

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6725413号
(P6725413)

(45) 発行日 令和2年7月15日(2020.7.15)

(24) 登録日 令和2年6月29日(2020.6.29)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/765 (2006.01)	A 6 1 K 31/765
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00

請求項の数 13 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-502223 (P2016-502223)	(73) 特許権者	515245424
(86) (22) 出願日	平成26年3月13日 (2014. 3. 13)		クール ファーマシューティカルズ ディ
(65) 公表番号	特表2016-515122 (P2016-515122A)		ベロップメント カンパニー インコーポ
(43) 公表日	平成28年5月26日 (2016. 5. 26)		レイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/026719		アメリカ合衆国, イリノイ州, ノースブル
(87) 国際公開番号	W02014/160465		ック サンダース ロード 2 2 1 5
(87) 国際公開日	平成26年10月2日 (2014. 10. 2)	(74) 代理人	100079108
審査請求日	平成29年3月10日 (2017. 3. 10)		弁理士 稲葉 良幸
審判番号	不服2019-1959 (P2019-1959/J1)	(74) 代理人	100109346
審判請求日	平成31年2月12日 (2019. 2. 12)		弁理士 大貫 敏史
(31) 優先権主張番号	61/779, 182	(74) 代理人	100117189
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013. 3. 13)		弁理士 江口 昭彦
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100134120
			弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症の治療のための免疫修飾粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする対象において、単球及び/又は好中球アポトーシスを誘導することによって炎症応答を寛解させるための、 $-75\text{ mV} \sim -40\text{ mV}$ のゼータ電位を有する乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) 粒子及び担体を含む医薬組成物であって、前記粒子が、結合したペプチド又は抗原性部分を含まない、医薬組成物。

【請求項 2】

前記粒子がカルボキシル化されている、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記粒子が、 $-50\text{ mV} \sim -40\text{ mV}$ 、又は -50 mV のゼータ電位を有する、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記粒子のポリ乳酸：ポリグリコール酸比が、50：50、80：20又は90：10である、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記粒子の粒径が、約 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $10\text{ }\mu\text{m}$ 、約 $0.3\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、約 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $3\text{ }\mu\text{m}$ 、約 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $1\text{ }\mu\text{m}$ 、又は約 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ である、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記それを必要とする対象が、自己免疫障害を有するか、移植レシピエントであるか、

10

20

虚血性再灌流損傷もしくはアテローム性動脈硬化症を有するか、心筋梗塞を患ったことがあるか、乾癬又は皮膚炎を有するか、アレルギー性障害を患うか、細菌又はウイルス感染を有するか、手術を受けたか又はこれから受けるか、或いは身体的外傷又は損傷を経験した、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記自己免疫障害が、多発性硬化症、強皮症、1 型糖尿病、リウマチ性関節炎、甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、レイノー症候群、シェーグレン症候群、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性心筋炎、炎症性腸疾患、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、セリアック病、潰瘍性大腸炎、及びクローン病からなる群から選択される、請求項 6 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 8】

前記アレルギー性障害が、湿疹、喘息、アレルギー性鼻炎、又は皮膚過敏症である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記ウイルス感染が、ヘルペスウイルス感染、肝炎ウイルス感染、西ナイルウイルス感染、フラビウイルス感染、インフルエンザ感染、ライノウイルス感染、パピローマウイルス感染、又はパラインフルエンザウイルス感染である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記ウイルス感染が、前記対象の中枢神経系に感染し、場合により、前記ウイルス感染が、ウイルス性脳炎又はウイルス性髄膜炎を引き起こす、請求項 9 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 11】

前記細菌感染が、前記対象の中枢神経系に感染し、場合により、前記細菌感染が、敗血症細菌性脳炎又は細菌性髄膜炎を引き起こす、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記粒子が、手術前、手術中、及び / 又は手術後に前記対象に投与される、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

それを必要とする対象に、経口、経鼻、静脈内、筋肉内、経眼、経皮、又は皮下投与される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2013 年 3 月 13 日出願の米国仮出願第 61 / 779, 182 号、2013 年 7 月 11 日出願の同第 61 / 844, 961 号、2013 年 8 月 13 日出願の同第 61 / 865, 392 号、及び 2013 年 10 月 4 日出願の同第 61 / 877, 212 号への優先権を主張し、これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

(電子的に提出されたテキストファイルの説明)

40

同封の電子的に提出されたテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読形式のコピー (ファイル名: COUR - 001_01WO_ST25.txt、記録日: 2014 年 3 月 13 日、ファイルサイズ 1.2 メガバイト)。

【背景技術】

【0003】

炎症性疾患及び障害は、異常あるいは無秩序な炎症応答が疾患の病因又は重症度に寄与する状態である。例としては、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、セリアック病、及び糖尿病などの自己免疫疾患、結核、並びに西ナイルウイルス脳炎を含む種々の形態の髄膜炎及び脳炎、そして心筋梗塞及び移植再灌流損傷などの虚血性再灌流疾患が挙げられる。加

50

えて、手術、損傷、又は他の組織外傷後に観察される炎症の増加は、患者の回復に悪影響を及ぼし得る。

【0004】

これらの疾患又は障害の多くは、組織損傷又は他の傷害の部位における多核/単核細胞浸潤を特徴とする。これらの浸潤において観察された単核細胞の例としては、リンパ球、特にTリンパ球、並びに単球、マクロファージ、樹状細胞、ミクログリア細胞、及び他のものなどの、単核食細胞系(MPS細胞)の細胞が挙げられる。

【0005】

単核細胞浸潤において観察される細胞の多くは、これらの異常炎症応答に関与することが疑われる。例えば、多発性硬化症などの疾患では、CD4⁺ T細胞が病的免疫応答において中心的役割を果たすことが知られている。T細胞活性化の早期の時点では、樹状細胞及び他のMPS細胞が、CD4⁺ T細胞の活性化の原因であり得る。MPS細胞も食作用を通して炎症に寄与するが、少なくとも一部の炎症性疾患では、このような細胞がCD4⁺ T細胞の不在下でそれが可能であるのかは明らかではない。

10

【0006】

末梢血単球は、発現に従って1つ若しくは2つ以上の群に分類され得るか、又はある特定の細胞表面分子のものではない。具体的には、ヒト「常在単球」又は「成熟単球」は、CD14⁺CD16⁺表現型(マウスの対応部分はCX₃CR1^{hi}CCR2⁻Gr1⁻である)を有すると理解されている。細胞の別の群「炎症性単球」又は「未熟単球」は、CD14⁺CD16⁻表現型(マウスの対応部分は(CX₃CR1^{lo}CCR2⁺Gr1⁺である)を有すると理解されている。(Geissmann F. et al. 2003 Immunity 19:71~82)

20

【0007】

炎症性単球は、広範な免疫介在性疾患及び障害に関与することが見出されている。炎症組織に進入すると、LY6C^{hi}炎症性単球は、やがては組織傷害、癒痕化、及び更には死亡に至る多数の炎症誘発性サイトカイン、プロテアーゼ、及び一酸化窒素を含む他のメディエータを分泌し得る、組織マクロファージ又は樹状細胞(DC)へと分化する。(Getts et al., 2008 J. Exp. Med. 205:2319~2337、Lin et al., 2011 J. Immunol. 186:508~515、Schhiopu et al., 2012 Atherosclerosis 223:291~298、Swirski et al., 2010 J. Clin. Invest. 120:2627~2634、Swirski et al., 2009 Science 325:612~616、Getts et al., J. Neuroinflamm. In press、Nahrendorf et al., 2010 Circulation 121:2437~2445)。炎症性単球の障害は、病変を減少させるだけでなく、ある特定の炎症状態においては修復機序の早期開始も可能にし得る。現在に至るまで、これらの転帰を変更する、炎症性単球を特異的に標的化するための安全かつ有効な療法は存在しない。医師らは、炎症性単球応答の成分を短期間中和する、広域作用性ステロイド、非ステロイド系抗炎症剤、又は抗体に頼っている。

30

【0008】

大部分の疾患状態における炎症性単球及び多形核細胞の役割、血流中のへのそれらの治療的到達性、及び粒子と相互作用するそれらの本質的傾向を考慮すると、粒子ベースの治療薬が、抗体又は小分子と比べて、これらの細胞を特異的に標的化することにより良く対応している可能性がある。現在に至るまで、この領域における研究は、予防接種を目的とした癌治療薬又は抗原性物質の送達の強化を可能にするための、ナノ粒子又は微粒子と共役した遅延放出性小分子治療薬の製剤化に集中した(De Jong et al., 2008 Int. J. Nanomedicine 3:133~149)。しかしながら、薬学的有効成分を担持しない粒子それ自体のインビボにおける免疫調節資質は、大抵の場合に見落とされてきた。

40

【0009】

50

自然の白血球クリアランス、及びアポトーシスを誘導する能力は、依然として、炎症由来のマクロファージ及び樹状細胞を含む特定の細胞サブセットと関連付けられる病変を減少させることを目的とする療法の主要目的であり続ける。驚くべきことに、ポリスチレン、ナノダイヤモンド、又は生分解性乳酸-グリコール酸共重合体由来の免疫修飾粒子（IMP）は、注入時に、コラーゲン構造を持つマクロファージ受容体（MARCO）を通して炎症性単球によって吸収され、それらがカスパーゼ3介在性アポトーシスを受ける脾臓における単球の遊走及び分画を引き起こすことが見出された。おそらくより驚くべきことに、炎症の急性モデルにおける免疫修飾粒子（IMP）の標的化した投与は、炎症の原発部位での炎症性単球の蓄積を減少させただけでなく、全モデルにおいて病変及び疾患重症度を減少させた。IMPは、炎症性単球によって引き起こされる又は増強される疾患に対する、汎用性があり容易に変換可能な治療選択肢である。IMPは、新規かつ安全な炎症性単球特異的療法を代表する。

10

【0010】

調節性T細胞（又はTreg）は、末梢における自己免疫及び一般的炎症を制御することにおいて重要な免疫調節細胞型である。Tregは、通常CD25を構造的に発現するCD4陽性細胞である。したがって、Tregは、多くの場合にCD4⁺CD25⁺T細胞である。これらの調節性T細胞は、感染性疾患、自己免疫、妊娠、及び腫瘍を含むがこれらに限定されない様々な炎症状態におけるT細胞介在性免疫の強力なサプレッサーである。インビボにおいて、少数のTregは、多数の活性化されたエフェクターT細胞を制御することができる。単離したばかりのTregは最小限の構成的エフェクター機能を呈するが、T細胞抗原受容体（TCR）をインビトロにおいてライゲーションすること又はマウスをインビボにおいて高用量の自己抗原で予備免疫することは、Tregのサプレッサー機能を刺激する。T細胞のサプレッサー機能を強化するためのTCRライゲーションに対する要件は、大部分のT細胞が構成的に発現される自己抗原を認識することから、逆説的である。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

Tregのサプレッサー機能を強化して、自己タンパク質に対する炎症応答を減少させることが、自己免疫疾患などの炎症状況において望ましい。逆に、例えば免疫応答を腫瘍に適用しようとする場合、Tregの機能を阻止すること、又はTregを、所望の標的に対する炎症性免疫応答が可能なエフェクターT細胞へと再プログラム化することのいずれかによって、Treg機能をオフにすることが望ましいことがある。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明には、修飾された粒子単独、つまり、ペプチドに結合していない粒子が、必要な患者において炎症性免疫応答を寛解させることに有効であるという驚くべき発見が関与する。驚くべきことに、炎症性免疫応答を減退させ、炎症性疾患を治療するために必要なのは、負に荷電した粒子の投与だけであり、それをペプチドに結合させる必要はない。

【0013】

一実施形態では、本発明は、負に荷電した粒子及び担体を含む薬学的組成物を対象に投与することを含む、対象において単球、顆粒球、及びノ又は好中球アポトーシスを誘導する方法を提供する。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、結合したペプチド又は抗原性部分を含まない。一部の実施形態では、負に荷電した粒子はポリスチレン粒子である。他の実施形態では、負に荷電した粒子はダイヤモンド粒子である。また他の実施形態では、負に荷電した粒子は、乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）粒子である。一部の実施形態では、粒子は、PLURONICS（登録商標）安定化ポリプロピレン硫化物粒子である。また他の実施形態では、負に荷電した粒子はカルボキシル化される。

40

【0014】

一実施形態では、本発明は、負に荷電した粒子及び担体を含む薬学的組成物を対象に投

50

与することを含む、対象における抗炎症性CD103+樹状細胞及び調節性T細胞の誘導及び増殖方法を提供する。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、結合したペプチド又は抗原性部分を含まない。

【0015】

一実施形態では、本発明は、負に荷電した粒子及び担体を含む薬学的組成物を対象に投与することを含む、炎症性障害を持つ対象中の炎症環境から炎症誘発性メディエータを除去するための方法を提供する。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、結合したペプチド又は抗原性部分を含まない。一部の実施形態では、負に荷電した粒子はポリスチレン粒子である。他の実施形態では、負に荷電した粒子はダイヤモンド粒子である。また他の実施形態では、負に荷電した粒子は、乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)粒子である。一部の実施形態では、粒子は、PLURONICS(登録商標)安定化ポリプロピレン硫化物粒子である。更なる実施形態では、負に荷電した粒子はカルボキシル化される。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、対象中で産生される炎症誘発性ポリペプチドに結合する。

10

【0016】

一実施形態では、本発明は、負に荷電した粒子及び担体を含む薬学的組成物を対象に投与することを含む、炎症性障害を持つ対象中の炎症環境からの調節タンパク質を濃縮し提示するための方法を提供する。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、結合したペプチド又は抗原性部分を含まない。一部の実施形態では、負に荷電した粒子はポリスチレン粒子である。他の実施形態では、負に荷電した粒子はダイヤモンド粒子である。また他の実施形態では、負に荷電した粒子は、乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)粒子である。一部の実施形態では、粒子は、PLURONICS(登録商標)安定化ポリプロピレン硫化物粒子である。更なる実施形態では、負に荷電した粒子はカルボキシル化される。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、対象中で産生される調節タンパク質に結合する。

20

【0017】

また更なる実施形態では、本発明は、負に荷電した粒子が濃縮調節タンパク質を濃縮し提示して、対象における炎症性免疫応答を寛解させるように、調節タンパク質を事前に吸収させた負に荷電した粒子を含む薬学的組成物を対象に投与することを含む、対象において病変状態の及び/又は不必要な炎症性免疫応答を制御するための方法を提供する。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、結合したペプチド又は抗原性部分を含まない。一部の実施形態では、負に荷電した粒子はポリスチレン粒子である。他の実施形態では、負に荷電した粒子はダイヤモンド粒子である。また他の実施形態では、負に荷電した粒子は、乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)粒子である。一部の実施形態では、粒子は、PLURONICS(登録商標)安定化ポリプロピレン硫化物粒子である。更なる実施形態では、負に荷電した粒子はカルボキシル化される。

30

【0018】

一実施形態では、中に1つ又は2つ以上の抗原が埋め込まれた負に荷電した粒子と、担体とを含む薬学的組成物を対象に投与することを含む、対象において抗原特異的寛容を誘導する方法を提供する。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、結合したペプチド又は抗原性部分を含まない。一部の実施形態では、負に荷電した粒子はポリスチレン粒子である。他の実施形態では、負に荷電した粒子はダイヤモンド粒子である。また他の実施形態では、負に荷電した粒子は、乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)粒子である。一部の実施形態では、粒子は、PLURONICS(登録商標)安定化ポリプロピレン硫化物粒子である。更なる実施形態では、負に荷電した粒子はカルボキシル化される。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、対象中で産生される炎症誘発性ポリペプチドに結合する。

40

【0019】

一実施形態では、粒子は、1つ又は2つ以上のエピトープを含む抗原に結合する。更なる実施形態では、エピトープは、アレルギー、自己免疫疾患、又は炎症性疾患若しくは障

50

害と関連付けられる。一実施形態では、エピトープは、1型糖尿病、多発性硬化症、セリアック病、又はクローン病若しくは大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎を含む、炎症性腸疾患と関連付けられる。一実施形態では、エピトープは、表1又は2に記載するエピトープである。一実施形態では、粒子は、1つの疾患及び/又は障害と関連付けられる1つのエピトープのみを含む抗原に結合させられる。更なる実施形態では、抗原は、同じ疾患及び/又は障害と関連付けられる2つ以上のエピトープを含む。更なる実施形態では、抗原は、異なる疾患及び/又は障害と関連付けられる2つ以上のエピトープを含む。

【0020】

一実施形態では、負に荷電した粒子は、約 - 100 mV 未満のゼータ電位を有する。別の実施形態では、負に荷電した粒子は、約 - 50 mV 未満のゼータ電位を有する。一実施形態では、負に荷電した粒子は、- 100 mV ~ 0 mV のゼータ電位を有する。一部の実施形態では、- 75 mV ~ 0 mV のゼータ電位を持つ負に荷電した粒子は、カルボキシル化される。別の実施形態では、負に荷電した粒子は、- 60 mV ~ 0 mV のゼータ電位を有する。別の実施形態では、負に荷電した粒子は、- 50 mV ~ 0 mV のゼータ電位を有する。特定の実施形態では、負に荷電した粒子は、- 50 mV ~ - 40 mV のゼータ電位を有する。別の実施形態では、負に荷電した粒子は、- 100 mV ~ - 50 mV のゼータ電位を有する。一実施形態では、負に荷電した粒子は、- 75 mV ~ - 50 mV のゼータ電位を有する。

10

【0021】

一実施形態では、本発明の薬学的製剤は、炎症性単球の炎症性病巣への浸潤を減少させる及び/又は阻害する。別の実施形態では、本発明の薬学的製剤は炎症性免疫応答を寛解させる。

20

【0022】

一実施形態では、本発明の薬学的製剤は調節性T細胞の数を増加させる。別の実施形態では、本発明の薬学的製剤は炎症性免疫応答を寛解させる。

【0023】

一実施形態では、本発明の薬学的製剤は、約 0.1 μm ~ 約 10 μm の平均粒径を持つ負に荷電した粒子を含む。別の実施形態では、負に荷電した粒子は、約 0.2 μm ~ 約 2 μm の平均粒径を有する。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、約 0.3 μm ~ 約 5 μm の平均粒径を有する。なお更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、約 0.5 μm ~ 約 3 μm の平均粒径を有する。また更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、約 0.5 μm の平均粒径を有する。

30

【0024】

一実施形態では、対象は、手術を受けたか、又はこれから受ける。更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、手術前に対象に投与される。なお更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、手術中に対象に投与される。なお更なる実施形態では、負に荷電した粒子は、手術後に対象に投与される。別の実施形態では、対象は移植レシピエントである。

【0025】

更なる実施形態では、対象は、直近に身体的外傷を経験している。更なる実施形態では、対象は、直近に損傷を経験している。なお更なる実施形態では、損傷はスポーツ損傷である。更なる実施形態では、損傷は震盪である。

40

【0026】

一実施形態では、対象は、自己免疫障害を有する。更なる実施形態では、自己免疫障害は、多発性硬化症、強皮症、1型糖尿病、リウマチ性関節炎、甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、レイノー症候群、シェーグレン症候群、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性心筋炎、炎症性腸疾患、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、セリアック病、潰瘍性大腸炎、又はクローン病である。特定の実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。更なる実施形態では、自己免疫疾患はセリアック病である。更なる実施形態では、自己免疫疾患は1型糖尿病である。更なる実施形態では、自己免疫疾患は、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患である。

50

【 0 0 2 7 】

一実施形態では、対象はアレルギー性障害を有する。更なる実施形態では、アレルギー性障害は、湿疹、喘息、アレルギー性鼻炎、又は皮膚過敏症である。別の実施形態では、対象は移植レシピエントである。

【 0 0 2 8 】

一実施形態では、対象は、虚血性再灌流損傷、アテローム性動脈硬化症を有するか、又は心筋梗塞を患ったことがある。別の実施形態では、対象は乾癬又は皮膚炎を有する。

【 0 0 2 9 】

一実施形態では、対象はウイルス感染を有する。更なる実施形態では、ウイルス感染は、ヘルペスウイルス感染、肝炎ウイルス感染、西ナイルウイルス感染、フラビウイルス、インフルエンザ感染、ライノウイルス感染、パピローマウイルス感染、又はパラインフルエンザウイルス感染である。更なる実施形態では、ウイルス感染は、該対象の中樞神経系に感染する。また更なる実施形態では、ウイルス感染は、ウイルス性脳炎又はウイルス性髄膜炎を引き起こす。

10

【 0 0 3 0 】

一実施形態では、対象は細菌感染を有する。更なる実施形態では、細菌感染は、該対象の中樞神経系に感染する。また更なる実施形態では、細菌感染は、敗血症細菌性脳炎又は細菌性髄膜炎を引き起こす。

【 0 0 3 1 】

更なる実施形態では、本発明の粒子の投与は、対象において好中球及び他の顆粒球を引き起こす可能性のある病変の蓄積を予防する。更なる実施形態では、対象は癌を有する。

20

【 0 0 3 2 】

一実施形態では、本発明の粒子の投与は、対象において傷害組織の再生を増加させる。一実施形態では、本発明の粒子の投与は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）又は外傷後ストレス障害（PTSD）を持つ対象における傷害組織の再生を増加させる。更なる実施形態では、粒子の投与は、上皮細胞の再生を増加させる。なお更なる実施形態では、粒子の投与は、ニューロンの再ミエリン化を増加させる。別の実施形態では、対象は自己免疫疾患を有する。なお別の実施形態では、対象は、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、及び/又はクローン病を有する。なお別の実施形態では、対象は多発性硬化症を有する。一実施形態では、負に荷電した粒子の投与は、対象において抗原特異的寛容を誘導する。一実施形態では、抗原特異的寛容を誘導する粒子は、アレルギー、自己免疫疾患、及び/又は炎症性疾患と関連付けられる1つ又は2つ以上のエピトープを含む。一実施形態では、エピトープは、表1又は2に記載するものから選択される。一実施形態では、負に荷電した粒子は、ポリスチレン粒子、ダイヤモンド粒子、PLURONICS（登録商標）安定化ポリプロピレン硫化物粒子、又は乳酸-グリコール酸共重合体粒子である。一実施形態では、粒子はカルボキシル化される。一実施形態では、粒子は、約-100mV未満のゼータ電位を有する。一実施形態では、粒子は、約-75mV~0mV、例えば、-50mV~0mV、又は-100mV~-50mV、又は-75mV~-50mV、又は-50mV~-40mVのゼータ電位を有する。一実施形態では、粒子は、約0.1μm~約10μm、例えば、約0.2μm~約2μm、又は約0.3μm~約5μm、又は0.5μm~約3μm、又は約0.5μm~約1μmの平均粒径を有する。

30

40

【 0 0 3 3 】

一実施形態では、対象は自己免疫疾患を有する。一実施形態では、自己免疫疾患は、多発性硬化症、強皮症、1型糖尿病、リウマチ性関節炎、甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、レイノー症候群、シェーグレン症候群、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性心筋炎、炎症性腸疾患、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、セリアック病、潰瘍性大腸炎、又はクローン病である。一実施形態では、粒子は、1つ又は2つ以上のミエリン塩基性タンパク質エピトープを含む。一実施形態では、ミエリン塩基性タンパク質エピトープは、配列番号4975又は配列番号4976のうちの1つ又は2つ以上である。一実施形態では、粒子は、1つ又は2つ以上のミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質エピトープを含む。

50

一実施形態では、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質エピトープは、配列番号 1 又は配列番号 4 9 7 8 のうちの 1 つ又は 2 つ以上である。一実施形態では、粒子は、1 つ又は 2 つ以上のインスリンエピトープを含有する。一実施形態では、1 つ又は 2 つ以上のインスリンエピトープは、配列番号 4 9 8 1 である。一実施形態では、粒子は、1 つ又は 2 つ以上のグルタミン酸デカルボキシラーゼエピトープを含む。一実施形態では、グルタミン酸デカルボキシラーゼエピトープは、配列番号 4 9 8 2 である。一実施形態では、粒子は、1 つ又は 2 つ以上のプロテオリピドタンパク質エピトープを含有する。一実施形態では、プロテオリピドタンパク質エピトープは、配列番号 4 9 7 7 である。一実施形態では、粒子は、1 つ又は 2 つ以上のグリアデン (gliaden) エピトープを含む。一実施形態では、グリアデンエピトープは、配列番号 4 9 8 3 ~ 4 9 8 5 を含む。

10

【0034】

一実施形態では、本方法は、負に荷電した粒子を任意の好適な手段によって投与することを含む。一実施形態では、本組成物は、経口、経鼻、静脈内、筋肉内、経眼、経皮、又は皮下投与される。特定の実施形態では、カルボキシル化された粒子は、経鼻投与される。また別の実施形態では、負に荷電した粒子は、静脈内投与される。また別の実施形態では、負に荷電した粒子は、皮下投与される。

【0035】

一実施形態では、本方法は、対象中の炎症状態を診断する方法を含む。特定の実施形態では、本方法は、対象から血液を取り出し、その血液又はそれに由来する血清 / 血漿を負に荷電した粒子と共にインキュベートし、表 6 に列挙するタンパク質の存否を決定することを含み、表 6 の 1 つ又は 2 つ以上のタンパク質の存在は、炎症性免疫応答を示す。別の実施形態では、本方法は、負に荷電した粒子を含む薬学的組成物を対象の血液循環中に注射し、続いて粒子を血液循環から取り出し、対象から取り出した粒子の表面における表 6 に列挙するタンパク質の存否を決定することを含み、表 6 の 1 つ又は 2 つ以上のタンパク質の存在は、炎症性免疫応答を示す。

20

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図 1】(A ~ G) は、PS - IMP による WNV 感染マウスの処置が疾患病変を寛解させる能力を示す。5 % 以上の体重減少時における PS - IMP による WNV 感染マウスの処置は、さもなければ感染により死亡したはずのマウスの 60 % の生存をもたらした (a)。この作用は、ポリスチレン中性粒子 (PSNP) で処置したマウスにおいて有意に減退し、ピヒクル対照においては不在であった (a)。免疫付与後 7 日目の WNV 感染マウスの脳への炎症性単球由来マクロファージの浸潤は、ポリスチレン免疫修飾粒子 (PS - IMP) で処置したマウスにおいて有意に減少し、NP で処置したマウスではより少ない程度に減少した (b)。乳酸 - グリコール酸共重合体免疫修飾粒子 (PLGA - IMP) 又はナノダイヤモンド (ND) - IMP による WNV 感染動物の処置は、さもなければ感染により死亡したはずのマウスの約 60 % の生存をもたらした (c)。ポリスチレン系のポリスチレン正荷電粒子 (PS - PP) による WNV 感染マウスの処置が、免疫付与後 7 日目の脳への炎症性単球マクロファージ浸潤を減少させず (d)、あるいは生存も向上させなかった (e) ため、IMP の負電荷はこの作用に不可欠である。WNV 感染マウスの生存を促進するのに最適な PS - IMP の用量は、約 4×10^9 個の粒子に相当する 0.355 mg であると決定した (f, g)。生存データは、1 群当たり 10 ~ 20 匹のマウスによる 3 つの別個の実験を代表する。マンテル・ヘンツェルログランク検定を使用して統計分析を実施した。フローサイトメトリーデータは、平均値 \pm 標準偏差であり、1 群当たり 4 ~ 5 匹のマウスによる 3 つの別個の実験を代表する。一元配置 ANOVA 及びテューキー・クレーマー事後検定を使用して統計分析を実施した。PS - IMP 及び NP 群とピヒクル対照群との比較において、P 値 0.05 以下 (*), P 値 0.01 以下 (**), P 値 0.001 以下 (***)。PS - IMP 群と NP 群との比較において、P 値 0.05 以下 (#), P 値 0.01 以下 (##), P 値 0.001 以下 (###)。

30

40

【図 2】(A ~ G) は、PS - IMP で処置したときの脾臓への IM の方向転換を示す。

50

静脈内注射から24時間後、FITC-PS-IMPは、肺、脾臓、及び肝臓に局在し、少数が、脳、腎臓、又は胸腺で観察される(a)。脾臓では、FITC-PS-IMPは、擬似感染動物におけるほぼ同数のLy6C^{hi} IM、B220⁺ B細胞、CD3⁺ T細胞、及びNK1.1⁺ NK細胞と関連付けられた(b、c)。WNV感染動物では、FITC-PS-IMPは、主にLy6C^{hi} IMに局在した(b、c)。(d)脾臓を、免疫付与後7日目にフローサイトメトリーに対して処理し、生細胞(R1)をゲーティングした。この集団から、CD45⁺白血球を選択し(R2)、CD11b⁺、Ly6G⁻単球をゲーティングしてLy6G⁺好中球の少数の集団を除外した(R3、d)。FITC-PS-IMPは、擬似感染動物におけるLy6C^{lo}単球とは対照的に、WNV感染動物におけるLy6C^{hi} IMと関連付けられることを見出した(e) 10。PS-IMPの注入、及び程度は小さいにせよNPの注入は、WNV感染動物の免疫付与後7日目の脾臓におけるLy6C^{hi} IMの蓄積(f)、及び血中のこれらの細胞数の有意な減少(g)をもたらした。免疫組織化学データは、1群当たり3匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。スライドをDAPI(青色)で対比染色して、細胞核を特定した。フローサイトメトリーデータは、平均値±標準偏差であり、1群当たり4~5匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。一元配置ANOVA及びテューキー・クレーマー事後検定を使用して統計分析を実施した。PS-IMP及びNPとビヒクル対照群との比較において、P値0.05以下(*)、P値0.01以下(**)、P値0.001以下(***)。PS-IMP群とNP群との比較において、P値0.05以下(#)、P値0.01以下(##)、P値0.001以下(###)。

【図3】(A~F)は、PS-IMP処置が、WNV感染マウスのCNSへの炎症性単球のホーミングを減少させることを示す。Ly6C^{hi}/CD11b⁺/CD11c⁻/Ly6G⁻ IMを、免疫付与後6日目の擬似感染ドナー及びWNV感染ドナーの骨髄から単離し、PKH26によって標識し、免疫付与後6日目の適合レシピエントに注射し、その直後にビヒクル、NP、又はPS-IMPを別個に注射した(a)。脳(b)及び脾臓(c)を、免疫付与後7日目にフローサイトメトリーに対して処理し、CD45^{hi}/CD11b⁺マクロファージをゲーティングした(R1)。PS-IMPは、養子導入したPKH26⁺/Ly6C^{hi}骨髄由来のIMの脳(b、d)への浸潤を有意に減少させ、このことは、脾臓(c、e)におけるPKH26⁺細胞の蓄積と相関する。養子導入したIMの70%超が、脾臓におけるFITC-PS-IMP(すなわち、PKH26⁺/FITC⁺細胞、g、R1)を取り込み、CD11c及びCD103(g、R2)を発現する細胞に分化したことを見出した。5%の体重減少時における脾摘マウスへのPS-IMP注入(f)は、脳への単球輸送の減少に失敗し、PS-IMP-及びビヒクル処置動物は、フローサイトメトリーによって決定したところ、ほぼ同数の単球を有した(f)。フローサイトメトリーデータは、平均値±標準偏差であり、1群当たり4~5匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。一元配置ANOVA及びテューキー・クレーマー事後検定を使用して統計分析を実施した。PS-IMP及びNPとビヒクル対照群との比較において、P値0.05以下(*)、P値0.01以下(**)、P値0.001以下(***)。PS-IMP群とNP群との比較において、P値0.05以下(#)、P値0.01以下(##)、P値0.001以下(###)。

【図4】(A~I)は、炎症性単球がIMP活性に不可欠なMARCOを発現することを示す。PS-IMPを、チオグリコール酸塩によって炎症を起こした腹膜への単球の遊走を阻害するその能力について試験した(レジメンはaに示す)。WT及びMARCO^{-/-}マウスは、腹膜から単離したLy6C^{hi}/CD11b⁺単球(IM)の数によって決定したところ、チオグリコール酸塩注射と同様に応答した(b、e)。PS-IMP処置(aに示す通り)は、チオグリコール酸塩を注射したWT動物において、48時間で腹腔へのIM浸潤を有意に減少させたが、MARCO^{-/-}マウスの腹腔から単離したIMは減少させなかった(b、e)。FITC-PS-IMP(緑色)は、脾臓の辺縁帯におけるMARCO⁺(赤色蛍光)細胞と関連付けられることを見出した(c)。WNV感染は、IM上のMARCO発現を上方調節する(d)。チオグリコール酸塩を注射し 50

たWTマウスにおいては、PS-IMP処置は、MARCO⁺/動物中では観察されなかった脾臓におけるIMの数の有意な増加と関連付けられた(b、e)。MARCO⁺/動物と比較して有意に数の多いPS-IMP⁺Ly6C^{hi}IMが、チオグリコール酸塩を注射したWTマウスの脾臓から単離された(f)。チオグリコール酸塩誘導性WTマウスへのPS-IMPの注入は、アポトーシスマーカーであるアネキシンV(g、h)及びカスパーゼ-3(i)を発現したLy6C^{hi}IMの数の有意な増加をもたらした。これは、MARCO⁺/動物中では観察されなかった。フローサイトメトリーデータは、平均値±標準偏差であり、1群当たり4~5匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。一元配置ANOVA及びテューキー・クレーマー事後検定を使用して統計分析を実施した。WT PS-IMP群と全ての他の群との比較において、P値0.05以下(*)、P値0.01以下(**)、P値0.001以下(***)。

【図5】(A~S)は、PS-IMPが、EAE、心筋炎症、及び炎症性腸疾患における疾患病変及び炎症性単球の浸潤を寛解させることを示す。PLP₁₃₉₋₁₅₁で免疫付与したSJLマウスにおけるEAE(a)又は最初の再発(b)の発症時に開始するPLGA-IMP注入は、平均臨床スコアを有意に減少させた。免疫付与後7日目から7日間、PLGA-IMP又はビヒクルのいずれかで処置したマウスからの脊髄へのフローサイトメトリーは、減少したCD45⁺CD11b⁺CD11c⁺Ly6C^{hi}細胞によって決定したところ、有意に少ない炎症を有した(c)。これは脊髄への単球流入を減少させ、このことは、脾臓におけるCD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺単球の増加と相関する(d)。炎症の別モデルとして、PLGA-IMP(hに示すように注入した)を永久的左前下行枝閉塞モデル中でも試験した。(h)に示す通りの3日間のPLGA-IMP注入は、ビヒクル処置対照と比較して、材料及び方法に記載するH&E組織学検査及び画像分析によって決定したところ、梗塞サイズの減少をもたらした(i、j)。加えて、減少した閉塞サイズは、ビヒクル処置対照と比較したPLGA-IMP処置マウスにおけるより少数のCD68⁺マクロファージと相関した(k、l、赤色蛍光)。炎症の別モデルでは、動脈を45分間結紮し、その後血流を戻した。(m)で示すように、マウスを6日間PLGA-IMPで処置した。1日目及び5日目で、血清クレアチニンクリアランスは、ビヒクル処置対照と比較して、IMPで処置した動物において有意に大きかった(n)。このことは、IMPで処置した動物における尿細管萎縮の減少と相関した(o)。炎症の別モデルとして、(p)に示すPS-IMP又はビヒクルのための注入レジメンを用いて、PS-IMP療法をDSS誘導性大腸炎モデルにおいて試験すると、これは、DSS誘導性大腸炎の全体的な臨床重症度を減少させた(q)。減少した臨床スコアは、単球(すなわち、非多形核球)形態を持つ減少した数のGr-1⁺細胞と相関した(r、s)。EAE平均臨床スコアデータは、1群当たり10~20匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。フローサイトメトリーデータは、平均値±標準偏差であり、1群当たり4~5匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。心筋梗塞データは、1群当たり少なくとも3匹のマウスによる2つの実験の代表である。腎臓虚血再灌流データは、1群当たり少なくとも4~5匹のマウスによる2つの実験の代表である。DSS大腸炎データは、1群当たり少なくとも3匹のマウスによる少なくとも3つの実験の代表である。画像分析を、材料及び方法に記載する通りに行った。不对で両側のスチューデントのT検定を使用して、統計分析を実施した。PS-IMPとビヒクル対照群との比較において、P値0.05以下(*)、P値0.01以下(**)、P値0.001以下(***)。事後のボンフェローニの補正を用いた二元配置分散分析(ANOVA)の使用による比較のための統計分析(Graph Pad Prism 6.0ソフトウェア)。* p値0.05未満、** p値0.01未満、*** p値0.001未満。擬似についてはn=5、1日目については1群当たりn=7、対照群に対する5日目についてはn=4~5(3匹の動物が3~4日目で死亡したため)。尿細管スコアデータが含まれるように4.3日目あたりでは1つの試料のみ採集し、5日目陰性ビーズについてはn=7であった。

【図6】(A~P)は、IMP処置が、WNV感染脳における炎症性サイトカインレベルを有意に減少させることを示す。擬似感染及びWNV感染マウスを、免疫付与後6日目に

10

20

30

40

50

PS-IMPで処置し、免疫付与後7日目に脳を単離及び均質化した。多重ELISAを使用してサイトカイン及びケモカインレベルを分析した。IMPで処置したWNV感染動物の脳において、対照と比較して有意に減少したレベルのCCL2(a)、IFN-(b)、IL-6(c)、TNF(d)、IL-10(e)、IL-4(f)、CCL3(g)、IL-12(h)、GM-CSF(k)、IL-1(l)、IL-9(n)、IL-1(o)、及びIL-2(p)が観察された。IL-3(h)、CCL5(j)、及びIL-15(m)のレベルは、IMP処置によって有意に減少はしなかった。

【図7】(A~F)は、少数のIMPがWNV感染脳中で見出され、IMPが腹膜炎における炎症性単球の減少に非常に有効であることを示す。鮮やかな青色のNP又はPS-IMPは、免疫付与後6日目の注射後の免疫組織化学検査によって、免疫付与後7日目のWNV感染脳中で検出できなかつた(a)。同様に、FITC-NP又はPS-IMPも、フローサイトメトリーによってWNV感染脳中で検出できなかつた(b)。PS-IMPを、(c)に示すように、C57BL/6マウスにおけるチオグリコール酸塩腹膜炎のモデル中で試験した。チオグリコール酸塩注入から24時間後のPS-IMP注入は、腹膜から単離されたLy6^{ch}iCD11^{b+}(R3)単球の数を減少させた(c、d)。この作用は、脾摘マウスにおいては無効にされた(e)。粒子の免疫組織化学検査及びフローサイトメトリーデータは、1群当たり少なくとも3匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。スライドをDAPI(青色)で対比染色して、細胞核を特定した。チオグリコール酸塩データは、1群当たり5匹のマウスによる少なくとも3つの実験の代表である。フローサイトメトリーデータは、平均値±標準偏差であり、1群当たり4~5匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。

【図8】(A~G)は、IMPが、EAE、心筋梗塞、及びDSS誘導性大腸炎における上皮の修復中に脾臓でのIMの蓄積を促進することを示す。CD45⁺CD11b⁺単球由来細胞の有意に減少した浸潤が、PLGA-IMP注入後に14日目のEAE脳中で観察された(a)。脳における単球由来細胞の減少は、ビヒクル処置対照と比較したPLGA-IMP処置動物の脾臓におけるIMの有意な蓄積に対応した(b)。心筋梗塞後、ビヒクル処置対照と比較して、脾臓におけるIMの有意な蓄積がPLGA-IMP処置動物中で観察された(c、d)。DSSチャレンジ9日目の横行結腸のKi67⁺免疫組織化学染色(f)は、H₂O対照群と比較して、上皮における特徴的なKi67⁺染色を見せ、DSSチャレンジ動物中では染色は比較的弱かつた(f)。より少ない腺窩降下物が、PS-IMPで処置したDSSチャレンジ動物中で観察された(f)。また更に、これらの動物中では、Ki67⁺染色が固有層においてより頻繁かつ強烈であった。DSS誘導性大腸炎ビヒクル対PS-IMPを比較する画像分析(g)は、観察されたKi67の差異が統計的に有意であったことを示した。EAEデータは、平均値±標準偏差であり、1群当たり4~5匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。心筋梗塞データは、1群当たり少なくとも3匹のマウスによる2つの実験の代表である。DSS大腸炎データは、1群当たり少なくとも3匹のマウスによる少なくとも3つの実験の代表である。画像分析を、材料及び方法に記載する通りに行った。不对で両側のスチューデントのT検定を使用して、統計分析を実施した。PS-IMPとビヒクル対照群との比較において、P値0.05以下(*)、P値0.01以下(**)、P値0.001以下(***)。

【図9】オプソニン化IMPが、脳へのマクロファージの遊走を阻害する能力を減少させたことを示す。7日目の血漿を、擬似又はWNV感染動物から採取し、PS-IMPと共にインキュベートした。これらの「オプソニン化」粒子又は未オプソニン化(未処理ビーズ)粒子を、免疫付与後6日目でWNV感染マウスに再注入した。7日目に、脳をフローサイトメトリーによって炎症性単球の流入について検査した。未処理IMP(正常IMP)は脳への単球流入の減少をもたらしたが、擬似血漿でコーティングしたIMPは、単球の遊走を阻害する能力は有しなかつた。目的とするWNV血清でコーティングしたIMPは、コーティングしていないIMPと比べて単球を阻害する能力は弱かつたが、それでもある程度遊走を減少させることはできた。

【図10】PLGA-IMPが、炎症性単球と好中球との両方においてTGモデル中でア

10

20

30

40

50

ポトーシスを誘導することを示す。チオグリコール酸塩誘導性WTマウスへのPLGA-IMPの注入は、アポトーシスマーカーであるアネキシンV及びカスパーゼ-3を発現したLy6C^{hi}IM及びLy6G⁺好中球の数の有意な増加をもたらした。これは、擬似処置動物においては観察されなかった。フローサイトメトリーデータは、平均値±標準偏差であり、1群当たり4~5匹のマウスによる3つの別個の実験を代表する。一元配置ANOVA及びテューキー・クレーマー事後検定を使用して統計分析を実施した。WT PS-IMP群と全ての他の群との比較において、P値0.05以下(*)、P値0.01以下(**)、P値0.001以下(***)。

【図11】(A及びB)は、アポトーシスが、PLGA又はPS IMP注入後2時間以内に検出可能であることを示す。注射から2時間後、PS-IMPは、擬似及びTG腹膜炎を誘導したマウスの脾臓におけるCD11b+Ly6C+Ly6G-単球に局在した。PS-IMPの取り込みは酵素カスパーゼ-3の活性と関連付けられ、これは、アポトーシスを示す(a)。単球の数の増加は、PS-IMPで処置したTG腹膜炎を誘導したマウスにおけるカスパーゼ-3活性に対して陽性であった(b)。

【図12】PLGA-IMPが、心筋梗塞モデルにおいて炎症性傷害から保護することを示す。4日間のPLGA-IMP注入は、ビヒクル処置対照と比較して、H&E組織学検査及び画像分析によって決定したところ、梗塞サイズの減少をもたらした。加えて、減少した閉塞サイズは、ビヒクル処置対照と比較したPLGA-IMP処置マウスにおけるより少数のCD68+マクロファージ、及び脾臓におけるLy6C^{hi}細胞の増加と関連した。

【図13】PLGA-IMP注入が、心筋虚血(LAD閉塞)再灌流モデルにおいて炎症性傷害から保護することを示す。冠動脈を閉塞させ、30分後に血流を戻した。マウスを4日間PLGA-IMPで処置した。PLGA-IMPによる処置は、PBS対照動物と比較して、梗塞瘢痕サイズ及び収縮期の駆出率を有意に減少させた。

【図14】(A)は、ラクチド-グリコリド共重合体(PLG)粒子の顕微鏡写真を示す。B及びCは、PLG-PEMA粒子の平均粒径(nm)及び電位(mV)を含む、動的光散乱分析による表面機能化ラクチド-グリコリド共重合体粒子の特徴化を示す。表面機能化ラクチド-グリコリド共重合体粒子を、18.2Mの水中で毎秒 2.5×10^5 計数の計数速度でMalvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments, Westborough, MA)において分析した。表面機能化ラクチド-グリコリド共重合体粒子の集団は、バッチ当たり5~15%異なったが、概して、567nmのZ平均粒径、670nmのピーク粒径、及び0.209の多分散性指数を有した。

【図15】(A)は、PLGA-IMP注入が、EAEにおいて炎症性傷害から保護することを示す。処置中止時には無病期間があるが、時間と共に疾患は再発する。(B)PLGA-IMP注入(しかしビヒクル対照ではない)は、抗炎症性タンパク質様PD-1を発現する調節性T細胞の増殖及び誘導をもたらす。(C)これらのTregは、IMP処置中に最も豊富であり、処置中止後に時間と共に衰える。

【図16】(A)炎症性障害を持つ対象の血液からの病原性タンパク質及び細胞残屑の除去、並びに(B)炎症性障害を持つ対象の血流からの調節タンパク質の濃縮及び提示を示す。

【図17】対象が炎症プロセスを受けているか否かを決定するために、負に荷電した粒子が対象の血清からタンパク質の存否を決定することができるという概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0037】

本発明者らは、驚くべきことに、ある特定の粒径及びゼータ電位のポリスチレン、PLGA、又はダイヤモンド粒子などの負に荷電した粒子が対象に投与されると、炎症性免疫応答が寛解することを見出した。加えて、本発明者らはまた、驚くべきことに、これらの同じ負に荷電した粒子が、対象に投与されるときに、対象において単球及び/又は好中球アポトーシス、並びに向上したクリアランスを誘導することも見出した。これらの同じ負

10

20

30

40

50

に荷電した粒子が、対象に投与されるときに、寛容原性樹状細胞、サプレッサー細胞、及び調節性T細胞を誘導することもまた驚くに値した。これらの負に荷電した粒子は、炎症環境から炎症誘発性メディエータを除去することも見出された。同様に、負に荷電した粒子はまた、調節性メディエータを濃縮及び提示して、調節性T細胞応答を更に誘導するか、あるいは炎症性免疫応答を寛解させる。負に荷電した粒子は、したがって、自己免疫疾患などの過剰な炎症性免疫応答を特徴とするあらゆる疾患又は状態の治療において、並びに細菌及びウイルス感染の治療において、有用であり得る。最後に、1つ又は2つ以上の抗原が埋め込まれた粒子は、対象において抗原特異的寛容を誘導する。

【0038】

本明細書で使用する「粒子」は、あらゆる物質の組織に由来しない微小な組成物を指し、それは球体又は球体様の実体又はビーズであってもよい。「粒子」という用語及び「ビーズ」という用語は、互換的に使用され得る。加えて、「粒子」という用語は、ビーズ及び球体を包含するように使用されてもよい。

10

【0039】

「カルボキシル化された粒子」又は「カルボキシル化されたビーズ」又は「カルボキシル化された球体」は、その表面にカルボキシル基を含有するように修飾されたあらゆる粒子を含む。一部の実施形態では、カルボキシル基の付加は、例えば、MARCOなどのスカベンジャー受容体との相互作用を通して、血液循環からの粒子の食細胞/単球取り込みを強化する。カルボキシル化は、エチレン-無水マレイン酸共重合体(PEMA)を含むがこれらに限定されない、カルボキシル基を付加するいずれの化合物を使用しても達成することができる。

20

【0040】

「負に荷電した粒子」又は「負に荷電したビーズ」又は「負に荷電した球体」は、負電荷を本質的に保有するか、負電荷を有するように修飾されたいかなる粒子も含む。一部の実施形態では、粒子は、粒子のカルボキシル化によって、負電荷を有するように作製される。

【0041】

本明細書で使用する「抗原性部分」は、宿主の免疫系によって認識される任意の部分、例えばペプチドを指す。抗原性部分の例としては、自己抗原及び/又は細菌若しくはウイルスタンパク質、ペプチド、又は成分が挙げられるが、これらに限定されない。理論に束縛されることなく、負に荷電したビーズそれ自体は免疫系によって認識され得るが、それに結合するだけの負に荷電したビーズは、本発明の目的では「抗原性部分」とはみなされない。

30

【0042】

本明細書で使用する「裸ビーズ」又は「裸粒子」又は「裸球体」は、カルボキシル化されていないか、あるいは修飾されていないビーズ、粒子、又は球体を指す。

【0043】

本明細書で使用する「炎症誘発性メディエータ」又は「炎症誘発性ポリペプチド」は、対象において炎症を誘導、維持、又は延長するポリペプチド又はその断片を指す。炎症誘発性メディエータの例としては、サイトカイン及びケモカインが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0044】

本明細書で使用する「炎症環境」又は「炎症病巣」は、対象における炎症又は炎症誘発性メディエータの増加した濃度の部位を指す。炎症環境は、全体としての対象の循環を包含してもよい。例えば、対象が全身性炎症性障害を患う場合、炎症性メディエータは、対象の循環全体で見出され得る。故に、これらの実施形態では、炎症環境は、目立たない領域内に封じられない。

【0045】

「調節性T細胞」又は「Treg」又は「サプレッサーT細胞」は、T細胞免疫応答を調節することができるT細胞を意味する。例えば、Tregは、CD4⁺又はCD8⁺

50

T細胞応答のエフェクター機能を阻害することができるCD4⁺又はCD8⁺ T細胞であり得る。

【0046】

粒子は、いかなる形状又は配座を有してもよい。しかしながら、一部の実施形態では、インビボにおいて凝集する可能性の低い粒子を使用することが好ましい。これらの実施形態内の粒子の例は、球形状を有するものである。

【0047】

各粒子が均一な粒径である必要はないが、粒子は概して、抗原提示細胞又は他のMPS細胞において食作用を引き起こすのに十分な粒径でなければならない。粒子は、溶解性を強化し、インビボにおける凝集に起因する起こり得る合併症を回避し、飲作用を促進するために、微視的又はナノスケールの粒径であることが好ましい。粒径は、間質腔からリンパ球成熟の領域への取り込みのための因子であり得る。約0.1 μm～約10 μmの平均粒径を有する粒子は、食作用を引き起こすことができる。故に、一実施形態では、粒子は、これらの範囲内の粒径を有する。別の実施形態では、粒子は、約0.2 μm～約2 μmの平均粒径を有する。別の実施形態では、粒子は、約0.3 μm～約5 μmの平均粒径を有する。また別の実施形態では、粒子は、約0.5 μm～約3 μmの平均粒径を有する。更なる実施形態では、粒子は、約0.1 μm、又は約0.2 μm、又は約0.3 μm、又は約0.4 μm、又は約0.5 μm、又は約1.0 μm、又は約1.5 μm、又は約2.0 μm、又は約2.5 μm、又は約3.0 μm、又は約3.5 μm、又は約4.0 μm、又は約4.5 μm、又は約5.0 μmの平均粒径を有する。特定の実施形態では、粒子は、約0.5 μmの粒径を有する。組成物中の粒子は、均一な粒径である必要はない。例として、薬学的製剤は複数の粒子を含有してもよく、その一部は約0.5 μmであり、他の粒子は約1.0 μmである。これら所与の範囲内である粒径のいずれの混合物も有用となるであろう。

【0048】

一部の実施形態では、粒子は非金属である。これらの実施形態では、粒子は重合体から形成され得る。好ましい実施形態では、粒子は、個体中で生分解性である。この実施形態では、粒子は、個体中で粒子が蓄積することなく、複数回の投薬にわたって個体中で提供することができる。好適な粒子の例としては、ポリスチレン粒子、PLGA粒子、PLURIONICS安定化ポリプロピレン硫化物粒子、及びダイヤモンド粒子が挙げられる。

【0049】

粒子表面は、非特異的又は不必要な生物相互作用を最小限にする物質からなることが好ましい。粒子表面と間質との間の相互作用は、リンパ取り込みに関与する因子であり得る。粒子表面は、物質でコーティングされて、非特異的相互作用を防止し得るか又は減少させ得る。ポリ(エチレングリコール)(PEG)、及びPLURONICS(登録商標)などのその共重合体(ポリ(エチレングリコール)-b1-ポリ(プロピレングリコール)-b1-ポリ(エチレングリコール))の共重合体を含む)といった親水性層で粒子をコーティングすることによる立体安定化は、皮下注射後のリンパ取り込みの向上によって示されるように、間質のタンパク質との非特異的相互作用を減少させ得る。これらの因子の全ては、リンパ取り込みの観点から粒子の物理的特性の重要性を示す。生分解性重合体を使用して、重合体及び/又は粒子及び/又は層の全て又は一部を作製し得る。生分解性重合体は、例えば、官能基が溶液中の水と反応した結果によって分解を受け得る。本明細書で使用する「分解」という用語は、分子量の減少又は疎水性基の親水性基への変換のいずれかによって可溶性となることを指す。エステル基を持つ重合体、例えば、ポリラクチド及びポリグリコリドは概して、自然加水分解に付される。

【0050】

本発明の粒子はまた、更なる成分を含有してもよい。例えば、担体は、担体に組み込まれるか又は共役される造影剤を有してもよい。現在市販されている、造影剤を有する担体ナノスフェアは、Kodak X-sightナノスフェアである。量子ドット(QD)として知られる無機の量子閉じ込め発光性ナノ結晶は、FRET用途において理想的なド

10

20

30

40

50

ナーとして現れた。その高量子収率及び同調可能なサイズ依存性ストークスシフトは、異なるサイズが、単一の紫外線波長で励起されるときに青から赤外までを発することを可能にする。(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)。デンドリマーとして知られる重合体のクラスに基づく有機/無機ハイブリッド量子ドットなどの量子ドットは、生物学的標識化、撮像、及び光学バイオセンシングシステムにおいて使用され得る。(Lemon, et al., J. Am. Chem. Soc. 2000, 1221, 12886)。無機量子ドットの伝統的な合成とは異なり、これらのハイブリッド量子ドットナノ粒子の合成は、高温、又は毒性の高い不安定な試薬を必要としない。(Etienne, et al., Appl. Phys. Lett. 87, 181913, 2005)。

【0051】

粒子は、広範な物質から形成され得る。粒子は、生体利用に好適な物質からなることが好ましい。例えば、粒子は、ガラス、シリカ、ヒドロキシカルボン酸のポリエステル、ジカルボン酸のポリ無水物、又はヒドロキシカルボン酸及びジカルボン酸の共重合体からなってもよい。より一般的には、担体粒子は、直鎖若しくは分枝鎖、置換若しくは非置換、飽和若しくは不飽和、線形若しくは架橋された、アルカニル、ハロアルキル、チオアルキル、アミノアルキル、アリール、アラルキル、アルケニル、アラルケニル、ヘテロアリール、若しくはアルコキシヒドロキシ酸のポリエステル、又は直鎖若しくは分枝鎖、置換若しくは非置換、飽和若しくは不飽和、線形若しくは架橋された、アルカニル、ハロアルキル、チオアルキル、アミノアルキル、アリール、アラルキル、アルケニル、アラルケニル、ヘテロアリール、若しくはアルコキシジカルボン酸のポリ無水物からなり得る。加えて、担体粒子は、量子ドットポリスチレン粒子などの量子ドットであるか、又は量子ドットからなることができる(Joumaa et al. (2006) Langmuir 22: 1810~6)。エステル及び無水物結合の混合物(例えば、グリコール酸及びセバシン酸の共重合体)を含む担体粒子も用いることができる。例えば、担体粒子は、ポリグリコール酸重合体(PGA)、ポリ乳酸重合体(PLA)、ポリセバシン酸重合体(PSA)、乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)、[rho]乳酸-セバシン酸共重合体([rho]oly(lactic-co-sebacic) acid copolymers)(PLSA)、グリコール酸-セバシン酸共重合体(PGSA)、ポリプロピレン硫化物重合体、ポリ(カプロラクトン)、キトサンなどを含む物質を含んでもよい。本発明において有用な他の生体適合性、生分解性重合体としては、カプロラクトン、炭酸塩、アミド類、アミノ酸、オルトエステル、アセタール、シアノアクリレート、及び分解性ウレタンの重合体又は共重合体、並びに直鎖若しくは分枝鎖、置換若しくは非置換、アルカニル、ハロアルキル、チオアルキル、アミノアルキル、アルケニル、又は芳香族ヒドロキシ若しくはジカルボン酸を持つこれらの共重合体が挙げられる。加えて、リジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシン及びシステイン、又はこれらの鏡像異性体などの、反応性側鎖基を持つ生物学的に重要なアミノ酸が、前述の物質のうちのいずれかを持つ共重合体に含まれて、抗原ペプチド及びタンパク質、又は共役部分に共役するための反応基を提供し得る。本発明に好適な生分解性物質としては、ダイヤモンド、PLA、PGA、ポリプロピレン硫化物重合体、及びPLGA重合体が挙げられる。生体適合性であるが非生分解性の物質も、本発明の担体粒子に使用し得る。例えば、アクリル酸塩、エチレン酢酸ビニル、アシル置換酢酸セルロース、非分解性ウレタン、スチレン、塩化ビニル、フッ化ビニル、ビニルイミダゾール、クロロスルホン化オレフィン、エチレンオキシド、ビニルアルコール、TEFLON(登録商標)(DuPont, Wilmington, Del.)、及びナイロンの非生分解性重合体を用いてもよい。

【0052】

一実施形態では、免疫修飾粒子と接触する緩衝溶液は、塩基性pHを有し得る。塩基性

10

20

30

40

50

溶液に好適な塩基性 pH としては、7.1、7.5、8.0、8.5、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、及び13.5が挙げられる。緩衝溶液はまた、任意の好適な塩基及びその複合体で作製され得る。本発明の一部の実施形態では、緩衝溶液は、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム、重炭酸リチウム、カリウム二水素リン酸塩、リン酸二水素ナトリウム、又はリン酸二水素リチウム、及びこれらの複合体を含むが、これらに限定されない。

【0053】

本発明の一実施形態では、免疫修飾粒子は、共重合体を含有する。これらの共重合体は、異なるモル比を有してもよい。本免疫修飾粒子の好適な共重合体の比率は、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、81:19、82:18、83:17、84:16、85:15、86:14、87:13、88:12、89:11、90:10、91:9、92:8、93:7、94:6、95:5、96:4、97:3、98:2、99:1、又は100:0であり得る。別の実施形態では、共重合体は、周期的、統計的、線状、分枝（星型、ブラシ型、又は櫛型共重合体）共重合体であってもよい。一部の実施形態では、共重合体の比率は、ポリスチレン：ポリ（カルボン酸ビニル）/80:20、ポリスチレン：ポリ（カルボン酸ビニル）/90:10、ポリ（カルボン酸ビニル）：ポリスチレン/80:20、ポリ（カルボン酸ビニル）：ポリスチレン/90:10、ポリ乳酸：ポリグリコール酸/50:50、ポリ乳酸：ポリグリコール酸/80:20、又はポリ乳酸：ポリグリコール酸/90:10であってもよいが、これらに限定されない。

【0054】

本発明の粒子は、当技術分野で既知の任意の手段によって製造することができる。粒子を製造する例示的な方法としては、マイクロエマルジョン重合法、界面重合法、沈殿重合法、エマルジョン蒸発法、エマルジョン拡散法、溶媒置換法、及び塩析法が挙げられるが、これらに限定されない（Astete and Sabliov, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 17:247~289 (2006)）。PLGA粒子の製造プロセスの操作によって、粒子特性（例えば、粒径、粒径分布、ゼータ電位、形態、疎水性/親水性、ポリペプチドの閉じ込めなど）を制御することができる。粒径は、PLGAの濃度、粒子の製造に使用される溶媒、有機相の性質、製造に使用される界面活性剤、連続相及び不連続相の粘度、使用される溶液の性質、使用される水の温度、超音波処理、蒸発速度、添加剤、剪断応力、滅菌、及び任意の封入された抗原又はポリペプチドの性質を含むがこれらに限定されない数々の要因に影響される。

【0055】

粒径は、重合体濃度に影響を受け、より大きい粒子は、より高い重合体濃度から形成される。例えば、1%から4% (w/v) へのPLGA濃度の増加は、溶媒プロピレンカーボネートを使用する場合、平均粒径を約205nmから約290nmへと増加させ得る。あるいは、酢酸エチル及び5%のPluronic F-127中では、1%から5% (w/v) へのPLGA濃度の増加は、平均粒径を120nmから230nmへと増加させる。

【0056】

連続及び不連続相の粘度も、より小さい粒子の形成において要となる工程である拡散プロセスに影響を与える重要なパラメータである。粒径は分散相の粘度の増加と共に増加し、一方で、粒径はより粘度の高い連続相と共に減少する。概して、有機溶媒対水性溶媒の相比率が低いほど、粒径は小さくなる。

【0057】

ホモジナイザー速度及び攪拌も粒径に影響を与え、概して、より早い速度及び攪拌が粒径の減少をもたらすが、速度及び攪拌の更なる増加が粒径を減少させなくなる時点が存在する。単に速く掻き混ぜる場合と比較して、エマルジョンが高圧ホモジナイザーによって均質化される場合には、粒径の減少に好ましい影響がある。例えば、5%のPVAにお

10

20

30

40

50

る20%の相分配で、掻き混ぜによる平均粒径は288nmであり、均質化(30MPa(300バール)の高圧)による平均粒径は231nmである。

【0058】

粒子の重要な粒径減少は、溶媒の拡散を向上させるために添加する水の温度を変化させることによって達成される。平均粒径は、水温の増加と共に減少する。

【0059】

粒子中に封入されるポリペプチドの性質も粒径に影響を与える。概して、疎水性ポリペプチドの封入は、より親水性であるポリペプチドの封入と比較して、より小さい粒子の形成につながる。二重エマルジョンプロセスでは、より親水性であるポリペプチドの閉じ込めは、高分子量のPLGAと高い内部相粘度を引き起こす高分子量の第1の界面活性剤とを使用して向上する。溶媒、重合体、及びポリペプチド間の相互作用は、粒子へのポリペプチドを粒子に組み込むことの効率性に影響を与える。

10

【0060】

PLGA分子量は最終平均粒径に影響する。概して、分子量が大きいほど、平均粒径は大きくなる。例えば、PLGAの組成及び分子量が変化するとき(例えば、50:50のPLGAについては12から48kDaへ、25のPLGAについては12から98kDaへ)、平均粒径は変化する(それぞれ、約102nm~154nm、約132nm~152nm)。粒子が同じ分子量である場合であっても、その組成は平均粒径に影響し得、例えば、50:50の比率を持つ粒子は、概して、75:25の比率を持つ粒子よりも小さい粒子を形成する。重合体の末端基も、粒径に影響を与える。例えば、酸性PLGA末端基についての平均粒径が240nm(PI=0.225)であるのと比較して、エステル末端基で調製した粒子は、740nm(PI=0.394)の平均粒径を持つ粒子を形成する。

20

【0061】

使用される溶媒も粒径に影響を与え、溶液の表面張力を減少させる溶媒はまた、粒径も減少させる。

【0062】

有機溶媒は真空蒸発によって除去されて、重合体及びポリペプチドの傷害を回避し、かつ最終粒径の減少を促進する。有機溶媒の真空下の蒸発は、より小さい粒子の形成に効果的である。例えば、真空蒸発は、通常の水速度の蒸発下でもたらされる平均粒径よりも約30%小さい平均粒径をもたらす。

30

【0063】

超音波処理波長の振幅も粒子の特徴に影響を与える。更なる液滴径の変化のない安定したミニエマルジョンを形成するためには、波長の振幅は600~800sの超音波処理で20%超であるべきである。しかしながら、超音波処理の主な欠点は、形成されたエマルジョンの単分散の欠如である。

【0064】

本発明の粒子の産生に使用し得る有機相としては、酢酸エチル、メチルエチルケトン、プロピレンカーボネート、及びベンジルアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。使用し得る連続相としては、界面活性剤のポロキサマー188が挙げられるが、これに限定されない。

40

【0065】

種々の界面活性剤を、本発明の粒子の製造に使用することができる。界面活性剤は、陰イオン性、陽イオン性、又は非イオン性であることができる。ポロキサミン及びポロキサミン(poloxamine)族の界面活性剤が粒子合成において一般的に使用される。使用し得る界面活性剤としては、PEG、Tween-80、ゼラチン、デキストラン、プルロニックL-63、PVA、メチルセルロース、レシチン、及びDMABが挙げられるが、これらに限定されない。加えて、生分解性かつ生体適合性である界面活性剤は、ビタミンETPGS(D-トコフェリルポリエチレングリコール1000コハク酸塩)が挙げられるが、これに限定されない。ある特定の実施形態では、2つの界面活性剤が必要と

50

される（例えば、二重エマルジョン蒸発法において）。これらの2つの界面活性剤は、第1のエマルジョンのための疎水性界面活性剤と、第2のエマルジョンのための疎水性界面活性剤とを含むことができる。

【0066】

本発明の粒子の産生に使用し得る溶媒としては、アセトン、テトラヒドロフラン（THF）、クロロホルム、及びクロリネート（chlorinate）族のメンバーである塩化メチルが挙げられるが、これらに限定されない。有機溶媒の選択には、重合体は本溶媒中で可溶性でなければならないということと、溶媒は水相と完全に非混和性でなければならないということとの2つの選択基準が求められる。

【0067】

本発明の粒子の産生に使用し得る塩としては、塩化マグネシウム六水和物が挙げられるが、これに限定されない。

【0068】

一般的な塩析剤としては、電解質（例えば、塩化ナトリウム、酢酸マグネシウム、塩化マグネシウム）、又は非電解質（例えば、スクロース）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0069】

本発明の粒子の安定性及び粒径は、脂肪酸又は炭素の短鎖を含むがこれらに限定されない化合物の付加によって向上し得る。ラウリン酸のより長い炭素鎖の付加は、粒子の特徴の向上と関連付けられる。また更に、疎水性添加剤の付加は、粒径、粒子へのポリペプチドの組み込み、及び放出プロファイルを向上させることができる。粒子の調製は、凍結乾燥によって安定化することができる。トレハロースなどの抗凍結剤の付加により、凍結乾燥時の粒子の凝集を減少させることができる。

【0070】

現在市販されている好適なビーズとしては、FluoSpheres（Molecular Probes, Eugene, Oreg.）などのポリスチレンビーズが挙げられる。

【0071】

物理的特性も、未熟リンパ球を有する領域における取り込み及び保持後のナノ粒子の有用性に関係する。これらは、剛性又は弾力性などの機械的特性を含む。一部の実施形態は、最近開発され、全身（だが標的化又は免疫ではない）送達を特徴とするPPS-PEG系においてのように、PEGにおいてのように、ゴム状コア、例えば、親水性被覆層といった被覆層を持つポリ（プロピレンスルフィド）（PPS）に基づく。ゴム状コアは、ポリスチレン又は金属ナノ粒子系においてのように、実質的に剛性であるコアとは対照的である。ゴム状という用語は天然又は合成ゴム以外のある特定の弾性物質を指し、これは重合体分野の当業者にはよく知られている用語である。例えば、架橋されたPPSを使用して、疎水性ゴム状コアを形成させることができる。PPSは、酸化条件下で分解して、疎水性ゴムから親水性の水溶性重合体へと移行しながら、ポリスルホキシド、及び最終的にポリスルホンとなる。他の硫化物重合体を使用し採用してもよく、硫化物重合体という用語は、単量体の主鎖に硫黄を持つ重合体を指す。使用し得る他のゴム状重合体は、約37

未満の水和状態下ガラス転移温度を持つポリエステルである。疎水性コアは、被覆層がコアから離れて立体的に膨張する傾向を持つように、コアと被覆層とが混ざらない傾向にあるため、親水性被覆層と共に有利に使用することができる。コアは、その上に層を有する粒子を指す。層は、コアの少なくとも一部分を覆う物質を指す。層は、吸収されるか、又は共有結合され得る。粒子又はコアは、固体又は中空であってもよい。より高い負荷の疎水性薬物がゴム状の疎水性コアを持つ粒子によって担持され得ることから、ゴム状の疎水性コアは、結晶又はガラス状（ポリスチレンの場合のように）コアなどの剛性疎水性コアよりも有利である。

【0072】

別の物理的特性は、表面の親水性である。親水性物質は、架橋されていないとき、1リ

10

20

30

40

50

ットル当たり少なくとも1グラムの水中での溶解度を有し得る。親水性重合体を持つ粒子の立体安定化は、非特異的相互作用を減少させることによって間質からの取り込みを向上させ得るが、粒子の増加した隠密性質も、未熟リンパ球を有する領域における食細胞による内在化を減少させ得る。これらの競合する特徴の均衡を保つという課題は克服したが、なお本出願は、リンパ節におけるDC及び他のAPCへの有効なリンパ送達のためのナノ粒子の創出を実証する。一部の実施形態は、親水性成分、例えば、親水性物質の層を含む。好適な親水性物質の例は、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレンオキシド、ポリサッカライド、ポリアクリル酸、及びポリエーテルのうちの1つ又は2つ以上である。層中の重合体の分子量は、インピボにおける有用な程度の立体障害を提供するように、例えば、約1,000~約100,000又は更にそれ以上に調整することができ、当業者であれば、全ての範囲及び明確に記述される範囲内の値、例えば10,000~50,000が企図されることを即座に理解するであろう。

10

【0073】

粒子の組成物は粒子が体内で存続する時間に影響し、寛容は急速な粒子の取り込み及びクリアランス/分解を必要とすることを見出した。50:50を超えるラクチド:グリコリドの比は分解速度を遅延させるため、本発明の粒子は、約50:50以下のラクチド:グリコリド比を有する。一実施形態では、本発明の粒子は、約50:50のD,L-ラクチド:グリコリド比を有する。

【0074】

粒子は、更なる反応のための官能基を組み込み得る。更なる反応のための官能基としては、求電子剤又は求核剤が挙げられ、これらは他の分子との反応に簡便である。求核剤の例は、第1級アミン、チオール、及びヒドロキシルである。求電子剤の例は、スクシンイミジルエステル、アルデヒド、イソシアネート、及びマレイミドである。

20

【0075】

本発明の負に荷電した粒子などのコロイド治療薬の効能は、粒子のインピボにおける分布に密接に関係する。コロイド系の分布は、ゼータ電位を決定することによって予測することができる。ゼータ電位は、分散媒と分散した粒子に結合する流体の固定層との間の電位差の測定であり、分散液中の隣接する同様に荷電した粒子間の反発の程度を示す。高いゼータ電位は、コロイド製剤の安定性及び良好な分散を予測する。好ましい実施形態では、本発明の薬学的製剤のゼータ電位は、インピボにおける製剤の良好な分散を予測する。

30

【0076】

本発明の粒子は、特定のゼータ電位を保有することができる。ある特定の実施形態では、ゼータ電位は負である。一実施形態では、ゼータ電位は約-100mV未満である。一実施形態では、ゼータ電位は約-50mVである。ある特定の実施形態では、粒子は、-100mV~0mVのゼータ電位を保有する。更なる実施形態では、粒子は、-75mV~0mVのゼータ電位を保有する。更なる実施形態では、粒子は、-60mV~0mVのゼータ電位を保有する。更なる実施形態では、粒子は、-50mV~0mVのゼータ電位を保有する。また更なる実施形態では、粒子は、-40mV~0mVのゼータ電位を保有する。更なる実施形態では、粒子は、-30mV~0mVのゼータ電位を保有する。更なる実施形態では、粒子は、-20mV~+0mVのゼータ電位を保有する。更なる実施形態では、粒子は、-10mV~-0mVのゼータ電位を保有する。更なる実施形態では、粒子は、-100mV~-50mVのゼータ電位を保有する。更なる実施形態では、粒子は、-75mV~-50mVのゼータ電位を保有する。更なる実施形態では、粒子は、-50mV~-40mVのゼータ電位を保有する。

40

【0077】

本発明の粒子は、炎症性免疫応答を減退させることを、それを必要とする対象において行うために、及び細菌又はウイルス感染を治療することを、それを必要とする対象において行うために有効ないかなる用量でも付与することができる。ある特定の実施形態では、約 10^2 ~約 10^{20} 個の粒子が個体に提供される。更なる実施形態では、約 10^3 ~約 10^{15} 個の粒子が提供される。なお更なる実施形態では、約 10^6 ~約 10^{12} 個の粒

50

子が提供される。また更なる実施形態では、約 10^8 ~ 約 10^{10} 個の粒子が提供される。好ましい実施形態では、好ましい用量は 1 ml 当たり 0.1% の固体である。したがって、 $0.5 \mu\text{m}$ のビーズについては、好ましい用量は約 4×10^9 個のビーズであり、 $0.05 \mu\text{m}$ のビーズについては、好ましい用量は約 4×10^{12} 個のビーズであり、 $3 \mu\text{m}$ のビーズについては、好ましい用量は 2×10^7 個のビーズである。しかしながら、治療される特定の状態を治療することにおいて有効であるあらゆる用量が、本発明に包含される。

【0078】

本発明は、自己免疫疾患、移植拒絶反応、炎症性疾患及び/又は障害、虚血再灌流、卒中、心筋梗塞、並びにアレルギー反応などの免疫関係障害の治療に有用である。合成の生体適合性粒子系を置換して免疫寛容を誘導することは、製造の容易さ、治療薬の広い可用性につながり、試料間の均一性を増加させ、可能性のある治療部位の数を増加させ、かつ担体細胞に対するアレルギー反応の可能性を劇的に減少させ得る。

10

【0079】

本明細書で使用する「免疫応答」という用語は、T細胞介在性及び/又はB細胞介在性免疫応答を含む。例示的な免疫応答は、T細胞応答、例えば、サイトカイン産生及び細胞傷害性を含む。加えて、免疫応答という用語は、T細胞活性化、例えば抗体産生(液性応答)、及びサイトカイン応答性細胞、例えばマクロファージの活性化によって間接的に影響される免疫応答を含む。免疫応答に関与する免疫細胞としては、B細胞及びT細胞(CD4⁺、CD8⁺、Th1、及びTh2細胞)などのリンパ球; 抗原提示細胞(例えば、樹状細胞、マクロファージ、Bリンパ球、ランゲルハンス細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞、及びケラチン生成細胞、内皮細胞、星状細胞、線維芽細胞、オリゴデンドロサイトなどのノンプロフェッショナル細胞); ナチュラルキラー細胞; マクロファージ、好酸球、肥満細胞、好塩基球、及び顆粒球などの骨髄細胞が挙げられる。一部の実施形態では、本発明の修飾された粒子は、炎症の部位への炎症性細胞の輸送を減少させるのに有効である。

20

【0080】

本明細書で使用する「炎症性単球」という用語は、CD14/CD16及びCCR2の任意の組み合わせを発現している任意の骨髄細胞を指す。本明細書で使用する「抑制性好中球」という用語は、単球由来のサプレッサー細胞及び/又は好中球を包含する。

30

【0081】

本明細書で使用する「アネルギー」、「寛容」、又は「抗原特異的寛容」という用語は、T細胞受容体介在性刺激へのT細胞の非感受性を指す。このような非感受性は、概して抗原特異的であり、抗原性ペプチドへの曝露が停止した後には存続する。例えば、T細胞におけるアネルギーは、サイトカイン産生、例えばIL-2の欠如を特徴とする。T細胞アネルギーは、T細胞が抗原に曝露され、第2のシグナル(共刺激シグナル)の不在下で第1のシグナル(T細胞受容体又はCD-3介在性シグナル)を受信するときには発生する。これらの条件下で、同じ抗原への細胞の再曝露が(再曝露が副刺激分子の存在下で発生するとしても)、サイトカインの産生の失敗、及びその後の増殖の失敗をもたらす。故に、サイトカインの産生の失敗は、増殖を防止する。アネルギー性T細胞は、しかしながら、サイトカイン(例えば、IL-2)と共に培養する場合、増殖することができる。例えば、T細胞アネルギーはまた、指標細胞系を使用してELISA又は増殖アッセイによって測定されるように、Tリンパ球によるIL-2産生の欠如によって観察され得る。あるいは、レポーター遺伝子構造物を使用することができる。例えば、アネルギー性T細胞は、5'IL-2遺伝子エンハンサーの制御下にある異種プロモーターによって、又はエンハンサー内で見出され得るAPI配列のマルチマーによって誘導されるDL-2遺伝子転写の開始に失敗する(Kang et al. 1992 Science. 257: 1134)。

40

【0082】

本明細書で使用する「免疫寛容」という用語は、a) 減少したレベルの特異的免疫応答

50

(少なくとも一部分では、抗原特異的エフェクターTリンパ球、Bリンパ球、抗体、又はそれらの等価物によって媒介されると考えられる)、b)特異的免疫応答の開始若しくは進行、又はc)特異的免疫応答の開始若しくは進行の減少した危険性の場合、治療されていない対象と比較した治療された対象の一部に行う方法を指す。「特異的」免疫寛容は、免疫寛容が他のものと比較してある特定の抗原に対して選択的に引き起こされるときに発生する。「非特異的」免疫寛容は、免疫寛容が、炎症性免疫応答をもたらす抗原に対して無差別に引き起こされるときに発生する。「準特異的」免疫寛容は、免疫寛容が、半差別的に、病原性免疫応答をもたらす抗原に対しては引き起こされ、防御免疫応答をもたらす他のものに対しては引き起こされないときに発生する。

【0083】

10

寛容活性に対する代用物は、標的部位において適切なサイトカインの産生を刺激する粒子の能力である。標的部位でTサブレッサー細胞によって放出される免疫調節性サイトカインは、TGF- β であると考えられている(Miller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:421, 1992)。寛容の間に産生され得る他の因子は、サイトカインIL4及びIL-10、並びにメディエータPGEである。対照的に、活発な免疫破壊を受けている組織中のリンパ球は、IL-1、IL-2、IL-6、及びIFN γ などのサイトカインを分泌する。よって、修飾された粒子の効能は、適切な型のサイトカインを刺激するその能力を測定することによって評価することができる。

【0084】

20

このことを考慮すると、修飾された粒子、有効な粘膜結合成分、有効な組み合わせ、又は粘膜投与の有効な様式及びスケジュールの迅速なスクリーニング試験を、動物モデル系を使用して実施することができる。動物は、試験粒子組成物を用いて粘膜表面で治療され、ある時期に、疾患を引き起こす抗原又は病原体の投与によるチャレンジを受ける。脾臓細胞を単離し、約50 μ g/mLの濃度にある、疾患を引き起こす抗原又は病原菌由来の抗原の存在下で、インビトロにおいて培養する。培地へのサイトカインの分泌は、標準的なイムノアッセイによって定量化することができる。

【0085】

細胞の活性を抑制する粒子の能力は、修飾された粒子で免疫付与した動物から単離した細胞を使用して、又は疾患を引き起こす抗原若しくはウイルス抗原標的抗原に応答性である細胞系を創出することによって、決定することができる(Ben-Nun et al., Eur. J. Immunol. 11:195, 1981)。この実験の一変形形態では、サブレッサー細胞集団に軽度放射線照射して(約1000~1250ラド)増殖を防止し、サブレッサーをキラー細胞を用いて共培養し、その後、トリチウム化チミジンの組み込み(又はMTT)を使用してキラー細胞の増殖活性を定量化する。別の変形形態では、ポリカーボネート膜によって分離させた相互の1mm以内で集団が共インキュベートするのを可能にするdual chamber transwell culture system(Costar, Cambridge Mass.)の上部及び下部レベルにおいて、サブレッサー細胞集団及びキラー細胞集団を培養する(国際公開第WO 93/16724号)。このアプローチでは、キラー細胞の増殖活性は別個に測定することができるため、サブレッサー細胞集団の照射は不要である。

30

40

【0086】

特定の疾患に対する組成物の有効性及び投与様式はまた、対応する動物疾患モデルにおいて詳述され得る。疾患の総体症状を減退又は遅延させるための治療の能力は、用いるモデルに適切のように、疾患の循環生化学的及び免疫学的特質、罹患組織の免疫組織学、並びに肉眼的な臨床的特徴のレベルでモニタリングする。試験に使用し得る動物モデルの非限定的な例を、以下の節に含める。

【0087】

本発明は、TH1応答、TH2応答、TH17応答、又はこれらの応答の組み合わせを調節することによる寛容の調節を企図する。TH1応答の調節は、例えばインターフェロ

50

ンガンマの発現を変化させることを含む。TH2 応答の調節は、例えば、IL - 4、IL - 5、IL - 10、及び IL - 13 の任意の組み合わせの発現を変化させることを含む。典型的には、TH2 応答の増加（減少）は、IL - 4、IL - 5、IL - 10、又は IL - 13 のうちの少なくとも1つの発現の増加（減少）を含むことになり、より典型的には、TH2 応答の増加（減少）は、IL - 4、IL - 5、IL - 10、又は IL - 13 のうちの少なくとも2つの発現の増加を含むことになり、最も典型的には、TH2 応答の増加（減少）は、IL - 4、IL - 5、IL - 10、又は IL - 13 のうちの少なくとも3つの増加を含むことになるが、TH2 応答の増加（減少）が、IL - 4、IL - 5、IL - 10、及び IL - 13 のうちの全ての発現の増加（減少）を含むことになるのが理想的である。TH17 の調節は、例えば、TGF - ベータ、IL - 6、IL - 21、及び IL 2 3 の発現を変化させることを含み、IL - 17、IL - 21、及び IL - 22 のレベルに影響する。

10

【0088】

自己抗原及び自己免疫疾患への寛容は、胸腺における自己反応性T細胞の陰性選択、及び、胸腺での削除を逃れ末梢において見出される自己反応性T細胞についての末梢寛容の機構を含む、種々の機構によって達成される。末梢T細胞寛容をもたらす機構の例としては、自己抗原の「無知」、自己抗原に対するアネルギー又は非応答、サイトカイン免疫偏向、及び自己反応性T細胞の活性化誘発性細胞死が挙げられる。加えて、調節性T細胞は、末梢寛容の介在に関与することが示されている。例えば、Walker et al. (2002) Nat. Rev. Immunol. 2: 11 ~ 19、Shevach et al. (2001) Immunol. Rev. 182: 58 ~ 67 を参照されたい。一部の状況では、自己抗原への末梢寛容が失われ（又は破壊され）、自己免疫応答が続いて起きる。例えば、EAE についての動物モデルにおいて、TLR 先天性免疫受容体を通じた抗原提示細胞（APC）の活性化は、自己寛容を破壊し、EAE の誘導をもたらすことを示した（Waldner et al. (2004) J. Clin. Invest. 113: 990 ~ 997）。ある特定の実施形態では、本発明の粒子は、Treg の頻度及び/又はエフェクター機能を増加させることによって、寛容又は一般的な免疫調節を誘導することができる。本発明の粒子によって概して上方調節される Treg は、転写レプレッサー因子フォークヘッドボックス P3（FoxP3）も発現する CD4⁺ CD25⁺ Treg である。しかしながら、本発明の粒子によって上方調節される Treg はまた、CD8⁺ Treg 又はサブレッサー細胞でもあってもよい。

20

30

【0089】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、抗原の提示を増加させ、同時に、TLR 7/8、TLR 9、及び/又は TLR 7/8/9 依存性の細胞刺激を抑制するか又は減少させるための方法を提供する。本明細書に記載するように、特定の修飾された粒子の投与は、DC 又は APC による抗原提示をもたらし、同時に、免疫賦活性ポリヌクレオチドと関連付けられる、TLR 7/8、TLR 9、及び/又は TLR 7/8/9 依存性細胞応答を抑制する。このような抑制は、1つ又は2つ以上の TLR 関連サイトカインの減少したレベルを含み得る。

【0090】

本発明の別の態様では、負に荷電した粒子は、図 16A に示すように、炎症応答を持つ対象の血液からの炎症誘発性メディエータ、病原性タンパク質、及び細胞残屑を拭い去るためのシンクとして働く。あるいは、又は加えて、本発明の負に荷電した粒子は、図 16B に示すように、炎症応答を持つ対象の血液中の調節タンパク質に結合することによって調節タンパク質を濃縮し、これらの調節タンパク質をその同種受容体に提示して、免疫応答を更に寛解させ得る。以下でより詳細に考察するように、本発明者らは、少なくとも15個の血清タンパク質が、無処置の対象又は免疫応答が進行中でない対象には結合が見出されない、活発な炎症性免疫応答を持つ対象において負に荷電した粒子に結合していることが見出されたことを発見した。これは、粒子が炎症誘発性シンク又は免疫調節物質のコンセントレーター/プレゼンターとして働くことができる上記の方法においてだけではな

40

50

く、診断方法との関連においても有用である。具体的には、負に荷電した本発明の粒子は、質量分析法及び他のプロテオーム方法などの他の方法が失敗した場合に、血液試料の広範な診断方法において使用し得る。驚くべきことに、炎症性血漿又は血清を本明細書に記載の負に荷電した粒子と共にインキュベートしたとき、これは、非炎症性又は恒常性状態下の血清／血漿中では見出されなかったタンパク質の結合及びその後の精製をもたらしたことを見出した。

【0091】

本発明の別の態様では、抗原を含む粒子を提供する。表面に抗原を担持するナノ粒子を使用して、T細胞寛容を誘導することに成功した (Getts et al., 2012 Nature Biotechnology 30:1217~1223)。ペプチドに結合した粒子による寛容は、T細胞アネルギーの誘導と調節性T細胞の活性との両方に依存し、T細胞寛容を誘導することによって自己免疫障害を治療するための代替的方法を示し得る。このT細胞寛容は、生分解性(PLG)粒子に結合したペプチドを使用するときに観察された。

10

【0092】

一実施形態では、本発明の粒子は、アレルギー、自己免疫疾患、及び／又は炎症性疾患若しくは障害と関連付けられる1つ若しくは2つ以上のエピトープを含む抗原に結合する。抗原は、エピトープの1つ又は2つ以上の複製を含み得る。一実施形態では、抗原は、1つの疾患又は障害と関連付けられる単一のエピトープを含む。更なる実施形態では、抗原は、同じ疾患又は障害と関連付けられる2つ以上のエピトープを含む。なお更なる実施形態では、抗原は、異なる疾患又は障害と関連付けられる2つ以上のエピトープを含む。更なる実施形態では、抗原は、1つ又は2つ以上のアレルギーと関連付けられる1つ又は2つ以上のエピトープを含む。更なる実施形態では、抗原は、多発性硬化症、1型糖尿病、セリアック病、及び／又はクローン病若しくは潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患と関連付けられる1つ又は2つ以上のエピトープを含む。

20

【0093】

一実施形態では、エピトープは、ミエリン塩基性タンパク質(例えば、配列番号4975及び4976)、プロテオリピドタンパク質(例えば、配列番号4977)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(例えば、配列番号1及び4978)、アクアポリン(例えば、配列番号4979)、ミエリン関連糖タンパク質(例えば、配列番号4980)、インスリン(例えば、配列番号4981)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(例えば、配列番号4982)、グリアジン(例えば、配列番号4983~4985又は5136~5140)、若しくはIV型コラーゲンの3鎖(例えば、配列番号5017)、又はその断片、相同体、若しくはアイソフォームからのものである。更なる実施形態では、エピトープは、グリアジン及び／又はグルテニンからのものを含む、グルテニンからのものである。一実施形態では、エピトープは、その全体があらゆる目的で本明細書に組み込まれる米国特許第8,476,228号に記載されるものなどの、インスリン相同体からのものである。一実施形態では、グリアデンは、米国出願第20110293644号中の配列番号13、14、16、320、若しくは321、又はSolli et al. (2012) Immunogenetics 65:455~460に記載されるものであり、これらの両方はその全体があらゆる目的で本明細書に組み込まれる。

30

40

【0094】

本発明が企図する、種々の自己免疫疾患及び／又は炎症性疾患若しくは障害と関連付けられるエピトープの更なる非限定的な例を、表1及び2に記載する。

【0095】

【表 1】

表 1 - 代表的な直鎖状エピトープ

疾患	代表的なエピトープ
多発性硬化症	配列番号 2~1294
セリアック病	配列番号 1295~1724、 配列番号 1726~1766、 配列番号 4986~5140
糖尿病	配列番号 1767~1840、 配列番号 1842~1962、 配列番号 1964~2027、 配列番号 2029~2073、 配列番号 2075~2113、 配列番号 2115~2197、 配列番号 2199~2248、 配列番号 2250~2259、 配列番号 2261~2420、 配列番号 2422~2486、 配列番号 2489~2505
リウマチ性関節炎	配列番号 2506~3260、 配列番号 3262~3693
全身性エリテマトーデス	配列番号 3694~3857、 配列番号 3860~4565
グッドパスチャー症候群	配列番号 4566~4576、 配列番号 4578~4610、 配列番号 4612~4613、 配列番号 5018~5039
自己免疫性ブドウ膜炎	配列番号 4614~4653
自己免疫性甲状腺炎	配列番号 4654~4694、 配列番号 4696~4894、 配列番号 4896~4901
自己免疫性筋炎	配列番号 4902~4906
自己免疫性血管炎	配列番号 4907~4914
自己免疫性睪炎	配列番号 4915~4917
クローン病	配列番号 4918~4941
潰瘍性大腸炎	配列番号 4942~4952
乾癬	配列番号 4953~4963
反応性関節炎	配列番号 4964~4974

10

20

30

【 0 0 9 6 】

全てのエピトープが直鎖状エピトープというわけではなく、エピトープは、不連続の立体構造エピトープであることもできる。自己免疫疾患又は炎症性疾患及び/若しくは障害と関連付けられる多数の不連続エピトープが既知である。不連続エピトープの非限定的な例を表 2 に記載する。

【 0 0 9 7 】

40

【表 2 - 1】

表 2 - 代表的な不連続エピトープ

疾患	エピトープ	完全長ポリペプチド
セリアック病	D151、E153、E154、E155、E158; D306、N308、N310; D434、E435、E437、D438; E329; E153; R19、E153、M659; 又は C277、H335、D358	タンパク質 - グルタミンガンマー グルタミルトランスフェラーゼ 2 配列番号 1725
糖尿病	E517; R255、F256、K257、K263、E264、 K265、L270、P271、R272、L273、 L285、K286、K287、I294、G295、 T296、D297、S298、R317、R318; N483、I484、I485、K486、N487、 R488、E489、G490、Y491、E492、 M493、V494、F495、D496、G497、 K498、P499、F556、F557、R558、 M559、V560、I561、S562、N563、 P564、A565、A566、T567、H568、 Q569、D570、I571、D572、F573、 L574、I575、E576、E577、I578、 E579、R580、L581、G582、Q583、 D584、L585; E264; E517、E520、E521、S524、S527、 V532; E517、E521; K358; R536、Y540	グルタミン酸デカルボキシラーゼ 2 配列番号 1841、1963、2114、 及び 2249
糖尿病	P876、A877、E878、T880; T804; T804、V813、D821、R822、Q862、 P886; T804、V813、D821、R822、Q862、 P886; W799、E836、N858; D911; Q862; L831、H833、V834、E836、Q860; W799、E836、N858; W799、L831、H833、V834、Y835、 E836、Q860;	タンパク質チロシンホスファターゼ、 受容体型、N前駆体 配列番号 2028 及び 2074
糖尿病	R325、R332、E333、K336、K340; R325; W325	亜鉛輸送体 8 アイソフォーム a 配列番号 2421

10

20

30

【 0 0 9 8 】

40

【表 2 - 2】

(表 2 の続き)

疾患	エピトープ	完全長ポリペプチド	
糖尿病	E872、C945	受容体型チロシンタンパク質 フォスファターゼN2 配列番号2198、2260、及び2487	
糖尿病	W799、C909	チロシンホスファターゼ 配列番号2488	
リウマチ性関節炎	L14、M15、I16、S17、R18、N147、 G148、S187、M191、H196、N197、 H198、Y199、Q201、S203	その自己抗原Igg Fcと複合したヒト Igmリウマチ因子の鎖A、結晶構造 配列番号3261	10
全身性エリテマトーデス	K591、S592、G593	ATP依存性DNAヘリカーゼ2 サブユニット1 配列番号3858	
全身性エリテマトーデス	M1、K2、L3、V4、R5、F6、L7、M8、 K9、L10、S11、H12、E13、T14、 V15、T16、I17、E18、L19、K20、 N21、G22、T23、Q24、V25、H26、 P85、K86、V87、K88、S89、K90、 K91、R92、E93、A94、V95、A96、 G97、R98、G99、R100、G101、 R102、G103、R104、G105、R106、 G107、R108、G109、R110、G111、 R112、G113、R114、G115、G116、 P117、R118、R119	核内低分子リボ核タンパク質Sm D1 配列番号3859	20
全身性エリテマトーデス	G59、R62	ベーター2-糖タンパク質I 配列番号4357	
グッドパスチャー症候群	T24、A25、I26、S28、E31、V34、 P35、S38、Q64	IV型コラーゲンアルファ3鎖 配列番号4577	
グッドパスチャー症候群	T1455、A1456、I1457、S1459、 E1462、T1464、V1465、P1466、 Y1468、S1469、Q1495、T1537、 T1565、P1569、H1572、K1579、 A1634	アルファ3 IV型コラーゲン 配列番号4611	30
自己免疫性甲状腺炎	E604、D620、K627、D630； R225、R646、D707； K627； R225； Y772； K713、F714、P715、E716； P715、D717	甲状腺ペルオキシダーゼ 配列番号4695	
自己免疫性甲状腺炎	D36、R38、K42、Q55、K58、I60、 E61、R80、Y82、S84、T104、 H105、E107、R109、N110、 K129、F130、D151、F153、I155、 E157、T181、K183、D203	チロトロピン受容体 配列番号4895	40

【0099】

本発明の別の態様では、抗原を封入する粒子を提供する。粒子の内部に抗原を封入する粒子を使用して、対象においてT細胞寛容を誘導することができる。本発明の粒子内に封入され得る抗原の例としては、ウイルス抗原及び細菌抗原などの外来性抗原、内在性抗原、自己抗原、腫瘍抗原、並びに/又は天然抗原が挙げられるが、これらに限定されない。

【0100】

単球及びマクロファージは、主に、食作用、炎症性サイトカインの放出、活性酸素種、及び後天性免疫系を通して、炎症の発症及び消散において中心的役割を果たす (Auffray et al., 2009 Annu Rev Immunol 27:669~692)。典型的に、単球は、アポトーシスを受ける前に、非常に短い時間血流中で循環

するが、刺激性シグナルは、アポトーシス経路を阻害することによって単球の生存を誘発し、故に炎症応答の維持に寄与し得る。抗アポトーシスタンパク質は、カスパーゼを阻害すること又はアポトーシスプログラムの活性化によって作用する。とりわけ、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(P I - 3 K) / Akt、ERK、Fas、TNF、熱ショックタンパク質、及び抗アポトーシス性分子は、単球の寿命を決定することにおいて重要な役割を果たす。炎症応答中、単球及びマクロファージなどの炎症性細胞は、炎症の部位に補充される。この補充は感染の有効な制御及びクリアランスに必須であるが、補充単球はまた、炎症性疾患及び変性疾患の発病に寄与する。単球の蓄積は有害であり得、アテローム性動脈硬化症、関節炎、及び多発性硬化症などの疾患を悪化させ得る。炎症の消散は、炎症病巣への炎症性細胞の減少及び/又は阻害、並びに既に存在する炎症性細胞のアポトーシスを必要とする。アポトーシス性カスパーゼは、多様な生物学的機能を用いてタンパク質を分解することで細胞をタンパク質分解的に解体することによって基本的な役割を果たす。例えば、カスパーゼ-3の活性化は、CD14⁺単球アポトーシスに必須である(Fahy et al., 1999 J. Immunol. 163: 1755~1762)。

10

【0101】

本発明の負に荷電した粒子(ときに本明細書では「免疫修飾粒子」又は「IMP」として言及する)は、炎症病巣への炎症性単球の移行を特異的に阻害する。炎症性単球は、コラーゲンに依存する様式を持つマクロファージ受容体(MARCO)中にIMPを取り込み、脾臓に遊走し、ここで、カスパーゼ3介在性細胞死を受ける。IMP療法は、西ナイルウイルス(WNV)脳炎、腹膜炎、実験的自己免疫性脳脊髄炎、心筋梗塞後の心機能、腎臓再灌流損傷、及び大腸炎に良い影響を与えることが示されている。IMPは、MARCO依存性様式で炎症性単球を阻害するための代替的及び極めて特異的なツールを提供する。天然の白血球クリアランス経路を生かすことで、IMPは、新規かつ安全な炎症性単球特異的療法を示す。

20

【0102】

一態様では、本発明の方法は、対象において、単球、顆粒球、及び/又は好中球中でアポトーシスを誘導して、炎症応答の重症度又は期間を減少させることを含む。一実施形態では、負に荷電した本発明の粒子を投与することは、単球、顆粒球、及び/又は好中球アポトーシス並びにクリアランスを誘導することで、炎症の消散を補助する。

30

【0103】

一態様では、本発明の方法は、細胞によって産生される炎症性分子及びポリペプチドに結合することで、それらがその活性を発揮するのを防止する、「分子シンク」として使用することを企図する。炎症が起こるときには、サイトカイン及びケモカインなどの炎症誘発性メディエータが、マクロファージ及び単球などの細胞によって周囲の炎症誘発性環境中に放出される。炎症誘発性メディエータの例としては、インターロイキン、TNF族のメンバー、インターフェロン、及びコロニー刺激因子が挙げられるが、これらに限定されない。これらのメディエータは、炎症応答を増強することで炎症性病変を悪化させる。本明細書に記載のように、本発明の粒子は、炎症性免疫応答を受けている動物の血清中で炎症性メディエータに結合する。本発明の粒子が結合する炎症性メディエータとしては、熱ショックタンパク質ベータ-1、タンパク質S100-A7、タンパク質S100-A8、タンパク質S100-A9、脂肪酸結合タンパク質、アネキシンA1、及びユビキチン交差反応性タンパク質前駆体が挙げられるが、これらに限定されない。コーティングしていない本発明の粒子の動物への投与は、炎症病巣に存在する炎症性単球の減少、炎症症状の減少、及び感染動物の生存の増加をもたらす。

40

【0104】

上で考察したように、本発明は、免疫介在性障害の治療に有用な生物学的特性を有する新規化合物を提供する。

【0105】

したがって、本発明の別の態様では、粒子を含み、かつ薬学的に許容される担体を任意

50

選択的に含む、薬学的組成物を提供する。ある特定の実施形態では、これらの組成物は、1つ又は2つ以上の追加の治療薬を任意選択的に更に含む。別の実施形態では、本発明の粒子は、抗原を封入し得るか、又は抗原を埋め込まれてもよい。あるいは、本発明の粒子は、1つ又は2つ以上の他の治療薬の投与と組み合わせ、それを必要とする患者に投与してもよい。例えば、本発明の化合物との共同投与、又は薬学的組成物中への本発明の化合物の含有のための追加の治療薬は、承認された抗炎症薬であってもよく、あるいは、無制御の炎症性免疫応答又は細菌若しくはウイルス感染を特徴とするいずれかの障害の治療のために最終的に承認を得る、食品医薬品局で承認を受けている最中の多数の薬剤のうちのいずれか1つであってもよい。本発明の修飾された粒子のある特定のものは、治療のために遊離型で、又は適切な場合にはその薬学的に許容される誘導体として、存在することができる。

10

【0106】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を追加で含み、この担体としては、本明細書で使用する場合、所望の特定の剤形に適したように、ありとあらゆる溶媒、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散若しくは懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤若しくは乳化剤、防腐剤、固体結合剤、滑沢剤などが挙げられる。Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) は、薬学的組成物の製剤化に使用される種々の担体、及びその調製のための既知の技法を開示する。望ましくない生物学的影響をもたらすこと、あるいは薬学的組成物の任意の他の成分(複数可)と有害な様式で相互作用することによってなど、いずれの従来の担体媒体もが本発明の化合物と不適合である限りにおいて、その使用は本発明の範囲内であると企図される。薬学的に許容される担体として働き得る物質の一部の例としては、ラクトース、グルコース、及びスクロースなどの糖類; コーンスターチ及びジャガイモデンプンなどのデンプン; カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロースなどのセルロース及びその誘導体; 粉末トラガカント; 麦芽; ゼラチン; 滑石; ココアバター及び坐薬ワックスなどの賦形剤; ピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、胡麻油、オリーブ油、トウモロコシ油、及び大豆油などの油類; プロピレングリコールなどのグリコール類; オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル; 寒天; 水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤; アルギン酸; 発熱物質を含まない水; 等張食塩水; リンガー溶液; エチルアルコール、並びにリン酸緩衝溶液が挙げられるがこれらに限定されず、かつラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムなどの他の無毒の相溶性滑沢剤、併せて着色剤、解除剤、コーティング剤、甘味、香味、及び芳香剤、防腐剤、並びに抗酸化剤も、製剤化担当者の判断に従って、組成中に存在し得る。

20

30

【0107】

経口投与のための液体剤形としては、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、及びエリキシルが挙げられるが、これらに限定されない。活性化化合物に加えて、液体剤形は、例えば水又は他の溶媒などの当技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油類(具体的には、綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、及び胡麻油)、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、及びソルビタンの脂肪酸エステルなどの、可溶化剤及び乳化剤、並びにこれらの混合物を含有してもよい。不活性希釈剤に加えて、経口用組成物はまた、湿潤剤、乳化及び懸濁剤、甘味剤、香味剤、及び芳香剤などのアジュバントを含むことができる。

40

【0108】

注射可能な調剤、例えば、滅菌の注射可能な水性又は油性懸濁液は、好適な分散又は湿潤剤及び懸濁化剤を使用して、既知の技術に従って製剤化し得る。滅菌の注射可能な調剤

50

はまた、無毒の非経口的に許容される希釈剤又は溶媒中の滅菌の注射可能な溶液、懸濁液、又はエマルション、例えば、1, 3 - ブタンジオール中の溶液としてあってもよい。用いることができる許容可能なビヒクル及び溶媒には、水、リンガー溶液、U.S.P.、及び等張食塩水がある。加えて、滅菌凝固油が、溶媒又は懸濁媒体として従来的に用いられる。この目的では、合成モノグリセリド又はジグリセリドを含むいかなる無菌性凝固油も用いることができる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸が、注射可能物質の調製に使用される。

【0109】

注射可能な製剤は、例えば、細菌保持フィルタを通した濾過によって、又は使用前に滅菌水若しくは他の注射可能な滅菌媒体中に溶解若しくは分散させ得る滅菌固体組成物の形態にある滅菌剤を組み込むことにより、滅菌することができる。

10

【0110】

薬物の効果を延長するために、皮下又は筋肉注射からの薬物の吸収を遅延させることが望ましい場合が多い。これは、液体懸濁液、又は難水溶性の結晶質若しくは非晶質物質の使用によって達成し得る。そして薬物の吸収の速度はその溶解速度に依存し、この溶解速度は、今度は結晶サイズ及び結晶形に依存し得る。あるいは、非経口的に投与された薬物形態の遅延吸収は、薬物を油性ビヒクル中に溶解させるか又は懸濁することによって達成される。注射可能なデポー剤形は、ポリラクチド - ポリグリコリドなどの生分解性重合体中の薬物のマイクロカプセル化マトリックスを形成することによって作製される。薬物の重合体に対する比率、及び用いる特定の重合体の性質に応じて、薬物放出の速度を制御することができる。他の生分解性重合体の例としては、(ポリ(オルトエステル)及びポリ(無水物)が挙げられる。注射可能なデポー剤形はまた、体組織と互換性のあるリポソーム又はマイクロエマルション中に薬物を封入することによっても調製される。ある特定の実施形態では、薬物及び治療薬は、対象への投与のために本発明の粒子中にカプセル化してもよい。

20

【0111】

経口投与のための固形剤形としては、カプセル錠、錠剤、丸薬、粉末剤、及び顆粒剤が挙げられる。このような固形剤形において、この修飾された粒子は、少なくとも1つのクエン酸ナトリウム又はリン酸ニカルシウムなどの不活性な薬学的に許容される賦形剤若しくは担体、並びにノ又はa) デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、及びケイ酸などの充填剤又は増量剤、b) 例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロース、及びアカシアなどの結合剤、c) グリセロールなどの保湿剤、d) 寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ又はタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウムなどの崩壊剤、e) パラフィンなどの溶液緩和剤、f) 第4級アンモニウム化合物などの吸収促進剤、g) 例えば、セチルアルコール及びグリセロールモノステアレートなどの湿潤剤、h) カオリン及びベントナイト粘土などの吸収剤、並びにi) 滑石、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、及びこれらの混合物などの滑沢剤と混合する。カプセル錠、錠剤、及び丸薬の場合には、剤形はまた、緩衝剤を含んでもよい。

30

40

【0112】

類似の型の固形組成物も、ラクトース又は乳糖及び超高分子量ポリエチレングリコールなどの賦形剤を使用して、軟及び硬ゼラチンカプセルにおける充填剤として用いてもよい。錠剤、糖衣錠、カプセル錠、丸薬、及び顆粒剤の固形剤形は、腸溶コーティング及び薬学的製剤化分野で公知の他のコーティングなどのコーティング及びシェルを用いて調製することができる。これらは、不透明化剤を任意選択で含有してもよく、これらが、任意選択で遅延した様式で、腸管のある特定の部分においてのみ又はそこで優先的に、活性成分(複数可)を放出するような組成物であることもできる。使用し得る埋め込み組成物の例としては、重合物質及びワックスが挙げられる。類似の型の固形組成物も、ラクトース又は乳糖及び超高分子量ポリエチレングリコールなどの賦形剤を使用して、軟及び硬ゼラチ

50

ンカプセルにおける充填剤として用いてもよい。

【0113】

修飾された粒子も、上記のような1つ又は2つ以上の賦形剤を用いたマイクロカプセル化形態にあることができる。錠剤、糖衣錠、カプセル錠、丸薬、及び顆粒剤の固形剤形は、腸溶コーティング、放出制御コーティング、及び薬学的製剤化分野で公知の他のコーティングなどのコーティング及びシェルを用いて調製することができる。このような固形剤形において、活性化化合物は、スクロース、ラクトース、及びデンプンなどの少なくとも1つの不活性希釈剤と混合してもよい。このような剤形はまた、通常の慣行のように、不活性希釈剤以外の追加的な物質、例えば、ステアリン酸マグネシウム及び微結晶性セルロースなどの錠剤化滑沢剤及び他の錠剤化助剤を含んでもよい。カプセル錠、錠剤、及び丸薬の場合には、剤形はまた、緩衝剤を含んでもよい。これらは、不透明化剤を任意選択で含有してもよく、これらが、任意選択で遅延した様式で、腸管のある特定の部分においてのみ又はそこで優先的に、修飾された粒子を放出するような組成物であることもできる。使用し得る埋め込み組成物の例としては、重合物質及びワックスが挙げられる。

10

【0114】

本発明は、本発明の修飾された粒子の薬学的に許容される局所製剤を包含する。本明細書で使用する「薬学的に許容される局所製剤」という用語は、表皮への製剤の適用による、本発明の修飾された粒子の皮膚内投与に対して薬学的に許容されるいずれの製剤も意味する。本発明のある特定の実施形態では、局所製剤は担体系を含む。薬学的に有効な担体としては、溶剤（例えば、アルコール、多価アルコール、水）、クリーム剤、ローション剤、軟膏、油剤、硬膏、リポソーム剤、粉末剤、エマルジョン、マイクロエマルジョン、及び緩衝溶液（例えば、低張又は緩衝食塩水）、又は医薬品を局所投与するための当技術分野で既知の任意の他の担体が挙げられるが、これらに限定されない。当技術分野で既知の担体のより完全な一覧は、当技術分野における基準である参照文献、例えば、共に Mack Publishing Company, Easton, Pa. から出版される Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, 1980、及び17th Edition, 1985によって提供され、これらの開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ある特定の他の実施形態では、本発明の局所製剤は、賦形剤を含んでもよい。当技術分野で既知の任意の薬学的に許容される賦形剤を使用して、本発明の薬学的に許容される局所製剤を調製し得る。本発明の局所製剤に含めることができる賦形剤の例としては、防腐剤、抗酸化剤、保湿剤、軟化剤、緩衝剤、可溶化剤、他の浸透剤、皮膚保護剤、界面活性剤、及び噴射剤、並びに/又はこの修飾された粒子と組み合わせて使用される追加的な治療薬が挙げられるが、これらに限定されない。好適な防腐剤としては、アルコール、第4級アミン、有機酸、パラベン、及びフェノールが挙げられるが、これらに限定されない。好適な抗酸化剤としては、アスコルビン酸及びそのエステル、亜硫酸水素ナトリウム、ブチル化ヒドロキシトルエン、ブチル化ヒドロキシアニソール、トコフェノール、並びにEDTA及びクエン酸のようなキレート剤が挙げられるが、これらに限定されない。好適な保湿剤としては、グリセリン、ソルビトール、ポリエチレングリコール、尿素、及びプロピレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。本発明との使用に好適な緩衝剤としては、クエン酸、塩酸、及び乳酸緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。好適な可溶化剤としては、第4級アンモニウムクロリド、シクロデキストリン、安息香酸ベンジル、レシチン、及びポリソルベートが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の局所製剤において使用し得る好適な皮膚保護剤としては、ビタミンE油、アラトイン、ジメチコーン、グリセリン、ペトロラタム、及び酸化亜鉛が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0115】

ある特定の実施形態では、本発明の薬学的に許容される局所製剤は、少なくとも本発明の修飾された粒子と浸透促進剤とを含む。局所製剤の選択は、治療される状態、本発明の化合物及び存在する他の賦形剤の物理化学的特徴、製剤中でのこれらの安定性、利用可能な製造設備、並びに費用上の制約を含むいくつかの要因に依存することになる。本明細書

50

で使用する「浸透促進剤」という用語は、全身性吸収をほとんど又は全く行わずに、薬理的に活性な化合物を、角質層を通して表皮又は真皮へと輸送することが可能な薬剤を意味する。多種多様な化合物が、皮膚を通じた薬物の浸透速度を促進することにおけるその有効性について評価されている。例えば、種々の皮膚浸透促進剤の使用及び試験を調査している、*Percutaneous Penetration Enhancers*, Maibach H.I. and Smith H.E. (eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995)、並びに Buyuktinkin 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) を参照されたい。ある特定の例示的な実施形態では、本発明と共に使用するための浸透剤としては、トリグリセリド（例えば、大豆油）、アロエ組成物（例えば、アロエベラゲル）、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、オクトリフェニルポリエチレングリコール（octolyphenylpolyethylene glycol）、オレイン酸、ポリエチレングリコール 400、プロピレングリコール、N-デシルメチルスルホキシド、脂肪酸エステル（例えば、ミリスチン酸イソプロピル、ラウリン酸メチル、グリセロールモノオレエート、及びプロピレングリコールモノオレエート）、及びN-メチルピロリドンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0116】

ある特定の実施形態では、本組成物は、軟膏、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、粉末剤、溶剤、噴霧剤、吸入剤、又はパッチ剤の形態にあってもよい。ある特定の例示的な実施形態では、本発明に従う組成物の製剤はクリームであり、これは更に、飽和又は不飽和脂肪酸、例えば、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、パルミトオレイン酸、セチル又はオレイルアルコールを含んでもよく、ステアリン酸が特に好ましい。本発明のクリーム剤は、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリオキシ-40-ステアレートも含み得る。ある特定の実施形態では、活性成分は、滅菌条件下で、薬学的に許容される担体及び任意の必要な防腐剤又は必要に応じて緩衝剤と混合する。眼用製剤、点耳剤、及び点眼剤も、本発明の範囲内にあるものと企図される。加えて、本発明は、化合物の体内への制御送達を提供する付加的利点を有する経皮パッチ剤の使用を企図する。このような剤形は、化合物を適切な媒体に溶解又は分散させることによって作製される。上述のように、浸透促進剤は、皮膚を通じた化合物の流量を増加させるためにも使用することができる。速度は、速度制御膜を提供するか、あるいは化合物を重合体マトリックス又はゲルに分散させることによって制御することができる。

【0117】

修飾された粒子は、エアロゾルによって投与することができる。これは、修飾された粒子を含有する水性エアロゾル、リポソーム調剤、又は固形粒子を調製することによって達成される。非水性（例えば、フルオロカーボン噴射剤）懸濁剤を使用し得る。

【0118】

通常は、水性エアロゾルは、従来の薬学的に許容される担体及び安定剤と共に薬剤の水溶液又は懸濁液を製剤化することによって作製される。担体及び安定剤は特定の化合物の要件によって異なるが、典型的には、非イオン性界面活性剤（Tweens、Pluronic（登録商標）、又はポリエチレングリコール）、血清アルブミンのような無害のタンパク質、ソルビタンエステル、オレイン酸、レシチン、グリシンなどのアミノ酸、緩衝液、塩、糖類、又は糖アルコールが挙げられる。エアロゾルは概して等張液から調製される。

【0119】

本発明の修飾された粒子及び薬学的組成物は、併用療法において製剤化し用いることができ、これはつまり、化合物及び薬学的組成物が、1つ若しくは2つ以上の他の所望され

10

20

30

40

50

る治療薬若しくは医療処置と共に製剤化するか、又はそれらと同時に、それらの前若しくは後に、投与することができるということも理解されるであろう。併用レジメンにおいて用いる療法（治療薬又は処置）の特定の組み合わせは、所望の治療薬及び／又は処置と達成が所望される治療効果との適合性を考慮に入れることになる。用いる療法は、同じ障害に対して所望の効果を達成し得る（例えば、本発明の化合物は、別の抗炎症剤と同時に投与し得る）か、又はこれらの療法は、異なる効果（例えば、任意の副作用の制御）を達成してもよい。

【0120】

ある特定の実施形態では、本発明の修飾された粒子を含有する薬学的組成物（例えば、抗炎症性及び／又は緩和的）は、1つ又は2つ以上の追加的な治療的活性成分を更に含む。本発明の目的では、「緩和的」という用語は、疾患の症状及び／又は治療レジメンの副作用の軽減に集中するが、治癒的ではない治療を指す。例えば、緩和的治療は、鎮痛剤、抗悪心薬（antinausea）、及び吐気止め薬（anti-sickness drug）を包含する。

10

【0121】

本発明は、個体、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおいて免疫応答を調節する方法を提供し、本方法は、本明細書に記載の修飾された粒子を個体に投与することを含む。本発明によって提供される免疫調節の方法は、免疫賦活性ポリペプチド又はウイルス若しくは細菌成分によって刺激される免疫応答を含むがこれに限定されない、先天性免疫応答又は適応免疫応答を抑制及び／又は阻害するものを含む。

【0122】

修飾された粒子は、免疫応答を調節するのに十分な量で投与される。本明細書に記載のように、免疫応答の調節は、液性及び／又は細胞性であってもよく、当技術分野における標準的な技法を使用して、及び本明細書に記載のように、測定される。

20

【0123】

ある特定の実施形態では、個体は、アレルギー性疾患又は状態、アレルギー、及び喘息などの不必要な免疫活性化と関連付けられる障害を患う。アレルギー性疾患又は喘息を有する個体とは、既存のアレルギー性疾患又は喘息の認識可能な症状を持つ個体である。

【0124】

ある特定の実施形態では、個体は、自己免疫疾患及び炎症性疾患などの不必要な免疫活性化と関連付けられる障害を患う。自己免疫疾患又は炎症性疾患を有する個体とは、既存の自己免疫疾患又は炎症性疾患の認識可能な症状を持つ個体である。

30

【0125】

自己免疫疾患は、臓器特異性及び全身性という2つの広義のカテゴリーに分類することができる。自己免疫疾患としては、リウマチ性関節炎（RA）、全身性エリテマトーデス（SLE）、1型真性糖尿病、2型真性糖尿病、多発性硬化症（MS）、早発閉経などの免疫介在性不妊症、強皮症、シェーグレン病、白斑、脱毛症（禿げ）、多腺性不全、グレーブス病、甲状腺機能低下症、多発性筋炎、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患、セリアック病、B型肝炎ウイルス（HBV）及びC型肝炎ウイルス（HCV）と関連付けられるものを含む自己免疫性肝炎、下垂体機能低下症、移植片対宿主病（GVHD）、心筋炎、アジソン病、自己免疫性皮膚疾患、ブドウ膜炎、悪性貧血、並びに副甲状腺機能低下症が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0126】

自己免疫疾患としてはまた、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、橋本病甲状腺炎、1型及び2型自己免疫性多腺性症候群、腫瘍随伴性天疱瘡、ブルス類天疱瘡、疱疹状皮膚炎、線状IgA病、後天性表皮水疱症、結節性紅斑、妊娠性類天疱瘡、癩痕性類天疱瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、幼少期の慢性水疱性疾患、溶血性貧血、血小板減少性紫斑病、グッドパスチャー症候群、自己免疫性好中球減少症、重症筋無力症、イトン・ランバート筋無力症候群、スティフマン症候群、急性散在性脳脊髄炎、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、伝導障害を伴う多巣性運動ニューロパチー、単クローン性免疫グロブリン血症を伴う慢性神経障害、オプソノクローヌス・ミオクローヌス

50

症候群、小脳変性症、脳脊髄炎、網膜症、原発性胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、グルテン過敏性腸疾患、強直性脊椎炎、反応性関節炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、混合性結合組織疾患、ペチエット病、乾癬、結節性多発動脈炎、アレルギー性血管炎性肉芽腫症(チャージ・ストラウス症候群)、多発性血管炎重複症候群、過敏性血管炎、ウエゲナー肉芽腫症、側頭動脈炎、高安動脈炎、川崎病、中枢神経系孤立性血管炎、閉塞性血栓性血管炎、サルコイドーシス、糸球体腎炎、及び寒冷症が挙げられるが、これらに限定されない。これらの状態は医学の分野で周知であり、例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th ed., Fauci A S et al., eds., New York: McGraw-Hill, 1998中で説明される。

10

【0127】

本発明の粒子で治療される対象はヒトであることが好ましいが、粒子は非ヒト動物種の治療に有用である。本発明の粒子で治療され得る非ヒト動物種としては、イヌ、ネコ、ニワトリ、ガチョウ、アヒル、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタ、非ヒト霊長類、サル、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、アレチネズミ、及びウマが挙げられるが、これらに限定されない。

【0128】

自己免疫疾患の研究のための動物モデルは、当技術分野で既知である。例えば、ヒトの自己免疫疾患に最も類似しているように思われる動物モデルとしては、特定の疾患の高い発症率を自然発現する動物系統が挙げられる。このようなモデルの例としては、1型糖尿病と同様の疾患を発症する非肥満糖尿病(NOD)マウス、並びにニュージーランドハイブリッド、MRL-Fas^{lpr}、及びBXSBマウスなどのループス様疾患にかかりやすい動物が挙げられるが、これらに限定されない。自己免疫疾患を誘導した動物モデルとしては、多発性硬化症に対するモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、リウマチ性関節炎に対するモデルであるコラーゲン誘導性関節炎(CIA)、及びブドウ膜炎に対するモデルである実験的自己免疫性ブドウ膜炎(EAU)が挙げられるが、これらに限定されない。自己免疫疾患のための動物モデルはまた、遺伝子操作によって創出し、例えば、炎症性腸疾患に対するIL-2/IL-10ノックアウトマウス、SLEに対するFas又はFasリガンドノックアウトマウス、及びリウマチ性関節炎に対するIL-I受容体アンタゴニストノックアウトマウスを含む。

20

30

【0129】

ある特定の実施形態では、個体は細菌又はウイルス感染を患う。細菌又はウイルス感染を有する個体とは、既存の細菌又はウイルス感染の認識可能な症状を持つ個体である。

【0130】

本発明の修飾された粒子で治療可能なウイルス感染の非限定的な一覧は、ヘルペスウイルス感染、肝炎ウイルス感染、西ナイルウイルス感染、フラビウイルス感染、インフルエンザウイルス感染、ライノウイルス感染、パピロマウイルス感染、パロミクソウイルス感染、パラインフルエンザウイルス感染、及びレトロウイルス感染を含む。好ましいウイルスは、対象の中枢神経系に感染するウイルスである。最も好ましいウイルスは、脳炎又は髄膜炎を引き起こすウイルスである。

40

【0131】

本発明の修飾された粒子で治療可能な細菌感染の非限定的な一覧は、ブドウ球菌感染、連鎖球菌感染、抗酸菌感染、バシラス感染、サルモネラ菌感染、ピブリオ感染、スピロヘータ感染、及びナイセリア感染を含む。対象の中枢神経系に感染する細菌が好ましい。脳炎又は髄膜炎を引き起こす細菌が最も好ましい。

【0132】

一部の実施形態では、本発明は、疾患の発症前に本発明の組成物を使用することに関する。他の実施形態では、本発明は、進行中の疾患を阻害するために本発明の組成物を使用することに関する。一部の実施形態では、本発明は、対象において疾患を寛解させることに関する。対象において疾患を寛解させることとは、対象において疾患を治療、予防、又

50

は抑制することを含む。

【0133】

一部の実施形態では、本発明は、疾患の再発を予防することに関する。例えば、不必要な免疫応答は、ペプチドの1つの領域（抗原決定基など）で発生し得る。不必要な免疫応答と関連付けられる疾患の再発は、ペプチドの異なる領域で免疫応答攻撃を有することによって発生し得る。本発明の負に荷電した粒子は、結合したペプチド又は抗原部分を含まないため、粒子は複数のエピトープに対して効果的となる。MS及び他のTh1/17介在性自己免疫疾患を含む一部の免疫応答障害におけるT細胞応答は動的であり、再発寛解型疾患及び/又は慢性進行性疾患の経過中に進化し得る。T細胞レパートリーの動的性質は、疾患が進行するにつれて標的が変化し得るため、ある特定の疾患の治療に対する影響を有する。これまでは、疾患の進行を予測するためには、応答パターンの事前の知識が必要とされた。本発明は、動的に変化する疾患の作用である「エピトープ伝播」の機能を予防することができる組成物を提供する。再発に対する既知のモデルは、多発性硬化症（MS）に対するモデルのように、プロテオリピドタンパク質（PLP）に対する免疫反応である。初期の免疫応答は、PLP139-15に対する応答によって発生し得る。後続の疾患の発症は、PLP[pi]s-i iに対する再発免疫応答によって発生し得る。

10

【0134】

本発明のある特定の実施形態は、不必要な過敏症に関係する病変状態の治療に関する。過敏症は、1型、2型、3型、及び4型のうちのいずれかであり得る。即時型（1型）過敏症。投与の頻度は、典型的にはアレルゲン曝露のタイミングに対応することになる。好適な動物モデルは、当技術分野で既知である（例えば、Gundel et al., Am. Rev. Respir. Dis. 146:369, 1992, Wada et al., J. Med. Chem. 39, 2055, 1996、及び国際公開第WO 96/35418号）。

20

【0135】

本発明の他の実施形態は、移植に関する。これは、ドナー個体からレシピエント個体への組織試料又は移植片の移動を指し、組織によって提供される生理学的機能を復元するために組織を必要とするヒトレシピエントに対して頻繁に行われる。移植される組織としては、腎臓、肝臓、心臓、肺などの全臓器；皮膚移植片及び眼の角膜などの臓器構成要素；並びに骨髓細胞、及び骨髓又は循環血液から選択し増殖させた細胞の培養物などの細胞浮遊液、並びに全血輸血が挙げられる（しかしこれらに限定されない）。

30

【0136】

いかなる移植の重度の起こり得る合併症も、宿主レシピエントと移植された組織との間の抗原性の差異の結果として起きる。差異の性質及び程度に応じて、宿主による移植片の、又は移植片による宿主の、又は両方の免疫学的攻撃が発生し得る危険性があり得る。危険性の程度は、同様の表現型を持つ同様に治療された対象の集団における応答パターンをたどり、広く受け入れられている臨床手順に従って種々の考えられる要因を相互に関連付けることによって決定する。免疫学的攻撃は、既存の免疫応答（事前に形成された抗体など）、又は移植時の前後に始動される免疫応答（TH細胞の生成など）の結果であり得る。抗体、TH細胞、又はTc細胞は、相互、並びに種々のエフェクター分子及び細胞との任意の組み合わせで関与し得る。しかしながら、免疫応答に関与する抗原は概して知られていないため、抗原特異的療法の設計又は抗原特異的寛容の誘導に困難をもたらしている。本発明の修飾された粒子は、臓器の拒絶反応を予防するのに特に有用であり、これは、粒子が寛容の誘導に有効であるために、又は炎症性免疫応答を寛解させるために、結合したペプチド又は抗原が修飾された粒子に共役される必要がないことによる。

40

【0137】

本発明のある特定の実施形態は、レシピエントによる組織移植片の拒絶反応をもたらす宿主対移植片病の危険性を減少させることに関する。治療は、超急性、急性、又は慢性拒絶反応の影響を予防するか、又は減少させるために行い得る。治療は、移植片を導入するときに寛容が整っているように、移植の十分はるか前に優先的に開始するが、それが可能

50

でない場合には、治療は、移植と同時か、又は移植の後に開始することができる。開始の時に関わらず、治療は概して、少なくとも移植後最初の月の間、一定間隔で継続することになる。移植片の十分な順応が起こる場合にはフォローアップの投薬は不要であり得るが、移植片の拒絶反応又は炎症の兆候が何かある場合には、再開することができる。もちろん、本発明の寛容化手順は、免疫抑制の他の形態と組み合わせ、更に低いレベルの危険性を達成してもよい。

【0138】

本発明のある特定の実施形態は、手術に対する応答として誘導される炎症応答を減少させるか、あるいは寛解させることに関する。本発明の一実施形態では、免疫修飾粒子は手術前に投与する。本発明の更なる実施形態では、免疫修飾粒子は、手術と並行して、又は手術中に投与する。本発明のなお更なる実施形態では、免疫修飾粒子は手術後に投与する。

10

【0139】

本発明の粒子はまた、膿瘍又は膿胸を治療するために使用して、細菌又は寄生生物などの病原体への曝露後に対象において産生される炎症応答を減少させ得る。本発明の一実施形態では、免疫修飾粒子は、当技術分野で既知の抗細菌及び/又は抗寄生生物治療と共に投与する。

【0140】

本発明の粒子はまた、スポーツ損傷、創傷、脊髄損傷、脳損傷、及び/又は軟部組織損傷を含むがこれらに限定されない身体的外傷又は損傷に対する応答として誘導される炎症応答を減少させ得るか、あるいは寛解させ得る。本発明の一実施形態では、免疫修飾粒子は、対象が外傷又は損傷を経た後に投与する。

20

【0141】

本発明の粒子はまた、癌細胞の発現及び/又は増殖と関連付けられる炎症応答を減少させるために使用してもよい。治療可能であり得る癌としては、中枢神経系癌、基底細胞癌腫、癌性脳腫瘍、パーキットリンパ腫、リンパ腫、子宮頸癌、卵巣癌、精巣癌、肝臓癌、非小細胞及び小細胞肺癌、黒色腫、膀胱癌、乳癌、結腸及び直腸癌、子宮内膜癌、腎臓(腎細胞)癌、白血病、非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、前立腺癌、並びに甲状腺癌が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、本発明の粒子の皮下注射は、抑制性好中球又は単球由来サプレッサー細胞の蓄積を防止することで、癌患者において腫瘍特異的免疫応答を強化又は促進する。

30

【0142】

本発明の粒子は、傷害を受けた組織の再生にも有用である。一実施形態では、患者への粒子の投与は、消化管中の傷害を受けた上皮細胞の再生を増加させる。更なる実施形態では、患者は、潰瘍性大腸炎、クローン病、又は炎症性腸疾患を患う。別の実施形態では、患者への本発明の粒子の投与は、ニューロンの再ミエリン化を増加させる。更なる実施形態では、患者は多発性硬化症を患う。

【実施例】

【0143】

以下の実施例を本発明の利点及び特徴を更に例解するために提供するが、本開示の範囲を制限することは意図しない。

40

【0144】

材料及び方法

マウス

WNV及びIBD研究のために、生後8週の雌のC57BL/6マウスをAnimal Resources Centre(WA, Australia)から入手した。全手順は、University of Sydney Animal Ethics Committeeの許可を得て行った。EAE研究のために、生後8週の雌のSJL/JマウスをHarlan Laboratories(Indianapolis, IN, USA)から入手した。チオグリコール酸塩研究のために、生後8週の雌のBalb/cを

50

National Cancer Institute (MD, USA) から入手した。Balb/c バックグラウンドの MARCO-/- 動物は、Lester Kobzik (Harvard University, MA, USA) の厚意により提供された。心臓炎症研究のために、生後 12 週の雄の C57BL/6 マウスを Jackson Laboratory (ME, USA) から購入した。全手順は、Northwestern University Institutional Animal Care and Use Committee の許可を得て行った。全動物は、飼料及び水を適宜与えた、特定病原体のない状態で飼育した。

【0145】

WNV 感染

WNV (Sarafend) を新生乳マウスの脳から得、インビトロの細胞培養で増殖させた (Getts et al., J. Exp. Med. 205: 2319~2337, 2008)。WNV 感染を C57BL/6 動物中で実施した (Getts et al., J. Exp. Med. 205: 2319~2337, 2008)。マウスを、10 μ L の滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, Invitrogen, CA, USA) 中の 6 \times 10⁴ 又は 6 \times 10³ の PFU WNV に鼻腔内感染させた。滅菌 PBS のみを使用して 24 回の擬似感染を実施した。感染させた後、マウスの体重を毎日測定した。

10

【0146】

チオグリコール酸塩誘導性腹膜炎

腹膜炎の感染を、滅菌水 (Sigma Aldrich, MO, USA) 中で調製した 1 ml の 4% (w/v) のチオグリコール酸塩ブロスの腹腔内注射で行った。氷冷した 0.05 mM の EDTA PBS 溶液を使用した腹腔内灌流 (洗浄) によって、白血球を定められた時点で単離した。

20

【0147】

EAE 誘導

PLP 139-151 (HSLGKWLGHDPKF) ペプチド誘導性 EAE を、SJL/J マウス中で誘導した (Getts et al., J. Immunol. 187: 2405~2417, 2011)。個々の動物を毎日観察し、臨床スコアを、以下の通りの 0~5 の尺度で盲検様式において評定した。0 = 異常なし、1 = 軟弱な尾又は後肢の脱力、2 = 軟弱な尾及び後肢の脱力、3 = 後肢の麻痺、4 = 後肢の麻痺及び前肢の脱力、5 = 瀕死。これらのデータを平均臨床スコアとして報告する。麻痺した動物は飼料及び水により容易にアクセスできるようにした。

30

【0148】

心筋梗塞 (Cardiac infarction)

心筋梗塞 (myocardial infarction) を C57BL/6 マウス中で実施した。左前下行枝を手術によって回復不能に閉塞させた (Yeap et al., Methods in Molecular Biology, In Press)。

【0149】

腎臓虚血再灌流の誘導

腎動脈を 45 分間結紮し、その後解放して腎臓の完全な再灌流を可能にした。

40

【0150】

炎症性腸疾患の誘導

IBD の DSS 誘導性大腸炎モデルを誘導した (Bao et al., Immunol. Cell Bio. 89: 853~860, 2011)。水道水に溶解させた 2.5% w/v 25 の D デキストラン硫酸ナトリウム (DSS, MW 36,000~44,000 D, ICN Biomedicals, Australasia) を 9 日間連続で適宜投与した 41。この期間中、対照群は水道水のみを受けた。体重及び臨床評定を毎日測定した。体重減少の百分率を次のように計算した。((0 日目~9 日目) の平均体重 / 0 日目の体重) \times 100。体重測定後、可動性及び歩行、発声、集団交流、並びに毛繕いを含む臨床パラメータについてマウスを検査した。各パラメータを 0~2 の値で採点し

50

、ここでは、総計値 0 ~ 1 が正常、2 ~ 4 が軽度、5 ~ 7 が中等度、8 ~ 10 が重度を表す 41。便評定を可能であれば毎日測定した。便の稠度、血便、及び直腸出血についてスコアをつけた。0 ~ 6 の総計値は便スコアを反映し、ここでは、0 の値は正常な外観の便を表し、6 の値は重度の下痢、直腸出血、及び便中の血液の存在を表す。

【0151】

粒子の静脈内送達

FITC 又は Bright Blue (BB) Fluoresbrite プレーン及びカルボキシル化ポリスチレン粒子 (粒径 0.5 μm) を Polysciences (PA, USA) から入手した。FITC 乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) と、FITC ポリスチレンのプレーン、カルボキシル化、及びアミノ化粒子 (粒径 500 nm) とを Phosphorex (MA, USA) から得た。カルボキシル化した 500 nm のナノダイヤモンドを Macquarie University 又は Sydney University (NSW, Australia) で生成した。粒子を滅菌 PBS 中で指示濃度まで希釈して、指示通りに 200 μL を静脈内注射した。ビヒクル対照動物は、200 μL の滅菌 PBS のみを受けた。組織を規定の時点で採取し、フローサイトメトリー、組織学検査、又は免疫組織化学検査のために処理した。骨髄由来の Ly6C^{hi} 炎症性単球の単離及び選別を Getts et al., 2008 に記載のように行い、単離した細胞は PKH26 (Invitrogen) で標識し、 2.0×10^6 の細胞は免疫付与後 6 日目に擬似及び WNV 感染レシピエントに静脈内注射した。特異的粒子特性を表 3 に定義する。

【0152】

フローサイトメトリー

マウスに麻酔し、50 mL の滅菌 PBS を用いて灌流した。脾臓、脳、骨髄、血液、及び腹水を単離し、処理して単個細胞浮遊液にした (Getts et al., J. Exp. Med. 205: 2319 ~ 2337, 2008)。細胞を抗 CD16/32 と共にインキュベートし、トリパンブルー色素排除法を使用して生細胞を計数すると、常に 95% 超の生存性を示した。その後、細胞を、CD45、CD11b、Ly6C、Ly6G、CD11c、CD103、ETC (Biolegend) に対する蛍光標識した抗体と共にインキュベートした。細胞表面分子の発現を、FACS Diva プログラム (Becton Dickinson, NJ, USA) を使用して、FACS LSR-II 上で測定した。生存集団を前方及び側方散乱によってゲーティングし、その後前方ゲーティングによって決定された蛍光集団を特定した。得た FACS データファイルを、フローサイトメトリープログラム Flow Jo (Tree Star, Inc. OR, USA) を使用して分析した。目的とする細胞集団の定量を、分析でのフローサイトメトリーの百分率及び各臓器からの絶対細胞数に基づいて計算した。

【0153】

養子移入

免疫付与後 6 日目に WNV 感染動物の骨髄を処理して単個細胞浮遊液にし、CD11b、Ly6C、及び Ly6G に対する蛍光標識した抗体と共にインキュベートした。CD11b⁺、Ly6C^{hi}、Ly6G⁻ 単球を、98% 超の純度を達成するように設定した厳密度で、FACS Diva プログラム (Becton Dickinson) を使用して、FACS Aria 上で選別した。その後、細胞を、製造業者の説明書に従って、蛍光性膜染料 PKH26 (Invitrogen) を用いて標識した。整合した擬似感染及び WNV 感染レシピエントに、免疫付与後 6 日目に、200 μL の PBS 中で送達した、 2.0×10^6 で選別した Ly6C^{hi} 単球を静脈内注射した。上記のように、脳及び脾臓を、免疫付与後 7 日目にレシピエントから単離した。(移入後 24 h)、フローサイトメトリーのために処理した。

【0154】

組織学検査及び免疫組織化学検査

マウスに麻酔し、50 mL の滅菌 PBS を用いて灌流した。処理してパラフィンにした

心臓 (Getts et al., J. Neurochem 103:10919~10330, 2007) を除いて、全臓器を単離し、Optimum Cutting Temperature Compound (OCT, Tissue-Tek, Tokyo, Japan) 中で急速凍結させた。8ミクロンの組織切片をクリオスタットミクロトーム上で切り取り、一晩空気乾燥させ、その後必要になるまで -80 で保管した。凍結させた切片を解凍し、組織学検査 (標準的なヘマトキシリン及びエオシン染色) 又は免疫組織化学検査を行った (Getts et al., J. Exp Med 205:2319~2337, 2008)。MARCO、SIGN-R1、及びSIGLEC-1 (R&D Systems, MN, USA)、CD68 (Abcam, MA, USA) 及びKi67 (Abcam) に対する抗体を指示通りに使用した。DP-70カメラ及びDPマナー
10

【0155】

組織学検査及び免疫組織化学検査

マウスに麻酔し、50mLの滅菌PBSを用いて灌流した。処理してパラフィンにした心臓 (Getts et al., J. Neurochem 103:10919~10330, 2007) を除いて、全臓器を単離し、Optimum Cutting Temperature Compound (OCT, Tissue-Tek, Tokyo, Japan) 中で急速凍結させた。8ミクロンの組織切片をクリオスタットミクロトーム上で切り取り、一晩空気乾燥させ、その後必要になるまで -80 で保管した。凍結させた
20

切片を解凍し、組織学検査 (標準的なヘマトキシリン及びエオシン染色) 又は免疫組織化学検査を行った (Getts et al., J. Exp Med 205:2319~2337, 2008)。MARCO、SIGN-R1、及びSIGLEC-1 (R&D Systems, MN, USA)、CD68 (Abcam, MA, USA) 及びKi67 (Abcam) に対する抗体を指示通りに使用した。DP-70カメラ及びDPマナー
20

【0156】

多重ELISA

多重プレート (multiplex plate) ELISA (Quansys Biosciences) を、製造業者の説明書に従って、Quansys Q-plex Mouse Cytokine Screen IR 16-plexを使用して行った。プレートを、Li-Cor Odyssey IR Imaging System (Li-Cor Biotechnology) 上で可視化した。Quansys Q-viewソフトウェア (Quansys Biosciences) を使用して画像を分析した。
30

【0157】

【 例 3 】

表 3 : 粒子の物理的特性

化学式	物理的特性				
	免疫修飾(カルボキシル化)ポリスチレン粒子 (Phosphorex)	ポリスチレン中性粒子 (Phosphorex)	正に荷電したポリスチレン (アミノ化粒子- Phosphorex)	免疫修飾 ナノダイヤモンド (University of Sydney)	免疫修飾(カルボキシル化) PLGA粒子 (Phosphorex)
色	白色ラテックス	白色ラテックス	白色ラテックス	乳白色(溶液)	白色粉末 (凍結乾燥済み)
臭気	無し	無し	無し	無し	無し
融点/°C	240°C	240°C	240°C	4500K	該当無し (非晶質)
ガラス転移/°C	100°C	100°C	100°C	該当無し	40~55°C
溶解度	水又はアルコールに不溶性、アセトン、酢酸エチル、THF、DMF、トルエン、塩化メチレンなどに可溶性	水又はアルコールに不溶性、アセトン、酢酸エチル、THF、DMF、トルエン、塩化メチレンなどに可溶性	水又はアルコールに不溶性、アセトン、酢酸エチル、THF、DMF、トルエン、塩化メチレンなどに可溶性	該当無し	水に不溶性、アセトン、酢酸エチル、DMSO、DMF、アセトニトリル、クロロホルム、塩化メチレンなどに可溶性
共重合体比率 (モル%)	90:10	100:0	90:10	該当無し	50:50
マルチインテックス g/10分、200°C/5kg	6.0~9.0	6.0~9.0	6.0~9.0	該当無し	該当無し
MW(kDa)	10~250	10~250	10~250	22,000,000KD	5~50
残留単量体	不明	不明	不明	該当無し	0.5%未満のラクチド 0.5%未満のグリコリド
Sn含量(ppm)	該当無し	該当無し	該当無し	該当無し	100未満 (ICP)
重金属(ppm)	不明	不明	不明	0~0.55%のニッケル 0~0.50%の銅 酸洗浄によるカルボキシル化前	10未満
硫酸塩灰分(%)	不明	不明	不明	該当無し	0.1未満
粒径分布	10.4%	2.4%	10.4%	270±30nm	10~50%
ゼータ電位	-40~-50mv	-5~+5mv	+20~+40mv	-50.6+/ -3mv	-30~-50mv

【 0 1 5 8 】

統計

グラフを作成し、GraphPad Prism (GraphPad software, SDG, USA) において統計的分析を行った。2つの試料を比較するために、不対

10

20

30

40

50

で両側のスチューデントのT検定を実施した。3つ以上の試料を比較するために、テューキー・クレーマー事後検定を用いて一元配置ANOVAを行った。生存データについては、マンテル・ヘンツェルログランク検定を実施した。これらの検定では、0.05以下のP値(*)は有意であり、0.01以下のP値(**)は非常に有意であると見なした。

【0159】

(実施例1)

オプソニン化IMPは、脳へのマクロファージの遊走を阻害する能力の減少を有した。

7日目の血漿を、擬似又はWNV感染動物から採取し、PS-IMPと共にインキュベートした。これらの「オプソニン化」粒子又は未オプソニン化(未処理ビーズ)粒子を、免疫付与後6日目でWNV感染マウスに再注入した。7日目に、脳をフローサイトメトリーによって炎症性単球の流入について検査した。未処理IMP(正常IMP)は脳への単球流入の減少をもたらしたが、擬似血漿でコーティングしたIMPは、単球遊走を阻害する能力は有しなかった(図9)。WNV血清でコーティングしたIMPは、コーティングしていないIMPと比べて単球を阻害する能力は弱かったが、それでもある程度遊走を減少させることはできた。

【0160】

(実施例2)

免疫修飾粒子は、炎症性単球の遊走を減少させ、WNVの生存を減少させる

急性及び多くの慢性炎症性疾患の特徴は、炎症領域への単球の流入である。これまで、発明者らは、WNVの脳感染と関連付けられる病的状態は、脳への炎症性単球輸送の直接的結果であることを示してきた(Getts, 2008, Getts, 2007, Terry, 2012, Getts, 2012)。このモデルでは、5%以上の体重減少は、脳へのIM輸送、故に致死性と相関するバイオマーカーである(Getts et al., J. Neuroinflammation, In Press)。感染動物のうち少なくとも50%が体重減少を始め、その100%が、典型的に、最初の体重減少の72時間以内に感染により死亡することになる(図1A)。体重が減少しない動物は、脳炎のいずれの他の症状も示さないが、それでも終生の殺菌免疫能を発現する(図1A)。単球輸送をモニタリングするため、最初の体重減少時(6日目)に、ポリスチレン中性粒子(PS-NP)の代わりに、カルボキシル化した負に荷電したポリスチレン粒子(PS-IMP)を非意図的に注入した。驚くべきことに、注入は、臨床的WNV中枢神経系(CNS)感染と一様に関連付けられる、荒れた毛皮、倦怠、及び痙攣などの症状をほぼ即座に減少させた。この減少は、局所的炎症誘発性サイトカイン及びケモカインの減少と相関した(図6)。また更に、最大5日間のPS-IMPの毎日の注入は、さもなければ感染により死亡したはずのマウスの60%の生存をもたらした(図1A)。これらのマウスにおいては、体重は典型的に安定し、5~6日以内に対照レベルに戻った(図示せず)。PS-NP又はピヒクルで処置したマウスは継続した体重減少を示し、生存は10%以下であった。また更に、WNV又は擬似感染動物からの血清を用いた、注入前のIMPの事前オプソニン化は、疾患の転帰に影響を与えなかった(図示せず)。WNV脳炎における発明者らの以前の観察と一貫して(Getts, 2008, Getts, 2007, Terry, 2012, Getts, 2012)、生存は、リン酸緩衝生理食塩水(ピヒクル)で処置した、又はPS-NPで処置した対照動物と比較して、PS-IMPで処置したマウスの脳におけるIM由来マクロファージの有意な減少と相関した(図1B、図7)。

【0161】

(実施例3)

免疫修飾粒子は負に荷電する必要がある

他のカルボキシル化粒子、具体的にはND IMP、及びPLGA-IMPによるWNV感染動物の処置は、PS-IMPで処置した動物中で見られた生存統計と同様の生存統計をもたらした(図1C)、このことは、粒子コアが、処置効果に貢献する特性とは無関係であることを示す。初期のパイロット研究では、ゼータ電位が-50mV未満のカルボキシル化PS-IMPを使用した(表3)。故に、ゼータ電位が-50mV、約-0.5(

10

20

30

40

50

中性、ポリスチレン中性粒子、PS-NP)、又は+40mV(アミノ化粒子、ポリスチレン正荷電粒子、PS-PP)であるPS粒子を比較した。PS-IMP(-50mV)は、脳への炎症性単球輸送の減少について最も大きな影響を示した(図1D)。対照的に、PPは、IM由来マクロファージの浸潤(図1D)も生存(図1E)も減少させなかった。WNV脳炎を持つマウスにおける500nmのPS-IMPについての用量反応は、最も効果的な用量が、マウス1匹当たり約 4×10^9 IMP粒子、又は0.355mgの粒子であることを示した(図1F~G)。

【0162】

(実施例4)

PS-IMP処置は、脾臓への炎症性マクロファージの方向転換をもたらす

注入後、PS-IMPは、肺、脾臓、及び肝臓に大部分が局在し(図2A)、脳及び胸腺にはFITC⁺粒子はなく(図7A及びB)、末梢リンパ節では見出されなかった(データ図示せず)。フローサイトメトリーによって、炎症性単球、BB20⁺B細胞、CD3⁺T細胞、及びNK1.1細胞間でのIMPの比較的均等な分布が明らかとなったが(図2B及びC)、感染マウス中では、炎症性単球は、脾臓において、いずれの他の細胞型よりも有意に多いIMPを吸収することが見出された(図2B及びC)。循環内では、擬似感染マウスにおけるIMPを含有する単球の表現型はLy6C陰性であり、一方でIMPは、感染動物においてLy6C陽性単球に主に局在した(図2D及びE)。また更に、FITC-PS-IMPで処置したWNV感染マウスからの脾臓は、NPで処置したもの又はビヒクル対照よりも有意に多い炎症性単球を有し(図2F、図9)、このことは、これらのマウスにおける末梢血中で循環する炎症性単球の減少と密接に対応する(図2G)。

【0163】

WNV脳炎における病的状態は炎症性単球によって引き起こされることがこれまでに示されている(Terry et al., 2012, Getts et al., 2012)。これらのこれまでの発見をここで得たデータと組み合わせると、IMPが、炎症性単球に結合し、炎症を起こしている脳へのその遊走を無効にし、代わりにそれらを脾臓へと迂回させることによって、その処置活性を媒介するとの仮説を立てた。これを確認するために、Ly6C^{hi}単球を免疫付与後6日目のWNV感染マウスの骨髄から選別し、PKH26で標識し、免疫付与後6日目の擬似又はWNV感染レシピエントに静脈注射で移入した(図3A)。この直後に、PS-IMP、NP、又はビヒクルのみを注射した。PKH26で標識したLy6C^{hi}炎症性単球をWNV感染脳に輸送してマクロファージに分化させ、末梢免疫細胞は擬似感染脳中では観察されなかった(図3B、データ図示せず)。Getts et al. (J. Exp. Med. 205: 2319~2337, 2008)に記載されるように、PS-IMP処置は、WNV感染脳への宿主の炎症性単球浸潤を減少させ(図3B)、有意に少ない養子移入したPKH26⁺細胞が脳中に遊走した(図3B及び3D)。PKH26で標識した細胞の脾臓への移動(図3C及び3E)が擬似及びWNV感染マウス中で観察されたが、PS-IMP処置は、WNV感染マウスの脾臓における有意に多いLy6C^{hi}単球の蓄積をもたらした(図3E)。IMP処置の効能における脾臓の重要性を脾摘マウス中で確認した。IMP注入は、脾摘したビヒクルで処置したWNV感染対照マウスと比較して、WNV感染脾摘マウスの脳への炎症性単球の移行を減少させることに失敗した(図3F)。脾臓は、ある特定の炎症状態下で脾臓から補充され得る、CD11b⁺/Ly6C^{hi}/CD11c⁻として特定される単球のリザーバを宿すことが最近になって示された(Swirski et al., Science 325: 612~616, 2009, Leuschner et al., J. Exp. Med. 209: 123~137, 2012, Robbins et al., Circulation 125: 364~374, 2012)。IMP注入が脾臓単球のこのプールを強化したとの仮説を立てた。しかしながら、IMPを取り込み脾臓に遊走した養子移入した単球のうちの70%超が、CD11c及びCD103を発現し(図3E及び3G)、このことは、この仮説の可能性を下げた。総合すると、これらのデータは、注

10

20

30

40

50

入したIMPが炎症性単球によって吸収され、それが脾臓に迂回させられて、炎症部位への遊走に対して血中の炎症性単球数の減少をもたらすことを示唆する。

【0164】

(実施例5)

IMPは炎症を起こしている腹膜への炎症性単球の遊走を阻害する

単球がWNV脳炎中に観察される免疫病変の重要なメディエータであることは明らかであるが、感染は、他の細胞サブセットを含む複雑に入り組んだ免疫応答をもたらす。炎症中の炎症性単球へのIMPの特異性に対処するため、滅菌マクロファージ介在性腹膜炎のモデルを使用した。チオグリコール酸塩で炎症を起こさせた腹膜への白血球の遊走は、型通りのパターンに従い、最初の4~18時間以内に好中球が誘発され、続いて約12時間以降にIM由来マクロファージがCCR2に依存して蓄積した(Tsou, et al., 2007)。PS-IMP(図7D-E、図4A-B)又はPLGA-IMP(図示せず)のいずれかの注入は、チオグリコール酸塩の腹腔内注射から24時間後、脾摘マウスにおいて無効にされた炎症部位への炎症性単球輸送を有意に減少させた(図7F)。このデータは併せて、主にマクロファージ介在性の炎症モデルにおけるIMPの抗炎症性質、及びIMPの効能のための脾臓の重要性も共に強調する。

10

【0165】

(実施例6)

炎症性単球は、IMP活性に不可欠なMARCOを発現する

IMPなどの粒子は、スカベンジャー受容体経路を通して吸収される(Kanno et al., 2007)。負に荷電した粒子及びポリスチレンの結合に特異的に関与する1つの要となるスカベンジャー受容体がMARCOである(Chao, et al., 2012、Kanno, et al., 2007)。脾臓において、PS-IMPは、静脈内注入後のアポトーシス性細胞取り込みについてこれまでに記載したものと同様に、辺縁帯においてMARCOを発現する細胞集団と共有化した(Getts, et al., 2011、Getts, et al., 2012)(図4C)。MARCOは、擬似感染動物ではなくWNV感染動物の脾臓から単離したLy6c^{hi}/CD11b⁺/CD11c⁻IMを上方調節されていることも分かった(図4D)。MARCOの役割に更に対処するために、チオグリコール酸塩を使用してMARCO欠乏(MARCO^{-/-})動物中で腹膜炎を誘導した。同様の数の腹膜単球を、チオグリコール酸塩の投与から48時間後にWT及びMARCO^{-/-}マウスから単離した(図4B、4E)。しかしながら、PS-IMP処置が腹膜におけるLy6c^{hi}/CD11b⁺IMの数の減少をもたらしたWTマウスとは異なり、PS-IMP処置の注入は、MARCO^{-/-}動物から単離した腹膜Ly6c^{hi}/CD11bマクロファージの数を減少させず(図4B、4D)、このことは、IMPの取り込み及び効能におけるMARCOの役割を直接的に指摘する。加えて、MARCOは、シリカ粒子を貪食したマクロファージ中でのアポトーシス誘導においても直接的な役割を担うことが示されている(Hamilton et al., 2006)。興味深いことに、IMPは、PS-IMP(図4G~I、図11B)又はPLGA-IMP(図示せず)の注入から2時間後に、WTマウスの脾臓において、アネキシンV及びカスパーゼ-3陽性炎症性単球の数を有意に増加させたが、MARCO^{-/-}マウスにおいては増加させなかった。アポトーシスは、好中球と炎症性単球との両方において誘導され、IMP注入後2時間の間検出可能である(図10)。マウスにPS-IMP又はPBSを注射し、2時間後に屠殺した。脾臓を取り出し、処理して単個細胞浮遊液にし、抗CD11b、Ly6C、CD11b、Ly6G、定着性生死判別染料(Fixable viability dye) eFluor780(eBioscience)で染色した。アポトーシス細胞を、CaspGLOW(商標)Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kitを使用して検出した。チオグリコール酸塩誘導性WTマウスへのPLGA-IMPの注入は、アポトーシスマーカーであるアネキシンV及びカスパーゼ-3を発現したLy6c^{hi}IM及びLy6G⁺好中球の数の有意な増加をもたらした。これは、擬似処置動物においては観察されな

20

30

40

50

かった。注射から2時間後(図11)、PS-IMPは、擬似及びTG腹膜炎を誘導したマウスの脾臓におけるCD11b+Ly6C+Ly6G-単球に局在した。PS-IMPの取り込みは酵素カスパーゼ-3の活性と関連付けられ、これは、アポトーシスを示す(a)。単球の数の増加は、PS-IMPで処置したTG腹膜炎を誘導したマウスにおけるカスパーゼ-3活性に対して陽性であった(b)。

【0166】

壊死細胞はわずかしがなく(5%未満)、このことは、細胞死がIMPの分解と関連付けられないことを示す。

【0167】

総合すると、データは、IMPがMARCOスカベンジャー受容体を通して吸収される可能性が高く、このことが、下流信号伝達経路を媒介し得、その結果、脾臓における炎症性単球の遊走、蓄積、及び後続のアポトーシスが起きることを示唆する。

【0168】

(実施例7)

IMP療法はEAEにおいて炎症性単球を阻害する

IMPの処置の資質を更に理解するために、ある数の無関係の炎症性疾患モデルを検査した。まず、CNS炎症の別の非感染性モデル、つまり実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を試験した。EAEにおいて、循環するLy6C^{hi}炎症性単球はマクロファージとミクログリアとに分化し、EAEにおいて、これらの同じ細胞は、T細胞活性化及びエプトブ伝播を促進するCD11c⁺ DCに主に分化する(Getts et al., J. Exp. Med. 205: 2319~2337, 2007, King et al., Blood 113: 3190~3197, 2009, Getts et al., J. Neuroinflammation, In Press)。疾患の発症時の7日間にわたる生分解性PLGA-IMPの毎日の静脈内注入が、処置中に疾患を寛解させると共に、処置中止後14日間の症状の欠如によって決定した長期的な利益と関連付けられた(図5A)。より重要なことに、原疾患中のIMP処置の毎日の注入は、処置期間中の疾患スコアの減少及び再発始動の阻害をもたらした(図5B)。発症時に処置した動物における疾患スコアの減少は、フローサイトメトリーによって決定したところ、脊髄における炎症の減少と相関し(図5C、D、及び図8A)、最も目立った減少は、炎症性単球由来DCコンパートメント内で観察された(図5C及びD、並びに図8A)。WNV脳炎又は腹膜炎を患う動物における観察と同様に、EAE CNSにおける炎症性単球の減少は、脾臓におけるLy6Cを発現している単球の有意な蓄積と相関した(図5D及び図8B)。

【0169】

(実施例8)

IMP療法は虚血再灌流によって引き起こされた傷害を減少させる。

炎症性単球は、アテローム性動脈硬化症及び心筋梗塞を含む心疾患の病理に関与し、不良転帰と相関してきた(Swirski et al., Science 325: 612~616, 2009, Leuschner et al., J. Exp. Med. 209: 123~137, 2012, Robbins et al., Circulation 125: 364~374, 2012, Bailey et al., Nat. Immunol 8: 172~180, 2007)。永久的左前下行枝閉塞モデル(Yeap et al., Methods in Molecular Biology, In Press)を使用して、3日間のPLGA-IMP処置の影響(図5H)を決定した。ビヒクル処置動物では、閉塞は、左室壁の最大40%が関与する心筋への強力な単球浸潤をもたらした(図5I及びJ)。IMP処置は、炎症性病巣のサイズを有意に減少させ、全体的な心臓炎症を15~20%減少させた(図5i、j)。また更に、梗塞領域内のCD68⁺マクロファージ数の有意な減少が観察され、IMP処置は、ビヒクル処置対照と比べて1mm²当たりのCD68⁺細胞の数の30%の減少をもたらした(図5K、L)。重要なことに、ここでも、この減少は脾臓におけるLy6C^{hi}炎症性単球の数の有意な減少と相関する(図8D及びE)。再灌流損傷モデルにおけるIMP療法の資質に更に

10

20

30

40

50

対処するために、腎動脈を45分間結紮してその後血流を戻すことによって、IMPを齧歯動物中で試験した。IMP処置は、結紮後12時間で開始した。際立って、血清クレアチニンクリアランスは、1日目及び5日目で、ビヒクル処置対照と比較して、IMPで処置した動物において有意に大きく(n)、このことは、これらの時点での処置した動物における尿細管萎縮スコアの減少と相関した(o)。全体として、移植における生着不全及び心筋梗塞後の長期的転帰が、それぞれ、炎症及び梗塞の程度と直接的に相関することが確立されている(Nahrendorf et al., Circulation 121:2437~2445, 2010、Leuschner et al., J. Exp. Med. 209:123~137, 2012、Nahrendorf, et al., J. Exp. Med. 204:3037~3047, 2007)。ここでのデータは、IMPが炎症を減少させるだけでなく、より重要なことに、増加した臓器機能とも関連することの強力な裏付けを示す。

10

【0170】

(実施例9)

IMP療法は、炎症性腸疾患の症状を寛解させる

腸は、脳、腹膜、又は心臓とは異なり、固有の臓器系を表す。炎症性腸疾患(IBD)における単球の重要性は、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性大腸炎モデルを使用して、ケモカインGM-CSF及びLy6C^{hi}炎症性単球がIBDの発病に關与するとして(Xu et al., Cell Res. 18:1220~1229, 2008)、18:1220~1229, 2008)。炎症を起こしている結腸へのLy6C^{hi}炎症性単球の輸送の減少は、疾患重症度を減少させると提案される。このため、DSS誘導性大腸炎を持つ動物におけるIMP処置(図5P)を調査した。大腸炎症状は、ビヒクル対照と比較して、PS-IMPで処置した動物において有意に減退した(図5G)。また更に、免疫組織化学検査によって決定したところ、炎症を起こしている結腸への単球形態を持つGR1⁺細胞の数が減少した(図5R-S)。これは、PS-IMPで処置した動物において、上皮分裂と相関し、増殖マーカーKi67で標識した上皮細胞の数を有意に増加させた(図8F-G)。上皮増殖はDSSチャレンジ後の腸の回復と関連付けられ、IMPの注入は明らかにDSS介在性傷害の早期の修復を可能にする。

20

【0171】

(実施例10)

IMP療法は、心筋梗塞モデルにおいて炎症性傷害から保護する。

永久的左前下行枝閉塞モデル(Yeap et al., Methods in Molecular Biology, In Press)を使用して、4日間の裸のPLGA-IMP処置の影響(図9)を決定した。ビヒクル処置動物では、閉塞は炎症の増加をもたらした。IMP処置は、炎症性病巣のサイズを有意に減少させ、全体的な心臓炎症を減少させた。また更に、梗塞領域内のCD68⁺マクロファージ数の有意な減少が観察され、IMP処置は、ビヒクル処置対照と比べて1mm²当たりのCD68⁺細胞の数の減少をもたらした。重要なことに、脾臓におけるLy6C^{hi}炎症性単球の数の有意な減少と相関したこの減少領域。

30

【0172】

心筋虚血(LAD閉塞)再灌流モデルにおけるIMP療法の資質に更に対処するために、左前下行枝を梗塞させ、次いで30分後に解放することによって、IMPを齧歯動物中で試験した。IMP処置は、結紮後24時間で開始し、4日間継続した。図10に示すように、IR後28日目で、処置動物における梗塞痕サイズは、PBS処置動物と比較して45%減少した。加えて、PLG-IMP処置動物における収縮期の駆出率は、対照動物と比較して21%増加した。

40

【0173】

前出の実施例におけるこれらのデータは、炎症部位への炎症性単球輸送を減少させるために、多種多様な感染性炎症性障害及び非感染性炎症性障害においてIMPをうまく利用できることを示す。これは、臨床的疾患症状の有意な減少をもたらし、また、さもなければ

50

ば炎症性単球が生成する炎症誘発性環境によって阻害され得る修復機構の始動を可能にし得る。

【0174】

(実施例11)

負に荷電した免疫修飾粒子 (IMP) の調製

D₂O中のポリ(エチレン-無水マレイン酸)(PEMA)の溶液(4 mL、1% w/v)に、ジクロロメタン(DCM)中の乳酸-グリコール酸共重合体(PLG)の溶液(2 mL、20% w/v)を滴加した。VC 30 Ultrasonic Processorを使用して、混合物を30秒間16ワットで氷上で超音波分解させた。得られた均質化した粗物質を、その後、D₂Oの溶液(0.5% w/vのPEMAを含有する200 mL)中に注ぎ入れた。Bellco Glass, Inc., Bellstir Multi-stir 9電磁攪拌機を使用して、3.5の速度設定で、均質化したスラリーを一晩攪拌させた(10 Wで10秒間、16 Wで10秒間、16 Wで30秒間)。

10

【0175】

結果

3時間の攪拌の後、粒径分析を、使い捨てのポリスチレンキュベット中で動的光散乱を使用して行った。

a. 10 W、10秒 - Z平均 = 499.9 nm - PdI = 0.23、ピーク = 634.5 nm

b. 16 W、10秒 - Z平均 = 528.9 nm - PdI = 0.227、ピーク = 657.5 nm

20

c. 16 W、30秒 - Z平均 = 471.6 nm - PdI = 0.228、ピーク = 580.5 nm

d. 16 W、60秒 - Z平均 = 491.1 nm - PdI = 0.275、ピーク = 600.8 nm

【0176】

反応が完了した後、得られた粗懸濁液を次いで精製した。

【0177】

精製

新たなD₂O及び10倍重炭酸ナトリウム緩衝液を一晩かけて4℃に冷却した。40 μmのセルストレーナーを使用して、36 mLの粒子懸濁液を、各バッチから、4 mLの冷却した10倍重炭酸ナトリウム緩衝液を含む適切にラベル付けした50 mLの遠心分離管中に濾過した。各ビーカーからは約6個のこのような管が得られた。全ての管を、4℃で7000 gで約15分間遠心分離させ、上清を吸引した。上述の手順を使用して懸濁液の調製を繰り返し、できるだけ多くの粒子ペレットを1 mLの冷却したD₂O中に懸濁した。

30

【0178】

4 mLの冷却した10倍重炭酸ナトリウム緩衝液を入れた新たな管に再懸濁した粒子を移した。(工程1)

【0179】

全粒子ペレットの再懸濁が成功するまで粒子の再懸濁を繰り返した。(工程2)

40

【0180】

6個の遠心分離管を1つの遠心分離管(50 mL管)にまとめ、40 mLの冷却したD₂Oになるまで管に残りの容積を充填した(洗浄1)。

【0181】

管を、4℃で7000 gで約20分間遠心分離させ、上清を吸引した。

【0182】

工程1及び2、並びに得られた粒子の洗浄1を、各回、少なくとも更に2回、繰り返した。最後に、次いで得られた粒子ペレットを液体窒素中での瞬間冷凍に付し、多岐管中で凍結乾燥させて負のIMPを得た。

50

【0183】

図14は、動的光散乱分析による、表面機能化ラクチド-グリコリド共重合体粒子の特徴化を示す。表面機能化ラクチド-グリコリド共重合体粒子を、18.2Mの水中で毎秒 2.5×10^5 計数の計数速度でMalvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, MA)において分析した。表面機能化ラクチド-グリコリド共重合体粒子の集団は、567nmのZ平均粒径、670nmのピーク粒径、及び0.209の多分散性指数を有した。

【0184】

表4は、表面機能化PLG-PEMA粒子についての測定値を示す。各バッチはわずかに異なるため、表中のデータは代表としてのものである。しかし、表中の数字は、粒子のいくつかのバッチの組み合わせに基づく。二重エマルション粒子についての測定値は、表3中の測定値と同様である。

【0185】

【表4】

表4-表面機能化PLG-PEMA粒子についての測定

粒子	強度によるZ平均粒径(nm)	ζ電位(mV)
PLG(Phosphorex)	624.3	-32.7±4.71
PLG-PEMA	429.9	-67.4±10.9

【0186】

(実施例12)

IMPは調節性T細胞を誘導する

これまでに、MSモデル、実験的自己免疫性脳脊髄炎におけるIMP注入が疾患を阻害し得ることを示した。このモデルでは、0日目で、マウスに、完全フロイントアジュバント及びミエリン抗原、プロテオリピドタンパク質139~158で免疫付与する。疾患症状を毎日モニタリングし、疾患の発症が明白であるときに、10日間のIMP処置を実施する。この実施例では、疾患の発症時から10日間にわたる生分解性PLGA-IMPの毎日の静脈内注入が、処置中に疾患を寛解させると共に、症状を欠いた14日間の処置後期間と関連付けられた(図15A)。発症時に処置した動物における疾患スコアの減少は、処置中のC4+CD25+FOX P3+TIM3+調節性T細胞の数の増加と相関した(図15B及びC)。20日目(処置開始後10日目)で、これらのTregは、陰性の副刺激分子PD-1を発現する(図15B)。投薬中止から10日目に、Tregの数が基準値まで減退したことが見出され、このことは、疾患の再発と相関した(図15A)。

【0187】

(実施例13)

IMPは、無処置の血液と比較して、炎症血液において独特のタンパク質に結合する

マウス血漿を、西ナイル又は擬似(非感染)マウスからヘパリン化管中に心穿刺によって採集した。その後、当技術分野で公知の標準的な方法によって、血漿を他の血液成分(例えば、白血球及び赤血球)から分離した。その後、血漿を、 3×10^8 の免疫修飾ナノ粒子と共に室温で30分間インキュベートした。30分後、粒子を洗浄し、タンパク質をSDS-PAGEゲル上で分離させ、各レーンから12個の均等なゲルスライスを取り出した。スライスをトリプシン消化に付し、得られたペプチド混合物を、タンデム質量分析と組み合わせた逆相液体クロマトグラフィー(LC-MS/MS)によって分析した。タンパク質をGeLC-MS分析に付した。端的に言えば、タンパク質をジチオスレイトール及びヨードアセトアミドの存在下で還元し、アルキル化した。バンドを真空遠心分離によって乾燥させ、240ngのトリプシンと共に1時間4でインキュベートした。余剰なトリプシンを除去し、37で一晩のインキュベートのために50mMの重炭酸アンモニウムで代置した。質量分光分析の前に、R2樹脂(Perseptive Biosystems, Framingham MA)を含む既製マイクロカラムの使用によって、

ペプチドを濃縮し脱塩した。溶出したペプチドを0.1%のギ酸中で再可溶化し、逆相LC-MS/MSに付した。約41,000個のMS/MSスペクトルを反復LC-MS/MS実験から生成した。タンデム質量スペクトルを抽出し、荷電状態をMascot中で解析及び脱アイソトープし、Mascot及びX!Tandemを使用して分析した。有意とする閾値を0.05未満のp値に設定して、SWISS-PROTデータベース中に含まれるムースムスクルス(マウス)要素に対してデータを検索した。検索は、15ppmの断片イオン質量耐性及び0.2Daの親イオン耐性で実施した。メチオニンスルホキシド、カルボアミドメチルシステイン(carbamidomethyl-cysteine)、並びに脱アミド化アスパラギン及びグルタミンを、変数変更として指定した。スカフォールドを使用して複数のMS/MS実験を統合し、ペプチド及びタンパク質同定に基づいてMS/MSを検証した。ペプチドは、Mascotのイオンスコアが、二重、三重、及び四重に荷電したペプチドについて、それぞれ、30、40、及び40を超過した場合にのみ考慮した。X!Tandem同定は、2.0を超える-Log(期待スコア)スコアを必要とした。タンパク質同定は、最低2個のペプチドが上記の基準に適合すると同定された場合に受け入れた。5個のタンパク質が、1個のペプチドが適合しただけであったにも関わらず同定と見なされた。この場合は、ペプチドを複数の根拠について配列決定し、単個のペプチドによって得られた配列包括度は5%超であった。

10

【0188】

これらの研究の結果によって、無処置の血清と共にインキュベートした粒子に結合した以下のタンパク質が特定された。

20

【0189】

【表5 - 1】

表5 無処置の血清中でIMPに結合するタンパク質

特定されたタンパク質	SWISSProt受託番号	遺伝子名	pI	分子量	特定された固有のペプチド	配列包括度%
14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ	1433Z_MOUSE	Ywhaz	4.73	28kDa	3	12%
タンパク質4.1	41_MOUSE	Epb41	5.43	96kDa	4	6.10%
アルファ1-アンチトリプシン1-1	A1AT1_MOUSE	Serpina1a	5.44	46kDa	3	4.60%
アクチン、細胞質1	ACTB_MOUSE	Actb	5.29	42kDa	11	39%
アルファ-アクチニン-1	ACTN1_MOUSE	Actn1	5.23	103kDa	2	2.50%
アルファ-アデュシン	ADDA_MOUSE	Add1	5.62	81kDa	2	3.10
ADP/ATPトランスロカーゼ1	ADT1_MOUSE	Slc25a4	9.73	33kDa	2	8.10%
血清アルブミン	ALBU_MOUSE	Alb	5.53	69kDa	14	29%
アンキリン-1	ANK1_MOUSE	Ank1	6.09	204kDa	5	3.30%
アネキシンA2	ANXA2_MOUSE	Anxa2	7.53	39kDa	6	20%
アネキシンA5	ANXA5_MOUSE	Anxa5	4.82	36kDa	3	9.40%
アシルアミノ酸放出酵素	APEH_MOUSE	Apeh	5.36	82kDa	4	6.10%
アポリポタンパク質A-1	APOA1_MOUSE	Apoa1	5.31	31kDa	6	21%
アポリポタンパク質A-IV	APOA4_MOUSE	Apoa4	5.21	45kDa	2	7.10%
アポリポタンパク質C-IV	APOC4_MOUSE	Apoc4	9.23	14kDa	2	16%
アポリポタンパク質E	APOE_MOUSE	ApoE	5.46	36kDa	12	38%
ベータ-2-糖タンパク質1	APOH_MOUSE	ApoH	8.62	39kDa	5	19%
ナトリウム/カリウム輸送ATPaseサブユニットアルファ-1	AT1A1_MOUSE	Atp1a1	5.27	113kDa	5	5.80%
筋小胞体/小胞体カルシウムATPase1	AT2A1_MOUSE	Atp2a1	5.13	109kDa	8	10%
ATPシンターゼサブユニットアルファ、ミトコンドリア	ATPA_MOUSE	Atp5a1	8.28	60kDa	6	13%
ATPシンターゼサブユニットベータ、ミトコンドリア	ATPB_MOUSE	Atp5b	4.99	56kDa	7	19%
バンド3陰イオン輸送タンパク質	B3AT_MOUSE	Slc4a1	5.31	103kDa	11	16%
フラビンシクロクサーゼ(NADPH)	BLVRB_MOUSE	Blvrb	6.47	22kDa	6	46%
補体C1qサブコンポーネントサブユニットA	C1QA_MOUSE	C1qa	9.48	26kDa	4	21%
補体C1qサブコンポーネントサブユニットB	C1QB_MOUSE	C1qb	8.34	27kDa	6	27%
補体C1qサブコンポーネントサブユニットC	C1QC_MOUSE	C1qc	8.88	26kDa	4	16%
C-1-テトラヒドロ葉酸シンターゼ、細胞質	C1TC_MOUSE	Mthfd1	6.73	101kDa	4	5.50%
C4b結合タンパク質	C4BPA_MOUSE	C4bpa	5.97	52kDa	4	12%
炭酸脱水酵素1	CAH1_MOUSE	Ca1	6.47	28kDa	4	20%
炭酸脱水酵素2	CAH2_MOUSE	Ca2	6.48	29kDa	6	37%
カタラーゼ	CATA_MOUSE	Cat	7.72	60kDa	7	17%
クラスリン重鎖1	CLH1_MOUSE	Cltc	5.48	192kDa	8	6.20%
補体C3	CO3_MOUSE	C3	6.3	186kDa	30	22%
コフィリン-1	COF1_MOUSE	Cfl1	8.26	19kDa	1	6.60%
ウロポルフィリノーゲンデカルボキシラーゼ	DCUP_MOUSE	Urod	6.21	41kDa	3	9.00%
デスマブラキ	DESP_MOUSE	Dsp	6.43	333kDa	2	0.80%
延長因子1-アルファ1	EF1A1_MOUSE	Eef1a1	9.1	50kDa	6	16%
延長因子1-デルタ	EF1D_MOUSE	Eef1d	4.91	31kDa	2	8.50%
延長因子2	EF2_MOUSE	Eef2	6.42	95kDa	4	4.50%
55kDa赤血球膜タンパク質	EM55_MOUSE	Mpp1	6.72	52kDa	3	7.50%
アルファ-エノラーゼ	ENOA_MOUSE	Eno1	6.36	47kDa	2	9.70%
エンドプラスミン	ENPL_MOUSE	Hsp90b1	4.72	92kDa	3	5.50%
赤血球膜タンパク質バンド4.2	EPB42_MOUSE	Epb42	6.98	77kDa	2	3.30%
エズリン	EZRI_MOUSE	Ezr	5.83	69kDa	6	10%
凝固因子V	FA5_MOUSE	F5	5.66	247kDa	4	2.60%
アルファ-2-HS-糖タンパク質	FETUA_MOUSE	Ahsg	5.94	37kDa	2	9.90%
フィブリノーゲンベータ鎖	FIBB_MOUSE	Fgb	3.53	55kDa	13	35%
フィブリノーゲンガンマ鎖	FIBG_MOUSE	Fgg	5.55	49kDa	13	34%
フィブロネクチン	FINC_MOUSE	Fn1	5.3	272kDa	31	17%
フィラミン-A	FLNA_MOUSE	Flna	5.68	281kDa	15	7.50%
グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ	G3P_MOUSE	Gapdh	8.45	36kDa	9	37%
ゲルゾリン	GELS_MOUSE	Gsn	5.72	86kDa	4	8.60%
グルタチオンペルオキシダーゼ3	GPX3_MOUSE	Gpx3	6.38	25kDa	3	18%
ヒストンH2B型1-B	H2B1B_MOUSE	Hist1h2bb	10.32	14kDa	1	7.10%
H-2クラスI組織適合抗原、Q10アルファ鎖	HA10_MOUSE	H2-Q10	5.06	37kDa	2	6.20%
ヘモグロビンサブユニットアルファ	HBA_MOUSE	Hba	8.08	15kDa	6	43%
ヘモグロビンサブユニットベータ-1	HBB1_MOUSE	Hbb-b1	7.26	16kDa	10	74%

10

20

30

【0190】

【表5 - 2】

(表5の続き)

特定されたタンパク質	SWISSProt受託番号	遺伝子名	pI	分子量	特定された固有のペプチド	配列包括度%
デルタアミノレブリン酸脱水酵素	HEM2_MOUSE	Alad	6.31	36kDa	2	6.40%
コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ、ミトコンドリア	HEM6_MOUSE	Cpox	6.47	50kDa	3	7.00%
ヘモベキシン	HEMO_MOUSE	Hpx	7.58	51kDa	2	4.30%
高ヒスチジン糖タンパク質	HRG_MOUSE	Hrg	7.28	59kDa	5	11%
熱ショックタンパク質HSP90-アルファ	HS90A_MOUSE	Hsp90aa1	4.93	85kDa	2	4.10%
熱ショックタンパク質HSP90-ベータ	HS90B_MOUSE	Hsp90ab1	4.97	83kDa	6	8.40%
熱ショック同種71kDaタンパク質	HSP7C_MOUSE	Hspa8	5.37	71kDa	13	24%
真核細胞翻訳開始因子4A-1	IF4A1_MOUSE	Eif4a1	5.32	46kDa	2	5.70%
Ig mu鎖C領域分泌形態	IGHM_MOUSE	Igh-6	6.56	50kDa	13	38%
Ig kappa鎖C領域	IGKC_MOUSE	該当無し	5.56	11kDa	3	31%
ユビキチン様タンパク質ISG15	ISG15_MOUSE	Isg15	8.61	18kDa	1	5.60%
インテグリンアルファIIb	ITA2B_MOUSE	Itga2b	5.43	113kDa	6	8.70%
インテグリンベータ3	ITB3_MOUSE	Itgb3	5.07	87kDa	2	3.40%
インターアルファトリプシン阻害物質、重鎖4	ITIH4_MOUSE	Itih4	5.91	105kDa	3	0.00%
キニンゲン-1	KNG1_MOUSE	Kng1	6.02	73kDa	4	9.70%
ビルビン酸キナーゼアイソザイムM1/M2	KPYM_MOUSE	Pkm2	7.42	58kDa	2	3.80%
L-乳酸脱水酵素A鎖	LDHA_MOUSE	Ldha	7.76	36kDa	3	9.00%
マンノース結合タンパク質C	MBL2_MOUSE	Mbl2	4.94	26kDa	2	9.40%
リンゴ酸脱水酵素、ミトコンドリア	MDHM_MOUSE	Mdh2	8.55	36kDa	5	18%
ミオシン調節軽鎖12B	ML12B_MOUSE	Myl12b	4.69	20kDa	4	24%
主要ウォールタンパク質	mVP_MOUSE	mVp	5.43	96kDa	5	7.80%
ミオシン-10	MYH10_MOUSE	Myh10	5.43	229kDa	2	3.00%
ミオシン-9	MYH9_MOUSE	Myh9	5.54	226kDa	34	21%
ミオシン軽ポリペプチド6	MYL6_MOUSE	Myl6	4.56	17kDa	3	20%
ビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のジヒドロリボリジン残基アセチルトランスフェラーゼ成分	ODP2_MOUSE	Dlat	5.7	68kDa	2	5.10%
タンパク質ジスルフィド異性化酵素A3	PDIA3_MOUSE	Pdia3	5.69	57kDa	3	6.10%
プラスミノゲン	PLMN_MOUSE	Plg	6.18	91kDa	10	20%
プリヌクレオシドホスホリラーゼ	PNPH_MOUSE	Pnp	5.78	32kDa	6	25%
ペプチジル-プロリルシス-トランス異性化酵素A	PPIA_MOUSE	Ppia	7.88	18kDa	3	22%
ペルオキシレドキシナーゼ1	PRDX1_MOUSE	Prdx1	8.26	22kDa	1	5.50%
ペルオキシレドキシナーゼ2	PRDX2_MOUSE	Prdx2	5.2	22kDa	6	32%
ペルオキシレドキシナーゼ6	PRDX6_MOUSE	Prdx6	5.72	25kDa	3	15%
GTP結合核タンパク質Ran	RAN_MOUSE	Ran	7.2	24kDa	2	9.70%
Ras関連タンパク質Rap-1b	RAP1B_MOUSE	Rap1b	5.65	21kDa	1	5.40%
ユビキチン-60Sリボソームタンパク質L40	RL40_MOUSE	Uba52	6.56	15kDa	3	27%
60S酸性リボソームタンパク質P0	RLA0_MOUSE	Rplp0	5.91	34kDa	4	20%
40Sリボソームタンパク質SA	RSSA_MOUSE	Rpsa	4.8	33kDa	2	11%
セレン結合タンパク質1	SBP1_MOUSE	Selenbp1	5.87	53kDa	3	6.60%
スペクトリンアルファ鎖、赤血球	SPTA1_MOUSE	Spta1	4.94	280kDa	19	9.60%
スペクトリンベータ鎖、赤血球	SPTB1_MOUSE	Sptb	5.19	245kDa	14	8.10%
トランスゲリン-2	TAGL2_MOUSE	Tagln2	8.44	22kDa	2	11%
チューブリンアルファ-1B鎖	TBA1C_MOUSE	Tuba1b	4.96	50kDa	9	27%
チューブリンアルファ-4A鎖	TBA4A_MOUSE	Tuba4a	4.93	50kDa	2	21%
チューブリンベータ-1鎖	TBB1_MOUSE	Tubb1	4.96	50kDa	3	15%
チューブリンベータ-4B鎖	TBB4B_MOUSE	Tubb4b	4.79	50kDa	11	30%
チューブリンベータ-5鎖	TBB5_MOUSE	Tubb5	4.78	50kDa	2	24%
移行型小胞体ATPase	TERA_MOUSE	Vcp	5.14	89kDa	4	6.20%
トランスフェリン受容体タンパク質1	TFR1_MOUSE	Tfrc	6.13	86kDa	11	18%
タリナー1	TLN1_MOUSE	Tln1	5.84	270kDa	16	8.20%
セロトランスフェリン	TRFE_MOUSE	Tf	6.81	77kDa	3	4.60%
トロンボスポンジン-1	TSP1_MOUSE	Thbs1	4.71	130kDa	3	2.60%
ユビキチン様改質剤活性化酵素1	UBA1_MOUSE	Uba1	5.43	118kDa	2	3.10%
ユビキチン共役酵素E2 O	UBE2O_MOUSE	Ube2o	4.94	141kDa	3	3.50%
フェルミチン(Fermitin)族相同体3	URP2_MOUSE	Fermt3	6.6	76kDa	4	8.10%
ビンキュリン	VINC_MOUSE	Vcl	5.77	117kDa	10	11%
ビトロネクチン	VTNC_MOUSE	Vtn	5.56	55kDa	7	17%

【0191】

しかし興味深いことに、これらの方法は、非炎症条件又は無処置条件下ではIMPへの結合が見られない、炎症条件下でIMPに結合する15個の固有のタンパク質を特定した。これらのタンパク質を表6に列挙する。

【0192】

10

20

30

40

【表6】

表6：炎症性血清中でのみIMPに結合するタンパク質

固有のタンパク質	受託番号
アクチン、筋-ピサスターオクラセウス(<i>Pisaster ochraceus</i>) (ヒトデ)	ACTM_PISOC
アネキシンA1 (アネキシンI) (リポコルチンI) (カルパクチンII) (クロモビンジン-9) (p35) (ホスホリパーゼA2阻害タンパク質) - ホモサピエンス(ヒト)	ANXA1_HUMAN(+1)
ATPシンターゼサブユニットベータ、ミトコンドリア前駆体 (EC 3. 6. 3. 14) - シゾサッカロミセスポンベ(分裂酵母)	ATPB_SCHPO
脂肪酸結合タンパク質、上皮(E-FABP) (乾癬関連脂肪酸結合タンパク質相同体) (PA-FABP) - ホモサピエンス(ヒト)	FABPE_HUMAN
フィラグリン-ホモサピエンス(ヒト)	FILA_HUMAN
熱ショックタンパク質ベーター-1 (HspB1) (熱ショック27kDaタンパク質) (HSP27) (ストレス応答性タンパク質27) (SRP27) (エストロゲンで調節される24kDaタンパク質) (28kDa熱ショックタンパク質) - ホモサピエンス(ヒト)	HSPB1_HUMAN
ヒストンH2A型1-B-ホモサピエンス(ヒト)	H2A1B_HUMAN(+36)
ジャンクションプラコグロビン(デスマブラキナーゼ3) (デスマブラキナーゼIII) - ボースタウルス(ウシ)	PLAK_BOVIN(+3)
耳下腺分泌タンパク質前駆体(PSP) - ムースムスクルス(マウス)	PSP_MOUSE
タンパク質S100-A11 (S100カルシウム結合タンパク質A11) (タンパク質S100C) (カルギザリン(Calgizzarin)) (MLN70) - ホモサピエンス(ヒト)	S10AB_HUMAN(+3)
タンパク質S100-A7 (S100カルシウム結合タンパク質A7) (ソリアシン(Psoriasin)) - ホモサピエンス(ヒト)	S10A7_HUMAN
タンパク質S100-A8 (S100カルシウム結合タンパク質A8) (カルグラニューリン-A) (移行阻害因子関連タンパク質8) (MRP-8) (嚢胞性線維性抗原) (CFAG) (P8) (白血球L1複合体軽鎖) (カルプロテクチンL1Lサブユニット) (尿路結石タンパク質バンドA) - ホモサピエンス(ヒト)	S10A8_HUMAN
タンパク質S100-A9 (S100カルシウム結合タンパク質A9) (カルグラニューリン-B) (移行阻害因子関連タンパク質14) (MRP-14) (P14) (白血球L1複合体重鎖) (カルプロテクチンL1Hサブユニット) - ホモサピエンス(ヒト)	S10A9_HUMAN
血清アルブミン前駆体(アレルゲンBos d6) (BSA) - ボースタウルス(ウシ)	ALBU_BOVIN
ユビキチン交差反応性タンパク質前駆体(インターフェロン刺激性タンパク質15) (IP17) - ムースムスクルス(マウス)	UCRP_MOUSE

10

20

30

【0193】

これらの結果は、本発明の粒子が、炎症性メディエータ、病原性タンパク質、及び/又は細胞残屑、例えば、例えば、S100タンパク質及び/又は脂肪酸結合タンパク質などを拭い去るためのシンクとして作用すること(図16A)と、同時にアネキシン1などの調節タンパク質を濃縮すること(図16B)との両方において有用であることを示す。

【0194】

加えて、これらの結果は、対象における炎症性免疫応答の存在を決定/診断するために、血清をインビトロかインビボかのいずれかでIMPと共にインキュベートし、続いて液体クロマトグラフィー、質量分析、HPLC、又は免疫沈降によってタンパク質をIMPから精製するという本明細書に記載の診断方法において有用である(図17)。

40

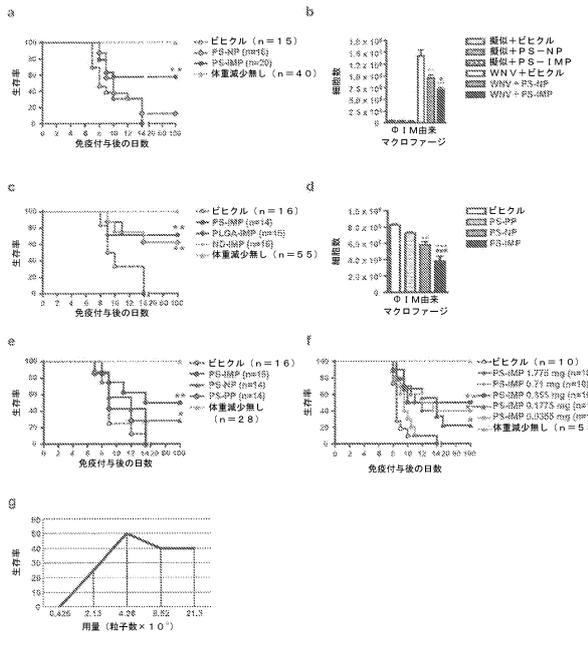
【0195】

本発明の特定の実施形態を説明し例解してきたが、このような実施形態は、本発明の例解のみであると見なされ、添付の特許請求の範囲に従って解釈されるほど本発明を限定するべきではない。

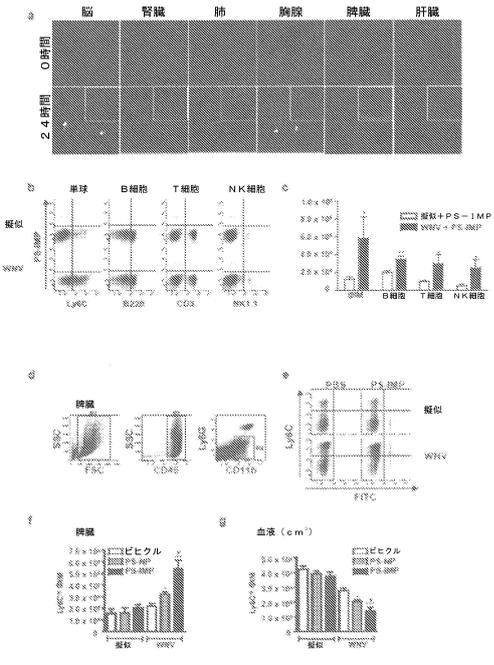
【0196】

本明細書で引用される全ての特許、出願、及び他の参考文献は、その全体が参照によって組み込まれる。

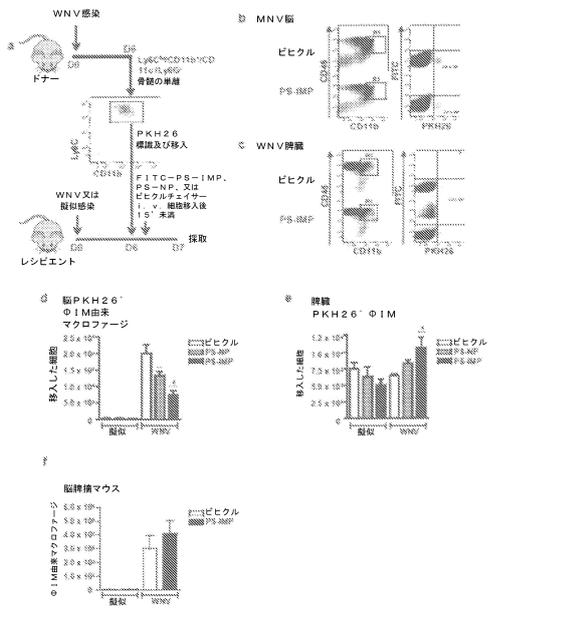
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

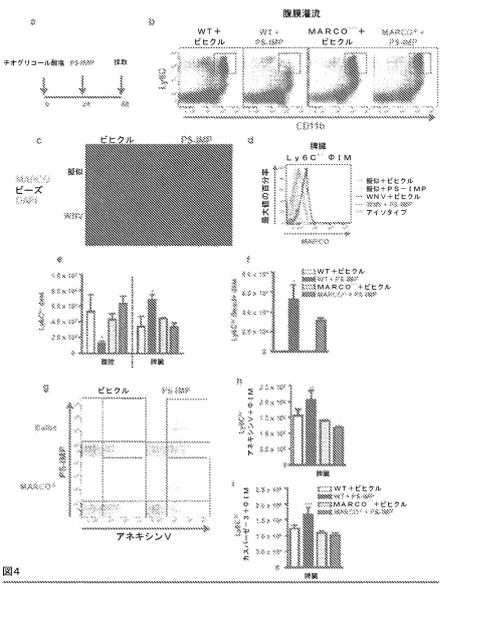
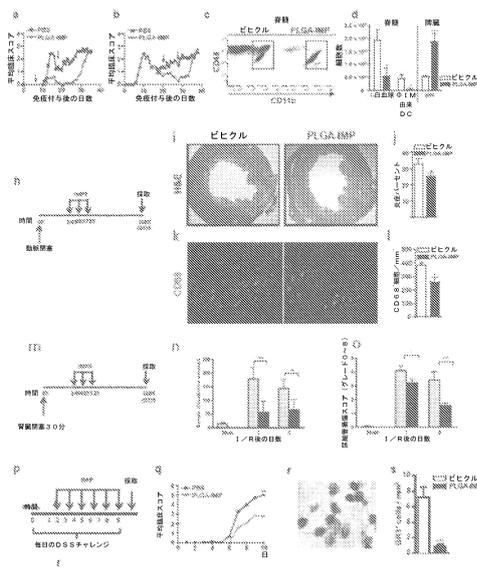
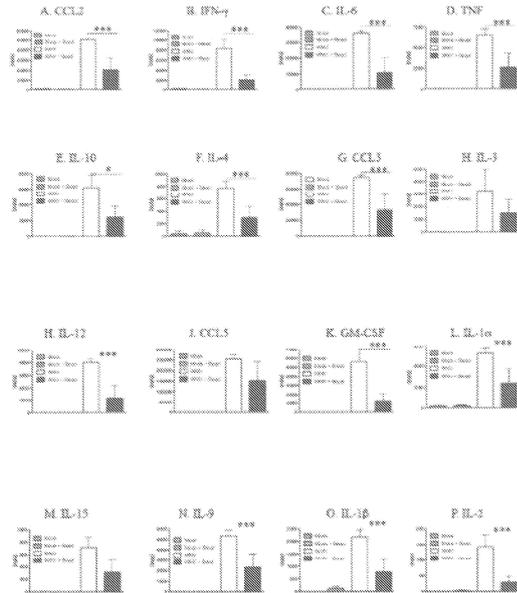


図4

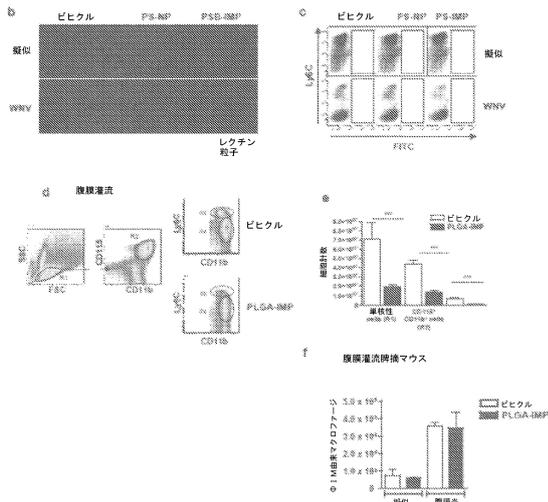
【図5】



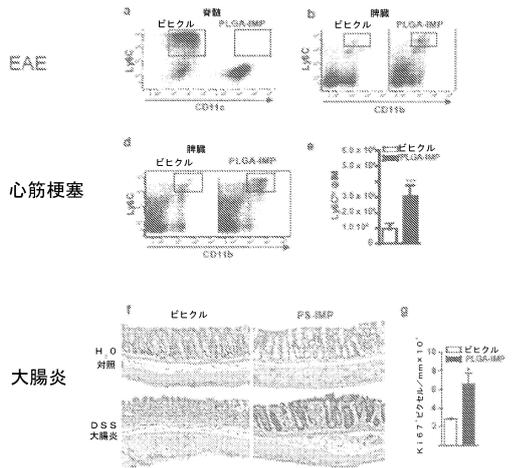
【図6】



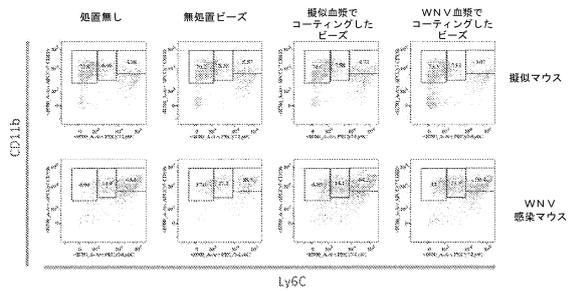
【図7】



【図8】



【図9】



【配列表】

0006725413000001.app

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 P	9/08 (2006.01)	A 6 1 P	9/08
A 6 1 P	11/02 (2006.01)	A 6 1 P	11/02
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	17/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/04
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	21/02 (2006.01)	A 6 1 P	21/02
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47 Z N A
C 0 7 K	14/62 (2006.01)	C 0 7 K	14/62
C 0 7 K	14/78 (2006.01)	C 0 7 K	14/78

(31)優先権主張番号 61/844,961

(32)優先日 平成25年7月11日(2013.7.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/865,392

(32)優先日 平成25年8月13日(2013.8.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/887,212

(32)優先日 平成25年10月4日(2013.10.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者 ゲッツ, ダニエル

アメリカ合衆国, ワシントン州, コロンビア特別区 20018, 20番 ストリート エヌイー
3303

(72)発明者 キング, ニコラス

オーストラリア連邦, ニュー サウス ウェールズ州 2049, ピーターシャム, コルーニャ
ロード 236

合議体

審判長 藤原 浩子

審判官 穴吹 智子

審判官 淵野 留香

(56)参考文献 国際公開第2012/065153(WO, A1)

国際公開第2013/032829(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 P 3 7 / 0 0

C A p l u s (S T N)

M E D L I N E (S T N)

E M B A S E (S T N)

B I O S I S (S T N)

E M B A S E (S T N)

J S T p l u s (J D r e a m I I I)

J M E D P l u s (J D r e a m I I I)

J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)