



등록특허 10-2808155



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월16일
(11) 등록번호 10-2808155
(24) 등록일자 2025년05월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/385 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/385 (2013.01)
A61K 39/0008 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7037203
- (22) 출원일자(국제) 2016년05월27일
심사청구일자 2021년05월24일
- (85) 번역문제출일자 2017년12월26일
- (65) 공개번호 10-2018-0012796
- (43) 공개일자 2018년02월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/034765
- (87) 국제공개번호 WO 2016/191723
국제공개일자 2016년12월01일

(30) 우선권주장
62/167,054 2015년05월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현
US20140037736 A1*
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 12 항

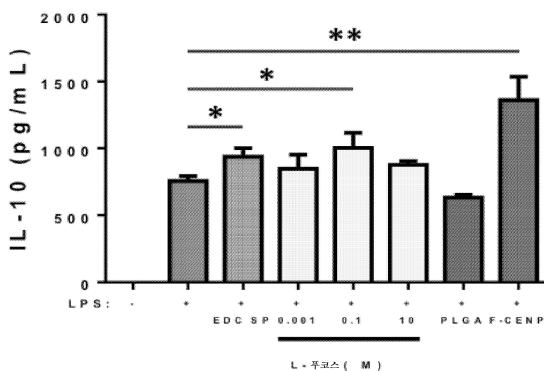
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 면역 반응 조절용 탄수화물-개질 입자 및 미립자 제제

(57) 요약

면역 반응을 조절하기 위한 조성물, 키트 및 방법이 개시된다. 상기 조성물 및 키트는 입자의 표면에 결합된 면역 조절인자를 갖는 탄수화물-개질 입자를 포함하며, 상기 방법은 그것을 이용한다. 상기 탄수화물-개질 입자, 및 탄수화물-개질 입자를 포함하는 미립자 제제는 대상체에서 면역 반응을 조절하는 데에 이용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 39/35 (2013.01)
A61K 2039/55555 (2013.01)
A61K 2039/572 (2013.01)
A61K 2039/577 (2013.01)
A61K 2039/6093 (2013.01)
A61K 2039/627 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Diabetologia 54(7): 1630-1638(2011.02.24. 공개)*
FASEB J. 8(8): 504-512(1994.05. 공개)
Pharm Res. 28(9): 2288-2301(2011.05.11. 공개)
J. Pharm. Sci. 96(2): 421-427(2007.02.)
US20150118318 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

0.01 내지 500 μm 의 유효 평균 직경을 갖는 생분해성 중합체 베이스 물질 및 탄수화물 모이어티를 포함하는 항원을 캡슐화하는 탄수화물-개질 입자이며, 상기 탄수화물 모이어티가 입자의 표면에 공유 결합되어 있는 면역조절인자이고, 여기서 상기 중합체 베이스 물질은 폴리락트산 (PLA)과 폴리글리콜산 (PGA)의 공중합체 (즉 PLGA)를 포함하고, 상기 입자는 항원에 대하여 관용 및/또는 항-염증 반응을 유도하고,

상기 탄수화물 모이어티는 혼파린 디사카라이드 II-A, 혼파린 디사카라이드 III-A, 혼파린 디사카라이드 IV-A, 혼파린 불포화 디사카라이드 I-H, 콘드로이틴 디사카라이드 Δ Di-triS, 혈액형 B 유형 2 선형 트리사카라이드, P1 항원, 시알릴-루이스 A, 시알릴-루이스 X β -메틸 글리코시드, 술포-루이스 A, 술포-루이스 X, α 1-3-만노비오스, α 1-6-만노비오스, 만노테트라오스, α 1-3, α 1-3, α 1-6-만노펩토스, β 1-2-N-아세틸글루코스아민-만노스, α -D-N-아세틸갈락토스아미닐 1-3 갈락토스 β 1-4 글루코스, 락토-N-테트라오스 (LNT), 4- β -갈락토비오스, 1-3 갈락토디오실 β -메틸 글리코시드, α 1-3, β 1-4, α 1-3 갈락토테트라오스, β -갈락토실 1-3 N-아세틸 갈락토스아민 메틸 글리코시드, β 1-3 Gal-N-아세틸 갈락토스아미닐- β 1-4 Gal- β 1-4-Glc, 1-데옥시노지리마이신 (DNJ), D-푸코스, L-푸코스, 칼리스테킨 A3, 칼리스테킨 B3, N-메틸 시스-4-히드록시메틸-L-프롤린, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 탄수화물-개질 입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 탄수화물 모이어티가 링커를 통하여 입자의 표면에 공유 결합된 것인 입자.

청구항 3

제2항에 있어서, 링커가 (1) 탄수화물 모이어티의 자유 히드록실 기와 반응하는 친전자체; 및 (2) 중합체 베이스 물질의 자유 카르복실 기와 반응하는 친핵체를 포함하는 것인 입자.

청구항 4

제3항에 있어서, 탄수화물 모이어티가 카르보디이미드 가교결합을 통하여 입자의 표면에 공유 결합된 것인 입자.

청구항 5

제1항에 있어서, 탄수화물 모이어티 이외의 다른 추가적인 면역조절인자를 추가적으로 포함하는 입자.

청구항 6

제1항에 있어서, 면역 조절인자가 탈민감화 또는 관용을 유도하고/거나, 면역 조절인자가 항-염증 반응을 유도하는 것인 입자.

청구항 7

제1항에 있어서, 항원이 자가면역 질환 또는 장애와 연관된 항원인 입자.

청구항 8

제7항에 있어서, 항원이 인슐린으로부터 유래된 항원인 입자.

청구항 9

(a) 탄수화물 모이어티 라이브러리를 시험관 내 면역 세포와 접촉시키고, 면역 세포를 자극하는 것에 대한 라이브러리의 효과를 측정하는 것에 의한, 면역 조절인자 활성에 대하여 탄수화물 모이어티 라이브러리를 스크리닝 하는 단계;

- (b) 면역 세포를 자극하는 것에 대한 효과를 기준으로 탄수화물 모이어티를 선택하는 단계; 및
- (c) 중합체 베이스 물질로부터 형성된 입자에 탄수화물 모이어티를 결합시키는 단계
중 하나 이상을 포함하는, 제1항에 따른 입자의 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 면역 세포를 자극하는 것에 대한 라이브러리의 효과를 측정하는 것이 시토카인 생성을 측정하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 시토카인 생성을 측정하는 것이 기준선 대비 IL-10 생성을 측정하는 것 및 기준선 대비 IL-6 생성을 측정하는 것을 포함하며, 면역 세포를 자극하는 것에 대한 효과를 기준으로 탄수화물 모이어티를 선택하는 것이, IL-6 분비는 변화시키지 않거나 IL-6 분비는 감소시키면서도 기준선 대비 IL-10 분비를 증가시키는 탄수화물 모이어티를 선택하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 탄수화물 모이어티를 결합시키는 것이 중합체 베이스 물질로부터 형성된 입자에 공유 결합시키는 것인 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[관련 특허 출원의 상호-참조]

[0001] 본 출원은 2015년 5월 27일자 U.S. 가출원 제62/167,054호에 대하여 35 U.S.C. § 119(e)하의 우선권 혜택을 주장하며, 그 개시내용이 전체적으로 본원에 참조로서 개재된다.

배경 기술

- [0003] 본 발명은 일반적으로 면역 반응을 조절하기 위한 조성물, 키트 및 방법 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 면역 반응을 조절하기 위한 탄수화물-개질 입자 및 미립자 제제에 관한 것이다.
- [0004] 많은 질환의 치료제들에 있어서 면역 반응의 조절 방법이 중요하며, 입자 담체들이 단백질, 약물 및 기타 치료제를 위한 전달 기구로서의 효능에 대하여 조사되어 왔다. 그러나, 이러한 담체들은 거의 선천적인 그대로이며, 통상적으로 활성 성분을 위한 담체로서만 기능한다. 본원에서, 본 발명자들은 초래되는 면역 반응을 능동적으로 변형시키도록 나노입자 담체를 관능화할 가능성을 조사하였다. 확립되어 있는 나노입자 물질인 폴리(락틱-코-글리콜산) 또는 PLGA, 그리고 면역조절 공동-신호를 위한 본사의 고-처리량 스크린을 사용하여, 본 발명자들은 면역 반응을 조절할 수 있는 탄수화물-강화 나노입자 (CENP)를 개발하였다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0005] [발명의 개요]
- [0006] 개시되는 것은 면역 반응을 조절하기 위한 조성물, 키트 및 방법이다. 상기 조성물 및 키트는 탄수화물-개질 입자, 및 탄수화물-개질 입자를 포함하는 미립자 제제를 포함하며, 상기 방법은 그것을 이용한다.
- [0007] 본원에서 개시되는 탄수화물-개질 입자는 상대적으로 소형이며, 마이크로규모 또는 나노규모 이내의 유효 평균 직경을 갖는다. 특히, 상기 탄수화물-개질 입자는 "탄수화물-강화 나노입자" 또는 "CENP"로 지칭될 수 있다. 입자는 입자 표면에서의 하나 이상 탄수화물 모이어티의 결합을 통하여 개질된다. 바람직하게는, 입자는 입자 표면에서의 하나 이상 탄수화물 모이어티의 공유 결합을 통하여 개질된다. 상기 탄수화물 모이어티는 직접 입자의 표면에 결합되거나, 하나 이상의 링커 분자를 통할 수 있다. 탄수화물 모이어티는 바람직하게는 면역 조절인자(immune modulator), 예를 들면 면역 관용(immune tolerance)을 유도하는 조절인자로서 기능한다.
- [0008] 개시되는 조성물 및 제제 중 입자는 바람직하게는 생분해성이며, 중합체 베이스 물질로부터 형성된다. 일부 실시양태에서, 상기 입자는 탄수화물 단량체 또는 예비중합체로부터 형성되는 중합체 베이스 물질을 포함한다.
- [0009] 탄수화물 모이어티 이외에, 개시되는 탄수화물-개질 입자는 면역 반응을 조절하기 위한 추가적인 성분들을 포함 할 수 있다. 특히, 개시되는 탄수화물-개질 입자는 항원, 예를 들면 항원으로 이용되는 웨티드, 폴리웨티드 또는 단백질을 포함하여, 그 항원에 대하여 대상체를 탈민감화(desensitization)하고/거나 대상체에서 관용을 유도하기 위하여 대상체에게 투여될 수 있다. 개시되는 탄수화물-개질 입자에 포함시키기에 적합한 항원에는 자가면역 질환과 연관되어 있는 자가항원 (예컨대 자가면역 질환과 연관되어 있는 웨티드, 폴리웨티드 또는 단백질)이 포함될 수 있다. 적합한 항원에는 유형 1 당뇨병 (T1D)과 연관되어 있는 자가항원이 포함될 수 있다. 적합한 항원에는 또한 알레르기 반응과 연관되어 있는 항원 (즉 알레르기원)이 포함될 수 있다.
- [0010] 개시되는 입자는 하기 단계들 중 하나 이상을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다: (a) 탄수화물 모이어티 라이브러리를 면역 세포와 접촉시키고, 면역 세포를 자극함에 있어서의 라이브러리의 효과를 측정하는 것 (예컨대 기준선에 대비한 시토카인 생성, 특히 IL-6 생성에 대비한 IL-10, TGF β 및/또는 CCL4 생성을 측정하는 것에 의함)에 의해, 면역-조절인자 활성에 대하여 탄수화물 모이어티 라이브러리를 스크리닝하는 단계; (b) 면역 세포를 자극함에 있어서의 그의 효과를 기준으로 탄수화물 모이어티를 선택하는 단계; 및 (c) 바람직하게는 탄수화물 모이어티를 생분해성 중합체 베이스 물질로부터 형성된 입자의 표면에 공유 결합시키는 것에 의해, 그렇게 선택된 탄수화물 모이어티를 중합체 베이스 물질로부터 형성된 입자에 결합시키는 단계.

발명의 효과

- [0011] 개시되는 입자는 면역 반응을 조절하기 위한 조성물로서 제제화될 수 있다. 그 자체로서, 상기 조성물은 비제한적으로 대상체를 탈민감화하고/거나 대상체에서 관용을 유도하는 것을 포함할 수 있는 면역 반응을 유도하기 위하여, 그를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 조성물은 자가면역 반응과 연관되어 있는 질환 및 장애를 치료 및/또는 예방하기 위하여, 또는 알레르기 반응을 치료 및/또는 예방하기 위하여 투여될 수 있다. 조성물은 이식 거부를 치료 및/또는 예방하기 위하여 투여될 수도 있다.

도면의 간단한 설명

[0012]

도 1은 PLGA 입자 (PP)에 의한 대식세포의 시험관내 자극 (LPS)은 IL-10을 강화하지 않는 반면, EDC-세포 (EDC SP)는 IL-10을 강화한다는 것을 도시한다.

도 2는 대식세포에 의한 시토카인 생성의 유도를 위한 탄수화물 화합물의 고처리량 스크리닝 전략을 도시한다.

도 3a 및 3b는 도 2에 도시되어 있는 바와 같은 고처리량 스크린을 사용하여 측정되었을 때의 IL-10 반응의 상향-조절 또는 하향-조절에 있어서의 유도 히트-맵(heat-map)을 도시한다.

도 4는 PLGA 나노입자에 L-푸코스를 첨가하기 위한 화학 결합 반응을 도시한다.

도 5는 푸코실화된 PLGA (F-CENP)가 PLGA 단독, EDC-세포 또는 유리 L-푸코스에 비해 더 강한 IL-10 유도를 촉진한다는 것을 도시한다.

도 6은 민감화(sensitization) 및 관용의 면역학적 메커니즘을 도시한다.

도 7은 탈민감화 및 관용 유도를 통하여 알레르기를 치료하기 위한 잠재적인 치료법을 도시한다.

도 8은 세포자멸사 세포 표면상의 잠재적인 자연 관용원성 신호를 도시한다.

도 9는 T1D에서의 관용 치료법을 위한 Ag-NP 전달 시스템의 효능이 하기에 의해 상당히 강화될 수 있다는 가설을 도시한다: (1) CD209 및 Mer 이중 신호전달을 위하여 NP상에 표적화 리간드들 (LNFP III 및 GAS6)을 동시에 조작하는 것; 및 (2) 전달성 관용을 유도하기 위한 최초 질환-관련 자가항원으로서의 인슐린의 탈아미드화된 형태 (INS (Q→E))의 전달.

도 10a, 10b 및 10c는 AG-SP가 Treg 세포의 확장, AD 결실 및 Teff 세포의 무반응을 통하여 관용을 유도한다는 것을 도시한다. A. 이식 후 28일차의 Ag-SP 처리 및 대조 수용자에서의 비장, dLN 및 이식편의 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 세포. B. -4일차, 0일차 및 7일차에 Ag-SP 처리 및 대조 수용자의 비장, dLN 및 이식편에서 계수된 동종으로(congenically) 표시된 TEa TCR 트랜스제닉 T 세포. C. Ag-SP의 제1 및 제2 주사 후 생체내 증식에 대하여 조사된 동종으로 표시되고 CFSE 표지된 4C TCR 트랜스제닉 T 세포. 히스토그램 중첩은 미처리 마우스에서의 비-증식 4C T 세포도 보여준다 (문헌 [Kheradmand *et al*, J Immunol 189:804-12, 2012]).

도 11. AG-SP 주사는 Treg 유도 및 귀소에 관련되어 있는 MDSC 및 가용성 매개체들의 확장을 유도한다. A. Ag-SP 주사 후 Ly6C^{HI} 및 Gr1^{HI} MDSC 양자의 수가 확장됨. B. 자극된 T 세포와의 Ly6C^{HI} 및 Gr1^{HI} MDSC의 공동-배양은 IL-10 및 CCL4의 생성을 유도함. C. Ag-SP 처리된 수용자로부터의 동종이식편은 Foxp3⁺ Treg의 점진적인 축적을 나타냄 (문헌 [Bryant *et al*, J Immunol 192(12): 6092, 2014]).

도 12a, 12b 및 12c는 Ag-SP-매개 MDSC 확장이 수용체 티로신 키나제 MER에 따라 달라진다는 것을 도시한다. A. 표면 렉틴 CD209 및 CD169를 발현하는 2종의 비장 대식세포 군집이 Ag-SP 처리에 반응하여 Mer 발현을 상향-조절함. B. MerTK^{-/-} 마우스에서는, Ly6C^{HI} 및 Gr1^{HI} MDSC의 Ag-SP 유도 확장이 상실됨. C. MerTK^{-/-} 마우스에서는, Ag-SP 관용 치료법이 효과적이지 않음. 이는 BALB/c→B6 심장 이식 모델에서의 것이며, 여기에서 MerTK^{+/+} (야생형) 마우스에서의 Ag-SP는 섬 동종이식편의 것과는 달리 무기한 생존은 아니지만, 심장 동종이식편 생존을 상당히 연장시킨다 (비공표 데이터).

도 13a, 13b 및 13c는 NP가 항원 전달 및 관용 유도용으로 적합화될 수 있다는 것을 도시한다. A. PLG NP는 지정된 크기 (이와 같은 경우에서는 ~500 nm) 및 제타 전위 (이와 같은 경우에서는 ~-75 mV)로 제조될 수 있음. B. 공여자 비장세포 용해질 형태의 공여자 항원이 PLG NP에 결합되어 수용자 마우스로 안전하게 전달될 수 있음. 그러나, 현재의 Ag-NP 형태는 단독으로 제공될 경우 이식된 섬 동종이식편에 주변부 보호만을 제공한다. 단기 과정의 저투여량 라파마이신과 조합될 경우, Ag-NP는 섬 동종이식편 보호에 있어서의 그의 효능을 상당히 향상시킨다 (문헌 [Bryant *et al*, Biomaterials 35: 8887-94, 2014]).

도 14a, 14b 및 14c는 인간 T1D 환자 및 NOD 마우스에서의 탈아미드화된 프로인슐린에 대한 체액성 반응을 도시한다. A. 30명의 성인 T1D 환자 코호트 중 4명에서의 웨스턴 블렛에 의해 검출된 탈아미드화된 인간 프로인슐린에 대한 항체 반응. B. 상부 패널: 3주령에 시작하여 연속 조사된 암컷 NOD 마우스 코호트에서의 웨스턴 블렛에 의한 탈아미드화된 마우스 프로인슐린 1에 대한 대표적인 항체 반응. 저부 패널: 탈아미드화된 프로인슐린에 대한 항체가 있거나 없는 암컷 NOD 마우스 하위군에서의 당뇨병 발생률. C. 양성 NOD B 세포 하이브리도 마로부터의 상청액에 의해 프로빙된 뮤린 프로인슐린 1 및 2의 4×30 펫티드 어레이.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본원에서 개시되는 것은 하기에서 논의되는 바와 같은 몇 가지 정의들을 사용하여 기술될 수 있는, 질환에 대하여 면역 반응을 유도하기 위한 조성물, 키트 및 방법이다.
- [0014] 문맥상 달리 명기되거나 표시되지 않는 한, "a", "an" 및 "the"의 용어들은 "하나 이상"을 의미한다. 또한, "탄수화물" 및 "탄수화물 모이어티"와 같은 단수의 명사들은 문맥상 달리 명기되거나 표시되지 않는 한, 각각 "하나 이상의 탄수화물" 및 "하나 이상의 탄수화물 모이어티"를 의미하는 것으로 해석되어야 한다. "입자"와 같은 단수의 명사들은 문맥상 달리 명기되거나 표시되지 않는 한, "하나 이상의 입자"를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0015] 본원에서 사용될 때, "약", "대략", "실질적으로" 및 "상당히"는 관련 기술분야 통상의 기술자라면 알고 있을 것이며, 그것이 사용되는 문맥에 따라 어느 정도까지 가변적이게 된다. 그것이 사용되는 문맥이 속하는 관련 기술분야 통상의 기술자에게 분명하지 않은 용어의 사용이 존재하는 경우, "약" 및 "대략"은 특정 용어의 더하기 또는 빼기 $\leq 10\%$ 를 의미하게 되며, "실질적으로" 및 "상당히"는 특정 용어의 더하기 또는 빼기 $> 10\%$ 를 의미하게 된다.
- [0016] 본원에서 사용될 때, "포함하다" 및 "포함한"이라는 용어는 "포함하다" 및 "포함하는"이라는 용어와 동일한 의미를 갖는다. "포함하다" 및 "포함하는"이라는 용어는 청구범위에서 언급되는 구성요소들에 대한 추가적인 구성요소들의 포함을 허용하는 "개방형의" 전이적 용어인 것으로 해석되어야 한다. "이루어지다" 및 "이루어진"이라는 용어는 청구범위에서 언급되는 구성요소들이 아닌 다른 추가적인 구성요소의 포함은 허용하지 않는 "폐쇄형의" 전이적 용어인 것으로 해석되어야 한다. "분질적으로 ~로 구성되다"라는 용어는 부분적으로는 폐쇄형으로, 그리고 기본적으로 청구되는 주제의 특성을 변경시키지 않는 추가적인 구성요소만의 포함은 허용하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0017] "대상체", "환자" 또는 "호스트(host)"라는 용어는 본원에서 호환가능하게 사용될 수 있으며, 인간 또는 비-인간 동물을 지칭할 수 있다. 비-인간 동물에는 비-인간 영장류, 개 및 고양이가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] "대상체", "환자" 또는 "개체"라는 용어는 인간 또는 비-인간 동물을 지칭하는 데에 사용될 수 있다. 대상체에는 탈민감화 및/또는 관용 유도를 포함할 수 있는 면역-조절에 의해 치료 및/또는 예방될 수 있는 질환 및/또는 장애를 가지고 있거나 거기에 걸릴 위험이 있는 인간이 포함될 수 있다. 면역-조절에 의해 치료 및/또는 예방되는 질환 및/또는 장애에는 식품 알레르기 및 기타 유형의 알레르기를 포함한 알레르기들이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 면역-조절에 의해 치료 및/또는 예방되는 질환 및/또는 장애에는 심장(예컨대 심근염 및 심근경색후 증후군), 신장(예컨대 항-사구체 기저막 신염), 간(예컨대 자가면역 간염, 원발성 담관간경화증), 피부(예컨대 원형 탈모증, 건선, 전신성 공피증 및 백반증), 부신(예컨대 애디슨병), 췌장(예컨대 자가면역 췌장염 및 제1형 당뇨병(T1D)), 갑상선(예컨대 그레이브병), 타액선(예컨대 쇠그렌 증후군), 소화기 계통(예컨대 복장 질환, 크론병 및 궤양성 결장염), 혈액(예컨대 자가면역 혈소판감소성 자반증, 애반스 증후군, 악성 빈혈 및 혈소판감소증), 결합 조직(예컨대 강직성 척추염, 소아 관절염, 류마티스 관절염, 사르코이드증 및 전신성 홍반 루푸스), 근육 조직(예컨대 섬유근육통, 중증 근무력증 및 피부근육염) 및 신경계(예컨대 급성 과종 뇌척수염, 길랑-바雷 증후군, 다발성 경화증 및 특발 염증성 탈수초 질환)의 자가면역 질환과 같은 자가면역 질환 및 장애들이 포함될 수 있다.
- [0019] 대상체에는 이식 수술을 받을 예정인 대상체 또는 이식 수술을 받은 대상체가 포함될 수 있다. 대상체에는 대상체가 이식 거부를 하고 있거나 이식 거부를 할 위험이 있는, 이식 수술을 받을 예정인 대상체 또는 이식 수술을 받은 대상체가 포함될 수 있다.
- [0020] 본원에서 개시되는 것은 탄수화물-개질 입자이다. 상기 탄수화물-개질 입자는 상대적으로 소형이며, 마이크로 규모 또는 나노규모 이내의 유효 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, 탄수화물-개질 입자는 약 500 μm , 200 μm , 100 μm , 50 μm , 20 μm , 10 μm , 5 μm , 2 μm , 1 μm , 0.5 μm , 0.2 μm , 0.1 μm , 0.05 μm , 0.02 μm , 0.01 μm 미만의 유효 평균 직경을 가질 수 있거나, 또는 탄수화물-개질 입자는 0.02-1 μm 또는 200-1000 nm와 같이 종료점으로서의 상기 값들 중 어느 것에 의해 둘러싸인 범위 내의 유효 평균 직경을 가질 수 있다. 탄수화물-개질 입자는 본원에서 "마이크로입자" 및/또는 "나노입자"로 지칭될 수 있다. 특히, 탄수화물-개질 입자는 "탄수화물-강화 나노입자" 또는 "CENP"로 지칭될 수 있다.
- [0021] 개시되는 입자는 통상적으로 예를 들면 그를 필요로 하는 대상체에게 개시되는 입자를 투여하는 데에 적합한 제

타 전위를 갖는다. 일부 실시양태에서, 개시되는 입자는 예를 들면 하기 제타 전위 값들 중 어느 것에 의해 둘러싸인 범위 이내인 음성의 제타 전위를 갖는다: -10 mV, -20 mV, -30 mV, -40 mV, -50 mV, -60 mV, -70 mV, -80 mV, -90 mV 또는 -100 mV, 예를 들면 -50 내지 -100 mV 또는 -60 내지 -80 mV.

[0022]

개시되는 입자는 생분해성 베이스 물질을 포함할 수 있다. 입자는 관련 기술분야에서 이해되게 되는 바 그대로의 "생분해성"이다. "생분해성"이라는 용어는 생리학적 환경에서 더 작은 기본 성분으로 분해될 수 있는 물질을 기술하는 데에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 더 작은 기본 성분은 무해한 것이다. 예를 들어, 생분해성 중합체는 비제한적으로 물, 이산화 탄소, 당, 유기 산 (예컨대 트리카르복실산 또는 아미노산) 및 알콜 (예컨대 글리세롤 또는 폴리에틸렌 글리콜)을 포함한 기본 성분으로 분해될 수 있다. 본원에서 고려되는 입자를 제조하는 데에 이용될 수 있는 생분해성 물질에는 U.S. 특허 제7,470,283호; 7,390,333호; 7,128,755호; 7,094,260호; 6,830,747호; 6,709,452호; 6,699,272호; 6,527,801호; 5,980,551호; 5,788,979호; 5,766,710호; 5,670,161호; 및 5,443,458호; 그리고 U.S. 출원 공개 제20090319041호; 20090299465호; 20090232863호; 20090192588호; 20090182415호; 20090182404호; 20090171455호; 20090149568호; 20090117039호; 20090110713호; 20090105352호; 20090082853호; 20090081270호; 20090004243호; 20080249633호; 20080243240호; 20080233169호; 20080233168호; 20080220048호; 20080154351호; 20080152690호; 20080119927호; 20080103583호; 20080091262호; 20080071357호; 20080069858호; 20080051880호; 20080008735호; 20070298066호; 20070288088호; 20070287987호; 20070281117호; 20070275033호; 20070264307호; 20070237803호; 20070224247호; 20070224244호; 20070224234호; 20070219626호; 20070203564호; 20070196423호; 20070141100호; 20070129793호; 20070129790호; 20070123973호; 20070106371호; 20070050018호; 20070043434호; 20070043433호; 20070014831호; 20070005130호; 20060287710호; 20060286138호; 20060264531호; 20060198868호; 20060193892호; 20060147491호; 20060051394호; 20060018948호; 20060009839호; 20060002979호; 20050283224호; 20050278015호; 20050267565호; 20050232971호; 20050177246호; 20050169968호; 20050019404호; 20050010280호; 20040260386호; 20040230316호; 20030153972호; 20030153971호; 20030144730호; 20030118692호; 20030109647호; 20030105518호; 20030105245호; 20030097173호; 20030045924호; 20030027940호; 20020183830호; 20020143388호; 20020082610호; 및 0020019661호에 개시되어 있는 물질들이 포함될 수 있는 바; 그 개시내용이 전체적으로 본원에 참조로서 개재된다. 통상적으로, 본원에서 개시되는 입자는 입자 중 생분해성 중합체의 단량체로의 분해; 입자 중 생분해성 중합체의 물, 이산화 탄소, 당, 유기 산 (예컨대 트리카르복실산 또는 아미노산) 및 알콜 (예컨대 글리세롤 또는 폴리에틸렌 글리콜)으로의 분해; 및 입자 중 탄수화물-모이어티 또는 입자에 존재하는 임의의 면역조절 작용제를 방출하는 입자의 분해 중 하나 이상을 통하여, 입자가 대상체에의 투여 약 4, 5, 6, 7 또는 8주 후 그의 최초 질량의 약 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % 또는 99 %를 초과하여 상실하도록 하는 분해 속도로 생체 내에서 분해된다.

[0023]

입자의 베이스 물질을 제조하는 데에 적합한 중합체에는 PLA와 PGA의 공중합체 (즉 PLGA), 폴리락트산을 포함한 폴리락티드 (즉 PLA)와 같은 단일중합체, 폴리글리콜산을 포함한 폴리글리콜리드 (즉 PGA)와 같은 단일중합체가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 적합한 중합체에는 폴리카프로락톤 (PCL), 폴리(디옥산온) (PDO), 콜라겐, 탈변성 콜라겐, 젤라틴, 탈변성 젤라틴, 가교-결합 젤라틴 및 이들의 공중합체가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 입자의 중합체는 중합체 사슬의 가수분해의 결과로서 생물학적으로 허용가능하며 폴리락티드, 폴리글리콜리드 및 이들의 공중합체와 같이 점진적으로 더 작은 성분으로 분해되도록 설계된다. 궁극적으로 락트산 및 글리콜산으로의 것인 이러한 붕괴는 크렙스 회로에 진입하여, 이산화 탄소 및 물로 붕괴된 후, 배설된다.

[0024]

탄수화물 모이어티 이외에, 개시되는 탄수화물-개질 입자는 면역 반응을 조절하기 위한 추가적인 성분들을 포함할 수 있다. 특히, 개시되는 탄수화물-개질 입자는 항원, 예를 들면 그 항원에 대하여 대상체를 탈민감화하고/거나 대상체에서 관용을 유도하기 위하여 이용되며 대상체에게 투여되는 항원을 포함할 수 있다. 항원은 탄수화물-개질 입자의 표면에 공유로, 또는 달리 결합될 수 있다. 적합한 항원에는 알레르기 반응과 연관되어 있는 항원, 예를 들면 식품 알레르기와 연관되어 있는 항원도 포함될 수 있다. 개시되는 탄수화물-개질 입자에 포함시키기에 적합한 항원에는 자가면역 질환과 연관되어 있는 자가항원, 예컨대 비제한적으로 심장 (예컨대 심근염 및 심근경색후 증후군), 신장 (예컨대 항-사구체 기저막 신염), 간 (예컨대 자가면역 간염, 원발성 담관 간경화증), 피부 (예컨대 원형 탈모증, 전선, 전신성 공피증 및 백반증), 부신 (예컨대 애디슨병), 췌장 (예컨대 자가면역 췌장염 및 제1형 당뇨병 (T1D)), 갑상선 (예컨대 그레이브병), 타액선 (예컨대 쇠그伦 증후군), 소화기 계통 (예컨대 복강 질환, 크론병 및 궤양성 결장염), 혈액 (예컨대 자가면역 혈소판감소성 자반증, 에반스 증후군, 악성 빈혈 및 혈소판감소증), 결합 조직 (예컨대 강직성 척추염, 소아 관절염, 류마티스 관절염, 사르코이드증 및 전신성 홍반 루푸스), 근육 조직 (예컨대 섬유근육통, 중증 근무력증 및 피부근육염) 및 신경계

(예컨대 급성 과종 뇌척수염, 길랑-바레 증후군, 다발성 경화증 및 특발 염증성 탈수초 질환)의 자가면역 질환에서 선택되는 자가면역 질환과 연관되어 있는 항원이 포함될 수 있다.

[0025] 개시되는 탄수화물-개질 입자의 일부 실시양태에서는, 탄수화물 모이어티 이외에도, 예를 들면 해당 항원 또는 알레르기원에 대하여 대상체를 탈민감화하고/거나 해당 항원 또는 알레르기원에 대하여 대상체에서 관용을 유도하기 위하여 그 항원 또는 알레르기원에 대하여 알레르기 반응을 나타내거나 그 항원 또는 알레르기원에 대하여 알레르기 반응을 발현할 위험이 있는 대상체에게 탄수화물-개질 입자가 투여될 수 있는 경우, 개시되는 탄수화물-개질 입자가 항원 또는 알레르기원을 포함할 수 있다. 개시되는 탄수화물-개질 입자의 다른 실시양태에서는, 탄수화물 모이어티 이외에도, 예를 들면 인슐린에 대하여 대상체를 탈민감화하고/거나 인슐린에 대하여 대상체에서 관용을 유도하기 위하여 유형 1 당뇨병을 가지고 있거나 유형 1 당뇨병의 발병 위험이 있는 대상체에게 탄수화물-개질 입자가 투여될 수 있는 경우, 개시되는 탄수화물-개질 입자가 인슐린으로부터 유래된 항원을 포함할 수 있다. 개시되는 탄수화물-개질 입자의 다른 실시양태에서는, 탄수화물 모이어티 이외에도, 해당 이식물 중 항원에 대하여 대상체를 탈민감화하고/거나 해당 이식물 중 항원에 대하여 대상체에서 관용을 유도하고 이식 거부를 치료 및/또는 예방하기 위하여, 개시되는 탄수화물-개질 입자가 이식물로부터 유래된 항원을 포함할 수 있다.

[0026] 탄수화물-개질 입자에 포함시키기에 적합한 항원에는 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질이 포함될 수 있다. 본원에서 사용될 때, 본원에서 호환가능하게 지칭될 수 있는 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 아미노산의 중합체를 포함하는 문자를 지칭한다. 자연 발생 단백질 문자의 서열을 지칭하기 위하여 "아미노산 서열"이 언급되는 경우에, "아미노산 서열" 등의 용어가 언급되는 단백질 문자와 연관되어 있는 완전한 자연 아미노산 서열로 아미노산 서열을 제한하는 것을 의미하는 것은 아니다. "아미노산"이라는 용어는 자연 발생 및/또는 비-자연 발생 아미노산을 지칭할 수 있다.

[0027] 본원에서 고려될 때, 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 항원, 예를 들면 본원에서 개시되는 입자의 표면에 공유 결합되는 항원으로 이용될 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호(SEQ ID NO): 1-9는 본원에서 고려될 때 항원으로 이용될 수 있는 인슐린 일부의 아미노산 서열 또는 그의 변이 (예컨대 Q→E 탈아미드화 변이)를 제공한다. 예시적인 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 서열식별번호: 1-9 중 어느 것의 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 서열식별번호: 1-9 중 어느 것과 적어도 약 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 %의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 변이 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질에는 참조 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질 대비 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 첨가 및/또는 아미노산 삽입을 갖는 폴리펩티드가 포함될 수 있다.

[0028] 본원에서 고려되는 아미노산 서열은 참조 아미노산 서열 대비 보존적인 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 변이 인슐린 폴리펩티드는 자연 인슐린 폴리펩티드 대비 보존적인 아미노산 치환을 포함할 수 있다. "보존적인 아미노산 치환"은 참조 폴리펩티드의 특성을 최소한으로 저해할 것으로 예상되는 치환이다. 다른 말로 하면, 보존적인 아미노산 치환은 참조 단백질의 구조 및 기능을 실질적으로 보존한다. 하기 표에, 예시적인 보존적인 아미노산 치환들의 목록을 제공한다.

원래의 잔기	보존적인 치환
Ala	Gly, Ser
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Glu, Gln
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

[0029]

[0030] 보존적인 아미노산 치환은 일반적으로 (a) 예를 들면 베타 시트 또는 알파 나선 입체형태와 같은 치환 영역의 폴리펩티드 백본 구조, (b) 치환 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 및/또는 (c) 측쇄의 크기를 유지한다.

[0031]

"결실"은 참조 서열 대비 하나 이상 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 부재를 초래하는 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 변화를 지칭한다. 결실은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 또는 200개의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 제거한다. 결실에는 내부 결실 또는 말단 결실 (예컨대 참조 폴리펩티드의 N-말단 감축 또는 C-말단 감축, 또는 참조 뉴클레오티드의 5'-말단 또는 3'-말단 감축)이 포함될 수 있다.

[0032]

"단편"은 참조 서열과 서열은 동일하나 길이가 더 짧은 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드의 일부이다. 단편은 참조 서열의 전체 길이 빼기 적어도 하나의 뉴클레오티드/아미노산 잔기까지를 포함할 수 있다. 예를 들면, 단편은 각각 참조 폴리뉴클레오티드 또는 참조 폴리펩티드의 5 내지 1000개의 연속 뉴클레오티드 또는 연속 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단편은 각각 참조 폴리뉴클레오티드 또는 참조 폴리펩티드의 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 250 또는 500개의 연속 뉴클레오티드 또는 연속 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 단편은 분자의 소정 영역에서 우선적으로 선택될 수 있다. "적어도 단편"이라는 용어는 전체 길이 폴리뉴클레오티드 또는 전체 길이 폴리펩티드를 포함한다.

[0033]

"상동성"은 2개 이상 폴리뉴클레오티드 서열 또는 2개 이상 폴리펩티드 서열 사이의 서열 유사성 또는 호환가능 하게는 서열 동일성을 지칭한다. 상동성, 서열 유사성 및 백분율 서열 동일성은 관련 기술분야 및 본원에서 기술되는 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0034]

폴리펩티드 서열에 적용될 때의 "퍼센트 동일성" 및 "% 동일성"이라는 구는 표준 알고리즘을 사용하여 정렬된 적어도 2개 폴리펩티드 서열 사이의 잔기 일치 백분율을 지칭한다. 폴리펩티드 서열 정렬 방법에 대해서는 잘 알려져 있다. 일부 정렬 방법은 보존적인 아미노산 치환을 고려한다. 상기에 더 상세하게 설명되어 있는 그와 같은 보존적인 치환은 일반적으로 치환 부위에서의 전하 및 소수성을 보존하여, 폴리펩티드의 구조 (및 그에 따른 기능)를 보존한다. 아미노산 서열의 % 동일성은 관련 기술분야에 알려져 있는 바와 같이 측정될 수 있다 (예컨대 그 전체가 본원에 참조로서 개재되는 U.S. 특허 제7,396,664호 참조). 통상적으로 사용되며 무료로 입수 가능한 일련의 서열 비교 알고리즘들이 국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information) (NCBI)에 의해 기본 로컬 정렬 탐색 툴(Basic Local Alignment Search Tool) (블라스트(BLAST)) (문헌 [Altschul, S. F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410])로 제공되며, 메릴랜드 베데스타 소재 NCBI의 웹사이트를 포함한 몇 곳의 공급원으로부터 입수 가능하다. 블라스트 소프트웨어 일습은 알려져 있는 아미노산 서열을 다양한 데이터베이스로부터 다른 아미노산 서열과 정렬하는 데에 사용되는 "블라스트p"를 포함한 다양한 서열 분석 프로그램들을 포함한다.

[0035]

% 동일성은 예를 들면 특정 서열식별번호에 의해 정의되는 바와 같은 전체의 정해진 폴리펩티드 서열 길이에 대비하여 측정될 수 있거나, 또는 더 짧은 길이에 대비하여, 예를 들면 더 큰 정해진 폴리펩티드 서열로부터 취한

단편, 예를 들면 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 70개 또는 적어도 150개 연속 잔기 단편의 길이에 대비하여 측정될 수 있다. 그와 같은 길이는 단지 예시적인 것이며, 본원의 표, 도면 또는 서열 목록에 나타나 있는 서열들에 의해 뒷받침되는 어떠한 단편 길이도 그에 대비하여 동일성 백분율이 측정될 수 있는 길이를 기술하는 데에 사용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0036] 특정 폴리펩티드 서열의 "변이"는 국립 생물공학 정보 센터의 웹사이트에서 입수가능한 "블라스트 2 시퀀스 (BLAST 2 Sequences)" 툴이 구비된 블라스트p를 사용하였을 때, 폴리펩티드 서열들 중 하나의 소정 길이상에서 특정 폴리펩티드 서열과 적어도 50 %의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열로 정의된다 (문헌 [Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250] 참조). 그와 같은 폴리펩티드 쌍은 폴리펩티드 중 하나의 소정의 정해진 길이상에서 예를 들면 적어도 60 %, 적어도 70 %, 적어도 80 %, 적어도 90 %, 적어도 91 %, 적어도 92 %, 적어도 93 %, 적어도 94 %, 적어도 95 %, 적어도 96 %, 적어도 97 %, 적어도 98 % 또는 적어도 99 %, 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타낼 수 있다.

[0037] 개시되는 폴리펩티드는 개시되는 폴리펩티드가 자연 발생인 것으로 언급될 수 없도록 하는 아미노산 서열 또는 변형된 아미노산을 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개시되는 폴리펩티드는 변형되며, 상기 변형은 아실화, 아세틸화, 포르밀화, 리폴릴화, 미리스토일화, 팔미토일화, 알킬화, 이소프레닐화, 프레닐화 및 아미드화로 이루어진 군으로부터 선택된다. 개시되는 폴리펩티드의 아미노산은 그렇게 변형될 수 있기는 하지만, 특히는 변형이 폴리펩티드의 N-말단 및/또는 C-말단에 존재할 수 있다 (예컨대 N-말단 아실화 또는 아세틸화, 및/또는 C-말단 아미드화). 상기 변형들은 폴리펩티드의 안정성을 강화하고/거나 폴리펩티드가 단백질분해에 대하여 내성이 되도록 할 수 있다.

[0038] 개시되는 입자는 비제한적으로 U.S. 특허 제8,546,371호; 8,518,450호; 및 7,550,154호에 개시되어 있는 방법을 포함하여, 관련 기술분야에 알려져 있는 방법에 의해 제조될 수 있고, 그 개시내용이 전체적으로 본원에 참조로서 개재된다. 마이크로입자 및/또는 나노입자의 형성 방법에는 베이스 물질 (예컨대 생분해성 중합체 베이스 물질)의 분무-건조, 침전 및/또는 마쇄가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 개시되는 입자는 통상적으로 탄수화물 모이어티, 바람직하게는 입자의 표면에 결합되는 (예컨대 공유 결합을 포함) 면역 조절인자인 탄수화물 모이어티의 포함을 통하여 개질된다. 적합한 탄수화물 모이어티에는 하기 군에 속하는 모이어티 또는 그의 제약용 염이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 헤파린 디사카라이드 I-A, 헤파린 디사카라이드 II-A, 헤파린 디사카라이드 III-A, 헤파린 디사카라이드 IV-A, 헤파린 디사카라이드 IV-S, 헤파린 불포화 디사카라이드 I-H, 헤파린 불포화 디사카라이드 II-H, 헤파린 불포화 디사카라이드 II-H, 헤파린 불포화 디사카라이드 I-P, 콘드로이틴 디사카라이드 Δ di-OS, 콘드로이틴 디사카라이드 Δ di-4S, 콘드로이틴 디사카라이드 Δ di-6S, 콘드로이틴 디사카라이드 Δ Di-diSB, 콘드로이틴 디사카라이드 Δ Di-diSE, 콘드로이틴 디사카라이드 Δ Di-triS, 콘드로이틴 디사카라이드 Δ Di-UA2S, 네오카라데카오스-41,3,5,7,9-펜타-0-슬페이트, 네오카라헥사데카오스-41,3,5,7,9,11,13,15-옥타-0-슬페이트, GalNAc β 1-4Gal (슈도모나스 아에루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 선모에 대한 수용체), 혈액형 B 유형 2 선형 트리사카라이드, P1 항원, Tn 항원, 시알릴-루이스 A, 시알릴-루이스 X, 시알릴-루이스 X β -메틸 글리코시드, 술포-루이스 A, 술포-루이스 X, α 1-2-만노비오스, α 1-3-만노비오스, α 1-6-만노비오스, 만노테트라오스, α 1-3, α 1-3, α 1-6-만노펜토스, β 1-2-N-아세틸글루코스아민-만노스, LS-테트라사카라이드 a (LSTA), LS-테트라사카라이드 c (LSTc), α -D-N-아세틸갈락토스아미닐 1-3 갈락토스, α -D-N-아세틸갈락토스아미닐 1-3 갈락토스 β 1-4 글루코스, D-갈락토스-4-0-슬페이트, 글리실-락토스 (Lac-gly), 글리실-락토-N-테트라오스 (LNT-gly), 2'-푸코실락토스, 락토-N-네오텐트라오스 (LNNT), 락토-N-테트라오스 (LNT), 락토-N-디푸코헥사오스 I (LNDFH I), 락토-N-디푸코헥사오스 II (LNDFHII), 락토-N-네오텐트라오스 (LNnH), 3'-시알릴락토스 (3'-SL), 6'-시알릴락토스 (6'-SL), 3'-시알릴-N-아세틸락토스아민, 6'-시알릴-N-아세틸락토스아민 (6'-SLN), 3-푸코실락토스 (3FL), 푸코이단, 4- β -갈락토비오스, 1-3 갈락토디오실 β -메틸 글리코시에, α 1-3, β 1-4, α 1-3 갈락토테트라오스, β -갈락토실 1-3 N-아세틸 갈락토스아민 메틸 글리코시드, β 1-3 Gal-N-아세틸 갈락토스아미닐- β 1-4 Gal- β 1-4-Glc, β 1-6 갈락토비오스, 글로보트리오스, β -D-N-아세틸글락토스아미닐 1-3 갈락토스 (글로보트리오스의 말단 디사카라이드), 1-데옥시노지리마이신 (DNJ), D-푸코스, L-푸코스, D-탈로스, 칼리스테인 A3, 칼리스테인 B3, N-메틸 시스-4-히드록시메틸-L-프롤린, 2,5-디데옥시-2,5-이미노-D-만니톨, 카스타노스페민, 6-에피-카스타노스페민, 및 이들의 조합. 일부 실시양태에서, 입자는 다수의 탄수화물 모이어티를 포함하며, 면역-조절을 통하여 질환 또는 장애를 치료 및/또는 예방하도록 설계된다.

[0040] 개시되는 입자의 탄수화물 모이어티는 통상적으로 탄소, 수소 및 산소 원자로 구성되는 탄수화물이며, 경험식

$C_m(H_2O)_n$ 을 가질 수 있으며, 여기서 m 및 n은 정수이고, 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 탄수화물은 탄소, 수소 및 산소 이외의 다른 원자, 예를 들면 질소, 인 및/또는 황 원자를 포함할 수 있다. 그러나, 탄소, 수소 및 산소 이외의 다른 원자, 예를 들면 질소, 인 및/또는 황 원자를 포함하는 탄수화물은 통상적으로 작은 탄수화물 분자 중 몰 질량 분율 (예컨대 10 % 또는 5 % 미만)로 이러한 다른 원자를 포함한다.

[0041] 탄수화물 모이어티는 직접 입자의 표면에 결합될 수 있다 (예컨대 공유 결합을 통함). 임의적으로, 탄수화물 모이어티는 예를 들면 하나 이상의 링커 분자 (예컨대 폴리에틸렌 글리콜 링커)를 통하여 공유로 입자의 표면에 간접 결합될 수 있다. 탄수화물 모이어티는 비제한적으로 카르보디이미드 (EDC) 가교결합을 포함할 수 있는 가교결합법을 통하여 입자의 표면에 결합될 수도 있다.

[0042] 임의적으로, 개시되는 입자는 탄수화물 모이어티 이외의 다른 하나 이상의 추가적인 면역조절 작용제를 포함할 수 있다. 추가적인 작용제에는 상기에서 논의된 바와 같은 항원, 및/또는 시토카인 (예컨대 인터류킨 및 인터페론) 및/또는 면역-조절 항체가 포함될 수 있다.

[0043] 개시되는 입자는 "면역-강화제" 및/또는 "면역-억제제"로 기능한다. 그에 따라, 개시되는 입자는 비제한적으로 하기를 포함한 수많은 적용분야에서 투여될 수 있다: 백신 효능을 향상시키기 위한 면역강화; 항-종양 면역성 및 암 결과를 향상시키기 위한 면역강화; 감염성 질환 동안의 결과를 향상시키기 위한 면역강화; 천식, 식품 알레르기 및 습진과 같은 알레르기성 질환을 치료하기 위한 면역억제; 류마티스 관절염, 다발성 경화증 및 당뇨병과 같은 자가면역 질환을 치료하기 위한 면역억제; 및/또는 이식 동안의 결과를 향상시키기 위한 면역억제.

[0044] 개시되는 입자는 항원에 대하여 대상체를 탈민감화하고/거나 대상체에서 관용을 유도하기 위하여 투여될 수 있다. 탈민감화 및/또는 관용은 관련 기술분야 및 본원에서 개시되는 방법을 사용하여 평가될 수 있고, 거기에는 바람직하게는 기준선 대비 IL-6의 분비 유도에 대비한 기준선 대비 대식세포에 의한 IL-10, TGF β 또는 CCL4의 분비 유도가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이에 따라, 탈민감화 및/또는 관용은 기준선 대비 IL-6 분비의 변화에 대비한 기준선 대비 IL-10 분비의 상대적인 변화를 반영하는 IL-10/IL-6 비를 사용하여 평가될 수 있다.

[0045] 개시되는 입자는 대상체에서 면역 반응을 조절하기 위하여 투여될 수 있다. 따라서, 개시되는 입자는 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 그와 같은 조성물은 의료 관련 기술분야 통상의 기술자에게 잘 알려져 있는 투약량 및 기술에 따라 특정 환자의 연령, 성, 체중 및 상태, 그리고 투여 경로와 같은 인자들을 고려하여 제제화 및/또는 투여될 수 있다.

[0046] 상기 조성물은 관련 기술분야에 알려져 있는 바와 같은 담체, 희석제, 부형제 (예컨대 락토스, 수크로스 및 만니톨과 같은 분말 부형제) 및 계면활성제 (예컨대 비-이온계 계면활성제)를 포함하는 제약용 용액을 포함할 수 있다. 또한, 조성물은 보존제 (예컨대 항-미생물 또는 항-세균 작용제)를 포함할 수 있다. 조성물은 또한 완충제 (예컨대 조성물의 pH를 6.5 내지 7.5 사이로 유지하기 위함)를 포함할 수 있다.

[0047] 상기 제약 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 수 있다. 예방적 투여에서, 조성물은 질환 또는 장애로부터 보호하기 위하여 면역 반응을 조절하기에 충분한 양 (즉 "예방적 유효 투여량")으로 대상체에게 투여될 수 있다. 치료적 적용에서, 조성물은 질환 또는 장애를 치료하기에 충분한 양 (즉 "치료적 유효 투여량")으로 대상체에게 투여된다.

[0048] 본원에서 개시되는 조성물은 다양한 경로를 통하여 전달될 수 있다. 통상적인 전달 경로에는 비경구 투여 (예컨대 피내, 근육내, 복막내 또는 피하 전달)가 포함된다. 다른 경로로는 비내 및 폐내 경로가 포함된다. 제약 조성물의 제제에는 액체 (예컨대 용액 및 에멀션), 스프레이 및 에어로졸이 포함될 수 있다. 특히, 상기 조성물은 비내 또는 폐내 전달을 위한 에어로졸 또는 스프레이로 제제화될 수 있다. 비내 또는 폐내 전달용 에어로졸 또는 스프레이를 투여하기에 적합한 장치에는 흡입기 및 분무기가 포함될 수 있다.

[0049] 본원에서 개시되는 조성물은 보조제, 또는 항원의 면역원성을 강화하기 위하여 항원과의 조합으로 제공되는 화학적 또는 생물학적 작용제를 포함하는 다른 면역학적인 항원 또는 백신 또는 치료 조성물과 공동-투여되거나 순차적으로 투여될 수 있다. 추가적인 치료제에는 인터류킨 및 인터페론과 같은 시토카인이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본원에서 사용될 때, "시동-추가 예방접종 요법"은 대상체가 제1 조성물을 투여받은 다음, 정해진 시간 기간 후 (예컨대 약 2, 3, 4, 5 또는 6주 후)에, 대상체가 제1 조성물과 동일하거나 상이할 수 있는 제2 조성물을 투여 받는 요법을 지칭한다. 상기 제1 조성물 (및 제2 조성물)은 1회 이상 투여될 수 있다. 개시되는 방법은 적어

도 1회 제1 조성물을 투여하는 것에 의해 제1 조성물을 사용하여 대상체를 시동접종하고, 예정된 길이의 시간이 경과되도록 한 (예컨대 적어도 약 2, 3, 4, 5 또는 6주) 다음, 동일한 조성물 또는 제2의 상이한 조성물을 투여하는 것에 의해 추가접종하는 것을 포함할 수 있다.

[0051] 본원에서 개시되는 제약 조성물의 효능을 평가하기 위해서는, 세포-매개 반응 및/또는 항체 반응의 유도를 측정하는 것에 의해 면역 반응이 평가될 수 있다. T-세포 반응은 예를 들면 세롭거나 배양된 PBMC의 사량체 염색을 사용하는 ELISPOT 검정에 의해, 또는 기능적 세포독성 검정을 사용하여 측정될 수 있는데, 관련 기술분야 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 항체 반응은 ELISA와 같이 관련 기술분야에 알려져 있는 검정에 의해 측정될 수 있다. 병원체의 역가 또는 부하는 병원체의 핵산을 검출하는 방법을 포함한 관련 기술분야의 방법들을 사용하여 측정될 수 있다 (예컨대 그 개시내용이 전체적으로 참조로서 개재되는 U.S. 특허 제7,252,937호 참조).

[실시예]

[0053] 하기 실시예들은 예시적인 것이며, 개시되는 주제를 제한하고자 하는 것은 아니다.

실시예 1 - 면역 조절용 탄수화물 강화 나노입자

서론

[0056] PLGA 나노입자는 약물 전달, 조직 및 세포 영상화, 그리고 면역 활성화 또는 관용의 유도를 돋기 위한 자가 또는 외래 단백질의 전달을 포함한 다양한 적용분야에 이용되어 왔다 (문헌 [Sah *et al.*, "Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems," International Journal of Medicine, 2013;8 747-765] 참조). 본원에서는, 관능화된 PLGA 입자를 생성시키기 위한 기술을 개발하였으며, 면역 반응을 변형시키는 데에 있어서의 그의 잠재력을 확립하였다.

실험 방법, 결과 및 논평

[0058] 본 발명자들은 처음에는 EDC 카르보디이미드 가교결합 화학을 사용하여 알레르기 단백질을 자가 세포에 결합시키고, 다시 마우스에 주입하여 관용 (즉 면역학적 비반응성의 상태)을 생성시키는, 알레르기 질환을 치료하기 위한 치료적 접근법 (문헌 [Smarr *et al.*, "Antigen-fixed leukocytes tolerate Th2 responses in mouse models of allergy," The Journal of Immunology, 11/2011; 187(1):5090-8] 참조)으로서의 세포-결합 항원 관용에 대한 본 발명자들의 연구로부터 본 분야에 접근하였다. 이를 환자에게 적용하는 것이 세포의 사용으로 인하여 복잡하였기 때문에, 대체물로서의 PLGA 나노입자의 잠재적인 용도를 조사하기 시작하였으나; 본 발명자들이 발견한 것은 PLGA 나노입자 내에 캡슐화된 항원이 다른 반응 (관용이라기보다는 탈민감화이어서, 시간이 지나면서 반응성이 회복됨)을 유도한다는 것이었다. 대식세포는 그의 인터류킨-10 (IL-10)으로 지칭되는 핵심 면역 매개체의 생성을 통한 관용을 포함한 면역 반응에 중요한 것으로 생각되는 일종의 면역세포이므로, IL-10 생성에 대한 그의 효과에 대하여 EDC-세포 대 PLGA 나노입자의 효과를 스크리닝하기 위한 시험관내 접근법을 개발하였다. 도 1에 나타낸 바와 같이, EDC-세포는 자극 (리포폴리사카라이드 (LPS)) 후 IL-10을 강화하였던 반면, PLGA 입자는 그렇지 않다는 것이 관찰되었다.

[0059] 이를 바탕으로 하여, 세포에는 존재하는 신호가 PLGA 입자에는 존재하지 않았다는 결론을 내렸으며, 그에 따라 고처리량-기반 스크린 (예반스톤 소재 노스웨스턴 HTS 코어(core)를 통하여 수행)을 개발하였다. 본 발명자들은 도 2에 개괄되어 있는 바와 같이 전염증성 반응 (IL-6) 또는 항-염증 반응 (IL-10)을 조사하였다.

[0060] 본 발명자들은 세포상에서는 발견되나 PLGA 나노입자 상에는 존재하지 않을 70종 고유 탄수화물 화합물들의 패널을 조사하였다. 도 2의 전략을 사용하여, 0.1, 1, 10 및 100 μM 의 치료적으로 적절한 투여량 곡선에 대비한 시토카인 생성의 최고 배수 변화를 계산하였다. 도 3에 나타나 있는 바와 같이, 대식세포 반응을 변형시킬 수 있었던 많은 탄수화물 화합물을 확인한 바, EDC-세포 또는 자극 단독에 비해 상향조절, 하향조절 또는 무변화 모두가 존재하여, 입자에 결합될 경우 이들이 PLGA를 관능화할 잠재력을 가지고 있음을 암시하였다. 이를 더 진행하기 위하여, 하나의 후보 (L-푸코스)를 선택하고, 2-단계 화학 과정을 사용하여 그것을 PLGA에 결합시켰다. 결합 과정은 도 4에 나타내었다.

[0061] 먼저, EDC 가교결합 반응을 사용하여 L-푸코스의 유도체 (4-아미노페닐 베타-L-푸코피라노시드)를 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 링커에 결합시켰다. 다음에, 제2 EDC 가교결합 반응을 사용하여, 이것을 카르복실화된 PLGA 나노입자에 결합시켰다. 최종 생성물의 특성화는 비결합 입자의 구형 구조 상실 및 거칠고 불규칙한 입자를 나타내었다. 푸코실화된 PLGA 나노입자 (F-CENP로 명명)의 기능적인 능력을 시험하기 위하여, 본 발명자들의 시험관내 IL-10 생성 모델에서 그의 효과를 조사하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, F-CENP는 IL-10 유도에 있어서

PLGA 단독, L-푸코스 단독 또는 심지어는 EDC-세포를 수용하는 세포에 비해 상당히 더 우수해서, 관능화된 PLGA 입자가 EDC-세포에 비해서도 향상된 것임을 암시하였다.

[0062] 실시예 2 - 식품 알레르기에서의 면역 관용의 유도를 위한 탄수화물 강화 나노입자의 개발

식품 알레르기는 식품에 대한 부정적인 면역 반응으로 정의될 수 있는데, 두드러기 및 생명을 위협하는 과민증을 포함할 수 있다. 반응의 중증도는 섭취된 식품의 양, 식품의 형태 (예컨대 날것, 조리된 것 또는 처리된 것), 그리고 연령, 민감화 정도 및 기타 동반인환 이상과 같은 위험 인자를 포함한 수많은 인자들에 따라 달라질 수 있다. 식품 알레르기는 전통적으로는 IgE-매개인 것으로 알려져 있으나, 생리학적 반응 및 증상에 있어서는 비균질성일 수 있다 (문헌 [Sicherer and Sampson, *J Allergy Clin. Immunol.* (2010) Feb;125(2 Suppl 2):S116-25]; [Berin and Mayer, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2013) Jan;131(1):14-22]; 및 [Boyce et al. (NIAID Guidelines), *J. Allergy Clin. Immunol.* (2010) Dec;126(6 Suppl):S1-58] 참조). 식품 알레르기에 연관되어 있는 면역학적 메커니즘에는 민감화 및 관용이 포함되며 (문헌 [Johnston et al., *J. Immunol.* (2014) Mar 15;192(6):2529-34] 및 도 6 참조), 식품 알레르기의 잠재적인 치료법은 탈민감화 (단기 치료법) 및/또는 관용 증가 (장기 치료법)를 위하여 항원을 투여하는 것을 포함할 수 있다 (문헌 [Berin and Mayer, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2013) Jan;131(1):14-22] 및 도 7). 탈민감화를 유도하기 위하여 마이크로입자에 캡슐화된 항원이 식품 알레르기 모델에 투여된 바 있는데, 마우스 알레르기 모델에서 항원-고정 백혈구가 반응을 관용화하는 것으로 나타난 바 있다 (문헌 [Smarr et al., *J. Immunol.* (2011) 187:5090-5098] 참조). 그러나, 이상적으로 조작된 치료제는 탈민감화 또는 관용을 유도하는 항원뿐만 아니라, 동시에 면역 시스템에 대한 관용원성 신호도 제공해야 한다. 따라서, 탈민감화 및 관용을 포함하는 알레르기 치료법을 이용할 수 있는 관용원성 신호를 확인하기 위한 방법이 바람직하다. 일단 확인되고 나면, 관용원성 신호는 임의적으로 탈민감화 및/또는 관용을 유도하기 위한 항원을 포함하는 마이크로-입자 및/또는 나노-입자의 일부로서 제제화될 수 있다. 세포자멸사 세포는 세포 표면상에 자연 관용원성 신호를 포함한다 (문헌 [Taylor et al., *Nat. Rev. Mol. Biol.* (2008) Mar;9(3):231-41] 및 도 8 참조). 단백질, 지질, 당지질 및 탄수화물을 포함하여 세포 표면상에 존재하는 화합물들은 관용의 발현에 연관되어 있을 수 있다.

알레르기 반응은 일반적으로 염증 반응을 포함하며, 염증 반응의 왜곡을 연구하기 위한 기구로는 LPS-자극 대식세포 (즉 "활성화된 대식세포")가 사용되어 왔다. 예를 들면, LPS-자극 대식세포는 IL-6, TNF- α 및 IL1 β 와 같은 전-염증성 시토카인을 분비하는데, 이러한 염증성 시토카인 분비의 조절은 염증 반응을 억제하는 화합물을 확인하는 데에 사용될 수 있다. 전-염증성 시토카인 분비의 감소, 및 IL-10/TGF β 의 증가를 특징으로 하는 RAW 264.7 대식세포에서 이와 같은 염증 반응을 억제하는 것으로 확인된 화합물에는 하기가 포함된다: 6-데하이드로진저디온; 폐이민; 아데노신; 및 사이코사포닌 A. (문헌 [Huang et al., *J. Agric. Food Chem.* (2014) Sep 17;62(37):9171-9]; [Yi et al., *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* (2013) Oct;35(5):567-72]; [Zhu et al., *Exp. Ther. Med.* (2013) May;5(5):1345-1350]; 및 [Koscso et al., *J. Leukoc. Biol.* (2013) Dec;94(6):1309-15] 참조). 따라서, 활성화된 RAW 대식세포는 관용원성 신호를 스크리닝하기 위한 모델로 사용될 수 있다.

활성화된 RAW 대식세포를 사용하여, 관용원성 신호를 확인하기 위한 고처리량 스크리닝 방법을 개발하였다 (도 2 참조). LPS에 의해 활성화된 대식세포, 그리고 화학적 가교-링커인 에틸카르보디이미드를 사용하여 처리된 비장세포 (SP) (ECDI-SP)의 존재하에 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 기준선 대비 IL-10 분비를 증가시키고/거나 기준선 대비 IL-6 분비를 감소시키는 화합물의 능력을 기준으로 칠십 (70) 종의 화합물을 시험하였다. ECDI-SP의 표면에 가교결합되는 항원은 항원-특이적 관용을 유도하기 위하여 투여될 수 있는데 (문헌 [Jenkins et al., *J. Exp. Med.* 165:302-319 (1987)] 참조), 그에 따라 ECDI-SP의 존재하에 LPS에 의해 활성화된 대식세포를 포함시켜, 화합물이 LPS에 의해 활성화된 대식세포, 및 ECDI-SP의 존재하에 LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 유사한 관용원성 신호를 나타내게 되는지를 확인하였다. 관용원성 신호를 나타내는 수많은 탄수화물 화합물을 확인하였다 (도 3a 및 3b 참조). 푸코스가 관용원성 신호를 나타내는 예시적인 탄수화물 화합물로 선택되어, 탄수화물-강화 PLGA 나노입자 (F-CENP)를 생성시키기 위하여 PLGA 중합체 코어를 갖는 나노입자에 결합되었다 (도 4 참조). 도 5에 나타낸 바와 같이, F-CENP가 IL-10 유도에 있어서 PLGA 단독, L-푸코스 단독 또는 심지어는 EDC-세포를 수용하는 세포에 비해 상당히 더 우수해서, 관능화된 PLGA 입자가 EDC-세포에 비해서도 향상된 것임을 암시하였다.

요약하자면, RAW 대식세포는 관용을 유도할 수 있는 잠재적인 화합물을 확인하기 위한 스크리닝 시스템으로 사용될 수 있었다. 70종 화합물의 예비 스크리닝은 IL-6 분비는 변화시키지 않거나 감소시키면서도 IL-10 분비를 촉진하는 데에 사용될 수 있는 몇 가지 화합물들을 밝혔다. 이러한 결과는 관용-촉진 신호가 항원을 투여하고

더 큰 효율로 관용을 유도하기 위한 치료 설계로 통합될 수 있다는 것을 표시하였다.

[0067] 실시예 3 - T1D에서의 관용 전달을 위한 LNFP III 및 GAS6 신호전달 나노입자

[0068] 배경

유형 1 당뇨병 (T1D)은 외래 인슐린 치료법을 필요로 하는 고혈당증을 초래하는 체장 β 세포의 자가반응성 T 세포-매개 과정에 의해 야기되는 자가면역 장애이다. 높은 T1D 발현 위험을 갖는 개체는 현재 인간 백혈구 항원에 대한 유전형검사와 섬 세포 자가항체의 패널에 대한 혈청학적 시험의 조합을 사용하여 확인될 수 있다.¹ 이와 같은 고위험 군에서는, 임상적 당뇨병의 급성 발병 전 또는 동안, 진행중인 β 세포-유도 자가면역성이 효과적이고도 영구적으로 억제될 수 있는 경우 나머지 β 세포가 정상혈당을 회복할 수 있도록 하는 실질적인 β 세포 질량이 여전히 존재할 수 있다.^{2,3} 조절 T 세포 (Treg)는 말초 관용을 유지하는 데에 중요한 역할을 하며, 그의 결핍은 T1D를 포함한 조절되지 않는 자가면역성과 연관되어 있다.⁴ 따라서, Treg를 직간접적으로 확장하는 면역치료법은 유망한 치료 접근법으로 보여져 왔다.⁵⁻⁷ 최근의 단계 1 임상 시험은 T1D 환자에서의 다클론 Treg 차용 전달(adoptive transfer)의 생체외 확장 및 안전성의 실현가능성을 입증하였으나⁷; 생체외 확장 Treg를 사용한 그와 같은 차용 면역치료법의 효능은 확인되어야 하는 것으로 남아 있다. 반면, 항원-특이적 Treg는 T1D에서 자가면역성을 억제하는 데에 있어서 다클론 Treg에 비해 더 유력한 것으로 생각된다.⁸⁻¹⁰ 그러나, 관련 β 세포 자가 항원이 해당 개체에서 확산되는 잘 인식되는 에피토프를 갖는 움직이는 표적이라는 것은 말할 것도 없이, 인간 치료법을 위한 항원-특이적 Treg의 생체외 확장은 고도로 노동-집약적이며 상당한 규제 및 허가상의 부담을 안고 있다.¹¹ 결론적으로, 내생 Treg의 생체내 확장을 목표로 하는 면역치료법이 더 실현가능한 것으로 보이며, 주어진 개체에 존재하는 일련의 특정 자가항원에 대하여 설계되는 원하는 항원-특이적 억제를 달성할 가능성이 더 크다. T1D에서의 면역치료법을 위한 가장 유망한 항원 후보는 인슐린 자체 및 그의 유도체이다.¹² 이상적으로는, 관련 인슐린-유래 자가항원이 다른 β 세포 자가항원으로 확산되는 효과적인 전달성 관용(infectious tolerance)¹³을 유도하는 데에 사용될 수 있다.

[0070] 본 발명자들은 자가면역성 및 동종면역성을 억제하기 위한 효과적인 관용원성 백신을 확립하였다.^{14,15} 상기 관용원성 백신은 항원-결합된 에틸렌 카르보디이미드 (ECDI)-고정 비장세포 (Ag-SP)로서 제조되며, 정맥내 (i.v.) 경로를 통하여 제공된다. 자가항원-결합된 Ag-SP의 i.v. 주사는 자가면역 당뇨병¹⁶, EAE^{17,18}, 알레르기 질환¹⁹의 마우스 모델에서; 그리고 더 최근에는 루오 랩(Luo Lab)에 의해 마우스^{20,21} 및 비-인간 영장류 양자의 동종이형 및 이종 이식 모델에서 효과적이고도 오래 지속되는 항원-특이적 관용을 유도하는 것으로 나타났었다 (미공표 데이터). 더 중요한 것은 수초 웨티드-결합 자가 세포를 사용한 이와 같은 원리를 바탕으로 한 다발성 경화증의 인간-최초 임상 시험이 동료들에 의해 최근 공개되어²², 이와 같은 신규한 관용 전략의 임상적인 실현 가능성, 안전성 및 효능을 확립하였다는 것이다. 흥미롭게도, Ag-SP-매개 관용의 두드러지는 특징은 내생 Treg의 강력한 생체내 확장이며^{15,19,23}, 비-인간 영장류에서 최근에 재현된 관찰이다.²⁴ 따라서, Ag-SP는 T1D가 있는 환자를 위한 매우 유망한 항원-특이적 관용 치료법이다.

[0071] Ag-SP를 제조하기 위해 많은 수의 환자 세포를 처리할 필요성을 모면하기 위하여, 항원 적재물의 전달을 위한 담체로서 생물조작된 나노입자 (NP)를 사용하는 연구를 최근 시작하였으며, 해당 관용원성 Ag-NP 백신의 가능성 있는 효능을 입증하는 초기 연구를 공표하였다.²⁵⁻²⁷ 그러나, 식품 알레르기 및 동종이형 섬 이식 양자의 뮤린 모델에서, 그와 같은 Ag-NP가 Ag-SP에 비해 최적-이하의 관용 효능을 갖는다는 것을 관찰하였다. 이러한 관찰로부터, Ag-NP상에는 존재하지 않는 Ag-SP에 의해 제공되는 추가적인 관용원성 신호가 존재해야 한다는 결론을 내렸다. 본 발명자들의 예비 연구를 통하여, 호스트 포식세포와의 상호작용시 (1) 렉틴 CD209 및 (2) 에페로사이티(efferocytic) 수용체 티로신 키나제 Mer (도 12a, b 및 c)를 활성화할 수 있는 두 가지 그와 같이 Ag-NP에서 빠져있는 관용원성 신호를 확인하였다. 이에 따라, CD209 및 Mer에 대한 리간드를 NP에 접합하는 것 (예컨대 직접적이거나 링커를 통한 간접적인 공유 결합을 통함)이 Ag-NP 백신의 관용원성을 상당히 강화하게 된다는 가설을 세웠다.

[0072] 본원에서, 본 발명자들은 CD209 및 Mer 이중 신호전달 리간드를 보유하는 생물조작된 NP를 개발하고, T1D에 대한 β 세포-특이적 관용을 유도하는 그의 능력을 시험할 것을 제안한다. 강력한 예비 결과, 포괄적인 실험 계

획 및 연구 팀의 상승효과를 나타내는 전문지식은 T1D에서의 관용 전달을 위한 매우 효과적인 생물조작 Ag-NP 백신의 설계를 위한 특별한 기회를 제공하였다.

[0073] 제안된 연구

[0074] 중심 가설: 도 9에 개략적으로 나타낸 바와 같이, 본 발명자들은 T1D에서의 관용 치료법을 위한 Ag-NP 전달 시스템의 효능이 하기에 의해 상당히 강화될 수 있다는 가설을 세웠다: (1) CD209 및 Mer 이중 신호전달을 위하여 NP상에 표적화 리간드들 (LNFPIII 및 GAS6)을 동시에 조작하는 것; 및 (2) 전달성 관용을 유도하기 위한 최초 질환-관련 자가항원으로서의 인슐린의 탈아미드화된 형태 (INS (Q→E))의 전달.

[0075] 구체적인 목표: 목표 1. NP 표면상에 존재하는 LNFPIII 및 GAS6를 포함하는 NP를 개발하는 것. 구체적으로, NP에 대한 LNFPIII 및 GAS6의 접합이 적절한 뮤린 포식세포에서 동시적인 표적화 및 신호전달을 초래하여 해당 포식세포의 관용원성 특징의 효과적인 유도로 이어지는지를 확인하게 된다. LNFPIII-GAS6-NP가 CD209 및 Mer 이중 신호전달을 통하여 뮤린 대식세포 (MF)에서 관용 특징을 효과적으로 유도한다는 가설을 세웠다. 목표 2. 비-비만 당뇨병 (NOD) 마우스 모델에서 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP의 관용 효능을 시험하는 것. 구체적으로, 탈아미드화된 마우스 프로인슐린과 결합된 LNFPIII-GAS6-NP의 전달이 β 세포-유도 자가면역성에 대한 강력한 관용을 초래하여 결론적으로 NOD 마우스에서 임상 당뇨병을 예방하고/거나 반전시키게 되는지를 NOD 마우스에서 확인하게 된다. INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP가 NOD 마우스에서 β 세포-유도 자가면역성을 효과적으로 억제한다는 가설을 세웠다.

[0076] 논거

[0077] 항원-특이적 관용 치료법은 특히 T1D를 위한 섬 이식의 맥락에서 루오 랩의 주안점이었다.¹⁴ 본 발명자들의 일차적인 접근법은 카르복실 활성화 작용제인 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (ECDI)의 존재하에서 아미드 결합 형성을 통하여 비장세포의 표면에 그것을 결합시키는 것 (Ag-SP)에 의해 해당 항원을 전달하는 것 (공여자)이었다.²⁰ 이와 같은 접근법은 처음에는 동료들에 의해 동물 자가면역성 모델에서의 관용 유도에 대하여 실험되었었다.²⁸ 루오 랩에서의 선구적인 연구는 동종이형 및 이종 이식에 대한 이와 같은 관용 접근법의 강력한 효능을 더 확장하였지만^{21,23,29}, 천식 및 알레르기 질환에서의 이와 같은 접근법의 효능은 브라이스 랩 (Bryce lab)에서 성공적으로 입증하였다.¹⁹ Ag-SP를 제조하기 위하여 다수의 환자 세포를 처리할 필요성을 모면하기 위하여, 본 발명자들은 최근 관용원성 항원 전달에 생물조작된 NP를 사용하는 선구적인 연구를 공표하여, 그와 같은 관용원성 Ag-NP 백신의 가능성 있는 효능을 입증하였다.²⁵⁻²⁷ 임상 이식이라는 분명한 관점에서, 본 출원에서는 본 발명자들의 연구를 하기에 의해 T1D에서의 관용 전달을 위한 고도로 효과적인 Ag-NP 백신을 개발하는 데에 초점을 두기로 계획하였다: (1) CD209 및 Mer 이중 신호전달 리간드들을 NP의 표면에 결합시키는 것; 및 (2) 전달성 관용을 유도하기 위한 최초 자가항원으로서 탈아미드화된 프로인슐린을 전달하는 것.

[0078] LNFPIII 및 GAS6-매개 관용 전달의 논거: 식품 알레르기 및 동종이형 섬 이식 양자의 뮤린 모델에서, Ag-NP가 Ag-SP에 비해 최적-이하인 관용 효능을 갖는다는 것을 관찰하였다. 예비 연구를 통하여, Ag-NP에 의해 연동되지 않은 Ag-SP에 의한 관용에 관련되는 하기 2종의 관용원성 신호전달 수용체를 확인하였다: (1) 에페로사이티 수용체 티로신 키나제 Mer (도 12a, b 및 c); 및 (2) 렉틴 CD209. 결론적으로, Mer 및 CD209의 리간드를 NP의 표면에 결합시키는 것이 Ag-NP 백신의 관용원성을 상당히 강화하게 될 것이라는 가설을 세웠다. 세포자멸사 세포의 항상성 청소에서 특수화되는 수용체 티로신 키나제 (RTK) 족에는 집합적으로 TAM RTK로 지칭되는 TYRO3, Ax1 및 Mer의 3종 구성원이 존재하는데, 후자의 2종이 면역 시스템에서 주요 TAM RTK가 된다.³⁰ 단백질 S 및 GAS6 (성장 중지-특이적 6(Growth Arrest-Specific 6))는 TAM RTK에 대한 2종의 동족 리간드이다. TAM RTK는 하기 두 가지의 알려져 있는 기능을 가지고 있다: (1) 세포자멸사 세포의 항상성 포식작용의 과정인 "에페로시 토피스(efferocytosis)"를 매개하는 것^{31,32}; 및 (2) 선천 면역 반응을 조절하는 조절 신호를 전달하는 것.^{33,34} TAM 신호전달의 결핍은 격심한 자가면역성으로 이어지는 것으로 알려져 있다.^{30,33} 외래 GAS6는 Mer 및 Ax1 양자의 티로신 자가인산화를 자극할 수 있는 반면, 단백질 S는 Mer를 통한 신호전달만을 할 수 있다.³⁵ 또한 GAS6는 특히 염증 환경에서 단백질 S³⁵에 비해 더 효율적인 포식작용을 자극한다.³⁶ CD209는 MF의 표면에 존재하는 C-유형 렉틴 수용체이다. MF에서의 그의 신호전달은 MF의 IL-10-매개 억제 기능과 연관되어 있다.³⁷ 락토-N-푸코 펜타오스 III(Lacto-N-fucopentaose III) (LNFPIII)는 CD209에 결합하여 그를 통해 신호를 전달하는³⁸ 루이스

^X(Lewis^X) 삼당류를 포함하는 자연 오당류이며, 면역조절 효과를 유도하며^{39,40}, 동종이식편 생존을 연장하고⁴¹, 이식 관용을 촉진³⁷하는 것으로 나타나 있다. 본 발명자들의 예비 연구 (도 12a)에서, CD209가 Ag-SP 주사시에 RTK Mer를 상향조절하나 Ag-NP 주사시에는 그렇지 않은 두드러진 비장 MF를 나타낸다는 것을 관찰하였다. 이러한 특징들은 GAS6 및 LNFPIII를 Mer 및 CD209 이중 신호전달, 그에 따른 Ag-NP의 관용원성을 강화하게 될 빠져있는 신호의 제공을 위한 Ag-NP로의 치료용 생물조작의 두 가지 매력적인 후보가 되게 한다.

[0079]

표적화할 최초 당뇨병-관련 자가항원으로서의 탈아미드화된 인슐린의 논거: 섬 β 세포는 생리학적 조건하에서 산화성 및 ER 스트레스에 대하여 매우 민감하기 때문에, 해당 세포에 존재하는 단백질이 다양한 변형(PTM)에 적용될 가능성을 높게 가지고 있다. 변형된 β 세포 단백질은 중추 및/또는 말초 관용 메커니즘을 통하여 자가-관용화되지 않은 신생-항원을 생성시킬 수 있으며, 그에 따라 면역 반응을 촉발하고 그와 같은 신생-항원에 대하여 유도되는 자가면역성으로 이어질 가능성이 더 크다. 세포 분할 및 질량 분광법을 사용한 3건의 최근의 연구들⁴²⁻⁴⁴에서, 인슐린이 β 세포 분비 과정에 의해 생성되는 폴리펩티드 종들의 풍부한 공급원임이 밝혀졌는데, β 세포에 대한 자가면역성을 매개하는 데에 있어서의 인슐린의 주된 역할을 입증하고 있는 기준의 문헌과 일치한다.^{12,45} 국제 단백질체 기구 데이터베이스(Global Proteome Machine Database)의 상세한 조사에 의해, 글루타민(Q)의 탈아미드화가 인슐린에서 빈번한 PTM이라는 것이 발견되었다. Q 측쇄의 탈아미드화는 효소 데아미다제에 의해 촉매촉진될 수 있거나, 또는 단백질이 산성에 노출되는 경우에 그것이 자발적으로 발생할 수 있다. 생체 내에서, 소포 산성화를 야기하는 산성화 스트레스를 경험하는 β 세포는 다량의 탈아미드화된 인슐린 단백질/펩티드를 생성시키는 테에 기여하는 환경을 제공할 가능성이 있다. 놀랍게도, 예비 연구에서, T1D 환자 및 NOD 마우스 모두에서 자연 인슐린에 대해서에 비해 탈아미드화된 (Q→E) 프로인슐린에 대하여 더 강한 체액성 (도 14a, b 및 c) 및 세포성 (데이터 미도시) 반응을 검출함으로써, 그와 같은 탈아미드화된 프로인슐린이 고도로 면역원성이라는 가설을 확인하였다. 중요한 것은 탈아미드화된 프로인슐린에 대한 그와 같은 반응이 NOD 마우스에서의 당뇨병 발병 발생률과 상당히 상관된다는 것이며 (도 14b), 현재도 T1D의 위험이 있는 소아과 군집에서 평가되고 있는 현상이다. 자연 프로인슐린에 비해 탈아미드화된 프로인슐린에 대한 더 강력한 면역 반응을 감안하여, 본원의 Ag-NP 관용 전달 접근법에서의 표적 항원으로서 탈아미드화된 프로인슐린이 사용될 경우, 관용이 더 효과적이 될 것이라는 가설을 세웠다. 흥미롭게도, 탈아미드화된 프로인슐린에 대하여 양성의 체액성 반응을 갖는 NOD 마우스로부터 수집된 하이브리도마로부터의 클로닝, 및 펩티드 어레이(peptide array)의 브로빙(probing)은 본 발명자들이 C-펩티드에서 단일 탈아미드화된 글루타민 잔기에 대하여 반응성을 맵핑하는 것을 가능케 하였다 (도 14c). 이와 같이 고도로 면역원성인 C-펩티드의 탈아미드화 서열이 표적화할 최초 자가항원 후보가 될 것이다.

[0080]

예비 데이터

[0081]

Ag-SP 세포를 통한 항원 전달은 결실 및 무반응을 통하여 Treg 세포의 상당한 확장 및 Teff 세포의 관용을 초래함. BALB/c → B6 동종이형 섬 이식 모델에서, B6 수용자에서의 -7일차 또는 +1일차 (0일차의 BALB/c 섬 이식 대비)의 ECDI-고정 공여자 (BALB/c) 비장세포 (Ag-SP)의 주사는 무기한 섬 동종이식편 생존을 초래한다.²⁰ Ag-SP 주사는 수용자의 비장, 배출 림프절 (dLN) 및 이식된 동종이식편에서 상당한 CD4⁺Foxp3⁺ Treg의 확장을 초래한다 (도 10a). 이에 따라, Ag-SP에 의해 유도되는 관용은 Ag-SP에 의한 Treg의 확장에 따라 달라지는데, Ag-SP 주사시점의 Treg의 고갈은 그의 관용 효능을 완전히 폐지하기 때문이다.²⁰ Ag-SP에 의한 Treg 확장은 본 발명자들의 자체 연구 (비공표 데이터) 및 다른 사람들의 공표된 데이터²⁴에 의해 비-인간 영장류 섬 동종이식 모델에서 최근 확인되었다. Treg 확장과 동시에, 하기 2종의 서로 다른 메커니즘에 의해 Teff 세포가 관용화된다: (1) 간접적인 특이성을 갖는 T 세포의 결실; 및 (2) 직접적인 특이성을 갖는 T 세포의 무반응.²³ 도 10b에 나타낸 바와 같이, 비장 및 dLN에서, 간접적인 공여자 특이성 (TEa TCR 트랜스제닉 T 세포의 차용 전달에 의해 인터로게이팅됨(interrogated)⁴⁶)을 갖는 T 세포는 강력한 최초 증식 (-4일차) 후 이어지는 빠른 수축 및 결실 (0일차, 7일차)을 겪음으로써, 몇 개의 그와 같은 T 세포가 7일차까지 섬 동종이식편을 침윤한다. 반면, 도 10c에 나타낸 바와 같이, 직접적인 공여자 특이성 (4C TCR 트랜스제닉 T 세포의 차용 전달에 의해 인터로게이팅됨⁴⁷)을 갖는 T 세포는 미처리 BALB/c SP의 주사에 대한 그의 증식과 비교하였을 때 제1 Ag-SP 주사에 대하여 상당히 훼손된 증식을 겪는다. 더 중요한 것은 제2 ECDI-SP 주사에 대한 그의 반응 결핍에서 드러나는 바와 같이, 나머지 4C T 세포가 더 이상 공여자 자극에 대하여 반응하지 않는다는 것이며 (우측 점선 플롯), 그것이 효과적으로 무반응화된다는 것을 표시한다. 집합적으로, 이러한 데이터는 Ag-SP가 Treg를 강력하게 확장

하면서도, Teff를 결실시키고/거나 무반응화한다는 것을 암시한다.

[0082] Ag-SP 관용에서, Treg 유도 및 염증 부위로의 이동은 골수 유래 억제 세포 (MDSC)의 확장에 따라 달라진다. Ag-SP 주사는 비장 (도 11a) 및 이식 부위 (데이터 미도시)에서의 하기 2종 골수 군집의 상당한 확장으로 이어진다: CD11b⁺Ly6C^{HI}Gr1^{INT} 세포 (Ly6C^{HI} 세포로 지칭됨) 및 CD11b⁺Ly6C^{LO}Gr1^{HI} 세포 (Gr1^{HI} 세포로 지칭됨). 이들 2종 세포 군집은 골수 유래 억제 세포 (MDSC)에 대한 표현형 유사성을 보유하며, 시험관 내에서 T 세포 증식을 억제한다.^{29,48} 중요한 것은 항-CD3/CD28 자극하에서 T 세포와 함께 공동-배양될 경우, 동종이식편 Ly6C^{HI} 및 Gr1^{HI} 세포가 Treg 세포의 유도 및 귀소화 관련되어 있는 2종의 가용성 매개체인 IL-10 및 CCL4의 상당한 생성을 유도할 수 있다는 것이다 (도 11b). 이와 같은 가능성은 뒷받침하여, 공여자 Ag-SP-처리된 수용자로부터 회수되는 동종이식편은 대조 수용자로부터의 것에 비해 Foxp3⁺ 세포의 점진적인 증가를 나타낸다 (도 11c). 결론적으로, Ly6C^{HI} 및 Gr1^{HI} MDSC의 고갈은 Ag-SP에 의한 관용 유도를 효과적으로 폐기한다.^{29,48} 집합적으로, 이러한 데이터는 MDSC의 확장이 Ag-SP에 의해 유도되는 Treg 유도 및 이동을 매개하는 중요한 단계라는 것을 암시한다.

[0083] Ag-SP에 의한 Ly6C^{HI} 및 Gr1^{HI} MDSC의 확장은 수용체 티로신 키나제 Mer에 따라 달라짐. 생체 내에서 주사된 Ag-SP를 추적하였을 때, 그것이 비장 주변부 구역에 보유되며, 이와 같은 영역에서 포식세포에 의해 내재화된다 는 것을 발견하였다.²³ 수용체 티로신 키나제 (RTK) 족 TAM (Tyro 3, Ax1, Mer)이 세포자멸사 세포의 항상성 청소와 관련되어 있기 때문에, 먼저 그것이 Ag-SP에 의해 유도되는 관용과 관련되어 있는지를 조사하였다. 도 12a에 나타낸 바와 같이, Mer 발현은 주로 세포 표면 렉틴을 발현하는 하기 2종의 비장 MF 군집에서 Ag-SP의 주사에 의해 유도된다: CD169⁺ 전이 구역 친금속성 MF 및 CD209⁺ 주변부 구역 MF. 포식세포 군집에서의 Mer 유도가 Ag-SP에 의해 유도되는 관용에서 역할을 하는지를 확인하기 위하여, Mer^{-/-} 마우스의 장점을 이용하였다. 도 12b에 나타낸 바와 같이, Ag-SP에 의해 유도되는 Ly6C^{HI} 및 Gr1^{HI} MDSC의 확장은 Mer^{-/-} 마우스에서는 상당히 둔화된다.

[0084] Ag-SP에 의한 Ly6C^{HI} 및 Gr1^{HI} MDSC의 확장은 수용체 티로신 키나제 Mer에 따라 달라짐. 생체 내에서 주사된 Ag-SP를 추적하였을 때, 그것이 비장 주변부 구역에 보유되며, 이와 같은 영역에서 포식세포에 의해 내재화된다 는 것을 발견하였다.²³ 수용체 티로신 키나제 (RTK) 족 TAM (Tyro 3, Ax1, Mer)이 세포자멸사 세포의 항상성 청소와 관련되어 있기 때문에, 먼저 그것이 Ag-SP에 의해 유도되는 관용과 관련되어 있는지를 조사하였다. 도 12a에 나타낸 바와 같이, Mer 발현은 주로 세포 표면 렉틴을 발현하는 하기 2종의 비장 MF 군집에서 Ag-SP의 주사에 의해 유도된다: CD169⁺ 전이 구역 친금속성 MF 및 CD209⁺ 주변부 구역 MF. 포식세포 군집에서의 Mer 유도가 Ag-SP에 의해 유도되는 관용에서 역할을 하는지를 확인하기 위하여, Mer^{-/-} 마우스의 장점을 이용하였다. 도 12b에 나타낸 바와 같이, Ag-SP에 의해 유도되는 Ly6C^{HI} 및 Gr1^{HI} MDSC의 확장은 억제성 단핵구 및 Treg 세포 확장의 Mer^{-/-} 마우스 유도에서는 상당히 둔화된다.^{34,35,37,41}

[0085] 나노입자 (NP)는 관용원성 항원 전달에 사용될 수 있음 (Ag-NP). 항원 전달을 단순화하고 표준화하기 위한 시도에서, 항원 전달 비히클로서 PLG NP를 이용하기 위한 시도들이 있어 왔다.^{25-27,49} 도 13a에 나타낸 바와 같이, 크기 및 전하 세부사항에 따라 PLG NP를 제조하고, 동일한 ECDI-결합 화학을 사용하여 공여자 (BALB/c) 비장세포 용해질 형태로 공여자 항원 (Ag)을 결합시킨 후, 0일차의 BALB/c 섬 세포 이식 대비 -7일차 및 +1일차에 Ag-NP를 B6 수용자에 주사하였다. 도 13b에 나타낸 바와 같이, Ag-NP 단독 ("PLG-dAg" 군)의 주사는 주변부 이식 편 보호만을 초래하였다. 따라서, Ag-NP의 사용은 이와 같은 관용 접근법의 임상적 실현가능성은 크게 강화할 수 있었지만, Ag-NP를 통한 관용 효능이 Ag-SP를 통한 것에 비해 덜 강력하였다.²⁵ 이는 상호작용하는 포식세포에서 훼손된 관용원성 신호전달을 초래하는 중요한 세포 표면 탄수화물 및 단백질 리간드가 Ag-NP에 결핍되어 있는 것에 기인한다고 가설을 세웠다.

[0086] 고-처리량 스크린은 탄수화물이 대식세포의 시토카인 생성 레퍼토리를 조절할 수 있다는 것을 입증함. ECDI-고정 NP에 관용원성 신호의 유도를 위한 신호가 결핍되어 있다는 최우선적인 개념을 바탕으로, 대식세포 세포주 (RAW264.7)에서 시토카인 반응을 조절하는 능력을 조사하였다. 이와 같은 세포주는 지금까지 관용을 위한 세포 반응을 제시하는 항원을 예측하는 데에 사용되어 왔다. LPS 첨가에 의해 IL-6 및 IL-10 양자를 발현하도록 세

포가 자극되는 384-웰 고-처리량 스크린 (HTS) 기반 접근법을 사용한 바, ECDI-고정 SP는 IL-10 생성의 상당한 증가 (도 1) 및 IL-6의 감소 (미도시)를 초래하였다. 아주 대조적으로, ECDI-처리된 NP는 비효과적이었으며, 사실상 RAW264.7 세포에 의한 IL-10 생성이 대조에 비해 감소되었다 (도 1). 이와 같은 HTS 접근법을 이용하여, 세포에 의해서는 제공되나 NP에 의해서는 그렇지 않을 수 있는 광대한 범위의 잠재적 신호들을 조사 하였으며, MF의 시토카인 생성 레퍼토리를 조절하는 그의 능력에 대하여 자연 및 합성 탄수화물 구조 모두의 패널에 초점을 맞추었다. 동시적인 IL-10의 강화와 IL-6 생성의 억제를 바탕으로, 루이스^X 항원을 포함한 몇 가지 그와 같은 놀라운 탄수화물 후보들을 성공적으로 확인하였다 (도 3a). 나아가, 과일lett 실험에서는, 푸코스의 결합이면 세포에 의한 NP 흡수를 강화하고 IL-10-왜곡 반응을 촉진하는 데에 충분하였다 (도 5).

[0087] 프로인슐린 Q→E 탈아미드화는 인간 및 마우스 양자에서 강력한 면역 반응을 도출함. 먼저 모든 해당 글루타민 (Q) 잔기나 글루타메이트 (E) 잔기로 돌연변이된 재조합 인간 프로인슐린, 또는 마우스 프로인슐린 1 및 프로인슐린 2 단백질을 합성하고, 이러한 Q→E 프로인슐린 단백질들을 사용하여 알려져 있는 T1D에 걸린 30명의 성인 환자 (도 14a), 그리고 3주령에서 시작하는 33마리의 젊은 NOD 암컷 마우스 (도 14b) 코호트의 혈청을 프로빙하였다. 도 14a에 나타낸 바와 같이, 30명의 성인 T1D 환자 중 4명이 탈아미드화된 프로인슐린에 대하여 항체 반응을 나타내었으나, 자연 (WT) 프로인슐린에 대해서는 그렇지 않았다. 유사하게, 도 14b 상부 패널에 나타낸 바와 같이, 개별 NOD 마우스들은 탈아미드화된 프로인슐린에 대해서는 항체 반응을 나타내었으나, WT 프로인슐린에 대해서는 그렇지 않았다 (나타낸 것은 탈아미드화된 뮤린 프로인슐린 1에 대한 항체 반응의 예이나, 탈아미드화된 뮤린 프로인슐린 2에 대한 반응 또는 양자 모두 역시 관찰되었음). 중요한 것은 NOD 마우스에서, 탈아미드화된 프로인슐린에 대한 체액성 반응이 당뇨병 발병의 발생률과 고도로 상관되었다는 것이다 (도 14b 저부 패널). 이와 같은 예측성 상관은 현재도 T1D의 위험이 있는 소아과 군집에서 평가되고 있다. 흥미롭게도, 탈아미드화된 프로인슐린에 대하여 양성의 체액성 반응을 갖는 NOD 마우스로부터 수집된 하이브리도마로부터의 클로닝, 그리고 도 14c에 예시되어 있는 바와 같은 웹티드 어레이의 프로빙은 C-웹티드 내에서 단일 탈아미드화된 글루타민 잔기에 대하여 체액성 반응성을 맵핑하는 것을 가능케 하였다: 서열 GGGPGAGDLET (서열식별번호: 4)에 대하여 상관되는 스폿 Y19, 20, 22.

연구 설계 및 방법

[0089] 목표 1. LNFPIII 및 GAS6 수식 NP를 개발하는 것

[0090] 목표 1A. LNFPIII-GAS6-NP의 설계 및 제조. 먼저 문헌 [Bryant *et al.*]²⁵에서 이전에 기술된 바와 같은 단일 에멀션 기술을 사용하여 직경이 대략 500 nm인 폴리(락티드-co-글리콜리드 (1:1)) (PLG) 나노입자를 제조하게 된다. 0.05 또는 0.1 M NaOH를 사용하여 나노입자의 표면을 부분적으로 가수분해하여, 입자의 표면을 판능화하고 항원을 결합시키는 데에 가용한 카르복실 기의 밀도를 증가시키게 된다. 변형은 NP 제타 전위를 측정하는 것은 물론, 톨루이딘 블루를 사용하여 카르복실 함량을 정량하는 것에 의해 모니터링되게 된다.⁵⁰ 카르보디이미드 화학 (ECDI)을 사용하여 NP상의 카르복실 기를 활성화하고, NP 표면상에 말레이미드 기를 제공하기 위하여 N--말레이미도프로피온산 히드라지드 (BMPH)와 반응시키게 되는데, 그것은 "클릭(click)" 화학에서 이용되는 티올기에 대하여 반응성이다.⁵¹ 시스테인을 사용하여 리간드 LNFPIII 및 GAS6을 유도체화하여, 말레이미드-판능화된 NP에 대한 그의 공유 결합을 가능케 할 티올 기를 제공하게 된다. LNFPIII와 Cys 사이의 환원성 아미노화를 통하여, LNFPIII-Cys를 합성하게 된다.⁵² HEK 293T 세포 중 His6 태그를 사용한 재조합 DNA 기술을 통하여 말단 Cys를 갖는 GAS6을 합성하고, Ni-NTA 비드를 사용한 친화성 크로마토그래피를 통하여 단리한 후, 이어서 이전에 기술된 바와 같이 하이트랩(HiTrap) Q FF 이온 교환 컬럼 (GE 헬스케어(Healthcare) 사)에서 정제하게 된다.³⁶

[0091] 클릭 화학을 통하여, LNFPIII-Cys 및 GAS6-Cys 양자를 PLG-NP에 결합시키게 된다.⁵¹ RAW264.7 MF 검정 (하기 목표 1B에서 상세하게 기술됨)에 의해 측정하였을 때 클릭 화학을 사용하여 예측되는 결과가 수득되지 않는 경우, 대안적으로 카르보디이미드 화학을 통하여 PLG NP가 스트렙타비딘으로 판능화되게 된다. 이후 스트렙타비딘-PLG NP를 바이오티닐화된 LNFPIII 및 GAS6와 반응시키게 된다. 결합 반응 전 및 후에 상청액 중 단백질 및 탄수화물을 정량하는 것에 의해, 리간드의 결합 효율이 측정되게 된다. 또한, GAS6 및 LNFPIII에 특이적인 표지된 항체를 통하여, NP 표면상의 단백질 및 탄수화물이 검출되게 된다.

[0092] PLG 플랫폼을 사용한 활성화가 RAW264.7 MF 검정 (하기 목표 1B에서 상세하게 기술됨)에 의해 측정하였을 때 최적 이하인 경우, 전달 기반으로서의 폴리(폴리에틸렌 글리콜 시트레이트-co-N-이소프로필아크릴아미드) (PPCN)의 사용을 조사하게 된다. PPCN은 생체적합성이며 단백질을 느리게 전달할 수 있는 것으로 나타난 발전된 열반

응성의 생분해성 거대분자이다.⁵³ 이와 같은 거대분자는 관능화될 수 있으며 매우 온건한 조건하에서 직경 대략 200-300 nm의 NP를 용이하게 형성할 수 있는 높은 밀도의 카르복실 기를 보유한다. 리간드는 상기에서 PLG NP에 대하여 기술된 것과 동일한 클릭 화학을 사용하여 PPCN에 접합될 수 있다. PPCN을 사용하는 것의 잠재적인 장점은 거대분자의 리간드에의 직접적인 접합, 및 리간드-관능화 PPCN의 자가-조립을 통한 NP의 형성으로 인한 NP 표면에서의 상당히 더 높은 리간드 밀도의 제시이다.

[0093] 목표 1B. RAW264.7 MF에서의 시토카인 조절에 의한 LNFPIII-GAS6-NP의 스크리닝. 목표 1A에서와 같이 개발된 LNFPIII-GAS6-NP는 도 2에 나타낸 바와 같이 RAW264.7 세포주 대식세포와의 공동-배양 시스템을 사용하여 스크리닝되게 된다. 가변적인 파라미터들 (접합 방법 (클릭 화학 대 바이오틴-스트렙타비딘), 중합체 물질 (PLG 대 PPCN))을 갖는 LNFPIII-GAS6-NP를 순차적으로 제조하고, 그에 따라 롤링(rolling) 기준으로 시험하게 될 것으로 예상한다. 각 LNFPIII-GAS6-NP 종을 72시간 동안 LPS 자극 (MF + LNFPIII-GAS6-NP + LPS)의 존재하에서 RAW264.7 MF와 함께 공동-배양하게 된다. 생성되는 상청액을 ELISA에 의해 IL-10 및 IL-6에 대하여 측정하게 된다. 대조 공동-배양은 하기를 포함하게 된다: (1) MF 단독; (2) MF + LPS; (3) MF + 비개질 NP; (4) MF + 비개질 NP + LPS; 및 (5) MF + LNFPIII-GAS6-NP. 대조 조건 #2의 IL-10/IL-6 비를 기준선으로 간주하게 된다. 기준선을 초과하는 IL-10/IL-6 비는 "양성"으로 스크리닝된 것으로 간주하게 되는 반면; 기준선 미만인 비는 "음성"으로 스크리닝된 것으로 간주하게 된다. RAW264.7 MF 세포주로부터 수득된 결과를 부수적으로 뒷받침하기 위하여, 스크리닝된 "양성" LNFPIII-GAS6-NP 종은 또한 유사한 공동-배양 시스템에서 일차 뮤린 골수 유래 MF를 사용하여 확인되게 된다.

[0094] 목표 1C. "양성" LNFPIII-GAS6-NP를 스크리닝하기 위한 항원 적재. 목표 2에서 제안된 실험을 위하여 하기 3종의 가능한 β 세포 항원을 적재하게 된다: 탈아미드화된 프로인슐린 웨티드 "GGGPGAGDLETLALE (서열식별번호: 2)" (도 14c), 탈아미드화된 전체 프로인슐린, 또는 전체 MIN6 (β 세포주) 세포 용해질. "양성" LNFPIII-GAS6-NP 종을 스크리닝하기 위한 항원 적재용으로 두 가지 방법을 시험하게 된다. 첫 번째 방법은 이전에 기술한 바와 같은 ECDI 화학을 사용하여 나노입자의 표면에 웨티드/단백질 항원을 결합시키는 것일 것이다.²⁵ 입자에 결합되는 웨티드/단백질의 양은 결합 반응 전 및 후에 상청액 중 항원을 정량하는 것에 의해 측정하게 된다. 결합 효율 또는 RAW264.7 MF와의 그의 상호작용 중 어느 하나가 최적 이하인 경우, 입자 내에서의 항원의 캡슐화가 더 효율적일 것인지도 시험하게 된다. 캡슐화된 웨티드를 사용하여 형성되는 PLG 입자는 자가면역 뇌염의 모델에서 효과적이었다.⁵⁴ 항원은 단일 에멀션 과정과 유사한 직경 및 전하 (500 nm, ζ 전위 = -60 mV)를 갖는 입자를 생성시킬 것을 목표로 하는 이중 에멀션 과정을 통하여 PLG 또는 PPCN 입자에 캡슐화되게 된다. 캡슐화를 위한 중합체 조성 및 평균 분자량 (고유 점도에 의해 특성화될 때의 것)을 시험하게 되는데, 이러한 특성들이 NP의 안정성에 영향을 주며, 그에 따라 캡슐화된 항원의 세포 내재화 및 방출 양자에 영향을 주게 되기 때문이다.⁵⁵ 입자 크기 및 제타 전위의 분포는 제타사이저(zetasizer)를 사용하여 측정하게 된다. 입자 내에 캡슐화되는 웨티드/단백질의 양은 이후의 CBQCA 검정을 사용한 분석을 위하여 항원-적재 NP를 DMSO에 용해시키는 것에 의해 정량하게 된다.⁵⁶

[0095] 예상 결과, 잠재적인 위험 및 대안적인 접근법. LNFPIII 및 GAS6를 NP에 접합시키는 것은 그의 MF와의 관용원성 상호작용을 상당히 강화하여 바람직한 IL-10/IL-6 생성 비로 이어지게 될 것으로 예상한다. 가변적인 접합 방법 (클릭 화학 대 바이오틴-스트렙타비딘), 중합체 물질 (PLG 대 PPCN), 항원 적재 방법 (가교결합 대 캡슐화), β 세포 항원의 선택 (프로인슐린 웨티드 대 전체 단백질 대 전체 β 세포 용해질)을 사용하여 일련의 MF IL-10/IL6 생성 비를 갖는 Ag-LNFPIII-GAS6-NP 종들의 라이브러리를 생성시키게 될 것으로 예상한다. 최상의 성능을 갖는 것이 목표 2에서 제안되는 실험용으로 선택될 것이다. 모든 변이의 군에 걸쳐 최적 이하 IL-10/IL-6 생성 비가 관찰되는 경우, 한 가지 추가적인 고려사항은 GAS6의 GLA 도메인에 포스파티딜세린 (PS)을 결합시키는 것에 의해 GAS6 신호전달을 강화하는 것이다.³² 이는 중량비 1:10 (PS:중합체)으로의 PS 첨가를 사용하는 에멀션 과정에 의한 PLG 또는 PPCN 입자 상에의 PS의 도입에 의해 실행될 수 있다.⁵⁷ PS는 카르복실산 헤드 기 및 알킬 테일을 가지며, 그에 따라 중합체 입자 상에의 도입 및 ECDI 결합 또는 캡슐화를 통한 항원 적재 모두를 위한 관능기들을 보유한다.

[0096] 목표 2. NOD 마우스 모델에서 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP의 관용 효능을 시험하는 것

[0097] 목표 2A: 관용원성 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신에 의한 NOD에서의 당뇨병의 예방 및 치료. 마우스 모델. 본 발명자들은 2종의 NOD 모델을 사용하게 된다. 첫 번째 모델 ("예방" 모델)에서는, 하기 2종 연령의 코호트

를 처리하게 된다: 5-주령 및 9주령 암컷 NOD 마우스. 양 연령 군에서, 전-염증성 면역 세포 침윤의 존재에 의해 입증되는 바와 같이 췌장에서의 염증 반응이 이미 시작되었으나, 혈당 수준은 아직 정상 범위 내에 있다. 이에 따라, 그들은 당뇨병-전기이다. 이러한 당뇨병-전기 NOD 마우스가 당뇨병을 발현시키는 것을 예방할 수 있는지를 확인하기 위하여, 최고인 것으로 확인된 제제 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 처리 (목표 1에 따름)를 적용하게 된다. INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 처리 후, 30주령까지 혈당 수준에 대하여 마우스를 모니터링하게 된다. 두 번째 모델 ("치료" 모델)에서는, 12주령에서 시작하여 주당 2회의 스크리닝에 의해 방금 고혈당증이 된 것으로 확인된 급성 당뇨병 (12-30-주령) NOD 마우스를 사용하게 된다. 고혈당증의 급성 발병 3-5일 이내에, INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 처리를 적용하게 된다. 이와 같은 단계에서는, 상당한 β 세포 질량이 아직 해당 NOD 마우스에 남아 있어서, 면역치료법을 사용한 자가면역성의 효과적인 억제가 남아있는 β 세포의 기능 회복 및 결과적인 당뇨병의 반전으로 이어질 수 있다.⁵⁸ INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 처리를 급성 당뇨병 NOD 마우스에 적용하고, 해당 마우스에서 당뇨병을 반전시킬 수 있는지를 확인하게 된다. 당뇨병 반전을 확인하기 위한 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 처리 후에는, 총 60일 동안 혈당 수준에 대하여 마우스를 모니터링하게 된다.

[0098]

INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 치료. NOD 마우스의 생체내 치료용으로 표적화된 항원을 적재하기 위하여, 치료적인 양으로 RAW264.7 MF와의 공동-배양시 강력한 IL-10/IL-6 생성 비를 갖는 NP 종들을 제조하게 된다. 먼저, 도 14c에서 표적화되는 항원으로 확인된 중요한 탈아미드화 부위를 포함하는 15-aa 프로인슐린 웨티드 "GGGPGAGDLETLALE" (서열식별번호: 2)를 시험하게 된다. 상기 15-aa INS(Q→E) 웨티드는 LNFPIII-GAS6-NP의 표면에 결합되는 것 (ECDI-매개 가교결합을 통함⁵⁴), 또는 LNFPIII-GAS6-NP 내에 캡슐화되는 것 중 어느 하나이게 된다. 가교결합과 캡슐화 사이의 선택은 목표 1C에서 확인되는 바와 같은 항원 적재 효율을 기준으로 결정되게 된다. 3 mg의 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP를 3종 연령 군 (5-주, 9-주 또는 급성 당뇨병)의 암컷 NOD 마우스에 i.v.로 주사하게 된다. 대조 마우스는 자연 프로인슐린 웨티드 ("GGGPGAGDLQTLALE" (서열식별번호: 3))가 적재된 LNFPIII-GAS6-NP, 미적재 LNFPIII-GAS6-NP 또는 NP가 없는 것으로 주사된 연령-일치 암컷 NOD 마우스들이 되게 된다. 이들 대조 군들은 하기를 확인하는 것을 가능케 해주게 된다: (1) 미적재 LNFPIII-GAS6-NP가 CNS 감염 및 심장 허혈 모델²⁷에서 기술되었던 바와 같이 그 자체로 소정의 질환 변형 효과를 가지게 되는지; 및 (2) 탈아미드화된 프로인슐린 웨티드를 표적화하는 것이 자연 프로인슐린 웨티드를 표적화하는 것에 비해 더 효과적인지. 실험 군 (INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP로 처리된 것)이 탁월한 당뇨병 억제를 입증하는 경우, 4주마다의 효과적인 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신의 다수 주사가 지속적인 질환 억제를 위한 추가적인 이점을 가지게 되는지도 시험하게 된다. 본 교부금의 일정 (2년) 이내에 제안된 실험들을 완료하기 위해서는, 다수의 유망한 NP 종들을 롤링 기준으로 시험할 필요가 있을 것으로 예상하는데, 상기에서 정의된 바와 같은 IL-10/IL-6 해독치를 충족하도록 그것이 개발 및 확인되기 때문이다.

[0099]

T1D용의 관용원성 LNFPIII-GAS6-NP 백신으로 시험될 추가적인 자가항원들. "GGGPGAGDLETLALE" (서열식별번호: 2) 프로인슐린 웨티드 이외에, 특히 자가-항원성이 다른 에피토프로 확산되었을 수 있는 질환의 후기 단계 동안 효과적인 관용^{22,59}을 달성하기 위하여 다수 자가항원들의 풀이 포함될 필요가 있게 될 가능성도 있다. 이에 따라, INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP가 특히 더 고령의 마우스에서 질환 "돌파(breakthrough)"를 나타내는 경우, 동일한 LNFPIII-GAS6-NP 비히클을 사용하여 추가적으로 가능한 자가항원을 전달하게 된다. 관용원성 LNFPIII-GAS6-NP 전달을 통하여 시험될 추가적으로 가능한 자가항원은 하기이다: (a) 탈아미드화된 전체 인슐린: 해당 자연 형태의 전체 인슐린이 NOD 마우스의 관용 치료법에서 입증된 효능을 갖는 것으로 나타나 있으며^{16,59}, 본 발명자들의 예비 결과 (도 14b)상 탈아미드화된 전체 인슐린에 대한 제고된 면역 반응이 입증되어 있기 때문에, 탈아미드화된 전체 인슐린 (전체 해당 글루타민 (Q) 잔기가 글루타메이트 (E) 잔기로 돌연변이 되어 있는 재조합 마우스 프로인슐린 1 및 프로인슐린 2 단백질)도 LNFPIII-GAS6-NP에 의해 전달되는 자가항원으로서 시험하게 되는데, 확장된 에피토프 영역을 갖는 그와 같은 탈아미드화된 프로인슐린이 "GGGPGAGDLETLALE" (서열식별번호: 2) 단독의 것에 비해 더 우수한 관용 효능을 나타내는지를 확인하기 위해서이다. (b) 전체 β 세포 용해질: 해당 β 세포에서 SV40의 대형 T-항원을 발현하는 트랜스제닉 마우스로부터 유래된 인슐린종 세포주 MIN6로부터의 전체 β 세포 용해질을 제조하게 된다.⁶⁰ 전체 β 세포 용해질은 ECDI 가교결합 (이식 항원에 대하여 공여자 세포 용해질을 사용하여 이전에 수행한 바와 같음²⁵)을 통하여 표면에 결합되는 것, 또는 LNFPIII-GAS6-NP 내에 캡슐화되는 것 중 어느 하나이게 된다. 가교결합과 캡슐화 사이의 선택은 목표 1C에서 기술되는 바와 같은 항원 적재 효율을 기준으로 유사하게 결정되게 된다. 당뇨병전기 및 급성 당뇨병 암컷 NOD 마우스에 β 세포 용해질-LNFPIII-GAS6-NP를 주사되게 되며, 각각 당뇨병 예방 및 당뇨병 반전에 대하여 마우스를 모니터링하게 된

다.

[0100] 실험 해독. 당뇨병 예방 군 (당뇨병-전기 NOD 마우스)에 대하여, INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 처리 후 마우스가 30주령에 도달할 때까지 주당 2회 혈당 수준을 점검하게 된다. 당뇨병을 발현하는 마우스의 백분율을 대조 군의 것과 비교하게 된다. 당뇨병 치료 군 (당뇨병 NOD 마우스)의 경우, 총 60일 동안의 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 처리 후 주당 2회 혈당 수준을 점검하게 된다. 정상혈당을 회복하는 마우스의 백분율을 대조 군의 것과 비교하게 된다. 실험 종료시, 섬 크기, 수 및 구조, 그리고 염증 세포 침윤의 췌장 조사를 위하여 NOD 마우스를 희생시키게 된다.

[0101] 목표 2B: 관용원성 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신에 의한 보호의 메커니즘 확인. MDSC의 확장. 생체 내에서의 MDSC 및 Treg의 확장, 그리고 Teff의 억제에 대한 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신의 효과를 조사하게 된다. 비장 및 췌장에서의 $CD11b^+ Ly6C^{HI} Gr1^{INT}$ (LyC^{HI}) 세포 및 $CD11b^+ Ly6C^{LO} Gr1^{HI}$ ($Gr1^{HI}$) 세포의 확장에 대하여 처리 및 대조 NOD 마우스를 조사하게 된다. 처리 및 대조 NOD 마우스의 비장 및 췌장으로부터 단리된 $Ly6C^{HI}$ 또는 $Gr1^{HI}$ 세포를 72시간 동안 항 CD3/CD28에 의해 자극된 미접촉 NOD T 세포와 함께 공동-배양하게 된다. CFSE 회색에 의해 T 세포 증식의 억제를 확인하게 된다. 도 11b에 나타낸 바와 같이 ELISA에 의해 배양 상청액 중 IL-10 및 CCL4의 생성을 측정하게 되며, $Ly6C^{HI}$ 또는 $Gr1^{HI}$ 와의 공동-배양 후 $Foxp3^+$ 세포를 계수하는 것에 의해 Treg의 확장을 확인하게 된다.

[0102] 자가항원-특이적 $CD4^+ Foxp3^+$ Treg의 확장. 변형된 프로인슐린 웨티드 "GGGPGAGDLETALLE" (서열식별번호: 2)에 대해 특이성을 갖는 항원-특이적 $CD4^+ Foxp3^+$ Treg의 유도 또는 확장에 대하여 처리 및 대조 NOD 마우스를 조사하게 된다: (a) INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 처리 후 일련의 시점에서 $CD4^+ Foxp3^+$ Treg의 총 수에 대하여 췌장 DLN 및 비장을 조사하게 된다 (FACS에 의함); (b) "GGGPGAGDLETALLE" (서열식별번호: 2) 웨티드, 또는 관련이 없는 OVA 웨티드, 또는 항-CD3 항체 (총-TCR 자극)를 사용하여 췌장 DLN 또는 비장으로부터의 정제된 총 $CD4^+$ T 세포 (Treg 및 비-Treg)를 자극하게 된다. 자극-후, 항원-특이적 방식으로 Treg의 확장이 발생하였는지를 확인하기 위하여 $CD4^+ Foxp3^+$ Treg를 계수하게 된다. (c) 동일한 "GGGPGAGDLETALLE" (서열식별번호: 2) 웨티드, 또는 관련이 없는 OVA 웨티드, 또는 항-CD3 항체 (총-TCR 자극)를 사용하여 췌장 DLN 또는 비장으로부터의 강화된 $CD4^+ CD25^+$ T 세포 (비-Treg)를 자극하게 된다. 자극-후, 항원-특이적 방식으로 Treg의 유도가 발생하였는지를 확인하기 위하여 $CD4^+ Foxp3^+$ T 세포를 계수하게 된다.

[0103] 자가항원-특이적 이펙터 T 세포 (Teff)의 억제. 처리 및 대조 NOD 마우스를 하기와 같이 자가항원-특이적 Teff 세포 기능에 대하여 조사하게 된다: (a) INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 처리 후 일련의 시점에서 CD4 또는 CD8, IFN- γ 또는 IL-17 생성 세포에 대하여 췌장 DLN 및 비장을 조사 및 계수하게 된다 (FACS에 의함); (b) "GGGPGAGDLETALLE" (서열식별번호: 2) 웨티드, 또는 관련이 없는 OVA 웨티드, 또는 항-CD3 항체 (총-TCR 자극)를 사용하여 췌장 DLN 또는 비장으로부터의 강화된 총 $CD4^+$ T 세포 (Treg 및 비-Treg)를 자극하게 된다. 자극-후, CFSE 회색에 의해 T 세포 증식을 확인하게 되며, 배양 상청액의 ELISA 검정에 의해 IFN- γ , IL-17 및 IL-4를 포함한 T 세포-유래 전염증성 시토카인들을 확인하게 된다; (c) "GGGPGAGDLETALLE" (서열식별번호: 2) 웨티드, 또는 관련이 없는 OVA 웨티드, 또는 항-CD3 항체 (총-TCR 자극)를 사용하여 췌장 DLN 또는 비장으로부터의 정제된 $CD4^+ CD25^-$ T 세포 (비-Treg)를 자극하게 된다. 자극-후, 증식 및/또는 염증성 시토카인 생성이 다시 미처리 마우스로부터의 T 세포 수준으로 증가되는지를 확인하기 위하여 Treg 부재하에서의 T 세포 증식 및 T 세포-유래 시토카인을 측정하게 된다.

[0104] 예상 결과, 잠재적인 위험 및 대안적인 접근법. INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신으로 처리되면, 당뇨병이 당뇨병-전기 NOD 마우스에서는 예방되고, 급성 당뇨병 NOD 마우스에서는 반전될 것으로 예상한다. 또한, 탈아미드화된 프로인슐린 또는 프로인슐린 웨티드가 관용을 유도함에 있어서 그의 변형되지 않은 상대물에 비해 더 효과적일 것으로 예상한다. 마지막으로, 당뇨병의 후기 단계에서는, 전체 β 세포 용해질과 같은 더 광범위한 항원 풀을 사용하는 관용이 단일 단백질/웨티드 백신 단독에 비해 더 효과적일 수 있다. 보호된 NOD 마우스는 보존된 섬 구조 및 감소된 췌도염을 나타내게 된다. 또한, 관용원성 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신으로 처리된 NOD 마우스에서는, 자가항원 특이성을 입증하는 더 많은 수의 Treg가 관찰될 것으로 예상한다. 반대로, 자가항원-자극되나 비-특이적 항-CD3 자극되지는 않는 경우, 이펙터 T 세포 증식 및 전염증성 시토카인 생성이 처리된

마우스에서 억제되게 될 것이며, 이와 같은 억제는 Treg-의존성일 것이다. 관용원성 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신은 이중으로 자가항원-특이적 Treg는 유도하고 자가항원-특이적 Teff는 억제하는 것에 의해 면역 시스템을 재프로그래밍할 것으로 예측된다. 상기언급된 실험 연구로부터 획득된 발견 및 지식은 T1D에 걸린 환자를 위한 임상 환경으로 본 발명자들의 접근법을 옮기는 데에 역학적 및 실제적 기초를 제공하게 될 것으로 예측된다. INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신이 당뇨병-전기 및 급성 당뇨병 단계 동안 자가면역성을 억제하는 데에 있어서 장래성 있는 효능을 입증하는 경우, 제안된 2년간의 편당 기간 이후의 향후 연구는 하기를 추가적으로 조사하도록 설계될 것이다: (1) 본 발명자들이 이전에 공표한 바와 같은⁵⁸ NOD 동계 섬 이식 모델을 사용하는 것에 의한 후기 당뇨병 단계; (2) 인슐린-특이적 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신에 의해 다른 항원 특이성을 갖는 T 세포 (예컨대 NOD 8.3⁶¹ (IGRP에 특이적임) 또는 NOD BDC2.5⁴⁵ (ChgA에 특이적임) T 세포)의 관용을 조사하는 것에 의한, 전달성 관용의 유도. INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 백신이 NOD 마우스에서 부분적인 효능만을 입증하는 경우, Treg/Teff의 균형을 조절쪽으로 더 기울일 수 있는 추가적인 저투여량 IL-2 또는 라파마이신과 같은 조합 치료법을 고려하게 된다.

[0105] 본 목표를 해소하게 될 대안적인 접근법들에 대비한 장점. 현재의 T1D용 항원-특이적 면역치료법은 대부분 항원만을 포함하며, 그에 따라 제한된 효능을 가지고 있다. LNFPIII-GAS6-NP를 통하여 β 세포 신생-자가항원을 전달하는 본 발명자들의 접근법은 호스트 포식세포에 표적화된 관용원성 신호를 제공하고, MDSC 및 항원-특이적 Treg와 같은 내생 억제 세포 군집을 확장하며, 궁극적으로 관용 효능을 강화하게 되면서도, 여전히 Ag-NP 백신의 제조 단순성은 유지한다. 또한, 그것은 다른 자가면역 및 알레르기 이상에 대하여 광범위한 적용 가능성을 갖는 기반 기술을 제공한다.

[0106] JDRF 교부금 제안이 편당되어야 하였기 때문에, 제안된 연구는 T1D 치료 생성물의 개발 및 허가에 초점을 맞춘 산업 협력의 확립으로 이어지게 될 가능성이 매우 크다. 제안된 편당 기간의 첫 해 이내에, 산업체의 파트너를 연계해 줄 INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP 관용원성 백신의 제조 및 치료 효능에 대한 충분한 예비 데이터를 얻게 될 가능성이 크다.

[참고문헌]

- [0108]** 1. Brorsson CA, Onengut S, Chen WM, *et al.* Novel Association Between Immune-Mediated Susceptibility Loci and Persistent Autoantibody Positivity in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2015;64:3017-27.
- [0109]** 2. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, *et al.* Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2007;297:1568-76.
- [0110]** 3. Moole H, Moole V, Mamidipalli A, *et al.* Spontaneous complete remission of type 1 diabetes mellitus in an adult - review and case report. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 2015;5:28709.
- [0111]** 4. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* 2005;6:345-52.
- [0112]** 5. Tan T, Xiang Y, Chang C, Zhou Z. Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014;47:234-43.
- [0113]** 6. Pham MN, von Herrath MG, Vela JL. Antigen-Specific Regulatory T Cells and Low Dose of IL-2 in Treatment of Type 1 Diabetes. *Frontiers in immunology* 2015;6:651.
- [0114]** 7. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, *et al.* Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science translational medicine* 2015;7:315ra189.
- [0115]** 8. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, *et al.* In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 2004;199:1455-65.
- [0116]** 9. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 2004;199:1467-77.
- [0117]** 10. Bluestone JA, Tang Q. Therapeutic vaccination using CD4+CD25+ antigen-specific regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101 Suppl

2:14622-6.

- [0118] 11. Luo X, Herold KC, Miller SD. Immunotherapy of type 1 diabetes: where are we and where should we be going? *Immunity* 2010;32:488-99.
- [0119] 12. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, *et al*. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 2005;435:220-3.
- [0120] 13. Kendal AR, Waldmann H. Infectious tolerance: therapeutic potential. *Current opinion in immunology* 2010;22:560-5.
- [0121] 14. McCarthy DP, Bryant J, Galvin JP, Miller SD, Luo X. Tempering allorecognition to induce transplant tolerance with chemically modified apoptotic donor cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2015;15:1475-83.
- [0122] 15. Miller SD, Turley DM, Podojil JR. Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease. *Nature reviews Immunology* 2007;7:665-77.
- [0123] 16. Fife BT, Guleria I, Gubbels Bupp M, *et al*. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *The Journal of experimental medicine* 2006;203:2737-47.
- [0124] 17. Turley DM, Miller SD. Peripheral tolerance induction using ethylenecarbodiimide-fixed APCs uses both direct and indirect mechanisms of antigen presentation for prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007;178:2212-20.
- [0125] 18. Chen G, Sun H, Yang H, *et al*. The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy. *Transplantation* 2006;81:273-83.
- [0126] 19. Smarr CB, Hsu CL, Byrne AJ, Miller SD, Bryce PJ. Antigen-fixed leukocytes tolerize Th2 responses in mouse models of allergy. *J Immunol* 2011;187:5090-8.
- [0127] 20. Luo X, Pothoven KL, McCarthy D, *et al*. ECDI-fixed allogeneic splenocytes induce donor-specific tolerance for long-term survival of islet transplants via two distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:14527-32.
- [0128] 21. Wang S, Tasch J, Kheradmand T, *et al*. Transient B-cell depletion combined with apoptotic donor splenocytes induces xeno-specific T- and B-cell tolerance to islet xenografts. *Diabetes* 2013;62:3143-50.
- [0129] 22. Lutterotti A, Yousef S, Suttek A, *et al*. Antigen-specific tolerance by autologous myelin Peptide-coupled cells: a phase 1 trial in multiple sclerosis. *Science translational medicine* 2013;5:188ra75.
- [0130] 23. Kheradmand T, Wang S, Bryant J, *et al*. Ethylenecarbodiimide-fixed donor splenocyte infusions differentially target direct and indirect pathways of allorecognition for induction of transplant tolerance. *J Immunol* 2012;189:804-12.
- [0131] 24. Lei J, Kim JI, Shi S, *et al*. Pilot Study Evaluating Regulatory T Cell-Promoting Immunosuppression and Nonimmunogenic Donor Antigen Delivery in a Nonhuman Primate Islet Allogeneic Transplantation Model. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2015;15:2739-49.
- [0132] 25. Bryant J, Hlavaty KA, Zhang X, *et al*. Nanoparticle delivery of donor antigens for transplant tolerance in allogeneic islet transplantation. *Biomaterials* 2014;35:8887-94.
- [0133] 26. Getts DR, Martin AJ, McCarthy DP, *et al*. Microparticles bearing encephalitogenic peptides induce T-cell tolerance and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature biotechnology* 2013;31:565.
- [0134] 27. Getts DR, Terry RL, Getts MT, *et al*. Therapeutic inflammatory monocyte modulation using immune-

modifying microparticles. *Science translational medicine* 2014;6:219ra7.

[0135] 28. Getts DR, McCarthy DP, Miller SD. Exploiting apoptosis for therapeutic tolerance induction. *J Immunol* 2013;191:5341-6.

[0136] 29. Chen G, Kheradmand T, Bryant J, et al. Intragraft CD11b(+) IDO(+) cells mediate cardiac allograft tolerance by ECDI-fixed donor splenocyte infusions. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2012;12:2920-9.

[0137] 30. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nature reviews Immunology* 2008;8:327-36.

[0138] 31. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 2001;411:207-11.

[0139] 32. Lemke G, Burstyn-Cohen T. TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1209:23-9.

[0140] 33. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 2001;293:306-11.

[0141] 34. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 2007;131:1124-36.

[0142] 35. Zagorska A, Traves PG, Lew ED, Dransfield I, Lemke G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nature immunology* 2014;15:920-8.

[0143] 36. Bhattacharyya S, Zagorska A, Lew ED, et al. Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors. *Cell host & microbe* 2013;14:136-47.

[0144] 37. Conde P, Rodriguez M, van der Touw W, et al. DC-SIGN(+) Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance. *Immunity* 2015;42:1143-58.

[0145] 38. Meyer S, van Liempt E, Imbert A, et al. DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-LewisY glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:37349-59.

[0146] 39. Srivastava L, Tundup S, Choi BS, Norberg T, Harn D. Immunomodulatory glycan lacto-N-fucopentaose III requires clathrin-mediated endocytosis to induce alternative activation of antigen-presenting cells. *Infection and immunity* 2014;82:1891-903.

[0147] 40. Tundup S, Srivastava L, Norberg T, Watford W, Harn D. A Neoglycoconjugate Containing the Human Milk Sugar LNFPIII Drives Anti-Inflammatory Activation of Antigen Presenting Cells in a CD14 Dependent Pathway. *PLoS one* 2015;10:e0137495.

[0148] 41. Dutta P, Hullett DA, Roenneburg DA, et al. Lacto-N-fucopentaose III, a pentasaccharide, prolongs heart transplant survival. *Transplantation* 2010;90:1071-8.

[0149] 42. Schwartz D, Brunner Y, Coute Y, Foti M, Wollheim CB, Sanchez JC. Improved characterization of the insulin secretory granule proteomes. *Journal of proteomics* 2012;75:4620-31.

[0150] 43. Brunner Y, Coute Y, Iezzi M, et al. Proteomics analysis of insulin secretory granules. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2007;6:1007-17.

[0151] 44. Hickey AJ, Bradley JW, Skea GL, et al. Proteins associated with immunopurified granules from a model pancreatic islet beta-cell system: proteomic snapshot of an endocrine secretory granule. *Journal of proteome research* 2009;8:178-86.

[0152] 45. Stadinski BD, Delong T, Reisdorph N, et al. Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nature immunology* 2010;11:225-31.

[0153] 46. Grubin CE, Kovats S, deRoos P, Rudensky AY. Deficient positive selection of CD4 T cells in mice

displaying altered repertoires of MHC class II-bound self-peptides. *Immunity* 1997;7:197-208.

[0154] 47. Brennan TV, Hoang V, Garrod KR, *et al.* A new T-cell receptor transgenic model of the CD4+ direct pathway: level of priming determines acute versus chronic rejection. *Transplantation* 2008;85:247-55.

[0155] 48. Bryant J, Lerret NM, Wang JJ, *et al.* Preemptive Donor Apoptotic Cell Infusions Induce IFN-gamma-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells for Cardiac Allograft Protection. *J Immunol* 2014;192:6092-101.

[0156] 49. Hlavaty KA, McCarthy DP, Saito E, Yap WT, Miller SD, Shea LD. Tolerance induction using nanoparticles bearing HY peptides in bone marrow transplantation. *Biomaterials* 2015;76:1-10.

[0157] 50. Hoshi RA, Van Lith R, Jen MC, Allen JB, Lapidos KA, Ameer G. The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts. *Biomaterials* 2013;34:30-41.

[0158] 51. Best MD. Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry* 2009;48:6571-84.

[0159] 52. Shang J, Piskarev VE, Xia M, *et al.* Identifying human milk glycans that inhibit norovirus binding using surface plasmon resonance. *Glycobiology* 2013;23:1491-8.

[0160] 53. Yang J, van Lith R, Baler K, Hoshi RA, Ameer GA. A thermoresponsive biodegradable polymer with intrinsic antioxidant properties. *Biomacromolecules* 2014;15:3942-52.

[0161] 54. Hunter Z, McCarthy DP, Yap WT, *et al.* A biodegradable nanoparticle platform for the induction of antigen-specific immune tolerance for treatment of autoimmune disease. *ACS nano* 2014;8:2148-60.

[0162] 55. Whittlesey KJ, Shea LD. Delivery systems for small molecule drugs, proteins, and DNA: the neuroscience/biomaterial interface. *Experimental neurology* 2004;190:1-16.

[0163] 56. Yap WT, Song WK, Chauhan N, *et al.* Quantification of particle-conjugated or particle-encapsulated peptides on interfering reagent backgrounds. *BioTechniques* in press.

[0164] 57. Shin S, Tuinstra HM, Salvay DM, Shea LD. Phosphatidylserine immobilization of lentivirus for localized gene transfer. *Biomaterials* 2010;31:4353-9.

[0165] 58. Luo X, Yang H, Kim IS, *et al.* Systemic transforming growth factor-beta1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice. *Transplantation* 2005;79:1091-6.

[0166] 59. Prasad S, Kohm AP, McMahon JS, Luo X, Miller SD. Pathogenesis of NOD diabetes is initiated by reactivity to the insulin B chain 9-23 epitope and involves functional epitope spreading. *Journal of autoimmunity* 2012;39:347-53.

[0167] 60. Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, *et al.* Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 1993;36:1139-45.

[0168] 61. Krishnamurthy B, Mariana L, Gellert SA, *et al.* Autoimmunity to both proinsulin and IGRP is required for diabetes in nonobese diabetic 8.3 TCR transgenic mice. *J Immunol* 2008;180:4458-64.

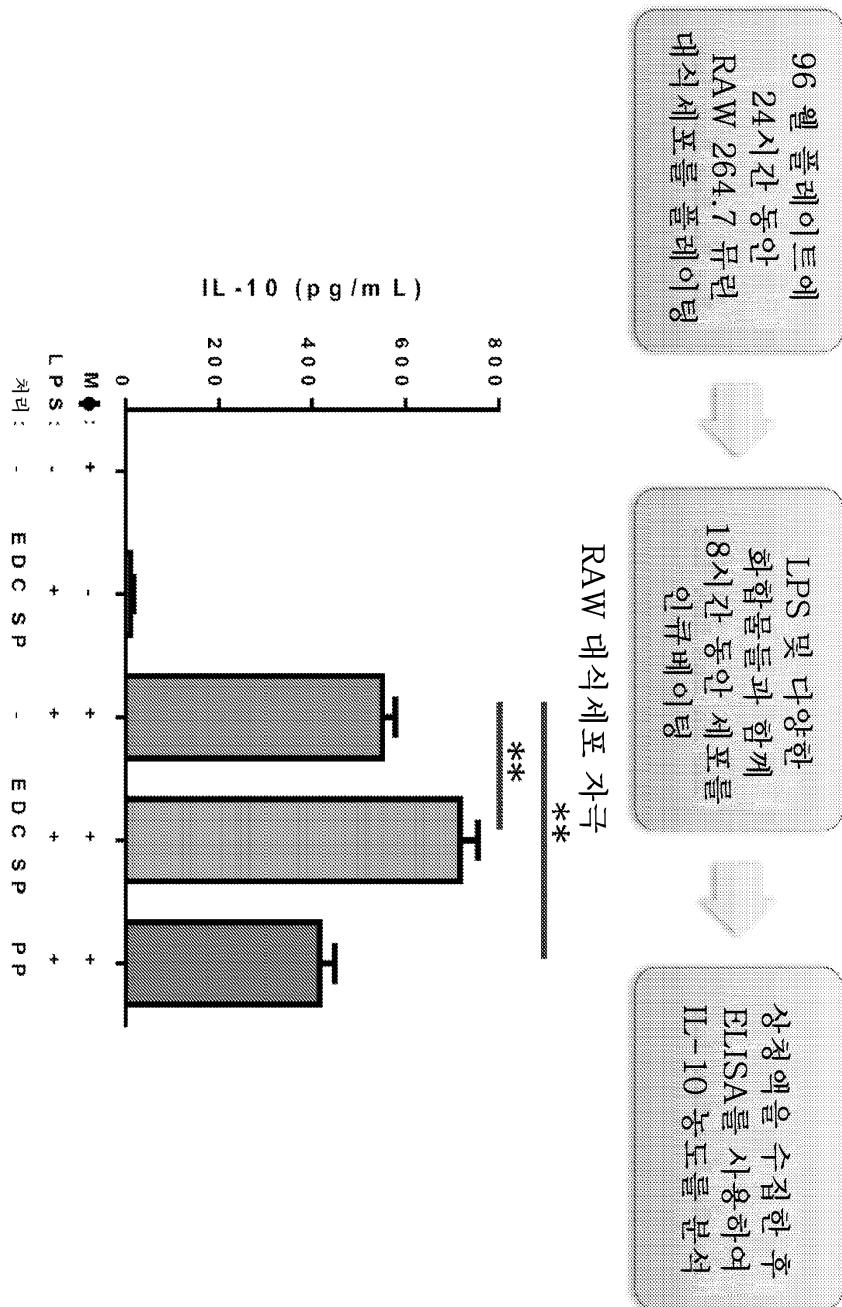
[0169] 관련 기술분야 통상의 기술자라면, 본 발명의 영역 및 기술사상에서 벗어나지 않고도 본원에서 개시되는 발명에 대하여 다양한 대체 및 변형이 이루어질 수 있다는 것을 잘 알고 있을 것이다. 본원에서 적합하게 예시적으로 기술된 본 발명은 본원에서 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재하에 실시될 수도 있다. 사용된 용어 및 표현들은 제한이 아니라 설명의 용어로 사용된 것이며, 그와 같은 용어 및 표현의 사용에 나타내고 기술된 특징 또는 그 일부의 어떠한 등가물도 배제하고자 하는 의도는 없으며, 오히려 본 발명의 영역 내에서 다양한 변형들이 가능하다는 것을 알아야 한다. 이에 따라, 본 발명이 구체적인 실시양태 및 임의적인 특징들에 의해 예시되기는 하였지만, 관련 기술분야 통상의 기술자가 본원에서 개시된 개념의 변형 및/또는 변이에 의존할 수도 있다는 것, 그리고 그와 같은 변형 및 변이가 본 발명의 영역에 속하는 것으로 간주된다는 것이 이해되어야 한다.

[0170]

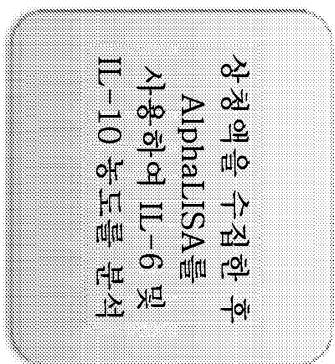
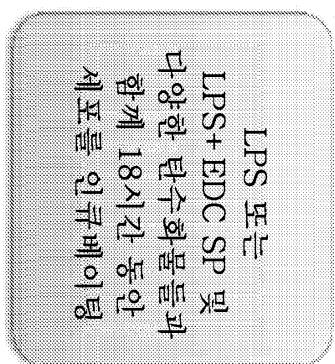
본원에서는, 수많은 특허 및 비-특허 참고문헌에 대한 인용이 이루어지고 있다. 인용되는 참고문헌은 그 전체가 본원에 참조로서 개재된다. 인용되는 참고문헌에서의 용어 정의와 비교하였을 때의 명세서에서의 용어 정의 사이에 불일치가 존재하는 경우, 그 용어는 명세서에서의 정의를 기준으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



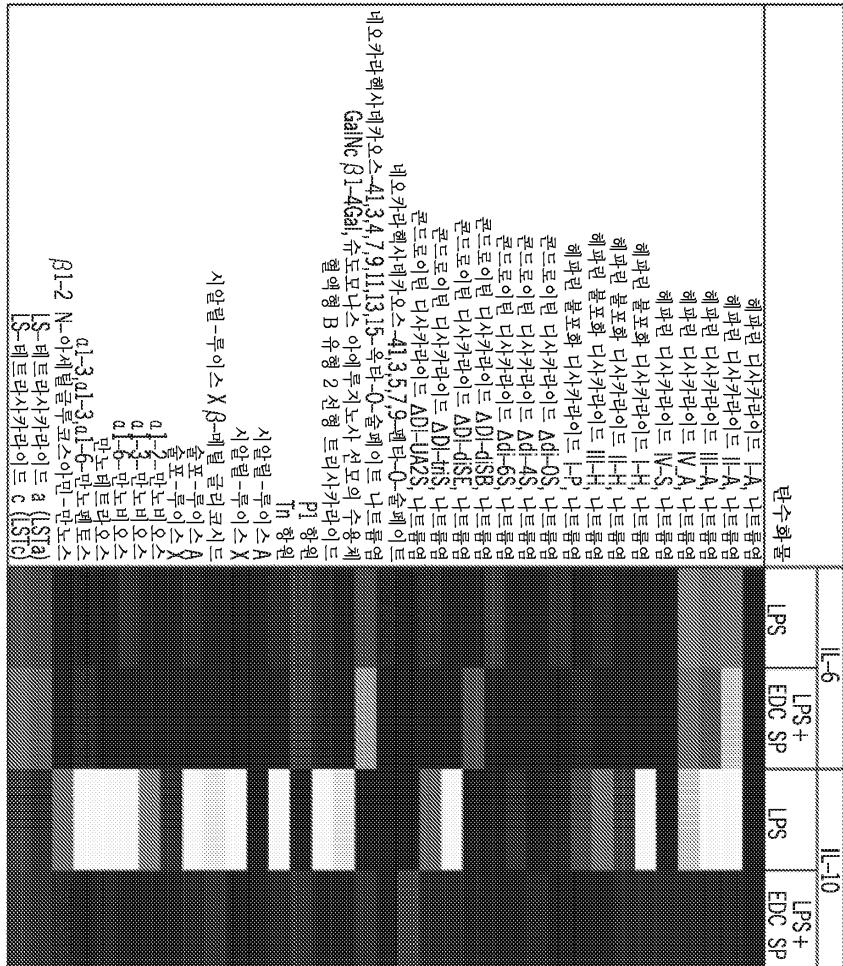
도면2



도면3a

기준선 LPS 또는
LPS+EDC SP 치극으로 부터의
시토카인의 배수 변화

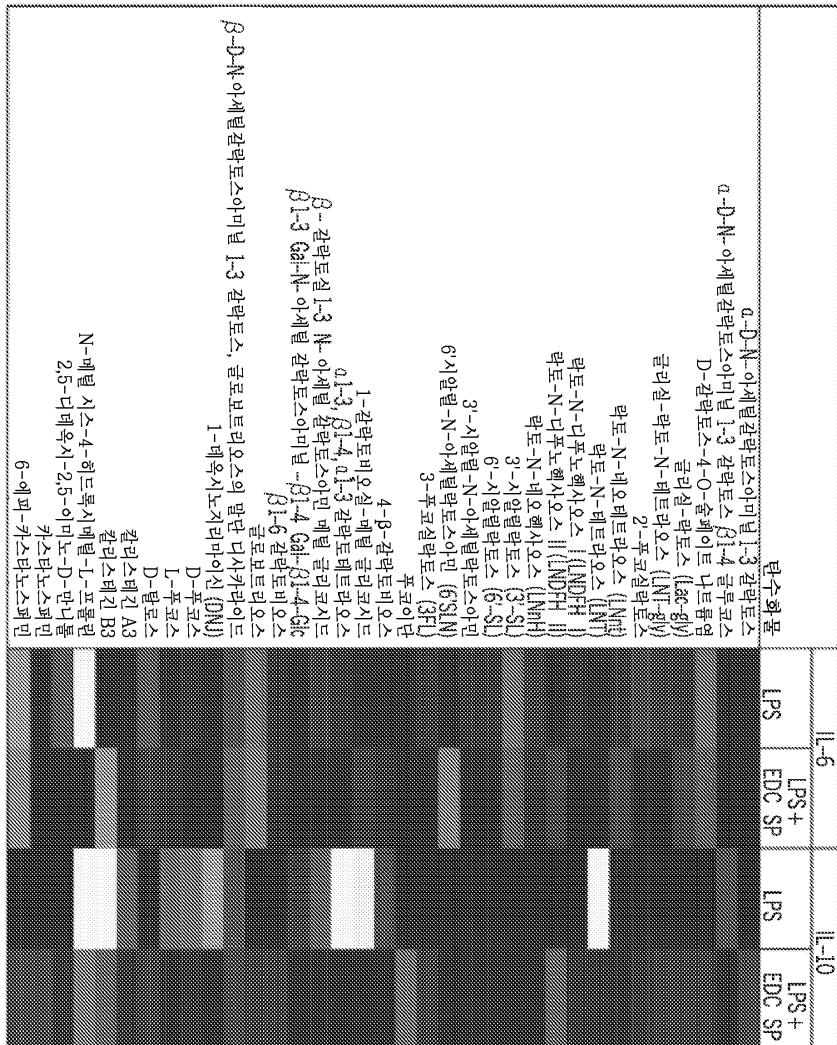
≤ -1	-0.8	-0.6	-0.4	-0.2	0	0.2	0.4	0.6	0.8	≥ 1
감소										증가



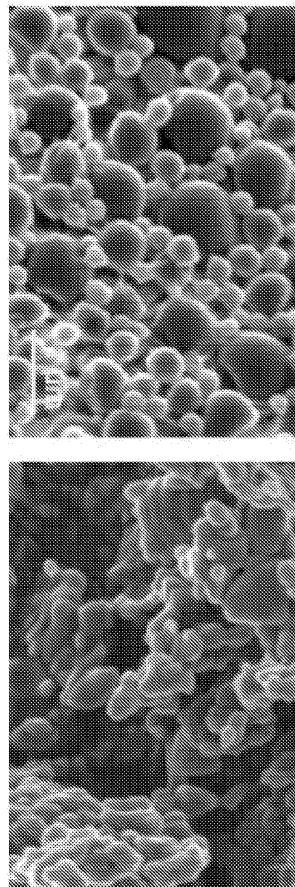
도면3b

기준 LPS 또는
LPS+EDC SP 차극으로 부터의
시토카인의 배수 변화

감소	≤ -1	-0.8	-0.6	-0.4	-0.2	0	0.2	0.4	0.6	0.8	≥ 1
----	-----------	------	------	------	------	---	-----	-----	-----	-----	----------

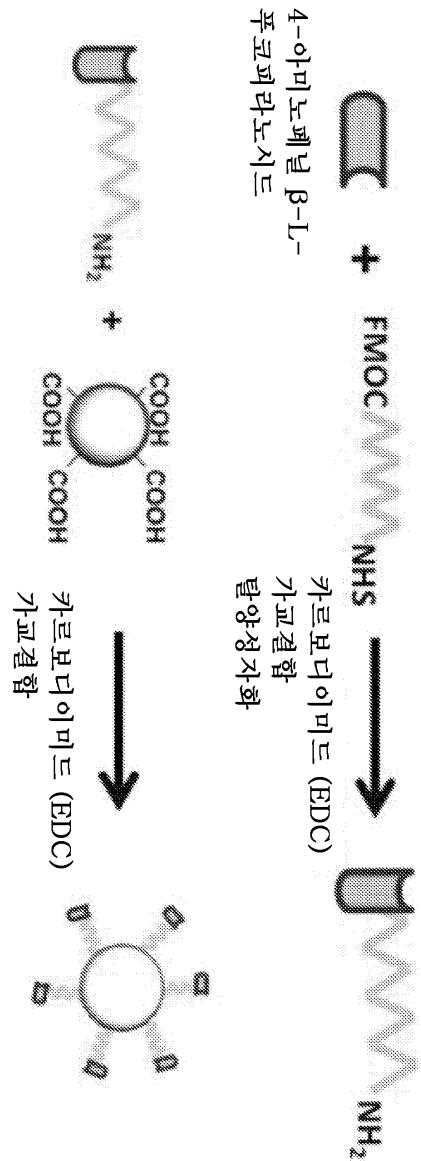


도면4

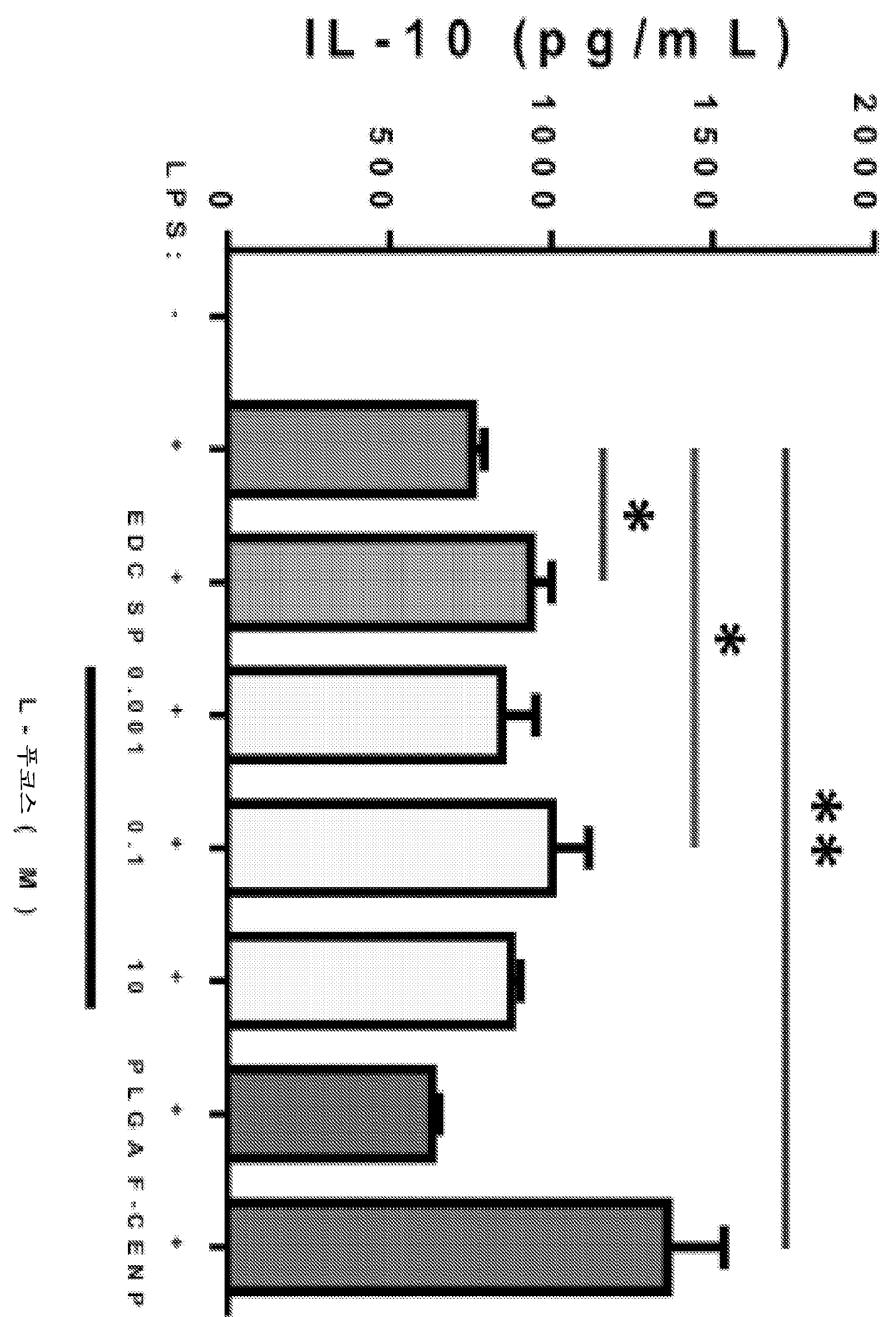


COOH를 가지는 PLGA (PLGA)

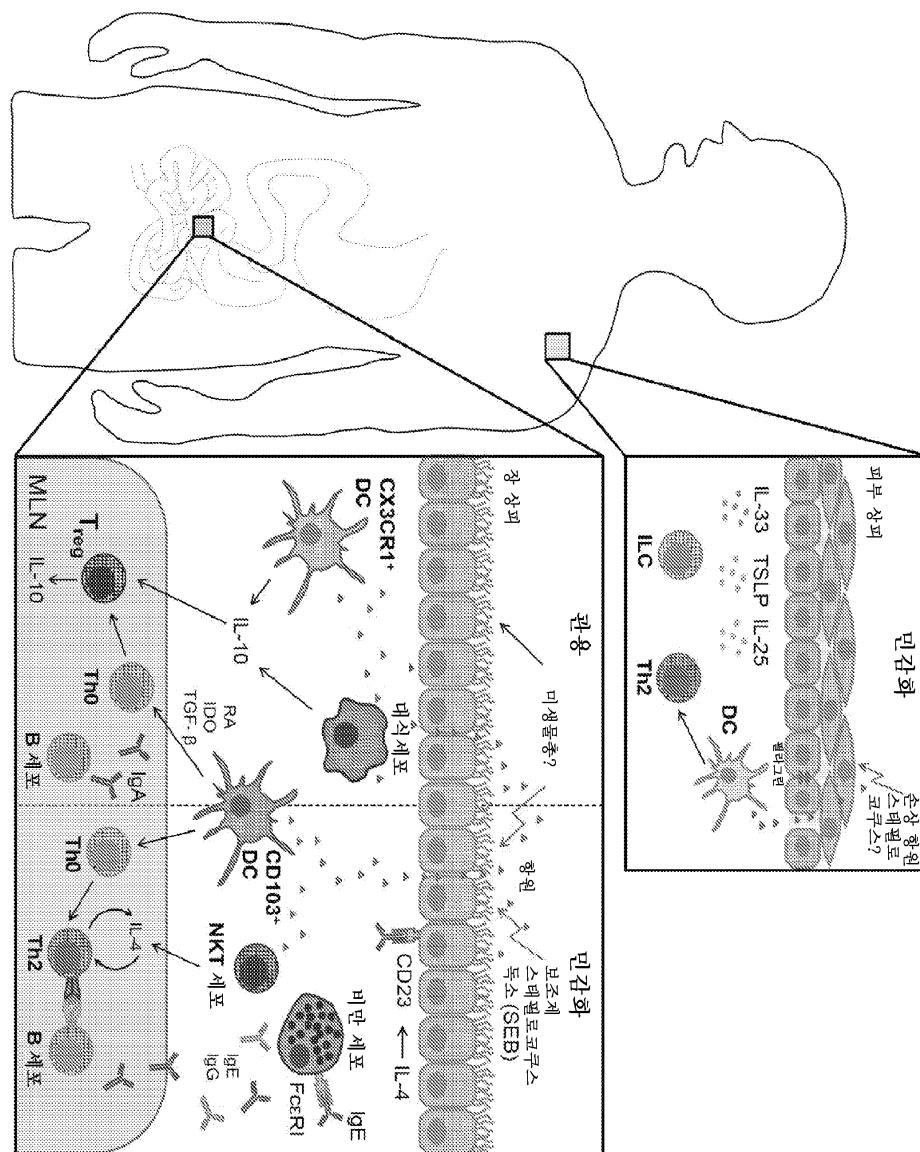
프로실화-된수화물 강화
PLGA 나노입자 (F-CENP)



도면5

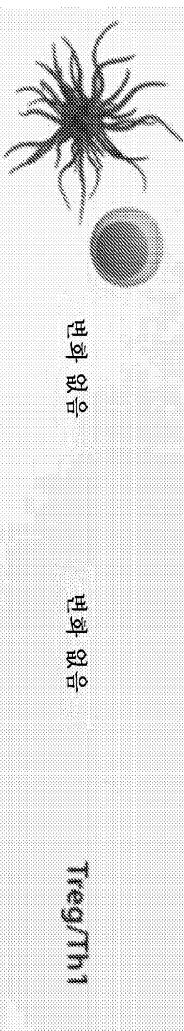


도면6

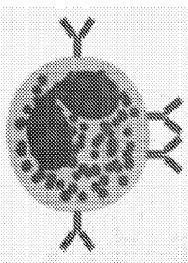


도면7

관용 (장기)

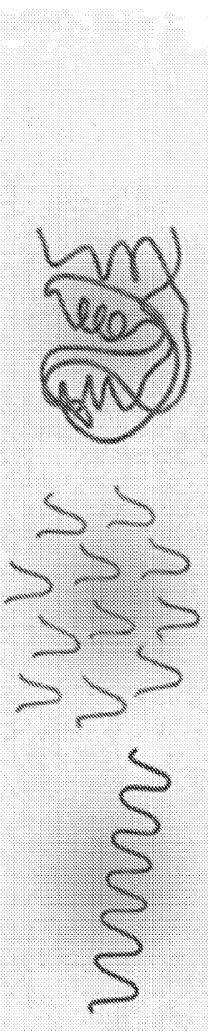


민감화 (단기)



변화
없음

감소



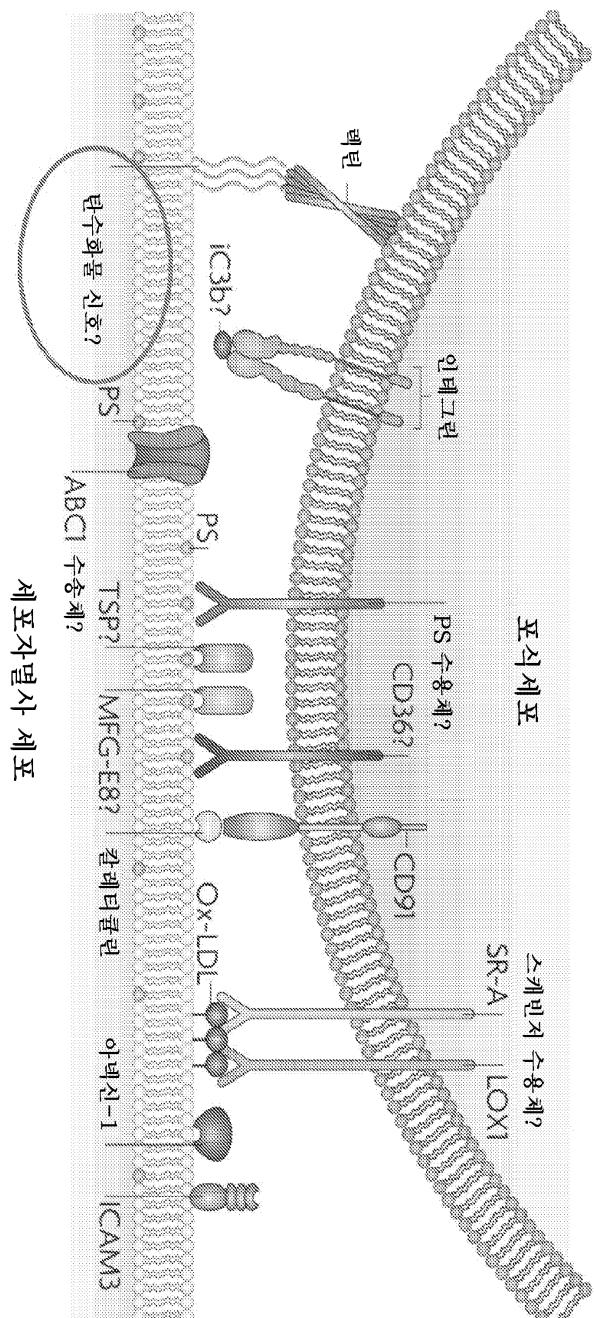
감소

자연 증원

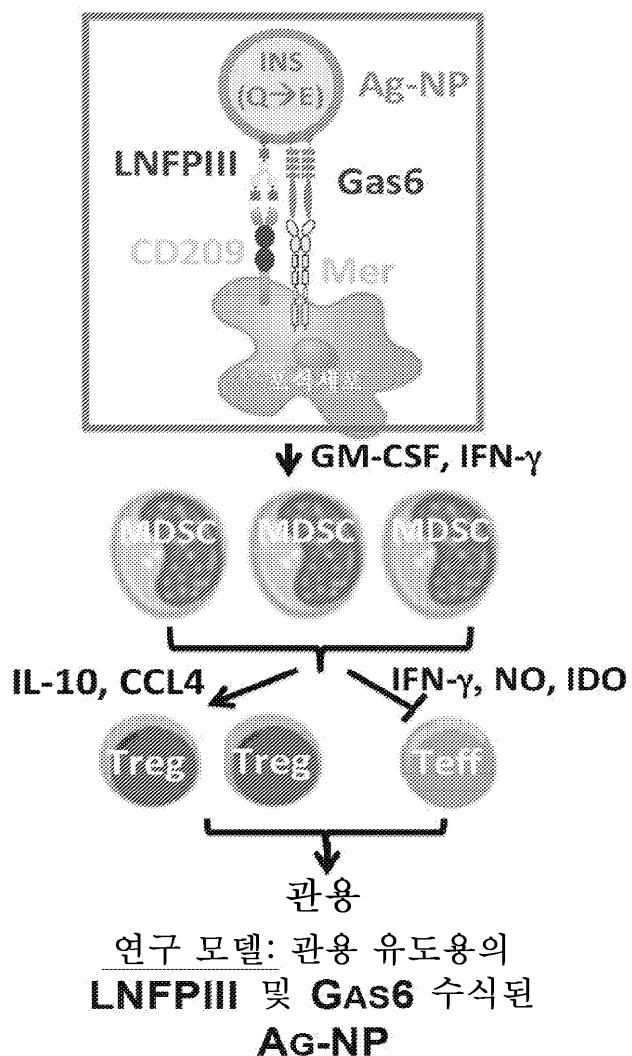
펩타드

변형된 증원

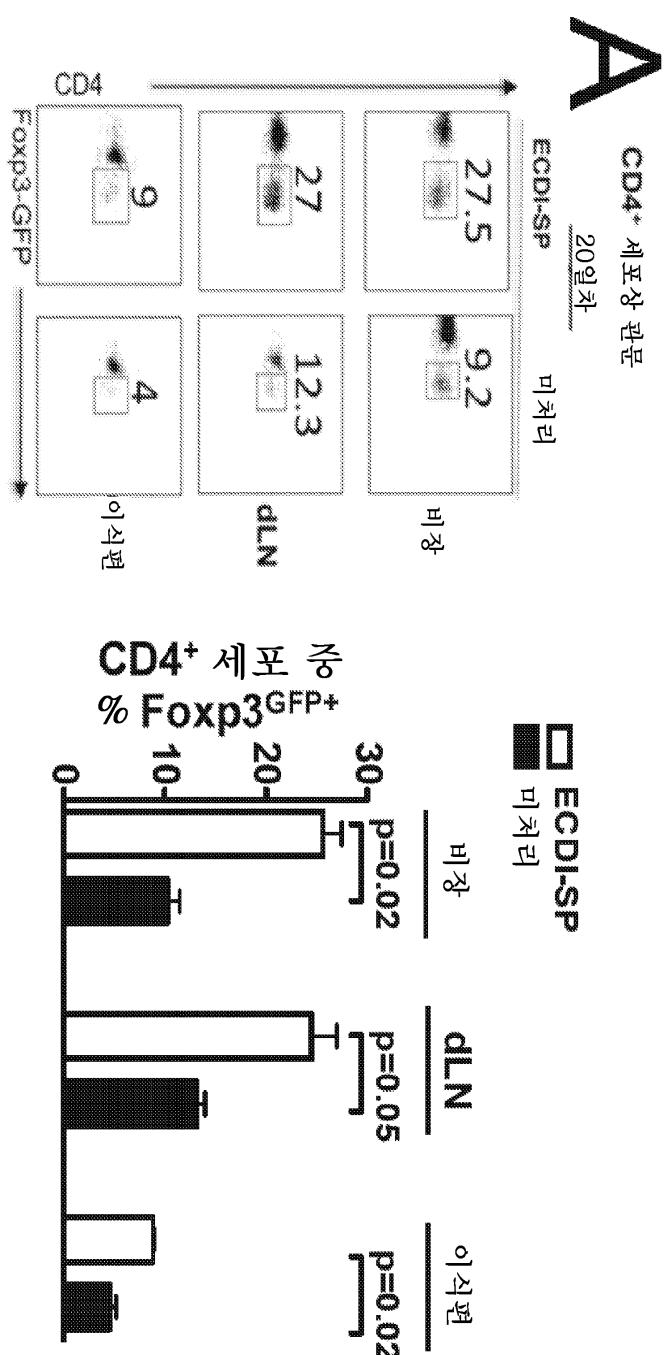
도면8



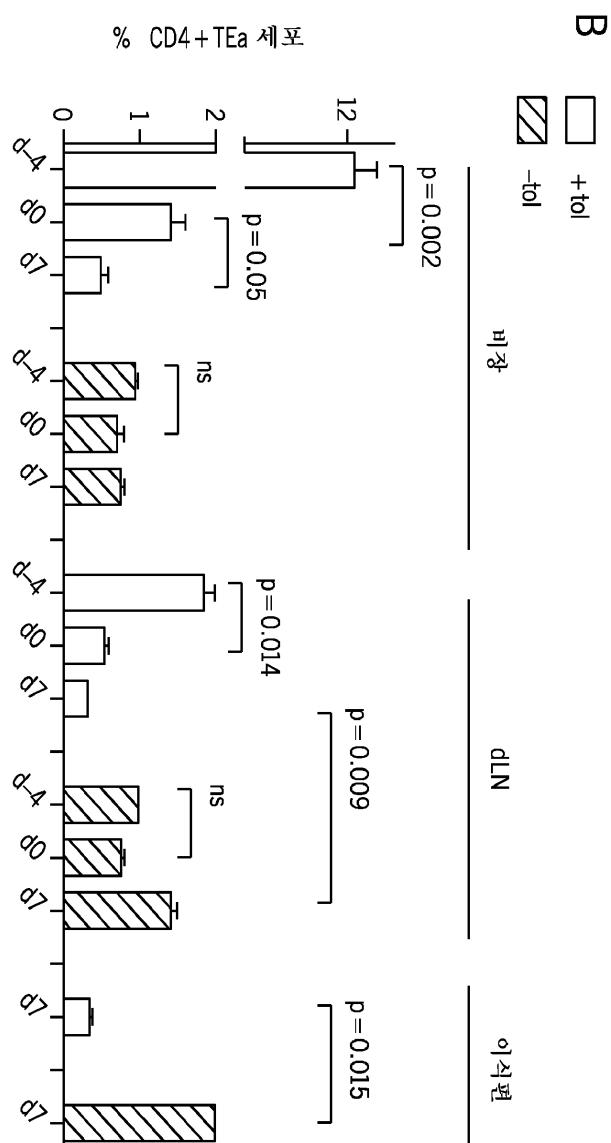
도면9



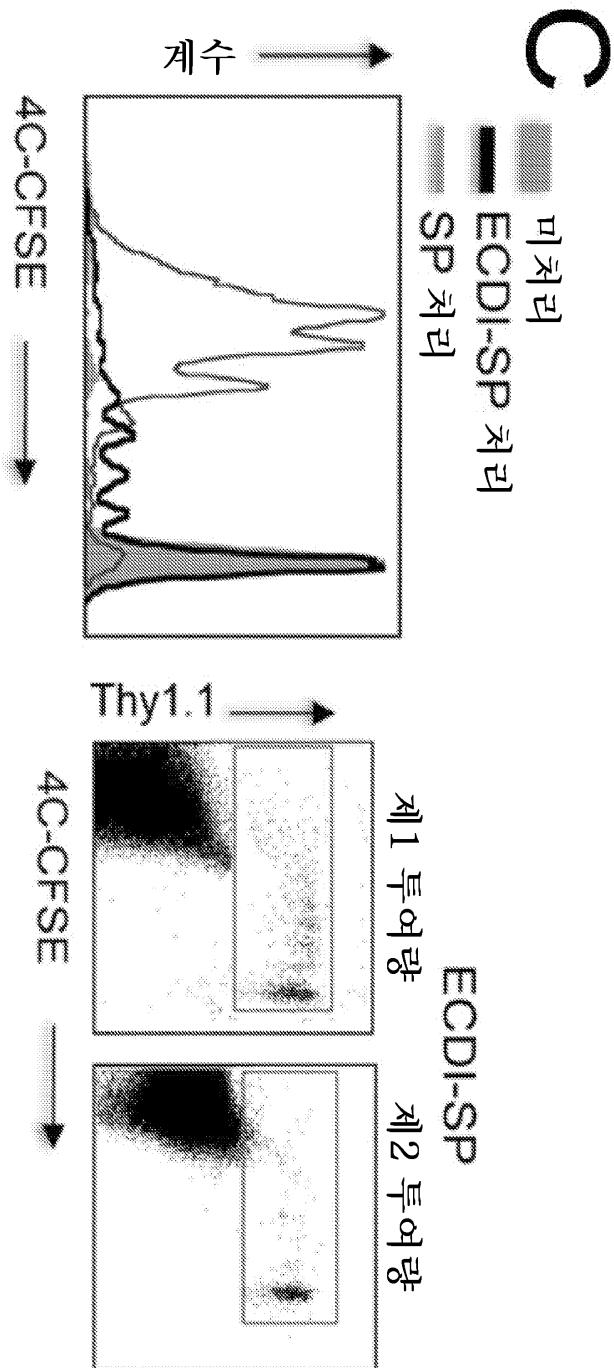
도면 10a



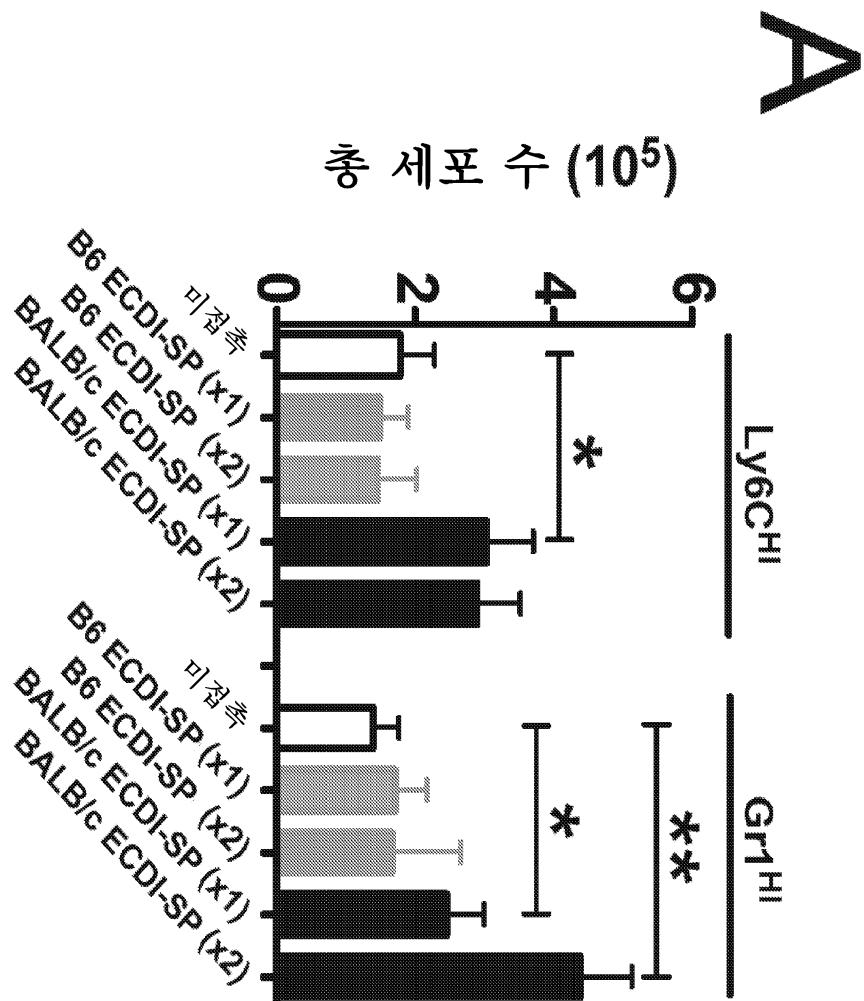
도면 10b



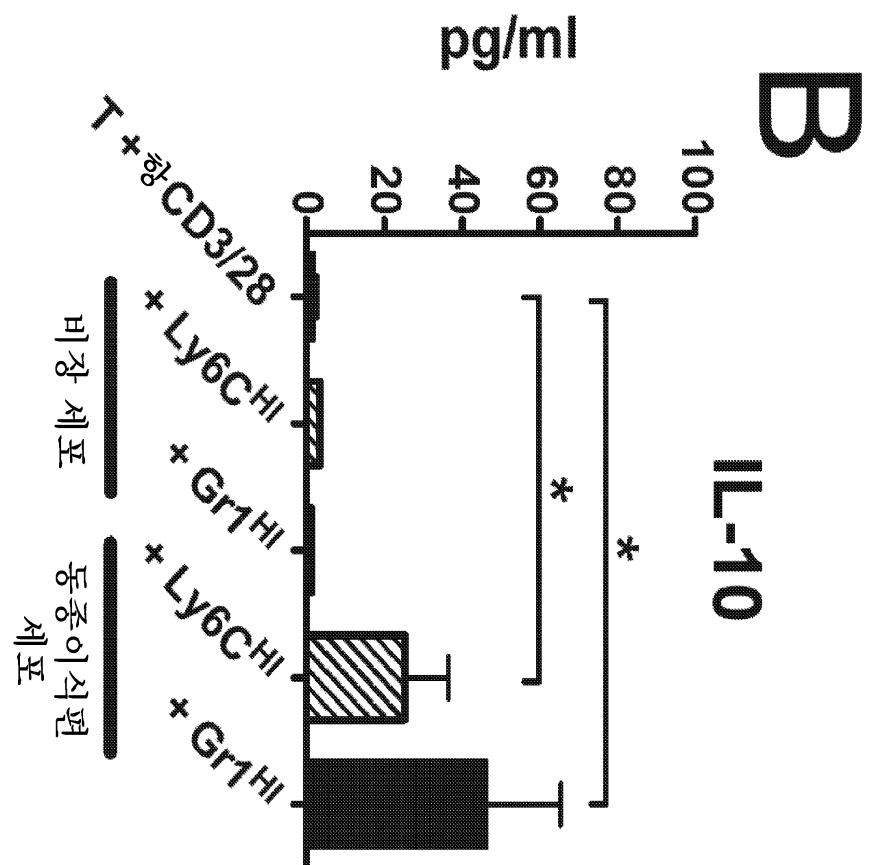
도면 10c



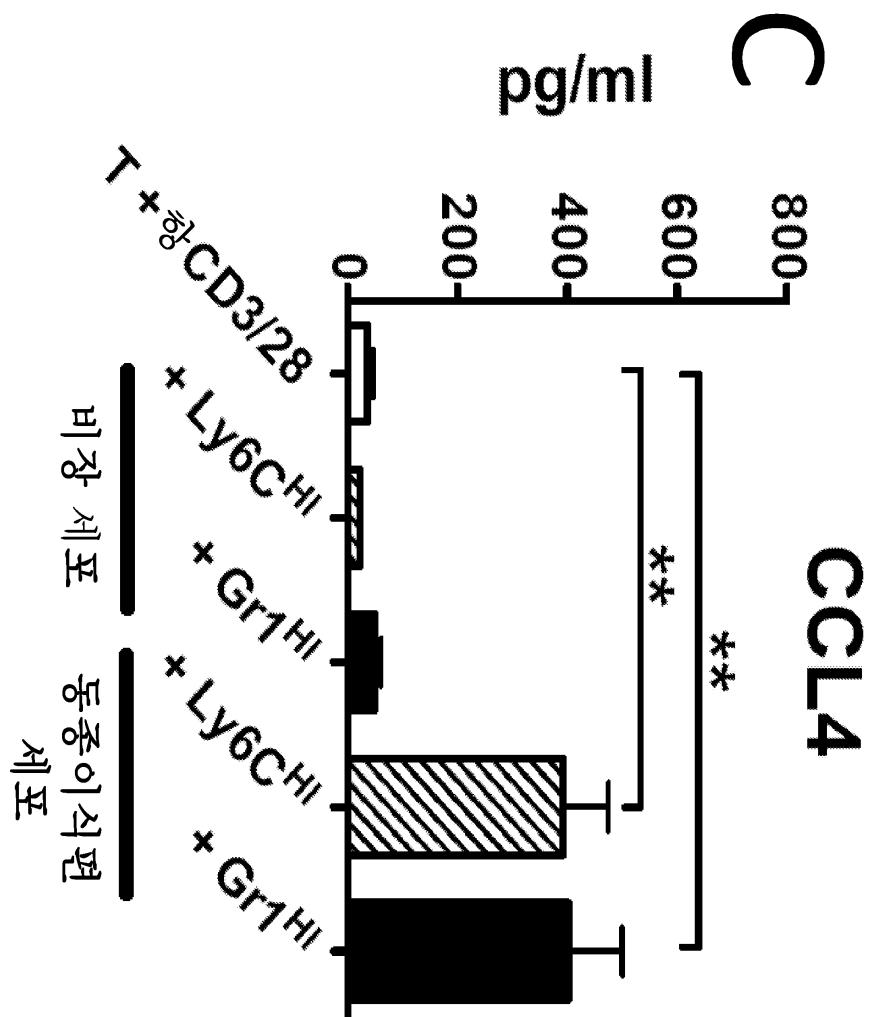
도면11a



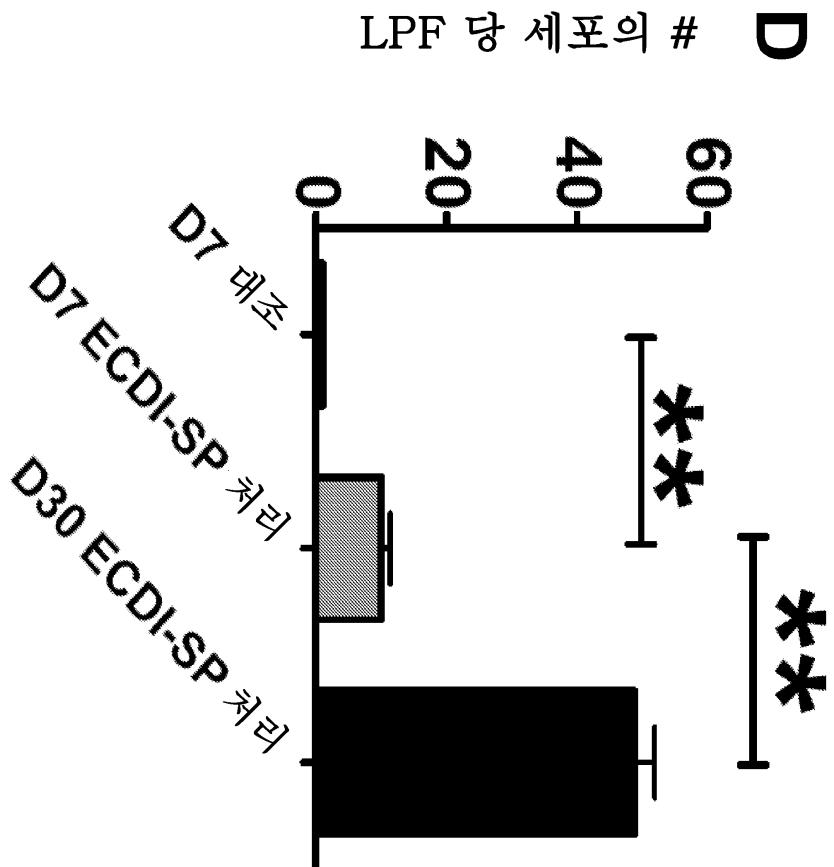
도면 11b



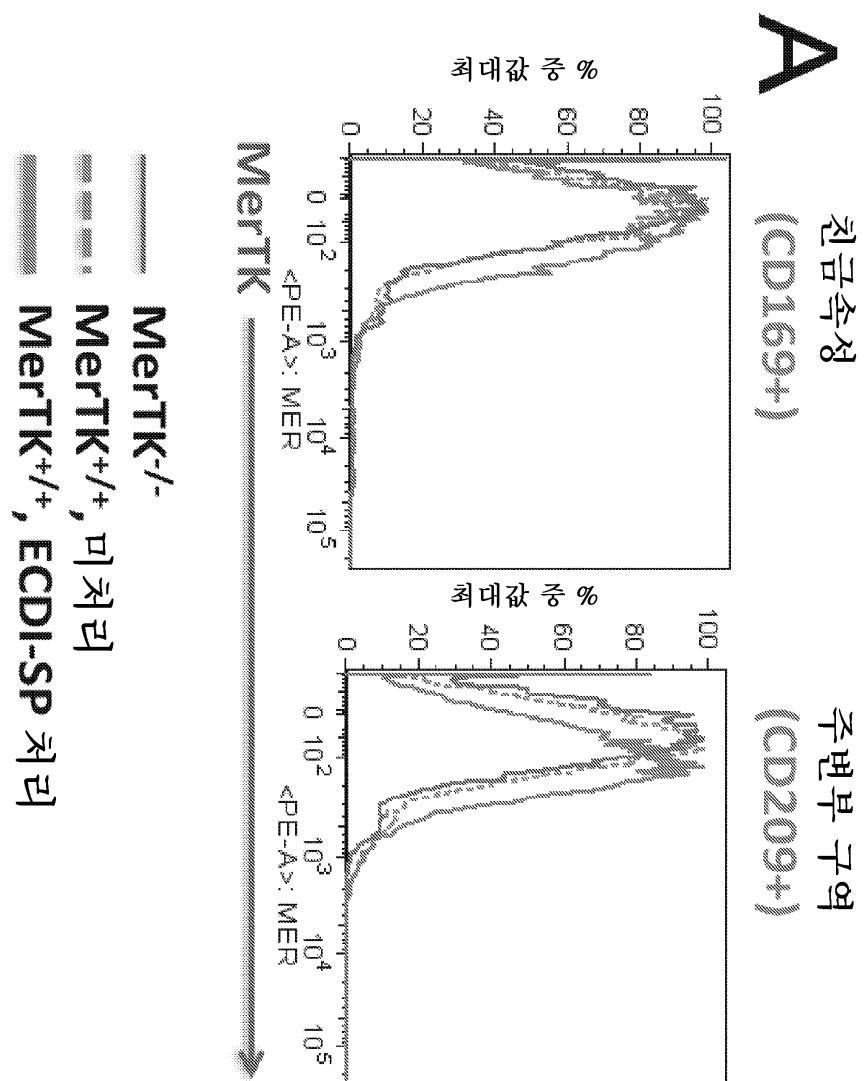
도면11c



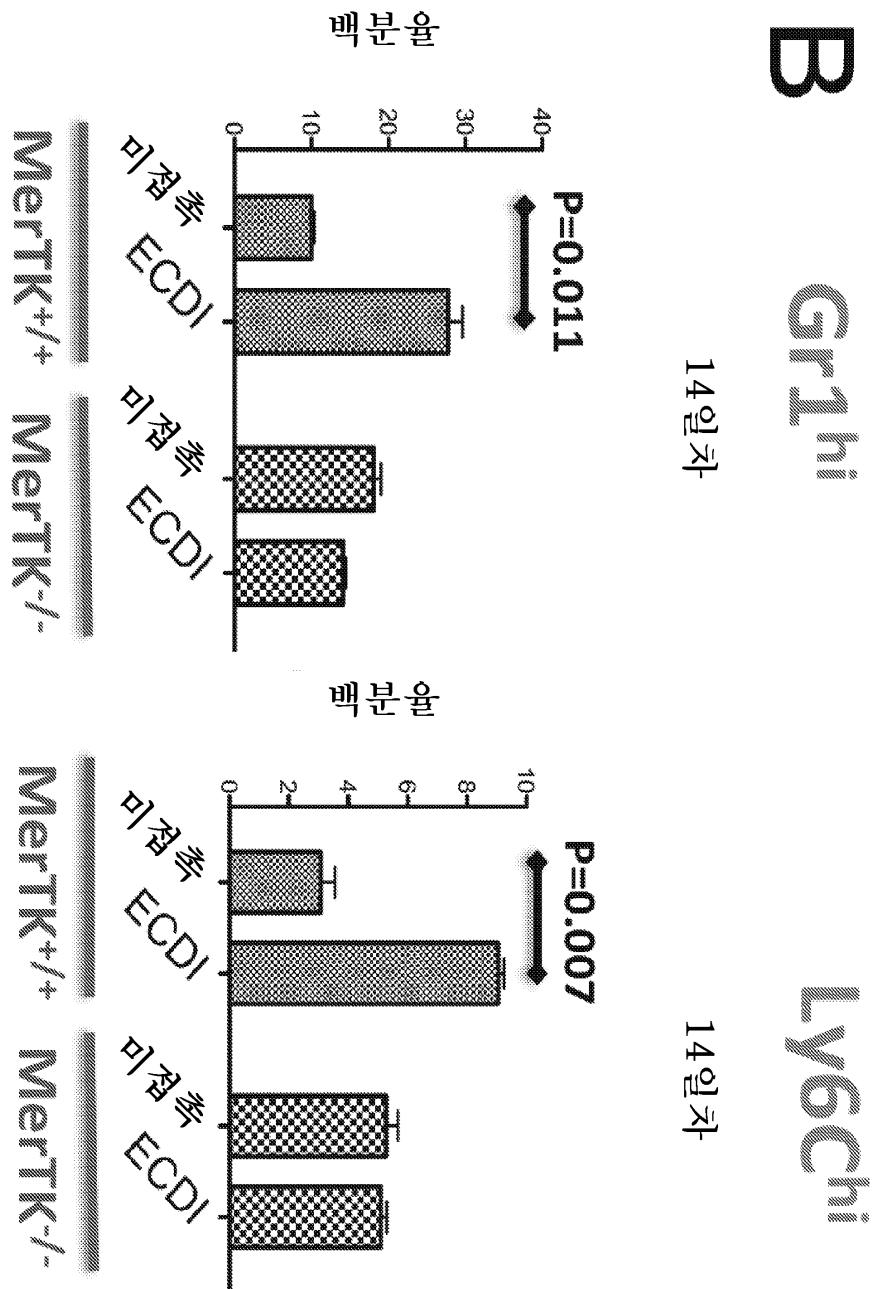
도면11d



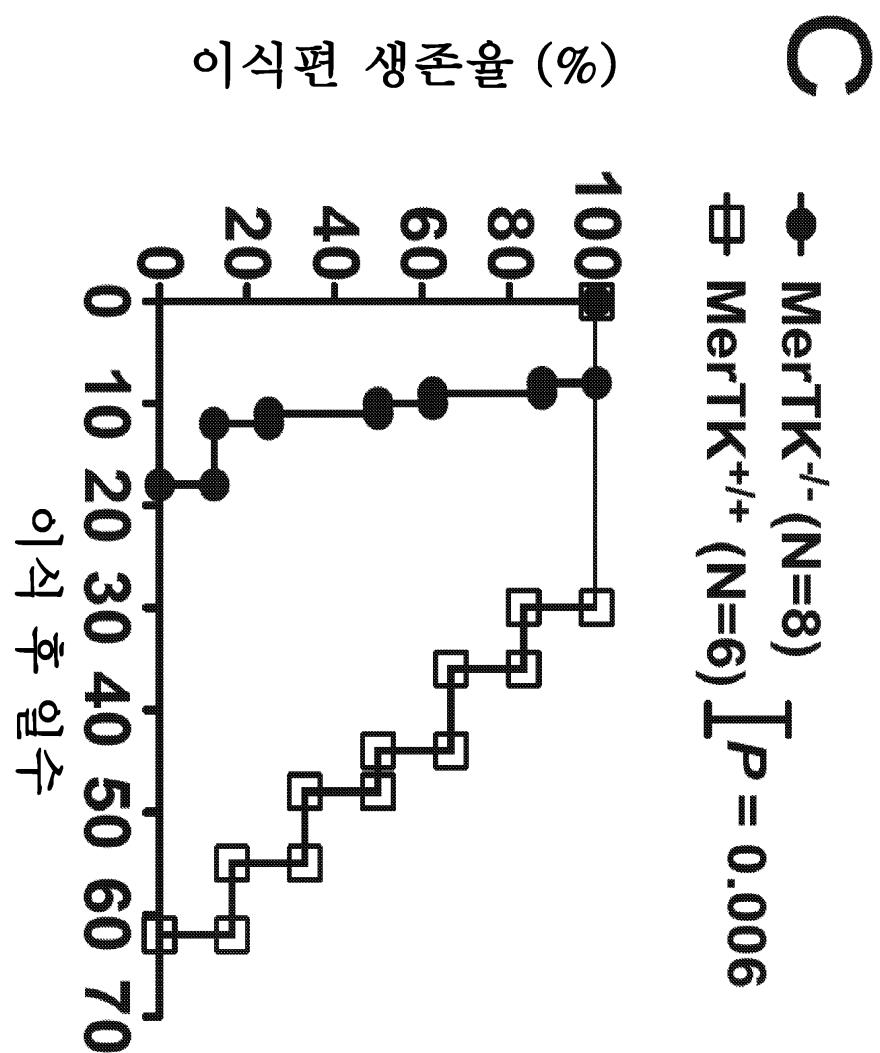
도면 12a



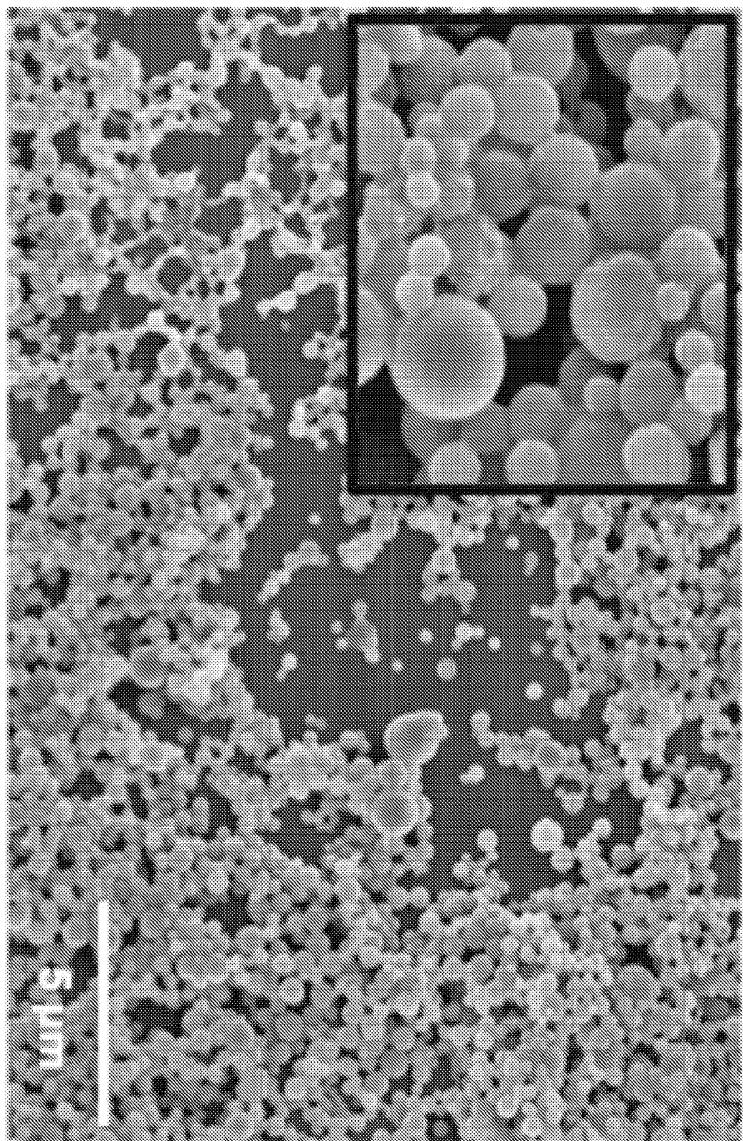
도면12b



도면12c

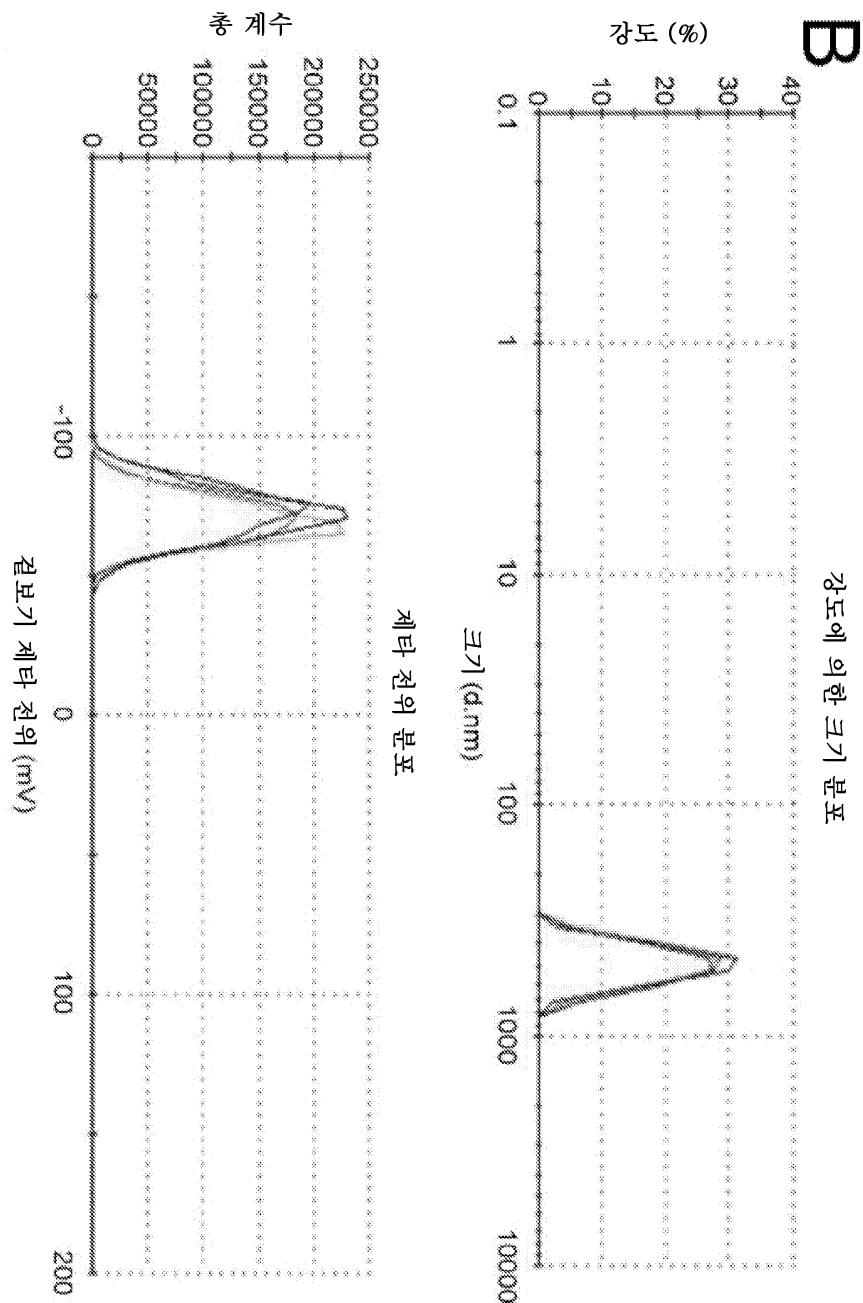


도면 13a



A PLG: 폴리(글리코-코-폴리(글리드))

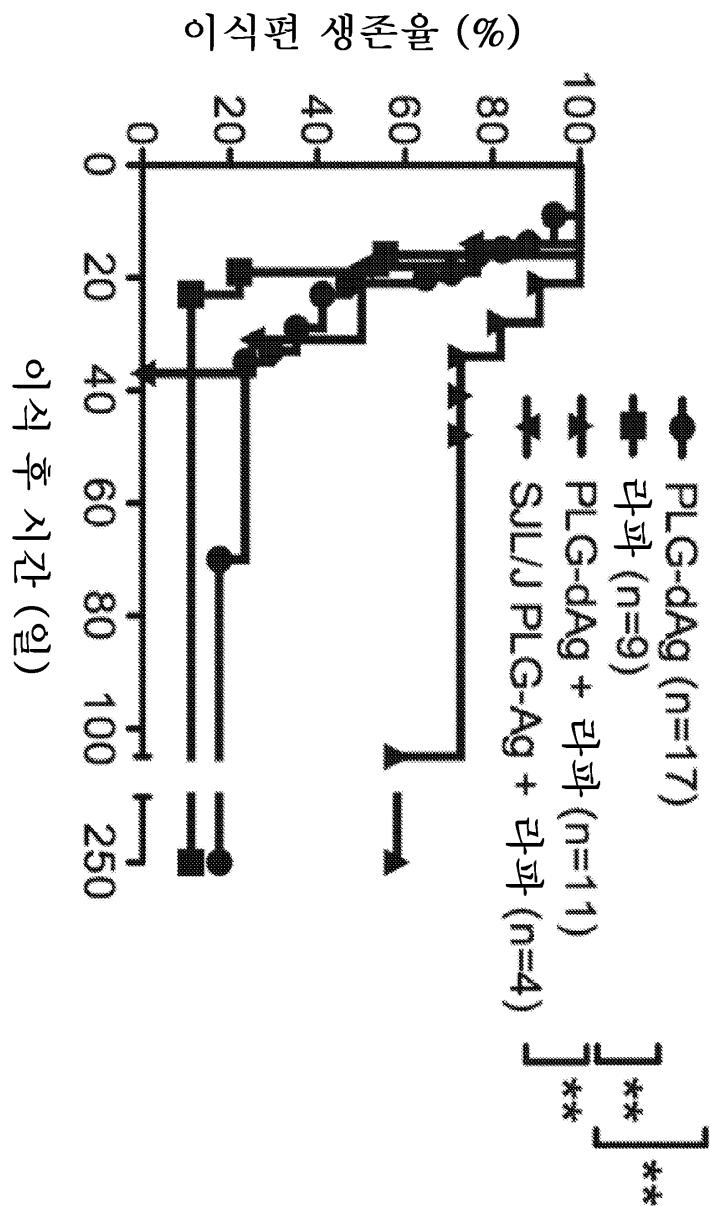
도면 13b



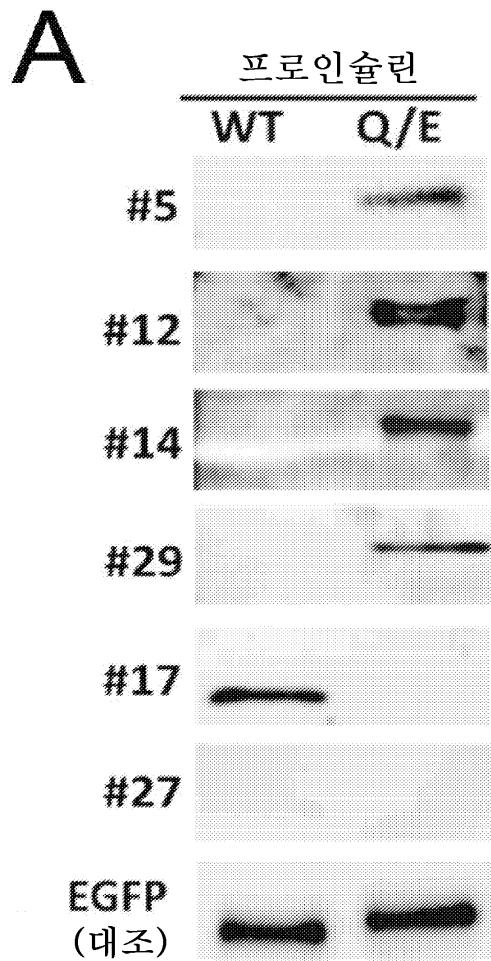
도면 13c

C

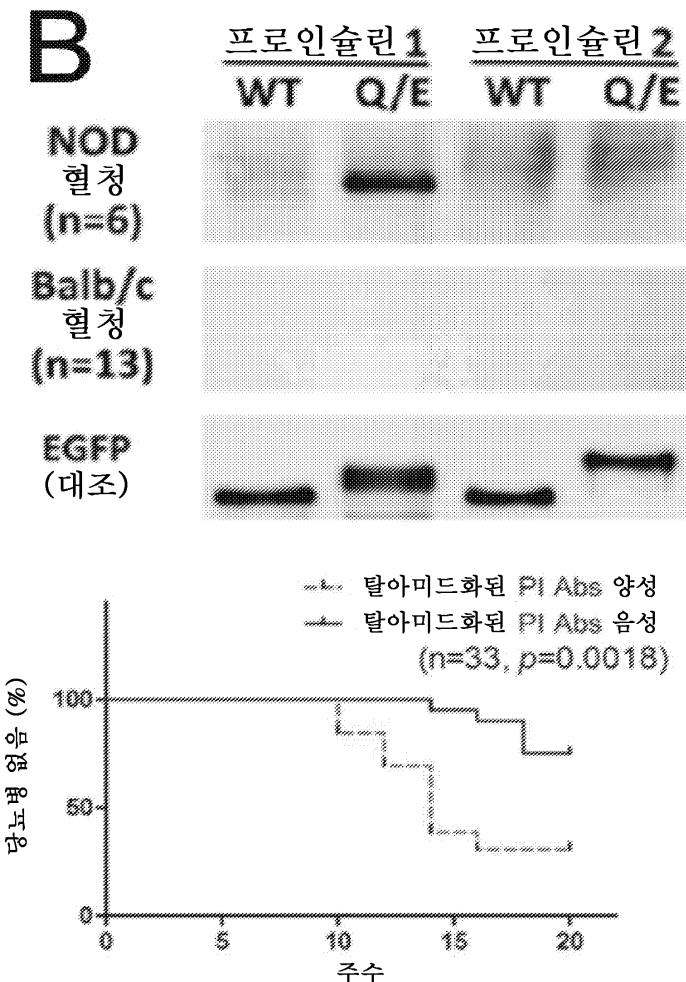
라파마이신 : 0.1 mg/kg, 일자 -1, 0, +1, +2



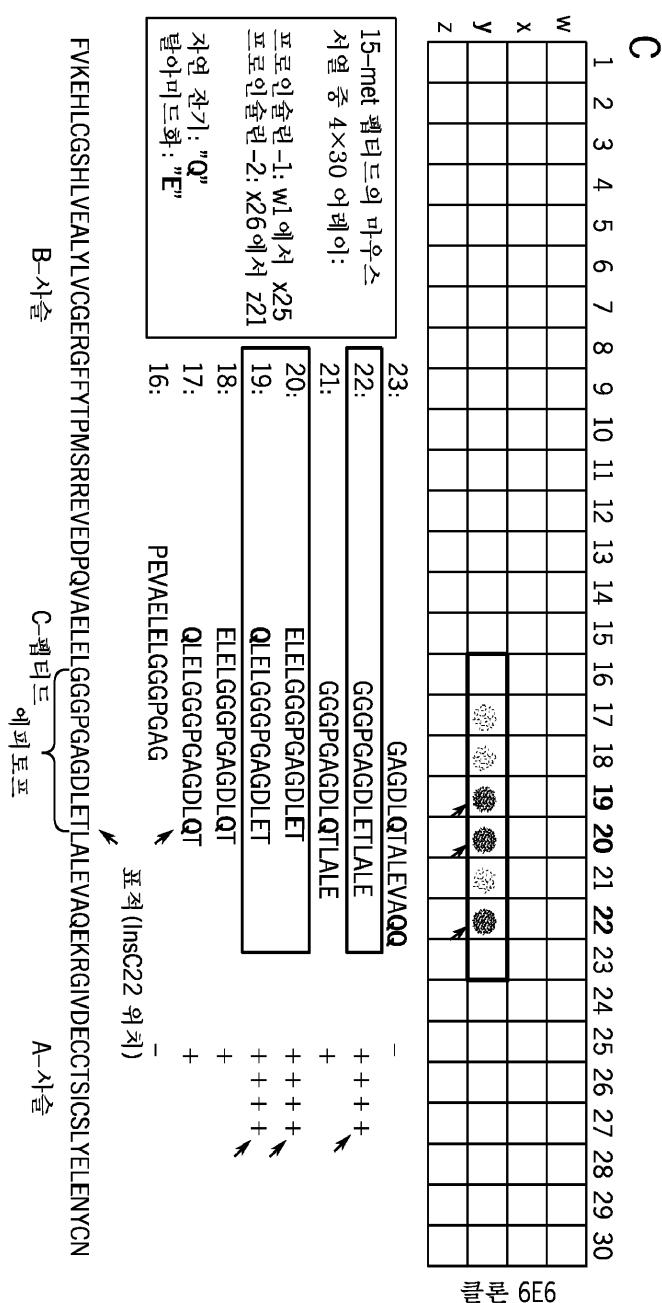
도면 14a



도면 14b



도면 14c



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Northwestern University

Bryce, Paul J.

Chien, Karen B.

<120> CARBOHYDRATE-MODIFIED PARTICLES AND PARTICULATE FORMULATIONS FOR
MODULATING AN IMMUNE RESPONSE

<130> 5369-00154

<150> US 62/167,054

<151> 2015-05-27

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu Ala Leu Glu Val Ala Gln Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Glu Thr Leu Ala Leu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu Ala Leu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Leu Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Glu Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Leu Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Glu Thr

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Leu Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 7

Gln Leu Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Pro Glu Val Ala Glu Leu Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly

1 5 10 15

<210> 9

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Val Lys Glu His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg
20 25 30
Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala Glu Leu Glu Leu Gly Gly Pro
35 40 45
Gly Ala Gly Asp Leu Glu Thr Leu Ala Leu Glu Val Ala Gln Glu Lys
50 55 60
Arg Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Glu
65 70 75 80
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85