정된다.
- [0159] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 임플란트(예를 들어, 장치) 및/또는 이식(예를 들어, 조직, 세포, 장기)과 함께(예를 들어, 병용하여, 병용하기 전에, 또는 병용 후) 투여되며, 이와 관련된 면역 반응을 매개, 무효화, 조절 및/또는 감소시킨다.
- [0160] 특정 구현예에서, 개체는 알러지성 질환 또는 병태, 알러지 및 천식과 같은 원하지 않는 면역 활성화와 관련된 장애를 앓고있다. 알러지성 질환 또는 천식을 가진 개체는 현존하는 알러지성 질환 또는 천식의 인식이 가능한 증상을 가진 개체이다. 예를 들어 알러지성 반응을 유도하는 흡입 물질(예를 들어, 일본 삼나무 꽃가루 단백질)과 복합체를 형성한 입자에 의해 그러한 개체에서 면역원성이 유도될 수 있다.
- [0161] 일부 구현예에서, 본 발명은 알러지, 예를 들어 일본 삼나무 꽃가루에 대한 알러지 반응의 발병 전에 본 발명의 조성물의 용도에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 본 발명은 진행중인 또는 현존하는 알러지를 억제하기 위한 본 발명의 조성물의 용도에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 알러지 반응 또는 알러지성 반응을 완화시키는 것에 관한 것이다. 완화는 대상체의 알러지 반응 또는 알러지성 반응을 치료, 예방 또는 억제하는 것을 의미한다.
- [0162] 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물(예를 들어, 일본 삼나무 꽃가루 알러지와 관련된 항원성 분자에 커플링된 PLG 캐리어)은 하나 이상의 스캐폴드, 매트릭스 및/또는 전달 시스템과 함께 사용된다(예를 들어, 미국 특허 공보 제2009/0238879호, 미국 특허 제7,846,466호, 제7,427,602호; 제7,029,697호; 제6,890,556호; 제6,797,738호; 및 제6,281,256호 참조; 본 명세서에 참고로 편입됨). 일부 구현예에서, 입자(예를 들어, 항원-커플링된 PLG 입자)는(예를 들어, 화학/생물학적 물질, 세포, 조직 및/또는 장기를 대상체에 전달하기 위한) 스캐폴드, 매트릭스 및/또는 전달 시스템과 결합된, 흡착된, 포매된, 컨주게이팅된다. 일부 구현예에서, (예를 들어, 화학/생물학적 물질, 세포, 조직 및/또는 장기를 대상체에 전달하기 위한) 스캐폴드, 매트릭스 및/또는 전달 시스템은 본원에 기재된 물질(예를 들어, 하나 이상의 항원성 펩타이드에 접합된 PLG)을 포함하고/하거나 이로부터 제조된다.
- [0163] 일부 구현예에서, (예를 들어, 생물학적 물질(예를 들어, 세포, 조직 등)을 대상체로 이식하기 위한) 미세다공성 스캐폴드가 제공된다. 일부 구현예에서, 제제(예를 들어, 세포의 기질 단백질, 액센딘-4) 및 생물학적 물질(예를 들어, 체장 소도세포)을 그위에 갖는 미세다공성 스캐폴드가 제공된다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 질환(예를 들어, 제1형 당뇨병)의 치료 및 관련 방법(예를 들어, 진단 방법, 연구 방법, 약물 스크리닝)에 사용된다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 스캐폴드 상에 및/또는 스캐폴드 내에 본원에 기재된 항원-접합된 캐리어를 갖는다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 항원 접합된 물질(예를 들어, 항원 접합된 PLG)로부터 생산된다.
- [0164] 일부 구현예에서, 스캐폴드 및/또는 전달 시스템은 하나 이상의 층을 포함하고/하거나, 하나 이상의 화학적 및/또는 생물학적 독립체/제제(예를 들어, 단백질, 펩타이드-접합된 입자, 소분자, 세포, 조직, 등)를 가지며, 예를 들어, 미국 특허 공보 제2009/0238879호를 참조하며; 그 전체가 참고 문헌으로 편입된다. 일부 구현예에서, 항원-커플링된 입자는 스캐폴드 전달 시스템과 함께 투여되어, 스캐폴드 및 관련 물질에 대한 면역학적 관용의 유도를 유도한다. 일부 구현예에서, 미세다공성 스캐폴드는 본원에 기재된 입자와 함께, 스캐폴드 상에 또는 스캐폴드 내에 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-커플링된 입자는 스캐폴드 전달 시스템에 커플링된다. 일부 구현예에서, 스캐폴드 전달 시스템은 항원-커플링된 입자를 포함한다.
- [0165] 기재된 특징 및 구현예의 다양한 변형, 재조합 및 변형은 본 발명의 범위 및 사상을 벗어나지 않으면서 당업자

에게 분명할 것이다. 특정 구현예가 기재되었지만, 청구된 본 발명이 그러한 특정 구현예에 지나치게 제한되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 관련 분야의 숙련자에게 명백한 설명된 상기 모드 및 구현예의 다양한 변형은 다음의 청구범위의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 예를 들어, 미국 특허 출원 제62/221,504호, PCT 출원 번호 PCT/US2016/068423 및 PCT/US2017/012173(이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 편입됨); 미국 특허 공개 번호 제2012/0076831호, 제2002/0045672호, 제2005/0090008호, 제2006/0002978호, 제2009/0238879호, 제2012/0076831호, 제2015/0209293호, 제2015/0283218호(이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 편입됨); 및 미국 특허 제7,846,466호; 제7,427,602호; 제7,029,697호; 제6,890,556호; 제6,797,738호; 및 제6,281,256호(이들 각각은 본 명세서에 그 전체가 참고로 편입됨)은 본원에 기재된 다양한 구현예에서 사용되는 세부사항, 변형 및 변화를 제공한다.

[0166] 본 출원 및/또는 하기에 언급된 모든 공보 및 특허는 그 전체가 본원에 참고로 편입된다.

# [0167] 실시예

[0168] 하기 실시예는 본 발명의 이점 및 특징을 추가로 설명하기 위해 제공되지만, 본 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다.

## [0169] 실시예 1: 제조합 일본 삼나무 꽃가루 단백질의 TIMPs로의 캡슐화

[0170] 상술한 바와 같이, 삼나무 꽃가루 과민증의 치료에서 일본 삼나무 꽃가루(JCP) 추출물을 캡슐화하는 입자의 사용은 저농도에서도 용액에서 매우 점성을 유지하는 JCP를 캡슐화하는 문제점 때문에 제한적이다. 이중 에멀전-용매 증발 방법을 사용하여 JCP를 캡슐화한 TIMP 입자(TIMP-JCP<sup>P</sup>)를 제조하기 위한 실험을 수행하였다(도 2c). 간단히, 시험된 JCP 추출물의 배치(batch)에 따라, 200  $\mu$ L의 5 mg/mL JCP 용액을 DCM 내 20% w/v PLGA 0.5 mL에 첨가하거나, 400  $\mu$ L의 5 mg/mL JCP 용액을 DCM 내 20% w/v PLGA 1.0 mL에 첨가하였다. 각 용액을 초음파처리기에 의해 에멀전화시켜 1차 에멀전을 생성시켰다. PEMA 용액(10 mL 1% w/v 수성 PEMA)을 에멀전에 첨가하고 초음파처리에 의해 제-에멀전화시켜 2차 에멀전을 생성시켰다. 에멀전을 교반하여 200 mL의 0.5% w/v 수성 PEMA에 부었다. 입자를 정제하고, 동결건조시키고, -20도에서 미래의 사용을 위해 저장하였다. CBQA 분석 전에 입자를 DMSO에 용해시킴으로써 이전에 기술된 바와 같이 입자의 항원 용량을 결정하였다. 물의 나노입자 크기 및 제타-전위는 Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, Westborough, MA)에서 동적 광산란을 사용하여 측정되었다. 로트-방출(Lot-release) 기준은 TIMP-JCP<sup>P</sup> 직경이 700nm  $\pm$  250nm이고, 적어도 -30mV의 전하를 필요로 하며, 적어도 5 $\mu$ g 항원/mg PLGA를 함유해야 한다. 입자 제조를 위한 조건 및 JCP 캡슐화의 결과를 도 4에 나타낸다.

[0171] 달성된 최대 항원 부하가 약 1 $\mu$ g 단백질/mg TIMP 또는 그 이하이기 때문에 총 JCP 추출물을 TIMP로 캡슐화하기 위한 초기의 시도는 부분적으로만 성공적이었다(도 4). 이는 잠재적으로 저농도에서도 JCP의 높은 점도에 기인하였다(도 2a). 따라서, 제조합 JCP 단백질(CRYJ1 및 CRY2, Lifeome)을 TIMP(TIMP-JCP<sup>R</sup>, 도 2b에 도시된 개략도)로 캡슐화하기 위한 최적 조건을 결정하기 위한 실험을 수행하였다.

[0172] 저 분자량 PLGA(0.17 dL/g), Sugi 염기성 단백질(CRYJ1, 55,180 Da) 및 폴리갈락투로나제(CRYJ2, 59,070 Da)를 사용하여 TIMP-JCP<sup>R</sup> 입자를 생성하였다. 제조합 단백질의 순도를 SDS-PAGE(도 3c)에 의해 평가하고, 이전에 결정된 결과와 비교하였다(Y. Mitobe *et al.*, *조질 독성학 및 약리학*: RTP 2015 71). TIMP-JCP<sup>R</sup> 입자 제조 조건은 표 2에 나타나 있다.

【표 2】

**TIMP-JCP<sup>R</sup> 입자 제조 조건**

입자	PLGA	재조합 단백질	연속 상 1% PEMA	추출 상 0.5% PEMA
TIMP-CRYJ103-56-1 (이론적 15 $\mu\text{g/mL}$ )	50 mg (100 mg/mL; 0.5 mL DCM)	0.75 mg (4 mg/mL; 186 $\mu\text{L}$ MilliQ)	2.5 mL	20 mL
TIMP-CRYJ103-56-2 (이론적 7.5 $\mu\text{g/mL}$ )	50 mg (100 mg/mL; 0.5 mL DCM)	0.375 mg (4 mg/mL; 94 $\mu\text{L}$ MilliQ)	2.5 mL	20 mL
TIMP-CRYJ203-56-3 (이론적 15 $\mu\text{g/mL}$ )	50 mg (100 mg/mL; 0.5 mL DCM)	0.75 mg (8 mg/mL; 94 $\mu\text{L}$ MilliQ)	2.5 mL	20 mL
TIMP-CRYJ203-56-4 (이론적 7.5 $\mu\text{g/mL}$ )	50 mg (100 mg/mL; 0.5 mL DCM)	0.375 mg (4 mg/mL; 47 $\mu\text{L}$ MilliQ)	2.5 mL	20 mL

입자 제형(도 2c에 도시된 개략도)을 위한, 및 상기 기술된 이중-에멀전 프로토콜을 사용하여 CRYJ1 또는 CRYJ2를 캡슐화하였다. 단백질 농도 및 버스트 방출은 CBQCA에 의해 각각의 샘플에 대해 결정되었다. 이들 분석의 결과를 하기 표 3에 나타내었다. 크기 및 입자 전하를 Malvern Zetasizer Nano ZS 또는 ZSP를 사용하는 동적 광산란(DLS)에 의해 측정하였고, 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

【표 3】

**TIMP 내 CRYJ1 및 CRYJ2의 로딩**

입자	단백질 로딩( $\mu\text{g}$ ) 단백질/TIMP의 mg	재구성시 단백질 방출율
TIMP-CRYJ103-56-1	13.1 $\pm$ 2.7	검출되지 않음 <sup>a</sup>
TIMP-CRYJ103-56-2	5.5 $\pm$ 4.2	검출되지 않음 <sup>a</sup>
TIMP-CRYJ203-56-3	10.2 $\pm$ 0.7	12.8
TIMP-CRYJ203-56-4	1.7 $\pm$ 0.5	0.7

<sup>a</sup> 검출 한계 이하

【표 4】

**입자 크기 및 제타 전위의 측정**

입자	Z-평균 크기(nm)	제타 전위(mV)	PDI
TIMP-CRYJ103-56-1	846.7 $\pm$ 39.0	-45.2 $\pm$ 0.7	0.380
TIMP-CRYJ103-56-2	775.9 $\pm$ 23.6	-37.3 $\pm$ 0.2	0.380
TIMP-CRYJ203-56-3	981 $\pm$ 9.6	-37.1 $\pm$ 1.4	0.370
TIMP-CRYJ203-56-4	1084 $\pm$ 7.7	-39.1 $\pm$ 0.8	0.410

**실시예 2: JCP 알러지의 류린 모델**

흡입된 알러지항원에 대한 급성 알러지 반응의 마우스 모델은 천식에서의 면역적 및 염증 반응의 기전을 밝히고, 알러지성 염증을 제어하기 위한 신규한 표적의 동정 및 조사에 널리 사용되어왔다.



- [0179] 급성 염증성 모델의 특성은 마우스 균주, 알러지항원 및 민감화 및 챌린지 프로토콜의 선택에 의해 영향을 받을 수 있다(도 5a). 간단히, 삼나무 꽃가루 추출물(Cedar pollen extract-Cj; LSL-LG5280, Lo# 153101, Cosmo Bio USA)을 1 mg/mL의 MilliQ 물에 재현탁했다. JCP 용액을 명반(alum)의 최종 농도가 20 mg/mL가 되도록 Imject 명반(Thermo Scientific, Cat. # 77161)에서 1:1 희석시켰다. 0일째, Balb/c 마우스에게 100  $\mu$ L JCP + 명반 용액(즉, 2 mg/mL의 명반에 흡착된 JCP 50  $\mu$ g, n=10)을 복강내 주사하였다. 대조군 마우스에는 PBS(n=10)로 희석한 명반을 주사하였다. 제2 균등 용량을 14일째에 마우스에게 투여하였다. 21일째에 마우스를 복강 내피 세포에서 채혈하여 항체 분석을 위해 혈청을 수집하였다(도 5b-5d). 22일째에, 꼬리 정맥을 통해 정맥내 투여된 TIMP-OVA(n=5) 또는 TIMP-JCP(n=4)의 단일 2.5mg 용량으로 각 그룹으로부터의 마우스의 일부를 관용시켰다. 또한, 마우스는 JCP로 민감화하기 전에 TIMP-OVA 또는 TIMP-JCP로 관용된다.
- [0180] 28일 및 29일째에, 마우스에게 20  $\mu$ L MilliQ 물 내 100  $\mu$ g의 JCP 추출물을 비강내로 투여하였다. 투여한지 29일 후, 1시간동안 마우스를 굶기(도 7) 및 체온 변화(도 6)에 대하여 모니터링하였다. 1시간 후, 혈액을 수집하여 MCPT-1(도 10b) 및 히스타민(도 10a)의 혈청 수준을 평가하기 위해 혈액을 수집하였다.
- [0181] 30일째에, 마우스를 다시 혈청 내의 항체 분석을 위해 출혈시켰다(도 9a-9c). 이어서 마우스를 희생시키고, 각 마우스로부터의 비장을 수집하고, 생체의 사이토카인 분석 및 증식을 위해 균질화시켰다(도 8). 비장을 수확하고, 적혈구-없는 단일 세포 현탁액으로 가공하고, 및 37°C에서 48시간동안 1, 25 또는 50  $\mu$ g/mL JCP 완전한 RPMI 배양 배지와 함께 배양하였다. 50  $\mu$ L의 상등액을 사이토카인 분석을 위해 제거하고, 세포를 배양 마지막 24시간 동안 1  $\mu$ Ci/웰 [3H]TdR로 펄스 처리하였다. 증식은 탐카운트 마이크로플레이트 신틸레이션 계수기(Topcount Microplate Scintillation Counter)(PerkinElmer, Waltham, MA)에 의해 검출된 [3H]TdR 혼입에 의해 측정하였다.
- [0182] 상기 데이터는 JCP 민감화 후 JCP-TIMP로 치료한 것이 생체의 분석에서 IFN $\gamma$ , IL-17 및 IL-5 생성을 충분히 감소시킨다는 것을 나타낸다. JCP의 고용량 투여로 비장 세포를 자극한 경우 IL-4, IL-10 및 IL-13 수준에서도 유사한 결과가 관찰되었다. TIMP 치료 후 항체 수치는 변하지 않았다.
- [0183] **실시예 3; JCP 알러지의 무린 모델 및 CRYJ1 및 CRYJ2 TIMPs에 의한 치료**
- [0184] *알러지 기도 염증 모델*
- [0185] 마우스를 10  $\mu$ g CRYJ1과 CRYJ2의 2회 용량, 명반(3 mg)내 주요 일본 삼나무 꽃가루 알러지항원 또는 명반과 PBS만으로 복강 내(i.p.)로 면역화하였다. 그후, 마우스를 조직 수확 전에 3일 연속, 에어로졸화한 CRYJ1 및 CRYJ2(10 mg/ml)로 20분간 투여하였다.
- [0186] *기관지폐포 세척 호산구의 분석*
- [0187] 폐를 1 mL의 기관지폐포 세척액(BALF; 1 mM EDTA 및 PBS 내 10% FBS)으로 플러싱한다. 총 세포 수를 측정하고, 샘플을 차등 세포 수에 대해 염색한 슬라이드 및 DiffQuik(Siemens, Newark, DE)상에 사이토스핀(cytospun)한다.
- [0188] *기도 조직학*
- [0189] 폐를 수집하여, 포르말린에 고정시키고 파라핀으로 가공한다. 파라핀 절편은 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 또는 파오오드산-쉬프(PAS)로 염색한다.
- [0190] *JCP-특이적 IgE*
- [0191] 희생시 마우스로부터 혈청을 수집하고, CRYJ1/2-특이적 IgE를 샌드위치 ELISA에 의해 정량화한다. 항-마우스 IgE(BD Biosciences)를 포획 항체로 사용하고, 바이오티닐화된 CRYJ1/2(Pierce[Rockford, Rock]의 EZ-Link 섀포-NHS-LC-바이오틴 키트를 사용하여 준비됨)를 2차 시약으로 사용한다. CRYJ1/2-IgE의 양은 정제된 마우스 CRYJ1/2-IgE를 사용하여 생성된 표준 곡선에 의해 측정되어야 한다.
- [0192] *사이토카인 정량화*
- [0193] 리콜 반응 배양액으로부터의 BAL 유체 및 상등액(48시간에 수확됨)을 자기 Milliplex MAP 멀티플렉스 분석(Millipore, Billerica, MA)에 의해 IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17 및 IFN $\gamma$ 에 대하여 분석하였다.
- [0194] *삼나무 꽃가루 항원의 생산 및/또는 공급*
- [0195] 정제된 삼나무 꽃가루 추출물은 일본 기상학회로부터 유래한다. 또한 제조함 일본 삼나무 꽃가루 항원은 이전에



기술한 바와 같이 제조해야 한다(Fujimura T, Int. Arch. Allergy Immunol. 2015;168(1):32-43). JCP에서 면역 우성 에피토프에 대한 아미노산 서열은 CRYJ1(수탁 번호 AB081309; SEQ ID NO: 1) 및 CRYJ2(수탁 번호 AB211810; SEQ ID NO: 2)이다.

[0196] TIMP-JCP의 연구 배치 생산

[0197] 재조합 JCP 항원은 상기 기재된 바와 같이 TIMP로 캡슐화된다. 200 mg의 TIMP-CRYJ1 및/또는 CRYJ2(TIMP-JCP<sup>R</sup>) 및 200 mg TIMP-OVA 대조군은 JCP 알러지의 마우스 모델에서 효능 시험을 위해 사용될 것이다. 5-10 마리의 마우스의 6개의 그룹을 TIMP-OVA 또는 TIMP-JCP<sup>R</sup>로 1회 용량(그룹 1-3) 또는 2회 용량(그룹 3-6) 요법으로 처리할 것이다. 동물은 JCP 항원에 민감화된다(TIMP 처리 전후). 28일 및 29일에 기도 감염이 수행될 것이며, 치료의 효능은 아래에 기재된 1차 판독 및 성공 측정을 사용하여 결정된다. 그룹 7은 OVA에 민감해야하며, JCP 대신에 OVA로 항원 투여가 가능하므로 양성 알러지 대조군으로 사용된다.

[0198] 동물 POC: 민감화 이전의 TIMP-JCP 치료

[0199] 5-10 마리의 마우스의 6개의 그룹을 TIMP-OVA 또는 TIMP-JCP<sup>R</sup>로 1회 용량(그룹 1-3) 또는 2회 용량(그룹 3-6) 요법으로 표 5에 제시된 바와 같이 처리한다. 동물은 JCP 항원에 민감화될 것이다. 28일 및 29일에 기도 감염이 수행될 것이며, 치료의 효능은 아래에 기재된 1차 판독 및 성공 측정을 사용하여 결정된다. 그룹 7은 OVA에 민감해야하며, JCP 대신에 OVA로 항원 투여가 가능하므로 양성 알러지 대조군으로 사용된다.

【표 5】

**실험적 설계: 민감화 이전에 TIMP-JCP 치료**

그룹	n	민감화	치료
그룹 1	5-10	JCP	1 용량 TIMP-JCP <sup>P</sup>
그룹 2	5-10	JCP	1 용량 TIMP-JCP <sup>R</sup>
그룹 3	5-10	JCP	1 용량 TIMP-OVA
그룹 4	5-10	JCP	2 용량 TIMP-JCP <sup>P</sup>
그룹 5	5-10	JCP	2 용량 TIMP-JCP <sup>R</sup>
그룹 6	5-10	JCP	2 용량 TIMP-OVA
그룹 7	5-10	OVA	없음
그룹 8	5-10	없음	없음

실험은 블라인딩이며, 3회 반복한다.

[0200]

[0201] 동물 POC - 민감화후 TIMP-JCP 치료

[0202] 6개의 마우스 그룹을 JCP에 대한 민감화 후에 TIMP-JCP<sup>R</sup> 또는 TIMP-OVA로 하기 표 6에 나타난 바와 같이 처리한다. 2회 용량 요법이 시험된다. 여기에는 1 회 TIMP 용량 요법(그룹 1-3)과 2회 용량 요법(그룹 4-6)을 포함하며, 7일 간격으로 나눈다. 28일 및 29일에 공기 챌린지(challenge)가 수행되고, 치료의 효능은 아래에 기술된 1차 판독 및 성공 측정을 사용하여 결정된다.

【표 6】

**실험적 설계: 민감화 이후에 TIMP-JCP 치료**

그룹	n	민감화	치료
그룹 1	5-10	JCP	1 용량 TIMP-JCP <sup>P</sup>
그룹 2	5-10	JCP	1 용량 TIMP-JCP <sup>R</sup>
그룹 3	5-10	JCP	1 용량 TIMP-OVA
그룹 4	5-10	JCP	2 용량 TIMP-JCP <sup>P</sup>
그룹 5	5-10	JCP	2 용량 TIMP-JCP <sup>R</sup>
그룹 6	5-10	JCP	2 용량 TIMP-OVA
그룹 7	5-10	OVA	없음

실험은 블라인딩이며, 3회 반복한다.

[0203]

- [0204] 동물 모델의 1차 판독 및 성공 측정
- [0205] 1차 판독 및 성공 측정은 민감화 전에 TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리를 받는 마우스에서 측정된다. TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리된 마우스는 공기 켈린지 후 기준선 온도에 비해 온도 변화가 없다. TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리된 마우스의 기준치와 비교된 혈액 호산구 수 및 비만 세포 수에는 변화가 없다. TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리된 마우스는 JCP에 민감화된 TIMP-OVA 처리된 마우스에 비해 JCP-특이적 IgE를 유의하게 감소시켰다. TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리된 마우스는 또한 JCP에 민감화된 TIMP-OVA 처리된 마우스와 비교하여 전신 IL-4, IL-5 및 IL-13을 유의하게 감소시켰다. TIMP-JCP<sup>R</sup>은 TIMP-OVA 처리된 마우스와 비교하였다.
- [0206] 1차 판독 및 성공 측정은 민감화 후 TIMP-JCP<sup>R</sup> 치료를 받은 마우스에서 측정된다. TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리된 마우스는 공기 켈린지 후 기준선 온도에 비해 온도 변화가 없다. TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리된 마우스의 기준치와 비교하여 혈액 호산구 수 및 비만 세포 수에는 변화가 없다. TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리된 마우스는 JCP에 민감화된 TIMP-OVA 처리된 마우스에 비해 JCP-특이적 IgE를 유의하게 감소시켰다. 또한 TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리된 마우스는 JCP에 민감화된 TIMP-OVA 처리된 마우스와 비교하여 JCP-특이적 전신 IL-4, IL-5 및 IL-13을 유의하게 감소시켰다. 또한 TIMP-JCP<sup>R</sup> 처리된 마우스는 TIMP-OVA 처리된 마우스에 비해 특정 항원 생성을 감소시켰다.
- [0207] **실시예 4; TIMP-JCP에 대한 임상 연구**
- [0208] 정량적 고밀도 일본 삼나무 꽃가루에 노출된 일본 계절성 알러지 비염(SAR) 환자에서 단일-중심, 비-블라인딩된, 위약 대조된 연구에서 TIMP-JCP의 효능 및 안전성을 평가하기 위해, 임상 연구를 수행한다.
- [0209] 임상 연구의 1차 목표는 일본 삼나무 꽃가루에 대한 고밀도 노출 동안 경구 TIMP-JCP로 치료된 일본 SAR 환자에서 총 비강 울혈 스코어(TNSS)의 변화를 분석하고 평가하는 것이다.
- [0210] 2차 목표는 알러지성 비염 환자에 대한 총 증상 점수(Total Symptom Score, TSS), 증상 점수, 비강 분비물 양, 재채기 수 및 환자의 인상의 변화를 분석하고 평가하고, 순수한 일본 삼나무 꽃가루에 고밀도 노출을 받은 환자의 정맥 내 경로로 투여된 TIMP-JCP의 안전성을 평가하는 것이다.
- [0211] **일반적인 연구 설계.**
- [0212] 환경적 노출 단위를 사용하여 일본 삼나무 꽃가루에 알러지 반응을 보이는 환자에서 TIMP-JCP의 안전성 및 효능을 측정한다. 그러나, 환경적 노출 단위(EEU)가 많이 존재하지만, 본 연구는 와카야마 현의 일본 보건 지원 네트워크 부서와 협력하여 수행된다. 기존 접근법의 많은 한계점이 없으므로, EEU를 통해 정밀하고 통제된 연구를 설계하고 실행할 수 있다(유사한 연구 설계는 Enomoto, 등, 2009에 기재되어 있음). 이하 다이어그램은 투약 및 이벤트 스케줄을 요약한 것이다.
- [0213] **대상체**
- [0214] 임상 연구에는 총 25명의 대상체가 있다. 5명의 대상체는 위약으로 치료한다. 20명의 대상체는 TIMP-JCP로 치료한다.
- [0215] **진단 및 포함 기준**
- [0216] **포함 기준:**
- [0217] · 일본 SAR 환자.
- [0218] · 적어도 2년동안 일본 삼나무 꽃가루 과민증상의 병력이 있는 환자.
- [0219] · (일본 삼나무 꽃가루 항원에 대한) 양성 IgE: 스크리닝 노출 시험일 이전 1.5년 이내에 형광-효소 면역검정(PEIA) 또는 화학발광 효소 면역검정(CLEIA)에 의해 결정됨.
- [0220] · 스크리닝 노출 시험(TNSS) 시작후, TNSS가 8 이상이고 비강 울혈 점수가 2(보통) 이상인 환자.(스크리닝 노출 시작 후 90 내지 150분의 적어도 하나의 평가 점수 및 비강 울혈 스코어는 기준을 충족하는 경우 임의의 다른 평가 점수가 될 수 있음)
- [0221] · 20세 이상 65세 이하(성 선호 없음).

- [0222] · 고지에 의한 동의에 서명한 환자.
- [0223] **제외 기준:**
- [0224] · 비계절성 알러지성 비염의 증상이 있는 환자.
- [0225] · 심한 천식, 기관지확장증, 중증 간, 신장 또는 심장 기능이상, 혈액, 내분비 질환 및 기타 심각한 합병증이 있는 환자.
- [0226] · 비강 질환(비대성 비염, 부비동염, 비강 용종, 비강 격막의 이탈 등) 또는 TIMP-JCP의 유효성 판단을 방해할 수 있는 안구 질환이 있는 환자
- [0227] · 치료 노출일에 상부 및/또는 하부 기도 염증(급성 비염, 만성 비염, 유헤성 비염, 위축성 비염, 화농성 비강 분비물, 냉증과 같은 부비동염 등)의 증거가 있는 환자.
- [0228] · TIMP-JCP의 평가에 영향을 줄 수 있는 임의의 하기 약물을 복용한 환자(항-참가물질 및 면역 조절제 포함).
- [0229] **추가 제외 기준:**
- [0230] 제1 투여일 이전 2주 이내에:
- [0231] · 항-알러지 약물, 항히스타민제(H1 및 H2 차단제: 경구 투여, 점비약, 안약, 주사제 및 국소 사용), 항콜린성 제제, 혈관수축제 점비약, 항히스타민제-함유 감기약, 항알러지성/항히스타민제 효과를 갖는 것으로 예상될 수 있는 제제(한약 및 글리사이르히진 포함) 및 알러지 증상(재채기, 비루, 비강 유헤, 눈 가려움증 등)에 대해 표시되는 기타 제제.
- [0232] · 스테로이드(경구, 흡입, 점비약, 안약 또는 국소 사용), 면역억제제(경구, 국소 사용 또는 주사제), 아졸 살진균제 및 감마글로불린 제제를 함유한 히스타민.
- [0233] · 아졸 살진균제, 매크롤라이드 항생제 및 수산화 알루미늄/수산화 마그네슘을 함유하는 제제.
- [0234] 스크리닝 노출 시험일 이전 4주 이내에:
- [0235] · 데포 스테로이드 제제.
- [0236] 스크리닝 노출 시험일 이전 6개월 이내에: 스테로이드 주사.
- [0237] · 스테로이드 주사
- [0238] 스크리닝 노출 시험일 이전 1년 이내에:
- [0239] · 특정 저-민감화를 위한 유지 요법 또는 비특이적 대체 요법을 받는 환자.
- [0240] · 다른 연구에 참여중이거나 고지에 의한 동의가 있기 전의 6개월 이내에 다른 연구에 이전에 참여한 환자.
- [0241] · 조사자/하위-조사자가 임의의 다른 기준을 위한 연구에 등록하기에 부적합하다고 생각되는 환자.
- [0242] · 항히스타민제 또는 항히스타민성 제제(펙소페나딘 HCl 포함) 및 슈도에페드린 하이드로클로라이드에 과민증 이력이 있는 환자.
- [0243] · 다른 연구에 참여 중이거나 스크리닝 노출 시험일 이전 6개월 이내에 다른 연구에 이전에 참여한 환자.
- [0244] · 임신 중이거나 임신가능성이 있거나, 현재 모유-수유중인 여성.
- [0245] **안전 및 중지 기준**
- [0246] 다음 파라미터들 중 하나가 충족되면, 연구는 데이터 안전성 모니터링 보드의 재량에 따라 보류될 수 있다:
- [0247] a) 하나 이상의 예상치 못한 약물 관련된 심각한 유해 사례(SAE)가 데이터 안전성 모니터링 보드에 보고되는 경우.
- [0248] b) 연구 약물과 명확하게 관련이 없는 과도한 및/또는 예상치 못한 유해 사례.
- [0249] c) 예기치 않은 환자 사망
- [0250] 투약량, 지속기간 및 투여 방식:

- [0251] **약물:** TIMP-JCP, 폴리(락트산-코-글라이콜 산) 면역원성 면역 변형성
- [0252] **용량 및 형태:** TIMP-JCP는 바이알 내에서 멸균된 동결건조된 백색 분말로서 제공된다. 각 바이알에는 TIMP-JCP 500mg이 함유되어 있다. TIMP-JCP는 [1단계 당 결과 조정-초기 가정은 10mg/kg임]의 용량으로 제공된다.
- [0253] **치료/연구의 지속기간:** 환자 스크리닝 및 고지에 의한 동의 후에 환자 등록이 발생한다. 연구에 동원되면 투약이 시작된다. 0일째에 투약이 제공되고, 14일째에 1회 이상 제공될 것이다. 첫번째 고밀도 일본 삼나무 꽃가루 노출은 18 내지 21일에 발생한다(환자는 환경 노출 단위로 5시간 동안 JCP의 8,000 알갱이/m<sup>3</sup>에 노출된다). 두번째 고밀도 일본 삼나무 꽃가루 노출은 32 내지 35일에 발생한다(환자는 환경 노출 단위로 5시간 동안 JCP의 8,000 알갱이/m<sup>3</sup>에 노출된다). 후속 조치 방문은 42, 49, 및 56일째에 이루어진다. 최종 후속 조치 방문은 두번째 노출 후 4주가 지난 63일에 발생한다.
- [0254] **투여 모드:** 재구성된 TIMP-JCP는 30분에 걸쳐 느린 IV 주입에 의해 정상 식염수(NS; 0.9% 염화나트륨, NaCl)로 희석되어야 한다. 조사자가 대체 요법을 시행해야 한다고 결정하면 TIMP-JCP는 언제든지 중단될 수 있다.
- [0255] **평가 기준**
- [0256] **안전성:**
- [0257] · AE의 발병률 및 중증도, 플러스 AE의 특수성(과민증 및 면역-매개된 반응에 대한 표준보고 기준 포함).
- [0258] · 바이탈 징후(거드랑이 온도, 앉은 자세의 혈압, 착석 위치의 맥박수)
- [0259] · 표준 실험실 평가
- [0260] · 12-리드(lead) ECG 실험실 검사(혈액학, 생화학 및 소변 검사)
- [0261] · 일본 삼나무 꽃가루에 대한 단자(prick) 테스트
- [0262] · 항체 및 히스타민 방출 시험에 의해 개발된 파라미터.
- [0263] **1차 종점:**
- [0264] TNSS: 재채기, 비루, 비강 울혈 및 가려운 코의 총 점수. 각 증상은 다음 5가지 범주의 환자에 의해 평가된다. 1 = 없음(증상 없음); 2 = 경증(증상은 있으나 쉽게 용인됨); 3 = 중등도(증상에 대한 인식; 불편함, 그러나 용납될 수 있음); 4 = 중증(증상의 확실한 인식; 용납하기가 어렵지만 일상 생활 활동을 방해하지 않음), 5 = 중증(용납하기 어렵고 일상 생활 활동을 방해한다)
- [0265] **2차 효능 종점:**
- [0266] **면역 모니터링:**
- [0267] · 항체: IgG 항체, 특정 IgG 항체(항-JCP, 항-CRYJ1 및 항-CRYJ2), 특정 IgG4 항체(항-JCP), IgE 항체, 특정 IgE 항체(항-JCP)
- [0268] · 사이토카인(IFN-감마, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 및 IL-13)
- [0269] · 면역 세포 표현형검사(Tregs, 효과기 T 세포 및 단핵구)
- [0270] · 일본 삼나무 꽃가루에 대한 주변 B 및 T 세포 반응.
- [0271] · TSS의 변화, 각 증상 점수의 변화, 비강 분비물 양, 재채기 횟수 및 환자의 인상.
- [0272] · 비강 분비물 양: 환자의 코를 풀은 후 티슈 페이지의 중량을 1시간마다 측정한다. 코를 풀기 전의 중량과의 차이는 비강 분비물 양으로 계산된다.
- [0273] · 재채기 횟수: 환자는 1시간마다 스스로 재채기 횟수를 기록한다.
- [0274] **약동학(PK):**
- [0275] · 연구 약물 투여 중에 최소 샘플링 디자인에서 매일 측정된 TIMP-JCP의 혈청 농도.
- [0276] **결론:**
- [0277] TIMP-JCP로 치료된 대상체는 일본 삼나무 꽃가루 노출에 대한 알러지성 반응의 발생 및 중증도가 덜 나타났다.

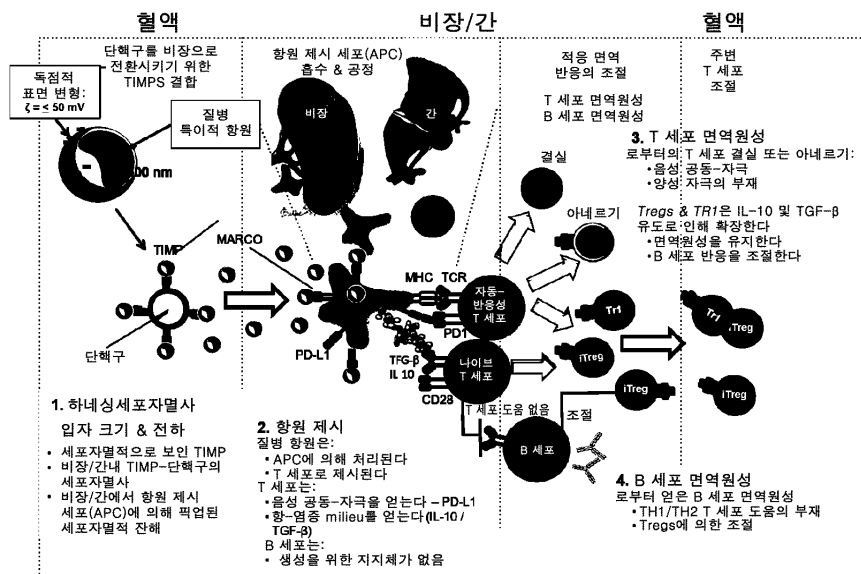
이는 TIMP-JCP로 치료받은 대상체의 TNSS가 위약으로 치료된 대상체에 비해 감소된 것으로 나타났다. JCP로 치료받은 대상체는 또한 감소된 수준의 특정 IgG 항체(항-JCP, 항-CRYJ1 및 항-CRYJ2), 특히 IgG4 항체(항-JCP), IgE 항체, 특정 IgE 항체(항-JCP); 일본 삼나무 꽃가루에 대한 감소된 주변 B 및 T 세포 반응; 위약 그룹에 비해 낮은 TSS 점수, 증상 점수, 비강 분비물 양 및 재채기 횟수를 갖는다.

[0278] 본 발명의 특정 구현예가 기재되고 예시되었지만, 상기 구현예는 단지 본 발명의 예시로서 간주되어야 하고, 첨부된 청구범위에 따라 해석되는 본 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0279] 본원에 인용된 모든 특허, 출원 및 다른 참고문헌은 그 전체가 참고문헌으로 편입된다.

## 도면

### 도면1



### 도면2a



동결건조된 분말

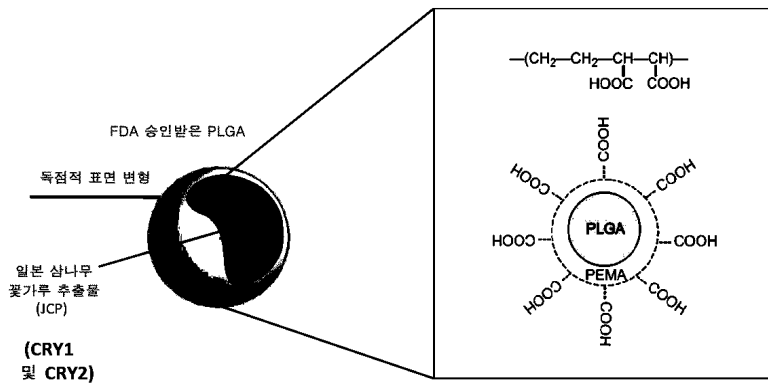


10 mg/mL

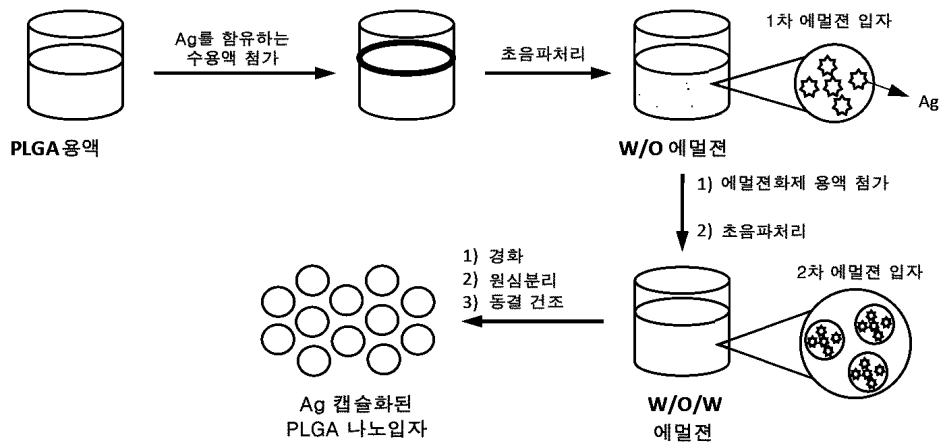


4 mg/mL

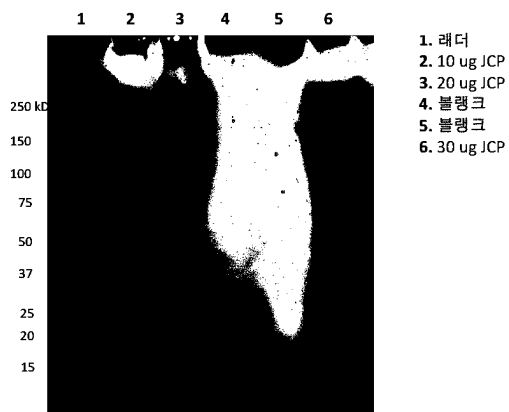
도면2b



도면2c



도면3a



도면3

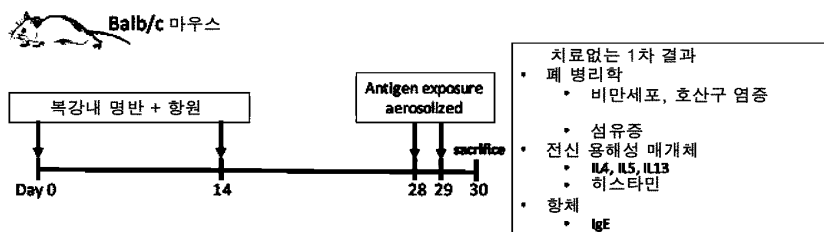


도면4

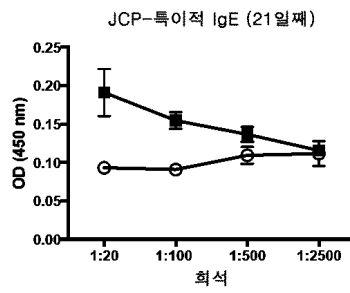
배치	JCP의 농도	첨가된 JCP의 용량	PLGA	PLGA의 농도	첨가된 PLGA의 용량	용매	코멘트
TIMP-JCP001	5 mg/mL	200 $\mu$ L	LMW	200 mg/mL	500 $\mu$ L	DCM	100% 초음파처리 진폭
TIMP-JCP002	5 mg/mL	400 $\mu$ L	LMW	100 mg/mL	1000 $\mu$ L	DCM	100% 초음파처리 진폭
TIMP-JCP003	5 mg/mL	200 $\mu$ L	LMW	100 mg/mL	500 $\mu$ L	DCM	50% 초음파처리 진폭
TIMP-JCP004	5 mg/mL	200 $\mu$ L	HMW	100 mg/mL	500 $\mu$ L	DCM	50% 초음파처리 진폭

배치	크기 (nm)	제타 전위 (mV)	PDI	로딩 ( $\mu$ g/mg)	캡슐화 효율 (%)
TIMP-JCP001	612.3 $\pm$ 7.1	-41.7 $\pm$ 1.5	0.247	0.34 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.6
TIMP-JCP002	442.7 $\pm$ 9.1	-39.0 $\pm$ 1.7	0.226	0.41 $\pm$ 0.02	2.1 $\pm$ 0.1
TIMP-JCP003	330.7 $\pm$ 2.1	-37.3 $\pm$ 0.9	0.263	0.28 $\pm$ 0.4	1.42 $\pm$ 1.8
TIMP-JCP004	993.3 $\pm$ 16.6	-33.7 $\pm$ 1.0	0.291	1.11 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 1.1

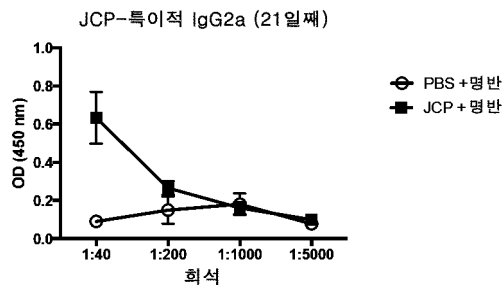
도면5a



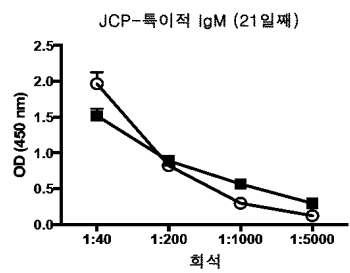
도면5b



도면5c



도면5d





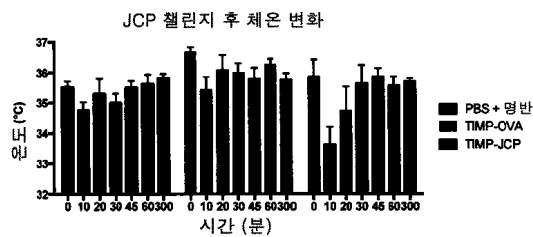
도면6

시간 PBS+명반 (입자 처리 없음)

시간	꼬리	등	우측	좌측	없음
0	36	34.9	35.5	35.8	35.4
10	34.7	34.8	35.1	35.4	33.8
20	36.1	35.3	35.7	36	33.4
30	36.1	35	34.9	34.8	34.2
45	36	35.5	35.7	35.6	34.7
60	36.8	35.7	35.1	35.4	35.1
300	36.1	35.9	35.3	35.8	36

시간	TIMP-OVA 처리됨 (JCP+명반에 의해 민감화됨)				
	꼬리	등	우측	좌측	없음
0	36.2	37	36.6	36.4	37.1
10	34.4	35.6	34.4	36.5	36.2
20	36.4	36.6	34.2	36.6	36.7
30	36.5	36.4	34.9	35.7	36.5
45	35.4	36	34.6	36.5	36.5
60	36.5	35.9	36.6	35.7	36.6
300	35.6	35.1	35.7	36.4	36

시간	TIMP-JCP 처리됨 (JCP+명반에 의해 민감화됨)				
	꼬리	등	우측	좌측	없음
0	35.2	35.4	37	N/A	N/A
10	34.1	34.3	32.5		
20	35.9	35.1	33.2		
30	36.6	35.8	34.5		
45	36.1	35.3	36.2		
60	35.7	36	35		
300	35.7	35.5	35.9		

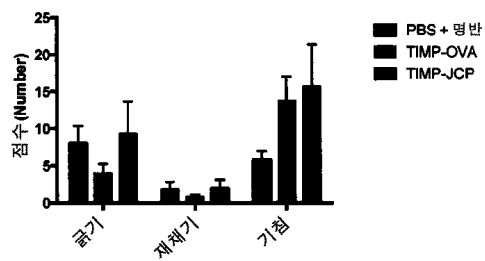


도면7

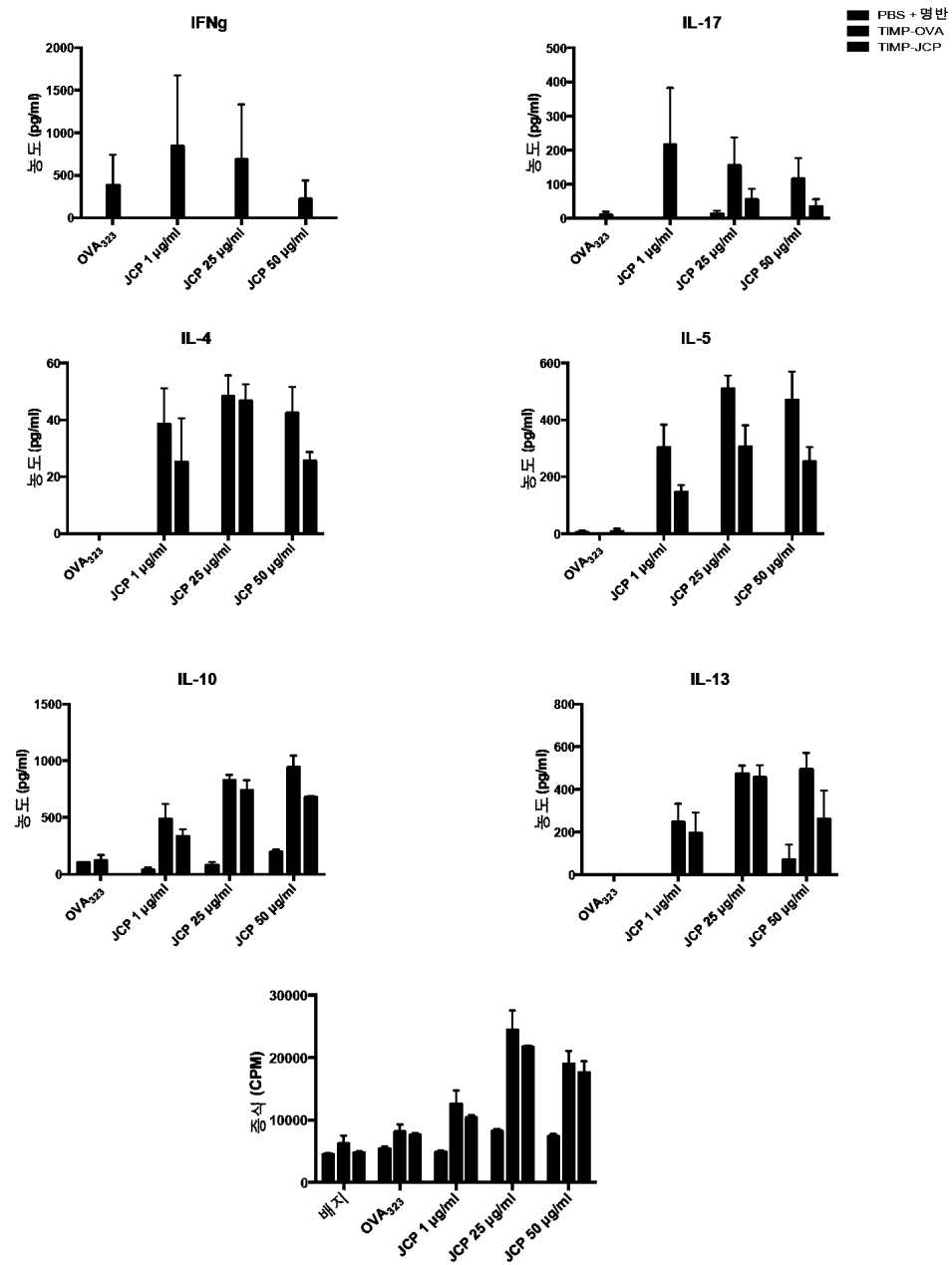
굽기 점수						
치료	마우스 1 T	마우스 2 B	마우스 3 R	마우스 4 L	마우스 5 N	평균
PBS + 명반	4	5	11	16	4	<u>8</u>
TIMP-OVA	3	7	1	2	7	<u>4</u>
TIMP-JCP	11	NA	NA	16	1	<u>9.33</u>

재채기 점수						
치료	마우스 1 T	마우스 2 B	마우스 3 R	마우스 4 L	마우스 5 N	평균
PBS + 명반	6	0	2	1	0	<u>1.8</u>
TIMP-OVA	2	0	0	1	1	<u>0.8</u>
TIMP-JCP	4	NA	NA	2	0	<u>2</u>

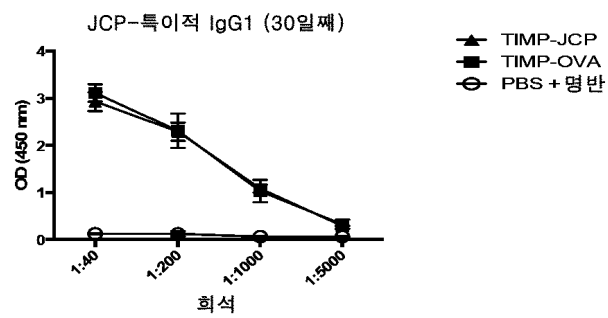
기침 점수						
치료	마우스 1 T	마우스 2 B	마우스 3 R	마우스 4 L	마우스 5 N	평균
PBS + 명반	6	10	3	4	6	<u>5.8</u>
TIMP-OVA	14	15	24	12	4	<u>13.8</u>
TIMP-JCP	27	NA	NA	10	10	<u>15.67</u>



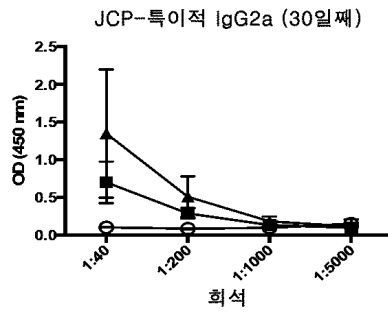
도면8



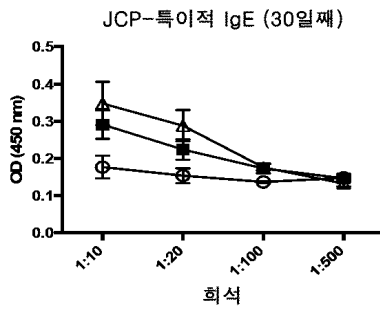
도면9a



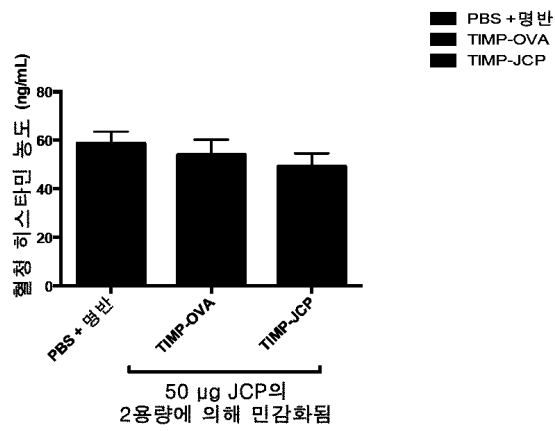
도면9b



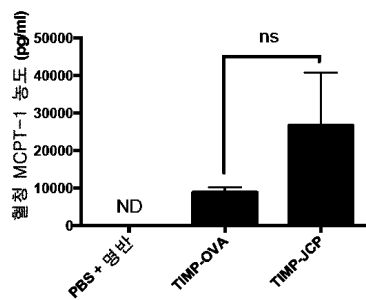
도면9c



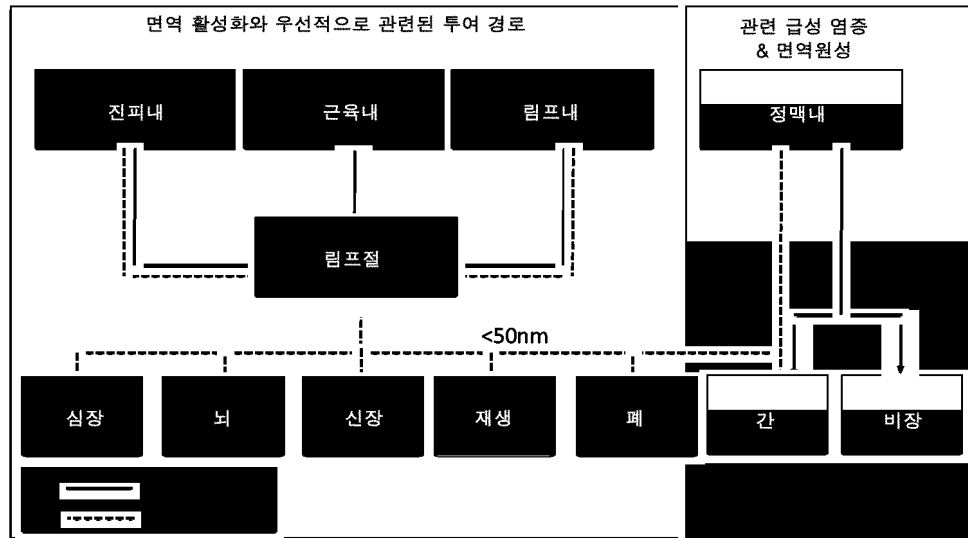
도면10a



도면10b



# 도면11



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Cour Pharmaceuticals Development Company  
Getts, Daniel R.

<120> TIMPs Encapsulating Japanese Cedar Pollen Epitopes

<130> COUR-014/02W0

<150> US 62/293,261

<151> 2016-02-09

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 329

<212> PRT

<213> Cryptomeria japonica

<400> 1

Met Asp Asn Pro Ile Asp Ser Ser Trp Arg Gly Asp Ser Asn Trp Ala

1 5 10 15

Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Ser Ala Val Gly Phe Gly Ser Ser

20 25 30

Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Asp Leu Tyr Thr Val Thr Asn Ser Asp

35 40 45



Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr Leu Arg Tyr Gly Ala Thr  
 50 55 60  
 Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn Met Asn Ile Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr Phe Asp Gly Arg  
 85 90 95  
 Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu His Leu Tyr Gly Ser Ser  
 115 120 125  
 Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn Glu Ser Phe Gly Val Glu  
 130 135 140  
 Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu Arg Thr Ala Thr  
 145 150 155 160  
 Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser Asn Ser Ser Asp Gly Leu  
 165 170 175  
 Val Asp Val Thr Leu Ser Ser Thr Gly Val Thr Ile Ser Asn Asn Leu  
 180 185 190  
 Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His Asp Asp Ala Tyr  
 195 200 205  
 Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly  
 210 215 220  
 Pro Asn Ser Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr Gly Leu Val His  
 225 230 235 240  
 Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr Ile Tyr Ala Ile Gly Gly  
 245 250 255  
 Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser Phe Thr Ala Pro  
 260 265 270  
 Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile Arg Ile Gly Ser Lys Thr  
 275 280 285  
 Ser Ser Ser Ser Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr Gln Asp Val Phe

290 295 300  
Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn  
305 310 315 320  
Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn

325  
<210> 2  
<211> 391  
<212> PRT  
<213> Cryptomeria japonica  
<400> 2

Val Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val

1 5 10 15  
Leu Thr Ser Ser Leu Ser Lys Arg Cys Arg Lys Val Glu His Ser Arg  
20 25 30  
His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr Gly Ala Val Gly  
35 40 45  
Asp Gly Lys His Asp Ser Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp Gln Ala  
50 55 60  
Ala Ser Lys Lys Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro Gly Asn Lys Lys

65 70 75 80  
Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Ser Gln Pro His Phe  
85 90 95  
Thr Phe Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser  
100 105 110  
Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe  
115 120 125  
Thr Leu Met Gly Lys Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly Lys Gln Trp Trp

130 135 140  
Ala Gly Gln Ser Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile Ser Asn Asp Arg  
145 150 155 160  
Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr Gly Leu Ile Ile  
165 170 175

Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His Leu Val Phe Gly  
180 185 190  
Asn Ser Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile Thr Ala Pro Arg  
195 200 205  
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe  
210 215 220  
His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp Ser Val Ala Ile  
225 230 235 240  
Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu Ile Ser Gly Pro  
245 250 255  
Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu Asn Ser Arg Ala  
260 265 270  
Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe Ile Asp Thr Gln  
275 280 285  
Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser  
290 295 300  
His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser Glu Asn Pro Ile  
305 310 315 320  
Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Ser Thr Ser Ala Ser Ala Ser Gln Asn Gln  
325 330 335  
Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys Asn Ile Arg Gly  
340 345 350  
Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Lys Ser Ser Asp Ser Met  
355 360 365  
Pro Ser Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser  
370 375 380  
Gly Lys Ile Ala Ser Ser Leu  
385 390

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized peptide linker

<400> 3

Gly Ala Val Val Arg Gly Ala

1

5