



등록특허 10-2460800



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월31일
(11) 등록번호 10-2460800
(24) 등록일자 2022년10월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/4178* (2006.01)
A61K 35/30 (2015.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/5153 (2013.01)
A61K 31/4178 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7014652
- (22) 출원일자(국제) 2014년10월31일
심사청구일자 2019년10월31일
- (85) 번역문제출일자 2016년06월01일
- (65) 공개번호 10-2016-0085794
- (43) 공개일자 2016년07월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/063545
- (87) 국제공개번호 WO 2015/066535
국제공개일자 2015년05월07일
- (30) 우선권주장
61/899,080 2013년11월01일 미국(US)
62/040,242 2014년08월21일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2013155487 A1*
WO2012068531 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 면역요법용 모듈러 입자

(57) 요 약

나노입자 조성물이 개시된다. 상기 나노입자 조성물은 전형적으로 적어도 하나, 바람직하게는 둘 또는 그 이상의 활성 제제를 포함하고, 그 중 하나는 전달운반체에 로드되고, 그 표면에 부착되며, 및/또는 내부에 폐쇄되는 면역 조절성 화합물이다. 상기 전달 운반체는 폴리머 코어 및 지질 쉘 또는 PLGA와 같은 생분해성 폴리머 나노입자를 포함하는 나노리포겔일 수 있다. 전형적으로, 상기 적어도 하나의 활성 제제는 면역 조절기이고, 이 면역 조절기는 면역 자극 반응을 증가시키거나 면역 억제 반응을 감소시킨다. 일부 실시예에서, 상기 나노입자는 면역 자극 반응을 증가시키고 면역 억제 반응을 감소시키는 두 면역 조절기를 포함한다. 상기 나노입자는 표적 세포로 전달을 개선하는 표적 모이에티로써 장식될 수 있다. 면역 반응을 향상시키고 암과 같은 질병을 치료하기 위하여 상기 조성물을 사용하는 방법을 개시한다.

(52) CPC특허분류

A61K 35/30 (2013.01)

A61K 38/1709 (2020.05)

A61K 38/195 (2013.01)

A61K 38/2013 (2013.01)

A61K 38/217 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

나노입자 조성물로서,

(a) 폴리머 코어 및 지질셀을 포함하는 나노리포겔; 생분해성 폴리머 나노입자; 및 리포솜으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 전달 운반체 및

(b) 상기 전달 운반체로 로드되고, 상기 전달운반체의 표면에 부착되거나 상기 전달 운반체내에 포함된 IL-2 및 로사르탄을 포함하는 나노입자 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 전달 운반체는 비가교결합성 폴리머로 형성된 폴리머 코어를 포함하는 나노리포겔인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 전달 운반체는 하나 이상의 가교결합성 폴리머 - 하나 이상의 광-중합성 그룹에 의해 가교결합되는 폴리머 -로 형성되는 폴리머 코어를 포함하는 나노리포겔인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 전달 운반체는,

폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌, 1,2-글리콜, 폴리(프로필렌 옥사이드) 또는 폴리프로필렌 1,3-글리콜 세그먼트로부터 선택된 하나 이상의 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트; 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 또는 폴리락티트-코글리코라이드(PLGA) 세그먼트로부터 선택된 하나이상의 알리파틱 폴리에스테르 세그먼트; 및 하나 이상의 광-중합성 그룹을 함유하는 블록 공중합체로 형성된 폴리머 코어를 포함하는 나노리포겔인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 블록 공중합체는,

중심 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트, 양끝 중 하나에 부착된 인접 알리파틱 폴리에스테르 세그먼트, 및 하나 이상의 광중합성 그룹을 함유하는 트리-블록 중합체인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 전달 운반체는,

중합체 매트릭스내에 분산되거나 중합체 매트릭스에 공유결합적으로 결합된 하나 이상의 호스트 분자 및 지질셀을 포함하는 나노리포겔인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 호스트 분자는 다당류, 사이클로덱스트린, 크립텐드, 크립토판, 캐비탄드, 크라운 에테르, 텐드리머, 카텐

난, 폴리카테난, 카르세란드, 쉬퍼란드, 카본 나노튜브, 폴리렌, 무기 포스페이트 및 실리카로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 전달 운반체는 하나 이상의 호스트 분자 및 지질셀을 함유하는 폴리머 코어를 포함하고; 및

상기 IL-2 및 로사르탄 각각은 폴리머 코어내에 분산되고, 지질셀내에 분산되거나 지질셀내에 부착되는 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 로사르탄은 호스트 분자와 관련되고 상기 IL-2는 상기 중합체 코어내에 분산되는 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 하나 이상의 호스트 분자는,

비작용화된 사이클로텍스트린이거나, 중합체 매트릭스 코어와 반응하는 하나 이상의 반응성 작용기 또는 상기 사이클로텍스트린의 용해도를 수정하는 하나 이상의 반응성 작용기와 작용화되는 사이클로텍스트린을 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 전달 운반체는,

인지질, PEG화된 인지질 및 콜레스테롤의 혼합물로 이루어진 지질셀을 포함하는 나노리포겔인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 전달 운반체는,

하이드록시산의 폴리머, 및 폴리에틸렌 글리콜과의 상기 하이드록시산의 공중합체, 폴리안하이드라이드, 폴리(오르토)에스테르, 폴리우레탄, 폴리(부티르산), 폴리(발레르산), 폴리(락타이드-코-카프로락톤), 및 이들의 혼합물 및 공중합체로부터 선택된 하나 이상의 폴리머로 형성된 폴리머 나노입자인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

RGD 웨პ타이드, CD40 아고니스트, 안티-CD40 항체 또는 이의 프레그먼트, T 세포 수용체(TCR), IL-15/IL-15R α 콤플렉스, 및 항원 프리젠팅 세포를 표적으로 삼는 모이에티로 이루어진 그룹에서 선택된 표적 모이에티로 장식되는(decorated) 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

면역 조절 물질 또는 화학요법제인 적어도 하나의 추가적인 활성제를 더 포함하고,

상기 적어도 하나의 추가적인 활성제는 상기 전달 운반체로 로드되지 않거나, 상기 전달 운반체의 표면에 부착

되지 않거나 또는 상기 전달 운반체내에 포함되어 있지 않는 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 면역 조절 물질은 면역 반응 자극제이거나, 면역 억제를 막는 제제; 또는 종양 체크포인트 봉쇄 또는 보조 자극 분자를 표적으로 삼는 제제인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 면역 반응 자극제는 PD-1 길항제, CTLA4 길항제 또는 이들의 조합; 또는 상기 화학요법제는 독소루비신인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 나노입자 조성물은 감염성 질병 또는 암의 증상을 치료하기 위하여 필요한 환자에게 상기 나노입자 조성물의 유효량을 투여함으로써, 감염성 질병 또는 암을 치료하기 위한 나노입자 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 암은,

뼈, 방광, 뇌, 가슴, 자궁경부 결장, 직장, 식도, 신장, 간, 폐, 코인두, 췌장, 전립선, 피부, 위장 및 자궁의 다발성 골수증 및 선암 및 육종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 암인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 나노입자 조성물은, 면역 반응 자극제 또는 화학요법제의 면역 자극 또는 면역 증진 효과를 증가시키기 위해서 상기 나노입자 조성물의 유효량을 면역 반응 자극제 또는 화학요법제와 조합하여 필요한 대상에 투여함으로써, 면역 반응 자극제의 면역 자극 또는 면역 증진 효과 또는 화학요법제의 효과를 증가시키거나 향상시키기 위한 나노입자 조성물로서,

상기 나노입자 조성물은 면역 반응 자극제 또는 화학요법제와 함께 또는 분리하여 대상에게 투여하는 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 나노입자 조성물은, 면역 반응 자극제 또는 화학요법제와 조합하여 유효량의 나노입자 조성물을 필요한 환자에게 투여함으로써, 감염성 질환 또는 암을 치료하기 위한 나노입자 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 암은,

뼈, 방광, 뇌, 가슴, 자궁경부 결장, 직장, 식도, 신장, 간, 폐, 코인두, 췌장, 전립선, 피부, 위장 및 자궁의 다발성 골수증 및 선암 및 육종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 암인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 나노입자 조성물 및 상기 면역 반응 자극제 또는 화학요법제는 동시에 또는 다른 시간에, 대상에게 분리되어 독립적으로 투여되는 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 23

제19항에 있어서,

상기 면역 반응 자극제는 종양 체크포인트 봉쇄 또는 보조 자극 분자를 표적으로 삼는 제제인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

청구항 24

제19항에 있어서,

상기 면역 반응 자극제는 PD-1 길항제, 또는 CTLA4-길항제, 또는 화학요법제는 독소루비신인 것을 특징으로 하는 나노입자 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원의 상호 참조

[0002]

본 출원은 2013.11.01에 출원된 미국특허출원 제61/899,080호와 2014.08.21자 출원된 미국특허출원 제62/040,242호의 우선권을 주장하고, 이들 미국특허출원은 본 명세서에서 원용된다.

[0003]

본 발명은 일반적으로 나노입자 조성물에 관한 것이고, 면역요법을 위한 나노입자 조성물의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004]

치료의 효과는 사용되는 약물의 작용 메카니즘에 의존하지만, 다른 요인들도 최적 반응을 도출하기 위하여 중요할 수 있다. 예컨대, 약물 동력학적 및 약력학적 특성을 포함한 많은 복합적인 문제들 뿐만 아니라 질병의 발병에 대한 투여량 및 투여시기가 중요한 고려사항일 수 있다. 약물 전달을 위한 최적의 전략들을 세우기 위한 노력으로 치료제의 배열로써 수년간 다양한 연구가 진행되어 왔다. 많은 다른 형태의 질병을 위한 약물 요법들이 치료법의 조합으로 진화되어 왔다. 예를 들면, 몇몇 경우에, 효과를 개선하기 위한 다음의 조합들이 사용되고 있다. (1) 동일 또는 다른 질병 표적을 가진 약물들을 조합함으로써; (2) 조합된 2개의 활성이 각각의 효과의 합보다 더 큰 2 약물을 조합함으로써; 및 (3) 하나의 약물이 질병 상태에 직접 작용하는 반면 다른 약물은 환자의 증세를 간접적으로 개선하는, 2가지 약물을 조합함으로써. 그러나 질병에 이질적인 역할을 하는 이질적인 약물들은 화학적 속성에 관하여 극적으로 다르고, 치료 조합에서 약물 전달 문제들은 매우 도전적일 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

따라서 본 발명의 목적은 개선된 약물 전달과 질병 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

[0006]

본 발명의 다른 목적은 표적 세포에 대한 활성 약물의 전달과 효과를 개선하기 위한 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

[0007]

본 발명의 또 다른 목적은, 적어도 2가지 활성 약물을 포함한 복합 치료제의 전달 및 효과를 개선하기 위한 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

[0008]

본 발명의 또 다른 목적은, 필요한 환자에 면역 자극 반응을 유도하거나 증강시키기 위한 구체적인 복합 치료를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009]

나노입자 조성물이 개시된다. 전달 운반체(vehicle) 내에 탑재, 전달 운반체 표면에 부착된, 및/또는 둘러쌓인,

하나, 바람직하게는 둘 또는 그 이상의 활성 제제를 전형적으로 포함하는 나노입자 조성물이 개시된다. 전달 운반체는 폴리머 코어 및 지질 쉘 또는 생분해성 폴리머 나노입자, 예를 들면, PLGA 나노입자를 포함한 나노리포겔(nanolipogels)일 수 있다. 활성 제제는 치료 또는 진단제, 표적 모이에티(moieties), 항원 또는 보조제일 수 있다. 둘 또는 그 이상의 활성 제제의 각각의 상대 농도 및 전달 운반체에서의 또는 내의 위치는 표적 세포에 의해 수용되는 바람직한 투여량 및 제시를 적응하기 위하여 상기 나노입자 조성물의 제조중에 조작될 수 있다. 둘 또는 그 이상의 활성 제제를 동일한 전달 운반체안으로 또는 상에 탑재하는 것은 둘 또는 그 이상의 활성 제제가 표적세포에 동시에 또는 소정의 순서로 존재하게 한다.

- [0010] 가장 바람직한 실시예에서, 나노입자 조성물은 적어도 하나의 면역 조절 물질(immunomodulator)를 포함한다. 상기 면역 조절 물질은 면역 자극 반응을 증가시키거나 강화하는 물질, 예컨대 T 세포 반응을 강화하거나, T 세포 활성을 증가시키고, T세포 증식을 증가시키고, T세포 억제신호를 감소시키고, 사이토카인의 생산을 강화하고, T 세포의 분화 또는 효과 기능을 자극하고, T세포의 생존을 촉진 하는 물질일 수 있다.
- [0011] 면역 자극 반응을 증가시키거나 강화하는 예시적인 물질은 예를 들면, 그러나 이에 한정되는 것은 아니고, 사이토카인과 인터루킨-2 (IL-2) 및 인터페론 γ (IFN γ)을 포함한다.
- [0012] 상기 면역 조절 물질은 면역 억제 반응을 감소시키거나 억제하는 물질, 예를 들면, 조절성 T세포(Treg)를 고갈시키고; Treg의 분화, 수송, 효과 기능 또는 이들의 조합을 차단하고; 효과기 세포 억제 역치를 상승시키는; 물질이거나 이들의 조합일 수 있다. 면역 억제 반응을 감소 또는 억제시키는 예시적인 물질은, SB505124 또는 로사르탄(losartan)과 같은 TGF- β 억제제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0013] 상기 조성물은 표적 모이에티(moiet)을 포함할 수 있다. 바람직한 표적 모이에티는 RGD 웨티드, CD40 작용체, p53 항원을 인식하는 T 세포 수용체 및 IL-15/IL-15R α 복합체를 포함한다.
- [0014] 활성 제제의 구체적인 조합이 또한 개시된다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 상기 전달 운반체는 로사르탄과 조합된 IL-2 또는 IFN γ 로 탑재되거나 장식된다. 다른 실시예에서, 상기 전달 운반체는 IL-2 또는 IFN γ 로드되고, RGD 웨티드 또는 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 같은 표적 모이에티로써 장식된다.
- [0015] 인공 수상 세포(dendritic cell) 및 수상 세포를 모방한 조성물이 개시된다. 특정 실시예에서, 인공 수상 세포는 폴리머 코어를 가진 나노리포겔과 지질 쉘 또는 생분해성 폴리머 나노입자로 구성된다. 나노리포겔 또는 폴리머 나노입자, 예를 들어, PLGA 나노입자는, IL-15/IL-15R α 복합체로 장식된다. 인공 수상 세포는 하나 이상의 추가적인 활성 제제, 예를 들면, IL-2, IFN γ , 로사르탄, SB505124, 또는 이들의 임의의 조합으로 로드될 수 있다.
- [0016] 환자에서의 면역 반응을 자극 또는 향상시키는 방법과 암 환자를 치료하는 방법이 또한 개시된다. 전형적으로, 상기 방법은 면역 반응을 증가시키고, 암 세포를 파괴하고, 암세포의 성장 및/또는 전이를 방해하고, 및/또는 하나 이상의 부정적인 결과 및/또는 후유증을 줄이기 위한, 나노입자 조성물의 유효량을 환자에게 투여하는 방법을 포함한. 이 작용 모드는 치료적 또는 예방적일 수 있다. 그와 같이, 투여되는 입자를 사용하는 면역반응의 개선, 자극 또는 강화는 알려진 항원 또는 자가 면역 질환의 억제와 양 백신 개발에 유용하다.
- [0017] 추가적인 활성 제제를 환자에게 투여하는 것과 조합하여, 전달 운반체에 로드(load)된 나노리포겔 또는 하나 이상의 활성 제제를 갖는 폴리머 입자와 같은 전달 운반체를 포함하는 나노입자 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 필요한 환자를 치료하는 방법이 또한 제공된다. 나노입자 조성물 및 추가의 활성 제제는 단일 약학 조성물로 또는 다른 별도의 약학 조성물로 별개로 투여될 수 있다. 특히 바람직한 실시예에서, 나노입자 조성물은, 나노리포겔들 또는 전염증성 사이토카인(예를 들어, IL-2) 및/또는 TGF β 억제제(예, 로사르탄)을 가지는 다른 폴리머 입자를 포함하고, 상기 추가적인 활성 제제는 면역 조절 물질 또는 화학 치료제이다. 특히 바람직한 실시예에서, 상기 하나 또는 그 이상의 활성 제제는, PD-1 길항제 (예를 들어, 길항 항 PD1 항체, 항 B7-H1 항체 등), 또는 CTLA4 길항제 (예, 길항성 항 CTLA4 항체) 또는 그보다 더 바람직하게는 이들의 조합과 같은 면역 반응 자극제 또는 강화제이다. 다른 바람직한 실시예에서, 상기 추가의 활성 제제는 화학 치료제, 예를 들어 독소루비신이다.

발명의 효과

- [0018] 상기 방법은 향상된 면역 반응(예를 들어, T 세포 증식 또는 활성화와 같은 T 세포 반응의 증가 또는 유도)이 요구되는 환자를 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 예시적인 환자(대상)은 암 또는 감염성 질환을 가진 환자를 포함한다. 면역 반응 (예를 들어, 증가 또는 유도된 T 세포 반응)은 암 또는 질병의 항원에 대항할 수 있다. 면

역 반응은 감염 또는 암을 치료하는데 효과적일 수 있다. 일부 실시예에서, 면역 반응은 암성 및/또는 질병에 감염된 세포에 대한 것일 수 있으며, 암 및/또는 질병의 하나 이상의 증상(예를 들어, 종양 부담, 종양 진행, 질병 진행 등)을 감소시킬 수 있다. 치료 요법도 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0019]

도 1a는 쿠마린-6-로드 PLGA 나노입자 주사 3시간 후 쥐의 비장, 간, 폐, 심장, 신장의 쿠마린-6/조직(ng/g)의 분포를 나타낸 막대 그래프이다.

도 1b는 쿠마린-6-로드 PLGA 나노입자 주사 6시간 후 쥐의 비장, 간, 폐, 심장, 신장의 쿠마린-6/조직(ng/g)의 분포를 나타낸 막대 그래프이다.

도 1c는 비장 세포의 서브 세트 내의, (C6 PLGA 나노입자 처리된(closed bar)), (비 형광 PLGA 나노입자 처리된(open bar)), 쿠마린-6 PLGA 나노입자 양성 세포의 %를 나타내는 막대 그래프이다.

도 1d는 램프질의 서브 세트 내의, C6 PLGA 나노입자 처리된(closed bar), 비 형광 PLGA 나노입자 처리된(open bar), 쿠마린-6 PLGA 나노입자 양성 세포(CD11c+F4/80-, CD11c+F4/80+, CD11c-F4/80-, B220 양성, CD4 양성, and CD8 양성)의 %를 나타내는 막대 그래프이다. *는 ANOVA(장기)에 의해 그리고 2-tailed t-test에 의해 $p<0.05$ 를 나타낸다.

도 2는 폐하 A375C15N (p53+HLA-A2/인간 흑색종) 이종 이식 종양 확립 및 PBS, TCR-입자 (IL-2 캡슐화된) 나노리포겔, 또는 TCR/IL-2 (가용성 p53-특이 scTCR/IL-2 융합단백질(Altor 801, Altor Biosciences, Miramar, FL)) 나노입자로 후속 처리한 후의 누드 쥐의 시간(일)에 대한 상태 종양 부피(mm^3)를 나타내는 선 그래프이다.

도 3은 B16F10 악성 흑색종 세포로 접종한 후 약 7일부터 시작하여, 항-CD40으로 표면개질된(-▲-); 항-CD40으로 표면개질되고 IL-2로 로드된(-▼-); 또는 대조군으로서, 빈 입자(깨끗한 표면 및 빈)(-■-); 또는 완충된 식염수(1X PBS)(-●-) 5 μ g의 PLGA 나노입자 처리 후, 시간에 대한 쥐의 종양 체적(mm^3)를 나타내는 선 그래프이다.

도 4는 아비딘-비오틴 연결 IL-15R α FC 융합 단백질, 그 제조방법과, 을 보여주는 PLGA 나노입자를 보여주는 도면이다. IL-15(수상 세포상에 발현된)와 NK세포에 발현된 중간-친화도 IL-2/15 수용체 사이의 상호 작용을 자연적으로 일으키는 것에 기초한, NK 세포와 같은 표적 세포와 상호작용하는 방법을 보여주는 도면이다.

도 5a는, PLGA 나노입자 단독, IL-15 로드 나노입자, IL-15/IL-15R α 복합체만, IL-15/IL-15R α 복합체 장식 나노입자로써 처리한 후, 처리되지 않은 대조군에서의 NK 증식 (세포 수)를 농도의 함수로서 보여주는 선 그래프이다.

도 5b는 IL-15/IL-15R α 복합체만 그리고 IL-15/IL-15R α 복합체로써 처리한 후 NK 증식(세포 수)을 농도의 함수로서 나타내는 선 그래프이다.

도 5c는 IL-15/IL-15R α 복합체 및 IL-15/IL-15R α 복합체를 농도의 함수로서 처리한 후, IFN- γ (ng/ml)을 나타내는 선 그래프이다.

도 6은 B16. Ova 쥐의 시간에 대한 생존율 %를 도시한 Kaplan-Meier 생존 곡선이다(파생적 악성 흑색종 세포주를 주사한 쥐, 그 세포는 PBS (-○-), 나노입자 단독 (-●-), IL-15/IL-15R α 복합체 단독(--□--), IL-15/IL-15R α 복합체 장식 PLGA 나노입자 (-□-), 및 IL-15/IL-15R α 복합체 장식 Ova 캡슐화 나노입자(-■-)로써 처리된, 오브알부민 표면 항원(OVA)을 수송한다).

도 7은 RGD 웹티드로 되고 SB505124를 캡슐화하는 PLGA-PEG 나노입자의 형성과 종양 세포에 대한 제안된 나노입자의 작용 기구를 보여주는 도면이다.

도 8은 아래의 실시예 6에서 사용한 쥐 종양 모델을 도시한 도면이다. B16F10 흑색종 종양 세포(500,000 세포)를 0일째에 C57BL/6 쥐의 꼬리 정맥에 주입되고, 그 후 SB505124와 RGD용액으로 또는 PLGA-PEG 나노입자 상에 로딩된 하나 또는 양 물질로써 IV에 주사 되었다. 쥐는 희생시켜 폐를 수집하고, 종양 결절이 계산되었다.

도 9a는 도 8의 분석에 따라 처리된 쥐의 시간 대한 종양 체적 $\times 10^3$ (MM3)을 나타내는 막대 그래프이다. 대조군 (-○-), 가용성 SB505124와 RGD(SOL SB+SOL RGD (-□-), SB505124로드된 PLGA-PEG 나노입자(SB/NP-△-), RGD

장식된 나노입자 (NP-RGD (-▽-)), 또는 SB505124가 로드되고 RGD가 장식된 나노입자 (SB/NP-RGD (-◆-)).

도 9b는 도 8의 분석에 따라 처리된 쥐의 시간에 대한 생존율 %를 도시한 Kaplan-Meier 생존 곡선 (-○-)이다. 대조군(-○-), 가용성 SB505124와 RGD(SOL SB+So1 RGD (-□-), SB505124가 로드된 나노입자(SB/NP-△-), RGD가 장식된 나노입자 (NP-RGD (-▽-)), 또는 SB505124가 로드되고 RGD가 장식된 나노입자 (-◆-).

도 9c는 나노입자(-○-) 및 RGD 장식 나노입자(-■-)의 반감기를 나타내는 선 그래프이다.

도 10a는 가용성 SB505124와 RGD(SOL SB +SOL RGD(-○-)), SB505124 로드된 PLGA-PEG 나노입자 (SB/NP), RGD 장식 나노입자 (NP-RGD) 또는 SB505124로드 RGD 장식된 나노입자 (SB/NP-RGD)로 처리한 후의 쥐 종양 모델에서 종양의 수를 나타내는 도트 플롯이다.

도 10b는 가용성 SB505124 및 RGD(SOL SB+SOL RGD(-○-)), 또는 SB505124로드되고 RGD 장식 나노입자(SB/NP-RGD(-■-))로 처리한 후의 쥐의 시간에 대한 생존율 %를 도시한 Kaplan-Meier 생존 곡선이다.

도 10c는, SB505124 로드되고 RGD 장식 나노입자(SB/NP-RGD), SB505124로드되고 RGD 장식 나노입자(SB/NP-RGD), 가용성 SB505124 및 RGB(SOL SB+SOL RGD), SB505124로드된 나노입자(SB/NP), 또는 TGF- β 로 치료 후 침입 세포의 수를 나타내는 도트 플롯이다.

주효 세포 (NK, CD8+T 세포, CD4+T 세포) 및 규제 T 세포 (CD4+FOXP3의+CD25 +)는 여기에서 분석되었다.

도 10D는 TGF- β , 가용성 SB505124와 RGD 또는 SB505124로드되고 RGD 장식 된 나노입자로 처리된 세포의 이동 (대조군의 %)를 보여주는 막대 그래프이다. 내피에서 중간엽 표현형(EMT)으로의 전이로 알려진 암 세포 (B16F10 흑색종 세포주)는 TGF-B의 존재 및 TGF-B 억제제로써 로드된 PLGA-PEG NP의 첨가로써 분석되었고, 그리고 인테그린을 과발현하는 암세로를 겨냥했다.

도 11a는 아래 실시예에서 사용된 쥐 종양 모델을 나타내는 다이아그램이다. B16F10 흑색종 종양 세포는-10일차에 C57BL/6 쥐의 꼬리 정맥안으로 주사되었다. 0 일에, 쥐에게 로사르탄 및 RGD용액 또는 PEG-PLGA 나노입자에 로딩된 하나 또는 양쪽 물질로써 IV 주사되었고, 쥐는 나중에 희생시키고 종양 결절이 계산되었다.

도 11b는 가용성 로사르탄 및 RGD (So1 Los+So1 RGD(-○-), 로사르탄 로드 나노입자 (Los/NP-△-), 또는 로사르탄 로드되고 RGD 장식된 나노입자(Los/NP-RGD(-▲-))로써 처리된 동물에서 시간에 대한 종양 체적 $\times 10^3 (\text{mm}^3)$ 을 보여주는 선 그래프이다.

도 11c는 도 11a의 분석에 따라 가용성 로사르탄 및 RGD(So1 Los+So1 RGD(-○-), 로사르탄 로드 나노입자 (Los/NP-△-), 또는 로사르탄 로드되고 RGD 장식된 나노입자(Los/NP-RGD(-▲-))로써 처리된 쥐의 시간에 대한 퍼센트 생존율을 보여주는 Kaplan-Meier 생존곡선이다.

도 12는 (난자 특징) (폐쇄 바)를 캡슐화 빈 중 하나와 세포 또는 IL-12를 격리된 CD4+OT-II(OVA 특이성) 세포의 빈(오픈 바) 또는 PLGA 나노입자를 캡슐화하는 IL-12(클로즈드 바)로써 처리한 후의 IFN γ (ng/ml) 수준을 나타내고, 4일동안 다양한 농도(125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 31 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 MHC-II OVA-표시 복합체를 디스플레이하는 막대 그래프이다.

도 13a는 가용성 IL-2 (0.1 NG/ml 또는 비교 HLA-A2의 맥락에서 MART-1 흑색 종 항원을 함유 인간 PBLCs에서 분리되고, 가용성 IL-2 (0.1 ng/ml 또는 10 ng/ml) 플러스 MART-1 항원 또는 IL-2 (0.1 ng/ml 또는 10 ng/ml) 플러스 MART 항원으로 펠스된 수지 세포에 비하여 HLA-A2의 배경에서 흑색종 항원 MART-1을 함유한, PLGA 나노입자로 처리된 CD8+T 세포의 배수-증가를 보여주는 막대 그래프이다.

도 13a는 가용성 IL-2 (0.1 NG/ml 또는 비교 HLA-A2의 맥락에서 MART-1 흑색 종 항원을 함유 인간 PBLCs에서 분리되고, 가용성 IL-2 (0.1 ng/ml 또는 10 ng/ml) 플러스 MART-1 항원 또는 IL-2 (0.1 ng/ml 또는 10 ng/ml) 플러스 MART 항원으로 펠스된 수지 세포에 비하여 HLA-A2의 배경에서 흑색종 항원 MART-1을 함유한, PLGA 나노입자로 처리된 CD8+T 세포의 배수-증가를 보여주는 막대 그래프이다. 각 치료 군의 결과는 0, 7, 14, 21 및 28일에서 보여진다(좌측에서 우측으로).

도 13b는 가용성 IL-2 (0.1 ng/ml 또는 10 ng/ml) 플러스 MART-1 항원 또는 IL-2 (0.1ng/ml 또는 10ng/ml) 플러스 MART 항원으로 펠스된 수지 세포에 비하여, HLA-A2의 배경에서 흑색종 항원 MART-1을 함유한, 나노입자로써 처리된 후 테크라마(tetramer)-양성 CD8+ T세포의 %를 보여주는 막대 그래프이다. 각 치료 군의 결과는 0, 7, 14, 21 및 28일에서 보여진다(좌측에서 우측으로).

도 14는 쥐 전이 모델에서 B16F10 쥐 흑색종에 시험된 다른 처리 조합 및 요법의 효과를 나타내는 산포도이다. "IMM1"은 로사르탄 및 IL-2로써 로드된 나노리포겔을 말한다; "PD1"는 "길항성 항-PD-1 항체를 말한다; "Yervoy"는 길항성 항-CTLA4 항체를 말한다; "Los-NLG"는 로사르탄으로 탑재된 나노리포겔을 말하고, "IL-2"는 자유 또는 가용성 IL-2를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] I. 정의

[0021] 여기서 사용되는 "나노리포겔(Nanolipogel)"은, 단일 라렐라(unilamellar) 또는 이중 라렐라(bilamellar)일 수 있는, 선택적으로 가교된, 리포좀성 셀 내에, 호스트 분자를 포함 할 수 있는 폴리머 매트릭스 코어를 갖는 코어-셀 나노입자를 의미한다.

[0022] 여기서 사용되는 "호스트 분자"는 복합체를 형성하기 위한 활성 제제와 가역적으로 연관되는 분자 또는 물질을 말한다. 특정 실시예에서, 호스트는 활성 제제와 내포 복합체를 형성하는 분자이다. 내포 복합체는, 활성 제제(즉, 게스트) 또는 활성 제제의 부분이 다른 분자, 분자 그룹, 또는 물질(즉, 호스트)의 캐비티 내로 삽입 될 때, 형성된다. 호스트는 이를 소분자, 올리고머, 폴리머, 또는 이들의 조합 일 수 있다. 예시적인 호스트는 예를 들면, 아밀로스, 시클로텍스트린, 및 복수의 알도스(aldoose) 고리를 포함한 다른 환상 또는 나선형 화합물, 예를 들어, 단당류(예를 들면 글루코스, 프릭토스 및 갈락토스)와 이당류(예: 설탕, 맥아당, 유당 등)의 1,4 및 1,6 결합을 통하여 형성된 화합물과 같은 다당류를 포함한다.

[0023] 다른 예시적인 호스트 화합물은 크립坦드(cryptands), 크립토판(cryptophanes), 캐비坦드(cavitands), 크라운 에테르(crown ethers), 덴드리머(dendrimers), 이온교환수지, 칼릭사렌(calixarenes), 바리노마이신(valinomycins), 니제리신(nigericins), 카테난(catenanes), 폴리카테난(polycatenanes), 카르세란드(carcerands), 쿠커비투릴(cucurbiturils) 및 쇠피란드(spherands)를 포함한다.

[0024] 여기서 사용되는 "작은 분자", 약 2000 g/몰, 더욱 바람직하게는 약 1,500 g/몰, 가장 바람직하게는 약 1,200 g/몰의 분자량을 갖는 분자를 의미한다.

[0025] 여기서 사용되는 "하이드로겔"은, 공유 또는 비-공유성 가교에 의해 고정된 거대분자의 3 차원 네트워크로부터 형성되고, 겔을 형성하기 위하여 실질적인 양의 물을 흡수할 수 있는, 물-팽윤성 폴리머 매트릭스를 의미한다.

[0026] "나노입자"는 여기서 사용되는 바와 같이, 일반적으로 약 10 nm에서 약 1 미크론, 바람직하게는 100 nm 내지 약 1 마이크론까지의 직경을 갖는, 그러나 포함하지 않는, 입자를 지칭한다. 상기 입자는 임의의 형상을 가질 수 있다. 구형 형상을 갖는 나노입자는 일반적으로 "나노"라고 칭한다.

[0027] 달리 명시되지 않는 한 여기서 사용되는 "분자량"은, 일반적으로, 별크 중합체의 상대적인 평균 사슬 길이를 말한다. 실제로, 분자량 추정 또는 겔 투과 크로마토 그래피(GPC) 또는 모세관 점도계 등 다양한 방법을 사용하여 특성화 될 수 있다. GPC 분자량은 수 평균 분자량 (M_n)과 반대로 중량 평균 분자량 (M_w)로 보고된다. 모세관 점도계는 농도, 온도, 용매 조건의 특정 집합을 사용하여 회색된 중합체 용액으로부터 결정되는 고유 점도, 분자량의 추정값을 제공한다.

[0028] 여기서 사용되는 바와 같이, "평균 입자 크기"는 일반적으로 입자의 집단에서 입자의 통계적 평균 입경(직경)을 의미한다. 본질적으로 구형 입자의 직경은 물리적 또는 유체 역학적 직경으로 지칭할 수 있다. 비-구형 입자의 직경은 유체 역학적 직경 우선적으로 지칭 할 수 있다. 여기서 사용되는 비 구형 입자의 직경은 입자의 표면에, 두 지점 사이의 최대 직선 거리를 의미 할 수 있다. 평균 입자 크기는 동적 광산란과 같은 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 측정 할 수 있다.

[0029] "단 분산"과 "균일한 크기 분포"는 상호 교환적으로 사용되고, 모든 입자가 동일하거나 거의 동일한 크기의 나노입자 또는 미립자의 집단을 말한다. 여기서 사용되는 바와 같이, 단 분산 분포는 분포의 90 %가 평균 입자 크기의 15 % 내에 있는 한 평균 입경보다 바람직 내 10 %, 가장 바람직하게는 평균 입자 크기의 5 % 이내에 놓이는 입자 분포를 지칭한다.

[0030] 여기서 사용되는 "PD-1 길항제"는 T 세포, B 세포, 자연 사멸(NK) 세포, 단핵구, DC와 대식 세포의 표면에 구축된, PD-1에 의해 매개되는 억제성 신호전달을 감쇠하는 분자를 의미한다. 이러한 길항제는 T 세포에 PD-1 분자에 의해 생성된 억제 신호를 방해하는 분자를 포함한다. 따라서, PD-1 길항제는, PD-1 수용체 신호 전달 경로를 통한 억제성 신호 전달을 억제, 감소, 폐지 시키는 분자일 수 있다. 그러한 감소는 다음의 경우에 발생할 수

있다: (i) PD-1 길항제가 신호전달을 유발하지 않고, 억제 신호 전달을 감소 또는 차단하는 경우 (ii) PD-1 길항제는 그(예를 들어, 상기 작용제는 B7-H1 인 것)에 결합을 방지하는 PD-1 수용체의 리간드 (예를 들어 작용제)에 결합하는 경우; (iii) PD-1 길항제가, 억제되지 않을 때 PD-1 억제 신호 전달을 자극하거나 그렇지 않으면 촉진하는 결과를 갖는, 억제성 사슬의 부분인 문자에 결합하거나, 그렇지 않으면 그 활성을 억제하는 경우; 또는 (iv) PD-1 길항제는, 특히 PD-1 또는 천연 리간드 중 하나 이상을 코딩하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소 또는 폐지하여, PD-1 수용체의 발현 또는 그의 리간드 발현을 억제한다. 따라서, PD-1 길항제는 하나 이상의 항원에 대한 T 세포 반응을 증가시킴으로써, PD-1 저해 신호 전달의 감소에 영향을 미치는 문자 일 수 있다.

[0031] 여기서 사용되는 "CTLA4 길항제"는 T 세포 반응의 CTLA4-매개 억제를 감소시키는 화합물을 의미한다. 예를 들어, T 세포에서 CTLA4는 B7-1 및 B7-2와 같은 B7 리간드의 결합시 억제 임펄스를 전달한다. CTLA4 길항제는 상기 리간드가 활성화된 T 세포에 결합하는 것을 방해하는 것이다.

[0032] II. 나노입자 조성물

[0033] 전달 운반체에 각각 로드되고, 그 표면에 부착되고, 및/또는 폐쇄되는 하나 또는 그 이상의 활성제를 포함하는 나노입자 조성물이 개시된다. 나노 입자 조성물은 용액 내의 표적 세포로 활성제의 전달에 비해 많은 장점을 제공한다. 예를 들면, 나노 입자 조성물은 나노 입자가 표적 세포를 만날 때 증가된 결합력을 유도하는, 나노 입자상 또는 내부의, 하나 또는 하나 이상의 활성제 또는 제제의 국부화된 농도를 제시한다.

[0034] 나노 입자 조성물은 효과적인 조직 반감기와 그 활성제 또는 그 활성제의 효능을 연장할 수 있는 나노입자 상 또는 내에 조정 가능한 릴리스 반응 동력학을 가진 활성제의 저장소 역할을 할 수 있다.

[0035] 일반적으로, 두 개 이상의 활성제로 로드의 표면에 부착 및/또는 전달 운반체 내에 포함된다. 둘 이상의 활성제 및 전달 운반체 또는 내에서의 위치를 각각의 상대적 농도는 타겟 셀에 의해 수신 될 바람직한 투여량 및 프레젠테이션 적응 조성물의 제조 중에 조작 될 수 있다. 내부 또는 동일한 전달 운반체 상 둘 이상의 활성제의 로딩은 두 개 이상의 활성제가 동시에 표적 세포에 제공하거나 타겟 셀에 별도로 소정의 순서로 할 수 있다.

[0036] A. 전달 운반체

[0037] 나노 입자 전달 운반체는 예를 들면, 나노폴리겔, 폴리머 입자, 실리카 입자, 리포좀, 또는 다중층 소포일 수 있다. 가장 바람직한 실시예에서, 입자 전달 운반체, 예를 들면 10 나노미터, 최대 약 1 미크론이지만, 이들을 포함하지 않는 나노 조성물이다. 그러나, 몇몇 실시예에서 일부 경우에는, 입자 (예컨대, 입자 등)를 작게 또는 크게 할 수 있다. 본원에 개시된 조성물은 조성물 전체에 나노 입자라고 하지만, 일부 실시예들에 대해 약간의 입자 조성물은 나노 입자보다 다소 를 수 있다는 이해할 것이다. 예를 들어, 입자 조성물은 약 1,000 미크론 내지 약 1 미크론 사이 일 수 있다. 이러한 조성물은 다음과 같이 입자 조성물로 지칭될 수 있다.

[0038] 암을 치료하기 위한 바람직한 실시예에서 그 입자는 종양 미세 환경에 액세스하기에 적합한 크기의 것이 바람직하다. 특정 실시예에서, 상기 입자는 종양 미세 환경 및/또는 향상된 통기성 및 체류 (EPR) 효과에 의해 종양 세포에 액세스하기에 적합한 크기이다. EPR 분자의 특정 크기 (예를 들어, 본원에서 논의 된 입상 조성물) 정상 조직에서 종양 조직에서 그들보다 더 축적하는 경향이 있는 속성을 의미한다. 따라서, 암 치료 용 조성물에 있어서, 전달 운반체가 포함 약 300 나노 미터, 더욱 바람직하게 약 50nm의 범위에 포함 된 약 500 나노 미터, 약 25 nm 범위 인 것이 바람직하다.

[0039] 1. 나노폴리겔(Nanopolygels)

[0040] 나노폴리겔은 리포좀 및 활성제의 지속적인 전달을 위한 고분자 계 입자 양쪽의 장점을 결합하는 코어-쉘 나노-입자다. 일부 실시예에서, 나노폴리겔 전달 운반체 등의 고분자 나노 입자보다 선호될 수 있다. 일반적 나노폴리겔은 생물학적 (예를 들어, 단백질, 웨티드, 항체 등)와 조합 소분자 소수성 약물의 동시로드 선정 될 수 있고, 소수성과 친수성 약물, 단일 또는 조합의 공동로드 이러한 사이토 카인, 항체, 성장 또는 억제 단백질/웨티드 요소 또는 전체 세포와 같은 조합 또는 생물학적 제제는 입자와 활성제 (들)의 세포 내 전달의 내재화가 요구되는 특징 및/또는 애플리케이션을 위해 이들 제품 또는 세포 용 해물을 분비. 이를 실시예 및 응용 프로그램 나노폴리겔의 일부를 나타낼 수에서, 적재 효율을 증가 릴리스를 지속 증가하고, 기존의 나노 입자 조성물에 비해 거대 분자와 분자의 조합에 대한 치료 효과를 향상시켰다.

[0041] 이하에서보다 상세히 논의 된 바와 같이, 일반적으로, 나노폴리겔의 외피화물을 보호하고, 생체 적합성뿐만 아니라 분자(들)을 타겟팅 작용하는 표면을 제공한다. 원하는 전까지는 환경 조건 또는 자극 단 분산 재현 입자

개체군을 생성하고, 원하는 세포 유형으로 내재화를 매개에 응답하여, 예를 들어, 노출되지 않도록 외피 성분을 캡슐화한다. 텐드리머 또는 다른 폴리머 일 수 있는 내부 코어는, 외부 쉘에 별도의 부가 기능을 가지고 있다. 예를 들어, 상기 내부 쉘은 약물, 백신, 또는 영상 화제의 보조 증착을 가능하게; 입자에 서로 다른 물리 화학적 특성을 가진 구성 요소의 부하를 증가; 입자 내용의 조정 가능한 릴리스 할 수 있다; 모든 향상된 약물 효과, 항원 제시하고, 형질 전환/침묵으로 이어지는, 중단 엔도 좀에 의해 DNA/RNA, 약물, 및/또는 단백질의 세포질 가용성을 증가.

- [0042] 나노폴리겔 하나 이상의 호스트 분자를 함유하는 폴리머 매트릭스 코어를 가지고 있다. 폴리머 매트릭스는 하나 이상의 폴리 폴리에틸렌 글리콜 (알킬렌 옥사이드) 세그먼트와 같은 하나 이상의 폴리 락트산 등의 지방족 폴리 에스테르 세그먼트를 함유하는 가교성 블록 공중 합체로서, 바람직하게는 하이드로겔이다. 이러한 시클로 텍스트린, 텐드리머, 또는 이온 교환 수지와 같은 하나 이상의 호스트 분자, 또는 공유 내에 분산 폴리머 매트릭스에 결합된다. 하이드로겔의 코어는 리포좀 껍질로 둘러싸여 있다.
- [0043] 나노폴리겔 이후 제어 된 방식으로 방출 될 수 활성제의 다양한 통합하도록 구성될 수 있다. 활성제는 이들의 하나 이상의 호스트 공유 리포좀 쉘에 부착 된 리포좀 성 쉘 내에 분산 분자, 및 이들의 조합과 연관 하이드로겔 매트릭스 내에 분산될 수 있다. 활성제 선택적 나노폴리겔 내의 이러한 국소에 각각 통합될 수 있다. 또한, 이들 국소 각각으로부터 활성제의 방출 속도가 독립적으로 조정될 수 있다. 이러한 국소 각각의 크기와 소수성/친수성을 포함하여 서로 다른 특성을 가지고 있기 때문에, 독립적으로 이러한 국소 각각에 포함 된 화학 물질의 실체는 크기와 구성에 대해 크게 다를 수 있다. 예를 들어, 나노폴리겔은 폴리머 매트릭스뿐만 아니라 호스트 분자와 관련된 작은 분자의 소수성 약물 내에 분산 된 하나 이상의 단백질을 로딩할 수 있다.
- [0044] 예를 들어, 특정 실시예에서, 나노폴리겔 코어는 둘 이상의 활성제를 포함한다. 바람직한 실시예에서, 나노폴리겔 코어는 바람직하게는 하나 이상의 적합한 호스트 분자와 관련된 작은 분자의 소수성 활성제 및 폴리머 매트릭스 내에 분산 된 친수성 활성제를 모두 포함한다. 특정 실시예에서, 친수성 활성제는 치료 사이토 카인 등의 단백질이다. 호스트 분자와 폴리머 매트릭스 내에 분산 된 친수성 분자, 용해도, 소수성/친수성 등 다양한 물리 화학적 특성을 가진 둘 이상의 활성제 (포함 둘 이상의 활성제의 조절 된 방출에 대응하여 소수성 활성제를 혼입함으로써, 분자량 및 이들의 조합)이 달성될 수 있다.
- [0045] 바람직한 실시예에서, 상기 호스트 분자는 예컨대 사이토 카인 등의 호스트 분자가 저 분자량 화합물의 방출을 지연시킨다 화학 요법, 및 더 친수성 화합물 등의 저분자 화합물을 전달하기 위해 사용되도록 방출된다 두 분자가 동일한 기간 동안 발생한다.
- [0046] 이러한 방식으로, 나노폴리겔 화학 조성 및 분자량이 크게 다르다 제제 동시에 서방성을 제공할 수 있다. 비 제한적인 예에서 나노폴리겔은 폴리머 매트릭스 내에 분산 된 면역 단백질 같은 호스트 분자 및 면역 아쥬 반트와 연관된 두 소수성 저분자 항원 로딩될 수 있다. 면역 반응을 최적화하기 위하여 이러한 나노폴리겔은 보조제와 함께 항원의 서방성을 제공할 수 있다.
- [0047] 특정 예에서, 면역 자극 단백질, 인터루킨-2 (IL-2) 뿐만 아니라, 저 분자량 유기 분자, 2-(5-벤조 [1,3] 디 옥술-5-일의 나노폴리겔 의해 동시에 지탱 전달-2-tert-부틸-3H-이미다졸-4-일)-6-메틸피리딘 히드로클로라이드, 성장 인자 β (TGF- β 를 변환 억제제)가 달성된다.
- [0048] 이 구조체는 단독으로 제 또는 이들의 조합 중 하나의 용액의 투여로 달성 될 훨씬 우수하다 뮤린 시스템에서 항 종양 반응을 이끈다. 또한, 바람직하게는 나노폴리겔 봉입 하나 이상의 활성제의 생체 분포를 조절할 수 있다.
- [0049] 나노폴리겔 평균 입자 크기는 가장 바람직하게는 약 90 내지 약 200 nm의 사이에, 더욱 바람직하게는 약 75 내지 약 300 nm의 사이에서, 약 50 내지 약 1,000 나노 미터 사이의 범위와 형상이 전형적으로 구형이다. 특정 실시예에서, 나노폴리겔 약 100 내지 약 140 나노 미터의 평균 입자 크기를 갖는다. 입자가 아닌 구형될 수 있다.
- [0050] 나노폴리겔의 리포좀 쉘에 존재하는 지질의 특성에 따라 나노폴리겔은 포지티브, 네거티브 또는 중성에 가까운 표면 전하가 제조 될 수 있는 데. 특정 실시예에서, 나노폴리겔은 거의 중성의 표면 전하를 갖는다. 특정 실시예에서, 나노폴리겔 가장 바람직하게는 약 사이, 보다 바람직하게는 약 5 내지 약-5 MV MV, 더욱 바람직하게는 약 3 내지 약 MV 간의-3 MV로 약 10 사이의 MV의 ζ 전위와 약-10 MV를, 보유 2 MV 약-2 MV.
- [0051] 친수성 활성제에 공유 나노폴리겔의 표면에 연결되거나 리포좀 쉘 내에 분산 될 수 있는 반면 단백질 소수성 활성제, 공유의 나노폴리겔의 표면에 연결될 수 있다. 특정 실시예에서, 리포좀 쉘은 하나 이상의 PEG화 지질을 포함한다. 이러한 경우, 하나 이상의 활성 제제는 리포좀 쉘의 표면에 존재하는 하나 이상의 PEG 사슬의 말단에

결합될 수 있다.

[0052] 다른 실시예에서, 지질은 원하면, 지질에 결합될 비오틴화된 표적화 잔기, 검출 가능한 표지 또는 기타 활성 제제가 지질에 결합될 수 있게 하는 아비딘 잔기를 포함하도록 변형된다.

[0053] 특정 실시예에서, 하나 또는 하나 이상의 활성제는, 원하는 생리학적 국소에서 활성 제제의 방출을 유도하기 위해 원하는 생리학적 국소에서 활성 제제의 방출을 유도하기 위해 주변 pH 변화와 같은 외부 화학적 또는 물리적 자극에 반응하여 절단되는 연결기를 통해 나노폴리겔의 표면에 공유결합적으로 접속된다.

[0054] 삭제

[0055] a. 코어

[0056] 나노폴리겔 코어는 폴리머 매트릭스로 형성된다. 이하에서보다 상세히 논의된 바와 같이, 매트릭스는 하나 이상의 호스트 분자를 포함할 수 있다. 나노폴리겔 코어는 추가로 하나 이상의 활성제를 포함할 수 있다. 활성제는 이들 폴리머 매트릭스, 또는 이들의 조합으로 분산 호스트 분자 작화될 수 있다.

[0057] 나노폴리겔의 폴리머성 매트릭스는 하나 이상의 폴리머 또는 공중 합체로부터 형성될 수 있다. 조성물 및 폴리머 매트릭스의 형태를 변화시킴으로써, 하나의 시간의 장기간 동안 하나 이상의 활성제의 적당한 일정 투여량의 전달을 허용하는, 제어 방출 특성의 다양성을 달성할 수 있다.

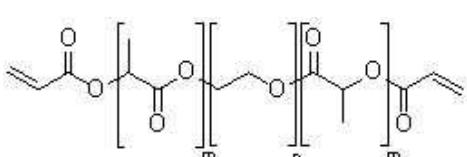
[0058] 폴리머 매트릭스는 생분해성 또는 비-생분해성 폴리미로부터 형성될 수 있다; 그러나, 바람직하게는, 폴리머 매트릭스는 생분해성이다. 폴리머 매트릭스는 가장 바람직하게는 7 일간 16주 20 주에 7 일간 더 바람직하게는 7 일간 26주보다 바람직 한 날부터 1 년까지의 기간에 걸쳐 분해되도록 선택될 수 있다.

[0059] 천연 고분자가 사용될 수 있지만 일반적으로 합성 폴리머가 바람직하다. 대표적인 폴리머는 폴리(락트산), 폴리(글리코산), 폴리(락트산-코-글리코산)와 같은 폴리(하이드록시산), poly3-히드록시부틸레이트 또는 폴리4-히드록시부틸레이트 폴리하이드록시 알카노에이트 등을 포함한다; 폴리 카프로 락톤; 폴리(오르토 에스테르); 하이드 라이드; 폴리(포스 파젠); 폴리(락 티드-코-카프로 락톤); 폴리(글리콜 라이드-코-카프로 락톤); 같은 티로신 폴리 카보네이트와 같은 폴리 카보네이트; 폴리펩티드 및 폴리(아미노산) (합성 및 천연 폴리 아미드 포함) 아미드; 폴리 에스테르 아미드; 다른 생체 적합성 폴리 에스테르; 폴리(dioxanones); 폴리(알킬 렌 알 킬레이트); 친수성 폴리 에테르; 폴리 우레탄; 폴리 에테르 에스테르; 폴리 아세탈; 폴리시; 폴리실록산; 폴리 옥시 에틸렌/폴리 옥시 프로필렌 공중 합체; 폴리케탈; 폴리 인산염; 폴리하이드록시발레레이트; 폴리 알킬 렌 옥살 레이트; 폴리 알킬 렌 숙시 네이트; 폴리(말레 산), 폴리 비닐 알코올, 폴리 비닐 피 롤리 돈; 폴리에틸렌 글리콜 등의 폴리(알킬렌 옥사이드) (PEG); 이들의 에스테르를 포함하여 알킬 셀룰로오스 (예, 메틸 셀룰로스), 히드 록시 셀룰로오스 (예, 히드 록시 프로필 셀룰로오스), 셀룰로오스 에테르, 셀룰로오스 에스테르, 니트로셀룰로오스, 아크릴산 폴리머, 메타 크릴 산 폴리머 또는 공중 합체 또는 그 유도체로서 과생된 셀룰로오스, 폴리(메틸 메타 크릴 레이트) 폴리(에틸 메타 크릴 레이트), 폴리(부틸 메타 크릴 레이트), 폴리(이소 부틸 메타 크릴 레이트), 폴리(hexylmethacrylate), 폴리(이소 대실 메타 크릴 레이트), 폴리(라 우릴 메타 크릴 레이트), 폴리(페닐 메타 크릴 레이트), 폴리(메틸 아크릴 레이트), 폴리(이소 프로필 아크릴 레이트), 폴리(부틸 아크릴 레이트) 및 폴리(옥타 대실 아크릴 레이트) (공동 "폴리 아크릴산")뿐만 아니라 유도체, 공중 합체로 지칭하고, 이들의 혼합.

[0060] 본원에서 사용 된 "유도체"는 통상적으로 당업자에 의해 상술 된 폴리머 골격에 치환, 화학 그룹 및 다른 변형의 추가를 갖는 폴리머를 포함한다. 이러한 제인과 같은 알부민, 콜라겐, 젤라틴, 프로라민 같은 단백질, 및 알기 네이트 및 펩틴 다당류를 포함하여 천연 폴리머는 또한 폴리머 매트릭스에 혼입될 수 있다. 다양한 폴리머가 폴리머 매트릭스를 형성하기 위해 사용될 수 있지만, 일반적으로, 생성 된 폴리머 매트릭스는 하이드로 겔 것이다. 폴리머 매트릭스에 천연 고분자가 포함 특정한 경우에서, 상기 천연 고분자는 폴리하이드록시 알카노에이트로서, 가수 분해에 의해 생체 고분자이다.

[0061] 바람직한 양태에서, 폴리머성 매트릭스는 하나 이상의 가교 결합성 폴리머를 포함한다. 바람직하게는, 가교성 폴리머는 다음 나노폴리겔 형성 폴리머 매트릭스의 가교 결합을 허용하는 하나 이상의 중합성 그룹을 함유한다. 적합한 중합성 기의 예로는 비닐 기, 아크릴 기, 메타 크릴 기, 아크릴 아미드기를 포함한다. 중합성 그룹이 존재하는 경우, 그 가교성 폴리머의 말단, 또는 이들의 조합 중 하나 이상에, 가교성 폴리머의 측쇄 중 하나 이상에서, 가교성 폴리머의 주쇄 내에 혼입될 수 있다.

- [0062] 나노폴리겔 특정 애플리케이션을 위한 최적의 약물 방출 속도를 포함한 특성을 갖는 형성하도록 폴리머 매트릭스는 다양한 분자량을 갖는 폴리머로 형성될 수 있다. 일반적으로, 고분자 매트릭스를 구성하는 고분자는 다 약 500 내지 50 kDa의에 이르기까지 평균 분자량을 갖는다. 폴리머 매트릭스는 비-가교성 폴리머로부터 형성되는 경우에, 폴리머는 전형적 kDa의 kDa의 약 1 내지 약 50, 더욱 바람직하게는 약 1 kDa 이상 내지 약 70 kDa의, 가장 바람직하게는 약 5 내지 kDa 이상에 대한 범위의 평균 분자량을 갖는다 50 kDa의. 폴리머 매트릭스는 가교 폴리머로부터 형성되는 경우에, 폴리머는 전형적 kDa의 다 약 500 내지 약 25, 더욱 바람직하게는 약 1 kDa 이상 내지 약 10 kDa의, 가장 바람직하게는 약 사이 3 kDa 이상 약 6 범위의 낮은 평균 분자량을 갖는다 kDa의. 특정 실시예에서, 폴리머 매트릭스는 약 5 kDa의 평균 분자량을 갖는 가교성 폴리머로부터 형성된다.
- [0063] 일부 실시예에서, 상기 폴리머 매트릭스는 폴리(알킬렌 옥사이드) 폴리머 또는 하나 이상의 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트를 함유하는 블록 공중 합체로부터 형성된다. 폴리(알킬렌 옥사이드) 폴리머 또는 폴리(알킬렌 옥사이드) 폴리머 세그먼트들은 가장 바람직하게는 50 내지 150의 반복 단위 사이, 보다 바람직하게는 40 내지 300의 반복 단위와, (8) 내지 (500)의 반복 단위를 포함할 수 있다. 적합한 폴리(알킬렌 옥사이드)는 그 (또한, 폴리에틸렌 옥사이드 또는 PEG 라 함), 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 1,2-글리콜, 폴리(프로필렌 옥사이드), 폴리프로필렌 1,3-글리콜, 및 공중 합체를 포함한다.
- [0064] 일부 실시예에서, 폴리머 매트릭스가 지방족 폴리 에스테르 또는 하나 이상의 지방족 폴리 에스터 분절을 함유하는 블록 공중 합체로부터 형성된다. 바람직하게는 폴리 에스테르 또는 폴리 에스테르 세그먼트는 폴리(락트산) (PLA), 폴리(글리코산) PGA, 또는 폴리(락 타이드-코-글리콜 라이드) (PLGA).
- [0065] 바람직한 양태에서, 폴리머성 매트릭스는 하나 이상의 중합성 그룹을 하나 이상의 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트를 하나 이상의 지방족 폴리 에스터 분절을 함유하는 블록 공중 합체를 형성하고있다. 이러한 경우, 하나 이상의 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트, 폴리 에스테르 세그먼트는 가변 소수성/친수성 및/또는 갖는 폴리머 매트릭스를 제공하는 동안 얻어진 폴리머 매트릭스는 적합한 하이드로겔을 형성하도록, 필요한 친수성 폴리머 스며들게 생체 분해 특성을 원하는.
- [0066] 폴리 에스테르 세그먼트의 열화 율, 종종 상응하는 약물 방출 속도는 (순수한 PLA의 경우) 개월 (순수한 PGA의 경우) 일까지 다양 할 수 있고, 용이의 비를 변화시켜 조작될 수 있다 폴리 에스테르 부문에서 PGA에 PLA, 또, PEG, 및 PGA, PLA, PLGA와 같은 지방족 폴리 에스테르와 같은 폴리(알킬렌 옥사이드)는 인간에서 사용하기에 안전한 것으로 확립되었다; 이들 물질은 30 년 이상, 약물 전달 시스템을 포함하는 인간의 임상 응용에 사용되어 왔다.
- [0067] 특정 실시예에서, 폴리머 매트릭스는 중앙 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트의 양 단부에 부착 된 지방족 폴리 에스테르 세그먼트 인접한 중앙 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트를 함유하는 트리-블록공중 합체로부터 형성되고, 하나 이상의 광중 합성 여러 폐. 바람직하게, 상기 중앙 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트 PEG이고, 지방족 폴리 에스테르 세그먼트 PGA, PLA, PLGA 또는이다.
- [0068] 일반적으로, 중앙 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트의 평균 분자량은 인접 폴리 에스테르 세그먼트의 평균 분자량보다 크다. 특정 구현 예에서, 상기 중앙 폴리 평균 분자량 (알킬렌 옥사이드) 세그먼트는 하나의 평균 분자량보다 인접 에스테르 세그먼트들 중 하나의 평균 분자량보다 적어도 세 배 더 큰, 더 바람직하게는 적어도 다섯 배 더 크다 인접한 폴리 에스테르 세그먼트는 인접하는 폴리 에스테르 세그먼트들 중 하나의 평균 분자량보다 가장 바람직하게는 적어도 열 배 이상이다.
- [0069] 몇몇 경우에, 중앙 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트는 가장 바람직하게는 약 2,500 Da와 약 5000 Da 사이, Da 약 500 내지 약 10,000, 보다 바람직하게는 약 1,000 사이 Da 약 7000 Da 이르는 평균 분자량을 갖는다. 특정 실시예에서, 중앙 폴리(알킬렌 옥사이드) 세그먼트의 평균 분자량은 약 4000이고 다. 일반적으로, 각각의 인접한 폴리 에스테르 세그먼트는 약 100 내지 약 500 다 다 사이, 가장 바람직하게는, 다 다 약 100 내지 약 3,500, 보다 바람직하게는 약 100 내지 약 1000 다 다 이르는 평균 분자량을 가지고있다.
- [0070] 바람직한 실시예에서, 상기 폴리머 매트릭스는 아래와 같이 트리-블록 공중 합체로부터 형성된다.



[0071]

[0072] 여기서 m 및 n은 독립적으로 각각의 경우에 대해, 도 10 및 150 사이의보다 바람직한 한 500의 정수이다.

[0073] 바람직한 천연 폴리머의 예로는 알부민, 콜라겐, 젤라틴 및 프로라민 같은 알긴산과 같은 예를 들면 제인, 다팅류, 셀룰로오스 유도체 및 폴리 하이드 록시 알 카노 에이트, 예를 들면, 폴리 하이드 록시 부티레이트와 같은 단백질을 포함한다. 입자의 생체 내 안정성은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)와 공중합 된 폴리 (락 타이드-코-글리콜 라이드)와 같은 폴리머를 사용하여 제조시에 조정할 수있다. PEG가 상기 외부 표면에 노출되어 있으면 의한 PEG의 친수성 이러한 물질은 순환 시간을 증가시킬 수있다.

[0074] 바람직한 비-생분해 성 폴리머의 예로는 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리 (메트) 아크릴산 아미드, 이들의 공중합체 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0075] 매트릭스는 기준의 이온 성 겔 방법으로 제조 예 알긴산 겔-형 폴리머로 제조 될 수있다. 폴리머는 제 황산 바륨 또는 어떤 생물 활성제와 혼합 수용액에 용해한 후, 경우에 따라, 액체 방울을 파괴하는 질소 가스의 흐름을 이용한 미적 성형 장치를 통해 압출된다. 천천히 교반 (약 100-170 RPM) 이온 성 경화 목욕 성형 미세 방울을 잡으려고 압출 장치 아래에 위치한다. 입자는 겔화가 발생하는 충분한 시간을 허용하기 위해 20-30 분 동안 옥조에 품어 남아 있다. 입자 크기는 질소 가스 또는 폴리머 용액 유량을 다양한 크기의 압출기를 사용하거나 변경함으로써 제어된다. 키토산 입자를 산성 용액에 폴리머를 용해시키고 삼인산으로 가교 결합에 의해 제조 될 수있다. 카르복시 메틸 셀룰로오스 (CMC) 입자, 산 용액 중의 폴리머를 용해시키고, 납 이온, 입자를 침전에 의해 제조 될 수있다. 음으로 하전 된 폴리머의 경우 (예를 들어, 알긴산, CMC) 분자량이 다른, 양전하 리간드 (예컨대, 폴리 리신, 폴리에틸렌 이민)을 이온에 부착 될 수있다.

[0076] 아마 가장 널리 사용되는 지방족 폴리 에스테르, 구체적으로는 소수성 폴리 (락트산) (PLA)보다 친수성 폴리 (글리코산) PGA 및 공중 합체, 폴리 (락 타이드-코-글리콜 라이드) (PLGA)를된다. 이들 폴리머의 분해 속도, 종종 상응하는 약물 방출 속도는 개월 (PLA)에 일 (PGA)에서 변할 수 있으며 쉽게 PGA에 PLA의 비율을 변화시켜 조작 된다. 둘째, PLGA와 호모폴리머 PGA 및 PLA의 생리적 호환성은 인간의 안전한 사용을 위해 설립되었다; 이 물질은 약물 전달 시스템 등 다양한 인간의 임상 응용 프로그램에서 30 년의 역사를 가지고있다. PLGA 나노 입자 중 수동 또는 능동 대상으로 조직을 대상으로 약물 동력학 및 생체 내 분포 향상을 다양한 방식으로 제형화 될 수 있다. 입자는 캡슐 또는 주 일간에 걸쳐 부착 될 분자를 방출하도록 설계된다. 방출의 지속 시간에 영향을 미치는 요인 (pH를 5에서 아래로 인해 산에 텔리스의 높은 비율 PLGA의 가수 분해 촉매) 주변 매체의 산도를 포함하는 고분자 조성물. 지방족 폴리 에스테르는 소수성에서 차이가 그 차례로 분해 속도에 영향을 미친다. 구체적으로는, 소수성 폴리 (락트산) (PLA)보다 친수성 폴리 (글리코산) PGA 및 공중 합체, 폴리 (락 타이드-코-글리콜 라이드) (PLGA)는 다양한 방출 속도를 갖는다. 이들 폴리머의 분해 속도, 종종 상응하는 약물 방출 속도는 개월 (PLA)에 일 (PGA)에서 변할 수 있으며 쉽게 PGA에 PLA의 비율을 변화시켜 조작된다.

[0077] b. 켈 구성 요소

[0078] 나노리포겔 하나 이상의 동심 지질 단층 또는 지질 이중층으로 이루어지는 켈 리포좀을 포함한다. 켈은 하나 이상의 활성제, 표적 분자 또는 이들의 조합을 포함 할 수있다.

[0079] 나노리포겔 하나 이상의 동심 지질 단층 또는 지질 이중층으로 이루어지는 켈 리포좀을 포함한다. 리포좀 켈의 조성물은 생체 내에서 하나 이상의 활성제의 방출 속도에 영향을 미치는 변화 될 수있다. 지질은 생체 내 약물 방출에 변경, 원하는 경우, 공유 가교 될 수 있다.

[0080] 지질 켈은 단일 지질 이중층 (즉, 켈이 단일 층이 될 수도 있음) 또는 다수의 동심 지질 이중층 (즉, 켈은 다중 층이 될 수 있음)로부터 형성 될 수 있다. 지질 켈은 단일 지질로 형성 될 수 있다; 그러나, 바람직한 실시예에서, 지질 켈은 하나 이상의 지질의 조합으로부터 형성된다. 지질은 생리적 pH에서 중성, 음이온 또는 양이온을 할 수 있다.

[0081] 적절한 중성과 음이온 지질은 콜레스테롤, 인지질, 리소리피드, 리소포스포리피드, 및 스팽고리피드와 같은 스테롤 및 지질을 포함한다. 중성 및 음이온 성 지질은 1,2-디아실-글리세로-3-포스포콜린(예 예그 PC, 대두 PC 등) 포스파티딜콜린(PC)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다; 포스파티딜 세린 (PS), 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 이노시톨 (PI); 당지질; 스 팽고 마이 엘린 등 스팽고포스포리피드, 이러한 세라마이드 갈락토, 강글리오사이드와 세레브 팽고 당지질 등 (1-세라미드 글루코사이드라고도 함); 지방산, 이들의 콜레스테롤 유도체, 카르복실 산기를 함유하는 스테롤; 1,2-디오레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 또는 1,2-디올레올릴글리세릴 된 포스파티딜 에탄올 아민 (DOPE), 1,2-디헥사데실-포스포에탄올아민 (DHPE), 1-포함 1,2-디아실-Sn-글리세로-3-포스포에탄올아민s, 2-디스테아로일포스포아티디클로라인 (DSPC), 1,2-디 팔미 토일 포스파티딜콜린

(DPPC) 및 1,2-디마이리스토일포스파디딜클로라인 (DMPC). : (계란 노른자, 심장, 뇌, 간, 콩 예를 들어, 조직 유래 L- α -포스파티딜) 및/또는 합성 (예를 들어, 포화 및 불포화 1,2-디아실-SN 글리세로 3 포스포콜린 또한 적합한 천연하다 1-아실-2-아실sn 글리세로-3-포스포콜린 1,2-디헵파노일sn-글리세로-3-포스 포)이 지질 유도체를 포함한다.

[0082] 적합한 양이온 성 지질을 포함 N-[1-(2,3-디오레오일oxy) 프로필]-N, 또한 메틸 살페이트 염으로서, 예를 들면, TAP 지질이라 N, N 트리메틸 암모늄 염. 적합한 TAP 지질을 포함하지만 DOTAP (디오레오일-) DMTAP, 이에 한정되지 않는다 (디마이리스토일-) DPTAP (디팔미토일I-) 및 DSTAP (디스케아로일-). 기타 적합한 양이온 성 지질 (DDAB) 1,2-diacyloxy-3-트리메틸 propanes, N-dimethyldioctadecyl 암모늄 브로마이드 등 [1-(2,3-diolyloxy 를) 프로필]-N, N 디메틸 아민 (DODAP), 1, 2-diacyloxy-3-디메틸 propanes, N-[1-(2,3-디올 레일 옥시) 프로필]-N, N, N-트리메틸 암모늄 클로라이드 (DOTMA), 1,2-디 알콕시-3-디메틸 암모늄 propanes, dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS) 3-[N-(N', N'-디메틸 아미노 에탄) 카르 바 모일] 콜레스테롤 (DC-Chol을); 2,3-디오레오일oxy-N-(2-(sperminecarboxamido)-에틸)-N, N 디메틸-1-propanaminium 트리 플루오로아세테이트 (DOSPA) β 알라 콜레스테롤, 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드 (CTAB), diC14-아미 딘, N-tert-부부틸 N' 테트라 테실-3-tetradecylamino-propionamidine, N-(알파-trimethylammonioacetyl) 디도-D 글루타메이트 클로라이드 (TMAG) ditetradecanoyl-N-(트리메틸 아세틸) 에탄올 아민 클로라이드, 1,3-디오레오일oxy-2-(6-카르복시-spermyl)-프로필 아미드 (DOSPER) 및 N, N, N', N'-테트라 메틸, N'-비스 (2-히드 록시 에틸)-2,3-디오레오일oxy-1,4-butanedi ammonium오다 이드, 1-[2-(아실 옥시) 에틸]-2-알킬 (알 케닐)-3-(2-히드 록시 에틸)-imidazolinium 클로라이드 유도체, 예로서 1-[2-(도 9의 (Z)-octadecenoyloxy) 에틸]-2-(8 (Z)-heptadecenyl-3-(2-히드 록시 에틸) 이미 다 졸리 늄 클로라이드 (DOTIM) 및 1-[2-(hexadecanoyloxy) 에틸]-2-펜타-3-(2-히드 록시 에틸) 이미 다 졸리 늄 클로라이드 (DPTIM) 및 2,3-dialkoxypropyl 2-dioleyloxypropyl-3-디메틸 히드 록시 예, 1,2-디오레오일-3-디메틸 히드 록시 에틸 암모늄 브로마이드 (DORI) 1, 사차 아민 히드 록시 잔기를 포함하는 사차 암모늄 유도체 암모늄 브로마이드 (DORIE) 1,2-dioleyloxypropyl-3-dimethyl 히드 록시 프로필 암모늄 브로마이드 (DORIE-HP), 1,2-디올 레일 옥시 프로필 1,3-디메틸 히드 록시 부틸 암모늄 브로마이드 (DORIE-HB), 1, 2-dioleyloxypropyl-3-디메틸 히드 록시 암모늄 브로마이드 (DORIE-HPE) 1,2-dimyristyloxypropyl-3-디메틸 히드 록시 에틸 암모늄 브로마이드 (DMRIE) 1,2-dipalmityloxypropyl-3-디메틸 히드 록시 에틸 암모늄 브로마이드 (DPRIE) 및 1,2-disteryloxypropyl-3-디메틸 히드 록시 에틸 암모늄 브로마이드 (DSRIE).

[0083] 다른 적합한 지질 PEG 화 중성, 음이온의 유도체, 및 상기 양이온 성 지질을 포함한다. 지질 셀에 하나 이상의 PEG 화 지질 유도체의 혼입은 표면에 폴리에틸렌 글리콜 쇄를 표시하는 나노폴리겔 초래할 수 있다. 그 표면에 PEG 사슬 결여 나노리포겔 비교하여 얻어진 나노리포겔은 생체 내에서의 안정성 및 순환 시간의 증가를 가질 수 있다. 적합한 PEG 화 지질의 예로는 DSPE PEG (2000 MW) 및 DSPE PEG (5000 MW), 디 팔미 토일 글리세로 숙시네이트, 폴리에틸렌 글리콜 (DPGS-PEG), 스테 아릴-폴리에틸렌 글리콜 스테 포함 디스케아로일 phosphatidylethanolamine 폴리에틸렌 글리콜 (DSPE-PEG)를 포함 글리콜-폴리에틸렌.

[0084] 바람직한 실시예에서, 지질 셀은 하나 이상의 지질의 조합으로부터 형성된다. 특정 실시예에서, 지질 셀이 적어도 세 지질의 혼합물로부터 형성된다. 특정 실시예에서, 지질 셀 포스파티딜콜린의 혼합물 (PC)로부터 형성되고, 1,2-디스 테아sn 글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노 (폴리에틸렌 글리콜)-2000 (DSPE-PEG), 콜레스테롤.

[0085] 일부 실시예에서, 지질 셀은 하나 이상의 PEG 화 인지질 및 하나 이상의 추가적인 지질이나 스테롤의 혼합물로부터 형성된다. 가장 바람직하게는 6 : 1 2 : 1보다 바람직하게, 6 : 1 1 : 일부 경우에, 하나 이상의 추가적인 지질 또는 스테롤에 하나 이상의 PEG 화 지질의 몰비는 약 1 내지 3 내지 약 1 : 1에서 5. 특정 실시예에서, 하나 이상의 추가적인 지질 또는 스테롤에 하나 이상의 PEG 화 지질의 몰비가 약 1 인 4.

[0086] 일부 실시예에서, 지질 셀은 하나 이상의 인지질 및 하나 이상의 추가적인 지질이나 스테롤의 혼합물로부터 형성된다. 가장 바람직하게는 1 : 6 : 1 내지 약 2보다 바람직하게 1 : 6 1 : 일부 경우에, 하나 이상의 추가적인 지질 또는 스테롤 상기 하나 이상의 인지질의 몰비는 약 1 내지 약 3 : 1 내지 약 5 : 1이다. 특정 실시예에서, 하나 이상의 추가적인 지질 또는 스테롤 상기 하나 이상의 인지질의 몰비가 약 4 : 1이다.

[0087] 바람직한 실시예에서, 지질 셀 같은 포스파티딜 콜린 (PC), PEG 화 인지질, 1,2-디스 테아sn 글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노 등 (폴리에틸렌 인지질의 혼합물로부터 형성된다 글리콜)-2000 (PEG-DSPE) 및 콜레스테롤. 특정 실시예에서, 지질 셀은 포스파티딜콜린의 혼합물, 1,2-디스 테아sn 글리세로-3-포스포에탄올

아민-N-[아미노 (폴리에틸렌 글리콜)-2000 (DSPE-PEG) 및 콜레스테롤 형성된다 3 : 1의 몰비.

2. 고분자 입자

[0089] 나노 입자 전달 운반체는 폴리머 입자, 예를 들면, 마이크로 또는 나노 입자 일 수 있다.

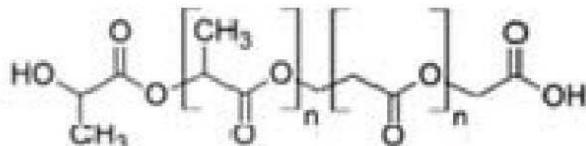
[0090] 입자는 생분해 또는 비 생분해 될 수 있다.

[0091] 폴리머 입자를 제조하는데 사용될 수 있다 실시 폴리머 나노리포겔의 폴리머 매트릭스 성분에 대해 상술한다.

[0092] 바람직한 생분해 성 폴리머의 예로는 PEG, 폴리 무수물, 폴리 (오르토) 에스테르, 폴리 우레탄, 폴리 (부틸 산), 폴리 (발레르 산), 폴리 (락 티드-코와 락트산 및 글리코산 등의 헤드 록시 산의 폴리머 및 공중 합체, 카프로 락톤), 이들의 혼합물 및 공중 합체. 바람직한 실시예에서, 입자는 하나 이상의 폴리 에스테르로 구성된다.

[0093] 예를 들어, 입자는 다음과 같은 폴리 에스테르를 하나 이상 포함 할 수 글리코산 단위를 포함 단독 폴리머 "PGA" 및 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리 젖산 단위로 지칭 D, L-락트산, 폴리-L-락 티드, 폴리-D-락 티드 및 폴리 D, L-락 티드는 총괄적으로 본원에서 폴리 (카프로 락톤) 등의 "PLA" 및 카프로 락톤 단위로서 지칭 통칭하여 "PCL"으로 지칭; 락트산 및 폴리 다양한 형태로서 글리코산 단위 및 폴리 락트산의 비율에 의해 특징 (락 티드-코-글리콜 라이드) (산-코-글리코산, 락트산)를 포함한 공중 합체 : 글리코산을 접합 적으로 지칭 "PLGA"; 이들의 폴리 아크릴 레이트 및 유도체. 대표적인 폴리머는 모두 "PEG 화 폴리머"로 언급되는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 PLGA-PEG 또는 PEG-PLA 공중 합체의 다양한 형태로서, 상기 폴리 에스테르의 공중 합체를 포함한다. 특정 실시예에서, PEG의 공유 영역을 절단 가능한 링커 "PEG 화 폴리머" 수득 폴리머와 연관 될 수 있다. 알기 네이트 폴리머도 사용될 수 있다.

[0094] 일부 실시예에서, PLGA 입자로 구성된다. PLGA는 안전, FDA 승인 폴리머다. PLGA 입자는, 활성제 (즉, 밀봉)을 보호 장기간 방출을 촉진 할 수 있기 때문에 유리하며, 표적 부분의 추가 의무가 있다. 예를 들어, 입자의 폴리머 구조를 가질 수 있다:



[0095]

[0096] (폴리(락트산-Co-글리코산) PLGA +H2O = 변수 저하 (주일에 대한 일수).

[0097] 입자는 폴리머 및 표적 부위, 검출 가능한 표지 또는 기타 활성제 간의 종단 간 결합을 함유하는 하나 이상의 폴리머 컨쥬 게이트를 포함 할 수 있다. 예를 들어, 변성 폴리머는 PLGA-PEG-포스 포 네이트 일 수 있다. 또 다른 예에서, 입자는 그에 접속 될 수 있는 부분과 아비딘 비오틴 표적 부분, 검출 가능한 표지 또는 기타 활성 성분을 포함하도록 수정된다.

[0098] 바람직한 천연 폴리머의 예로는 알부민, 콜라겐, 젤라틴 및 prolamines 같은 알긴산과 같은 예를 들면 제인, 다팡류, 셀룰로오스 유도체 및 폴리 하이드 록시 알 카노 에이트, 예를 들면, 폴리 하이드 록시 부티레이트와 같은 단백질을 포함한다. 입자의 생체 내 안정성은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)와 공중합 된 폴리 (락 티드-코-글리콜 라이드)와 같은 폴리머를 사용하여 제조시에 조정할 수 있다. PEG가 상기 외부 표면에 노출되어 있으면 위한 PEG의 친수성 이러한 물질은 순환 시간을 증가시킬 수 있다.

[0099] 바람직한 비-생분해 성 폴리머의 예로는 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리 (메트) 아크릴산 아미드, 이들의 공중 합체 및 이들의 혼합물을 포함한다.

3. 기타 전달 운반체

[0101] 일부 실시예에서, 전달 운반체 리포좀이다. 리포좀은 통상적 라멜라 상 지질 이중층으로 이루어지는 구형 소포이다. 리포좀은, 예를 들면, 다중 층 소포 (MLV), 소형 단일 층 리포좀 소포 (SUV), 큰 단일 층 소포 (LUV) 또는 cochleate 소포. 개시된 나노 입자 조성물의 제조에 유용한 리포좀 miscelles 및 기타 지질 기반 전달 운반체는 당 업계에 공지되어있다. 예를 들면, Torchilin, 등, 고급 약물 전달은, 58 (14) 리뷰 : 1천5백32에서

55 사이 (2006).

[0102] 전달 운반체는 실리카 입자가 될 수 있다. 개시된 나노 입자 조성물의 제조에 유용한 적합한 실리카 입자는 또한 당해 분야에 공지되어있다. 예를 들면, BARBE, 등, 신소재, 16 (21) : 1959에서 1966 사이 (2004)와 Argyo, 등, 화학... 이잖아요, 26 (1) : 435-451 (2014).

[0103] B. 활성 제제

[0104] 본원에 개시된 나노 입자 조성물은 일반적으로 나노폴리겔 또는 마이크로 또는 나노 입자 또는 다른 전달 운반체를 포함하고, 하나 이상의 활성제가 전달 운반체에 로드되거나, 표면에 부착되거나 및/또는 전달 운반체 내에 포함된다. 일부 실시예에서, 둘, 셋, 넷 또는 그 이상의 활성제들이 전달 운반체 내에 로드되거나, 표면에 부착 및/또는 전달 운반체 내에 포함된다. 둘 이상의 제제가 동일한 입자 또는 다른 입자 내에 로드되거나, 표면에 부착 및/또는 포함될 수 있다.

[0105] 일부 실시예에서, 제제는 동일하거나 상이한 연관 활성제들을 가지는 둘 이상의 상이한 입자를 포함한다.

[0106] 제형의 표면에 부착 된에로드되지 않은 하나 이상의 활성제를 포함할 수 있으며 및/또는 기재된 전달 운반체 (들) 내에 포함. 예를 들면, 활성제는 무료 또는 수용성 활성제 (들), 또는 상이한 담체 또는 투여 형태로 활성성분 (들) 일 수 있지만, 그럼에도 불구하고 나노 입자 조성물과 동일한 약학 조성물의 일부이다.

[0107] 이하에서보다 상세히 설명되는 바와 같이, 몇몇 실시예에서, 개시된 방법은 표면에 부착 된 두 번 세에로드 이상의 활성제를 포함하는 나노 입자 조성물을 이를 필요로하는 대상에 투여하는 것을 포함하고 / 또는 내에 포함하나 이상의 별개의 제제로 환자에게 투여되는 한 개, 두 개, 세 개 이상의 추가적인 활성제와 함께 전달 차량. 자유 또는 가용성, 예를 들어, 일부 실시예에서, 추가의 활성 제제는 환자에게 공동 투여되어 있지만, 표면에 부착 된에로드되지 않고, 그리고 / 또는 개시된 전달 운반체 (들) 내에 포함 할 수 있고, 또는 상이한 담체 또는 투여 형태로 사용될 수 있다. 개시된 활성제의 상관이에로드의 표면에 부착 및/또는 이들의 나노 입자 조성물의 일부로서 필요로하는 대상에게 전달 운반체 내에 포함 투여 될 수 있다. 개시된 활성제의 상관이 무료 또는 수용성 또는 나노 입자 조성물과 조합하여 환자에게 투여 다른 투여 단위 또는 투여 형의 일부로서 환자에게 투여 할 수 있다.

[0108] 예시적인 활성제는, 예를 들면, 종양 항원, CD4 + T 세포 에피토프, 사이토킨, 화학 치료제, 방사성 핵종, 소분자 신호 전달 억제제, 광열 안테나 면역 위험 신호 분자 다른 면역치료제, 효소, 항생제, 항 바이러스제, 항 기생충을 포함 (기생충, 원생 동물), 성장 인자, 성장 억제제, 호르몬, 호르몬 길항제, 항체 및 생체 활성 이의 단편, 항원 및 (보조제 포함) 백신 제형 펩티드 약물 (인간화 단일 쇄 및 키메라 항체를 포함), 항염증제, 선천성 면역계를 활성화 ()를 포함하지만, CpG 디 뉴클레오티드에 한정되지 수신자 같은 수용체에 결합 리간드 면역 조절제 (활성화 또는 세포 독성 T 림프구의 작용을 상향 조절 동원 적응 면역 시스템을 최적화 분자, 분자 비활성화하거나 억제 또는 규제 T 세포를 하향 조절, 자연 살해 세포와 헬퍼 T 세포 및 분자), 수지상 세포 등의 항원 제시 세포를 포함하는 세포 (예 전달 운반체의 흡수를 촉진 제제), 기능 식품 등 비타민 및 올리고 뉴클레오티드 약물 (DNA, RNA를, 안티센스, 앱 타며, 작은 간접 RNA를, 리보 자임, 리보 뉴 클레아 제 P 외부 가이드 서열을 포함하고, 삼박자 형성 제) 등.

[0109] 바람직한 실시예에서, 활성제의 하나 이상의 이러한 면역 반응 자극 제나 블록 면역 그 제제로 면역 조절제이다. 특히 바람직한 실시예에서, 상기 활성제는 종양 검사 봉쇄 또는 보조 자극 분자를 표적. 본 명세서에 기재된 나노 입자 조성물 및 사용 방법은 효율성을 증가 및/또는 단독으로 동일한 제를 투여에 비해 독성을 감소시킬 수 있다고 생각된다. 예를 들어, 이하에서보다 상세히 논의 된 바와 같이, 조성물 및 방법 중 일부는 공동-투여 나노 입자 보조제 종래의 암 치료법 (예를 들어, 면역 또는 함께 조합 (소분자 약물 및 생물학적 작용제를 캡슐화 일반적 생분해 성 나노 입자 조성물)을 포함 면역 신호 특성과 관련된 화학 요법). 이러한 병용 요법과식이 요법은 효능을 증가 독성을 줄이고 관리의 전체 용량을 낮출 수 있다. 특정 실시예는 이하에서보다 상세히 논의된다.

[0110] 1. 면역 반응 자극제

[0111] 하나 또는 그 이상의 활성제는 면역 반응의 자극 제일 수 있다. 면역 시스템은 셀룰러 (구동 T 세포) 및 체액 (B 세포 구동) 소자로 구성된다. 그것은 일반적으로 강력한 세포 매개 면역 반응의 유발, 암이 허용된다 체액 성 면역의 활성화보다 더 효과적이다. 세포 기반 면역 항원 제시 세포를 포함한 다양한 면역 세포 유형, 다수의 상호 작용과 협력에 의존한다 (APC; 있는 수지상 세포의 중요한 요소이다), 세포 독성 T 세포, 자연 살해 세포 및 T 헬퍼를 세포. 따라서, 활성제는 셀 (구동 T 세포) 면역 반응, 체액 (중심 B 세포) 면역 반응, 또는 이들의 조

합을 증가 제제 일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 제제는, T 세포의 활성을 증가 T 세포의 증식을 증가 하는 T 세포 억제 신호를 감소 사이토 카인의 생산을 향상, T 세포 분화 또는 효과기 기능을 자극하고, T 세포의 생존을 촉진하는 T 세포 반응을 강화 또는 이들의 임의의 조합.

[0112] 예시적인 면역 조절제는 사이토 카인, 크산틴, 인터루킨, 인터페론, 올리고데옥시 뉴클레오티드, 글루칸, 성장 인자 (예컨대, TNF, CSF, GM-CSF 및 G-CSF), 예컨대 에스트로겐 (디 에틸 에스트라 디올), 안드로겐과 같은 호르몬 (테스토스테론 HALOTESTIN® 포함 (fluoxymesterone)), 프로게스틴 (MEGACE® (메 게스트 를 아세테이트), PROVERA® (메드 록시 프로게스테론 아세테이트)) 및 코르티코 스테로이드 (프레드니손, 텍사메타손, 하이드로 코르티손).

[0113] 일부 실시예에서, 제제는, 예컨대, IL-1 β , TNF- α , TGF 베타, IFN- γ 에 한정되는 사이토 카인, metalloprotease 또는 포함하는 다른 분자가 아니라, IL-17으로 IL-6 염증성 분자 IL-23, IL-22, IL-21 및 MMP 의.

[0114] a. 사이토카인

[0115] 바람직한 실시예에서, 상기 활성제 중 하나 이상은 전 염증성 사이토 카인이다. 사이토 카인은 일반적으로 호르몬 규제 또는 피코 몰 농도 대 나노에서 신호 분자의 역할 및 세포 신호에 도움이된다. 사이토 카인은 단백질, 펩타이드, 또는 당 단백질이 될 수 있다. 대표적인 사이토 카인을 포함하지만 이에 국한되지는 않으며, 인터루킨 (예를 들면, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15 등), 인터페론 (예 : 인터페론- γ), 대식 세포 콜로니 자극 인자, 과립구 콜로니 자극 인자, 종양 괴사 인자, 백혈구 억제 인자 (LIF), 케모카인, SDF-1 α , 및 사이토 카인의 CXC 군.

[0116] b. 케모카인

[0117] 다른 실시예에서, 상기 활성제 중 하나 이상은 전 염증성 케모카인이다. 케모카인은 작은 사이토 카인의 가족이다. 그들의 이름은 근처의 반응 세포에 직접 화성을 유도하는 능력에서 과생된다. 따라서 이들은 화학 주성 사이토카인이다. 단백질은, 자신의 3 차원 형상을 형성하는 핵심 보존 지역에서 네 개의 시스테인 잔기의 존재 (그들은 모두 약 8 ~ 10 사이즈 킬로 달톤이다)와 같은 작은 크기와 공유 구조적 특성에 따라 케모카인으로 분류하고 있다. CXC, CC, CX3C 및 XC : 케모카인은 네 가지 주요 아파로 분류되고 있다. 케모카인은 G 단백질 결합 막통과 수용체 (즉, 케모카인 수용체)에 결합하여 세포 신호를 유도한다.

[0118] 2. 면역 억제를 차단하는 제제

[0119] 활성제의 적어도 하나의 블록이, 억제 또는 면역 억제를 감소 또는 대리인이 될 수 있는 블록, 억제 또는 면역 억제에 기여하는 인자의 생리 활성을 감소 시킨다는 것이다. 이는 종양-관련 면역 억제뿐만 아니라 종양 진행에 크게 기여하지만, 암 면역 요법의 활성을 제한하는 주요한 요인 중 하나라고 더욱 명백 해졌다. 항원 특이 적 T 세포 내성 종양 탈출 중요한 메커니즘 중 하나, 종양 비 반응성 항원-특이 본성은 또 다른 면역 응답하면서 종양 담 호스트는 종양-특이 적 면역 반응을 유지할 수 있는 것을 나타낸다 자극 (Willimsky, et al., *Immunol. Rev.*, 220:10212 (2007), Wang, et al. *Semin Cancer Biol.*, 16:739 (2006), Frey, et al., *Immunol. Rev.*, 222:192205 (2008), Nagaraj, et al., *Clinical Cancer Research*, 16(6):1812-23 (2010)).

[0120] a. Tregs를 극감시키는 제제

[0121] 규제 T 세포 (Tregs)은 심각한자가 면역 질환에 대한 자신의 캠 리드의 결합으로 자기 내성을 유지하기 위해 필수적이다. 그러나이 중요한 기능은 종양 immunosurveillance 및 항 종양 면역에 미치는 해로운 영향과 대조된다. 종양 및 암 환자의 순환 내의 Tregs의 증가는 암의 발병 및 질병 진행 및 특정 트래픽 관리 네트워크는 자신의 축적을 고려하여 식별 된 확산의 범위 메커니즘에 연루되어왔다. 시험관에서 실험은 사이클로 옥시게나 제-2를 포함 TREG 발전에 기여하는 여러 가지 수용성 또는 접촉에 의존하는 종양 요인을 표시, CD70, GAL1, TGF- β , indoleamine 2,3-디옥시게나 및 기타 아직-투--식별 할 요소. 향상된 로컬 TREG 증식 또는 감소 된 세포 사멸이 증가 종양 TREG 번호에 기여할 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, 제제들 중 적어도 하나는 사이클로 옥시게나 제-2, CD70, GAL1, TGF- β 또는 indoleamine 2,3-디옥시게나 제는 로컬 TREG 증식을 감소 및/또는, 특히 또는 종양 근처 TREG 사멸을 증가 감소시킨다.

[0122] Tregs에 의해 가해지는 길항 효과를 극복하기위한 다양한 면역 방법은 Mougakakos 교수실 암 해상도, 107 검토된다. 57-117 (2010), 드 Rezende, 등, 아치. *Immunol. THER.* . 특급, 58 (3) : 179-90 (2010), 및 Curiel, 문현 [Curr. OPIN. . *Immunol.*, 20 (2) : 241-246 (2008).

- [0133] 이러한 실시예는 각각도 3 및/도 7에 설명 된 것과 같은 방법을 포함 할 수있는 나노 입자에 이들 체를 넣는 방법. 입자 PLGA 나노 입자 나노리포겔 또는 기타 생분해 성 폴리머 일 수있다.
- [0134] 다른 입자 및/또는 활성제의 투여 량의 항 종양 효능을 테스트하기위한 예시적인 분석에서, 동물의 뒷다리에서 B16F10 흑색 종 세포를 접종한다. 종양의 성장은 대략 칠일 후에 종양 영역에서 0.5 MM²에 도달 할 때부터 모니터하고, 동물의 IL-2 및 로사르탄 로딩 된 나노 입자 (a) 5 UG의 peritumoral 주사의 과정을 실시한다; 혹은, 제어 장치로서, (b) (이하, 실시예에 기재된 분석법과 유사) 블랭크 입자.
- [0135] b. 골수 유래 억제 세포를 극감시키는 제제
- [0136] 억제 세포
- [0137] 골수 유래의 억제 세포 (MDSC)은 암 항원 특이 적 CD8 + T 세포 내성을 유도 할 책임이 항원 제시 세포의 주요 인구를 나타낼 수있다. 따라서, 일부 실시예에서, 조성물은 MDSC의 수 또는 활성을 감소시키는 작용제를 포함한다. 이러한 MDSC 함수의 올-트랜스 레티노 산, 화학 요법 약물, aminobiphosphonates, 티로신 키나제 억제제 (예 sunitinib에), 시클로 옥 시게나 제 2 저해제 및 억제 등 제제 차별화 MDSC를 제거하는 데, 이에 한정되지 않는다 수 예시 제제 포스 포-5 억제제 (sildanefi1), 트리 테르 폐 노이드 합성함으로써, (예를 들어,도 CDDO-라고도 2-시아 노-3,12 dioxooleana-1,9-(11)-dien-28 OIC 산 (메틸 에스테르 저와 bardoxolone 메틸) ((인 Nagaraj, 등, 임상 암 연구, 16 (6) : 1,812에서 23 사이 (2010)).
- [0138] c. PD-1 길항제
- [0139] 일부 실시예에서, 상기 활성제는 PD-1 길항제이다. 반응의 정도는 양극과 음극 항원 독립적으로 제어되는 상태에서 T 세포의 활성화는 일반적으로 주 조직 적합성 복합체 (MHC)를 통해 제시된 항원 성 웨პ타이드로 T 세포 수용체 (TCR)의 항원 특이 적 신호를 다음의 접촉에 의존 공동 자극 분자의 다양한에서 emanating 신호. 후자는 일반적으로 CD28 / B7 가족의 구성원이다. 역 프로그래밍 테스-1-(PD-1) T 세포를 유도 할 때 음의 면역 반응을 제공 CD28 수용체 패밀리의 구성원이다. PD-1 및 리간드 (B7-H1 또는 B7-DC) 중 하나 사이의 접촉은 T 세포의 증식 및/또는 T 세포 반응의 강도 및/또는 지속 기간을 감소 억제 반응을 유도한다. 적합한 PD-1 길항제, 8,114,845. 미국 특허 제 8,609,089에 설명 및 8,709,416 및 포함한다
- [0140] 화합물 또는 어느 바인딩 및 PD-1의 리간드를 블록 방해하거나 PD-1 수용체에 대한 리간드의 결합을 억제 또는 직접 결합하고 관통 저해 신호 전달을 유도하지 않고 PD-1 수용체를 차단하는 것을 제 PD-1 수용체.
- [0141] 일부 실시예에서, PD-1 수용체 길항제는 저해 신호 전달을 유발하지 않고 PD-1 수용체에 직접 결합하여도 줄이거나 PD-1을 통해 신호 전달을 트리거로 리간드를 억제하는 PD-1 수용체의 리간드에 결합 수용체. PD-1 수용체에 결합하여 억제 성 신호 전달을 트리거 리간드의 수 및/또는 크기를 감소시킴으로써, 보다 적은 세포는 PD-1 신호 전달 및보다 강력한 면역 반응이 달성 될 수 의해 전달 음 신호에 의해 감쇠 .
- [0142] 이 PD-1 신호는 주 조직 적합성 복합체 (MHC)에 의해 제시된 웨პ티드 항원에 근접 (예 B7-H1 또는 B7-DC으로) PD-1 리간드에 대한 결합에 의해 구동되는 것으로 생각된다 (예컨대, Freeman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 105:10275-10276 (2008)). 따라서, T 세포 막에서 PD-1 및 TCR 공동 결찰 방지 단백질, 항체 또는 작은 분자도 유용 PD-1 길항제이다.
- [0143] 바람직한 실시예에서, PD-1 수용체 길항제는 PD-1 리간드 또는 PD-1 자체 PD-특히 코 게이션 결합하여 PD-1 수용체 신호 전달로 감소 시키거나 방해하는 작은 분자 길항제 또는 항체는 TCR 1함으로써 PD-1 수용체를 억제 신호 전달을 유발하지, 이러한 바인딩을 수행하지 않는다.
- [0144] 본 발명의 방법에 의해 고려되는 다른 PD-1 길항제는 PD-1과 결합하는 항체 또는 PD-1 리간드 및 다른 항체를 포함한다.
- [0145] 다음의 공보에 적합한 항 PD-1 항체를 포함하지만, 기재된, 이에 한정되지 않는다 :
- [0146] PCT/IL03/00425 (Hardy et al., WO/2003/099196)
- [0147] PCT/JP2006/309606 (Korman et al., WO/2006/121168)
- [0148] PCT/US2008/008925 (Li et al., WO/2009/014708)
- [0149] PCT/JP03/08420 (Honjo et al., WO/2004/004771)

- [0150] PCT/JP04/00549 (Honjo et al., WO/2004/072286)
- [0151] PCT/IB2003/006304 (Collins et al., WO/2004/056875)
- [0152] PCT/US2007/088851 (Ahmed et al., WO/2008/083174)
- [0153] PCT/US2006/026046 (Korman et al., WO/2007/005874)
- [0154] PCT/US2008/084923 (Terrett et al., WO/2009/073533)
- [0155] Berger et al., *Clin. Cancer Res.*, 14:30443051 (2008).
- [0156] 항 PD-1 항체의 구체적인 예는 MDX-1106 (Kosak, US 20070166281 (2007. 7. 19 공개) 문단 42)를 참조.), 바람직하게는 3 mg/ kg 의 용량으로 투여되는 인간 항 PD-1 항체이다.
- [0157] 대표적인 항 B7-H1 항체를 포함하지만 다음의 공보에 기재된, 이에 한정되지 않는다 :
- [0158] PCT/US06/022423 (WO/2006/133396, 2006. 12.14 공개)
- [0159] PCT/US07/088851 (WO/2008/083174, 2008. 7. 10 공개)
- [0160] US 2006/0110383 (2006. 5.25 공개)
- [0161] 항 B7-H1 항체의 구체적인 예는 (WO 2007/005874) MDX-1105, 인간 항 B7-H1 항체이다.
- [0162] 안티 B7-DC의 경우 항체는 7,411,051, 7,052,694, 7,390,888, 및 미국 공개 출원 제 2006/0099203를 참조.
- [0163] 항체는 B7-H1 같은 PD-1의 리간드에 결합하는 항체에 가교는 PD-1 수용체에 결합하는 항체를 포함하는 이중 특이 적 항체 일 수 있다. 일부 실시예에서, PD-1 결합 부분은 감소 또는 PD-1 수용체를 통한 신호 전달을 억제한다.
- [0164] 다른 예시 PD-1 수용체 길항제를 포함하지만, B7-DC 유사체 및 이들의 변형을 포함한 폴리 펩타이드뿐만 아니라 이들의 임의의 활성 단편, 이들 중 하나를 통합하는 융합 단백질에 한정되지 않는다. 바람직한 실시예에서, 융합 단백질은 인간 IgG와 같은 항체의 Fc 부분에 결합 B7-DC의 가용성 부분을 포함하는 모든 인간 B7-DC의 횡단부의 부분을 포함하지 않는다.
- [0165] 는 PD-1 길항제는 바람직 단편과 볼록 PD-1에 결합하지만 PD-1을 억제 신호 전달을 초래하지 않는 것을 특징으로 마우스 나 영장류, 바람직하게는 인간에서, 포유 동물 B7-H1의 조각이 될 수 있다. 단편은 또한 융합 단백질의 일부, 예를 들면의 Ig 융합 단백질 일 수 있다.
- [0166] 다른 유용한 폴리펩티드 PD-1 길항제는 PD-1 수용체의 리간드에 결합하는 것을 포함한다. 여기에는 B7-H1 또는 B7-DC와 PD-1 리간드에 결합 할 수 있는 PD-1 수용체 단백질 또는 이의 가용성 단편을 포함하고, 이에 저해 신호 전달을 방지 내인성 PD-1 수용체에 결합 방지 . B7-H1은 단백질 B7.1을 결합하는 것으로 나타났다 (버트 등., 내성, 권. 27 쪽. 111-122 (2007)). 이러한 단편은 또한 증가 자연 리간드에 결합하는 것으로, 예 A99L 돌연변이와 같은 돌연변이를 포함하는 PD-1 단백질의 용해성 ECD 부를 포함 (Molnar는 등, PNAS, 105 : 10483-10488 (2008)). B7-H1 리간드에 결합 할 수함으로써 저해 신호 전달을 방지 내인성 PD-1 수용체에 결합 방지 B7-1 또는 이의 가용성 단편이 또한 유용하다.
- [0167] siRNA 분자 뿐만 아니라 PD-1 및 B7-H1 안티센스 핵산, DNA 및 RNA가 또한 PD-1 길항제일 수 있다. 이러한 안티센스 분자는 B7-H1, PD-L1 및/또는 PD-L2와 같은 T 세포 리간드의 생산 뿐만아니라, T 세포에의 PD-1 발현을 방지한다. 예를 들어, 폴리에틸렌이민과 같은 담체(Cubillos-Ruiz et al., *J. Clin. Invest.* 119(8): 2231-2244 (2009) 참조)와 복합된, siRNA(예를 들어, 코딩하는 유전자 PD-1 또는 PD-1 리간드에 특이적이고, 약 21 뉴클레오티드의 길이를 가지고, 올리고 뉴클레오티드는 상업적으로 쉽게 구입할 수 있는)는 쉽게 PD-1 리간드 뿐만 아니라 PD-1를 발현하고, 이를 수용체 및 리간드의 발현을 감소시켜 T 세포를 활성화시키는 세포에 의해 쉽게 취해진다.
- [0168] d. CTLA4 길항제
- [0169] 면역 반응의 T 세포의 효과를 매개하는데 유용한 다른 분자는 활성제로서 고려된다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 분자는 제제가 PD-1하지 않은 면역 반응을 매개하는 분자에 결합된다. 바람직한 실시예에서, 분자는 CTLA4의 길항제, 예를 들어 길항제 항 CTLA4 항체이다. 본 발명의 방법에 사용하기 위해 고려되는 항 CTLA4 항체의

예는 PCT / US2006 / 043690에 기재된 바와 같이 항체를 포함한다 (Fischkoff 외., WO / 2007 / 056539).

[0170] 항 PD-1에 대한 투여량, 항 B7-H1, 및 안티 CTLA4 항체는 당 업계에 공지되어 있으며, 1 내지 50mg의 짧은 범위가 0.1-100 mg / kg의 범위 일 수 있다 / 바람직 KG 10 내지 20 mg의 범위 /보다 바람직하게 kg이다. 인간 대상에 대한 적절한 투여량은 10 Mg를 5 내지 15 mg / kg이다 / kg의 항체 (예를 들면 MDX-1106과 같은 인간 항 PD-1 항체) 가장 바람직하다.

[0171] 본 발명의 방법에 유용한 항 CTLA4 항체의 구체적인 예는 MDX-010 또는 MDX-101, 바람직하게는 약 10 mg / kg의 용량으로 투여 인간 안티 CTLA4 항체 및 Tremelimumab라고도 Ipilimumab이다 인간 항 CTLA4 항체는, 바람직하게는 약 15 mg / kg의 용량으로 투여 될 수 있다. 참고 Sammartino, 등, 임상 신장 학회지, 3 (2). 135-137 (2010), 2009 년 온라인 12 월 발표했다.

[0172] 다른 실시예에서, 길항체는 소분자이다. 7363-7368 (2002)와 같은 작은 유기물이 될 수 있다 : 작은 유기화합물의 일련의 CTLA4 (에르베 등, J. BIOL 화학, 277 참조 바인딩 방지하기 위해 B7-1 리간드에 결합하는 것으로 나타났다 T 세포 억제 성 신호 전달을 감소시키는 항 CTLA4 항체를 단독으로 또는 함께 투여 될 수 있다.

3. 보조제 및 항원

[0173] 일부 실시예에서, 나노 입자 조성물은 백신 제제의 일부로서 사용되거나 보조제로서 면역 체계를 자극. 일부 실시예에서, 항원 및/또는 보조제로로드의 표면에 부착 및/또는 전달 운반체 내에 포함. 일부 실시예에서, 항원 및/또는 보조제로로드 활성제와 병용 투여의 표면에 부착 및/또는 전달 운반체 내에 포함. 항원 및/또는 보조제는 입자가 없어야한다. 예를 들어, 항원 및/또는 보조제는 용해 될 수 있다.

[0174] 이 항원은 투여 후 흡수 될 수 있다. 종양 세포가 죽는 NLGs가 현장에서 종양 항원을 흡수 할 수 있기 때문에, 예를 들어, 이 NLGs immunestimulant 및/또는 화학 요법 제와 함께 투여 될 수 있고, 다음 종양 항원을 흡수한다. 웨타이드, 단백질, DNA 및 기반 백신은 다양한 질환 또는 상태에 대한 내성을 유도하는데 사용될 수 있다. 세포 매개 면역은 검출 및 바이러스 감염된 세포를 파괴하기 위하여 필요하다. 대부분의 전통적인 백신 (예를 들면 단백질 기반 백신) 만 체액 성 면역을 유도 할 수 있다. DNA 기반 백신은 DNA 기반 백신이 모두 체액 성 및 세포 성 면역을 유도 할 수 있기 때문에 바이러스 나 기생충에 대한 예방 접종을 할 수 있는 독특한 방법을 나타낸다. 또한, DNA 기반 백신은 기존의 백신보다 잠재적으로 더 안전하다. DNA 백신은 상대적으로 안정적이고 경제적 인 제조 및 저장을 위한 더 많은 것이다. DNA 백신은 두 가지 주요 구성 요소로 DNA 캐리어 (또는 전달 운반체) 및 항원을 코딩하는 DNA를 구성. DNA 캐리어는 저하로부터 DNA를 보호하고, 효율적인 수준에서 특정 조직 또는 세포 발현에 DNA 항목을 용이하게 할 수 있다.

a. 보조제

[0175] 입자와 연관된 포함하지만, TLR 리간드, C 형 렉틴 수용체 리간드, NOD 형 수용체 리간드, RLR 리간드 및 리간드 RAGE, 이에 한정되지 않는다 수 면역 보조제의 예. TLR 리간드는 이의 포함하지만, 모노 포스 포릴 지질 A (MPL), 글리코 리피드 A, PET-지질 A, 3-O-desacyl-한정되지 리포 폴리 사카 라이드 (LPS) 및 이들의 유도체뿐만 아니라, 지질 A 및 유도체를 포함 할 수 있다 4'-모노 포스 포릴 지질 A의 특정 실시예에서, 면역 학적 보조제는 MPL이다. 다른 실시예에서, 면역 학적 보조제는 LPS이다. TLR 리간드가 또한 포함될 수 있지만, TLR3 리간드, 이에 한정되지 않는다 (예를 들어, polyinosinic-polycytidylic 산 (폴리 (I : C)), TLR7 리간드 (예, 이미 퀴 모드 및 resiquimod) 및 TLR9 리간드.

b. 항원

[0176] 항원은 이를 웨타이드, 단백질, 다당류, 당, 지질, 핵산, 또는 이들의 조합 일 수 있다. 항원은 바이러스, 박테리아, 기생충, 식물, 원생 동물, 곰팡이, 조직에서 파생 또는 세포를 형질 전환 이러한 암이나 백혈병 세포로 및 전체 세포 또는 이들의 면역 원성 구성 요소, 그 예를 들면, 세포벽 성분 또는 분자 구성 요소 일 수 있다 할 수 있다.

[0177] 적합한 항원은 당 업계에 공지 및 상업 정부 과학 소스에서 가능하다. 일 실시예에서, 항원은 전 비활성화 된 또는 감쇠 된 미생물이다. 이 생물은 바이러스, 기생충 및 세균 등의 감염 유기체 일 수 있다. 이 생물은 또한 종양 세포 일 수 있다. 항원은 종양 또는 바이러스 또는 박테리아 소스에서 파생 된 정제 또는 부분적으로 정제된 폴리 웨타이드 할 수 있다. 항원이 이종 발현 시스템에서의 항원 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 발현하는 재조합 폴리펩티드를 제조 할 수 있다. 항원은 항원 성 단백질의 전부 또는 일부를 코딩하는 DNA 일 수 있다. DNA를 플라스미드 DNA와 같은 벡터 DNA의 형태로 존재할 수 있다.

- [0181] 항원은 하나의 항원으로 제공 될 수 있거나 또는 조합하여 제공 될 수 있다. 항원은 폴리펩티드 또는 핵산의 복합 혼합물로서 제공 될 수 있다.
- [0182] i. 바이러스 성 항원
- [0183] 바이러스 성 항원을 포함한 모든 바이러스 분리, 이에 국한되지 수 있다, 다음과 같은 바이러스 성 가족의에서 바이러스 : Arenaviridae, Arterivirus, Astroviridae, Baculoviridae, Badnavirus, Barnaviridae, Birnaviridae, Bromoviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Capillovirus, Carlavirus, Caulimovirus, Circoviridae, Closterovirus, Comoviridae, Coronaviridae (예 : 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 바이러스와 같은 예를 들면, 코로나), Corticoviridae, Cystoviridae, Deltavirus, Dianthovirus, Enamovirus, Filoviridae (예를 들어, 마르부르크 바이러스와 에볼라 바이러스 (예를 들어, 자이르, 레스톤, 코트디부아르, 또는 수단 주)), 플라비비리다, (예를 들어, C 형 간염 바이러스, 뎅기열 바이러스 1, 뎅기열 바이러스 2, 뎅기열 바이러스 3, 뎅기열 바이러스 4), Hepadnaviridae, 헤르페스 (예를 들면, 인간 헤르페스 바이러스 1, 3, 4, 5, 6, 및 사이토 메갈로 바이러스) Hypoviridae, Iridoviridae, Leviviridae, Lipothrixviridae, Microviridae, 오르 쏘 믹소 바이러스과 (orthomixoviridae) (예 Influenzavirus A와 B와 C) Papovaviridae, Paramyxoviridae (예를 들어, 홍역, 이하선염, 및 호흡기 세포 융합 바이러스) Parvoviridae, Picornaviridae (예, 폴리오 바이러스, 리노 바이러스, hepatovirus 및 aphthovirus) Poxviridae (예, 백시니아 및 천연두 바이러스), 레오 바이러스과 (예를 들면, 로타 바이러스) Retroviridae (예, 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV) 1 및 HIV와 같은 렌티 바이러스, 2) Rhabdoviridae (예, 광견병 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포 융합 바이러스 등), Togaviridae (예를 들어, 풍진 바이러스, 뎅기열 바이러스, 등)에 대한 Totiviridae. 적합한 바이러스 항원은 모든 또는 뎅기열 단백질 M, 뎅기열 단백질 E, 뎅기열 D1NS1, 뎅기열 D1NS2 및 뎅기열 D1NS3의 일부를 포함한다.
- [0184] 바이러스 항원은 이러한 유두종 바이러스, 헤르페스 바이러스, 즉, 단순 포진 1 및 2로 특정 균주로부터 유도 될 수 있다; 간염 바이러스, 예를 들면, A 형 간염 바이러스 (HAV), B 형 간염 바이러스 (HBV), C 형 간염 바이러스 (HCV), 엘타 간염 D 바이러스 (HDV), E 형 간염 바이러스 (HEV) 및 간염 G 바이러스 (HGV), 진드기 매개 뇌염 바이러스; 파라 인플루엔자, 수두-대상 포진, cytomegalovirus, 앰스타인-바 바이러스, 로타 바이러스, 리노 바이러스, 아데노 바이러스, 콕, 말 뇌염, 일본 뇌염, 황열병, 리프트 밸리 열병, 및 럼프 구성 맥락 수막염.
- [0185] ii. 세균 항원
- [0186] 세균 항원을 포함하는 박테리아에서 유래하지만, 방선균, Anabaena, 바실러스, 박테로이드, Bdellovibrio, 보르데텔라, 보렐리, 캄필로박터, Caulobacter, 클라미디아, Chlorobium, Chromatium, 클로스 트리 디움, 코리네박테리움, 리움, Cytophaga, Deinococcus, 대장균, Francisella, 제한 할 수 없다 Halobacterium, Helio bacter, 헤모필루스, 헤모필루스 인플루엔자 B 형 (HIB), Hyphomicrobium, 레지오넬라, Leptospirosis, 리스테리아, 수막 구균 A, B와 C, Methanobacterium, 인 Micrococcus, 미코박테륨, 마이코 플라즈마, Myxococcus, 나이세리아, Nitrobacter, Oscillatoria, Prochloron, 프로테우스, 슈도모나스 (Pseudomonas), Phodospirillum, 리케차, 살모넬라, 시겔라, 나선균, 스피로테타, 포도상 구균, 연쇄상 구균, 스트렙토マイ세스 (Streptomyces), 또는 술, Thermoplasma, Thiobacillus 및 트레포네마, 비브리오, 및 예르시니아.
- [0187] iii. 기생충 항원
- [0188] 기생충 항원과 같은 기생충에서 얻을 수 있지만, 크립토 콕 쿠스 네오 포르만, Histoplasma의 capsulatum, 칸디다 알비 칸스, 칸디다 tropicalis, 노 카르 디아의 asteroides, 리케차 rickettsii, 리케차의 typhi, 폐렴 미코 플라스마, 클라미디아의 psittaci, 클라미디아 트라코마 티스, 변형체에서 파생 된 항원에 국한되지 수 있다 원충, 트리파노소마 (Trypanosoma) brucei, Entamoeba 아메바, 톡소 포자충, 트리코모나스 vaginalis에와 주혈흡충 mansoni의. 이들은 이러한 Circumsporozoite 단백질하는 포자 소체 표면 단백질 간 단 항원 단백질 연관된 정단 막 또는 Merozoite 표면 단백질의 전부 또는 일부로서 Sporozoan 항원, Plasmodian 항원을 포함한다.
- [0189] iv. 알레르기 유발 물질 및 환경 항원
- [0190] 항원과 같은 알레르기 항원 또는 환경 항원, 수 있지만, 제한 할 수 없다 꽃가루 알레르기 (트리-, 허브, weed-, 잔디 꽃가루 알레르기), 곤충 알레르기 (흡입, 침으로 자연적으로 발생하는 알레르기에서 파생 된 항원 그리고 독 알레르기), 동물의 머리와 비듬 알레르기, 식품 알레르기. 나무, 잔디, 허브에서 중요 꽃가루 알레르기는 참나무 목, Oleales, 구과목의 분류 학적 주문 및 platanaceae 포함 I.A.에서 시작 자작 나무 (Betula), 오리

(오리), 암 (Corylus), 서어 나무속 (서어), 올리브 (Olea), 삼나무 (Cryptomeria and Juniperus), 평면 트리 (버즘 나무과)에 속 Lolium, Phleum의 예 잔디를 포함 벼목의 순서, 포아, Cynodon, 오리새, Holcus, Phalaris, Secale 및 사탕 수수, 국화 목의 주문 및 Urticales 포함 아이오와 장군 신의 음식, 쑥과 개 물통이 속의 허브이다. 사용될 수 있는 다른 알레르기 항원은 예를 들어, 속 집먼지 및 Euroglyphus의 집 먼지 진드기, 저장 진드기의 알레르기 항원을 포함 Lepidoglyphys, Glycyphagus 및 Tyrophagus, 예를 들어, 바퀴벌레, 작은 벌레 및 벼룩에서 그 Blatella, Periplaneta, Chironomus 및 Ctenocephalides, 같은 고양이, 개, 말, 새, 등 의 상과 벌 (상과 꿀벌과), 말벌 (포함 벌목의 분류 학적 주문 것과 쏘는이나 무는 곤충에서 이러한 원래 포함 독 알레르기 등의 포유 동물에서 그 Vespidae), 개미 (슈퍼 패밀리 Formicoidae). 아직 사용할 수 있는 다른 알레르기 항원은 장군 알터와 Cladosporium에서와 같은 곰팡이에서 흡입 알레르기 항원을 포함한다.

[0191]

v. 종양 항원

[0192]

항원과 같은 종양 관련 또는 종양 관련 항원을 포함하는 종양 항원 일 수 있지만, 알파 티닌-4, Bcr-Ab1 융합 단백질, CASP-8, β -카테닌, cdc27, CDK4 한정 없다, CDKN2A, COA-1 DEK-수있는 융합 단백질 EF2, ETV6-AML1 융합 단백질 LDLR-fucosyltransferaseAS 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, 염마-1, 2, 3, 신 PAP, 마이 오신 클래스 I, OS-9, PML-RARA 융합 단백질, PTPRK, K-RAS, N-RAS, Triosephosphate의 isomeras, 바게-1, 게이지 3,4,5,6,7, GnTV, HERV-K-엘, 레이지-1, 마법사-A1,2,3,4,6,10,12, 마법사-C2, NA-88, NY-ESO-1 / 레이지-2, SP17, SSX-2, 및 TRP2-INT2, MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), 티로시나 아제, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, P15 (58), CEA, RAGE, NY-ESO (LAGE), SCP-1, 동음 / 엘-40, PRAME, p53의, H-RAS, HER-2 / NEU, BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, 앱스타인 바 바이러스 항원, EBNA, 인간 유두종 바이러스 (HPV)는 E6와 E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, C-MET, nm의 항원-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NUMA, K-RAS, B-카테닌, CDK4, 염마-1, P16, TAGE, PSMA, PSCA, CT7, 텔로 머라 제, 43-9F, 5T4, 791Tgp72하는 태아 단백, 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29 \pm BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68 \pm KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (는 EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-의 Ag, MOV18, NB \pm 70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (맥-2) 단백질 \pm 의 시클로 필린의 C-관련된 단백질을 결합, TAAL6, TAG72, TLP, 및 TPS.

[0194]

4. 기타 활성 제제

[0195]

로로드의 표면에 부착 및/또는 둘러싸 전달 운반체 내에 또는 나노 입자 조성물과 함께 투여 될 수 있는 기타 활성제, 영양 치료, 진단 및 예방제 포함한다. 활성제는 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산과 같은 작은 분자 활성제 또는 생체 거대 분자 일 수 있다. 적합한 작은 분자 활성제는 유기 및 유기 금속 화합물을 포함한다. 작은 분자 활성제는 친수성, 소수성 또는 양친 매성 화합물이 될 수 있다.

[0196]

예시 진단 제는 상자성 분자 형광 화합물, 자성 분자 및 방사성 핵종, X 선 조영제, 및 조영제를 포함한다.

[0197]

특정 실시예에서, 전달 운반체는 하나 이상의 항암제를 포함한다. 대표적인 항암제 5 (포함하지만, 예컨대 플루오로 우라실과 같은 (예, 시스플라틴, 카르 보플 라틴, 옥살리플라틴, mechlorethamine, 시클로 포스 파 미드, 클로 랍 부실, 다카르 바진, 로무 스틴, 카무 스틴, 프로 카르 바진, 클로 랍 부실 및 이포 스파 마이드와 같은) 제, 항 대사 물질을 (알킬화, 이에 한정되지 않는다-fu), 쟈시 타빈, 메토트렉세이트, 시토신 아라 비노 시드, 플루 다 라빈 및 플록스 우리 딘) 등 독소루비신, 다우 노루 비신, valrubicin을 포함하여 이러한 빈 크리스틴, 빈 블라 스틴, 비노 렐빈, 및 빈데 신으로 파클리티셀과 decetaxel 및 빈카 알칼로이드), 안트라 사이클린 (같은 탁산을 포함 antimitotics (, 이다 루비 신 및 에피 루비 신, 그리고 예컨대 액 티노 마이신 D와 같은 actinomycins), 미토 마이신, plicamycin 및 블레오 마이신을 포함하여 세포 독성 항생제 ()와 같은 캄 프로 테신, 이리노테칸 및 토포 테칸과 같은 암사 크린 등 epipodophyllotoxins 유도체와 같은 캄 프로 테 포함한 토포 이소 머라 제 억제제 (AS, 에토 포 시드, 에토 포 시드 포스페이트, 테니 포 시드와), 예컨대 베바 시주 맙 (AVASTIN \circledR) 다른 항 VEGF 화합물 등의 혈관 내피 성장 인자에 대한 항체 (VEGF); 탈리도마이드 (THALOMID \circledR) 및 레 날리도 마이드 등 (REVLIMID \circledR) 그 유도체; 엔도스타틴; 안지오스타틴; 수용체 티로신 키나제 (RTK) 등 sunitinib에 억제제 (SUTENT \circledR); 이러한 sorafenib (Nexavar \circledR), 엘로 티니 브 (Tarceva \circledR), 과 조파 닙, 액 시티 닙과 라파티닙과 같은 티로신 키나제 억제제; 성장 인자 α 변형 또는 성장 인자 β 억제제 변형 및 panitumumab (VECTIBIX \circledR) 및 세툭 (얼비툭스)와 표피 성장 인자 수용체 항체.

[0198]

바람직한 실시예에서, 특히, 활성제 중 하나 이상을 암 치료 용 면역 신호 전달 특성을 갖는 화학 치료제가 될

수있다.

[0199] 5. 표적 모이에티

[0200] 하나 이상의 표적 잔기로로드의 표면에 부착 및/또는 전달 운반체 내에 포함 할 수 있다 (도 표적 분자로 지칭). 바람직하게는, 표적 부분은 전달 운반체의 외부 표면에 표시된다.

[0201] 전형적인 표적 분자는 장기, 조직, 세포 나 세포 외 매트릭스 또는 종양 또는 감염 세포의 특정 유형과 연관된 하나 이상의 타겟에 결합하는 단백질, 펩타이드, 핵산, 지질, 당 또는 다당류를 포함한다. 전달 운반체를 대상으로되는 특이성의 정도는 적당한 친화성 및 특이성 표적 분자의 선택을 통해 조절 될 수 있다. 예를 들어, 항체는 매우 다르다. 이들은 상업적으로 입수하거나 용이 표준 기술을 이용하여 수득 이는 많은 클론, 단클론, 단편, 재조합, 또는 단일 사슬 일 수 있다. 항원 전달 세포뿐만 아니라 종양 표적 분자에 의해 결합되는 T 세포의 특정 분자와 항원 및/또는 호스트 분자에 나노폴리겔의 표면에 결합 될 수 있다. 표적 분자는 입자의 표면에 존재하는 하나 이상의 PEG 사슬의 말단에 결합 될 수 있다.

[0202] 즉, 구체적으로는 악성 종양 세포 (예컨대, 종양 항원)에 단독 또는 높은 양으로 존재하는 종양 마커를 인식하고, 그 일부 실시예에 있어서, 표적 부분은 항체 또는 항원 결합 단편이다. 적절한 표적 세포 및 조직에 주목하는 나노 입자를 직접 사용할 수 있는 분자뿐만 아니라 나노 입자를 표적 분자를 공 액화하는 방법은 당 업계에 공지되어있다. , Ruoslahti, 등, 예를 들어, 참조하십시오. 넷. 계 암, 2 : 83-90 (2002). 항체 항원 결합 분자로 타겟팅 될 수 있는 예시적인 종양 항원은 백신 항원에 대해 상술한다.

[0203] 표적 분자는 neuropilins 및 내피 표적 분자 인테그린, 셀렉틴, 접착 분자를 포함 할 수 있다.

[0204] 일부 실시예에 있어서, 표적 부분은 항원 제시 세포에 입자 (APCs)을 대상으로하고, 특히 수지상 세포로 알려진 APCs의 서브 클래스이다. 수지상 세포는 세포 내 이입을 매개 할 수 있는 세포 표면 수용체의 수를 표현한다. 체계적으로 분산 항원 제시 세포 표면 분자를 내면화에 의해 항원을 표적으로하는 입자의 흡수를 용이하게하고 치료의 주요 속도 제한 단계를 극복할 수 있다.

[0205] 수상 세포 표적 분자는 인식하고 수상 세포의 표면 상에 표시되는 에피토프에 결합하는 이들의 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 수상 세포 표적 분자는 수지상 세포의 세포 표면 수용체에 결합하는 리간드를 포함한다. 그러한 리셉터, 렉틴 데크 (205), 등의 크기의 2-4 오더 (Hawiger, et al., *J. Exp. Med.*, 194(6):769-79 (2001); Bonifaz, et al., *J. Exp. Med.*, 196(12):1627-38 (2002); Bonifaz, et al., *J. Exp. Med.*, 199(6):815-24 (2004)). 이 실험에서, 항원은 항 DEC205 중쇄에 융합시키고, 재조합 항체 분자는 예방 접종에 사용 하였다.

[0206] 다른 세포 내 이입 만노스 특정 렉틴 (만노스 수용체)를 포함하는 수용체와의 IgG Fc 수용체의 다양한, 또한 항원 제시 효율의 유사한 향상이 방법으로 목표로하고있다. 타겟팅을 포함하지만 DC-SIGN, 33D1, SIGLEC-H, DCIR, 중 CD11c, 열 쇼크 단백질 수용체 및 소제 수용체에 한정되지 않는 다른 적합한 수용체.

[0207] 대상이 될 수 있는 다른 수용체는 수신자 같은 수용체 (TLR들)를 포함한다. TLR에 인식하고 병원체 관련 분자 패턴 (PAMPs가)에 결합한다. PAMPs가함으로써 잠재적 DC 항원 흡수 성숙과 T 세포 자극 능력 증가, 내부 수상 세포 및 신호의 표면에 TLR 타겟팅. 캡슐화 된 공동 입자 표면 또는 접합 PAMPs가이 메틸화 (세균)의 CpG DNA, 이 중 가닥 (바이러스) RNA, lipopolysacharride (세균), 펩티도 글리 (세균), lipoarabinomannin (세균), 자이모산 (효모)를 포함 같은 mycoplasma1 지단백질 MALP-2 (세균), 플라 젤린 (세균) 폴리 (이노신산-cytidyllic) 산 (세균), 리포 타이코 산 (세균) 또는 imidazoquinolines (합성).

[0208] 표적 분자에 공유 당 업계에 공지 된 다양한 방법을 사용하여 전달 운반체에 결합 될 수 있다. 바람직한 실시예에 있어서, 표적 부분은 PEG 화하여 전달 운반체 또는 비오틴-아비딘 다리에 부착된다.

[0209] a. CD40 작용제

[0210] 특정 실시예에서, 표적 부분은 CD40을 표적으로 한다. 잔기는 CD40 작용제가 될 수 있다. 세포 표면 분자 CD40은 수퍼 패밀리 종양 괴사 인자 수용체의 부재이며, 대체로 면역, 조혈, 혈관, 상피 및 광범위한 종양 세포를 포함하는 기타 세포에 의해 발현된다(*Clin Cancer Res*, 13(4):1083-1088 (2007)). 암 치료에 대한 잠재적인 타겟으로서, CD40은 CD40 작용제의 작용을 '2 대 1'메커니즘 결과 면역 활성의 간접적인 효과 및 종양에 직접적인 세포 독성 효과 모두를 통해 종양 퇴화를 매개할 수 있다. CD40 작용제는 당 업계에 공지되고, Vonderheide, *Clin Cancer Res*, 13(4):1083-1088 (2007)에서 검토된다. 대표적인 효능이 포함되지만 재조합 CD40L (재조합 인간의 삼량), CD는-870, 893 (완전한 인간 IgG2 단클론 항체), SGN-40 (의 IgG1 인간화) 및 HCD 122 (완전한

인간의 IgG1 단클론 항체)에 한정되지 않는다. 가용성 아고 니스트 CD40 항체가 T 세포 성 면역의 쥐 모델에서 CD4 + 림프구가 제공하는 T 세포의 도움을 대체하는 것으로 나타났다 (Khalil, et al., *Update Cancer Ther.*, 2:61-65 (2007)). 바람직한 실시예에 있어서, 표적 부분은 작용제 항 CD40 항체, CD40 리간드 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0211] b. 인테그린 리간드

다른 실시예에 있어서, 표적 부분은 인테그린에 대한 리간드이다. 인테그린 연구는 종양 세포의 표면에서 과발현되어 있어 종양 세포와 정상 세포를 구별 마커로 역할을 할 수 있음을 보여준다. 특정 인테그린은 세포 외 경로를 통해 TGF- β 를 활성화한다. 잠재성의 TGF- β 는 종양 세포로부터 방출 된 후, 상기 잠재성 TGF- β 의 활성화에 이르는 종양 세포의 표면상에서 인테그린에 결합한다. 종양 미세 환경의 면역 억제 지지체에 TGF- β 의 농도를 증가시키고 종양 환경 규제 T 세포 모집.

[0213] RGD 웹타이드는 이중 기능을 제공할 수 있다: RGD 웹타이드는 전형적인 인테그린 표적 리간드 (Ruosahti E., et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12:697-715 (1996))일 뿐만 아니라, APCs를 활성화하는 면역 위험 신호로 기능을 한다 (Altincicek, et al., *Biol. Chem.*, 390, 1303-11 (2009)). 따라서, 바람직한 실시예에서, RGD 웹타이드는 전달 운반체 내에 로드되건, 표면에 부착 및/또는 전달 운반체 내에 포함된다.

[0214] c. p53 항원을 인식하는 T 세포 수용체

특정 실시예에서, 표적 부분은 T 세포 수용체 인간 MHC의 문맥 내에서의 p53 항원을 인식 (TCR)이다. 알파 이루어지는 T 세포 수용체 베타 사슬 또는 감마 / 델타 사슬 (α/β TCR 또는 γ/δ TCRs)를 포함하여 박테리아 eukaryotic 효모 세포 유래의 T 세포 수용체의 재조합 단백질. 예를 들어, 짧은 텔 원숭이 TCR α (TCRAR2 5'-CCCOGGCCACTTCAGGAGGAGG-3') (SEQ ID NO:1) 및 β (TCRBR 5'-GTCCTGTCTGCAC-CATCCTC-3') (SEQ ID NO:2)로부터 유래된 전체 길이 ectodomains 보존 서열.

[0216] 삭제

[0217] 삭제

[0218] d. IL-15 / IL-15R α

다른 실시예에 있어서, 표적 부분은 IL-15 / IL-15R α 복합하다. 인터루킨 15 (IL-15) IL-2와 특정 수용체의 서브 유닛을 공유하는 사이토 카인이며, 따라서 행동의 일부 중복 메커니즘을 가지고 있다. IL-15은 수상 세포에 의해 발현되고 자연 살해 (NK) 세포의 증식 및 프라이밍위한 중요한 신호를 제공한다. 따라서, IL-15 / IL-15R α 복합체는, 예를 들면, 자연 살해 (NK) 세포에 나노 입자 조성물을 대상으로 사용될 수 있다.

[0220] 인간 IL-15: MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG

[0221] IHVFILGCFS AGLPKTEANWVNVISDLKKI EDLIQSMHID

[0222] ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHD

[0223] VENLIIILANN SLSSNGNVTE SGCKECEELE

[0224] EKNIKEFLQSFVHIVQMFN TS (SEQ ID NO:3)

[0225] 인간 IL-15 수용체:

[0226] MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLRPPATRGITCPPPMVEHADIWVK

[0227] SYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0228] DPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATT

[0229] AAI VPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASH

[0230] QPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASV

[0231] EMEAMEALPVWTGSSRDEDLENCSSHHL (SEQ ID NO:4).

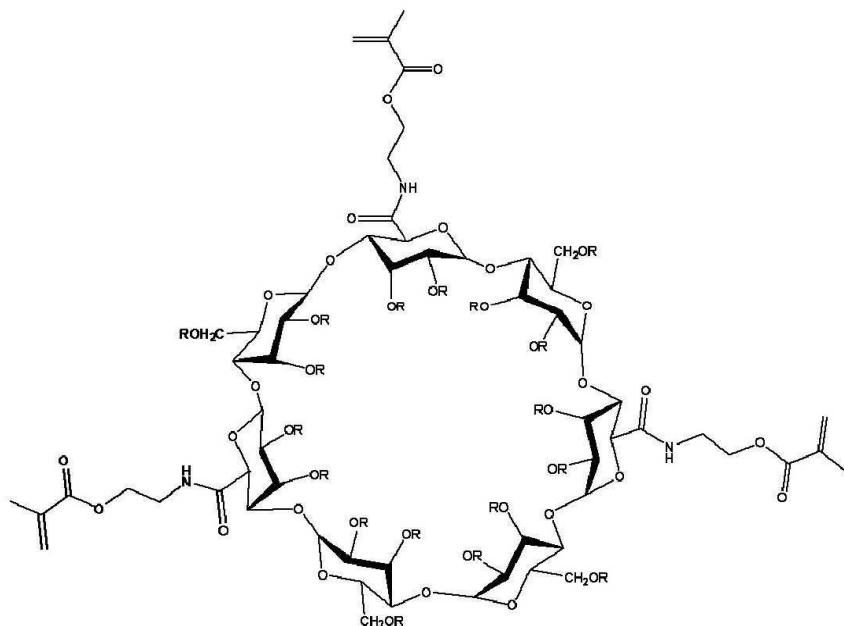
- [0232] C. 호스트 분자
- [0233] 호스트 분자는 분자 또는 가역적으로 착체를 형성 할 활성체와 연결 물질이다. 가역적 활성체와 복합체를 형성 할 수있는 능력 덕분에, 호스트 분자는 생체 내에서 착화 활성 성분의 방출을 제어하기 위해 기능 할 수있다.
- [0234] 몇몇 경우에, 호스트 분자 활성체와 내포 복합체를 형성하는 분자이다. 활성체의 활성체 (즉, 게스트) 또는 일부 다른 분자, 분자 그룹, 또는 물질 (즉, 호스트)의 공동 내로 삽입 될 때 포접 복합체가 형성된다. 호스트의 틀이나 구조에 영향을주지 않고, 호스트 분자와 일반적으로 게스트 분자 연관시킨다. 예를 들어, 내포 복합체의 경우, 크기와 호스트 분자에 이용 가능한 공간의 형태는 복합체 형성의 결과로서 실질적으로 변경되지 않고 남아있다.
- [0235] 호스트 분자는 이들 소분자, 올리고머, 폴리머, 또는 이들의 조합 일 수있다. 전형적인 호스트는 알도의 복수의 링을 포함 amyloses, 텍스트린 및 기타 환상 또는 나선형 화합물과 같은 폴리 사카 라이드, 예를 들어, 1,4-통해 형성된 화합물 (예를 들면 글루코스, 프럭 토스 및 갈락토스) 단당류의 1,6-결합 및 이당류 (예 : 설탕, 맥아당, 유당 등). 다른 예시적인 호스트 화합물은 cryptands, cryptophanes, cavitands, 크라운 에테르, 텐드리 머, 이온 교환 수지, 칼릭 사렌, valinomycins, nigericins, 카테, polycatenanes, carcerands, 쿠커비투릴 및 스피랜드을 포함한다.
- [0236] 또 다른 실시예에서, 유기 화합물 또는 호스트 물질은 탄소 나노 튜브, 풀러렌 및/또는 자소 기반 호스트 물질을 포함한다. 탄소 나노 튜브는 원통형 나노 탄소의 동소체이다. 나노 튜브는 구면 포함 벼기볼 풀러렌 구조 가족의 구성원, 및 나노 튜브의 단부는 벼기볼 구조의 반구로 캡핑 될 수있다. 그들의 이름이 탄소 하나 원자 두께의 시트에 의해 형성된 벽 긴 중공 구조에서 파생 된 그레 편했다. 이들 시트는 특정 이산 ("키랄") 각도로 암연하고, 암연 각도와 반경의 조합은 나노 튜브의 특성을 결정한다. 나노 튜브는 단일 벽 나노 튜브 (단일 벽 탄소 나노 튜브) 및 다중 벽 나노 튜브 (다중 벽 탄소 나노 튜브)로 분류 할 수있다. 튜브 및/또는 튜브는 풀러렌 또는 풀러렌 내에 (즉, 게스트) 전달되는 밀봉 물질 또는 포획하여, 예를 들어, 호스트의 역할을 할 수있다. 대안 적으로, 외부 및/또는 튜브 및/또는 풀러렌의 내부는 게스트 복합체가 제공 될 수있는 작용기로 작용 화될 수있다. Complexations 포함하지만 이러한 PI 스태킹 이온 성 상호 작용, 수소 결합, 반 데르 발스 상호 작용, 및 파이-파이 상호 작용으로 제한되지 않는다.
- [0237] 그레 편은 탄소의 동소체이다. 그레 편의 구조는 조밀 허니컴 결정 격자 포장 SP2 결합 된 탄소 원자의 1 원자 두께의 평면 시트이다. 그레 편은 흑연, 활성탄, 탄소 나노 튜브 및 풀러렌 등 일부의 탄소 동소체의 기본적인 구성 요소이다. 게스트는 나노 튜브와 풀러렌을 위해 전술 한 바와 같이 및/또는 그라 편에 복잡하거나 기능화 된 그라 편에 연결할 수 있다 제공한다.
- [0238] 호스트 물질도 포함하지만, 무기 포스페이트 및 실리카에 한정되지 않고, 무기 재료 일 수있다.
- [0239] 적합한 숙주 분자는 일반적으로 전달되는 활성 성분 (들) 및 목적하는 약물 방출 프로파일의 ID를 감안 나노리 포겔 또는 나노 입자에 혼입 선택된다. 활성체가 전송 될 수있는 착물을 형성하기 위해, 상기 호스트 분자는 일반적으로 활성 성분을 모두 sterics (크기)과 전자 (전하 극성)의 관점에서 무료로 선택된다. 예를 들어, 활성체 포접 복합체가 전달되도록 형성 호스트 분자의 경우에, 호스트 분자는 일반적으로 활성 성분을 포함하는 적절한 크기의 구멍을 보유한다. 또한, 상기 호스트 분자는 일반적으로 활성 성분과의 복합체 형성을 촉진하는 적절한 소수성 / 친수성의 공동을 갖는다. 게스트-호스트 상호 작용의 강도가 강해 게스트-호스트 상호 작용이 일반적으로 더 연장 된 약물 방출을 생산하는 상기 나노폴리겔 또는 나노 입자로부터 활성 제제의 약물 방출 프로파일에 영향을 미칠 것이다.
- [0240] 일반적으로, 호스트 분자는 나노폴리겔 또는 나노 입자 코어를 형성하는 폴리머 매트릭스 내에 분산되어있다. 일부의 경우, 하나 이상의 호스트 분자가 고분자 매트릭스에 공유 결합된다. 예를 들어, 상기 호스트 분자는 폴리머 매트릭스와 반응하는 하나 이상의 반응성 펜던트 작용기로 작용 화 될 수있다. 특정 실시예에서, 상기 호스트 분자는 폴리머 매트릭스를 가교 폴리머 매트릭스와 반응하는 하나 이상의 펜던트 반응성 관능기를 함유한다. 적합한 반응성 작용기의 예로는 메타 크릴 레이트, 아크릴 레이트, 비닐 기, 에폭 사이드, thiiranes, 아지드 및 알킨을 포함한다.
- [0241] 특정 구현 예에서, 상기 호스트 분자는 시클로 텍스트린이다. 링크 된 포도당 잔류-시클로 텍스트린은 육 (α -시클로 텍스트린), 칠 (β -시클로 텍스트린), 팔 (γ -시클로 텍스트린)를 포함 환상 올리고당, 또는 그 이상의 α -(1,4)이다. 글루코 산소 및 비-교환 수소 원자의 두 개의 고리가 상기 캐비티의 내부 지향되는 동안 텍스트린의 수산기 링의 외부로 배향된다. 결과적으로, 시클로 텍스트린은 친수성 외관과 결합 된 소수성 내부 공동을

갖는다. 소수성 활성제와 조합시, 활성 성분 (즉, 게스트) 사이클로 텍스트린 (즉, 호스트)의 소수성 내부로 삽입한다.

[0242] 사이클로 텍스트린은 화학적 일차 또는 이차 하이드 록실 마크로 사이클의 그룹, 또는 이들의 일부 또는 전부가 하나 이상의 펜던트 그룹과 기능화되도록 변형 될 수 있다. 펜던트 기는 반응성 작용 등의 메타 크릴 레이트 등의 고분자 매트릭스와 반응 할 수 있는 그룹, 아크릴 레이트, 비닐 기, 에폭 사이드, thiiranes, 아 지드, 알킨, 및 이들의 조합 일 수 있다. 펜던트 그룹은 사이클로 텍스트린의 용해도를 변경하는 역할을 할 수 있다. 이러한 타입의 예시적인 그룹은 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 또는 4-) 히드 록시, 카르복시, 카르 보닐, 아실 옥시, 및 옥소로 치환 된 술 피닐, 술 포닐, 포스페이트, 아실, 및 CL-C12 알킬기를 포함 여러 폐. 이러한 알코올 잔기를 수정하는 방법은 당 업계에 공지되어, 많은 시클로 텍스트린 유도체는 시판 중이다.

[0243] 적합한 시클로 텍스트린의 예는 α -시클로 텍스트린을 포함한다; β -시클로 텍스트린을; γ -시클로 텍스트린을; 메틸 α -시클로 텍스트린; 메틸 β -시클로 텍스트린; 메틸 γ -시클로 텍스트린; 에틸 β -시클로 텍스트린; 부틸 α -시클로 텍스트린; 부틸 β -시클로 텍스트린; 부틸 γ -시클로 텍스트린; 펜 γ -시클로 텍스트린; 히드 록시 에틸 β -시클로 텍스트린; 히드 록시 에틸 γ -시클로 텍스트린; 2-히드 록시 α -시클로 텍스트린; 2-하이드 록시 프로필 β -시클로 텍스트린; 2-히드 록시 γ -시클로 텍스트린; 2-히드 록시의 β -시클로 텍스트린; 아세틸 α -시클로 텍스트린; 아세틸 β -시클로 텍스트린; 아세틸 γ -시클로 텍스트린; 프로피 오닐 β -시클로 텍스트린; 부티 릴 β -시클로 텍스트린; 숙시 닐 α -시클로 텍스트린; 숙시 닐 β -시클로 텍스트린; 숙시 닐 γ -시클로 텍스트린; 벤조일 β -시클로 텍스트린; 팔미 틸 β -시클로 텍스트린; 톨루엔 β -시클로 텍스트린; 아세틸 메틸 β -시클로 텍스트린; 아세틸 부틸 β -시클로 텍스트린; 글루코 α -시클로 텍스트린; 글루코 β -시클로 텍스트린; 글루코 γ -시클로 텍스트린; 말 토실의 α -시클로 텍스트린; 말 토실의 β -시클로 텍스트린; 말 토실의 γ -시클로 텍스트린; α -시클로 텍스트린 carboxymethylether; β -시클로 텍스트린 carboxymethylether; γ -시클로 텍스트린 carboxymethylether; carboxymethyl ethyl의 β -시클로 텍스트린; 포스페이트 에스테르 α -시클로 텍스트린; 인산 에스테르 β -시클로 텍스트린; 인산 에스테르 γ -시클로 텍스트린; 3-트리메틸-2-히드 록시 프로필 β -시클로 텍스트린; 설포 부틸 에테르 β -시클로 텍스트린; 카르복시 메틸 α -시클로 텍스트린; 카르복시 메틸 β -시클로 텍스트린; 카르복시 γ -시클로 텍스트린 및 이들의 조합.

[0244] 바람직한 시클로 텍스트린은 하나 이상의 펜던트 아크릴 레이트 또는 메타 크릴 레이트 그룹으로 작용 α -시클로 텍스트린, β -시클로 텍스트린, 및 γ -시클로 텍스트린을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 호스트 분자는 다수의 메타 크릴 레이트 그룹으로 작용 화 β -시클로 텍스트린이다. 이러한 유형의 예시적인 호스트 분자는 R은 C1-C6 알킬기를 나타내고, 아래에 도시된다.



[0245]

[0246] 또 다른 예로서, 호스트 분자는 일시적 이온 성 상호 작용을 통한 활성제와 연관시키는 재료 일 수 있다. 예를 들어, 제어 된 약물 방출에 사용하기위한 당 업계에 공지 된 종래의 이온 교환 수지가 호스트 분자로서 작용할 수있다. 천, 등, 예를 들어, 참조하십시오. "항암제 독소루비신을위한 담체로서 이온 교환 미소 평가 : 관내

연구" J. 제약. Pharmacol. 44 (3) : 211-215 (1992) 및 파락, 등. J. 제약 "이온 교환 수지의 유기 카르복실산의 방출 속도". 과학. 77 (10) : 872-875 (1988).

[0247] 예시로서, 활성제가 전달 될 때이다 양이온 종은 적합한 이온 교환 수지는 생리 학적으로 허용 가능한 지지체의 술폰산 기 (또는 변형 된 술폰산 기) 또는 임의로 변형 카복실산 그룹을 포함 할 수있다. 마찬가지로, 활성제는 음이온 성 종, 적합한 이온 교환 수지가 아민 계 그룹을 포함 할 수이다 (예를 들어, 강한 상호 작용이 약한 상호 작용, 또는 디메틸위한 트리메틸). 이러한 폴리에틸렌 아민 (PEI) 등의 양이온 성 폴리머는, 예컨대 siRNA와 같은 복잡한 올리고 뉴클레오티드의 호스트 분자로서 기능 할 수있다.

[0248] 다른 경우들에서, 호스트 분자는 폴리 (아미도 아민) (PAMAM) 텐드리머 같은 텐드리머이다. 전술 한 바와 같이 양이온과 음이온 텐드리머는 이온 활성제와 관련하여 호스트 물질로서 기능 할 수있다. 또, 3-4 세대 PAMAM 텐드리머와 같은 중간 크기의 텐드리머는 핵산의 복합체, 예를 들면, 활성제를 수용 할 수있는 내부 공극 공간을 가질 수있다.

[0249] 일부 실시예에서, 호스트 분자는 시클로 텍스트린에 접합 된 텐드리머이다. 일부 실시예에서, 시클로 텍스트린 (들)의 차 아민 텐드리머 보호막. 적절한 텐드리머 및 시클로 텍스트린은 위의 설명한다. 수정되지 않은 텐드리머 (즉, 세대 4 PAMAM 텐드리머 (G4))는 경험적으로 cyclodextrin (CD)와 결합 텐드리머보다 엔도 좀 중단 (아래 예 참조)에서 더 좋았다. 이론에 구애 됨이없이, PAMAM 텐드리머의 말단 아민 기가 엔도 베퍼링을 제공하여 양성자 스폰지 효과에 의해 엔도 좀을 붕괴 것으로 여겨진다. 따라서, CD 증가는 엔도 좀 분열의 감소를 초래한다. 하기 실시예에서 논의 된 바와 같이, 텐드리머 및 사이클로 텍스트린의 상이한 조합은 형질 전환 효율과 세포 내의 엔도 솔 중단 레벨을 조절하는데 사용될 수있다.

[0250]

[0251] 바람직하게는, 상기 하나 이상의 호스트 분자 / 폴리머 매트릭스 w, 더욱 바람직하게는 약 0.1 % 내지 약 25 % w 약 40 % 내지 약 0.1 %의 양으로 존재하고 / 전체 제형의 w w

[0252] III. 제조, 로딩 방법 및 약학 조성물

[0253] A. 제조 및 로딩 방법

[0254] 1. 나노폴리겔

[0255] 나노폴리겔 핵산, 단백질 및/또는 작은 분자의 지속적인 전달을 위해 리포좀과 고분자 계 입자 모두의 장점을 결합한 나노 입자이다. 나노폴리겔 다른 종횡비 분야, 디스크, 막대 형상 등의 형태 일 수있다. 나노 구체, 즉, 입자 를 수있다. 방출의 다른 비율을 용이하게하도록 나노폴리겔은 전형적으로 특성의 원격 장전과 동조하여 제제를 캡슐화 할 수있는 합성 또는 천연 폴리머로 형성된다. 방출 속도는 0.5 ~ 1.5, 보다 바람직하게는 0.05 ~ 5.0 지질 비율 폴리머를 변화시킴으로써 조절된다.

[0256]

나노리포겔은 동안 또는 형성 후 이전에 어느 제제와로드 할 수 있도록 설계 이후 제제에 대한 제어 방출 차량의 기능을한다. 나노폴리겔은 제제의 다수의 제어 방출은 연속적으로 달성 될 수 있도록 하나 이상의 제제와 함께로드 될 수있다.

[0257]

나노폴리겔 번째 제제의 존재 나노폴리겔의 재수화의 방법에 의해 형성 다음 형성 동안 하나 이상의 제제 및 하나 이상의 초 제제로딩된다. 예를 들어, 나노폴리겔은 보조제 및 나노폴리겔이 후, 항원과 함께 보조제의 방출 제어용, 형성 후에 하나 이상의 대상 항원을 포함로서의 분자로 로딩된다.

[0258]

2. 고분자 나노 입자

[0259] a. 에멀젼 방법

[0260]

일부 실시예에서, 나노 입자는 폴리머 에멀젼 용매 증발 법을 사용하여 제조된다. 예를 들어, 고분자 재료는 물에 섞이지 않는 유기 용매에 용해 및 약물 용액 또는 약제 용액의 조합으로 혼합 하였다. 불 hòa 화성 유기 용매가 될 수 있지만, 다음 중 하나 이상으로 한정되는 것은 아니다 : 클로로포름, 디클로로 메탄, 및 아실 아세테이트. 약물에 용해 될 수 있지만, 다음 중 하나 이상으로 한정되는 것은 아니다 : 아세톤, 에탄올, 메탄올, 이소 프로필 알코올, 아세토 니트릴, 디메틸 술록 시드 (DMSO). 수성 용액을 유화하여 에멀젼 용액을 수득하기 위해 생성 된 혼합물을 용액에 첨가한다. 유화 기술 될 수 있지만, 호 모지 나이저를 통해 프로브 초음파 처리 또는 균질화에 한정되지 않는다. 웨터드 또는 형광 물질 또는 약물은, 캡슐화의 표면과 연관 둘러싸여 및/또는 전체의 입자의 폴리머 성 매트릭스를 분배 할 수있다.

[0261] b. 나노석출 방법

[0262] 다른 실시예에서, 당 업계에 공지된 방법에 따라 폴리머 나노입자는 나노침전 방법 또는 미세유체 장치를 사용하여 제조된다. 폴리머성 물질은 수흔화성 유기 용매에서 약물 또는 약물 조합과 혼합된다. 고분자 재료는 수흔화성 유기 용매에 약물 또는 약물의 조합과 혼합된다.

[0263] 그리고나서, 생성된 혼합 용액은 수용액에 첨가되어 아나노입자 용액을 생성한다.

[0264] 다. 제조의 실시 방법

[0265] 입자는 입자의 폴리머성 조성물을 포함하는 기준에 기초하여 선택될 수 있는 다양한 방법을 사용하여 상이한 폴리머로부터 제조될 수 있으며, 제제(들)은 당해 분야에 공지된 방법에 따라 입자 내로 로딩되거나 입자와 연관된다. 예시적인 방법들은 아래에 제공된다.

[0266] a. 용매 증발. 이 방법에서, 폴리머는, 염화 메틸렌과 같은 휘발성 유기 용매에 용해시킨다. 약물은 (중 가용성 또는 입자로 분산)을 첨가하고, 혼합물을 계면 활성제 등의 폴리(비닐 알콜)을 포함하는 수용액에 혼탁된다. 유기 용매의 대부분이 증발 할 때까지 생성된 에멀젼의 고체 입자를 두고, 교반 하였다. 얻어진 입자를 물로 세정하고, 동결 건조기에서 밤새 건조된다. 다른 크기 (0.5-1000 마이크론) 및 모폴로지를 가진 입자들은 이 방법에 의해 얻을 수 있다. 이 방법은 폴리 에스테르와 폴리스티렌 등 상대적으로 안정적인 폴리머 유용한다.

[0267] 그러나, 폴리 안 하이드 라이드와 같은 불안정성 폴리머는 때문에 물의 존재로 제조 프로세스 중에 품질 저하가 발생 될 것이다. 이러한 폴리머 완전히 무수 유기 용매에서 수행되는 다음의 두 가지 방법이 더 유용하다.

[0268] b. 핫멜트 마이크로 캡슐화. 이 방법에서, 폴리머는 먼저 용융하고, 고체 입자와 혼합 하였다. 혼합물을 폴리머의 용점 이상으로 가열 5°C 지속적인 교반으로 (실리콘 오일 등) 비 혼화 용매에 혼탁하고 있다. 에멀젼이 안정화되면, 폴리머 입자가 고화 할 때까지 냉각된다. 생성된 입자는 자유-유동 분말을 수득 석유 에테르와 데칸테이션에 의해 세정된다. 0.5-1000 마이크론 크기의 입자는 이 방법으로 얻을 수 있다. 이 기술로 제조 분야의 외부 표면은 일반적으로 부드럽고 조밀하다. 이 과정은 폴리 에스테르 및 폴리 안 하이드 라이드로 이루어지는 입자를 제조하는데 사용된다. 그러나, 이 방법은 1,000-50,000 사이 분자량 폴리머로 제한된다.

[0269] c. 용매 제거. 이 기술은 주로 하이드 라이드를 위해 설계된다. 이 방법에서는, 약물이 분산 또는 염화 메틸렌과 같은 휘발성 유기 용매에서 선택된 폴리머의 용액에 용해시켰다. 이 혼합물을 에멀젼을 형성하기 위해 (예를 들면 실리콘 오일 등) 유기 오일의 교반에 의해 중단된다. 용매 증발과는 달리, 이 방법은 높은 용점과 다른 분자량 폴리머로부터 입자를 만들기 위해 사용될 수 있다. 1-300 미크론 범위의 입자는 이 절차에 의해 얻을 수 있다. 이 기술로 제조 분야의 외부 형태는 사용되는 폴리머의 종류에 크게 의존한다.

[0270] d. 분무 건조, 이 방법에서 폴리머는 유기 용매에 용해시킨다. 활성 약물의 양은 공지된 폴리머 용액 (수 불용성 약물) 또는 공동 용해 (용성 약물)에 혼탁된다. 상기 용액 또는 분산 물을 분무 건조시킨다. 다음과 같이 일반적인 공정 매개 변수 (부치를) 건조기 미니 스프레이 같다 폴리머 농도 = 0.04 g / mL로, 입구 온도 = -24°C, 출구 온도 = 13 ~ 15 °C, 흡인기 설정 = 15, 펌프 설정 = 10 mL / 분, 분무 유량 = 600 N1 개의 / hr이고, 노즐 직경 = 0.5 mm. 1-10 미크론 범위의 입자가 사용되는 폴리머의 종류에 따라 다른 형태로 얻어진다.

[0271] e. 히드로겔 입자. 예컨대 알긴산 젤-형 폴리머로 이루어지는 입자는, 기존 이온 성 젤 기술을 통해 제조된다. 폴리머는 제황산 바륨 또는 어떤 생물 활성제와 혼합 수용액에 용해한 후, 경우에 따라, 액체 방울을 파괴하는 질소 가스의 흐름을 이용한 미적 성형 장치를 통해 압출된다. 천천히 교반 (약 100-170 RPM) 이온 성 경화 목욕 성형 미세 방울을 잡으려고 압출 장치 아래에 위치한다. 입자는 젤화가 발생하기에 충분한 시간을 허용하기 위해 20-30 분 동안 배양 조에서 남아있다. 입자 크기는 질소 가스 또는 폴리머 용액 유량을 다양한 크기의 압출 기를 사용하거나 변경함으로써 제어된다. 키토산 입자를 산성 용액에 폴리머를 용해시키고 삼인산으로 가교 결합에 의해 제조 될 수 있다. 카르복시 메틸 셀룰로오스 (CMC) 입자를 산성 용액에 폴리머를 용해시키고, 납 이온은 입자를 석출시킴으로써 제조 할 수 있다. 음으로 하전 된 폴리머의 경우 (예를 들어, 알긴산, CMC) 분자량이 다른, 양전하 리간드 (예컨대, 폴리 리신, 폴리에틸렌 이민)을 이온에 부착 될 수 있다.

[0272] B. 약학 조성물

[0273] 약학 조성물은 투여 경로 각각에 적합한 투여 형태, 점적으로 또는 중언에서 제형 ((IV) 또는 피하 주사, 정맥, 근육 내, 복강 내)에 의해 비경 구 투여 될 수 있다.

[0274] 일부 실시예에서, 상기 조성물은 표적 세포 조성물의 전달을 위한 효과적인 양으로 정맥 내 또는 복강 내 투여에

의해, 예를 들면 전신적으로 투여된다. 다른 노선들은 점안 또는 점막을 포함한다.

[0275] 특정 실시예에서, 상기 조성물을 직접 처리 할 수 있는 부위에 주사하여, 예를 들면, 국소 투여된다. 일부 실시 예에서, 상기 조성물은 주입되거나 하나 이상의 종양 또는 병든 조직에 직접 투여 될 수 있다. 통상적으로, 로컬 주입 전신 투여에 의해 달성 될 수 있는 것보다 더 큰 조성물의 국소 농도 증가시킨다. 일부 실시예에서, 조성물은 카테터 또는 주사기를 이용하여 해당 셀에 국부적으로 전달된다. 셀에 국부적 조성물을 포함 제공 주입 펌프를 사용하거나 임프란트의 인접 지역에 조성물의 지속 방출에 영향을 줄 수 폴리머 임프란트로 조성물을 포함하는 다른 수단을 포함한다.

[0276] 조성물은 예컨대 생물학적 프로세스의 작용을 통해 같이 간접적으로 세포와 접촉하거나 등에 의해, 직접 세포에 제공 될 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 생리 학적으로 허용되는 담체 또는 운반체로 제형화 될 수 있고, 셀을 둘러싸는 조직 또는 유체 주입. 조성물은 단순 확산, 세포 내 이입에 의해 또는 임의의 수동 또는 능동 수송 메카니즘에 의한 세포막을 통과 할 수 있다.

[0277] 선택된 투여량은 투여 경로에 원하는 치료 학적 효과에 따라 다르며, 목적하는 치료의 기간. 일반적으로 나노 입자 조성물은 약 0001 mg의 범위로 투여 될 수 / 100 mg의 칼로그램 / 투여 당 kg (예를 들어, 매일, 또는 2, 3, 4, 5 회 이상 매주 또는 2, 3, 4, 5 또는 번보다 상세히 논의 된 바와 같이 한 달, 등). 투여 경로뿐만 아니라 투여량을 결정하는데 고려 될 수 있다. 매주 또는 2, 3, 4, 5 배 이상, 예를 들어, 특정 실시예에서, 나노 입자 조성물은 0.01의 범위로 투여되고 / 100 mg의 / kg (예, 매일 kg을 2, 3, 4 5 회 이상 한달 등 정맥 또는 해석상 경로에 의해보다 상세히)에서 논의 된 바와 같이, 0.0001 밀리그램의 범위 / 1 mg의 kg의 / kg (예를 들어, 매일, 또는 2, 3, 4, 5 회 이상 매주 또는 2, 3, 4, 종양 또는 종양 미세 환경에 피하 경로 (예를 들면, 로컬 또는 주입에 인접한 아래 더 상세히 논의 된 바와 같이 등을 5 회 이상 월)). 더 바람직한 투여량은 아래에 설명되어 있다.

1. 비경구 투여 제형

[0278] 바람직한 실시예에서, 조성물은 정맥 주사, 수용액에 투여된다. 제형은 혼탁액 또는 에멀젼의 형태 일 수 있다. 일반적으로, 약학 조성물은 하나 이상의 활성제의 유효량을 임의로 약학적으로 허용 가능한 희석제, 보존제, 가용 화제, 유화제, 보조제 및/또는 담체를 포함 포함한 제공된다. 이러한 조성물은 멸균 희석제, 각종 벼파 콘텐츠 완충 식염수를 포함 할 수 있다 (예컨대, 트리스-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도; 선택적으로, 세제 및 가용 화제와 같은 첨가제, 항산화제 (예, 아스코르브 산, 소듐 메타 바이 설 파이트), 방부제 (예 Thimersol (예 TWEEN® 20 TWEEN® 80과 같은 폴리 소르 베이트 20 또는 80 라 함) 벤질 알콜). 비 수용성 용매 또는 운반체의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유 및 옥수수 유, 젤라틴, 및 에틸 올레 에이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르, 식물성 오일이다. 제제는 동결 건조하여 사용 직전에 재현 탁 할 수 있다. 제형은, 예를 들면, 조성물을 조사하여, 조성물에 멸균 제를 혼입함으로써, 박테리아 보류 필터를 통한 여과, 또는 조성물을 가열하여 멸균 될 수 있다.

2. 국소, 점막 및 구강 투여용 제형

[0279] 조성물은 국소 또는 점막하여 적용될 수 있다. 국소 투여는 폐에 적용, 비강, 구강 (설하, 협측), 질, 또는 직장 점막을 포함 할 수 있다. 이러한 투여 방법은 점막 전송 요소와 셀을 배합함으로써 효과적으로 제조 될 수 있다. 에어로졸로서 전달하거나 또는 약 5 미크론보다 공기 역학적 직경을 갖는 건조 입자를 분사 할 때 혈류로 폐의 상피 라이닝에 걸쳐 흡입 및 이송 동안 조성물은 폐에 전달 될 수 있다.

[0280] 치료 제품의 폐 전달을 위해 고안된 기계적 장치들의 넓은 범위를 포함하여 사용하지만, 당업자에게 익숙하다 모두 분무기, 계량 흡입기, 및 분말 흡입기, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0281] 점막 투여 용 제제는 일반적으로 타블렛, 젤, 캡슐 제, 혼탁액 또는 에멀젼에 혼입 될 수 분무 건조 된 약물 입자가 될 것이다. 표준 의약품 부형제는 조제를 제공한다.

[0282] 경구 제제는 츄잉 검, 젤 스트립, 정제, 캡슐, 또는 로젠 지 형태 일 수 있다. 경구 제제는 장 상피와 점막을 포함한 위장관을 통해 장내 보호 또는 강화 된 전달을 부여 할 수 있는 입자에 부형제 또는 다른 수정을 포함 할 수 있다 (Samstein, et al. .29(6):703-8 (2008)).

[0283] 경피 제형 또한 제조 할 수 있다. 이들은 일반적으로 표준 기술을 사용하여 제조 할 수 있다 모두 연고, 로션, 스프레이, 또는 폐치 될 것이다. 경피 제형은 침투 증진제를 포함 할 수 있다. 전기 및 미세 바늘을 포함한 화학 증강 및 물리적 방법과 함께 작업 할 수 있다.

[0286] IV. 치료 방법

A. 면역 반응을 자극하거나 강화하는 방법

나노 입자 조성물은, 유도 강화하거나 주제에 대한 면역 반응을 증가시키는 효과적인 양으로 이를 필요로하는 환자에게 투여 될 수 있다. 통상적으로, 면역 반응은 면역 자극 응답이다. 예를 들어, 상기 조성물은 면역 반응, A (B 세포 구동) 체액 성 면역 반응, T 세포의 활성 및/또는 T 세포 증식 (T-세포 구동) 세포를 증가 시키는데 효과적인 양으로 투여 될 수 있다하는을 줄이기 T 세포 억제 신호는 T 세포 분화 또는 효과기 기능을 자극 T 세포의 생존, 또는 이들의 임의의 조합을 촉진하는 사이토 카인의 생산을 향상한다.

일부 실시예에서, 조성물은 감소 또는 면역 억제 반응을 억제 할 수 있다. 예를 들어, 조성물을 Tregs 블록 TREG 분화 피킹 및/또는 효과기 기능을 고갈 유효량으로 투여 될 수 있으며, 이펙터 세포 억제 액, 또는 이들의 임의의 조합을 일으킨다.

전달 운반체 동일한 표적 세포에 둘 이상의 활성제를 동시에 또는 순서 전달에 특히 유용하다. 예를 들어, 내부 또는 동일한 전달 운반체 상 두개 이상의 활성제의 공동 로딩 두 제제는 동일한 표적 세포에 전달 될 가능성을 증가시킬 수 있다. 사용자는 전달 운반체의 표면 상에 제시되어있는 내부에 캡슐화 된 활성 제제를 제어 할 수 있다. 따라서, 사용자가 확인하는 방법 및 각각의 활성제 (상기 셀의 외부 세포 내 이입 다음 등의 수용체에 즉) 표적 세포에게 제시 될 때.

공동 전달도 동시에 두 개의 서로 다른 경로로 타겟팅 할 수 있다. 예를 들면, 나노 입자 조성물을 유도 또는 자극 면역 반응을 증가시키고 동시에 감소 또는 억제, 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 일반적으로 이러한 조성물은 면역 자극 반응 및 면역 억제 반응을 감소하는 두 번째 제 증가하는 적어도 두 활성제를 포함한다. 예시적인 조성물은 IL-2 및 SB505124 또는 로사르탄과 같은 TGF- β 억제제와 같은 염증성 사이토 카인을 포함한다. 다른 실시예에서, 입자는 예를 들면, 표적 부위, 예 RGD 웨티드 잔기를 표적 종양을 포함한다.

다른 실시예에서, 상기 활성제는 각각 두 제제는 동일한 셀에 작용하거나 동일한 미세 국소화 할 필요가 없을 때, 예를 들면, 함께 또는 개별적으로 환자에게 전달되는 별도의 입자로 로딩된다.

본원에 개시된 나노 입자 조성물은 기능성 APC 고갈 및/또는 암 환자에 효과가 있다 T 헬퍼 세포를 에뮬레이트하도록 설계 될 수 있다. 인간의 내성이 진화 응답으로 구성되어-타고난 및 적응. 일반적으로 면역 체계에 제시되지 않은 트리거 분자의 APCs, 어느 외국 분자 또는 "자기"기반 분자 프리젠 테이션은 모두 응답 중요하다. 통칭 '위험 신호'로 지칭 된 이러한 분자는 질환 또는 질병이 발생할 가능성이 상황의 존재, 특히 APCs 통해 면역계 경고. 나노 입자 (AAPC의)을 위험 신호를 촉진하기 위해 배포 할 수 있다, 심지어 인공 APCs를 제공, 활성화 APCs를 에뮬레이션 할 수 있다. 일부 특정 실시예에서, 입자는 인공 수지상 세포로서 수상 세포 또는 기능을 모방하도록 설계된다. 그 표면에 특정 실시예에서, 입자 본 IL-15 / IL-15R α 차체.

나노 입자 조성물의 활성 또는 효능은 대조군과 비교 될 수 있다. 적절한 제어는 당 업계에 공지되어있다. 예를 들어, 제어를 처리하기 전에 적용될 수 있다. 조성물의 활성 또는 효능은 치료 후 환자의 상태나 증상의 변화 일 수 있다.

제어는 가용성 형태 또는 다른 전달 운반체 동일한 활성제와 병렬 처리와 동일한 조건 또는 증상을 갖는 대상이 될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 활성제는 덜 활성제는 덜 빈번하게 투여, 사용 또는 이들의 조합 가용성 형태 또는 다른 전달 운반체에 동일한 활성 성분의 투여에 비해. 예를 들어, 일부 실시예에서, 10에서 25, 50, 75, 100, 500, 1000, 5000 또는 10,000 배 이하 활성제는 수용성 형태로 투여 활성제에 비해 나노 입자 조성물에 사용된다.

일반적으로 개시된 나노 입자 조성물은 개선 활동, 효과 또는 효능을 보여준다. 예를 들어, 차량의 치료 효능은 전달 운반체의 부재 제제 (들)을 초과 할 수 활성제 (들)를 전달했다. 개시된 전달 운반체의 개선 된 치료 적 효능으로 인해 표적 세포 둘 이상의 치료제를 동시에 높은 국소 농도, 억제 소자를 동시에 감쇠의 자극 요소의 향상을위한 제제 (들)의 결합력의 증가 일 수 있다 면역, 면역계의 자극 요소가 직접 질병 세포의 표적, 또는 이들의 임의의 조합을 선택적으로 타겟팅.

[0297] B. 치료될 질병

나노 입자 조성물은, 지연 방지, 치료, 또는 질환 또는 장애, 또는 이의 하나 이상의 증상의 중증도를 감소시키는 그의 양 효과를 필요로하는 환자에게 치료 적 또는 예방 적으로 투여 될 수 있다. 개시된 조성물은 치료 조작 반감기 및 생체 분포 중요하며 가용성 형태로 투여되거나 또는 전달 운반체 무채색 일 경우 덜 효과적이나 비효

율적 일 수 있다 약물 많은 질병의 제어 가능성을 제공한다. 질환 또는 장애는 예컨대, 암 또는 감염 될 수 있다.

[0299] 1. 암

[0300] 개시된 조성물은 이를 양성 또는 악성 종양, 종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 처리는 직접적 간접적으로 암 세포에 대한 면역 반응을 증가시켜 암세포를 타겟팅하는 타겟팅 암세포를 죽일 수 있다; 또는 이들의 조합.

[0301] 성숙한 동물에서, 잔액은 보통 대부분의 기관 및 조직에서 세포 재생 및 세포사 사이에 유지된다. 신체의 성숙 세포의 각종 소정의 수명을 가지고; 이러한 세포가 죽는 새로운 세포 증식 및 줄기 세포의 다양한 유형의 분화에 의해 생성된다. 정상적인 상황에서는, 새로운 세포의 생산 세포의 특정 유형의 수가 일정하게 유지되도록 조절된다. 때때로, 그러나, 세포는 더 이상 정상적인 성장 제어 메커니즘에 반응하는이 발생하지 않는다. 이 세포들은 종양 또는 종양의 제조, 상당한 크기를 확장 할 수 세포 클론을 일으킨다. 무한 성장 할 수없는 광범위 건강한 주위 조직을 침범하지 않는 종양은 양성이다. 성장을 계속하게 종양은 점진적으로 악성 침입이다. 용어 암은 악성 종양 특이 말한다. 제어되지 않은 성장에 더하여, 악성 종양의 전이를 나타낸다. 이 과정에서, 암성 세포의 작은 클리스터는 종양시키다 혈액이나 림프관에 침입하고, 이들이 계속 증식 다른 조직으로 운반된다. 이러한 방식으로 하나의 사이트에서 일차 종양 다른 사이트에서 이차 종양을 야기 할 수 있다.

[0302] 개시된 조성물은 종양의 성장 또는 크기를 감소 또는 전부를 제거, 억제 또는 종양 전이를 감소 및/또는 억제 또는 종양 발달 또는 성장과 관련된 증상을 감소, 치료 또는 대상체에서 종양의 성장을 억제 할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 조성물은 대상 또는 느린 종양 부담을 감소 시키거나 시간이 지남에 따라 종양의 성장을 방지한다.

[0303] 치료 될 수 있는 악성 종양은 종양 유도되는 조직의 배아 기원에 따라 본원에 분류된다. 암은 피부 또는 내부 장기와 샘의 상피 안감으로 내배엽 또는 외배엽 조직에서 발생하는 종양이다. 자주 발생하는 육종은, 뼈, 지방, 연골 등의 중배엽 결합 조직에서 파생된다. 백혈병 및 림프종이 골수의 조혈 세포의 악성 종양이다. 림프종은 종양 뉴어리로 성장하는 경향이있는 반면 백혈병은 같은 하나의 세포를 증식. 악성 종양은 암을 설정하는 다수의 장기 또는 신체의 조직에 표시 될 수 있다.

[0304] 제공된 조성물로 처리 방법을 포함하지만, 뼈, 방광, 뇌, 유방, 자궁 경부 암종 및 육종이 포함 다발성 골수종 뿐만 아니라 고형암뿐만 혈관 암에 한정되는 것은 아니다 가능 암의 종류, 결장, 직장, 식도, 신장, 간, 폐, 인두, 췌장, 전립선, 피부, 위장 및 자궁. 일부 실시예에서, 상기 기재된 조성물은 동시에 여러 종류의 암을 치료하는데 사용된다. 상기 조성물은 또한 여러 위치에서 또는 종양 전이를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0305] 투여는 기존의 종양 또는 감염성 질환의 치료에 제한되지 않고, 방지 또는 예방 용으로, 즉, 개개의 상기 질환에 걸릴 위험을 낮출 수 있다. 예방 접종을위한 후보가 암의 특정 유형의 개인 또는 가족 병력, 즉 암 발병 위험이 높은 개인을 포함한다.

[0306] 2. 감염

[0307] 상기 조성물은 예를 들어, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 진균 감염 또는 원생 동물의 감염을 감염으로부터 고통받는 대상에서 면역 반응을 자극 할 수 있다. 따라서, 일 실시예는 감염에 대한 면역 반응을 증가시키는 나노 입자 조성물의 유효량을 투여함으로써 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[0308] 치료를 포함하지만 감염에 한정되지 않는다 할 수 대표 감염을 포함한 미생물로에 의해 발생할 수 있지만, 방선균, *Anabaena*, 바실러스, 박 테로이드, *Bdellovibrio*, 보르 데 텔라, 보렐리, 캄 필로 박터, *Caulobacter*, 클라미디아, *Chlorobium*, *Chromatium*, 클로스 트리 더움, 이에 한정되는 것은 아니다 코리 네 박테 리움, *Cytophaga*, *Deinococcus*, 대장균, *Francisella*, *Halobacterium*, *Helio bacter*, 헤모필루스, 헤모필루스 인플루 엔자 B 형 (HIB), *Hyphomicrobium*, 레지오넬라, *Lept spirosis*, 리스테리아, 수막 구균 A, B와 C, *Methanobacterium*, 인 *Micrococcus*, 미코 박 테륨, 마이코 플라즈마, *Myxococcus*, 나이 세리아, *Nitrobacter*, *Oscillatoria*, *Prochloron*, 프로테우스, 슈도모나스 (*Pseudomonas*), *Phodospirillum*, 리케차, 살모넬라, 시겔라, 나선균, 스피로테타, 포도상 구균, 연쇄상 구균, 스트렙토 마이 세스 (*Streptomyces*), 또는 술, *Thermoplasma*, *Thiobacillus* 및 트레 포 네마, 비브리오, 예 르시 니아, 크립토 콕 쿠스 네오 포르 만, *Histoplasma capsulatum*, 칸디다 알비 칸스, 칸디다 *tropicalis*, 노 카르 디아의 *asteroides*, 리케차 *rickettsii*, 리케차의 *typhi*, 폐렴 미코 플라스마, 클라미디아의 *psittaci*, 클라미디아 트라코마 티스, 말라리아 원충, 트리파노소마 (*Trypanosoma*) *brucei*, *Entamoeba* 아메바, 톡소 포자충, 트리코모나스 *vaginalis*에와 주혈 흡충 *mansonii*의.

- [0309] C. 예시적인 질병 치료 전략
- [0310] 활성제의 특정 조합은 본 명세서에 개시되고하기 실시예에 예시된다.
- [0311] 1. 염증성 사이토 카인 및 TGF- β 억제제
- [0312] 하나의 예시적인 질병의 치료 전략은 전 염증성 사이토 카인 및 TGF- β 억제제를 포함하는 나노 입자 조성물을 이를 필요로하는 환자에게 투여를 포함한다. 두 제제로 또는 동일한 입자에, 또는에 또는 별도의 입자와 병용 투여에로드 할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 염증성 사이토 카인 및 TGF- β 억제제, 예를 들어 내부 또는 동일한 전달 운반체에 예컨대 PLGA 같은 나노폴리겔 또는 폴리머 나노로드된다. 염증성 사이토 카인 IL-2, IFN γ 될 수 있고, TGF- β 억제제 SB505124 로사르탄 또는 일 수있다. 특정 실시예에서, 나노폴리겔 또는 PLGA 나노 입자는 재조합 IL-2 및 로사르탄과 공동로드된다. 다른 실시예에서, 전달 운반체 같은 RGD 같은 표적 부분으로 장식된다.
- [0313]
- [0314] 염증성 사이토 카인 및/또는 TGF- β 억제제를 함유하는 나노 입자 조성물의 제조 방법은하기 실시예에서 상세하게 논의된다. 예를 들어, 0.5 mg을 5 mg을 투여 마우스에서 테스트되었다. 이러한 활성 제제를위한 바람직한 투여 량 범위는 0.01이다 / 정맥 내 또는 복장 내 주사 또는 주입 경로로 입자 나노리포겔의 100 mg / kg으로 kg (예를 들어, 매일, 또는 2, 3, 4, 5 회 이상 매주 또는 2, 3, 4, 5 배 이상보다 상세히 논의 된 바와 같이 등월); 논의 된 바와 같이, 2, 3, 4 등을 5 회 이상 한달, 또는 2, 3, 4, 5 또는 매주 회 이상, 또는 0.0001 mg 의 / 피하 일 예 경로 (의해 1 밀리그램 / kg kg 내지 아래에서 더 자세히). 이는 IL-2 및 로사르탄 로케이션 나노리포겔 5 mg을 통상적으로 약 50 ng의 IL-2 및 약 200 μ g의 로사르탄을 포함 할 것으로 판단되었다.
- [0315] 2. 염증성 사이토 카인 및 표적 부분
- [0316] 다른 예시 질환 치료 전략은 표적 부분 및 염증성 사이토킨을 포함하는 나노 입자 조성물을 이를 필요로하는 환자에게 투여를 포함한다. 상술 한 바와 같이, 표적 분자는 예를 들어, RGD 수있다. 다른 실시예에서, 표적 부분은 T 세포 수용체 (TCR) 또는 항 CD40 작용제이다. 바람직한 염증성 사이토 카인은 IL-2 IFN γ 있다.
- [0317] 특정 실시예에서, 표적 부분은 T 세포 수용체 인간 MHC의 컨텍스트 내에서의 p53 항원을 인식 (TCR)이다.
- [0318] 다른 실시예에있어서, 표적 부분은 예를 들어, 항 CD40 항체 또는 항원 결합 단편하는 CD40 작용제이다. 적합한 CD40 작용제는 당 업계에 공지되어 있으며, 상술된다.
- [0319] 따라서, 전달 운반체는 예 나노폴리겔 인간 MHC의 컨텍스트 내에서의 p53 항원을 인식하는 T 세포 수용체 (TCR)와 IL-2와 함께 로딩 장식 PLGA 나노 입자와 같은 나노 입자가 개시되어있다. 또한 이러한 나노폴리겔 또는 CD40 작용제와 IL-2와 함께 로딩 장식 PLGA 나노 입자와 같은 나노 입자로 전달 운반체를 제공한다. 나노폴리겔 IFN γ 또는 로케이션 PLGA 나노 입자와 같은 나노 입자 및 인간 MHC 또는 CD40 작용제의 컨텍스트 내에서의 p53 항원을 인식하는 T 세포 수용체 (TCR)와 장식이 또한 개시된다.
- [0320] 2, 3, 4, 5 회 이상 매주, 또는 2, 3, 4, 5 회 이상이 활성제에 대한 바람직한 투여 량은 약 10 mg의 범위이다 / 100 밀리그램 / kg (예, 매일 kg 내지 한 달 등) 아래에서 더 상세히 논의 된 바와 같이.
- [0321] 3. IL-15 / IL-15 α
- [0322] 일부 실시예에서, 나노 입자 조성물은 수지상 세포와 같은 APCs을 모방하도록 설계된다. 인터루킨 15 (IL-15) IL-2와 특정 수용체의 서브 유닛을 공유하는 사이토 카인이며, 따라서 행동의 일부 중복 메커니즘을 가지고있다. IL-15은 수상 세포에 의해 발현되고 자연 살해 (NK) 세포의 증식 및 프라이밍 중요한 신호를 제공한다. IL-15은 IL-15R α 라고 IL-2에 의해 공유되지 수용체의 서브 유닛에 밀접하게 결합한다. IL-15R α 독립적으로 다른 서브 유닛의 IL-15를 결합 할 수 있다. 이 건물은 IL-15가 다른 세포에 의해 endocytosed, 하나의 셀에 의해 생성 한 다음 세 번째 셀에 제공 할 수 있다고 믿고 있다. IL-15 / IL-15R α 의 가용성 복합체는 인공 수지상 세포처럼 행동 전달 운반체에 표시 제조 할 수있다.
- [0323] 전달 운반체의 표면에 IL-15 / IL-15R α 복합체 다가 프레젠테이션 NK 세포에 입자의 부착을 용이하게하는 것이 생각된다. 사실, 나노 입자에 IL-15 / IL-15R α 단지는 IL-15 단독 또는 가용성 IL-15 / IL-15R α 단지 (아래 예 참조)보다 더 효율적으로 NK 세포를 확장했다. 나노 입자에 IL-15 / IL-15R α 단지로 자극 할 때, 이 NK 세포는 또한 심지어는 세포 분열의 상당한 수준을 흥 보하지 않는 나노 입자의 농도에서 인터페론 γ 분비의 높은

수준을 보여준다. IL-15 / IL에 나노 입자-15R α 착물은 또한 CD8 + T 세포의 팽창을 촉진한다.

[0324] 따라서, 일부 실시예에서, 나노폴리겔 또는 PLGA 나노 입자와 같은 나노 입자는 IL-15 / IL-15R α 단자로 장식되어 있다. 나노폴리겔 또는 나노 입자는 상기 하나 이상의 추가적인 활성제와 함께로드 될 수 있다. 하나 이상의 추가 제제는 항암제 또는 면역 조절제, 예를 들면, IL-2, 로사르탄과 같은 TGF- β 억제제 수 있다. 일부 실시예에서, 나노폴리겔 또는 나노 입자는 또한 예를 들어 하나 이상의 항원 또는 보조제, 종양 항원으로 로딩된다.

[0325] 바람직한 투여 이러한 활성제가 약 1 mg의 범위이다 / 50 밀리그램 / kg, 또는 약 1 mg의 / kg을 5 mg / kg으로 kg 군; 또는 약 10 mg의 / 50 mg / kg으로 kg 군; 또는 1 내지 5 mg / kg-10-50 밀리그램 / kg (예를 들어, 매일, 또는 2, 3, 4, 5 회 이상 매주 또는 2, 3, 4, 5 회 이상 달 등과 같은 자세한 세부 사항 아래)에 대해 논의 했다.

D. 보조제 전략과 병용 요법

[0327] 일부 실시예에서, 나노 입자 조성물은 보조제로 사용되며 상 또는 개시된 나노 입자 조성물에로드되지 않은 추가적인 활성제와 함께 공동 투여된다. 보조제와 조합 치료는 입자, 또는 별도의 혼화제에서 같은 혼합 함께 추가 활성제의 투여를 포함 할 수 있다.

[0328] 바람직한 실시예에서, 하나 (예를 들면 TGF- β 억제제 및/또는 염증성 사이토 카인 등) 추가 활성제는 나노 입자 조성물을 형성하는 내부 또는 나노리포겔 또는 다른 전달 운반체에 탑재되고 하나 이상과 조합하여 환자에게 투여 무료 또는 가용성 형태 또는 별도의 투여 단위의도 부분에 추가 활성제.

[0329] 일부 실시예에서, 제약 조성물에 또는 입자들 상에로드하고 그 중 일부가 아닌 일부는 2 개, 3 개 또는 그 이상의 활성제를 포함한다.

[0330] 상이한 활성제 작용의 동일 또는 다른 메카니즘을 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 결합은 질환 또는 장애의 치료에 대한 부가 효과를 초래한다.

[0331] 면역 반응은 감염 또는 암을 치료하는데 효과적 일 수 있다.

[0332] 나노 입자 조성물 및 하나 이상의 추가 여유 또는 수용성 활성제는 치료 요법의 일부로서 환자에게 투여 할 수 있다. 치료법은 일반적으로 이러한 증가 또는 감소함에 따라 증가 또는 항원 또는 면역원에 대한 면역 시스템의 반응을 감소 등의 질환의 치료 또는 질병의 증상의 원하는 생리적 변화 또는 변화를 달성하기위한 방법을 말한다 치료 또는 방법은 포유 동물, 특히 인간 둘 이상의 충분한 양으로, 동물에게 투여하는 것을 포함하는 것을 특징으로하는 수 또는 하나 이상의 셀, 또는 반응에 관여하는 세포 유형의 활성에 화학 약품 또는 성분 화학 제 또는 부품은 동일한 조성물의 일부로서 함께 투여하거나 각각 개별적으로 투여되는 처방 효과적으로 질병을 치료 또는 질병의 증상의 상기 생리적 변화 또는 변화를 생성하도록 상기 동시에 또는 다른 시간에 (즉, 각 제제 또는 성분의 투여 제제 또는 성분의 하나 이상으로부터 일정한 시간에 의해 분리된다). 바람직하게는, 상기 하나 이상의 제제 또는 성분의 투여는 단독으로 또는 단독으로 투여 될 때 제제 또는 구성 요소의보다 큰 결과를 얻을 수 있다. 바람직하게는, 상기 활성제 중 하나 이상은 나노 입자 조성물이다.

[0333] 나노 입자 조성물 및/또는 추가 활성제 (들) 3-일, 5 일, 7 일까지, 또는 최대 10대로 한정된 기간 동안 매일 함께 또는 별도로 투여 될 수 있다 일이 25 일에서 15 일까지 20 일까지 또는까지, 모든 구체적으로 본 발명에 의해 고려된다. 일부 실시예에서, 나노 입자 조성물 및/또는 추가 활성제 (들) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 투여 , 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 일. 일부 실시예에서, 투여 빈도는 1 회, 또는 격주 회, 또는 4 주마다 한 번, 또는 두번 매주이다. 일부 실시예에서, 한번의 투여가 효과적이다. 일부 실시예에서, 둘 이상의 투여가 필요하다.

[0334] 나노 입자 조성물의 이러한 모든 투여 전 또는 추가 활성제 (들)의 투여 후 발생할 수 있다. 대안 적으로, 활성 성분 (들)의 하나 이상의 투여 량 투여 temprally 활성제 (들)의 하나 이상의 투여 량을 투여함으로써 치료의 균일 또는 불균일 과정을 형성하는 나노 입자 조성물의 투여와 엇갈리게 될 수 있으며, 추가 활성제 (들)의 하나 이상의 투여 한 후, 나노 입자 조성물의 하나 이상의 투여 하였다; 또는 그 반대로, 모든 선택 또는 연구원 또는 임상의 제제를 투여함으로써 바람직하다 어떤 일정에 따라.

[0335] 일부 실시예에서, 나노 입자 조성물은 전 또는 추가 활성제 (들)의 투여 후 적어도 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 24 또는 30 시간에 투여된다. 다른 실시예에서, 추가의 활성 성분 (들)은 전 또는 나노 입자 조성물의 투여 후 적어도 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 24 또는 30 시간에 투여된다.

- [0336] 예시적인 전략을 필요로하는 대상은 그의 전 염증성 사이토 카인 및/또는 하나 이상의 추가의 면역 반응을 자극하거나 증진제와 조합하여 TGF- β 억제제를 포함하는 나노 입자 조성물을 투여한다. 염증 유발 사이토 카인 및/또는 TGF- β 억제제 제제로 또는 동일한 입자에, 또는에 또는 별도의 입자와 병용 투여에로드 할 수 있습니다. 일부 실시하는 염증성 사이토 카인을 포함하거나, TGF- β 억제제 타방의 부재 환자에게 투여를 포함한 전용 나노리포겔 또는 입자. 바람직한 실시예에서, 염증성 사이토 카인 및 TGF- β 억제제, 예를 들어 내부 또는 동일한 전달 운반체에 예컨대 PLGA 같은 나노폴리겔 또는 폴리머 나노로드된다. 염증성 사이토 카인 IL-2, IFN γ 될 수 있고, TGF- β 억제제 SB505124 로사르탄 또는 일 수 있다. 특정 실시예에서, 나노폴리겔 또는 PLGA 나노 입자는 재조합 IL-2 및 로사르탄과 공동로드된다.
- [0337] 상기 하나 이상의 부가적인 면역 반응을 자극하거나 강화 제제는 대상에서 면역 억제 반응을 감소 제제 일 수 있다. 대표적인 제제는 예컨대, PD-1 길항제 및 CTLA4 길항제 위에서 자세히 설명하고 포함한다. 바람직한 실시예에서, PD-1 길항제 길항 항 PD1 항체이며 CTLA4 길항제 길항 항 CTLA4 항체이다.
- [0338] 바람직한 실시예에서, 하나 이상의 부가적인 면역 반응을 자극 또는 증강제는 내부 또는 나노폴리겔 또는 다른 입자 전달 운반체에로드되지 않는다. 상기 하나 이상의 부가적인 면역 반응을 자극 또는 증강제는 자유 또는 가용성 형태로 환자에게 투여 또는 다른 통상적 인 투여 형태로 될 수 있다.
- [0339] 예시적인 바람직한 실시예에서, 로사르탄 및/또는 IL-2로 또는 항 PD-1, 항 CTLA4, 또는 이들의 조합과 함께 대상에게 투여 PLGA 나노 입자로서 또는 나노리포겔 nanparticles에로드된다.
- [0340] 이론에 얹매이지 않고, 그와 같은 길항제 항 PD-1 및/또는 길항 항 CTLA4와 같은 하나 이상의 면역 반응을 자극 하는 제제는 염증로드 또는 관련 나노리포겔 또는 입자와 함께 동시 투여 될 때 이러한 IL-2 및/또는 로사르탄과 같은 TGF- β 억제제와 같은 사이토 카인 (1) 자극에 대한 면역 반응 제 (들)보다 낮은 용량으로 투여 될 수 있다; (2) 면역 반응을 자극 제 (들)는 피사체까지 감소 부작용 또는 독성을 나타낼 것; (3) 면역 반응 강화 된 효능을 나타낼 것이다 제제를 자극 및/또는 (4)로드 나노리포겔 또는 입자와 함께 제를 자극하는 면역 반응에 의해 달성되는 결과 피사체에 부가 효과보다 더 큰을 갖는 투여에 비해 로드 나노리포겔 또는 입자없이 면역 반응을 자극하는 작용제 (들); 또는 면역 반응 자극 제 (들)의 부재하에로드 나노리포겔 또는 입자 투여.
- [0341] 다른 예시적인 전략을 필요로하는 대상은 그의 전 염증성 사이토 카인 및/또는 하나 이상의 화학 요법 제와 조합하여 TGF- β 억제제를 포함하는 나노 입자 조성물을 투여한다. 염증 유발 사이토 카인 및/또는 TGF- β 억제제 제제로 또는 동일한 입자에, 또는에 또는 별도의 입자와 병용 투여에로드 할 수 있습니다. 일부 실시하는 염증성 사이토 카인을 포함하거나 기타의 부재 환자에게 투여되는 TGF- β 억제제 등 만 나노리포겔 또는 입자. 바람직한 실시예에서, 염증성 사이토 카인 및 TGF- β 억제제, 예를 들어 내부 또는 동일한 전달 운반체에 예컨대 PLGA 같은 나노폴리겔 또는 폴리머 나노로드된다. 염증성 사이토 카인 IL-2, IFN γ 될 수 있고, TGF- β 억제제 SB505124 로사르탄 또는 일 수 있다. 특정 실시예에서, 나노폴리겔 또는 PLGA 나노 입자는 재조합 IL-2 및 로사르탄과 공동로드된다.
- [0342] 바람직한 실시예에서, 하나 이상의 화학 요법 제는 내부 또는 나노폴리겔 또는 다른 입자 전달 운반체에로드되지 않는다. 하나 이상의 화학 요법 제는 자유 또는 가용성 형태로 환자에게 투여 또는 다른 통상적 인 투여 형태로 될 수 있다. 대표적인 화학 요법 제는 위의 설명합니다. 특정 실시예에서, 화학 요법 제는 독소루비신이다.
- [0343] 예시적인 바람직한 실시예에서, 로사르탄 및/또는 IL-2로 또는 독소루비신과 함께 대상에게 투여 PLGA 나노 입자로서 또는 나노리포겔 nanparticles에로드된다.
- [0344] 면역 반응을 자극하는 제제에 대해 위에서 논의 된 바와 같이, 그것은 마찬가지로 생각된다는 등 독소루비신과 같은 하나 이상의 화학 요법 제의 공동 투여 등의 IL-2 및/와 같은 염증성 사이토 카인 로케이션 또는 관련 나노리포겔 또는 입자들과 조합 될 때 또는 TGF- β 억제제 예컨대 로사르탄과 같은, (1) 화학 요법 제 (들)은 낮은 용량으로 투여 될 수 있다; (2) 화학 요법 제 (들)은 피사체 감소 된 부작용 또는 독성을 나타낼 것; (3) 화학 요법 제는 개선 된 효능을 나타내는 것, 및/또는 (4)로드 나노리포겔 또는 입자들과 조합 화학 요법 제에 의해 달성 된 결과는 (투여되는 화학 요법 제에 비해 피사체에 부가 효과보다 더 큰을 갖 로드 나노리포겔 또는 입자없이들); 또는 화학 요법 제 (들)의 부재하에로드 나노리포겔 또는 입자 투여.
- [0345] 조합 치료 및 치료 요법을 유도 증가 또는 면역 반응 (예를 들어 증가 또는 이러한 T 세포 증식 또는 활성화와 같은 T 세포 반응 유도)이 필요로하는 대상에서의 성능을 향상시킬 수 있다. 앞서 좀더 상세하게 기술 된 바와 같이 예시적인 주체는 암 또는 감염성 질병들을 포함한다. 면역 반응 (예를 들어, 증가 또는 유도 된 T 세포 반응)은 암 또는 질환의 항원 일 수 있다. 면역 반응은 감염 또는 암을 치료하는데 효과적 일 수 있다. 일부 실시예

에서, 면역 반응은 암성 질병에 감염된 세포에 있으며, 암 또는 질환의 하나 이상의 증상을 감소시킬 수 있다 (예를 들어, 종양 부담 종양 진행, 질병 진행 등).

[0346] 염증성 사이토 카인 및/또는 TGF- β 억제제를 포함한 나노 입자 조성물의 바람직한 투여량은 위에서 설명되어 있다. 여기에서 설명되는 방법, 보조제 조성물 및 방법 다른 특정 실시예에서, 나노 입자 조성물은 약 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 1 mg/kg; 또는 약 10 mg/kg 내지 100 mg/kg; 또는 0.1-1 mg/kg 내지 10-100 mg/kg의 범위로 투여된다(예, 매일; 또는 2,3,4,5 또는 일주일에 그 이상; 또는 한 달에 2, 3, 4, 5 또는 그 이상).

실시예 1

[0347] 비장으로 나노입자 수송 및 수상 세포로 제시

[0348] 재료 및 방법

[0349] 나노입자는 전술한 프로토콜에 따라 제조되었고 특징지워졌다(Look, et al., *J. Clinical Investigation*, 123(4):1741-9 (2013), Shirali, et al., *Am. J. Transplant*, 11(12):2582-92 (2011)). PLGA 입자, 형광 프로브(쿠마린 6)는 에틸 아세테이트의 PLGA로써 용해되었고, 폴리(비닐알콜)과 프로브를 사용하여 아비딘 팔미테이트로써 유화시켰다.

[0350] PLGA 입자는 후속하여 경화, 세정한 후, 동결 건조하였다. 바이오티닐레이트된 폴리(에틸렌 글리콜)은 실험에 사용하기 전에 1.33 μ g/mg입자의 비율로 PLGA 입자에 첨가되었다.

[0351] 생체 분포 연구 : 입자(동물 당 2 mg)가 제조된 후 쥐에 복강내 주사되었다. 기관들이 수확되었고, 무게 측정된 후 정량적 형광 측정을 얻기 위해 IVIS 이미징 시스템으로 이미징 하였다. 조직학적 분석을 위해, 비장은 매체를 포함한 OCT에서 스냅인 동결하고, 그리고나서 충전된 슬라이드 상에 크리오톰(cryotome)에 구분되었다. 구분된 섹션은 10 분 동안 차가운 냉 아세톤에 고정하고, 이어서 항체로 염색하였다. 조직 섹션은 니콘 TE-2000 현미경에서 이미지화 되었다.

[0352] 결과

[0353] 항원의 나노입자에 의한 APCs으로의 이동은 그 항원에 대한 세포-기반 면역 반응을 고정하는 데 첫번째 중요한 단계이다. 나노입자의 생체내 축적을 추적하기 위하여 실험이 계획되었다. PLGA로 만들어진 나노입자들은 형광 물질, 쿠마린-6로 로드되었고, 쥐에 주사되었다. 그결과는 도 1a 내지 도 1d에 나타나 있다. 도 1a는 형광물질 쿠마린-6로 로드된 나노입자로써 쥐에 정맥주사한 3시간 후, 이들 나노입자들은 많은 조직중에서 넓게 산포되었다; 그러나 6시간까지(도 1b), 형광 나노입자들은 비장에 농축되었다. 면역 세포들은 어떤 조직들, 비장에 뚜렷하게 집중되었다. 도 1c 내지 도 1d는 쿠마린-6 나노입자들이 비장(도 1c)과 림프절(도 1d), 면역성 자극에 관련된 다른 중요한 부위에서, 항원-표시 세포집단과 현저히, 수상 세포 및 대식 세포에 뚜렷이 연관되었음을 보여준다.

실시예 2

[0354] IL-2의 나노입자 촉진 항종양 효과

[0355] 재료 및 방법

[0356] 나노겔은 콜레스테롤: 포스파티딜: 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에탄올아민인산-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)-2000]의 1:2:0.1의 몰비의 지질 혼합에서 추출된 리포솜으로 만들어졌다.

[0357] 리포솜은 동결 건조된 후, 아크릴 락트산-폴리(에틸렌 글리콜)-젖산, 비 메틸화된 β -덱스트린에서 복합된 형광 프로브(로다민 B), 및 이르가큐어 2959의 혼합물로 재수화되었다. 그 입자들은, UV광 하에서 경화, 세척되고, 원심 분리 및 100 μ g/ml의 인간 IL-2(프로류킨)로 원격 로드되었다. 나노 겔은 술포-N-히드록시 숙신이미드/1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]을 사용하여 아비딘으로 작용화되었다. 크로보디이미드 하이드로클로라이드 (sNHS/EDC)를 사용하여 아비딘 작용화되었다.

[0358] 바이오티닐레이트된 T세포 수용체는 나노입자 mg당 TCR 10ug의 농도로 첨가되었다. (Look, et al., *J. Clinical Investigation*, 123(4):1741-9 (2013), Joshi, et al., *J. Control Release*, 161(1):25-37 (2012), Danhier, et al., *J. Control Release*, 161(2):505-22 (2012), Elamanchili, et al., *Vaccine*, 22(19):2406-12 (2004),

Shirali, et al., *Am. J. Transplant.*, 11(12):2582-92 (2011)).

[0359] 결과

[0360] 면역 결핍 (누드) 쥐는 p53의 항원을 발현하는 인간 A37C515N의 흑색종 세포의 105 세포로써 피하적으로 이종 이식했다. 도 2(화살표)에 표시된 시간에서, 쥐는 인간의 MHC의 맥락에서, 이 p53 항원을 인식하고 사이토카인 IL-2으로, 또는 가용성 p53-특이적 scTCR/IL-2 융합 단백질(Altior Biosciences, Miramar, FL)로 로드된, T 세포 수용체 (TCR)에 결합된 나노입자로 정맥내 주사되었다. 도 2는 키메라 단백질로 처리된 쥐의 평균 종양 체적이, PBS-처리된 대조 쥐의 종양에 비해 약 40 % 감소하였음을 보여준다. 그러나, 연구 기간의 마지막에, 나노입자에 로드된 IL-2의 양이 TCR/IL-2 키메라 단백질의 상대 IL-2의 농도에 비해 약 1,000 배 낮음에도 불구하고, 나노입자 처리된 쥐의 평균 종양 체적이 약 70 % 감소했다. 나노입자상의 IL-2 및/또는 TCR의 증가된 결합력은, 가용성 융합 단백질에 비하여 나노입자 제재의 우수한 항종양 효능을 설명할 수 있다.

실시 예 3

[0361] 나노입자상 항-AD40과 조합한 IL-2 또는 IFN 감마는 항암활성을 보여준다.

[0362] 재료 및 방법

[0363] PLGA 나노입자가 실시예 1에 설명된 바와 같이 마련되었다. IFN 감마(100 ug/ml)는 PLGA 100mg으로 로드(load)되었다. 항-CD40 바이오틴(10 ug/ml)이, 실시예 1에서 설명한 바와 같이, 아비딘(avidin)으로 표면개질된 폴리머 np의 1 mg/ml당 첨가되었다.

[0364] 결과

[0365] 활성화된 T 세포에 의해 제조되고 분비되는 IL-2는 항종양 효과를 유도하는 다른 면역-촉진제와 나노입자에 결합 될 수 있다. 그러한 약물의 하나는 CD40에 대한 길항 항체이다(Honeychurch, J., Glennie, MJ, Johnson, PW, Illidge, TM.: Anti-CD40 monoclonal antibody therapy in combination with irradiation results in a CD8 T-cell-dependent immunity to B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 102:14491457). CD40는 APCs상에 구축된 보조 자극 단백질이고 그들의 활성화에 요구된다. 그러한 활성화는 CD40이 CD40L (CD154), 활성화된 T 세포에서 주로 발현되는 단백질에 결합할 때 발생하고, 분자의 TNF 상과의 구성원이다. 길항성 항-CD40은 활성화 APCs에 CD40L의 기능을 촉진하고, 따라서 작용제 항 CD40 및 IL-2의 조합을 운반하는 나노입자는 T 헬퍼 세포의 일부 기능적 측면을 제공할 수 있다.

[0366] TNF 상과의 일부 구성원의 동량 삼량체화(homotrimerization)는 신호화 중 원자가 역할과 고 결합력 상호작용의 역할을 연관시키는 활성화 동안에 발생한다. 실제로, 원형질막에 예상되는 등 고차 올리고머는 효과적인 반응을 얻기 위해 요구 될 수 있다. (Grell, et al., *Cell*, 83: 793802 (1995), Tanaka, et al., *Nat. Med.*, 4: 3136 (1998), Schneider, et al., *J. Exp. Med.*, 187: 1205-121 (1998)).

[0367] 그리하여, 실험은 항-CD40를 표시하는 나노입자가 표적에 더 높은 결합력으로 상호 작용하는지를 결정하도록 설계되었다. 그리고 실험은 가용성 단량체의 또는 CD40의 항체 복합체로써 얻어질 수 없는 강력한 신호에 대한 생리적인 요구사항을 개괄할 수 있다.

[0368] 동물의 뒷다리의 B16F10 흑색종 세포를 동물에게 접촉하였다. 종양 성장은 감시되었고, 약 7일 후, 종양 면적이 0.5mm² 에 도달하였을 때, 동물은, (a) 항-CD40으로 표면개질되고; (b) 항-CD40으로 표면개질되고 IL-2로써 로드되며; 또는 대조군으로서, (c) 블랭크 나노입자(깨끗한 표면 그리고 비어있는) 또는 (d) 완충된 식염수 (1XPBS);의 5ug의 PLGA 나노입자로써 처리되었다. 로드되지 않은 PLGA 나노입자들은 PBS 처리와 비교하여 종양 성장에 효과가 전혀 없었다(도 3). IL-2 단독으로는 항-종양 특성을 거의 가지지 않거나 전혀 가지지 않았다. 나오입자상의 작용성 항-CD40은 실험 기간동안 이 항체의 표면 표시는 치료적 이용을 가질 수 있음을 나타내는, 중요한 항암 효과를 보여준다(도 3). 가장 강력한 반응이 작용성 항-CD40 및 IL-2를 함유한 나노입자로써 관찰되었다.

실시 예 4

[0369] 나노입자 상의 IL-15는 NK 세로를 활성화한다.

[0370] 재료 및 방법

[0371] 80KDa의 평균분자량을 가진 폴리(락티드-코-글리코라이드)(PLGA) 50/50이 Direct 사(Cupertino, CA)에서 얻었

고 나노입자 제조를 위하여 사용되었다. 나노입자는 오일-물 에멀젼 기법 또는 친수성 밀봉재용 물-오일-물의 이중 에멀젼 법을 이용하여 형성하였다. 에멀젼은 600W 초음파 프로세서(Sonics & Materials Inc, Newtown, CT) 초음파 프로브에서 10초씩 3회 초음파 처리하였고, 폴리(비닐알콜)의 0.2 % 용액에서 1.5-3 시간 동안 경화시켰다. 나노입자는 전술한 아비딘-팔미테이트 접합체로 표면개질하였다. 입자는 dH_2O 로 세척하고, 동결 건조하여-20 °C에서 보관 하였다.

[0372] 인간 IL-15: IL-15R α 헤테로다이머는 프레드릭 소재 국립암연구소 (프레드릭, MD)에서 기증받았다. IL-15은 NHS-LC-LC-비오틴과 1:10 몰비(Thermo Scientific, Rockford, IL)에서 반응시킨 후, 헤테로 과량의 미반응의 파이프 비오틴을 제거하기 위해 PBS로 48시간 동안 투석하였다. 비오틴화된 IL-15은 지시된 농도로 나노입자에 첨가하고, 실온에서 15분 동안 회전 플레이트 진탕 기에서 배양하였다.

결과

[0374] 인터루킨-15(IL-15)는 수용체 서브유닛을 IL-2과 공유하는 사이토 카인이고 일부 중복하는 작용 메카니즘을 가진다.

[0375] IL-15은 수상세포에 의해 발현되고 자연 살해 (NK) 세포의 증식 및 기폭을 위한 중요한 신호를 제공한다. IL-15은 IL-15R α 라고 불리는 IL-2에 의해 공유되지 않는 수용체의 서브유닛에 밀접하게 결합한다. IL-15R α 는 독립적으로 다른 서브 유닛의 IL-15를 결합할 수 있다. 이 속성은 IL-15가 하나의 세포에 의해 생성되고, 두번째 세포에 의해 흡수된 다음, 세 번째 세포에 표시되게 하는 것이 제안된다.

[0376] IL-15/IL-15R α 의 가용성 복합체를 제조할 수 있기 때문에, IL-15/IL-15R α 복합체의 잠재적 항암 활성을 평가할 수 있다. 그러한 IL-15/IL-15R α 의 복합체는 나노입자상에 로드될 수 있고, 어떤 관점에서 인공 수상 세포로 작용할 수 있다(도 4).

[0377] 실험은 면역 반응을 조절하기 위하여 나노입자로 장식된 IL-15/IL-15R α 복합체의 능력을 시험하도록 설계되었다. 그 결과는 나노입자의 표면에 IL-15/IL-15R α 복합체의 다가 프레젠테이션은 NK 세포에 나노입자의 부착을 용이하게 하는 것을 보여준다. 나노입자 상의 IL-15/IL-15R α 복합체는 IL-15 단독 또는 가용성 IL-15/IL-15R α 복합체보다 더 효과적으로 NK 세포를 팽창시킨다(도 5a). 나노입자에 IL-15/IL-15R α 복합체로 자극할 때, 이들 NK세포는 세포 분열의 유의 수준을 촉진하지 않는 나노입자 농도에서 인터페론- γ 의 상승된 수준을 보여 주었다 (각각 도 5c 및 도 5b). 또한 그 결과는 나노입자 상의 IL-15/IL-15R α 복합체는 CD8+T 세포의 팽창을 촉진하였다.

실 시 예 5

[0378] 나노입자상 IL-15는 항암 활성을 보여준다.

재료 및 방법

[0380] IL-15/IL-15R α 나노입자는 실시예 4에서 설명한 바와 같이 사용되었다. B16-OVA 세포(ATCC)는 DMEM (Gibco)에서 배양되었고 주사전 1X PBS (얼음으로 유지된)내 2×10^6 세포수/ML로 혼탁되었다. 피하 종양 연구를 위하여, 6-8 주된 암 쥐는 AEerrane (isofluorane; Baxter)으로 진정되었고, 오른쪽 뒷다리 측면은 $50 \mu\text{L}$ 의 세포 혼탁액을 피하 주사하기 전에 면도되었다. 종양은 감시되었고 종양의 평균 면적이 5.5 mm^2 에 도달했을 때, 처리를 시작하였다(마우스 그룹에서 종양의 크기를 정상화하기 위해 재 배열 된 8~10일 B16 주사후 8-10일; 쥐 그룹에서 종양 크기를 규정화하기 위하여 쥐는 재배치되었다). 쥐는 나노리포겔 투여를 위하여 이소플루오란으로 진정되었고, 투여는 종양내에 이루어졌다.

[0381] 각 용량은 2mg의 IL-15/IL-15R NP로 구성되었다. 관찰자는 종양 면적과 생존 연구를 위하여 눈을 가렸다. 쥐는 이산화탄소로 안락시켰다. 어느 한 종양 크기가 15mm²이상일 때, 병의 어떤 징후가 보일 때, 또는 FACS분석 연구를 위한 처리 일주일 후에 마우스가 이산화탄소로 안락사시켰다. 그룹당 5마리 쥐를 서로 다른 시점들에서 안락사시켰고 종양은 추출되었고 칭량하였다.

결과

[0383] 강력한 NK세포 반응을 촉진하기 위하여 나노입자 상의 IL-15/IL-15R α 복합체의 능력의 관점에서, 실험들이 암 모델에서의 이들 복합체의 유효성을 결정하도록 설계되었다. 본 실시예에서, IL-15/IL-15R α 복합체들은 이들 종양에 대한 면역 반응에서 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에, 전이성 B16 질병이 선택되었다. 세포가 오

브알부민 표면 항원을 싣고 있는, 파생의 흑색종 주, B16.OVA가 사용되었다. 이는 나노입자를 통한 종양 표적화의 효과를 높이기 위한 추가적인 기회를 제공한다.

[0384] 나노입자는 IL-15/IL-15R α 복합체로써 장식되고 추가적으로 내독소 없는 오브 알부민 단백질로 로딩되었다. 10^5 B16.OVA 흑색종 세포가 C57BL/6 쥐에 주사되었고 주사후 1, 2 및 7일차에 5마리 쥐의 그룹에, 인산-완충 식염수(PBS), 로드되지 않은 PLGA 나노입자, 전 복합체의 1 μ g IL-15/IL-15R α 또는 나노입자상에 캡슐화된 오브 알부민 또는 캡슐화된 오브알부민 없이 로드된 IL-15/IL-15R α 복합체의 동일한 양으로 주사되었다. PBS로 처리된 또는 로드되지 않은 나노입자로 처리된 모든 쥐들은 50일 이전에 죽었다. 용액에 또는 나노입자 상에 로드된 IL-15/IL-15R α 복합체로써 처리된 쥐들은 더 긴 시간 동안 생존하였다. 가장 효과적인 처리는 오브알부민이 부가된 IL-15/IL-15R α 복합체였고, 이는 종양에 대한 나노입자의 표적화가 IL-15/IL-15R α 복합체의 항암 효과를 개선할 수 있었음을 증명한다(도 6).

실시예 6

[0385] RGD 웨티드로써 TGF- β 억제제 SB505124를 표적화는 것은 항암 활성을 보여준다.

재료 및 방법

RGB/SB 나노입자의 합성 및 특성화

[0388] 산-말단 PLGA와 아민-말단 PEG의 접합은 다음과 같았다. 산-말단 PLGA(500MG)와 NHS 및 DCC의 10배 과잉은 10mL 무수 DCM에 용해되었다. 4시간동안 상온에서 교반한 후, 반응용액은 석출물을 제거하기 위하여 PTFE 필터를 통하여 여과되었다. NHS-활성화된 PLGA가 찬 에틸에테르안에 석출을 통하여 얻어졌다. 진공하에서 건조한 후, NHS-활성화된 PLGA는 $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 의 상당 몰비를 가진 무수 DCM에 용해되었고, 그 용액은 상온에서 교반되었다. 상기 접합체는 찬 에틸에테르에서 석출되었고 진공하에서 건조되어 90% 이상의 수득률로써 석출되었다. RGD 웨티드는 NHS 및 EDC를 사용하여 PLGA-PEG-COOH 카르복시 기로써 접합되었다. 이 블록공중합체를 사용하여, TGF- β 억제제 약물은 투석 기법을 사용하여 나노입자안으로 캡슐화되었다. 특히, 상기 약물과 폴리머는 DMSO에 용해되었고, 그 용액은 다이알리시스 멤브레인(MWCO 100,000)안으로 이동하였다. 다이알리시스는 DI 물에 대향하여 24시간 동안 행하였다. 그 후, 입자 수용액은 원심분리되고 초음파처리하여 입자를 농축하였다.

[0389] 나노입자 또는 ID의 크기는 Zetasizer(Malvern)를 사용한 동적광산란법(DLS)에 의해 결정되었다. 샘플 농도는 0.5 mg/mL에서 유지되었다. SB 캡슐의 양은 DMSO 용액에 발매 SB 990 mL의 DMSO로 SB 나노 10mL를 흡광도 측정으로부터 유도 하였다. 이어서 흡광도 300 nm에서 측정 하였다. 그 적정 농도에 따른 SB 흡광도의 미리 측정 된 보정 곡선을 사용하여 캡슐화 SB 농도를 계산 하였다. SB를 방출 프로필은 다른 프로토콜에 따라 측정 하였다. PBS-SB 나노 입자 중 하나는 중간 밀리리터 진탕 에센스 도르프 튜브를 제조 하였다. 각 시점에서, 튜브는 나노입자를 펠럿을 원심 분리시키고 상등액을 수집 하였다. 상등액을 DMSO로 100 배 희석하고, 흡광도는 300 nm에서 측정 하였다.

결과

[0391] 연구는 인테그린이 종양 세포의 표면에서 과발현되었고 종양 세포와 정상 세포를 구별 마커로 작용할 수 있음을 보여 주었다. 인테그린은 세포 외 경로를 통해 TGF- β 를 활성화한다. 잠재성 TGF- β 는 종양 세포로부터 방출 된 후, 상기 잠재성 TGF- β 의 활성화를 유도하는 종양 세포의 표면에 인테그린으로 결합한다. 결과적으로, 종양 미세 환경의 증가된 TGF- β 의 농도는 규제성 T세포를 모집함으로써 면역 억제를 지지한다(Massayo, et al., *Eur J Clin Med Oncol.*, (4):27-32 (2013). 증가된 TGF- β 분자는 SB505124(2-(5-벤조[1,3]디옥솔-5-일-2-tert-부틸-3H-이미다졸-4-일)-6-메틸파리딘 하이드로클로라이드)와 같은 TGF- β 억제제에 의해 억제될 수 있다. SB505124는 성장 인자-베타형 1 수용체 ALK4, ALK5, 및 ALK7 (DaCosta, et al., *Mol Pharmacol.* 65:744-52 (2004)), 또한 SB505124 로 알려져 있다(또, SB로 약칭된다).

[0392] 본 실시예에서, 위에서 설명한 바와 같이, SB505124는 직접 PLGA-PEG 나노입자안에 로드되었다.

[0393] RGD 웨티드는 이중 기능을 할 수 있다: 그 것은 전형적인 인테그린-표적 리간드일 뿐아니라(Ruoslahti, et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12:697-715 (1996)) APCs를 활성화하는, 면역 위험신호로서 작용한다(Altincicek, et al., *Biol Chem.*, (390)1303-11 (2009)).

[0394] 본 실시예에서, PLGA 나노입자는 SB505124 및 RGD 웨티드로 로드되었다.

[0395] 이러한 나노입자는 눈에 띄게 TGF- β 의 조절 및 그 활성화 및 여러 가지 방법으로 기능을 포함하여, 강력한 항 종양 효과를 촉진하였다(도 7); 양 제제는 또한 면역 시스템의 요소들을 조절하여, 국부 환경은 억제에서 자극적으로 변경하였다. RGD 웨티드는 면역 위험 신호로서의 역할에 의해 APCs를 활성화할 수 있고, 인테그린과의 상호작용을 통하여 RGD 웨티드는 잠재적인 TGF- β 와 인테그린 사이의 결합을 차단할 수 있다. SB505124는 TGF- β 의 활성을 억제할 수 있다. 따라서, 잠재적 TGF- β 는 최소한으로 활성화되고 Treg-매개 종양 면역 회피가 방지된다.

[0396] 도 8 및 도 9a 내지 도 9c는 B16F10 흑색종 세포상의 SB505124 및/또는 RGD의 효과를 결정하기 위한 연구를 요약한다.

[0397] 처리는 쥐에 항암세포 접종한 10일 후 개시되었다(도 8). RGD(100nM) 및/또는 SB505124(100nM)는 용액으로 또는 나노입자상에 로드되어 지연된 간격(그룹당 7마리 쥐). 한 세트의 실험에서 동물은 4주간 종양주위 주사를 주고 볼륨과 생존율이 모두 5 주에 걸쳐 추적되었다.

[0398] 도 9a 및 도 9b에 도시 된 바와 같이, 수용성 SB505124 및 RGD는 있으면 보통의 항 종양 효과가 있었다. SB505124이 나노입자에 로드되고, 쥐에 투여한 경우에도 마찬가지였다. RGD를 운반하는 나노입자는 항 종양 효과를 가지는 것으로 보이지만, 나노입자 상의 SB505124와 RGD의 조합은 훨씬 우수한 유의한 종양 억제 효과가 있었다. 나노입자 투여를 통한 증가된 효과의 적어도 일부분은 쿠마린-캡슐화된 나노입자가 RGD로써 또는 RGD없이 4마리 쥐의 그룹에 종양 주위에 주사하고 96시간동안 스캔되었을 때 도시된 바와 같이 감소된 클리어런스에 기인하였다. 형광 강도는 자유 RGD보다 적어도 4 배 더 큰 나노입자-결합된 RGD의 반감기를 나타내었다(도 9c).

실시예 7

[0399] RGD 웨티드로써 TGF- β 억제제 SB505124를 표적화하는 것은 항암 활성을 보여준다.

재료 및 방법

[0400] 재료는 위에서 설명한 바와 같다. 생체내 연구를 위해, 쥐는 고압멸균된 마이크로격리기 케이지에 수용되었다. 상기 케이지는 양압력 봉쇄 랙 내부에 배치되고, 예일 대학 기관 동물 관리 및 사용위원회에서 승인된 프로토콜에 따라 유지되었다.

[0401] 쥐는 무작위로 5-7 마리씩 실험과 대조군으로 나누었다. 전술한 바와 같이 B16F10 흑색종 세포를 배양하였다. 흑색종의 이종 이식은 쥐의 오른쪽 뒤쪽 측면에 5×10^6 B16F10 OVA 또는 B16F10 세포를 피하주사에 의해 개시되었다.

[0402] 10일 후, 각각의 쥐는 다른 약물 제형으로 처리되었다. 모든 제제는 종양에 직접 주입하였다. 다중 투여 연구를 위해, 모든 제제는 일주일에 한 번 주사 하였다. 종양 억제 활성은 종양은 다음의 방정식을 사용하여 계산된 부피에 의해 측정 하였다 : 측정 $V = (w)^2 \times (l)/2$, 여기서 (w) 및 (l)는 캘리퍼에 의해 측정된 종양의 폭과 길이 이었다.

[0403] 종양 생체 분포 연구를 위해, 쥐는 종양내 주사에 의해 쿠마린-6 캡슐화된 RGD 나노입자로 처리되었다. RGD없이 쿠마린-6 캡슐화된 나노 입자는 대조군으로 사용하였다. 분자 영상기기(Carestream molecular imaging)의 생체내 사용하여, 각 쥐는 스캔되어 주사후 다른 시점에서 종양의 쿠마린 6의 형광 강도를 측정하였다. 각 쥐에서의 쿠마린 6 강도는 각 시점에서 종양 면적을 둘러싸는 관심영역(ROI)에서 분석되었다.

결과

[0404] B16F10 흑색종 종양세포(500,000 셀)은 0일째 C57BL/6 쥐의 꼬리 정맥에 주사 하였다. 5일째에, 쥐는 용액내의 SB505124와 RGD로써 또는 나노입자상에 로드된 하나 또는 둘 제제로써 IV 주사되었다.

[0405] 열흘 후 생쥐는 희생시키고 폐는 수집하고, 종양 결절의 수는 카운트되었다. 도 10a는 나노입자-결합된 SB505124 및 RGD는 용액내의 두 제제의 투여 대 폐결절 수의 유의적인 감소를 유도하였고; 제제를 단독으로 함유한 나노입자는 중간 반응을 유발하였음을 보여준다.

[0406] 더 긴 시간에 걸쳐 흑색종 종양의 이들 제제의 효과를 결정하기 위하여, 500,000 B16f10 흑색종 세포는 0일차 꼬리 정맥을 통하여 i.v. 주사되었다. 다시 한번, 종양-보유 쥐는 용액내의 또는 나노입자에 로드된, SB505124 및 RGD로써 이 경우, 5, 12, 19 및 26일에 주사되었다. 도 10b는 나노입자-결합된 SB505124와 RGD로써 처리는

용액내 제제를 수용하는 쥐와 비교할 때 극적으로 연장된 생존 시간을 유도하는 것을 보여준다.

[0409] 나노입자-결합된 SB505124와 RGD가 전이성 종양 모델내에 강력한 억제효과를 이끌어낼 수 있는 많은 기구들이 있다. 하나의 강력한 기구는 전이과정을 포함한다. 증거 축적은 암세포, 암줄기 세포(CSCs)의 서브프랙션은 종양 형성 및 간신할 수 있는 것을 나타낸다(Clarke, et al., *Cancer Res.*, 66:9339-9344 (2006); Dalerba, et al., *Annu. Rev. Med.*, 58:267-284 (2007)). 고형 종양내의 CSCs는 일반적으로 종양 유지를 소유하는 암세포의 기능적으로 균일한 집단인 것으로 생각된다. 상피 종양에서, 이러한 CSCs는 종양의 상피 특성을 유지하지만, 이동할 수 있는 능력이 부족하기 때문에 전이를 확립할 수 있다. 단지 작은 서브세트만 이동하고 전이형성을 개시 할 잠재력을 가진다. 이 속성은 상피-중간엽 전이(EMT)을 유도하여 암 전이에 중요한 역할을 수행 할 수 있는, TGF- β 의 발현과 연관되어 있다. 따라서 대부분의 암세포에 의해 분비되는 TGF- β 는, 전이 가능성 암 세포의 형성을 분비 방식으로 유도하는 기능을 할 수 있다.

[0410] 실험은, 종양 미세 환경에서의 TGF- β 의 억제가 중간 엽 세포의 발생을 방지할 것인지를 결정하도록 설계함으로써 전이성 종양 부하 감소시킨다.

[0411] TGF- β 억제, 스크래치 분석(도 10c) 및 회전 타원체 형성 분석 (도 10d)로써 세포 이동의 잠재적 감소를 테스트 하는 것이 사용되었다. 전자의 경우에, 세포는 웨내에 도금되었고, 영역은 $t = 0$ 에서 피펫 팁으로 스크래치되었다. 24시간 후, 우리는 (1) TGF- β , (2) SB505124의 혼합물 또는 (3) SB505124로 로딩되고 표면에 RGD를 실은 PLGA 나노입자가 존재하는 스크래치된 영역에서 세포 이동을 비교하였다. 암세포 이동에서 감소가 상처 면적 비로서 도식화되었다(24시간후 세포없는 면적/0시간에서 세포없는 면적)(도 10c). 유사한 효과가 시험관내 타원체 형성 분석에서 관찰되었고, 그 분석에서 우리는 RGD와 SB505124로써 시너지적 표적화가 타원체 형성에 향상된 감소를 촉진하였음을 관찰하였다(도 10d). 이 연구에서

[0412] RGD 및 SB505124의 공동 국부화된 분비 전달이 암 세포 이동을 강력하게 억제하고, RGD로써 나노입자-기반의 표적화는 종양 미세환경의 유지를 촉진하여 TGF- β 억제제의 항-전이성 효과를 추가적으로 증가시키는 개념을 지지한다는 것을 증명하였다.

실시 예 8

[0413] RGD 웨პ티드와 조합된 TGF- β 억제제 로사르탄의 항종양 효과

[0414] 재료 및 방법

[0415] 재료는 상기 실시예 6에서 설명한 바와 같다. 여기서 로사르탄은 동일한 농도에서 SB505124 대신에 사용되었다.

[0416] 결과

[0417] RGD 웨პ티드의 효과도 로사르탄과 조합하여 시험되었다. 안지오텐신 II 수용체 길항제, 또한로서 가장 잘 알려진, 로사르탄은 TGF- β 를 하향 조절한다(Guo, et al., *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 42:403-8 (2003)). 도 11a 내지 11c는 C57BL/6 쥐가 다음의 것들에 의해 추종되는 B16F10 흑색종 세포로써 주사되었을 때, (1) 빈 나노입자, (2) 가용성 로사르탄 플러스 가용성 RGD, (3) 로사르탄으로 로드된 나노입자, 또는 (4) 로사르탄 플러스 RGD로써 로드된 나노입자, 상기 로사르탄 플러스 RGD로써 로드된 나노입자는, 종양 성장을 감소시키고 종양-보유 쥐의 생존을 연장하는 다른 처리법중 어느 것보다도 훨씬 더 효과적이다는 것을 증명하고 있다.

실시 예 9

[0418] IL-12를 캡슐화하는 나노입자는 항원-특이적 CD4+T 세포를 자극한다

[0419] 재료 및 방법

[0420] 아비딘으로 장식되고 IL-12를 캡슐화하는 PLGA 나노입자를 만드는 방법은 실시예 3과 동일하다. IL-12는 PLGD 100mg당 100ug/ml의 농도에서 사용되었다. 우리는 오브알부민 웨პ티드에 특이적인 바이오틴레이트된 웨პ티드/MHC II를 사용한다.

[0421] 결과

[0422] 보다 내구성있는 세포 독성 T 세포 반응의 전개를 촉진하는 한 가지 방법은 CD4⁺T세포의 도움을 통하는 것이다. CD4⁺T세포는 소진된 세포독성 T세포를 구제하고 생체내 그들의 기능을 완전히 회복하기 위한 것으로 이전부터 널

리 알려져 왔다(Aubert, et al., *Proc Natl Acad Sci*, 108:21182-21187 (2011)). CD4⁺T세포 도움은 수상세포 및 세포독성 T세포 양측에 대한 CD40-CD40L 상호작용의 형태로 제공되어 간접 및 직접적인 방법으로 CD8⁺ 항-종양 반응을 개시할 수 있다(Nesbeth, et al., *Journal of Immunology*, 184:5654-5662 (2010), Shafer-Weaver, et al., *Cancer Research*, 69:6256-626 (2009)). 이 CD4⁺ 이외에 T세포도 암세포 성장의 구속을 촉진하기 위하여 천연 킬러세포와 거대세포를 활성화할 수 있다(Corthay, *Immunity*, 22, 371-383 (2005)). Perez-Diez, A., *Blood*, 109:5346-5354 (2007). Braumuller, et al., *Nature*, 494:361-365 (2012)). 또, CD4⁺ T세포는 MHC-I를 하향 조절하여, 어떤 고형 종양상에 상향 조절될 수 있는 MHC-II 분자와 상호작용을 통하여 세포독성 T세포 파괴를 피할 수 있는 종양 세포를 향하여 직접 사멸시킬 수도 있다. 종양-특이적 CD4⁺ T세포의 이동은 전이성 흑색종 모델에서 치료적으로 내구성있는 반응을 생성시켰음이 알려져 왔다(Hunder, et al., *The New England journal of medicine*, 358, 2698-2703 (2008), Kahn, *Journal of Immunology*, 146:3235-3241 (1991)). 더욱 중요하게, 전달된 CD4⁺ T세포는 비-관련성 종양 항원에 대항하여 T세포 반응을 촉진하였다.

[0423] CD4⁺ T 세포의 분화에서의 구동 요소 중 하나는 사이토카인 환경이고, IL-12는 Th1 CD4+T 세포의 분화를 촉진하는 역할을 한다.

[0424] 실험은 IL-12를 캡슐화고 MHC-II 웨პ티드 복합체 또는 클론성 CD4+T 세포를 표적화하는 리간드가 순수 집단으로부터 Th1 CD4+T 세포의 분화를 촉진하는지 시험할 수 있도록 설계되었다. IL-12는 효율적으로 PLGA와 나노리포겔 나노입자 안으로 캡슐화할 수 있다. 나노입자를 캡슐화하는 IL-12로 처리된 CD4+T세포는 빈 나노입자로 배양된 세포보다 상당히 더 많은 IFN 감마를 유의적으로 분비하였다(도 12). 이들 세포에 의해 분비된 IL-4의 수준은 이들은 Th1 CD4+T 세포임을 나타내는 분석의 검출한계 이하였다. 또한, IL-12를 캡슐화 하는 나노 입자는 출발 순수 집단과 빈 나노입자로 처리된 세포에 비하여, CD44, CD25 및 CD27의 발현의 상향 조정을 촉진하였다.

[0425] MHC-II 우리의 IL-12 캡슐화된 나노입자의 표면상의, MHC-II OVA-출현 복합체의 수준은 적정되었고 후속 CD4 T 세포 반응은 빈 나노입자에 노출된 세포에 비교되었다.

[0426] 세포 추적 인도 바이올렛을 사용하여 IL-12를 캡슐화하는 나노입자로써 배양된 CD4+T-II 세포의 큰 %비율이 증식했다고 판정되었다. 또한, 이들 세포는, CD25와 CD44의 훨씬 높은 수준의 발현과 인터페론 감마의 유의적으로 더 높은 수준의 분비에 의해 나타나는 바와 같이, CD4⁺T 세포보다 더 높게 활성화되었다(도 13a). 결론적으로, CD4 표적화된 나노입자에서 IL-12의 캡슐화는 CD4+T세포의 응답성 및 활성화를 향상시킨다.

실시예 10

나노리포겔의 항종양 효과의 면역학적 기구

[0427] 항종양 효과를 나타낼 수 있는 종양-항원-특이적 T 세포 집단을 확대하는 나노입자를 사용할 능력을 시험하기 위하여, HLA-A2 맥락에서 흑색종 항원 MART-1를 함유하는 나노입자는 생성되고 인간 pBLS에서 고립된 CD8+T세포에 표시되었다(도 13a 내지 13b). 도 13a에 도시된 바와 같이, 이들 나노입자들은 배양 21일후, 약 150배의 최대 증가율로써 배양하는 28일 동안 T세포 집단을 확장하는데 매우 효과적이었다. 팽창은 가용성 IL-2 플러스 MART-1 항원에 또는 IL-2 플러스 MART 항원으로 플러스된 수상 세포에 T세포 배양을 노출함으로써 얻어질 수 있는 것보다 훨씬 더 많이 표명되었다(도 13a). 배양 14일 후부터 그리고 넘어서 MART-로드된 나노입자로 처리된 T세포의 대부분은 MART에 노출될 때 테트라머를 형성하였고(도 13b), 이는 T세포의 확장된 집단은 항원-특이적인 것을 나타낸다.

실시예 11

[0428] 로사르판/IL-2 나노리포겔은 항-PD1 및 항-CTLA4 치료의 효과를 향상시키는 보조제이다.

재료 및 방법

[0429] 생체 내 연구를 위하여, 쥐는 압력 멸균된 마이크로-고립기 케이지안에 가두었다. 쥐는 각 6-8마리의 동물의 실험군 및 대조군에 할당되었다. B16F10 흑색종 세포는 다음과 같이 배양되었다: B16F10 흑색종 세포는 10% FBS로 DMEM 매개로 배양되었다. 합류 도달후, 그 세포는 트립신-EDTA를 사용하여 분리되었고, 2×10^5 세포는 정맥주사되었다(Tail vein i.v. injection of B16F10 (200,000 cells/50 uL) (Gorelik et al., *Nat Med.*, 7(10):1118-

22 (2001)).

[0432] 꼬리정맥 주사를 통하여 정맥주사로 투여되는 5mg 나노리포겔로 구성되는 각 투여량으로써 7-10일 이후에 처리가 개시되었다. 항-CTLA4 및 항-PD1은 다음 표에 나타난 투여 스케줄로 IP 투여되었다.

[0433] ●생체내 종-전이 모델

[0434] - C57BL/6마리 쥐(그룹 1-10)

[0435] ●처리

[0436] - i.v.(그룹 10)

[0437] ●스케줄

[0438] 투여량 X(반복 회수)

[0439] ●본 실시예 및 표1, 도 14 및 그와 관련된 상세한 설명에서 "IMM1"은 IL-2 및 로사르탄으로 로드된 나노리포겔 ("NLG")를 말함. 상기 나노리포겔은 위 실시예들에서 설명된 나노리포겔과 동일한 폴리머와 지질 조성물을 가진다.

[0440] ●본 실시예, 표1, 도 14 및 상세한 설명에서 "Yervoy"는 길항 항-CTLA4 항체를 말한다.

표 1

그룹1-12에 대한 치료 식이요법

그룹	약물	N	투여량	약물 스케줄	사이클
1	IMM1	10*	5mg	7, 14, 21, 28, 35	
2	IMM1	10*	5mg	7, 10, 13, 16, 19	
3	IMM1	5	5mg	7, 10, 13, 16, 19 34, 37, 40, 43, 46	2주후 한번 또는 그 이상 반복
4	IMM1	8**	0.5mg	7, 10, 13, 16, 19	
4a	IMM1	2**	0.5mg	7, 10	
5	PD1	5*	100ug	Day 7 and 10	
6	PD1+LosNL G	5*	100ug/0.5mg	Day 7 and 10	
7	LosNLG	5*	0.5mg	Day 7 and 10	
8	PD1+IMM1	5*	100ug/0.5mg	Day 7 and 10	
9	Yervoy	5*	100ug	Day 7 and 10	
10	Yervoy+IM M1	5*	100ug/0.5mg	Day 7 and 10	
11	Yervoy+IM M1	5*	100ug/0.5mg	Day 7 and 10 for mAb and day 7 for IMM1	
12	PD1+IMM1	5*	100ug/0.5mg	Day 7 and 10 for mAb and day 7 for IMM1	

[0441]

-* 폐 메츠(mets) 수치, 간 중량을 위한 3마리 쥐 희생, TCR 시성, CBC를 위한 채혈, 종양 및 T세포를 위한 폐

조직 및 자국 고정.

[0443] -** 폐 메츠(mets) 수치, 간 중량을 위한 2마리 쥐 희생, TCR 시성, CBC를 위한 채혈, 종양 및 T세포를 위한 폐 조직 및 자국 고정.

[0444] -mAB 7일 및 10일째 IP제공

[0445] -그룹 1-4는 혈액, 종양 및 조직 분석을 위해 14일째 희생된 서브세트 이외에 생존 부분을 가진다.

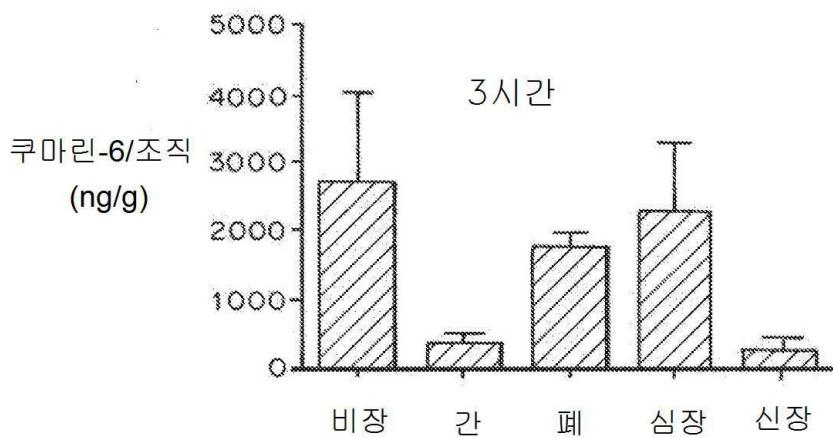
[0446] - 그룹 5-12는 혈액, 조직 및 조직 분석을 위해 14일째 희생된 모든 것.

결과

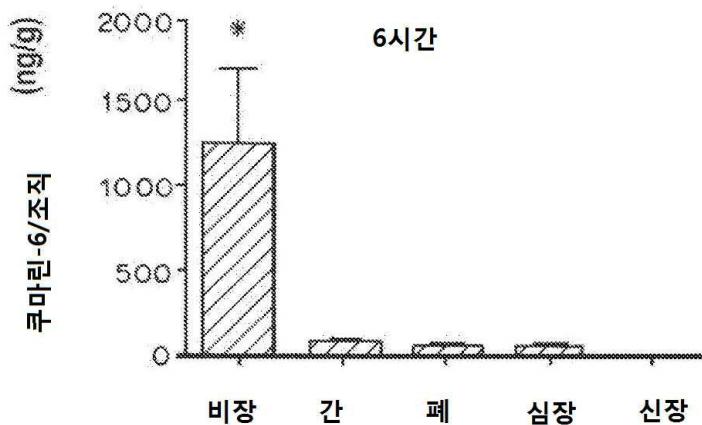
[0448] 도 14에 도시된, 실험 데이터는 중요한 2가지 점을 입증한다. (1) 주기와 투여량은 나노리포젤내 IMM1(로사르탄-IL2)의 치료적 함수에 중요할 수 있다. 예를 들면, 최고 투여량으로 3회 투여된 IMM1은 전이성 장애의 수를 동일한 주기로 10배 감소된 투여량으로 투여하는 것보다 더 크다. (2) 또 더 많은 항-PD1 및 항-CTLA4는 IMM1보다 더 많은 기능을 하고 및/또는 IMM-1은 그 항체들의 치료적 반응을 보조하거나 강화시킨다는 것을 보여준다. 예를 들면, 10배 더 낮은 투여량으로 2회 투여된 IMM1과 항-PD1 단독은 두 제제의 투여에 비하여 더 높은 폐 메트 수치를 가진다(첨가제 효과 보다 치료적 효과). 같은 것이 항-CTLA4에 적용된다.

도면

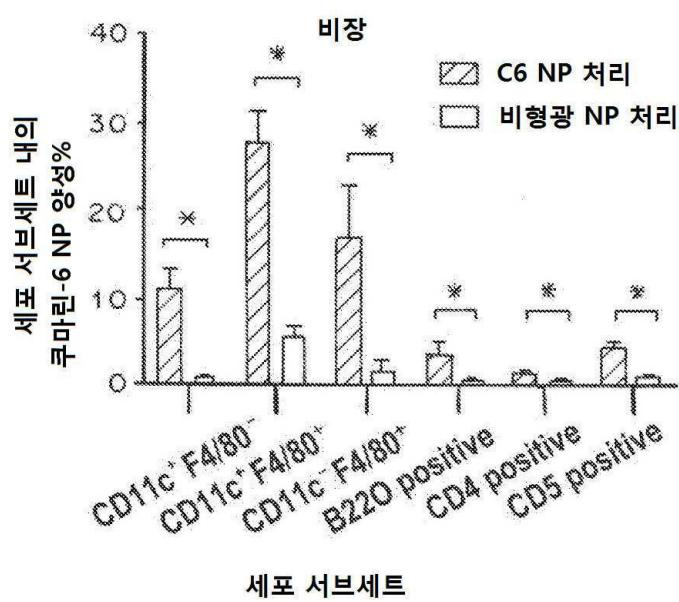
도면 1a



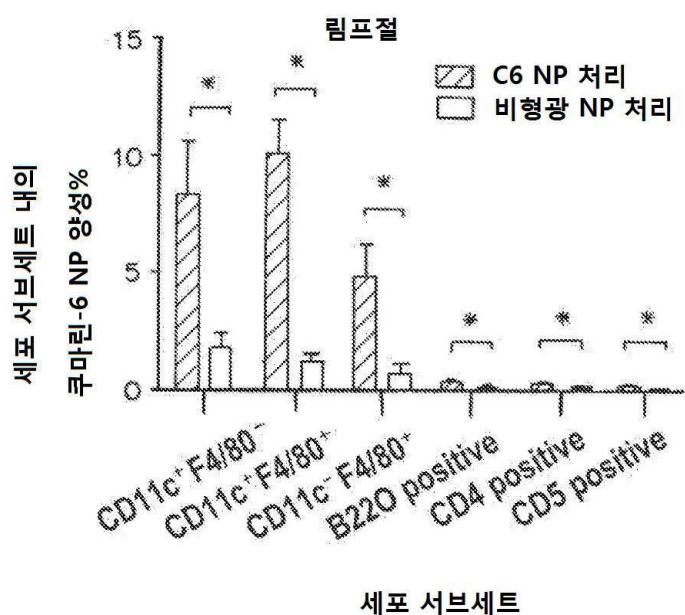
도면 1b



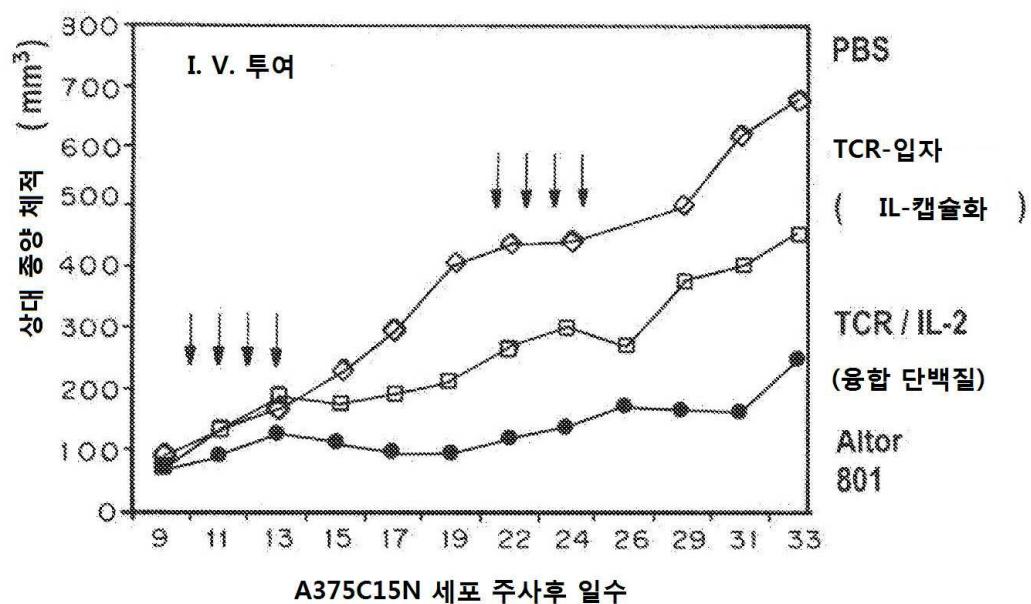
도면 1c



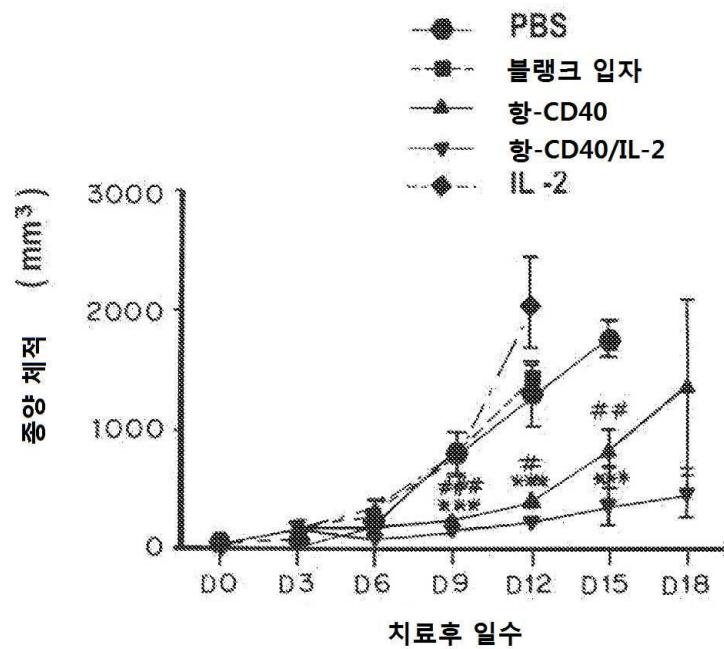
도면1d



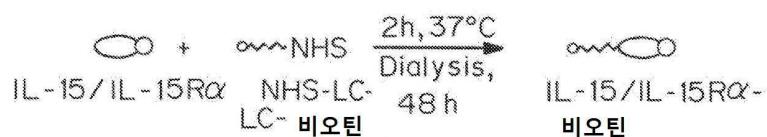
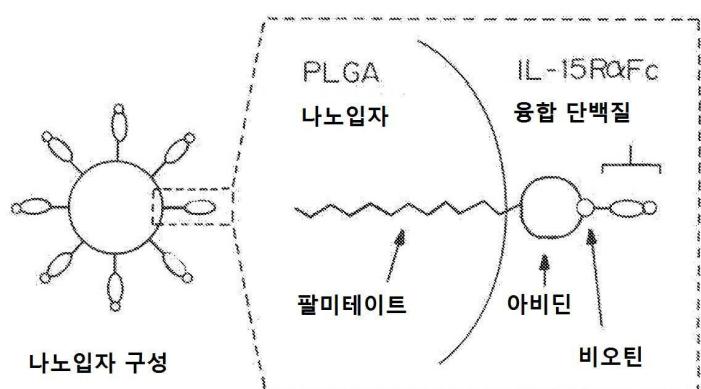
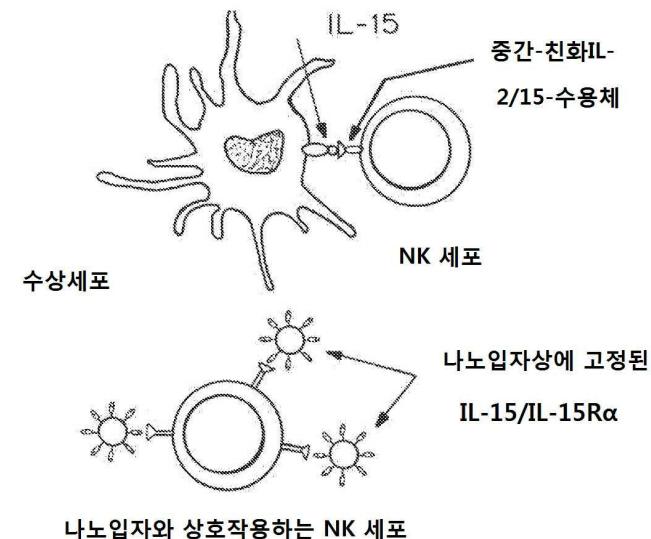
도면2



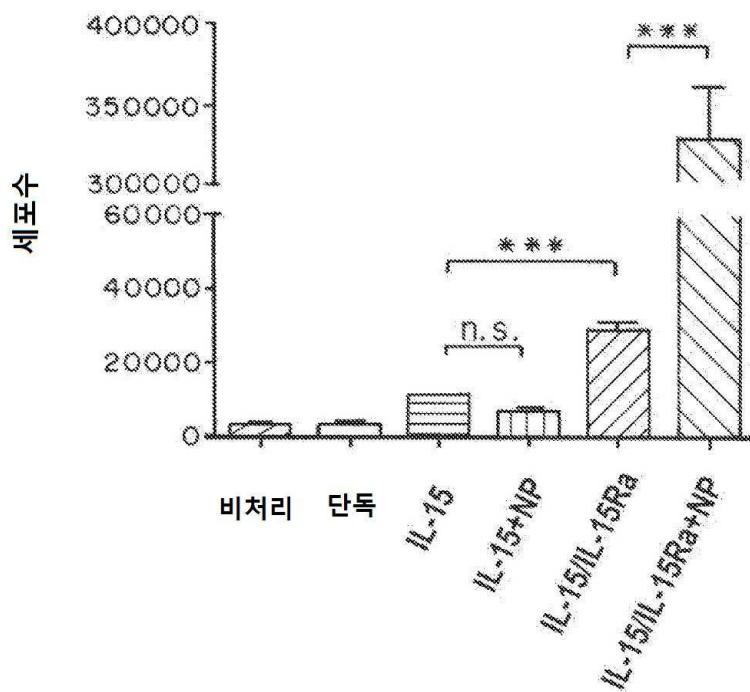
도면3



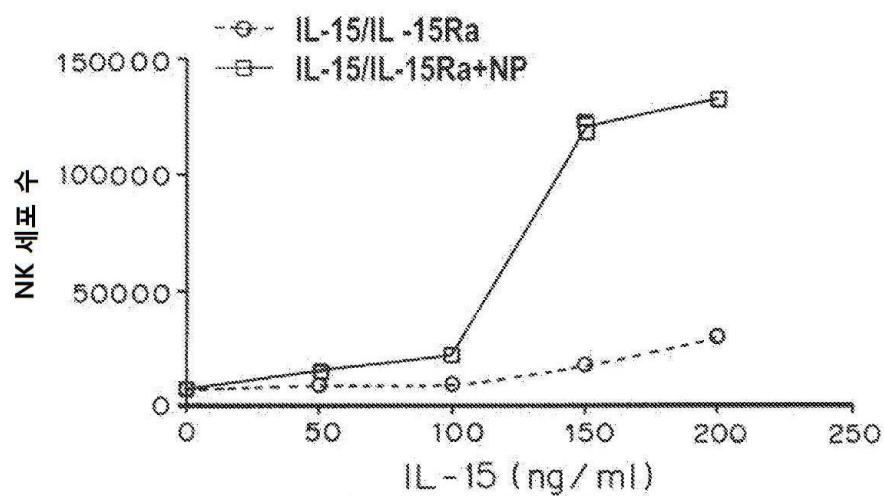
도면4



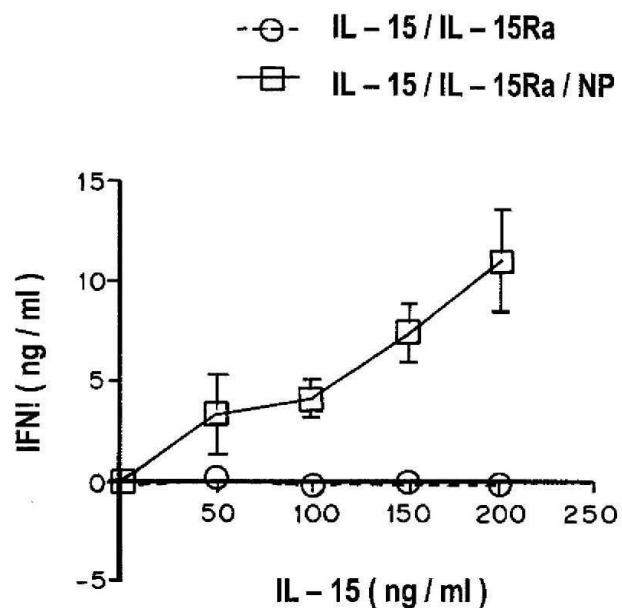
도면5a



도면5b



도면5c

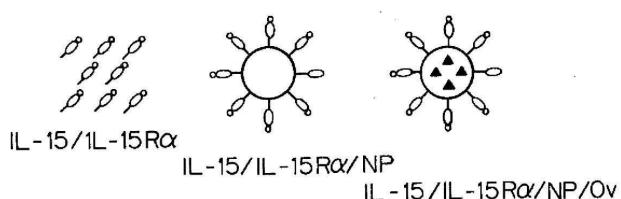


도면6

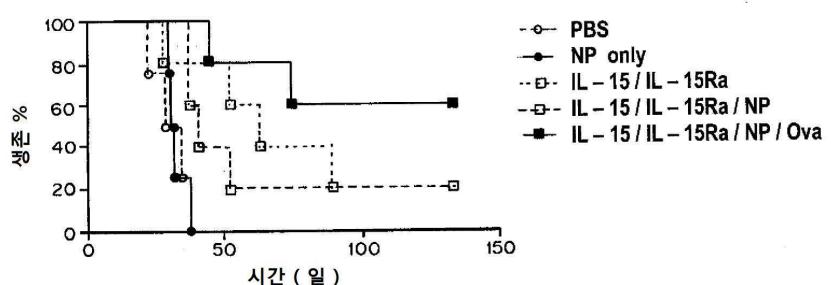
시험 군 (각 n=5) :

- PBS
- NP only
- IL-15 / IL-15Ra
- IL-15 / IL-15Ra bound to NP
- IL-15 / IL-15Ra bound to NP

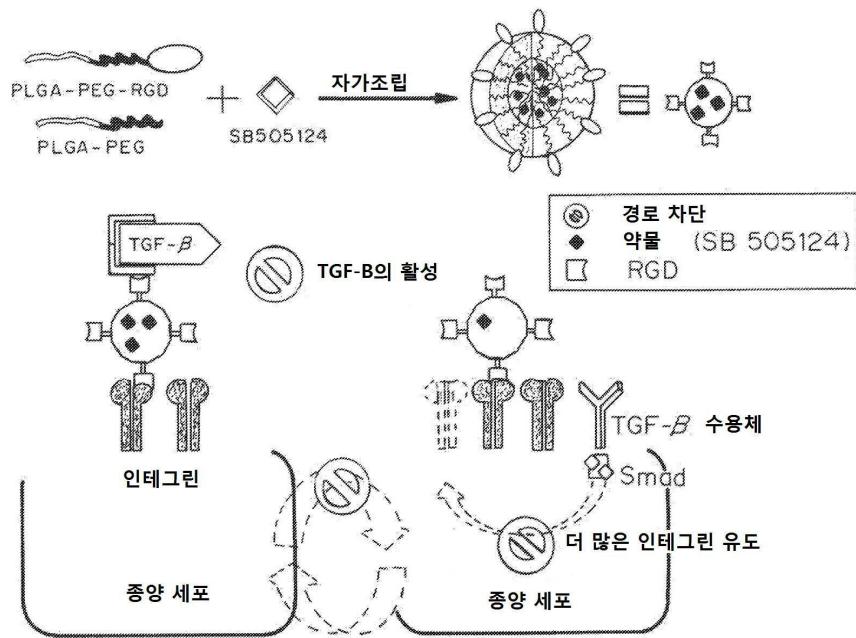
오브알부민 캡슐화



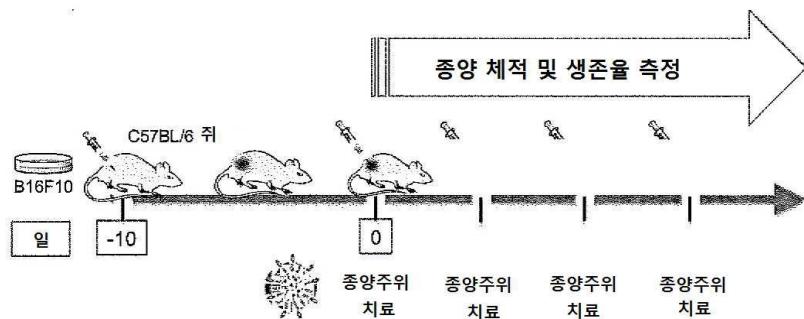
B16. 오브알부민 접종 된 쥐의 생존



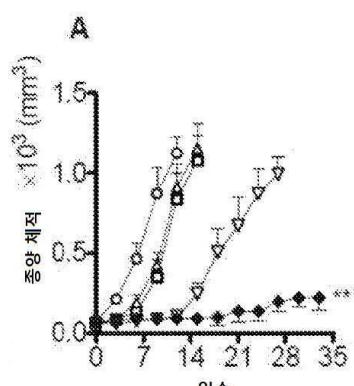
도면7



도면8

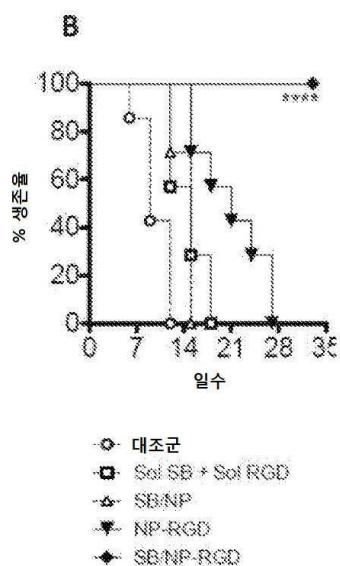


도면9a

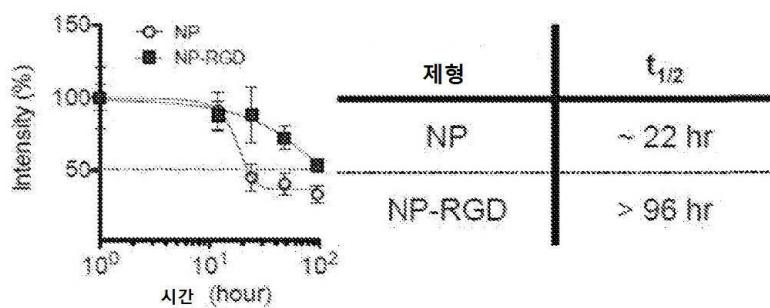


- ~○~ 대조군
- ~□~ SB505124 + Sol RGD
- ~△~ SB505124
- ~▽~ NP-RGD
- ~◆~ SB505124 + NP-RGD

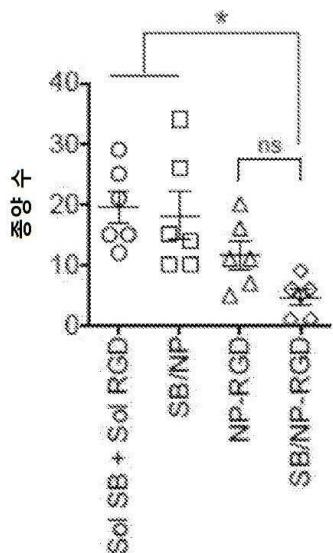
도면9b



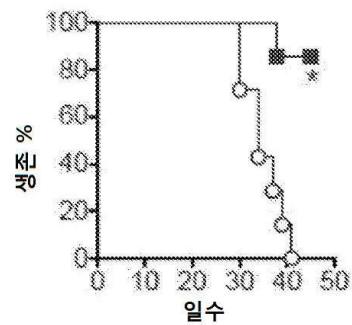
도면9c



도면10a

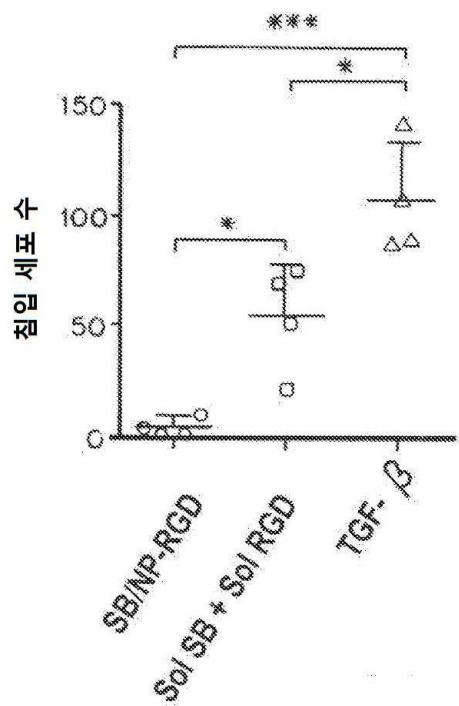


도면 10b

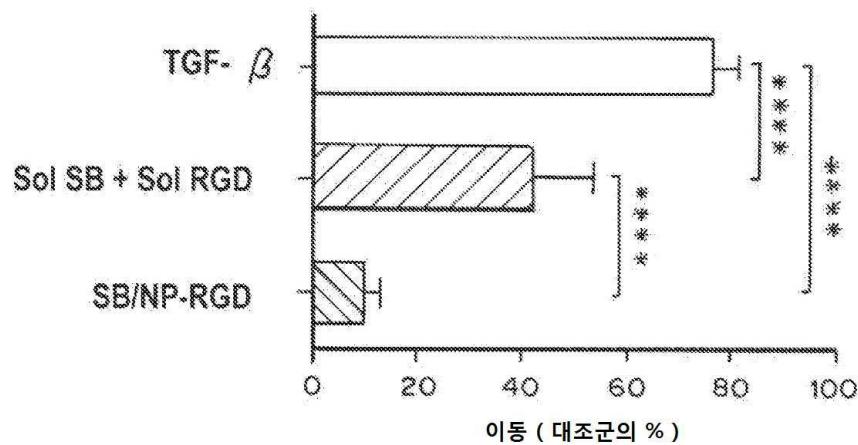


○ Sol SB+Sol RGD
■ SB/NP-RGD

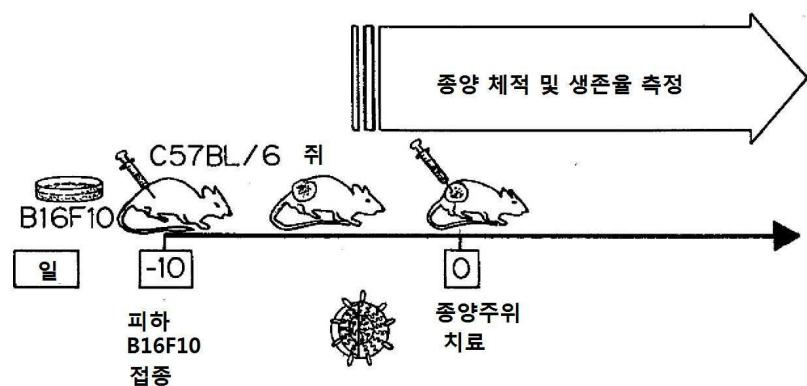
도면 10c



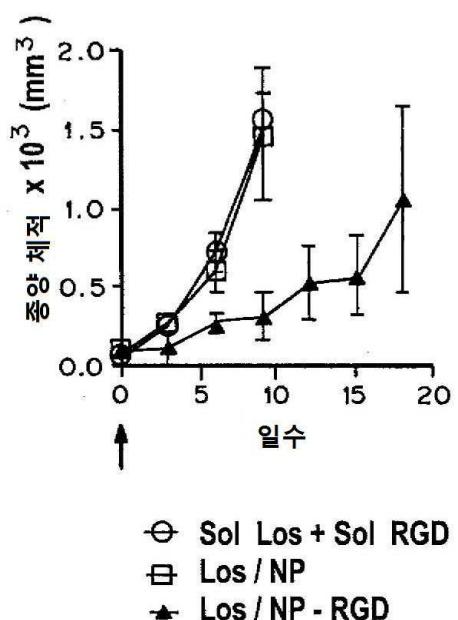
도면10d



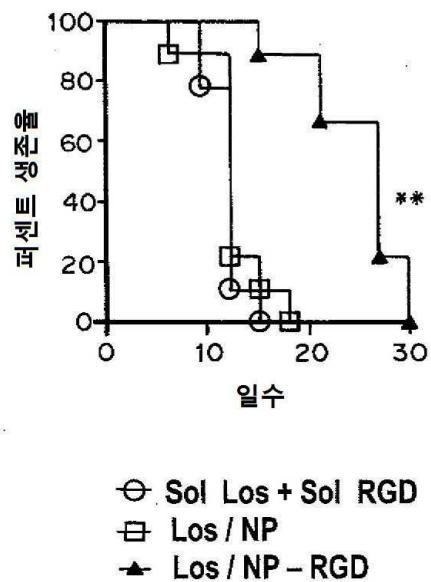
도면11a



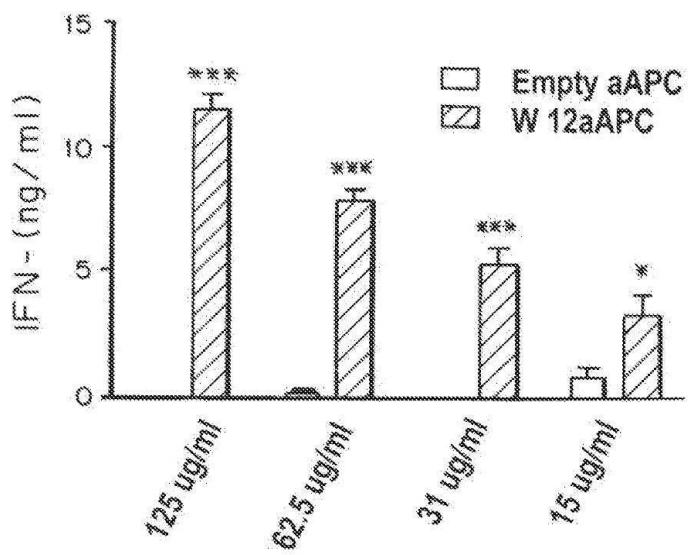
도면11b



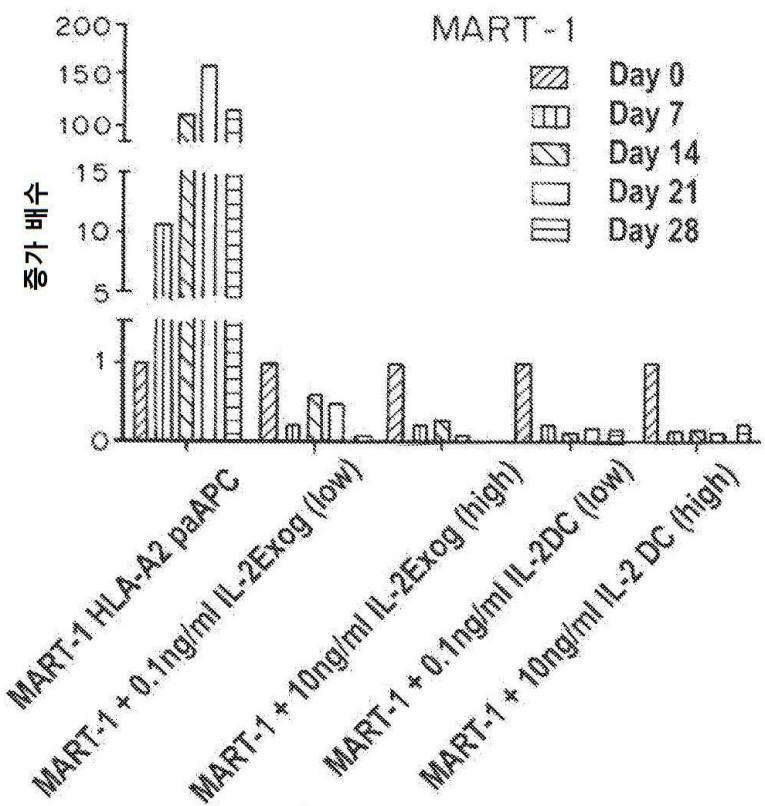
도면11c



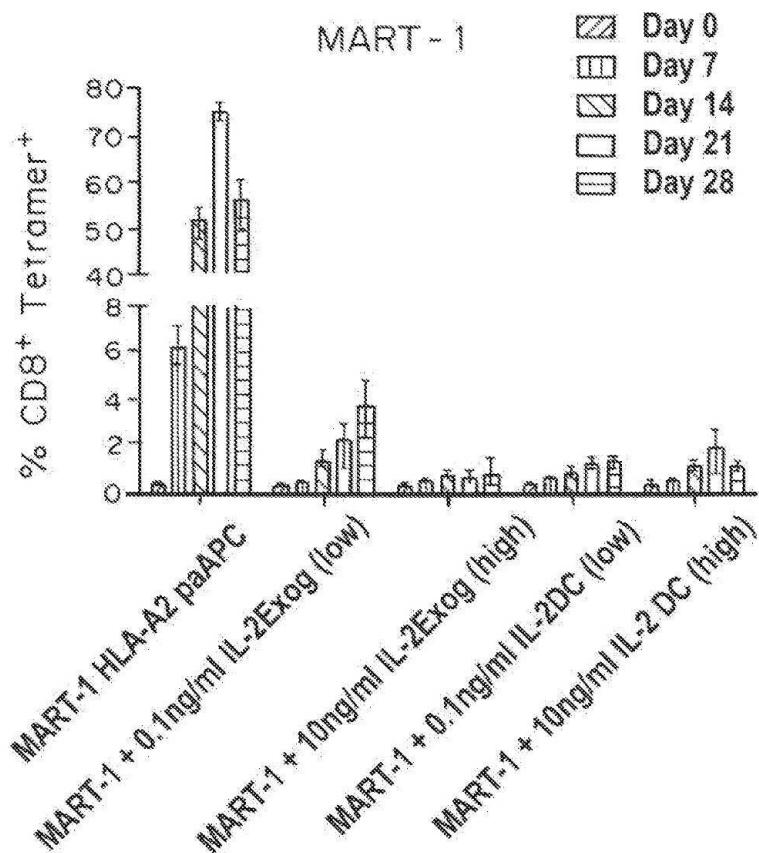
도면12



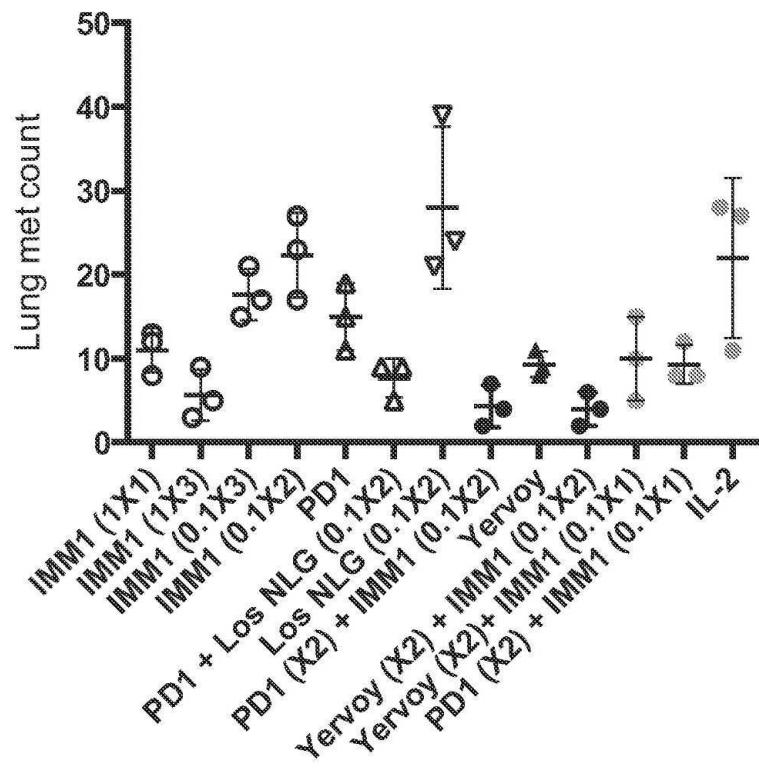
도면13a



도면13b



도면14



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Yale University

Fahmy, Tarek

<120> MODULAR PARTICLES FOR IMMUNOTHERAPY

<130> YU 5901 PCT

<150> 61/899,080

<151> 2013-11-01

<150> 62/040,242

<151> 2014-08-21

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Rhesus monkey

<400> 1

cccgccact ttccaggagga gg

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Rhesus monkey

<400> 2

gtcctgtctg caccatcctc 20

<210> 3

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr

1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His

20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala

35 40 45

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Ile Glu Asp Leu Ile

50 55 60

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His

65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln

85 90 95

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu

100 105 110

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val

115 120 125

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile

130 135 140

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

145 150 155 160

Thr Ser

<210> 4

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr

20 25 30

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser

35 40 45

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys

50 55 60

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala

65 70 75 80

Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp

85 90 95

Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val Thr Thr

100 105 110

Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu

115 120 125

Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala

130 135 140

Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr

145 150 155 160

Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser

165 170 175

Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln

180 185 190

Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr Val Ala Ile

195

200

205

Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val Ser Leu Leu

210

215

220

Ala Cys Tyr Leu Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val Glu

225

230

235

240

Met Glu Ala Met Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg

245

250

255

Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu

260

265