

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-500285
(P2017-500285A)

(43) 公表日 平成29年1月5日(2017.1.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/385 (2006.01)	A 6 1 K 39/385 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 G	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/50 (2017.01)	A 6 1 K 47/48	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-528073 (P2016-528073)
 (86) (22) 出願日 平成26年11月3日 (2014.11.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年6月22日 (2016.6.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2014/003014
 (87) 国際公開番号 W02015/063616
 (87) 国際公開日 平成27年5月7日 (2015.5.7)
 (31) 優先権主張番号 61/899,826
 (32) 優先日 平成25年11月4日 (2013.11.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507132329
 ユーティーアイ リミテッド パートナー
 シップ
 カナダ国 アルバータ州 カルガリー 3
 1 ストリート ノースウェスト 355
 3 スイート 130
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 持続的免疫療法のための方法および組成物

(57) 【要約】

本開示は、抗原特異的にTR1細胞および/またはBreg細胞の形成、増殖、および動員を促進するための組成物および方法、ならびにそれを必要とする対象において自己免疫疾患および障害を治療するための組成物および方法を提供する。

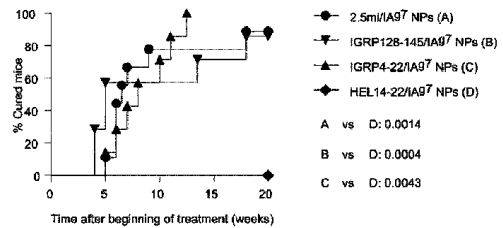
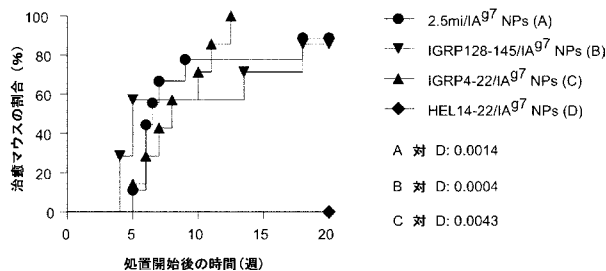


FIG. 3B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象におけるTR1細胞および/または制御性B細胞の集団の増殖および/または発生において用いるための、ナノ粒子と疾患に関連する抗原-MHCII複合体とを含む複合体であって、該ナノ粒子が、約1 nm～約100 nm; 約1 nm～約50 nm; または約1 nm～約20 nmもしくは約5 nm～約100 nmの群から選択される直径を有し、かつ抗原-MHCII複合体とナノ粒子との数の比率が約10:1～約1000:1である、前記複合体。

【請求項 2】

抗原-MHCIIの密度が、前記ナノ粒子の表面積100 nm²あたりpMHC約0.05個～約25個である、請求項1に記載の複合体。

10

【請求項 3】

前記抗原が、自己免疫応答に関与する自己抗原またはその模倣体に由来し、かつ任意で、該自己抗原が、膵細胞によって発現される抗原、IGRP、インスリン、GAD、IA-2、またはミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質(MOG)に由来するエピトープである、請求項1または2に記載の複合体。

【請求項 4】

前記ナノ粒子が、非リポソーム性であり、かつ/または固形コア、好ましくは金もしくは酸化鉄のコアを有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 5】

前記抗原-MHCIIが、共有結合または非共有結合によって前記ナノ粒子に結合されている、請求項1～3のいずれか一項に記載の複合体。

20

【請求項 6】

前記抗原-MHCIIが、サイズが5 kD未満のリンカーを介して共有結合によって前記ナノ粒子に結合されている、請求項1～4のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 7】

前記ナノ粒子が、生体吸収性かつ/または生体分解性である、請求項1～6のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 8】

ナノ粒子複合体が、約10:1～約100:1の抗原-MHCII複合体とナノ粒子との比率を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の複合体。

30

【請求項 9】

前記リンカーがポリエチレングリコールを含む、請求項5に記載の複合体。

【請求項 10】

前記抗原-MHCII複合体が同一であるかまたは異なる、請求項1～9のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 11】

前記リンカーが同一であるかまたは異なる、請求項9または10に記載の複合体。

【請求項 12】

治療有効量の前記請求項のいずれか一項に記載の複合体および担体を含む、組成物。

40

【請求項 13】

前記担体が薬学的に許容される担体である、請求項12に記載の組成物。

【請求項 14】

抗原-MHCII複合体をナノ粒子上にコーティングするかまたは複合体化させる工程を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の複合体を作製する、調製する、または得るための方法。

【請求項 15】

Tr1細胞および/または制御性B細胞の形成、増殖、および動員をそれを必要とする対象において抗原特異的に促進するための方法であって、該対象に有効量の請求項1～11のいずれか一項に記載の複合体または請求項12もしくは13に記載の組成物を投与する工程を含む、前記方法。

50

【請求項 16】

ウイルス感染または自己免疫障害の治療または予防をそれを必要とする対象において行うための方法であって、該対象に有効量の請求項1～11のいずれか一項に記載の複合体または請求項12もしくは13に記載の組成物を投与する工程を含み、ただし、抗原が自己免疫に関連する自己抗原である、前記方法。

【請求項 17】

対象が哺乳動物である、請求項14～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

自己免疫障害が、糖尿病、前糖尿病、多発性硬化症、または多発性硬化症に関連する障害の群より選択され、ただし、抗原が、治療される自己免疫障害に関連する、請求項15または17に記載の方法。

10

【請求項 19】

請求項1～11のいずれか一項に記載の複合体または請求項11もしくは12に記載の組成物と使用説明書とを含む、キット。

【請求項 20】

鉄アセチルアセトネートを熱分解する工程を含む、酸化鉄ナノ粒子を作製するための方法。

【請求項 21】

前記酸化鉄ナノ粒子が水溶性である、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

熱分解が単一工程の反応を含む、請求項20または21に記載の方法。

20

【請求項 23】

熱分解が官能化PEG分子の存在下で起こる、請求項20～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

熱分解がベンジルエーテルの存在下で行われる、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

熱分解の温度が、約80～約300、または約80～約200、または約80～約150、または約100～約250、または約100～約200、または約150～約250、または約150～約250である、請求項20または21に記載の方法。

30

【請求項 26】

熱分解が約1～約2時間行われる、請求項20～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記ナノ粒子が、検出可能ないかなる分解または凝集もなしにPBS中、約4で安定である、請求項20～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記ナノ粒子が少なくとも6ヶ月間安定である、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記ナノ粒子を磁気カラムで精製する工程をさらに含む、請求項20～28のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 30】

請求項20～29のいずれか一項から得られた酸化鉄ナノ粒子とpMHCを接触させる工程を含み、それによってナノ粒子複合体が提供される、ナノ粒子複合体を作製するための方法。

【請求項 31】

前記ナノ粒子を磁気カラムで精製する工程をさらに含む、請求項30に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年11月4日付で出願された米国特許仮出願第61/899,826号に対する米国

50

特許法第119条(e)の下での優先権を主張するものであり、この出願の全内容は参照により本開示へ組み入れられる。

【0002】

開示の分野

本開示は、免疫療法および医薬に関連する組成物および方法を対象とする。

【背景技術】

【0003】

背景

本開示の全体および本開示の範囲内で、識別引用によりまたはアラビア数字により、技術的刊行物および特許刊行物が参照される。アラビア数字に対応する完全な書誌的引用は、本明細書中、特許請求の範囲の前に見出される。本明細書において引用される全ての参考文献の開示は、本発明が関連する技術分野の状態をさらに十分に記載するように、参照により本出願へ組み入れられる。

10

【0004】

自己免疫疾患は、免疫系による自己組織の攻撃によって引き起こされる。理想的な治療法は、全身性免疫（外来抗原に対する免疫応答）を損なうことなく、自己免疫応答（その疾患において標的とされる全ての抗原エピトープに対する）を選択的に鈍らせることができるものであろう。残念ながら、いずれか1つの自己免疫疾患に関連するリンパ球特異性は、多くあって、完全には定義されておらず、これを、困難な目標としている。

20

【発明の概要】

【0005】

概要

当技術分野におけるこの必要性に心えて、自己免疫障害の治療に有用な治療用組成物が本明細書に記載される。一局面は、それを必要とする対象において抗病原性自己反応性T細胞および/またはB細胞の集団を増殖および/または発生させるための方法であって、該対象に抗原-MHCクラスII-ナノ粒子（「NP」）複合体（「NP-複合体」）を投与する工程を含むか、または該工程から本質的になるか、または該工程からなり、該抗原が自己免疫に関連する抗原または自己抗原である、前記方法に関する。いくつかの局面において、特定のNP上の抗原の全ては同一であってもよいし、または異なってもよい。別の局面において、NP上の抗原は、異なるアミノ酸配列を有するが、同じ抗原タンパク質から単離される。さらなる局面において、NP上の抗原は異なる抗原由来である。別の局面において、MHC Iは同じまたは異なるものである。

30

【0006】

一局面において、本開示は、対象における1つまたは複数の制御性B細胞およびTR1細胞（例えば、TR1およびCD4⁺細胞）集団の増殖および/または発生において用いるための、抗原/MHC II複合体の形態であり得る、ナノ粒子；MHCクラスIIタンパク質および疾患に関連する抗原を含むか、またはその代わりそれから本質的になるか、またはそれからなる、NP-複合体であって、ナノ粒子は、直径が約1 nm～約100 nm；直径が約1 nm～約50 nmまたは直径が約1 nm～約20 nmもしくは約5 nm～約20 nmの群から選択される直径を有し、かつ抗原-MHC II複合体とナノ粒子との数の比率が約10:1～約1000:1であるものを提供する。一局面において、前記複合体が有するMHCクラスIIの密度は、NP表面積（コーティングを含む）100 nm²当たりのpMHC IIが約0.05個～約25個である。抗原は、例えば、前糖尿病、糖尿病、多発性硬化症（「MS」）または多発性硬化症に関連する障害のような自己免疫応答に関連する自己抗原またはその模倣体であり、かつ任意により、ここで疾患が前糖尿病または糖尿病である場合、自己抗原は、膵細胞によって発現される抗原または自己抗原IGRP、インスリン、GADもしくはIA-2タンパク質由来のエピトープである。別の局面において、MHCクラスII成分は、HLA-DR、HLA-DQ、またはHLA-DPの全部または一部を含む。抗原-MHCクラスII複合体は、ナノ粒子に共有結合または非共有結合によって結合されている。ナノ粒子は生体吸収性かつ/または生体分解性であることができる。

40

【0007】

50

さらなる局面において、ナノ粒子は非リボソーム性であり、かつ/または固形コア、好ましくは金または酸化鉄のコアを有する。共有結合によって結合されている場合、抗原-MHCクラスII複合体は、サイズが5 kD未満のリンカーを介してナノ粒子に共有結合によって結合されている。一局面において、リンカーはポリエチレングリコール(PEG)を含む。pMHCは、リンカーを含むがこれに限定されない任意の構造によってまたは架橋結合によってナノ粒子またはナノ粒子コーティングに結合されていてもよい。一局面において、MHCは、C末端を介して直接ナノ粒子またはコーティングに結合されている。

【0008】

本出願人は、ナノ粒子上の抗原-MHCクラスII複合体の密度が治療効果に寄与することを発見した。したがって、本明細書に開示されるように、少なくとも2個のMHCII、またはその代わり少なくとも8個、またはその代わり少なくとも9個、またはその代わり少なくとも10個、またはその代わり少なくとも11個、またはその代わり少なくとも12個のMHCIIがナノ粒子に複合体化されると仮定して、抗原-MHCIIナノ粒子複合体は、ナノ粒子の表面積(任意のコーティングを含むように測定されている表面積)100 nm²あたりに約0.05個のMHC分子からの範囲で規定の密度を有することができる。一局面において、複合体が有するMHCIIの密度は、100 nm²あたり約0.01個のMHCII(0.05個のMHCII/100 nm²)~約30個のMHCII/100 nm²、またはその代わり0.1個のMHCII/100 nm²~約25個のMHCII/100 nm²、またはその代わり約0.3個のMHCII/100 nm²~約25個のMHCII/100 nm²、またはその代わり約0.4個のMHCII/100 nm²~約25個のMHCII/100 nm²、またはその代わり約0.5個のMHCII/100 nm²~約20個のMHCII/100 nm²、またはその代わり0.6個のMHCII/100 nm²~約20個のMHCII/100 nm²、またはその代わり約1.0個のMHCII/100 nm²~約20個のMHCII/100 nm²、またはその代わり約5.0個のMHCII/100 nm²~約20個のMHCII/100 nm²、またはその代わり約10.0個のMHCII/100 nm²~約20個のMHCII/100 nm²、またはその代わり約15個のMHCII/100 nm²~約20個のMHCII/100 nm²、またはその代わり少なくとも約0.5個、またはその代わり少なくとも約1.0個、またはその代わり少なくとも約5.0個、またはその代わり少なくとも約10.0個、またはその代わり少なくとも約15.0個のMHCII/100 nm²であり、ナノ粒子のnm²表面積は任意のコーティングを含むように測定されている。一局面において、9個または少なくとも9個のMHCIIが1個のナノ粒子に複合体化された場合、密度範囲は、約0.3個のMHCII/100 nm²~約20個のMHCII/100 nm²である。

【0009】

本開示は、治療有効量の本明細書に記載されるNP-複合体および担体(例えば、薬学的に許容される担体)を含む組成物も提供する。一局面において、組成物中の全てのNP-複合体が同一である。別の局面において、組成物のNP-複合体は多様なまたは種々のMHC-抗原複合体を含む。

【0010】

複合体および組成物を作製するための方法が、本明細書においてさらに提供される。本方法は、抗原-MHC複合体(例えば、MHCII複合体)をナノ粒子上に非共有結合的にコーティングまたは共有結合的に複合体化する工程を含むか、またはその代わり該工程から本質的になるか、または該工程からなることができる。

【0011】

医療法および診断法も提供される。一局面において、本明細書に記載されるNP-複合体または組成物の有効量を対象に投与する工程を含むか、またはその代わり該工程から本質的になるか、または該工程からなる、方法が、それを必要とする対象において抗原特異的制御性B細胞および/またはTR1細胞(例えば、TR1およびCD4⁺細胞)の形成、増殖、および動員を促進するために提供される。

【0012】

別の局面において、それを必要とする対象において本明細書に記載される自己免疫疾患または障害(例えば、MS、MSに関連する障害、糖尿病、または前糖尿病)を治療または予防するための方法であって、本明細書に記載されるNP-複合体または組成物の有効量を対象に投与する工程を含むか、またはその代わり該工程から本質的になるか、または該工程

10

20

30

40

50

からなり、自己抗原が、治療される疾患に関する（例えば、糖尿病の予防または治療に関する）疾患関連抗原であり、抗原が糖尿病関連抗原である、前記方法が提供される。さらなる局面において、自己免疫疾患はMSまたはMSに関連する障害であり、抗原はMS関連抗原である。

【0013】

キットも提供される。当該キットは、本明細書に記載されるNP-複合体または組成物および使用説明書を含むか、またはその代わりそれらから本質的になるか、またはそれらからなる。

【0014】

一局面において、ナノ粒子前駆体を熱分解または加熱する工程を含む、ナノ粒子を作製する方法が、本明細書において提供される。一態様において、ナノ粒子は金属または金属酸化物ナノ粒子である。一態様において、ナノ粒子は酸化鉄ナノ粒子である。一態様において、ナノ粒子は金ナノ粒子である。一態様において、本技術によって調製されたナノ粒子が、本明細書において提供される。一態様において、鉄アセチルアセトネートの熱分解反応を含む酸化鉄ナノ粒子を作製する方法が、本明細書において提供される。一態様において、得られる酸化鉄ナノ粒子は水溶性である。一局面において、酸化鉄ナノ粒子はタンパク質結合に適している。一態様において、本方法は単一工程の熱分解反応を含む。

10

【0015】

一局面において、熱分解は官能化PEG分子の存在下で起こる。官能化PEGリンカーのある種の非限定的な例は、表1に示されている。

20

【0016】

一局面において、熱分解は、鉄アセチルアセトネートを加熱することを含む。一態様において、熱分解は、官能化PEG分子の存在下で鉄アセチルアセトネートを加熱することを含む。一態様において、熱分解は、ベンジルエーテルおよび官能化PEG分子の存在下で鉄アセチルアセトネートを加熱することを含む。

【0017】

理論によって束縛されるわけではないが、一態様において、官能化PEG分子は還元試薬としておよび界面活性剤として使用される。本明細書において提供されるナノ粒子作製方法は、PEG分子によって粒子を水溶性にするため、置換が困難かまたは完全には置換されない界面活性剤を使用する従来の方法を単純化および改善する。通常、界面活性剤は高価（例えば、リン脂質）であるかまたは有毒（例えば、オレイン酸もしくはオレイルアミン）であり得る。別の局面において、理論によって束縛されるわけではないが、ナノ粒子作製方法は、従来界面活性剤を使用する必要性を取り除き、それによって高度の分子純度および水溶性を達成する。

30

【0018】

一態様において、熱分解は、鉄アセチルアセトネートおよびベンジルエーテルを必要とし、かつ本明細書において利用されるもの以外の従来界面活性剤の非存在下であることを必要とする。

【0019】

一態様において、熱分解の温度は、約80～約300、または約80～約200、または約80～約150、または約100～約250、または約100～約200、または約150～約250、または約150～約250である。一態様において、熱分解は約1～約2時間で起こる。

40

【0020】

一態様において、酸化鉄ナノ粒子を作製する方法は、例えばMiltenyi Biotec LS磁気カラムの使用による、精製工程を含む。

【0021】

一態様において、ナノ粒子は、検出可能ないかなる分解または凝集もなしに、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中、約4で安定である。一態様において、ナノ粒子は少なくとも6ヶ月間安定である。

【0022】

50

一局面において、本明細書において提供される酸化鉄ナノ粒子とpMHCを接触させる工程を含む、ナノ粒子複合体を作製する方法が、本明細書において提供される。理論によって束縛されるわけではないが、pMHCはそのカルボキシ末端の位置にシステインをコードし、これは約12～約14時間、約pH 6.2～約pH 6.5で官能化PEG中のマレイミド基と反応することができる。

【0023】

一局面において、ナノ粒子複合体を作製する方法は、例えばMiltenyi Biotec LS磁気力ラムの使用による、精製工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0024】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のある局面をさらに実証するために含めるものである。本明細書において提示される特定の態様の詳細な説明と併せてこれらの図面の1つまたは複数を参照することにより、本発明をよりよく理解することができる。

【0025】

【図1A】NP複合体の概略図を示す。図1A: 単鎖pMHCクラスI発現構築体の概略図(上図)およびコグネイトCD8⁺T細胞への対応するpMHC四量体(蛍光色素で標識された)の結合の代表的なフローサイトメトリープロファイルである。

【図1B】NP複合体の概略図を示す。図1B: NP複合体の2次元構造およびリンカーを示す概略図である。図に示す通り、1つのNPは、さまざまな化学的リンカーを介してナノ粒子コアと複合体化されている同じ抗原を含むことができる。

【図1C】NP複合体の概略図を示す。図1C: NPと結合されたマレイミド官能化NPを示す。

【図2】典型的なpMHCクラスII単量体の構造(上図)および対応するpMHC四量体で染色されたまたは未染色のままとされたコグネイトCD4⁺T細胞の代表的なFACSプロファイルを示す。

【図3A】種々のT1D関連pMHCクラスII-NPが新たな糖尿病NODマウスにおいて高血糖を元に戻すことを示す。図3A: 個々のマウス血中グルコース曲線を示す。マウスは、4週間安定して正常血糖である場合に「治癒した」と見なされ、その後処置を中止した。外来抗原HEL₁₄₋₂₂を対照として用いた。

【図3B】種々のT1D関連pMHCクラスII-NPが新たな糖尿病NODマウスにおいて高血糖を元に戻すことを示す。図3B: 疾患回復頻度を示す。

【図4】長期治癒マウスにおける腹腔内グルコース負荷試験(IPTGTT)およびインスリン産生能を示す。IDDM, 糖尿病未処置マウス; 治癒, 50週齢の時点で正常血糖を有するマウス(処置中止後30週超); 対照, 年齢を適合させた非糖尿病未処置マウス(50週齢)。

【図5】T1D関連pMHCクラスII-NPがコグネイト自己反応性CD4⁺T細胞を増殖させることを示す。データは、2.5mi/1-A⁹⁷-NPで処置されたマウスに対応する。右下図、2.5mi/1-A⁹⁷-NPで処置されたマウスは、他の2つの自己反応性CD4⁺T細胞特異性の割合の増加を示さなかったため、増殖はNP上のpMHCに特異的である。PLN, 膵リンパ節; MLN, 腸間膜リンパ節; BM, 骨髄(メモリーT細胞の貯蔵所)。

【図6】T1D関連pMHCクラスII-NPがコグネイト自己反応性CD4⁺T細胞を増殖させることを示す。増殖は脾臓に対して示されるが、類似のパターンが膵リンパ節、血液および髄質において認められる。「発症」は処置前の値に対応する; 「治癒」は、pMHC-NPにより正常血糖となったマウスである(処置中止後30週を越えた時点で分析); 「IDDM」は、処置中止により再発したマウスである(およそ25%); 「50週齢」は年齢を適合させた未処置の非糖尿病対照に対応する。

【図7-1】T1D関連pMHCクラスII-NPがコグネイトメモリー様1型制御性T細胞(「Tr1またはTR1」細胞)を増殖させることを示す。

【図7-2】T1D関連pMHCクラスII-NPがコグネイトメモリー様1型制御性T細胞(「Tr1またはTR1」細胞)を増殖させることを示す。

【図8】pMHCクラスII-NPによって増殖する自己反応性CD4⁺T細胞がIL-10産生体であることを示す。IGRP₁₂₆₋₁₄₅/1-A⁹⁷-NPまたは対照NPで処置したマウスに由来するIGRP₁₂₆₋₁₄

10

20

30

40

50

$5/1-A^{97}$ 四量体⁺細胞を選別し、コグネイトおよび非コグネイトペプチドで抗原刺激し、上清のサイトカイン含量をルミネックス技術によりアッセイした。

【図9】pMHCクラスII-NPがIL-10およびTGF β 依存的に高血糖を元に戻すことを示す。図9: サイトカインブロック抗体(「Abs」)で処置したマウスの、正常血糖を回復させる(上図)、コグネイトTr1細胞を増殖させる(左下図)、および(IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞に対する)PLN中での自己抗原の提示を抑制する(右下図)IGRP₄₋₂₂/IA⁹⁷-NPの能力を示す。抗IL10 Abおよび抗TGF Abは、Tr1細胞の増殖を損なうことなく、自己抗原の提示を部分的に回復させ、pMHC-NPの治療効果を阻害する。

【図10】pMHCクラスII-NP治療が全身性免疫を損なわないことを示す。図10A: pMHC-NPで処置されたNODマウスは、自己制御性Tr1 CD4⁺T細胞の全身性の増殖(上図)にもかかわらず、急性ウイルス(ワクシニアウイルス)感染を容易に除去できることを示す(下図、感染後4日目 vs 14日目を比較されたい)。図10B: pMHC-NPで処置されたマウス(10用量)は、未処置およびワクチン未接種マウスと比べて、CFA中での免疫付与により、KLH-DNPに対する抗体応答を開始させることができることを示す。

【図11】pMHCクラスII-NP治療が、C57BL/6マウスにおいて確立されたEAEの重症度を低減することを示す。B6マウスをCFA中のpMOG₃₅₋₅₅で免疫し、静脈から百日咳毒素で処置した。15点尺度にわたる確立された基準を用いて、マウスをEAEの兆候についてスコア化した。罹患したマウスを、免疫から21日後に始めて週2回、用量7.5~22.5 ugのpMOG₃₈₋₄₉/IA^bでコーティングされたNPで処置した。

【図12A】pMHCクラスII-NPの構造および特性を示す。図12A: 官能化された、生体適合性の酸化鉄NP上にpMHCを共有結合的にコーティングするために使用され得るさまざまなケミストリーを描く漫画である。

【図12B】pMHCクラスII-NPの構造および特性を示す。図12B: pMHCでコーティングされたNPの透過電子顕微鏡写真である。

【図12C】pMHCクラスII-NPの構造および特性を示す。図12C: pMHCでコーティングされたNP vs pMHCでコーティングされていないNPの動的光散乱プロファイルを示す。

【図13A】pMHCクラスII-NP処置マウスにおけるコグネイトB細胞の増殖およびBreg細胞への分化を示す。図13Aでは、PKH26標識/2.5miペプチドパルスB細胞(下図)(または樹状細胞, 上図)に加えてCFSE標識/GPIペプチドパルスB細胞(下図)(または樹状細胞, 上図)の1:1混合物を2.5mi/IA⁹⁷-NPで処置されたNODマウスへ注射した。7日後、宿主をB細胞(下図)または樹状細胞(上図)のサブセットの両方の存在について分析した。左パネルは代表的な結果を示し、右ヒストグラムは、いくつかの実験で得られた結果の要約を示す。データから、2.5mi/IA⁹⁷-NPで処置されたNODマウスにおいて2.5miペプチドパルスB細胞(DCではなく)が増殖することが示唆される。

【図13B】pMHCクラスII-NP処置マウスにおけるコグネイトB細胞の増殖およびBreg細胞への分化を示す。B(左パネル)では、本出願人は、2.5mi/IAg7-NP vs 対照の(糖尿病に無関係の)pMHC-NPでコーティングされたNPで処置されたNODマウスの腓リンパ節(PLN)および腸間膜リンパ節(MLN)におけるB細胞含量を比較した。データは前者におけるB細胞の動員の増加を示す。B(右パネル)では、本出願人は、Tr1細胞の動員に応じたPLNへのB細胞の動員を比較した。データは、いくつかの異なるpMHC-NP調製物を用いて得られた。データは、pMHC-NPで増殖したTR1細胞とB細胞のPLNへの動員における統計的に有意な相関関係を示す。

【図13C】pMHCクラスII-NP処置マウスにおけるコグネイトB細胞の増殖およびBreg細胞への分化を示す。図13Bでは、本出願人は、IL10-eGFPノックインNODマウス由来の、2.5miペプチドまたは対照ペプチドをパルスしたB細胞を、いくつかの異なるタイプのドナーマウス(上ラベル)へ移入した。7日後に、移入されたB細胞の、高レベルのCD1dおよびCD5(制御性B細胞)を発現するIL10産生(eGFP⁺)B細胞への転換について脾臓を分析した。データは、2.5mi/IA⁹⁷-NPで処置された宿主においてのみ、コグネイト(2.5mi負荷)B細胞の力強い増殖およびB-reg細胞への転換を示す。

【図14】鉄アセチルアセトネートの熱分解による表面官能化酸化鉄ナノ粒子の合成およ

10

20

30

40

50

び生体共役反応 (bioconjugation) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

詳細な説明

本発明は、記載された特定の態様に限定されず、そのため、当然変化し得るものであることを理解されるべきである。さらに、本明細書で用いる用語は、特定の態様のみを説明する目的のためであり、限定することを意図したものではないことを理解すべきである。なぜなら、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるからである。

【0027】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いる単数形「1つ (a)」、「1つ (an)」および「その (the)」は、文脈上別段のはっきりした指示がない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「賦形剤」への言及には、複数の賦形剤が含まれる。

10

【0028】

1. 定義

他に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書で用いる場合、以下の用語は以下の意味を有する。

【0029】

本明細書で用いる「含んでいる」または「含む」という用語は、組成物および方法が列挙された要素を含むが、他を排除しないことを意味するものである。組成物および方法を定義するために用いる場合の「から本質的になる」は、記載した目的のための組み合わせにとって本質的に意義のある他の要素を排除することを意味するものとする。したがって、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、多発性硬化症を治療または予防するための組成物のような、主張された発明の基本的かつ新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない他の材料または工程を排除しない。「からなる」は、微量要素を上回る他の成分および実質的な方法工程を排除することを意味するものとする。これらの移行用語 (transition term) のそれぞれによって定義された態様は、本発明の範囲内である。

20

【0030】

「自己反応性T細胞」とは、そのT細胞を含有するのと同一の個体によって産生および含有される分子である「自己抗原」を認識するT細胞である。

30

【0031】

「病源性T細胞」とは、そのT細胞を含有する対象にとって有害なT細胞である。一方、非病源性T細胞は、対象に実質的に有害ではなく、抗病源性T細胞は、病源性T細胞の害を低減、改善、阻害、または無効化する。

【0032】

本明細書で用いる場合、制御性B細胞またはB制御性細胞 (「B-reg」) という用語は、CD1d、CD5の発現およびIL-10の分泌によって特徴付けられる、抗炎症効果に参与しているそれらの細胞を意味する。B-regはTim-1の発現によっても同定され、Tim-1ライゲーションを通じ誘導されて、寛容を促進することができる。B-regであること的能力は、toll様受容体、CD40-リガンドなどのような、多くの刺激因子によって推進されることが明らかにされた。しかしながら、B-regの完全な特徴付けは、現在進行中である。B-regはまた、高レベルのCD25、CD86、およびTGF- β を発現する。B細胞のこのサブセットは、Th1増殖を抑制し、かくして自己寛容の維持に寄与し得る。B-reg機能の増強は、多くの免疫調節薬の目標となり、自己免疫疾患の、さらに良好な制御に寄与するはずである。例えば、2013年10月31日に最終アクセスされた ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707422 を参照されたい。

40

【0033】

1型制御性T細胞 (Tr1) は、制御性の特性を有し、かつインビトロおよびインビボで抗原特異的な免疫応答を抑制できるCD4⁺T細胞のサブセットである。これらの1型制御性T (Tr1) 細胞は、その固有なサイトカイン産生プロファイルにより定義され、高レベルのIL-1

50

0およびTGF- β を産生するが、IL-4またはIL-2を産生しない。これらの細胞により産生されたIL-10およびTGF- β は、インビトロで初代ナイーブT細胞の阻害を媒介する。Tr1細胞がインビボに存在するという証拠もあり、同種幹細胞移植を受けた重症複合免疫不全を有する患者における高いIL-10産生CD4⁺T細胞の存在が立証されている。Tr1細胞は末梢寛容の調節に関与しており、それらは、インビボで免疫応答を媒介するための細胞療法として使用される可能性がある。例えば、2013年10月31日に最終アクセスされたncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887343を参照されたい。

【0034】

1型制御性T(Tr1)細胞は、高レベルのIL-10およびTGF- β を産生するその能力によって定義される。種々の抗原に特異的なTr1細胞がインビボで生ずるが、インビトロにおいてIL-10の存在下でナイーブCD4⁺T細胞から分化することもある。Tr1細胞の増殖能は低いが、これはIL-15によって克服することができる。Tr1細胞はIL-10およびTGF- β の産生を介してナイーブおよびメモリーTヘルパー1型または2型応答を抑制する。分子レベルでTr1細胞をさらに特徴付けることによって、Tr1細胞の作用機序が明確化され、他のTr細胞サブセットとTr1細胞の関係が明らかにされよう。新たな治療薬の開発に向けて新規の標的を同定するために、および末梢寛容を調節するための細胞療法として、Tr1細胞を用いることを、予測することができる。例えば、2013年10月31日に最終アクセスされたncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722624を参照されたい。

【0035】

「阻害」、「低減」もしくは「予防」という用語、またはこれらの用語の任意の変形は、本願の特許請求の範囲および/または明細書において使用される場合、所望の結果を達成するための任意の測定可能な減少または完全な阻害を含む。

【0036】

本出願を通して、「約」という用語は、値が、その値を測定するために使用される装置または方法に関する誤差の標準偏差を含むことを示すために用いられる。範囲を含め、数字表示、例えば、温度、時間、量、および濃度の前で用いられる場合の「約」という用語は、(+)または(-)10%、5%、または1%変動し得る近似値を示す。

【0037】

「生体適合性である」とは、送達システムの構成成分が組織傷害またはヒトの生体システムへの傷害を引き起こさないことを意味する。生体適合性を付与するために、ヒトで安全に使用された歴史があるかまたはGRAS(一般に安全と認められる)ステータスを有するポリマーおよび添加剤が優先的に使用される。「生体適合性」とは、組成物に用いられる成分および添加剤が、体に悪影響を及ぼすことなく、最終的に体内で「生体吸収される」または排出されることを意味する。組成物が生体適合性でありかつ無毒とみなされるために、組成物は細胞に対する毒性を引き起こしてはならない。同様に、「生体吸収性」という用語は、患者の体内での材料の長期蓄積が避けられるように、ある期間にわたってインビボで生体吸収を受ける該材料から作製されたナノ粒子を指す。好ましい態様において、生体適合性ナノ粒子は、2年未満、好ましくは1年未満、さらに好ましくは6ヶ月未満の期間にわたって生体吸収される。生体吸収率は、粒子のサイズ、使用される材料、および当業者によって十分認識される他の要因に関連する。本発明で用いるナノ粒子を形成するために、生体吸収性で生体適合性の材料の混合物が使用可能である。一態様において、酸化鉄と生体適合性生体吸収性ポリマーを組み合わせることができる。例えば、酸化鉄とPGLAを組み合わせることでナノ粒子を形成することができる。

【0038】

抗原-MHC-ナノスフェア複合体(「NP-複合体」)とは、生体適合性で生体分解性のナノスフェアなどの表面上でのペプチド、糖質、脂質、または他の抗原分子もしくは抗原タンパク質(すなわち、自己ペプチドもしくは自己抗原)の抗原セグメント、断片もしくはエピトープの提示を指す。本明細書で用いる「抗原」とは、対象において免疫応答を誘導することができるか、または抗病原性細胞の増殖を誘導することができる分子の全体、一部、断片またはセグメントを指す。

10

20

30

40

50

【0039】

「模倣体」は、所定のリガンドまたはペプチドの類似体であり、該類似体は該リガンドに実質的に類似している。「実質的に類似」とは、合計でリガンドの分子量の約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、または約5%未満を占める、1つまたは複数の官能基または修飾を、模倣体が有することを除いて、類似体が該リガンドと同様の結合プロファイルを有することを意味する。

【0040】

「抗病原性自己反応性T細胞」という用語は、抗病原性の特性を有するT細胞（すなわち、MS、MSに関連する疾患もしくは障害、または前糖尿病のような自己免疫疾患を和らげるT細胞）を指す。これらのT細胞には、抗炎症性T細胞、エフェクタT細胞、メモリーT細胞、低結合活性T細胞、ヘルパーT細胞、自己制御性T細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、TR1細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞などが含まれ得る。

10

【0041】

「抗炎症性T細胞」という用語は、抗炎症反応を促進するT細胞を指す。T細胞の抗炎症機能は、抗炎症性タンパク質、サイトカイン、ケモカインなどの産生および/または分泌を介して達成され得る。抗炎症性タンパク質はまた、免疫応答を抑制する抗増殖シグナルを包含することが意図される。抗炎症性タンパク質としては、IL-4、IL-10、IL-13、IL-21、IL-23、IL-27、IFN- γ 、TGF- β 、IL-1ra、G-CSF、ならびにTNFおよびIL-6の可溶性受容体が挙げられる。したがって、本開示の局面は、患者において、MS、MSに関連する障害、糖尿病、または前糖尿病などの自己免疫障害を治療するための方法であって、抗原が疾患に関連する抗原である抗原-MHCII-ナノ粒子複合体をその患者に投与する工程を含むか、該工程から本質的になるか、または該工程からなる、該方法に関する。

20

【0042】

「IL-10」または「インターロイキン-10」という用語は、IL-10遺伝子によってコードされるサイトカインを指す。IL-10配列は、GenBankアクセッション番号NM_000572.2(mRNA)およびNP_000563.1(タンパク質)で表される。

【0043】

「TGF- β 」または「トランスフォーミング増殖因子 β 」という用語は、抗炎症効果を及ぼすことができるタンパク質を指す。TGF- β は、TGF- β 1、TGF- β 2、およびTGF- β 3と呼ばれる、少なくとも3つのアイソフォームで存在する分泌タンパク質である。それはまた、このファミリーの初代メンバーであった、TGF- β 1の元の名称であった。TGF- β ファミリーは、トランスフォーミング増殖因子 β スーパーファミリーとして知られるタンパク質のスーパーファミリーの一部であり、該スーパーファミリーには、インヒピン、アクチピン、抗ミューラー管ホルモン、骨形成タンパク質、デカペンタプレジック、およびVg-1が含まれる。

30

【0044】

「有効量」とは、意図された目的を達成するのに十分な量であり、そのような目的の非限定的な例としては、免疫応答の開始、免疫応答の調節、炎症反応の抑制、およびT細胞活性、またはT細胞集団の調節が挙げられる。一局面において、有効量は、記載された治療目的を達成するように機能する量、例えば治療に有効な量である。本明細書中で詳細に記載されるように、有効量、つまり投与量は、目的、および組成、成分に依存し、かつ本開示に従って決定することができる。

40

【0045】

特許請求の範囲および/または明細書において「含む」という用語と組み合わせて使用される場合の単語「1つの(a)」または「1つの(an)」の使用は、「1つ」を意味し得るが、それはまた、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」および「1つ以上」の意味とも合致する。

【0046】

本明細書において「ナノスフェア」、「NP」、または「ナノ粒子」とは、適宜、対象、細胞試料、または組織試料に単独でまたは複数で投与される小さな個別の粒子を意味する

50

。特定の態様において、ナノ粒子は形状が実質的に球形である。特定の態様において、ナノ粒子はリポソームまたはウイルス粒子ではない。さらなる態様において、ナノ粒子は中空ではないか、または固形コアを有する。本明細書で用いる「実質的に球形」という用語は、粒子の形状が約10%を超えて球からそれていないことを意味する。本発明のさまざまな既知の抗原複合体またはペプチド複合体を該粒子に付けることが可能である。本発明のナノ粒子は、サイズが約1 nm~約1 μm、好ましくは、約1 nm~約100 nm、またはその代わり約1 nm~約50 nm、またはその代わり約5~50 nm、またはその代わり約5 nm~100 nmの範囲であり、いくつかの局面において、複数のナノ粒子が意図されている場合、複数のナノ粒子の平均粒子径または中央粒子径を指す。より小さなナノサイズ粒子は、例えば、より大きな粒子を水溶液中で沈降させる分別の方法によって、得ることができる。その後、当業者に公知の方法によって溶液の上部が回収される。所望の平均サイズが生じるまで、この方法を繰り返すことができる。

10

【0047】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、選択肢のみを指すことまたは選択肢が相互に排他的であることが明示的に示されない限り、「および/または」を意味するために用いられるが、本開示は、唯一の選択肢を指す定義ならびに「および/または」を支持する。

【0048】

本明細書で用いる「免疫応答」またはそれと等価な「免疫学的応答」という用語は、細胞媒介性応答（抗原特異的T細胞またはその分泌産物により媒介される）の発生を指す。細胞性免疫応答は、クラスIまたはクラスII MHC分子と会合したポリペプチドエピトープの提示により誘発されて、ウイルス感染を治療または予防し、抗原特異的Breg細胞、TC1、CD4⁺Tヘルパー細胞、および/またはCD8⁺細胞傷害性T細胞、ならびに/あるいは疾患により生じた自己制御性T細胞およびB細胞「メモリー」細胞を増殖させる。その応答は他の成分の活性化を伴うこともある。

20

【0049】

本明細書で用いる「炎症反応」および「炎症」という用語は、病原体、損傷細胞、または刺激物などの有害な刺激に対する個体の血管組織の複雑な生物学的応答を示し、サイトカインの分泌、特に炎症性サイトカイン、すなわち活性化された免疫細胞によって主に産生されかつ炎症性反応の増幅に関与しているサイトカインの分泌を含む。例示的な炎症性サイトカインとしては、IL-1、IL-6、IL-10、TNF-α、IL-17、IL21、IL23、IL27、およびTGF-βが挙げられるが、これらに限定されない。代表的な炎症には、急性炎症と慢性炎症が含まれる。急性炎症は、血漿および白血球による組織の浸潤に起因する炎症の古典的な兆候（腫脹、発赤、痛み、熱、および機能喪失）を特徴とする短期的なプロセスを示す。急性炎症は、一般的に、有害な刺激が存在している間は発生しており、ひとたび刺激が除去されるか、分解されるか、または瘢痕化（線維化）によって遮断されると停止する。慢性炎症は、同時活動性炎症、組織破壊、および修復への試みの特徴とする状態を示す。慢性炎症は、上に挙げた急性炎症の古典的な兆候を特徴としない。代わりに、慢性的に炎症を起こした組織は、単核免疫細胞（単球、マクロファージ、リンパ球、および形質細胞）の浸潤、組織破壊、および血管新生と線維化を含む治癒への試みの特徴とする。炎症は、個体において炎症と関連する複雑な生物学的応答を形成している事象のいずれかに影響を与えることによって、特にそれを阻害することによって、本開示の意味において抑制することが可能である。

30

40

【0050】

自己免疫障害には、真性糖尿病（diabetes melitus）、前糖尿病、移植拒絶、多発性硬化症、多発性硬化症に関連する障害、早発閉経、強皮症、シェーグレン病、狼瘡、白斑、脱毛症（禿頭症）、多腺性機能不全、グレーブズ病、甲状腺機能低下症、多発性筋炎、天疱瘡、クローン病、結腸炎、自己免疫性肝炎、下垂体機能低下症、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、副甲状腺機能低下症、および/または関節リウマチが含まれ得るが、これらに限定されない。特定の局面において、抗原/MHCII/粒

50

子複合体のペプチド成分は、処置によって探索され、調節され、または鈍らせられる自己免疫応答に關与する、自己抗原もしくは自己抗原エピトープまたはそれらの模倣体に由来するかまたはそれらから設計される。特定の局面において、自己抗原は、ペプチド、糖質、または脂質である。特定の局面において、自己抗原は、対象の特定の細胞、例えば膵細胞によって発現されるタンパク質、糖質、または脂質の、断片、エピトープ、またはペプチドであり、IGRP、インスリン、GAD、またはIA-2タンパク質の断片を含むが、これらに限定されない。種々のこのようなタンパク質またはエピトープが、種々の自己免疫状態について同定されている。自己抗原は、膵島周辺の (peri-islet) シュワン細胞などのような、第2の内分泌要素または神経分泌 (neurocrine) 要素に由来する、ペプチド、糖質、脂質などであってもよい。

10

【0051】

本明細書で用いる「疾患に關連する」抗原という用語は、選択された疾患を治療するために選択される抗原またはその断片を意味する。例えば、糖尿病關連抗原は、糖尿病を治療するものと考えられる抗原またはその断片である。MSを治療するために、MS關連抗原が選択される。MSを治療するために、糖尿病關連抗原は選択されないであろう。同様に、自己免疫關連抗原は、自己免疫疾患に關連する抗原であり、自己免疫以外の障害または疾患、例えば、がんの治療のためには選択されないであろう。

【0052】

本明細書で用いる「糖尿病」という用語は、遺伝要因および環境要因の組み合わせによって引き起こされる糖質代謝の可變的障害を意味し、通常、インスリンの不十分な分泌または利用によって、過剰な尿産生によって、血液中および尿中の過剰な量の糖によって、ならびに口渇、空腹、および体重減少によって特徴付けられる。糖尿病は1型糖尿病および2型糖尿病によって特徴付けられる。非肥満糖尿病 (「NOD」) マウスは、糖尿病の研究および治療のために一般に認められた動物モデルである。マウスでの1型糖尿病 (T1D) は、自己反応性CD8⁺T細胞に關連している。非肥満糖尿病 (NOD) マウスは、自己抗原の増大するリストを認識するT細胞による膵細胞の選択的破壊から生じる、ヒトT1Dに非常によく似た形態のT1Dを生じる。T1Dの開始はCD4⁺細胞の寄与を明らかに必要とするが、T1DはCD8⁺T細胞依存性であるという説得力のある証拠が存在する。NODマウスにおける膵島關連CD8⁺細胞の有意なフラクションが、「8.3-TCR様」と呼ばれる、CDR3不変異体V_{17-J}42+ TCRを用いることが発見されている。MHC分子K^dとの關連でミモトープNRP-A7 (コンビナトリアル・ペプチド・ライブラリを用いて規定された) を認識する、これらの細胞は、既に初期NOD膵島CD8⁺浸潤物の重要な成分であり、糖尿病誘発性であり、機能未知のタンパク質・膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット關連タンパク質 (IGRP) に由来するペプチドを標的とする。このペプチド (NRP-A7に類似する、IGRP₂₀₆₋₂₁₄) を認識するCD8⁺細胞は、循環血中において異常に高頻度に存在する (>1/200 CD8⁺細胞)。とりわけ、NODマウスにおける膵島炎の糖尿病への進行には、循環IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺プールの周期的増殖、およびその膵島關連対応物のアピディティ成熟が常に伴う。最近になって、NODマウスにおける膵島關連CD8⁺細胞は複数のIGRPエピトープを認識することが示され、このことは、IGRPが、少なくともマウスT1Dにおいて、CD8⁺細胞についての主要な自己抗原であることを示している。NOD膵島關連CD8⁺細胞、特に疾患過程の初期に見られるものは、インスリンエピトープ (Ins B₁₅₋₂₃) も認識する。

20

30

40

【0053】

關連調査によって、あるHLAクラスI対立遺伝子 (すなわち、HLA-A*0201) が、ヒトT1Dに対する感受性を与えることが示唆された。病理学調査によって、新たに診断された患者の膵島炎病巣は、ほとんど (HLAクラスI拘束性の) CD8⁺T細胞からなることが示され、これらはまた、膵臓の同種同系移植片 (一卵性双生児由来) または同種異系移植片 (血縁ドナー由来) の移植によって処置された患者においても主な細胞集団である。

【0054】

インスリンは、ヒトT1DおよびマウスT1Dの両方において、抗体およびCD4⁺応答の重要な標的である。ヒトインスリンB鎖エピトープhInsB₁₀₋₁₈は、膵島移植レシピエントおよび

50

自然発生疾患の経過の両方において、HLA-A * 0201により、自己反応性CD8⁺細胞へ提示される。さらに、4つのさらなるペプチドがマウスプレプロインスリン1または2から同定され、これらは、HLA-A * 0201との関連においてHLA-A * 0201トランスジェニックマウス由来の膵島関連CD8⁺T細胞によって認識される。

【0055】

本明細書で用いる「前糖尿病」という用語は、患者が正常な血漿グルコースレベルを示す、無症状の細胞損傷を特徴とした糖尿病状態の前の無症候性期を意味する。前糖尿病はまた、膵島細胞自己抗体（ICA）の存在を特徴とし、臨床症状の発現に近づくと、前糖尿病にはグルコース不耐性が伴うこともある。

【0056】

本明細書で用いる「多発性硬化症」または「MS」という用語は、身体の免疫系が、神経を覆う保護鞘を侵食する自己免疫障害を意味する。これによって、脳と体の他の部位との間のコミュニケーションが妨害される。最終的に、これは、神経自体の劣化、つまり不可逆的なプロセスを引き起こし得る。

【0057】

本明細書で用いる「多発性硬化症に関連する障害」という用語は、MSに対する感受性またはMSと共存している障害を意味する。そのような障害の非限定的な例としては、視神経脊髄炎（NMO）、ブドウ膜炎、神経障害性疼痛、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、散在性硬化症、全身性硬化症、脊髄視覚（spino-optical）MS、一次進行型MS（PPMS）、および再発寛解型MS（RRMS）、進行型全身性硬化症、ならびに失調性硬化症が挙げられる。

【0058】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、「エピトープ」および「抗原決定基」という用語は、互換的に用いられ、B細胞および/またはT細胞が応答または認識する抗原上の部位を指す。B細胞エピトープは、連続アミノ酸から、またはタンパク質の三次フォールディングによって並置された非連続的アミノ酸から、形成され得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープは、変性溶媒に曝露されても一般に保持されるのに対し、三次フォールディングによって形成されたエピトープは変性溶媒で処理した場合一般に失われる。エピトープは通常、少なくとも3個のアミノ酸、より一般的には、少なくとも5個または8~20個のアミノ酸を、独特の空間的配置で含む。エピトープの空間的配置を決定する方法としては、例えば、X線結晶解析および2次元核磁気共鳴が挙げられる。例えば、Glenn E. Morris、Epitope Mapping Protocols (1996)を参照されたい。T細胞は、CD8細胞では約9アミノ酸の連続エピトープを、CD4細胞では約13~15アミノ酸の連続エピトープを認識する。エピトープを認識するT細胞は、エピトープに応答してプライミングされたT細胞による³H-チミジンの取り込み（Burke et al., J. Inf. Dis., 170:1110-119, 1994）により、抗原依存性死滅（細胞傷害性Tリンパ球アッセイ法、Tigges et al., J. Immunol., 156(10):3901-3910, 1996）により、またはサイトカインの分泌により測定される、抗原依存性増殖を測定するインビトロアッセイ法によって同定することができる。細胞媒介性免疫学的応答の存在は、増殖アッセイ法（CD4⁺ T細胞）またはCTL（細胞傷害性Tリンパ球）アッセイ法によって測定することができる。

【0059】

任意で、抗原または好ましくは抗原のエピトープは、MHCおよびMHC関連タンパク質などの他のタンパク質に化学的に結合させること、または他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることができる。

【0060】

本明細書で用いる「患者」および「対象」という用語は同義的に使用され、哺乳動物を指す。いくつかの態様において、患者はヒトである。他の態様において、患者は、実験室でよく用いられる哺乳動物、例えば、マウス、ラット、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、またはヒツジである。

【0061】

本願において用いる「ポリヌクレオチド」という用語は、組換え体または全ゲノム核酸から単離された核酸分子のいずれかを指す。「ポリヌクレオチド」という用語には、オリゴヌクレオチド（核酸の長さが100残基またはそれ未満）、組換えベクター、例えばプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどが含まれる。ポリヌクレオチドには、特定の局面において、天然に存在する遺伝子またはタンパク質をコードする配列から実質的に単離された、調節配列が含まれる。ポリヌクレオチドはRNA、DNA、その類似体、またはそれらの組み合わせであり得る。ポリペプチドの全部または一部をコードする核酸は、そのようなポリペプチドの全部または一部をコードする、以下の長さの連続した核酸配列を含むことができる：10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、9000、10000個、またはそれ以上のヌクレオチド、ヌクレオシド、もしくは塩基対。また、所定の生物種に由来する特定のポリペプチドは、若干異なる核酸配列を有するが、それにもかかわらず、同じまたは実質的に類似のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドをコードする、天然の変異を含む核酸によってコードされ得ると考えられる。

【0062】

ポリヌクレオチドは、4種のヌクレオチド塩基の特定の配列で構成される：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；および、ポリヌクレオチドがRNAである場合にはチミンの代わりにウラシル（U）。したがって、「ポリヌクレオチド配列」という用語はポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピュータ内のデータベースに入力されて、機能的ゲノム学および相同性検索などのバイオインフォマティクスの用途に使用される。

【0063】

DNAまたはRNAなどの核酸に関して本明細書で用いる「単離された」または「組換え」という用語は、巨大分子およびポリペプチドの天然源に存在する、それぞれ他のDNAまたはRNAから分離された分子を指す。「単離された核酸または組換え核酸」という用語は、断片として天然に存在せずかつ自然な状態では見出されない、核酸断片を含むことを意味する。「単離された」という用語はまた、他の細胞タンパク質から単離されたポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびタンパク質を指すために本明細書中で使用され、精製ポリペプチドと組換えポリペプチドの両方を含むものとする。他の態様において、「単離されたまたは組換え」という用語は、細胞、組織、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片が自然界で通常結び付いている、細胞のまたは細胞ではない成分から分離されていることを意味する。例えば、単離された細胞は、異なる表現型または遺伝子型の組織または細胞から分離されている細胞である。単離されたポリヌクレオチドは、それがその天然または自然環境において、例えば染色体上で、通常結合している3'および5'連続ヌクレオチドから分離されている。当業者には明らかなように、非天然のポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片は、その天然の対応物からそれを区別するために「単離」を必要としない。

【0064】

ポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）が他の配列に対して一定割合（例えば、80%、85%、90%、または95%）の「配列同一性」を有するとは、アライメントした場合、その割合の塩基（またはアミノ酸）がこれら2つの配列を比較した際に同一であることを意味する。アライメントおよび相同性パーセントまたは配列同一性は、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例え

ばCurrent Protocols in Molecular Biology(Ausubelら編, 1987)補遺30, セクション7.7.18, 表7.7.1に記載されているものを用いて決定することができる。好ましくは、デフォルトパラメータがアライメントのために使用される。好ましいアライメントプログラムは、デフォルトパラメータを用いるBLASTである。特に、好ましいプログラムはBLASTNおよびBLASTPであり、以下のデフォルトパラメータを用いる: Genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR。これらのプログラムの詳細は、次のインターネットアドレスで見ることができる: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

10

【0065】

本発明が抗原、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、または抗体に関する場合、その等価物または生物学的等価物が本発明の範囲内で意図されることが、特に別の意図がない限り、明示的な列挙なしに推測されるべきである。本明細書で用いる「その生物学的等価物」という用語は、参照抗原、タンパク質、抗体、断片、ポリペプチドまたは核酸に言及する場合に、「その等価物」と同義であることが意図され、最小の相同性を有するが依然として所望の構造または機能を維持しているものを意図している。本明細書に具体的に列挙しない限り、本明細書中で挙げた任意のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはタンパク質はまた、その等価物を包含すると考えられる。一局面において、等価のポリヌクレオチドは、記載した方法における使用のための本明細書に記載されたポリヌクレオチドまたはその相補体とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものである。別の局面において、等価な抗体または抗原結合ポリペプチドは、少なくとも70%、またはその代わり少なくとも75%、またはその代わり少なくとも80%、またはその代わり少なくとも85%、またはその代わり少なくとも90%、またはその代わり少なくとも95%の親和性もしくはより高い親和性で、参照抗体もしくは参照抗原結合断片に結合するものを意図している。別の局面において、その等価物は、競合ELISAアッセイ法の下で抗体もしくは抗原結合断片のその抗原への結合について競合するものである。別の局面において、等価物は、少なくとも約80%の相同性もしくは同一性、またはその代わり少なくとも約85%、またはその代わり少なくとも約90%、またはその代わり少なくとも約95%、またはその代わり少なくとも98%の相同性もしくは同一性を有し、かつ参照タンパク質、参照ポリペプチド、または参照核酸と実質的に等価な生物学的活性を示すものである。

20

30

【0066】

「ハイブリダイゼーション」とは、1つまたは複数のポリヌクレオチドがヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化された複合体を形成するように反応する、反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対形成によって、フーグスティーン結合によって、または他のいずれかの配列特異的な方法で起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2本の鎖、多重鎖複合体を形成する3本以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズする鎖、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、PCRの開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断などの、より広範なプロセスの1段階を構成することができる。

40

【0067】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、以下が挙げられる: 約25 ~ 約37 のインキュベーション温度; 約6×SSC ~ 約10×SSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度; 約0% ~ 約25%のホルムアミド濃度; および約4×SSC ~ 約8×SSCの洗浄液。適度なハイブリダイゼーション条件の例としては、以下が挙げられる: 約40 ~ 約50 のインキュベーション温度; 約9×SSC ~ 約2×SSCの緩衝液濃度; 約30% ~ 約50%のホルムアミド濃度; および約5×SSC ~ 約2×SSCの洗浄液。高ストリンジェンシー条件の例としては、以下が挙げられる: 約55 ~ 約68 のインキュベーション温度; 約1×SSC ~ 約0.1×SSCの緩衝液濃度; 約55% ~ 約75%のホルムアミド濃度; および約1×SSC、0.1×SSC、または脱イオン水の洗浄液。一般に、ハイブリダイゼーションのインキュベーション時間は、

50

1回、2回、またはそれ以上の洗浄段階を伴う5分から24時間であり、洗浄インキュベーション時間は約1、2、または15分である。SSCは、0.15 M NaClおよび15 mMクエン酸緩衝液である。当然のことながら、他の緩衝液系を用いるSSCの等価物を用いることができる。

【0068】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較のためにアライメントされ得る各配列において位置を比較することによって決定することができる。比較された配列における位置が同じ塩基またはアミノ酸で占められている場合、これらの分子はその位置で相同である。配列間の相同性の程度は、これらの配列により共有される、マッチする位置または相同な位置の数の関数である。「関連のない」または「非相同」配列は、本発明の配列のうちの1つと40%未満の同一性、または25%未満の同一性を共有するものである。

10

【0069】

「相同性」または「同一性」または「類似性」はまた、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸分子を指すことができる。

【0070】

本明細書で用いる「治療する」、「治療」などの用語は、所望の薬理学的および/または生理学的効果を得ることを意味するために使用される。その効果は、障害のおよび/または該障害に起因する有害作用の部分的または完全な治癒という点で治療的であり得る。一局面において、治療は、確立された尺度を用いて疾患の兆候の軽減を示す。

【0071】

(T1D感受性遺伝子座であるIDDM7(2q31)と重なる染色体2q28-32に位置する) 遺伝子によりコードされるIGRPも、ヒトT1Dにおける潜在的に関連する細胞自己抗原として最近同定されている。ヒトIGRPの2種のHLA-A*0201結合エピートープ(hIGRP₂₂₈₋₂₃₆およびhIGRP₂₆₅₋₂₇₃)は、HLA-A*0201導入遺伝子を発現するマウスMHCクラスI欠損NODマウス由来の脾臓関連CD8⁺細胞により認識される。マウスMHCクラスII分子(IAg7)に結合するIGRP抗原の非限定的な例としては、例えば、抗原ペプチド

VYLKTNVFL

を含むIGRP₂₀₆₋₂₁₄、および抗原ペプチド

LHRSGVLIHHLQEDYRTY

を含むIGRP₄₋₂₂またはその等価物、ならびに抗原ペプチド

TAALSYTISRMEESSVTL

を含むIGRP₁₂₈₋₁₄₅またはその等価物が挙げられる。

【0072】

「予防すること」は、障害にかかりやすいかまたは影響を受けやすい系もしくは対象において、その障害または影響をインビトロまたはインビボで防ぐことを意味している。

【0073】

「組成物」は、活性物質と、不活性な(例えば、検出物質もしくは標識)または活性のある(例えばアジュバント)別の化合物または組成物との組み合わせを意味する。特定の態様において、組成物はアジュバントを含まない。

【0074】

「薬学的組成物」は、活性物質と、不活性なまたは活性のある担体との組み合わせを含むものであり、該担体は、該組成物をインビトロ、インビボ、またはエクスピボでの診断または治療における使用に適したものにする。

【0075】

「機能的に等価なコドン」という用語は、本明細書では、例えばアルギニンまたはセリンのための6つのコドンのような、同じアミノ酸をコードするコドンを指すために使用され、さらに、生物学的に等価なアミノ酸をコードするコドンも意味する(下記の表を参照されたい)。

【0076】

コドン表

20

30

40

50

アミノ酸			コドン
アラニン	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
システイン	Cys	C	UGC UGU
アスパラギン酸	Asp	D	GAC GAU
グルタミン酸	Glu	E	GAA GAG
フェニルアラニン	Phe	F	UUC UUU
グリシン	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
ヒスチジン	His	H	CAC CAU
イソロイシン	Ile	I	AUA AUC AUU
リジン	Lys	K	AAA AAG
ロイシン	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
メチオニン	Met	M	AUG
アスパラギン	Asn	N	AAC AAU
プロリン	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA CAG
アルギニン	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
セリン	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
トレオニン	Thr	T	ACA ACC ACG ACI
バリン	Val	V	GUA GUC GUG GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG
チロシン	Tyr	Y	UAC UAU

10

20

30

【 0 0 7 7 】

本明細書で用いる「タンパク質」または「ポリペプチド」または「ペプチド」は、少なくとも5個のアミノ酸残基を含む分子を指す。

【 0 0 7 8 】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになると考えられる。しかし、本発明の精神内および範囲内でのさまざまな変更および修飾が、この詳細な説明から当業者には明らかになり得るため、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の特定の態様を示すものの、例示のみの目的で与えられることを理解すべきである。

【 0 0 7 9 】

II. 説明的態様

全身性免疫を損なうことなくポリクローナルな自己免疫応答の完全な抑制を可能にする治療プラットフォームは、現在、存在しない。本明細書に記載される本出願人の開示は、優れた抗原特異性にかかわらず、なおかつ、絶妙な疾患特異性を持ちながら、全身性免疫を損なうことなく、自己反応性疾患に特異的なCD4⁺T細胞およびB細胞を、宿主の他の全ての自己反応性TおよびB細胞応答を協調的に抑制するコグネイトの単一特異的な制御性CD4⁺T細胞およびB細胞へと変化させる、自己免疫疾患に特異的な医薬の設計を可能にする。

40

【 0 0 8 0 】

1型糖尿病 (T1D) の自己抗原複合性

T1Dは、膵臓 細胞塊を漸進的にむしばむ慢性自己免疫応答によって引き起こされる。

50

ヒトおよびNODマウスの両方におけるB細胞破壊は、多くの自己抗原を認識するT細胞によって達成される (Tsai, S. et al. (2008) *Adv. Immunol.* 100:79-124; Lieberman, S. et al. (2003) *Tissue Antigens* 62:359-377)。事象の正確な順序は明確に定義されていないままであるが、現在の証拠から、T1DがCD4⁺およびCD8⁺細胞を必要とすること、局所APC上のB細胞抗原との結合により自己反応性T細胞がキラーT細胞へと分化すること、ならびにこれらのT細胞が広範な自己抗原レパートリーを標的とすることが示唆されている (Tsai, S. et al. (2008) *Adv. Immunol.* 100:79-124; Santamaria, P. (2010) *Immunity* 32:437-445)。

【0081】

可溶性ペプチドはインビボでペプチド特異的なT細胞寛容を誘導できるが、多特異的な自己免疫応答を鈍らせられないことが明らかにされている (Han et al. (2005) *Nature Medicine* 11(6):645-652)。予想外にも、可溶性ペプチドによる治療とは異なり、単一のT1D関連pMHCクラスI (当初は陰性対照として使われた) でコーティングされたNPによる治療は、前糖尿病NODマウスにおいてT1Dの進行を鈍らせ、糖尿病動物において正常血糖を回復させることが分かった (Tsai, S. et al. (2010) *Immunity* 32:568-580)。その後の調査は、pMHC-NP治療が、自己抗原を負荷されたAPCを阻害および死滅化することにより他の自己抗原性T細胞の特異性の漸増を抑制した自己抗原を経験済の自己反応性CD8⁺細胞をエピトープ特異的に増殖させることによって機能するという意外な発見につながった。最近になって、本出願人は、この治療プラットフォームを自己反応性制御性CD4⁺T細胞のインビボでの増殖のために利用できることを見出した。具体的には、本出願人は、個々のT1D関連pMHCクラスIIでコーティングされたNPが、TR1マーカーCD49bおよびLAG3を発現し (Gagliani, N. et al. (2013) *Nature Medicine* 19:739-746) かつサイトカインIL10およびTGF- β を産生している疾患特異的なTR1 CD4⁺T細胞を増殖させることを発見した (下記参照)。

【0082】

まとめると、これらの知見は、内因性エピトープによるナイーブ自己反応性CD8⁺またはCD4⁺T細胞の長期間刺激が、当該細胞のメモリー様自己反応性制御性T細胞への分化を誘発することを述べた、自己免疫の進行に関する新たなパラダイム; ならびにこれらのメモリー自己反応性制御性細胞が、自己抗原を負荷されたAPCを抑制および/または死滅化することによりコグネイトおよび非コグネイトの両方の高アビディティ自己反応性T細胞の特異性の活性化を抑制することを支持するものである (Tsai, S. et al. (2010) *Immunity* 32:568-580)。重要なことには、および理論によって束縛されるわけではないが、(とりわけ) 自己免疫疾患に関与するいずれか1つのエピトープ (pMHC) 特異性を用い、リガンドとしてNP上へコーティングした場合に、複雑な自己免疫応答を鈍らせることができる。これらのNP調製物はCD80およびCD86などの重要な共刺激分子を欠いているので、ナイーブT細胞を活性化できず、したがってエフェクタT細胞応答を誘導できないというのが本出願人の考えである。実際に、コグネイトのナイーブおよびエフェクタ自己反応性細胞は、このアプローチによって取り除かれる。それゆえ、その発見を可能にした治療アプローチは、自己免疫における新たなクラスの治療法のためのプラットフォームとなり、全身性免疫を損なうことなく、疾患特異的かつ臓器特異的にポリクローナルな自己免疫応答を解消できる可能性がある。

【0083】

III. 方法

医療法および診断法も提供される。一局面において、本明細書に記載されるNP-複合体または組成物の有効量を対象に投与する工程を含むか、またはその代わり該工程から本質的になるか、または該工程からなる、方法が、それを必要とする対象において抗原特異的に制御性B細胞および/またはTR1細胞 (例えば、TR1およびCD4⁺細胞) の形成、増殖、および動員を促進するために提供される。

【0084】

別の局面において、それを必要とする対象において本明細書に記載される自己免疫疾患

または障害（例えば、MS、MSに関連する障害、糖尿病、または前糖尿病）を治療または予防するための方法であって、本明細書に記載されるNP-複合体または組成物の有効量を対象に投与する工程を含むか、またはその代わり該工程から本質的になるか、または該工程からなり、自己抗原が、治療される疾患に関する（例えば、糖尿病の予防または治療に関する）疾患関連抗原であり、抗原が糖尿病関連抗原である、前記方法が提供される。さらなる局面において、自己免疫疾患は多発性硬化症または多発性硬化症に関連する障害であり、抗原はMS関連抗原である。

【 0 0 8 5 】

前糖尿病または糖尿病の治療または予防のためのペプチド抗原には、
 hInsB₁₀₋₁₈ (HLVEALYLV), hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ (LNIDLLWSV), hIGRP₂₆₅₋₂₇₃ 10
 (VLFGLGFAI), IGRP₂₀₆₋₂₁₄ (VYLKTNVFL), NRP-A7 (KYNKANAFI), NRP-I4
 (KYNIANVFL), NRP-V7 (KYNKANVFL), YAI/D^b (FQDENYLYL) and/or INS B₁₅₋₂₃
 (LYLVCGERG), GAD65₁₁₄₋₁₂₃, VMNILLQYVV; GAD65₅₃₆₋₅₄₅, RMMYEGTTMV;
 GFAP₁₄₃₋₁₅₁, NLAQTDLATV; GFAP₂₁₄₋₂₂₂, QLARQQVHV; IA-2₁₇₂₋₁₈₀, SLSPLQAEL; IA-
 2₄₈₂₋₄₉₀, SLAAGVKLL; IA-2₈₀₅₋₈₁₃, VIVMLTPLV; ppIAPP₅₋₁₃, KLQVFLIVL; ppIAPP₉₋₁₇,
 FLIVLSVAL; IGRP₁₅₂₋₁₆₀, FLWSVFMLI; IGRP₂₁₁₋₂₁₉, NLFLFLFAV; IGRP₂₁₅₋₂₂₃,
 FLFAVGFYL; IGRP₂₂₂₋₂₃₀, YLLLRVLNI; IGRP₂₂₈₋₂₃₆, LNIDLLWSV; IGRP₂₆₅₋₂₇₃, 20
 VLFGLGFAI; IGRP₂₉₃₋₃₀₁, RLLCALTSI; プロインスリン_{L2-10}, ALWMRLLPL; プロインスリン_{L3-11},
 LWMRLLPLL; プロインスリン_{L6-14}, RLLPLLALL; プロインスリン_{B5-14}, HLCGSHLVEA; プロ
 インスリン_{B10-18}, HLVEALYLV; プロインスリン_{B14-22}, ALYLVCGER; プロインスリン_{B15-24},
 LYLVCGERGF; プロインスリン_{B17-25}, LVCGERGFF; プロインスリン_{B18-27}, VCGERGFYF; プロ
 インスリン_{B20-27}, GERGFYF; プロインスリン_{B21-29}, ERGFYTPK; プロインスリン_{B25-C1}, FYTPKTRRE;
 プロインスリン_{B27-C5}, TPKTRREAEDL; プロインスリン_{C20-28}, SLQPLALEG; プロインスリン_{C25-33},
 ALEGLQKR; プロインスリン_{C29-A5}, SLQKRGIVEQ; プロインスリン_{A1-10}, GIVEQCCTSI; プロ
 インスリン_{A2-10}, IVEQCCTSI; プロインスリン_{A12-20}, SLYQLENYC 30
 またはそれらの等価物および/または組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。
 さらなる例としては、
 ProIns 76-90, SLQPLALEGLQKRG,
 ProIns 79-89, PLALEGLQKR, ProIns 90-109, GIVEQCCTSICSLYQLENYC, ProIns 94-
 105, QCCTSICSLYQL, GAD 247-266, NMYAMMIARFKMFPEVKEKG, GAD 255-265,
 RFKMFPEVKEK, GAD 555-567, NFFRMVISNPAAT, IGRP 13-25, QHLQKDYRAYYTFLN,
 IGRP 8-27, GVLIIQHLQKDYRAYYTFLN, ProIns B24-C36, FFYTPMSRREVED 40
 およびそれらの各等価物が挙げられる。

【 0 0 8 6 】

本方法がMSまたはMS関連障害の治療を対象とする場合、複合体は多発性硬化症に関連する抗原を含む。そのような抗原には、例えば、米国特許出願第2012/0077686号において開示されるもの、ならびに、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリン関連糖タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質、プロテオリピドタンパク質、オリゴデンドロサイトミエリンオリゴタンパク質、ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質、オリゴデンドロサイト特異的タンパク質、熱ショックタンパク質、オリゴデンドロサイト特異的タンパク質であるNOGO A、糖タンパク質Po、末梢ミエリンタンパク質22、および2'3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼに由来する抗原が含まれる。特定の態様にお 50

いて、抗原は、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）に由来する。非限定的な例としては、例えば、

MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLELEE; MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI; MBP₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA; MOG₁₁₄₋₁₂₂, KVEDPFYWV; MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV; MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI; MOG₁₇₉₋₁₈₈, KITLFVIVPV; MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI; MOG₁₈₁₋₁₈₉, TLFVIVPVL; MOG₂₀₅₋₂₁₄, RLAGQFLEEL; PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLA

またはそれらの等価物または組み合わせが挙げられる。

【0087】

本発明において使用され得る抗原のさらなる非限定的な例には、MOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK;

MOG₃₆₋₅₅, EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLELEE; MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI; MBP₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA; MOG₁₁₄₋₁₂₂, KVEDPFYWV; MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV; MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI; MOG₁₇₉₋₁₈₈, KITLFVIVPV; MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI; MOG₁₈₁₋₁₈₉, TLFVIVPVL; MOG₂₀₅₋₂₁₄,

RLAGQFLEEL; PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLA

の群のポリペプチドを含むか、もしくはその代わり該ポリペプチドから本質的になるか、もしくは該ポリペプチドからなるポリペプチド、またはそれらの各等価物、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0088】

治療法を決定およびモニターする方法は当技術分野で公知であり、本明細書に簡単に記載されている。インビトロで送達される場合、投与は、任意の適切な方法により（例えば細胞または組織培養培地への投与により）組成物を組織または細胞と接触させることによるものであり、治療が個体に適しているかどうかを決定するための、あるいは代用方法としてまたは開示した組成物と組み合わせで使用される代替療法を選抜するためのスクリーニングとして有用である。インビボで投与される場合、投与は、全身投与または局所投与によるものである。インビボでは、前記方法は、ヒトへの投与に先立って、代用方法としてまたは開示した組成物と組み合わせで使用される代替療法をスクリーニングするために、ヒト以外の動物で実施することができる。ヒトまたは非ヒト哺乳動物において、それらはまた、疾患または障害を治療するために有用である。

【0089】

上記の方法は、有効量のNP-複合体の投与を必要とする。

【0090】

抗原-MHC-ナノ粒子複合体のMHCは、MHC I、MHC II、または非古典的MHCであることができるが、好ましくはMHC IIであることができる。MHCタンパク質は、本明細書に記載されている。一態様において、抗原-MHC-ナノ粒子複合体のMHCは、MHCクラスIである。別の態様において、MHCはMHCクラスIIである。他の態様において、抗原-MHC-ナノ粒子複合体のMHC成分は、MHCクラスIIまたは本明細書に記載される非古典的MHC分子である。一局面において、抗原は、ポリペプチド

GWYRSPFSRVVH

もしくは

GWYRSPFSRVVH

の等価物を含むか、またはその代わり該ポリペプチドもしくは該等価物から本質的になるか、または該ポリペプチドもしくは該等価物からなる。

【0091】

ナノ粒子のサイズは、約1 nm～約1 μmの範囲であることができる。特定の態様において、ナノ粒子は、直径が約1 μm未満である。他の態様において、ナノ粒子は、直径が約5

10

20

30

40

50

00 nm未満、約400 nm未満、約300 nm未満、約200 nm未満、約100 nm未満、または約50 nm未満である。さらなる態様において、ナノ粒子は、直径が約1 nmから約10 nm、15 nm、20 nm、25 nm、30 nm、40nm、50 nm、75 nm、または100 nmまでである。特定の態様において、ナノ粒子は、約1 nm～約100 nm、約1 nm～約50 nm、約1 nm～約20 nm、または約5 nm～約20 nmである。

【0092】

複合体のサイズは、約5 nm～約1 μmの範囲であることができる。特定の態様において、複合体は、直径が約1 μm未満、またはその代わり100 nm未満である。他の態様において、複合体は、直径が約500 nm未満、約400 nm未満、約300 nm未満、約200 nm未満、約100 nm未満、または約50 nm未満である。さらなる態様において、複合体は、約5 nmもしくは約10 nm～約50 nm、または約5 nm～約75 nm、または約5 nm～約50 nm、または約5 nm～約60 nm、または約10 nm～約60 nm、または一局面において約55 nmである。

【0093】

本出願人は、ナノ粒子上の抗原-MHC複合体の密度が治療効果に寄与することを発見した。したがって、本明細書に開示されているように、少なくとも2個のMHC、またはその代わり少なくとも8個、またはその代わり少なくとも9個、またはその代わり少なくとも10個、またはその代わり少なくとも11個、またはその代わり少なくとも12個のMHCがナノ粒子に複合体化されると仮定して、抗原-MHCナノ粒子複合体は、複合体を含むナノ粒子の表面積の100 nm²あたりに約0.05個のMHC分子からの範囲で規定の密度を有することができる。一局面において、複合体は、100 nm²あたり約0.01個のMHC (0.05個のMHC/100 nm²)～約30個のMHC/100 nm²、またはその代わり0.1個のMHC/100 nm²～約25個のMHC/100 nm²、またはその代わり約0.3個のMHC/100 nm²～約25個のMHC/100 nm²、またはその代わり約0.4個のMHC/100 nm²～約25個のMHC/100 nm²、またはその代わり約0.5個のMHC/100 nm²～約20個のMHC/100 nm²、またはその代わり0.6個のMHC/100 nm²～約20個のMHC/100 nm²、またはその代わり約1.0個のMHC/100 nm²～約20個のMHC/100 nm²、またはその代わり約5.0個のMHC/100 nm²～約20個のMHC/100 nm²、またはその代わり約10.0個のMHC/100 nm²～約20個のMHC/100 nm²、またはその代わり約15個のMHC/100 nm²～約20個のMHC/100 nm²、またはその代わり少なくとも約0.5個、またはその代わり少なくとも約1.0個、またはその代わり少なくとも約5.0個、またはその代わり少なくとも約10.0個、またはその代わり少なくとも約15.0個のMHC/100 nm²のMHCの密度を有する。一局面において、9個または少なくとも9個のMHCが1個のナノ粒子に複合体化された場合、密度範囲は、約0.3個のMHC/100 nm²～約20個のMHC/100 nm²である。

【0094】

その方法の局面の1つでは、必要な患者において制御性B細胞および/または抗炎症性T細胞を蓄積するための方法が提供される。さらなる態様において、T細胞はCD4⁺またはCD8⁺T細胞である。関連する態様において、T細胞はIL-10またはTGF β を分泌する。本方法は、本明細書に記載される抗原-MHCナノ粒子複合体の有効量を、必要な患者に投与する工程を含むか、該工程から本質的になるか、または該工程からなる。

【0095】

一態様において、本明細書に記載される組成物および方法は、MS、MS関連障害、糖尿病、または前糖尿病などの自己免疫障害を治療するためのものである。本方法は、本明細書に記載される抗原-MHCナノ粒子複合体の有効量を、必要な患者に投与する工程を含むか、該工程から本質的になるか、または該工程からなる。

【0096】

インビトロおよびインビボでの投与様式に関する詳細は、本明細書に記載されている。

【0097】

本開示は同様に、本明細書に記載される疾患および障害の治療および/または予防用の医薬の調製のためのNP-複合体の使用を提供する。

【0098】

IV. 抗原-MHC-ナノ粒子複合体

10

20

30

40

50

A. ポリペプチドおよびポリヌクレオチド

さらなる局面は、本明細書に記載されるアミノ酸配列を含むか、もしくは該アミノ酸配列から本質的になるか、もしくは該アミノ酸配列からなる、単離もしくは精製されたポリペプチド抗原、または該抗原のアミノ酸配列に対して少なくとも約80%の配列同一性、もしくはその代わり少なくとも85%、もしくはその代わり少なくとも90%、もしくはその代わり少なくとも95%、もしくはその代わり少なくとも98%の配列同一性を有するポリペプチド、または該抗原のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して約80%の配列同一性、もしくはその代わり少なくとも85%、もしくはその代わり少なくとも90%、もしくはその代わり少なくとも95%、もしくはその代わり少なくとも98%の配列同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または該抗原のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体と中程度から高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドに関する。同様に、本明細書に開示される抗原ポリペプチド、または本明細書に開示される抗原ポリペプチドに対して少なくとも約80%の配列同一性を有する、もしくはその代わり開示される配列に対して少なくとも85%、もしくはその代わり少なくとも90%、もしくはその代わり少なくとも95%、もしくはその代わり少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸、または等価物をコードする単離および精製されたポリヌクレオチド、あるいは該ポリヌクレオチド、その等価物またはその相補体とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、ならびにこれらのポリヌクレオチドによりコードされる単離または精製されたポリペプチドが提供される。ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、それらが天然では会合しない非天然の物質と、例えば、担体、薬学的に許容される担体、ベクター、およびMHC分子と、当技術分野で公知でありかつ本明細書に記載されるナノ粒子と、組み合わせることができる。

10

20

30

40

50

【0099】

ペプチド、糖質、脂質、または、本発明の古典的および非古典的MHC分子により提示される他の分子を含むがこれらに限定されない抗原（抗原種由来のセグメント、断片および他の分子を含む）は、通常、MHC分子またはその誘導體と複合体化されているか、または該MHC分子またはその誘導體に機能的に結合されている。Tリンパ球による抗原認識は、主要組織適合複合体（MHC）拘束性である。所定のTリンパ球は、抗原が特定のMHC分子に結合している場合だけ該抗原を認識する。一般的に、Tリンパ球は自己MHC分子の存在下でのみ刺激され、かつ抗原は自己MHC分子に結合した該抗原の断片として認識される。MHC拘束性は、認識される抗原の観点から、およびその抗原断片に結合するMHC分子の観点から、Tリンパ球特異性を規定する。特定の局面において、特定の抗原は特定のMHC分子またはそれに由来するポリペプチドと対を形成する。

【0100】

本明細書で用いる「機能的に結合した」または「コーティングされた」という用語は、個々のポリペプチド（例えば、MHC）と抗原（例えば、ペプチド）成分が組み合わせさせて、標的部（例えば免疫細胞）における結合の前に活性複合体を形成する状況を指す。これには、個々のポリペプチド複合体成分が、合成されるかまたは組換えで発現され、その後単離され組み合わせられて、対象に投与する前にインビトロで複合体を形成する状況；キメラまたは融合ポリペプチド（すなわち、複合体の個別の各タンパク質成分が、単一のポリペプチド鎖に含まれている）が、完全な複合体として合成されるかまたは組換えで発現される状況が含まれる。概して、ポリペプチド複合体をナノ粒子に添加すると、ポリペプチド複合体が吸着または結合したナノ粒子が得られ、こうしたナノ粒子は、分子の数：ナノ粒子の数の比が、約、少なくとも約、または多くとも約0.1、0.5、1、3、5、7、10、15、20、25、30、35、40、50、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、またはそれ以上：1であり、より典型的には0.1：1、1：1～50：1または300：1である。ナノ粒子のポリペプチド含有量は、標準的な技術を用いて測定することができる。

【0101】

B. MHC分子

細胞内抗原および細胞外抗原は、認識の観点と適切な応答の観点の両面から、免疫系に対してまったく異なるチャレンジを示す。T細胞への抗原の提示は、異なる抗原プロセッシング経路を用いる2つの別個のクラスの分子であるMHCクラスI (MHC-I) とMHCクラスII (MHC-II) (本明細書においては「pMHC」としても特定されている) によって媒介される。細胞内抗原に由来するペプチドは、ほぼ全ての細胞に発現されているMHCクラスI分子によってCD8⁺T細胞に提示されるのに対し、細胞外抗原に由来するペプチドは、MHC-II分子によってCD4⁺T細胞に提示される。しかしながら、この二分法には一定の例外がある。いくつかの調査は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた粒状または可溶性タンパク質から生成されたペプチドが、マクロファージのみならず樹状細胞でもMHC-I分子上に提示されることを示した。本発明の特定の態様において、特定の抗原は、適切なMHCクラスIまたはIIポリペプチドの下で、抗原-MHC-ナノ粒子複合体において、識別および提示される。特定の局面において、特定の患者および特定のペプチドセットについて、どのMHCポリペプチドが使用されるべきかを決定するために、対象の遺伝子構造が評価され得る。特定の態様において、MHCクラスI成分は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、またはCD-1分子の全部または一部を含む。MHC成分がMHCクラスII成分である態様において、MHCクラスII成分は、HLA-DR、HLA-DQ、またはHLA-DPの全部または一部を含むことができる。

10

【0102】

非古典的MHC分子もまた、本発明のMHC複合体における使用が意図される。非古典的MHC分子は、非多型であり、種間で保存され、かつ、狭くて深い疎水性のリガンド結合ポケットを保有する。これらの結合ポケットは、糖脂質とリン脂質をナチュラルキラーT(NKT)細胞にまたはQa1もしくはHLA-E拘束性CD8⁺T細胞などのCD8⁺T細胞の特定のサブセットに提示することができる。NKT細胞は、NK細胞マーカーと半不変なT細胞受容体(TCR)を共発現する特異なリンパ球集団を表す。それらは広範な疾患に関連する免疫応答の調節に関与している。

20

【0103】

C. 抗原成分

本発明の特定の局面は、抗原組成物に関する方法および組成物を包含し、該抗原組成物には、一般に抗原と呼ばれる、ポリペプチド、ペプチド、核酸、糖質、脂質、および抗原応答を惹起または誘導する他の分子のセグメント、断片、またはエピトープが含まれる。特に、自己免疫応答を介して細胞の破壊に導く、抗原決定基の抗原セグメントまたは抗原断片を同定して、本明細書に記載の抗原-MHC-ナノ粒子複合体を作製するのに使用することができる。本発明の態様は、体の細胞または組織において免疫応答を調節するための組成物および方法を包含する。

30

【0104】

本発明の抗原ポリペプチドおよびペプチドは、種々のアミノ酸の欠失、挿入、および/または置換によって修飾することができる。特定の態様において、修飾されたポリペプチドおよび/またはペプチドは、対象において免疫応答を調節することが可能である。抗原-MHC-ナノ粒子複合体を生成するために、いくつかの態様においては野生型のタンパク質またはペプチドが使用されるが、本発明の多くの態様においては修飾されたタンパク質またはポリペプチドが使用される。抗原-MHC-ナノ粒子複合体は、抗炎症性免疫応答を生じさせるために、免疫系のT細胞集団を修飾する(すなわち、免疫系を再教育する)ために、および/または、特定の組織への抗炎症性T細胞の動員および蓄積を促すために使用することができる。上記の用語は本明細書中では互換的に用いられる。「修飾(された)タンパク質」または「修飾(された)ポリペプチド」または「修飾(された)ペプチド」は、その化学構造(特にそのアミノ酸配列)が野生型タンパク質またはポリペプチドに対して変更されている、タンパク質またはポリペプチドを指す。いくつかの態様において、修飾されたタンパク質またはポリペプチドまたはペプチドは、少なくとも1つの変更された活性または機能を有する(タンパク質またはポリペプチドまたはペプチドは複数の活性または

40

50

機能を有し得るという認識)。特に、修飾されたタンパク質またはポリペプチドまたはペプチドは、1つの活性または機能に関して変更され得るが、他の点では野生型の活性または機能を保持し、例えばMHC-ナノ粒子複合体という状況における場合に免疫系の他の細胞と相互作用する能力または免疫原性を保有すると考えられる。

【0105】

ペプチド抗原の非限定的な例としては、
hInsB₁₀₋₁₈

(HLVEALYLV), hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ (LNIDLLWSV), hIGRP₂₆₅₋₂₇₃ (VLFGLGFAI), IGRP₂₀₆₋₂₁₄
(VYLKTNVFL), NRP-A7 (KYNKANAFI), NRP-I4 (KYNIANVFL), NRP-V7
(KYNKANVFL), YAI/D^b (FQDENYLYL) および/または INS B₁₅₋₂₃ (LYLVCGERG)

10

と同様に米国特許仮出願第2005/0202032号に開示されたペプチドおよびタンパク質ならびにそれらの等価物および/または組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0106】

特定の局面において、T1Dの治療のためのペプチド抗原は、
GAD65₁₁₄₋₁₂₃,

VMNILLQYVV; GAD65₅₃₆₋₅₄₅, RMEYGTMMV; GFAP₁₄₃₋₁₅₁, NLAQTDLATV; GFAP₂₁₄₋₂₂₂, QLARQQVHV; IA-2₁₇₂₋₁₈₀, SLSPLQAEL; IA-2₄₈₂₋₄₉₀, SLAAGVKLL; IA-2₈₀₅₋₈₁₃,
VIVMLTPLV; ppIAPP₅₋₁₃, KLQVFLIVL; ppIAPP₉₋₁₇, FLIVLSVAL; IGRP₁₅₂₋₁₆₀,
FLWSVFMLI; IGRP₂₁₁₋₂₁₉, NLFLFLFAV; IGRP₂₁₅₋₂₂₃, FLFAVGFYL; IGRP₂₂₂₋₂₃₀,
YLLLRVNI; IGRP₂₂₈₋₂₃₆, LNIDLLWSV; IGRP₂₆₅₋₂₇₃, VLFGLGFAI; IGRP₂₉₃₋₃₀₁,
RLLCALTSL; プロ-インスリン_{L2-10}, ALWMRLLPL; プロ-インスリン_{L3-11}, LWMRLLPLL; プロ-
インスリン_{L6-14}, RLLPLLALL; プロ-インスリン_{B5-14}, HLCGSHLVEA; プロ-インスリン_{B10-18},
HLVEALYLV; プロ-インスリン_{B14-22}, ALYLVCGER; プロ-インスリン_{B15-24}, LYLVCGERGF; プロ-
インスリン_{B17-25}, LVCGERGFF; プロ-インスリン_{B18-27}, VCGERGFYFYT; プロ-インスリン_{B20-27},
GERGFFYT; プロ-インスリン_{B21-29}, ERGFFYTPK; プロ-インスリン_{B25-C1}, FYTPKTRRE; プロ-
インスリン_{B27-C5}, TPKTRREAEDL; プロ-インスリン_{C20-28}, SLQPLALEG; プロ-インスリン_{C25-33},
ALEGSLQKR; プロ-インスリン_{C29-A5}, SLQKRGIVEQ; プロ-インスリン_{A1-10}, GIVEQCCTSI; プロ-
インスリン_{A2-10}, IVEQCCTSI; プロ-インスリン_{A12-20}, SLYQLENYC

20

30

またはそれらの等価物および/または組み合わせである。

【0107】

抗原のさらなる非限定的な例としては、本発明において使用され得るMSおよびMSに関連するまたはMSに関する抗原が挙げられ、

40

MOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MOG₃₆₋₅₅,
EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLELEE; MAG₅₀₉₋₅₁₇, LMWAKIGPV;
MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI; MBPI₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA; MOG₁₁₄₋₁₂₂, KVEDPFYWW;
MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV; MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI; MOG₁₇₉₋₁₈₈, KITLFVIVPV;
MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI; MOG₁₈₁₋₁₈₉, TLFVIVPV; MOG₂₀₅₋₂₁₄, RLAGQFLEEL; PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLLA

の群のポリペプチドを含むか、もしくはその代わり該ポリペプチドから本質的になるか、

50

もしくは該ポリペプチドからなる、ポリペプチド、またはそれらの各等価物、またはそれらの組み合わせを含む。

【 0 1 0 8 】

さらなる局面において、MSおよびMSに関連する障害の治療のためのペプチド抗原は、非限定的に、

MOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNOK; MOG₃₆₋

₅₅, EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLELEE; MAG₅₀₉₋₅₁₇,

LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI; MBP₁₁₀₋₁₁₈, SLSRFSWGA; MOG₁₁₄₋₁₂₂,

KVEDPFYWV; MOG₁₆₆₋₁₇₅, RTFDPHFLRV; MOG₁₇₂₋₁₈₀, FLRVPCWKI; MOG₁₇₉₋₁₈₈,

KITLFVIVPV; MOG₁₈₈₋₁₉₆, VLGPLVALI; MOG₁₈₁₋₁₈₉, TLFVIVPVL; MOG₂₀₅₋₂₁₄,

RLAGQFLEEL; PLP₈₀₋₈₈, FLYGALLA MAG₂₈₇₋₂₉₅, SLLLELEE; MAG₅₀₉₋₅₁₇,

LMWAKIGPV; MAG₅₅₆₋₅₆₄, VLFSSDFRI

ならびにその等価物および/または組み合わせを含む。

【 0 1 0 9 】

MSおよびMSに関連する障害の治療のための抗原には、米国特許出願第2012/0077686号において開示されるもの、ならびに、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリン関連糖タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質、プロテオリピドタンパク質、オリゴデンドロサイトミエリンオリゴタンパク質、ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質、オリゴデンドロサイト特異的タンパク質、熱ショックタンパク質、オリゴデンドロサイト特異的タンパク質であるNOGO A、糖タンパク質Po、末梢ミエリンタンパク質22、および2'3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼに由来する抗原が含まれる。特定の態様において、抗原は、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)に由来する。

【 0 1 1 0 】

特定の態様において、タンパク質またはポリペプチド(野生型または修飾型)のサイズは、関心対象のタンパク質またはペプチドの複合体、特にMHC-ペプチド融合体を含めて、限定するものではないが、そこから導き出せる任意の範囲または値を含む、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500個、もしくはそれ以上のアミノ分子、またはその誘導体を含むことができる。特定の局面において、その誘導体を含む、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上連続したアミノ酸、および抗原の断片、例えば本明細書に開示され参照されるアミノ酸配列などが、抗原として使用され得る。ポリペプチドは、それらの対応する野生型形態よりそれらを短くするトランケーションによって変異させることができるが、それらはまた、(例えば、タンパク質複合体としての提示、免疫原性の増強などのために)特定の機能を有する異種タンパク質配列を融合または結合させることによって変化させることもできると考えられる。

【 0 1 1 1 】

タンパク質組成物は、(i)標準的な分子生物学的技術によるタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの発現、(ii)天然源からのタンパク質化合物の単離、または(iii)タンパク質物質の化学合成を含めて、当業者に公知の任意の技術によって作製すること

ができる。さまざまな遺伝子のヌクレオチド配列、ならびにタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドの配列は、すでに開示されており、かつ認められているコンピュータ化データベース中に見いだすことができる。1つのそのようなデータベースは、国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）のGenBankおよびGenPeptデータベース（World Wide Webのncbi.nlm.nih.gov/で入手可能）である。これらの遺伝子のコード領域の全部または一部は、本明細書に開示されたまたは当業者に公知の技術を用いて増幅および/または発現させることができる。

【 0 1 1 2 】

これらの組成物の自己抗原エピトープおよび他のポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、置換、挿入、または欠失変異体であり得る。本発明のポリペプチドの修飾は、野生型に比べて、ペプチドまたはポリペプチドの

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42,

43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,

68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92,

93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111,

112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129,

130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147,

148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165,

166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183,

184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201,

202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219,

220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237,

238, 239, 240, 241, 242, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247,

248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265,

266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283,

284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301,

302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319,

320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337,

338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355,

356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373,

374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391,

392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409,

410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427,

428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445,

446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463,

464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481,

482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500

個、またはそれ以上の非連続的なまたは連続したアミノ酸に影響を与えることができる。

10

20

30

40

50

【0113】

欠失変異体は一般に、天然または野生型アミノ酸配列の1個以上の残基を欠いている。個々の残基を欠失すること、またはいくつかの連続したアミノ酸を欠失することが可能である。停止コドンコード核酸配列に（置換または挿入により）導入して、トランケート型タンパク質を作製することができる。挿入変異体は一般に、ポリペプチド内の非末端部への物質の付加を含む。これには1個以上の残基の挿入が含まれる。融合タンパク質と呼ばれる末端付加物を作製することもできる。

【0114】

置換変異体は典型的には、タンパク質内の1つまたは複数の部位における、あるアミノ酸と別のアミノ酸との交換を含み、これは、ポリペプチドの1つまたは複数の特性を、他の機能または特性の喪失の有無にかかわらず、調節するように設計され得る。置換は保存的であってよく、すなわち、あるアミノ酸が形状および電荷の類似したアミノ酸と交換される。保存的置換は、当技術分野で周知であり、例えば、以下の交換が含まれる：アラニンからセリンへの；アルギニンからリジンへの；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジンへの；アスパラギン酸からグルタミン酸への；システインからセリンへの；グルタミンからアスパラギンへの；グルタミン酸からアスパラギン酸への；グリシンからプロリンへの；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへの；イソロイシンからロイシンまたはバリンへの；ロイシンからバリンまたはイソロイシンへの；リジンからアルギニンへの；メチオニンからロイシンまたはイソロイシンへの；フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニンへの；セリンからトレオニンへの；トレオニンからセリンへの；トリプトファンからチロシンへの；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへの；およびバリンからイソロイシンまたはロイシンへの交換。あるいは、置換は、非保存的であってもよく、この場合は、細胞受容体に対する結合活性または親和性などの、ポリペプチドまたはペプチドの機能もしくは活性が影響を受ける。非保存的交換は一般に、ある残基を化学的に非類似の残基で置換することを含み、例えば、極性または荷電アミノ酸を非極性または非荷電アミノ酸の代わりに用いるか、またはその逆を含む。

【0115】

本発明のタンパク質は、組換え体であってもよいし、またはインビトロで合成されてもよい。あるいは、組換えタンパク質は、細菌または他の宿主細胞から単離することができる。

【0116】

アミノ酸配列および核酸配列が、それぞれ、追加のN末端アミノ酸もしくはC末端アミノ酸、または5'もしくは3'核酸配列などの、追加の残基を含むことができ、それでもまだ、その配列が、生物学的タンパク質活性（例えば、免疫原性）の維持を含めて、上述した基準を満たす限り、本質的に本明細書に開示された配列の1つに示されたものであることも理解されると考えられる。末端配列の付加は特に核酸配列に適用され、例えば、核酸配列はそのコード領域の5'または3'部分のいずれかに隣接する種々の非コード配列を含むことができる。

【0117】

本発明の組成物には、1 mlあたり約0.001 mg～約10 mgの総タンパク質が存在すると企図される。したがって、組成物中のタンパク質の濃度は、約、少なくとも約、または多くとも約0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、50、100 μg/mlまたはmg/ml、あるいはそれ以上（あるいはそこから導き出せる任意の範囲）であり得る。このうち、約、少なくとも約、または多くとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%が抗原-MHC-ナノ粒子

10

20

30

40

50

複合体であり得る。

【0118】

さらに、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,554,101号(Hopp)は、親水性に基づいて一次アミノ酸配列からエピトープを同定して調製することを教示している。Hoppに開示された方法を通して、当業者は、アミノ酸配列内から潜在的なエピトープを同定して、それらの免疫原性を確認することができると考えられる。数多くの科学出版物もまた、アミノ酸配列の解析からの、二次構造の予測およびエピトープの同定を扱っている(Chou and Fasman, *Adv. Enzymol.*, 47:45-148, 1978; 1979; Chou and Fasman, *Ann u, Rev. Biochem.*, 47:251-276, 1978, Chou and Fasman, *Biochemistry*, 13(2):211-222, 1974; Chau and Fasman, *Biochemistry*, 13(2):222-245, 1974, Chou and Fasman, *Biophys. J.*, 26(3):385-399, 1979)。必要に応じてこれらのいずれかを用いて、米国特許第4,554,101号のHoppの教示を補完することができる。

10

【0119】

どのような自己免疫疾患であっても、当技術分野で公知の方法を用いて抗原MHC複合体を同定および事前選択することができる。所与のMHC分子に結合することが知られているアライメントされたペプチドのセットに由来し、これをペプチド・MHC結合およびT細胞エピトープの両方の予測因子として使用できる、アルゴリズムが存在している。例えば、Reche and Reinherz (2007) *Methods Mol. Biol.* 409: 185-200を参照されたい。

【0120】

ペプチド以外の分子は、MHC分子と複合体を形成する抗原または抗原断片として使用することができるが、こうした分子として、限定するものではないが、糖質、脂質、小分子などが挙げられる。糖質はさまざまな細胞の外表面の主要な成分である。特定の糖質は異なる分化段階の特徴を示しており、これらの糖質は特異的な抗体によって認識されることが非常に多い。はっきりと区別できる糖質の発現は、特定の細胞タイプに限定され得る。

20

【0121】

D. 基材/ナノ粒子

特定の局面において、抗原/MHC複合体は基材に機能的に結合され、これは、共有結合によりまたは共有結合によらずに、該基材に結合され得る。基材は、生体適合性かつ/または生体吸収性の材料を任意で含むナノ粒子の形態であり得る。したがって、一態様において、ナノ粒子は生体適合性かつ/または生体吸収性である。別の局面において、ナノ粒子は固形コアを有し、かつ/またはリポソームではない。基材はまた、米国特許出願公開第2009/0155292号に以前に記載されたようなナノ粒子の形態をとることもできる。ナノ粒子はさまざまな寸法の構造をしていてよく、ナノスフェア、ナノ粒子、または生体適合性で生分解性のナノスフェアもしくは生体適合性で生分解性のナノ粒子として種々に知られている。そのような抗原/MHC複合体を含む粒子状製剤は、ナノ粒子への該複合体の共有結合または非共有結合によって形成することができる。

30

【0122】

ナノ粒子は、典型的には、実質的に球状のコアと、任意で1つまたは複数の層とからなる。コアのサイズおよび組成は多様であり得る。コアのほかに、ナノ粒子は、関心対象の用途に適した機能性を提供するために、1つまたは複数の層があってもよい。層が存在する場合、その厚さは、特定の用途の必要性に応じて異なり得る。例えば、層は有用な光学的性質を付与することができる。

40

【0123】

層はまた、化学的または生物学的な機能性を付与することもでき、本明細書中では化学的活性層または生物学的活性層といい、これらの機能性のため、1つまたは複数の層は一般に、厚さが約0.001マイクロメートル(1ナノメートル)~約10マイクロメートルまたはそれ以上の範囲であってよく(希望のナノ粒子径による)、これらの層は通常、ナノ粒子の外表面に適用される。

【0124】

コアと層の組成はさまざまでありうる。粒子またはコアに適する材料には、限定するも

50

のではないが、ポリマー、セラミック、ガラス、鉱物などが含まれる。例としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：標準および特殊ガラス、シリカ、ポリスチレン、ポリエステル、ポリカーボネート、アクリル系ポリマー、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、フルオロポリマー、シリコン、セルロース、シリコン、金属（例えば、鉄、金、銀）、鉱物（例えば、ルビー）、ナノ粒子（例えば、金ナノ粒子、コロイド粒子、金属酸化物、金属硫化物、金属セレン化物、および酸化鉄などの磁性材料）、およびそれらの複合材料。コアは、均一な組成のものでもよいし、または希望する特性に応じて2種類以上の材料の複合材料であってもよい。特定の局面において、金属ナノ粒子が用いられる。こうした金属粒子またはナノ粒子は、Au、Pt、Pd、Cu、Ag、Co、Fe、Ni、Mn、Sm、Nd、Pr、Gd、Ti、Zr、Si、およびIn、前駆体、それらの二元合金、それらの三元合金、ならびに金属間化合物から形成することができる。米国特許第6,712,997号を参照されたい。特定の態様において、コアと層の組成は、ナノ粒子が生体適合性かつ生体吸収性であるという条件で、変えることができる。コアは、均一な組成のものでもよいし、または希望する特性に応じて2種類以上の材料の複合材料であってもよい。特定の局面において、金属ナノスフェアが使用される。これらの金属ナノ粒子はFe、Ca、Gaなどから形成することができる。特定の態様において、ナノ粒子は、金属または金属酸化物、例えば金または酸化鉄などを含むコアを含む。

10

【0125】

先に述べたとおり、ナノ粒子は、コアのほかに、1つまたは複数の層を含むことができる。ナノ粒子は、生分解性の糖または他のポリマーからなる層を含み得る。生分解性の層の例としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：デキストラン；ポリ（エチレングリコール）；ポリ（エチレンオキシド）；マンニトール；ポリラクチド（PLA）、ポリグリコリド（PGA）、ポリカプロラクトン（PCL）に基づくポリ（エステル）；PHB-PHVクラスのポリ（ヒドロキシアルカノエート）；および他の改質ポリ（サッカライド）、例えばデンプン、セルロースおよびキトサン。さらに、ナノ粒子は、化学的結合または連結部位のための化学官能基を付着させるのに適した表面を備えた層を含むことができる。

20

【0126】

層は、当業者に公知のさまざまな方法で、ナノ粒子上に生成させることができる。例としては、Iler, *Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, 1979; Brinker and Scherer, *Sol-gel Science*, Academic Press, (1990) に記載されているようなゾル-ゲル化学技術が挙げられる。ナノ粒子上に層を生成させる追加のアプローチには、Partch and Brown, *J. Adhesion*, 67:259-276, 1998; Pekarek et al., *Nature*, 367:258, (1994); Hanprasopwattana, *Langmuir*, 12:3173-3179, (1996); Davies, *Advanced Materials*, 10:1264-1270, (1998); およびそこに引用された文献に記載されるような、表面化学およびカプセル化技術が含まれる。蒸着技術も使用可能であり；例えば、Golman and Shinohara, *Trends Chem. Engin.*, 6:1-6, (2000); および米国特許第6,387,498号を参照されたい。さらに他のアプローチには、Sukhorukov et al., *Polymers Adv. Tech.*, 9(10-11):759-767, (1998); Caruso et al., *Macromolecules*, 32(7):2317-2328, (1998); Caruso et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 121(25):6039-6046, (1998); Caruso et al. (1998); Caruso et al. (1999); 米国特許第6,103,379号およびそこに引用された文献に記載されるような、交互積層自己集合技術が含まれる。

30

40

【0127】

ナノ粒子は、抗原/MHC/共刺激分子複合体およびポリマーを含む水相と非水相とを接触させ、次に、非水相を蒸発させて水相から粒子を凝集させることによって、米国特許第4,589,330号または同第4,818,542号に教示されるとおりに形成することができる。このような調製に好ましいポリマーは、天然もしくは合成のコポリマーまたはポリマーであり、以下からなる群より選択される：ゼラチン寒天、デンプン、アラビノガラクトン、アルブミン、コラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコリド-L(-)ラクチドポリ（-カプロラクトン）、ポリ（-カプロラクトン-CO-乳酸）、ポリ（-カプロラクトン-CO-グリコール酸）、ポリ（-ヒドロキシ酪酸）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリエチレン

50

、ポリ(アルキル-2-シアノアクリレート)、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリアミド、ポリ(アミノ酸)、ポリ(2-ヒドロキシエチルDL-アスパルトアミド)、ポリ(エステルウレア)、ポリ(L-フェニルアラニン/エチレングリコール/1,6-ジイソシアナトヘキサン)、およびポリ(メチルメタクリレート)。特に好ましいポリマーは、ポリエステル、例えばポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコリド-L(-)ラクチドポリ(ε-カプロラクトン)、ポリ(ε-カプロラクトン-CO-乳酸)、およびポリ(ε-カプロラクトン-CO-グリコール酸)である。ポリマーを溶解するのに有用な溶媒としては、以下が挙げられる：水、ヘキサフルオロイソプロパノール、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、ヘキサン、ベンゼン、またはヘキサフルオロアセトンセスキ水合物。

【0128】

ナノ粒子のサイズは、約1 nm~約1 μmの範囲であることができる。特定の態様において、ナノ粒子は、直径が約1 μm未満である。他の態様において、ナノ粒子は、直径が約500 nm未満、約400 nm未満、約300 nm未満、約200 nm未満、約100 nm未満、または約50 nm未満である。さらなる態様において、ナノ粒子は、直径が、約1 nmから約10 nm、15 nm、20 nm、25 nm、30 nm、40nm、50 nm、75 nm、または100 nmまでである。特定の態様において、ナノ粒子は、約1 nm~約100 nm、約1 nm~約50 nm、約1 nm~約20 nm、または約5 nm~約20 nmである。

【0129】

複合体のサイズは、約5 nm~約1 μmの範囲であることができる。特定の態様において、複合体は、直径が約1 μm未満、またはその代わり100 nm未満である。他の態様において、複合体は、直径が約500 nm未満、約400 nm未満、約300 nm未満、約200 nm未満、約100 nm未満、または約50 nm未満である。さらなる態様において、複合体は、約10 nm~約50 nm、または約20 nm~約75 nm、または約25 nm~約60 nm、または約30 nm~約60 nm、または一局面において約55 nmである。

【0130】

E. 抗原-MHC複合体とナノ粒子との結合

基材またはナノスフェアを抗原-MHC複合体に結合させるために、以下の手法を適用することができる。

【0131】

表面上での「官能基」の生成を典型的に伴う基材またはナノ粒子の化学修飾(ここで該官能基は抗原-MHC複合体に結合することができる)、および/または、基材もしくはナノ粒子の任意で化学修飾された表面と共有結合型もしくは非共有結合型のいわゆる「連結分子」との連結、ならびにその後の、得られたナノ粒子と抗原-MHC複合体との反応によって、該結合を生じさせることができる。

【0132】

「連結分子」という用語は、基材またはナノ粒子と連結することが可能であり、かつ、抗原-MHC複合体に連結することも可能である、物質を意味する。特定の態様において、抗原-MHC複合体は、リンカーによりナノ粒子に結合されている。適切なリンカーの非限定的な例としては、ドーパミン(DPA)-ポリエチレングリコール(PEG)リンカー、例えば、DPA-PEG-NHSエステル、DPA-PEG-オルソピリジル-ジスルフィド(OPSS)および/またはDPA-PEG-アジドが挙げられる。他のリンカーとしては、ペプチドリナー、エチレングリコール、ビオチン、およびストレプトアビジンが挙げられる。

【0133】

本明細書中で先に用いられている「官能基」という用語は、共有結合を形成する反応性化学基に限定されるものではなく、抗原-MHC複合体とのイオン相互作用または水素結合をもたらす化学基も含まれる。さらに、時として、表面の修飾がエチレングリコールなどの小さい連結分子とナノスフェア表面との反応を必要とするので、表面に生成された「官能基」と「官能基」を有する連結分子との間の厳密な区別は不可能であることに留意すべきである。

【0134】

10

20

30

40

50

官能基またはそれらを有する連結分子は、以下から選択することができる：アミノ基、カルボン酸基、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、グアニジノ、ヒドロキシル基、アミン基、ビシナルジオール、アルデヒド、 α -ハロアセチル基、水銀オルガニル、エステル基、酸ハロゲン化物、酸チオエステル、酸無水物、イソシアネート、イソチオシアネート、スルホン酸ハロゲン化物、イミドエステル、ジアゾアセテート、ジアゾニウム塩、1,2-ジケトン、ホスホン酸、リン酸エステル、スルホン酸、アゾリド、イミダゾール、インドール、N-マレイミド、 α,β -不飽和カルボニル化合物、アリールハロゲナイド、またはそれらの誘導体。

【0135】

より高分子量の他の連結分子の非限定的な例は、核酸分子、ポリマー、コポリマー、重合可能なカップリング剤、シリカ、タンパク質、および基材またはナノ粒子に対して反対の極性を有する表面を有する鎖状分子である。核酸は、それ自体が核酸分子を含むが連結分子に対して相補的な配列を有する親和性分子に対して、連結を提供することができる。

10

【0136】

共有結合性リンカーの具体例としては、官能化PEGなどのポリ(エチレン)グリコール(PEG)が挙げられる。本明細書で用いる「官能化PEG」とは、末端官能基を含むPEG部分を指し、その非限定的な例としては、アミノ、メルカプト、チオエーテル、カルボキシルなどが挙げられる。さまざまなナノ粒子コア上の官能化PEGリンカーの非限定的な例は、本明細書に添付されている表1および表2において提供されており、例えば、PEGリンカーはチオール-PEG-NH₂リンカーである。

20

【0137】

特定の態様において、本明細書に記載されるリンカーは、規定のサイズを有している。いくつかの態様において、リンカーは、約10 kD未満、約5 kD未満、約4.5 kD未満、約4 kD未満、約3.5 kD未満、約3 kD未満、約2.5 kD未満、約2 kD未満、または約1 kD未満である。さらなる態様において、リンカーは、約0.5 kDから約5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、または1 kDまでである。さらに別の態様において、リンカーは約1 kDから約4.5、4、3.5、3、2.5、2、または1.5 kDまでである。

【0138】

重合可能なカップリング剤の例として、ジアセチレン、スチレンブタジエン、酢酸ビニル、アクリレート、アクリルアミド、ビニル化合物、スチレン、酸化シリコン、酸化ホウ素、酸化リン、ホウ酸系、ピロール、ポリピロールおよびリン酸系を挙げることができる。

30

【0139】

基材またはナノ粒子の表面は、例えば反応性官能基を有するホスホン酸誘導体の結合によって、化学的に修飾することができる。これらのホスホン酸またはホスホン酸エステル誘導体の一例は、「マンニッヒ-メドリツァー(Mannich-Moedritzer)」反応に従って合成することができるイミノ-ビス(メチレンホスホノ)炭酸である。この結合反応は、調製プロセスから直接得られた、または(例えば臭化トリメチルシリルによる)前処理後の、基材またはナノスフェアを用いて行うことができる。最初の場合では、ホスホン酸(エステル)誘導体が、例えば、表面にまだ結合している反応媒体の成分を置換することができる。この置換はより高い温度で促進される。一方、臭化トリメチルシリルは、アルキル基含有リン系錯化剤を脱アルキル化し、それによってホスホン酸(エステル)誘導体の新しい結合部位を生成すると考えられる。ホスホン酸(エステル)誘導体、またはそれに結合した連結分子は、上記と同じ官能基を表示することができる。基材またはナノスフェアの表面処理のさらなる例は、エチレングリコールなどのジオール中で加熱することを含む。なお、合成がすでにジオール中で進行した場合には、この処理は不要になり得ることに留意すべきである。これらの状況下で、直接得られた合成生成物は必要な官能基を示す可能性がある。この処理はしかし、N含有またはP含有錯化剤中で生成された基材またはナノ粒子に適用可能である。このような基材または粒子がエチレングリコールによる後処理を受ける場合には、表面にまだ結合している反応媒体の成分(例えば、錯化剤)をジオール

40

50

で置換することができ、かつ/または脱アルキル化することができる。

【0140】

粒子表面にまだ結合しているN含有錯化剤を、第2官能基を有する一級アミン誘導体で置き換えることもまた可能である。基材またはナノ粒子の表面はまた、シリカでコーティングすることもできる。シリカは、トリエトキシシランまたはクロロシランなどの有機リンカーと容易に反応するので、有機分子の比較的単純な化学的結合を可能にする。ナノ粒子の表面はまた、ホモ-またはコポリマーでコーティングすることもできる。重合可能なカップリング剤の例は、N-(3-アミノプロピル)-3-メルカプトベンズアミジン、3-(トリメトキシシリル)プロピルヒドラジドおよび(3-トリメトキシシリル)プロピルマレイミドである。重合可能なカップリング剤の他の非限定的な例は、本明細書に記載されている。これらのカップリング剤は、コーティングとして生成されるコポリマーのタイプに応じて、単独でまたは組み合わせて使用することができる。

10

【0141】

酸化遷移金属化合物を含む基材またはナノ粒子とともに使用できる別の表面修飾技術は、塩素ガスまたは有機塩素化剤による酸化遷移金属化合物の対応するオキシ塩化物への変換である。こうしたオキシ塩化物は、生体分子にしばしば見られるヒドロキシ基またはアミノ基などの求核試薬と反応することができる。この技術では、例えばリジン側鎖のアミノ基を介して、タンパク質との直接結合を生じさせることが可能である。オキシ塩化物で表面修飾した後でのタンパク質との結合はまた、マレイミドプロピオン酸ヒドラジドなどの二官能性リンカーを用いて行うこともできる。

20

【0142】

非共有結合型の連結技術に関しては、基材またはナノスフェアと反対の極性または電荷を有する鎖状分子が特に適している。非共有結合でコア/シェルナノスフェアに結合させることができる連結分子の例には、アニオン性、カチオン性もしくは両性イオン性界面活性剤、酸性もしくは塩基性タンパク質、ポリアミン、ポリアミド、ポリスルホン、またはポリカルボン酸が含まれる。基材またはナノスフェアと、反応性官能基を有する両親媒性試薬との間の疎水性相互作用は、必要な連結を生成させることができる。特に、相互に架橋することができる、リン脂質または誘導体化された多糖類などの、両親媒性の性質を有する鎖状分子が有用である。表面上へのこれらの分子の吸着はコインキュベーションによって達成され得る。親和性分子と基材またはナノ粒子との間の結合はまた、非共有結合型の自己組織化結合に基づくこともできる。その一例は、連結分子としてのビオチンを有する単純な検出プローブと、アビジン結合分子またはストレプトアビジン結合分子とを含む。

30

【0143】

生体分子への官能基のカップリング反応のためのプロトコールは、文献、例えば"Biocoujugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press 1996)に見いだすことができる。生体分子(例えば、MHC分子またはその誘導体)は、酸化、ハロゲン化、アルキル化、アシル化、付加、置換、またはアミド化などの有機化学の標準的手法に沿って、共有結合または非共有結合で連結分子に結合させることができる。共有結合または非共有結合した連結分子をカップリングするためのこれらの方法は、基材またはナノ粒子への連結分子のカップリングの前または後に適用することができる。さらに、インキュベーションによって、分子を、相応に(例えば、臭化トリメチルシリルにより)前処理された基材またはナノスフェアへと直接結合させることが可能であり、該基材または該ナノスフェアは、この前処理により改質された表面(例えば、より高い電荷または極性の表面)を示す。

40

【0144】

F. タンパク質産生

本発明では、本発明のさまざまな態様で使用するためのポリペプチド、ペプチド、およびタンパク質が記載される。例えば、特定のペプチドおよびそれらの複合体は、免疫応答を誘発または調節するそれらの能力についてアッセイされる。特定の態様において、本発明のペプチドまたはタンパク質の全部もしくは一部はまた、従来技術に従って、溶液中

50

でまたは固相支持体上で合成することが可能である。種々の自動合成装置が市販されており、公知のプロトコルに従って使用することができる。例えば、各々が参照により本明細書に組み入れられる、Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. Ed., Pierce Chemical Co., (1984); Tam et al., J. Am. Chem. Soc., 105:6442, (1983); Merrifield, Science, 232(4748):341-347, (1986); およびBarany and Merrifield, The Peptides, Gross and Meinhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, (1979)を参照されたい。あるいは、組換えDNA技術を用いることができ、この方法では、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列が発現ベクターに挿入され、適切な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクションされ、発現に適する条件下で培養される。

【0145】

本発明の一態様には、タンパク質の生産のために、微生物などの細胞への遺伝子導入を使用することが含まれる。関心対象のタンパク質の遺伝子が適切な宿主細胞内に導入され、その後適切な条件下で細胞が培養される。ほぼ全てのポリペプチドをコードする核酸を使用することができる。組換え発現ベクターの作製およびそこに含まれる要素は、当業者に公知であり、本明細書に簡潔に記載される。哺乳動物宿主細胞株の例としては、限定するものではないが、Vero細胞およびHeLa細胞、他のB細胞株およびT細胞株、例えばCEM、721.221、H9、Jurkat、Raji、ならびにチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、3T3、RINおよびMDCK細胞が挙げられる。さらに、宿主細胞株は、挿入配列の発現を調節する細胞株、または所望の方法で遺伝子産物を修飾およびプロセシングする細胞株が選択され得る。そのようなタンパク質産物の修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセシング(例えば、切断)はタンパク質の機能にとって重要である。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセシングおよび修飾のための特徴的かつ特異的な機構を有する。適切な細胞株または宿主システムが、発現された外来タンパク質の正しい修飾とプロセシングを確実にするために選択され得る。

【0146】

多くの選択システムを使用することができ、限定するものではないが、それぞれtk-細胞中、hgprt-細胞中またはaprt-細胞中のHSVチミジンキナーゼ遺伝子、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が挙げられる。また、トリメトプリムおよびメトトレキサートへの耐性を付与する、dhfrについて;ミコフェノール酸への耐性を付与する、gptについて;アミノグリコシドG418への耐性を付与する、neoについて;およびハイグロマイシンへの耐性を付与する、hygroについての選択の基礎として代謝拮抗物質耐性を用いることができる。

【0147】

G. 核酸

本発明は、抗原ペプチドをコードするものなどの、本発明のタンパク質、ポリペプチド、ペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドを含むことができる。

【0148】

特定の態様において、本発明は、自己抗原および/またはMHC分子をコードする核酸配列を組み入れている単離された核酸セグメントおよび組換えベクターに関する。「組換え」という用語は、ポリペプチドまたは特定のポリペプチドの名称と組み合わせ用いられ、これは一般的に、インビトロで操作された核酸分子、またはそのような分子の複製産物である核酸分子から産生されたポリペプチドを指す。

【0149】

本発明で使用される核酸セグメントは、それらの全長が大幅に変化するよう、コード配列自体の長さにかかわらず、他の核酸配列、例えばプロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコードセグメントなどと組み合わせることができる。したがって、ほぼ全ての長さの核酸断片を使用することができると考えられるが、好ましくは、その全長は意図した組換え核酸プロトコルにおける調製および使用の容易さによって制限される。いくつかの場合では、核酸配列は、例えば、ポ

10

20

30

40

50

リペプチドの精製、輸送、分泌、翻訳後修飾を可能にするために、または標的化もしくは効能といった治療上の有用性のために、追加の異種コード配列とともにポリペプチド配列をコードし得る。タグまたは他の異種ポリペプチドは、修飾ポリペプチドをコードする配列に付加することができ、ここで「異種」とは、修飾ポリペプチドと同じでないポリペプチドを指す。

【0150】

V. 薬学的組成物および投与

本明細書において、疾患の治療のために有用である薬学的組成物を提供する。

【0151】

A. 薬学的組成物

抗原-MHCナノ粒子複合体を単独で、または担体、例えば、組成物中の薬学的に許容される担体と組み合わせて、投与することができる。本発明の組成物は通常、例えば、静脈、皮下、または筋肉内に、注射によって非経口的に投与されることができる。他の投与様式に適する追加の製剤としては、経口製剤が挙げられる。経口製剤は、例えば、医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの、通常用いられる賦形剤を含む。こうした組成物は、液剤、懸濁液剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤または粉剤の形をとり、約10%～約95%の活性成分、好ましくは約25%～約70%を含有する。対象の免疫状態を調整する抗原-MHC-ナノ粒子複合体を含有する水性組成物の調製は、本開示を踏まえて、当業者には公知である。特定の態様において、組成物は吸入されることが可能である（例えば、米国特許第6,651,655号参照、これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。一態様において、抗原-MHC-ナノ粒子複合体を全身投与する。

【0152】

典型的には、本発明の組成物は、剤形に適合する様式で、かつ治療に有効でありかつ免疫を調整するような量で、投与される。投与すべき量は治療される対象に依存する。投与を必要とする活性成分の正確な量は、医師の判断によって決まる。しかし、適切な投与量範囲は、1回の投与あたり抗原-MHC-ナノ粒子複合体 10～数百ナノグラムまたはマイクログラム程度である。また、初回投与およびブースターのための適切な投与計画はまた変えられるが、初回投与とこれに続く後続の投与によって代表される。

【0153】

多くの場合、ペプチド-MHC-ナノ粒子複合体は、約、多くとも約、または少なくとも約3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれより多く、複数回投与することが望ましい。投与は一般的に2日～12週間隔、より一般的には1週～2週間隔の範囲である。免疫系のコンディションを維持するために、0.25～5年、通常は2年の間隔での定期的なブースターが望ましい場合がある。投与の経過は、炎症性免疫応答および/または自己制御性T細胞活性のためのアッセイ法により追跡することができる。

【0154】

いくつかの態様において、薬学的組成物は対象に投与される。本発明の別の局面は、抗原-MHC-ナノ粒子複合体組成物の有効量を対象に投与することを含む。さらに、該組成物は、免疫系の調整剤と組み合わせて投与することができる。該組成物は一般に、薬学的に許容される担体または水性媒体中に溶解または分散される。

【0155】

「薬学的に許容される」または「薬理学に許容される」という用語は、動物またはヒトに投与した場合、有害反応、アレルギー反応、またはその他の都合の悪い反応を引き起こさない分子実体および組成物を指す。本明細書で用いる「薬学的に許容される担体」には、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤と抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。薬学的活性物質のためのそのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野で周知である。慣用の媒体または作用物質が活性成分と適合しない場合を除いて、免疫原性組成物および治療用組成物におけるその使用が企図される。

【0156】

10

20

30

40

50

注射用に適した薬学的形態には、無菌の水性液剤または分散液剤；ゴマ油、落花生油、または水性プロピレングリコールを含む製剤；および無菌の注射用溶液または分散液の即時調製のための無菌粉末剤が含まれる。全ての場合に、該形態は無菌でなければならず、しかも容易に注射できる程度に流動性でなければならない。それはまた、製造および貯蔵の条件下で安定しているべきであり、かつ細菌および真菌などの微生物の汚染活動から保護されなければならない。

【0157】

組成物は中性または塩の形態に製剤化することができる。薬学的に許容される塩には、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基により形成される）が含まれ、それらは塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸により形成される。また、遊離カルボキシル基により形成される塩は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、もしくは水酸化鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導することができる。

10

【0158】

担体はまた、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリ（エチレングリコール）など）、それらの適切な混合物、および植物油を含む、溶媒または分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持によって、または界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物活動の防止は、各種の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされる。多くの場合、等張剤、例えば糖類または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、その組成物中で、吸収を遅らせる物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを使用することによってもたらされる。

20

【0159】

無菌の注射液剤は、必要な量の活性化化合物を、必要に応じて、上に列挙したさまざまな他の成分とともに、適切な溶媒中に加え、その後滅菌することによって調製される。溶液の滅菌は、抗原-MHC-ナノ粒子複合体の治療的特性を弱めないようにして行われ得る。一般的に、分散液剤は、滅菌した各種活性成分を、基礎分散媒と、上に列挙したのから必要とされる他の成分とを含有する無菌ビヒクルに加えることによって、調製される。無菌の注射液剤を調製するための無菌粉剤の場合、好ましい調製方法は真空乾燥および凍結乾燥技術であり、こうした技術は、予め滅菌された溶液から、活性成分と任意の追加的な所望成分との粉末をもたらす。溶液の滅菌のそのような一方法は滅菌濾過であるが、本発明は、抗原-MHC-ナノ粒子複合体の治療的特性を大幅に低下させない、あらゆる滅菌方法を包含するものとする。オートクレーブ滅菌のような、激しい熱と圧力を必要とする滅菌方法は該複合体の三次構造に支障をきたすことがあり、したがって、抗原-MHC-ナノ粒子複合体の治療的特性を有意に低下させる可能性がある。

30

【0160】

治療用組成物の有効量は、意図した目標に基づいて決定される。「単位用量」または「投与量」という用語は、対象に使用するのに適した物理的に個別の単位を指し、各単位は、その投与、すなわち、適切な投与経路および投与計画に付随して上記の所望の応答を生じるように計算された、該組成物の予め定められた量を含有する。治療数と単位用量の両方に応じて、投与される量は、求められる結果および/または保護に左右される。本組成物の正確な量はまた、医師の判断に左右され、かつ各個体に特有である。用量に影響を与える要因としては、対象の身体的および臨床的状态、投与経路、治療の意図した目標（症状の緩和対治療）、ならびに特定の組成物の効果、安定性、および毒性が挙げられる。処方に関して、液剤は、その剤形に適合した様式でかつ治療または予防に有効であるような量で投与される。製剤は、上記のタイプの注射液剤などの、さまざまな剤形で容易に投与される。

40

50

【 0 1 6 1 】

B. 併用療法

本発明の組成物および関連する方法、特に、抗原-MHC-ナノ粒子複合体の投与はまた、従来の治療法の適用と組み合わせて使用することができる。これらには、Avonex（インターフェロン -1a）、Betaseron（インターフェロン -1b）、Copaxone（グラチラマー酢酸塩）、Novantrone（ミトキサントロン）、Rebif（インターフェロン -1a）、Tysabri（ナタリズマブ）、Gilenya（フィンゴリモド）、グラチラマー、ステロイド、シトキサン、イムラン、パクロフェン、脳深部刺激療法、Ampyra（ダルファムプリジン）、刺鍼術、および理学療法が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 6 2 】

併用療法を用いる場合、例えば、抗原-MHC-ナノ粒子複合体の投与を「A」とし、追加の作用物質を「B」とすると、さまざまな組み合わせを用いることができる。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A/ B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【 0 1 6 3 】

患者/対象への本発明のペプチド-MHC複合体組成物の投与は、もしあれば、毒性を考慮に入れて、このような化合物を投与するための一般的なプロトコールに従うことになる。治療サイクルは必要に応じて繰り返されることが見込まれる。また、水分補給などの、さまざまな標準治療法を、上記の治療法と組み合わせて適用することも考えられる。

【 0 1 6 4 】

C. インビトロ投与またはエクスビボ投与

本明細書で用いるインビトロ投与という用語は、対象から取り出された細胞、または培養下の細胞を含むがこれに限定されない、対象の外部に取り出された細胞に対して実施される操作を指す。エクスビボ投与という用語は、インビトロで操作されて、その後対象に投与される細胞を指す。インビボ投与という用語には、投与を含めて、対象の内部に実施された全ての操作が含まれる。

【 0 1 6 5 】

本発明の特定の局面では、本組成物をインビトロ、エクスビボ、またはインビボのいずれかで投与することができる。特定のインビトロ態様において、自己T細胞が本発明の組成物とともにインキュベートされる。次に、細胞または組織は、インビトロ分析またはエクスビボ投与のために使用される。

【 実施例 】

【 0 1 6 6 】

VI. 実施例

以下の実施例は、本発明のさまざまな態様を説明する目的で提供され、どのような形であっても本発明を限定するものではない。当業者であれば、本発明は、その目的を成し遂げて、記載した結果および効果を得るだけでなく、本発明に固有の目的、結果、および効果を得るのによく適合していることが容易に理解されよう。本実施例は、本明細書に記載の方法とともに、現在態様を代表するものでありかつ例示であり、本発明の範囲を限定することを目的とするものではない。特許請求の範囲によって定義される本発明の精神の範囲内に包含されるそれらの変更および他の使用が、当業者には想起されると考えられる。

【 0 1 6 7 】

実施例1. pMHCナノ粒子の調製および分析

pMHC産生

2通りの異なる方法を使用して、組換えpMHCクラスI複合体を発現させた。第1の方法では、記載（Garboczi, D.N. et al. (1992) Proc Natl. Acad Sci USA 89: 3429-3433; Altman, J.D. et al. (1996) Science 274:94-96）の通り、ペプチドの存在下において細菌中で発現されたMHCクラスI重鎖および軽鎖の再折り畳みと、その後のゲルろ過および陰イ

10

20

30

40

50

オン交換クロマトグラフィーによる精製とを伴った。第2の方法では、ペプチドコード配列、MHCクラスI軽鎖および重鎖が可動性GSリンカーによって順次つながれ (Yu, Y.Y. et al. (2002) J Immunol 168:3145-3149)、これに、BirA部位、6×Hisタグをコードし遊離Cysで終わるカルボキシ末端リンカーが続いた単鎖構築体としてレンチウイルスにより形質導入されたフリースタイルCHO細胞において高収率でMHCクラスI複合体を発現させることを伴った。分泌されたタンパク質を、ニッケルカラムおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて培養上清から精製し、NPコーティングに直接使用するか、またはビオチン化して、蛍光色素を結合させたストレプトアビジンを用いてpMHC四量体を生成させた。IGRP₂₀₆₋₂₁₄自己抗原ペプチドまたはその模倣体NRP-V7をコードする代表的な単鎖pMHC複合体を用いて生成された四量体は、フローサイトメトリーによって決定した場合、コグネイトのモノクローナルな自己反応性CD8⁺T細胞には効率的に結合するが、そのポリクローナルな対応物 (図示せず) には結合しない。

10

【0168】

まず、既述 (Stratmann, T. et al. (2000) J Immunol 165:3214-3225; Stratmann, T. et al. (2003) J. Clin. Invest. 112:3214-3225) の通り、それぞれc-Junまたはc-Fosロイシンジッパーを保持するI-A 鎖およびI-E 鎖、ならびにBirAおよび6×Hisタグをコードする構築体をトランスフェクションされたショウジョウバエ (*Drosophila*) SC2細胞から、組換えpMHCクラスII単量体を精製した。このアプローチの収率はたいてい低く、多大な時間を必要としたので、本出願人は、複合体のペプチド-IA およびIA 鎖がリボソームスキッピングP2A配列によって分離されている単シストロン性のメッセージをコードするレンチウイルスで形質導入されたフリースタイルCHO細胞中での発現系を開発した (Holst, J. et al. (2006) Nat Protoc 1:406-417)。上記の単鎖pMHCクラスI構築体と同様に、BirA部位、6×Hisタグ、および遊離Cysをコードするリンカーを構築体のカルボキシ末端に付加した。自己組織化したpMHCクラスII複合体を、ニッケルクロマトグラフィー、続いて陰イオン交換クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製し、上記のようにNP上へのコーティングに使用するか、またはビオチン化および四量体形成のために加工処理した。2.5mi自己抗原ペプチドをコードする代表的なpMHCクラスII複合体を用いて作製されたpMHCクラスII四量体は、フローサイトメトリーによって決定した場合、コグネイトのモノクローナルな自己反応性CD4⁺T細胞によって特異的かつ効率的に結合されている。

20

【0169】

pMHC四量体染色

記載 (Stratmann, T. et al. (2000) J Immunol 165:3214-3225; Stratmann, T. et al. (2003) J. Clin. Invest. 112:3214-3225; Amrani, A. et al. (2000) Nature 406:739-742) の通り、ビオチン化されたpMHC単量体を用いて、PE結合TUM-H-2K^d、NRP-V7-H-2K^d、IGRP₂₀₆₋₂₁₄-H-2K^d、HEL₁₄₋₂₂/IA⁹⁷およびBDC2.5mi/IA⁹⁷四量体を調製した。末梢血単核細胞、脾細胞およびリンパ節CD8⁺またはCD4⁺T細胞をFACS緩衝液 (PBS中0.1%のアジ化ナトリウムおよび1%のFBS) 中で4 で1時間、四量体 (5 ug/mL) により染色し、洗浄し、FITC結合抗CD8 または抗CD4 (5 μg/mL) およびPerCP結合抗B220 (2 μg/mL; 「沈黙の (dumb)」ゲートとして) とともに4 で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、1% PFA/PBS中で固定し、FACSによって分析した。

30

40

【0170】

NP合成

記載 (Perrault, S.D. et al. (2009) Nano Lett 9: 1909-1915) の通り、クエン酸ナトリウムによる塩化金の化学的還元を用いて、金ナノ粒子 (GNP) を合成した。手短に言えば、1%のHAuCl₄ (Sigma Aldrich) 2 mLを激しく攪拌させながらH₂O 100 mLに添加し、この溶液を油浴中で加熱した。1%クエン酸Na 6 mL (14 nm GNPの場合) または2 mL (40 nm GNPの場合) を煮沸HAuCl₄溶液に添加し、これをさらに10分間攪拌し、その後、室温に冷却した。pMHCのアクセプタとして-COOH基または-NH₂基で官能化された1 uMolのチオール-PEGリンカー (Nanocs, MA) の添加によりGNPを安定化させた (表1および2)。ペグ化GNPを水で洗浄して遊離チオール-PEGを除去し、濃縮し、さらなる分析のために水中に保存

50

した。NP密度は分光測定によるものとし、ベールの法則にしたがって計算した。

【0171】

SFP系列の酸化鉄NP (SFP IONP) を、界面活性剤の存在下、有機溶媒中での酢酸鉄の熱分解により生成させ、その後ペグ化によって水性緩衝液中に溶解させた (Xie, J. et al. (2007) Adv Mater 19:3163; Xie, J. et al. (2006) Pure Appl. Chem. 78: 1003-1014; Xu, C. et al. (2007) Polymer International 56:821-826)。手短に言えば、2 mMolの $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (Sigma Aldrich, Oakville, ON) を、10 mLのベンジルエーテルおよびオレイルアミンの混合液に溶解し、窒素雰囲気生成装置の保護の下、還流させながら1時間100 まで、その後2時間300 まで加熱した。合成されたNPをエタノールの添加により沈降させ、ヘキサンに再懸濁させた。IONPのペグ化のため、異なる3.5 kDa DPA-PEGリンカー (表1中のS1~S5; Jenkem Tech USA) 100 mgを CHCl_3 および $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ (DMF) の混合液に溶解した。次に、NP溶液 (20 mg Fe) をDPA-PEG溶液に添加し、室温で4時間攪拌した。ペグ化SFP NPをヘキサンの添加によって終夜沈降させ、その後、水に再懸濁させた。微量の凝集体を高速遠心分離 (20,000 x g, 30分) によって除去し、単分散SFP NPをさらなる特徴付けおよびpMHC結合のために水中に保存した。IONP生成物中の鉄の濃度を、2N HCL中、A410での分光測定により決定した。SFP NPの分子構造および直径 (Fe_3O_4 ; 直径 8 ± 1 nm) (Xie, J. et al. (2007) Adv Mater 19:3163; Xie, J. et al. (2006) Pure Appl. Chem. 78: 1003-1014) に基づき、本出願人は、鉄1 mgを含有するSFP溶液が 5×10^{14} 個のNPを含有するものと推定する。

10

【0172】

本出願人は引き続き、界面活性剤の完全な非存在下でペグ化IONPの、同じく熱分解によるが単一の工程による形成を可能にした新しいIONPの設計を開発した (PF系列IONP)。この新規の設計において、PEG分子は還元試薬としても界面活性剤としても使用された。典型的な反応においては、PEG (2 kDa) 3 gを100 にて50 mLの丸底煮沸フラスコ中でゆっくり溶かし、その後7 mLのベンジルエーテルおよび2 mMolの $\text{Fe}(\text{acac})_3$ と混合した。反応液を1時間激しく攪拌し、さらに2時間還流させながら260 まで加熱した。反応混合液を室温に冷却し、遠心分離管に移し、水30 mLと混合した。2,000 x gで30分間の遠心分離によって不溶性物質を除去した。Amicon-15フィルタ (MWCO 100 kDa, Millipore, Billerica, MA) を通じた限外ろ過により、遊離PEG分子を除去した。本出願人は、試験したPEG分子の全てではないが大部分でIONPを作製することができた (表1, P1~P5)。IONPのサイズは、熱分解反応において使われたPEGリンカーの官能基に応じて異なった (表1および2)。NPは磁性 (MACS) カラム (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) またはIMag細胞分離システム (BD Biosciences, Mississauga, ON) を用いて容易に精製することができた。精製されたIONPは、検出可能ないずれの凝集もなく、室温または4 で水中またはさまざまな緩衝液 (pH 5~10) 中に保存された。SFP NPについて上述したようにNP密度を計算した。

20

30

【0173】

NPのpMHC結合

末端-NH₂基または-COOH基を保持するPEGリンカーを用いて生成されたNPへのpMHCの結合は、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩 (EDC) の存在下でのアミド結合の形成によって達成された。まず、-COOH基を有するNP (GNP-C、SFP-CおよびPF-C、表2) を20 mM MES緩衝液、pH 5.5に溶解した。NP溶液にN-ヒドロキシスルホスクシンイミドナトリウム塩 (スルファ-NHS, Thermo scientific, Waltham, MA, 終濃度10 mM) およびEDC (Thermo scientific, Waltham, MA, 終濃度1 mM) を加えた。室温で20分の攪拌後、NP溶液を、20 mMホウ酸緩衝液 (pH 8.2) に溶解されたpMHC単量体を含有する溶液に滴加した。この混合物をさらに4時間攪拌した。まず、pMHCをNH₂-官能化NP (GNP-N、SFP-NおよびPF-N、表2) に結合させるため、pMHC複合体を、100 mM NaClを含有する20 mM MES緩衝液、pH 5.5に溶解した。次に、pMHC溶液にスルファ-NHS (10 mM) およびEDC (5 mM) を添加した。次に、活性化されたpMHC分子をNPの20 mMホウ酸緩衝液 (pH 8.2) 溶液に添加し、室温で4時間攪拌した。

40

【0174】

50

pMHCをマレイミド官能化NP (SFP-MおよびPF-M、表2および図1C) に結合させるためには、まず、pMHC分子をトリブチルホスフィン (TBP, 1 mM) とともに室温で4時間インキュベートした。次に、遊離カルボキシ末端Cys残基をコードするように操作されたpMHCを、2 mM EDTA, 150 mM NaClを含有する40 mMリン酸緩衝液, pH 6.0中のNPと混合し、室温で終夜インキュベートした。マレイミド基とCys残基との間の炭素-スルフィド結合の形成を介して、pMHCは共有結合によりNPに結合された。

【0175】

クリックケミストリーを用いて、アジド基で官能化されたNPにpMHCまたはアビジンを結合させた (SFP-Z, 表2)。この反応のため、まず、pMHCまたはアビジン分子をジベンゾシクロオクチル (DBCO, Click Chemistry Tools, Scottsdale, AZ) 試薬とともに室温で2時間インキュベートした。遊離DBCO分子を終夜、透析によって除去した。次に、pMHC-DBCOまたはアビジン-DBCO結合体をSFP-Zとともに2時間インキュベートし、pMHCまたはアビジン分子とNPとの間のトリアゾール結合の形成をもたらした。

10

【0176】

異なるpMHC-NP結合反応での未結合のpMHC複合体を、300 kDaの分子量カットオフ膜 (Spectrum labs) に通す、4 でのPBS, pH 7.4に対する広範な透析によって除去した。あるいは、pMHC結合IONPを磁気分離によって精製した。結合されたNPを、Amicon Ultra-15ユニット (100 kDa MWC0) に通す限外ろ過によって濃縮し、PBS中にて保存した。

【0177】

電子顕微鏡法、動的光散乱DLS、および小角電子線回折

20

まず、未結合NPおよびpMHC結合NPのコアサイズおよび分散度を透過電子顕微鏡法 (TEM, Hitachi H7650) によって評価した。動的光散乱 (DLS) を使用して、ZetaSizer機器 (Malvern, UK) によりpMHC-NPの流体力学的サイズ、ゼータ電位、および単分散度を決定した。小角電子線回折 (SEBD) を用いて、PF系列のNPの酸化鉄コアの化学的性質を評価した。

【0178】

フーリエ変換赤外分光法

フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) を用いて、PF系列IONPの設計の表面化学特性を評価した。Nicolet FTIR分光光度計をATR (減衰全反射) モードにて用い、対照PEGおよびPF-NP表面に固定されたPEGのFTIRスペクトルを得た。各々のスペクトルをスペクトル分解能 4 cm^{-1} における256回のスキャンの平均として記録した。PEG主鎖C-O-C基およびその末端pMHCアクセプタ官能基の伸縮振動のシグネチャを同定した。

30

【0179】

アガロースゲル電気泳動

ペグ化またはpMHCコーティングに応じてNP荷電に対する変化を素早く評価するため、NPを0.8%アガロースゲル上での電気泳動に供した。ペグ化されたNPは、全体の表面電荷に依って陰極または陽極に移動した。クマシーブルー染色を行って、NPとのpMHCの共移動を確認した。

【0180】

未変性および変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

pMHC結合NPを未変性PAGE (10%) およびSDS-PAGE (12%) 分析に供して、pMHC-NP調製物中に遊離 (未結合pMHC) がいないことを確認し、NPの表面上に完全な3分子のpMHC複合体があることを確認した。

40

【0181】

pMHC原子価測定

個々のNP上に結合したpMHC単量体の数 (pMHC原子価) を評価するため、本発明者らは、Bradfordアッセイ法 (Thermo Scientific)、アミノ酸分析 (加水分解されたpMHC-NP調製物における17個の異なるアミノ酸の、HPLCに基づく定量) (University of Toronto)、ドット-ELISAおよび質量分析によるシグネチャーペプチド分析を含む、異なるアプローチを用いてpMHC-NP調製物のpMHC濃度の測定を行い、pMHC分子数とNP数との比率に変換した値の測定を行った。手短に言えば、「ドット-ELISA」アプローチでは、pMHC結合NPおよび

50

未結合NPならびにpMHC単量体溶液（標準物質として）をPBS中で連続的に希釈し、次にマルチウェルフィルタプレート（PALL Corporation）中でPVDF膜へ吸収させた。プレートを室温で部分的に乾燥させ、次に、pMHC特異的な一次抗体（すなわち、pMHCクラスIでコーティングされたNPに対する抗 2M抗体および抗K^d抗体、クローン2M2およびSF 1-1.1, Bio Legend, San Diego, CA）とともにインキュベートし、その後HRP結合二次抗体またはAP結合二次抗体とともにインキュベートした。酵素呈色反応の発生と同時に、ウェルの内容を従来のELISAプレート中のウェルへ移し、その吸光度を、プレートリーダーを用い450 nmで測定した。シグネチャーペプチド質量分析法の場合、pMHC特異的トリプシンペプチド（K^d複合体に対するシグネチャーペプチド

TWTAADTAALTR

およびI-A^{g7}複合体に対するシグネチャーペプチド

AQNSELASTANMLR

）が質量分析によって同定された。対応する合成ペプチドを安定同位体で標識した（AQUAペプチド合成, Sigma Aldrich）。次に、同位体で標識されたペプチドを規定の濃度まで連続的に希釈し、トリプシン消化のためpMHC結合NPと混合した。この混合物を質量スペクトル分析（Agilent QTOF6520）に供し、pMHC濃度の読み出しとして、同位体で標識されたシグネチャーペプチドと未標識のシグネチャーペプチドの比率を定量化した。これらの異なる方法がもたらしたデータは類似していたので、Bradfordアッセイ法（ブランクとして未結合NPを用いる）が、容易かつ簡単なため、選択の方法となった。

【0182】

インビトロでのpMHC-NPのアゴニスト活性

TCR-TGマウス由来のFACSで選別された脾臓CD8⁺細胞（細胞 2.5×10^5 個/mL）を、連続的に希釈されたpMHC結合NPまたは対照NPとともに37 °Cで24~48時間インキュベートした。上清をELISAによりIFN γ についてアッセイした。培養細胞に1 mCiの³H]-チミジンをパルスし、これを24時間後に収集して³H]の取込みを測定した。

【0183】

pMHC-NP治療法

10週齢の雌性NODマウスのコホートに、pMHCでコーティングされたNPをPBS中で5週間、週2回（合計で10回の投与）静脈内注射した。血液、脾臓、リンパ節、および/または骨髄における四量体⁺CD8⁺またはCD4⁺T細胞プールのサイズの増加、ならびにその表現型特性を、記載の通りフローサイトメトリーによって評価した（Tsai, S. et al. (2010) *Immunity* 32:568-580）（およびClemente-Casares et al., 投稿中）。他の実験においては、11 mM超の血中グルコースレベルを2日間呈しているマウスを、pMHC-NPで週2回、静脈内処置し、安定した正常血糖になるまで（4週間）高血糖についてモニターした。また、糖尿について動物を毎日評価し、3+ならヒトインスリンイソフェン（1日あたり1 IU）を皮下に投与した。

【0184】

統計分析

両側スチューデントt検定、マンホイットニーU検定、カイ二乗検定、または2元配置ANOVA検定によってデータを比較した。P < 0.05で統計的有意と見なした。

【0185】

マウス

NOD/LtマウスはJackson Lab (Bar Harbor, ME) からのものであった。17.4 /8.3 (8.3-NOD)、17.6 /8.3 (17.6-NOD) およびBDC2-5-NODマウスは、記載済である（Katz, J. D. et al. (1993) *Cell* 74: 1089-1100; Verdaguer, J. et al. (1997) *J Exp Med* 186: 1663-1676; Han, B. et al. (2005) *J Clin Invest* 115: 1879-1887）。

【0186】

実施例2. T1Dに関連するpMHCクラスIIの産生

いくつかの異なるT1D関連ペプチドおよび無関連ペプチド（すなわち、陰性対照）/I-A^{g7}複合体が真核生物（S2またはCHO細胞）において産生された。これらの単量体調製物から

10

20

30

40

50

作製された四量体を用いた調査から、これらの単量体が、正確に折り畳まれたpMHC複合体として上清中へ分泌されることが確認される。図2は一例を示す。

【0187】

T1D関連pMHCクラスII-NPを用いた処置によるNODマウスにおける高血糖からの回復

糖尿病NODマウスを、pMHCクラスIIでコーティングされたNP 7.5 μ gによって週2回処置した。マウスは、4週間正常血糖である場合に治癒したと見なされ、その時点で、処置を中止した。図3に示されるように、2.5mi/I-A⁹⁷-NP、IGRP₁₂₈₋₁₄₅/I-A⁹⁷-NP、およびIGRP₄₋₂₂/I-A⁹⁷-NPはマウスの90~100% (マウスn=29匹)において高血糖を元に戻したが、HEL₁₄₋₂₂/I-A⁹⁷-NP (無関係なpMHC)による処置では効果がなかった。処置中止後30週超の治癒マウスでの腹腔内グルコース負荷試験 (IPGTT)によって、年齢を適合させた非糖尿病未処置対照での曲線と酷似し、未処置の急性糖尿病NODマウスで得られたものとは大きく異なる曲線が得られた (図4)。かくして、T1Dに関連するpMHCクラスIIでコーティングされたNPは、糖尿病マウスにおいてグルコース恒常性を回復させる。

10

【0188】

T1D関連pMHCクラスII-NPはコグネイトメモリーTR1自己制御性CD4⁺T細胞を増殖させる

2.5mi/I-A⁹⁷-NPを用いた処置により正常血糖とされていた50週齢の糖尿病マウスの血液、脾臓、膵リンパ節 (PLN)、腸間膜リンパ節 (MLN) および骨髄の調査から、糖尿病発症時に調査されたマウスまたは年齢を適合させた非糖尿病未処置動物と比べて、2.5mi/I-A⁹⁷四量体⁺CD4⁺細胞の割合が著しく増加したことが明らかになった (図5)。CD4⁺T細胞の増殖は抗原特異的であった (図5)。増殖のテンポ、大きさ、および分布は、試験した3つのT1D関連pMHCクラスII-NPの場合と類似していた (図6)。これらの全てのコホートにおけるNPにより増殖した四量体⁺細胞 vs 四量体⁻細胞の表現型分析から、最近になって記述されたTR1特異的マーカー (Gagliani, N. et al. (2013) Nature Medicine 19:739-746) (図7, 下部) の共発現を伴うメモリー様TR1表現型 (図7, 上部) が示された: CD62^{hi}/CD44^{hi}/ICOS⁺/CD25⁻/FoxP3⁻/表面TGF β ⁺/CD49b⁺/LAG3⁺。これらの細胞がFoxP3⁺でなかったことは、FoxP3プロモーター-eGFPを発現しているNODマウスにおいて確認されており、ここではpMHC-NPで増殖した細胞の全てがeGFP陰性であった (図示せず)。

20

【0189】

これらの表現型データと一致して、pMHC-NPで処置されたマウスから選別された四量体⁺CD4⁺細胞は、ほぼIL-10および (それよりは少ないが) IFN γ のみを分泌することによって、コグネイトペプチドをパルスしたDCに応答した (図8および図示せず)。重要な点として、pMHC-NPで処置されたドナーから精製された、CD8⁺T細胞ではなく、CD4⁺細胞が、糖尿病誘発脾細胞を移入したNOD.scidマウスにおいてT1Dを阻害し、pMHCクラスII-NPで処置された宿主が100日超の間100%保護された (図示せず)。

30

【0190】

これらのpMHCクラスII-NPで増殖した四量体⁺細胞は、その対応する四量体⁻細胞と異なり、ペプチドをパルスしたDC (レスポナーと四量体⁺TR1細胞の両方によって標的化されるペプチドを提示している) に対する非コグネイトT細胞の増殖を阻害した。培養物への抗IL10 mAbまたは抗TGF β mAbの添加は、抗IFN γ またはラットIgGを与えられた培養物と比べて、抑制を部分的に阻害した (図示せず)。最も重要な点として、IGRP₄₋₂₂または2.5mi/I-A⁹⁷-NPおよびブロッキング用の抗IL-10 mAb、抗TGF β mAbまたは抗IFN γ mAbまたはラットIgGで処置された糖尿病マウスの調査 (図9) は、pMHCクラスII-NPによる正常血糖の回復にはIFN γ でなく、IL-10およびTGF β が必要になることを示唆している。しかしながら、自然発症糖尿病NOD.II10^{-/-}マウスおよびNOD.IIfng^{-/-}マウスにおける調査は、pMHCクラスII-NPに反応して増殖するTR1細胞の発生には、IL-10およびIFN γ の両方の発現が必要であることを示唆している; これらのマウスにおいて、pMHC-NP治療はTh2様細胞 (NOD.IIfng^{-/-}) またはIFN γ ⁺/IL-4⁺/IL10⁻細胞 (NOD.II10^{-/-}マウス) を増殖させた。糖尿病IGRP^{-/-} NODマウス (IGRP反応性T細胞をプライミングできない) における調査から、これらのマウスがIGRP₄₋₂₂/I-A⁹⁷-NPに反応しない (T細胞増殖または正常血糖の回復がない) ことが示唆された。というのは、これらのマウスがIGRP₄₋₂₂でプライミングされた細

40

50

胞を欠いていたからである。対照的に、2.5mi/1-A⁹⁷-NPで処置された全ての糖尿病IGRP^{-/-} NODマウスが治癒した（図示せず）。かくして、pMHCクラスI-NPと同様に、pMHCクラスII-NPは、疾患によりプライミングされた制御性メモリーを増大させることによって作用するが、それらは共刺激シグナルを欠いているので、これらの応答を新たにプライミングすることはできない。

【0191】

最後に、ワクシニアウイルス（rVV）を用いた調査により、pMHCクラスII-NPで処置されたNODマウスは急性ウイルス感染を容易に除去できることが示された（図10A）。これと一致して、処置されたマウスは、アジュバント中のモデル抗原に対する抗体応答を開始し得る（図10B）。

【0192】

実施例3. 単一特異的なpMHCクラスII-NPはEAEの重症度を低下させる

次に、本出願人は、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）においてpMHCクラスIIに基づくナノ医薬の治療可能性を試験した。このモデルは、EAEの発症を抑制または鈍らせるのではなく、確立されたEAEをpMHC-NPが元に戻すことができるかを調べることが可能な最もトリンジェントな試験において利用された。これはささいな問題ではない。EAEにおける介入に関する最近の総説は、400超の調査のうちの1%未満でEAE誘導から21日後に処置が開始されたことを示している（Holst, J. et al. (2006) Nat Protoc 1 :406-417）；報告されたデータは、EAE誘導から21日後に処置が開始され、用量依存的に疾患スコアが改善されたマウスにおいて得られた（図11）。

【0193】

実施例4. pMHCクラスIIでコーティングされたNPの合成および品質管理

本出願人は、合成のために界面活性剤を利用せず、かつ最適なpMHC負荷を負荷できる極めて安定な単分散調製物をもたらす、最適化された酸化鉄NPの設計を開発した。いくつかの異なるpMHCコーティングケミストリー（図12A）を使用できるが、本出願人は、カルボキシ末端に遊離Cysをコードするように操作された高原子価のpMHCを受け入れる（最大60個超のpMHC/NP）、マレイミド結合PEGで官能化されたNPを常用する。これらのpMHCクラスII-NPは、NPあたりのpMHC原子価（ドット-ELISA、アミノ酸分析）、NP密度、NP電荷、およびNPサイズ（TEMによって規定される、金属コア；および動的分散（DLS）によって規定される、流体力学直径）を規定するいくつかの品質管理チェックにかけられる。図12Bは代表的なTEM像を示し、図12Cは、pMHCでコーティングされていないNPとpMHCでコーティングされたNPのDLSプロファイルを示す。典型的な投薬計画には、用量あたり全pMHC（NPコーティング）1~50 μg（PBS 100 uLに希釈した調製物およそ2 uL）の投与を伴う。

【0194】

実施例5. pMHCクラスIIでコーティングされたNPによる処置

上記のデータは、pMHCクラスI-NPで処置されたマウスにおいて本出願人が以前に得たデータと一致しており、つまりpMHCクラスII-NPは、局所の自己抗原負荷APCによる他の自己抗原ペプチドの提示を抑制するコグネイトメモリー制御性T細胞（この場合TR1）を増殖させる（Amrani, A. et al. (2000) Nature 406:739-742）。

【0195】

ヒトTR1 CD4⁺T細胞クローンは、樹状細胞（DC）のような、プロフェッショナルAPCのある種のサブセットを死滅化することが報告されている（Amrani, A. et al. (2000) Nature 406:739-742）。本出願人はそれゆえ、pMHCクラスII-NP治療に反応して増殖する抗原特異的TR1細胞が、自己抗原負荷APCを死滅化させることにより自己免疫を抑制するかどうか調べた。これは、2.5miまたはGPIペプチドをパルスしてPKH26（2.5miパルスDC）またはCFSE（GPIパルスDC）で標識したDCの1:1混合物を、先行して5週間、10回の2.5mi/1A⁹⁷-NP投与を受けていたNODマウスまたはいずれの処置も受けていなかったNODマウスに移入することによって行われた。宿主を7日後に殺処理して、2種の異なる宿主におけるPKH26⁺細胞 vs CFSE⁺細胞の比率を比較した。図13A（上パネル）に示されるように、差異は観察されず、pMHC-NP治療に反応して増殖したTR1 CD4⁺T細胞は、抗原を発現しているDCを死滅化しな

10

20

30

40

50

いことが示唆された。

【0196】

これが、使われたAPCのタイプ(DC)の特性、または他のAPCタイプの一般的特徴であったかどうか調べるため、DCとは対照的に脾臓B細胞を用いて上記の実験を繰り返した。予想外にも、2.5mi/IA⁹⁷-NPでコーティングされたNPにより処置されていた宿主において、2.5miをパルスしたB細胞の数が(減少したのではなく)増大したことが分かった(図13A, 下パネル)。これは予想外であった。というのは、技術の現状に基づくと、全く逆の結果(2.5miをパルスしたB細胞の、GPIをパルスした対応細胞と比べた場合の選択的かつ特異的な減少)が予想されたからである。

【0197】

次に、本出願人は、pMHCクラスII-NP処置のそのようなB細胞増殖効果が、2.5mi/IA⁹⁷-NPで処置されたマウスおよび未処置対照の脾臓流入領域リンパ節(PLN)および非流入領域リンパ節(MLN)におけるB細胞の絶対数および割合を比較することによって立証され得るかどうか確認した。図13Bに示されるように、pMHCクラスII-NPで処置されたNODマウスは、MLNではなくPLNにおいてB細胞の割合の著しい増加を有していた。そのような差異は未処置NODマウスのPLN vs MLNにおいては認められず、これらの効果がpMHC-NP治療の結果であることが示唆された。とりわけ、個々のマウスのPLN中の2.5mi特異的TR1 CD4⁺T細胞の頻度とPLN関連B細胞の頻度との間に統計的に有意な相関関係があったことから、pMHC-NPで処置されたNODマウスのPLNへの、B細胞のそのような動員の増加は、MHC-NP治療に应答して増殖した2.5mi特異的TR1 CD4⁺T細胞により推進されることが示唆された。

【0198】

まとめると、これらのデータは、MHC-NP治療に应答して増殖したB細胞が制御性B細胞、つまりpMHC-NPにより増殖したTR1 CD4⁺T細胞とのコグネイト相互作用に应答してIL-10を産生する能力を獲得するB細胞であり得るという可能性を高めた。この事例のシナリオは、2.5mi特異的TR1 CD4⁺T細胞が、未分化クロモグラニンA特異的B細胞(クロモグラニンAを捕捉し、それゆえ、対応する2.5mi/IA⁹⁷ pMHC複合体を表面に提示する:クロモグラニンAは2.5miエピトープの天然の抗原供給源である)のIL-10産生Breg細胞への分化および増殖を誘導すると仮定するものである。

【0199】

この仮説を検証するため、本出願人は、2つのIL10遺伝子座のうちの1つが、第5エクソン(第11エクソン)の停止コドンとポリアデニル化シグナルとの間に標的化されたIRES-eGFPカセットの挿入を保有するNODマウス系統由来の2.5miパルスB細胞またはGPIパルスB細胞(PKH26で標識した)を、2.5mi/IA⁹⁷-NP処置NOD宿主または未処置NOD宿主へ移入した。

【0200】

移入から7日後に、宿主におけるドナーPKH26⁺B細胞のフローサイトメトリー表現型(図13C, 上パネル)を決定した。図13C(中央および下パネル)に示されるように、かなりの割合のドナーB細胞が、IL10コード化eGFPを発現し、CD5⁺かつCD1d^高であった。これらはBreg細胞の3つの重要なマーカーである(Xie, J. et al. (2007) Adv Mater 19:3163; Xie, J. et al. (2006) Pure Appl. Chem. 78: 1003-1014)。これは、2.5miをパルスしたB細胞でのみ認められたが、陰性対照ペプチド(GPI)をパルスしたB細胞では認められず、それはpMHC-NPで処置されたマウスにおいてのみ起きた。重要なことには、この効果は、少なくとも一部は、IL-10 pMHC-NPで増殖したTR1 CD4⁺T細胞によって媒介された。というのは、そのような应答がIL-10欠損NOD宿主においては観察されなかったからである。

【0201】

総合すれば、これらのデータは、pMHCクラスII-NP治療が抗原特異的B細胞の制御性B細胞への分化および増殖を誘導することを実証するものである。

【0202】

調節特性を有するBリンパ球の存在を示唆しているデータの記述は、1974年まで遡る文献において見出すことができる。pMHCクラスII-NP治療に应答して増殖するTR1 CD4⁺T細胞と同様に、Breg細胞は、IL-10およびTGFβを含む免疫抑制性サイトカイン、ならびに、pMH

10

20

30

40

50

CクラスIIによって推進されるコグネイト細胞間相互作用を介して、抗原依存的かつ極めて特異的に、病原性自己反応性T細胞およびB細胞を阻害できる他の分子を発現する(Xu, C. et al. (2007) Polymer International 56:821-826)。さまざまな刺激がBreg形成をインビトロで、およびそれほどではないにせよインビボで、誘導できることが示されたが、本出願人の知る限り、現在、インビボで抗原特異的Breg細胞を誘導および増殖させることが可能な治療アプローチは存在していない。高度に疾患特異的なTR1 CD4⁺T細胞を誘発することにより、本出願人は、pMHCクラスIIに基づくナノ医薬も疾患特異的Breg細胞を誘発することを実証する。Breg細胞は、エフェクタのTR1 CD4⁺T細胞への分化を促進することもできるので、pMHCクラスIIに基づくナノ医薬は、高度に抗原特異的な、それゆえ、全身性免疫を損なうことなく自己免疫応答を選択的に抑制可能な、顕著で持続的な免疫抑制応答を解き放つ。

10

【0203】

実施例6. 鉄アセチルアセトネートの熱分解による表面官能化酸化鉄ナノ粒子の合成、およびその生体共役反応

PEGを溶かす。ベンジルエーテルおよび鉄アセチルアセトネートを添加する。105 で1時間の加熱後、温度を260 まで増加させ、還流させる。約2時間後、鉄ナノ粒子が生じ、溶液の色が黒変する。反応液を室温まで冷却し、いくらかの水を添加して、反応容器からナノ粒子を抽出する。ナノ粒子をMiltenyi Biotec LS磁気カラムによって精製する。酸化鉄ナノ粒子タンパク質結合体の作製には、6.2~6.5の緩衝pH(0.15 M NaClおよび2 mM EDTA)でのタンパク質および鉄ナノ粒子の添加、12~14時間室温での攪拌、およびMiltenyi Biotec LS磁気カラムによるタンパク質結合粒子の精製が含まれる。

20

【0204】

本発明は好ましい態様および任意の構成により具体的に開示されているが、当業者であれば、本明細書中に開示され、そこに具体化された本発明の修飾、改良、および変更を行うことができ、そのような修飾、改良、および変更は本発明の範囲内にあるということが理解されるべきである。本明細書に提供された材料、方法、および例は、好ましい態様の代表であり、例示であり、本発明の範囲の限定を意図したものではない。

【0205】

本明細書では、本発明を広範かつ包括的に説明してきた。より狭い種および属の開示に含まれる亜属グループのそれぞれも本発明の一部を形成する。これには、除かれた材料が本明細書に具体的に挙げられているか否かに関係なく、任意の主題を属から取り除く但し書きまたは消極的な限定を有する本発明の一般的記述が含まれる。

30

【0206】

さらに、本発明の構成または局面がマーカッシュグループの観点から記載されている場合、当業者であれば、本発明はまた、マーカッシュグループの個々のメンバーまたはメンバーのサブグループの観点からも説明されることを認識するであろう。

【0207】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、選択肢のみを指すことまたは選択肢が相互に排他的であることが明示的に示されない限り、「および/または」を意味するために用いられるが、本開示は、唯一の選択肢を指す定義ならびに「および/または」を支持する。

40

【0208】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、「含む(comprising)」（ならびに「含む(comprise)」および「含む(comprises)」のような、含むの任意の形態)、「有する(having)」（ならびに「有する(have)」および「有する(has)」のような、有するの任意の形態)、「含む(including)」（ならびに「含む(includes)」および「含む(include)」のような、含むの任意の形態)または「含有する(contains)」（ならびに「含有する(contains)」および「含有する(contains)」のような、含有するの任意の形態)という単語は、包含的または非限定的であり、追加の、記載されていない要素または方法工程を除外しない。


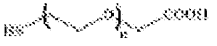
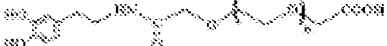

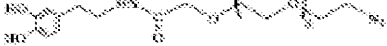
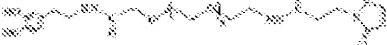
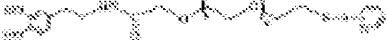
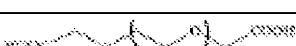
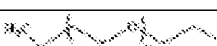

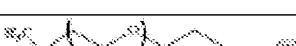

50

【0209】

本開示を通して、種々の刊行物、特許および公開された特許明細書は識別引用によって参照される。本明細書中で挙げた全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それぞれが個々に参照により組み入れられるのと同程度に、参照によりその全体が明示的に組み入れられる。矛盾がある場合には、定義を含めて、本明細書が統制する。

【0210】

(表1) 官能化PEGリンカー

リンカーコード	ナノ粒子のタイプ	PEGリンカー	MW (&Da)	官能基	構造
A1	金 ナノ粒子 (GNP-C)	チオール-PEG- カルボキシル	3.5	アミン (-NH ₂)	
A2	金 ナノ粒子 (GNP-N)	チオール-PEG- アミン	3.5	カルボキシル (-COOH)	
S1	酸化鉄 ナノ粒子 (SFP-C)	ドーパミン-PEG- カルボキシル	3.5	カルボキシル (-COOH)	
S2	酸化鉄 ナノ粒子 (SFP-N)	ドーパミン-PEG- アミン	3.5	アミン (-NH ₂)	
S3	酸化鉄 ナノ粒子 (SFP-Z)	ドーパミン-PEG- アジド	3.5	アジド(-N ₃)	
S4	酸化鉄 ナノ粒子 (SFP-M)	ドーパミン-PEG- マレイミド	3.5	マレイミド	
S5	酸化鉄 ナノ粒子 (SFP-O)	ドーパミン-PEG- オルソピリジル ジスルフィド	3.5	オルソピリジル ジスルフィド	
F1	酸化鉄 ナノ粒子 (FF-C)	カルボキシル-PEG- カルボキシル	20	カルボキシル (-COOH)	
F2	酸化鉄 ナノ粒子 (FF-N)	メトキシ-PEG- アミン	20	アミン (-NH ₂)	
F3	酸化鉄 ナノ粒子 (FF-M)	メトキシ-PEG- マレイミド	20	マレイミド	
F4	酸化鉄 ナノ粒子 (FF-O)	メトキシ-PEG- オルソピリジル ジスルフィド	20	オルソピリジル ジスルフィド	
F5	酸化鉄 ナノ粒子 (FF)	PEG	20	ヒドロキシル (-OH)	

10

20

30

【0211】

(表2) ナノ粒子の設計およびpMHC結合能

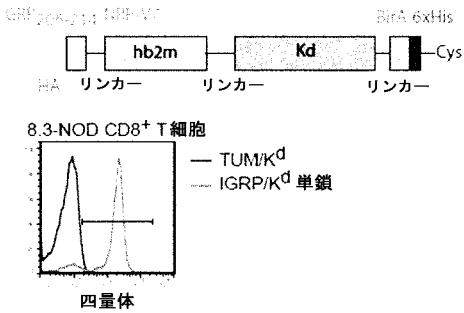
40

ナノ粒子合成				pMHC結合			
タイプ	サイズ(nm)	リンカー (コード)	沈降/凝集	結合	pMHC結合能 (pMHC/NP)	配向性	磁気精製
金 GNP-C	14 ± 2	A1	なし	アミド	280	ランダム	なし
金 GNP-N	14 ± 2	A2	なし	アミド	263	ランダム	なし
金 GNP-C	40 ± 6	A3	なし	アミド	5,258	ランダム	なし
酸化鉄 SFP-C	7.4 ± 1.2	S1	なし	アミド	54	ランダム	なし
酸化鉄 SFP-N	7.4 ± 1.2	S2	あり	アミド	31	ランダム	なし
酸化鉄 SFP-Z	7.4 ± 1.2	S3	なし	トリアゾール	50	ランダム	緩徐的
酸化鉄 SFP-M	7.4 ± 1.2	S4	あり	炭素-硫黄	<10	方向性あり	なし
酸化鉄 SFP-O	7.4 ± 1.2	S5	なし	ジスルフィド	65	方向性あり	なし
酸化鉄 PF-C	14.6 ± 3.8	P1	なし	アミド	58	ランダム	なし
酸化鉄 PF-N	20.4 ± 4.2	P2	あり	アミド	210	ランダム	なし
酸化鉄 PF-M	23.5 ± 4.9	P3	なし	炭素-硫黄	84	方向性あり	効率的
酸化鉄 PF-O	形成 されず	P4	NA	ジスルフィド	NA	方向性あり	NA
酸化鉄 PF	10.8 ± 2.7	P5	なし	なし	0	NA	なし

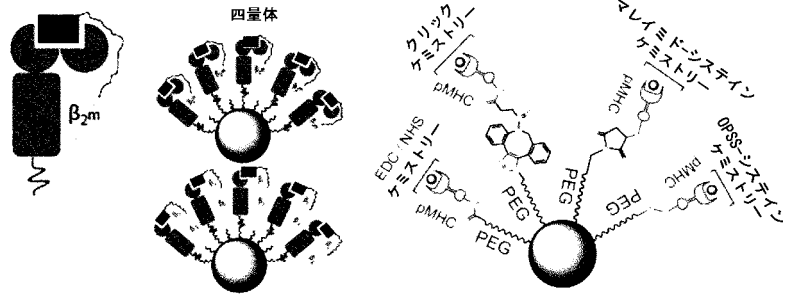
10

20

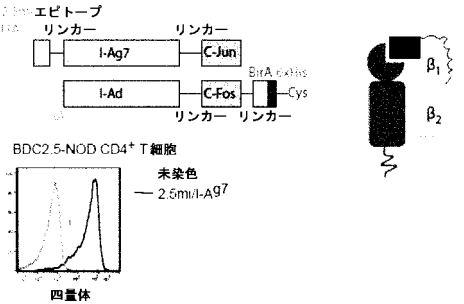
【図1A】



【図1C】

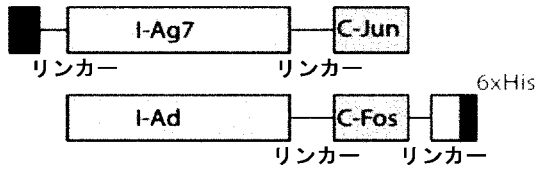


【図1B】

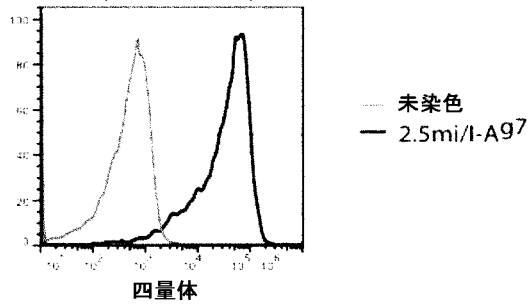


【図2】

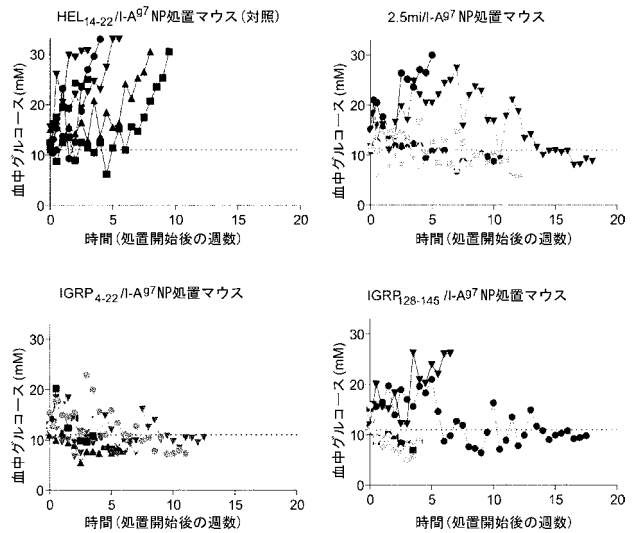
2.5mi エピトープ



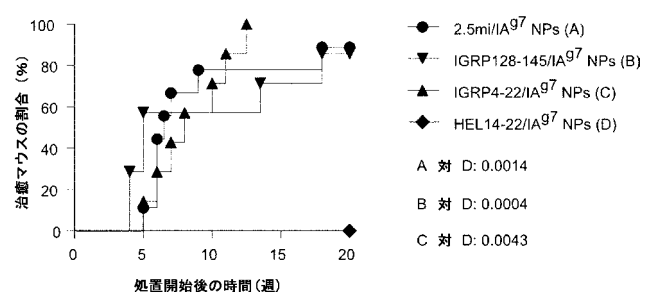
BDC2.5-CD4⁺ T細胞 (2.5mi-特異的)



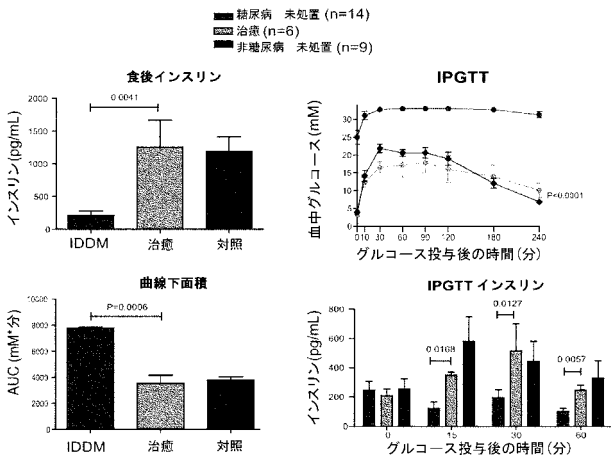
【図3A】



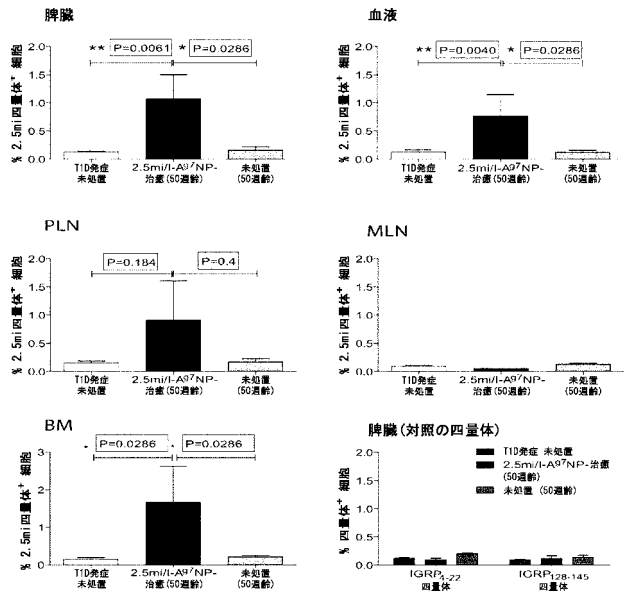
【図3B】



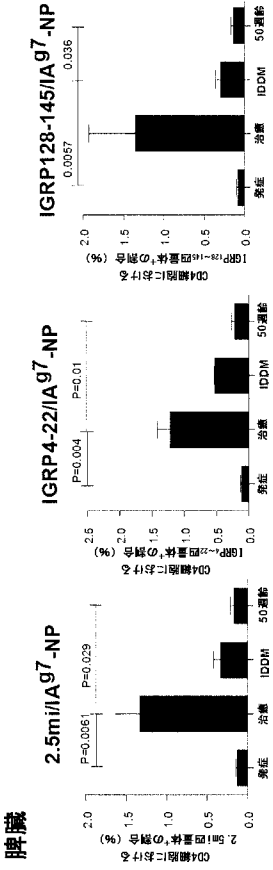
【図4】



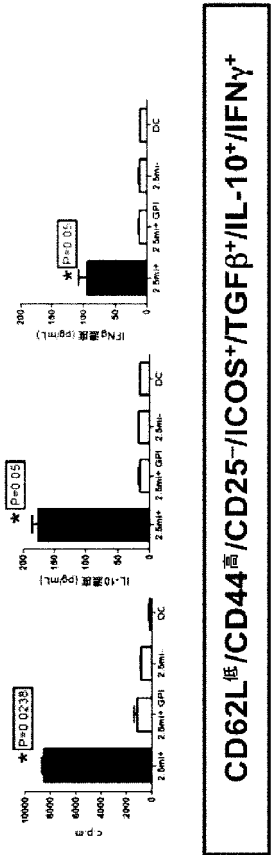
【図5】



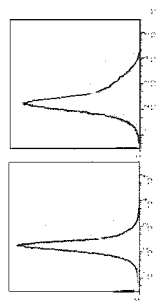
【 図 6 】



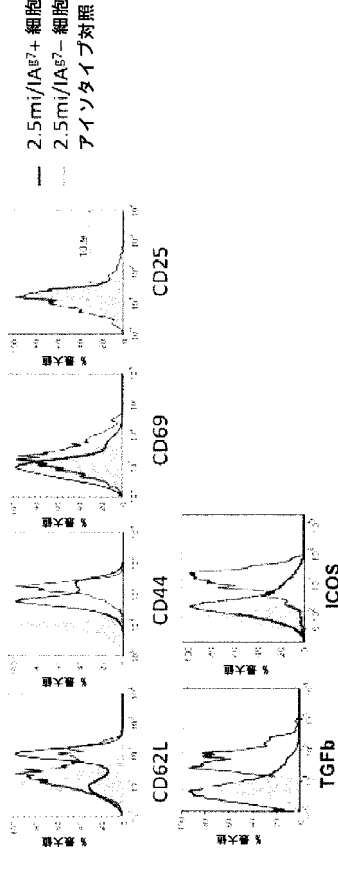
【 図 7 - 2 】



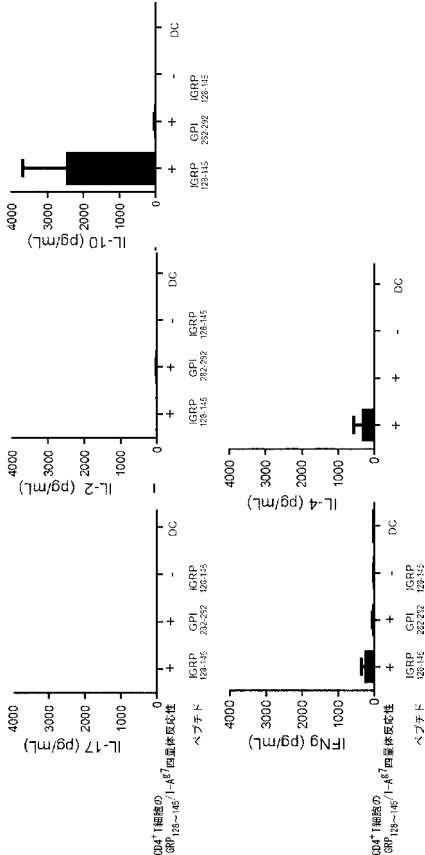
2.5mi/IAg7+
2.5mi/IAg7-
アイソタイプ対照



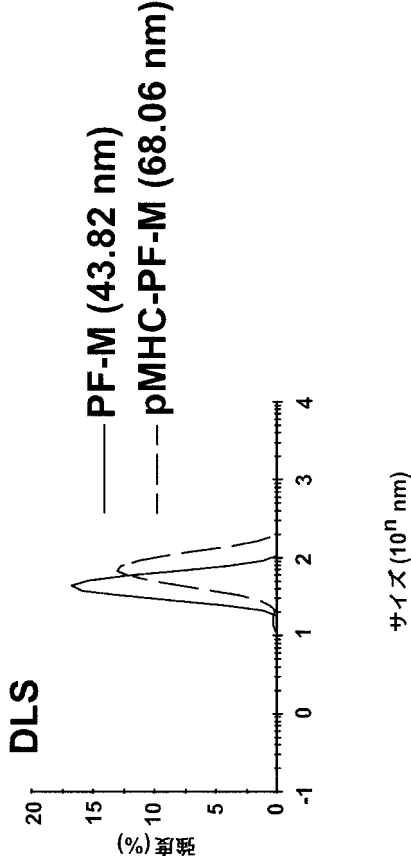
【 図 7 - 1 】



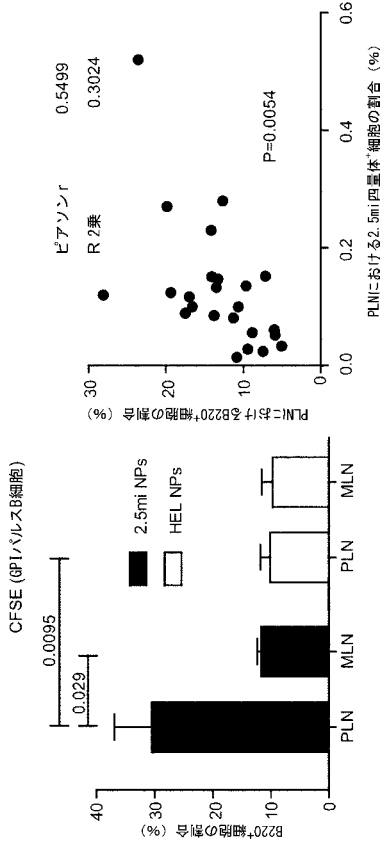
【 図 8 】



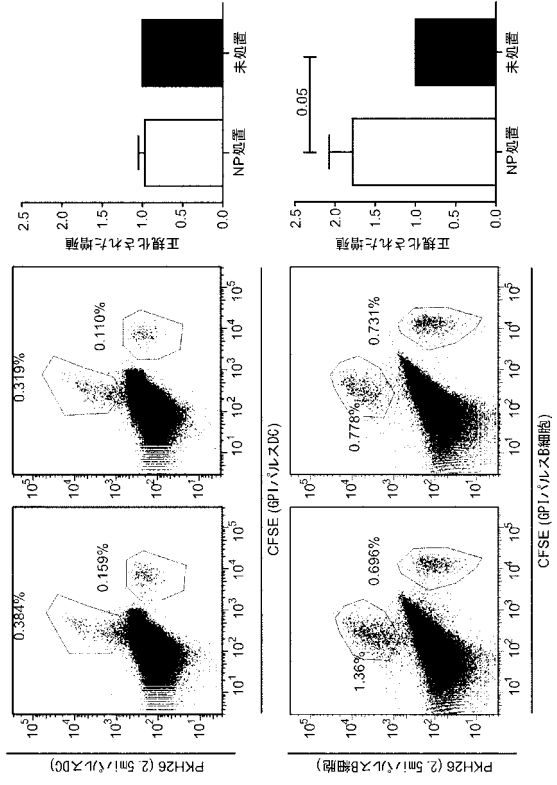
【図 1 2 C】



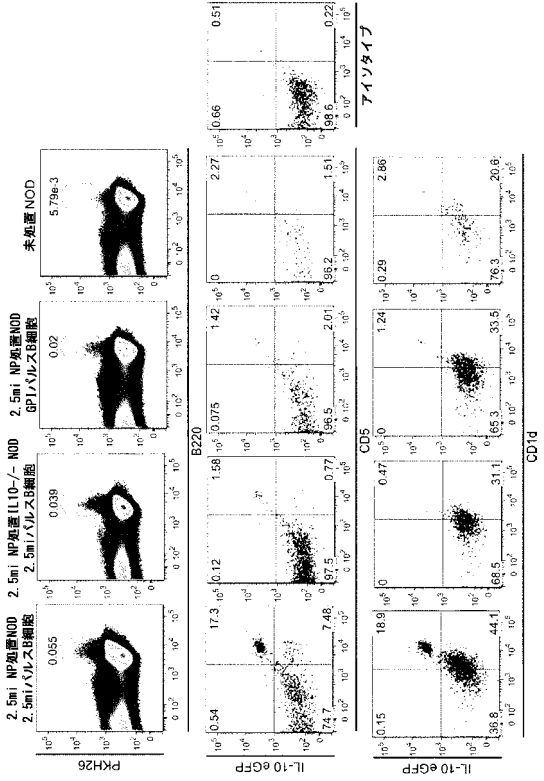
【図 1 3 B】



【図 1 3 A】

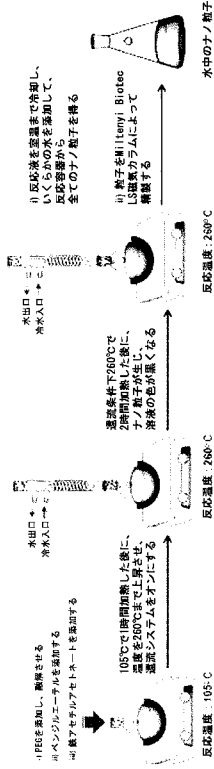


【図 1 3 C】

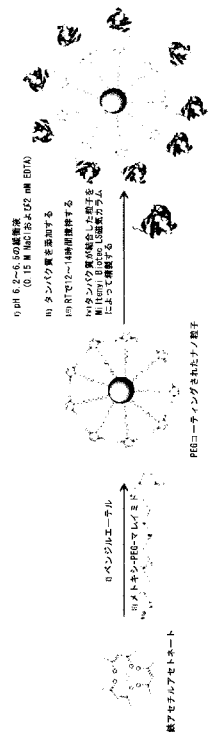


【 図 1 4 】

ベンジルエーテルおよびメトキシPEG-マレイミドの存在下での鉄アセチルアセトネートの熱分解による表面官能酸化鉄ナノ粒子の1段階合成



システイン-マレイミド反応による酸化鉄ナノ粒子表面上でのタンパク質の結合の化学作用の概略



- 【 手続 補正書 】
- 【 提出日 】平成28年7月7日 (2016.7.7)
- 【 手続 補正 1 】
- 【 補正対象書類名 】明細書
- 【 補正対象項目名 】配列表
- 【 補正方法 】追加
- 【 補正の内容 】
- 【 配列表 】

2017500285000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2014/003014
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61K 9/14</i> (2006.01), <i>A61P 37/06</i> (2006.01), <i>C07K 14/74</i> (2006.01), <i>C12N 5/0781</i> (2010.01), <i>C12N 5/0783</i> (2010.01)		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61K 9/14</i> (2006.01), <i>A61P 37/06</i> (2006.01), <i>C07K 14/74</i> (2006.01), <i>C12N 5/0781</i> (2010.01), <i>C12N 5/0783</i> (2010.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: ORBIT/QUESTEL, USPTO/WEST, ESPACENET, LEXISNEXIS/TOTAL PATENT, STN/CAPLUS, CANADIAN PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENT; Keywords: antigen-MHC complex, nanoparticle, Tr1 cell, B-regulatory cell, iron oxide, thermal decomposition.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/041968 A1 (SANTAMARIA, P.) 5 April 2012 (05-04-2012)	1-19, 30 and 31
X	WU, W et al. "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies", <i>Nanoscale Res Lett.</i> Vol. 3, pages 397-415, 2 October 2008 (02-10-2008), ISSN: 1931-7573.	20-31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 12 May 2015 (12-05-2015)		Date of mailing of the international search report 12 May 2015 (12-05-2015)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Qianfa Chen (819) 994-1374

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2014/003014

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/109852 A2 (SANTAMARIA, P. and MOORE, A.) 12 September 2008 (12-09-2008)	1-31
A	WO2013/144811 A2 (SANTAMARIA, P.) 3 October 2013 (03-10-2013)	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2014/003014**Box No. II****Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

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

1. Claim Nos.: 15-18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 15-18 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search under Rule 39.1 (iv) of the *PCT*. Regardless, this Authority has carried out a search based on the alleged effect(s) or purpose(s)/use(s) of the product defined in claims 15-18.
2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Group 1: Claims 1-19, 30 (partly, P) and 31 (P) are directed to an auto-antigen-MHC complex operatively coupled to a nanoparticle, the preparation, and the therapeutic use thereof in a method for treating an autoimmune disease; and

[Continuation in extra sheet]

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2014/003014

Continued from Box III:

Group 2: Claims 20-29, 30 (P) and 31(P) are directed to a method for making iron oxide nanoparticle comprising thermally decomposing iron acetyl acetonate.

There are no common inventive "special technical features" linking each group of the claimed invention. The common concept linking together the groups appears to be the preparation and use of iron oxide nanoparticle. However, this concept is not novel in view of any one of D1 and D2. Therefore, the requirements of the unity of invention are not fulfilled in that there is no technical relationship among the inventions as they do not involve one or more of the same or corresponding technical features. The expression "special technical features" means those features which define a contribution which each of the claimed inventions considered as a whole makes over the prior art

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IB2014/003014

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2012041968 A1	05 April 2012 (05-04-2012)	WO2012041968A1 AU2011310513A1 CA2813064A1 CN103237559A EP2621523A1 IL225470D0 JP2013541532A KR20130124487A MX2013003559A SG188653A1 US2012093934A1	05 April 2012 (05-04-2012) 11 April 2013 (11-04-2013) 05 April 2012 (05-04-2012) 07 August 2013 (07-08-2013) 07 August 2013 (07-08-2013) 27 June 2013 (27-06-2013) 14 November 2013 (14-11-2013) 14 November 2013 (14-11-2013) 02 September 2013 (02-09-2013) 30 April 2013 (30-04-2013) 19 April 2012 (19-04-2012)
WO2008109852 A2	12 September 2008 (12-09-2008)	WO2008109852A2 WO2008109852A3 WO2008109852A8 AU2008222678A1 AU2008222678A2 AU2008222678B2 CA2680227A1 CN101678090A CN101678090B DK2131856T3 EP2131856A2 EP2131856B1 EP2614834A1 EP2842570A1 ES2525801T3 IL200768D0 JP2010522695A JP5650406B2 JP2015061854A NZ579853A NZ599561A US2009155292A1 US8354110B2 US2011059121A1 US2013302421A1	12 September 2008 (12-09-2008) 11 December 2008 (11-12-2008) 06 August 2009 (06-08-2009) 12 September 2008 (12-09-2008) 28 April 2011 (28-04-2011) 17 January 2013 (17-01-2013) 12 September 2008 (12-09-2008) 24 March 2010 (24-03-2010) 11 April 2012 (11-04-2012) 15 December 2014 (15-12-2014) 16 December 2009 (16-12-2009) 17 September 2014 (17-09-2014) 17 July 2013 (17-07-2013) 04 March 2015 (04-03-2015) 30 December 2014 (30-12-2014) 17 May 2010 (17-05-2010) 08 July 2010 (08-07-2010) 07 January 2015 (07-01-2015) 02 April 2015 (02-04-2015) 27 July 2012 (27-07-2012) 29 November 2013 (29-11-2013) 18 June 2009 (18-06-2009) 15 January 2013 (15-01-2013) 10 March 2011 (10-03-2011) 14 November 2013 (14-11-2013)
WO2013144811 A2	03 October 2013 (03-10-2013)	WO2013144811A2 WO2013144811A3 AU2013202911A1 CA2868551A1 CN104321077A EP2830654A2 US2013330414A1	03 October 2013 (03-10-2013) 28 November 2013 (28-11-2013) 10 October 2013 (10-10-2013) 03 October 2013 (03-10-2013) 28 January 2015 (28-01-2015) 04 February 2015 (04-02-2015) 12 December 2013 (12-12-2013)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K 7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

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

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 サンタマリア ペドロ

カナダ国 アルバータ州 カルガリー 31 ストリート ノースウェスト 3553 スイート
130 ユーティーアイ リミテッド パートナーシップ内

Fターム(参考) 4C076 CC07 DD21 DD29 EE59

4C085 AA02 BA01 DD75 EE01

4H045 AA11 AA30 BA10 BA15 BA50 BA57 CA40 DA86 EA20 FA10

FA74