



(21)申請案號：099101695 (22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 01 月 20 日
(51)Int. Cl. : A61K39/385 (2006.01) A61P37/00 (2006.01)
(30)優先權：2009/01/20 美國 61/145,941
(71)申請人：米林維修基金公司 (美國) MYELIN REPAIR FOUNDATION, INC. (US)
美國
美國西北大學 (美國) NORTHWESTERN UNIVERSITY (US)
美國
(72)發明人：米勒 史蒂芬 MILLER, STEPHEN (US)；柏利 羅素 L BROMLEY, RUSSELL L.
(US)；普雷斯 麥可 A PLEISS, MICHAEL A. (US)；蓋斯 丹尼爾 GETTS,
DANIEL (AU)；馬丁 艾倫 MARTIN, AARON (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：5 共 94 頁

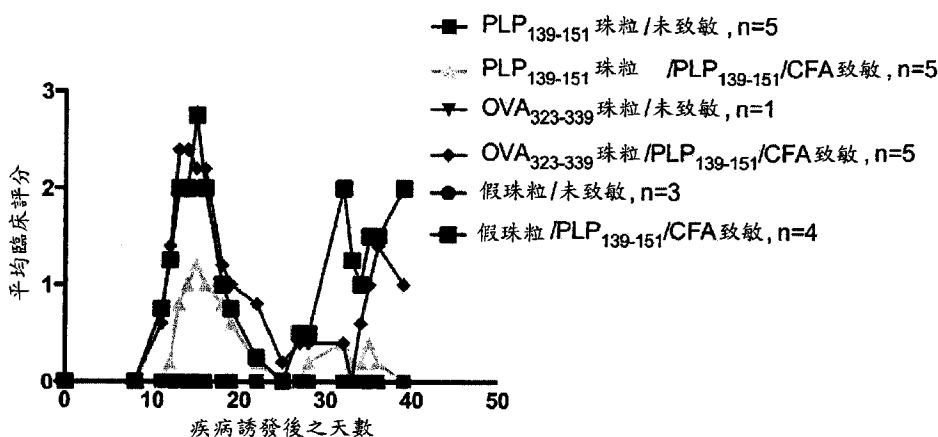
(54)名稱

用於誘發耐受性之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR INDUCED TOLERANCE

(57)摘要

本發明利用載體粒子將抗原肽及蛋白質呈現至免疫系統，以此方式誘發抗原特異性耐受性。該載體粒子經設計以觸發免疫耐受性作用。在一些實例中，該載體粒子進一步含有模擬細胞凋亡信號之分子。本發明適用於治療免疫相關病症，諸如自體免疫疾病、移植排斥及過敏反應。





(21)申請案號：099101695 (22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 01 月 20 日
(51)Int. Cl. : A61K39/385 (2006.01) A61P37/00 (2006.01)
(30)優先權：2009/01/20 美國 61/145,941
(71)申請人：米林維修基金公司 (美國) MYELIN REPAIR FOUNDATION, INC. (US)
美國
美國西北大學 (美國) NORTHWESTERN UNIVERSITY (US)
美國
(72)發明人：米勒 史蒂芬 MILLER, STEPHEN (US)；柏利 羅素 L BROMLEY, RUSSELL L.
(US)；普雷斯 麥可 A PLEISS, MICHAEL A. (US)；蓋斯 丹尼爾 GETTS,
DANIEL (AU)；馬丁 艾倫 MARTIN, AARON (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：5 共 94 頁

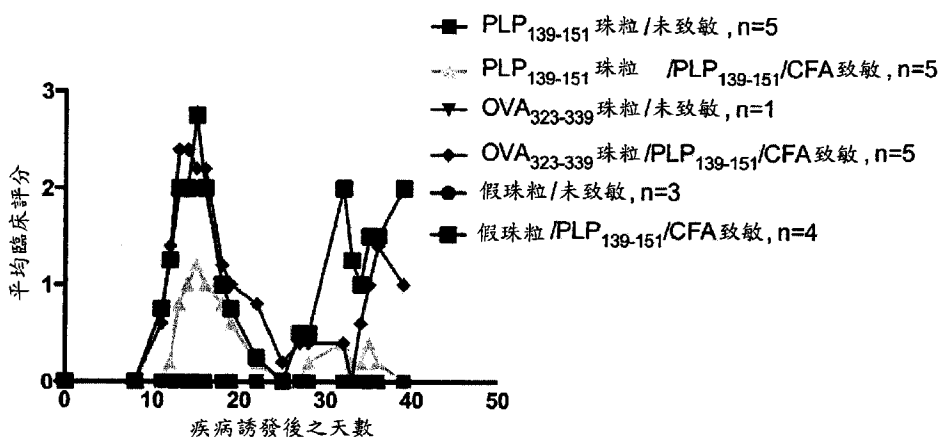
(54)名稱

用於誘發耐受性之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR INDUCED TOLERANCE

(57)摘要

本發明利用載體粒子將抗原肽及蛋白質呈現至免疫系統，以此方式誘發抗原特異性耐受性。該載體粒子經設計以觸發免疫耐受性作用。在一些實例中，該載體粒子進一步含有模擬細胞凋亡信號之分子。本發明適用於治療免疫相關病症，諸如自體免疫疾病、移植排斥及過敏反應。



六、發明說明：

【先前技術】

引起免疫反應起始之第一步為識別與主要組織相容複合物(MHC)分子締合呈現之抗原片段。抗原識別可在抗原於外來細胞或組織表面上與MHC締合時直接進行，或在抗原經加工且接著於專職性抗原呈現細胞(APC)表面上與MHC締合時間接進行。識別此等抗原-MHC複合物之休眠T淋巴細胞經由此等複合物與T細胞受體締合而活化(Jenkins等人，J. Exp. Med. 165, 302-319, 1987；Mueller等人，J. Immunol. 144, 3701-3709, 1990)。活有機體一般不會對自編抗原(self-composing antigen)展現免疫反應。此稱為天然或先天性免疫耐受性。另一方面，即使抗原最初對於活有機體而言為異源的，視何時給予抗原、如何給予抗原及以何形式給予抗原而定，該活有機體亦可能對給予抗原時所展現之免疫反應不起反應。此稱為後天性耐受性。若T細胞僅受T細胞受體刺激，而不接收額外協同刺激信號，則其會變得無反應性、無變應性或死亡，由此導致對抗原之免疫反應下調及對抗原產生耐受性。(Van Gool等人，Eur. J. Immunol. 29(8):2367-75, 1999；Koenen等人，Blood 95(10):3153-61, 2000)。然而，若T細胞接收第二信號(稱為協同刺激)，則誘導T細胞增殖且變為有功能性的(Lenschow等人，Annu. Rev. Immunol. 14:233, 1996)。認為自我/非自我識別係在抗原呈現細胞(例如樹突狀細胞或巨噬細胞)與T淋巴細胞相互作用之水準上發生。

用於與不當免疫反應相關之病症(例如自體免疫疾病、移植物排斥)之通用長期免疫抑止的習知臨床策略係基於長期投與廣泛作用之免疫抑止藥物，例如信號1阻斷劑，諸如環孢素A(CsA)、FK506(他克莫司(tacrolimus))及皮質類固醇。長期使用高劑量之此等藥物亦可能具有毒性副作用。此外，即使在能夠耐受此等藥物之彼等患者中，終生需要免疫抑止藥物療法亦具有顯著之嚴重副作用危險，包括腫瘤、嚴重感染、腎毒性及代謝病症(Penn 2000；Fishman等人，1998)。

已開發出誘發抗原特異性耐受性之方法，包括抗原或肽之細胞偶合。舉例而言，在一種方法中，肽偶合細胞誘發之耐受性涉及在無菌GMP條件下收集、分離周邊血細胞，及以疾病特異性自體抗原及乙烯碳化二亞胺(ECDI)偶合試劑處理，及隨後再輸注至供體/患者體內。此方法花費高且必須在嚴密監控之條件下由熟習此相關技藝之人士進行，且可進行該程序之中心的數目有限。使用紅血球作為載體細胞類型可使可能之來源擴展至包括同種異體供體，從而顯著增加源細胞供應且可能使此療法之傳遞擴展至經驗證適於輸血之任何情形。習知方法亦包括使用經乙烯碳化二亞胺固定之自體性脾細胞。此等細胞表現一種肽，而針對該肽之抗原特異性耐受性為所尋求的。然而，收集及製備足量細胞為廣泛利用此技術治療人類自體免疫疾病、移植排斥及過敏或高免疫反應之重大障礙。此等方法在源細胞供應及使對載體之免疫反應降至最低之組織類型匹配

必要性方面具有顯著之潛在侷限性。此外，經由EDCI局部處理細胞以偶合自體抗原亦呈現出顯著之品質控制問題。

【發明內容】

在某些情況下，例如自體免疫疾病、移植排斥及過敏或高免疫反應，需要獲得免疫耐受性。因此，需要能夠有效誘發長期免疫耐受性而無需投與高初始劑量之免疫抑止藥物或使用生物材料作為載體之改良方法。

在一個實施例中，本發明提供一種誘發抗原特異性耐受性之組合物，其包含載體粒子與細胞凋亡信號傳導分子及抗原肽連接。在另一實施例中，本發明提供一種誘發抗原特異性耐受性之組合物，其包含載體粒子與抗原肽連接。在一個較佳實施例中，載體粒子為聚苯乙烯粒子。在一態樣中，組合物誘發個體之抗原特異性耐受性。需要時，抗原肽可為自體免疫抗原、移植抗原或過敏原。舉例而言，該抗原肽為髓鞘鹼性蛋白、乙醯膽鹼受體、內源性抗原、髓鞘寡樹突細胞糖蛋白、胰臟 β 細胞抗原、胰島素、麩胺酸脫羧酶(GAD)、第11型膠原蛋白、人軟骨gp39、fp 130-RAPS、蛋白脂質蛋白、核仁纖維蛋白(fibrillarin)、小核仁蛋白、甲狀腺刺激因子受體、組蛋白、糖蛋白gp70、丙酮酸去氫酶去氫硫辛醯胺(dehyrolipoamide)乙醯基轉移酶(PCD-E2)、毛囊抗原或人原肌凝蛋白同功異型物(isoform) 5。在另一態樣中，抗原肽藉由結合分子與載體偶合。在另一態樣中，細胞凋亡信號傳導分子為清除受體(scavenger

receptor)配位體，諸如磷脂結合蛋白(annexin)-1、磷脂結合蛋白-5、磷脂醯絲胺酸、膽固醇、乳脂肪球-EGF-因子8(MFG-E8)或Fas配位體。需要時，抗原肽可與細胞凋亡信號傳導分子融合。在另一態樣中，載體包含量子點。在一些實例中，載體為樹枝狀聚合物、脂質體或微胞。載體亦可為直徑小於1000微米之奈米粒子或微米粒子。奈米粒子或微米粒子可為生物可降解的。

本發明亦提供一種降低個體之抗原特異性免疫反應之方法。該方法涉及向該個體投與一種組合物以誘發抗原特異性耐受性之步驟。在一個實施例中，組合物包含載體粒子連接至細胞凋亡信號傳導分子及抗原肽，其中該組合物降低個體之抗原特異性免疫反應。在另一實施例中，組合物包含載體粒子連接至抗原肽，其中該組合物降低個體之抗原特異性免疫反應。在一個較佳實施例中，載體粒子為聚苯乙烯粒子。需要時，本發明方法中所用之抗原肽為自體免疫抗原、移植抗原或過敏原。在一些實例中，自體免疫抗原可為使個體產生免疫反應者。

本發明進一步提供一種治療患有自體免疫病症之個體之方法，其包含向該個體投與包含奈米粒子或微米粒子之組合物。該奈米粒子或微米粒子包含(a)固有或添加之細胞凋亡信號傳導分子；及(b)病原性抗原。

本發明亦提供一種改善需要利用任何本文所揭示組合物之個體之脫髓鞘病症的方法。

本發明進一步提供一種誘發抗原特異性耐受性之套組，

其包含：(a)載體粒子；及(b)與載體粒子結合之抗原肽。

以引用之方式併入

本說明書中所提及之所有公開案及專利申請案皆以引用的方式併入本文中，其引用的程度如同特定且個別地將各個別公開案或專利申請案以引用的方式併入一般。

【實施方式】

本發明之新穎特徵將詳細闡述於隨附申請專利範圍中。藉由參考以下闡述說明性實施例(其中利用本發明原理)之[實施方式]及隨附圖式，將更好地理解本發明之特徵及優點。

在若干情況中，需要誘發抗原特異性耐受性之方法來預防或減少免疫反應，該等情況包括治療自體免疫疾病、移植排斥及過敏或高免疫反應。本發明利用一種載體將抗原肽及蛋白質呈現至免疫系統，以此方式誘發抗原特異性耐受性。抗原呈現細胞，諸如樹突狀細胞及巨噬細胞，一般會觸發免疫系統級聯，但此等相同細胞能夠在無協同刺激分子存在及/或不分泌炎性細胞激素情況下呈現抗原時誘發耐受性(Duperrier, K. 等人，"Immunosuppressive agents mediate reduced allostimulatory properties of myeloid-derived dendritic cells despite induction of divergent molecular phenotypes". Mol Immunol 42 (2005), 1531-40；Piemonti, L. 等人，"Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation". J Immunol 162 (1999), 6473-81)。本發明載體可結合至抗原與具有以下作用之物質(例如乙烯碳化二亞

胺或ECDI)的結合物：使粒子被宿主網狀內皮系統之抗原呈現細胞(APC)或直接被T細胞視為自體抗原且允許以誘發耐受性之方式呈現經締合抗原。在不受理論限制情況下，此耐受性可藉由呈現抗原而無免疫細胞刺激中所涉及之分子(例如I/II類MHC或協同刺激分子)的伴隨上調而產生。

在一些實施例中，惰性載體(諸如下述載體)可有效誘發抗原特異性耐受性，及/或預防EAE症狀發作，及/或降低先前已確立之疾病的嚴重性。在一些實施例中，本發明組合物及方法可引起T細胞發生與T細胞活化相關之早期事件，但不會使T細胞獲得效應功能。舉例而言，投與本發明組合物可產生具有類活化表型(諸如CD69及/或CD44上調)之T細胞，但其不展現效應功能，諸如由缺少IFN- γ 或IL-17合成所指示。在一些實施例中，投與本發明組合物產生具有類活化表型之T細胞，且原生抗原特異性T細胞不會轉化為調控表型，諸如具有CD25⁺/Foxp3⁺表型者。

在一些實例中，載體進一步與模擬致耐受性信號之分子結合。認為添加細胞凋亡信號傳導分子會特別對APC發出一種非危險性細胞凋亡吸收信號，其向宿主指示相關抗原為自體抗原且產生耐受化反應。在其他實例中，載體粒子不包括單獨之細胞凋亡信號傳導分子。在不受理論限制情況下，載有抗原特異性肽或蛋白質之載體粒子靶向未成熟的B細胞及T細胞(例如脾、骨髓或淋巴結中者)以實現耐受性。

本發明適用於治療免疫相關病症，諸如自體免疫疾病、

移植排斥及過敏反應。取代能夠載運細胞基質之合成生物相容性載體系統來誘發抗原特異性耐受性反應可使治療劑易於製造、廣泛可用；增加各樣品之間之均一性；增加可能之治療部位的數量，且顯著降低發生針對載體細胞之過敏反應之可能性。

如本文中所使用，術語「免疫反應」包括T細胞介導及/或B細胞介導之免疫反應。例示性免疫反應包括T細胞反應，例如細胞激素產生及細胞毒性。此外，術語免疫反應包括間接受T細胞活化(例如抗體產生(體液反應))及細胞激素反應性細胞(巨噬細胞)活化影響的免疫反應。免疫反應中涉及之免疫細胞包括淋巴細胞，諸如B細胞及T細胞(CD4⁺、CD8⁺、Th1及Th2細胞)；抗原呈現細胞(例如專職性抗原呈現細胞，諸如樹突狀細胞、巨噬細胞、B淋巴細胞、蘭氏細胞(Langerhans cell)；及非專職性抗原呈現細胞，諸如角質細胞、內皮細胞、星形膠質細胞、纖維母細胞、寡樹突細胞)；天然殺手細胞；骨髓細胞，諸如巨噬細胞、嗜伊紅血球、肥大細胞、嗜鹼性細胞及粒細胞。

如本文中所使用，術語「無變應性」、「耐受性」或「抗原特異性耐受性」係指T細胞對T細胞受體介導之刺激不敏感。此不敏感通常為抗原特異性的且在停止暴露於抗原肽後持續。舉例而言，T細胞無變應性之特徵為缺少細胞激素(例如IL-2)產生。T細胞無變應性係在無第二信號(協同刺激信號)存在下T細胞暴露於抗原且接收第一信號(T細胞受體或CD-3介導之信號)時發生。在此等條件下，使細胞

再暴露於同一抗原(即使再暴露係在協同刺激分子存在下發生)將導致無法產生細胞激素且隨後無法增殖。因此，無法產生細胞激素會阻礙增殖。然而，無變應性T細胞若與細胞激素(例如IL-2)一起培養則可增殖。舉例而言，亦可使用指標細胞株，藉由ELISA或增殖檢定量測T淋巴細胞產生IL-2之缺乏，來觀測T細胞之無變應性。或者，可使用報導基因構築體。舉例而言，無變應性T細胞無法起始由受5' IL-2基因強化子控制之異源啟動子或由強化子內可見之AP1序列之多聚體所誘導的IL-2基因轉錄(Kang等人，1992 Science. 257:1134)。

如本文中所使用，術語「免疫耐受性」係指對一部分經治療個體與未經治療個體執行方法之比較，其中：a)特異性免疫反應(認為至少部分由抗原特異性效應T淋巴細胞、B淋巴細胞、抗體或其等效物介導)程度降低；b)特異性免疫反應之發生或進展延遲；或c)特異性免疫反應發生或進展的危險降低。在與其他抗原相比，優先對某些抗原產生免疫耐受性時，產生「特異性」免疫耐受性。

本發明之各個態樣將於以下各分段中進一步詳述。

載體

本發明之誘發抗原特異性耐受性之組合物可使用多種載體中之任一者來製造，包括(但不限於)粒子、珠粒、分支聚合物、樹枝狀聚合物或脂質體。載體較佳為微粒，且形狀通常為球體、橢球形、桿形、球形或多面體。然而，載體可能另外呈不規則或分支形狀。在較佳實施例中，載體

係由生物可降解材料構成。載體進一步較佳為電中性或具有淨負電荷，以減少與通常帶有淨負電荷之細胞表面的非特異性結合。載體能夠直接或間接結合至一種抗原(本文中亦稱作抗原特異性肽、抗原肽、自體抗原、誘導性抗原或耐受化抗原)，其中對於該抗原之耐受性為所需的。在一些實例中，載體將具有多個結合位點以使抗原特異性肽之多個複本暴露且增加耐受性反應之可能性。載體可在載體表面上具有一個抗原肽或在表面上具有多個不同的抗原肽。然而，載體可另外具有可在不形成化學鍵之情況下吸附結合部分的表面。

在一些實例中，抗原特異性肽傳遞至抗原呈現細胞(APC)，諸如樹突狀細胞(DC)或巨噬細胞，在其中淋巴細胞經歷成熟(例如脾、骨髓、胸腺及淋巴結)。舉例而言，在脾、骨髓、胸腺及淋巴結中存在固有APC及DC。或者，抗原特異性肽可傳遞至周邊APC或DC，其中該抗原特異性肽首先使載體內化，且接著遷移至淋巴細胞成熟部位(例如脾、骨髓、胸腺或淋巴結)以活化耐受性反應。此通常在1至3天內發生。在淋巴細胞成熟部位之固有APC可用作靶。

載體之總尺寸及重量為重要的考慮因素。載體尺寸較佳為微米級或奈米級，以提高溶解度、避免由活體內聚集引起之可能的併發症且促進胞飲作用。粒度可為自胞間隙吸收至淋巴細胞成熟區中之因素。

在各種實施例中，本發明組合物之最大截面直徑小於約

1,000 μm 、500 μm 、100 μm 、50 μm 、25 μm 、20 μm 、15 μm 、10 μm 、5 μm 、1 μm 、500 nm、400 nm、300 nm、200 nm 或 100 nm。可選擇本發明組合物以使達至淋巴細胞(例如未成熟淋巴細胞，諸如脾、胸腺、骨髓或淋巴結中所見者)之傳遞最大化。在一些實施例中，載體之最大直徑為約 5-80 nm。或者，載體之最大直徑可為約 10-70 nm，或 20-60 nm，或 30-50 nm。在一些實施例中，載體之總重量小於約 10,000 kDa、小於約 5,000 kDa 或小於約 1,000 kDa、500 kDa、400 kDa、300 kDa、200 kDa 或 100 kDa。

粒子表面較佳係由使非特異性或非吾人所樂見之生物相互作用減至最少之材料構成。粒子表面與組織間隙之間的相互作用可能為在淋巴吸收中起作用的一個因素。粒子表面可塗覆用以防止或減少非特異性相互作用之材料。如由皮下注射後淋巴吸收之改良所說明，藉由在粒子上塗覆親水層(諸如聚乙二醇(PEG)及其共聚物，諸如 PLURONICS(包括聚乙二醇-bi-聚丙二醇-bi-聚乙二醇共聚物))所達成之空間穩定可減少與組織間隙蛋白質之非特異性相互作用。所有此等事實均針對粒子之物理性質在淋巴吸收中之重要性。可使用生物可降解聚合物來製造所有或一些該等聚合物及/或粒子及/或層。生物可降解聚合物可例如因官能基與溶液中之水反應而經歷降解。本文中所使用之術語「降解」係指藉由降低分子量或藉由使疏水性基團轉化為親水性基團而變得可溶。具有酯基之聚合物通常會進行自發性水解，例如聚丙交酯及聚乙交酯。已知許多經歷特定酶攻

擊之肽序列，例如經膠原酶或金屬蛋白酶降解：僅由生物自由基機制降解之序列不被特異性降解。溫和氧化劑會使具有氧化敏感性官能基之聚合物化學改變，且針對該聚合物之一個測試表明，其藉由在活體外暴露於10%過氧化氫20小時而溶解性增強。

本發明載體亦可含有其他組份。舉例而言，載體可併入或結合至顯影劑。目前市售之具有顯影劑之載體奈米球的實例為Kodak X-sight奈米球。已出現無機量子限制發光奈米晶體(稱為量子點(QD))作為FRET應用中之理想供體：其高量子產率及可調尺寸依賴性斯托克位移(Stokes Shift)容許不同尺寸在單一紫外波長激發時發出藍光乃至紅外線。(Bruchez等人，Science, 1998, 281, 2013；Niemeyer, C. M. Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 5796；Waggoner, A. Methods Enzymol. 1995, 246, 362；Brus, L. E. J. Chem. Phys. 1993, 79, 5566)。量子點，諸如基於一類稱為樹枝狀聚合物之聚合物的混合有機/無機量子點，可用於生物標記、顯影及光學生物感測系統中。(Lemon等人，J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 12886)。與傳統的無機量子點合成不同，此等混合量子點奈米粒子之合成不需要高溫或者高毒性、不穩定性試劑(Etienne等人，Appl. Phys. Lett. 87, 181913, 2005)。

微米珠粒或奈米珠粒載體

在一些實施例中，本發明之誘發抗原特異性耐受性之組合物包含微米粒子或奈米粒子載體。在一些實例中，微米粒子或奈米粒子實質上為球體珠粒或多孔珠粒。

載體粒子可由多種材料形成。該粒子較佳係由適於生物使用之材料構成。舉例而言，粒子可由玻璃、矽石、羥基羧酸之聚酯、二羧酸之聚酸酐或羥基羧酸與二羧酸之共聚物構成。載體粒子更通常可由直鏈或分支鏈、經取代或未經取代、飽和或不飽和、線性或交聯烷基、鹵烷基、硫烷基、胺基烷基、芳基、芳烷基、烯基、芳烯基、雜芳基或烷氧基羧酸之聚酯，或者直鏈或分支鏈、經取代或未經取代、飽和或不飽和、線性或交聯烷基、鹵烷基、硫烷基、胺基烷基、芳基、芳烷基、烯基、芳烯基、雜芳基或烷氧基二羧酸之聚酸酐構成。此外，載體粒子可為量子點，或由量子點構成，諸如量子點聚苯乙烯粒子(Joumaa 等人(2006) *Langmuir* 22:1810-6)。亦可採用包括酯鍵與酸酐鍵之混合物(例如乙醇酸與癸二酸之共聚物)之載體粒子。舉例而言，載體粒子可包含包括以下之材料：聚乙醇酸聚合物(PGA)、聚乳酸聚合物(PLA)、聚癸二酸聚合物(PSA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)共聚物(PLGA)、聚(乳酸-共-癸二酸)共聚物(PLSA)、聚(乙醇酸-共-癸二醇)共聚物(PGSA)等。適用於本發明中之其他生物相容性、生物可降解聚合物包括己內酯、碳酸酯、醯胺、胺基酸、原酸酯、縮醛、氰基丙烯酸酯及可降解胺基甲酸酯之聚合物或共聚物，以及具有直鏈或分支鏈、經取代或未經取代烷基、鹵烷基、硫烷基、胺基烷基、烯基或芳族羧基羧酸或二羧酸之該等物質的共聚物。此外，具有反應性側鏈基團之生物學上重要的胺基酸，諸如離胺酸、精胺酸、天冬胺酸、麩

胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸及半胱胺酸，或其對映異構體，可與任何上述材料一起包括在共聚物中以提供結合至抗原肽及蛋白質或結合部分之反應性基團。適用於本發明之生物可降解材料包括PLA、PGA及PLGA聚合物。具生物相容性但不可生物降解之材料亦可用於本發明之載體粒子中。舉例而言，可採用丙烯酸酯、乙烯-乙酸乙烯酯、醯基經取代之纖維素乙酸酯、不可降解之胺基甲酸酯、苯乙烯、氯乙烯、氟乙烯、乙烯基咪唑、氯磺酸化烯烴、環氧乙烷、乙烯醇、TEFLON[®](DuPont, Wilmington, Del.)及耐綸(nylon)之不可生物降解聚合物。

目前市售之適合珠粒包括聚苯乙烯珠粒，諸如FluoSpheres(Molecular Probes, Eugene, Oreg.)。

在一個實施例中，微米粒子或奈米粒子為APC所吸收。微米粒子或奈米粒子之尺寸較佳在觸發APC之吞噬作用或胞飲作用之範圍內。在一些實施例中，微米粒子或奈米粒子在約100 nm至50 μm 、1 μm 至40 μm 、5 μm 至30 μm 或10 μm 至20 μm 之範圍內。在一些實施例中，微米粒子或奈米粒子小於100 μm 、50 μm 、25 μm 、20 μm 、15 μm 、10 μm 、5 μm 、1 μm 、500 nm或100 nm。在其他實施例中，微米粒子或奈米粒子大於10 nm、50 nm、100 nm、500 nm、600 nm、700 nm、800 nm、900 nm或1 μm 。

在一個實施例中，微米粒子及奈米粒子在具有未成熟淋巴細胞之區域(例如脾、骨髓、胸腺或淋巴結)中被吸收。如本文中所記錄，尺寸與具有未成熟淋巴細胞之區域中載

體之吸收及滯留有關。需要獲得有效吸收及滯留，因為載體性質，諸如尺寸及表面特徵，可具有相衝突之作用。通常較小粒子之吸收優於較大粒子，但滯留少於較大粒子。直徑尺寸為約5 nm至約10 μm 之載體較佳；熟習此項技術者將立即瞭解涵蓋在明確闡述之範圍內之所有範圍及值，例如25 nm、50 nm、100 nm、200 nm、300 nm、400 nm、500 nm、600 nm、700 nm、800 nm、900 nm、1 μm 、2 μm 、3 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 或10 μm 。奈米粒子可以平均直徑為約5 nm至約100 nm之粒子集合構成；熟習此項技術者將立即瞭解涵蓋在明確闡明之範圍內的所有範圍及值，例如約10 nm至約70 nm。此粒子集合之尺寸分布可經控制，以致在粒子集合之平均直徑附近變化之係數(標準差除以平均粒度)可小於約50 nm、約35 nm、約20 nm、約10 nm或約5 nm。熟習此項技術者將立即瞭解涵蓋在明確闡明之範圍內之所有範圍及值。

物理性質亦關於在具有未成熟淋巴細胞之區域中吸收及滯留後奈米粒子之效用。此等物理性質包括機械性質，諸如剛性或彈性(rubberiness)。一些實施例係基於橡膠狀核心，例如，如最近所開發且經表徵適於全身(但非靶向或免疫)傳遞之PPS-PEG系統中，如在PEG中，具有上覆層(例如親水性上覆層)之聚(丙烯硫化物)(PPS)核心。橡膠狀核心與實質上剛性之核心(如在聚苯乙烯或金屬奈米粒子系統中)形成對照。術語橡膠狀除指天然或合成橡膠以外，亦指某些彈性材料，其中橡膠狀為熟習聚合物技術者

所熟悉之術語。舉例而言，可使用交聯PPS來形成疏水性橡膠狀核心。PPS為在氧化條件下降解為聚亞砷且最終成為聚砷，由此使疏水性橡膠轉變為親水性、水溶性聚合物之聚合物。其他硫化物聚合物可能適於使用，其中術語硫化物聚合物係指在聚合物主鏈中具有硫之聚合物。可使用之其他橡膠狀聚合物為在水合條件下玻璃轉移溫度小於約37°C之聚酯。宜使用具有親水性上覆層之疏水性核心，因為該核心與上覆層傾向於不混合，以致上覆層傾向於空間擴展而遠離核心。核心係指上面具有層之粒子。層係指覆蓋至少一部分核心之材料。層可經吸附或共價結合。粒子或核心可為實心或中空的。橡膠狀疏水性核心優於剛性疏水性核心(諸如結晶或玻璃狀(如在聚苯乙烯之情況下)核心)之處在於，具有橡膠狀疏水性核心之粒子可載運更高之疏水性藥物負載。

另一物理性質為表面之親水性。當親水性材料未交聯時，其在水中可具有每公升至少1公克之溶解度。具有親水性聚合物之粒子之空間穩定可藉由降低非特異性相互作用而改良自組織間隙之吸收；而粒子之隱匿性(*stealth nature*)之增加亦可減少在具有未成熟淋巴細胞之區域中吞噬細胞之內化。然而，平衡此等競爭特徵之難題已得到解決，且本申請案記錄了可有效淋巴傳遞至DC及淋巴結中之其他APC的奈米粒子之產生。一些實施例包括親水性組份，例如親水性材料層。適合親水性材料之實例為聚氧化烯、聚氧化乙烯、多醣、聚丙烯酸及聚醚中之一或多者。

層中聚合物之分子量可經調節以提供在活體內有用之位阻程度，例如約1,000至約100,000或甚至更高；熟習此項技術者將立即瞭解涵蓋在明確闡述之範圍內之所有範圍及值，例如10,000至50,000。

奈米粒子可併入官能基以供進一步反應。供進一步反應之官能基包括親電子試劑或親核試劑；此等試劑適宜與其他分子反應。親核試劑之實例為一級胺、硫醇及羥基。親電子試劑之實例為丁二醯亞胺基酯、醛、異氰酸酯及順丁烯二醯亞胺。

在較佳實施例中，採用平均直徑為約5-1000 nm，10-400 nm，20-200 nm，30-100 nm或約40-50 nm之載體珠粒。

可經由使用所述之與一或多個抗原肽結合之微米粒子或奈米粒子來誘發抗原特異性耐受性。

在一系列實施例中，本發明提供使用與奈米粒子載體粒子連接之抗原肽誘發耐受性之組合物及方法。在一些實例中，載體亦含有細胞凋亡信號傳導分子。載體粒子可為實心、中空或多孔的。

聚苯乙烯珠粒

已發現聚苯乙烯珠粒可在無需細胞凋亡信號傳導分子之情況下引發對與表面結合之抗原肽之抗原特異性耐受性作用。在一個實施例中，本發明提供交聯、官能化聚苯乙烯珠粒，其具有極佳性質，諸如特別均勻之珠粒尺寸分布、孔徑、密度、膨脹性質，及/或對寡聚物合成中通常使用

之溶劑及試劑之耐受性。在一些較佳實施例中，珠粒具有優越的負載特徵。在一些較佳實施例中，珠粒之負載能力為每公克珠粒至少約50微莫耳；每公克珠粒至少約100微莫耳；每公克珠粒至少約150微莫耳；每公克珠粒至少約200微莫耳；每公克珠粒至少約250微莫耳；每公克珠粒至少約300微莫耳；每公克珠粒至少約350微莫耳；每公克珠粒至少約400微莫耳，或每公克珠粒至少約450微莫耳。在一些實施例中，珠粒之負載能力為每公克珠粒約100微莫耳至每公克珠粒約350微莫耳。

已知在40-50 nm範圍內之聚苯乙烯粒子可觸發由樹突狀細胞(DC)識別之危險信號。已知高於較小尺寸(20 nm)之中等尺寸(40 nm)以及較大尺寸(> 100 nm)之聚苯乙烯珠粒會在淋巴結中積聚。在一些實例中，可能需要介於10-100 nm之間、介於20-80 nm之間、介於30-70 nm之間或介於40-50 nm之間之聚苯乙烯粒子。

聚苯乙烯珠粒之尺寸對於觸發針對DC之信號極為重要，因為DC已發展為識別病毒尺寸範圍。因此，珠粒尺寸將控制成功的DC靶向，其中適合尺寸之珠粒經周邊DC識別。此外，脾結構本身有助於粒子為巨噬細胞所吸收。

在各種實施例中，本發明組合物之最大截面直徑小於約1,000 μm 、500 μm 、100 μm 、50 μm 、25 μm 、20 μm 、15 μm 、10 μm 、5 μm 、1 μm 、500 nm、400 nm、300 nm、200 nm或100 nm。可選擇本發明組合物以使達至淋巴細胞(例如未成熟淋巴細胞，諸如脾、胸腺、骨髓或淋巴結中所見

者)之傳遞最大化。在一些實施例中，載體之最大直徑為約10-500 nm。或者，載體之最大直徑為約100-500 nm，或250-500 nm，或300-500 nm。在一些實施例中，載體總重量小於約10,000 kDa、小於約5,000 kDa，或小於約1,000 kDa、500 kDa、400 kDa、300 kDa、200 kDa或100 kDa。

在一系列實施例中，本發明提供使用與聚苯乙烯珠粒連接之抗原肽誘發耐受性之組合物及方法。在一些實例中，抗原肽連接至聚苯乙烯珠粒，此係經由抗原肽之N端連接至聚苯乙烯珠粒之羧基位點實現。在一些實例中，載體亦含有細胞凋亡信號傳導分子。

分支聚合物載體/樹枝狀聚合物

在一些實施例中，本發明之誘發耐受性之組合物包含載體，該載體為分支聚合物，諸如樹枝狀聚合物。分支聚合物具有多個可經官能化之鏈端或末端，且因此其可直接或經由結合部分間接結合至多種誘發耐受性之複合物。

一些聚合物系統本身為奈米微粒(nanoparticulate)且包括在術語奈米粒子中。舉例而言，樹枝狀聚合物為一類可為奈米級奈米微粒的聚合物。此等聚合物在其表面上包含大量例如用以結合生物分子及其他基團之官能基。類似地，抗原可結合至樹枝狀聚合物表面。此外，樹枝狀聚合物表面上之官能基可例如藉由羥基化來優化以實現補體活化。已表明一些樹枝狀聚合物-DNA複合物可使補體活化。樹枝狀聚合物展現令人感興趣的奈米微粒化學，其可適用於

使用本文中所述之技術進行之淋巴靶向、適用於抗原結合且適用於補體活化，例如美國專利公開案第2004/0086479號、第2006/0204443號以及美國專利第6,455,071號及第6,998,115號中所述，其係在不會與明確揭示之內容相矛盾的情況下以引用的方式併入本文中。

另一方面，樹枝狀聚合物之形狀與其組份聚合物在指定環境中之溶解度高度相關，且可根據其周圍之溶劑或溶質(例如溫度、pH值、離子含量變化)而顯著變化，或者在被DC吸收後顯著變化。相比之下，外形尺寸比樹枝狀聚合物或其他僅為分支之聚合物系統相對更穩定之奈米粒子適用於儲存目的或關於生物活性為適用的，例如具有親水性暈(corona)之固體核心會使該暈始終呈現於其環境中。因此，奈米粒子之一些實施例取決於非樹枝狀聚合物之粒子，或核心為固體及/或核心為交聯水凝膠之粒子。基於PPS之奈米粒子不為樹枝狀聚合物且具有固體核心。

樹枝狀聚合物，亦稱為喬木枝形聚合物(arborol)、階式分子(cascade molecule)、樹突狀聚合物(dendritic polymer)或分形聚合物(fractal polymer)，為分支自中心發散之高度分支之巨分子。樹枝狀聚合物可由各種材料製成，包括(但不限於)聚醯胺基胺、聚醯胺基醇、聚伸烷基亞胺(諸如聚伸丙基亞胺或聚伸乙基亞胺)、聚烯烴(諸如聚苯乙烯或聚乙烯)、聚醚、聚硫醚、聚磷、聚矽氧烷、聚醯胺、聚芳基聚合物，或其組合。樹枝狀聚合物亦由胺基酸(例如聚離胺酸)製備。較佳採用以羧基或其他帶負電之反應性

基團封端以便利結合之樹枝狀聚合物。

此項技術中已知樹枝狀聚合物，且其為化學上確定之球形分子，通常係藉由多官能單體逐步或反覆迭代反應以獲得分支結構製備而成(參見例如Tomalia等人(1990) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29:138-75)。已知多種樹枝狀聚合物，例如以胺封端之聚醯胺基胺、聚伸乙基亞胺及聚伸丙基亞胺樹枝狀聚合物。適用於本發明之例示性樹枝狀聚合物包括「密集星型(dense star)」聚合物或「星射狀(starburst)」聚合物，諸如描述於美國專利第4,587,329號、第5,338,532號及第6,177,414號中者，包括聚(醯胺基胺)樹枝狀聚合物(「PAMAM」)。適用於本發明中之其他多聚體間隔分子包括化學上確定之非聚合價數平台分子(platform molecule)，諸如揭示於美國專利第5,552,391號及PCT申請公開案WO 00/75105、WO 96/40197、WO 97/46251、WO 95/07073及WO 00/34231中者。可使用許多其他適合的多價間隔基且其為熟習此項技術者已知。舉例而言，樹枝狀聚合物及其使用描述於美國專利申請案第20070238678號中，其全文以引用的方式併入本文中。

此等樹枝狀聚合物包括(但不限於)聚醯胺基胺(PAMAM)樹枝狀聚合物、聚(伸丙基亞胺)(PPI)樹枝狀聚合物、聚(三嗪)樹枝狀聚合物、聚(醚-羥基胺)(PEHAM)樹枝狀聚合物，其Z基團可經修飾或經選擇以迫使螯合劑僅進入樹突狀聚合物內部或與包囊組合，從而與樹突狀聚合物之表面締合。一些此等Z表面的實例為不與配位體相互作用者；

此等Z基團為羥基、酯、酸、醚、羧酸鹽、烷基、二醇，諸如羥基，尤其來自醯胺基乙醇、醯胺基乙基乙醇胺、參(羥甲基)胺、甲氧羰基吡咯啉酮、醯胺基、硫脲、尿素、羧酸鹽、琥珀醯胺酸及聚乙二醇者，或者有或無羥基烷基修飾之一級胺基、二級胺基或三級胺基。其他適合之表面基團可包括允許締合性連接(締合)樹突狀聚合物表面之任何此類官能基，且包括(但不限於)受體介導之靶向基團(例如葉酸、抗體、抗體片段、單鏈抗體、蛋白質、肽、寡聚物、寡肽或遺傳材料)或促進生物相容性、生物分布、溶解性或者調節毒性之其他官能基。在一較佳實施例中，樹枝狀聚合物在表面上含有胺基及/或羧基結合位點。

目前市售之適合樹枝狀聚合物包括聚醯胺基胺樹枝狀聚合物，諸如Starburst™樹枝狀聚合物(Dendritech, Midland, Mich.)。Starburst™樹枝狀聚合物以可使用之胺基或羧甲基封端(有或無其他修飾且有或無插入結合部分)以使抗原肽及蛋白質結合至此等載體之表面。

在製造樹枝狀聚合物之一種方法中，自核心分子向外藉由連續添加單體層來合成樹枝狀聚合物。第一輪樹枝狀聚合物合成向核心添加單一層或單一「代」單體，其中各單體具有至少一個游離反應端。隨後每一輪聚合使樹枝狀聚合物擴增一層且增加游離反應端之數目。可重複此方法多次以產生具有所需直徑或質量之樹枝狀聚合物。隨著分支密度增加，最外層分支本身排列成環繞較低密度核心之球體形式。參見例如美國專利第5,338,532號，其全文以引用

的方式併入本文中。此外，藉由改變核心分子之形狀，可製造出桿形、盤形及梳狀形式之樹枝狀聚合物。所得樹枝狀聚合物可具有極大量可直接或間接結合許多抗原肽及蛋白質之游離反應端。在一較佳實施例中，樹枝狀聚合物之形狀為球體或卵形。

樹枝狀聚合物之重量、尺寸、形狀以及末端反應性基團之數目可能不同。舉例而言，樹枝狀聚合物之重量可在100至10000 kDa，或200至5000 kDa，或250至2500 kDa之範圍內。樹枝狀聚合物之最長尺寸亦可在20至1000 nm、30至500 nm或50至250 nm之尺寸範圍內。

使用樹枝狀聚合物(例如PANAM或PPI樹枝狀聚合物)能夠產生在表面上具有特定數目之胺基結合位點之陽離子性球體粒子。此等粒子之尺寸可經選擇以優化負載且使表面所連接之抗原肽之間的位阻減至最低。舉例而言，在大多數應用中，使用具有6-7代之PANAM樹枝狀聚合物將產生分子量為50-125 kDa、直徑為60-90埃(尺寸與血色素、IgG或組蛋白大致類似)且具有100-1500個活性表面基團之粒子。

具有各種價數之多價間隔基適用於實踐本發明，且在各種實施例中，多價間隔基結合至約3至約400個核酸部分，通常3至100個，有時3-50個，通常3-10個且有時超過400個核酸部分。在各種實施例中，多價間隔基結合至超過10個、超過25個、超過50個或超過500個核酸部分(其可相同或不同)。應瞭解，在包含多價間隔基之某些實施例中，

本發明提供分子結構略微不同之群體。舉例而言，本發明樹枝狀聚合物可由有些不均勻的所產生分子之混合物構成，亦即包含不同數目(在可測定之範圍內或主要在可測定之範圍內)之核酸部分接合至各樹枝狀聚合物分子。在一較佳實施例中，各樹枝狀聚合物之尺寸及形狀類似，亦即由彼此數目差異在20%、15%、10%、5%、2%或1%內之核酸部分構成。

非樹枝狀聚合物之分支聚合物亦可用於本發明中，且可由與樹枝狀聚合物相同之通用種類之材料製造。此等分支聚合物之合成亦為此項技術所熟知。

分支聚合物可包括至少5個末端、至少10個末端或至少100個末端。分支聚合物可包括5至500個末端，較佳10至400個末端且更佳50至250個末端。

在一些實施例中，提供本發明之誘發耐受性之組合物以製造誘發耐受性之複合物與分支或線性聚合物結合的結合物。

脂質體載體

在一些實施例中，多聚抗原肽或蛋白質結合物包含脂質體或微胞載體。脂質體亦稱為脂囊泡，其為由脂膜封閉之含水隔室，且通常係藉由將適合脂質懸浮於含水介質中且震盪、擠壓或音波處理該混合物以產生囊泡分散液而形成。本發明中可使用各種形式之脂質體，包括單層囊泡及多層囊泡。

微胞系統亦可展現與上述相同之有用特徵，包括由聚

(乙二醇)與PPS之AB及ABA嵌段共聚物形成之微胞。當形成聚(乙二醇)分子分率相對較高(例如超過約40%)之此等共聚物時，則可預期在特定條件下會形成球體微胞。此等微胞可較小，例如滿足上述之允許淋巴進入之尺寸，且可視情況接枝有PEG上覆層，或以其他方式併入PEG或其他聚合物，以達成類似性質。此外，其可與抗原(如本文所教示)、危險信號或兩者在微胞表面結合。該嵌段共聚物可以羥基封端以實現補體活化，且尤其有益地以羥基封端親水性嵌段，以致此羥基在微胞奈米粒子表面上更易於利用以實現補體結合。此等經羥基化之表面可經修整以有效活化補體。特別適用之親水性嵌段為以羥基封端之PEG。除形成微胞之聚合物架構外，亦可選擇嵌段尺寸及嵌段尺寸比率來形成囊泡結構。亦存在許多其他可能之微胞調配物的化學組成可供使用。

在另一系列實施例中，本發明提供多聚抗原肽及蛋白質結合物之製造方法，其中許多抗原肽及蛋白質均結合至脂質體之外表面。

脂質體可由多種脂質材料製備，該等脂質材料包括(但不限於)以下脂質：磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、磷脂醯甘油、磷脂醯乙醇胺、磷脂酸、磷酸二-十六烷基酯、單唾液酸神經節苷酯、聚乙二醇、硬脂醯胺、卵磷脂及膽固醇，以及不同化學計量之此等物質之混合物。如本文中所使用，脂質體亦可由非脂質兩性分子形成，諸如由聚(氧乙烯-b-異戊二烯-b-氧乙烯)之嵌段共聚物

及其類似物形成。在較佳實施例中，脂質體係由將形成帶負電脂質體之脂質製備，該等脂質諸如由磷脂醯絲胺酸、磷酸二-十六烷基酯及二肉豆蔻醯基磷脂酸製造者。

脂質體表面亦可經修飾以降低免疫原性或提供適宜的反應性基團以供結合。舉例而言，唾液酸或其他碳水化合物，或聚乙二醇或其他烷基或烯基聚合物，均可連接至脂質體表面以降低免疫原性。或者，可藉由在脂質體中包括較低莫耳百分比之例如生物素-X-二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺 (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) 來製造具有結合部分 (諸如生物素) 之脂質體。

將抗原肽及蛋白質結合至載體之方式

可使用此項技術中熟知之各種方式將抗原肽及蛋白質結合至載體。此等方法包括不破壞或嚴重限制抗原肽及蛋白質之生物活性且允許足量之抗原肽及蛋白質以使抗原肽或蛋白質能與同源T細胞受體相互作用之定向結合至載體的任何標準化學反應。通常，將抗原肽或蛋白質之C端區或者抗原肽或蛋白質融合蛋白之C端區結合至載體之方法較佳。確切化學反應當然將視載體材料之性質、抗原肽或蛋白質之C端融合物的存在與否及/或結合部分之存在與否而定。

官能基視需要可定位於粒子上以供利用。一個位置可作為核心聚合物上或者為核心上之層之聚合物上或以其他方式連至粒子之聚合物上的側基或末端。舉例而言，本文中包括描述PEG使奈米粒子穩定的實例，該等奈米粒子易於

官能化以供特定細胞靶向或蛋白質及肽藥物傳遞。

可使用結合物，諸如乙烯碳化二亞胺(ECDI)、二異氰酸伸己酯、含有2個環氧基殘基之丙二醇二縮水甘油醚及表氯醇，將肽或蛋白質固定於載體表面。在不受理論限制之情況下，懷疑ECDI發揮兩個主要功能來誘發耐受性：(a)其經由催化游離胺基與游離羧基之間之肽鍵形成來將蛋白質/肽以化學方式偶合至細胞表面；及(b)其誘導載體模擬細胞凋亡細胞死亡，以致其被脾中之宿主抗原呈現細胞挑出且誘發耐受性。正是此種以非免疫原性方式呈現至宿主T細胞引起在自身反應性細胞中直接誘發無變應性。此外，ECDI亦用作誘導特異性調控性T細胞之有效刺激物。

在一系列實施例中，抗原肽及蛋白質經由共價化學鍵結合至載體。舉例而言，接近抗原C端之反應性基團或部分(例如C端羧基，或羥基、硫醇，或來自胺基酸側鏈之胺基)可藉由直接化學反應直接結合至載體表面上之反應性基團或部分(例如PLA或PGA聚合物之羥基或羧基；樹枝狀聚合物之末端胺或羧基；或磷脂之羥基、羧基或磷酸酯基)。或者，結合部分可共價結合至抗原肽及蛋白質與載體兩者，藉此將其連接在一起。

載體表面上之反應性羧基可藉由與例如1-乙基-3-[3,9-二甲基胺基丙基]碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)或N-羥基丁二醯亞胺酯(NHS)反應而接合至抗原肽或蛋白質上之游離胺(例如來自Lys殘基)。類似地，可使用相同化學將載體表面上之游離胺與抗原肽或蛋白質上之游離羧基(例如來自C端，或

來自 Asp 或 Glu 殘基) 結合。或者，可基本上如 Arano 等人 (1991) *Bioconjug. Chem.* 2:71-6 中所述，使用磺基-SIAB 化學，使載體表面上之游離胺基共價結合至抗原肽及蛋白質或者抗原肽或蛋白質融合蛋白。

在另一實施例中，與抗原肽或蛋白質結合之配位體與連接至載體之抗配位體之間的非共價鍵可使抗原與載體結合。舉例而言，生物素連接酶識別序列標籤可接合至抗原肽或蛋白質之 C 端，且此標籤可藉由生物素連接酶結合生物素。接著生物素可用作配位體以將抗原肽或蛋白質與吸附或以其他方式結合至載體表面作為抗配位體之抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素非共價結合。或者，若如上所述，抗原肽及蛋白質與具有 Fc 區之免疫球蛋白域融合，則 Fc 域可充當配位體及蛋白質 A，共價或非共價結合至載體表面；可用作抗配位體，以將抗原肽或蛋白質非共價結合至載體。此項技術中熟知可用以將抗原肽及蛋白質非共價結合至載體之其他方式，包括金屬離子螯合技術(例如在抗原肽或蛋白質或者抗原肽或蛋白質融合蛋白之 C 端使用聚 His 標籤，及使用經 Ni^+ 塗覆之載體)，且此等方法可替代本文中所述者。

將核酸部分結合至平台分子可以許多方式實現，通常涉及一或多種交聯劑以及核酸部分及平台分子上之官能基。使用標準化學合成技術將連接基團添加至平台中。可使用標準合成技術將連接基團添加至核酸部分中。

細胞凋亡信號傳導分子

在一些實施例中，本發明之誘發耐受性之組合物含有細胞凋亡信號傳導分子。細胞凋亡信號傳導分子用以使載體被宿主之抗原呈現細胞(諸如宿主網狀內皮系統之細胞)視為細胞凋亡體。此使得以誘發耐受性之方式呈現所締合之肽抗原決定基。在不受理論限制之情況下，推測此法會阻礙免疫細胞刺激中所涉及之分子(諸如I/II類MHC及協同刺激分子)之上調。此等細胞凋亡信號傳導分子亦可用作吞噬細胞標記物。舉例而言，適用於本發明之細胞凋亡信號傳導分子已描述於美國專利申請案第20050113297號中，其全文以引用的方式併入本文中。適用於本發明之分子包括靶向吞噬細胞(包括巨噬細胞、樹突狀細胞、單核細胞及嗜中性細胞)之分子。

適用作細胞凋亡信號傳導分子之分子用以增強所締合之肽之耐受性。此外，與細胞凋亡信號傳導分子結合之載體在凋亡細胞識別中可為Clq所結合(Paidassi等人，(2008) *J. Immunol.* 180:2329-2338)。舉例而言，適用作細胞凋亡信號傳導分子之分子包括磷脂醯絲胺酸、磷脂結合蛋白-1、磷脂結合蛋白-5、乳脂肪球-EGF-因子8(MFG-E8)或凝血栓蛋白家族。

凝血栓蛋白為參與細胞與細胞之間及細胞與基質之間之通信的胞外蛋白質家族。其在組織產生及修復期間調控細胞表型。此外，凝血栓蛋白-1(TSP-1)係於凋亡細胞上表現，且涉及巨噬細胞對該等凋亡細胞之識別。因此凝血栓蛋白-1為根據本發明可用以增強吞噬作用之另一吞噬細胞

標記物。巨噬細胞經由CD36分子(其存在於巨噬細胞表面上且亦可能存在於凋亡細胞上)識別凋亡細胞上之TSP-1。在不希望受任何理論限制的情況下，凋亡細胞表面上之CD36/TSP1複合物有可能形成配位體，將該細胞橋接至巨噬細胞上由 $\alpha(v)\beta 3$ /CD36/TSP1組成之複合物。TSP-1與CD36之結合可能係由TSP-1之TSR-1域與CD36中稱為CLESH-1之保守域的相互作用介導。在本發明之某些實施例中，藉由增加細胞或分子表面上TSP-1、CD36或TSP-1/CD36複合物之含量或密度，例如藉由將TSP-1、CD36或TSP-1/CD36複合物傳遞至細胞，來增強吞噬作用。在本發明之某些實施例中，將TSP-1/CLESH域複合物傳遞至細胞。

或者或另外，吞噬細胞標記物可包含用作巨噬細胞與其靶之間之橋接劑的分子(例如MFG-E8、b2-糖蛋白等)，或此類分子之一部分。此等標記物可例如便利巨噬細胞識別磷脂醯絲胺酸，或可被獨立地識別。已知亦可增強吞噬作用之其他標記物包括蛋白質S、生長停滯特異性基因產物GAS-6，及各種補體組份，包括(但不限於)因子B、C1q及C3。如上所述，MFG-E8為分泌性糖蛋白，其係由經刺激之巨噬細胞產生且藉由識別胺基磷脂(諸如磷脂醯絲胺酸(PS))特異性結合至凋亡細胞。MFG-E8當藉由磷脂連結時，經由其RGD(精胺酸-甘胺酸-天冬胺酸)基元結合至細胞且特別強地結合至表現 $\alpha(v)\beta(3)$ 整合素之細胞(諸如巨噬細胞)。已知MFG-E8之至少兩個剪接變異體，其中威信L

變異體具有刺激吞噬作用之活性。在本發明之某些實施例中，吞噬細胞標記物包含MFG-E8之L剪接變異體(MFG-E8-L)。在本發明之某些實施例中，吞噬細胞標記物包含MFG-E8之N端域。

磷脂結合蛋白I為可根據本發明使用之另一種吞噬細胞標記物。簡言之，37 kDa蛋白質磷脂結合蛋白I(Anx-1；脂皮素1)為一種調控吞噬作用、細胞信號傳導及增殖中所涉及之糖皮質激素調控蛋白，且假設其為在炎症中及在控制前垂體激素釋放中糖皮質激素作用之介體。磷脂結合蛋白I之表現在凋亡細胞中升高，且似乎在凋亡細胞上之磷脂醯絲胺酸橋接至吞噬細胞且增強諸如巨噬細胞之吞噬細胞對凋亡細胞之識別中起作用。在不希望受任何理論限制的情況下，巨噬細胞上之磷脂醯絲胺酸受體有可能識別磷脂結合蛋白I或含有磷脂結合蛋白I及PS之複合物，或磷脂結合蛋白I可能藉由使PS聚集成簇來便利識別。此外，其他DC靶向研究使用經結合之靶向配位體(諸如抗Dec-205及抗CD11c)來增加DC特異性。

在一些實施例中，細胞凋亡信號傳導分子可結合至抗原特異性肽。在一些實例中，細胞凋亡信號傳導分子與抗原特異性肽藉由產生融合蛋白而結合。如本文中所使用，「融合蛋白」係指藉由將至少一個抗原特異性肽(或其片段或變異體)與至少一分子細胞凋亡信號傳導分子(或其片段或變異體)融合而形成的蛋白質。對於融合蛋白之產生而言，術語「融合蛋白」、「融合肽」、「融合多肽」及「嵌

合肽」可互換使用。適合之抗原特異性肽之片段包括全長肽中保留產生本發明之所需抗原特異性耐受性功能之功能的任何片段。適合之細胞凋亡信號傳導分子之片段包括全長肽中保留產生細胞凋亡信號之功能之任何片段。本申請案亦關於含有與本文中所闡述之參考多肽序列(例如抗原特異性肽或細胞凋亡信號傳導分子，或其融合蛋白)至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之多肽的蛋白質，或其片段。「變異體」係指與參考核酸或多肽不同但保留其基本性質之聚核苷酸或核酸。通常變異體與參考核酸或多肽總體上極為類似且在許多區域中一致。如本文中所使用，「變異體」係指序列分別與本發明抗原特異性肽、細胞凋亡信號傳導分子或其融合蛋白不同，但保留其至少一個功能及/或治療性質(例如觸發免疫系統之耐受性或產生細胞凋亡信號)的抗原特異性肽、細胞凋亡信號傳導分子或其融合蛋白。本發明亦關於包含與例如本發明抗原特異性肽、細胞凋亡信號傳導分子或其融合蛋白之胺基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列或者由其組成的蛋白質。

融合蛋白可由多種方式產生。一種方式為藉由基因融合(亦即融合蛋白係藉由轉譯核酸序列產生，在該核酸序列中，編碼全部或一部分抗原特異性肽或其變異體之聚核苷酸同框接合至編碼全部或一部分細胞凋亡信號傳導分子或其變異體之聚核苷酸)。兩種蛋白質可直接融合，或經由

胺基酸連接子融合。形成融合蛋白之多肽通常為C端連接至N端，但其亦可為C端連接至C端、N端連接至N端或N端連接至C端。融合蛋白之多肽可為任何順序。此術語亦指構成融合蛋白之抗原之經保守修飾的變異體、多型變異體、對偶基因、突變體、子序列及種間同系物。亦可藉由化學結合產生融合蛋白。產生融合多肽之方案為此項技術中所熟知且包括各種重組方式及DNA合成器。或者，亦可使用PCR擴增及錨定引子在兩個連續基因片段之間產生互補懸端，隨後其可黏接且再擴增以產生嵌合基因序列，由此容易地產生細胞凋亡信號傳導分子與抗原特異性肽的融合蛋白。舉例而言，細胞凋亡信號傳導分子可與抗原特異性肽同框融合。在本發明中，細胞凋亡信號傳導分子或抗原特異性肽均可為融合蛋白之N端部分。

融合蛋白通常可使用標準技術(包括化學結合)來製備。融合蛋白較佳表現為重組蛋白，使得在表現系統中產生相對於非融合蛋白有所增加之含量。簡言之，編碼多肽組份之DNA序列可單獨組裝且連接至適當表現載體中。編碼一種多肽組份之DNA序列之3'端在有或無肽連接子情況下連接至編碼另一多肽組份之DNA序列之5'端，以致各序列之閱讀框同相。此容許轉譯成保留兩種組份多肽之生物活性的單一融合蛋白。

可採用肽連接子序列使第一多肽組份與第二多肽組份分開一段足以確保各多肽摺疊成其二級及三級結構之距離。此類肽連接子序列係使用此項技術中熟知之標準技術併入

融合蛋白中。適合的肽連接子序列可基於以下因素選擇：
(1)其能夠採用可撓性延伸構形；(2)其不能採用可與第一及第二多肽上之功能性抗原決定基相互作用的二級結構；及(3)缺少可能與多肽之功能性抗原決定基反應之疏水性或帶電殘基。較佳之肽連接子序列含有 Gly、Asn 及 Ser 殘基。其他接近中性之胺基酸(諸如 Thr 及 Ala)亦可用於連接子序列中。適用作連接子之胺基酸序列包括揭示於 Maratea 等人，Gene 40:39-46 (1985)；Murphy 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986)；美國專利第 4,935,233 號及美國專利第 4,751,180 號中者。連接子序列通常可為 1 至約 50 個胺基酸長。當第一多肽及第二多肽均具有可用以分開各功能域且防止立體干擾之非必需 N 端胺基酸區時，不需要連接子序列。

經連接 DNA 序列係操作性連接至適合的轉錄或轉譯調控元件。負責表現 DNA 之調控元件僅位於編碼第一多肽之 DNA 序列之 5' 端。類似地，結束轉譯所需之終止密碼子以及轉錄終止信號僅存在於編碼第二多肽之 DNA 序列之 3' 端。

抗原肽及蛋白質

從業者對用於本發明組合中之抗原具有許多選擇。組合中存在之誘導性抗原有助於所誘發之致耐受性反應的特異性。其可能與或可能不與靶抗原相同，其為存在於所治療之個體體內或欲置放入所治療之個體體內之抗原，其為非吾人所樂見之免疫反應之靶且需要獲得針對其之耐受性。

本發明之誘導性抗原可為多肽、聚核苷酸、碳水化合物、醣脂或自生物來源分離之其他分子，或其可為化學合成之小分子、聚合物或者生物材料之衍生物，只要其在與黏膜結合組份組合時能夠根據本發明誘發耐受性即可。

在本發明之某些實施例中，誘導性抗原為單一經分離或重組產生之分子。為治療靶抗原散布於宿主體內各處之病狀，通常需要誘導性抗原與靶抗原相同或在免疫學上相關。此等抗原之實例為大多數聚核苷酸抗原及一些碳水化合物抗原(諸如血型抗原)。

當靶抗原優先於特定器官、細胞或組織類型上表現時，從業者可再次選擇使用與靶抗原相同或在免疫學上相關之誘導性抗原。然而，亦可另外選擇使用作為該靶之旁觀者(bystander)之抗原。此為可能與靶抗原在免疫學上無關但優先於表現靶抗原之組織中表現之抗原。關於旁觀者抑止之有效性之工作理論為，抑止為一種使靶細胞處之免疫反應效應臂下調的活性細胞介導之過程。抑止細胞在黏膜表面受誘導性抗原之特異性刺激，且返回優先表現旁觀者(bystander)抗原之組織部位。經由交互式或細胞激素介導之機制，局部抑止細胞接著下調附近之效應細胞(或效應細胞之誘導物)，而無論其針對何物具有反應性。若效應細胞對不同於誘導性抗原之靶具有特異性，則結果為出現旁觀者效應。關於旁觀者反應及具有此效應之致耐受性肽之清單的進一步詳述，讀者可參考國際專利公開案 WO 93/16724。旁觀者理論暗示普通熟習此項技術者無需為了

實踐本發明而鑑別或分離出一種特定靶抗原，而針對該靶抗原之耐受性為所需的。從業者僅需要能夠獲得至少一個優先於靶位點表現之分子用作誘發性抗原。

在本發明之某些實施例中，誘導性抗原與於所治療之個體體內所表現者具有不同形式，但為其片段或衍生物。本發明之誘導性抗原包括基於具有適當特異性之分子但藉由裂解、殘基取代、標記、結合及/或與具有其他功能性質之肽融合來改造的肽。改造可出於任何所需目的進行，包括(但不限於)消除任何不良性質，諸如毒性或免疫原性；或增強任何所需性質，諸如黏膜結合、黏膜穿透或刺激免疫反應之致耐受性臂。如本文中所使用，諸如胰島素肽、膠原蛋白肽及髓鞘鹼性蛋白肽之術語不僅指完整的次單元，而且亦指含有與各別類似物分子之至少10個且較佳20個連續胺基酸同源(較佳胺基酸含量70%一致，更佳80%一致且甚至更佳90%一致)之區域的異型及合成變異體、片段、融合肽、結合物及其他衍生物，其中該衍生物之同源區與各別母體分子共有誘發針對靶抗原之耐受性的能力。

應認識到，對於刺激抗體反應，誘導性抗原之致耐受性區通常不同於優勢免疫抗原決定基。致耐受性區通常為在涉及T細胞之特定細胞相互作用中可存在之區域。致耐受性區可能存在且能夠在呈現完整抗原後誘發耐受性。一些抗原含有隱藏的致耐受性區，因為天然抗原之加工及呈現通常不會觸發耐受性。隱藏抗原及其鑑別之詳述見於國際專利公開案WO 94/27634中。

在本發明之某些實施例中，使用兩個、三個或更多個誘導性抗原。可能需要在存在複數個靶抗原時實施此等實施例，或可能需要提供複數個靶旁觀者。舉例而言，在治療糖尿病時，胰島素及升糖素皆可與黏膜結合組份混合。亦可能需要提供抗原混合物以覆蓋數種可能之替代性靶。舉例而言，可使用組織相容性抗原片段之混合物以使預期未來會移植未知表型之同種異體物之個體具耐受性。此項技術中已知人類白血球抗原之同種型變異體 (Allovariant) 區：例如 Immunogenetics 29:231, 1989。在另一實例中，過敏原之混合物可用作治療異位性皮膚炎之誘導性抗原。

視誘導性抗原之性質而定，可藉由此項技術中已知之多種技術製備該分子。聚核苷酸、多肽及碳水化合物抗原可自富集其之待治療物種之細胞分離。短肽適宜藉由胺基酸合成來製備。序列已知之較長蛋白質可藉由合成編碼序列或PCR擴增來自天然來源或載體的編碼序列，且接著於適合之細菌或真核宿主細胞中表現該編碼序列來製備。

在本發明之某些實施例中，組合包含自細胞或組織獲得之抗原之複雜混合物，其中一或多者起誘導性抗原之作用。抗原可為未經處理的或經固定劑(諸如甲醛、戊二醛或醇)處理的全細胞形式。抗原可為藉由清潔劑溶解或機械斷裂細胞或組織，隨後澄清而產生的細胞溶解物形式。亦可藉由次細胞分級分離，尤其藉由諸如差速離心之技術富集質膜，視情況隨後進行清潔劑溶解及透析，來獲得抗原。其他分離技術亦適合，諸如經溶解膜蛋白之親和層析

或離子交換層析。

在一個實施例中，抗原肽或蛋白質為自體抗原、同種抗原或移植抗原。在另一特定實施例中，自體抗原係選自由髓鞘鹼性蛋白、膠原蛋白或其片段、DNA、核蛋白及核仁蛋白、粒線體蛋白及胰臟 β 細胞蛋白組成之群。

本發明提供藉由投與一種自體抗原(其中針對該抗原之耐受性為所需的)來誘發針對該抗原之耐受性，由此治療自體免疫疾病。舉例而言，在患有多發性硬化症之患者體內觀測到針對髓鞘鹼性蛋白(MBP)之自體抗體，且因此本發明中可使用待使用本發明組合物傳遞之MBP抗原肽或蛋白質來治療及預防多發性硬化症。

在另一個非限制性實例中，來自異卵雙胎之移植物之候選個體可能因經移植抗原對於接受者而言為外來的，而經歷經移植細胞、組織或器官之排斥反應。接受者個體對預定移植物之先期耐受性會消除或減少後期之排斥反應。可藉由實踐本發明來減少或消除長期的抗排斥療法。在另一實例中，許多自體免疫疾病均以針對內源性或自體抗原之細胞免疫反應為特徵。需要免疫系統對內源性抗原具耐受性來控制疾病。

在另一實例中，個體對工業污染物或化學物質(諸如可能在工作中遭遇者)之敏感呈現出免疫反應之危險。可能需要個體之免疫系統對化學物質(尤其與個體之內源性蛋白質反應之化學物質形式)產生先期耐受性，來防止後期發生職業性免疫反應。

過敏原為亦需要對其具有免疫反應耐受性的其他抗原。

值得注意的是，即使在病原性自體抗原未知之疾病中，亦可使用在解剖之鄰近位置存在之抗原誘發旁觀者抑止。舉例而言，在類風濕性關節炎中觀測到針對膠原蛋白之自體抗體，且因此可將編碼膠原蛋白之基因用作抗原表現基因模組，以治療類風濕性關節炎(參見例如 Choy (2000) *Curr Opin Investig Drugs* 1: 58-62)。此外，可利用針對 β 細胞自體抗原之耐受性來預防第1型糖尿病之發生(參見例如 Bach及Chatenoud (2001) *Ann Rev Immunol* 19: 131-161)。

在另一實例中，在自體免疫性腦脊髓炎及許多其他CNS疾病以及多發性硬化症中觀測到針對髓鞘寡樹突細胞糖蛋白(MOG)之自體抗體(參見例如 Iglesias等人(2001) *Glia* 36: 22-34)。因此，在本發明中使用MOG抗原表現構築體使得能治療多發性硬化症以及中樞神經系統之相關自體免疫病症。

用於治療自體免疫疾病之候選自體抗原的其他實例包括：胰臟 β 細胞抗原、胰島素及GAD，用於治療胰島素依賴性糖尿病；第11型膠原蛋白、人軟骨gp 39(HCgp39)及gp130-RAPS，用於治療類風濕性關節炎；髓鞘鹼性蛋白(MBP)、蛋白質質蛋白(PLP)及髓鞘寡樹突細胞糖蛋白(MOG，見上文)，用於治療多發性硬化症；核仁纖維蛋白及小核仁蛋白(snoRNP)，用於治療硬皮病；甲狀腺刺激因子受體(TSH-R)，用於治療葛瑞夫茲氏病(Graves' disease)；核抗原、組蛋白、糖蛋白gp70及核糖體蛋白，用於治療全

身性紅斑性狼瘡症；丙酮酸去氫酶去氫硫辛醯胺乙醯基轉移酶(PCD-E2)，用於治療原發性膽汁性肝硬化症；毛囊抗原，用於治療斑形脫髮；及人原肌凝蛋白同功異型物5(hTM5)，用於治療潰瘍性結腸炎。

評估耐受性

可藉由使用經分離細胞或在動物模型中進行實驗來測試組合激發耐受性的能力。

致耐受性活性之代替物為完整抗原或片段刺激靶位點產生適當細胞激素的能力。TGF- β 被認為是T抑制細胞在靶位點處釋放之免疫調控細胞激素(Miller等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:421, 1992)。可在耐受期間產生之其他因子為細胞激素IL4及IL-10，及介體PGE。相比之下，在經歷自動免疫破壞之組織中淋巴細胞分泌諸如IL-1、IL-2、IL-6及 γ -IFN之細胞激素。因此，可藉由量測候選誘導性抗原刺激適當類型細胞激素之能力來評估其功效。

須注意，可使用同系動物作為供體用於活體外細胞檢定中，以進行針對誘導性抗原、有效黏膜結合組份、有效組合或有效之黏膜投與模式及時程的快速篩檢測試。使用測試組合物處理動物之黏膜表面，且在某一時間藉由非經腸投與含靶抗原之弗氏完全佐劑來激發動物。分離脾細胞且在活體外在約50 μ g/mL濃度靶抗原存在下進行培養。可用候選蛋白或子片段取代靶抗原，以定位致耐受性抗原決定基之位置。分泌至介質中之細胞激素可藉由標準免疫檢定來定量。

細胞抑止其他細胞活性之能力可使用自經靶抗原免疫之動物分離之細胞或藉由產生對靶抗原具反應性的細胞株來測定(Ben-Nun等人, Eur. J. Immunol. 11:195, 1981)。在此實驗之一個變型中, 適度輻射(約1000至1250 rad)抑止細胞群體以防止增殖, 將抑止細胞與反應細胞共培養且接著使用經氙化胸苷併入(或MTT)來定量該等反應細胞之增殖活性。在另一變型中, 將抑止細胞群體及反應細胞群體培養於transwell雙室培養系統(Costar, Cambridge Mass.)之上層及下層中, 該培養系統容許該等群體在藉由聚碳酸酯膜彼此分開1 mm之距離內共培育(WO 93/16724)。以此方法, 不需要輻射抑止細胞群體, 因為可獨立量測反應細胞之增殖活性。

在靶抗原已存在於個體中之本發明之實施例中, 無需分離抗原或將其與黏膜結合組份預先組合。舉例而言, 抗原可因病理病狀(諸如發炎性腸病或乳糜瀉)或經由食物過敏原之消化而以某種方式於個體中表現。藉由以一或多種劑量或調配物給予黏膜結合組份, 且測定其當場激發對抗原之耐受性的能力來進行測試。

用於治療特定疾病之組合物的有效性及投藥模式亦可在相應動物疾病模型中得到詳述。在疾病之循環生物化學及免疫學標誌、患病組織之免疫組織學及適於所用模型之全部臨床特徵層面上, 監測該治療減輕或延緩疾病之症狀學之能力。可用於測試之動物模型的非限制性實例包括在以下部分中。

本發明涵蓋藉由調節TH1反應、TH2反應、TH17反應或此等反應之組合來調節耐受性。調節TH1反應涵蓋改變例如干擾素 γ 之表現。調節TH2反應涵蓋改變例如IL-4、IL-5、IL-10與IL-13之任何組合的表現。通常，TH2反應之增加(減少)包含IL-4、IL-5、IL-10或IL-13中至少一者之表現的增加(減少)；更通常，TH2反應之增加(減少)包含IL-4、IL-5、IL-10或IL-13中至少兩者之表現的增加；最通常，TH2反應之增加(減少)包含IL-4、IL-5、IL-10或IL-13中至少三者之增加，而理想地，TH2反應之增加(減少)包含全部IL-4、IL-5、IL-10及IL-13之表現之增加(減少)。調節TH17涵蓋改變例如TGF- β 、IL-6、IL-21及IL23之表現以及IL-17、IL-21及IL-22之作用量。

在本發明之研究中，在CD200KO小鼠中儘管疾病發作加速，但總體疾病發生率及嚴重性均隨時間而降低，其中疾病症狀之減輕與在病程後期調控T細胞之數目升高及存在高IL-10分泌性脾髓細胞相關。CD200KO對視網膜抗原之耐受性增強。此有關CD200KO之結果可與呼吸道中APC之表型相比野生型有所變化及耐受化CD200KO小鼠體內Th2轉換之增強相關。CD200KO小鼠之耐受性誘發係有效的，其中在免疫後28天仍有多達50%之眼睛受到保護而免於發生疾病(參見例如Murphy及Reiner (2002) Nat. Rev. Immunol. 2:933-944；Suri-Payer等人(1998) J. Immunol. 160:1212-1218；Thornton及Shevach (2000) J. Immunol. 164:183-190；Roncarolo等人(2001) Immunol. Rev. 182:68-

79 ; Peiser及Gordon (2001) *Microbes Infect.* 3:149-159 ;
Gordon (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3:23-35)。

在本發明研究中，第28天時，假耐受及耐受化CD200KO小鼠之脾中CD11b⁻IL10^{high}細胞皆明顯增加。自第21天起，此等細胞與所有實驗組中存在之較大CD11b⁺IL10^{low}群體截然不同。所偵測之高含量IL-10為內源性的，因為細胞係在無任何額外的活化刺激物或未藉由布雷菲德菌素A(brefeldin A)或其他高基氏抑制劑(Golgi inhibitor)人工整合細胞激素的情況下直接離體分析。對此等細胞之進一步分析表明其為CD11c⁻/low、CD45RB^{intermediate}及B220⁻，且具有漿細胞樣DC形態。具有類似表型但為CD45RB^{high}之致耐受性漿細胞樣DC可藉由在活體外與IL-10一起培養產生，可自正常C57B1/6小鼠之脾分離且在IL10轉殖基因小鼠體內增加。該等細胞在活體外分化3週時間，且在本發明研究中在疾病發作後3-4週出現在CD200KO脾中，表明涉及長時間之刺激及/或數個細胞分裂週期。骨髓源性漿細胞樣細胞亦具致耐受性且能夠在活體內產生分泌抗原特异性IL-10之Treg。在此研究中未發現大量的CD3⁺CD4⁺IL-10⁺細胞，但發現CD200KO小鼠體內CD3⁺CD4⁺CD25⁺之數量有增加之趨勢，且此在所有時間點時在耐受化組中均極為明顯。Treg可例如藉由抑制IL-2或IL-10之表現而具有免疫抑止作用。在本發明研究之第28天時，在所有組中IL-10之誘導及IL-2之抑止與在病程期間調控T細胞之誘導一致，且研究結果表明鼻內投與抗原與Tr1之誘導相關(參見

例如 Shevach (2002) *Nat. Rev. Immunol.* 2:389-400 ;
McGuirk 及 Mills (2002) *Trends Immunol.* 23:450-455 ;
Herrath 及 Harrison (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3:223-232 ;
Bluestone 及 Abbas (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3:253-257 ;
Thornton 及 Shevach (1998) *J. Exp. Med.* 188:287-296 ;
Jonuleit 等人 (2000) *J. Exp. Med.* 192:1213-1222 ; Wakkach
等人 (2003) *Immunity* 18:605-617)。

對自體抗原及自體免疫疾病之耐受性可藉由多種機制達成，包括陰性選擇胸腺中之自反應性T細胞，及對逃脫胸腺清除(thymic deletion)且在周邊發現之自反應性T細胞之周邊耐受性機制。提供周邊T細胞耐受性之機制的實例包括「忽視(ignorance)」自體抗原、對自體抗原無變應性或無反應性、細胞激素免疫偏差及活化誘發的自反應性T細胞之細胞死亡。此外，已展示在介導周邊耐受性過程中涉及調控T細胞。參見例如 Walker 等人 (2002) *Nat. Rev. Immunol.* 2:11-19 ; Shevach 等人 (2001) *Immunol. Rev.* 182:58-67。在一些情形中，對自體抗原之周邊耐受性喪失(或被破壞)且接著發生自體免疫反應。舉例而言，在EAE動物模型中，展示經由TLR先天性免疫受體活化抗原呈現細胞(APC)破壞自體耐受性且導致誘發EAE(Waldner 等人 (2004) *J. Clin. Invest.* 113:990-997)。

因此，在一些實施例中，本發明提供增加抗原呈現同時抑止或降低TLR7/8、TLR9及/或TLR 7/8/9依賴性細胞刺激之方法。如本文中所述，投與特定NISC引起DC或APC進

行之抗原呈現，同時抑止與免疫刺激聚核苷酸相關之TLR 7/8、TLR9及/或TLR7/8/9依賴性細胞反應。此抑止可包括一或多種TLR相關細胞激素之含量降低。適用於抑止TLR9依賴性細胞刺激之IRP為抑制或抑止與TLR9相關之細胞反應的彼等IRP。

使用方法

本發明提供調控個體、較佳哺乳動物、更佳人類之免疫反應之方法，其包含向該個體投與如本文中所述之抗原-載體複合物。本發明所提供之免疫調控方法包括抑止及/或抑制先天性免疫反應，包括(但不限於)由諸如髓鞘鹼性蛋白之免疫刺激多肽所刺激的免疫反應。

抗原-載體複合物係以足以調控免疫反應之量投與。如本文中所述，免疫反應之調控可為體液調控及/或細胞調控，且使用此項技術中之標準技術及如本文中所述量測。

在某些實施例中，個體患有與非吾人所樂見之免疫活化相關之病症，諸如過敏性疾病或病狀、過敏及哮喘。患有過敏性疾病或哮喘之個體為所患過敏性疾病或哮喘呈現可識別之症狀的個體。

在某些實施例中，個體患有與非吾人所樂見之免疫活化相關之病症，諸如自體免疫疾病及發炎性疾病。患有自體免疫疾病或發炎性疾病之個體為所患自體免疫疾病或發炎性疾病呈現可識別之症狀的個體。

自體免疫疾病可分為兩大類：器官特異性及全身性。自體免疫疾病包括(但不限於)類風濕性關節炎(RA)、全身性

紅斑性狼瘡症(SLE)、第I型糖尿病、第II型糖尿病、多發性硬化症(MS)、免疫介導之不孕症(諸如卵巢早衰)、硬皮病、休格連氏症候群(Sjogren's disease)、白斑病、禿頭症(禿髮)、多腺體衰竭、葛瑞夫茲氏病(Grave's disease)、甲狀腺功能低下、多發性肌炎、尋常天庖瘡、落葉型天庖瘡、發炎性腸病(包括克羅恩氏病(Crohn's disease)及潰瘍性結腸炎)、自體免疫性肝炎(包括與B型肝炎病毒(HBV)及C型肝炎病毒(HCV)相關之自體免疫性肝炎)、垂體低能症、移植物抗宿主疾病(GvHD)、心肌炎、艾迪森氏病(Addison's disease)、自體免疫性皮膚病、葡萄膜炎、惡性貧血及副甲狀腺低能症。

自體免疫疾病亦可包括(但不限於)橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、第I型及第II型自體免疫性多腺體症候群、副腫瘤性天庖瘡、大皰性類天庖瘡、疱疹樣皮炎、線狀IgA病、後天性大皰性表皮鬆解、結節紅斑、妊娠期類天庖瘡、癩痕性類天庖瘡、原發性混合型冷球蛋白血症、兒童期慢性大皰性疾病、溶血性貧血、血小板減少性紫癍、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、自體免疫性嗜中性球減少症、重症肌無力、伊頓-蘭伯特重症肌無力症候群(Eaton-Lambert myasthenic syndrome)、僵人症候群、急性彌散性腦脊髓炎、格-巴二氏徵候群(Guillain-Barre syndrome)、慢性炎性脫髓鞘性多神經根神經病變、出現傳導阻滯之多灶性運動神經病變、伴以單株性丙種球蛋白症之慢性神經病變、斜視眼陣攣-肌陣攣症

候群、小腦變性、腦脊髓炎、視網膜病、原發性膽汁性硬化症、硬化性膽管炎、麩質敏感性腸病、僵直性脊椎炎、反應性關節炎、多發性肌炎/皮膚炎、混合型結締組織病、貝塞特氏症候群(Bechet's syndrome)、牛皮癬、結節性多動脈炎、過敏性血管炎(allergic anguitis)及肉芽腫病(徹奇-斯全司病(Churg-Strauss disease))、多脈管炎重疊症候群、過敏性血管炎(hypersensitivity vasculitis)、韋格納肉牙腫病(Wegener's granulomatosis)、顛動脈炎、高安氏動脈炎(Takayasu's arteritis)、川崎氏病(Kawasaki's disease)、孤立性中樞神經系統血管炎、血栓閉塞性脈管炎、類肉瘤病、絲球體腎炎及寒冷病。此等病狀為醫學技術中所熟知且描述於例如Harrison's Principles of Internal Medicine, 第14版, Fauci A S等人編, New York: McGraw-Hill, 1998中。

在一些實施例中, 本發明係關於本發明組合物在疾病發作前之用途。在其他實施例中, 本發明係關於本發明組合物抑制所患疾病的用途。在一些實施例中, 本發明係關於改善個體之疾病。改善個體之疾病意謂包括治療、預防或抑止個體之疾病。

在一些實施例中, 本發明係關於預防疾病之復發。舉例而言, 非吾人所樂見之免疫反應可在一個肽區域(諸如抗原決定子)發生。與非吾人所樂見之免疫反應相關之疾病復發可藉由免疫反應攻擊不同肽區域而發生。一些免疫反應病症(包括MS及其他Th1/17介導之自體免疫疾病)中之T

細胞反應可為動態的，且在復發-緩解及/或慢性-進行性疾病過程期間發展。T細胞譜系之動態性質暗示可用於治療某些疾病，因為該靶可隨疾病進程而變化。先前需要業已存在之關於反應模式之知識來預測疾病進程。本發明提供可預防動態變化之疾病之影響(「抗原決定基擴展」之功能)的組合物。已知之復發模型為作為多發性硬化症(MS)之模型的對蛋白脂質蛋白(PLP)之免疫反應。初始免疫反應可因對PLP₁₃₉₋₁₅₁之反應而發生。隨後疾病之發作可因對PLP₁₇₈₋₁₉₁之復發性免疫反應而發生。已使用PLP模型展示本發明組合物可預防疾病復發。

本發明之某些實施例係關於在先前未經治療性干預耐受的個體中進行免疫耐受性預致敏。此等實施例通常涉及複數次投與抗原與黏膜結合組份之組合。在預致敏期間，通常進行至少三次投藥，通常至少四次投藥且有時至少六次投藥以達成長期結果，但個體可能在治療過程之早期就展示耐受性表現。最通常各次給藥均以快速投藥給予，但能夠黏膜釋放之持續調配物亦為適合的。當進行多次投藥時，各次投藥之間之時間一般在1天與3週之間且通常在約3天與2週之間。通常相同的抗原及黏膜結合組份係以相同濃度提供且對相同黏膜表面投藥，但可包括在治療過程期間任何此等變量之變化。

本發明之其他實施例係關於加強或延長先前確立之免疫耐受性之持久性。此等實施例通常涉及當已確立之耐受性衰減或具有衰減危險時投藥一次或進行短期治療。加強通

常係在預致敏或先前加強後1個月至1年且通常2個月至6個月進行。本發明亦包括涉及以每半週、每週、每兩週之投藥時程或以任何其他有規律之時程有規律地維持耐受性之實施例。

本發明之其他實施例係關於治療與非吾人所樂見之過敏相關之病理病狀。過敏可為第I型、第II型、第III型及第IV型中任一者。通常藉由使用一或多種入侵過敏原(offending allergen)或其致耐受性片段作為誘導性抗原來治療速發型(第I型)過敏。投藥頻率通常與過敏原暴露之時序一致。適合動物模型為此項技術中已知(例如Gundel等人, Am. Rev. Respir. Dis. 146:369, 1992; Wada等人, J. Med. Chem. 39, 2055, 1996, 及WO 96/35418)。

本發明之其他實施例係關於移植。移植係指將組織樣品或移植物自供體個體轉移至接受個體, 且通常係對需要該組織以恢復由該組織所提供之生理功能的人類接受者進行。所移植之組織包括(但不限於)全器官, 諸如腎、肝、心臟、肺; 器官組件, 諸如皮膚移植物及眼角膜; 及細胞懸浮液, 諸如骨髓細胞以及自骨髓或循環血液選擇且擴增之細胞的培養物, 及全血輸注。

由於宿主接受者與移植組織之間的抗原差異而接著發生任何移植之可能的嚴重併發症。視該差異之性質及程度而定, 可能存在宿主免疫攻擊移植物或移植物免疫攻擊宿主或二者之危險。藉由密切注意具有類似表型之經歷類似治療之個體群體的反應模式, 且根據廣泛接受之臨床程序將

各種可能之影響因素相關聯，來確定危險程度。免疫攻擊可為預先存在之免疫反應(諸如預先形成之抗體)之結果，或為在移植時間前後起始之反應(諸如產生 T_H 細胞)的結果。可涉及抗體、 T_H 細胞或 T_C 細胞彼此間之任何組合及其與各種效應分子及細胞之任何組合。

本發明之目標為提供容許根據標準手術程序進行移植，但發生移植物接受者之不利免疫反應的危險降低的材料及程序。該程序涉及使接受者耐受供體組織，或使供體組織耐受接受者，或兩者。藉由投與含移植組織中表現之靶抗原或旁觀者抗原的本發明組合物來進行耐受化。靶抗原可為例如同種異體細胞提取物。移植物可為具有許多不同細胞類型之複雜結構，且任一種或多種細胞類型移植至個體體內均可能引起適用本發明程序的危險。舉例而言，腎移植物併有內皮細胞抗原且肝移植物併有過客淋巴細胞(passenger lymphocyte)。

本發明之某些實施例係關於降低宿主抗移植物疾病引起接受者對組織移植物之排斥之危險。可進行治療以防止或減少超急性、急性或慢性排斥反應的影響。治療優選在移植前足夠長的時間內起始，以致在植入移植物時耐受性已產生；但若此不可能發生，則可在移植之同時或在移植後起始治療。無論何時起始，治療通常在移植後至少第一個月內以規律時間間隔持續。若移植物足夠適應，則可無需後續給藥，但若存在任何移植物排斥或發炎跡象，則可重新開始給藥。當然，本發明之耐受化程序可與其他形式之

免疫抑止組合以達成危險程度之進一步降低。

本發明之某些實施例係關於降低移植物抗宿主疾病之危險。在此系列實施例中，必需在進行移植前使活供體耐受未來移植物接受者之靶抗原。獲得耐受性後，即收集供體之細胞或組織且進行移植。

自體免疫疾病研究之動物模型為此項技術中已知。舉例而言，看起來與人類自體免疫疾病最為類似的動物模型包括自發出現較高的特定疾病發生率的動物品系。該等模型之實例包括(但不限於)非肥胖性糖尿病(NOD)小鼠，其發生類似於第1型糖尿病之疾病；及易患狼瘡樣疾病之動物，諸如紐西蘭(New Zealand)雜交MRL-Fas^{lpr}及BXSB小鼠。已誘發自體免疫疾病之動物模型包括(但不限於)實驗性自體免疫性腦脊髓炎(EAE)，其為多發性硬化症之模型；膠原蛋白誘發之關節炎(CIA)，其為類風濕性關節炎之模型；及實驗性自體免疫性葡萄膜炎(EAU)，其為葡萄膜炎之模型。自體免疫疾病之動物模型亦已藉由基因操控產生，且包括例如針對發炎性腸病之IL-2/IL-10基因剔除小鼠；針對SLE之Fas或Fas配位體基因剔除動物模型；及針對類風濕性關節炎之IL-1受體拮抗劑基因剔除動物模型。

投藥及免疫反應之評定

載體可如本文中所述與其他藥劑組合投與，且可與其生理學上可接受之載劑組合(且因而本發明包括此等組合物)。載體可為任何本文中所述之載體。

可製備本發明組合物以投與有需要之個體，尤其具有非吾人所樂見之免疫反應之人類個體。組合物之製備及其使用係根據通常所接受之醫藥組合物製備程序進行。

Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin編，Mack Publishing Co., Pa中描述製備醫藥組合物之程序。黏膜結合組份及抗原(分開或一起給予)視情況與其他活性組份、載劑及賦形劑以及穩定劑組合。相關的額外活性組份為增強該組合在黏膜表面之致耐受作用的藥劑。額外活性組份之實例為細胞激素，例如IL-4。儘管並不必要，但醫藥組合物可以適於投與精確量之單位劑型供應。

用於調節免疫反應之本發明之有效量及投藥方法可基於個體、待治療之病狀及熟習此項技術者顯而易知之其他因素而變化。須考慮的因素包括投藥途徑及欲投與之劑量數。此等因素為此項技術中已知且恰在熟習此項技術者之技能範圍內，由此無需過度實驗即可做出此等決定。適合劑量範圍為提供所需免疫反應調控(例如抑止IFN- α 或其他細胞激素之產生)之範圍。適用的載體劑量範圍(以所傳遞之載體量給出)可為例如大約以下任何劑量：0.5至10 mg/kg、1至9 mg/kg、2至8 mg/kg、3至7 mg/kg、4至6 mg/kg、5 mg/kg、1至10 mg/kg、5至10 mg/kg。或者，可以粒子數計投與該劑量。舉例而言，適用之載體劑量(以所傳遞之載體量給出)可為例如大約以下任何劑量：每劑超過 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} 個粒子；或每劑 1×10^7 至 1×10^9 個粒子；或每劑 1×10^8 至 1×10^9 個粒子；或每劑 2×10^9

至 5×10^9 個粒子。給予各患者之絕對量視藥理性質(諸如生物可用性、清除率)及投藥途徑而定。關於醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及賦形劑以及製備醫藥組合物及調配物之方法的細節提供於Remington's Pharmaceutical Sciences第18版, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA. 中, 其全文以引用的方式併入本文中。

特定載體調配物之有效量及投與方法可基於個別患者、所需結果及/或病症類型、疾病分期及熟習此項技術者顯而易知之其他因素而變化。適用於特定應用之投藥途徑為熟習此項技術者顯而易知。投藥途徑包括(但不限於)局部、皮膚、經皮、經黏膜、表皮、非經腸、腸胃及鼻咽以及經肺(包括經支氣管及經肺泡)投與。適合劑量範圍為提供足以獲得約 $1-50 \mu\text{M}$ 之組織濃度(如以血液含量所量測)之含IRP組合物的範圍。給予各患者之絕對量視藥理性質(諸如生物可用性、清除率)及投藥途徑而定。

本發明提供適於局部應用之載體調配物, 包括(但不限於)生理學上可接受之植入物、軟膏、乳膏、洗劑及凝膠。皮膚投藥之例示性途徑為侵襲性最小的途徑, 諸如經皮輸送、表皮投與及皮下注射。

經皮投藥係藉由施用能夠使載體穿透皮膚且進入血流之乳膏、洗劑、凝膠等實現。適於經皮投與之組合物包括(但不限於)直接施用於皮膚或併入保護性載體(諸如經皮裝置(所謂的「貼片」))中的醫藥學上可接受之懸浮液、油劑、乳膏及軟膏。適合乳膏、軟膏等之實例可見於例如

Physician's Desk Reference 中。亦可藉由離子導入療法，例如使用市售貼片經由未破損之皮膚連續傳遞其產物歷時數天或更長時間，來實現經皮輸送。使用此方法允許以相對較高濃度受控輸送醫藥組合物，容許輸注組合藥物且允許同時使用吸收促進劑。

非經腸投藥途徑包括(但不限於)電動注射(離子導入法)或直接注射，諸如直接注射至中心靜脈導管、靜脈內注射、肌肉內注射、腹膜內注射、皮內注射或皮下注射。適於非經腸投與之載體調配物通常係於USP水或注射用水中調配，且可進一步包含pH緩衝劑、鹽增積劑(bulking agents)、防腐劑及其他醫藥學上可接受之賦形劑。非經腸注射之免疫調節聚核苷酸可於醫藥學上可接受之滅菌等張溶液(諸如注射用鹽水及磷酸鹽緩衝鹽水)中調配。

腸胃投藥途徑包括(但不限於)攝取及直腸途徑，且可包括使用例如醫藥學上可接受之散劑、藥丸或液體以供攝取，及栓劑以供直腸投與。

鼻咽及肺投藥係藉由吸入實現，且包括諸如鼻內、經支氣管及經肺泡途徑之傳遞途徑。本發明包括適於藉由吸入投與之載體調配物，包括(但不限於)形成氣溶膠之液體懸浮液以及用於乾粉吸入傳遞系統之粉末形式。適於吸入投與載體調配物之裝置包括(但不限於)霧化器、汽化器、噴霧器及乾粉吸入傳遞裝置。

如此項技術中所熟知，本文中所述之投藥途徑所使用之溶液或懸浮液可包括以下任一種或多種組份：滅菌稀釋

劑，諸如注射用水、鹽水溶液、不揮發性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶劑；抗細菌劑，諸如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸；緩衝劑，諸如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；及張力調節劑，諸如氯化鈉或右旋糖。可使用酸或鹼，諸如鹽酸或氫氧化鈉，來調節pH。非經腸製劑可封裝於玻璃或塑膠製成之安瓿、拋棄式注射器或多劑量小瓶中。

如此項技術中所熟知，適於注射使用之醫藥組合物包括滅菌水溶液(若為水溶性)或分散液，及臨用方製備滅菌注射溶液或分散液之滅菌粉末。對於靜脈內投藥，適合載劑包括生理食鹽水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany N.J.)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。在所有情況中，組合物必須為滅菌的且可流動至易於注射之程度。其在製造及儲存條件下穩定，且必須防腐以對抗微生物(諸如細菌及真菌)之污染作用。載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液態聚乙二醇，及其類似物)之溶劑或分散介質，及其適合混合物。適當流動性可例如藉由使用諸如卵磷脂之塗層、在分散液情況下藉由維持所需粒度，及藉由使用界面活性劑來維持。微生物作用之防止可由各種抗細菌劑及抗真菌劑(例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、硫柳汞及其類似物)達成。一些實施例在組合物中包括等張劑，例如糖；多元醇，諸如甘露醇、山梨糖醇；氯化鈉。注射組合物之延長吸收可藉由在組合物

中包括延遲吸收劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)達成。

如此項技術中所熟知，可藉由將所要量之活性化合物視需要與以上列舉之一種成份或成份組合一起併入適當溶劑中，隨後過濾滅菌，來製備無菌可注射溶液。通常藉由將活性化合物併入含有鹼性分散介質及以上列舉之其他所需成份的無菌媒劑中來製備分散液。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末之情況中，較佳的製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥先前經無菌過濾之其溶液，由此得到活性成份加上任何額外所需成份的粉末。

本發明之某些實施例係關於一或多種組份視情況與書面說明書一起提供於一單獨容器中以供患者或投藥之保健專業人員組合醫藥組合物之套組及試劑。

實例

儘管本文中已展示且描述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者將顯而易見此等實施例係僅作為實例提供。在不悖離本發明之情況下，熟習此項技術者現可進行多種變更、變化及取代。應瞭解本文中所描述之本發明實施例之各種替代方案均可用於實施本發明。預期下文之申請專利範圍將界定本發明之範疇且在此等申請專利範圍範疇內之方法及結構以及其等效物均涵蓋於其中。

實例1. 使用PLP肽與聚苯乙烯球之結合物誘發對EAE復發之耐受性。

使聚苯乙烯微球體與致腦炎抗原決定基或對照肽偶合以確定是否能使用人工載體誘發活動性EAE。

測定對所誘發之EAE之抑制作用的方法遵循先前描述於Smith及Miller (2006) *J. Autoimmun.* 27:218-31中之程序。簡言之，自Harlan Laboratories(Bethesda, MD)購得6-7週齡之SJL小鼠。在美國西北大學比較醫學中心(Northwestern University Center for Comparative Medicine)中，在無特定病原體條件(SPF)下圈養所有小鼠。使癱瘓動物更易接取食物及水。

Fluoresbrite黃綠色羧酸酯(Fluoresbrite YG Carboxylate)微球體係購自Polysciences, Inc.(Warrington, PA)。合成肽PLP₁₃₉₋₁₅₁(HSLGKWLGHDPKF)及OVA₃₂₃₋₃₃₉(ISQAVHAAHAEINEAGR)係購自Genemed, San Francisco, CA。使用ECDI將肽與微球體偶合，即將肽偶合至該等粒子上特定數目之活性胺基或羧基位點。

使用乙烯碳化二亞胺(ECDI)將聚苯乙烯微球體懸浮液與肽偶合。於PBS中洗滌微球體2次，以 3.2×10^6 /ml再懸浮於含有1 mg/ml各肽及30.75 mg/ml ECDI(CalBiochem, La Jolla, CA)之PBS中，且在4°C下在週期性震盪下培育1小時。接著於PBS中洗滌與肽偶合之微球體3次，經由70 μ m細胞過濾器過濾且以每毫升 250×10^6 個微球體再懸浮於PBS中。在第0天以PLP₁₃₉₋₁₅₁/弗氏完全佐劑(CFA)預致敏之前第7天，對8-10週齡之雌性小鼠靜脈內注射 10^9 個與PLP₁₃₉₋₁₅₁或OVA₃₂₃₋₃₃₉偶合之所述Fluoresbrite黃綠色羧酸酯0.50微米微球體。每1-3天觀察個別動物且如下根據0-4級評分量表評定臨床評分：0=無異常；1=尾部無力或後肢疲軟；2=尾

部無力及後肢疲軟；3=後肢部分癱瘓；4=後肢完全癱瘓。所報導的數據為平均每日臨床評分。再觀察小鼠之EAE臨床症狀40天。

在免疫後之指定天數，將小鼠麻醉且灌注30 ml PBS。藉由剝離移除脊髓，且立即在液氮中以OCT(Miles Laboratories; Elkhart, IN)冷凍2至3 mm之脊髓塊。在塑膠袋中在-80°C下儲存該等脊髓塊以防止脫水。在Reichert-Jung Cyocut CM1850冷凍切片機(Leica, Deerfield, IL)上將來自腰椎區(約L2-L3)之切片切成6微米厚，裝於Superfrost Plus帶靜電載片(Fisher, Pittsburgh, PA)上，風乾且在-80°C下儲存。根據製造商說明書，使用酪胺醯胺信號放大(Tyramide Signal Amplification, TSA)Direct套組(NEN, Boston, MA)對載片染色。將各組之腰切片解凍、風乾，在室溫下固定於2%聚甲醛中且於1x PBS中再水合。使用抗CD16/CD32(FcIII/IIR, 2.4G2; BD PharMingen)，及抗生物素蛋白/生物素阻斷套組(Vector Laboratories)以及由TSA套組提供之阻斷試劑阻斷非特異性染色。使用與生物素結合之抗小鼠CD4(H129.19)抗體(BD Biosciences, San Jose, CA)及抗小鼠F4/80(BM8)(Caltag, Burlingame, CA)對組織染色。使用包括DAPI之Vectashield封片劑(Vector Laboratories, Burlingame, CA)對切片封蓋蓋玻片。檢查載片且經由落射螢光法使用SPOT RT照相機(Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI)及Metamorph成像軟體(Universal Imaging, Downingtown, PA)獲取影像。以100倍及200倍放

大率分析每組八個來自各樣品之不連續腰椎切片。

結果展示於圖 1 中。在 SJL 小鼠中，經由胺基鍵聯與 PLP139-151 偶合但不與 OVA323-339 偶合之 Fluoresbrite 黃綠色羧酸酯 0.50 微米聚苯乙烯微球體 (Polysciences, Warrington, PA) 不僅有效提供顯著保護而免於誘發由 PLP139-151/CFA 誘發之 EAE，而且更重要的是使活動性 EAE 復發之起始完全消除。此可表明視載體珠粒之組成而定，可能不需要在惰性載體上包括細胞凋亡信號。

實例 2. 調配 PLG 微球體

本實例描述適於包覆且傳遞抗原特異性肽之聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微球體調配物。微球體係使用雙乳化技術製備(J. H. Eldridge 等人，Mol Immunol, 28:287-294, 1991；S. Cohen 等人，Pharm Res, 8:713-720, 1991)。RG502H 用作聚合物且聚乙醇醇用作穩定劑。發現包覆效率隨著有機相(二氯甲烷)中 PLG 濃度(30-200 mg/ml)之增加而增加，其亦與中值微球體直徑(約 1 至約 10 μm)增加相關。

實例 3. 製備含有髓鞘鹼性蛋白之脂質體組合物

藉由先前所述之方法(17)憑經驗測定最佳的髓鞘鹼性蛋白(MBP)/脂質體比率。為製備 MBP/脂質組合，首先使各組份達到室溫。將脂質[1,2-二月桂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC)；Avanti Polar-Lipids, Inc., Alabaster, Ala.]以 120 mg/ml 之濃度溶解於第三丁醇(Fisher Scientific, Houston, Tex.)中，接著音波處理，獲得澄清溶液。亦將 MBP 以 40 mg/ml 溶解於

第三丁醇中且渦旋，直至所有固體均溶解。接著將兩種溶液等量(v:v)合併，獲得所需比率之MBP/脂質體，藉由渦旋混合，在-80°C下冷凍1-2小時且凍乾隔夜得到乾粉，隨後在-20°C下儲存待用。各處理小瓶含有75 mg MBP。

實例4. 合成聚(Glu-Lys)聚合物

適用作連接載劑之多肽聚合物為聚(麩胺酸-離胺酸)(聚(麩胺醯基離胺酸)或聚(EK))。使用二異丙基碳化二亞胺及1-羥基苯并三唑將N- α -Fmoc 麩胺酸 γ -苯甲酯(Fmoc-Glu(OBzl)-OH)與N-E-CBZ 離胺酸第三丁酯(H-Lys(Z)-tBu)偶合(兩種試劑均購自 Calbiochem-Novabiochem, San Diego, Calif.)。可使用哌啶隨後用95%三氟乙酸脫除所得二肽 Fmoc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-tBu 之保護基，得到 H-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OH。接著可藉由碳化二亞胺或其他縮合作用使二肽單元自由聚合形成不同鏈長度之混合物。或者，若需要指定長度，則使用哌啶脫除胺基端保護基以提供 H-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OtBu，且使用95%三氟乙酸脫除羧基端保護基以提供 Fmoc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OH，由此使兩個二肽能夠與碳化二亞胺縮合，得到 Fmoc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OtBu。重量此循環可得到指定長度之聚(Glu(OBzl)-Lys(Z))。對於無規聚合物或指定長度之聚合物，可使用H₂/Pd或者諸如液態HF或三氟甲烷磺酸之強酸，同時移除麩胺酸上之苄基保護基及離胺酸上之CBZ保護基。此使得游離胺基及游離羧基皆可用於連接抗原特異性肽及/或細胞凋亡信號傳導分子。可藉由使用肽

化學領域中之標準方法，使用Boc、Bpoc或Fmoc基團再保護游離胺基以防止其在羧酸酯基衍生化期間發生反應。

實例5. 結合抗原特異性肽之聚合脂質體

抗原特異性肽與聚合脂質體結合，形成結合抗原特異性肽之聚合脂質體以用於誘發對抗原特異性肽之耐受性。

以指定量組合以下脂質組份：60%二十五二炔酸填充脂質、29.5%螯合劑脂質、10%胺封端之脂質及0.5%結合生物素之脂質，且蒸發溶劑。添加水，得到30 mM醯基鏈溶液。音波處理脂質/水混合物至少1小時。在音波處理期間，使用NaOH將溶液之pH值維持在7與8之間，且藉由音波處理產生之熱將溫度維持在高於凝膠-液晶相轉變點。將脂質體轉移至靜置於濕冰床上之皮氏培養皿中且在254 nm下輻射至少1小時以進行聚合。在通過0.2 μm 過濾器後，收集聚合之脂質體。為形成結合抗原特異性肽之聚合脂質體，將2.3 μg 抗生物素蛋白與14.9 μg 結合生物素之抗體以約1:3之莫耳比合併於磷酸鹽緩衝生理食鹽水中，且在室溫下培育15分鐘。將此溶液與150 μL 以上形成之聚合脂質體合併且在4 $^{\circ}\text{C}$ 下培育隔夜，形成結合抗原特異性肽之聚合脂質體。

實例6. 製造奈米粒子之方法

藉由反相乳液聚合合成奈米粒子。藉由在恆定攪拌下，向超純milliQ水中添加PEG嵌段共聚物乳化劑、PLURONIC F-127(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)及單體硫化丙烯來產生乳液。經保護之引發劑異戊四醇四硫酯

之保護基藉由在攪拌下與0.20 mL 0.5 M 甲醇鈉溶液混合10分鐘而脫除。脫除保護基後，接著將引發劑添加至單體乳液中，且在5分鐘後，向反應物中添加60 μ l 鹼二氮雜[5.4.0]雙環十一-7-烯(DBU)且在惰性氛圍下連續攪拌24小時。接著將奈米粒子暴露於空氣中以產生二硫化物交聯。

藉由使用12-14 kDa MWCO膜(Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, Calif.)對超純milliQ水進行2天的反覆透析，自剩餘單體、鹼或游離PLURONIC中純化出奈米粒子。藉由使用動態光散射儀(Malvern, Worcestershire, United Kingdom)測定奈米粒子之尺寸分布。

實例7. 髓鞘鹼性蛋白與奈米粒子結合

可藉由以蛋白質或肽將Pluronic(PEG與PPG之嵌段共聚物)表面功能化來實現抗原與奈米粒子之結合。本實例中提供使用游離半胱胺酸殘基進行化學結合的蛋白質抗原髓鞘鹼性蛋白(MBP)之結合流程。在相關流程中可使用其他官能基，諸如N端或離胺酸殘基上之胺。抗原亦可吸附於奈米粒子表面。

為將MBP與奈米粒子結合，合成Pluronic二乙烯基磺，經由MPB上之游離硫醇基以麥可加成反應(Michael addition reaction)與MPB偶合。以下給出兩個步驟之合成細節。

以原樣使用Pluronic F127(Sigma)、二乙烯基磺(Fluka)、氫化鈉(Aldrich)、甲苯(VWR)、乙酸(Fluka)、乙醚(Fisher)、二氯甲烷(Fisher)及矽藻土(Macherey Nagel)。反應係在氫

(Messer)下進行。於氘化氯仿(Armar)中量測 ^1H NMR且以ppm給出相對於0.0 ppm之內標四甲基矽烷(Armar)信號之化學位移。

使用迪恩-斯達克分離器(Dean-Stark trap)藉由共沸蒸餾來乾燥Pluronic F-127之甲苯溶液。於冰浴中冷卻該溶液，添加氫化鈉。將反應混合物攪拌15分鐘且迅速添加二乙烯基矽(Sigma-Aldrich)。在室溫下在黑暗中攪拌5天後，藉由添加乙酸使反應淬滅。經矽藻土過濾且在減壓下將濾液濃縮至較小體積後，於1公升冰冷的乙醚中沈澱產物。濾出固體，溶解於極少量之二氯甲烷中且於冰冷的乙醚中沈澱，重複總共四次。在真空下乾燥聚合物且在氫下在 -20°C 下儲存。

實例 8. 流動式細胞測量及分析以及活體外奈米粒子內化：由APC(包括DCS)吸收

進行流動式細胞測量術分析以定量淋巴結中使奈米粒子內化之APC及DC的分率。染色後，藉由流動式細胞測量術(CyAn ADP, Dako, Glostrup, Denmark)分析淋巴結細胞懸浮液。使用FlowJo軟體(TreeStar, Ashland, Oreg.)進行進一步分析。確定具有內化之螢光奈米粒子之APC及DC分別為 $\text{MHCII}^+\text{FITC}^+$ 及 $\text{CD11c}^+\text{FITC}^+$ ，FITC表示奈米粒子之標記。藉由計算表現CD86及CD80之細胞之分率來評估在奈米粒子內化後DC的成熟情況。

實例 9. 修飾量子點奈米粒子

使用連接劑，諸如磺基-SMCC(4-N-順丁烯二醯亞胺基

甲基環己烷-1-甲酸磺基丁二醯亞胺酯)，修飾包括經樹枝狀聚合物包覆之量子點的量子點奈米粒子之胺表面，以形成經順丁烯二醯亞胺活化之量子點。藉由尺寸排阻層析(一種分離反應混合物中各組份之常用技術)移除任何過量試劑。以樹枝狀聚合物包覆量子點之方法描述於例如 Lemon 等人(J. Am. Chem. Soc., 2000, 122:12886)中，其內容以引用的方式併入本文中。

形成量子點奈米粒子-AChE結合物

使經順丁烯二醯亞胺活化之 QD 與經硫氫基修飾之 AChE 反應有限的時間，以防止多個 QD 連接至多個蛋白質。歸因於大分子之位阻及熵值，多個交聯係不利的。藉由使用尺寸排阻層析法分離來停止反應。

實例 10. 製備樹枝狀聚合物之方法

PAMAM 樹枝狀聚合物係由乙二胺(EDA)引發劑核心以及四個放射狀樹突臂構成，且使用包含丙烯酸甲酯(MA)之澈底麥可加成反應及所得酯與大量過量之 EDA 之縮合(醯胺化)反應以產生各繼代的重複反應序列合成。因此，各連續反應在理論上使表面胺基數量加倍，該等胺基可經活化以進行官能化。已分析所合成之樹枝狀聚合物，且藉由 GPC 發現分子量為 26,380 g/mol 且藉由電位滴定測定一級胺基之平均數量為 110 個。

實例 11. 表徵樹枝狀聚合物之官能基

乙醯化樹枝狀聚合物。

乙醯化為合成樹枝狀聚合物之第一必需步驟。使用部分

乙醯化以使一部分樹枝狀聚合物表面不致在生物系統內進一步反應或發生分子間相互作用，從而防止在合成期間發生非特異性相互作用。留下的一部分未經乙醯化之表面胺允許連接官能基。剩餘胺基之乙醯化會使水溶性增加(在FITC結合後)，使得與許多習知介質相比較，樹枝狀聚合物能更自由地分散於水性介質中且具有增加之靶向特異性(Quintana等人，Pharm. Res. 19, 1310 (2002))。

實例12. 官能基與乙醯化樹枝狀聚合物結合

螢光素異硫氰酸酯與乙醯化樹枝狀聚合物結合。使用部分乙醯化之PAMAM樹枝狀聚合物來結合螢光素異硫氰酸酯(FITC)以增加樹枝狀聚合物之溶解度。使部分乙醯化之樹枝狀聚合物與螢光素異硫氰酸酯反應，且在澈底透析、凍乾及反覆膜過濾後，得到樹枝狀聚合物-FITC產物。

葉酸與乙醯化樹枝狀聚合物結合。

葉酸與部分乙醯化之單官能樹枝狀裝置結合係經由葉酸之 γ -羧基與樹枝狀聚合物之一級胺基縮合來進行。將此反應混合物逐滴添加至含有樹枝狀聚合物-FITC之DI水溶液中且用力攪拌2天(在氮氣氛圍下)，以使葉酸與樹枝狀聚合物-FITC完全結合。

實例13. 藉由T細胞表型分析來評估耐受性

將本發明之奈米粒子-MBP(83-99)複合物溶解於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)中，且將0.1-0.2 ml含有500 μ g奈米粒子-MBP複合物之PBS經腹膜內注射至雌性路易斯大鼠(Lewis rat)體內。對照組大鼠接收0.1-0.2 ml PBS。注射後

九至十天，自大鼠收集脾及淋巴結(腹股溝及腰部)，且藉由經40 μm 耐綸細胞過濾器浸解組織而獲得單一細胞懸浮液。於PBS(1% FCS)中以相關單株抗體之適當稀釋液對樣品染色。自分析中排除碘化丙錠染色之細胞。於LSR2流式細胞儀(BD Biosciences, USA)上獲取樣品且使用FACS Diva軟體進行分析。分析來自注射奈米粒子-MBP複合物之大鼠之脾細胞及淋巴結細胞上活化標記物CD25、CD44、CD62L、CTLA-4、CD45Rb及CD69的表現。來自注射該複合物之大鼠的CD4⁺ T細胞表現CD25^{hi}/CD45RB^{int}表型，其為無變應性CD4⁺ T細胞之特徵。亦存在較高百分比之CD4⁺細胞為CD25^{hi}及FoxP3⁺，暗示調控T細胞之誘發。

為評定細胞凋亡，根據製造商方案使用CD8 α 分離套組(Miltenyi Biotec, Germany)將CD8⁺ T細胞自脾細胞分離，根據製造商方案用磷脂結合蛋白V及PI(皆來自BD Biosciences)染色且接著藉由流動式細胞測量術分析。為進行顆粒酶B(Granzyme B)及Bcl-2之胞內染色，用BD cytofix/cytoperm套組(BD Biosciences)滲透T細胞且用大鼠抗小鼠顆粒酶B PE單株抗體(eBioscience)或倉鼠抗小鼠Bcl-2 FITC單株抗體(BD Biosciences)染色。使用適當同型單株抗體進行特異性對照。藉由此項技術中熟知之流動式細胞測量術來分析樣品。

實例14. 藉由T細胞增殖來評估耐受性

將本發明之奈米粒子-MBP(83-99)複合物溶解於磷酸鹽

緩衝生理食鹽水(PBS)中，且將0.1-0.2 ml含有500 μg 奈米粒子-MBP複合物之PBS經腹膜內注射至Balb/c小鼠體內。對照組小鼠接收0.1-0.2 ml PBS。注射後九至十天，自小鼠收集脾及淋巴結(腹股溝及腰部)，且藉由經40 μm 耐綸細胞過濾器浸解組織而獲得單一細胞懸浮液。根據製造商方案，使用 CD4^+ T細胞分離套組(Miltenyi Biotec, Germany)將 CD4^+ T細胞自脾細胞分離。一式三份，將經純化 CD4^+ T細胞(每孔 5×10^4 個)與以下一起塗盤：1)耗盡T細胞之經輻射(2000 R)CBA/J刺激細胞(5×10^5 個)，培養72小時；2)同系脾細胞(5×10^5 個)加可溶性抗CD3(145-2C11)，培養48小時，或3)100 ng/ml佛波醇12-十四烷酸酯13-乙酸酯(Sigma)及200 nM鈣離子載體(離子黴素(ionomycin), Sigma)，培養總共36小時，其中在最後8-12小時期間存在每孔1 μCi [^3H]TdR之脈衝。在閃爍液存在下，在 β 計數器(Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)上量測[^3H]TdR併入作為DNA複製及細胞增殖之指標。在48小時時收集經抗CD3刺激之T細胞之上清液，且藉由在抗IL-4抗體(11B11)存在下量測IL-2依賴性細胞株CTLL-2之增殖，來測定IL-2之產生，其中1單位為支持半數最大[^3H]TdR併入量所需之IL-2的量。

亦可藉由使用螢光胞質染料羧基二乙酸螢光素丁二醯亞胺基酯(Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester, CFSE)直接觀測細胞分裂，來評定T細胞增殖。為進行細胞之CFSE標記，將來自注射奈米粒子-MBP複合物之小鼠

之脾細胞與3 μM CFSE(Molecular Probes, UK)一起在1 ml PBS中在37°C下培育3分鐘。在96孔盤之各孔中，以 1×10^5 個塗覆有MBP(83-99)肽(10 μM)或不相關之對照肽pSV9(10 μM)的經輻射(80 Gy)之溫度誘導之RMA-S刺激 2×10^5 個標記CFSE之脾細胞。適當培養物中補充10 U/ml IL-2、10 ng/ml IL-7、50 ng/ml IL-15或50 ng/ml IL-21。在適當時間點收集細胞，以CD4染色且藉由流動式細胞測量術測定CFSE特徵。

實例 15. 藉由T細胞之細胞激素特徵及細胞毒性來評估耐受性

IFN- γ 檢定

將本發明之奈米粒子-MBP(83-99)複合物溶解於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)中，且將0.1-0.2 ml含有500 μg 奈米粒子-MBP複合物之PBS經腹膜內注射至Balb/c小鼠體內。對照組小鼠接收0.1-0.2 ml PBS。注射後九至十天，自小鼠收集脾及淋巴結(腹股溝及腰部)，且藉由經40 μm 耐綸細胞過濾器浸解組織獲得單一細胞懸浮液。為量測抗原特异性IFN- γ 之產生，根據製造商方案，使用CD4⁺ T細胞分離套組(Miltenyi Biotec, Germany)將CD4⁺ T細胞自脾細胞分離。刺激經純化之CD4⁺ T細胞，收集培養物上清液且以IFN- γ ELISA量測IFN- γ 。對於各不同實驗條件，將一式三份培養物塗於96孔圓底盤上。在各孔中，以 1×10^4 個塗覆有MBP(83-99)肽(10 μM)或不相關對照肽pSV9的經輻射(80 Gy)之溫度誘導之RMA-S刺激 1×10^4 個來自注射奈米粒子-

MBP(83-99)複合物之小鼠的脾細胞。適當培養物中補充10 U/ml IL-2、10 ng/ml IL-7、50 ng/ml IL-15或50 ng/ml IL-21。72小時後，自各孔收集50 μ l培養物上清液且藉由使用抗IFN- γ 抗體之夾心ELISA(BD Biosciences)量測鼠類IFN- γ 。使用平均吸光度值(OD)相對於上清液中重組IFN- γ 之稀釋度作出的標準曲線，確定實驗樣品中之活性。

IL-2生物檢定

為量測抗原特異性IL-2之產生，刺激經純化的來自注射奈米粒子-MBP(83-99)複合物之小鼠之CD4⁺ T細胞，收集培養物上清液且使用IL-2依賴性CTLL細胞量測IL-2。IL-2檢定之刺激階段係完全如IFN- γ 檢定一般進行。72小時後，收集50 μ l培養物上清液，轉移至含有CTLL細胞(5×10^3 個)之孔中，且培育16-18小時。藉由向各孔中添加1 μ Ci ³[H]-胸苷且再培育12小時，以³[H]-胸苷對細胞作脈衝處理。使用cpm相對於上清液中重組IL-2之稀釋度作出的標準曲線，確定實驗樣品中之活性。或者，可藉由使用抗IL-2抗體之夾心ELISA(BD Biosciences)量測來自上清液中之鼠類IL-2。

CTL檢定

在4小時⁵¹鉻釋放檢定中，測定來自注射奈米粒子-MBP(83-99)複合物之小鼠的CD8⁺ T細胞對塗覆有MBP(83-99)肽或結合I類MHC之對照肽之MBL-2腫瘤細胞及RMA-S細胞的細胞毒性活性。⁵¹鉻釋放檢定為此項技術中所熟知。

細胞激素ELISA

如上文所述，刺激經純化的來自注射奈米粒子-MBP(83-99)複合物之小鼠的CD4⁺ T細胞且收集培養物上清液。藉由使用標準方案之細胞激素夾心ELISA(BD Biosciences)量測細胞激素(包括IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、TGF-β及TNF-α)之含量。IL-4、IL-5、IL-10及IL-13之產量增加通常與Th2反應相關。IL-10及TGF-β通常與調控T細胞之反應相關。

實例 16. 藉由T細胞抑止活性來評估耐受性

將本發明之奈米粒子-MBP(83-99)複合物溶解於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)中，且將0.1-0.2 ml含有500 μg奈米粒子-MBP複合物之PBS經腹膜內注射至Balb/c小鼠體內。對照組小鼠接收0.1-0.2 ml PBS。注射後九至十天，自小鼠收集脾及淋巴結(腹股溝及腰部)，且藉由經40 μm耐綸細胞過濾器浸解組織獲得單一細胞懸浮液。為量測T細胞之抑止活性，根據製造商方案，使用CD4⁺ T細胞分離套組(Miltenyi Biotec, Germany)將CD4⁺ T細胞自脾細胞分離。可使用CD25微珠分離CD4⁺CD25⁺調控T細胞。

在U型底96孔盤中，在可溶性0.5-0.75 μg/ml α-CD3及2.5-4 μg/ml α-CD28存在下，將CD4⁺CD25⁻反應T細胞(Tresp)(3×10⁴個)與來自注射奈米粒子-MBP(83-99)複合物之小鼠的Treg(CD4⁺CD25⁺)一起培養2-4天。可添加3×10⁴個經輻射(3000 Rad)之耗盡T細胞之脾細胞作為APC，替代共培養物中之α-CD28。用CFSE標記Tresp細胞以使其與共

培養物中之Treg細胞相區分。藉由在培養之最後6-16小時併入³H-胸苷，或藉由CFSE稀釋，來量測CD4+CD25-反應T細胞之增殖。在第0小時以及在1、2及3天後量測細胞死亡。應基於前向散射或磷脂結合蛋白V及碘化丙錠染色進行CFSE+反應細胞之細胞死亡分析。自注射奈米粒子-MBP(83-99)複合物之小鼠分離之Treg能夠抑止反應性CD4+CD25- T細胞之增殖。

實例 17. 在活體內以gp39肽誘發耐受性

開展適於監控使用肽抗原誘發耐受性的人軟骨(HC)gp-39(263-275)特異性遲發型過敏(DTH)檢定。用含HC gp-39(263-275)之弗氏不完全佐劑(IFA)使Balb/c小鼠免疫，能在用HC gp-39(263-275)肽激發後有效誘發DTH反應。使用此基於肽之DTH系統，藉由非經腸施用與HC gp-39 (263-275)肽結合之奈米粒子來偵測DTH反應之調節。施用與HC gp-39 (263-275)肽結合之奈米粒子以劑量依賴性方式下調HC gp-39 (263-275)誘發之DTH反應，表明與HC gp-39 (263-275)肽結合之奈米粒子可有效耐受HC gp-39 (263-275)誘發之肽特異性反應。

實例 18. 於轉殖HLA:DR2基因之小鼠中誘發耐受性

本發明之抗原-載體複合物當藉由MHC分子呈現時，可在人類化小鼠多發性硬化症模型中使用選自對應於MBP 140-154之髓鞘鹼性蛋白(MBP)之T細胞抗原決定基內的肽誘發免疫耐受性。該小鼠模型為轉殖人類MHC分子HLA:DR2(DRB1*1501)基因的模型(Madsen等人(1999))

Nature Genetics 23:343-347)。

在小鼠中投與抗原-載體複合物後CD4⁺ T細胞群體無變應性或改變之誘發可藉由在活體內以抗原激發時T細胞增殖降低來進行監控。

方法

抗原

在 Abimed AMS 422 多肽合成儀 (Abimed, Langenfeld, German) 上使用 L-胺基酸及標準 F-moc 化學來合成 MBP 肽 140-154。MBP 肽 140-154 之序列為 GFKGVDAQGTLISKIF。如本文中所述將 MBP 肽 140-154 與奈米粒子結合。在淋巴細胞增殖檢定中使用濃度為 50 µg/ml 之結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 純化蛋白質衍生物 (PPD)(Veterinary Laboratories, Addlestone, Surrey)。

小鼠及耐受性誘發

在隔離飼養箱中繁育轉殖 HLA:DR2 基因之小鼠且圈養於無特定病原體設施中。在各處理組內，小鼠年齡 (8-12 週) 及性別皆相匹配。在第 0 天免疫前 8 天、6 天及 4 天，經鼻內 (i.n) 用 25 µl 含 100 µg MBP 肽 140-154 之磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS) 或單獨 25 µl PBS 預處理小鼠。

用 100 µl 由等體積的弗氏完全佐劑 (CFA) 與含有 200 µg MBP140-154 及 400 µg 熱殺死結核分枝桿菌菌株 H37RA (Difco, Detroit, Mich.) 之 PBS 組成的乳液在尾基部及後肢經皮下使小鼠免疫。在無肽情況下，使預先用 PBS 鼻內處理之對照組小鼠免疫。

鼻內預處理隨後免疫，產生三組小鼠：A組經PBS耐受化且經MBP 140-154免疫(7隻小鼠)；B組經MBP 140-154-奈米粒子耐受化且接著經同種肽MBP 140-154免疫(7隻小鼠)；且C組經PBS耐受化及免疫。

淋巴結增殖檢定

10天後，無菌移除膈及腹股溝之引流淋巴結。分解淋巴結，洗滌且再懸浮於補充有 5×10^{-5} M 2-巰基乙醇及4 mM L-麩醯胺酸之X-Vivo 15培養基(BioWhittaker, Maidenhead, UK)中。一式三份，將細胞以每孔 5×10^5 個細胞塗盤，且與不同濃度之MBP肽140-154(1-150 $\mu\text{g/ml}$)一起或在無MBP肽140-154存在下培養72小時。為檢查小鼠之成功免疫，如上所述將淋巴結細胞與PPD(50 $\mu\text{g/ml}$)一起塗盤。在最後16小時培養中，以0.5 μCi [^3H]-胸苷對培養物作脈衝處理。收集細胞且以刺激指數(SI)表示T細胞增殖：含抗原培養物之經校正每分鐘計數(ccpm)/無抗原之培養物之ccpm。

結果

用PBS鼻內預處理且接著用MBP肽140-154免疫之小鼠(A組)在用MBP140-154以劑量依賴性方式再激發時，會對抗原刺激起反應。隨著肽濃度之增加，SI(淋巴細胞增殖之量度)中值自2.5增加至10。此組中之所有小鼠均顯示鼻內投與PBS不能誘發對MBP 140-154之耐受性。相比之下，用MBP 140-154-奈米粒子鼻內預處理對用此肽刺激之淋巴細胞之增殖反應具有顯著作用。即使在150 $\mu\text{g/ml}$ 之較高肽濃度下，來自B組小鼠之淋巴細胞仍不能作出任何明顯反

應(SI中值為3)。與A組相比，B組中增殖之顯著降低較為明顯。資料顯示，本發明之MBP 140-154-奈米粒子可誘發來自HLA-DR2小鼠之淋巴細胞之耐受性。

自經PBS預處理及免疫之小鼠(C組)提取之淋巴細胞無法對MBP 140-154展示任何反應，但其引起對PPD之極佳反應且因此對PPD抗原免疫。C組內此種對MBP肽之反應的缺乏證明在A組中所見之增殖反應實際上為對用MBP 140-154進行免疫之反應，且對照組A及C中對MBP 140-154及PPD兩者之反應具抗原特異性。由於MBP 140-154之增殖具抗原特異性，故誘發對此分子之耐受性亦具特異性。

結論

本發明MBP肽-奈米粒子(例如MBP 140-154)不需要加工且與HLA:DR2 II類MHC分子結合，即可在鼻內投與時誘發耐受性。

實例19. 用抗原-載體複合物治療EAE

免疫及EAE誘發

將MBP肽及肽類似物溶解於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)中，且用等體積之補充有含4 mg/ml熱殺死之結核分枝桿菌H37Ra(Difco Laboratories, Inc., Detroit, Mich.)之油的弗氏不完全佐劑乳化。用0.1-0.2 ml含500 µg肽之乳液在尾基部經皮下使雌性路易斯大鼠免疫，且每天監控臨床症狀。如下根據0-4級評分量表對EAE評分：0，臨床上正常；1，尾部無力；2，後肢疲軟；3，後肢癱瘓；4，前後肢皆患病。

在此系統中，在十二隻雌性路易斯大鼠中藉由在尾基部注射含MBP(83-99)肽之弗氏完全佐劑(CFA)，來誘發實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)。九天後，將大鼠分為兩組，每組六隻動物，且皮下注射13.2 mg/kg MBP肽-樹枝狀聚合物或對照肽巨頭鯨肌球蛋白(sperm whale myoglobin, SWM)(110-121)。每天監控動物之疾病症狀，且在不知情情況下，根據非線性遞增之0-4級評分量表(其中增量表示癱瘓嚴重程度之增加)進行評分。對各組群之各個別評分求平均值，獲得平均臨床評分。

與對照組相比，用MBP肽-樹枝狀聚合物治療之彼等動物之疾病嚴重程度降低約50%。在此模型系統中，MBP肽-樹枝狀聚合物使疾病之嚴重性及持續時間均降低。

儘管此等結果清楚表明MBP肽-樹枝狀聚合物抑制EAE之發展，但亦開發出EAE之鼠類動物模型系統。SJL/J (H-2_s)小鼠對在百日咳(pertussis)疫苗存在下以MBP(83-99)肽進行之免疫起反應，而發生慢性復發形式之EAE。評估MBP肽(83-99)-樹枝狀聚合物抑制該疾病之能力。

每週對具有10隻動物之組群腹膜內注射20 mg/kg對照肽或肽類似物，持續4週。接著，在接下來的2-3個月內監控動物之疾病。在對照組中，SJL/J小鼠在約第20天開始顯現EAE症狀，持續約3週。約第70天開始，出現復發，達到約1之平均臨床評分。然而，連續四週每週注射MBP肽(83-99)-樹枝狀聚合物不僅降低第一期疾病之程度，而且亦降低復發之嚴重性。

實例 20. 製造及使用偶合肽之聚苯乙烯微球體**製造偶合肽之聚苯乙烯微球體**

需要時，使羧基微粒、PolyLink偶合緩衝液及PolyLink洗滌/儲存緩衝液(Polysciences, Inc., Warrington, PA)升溫至室溫。羧基(COOH)微粒可藉由以水溶性碳化二亞胺活化羧基而用於共價偶合蛋白質。碳化二亞胺與羧基反應，產生對相關蛋白質上之一級胺具反應性之活性酯。將12.5 mg微粒吸入1.5聚丙稀微量離心管中。經由在約10000×G下離心5-10分鐘使微粒成球狀。注意：離心時間應根據粒子尺寸而變化。將微粒小球再懸浮於0.4 ml PolyLink偶合緩衝液中。再經由在約10000 x G下離心5-10分鐘使其成球狀。將微粒小球再懸浮於0.17 ml PolyLink偶合緩衝液中。恰在使用前，藉由將10 mg PolyLink EDAC溶解於50 µl PolyLink偶合緩衝液中來製備200 mg/ml EDAC溶液。即刻使用。(注意EDAC=ECDI)。向微粒懸浮液中添加20 µl EDAC溶液。輕柔地翻轉混合或短時渦旋。添加等於200-500 µg之蛋白質。藉由抽吸輕柔地混合。注意：與微粒結合之蛋白質之量視溶液中蛋白質之濃度及視微粒尺寸而定。關於此關係之實例，請參看圖2。在室溫下培育30-60分鐘。在約10000×G下離心混合物10分鐘。保留此上清液以測定經結合蛋白質之量。將微粒小球再懸浮於1 mL無菌PBS中。再在10000×G下離心。

注射偶合肽之聚苯乙烯微球體

再懸浮於1 mL無菌PBS中。使懸浮液通過40 µm篩網過

濾器以移除交聯粒子塊。用無菌PBS將體積增加至4 mL (500微克經偶合微球體足以給予20隻動物)。經由外側尾靜脈將懸浮粒子注射至小鼠體內。

實例 21. 偶合肽之聚苯乙烯微球體誘發特異性耐受性以預防及治療PLP誘發之EAE

本實例描述在小鼠體內誘發由PLP₁₃₉₋₁₅₁誘發之EAE之前或之後投與偶合肽之聚苯乙烯微球體的作用。

如實例 1 或實例 20 所述製造出偶合肽之微球體。PLP₁₃₉₋₁₅₁或對照(OVA₃₂₃₋₃₃₉)肽與0.5 μm微球體偶合。在第0天以PLP₁₃₉₋₁₅₁或PLP₁₇₈₋₁₉₁+弗氏完全佐劑(CFA)預致敏之前7天(「疾病預防」)或12天(「疾病治療」),對小鼠靜脈內注射與PLP₁₃₉₋₁₅₁或與對照(OVA₃₂₃₋₃₃₉)肽結合之微球體。如實例 1 中所述觀察動物且評分。結果展示於圖 2 中。在疾病發作前以塗覆PLP₁₃₉₋₁₅₁之微球體治療之動物展示比經假珠粒(Sham bead)(微球體經ECDI而非肽處理)治療之動物低的臨床評分。結果亦展示使用經處理而在細胞表面上具有PLP₁₃₉₋₁₅₁之細胞進行的治療之臨床評分存在類似降低(參見圖 2A 及 2B)。疾病發作後用塗覆PLP₁₃₉₋₁₅₁之微球體治療之動物類似地展示比未經治療或經具有對照肽之微球體治療之動物低的臨床評分(參見圖 2C)。因此,結果展示,在疾病發作之前及之後使用偶合肽之聚苯乙烯微球體進行治療適用於降低疾病之嚴重性。

實例 22. 在經耐受化接受者中對預致敏及散布抗原決定基之回憶反應(Recall response)降低。

本實例描述在小鼠模型中投與偶合肽之聚苯乙烯微球體對遲發型過敏反應的影響。

準備小鼠且使用與PLP₁₃₉₋₁₅₁結合、與對照(OVA₃₂₃₋₃₃₉)肽結合或假結合微球體處理。如先前所述，在第0天以PLP₁₃₉₋₁₅₁或PLP₁₇₈₋₁₉₁/弗氏完全佐劑(CFA)預致敏之前40天，藉由遲發型過敏反應(DTH)量測CD4 T細胞之回憶反應(Smith及Miller (2006) Journal of Autoimmunity 27:218-31)。藉由使用24小時耳腫脹檢定量測耳腫脹來進行DTH量測。使用7326型Mitutoyo工程測微器(engineer's micrometer)(Schlesinger's Tools, Brooklyn, NY)測定激發前耳厚度。此後立即藉由將肽注射至耳背面來引發DTH反應。在耳激發後24小時，測定耳厚度大於激發前量測值之增加值。結果展示於圖3中。用PLP₁₃₉₋₁₅₁微球體預處理之小鼠之平均淨腫脹與對照組相當，而與對照(OVA₃₂₃₋₃₃₉)肽結合或假結合微球體使腫脹增加。此等結果表明該等微粒可用以保護動物免於稍後發生發炎性反應。

實例23. 偶合肽之微球體對CNS浸潤之影響

本實例描述投與偶合肽之聚苯乙烯微球體對白血球CNS浸潤至CNS中之影響。

準備小鼠且使用與PLP₁₃₉₋₁₅₁結合、與對照(OVA₃₂₃₋₃₃₉)肽結合之微球體處理，或不用任何微球體處理。在用PLP₁₃₉₋₁₅₁/弗氏完全佐劑(CFA)預致敏之前7天對小鼠注射。如先前所述，藉由免疫組織化學檢查小鼠之白血球浸潤至CNS中(Smith及Miller (2006) Journal of Autoimmunity 27:218-

31)。簡言之，在免疫後之指定天數，將小鼠麻醉且灌注 30 ml PBS。藉由剝離移除脊髓，且在液氮中立即冷凍。將腰椎區切片切成 6 微米厚且裝於 Superfrost Plus 帶靜電載片 (Fisher, Pittsburgh, PA) 上，風乾且在 -80°C 下儲存。結果展示於圖 4 中。對載片染色以觀察 CNS 中之細胞結構 (圖 4A)、 $\text{CD4}+\text{CD3}+$ 細胞 (圖 4B) 或 $\text{Foxp3}+$ 細胞 (圖 4C)。結果表明用經 $\text{PLP}_{139-151}$ 處理之微球體處理使 CNS 中之白血球相比對照組有所減少。

實例 24. 偶合肽之微球體對切除脾之動物的效用

本實例描述投與偶合肽之聚苯乙烯微球體對切除脾之小鼠的影響，以檢查在誘發耐受性過程中對脾活性的要求。

如實例 1 或實例 20 所述製造出偶合肽之微球體。將切除脾之動物或完整動物以與 $\text{PLP}_{139-151}$ 結合、與對照 ($\text{OVA}_{323-339}$) 肽結合之微球體處理，或不以任何微球體處理。在以 $\text{PLP}_{139-151}$ /弗氏完全佐劑 (CFA) 預致敏之前 7 天，以微球體處理動物。結果展示於圖 5 中。與對照 ($\text{OVA}_{323-339}$) 肽結合之微球體展示與未經任何微球體處理之動物類似之平均臨床評分，而經 $\text{PLP}_{139-151}$ 微球體處理之切除脾的小鼠或完整小鼠皆展示平均臨床評分降低。

【圖式簡單說明】

圖 1 描述使用肽與人工載體之結合物治療後，EAE 臨床徵狀的平均臨床評分。該圖展示聚苯乙烯微球體與 PLP 肽偶合可對 SJL 小鼠提供保護使其免於經歷 $\text{PLP}_{139-151}$ /CFA 誘發之 EAE 且避免活動性 EAE 復發；

圖 2 描述在小鼠體內誘發由 PLP₁₃₉₋₁₅₁ 誘發之 EAE 之前或之後投與偶合肽之聚苯乙烯微球體的作用。(A) 在以 PLP₁₃₉₋₁₅₁ + 弗氏完全佐劑 (Complete Freund's Adjuvant, CFA) 預致敏前以微球體預處理；(B) 在以 PLP₁₇₈₋₁₉₁ + 弗氏完全佐劑 (CFA) 預致敏前用微球體預處理；(C) 在以 PLP₁₃₉₋₁₅₁ + 弗氏完全佐劑 (CFA) 預致敏後用微球體後處理；

圖 3 描述在小鼠模型中投與偶合肽之聚苯乙烯微球體對遲發型過敏反應的作用；

圖 4 描述投與偶合肽之聚苯乙烯微球體對白血球 CNS 浸潤至 CNS 中之影響。檢定來自脊髓切片之白血球標記物且染色以觀察：(A) 細胞結構；(B) CD4+CD3+ 細胞；及 (C) Foxp3+ 細胞；及

圖 5 描述投與偶合肽之聚苯乙烯微球體對切除脾之小鼠的作用以檢查在誘發耐受性時對脾活性的要求。

201039843

Arg

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成胜肽

<400> 3

Glu Lys Glu Lys

1

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成胜肽

<400> 4

Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe

1

5

10

15

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99101695

※申請日：99.11.20

※IPC 分類：A61K^{39/385}

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P^{37/00}

用於誘發耐受性之組合物及方法

(2006.01)

COMPOSITIONS AND METHODS FOR INDUCED TOLERANCE

二、中文發明摘要：

本發明利用載體粒子將抗原肽及蛋白質呈現至免疫系統，以此方式誘發抗原特異性耐受性。該載體粒子經設計以觸發免疫耐受性作用。在一些實例中，該載體粒子進一步含有模擬細胞凋亡信號之分子。本發明適用於治療免疫相關病症，諸如自體免疫疾病、移植排斥及過敏反應。

三、英文發明摘要：

The present invention utilizes carrier particles to present antigen peptides and proteins to the immune system in such a way as to induce antigen specific tolerance. The carrier particle is designed in order to trigger an immune tolerance effect. In some instances, the carrier particle further contains a molecule that mimics an apoptotic signal. The invention is useful for treatment of immune related disorders such as autoimmune disease, transplant rejection and allergic reactions.

七、申請專利範圍：

1. 一種誘發抗原特異性耐受性之組合物，其包含載體粒子與細胞凋亡信號傳導分子及抗原肽連接。
2. 如請求項1之組合物，其中該組合物誘發個體之抗原特異性耐受性。
3. 如請求項1之組合物，其中該抗原肽為自體免疫抗原、移植抗原或過敏原。
4. 如請求項3之組合物，其中該抗原肽為髓鞘鹼性蛋白、乙醯膽鹼受體、內源性抗原、髓鞘寡樹突細胞糖蛋白、胰臟 β 細胞抗原、胰島素、麩胺酸脫羧酶(GAD)、第11型膠原蛋白、人軟骨gp39、fp130-RAPS、蛋白脂質蛋白、核仁纖維蛋白(fibrillarin)、小核仁蛋白、甲狀腺刺激因子受體、組蛋白、糖蛋白gp70、丙酮酸去氫酶去氫硫辛醯胺(dehyrolipoamide)乙醯基轉移酶(PCD-E2)、毛囊抗原或人原肌凝蛋白同功異型物(isoform) 5。
5. 如請求項1之組合物，其中該抗原肽係藉由結合分子與該載體偶合。
6. 如請求項5之組合物，其中該結合物為乙烯碳化二亞胺(ECDI)。
7. 如請求項1之組合物，其中該細胞凋亡信號傳導分子為磷脂結合蛋白(annexin)-1、磷脂結合蛋白-5、磷脂醯絲胺酸或乳脂肪球-EGF-因子8(MFG-E8)。
8. 如請求項1之組合物，其中該細胞凋亡信號傳導分子為Fas配位體或TNF- α 。

9. 如請求項1之組合物，其中該抗原肽係與該細胞凋亡信號傳導分子融合。
10. 如請求項1之組合物，其中該載體粒子為奈米粒子或微米粒子。
11. 如請求項9之組合物，其中該奈米粒子或微米粒子之直徑在1微米與20微米之間。
12. 如請求項9之組合物，其中該奈米粒子或微米粒子為生物可降解的。
13. 如請求項1之組合物，其中該載體進一步包含量子點。
14. 如請求項1之組合物，其中該載體為樹枝狀聚合物。
15. 如請求項1之組合物，其中該載體為脂質體或微胞。
16. 如請求項1之組合物，其進一步包含第二抗原肽。
17. 一種組合物，其包含聚苯乙烯粒子與抗原肽連接。
18. 一種降低個體之抗原特異性免疫反應之方法，其包含向該個體投與誘發抗原特異性耐受性之組合物，該組合物包含載體粒子與細胞凋亡信號傳導分子及抗原肽連接，其中該組合物降低個體之抗原特異性免疫反應。
19. 如請求項18之方法，其中該抗原肽為自體免疫抗原、移植抗原或過敏原。
20. 如請求項19之方法，其中該自體免疫抗原為使該個體產生免疫反應者。
21. 如請求項18之方法，其中該抗原肽為髓鞘鹼性蛋白、乙醯膽鹼受體、內源性抗原、髓鞘寡樹突細胞糖蛋白、胰臟 β 細胞抗原、胰島素、麩胺酸脫羧酶(GAD)、第11型膠

原蛋白、人軟骨gp39、fp130-RAPS、蛋白脂質蛋白、核仁纖維蛋白、小核仁蛋白、甲狀腺刺激因子受體、組蛋白、醣蛋白gp70、丙酮酸去氫酶去氫硫辛醯胺乙醯基轉移酶(PCD-E2)、毛囊抗原或人原肌凝蛋白同功異型物5。

22. 如請求項18之方法，其中該抗原肽與ECDI偶合。
23. 如請求項18之方法，其中該細胞凋亡信號傳導分子為磷脂結合蛋白-1、磷脂結合蛋白-5、磷脂醯絲胺酸或乳脂肪球-EGF-因子8(MFG-E8)。
24. 如請求項18之方法，其中該細胞凋亡信號傳導分子為Fas配位體或TNF- α 。
25. 如請求項18之方法，其中該載體為奈米粒子或微米粒子。
26. 如請求項18之方法，其中該載體為樹枝狀聚合物。
27. 如請求項18之方法，其中該載體為脂質體或微胞。
28. 如請求項18之方法，其中該抗原特異性免疫反應為自體免疫反應、過敏、哮喘、移植物抗宿主反應或移植物排斥反應。
29. 如請求項18之方法，其中該組合物係經口、經鼻、靜脈內、肌肉內、非經腸、經眼或皮下傳遞。
30. 一種降低抗原特異性免疫反應之方法，其包含投與包含聚苯乙烯粒子的組合物，該聚苯乙烯粒子包含病原性抗原。
31. 如請求項30之方法，其中該抗原係使用ECDI與該聚苯乙

烯粒子結合。

32. 一種治療患有自體免疫病症之個體之方法，其包含向該個體投與包含奈米粒子或微米粒子之組合物，該奈米粒子或微米粒子包含：

(a) 細胞凋亡信號傳導分子；及

(b) 病原性抗原；

由此治療該個體之該自體免疫病症。

33. 一種改善需要A套組誘發抗原特異性耐受性之個體之脫髓鞘病症的方法，該A套組包含：

(a) 載體粒子；及

(b) 結合至該載體粒子之抗原肽。

八、圖式：

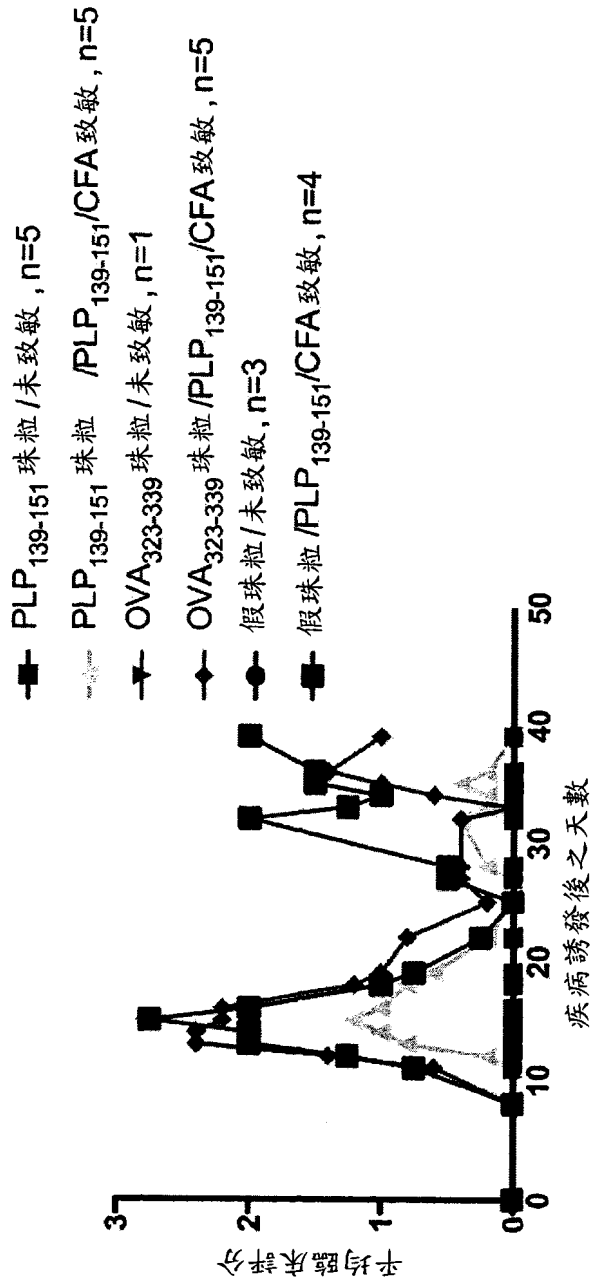
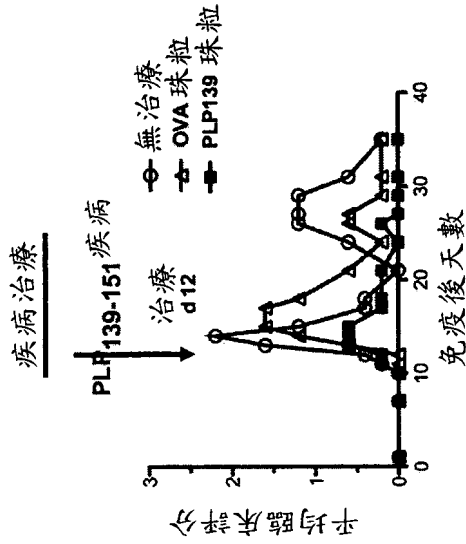
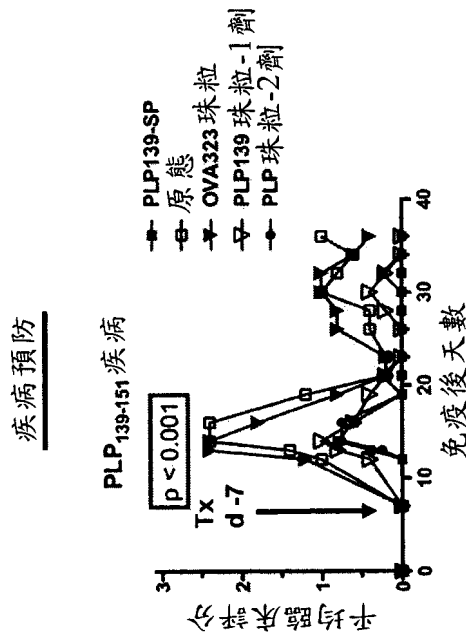


圖 1

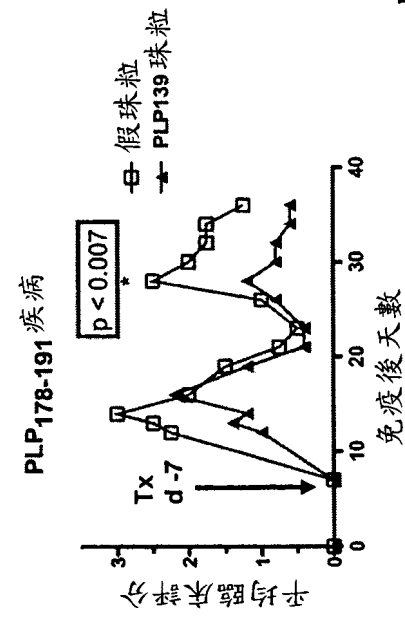
偶合肽之0.5 μm聚苯乙烯微珠誘發特异性耐受性以預防及治療經PLP誘發之EAE



C.



A.



B.

圖2

在經耐受化接受者中對預致敏及散布抗原決定基之回憶反應降低

139/CFA預致敏後40天

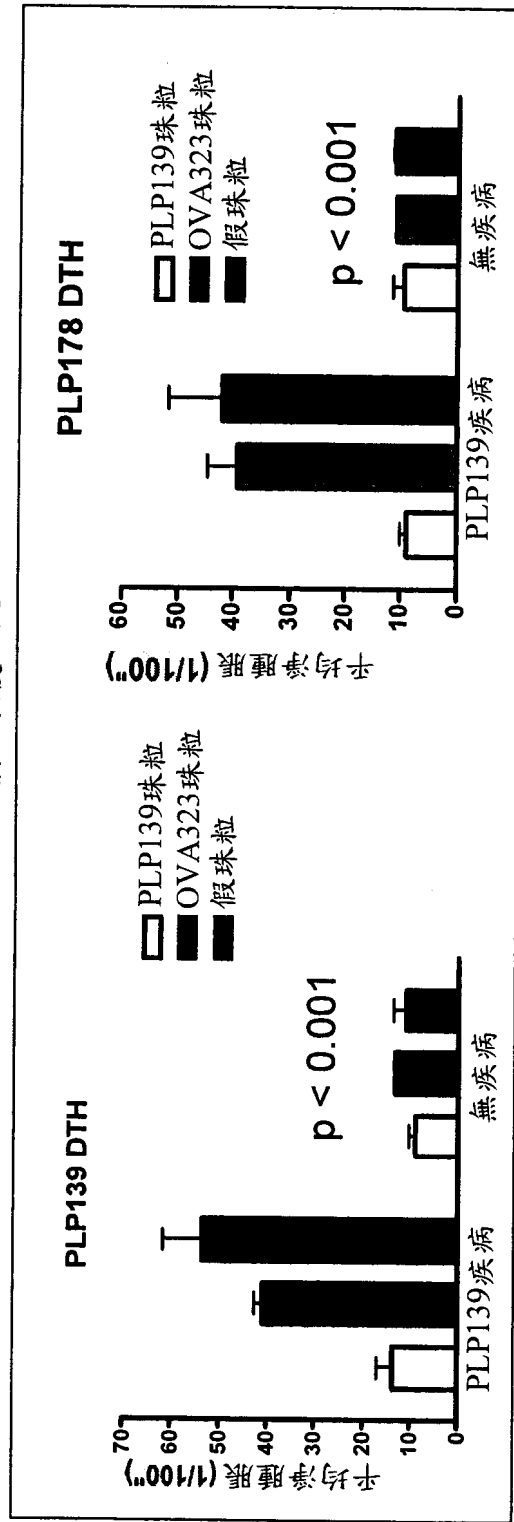


圖3

微粒預防CNS浸潤

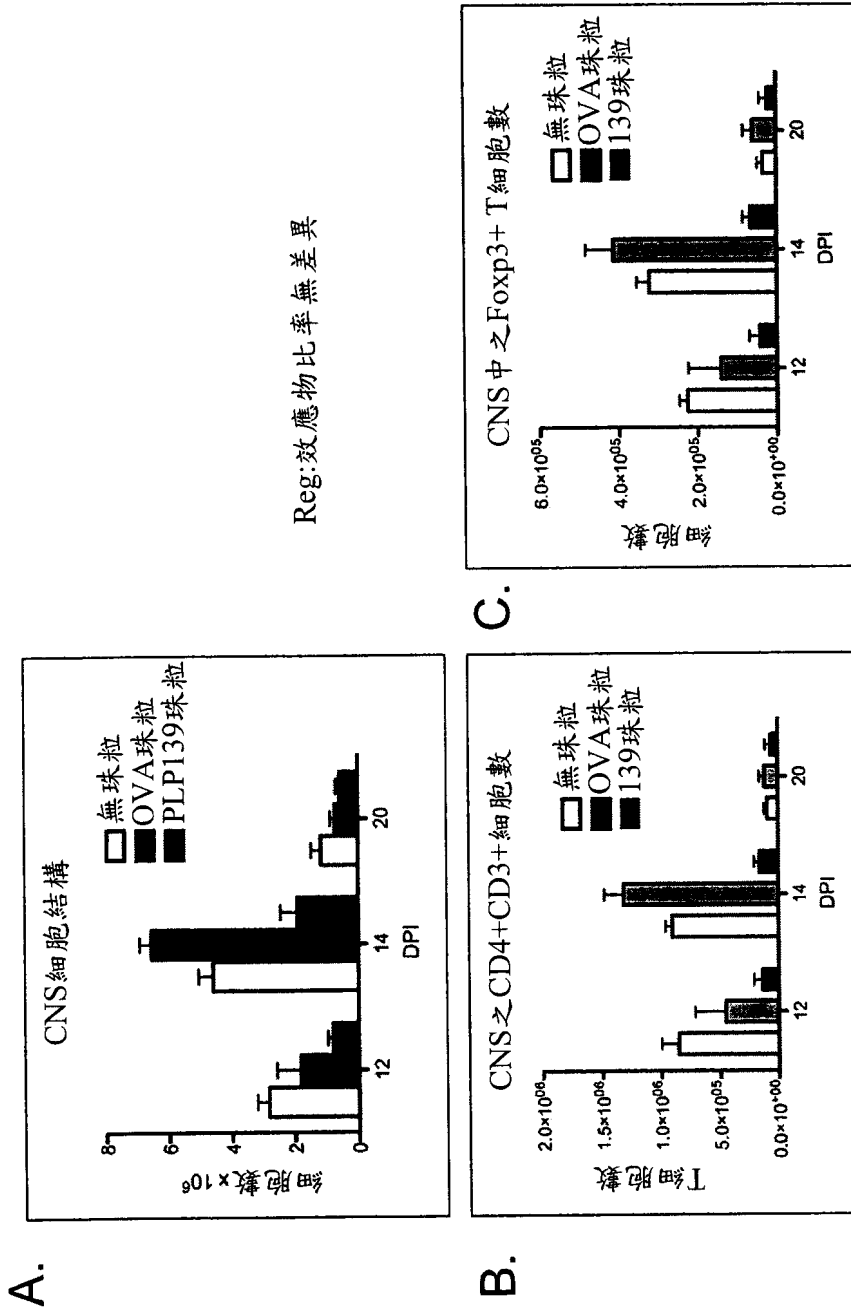


圖4

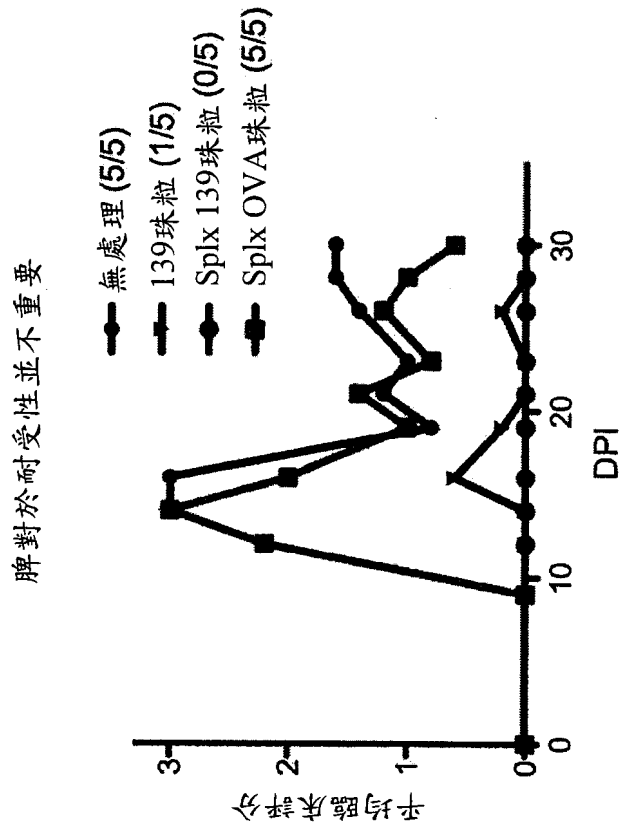


圖5

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無 元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)