(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-540162
(P2013-540162A)
(43)公表日　平成25年10月31日(2013.10.31)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 9/14	(2006.01)	A61K 9/14		4C076
A61K 39/35	(2006.01)	A61K 39/35		4C084
A61K 39/00	(2006.01)	A61K 39/00	G	4C085
A61K 38/21	(2006.01)	A61K 37/66		4C086
A61K 38/55	(2006.01)	A61K 37/64		4C206

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 24 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-535139 (P2013-535139)
(86)(22)出願日　平成23年10月24日 (2011.10.24)
(85)翻訳文提出日　平成25年5月28日 (2013.5.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/057478
(87)国際公開番号　WO2012/054920
(87)国際公開日　平成24年4月26日 (2012.4.26)
(31)優先権主張番号　61/405,999
(32)優先日　平成22年10月22日 (2010.10.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　513098684
ユニバーシティ　オブ　フロリダ　リサーチ　ファンデーション　インコーポレーティッド
アメリカ合衆国　フロリダ州　ゲインズビル　ピーオーボックス　１１５５７５
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗原特異的な寛容を誘導する微粒子およびその使用

(57)【要約】
本発明は、免疫細胞への治療剤の標的送達のための、抗原特異的な寛容を誘導する微粒子を提供する。さらに、本発明は、長期間にわたる治療剤の徐放を可能にする。また、免疫疾患および自己免疫障害の予防および／または処置のための、本発明の治療的使用も提供する。具体的な態様において、本発明は、1型糖尿病に対する処置を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原および治療剤を含み、かつ、生分解性材料で作製されている、関心対象の抗原提示免疫細胞を標的とするためおよび抗原特異的な免疫寛容を誘導するための微粒子であって、該治療剤が、免疫調節剤、免疫抑制性の寛容誘発剤、または関心対象の該抗原提示免疫細胞を動員する剤であり、該微粒子の表面が、関心対象の該抗原提示免疫細胞を標的とするリガンドを含む、微粒子。
【請求項２】
前記表面リガンドが、樹状細胞を標的とする、請求項1記載の微粒子。
【請求項３】
前記表面リガンドが、PD2、P2、抗CD11抗体、抗Dec205抗体、ホスファチジルセリン（PS）、またはこれらの組み合わせから選択される、請求項2記載の微粒子。
【請求項４】
ビタミンD_3、ビタミンD_3類似体、グルココルチコイド、ラパマイシン、レチノイン酸、またはこれらの組み合わせから選択される免疫調節剤を含む、請求項1記載の微粒子。
【請求項５】
IL-10、INF-γ、INF-λ、TGF-β1、またはこれらの組み合わせから選択される免疫抑制性の寛容誘発剤を含む、請求項1記載の微粒子。
【請求項６】
GM-CSFを含む、請求項2記載の微粒子。
【請求項７】
生分解性材料が、PLGAである、請求項1記載の微粒子。
【請求項８】
関心対象の抗原提示免疫細胞を標的とするためおよび抗原特異的な免疫寛容を誘導するための二重微粒子システムであって、
関心対象の該抗原提示免疫細胞により貪食可能な（phagocytosable）微粒子、および
関心対象の該抗原提示免疫細胞により貪食不可能な（non-phagocytosable）微粒子
を含み、
該貪食可能な微粒子が、抗原および免疫調節剤を含み、
該貪食不可能な微粒子が、免疫抑制性の寛容誘発剤、および関心対象の該抗原提示免疫細胞を動員する剤を含み、
該貪食可能な微粒子および該貪食不可能な微粒子が、生分解性材料で作製されており、かつ、関心対象の該抗原提示免疫細胞を標的とする表面リガンドを含む、微粒子システム。
【請求項９】
前記表面リガンドが、樹状細胞を標的とする、請求項8記載の微粒子。
【請求項１０】
前記貪食可能な微粒子が、0.5μm～5.0μmの直径を有し、かつ、貪食不可能な微粒子が、15.0μm～50.0μmの直径を有する、請求項9記載の微粒子。
対象において抗原特異的な免疫寛容を誘導する方法であって、そのような寛容を必要とする対象に、請求項1記載の微粒子を投与する段階を含む、方法。
【請求項１１】
前記微粒子が、未熟樹状細胞を標的とする、請求項11記載の方法。
【請求項１２】
前記表面リガンドが、PD2、P2、抗CD11抗体、抗Dec205抗体、ホスファチジルセリン（PS）、またはこれらの組み合わせから選択される、請求項12記載の方法。
【請求項１３】
前記微粒子が、GM-CSFを含む、請求項12記載の方法。
【請求項１４】
前記微粒子が、ビタミンD_3、ビタミンD_3類似体、グルココルチコイド、ラパマイシン、

レチノイン酸、またはこれらの組み合わせから選択される免疫調節剤を含む、請求項11記載の方法。

【請求項１５】

前記微粒子が、IL-10、INF-γ、INF-λ、トランスフォーミング増殖因子β１（TGF-β１）、またはこれらの組み合わせから選択される免疫抑制性の寛容誘発剤を含む、請求項11記載の方法。

【請求項１６】

ポリマー生分解性材料が、PLGAである、請求項11記載の方法。

【請求項１８】

自己免疫疾患、アレルギー、慢性炎症、および／または移植拒絶反応を予防または処置するために使用される、請求項11記載の方法。

【請求項１９】

1型糖尿病を予防または処置するために使用される、請求項11記載の方法。

【請求項２０】

対象において抗原特異的な免疫寛容を誘導する方法であって、そのような処置を必要とする対象に、請求項8記載の二重微粒子システムを投与する段階を含み、関心対象の抗原提示免疫細胞が、樹状細胞である、方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【０００１】

発明の背景

自己免疫疾患は、制御性T細胞（T_{reg}）の数および機能の低下と頻繁に関連している。これらの細胞は、生理学的な自己反応性T細胞のレベルを抑制することが公知である。自己反応性T細胞のレベルが上昇すると、望ましい細胞の病理学的破壊が結果として起こり得る。例えば、1型糖尿病は、インスリン産生β細胞のT細胞により媒介される破壊を特徴とする。

【０００２】

樹状細胞（DC）は、末梢寛容の維持において重要な役割を果たす。DCは、T_{reg}誘導を促進し、それにより過剰な免疫応答を抑制する。樹状細胞ベースのワクチンは、抗原提示細胞（APC）を通して寛容を促進することが実証されている。APCは、寛容誘発様式で自己ペプチドをプロセシングしてT細胞に提示し、かつT_{reg}増殖を誘導する。アポトーシス細胞は、ホスファチジルセリン（PS）受容体、CD 47、CD 36、および$\alpha_v\beta_3$などの表面分子を介してAPCにより認識される表面リガンドを発現する。最近の研究は、これらの受容体がDCの成熟を阻害し、かつ寛容を誘導できるであろうことを暗示している。

【０００３】

しかしながら、樹状細胞ベースのDCワクチンの現在の使用は、いくつかの限界を欠点として有する。例えば、現在のアプローチには、患者の安全に悪影響を及ぼし得かつコストの高い、患者の細胞のエクスビボ操作が必要である。さらに、現在の樹状細胞ベースのDCワクチン組成物のエクスビボ安定性は最適には満たない。

【０００４】

従って、改善された安定性および有効期間を有する代替的なワクチン組成物を開発する必要がある。さらに、標的細胞に有効に送達されるワクチン組成物を開発する必要がある。以下に続く開示から明らかであろうように、これらのおよび他の有益性が、本発明により提供される。

【発明の概要】

【０００５】

簡単な概要

本発明は、免疫系細胞への標的送達のための、抗原特異的な寛容を誘導する微粒子を提供する。

【０００６】

一つの態様において、本発明は、関心対象の免疫細胞への化合物の標的送達を容易にする微粒子であって、ポリマーマトリクス、抗原（例えば、自己抗原およびアレルゲンを含む）、および関心対象の治療剤を含み、該抗原および該治療剤が該ポリマーマトリクス中にカプセル化されている微粒子を提供する。一つの態様において、微粒子の外側表面は、免疫細胞により認識される1種または複数の分子（リガンドまたは抗体など）を含む。一つの具体的な態様において、本発明の微粒子は、未熟樹状細胞（DC）を標的とし、かつ抗原特異的な様式で寛容を誘導する。有利なことに、本発明の微粒子は、免疫細胞を特異的に標的とし、それにより微粒子の細胞内貪食またはインサイチュー局在化をもたらし；免疫学的な抗原特異的寛容を誘導して、寛容誘発DC（tDC）およびT_{reg}を産生し；かつ、DCなどの免疫細胞による抗原提示および抗原特異的な免疫抑制を結果として生じる。

【０００７】

一つの態様において、本発明の微粒子は、それらがDCを効率的に標的とすることを可能にする抗体で、表面が修飾されている。一つの態様において、微粒子には、免疫調節因子などの1種または複数の治療剤（例えば、ビタミンD3、TGF-β1、GM-CSF、またはラパマイシン）が装填される。有利なことに、本発明のある特定の微粒子は、寛容誘発DCを生じ、$Foxp3^{+}$ T_{reg}細胞を誘導し、従って、1型糖尿病（T1D）の予防および処置に有用である。

【０００８】

本発明はさらに、自己免疫疾患、アレルギー誘発反応、移植拒絶反応、慢性炎症、および、特異的な寛容の誘導が有益である他の疾患の予防および／または処置のための方法を提供する。好ましくは、方法は、そのような処置を必要とする対象に、有効量の本発明の微粒子または組成物を投与する段階を含む。具体的な態様において、本発明は、1型糖尿病のための処置を提供する。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】本発明の微粒子（MP）の具体的な態様を図示する。

【図２】樹状細胞（DC）（白色）およびMφ（黒色）による、表面修飾微粒子の貪食の比較を示す。

【図３】表面修飾微粒子で処置されたDCのサイトカインプロフィールを示す。

【図４】本発明の微粒子で処置された、陽性染色されたDCのパーセンテージを測定するための、免疫蛍光定量化の結果を示す。

【図５】フローサイトメトリーにより測定した際の、BrdUの取り込みについて陽性であるT細胞のパーセンテージを示す。対照（iDC、ポリ乳酸グリコール酸共重合体（PLGA））と比較した時、免疫抑制粒子で処置されたDCは、同種刺激に応答してT細胞増殖を誘導しない。

【図６】注射可能な微粒子の2種の具体的に例示される種類を示す。二重微粒子システムは、樹状細胞を標的とする貪食可能な（phagocytosable）微粒子および樹状細胞を標的とする貪食不可能な（non-phagocytosable）微粒子を含む。この二重システムは、寛容誘発促進（pro-tolerogenic）DCおよび抗原特異的な免疫抑制を促進するために合理的に設計されたDC調節システムである。

【図７Ａ】水-油-水溶媒蒸発法を用いてPLGAで作製された微粒子（MP）を示す。直径が2.3μmの、治療剤が装填された貪食可能な粒子を示す。粒子のサイズは、動的光散乱解析により測定した。

【図７Ｂ】水-油-水溶媒蒸発法を用いてPLGAで作製された微粒子（MP）を示す。TGF-β1（62±5％の装填効率）が、直径35μmの貪食不可能な微粒子（ローダミンが装填されて示されている）中に装填されていることを示す。

【図７Ｃ】水-油-水溶媒蒸発法を用いてPLGAで作製された微粒子（MP）を示す。理論的な最大装填のパーセントとして表された、ビタミンD3およびTGF-β1が装填された微粒子のカプセル化効率を示す。

【図８Ａ】本発明の微粒子が、DCを標的とし、十分な取り込み特性を有し、かつ最小限の活性を有することを示す。抗CD11c抗体、抗Dec 205抗体、またはP-D2ペプチドから選択さ

れるDC標的リガンドによる表面修飾は、DCによる微粒子の取り込みを増加させることを示す。連結されたRGDペプチドおよびPEGを有する微粒子が、比較のために含まれる。
【図８Ｂ】本発明の微粒子が、DCを標的とし、十分な取り込み特性を有し、かつ最小限の活性を有することを示す。蛍光体が装填された微粒子の貪食を示す共焦点顕微鏡画像である。
【図８Ｃ】本発明の微粒子が、DCを標的とし、十分な取り込み特性を有し、かつ最小限の活性を有することを示す。IL-10およびIL-12についてのサイトカイン染色により測定されたように、P-D2で修飾された微粒子は、ブランク微粒子と比較した時にDCを活性化しないことを示す。未熟DC（iDC）およびLPSで成熟させたDC（LPS）が、比較のために含まれる。
【図８Ｄ】本発明の微粒子が、DCを標的とし、十分な取り込み特性を有し、かつ最小限の活性を有することを示す。表面修飾微粒子は、樹状細胞に対して無視可能な毒性効果を有する。
【図９】P-D2ペプチドによる表面修飾が、微粒子の取り込みおよびその後のリンパ節への転位を大幅に増強することを示す。
【図１０】本発明の微粒子製剤が、寛容誘発樹状細胞のマーカーであるインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ（IDO）の産生を促進することを示す。
【図１１Ａ】微粒子にカプセル化された抗原が、効率的に放出され、装填され、かつDCによりT細胞に提示されることを示す。
【図１１Ｂ】微粒子にカプセル化された抗原が、効率的に放出され、装填され、かつDCによりT細胞に提示されることを示す。
【図１２Ａ】微粒子で処置されたDCが、同種T細胞増殖を抑制することを示す。
【図１２Ｂ】微粒子で処置されたDCが、同種T細胞増殖を抑制することを示す。
【図１３】本発明の抗原特異的な寛容誘発微粒子製剤が、NODマウスにおいてT1Dを予防するか、遅延させるか、または逆転することを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１０】
詳細な開示
本発明は、抗原特異的な寛容を誘導する微粒子および該微粒子を含む治療用組成物を提供する。有利なことに、本発明は、免疫細胞への治療剤の標的送達を可能にする。さらに、ある特定の態様において、本発明は、治療剤の徐放を容易にする。有利なことに、本発明の微粒子送達システムは、抗原特異性およびエクスビボ安定性を有する。
【００１１】
一つの態様において、本発明は、免疫調節分子と共に1種または複数の抗原を抗原提示細胞（例えば、樹状細胞またはマクロファージ）へ標的送達するための微粒子を提供する。生分解性材料を用いて製造された粒子に、疎水性および／または親水性分子が装填され得る。さらに、ワクチン粒子は、粒子表面の修飾により、特異的な抗原提示細胞を標的とし得る。送達される免疫調節分子（例えば、トランスフォーミング増殖因子β1、ラパマイシン、ビタミンD、およびレチノイン酸）は、内部移行してリンパ球に提示するための抗原貯蔵物を抗原提示細胞に送達するとともに、抗原提示細胞の免疫抑制／寛容誘発の調整を提供し得る。従って、ワクチン粒子は、自己免疫障害（例えば、1型糖尿病）の処置、器官／組織／細胞移植、または組織工学による構築物などの用途に適した特異的な寛容をもたらすように、抗原提示細胞の機能を調節する。
【００１２】
自己免疫疾患を含む免疫系障害の予防および／または処置のための本発明の治療的使用もまた、提供される。具体的な態様において、本発明は、1型糖尿病のための処置を提供する。
【００１３】
抗原特異的な寛容誘発組成物
一つの局面において、本発明は、抗原特異的な様式で免疫寛容を誘導する治療用組成物

を提供する。好ましい態様において、組成物は、関心対象の免疫細胞を標的とする微粒子であって、生体適合性材料で作製され、関心対象の免疫細胞を標的とするリガンドが表面に結合しており、かつ、治療剤および抗原（ある特定の態様において、自己抗原および／またはアレルゲンである）をその内部にカプセル化している、微粒子を含む。一つの具体的な態様において、本発明の微粒子は、未熟樹状細胞を標的とし、カプセル化された構成要素を時限方式で放出し、かつ抗原特異的な様式で寛容を誘導する。治療用組成物は、自己免疫疾患、アレルギー、移植拒絶反応、慢性炎症、ならびに／または特異的な寛容が有益であると考えられる他の疾患および状態に対するワクチンに製剤化され得る。

【００１４】

好ましくは、微粒子マトリクスは主に、実質的に生物学的に不活性なまたは生物学的に適合性の材料で作製される。本明細書において使用される「不活性な」、「生物学的に不活性な」、または「生物学的に適合性の」という用語は、生きている組織中に投与された場合の通常の治癒期間後に、実質的に有害な生化学的免疫応答、アレルギー性免疫応答、または望ましくない免疫応答を誘発しない物質または材料を指す。

【００１５】

好ましくは、本微粒子マトリクスは、生分解性である。本明細書において使用される「生分解性」という用語は、材料が侵食、溶解、腐食、分解、加水分解、摩耗などおよびこれらの組み合わせのような標準的な化学的、生化学的、および／または物理的過程により壊れることができる能力を指す。

【００１６】

微粒子を作製するために有用な生体適合性材料は、ヒドロゲル、コラーゲン、アルギナート、ポリ（グリコリド）（PGA）、ポリ（L-ラクチド）（PLA）、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）（PLGA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエステル、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリアミドを含むがこれらに限定されない生分解性ポリマー材料；リン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウムを含むがこれらに限定されない非ポリマー生分解性セラミック材料；およびこれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。好ましい態様において、微粒子は、治療薬の送達についてFDAに認可されているポリ乳酸グリコール酸共重合体（PLGA）で製造される。

【００１７】

本発明に従って標的とされ得る免疫細胞は、樹状細胞、マクロファージ、リンパ球、単球、好中球、肥満細胞、B細胞、T細胞、およびTヘルパー細胞を含むが、これらに限定されない。ある特定の態様において、樹状細胞、マクロファージ、T細胞、およびB細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞が標的とされる。ある特定の態様において、樹状細胞および／またはTreg細胞が標的とされる。

【００１８】

一つの態様において、微粒子の外側表面は、特定の免疫細胞を標的とする1種または複数の表面リガンドまたは表面抗体を含む。ある特定の態様において、表面リガンドは、微粒子に化学的に固定されるか、または共有結合で連結される。一つの態様において、微粒子は樹状細胞を標的とする。好ましい態様において、微粒子は、成熟樹状細胞と比べて未熟樹状細胞を特異的かつ選択的に標的とする。好ましくは、表面リガンドまたは抗体はまた、免疫細胞においてアポトーシスおよび／または寛容誘発経路を誘導する。

【００１９】

樹状細胞に対する表面リガンドの例は、抗CD11抗体および抗Dec205抗体；ホスファチジルセリン（PS）｛PS受容体｝；4N1K｛CD 36／CD 47｝；PD2｛CD11c｝；P2｛CD11b｝；RGD｛$\alpha_v\beta_3$｝；およびCS1｛$\alpha_4\beta_7$｝などの、樹状細胞の細胞表面リガンド／受容体に特異的に結合する抗体、アプタマー、および結合パートナーを含むが、これらに限定されない。一つの態様において、表面抗体は、樹状細胞を認識する抗DEC-205抗体である。好ましい態様において、微粒子マトリクスは、樹状細胞を標的とするためにPD2で表面が修飾される。

【００２０】

微粒子中へのカプセル化のために有用な治療剤は、免疫調節剤、抗炎症性、免疫抑制性および／または寛容誘発性の剤、関心対象の免疫細胞を動員する剤、サイトカイン、ならびにアジュバントを含むがこれらに限定されず、そのすべては、免疫学の分野における当業者に周知である。

【００２１】

免疫調節剤は、ビタミンD（例えば、ビタミンD_3およびその類似体）、グルココルチコイド、エストロゲン、ラパマイシン、およびレチノイン酸を含むが、これらに限定されない。免疫抑制性の寛容誘発剤は、IL-10、INF-γ、およびINF-λなどの抗炎症性サイトカイン；ならびにトランスフォーミング増殖因子β1（TGF-β1）を含むが、これらに限定されない。治療剤は、親水性または疎水性物質であり得る。

【００２２】

免疫細胞を動員または誘引する様々な剤もまた、公知である。例えば、樹状細胞を動員する化学誘引物質は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、およびマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）を含む。好ましくは、未熟樹状細胞を選択的に誘引するGM-CSFが、本発明において使用される。

【００２３】

本発明に従う有用な抗炎症性または免疫抑制性の剤はまた、アスピリン、イブプロフェン；ナプロキセンなどの非ステロイド性抗炎症薬物（NSAID）、ベツリン酸、バルドキソロンメチル（bardoxolone methyl）、およびトリテルペノイドサポニンなどのトリテルペノイドを含む。

【００２４】

本発明に従う有用なアジュバントは、例えば、CpG、ポリI:C、およびmPLAを含む。

【００２５】

ある特定の具体的な態様において、本発明に従う有用な治療剤は、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）およびインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ（IDO）などのT細胞阻害剤；IL-2、ラパマイシン、またはホスホジエステラーゼ3B（PDE3b）阻害剤、例えばシロスタミド（cilostamide）などのTreg選択的増殖因子；ならびに、血管内皮成長因子（VEGF）および転写因子E2F1などの樹状細胞の成熟を阻害する剤を含む。

【００２６】

本発明の微粒子は、特異的な寛容の誘導がそれにとって有益であると考えられる抗原（自己抗原および／またはアレルゲンを含む）を、その内部にカプセル化している。抗原の選択は、予防または処置されるべき特定の自己免疫疾患、アレルギー誘発反応、または炎症性応答に依存し、本開示の恩恵にあずかる熟練した臨床医により決定され得る。様々な過敏性免疫応答を引き起こす抗原が特徴決定されており、または臨床試験を介して同定され得る。例えば、1型糖尿病を引き起こす自己抗原は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）の65 kDaアイソフォーム、インスリン、ホスファターゼ関連IA-2分子、膵臓β細胞および島細胞のエピトープなどを含むが、これらに限定されない。多発性硬化症を引き起こす自己抗原は、ミエリン塩基性タンパク質を含む。一般的なアレルゲンは、薬物、血清、落花生、動物の毛、花粉、およびふけを含むが、これらに限定されない。さらに、移植拒絶反応を予防するために、抗原を、ドナー細胞、組織、または器官に由来させることができる。

【００２７】

一つの態様において、寛容誘発表現型を有する樹状細胞の誘導の場合、治療用組成物は、プロスタグランジンE2などの成熟刺激物質を含有しない。

【００２８】

図1は、本発明の微粒子の具体的な態様を図示する。

【００２９】

一つの具体的な態様において、微粒子は、プロフェッショナル抗原提示細胞などの免疫細胞により貪食可能である。貪食可能な微粒子は、抗原、自己抗原、および／またはアレルゲン（例えば、β細胞特異的な自己抗原）ならびに治療的に有効な免疫調節因子（例え

ば、ビタミンD3またはラパマイシン）を含むかまたはその内部にカプセル化している。貪食により、PLGAなどのポリマーマトリクスから細胞内標的への、カプセル化された抗原および治療剤のエンドソーム放出が可能になる。一つの態様において、本発明の微粒子は、交差提示を通して、MHC-II指向性およびMHC-I指向性の免疫応答の両方を生じる。

【００３０】

一つの態様において、本発明の微粒子は、ピノサイトーシス可能（pinocytosable）ではない（ナノ粒子は、ピノサイトーシス可能である）。本微粒子は、DCなどの食細胞を効率的に標的とする。一つの態様において、本微粒子は、非食細胞を標的としない。

【００３１】

別の具体的な態様において、微粒子は、プロフェッショナル抗原提示細胞などの免疫細胞により貪食不可能である。一つの態様において、貪食不可能な微粒子は、関心対象の免疫細胞を動員するための剤（例えば、GM-CSF）および免疫抑制剤（例えば、TGF-β1）を含むかまたはその内部にカプセル化している。関心対象の部位に局在化させた貪食不可能な微粒子により、例えば、数日から数週間などの長期間にわたる、細胞外環境における治療剤の徐放が可能になる。一つの態様において、免疫調整因子の局所的送達は、Treg細胞の誘導を促進しかつ自己反応性T細胞を抑制する、寛容誘発DC表現型をもたらす。

【００３２】

ある特定の態様において、樹状細胞により貪食可能な微粒子は、0.5μm～10.0μmの範囲、またはその間の任意の範囲、例えば、0.5μm～8.0μm、0.5μm～5.0μm、0.5μm～3.0μm、0.5μm～2.0μm、および0.5μm～1.0μmの直径を有する。ある特定の態様において、微粒子は、約1.0～3.0μmの直径を有する。

【００３３】

ある特定の態様において、微粒子は、樹状細胞により貪食不可能であり、約15.0μm～200.0μmの範囲、またはその間の任意の範囲、例えば、15.0μm～60.0μm、20.0μm～50.0μm、20.0μm～40.0μm、20.0μm～35.0μm、15.0μm～30.0μm、15.0μm～25.0μm、および15.0μm～20.0μmの直径を有する。

【００３４】

微粒子のサイズは、例えば、細胞型、カプセル化される治療薬の量、送達の部位、および宿主の種などの種々のパラメータに応じて、最適の送達効果を達成するように当業者により最適化され得る。

【００３５】

さらなる態様において、本発明は、関心対象の免疫細胞により貪食可能な微粒子および関心対象の免疫細胞により貪食不可能な微粒子の混合物を含む、二重微粒子システムを提供する。一つの態様において、二重微粒子システムは、樹状細胞により貪食可能な微粒子および樹状細胞により貪食不可能な微粒子の混合物を含む。

【００３６】

図6は、本発明の樹状細胞を標的とする二重微粒子システムの具体的な態様を図示する。

【００３７】

別のさらなる態様において、本発明は、注射可能なヒドロゲル組成物を提供し、該ヒドロゲルは、貪食可能な微粒子；関心対象の免疫細胞を動員するための剤（例えば、GM-CSF）；および免疫抑制剤（例えば、TGF-β1）を含むかその内部にカプセル化しており；該貪食可能な微粒子は、抗原（自己抗原および／またはアレルゲンであり得る）（例えば、β細胞特異的な自己抗原）および免疫調節剤（例えば、ビタミンD3、ラパマイシン）を含むかまたはその内部にカプセル化している。一つの態様において、注射可能な生分解性ヒドロゲルが、インサイチューゲル化を介して作製され、かつ、長期間（例えば、約2日）にわたるその成分の徐放を容易にする。

【００３８】

一つの態様において、本発明の治療用組成物または微粒子は、樹状細胞およびTreg細胞を含むがこれらに限定されないいかなる免疫細胞も含有しない。

【００３９】
抗原特異的な免疫寛容の誘導
一つの局面において、本発明は、抗原特異的な免疫寛容を誘導するための治療法を提供する。好ましくは、方法は、抗原特異的な免疫寛容の誘導が必要とされる対象に、有効量の本発明の微粒子および治療用組成物を投与する段階を含む。具体的な態様において、本発明の治療用組成物は、樹状細胞を特異的に標的とし、寛容誘発表現型を有する樹状細胞を誘導し、Treg細胞の誘導を促進し、かつ／またはT細胞増殖を抑制する。
【００４０】
本明細書において使用される「寛容」という用語は、自己抗原およびアレルゲンを含む抗原に対する応答がないこと、または応答の低減を指す。
【００４１】
本明細書において使用される「寛容誘発」または「寛容を誘導する」という用語は、抗原に対する寛容を直接的もしくは間接的に誘導するか、または、抗原に対する適応免疫応答をサイレンシングできるかもしくは下方制御できる表現型を指す。寛容誘発樹状細胞は、エフェクターT細胞を活性化する能力は低いが、制御性T細胞を誘導しかつ活性化する高い能力を有する。一つの態様において、寛容誘発樹状細胞は、典型的に、低いMHCII、CD80、CD86レベルを有し、かつ、CD103およびインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼなどの寛容誘発マーカーを発現する。
【００４２】
好ましくは、本発明の微粒子は、未熟樹状細胞を標的とし、成熟樹状細胞を標的としない。未熟樹状細胞は、非常に樹枝状の形態を有し、かつ低いT細胞活性化可能性を有する。未熟樹状細胞は、成熟刺激が活性化されると、不可逆性の成熟プロセスを受ける。成熟樹状細胞は、抗原をプロセシングしかつT細胞を活性化する、増強された能力を有する。
【００４３】
実施例において実証されるように、本発明の微粒子は、DC標的特異性の改善およびDCによる取り込みの増加を有することができ；DCにおける機能的な抗原プロセシングおよび提示を結果として生じることができ；未熟DC表現型の維持を容易にし、かつ、粒子の取り込み後の成熟を、および寛容誘発DCマーカー（例えば、インドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ）の発現を予防するかまたは遅延させることができ；同種混合リンパ球反応の抑制を容易にすることができ；かつ$Foxp3^{+}$ T_{reg}細胞を誘導することができる。
【００４４】
一つの態様において、微粒子組成物の投与は、MHC-II、CD86、およびCD80の下方制御を結果として生じる。さらに、リガンド4N1K、RGD、および／またはCS1で表面が修飾された微粒子は、未熟DC対照と比較して、混合リンパ球反応試験において低減したT細胞増殖を示す。さらに、微粒子は、制御性T細胞の誘導を通して、自己反応性T細胞を抑制する。
【００４５】
具体的には、インビボのデータにより、後期の糖尿病前症の12週齢NODマウスに対する本微粒子組成物の投与が1型糖尿病（T1D）の発症を遅延させることが、示された。
【００４６】
有利なことに、本微粒子中にカプセル化されたワクチンは、徐放性材料（例えば、ポリラクチド-コ-グリコリド）を用いた初回刺激用量および追加免疫用量の両方の同時送達により、容易に投与され得る。
【００４７】
免疫障害および／または自己免疫疾患の処置
本発明は、自己免疫疾患、アレルギー誘発反応、移植拒絶反応、慢性炎症、および、特異的な寛容の誘導が有益であると考えられる他の疾患または障害の予防および／または処置のための方法を提供する。好ましくは、方法は、そのような処置を必要とすると診断されている対象に、有効量の本発明の微粒子または組成物を投与する段階を含む。
【００４８】
本明細書において使用される、「処置」という用語または任意のその文法的変形物（例

えば、処置する、処置すること、および処置など）は、疾患または状態の症候を回復することまたは緩和すること、状態の進行、重症度、および／または範囲を、低減させること、抑制すること、阻害すること、少なくすること、または影響を及ぼすことを含むが、これらに限定されない。

【００４９】

本明細書において使用される、「予防」という用語または任意のその文法的変形物（例えば、予防する、予防すること、および予防など）は、症候の発症を遅延させること、疾患の再発を予防すること、再発症状発現の数または頻度を減少させること、症候性症状発現間の潜伏期を増加させること、またはこれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。本明細書において使用される予防とは、症候の完全な阻害または排除を必要としない。

【００５０】

本明細書において使用される「有効量」という用語は、疾患もしくは状態を処置することができるか、または意図された治療効果を別の方法で生じることができる量を指す。一つの態様において、有効量とは、寛容誘発量である。例えば、有効量の抗原は、抗原特異的な免疫寛容を誘導することができるが、免疫原性反応を生じることはできない。

【００５１】

本明細書において使用される「対象」という用語は、本発明に従う組成物での処置が提供され得る、霊長類などの哺乳動物を含む生物を記載する。開示される処置の方法から恩恵を受け得る哺乳動物種は、類人猿、チンパンジー、オランウータン、ヒト、サルなどの霊長類；ならびに、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、マウス、ラット、モルモット、およびハムスターなどの非霊長類を含むが、これらに限定されない。

【００５２】

ある特定の態様において、本発明に従って処置される対象は、自己免疫疾患、アレルギー、慢性炎症、および、特異的な寛容の誘導が有益であると考えられる他の疾患または障害を有すると診断されている。別の態様において、移植レシピエントは、移植手順の前、後、または最中に、本発明で処置される。

【００５３】

別の態様において、本発明に従って処置される対象は、自己免疫疾患、または特異的な寛容の誘導が有益であると考えられる他の疾患を発症しやすいか、または発症する素因を有すると診断される。自己免疫疾患は、強い遺伝的要因および環境的要因を有すると考えられている。ある特定の個体は、遺伝的に自己免疫の素因を有するとみなされる。多くの自己免疫疾患は、家系に伝わる。例えば、DRB1 0401、DRB1 0402、DRB1 0405、DQA 0301、DQB1 0302、およびDQB1 0201などのIDDM1遺伝子の多くの変異は、より高いT1D発症リスクと関連している。さらに、毒素および感染症への曝露は、より高い自己免疫発症リスクを生じる。従って、特定の型の自己免疫疾患に対する素因または感受性は、自己免疫疾患の個人歴および家族歴の存在、自己免疫と関連する遺伝マーカーの存在、ならびに／または、毒素もしくは感染症に曝露される機会が多い状態における生活および／もしくは仕事などの要因の組み合わせにより、決定され得る。

【００５４】

一つの態様において、予防および処置の方法は、本発明の微粒子および組成物の投与の前に、対象が自己免疫疾患、または特異的な寛容の誘導が有益であり得る他の疾患もしくは障害を有するか否かまたはその素因を有するか否かを診断する段階を含む。

【００５５】

一つの態様において、本発明は、免疫障害および／または自己免疫疾患、特に1型糖尿病の予防および／または処置において使用され得る。ある特定の態様において、本発明は、1型糖尿病、関節リウマチ、クローン病、慢性炎症性腸疾患、多発性硬化症（MS）、卵巣炎、移植片対宿主反応および移植拒絶反応、小児脂肪便症、尋常性天疱瘡、および自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）の原型、ならびに、望ましくない免疫反

応の抑制が有益である関連障害を含むがこれらに限定されない免疫障害および自己免疫疾患を処置するために、有用である。

【００５６】

ある特定の態様において、本発明は、免疫障害および自己免疫疾患と関連する疾患または状態を処置するために有用である。疾患または状態は、喘息、アレルギー、鼻炎、慢性蕁麻疹、およびアトピー性皮膚炎を含むが、これらに限定されない。

【００５７】

さらに本発明は、慢性炎症、移植拒絶反応、およびアレルギー誘発反応の予防および／または処置において使用され得る。

【００５８】

その上、本発明はまた、免疫応答におけるマクロファージまたはT細胞に関連する局面を阻害するためにも使用され得る。本発明は、マクロファージ抗原提示活性、マクロファージ関連サイトカイン産生、T細胞サイトカイン産生、T細胞接着、およびT細胞増殖活性を含むがこれらに限定されない、マクロファージまたはT細胞の活性を阻害するために使用され得る。従って、本発明はまた、液性および／または細胞性免疫応答を抑制または阻害するために有用である。

【００５９】

一つの態様において、DCを標的とする微粒子製剤は、寛容誘発DCを生成し、T_{reg}を誘導し、かつ従って、NODマウスにおいてT1Dを予防および逆転するために有用である。

【００６０】

本発明の実験モデルにおいて、自己免疫疾患の治療モデルとして1型糖尿病が使用されたが、本発明の治療的恩恵が1型糖尿病の処置を超えて広がることが容易に理解されるであろう。

【００６１】

スクリーニング法

本発明の別の局面は、接着DCの単離された集団と表面結合型微粒子とを共存させるように働く、樹状細胞などの寛容誘発免疫細胞のスクリーニングのための、新規の樹状細胞／微粒子細胞性マイクロアレイを提供する。このプラットフォームは、非常にわずかな細胞のみを用いてコンビナトリアルに装填された大量の微粒子製剤をスクリーニングする手段を提供する。少ない細胞数を用いてスクリーニングする技術は、T1D患者由来細胞の入手可能性が限られているという障害を克服し、かつ、個別化医療に向けて一歩踏み出す。従って、本微粒子細胞マイクロアレイは、最適化の基準として寛容誘発DC表現型マーカーを用いて、コンビナトリアル粒子製剤をスクリーニングするために使用され得る。

【００６２】

一つの態様において、本発明は、以下の段階を含む、抗原に対して特異的な寛容を有する関心対象の免疫細胞を誘導する治療剤をスクリーニングするための方法を提供する：

a）抗原を含むかまたはその内部にカプセル化している微粒子、および、候補治療剤または治療剤の組み合わせ候補を供給する段階であって、該微粒子の表面が、関心対象の該免疫細胞に結合するリガンドを含む、段階；

b）該免疫細胞を該微粒子と接触させる段階；

c）該免疫細胞が寛容誘発表現型を獲得しているか否かを判定する段階；ならびに

d）免疫細胞が寛容誘発表現型を獲得している場合に、候補治療剤または治療剤の組み合わせ候補を選択する段階。

【００６３】

関心対象の免疫細胞は、樹状細胞およびマクロファージなどの抗原提示細胞を含む。

【００６４】

候補治療剤は、有機または無機分子、薬物、ペプチドまたはタンパク質、脂質、および核酸；生物学的因子；細胞抽出物；ならびに植物抽出物などの、種々の化学的クラスの化合物を含む。例えば、候補治療剤は、免疫調節剤、免疫抑制剤、寛容誘発剤、関心対象の免疫細胞を動員する剤、アジュバント、サイトカインなどから選択され得る。

【００６５】
一つの態様において、インビトロで多数の候補剤をスクリーニングするために、ハイスループットシステムが使用される。あるいは、候補剤は、微粒子を介して動物対象に送達され得、それによりインビボで特異的な寛容を誘導する能力についてスクリーニングする。
【００６６】
特異的な寛容を誘導する能力は、寛容誘発マーカー（例えば、IDO）の存在、寛容誘発表現型の誘導、T細胞増殖を抑制する能力、Treg細胞の誘導を促進する能力、サイトカインプロフィール、インビボでの特異的な寛容の誘導、ならびに、自己免疫疾患、アレルギー、慢性炎症、移植拒絶反応などの予防および／または処置を含む種々のパラメータに基づいて、判定され得る。
【００６７】
パラメータは、免疫蛍光定量化、蛍光活性化細胞選別（FACS）、フローサイトメトリー、免疫染色などのような標準的な方法を用いて、定性的または定量的に測定され得る。
【００６８】
製剤および投与
本発明は、治療用組成物または薬学的組成物を提供する。一つの態様において、組成物は、治療的有効量の本発明の微粒子、および任意で、薬学的に許容される担体を含む。
【００６９】
剤との使用に適した非毒性の薬学的に許容される担体は、薬学的製剤の分野における当業者に明らかであろう。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, seventeenth edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)を参照されたい。
【００７０】
本発明の微粒子および治療用組成物は、組織、例えば皮膚、筋肉、器官など、または他の局所的部位、例えばリンパ節、パイエル板などに送達されてもよい。
【００７１】
一つの態様において、本発明の微粒子は、炎症性障害および／または自己免疫関連障害の発症リスクをある程度有する対象へ投与するためのワクチン組成物に製剤化される。さらに、本発明の組成物は、炎症性障害および自己免疫関連障害の既存の症候を有する対象に投与され得、かつ、疾患を予防するかまたはその悪化を最小化するためのカスタマイズされたワクチンスケジュールおよび組成物を提供する。
【００７２】
治療用量範囲は、本開示の恩恵にあずかる当業者により決定され得る。当然、そのような治療用量範囲は、患者のサイズ、種、および身体状態、患者の医学的状態の重症度、使用される特定の剤形、投与の経路などと共に変動するであろう。
【００７３】
組成物は、単一用量で、または望ましい効果を与えるためのある期間にわたって1回より多い用量で、投与され得る。
【００７４】
好ましい態様において、本発明の微粒子は、非経口投与のために製剤化され得る。本発明の遺伝子構築物などの1種または複数の剤を含有する水性組成物の調製は、本開示に照らして当業者に公知であろう。典型的に、そのような組成物は、液体の溶液または懸濁液のいずれかとしての注射可能物質として、調製され得；注射前に液体を添加して溶液または懸濁液を調製するための使用に適した固体形態もまた調製され得；かつ、該調製物は乳化されてもよい。
【００７５】
注射可能な使用に適した薬学的形態は、滅菌された水性溶液または分散液；ゴマ油、落花生油、または水性プロピレングリコールを含む製剤；および滅菌された注射可能な溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末を含む。すべての場合において、形態は、滅菌

でなければならず、かつ、易注射性（easy syringability）が存在する程度まで流動性でなければならない。形態は、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、かつ、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。

【００７６】

本発明の微粒子を含む組成物は、中性または塩形態の組成物に製剤化され得る。薬学的に許容される塩は、酸付加塩を含み、かつ例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸で、または、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸で形成されたものを含む。塩はまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、および、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基に由来し得る。

【００７７】

担体はまた、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、それらの適当な混合物、ならびに植物油を含有する、溶媒または分散媒でもあり得る。例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により、妥当な流動性が維持され得る。多くの場合において、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期にわたる吸収は、吸収を遅延させる剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物における使用によりもたらされ得る。

【００７８】

滅菌された注射可能な溶液は、必要とされる量の活性化合物を適切な溶媒に組み入れた後、濾過滅菌することにより、調製される。一般に、分散液は、種々の滅菌された活性成分を、上記に列挙されたもの由来の基本的な分散媒および必要とされる他の成分を含有する滅菌媒体中に組み入れることにより、調製される。滅菌された注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥技術および凍結乾燥技術であり、これにより、活性成分に加えて、以前に濾過滅菌されたその溶液からの任意の追加的な望ましい成分の粉末が得られる。

【００７９】

本発明の組成物は、局所的、経皮、関節内、非経口（例えば、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、または筋肉内）、頭蓋内、脳内、脊髄内、膣内、または子宮内を含む標準的な経路により、処置されるべき対象に投与され得る。処置されるべき状態に応じて、ある経路が他のものよりも好ましい可能性があり、これは当業者により決定され得る。好ましい態様において、本発明の組成物は、非経口投与のために製剤化される。別の態様において、本発明のペプチドおよび組成物は、徐放性製剤として製剤化される。

【００８０】

本発明のさらなる態様は、他の薬理学的療法と組み合わせた微粒子の投与を提供する。同様のまたは別個の疾患機構を標的とする他の医薬との併用療法は、いずれかの特定医薬を用いたそれぞれの単独療法に比べてより大きな有効性および安全性の利点を有する。

【００８１】

1種より多くを投与する時、剤の投与は、同時にまたは時間内で連続的に行われ得る。剤は、互いに前後して、または同時に投与され得る。方法はまた、網膜症または本明細書において記載される他の疾患を処置するために使用される他の薬物との同時投与も含む。

【実施例】

【００８２】

以下は、本発明を実施するための手順を例証する実施例である。これらの実施例は、限定的であると解釈されるべきではない。特に断りのない限り、すべてのパーセンテージは重量あたりであり、かつすべての溶媒混合比は容積あたりである。

【００８３】

実施例1‐寛容誘発樹状細胞の誘導

本実施例は、本発明の表面修飾微粒子が、樹状細胞を効率的に標的とし、かつ「寛容誘

発」表現型を有する樹状細胞を誘導することを示す。

【００８４】

簡潔に言うと、C57BL/6jマウスの骨髄から単離した前駆体を、20 ng/mlの増殖因子GM-CSFの存在下で10日間、培地の半分を1日おきに交換して培養することにより、未熟樹状細胞（iDC）を取得する。

【００８５】

50：50ポリマー組成のポリ(d,lラクチド-コ-グリコリド)（PLGA）（Lactel, AL, USA）を使用して、微粒子を生成する。約数μmの直径を有する微粒子を、標準的な油-水溶媒蒸発技術を用いて形成する。微粒子は、CD11cAb、Dec-205Ab、Dec-205 Con、P-D2、P2、RGD、またはREGから選択されるリガンドで表面修飾する。樹状細胞による微粒子の取り込みは、ローダミンが装填された微粒子の全蛍光を、iDCへの1時間の曝露の前後にプレートリーダー（励起：532 nm；放出：585 nm）を用いて測定することにより判定する。本発明の微粒子のDC結合特異性をMφのものと比較するために、このアッセイ法を、BL/6マウスの骨髄由来のMφについて繰り返す。

【００８６】

種々の表面修飾微粒子との24時間の細胞培養後に、細胞培養上清を収集する。IL-12サイトカインのサブユニットであるIL-12p40、およびIL-10サイトカインの産生を、サンドイッチ酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）キット（Becton Dickinson）を用い、製造業者の指示に従って解析する。

【００８７】

T_{reg}誘導インドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ（IDO）の発現のレベルを測定するために、樹状細胞を収集し、蛍光タグを付加した抗IDO抗体で製造業者の使用説明書に従って染色し、かつフローサイトメトリーを用いて解析する。さらに、T細胞抑制を、標準的な同種MLR手順、その後の免疫染色およびフローサイトメトリーを用いて解析する。

【００８８】

結果から、種々のリガンドが装填された微小球で、DCおよびMφ取り込みレベルが異なることが示される（図2、図8AおよびB）。CD11cAb、Dec205Ab、Dec205Con、P-D2、またはP2から選択されるリガンドによる微粒子表面の特徴づけは、樹状細胞による微粒子の取り込みを増強する。さらに、表面修飾微粒子で処置された樹状細胞のサイトカイン解析により、本微粒子製剤はDCの成熟を誘導しないことが示される（図3および図8C）。結果はまた、本発明の薬物が装填された微粒子が、DCにおいてIDO発現を誘導すること（図4）、およびMLRにおいてT細胞増殖を抑制すること（図5）を示す。また、表面修飾微粒子が有する、樹状細胞に対する毒性効果は無視可能である（図8D）。

【００８９】

結果から、本発明の微粒子ワクチン製剤が、（a）インビトロでDCを貪食の標的とすること；（b）少ないMHCおよび共刺激分子を有しかつインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ（IDO）などの免疫抑制剤を産生する、「寛容誘発」表現型を有するDCを誘導すること；ならびに（c）T細胞増殖を低減させることが、実証される。従って、治療剤が装填された本微粒子は、様々な免疫障害および自己免疫疾患の予防および処置のためのワクチン組成物として使用され得る。

【００９０】

実施例2‐表面修飾微粒子の、リンパ節へのインビボ標的化および輸送

簡潔に言うと、Didが装填された微粒子を、EDC化学により、P-D2ペプチド（ICAM-4由来）で表面修飾する。1mgの表面修飾微粒子を、C57BL/6マウス（n＝2）の各足蹠に注射する。小さな直径および大きな直径を有する、DiDが装填された非修飾微粒子もまた、対照としてそれぞれのマウスの足蹠に注射される。

【００９１】

注射の3日後に、膝窩リンパ節を切除して単一細胞懸濁液に加工処理し、CD11c（樹状細胞マーカー）およびF4/80（マクロファージマーカー）抗体を用いて染色する。蛍光活性化細胞選別（FACS）解析を行って、DiDが装填された微粒子を有するマクロファージおよ

びDCのパーセントを測定する。

【００９２】

結果から、P-D2ペプチドによる表面の特徴づけが、微粒子の取り込みおよびその後のリンパ節への転位を大幅に増強することが示される（図9）。

【００９３】

実施例3‐寛容誘発樹状細胞の誘導

本実施例は、寛容誘発樹状細胞マーカーであるインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ（IDO）の産生の増加により示されるように、本発明の微粒子製剤が寛容誘発樹状細胞を誘導することを示す。簡潔に言うと、DCを、ビタミンD3および／またはTGF-β1がカプセル化されたMPと72時間インキュベーションする。インキュベーション後、DCを固定化し、透過化処理し、かつ細胞内IDOについて免疫染色する。図9は、前方散乱対IDOのフローサイトメトリーデータを示すグラフである。iDCおよびブランクPLGA MPSの対照を、比較のために含める。結果から、ビタミンD3およびTGF-β1の両方が装填されたMPとインキュベーションしたDCにおける、IDO発現の増加が示される（図10）。

【００９４】

実施例4‐抗原が装填された微粒子で処置された樹状細胞による抗原提示

本実施例は、本発明の微粒子中にカプセル化された抗原が効率的に放出され、装填され、かつ、DCによりT細胞に提示されることを示す。簡潔に言うと、DCを、抗原ペプチド1040-55（BDC2.5ミメオトープ（mimeotope））が装填された微粒子と24時間インキュベーションし、その後、BDC2.5マウス（すべてのT細胞がBDC2.5 T細胞受容体を保有するように操作されている）から単離されたCD4+ T細胞と共インキュベーションする。T細胞刺激を、T細胞増殖のマーカーとしてのBrdU取り込みにより定量化する。

【００９５】

それぞれのドットプロットグラフ（図11A）および棒グラフ形態のプールされたデータの要約（図11B）に示される結果から、抗原ペプチドが装填された微粒子を与えたDC（「P-MP+iDC」）がペプチド抗原を提示する際の効率は、陽性対照（1040-55ペプチドが外因的に装填されたDC：「ペプチド+iDC」）とほぼ同じであることが明示される。また、未熟DC（「iDC」）およびブランクMP（「B-MP+iDC」）の陰性対照も示される。

【００９６】

実施例5‐微粒子で処置された樹状細胞による同種T細胞増殖の抑制

本実施例は、TGF-β1およびビタミンD_3が装填されたMPの製剤が、免疫抑制効果を生じることを示す。簡潔に言うと、樹状細胞を、微粒子製剤と72時間プレインキュベーションする。プレインキュベーション後、同種CD4+ T細胞を培養ウェルに添加し（DC細胞:T細胞の比は1:5）、この混合リンパ球反応物を3日間培養する。培養物をBrdUで5時間パルスし、その後、固定化し、透過化処理し、BrdU取り込み（T細胞増殖のため）およびCD4（T細胞のため）について免疫染色する。培養物をまた、フローサイトメトリーにより解析する。

【００９７】

結果から、TGF-β1およびビタミンD3が装填されたMPの製剤は、iDCまたはPMA／イオノマイシン処置（陽性対照）により誘導されるT細胞増殖のレベルと比較すると、リポ多糖（「SolLPS」）の存在下でさえ同種T細胞増殖を抑制することが示される。

【００９８】

実施例6‐1型糖尿病の予防および処置

本実施例は、本発明の微粒子製剤が、1型糖尿病を予防および／または処置するために使用され得ることを示す。

【００９９】

簡潔に言うと、NODマウスのコホートに、4および5週齢で、対照および実験微粒子製剤を注射する。実験製剤の微粒子に、GM-CSFおよびインスリンBペプチドの組み合わせ；ビタミンD3、TGF-β1、およびインスリンBペプチドの組み合わせ；ならびに、GM-CSF、ビタミンD3、TGF-β1、およびインスリンBペプチドの組み合わせをそれぞれ装填する。マウス

の血中グルコールレベルを、微粒子注射後の最初の32週間にわたって、週1回モニタリングする。血中グルコースレベルが2日連続して250 mg/dlを超えたら、糖尿病と診断し、マウスを屠殺する。

【０１００】

生存曲線の統計学的解析を、カプラン・マイヤー（Kaplan-Meier）ノンパラメトリック生存解析モデルを用いてSYSTATで行う。P値は、ブランクPLGA処置群との比較に相当する。

【０１０１】

結果から、対照と比較すると、本発明の微粒子製剤（「実験製剤」）が、1型糖尿病の発症を遅延させることが示される。ビタミンD_3、GM-CSF、TGF-β1、およびインスリンBペプチドが装填された微粒子は、最も大きな治療効果を生じる。これは、本発明の微粒子製剤が、1型糖尿病を予防するか、遅延させるか、または処置するために使用され得ることを示す。

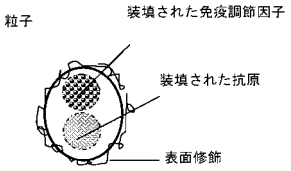
【０１０２】

本明細書において言及されるかまたは引用されるすべての特許、特許出願、仮出願、および刊行物は、それらが本明細書の明示的な教示と矛盾しない程度まで、すべての図面および表を含み、全体として参照により組み入れられる。

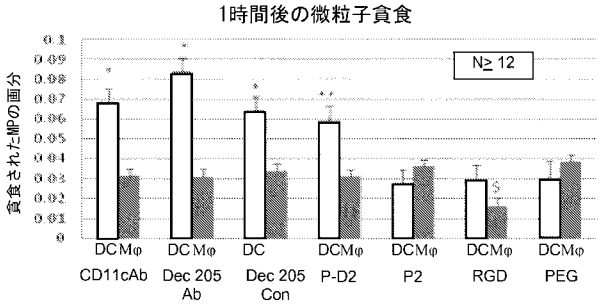
【０１０３】

本明細書において記載される実施例および態様は、単に例証を目的とすること、ならびに、それに照らして種々の改変または変化が、当業者に示唆されると考えられ、かつ本出願の精神および範囲内に含まれるべきであることが、理解されなければならない。

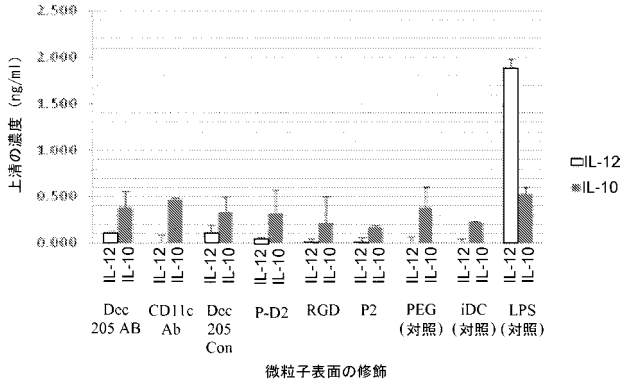
【図１】



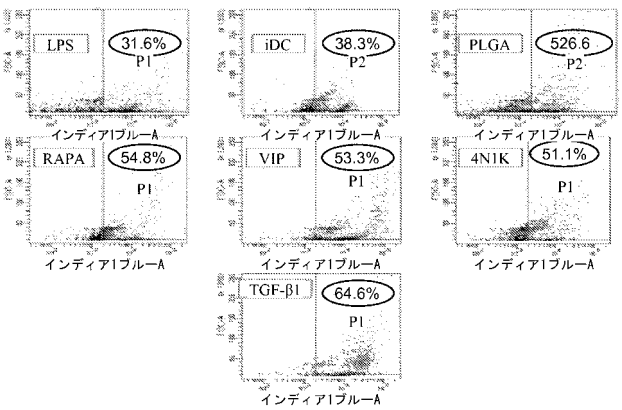
【図２】



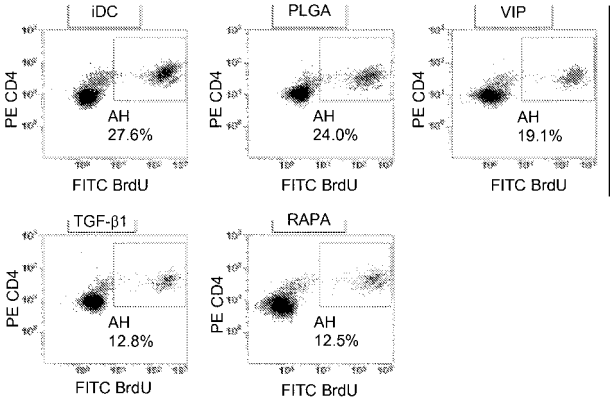
【図３】



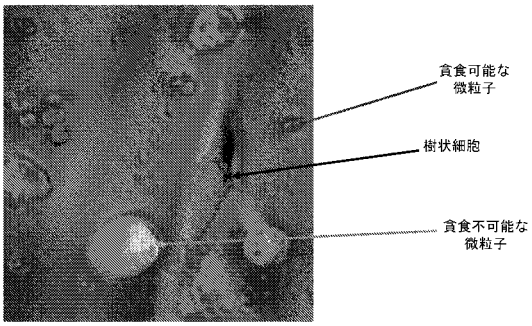
【図４】



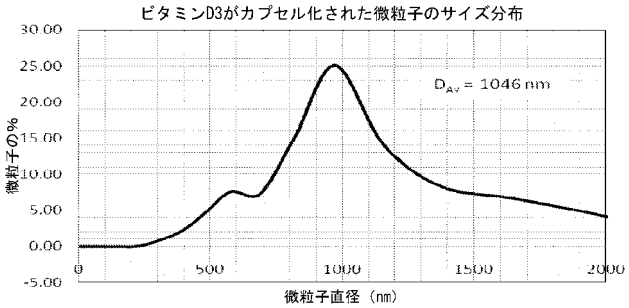
【図５】



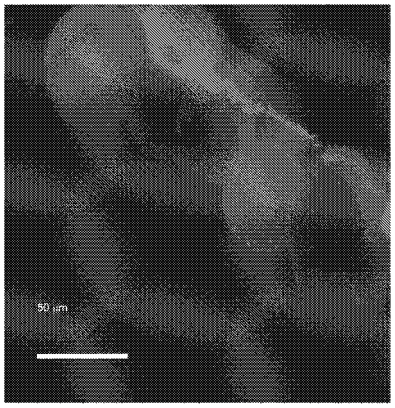
【図６】



【図７Ａ】



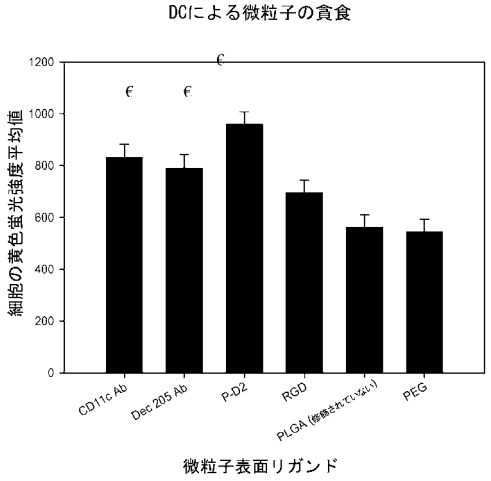
【図７Ｂ】



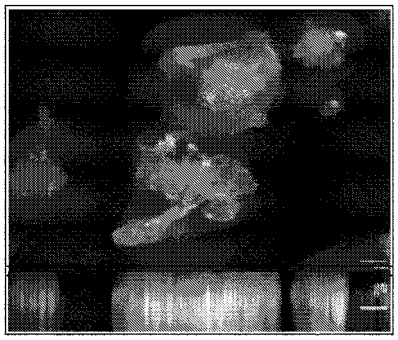
【図７Ｃ】

生物学的剤	使用された量／PLGA (μg/100 mg)	カプセル化効率 ±SD（%）	装填±SD (ng/mg)
TGF-β1	1	62.37 ± 5.18	6.24 ± 0.52
ビタミンD3	5	79.82 ± 6.59	39.91 ± 3.29

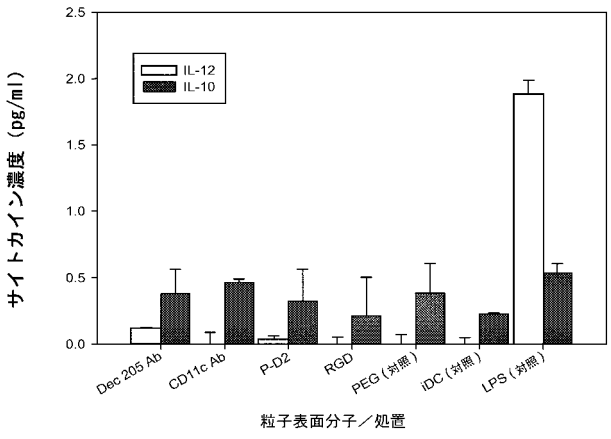
【図８Ａ】



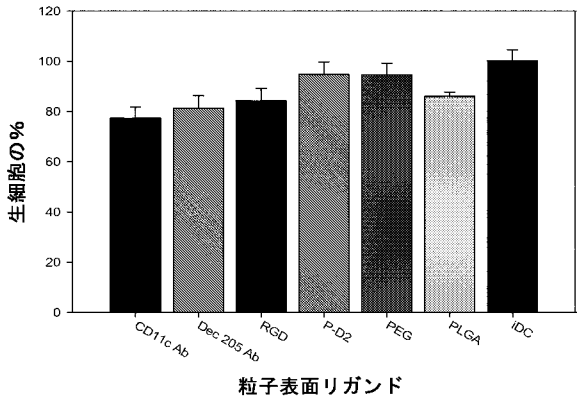
【図８Ｂ】



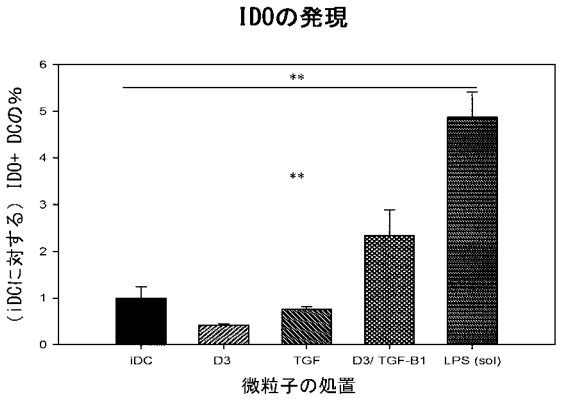
【図８Ｃ】



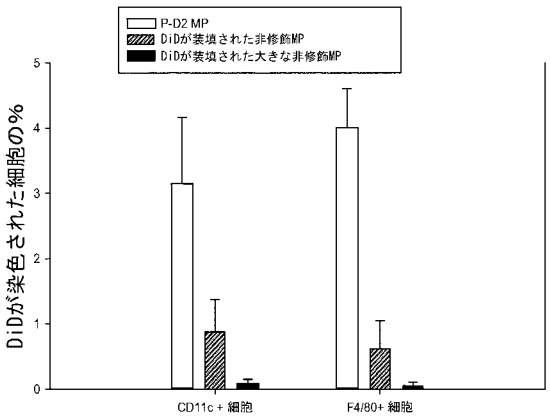
【図８Ｄ】



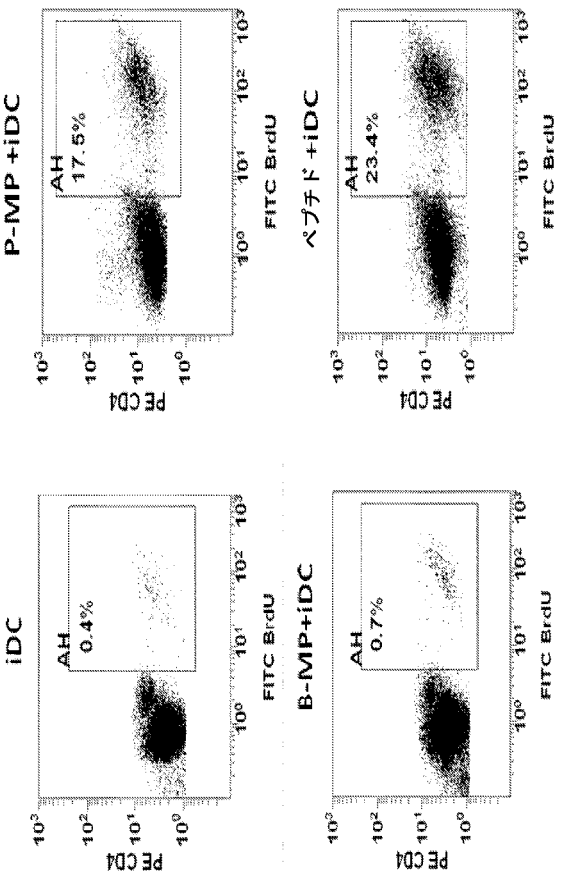
【図１０】



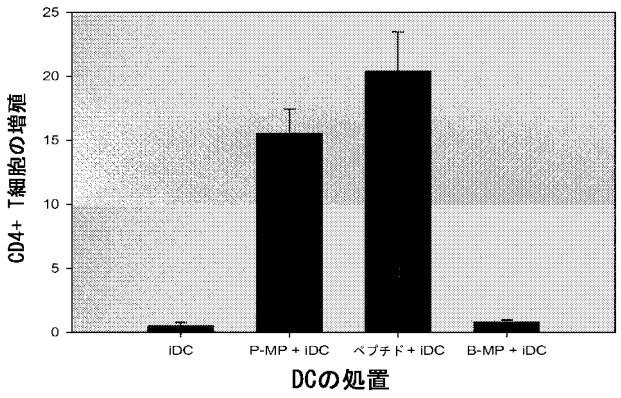
【図９】



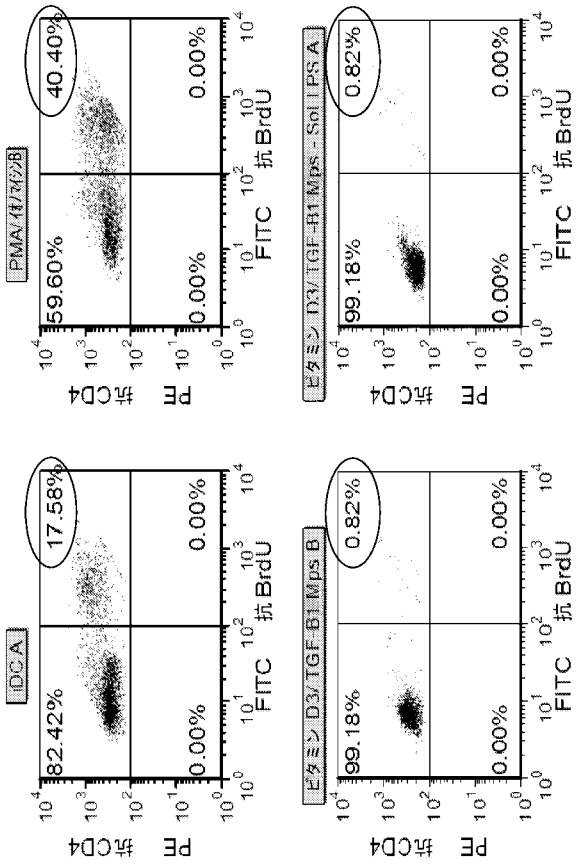
【図１１Ａ】



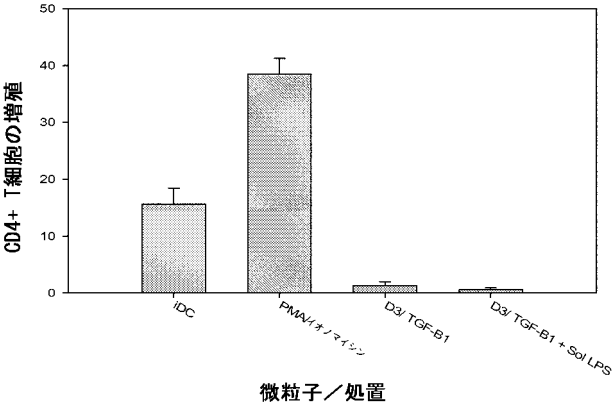
【図１１Ｂ】



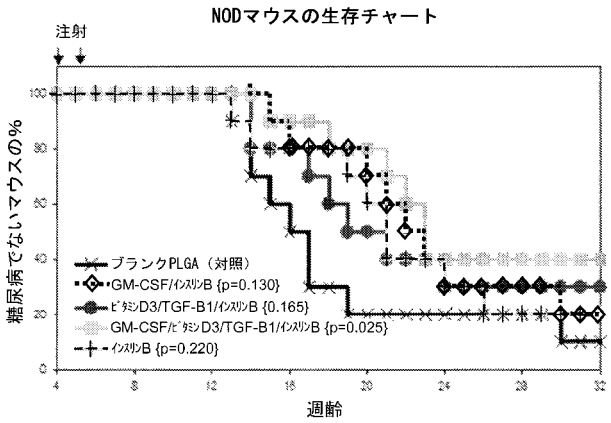
【図１２Ａ】



【図１２Ｂ】



【図１３】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/057478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/564(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i, A61K 31/59(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N 33/53; A61K 9/14; A61K 9/50; A61K 51/00; A61K 39/38

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: vaccine, diabetes, dendritic cell, microparticle, microsphere, immunotherapy

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JHUNJHUNWALA, S. et al., "Delivery of rapamycin to dendritic cells using de gradable microparticles.", J Control Release., Vol. 133, No. 3, pp. 191-197, 26 October 2008	1-5,7
A	See the whole document, especially Pages 5,6, Abstract	6,8-10
A	US 2005-0053667 A1 (DARRELL IRVINE et al.) 10 March 2005 See the whole document, especially Paragraphs [0012],[0054],[0060],[0065],[0111]	1-10
A	US 2006-0002852 A1 (BROWN, L. R. et al.) 05 January 2006 See the whole document, especially Paragraph [0095]	1-10
PX	KESELOWSKY, B. G. et al., "Multifunctional dendritic cell-targeting polymeric microparticles: engineering new vaccines for type 1 diabetes.", Hum Vaccin., 01 January 2011, Vol. 7, No. 1, pp. 37-44, 01 January 2011	1-7
PA	See the whole document, especially Pages 37,38,40, Abstract	8-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 JUNE 2012 (29.06.2012)	**02 JULY 2012 (02.07.2012)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer CHO, Hyun Kyung Telephone No. 82-42-481-5629

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/057478

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 20 pertain to methods for treatment of the human by therapy, as well as prevention method, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: 11-19
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 11, 12 quotes itself; and claims 13-19 are dependent on claim 11 or 12.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2011/057478

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005-0053667 A1	10.03.2005	AU 2004-263094 A1	17.02.2005
		CA 2531032 A1	17.02.2005
		EP 1641424 A2	05.04.2006
		EP 1641424 A4	02.05.2007
		JP 2007-528848 A	18.10.2007
		JP 2007-528848 T	18.10.2007
		WO 2005-013896 A2	17.02.2005
		WO 2005-013896 A3	30.03.2006
US 2006-0002852 A1	05.01.2006	AU 2005-326322 A1	03.08.2006
		AU 2005-326322 B2	05.02.2009
		AU 2009-201301 A1	23.04.2009
		CA 2571899 A1	03.08.2006
		EP 1768692 A2	04.04.2007
		JP 2008-512350 A	24.04.2008
		JP 2008-512350 T	24.04.2008
		US 2006-0002971 A1	05.01.2006
		US 2008-0014144 A1	17.01.2008
		US 2009-0239789 A1	24.09.2009
		US 2009-0269397 A1	29.10.2009
		US 7534448 B2	19.05.2009
		US 7534449 B2	19.05.2009
		US 7550154 B2	23.06.2009
		WO 2006-080951 A2	03.08.2006
		WO 2006-080951 A3	27.12.2007
		WO 2006-080951 A3	03.08.2006
		WO 2006-080951 A8	14.08.2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　38/35	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/40	
Ａ６１Ｐ　3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ　29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ　37/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/00	
Ａ６１Ｐ　37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06	
Ａ６１Ｋ　31/203	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/203	
Ａ６１Ｋ　31/436	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/436	
Ａ６１Ｋ　31/593	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/593	
Ａ６１Ｐ　43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00　１２１	
Ａ６１Ｋ　38/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02	
Ａ６１Ｋ　38/27	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/36	
Ａ６１Ｋ　47/34	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34	
Ａ６１Ｋ　47/48	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/48	
Ａ６１Ｋ　39/395	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395　Ｃ	
		Ａ６１Ｋ	39/395　Ｌ	

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤　利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林　智彦
(74)代理人　100130845
弁理士　渡邉　伸一
(74)代理人　100114340
弁理士　大関　雅人
(74)代理人　100114889
弁理士　五十嵐　義弘
(74)代理人　100121072
弁理士　川本　和弥
(72)発明者　ケセロウスキー　ベンジャミン　ジョージ
アメリカ合衆国　フロリダ州　ゲインズビル　第３５　テラス　ノースウェスト　４３５９
(72)発明者　ルイス　ジャマル
アメリカ合衆国　フロリダ州　ゲインズビル　ユニバーシティ　オブ　フロリダ　リサーチ　ファンデーション　インコーポレーティッド内　ピーオーボックス　１１５５７５
(72)発明者　アチャリャ　アブヒナブ
アメリカ合衆国　ジョージア州　アトランタ　ノースイースト　ピーチトリー　パーク　ドライブ

２７０５
(72)発明者　クレアーサルズラー　マイケル　ジェイ.
アメリカ合衆国　フロリダ州　ゲインズビル　第４２　アベニュー　サウスウェスト　８１０４
(72)発明者　アトキンソン　マーク　エイ.
アメリカ合衆国　フロリダ州　ゲインズビル　第１１６　テラス　サウスウェスト　７４５６
(72)発明者　ワッサーフォール　クライブ　ヘンリー
アメリカ合衆国　フロリダ州　ゲインズビル　第３６　プレイス　サウスウェスト　１９２８
(72)発明者　シャー　チャン　キン
アメリカ合衆国　フロリダ州　ゲインズビル　ユニバーシティ　オブ　フロリダ　リサーチ　ファンデーション　インコーポレーティッド内　ピーオーボックス　１１５５７５
(72)発明者　ブラスコ　トッド　エム.
アメリカ合衆国　フロリダ州　ゲインズビル　第５２　テラス　ノースウェスト　９２８

Ｆターム(参考) 4C076 AA29 AA95 CC04 CC07 CC16 EE24H EE59 FF21 FF32
4C084 AA02 AA03 BA36 BA44 CA62 DA12 DA21 DA24 DB01 DB61
MA02 MA41 NA14 ZB072 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132
ZC232 ZC351 ZC352 ZC751 ZC752
4C085 AA02 AA21 CC21 EE03
4C086 CB22 DA15 MA03 MA05 MA41 ZB07 ZB08 ZC35 ZC75
4C206 AA01 AA02 DA12 MA03 MA05 NA14 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13
ZC23 ZC35