(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0025909
(43) 공개일자 2022년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/69 (2017.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6937 (2017.08)
A61K 31/436 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7004760(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년05월02일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-7034102
원출원일자(국제) 2014년05월02일
심사청구일자 2019년05월02일
(85) 번역문제출일자 2022년02월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/036697
(87) 국제공개번호 WO 2014/179770
국제공개일자 2014년11월06일
(30) 우선권주장
61/819,517 2013년05월03일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
셀렉타 바이오사이언시즈, 인크.
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 그로브 스트리트 65
(72) 발명자
키시모토, 다까시, 케이
미국 02420 메사추세츠주 렉싱턴 쿨리지 애비뉴 46
(74) 대리인
양영준, 김영

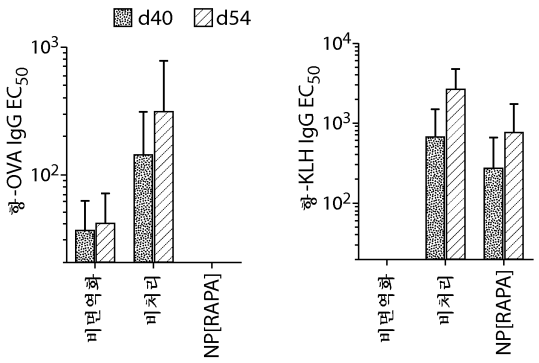
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **면역 관용의 유도를 위한 특정된 약역학적 유효 수명을 갖는 면역억제제 및 항원의 전달**

(57) 요 약

본 발명은 면역억제제, 및 면역억제제의 약역학상 유효한 윈도우 내로 투여되는 치료 거대분자를 제공하여 치료 거대분자에 대한 면역 관용을 유도하는 방법에 관한 것이다. 방법은 치료 거대분자에 특이적인 관용유발 면역 반응 발생을 위해 면역 반응을 이동시키도록 한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/6923 (2017.08)
A61K 9/5115 (2013.01)
A61K 9/5153 (2013.01)
A61P 37/06 (2018.01)

(30) 우선권주장
61/881,913 2013년09월24일 미국(US)
61/881,921 2013년09월24일 미국(US)
61/881,851 2013년09월24일 미국(US)
61/907,177 2013년11월21일 미국(US)
61/948,384 2014년03월05일 미국(US)
61/948,313 2014년03월05일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

합성 나노담체의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 35 U.S.C. §119 하에, 2013년 5월 3일에 출원된 미국 가출원 61/819517; 2013년 9월 24일에 출원된 61/881851; 2013년 9월 24일에 출원된 61/881913; 2013년 9월 24일에 출원된 61/881921; 2013년 11월 21일에 출원된 61/907177; 2014년 3월 5일에 출원된 61/948313; 및 2014년 3월 5일에 출원된 61/948384에 대한 이익을 주장하며, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 면역억제제, 및 면역억제제의 약역학상 유효한 윈도우 내로 투여되는 치료 거대분자를 제공하여 치료 거대분자에 대한 면역 관용을 유도하는 방법에 관한 것이다. 방법은 치료 거대분자에 특이적인 관용유발 면역 반응 발생에 유리하게 면역 반응을 이동시키도록 한다. 본원에 제공된 방법은 치료 거대분자의 투여가 바람직하지 않은 면역 반응을 초래하거나 초래할 것으로 예상되는 대상체에서 관용유발 면역 반응을 생성하는데 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0005] 치유적 치료, 예컨대 단백질 또는 효소 대체 요법은 특정한 치료에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 종종 초래한다. 이러한 바람직하지 않은 면역 반응은 면역억제제 약물의 사용을 통해 감소될 수 있다. 그러나, 통상의 면역억제제 약물은 광범위-작용성이다. 추가로, 면역억제를 유지하기 위해, 면역억제제 약물 요법은 일반적으로 일생의 과제이다. 불행하게도, 광범위-작용성 면역억제제의 사용은 중증 부작용, 예컨대 종양, 감염, 신독성 및 대사 장애의 위험과 연관된다. 따라서, 새로운 관용유발 요법이 유익할 것이다.

[0006] [배경기술이 개시된 선행기술문헌]

[0007] 미국공개공보 US 2012-0301498 (공개일: 2012.11.29.)

[0008] 미국공개공보 US 2010-0129439 (공개일: 2010.5.27.)

[0009] 미국공개공보 US 2010-0303850 (공개일: 2010.12.2.)

[0010] 미국공개공보 US 2006-0251711 (공개일: 2006.11.9.)

발명의 내용

[0011] 한 측면에서, 제1 부류의 대상체 중 한 대상체에게 치료 거대분자에 대하여 투여 약역학적 유효 수명을 제공하는 투여 용량으로 면역억제제를 투여하고, 대상체에게 면역억제제의 투여 약역학적 유효 수명의 지속기간 내에 치료 거대분자를 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 약역학적 유효 수명은 최소 20시간 내지 최대 1개월의 범위인 지속기간을 갖는다. 한 실시양태에서, 치료 거대분자 및 면역억제제는 서로 부착되어 있지 않다. 한 실시양태에서, 치료 거대분자는 합성 나노담체에 부착되어 있지 않다.

[0012] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 면역억제제의 시험 용량을 기준으로 하여 면역억제제의 투여 용량을 결정하는 것을 추가로 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 시험 용량은 치료 거대분자에 대하여, 제2 부류의 대상체에서 최소 20시간 내지 최대 1개월의 범위인 지속기간을 갖는 시험 약역학적 유효 수명을 갖는다.

[0013] 또 다른 측면에서, 치료 거대분자에 대한 관용을 유도하는 방법에 사용하기 위한, 본원에 제공된 면역억제제 조성물 중 어느 하나가 제공된다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 (a) 대상체에게 20시간 내지 1개월의 범위인 지속기간의 약역학적 유효 수명을 유발하는데 충분한 용량으로 면역억제제를 투여하고; (b) 상기 대상체에게 상기 약역학적 유효 수명의 지속기간 내에 치료 거대분자를 투여하는 것을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료 거대분자 및 면역억제제는 서로 부착되어 있지 않다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료 거대분자는 합성 나노담체에 부착되어 있지 않다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 방법 중 어느 하나, 예컨대 대상체에서 치료 거대분자에 대한 관용을 유도하는 방법에 사용하기 위한 의약의 제조를 위한 본원에 제공된 면역억제제 조성물 중 어느 하나의 용도가 제공된다. 한 실시양태에서, 방법은 (a) 대상체에게 20시간 내지 1개월의 범위인 지속기간의 약역학적 유효 수명을 유발하는데 충분한 용량으로 면역억제제를 투여하고; (b) 상기 대상체에게 상기 약역학적 유효 수명의 지속기간 내에 치료 거대분자를 투여하는 것을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료 거대분자 및 면역억제제는 서로 부착되어 있지 않다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 거대분자는 합성 나노담체에 부착되어 있지 않다.

[0015] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체-부착 면역억제제, 이식형 삼투 펌프, 이중특이적 항체 또는 이식형 중합체성 데포 물질을 포함하는 합성 나노담체를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체-부착 면역억제제를 포함한다.

[0016] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 나노입자, 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀젼, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자, 단백질 입자, 또는 나노물질의 조합을 포함하는 나노입자를 포함하며, 임의로 상기 나노입자는 지질-중합체 나노입자가다.

[0017] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제; TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능 억제제; P38 억제제; NF-κβ 억제제, 덱사메타손; TCPA-1; IKK VII; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제; 포스포디에스테라제 억제제; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제; PI3KB 억제제; 자가포식 억제제; 아릴 탄화수소 수용체 억제제; 프로테아솜 억제제 I (PSI); 산화 ATP; IDO, 비타민 D3; 시클로스포린; 아릴 탄화수소 수용체 억제제; 레스베라트롤; 아자티오퓨린; 6-메르캅토퓨린; 6-티오구아닌; FK506; 상글리페린 A; 살메테롤; 미코페놀레이트 모페틸; 아스피린 및 다른 COX 억제제; 니플룸산; 에스트리올; 또는 트리프톨리드를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 mTOR 억제제를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, mTOR 억제제는 라파마이신을 포함한다.

[0018] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체 중 면역억제제의 로딩은 합성 나노담체 중 물질의 총 건조 레시피 중량을 기준으로 하여 0.0001 wt% 내지 50 wt% (중량/중량)의 범위이다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체 중 면역억제제의 로딩은 합성 나노담체 중 물질의 총 건조 레시피 중량을 기준으로 하여 0.1 wt% 내지 10 wt% (중량/중량)의 범위이다.

[0019] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 단백질 또는 치료 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료 단백질은 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 시토카인, 성장 인자, 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체를 포함한다.

[0020] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 투여 약역학적 유효 수명은 최소 20시간 내지 최대 2주의 범위인 지속기간을 갖는다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 투여 약역학적 유효 수명은 최소 20시간 내지 최대 1주의 범위인 지속기간을 갖는다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 투여 약역학적 유효 수명은

최소 24시간 내지 최대 2일의 범위인 지속기간을 갖는다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 시험 약역학적 유효 수명은 최소 20시간 내지 최대 2주의 범위인 지속기간을 갖는다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 시험 약역학적 유효 수명은 최소 20시간 내지 최대 1주의 범위인 지속기간을 갖는다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 시험 약역학적 유효 수명은 최소 24시간 내지 최대 2일의 범위인 지속기간을 갖는다.

[0021] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제의 투여 용량은 알로메트릭 또는 이소메트릭 스케일링 기술의 사용과 함께, 면역억제제의 시험 용량을 기준으로 하여 결정된다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 제1 부류의 대상체 및 제2 부류의 대상체는 동일한 부류의 대상체이다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 제1 부류의 대상체 및 제2 부류의 대상체는 상이한 부류의 대상체이다.

[0022] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 나노입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 리포솜을 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속성 나노입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 금속성 나노입자는 금 나노입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체성 나노입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체인 중합체를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 폴리에스테르, 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 폴리사카라이드, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 폴리에스테르는 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 폴리에스테르 및 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함한다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 폴리에테르는 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0023] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체의 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균은 100nm 초과의 직경이다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 150nm 초과이다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 200nm 초과이다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 250nm 초과이다. 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 300nm 초과이다.

[0024] 본원에 제공된 방법, 면역억제제 또는 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체의 종횡비는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 초과이다.

[0025] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 면역억제제 및/또는 치료 거대분자 조성물 중 어느 하나를 제조하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 제조 방법은 치료 거대분자의 용량 또는 투여 형태를 제조하고, 면역억제제의 용량 또는 투여 형태를 제조하는 것을 포함한다. 제공된 제조 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제의 용량 또는 투여 형태를 제조하는 단계는 합성 나노담체에 면역억제제를 부착시키는 것을 포함한다. 제공된 제조 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 방법은 키트에서 면역억제제의 용량 또는 투여 형태와 치료 거대분자의 용량 또는 투여 형태를 조합하는 것을 추가로 포함한다.

[0026] 또 다른 측면에서, 제조 방법 중 어느 하나는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나를 수행하기 위한 의약을 제조하기 위한 것일 수 있고, 이러한 제조 방법이 또한 제공된다. 한 실시양태에서, 제조 방법은 치료 거대분자에 대한 관용을 유도하기 위한 의약을 제조하기 위한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 제조 방법은 치료 거대분자가 면역억제제의 약역학적 유효 수명 동안 투여되도록 하는 면역억제제 및 치료 거대분자의 투여를 위한 의약을 제조하기 위한 것이다. 본원에 제공된 제조 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 OVA 및 KLH가 투여된 캡슐화된 라파마이신에 대한 IgG 반응을 나타낸다.

도 2는 프로토콜 및 다양한 라파마이신 용량으로부터의 결과를 나타낸다.

도 3은 라파마이신에 부착된 합성 나노담체의 약역학적 유효 수명 내의 투여의 효과를 입증한다.

도 4는 캡슐화된 단백질과 병용 투여된, 라파마이신에 부착된 합성 나노담체 또는 GSK1059615에 부착된 나노담체의 효과를 입증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명을 상세하게 기재하기 전에, 본 발명이 특히 예시되는 물질 또는 공정 파라미터로 제한되는 것은 아니며, 그에 따라 당연히 달라질 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 본 발명의 특정한 실시양태를 기재하기 위한 것이고, 본 발명을 기재하는 대안적 용어의 사용을 제한하고자 하는 것은 아니라는 것이 이해되어야 한다.

[0029] 상기 또는 하기에 관계 없이, 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적상 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0030] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 단수 형태는 문맥상 분명하게 다르게 기술되지 않는 한, 복수 지시대상을 포함한다. 예를 들어, "중합체"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 분자의 혼합물 또는 상이한 분자량의 단일 중합체 종의 혼합물을 포함하고, "합성 나노담체"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 합성 나노담체 또는 다수의 이러한 합성 나노담체의 혼합물을 포함하고, "RNA 분자"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 RNA 분자 또는 다수의 이러한 RNA 분자의 혼합물을 포함하고, "면역억제제"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 물질 또는 다수의 이러한 면역억제제 분자의 혼합물을 포함하는 등이다.

[0031] 본원에 사용된 용어 "포함하다" 또는 그의 변형, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 임의의 언급된 완전체(예를 들어 양상, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 완전체의 군 (예를 들어 양상, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한)을 포함하지만 임의의 다른 완전체 또는 완전체의 군을 배제하는 것은 아님을 나타내는 것으로 판독된다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "포함하는"은 포괄적이고, 추가의 언급되지 않은 완전체 또는 방법/공정 단계를 배제하지 않는다.

[0032] 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 실시양태에서, "포함하는"은 "본질적으로 이루어진" 또는 "이루어진"으로 대체될 수 있다. 어구 "본질적으로 이루어진"은 명시된 완전체(들) 또는 단계 뿐만 아니라 청구 발명의 특색 또는 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 필요로 하는 것으로 본원에서 사용된다. 본원에 사용된 용어 "이루어진"은 언급된 완전체 (예를 들어 양상, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 완전체의 군 (예를 들어 양상, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한)만의 존재를 나타내기 위해 사용된다.

[0033] A. 서론

[0034] 본원에 제공된 방법은 면역억제제의 약역학상 유효한 윈도우 (또는 약역학적 유효 수명) 동안 치료 거대분자의 투여의 결과로서 개선된 치료 효과를 가져올 수 있다. 면역억제제는, 일부 실시양태에서, 합성 나노담체에 부착되어 투여된다. 본원에 제공된 방법 및 조성물은 치료 거대분자를 대상체에게 투여하는 경우에 면역억제제 요법의 이익을 최대화하도록 돕는다.

[0035] 본 발명자들은 예상외로 및 놀랍게도, 상기 언급된 문제 및 한계가 본원에 개시된 발명을 실시함으로써 극복될 수 있다는 것을 발견하였다. 특히, 본 발명자들은 예상외로, 대상체에게 치료 거대분자에 대하여 최소 20시간 내지 최대 1개월의 범위인 지속기간을 갖는 투여 약역학적 유효 수명을 제공하는 투여 용량으로 면역억제제를 투여하고, 대상체에게 면역억제제의 투여 약역학적 유효 수명의 지속기간 내에 치료 거대분자를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 면역억제제 및 치료 거대분자는 서로 커플링되어 있지 않고, 치료 거대분자는 합성 나노담체에 커플링되어 있지 않은 것인 방법을 제공하는 것이 가능하다는 것을 발견하였다. 관련 조성물이 또한 본원에 제공된다.

[0036] 본 발명은 본 발명을 실시하는데 유용한 다양한 조성물을 예시하는 하기 실시예에서 설명되고, 또한 본 발명의 특정 실시양태에서 약역학적 유효 수명의 기초가 되는 개념을 설명하는 데이터를 제공한다.

[0037] 본 발명은 하기에서 보다 상세하게 기재될 것이다.

[0038] B. 정의

[0039] "투여 용량" 또는 "면역억제제의 투여 용량"은 투여에 적합한 면역억제제의 용량을 의미한다. 실시양태에서, 투여 용량은 면역억제제의 시험 용량을 기준으로 한다. 실시양태에서, 투여 용량은 알로메트릭 스케일링 기술의 적용과 함께, 면역억제제의 시험 용량으로부터의 정보를 기준으로 하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [I. Mahmood, "Interspecies Pharmacokinetic Scaling: Principles and Application of Allometric Scaling", Pine House Publishers 2005]을 참조한다. 실시양태에서, 특히 제1 부류의 대상체 및 제2 부류의 대상체가 동일한 종으로부터인 경우에, 투여 용량은 이소메트릭 스케일링 기술의 적용과 함께, 면역억제제의 시험 용량으로부터의 정보를 기준으로 하여 결정될 수 있다. 실시양태에서, 투여 용량은 상기 기재된 바와 같이 알로메트릭 또는 이소메트릭 스케일링을 사용하여 간단하게 추정되기 보다는, 시험 용량을 기준으로 하여 제2 부류의 대상체에서의 직접적 실험에 의해 결정될 수 있다.

[0040] "투여하는 것" 또는 "투여" 또는 "투여한다"는 약리학상 유용한 방식으로 대상체에게 물질을 제공하는 것을 의미한다. 실시양태에서, "투여하는 것" 또는 "투여" 또는 "투여한다"는 "투여되도록 유발하는 것"을 포함한다. "투여되도록 유발하는 것"은 또 다른 당사자가 직접적으로 또는 간접적으로 물질을 투여하도록 유발하는 것, 압박하는 것, 권장하는 것, 보조하는 것, 유도하는 것 또는 지시하는 것을 의미한다.

[0041] "투여 약역학적 유효 수명"은 면역억제제의 투여 용량에서 및 제1 부류의 대상체에서 치료 거대분자에 대하여 결정된 면역억제제의 약역학적 유효 수명을 의미한다. 실시양태에서, 인용된 면역억제제는 치료 거대분자에 대하여, 최소 20시간 내지 최대 1개월, 바람직하게는 최소 20시간 내지 최대 2주, 바람직하게는 최소 20시간 내지 최대 1주, 바람직하게는 최소 20시간 내지 최대 5일, 바람직하게는 최소 20시간 내지 최대 3일, 바람직하게는 최소 24시간 내지 최대 2일의 범위인 지속기간을 갖는 투여 약역학적 유효 수명을 가질 수 있다. 바람직하게는, 치료 거대분자는 약역학적 유효 수명 동안에 투여되고, 따라서 일부 실시양태에서, 치료 거대분자의 투여가 약역학적 유효 수명의 지속기간의 종료 전에 일어난다면, 면역억제제의 투여와 동시에 또는 투여 직후에 투여될 수 있다.

[0042] 대상체에게의 투여에 대한 조성물 또는 용량의 문맥에서 "유효량"은 대상체에서 하나 이상의 목적하는 반응의 생성, 예를 들어 관용유발 면역 반응 (예를 들어, 치료 거대분자-특이적 B 세포의 증식, 활성화, 유도, 생존, 동원에서의 감소 또는 치료 거대분자-특이적 항체의 생산에서의 감소)이 생성되게 하는 조성물 또는 용량의 양을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 치료 유효량이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 유효량은 본원에 제공된 바와 같은 하나 이상의 목적하는 면역 효과 및/또는 치료 효과를 생성하는 본원에 제공된 조성물 또는 용량의 임의의 양이다. 이러한 양은 시험관내 또는 생체내 목적을 위한 것일 수 있다. 생체내 목적상, 상기 양은 임상의가 치료 거대분자 투여 및/또는 그에 대한 항원-특이적 면역 관용을 필요로 하는 대상체를 위해 임상 이익을 가질 수 있는 것으로 생각할 양일 수 있다.

[0043] 유효량은, 일부 실시양태에서 바람직하지 않은 면역 반응을 전적으로 방지하는 것을 수반하기도 하지만, 바람직하지 않은 면역 반응의 수준을 감소시키는 것을 수반할 수 있다. 유효량은 또한 바람직하지 않은 면역 반응의 발생을 지연시키는 것을 수반할 수 있다. 유효한 양은 또한 목적하는 치료 종점 또는 목적하는 치료 결과를 생성하는 양일 수 있다. 다른 실시양태에서, 유효량은 목적하는 반응, 예컨대 치료 종점 또는 결과의 수준을 증진시키는 것을 수반할 수 있다. 유효량은, 바람직하게는, 대상체에서 항원, 예컨대 치료 거대분자에 대한 관용 유발 면역 반응을 생성한다. 임의의 상기의 달성은 상용 방법에 의해 모니터링할 수 있다.

[0044] 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 유효량은 목적하는 반응을 대상체에서 지속시키는 양이다. 제공된 임의의 조성물 및 방법의 다른 실시양태에서, 유효량은 일정 기간 동안 측정가능한 바람직한 반응을 생성하는 양이다.

[0045] 유효량은, 물론, 건강 진료의의 지식 및 전문성 내에서 치료할 특정한 대상체; 상태, 질환 또는 장애의 중증도; 연령, 신체 조건, 크기 및 체중을 비롯한 개별 환자 파라미터; 치료의 지속기간; 공동 요법 (존재하는 경우)의 속성; 구체적인 투여 경로 및 유사 인자에 의존할 것이다. 이들 인자는 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 상용을 넘지 않는 실험으로 다룰 수 있다. 일반적으로, 최대 용량, 즉 타당한 의학적 판단에 따른 최고의 안전한 용량을 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 통상의 기술자는, 의학적 이유, 심리적 이유 또는 실질적으로 임의의 다른 이유로 환자가 더 낮은 용량 또는 관용가능한 용량을 고집할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0046] 일반적으로, 본 발명의 조성물 중 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 용량은 면역억제제 및/또는 치료 거대분

자의 양을 지칭한다. 대안적으로, 용량은 면역억제제의 목적하는 양을 제공하는 합성 나노담체의 수를 기초로 하여 투여될 수 있다.

[0047] "항원"은 B 세포 항원 또는 T 세포 항원을 의미한다. "항원의 유형(들)"은 동일하거나 실질적으로 동일한 항원 특징을 공유하는 분자를 의미한다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 지단백질, 당지질, 폴리뉴클레오티드, 폴리사카라이드일 수 있거나, 또는 세포에 함유되어 있거나 세포에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 예컨대 항원이 잘 정의되거나 특성화되지 않은 경우에, 항원은 세포 또는 조직 표본, 세포 파편, 세포 엑소솜, 조건화 배지 등에 함유되어 있을 수 있다.

[0048] "항원-특이적"은 항원 또는 그의 부분의 존재로 인해 초래되거나, 또는 항원을 특이적으로 인식하고 그에 결합하는 분자를 생성하는 임의의 면역 반응을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항원이 치료 거대분자를 포함하는 경우에, 항원-특이적은 치료 거대분자-특이적을 의미할 수 있다. 예를 들어, 면역 반응이 항원-특이적 항체 생산인 경우에, 항원 (예를 들어, 치료 거대분자)에 특이적으로 결합하는 항체가 생산된다. 또 다른 예로서, 면역 반응이 항원-특이적 B 세포 또는 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성인 경우에, 증식 및/또는 활성은 단독으로 또는 MHC 분자, B 세포 등과 복합체로서 항원 또는 그의 부분의 인식으로부터 초래된다.

[0049] "면역 반응을 평가하는 것"은 시험관내 또는 생체내 면역 반응의 수준, 존재 또는 부재, 감소, 증가 등의 임의의 측정 또는 결정을 지칭한다. 이러한 측정 또는 결정은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 샘플에 대해 수행될 수 있다. 이러한 평가는 본원에 제공되거나 또는 달리 관련 기술분야에 공지되어 있는 임의의 방법으로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 면역 반응을 평가하는 단계를 포함할 수 있다.

[0050] "부착하다" 또는 "부착된" 또는 "커플링시키다" 또는 "커플링된" (등)은 하나의 개체 (예를 들어 모이어티)를 또 다른 것과 화학적으로 회합시키는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 부착은 공유적이며, 이는 부착이 2개의 개체 사이에 공유 결합이 존재한다는 맥락에서 일어남을 의미한다. 비-공유적 실시양태에서, 비-공유적 부착은 전하 상호작용, 친화성 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 숙주-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 적층 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 및/또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-공유적 상호작용에 의해 매개된다. 실시양태에서, 캡슐화는 부착의 형태이다.

[0051] 실시양태에서, 치료 거대분자 및 면역억제제는 서로 부착되지 않으며, 이는 치료 거대분자 및 면역억제제가 하나를 또 다른 것에 화학적으로 회합시키고자 특이적으로 의도되는 과정의 대상이 아님을 의미한다. 실시양태에서, 치료 거대분자 및/또는 면역억제제는 합성 나노담체에 부착되지 않으며, 이는 치료 거대분자 (및/또는 면역억제제) 및 합성 나노담체가 하나를 또 다른 것에 화학적으로 회합시키고자 특이적으로 의도되는 과정의 대상이 아님을 의미한다.

[0052] 본원에 사용된 "평균"은 달리 나타내지 않는 한 산술 평균을 지칭한다.

[0053] "대상체의 부류"는 하나 이상의 공통 특성 (예컨대, 생물학적 분류, 식습관, 수면 습관, 면역계 생물학, 위치에서의 물리적 존재 등)을 공유하는 대상체의 군별화를 의미한다. 부류는 꼭 표준 생물학 분류를 따를 필요는 없다. 한 부류의 대상체에서 결과를 결정하는 것이 또 다른 부류의 대상체에서 달성가능한 결과를 추정하는데 유용할 수 있다 (예를 들어 인간 질환을 예측 또는 탐구하는데 있어서 동물 모델의 사용).

[0054] "결정하는 것" 또는 "결정하다"는 사실 관계를 확인하는 것을 의미한다. 결정은 실험을 수행하는 것 또는 예측하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다수의 방식으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 면역억제제 또는 치료 거대분자의 용량은 시험 용량으로 출발하고 공지된 스케일링 기술 (예컨대 알로메트릭 또는 이소메트릭 스케일링)을 사용하여 투여를 위한 용량을 결정함으로써 결정될 수 있다. 이는 본원에 제공된 바와 같은 프로토콜을 결정하는데 또한 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 용량은 대상체에서 다양한 용량을 시험하고, 즉 경험에 기초한 직접 실험을 통하고, 데이터를 유도함으로써 결정될 수 있다. 실시양태에서, "결정하는 것" 또는 "결정하다"는 "결정되도록 유발하는 것"을 포함한다. "결정되도록 유발하는 것"은 직접적으로 또는 간접적으로, 또는 분명하게 또는 함축적으로를 포함하여, 개체와 협력하여 개체가 사실 관계를 확인하도록 유발하는 것, 압박하는 것, 권장하는 것, 보조하는 것, 유도하는 것 또는 지시하는 것 또는 작용하는 것을 의미한다.

[0055] "투여 형태"는 대상체에 투여하는데 적합한 매체, 담체, 비히클, 또는 장치 내의 약리학적 및/또는 면역학적 활성 물질을 의미한다. 본원에 제공된 조성물 또는 용량 중 어느 하나는 투여 형태로 존재할 수 있다.

[0056] "용량"은 주어진 시간 동안 대상체에게 투여하기 위한 약리학적 및/또는 면역학적 활성 물질의 특정 양을 지칭

한다.

[0057] "캡슐화하다"는 물질의 적어도 한 부분을 합성 나노담체 내에 봉입하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 물질은 합성 나노담체 내에 완전히 봉입된다. 다른 실시양태에서, 캡슐화되는 물질의 대부분 또는 모두는 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출되지 않는다. 다른 실시양태에서, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% (중량/중량) 이하가 국부 환경에 노출된다. 캡슐화는, 물질의 대부분 또는 모두가 합성 나노담체의 표면 상에 놓이고 물질이 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출된 채로 있게 되는 흡수와 구별된다.

[0058] "생성하는 것"은 작용, 예컨대 생리학적 또는 면역학적 반응 (예를 들어, 관용유발 면역 반응)이 일어나도록 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 유발하는 것을 의미한다.

[0059] "대상체를 확인하는 것"은 임상의가 대상체를 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트로부터 이익을 얻을 수 있는 것으로서 인식하도록 하는 임의의 작용 또는 일련의 작용이다. 바람직하게는, 확인된 대상체는 치료 거대분자로부터의 치료 이익을 필요로 하고/거나 항-치료 거대분자-특이적 항체 반응이 본원에 제공된 바와 같이 일어났거나 또는 일어날 것으로 예상되거나 (또는 일어날 위험이 있다). 작용 또는 일련의 작용은 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 본원에 제공된 바와 같은 방법, 조성물 또는 키트를 필요로 하는 대상체를 확인하는 것을 추가로 포함한다.

[0060] "면역억제제"는 APC가 면역억제 효과 (예를 들어, 관용유발 효과)를 갖도록, 또는 T 세포 또는 B 세포가 억제되도록 하는 화합물을 의미한다. 면역억제 효과는 일반적으로 바람직하지 않은 면역 반응을 감소, 억제 또는 방지하거나 또는 목적하는 면역 반응, 예컨대 조절 면역 반응을 촉진하는 APC에 의한 시토카인 또는 다른 인자의 생산 또는 발현을 지칭한다. APC가 이러한 APC에 의해 제시된 항원을 인식하는 면역 세포에 대해 (면역억제 효과 하에) 면역억제 기능을 획득한 경우에, 면역억제 효과는 제시된 항원에 대해 특이적인 것으로 언급된다. 어떠한 특정한 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 면역억제 효과는 면역억제제가 APC에게, 바람직하게는 항원의 존재 하에 전달된 결과인 것으로 여겨진다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 APC가 하나 이상의 면역 이펙터 세포에서 조절 표현형의 촉진을 유발하는 것이다. 예를 들어, 조절 표현형은 항원-특이적 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 생산, 유도, 자극 또는 동원의 억제, 항원-특이적 항체의 생산의 억제, Treg 세포 (예를 들어, CD4+CD25highFoxP3+ Treg 세포)의 생산, 유도, 자극 또는 동원 등을 특징으로 할 수 있다. 이는 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 조절 표현형으로의 전환의 결과일 수 있다. 이는 또한 다른 면역 세포, 예컨대 CD8+ T 세포, 대식세포 및 iNKT 세포에서의 FoxP3의 유도의 결과일 수 있다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 항원을 프로세싱한 후 APC의 반응에 영향을 미치는 것이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 항원의 프로세싱을 방해하는 것이 아니다. 추가 실시양태에서, 면역억제제는 아폽토시스-신호전달 분자가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 인지질이 아니다.

[0061] 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 트리코스타틴 A; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF-κβ 억제제, 예컨대 6Bio, 넥사메타손, TCPA-1, IKK VII; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제 (PGE2), 예컨대 미소프로스톨; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제 (PDE4), 예컨대 롤리프람; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제; PI3KB 억제제, 예컨대 TGX-221; 자가포식 억제제, 예컨대 3-메틸아데닌; 아릴 탄화수소 수용체 억제제; 프로테아솜 억제제 I (PSI); 및 산화 ATP, 예컨대 P2X 수용체 차단제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한 IDO, 비타민 D3, 시클로스포린, 예컨대 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오퓨린 (Aza), 6-메르캅토퓨린 (6-MP), 6-티오구아닌 (6-TG), FK506, 상글리페린 A, 살메테롤, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF), 아스피린 및 다른 COX 억제제, 니플룸산, 에스트리올, 메토트렉세이트 및 트리프톨리드를 포함한다. 실시양태에서, 면역억제제는 본원에 제공된 임의의 작용제를 포함할 수 있다.

[0062] 면역억제제는 APC에 대해 면역억제 효과를 직접적으로 제공하는 화합물일 수 있거나, 또는 면역억제 효과를 간접적으로 (즉, 투여 후 일부 방식으로 프로세싱된 후에) 제공하는 화합물일 수 있다. 따라서 면역억제제는 본원에 제공된 임의의 화합물의 전구약물 형태를 포함한다.

[0063] 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 실시양태에서, 본원에 제공된 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다. 바람직한 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체의 구조를 구성하는 물질에 부가된 요소이

다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 중합체로 구성된 경우에, 면역억제제는 하나 이상의 중합체에 부가되고 부착된 화합물이다. 또 다른 예로서, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 지질로 구성된 경우에, 면역억제제는 또한 하나 이상의 지질에 부가되고 부착된다. 실시양태에서, 예컨대 합성 나노담체 물질이 또한 면역억제 효과를 생성하는 경우에, 면역억제제는 면역억제 효과를 생성하는 합성 나노담체 물질에 부가되어 존재하는 요소이다.

[0064] 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 실시양태에서, 면역억제제는 나노결정질 형태와 같은 형태 내에 존재하고 그에 의해 면역억제제 그 자체의 형태는 입자이거나 입자-유사이다. 실시양태에서, 이러한 형태는 바이러스 또는 다른 외래 병원체를 모방한다. 많은 약물이 나노화되어 있고, 이러한 약물 형태를 생산하는 적절한 방법이 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다. 약물 나노결정, 예컨대 나노결정질 라파마이신은 통상의 기술자에게 공지되어 있다 (Katteboinaa, et al. 2009, International Journal of PharmTech Resesarch; Vol. 1, No. 3; pp682-694). 본원에 사용된 "약물 나노결정"은 담체 또는 매트릭스 물질을 포함하지 않는 약물 (예를 들어, 면역억제제)의 형태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 약물 나노결정은 90%, 95%, 98% 또는 99% 또는 그 초과의 약물을 포함한다. 약물 나노결정을 생산하는 방법은, 제한 없이, 밀링, 고압 균질화, 침전, 분무 건조, 초임계 용액의 급속 팽창 (RESS), 나노에지(Nanoedge)® 기술 (백스터 헬스케어(Baxter Healthcare)) 및 나노크리스탈 테크놀로지(Nanocrystal Technology)™ (엘란 코포레이션(Elan Corporation))을 포함한다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 또는 안정화제는 약물 나노결정의 입체적 또는 정전기적 안정성을 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서,면역억제제의 나노결정 또는 나노결정질 형태는 면역억제제, 특히 불용성 또는 불안정성인 면역억제제의 용해도, 안정성 및/또는 생체이용률을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노결정질 형태의 면역억제제의 투여는 치료 거대분자에 대한 관용을 유도한다.

[0065] 다른 예시적인 면역억제제는 소분자 약물, 천연 산물, 항체 (예를 들어, CD20, CD3, CD4에 대한 항체), 생물제제-기반 약물, 탄수화물-기반 약물, 나노입자, 리포솜, RNAi, 안티센스 핵산, 압타머, 메토트렉세이트, NSAID; 핑골리모드; 나탈리주맙; 알렘투주맙; 항-CD3; 타크롤리무스 (FK506); 시토카인 및 성장 인자, 예컨대 TGF-β 및 IL-10 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 제공된 측면 또는 실시양태 중 어느 하나에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 부착될 수 있거나 또는 이식형 삼투 펌프의 형태, 예컨대 알젯(ALZET)® 이식형 삼투 펌프, 이식형 데포 물질 또는 이중특이적 항체 (항-CD22 + Ag, 항-GITR + Ag 또는 항-LAG3 + Ag)로부터 유래될 수 있다. 추가의 면역억제제는 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명은 이러한 점에서 제한되지 않는다.

[0066] 합성 나노담체에 부착된 경우의 면역억제제의 "로드"는, 합성 나노담체 중 물질의 총 건조 레시피 중량을 기준으로 한 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 양 (중량/중량)이다. 일반적으로, 로드는 합성 나노담체 집단에 대한 평균으로 계산된다. 한 실시양태에서, 면역억제제의 로드는 합성 나노담체에 대해 평균 0.0001wt% 내지 99wt%의 범위이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제의 로드는 0.01wt% 내지 50wt%의 범위이다. 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1wt% 내지 20wt%이다. 추가 실시양태에서, 면역억제제의 로드는 0.1wt% 내지 10wt%의 범위이다. 추가 실시양태에서, 면역억제제의 로드는 1wt% 내지 10wt%의 범위이다. 추가 실시양태에서, 로드는 7wt% 내지 20wt%이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제의 로드는 합성 나노담체 집단에 대해 평균 적어도 0.1wt%, 적어도 0.2wt%, 적어도 0.3wt%, 적어도 0.4wt%, 적어도 0.5wt%, 적어도 0.6wt%, 적어도 0.7wt%, 적어도 0.8wt%, 적어도 0.9wt%, 적어도 1wt%, 적어도 2wt%, 적어도 3wt%, 적어도 4wt%, 적어도 5wt%, 적어도 6wt%, 적어도 적어도 7wt%, 적어도 8wt%, 적어도 9wt%, 적어도 10wt%, 적어도 11wt%, 적어도 12wt%, 적어도 13wt%, 적어도 14wt%, 적어도 15wt%, 적어도 16wt%, 적어도 17wt%, 적어도 18wt%, 적어도 19wt%, 적어도 20wt%, 적어도 25wt%, 적어도 30wt%, 적어도 40wt%, 적어도 50wt%, 적어도 60wt%, 적어도 70wt%, 적어도 80wt%, 적어도 90wt%, 적어도 95wt%, 적어도 96wt%, 적어도 97wt%, 적어도 98wt% 또는 적어도 99wt%의 범위이다. 추가 실시양태에서, 면역억제제의 로드는 합성 나노담체 집단에 대해 평균 0.1wt%, 0.2wt%, 0.3wt%, 0.4wt%, 0.5wt%, 0.6wt%, 0.7wt%, 0.8wt%, 0.9wt%, 1wt%, 2wt%, 3wt%, 4wt%, 5wt%, 6wt%, 7wt%, 8wt%, 9wt%, 10wt%, 11wt%, 12wt%, 13wt%, 14wt%, 15wt%, 16wt%, 17wt%, 18wt%, 19wt% 또는 20wt%이다. 상기 실시양태의 일부 실시양태에서, 면역억제제의 로드는 합성 나노담체 집단에 대해 평균 25wt% 이하이다. 실시양태에서, 로드는 실시예에 기재될 수 있는 바와 같이 또는 달리 관련 기술분야에 공지되어 있는 바와 같이 계산된다.

[0067] 일부 실시양태에서, 면역억제제의 형태가 그 자체로 입자 또는 입자-유사, 예컨대 나노결정질 면역억제제인 경우에, 면역억제제의 로드는 입자 등으로의 면역억제제의 양 (중량/중량)이다. 이러한 실시양태에서, 로드는 97%, 98%, 99% 또는 그 초과에 접근할 수 있다.

[0068] "합성 나노담체의 최대 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 나노담체의 가장 큰 치수를 의미한다. "합성 나노담체의 최소 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 합성 나노담체의 가장 작

은 치수를 의미한다. 예를 들어, 구형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수는 실질적으로 동일할 것이고, 그의 직경의 크기일 것이다. 유사하게, 입방형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최소 치수는 그의 높이, 가로 또는 세로 중 가장 작은 것일 것이고, 합성 나노담체의 최대 치수는 그의 높이, 가로 또는 세로 중 가장 큰 것일 것이다. 한 실시양태에서, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상이다. 한 실시양태에서, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 5 μm 이하이다. 바람직하게는, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 110 nm 초과, 보다 바람직하게는 120 nm 초과, 보다 바람직하게는 130 nm 초과, 보다 더 바람직하게는 150 nm 초과이다. 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수의 종횡비는 실시양태에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 최대 대 최소 치수의 종횡비는 1:1 내지 1,000,000:1, 바람직하게는 1:1 내지 100,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 10,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1000:1, 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 100:1, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 10:1로 달라질 수 있다. 바람직하게는, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 3 μm 이하, 보다 바람직하게는 2 μm 이하, 보다 바람직하게는 1 μm 이하, 보다 바람직하게는 800 nm 이하, 보다 바람직하게는 600 nm 이하, 보다 더 바람직하게는 500 nm 이하이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상, 보다 바람직하게는 120 nm 이상, 보다 바람직하게는 130 nm 이상, 보다 바람직하게는 140 nm 이상, 보다 더 바람직하게는 150 nm 이상이다. 합성 나노담체 치수 (예를 들어, 유효 직경)의 측정치는, 일부 실시양태에서 합성 나노담체를 액체 (통상적으로 수성) 매질에 현탁시키고 동적 광 산란 (DLS)을 사용함으로써 (예를 들어, 브룩하벤 제타팔스 (Brookhaven ZetaPALS) 기기를 사용함) 수득할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 현탁액은 수성 완충제로부터 정제수로 희석되어 대략 0.01 내지 0.1 mg/mL의 최종 합성 나노담체 현탁액 농도가 달성될 수 있다. 희석된 현탁액은 내부에서 직접 제조될 수 있거나, 또는 DLS 분석에 적합한 큐벳으로 옮겨질 수 있다. 이어서 큐벳을 DLS 내에 놓고, 제어 온도와 평형이 되도록 한 다음, 충분한 시간 동안 스캐닝하여, 매질의 점도 및 샘플의 굴절률에 대한 적절한 입력을 기반으로 하여 안정하고 재생가능한 분포를 획득할 수 있다. 이어서 유효 직경 또는 분포의 평균을 보고한다. 높은 종횡비 또는 비-구형 합성 나노담체의 유효 크기를 결정하는 것은 보다 정확한 측정치를 수득하기 위해 확대 기술, 예컨대 전자 현미경검사를 필요로 할 수 있다. 합성 나노담체의 "치수" 또는 "크기" 또는 "직경"은 예를 들어 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균을 의미한다.

[0069] "비-메톡시-종결 중합체"는 메톡시 이외의 모이어티로 종결된 적어도 하나의 말단을 갖는 중합체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 메톡시 이외의 모이어티로 종결된 적어도 2개의 말단을 갖는다. 다른 실시양태에서, 중합체는 메톡시로 종결된 어떠한 말단도 갖지 않는다. "비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체"는 양쪽 말단에서 메톡시를 갖는 선형 플루로닉 중합체 이외의 중합체를 의미한다. 본원에 제공된 바와 같은 중합체성 나노입자는 비-메톡시-종결 중합체 또는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체를 포함할 수 있다.

[0070] "제약상 허용되는 부형제" 또는 "제약상 허용되는 담체"는 조성물을 제제화하기 위해 약리학적 활성 물질과 함께 사용되는 약리학적 불활성 물질을 의미한다. 제약상 허용되는 부형제는 사카라이드 (예컨대 글루코스, 락토스 등), 보존제, 예컨대 항미생물제, 재구성 보조제, 착색제, 염수 (예컨대 포스페이트 완충 염수) 및 완충제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지되어 있는 다양한 물질을 포함한다.

[0071] "약역학적 유효 수명"은 대상체에게 면역억제제를 투여한 후인 제1 용량-의존성 기간을 의미하며, 그 동안에 항원의 투여는 항원의 투여 후 5일부터 3개월에 이르는 시간에 시작하는 제2 주기 동안에 측정가능한 대상체에서의 항원-특이적 관용을 일으킨다. 실시양태에서, 약역학적 유효 수명은 하나 이상의 대상체, 예컨대 제1 부류의 대상체에서 측정된 개별 약역학적 유효 수명의 평균으로서 측정될 수 있고, 각각의 측정된 대상체에서 단일회 또는 다수회로 측정될 수 있다.

[0072] "제공하는 것"은 본 발명의 실시를 위해 필요한 품목 또는 일련의 품목 또는 방법을 공급하는, 개체가 수행하는 작용 또는 일련의 작용을 의미한다. 작용 또는 일련의 작용은 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다.

[0073] "대상체를 제공하는 것"은 임상의가 대상체와 접촉하게 하고 그에게 본원에 제공된 조성물을 투여하거나, 또는 그에 대해 본원에 제공된 방법을 수행하게 하는 임의의 작용 또는 일련의 작용이다. 바람직하게는, 대상체는 치료 거대분자 투여 및 그에 대한 항원-특이적 관용을 필요로 하는 것이다. 작용 또는 일련의 작용은 직접적으

로 스스로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 대상체를 제공하는 것을 추가로 포함한다.

[0074] "대상체"는 온혈 포유동물, 예컨대 인간 및 영장류; 조류; 가정용 또는 농장 동물, 예컨대 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험 동물, 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그; 어류; 파충류; 동물원 및 야생 동물 등을 비롯한 동물을 의미한다.

[0075] "합성 나노담체(들)"는 천연에서는 발견되지 않고, 크기가 5 마이크로미터 이하인 적어도 하나의 치수를 갖는 개별 물체를 의미한다. 알부민 나노입자가 일반적으로 합성 나노담체로서 포함되지만, 특정 실시양태에서 합성 나노담체는 알부민 나노입자를 포함하지 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 키토산을 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질-기반 나노입자가 아니다. 추가 실시양태에서, 합성 나노담체는 인지질을 포함하지 않는다.

[0076] 합성 나노담체는 1개 또는 다수의 지질-기반 나노입자 (본원에서 지질 나노입자, 즉 그의 구조를 구성하는 대부분의 물질이 지질인 나노입자로도 지칭됨,), 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀젼, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 (즉, 주로 바이러스 구조 단백질로 구성되지만 감염성이지 않거나 낮은 감염성을 갖는 입자), 펩티드 또는 단백질-기반 입자 (본원에서 단백질 입자, 즉 그의 구조를 구성하는 대부분의 물질이 펩티드 또는 단백질인 입자로도 지칭됨) (예컨대 알부민 나노입자) 및/또는 지질-중합체 나노입자와 같이 나노물질의 조합을 사용하여 개발된 나노입자일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 합성 나노담체는 구형, 입방형, 피라미드형, 장방형, 실린더형, 도넛형 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 상이한 형상일 수 있다. 본 발명에 따른 합성 나노담체는 하나 이상의 표면을 포함한다. 본 발명의 실시에 사용하기 위해 적합화될 수 있는 예시적인 합성 나노담체는 (1) 미국 특허 5,543,158 (Gref et al.)에 개시된 생분해성 나노입자, (2) 공개 미국 특허 출원 20060002852 (Saltzman et al.)의 중합체성 나노입자, (3) 공개 미국 특허 출원 20090028910 (DeSimone et al.)의 리소그래피로 구축된 나노입자, (4) WO 2009/051837 (von Andrian et al.)의 개시내용, (5) 공개 미국 특허 출원 2008/0145441 (Penades et al.)에 개시된 나노입자, (6) 공개 미국 특허 출원 20090226525 (de los Rios et al.)에 개시된 단백질 나노입자, (7) 공개 미국 특허 출원 20060222652 (Sebbel et al.)에 개시된 바이러스-유사 입자, (8) 공개 미국 특허 출원 20060251677 (Bachmann et al.)에 개시된 핵산 부착 바이러스-유사 입자, (9) WO2010047839A1 또는 WO2009106999A2에 개시된 바이러스-유사 입자, (10) 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]에 개시된 나노침전 나노입자, (11) 미국 공개 2002/0086049에 개시된 아폽토시스 세포, 아폽토시스체 또는 합성 또는 반합성 모방체, 또는 (12) 문헌 [Look et al., Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice" J. Clinical Investigation 123(4):1741-1749(2013)]의 것을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 초과, 또는 1:10 초과의 종횡비를 가질 수 있다.

[0077] 약 100 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화시키는 히드록실 기가 있는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 활성화시키는 히드록실 기가 아닌 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 실질적으로 활성화시키는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 실질적으로 활성화시키지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화시키는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 활성화시키지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 바이러스-유사 입자를 배제한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 초과, 또는 1:10 초과의 종횡비를 가질 수 있다.

[0078] "시험 용량" 또는 "면역억제제의 시험 용량"은 시험을 위한 면역억제제의 용량을 의미한다.

[0079] "시험 약역학적 유효 수명"은 면역억제제의 시험 용량에서 및 제2 부류의 대상체에서 치료 거대분자에 대해 결정된 면역억제제의 약역학적 유효 수명을 의미한다. 실시양태에서, 인용된 면역억제제는 치료 거대분자에 대하여, 최소 20시간 내지 최대 1개월, 바람직하게는 최소 20시간 내지 최대 2주, 바람직하게는 최소 20시간 내지 최대 1주, 바람직하게는 최소 20시간 내지 최대 5일, 바람직하게는 최소 20시간 내지 최대 3일, 바람직하게는 최소 24시간 내지 최대 2일의 범위인 지속기간을 갖는 시험 약역학적 유효 수명을 가질 수 있다.

[0080] "치료 거대분자"는 대상체에게 투여될 수 있고 치료 효과를 갖는 임의의 단백질, 탄수화물, 지질 또는 핵산을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체에게의 치료 거대분자의 투여는 항-치료 거대분자-특이적 항체의 생산을 비롯한 바람직하지 않은 면역 반응을 생성할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 바와 같은 치료 거대분자의 투여는, 일부 실시양태에서, 예컨대 치료 거대분자에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 감소시킴으로써 그의 치료 유효성을 증진시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 폴리뉴클레오티드 또는 치료 단백질일 수 있다.

[0081] "치료 폴리뉴클레오티드"는 대상체에게 투여될 수 있고 치료 효과를 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드-기반 요법을 의미한다. 이러한 요법은 유전자 침묵을 포함한다. 이러한 요법의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 네이키드 RNA (메신저 RNA, 변형된 메신저 RNA, 및 RNAi 형태 포함)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다른 치료 폴리뉴클레오티드의 예가 본원의 다른 곳에서 제공된다. 치료 폴리뉴클레오티드는 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산될 수 있고, 또한 무세포를 사용하거나 완전 합성 시험관내 방법으로부터 수득될 수 있다. 따라서, 대상체는 임의의 상기의 것에 의한 치료를 필요로 하는 임의의 대상체를 포함한다. 이러한 대상체는 임의의 상기의 것을 제공받을 것을 포함한다.

[0082] "치료 단백질"은 대상체에게 투여될 수 있고 치료 효과를 갖는 임의의 단백질 또는 단백질-기반 요법을 의미한다. 이러한 요법은 단백질 대체 및 단백질 보충 요법을 포함한다. 이러한 요법은 또한 외인성 또는 외래 단백질의 투여, 항체 요법, 및 세포 또는 세포-기반 요법을 포함한다. 치료 단백질은 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 시토카인, 성장 인자, 모노클로날 항체, 항체-약물 접합체 및 폴리클로날 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 치료 단백질의 예가 본원의 다른 곳에서 제공된다. 치료 단백질은 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산될 수 있고, 이러한 세포로부터 수득될 수 있거나 이러한 세포의 형태로 투여될 수 있다. 실시양태에서, 치료 단백질은 포유동물 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 박테리아 세포, 식물 세포, 트랜스제닉 동물 세포, 트랜스제닉 식물 세포 등 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산된다. 치료 단백질은 이러한 세포에서 재조합적으로 생산될 수 있다. 치료 단백질은 바이러스 형질전환된 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 대상체는 임의의 상기의 것에 의한 치료를 필요로 하는 임의의 대상체를 포함한다. 이러한 대상체는 임의의 상기의 것을 제공받을 것을 포함한다.

[0083] C. 방법의 실시에 유용한 조성물

[0084] 바람직하지 않은 면역 반응의 생성을 감소시키고 치료 거대분자에 특이적인 관용유발 면역 반응의 생성을 촉진하는데 유용한 방법 및 관련 조성물이 본원에 제공된다. 방법 및 조성물은 면역억제제의 치료 거대분자에 대한 약역학적 유효 수명 동안 치료 거대분자를 투여함으로써 면역억제제 투여의 이익을 최대화하는 것을 돕는다. 본 발명의 방법은 치료 거대분자에 대한 관용유발 면역 반응이 요망되는 대상체로 실시될 수 있다. 이러한 대상체는 치료 거대분자가 투여될 자들을 포함한다. 치료 거대분자에 대하여 최소 20시간 내지 최대 1개월 범위의 지속기간을 갖는 약역학적 유효 수명을 갖는 면역억제제가 본 발명의 실시에서 특히 유용하다. 다양한 면역억제제가 본 발명의 실시에 사용될 수 있다.

[0085] 특정 실시양태에서, 인용된 면역억제제는 장치, 예컨대 이식형 삼투 펌프의 형태일 수 있다. 본 발명의 실시에 사용될 수 있는 그러한 하나의 이식형 삼투 펌프는 알젯® 브랜드 이식형 삼투 펌프 (두렉트 코포레이션(Durect Corporation) (캘리포니아주 쿠퍼티노)으로부터 이용가능함)이다. 알젯® 브랜드 삼투 펌프는 외부 접속, 빈번한 취급 또는 반복 투약의 필요없이 1일 내지 4주간 제어된 속도로 약물, 호르몬 및 다른 시험 작용제를 연속적으로 전달할 수 있는 소형 이식형 삼투 펌프이다. 이들 주입 펌프는 피부 하에 또는 신체에 이식되는 경우에 전신 투여를 위해 사용될 수 있다. 그들은 정맥내, 뇌내 또는 동맥내 주입을 위해 또는 약물 또는 시험 작용제의 효과가 특정한 조직 또는 기관에 국재화되는 표적화 전달을 위해 카테터에 부착될 수 있다. 펌프는 펌프와 동물의 체액 사이의 삼투성 차이에 의해 동력을 얻으므로, 어떠한 외부 동력 공급원도 요구하지 않는다. 알젯 펌프는 척수, 비장, 간, 기관 또는 조직 이식체를 포함하는 매우 다양한 부위, 및 상처 치유 부위로의 전달을 표적화하는데 사용되어왔다. 예를 들어, 문헌 [S. M. Stepkowski et al., "Inhibition of host-versus-graft and graft-versus-host responses after small bowel transplantation in rats by rapamycin." Transplantation (1992) 53(-2-): 258-264]을 참조한다. 알젯® 브랜드 삼투 펌프에 관한 다른 정보는 alzet.com에서 이용가능하다.

[0086] 실시양태에서, 인용된 면역억제제는 이중특이적 항체 (BsAb)의 형태일 수 있으며, 이때 하나의 가변 영역은 면역 세포 상의 관심 거대분자에 선택적으로 결합하는 항원에 대한 수용체 (예컨대 BCR)를 표적화하도록 설계되어 있고, 다른 가변 영역은 관용을 자극하는데 관여하는 면역 세포 상의 표적 (예컨대 세포 표면 수용체)에 결합하

도록 설계되어 있다. 또 다른 실시양태에서, BsAb는 관심 거대분자에 결합하는 또 다른 항체의 가변 영역을 표적화하도록 설계된 하나의 가변 영역 (항-이디오타입 영역 또는 항체) 및 관용을 자극하는데 관여하는 면역 세포 상의 표적 (예컨대 세포 표면 수용체)에 결합하도록 설계된 다른 가변 영역으로 이루어진다. 두 결합 특이성의 조합으로, BsAb 면역억제제의 선택성 및 효력이 개선될 수 있고, 관심 거대분자의 면역 관용이 유도될 수 있다. 실시양태에서, 면역억제제 BsAb 표적은 B-세포 상의 CD-19, CD-20, CD-21, CD-22 (참고문헌: M. R. Clatworthy, American Journal of Transplantation 2011; 11: 1359-1367) 및 GITR (글루코코르티코이드-유도 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체 패밀리-관련 유전자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. GITR은 TNF 수용체 패밀리 구성원에 대한 상동성을 갖는 유형 I 막횡단 단백질이다. GITR은 휴지 CD4+ 및 CD8+ T 세포 상에서 낮은 수준으로 발현되고, T-세포 활성화 후에 상향조절된다. GITR의 라이게이션은 특히 준최적 T-세포 수용체 (TCR) 자극의 상황에서 CD4+ 및 CD8+T-세포 둘 다의 증식 및 이펙터 기능을 증진시키는 공동자극 신호를 제공한다. 또한 GITR은 조절 T 세포 (Treg) 상에서 높은 수준으로 구성적으로 발현되고, Treg 억제를 극복하기 위한 잠재적 표적으로서 조사되었다. GITR 리간드를 사용하는 GITR을 통한 신호전달은 Treg의 억제 효과를 없애고, 자가반응성 및 동종반응성 T-세포 반응을 증진시키고, 자가면역을 악화시킨다. 또 다른 BsAb 표적은 LAG3 (일명 CD223)을 포함할 수 있다. CD223은 CD4보다 더 높은 친화도로 MHC 부류 II에 결합하고, 이러한 상호작용은 T-세포 활성화와 항상성 증식의 음성 조절에 관여하는 것으로 생각된다. 또한, CD223은 CD4+CD25+ 조절 T 세포에 의해 발현되고, 관련 기술분야에 공지된 다른 상기 표적에 추가로 CD223이 상기 T 세포의 조절 기능에 관여할 수 있는 것으로 시사되었다.

[0087] 특정 실시양태에서, 인용된 면역억제제는 이식형 중합체성 데포 물질의 형태일 수 있다. 실시양태에서, 이식형 중합체성 데포 물질은 생체적합성, 생분해성 열가소성 중합체의 미세다공성 고체 매트릭스, 속도 조절제 및 생물활성 물질을 포함한다. 매트릭스는 주사액을 형성하기 위해 용액 또는 현탁액으로 형성된다. 매트릭스는 매트릭스로부터 생물활성제 방출의 속도 및 정도를 제어한다. 데포가 부분적으로 형성되는 과정은 속도의 전개 및 방출 제어를 담당한다. 적어도 부분적으로 중합체 시스템을 응고시키기 위한 신체내 또는 신체 외부의 계내에서의 수성 매질과 액체 조성물의 상호작용은 성분의 변화와 다양한 성분의 농도의 함수로서 바람직한 제어 방출 프로파일을 유발한다. 예시적인 이식형 중합체성 데포 물질은 발명의 명칭 "Polymeric compositions useful as controlled release implants"의 미국 특허 5,702,716 (Dunn et al.) 및 발명의 명칭 "Gel composition and methods"의 미국 특허 6,130,200 (Brodbeck et al.)에서 찾아볼 수 있다.

[0088] 인용된 면역억제제는 또한 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 형태로 투여될 수 있다. 매우 다양한 합성 나노담체가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 구체 또는 구형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 평면 또는 판-형상이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 입방체 또는 입방형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 타원체 또는 타원형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 실린더형, 원뿔형, 또는 피라미드형이다.

[0089] 일부 실시양태에서, 각 합성 나노담체가 유사한 특성을 갖도록, 크기 또는 형상의 면에서 비교적 균일한 합성 나노담체 집단을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 합성 나노담체의 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 합성 나노담체의 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10% 또는 20% 내에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다.

[0090] 합성 나노담체는 고체 또는 중공일 수 있고, 1개 이상의 층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각 층은 다른 층(들)과 비교하여 고유한 조성 및 고유한 특성을 갖는다. 하나의 예를 제시하자면, 합성 나노담체는 코어가 1개의 층 (예를 들어, 중합체성 코어)이고, 쉘이 제2 층 (예를 들어, 지질 이중층 또는 단일층)인 코어/쉘 구조를 가질 수 있다. 합성 나노담체는 다수의 상이한 층을 포함할 수 있다.

[0091] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 임의로 하나 이상의 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 리포솜을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 이중층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 단층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 미셀을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 중합체성 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 비-중합체성 코어 (예를 들어, 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자, 골 입자, 바이러스 입자, 단백질, 핵산, 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.

[0092] 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체성 합성 나노담체는 비-중합체성 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집

체이다.

[0093] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 임의로 1종 이상의 친양쪽성 개체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 개체는 증가된 안정성, 개선된 균일성, 또는 증가된 점도를 갖는 합성 나노담체의 생성을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 개체는 지질 막 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)의 내부 표면과 회합될 수 있다. 관련 기술분야에 공지되어 있는 많은 친양쪽성 개체가 본 발명에 따라 합성 나노담체를 제조하는데 사용하기에 적합하다. 이러한 친양쪽성 개체는 포스포글리세리드; 포스파티딜콜린; 디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC); 디올레일포스파티딜 에탄올아민 (DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄 (DOTMA); 디올레오일포스파티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤숙시네이트; 디포스파티딜 글리세롤 (DPPG); 헥산데칸올; 지방 알콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 표면 활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세리드; 지방산 디글리세리드; 지방산 아미드; 소르비탄 트리올레에이트 (스팬(Span)®85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트 (스팬®20); 폴리소르베이트 20 (트윈(Tween)®20); 폴리소르베이트 60 (트윈®60); 폴리소르베이트 65 (트윈®65); 폴리소르베이트 80 (트윈®80); 폴리소르베이트 85 (트윈®85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서팩틴; 폴록사머; 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 트리올레에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스파티딜세린; 포스파티딜이노시톨; 스핑고미엘린; 포스파티딜에탄올아민 (세팔린); 카르디올리핀; 포스파티드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스파티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실-아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀레에이트; 헥사데실 스테레이트; 이소프로필 미리스테이트; 틸록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스파티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 인지질; 높은 계면활성제 특성을 갖는 합성 및/또는 천연 세제; 데옥시콜레이트; 시클로덱스트린; 무질서 염; 이온 쌍형성 작용제; 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 친양쪽성 개체 성분은 상이한 친양쪽성 개체의 혼합물일 수 있다. 통상의 기술자라면, 이것이 계면활성제 활성을 갖는 물질의 포괄적이 아닌 예시적인 목록이라는 것을 인식할 것이다. 임의의 친양쪽성 개체가 본 발명에 따라 사용될 합성 나노담체의 생산에 사용될 수 있다.

[0094] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 임의로 1종 이상의 탄수화물을 포함할 수 있다. 탄수화물은 천연 또는 합성일 수 있다. 탄수화물은 유도체화 천연 탄수화물일 수 있다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 글루코스, 프룩토스, 갈락토스, 리보스, 락토스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 셀로비오스, 만노스, 크실로스, 아라비노스, 글루코론산, 갈락토론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민, 및 뉴람산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 모노사카라이드 또는 디사카라이드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 풀루란, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 히드록시셀룰로스 (HC), 메틸셀룰로스 (MC), 덱스트란, 시클로덱스트란, 글리코겐, 히드록시에틸전분, 카라기난, 글리콘, 아밀로스, 키토산, N,O-카르복실메틸키토산, 알긴 및 알긴산, 전분, 키틴, 이눌린, 곤약, 글루코만난, 푸스툴란, 헤파린, 히알루론산, 커들란 및 크산탄을 포함하나 이에 제한되지는 않는 폴리사카라이드이다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 폴리사카라이드와 같은 탄수화물을 포함하지 않는다 (또는 구체적으로 배제한다). 특정 실시양태에서, 탄수화물은 만니톨, 소르비톨, 크실리톨, 에리트리톨, 말티톨 및 락티톨을 포함하나 이에 제한되지는 않는 당 알콜과 같은 탄수화물 유도체를 포함할 수 있다.

[0095] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 1종 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체인 1종 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체 중 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체가다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체는 모두 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체가다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-종결 중합체인 1종 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체 중 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)는 비-메톡시-종결 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체는 모두 비-메톡시-종결 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 플루로닉 중합체를 포함하지 않는 1종 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체 중 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)는 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체는 모두 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 이러한 중합체는 코팅 층 (예를 들어, 리포솜, 지질 단층, 미셀 등)에 의해 둘러싸일 수 있다. 일부 실시양태에서는, 합성 나노담체의 다양한 요소는 중합체에 부착될 수 있다.

[0096] 면역억제제는 다수의 방법 중 임의의 것에 의해 합성 나노담체에 부착될 수 있다. 일반적으로, 부착은 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합의 결과일 수 있다. 이러한 결합은 면역억제제가 합성 나노담체의 표면에 부착되게 하고/거나 합성 나노담체 내에 함유되게 (캡슐화되게) 할 수 있다. 그러나 일부 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체의 구조의 결과로서 합성 나노담체에 결합되기 보다는 합성 나노담체에 의해 캡슐화된다. 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함하고, 면역억제제는 중합체에 부착된다.

[0097] 부착이 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합의 결과로서 일어나는 경우에, 부착은 커플링 모이어티를 통해 일어날 수 있다. 커플링 모이어티는 면역억제제를 합성 나노담체에 결합시키는 임의의 모이어티일 수 있다. 이러한 모이어티는 공유 결합, 예컨대 아미드 결합 또는 에스테르 결합, 뿐만 아니라 면역억제제를 합성 나노담체에 (공유적으로 또는 비-공유적으로) 결합시키는 개별 분자를 포함한다. 이러한 분자는 링커 또는 중합체 또는 그의 유닛을 포함한다. 예를 들어, 커플링 모이어티는 면역억제제가 정전기적으로 결합하는 하전된 중합체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 커플링 모이어티는 공유적으로 결합되는 중합체 또는 그의 유닛을 포함할 수 있다.

[0098] 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함한다. 이들 합성 나노담체는 완전히 중합체성일 수 있거나, 또는 중합체 및 다른 물질의 믹스일 수 있다.

[0099] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 중합체는 회합되어 중합체성 매트릭스를 형성한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 성분, 예컨대 면역억제제는 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 공유적으로 회합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공유 회합은 링커에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 성분은 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 비공유적으로 회합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 성분은 중합체성 매트릭스 내에 캡슐화되거고/거나, 그에 의해 둘러싸이고/거나, 그 전반에 분산될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 성분은 소수성 상호작용, 전하 상호작용, 반 데르 발스 힘 등에 의해 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 회합될 수 있다. 매우 다양한 중합체 및 그로부터 중합체성 매트릭스를 형성하는 방법이 통상적으로 공지되어 있다.

[0100] 중합체는 천연 또는 비천연 (합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 단독중합체, 또는 2종 이상의 단량체를 포함하는 공중합체일 수 있다. 순서의 관점에서, 공중합체는 무작위, 블록일 수 있거나, 또는 무작위 및 블록 순서의 조합을 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따른 중합체는 유기 중합체이다.

[0101] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리아미드 또는 폴리에테르, 또는 그의 유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤, 또는 그의 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 생분해성인 것이 바람직하다. 따라서, 이들 실시양태에서, 중합체가 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛을 포함하는 경우에, 중합체가 생분해성이도록 중합체는 폴리에테르와 생분해성 중합체의 블록-공-중합체를 포함하는 것이 바람직하다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리에테르 또는 그의 유닛, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛만을 포함하지 않는다.

[0102] 본 발명에서 사용하기에 적합한 중합체의 다른 예는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트 (예를 들어, 폴리(1,3-디옥산-2온)), 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)), 폴리프로필푸마레이트, 폴리아미드 (예를 들어, 폴리카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-코-글리콜리드, 폴리카프로락톤, 폴리히드록시산 (예를 들어, 폴리(β-히드록시알카노에이트))), 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 및 폴리아민, 폴리리신, 폴리리신-PEG 공중합체, 및 폴리(에틸렌이민), 폴리(에틸렌 이민)-PEG 공중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0103] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 중합체는 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리발레로락톤, 폴리(1,3-디옥산-2온)); 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리시아노아크릴레이트를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 미국 식품 의약국 (FDA)에 의해 21 C.F.R. § 177.2600 하에 인간에서의 용도에 대해 승인받은 중합체를 포함한다.

[0104] 일부 실시양태에서, 중합체는 친수성일 수 있다. 예를 들어, 중합체는 음이온성 기 (예를 들어, 포스페이트

기, 술페이트 기, 카르복실레이트 기); 양이온성 기 (예를 들어, 4급 아민 기); 또는 극성 기 (예를 들어, 히드록실 기, 티올 기, 아민 기)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 합성 나노담체 내에 친수성 환경을 생성한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 중합체성 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 합성 나노담체 내에 소수성 환경을 생성한다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노담체 내에 도입되는 (예를 들어, 부착되는) 물질의 속성에 영향을 미칠 수 있다.

[0105] 일부 실시양태에서, 중합체는 1종 이상의 모이어티 및/또는 관능기에 의해 변형될 수 있다. 다양한 모이어티 또는 관능기가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 탄수화물, 및/또는 폴리사카라이드로부터 유래된 비-시클릭 폴리아세탈에 의해 변형될 수 있다 (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). 특정 실시양태는 미국 특허 번호 5543158 (Gref et al.) 또는 WO 공개 WO2009/051837 (Von Andrian et al.)의 일반적 교시를 사용하여 제조될 수 있다.

[0106] 일부 실시양태에서, 중합체는 지질 또는 지방산 기에 의해 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산 또는 리그노세르산 중 하나 이상일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 팔미톨레산, 올레산, 바센산, 리놀레산, 알파-리놀레산, 감마-리놀레산, 아라키돈산, 가돌레산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 도코사헥사엔산 또는 에루스산 중 하나 이상일 수 있다.

[0107] 일부 실시양태에서, 중합체는 본원에서 "PLGA"로 총칭되는 락트산 및 글리콜산 유닛을 포함하는 공중합체, 예컨대 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드); 및 본원에서 "PGA"로 지칭되는 글리콜산 유닛, 및 본원에서 "PLA"로 총칭되는 락트산 유닛, 예컨대 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드 및 폴리-D,L-락티드를 포함하는 단독중합체를 비롯한 폴리에스테르일 수 있다. 일부 실시양태에서, 예시적인 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리히드록시산; PEG 공중합체 및 락티드와 글리콜리드의 공중합체 (예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체, 및 그의 유도체)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리(카프로락톤), 폴리(카프로락톤)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 그의 유도체를 포함한다.

[0108] 일부 실시양태에서, 중합체는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산과 글리콜산의 생체적합성 및 생분해성 공중합체이고, PLGA의 다양한 형태는 락트산:글리콜산의 비를 특징으로 한다. 락트산은 L-락트산, D-락트산 또는 D,L-락트산일 수 있다. PLGA의 분해 속도는 락트산:글리콜산 비를 변경시킴으로써 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용될 PLGA는 대략 85:15, 대략 75:25, 대략 60:40, 대략 50:50, 대략 40:60, 대략 25:75, 또는 대략 15:85의 락트산:글리콜산 비를 특징으로 한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴 중합체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 아크릴 중합체는, 예를 들어 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리시아노아크릴레이트, 및 상기 중합체 중 1종 이상을 포함하는 조합을 포함한다. 아크릴 중합체는 낮은 함량의 4급 암모늄 기를 갖는, 아크릴산 및 메타크릴산 에스테르의 완전-중합 공중합체를 포함할 수 있다.

[0110] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 핵산의 음으로 하전된 가닥을 축합시키고/거나 보호할 수 있다. 아민-함유 중합체, 예컨대 폴리(리신) (Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; 및 Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7), 폴리(에틸렌 이민) (PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297), 및 폴리(아미도아민) 덴드리머 (Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; 및 Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372)는 생리학적 pH에서 양으로 하전되고, 핵산과 이온 쌍을 형성한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 양이온성 중합체를 포함하지 않을 수 있다 (또는 배제할 수 있다).

[0111] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 측쇄를 보유하는 분해성 폴리에스테르일 수 있다 (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989,

Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; 및 Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399). 이들 폴리에스테르의 예는 폴리(L-락티드-코-L-리신) (Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010), 폴리(세린 에스테르) (Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633), 및 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633)를 포함한다.

[0112] 이들 및 다른 중합체의 특성 및 그의 제조 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 6,123,727; 5,804,178; 5,770,417; 5,736,372; 5,716,404; 6,095,148; 5,837,752; 5,902,599; 5,696,175; 5,514,378; 5,512,600; 5,399,665; 5,019,379; 5,010,167; 4,806,621; 4,638,045; 및 4,946,929; 문헌 [Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; 및 Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181] 참조). 보다 일반적으로, 특정의 적합한 중합체를 합성하는 다양한 방법이 문헌 [Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386]; 및 미국 특허 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446, 및 6,818,732에 기재되어 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 덴드리머일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 서로 가교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 가교가 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 가교 단계를 거치지 않고 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 또한, 합성 나노담체는 블록 공중합체, 그라프트 공중합체, 블렌드, 혼합물, 및/또는 상기 중 임의의 것 및 다른 중합체의 부가물을 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 통상의 기술자라면, 본원에 열거된 중합체가 본 발명에 따라 사용될 수 있는 중합체의 포괄적이 아닌 예시적인 목록을 나타낸다는 것을 인식할 것이다.

[0114] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체성 성분을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체성 합성 나노담체는 비-중합체성 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0115] 본 발명에 따른 조성물은 요소를 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 보존제, 완충제, 염수 또는 포스페이트 완충 염수와 조합하여 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위해 통상의 제약 제조 및 배합 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물, 예컨대 합성 나노담체를 포함하는 조성물은 보존제와 함께 주사용 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.

[0116] 실시양태에서, 합성 나노담체를 담체로서 사용하기 위해 제조하는 경우에, 성분을 합성 나노담체에 부착시키는 방법이 유용할 수 있다. 성분이 소분자인 경우에, 합성 나노담체의 어셈블리 전에 성분을 중합체에 부착시키는 것이 유익할 수 있다. 실시양태에서, 성분을 중합체에 부착시키는 것보다 표면 기를 사용한 다음 이러한 중합체 접합체를 합성 나노담체의 구축에 사용하는 것을 통하는, 성분을 합성 나노담체에 부착시키는데 사용되는 상기 표면 기를 갖는 합성 나노담체를 제조하는 것이 또한 유익할 수 있다.

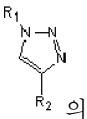
[0117] 특정 실시양태에서, 부착은 공유 링커에 의할 수 있다. 실시양태에서, 본 발명에 따른 성분은 나노담체의 표면 상의 아지도 기와 알킨 기를 함유하는 성분의 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응에 의해 또는 나노담체의 표면 상의 알킨과 아지도 기를 함유하는 성분의 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응에 의해 형성된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 외부 표면에 공유적으로 부착될 수 있다. 이러한 고리화첨가 반응은 바람직하게는 적합한 Cu(I)-리간드와 함께 Cu(I) 촉매 및 Cu(II) 화합물을 촉매 활성 Cu(I) 화합물로 환원시키기 위한 환원제의 존재 하에 수행된다. 이러한 Cu(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (CuAAC)는 또한 클릭 반응으로 지칭될 수 있다.

[0118] 추가로, 공유 부착은 아미드 링커, 디술피드 링커, 티오에테르 링커, 히드라존 링커, 히드라지드 링커, 이민 또는 옥심 링커, 우레아 또는 티오우레아 링커, 아미딘 링커, 아민 링커 및 술폰아미드 링커를 포함하는 공유 링커를 포함할 수 있다.

[0119] 아미드 링커는 한 성분, 예컨대 면역억제제 상의 아민과 제2 성분, 예컨대 나노담체의 카르복실산 기 사이의 아미드 결합을 통해 형성된다. 링커 내 아미드 결합은 적합하게 보호된 아미노산 및 활성화된 카르복실산, 예컨대 N-히드록시숙신이미드-활성화 에스테르에 의한 임의의 통상의 아미드 결합 형성 반응을 사용하여 만들어질

수 있다.

[0120] 디술피드 링커는 예를 들어 R1-S-S-R2 형태인, 2개 황 원자 사이의 디술피드 (S-S) 결합의 형성을 통해 만들어진다. 디술피드 결합은 티올/메르캅탄 기(-SH)를 함유하는 성분의, 중합체 또는 나노담체 상의 또 다른 활성화 티올 기에 의한 티올 교환, 또는 티올/메르캅탄 기를 함유하는 나노담체의, 활성화 티올 기를 함유하는 성분에 의한 티올 교환에 의해 형성될 수 있다.

[0121] 트리아졸 링커, 구체적으로 R1 및 R2가 임의의 화학적 개체일 수 있는 형태  의 1,2,3-트리아졸은, 제1 성분, 예컨대 나노담체에 부착된 아지드를 제2 성분, 예컨대 면역억제제에 부착된 말단 알킨과 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응시킴으로써 만들어진다. 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응은 촉매의 존재 또는 부재 하에, 바람직하게는 Cu(I)-촉매의 존재 하에 수행되며, 이는 1,2,3-트리아졸 관능을 통해 2개의 성분을 연결한다. 이러한 화학은 문헌 [Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002) 및 Meldal, et al., Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015]에 상세하게 기재되어 있고, 종종 "클릭" 반응 또는 CuAAC로 지칭된다.

[0122] 실시양태에서, 중합체 쇄에 대해 말단으로 아지드 또는 알킨 기를 함유하는 중합체가 제조된다. 이러한 중합체는 이어서 다수의 알킨 또는 아지드 기가 합성 나노담체의 표면 상에 배치되는 방식으로 그러한 나노담체를 제조하는데 사용된다. 대안적으로, 합성 나노담체는 또 다른 경로에 의해 제조될 수 있고, 그 후 알킨 또는 아지드 기에 의해 관능화될 수 있다. 성분은 알킨 (중합체가 아지드를 함유하는 경우) 또는 아지드 (중합체가 알킨을 함유하는 경우) 기의 존재 하에 제조된다. 이어서 성분은 1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 성분을 입자에 공유적으로 부착시키는 촉매의 존재 또는 부재 하에 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응을 통해 나노담체와 반응하게 된다.

[0123] 티오에테르 링커는 황-탄소 (티오에테르) 결합의 형성에 의해 예를 들어 R1-S-R2의 형태로 만들어진다. 티오에테르는 한 성분 상의 티올/메르캅탄 (-SH) 기의, 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드 또는 에폭시드에 의한 알킬화에 의해 만들어질 수 있다. 티오에테르 링커는 또한 한 성분 상의 티올/메르캅탄 기의, 마이클 수용자로서 말레이미드 기 또는 비닐 술폰 기를 함유하는 제2 성분 상의 전자-결핍 알켄 기에 대한 마이클 첨가에 의해 형성될 수 있다. 또 다른 방식으로, 티오에테르 링커는 한 성분 상의 티올/메르캅탄 기의, 제2 성분 상의 알켄 기와의 라디칼 티올-엔 반응에 의해 제조될 수 있다.

[0124] 히드라존 링커는 한 성분 상의 히드라지드 기의, 제2 성분 상의 알데히드/케톤 기와의 반응에 의해 만들어진다.

[0125] 히드라지드 링커는 한 성분 상의 히드라진 기의, 제2 성분 상의 카르복실산 기와의 반응에 의해 형성된다. 이러한 반응은 일반적으로 활성화 시약을 사용하여 카르복실산을 활성화시키는 아미드 결합의 형성과 유사한 화학을 사용하여 수행된다.

[0126] 이민 또는 옥심 링커는 한 성분 상의 아민 또는 N-알콕시아민 (또는 아미노옥시) 기의, 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기와의 반응에 의해 형성된다.

[0127] 우레아 또는 티오우레아 링커는 한 성분 상의 아민 기의, 제2 성분 상의 이소시아네이트 또는 티오이소시아네이트 기와의 반응에 의해 제조된다.

[0128] 아미딘 링커는 한 성분 상의 아민 기의, 제2 성분 상의 이미도에스테르 기와의 반응에 의해 제조된다.

[0129] 아민 링커는 한 성분 상의 아민 기의, 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드, 에폭시드 또는 술포네이트 에스테르 기에 의한 알킬화 반응에 의해 만들어진다. 대안적으로, 아민 링커는 또한 소듐 시아노보로히드리드 또는 소듐 트리아세톡시보로히드리드와 같은 적합한 환원 시약의 존재 하에, 한 성분 상의 아민 기의 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기에 의한 환원성 아미노화에 의해 만들어질 수 있다.

[0130] 술폰아미드 링커는 한 성분 상의 아민 기의 제2 성분 상의 술포닐 할라이드 (예컨대 술포닐 클로라이드) 기와의 반응에 의해 만들어진다.

[0131] 술폰 링커는 비닐 술폰에 대한 친핵체의 마이클 첨가에 의해 만들어진다. 비닐 술폰 또는 친핵체는 나노담체의 표면 상에 존재할 수 있거나 성분에 부착될 수 있다.

[0132] 성분은 또한 비-공유 접합 방법을 통해 나노담체에 접합될 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 면역억제제는 양으로 하전된 나노담체에 정전기적 흡착을 통해 접합될 수 있다. 금속 리간드를 함유하는 성분은 또한 금속

착물을 함유하는 나노담체에 금속-리간드 착물을 통해 접합될 수 있다.

[0133] 실시양태에서, 성분은 합성 나노담체의 어셈블리 전에 중합체, 예를 들어 폴리락트산-블록-폴리에틸렌 글리콜에 부착될 수 있거나, 또는 합성 나노담체는 그의 표면 상에 반응성 또는 활성화가능 기를 가진 상태로 형성될 수 있다. 후자의 경우에, 성분은 합성 나노담체의 표면에 의해 제공되는 부착 화학과 상용성인 기를 가진 상태로 제조될 수 있다. 다른 실시양태에서, 펩티드 성분은 적합한 링커를 사용하여 VLP 또는 리포솜에 부착될 수 있다. 링커는 2개의 분자를 함께 부착시킬 수 있는 화합물 또는 시약이다. 한 실시양태에서, 링커는 문헌 [Hermanson 2008]에 기재된 바와 같은 동종이관능성 또는 이종이관능성 시약일 수 있다. 예를 들어, 표면 상에 카르복실 기를 함유하는 VLP 또는 리포솜 합성 나노담체는 EDC의 존재 하에 동종이관능성 링커, 아디프산 디히드라지드 (ADH)로 처리되어 ADH 링커를 갖는 상응하는 합성 나노담체를 형성할 수 있다. 생성된 ADH 연결된 합성 나노담체는 이어서 나노담체 상의 ADH 링커의 다른 말단을 통해 산 기를 함유하는 펩티드 성분과 접합되어 상응하는 VLP 또는 리포솜 펩티드 접합체를 생성한다.

[0134] 이용가능한 접합 방법의 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008]을 참조한다. 공유 부착에 더하여, 성분은 사전-형성된 합성 나노담체에의 흡착에 의해 부착될 수 있거나, 또는 합성 나노담체의 형성 동안 캡슐화에 의해 부착될 수 있다.

[0135] 본원에 제공된 바와 같은 임의의 면역억제제는 본 발명에 따라 사용될 수 있으며, 예를 들어 나노결정질 형태로 사용되거나, 알젯® 삼투 펌프 내로 로딩되거나 또는 합성 나노담체에 대해 부착되어 (즉, 합성 나노담체-부착 면역억제제로) 사용될 수 있다.

[0136] 본원에 제공된 바와 같은 임의의 면역억제제가 제공된 방법 또는 조성물에서 사용될 수 있고, 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 부착될 수 있다. 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF-κβ 억제제; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제 및 산화 ATP를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한 IDO, 비타민 D3, 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오퓨린, 6-메르캅토퓨린, 아스피린, 니플룸산, 에스트리올, 트리프롤리드, 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-10), 시클로스포린 A, siRNA 표적화 시토카인 또는 시토카인 수용체 등을 포함한다.

[0137] 스타틴의 예는 아토르바스타틴 (리피토르(LIPITOR)®, 토르바스트(TORVAST)®), 세리바스타틴, 플루바스타틴 (레스콜(LESCOL)®, 레스콜® XL), 로바스타틴 (메바코르(MEVACOR)®, 알토코르(ALTOCOR)®, 알토프레브(ALTOPREV)®), 메바스타틴 (콤팩틴(COMPACTIN)®), 피타바스타틴 (리발로(LIVALO)®, 피아바(PIAVA)®), 로수바스타틴 (프라바콜(PRAVACHOL)®, 셀렉틴(SELEKTINE)®, 리포스타트(LIPOSTAT)®), 로수바스타틴 (크레스토르(CRESTOR)®) 및 심바스타틴 (조코르(ZOCOR)®, 리펙스(LIPEX)®)을 포함한다.

[0138] mTOR 억제제의 예는 라파마이신 및 그의 유사체 (예를 들어, CCL-779, RAD001, AP23573, C20-메트알릴라파마이신 (C20-Marap), C16-(S)-부틸술폰아미도라파마이신 (C16-BSrap), C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신 (C16-iRap) (Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107)), AZD8055, BEZ235 (NVP-BEZ235), 크리소판산 (크리소판올), 데포롤리무스 (MK-8669), 에베롤리무스 (RAD0001), KU-0063794, PI-103, PP242, 템시롤리무스, 및 WYE-354 (미국 텍사스주 휴스톤 소재 셀렉크(Selleck)에서 입수가능)를 포함한다.

[0139] TGF-β 신호전달 작용제의 예는 TGF-β 리간드 (예를 들어, 액티빈 A, GDF1, GDF11, 골 형태발생 단백질, 노달, TGF-β) 및 그의 수용체 (예를 들어, ACVR1B, ACVR1C, ACVR2A, ACVR2B, BMPR2, BMPR1A, BMPR1B, TGFβRI, TGFβRII), R-SMADS/co-SMADS (예를 들어, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD8), 및 리간드 억제제 (예를 들어, 폴리스타틴, 노긴, 코르딘, DAN, 레프티, LTBP1, THBS1, 데코린)를 포함한다.

[0140] 미토콘드리아 기능 억제제의 예는 아트락틸로시드 (이칼륨 염), 봉크렉산 (트리암모늄 염), 카르보닐 시아나이드 m-클로로페닐히드라존, 카르복시아트락틸로시드 (예를 들어, 아트락틸리스 구미페라(Atractylis gummifera)로부터), CGP-37157, (-)-데구엘린 (예를 들어, 문둘레아 세리세아(Mundulea sericea)로부터), F16, 헥소키나

제 II VDAC 결합 도메인 펩티드, 올리고마이신, 로테논, Ru360, SFK1 및 발리노마이신 (예를 들어, 스트렙토미세스 풀비시무스(Streptomyces fulvissimus)로부터) (EMD4바이오사이언시스(EMD4Biosciences), 미국)을 포함한다.

[0141] P38 억제제의 예는 SB-203580 (4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸술피닐페닐)-5-(4-피리딜)1H-이미다졸), SB-239063 (트랜스-1-(4히드록시시클로헥실)-4-(플루오로페닐)-5-(2-메톡시-피리미딘-4-일) 이미다졸), SB-220025 (5-(2아미노-4-피리미디닐)-4-(4-플루오로페닐)-1-(4-피페리디닐)이미다졸)), 및 ARRY-797을 포함한다.

[0142] NF (예를 들어, NK-κβ) 억제제의 예는 IFRD1, 2-(1,8-나프티리딘-2-일)-페놀, 5-아미노살리실산, BAY 11-7082, BAY 11-7085, CAPE (카페인산 페네틸에스테르), 디에틸말레에이트, IKK-2 억제제 IV, IMD 0354, 락타시스틴, MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO], NFκB 활성화 억제제 III, NF-κB 활성화 억제제 II, JSH-23, 파르테놀리드, 페닐아르신 옥시드 (PAO), PPM-18, 피롤리딘디티오카르밤산 암모늄 염, QNZ, RO 106-9920, 로카글라미드, 로카글라미드 AL, 로카글라미드 C, 로카글라미드 I, 로카글라미드 J, 로카글라올, (R)-MG-132, 살리실산나트륨, 트리프톨리드 (PG490), 및 웨델로락톤을 포함한다.

[0143] 아데노신 수용체 효능제의 예는 CGS-21680 및 ATL-146e를 포함한다.

[0144] 프로스타글란딘 E2 효능제의 예는 E-프로스타노이드 2 및 E-프로스타노이드 4를 포함한다.

[0145] 포스포디에스테라제 억제제 (비-선택적 및 선택적 억제제)의 예는 카페인, 아미노필린, IBMX (3-이소부틸-1-메틸크산틴), 파라크산틴, 펜톡시필린, 테오브로민, 테오필린, 메틸화 크산틴, 빈포세틴, EHNA (에리트로-9-(2-히드록시-3-노닐)아데닌), 아나그렐리드, 에녹시몬 (페르판(PERFAN)™), 밀리논, 레보시멘단, 메셈브린, 이부딜라스트, 피클라밀라스트, 루테올린, 드로타베린, 로플루밀라스트 (닥사스(DAXAS)™, 달리레스프(DALIRESP)™), 실데나필 (레바티온(REVATION)®, 비아그라(VIAGRA)®), 타달라필 (애드서카(ADCIRCA)®, 시알리스(CIALIS)®), 바르데나필 (레비트라(LEVITRA)®, 스탁신(STAXYN)®), 우데나필, 아바나필, 이카리인, 4-메틸피페라진 및 피라졸로 피리미딘-7-1을 포함한다.

[0146] 프로테아솜 억제제의 예는 보르테조밉, 디술피람, 에피갈로카테킨-3-갈레이트 및 살리노스포라미드 A를 포함한다.

[0147] 키나제 억제제의 예는 베바시주맙, BIBW 2992, 세툭시맙 (에르비툭스(ERBITUX)®), 이마티닙 (글리벡(GLEEVEC)®), 트라스투주맙 (헤르셉틴(HERCEPTIN)®), 게피티닙 (이레사(IRESSA)®), 라니비주맙 (루센티스(LUCENTIS)®), 페갑타닙, 소라페닙, 다사티닙, 수니티닙, 에를로티닙, 닐로티닙, 라파티닙, 파니투무맙, 반데타닙, E7080, 파조파닙 및 무브리티닙을 포함한다.

[0148] 글루코코르티코이드의 예는 히드로코르티손 (코르티솔), 코르티손 아세테이트, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 덱사메타손, 베타메타손, 트리암시놀론, 베클로메타손, 플루드로코르티손 아세테이트, 데옥시코르티코스테론 아세테이트 (DOCA) 및 알도스테론을 포함한다.

[0149] 레티노이드의 예는 레티놀, 레티날, 트레티노인 (레티노산, 레틴-A(RETIN-A)®), 이소트레티노인 (아큐탄(ACCUTANE)®, 암네스팀(AMNESTEEM)®, 클라라비스(CLARAVIS)®, 소트레트(SOTRET)®), 알리트레티노인 (판레틴(PANRETIN)®), 에트레티네이트 (테기손(TEGISON)™) 및 그의 대사물 아시트레틴 (소리아탄(SORIATANE)®), 타자로텐 (타조락(TAZORAC)®, 아바게(AVAGE)®, 조락(ZORAC)®), 벡사로텐 (탈그레틴(TARGRETIN)®) 및 아다팔렌 (디페린(DIFFERIN)®)을 포함한다.

[0150] 시토카인 억제제의 예는 IL1ra, IL1 수용체 길항제, IGFBP, TNF-BF, 우로모듈린, 알파-2-마크로글로불린, 시클로스포린 A, 펜타미딘 및 펜톡시필린 (펜토팍(PENTOPAK)®, 펜톡실(PENTOXIL)®, 트렌탈(TRENTAL)®)을 포함한다.

[0151] 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제의 예는 GW9662, PPARγ 길항제 III, G335 및 T0070907 (EMD4바이오사이언시스, 미국)을 포함한다.

[0152] 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 효능제의 예는 피오글리타존, 시글리타존, 클로피브레이트, GW1929, GW7647, L-165,041, LY 171883, PPARγ 활성화제, Fmoc-Leu, 트로글리타존 및 WY-14643 (EMD4바이오사시언시스, 미국)을 포함한다.

[0153] 히스톤 데아세틸라제 억제제의 예는 히드록삼산 (또는 히드록사메이트), 예컨대 트리코스타틴 A, 시클릭 테트라펩티드 (예컨대 트라폭신 B) 및 뎁시펩티드, 벤즈아미드, 친전자성 케톤, 지방족 산 화합물, 예컨대 페닐부티레

이트 및 발프로산, 히드록삼산, 예컨대 보리노스타트 (SAHA), 벨리노스타트 (PXD101), LAQ824 및 파노비노스타트 (LBH589), 벤즈아미드, 예컨대 엔티노스타트 (MS-275), CI994 및 모세티노스타트 (MGCD0103), 니코틴아미드, NAD 유도체, 디히드로쿠마린, 나프토피라논, 및 2-히드록시나프알데히드를 포함한다.

[0154] 칼시뉴린 억제제의 예는 시클로스포린, 피메크롤리무스, 보클로스포린 및 타크롤리무스를 포함한다.

[0155] 포스파타제 억제제의 예는 BN82002 히드로클로라이드, CP-91149, 칼리큘린 A, 칸타리드산, 칸타리딘, 시페르메트린, 에틸-3,4-데포스타틴, 포스트리에신 나트륨 염, MAZ51, 메틸-3,4-데포스타틴, NSC 95397, 노르칸타리딘, 프로로센트룸 콘카붐(prorocentrum concavum)으로부터의 오카다산 암모늄 염, 오카다산, 오카다산 칼륨 염, 오카다산 나트륨 염, 페닐아르신 옥시드, 다양한 포스파타제 억제제 칵테일, 단백질 포스파타제 1C, 단백질 포스파타제 2A 억제제 단백질, 단백질 포스파타제 2A1, 단백질 포스파타제 2A2 및 오르토바나듐산나트륨을 포함한다.

[0156] 일부 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 거대분자 그 자체, 또는 그의 단편 또는 유도체의 형태로 전달될 수 있다. 치료 거대분자는 치료 단백질 및 치료 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 치료 단백질은 주입가능한 치료 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 시토카인 및 인터페론, 성장 인자, 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체 (예를 들어, 대체 요법으로서 대상체에게 투여됨) 및 폼페병 연관 단백질 (예를 들어, 산 글루코시다제 알파, rhGAA (예를 들어, 미오자임(Myozyme) 및 루미자임(Lumizyme) (겐자임(Genzyme)))를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 단백질은 또한 혈액 응고 캐스케이드에 수반되는 단백질을 포함한다. 치료 단백질은 인자 VIII, 인자 VII, 인자 IX, 인자 V, 폰 빌레브란트 인자, 폰 헬데브란트 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 인슐린, 성장 호르몬, 에리트로포이에틴 알파, VEGF, 트롬보포이에틴, 리소자임, 항트롬빈 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 단백질은 또한 아디포킨, 예컨대 렙틴 및 아디포넥틴을 포함한다. 치료 단백질의 다른 예는 하기 및 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같다.

[0157] 리소솜 축적 장애를 갖는 대상체의 효소 대체 요법에 사용되는 치료 단백질의 예는 고셔병의 치료를 위한 이미글루세라제 (예를 들어, 세레자임(CEREZYME)™), 파브리병의 치료를 위한 a-갈락토시다제 A (a-gal A) (예를 들어, 아갈시다제 베타, 파브리자임(FABRYZYME)™), 폼페병의 치료를 위한 산 α-글루코시다제 (GAA) (예를 들어, 산 글루코시다제 알파, 루미자임™, 미오자임™), 및 뮤코폴리사카라이드증의 치료를 위한 아릴술파타제 B (예를 들어, 라로니다제, 알두라자임(ALDURAZYME)™, 이두르술파제, 엘라프라제(ELAPRASE)™, 아릴술파타제 B, 나글라자임(NAGLAZYME)™), 페글로티카제 (크리스텍사(KRYSTEXXA)) 및 페그시티카제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0158] 효소의 예는 옥시도리덕타제, 트랜스퍼라제, 히드롤라제, 리아제, 이소머라제, 아스파라기나제, 우리카제, 글리코시다제, 아스파라기나제, 우리카제, 프로테아제, 뉴클레아제, 콜라게나제, 히알루로니다제, 헤파리나제, 헤파라나제, 리신 및 리가제를 포함한다.

[0159] 치료 단백질은 또한 임의의 효소, 독소, 또는 박테리아, 진균 또는 바이러스 공급원으로부터 단리되거나 유래된 다른 단백질 또는 펩티드를 포함할 수 있다.

[0160] 호르몬의 예는 멜라토닌 (N-아세틸-5-메톡시트립타민), 세로토닌, 티록신 (또는 테트라아이오도티로닌) (갑상선 호르몬), 트리아이오도티로닌 (갑상선 호르몬), 에피네프린 (또는 아드레날린), 노르에피네프린 (또는 노르아드레날린), 도파민 (또는 프로락틴 억제 호르몬), 항뮐러관 호르몬 (또는 뮐러 억제 인자 또는 호르몬), 아디포넥틴, 부신피질자극 호르몬 (또는 코르티코트로핀), 안지오텐시노겐 및 안지오텐신, 항이뇨 호르몬 (또는 바소프레신, 아르기닌 바소프레신), 심방-나트륨이뇨 펩티드 (또는 아트리오펩틴), 칼시토닌, 콜레시스토키닌, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 에리트로포이에틴, 여포-자극 호르몬, 가스트린, 그렐린, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩티드 (GLP-1), GIP, 고나도트로핀-방출 호르몬, 성장 호르몬-방출 호르몬, 인간 융모성 고나도트로핀, 인간 태반 락토겐, 성장 호르몬, 인히빈, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (또는 소마토메딘), 렙틴, 황체화 호르몬, 멜라닌세포 자극 호르몬, 오렉신, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, 프로락틴, 렐락신, 세크레틴, 소마토스타틴, 트롬보포이에틴, 갑상선-자극 호르몬 (또는 티로트로핀), 티로트로핀-방출 호르몬, 코르티솔, 알도스테론, 테스토스테론, 데히드로에피안드로스테론, 안드로스텐디온, 디히드로테스토스테론, 에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 프로게스테론, 칼시트리올 (1,25-디히드록시비타민 D3), 칼시디올 (25-히드록시비타민 D3), 프로스타글란딘, 류코트리엔, 프로스타시클린, 트롬복산, 프로락틴 방출 호르몬, 리포트로핀, 뇌 나트륨이뇨 펩티드, 뉴로펩티드 Y, 히스타민, 엔도텔린, 췌장 폴리펩티드, 레닌 및 엔케팔린을 포함한다.

[0161] 혈액 또는 혈액 응고 인자의 예는 인자 I (피브리노겐), 인자 II (프로트롬빈), 조직 인자, 인자 V (프로악셀레

린, 불안정성 인자), 인자 VII (안정 인자, 프로콘버틴), 인자 VIII (항혈우병 글로불린), 인자 IX (크리스마스 인자 또는 혈장 트롬보플라스틴 성분), 인자 X (스튜어트-프라워 인자), 인자 Xa, 인자 XI, 인자 XII (하게만 인자), 인자 XIII (피브린-안정화 인자), 폰 빌레브란트 인자, 프리칼리크레인 (플레처 인자), 고분자량 키니노겐 (HMWK) (피츠제랄드 인자), 피브로넥틴, 피브린, 트롬빈, 항트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제 (ZPI), 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA), 우로키나제, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2 (PAI2), 암 응고촉진제 및 에포에틴 알파 (에포젠(Epogen), 프로크리트(Procrit))를 포함한다.

[0162] 시토카인의 예는 림포카인, 인터류킨 및 케모카인, 제1형 시토카인, 예컨대 IFN-γ, TGF-β 및 제2형 시토카인, 예컨대 IL-4, IL-10 및 IL-13을 포함한다.

[0163] 성장 인자의 예는 아드레노메듈린 (AM), 안지오포이에틴 (Ang), 자가분비 운동성 인자, 골 형태발생 단백질 (BMP), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 표피 성장 인자 (EGF), 에리트로포이에틴 (EPO), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 (GDNF), 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간세포암-유래 성장 인자 (HDGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 이동-자극 인자, 미오스타틴 (GDF-8), 신경 성장 인자 (NGF) 및 다른 뉴로트로핀, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 트롬보포이에틴 (TPO), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF-α), 형질전환 성장 인자 베타 (TGF-β), 암_괴사_인자-알파 (TNF-α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), Wnt 신호전달 경로, 태반 성장 인자 (PlGF), (태아 소 소마토트로핀) (FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-7을 포함한다.

[0164] 모노클로날 항체의 예는 아바고보맙, 압식시맙, 아달리무맙, 아데카투무맙, 아펠리모맙, 아푸투주맙, 알라치주맙 페골, ALD, 알렘투주맙, 알투모맙 펜테테이트, 아나투모맙 메페나톡스, 안루킨주맙, 항-흉선세포 글로빈, 아폴리주맙, 아르시투모맙, 아셀리주맙, 아틀리주맙 (토실리주맙), 아토롤리무맙, 바피뉴주맙, 바실릭시맙, 바비툭시맙, 벡투모맙, 벨리무맙, 벤랄리주맙, 베르틸리무맙, 베실레소맙, 베바시주맙, 비시로맙, 비바투주맙 메르탄신, 블리나투모맙, 브렌툭시맙 베도틴, 브리아키누맙, 카나키누맙, 칸투주맙 메르탄신, 카프로맙 펜데티드, 카투막소맙, 세델리주맙, 세르톨리주맙 페골, 세툭시맙, 시타투주맙 보가톡스, 식수투무맙, 클레놀릭시맙, 클리바투주맙 테트락세탄, 코나투무맙, 다세투주맙, 다클리주맙, 다라투무맙, 데노수맙, 데투모맙, 도를리모맙 아리톡스, 도를릭시주맙, 에크로멕시맙, 에쿨리주맙, 에도바코맙, 에드레콜로맙, 에팔리주맙, 에펀구맙, 엘로투주맙, 엘실리모맙, 엔리모맙 페골, 에피투모맙 시툭세탄, 에프라투주맙, 에를리주맙, 에르투막소맙, 에타라시주맙, 엑스비비루맙, 파놀레소맙, 파랄리모맙, 파를레투주맙, 펠비주맙, 페자키누맙, 피기투무맙, 폰톨리주맙, 포라비루맙, 프레솔리무맙, 갈릭시맙, 간테네루맙, 가빌리모맙, 겜투주맙 오조가미신, GC1008, 기렌툭시맙, 글렘바투무맙 베도틴, 골리무맙, 고밀릭시맙, 이발리주맙, 이브리투모맙 티욱세탄, 이고보맙, 임시로맙, 인플릭시맙, 인테투무맙, 이놀리모맙, 이노투주맙 오조가미신, 이필리무맙, 이라투무맙, 켈릭시맙, 라베투주맙, 레브리키주맙, 레말레소맙, 레르델리무맙, 렉사투무맙, 리비비루맙, 린투주맙, 로르보투주맙 메르탄신, 루카투무맙, 루밀릭시맙, 마파투무맙, 마슬리모맙, 마투주맙, 메폴리주맙, 메텔리무맙, 밀라투주맙, 민레투모맙, 미투모맙, 모롤리무맙, 모타비주맙, 무로모납-CD3, 나콜로맙 타페나톡스, 나프투모맙 에스타페나톡스, 나탈리주맙, 네바쿠맙, 네시투무맙, 네렐리모맙, 니모투주맙, 노페투모맙 메르펜탄, 오크렐리주맙, 오둘리모맙, 오파투무맙, 올라라투맙, 오말리주맙, 오포르투주맙 모나톡스, 오레고보맙, 오텔릭시주맙, 파기박시맙, 팔리비주맙, 파니투무맙, 파노바쿠맙, 파스콜리주맙, 펨투모맙, 페르투주맙, 펙셀리주맙, 핀투모맙, 프릴릭시맙, 프리투무맙, 라피비루맙, 라무시루맙, 라니비주맙, 락시바쿠맙, 레가비루맙 레슬리주맙, 릴로투무맙, 리툭시맙, 로바투무맙, 론탈리주맙, 로벨리주맙, 루플리주맙, 사투모맙 펜데티드, 세비루맙, 시브로투주맙, 시팔리무맙, 실툭시맙, 시플리주맙, 솔라네주맙, 소넵시주맙, 손투주맙, 스타물루맙, 술레소맙, 타카투주맙 테트락세탄, 타도시주맙, 탈리주맙, 타네주맙, 타플리투모맙 팝톡스, 테피바주맙, 텔리모맙 아리톡스, 테나투모맙, 테넬릭시맙, 테플리주맙, 티실리무맙 (트레멜리무맙), 티가투주맙, 토실리주맙 (아틀리주맙), 토랄리주맙, 토시투모맙, 트라스투주맙, 트레멜리무맙, 투코투주맙 셀모류킨, 투비루맙, 우르톡사주맙, 우스테키누맙, 바팔릭시맙, 베돌리주맙, 벨투주맙, 베팔리모맙, 비실리주맙, 볼로식시맙, 보투무맙, 잘루투무맙, 자놀리무맙, 지랄리무맙, 및 졸리모맙 아리톡스를 포함한다. 모노클로날 항체는 추가로 항-TNF-α 항체를 포함한다.

[0165] 주입 요법 또는 주사가능한 치료 단백질의 예는 예를 들어 토실리주맙 (로슈(Roche)/악템라(Actemra)®), 알파-1 항트립신 (카마다(Kamada)/AAT), 헤마티드® (아피맥스(Affymax) 및 다케다(Takeda), 합성 펩티드), 알빈테르페론 알파-2b (노파르티스(Novartis)/잘빈(Zalbin)™), 루신(Rhucin)® (파밍 그룹(Pharming Group), C1 억제제 대체 요법), 테사모렐린 (테라테크놀로지스(Theratechnologies)/에그리프타(Egrifta), 합성 성장 호르몬-방출 인자), 오크렐리주맙 (제넨테크(Genentech), 로슈 및 비오겐(Biogen)), 벨리무맙 (글락소스미스클라인

(GlaxoSmithKline)/벤리스타(Benlysta)®), 페글로티카제 (사비엔트 파마슈티칼스(Savient Pharmaceuticals)/크리스텍사™), 페그시티카제, 탈리글루세라제 알파 (프로탈릭스(Protalix)/유플리소(Uplyso)), 아갈시다제 알파 (샤이어(Shire)/레플라갈(Replagal)®), 벨라그루세라제 알파 (샤이어) 및 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)을 포함한다.

[0166] 추가의 치료 단백질은, 예를 들어 조작된 단백질, 예컨대 Fc 융합 단백질, 이중특이적 항체, 다중-특이적 항체, 나노바디, 항원-결합 단백질, 항체 단편 및 단백질 접합체, 예컨대 항체 약물 접합체를 포함한다.

[0167] 치료 폴리뉴클레오티드는 핵산 압타머, 예컨대 페갑타닙(Pegaptanib) (마큐젠(Macugen), PEG화 항-VEGF 압타머), 안티센스 치료제, 예컨대 안티센스 폴리- 또는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 항바이러스 약물 포미비르센, 또는 미포메르센, 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위해 아포지단백질 B에 대한 메신저 RNA를 표적으로 하는 안티센스 치료); 소형 간섭 RNA (siRNA) (예를 들어, 고도의 효력을 갖는 RNAi를 매개하는 25-30 염기 쌍 비대칭 이중-가닥 RNA인 다이서 기질 siRNA 분자 (DsiRNA)); 또는 변형된 메신저 RNA (mmRNA), 예컨대 미국 특허 출원 2013/0115272 (de Fougerolles et al.) 및 공개 미국 특허 출원 2012/0251618 (Schrum et al.)에 개시된 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0168] 본 발명의 측면에 따라 유용한 추가의 치료 거대분자는 통상의 기술자에게 분명할 것이고, 본 발명은 이러한 측면으로 제한되지 않는다.

[0169] 일부 실시양태에서, 성분, 예컨대 치료 거대분자 또는 면역억제제는 단리될 수 있다. 단리된은 요소가 그의 천연 환경으로부터 분리되고 그의 확인 또는 사용을 허용하는 충분한 양으로 제공되는 것을 지칭한다. 이는, 예를 들어 요소가 (i) 발현 클로닝에 의해 선택적으로 생산될 수 있거나 또는 (ii) 크로마토그래피 또는 전기영동에 의해 정제될 수 있음을 의미한다. 단리된 요소는, 실질적으로 순수할 수 있지만, 그러할 필요는 없다. 단리된 요소는 제약 제제 내에서 제약상 허용되는 부형제와 함께 혼합될 수 있기 때문에, 요소는 제제의 중량을 기준으로 단지 작은 백분율만을 포함할 수 있다. 그럼에도 불구하고 요소는 살아있는 시스템 내에서 회합되어 있을 수 있는 물질로부터 분리되었다는 점에서 단리, 즉 다른 지질 또는 단백질로부터 단리된다. 본원에 제공된 임의의 요소는 단리될 수 있고, 조성물 중에 포함되거나 또는 단리된 형태로 방법에서 사용될 수 있다.

[0170] D. 조성물의 제조 및 사용 방법 및 관련 방법

[0171] 인용된 면역억제제가 이식형 삼투 펌프를 포함하는 실시양태에서, 면역억제제는 면역억제제의 용액을 함유하는 알젯® 이식형 삼투 펌프를 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 이식형 펌프는 국부 모세관에 의해 화합물을 흡수하여 전신 투여를 유발하기 위한 국부 피하 공간 내로의 면역억제제의 제어 방출을 위해 피하로 이식될 수 있거나 또는 간 문맥 순환 내로의 면역억제제의 제어 방출을 위해 복막강에서 복강내로 이식될 수 있다. 이식형 펌프는 또한 정맥 또는 동맥 순환 내로의 면역억제제의 제어된 정맥내 전달을 위해 카테터를 통해 사용될 수 있다. 이들은 정맥내, 뇌내 또는 동맥내 주입을 위해 또는 약물 또는 시험 작용제의 효과가 특정한 조직 또는 기관에 국재화되는 표적화 전달을 위해 카테터에 부착될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [S. M. Stepkowski et al., "Inhibition of host-versus-graft and graft-versus-host responses after small bowel transplantation in rats by rapamycin." Transplantation (1992) 53(-2-): 258-264]을 참조한다. 광범위한 문헌 데이터베이스를 비롯하여, 알젯® 브랜드 삼투 펌프의 셋업 및 사용에 관한 다른 정보는 alzet.com에서 이용가능하다.

[0172] 인용된 면역억제제가 이중특이적 항체 (BsAb)를 포함하는 실시양태에서, 이중특이적 항체는 관련 기술분야에 공지된 방법에 따라 유전학적 또는 생물학적 방법, 예컨대 2종의 상이한 하이브리도마 세포주의 융합에 의해 또는 화학적 방법, 예컨대 적합한 링커를 통한 2종의 항체 분자의 가교에 의해 제조될 수 있다. BsAb를 생산하기 위한 여러 방법이 개발되었다. BsAb는 2종의 하이브리도마 세포주를 융합시켜, BsAb를 분비할 수 있는 쿼드로마를 생성함으로써 생물학적으로 생산될 수 있다. BsAb는 또한 유전학적으로 생성될 수 있고, 다양한 유전학적 기술이 이중특이적 분자를 생성하는데 사용되었다. BsAb를 생성하기 위한 제3의 방법은 다양한 동종이관능성 및 이종이관능성 화학적 링커를 사용하는 화학적 수단에 의한다 (참고문헌: Bispecific Antibodies, edited by Roland E. Kontermann, Springer, 2011). BsAb의 형성에 대한 추가의 정보는 문헌 [M. Peipp et al., "Bispecific antibodies targeting cancer cells" Biochemical Society Transaction pp. 507-511 vol. 30 part 4 (2002)]을 포함하나 이에 제한되지는 않는 문헌에서 찾아볼 수 있다. BsAb는 모노클로날 항체를 사용하는 방법에 유사하게 피하 또는 정맥내 주사에 의해 환자에게 투여될 수 있다.

[0173] 특정 실시양태에서, 인용된 면역억제제는 이식형 중합 데포 물질의 형태일 수 있다. 이식형 중합체성 데포 물질은 발명의 명칭 "Polymeric compositions useful as controlled release implants"의 미국 특허 5,702,716

(Dunn et al.) 및 발명의 명칭 "Gel composition and methods"의 미국 특허 6,130,200 (Brodbeck et al.)에서 발견된 통상의 실시에 따라 제제화 및 투여될 수 있다.

[0174] 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다. 합성 나노담체는 관련 기술분야에 공지된 매우 다양한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체는 나노침전, 유체 채널을 사용한 유동 포커싱, 분무 건조, 단일 및 이중 에멀젼 용매 증발, 용매 추출, 상 분리, 밀링, 마이크로에멀젼 절차, 마이크로제작, 나노제작, 희생 층, 단순 및 복합 코아세르베이션, 및 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 방법과 같은 방법에 의해 형성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 단분산 반도체, 전도성, 자기성, 유기 및 다른 나노물질에 대한 수성 및 유기 용매 합성이 기재되어 있다 (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; 및 Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). 추가의 방법이 문헌에 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; 및 Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755]; 미국 특허 5578325 및 6007845; 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)] 참조).

[0175] 문헌 [C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8- 21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 방법을 사용하여 바람직하게 다양한 물질을 합성 나노담체 내로 캡슐화할 수 있다. 제한 없이 2003년 10월 14일에 허여된 미국 특허 6,632,671 (Unger)에 개시된 방법을 비롯한, 물질을 합성 나노담체 내로 캡슐화하기에 적합한 다른 방법을 사용할 수 있다.

[0176] 특정 실시양태에서, 합성 나노담체는 나노침전 과정 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 합성 나노담체를 제조하는데 사용되는 조건은 목적하는 크기 또는 특성 (예를 들어, 소수성, 친수성, 외부 형태, "점착성", 형상 등)의 입자를 생성하기 위해 변경될 수 있다. 합성 나노담체를 제조하는 방법 및 사용되는 조건 (예를 들어, 용매, 온도, 농도, 공기 유량 등)은 합성 나노담체에 부착될 물질 및/또는 중합체 매트릭스의 조성에 의존할 수 있다.

[0177] 임의의 상기 방법에 의해 제조된 합성 나노담체가 목적하는 범위 밖의 크기 범위를 갖는 경우에, 이러한 합성 나노담체는 예를 들어 체를 사용하여 사이징될 수 있다.

[0178] 합성 나노담체의 요소 (즉, 성분)는 예를 들어 1개 이상의 공유 결합에 의해 전체 합성 나노담체에 부착될 수 있거나, 또는 1개 이상의 링커에 의해 부착될 수 있다. 합성 나노담체를 관능화하는 추가의 방법은 공개 미국 특허 출원 2006/0002852 (Saltzman et al.), 공개 미국 특허 출원 2009/0028910 (DeSimone et al.), 또는 공개 국제 특허 출원 WO/2008/127532 A1 (Murthy et al.)로부터 적합화될 수 있다.

[0179] 대안적으로 또는 추가로, 합성 나노담체는 비-공유적 상호작용을 통해 성분에 직접적으로 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 비-공유적 실시양태에서, 비-공유적 커플링은 전하 상호작용, 친화도 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 숙주-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 적층 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 및/또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-공유적 상호작용에 의해 매개된다. 이러한 커플링은 합성 나노담체의 외부 표면 또는 내부 표면 상에 배열될 수 있다. 실시양태에서, 캡슐화 및/또는 흡착은 커플링의 형태이다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 동일한 비히클 또는 전달 시스템 내에서의 혼합에 의해 면역억제제 또는 치료 거대분자와 조합될 수 있다.

[0180] 본원에 제공된 조성물은 무기 또는 유기 완충제 (예를 들어, 포스페이트, 카르보네이트, 아세테이트 또는 시트레이트의 나트륨 또는 칼륨 염) 및 pH 조정제 (예를 들어, 염산, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨, 시트레이트 또는 아세테이트의 염, 아미노산 및 그의 염) 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 알파-토코페롤), 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌9-10 노닐 페놀, 소듐 데스옥시콜레이트), 용액 및/또는 동결/냉동 안정화제 (예를 들어, 수크로스, 락토스, 만니톨, 트레할로스), 삼투 조정제 (예를 들어, 염 또는 당), 항박테리아제 (예를 들어, 벤조산, 페놀, 겐타미신), 소포제 (예를 들어, 폴리디메틸실로존),

보존제 (예를 들어, 티메로살, 2-페녹시에탄올, EDTA), 중합체성 안정화제 및 점도-조정제 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 폴록사머 488, 카르복시메틸셀룰로스) 및 공-용매 (예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올)를 포함할 수 있다.

[0181] 본 발명에 따른 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위해 통상의 제약 제조 및 배합 기술을 사용하여 제조될 수 있거나, 또는 특화된 기술 (예컨대 알젯® 펌프 또는 이중 특이적 항체의 경우)을 사용하여 제조될 수 있다. 본 발명을 실시하는데 사용하기에 적합한 기술은 문헌 [Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Edited by Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; 및 Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone]에서 찾아볼 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사용 멸균 염수 용액 중에 존재한다.

[0182] 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 방식으로 제조될 수 있고, 본 발명은 어떠한 방식으로든 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성될 수 있는 조성물로 제한되지 않음이 이해되어야 한다. 적절한 제조 방법의 선택은 회합할 특정한 모이어티의 특성에 대한 주의를 필요로 할 수 있다.

[0183] 일부 실시양태에서, 면역억제제, 치료 거대분자, 또는 이러한 물질을 포함하는 조성물은 멸균 조건 하에 제조되거나 또는 최종적으로 멸균된다. 이는 생성되는 물질 또는 조성물이 멸균이고 비-감염성이며, 그에 따라 비-멸균 물질 또는 조성물과 비교하였을 때 안전성이 개선되는 것을 보장할 수 있다. 이는 특히 인용된 물질 또는 조성물을 제공받는 대상체가 면역 결핍을 갖고/거나, 감염을 앓고 있고/거나, 감염되기 쉬운 경우에 가치있는 안전 조치를 제공한다. 일부 실시양태에서, 물질 또는 조성물은 활성의 손실 없이 연장된 기간을 위해 제제 전략에 의존하여 동결건조되고 현탁액 중에서 또는 동결건조된 분말로서 보관될 수 있다.

[0184] 본 발명에 따른 투여는 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 경점막, 경피부, 경피 또는 피내 경로를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의해 이루어질 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 투여는 피하 투여 경로를 통한다. 본원에 언급된 조성물은 투여, 일부 실시양태에서 병용 투여를 위해 통상의 방법을 사용하여 제작 및 제조될 수 있다.

[0185] 본 발명의 조성물은 유효량, 예컨대 본원의 다른 곳에 기재되어 있는 유효량으로 투여될 수 있다. 투여 형태의 용량은 본 발명에 따라 다양한 양의 면역억제제 또는 치료 거대분자를 함유할 수 있다. 투여 형태 내에 제공된 면역억제제 또는 치료 거대분자의 양은 치료 거대분자, 면역억제제의 속성, 달성하고자 하는 치료 이익, 및 다른 이러한 파라미터에 따라 변경될 수 있다. 실시양태에서, 임의의 투여 형태 내에 제공될 면역억제제 또는 치료 거대분자의 최적의 치료 양을 확립하기 위해 용량 범위설정 연구가 수행될 수 있다. 실시양태에서, 면역억제제 또는 치료 거대분자는 대상체에게의 투여 후 치료 거대분자에 대한 관용유발 면역 반응을 생성하는데 유효한 양으로 투여 형태 내에 제공된다. 대상체에서 통상의 용량 범위설정 연구 및 기술을 사용하여 관용유발 면역 반응을 생성하는데 유효한 면역억제제 또는 치료 거대분자의 양을 결정하는 것이 가능할 수 있다. 면역억제제 또는 치료 거대분자의 투여는 다양한 빈도로 일어날 수 있다.

[0186] 본 개시내용의 또 다른 측면은 키트에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 키트는 약역학적 유효 수명을 제공하는 면역억제제 용량을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 치료 거대분자 용량을 추가로 포함한다. 면역억제제 용량 및 치료 거대분자 용량은 키트 내의 개별 용기 내에 또는 동일한 용기 내에 수용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 용기는 바이알 또는 앰플이다. 일부 실시양태에서, 치료 거대분자 용량 및/또는 면역억제제 용량은, 치료 거대분자 용량 및/또는 면역억제제 용량이 후속 시점에 용기에 첨가될 수 있도록 용기(들)와 분리된 용액 내에 수용된다. 일부 실시양태에서, 치료 거대분자 용량 및/또는 면역억제제 용량은 이들이 후속 시점에 재구성될 수 있도록 각각 개별 용기 내에 또는 동일한 용기 내에 동결건조 형태로 존재한다. 일부 실시양태에서, 키트는 재구성, 혼합, 투여 등에 대한 지침을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 지침은 본원에 기재된 방법의 설명을 포함한다. 지침은 임의의 적합한 형태로, 예를 들어 인쇄 삽입물 또는 라벨로서 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 1개 이상의 시린지를 추가로 포함한다.

[0187] 실시예

[0188] 실시예 1: 라파마이신-함유 나노담체

[0189] 물질

[0190] 라파마이신은 TSZ 켐(TSZ CHEM) (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 윌슨 스트리트 185; 제품 카탈로그 # R1017)에서 구입하였다. 대략 25,000 Da의 PLGA는 레이크쇼어 바이오케미칼스(Lakeshore Biochemicals) (35211 앨라배

마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서 구입하였다. 제품 코드 5050 DLG 2.5A. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 48,000 Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스(35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서 구입하였다. 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE. 엠프로브(EMPROVE)® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa.s)는 EMD 케미칼스 인크.(EMD Chemicals Inc.) (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 파트 번호 1.41354)에서 구입하였다.

[0191] 방법

[0192] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0193] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLGA, PLA-PEG-OMe 및 라파마이신을 용해시킴으로써 용액을 제조하였다.

[0194] 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0195] 용액 3: 70 mM 포스페이트 완충제, pH 8.

[0196] 용액 1 (1 mL) 및 용액 2 (3 mL)를 소형 유리 압력 튜브에서 혼합하고 브랜슨 디지털 소니파이어(Branson Digital Sonifier) 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭으로 초음파처리함으로써 수중유 에멀젼을 생성하였다. 용액 3 (30 mL)을 함유하는 개방 50 mL 비커에 에멀젼을 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고 현탁액 중에 나노담체가 형성되게 하였다. 이어서, 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮기고, 75,600 rcf로 40분 동안 회전시키고, 상청액을 제거하고, 포스페이트 완충 염수 중에 펠릿을 재현탁시킴으로써, 현탁된 나노담체의 부분을 세척하였다. 이러한 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 현탁액을 사용할 때까지 -20℃에서 동결상태로 보관하였다.

[0197] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 중 라파마이신 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0198]

유효 직경 (nm)	라파마이신 로드 (% w/w)
218	9.9

[0199] 실시예 2: 중합체-라파마이신 접합체를 함유하는 중합체성 나노담체 (예측)

[0200] 단계 1: PLGA-라파마이신 접합체의 제조:

[0201] 산 말단 기를 갖는 PLGA 중합체 (7525 DLG1A, 산가 0.46 mmol/g, 레이크쇼어 바이오머티리얼스(Lakeshore Biomaterials); 5 g, 2.3 mmol, 1.0 eq)를 30 mL의 디클로로메탄 (DCM) 중에 용해시켰다. N,N-디시클로헥실카르보디미이드 (1.2 eq, 2.8 mmol, 0.57 g)에 이어서 라파마이신 (1.0 eq, 2.3 mmol, 2.1 g) 및 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP) (2.0 eq, 4.6 mmol, 0.56 g)을 첨가하였다. 혼합물을 2일 동안 실온에서 교반하였다. 이어서, 혼합물을 여과하여 불용성 디시클로헥실우레아를 제거하였다. 여과물을 대략 10 mL의 부피로 농축시키고, 100 mL의 이소프로필 알콜 (IPA)을 첨가하여, PLGA-라파마이신 접합체를 침전시켰다. IPA 층을 제거한 다음에, 중합체를 50 mL의 IPA 및 50 mL의 메틸 t-부틸 에테르 (MTBE)로 세척하였다. 이어서, 중합체를 2일 동안 35℃에서 진공 하에 건조시켜 PLGA-라파마이신을 백색 고체 (대략 6.5 g)로서 얻었다.

[0202] 단계 2: PLGA-라파마이신을 함유하는 나노담체를 하기와 같이 실시예 1에 기재된 절차에 따라 제조하였다:

[0203] 나노담체 형성을 위한 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0204] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 100 mg/mL의 PLGA-라파마이신. 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLGA-라파마이신을 용해시킴으로써 용액을 제조하였다. 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100 mg/mL의 PLA-PEG. 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLA-PEG를 용해시킴으로써 용액을 제조하였다. 용액 3: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0205] 먼저 1차 유중수 에멀젼을 제조하였다. 용액 1 (0.75 mL) 및 용액 2 (0.25 mL)를 소형 압력 튜브 내에서 합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 40초 동안 50% 진폭으로 초음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 이어서, 용액 3 (3.0 mL)을 1차 W1/O1 에멀젼과 합하고, 10초 동안 볼텍싱하고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을

사용하여 60초 동안 30% 진폭으로 초음파처리하여 2차 에멀젼 (W1/O1/W2)을 제조하였다. W1/O1/W2 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액 (30 mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮기고, 35분 동안 75,600xg 및 4℃에서 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 포스페이트 완충 염수에 펠렛을 재현탁시켜 나노담체의 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 펠릿을 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 분산액을 위해 포스페이트 완충 염수에 재현탁시켰다.

[0206] 실시예 3: 라파마이신을 함유하는 금 나노담체 (AuNC)의 제조 (예측)

[0207] 단계 1. HS-PEG-라파마이신의 제조:

[0208] 건조 DMF 중 PEG 산 디숙피드 (1.0 eq), 라파마이신 (2.0-2.5 eq), DCC (2.5 eq) 및 DMAP (3.0 eq)의 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 불용성 디시클로헥실우레아를 여과에 의해 제거하고, 여과물을 이소프로필 알콜 (IPA)에 첨가하여 PEG-디숙피드-디-라파마이신 에스테르를 침전시키고, IPA로 세척하고, 건조시켰다. 이어서, 중합체를 DMF 중 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드로 처리하여 PEG 디숙피드를 티올 PEG 라파마이신 에스테르 (HS-PEG-라파마이신)로 환원시켰다. 생성된 중합체를 IPA로부터 침전에 의해 회수하고, 이전에 기재된 바와 같이 건조시키고, H NMR 및 GPC에 의해 분석하였다.

[0209] 단계 2. 금 NC (AuNC)의 형성:

[0210] 1 mM HAuCl4의 500 mL의 수용액을 응축기가 장착된 1 L 둥근 바닥 플라스크에서 격렬한 교반 하에 10분 동안 환류로 가열하였다. 이어서, 40 mM 시트르산삼나트륨의 50 mL의 용액을 교반 용액에 신속하게 첨가하였다. 생성된 진한 와인 적색 용액을 25-30분 동안 환류 하에 유지시키고, 가열을 중단하고, 용액을 실온으로 냉각시켰다. 이어서, 용액을 0.8 μm 막 필터를 통해 여과하여 AuNC 용액을 얻었다. AuNC는 가시적 분광분석법 및 투과 전자 현미경검사를 사용하여 특성화하였다. AuNC는 시트레이트에 의해 캡핑되어 약 20 nm 직경을 가지며 520 nm에서 피크 흡수를 나타낸다.

[0211] 단계 3. HS-PEG-라파마이신을 갖는 AuNC 접합체:

[0212] HS-PEG-라파마이신의 150 μl 용액 (10 mM pH 9.0 카르보네이트 완충제 중 10 μM)을 20 nm 직경의 시트레이트-캡핑된 금 나노담체 1 mL (1.16 nM)에 첨가하여 2500:1의 티올 대 금 몰비를 생성하였다. 혼합물을 실온에서 아르곤 하에 1시간 동안 교반하여 금 나노담체 상의 시트레이트에 의해 티올이 완전히 교환되게 하였다. 이어서, 표면 상에 PEG-라파마이신을 갖는 AuNC를 12,000g에서 30분 동안 원심분리에 의해 정제하였다. 상청액을 경사분리한 다음, AuNC-S-PEG-라파마이신을 함유하는 펠릿을 1x PBS 완충제로 펠릿 세척하였다. 이어서, 정제된 금-PEG-라파마이신 나노담체를 추가의 분석 및 생물검정을 위해 적합한 완충제 중에 재현탁시켰다.

[0213] 실시예 4: 항체 반응의 개시에 대한 캡슐화된 라파마이신의 효과

[0214] I. IgG의 측정

[0215] IgG 항체의 수준을 일반적으로 하기와 같이 측정하였다. 차단제 PBS 중 카세인 (써모 피셔(Thermo Fisher), 카탈로그 #37528)을 희석제로서 사용하였다. 10 ml의 트윈-20 (시그마(Sigma), 카탈로그 #P9416-100mL)을 2 리터의 10x PBS 원액 (PBS: 옴니푸르(OmniPur)® 10X PBS 액체 농축물, 4L, EMD 케미칼스(EMD Chemicals), 카탈로그 #6505) 및 18리터의 탈이온수에 첨가함으로써 제조된 PBS 중 0.05% 트윈-20을 세척 완충제로서 사용하였다.

[0216] 10 mg/ml의 원액 농도의 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) 또는 5 mg/mL의 원액 농도의 오브알부민 (OVA) 단백질을 코팅 물질로서 사용하였다. 양쪽 물질을 5 μg/ml로 희석하고 작업 농도로서 사용하였다. 검정 플레이트의 각 웰을 웰당 100 μl의 희석된 KLH 또는 OVA로 코팅하고, 플레이트를 밀봉 필름 (VWR 카탈로그 #60941-120)으로 밀봉하고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 코스타(Costar) 9017 96-웰 편평 바닥 플레이트를 검정 플레이트로서 사용하였다 (코스타 9017).

[0217] 저-결합 폴리프로필렌 96-웰 플레이트 또는 튜브를 셋업 플레이트로서 사용하였으며, 여기서 샘플을 제조한 후, 이를 검정 플레이트로 옮겼다. 셋업 플레이트는 어떠한 항원도 함유하지 않았고, 따라서 혈청 항체는 샘플의 셋업 동안 플레이트에 결합하지 않았다. 셋업 플레이트를 샘플 제조에 사용하여, 항원-코팅된 플레이트를 샘플 제조에 사용할 경우에 샘플의 제조 또는 피펫팅 동안 일어날 수 있는 결합을 최소화하였다. 셋업 플레이트에서 샘플을 제조하기 전에, 웰을 희석제로 커버하여 임의의 비-특이적 결합을 차단하고, 플레이트를 밀봉하고, 밤새

4℃에서 인큐베이션하였다.

[0218] 검정 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척하고, 마지막 세척 후에 세척 완충제를 웰로부터 완전히 흡인해내었다. 세척 후에, 300 μl 희석제를 검정 플레이트(들)의 각 웰에 첨가하여 비-특이적 결합을 차단하고, 플레이트를 실온에서 적어도 2시간 인큐베이션하였다. 혈청 샘플을 셋업 플레이트의 적절한 웰에서 1:40으로 희석하였다. 표준물을 양성 대조군으로서 사용하였다. KLH의 경우에, 마우스 항-KLH IgG 항체를 1 μg/mL 출발 희석으로 사용하였고, 이어서 플레이트에 걸쳐 3배 희석하였다. OVA의 경우에, 마우스 항-OVA IgG 항체를 0.5 μg/mL 출발 희석으로 사용하였고, 이어서 플레이트에 걸쳐 3배 희석하였다.

[0219] 모든 샘플을 셋업 플레이트에서 제조하였으면, 플레이트를 밀봉하고 검정 플레이트의 차단이 완료될 때까지 4℃에서 보관하였다. 검정 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척하고, 마지막 세척 후에 세척 완충제를 완전히 흡인해내었다. 세척 후에, 100 μL의 희석제를 검정 플레이트의 칼럼 2-12에 첨가하였다. 피펫을 사용하여 샘플을 셋업 플레이트에서 검정 플레이트로 옮겼다. 옮기기 전에 150 μl의 희석된 혈청을 상하로 3회 피펫팅하여 샘플을 혼합하였다. 혼합한 후, 150μl의 각 샘플을 셋업 플레이트로부터 옮겨, 각 검정 플레이트에 첨가하였다.

[0220] 각 샘플의 출발 희석물을 셋업 플레이트에서 검정 플레이트로 옮겼으면, 연속 희석물을 하기와 같이 검정 플레이트 상에 피펫팅하였다: 50 μl의 각 혈청 샘플을 피펫을 사용하여 제거하고, 이전에 첨가된 100 μl의 희석제와 혼합하였다. 이 단계를 전체 플레이트에 걸쳐 반복하였다. 최종 칼럼의 희석물을 피펫팅한 후에, 50 μl의 유체를 최종 칼럼 내의 웰에서 제거하고 폐기하여, 검정 플레이트의 모든 웰에서 100 μl의 최종 부피를 만들었다. 샘플 희석물을 검정 플레이트에서 제조하였으면, 플레이트를 적어도 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다.

[0221] 인큐베이션 후에, 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척하였다. 검출 항체 (염소 항-마우스 항-IgG, HRP 접합)를 희석제 중에 1:1500 (0.33 μg/mL)으로 희석시키고, 100 μl의 희석된 항체를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 세척 완충제로 5회 세척하고, 마지막 세척 후에 세척 완충제를 웰로부터 완전히 흡인해내었다. 세척 후에, 검출 기질을 웰에 첨가하였다. 동일 부의 기질 A 및 기질 B (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences) TMB 기질 시약 세트, 카탈로그 #555214)를 검정 플레이트에의 첨가 직전에 합하고, 100 μl의 혼합된 기질 용액을 각 웰에 첨가하고, 암실에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 10분 기간 후에 각 웰에 50 μl의 정지 용액 (2N H2SO4)을 첨가함으로써 반응을 정지시켰다. 플레이트 판독기 상에 정지 용액을 첨가한 직후에 웰의 광학 밀도 (OD)를 450 nm에서 평가하고 570 nm에서 차감하였다. 데이터 분석은 몰레큘라 디바이스(Molecular Device)의 소프트웨어 소프트맥스 프로(SoftMax Pro) v 6.2.2를 사용하여 수행하였다. 4-파라미터 로지스틱 곡선-적합 그래프를 x-축 상의 희석 (로그 스케일) 및 y-축 상의 OD 값 (선형 스케일)으로 작성하고, 각 샘플에 대한 반수 최대 값 (EC50)을 결정하였다. 레이아웃의 상단에 있는 플레이트 템플릿을 각 샘플의 희석을 반영하도록 조정하였다 (행당 1).

[0222] II. 미립자 오브알부민 단백질 (pOVA)의 제조

[0223] 물질

[0224] 닭 알 오브알부민 (OVA)을 워싱턴 바이오케미칼 코포레이션(Worthington Biochemical Corporation) (08701 뉴저지주 레이크우드 바사르 애비뉴 730; 제품 코드 LS003054)에서 구입하였다. 포스페이트 완충 염수 (PBS)를 미디어테크(Mediatech) (20109 버지니아주 마나사스 디스커버리 불러바드 9345; 제품 코드 21-040-CV)에서 구입하였다. 수산화나트륨 (NaOH, 제품 코드 367176) 및 트리플루오로아세트산 (TFA, 제품 코드 T62200)을 시그마-알드리치 코포레이션(Sigma-Aldrich Corp.) (63103 미주리주 세인트 루이스 스프루스 스트리트 3050)에서 구입하였다.

[0225] 방법

[0226] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0227] 용액 1: PBS 중 15 mg/mL의 OVA. PBS 중에 직접적으로 오브알부민을 용해시킴으로써 용액을 제조하였다. 용액 2: 물 중 1 M의 NaOH. 내독소-무함유 물에 직접적으로 NaOH를 용해시킴으로써 용액을 제조하였다.

[0228] OVA를 오브알부민 용액의 pH를 반복적으로 상승시키고 저하시킴으로써 코아세르베이트하였다. 용액 1 (10 mL)을 자기 교반 막대를 함유하는 20-mL 유리 바이알에 첨가하였다. 교반하면서, 용액이 pH 12에 도달할 때까지 용액 2를 바이알에 적가하였다. 이어서, 용액이 pH 2에 도달할 때까지 TFA를 바이알에 적가하였다. 이러한 pH의 상승 및 저하를 추가 3회 반복하였다. 이어서, 용액이 pH 7에 도달할 때까지 용액 2를 바이알에

적가하였다.

[0229] 이어서, 코아세르베이트된 OVA 입자의 크기를 고압 균질화에 의해 감소시켰다. 코아세르베이트된 OVA 현탁액을 G10Z 상호작용 챔버를 갖는 마이크로플루이딕스(Microfluidics) LV1 내로 로딩한 다음, 20,000 psi에서의 3회 통과를 사용하여 균질화하였다. 190-240 nm 범위의 크기를 갖는 생성된 미립자 OVA (pOVA)를 -20℃에서 보관하였다.

[0230] III. 항체 반응의 개시에 대한 캡슐화된 라파마이신의 생체내 시험

[0231] C57BL/6 동물 (n=5)의 군을 미처리 및 미면역화 (비면역화), 미처리 및 면역화 (비처리) 상태로 두거나 또는 제0일, 제3일 및 제7일에 실시예 1로부터의 라파마이신-함유 나노담체로 처리하고 면역화시켰다 (Rapa-NC). 면역화는 미립자 형태의 오브알부민 (pOVA)의 주사로 이루어졌다. 주사를 뒷다리에 피하로 실시하였다. 각 주사에 대한 입자의 용량은 3회 주사 후 총 300 μg에 대해 라파마이신 100 μg에 해당하였다. 제14일에 시작하여 미처리 및 처리된 동물 (비처리 및 Rapa-NC)에게 상기와 같이 제조된 10 μg의 pOVA으로 앞다리에 (각각 30 μl) 및 50 μg의 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH, 시그마 알드리치)으로 기저 꼬리에 (각각 측면에 50 μl) 격주로 면역화시켰다 (제14일, 제28일 및 제42일). 모든 동물을 도 1에 나타낸 일에 채혈하고, 항-OVA 반응을 ELISA에 의해 결정하였다.

[0232] 데이터는 캡슐화된 라파마이신이 항원 투여 7일 전에 주사될 때 본원에 제공된 바와 같은 약역학적 유효 수명의 범위 내에서 항-OVA 반응을 효과적으로 억제하였다는 것을 입증한다.

[0233] 실시예 5: 캡슐화된 라파마이신을 사용한 T 세포 활성화의 용량-의존성 억제

[0234] T 세포 활성화에 대한 라파마이신-매개 억제의 용량-의존성을 시험하기 위해, CD45.1+ 동물 (B6.SJL)에게 캡슐화된 라파마이신 (NP[Rapa], 실시예 1에 개시된 바와 같음)을 상이한 용량 (10 내지 50 μg의 라파마이신 및 하나의 PBS 대조군)으로 정맥내 주사하였다. 이들 동물은 C57BL/6 마우스와 동일한 유전적 배경을 공유하지만, CD45 분자의 상이한 이소형 (CD45.2 대신에 CD45.1)을 발현한다. 6일 후에 CD45.2를 발현하는 OTII 마우스 계통의 비장 및 림프절로부터 자기 세포 분류 (MACS, 밀테니(Miltenyi))에 의해 단리된 T 세포 및 MHC CLII와 관련하여 제공된 닭 오브알부민으로부터의 펩티드 ($OVA_{323-339}$ 또는 OPII.323)를 인식하는 트랜스제닉 TCR을 CD45.1+-처리 동물 내로 입양 전달하였다. 이들 세포를 또한 그의 증식 상태를 추적하기 위해 CFSE (인비트로젠)로 표지하였다. 다음날 (제7일)에 모든 동물에게 TLR7/8 효능제 R4848과 혼합된 OPII.323의 면역원성 용량을 뒷다리에 피하로 주사하였다. 제11일에 동물을 희생시키고, 주사 부위를 배수시키는 림프절 (슬와)을 절제하고, 세포를 유동 세포측정법에 의해 분석하여 전달된 CD45.2+TCRb+CD4+7AAD- T 세포 (바이오레전드(Biolegend)로부터의 항체)를 확인하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 20 μg 정도의 적은 라파마이신의 주사는 심지어 나노담체의 주사 6일 후에도, 또한 본원에 제공된 바와 같은 약역학적 유효 수명의 범위 내에서, 상기 T 세포의 활성화 및 생존에 대한 억제 효과를 나타냈다. 라파마이신 투약을 증가시키는 것은 세포 수 및 증식을 감소시켰다.

[0235] 실시예 6: 이식형 삼투 펌프를 사용하는 면역억제제 및 그의 관용유발 면역 반응의 생체내 평가 (예측)

[0236] 단계 1:

[0237] 라파마이신을 디메틸 술폭시드 (DMSO)/폴리에틸렌 글리콜 400으로 이루어진 비히클에 용해시키고, 알젯® 이식형 삼투 펌프 (0.2 mL 부피, 모델 2001, 두렉트 코포레이션, 캘리포니아주 쿠퍼티노)에 로딩하였다. 이어서, 펌프를 알젯® 펌프 작동 절차에 따라 마우스의 우측 하복부에 피하 (s.c.) 이식하였다. 펌프를 사용하여, 라파마이신을 2.5 mg/kg/일의 용량으로 2일 동안 연속적으로 s.c. 투여하였다.

[0238] 단계 2:

[0239] C57BL/6 동물 (n=5)의 군을 미처리 및 미면역화 (비면역화), 미처리 및 면역화 (비처리) 상태로 두거나 또는 제0일, 제3일 및 제7일에 마우스의 측면 하복부에 피하 이식된 상기 라파마이신 로딩된 삼투 펌프로 처리하고 면역화시켰다. 면역화는 미립자 형태의 오브알부민 (pOVA)의 주사로 이루어졌다. 펌프를 사용하여, 라파마이신을 2.5 mg/kg/일의 용량으로 2일 동안 연속적으로 s.c. 투여하였다. 각 주사에 대한 라파마이신의 용량은 3회 주사 후 총 300 μg에 대해 라파마이신 100 μg에 해당하였다. 제14일에 시작하여 미처리 및 처리된 동물 (비처리 및 라파마이신 로딩된 펌프)에게 100 μg의 치료 단백질, 예컨대 산 글루코시다제 알파 또는 조직 플라스미노겐 활성화제 또는 에리트로포이에틴 알파 또는 도를릭시주맙 또는 리툭시주맙으로 앞다리에 주사하여 격주로 면역화시켰다 (제14일, 제28일 및 제42일). 모든 동물을 제40일 및 제54일에 채혈하고, 항-단백질 반응을

ELISA에 의해 결정하였다. 이식된 삼투 펌프를 통해 투여된 라파마이신은 본원에 제공된 바와 같은 약역학적 유효 수명 내에서 주사될 때 항-단백질 반응을 효과적으로 억제할 것으로 예상되고, 이러한 효과는 심지어 단백질을 사용한 프라이밍 및 2회 부스트 후에도 분명할 것으로 예상된다.

[0240] 실시예 7: 이식형 삼투 펌프를 사용하는 면역억제제 및 그의 관용유발 면역 반응의 생체내 평가 (예측)

[0241] 단계 1:

[0242] N,N-디메틸아세트아미드 (DMAC) 중 라파마이신 (Rapa)의 원액 (19 mg/ml)을 4℃에서 보관하고, 광에 대한 노출로부터 보호하였다. 래트의 중량을 기준으로 하여 적절한 Rapa 농도를 얻기 위해, 원액을 10% 트윈-80, 20% DMAC 및 70% 폴리에틸렌 글리콜 400 (PEG400)의 혼합물에 희석하였다. 적절하게 희석된 Rapa를 알젯® 브랜드 이식형 삼투 펌프 (모델 2002; 두렉트 코포레이션, 캘리포니아주 쿠퍼티노) 내로 로딩하고, 이를 37℃에서 멸균 염수 중에 인큐베이션하여 4-6시간 동안 프라이밍하였다. 그 후에, 라파마이신의 정맥내 전달을 위해 마우스의 요추 정맥 내에 전달 캐뉼라를 삽입하였다.

[0243] 단계 2:

[0244] C57BL/6 동물 (n=5)의 군을 미처리 및 미면역화 (비면역화), 미처리 및 면역화 (비처리) 상태로 두거나 또는 제0일, 제3일 및 제7일에 상기 라파마이신 로딩된 삼투 펌프로 처리하고 면역화시켰다. 면역화는 미립자 형태의 오브알부민 (pOVA)의 주사로 이루어졌다. 펌프를 사용하여, 라파마이신을 2.5 mg/kg/일의 용량으로 2일 동안 정맥내 주입을 통해 투여하였다. 각 주입에 대한 라파마이신의 용량은 3회 주입 후 총 300 μg에 대해 라파마이신 100 μg에 해당하였다. 제14일에 시작하여 미처리 및 처리된 동물 (비처리 및 라파마이신 로딩된 펌프)에게 50-100 μg의 치료 폴리뉴클레오티드, 예컨대 페갑타닙, 미포메르센, 변형된 메신저 RNA (mmRNA), 예컨대 미국 특허 출원 2013/0115272 (de Fougerolles et al.)에 개시된 것으로 격주로 면역화시켰다 (제14일, 제28일 및 제42일).

[0245] 모든 동물을 제40일 및 제54일에 채혈하고, 항-단백질 반응을 ELISA에 의해 결정하였다. 이식된 삼투 펌프를 통해 투여된 라파마이신은 본원에 제공된 바와 같은 약역학적 유효 수명 내에서 주사될 때 항-폴리뉴클레오티드 반응을 효과적으로 억제할 것으로 예상되고, 이러한 효과는 심지어 폴리뉴클레오티드를 사용한 프라이밍 및 2회 부스트 후에도 분명할 것으로 예상된다.

[0246] 실시예 8: 화학적으로 가교된 항-GITR 항체 및 인자-VIII 단백질에 대한 관용 유도를 위한 억제 인자 VIII 항체에 대한 항-이디오타입 항체를 사용하는 이중특이적 항체 면역억제제 (예측)

[0247] 단계 1: 이중특이적 항체의 제조

[0248] 에프라투주맙과 같은 항-GITR-항체 및 억제 인자 VIII 항체에 대한 항-이디오타입 항체 (미국 특허 8071094에 따라 제조됨)의 $F(ab')_2$ 단편을 이뮤노퓨어(ImmunoPure) $F(ab')_2$ 제조 키트 (피어스(Pierce))를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 제조하였다. $F(ab')_2$ 함유 분획을 풀링하고, 10,000 MWCO 원심력 필터 (밀리포어(Millipore))를 사용하여 농축시켰다. 2-메르캅토에탄올을 20-40분 동안 30℃에서 최종 농도 20 mM로 첨가하여 각 $F(ab')_2$를 F(ab)-티올로 환원시켰다. 샘플을 얼음 상에서 냉각시킨 다음, 50 mM 아세트산나트륨/0.5 mM EDTA pH 5.3에서 평형화된 냉각된 세파덱스(Sephadex) G25 칼럼 상에 통과시켰다. 단백질-함유 분획을 풀링하였다. 이어서, 항-GITR Fab-티올을 1/2 부피의 사전 냉각된 12 mM 가교제 o-페닐렌디말레이미드 (o-PDM) (DMF 중에 용해됨)를 첨가하여 빙조에서 30분 동안 말레이미드화하였다. 이어서, 항-GITR-말레이미드화-Fab를 50 mM 아세트산나트륨/0.5 mM EDTA pH 5.3에서 평형화된 냉각된 세파덱스 G25 칼럼 상에 통과시켰다. 단백질-함유 분획을 풀링하고, 억제 인자 VIII 항체-티올-Fab에 대한 항-이디오타입 항체에 1:1 몰비로 즉시 첨가하였다. 반응을 질소 하에 놓고, 4℃에서 15-20시간 동안 온화하게 교반하였다. pH는 1 M 트리스-HCl pH 8.0을 사용하여 pH 8.0으로 조정하고, 이어서 2-메르캅토에탄올을 최종 농도 20 mM로 첨가하였다. 반응물을 30℃에서 20-40분 동안 인큐베이션한 다음, 아이오도아세트아미드를 최종 농도 25 mM로 첨가하여 알킬화하였다. 이어서, 혼합물을 PBS pH 7.4에서 평형화된 슈퍼덱스 200 칼럼 상에 통과시키고, 분획을 수집하였다. 개별 분획을 비-환원 조건 하에서 10% SDS-PAGE 겔 상에 전개시키고, 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) (시그마) 또는 실버 스냅(Silver Snap) II 키트 (피어스)로 염색하였다. 이중특이적 항체 (항-GITR/억제 인자 VIII 항체에 대한 항-이디오타입 항체)를 확인하고, 풀링하고, 면역억제제 (용량 10μg/일)로서 사용하기 위해 보관하였다.

[0249] 단계 2. 인자 VIII에 대한 관용 유도

[0250] C57BL/6 동물 (n=5)의 군을 미처리 및 미면역화 (비면역화), 미처리 및 면역화 (비처리) 상태로 두거나 또는 제0일, 제3일 및 제7일에 10㎍/일의 상기 이중특이적 항체로 처리하고 면역화시켰다. 면역화는 미립자 형태의 오브알부민 (pOVA)의 주사로 이루어졌다. 제14일에 시작하여 미처리 및 처리된 동물 (비처리 및 이중특이적 항체 처리)에게 150 IU/kg의 재조합 인간 항혈우병성 인자 VIII (인자-VIII)로 격주로 면역화시켰다 (제14일, 제28일 및 제42일).

[0251] 모든 동물을 제40일 및 제54일에 채혈하고, 항-단백질 반응을 ELISA에 의해 결정하였다. 이중특이적 항체 (항-GITR/억제 인자 VIII 항체에 대한 항-이디오타입 항체)는 본원에 제공된 바와 같은 약역학적 유효 수명 내에서 주사될 때 항-인자 VIII 반응을 효과적으로 억제할 것으로 예상되고, 이러한 효과는 심지어 인자 VIII 단백질을 사용한 프라이밍 및 2회 부스트 후에도 분명할 것으로 예상된다.

[0252] 실시예 9: 이식형 중합체성 데포 물질을 사용하는 면역억제제 및 그의 관용유발 면역의 생체내 평가 (예측)

[0253] 단계 1: 겔 비히클 제조

[0254] 유리 용기를 메틀러(Mettler) PJ3000 탑 로더 밸런스 상에서 칭량하였다. 폴리 (D,L-락티드-코-글리콜리드) 50:50 레소머(RESOMER)® RG502 (PLGA-502)를 유리 용기 내에 칭량 투입하였다. PLGA-502를 포함하는 유리 용기를 칭량하고, 상응하는 용매 (표 2에 기재된 바와 같은 것)를 첨가하였다. 다양한 중합체/용매 조합물에 대해 백분율로서 표시된 양을 하기 표 1에 기재하였다. 중합체/용매 혼합물을 스테인레스 스틸 스퀘어-팁 스패튤라로 수동으로 교반하여, 백색 중합체 입자를 함유하는 점착성 호박색 페이스트-유사 물질을 얻었다. 중합체/용매 혼합물을 포함하는 용기를 밀봉하고, 39℃로 평형화된 온도 제어 인큐베이터에 넣었다. 중합체/용매 혼합물은 그것이 투명한 호박색균질 겔인 것처럼 보였을 때 인큐베이터로부터 제거하였다. 인큐베이션 시간 간격은 용매 및 중합체 유형 및 용매 및 중합체 비에 따라 1 내지 4일의 범위일 수 있다. 추가의 데포 겔 비히클은 하기 중합체를 사용하여 제조하였다: 폴리 (D,L-락티드-코-글리콜리드) 50:50 레소머® L104, PLGA-L104, 코드 번호 33007, 폴리 (D,L-락티드-코-글리콜리드) 50:50 레소머® RG206, PLGA-206, 코드 번호 8815, 폴리 (D,L-락티드-코-글리콜리드) 50:50 레소머® RG502, PLGA-502, 코드 0000366, 폴리 (D,L-락티드-코-글리콜리드) 50:50 레소머® RG502H, PLGA-502H, 코드 번호 260187, 폴리 (D,L-락티드-코-글리콜리드) 50:50 레소머® RG503, PLGA-503, 코드 번호 0080765, 폴리 (D,L-락티드-코-글리콜리드) 50:50 레소머® RG506, PLGA-506, 코드 번호 95051, 폴리 (D,L-락티드-코-글리콜리드) 50:50 레소머® RG755, PLGA-755, 코드 번호 95037, (베링거 잉겔하임 케미칼스, 인크.(Boehringer Ingelheim Chemicals, Inc.), 버지니아주 피터스부르그), 및 하기 용매 또는 혼합물: 글리세릴 트리아세테이트 (이스트만 케미칼 캄파니(Eastman Chemical Co.), 테네시주 킹스포트), 벤질 벤조에이트 ("BB"), 에틸 벤조에이트 ("EB"), 메틸 벤조에이트 ("MB"), 트리아세틴 ("TA"), 및 트리에틸 시트레이트 ("TC") (알드리치 케미칼 캄파니(Aldrich Chemical Co.), 미주리주 세인트 루이스). 용매 조합물, 예를 들어 20% 트리아세틴과 80% 벤질 벤조에이트를 사용하는 경우에, 용매 혼합물을 미리-칭량된 건조 중합체에 직접적으로 첨가하였다. 전형적인 중합체 분자량은 14,400-39,700 (M_w) [6,400-12, 200 (M_n)]의 범위이다. 대표적인 겔 비히클을 하기 표 1에 기재하였다.

[0255] <표 1> 겔 비히클

용매/중합체	용매	중합체	용매 양	중합체 양	겔 중량	비
50/50	BB	PLGA-502	5 g	5 g	10 g	1.0
50/50	TA/BB 혼합물	PLGA-502	5 g	5 g	10 g	1.0
60/40	TA/BB 혼합물	PLGA-502	6 g	4 g	10 g	1.5
70/30	TA/BB 혼합물	PLGA-502	7 g	3 g	10 g	2.3
80/20	TA/BB 혼합물	PLGA-502	8 g	2 g	10 g	4.0
50/50	EB	PLGA-502	5 g	5 g	10 g	1.0
50/50	TA/EB 혼합물	PLGA-502	5 g	5 g	10 g	1.0
50/50	BB	PLGA-502	25 g	25 g	50 g	1.0
55/45	BB	PLGA-502	27.5 g	22.5 g	50 g	1.2
50/50	BB	PLGA-502	50 g	50 g	100 g	1.0
50/50	TA/BB 혼합물	PLGA-502	50 g	50 g	100 g	1.0
50/50	BB	PLGA-502H	5 g	5 g	10 g	1.0
50/50	BB	PLGA-503	50 g	50 g	100 g	1.0

[0256]

[0257] <표 2> 면역억제제

아토르바스타틴
라파마이신
C16-(S)-부틸술폰아미도라파마이신 (C16-BSrap)
템시롤리무스
액티빈 A
아트락틸로시드 (이칼륨 염)
2-(1,8-나프티리딘-2-일)-페놀
E-프로스타노이드 2
테오필린
보르테조밉
이마티닙 (글리벡(GLEEVEC)®)
메틸프레드니솔론
트레티노인 (레티노산, 레틴-A(RETIN-A)®)
시클로스포린 A
피오글리타존
피메크롤리무스
칸타리딘

[0258]

[0259] 상기 표 2에 따른 다양한 면역억제제 (10-20% w/w)를 특정된 투명한 호박색데포 겔 비히클에 첨가하고, 건조 분말이 완전히 습윤될 때까지 수동으로 블렌딩하였다. 이어서, 혼합물을 부착된 스퀘어-팁 금속 스패튤라를 갖는 카프라모(Caframo) 기계적 교반기를 사용하여 통상의 혼합에 의해 완전히 블렌딩하였다. 최종 균질 겔 면역억제제 이식형 중합체성 데포 물질을 보관 또는 분배를 위해 위한 3, 10 또는 30 cc 일회용 시린지로 전달하였다.

[0260] 단계 2: 관용유발 면역 반응의 생체내 평가

[0261] C57BL/6 동물 (n=5)의 군을 미처리 및 미면역화 (비면역화), 미처리 및 면역화 (비처리) 상태로 두거나 또는 제0일, 제3일 및 제7일에 100 μg의 라파마이신을 함유하는 상기 이식형 중합체성 데포 물질로 처리하고 면역화시켰다. 면역화는 미립자 오브알부민 (pOVA)의 주사로 이루어졌다. 중합체 데포-라파마이신을 뒷다리에 이식하였다. 중합체 데포-라파마이신의 용량은 3회 처리 후 총 300 μg에 대해 라파마이신 100 μg에 해당하였다. 제14일에 시작하여 미처리 및 처리된 동물 (비처리 및 Rapa-데포)에게 2 mg/kg의 치료 단백질, 예컨대 재조합 조직 플라스미노겐 활성화제 (rtPA)로 앞다리에 주사하여 격주로 면역화시켰다 (제14일, 제28일 및 제42일). 모든 동물을 나타낸 일에 채혈하고, 항-rtPA 반응을 ELISA에 의해 결정하였다. 라파마이신을 함유하는 겔-이식물은 본원에 제공된 바와 같은 약역학적 유효 수명 내에서 주사될 때 항-rtPA 반응을 효과적으로 억제할 것으로 예상되고, 이러한 효과는 심지어 rtPA를 사용한 프라이밍 및 2회 부스트 후에도 분명할 것으로 예상된다.

[0262] 실시예 10: 합성 나노담체에 부착된 라파마이신의 약역학적 유효 수명 내의 투여

[0263] 물질

[0264] 라파마이신은 TSZ 켐 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 윌슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.69 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스(SurModics Pharmaceuticals) (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 7525 DLG 7A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa·s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0265] 방법

[0266] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0267] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0268] 수중유 에멀젼을 나노담체를 제조하는데 사용하였다. O/W 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 압력 튜브 내에서 합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭으로 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액을 함유하는 비커에 첨가하였다. 3개의 동일한 에멀젼이 형성되었고, 이들을 제1 에멀젼과 동일한 비커에 첨가하였다. 이어서, 이들을 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600xg 및 4℃에서 35분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 현탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다. 이어서, 세척된 나노담체 용액을 폴(Pall) (파트 번호 4656)로부터의 1.2㎛ PES 막 시린지 필터를 사용하여 여과하였다.

[0269] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0270]

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
241	11.1

[0271] 라파마이신-로딩된 나노담체의 면역억제 윈도우 (약역학적 유효 수명)의 결정

[0272] C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷에게 14, 10, 7, 4, 2 및 1일 전 (각각 d-14, -10, -7, -4. -2 및 -1)으로부터 키홀 림펫 헤모시아닌 (d0, 200㎍, KLH)의 주사와 같은 날까지의 다양한 시점 (도 3에 나타난 바와 같음)에 0.9mg의 나노담체를 사용하여 꼬리 정맥에 i.v. 주사하였다. 모든 동물은 제0일, 제7일 및 제14일에 KLH를 매주 주사받았다 (200㎍, KLH). 이들 동물의 혈액에서의 항체 역가를 제19일에 결정하였다.

[0273] 도 3에서의 결과는 라파마이신-함유 나노담체를 심지어 면역화 14일 이전에 주사하는 것이 KLH에 대한 항체 반응을 변형시킨다는 것 및 관용유발 나노담체가 면역 반응의 개시를 약화시키는 유의한 면역억제 윈도우를 제공한다는 것을 제시한다. 결과는 면역억제제의 약역학적 유효 수명 내에 면역억제제 및 항원을 투여함으로써 항원-특이적 면역 반응을 감소시킬 수 있는 능력을 입증한다.

[0274] 실시예 11: 캡슐화된 라파마이신을 사용한 닭 오브알부민에 대한 항원-특이적 관용유발 반응

[0275] NP[Rapa] 물질 및 방법

[0276] 물질

[0277] 라파마이신은 TSZ 켐 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 윌슨 스트리트 185)에서, 제품 코드 R1017로 구입하였다. 1:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 레이크쇼어 바이오머티리얼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 5050 DLG 2.5A로 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.50 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오

머티어리얼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE로 구입하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa·s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480)에서, 제품 코드 1.41350으로 구입하였다. 셀그로 (Cellgro) 포스페이트 완충 염수 1X (PBS 1X)는 코닝(Corning) (20109 버지니아주 마나사스 디스커버리 불러바드 9345)에서, 제품 코드 21-040-CV로 구입하였다.

[0278] 방법

[0279] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0280] 용액 1: 중합체 및 라파마이신 혼합물은 1 mL당 75 mg의 PLGA, 1 mL당 25 mg의 PLA-PEG-Ome, 및 1 mL당 12.5 mg의 라파마이신을 디클로로메탄 중에 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 폴리비닐 알콜은 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL로 제조하였다.

[0281] O/W 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 유리 압력 튜브 내에서 합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭으로 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액 (60 mL)을 함유하는 개방 비커에 첨가하였다. 3개의 추가의 동일한 O/W 에멀젼을 제조하고, 제1과 동일한 비커에 첨가하였다. 이어서 이를 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600xg 및 4℃에서 35분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 동일한 제제를 개별 비커에서 상기와 같이 제조하고, 세척 단계 후에 제1과 합하였다. 이어서 혼합된 나노담체 용액을 폴 파트 번호 4656으로부터의 1.2μm PES 막 시린지 필터를 사용하여 여과하고, -20℃에서 보관하였다.

[0282] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0283]

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
220	11.85

[0284] NP[OVA] 물질 및 방법

[0285] 물질

[0286] 오브알부민 단백질을 워싱턴 바이오케미칼 코포레이션 (08701 뉴저지주 레이크우드 바사르 애비뉴 730)에서, 제품 코드 LS003054로 구입하였다. 54% 락티드 및 46% 글리콜리드 함량 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 레이크쇼어 바이오머티리얼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 5050 DLG 2.5A로 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 28,000 Da의 Mw, 0.38 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLA-PEG 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오머티리얼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 100 DL mPEG 5000 4CE로 구입하였다. 85-89% 가수분해된, 점도 3.4-4.6 mPa·s의 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480)에서, 제품 코드 1.41350.1001로 구입하였다. 셀그로 포스페이트 완충 염수 1X (PBS 1X)는 코닝 (20109 버지니아주 마나사스 디스커버리 불러바드 9345)에서, 제품 코드 21-040-CV로 구입하였다.

[0287] 방법

[0288] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0289] 용액 1: 50 mg/mL의 오브알부민 단백질은 10 중량% 수크로스를 함유하는 10mM 포스페이트 완충제 pH 8 중에서 제조하였다. 용액 2: PLGA는 화학 흄 후드 내에서 PLGA를 디클로로메탄 1 mL당 100 mg으로 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 3: PLA-PEG-OMe는 화학 흄 후드 내에서 PLA-PEG-OMe를 디클로로메탄 1 mL당 100 mg으로 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 4: 100mM 포스페이트 완충제, pH 8 중 65 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0290] 먼저 1차 (W1/O) 에멀젼은 용액 1 내지 3을 혼합하여 생성하였다. 용액 1 (0.2 mL), 용액 2 (0.75 mL), 및 용액 3 (0.25mL)을 빙수조 내에서 >4분 사전-냉각시킨 소형 유리 압력 튜브 내에서 합하고, 브랜슨 디지털 소니파

이어 250을 사용하여 빙조 상에서 40초 동안 50% 진폭으로 초음파처리하였다. 이어서 2차 (W1/O/W2) 에멀젼은 용액 4 (3 mL)를 1차 에멀젼에 첨가하고, 볼텍스 혼합하여 유백색 현탁액을 생성한 다음, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 빙조 상에서 60초 동안 30% 진폭으로 초음파처리하여 형성하였다. 2차 에멀젼을 PBS 1X (30 mL)를 함유하는 개방 50 mL 비커에 첨가하였다. 2차의 동일한 이중 에멀젼 제제를 상기 기재된 바와 같이 제조하고, 제1과 동일한 50 mL 비커에 첨가하였다. 2개의 제제를 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고 나노담체가 현탁액 중에 형성되게 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600 rcf에서 50분 동안 회전시키고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 현탁된 나노담체 부분을 세척하였다. 이러한 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 현탁액을 사용 시까지 -20℃에서 동결 보관하였다.

유효 직경 (nm)	오브알부민 함량 (% w/w)
164	5.81

[0291]

[0292] NP[GSK1059615] 물질 및 방법

[0293] 물질

[0294] GSK1059615는 메드켐 익스프레스(MedChem Express) (08852 뉴저지주 스위트 102D 몬마우스 정션 디어 파크 드라이브 11)에서, 제품 코드 HY-12036으로 구입하였다. 1:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 레이크쇼어 바이오머티리얼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 5050 DLG 2.5A로 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.26 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오머티어리얼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5K-E)에서 구입하였다. 셀그로 포스페이트 완충 염수 1X pH 7.4 (PBS 1X)는 코닝 (20109 버지니아주 마나사스 디스커버리 불러바드 9345)에서, 제품 코드 21-040-CV로 구입하였다.

[0295] 방법

[0296] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0297] 용액 1: PLGA (125 mg) 및 PLA-PEG-OMe (125 mg)를 아세톤 10 mL 중에 용해시켰다. 용액 2: GSK1059615는 N-메틸-2-피롤리디논 (NMP) 1 mL 중 10 mg으로 제조하였다.

[0298] 나노담체는 용액 1 (4 mL) 및 용액 2 (0.25 mL)를 소형 유리 압력 튜브 내에서 합하고, 혼합물을 20 mL의 초-순수를 함유하는 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반 하에 적가하여 제조하였다. 플라스크를 회전 증발 장치 상에 장착하고, 감압 하에 아세톤을 제거하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600 rcf 및 4℃에서 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 이어서 세척된 나노담체 용액을 폴, 파트 번호 4656으로부터의 1.2 μm PES 막 시린지 필터를 사용하여 여과하였다. 동일한 나노담체 용액을 상기와 같이 제조하고, 여과 단계 후에 제1과 풀링하였다. 균질한 현탁액을 -20℃에서 동결 보관하였다.

[0299] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 GSK1059615의 양은 351nm에서 UV 흡수에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

유효 직경 (nm)	GSK1059615 함량 (% w/w)
143	1.02

[0300]

[0301] C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷 마우스에게 제-21일 및 제-14일에 염수 (비처리), 1.2mg의 라파마이신-함유 나노담체 (NP[Rapa]) 또는 8mg의 GSK1059615-함유 나노담체 (NP[GSK1059615])와 조합된 1.1mg의 전체 오브알부민-로딩된 나노담체 (NP[OVA])를 꼬리 정맥에 i.v. 주사하였다.

[0302] 제0일에 모든 동물에게 뒷다리에 2 μg의 CpG와 혼합된 25 μg의 미립자 OVA (pOVA)를 s.c. 주사한 다음, 제7일 및 제14일에 25 μg pOVA만을 주사하였다. 제21일에 항체 역가를 측정하였다. 임의의 처리의 부재 하에, 동물은 항-OVA IgG 항체 역가에 의해 측정될 수 있는 OVA에 대한 강건한 면역 반응을 발생시켰다. 도 4에 나타난

제21일의 항체 역가는 동일한 용액으로 캡슐화된 OVA와 병용 투여된 2회 용량의 합성 관용유발 나노담체(NP[OVA]+NP[Rapa] 또는 NP[GSK1059615])가 OVA+CpG의 1회 주사 및 OVA 단독의 2회 주사 후에도 OVA에 대한 항체 형성을 감소시키는데 효과적임을 입증하였다. 이들 결과는 캡슐화된 면역억제제 (예컨대 라파마이신 및 GSK1059615)가 단백질과 병용 전달된 경우에, 그 단백질에 대한 항체 형성을 방지할 수 있음을 제시한다.

[0303] 실시예 12: 합성 나노담체를 사용하는 투여 약역학적 유효 수명 (예측)

[0304] 가용성 인자 VIII 및 실시예 1의 합성 나노담체를 사용하여 비-인간 영장류 대상체에 대해 파일럿 시험을 수행하였다. 50마리의 비-인간 영장류 대상체를 5개의 아암에 무작위로 배정하였다: 위약, 및 이어서 용량 범위설정을 위해 선택된 4개 용량 수준의 합성 나노담체. 용량 범위설정은 20시간 내지 1개월 범위의 약역학적 유효 수명을 확립하는 것이고, 바람직한 약역학적 유효 수명 표적은 1일이다. 제0일에, 각 활성 아암의 대상체 모두에게 합성 나노담체의 용량을 피하로 투여하고, 합성 나노담체 투여 24시간 내에 인자 VIII의 표준 주입 용량을 주입하였다. 2주 후에, 각 동물을 가용성 인자 VIII의 표준 용량으로 챌린지하고, 항-인자 VIII IgG 항체의 수준을 표준 ELISA 기술을 사용하여 측정하였다. 항-인자 VIII 항체의 유의한 감소를 보여주는, 4개 활성 아암 중으로부터의 합성 나노담체의 최하위 용량을 시험 용량으로서 선택하였다.

[0305] 이어서, 합성 나노담체의 시험 용량을 인간 대상체에게의 투여에 대해 알로메트릭 스케일링하고, 가용성 인자 VIII의 표준 용량과 함께 사용된 합성 나노담체의 투여 용량 수준의 범위를 결정하기 위해 인간 임상 시험에 사용하였다. 이어서, 합성 나노담체 및 인자 VIII의 투여 용량을 정규 임상 실시에 이용가능하게 만들었다.

[0306] 실시예 13: 합성 삼투 펌프를 사용하는 투여 약역학적 유효 수명 (예측)

[0307] 가용성 인자 VIII 및 삼투 펌프 (실시예 6의 라파마이신 대신 GSK1059615를 사용하여 실시예 6에 따라 일반적으로 제조됨)를 사용하여 비-인간 영장류 대상체에 대해 파일럿 시험을 수행하였다. 50마리의 비-인간 영장류 대상체를 5개의 아암에 무작위로 배정하였다: 위약, 및 이어서 삼투 펌프에 의해 전달되고 용량 범위설정을 위해 선택된 4개 용량 수준의 GSK1059615. 용량 범위설정은 20시간 내지 1개월 범위의 약역학적 유효 수명을 확립하는 것이고, 바람직한 약역학적 유효 수명 표적은 1일이다. 제0일에, 각 활성 아암의 대상체 모두에게 합성 나노담체의 용량을 피하로 투여하고, 합성 나노담체 투여 24시간 내에 인자 VIII의 표준 주입 용량을 주입하였다. 2주 후에, 각 동물을 가용성 인자 VIII의 표준 용량으로 챌린지하고, 항-인자 VIII IgG 항체의 수준을 표준 ELISA 기술을 사용하여 측정하였다. 항-인자 VIII 항체의 유의한 감소를 보여주는, 4개 활성 아암 중으로부터의 삼투 펌프에 의해 전달된 GSK1059615의 최하위 용량을 시험 용량으로서 선택하였다.

[0308] 이어서, 삼투 펌프에 의해 전달된 GSK1059615의 시험 용량을 인간 대상체에게의 투여에 대해 알로메트릭 스케일링하고, 가용성 인자 VIII의 표준 용량과 함께 사용된 삼투 펌프에 의해 전달된 GSK1059615의 투여 용량 수준의 범위를 결정하기 위해 인간 임상 시험에 사용하였다. 이어서, 삼투 펌프에 의해 전달된 GSK1059615 및 인자 VIII의 투여 용량을 정규 임상 실시에 이용가능하게 만들었다.

[0309] 실시예 14: 치료 폴리뉴클레오티드를 사용하는 투여 약역학적 유효 수명 (예측)

[0310] 아스파라기나제를 코딩하는 mmRNA (미국 특허 출원 2013/0115272 (de Fougerolles et al.)에 따른 제조에 따라 일반적으로 제조됨 ("mmRNA")) 및 실시예 1의 합성 나노담체를 사용하여 비-인간 영장류 대상체에 대해 파일럿 시험을 수행하였다. 50마리의 비-인간 영장류 대상체를 5개의 아암에 무작위로 배정하였다: 위약, 및 이어서 용량 범위설정을 위해 선택된 4개 용량 수준의 합성 나노담체. 용량 범위설정은 20시간 내지 1개월 범위의 약역학적 유효 수명을 확립하는 것이고, 바람직한 약역학적 유효 수명 표적은 1일이다. 제0일에, 각 활성 아암의 대상체 모두에게 합성 나노담체의 용량을 피하로 투여하고, 합성 나노담체 투여 24시간 내에 인자 VIII의 표준 주입 용량을 주입하였다. 2주 후에, 각 동물을 mmRNA의 표준 용량으로 챌린지하고, 항-mmRNA 항체의 수준을 표준 ELISA 기술을 사용하여 측정하였다. 항-mmRNA 항체의 유의한 감소를 보여주는, 4개 활성 아암 중으로부터의 합성 나노담체의 최하위 용량을 시험 용량으로서 선택하였다.

[0311] 이어서, 합성 나노담체의 시험 용량을 인간 대상체에게의 투여에 대해 알로메트릭 스케일링하고, mmRNA의 표준 용량 수준과 함께 사용된 합성 나노담체의 투여 용량의 범위를 결정하기 위해 인간 임상 시험에 사용하였다. 이어서, 합성 나노담체 및 mmRNA의 투여 용량을 정규 임상 실시에 이용가능하게 만들었다.

[0312] 실시예 15: 나노결정질 면역억제제를 사용하는 투여 약역학적 유효 수명 (예측)

[0313] 가용성 인자 VIII 및 실시예 1의 합성 나노담체를 사용하여 비-인간 영장류 대상체에 대해 파일럿 시험을 수행하였다. 50마리의 비-인간 영장류 대상체를 5개의 아암에 무작위로 배정하였다: 위약, 및 이어서 용량 범위설

정을 위해 선택된 4개 용량 수준의 나노결정질 라파마이신. 용량 범위설정은 20시간 내지 1개월 범위의 약역학적 유효 수명을 확립하는 것이고, 바람직한 약역학적 유효 수명 표적은 1일이다. 제0일에, 각 활성 아암의 대상체 모두에게 나노결정질 라파마이신의 용량을 피하로 투여하고, 나노결정질 라파마이신 투여 24시간 내에 인자 VIII의 표준 주입 용량을 주입하였다. 2주 후에, 각 동물을 가용성 인자 VIII의 표준 용량으로 챌린지하고, 항-인자 VIII IgG 항체의 수준을 표준 ELISA 기술을 사용하여 측정하였다. 항-인자 VIII 항체의 유의한 감소를 보여주는, 4개 활성 아암 중으로부터의 나노결정질 라파마이신의 최하위 용량을 시험 용량으로서 선택하였다.

[0314] 이어서, 나노결정질 라파마이신의 시험 용량을 인간 대상체에게의 투여에 대해 알로메트릭 스케일링하고, 가용성 인자 VIII의 표준 용량과 함께 사용된 나노결정질 라파마이신의 투여 용량 수준의 범위를 결정하기 위해 인간 임상 시험에 사용하였다. 이어서, 나노결정질 라파마이신및 인자 VIII의 투여 용량을 정규 임상 실시에 이용가능하게 만들었다.

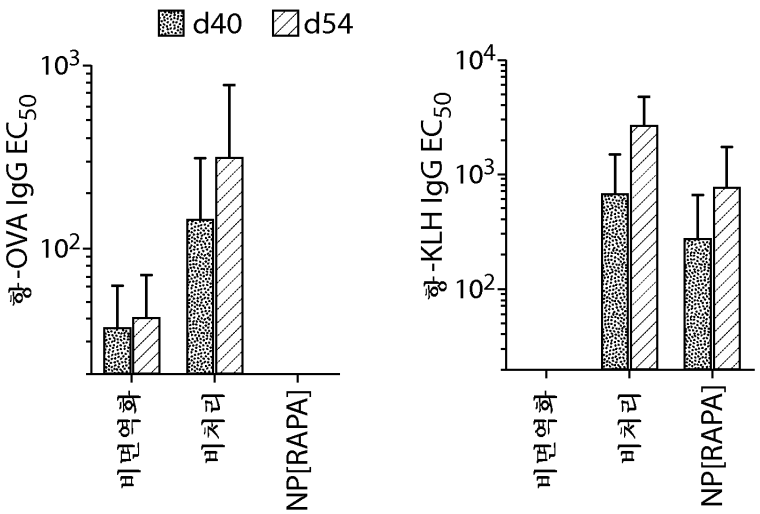
[0315] 실시예 16: 나노결정질 면역억제제를 사용하는 투여 약역학적 유효 수명 (예측)

[0316] 아스파라기나제를 코딩하는 mmRNA (미국 특허 출원 2013/0115272 (de Fougerolles et al.)에 따른 제조에 따라 일반적으로 제조됨 ("mmRNA")) 및 나노결정질 라파마이신을 사용하여 비-인간 영장류 대상체에 대해 파일럿 시험을 수행하였다. 50마리의 비-인간 영장류 대상체를 5개의 아암에 무작위로 배정하였다: 위약, 및 이어서 용량 범위설정을 위해 선택된 4개 용량 수준의 나노결정질 라파마이신. 용량 범위설정은 20시간 내지 1개월 범위의 약역학적 유효 수명을 확립하는 것이고, 바람직한 약역학적 유효 수명 표적은 1일이다. 제0일에, 각 활성 아암의 대상체 모두에게 나노결정질 라파마이신의 용량을 피하로 투여하고, 나노결정질 라파마이신 투여 24시간 내에 인자 VIII의 표준 주입 용량을 주입하였다. 2주 후에, 각 동물을 mmRNA의 표준 용량으로 챌린지하고, 항-mmRNA 항체의 수준을 표준 ELISA 기술을 사용하여 측정하였다. 항-mmRNA 항체의 유의한 감소를 보여주는, 4개 활성 아암 중으로부터의 나노결정질 라파마이신의 최하위 용량을 시험 용량으로서 선택하였다.

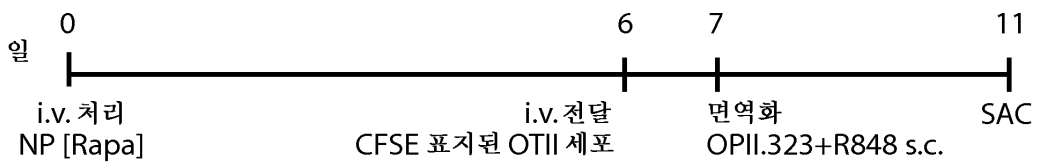
[0317] 이어서, 나노결정질 라파마이신의 시험 용량을 인간 대상체에게의 투여에 대해 알로메트릭 스케일링하고, mmRNA의 표준 용량 수준과 함께 사용된 나노결정질 라파마이신의 투여 용량의 범위를 결정하기 위해 인간 임상 시험에 사용하였다. 이어서, 나노결정질 라파마이신 및 mmRNA의 투여 용량을 정규 임상 실시에 이용가능하게 만들었다.

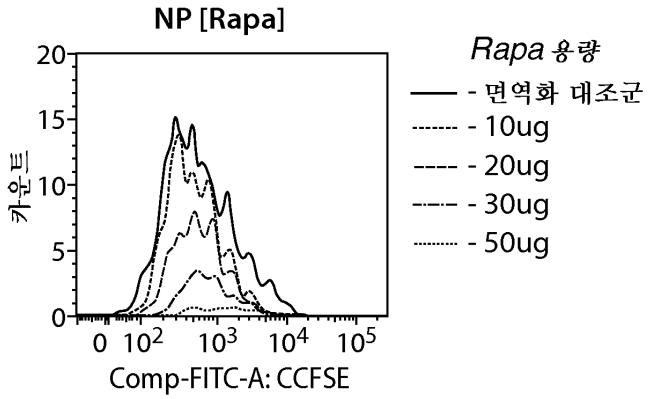
도면

도면1

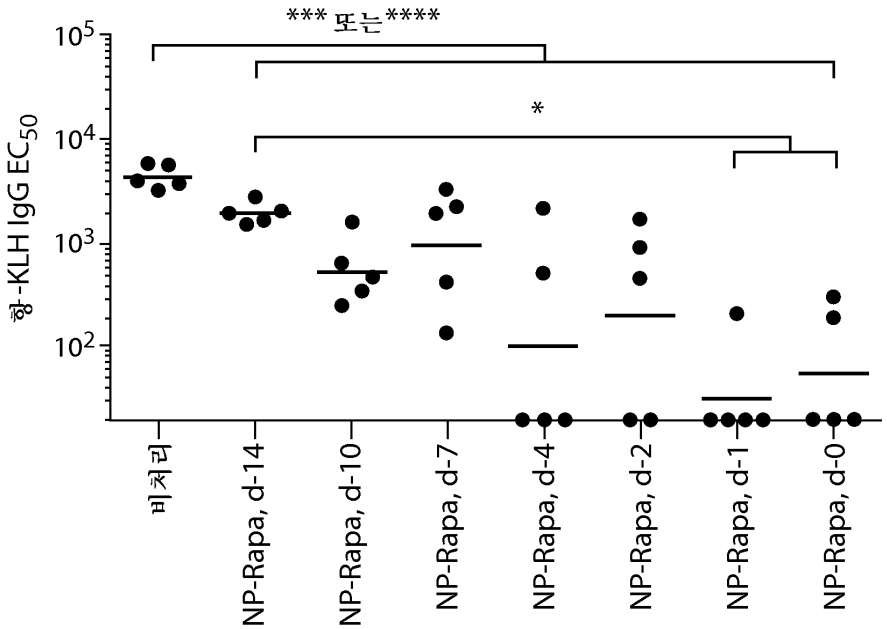


도면2

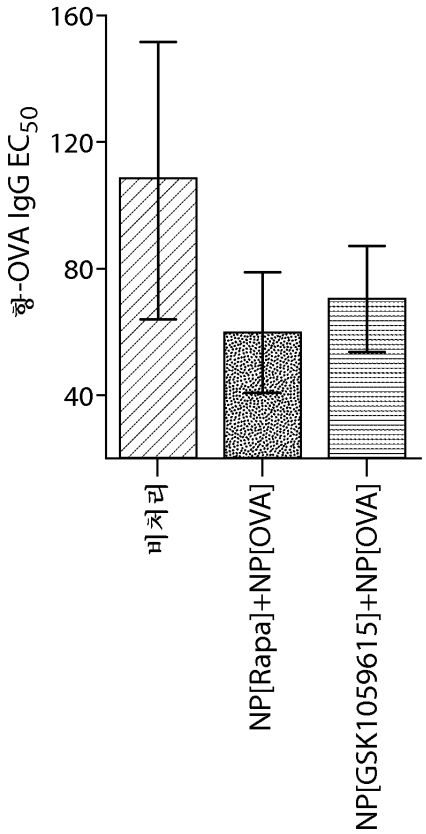

일
0
6
7
11
i.v. 처리
NP [Rapa]
i.v. 전달
CFSE 표지된 OTII 세포
면역화
OPII.323+R848 s.c.
SAC


NP [Rapa]
Rapa 용량
- 면역화 대조군
- 10ug
- 20ug
- 30ug
- 50ug
카운트
Comp-FITC-A: CCFSE

도면3


*** 또는 ****
*
항-KLH IgG EC50
비처리
NP-Rapa, d-14
NP-Rapa, d-10
NP-Rapa, d-7
NP-Rapa, d-4
NP-Rapa, d-2
NP-Rapa, d-1
NP-Rapa, d-0

도면4


160
120
80
40
항-OVA IgG EC50
비처리
NP[Rapa]+NP[OVA]
NP[GSK1059615]+NP[OVA]