(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월17일
(11) 등록번호 10-1908445
(24) 등록일자 2018년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/765 (2006.01) *A61K 31/19* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 9/10* (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/765 (2013.01)
A61K 31/19 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7000998(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년11월14일
심사청구일자 2018년02월12일
(85) 번역문제출일자 2018년01월11일
(65) 공개번호 10-2018-0009381
(43) 공개일자 2018년01월26일
(62) 원출원 특허 10-2013-7015072
원출원일자(국제) 2011년11월14일
심사청구일자 2016년11월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/060537
(87) 국제공개번호 WO 2012/065153
국제공개일자 2012년05월18일
(30) 우선권주장
61/413,016 2010년11월12일 미국(US)
61/413,018 2010년11월12일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2010085509 A1

(73) 특허권자
코어 파마슈티칼스 디벨롭먼트 컴퍼니 인크.
미국 일리노이 노쓰브룩 샌더스 로드 2215
(72) 발명자
게츠, 다니엘
미국 49001 미시간주 칼라마주 에지무어 애비뉴 405
테리, 레이첼
오스트레일리아 2006 뉴 사우스 웨일즈 시드니 더 유니버시티 오브 시드니 블랙번 빌딩 - 디06
킹, 니콜라스
오스트레일리아 2006 뉴 사우스 웨일즈 시드니 더 유니버시티 오브 시드니 블랙번 빌딩 - 디06
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 **변형된 면역-조절 입자**

(57) 요 약

본 발명은 카복실화된 입자, 예컨대 카복실화된 폴리스타이렌, PLGA 또는 다이아몬드 입자가 피험체에게 투여될 때 염증성 면역 반응이 개선된다는 놀라운 발견에 관련된다. 추가적으로, 본 발명은 이들 동일한 카복실화된 입자를 투여함으로써 염증성 질병을 치료하는 방법을 기재한다.

(52) CPC특허분류
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/10 (2013.01)
A61K 9/14 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

카복실화된 입자를 포함하는 정맥내 투여용 제제로서, 상기 카복실화된 입자는 폴리스티렌 입자, 다이아몬드 입자 또는 폴리(락트-코-글라이콜산)(PLGA) 입자이고, 부착되거나 포매(embedded)된 펩타이드 항원 또는 다른 생활성(bioactive) 제제가 없는 것인, 피험체에서 염증성 면역반응의 지속기간 또는 중증도를 감소시키는 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 입자가 카복실화된 PLGA 입자인 제제.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 카복실화된 입자의 직경이 0.1㎛ 내지 10㎛인 제제.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 카복실화된 입자의 직경이 0.5㎛ 내지 3㎛인 제제.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 피험체가 자가면역 질환, 예컨대, 다발성 경화증, 경피증, I형 당뇨병, 류마티스 관절염, 갑상샘염, 전신성 홍반성 낭창, 레노 증후군(Reynauud's syndrome), 쇼그렌 증후군, 자가면역 포도막염, 자가면역 심근염 또는 크론병을 가지거나, 허혈성 재관류 손상, 아테롬성 동맥 경화증을 가지거나 또는 심근경색에 걸리거나, 이식 수용자이거나, 건선 또는 피부염을 가지거나, 알레르기 장애, 예컨대 습진, 천식, 알레르기 비염 또는 피부 과민증에 걸린 것인 제제.

청구항 6

카복실화된 입자를 포함하는 정맥내 투여용 제제로서, 상기 카복실화된 입자는 폴리스티렌 입자, 다이아몬드 입자 또는 폴리(락트-코-글라이콜산)(PLGA) 입자이고, 부착되거나 포매된 펩타이드 항원 또는 다른 생활성 제제가 없는 것인, 피험체에서 바이러스 또는 박테리아 감염을 치료하기 위한 제제.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 입자가 카복실화된 PLGA 입자인 제제.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 카복실화된 입자의 직경이 0.1㎛ 내지 10㎛인 제제.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 바이러스 감염은 웨스트 나일 바이러스 감염, 헤르페스 바이러스 감염, 간염 바이러스 감염, 플라비바이러스, 인플루엔자 감염, 리노바이러스 감염, 레트로바이러스 감염, 유두종바이러스 감염, 파라믹소바이러스 감염 및 파라인플루엔자 바이러스 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 제제.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 바이러스 감염은 상기 피험체의 중추 신경계를 감염시키거나 바이러스성 뇌염 또는 바이러스성 뇌수막염을 야기하는 것인 제제.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 박테리아 감염이 상기 피험체의 중추 신경계를 감염시키거나 박테리아 뇌염 또는 박테리아 뇌수막염을 야기하는 것인 제제.

청구항 12

카복실화된 입자를 포함하는 정맥내 투여용 제제로서, 상기 카복실화된 입자는 폴리스티렌 입자, 다이아몬드 입자 또는 폴리(락트-코-글라이콜산)(PLGA) 입자이고, 부착되거나 포매된 펩타이드 항원 또는 다른 생활성 제제가 없는 것인, 염증성 면역 반응을 개선시키는 것이 필요한 피험체에서 염증성 면역 반응을 개선시키는 제제.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 입자가 카복실화된 PLGA 입자인 제제.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 카복실화된 입자의 직경이 0.1㎛ 내지 10㎛인 제제.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 카복실화된 입자의 직경이 0.5㎛ 내지 3㎛인 제제.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 피험체가 자가면역 질환, 예컨대, 다발성 경화증, 경피증, I형 당뇨병, 류마티스 관절염, 갑상샘염, 전신성 홍반성 낭창, 레노 증후군, 쇼그렌 증후군, 자가면역 포도막염, 자가면역 심근염 또는 크론병을 가지거나, 허혈성 재관류 손상, 아테롬성 동맥 경화증을 가지거나 또는 심근경색에 걸리거나, 이식 수용자이거나, 건선 또는 피부염을 가지거나, 알레르기 장애, 예컨대 습진, 천식, 알레르기 비염 또는 피부 과민증에 걸린 것인 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련출원과의 상호참조**

[0002] 본 출원은 미국 가특허출원 제61/413,016호 및 제61/413,018호의 우선권을 주장하며, 이들 둘 다 2011년 11월 12일 출원되었고, 본 명세서에 전문이 참조로서 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 염증성 질병 및 장애는 비정상의 또는 달리 조절되지 않은 염증 반응이 질병의 병인 또는 중증도에 기여하는 질환이다. 예는 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 및 당뇨병과 같은 자가면역질병, 결핵 및 다양한 형태의 뇌수막염 및 웨스트 나일 바이러스성 뇌염을 포함하는 뇌염과 같은 감염성 질병을 포함하며, 다른 장애는 아테롬성 동맥 경화증 및 허혈성 재관류를 포함한다.

[0004] 이들 질병 중 다수는 조직 손상 또는 다른 상해 부위에서 단핵 세포 침윤을 특징으로 한다. 이들 침윤에서 관찰된 단핵 세포의 예는 림프구, 특히 T 림프구 및 단핵식세포계의 세포(mononuclear phagocyte system, MPS 세포), 예컨대 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 미세아교세포 및 기타를 포함한다.

[0005] 단핵 세포 침윤에서 관찰된 세포 중 다수는 이들 비정상 염증 반응에 어떤 역할을 하는 것으로 의심된다. 예를 들어, 다발성 경화증과 같은 질병에서, $CD4^+$ T세포는 병적 자가면역 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 공지되어 있다. T 세포 활성화에서 더 이른 시점에, 수지상 세포 및 다른 MPS 세포는 $CD4^+$ T 세포의 활성화를 초래할 수 있다. MPS 세포는 또한 식세포작용을 통한 염증에 기여할 수 있었지만, 그러나 적어도 일부의 염증 질병에서, 이러한 세포가 $CD4^+$ T 세포가 없을 때 이렇게 될 수 있는지 여부는 분명하지 않다.

[0006] 말초혈액 단핵구는 특정 세포 표면 분자의 발현에 따르든 따르지 않든 2개의 그룹 중 하나로 분류될 수 있다. 특히 인간 "체류 단핵구" 또는 "성숙 단핵구"는 $CD14^{lo}CD16^+$ 표현형을 갖는 것으로 이해된다(마우스 상대는 $CX_3CR1^{hi}CCR2^-Gr1^-$이다). 세포의 다른 그룹, 즉 "염증성 단핵구" 또는 "미성숙 단핵구"는 $CD14^+CD16^-$ 표현형을 갖는 것으로 이해된다(마우스 상대는 $CX_3CR1^{lo}CCR2^+Gr1^+$이다). (Geissmann F. et al. 2003 Immunity 19: 71-82)

[0007] 중요하게는, 후자는 그것들이 골수 유래 말초혈액 세포로부터 염증 조직 내로 이동하는 것으로 관찰된다는 점에서 "염증성"이 되는 것으로 이해되며, 이들 세포는 직접적으로 또는 다른 세포 작용을 통해 염증을 야기하는 것으로 나타나지 않았다. 추가로, 이들 세포가 분화될 때 형성될 수 있는 다양한 MPS 세포는 염증을 야기하는 것으로 나타나지 않았다.

[0008] 원치않는 면역 반응과 관련된 장애에서 일반적인 장기간 면역억제를 위한 통상적인 임상적 전략은 광범위하게 작용하는 면역억제 약물, 예를 들어 신호 1 차단제, 예컨대 사이클로스포린 A(cyclosporin A, CsA), FK506(타크롤리무스) 및 코티코스테로이드의 장기간 투여에 기반한다. 이들 약물의 고용량의 장기간 사용은 독성 부작용을 가질 수 있다. 게다가, 이들 약물을 견뎌내는 해당 환자조차도, 장기간 면역억제 약물 치료에 대한 필요는 종양, 중증의 감염, 신독성(nephrotoxicity) 및 대사장애를 포함하는 중증의 부작용의 상당한 위험을 지닌다.

[0009] 항원 또는 펩타이드의 세포 결합을 포함하는 항원-특이적 관용(tolerance)을 유도하는 방법이 개발되었다. 예를 들어, 한 방법에서, 펩타이드 유도 세포는 멸균 조건하에 질병 특이적 자기항원과 에틸렌 카보다이이미드(ethylene carbodimide, ECDI) 결합제에 의한 말초혈액 세포의 수집, 분리 및 처리, 및 이후의 공여자/환자에게 재주입과 관련되었다. 이 과정은 비용이 들며, 당업자에 의해 면밀히 모니터링되는 조건 하에 수행되어야 하고, 해당 절차를 수행할 수 있는 센터의 수는 제한되어 있다. 공여세포 유형으로서 적혈구 세포의 사용은 동종 공여자를 포함하는 잠재적 공급원을 확장시키며, 따라서 수혈용으로 증명된 임의의 설정에 대해 이 치료제의 전달을 극적이고, 잠재적으로 확장시키는 공급원 세포의 공급을 증가시킨다. 이들 접근은 공급원 세포의 공급 및 공여세포에 대한 면역 반응을 최소화하기 위한 조직유형 매칭에 대한 필요성에 대해 상당한 제한을 가진다. 추가로, EDCI를 통해 자기항원을 결합시키기 위한 세포의 국소 처리는 상당한 품질 제어 문제를 제시한다. 더 나아가, 이들 접근은 또한 면역관용(immune tolerance)이 추구되는 병적 항원의 적어도 일부의 지식을 필요로 한다.

[0010] 최근에, 펩타이드-결합된 입자는 공급원 세포의 공급에 대한 필요를 제거하고 사전 접근의 조직-유형 필요를 피하는 것으로 설명되었으며, 본 명세서에 전문이 참조로서 포함된 WO 2010/085509를 참조한다. 그러나, 이들 접근은 여전히 항원-특이적 면역관용에 의존할 것이다.

[0011] 항원-특이적 관용은 대체로 이상적이지 않은데, 특이적 항원/에피토프는 대체로 인간 질병에서 알려져 있지 않기 때문이다. 더 나아가, 항원 특이적 접근이 효과적인 것이 되도록 하기 위하여 항원은 피험체에 따라 다를 수 있고, 따라서 항원 각각이 개개의 환자를 인식하는지를 결정하는 것이 필요하거나, 또는 투여 전 가능한 펩타이드의 라이브러리를 입자에 결합시키는 것이 필요하다. 이들 펩타이드의 합성 및 개개의 결합은 시간 소모적이고 비싸다. 따라서, 이 문제를 둘 다 해결함으로써, 조직 매치된 세포의 공급원에 대한 필요를 제거하고, 동시에 펩타이드의 거대 패널을 합성하고 결합시킬 필요를 제거하는 치료에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 변형된 입자가 단독으로, 즉 그것에 결합된 펩타이드 없이, 치료가 필요한 환자에서 염증성 면역 반응을 개선시키는 것에 유효하다는 놀라운 발견에 관련된다. 놀랍게도, 이들 모두는 염증성 면역 반응을 약화시키고 염증성 질병을 치료하기 위해 필요하며, 그것에 결합된 펩타이드(들)에 대한 필요 없이 카복실화된 입자가 투여된다.

[0013] 한 실시형태에서, 본 발명은 카복실화된 입자를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자는 부착된 펩타이드 또는 항원성 모이어티(moiety)로부터 유리된다. 일부 실시형태에서, 카복실화된 입자는 폴리스타이렌 입자이다. 다른 실시형태에서, 카복실화된 입자는 다이아몬드 입자이다. 또 다른 실시형태에서, 카복실화된 입자는 폴리(락트-코-글라이콜산)(PLGA) 입자이다.

[0014] 한 실시형태에서, 카복실화된 입자를 함유하는 약제학적 조성물은 치료가 필요한 피험체에게 투여될 때 면역관용을 유도한다. 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자를 함유하는 약제학적 조성물은 치료가 필요한 피험체에게 투여될 때 염증성 면역 반응을 개선시킨다.

[0015] 한 실시형태에서, 본 발명의 약제학적 조제물을 포함하는 카복실화된 입자는 약 0.1㎛ 내지 약 10㎛의 직경을 가진다. 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자는 약 0.3㎛ 내지 약 5㎛의 직경을 가진다. 또한 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자는 약 0.5㎛ 내지 약 3㎛의 직경을 가진다. 또한 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자는 약 0.5㎛의 직경을 가진다.

[0016] 한 실시형태에서, 본 발명은 카복실화된 입자를 포함하는 약제학적 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 피험체에서 염증성 면역 반응의 지속 또는 중증도를 감소시키는 방법을 제공한다. 추가의 실시형태에서,

카복실화된 입자는 부착된 펩타이드 또는 항원성 모이어티로부터 유리된다. 일부 실시형태에서, 카복실화된 입자는 폴리스타이렌 입자이다. 다른 실시형태에서, 카복실화된 입자는 다이아몬드 입자이다. 또 다른 실시형태에서, 카복실화된 입자는 폴리(락트-코-글라이콜산)(PLGA) 입자이다.

[0017] 한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 치료가 필요한 피험체에게 투여될 때 면역관용을 유도한다. 추가의 실시형태에서, 해당 방법은 치료가 필요한 피험체에게 투여될 때 염증성 면역 반응을 개선시킨다.

[0018] 한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 약 0.1㎛ 내지 약 10㎛의 직경을 갖는 것을 포함하는 카복실화된 입자를 이용한다. 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자는 약 0.3㎛ 내지 약 5㎛의 직경을 가진다. 또한 추가의 실시형태에서 카복실화된 입자는 약 0.5㎛ 내지 약 3㎛의 직경을 가진다. 또한 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자는 약 0.5㎛의 직경을 가진다.

[0019] 한 실시형태에서, 피험체는 자가면역 장애를 가진다. 추가의 실시형태에서, 자가면역 장애는 다발성 경화증, 경피증, I형 당뇨병, 류마티스 관절염, 갑상샘염, 전신성 홍반성 낭창, 레노 증후군(Reynauud's syndrome), 쇼그렌 증후군, 자가면역 포도막염, 자가면역 심근염 또는 크론병이다. 특정 실시형태에서, 자가면역질병은 다발성 경화증이다.

[0020] 다른 실시형태에서, 피험체는 알레르기 장애를 가진다. 추가의 실시형태에서, 알레르기 장애는 습진, 천식, 알레르기 비염 또는 피부 과민증이다.

[0021] 다른 실시형태에서, 피험체는 이식 수용자이다. 또 다른 실시형태에서, 피험체는 심근경색에 걸려있다. 또 다른 실시형태에서, 환자는 허혈성 재관류가 있다. 또 다른 실시형태에서, 환자는 아테롬성 동맥 경화증이 있다.

[0022] 한 실시형태에서, 해당 방법은 임의의 적합한 수단에 의해 카복실화된 입자를 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시형태에서, 조성물은 경구로, 비강으로, 정맥내로, 근육내로, 안내로, 경피로 또는 피하로 투여된다. 특정 실시형태에서, 카복실화된 입자는 비강으로 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 입자는 정맥내로 투여된다.

[0023] 한 실시형태에서, 본 발명은 카복실화된 입자를 포함하는 약제학적 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 피험체에서 박테리아 또는 바이러스 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자는 부착된 펩타이드 또는 항원성 모이어티로부터 유리된다. 일부 실시형태에서, 카복실화된 입자는 폴리스타이렌 입자이다. 다른 실시형태에서, 카복실화된 입자는 다이아몬드 입자이다. 또 다른 실시형태에서, 카복실화된 입자는 폴리(락트-코-글라이콜산)(PLGA) 입자이다.

[0024] 한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 박테리아 또는 바이러스에 감염된 피험체에 투여될 때 면역관용을 유도한다. 추가의 실시형태에서, 해당 방법은 박테리아 또는 바이러스에 감염된 피험체에 투여될 때 염증성 면역 반응을 개선시키거나 또는 약화시킨다.

[0025] 한 실시형태에서, 본 발명의 박테리아 또는 바이러스 감염의 치료 방법은 약 0.1㎛ 내지 약 10㎛의 직경을 갖는 카복실화된 입자를 이용하는 단계를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자는 약 0.3㎛ 내지 약 5㎛의 직경을 가진다. 또한 추가의 실시형태에서 카복실화된 입자는 약 0.5㎛ 내지 약 3㎛의 직경을 가진다. 또한 추가의 실시형태에서, 카복실화된 입자는 약 0.5㎛의 직경을 가진다.

[0026] 한 실시형태에서, 피험체는 바이러스 감염이 있다. 추가의 실시형태에서, 바이러스 감염은 헤르페스 바이러스 감염, 간염 바이러스 감염, 웨스트 나일 바이러스 감염, 플라비바이러스, 인플루엔자 감염, 리노바이러스 감염, 유두종바이러스 감염 또는 파라인플루엔자 바이러스 감염이다. 추가의 실시형태에서, 바이러스 감염은 상기 피험체의 중추신경계를 감염시킨다. 또한 추가의 실시형태에서, 바이러스 감염은 바이러스성 뇌염 또는 바이러스성 뇌수막염을 야기한다.

[0027] 한 실시형태에서, 피험체는 박테리아 감염이 있다. 추가의 실시형태에서, 박테리아 감염은 상기 피험체의 중추신경계를 감염시킨다. 또한 추가의 실시형태에서, 박테리아 감염은 패혈증 박테리아 뇌염 또는 박테리아 뇌수막염을 야기한다.

도면의 간단한 설명

[0028] **도 1**의 (A)는 WNV로 고용량 또는 저용량 감염 후 마우스의 생존 백분율; (B)는 WNV에 의한 고용량 감염과 관련된 체중 손실; (C)는 감염에 굴복한 마우스 뇌에서 바이러스 역가; (D)는 제0일 내지 제7일 감염을 통해 고용량 및 저용량 WNV로 감염된 마우스의 체중 손실; (E)는 감염 후 제7일에 고용량 및 저용량 WNV로 감염시킨 마우스의 뇌에서 바이러스 역가 및 제7일에 체중 손실 백분율과 바이러스 역가 사이의 상관관계; (F)는 고용량 및 저

용량 WNV로 감염 후 제7일에 마우스의 뇌에서 $CD45^+$ 백혈구의 존재와 체중 손실 백분율 사이의 상관관계; (G)는 고용량 및 저용량 WNV로 감염 후 제7일에 마우스의 뇌에서 $CD45^+$ 백혈구의 존재와 뇌에서 바이러스 역가 사이의 상관관계; (H)는 고용량 및 저용량 WNV로 감염 후 제7일에 마우스의 뇌에서 $CD45^{hi}$ 대식세포의 존재와 체중 손실 백분율 사이의 상관관계를 도시한 도면.

도 2의 (A)는 $CD45^{int}CD11b^+$ 이주 미세아교세포(immigrant microglia); (C)는 $CD3^+$ T 세포; (D)는 $CD11b^{hi}$ $Ly6G^+$ 호중구 및 (E)는 $NK1.1^+CD11b^{lo/-}$ 자연 살해 세포의 존재와 체중 손실의 백분율 사이의 상관관계를 도시하는 한편, $CD45^{lo}$ 체류 미세아교세포의 수(B)는 고용량 또는 저용량 WNV으로 감염 제7일 후에 변화되지 않고 남아있고; (F)는 저용량 WNV로 감염시킨 마우스의 희생 시 뇌의 바이러스 역가와 체중 손실 사이의 상관관계를 나타내며; (G)는 저용량 WNV로 감염시킨 마우스에서 체중 손실 백분율과 백혈구 침윤의 상관 관계를 나타내고, (H)는 저용량 WNV 감염 후 바이러스 역가와 백혈구 침윤 사이의 상관관계가 없음을 도시한 도면.

도 3의 (A)는 고용량 WNV로 감염 후 제6일에 PBS 중의 카복실화된 폴리스타이렌 비드로 처리한 마우스의 장기간 생존을 나타내며; (B)는 감염 후 제6일에 시작하여 카복실화된 폴리스타이렌 비드로 저용량 WNV-감염 마우스를 처리하는 것이 마우스의 생존을 연장시키는 것에 유효하지 않다는 것을 나타내고; (C)는 감염 후 제6일에 시작하여 카복실화된 폴리스타이렌 비드로 저용량 WNV-감염 마우스를 처리하는 것이 대조군 마우스와 비교하여 마우스에서 체중 손실을 방지하는 것에 유효하지 않다는 것을 나타내며; (D)는 마우스의 체중 손실 시 비드가 투여될 때 저용량 WNV-감염 마우스의 처리는 마우스의 생존을 연장시키는 것에 유효하다는 것을 도시한 도면. (E 내지 G)는 제20일 pi까지 이들 마우스의 체중 손실을 기록한다.

도 4의 (A 내지 D)는 마우스에서 체중 손실 시 카복실화된 폴리스타이렌 비드로 저용량 WNV-감염 마우스를 처리하는 예를 도시하되, (A 내지 B)의 마우스는 단지 5일 동안 비드 처리를 필요로 하며, 체중은 안정하게 유지되고, 그것들은 추가적인 비드 처리 없이 계속 생존하는 반면, (C 내지 D)의 마우스는 5일 후 비드 처리가 중단되었을 때 다시 체중 손실이 시작되었고, 따라서 체중이 다시 안정화될 때까지 처리를 재개하였으며, (E)는, 체중 손실이 있거나 또는 체중손실이 없고, 감염 후 제8일에 PBS 또는 카복실화된 비드로 처리된, 감염 후 제9일에 저용량 WNV-감염 마우스의 뇌에 $CD45^+CD11b^+$ 대식세포의 침윤을 도시하고; (F)는, 체중손실이 있거나 또는 체중손실이 없고, 감염 후 제8일에 PBS 또는 카복실화된 비드로 처리된, 감염 후 제9일에 WNV-감염 마우스의 뇌를 침윤하는 것이 발견된 세포 유형의 그래프를 도시한다.

도 5의 (A)는 WNV로 저용량 감염시킨 후 카복실화된 폴리스타이렌 비드, 네이키드(naked) 폴리스타이렌 비드 또는 PBS로 처리된 마우스 생존의 차이를 도시하고; (B)는 WNV로 저용량 감염시킨 후 카복실화된 비드, 네이키드 비드 또는 PBS로 처리한 마우스에서 체중손실%의 차이를 도시하며; (C, D)는 WNV로 저용량 감염시킨 후 마우스에서 카복실화된 비드 처리 및 네이키드 비드 처리 사이의 체중손실%의 차이를 도시하고; (E, O)는 제0일에 고용량 WNV로 감염되고, 제6일에 FITC-카복실화된 비드, FITC-네이키드 비드 또는 PBS 처리된 마우스에서 제7일에 FITC-컨쥬게이트된 카복실화된 비드 또는 네이키드 비드의 국소화를 도시한다. (E 내지 G)는 3개의 별개의 PBS-처리된 마우스로부터의 혈액을 도시하고, (H 내지 J)는 3개의 별개의 네이키드 폴리스타이렌 비드-처리된 마우스로부터의 혈액을 도시하며, (L 내지 N)은 3개의 별개의 카복실화된 폴리스타이렌 비드-처리된 마우스로부터의 혈액을 도시하고, 이는 카복실화된 비드보다 더 많은 평범한 비드가 혈액 내에 남아있는 것을 나타낸다.

도 6의 (A 내지 C)는 E 내지 O에서와 같이 감염되고 처리된 마우스의 뇌에서 FITC-컨쥬게이트된 폴리스타이렌 비드 침윤의 결여를 도시하고; (D 내지 E)는 도 5(E-O)에서와 같이 카복실화된 폴리스타이렌 비드 또는 네이키드 폴리스타이렌 비드로 처리된 WNV-감염 마우스의 내로 다양한 백혈구, 대식세포 및 미세아교세포 침윤의 감소를 도시한 도면.

도 7의 (A)는 비장에서 FITC-컨쥬게이트된 폴리스타이렌 카복실화된 비드 및 FITC-컨쥬게이트된 네이키드 폴리스타이렌 비드와 $CD45^+$ 백혈구(A, B, F)의 $CD11b^+$(C, G), $CD11c^+$(D, H) $Ly6c^+$(E, I) 세포 내에서 결합을 도시하고; (J 내지 R)은 FITC-컨쥬게이트된 카복실화된 비드 및 FITC-컨쥬게이트된 네이키드 비드를 취한 세포 유형을 도시한 도면.

도 8은 고용량 WNV로 감염시킨 후 비장에서 $CD11b^+$ $CD11c^-$ 단핵구(A) 및 $CD11b^+$ $CD11c^+$(B) 또는 $CD11b^-$ $CD11c^+$(C) 수지상 세포 수를 증가시키고, 이들에 의해 취해지는 FITC-컨쥬게이트된 폴리스타이렌 카복실화된 비

드 또는 FITC-컨쥬게이트된 네이키드 폴리스타이렌 비드의 능력을 도시한 도면.

도 9의 (A 내지 D)는 고용량 WNV로 감염시킨 후 비장에서 $CD19^+$ B 세포 및 $CD3^+$ T 세포 수를 증가시키고, 이들에 의해 취해지는 FITC-컨쥬게이트된 카복실화된 폴리스타이렌 비드 또는 FITC 컨쥬게이트된 네이키드 폴리스타이렌 비드의 능력을 도시한 도면.

도 10의 (A 내지 L)은 고용량 WNV로 감염시킨 후 간에서 $CD11b^+$(C, G), $CD11c^+$(D, H) 및 $Ly6c^+$(E, I) 세포, 구체적으로는 $CD11b^+$ $CD11c^-$ 단핵구(J) 및 $CD11b^+$ $CD11c^+$(K) 또는 $CD11b^-$ $CD11c^+$(L) 수지상 세포에 의해 취해지는 FITC-컨쥬게이트된 카복실화된 폴리스타이렌 비드 또는 FITC 컨쥬게이트된 네이키드 폴리스타이렌 비드의 능력을 도시한 도면.

도 11의 (A 내지 G)는 고용량 WNV로 감염시킨 후 골수에서 $CD11b^+$(C, F), $CD11c^+$ 및 $Ly6C^+$(D, G) 세포에 의해 취해지는 FITC-컨쥬게이트된 카복실화된 폴리스타이렌 비드 또는 FITC 컨쥬게이트된 네이키드 폴리스타이렌 비드의 능력을 도시한 도면.

도 12의 (A)는 상이한 크기의 고용량 또는 저용량 카복실화된 폴리스타이렌 비드로 처리된 저용량 WNV-감염 마우스의 생존 백분율을 도시하고; (B)는 FITC-컨쥬게이트된 카복실화된 비드, 네이키드 FITC-컨쥬게이트된 비드, 카복실화된 PLGA 구체(sphere) 또는 네이키드 PLGA 구체로 처리된 저용량 WNV-감염 마우스의 생존 백분율을 도시하며; (C)는 저용량 WNV로 감염되고 카복실화된 FITC-비드, 카복실화된-FITC PLGA 구체, 또는 카복실화된 나노다이아몬드로 처리된 마우스 뇌에서 다양한 단핵구 집단의 침윤/활성화를 도시한 도면.

도 13은 고용량 또는 저용량 WNV로 감염시킨 야생형 및 T 세포 결핍 마우스에서 (A) 생존 백분율 및 (B) 체중손실; (C) 고용량 또는 저용량 WNV로 감염시킨 야생형 및 T 세포 결핍 마우스의 뇌에서 체중손실과 바이러스 역가 사이의 상관관계; 감염 후 제8일에 고용량 WNV로 감염시킨 야생형 및 T 세포 결핍 마우스의 (D) 체중손실 및 (E) 뇌에 대한 면역 세포 침윤; 고용량 또는 저용량 WNV로 감염시키고 상당한 체중손실시 카복실화된 비드 또는 PBS로 처리한 야생형 및 T 세포 결핍 마우스의 (F) 생존 백분율 및 (G) 체중손실을 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명자는 놀랍게도 특정 크기의 카복실화된 입자, 예컨대 카복실화된 폴리스타이렌, PLGA 또는 다이아몬드 입자가 피험체에게 투여될 때, 염증성 면역 반응이 개선된다는 것을 발견하였다. 추가적으로, 본 발명자는 놀랍게도 이들 동일한 카복실화된 입자가 활성 바이러스 또는 박테리아 감염, 특히 중추신경계를 감염시키는 것과 함께 피험체에게 투여될 때, 이들 감염 증상의 극적인 감소를 야기하며, 생존을 연장시킨다는 것을 발견하였다. 따라서, 이들 입자는 자가면역 질병과 같은 과량의 염증성 면역 반응을 특징으로 하는 임의의 질병 또는 질환의 치료뿐만 아니라 박테리아 및 바이러스 감염의 치료에서 유용할 수 있다.

[0030] 본 명세서에 사용되는 "입자"는 임의의 비-조직 유래인 적은 양의 물질의 조성물을 지칭하며, 구체 또는 구체-유사 독립체 또는 비드일 수 있다. 용어 "입자" 및 용어 "비드"는 상호호환적으로 사용될 수 있다. 추가적으로, 용어 "입자"는 비드 및 구체를 포함하는 것으로 사용될 수 있다.

[0031] "카복실화된 입자" 또는 "카복실화된 비드" 또는 "카복실화된 구체"는 그것의 표면 상에 카복실기를 함유하도록 변형된 임의의 입자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 카복실기의 첨가는, 예를 들어 MARCO와 같은 스캐빈저(scavenger) 수용체와 상호작용을 통해 순환으로부터 입자의 식세포/단핵구 흡수를 향상시킨다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 "항원성 모이어티"는 임의의 모이어티, 예를 들어 숙주의 면역계에 의해 인식되는 펩타이드를 지칭한다. 항원성 모이어티의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 자기항원 및/또는 박테리아 또는 바이러스 단백질, 펩타이드 또는 성분을 포함한다. 이론에 의해 구속되지 않고, 카복실화된 비드 그 자체는 면역계에 의해 인식될 수 있지만, 부착된 것이 없는 카복실화된 비드는 본 발명의 목적을 위한 "항원성 모이어티"로 고려되지 않는다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 "네이키드 비드" 또는 "네이키드 입자" 또는 "네이키드 구체"는 카복실화되지 않은 비드, 입자 또는 구체를 지칭한다.

[0034] 입자는 임의의 입자 형상 또는 입체구조를 가질 수 있다. 그러나, 일부 실시형태에서 생체내 클럼프(clump)의 가능성이 덜한 입자의 사용이 바람직하다. 이들 실시형태의 입자의 예는 구체 형상을 갖는 것이다.

[0035] 입자는 항원 제시 세포 또는 다른 MPS 세포에서 식세포작용을 촉발하기에 충분한 크기를 가져야 하지만, 각 입

자의 크기가 균일할 필요는 없다. 바람직하게는, 입자는 용해도를 향상시키고 생체내 응집에 의해 야기되는 가능한 문제를 회피하고, 음세포작용(pinocytosis)을 가능하게 하기 위하여 마이크로 또는 나노규모의 크기이다. 입자 크기는 간질성 공간으로부터 림프구 성숙 영역 내로 흡수를 위한 요인일 수 있다. 약 0.1㎛ 내지 약 10㎛의 직경을 갖는 입자는 식세포작용을 촉발할 수 있다. 따라서 한 실시형태에서, 입자는 이들 제한 내에서 직경을 가진다. 다른 실시형태에서, 입자는 약 0.3㎛ 내지 약 5㎛의 직경을 가진다. 또 다른 실시형태에서, 입자는 약 0.5㎛ 내지 약 3㎛의 직경을 가진다. 바람직한 실시형태에서, 입자는 약 0.5㎛의 크기를 가진다. 조성물 내 입자는 균일한 직경을 가질 필요는 없다. 예로서, 약제학적 조제물은 다수의 입자를 함유할 수 있고, 이중 일부는 약 0.5㎛이지만, 나머지는 약 1.0㎛이다. 이들 주어진 범위 내에서 입자 크기의 임의의 혼합물은 유용할 것이다.

[0036] 일부 실시형태에서, 입자는 비금속성이다. 이들 실시형태에서, 입자는 폴리머로부터 형성될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 입자는 개체 내에서 생분해성이다. 이 실시형태에서, 입자는 개체 내에서 입자가 축적되는 것 없이 다회 용량에 걸쳐서 개체에게 제공될 수 있다. 적합한 입자의 예는 폴리스타이렌 입자, PLGA 입자 및 다이아몬드 입자를 포함한다.

[0037] 바람직하게는, 입자 표면은 비-특이적 또는 원치않는 생물학적 상호작용을 최소화하는 물질로 구성된다. 입자 표면과 간질 사이의 상호작용은 림프 흡수에서 어떤 역할을 하는 요인일 수 있다. 입자 표면은 비-특이적 상호작용을 방지하거나 또는 감소시키도록 물질로 코팅될 수 있다. 폴리(에틸렌 글라이콜)(PEG) 및 그것의 공중합체, 예컨대 PLURONICS(폴리(에틸렌 글라이콜)-bl-폴리(프로필렌 글라이콜)-bl-폴리(에틸렌 글라이콜)의 공중합체를 포함)와 같은 친수성 층으로 입자를 코팅하는 것에 의한 입체적 안정화는 피하 주사 후 개선된 림프 흡수에 의해 증명되는 바와 같이 간질의 단백질과의 비-특이적 상호작용을 감소시킬 수 있다. 모든 이러한 사실은 림프 흡수에 대해 입자의 생리적 특성의 중요성을 지적한다. 생분해성 폴리머는 폴리머 및/또는 입자 및/또는 층의 모두 또는 일부를 만들기 위하여 사용될 수 있다. 생분해성 폴리머는, 예를 들어 용액 중에서 작용기를 물과 반응시킨 결과에 의해 분해될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 용어 "분해"는 분자량의 감소에 의해 또는 소수성 기에서 친수성 기로 전환에 의해 가용성으로 되는 것을 지칭한다. 에스터기를 갖는 폴리머, 예를 들어 폴리락타이드 및 폴리글라이콜라이드에 대체로 자발적 가수분해가 실시된다.

[0038] 본 발명의 입자는 또한 추가적인 성분을 함유할 수 있다. 예를 들어, 담체는 담체에 포함되거나 또는 컨쥬게이트된 영상화제를 가질 수 있다. 현재 상업적으로 입수가능한 영상화제를 갖는 담체 나노입자의 예는 코닥 X-사이트(Kodak X-sight) 나노구체이다. 양자점(quantum dot, QD)으로 알려진 무기 양자-가둠(quantum-confined) 발광성 나노결정은 FRET 적용에서 이상적인 공여자로서 나타났다: 그것의 높은 양자 수득률 및 조정가능한 크기-의존적 스토크스 이동(Stokes Shift)은 단일 자외선 파장에서 여기될 때 청색으로부터 적외선으로 상이한 크기가 방출되도록 한다. (Bruchez, et al., Science, 1998, 281, 2013; Niemeyer, C. M Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 5796; Waggoner, A. Methods Enzymol. 1995, 246, 362; Brus, L. E. J. Chem. Phys. 1993, 79, 5566). 덴드리머로서 알려진 폴리머의 분류에 기반한 혼성체 유기/무기 양자점과 같은 양자점이 생물학적 표지, 이미징 및 광학 바이오센싱 시스템에 사용될 수 있다. (Lemon, et al., J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 12886). 무기 양자점의 전통적 합성과 달리, 이들 혼성 양자점 나노입자의 합성은 고온 또는 매우 독성의, 불안정한 시약을 필요로 하지 않는다. (Etienne, et al., Appl. Phys. Lett. 87, 181913, 2005).

[0039] 입자는 넓은 범위의 물질로부터 형성될 수 있다. 입자는 바람직하게는 생물학적 용도에 적합한 물질로 구성된다. 예를 들어, 입자는 유리, 실리카, 하이드록시 카복실산의 폴리에스터, 다이카복실산의 폴리무수물, 또는 하이드록시 카복실산의 공중합체 및 다이카복실산으로 구성될 수 있다. 더 일반적으로는, 담체 입자는 직쇄 또는 분지된, 치환되거나 또는 미치환된, 포화되거나 또는 불포화된, 선형 또는 가교된, 알칸일, 할로알킬, 티오알킬, 아미노알킬, 아릴, 아랄킬, 알케닐, 아랄케닐, 헤테로아릴 또는 알콕시 하이드록시산의 폴리에스터, 또는 직쇄 또는 분지된, 치환되거나 또는 미치환된, 포화되거나 또는 불포화된, 선형 또는 가교된, 알칸일, 할로알킬, 티오알킬, 아미노알킬, 아릴, 아랄킬, 알케닐, 아랄케닐, 헤테로아릴, 또는 알콕시 다이카복실산의 폴리무수물로 구성될 수 있다. 추가적으로, 담체 입자는 양자점일 수 있거나 또는 양자점 폴리스타이렌 입자와 같은 양자점으로 구성될 수 있다(Joumaa et al. (2006) Langmuir 22: 1810-6). 에스터 및 무수물 결합의 혼합물을 포함하는 담체 입자(예를 들어, 글라이콜산 및 세바스산의 공중합체)가 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 담체 입자는 폴리글라이콜산 폴리머(PGA), 폴리락트산 폴리머(PLA), 폴리세바스산 폴리머(PSA), 폴리(락트-코-글라이콜) 산 공중합체(PLGA), [로(rho)]올리(락트-코-세바스) 산 공중합체(PLSA), 폴리(글라이콜-코-세바스) 산 공중합체(PGSA) 등을 포함하는 물질을 포함할 수 있다. 본 발명에서 유용한 다른 생체양립가능한, 생분해성 폴리머는 카프롤락톤, 카보네이트, 아마이드, 아미노 산, 오쏘에스터, 아세탈, 시아노크릴레이트 및 분해가능한

우레탄의 폴리머 또는 공중합체뿐만 아니라 직쇄 또는 분지된, 치환되거나 또는 미치환된, 포화되거나 또는 불포화된, 선형 또는 가교된, 알칸일, 할로알킬, 티오알킬, 아미노알킬, 아릴, 아랄킬, 알케닐, 아랄케닐, 헤테로아릴, 또는 알콕시 다이카복실산과 이들의 공중합체를 포함한다. 추가로, 생물학적으로 중요한 아미노산과 반응성 측쇄 기, 예컨대 리신, 알기닌, 아스팔트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 티로신 및 시스테인 또는 이들의 거울상체는 앞서 언급한 물질 중 어떤 것과 공중합체로 포함되어 항원 펩타이드 및 단백질 또는 컨쥬게이트 모이어티에 컨쥬게이트를 위한 반응기를 제공할 수 있다. 본 발명에 적합한 생분해성 물질은 다이아몬드, PLA, PGA 및 PLGA 폴리머를 포함한다. 생체 적합하지만 비-생분해성인 물질이 또한 본 발명의 담체 입자에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 아크릴레이트, 에틸렌-비닐 아세테이트, 아실 치환된 셀룰로스 아세테이트, 비-분해성 우레탄, 스타이렌, 비닐 클로라이드, 비닐 플루오라이드, 비닐 이미다졸, 클로로설포네이트된 올레핀, 에틸렌 옥사이드, 비닐 알코올, 테플론(TEFLON(등록상표))(델라웨어주 윌밍턴에 소재한 DuPont) 및 나일론의 비-생분해성 폴리머가 사용될 수 있다.

[0040] 현재 상업적으로 입수가능한 적합한 비드는 플루오스피어스(FluoSpheres)(오리건주 유진에 소재한 Molecular Probes)와 같은 폴리스타이렌 비드를 포함한다.

[0041] 생리적 특성은 또한 미성숙 림프구를 갖는 영역에서 흡수 및 보유 후 나노입자의 유용성에 관한 것이다. 이들은 강성률 또는 고무 같음(rubberiness)과 같은 기계적 특성을 포함한다. 일부 실시형태는 PEG에서와 같이, 전신성 전달(표적화 또는 면역 전달은 아님)을 위해 최근에 개발되고 특성규명된 PPS-PEG에서와 같이, 고무질(rubbery) 코어, 예를 들어 친수성 위층(overlayer)과 같은 위층을 갖는 폴리(프로필렌 설파이드)(PPS) 코어에 기반한다. 고무질 코어는 폴리스타이렌 또는 금속 나노입자 시스템의 경우와 같이 실질적으로 강성인 코어와 반대이다. 고무질이라는 용어는 천연 또는 합성 고무 이외의 어떤 탄성 재료를 지칭하며, 고무질은 폴리머 분야의 당업자에게 익숙한 용어이다. 예를 들어, 가교된 PPS는 소수성 고무질 코어를 형성하기 위하여 사용될 수 있다. PPS는 폴리설폭사이드 및 최종적으로 폴리설폰에 대한 산화 조건 하에 분해되는 폴리머이며, 소수성 고무로부터 친수성의, 수용성 폴리머로 전이된다. 다른 설파이드 폴리머는 사용에 적합할 수 있고, 용어 설파이드 폴리머는 량체(mer)의 백본 내 황을 갖는 폴리머를 지칭한다. 사용될 수 있는 다른 고무질 폴리머는 약 37℃ 미만인 수화 조건하에서 유리 전이 온도를 갖는 폴리에스터이다. 코어와 위층은 섞이지 않는 경향이 있기 때문에, 소수성 코어는 친수성 위층과 함께 유리하게 사용될 수 있고, 따라서 위층은 코어로부터 떨어져서 입체적으로 확장되는 경향이 있다. 코어는 그 위에 층을 갖는 입자를 지칭한다. 층은 코어의 적어도 일부를 덮는 물질을 지칭한다. 층은 흡착되거나 또는 공유적으로 결합될 수 있다. 입자 또는 코어는 고체 또는 중공(hollow)일 수 있다. 고무질 소수성 코어는 강성 소수성 코어, 예컨대 결정질 또는 유리질(폴리스타이렌의 경우와 같음) 코어 이상으로 유리하며, 즉 소수성 약물의 더 높은 로딩은 고무질 소수성 코어를 갖는 입자에 의해 수행될 수 있다.

[0042] 다른 생리적 특성은 표면의 소수성이다. 친수성 물질은 그것이 가교되지 않을 때 리터 당 적어도 1 그램의 물 중에서 용해도를 가질 수 있다. 친수성 폴리머에 의한 입자의 입체적 안정화는 비특이적 상호작용을 감소시킴으로써 간질로부터 흡수를 개선시킬 수 있지만; 그러나, 입자의 증가된 포착되지 않는 특성은 또한 미성숙 림프구를 갖는 영역에서 식세포에 의한 내재화(internalization)를 감소시킬 수 있다. 그러나 이런 경쟁적 특징과 균형을 이루는 도전은 충족되었고, 본 출원은 림프절 내 DC 및 다른 APC에 대한 효과적인 림프구 전달을 위한 나노입자의 생성을 기록한다. 일부 실시형태는 친수성 성분, 예를 들어 친수성 물질 층을 포함한다. 적합한 친수성 물질의 예는 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리에틸렌 옥사이드, 다당류, 폴리아크릴산, 및 폴리에터 중 하나 이상이다. 층 내 폴리머의 분자량은 생체내에서 유용한 정도의 입체 장애, 예를 들어 약 1,000 내지 약 100,000 또는 그 이상을 제공하도록 조절될 수 있으며; 당업자라면 명확하게 언급되는 범위 내에서 모든 범위 및 수치, 예를 들어 10,000 내지 50,000이 고려된다는 것을 즉시 인식할 것이다.

[0043] 나노입자는 추가적인 반응을 위한 작용기를 포함할 수 있다. 추가 반응을 위한 작용기는 친전자체 또는 친핵체를 포함하며; 이들은 다른 분자와 반응에 편리하다. 친핵체의 예는 1차 아민, 티올 및 하이드록실이다. 친전자체의 예는 숙신이미딜 에스터, 알데하이드, 아이소시아네이트 및 말레이미드이다.

[0044] 본 발명의 입자는 치료가 필요한 피험체에서 염증성 면역 반응을 약화시키고, 치료가 필요한 피험체에서 박테리아 또는 바이러스 감염을 치료하기에 유효한 임의의 용량으로 제공될 수 있다. 특정 실시형태에서, 약 10^2 내지 약 10^{20}개 입자가 개체에게 제공된다. 추가의 실시형태에서, 약 10^3 내지 약 10^{15}개 입자가 제공된다. 또한 추가의 실시형태에서, 약 10^6 내지 약 10^{12}개 입자가 제공된다. 또한 추가의 실시형태에서, 약 10^8 내지 약 10^{10}개 입자가 제공된다. 한 실시형태에서 바람직한 용량은 0.1% 고체/㎖이다. 따라서, 0.5㎛ 비드에 대해, 바람직한 용

량은 대략 4 × 10^9개 비드이며, 0.05㎛ 비드에 대해, 바람직한 용량은 대략 4 × 10^{12}개 비드이고, 3㎛ 비드에 대해, 바람직한 용량은 2 × 10^7개 비드이다. 그러나, 치료되는 특정 질환의 치료에 유효한 임의의 용량은 본 발명에 의해 포함된다.

[0045] 본 발명은 자가면역 질병, 이식 거부 및 알레르기 반응과 같은 면역 관련 장애의 치료에 유용하다. 면역관용을 유도하기 위한 합성의 생체적합성 입체 시스템의 대체는 제조의 용이함, 치료제의 넓은 이용가능성을 유발하며, 샘플간의 균일성을 증가시키고, 잠재적 치료 부위의 수를 증가시키며, 담체 세포에 대한 알레르기 반응의 가능성을 극적으로 감소시킬 수 있었다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "면역 반응"은 T 세포 매개 및/또는 B 세포 매개 면역 반응을 포함한다. 대표적인 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들어 사이토카인 생성 및 세포의 세포독성을 포함한다. 추가로, 면역 반응이라는 용어는 T 세포 활성화, 예를 들어 항체 생성(체액성 반응) 및 사이토카인 반응 세포, 예를 들어 대식세포의 활성화에 의해 간접적으로 영향을 받는 면역반응을 포함한다. 면역 반응에 수반된 면역 세포는 림프구, 예컨대 B 세포 및 T 세포($CD4^+$, $CD8^+$, Th1 및 Th2 세포); 항원 제시 세포(예를 들어, 전문 항원 제시 세포, 예컨대 수지상 세포, 대식세포, B 림프구, 랑게르한스 세포 및 비전문 항원 제시 세포, 예컨대 케라틴세포, 내피세포, 성상교세포, 섬유아세포, 희소돌기아교세포); 자연 살해 세포; 골수 세포, 예컨대 대식세포, 호산구, 비만세포, 호염구 및 과립구를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 변형된 입자는 염증 부위를 수송하는 염증 세포를 감소시키는데 효과적이다.

[0047] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아네르기(anergy)", "관용" 또는 "항원-특이적 관용"은 T 세포 수용체-매개 자극에 대한 T 세포의 무감성(insensitivity)을 지칭한다. 이러한 무감성은 대체로 항원-특이적이며, 항원 펩티아드에 노출이 중단된 후 계속된다. 예를 들어, T 세포의 아네르기는, 예를 들어 IL-2의 사이토카인 생성의 결여를 특징으로 한다. T-세포 아네르기는 T 세포가 항원에 노출되고, 제2 신호(공동자극 신호) 없이 제1 신호(T 세포 수용체 또는 CD-3 매개 신호)를 받을 때 일어난다. 이들 조건 하에, 동일 항원에 대한 세포의 재노출은 (재노출이 공동자극 분자의 존재에서 일어난다고 해도) 사이토카인을 생성하는 것에 대한 부전 및 후속하여 증식에 대한 부전을 초래한다. 따라서, 사이토카인을 생성하는 것에 대한 부전은 증식을 방지한다. 그러나 아네르기 T세포는 사이토카인(예를 들어, IL-2)과 함께 배양된다면 증식될 수 있다. 예를 들어, T 세포 아네르기는 또한 ELISA에 의해 또는 표지자 세포주를 사용하는 증식에 의해 측정되는 바와 같이 T 림프구에 의한 IL-2 생성의 결여에 의해 관찰될 수 있다. 대안적으로, 수용체 유전자 구성체가 사용될 수 있다. 예를 들어 아네르기 T 세포는 5' IL-2 유전자 인핸서의 제어 하에 이종성 프로모터에 의해 또는 인핸서 내에서 발견될 수 있는 API 서열의 멀티머에 의해 유도되는 DL-2 유전자 전사를 개시하지 못한다(Kang et al. 1992 Science. 257:1134).

[0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역학적 관용"은 하기를 미처리 피험체와 비교하여 처리 피험체에 비례하여 수행되는 방법을 지칭한다: a) 특이적 면역학적 반응의 감소된 수준(항원-특이적 효과기 T 림프구, B 림프구, 항체 또는 그것의 동등물에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 것으로 생각됨); b) 특이적 면역 반응의 개시 또는 진행의 지연; 또는 c) 특이적 면역학적 반응의 개시 또는 진행의 감소된 위험. "특이적" 면역학적 관용은, 면역학적 관용이 다른 것과 비교하여 특정 항원에 대해 우선적으로 일어날 때 발생된다. "비-특이적" 면역학적 관용은, 면역학적 관용이 염증 면역 반응을 유발하는 항원에 대해 무차별적으로 일어날 때 발생된다. "준-특이적(Quasi-Specific)" 면역학적 관용은 면역학적 관용이 병적 면역 반응을 유발하는 항원에 대해 반-차별적으로 일어나지만, 보호 면역 반응을 유발하는 나머지에 대해서는 그렇지 않을 때 발생된다.

[0049] 관용원성 활성을 위한 프록시(proxy)는 표적 부위에서 적절한 사이토카인의 생성을 자극하는 입자의 능력이다. 표적 부위에서 T 억제 세포에 의해 방출된 면역조절 사이토카인은 TGF-β가 되는 것으로 생각된다(Miller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:421, 1992). 관용동안 생성될 수 있는 다른 요인은 사이토카인 IL-4 및 IL-10, 및 매개자 PGE이다. 대조적으로, 활성 면역 파괴를 겪는 조직 내 림프구는 IL-1, IL-2, IL-6 및 IFNɣ와 같은 사이토카인을 분비한다. 따라서, 변형된 입자의 효능은 적절한 유형의 사이토카인을 자극하는 그것의 능력을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0050] 이것을 염두에 두고, 변형된 입자에 대한 빠른 스크리닝 시험, 효과적인 점막 결합 성분, 효과적인 조합 또는 점막 투여의 효과적인 방식 및 스케줄은 동물 모델 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 동물은 점막 표면에서 시험 입자 조성물로 처리되며, 일정 시간에 질병 원인 항원 또는 감염제의 투여에 의해 시험감염된다. 비장세포가 분리되면, 질병 원인 항원 또는 약 50㎍/㎖의 농도에서 감염제로부터 유도된 항원의 존재에서 시험관내에서 배양된다. 배지 내로 사이토카인 분비는 표준 면역분석에 의해 정량화될 수 있다.

[0051] 세포의 활성을 억제하는 입자의 능력은 변형된 입자에 의해 면역화된 동물로부터 분리된 세포를 사용하여, 또는 질병 원인 항원 또는 바이러스 항원 표적 항원에 반응하는 세포주를 만들어냄으로써 결정될 수 있다(Ben-Nun et al., Eur. J. Immunol. 11:195, 1981). 이 실험의 한 변형에서, 억제 세포 집단은 약하게 방사선 조사되어(약 1000 내지 1250 rad) 증식을 방지하며, 저해제는 응답 세포와 공동배양된 다음, 3중수소 티미딘 함입(또는 MTT)이 사용되어 응답자의 증식 활성을 정량화한다. 다른 변형에서, 억제 세포 생성 및 응답 세포 집단은 2중 챔버 트랜스웰 배양 시스템(Costar, Cambridge Mass.)의 상위 및 하위 수준에서 배양되는데, 이는 집단을 서로 1 mm 내에서 공동인큐베이션시키며, 폴리카보네이트 막에 의해 분리시킨다(WO 93/16724). 이 접근에서, 억제 세포 집단의 조사가 필요한데, 응답자의 증식 활성이 개별적으로 측정될 수 있기 때문이다.

[0052] 조성물의 유효성 및 특정 질병의 치료를 위한 투여 방식은 또한 대응하는 동물 질병 모델에서 상술될 수 있다. 질병의 징후를 줄이거나 또는 지연시키기 위한 치료의 능력은 질병의 생화학적 및 면역학적 특징, 영향받은 조직의 면역조직학 및 사용된 모델에 대해 적절한 중대한 임상적 특징을 순환하는 수준에서 모니터링된다. 시험에 대하여 사용될 수 있는 동물 모델의 비제한적 예는 다음의 부문에 포함된다.

[0053] 본 발명은 TH1 반응, TH2 반응, TH17 반응 또는 이들 반응의 조합을 조절하는 것에 의해 관용의 조절을 고려한다. TH1 반응을 조절하는 것은, 예를 들어 인터페론-감마의 발현을 변화시키는 것을 포함한다. TH2 반응을 조절하는 것은, 예를 들어 IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-13의 임의의 조합의 발현을 변화시키는 것을 포함한다. 전형적으로 TH2 반응의 증가(감소)는 IL-4, IL-5, IL-10 또는 IL-13 중 적어도 하나의 발현에서 증가(감소)를 포함할 것이며; 더 전형적으로는 TH2 반응의 증가(감소)는 IL-4, IL-5, IL-10 또는 IL-13 중 적어도 2개의 발현의 증가를 포함할 것이며, 가장 전형적으로는 TH2 반응의 증가(감소)는 IL-4, IL-5, IL-10 또는 IL-13 중 적어도 3개의 증가를 포함하는 반면, 이상적으로는 TH2 반응의 증가(감소)는 IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-13의 모두의 발현에서 증가(감소)를 포함할 것이다. TH17의 조절은, 예를 들어 TGF-베타, IL-6, IL-21 및 IL-23의 발현을 변화시키는 것을 포함하며, IL-17, IL-21 및 IL-22의 수준을 달성한다.

[0054] 자기항원 및 자가면역 질병에 대한 관용은 흉선 결실을 벗어나며 주변부에서 발견되는 해당 자기반응성 T 세포의 음성 선택을 포함하는 다수의 메커니즘에 의해 달성된다. 주변부 T 세포 관용을 제공하는 메커니즘의 예는 자기 항원의 "과오(ignorance)", 아네르기 또는 자기항원에 대한 무반응, 사이토카인 면역 이탈 및 자기-반응 T 세포의 활성화-유도 세포사를 포함한다. 추가로, 조절 T 세포는 주변 관용을 매개하는 것에 수반되는 것으로 나타났다. 예를 들어, 문헌[Walker et al. (2002) Nat. Rev. Immunol. 2: 11-19; Shevach et al. (2001) Immunol. Rev. 182:58-67]을 참조한다. 일부 상황에서, 자기항원에 대한 주변 관용은 상실되거나(또는 파손되고), 자가면역 반응이 뒤이어 일어난다. 예를 들어, EAE에 대한 동물 모델에서, TLR 고유 면역 수용체를 통한 항원 제시 세포(antigen presenting cell, APC)의 활성화는 자기-관용을 파손하고, EAE의 유도를 초래하는 것으로 나타났다(Waldner et al. (2004) J. Clin. Invest. 113:990-997).

[0055] 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명은 항원 제시를 증가시키는 한편, TLR7/8, TLR9 및/또는 TLR 7/8/9 의존적 세포 자극을 억제하거나 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 본 명세서에 기재되는 바와 같이, 특정 변형 입자의 투여는 DC 또는 APC에 의한 항원 제시를 초래하는 한편, 면역조절 폴리뉴클레오타이드와 관련된 TLR 7/8, TLR9, 및/또는 TLR7/8/9 의존적 세포 반응을 억제한다. 이러한 억제는 하나 이상의 TLR-관련 사이토카인의 감소된 수준을 포함할 수 있다.

[0056] 상기 논의한 바와 같이, 본 발명은 Mac-1 및 LFA-1 매개 장애의 치료에 유용한 생물학적 특성을 갖는 신규 화합물을 제공한다.

[0057] 따라서, 본 발명의 다른 양태에서, 카복실화된 입자를 포함하며, 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 입자를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 특정 실시형태에서, 이들 조성물은 선택적으로 하나 이상의 추가적인 치료제를 추가로 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 변형된 입자는 하나 이상의 다른 치료제의 투여와 조합되어 치료가 필요한 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물과 함께 약제학적 조성물의 공동(conjoint) 투여 또는 포함을 위한 추가적인 치료제는 승인된 항-염증제일 수 있거나, 또는 제어되지 않은 면역 염증 반응 또는 박테리아 또는 바이러스 감염을 특징으로 하는 임의의 장애의 치료를 위한 승인을 궁극적으로 얻는 식품의약품국(Food and Drug Administration)의 승인을 받은 다수의 작용제(agent) 중 어느 하나일 수 있다. 또한 본 발명의 특정 변형된 입자는 치료를 위해 유리 형태로, 또는 적절하다면, 이것의 약제학적으로 허용가능한 유도체로 존재할 수 있다는 것이 인식될 것이다.

[0058] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 명세서에 사용되는 것과 같이 원하는 특정 제형에 대해 적합한 임의의 및 모든 용매, 희석제 또는 다른 액체 비히클, 분산제 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장제, 증점제 또는

에멀전화제, 보존제, 고체 결합체, 윤활제 등을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)]은 약제학적 조성물 및 이것의 제조를 위한 공지된 기법에서 사용되는 다양한 담체를 개시한다. 임의의 통상적인 담체 매질이 본 발명의 화합물과 양립가능하지 않은 경우를 제외하고, 예컨대 임의의 원치않는 생물학적 효과를 생성하고, 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 달리 상호작용하는 것에 의해, 담체의 사용은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 고려된다. 약제학적으로 허용가능한 담체로서 작용할 수 있는 물질의 일부 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그것의 유도체, 예컨대 카복시메틸 셀룰로스 나트륨, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말화된 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 예컨대 땅콩 오일, 면실 오일; 새플라워 오일, 참깨 오일; 올리브 오일; 옥수수 오일 및 대두 오일; 글라이콜; 예컨대 프로필렌 글라이콜; 에스터, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화 알루미늄; 알긴산; 무발열원수(pyrogenfree water); 등장 식염수; 링거액; 에틸 알코올 및 인산염 완충 용액뿐만 아니라 다른 비-독성 양립성 윤활제, 예컨대 라우릴 황산나트륨 및 스테아르산 마그네슘 및 착색제, 방출제, 코팅제, 감미제, 향미제 및 방향제, 보존제 및 항산화제가 또한 조제자의 판단에 따라 본 조성물에 제공될 수 있다.

[0059] 경구 투여를 위한 액체 제형은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 약제학적으로 허용가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 화합물에 추가로, 액체 제형은, 예를 들어 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 에멀전화제, 예컨대 에틸 알코올, 아이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글라이콜, 1,3-뷰틸렌 글라이콜, 다이메틸폼아마이드, 오일(특히, 면실, 땅콩, 옥수수, 배아, 올리브, 피마자 및 참깨 오일), 글라이세롤, 테트라하이드로퓨푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글라이콜 및 솔비탄의 지방산 에스터 및 이들의 혼합물과 같이 당업계에서 보통 사용되는 비활성 희석제를 함유할 수 있다. 비활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 또한 습윤제, 에멀전화제 및 현탁제, 감미제, 향미제 및 방향제를 포함할 수 있다.

[0060] 주사가능한 제제, 예를 들어 멸균 주사 수성 또는 유성 현탁액이 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 공지된 기술에 따라 조제될 수 있다. 멸균 주사 제제는 또한 비독성의 비경구로 허용가능한 희석제 또는 용매 내, 예를 들어 1,3-뷰탄다이올 중의 용액으로서 멸균 주사 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있다. 사용될 수 있는 허용가능한 비히클 및 용매 중에 물, 링거액, U.S.P. 및 등장 염화나트륨 용액이 있다. 추가로, 멸균의, 고정오일은 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다. 이 목적을 위하여 합성의 모노- 또는 다이글라이세라이드를 포함하는 임의의 배합 고정오일이 사용될 수 있다. 추가로, 올레산과 같은 지방산은 주사가능한 제제에서 사용된다.

[0061] 주사가능한 조제물은, 예를 들어 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해 또는 사용 전 멸균수 또는 다른 멸균 주사가능한 매질 중에서 용해되거나 또는 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 멸균제를 함입시킴으로써 멸균될 수 있다.

[0062] 약물의 효과를 연장시키기 위하여, 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 지연시키는 것이 종종 바람직하다. 이는 불량한 수 용해도를 갖는 액체 현탁액 또는 결정질 또는 비정질 물질의 사용에 의해 달성될 수 있다. 그 다음에 약물의 흡수 속도는 해리 속도에 의존하며, 차례로 결정 크기 및 결정질 형태에 의존할 수 있다. 대안적으로, 비경구로 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 오일 비히클 중에서 약물을 용해시키거나 또는 현탁시킴으로써 달성된다. 주사가능한 데포 형태는 폴리락타이드-폴리글라이콜라이드와 같은 생분해성 폴리머 중에서 약물의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성함으로써 만들어진다. 약물 대 폴리머의 비 및 사용되는 특정 폴리머의 특성에 의존하여, 약물 방출속도가 제어될 수 있다. 다른 생분해성 폴리머의 예는 (폴리(오쏘에스터) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 데포 주사 조제물은 또한 체조직과 양립가능한 리포좀 또는 마이크로에멀전 중에 약물을 포괄시킴으로써 제조된다.

[0063] 경구 투여를 위한 고체 제형은 캡슐, 정제, 알약, 분말 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 제형에서, 변형된 입자는 적어도 하나의 비활성의 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체, 예컨대 시트르산 나트륨 또는 인산2칼슘 및/또는 a) 충전제 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산, b) 결합제, 예를 들어 카복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리디논, 수크로스 및 아카시아, c) 습윤제, 예컨대 글라이세롤, d) 붕해제, 예컨대 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 전분 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이트 및 탄산나트륨, e) 파라핀과 같은 용해 지연제, f) 흡수 가속화제, 예컨대 4차 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예컨대 세틸 알코올 및 글라이세롤 모노스테아레이트, h) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토 및

i) 윤활제, 예컨대 탈크, 스테아르산 칼슘, 스테아르산 마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글라이콜, 라우릴황산나트륨 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 알약의 경우에, 제형은 또한 완충제를 포함할 수 있다.

[0064] 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글라이콜 등으로서 이러한 부형제를 사용하여 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐 내 충전제로서 사용될 수 있다. 정제, 드라제, 캡슐, 알약 및 과립의 고체 제형은 코팅 및 셸(shell), 예컨대 장용 코팅 및 약제학적 조제 분야에 잘 공지된 다른 코팅과 함께 제조될 수 있다. 그것들은 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있으며, 그것들이 장관의 특정 부분에서, 선택적으로 지연된 방식으로 단지 또는 우선적으로 활성 성분(들)을 방출시키도록 조성물을 가질 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 폴리머 물질 및 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고체 조성물은 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글라이콜 등으로서 이러한 부형제를 사용하여 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐 내 충전제로서 사용될 수 있다.

[0065] 변형된 입자는 또한 상기 주목한 바와 같이 하나 이상의 부형제와 함께 마이크로-캡슐화된 형태로 존재할 수 있다. 정제, 드라제, 캡슐, 알약 및 과립의 고체 제형은 코팅 및 셸, 예컨대 장용 코팅, 방출 제어 코팅 및 약제학적 조제 분야에 잘 공지된 다른 코팅과 함께 제조될 수 있다. 이러한 고체 제형에서, 활성 화합물은 수크로스, 락토스 및 전분과 같은 적어도 하나의 비활성 희석제와 혼합될 수 있다. 이러한 제형은 또한 보통의 실행으로서 비활성 희석제, 예를 들어 정제 윤활제 및 다른 정제 보조제, 예컨대 스테아르산 마그네슘 및 미결정질 셀룰로스 이외의 추가적인 물질을 포함할 수 있다. 캡슐, 정제 및 알약의 경우에, 제형은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 그것들은 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있고, 또한 그것들이 장관의 특정 부분에서, 선택적으로 지연된 방식으로 단지 또는 우선적으로 변형된 입자를 방출시키도록 조성물을 가질 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 폴리머 물질 및 왁스를 포함한다.

[0066] 본 발명은 본 발명의 변형된 입자의 약제학적으로 허용가능한 국소 조제물을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "약제학적으로 허용가능한 국소 조제물"은 표피에 조제물의 적용에 의한 본 발명의 변형된 마이크로입자의 피내 투여를 위해 약제학적으로 허용가능한 임의의 조제물을 의미한다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 국소 조제물은 담체 시스템을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 담체는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 용매(예를 들어, 알코올, 폴리알코올, 물), 크림, 로션, 연고, 오일, 플라스터(plaster), 리포좀, 분말, 에멀전, 마이크로에멀전 및 완충 용액(예를 들어, 저장성 또는 완충 식염수) 또는 국소적으로 투여되는 약제에 대해 당업계에 공지된 임의의 다른 담체를 포함한다. 당업계에 공지된 담체의 더 완전한 열거는 당업계의 표준인 참고문헌, 예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, 1980 및 17th Edition, 1985]에 의해 제공되며, 이들 둘 다 펜실베니아주 이스턴에 소재한 맥 퍼블리싱(Mack Publishing)에 의해 간행되었으며, 이것의 개시내용은 본 명세서에 그것의 전문이 참조로서 포함된다. 특정의 다른 실시형태에서, 본 발명의 국소 조제물은 부형제를 포함할 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 약제학적으로 허용가능한 부형제는 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 국소 조제물을 제조하기 위하여 사용될 수 있다. 본 발명의 국소 조제물 내에 포함될 수 있는 부형제의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 보존제, 항산화제, 수분공급제, 연화제, 완충제, 가용화제, 다른 침투제, 피부 보호제, 계면활성제 및 추진제 및/또는 변형된 입자와 조합되어 사용되는 추가적인 치료제를 포함한다. 적합한 보존제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 알코올, 4차 아민, 유기산, 파라벤 및 페놀을 포함한다. 적합한 항산화제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아스코르브산 및 그것의 에스터, 아황산수소나트륨, 뷰틸화된 하이드록시톨루엔, 뷰틸화된 하이드록시아니솔, 토코페롤 및 EDTA와 같은 킬레이트제 및 시트르산을 포함한다. 적합한 수분공급제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 글라이세린, 솔비톨, 폴리에틸렌 글라이콜, 유레아 및 프로필렌 글라이콜을 포함한다. 본 발명과 함께 사용을 위한 적합한 완충제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 시트르산, 염산 및 락트산 완충제를 포함한다. 적합한 가용화제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 4차 염화암모늄, 사이클로덱스트린, 벤질 벤조에이트, 레시틴 및 폴리솔베이트를 포함한다. 본 발명의 국소 조제물에 사용될 수 있는 적합한 피부 추진제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 비타민 E 오일, 알라토인, 다이메티콘, 글라이세린, 페트롤라툼 및 산화아연을 포함한다.

[0067] 특정 실시형태에서, 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 국소 조제물은 적어도 본 발명의 변형된 입자 및 침투 향상제를 포함한다. 국소 조제물의 선택은 치료되어야 하는 질환, 본 발명의 화합물의 물리화학적 특징 및 다른 부형제 존재, 조제물 내 그것의 안정성, 이용가능한 제조 도구 및 비용 제한에 의존할 것이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "침투 향상제"는 각질층을 통해 바람직하게는 표피 또는 진피 내로 침투성 흡수가 거의 또는 전혀 없이 약리적으로 활성인 화합물을 수송할 수 있는 작용제를 의미한다. 피부를 통한 약물 침투율을 향상시키는 것에서 매우 다양한 화합물이 그것의 유효성에 대해 평가되었다. 예를 들어, 다양한 피부 침투 향상제의 사용 및 시험을 조사하는 문헌[Percutaneous Penetration Enhancers, Maibach H. I. and Smith H. E. (eds.),

CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995)], 및 문헌[Buyuktimkin et al., Chemical Means of Transdermal Drug Permeation Enhancement in Transdermal and Topical Drug Delivery Systems, Gosh T. K., Pfister W. R., Yum S. I. (Eds.), Interpharm Press Inc., Buffalo Grove, Ill. (1997)]을 참조한다. 특정 대표적인 실시형태에서, 본 발명과 함께 사용을 위한 침투제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 트라이글라이세라이드(예를 들어, 대두 오일), 알로에 조성물(예를 들어, 알로에-베라 겔), 에틸 알코올, 아이소프로필 알코올, 옥토일페닐폴리에틸렌 글라이콜, 올레산, 폴리에틸렌 글라이콜 400, 프로필렌 글라이콜, N-데실메틸설폭사이드, 지방산에스터(예를 들어, 아이소프로필 미리스테이트, 메틸 라우레이트, 글라이세롤 모노올레이트 및 프로필렌 글라이콜 모노올레이트) 및 N-메틸피롤리돈을 포함한다.

[0068] 특정 실시형태에서, 조성물은 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치의 형태일 수 있다. 특정 대표적인 실시형태에서, 본 발명에 따른 조성물의 조제물은 크림인데, 이는 스테아르산, 팔미트산, 올레산, 팔미토올레산, 세틸 또는 올레일 알코올과 같은 포화 또는 불포화된 지방산을 추가로 함유할 수 있으며, 스테아르산이 특히 바람직하다. 본 발명의 크림은 또한 비이온성 계면활성제, 예를 들어 폴리옥시-40-스테아레이트를 함유할 수 있다. 특정 실시형태에서, 활성 성분은 약제학적으로 허용가능한 담체 및 임의의 필요한 보존제 또는 필요로 될 수 있는 완충제와 함께 멸균 조건 하에 혼합된다. 안과 조제물, 귀약 및 안약은 또한 본 발명의 범주 내인 것으로 고려된다. 추가적으로, 본 발명은 경피 패치의 사용을 고려하는데, 이는 신체에 화합물의 제어된 전달을 제공하는 추가된 이점을 가진다. 이러한 제형은 적절한 배지에서 화합물을 용해시키거나 또는 제공함으로써 만들어진다. 상기 논의한 바와 같이, 침투 향상제는 또한 피부를 가로지르는 화합물의 유입을 증가시키기 위하여 사용될 수 있다. 속도 제어 막을 제공하거나 또는 폴리머 매트릭스 또는 겔 내 화합물을 분산시킴으로써 속도는 제어될 수 있다.

[0069] 변형된 입자는 에어로졸에 의해 투여될 수 있다. 이는 수성 에어로졸, 리포좀 제제 또는 변형된 입자를 함유하는 고체 입자를 제어함으로써 수행된다. 비수성(예를 들어, 플로로카본 추진제) 현탁액이 사용될 수 있다.

[0070] 보통, 수성 에어로졸은 통상적인 약제학적으로 허용가능한 담체 및 안정제와 함께 작용제의 수용액 또는 현탁액을 조제함으로써 만들어진다. 담체 및 안정제는 특정 화합물의 필요에 따라 다르지만, 전형적으로 비이온성 계면활성제(트윈(Tween), 플루로닉스(Pluronics) 또는 폴리에틸렌 글라이콜), 혈청 알부민과 같은 무해한 단백질, 솔비탄 에스터, 올레산, 레시틴, 아미노산, 예컨대 글라이신, 완충제, 염, 당 또는 당 알코올을 포함한다. 에어로졸은 대체로 등장성 용액으로부터 제조된다.

[0071] 변형된 입자 및 본 발명의 약제학적 조성물은 치료제와 조합되어 조제되고 사용될 수 있고, 즉, 본 화합물 및 약제학적 조성물은 하나 이상의 다른 원하는 치료 또는 의학적 과정과 동시에, 전에 또는 이후에 조제되거나 또는 투여될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 조합 섭생에서 사용을 위한 치료제의 특정 조합(치료제 또는 과정)은 원하는 치료 및/또는 과정의 양립가능성 및 달성되어야 하는 원하는 치료적 효과를 고려할 것이다. 또한 사용되는 치료제가 동일한 장애에 대해 원하는 효과를 달성할 수 있거나(예를 들어, 본 발명의 화합물은 다른 항-염증제와 동시에 투여될 수 있음) 또는 그것들이 상이한 치료를 달성할 수 있다(예를 들어 임의의 부작용의 제어)는 것을 인식할 것이다.

[0072] 특정 실시형태에서, 본 발명의 변형된 입자를 함유하는 약제학적 조성물은 하나 이상의 추가적인 치료적으로 활성인 성분(예를 들어, 항-염증제 및/또는 완화제)을 추가로 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, 용어 "완화적"은 질병 증상 및/또는 치료 섭생의 부작용의 경감에 초점을 두지만, 치유력은 없는 처치를 지칭한다. 예를 들어, 완화적 처치는 진통제, 매스꺼움 억제약 및 구토방제 약물을 포함한다.

[0073] 본 발명은 본 명세서에 기재된 변형된 입자를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체, 바람직하게는 포유류, 더 바람직하게는 인간에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의해 제공되는 면역조절 방법은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 면역자극 폴리펩타이드 또는 바이러스 또는 박테리아 성분에 의해 자극되는 면역 반응을 포함하는 타고난 면역 반응 또는 적응 면역 반응을 억제하고/하거나 저해하는 것을 포함한다.

[0074] 변형된 입자는 면역 반응을 조절하기에 충분한 양으로 투여된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 면역 반응의 조절은 체액성 및/또는 세포성일 수 있고, 당업계에서 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 표준 기법을 사용하여 측정된다.

[0075] 특정 실시형태에서, 개체는 알레르기 질병 또는 질환, 알레르기 및 천식과 같은 원치않는 면역 활성화와 관련된 장애에 걸려있다. 알레르기 질병 또는 천식을 갖는 개체는 존재하는 알레르기 질병 또는 천식의 인식가능한 증상을 갖는 개체이다.

[0076] 특정 실시형태에서, 개체는 아테롬성 동맥 경화증, 허혈성 재관류 손상 및 심근경색과 같은 원치않는 면역 활성화와 관련된 장애에 걸려있다.

[0077] 특정 실시형태에서, 개체는 자가면역 질병 및 염증 질병과 같은 원치않는 면역 활성화와 관련된 장애에 걸려있다. 자가면역 질병 또는 염증 질병을 갖는 개체는 자가면역 질병 또는 염증 질병의 인식가능한 증상을 갖는 개체이다.

[0078] 자가면역 질병은 2가지의 넓은 범주: 기관-특이적 및 전신성으로 나눌 수 있다. 자가면역 질병은, 제한 없이, 류마티스 관절염(RA), 전신성 홍반성 낭창(SLE), I형 진성 당뇨병, II형 진성 당뇨병, 다발성 경화증(MS), 면역-매개 불임, 예컨대 조기 폐경, 경피증, 쇼그렌 병, 백반증, 탈모(대머리), 뭇샘성 기능이상, 그레이브스병, 갑상선 기능 저하증, 다발근육염, 심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함하는 염증성 장 질환, 간염 B 바이러스(HBV) 및 간염 C 바이러스(HCV)와 관련된 것을 포함하는 자가면역 간염, 뇌하수체 기능 저하증, 이식편대숙주병(GvHD), 심근염, 에디슨병, 자가면역 피부질병, 포도막염, 악성빈혈, 및 부갑상선 기능 저하증을 포함한다.

[0079] 자가면역 질병은, 제한 없이, 하시모토 갑상샘염, I형 및 II형 자가면역 다선성 증후군, 종양수반성 천포창, 유사천포창, 포진성 피부염, 선형 IgA 병, 후천성 표피 수포증, 결절홍반, 천포창양 임신, 흉터성 유사 천포창, 한랭 글로불린 혈증, 소아의 만성 수포성 질환, 용혈성 빈혈, 혈소판 감소성 자반증, 굿파스튜어 증후군, 자가면역 호중구 감소증, 중증 근무력증, 램버트-이튼 근무력 증후군, 강직-인간 증후군, 급성 횡단성 척수염, 길랑-바레 증후군, 만성 염증성 탈수 초성 다발성 신경증, 다초점운동 신경병증, 단클론성 감마병증과 함께 만성 신경병증, 안구간대경련-근간대경련 증후군, 소뇌변성, 뇌척수염, 당뇨망막병증, 원발성 담즙성 경화증, 경화성 담관염, 글루텐 과민성 장질환, 강직성 척추염, 반응성 관절염, 다발근육염/피부근육염, 혼합 결합 조직병, 베체트 증후군, 건선, 결절성 다발동맥염, 알레르기 혈관염 및 육아종증(처그 스트라우스병), 다발혈관염 중복 증후군, 과민성맥관염, 베게너 육아종증, 측두동맥염, 타카야수 동맥염, 카와사키병, 중추신경계의 분리된 혈관염, 폐색성 혈전혈관염, 유육종증, 사구체신염 및 한랭병증을 포함할 수 있다. 이들 질환은 이들 조건은 의학분야에 잘 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th ed., Fauci A S et al., eds., New York: McGraw-Hill, 1998]에 기재되어 있다.

[0080] 자가면역 질병의 연구를 위한 동물 모델은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 자가면역 질병과 가장 유사한 것으로 나타난 동물 모델은 특정 질병의 높은 발생을 자발적으로 발생시키는 동물 균주를 포함한다. 이러한 모델의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 1형 당뇨병과 유사한 질병이 발생하는 비만이 없는 당뇨병(nonobeses diabetic, NOD) 마우스 및 루프스-유사 질병의 경향이 있는 동물, 예컨대 뉴질랜드 혼성체, MRL-Fas^{lpr} 및 BXSB 마우스를 포함한다. 자가면역 질병이 유발된 동물 모델은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 다발성 경화증에 대한 모델인 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE), 류마티스 관절염에 대한 모델인 콜라겐-유도 관절염(collagen-induced arthritis, CIA) 및 포도막염에 대한 모델인 실험적 자가면역 포도막염(EAU)을 포함한다. 자가면역질병에 대한 동물 모델은 또한 유전적 조작에 의해 만들어졌고, 예를 들어 염증성 장질환에 대해 IL-2/IL-10 녹아웃 마우스, SLE에 대해 Fas 또는 Fas 리간드 녹아웃 및 류마티스 관절염에 대해 IL-1 수용체 길항물질을 포함한다.

[0081] 특정 실시형태에서, 개체는 박테리아 또는 바이러스 감염에 걸려있다. 박테리아 또는 바이러스 감염을 갖는 개체는 존재하는 박테리아 또는 바이러스 감염의 인식가능한 증상을 갖는 개체이다.

[0082] 본 발명의 변형된 입자로 처리가능한 바이러스 감염의 비-제한적 열거는 헤르페스 바이러스 감염, 간염 바이러스 감염, 웨스트 나일 바이러스 감염, 플라비바이러스 감염, 인플루엔자 바이러스 감염, 리노바이러스 감염, 유두종바이러스 감염, 파라믹소바이러스 감염, 파라인플루엔자 바이러스 감염, 및 레트로바이러스 감염을 포함한다. 바람직한 바이러스는 피험체의 중추 신경계를 감염시키는 해당 바이러스이다. 가장 바람직한 바이러스는 뇌염 또는 뇌수막염을 야기하는 것이다.

[0083] 본 발명의 변형된 입자로 치료가능한 박테리아 감염의 비-제한적 열거는 스타필로코커스(*staphlococcus*) 감염, 스트렙토코커스(*streptococcus*) 감염, 마이코박테리아(*mycobacteria*) 감염, 바실러스(*bacillus*) 감염, 살모넬라(*Salmonella*) 감염, 비브리오(*Vibrio*) 감염, 스피로헤타(*spirochete*) 감염 및 네이세리아(*Neisseria*) 감염을 포함한다. 피험체의 중추신경계를 감염시키는 박테리아가 바람직하다. 뇌염 또는 뇌수막염을 야기하는 박테리아가 가장 바람직하다.

[0084] 일부 실시형태에서, 본 발명은 질병의 개시 전 본 발명의 조성물의 사용에 관한 것이다. 다른 실시형태에서, 본

발명은 진행 중인 질병을 저해하는 본 발명의 조성물의 사용에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 피험체에서 질병을 개선시키는 것에 관한 것이다. 피험체에서 질병을 개선시키는 것은 피험체에서 질병을 치료하고, 예방하거나 또는 억제하는 것을 포함하는 것을 의미한다.

[0085] 일부 실시형태에서, 본 발명은 질병의 재발을 방지하는 것에 관한 것이다. 예를 들어, 원치않는 면역 반응이 펩타이드(예컨대 항원성 결정소)의 한 영역에서 일어날 수 있다. 원치않는 면역 반응과 관련된 질병의 재발은 펩타이드의 상이한 영역에서 면역 반응 공격을 가짐으로써 일어날 수 있다. 본 발명의 카복실화된 입자가 부착된 펩타이드 또는 항원성 모이어티로부터 유리되기 때문에, 입자는 다수의 에피토프에 대해 효과적일 것이다. MS 및 다른 TH1/17-매개 자가면역 질병을 포함하는 일부 면역 반응 장애에서 T-세포 반응은 동적이며, 재발성 감퇴 및/또는 만성-진행성 질병의 과정 동안 발달할 수 있다. T-세포 레퍼토리의 동적 특성은 특정 질병의 치료와 연루되는데, 질병이 진행함에 따라 표적이 변화할 수 있기 때문이다. 이전에, 질병 진행을 예측하기 위해 반응 패턴의 사전-존재 지식이 필요하였다. 본 발명은 "에피토프 퍼짐(spreading)"의 작용인 질병의 극적 변화의 효과를 방지할 수 있는 조성물을 제공한다. 재발에 대해 공지된 모델은 다발성 경화증(MS)에 대한 모델로서 단백지질 단백질에 대한 면역 반응이다. 초기 면역 반응은 $PLP_{139-151}$에 대한 반응으로서 일어날 수 있다. 후속의 질병 개시는 PLP151-171에 대한 재발 면역 반응으로서 일어날 수 있다.

[0086] 본 발명의 특정 실시형태는 원치않는 과민반응에 관한 병적 질환의 치료에 관한 것이다. 과민반응은 I, II, III 및 IV형 중 어느 하나 일 수 있다. 즉각적인(I형) 과민반응. 투여 빈도는 전형적으로 알레르겐 노출 시간에 대응할 것이다. 적합한 동물 모델은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Gundel et al., Am. Rev. Respir. Dis. 146:369, 1992, Wada et al., J. Med. Chem. 39, 2055, 1996]; 및 WO 96/35418).

[0087] 본 발명의 다른 실시형태는 이식에 관한 것이다. 이는 공여자 개체로부터 수용자 개체로 조직 샘플의 전달 또는 이식편(graft)에 관한 것이며, 조직에 의해 제공된 생리적 기능을 회복시키기 위하여 조직이 필요한 인간 수용자 상에서 빈번하게 수행된다. 이식된 조직은 (이에 제한되는 것은 아니지만) 전체 기관, 예컨대 신장, 간, 심장, 폐; 기관의 구성요소, 예컨대 피부 이식편 및 눈의 각막; 및 세포 현탁물, 예컨대 골수 세포 및 골수 또는 순환하는 혈액으로부터 선택되고 확장된 세포 배양물 및 전혈 수혈을 포함한다.

[0088] 임의의 이식의 중증의 가능성 있는 합병증은 숙주 수용자와 접목된 조직 사이의 항원성 차이로부터 나온다. 차이의 특성 및 정도에 의존하여, 숙주에 의한 이식편의 또는 이식편에 의한 숙주의 면역학적 공격의 위험이 있을 수 있고, 또는 둘 다 일어날 수 있다. 위험의 정도는 유사한 표현형을 갖는 유사하게 처리된 피험체의 집단에서 반응 패턴을 따름으로써, 잘 허용되는 임상적 과정에 따라 다양한 가능한 기여 요인과 상호관련 지음으로써 결정된다. 면역학적 공격은 기존 면역학적 반응(예컨대 미리형성된 항체)의 결과 또는 이식 시간쯤에 개시된 것(예컨대, TH 세포의 생성)일 수 있다. 항체인 T 헬퍼(TH) 세포 또는 세포독성 T(Tc) 세포는 서로 및 다양한 효과기 분자 및 세포와 임의의 조합으로 관련될 수 있다. 그러나, 면역 반응에 관련된 항원은 대체로 알려지지 않았으며, 따라서 항원-특이적 치료를 설계하거나 또는 항원-특이적 관용을 유도하는 것에서 어려움을 제기한다. 본 발명의 변형된 입자는 기관의 거부를 방지하는데 특히 유용한데, 입자가 관용을 유도하거나 또는 염증 면역 반응을 개선시키는데 효과적이도록 하기 위하여 부착된 펩타이드 또는 항원이 변형된 입자에 컨쥬게이트될 필요가 없기 때문이다.

[0089] 본 발명의 특정 실시형태는 수용자에 의한 조직 이식편의 거부를 야기하는 이식편대 숙주병의 위험을 감소시키는 것에 관한 것이다. 초급성, 급성 또는 만성 거부 반응의 효과를 방지하거나 또는 감소시키기 위한 처리가 수행될 수 있다. 처리는 이식보다 충분하게 훨씬 전에 우선적으로 개시되며, 따라서 관용은 이식편이 자리를 잡을 때 제자리에서 있을 수 있지만; 이것이 가능하지 않다면, 처리는 이식과 동시에 또는 이식 후에 개시될 수 있다. 개시 시간에도 불구하고, 처리는 대체로 이식 후 적어도 처음 1개월 동안 정기적 간격으로 지속될 것이다. 이식편의 충분한 적응이 일어난다면, 후속 투약은 필요하지 않지만, 이식편의 거부 또는 염증의 어떤 증거가 있다면, 투약이 재개될 수 있다. 물론, 본 발명의 관용 과정은 다른 형태의 면역억제와 조합되어 위험 수준을 훨씬 더 낮출 수 있다.

[0090] **실시예**

[0091] 다음의 실시예는 본 발명의 이점 및 특징을 추가로 예시하기 위하여 제공되지만, 본 개시의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0092] **재료 및 방법**

[0093] *바이러스 증식*

[0094] 앞서 기재된 바와 같이(Getts et al., J Neurochem. 103 :1019, 2007), 웨스트 나일 바이러스(사라펜드(Sarafend) 균주)를 신생아 마우스의 뇌로부터 얻었고, 세포 당 5개 플라크 형성 단위(PFU)의 감염다중도에서 컨플류언트(confluent) 베로 세포 단일층을 감염시키기 위하여 사용하였다. 세포를 37℃에서 40시간 동안 바이러스와 함께 인큐베이션시킨 후, 이것을 냉동시켰다. 그 다음에 플라스크를 해동시켰고, 바이러스-풍부 상청액을 원심분리에 의해 정화시킨 후, 알리쿼트(aliquot)를 사용시까지 -70℃에서 저장시켰다.

[0095] *마우스 및 감염*

[0096] 8주령 내지 12주령의 암컷 C57BL/6(CD45.2) 및 유사유전자(congenic) B6.SJL-Ptprc^{a}Pep3^{b}/BoyJ(CD45.1) 마우스를 웨스턴 오스트레일리아에 소재한 동물 자원 센터(Animal Resources Center)로부터 얻었다. C57BL/6-7.2fms-EGFP 유전자이식(CD45.2) 마우스를 오스트레일리아 퀸즐랜드에 소재한 유전자이식 동물 자원 센터(Transgenic Animal Resources Center)로부터 얻었다. 모든 과정을 시드니 유니버시티 동물 윤리 위원회(University of Sydney Animal Ethics Committee)의 허가하에 수행하였다. 모든 동물을 헤파-필터(hepa-filter) 탑 케이지 내 클래스 II 생물학적 위험 조건 하에 수용하였다. 사료와 물은 자유식으로 제공하였다.

[0097] 고용량 비강내 감염을 멸균 인산염 완충 식염수(PBS; 미국 캘리포니아주에 소재한 Gibco BRL) 중에서 6×10^{4} PFU WNV로 앞서 기재한 바와 같이 수행하였다. 저용량 감염에 대해, 마우스를 6×10^{3} PFU WNV로 접종시켰다. 멸균 PBS만으로 마우스를 접종시킴으로써 모의(mock) 감염을 수행하였다. (Getts et al., J Neurochem. 103: 1019, 2007, Wacher et al., J Virol. 81: 860, 2007).

[0098] 마우스를 감염시킨 후 매일 2회 체중을 측정하였다. 빙냉한 40㎖의 PBS를 사용하여 심장관류에 의한 마취하에 마우스를 희생시켰다. 조직에 대해, 마우스를 PBS 중에서 20㎖의 4% 파라포름알데하이드(미국 세인트 루이스에 소재한 Sigma Aldrich)와 함께 추가로 관류시켰다.

[0099] *바이러스 역가를 결정하기 위한 플라크 분석*

[0100] 조직 샘플 내 살아있는 바이러스의 역가를 결정하기 위하여, 바이러스-감수성 BHK 세포를 사용하는 플라크 분석(Guna Kapuriah에 의해 기증된 신장, 오스트레일리아 캔버라에 소재한 John Curtin Medical School)을 사용하였다. 앞서 기재한 바와 같이(Getts et al., J Neurochem. 103: 1019, 2007), 조직 샘플을 동물로부터 해부하였고, 파워 균질기(Tissue Tearor, 미국 오클라호마주 바틀스에 소재한 Biospec)로 해리시켰다. 간략하게, 정화시킨 균질물의 5-배 희석을 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 1640 배지(Roswell Park Memorial Institute 1640 media, RPMI; CSL Biosciences) 내에서 제조하였고, 6-웰 플레이트 내 컨플류언트 BHK 세포를 감염시키기 위하여 사용하였다(1×10^{6} 세포를 2㎖ RPMI 중에서 밤새 시딩하였다).

[0101] 세포를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰고, 그 후에 접종물을 흡인에 의해 제거하였다. 웰을 2X 최소 필수 배지(Minimum Essential Medium, MEM; 미국 뉴욕주 글랜드 아일랜드에 소재한 GibcoBRL)에서 3㎖의 1.5% (w/v) 낮은 겔화 아가로스 II(미국 오하이오주 솔론에 소재한 암레스코(Amresco))로 씌웠다. 세포를 추가 3일 동안 37℃에서 인큐베이션시켰고, 이 후에 그것들을 3㎖의 10% 포말린(Co.)으로 2시간 동안 고정시킨 후, 아가로스 플러그를 제거하였다. 고정 세포를 염색하기 위하여 20% 메탄올(오스트레일리아 NSW 리버스톤에 소재한 프로닌(Fronine)) 중의 3% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)(영국 에식스에 소재한 홉킨스 앤드 윌리엄스(Hopkins and Williams)) 염료 용액을 사용하였다. 콜로니 계측기(스페인 바르셀로나에 소재한 IUL S. A.)를 사용하여 플라크를 계측하였고, 플라크 수, 접종 용적 및 샘플 희석을 고려하여 그램당(조직) 최종 PFU를 결정하였다.

[0102] *키메라 마우스의 생성*

[0103] 앞서 기재한 바와 같이(Getts et al., J Neurochem. 103: 1019, 2007), 6 내지 8주령의 B6.SJL-Ptprc^{a}Pep3^{b}/BoyJ(CD45.1) 마우스를 950 rad의 1 용량으로 방사선 조사하였다. 12시간 후, C57BL/6-7.2fms-EGFP 공여자로부터 10^{7}개 골수세포와 함께 마우스를 재구성하였다. 마우스에 방사선 조사 후 10일 동안 음용수 중에서 설파메톡사졸(Sigma Aldrich) 및 트라이메토프림(Sigma Aldrich)을 제공하였다. 상기 기재한 바와 같이 마우스를 방사선 조사 6주 후에 WNV로 감염시켰다. 유세포분석기를 사용하여 키메리즘(Chimerism)을 확인하였고, 앞서 증명한 바와 같이 공여자 기원의 96 내지 99% 가 되는 것을 변함없이 발견하였다(Getts et al., J Neurochem. 103: 1019, 2007).

[0104] *비드의 정맥내 주사*

[0105] 0.5, 0.05 및 3㎛ FITC 또는 브라이트 블루(Bright Blue, BB) 플루오오레스브라이트(Flouresbrite) 네이키드 및 카복실화된 폴리스타이렌 비드를 미국 뉴욕주에 소재한 폴리사이언스(Polyscience)로부터 얻었다. 폴리(락트-코-글라이콜산)(PLGA) 네이키드 및 카복실화 비드를 미국 매사추세츠주에 소재한 포스포렉스(Phosphorex)로부터 얻었다.

[0106] 멸균 PBS 중에 비드를 희석시켰고, 300㎕를 감염 또는 모의-감염 마우스의 꼬리 정맥에 정맥주사로 주사하였다. 고용량 생존 연구를 위하여(6×10^4개 PFU WNV 비강내(i.n.)), 마우스에 감염 후 제6일에 시작하여 매일 1 용량의 비드를 제공하였다. 필요하다면, 마우스에 체중이 재안정화될 때까지 매일 추가 주사를 제공하였다. 저용량 생존 연구를 위해(6×10^3개 PFU WNV i.n.), 마우스에 감염 후 제6일로부터 또는 상당한 체중 손실이 보고될 때(전체 체중의 4 내지 6%) 비드로 감염시켰다. 마우스에 5일 동안 또는 체중이 재안정화될 때까지 1일 1회 300㎕의 비드로 주사하였다. 조직 수집을 위해, 6×10^4 또는 6×10^3-감염 마우스를 감염 후 제6일 또는 상당한 체중 손실이 보고되었을 때 300㎕의 비드로 주사하였고, 필요하다면, 도태시켰다. 이하에 기재하는 바와 같이 면역조직화학, 유세포분석기, 플라크 분석 및 사이토카인 분석을 위해 기관을 채취하였다.

[0107] *면역조직학*

[0108] C57BL/6 및 cFMS-EGFP(B6.SJL-Ptprc^{a}Pep3^b/BoyJ 내로) 키메라로부터 수집한 뇌, 비장, 간, 폐 및 신장 상에서 형광 면역조직화학(Fluoresence immunohistochemistry, IHC)을 수행하였다. 관류 후, 기관을 4시간 동안 4℃에서 4% 파라포름알데하이드 중에서 고정시킨 다음, 30% 수크로스 중에서 밤새 담지한 후, 최적의 절단 온도 화합물(Optimum Cutting Temperature Compound, OCT, 일본 도쿄에 소재한 Tissue-Tek) 중에서 냉동시켰다. 8-마이크론 조직 절편을 동결절단기(cryostat microtome) 상에서 절단시켰고, 공기-건조시켰다. 앞서 기재한 바와 같이 형광 IHC를 수행하였고(Getts et al, J Exp Med. 29: 2319, 2007), 티라마이드-기반 증폭 시스템(tyramide-based amplification system, TSA 키트; 벨기에에 소재한 Perkin Elmer)을 첨가하였으며, 제조업자의 설명서에 따라 사용하였다. 조직 절편을 시각화 전 DAPI-안티 페이트(DAPI-anti fade)(Vector)로 대조염색시켰다.

[0109] *현미경 및 영상 획득*

[0110] DP-70 카메라 및 DP 매니저 2.2.1 소프트웨어(Olympus)를 사용하여 올림푸스 BX-51 현미경(일본에 소재한 Olympus)에서 영상을 획득하였다.

[0111] *뇌 및 간으로부터 백혈구의 분리*

[0112] 앞서 기재한 바와 같이(Getts et al, J Exp Med. 29: 2319, 2007) 데옥시-리보뉴클레아제(0.005 g/㎖; Sigma Aldrich) 및 콜라게나제 IV(0.05 g/㎖; Sigma Aldrich)와 함께 PBS 중에서 37℃에서 60분 동안 뇌를 분해함으로써 PBS-관류 마우스의 뇌로부터 백혈구를 얻었다. 10% FCS에 의해 분해를 중단시켰고, 세포분쇄액은 70㎛ 나일론 세포 스트레이너(strainer)(미국 뉴저지주에 소재한 Becton Dickinson)를 통과시킨다. 340xg에서 10분 원심분리 후 얻은 펠렛을 30% Percoll(노르웨이에 소재한 Amersham) 중에서 재현탁시켰고, 80% Percoll 위로 층상화하였다. 실온에서 25분 동안 1140xg에서 원심분리 시킨 후 30%/80% 계면으로부터 백혈구를 수집하였다. 동일 프로토콜을 사용하여 간으로부터 백혈구를 얻었고, 처리 전 조직을 칭량하였다.

[0113] *비장, 혈액 및 골수로부터 백혈구의 분리*

[0114] 유세포 분석을 위하여, 우측 대퇴골을 절개하였고, PBS 로딩된 시린지를 사용하여 골수 세포를 플러쉬(flush)하였다. 골수 전구체 분리를 위해, 적어도 4마리의 마우스로부터 대퇴골 및 경골을 이용하였다. 플러쉬 후 획득한 세포 현탁액을 70㎛ 세포 스트레이너를 통해 여과시켰고, 340g에서 5분 동안 원심분리시켰다. 얻어진 펠렛 내 적혈구 세포를 NH_4Cl-기반 적혈구 세포 용해 완충제(BD Pharm Lyse(상표명); BD Pharmingen) 중에 용해시킨 후, 340xg에서 5분 동안 원심분리시켰다. 말초혈액의 경우에, 혈액을 심장천자를 통해 수집하였고, 시트르산염 완충제(mMol, Sigma Alrich)에 바로 전달하였다. 얻어진 현탁액을 70% Percoll에 걸쳐 층상화하였고, 실온에서 20분 동안 제동하면서 1140xg로 원심분리시켰다. 계면을 수집하였고, 일단 PBS 중에서 세포를 세척하였으며, 340xg에서 원심분리시켰다. 비장 백혈구의 분리를 위해, 비장을 7070㎛ 세포 스트레이너를 통과시켰고, 340g에서 5분 동안 원심분리시켰다. 얻어진 펠렛 내 적혈구를 NH_4Cl-기반 적혈구 용해 완충제(BD Pharm Lyse(상표명); BD Pharmingen) 중에서 용해시킨 후, 5분 동안 340xg에서 원심분리시켰다.

[0115] *유세포 분석*

[0116] 뇌, 혈액 및 골수로부터 수집한 세포(상기 기재)를 PBS 중에서 세척하였고, 항-CD16/CD32 항체(Biolegend)로 차단하였다. 트리판 블루 제외를 사용하여 살아있는 세포를 계측하였는데, 이는 일상적으로 >95% 세포 생존율을 나타내었다.

[0117] 세포 표면 분자 발현을 측정하였고, 아르곤 이온 및 HeNe 레이저를 구비한 FACS ARIA(Becton Dickinson) 상에서 세포 정렬을 수행하였다. 살아있는 집단을 전방 및 측방 산란기에 의해 게이팅(gate)하였고, 이후에 전방-게이팅에 의해 결정된 형광 집단을 확인하였다. 관심의 집단을 확인하는 특이적 형광 및 산란기 변수를 사용하여 정렬을 수행하였다. 정렬 엄격도는 골수 집단에 대해 >98% 정제를 달성하기 위한 순도로 설정하였다.

[0118] 유세포 분석 프로그램인 Flow Jo(미국 오리건주 애슐랜드에 소재한 FlowJo)를 사용하여 획득한 FACS 데이터 파일을 분석하였다. 관심의 세포 집단의 정량화는 각 기관으로부터의 분석 및 절대 세포수에서 유세포분석 백분율을 기준으로 계산하였다.

[0119] *양자전이*

[0120] $Ly6C^{hi}$/cFMS-$EGFP^{+}$/$CD11b^{+}$와 $Ly6C^{lo}$/Cfms-$EGFP^{+}$/$CD11b^{+}$ 집단을 둘 다 제6일에 비강내로 WNV-감염 마우스로부터 정렬시켰다. $Ly6C^{hi}$ BM을 10 mM 셀 트래커 오렌지(cell tracker orange)(CMTMR [5-(및 -6)-(((4-클로로메틸) 벤조일) 아미노) 테트라메틸로다민)-혼합된 이성질체; Invitrogen)로 표지하였다. 정렬된 세포를 원심분리시키고, 10㎛ CMTMR을 함유하는 1㎖ PBS 중에서 상승시켰다. 세포를 10분 동안 염색한 후, 10% FCS로 반응을 중단시켰다. 세포를 적어도 3회 50㎖ PBS 중에서 세척하였다. 그 다음에 표지한 CMTMR $Ly6C^{hi}$ BM 세포를 $Ly6C^{lo}$ 세포와 1:1로 혼합하였는데, 이는 CMTMR의 첨가를 제외하고, $Ly6C^{hi}$ 집단과 유사하게 처리하였다. 전체 2×10^{6} BM 세포를 6.5일 WNV-감염된 또는 모의-감염된 Ly5.1-C57BL/6 유사유전자 마우스에 정맥내로(i.v.) 주사하였다. 이것에 바로 다음에 300㎕ BB 폴리스타이렌 비드를 정맥내 주사하였다. 12시간 후, 뇌, 비장 및 간을 상기 기재한 바와 같이 채취하였다. 공여자 세포의 존재를 cFMS-EGFP와 CMTMR-셀 트래커 오렌지를 둘 다 사용하는 유세포분석기를 사용하여 조사하였다.

[0121] *다중(Multiplex) ELISA*

[0122] 다중화된 플레이트 ELISA를 제조업자(미국 유타주 로간에 소재한 Quansys Biosciences)의 설명서에 따라 수행하였다. 간략하게, 뇌, 비장 및 간 조직을 PBS 중에서 균일화하였고, 1000xg 스핀에 의해 정화시켰으며, 분석을 수행할 때까지 -20℃에서 저장하였다. 또한 혈청을 사용하였다. 해동시킨 샘플 및 표준을 제공한 완충제 중에서 희석시켰고, 각각의 30㎕를 특정 가용성 단백질에 대해 포획 항체를 각각 함유하는 16개의 스팟을 함유하는 각 웰에 플레이팅하였다. 그 다음에 플레이트를 120 r.p.m의 오비탈 진탕기 상에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 3회 세척하였고, 30㎕의 검출 항체를 각 웰에 첨가하였으며, 다른 시간 동안 인큐베이션시켰다. 3회 세척한 후, 스트렙타비딘-HRP를 첨가하였고 추가 15분 동안 인큐베이션시켰다. 그 다음에 플레이트를 6회 세척하였고, 기질 혼합물을 첨가하였다. 플레이트를 즉시 CCD 이미저(미국 뉴욕주 로체스터에 소재한 Kodak) 상에서 판독하였다. 플레이트 이미지를 퀀시스 Q-뷰(Quansys Q-view) 소프트웨어(Quansys Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

[0123] *실험적 자가면역 뇌염(EAE)의 유도 및 평가*

[0124] C57BL/6 마우스에 0.1mg MOG 펩타이드(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; 오스트레일리아 빅토리아주 파크빌에 소재한 Auspep; >95% HPLC 정제됨) 및 2mg/㎖ 마이코박테리움(Mycobacterium) 결핵(Sigma Aldrich)을 함유하는 완전 프로인트 애주번트(adjuvant)를 함유하는 에멀젼으로 피하 주사하였다. 2일 후, 마우스에 500㎕ 백일해독소(Sigma Aldrich)를 복강내로 투여하였다. 마우스를 질병 진행에 대해 모니터링하였고, 다음의 스케일로 등급을 나누었다: 1, 축 처진 꼬리 및/또는 1개 뒷다리의 힘이 없음; 2, 1개 이상 다리의 힘이 없음, 보행장애; 3, 1개 다리의 마비; 4, 1개 이상 다리의 마비, 실금; 5, 빈사 상태.

[0125] *티오글라이콜레이트-유도 복막염의 유도*

[0126] PBS 중에 용해시킨 1㎖ 티오글라이콜레이트(4% (w/v); Sigma Alrich)의 주사에 의해 복막염의 유도를 수행하였다. 경추탈골에 의해 희생시킨 마우스 상에서 복막내 세척을 수행하였다. 간략하게, 5㎖의 복막관류 완충제(peritoneal lavage buffer, PLB; 헤파린(Sigma Aldrich) 9.9 단위/㎖과 함께 0.5mM EDTA(Fronine)을 함유하는 PBS)를 복막내로 주사하였다. 복막을 부드럽게 마사지한 후, PLB를 10㎖ 주사기 내로 흡입하였다. 이 과정을 2

회 반복하였다. 그 다음에 관류를 PLB 중에서 50㎖로 상승시켰고, 5분 동안 340xg에서 교반시켰다. 상기 기재한 바와 같은 유세포분석을 위해 세포를 제조하였다.

[0127] *통계학*

[0128] 그래프를 만들었고, 컴퓨터화된 통계 분석을 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 및 인스태트(InStat)에서 각각 수행하였다(둘 다 미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재한 그래프패드(GraphPad)소프트웨어제의 프로그램임). 데이터에 의존하여, 이표본, 양방 스튜던트 t-검정(unpaired, two-tailed Student t-test) 또는 터키-크라머(Tukey-Kramer) 사후 검정과 함께 일원배치분산분석(one way ANOVA)을 수행하였고, $P < 0.05$를 유의한 것으로 고려하였다.

[0129] 상관관계에 대해, 중량손실, 침윤 및 바이러스 역가, 비-선형 회귀(곡선 맞춤)과 같은 변수 사이의 분석을 사용하였고, 2차 다항식이었다(Y=A + B*X + C*X^2).

[0130] 실시예 1

[0131] *WNV 뇌염의 고용량 및 저용량 모델의 특성규명(characterization)*

[0132] 6×10^4 PFU WNV i.n.으로 C57BL/6 마우스의 고용량 감염은 감염 후 제7일에서 100% 사망률을 초래한다(도 1A). 본 발명자들이 앞서 순환 $Ly6c^{hi}$ 단핵구 전구체로부터 유래된 것으로 나타낸(Getts et al, J Exp Med. 29: 2319, 2007) 대식세포 및 이주 미세아교세포는 감염 후 제5일 T 세포, NK 세포로부터 WNV-감염 뇌를 침윤하였고, 호중구는 또한 이 시점부터 계속 CNS로 유입되며, 침윤의 정점은 감염 후 제7일에 나타났다(도 1F-H, 도 2A-D). 뇌 바이러스 역가는 또한 감염 후 제5일로부터 기하급수적으로 증가되며, 감염 후 제7일상의 높은 수준에 도달하고(도 1C), 감염된 마우스의 체중은 사망까지 감염 후 제5일로부터 감소된다(도 1B).

[0133] 10-배 더 적은, 즉 6×10^3 PFU i.n 바이러스로 마우스의 접종은 아치사(sub-lethal) 결과를 만든다. 독립 실험과 비교할 때 사망률에서 일부 가변성이 발생하는데, 이는 40 내지 60%의 범위에 있지만(도 1A); 체중손실의 백분율과 바이러스 역가/침윤 사이의 강한 상관관계가 지속적으로 나타났다(도 1B-H, 도 2A-E). 마우스 체중의 매일의 모니터링은 개체 내 감염 결과를 예측하기 위한 믿을 수 있는 방법이 되는 것으로 입증되었고, 마우스가 감염을 견뎌내기 위하여 개입을 필요로 할 때 표시한다(도 1B).

[0134] 6×10^3 WNV로 접종 후 체중이 손실되지 않은 마우스는 감염에 의해 사망 굴복하지 않으며, 6×10^4로 이후의 재감염에 대해 면역화된다(도 1A-B). 이들 마우스는 초기 감염 또는 고용량 재감염 시 체중손실을 포함하는 어떤 질병 증상을 나타내지 않는다. 대조적으로, 모의-감염 대조군의 정상 변동과 비교하여 상당한 양의 체중을 손실한 마우스는(보통 24시간 기간에 체중의 >4%) 사망하기 전 전형적으로 2 내지 3일 동안 계속해서 체중이 손실된다. 뇌염의 이 모델에서, 감염에 굴복하는 대다수의 마우스는 감염 후 제6일 내지 제11일에 체중이 손실되기 시작하였고, 감염 후 제16일전에 사망한다. 6×10^4으로 감염시킨 제7일 마우스와 비교하여, 이들 마우스는 TOD에서 뇌내의 바이러스의 높은 역가를 나타낸다(도 1C).

[0135] 6×10^4 및 6×10^3-감염 마우스의 뇌에서 백혈구 침윤과 비교하는 유세포 분석은 감염 후 제7일에 체중 손실 백분율이 전체 백혈구(도 1F), 대식세포(도 1H), 이주 미세아교세포(도 2A), T 세포(도 2C), 및 NK 세포(도 2E)의 침윤과 강하게 상관관계가 있으며, 체중 손실과 호중구 이입(2D) 사이에 일부 상관관계가 보여진다는 것을 나타내었다. 놀랍지 않게, 다수의 $CD45^{lo}$ 미세아교세포는 모든 마우스에서 상대적으로 변하지 않고 남아있는데, 이 집단이 주로 뇌의 체류 미세아교세포를 포함하기 때문이다(도 2B).

[0136] 감염의 저용량 모델을 추가로 조사하기 위하여, 6×10^3-감염 마우스를 매일 체중을 쟀고, 제0일 내지 제14일에 희생시켰으며, 유세포분석 및 플라크 분석을 위해 뇌를 채취하였다. 희생 시간에 체중 손실 백분율과 바이러스 역가(도 2F) 또는 백혈구 침윤(도 2G)사이에 일부 상관관계가 나타났다. 그러나, 바이러스 역가와 백혈구 침윤 사이의 비교는 일부 마우스가 상당한 침윤 없이 바이러스의 높은 역가를 가지는 한편(도 2H), 이들 마우스 중 일부는 또한 상당한 양의 체중을 손실하였고, 나머지는 그렇지 않다(도 2F)는 것을 나타내었다. 뇌에서 바이러스 역가를 결정하기 위하여 마우스를 희생시켜야 하기 때문에, 상당한 체중 손실 또는 백혈구 침윤이 없는 뇌에서 바이러스를 갖는 이들 마우스가 체중 손실 또는 침윤을 나타내지 않고 바이러스를 클리어런스하는지 여부, 또는 보이는 높은 바이러스 역가가 뇌의 침윤/체중 손실에 앞서는지는 명확하지 않다.

[0137] 실시예 2

[0138] *카복실화된 비드 처리는 WNV 뇌염의 고용량 및 저용량 모델에서 생존을 개선*시킨다.

[0139] 형광 비드는 질병의 다양한 생체내 모델에서 단핵구 서브세트의 수송에 따르는 문헌에서 빈번하게 사용되었다. 그러나, 이들 연구는 이들 이론적으로 "비활성"인 비드가 단핵구 기능을 가질 수 있고, 결과로서, 질병을 극복할 수 있다는 잠재적인 영향을 간과한다.

[0140] WNV 감염동안 단핵구를 수송하기 위한 시도에서, 본 발명자들은 네이키드와 카복실화된 폴리스타이렌 비드를 둘 다 사용하였고, 질병 과정 상에서 예상치 못한 변화를 발견하였다. 다음의 데이터는 네이키드와 카복실화된 폴리스타이렌 비드가 둘 다 면역 세포에 의한 뇌의 침윤을 유의하게 감소시키고, 감염된 마우스의 장기간 생존을 촉진한다는 것을 나타낸다.

[0141] 감염 후 제6일에 i.v.로 300㎕ PBS 중의 4.41×10^{9} 0.5㎛ 카복실화된 폴리스타이렌 비드에 의한 6×10^{4} WNV-감염 마우스의 주사는 이 치명적인 질병모델에서 마우스의 10% 장기간 생존을 초래하였다(도 3A). 생존 결과가 개선될 수 있는지 여부를 보기 위하여, 본 발명자들은 또한 감염 후 제6일에서 6×10^{3}의 더 낮은 용량으로 감염시킨 마우스에 이 동일한 농도의 비드를 주사하였다. 그러나, 이 전략은 PBS-처리 대조군과 비교하여 처리군 마우스의 생존을 감소시켰다(도 3B). 이 결과는 비드가 치료적으로 투여될 필요가 있다는 것, 즉 마우스가 유의한 체중손실을 나타낼 때, 본 발명자들은 백혈구 집단에 의한 뇌의 높은 바이러스 역가 및 침윤을 표시하는 것을 나타낸다는 점을 강조한다.(도 1,2를 참조).

[0142] 따라서 본 발명자들은 저용량 감염 모델에서 비드 투여에 치료적 접근을 채택하였다. 마우스의 체중을 매일 측정하였고(도 3E-G), 24-시간 기간에 유의한 체중 손실이 검출된다면(보통 모의-감염 대조군의 정상 변동과 비교하여 전체 체중의 >4%) 4.41×10^{9}개 카복실화된 폴리스타이렌 비드를 투여하였다. 이 전략을 사용하여, 본 발명자들은 보통 체중 손실을 계속한 마우스의 생존을 증가시킬 수 있었고, 60%(독립 실험에서 40 내지 80%) 만큼은 개입 없이 사망하였다(도 3D). 예상되는 바와 같이, 체중이 상실되고 PBS로 처리된 모든 마우스는 체중 손실이 계속되었고, 2 내지 4일 후에 사망하였다(도 3E, G). 임의의 시간에 상당한 양의 체중을 상실하지 않은 마우스는 PBS-감염 대조군과 체중에서 유사한 안정성을 나타내었다(도 3E-F).

[0143] 마우스를 상당한 체중 손실의 초기 검출 시 5연속일 동안 카복실화된 비드로 처리하였다. 일부 마우스에서, 5일의 비드 처리는 충분하였고, 비드 주사를 중단한 후 체중은 안정하게 남아있었으며, 이들 마우스는 추가 개입 없이 감염에서 계속 생존하였다(도 4A-B). 그러나, 일부 마우스는 제5일에 비드 처리를 중단하였을 때 다시 체중이 손실되기 시작하였고, 따라서 체중이 재안정화될 때까지 처리가 추천되었으며, 이들 마우스는 또한 장기간 생존하였다(도 4C-D).

[0144] 카복실화된 폴리스타이렌 비드 또는 PBS로 처리된 6×10^{3}개 WNV-감염 마우스의 뇌 상에서 감염 후 제9일에 또는 제8일에 유의한 체중 손실이 검출되었을 때 유세포 분석을 수행하였다. 체중 손실되지 않은 마우스를 또한 실험 대조군으로서 제8일에 비드- 또는 PBS-처리하였다. 도 4D 내지 L에 나타내는 바와 같이, 감염 후 제8일 상에서 체중이 손실되지 않았지만, 비드-(도 4H 내지 I) 또는 PBS-처리된(도 4D 내지 E) 마우스는 단핵구-유래 대식세포 또는 이주 미세아교세포, T 세포, NK 세포 또는 호중구에 의해 뇌의 침윤을 나타내지 않았고, 분리된 주요 집단은 $CD45^{lo/int}$ $CD11b^{+}$ 체류 미세아교세포이었다. 감염 후 제8일에 체중이 손실되지 않고, PBS로 처리된 마우스에서, 뇌의 뇌의 엄청난 침윤은 감염 후 제9일에 증명되었고(도 4F-G), 주요집단은 $CD45^{hi}$ 염증성 단핵구-유래 대식세포가 된다(도 4L). 그러나, 체중손실되고 감염 후 제8일에 비드로 처리된 마우스에서, 상당한 침윤이 여전히 존재하였지만, PBS-처리 마우스와 비교하여 크게 감소되었다(도 4J-L). 체중 손실 시 비드 또는 PBS로 처리한 10^{3}-감염 마우스의 유세포 분석은 마우스가 감염 후 제6일 내지 제14일에 걸쳐 비드-처리되었을 때 해당 침윤의 감소를 나타내는 것이 반복될 필요가 있다.

[0145] 실시예 3

[0146] *비드의 카복실화는 WNV-감염 마우스의 백혈구 집단에서 생존 및 변화의 유의*한 개선에 중요하다

[0147] 이 조사 단계에서, 비드의 카복실화가 뇌에 대한 백혈구 수송의 감소 및 생존에서 보이는 개선에서 중요한지 여부는 불명확하다. 6×10^{3}개 WNV-감염 마우스는, 유의한 체중 손실이 보고되었을 때, 300㎕ PBS i.v에서 4.41

$\times 10^9$ 0.5㎛ 네이키드 또는 카복실화된 비드로 또는 단지 PBS로 주사되었다. 카복실화된 비드로 주사된 마우스는 60% 생존으로 유의한 개선을 나타낸 반면, 네이키드 비드-처리된 마우스는 25%의 훨씬 더 적은 개선을 나타내었다(도 5A). 체중이 손실되지 않은 마우스는 처리되지 않았고, 개입 없는 감염으로 생존한 반면, 체중이 손실되고, PBS로 처리된 마우스는 모두 감염 후 제14일에 사망하였다(도 5B-D). 이들 마우스에서 체중 손실을 감염 후 제20일까지 모니터링하였고; 체중의 유의한 양을 손실하지 않은 마우스는 PBS-감염 대조군(도시하지 않음)과 유사한 안정성 패턴을 나타낸 반면, 카복실화되거나 또는 네이키드 비드(도 5B-C)로 처리된 마우스는 종국적으로 안정화되고, 생존하거나, 계속해서 체중이 손실되었고, 2 내지 4일 후 사망하였다. 체중이 손실되고 PBS로 처리한 모든 마우스는(B, D) 계속해서 체중이 손실되었고, 2일 내지 5일 후 사망하였다.

[0148] 백혈구 집단에서 변화를 조사하고 세포가 카복실화된 또는 네이키드 비드와 결합되어 발견될 수 있다는 것을 결정하기 위하여, 6×10^4 PFU WNV로 감염시킨 마우스 상에서 유세포 분석을 수행하였다. 마우스를 4.41×10^9 0.5㎛ 카복실화된 FITC-비드 또는 네이키드 FITC-비드로 주사하였고, 감염 후 제6일에 300㎕ PBS, 또는 PBS 단독로 i.v. 전달하였다. 감염 후 제7일에 마우스를 희생시켰고, 유세포분석을 위해 혈액, 뼈, 골수, 간 및 비장을 수집하였다.

[0149] "유리" 비드뿐만 아니라 $CD45^+$ 백혈구와 결합된 비드를 유세포 분석(Ex/Em Max 441/486㎚)에 의해 검출할 수 있었다. 예상한 바와 같이, 비드는 PBS-처리 대조군의 혈액 중에서 검출되지 않았지만(도 5E-G), 네이키드 (도 5H 내지 J) 및 카복실화된(도 L 내지 M) 비드-처리 마우스에서 볼 수 없었다. 비드는 그것들이 카복실화되었을 때 더 효과적으로 클리어런스 되는 것으로 나타났고, 순환에서 남아 있는 것의 다수는 원래 "유리"였던 네이키드 비드(도 5K)와 비교하여 CD45+ 백혈구(도 5O)와 결합되었다. 이 데이터는 카복실화가 어떻게든 네이키드 비드와 비교하여 백혈구에 의한 순환으로부터 비드의 흡수를 촉진하고, 이중 일부는 주사 24시간 후 순환에서 여전히 "유리"로 남아 있다는 것을 시사한다.

[0150] 뇌의 유세포 분석은 카복실화된 또는 네이키드 비드로 처리된 마우스의 뇌에서 백혈구 집단의 감소에서 일부 유의한 차이를 나타내었다. 카복실화된 또는 네이키드 비드는 처리 1일 후인 감염 후 제7일의 뇌에서 검출되지 않을 수 있었고(도 6A-C), 이는 비드를 취한 세포가 감염된 CNS로 유입되지 않았다는 것을 시사한다. 네이키드와 카복실화된 비드-처리 마우스 둘 다의 뇌에서 백혈구의 전체 수는 PBS-처리 대조군뿐만 아니라 전체 대식세포 및 미세아교세포 집단과 비교하여 유의하게 감소되었다(도 6D). 그러나, 단지 카복실화된 비드는 이들 마우스의 뇌에서 T 세포 및 NK 세포 수를 감소시켰다. 대식세포의 $Ly6c^{hi}$ 및 $Ly6c^{lo/int}$ 집단 둘 다는 비드 처리군 둘 다에 의해 유의하게 감소되었고, $Ly6c^-$ 세포의 소집단에서 변화가 보이지 않았다. $CD45^{int}$ 활성화된 미세아교세포에 대해, $Ly6c^{hi}$ 서브세트의 감소는 단지 카복실화된 비드 처리에 의해 나타났지만, $Ly6c^{lo/int}$ 및 $Ly6c^-$ 서브셋트의 감소는 비드 처리 둘 다에 의해 나타났다. $Ly6c^{hi}$ $CD45^{lo}$ 휴면 미세포아교세포의 작은 서브세트에서 변화가 보이지 않았지만, 비드 처리군 둘 다에서 $Ly6c^{lo/int}$ 및 $Ly6c^-$ 서브세트가 유의하게 감소되었다.

[0151] 비장의 유세포 분석은 다수의 비드가 이 기관에서 백혈구에 의해 취해졌다는 것을 나타내었고, 처리군 간의 집단에서 일부 흥미로운 차이가 있었다. 도 7A 내지 I에서 나타내는 바와 같이, 비드$^+$ 세포는 주로 $CD11b^+$, $CD11c^+$ 및 $Ly6c^+$이었다.

[0152] 추가 분석은 관심의 3가지 주요 서브세트가 비장 - $CD11b^+$, $CD11c^-$ 단핵구(도 7J, M, P), $CD11b^+$, $CD11c^+$ "골수성" 수지상 세포, 주로 $Ly6c^{lo/-}$ (도 7K, N, Q), 및 $CD11b^-$, $CD11c^+$ 수지상 세포, 주로 $Ly6c^{lo/-}$(도 7L, O, R)에서 비드를 취한 것으로 발견되었다.

[0153] 이들 3개 세포 집단의 증가는 또한 카복실화된 비드-처리 마우스의 비장에서 명백하다. 전체 $CD11b^+$, $CD11c^-$ 단핵구뿐만 아니라 전체 $Ly6c^{int/hi}$, 비드$^+$ $Ly6c^{int/hi}$ 및 비드$^-$ $Ly6c^{int/hi}$ 서브세트의 증가가 카복실화된-처리 마우스에서 발견되었다(도 8A). 전체 $Ly6c^{-/lo}$, 비드$^+$ $Ly6c^{-/lo}$ 및 비드$^-$ $Ly6c^{-/lo}$는 또한 카복실화된 비드 처리에 의해 증가되는 것이 발견되었다. 이들 데이터는 단핵구가 카복실화된 비드 처리의 결과로서 비장에 수송될 수 있고, 비드$^+$뿐만 아니라 비드$^-$ 세포도 구성할 수 있다는 것을 시사한다.

[0154] 비장에서 $CD11b^+$ $CD11c^+$ 수지상 세포의 $Ly6c^{-/lo}$ 집단은 비드의 유형 둘 다를 취한다는 것을 발견하였다(도 8B).

그러나, 카복실화된 비드만이 비장 내 $CD11b^{+}$ $CD11c^{+}$ 수지상 세포의 전체 수 및 이것의 $Ly6c^{-/lo}$ 집단을 증가시켰다. 비드$^{-}$ $Ly6c^{-/lo}$ 수지상 세포에스 증가가 없었기 때문에, 비드$^{+}$ $Ly6c^{-/lo}$ 수지상 세포만이 카복실화된 비드의 흡수 후 비장에 수송된다는 것은 명백하다. 이들 세포가 사실상 순환 시 비드를 취한 $Ly6c^{hi}$ 염증 단핵구로부터 유래되며, 그것들이 수지상 세포로 분화함에 따라 그것이 Ly6c 발현을 하향조절하고, CD11c 발현을 상향조절하는 경우 뇌에 대한 수송 대신에 비장으로 우회되는 것이 가능하다.

[0155] 비장 내 $CD11b^{-}$ $CD11c^{+}$ 수지상 세포 집단의 $Ly6c^{lo/-}$ 세포는 비드 유형을 둘 다 취하였다(도 8C). 카복실화 비드 처리에 의해 $CD11b^{-}$ $CD11c^{+}$ 수지상 세포 집단, 더 구체적으로는 $Ly6c^{lo/-}$ 세포의 전체 수에서 증가가 나타났다. 증가는 이 집단의 비드$^{+}$와 비드$^{-}$ 세포 둘 다에서 나타났으며, 이는 비드$^{+}$뿐만 아니라 비드$^{-}$ 세포가 비장 내에서 증가되었다는 것을 시사한다. 이 집단은 비장의 체류 DC, 주변부로부터 구성된 비골수성 DC를 포함할 수 있거나 또는 잠재적으로 비드, 하향조절된 CD11b 및 Ly6c 및 상향조절된 CD11c 발현을 취한 염증성 단핵구로 이루질 수 있다.

[0156] 비드는 또한 비장 내 적은 백분율의 B 세포와 함께 발견되었지만, 그러나 카복실화된 비드만이 비장 내 B 세포 수를 유의하게 증가시켰다(도 9A-D). 비장 내에서 나타난 다른 유의한 증가만이 $CD8^{+}$ T 세포에 있었지만, $CD4^{+}$ T 세포, NK 세포 및 호중구의 수는 변화되지 않고 남아있었다.

[0157] 비드는 또한 간에서, 주로 CD11b, CD11c 및 Ly6c-발현 세포(도 10A-I)와 함께 검출될 수 있었다. 비장에 대해, $CD11b^{+}$ $CD11c^{-}$ 단핵구(도 10J), $CD11b^{+}$ $CD11c^{+}$ (도 10K) 및 $CD11b^{-}$ $CD11c^{+}$(도 10L) 수지상 세포가 간에서 비드를 취한 것을 발견하였다. 그러나, 간의 임의의 백혈구 집단에서 유의한 증가 또는 감소가 없었다. 또한 골수에서, $CD11b^{+}$ $CD11c^{+}$ $Ly6c^{+}$ 백혈구의 소집단에서 적은 수의 비드가 검출되었다(도 11A-G). 그러나, 골수의 임의의 백혈구 집단에서 유의한 증가 또는 감소가 발견되지 않았다.

[0158] 실시예 4

[0159] 유의한 체중 손실이 보고되었을 때, 6×10^{3}개 WNV-감염 마우스를 300㎕ PBS i.v.로 0.5, 0.05 또는 3㎛ 카복실화된 폴리스타이렌 비드의 저용량 0.1% 또는 고용량의 0.5% 비드로, 또는 PBS 만으로 주사하였다. 저용량의 0.5, 0.05 또는 3㎛로 처리한 마우스는 대략 40 내지 50%의 생존 시 유의한 개선을 나타내었다(도 12A). 그러나, 마우스의 고용량 처리는 20%의 훨씬 더 적은 개선으로 생존에 유의한 것으로 나타났다. 고용량 비드로 처리한 유의한 수의 마우스는 이례적인 질병 증상을 나타내었고, 여러 날에 걸친 생명 기관(vital organ) 내 비드의 이러한 고용량이 쌓이는 것이 마우스에게 유해하다는 것을 추측할 수 있었다. 다른 저용량의 비드를 포함하기 위한 가능성과 함께 이 시간 과정을 반복할 것이다. 또한 상이한 크기의 비드에 의해 감염 후 제6일에 처리한 6×10^{4}개 WNV-감염 마우스에서 유세포 분석을 수행할 것이다.

[0160] 이들 데이터는 카복실화된 폴리스타이렌 비드가 생체내에서 파괴되지 않을 수도 있고, 따라서 치료적 적용을 제한할 수 있다는 것을 강조한다. 따라서 본 발명자들은 카복실화되거나 또는 네이키드인(그러나 네이키드 구체는 또한 소량의 카복실기를 함유할 수 있음) 0.5㎛ 생분해성 폴리(락트-코-글라이콜산)(PLGA) 구체를 얻었다. 유의한 체중 손실이 검출되었을 때, 6×10^{3}개 WNV-감염 마우스를 4.41×10^{9}개 0.5㎛ 네이키드 또는 카복실화된 폴리스타이렌 비드 또는 PLGA 구체로 주사하였다. 도 12B에서 알 수 있는 바와 같이, PLGA 네이키드 및 카복실화된 구체는 생존에서 카복실화된 폴리스타이렌 비드와 유사한 개선을 나타내었다.

[0161] 감염 후 제6일에 주사된 카복실화된 PLGA 구체가 6×1^{04}개 WNV-감염 마우스 내 제7일 뇌의 침윤을 감소시키는지 여부를 알기 위하여, 본 발명자들은 i.v로 전달된 4.41×1^{09}개 입자에 의한 마우스의 PBS, 0.5㎛ 카복실화된 비드, 0.5㎛ 카복실화된 PLGA 구체, 및 0.5㎛ 카복실화된 다이아몬드 입자 처리와 비교하였다. 뇌, 혈액, 비장 및 간을 유세포 분석을 위해 처리하였다. 이 실험의 분석을 계속하였지만, 이들 마우스 뇌의 예비 분석은 모든 3가지 입자가 면역 세포에 의해 뇌의 침윤을 성공적으로 감소시켰음을 나타낸다(도 12C). 비장 내 전체 백혈구의 증가가 또한 관찰되었고, 이는 본 발명자들이 카복실화된 비드 처리 마우스에서 본 결과와 일치한다.

[0162] 실시예 5

[0163] *T-세포 결여 마우스에서 비드 처리*

[0164] C57BL/6 야생형(WT) 및 RAG(T 세포-결여)마우스를 6×10^4 또는 6×10^3개 PFU WNV로 감염시켰다. 고용량의 6×10^4로 감염시킨 WT 마우스는 감염 후 제7일에 100% 사망률을 나타낸 반면, 동일 용량으로 감염시킨 RAG 마우스는 감염 후 제8일에 죽기 시작하였고, 일부 마우스는 감염 후 제13일까지 살아 있었다. 저용량의 6×10^3로 감염시킨 WT 마우스는 감염 후 제8일에 60% 사망률을 나타내었지만, 이 시점 후 40%는 장기간 생존을 나타내었다. 동일 용량으로 감염시킨 RAG 마우스는 감염 후 제14일까지 사망을 시작하지 않았지만, 제16일까지 모든 마우스가 사망하였다(도 13A 내지 B). T 세포 결핍 마우스가 RAGS보다 더 길게 생존하기 때문에 이들 데이터는 WNV 뇌염의 면역병리학에서 T 세포에 대한 직접적 또는 간접적 역할을 시사한다. 그러나, 이는 또한 저용량으로 감염시킨 모든 RAG 마우스가 질병에 굴복한 반면 WT 마우스의 40%는 면역으로 생존하였기 때문에 T 세포가 대조군 바이러스 감염에 대해 중요하다는 점을 강조한다.

[0165] 이들 마우스의 체중 손실을 매일 기록하였고, 이는 RAGS와 WT 마우스 둘 다에서 체중 손실일 사망으로 진행한다는 것을 나타내었다(도 13B). 그러나, 처음 체중 손실 후 최대 2 내지 3일 동안 야생형만이 살아있다는 것을 관찰한 반면, RAGS는 체중 손실이 시작된 후 5일까지 살아있을 수 있었다. 6×10^4 또는 6×10^3로 감염시킨 RAG 및 WT 마우스로부터 채취한 뇌의 플라크 분석은 체중 손실 백분율이 바이러스 역가와 강하게 상관관계가 있다는 것을 나타내었다(도 12C). 대체로, RAG 마우스는 WT 마우스보다 사망 시간에 체중 손실이 더 컸고, 더 높은 바이러스 역가를 나타내었다. 이는 그것들이 초기 체중 손실 후 WT 마우스보다 더 길게 살아있을 수 있으며, 따라서 바이러스는 뇌에서 증가를 지속하였고, 직접적으로 T 세포 없이 바이러스를 제어할 수 없는 결과가 되는 것과 대조적으로 마우스는 사망 시까지 체중 손실이 계속되었다는 사실에 기인할 수 있는 것으로 나타났다. 이 가설은 뇌의 유세포분석에 의해 뒷받침되는데(도 13D 내지 E), 여기서 제7일 WT 및 제7일/제8일 마우스 뇌를 비교하였다. RAG 마우스는 대식세포, 미세아교세포, T 세포(그것들이 결핍이라면) 및 호중구에 의한 뇌의 침윤에서 유의한 감소를 나타내는데, 이는 감염 후 제7일과 제8일 사이에 증가되지 않았다. 이는 이들 동물이 면역병리학이 이들 동물의 사망에 대한 주된 기여자라면, 초기 체중 손실 후 WT 마우스보다 더 길게 생존하는 이유를 설명할 수 있다.

[0166] RAG 및 WT 마우스를 또한 6×10^3 PFU WNV로 감염시켰고, T 세포가 없을 때 카복실화된 비드의 효능을 시험하기 위하여 매일 체중을 측정하였다. 유의한 체중 손실 시(24시간에 >4%), 300㎕ 용적으로 전달된 4.41×10^9 카복실화된 비드 또는 PBS i.v.로 마우스를 처리하였다. 비드 주사에 의한 RAG 마우스의 생존에서 유의한 개선이 없었다(도 12F). RAG 마우스는 비드 또는 PBS 주사 후 체중 손실이 계속되었고, 2일 내지 5일 후 사망하였다(도 12G). 결과를 확인하기 위하여 이 실험을 다시 반복할 필요가 있다.

[0167] 실시예 6

[0168] *EAE에서 비드 처리*

[0169] C57BL/6 마우스를 MOG 및 CFA 애주번트로 프라이밍할 것이다. 질병 증상의 발생 시, 걸음걸이, 자세 및 다른 활동의 변화에 의해 결정되는 바와 같이, 카복실화된 입자를 매 8시간 마다, 16시간 마다, 매일 또는 48시간마다 정맥내로 투여할 것이다. 질병 스코어의 변화에 의해 질병의 중증도를 결정할 것이다. 입자의 주입은 질병 스코어에서 유의한 감소를 초래하는 뇌 내로 단핵구의 이동 및 후속하는 T 세포 프라이밍을 방지할 것이다.

[0170] 실시예 7

[0171] *아테롬성 동맥 경화증 및 신생혈관내막(neointimal) 평활근 세포 증식에서* 비드 처리

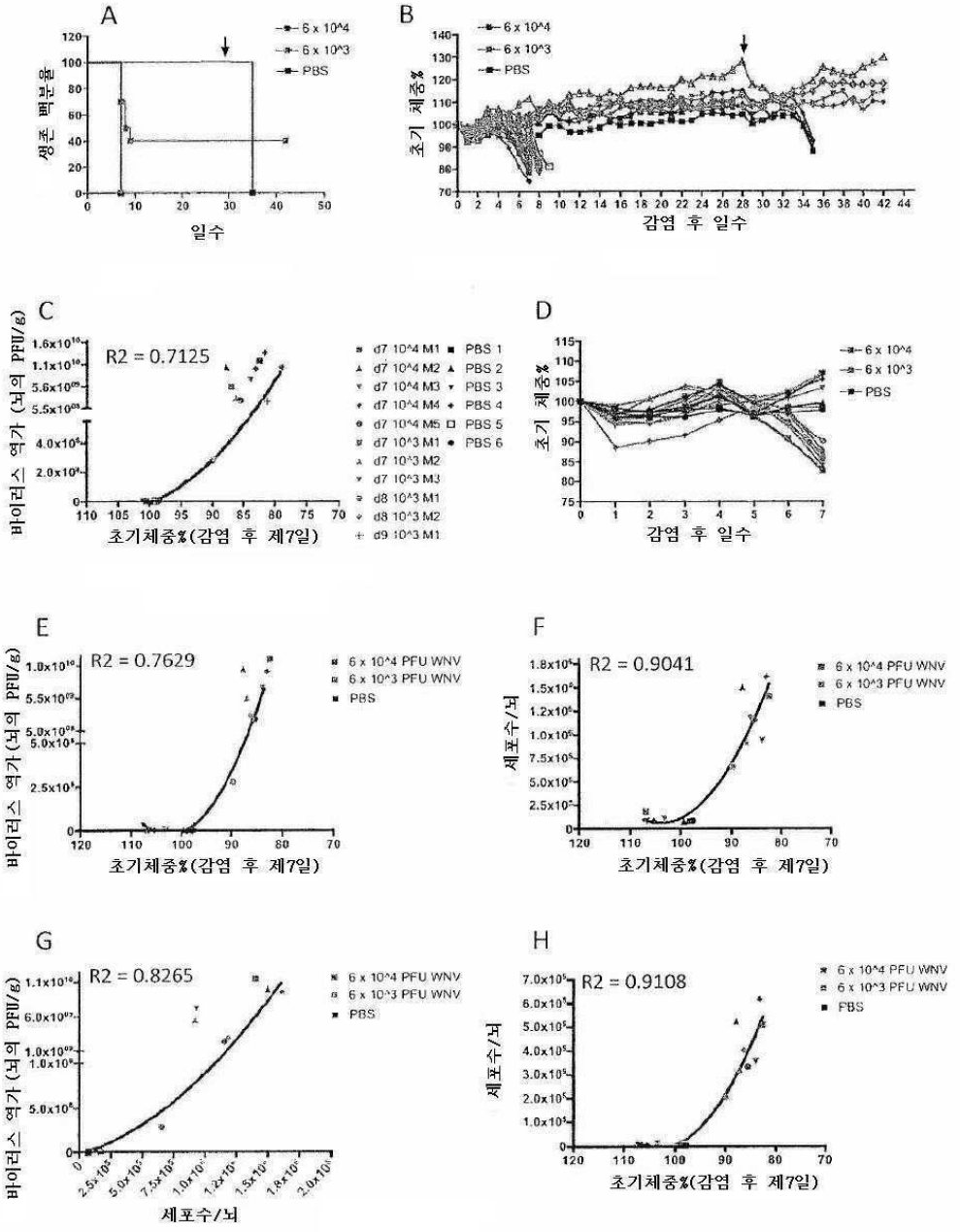
[0172] APO/E 결핍 마우스에게 고지방 식이요법을 공급할 것이다. 4주령으로부터, 카복실화된 입자를 8시간마다, 16시간마다, 24시간 마다, 48시간마다, 72시간 마다, 또는 1개월에 1회 정맥내로 투여할 것이다. 동맥 조직학에서 변화에 의해 질병의 중증도를 결정할 것이다. 입자의 주입은 동맥 벽 내로 단핵구의 이동을 방지할 것이고, 평활근 증식 및 초기 플라크 형성을 구동하는데 중요한 이후의 면역 후유증을 방지할 것이다.

[0173] 본 발명의 특이적 실시형태가 기재되고, 예시되지만, 이러한 실시형태는 단지 본 발명의 예시로서 고려되어야 하며, 수반되는 특허청구범위에 따라 해석되는 것으로서 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

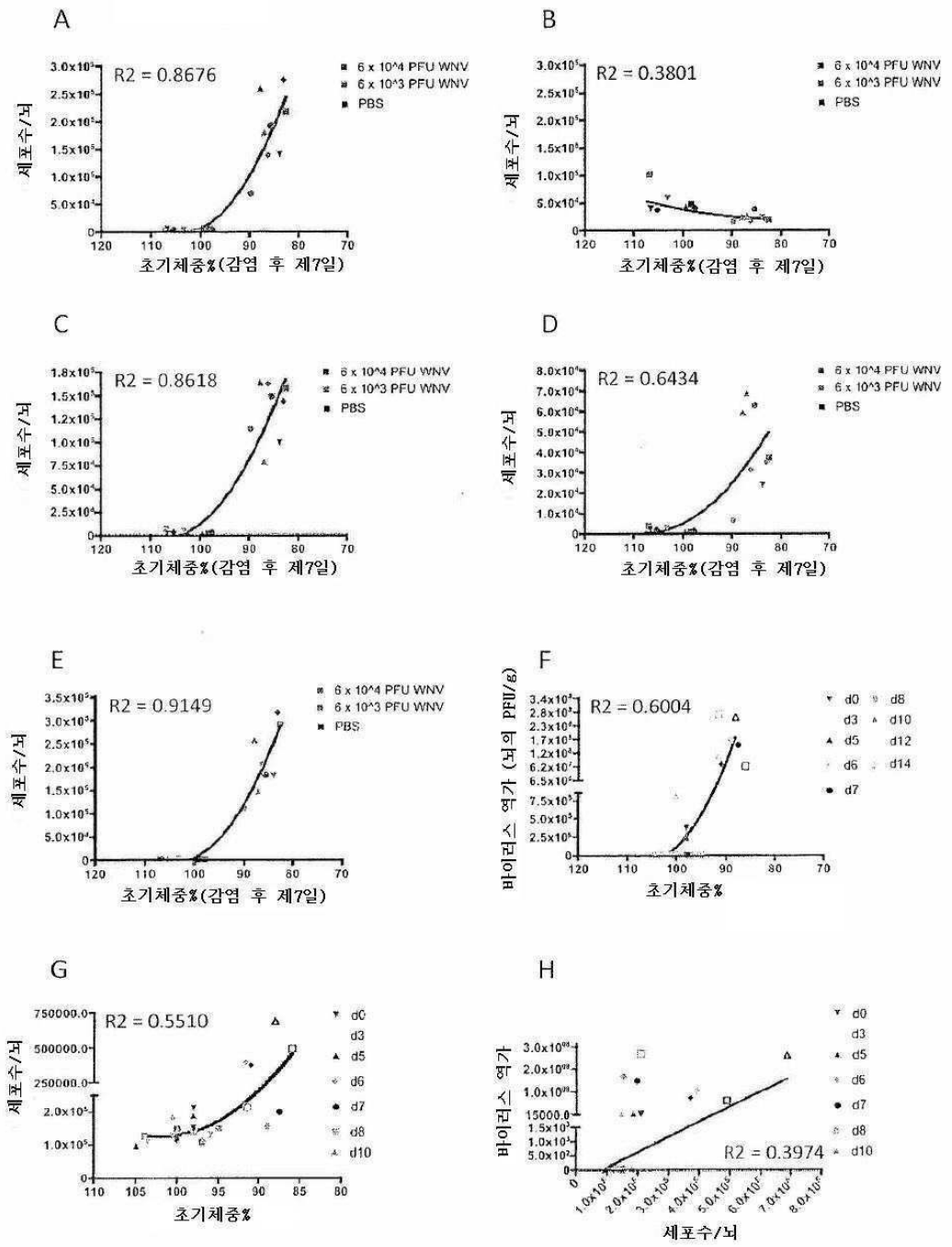
[0174] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 출원 및 다른 참고문헌은 그것의 전문이 참조로서 포함된다.

도면

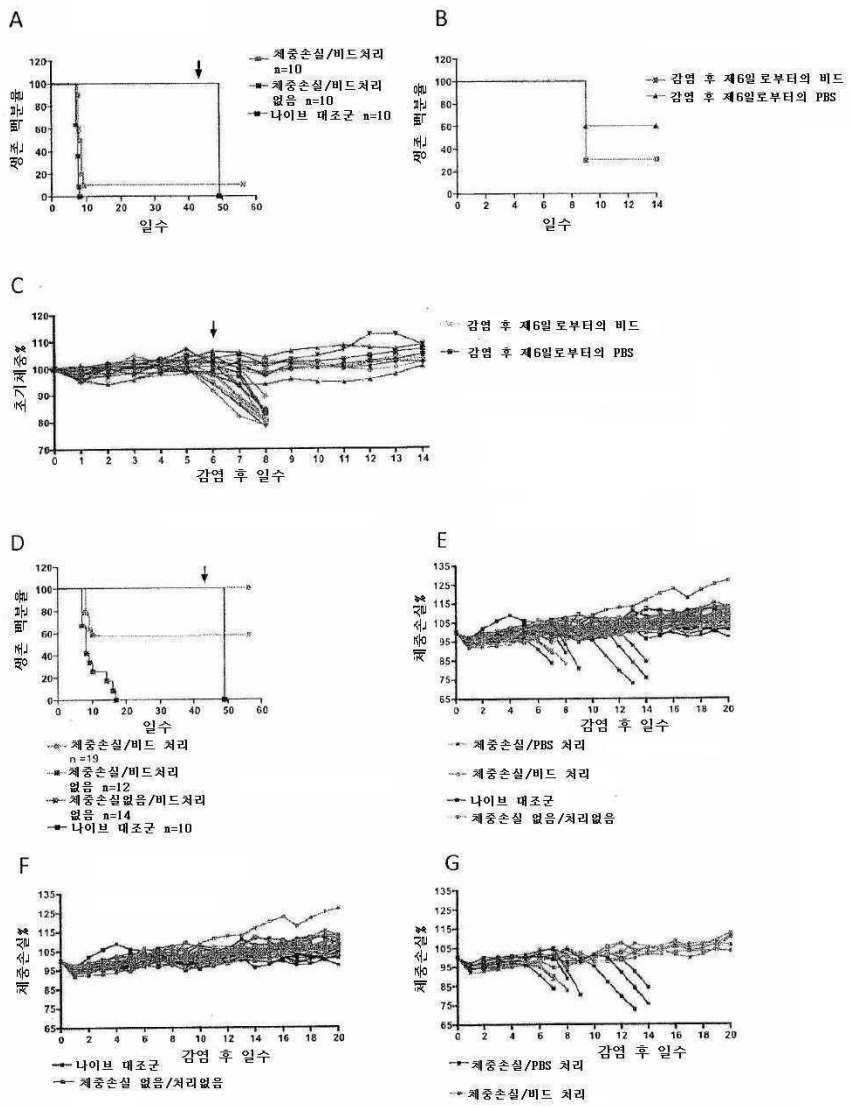
도면1


A
생존 백분율
일수
6 x 10^4
6 x 10^3
PBS
B
초기 체중%
감염 후 일수
C
바이러스 역가 (뇌의 PFU/g)
R2 = 0.7125
초기체중%(감염 후 제7일)
D
초기 체중%
감염 후 일수
E
바이러스 역가 (뇌의 PFU/g)
R2 = 0.7629
6 x 10^4 PFU WNV
6 x 10^3 PFU WNV
PBS
초기체중%(감염 후 제7일)
F
세포수/뇌
R2 = 0.9041
초기체중%(감염 후 제7일)
G
바이러스 역가 (뇌의 PFU/g)
R2 = 0.8265
세포수/뇌
H
세포수/뇌
R2 = 0.9108
초기체중%(감염 후 제7일)

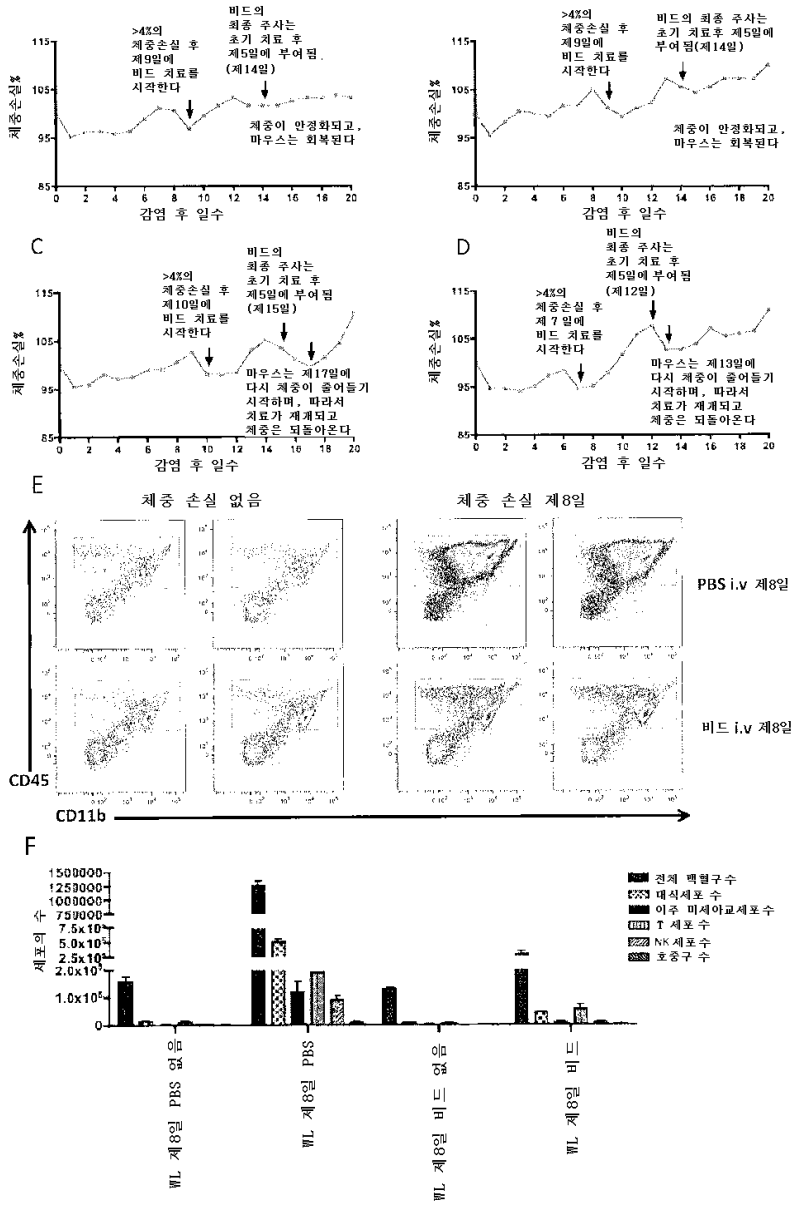
도면2


A
R2 = 0.8676
6 x 10^4 PFU WNV
6 x 10^3 PFU WNV
PBS
세포수/뇌
초기체중%(감염 후 제7일)
B
R2 = 0.3801
6 x 10^4 PFU WNV
6 x 10^3 PFU WNV
PBS
세포수/뇌
초기체중%(감염 후 제7일)
C
R2 = 0.8618
6 x 10^4 PFU WNV
6 x 10^3 PFU WNV
PBS
세포수/뇌
초기체중%(감염 후 제7일)
D
R2 = 0.6434
6 x 10^4 PFU WNV
6 x 10^3 PFU WNV
PBS
세포수/뇌
초기체중%(감염 후 제7일)
E
R2 = 0.9149
6 x 10^4 PFU WNV
6 x 10^3 PFU WNV
PBS
세포수/뇌
초기체중%(감염 후 제7일)
F
R2 = 0.6004
d0
d3
d5
d6
d7
d8
d10
d12
d14
바이러스 역가 (뇌의 PFU/g)
초기체중%
G
R2 = 0.5510
d0
d3
d5
d6
d7
d8
d10
세포수/뇌
초기체중%
H
R2 = 0.3974
d0
d3
d5
d6
d7
d8
d10
바이러스 역가
세포수/뇌

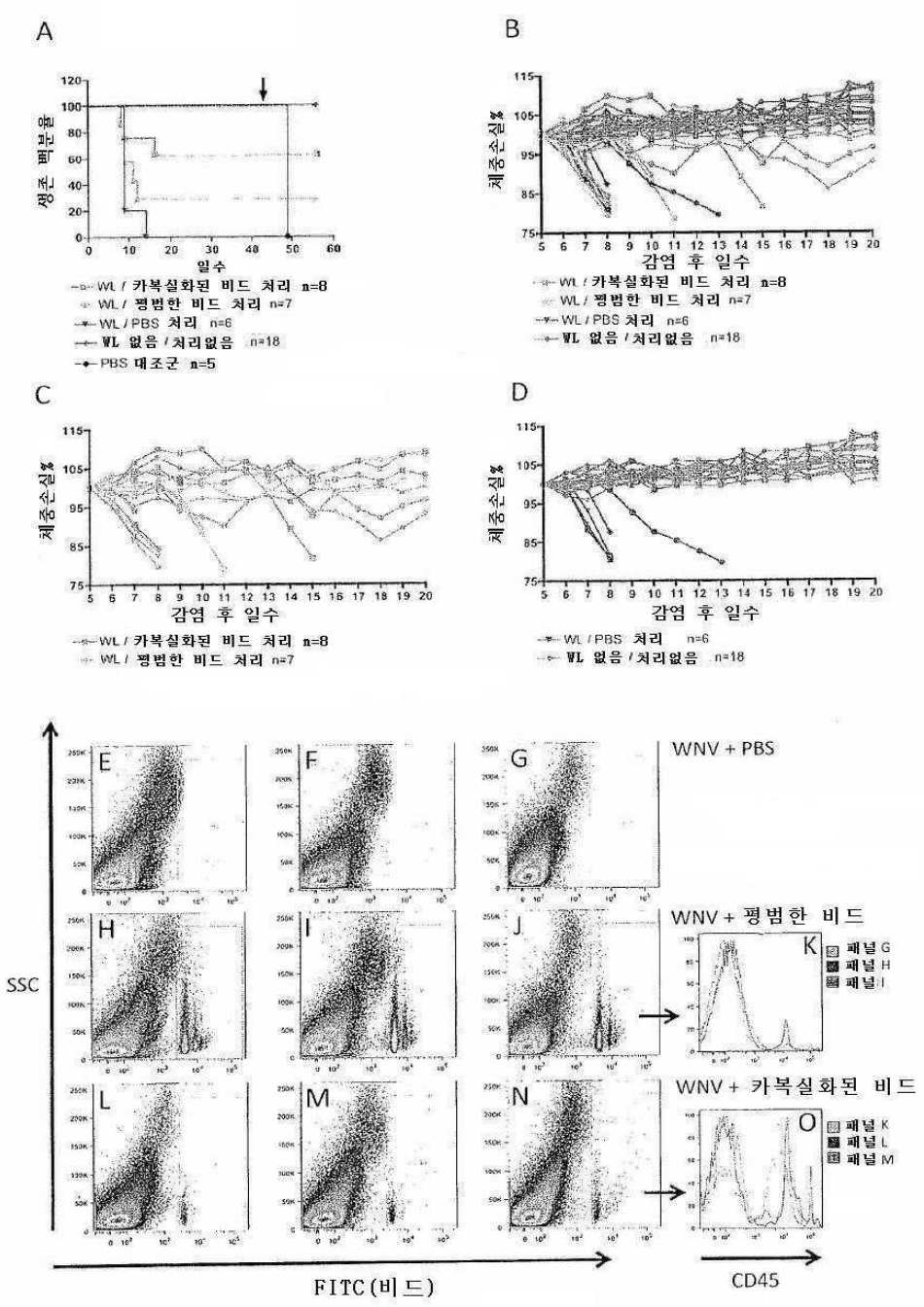
도면3


A
생존 백분율
일수
체중손실/비드처리 n=10
체중손실/비드처리 없음 n=10
나이브 대조군 n=10
B
생존 백분율
일수
감염 후 제6일로부터의 비드
감염 후 제6일로부터의 PBS
C
초기체중%
감염 후 일수
감염 후 제6일로부터의 비드
감염 후 제6일로부터의 PBS
D
생존 백분율
일수
체중손실/비드 처리 n=19
체중손실/비드처리 없음 n=12
체중손실없음/비드처리 없음 n=14
나이브 대조군 n=10
E
체중손실%
감염 후 일수
체중손실/PBS 처리
체중손실/비드 처리
나이브 대조군
체중손실 없음/처리없음
F
체중손실%
감염 후 일수
나이브 대조군
체중손실 없음/처리없음
G
체중손실%
감염 후 일수
체중손실/PBS 처리
체중손실/비드 처리

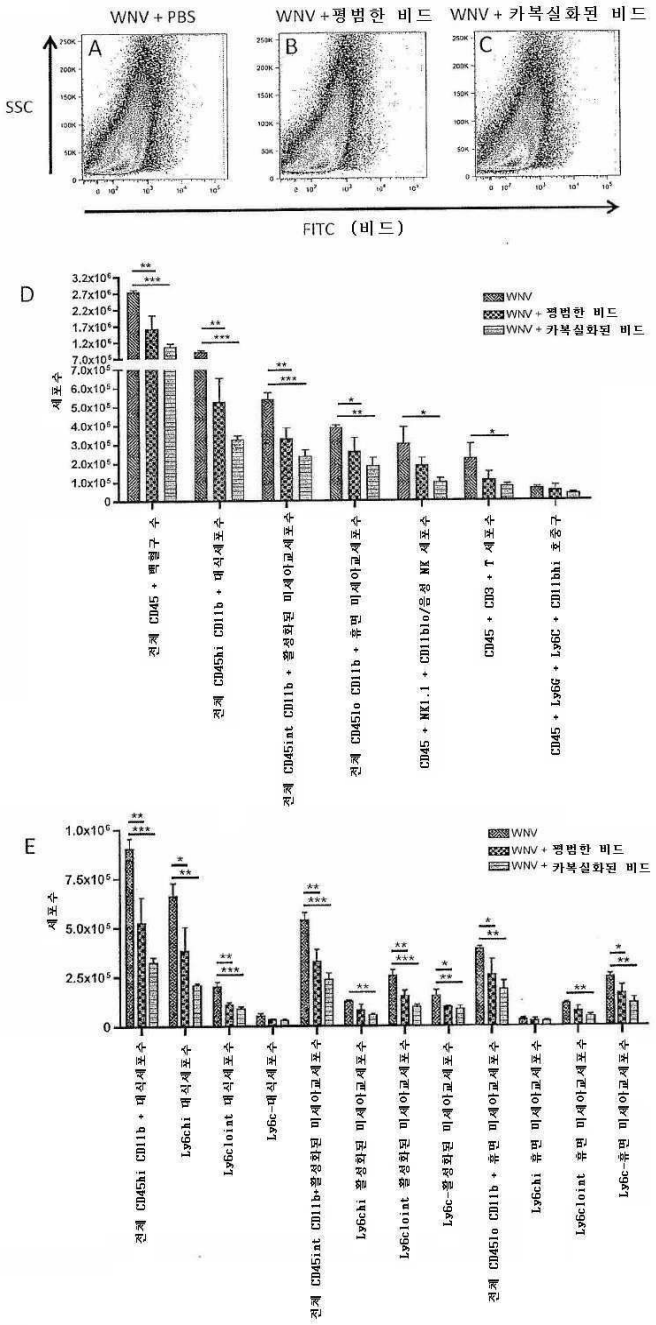
도면4


>4%의 체중손실 후 제9일에 비드 처료를 시작한다
비드의 최종 주사는 초기 치료 후 제5일에 부여됨. (제14일)
체중이 안정화되고, 마우스는 회복된다
체중손실%
감염 후 일수
C
>4%의 체중손실 후 제10일에 비드 처료를 시작한다
비드의 최종 주사는 초기 치료 후 제5일에 부여됨 (제15일)
마우스는 제17일에 다시 체중이 줄어들기 시작하며, 따라서 치료가 재개되고 체중은 되돌아온다
D
>4%의 체중손실 후 제 7 일에 비드 처료를 시작한다
비드의 최종 주사는 초기 치료 후 제5일에 부여됨 (제12일)
마우스는 제13일에 다시 체중이 줄어들기 시작하며, 따라서 치료가 재개되고 체중은 되돌아온다
E
체중 손실 없음
체중 손실 제8일
PBS i.v 제8일
비드 i.v 제8일
CD45
CD11b
F
세포의 수
전체 백혈구수
대식세포 수
이주 미세아교세포수
T 세포 수
NK 세포수
호중구 수
WL 제8일 PBS 없음
WL 제8일 PBS
WL 제8일 비드 없음
WL 제8일 비드

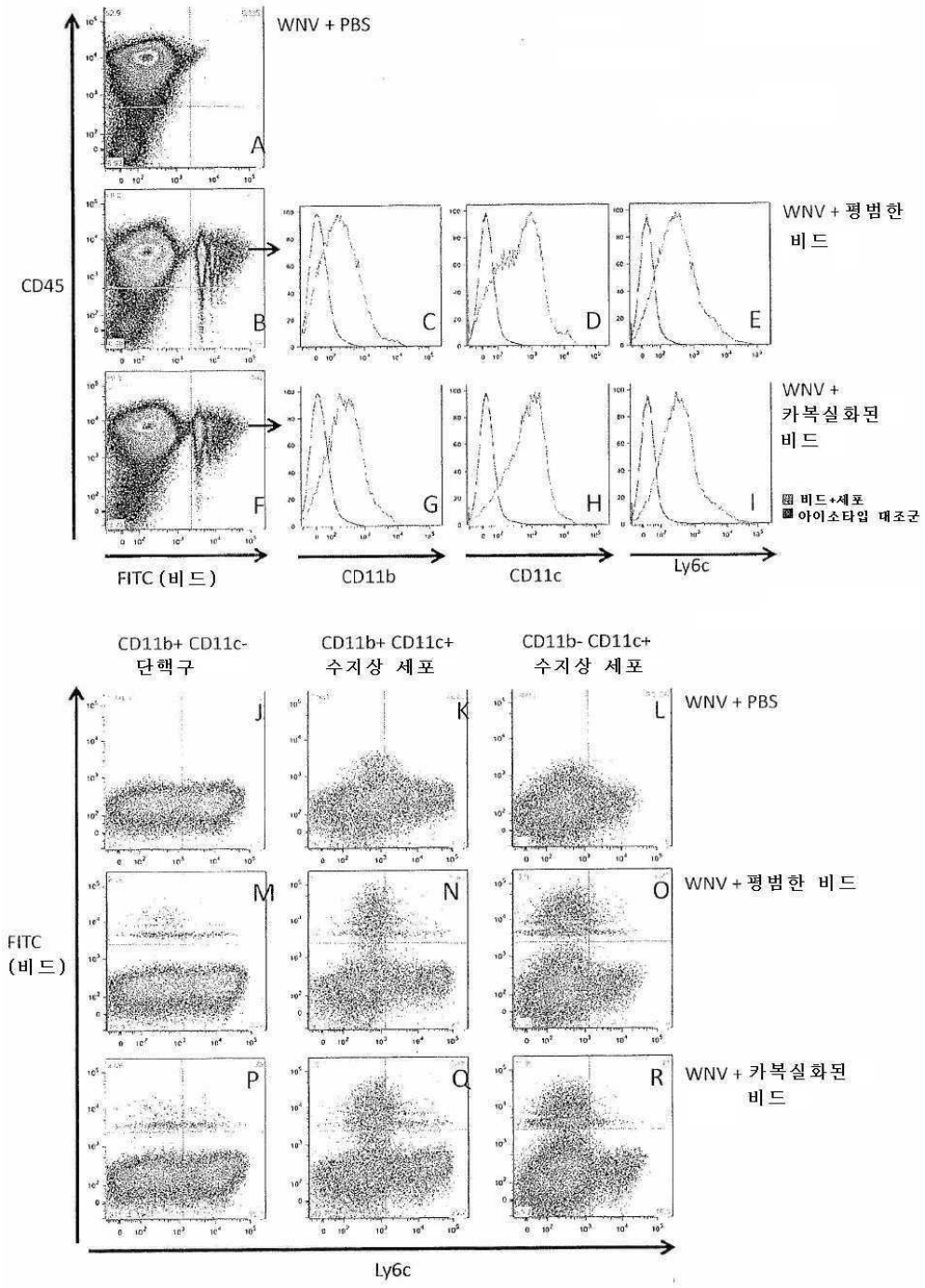
도면5


A
생존 백분율
일수
WL / 카복실화된 비드 처리 n=8
WL / 평범한 비드 처리 n=7
WL / PBS 처리 n=6
WL 없음 / 처리없음 n=18
PBS 대조군 n=5
B
체중손실%
감염 후 일수
WL / 카복실화된 비드 처리 n=8
WL / 평범한 비드 처리 n=7
WL / PBS 처리 n=6
WL 없음 / 처리없음 n=18
C
체중손실%
감염 후 일수
WL / 카복실화된 비드 처리 n=8
WL / 평범한 비드 처리 n=7
D
체중손실%
감염 후 일수
WL / PBS 처리 n=6
WL 없음 / 처리없음 n=18
E
F
G
WNV + PBS
H
I
J
K
WNV + 평범한 비드
패널 G
패널 H
패널 I
L
M
N
O
WNV + 카복실화된 비드
패널 K
패널 L
패널 M
SSC
FITC (비드)
CD45

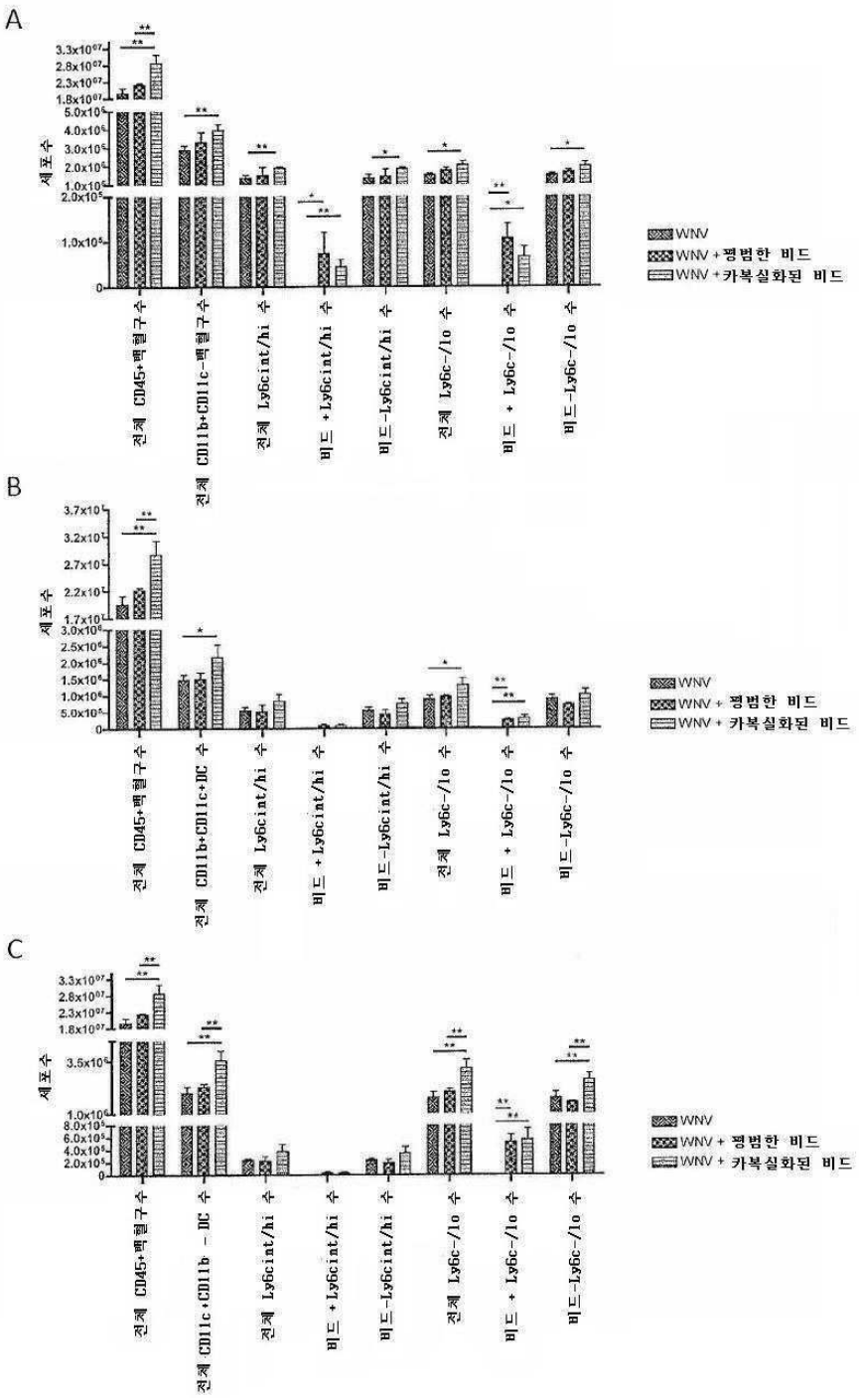
도면6


WNV + PBS
WNV + 평범한 비드
WNV + 카복실화된 비드
A
B
C
SSC
FITC (비드)
D
WNV
WNV + 평범한 비드
WNV + 카복실화된 비드
세포수
전체 CD45 + 백혈구 수
전체 CD45hi CD11b + 대식세포수
전체 CD45int CD11b + 활성화된 미세아교세포수
전체 CD45lo CD11b + 휴면 미세아교세포수
CD45 + NK1.1 + CD11blo/음성 NK 세포수
CD45 + CD3 + T 세포수
CD45 + Ly6G + Ly6C + CD11bhi 호중구
E
WNV
WNV + 평범한 비드
WNV + 카복실화된 비드
세포수
전체 CD45hi CD11b + 대식세포수
Ly6Chi 대식세포수
Ly6Cloint 대식세포수
Ly6C-대식세포수
전체 CD45int CD11b+활성화된 미세아교세포수
Ly6Chi 활성화된 미세아교세포수
Ly6Cloint 활성화된 미세아교세포수
Ly6C-활성화된 미세아교세포수
전체 CD45lo CD11b + 휴면 미세아교세포수
Ly6Chi 휴면 미세아교세포수
Ly6Cloint 휴면 미세아교세포수
Ly6C-휴면 미세아교세포수

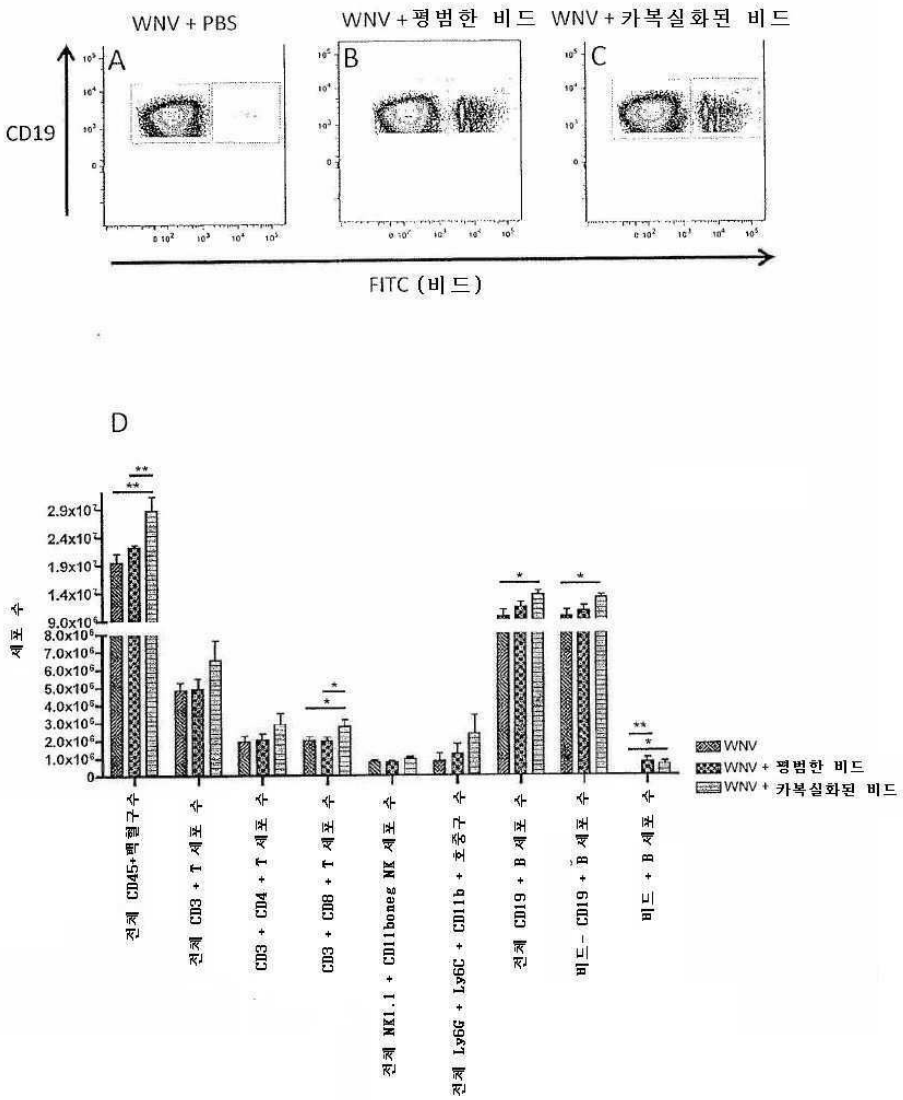
도면7


WNV + PBS
WNV + 평범한 비드
WNV + 카복실화된 비드
비드+세포
아이소타입 대조군
CD45
FITC (비드)
CD11b
CD11c
Ly6c
CD11b+ CD11c-
단핵구
CD11b+ CD11c+
수지상 세포
CD11b- CD11c+
수지상 세포
WNV + PBS
WNV + 평범한 비드
WNV + 카복실화된 비드
FITC
(비드)
Ly6c

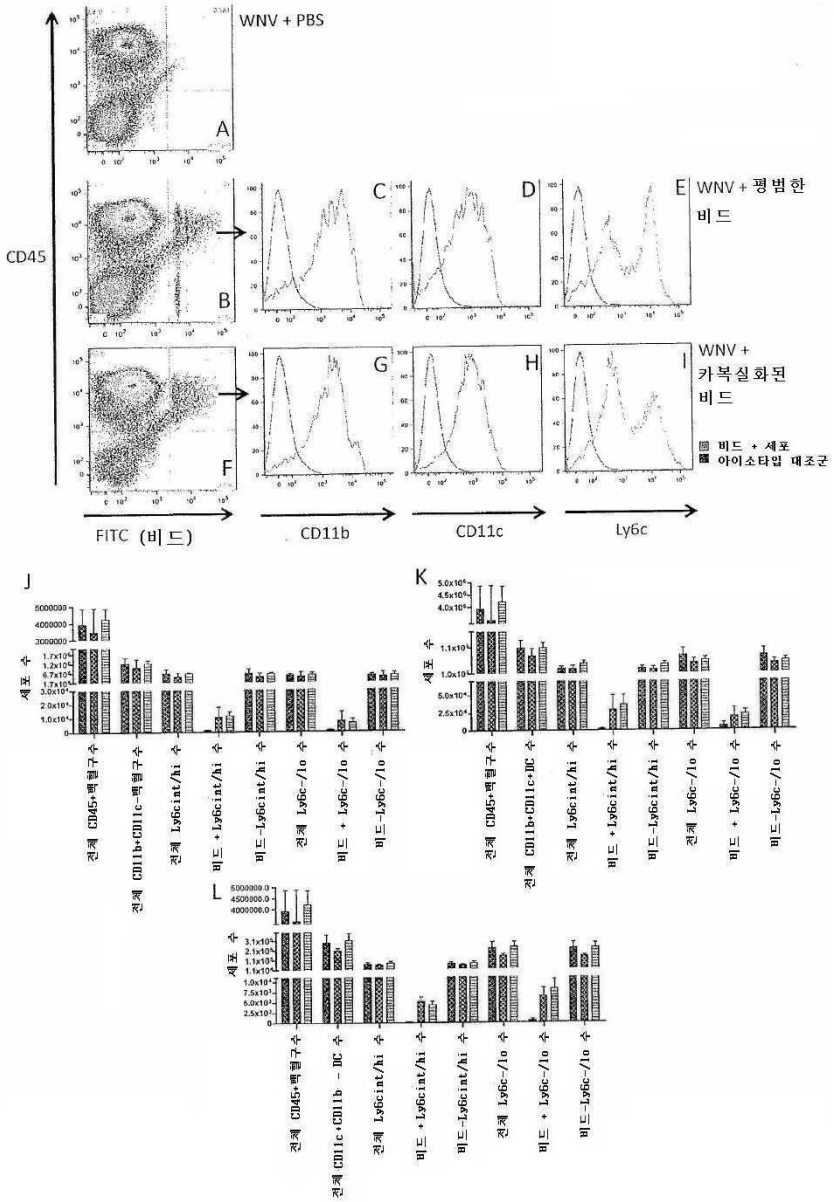
도면8


A
B
C
세포수
WNV
WNV + 평범한 비드
WNV + 카복실화된 비드
전체 CD45+백혈구수
전체 CD11b+CD11c+백혈구수
전체 CD11b+CD11c+DC 수
전체 CD11c+CD11b - DC 수
전체 Ly6cint/hi 수
비드 + Ly6cint/hi 수
비드-Ly6cint/hi 수
전체 Ly6c-/lo 수
비드 + Ly6c-/lo 수
비드-Ly6c-/lo 수

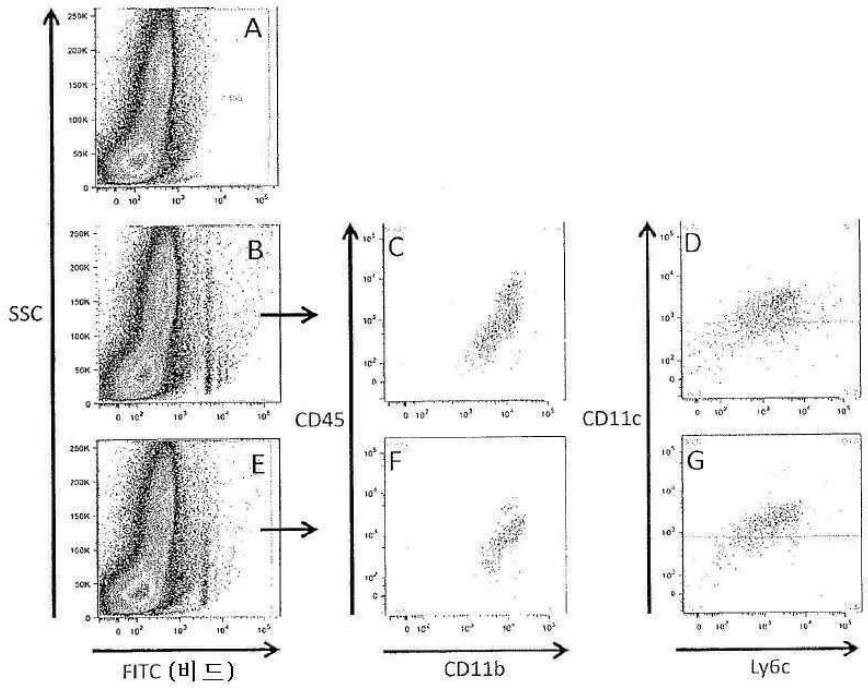
도면9


WNV + PBS
WNV + 평범한 비드
WNV + 카복실화된 비드
A
B
C
CD19
FITC (비드)
D
세포 수
2.9x10⁷
2.4x10⁷
1.9x10⁷
1.4x10⁷
9.0x10⁶
8.0x10⁶
7.0x10⁶
6.0x10⁶
5.0x10⁶
4.0x10⁶
3.0x10⁶
2.0x10⁶
1.0x10⁶
0
전체 CD45+백혈구 수
전체 CD3 + T 세포 수
CD3 + CD4 + T 세포 수
CD3 + CD8 + T 세포 수
전체 NK1.1 + CD11boneg NK 세포 수
전체 Ly6G + Ly6C + CD11b + 호중구 수
전체 CD19 + B 세포 수
비드- CD19 + B 세포 수
비드 + B 세포 수
WNV
WNV + 평범한 비드
WNV + 카복실화된 비드

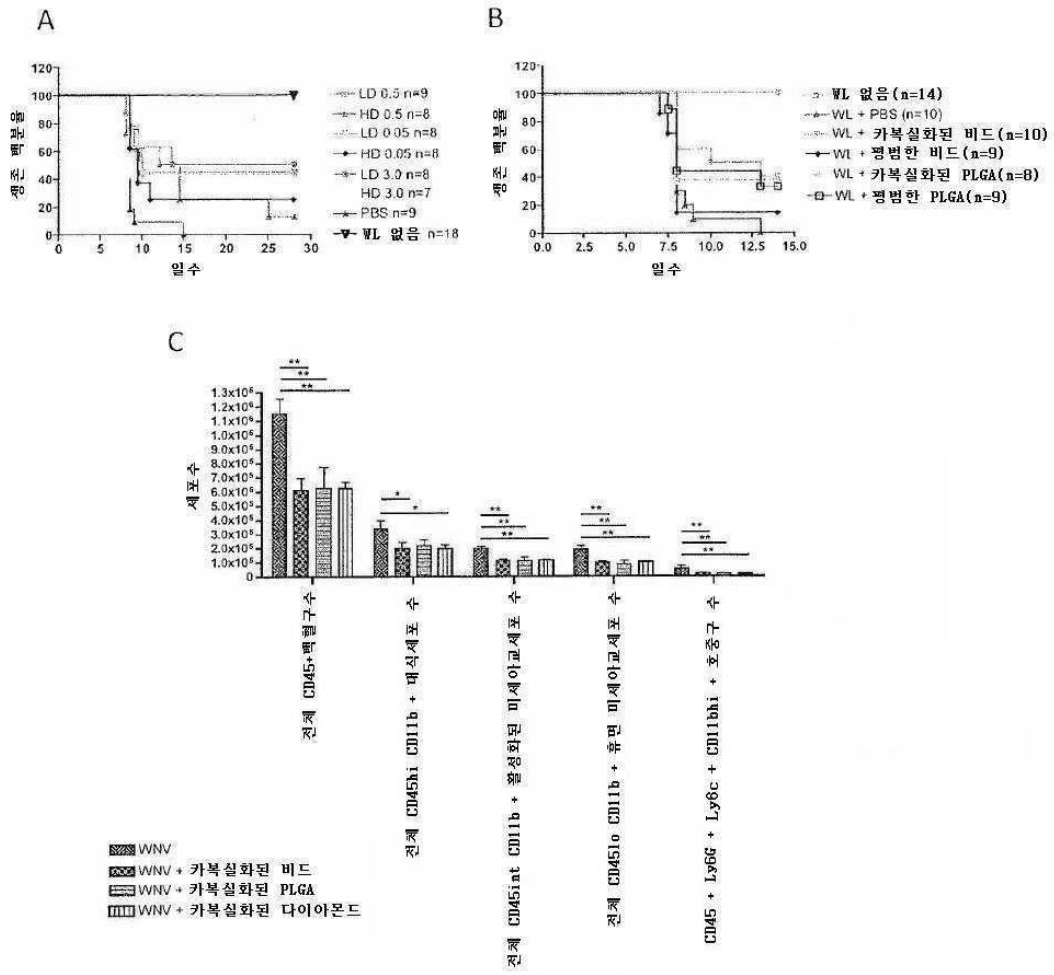
도면10


WNV + PBS
A
CD45
B
C
D
E
WNV + 평범한 비드
F
G
H
I
WNV + 카복실화된 비드
비드 + 세포
아이소타입 대조군
FITC (비드)
CD11b
CD11c
Ly6c
J
세포 수
전체 CD45+백혈구수
전체 CD11b+CD11c-백혈구수
전체 Ly6cint/hi 수
비드 + Ly6cint/hi 수
비드-Ly6cint/hi 수
전체 Ly6c-/lo 수
비드 + Ly6c-/lo 수
비드-Ly6c-/lo 수
K
전체 CD45+백혈구수
전체 CD11b+CD11c+DC 수
전체 Ly6cint/hi 수
비드 +Ly6cint/hi 수
비드-Ly6cint/hi 수
전체 Ly6c-/lo 수
비드 + Ly6c-/lo 수
비드-Ly6c-/lo 수
L
세포 수
전체 CD45+백혈구수
전체 CD11c+CD11b - DC 수
전체 Ly6cint/hi 수
비드 +Ly6cint/hi 수
비드-Ly6cint/hi 수
전체 Ly6c-/lo 수
비드 + Ly6c-/lo 수
비드-Ly6c-/lo 수

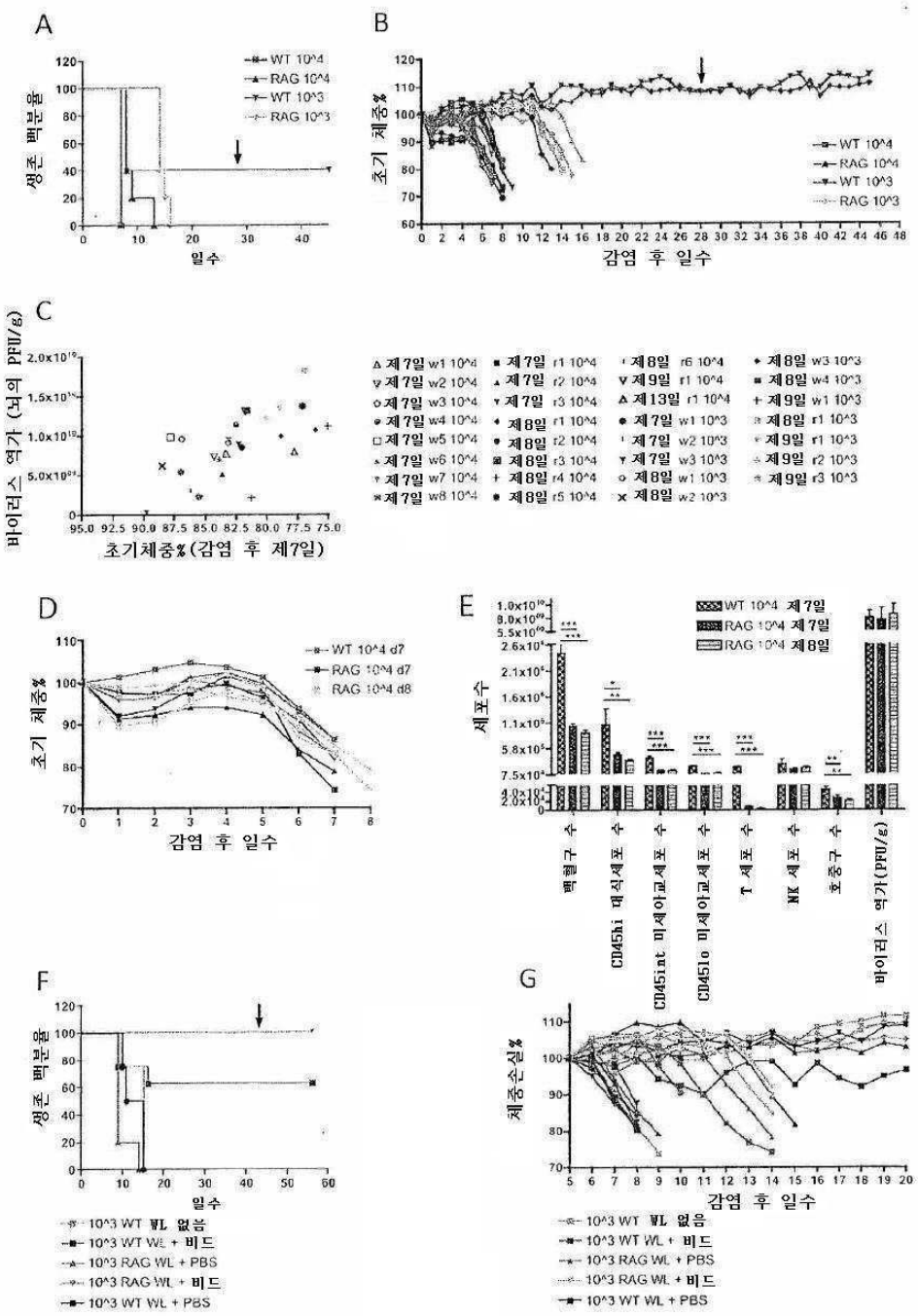
도면11


A
B
C
D
E
F
G
SSC
CD45
CD11c
FITC (비드)
CD11b
Ly6c

도면12


A
B
C
생존 백분율
일수
LD 0.5 n=9
HD 0.5 n=8
LD 0.05 n=8
HD 0.05 n=8
LD 3.0 n=8
HD 3.0 n=7
PBS n=9
WL 없음 n=18
WL 없음(n=14)
WL + PBS (n=10)
WL + 카복실화된 비드(n=10)
WL + 평범한 비드(n=9)
WL + 카복실화된 PLGA(n=8)
WL + 평범한 PLGA(n=9)
세포수
전체 CD45+백혈구수
전체 CD45hi CD11b + 대식세포 수
전체 CD45int CD11b + 활성화된 미세아교세포 수
전체 CD45lo CD11b + 휴면 미세아교세포 수
CD45 + Ly6G + Ly6c + CD11bhi + 호중구 수
WNV
WNV + 카복실화된 비드
WNV + 카복실화된 PLGA
WNV + 카복실화된 다이아몬드

도면13



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Getts, Daniel

Terry, Rachael

King, Nicholas

<120> Modified Immune-Modulating Particles

<130> GETT-001/01WO 314104-2003

<140> PCT/US2011/060537

<141> 2011-11-14

<150> US 61/413,018

<151> 2010-11-12

<150> US 61/413,016

<151> 2010-11-12

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu

1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys

20