

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-196363
(P2019-196363A)

(43) 公開日 令和1年11月14日(2019.11.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z N A H	4 C O 7 6
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C O 8 5
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	4 H O 4 5
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	

審査請求 有 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-114294 (P2019-114294)	(71) 出願人	512219921
(22) 出願日	令和1年6月20日 (2019.6.20)		フンダシオ・インスティトゥート・ディン
(62) 分割の表示	特願2016-564400 (P2016-564400) の分割		ベスティガシオ・エン・シエンシス・デ・
原出願日	平成27年1月16日 (2015.1.16)		ラ・サルー・ヘルマンズ・トリアス・イ・
(31) 優先権主張番号	14151629.4		ブホル
(32) 優先日	平成26年1月17日 (2014.1.17)		スペイン・08916・バルセロナ・バダ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ロナ・カミ・デ・レス・エスコレス・カレ
		(71) 出願人	516213921
			フンダシオ インスティトゥート カタラ
			ー デ ナノシエンシア イ ナノテクノ
			ロヒア
			スペイン国 エー08193 ベジャテラ
			, カンプス デ ラ ウアベ, エディ
			フィシオ イセエネ2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リポソームに基づく免疫療法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】自己抗原を封入するリポソームの提供。

【解決手段】(i) リポソームが500~15000nmの大きさを有し;且つ、(ii) リポソーム膜がホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルコリン(PC)及びコレステロール(CHOL)を含み、PSの量が膜リポソームの組成全体に対して少なくとも10重量%であり、PCの量が膜リポソームの組成全体に対して少なくとも10重量%であり、CHOLの量が膜リポソームの組成全体に対して少なくとも13重量%である、リポソーム。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己抗原を封入するリポソームであって、

(i) リポソームが 5 0 0 ~ 1 5 0 0 0 n m の大きさを有し ; 且つ

(i i) リポソーム膜が膜リポソームの組成全体に対して 1 0 ~ 4 0 重量 % の量でホスファチジルセリン (P S) を含む、

リポソーム。

【請求項 2】

多胞体ベシクル (M V V) である、請求項 1 に記載のリポソーム。

【請求項 3】

P S の重量 % が膜リポソームの組成全体に対して 2 2 ~ 3 3 % である、請求項 1 又は 2 に記載のリポソーム。

【請求項 4】

リポソーム膜が更にホスファチジルコリン (P C) とコレステロール (C H O L) を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 5】

リポソーム膜が、P S、P C 及び C H O L を、0 . 6 : 0 . 6 : 0 . 7 ~ 1 . 5 : 1 . 5 : 1 . 8 からなるモル比 P S : P C : C H O L で含む、請求項 4 に記載のリポソーム。

【請求項 6】

リポソーム膜を形成する脂質の総量と自己抗原の総量との重量比が 2 0 : 1 ~ 3 : 1 である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 7】

自己抗原が 5 ~ 5 0 のアミノ酸からなる大きさを有する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 8】

自己抗原が、1 型糖尿病 (T 1 D)、紅斑性狼瘡、関節リウマチ、多発性硬化症 (M S)、アジソン病、セリアック病、皮膚筋炎、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、悪性貧血、反応性関節炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、グレーブス病、乾癬、乾癬性関節炎及びシェーグレン症候群からなる群より選択される自己免疫疾患に関連付けられるペプチドである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 9】

自己抗原が、T 1 D に関連付けられるものであり、配列番号 1 及び配列番号 2 のペプチドからなる群より選択される、請求項 8 に記載のリポソーム。

【請求項 1 0】

自己抗原が M S に関連付けられるものであり、配列番号 3 を含む、請求項 8 に記載のリポソーム。

【請求項 1 1】

更に自己抗原を封入し、封入された自己抗原のすべてが同じ自己免疫疾患に関連付けられる、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項 1 2】

請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のリポソームの治療的有効量を、他の適切な薬学的又は獣医学的に許容される賦形剤又は担体と共に含む、薬学的若しくは獣医学的組成物。

【請求項 1 3】

医薬としての使用のための、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のリポソーム又は請求項 1 2 に記載の薬学的若しくは獣医学的組成物。

【請求項 1 4】

自己免疫疾患の予防又は治療における使用のための、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のリポソーム又は請求項 1 2 に記載の薬学的若しくは獣医学的組成物。

【請求項 1 5】

10

20

30

40

50

自己免疫疾患に罹患した患者の、自己に対する寛容性の回復における使用のための、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のリポソーム又は請求項 1 2 に記載の薬学的若しくは獣医学的組成物。

【請求項 1 6】

自己免疫疾患が、T 1 D、紅斑性狼瘡、関節リウマチ、多発性硬化症、アジソン病、セリアック病、皮膚筋炎、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、悪性貧血、反応性関節炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、グレーブス病、乾癬、乾癬性関節炎及びシェーグレン症候群からなる群より選択される、請求項 1 4 又は 1 5 に記載の使用のための、リポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物。

【請求項 1 7】

自己免疫疾患が 1 型糖尿病又は MS である、請求項 1 6 に記載の使用のための、リポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、医学の分野に関する。特に、本発明は、自己免疫疾患の予防又は治療のための自己抗原封入リポソームを提供する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

自己免疫は、自身の構成部分を自身として認識するうえでの生物体の失敗であり、したがって自身の細胞及び組織に対する免疫応答を招く。異常な免疫応答に起因するあらゆる疾患を自己免疫疾患という。顕著な例には、1 型糖尿病 (T 1 D)、紅斑性狼瘡、関節リウマチ、多発性硬化症 (MS)、アジソン病、セリアック病、皮膚筋炎、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、悪性貧血、反応性関節炎、シェーグレン症候群が含まれる。

【0 0 0 3】

先進国の人口のうち 7 ~ 1 0 % の人口がこれらの疾患に罹患していると計算されており、疾患は時に慢性、消耗性で、生命に関わる。自己免疫関連の医療費は、自己免疫疾患が世界的に増加している中、有効な治療法がないために、膨張を続けている。

【0 0 0 4】

自己免疫疾患の治療は、常套的に、免疫抑制薬、抗炎症剤 (ステロイド)、又は苦痛緩和剤であった。橋本甲状腺炎又は 1 型糖尿病におけるホルモン補充のような非免疫学的療法は、自己攻撃的応答の結果を処置するものであり、したがってこれらは対症療法である。食餌操作はセリアック病の重症度を制限する。ステロイド又は NSAID による治療は多くの疾患の炎症症候を制限する。

【0 0 0 5】

望ましくない免疫応答を低減又は回避する免疫調節性療法の開発に大規模な研究の投資が行われた。しかしながら、複数の異なる自己免疫疾患の複雑な詳細の理解が不足しているために、この分野の進歩は実質的に減速している。現在の戦略は、一般に、免疫抑制を維持するために通常生涯にわたる治療となる、広範な作用を有する免疫抑制薬である。加えて、広範に作用する免疫抑制薬の使用は、腫瘍、感染、腎毒性、及び代謝異常といった重度の副作用の危険に関連付けられる。

【0 0 0 6】

これまでの努力にも関わらず、効果的且つ望ましくない副作用を回避する、自己免疫疾患を治療するための更なる治療的手法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0 0 0 7】

本発明者らは、自己免疫疾患の治療において高度に効果的な新規の自己抗原特異的療法を開発した。特に、本発明者らは、脂質ホスファチジルセリンを含む特定の大きさのリポソーム内に、治療対象の自己免疫疾患に関連付けられる自己抗原を封入することにより、自己免疫疾患が効果的に治療されうることを発見した。

10

20

30

40

50

【0008】

したがって、第一の態様において、本発明は、自己抗原を封入するリポソームに関し、ここで(i)リポソームは500~15000nmの大きさを有し；且つ(ii)リポソーム膜は、膜リポソームの全組成に対してホスファチジルセリン(PS)を10~40重量%の量で含む。

【0009】

本発明は、本発明のリポソームの特徴、即ち、500~15000nmからなる大きさ、及び10~40%のPSの存在が、抗原提示細胞による封入自己抗原の寛容原性提示を可能にし、それにより自己抗原に対する寛容性を回復することを発見した。

【0010】

理論に拘束されることを望むものではないが、本発明者らは、本リポソームの特徴が、それらが樹状細胞によって効果的に取り込まれ、封入された自己抗原が処理されて、MHCクラスII分子を介してCD4+Tリンパ球に(外因性提示)、寛容原性形態でCD8+Tリンパ球に(交差提示)それぞれ提示されることを保証し、したがって抗原に対する寛容性を誘導し、自己免疫カスケードを停止させると仮定する。換言すれば、本発明の自己抗原封入リポソームは、自己免疫性ではなく自己抗原に対する寛容性を誘導し、自己免疫疾患の効果的な治療を導くものである。

【0011】

本発明の自己抗原封入リポソームの寛容原性効果、並びに自己免疫疾患の治療、特にT1D及びMSの治療におけるその驚くべき効果を、後述の実施例に示す。

【0012】

図2、3及び4に示すように、インスリンペプチドを封入するPS-リポソームは樹状細胞によって取り込まれ、それによりこれら樹状細胞は寛容原性を取得する：共刺激性分子の発現低下は、PGE2の生成を誘導し、糖尿病の観点からはT細胞の増殖を低減させた。このような結果は、リポソームが、ある程度は、アポトーシス小体と同様に樹状細胞(DC)の免疫寛容原性を促進することを示している。加えて、この効果は、炎症誘発性の刺激後も減じることはなく、これはこの治療法が、自己免疫カスケードが進行していて刺激促進刺激が存在するときに有効であることを実証するものであるため、考慮すべき重要な特徴である。

【0013】

上記はすべて、後述の実施例に示すように、自己免疫疾患の効率的な治療に繋がる。図5及び6は、NOD前糖尿病マウスの治療が、本発明のリポソームの単独投与内で達成されることを示し、図8Aは、疾患の発症後に投与されたとき、インスリンペプチドが充填されたPS-リポソームはNODマウスの糖尿病を元に戻すことができることを示している。更に、図9は、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)ペプチドを含有するPS-リポソームが、C57BL/6免疫化マウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)疾患の発生を防ぎうることを示している。したがって、自己免疫疾患のための既知の免疫調節又は抗炎症治療とは異なり、本発明者らの開発したリポソームに基づく治療法は、恒久的に必要とされるものではない。代わりに、長期持続性の耐性の回復が達成され、それにより自己免疫疾患の効果的な予防又は治療がもたらされる。この効果は、有効量の自己抗原封入リポソームを含む薬学的組成物の単回投与、又は2~4回以内の投与後に達成されうる。

【0014】

また、図5、6及び8Bでは、マウスが空のリポソームを投与されたとき、T1Dの発生に何の効果も得られなかったことを見ることができる。したがって、治療はリポソームが適切な自己抗原を封入しているときのみ効果的であり、これはナノ治療の抗原特異性を示している。

【0015】

抗原特異性に基づく治療法であるが、本発明の自己抗原封入リポソームは、望ましくない副作用を呈しないという利点を有する。上述のように、自己免疫疾患の治療のための他

10

20

30

40

50

の免疫調節法は免疫抑制性剤を使用しており、これは往々にして感染に対する高い感受性を招き、時に腫瘍の発生、腎毒性又は代謝異常を助長する。

【0016】

寛容原性の提示が得られることに加え、特別に設計した本発明のリボソーム内に自己抗原を封入することは、カーゴの劣化を防ぎ、毒性が低下/排除されることから極めて望ましい目標である。これは、自己抗原が、抗原提示細胞によって取り込まれるまでリボソーム内に閉じ込められていることにより、有害な免疫応答を誘導しえないという事実依るものである。

【0017】

本発明の第2の態様は、治療的有効量の上述の自己抗原封入リボソームを、他の適切な薬学的に又は獣医学的に許容される賦形剤又は担体と共に含有する薬学的又は獣医学的組成物を提供する。

10

【0018】

本発明によるリボソームに基づく薬学的組成物は、安定性、均一性、及び大規模生産の容易性といった観点から複数の利点を有する。

【0019】

第1に、本発明の自己抗原封入リボソームの生産は、製薬業界において一般的な試薬及び設備を用いて低コストで達成されうる。

【0020】

本発明のリボソームは、その大きさにより、溶液中で極めて安定であり、凝集しがちでその生産に小さな孔径を有する高価な膜を用いた押出成型プロセスの反復が必要とされるそれらより小さなリボソームとは異なり、容易に得ることができる。

20

【0021】

更に、製品の均一性が保障されると同時に、大規模な工業的生産のためのスケールアップが可能である。

【0022】

別の大きな利点は、本発明のリボソームに基づく薬学的組成物が規定組成物であり、望ましくない夾雑物又は副産物を含まないという事実に起因する。自己抗原封入リボソームは、ネクローシス小体といった毒性の副産物へと変性することはなく、自家性又は異種性の細胞ベースの治療法の場合のような拒絶を起こすことがない。

30

【0023】

その寛容原性効果のために、本発明の自己抗原封入リボソームは、自己免疫疾患の効果的な予防(即ち、自己免疫の発動の回避)、並びに、前臨床病期(即ち、自己免疫性は既に発動しているが、組織損傷及び臨床症状は小さい段階)及び臨床病期(即ち、組織損傷が大きく臨床症状が明白である段階)の両方における自己免疫疾患の効果的な治療を可能にする。

【0024】

したがって、本発明の第3の態様は、医薬としての使用のための、本発明の第1の態様による自己抗原封入リボソームを提供する。この態様は、治療を必要とするヒトを含む哺乳動物に対し、治療的有効量の本発明の自己抗原封入リボソームを、一又は複数の適切な薬学的に許容される賦形剤又は担体と共に投与することを含む、疾患の予防又は治療のための方法として説明することもできる。

40

【0025】

第4の態様では、本発明は、自己免疫疾患の予防又は治療における使用のための、上記に定義された自己抗原封入リボソームを提供する。この態様は、自己免疫疾患の予防又は治療のための医薬の製造のための、上記に定義された自己抗原封入リボソームの使用として説明することもできる。この態様は、治療を必要とするヒトを含む対象において、治療的有効量の上記に定義された自己抗原封入リボソームを、薬学的に許容される賦形剤又は担体と共に投与することを含む、自己免疫疾患の予防又は治療のための方法として説明することもできる。

50

【 0 0 2 6 】

第5の態様では、本発明は、自己免疫疾患に罹患した患者の自己に対する寛容性の回復における使用のための、上記に定義された自己抗原封入リポソームを提供する。この態様は、自己免疫疾患に罹患した患者の自己に対する寛容性の回復のための医薬の製造のための、上記に定義された自己抗原封入リポソームの使用として説明することもできる。この態様は、治療を必要とするヒトを含む対象において、治療的有効量の上記に定義された自己抗原封入リポソームを、薬学的に許容される賦形剤又は担体と共に投与することを含む、自己免疫疾患に罹患した患者の自己に対する寛容性の回復のための方法として説明することもできる。

【 0 0 2 7 】

最後に、本発明の他の態様は、自己免疫応答を抑制するための、上記に定義されたリポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物；並びに自己免疫疾患の予防又は治療における使用のための、上記に定義されたリポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物を提供し、前記リポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物は封入された自己抗原に対する寛容性を回復する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 8 】

【 図 1 】インスリン由来の自己抗原を充填した PS - リポソームの極低温透過型電子顕微鏡（クライオ TEM、J E O L - J E M 1 4 0 0 顕微鏡）画像である。Bar = 0 . 2 μ m。

【 図 2 】コントロール DC (A)、Oregon green 488 DHPE 標識した PS - リポソーム (O G 4 8 8 PS - l i p o) と共に 3 0 分間 4 0 C で共培養した DC (B) 及び 3 7 0 C で同様に共培養した DC (C) の、フローサイトメトリー (F A C S) 分析である。x 座標は O G 4 8 8 PS - l i p o を；y 座標は C D 1 1 c - P E C y 7 染色した DC を表す。

【 図 3 】DC 中への PS - リポソームの捕捉の効果を示す。y 座標は、(A) アネキシン V 及び 7 a a d 染色により評価した DC 生存率 (%)、(B) C D 4 0 及び C D 8 6 膜発現の蛍光強度の中央値、及び (C) 未成熟及び成熟 DC の培養上清における、E L I S A によるプロスタグランジン E 2 (P G E 2) 生成の定量化を表している。白の記号は、PS - リポソームの捕捉前 (三角) 及び後 (四角) の未成熟 DC、又は培養の 2 4 時間後の、インスリンペプチドを充填した PS - リポソーム (丸) を表す。黒の記号は、PS - リポソームの捕捉前 (三角) 及び後 (四角) の成熟 DC の生存率、又は炎症促進性刺激 (リポ多糖、L P S) の 2 4 時間後のインスリンペプチドを充填した PS - リポソーム (丸) を表す。E L I S A のデータは細胞 1 0 6 個当たりの p g として表す。

【 図 4 】炎症促進性刺激後であっても、PS - リポソームの捕捉後は、DC は T 細胞の自己増殖を刺激しない。y 座標は、PS - リポソームの捕捉前 (白三角) 及び後 (白四角) における、未成熟 DC により誘導される刺激後の T 細胞の自己増殖 (3 H チミジンアッセイの場合 c . p . m .)、或いは 7 日間インスリンペプチド (2 0 μ g / m l) を 1 : 1 0 の比で充填した PS - リポソーム (白丸) の場合の自己増殖を表す。黒の記号は、PS - リポソームの捕捉前 (黒三角) 及び後 (黒四角) の、成熟 DC により誘導される増殖、又は炎症促進性刺激 L P S (1 0 0 n g / m l) で予め活性化した、インスリンペプチドを充填した PS - リポソーム (黒丸) の場合の増殖を表す。

【 図 5 】PS - リポソームに封入されたインスリンペプチドを用いる免疫療法は、T 1 D の発生を減少させる。(A) y 座標は、インスリンペプチドを充填した PS - リポソームで処置した N O D マウス (丸、n = 1 2)、空の PS - リポソームで処置した N O D マウス (四角、n = 1 8)、及び食塩水を与えたコントロール群 (三角、n = 1 6) における糖尿病の累積発生率 (パーセンテージ) を表す。(B) y 座標は、インスリンペプチドを充填した PS - リポソームで処置したマウス (丸、n = 1 2 - 6)、空の PS - リポソームで処置したマウス (四角、n = 1 8 - 3)、及び食塩水で処置したコントロール群 (三角、n = 1 6 - 3) における体重 (g) の経観察を表す。x 座標はマウスの週齢を示す。

10

20

30

40

50

【図6】膵島炎スコアは免疫化マウスにおいて重度が低かった。NODマウスの膵島炎に対するPS-リポソームの効果。y座標は、(A)異なる群のNODマウスの膵島炎スコア、及び(B)異なるNODマウス群において五つの浸潤カテゴリーの各々に分類された膵島のパーセンテージを表す。浸潤カテゴリー：0、膵島炎なし；1、膵島周囲の炎症；2、軽度の膵島炎(<25%の膵島に浸潤)；3、25~75%の膵島に浸潤；4、膵島全体に浸潤。NODマウスの群は：食塩水で処置したコントロールマウス(S)、空のPS-リポソームで処置したマウス(PS)、及び自己抗原を含有するPS-リポソームで処置したマウス(PSAB)であった。一の群につき4~6の非糖尿病マウス由来の膵臓を、試験期間(30週)の最後に分析した。結果は平均±SEMである。*コントロール群との有意な差($p < 0.05$) (独立t検定)。

10

【図7】PS-リポソームの経過観察。24時間目の、蛍光標識されたPS-リポソーム(Alexa Fluor 750)を腹腔内(i.p.)注射されたNODマウス由来の複数の器官における蛍光性シグナル(組織1g当たりのRFU、即ち相対蛍光単位)の柱状図である。PAT(生殖腺周囲脂肪組織)；K(腎臓)；S(脾臓)；P(膵臓)；PLN(膵臓リンパ節)；MLN(腸間膜リンパ節)；L(肝臓)；MDLN(縦隔リンパ節)；T(胸腺)。三つの個別の実験のうち一つの代表的な実験の結果を示す。Y座標は組織1g当たりのRFUを示す。

【図8】インスリンペプチドを充填したPS-リポソームで処置した糖尿病マウス(A)又は空のリポソームで処置した同マウス(B)における、疾患の発症(0日目)後1、5及び8日目の糖血症のレベルである。Y座標は糖血(mg/dl)を示す。グレーのゾーンは血糖症の診断値の範囲を示す。X座標は、疾患の発症からの時間を日数で示す。丸はインスリン投与のなかった日を示す。

20

【図9】MOGペプチドを含有するリポソームで処置したC57BL/6免疫化マウス(白丸)又は空のリポソーム(白三角)で処置した同マウスについて毎日実施したEAEの臨床スコアである。Y座標は平均臨床スコアを示す。X座標は免疫化後の時間(日)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明の第1の態様は、自己抗原封入リポソームを提供する。

【0030】

「リポソーム」という用語は、脂質の二重層からなる一又は二の膜を含む自己凝集構造と理解され、前記二重層の各々は、両親媒性の脂質分子を含有し反対方向を向く二つの単一層を含む。両親媒性の脂質は、一又は複数の非極性(疎水性)アシル鎖に共有結合した極性(親水性)のヘッドグループ領域を含む。疎水性アシル鎖と周囲の水性媒体とのエネルギー的に好ましくない接触は、両親媒性脂質分子を誘導して、それらの極性ヘッドグループが二重層表面の方向を向き、アシル鎖が二重層の内部に再び向くように自身を構成せる。したがって、エネルギー的に安定な構造が形成され、アシル鎖が水性の環境と接触しないように効果的に遮蔽される。

30

【0031】

リポソームは、単一の二重層膜(小さな単層ベシクル「SU V」及び大きな単層ベシクル「LU V」)、又は複数の二重層膜(多層の大ベシクル「ML V」)を有することができる。リポソームは、複数の非同円状の水性チャンパーを閉じ込める又は封入するリポソームである、多胞体ベシクル「MV V」として調製されてもよい。対照的に、ML Vは複数の同心円状の「玉ねぎの皮」様の膜を有し、それら膜の各々は水性の区画を封入する。脂質分子の保護障壁内部におけるこのような水性の容積の封入により、リポソームは、封入された分子、例えばペプチドを、外部環境内に存在する要因、例えばペプチダーゼ酵素の劣化効果から隔離することができる。

40

【0032】

本発明のリポソームの大きさは、抗原提示細胞によるそれらの取り込みを増大させる500~15000nmである。加えて、本発明のリポソームは、好ましくは図1に示すよ

50

うなM V V形態を有する。これら大きなM V Vリポソームは、従来のM L V又はS U Vと比較して有意に高い充填効率を有し、且つ、封入された活性薬剤（この場合、自己抗原）が好ましくは水性の区画において溶解する（沈殿したり膜に結合したりしない）ために有利に働く。これらすべては、抗原提示細胞内部の自己抗原のバイオアベイラビリティとそれによりもたらされる免疫調節活性の向上という観点から利点を有する。

【0033】

一実施態様では、本発明のリポソームは500～12000nmの大きさを有する。別の実施態様では、リポソームの大きさは500～10000nmである。別の実施態様では、リポソームの大きさは600～8000nmであり、具体的には700～7000nm、又は800～5000nm、又は900～3000nm、又は900～2000nm、又は900～1500nm、又は1000又は1400nmである。特定の実施態様では、リポソームは、1000～1300nm、例えば1000nm、1050nm、1100nm、1150nm又は1200nmの大きさを有する。

10

【0034】

一実施態様では、本発明のリポソームは、M V V形態及び500～12000nmの大きさを有する。別の実施態様では、本発明のリポソームは、M V V形態を有し、500～10,000nmの大きさを有する。別の実施態様では、本発明のリポソームは、M V V形態を有し、600～8000nm、具体的には700～7000nm、又は800～5000nm、又は900～3000nm、又は900～2000nm、又は900～1500nm、又は1000又は1400nmの大きさを有する。特定の実施態様では、リポソームは、M V V形態を有し、1000～1300nm、例えば1000nm、1050nm、1100nm、1150nm又は1200nmの大きさを有する。

20

【0035】

リポソーム膜は、限定しないが、リン脂質、例えばホスファチジルコリン（「PC」）、ホスファチジルセリン（「PS」）、ホスファチジルエタノールアミン（「PE」）、ホスファチジルグリセロール（「PG」）、ホスファチジリンイノシトール（「PI」）及びホスファチジン酸（「PA」）を含みうる。ナノ粒子の膜を構成することができる他の脂質には、限定されないが、コレステロール（「CHOL」）及びコレステロール-PEG、及び蛍光標識されたホスファチジルコリンが含まれる。リポソーム膜は、タンパク質、糖（炭水化物）、抗体又はポリエチレングリコール（PEG）鎖といった、自然界では脂質でない他の分子を含有しうる。リポソームは、リポソームを特定の部位又は標的細胞に向かわせるように、又はリポソームを有害環境（例えば、胃腸管）から保護するように設計された特定の部分を含むことができる。リポソームの組成は、自己抗原の寛容原性の送達に関連する。したがって、上述のように、リポソーム膜はPSを、膜リポソームの組成全体に対して10～40重量%の量で含む。リポソーム膜に含有されるPSは「私を食べて」というシグナルを構成し、このシグナルは抗原提示細胞によるPS認識を寛容誘導の結果につなげる。DCによって効果的に取り込まれ、自己抗原の寛容原性の送達が達成されるために、本発明のリポソームが更なる受容体又はリガンドを必要としないことは注目に値する。しかしながら、他の受容体及び/又はリガンドが、取り込み及び/又は寛容原性処理を向上させるためにリポソーム中に集められてもよい。

30

40

【0036】

「重量パーセント（%）」は、膜リポソーム組成物の総重量に対するリポソーム膜の各成分のパーセンテージを指す。

【0037】

「膜リポソーム組成物」は、例えば、複数の膜二重層を含むM V Vリポソームであるとき（図1に示すように）、リポソームに含有される膜二重層の全体を指す。共に本発明のリポソームに含有される膜二重層全体を指す用語「リポソーム膜（liposome membrane）」又は「リポソーム膜（liposomal membrane）」が使用される場合も同義である。

【0038】

50

一実施態様では、リポソーム膜は、膜リポソームの組成全体に対して15～37重量%の量でPSを含む。更なる実施態様では、膜のPSは、膜リポソームの組成全体に対して20～35重量%、又は22～35重量%、又は22～33重量%、又は25～32重量%、又は26～31重量%、又は27～30重量%、例えば27重量%、28重量%、29重量%又は30重量%で含まれる。好ましくは、膜のPSは、膜リポソームの組成全体に対して30重量%である。

【0039】

本発明によるリポソームは、PSに加えて、可変濃度の他の脂質を含みうる。いくつかの実施態様では、リポソーム膜はPCも含む。いくつかの実施態様では、リポソーム膜はCHOLも含む。特定の実施態様では、リポソーム膜はPC及びCHOLも含む。

10

【0040】

一実施態様では、リポソーム膜は、膜リポソームの組成全体に対して10～40重量%の量でPCを含む。別の実施態様では、リポソーム膜は、膜リポソームの組成全体に対して12～40重量%の量でPCを含む。更なる実施態様では、膜のPSは、膜リポソームの組成全体に対して15～37重量%、又は20～35重量%、又は22～33重量%、又は25～32重量%、又は26～31重量%、又は27～30重量%、例えば27重量%、28重量%、29重量%又は30重量%で含まれる。

【0041】

CHOLの量は、膜リポソームの組成全体に対して13～53重量%で含まれる。一実施態様では、リポソーム膜は、膜リポソームの組成全体に対して20～50重量%の量でCHOLを含む。更なる実施態様では、膜のCHOLは、好ましくは、膜リポソームの組成全体に対して27～46重量%、又は30～44重量%、又は33～42重量%、又は36～40重量%、例えば36重量%、37重量%、38重量%、39重量%、又は40重量%で含まれる。

20

【0042】

リポソーム膜に含有される複数の異なる脂質の割合は、安定性、透過性、及び形態の観点から適切な物理的及び化学的特性を有するリポソームを得るために釣り合っていないなければならない。一般に、リポソーム膜は、PS、PC及びCHOLを、0.6：0.6：0.7～1.5：1.5：1.8のモル比PS：PC：CHOLで含む。用語「比」は、互いに対する量の大きさとして通常の意味で理解されるものとする。厳密には、二つの量の比は、第1の量(X)が第2の量(Y)に何回含まれるかをX：Yとして表したものである。用語「モル比」は、言及される大きさがモルであるときに使用される。或いは、比は、言及される大きさが重量であるときは「重量比」と表現されうる。ここで、三つの特定の脂質(PS、PC及びCHOL)についてモル比の範囲を示す。一実施態様では、膜は、0.7：0.7：0.8～1.4：1.4：1.6からなるモル比PS：PC：CHOLを含む。別の実施態様では、膜は、0.8：0.8：0.9～1.2：1.2：1.5からなるモル比PS：PC：CHOLを含む。別の実施態様では、膜は、0.9：0.9：1～1.1：1.1：1.4からなるモル比PS：PC：CHOLを含む。好ましい実施態様では、膜は、約1：1：1.33のモル比PS：PC：CHOLを含む。

30

【0043】

上述のように、本発明のリポソームは自己抗原を封入する。用語「自己抗原」は、特定の自己免疫疾患に罹患した患者の免疫系によって認識される正常なタンパク質又はタンパク質の複合体を指す。これら抗原は正常条件下においては免疫系の標的になってはならないが、主に遺伝的及び環境的要因により、これら患者においてはそのような抗原の正常な免疫寛容が失われている。特定の実施態様では、リポソームは、同じ自己免疫疾患に関連付けられる更なる自己抗原を封入する。例えば、リポソームは、好ましくはT1Dに関連付けられる、二つ、三つ、四つ又は五つの自己抗原を封入する。

40

【0044】

いくつかの実施態様では、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は50：1～2：1である。別の実施態様では、リポソーム膜を形成する脂質の

50

総重量と自己抗原の総重量との重量比は30 : 1 ~ 3 : 1である。また別の実施態様では、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は20 : 1 ~ 3 : 1である。また別の実施態様では、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は15 : 1 ~ 3 : 1である。また別の実施態様では、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は12 : 1 ~ 3 : 1である。別の実施態様では、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は、11 : 1、10 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1及び4 : 1からなる群より選択される。

【0045】

一実施態様では、リポソームは、500 ~ 10,000 nmの大きさを有し、リポソーム膜は、20 ~ 35重量%のPS及び0.7 : 0.7 : 0.8 ~ 1.4 : 1.4 : 1.6からなるモル比PS : PC : CHOLを含み、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は50 : 1 ~ 3 : 1である。

10

【0046】

一実施態様では、リポソームは、700 ~ 7,000 nmの大きさを有し、リポソーム膜は、22 ~ 33重量%のPS及び0.8 : 0.8 : 0.9 ~ 1.2 : 1.2 : 1.5からなるモル比PS : PC : CHOLを含み、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は20 : 1 ~ 3 : 1である。

【0047】

別の実施態様では、リポソームは、800 ~ 5000 nmの大きさを有し、リポソーム膜は、25 ~ 32重量%のPS及び0.9 : 0.9 : 1 ~ 1.1 : 1.1 : 1.4からなるモル比PS : PC : CHを含み、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は15 : 1 ~ 3 : 1である。

20

【0048】

別の実施態様では、リポソームは900 ~ 3000 nmの大きさを有し、リポソーム膜は、30重量%のPS、30重量%のPS及び40重量%のCHを含み、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は12 : 1 ~ 3 : 1であり、好ましくは重量比は、11 : 1、10 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1及び4 : 1からなる群より選択される。

【0049】

別の実施態様では、リポソームは、MVV形態を有し、且つ800 ~ 5000 nmの大きさを有し、リポソーム膜は、25 ~ 32重量%のPS及び0.9 : 0.9 : 1 ~ 1.1 : 1.1 : 1.4からなるモル比PS : PC : CHを含み、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は15 : 1 ~ 3 : 1である。別の実施態様では、リポソームは、MVV形態を有し、且つ900 ~ 3000 nmの大きさを有し、リポソーム膜は、30重量%のPS、30重量%のPS及び40重量%のCHを含み、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は12 : 1 ~ 3 : 1であり、好ましくは重量比は、11 : 1、10 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1及び4 : 1からなる群より選択される。好ましい実施態様では、リポソームは、MVV形態、1000 nmを有し、リポソーム膜は、30重量%のPS、30重量%のPS及び40重量%のCHを含み、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は12 : 1 ~ 3 : 1であり、好ましくは重量比は、11 : 1、10 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1及び4 : 1からなる群より選択される。

30

40

【0050】

封入される自己抗原は、特定の自己免疫疾患に関連付けられる。特定の実施態様では、自己抗原は、T1D、紅斑性狼瘡、関節リウマチ、多発性硬化症、アジソン病、セリアック病、皮膚筋炎、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、悪性貧血、反応性関節炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、グレーブス病、乾癬、乾癬性関節炎及びシェーグレン症候群からなる群より選択される自己免疫疾患に関連付けられる。特定の実施態様では、リポソームはT1Dに関連付けられる自己抗原を封入する。T1Dに関連付けられるこ

50

とが知られる非限定的な自己抗原は、インスリン、プロインスリン、タンパク質チロシンホスファターゼ（IA2、膵島細胞抗原512としても知られる）、グルタメートデカルボキシラーゼ（GAD）、クロモグラニン及び膵島-グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質（IGRP）（Roep BO, Peakman M. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, vol. 2 (4) : a007781. oi: 10.1101/cshperspect.a007781.）である。したがって、一実施態様では、本発明のリポソームは、インスリン、プロインスリン、IA2、GAD、クロモグラニン及びIGRPからなる群より選択される自己抗原を封入する。

【0051】

更に、本発明の意味において、リポソームに封入される自己抗原は、完全な抗原タンパク質である必要はない。実際、関連するタンパク質の特定の領域が単離されて、これは特に抗原性であると説明されている。したがって、特定の実施態様では、リポソームは、抗原性ペプチド、特にT1Dに関連付けられた抗原性ペプチド、例えばインスリン、プロインスリン、IA2、GAD、クロモグラニン及びIGRPから誘導される抗原性ペプチドである自己抗原を封入する。例えば、インスリンA鎖から誘導される配列番号1（21aa、GIVDQCCTSLICSLYQLENYCN）及びインスリンB鎖から誘導される配列番号2（30aa、FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTTPMS）によって規定されるペプチドが、T1Dにおいて特に自己抗原性として開示された。したがって、一実施態様では、リポソームは、好ましくは配列番号1及び配列番号2を含むペプチドから選択されるインスリンから誘導された、T1Dに関連付けられる自己抗原を封入する。特定の実施態様では、リポソームは、配列番号1及び配列番号2を含むペプチドを封入する。

【0052】

自己免疫疾患に関連付けられ、本発明のリポソームに封入されうる他の自己抗原性タンパク質又はペプチドは、例えば、多発性硬化症のミエリン由来のペプチド、例えばミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）由来のペプチド、重症筋無力症のアセチルコリン受容体由来のペプチド、セリアック病のトランスグルタミナーゼ、自己免疫甲状腺炎のサイログロブリンである（Lernmark A. J. Clin Invest, 2001, vol. 108, p. 1091-1096）。特定の実施態様では、本発明のリポソームは、MSに関連付けられる抗原性ペプチド、例えばMOGに由来する抗原性ペプチド、例えば配列番号3によって規定されるペプチドである自己抗原を封入する。

【0053】

本発明のリポソームに含有される自己抗原性ペプチドは、有利には、主要組織適合性遺伝子複合体の表面分子による前記抗原の直接提示を可能にする大きさである。「直接提示」は、抗原提示細胞によるこれらペプチドの主要な処理が、表面表示前に不要であることを意味する。いくつかの実施態様では、本発明のリポソーム中の自己抗原性ペプチドの大きさは、5~100アミノ酸、特に5~70アミノ酸、又は8~50アミノ酸、又は8~35アミノ酸、又は8~30アミノ酸である。このような自己抗原は、バイオアベイラビリティ、リポソームに基づく治療法の有効性及び処理の容易さ（このような小さなペプチドの封入は、全タンパク質又は大きなペプチドと比較して容易且つ安価である）といった観点で利点を提供する。

【0054】

一実施態様では、リポソームは、MVV形態を有し、且つ700~7000nmの大きさを有し、リポソーム膜は、22~33重量%のPS及び0.8:0.8:0.9~1.2:1.2:1.5からなるモル比PS:PC:CHOLを含み、リポソームは、T1Dに関連付けられる少なくとも一つの自己抗原、好ましくはインスリンから誘導されるペプチドである自己抗原を封入し、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は20:1~3:1である。

【0055】

10

20

30

40

50

一実施態様では、リポソームは、M V V形態及び700~7000nmの大きさを有し、リポソーム膜は、22~33重量%のPS及び0.8:0.8:0.9~1.2:1.2:1.5からなるモル比PS:PC:CHOLを含み、少なくとも一つの自己抗原は、配列番号1及び配列番号2から選択されるペプチドであり、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は20:1~3:1である。

【0056】

一実施態様では、リポソームは、M V V形態及び800~5000nmの大きさを有し、リポソーム膜は、22~32重量%のPS及び0.9:0.9:1~1.1:1.1:1.4からなるモル比PS:PC:CHOLを含み、少なくとも一つの自己抗原は、配列番号1及び配列番号2から選択されるペプチドであり、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は15:1~3:1である。

10

【0057】

一実施態様では、リポソームは、M V V形態及び800~5000nmの大きさを有し、リポソーム膜は、22~32重量%のPS及び0.9:0.9:1~1.1:1.1:1.4からなるモル比PS:PC:CHOLを含み、少なくとも一つの自己抗原は、配列番号1を含むペプチドであり、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は15:1~3:1である。

【0058】

一実施態様では、リポソームは、M V V形態及び800~5000nmの大きさを有し、リポソーム膜は、22~32重量%のPS及び0.9:0.9:1~1.1:1.1:1.4からなるモル比PS:PC:CHOLを含み、少なくとも一つの自己抗原は、配列番号2を含むペプチドであり、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は15:1~3:1である。

20

【0059】

一実施態様では、リポソームは、M V V形態及び700~7000nmの大きさを有し、リポソーム膜は、22~33重量%のPS及び0.8:0.8:0.9~1.2:1.2:1.5からなるモル比PS:PC:CHOLを含み、リポソームは、MSに関連付けられる少なくとも一つの自己抗原、好ましくはMOGから誘導されるペプチドである自己抗原、例えば配列番号3により規定されるペプチドである自己抗原を封入し、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は20:1~3:1である。

30

【0060】

当業者に周知の様々な方法を使用して、一又は複数のペプチドを封入するリポソームを調製することができる。例えば、本発明のリポソームは、リポソーム形成の間に自己抗原を脂質膜水和方法により直接的に捕捉することにより形成される。

【0061】

一実施態様では、本発明のリポソームは：(a)適切な溶媒、例えばクロロホルム中において脂質ブレンド物を調製すること、(b)溶媒を、例えば減圧下でのエバポレーションにより除去すること、(c)脂質ブレンド物を適切なバッファー、例えば少なくとも一つの自己抗原を含むリン酸バッファー生理食塩水で水和させること、(d)任意選択的に非封入ペプチドを、例えば遠心分離により除去すること、及び(e)その結果得られた自己抗原含有リポソームを、大きさを精製又は均質化することを含む方法により調製される。好ましくは、リポソームの大きさを均一化する、即ちリポソームを圧力下で規定の選択された大きさのフィルター孔に通すことにより、所定の平均サイズを有するリポソームを生成するために、押出成形を使用することができる。リポソームを精製して大きさを規制化するため、即ち、含まれる不純物を減少させ、大きさの不均一性を低減し、分布の均一性及び統一性を向上させたリポソームの集団を生成するために、タンジェント流濾過を使用することもできる。リポソームが複数の自己抗原を封入するとき、水和工程(c)は前記自己抗原の混合物を所望の割合で含有するバッファーの存在下で実施される。このような割合は、各自己抗原の特定の封入効率を考慮する。

40

【0062】

50

別の実施態様では、本発明は、上記の方法により得られる自己抗原封入リポソームに関する。

【0063】

当技術分野において既知の他の方法も、本発明の自己抗原封入リポソームを得るために使用されてよい。例えば、いくつかの実施態様は、まずリポソームを得、次いで自己抗原を封入することを考慮する。当技術分野には化合物をリポソーム内に封入するための周知の方法が存在する (Maurer N. et al., Expert Opin Biol Ther, 2001, vol. 1(6), p. 9 23-47; Waterhouse D. N. et al., Methods Enzymol., 2005; vol. 391, p. 40-57; Urban P. et al., Nanosc. Res. Lett., 2011, vol. 6, p. 620参照)。

【0064】

本発明の別の態様は、上記請求内容のいずれか一つに定義されるリポソームの治療的有効量を、他の適切な薬学的に又は獣医学的に許容される賦形剤又は担体と共に含む薬学的又は獣医学的組成物を提供する。

【0065】

好ましくは、本発明の組成物は、狭い粒径分布の、即ちサイズ不均一性の低いリポソームを含む。特定の実施態様では、本発明の薬学的又は獣医学的組成物は、700~7000nmの大きさを有するリポソームを含み、この場合、リポソーム膜は、22~33重量%のPS及び0.8:0.8:0.9~1.2:1.2:1.5, からなるモル比PS:PC:CHOLを含み、リポソーム膜を形成する脂質の総重量と自己抗原の総重量との重量比は20:1~3:1である。

【0066】

好ましくは、本発明の組成物に含まれるリポソームは、少なくとも、T1Dに関連付けられる自己抗原を封入する。更に好ましくは、自己抗原は、インスリンから誘導されるペプチドである。更に好ましくは、自己抗原は、配列番号1及び配列番号2から選択されるペプチドである。

【0067】

一実施態様では、本発明の組成物に含まれるリポソームは、少なくとも、MSに関連付けられる自己抗原を封入する。好ましくは、自己抗原はMOGから誘導されるペプチドである。更に好ましくは、自己抗原は配列番号3を有するペプチドである。

【0068】

本発明は、リポソームが複数の自己抗原を封入する組成物、及び各々が異なる自己抗原を封入する複数の異なるリポソームを含む組成物も考慮する。好ましくは、本発明の組成物中のリポソームに封入されるすべての自己抗原は、同じ自己免疫疾患、好ましくはT1D又はMSに関連する。特定の実施態様では、組成物は、配列番号1及び配列番号2を有するペプチドの両方を封入するリポソームを含む。別の実施態様では、組成物は、配列番号1を有するペプチドを封入するリポソームと、配列番号2を有するペプチドを封入するリポソームとを含む。別の実施態様では、組成物は、配列番号1を有するペプチドを封入するリポソームと、配列番号2を有するペプチドを封入するリポソームとを、10:1~1:10、好ましくは5:1~1:5、具体的には2:1~1:2、好ましくは1:1からなる配列番号1のリポソーム対配列番号2のリポソームの重量比で含む。

【0069】

本発明において、用語「薬学的に許容される賦形剤又は担体」は、薬学的に許容される物質、組成物又はビヒクルを指す。各成分は、薬学的組成物の他の成分との適合性という意味で薬学的に許容されなければならない。また、各成分は、妥当な利益/危険の比に見合う過度な毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性又は他の問題又は合併症なしで、ヒト及び動物の組織又は器官との接触に使用されるための適性を有さなければならない。同様に、用語「獣医学的に許容される」とは、非ヒト動物との接触に使用するために適切であることを意味する。

【0070】

本発明の組成物の製剤は、投与経路に大きく依存する。本発明の一実施態様では、自己

10

20

30

40

50

抗原封入リポソームが患者に対して経口投与される。経口組成物には、錠剤、粉末、カプセル剤、サシェ剤、並びに液体シロップ剤、懸濁液及びエリキシル剤が含まれ、それらはすべて当技術分野で周知の方法により製剤化されうる。自己抗原封入リポソームは、患者に対し、静脈内、動脈内、腹腔内（i.p.）、皮下、筋肉内又は皮内経路で投与することもできる。これら投与経路に適した組成物は、やはり当技術分野において周知であり、注射用溶液、灌流用溶液、液体注入の再構成のための粉末、及び事前充填シリンジを含む。本発明の意味において、鼻腔内又は吸入投与、直腸内投与のため、又は例えばクリーム、ジェル、軟膏又は皮膚パッチの形態での局所投与のために、自己抗原封入リポソームを製剤化することも適切であろう。これら製剤の調製のための方法は当技術分野で既知である。更に、自己抗原封入リポソームは、制御された放出投与の形態で製剤化することができる。制御放出投与形態は、当技術分野で既知であり、慢性疾患の治療のため、又は高用量で毒性となりうる若しくは患者に投与されると低半減期パターンを示す活性薬剤の投与のために特に望ましい。

10

【0071】

本明細書において使用される「治療的有効な量」という表現は、投与されると、対処される疾患の一又は複数の症候の、発生を防止する、又はある程度緩和するために十分な化合物の量を指す。本発明により投与される化合物の特定の用量は、言うまでもなく、投与される化合物、封入効率、投与経路などの検討事項を含む、症例を取り巻く特定の事情によって決定されるであろう。

20

【0072】

治療される特定の自己免疫状態は、投与される化合物の特定の用量に重要な役割を果たす。一実施態様では、予防又は治療される自己免疫疾患は、T1D、紅斑性狼瘡、関節リウマチ、多発性硬化症、アジソン病、セリアック病、皮膚筋炎、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、悪性貧血、反応性関節炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、グレーブス病、乾癬、乾癬性関節炎及びシェーグレン症候群からなる群より選択される。好ましい実施態様では、自己免疫状態はT1Dである。

【0073】

更に、投与される自己抗原封入リポソームの適切な用量を決定するために、治療される自己免疫状態の臨床病期も考慮する必要がある。前述のように、本発明のリポソームは、自己免疫疾患の予防及び治療の両方に有用である。「予防」とは、自己抗原に対する異常な免疫応答を防ぐことにより、異常な免疫応答の原因である病原性事象を発症させないことと理解される。「治療」とは、異常な免疫応答の原因である進行する病原性事象に対処し、続いて存在するあらゆる臨床症状を緩和することと理解される。これには、自己免疫応答及び何らかの組織損傷を有しているにも関わらず、自己免疫疾患の臨床症状を示さないか、又は殆ど示さない患者の自己免疫状態の治療が含まれる。この段階は、時に「前臨床」段階と呼ばれ、T1Dのような多くの自己免疫疾患に典型的であり、T1Dにおいては「前糖尿病」と呼ばれる。前糖尿病では、膵臓B細胞がある程度損傷しているが、糖尿病の診断基準の一部しか満たされていない。この段階の疾患は、後述の実験において得られた結果によって支持されるように、本発明のリポソームに基づく免疫療法によって効果的に治療される。加えて、組織損傷が大きく臨床症状が顕著である自己免疫疾患の進行段階も、本発明の自己抗原封入リポソームの有効量を投与することにより効果的に治療されうる。

30

40

【0074】

本発明の一実施態様は、自己免疫疾患の予防を目的とし、別の実施態様は、疾患の治療を目的とする。別の特定の実施態様は、前臨床病期の間の自己免疫疾患の治療を目的とする。

【0075】

好ましい実施態様では、本発明は、T1Dの予防における使用のための、上記に定義されるリポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物を提供する。別の好ましい実施態様では、上記に定義されるリポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物は、T1Dの治療に

50

おける使用を目的とする。また別の好ましい実施態様では、上記に定義されるリポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物は、前糖尿病の対象におけるT1Dの治療における使用を目的とする。

【0076】

一実施態様では、本発明は、MSの予防における使用のための、上記に定義されるリポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物を提供する。別の実施態様では、上記に定義されるリポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物は、MSの治療における使用を目的とする。

【0077】

つまるところ、投与される自己抗原封入リポソームの用量は、複数の事情を鑑みて決定される。単に説明的实施例として、配列番号1を有するTD1関連自己抗原を脂質対抗原の重量比11,6:1(脂質の総量対自己抗原の総量)で封入する、PS、PC及びCHOLを脂質モル比1:1:1.33(PS:PC:CHOL)で含有する本発明によるMVVリポソームが使用されるとき、前糖尿病のステージにあるT1Dに罹患したヒト対象を治療するための治療的有効量は、体重1kg当たり、0.05~50mg、好ましくは0.5~5mgの自己抗原封入リポソームとすることができる。配列番号2が、上記に定義されるリポソーム内に、脂質対抗原の重量比3.8:1で封入されるとき、前糖尿病のステージにあるT1Dに罹患したヒト対象を治療するための治療的有効量は、体重1kg当たり、0.05~50mg、好ましくは0.5~5mgの自己抗原封入リポソームとすることができる。上記に定義される両種のリポソームを、好ましくは、配列番号1を有するリポソーム対配列番号2を有するリポソームの重量比1:1で含む組成物が使用される時、前糖尿病のステージにあるT1Dに罹患したヒト対象を治療するための治療的有効量は、体重1kg当たり、0.05~50mg、好ましくは0.5~5mgの自己抗原封入リポソームとすることもできる。

【0078】

更に、医療専門家は、自己免疫疾患を予防又は治療するために、医薬の何回分の用量を患者に投与するかを決定するであろう。これに関し、本発明者らは、本発明の自己抗原封入リポソームが一回分の用量だけで前糖尿病のマウスのT1Dを治療することを発見した。しかしながら、医療専門家は、疾患の進行段階を治療するためには投薬回数を増やす必要があると決定することがあるであろう。一実施態様では、上記に定義されたりポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物は、一から五回分の用量の前記リポソーム又は薬学的組成物を患者に対して投与することによる、自己免疫疾患、好ましくはT1Dの予防又は治療のための使用を目的とする。特定の実施態様では、予防又は治療は、一回、二回、三回、又は四回分の用量を投与することにより達成される。別の実施態様では、上記に定義されるリポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物は、一回、二回、三回、四回又は五回分の用量の前記リポソーム又は薬学的組成物を患者に対して投与することによる、T1Dの治療のための使用を目的とする。好ましい実施態様では、患者は糖尿病患者である。

【0079】

予防的又は治療的効果は、封入された自己抗原の寛容原性の提示と、その後の自己免疫応答の抑制により達成されるため、本発明の最後の態様は、自己に対する寛容性の回復と、自己免疫応答の抑制とのための、上記に定義されるリポソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物に関する。本発明のこれら態様の特定の実施態様では、自己に対する寛容性の回復と自己免疫応答の抑制とは、T1Dに関し、具体的には前糖尿病に関する。

【0080】

明細書及び特許請求の範囲を通して、「含む(comprise)」という語とその変形は、他の技術的特徴、添加剤、成分、又は段階を排除することを意図していない。更に、「含む(comprise)」という語は、「~なる/~構成される」という場合も包含する。本発明の更なる目的、利点及び特徴は、記載を吟味すること又は本発明の手順を学ぶことにより、当業者に明らかとなる。後述の実施例及び添付図面は、説明のために提供されているのであり、本発明を限定することを意図するものではない。添付図面に關

10

20

30

40

50

連する及び特許請求の範囲において括弧内に配置される参照記号は、特許請求の範囲の完全性を向上させることのみを目的としており、特許請求の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。更に、本発明は、本明細書に記載される特定の実施態様及び好ましい実施態様に可能なすべての組み合わせを網羅する。

【実施例】

【0081】

材料及び方法：

リポソームの調製

ホスファチジルセリン (PS) 及びホスファチジルコリン (PC) は、Lipoid、Steinhausen、Switzerland から購入した。コレステロール (CHOL) は、Sigma Aldrich、Saint Louis、USA から購入した。脂質コンジュゲート蛍光色素 Oregon Green 488 DHPE は、Invitrogen、California、USA から購入した。Alexa Fluor 750 は、Invitrogen からそのスクシンイミジルエステル形態で取得され、Avanti Polar Lipids (Alabaster、USA) により供給される脂質 DOPE とコンジュゲートされた。インスリン A 鎖及びインスリン B 鎖からそれぞれ誘導される配列番号 1 (GIVDQCCTSI CSLYQLENYCN) 及び配列番号 2 (FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPMS) を有するペプチドは、Genosphere Biotechnologies (Paris、France) から取得され、>95% の純度を有し、トリフルオロ酢酸 (TFA) を除去したものであった。ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) から誘導される配列番号 3 (YRSPFSRVVHLYRNGK) を有するペプチドは、Institut de Recerca Biomedica de Barcelona、IRBB、Barcelona、Spain から取得した。

【0082】

リポソームは、薄膜水和方法を用いて、1:1:1.33 のモル比の PS、PC 及び CHOL の脂質混合物からそれぞれ調製された (Harel-Adar T、2011)。脂質の総量は 30 mM であった。脂質及び脂質コンジュゲート蛍光色素をクロロホルムに溶解し、減圧下及び窒素下におけるエバポレーションにより溶媒を除去した。脂質を適切なバッファー (PBS、PBS 中、それぞれ配列番号 1 又は配列番号 2 又は配列番号 3 を有するペプチドの溶液 0.5 mg/mL) を用いて水和させ、このようにして得られたリポソームを押出成型により 1 μm に均一化した (Lipex Biomembranes、Vancouver、Canada)。非封入ペプチドを、遠心分離によりリポソーム製剤から除去した。粒子径分布及びリポソームのゼータ電位 () として表される安定性を、希釈していない試料中において、Malvern Zetasizer、(Malvern Instruments、UK) を用いる動的光散乱法 (DLS) によって測定した。リポソームの形態及びラメラ特性を、JEOL-JEM1400 顕微鏡の極低温透過型電子顕微鏡 (クリオ TEM) を用いて調べた。

【0083】

マウス

野生型 NOD マウスは、The Jackson Laboratory (Bar Harbor、ME、USA) から取得し、特定の無病原体条件下に保った。週齢 8 のメスのみが使用された。

【0084】

マウスは、Harlan Laboratories (Italy) から購入し、一般的な条件下で収容した。週齢 8 ~ 10 のメスのみが使用された。EAE の誘導のために、週齢 8 の C57BL/6 メスマウス (Harlan) の両側腹部に、ケタミン (体重 1 kg 当たり 50 mg) 及びキシラジン (体重 1 kg 当たり 5 mg) 下において、4 mg/mL のマイコバクテリウム結核 H37RA (Difco、Detroit、MI、USA) を含有する等容積の完全フロイントアジュバント (CFA) 中に乳化した、PBS 中 50

μg のMOGペプチドを皮下注射した。加えて、 250ng の百日咳毒素(Sigma Chemical)を、0及び2日目に静脈注射した。

【0085】

この試験は、ジャンラリータ・デ・カタルーニャ(カタロニア自治政府)の実験動物のケアと使用に関する指針の勧告を遵守して実施された。プロトコールは、Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Germans Trias i Pujol Research Instituteによって承認された(許可番号:DAAM5157)。

【0086】

樹状細胞(DC)の生成及び取り込み実験

DCを、以前に報告されているようにして(Marin-Gallen, Clinical and Experimental Immunology 2010)、GM-CSF(1000U/ml ; Prospec, Rehovot, Israel)を含有する培地においてNODマウスの骨髄前駆体から生成した。DCの純度を、記載されているようにして(Pujol-Autinell, et al. PLOS ONE 2013)CD11c-PECy7染色(BD Pharmingen)により評価した。生存率を、以前に報告されているようにして(Pujol-Autonell et al. PLOS ONE, 2013)、アネキシン及び7aad染色により決定し、細胞をフローサイトメトリー(Perfect Count Microspheres, Cytognos, Salamanca, Spain)により数えた。リボソーム捕捉を、DCをリボソームの微小粒子(空又はインスリンペプチドを充填)と共に2時間共培養することにより実施した。 $100\sim 1000\mu\text{M}$ に希釈したリボソーム微小粒子の原液(30mM)をこれら実験に用いた。コントロールDCを、塩基性条件下で培養して未成熟DC(iDC)を得るか、又はLPS(100ng/ml ; Sigma)で24時間刺激して成熟DC(mDC)を得た。DCによるPS-リボソームのインビトロでの取り込みを、蛍光標識されたPS-リボソーム(Oregon green 488 DHPE, Invitrogen)を用いて決定した。細胞膜に付着したリボソームを除去するためにPBS中において徹底的に洗浄した後、リボソーム捕捉をフローサイトメトリー(FACSCanto II, BD Biosciences)により決定した。

【0087】

リボソーム捕捉後のDC中における寛容原性特性

DCの共刺激膜分子CD40及びCD86の発現を、フローサイトメトリー分析(FACSCanto II)により決定した。DCを、マウスCD11c/PE-Cy7、CD40/APC、CD86/PE(BD Pharmingen)に対するモノクローナル抗体で染色した。アイソタイプコントロール染色をコントロールとして使用した。CellQuest software(BD Biosciences)を用いてデータを分析した。アポトーシス細胞(Pujol-Autonell PLOS ONE 8: e63296, 2013)による寛容性誘導におけるPGE2の役割の以前の結果に基づいて、複数の異なる培養物の上清中におけるDCによるPS-リボソームの捕捉を、ELISA(PGE2 EIA Kit-モノクローナル; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)により評価した。検出限界: $80\% B/B0: 15\text{pg/ml}$ 。感受性: $50\% B/B0: 50\text{pg/ml}$ 。結果は指標として表した(細胞106個当たりのPGE2のpg)。

【0088】

T細胞増殖アッセイ

DCに、 1mM のリボソーム(空又はインスリンペプチドを充填したもの)を、2時間にわたり $20\mu\text{g/m}$ のインスリン(Sigma, St Louis, MO, USA)を用いて充填し、次いでT細胞の増殖を決定するために使用した。記載されているように(Pujol-Autonell, PLOS ONE 2013)、T細胞を、NODの脾臓の機械的破壊後に取得し、CD19-PE、CD16/32-PE、CD11c-PECy7(BD Pharmingen)、CD11b-PE(ImmunoTools GmbH, Friesoyt

10

20

30

40

50

he, Germany)、及びLy-6G(Gr-1)-eFluor660(eBioscience, CA, USA)に対する抗体を用いた負の選択により精製し、選別した(FACSAria II, BD Biosciences)。DC(10000個の細胞)のみ又は空のPS-リポソーム若しくは自己抗原を封入するリポソームでパルスしたDCを、105のTリンパ球(1:10の比)を用いて培養した。6日後、細胞を、1 μ Ciの(3H)-チミジン(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)で更に16時間パルスした。細胞を採取し(Harvester 96, Tomtec Inc., Hamden, CT, USA)、シンチレーションカウンター(1450 Microbeta, Trilux Wallac, Turku, Finland)を用いて分析した。T細胞増殖をc.p.m \times 10³個の細胞として表した。

10

【0089】

1型糖尿病免疫療法(予防及び治療)

前糖尿病のNODマウス(週齢8)に、200 μ lの食塩水中3mgの用量のPS-リポソーム(空又は配列番号1及び配列番号2を1:1の比で有するペプチドを封入)を腹腔内に一回投与した。食塩水のみを与える疑似コントロール群も含めた。一群当たり合計12~18の動物を使用した。マウスを、グルコストリップ(Menarini, Barcelona, Spain)を用いて尿中グルコースについて毎日、及び体重について30週の期間にわたり毎週、モニタリングした。血糖値が>300mg/dlであったとき、糖尿を有するマウスを糖尿病と確定した。

20

【0090】

糖尿病のNODマウス(週齢>25)は、疾患の発症後、200 μ lの食塩水中3.5mのPS-リポソーム(空又は配列番号1及び配列番号2を1:1の比で有するペプチドを封入)の用量を、1、5及び8日目に計3回腹腔内投与することにより処置された。マウスを、尿中グルコースについて、Glucocardストリップ(Menarini, Barcelona, Spain)を用いて30週の期間にわたり毎日モニタリングした。連続して血糖値が200mg/dLを上回ったとき、又は測定値が300mg/dLより高かったとき、糖尿を有する動物を糖尿病と確定し、疾患の発症を決定した。血糖値を週に一度モニタリングした(AccuCheck, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)。正常血糖値が達成されない限り、疾患の発症から毎日皮下(s.c.)注射によりインスリン(1U, Insulatard Flex-Pen, Novo-Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)を投与した。血糖症を、週に3回2時間の絶食後にモニタリングした(AccuCheck, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)。

30

【0091】

膵島炎スコア

白血球による膵島の浸潤-膵島炎-の度合いを、試験の最後に決定した。簡潔には、各群のすべてのマウス由来の膵臓を、イソペンタン1/冷アセトン浴槽においてスナップ凍結した。5の非重複レベルにおいて5 μ mの低温切片を得た。切片を、ヘマトキシリン/エオシンで染色し、コード化し、実験条件を知らない2人の独立した観察者が分析した。各観察者は一の動物について最低40個の膵島を評価した。膵島炎を別途記載(Alba A, J Immunol 2004; 173: 6667-75)のようにスコア化した: 0、膵島炎なし; 1、膵島周囲の炎症; 2、軽度の膵島炎(<25%の膵島に浸潤); 3、25~75%の膵島に浸潤; 4、膵島全体に浸潤。

40

【0092】

EAE免疫療法

C57BL/6免疫化マウスは、MSに密接に関連しているEAE疾患のモデルとして頻繁に使用され、MSに対する治療法及び処置を試験するために役立つことが多い。EAEの発生を防ぐため、C57BL/6免疫化マウスを、100 μ lの食塩水中1.75mgのMOG40-55を充填したPS-リポソームの用量を、免疫化後5及び9日目に計2回腹腔内投与することにより処置した。コントロールとして、マウスを空のリポソーム

50

(P S - リポソーム) 又は P B S (疑似) で処置した。

【 0 0 9 3 】

すべての動物について毎日、体重を量り、処置したマウスの健康及び臨床状態、並びに神経徴候を調べた。以下の基準に従って E A E の臨床スコアを実施した (Espejo C, et al., Exp Neurol 2001) : 0、無症候 ; 0.5、尾部遠位側半分の色調喪失 ; 1、尾部全体の色調喪失 ; 1.5、後足の脱力 ; 2、後足の麻痺 ; 2.5、後足の対麻痺 ; 3、前足の脱力 ; 4、四肢不全麻痺 ; 4.5、重度の四肢不全麻痺 ; 5、四肢麻痺 ; 及び 6、死亡 (別途記載による [Espejo 2001, supra])。二名の異なる観察者により盲検下において臨床経過観察分析を実施した。

【 0 0 9 4 】

腹腔内投与後のリポソームの追跡

バイオイメージング実験のために、蛍光標識された P S - リポソーム (A l e x a F l u o r 7 5 0) を、前糖尿病の N O D マウスに腹腔内注射し、3日間観察した。マウスを、投与の時点、並びに注射後 6、24、48 及び 72 時間後に麻酔 (P e a r l I m a g e r , L i - C o r) 下において画像化した。蛍光シグナルを定量化した。実験の最後に、複数の器官を採取し、重量を測定し、画像化して蛍光分布を決定した。

【 0 0 9 5 】

統計分析

P r i s m 5 . 0 ソフトウェア (G r a p h P a d s o f t w a r e I n c . , S a n D i e g o , C A) を用いて統計を実施した。対のデータのために、ノンパラメトリックなウィルコクソン試験を実施した。それ以外の場合、マン・ホイットニー検定を使用した。 < 0 . 0 5 の p 値を有意と考えた。

【 0 0 9 6 】

結果

インスリンペプチドを封入する P S 提示リポソームは D C によって捕捉される。

P S - リポソームは、1 : 1 : 1.33 のモル比の P S : P C : C H O L を用いて調製され、それらの表面上に「デスシグナル」P S を提示した。空のリポソームは、多分散指数 (P d I) 0.321 と共に、樹状細胞による効率的な取り込みに最適な大きさである平均粒径 1.014 μ m を提示する (U l r i c h A S, B i o s c i e n c e R e p o r t s 22: 129-150, 2002)。加えて、ゼータ電位の測定値により、P S - リポソーム上の正味表面電荷が - 30.66 mV であることが明らかとなった。一方、P S - リポソームがマウスインスリン I n s u l i n 2 由来の配列番号 1 又は配列番号 2 を有するペプチドを封入していたとき、リポソームは、配列番号 1 及び配列番号 2 を有するペプチドについてそれぞれ平均径 1.062 μ m (P d I = 0.324) 及び 0.954 μ m (P d I = 0.309) を示す (図 1)。ゼータ電位に関し、両方の封入リポソームは負の表面電荷 - 29.5 mV を提示する。封入の % は、配列番号 1 を有するペプチドの場合 44.63 \pm 23.68 % であり、配列番号 2 のペプチドの場合 88.48 \pm 3.97 % であった (平均 \pm S D)。配列番号 3 を有するペプチドを封入する P S - リポソームは、平均径 942.2 nm とゼータ電位 - 33.66 mV を有していた。配列番号 3 の封入効率は 89.34 \pm 4.69 % であった。クリオ T E M 分析により、大部分のリポソーム (空又は封入ペプチド) が多胞体ベシクル (M V V) であることが観察された。共培養後、P S - リポソームは D C によって取り込まれた (図 2)。

【 0 0 9 7 】

D C は、共刺激分子の低減された発現を有し、且つインスリンペプチドを封入する P S - リポソームの捕捉後に P G E 2 を生成する。

共培養後の D C の生存率は、用量 (100 ~ 2000 m M の範囲、データは示さない) に関係なく、炎症促進性刺激の後も常にコントロール D C と同様であった (図 3 A)。

【 0 0 9 8 】

二つの共刺激分子 C D 4 0 及び C D 8 6 の発現を、C D の表面上において評価した (図 3 B)。細胞膜中の C D 4 0 及び C D 8 6 の発現が、リポソーム捕捉後に増大せず、低レ

10

20

30

40

50

ベルのままであることが観察された。LPS曝露後、DCは、CD40及びCD86発現を有意に増大させ、PS-リポソームを充填したDCはCD86を有意に増大させた ($p < 0.001$) がCD40は増大させなかった。対照的に、PSAB-リポソームはCD40の膜発現もCD86の膜発現も有意に増大させることはなかった。

【0099】

過去の結果に基づいて (Pujol-Autonell, PLOS ONE 2013)、DC中のリポソームによって誘導されたPGE2の生成を試験した。PGE2の濃度は、iDCと比較したときリポソーム (空又はインスリンペプチドを充填) を用いて共培養されたDCの上清において有意に上昇した ($p < 0.05$) (図3C)。

【0100】

インスリンペプチドを封入するPS-リポソームの捕捉後、CDは自己T細胞の増殖を刺激しない。

NODマウスの骨髄前駆体から生成されたDCは、DCマーカーCD11cの染色に基づけば > 80%の純度を有しており、生存率は常に > 90%であった。T細胞の純度及び生存率は、それぞれ常に90%及び95%を上回っていた (データは示さない)。iDCによるPS-又はPSAB-リポソームの捕捉は、iDCのみと比較したとき、自己T細胞の増殖を増加させない (図4)。LPS刺激後、mDCによって誘導されるT細胞の増殖は、iDCによって誘導される増殖より大きかった ($p < 0.05$)。対照的に、PS-又はPSAB-リポソームを充填したDCによって誘導されるT細胞増殖は、これら炎症促進性刺激の影響後であっても増大しない。この結果は、PS-リポソーム-DCによって誘導されるT細胞の増殖が、これら炎症促進性刺激の効果の後も増大しないことを示している。

【0101】

インスリンペプチドを封入するPS-リポソームは、NOD前糖尿病マウスを効果的に治療する。

T1Dを予防するためのリポソームの有効性を評価するために、本発明者らは、前糖尿病の期間の間に免疫療法の単回用量を用いてNODマウスを処置した (週齢8)。予想通りに、疑似コントロール群の動物は週齢13から糖尿病を発症し、最終的な発生率は81.3% ($n = 16$) であった (図5A)。空のPS-リポソームを用いた処置の結果は83.3% ($n = 18$) の疾患発生率であり、疾患は週齢15で発症した。自己抗原性インスリンペプチドを封入するPS-リポソームによる処置の結果、疾患が改善し、やはり週齢15で発症した疾患発生率は50% ($n = 12$) であった。疑似群又は空のリポソーム処置群と比較したとき、免疫療法を受けたマウスの体重に有意な差は見られなかった (図5B)。

【0102】

インスリンペプチドを封入するPS-リポソームにより処置したマウスにおいて膵島炎は減少する。

膵島炎を、経過観察期間 (30週) の最後に各群から3~6の非糖尿動物についてスコア化し、膵島白血球の浸潤に対する治療の効果があつたかを決定した (図6A)。予想通り、疑似群の動物は高い膵島炎スコアを示した (2.34 ± 0.18)。空のPS-リポソームで処置したマウスは、類似の膵島炎の度合いを示した (2.12 ± 0.46)。インスリンペプチドを封入するPS-リポソームを用いた免疫療法は、疑似群と比較したとき、有意ではないものの、膵島炎スコアの生物学的減少を示した (1.69 ± 0.58)。更に、五つの浸潤カテゴリーの各々に分類される膵島炎のパーセンテージの分析は、免疫療法により治療したマウスでは、膵島炎を有さない又は炎症が周囲のみの膵島が47%残ったのに対し、疑似群及びPS-リポソーム群では、破壊されなかった膵島はそれぞれ26%及び34%あつた (図6B)。

【0103】

インスリンペプチドを充填したPS-リポソームは、疾患の発症後に投与されたとき、NODマウスの糖尿病を元に戻すことができる。

10

20

30

40

50

インスリンペプチドを充填した P S - リポソームは、疾患の発症後に投与されたとき、N O D マウスの糖尿病を元に戻した (図 8 A)。これらマウスは、外的なインスリン投与なしに生存し、インスリンが正常な血糖値に到達した。対照的に、空の P S - リポソームで処置したマウスは、インスリンの継続投与にもかかわらず、正常血糖値に到達しない (図 8 B)。

【 0 1 0 4 】

M O G ペプチドを封入する P S - リポソームは E A E を改善する。

M O G ペプチドを含有する P S - リポソーム (M S 中の特異的自己抗原) を調製した。これらリポソームは、C 5 7 B L / 6 免疫化マウスに腹腔内投与されると、疾患の発生を予防した (図 9)。M O G ペプチドを充填したリポソームによる処置は、免疫化したマウスの脾臓における周囲寛容性の維持に關与する細胞集団である、従来 of 制御性 T 細胞の増加を誘導した (結果は示さない)。空のリポソームには効果がなく、P S - リポソームとペプチド封入の両方が、治療的効果にとって重要であった。したがって、M O G ペプチド封入 P S - リポソームは、E A E を改善し、最初の発作の重症度を低減し、増悪から迅速に回復させる。結果として、M O G ペプチド封入 P S - リポソームは、M S の治療にとって有用でありうる。

10

【 0 1 0 5 】

腹腔内投与後のリポソームの追跡

リポソームからの蛍光シグナルを、免疫系の複数の異なる器官において検出した。予想通り、リポソームは脾臓リンパ節、脾臓、脾臓及び縦隔又は副甲状腺リンパ節に見つかった。 (図 7)。

20

【 0 1 0 6 】

本出願に引用される参照文献

Marin-Gallen S, Clemente-Casares X, Planas R, Pujol-Autonell I, Carrascal J, et al. "Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent experimental type 1 diabetes". *Clin Exp Immunol* 2010, vol. 160, p. 207-214.

Alba A, Puertas MC, Carrillo J et al. "IFN beta accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to beta cells in non diabetes-prone mice". *J Immunol* 2004, vol. 173, p. 6667-75.

Pujol-Autonell I, Planas R, Ampudia R, Marin-Gallen S, Sanchez A, Carrascal J, Marin A, Puig-Domingo M, Pujol-Borrell R, Verdager J, Vives-Pi M. "Efferocytosis promotes suppressive effects in dendritic cells through prostaglandin E2 production in the context of autoimmunity". *PLOS ONE* 8:e63296, 2013.

30

Ulrich AS. "Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles". *Bioscience Reports* 2002, vol. 22, p. 129-150.

Maurer N. et al., "Developments in liposomal drug delivery Systems", *Expert Opin Biol Ther*, 2001, vol. 1(6), p. 923-47.

Waterhouse D. N. et al., "Preparation, characterization, and biological analysis of liposomal formulations of vincristine", *Methods Enzymol.*, 2005; vol. 391, p. 40-57.

40

Urban P. et al., "Study of the efficacy of antimalarial drugs delivered inside targeted immunoliposomal nanovectors", *Nanoscale Research Letters*, 2011, vol. 6, p. 620

Roep BO, Peakman M. "Antigen Targets of Type 1 Diabetes Autoimmunity". *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, vol. 2(4):a007781. doi: 10.1101/cshperspect.a007781. Review. PMID:22474615.

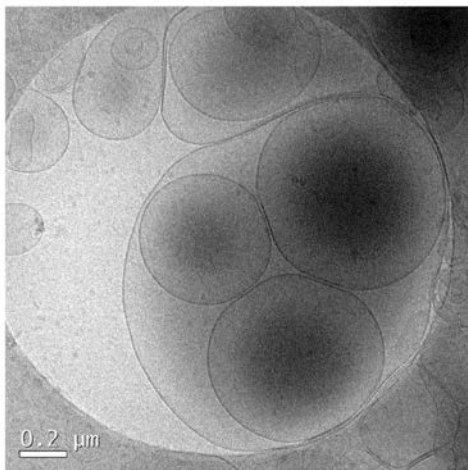
Lernmark A. "Series introduction: Autoimmune diseases: are markers ready for prediction?". *J. Clin Invest*, 2001, vol. 108, p. 1091-1096.

Espejo C, et al. "Treatment with anti-interferon-gamma monoclonal antibodies modifies experimental autoimmune encephalomyelitis in interferon-gamma receptor k

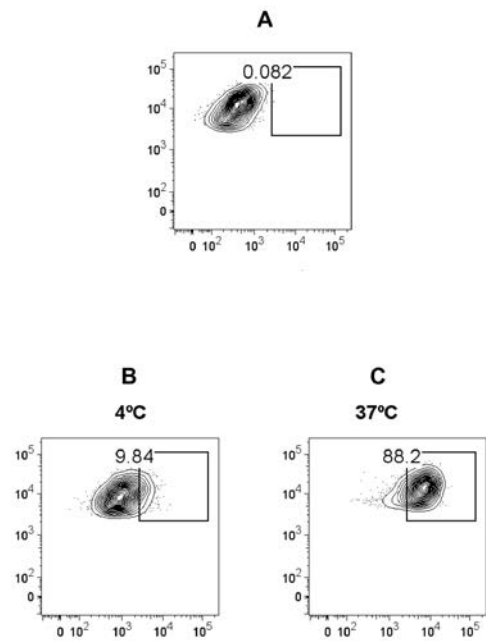
50

nockout mice” .Exp Neurol 2001, vol. 172, p. 460-468

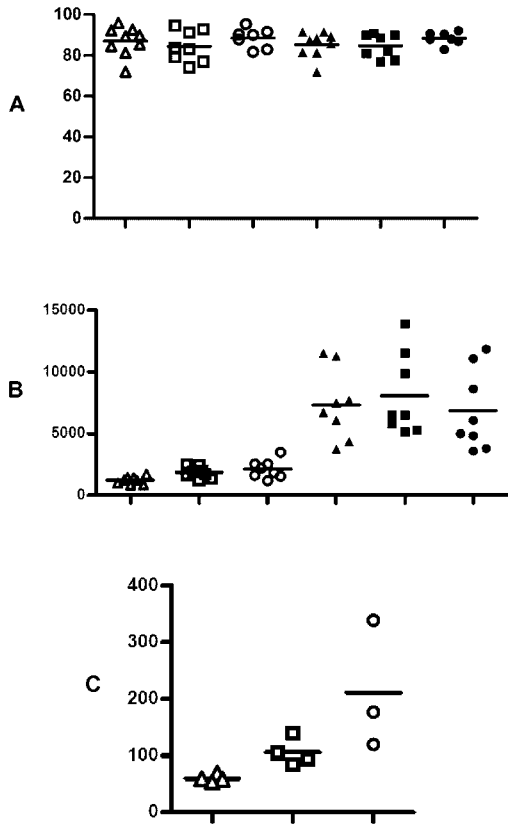
【 図 1 】



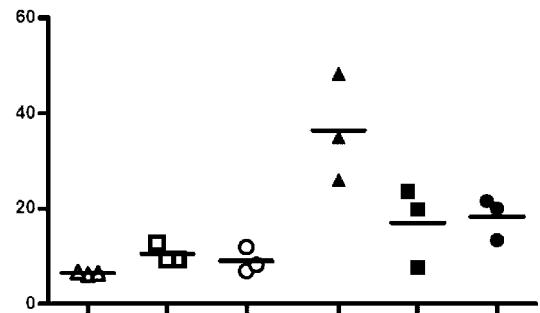
【 図 2 】



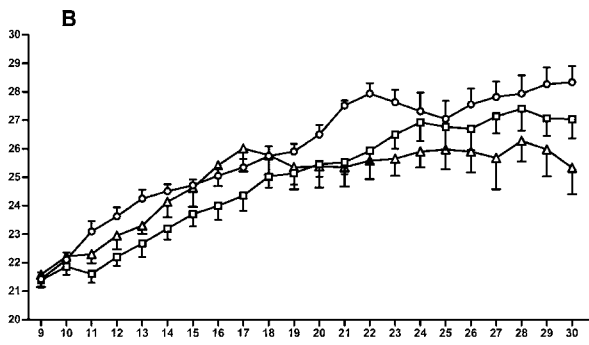
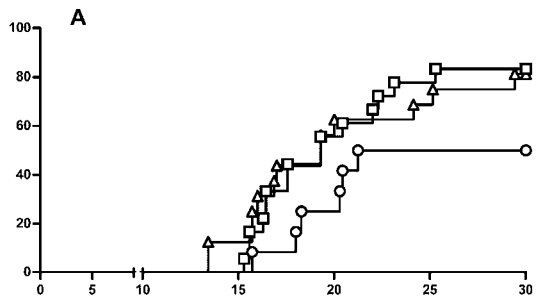
【 図 3 】



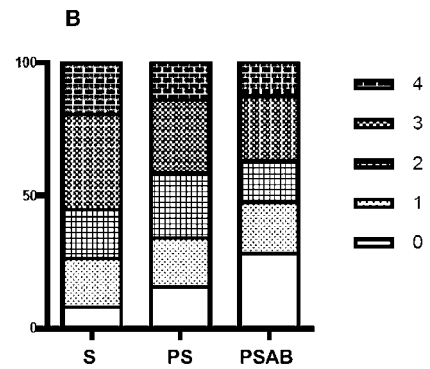
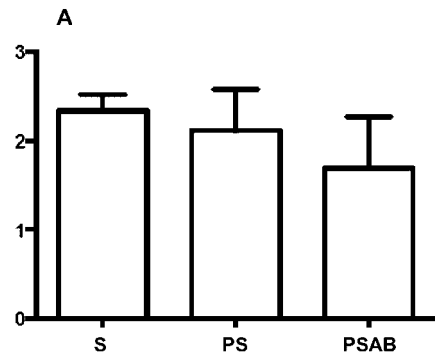
【 図 4 】



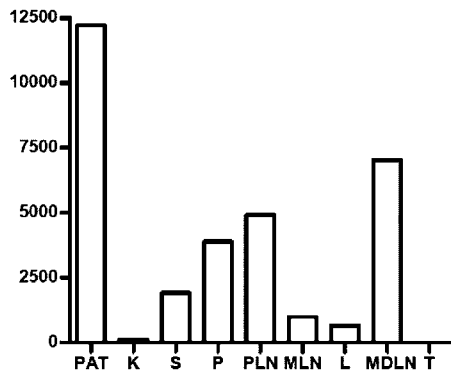
【 図 5 】



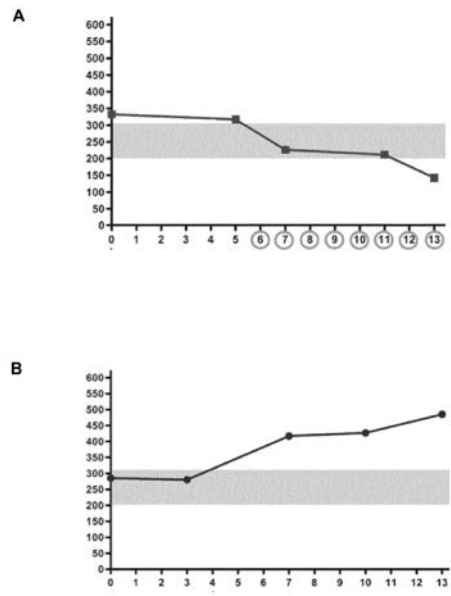
【 図 6 】



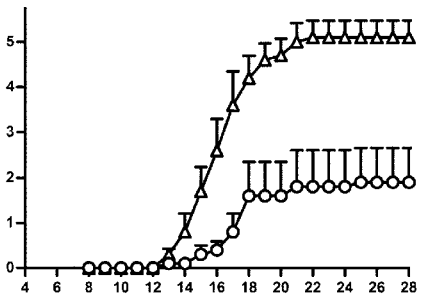
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2019196363000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年7月19日(2019.7.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

自己抗原を封入するリポソームであって、

(i) リポソームが500~15000nmの大きさを有し；且つ

(ii) リポソーム膜がホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルコリン(PC)及びコレステロール(CHOL)を含み、PSの量が膜リポソームの組成全体に対して少なくとも10重量%であり、PCの量が膜リポソームの組成全体に対して少なくとも10重量%であり、CHOLの量が膜リポソームの組成全体に対して少なくとも13重量%である、リポソーム。

【請求項2】

多胞体ベシクル(MVV)である、請求項1に記載のリポソーム。

【請求項3】

PSの重量%が膜リポソームの組成全体に対して10~40%である、請求項1又は2に記載のリポソーム。

【請求項4】

リポソーム膜が、PS、PC及びCHOLを、0.6:0.6:0.7~1.5:1.5:1.8からなるモル比PS:PC:CHOLで含む、請求項3に記載のリポソーム。

【請求項5】

リポソーム膜を形成する脂質の総量と自己抗原の総量との重量比が20:1~3:1である、請求項1から4のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項6】

自己抗原が5~50のアミノ酸からなる大きさを有する、請求項1から5のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項7】

自己抗原が、1型糖尿病(T1D)、紅斑性狼瘡、関節リウマチ、多発性硬化症(MS)、アジソン病、セリアック病、皮膚筋炎、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、悪性貧血、反応性関節炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、グレーブス病、乾癬、乾癬性関節炎及びシェーグレン症候群からなる群より選択される自己免疫疾患に関連付けられるペプチドである、請求項1から6のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項8】

自己抗原が、T1Dに関連付けられるものであり、配列番号1及び配列番号2のペプチドからなる群より選択される、請求項7に記載のリポソーム。

【請求項9】

自己抗原がMSに関連付けられるものであり、配列番号3を含む、請求項7に記載のリポソーム。

【請求項10】

更なる自己抗原を封入し、封入された自己抗原のすべてが同じ自己免疫疾患に関連付けられる、請求項1から9のいずれか一項に記載のリポソーム。

【請求項11】

請求項1から10のいずれか一項に記載のリポソームの治療的有効量を、他の適切な薬学的又は獣医学的に許容される賦形剤又は担体と共に含む、薬学的若しくは獣医学的組成

物。

【請求項 1 2】

医薬としての使用のための、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載のリボソーム又は請求項 1 1 に記載の薬学的若しくは獣医学的組成物。

【請求項 1 3】

自己免疫疾患の予防又は治療における使用のための、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載のリボソーム又は請求項 1 1 に記載の薬学的若しくは獣医学的組成物。

【請求項 1 4】

自己免疫疾患に罹患した患者の、自己に対する寛容性の回復における使用のための、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載のリボソーム又は請求項 1 1 に記載の薬学的若しくは獣医学的組成物。

【請求項 1 5】

自己免疫疾患が、T 1 D、紅斑性狼瘡、関節リウマチ、多発性硬化症、アジソン病、セリアック病、皮膚筋炎、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、悪性貧血、反応性関節炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、グレーブス病、乾癬、乾癬性関節炎及びシェーグレン症候群からなる群より選択される、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の使用のための、リボソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物。

【請求項 1 6】

自己免疫疾患が 1 型糖尿病又は MS である、請求項 1 5 に記載の使用のための、リボソーム又は薬学的若しくは獣医学的組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	5/18 (2006.01)	A 6 1 P	5/18
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00
A 6 1 P	5/14 (2006.01)	A 6 1 P	5/14
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
C 0 7 K	14/62 (2006.01)	C 0 7 K	14/62
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08

(71)出願人 511143210

インスティテューシオ カタラーナ デ レセルカ イ エストゥディス アバンサツ
 スペイン国, エ - 0 8 0 1 0 パルセロナ, 3番 ペテア., 23, ペヘ. ユイス ク
 ンパニイス

(74)代理人 110002077

園田・小林特許業務法人

(72)発明者 マスパヒ コママラ, ダニエル

スペイン国 エ - 0 8 1 7 2 サン クガ デル バリエス, カレール トレス プラセス 1
 2

(72)発明者 カノ サラビア, アントニア マリア

スペイン国 エ - 3 0 5 6 0 アルグアサス, カジェ マヨール 7

(72)発明者 ビーバス ピ, マルタ

スペイン国 エ - 0 8 0 2 8 パルセロナ, パサツジェ シレ 1ア

(72)発明者 プホル アウトーネル, イルマ

スペイン国 エ - 0 8 5 7 1 サン ビセンス デ トレリョ, カレール ベルタゲル 2 5

(72)発明者 ヴェルダゲル アウトーネル, フアン

スペイン国 エ - 0 8 0 0 9 パルセロナ, カレール ジローナ 1 1 1, プラル. 1号室

Fターム(参考) 4C076 AA06 AA19 AA22 AA24 AA29 AA36 AA53 AA72 BB01 BB11
 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21 BB25 BB29 CC01 CC04 CC06
 CC07 CC09 CC14 CC15 CC18 CC21 CC30 DD63 DD70 FF02
 FF04 FF21
 4C085 AA03 BB11 EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06
 GG08 GG10
 4H045 AA11 BA17 BA18 DA38 EA20

【外国語明細書】

2019196363000001.pdf