(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0025911
(43) 공개일자 2022년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/69 (2017.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6937 (2017.08)
A61K 31/436 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7004763(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년05월02일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-7034121
원출원일자(국제) 2014년05월02일
심사청구일자 2019년05월02일
(85) 번역문제출일자 2022년02월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/036700
(87) 국제공개번호 WO 2014/179773
국제공개일자 2014년11월06일
(30) 우선권주장
61/819,517 2013년05월03일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
셀렉타 바이오사이언시즈, 인크.
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 그로브 스트리트 65
(72) 발명자
키시모토, 다까시, 케이
미국 02420 메사추세츠주 렉싱턴 쿨리지 애비뉴 46
말도나도, 로베르토, 에이.
미국 02130 메사추세츠주 자메이카 플레인 가틀랜드 스트리트 넘버1 44
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **CD4+ 조절 T 세포를 증진시키기 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

CD4+ 조절 T 세포를 증진시키기 위한 면역억제제 및 치료 거대분자를 투여하는 방법 및 관련 조성물이 개시된다.

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

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

명 세 서

청구범위

청구항 1

합성 나노담체의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

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

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자에 특이적인 CD4+ 조절 T 세포를 증진시키기 위한 면역억제제 및 치료 거대분자의 투여에 관한 것이다. 본원에 제공된 방법 및 조성물은 관용유발 면역 반응 발생, 특히 CD4+ 조절 T 세포 생산 또는 발생으로의 이동을 가능하게 한다. 따라서, 제공된 방법 및 조성물은 치료 거대분자의 투여가 바람직하지 않은 면역 반응을 초래할 수 있는 대상체에서 관용유발 면역 반응을 생성하는데 사용될 수 있다. 방법 및 조성물은 바람직하게는 CD4+ 조절 T 세포의 증진이 유익할 대상체에 대해 사용된다.

배 경 기 술

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

[0006] [배경기술이 개시된 선행기술문헌]

[0007] 미국공개공보 US 2007-0110685 (공개일: 2007.5.17.)

[0008] 미국공개공보 US 2006-0210638 (공개일: 2006.9.21.)

발명의 내용

[0009] 한 측면에서, 면역억제제에 부착된 합성 나노담체 및 치료 거대분자를 대상체에게 투여함으로써 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자에 특이적인 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)을 증진시키는 것을 포함하며, 여기서 치료 거대분자는 투여 전에 면역억제제에 부착된 합성 나노담체와 공동-제제화되지 않는 것인 방법이 제공된다.

[0010] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제에 부착된 합성 나노담체 및 치료 거대분자는 대상체에게 병용 투여된다.

[0011] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 투여는 치료 거대분자가 투여 전에 합성 나노담체와 공동-제제화되지 않는 경우에 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)의 증진을 가져오는 것으로 이전에 입증된 프로토콜에 따른다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 방법은 프로토콜을 결정하는 것을 추가로 포함한다.

[0012] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 방법은 투여 전 및/또는 후에 대상체에서 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)을 평가하는 것을 추가로 포함한다.

[0013] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)의 증

진은 투여 전의 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율과 비교하여 적어도 2배, 3배, 4배, 5배 또는 6배의 증가이다.

[0014] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 투여는 정맥내, 복강내 또는 피하 투여에 의한 것이다.

[0015] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 방법은 투여 후에 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)의 증가를 기록하는 것을 추가로 포함한다.

[0016] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 스타틴, mTOR 억제제, TGF-β 신호전달 작용제, 코르티코스테로이드, 미토콘드리아 기능 억제제, P38 억제제, NF-κB 억제제, 아데노신 수용체 효능제, 프로스타글란딘 E2 효능제, 포스포디에스테라제 4 억제제, HDAC 억제제 또는 프로테아솜 억제제를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, mTOR 억제제는 라파마이신이다.

[0017] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 단백질 또는 치료 폴리뉴클레오티드이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 단백질은 단백질 대체 또는 단백질 보충 요법을 위한 것이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 단백질은 주입가능하거나 주사가능한 치료 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고 인자, 시토카인, 인터페론, 성장 인자, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 폼페병과 연관된 단백질을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 주입가능하거나 주사가능한 치료 단백질은 토실리주맙(Tocilizumab), 알파-1 항트립신, 헤마티드(Hematide), 알빈테르페론 알파-2b, 루신(Rhucin), 테사모렐린, 오크렐리주맙, 벨리무맙, 페글로티카제, 탈리글루세라제 알파, 아갈시다제 알파 또는 벨라글루세라제 알파를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 효소는 옥시도리덕타제, 트랜스퍼라제, 히드롤라제, 리아제, 이소머라제 또는 리가제를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 효소는 리소솜 축적 장애에 대한 효소 대체 요법을 위한 효소를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 리소솜 축적 장애에 대한 대체 요법을 위한 효소는 이미글루세라제, a-갈락토시다제 A (a-gal A), 아갈시다제 베타, 산 α-글루코시다제 (GAA), 알글루코시다제 알파, 루미자임(LUMIZYME), 미오자임(MYOZYME), 아릴술파타제 B, 라로니다제, 알두라자임(ALDURAZYME), 이두르술파제, 엘라프라제(ELAPRASE), 아릴술파타제 B, 페글로티카제, 페그시티카제 또는 나글라자임(NAGLAZYME)을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 시토카인은 림포카인, 인터류킨, 케모카인, 유형 1 시토카인 또는 유형 2 시토카인을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 혈액 또는 혈액 응고 인자는 인자 I, 인자 II, 조직 인자, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 Xa, 인자 XII, 인자 XIII, 폰 빌레브란트 인자, 프리칼리크레인, 고분자량 키니노겐, 피브로넥틴, 항트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제 (ZPI), 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA), 우로키나제, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2 (PAI2), 암 응고촉진제 또는 에포에틴 알파를 포함한다.

[0018] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 로드는 합성 나노담체에 대해 평균 0.1% 내지 50%이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 20%이다.

[0019] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 나노입자, 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀젼, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 또는 펩티드 또는 단백질 입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 나노입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 리포솜을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속성 나노입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 금속성 나노입자는 금 나노입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체성 나노입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체인 중합체를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 폴리에스테르, 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 폴리사카라이드, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 폴리에스테르는 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양

태에서, 중합체성 나노입자는 폴리에스테르 및 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 폴리에테르는 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0020] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체의 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균은 100nm 초과의 직경이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 150nm 초과이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 200nm 초과이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 250nm 초과이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 300nm 초과이다.

[0021] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체의 종횡비는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 초과이다.

[0022] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나를 제조하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 제조 방법은 치료 거대분자의 용량 또는 투여 형태를 제조하고, 면역억제제의 용량 또는 투여 형태를 제조하는 것을 포함한다. 제공된 제조 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제의 용량 또는 투여 형태를 제조하는 단계는 합성 나노담체에 면역억제제를 부착시키는 것을 포함한다. 제공된 제조 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 방법은 키트에서 면역억제제의 용량 또는 투여 형태와 치료 거대분자의 용량 또는 투여 형태를 조합하는 것을 추가로 포함한다. 본원에 제공된 제조 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 거대분자는 면역억제제와 공동-제제화되지 않는다.

[0023] 또 다른 측면에서, 대상체에서 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)을 증진시키기 위한 의약의 제조를 위한, 본원에 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 용도가 제공된다. 한 실시양태에서, 조성물 또는 키트는 면역억제제 및 치료 거대분자를 포함하며, 여기서 면역억제제 및 치료 거대분자는 공동-제제화되지 않는다. 본원에 제공된 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나가 제공된다. 한 실시양태에서, 방법은 대상체에게 면역억제제 및 치료 거대분자를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 치료 거대분자는 투여 전에 면역억제제와 공동-제제화되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다. 또 다른 실시양태에서, 투여는 병용 투여이다.

[0025] 또 다른 측면에서, CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)을 증진시키는 것으로 의도된 의약을 제조하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 의약은 면역억제제 및 치료 거대분자를 포함하며, 여기서 면역억제제 및 치료 거대분자는 공동-제제화되지 않는다. 본원에 제공된 제조 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 지시된 치료의 투여 후에 유동 세포측정법에 의해 평가된 CD4+ 및 CD25+Fox3p+ (조절 T 세포)의 백분율을 나타낸다.

도 2는 지시된 치료의 투여 후에 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)에 대한 항체 형성의 감소를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명을 상세하게 기재하기 전에, 본 발명이 특히 예시되는 물질 또는 공정 파라미터로 제한되는 것은 아니며, 그에 따라 당연히 달라질 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 본 발명의 특정한 실시양태를 기재하기 위한 것이고, 본 발명을 기재하는 대안적 용어의 사용을 제한하고자 하는 것은 아니라는 것이 이해되어야 한다.

[0028] 상기 또는 하기에 관계 없이, 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적상 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0029] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 단수 형태는 문맥상 분명하게 다르게 기술되지 않는 한, 복수 지시대상을 포함한다. 예를 들어, "중합체"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 분자의 혼합물 또는 상이한 분자량의 단일 중합체 종의 혼합물을 포함하고, "합성 나노담체"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 합성 나노담체 또는 다수의 이러한 합성 나노담체의 혼합물을 포함하고, "RNA 분자"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 RNA 분자 또

는 다수의 이러한 RNA 분자의 혼합물을 포함하고, "면역억제제"에 대한 언급은 2종 이상의 이러한 물질 또는 다수의 이러한 면역억제제 분자의 혼합물을 포함하는 등이다.

[0030] 본원에 사용된 용어 "포함하다" 또는 그의 변형, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 임의의 언급된 완전체(예를 들어 양상, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 완전체의 군 (예를 들어 양상, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한)을 포함하지만 임의의 다른 완전체 또는 완전체의 군을 배제하는 것은 아님을 나타내는 것으로 판독된다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "포함하는"은 포괄적이고, 추가의 언급되지 않은 완전체 또는 방법/공정 단계를 배제하지 않는다.

[0031] 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 실시양태에서, "포함하는"은 "본질적으로 이루어진" 또는 "이루어진"으로 대체될 수 있다. 어구 "본질적으로 이루어진"은 명시된 완전체(들) 또는 단계 뿐만 아니라 청구 발명의 특색 또는 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 필요로 하는 것으로 본원에서 사용된다. 본원에 사용된 용어 "이루어진"은 언급된 완전체 (예를 들어 양상, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 완전체의 군 (예를 들어 양상, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한)만의 존재를 나타내기 위해 사용된다.

[0032] A. 서론

[0033] 이전에 언급된 바와 같이, 현재 통상의 면역억제제는 광범위-작용성이고, 일반적으로 면역계의 전체적 전신 하향조절을 초래한다. 본원에 제공된 방법 및 조성물은 보다 표적화된 면역 효과, 및 특히 놀랍게도, CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포 생산의 증진을 가능하게 한다. 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)의 증진은 기재된 방법을 실시함으로써 또는 본원에 제공된 조성물을 투여함으로써 달성될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 이러한 방법 및 조성물은 치료 거대분자의 투여와 연관된 바람직하지 않은 면역 반응의 감소를 가져올 수 있고/거나 치료 거대분자를 사용한 치료를 필요로 하는 대상체에 대해 유익할 수 있다.

[0034] 본 발명자들은 예상외로 및 놀랍게도, 상기 언급된 문제 및 한계가 본원에 개시된 발명을 실시함으로써 극복될 수 있다는 것을 발견하였다. 본 발명은 하기 실시예에서 예시된다.

[0035] 본 발명은 지금부터 하기에서 보다 상세하게 기재될 것이다.

[0036] B. 정의

[0037] "투여하는 것" 또는 "투여" 또는 "투여하다"는 약리학상 유용한 방식으로 대상체에게 물질을 제공하는 것을 의미한다. 상기 용어는 일부 실시양태에서 "투여되도록 유발하는 것"을 포함하는 것으로 의도된다. "투여되도록 유발하는 것"은 또 다른 당사자가 직접적으로 또는 간접적으로 물질을 투여하도록 유발하는 것, 압박하는 것, 권장하는 것, 보조하는 것, 유도하는 것 또는 지시하는 것을 의미한다.

[0038] 대상체에게의 투여에 대한 조성물 또는 투여 형태의 문맥에서 "유효량"은 대상체에서 하나 이상의 목적하는 면역 반응을 생성하는, 예를 들어 관용유발 면역 반응의 생성, 예컨대 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자에 특이적인 CD4+ 조절 T 세포의 생산 또는 발생의 증진을 가져오는 조성물 또는 투여 형태의 양을 지칭한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 유효량은 하나 이상의 목적하는 면역 반응, 예컨대 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)의 증가를 가져오는 본원에 제공된 조성물의 양이다. 유효량은 시험관내 또는 생체내 목적을 위한 것일 수 있다. 생체내 목적상, 상기 양은 임상의가 치료 거대분자 투여의 결과로 바람직하지 않은 면역 반응을 경험할 수 있는 대상체를 위해 임상 이익을 가질 수 있는 것으로 생각할 양일 수 있다.

[0039] 유효량은, 일부 실시양태에서 바람직하지 않은 면역 반응을 전적으로 방지하는 것을 수반하기도 하지만, 바람직하지 않은 면역 반응의 수준을 감소시키는 것을 수반할 수 있다. 유효량은 또한 바람직하지 않은 면역 반응의 발생을 지연시키는 것을 수반할 수 있다. 유효한 양은 또한 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 생산 또는 발생의 증가를 가져오는 본원에 제공된 조성물의 양일 수 있다. 구체적으로, 생산 또는 발생의 증가는 이러한 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)의 증가일 수 있다. 유효량은 또한 목적하는 치료 종점 또는 목적하는 치료 결과를 가져오는 양일 수 있다. 유효량은, 바람직하게는, 대상체에서 항원, 예컨대 치료 거대분자에 대한 관용유발 면역 반응을 생성한다. 임의의 상기의 달성은 상용 방법에 의해 모니터링할 수 있다.

[0040] 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 유효량은 목적하는 면역 반응을 대상체에서 적어도 1주, 적어도 2주 또는 적어도 1개월 동안 지속시키는 양이다. 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 다른 실

시양태에서, 유효량은 측정가능한 목적하는 면역 반응, 예를 들어 (특이적 항원에 대한) 면역 반응의 측정가능한 감소를 적어도 1주, 적어도 2주 또는 적어도 1개월 동안 생성하는 양이다.

[0041] 유효량은, 물론, 건강 진료의의 지식 및 전문성 내에서 치료할 특정한 대상체; 상태, 질환 또는 장애의 중증도; 연령, 신체 조건, 크기 및 체중을 비롯한 개별 환자 파라미터; 치료의 지속기간; 공동 요법 (존재하는 경우)의 속성; 구체적인 투여 경로 및 유사 인자에 의존할 것이다. 이들 인자는 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 상용을 넘지 않는 실험으로 다룰 수 있다. 일반적으로, 최대 용량, 즉 타당한 의학적 판단에 따른 최고의 안전한 용량을 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 통상의 기술자는, 의학적 이유, 심리적 이유 또는 실질적으로 임의의 다른 이유로 환자가 더 낮은 용량 또는 관용가능한 용량을 고집할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0042] 일반적으로, 본 발명의 조성물 중 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 용량은 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 양을 지칭한다. 대안적으로, 용량은 면역억제제 및/또는 항원의 목적하는 양을 제공하는 합성 나노담체의 수를 기초로 하여 투여될 수 있다.

[0043] "항원-특이적"은 항원 또는 그의 부분의 존재로 인해 초래되거나, 또는 항원을 특이적으로 인식하거나 그에 결합하는 분자를 생성하는 임의의 면역 반응을 지칭한다. 예를 들어, 면역 반응이 항원-특이적 항체 생산인 경우에, 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 생산된다. 또 다른 예로서, 면역 반응은 항원-제시 세포 (APC)에 의해 제시되는 경우에 치료 거대분자 APC 제시가능 항원에 결합하는 CD4+ 조절 T 세포일 수 있는 CD4+ 조절 T 세포의 생산이다.

[0044] "면역 반응을 평가하는 것"은 시험관내 또는 생체내 면역 반응의 수준, 존재 또는 부재, 감소, 증가 등의 임의의 측정 또는 결정을 지칭한다. 이러한 측정 또는 결정은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 샘플에 대해 수행될 수 있다. 이러한 평가는 본원에 제공되거나 또는 달리 관련 기술분야에 공지되어 있는 방법 중 임의의 것으로 수행될 수 있다. 평가는 예컨대 대상체로부터의 샘플에서 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자에 특이적인 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율을 평가하는 것일 수 있다.

[0045] "부착하다" 또는 "부착된" 또는 "커플링시키다" 또는 "커플링된" (등)은 하나의 개체 (예를 들어 모이어티)를 또 다른 것과 화학적으로 회합시키는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 부착은 공유적이며, 이는 부착이 2개의 개체 사이에 공유 결합이 존재한다는 맥락에서 일어남을 의미한다. 비-공유적 실시양태에서, 비-공유적 부착은 전하 상호작용, 친화성 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 숙주-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 적층 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 및/또는 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 비-공유적 상호작용에 의해 매개된다. 실시양태에서, 캡슐화는 부착의 형태이다. 실시양태에서, 치료 거대분자 및 면역억제제는 서로 부착되지 않으며, 이는 치료 거대분자 및 면역억제제가 하나를 또 다른 것에 화학적으로 회합시키고자 특이적으로 의도되는 과정의 대상이 아님을 의미한다. 실시양태에서, 치료 거대분자 및/또는 면역억제제는 합성 나노담체에 부착되지 않으며, 이는 치료 거대분자 (및/또는 면역억제제) 및 합성 나노담체가 하나를 또 다른 것에 화학적으로 회합시키고자 특이적으로 의도되는 과정의 대상이 아님을 의미한다.

[0046] 본원에 사용된 "평균"은 달리 나타내지 않는 한 산술 평균을 지칭한다.

[0047] "공동-제제화된"은 지시된 물질이 친밀하게 물리적으로 접촉되어 있거나 또는 화학적으로 공유 또는 비-공유 부착되어 있는 충전 및 마감된 제약 투여 형태를 생성하도록 상기 물질이 처리되는 것을 의미한다. 본원에 사용된, "공동-제제화되지 않은"은 지시된 물질 (예를 들어, 치료 거대분자 및 면역억제제 (또는 면역억제제에 부착된 합성 나노담체))가 친밀하게 물리적으로 접촉되어 있거나 또는 화학적으로 부착되어 있지 않다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 치료 거대분자 및 면역억제제 (또는 면역억제제에 부착된 합성 나노담체)는 대상체에게의 투여 전에 공동-제제화되지 않는다.

[0048] 2종 이상의 물질 및/또는 작용제 (본원에서 성분으로도 지칭됨)에 적용되는 바와 같은 "조합"은, 2종 이상의 물질/작용제가 회합된 물질을 정의하는 것으로 의도된다. 성분은, 예를 들어 제1 성분, 제2 성분, 제3 성분 등으로 개별적으로 확인될 수 있다. 따라서 이러한 문맥에서 용어 "조합된" 및 "조합하는"이 해석되게 된다.

[0049] 조합에서 2종 이상의 물질/작용제의 회합은 물리적 또는 비-물리적일 수 있다. 물리적으로 회합된 조합 물질/작용제의 예는 하기를 포함한다:

[0050] • 2종 이상의 물질/작용제를 혼합물로 (예를 들어 동일한 단위 용량 내에) 포함하는 조성물 (예를 들어, 단일

제제);

[0051] • 2종 이상의 물질/작용제가 화학적/물리화학적으로 연결된 (예를 들어 가교, 분자 응집 또는 공통 비히클 모이어티에의 결합에 의함) 물질을 포함하는 조성물;

[0052] • 2종 이상의 물질/작용제가 화학적/물리화학적으로 공동-포장된 (예를 들어, 지질 소포, 입자 (예를 들어, 마이크로- 또는 나노입자) 또는 에멀젼 액적 상 또는 그 내에 배치된) 물질을 포함하는 조성물;

[0053] • 2종 이상의 물질/작용제가 공동-포장되거나 공동-제공되는 (예를 들어, 단위 용량 어레이의 일부로서) 제약 키트, 제약 팩 또는 환자 팩.

[0054] 비-물리적으로 회합된 조합 물질/작용제의 예는 하기를 포함한다:

[0055] • 2종 이상의 물질/작용제의 물리적 회합을 형성하기 위한 적어도 1종의 화합물/작용제의 즉석 회합에 대한 지침과 함께 2종 이상의 물질/작용제 중 적어도 1종을 포함하는 물질 (예를 들어, 비-단일 제제);

[0056] • 2종 이상의 물질/작용제와의 조합 요법에 대한 지침과 함께 2종 이상의 물질/작용제 중 적어도 1종을 포함하는 물질 (예를 들어, 비-단일 제제);

[0057] • 2종 이상의 물질/작용제 중 다른 것(들)이 투여된 (또는 투여되고 있는) 환자 집단에의 투여에 대한 지침과 함께 2종 이상의 물질/작용제 중 적어도 1종을 포함하는 물질;

[0058] • 2종 이상의 물질/작용제 중 적어도 1종을 2종 이상의 물질/작용제 중 다른 것(들)과의 조합 사용을 위해 특이적으로 적합화된 양 또는 형태로 포함하는 물질.

[0059] 본원에 사용된 용어 "조합 요법"은 2종 이상의 물질/작용제의 조합 사용 (상기 정의된 바와 같음)을 포함하는 요법을 정의하는 것으로 의도된다. 따라서, 본원에서 "조합 요법", "조합" 및 물질/작용제"의 조합" 사용에 대한 언급은 동일한 전체 치료 요법의 일부로서 투여되는 물질/작용제를 지칭할 수 있다. 따라서, 2종 이상의 물질/작용제의 각각의 약량학은 상이할 수 있으며: 각각은 동시에 또는 상이한 시점에 투여될 수 있다. 따라서, 조합 물질/작용제는 동일한 제약 제제로 (즉, 함께) 또는 상이한 제약 제제로 (즉, 개별적으로) 순차적으로 (예를 들어, 전 또는 후에) 또는 동시에 투여될 수 있음이 인식될 것이다. 동일한 제제로 동시는 단일 제제로서인 반면에, 상이한 제약 제제로 동시는 비-단일이다. 조합 요법에서 2종 이상의 물질/작용제의 각각의 약량학은 또한 투여 경로와 관련하여 상이할 수 있다.

[0060] "병용"은 2종 이상의 물질/작용제를 시간상 관련된, 바람직하게는 면역 반응에서 조절을 제공하도록 충분히 시간상 관련된 방식으로 대상체에게 투여하는 것을 의미하고, 보다 바람직하게는 2종 이상의 물질/작용제는 조합되어 투여된다. 실시양태에서, 병용 투여는 2종 이상의 물질/작용제의 명시된 시간 내, 바람직하게는 1개월 내, 보다 바람직하게는 1주 내, 보다 더 바람직하게는 1일 내, 더욱 바람직하게는 1시간 내 투여를 포괄할 수 있다. 실시양태에서, 물질/작용제는 실시예에서 제공된 바와 같이, 1회 초과의 병용 투여로 반복적으로 병용 투여될 수 있다.

[0061] "결정하는 것" 또는 "결정하다"는 사실 관계를 확인하는 것을 의미한다. 결정은 실험을 수행하는 것 또는 예측하는 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다수의 방식으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 면역억제제 또는 치료 거대분자의 용량은 시험 용량으로 출발하고 공지된 스케일링 기술 (예컨대 알로메트릭 또는 이소메트릭 스케일링)을 사용하여 투여를 위한 용량을 결정함으로써 결정될 수 있다. 이는 본원에 제공된 바와 같은 프로토콜을 결정하는데 또한 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 용량은 대상체에서 다양한 용량을 시험하고, 즉 경험에 기초한 직접 실험을 통하고, 데이터를 유도함으로써 결정될 수 있다. 실시양태에서, "결정하는 것" 또는 "결정하다"는 "결정되도록 유발하는 것"을 포함한다. "결정되도록 유발하는 것"은 직접적으로 또는 간접적으로, 또는 분명하게 또는 함축적으로를 포함하여, 개체와 협력하여 개체가 사실 관계를 확인하도록 유발하는 것, 압박하는 것, 권장하는 것, 보조하는 것, 유도하는 것 또는 지시하는 것 또는 작용하는 것을 의미한다.

[0062] "투여 형태"는 대상체에 투여하는데 적합한 매체, 담체, 비히클, 또는 장치 내의 약리학적 및/또는 면역학적 활성 물질을 의미한다. 본원에 제공된 조성물 또는 용량 중 어느 하나는 투여 형태로 존재할 수 있다.

[0063] "용량"은 주어진 시간 동안 대상체에게 투여하기 위한 약리학적 및/또는 면역학적 활성 물질의 특정 양을 지칭한다.

[0064] "캡슐화하다"는 물질의 적어도 한 부분을 합성 나노담체 내에 봉입하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 물질은 합성 나노담체 내에 완전히 봉입된다. 다른 실시양태에서, 캡슐화되는 물질의 대부분 또는 모두는 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출되지 않는다. 다른 실시양태에서, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% (중량/중량) 이하가 국부 환경에 노출된다. 캡슐화는, 물질의 대부분 또는 모두가 합성 나노담체의 표면 상에 놓이고 물질이 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출된 채로 있게 되는 흡수와 구별된다.

[0065] "CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율을 증진시키는 것"은 대상체 또는 대상체들로부터 샘플을 취한 다음 샘플을 적절한 시험 방법을 사용하여 검정함으로써 대상체 또는 대상체들에서 (한 유형의 세포의 총 수, 예컨대 T 세포 또는 CD4+ T 세포의 총 수에 대해) 상기 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)을 증가시키는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법을 실시함으로써 또는 본원에 기재된 조성물의 투여에 따라, CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자에 특이적인 CD4+ 조절 T 세포의 백분율이 적어도 2-, 3-, 4-, 5-, 또는 6배 이상 증가한다.

[0066] CD4+ 조절 T 세포는 CD4+CD25+Fox3p+ 세포를 특징으로 할 수 있다. CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율은 본원에 기재되거나 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 대상체의 말초 혈액 중 CD4+ 조절 T 세포는, 대상체로부터 말초 혈액의 샘플을 수득하고, CD25, Foxp3, CCR4, CCR8, CCR5, CTLA4, CD134, CD39 및/또는 GITR을 비제한적으로 포함하는, CD4+ 조절 T 세포와 연관된 하나 이상의 분자의 유전자 발현, 단백질 존재 및/또는 국재화를 평가함으로써 정량화될 수 있다. 임의의 상기 언급된 분자는 전사 분석, 예컨대 정량적 RT-PCR, 노던 블롯팅, 마이크로어레이, 형광 계내 혼성화 또는 RNAseq에 의해 평가될 수 있고; 단백질은 웨스턴 블롯팅, 면역형광 현미경검사, 유동 세포측정법 또는 ELISA에 의해 검출될 수 있다. 세포 표면 분자, 예컨대 CD25, CCR4, CCR8, CCR5, CTLA4, CD134, CD39 및/또는 GITR은 방법, 예컨대 유동 세포측정법, 세포 표면 염색, 면역형광 현미경검사, ELISA 등에 의해 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, CD4+ 조절 T 세포는 무력화 표현형 (예를 들어, TCR 자극 후 증식의 결핍)을 기반으로 하여 검출된다. 일부 실시양태에서, CD4+ 조절 T 세포는 활성화-유도된 세포 사멸에 대한 내성 또는 시토카인 박탈에 의해 유도된 사멸에 대한 감수성을 기반으로 하여 확인된다. 일부 실시양태에서, CD4+ 조절 T 세포는 Foxp3을 코딩하는 유전자의 메틸화 상태를 기반으로 하여 확인될 수 있으며; 예를 들어, CD4+ 조절 T 세포에서, Foxp3 유전자의 일부분은 탈메틸화된 것으로 발견될 수 있고, 이는 DNA 메틸화 분석, 예컨대 PCR 또는 다른 DNA 기반 방법에 의해 검출될 수 있다. CD4+ 조절 T 세포는 IL-9, IL-10 또는 TGF-β를 포함하는 면역억제 시토카인의 생산을 기반으로 하여 추가로 확인 또는 정량화될 수 있다. 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 치료 거대분자로부터 유래된 항원이 로딩된 항원-제시 세포를 사용하여 상기 세포를 생체외 자극시키고 CD4+ 조절 T 세포의 활성화를 평가하거나 CD4+ 조절 T 세포의 T 세포 수용체를 평가함으로써 확인 및 정량화될 수 있다. 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)은 치료 거대분자 또는 그의 항원 부분의 투여 후에 활성화된 CD4+ 조절 T 세포의 하나 이상의 기능 또는 활성을 평가함으로써 간접적으로 정량화될 수 있다.

[0067] "생성하는 것"은 작용, 예컨대 면역 반응 (예를 들어, 관용유발 면역 반응)이 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 일어나도록 유발하는 것을 의미한다.

[0068] "대상체를 확인하는 것"은 임상의가 대상체를 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트로부터 이익을 얻을 수 있는 자로서 인식하도록 하는 임의의 작용 또는 일련의 작용이다. 바람직하게는, 확인된 대상체는 본원에 제공된 바와 같은 관용유발 면역 반응을 필요로 하는 자, 예컨대 증진된 CD4+ 조절 T 세포 생산 또는 발생, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포 생산 또는 발생을 필요로 하는 대상체이다. 작용 또는 일련의 작용은 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 본원에 제공된 바와 같은 방법, 조성물 또는 키트를 필요로 하는 대상체를 확인하는 것을 추가로 포함한다.

[0069] "면역억제제"는 APC가 면역억제 효과 (예를 들어, 관용유발 효과)를 갖도록, 또는 T 또는 B 세포가 억제되도록 유발하는 화합물을 의미한다. 면역억제 효과는 일반적으로 바람직하지 않은 면역 반응을 감소, 억제 또는 방지하거나 또는 목적하는 면역 반응, 예컨대 조절 면역 반응 (예를 들어, CD4+ 조절 T 세포의 생산 또는 발생)을 촉진하는 APC에 의한 시토카인 또는 다른 인자의 생산 또는 발현을 지칭한다. APC가 이러한 APC에 의해 제시된 항원을 인식하는 면역 세포에 대해 (면역억제 효과 하에) 면역억제 기능을 획득한 경우에, 면역억제 효과는 제시된 항원에 대해 특이적인 것으로 언급된다. 어떠한 특정한 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 면역억제 효과는 면역억제제가 APC에게, 바람직하게는 항원의 존재 하에 전달된 결과인 것으로 여겨진다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 APC가 하나 이상의 면역 이펙터 세포에서 조절 표현형의 촉진을 유발하는 것이다. 예를 들어, 조절

표현형은 항원-특이적 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 생산, 유도, 자극 또는 동원의 억제, 항원-특이적 항체의 생산의 억제, Treg 세포 (예를 들어, CD4+CD25highFoxP3+ Treg 세포)의 생산, 유도, 자극 또는 동원 등을 특징으로 할 수 있다. 이는 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 조절 표현형으로의 전환의 결과일 수 있다. 이는 또한 다른 면역 세포, 예컨대 CD8+ T 세포, 대식세포 및 iNKT 세포에서의 FoxP3의 유도의 결과일 수 있다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 항원을 프로세싱한 후 APC의 반응에 영향을 미치는 것이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 항원의 프로세싱을 방해하는 것이 아니다. 추가 실시양태에서, 면역억제제는 아폽토시스-신호전달 분자가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 인지질이 아니다.

[0070] 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 트리코스타틴 A; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF-κβ 억제제, 예컨대 6Bio, 텍사메타손, TCPA-1, IKK VII; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제 (PGE2), 예컨대 미소프로스톨; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제 (PDE4), 예컨대 롤리프람; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제; PI3KB 억제제, 예컨대 TGX-221; 자가포식 억제제, 예컨대 3-메틸아데닌; 아릴 탄화수소 수용체 억제제; 프로테아솜 억제제 I (PSI); 및 산화 ATP, 예컨대 P2X 수용체 차단제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한 IDO, 비타민 D3, 시클로스포린, 예컨대 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오퓨린 (Aza), 6-메르캅토퓨린 (6-MP), 6-티오구아닌 (6-TG), FK506, 상글리페린 A, 살메테롤, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF), 아스피린 및 다른 COX 억제제, 니플룸산, 에스트리올 및 트리프톨리드를 포함한다. 실시양태에서, 면역억제제는 본원에 제공된 임의의 작용제를 포함할 수 있다.

[0071] 면역억제제는 APC에 대해 면역억제 효과를 직접적으로 제공하는 화합물일 수 있거나, 또는 면역억제 효과를 간접적으로 (즉, 투여 후 일부 방식으로 프로세싱된 후에) 제공하는 화합물일 수 있다. 따라서 면역억제제는 본원에 제공된 임의의 화합물의 전구약물 형태를 포함한다.

[0072] 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 실시양태에서, 본원에 제공된 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다. 바람직한 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체의 구조를 구성하는 물질에 부가된 요소이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 중합체로 구성된 경우에, 면역억제제는 하나 이상의 중합체에 부가되고 부착된 화합물이다. 또 다른 예로서, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 지질로 구성된 경우에, 면역억제제는 또한 하나 이상의 지질에 부가되고 부착된다. 실시양태에서, 예컨대 합성 나노담체 물질이 또한 면역억제 효과를 생성하는 경우에, 면역억제제는 면역억제 효과를 생성하는 합성 나노담체 물질에 부가되어 존재하는 요소이다.

[0073] 다른 예시적인 면역억제제는 소분자 약물, 천연 산물, 항체 (예를 들어, CD20, CD3, CD4에 대한 항체), 생물제제-기반 약물, 탄수화물-기반 약물, 나노입자, 리포솜, RNAi, 안티센스 핵산, 압타머, 메토트렉세이트, NSAID; 핑골리모드; 나탈리주맙; 알렘투주맙; 항-CD3; 타크롤리무스 (FK506) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 추가의 면역억제제가 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명은 이러한 측면으로 제한되지 않는다.

[0074] 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 실시양태에서, 면역억제제는 나노결정질 형태와 같은 형태 내에 존재하고 그에 의해 면역억제제 그 자체의 형태는 입자이거나 입자-유사이다. 실시양태에서, 이러한 형태는 바이러스 또는 다른 외래 병원체를 모방한다. 많은 약물이 나노화되어 있고, 이러한 약물 형태를 생산하는 적절한 방법이 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다. 약물 나노결정, 예컨대 나노결정질 라파마이신은 통상의 기술자에게 공지되어 있다 (Katteboinaa, et al. 2009, International Journal of PharmTech Resesarch; Vol. 1, No. 3; pp682-694). 본원에 사용된 "약물 나노결정"은 담체 또는 매트릭스 물질을 포함하지 않는 약물 (예를 들어, 면역억제제)의 형태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 약물 나노결정은 90%, 95%, 98%, 또는 99% 또는 그 초과의 약물을 포함한다. 약물 나노결정을 생산하는 방법은, 제한 없이, 밀링, 고압 균질화, 침전, 분무 건조, 초임계 용액의 급속 팽창 (RESS), 나노에지(Nanoedge)® 기술 (백스터 헬스케어(Baxter Healthcare)) 및 나노크리스탈 테크놀로지(Nanocrystal Technology)™ (엘란 코포레이션(Elan Corporation))을 포함한다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 또는 안정화제는 약물 나노결정의 입체적 또는 정전기적 안정성을 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서 면역억제제의 나노결정 또는 나노결정질 형태는 면역억제제, 특히 불용성 또는 불안정성인 면역억제제의 용해도, 안정성 및/또는 생체이용률을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노결정질 형태의 면역억제제와 치료 거대분자의 병용 투여는 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대

치료 거대분자에 특이적인 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)의 증진을 가져온다.

[0075] "로드"는, 합성 나노담체에 부착된 경우에, 전체 합성 나노담체 내의 물질의 총 건조 레시피 중량을 기준으로 한 합성 나노담체에 부착된 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 양 (중량/중량)이다. 일반적으로, 이러한 로드는 합성 나노담체 집단에 대한 평균으로 계산된다. 한 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체에 대해 평균 0.1% 내지 99%이다. 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 50%이다. 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 20%이다. 추가 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 10%이다. 추가 실시양태에서, 로드는 1% 내지 10%이다. 추가 실시양태에서, 로드는 7% 내지 20%이다. 또 다른 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체 집단에 대해 평균 적어도 0.1%, 적어도 0.2%, 적어도 0.3%, 적어도 0.4%, 적어도 0.5%, 적어도 0.6%, 적어도 0.7%, 적어도 0.8%, 적어도 0.9%, 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 11%, 적어도 12%, 적어도 13%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%이다. 추가 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체 집단에 대해 평균 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20%이다. 상기 실시양태의 일부 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체 집단에 대해 평균 25% 이하이다. 실시양태에서, 로드는 실시예에 기재될 수 있는 바와 같이 또는 관련 기술분야에 달리 공지되어 있는 바와 같이 계산된다.

[0076] 일부 실시양태에서, 면역억제제의 형태가 그 자체로 입자 또는 입자-유사, 예컨대 나노결정질 면역억제제인 경우에, 면역억제제의 로드는 입자 등으로의 면역억제제의 양 (중량/중량)이다. 이러한 실시양태에서, 로드는 97%, 98%, 99% 또는 그 초과에 접근할 수 있다.

[0077] "합성 나노담체의 최대 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 나노담체의 가장 큰 치수를 의미한다. "합성 나노담체의 최소 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 합성 나노담체의 가장 작은 치수를 의미한다. 예를 들어, 구형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수는 실질적으로 동일할 것이고, 그의 직경의 크기일 것이다. 유사하게, 입방형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최소 치수는 그의 높이, 가로 또는 세로 중 가장 작은 것일 것이고, 합성 나노담체의 최대 치수는 그의 높이, 가로 또는 세로 중 가장 큰 것일 것이다. 한 실시양태에서, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상이다. 한 실시양태에서, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 5 μm 이하이다. 바람직하게는, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 110 nm 초과, 보다 바람직하게는 120 nm 초과, 보다 바람직하게는 130 nm 초과, 보다 더 바람직하게는 150 nm 초과이다. 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수의 종횡비는 실시양태에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 최대 대 최소 치수의 종횡비는 1:1 내지 1,000,000:1, 바람직하게는 1:1 내지 100,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 10,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1000:1, 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 100:1, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 10:1로 달라질 수 있다. 바람직하게는, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 3 μm 이하, 보다 바람직하게는 2 μm 이하, 보다 바람직하게는 1 μm 이하, 보다 바람직하게는 800 nm 이하, 보다 바람직하게는 600 nm 이하, 보다 더 바람직하게는 500 nm 이하이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상, 보다 바람직하게는 120 nm 이상, 보다 바람직하게는 130 nm 이상, 보다 바람직하게는 140 nm 이상, 보다 더 바람직하게는 150 nm 이상이다. 합성 나노담체 치수 (예를 들어, 유효 직경)의 측정치는, 일부 실시양태에서 합성 나노담체를 액체 (통상적으로 수성) 매질에 현탁시키고 동적 광 산란 (DLS)을 사용함으로써 (예를 들어, 브룩하벤 제타팔스 (Brookhaven ZetaPALS) 기기를 사용함) 수득할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 현탁액은 수성 완충제로부터 정제수로 희석되어 대략 0.01 내지 0.1 mg/mL의 최종 합성 나노담체 현탁액 농도가 달성될 수 있다. 희석된 현탁액은 내부에서 직접 제조될 수 있거나, 또는 DLS 분석에 적합한 큐벳으로 옮겨질 수 있다. 이어서 큐벳을 DLS 내에 놓고, 제어 온도와 평형이 되도록 한 다음, 충분한 시간 동안 스캐닝하여, 매질의 점도 및 샘플의 굴절률에 대한 적절한 입력을 기반으로 하여 안정하고 재생가능한 분포를 획득할 수 있다. 이어서 유효 직경 또는 분포의 평균을 보고한다. 높은 종횡비 또는 비-구형 합성 나노담체의 유효 크기를 결정하는 것은 보다 정확한 측정치를 수득하기 위해 확대 기술, 예컨대 전자 현미경검사를 필요로 할 수 있다. 합성 나노담체의 "치

수" 또는 "크기" 또는 "직경"은 예를 들어 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균을 의미한다.

[0078] "비-메톡시-종결 중합체"는 메톡시 이외의 모이어티로 종결된 적어도 하나의 말단을 갖는 중합체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 메톡시 이외의 모이어티로 종결된 적어도 2개의 말단을 갖는다. 다른 실시양태에서, 중합체는 메톡시로 종결된 어떠한 말단도 갖지 않는다. "비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체"는 양쪽 말단에서 메톡시를 갖는 선형 플루로닉 중합체 이외의 중합체를 의미한다. 본원에 제공된 바와 같은 중합체성 나노입자는 비-메톡시-종결 중합체 또는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체를 포함할 수 있다.

[0079] "제약상 허용되는 부형제" 또는 "제약상 허용되는 담체"는 조성물을 제제화하기 위해 약리학적 활성 물질과 함께 사용되는 약리학적 불활성 물질을 의미한다. 제약상 허용되는 부형제는 사카라이드 (예컨대 글루코스, 락토스 등), 보존제, 예컨대 항미생물제, 재구성 보조제, 착색제, 염수 (예컨대 포스페이트 완충 염수) 및 완충제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지되어 있는 다양한 물질을 포함한다.

[0080] "프로토콜"은 대상체에게 투여하는 패턴을 의미하고, 대상체에 대한 1종 이상의 물질의 임의의 투약 요법을 포함한다. 프로토콜은 요소 (또는 변수)로 구성되고; 따라서 프로토콜은 1종 이상의 요소를 포함한다. 이러한 프로토콜의 요소는 투약량, 투약 빈도, 투여 경로, 투약 지속기간, 투약률, 투약 사이의 간격, 임의의 상기의 조합 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 프로토콜은 하나 이상의 시험 대상체에게 본 발명의 1종 이상의 조성물을 투여하는데 사용될 수 있다. 이어서 이들 시험 대상체에서 면역 반응을 평가하여 프로토콜이 목적하는 또는 목적하는 수준의 면역 반응 또는 치료 효과를 생성하는데 효과적인지 여부를 평가할 수 있다. 임의의 치료 및/또는 면역학적 효과가 평가될 수 있다. 프로토콜의 1종 이상의 요소는 시험 대상체, 예컨대 비-인간 대상체에서 사전 입증된 다음 인간 프로토콜로 해석될 수 있다. 예를 들어, 비-인간 대상체에서 입증된 투약량을 확립된 기술, 예컨대 알로메트릭 스케일링 또는 다른 스케일링 방법을 사용하여 인간 프로토콜의 요소로 스케일링할 수 있다. 프로토콜이 목적하는 효과를 갖는지 여부는 본원에 제공되거나 달리 관련 기술분야에 공지되어 있는 임의의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 특정 면역 세포, 시토카인, 항체 등이 감소, 생성, 활성화되는지 등의 여부를 결정하기 위해 본원에 제공된 조성물을 특정 프로토콜에 따라 투여한 대상체로부터 샘플을 수득할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)이 결정된다. 예시적인 프로토콜은 (하나 이상의 시험 대상체에서 프로토콜에 따라 투여되기 전의 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율과 비교하여) 투여 전에 치료 거대분자가 면역억제제 (합성 나노담체에 부착된 면역억제제)와 공동-제제화되지 않는 경우에 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)의 증진을 가져올 수 있는 것으로 이전에 입증된 것이다. 면역 세포의 존재 및/또는 수를 검출하는데 유용한 방법은 유동 세포측정 방법 (예를 들어, FACS), 엘리스팟(ELISpot), 증식 반응, 시토카인 생산, 및 면역조직화학 방법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역 세포 마커의 특이적 염색을 위한 항체 및 다른 결합제는 상업적으로 입수가능하다. 이러한 키트는 전형적으로 FACS-기반 검출, 목적하는 세포 집단의 이종 세포 집단으로부터의 분리 및/또는 정량화를 가능하게 하는 항원에 대한 염색 시약을 포함한다. 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 다수의 조성물을 프로토콜을 구성하는 1종 이상 또는 모든 또는 실질적으로 모든 요소를 사용하여 또 다른 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 프로토콜은 본원에 제공된 바와 같은 면역억제제 및 치료 거대분자를 사용하여 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 발생 또는 생산을 가져오는 것으로 입증되었다.

[0081] "제공하는 것"은 본 발명의 실시를 위해 필요한 품목 또는 일련의 품목 또는 방법을 공급하는, 개체가 수행하는 작용 또는 일련의 작용을 의미한다. 작용 또는 일련의 작용은 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다.

[0082] "대상체를 제공하는 것"은 임상의가 대상체와 접촉하게 하고 그에게 본원에 제공된 조성물을 투여하거나, 또는 그에 대해 본원에 제공된 방법을 수행하게 하는 임의의 작용 또는 일련의 작용이다. 바람직하게는, 대상체는 항원-특이적 관용 또는 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 생산 또는 발생 증진을 필요로 하는 자이다. 작용 또는 일련의 작용은 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 대상체를 제공하는 것을 추가로 포함한다.

[0083] "기록하는 것"은 본원에 제공된 방법 또는 조성물에 의해 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 생산 또는 발생 증진을 달성했음을 필기하는 것, 또는 이러한 필기가 임의의 문서적 또는 전자적 형태로 이루어질 것이라는 예상 하에 직접적으로 또는 간접적으로 활동하게 하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 기록은 치료 거대분자와 조합된 면역억제제가 본원에 제공된 바와 같은 방법 또는 이후 어느 지점에서의 방법에 따라 대상체에게 투여되는 경우에 일어난다. 본원에 사용된 "문서적 형태"는 종이와 같은 매체 상의

임의의 기록을 지칭한다. 본원에 사용된 "전자적 형태"는 전자 매체 상의 임의의 기록을 지칭한다.

[0084] "대상체"는 온혈 포유동물, 예컨대 인간 및 영장류; 조류; 가정용 또는 농장 동물, 예컨대 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험 동물, 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그; 어류; 파충류; 동물원 및 야생 동물 등을 비롯한 동물을 의미한다.

[0085] "합성 나노담체(들)"는 천연에서는 발견되지 않고, 크기가 5 마이크로미터 이하인 적어도 하나의 치수를 갖는 개별 물체를 의미한다. 알부민 나노입자가 일반적으로 합성 나노담체로서 포함되지만, 특정 실시양태에서 합성 나노담체는 알부민 나노입자를 포함하지 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 키토산을 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질-기반 나노입자가 아니다. 추가 실시양태에서, 합성 나노담체는 인지질을 포함하지 않는다.

[0086] 합성 나노담체는 1개 또는 다수의 지질-기반 나노입자 (본원에서 지질 나노입자, 즉 그의 구조를 구성하는 대부분의 물질이 지질인 나노입자로도 지칭됨,), 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀젼, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 (즉, 주로 바이러스 구조 단백질로 구성되지만 감염성이지 않거나 낮은 감염성을 갖는 입자), 펩티드 또는 단백질-기반 입자 (본원에서 단백질 입자, 즉 그의 구조를 구성하는 대부분의 물질이 펩티드 또는 단백질인 입자로도 지칭됨) (예컨대 알부민 나노입자) 및/또는 지질-중합체성 나노입자와 같이 나노물질의 조합을 사용하여 개발된 나노입자일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 합성 나노담체는 구형, 입방형, 피라미드형, 장방형, 실린더형, 도넛형 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 상이한 형상일 수 있다. 본 발명에 따른 합성 나노담체는 하나 이상의 표면을 포함한다. 본 발명의 실시에 사용하기 위해 적합화될 수 있는 예시적인 합성 나노담체는 (1) 미국 특허 5,543,158 (Gref et al.)에 개시된 생분해성 나노입자, (2) 공개 미국 특허 출원 20060002852 (Saltzman et al.)의 중합체성 나노입자, (3) 공개 미국 특허 출원 20090028910 (DeSimone et al.)의 리소그래피로 구축된 나노입자, (4) WO 2009/051837 (von Andrian et al.)의 개시내용, (5) 공개 미국 특허 출원 2008/0145441 (Penades et al.)에 개시된 나노입자, (6) 공개 미국 특허 출원 20090226525 (de los Rios et al.)에 개시된 단백질 나노입자, (7) 공개 미국 특허 출원 20060222652 (Sebbel et al.)에 개시된 바이러스-유사 입자, (8) 공개 미국 특허 출원 20060251677 (Bachmann et al.)에 개시된 핵산 부착 바이러스-유사 입자, (9) WO2010047839A1 또는 WO2009106999A2에 개시된 바이러스-유사 입자, (10) 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]에 개시된 나노침전 나노입자, (11) 미국 공개 2002/0086049에 개시된 아폽토시스 세포, 아폽토시스체 또는 합성 또는 반합성 모방체, 또는 (12) 문헌 [Look et al., Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice" J. Clinical Investigation 123(4):1741-1749(2013)]의 것을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 초과, 또는 1:10 초과의 종횡비를 가질 수 있다.

[0087] 약 100 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화시키는 히드록실 기가 있는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 활성화시키는 히드록실 기가 아닌 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 실질적으로 활성화시키는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 실질적으로 활성화시키지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화시키는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 활성화시키지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 바이러스-유사 입자를 배제한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 초과, 또는 1:10 초과의 종횡비를 가질 수 있다.

[0088] "치료 거대분자"는 대상체에게 투여될 수 있고 치료 효과를 갖는 임의의 단백질, 탄수화물, 지질 또는 핵산을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체에게의 치료 거대분자의 투여는 바람직하지 않은 면역 반응을 생성할 수 있다. 본원에 기재된 치료 거대분자의 면역억제제와의 병용 투여는 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자에 특이적인 CD4+ 조절 T 세포의 생산 또는 발생을 증진시킬 수 있고/거나 치료 거대분자에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 감소시킴으로써 그의 치료 유효성을 증진시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 폴리뉴클레오티드 또는 치료 단백질일 수 있다.

[0089] "치료 폴리뉴클레오티드"는 대상체에게 투여될 수 있고 치료 효과를 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴

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

[0090] "치료 단백질"은 대상체에게 투여될 수 있고 치료 효과를 갖는 임의의 단백질 또는 단백질-기반 요법을 의미한다. 이러한 요법은 단백질 대체 및 단백질 보충 요법을 포함한다. 이러한 요법은 또한 외인성 또는 외래 단백질의 투여, 항체 요법, 및 세포 또는 세포-기반 요법을 포함한다. 치료 단백질은 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 시토카인, 성장 인자, 모노클로날 항체, 항체-약물 접합체 및 폴리클로날 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 치료 단백질의 예가 본원의 다른 곳에서 제공된다. 치료 단백질은 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산될 수 있고, 이러한 세포로부터 수득될 수 있거나 이러한 세포의 형태로 투여될 수 있다. 실시양태에서, 치료 단백질은 포유동물 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 박테리아 세포, 식물 세포, 트랜스제닉 동물 세포, 트랜스제닉 식물 세포 등 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산된다. 치료 단백질은 이러한 세포에서 재조합적으로 생산될 수 있다. 치료 단백질은 바이러스 형질전환된 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 대상체는 임의의 상기의 것에 의한 치료를 필요로 하는 임의의 대상체를 포함한다. 이러한 대상체는 임의의 상기의 것을 제공받을 것을 포함한다.

[0091] "치료 거대분자 APC 제시가능한 항원"은 치료 거대분자 (즉, 치료 거대분자에 대한 면역 반응 (예를 들어, 항-치료 거대분자-특이적 항체의 생산)을 생성할 수 있는 치료 거대분자 또는 그의 단편)와 회합된 항원을 의미한다. 일반적으로, 치료 거대분자 항원-제시 세포 (APC) 제시가능한 항원은 면역계에 의한 인식을 위해 제시될 수 있다 (예를 들어, 면역계 세포, 예컨대 수지상 세포, B 세포 또는 대식세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 항원 제시 세포에 의해 제시됨). 치료 거대분자 APC 제시가능한 항원은 예를 들어 T 세포에 의한 인식을 위해 제시될 수 있다. 이러한 항원은 그에 의해 인식되어 부류 I 또는 부류 II 주요 조직적합성 복합체 분자 (MHC)에 결합된 항원의 에피토프의 제시를 통해 T 세포에서 면역 반응을 촉발할 수 있다. 치료 거대분자 APC 제시가능한 항원은 일반적으로 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 지단백질을 포함하거나, 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 함유되거나 발현된다. 치료 거대분자 항원은, 일부 실시양태에서, MHC 부류 I-제한된 에피토프 및/또는 MHC 부류 II-제한된 에피토프 및/또는 B 세포 에피토프를 포함한다. 바람직하게는, 치료 거대분자에 대해 특이적인 관용유발 면역 반응이 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트에 의해 생성된다. 실시양태에서, 합성 나노담체 집단은 어떠한 부가된 치료 거대분자 APC 제시가능한 항원도 포함하지 않으며, 이는 어떠한 실질적인 양의 치료 거대분자 APC 제시가능한 항원도 그의 제조 동안 합성 나노담체에 의도적으로 부가되지 않음을 의미한다.

[0092] "바람직하지 않은 면역 반응"은 항원에 대한 노출로부터 생성되거나, 본원에 제공된 질환, 장애 또는 상태 (또는 그의 증상)를 촉진 또는 악화시키거나, 또는 본원에 제공된 질환, 장애 또는 상태의 증후인 임의의 바람직하지 않은 면역 반응을 지칭한다. 이러한 면역 반응은 일반적으로 대상체의 건강에 대해 부정적인 영향을 갖거나, 또는 대상체의 건강에 대한 부정적인 영향의 증후이다.

[0093] C. 조성물

[0094] CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자에 특이적인 CD4+ 조절 T 세포의 생산 또는 발생을 증진시키기 위한 면역억제제 및 치료 거대분자의 투여에 사용하기 위한 조성물, 및 관련 방법 및 키트가 본원에 제공된다. 이러한 조성물, 키트 및 방법은 치료 거대분자 요법을 필요로 하는 대상체, 예컨대 치료 거대분자 요법을 받을 대상체에 대해 유용하다.

[0095] 매우 다양한 합성 나노담체가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 구체 또는 구형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 평면 또는 판-형상이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 입방체 또는 입방형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 타원체 또는 타원형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 실린더형, 원뿔형, 또는 피라미드형이다.

[0096] 일부 실시양태에서, 각 합성 나노담체가 유사한 특성을 갖도록, 크기 또는 형상의 면에서 비교적 균일한 합성 나노담체 집단을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 합성 나노담체의 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 합성 나노담체의 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10% 또는 20% 내에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다.

[0097] 합성 나노담체는 고체 또는 중공일 수 있고, 1개 이상의 층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각 층은 다른 층(들)과 비교하여 고유한 조성 및 고유한 특성을 갖는다. 하나의 예를 제시하자면, 합성 나노담체는 코어가 1개의 층 (예를 들어, 중합체성 코어)이고, 쉘이 제2 층 (예를 들어, 지질 이중층 또는 단일층)인 코어/쉘 구조를 가질 수 있다. 합성 나노담체는 다수의 상이한 층을 포함할 수 있다.

[0098] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 임의로 하나 이상의 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 리포솜을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 이중층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 단층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 미셀을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 중합체성 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 비-중합체성 코어 (예를 들어, 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자, 골 입자, 바이러스 입자, 단백질, 핵산, 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.

[0099] 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체성 합성 나노담체는 비-중합체성 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0100] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 임의로 1종 이상의 친양쪽성 개체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 개체는 증가된 안정성, 개선된 균일성, 또는 증가된 점도를 갖는 합성 나노담체의 생성을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 개체는 지질 막 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)의 내부 표면과 회합될 수 있다. 관련 기술분야에 공지되어 있는 많은 친양쪽성 개체가 본 발명에 따라 합성 나노담체를 제조하는데 사용하기에 적합하다. 이러한 친양쪽성 개체는 포스포글리세리드; 포스파티딜콜린; 디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC); 디올레일포스파티딜 에탄올아민 (DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄 (DOTMA); 디올레오일포스파티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤숙시네이트; 디포스파티딜 글리세롤 (DPPG); 헥산데칸올; 지방 알콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 표면 활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세리드; 지방산 디글리세리드; 지방산 아미드; 소르비탄 트리올레에이트 (스팬(Span)®85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트 (스팬®20); 폴리소르베이트 20 (트윈(Tween)®20); 폴리소르베이트 60 (트윈®60); 폴리소르베이트 65 (트윈®65); 폴리소르베이트 80 (트윈®80); 폴리소르베이트 85 (트윈®85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서팩틴; 폴록사머; 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 트리올레에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스파티딜세린; 포스파티딜이노시톨; 스핑고미엘린; 포스파티딜에탄올아민 (세팔린); 카르디올리핀; 포스파티드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스파티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실-아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀레에이트; 헥사데실 스테레이트; 이소프로필 미리스테이트; 틸록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스파티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 인지질; 높은 계면활성제 특성을 갖는 합성 및/또는 천연 세제; 데옥시콜레이트; 시클로덱스트린; 무질서 염; 이온 쌍형성 작용제; 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 친양쪽성 개체 성분은 상이한 친양쪽성 개체의 혼합물일 수 있다. 통상의 기술자라면, 이것이 계면활성제 활성을 갖는 물질의 포괄적이 아닌 예시적인 목록이라는 것을 인식할 것이다. 임의의 친양쪽성 개체가 본 발명에 따라 사용될 합성 나노담체의 생산에 사용될 수 있다.

[0101] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 임의로 1종 이상의 탄수화물을 포함할 수 있다. 탄수화물은 천연 또는 합성일 수 있다. 탄수화물은 유도체화 천연 탄수화물일 수 있다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 글루코스, 프룩토스, 갈락토스, 리보스, 락토스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 셀로비오스, 만노스, 크실로스, 아라비노스, 글루코론산, 갈락토론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민, 및 뉴람산을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 모노사카라이드 또는 디사카라이드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 풀루란, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 히드록시셀룰로스 (HC), 메틸셀룰로스 (MC), 덱스트란, 시클로덱스트란, 글리코겐, 히드록시에틸전분, 카라기난, 글리콘, 아밀로스, 키토산, N,O-카르복실메틸키토산, 알긴 및 알긴산, 전분, 키틴, 이눌린, 곤약, 글루코만난, 푸스툴란, 헤파린, 히알루론산, 커들란 및 크산탄을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 폴리사카라이드이다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 폴리사카라이드와 같은 탄수화물을 포함하지 않는다 (또는 구체적으로 배제한다). 특정 실시양태에서, 탄수화물은 만니톨, 소르비톨, 크실리톨, 에리트리톨, 말티톨 및 락티톨을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 당 알콜과 같은 탄수화물 유도체를 포함할 수 있다.

[0102] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 1종 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체인 1종 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를

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

[0103] 면역억제제는 다수의 방법 중 임의의 것에 의해 합성 나노담체에 부착될 수 있다. 일반적으로, 부착은 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합의 결과일 수 있다. 이러한 결합은 면역억제제가 합성 나노담체의 표면에 부착되게 하고/거나 합성 나노담체 내에 함유되게 (캡슐화되게) 할 수 있다. 그러나 일부 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체의 구조의 결과로서 합성 나노담체에 결합되기 보다는 합성 나노담체에 의해 캡슐화된다. 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함하고, 면역억제제는 중합체에 부착된다.

[0104] 부착이 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합의 결과로서 일어나는 경우에, 부착은 커플링 모이어티를 통해 일어날 수 있다. 커플링 모이어티는 면역억제제를 합성 나노담체에 결합시키는 임의의 모이어티일 수 있다. 이러한 모이어티는 공유 결합, 예컨대 아미드 결합 또는 에스테르 결합, 뿐만 아니라 면역억제제를 합성 나노담체에 (공유적으로 또는 비-공유적으로) 결합시키는 개별 분자를 포함한다. 이러한 분자는 링커 또는 중합체 또는 그의 유닛을 포함한다. 예를 들어, 커플링 모이어티는 면역억제제가 정전기적으로 결합하는 하전된 중합체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 커플링 모이어티는 공유적으로 결합되는 중합체 또는 그의 유닛을 포함할 수 있다.

[0105] 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함한다. 이들 합성 나노담체는 완전히 중합체성일 수 있거나, 또는 중합체 및 다른 물질의 믹스일 수 있다.

[0106] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 중합체는 회합되어 중합체성 매트릭스를 형성한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 성분, 예컨대 면역억제제는 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 공유적으로 회합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공유 회합은 링커에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 성분은 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 비공유적으로 회합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 성분은 중합체성 매트릭스 내에 캡슐화되거고/거나, 그에 의해 둘러싸이고/거나, 그 전반에 분산될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 성분은 소수성 상호작용, 전하 상호작용, 반 데르 발스 힘 등에 의해 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 회합될 수 있다. 매우 다양한 중합체 및 그로부터 중합체성 매트릭스를 형성하는 방법이 통상적으로 공지되어 있다.

[0107] 중합체는 천연 또는 비천연 (합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 단독중합체, 또는 2종 이상의 단량체를 포함하는 공중합체일 수 있다. 순서의 관점에서, 공중합체는 무작위, 블록일 수 있거나, 또는 무작위 및 블록 순서의 조합을 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따른 중합체는 유기 중합체이다.

[0108] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리아미드 또는 폴리에테르, 또는 그의 유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤, 또는 그의 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 생분해성인 것이 바람직하다. 따라서, 이들 실시양태에서, 중합체가 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛을 포함하는 경우에, 중합체가 생분해성이도록 중합체는 폴리에테르와 생분해성 중합체의 블록-공-중합체를 포함하는 것이 바람직하다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리에테르 또는 그의 유닛, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛만을 포함하지 않는다.

[0109] 본 발명에서 사용하기에 적합한 중합체의 다른 예는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트 (예를 들어, 폴리(1,3-디옥

산-2온)), 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)), 폴리프로필푸마레이트, 폴리아미드 (예를 들어, 폴리카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-코-글리콜리드, 폴리카프로락톤, 폴리히드록시산 (예를 들어, 폴리(β-히드록시알카노에이트))), 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 및 폴리아민, 폴리리신, 폴리리신-PEG 공중합체, 및 폴리(에틸렌이민), 폴리(에틸렌 이민)-PEG 공중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0110] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 중합체는 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리발레로락톤, 폴리(1,3-디옥산-2온)); 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리시아노아크릴레이트를 포함하나, 이에 제한되지는 않는, 미국 식품 의약국 (FDA)에 의해 21 C.F.R. § 177.2600 하에 인간에서의 용도에 대해 승인받은 중합체를 포함한다.

[0111] 일부 실시양태에서, 중합체는 친수성일 수 있다. 예를 들어, 중합체는 음이온성 기 (예를 들어, 포스페이트 기, 술페이트 기, 카르복실레이트 기); 양이온성 기 (예를 들어, 4급 아민 기); 또는 극성 기 (예를 들어, 히드록실 기, 티올 기, 아민 기)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 합성 나노담체 내에 친수성 환경을 생성한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 중합체성 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 합성 나노담체 내에 소수성 환경을 생성한다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노담체 내에 도입되는 (예를 들어, 부착되는) 물질의 속성에 영향을 미칠 수 있다.

[0112] 일부 실시양태에서, 중합체는 1종 이상의 모이어티 및/또는 관능기에 의해 변형될 수 있다. 다양한 모이어티 또는 관능기가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 탄수화물, 및/또는 폴리사카라이드로부터 유래된 비-시클릭 폴리아세탈에 의해 변형될 수 있다 (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). 특정 실시양태는 미국 특허 번호 5543158 (Gref et al.) 또는 WO 공개 WO2009/051837 (Von Andrian et al.)의 일반적 교시를 사용하여 제조될 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 중합체는 지질 또는 지방산 기에 의해 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산 또는 리그노세르산 중 하나 이상일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 팔미톨레산, 올레산, 바센산, 리놀레산, 알파-리놀레산, 감마-리놀레산, 아라키돈산, 가돌레산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 도코사헥사엔산 또는 에루스산 중 하나 이상일 수 있다.

[0114] 일부 실시양태에서, 중합체는 본원에서 "PLGA"로 총칭되는 락트산 및 글리콜산 유닛을 포함하는 공중합체, 예컨대 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드); 및 본원에서 "PGA"로 지칭되는 글리콜산 유닛, 및 본원에서 "PLA"로 총칭되는 락트산 유닛, 예컨대 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드 및 폴리-D,L-락티드를 포함하는 단독중합체를 비롯한 폴리에스테르일 수 있다. 일부 실시양태에서, 예시적인 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리히드록시산; PEG 공중합체 및 락티드와 글리콜리드의 공중합체 (예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체, 및 그의 유도체)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리(카프로락톤), 폴리(카프로락톤)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 그의 유도체를 포함한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 중합체는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산과 글리콜산의 생체적합성 및 생분해성 공중합체이고, PLGA의 다양한 형태는 락트산:글리콜산의 비를 특징으로 한다. 락트산은 L-락트산, D-락트산 또는 D,L-락트산일 수 있다. PLGA의 분해 속도는 락트산:글리콜산 비를 변경시킴으로써 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용될 PLGA는 대략 85:15, 대략 75:25, 대략 60:40, 대략 50:50, 대략 40:60, 대략 25:75, 또는 대략 15:85의 락트산:글리콜산 비를 특징으로 한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴 중합체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 아크릴 중합체는, 예를 들어 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리시아노아크릴레이트, 및 상기 중합체 중 1종 이상을 포함하는 조합을 포함한

다. 아크릴 중합체는 낮은 함량의 4급 암모늄 기를 갖는, 아크릴산 및 메타크릴산 에스테르의 완전-중합 공중합체를 포함할 수 있다.

[0117] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 핵산의 음으로 하전된 가닥을 축합시키고/거나 보호할 수 있다. 아민-함유 중합체, 예컨대 폴리(리신) (Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; 및 Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7), 폴리(에틸렌 이민) (PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297), 및 폴리(아미도아민) 덴드리머 (Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; 및 Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372)는 생리학적 pH에서 양으로 하전되고, 핵산과 이온 쌍을 형성한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 양이온성 중합체를 포함하지 않을 수 있다 (또는 배제할 수 있다).

[0118] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 측쇄를 보유하는 분해성 폴리에스테르일 수 있다 (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; 및 Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399). 이들 폴리에스테르의 예는 폴리(L-락티드-코-L-리신) (Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010), 폴리(세린 에스테르) (Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633), 및 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633)를 포함한다.

[0119] 이들 및 다른 중합체의 특성 및 그의 제조 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 6,123,727; 5,804,178; 5,770,417; 5,736,372; 5,716,404; 6,095,148; 5,837,752; 5,902,599; 5,696,175; 5,514,378; 5,512,600; 5,399,665; 5,019,379; 5,010,167; 4,806,621; 4,638,045; 및 4,946,929; 문헌 [Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; 및 Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181] 참조). 보다 일반적으로, 특정의 적합한 중합체를 합성하는 다양한 방법이 문헌 [Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386]; 및 미국 특허 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446, 및 6,818,732에 기재되어 있다.

[0120] 일부 실시양태에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 덴드리머일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 서로 가교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 가교가 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 가교 단계를 거치지 않고 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 또한, 합성 나노담체는 블록 공중합체, 그라프트 공중합체, 블렌드, 혼합물, 및/또는 상기 중 임의의 것 및 다른 중합체의 부가물을 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 통상의 기술자라면, 본원에 열거된 중합체가 본 발명에 따라 사용될 수 있는 중합체의 포괄적이 아닌 예시적인 목록을 나타낸다는 것을 인식할 것이다.

[0121] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체성 성분을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체성 합성 나노담체는 비-중합체성 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0122] 본 발명에 따른 조성물은 요소, 예컨대 면역억제제를 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 보존제, 완충제, 염수 또는 포스페이트 완충 염수와 조합하여 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위해 통상의 제약 제조 및 배합 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물, 예컨대 면역억제제를 포함하는 조성물은 보존제와 함께 주사용 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.

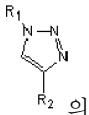
[0123] 실시양태에서, 합성 나노담체를 담체로서 제조하는 경우에, 성분을 합성 나노담체에 부착시키는 방법이 유용할 수 있다. 성분이 소분자인 경우에, 합성 나노담체의 어셈블리 전에 성분을 중합체에 부착시키는 것이 유익할 수 있다. 실시양태에서, 성분을 중합체에 부착시키는 것보다 표면 기를 사용한 다음 이러한 중합체 접합체를 합성 나노담체의 구축에 사용하는 것을 통하는, 성분을 합성 나노담체에 부착시키는데 사용되는 상기 표면 기를 갖는 합성 나노담체를 제조하는 것이 또한 유익할 수 있다.

[0124] 특정 실시양태에서, 부착은 공유 링커일 수 있다. 실시양태에서, 본 발명에 따른 면역억제제는 나노담체의 표면 상의 아지도 기와 알킨 기를 함유하는 면역억제제의 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응에 의해 또는 나노담체의 표면 상의 알킨과 아지도 기를 함유하는 면역억제제의 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응에 의해 형성된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 외부 표면에 공유적으로 부착될 수 있다. 이러한 고리화첨가 반응은 바람직하게는 적합한 Cu(I)-리간드와 함께 Cu(I) 촉매 및 Cu(II) 화합물을 촉매 활성 Cu(I) 화합물로 환원시키기 위한 환원제의 존재 하에 수행된다. 이러한 Cu(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (CuAAC)는 또한 클릭 반응으로 지칭될 수 있다.

[0125] 추가로, 공유 커플링은 아미드 링커, 디술피드 링커, 티오에테르 링커, 히드라존 링커, 히드라지드 링커, 이민 또는 옥심 링커, 우레아 또는 티오우레아 링커, 아미딘 링커, 아민 링커 및 술폰아미드 링커를 포함하는 공유 링커를 포함할 수 있다.

[0126] 아미드 링커는 한 성분, 예컨대 면역억제제 상의 아민과 제2 성분, 예컨대 나노담체의 카르복실산 기 사이의 아미드 결합을 통해 형성된다. 링커 내 아미드 결합은 적합하게 보호된 아미노산 및 활성화된 카르복실산, 예컨대 N-히드록시숙신이미드-활성화 에스테르에 의한 임의의 통상의 아미드 결합 형성 반응을 사용하여 만들어질 수 있다.

[0127] 디술피드 링커는 예를 들어 R1-S-S-R2 형태인, 2개 황 원자 사이의 디술피드 (S-S) 결합의 형성을 통해 만들어진다. 디술피드 결합은 티올/메르캅탄 기(-SH)를 함유하는 성분의, 중합체 또는 나노담체 상의 또 다른 활성화 티올 기에 의한 티올 교환, 또는 티올/메르캅탄 기를 함유하는 나노담체의, 활성화 티올 기를 함유하는 성분에 의한 티올 교환에 의해 형성될 수 있다.

[0128] 트리아졸 링커, 구체적으로 R1 및 R2가 임의의 화학적 개체일 수 있는 형태  의 1,2,3-트리아졸은, 제1 성분, 예컨대 나노담체에 부착된 아지드를 제2 성분, 예컨대 면역억제제에 부착된 말단 알킨과 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응시킴으로써 만들어진다. 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응은 촉매의 존재 또는 부재 하에, 바람직하게는 Cu(I)-촉매의 존재 하에 수행되며, 이는 1,2,3-트리아졸 관능을 통해 2개의 성분을 연결한다. 이러한 화학은 문헌 [Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002) 및 Meldal, et al., Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015]에 상세하게 기재되어 있고, 종종 "클릭" 반응 또는 CuAAC로 지칭된다.

[0129] 실시양태에서, 중합체 쇄에 대해 말단으로 아지드 또는 알킨 기를 함유하는 중합체가 제조된다. 이러한 중합체는 이어서 다수의 알킨 또는 아지드 기가 합성 나노담체의 표면 상에 배치되는 방식으로 그러한 나노담체를 제조하는데 사용된다. 대안적으로, 합성 나노담체는 또 다른 경로에 의해 제조될 수 있고, 그 후 알킨 또는 아지드 기에 의해 관능화될 수 있다. 성분은 알킨 (중합체가 아지드를 함유하는 경우) 또는 아지드 (중합체가 알킨을 함유하는 경우) 기의 존재 하에 제조된다. 이어서 성분은 1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 성분을 입자에 공유적으로 부착시키는 촉매의 존재 또는 부재 하에 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응을 통해 나노담체와 반응하게 된다.

[0130] 티오에테르 링커는 황-탄소 (티오에테르) 결합의 형성에 의해 예를 들어 R1-S-R2의 형태로 만들어진다. 티오에테르는 한 성분 상의 티올/메르캅탄 (-SH) 기의, 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드 또는 에폭시드에 의한 알킬화에 의해 만들어질 수 있다. 티오에테르 링커는 또한 한 성분 상의 티올/메르캅탄 기의, 마이클 수용자로서 말레이미드 기 또는 비닐 술폰 기를 함유하는 제2 성분 상의 전자-결핍 알켄 기에 대한 마이클 첨가에 의해 형성될 수 있다. 또 다른 방식으로, 티오에테르 링커는 한 성분 상의 티올/메르캅탄 기의, 제2 성분 상의 알켄 기와의 라디칼 티올-엔 반응에 의해 제조될 수 있다.

[0131] 히드라존 링커는 한 성분 상의 히드라지드 기의, 제2 성분 상의 알데히드/케톤 기와의 반응에 의해 만들어진다.

[0132] 히드라지드 링커는 한 성분 상의 히드라진 기의, 제2 성분 상의 카르복실산 기와의 반응에 의해 형성된다. 이러한 반응은 일반적으로 활성화 시약을 사용하여 카르복실산을 활성화시키는 아미드 결합의 형성과 유사한 화학을 사용하여 수행된다.

[0133] 이민 또는 옥심 링커는 한 성분 상의 아민 또는 N-알콕시아민 (또는 아미노옥시) 기의, 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기와의 반응에 의해 형성된다.

[0134] 우레아 또는 티오우레아 링커는 한 성분 상의 아민 기의, 제2 성분 상의 이소시아네이트 또는 티오이소시아네이트 기와의 반응에 의해 제조된다.

[0135] 아미딘 링커는 한 성분 상의 아민 기의, 제2 성분 상의 이미도에스테르 기와의 반응에 의해 제조된다.

[0136] 아민 링커는 한 성분 상의 아민 기의, 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드, 에폭시드 또는 술포네이트 에스테르 기에 의한 알킬화 반응에 의해 만들어진다. 대안적으로, 아민 링커는 또한 소듐 시아노보로히드리드 또는 소듐 트리아세톡시보로히드리드와 같은 적합한 환원 시약의 존재 하에, 한 성분 상의 아민 기의 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기에 의한 환원성 아미노화에 의해 만들어질 수 있다.

[0137] 술폰아미드 링커는 한 성분 상의 아민 기의 제2 성분 상의 술포닐 할라이드 (예컨대 술포닐 클로라이드) 기와의 반응에 의해 만들어진다.

[0138] 술폰 링커는 비닐 술폰에 대한 친핵체의 마이클 첨가에 의해 만들어진다. 비닐 술폰 또는 친핵체는 나노담체의 표면 상에 존재할 수 있거나 성분에 부착될 수 있다.

[0139] 성분은 또한 비-공유 접합 방법을 통해 나노담체에 접합될 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 면역억제제는 양으로 하전된 나노담체에 정전기적 흡착을 통해 접합될 수 있다. 금속 리간드를 함유하는 성분은 또한 금속 착물을 함유하는 나노담체에 금속-리간드 착물을 통해 접합될 수 있다.

[0140] 실시양태에서, 성분은 합성 나노담체의 어셈블리 전에 중합체, 예를 들어 폴리락트산-블록-폴리에틸렌 글리콜에 부착될 수 있거나, 또는 합성 나노담체는 그의 표면 상에 반응성 또는 활성화가능 기를 가진 상태로 형성될 수 있다. 후자의 경우에, 성분은 합성 나노담체의 표면에 의해 제공되는 부착 화학과 상용성인 기를 가진 상태로 제조될 수 있다. 다른 실시양태에서, 펩티드 성분은 적합한 링커를 사용하여 VLP 또는 리포솜에 부착될 수 있다. 링커는 2개의 분자를 함께 커플링시킬 수 있는 화합물 또는 시약이다. 한 실시양태에서, 링커는 문헌 [Hermanson 2008]에 기재된 바와 같은 동종이관능성 또는 이종이관능성 시약일 수 있다. 예를 들어, 표면 상에 카르복실 기를 함유하는 VLP 또는 리포솜 합성 나노담체는 EDC의 존재 하에 동종이관능성 링커, 아디프산 디히드라지드 (ADH)로 처리되어 ADH 링커를 갖는 상응하는 합성 나노담체를 형성할 수 있다. 생성된 ADH 연결된 합성 나노담체는 이어서 나노담체 상의 ADH 링커의 다른 말단을 통해 산 기를 함유하는 펩티드 성분과 접합되어 상응하는 VLP 또는 리포솜 펩티드 접합체를 생성한다.

[0141] 이용가능한 접합 방법의 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008]을 참조한다. 공유 부착에 더하여, 성분은 사전-형성된 합성 나노담체에의 흡착에 의해 부착될 수 있거나, 또는 합성 나노담체의 형성 동안 캡슐화에 의해 부착될 수 있다.

[0142] 본원에 제공된 바와 같은 임의의 면역억제제가 제공된 방법 또는 조성물에서 사용될 수 있고, 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 부착될 수 있다. 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF-κβ 억제제; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제; 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제 및 산화 ATP를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한 IDO, 비타민 D3, 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오퓨린, 6-메르캅토퓨린, 아스피린, 니플룸산, 에스트리올, 트리프롤리드, 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-10), 시클로스포린 A, siRNA 표적화 시토카인 또는 시토카인 수용체 등을 포함한다.

[0143] 스타틴의 예는 아토르바스타틴 (리피토르(LIPITOR)®, 토르바스트(TORVAST)®), 세리바스타틴, 플루바스타틴 (레스콜(LESCOL)®, 레스콜® XL), 로바스타틴 (메바코르(MEVACOR)®, 알토코르(ALTOCOR)®, 알토프레브(ALTOPREV)®), 메바스타틴 (콤팩틴(COMPACTIN)®), 피타바스타틴 (리발로(LIVALO)®, 피아바(PIAVA)®), 로수바스타틴 (프라바콜(PRAVACHOL)®, 셀렉틴(SELEKTINE)®, 리포스타트(LIPOSTAT)®), 로수바스타틴 (크레스토르(CRESTOR)®) 및 심바스타틴 (조코르(ZOCOR)®, 리펙스(LIPEX)®)을 포함한다.

[0144] mTOR 억제제의 예는 라파마이신 및 그의 유사체 (예를 들어, CCL-779, RAD001, AP23573, C20-메트알릴라파마이신 (C20-Marap), C16-(S)-부틸술폰아미도라파마이신 (C16-BSrap), C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신 (C16-iRap) (Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107)), AZD8055, BEZ235 (NVP-BEZ235), 크리소판산 (크리소판올), 데포롤리무스 (MK-8669), 에베롤리무스 (RAD0001), KU-0063794, PI-103, PP242, 템시롤리무스, 및 WYE-

354 (미국 텍사스주 휴스톤 소재 셀렉크(Selleck)에서 입수가능)를 포함한다.

[0145] TGF-β 신호전달 작용제의 예는 TGF-β 리간드 (예를 들어, 액티빈 A, GDF1, GDF11, 골 형태발생 단백질, 노달, TGF-β) 및 그의 수용체 (예를 들어, ACVR1B, ACVR1C, ACVR2A, ACVR2B, BMPR2, BMPR1A, BMPR1B, TGFβRI, TGFβRII), R-SMADS/co-SMADS (예를 들어, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD8), 및 리간드 억제제 (예를 들어, 폴리스타틴, 노긴, 코르딘, DAN, 레프티, LTBP1, THBS1, 데코린)를 포함한다.

[0146] 미토콘드리아 기능 억제제의 예는 아트락틸로시드 (이칼륨 염), 봉크렉산 (트리암모늄 염), 카르보닐 시아나이드 m-클로로페닐히드라존, 카르복시아트락틸로시드 (예를 들어, 아트락틸리스 구미페라(Atractylis gummifera)로부터), CGP-37157, (-)-데구엘린 (예를 들어, 문둘레아 세리세아(Mundulea sericea)로부터), F16, 헥소키나제 II VDAC 결합 도메인 펩티드, 올리고마이신, 로테논, Ru360, SFK1 및 발리노마이신 (예를 들어, 스트렙토미세스 풀비시무스(Streptomyces fulvissimus)로부터) (EMD4바이오사이언시스(EMD4Biosciences), 미국)을 포함한다.

[0147] P38 억제제의 예는 SB-203580 (4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸술피닐페닐)-5-(4-피리딜)1H-이미다졸), SB-239063 (트랜스-1-(4히드록시시클로헥실)-4-(플루오로페닐)-5-(2-메톡시-피리미딘-4-일) 이미다졸), SB-220025 (5-(2아미노-4-피리미디닐)-4-(4-플루오로페닐)-1-(4-피페리디닐)이미다졸)), 및 ARRY-797을 포함한다.

[0148] NF (예를 들어, NK-κβ) 억제제의 예는 IFRD1, 2-(1,8-나프티리딘-2-일)-페놀, 5-아미노살리실산, BAY 11-7082, BAY 11-7085, CAPE (카페인산 페네틸에스테르), 디에틸말레에이트, IKK-2 억제제 IV, IMD 0354, 락타시스틴, MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO], NFκB 활성화 억제제 III, NF-κB 활성화 억제제 II, JSH-23, 파르테놀리드, 페닐아르신 옥시드 (PAO), PPM-18, 피롤리딘디티오카르밤산 암모늄 염, QNZ, RO 106-9920, 로카글라미드, 로카글라미드 AL, 로카글라미드 C, 로카글라미드 I, 로카글라미드 J, 로카글라올, (R)-MG-132, 살리실산나트륨, 트리프톨리드 (PG490), 및 웨델로락톤을 포함한다.

[0149] 아데노신 수용체 효능제의 예는 CGS-21680 및 ATL-146e를 포함한다.

[0150] 프로스타글란딘 E2 효능제의 예는 E-프로스타노이드 2 및 E-프로스타노이드 4를 포함한다.

[0151] 포스포디에스테라제 억제제 (비-선택적 및 선택적 억제제)의 예는 카페인, 아미노필린, IBMX (3-이소부틸-1-메틸크산틴), 파라크산틴, 펜톡시필린, 테오브로민, 테오필린, 메틸화 크산틴, 빈포세틴, EHNA (에리트로-9-(2-히드록시-3-노닐)아데닌), 아나그렐리드, 에녹시몬 (페르판(PERFAN)™), 밀리논, 레보시멘단, 메셈브린, 이부딜라스트, 피클라밀라스트, 루테올린, 드로타베린, 로플루밀라스트 (닥사스(DAXAS)™, 달리레스프(DALIRESP)™), 실데나필 (레바티온(REVATION)®, 비아그라(VIAGRA)®), 타달라필 (애드서카(ADCIRCA)®, 시알리스(CIALIS)®), 바르데나필 (레비트라(LEVITRA)®, 스탁신(STAXYN)®), 우데나필, 아바나필, 이카리인, 4-메틸피페라진 및 피라졸로 피리미딘-7-1을 포함한다.

[0152] 프로테아솜 억제제의 예는 보르테조밉, 디술피람, 에피갈로카테킨-3-갈레이트 및 살리노스포라미드 A를 포함한다.

[0153] 키나제 억제제의 예는 베바시주맙, BIBW 2992, 세툭시맙 (에르비툭스(ERBITUX)®), 이마티닙 (글리벡(GLEEVEC)®), 트라스투주맙 (헤르셉틴(HERCEPTIN)®), 게피티닙 (이레사(IRESSA)®), 라니비주맙 (루센티스(LUCENTIS)®), 페갑타닙, 소라페닙, 다사티닙, 수니티닙, 에를로티닙, 닐로티닙, 라파티닙, 파니투무맙, 반데타닙, E7080, 파조파닙 및 무브리티닙을 포함한다.

[0154] 글루코코르티코이드의 예는 히드로코르티손 (코르티솔), 코르티손 아세테이트, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 덱사메타손, 베타메타손, 트리암시놀론, 베클로메타손, 플루드로코르티손 아세테이트, 데옥시코르티코스테론 아세테이트 (DOCA) 및 알도스테론을 포함한다.

[0155] 레티노이드의 예는 레티놀, 레티날, 트레티노인 (레티노산, 레틴-A(RETIN-A)®), 이소트레티노인 (아큐탄(ACCUTANE)®, 암네스팀(AMNESTEEM)®, 클라라비스(CLARAVIS)®, 소트레트(SOTRET)®), 알리트레티노인 (판레틴(PANRETIN)®), 에트레티네이트 (테기손(TEGISON)™) 및 그의 대사물 아시트레틴 (소리아탄(SORIATANE)®), 타자로텐 (타조락(TAZORAC)®, 아바게(AVAGE)®, 조락(ZORAC)®), 벡사로텐 (탈그레틴(TARGRETIN)®) 및 아다팔렌 (디페린(DIFFERIN)®)을 포함한다.

[0156] 시토카인 억제제의 예는 IL1ra, IL1 수용체 길항제, IGFBP, TNF-BF, 우로모듈린, 알파-2-마크로글로불린, 시클로스포린 A, 펜타미딘 및 펜톡시필린 (펜토팍(PENTOPAK)®, 펜톡실(PENTOXIL)®, 트렌탈(TRENTAL)®)을 포함한

다.

[0157] 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제의 예는 GW9662, PPARγ 길항제 III, G335 및 T0070907 (EMD4바이오사이언시스, 미국)을 포함한다.

[0158] 퍼옥시솜 증식자-활성화 수용체 효능제의 예는 피오글리타존, 시글리타존, 클로피브레이트, GW1929, GW7647, L-165,041, LY 171883, PPARγ 활성화제, Fmoc-Leu, 트로글리타존 및 WY-14643 (EMD4바이오사시언시스, 미국)을 포함한다.

[0159] 히스톤 데아세틸라제 억제제의 예는 히드록삼산 (또는 히드록사메이트), 예컨대 트리코스타틴 A, 시클릭 테트라펩티드 (예컨대 트라폭신 B) 및 뎁시펩티드, 벤즈아미드, 친전자성 케톤, 지방족 산 화합물, 예컨대 페닐부티레이트 및 발프로산, 히드록삼산, 예컨대 보리노스타트 (SAHA), 벨리노스타트 (PXD101), LAQ824 및 파노비노스타트 (LBH589), 벤즈아미드, 예컨대 엔티노스타트 (MS-275), CI994 및 모세티노스타트 (MGCD0103), 니코틴아미드, NAD 유도체, 디히드로쿠마린, 나프토피라논, 및 2-히드록시나프알데히드를 포함한다.

[0160] 칼시뉴린 억제제의 예는 시클로스포린, 피메크롤리무스, 보클로스포린 및 타크롤리무스를 포함한다.

[0161] 포스파타제 억제제의 예는 BN82002 히드로클로라이드, CP-91149, 칼리큘린 A, 칸타리드산, 칸타리딘, 시페르메트린, 에틸-3,4-데포스타틴, 포스트리에신 나트륨 염, MAZ51, 메틸-3,4-데포스타틴, NSC 95397, 노르칸타리딘, 프로로센트룸 콘카붐(prorocentrum concavum)으로부터의 오카다산 암모늄 염, 오카다산, 오카다산 칼륨 염, 오카다산 나트륨 염, 페닐아르신 옥시드, 다양한 포스파타제 억제제 칵테일, 단백질 포스파타제 1C, 단백질 포스파타제 2A 억제제 단백질, 단백질 포스파타제 2A1, 단백질 포스파타제 2A2 및 오르토바나듐산나트륨을 포함한다.

[0162] 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 치료 거대분자는 또한 합성 나노담체에 부착된다. 다른 실시양태에서, 치료 거대분자는 임의의 합성 나노담체에 부착되지 않는다. 이러한 경우 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 거대분자 그 자체, 또는 그의 단편 또는 유도체의 형태로 전달될 수 있다.

[0163] 치료 거대분자는 치료 단백질 또는 치료 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 치료 단백질은 주입가능한 치료 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 시토카인 및 인터페론, 성장 인자, 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체 (예를 들어, 대체 요법으로서 대상체에게 투여됨) 및 폼페병 연관 단백질 (예를 들어, 산 글루코시다제 알파, rhGAA (예를 들어, 미오자임 및 루미자임 (겐자임(Genzyme)))를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 단백질은 또한 혈액 응고 캐스케이드에 수반되는 단백질을 포함한다. 치료 단백질은 인자 VIII, 인자 VII, 인자 IX, 인자 V, 폰 빌레브란트 인자, 폰 헬데브란트 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 인슐린, 성장 호르몬, 에리트로포이에틴 알파, VEGF, 트롬보포이에틴, 리소자임, 항트롬빈 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 단백질은 또한 아디포킨, 예컨대 렙틴 및 아디포넥틴을 포함한다. 치료 단백질의 다른 예는 하기 및 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같다.

[0164] 리소솜 축적 장애를 갖는 대상체의 효소 대체 요법에 사용되는 치료 단백질의 예는 고셔병의 치료를 위한 이미글루세라제 (예를 들어, 세레자임(CEREZYME)™), 파브리병의 치료를 위한 a-갈락토시다제 A (a-gal A) (예를 들어, 아갈시다제 베타, 파브리자임(FABRYZYME)™), 폼페병의 치료를 위한 산 α-글루코시다제 (GAA) (예를 들어, 산 글루코시다제 알파, 루미자임™, 미오자임™), 뮤코폴리사카라이드증의 치료를 위한 아릴술파타제 B (예를 들어, 라로니다제, 알두라자임™, 이두르술파제, 엘라프라제™, 아릴술파타제 B, 나글라자임™), 페글로티카제 (크리스텍사(KRYSTEXXA)) 및 페그시티카제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0165] 효소의 예는 옥시도리덕타제, 트랜스퍼라제, 히드롤라제, 리아제, 이소머라제, 아스파라기나제, 우리카제, 글리코시다제, 아스파라기나제, 우리카제, 프로테아제, 뉴클레아제, 콜라게나제, 히알루로니다제, 헤파리나제, 헤파라나제, 리신 및 리가제를 포함한다.

[0166] 치료 단백질은 또한 임의의 효소, 독소, 또는 박테리아, 진균 또는 바이러스 공급원으로부터 단리되거나 유래된 다른 단백질 또는 펩티드를 포함할 수 있다.

[0167] 호르몬의 예는 멜라토닌 (N-아세틸-5-메톡시트립타민), 세로토닌, 티록신 (또는 테트라아이오도티로닌) (갑상선 호르몬), 트리아이오도티로닌 (갑상선 호르몬), 에피네프린 (또는 아드레날린), 노르에피네프린 (또는 노르아드레날린), 도파민 (또는 프로락틴 억제 호르몬), 항뮐러관 호르몬 (또는 뮐러 억제 인자 또는 호르몬), 아디포넥틴, 부신피질자극 호르몬 (또는 코르티코트로핀), 안지오텐시노겐 및 안지오텐신, 항이뇨 호르몬 (또는 바소프

레신, 아르기닌 바소프레신), 심방-나트륨이뇨 펩티드 (또는 아트리오펩틴), 칼시토닌, 콜레시스토키닌, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 에리트로포이에틴, 여포-자극 호르몬, 가스트린, 그렐린, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩티드 (GLP-1), GIP, 고나도트로핀-방출 호르몬, 성장 호르몬-방출 호르몬, 인간 융모성 고나도트로핀, 인간 태반 락토겐, 성장 호르몬, 인히빈, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (또는 소마토메딘), 렙틴, 황체화 호르몬, 멜라닌세포 자극 호르몬, 오렉신, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, 프로락틴, 렐락신, 세크레틴, 소마토스타틴, 트롬보포이에틴, 갑상선-자극 호르몬 (또는 티로트로핀), 티로트로핀-방출 호르몬, 코르티솔, 알도스테론, 테스토스테론, 데히드로에피안드로스테론, 안드로스텐디온, 디히드로테스토스테론, 에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 프로게스테론, 칼시트리올 (1,25-디히드록시비타민 D3), 칼시디올 (25-히드록시비타민 D3), 프로스타글란딘, 류코트리엔, 프로스타시클린, 트롬복산, 프로락틴 방출 호르몬, 리포트로핀, 뇌 나트륨이뇨 펩티드, 뉴로펩티드 Y, 히스타민, 엔도텔린, 췌장 폴리펩티드, 레닌 및 엔케팔린을 포함한다.

[0168] 혈액 또는 혈액 응고 인자의 예는 인자 I (피브리노겐), 인자 II (프로트롬빈), 조직 인자, 인자 V (프로악셀레린, 불안정성 인자), 인자 VII (안정 인자, 프로콘버틴), 인자 VIII (항혈우병 글로불린), 인자 IX (크리스마스 인자 또는 혈장 트롬보플라스틴 성분), 인자 X (스튜어트-프라워 인자), 인자 Xa, 인자 XI, 인자 XII (하게만 인자), 인자 XIII (피브린-안정화 인자), 폰 빌레브란트 인자, 프리칼리크레인 (플레처 인자), 고분자량 키니노겐 (HMWK) (피츠제랄드 인자), 피브로넥틴, 피브린, 트롬빈, 항트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제 (ZPI), 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA), 우로키나제, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2 (PAI2), 암 응고촉진제 및 에포에틴 알파 (에포젠(Epogen), 프로크리트(Procrit))를 포함한다.

[0169] 시토카인의 예는 림포카인, 인터류킨 및 케모카인, 제1형 시토카인, 예컨대 IFN-γ, TGF-β 및 제2형 시토카인, 예컨대 IL-4, IL-10 및 IL-13을 포함한다.

[0170] 성장 인자의 예는 아드레노메듈린 (AM), 안지오포이에틴 (Ang), 자가분비 운동성 인자, 골 형태발생 단백질 (BMP), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 표피 성장 인자 (EGF), 에리트로포이에틴 (EPO), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 (GDNF), 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간세포암-유래 성장 인자 (HDGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 이동-자극 인자, 미오스타틴 (GDF-8), 신경 성장 인자 (NGF) 및 다른 뉴로트로핀, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 트롬보포이에틴 (TPO), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF-α), 형질전환 성장 인자 베타 (TGF-β), 암_괴사_인자-알파 (TNF-α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), Wnt 신호전달 경로, 태반 성장 인자 (PlGF), (태아 소 소마토트로핀) (FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-7을 포함한다.

[0171] 모노클로날 항체의 예는 아바고보맙, 압식시맙, 아달리무맙, 아데카투무맙, 아펠리모맙, 아푸투주맙, 알라치주맙 페골, ALD, 알렘투주맙, 알투모맙 펜테테이트, 아나투모맙 메페나톡스, 안루킨주맙, 항-흉선세포 글로빈, 아폴리주맙, 아르시투모맙, 아셀리주맙, 아틀리주맙 (토실리주맙), 아토롤리무맙, 바피뉴주맙, 바실릭시맙, 바비툭시맙, 벡투모맙, 벨리무맙, 벤랄리주맙, 베르틸리무맙, 베실레소맙, 베바시주맙, 비시로맙, 비바투주맙 메르탄신, 블리나투모맙, 브렌툭시맙 베도틴, 브리아키누맙, 카나키누맙, 칸투주맙 메르탄신, 카프로맙 펜데티드, 카투막소맙, 세델리주맙, 세르톨리주맙 페골, 세툭시맙, 시타투주맙 보가톡스, 식수투무맙, 클레놀릭시맙, 클리바투주맙 테트락세탄, 코나투무맙, 다세투주맙, 다클리주맙, 다라투무맙, 데노수맙, 데투모맙, 도를리모맙 아리톡스, 도를릭시주맙, 에크로멕시맙, 에쿨리주맙, 에도바코맙, 에드레콜로맙, 에팔리주맙, 에펀구맙, 엘로투주맙, 엘실리모맙, 엔리모맙 페골, 에피투모맙 시툭세탄, 에프라투주맙, 에를리주맙, 에르투막소맙, 에타라시주맙, 엑스비비루맙, 파놀레소맙, 파랄리모맙, 파를레투주맙, 펠비주맙, 페자키누맙, 피기투무맙, 폰톨리주맙, 포라비루맙, 프레솔리무맙, 갈릭시맙, 간테네루맙, 가빌리모맙, 겜투주맙 오조가미신, GC1008, 기렌툭시맙, 글렘바투무맙 베도틴, 골리무맙, 고밀릭시맙, 이발리주맙, 이브리투모맙 티욱세탄, 이고보맙, 임시로맙, 인플릭시맙, 인테투무맙, 이놀리모맙, 이노투주맙 오조가미신, 이필리무맙, 이라투무맙, 켈릭시맙, 라베투주맙, 레브리키주맙, 레말레소맙, 레르델리무맙, 렉사투무맙, 리비비루맙, 린투주맙, 로르보투주맙 메르탄신, 루카투무맙, 루밀릭시맙, 마파투무맙, 마슬리모맙, 마투주맙, 메폴리주맙, 메텔리무맙, 밀라투주맙, 민레투모맙, 미투모맙, 모롤리무맙, 모타비주맙, 무로모납-CD3, 나콜로맙 타페나톡스, 나프투모맙 에스타페나톡스, 나탈리주맙, 네바쿠맙, 네시투무맙, 네렐리모맙, 니모투주맙, 노페투모맙 메르펜탄, 오크렐리주맙, 오둘리모맙, 오파투무맙, 올라라투맙, 오말리주맙, 오포르투주맙 모나톡스, 오레고보맙, 오텔릭시주맙, 파기박시맙, 팔리비주맙, 파니투무맙, 파노바쿠맙, 파스콜리주맙, 펨투모맙, 페르투주맙, 펙셀리주맙, 핀투모맙, 프릴릭시맙, 프리투무맙, 라피비루맙, 라무시루맙, 라니비주맙, 락시바쿠맙, 레가비루맙 레슬리주맙, 릴로투무맙, 리툭시맙, 로바투무맙, 론탈리주맙, 로벨리주맙, 루플리주맙, 사투모맙 펜데티드, 세비루맙, 시브로투주맙, 시팔리무맙, 실툭시맙, 시

플리주맙, 솔라네주맙, 소넵시주맙, 손투주맙, 스타물루맙, 술레소맙, 타카투주맙 테트락세탄, 타도시주맙, 탈리주맙, 타네주맙, 타플리투모맙 팝톡스, 테피바주맙, 텔리모맙 아리톡스, 테나투모맙, 테넬릭시맙, 테플리주맙, 티실리무맙 (트레멜리무맙), 티가투주맙, 토실리주맙 (아틀리주맙), 토랄리주맙, 토시투모맙, 트라스투주맙, 트레멜리무맙, 투코투주맙 셀모류킨, 투비루맙, 우르톡사주맙, 우스테키누맙, 바팔릭시맙, 베돌리주맙, 벨투주맙, 베팔리모맙, 비실리주맙, 볼로식시맙, 보투무맙, 잘루투무맙, 자놀리무맙, 지랄리무맙, 및 졸리모맙 아리톡스를 포함한다. 모노클로날 항체는 추가로 항-TNF-α 항체를 포함한다.

[0172] 주입 요법 또는 주사가능한 치료 단백질의 예는 예를 들어 토실리주맙 (로슈(Roche)/악템라(Actemra)®), 알파-1 항트립신 (카마다(Kamada)/AAT), 헤마티드® (아피맥스(Affymax) 및 다케다(Takeda), 합성 펩티드), 알빈테르페론 알파-2b (노파르티스(Novartis)/잘빈(Zalbin)™), 루신(Rhucin)® (파밍 그룹(Pharming Group), C1 억제제 대체 요법), 테사모렐린 (테라테크놀로지스(Theratechnologies)/에그리프타(Egrifta), 합성 성장 호르몬-방출 인자), 오크렐리주맙 (제넨테크(Genentech), 로슈 및 비오겐(Biogen)), 벨리무맙 (글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)/벤리스타(Benlysta)®), 페글로티카제 (사비엔트 파마슈티칼스(Savient Pharmaceuticals)/크리스텍사™), 페그시티카제, 탈리글루세라제 알파 (프로탈릭스(Protalix)/유플리소(Uplyso)), 아갈시다제 알파 (샤이어(Shire)/레플라갈(Replagal)®), 벨라그루세라제 알파 (샤이어) 및 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)을 포함한다.

[0173] 추가의 치료 단백질은, 예를 들어 조작된 단백질, 예컨대 Fc 융합 단백질, 이중특이적 항체, 다중-특이적 항체, 나노바디, 항원-결합 단백질, 항체 단편 및 단백질 접합체, 예컨대 항체 약물 접합체를 포함한다.

[0174] 치료 폴리뉴클레오티드는 핵산 압타머, 예컨대 페갑타닙(Pegaptanib) (마큐젠(Macugen), PEG화 항-VEGF 압타머), 안티센스 치료제, 예컨대 안티센스 폴리- 또는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 항바이러스 약물 포미비르센, 또는 미포메르센, 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위해 아포지단백질 B에 대한 메신저 RNA를 표적으로 하는 안티센스 치료); 소형 간섭 RNA (siRNA) (예를 들어, 고도의 효력을 갖는 RNAi를 매개하는 25-30 염기 쌍 비대칭 이중-가닥 RNA인 다이서 기질 siRNA 분자 (DsiRNA)); 또는 변형된 메신저 RNA (mmRNA), 예컨대 미국 특허 출원 2013/0115272 (de Fougerolles et al.) 및 공개 미국 특허 출원 2012/0251618 (Schrum et al.)에 개시된 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0175] 본 발명의 측면에 따라 유용한 추가의 치료 거대분자는 통상의 기술자에게 분명할 것이고, 본 발명은 이러한 측면으로 제한되지 않는다.

[0176] 일부 실시양태에서, 성분, 예컨대 치료 거대분자 또는 면역억제제는 단리될 수 있다. 단리된은 요소가 그의 천연 환경으로부터 분리되고 그의 확인 또는 사용을 허용하는 충분한 양으로 제공되는 것을 지칭한다. 이는, 예를 들어 요소가 (i) 발현 클로닝에 의해 선택적으로 생산될 수 있거나 또는 (ii) 크로마토그래피 또는 전기영동에 의해 정제될 수 있음을 의미한다. 단리된 요소는, 실질적으로 순수할 수 있지만, 그러할 필요는 없다. 단리된 요소는 제약 제제 내에서 제약상 허용되는 부형제와 함께 혼합될 수 있기 때문에, 요소는 제제의 중량을 기준으로 단지 작은 백분율만을 포함할 수 있다. 그럼에도 불구하고 요소는 살아있는 시스템 내에서 회합되어 있을 수 있는 물질로부터 분리되었다는 점에서 단리, 즉 다른 지질 또는 단백질로부터 단리된다. 본원에 제공된 임의의 요소는 단리될 수 있고, 조성물 중에 포함되거나 또는 단리된 형태로 방법에서 사용될 수 있다.

[0177] D. 조성물의 제조 및 사용 방법 및 관련 방법

[0178] 본 발명의 측면은 본원에 제공된 바와 같은 투여 방법을 위한 프로토콜의 결정에 관한 것이다. 프로토콜은 치료 거대분자 및 면역억제제의 투여 빈도, 투여량 및 다른 측면을 변경하고, 후속적으로 이러한 변경을 기반으로 하여 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비) 및/또는 임의의 바람직한 또는 바람직하지 않은 면역 반응을 평가함으로써 결정될 수 있다. 본 발명의 실시를 위한 바람직한 프로토콜은 CD4+ 조절 T 세포, 예컨대 치료 거대분자-특이적 CD4+ 조절 T 세포의 수 또는 백분율 (또는 비)을 증진시킨다.

[0179] 합성 나노담체는 관련 기술분야에 공지된 매우 다양한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체는 나노침전, 유체 채널을 사용한 유동 포커싱, 분무 건조, 단일 및 이중 에멀젼 용매 증발, 용매 추출, 상 분리, 밀링, 마이크로에멀젼 절차, 마이크로제작, 나노제작, 희생층, 단순 및 복합 코아세르베이션, 및 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 방법과 같은 방법에 의해 형성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 단분산 반도체, 전도성, 자기성, 유기 및 다른 나노물질에 대한 수성 및 유기 용매 합성이 기재되어 있다 (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; 및 Trindade et al., 2001,

Chem. Mat., 13:3843). 추가의 방법이 문헌에 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; 및 Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755]; 미국 특허 5578325 및 6007845; 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)] 참조).

[0180] 문헌 [C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8- 21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 방법을 사용하여 바람직하게 다양한 물질을 합성 나노담체 내로 캡슐화할 수 있다. 제한 없이 2003년 10월 14일에 허여된 미국 특허 6,632,671 (Unger)에 개시된 방법을 비롯한, 물질을 합성 나노담체 내로 캡슐화하기에 적합한 다른 방법을 사용할 수 있다.

[0181] 특정 실시양태에서, 합성 나노담체는 나노침전 과정 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 합성 나노담체를 제조하는데 사용되는 조건은 목적하는 크기 또는 특성 (예를 들어, 소수성, 친수성, 외부 형태, "점착성", 형상 등)의 입자를 생성하기 위해 변경될 수 있다. 합성 나노담체를 제조하는 방법 및 사용되는 조건 (예를 들어, 용매, 온도, 농도, 공기 유량 등)은 합성 나노담체에 부착될 물질 및/또는 중합체 매트릭스의 조성에 의존할 수 있다.

[0182] 임의의 상기 방법에 의해 제조된 합성 나노담체가 목적하는 범위 밖의 크기 범위를 갖는 경우에, 합성 나노담체는 예를 들어 체를 사용하여 사이징될 수 있다.

[0183] 합성 나노담체의 요소 (즉, 성분)는 예를 들어 1개 이상의 공유 결합에 의해 전체 합성 나노담체에 부착될 수 있거나, 또는 1개 이상의 링커에 의해 부착될 수 있다. 합성 나노담체를 관능화하는 추가의 방법은 공개 미국 특허 출원 2006/0002852 (Saltzman et al.), 공개 미국 특허 출원 2009/0028910 (DeSimone et al.), 또는 공개 국제 특허 출원 WO/2008/127532 A1 (Murthy et al.)로부터 적합화될 수 있다.

[0184] 대안적으로 또는 추가로, 합성 나노담체는 비-공유적 상호작용을 통해 성분에 직접적으로 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 비-공유적 실시양태에서, 비-공유적 부착은 전하 상호작용, 친화도 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 숙주-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 적층 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 및/또는 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 비-공유적 상호작용에 의해 매개된다. 이러한 부착은 합성 나노담체의 외부 표면 또는 내부 표면 상에 배열될 수 있다. 실시양태에서, 캡슐화 및/또는 흡착이 부착 형태이다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 동일한 비히클 또는 전달 시스템 내에서의 혼합에 의해 항원과 조합될 수 있다.

[0185] 본원에 제공된 조성물은 무기 또는 유기 완충제 (예를 들어, 포스페이트, 카르보네이트, 아세테이트 또는 시트레이트의 나트륨 또는 칼륨 염) 및 pH 조정제 (예를 들어, 염산, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨, 시트레이트 또는 아세테이트의 염, 아미노산 및 그의 염) 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 알파-토코페롤), 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌9-10 노닐 페놀, 소듐 데스옥시콜레이트), 용액 및/또는 동결/냉동 안정화제 (예를 들어, 수크로스, 락토스, 만니톨, 트레할로스), 삼투 조정제 (예를 들어, 염 또는 당), 항박테리아제 (예를 들어, 벤조산, 페놀, 겐타미신), 소포제 (예를 들어, 폴리디메틸실로존), 보존제 (예를 들어, 티메로살, 2-페녹시에탄올, EDTA), 중합체성 안정화제 및 점도-조정제 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 폴록사머 488, 카르복시메틸셀룰로스) 및 공-용매 (예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올)를 포함할 수 있다.

[0186] 본 발명에 따른 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위해 통상의 제약 제조 및 배합 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 본 발명을 실시하는데 사용하기에 적합한 기술은 문헌 [Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Edited by Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; 및 Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone]에서 찾아볼 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 보존제와 주사용 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.

[0187] 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 방식으로 제조될 수 있고, 본 발명은 어떠한 방식으로든 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성될 수 있는 조성물로 제한되지 않음이 이해되어야 한다. 적절한 제조 방법의 선택은 회합할 특정한 모이어티의 특성에 대한 주의를 필요로 할 수 있다.

[0188] 일부 실시양태에서, 조성물은 멸균 조건 하에 제조되거나 또는 최종적으로 멸균된다. 이는 생성되는 조성물이 멸균이고 비-감염성이며, 그에 따라 비-멸균 조성물과 비교하였을 때 안전성이 개선되는 것을 보장할 수 있다. 이는 특히 조성물을 제공받는 대상체가 면역 결핍을 갖고/거나, 감염을 앓고 있고/거나, 감염되기 쉬운 경우에 가치있는 안전 조치를 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 활성의 손실 없이 연장된 기간을 위해 제제 전략에 의존하여 동결건조되고 현탁액 중에서 또는 동결건조된 분말로서 보관될 수 있다.

[0189] 본 발명에 따른 투여는 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 경점막, 경피부, 경피 또는 피내 경로를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의해 이루어질 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 투여는 피하 투여 경로를 통한다. 본원에 언급된 조성물은 투여, 일부 실시양태에서 병용 투여를 위해 통상의 방법을 사용하여 제작 및 제조될 수 있다.

[0190] 본 발명의 조성물은 유효량, 예컨대 본원의 다른 곳에 기재되어 있는 유효량으로 투여될 수 있다. 투여 형태의 용량은 본 발명에 따라 다양한 양의 면역억제제 및/또는 치료 거대분자를 함유할 수 있다. 투여 형태 내에 제공된 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 양은 치료 거대분자 및/또는 면역억제제의 속성, 달성하고자 하는 치료 이익, 및 다른 이러한 파라미터에 따라 변경될 수 있다. 실시양태에서, 투여 형태 내에 제공될 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 최적의 치료 양을 확립하기 위해 용량 범위설정 연구가 수행될 수 있다. 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자는 대상체에게의 투여 시 치료 거대분자에 대한 관용유발 면역 반응을 생성하는데 유효한 양으로 투여 형태 내에 제공된다. 바람직한 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자는 예컨대 대상체에게 병용 투여되는 경우에 CD4+ 조절 T 세포의 생산 또는 발생을 증진시키는데 유효한 양으로 투여 형태 내에 제공된다. 통상의 용량 범위설정 연구 및 기술을 사용하여 대상체에서 목적하는 면역 반응을 생성하는데 유효한 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 양을 결정하는 것이 가능할 수 있다. 투여 형태는 다양한 빈도로 투여될 수 있다.

[0191] 일부 실시양태에서, 면역억제제, 예컨대 합성 나노담체에 부착되어 있는 것과 치료 거대분자의 투여는, 예를 들어 치료 거대분자의 후속하는 추가의 투여 전에 착수된다.

[0192] 본 개시내용의 또 다른 측면은 키트에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 키트는 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 부착된 면역억제제, 및 치료 거대분자를 포함한다. 면역억제제 및 치료 거대분자는 키트 내의 개별 용기 내에 수용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 용기는 바이알 또는 앰플이다. 일부 실시양태에서, 치료 거대분자 또는 면역억제제는 치료 거대분자 또는 면역억제제가 후속 시점에 용기에 첨가될 수 있도록 용기와 분리된 용액 내에 수용된다. 바람직한 실시양태에서, 치료 거대분자는 투여 전에 면역억제제와 공동-제제화되지 않는다. 일부 실시양태에서, 치료 거대분자 또는 면역억제제는 이들이 후속 시점에 재구성될 수 있도록 각각 개별 용기 내에 동결건조 형태로 존재한다. 일부 실시양태에서, 키트는 재구성, 혼합, 투여 등에 대한 지침을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 지침은 본원에 기재된 방법의 설명을 포함한다. 지침은 임의의 적합한 형태로, 예를 들어 인쇄 삽입물 또는 라벨로서 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 면역억제제 및 치료 거대분자를 투여하기 위한 1개 이상의 시린지 또는 다른 수단을 추가로 포함한다.

[0193] 실시예

[0194] 실시예 1: 중합체-라파마이신 접합체를 함유하는 중합체성 나노담체 (예측)

[0195] PLGA-라파마이신 접합체의 제조:

[0196] 산 말단 기 (7525 DLG1A, 산가 0.46 mmol/g, 레이크쇼어 바이오머티리얼스(Lakeshore Biomaterials); 5 g, 2.3 mmol, 1.0 eq)를 갖는 PLGA 중합체를 30 mL의 디클로로메탄 (DCM) 중에 용해시켰다. N,N-디시클로헥실카르보디미이드 (1.2 eq, 2.8 mmol, 0.57 g)에 이어서 라파마이신 (1.0 eq, 2.3 mmol, 2.1 g) 및 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP) (2.0 eq, 4.6 mmol, 0.56 g)을 첨가하였다. 혼합물을 2일 동안 rt에서 교반하였다. 이어서, 혼합물을 여과하여 불용성 디시클로헥실우레아를 제거하였다. 여과물은 약 10 mL의 부피로 농축시키고, 100 mL의 이소프로필 알콜 (IPA)을 첨가하여 PLGA-라파마이신 접합체를 침전시켰다. IPA 층을 제거한 다음에, 중합체를 50 mL의 IPA 및 50 mL의 메틸 t-부틸 에테르 (MTBE)로 세척하였다. 이어서, 중합체를 2일 동안 35℃에서 진공 하에 건조시켜 PLGA-라파마이신을 백색 고체 (약 6.5 g)로서 얻었다.

[0197] PLGA-라파마이신을 함유하는 나노담체를 하기와 같이 제조하였다:

[0198] 나노담체 형성을 위한 용액을 하기와 같이 제조하였다:

[0199] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 100 mg/mL의 PLGA-라파마이신. 용액은 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLGA-라파마이신을 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100 mg/mL의 PLA-PEG. 용액은 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLA-PEG를 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 3: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0200] 1차 유중수 에멀젼을 먼저 제조하였다. W1/O1은 용액 1 (0.75 mL) 및 용액 2 (0.25 mL)를 소형 압력 튜브 내에서 합하고 브랜슨 디지털 소니파이어(Branson Digital Sonifier) 250을 사용하여 40초 동안 50% 진폭으로 초음파처리하여 제조하였다. 이어서, 2차 에멀젼 (W1/O1/W2)은 용액 3 (3.0 mL)을 1차 W1/O1 에멀젼과 합하고, 10초 동안 볼텍싱하고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭으로 초음파처리하여 제조하였다. W1/O1/W2 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액 (30 mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 합성 나노담체가 형성되게 하였다. 합성 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600xg 및 4℃에서 35분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 합성 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 합성 나노담체 현탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0201] 실시예 2: 라파마이신을 함유하는 금 나노담체 (AuNC)의 제조 (예측)

[0202] HS-PEG-라파마이신의 제조:

[0203] 건조 DMF 중 PEG 산 디숙피드 (1.0 eq), 라파마이신 (2.0-2.5 eq), DCC (2.5 eq) 및 DMAP (3.0 eq) 용액을 rt에서 밤새 교반하였다. 불용성 디시클로헥실우레아를 여과에 의해 제거하고, 여과물을 이소프로필 알콜 (IPA)에 첨가하여 PEG-디숙피드-디-라파마이신 에스테르를 침전시키고, IPA로 세척하고 건조시켰다. 이어서 중합체를 DMF 중 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드로 처리하여 PEG 디숙피드를 티올 PEG 라파마이신 에스테르 (HS-PEG-라파마이신)로 환원시켰다. 생성된 중합체를 IPA로부터 침전에 의해 회수하고, 상기 기재된 바와 같이 건조시키고, H NMR 및 GPC에 의해 분석하였다.

[0204] 금 NC (AuNC)의 형성:

[0205] 1 mM HAuCl4의 500 mL 수용액을 응축기가 장착된 1 L 둥근-바닥 플라스크 내에서 격렬한 교반 하에 10분 동안 환류 가열하였다. 이어서 40 mM 시트르산삼나트륨의 50 mL 용액을 교반 용액에 신속하게 첨가하였다. 생성된 진한 와인빛 적색 용액을 25-30분 동안 환류 하에 유지시키고, 가열을 중단하고, 용액을 실온으로 냉각시켰다. 이어서 용액을 0.8 μm 막 필터를 통해 여과하여 AuNC 용액을 수득하였다. AuNC는 가시적 분광분석법 및 투과전자 현미경검사를 사용하여 특성화하였다. AuNC는 시트레이트에 의해 캡핑되어 약 20 nm 직경을 가지며 520 nm에서 피크 흡수를 나타낸다.

[0206] HS-PEG-라파마이신을 갖는 AuNC 접합체:

[0207] HS-PEG-라파마이신의 150 μl 용액 (10 mM pH 9.0 카르보네이트 완충제 중 10 μM)을 20 nm 직경의 시트레이트-캡핑된 금 나노담체 1 mL (1.16 nM)에 첨가하여 2500:1의 티올 대 금 몰비를 생성하였다. 혼합물을 아르곤 하에 실온에서 1시간 동안 교반하여 금 나노담체 상의 시트레이트에 의해 티올이 완전히 교환되게 하였다. 이어서 표면 상에 PEG-라파마이신을 갖는 AuNC를 12,000g에서 30분 동안 원심분리에 의해 정제하였다. 상청액을 경사분리한 다음, AuNC-S-PEG-라파마이신을 함유하는 펠릿을 1x PBS 완충제로 펠릿 세척하였다. 정제된 금-PEG-라파마이신 나노담체를 이어서 추가의 분석 및 생물검정을 위해 적합한 완충제 중에 재현탁시켰다.

[0208] 실시예 3: 이부프로펜이 부착된 메조다공성 실리카 나노입자 (예측)

[0209] 메조다공성 SiO2 나노입자 코어는 졸-겔 과정을 통해 생성하였다. 헥사데실트리메틸-암모늄 브로마이드 (CTAB) (0.5 g)를 탈이온수 (500 mL) 중에 용해시킨 다음, 2 M 수성 NaOH 용액 (3.5 mL)을 CTAB 용액에 첨가하였다. 용액을 30분 동안 교반한 다음, 테트라에톡시실란 (TEOS) (2.5 mL)을 용액에 첨가하였다. 생성된 겔을 80℃의 온도에서 3시간 동안 교반하였다. 형성된 백색 침전물을 여과에 의해 포획한 다음, 탈이온수로 세척하고, 실온에서 건조시켰다. 이어서 남은 계면활성제는 밤새 HCl의 에탄올성 용액 중 현탁액에 의해 입자로부터 추출하였다. 입자를 에탄올로 세척하고, 원심분리하고, 초음파처리 하에 재분산시켰다. 이러한 세척 절차를 2회 추가로 반복하였다.

[0210] 이어서 SiO2 나노입자를 (3-아미노프로필)-트리에톡시실란 (APTMS)을 사용하여 아미노 기로 관능화하였다. 이를 위해, 입자를 (30 mL) 중에 현탁시키고, APTMS (50 μL)를 현탁액에 첨가하였다. 현탁액이 실온에서 2시간 동안 정치되도록 한 다음, 주기적으로 에탄올을 첨가하여 부피 상수를 유지시키면서 4시간 동안 비등시켰다. 남은 반응물은 5회 사이클의 원심분리에 의한 세척 및 순수한 에탄올 중 재분산에 의해 제거하였다.

[0211] 개별 반응에서, 1-4 nm 직경의 금 시드를 생성하였다. 본 반응에 사용된 모든 물은 처음에는 탈이온수였고, 다음에는 유리로부터의 증류수였다. 물 (45.5 mL)을 100 mL 둥근-바닥 플라스크에 첨가하였다. 교반하면서, 0.2 M 수성 NaOH (1.5 mL)에 이어서 테트라키스(히드록시메틸)포스포늄 클로라이드 (THPC)의 1% 수용액 (1.0 mL)을 첨가하였다. THPC 용액의 첨가 2분 후에, 적어도 15분 숙성시킨 클로로금산의 10 mg/mL 수용액 (2 mL)을 첨가하였다. 금 시드를 물에 대한 투석을 통해 정제하였다.

[0212] 코어-쉘 나노담체를 형성하기 위해, 상기 형성된 아미노-관능화 SiO2 나노입자를 먼저 금 시드와 실온에서 2시간 동안 혼합하였다. 금-장식된 SiO2 입자를 원심분리를 통해 수집하고, 클로로금산 및 중탄산칼륨의 수용액과 혼합하여 금 쉘을 형성하였다. 이어서 입자를 원심분리에 의해 세척하고, 물 중에 재분산시켰다. 이부프로펜은 입자를 소듐 이부프로펜 용액 (1 mg/L) 중에 72시간 동안 현탁시켜 로딩시켰다. 이어서 유리 이부프로펜을 원심분리에 의해 입자로부터 세척하고, 물 중에 재분산시켰다.

[0213] 실시예 4: 시클로스포린 A를 함유하는 리포솜 (예측)

[0214] 리포솜을 박막 수화를 사용하여 형성하였다. 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC) (32 μmol), 콜레스테롤 (32 μmol), 및 시클로스포린 A (6.4 μmol)를 순수한 클로로포름 (3 mL)에 용해시켰다. 이러한 지질 용액을 50 mL 둥근-바닥 플라스크에 첨가하고, 용매를 60℃의 온도에서 회전 증발기 상에서 증발시켰다. 이어서 플라스크를 질소 기체로 플러싱하여 남은 용매를 제거하였다. 포스페이트 완충 염수 (2 mL) 및 5개의 유리 비드를 플라스크에 첨가하고, 60℃에서 1시간 동안 진탕시킴으로써 지질 막을 수화시켜 현탁액을 형성하였다. 현탁액을 소형 압력 튜브로 옮기고, 30초 펄스 및 각각의 펄스 사이에 30초 지연의 4주기 동안 60℃에서 초음파처리하였다. 이어서 현탁액을 실온에서 2시간 동안 비교란 상태로 두어 완전히 수화되게 하였다. 리포솜을 원심분리에 의해 세척한 다음 새로운 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0215] 실시예 5: 라파마이신을 함유하는 합성 나노담체

[0216] 물질

[0217] 라파마이신은 TSZ 켐(TSZ CHEM) (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 윌슨 스트리트 185; 제품 카탈로그 # R1017)에서 구입하였다. 76% 락티드 및 24% 글리콜리드 함량 및 0.69 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스(SurModics Pharmaceuticals) (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 7525 DLG 7A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 PEG 블록 및 대략 40,000 Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 폴리비닐 알콜 (85-89% 가수분해됨)은 EMD 케미칼스(EMD Chemicals) (제품 번호 1.41350.1001)에서 구입하였다.

[0218] 방법

[0219] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0220] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA 및 25 mg/mL의 PLA-PEG. 용액은 PLGA 및 PLA-PEG를 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0221] 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100 mg/mL의 라파마이신. 용액은 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0222] 용액 3: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0223] 수중유 에멀젼을 나노담체를 제조하는데 사용하였다. O/W 에멀젼은 용액 1 (1 mL), 용액 2 (0.1 mL), 및 용액 3 (3 mL)을 소형 압력 튜브 내에서 합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭으로 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액 (30 mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,000xg 및 4℃에서 35분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의

최종 나노담체 현탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0224] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0225]

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
227	6.4

[0226] 실시예 6: GSK1059615를 함유하는 합성 나노담체

[0227] 물질

[0228] GSK1059615는 메드켐 익스프레스(MedChem Express) (08852 뉴저지주 스위트 102D 몬마우스 정션 디어 파크 드라이브 11)에서, 제품 코드 HY-12036으로 구입하였다. 1:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 레이크쇼어 바이오머티리얼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 5050 DLG 2.5A로 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.26 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오머티어리얼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5K-E)에서 구입하였다. 셀그로(Cellgro) 포스페이트 완충 염수 1X pH 7.4 (PBS 1X)는 코닝(Corning) (20109 버지니아주 마나사스 디스커버리 불러바드 9345)에서, 제품 코드 21-040-CV로 구입하였다.

[0229] 방법

[0230] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0231] 용액 1: PLGA (125 mg) 및 PLA-PEG-OMe (125 mg)를 아세톤 10 mL 중에 용해시켰다. 용액 2: GSK1059615는 N-메틸-2-피롤리디논 (NMP) 1 mL 중 10 mg으로 제조하였다.

[0232] 나노담체는 용액 1 (4 mL) 및 용액 2 (0.25 mL)를 소형 유리 압력 튜브 내에서 합하고, 혼합물을 20 mL의 초-순수를 함유하는 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반 하에 적가하여 제조하였다. 플라스크를 회전 증발 장치 상에 장착하고, 감압 하에 아세톤을 제거하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600 rcf 및 4℃에서 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 이어서 세척된 나노담체 용액을 폴(Pall), 파트 번호 4656으로부터의 1.2μm PES 막 시린지 필터를 사용하여 여과하였다. 동일한 나노담체 용액을 상기와 같이 제조하고, 여과 단계 후에 제1과 풀링하였다. 균질한 현탁액을 -20℃에서 동결 보관하였다.

[0233] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 GSK1059615의 양은 351nm에서 UV 흡수에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0234]

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

[0235] 실시예 7: 합성 나노담체를 사용한 CD4+ 조절 T 세포의 유도

[0236] 물질

[0237] 라파마이신을 TSZ 켐 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 윌슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 7525 DLG 7A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 엠프로브 (EMPROVE)® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa·s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0238] 방법

[0239] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0240] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0241] 수중유 에멀젼을 나노담체를 제조하는데 사용하였다. O/W 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 압력 튜브 내에서 합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭으로 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600xg 및 4℃에서 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 현탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0242] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0243]

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
241	11.1

[0244] CD4+ 조절 T 세포의 발생에 대한 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 효과의 결정을 모니터링하기 위해, CD4+ T 세포를 자기-활성화 세포 소팅 (MACS)에 의한 음성 선택을 사용하여 트랜스제닉 마우스 계통 OTII로부터 정제하였다. OTII 마우스는 닭 오브알부민 펩티드 $OVA_{323-339}$에 특이적인 T 세포 수용체를 발현한다. 단리 후에, $4x10^6$개의 CD4+ OTII 세포를, 범-백혈구 마커 CD45.1 (*Ptprc*^{a}) (SJL-*Prprc*^{a}/BoyAiTac)을 유사유전자형으로 발현하는 SJL 마우스 내에 전달하였다. 수용자 동물은 미처리된 상태로 존재하거나 (PBS 주사) 또는 제1일 및 제5일에 나노담체 단독을 함유하는 라파마이신 (NP[Rapa]), 유리 $OVA_{323-339}$ 펩티드 (fOPII.323) 또는 나노담체를 함유하는 라파마이신과 $OVA_{323-339}$ 펩티드의 조합으로 뒷다리에 피하 주사함으로써 처리하였다.

[0245] 지시된 처리의 제2 투여 후 5일째인 제10일에, 동물을 희생시키고, 주사 부위를 배수시키는 슬와 림프절을 수거하여 발생 상태를 분석하고 SJL 마우스 내로 전달된 CD4+ OTII 세포를 유동 세포측정법에 의해 정량화하였다.

[0246] 도 1에 나타난 바와 같이, 미처리되었거나 (PBS) 또는 나노담체를 함유하는 라파마이신 (NP[Rapa])만을 제공받은 동물은 항-CD25 및 항-Foxp3 항체에 의한 염색을 특징으로하는 조절 T 세포 표현형 (CD25+Fox3p+)을 획득한 OTII 세포의 소수 내지 검출불가능한 수준을 가졌다. 유리 OVA 펩티드 (fOPII.323)의 투여는 CD25+Fox3p+ 세포의 비율의 검출가능한 증가를 가져왔지만 만족스럽게 유의한 증가를 가져오지는 않았다. 대조적으로, OVA 펩티드와 병용하여 나노담체를 함유하는 라파마이신을 투여하는 것은 CD25+ Fox3p+ 세포의 강건한 집단을 생성하였으며, 이는 조합 치료가 큰 비율의 전달된 CD4+ OTII를 조절 T 세포 (Treg)로 발생하도록 유도하였다는 것을 나타낸다.

[0247] 이들 결과는 본원에 제공된 면역억제제가 항원과 병용 투여되는 경우에 조절 면역 반응의 형성, 예컨대 항원에 특이적인 CD4+ 조절 T 세포의 백분율의 증진을 유도할 수 있다는 것을 제시한다.

[0248] 실시예 8: 항-PEG 면역 반응의 평가

[0249] 물질

[0250] 라파마이신을 TSZ 켐 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 윌슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 7525 DLG 7A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa·s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지

주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0251] 방법

[0252] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0253] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0254] 수중유 에멀젼을 나노담체를 제조하는데 사용하였다. O/W 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 압력 튜브 내에서 합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭으로 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600xg 및 4℃에서 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 현탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0255] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0256]

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
238	10.6

[0257] C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷에게 키홀 림펫 헤모시아닌 및 폴리에틸렌 글리콜의 접합체 (KLH-PEG) 250 μg을 매주 (제0일, 제7일, 제14일, 제21일, 제28일, 제35일, 제42일, 제49일), 첫번째 5회 주사에 대해서는 0.47mg의 라파마이신-함유 나노담체 (NP[Rapa], 50 μg의 라파마이신 함량)와 함께 (제0일, 제7일, 제14일, 제21일, 제28일) 또는 그 없이 꼬리 정맥에 i.v. 주사하였다. 뒤에 오는 3회의 주사는 동일한 양의 KLH-PEG로만 이루어졌다. PEG에 대한 IgM 항체 반응을 이들 동물의 혈액에서 매주 (제12일, 제20일, 제34일, 제40일, 제47일, 제54일) 모니터링하였다.

[0258] 도 2에 나타난 바와 같이, i.v.로 동일한 용액으로 KLH-PEG와 병용 투여된 합성 나노담체의 5회 용량은 PEG에 대한 항체 형성을 방지하는데 효과적이었다. 이들 결과는 PEG화 단백질과 병용 투여된 라파마이신-함유 나노담체가 PEG에 대한 항체 형성을 감소시키거나 또는 방지할 수 있음을 제시한다. 따라서 본원에 제공되 바와 같은 치료 방법의 사용은 치료 단백질, 예컨대 PEG화 치료 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 감소시키는데 사용될 수 있다. 데이터는 또한 이러한 효과를 달성하기 위한 투여 스케줄을 입증한다.

[0259] 실시예 9: 합성 나노담체를 사용하는 인자 VIII-특이적 CD4+ Treg의 증진 (예측)

[0260] 가용성 인자 VIII 및 실시예 1의 합성 나노담체를 사용하여 비-인간 영장류 대상체에 대해 파일럿 시험을 수행하였으며, 이때 인자 VIII 및 합성 나노담체는 투여 전에 공동-제제화되지 않았다. 50마리의 비-인간 영장류 대상체를 5개의 아암에 무작위로 배정하였다: 위약, 및 이어서 용량 범위설정을 위해 선택된 4개 용량 수준의 합성 나노담체. 용량 범위설정은 인자 VIII-특이적일 CD4+ Treg (CD4+ 조절 T 세포)의 최적 증진을 선택하도록 확립되었다. 제0일에, 각 활성 아암의 대상체 모두에게 합성 나노담체의 용량을 피하로 투여하고, 합성 나노담체 투여 24시간 내에 인자 VIII의 표준 주입 용량을 주입하였다. 2주 후에, 각 동물을 가용성 인자 VIII의 표준 용량으로 챌린지하고, 인자 VIII-특이적 CD4+ Treg의 수 또는 백분율을 표준 기술을 사용하여 측정하였다. 인자 VIII-특이적 CD4+ Treg의 유의한 증진을 보여주는, 4개 활성 아암 중으로부터의 합성 나노담체의 최하위 용량을 시험 용량으로서 선택하였다.

[0261] 이어서, 합성 나노담체의 시험 용량을 인간 대상체에게의 투여에 대해 알로메트릭 스케일링하고, 가용성 인자 VIII의 표준 용량과 함께 사용된 합성 나노담체의 투여 용량 수준의 범위를 결정하기 위해 인간 임상 시험에 사용하였다. 또한, 인자 VIII 및 합성 나노담체는 투여 전에 공동-제제화되지 않았다. 이어서, 합성 나노담체 및 인자 VIII의 공동-제제화되지 않은 투여 용량을 정규 임상 실시에 이용가능하게 만들었다.

[0262] 실시예 10: 합성 삼투 펌프를 사용하는 인자 VIII-특이적 CD4+ Treg의 증진 (예측)

[0263] 가용성 인자 VIII 및 삼투 펌프 (실시예 6의 라파마이신 대신 GSK1059615를 사용하여 실시예 6에 따라 일반적으

로 제조됨)를 사용하여 비-인간 영장류 대상체에 대해 파일럿 시험을 수행하였으며, 이때 인자 VIII 및 삼투 펌프는 투여 전에 공동-제제화되지 않았다. 50마리의 비-인간 영장류 대상체를 5개의 아암에 무작위로 배정하였다: 위약, 및 이어서 삼투 펌프에 의해 전달되고 용량 범위설정을 위해 선택된 4개 용량 수준의 GSK1059615. 용량 범위설정은 인자 VIII-특이적일 CD4+ Treg의 최적 증진을 선택하도록 확립되었다. 제0일에, 각 활성 아암의 대상체 모두에게 합성 나노담체의 용량을 피하로 투여하고, 합성 나노담체 투여 24시간 내에 인자 VIII의 표준 주입 용량을 주입하였다. 2주 후에, 각 동물을 가용성 인자 VIII의 표준 용량으로 챌린지하고, 인자 VIII-특이적 CD4+ Treg의 수 또는 백분율을 표준 기술을 사용하여 측정하였다. 인자 VIII-특이적 CD4+ Treg의 유의한 증진을 보여주는, 4개 활성 아암 중으로부터의 삼투 펌프에 의해 전달된 GSK1059615의 최하위 용량을 시험 용량으로서 선택하였다.

[0264] 이어서, 삼투 펌프에 의해 전달된 GSK1059615의 시험 용량을 인간 대상체에게의 투여에 대해 알로메트릭 스케일링하고, 가용성 인자 VIII의 표준 용량과 함께 사용된 삼투 펌프에 의해 전달된 GSK1059615의 투여 용량 수준의 범위를 결정하기 위해 인간 임상 시험에 사용하였다. 또한, 인자 VIII 및 삼투 펌프는 투여 전에 공동-제제화되지 않았다. 이어서, 삼투 펌프에 의해 전달된 GSK1059615 및 인자 VIII의 공동-제제화되지 않은 투여 용량을 정규 임상 실시에 이용가능하게 만들었다.

[0265] 실시예 11: 치료 폴리뉴클레오티드를 사용하는 특이적 CD4+ Treg의 증진 (예측)

[0266] 아스파라기나제를 코딩하는 mmRNA (미국 특허 출원 2013/0115272 (de Fougerolles et al.)에 따른 제조에 따라 일반적으로 제조됨 ("mmRNA")) 및 실시예 1의 합성 나노담체를 사용하여 비-인간 영장류 대상체에 대해 파일럿 시험을 수행하였으며, 이때 mmRNA 및 합성 나노담체는 투여 전에 공동-제제화되지 않았다. 50마리의 비-인간 영장류 대상체를 5개의 아암에 무작위로 배정하였다: 위약, 및 이어서 용량 범위설정을 위해 선택된 4개 용량 수준의 합성 나노담체. 용량 범위설정은 mmRNA-특이적일 CD4+ Treg의 최적 증진을 선택하도록 확립되었다. 제0일에, 각 활성 아암의 대상체 모두에게 합성 나노담체의 용량을 피하로 투여하고, 합성 나노담체 투여 24시간 내에 인자 VIII의 표준 주입 용량을 주입하였다. 2주 후에, 각 동물을 mmRNA의 표준 용량으로 챌린지하고, mmRNA 특이적 CD4+ Treg의 수 또는 백분율을 표준 기술을 사용하여 측정하였다. mmRNA 특이적 CD4+ Treg의 유의한 증진을 보여주는, 4개 활성 아암 중으로부터의 합성 나노담체의 최하위 용량을 시험 용량으로서 선택하였다.

[0267] 이어서, 합성 나노담체의 시험 용량을 인간 대상체에게의 투여에 대해 알로메트릭 스케일링하고, mmRNA의 표준 용량 수준과 함께 사용된 합성 나노담체의 투여 용량의 범위를 결정하기 위해 인간 임상 시험에 사용하였다. 또한, mmRNA 및 합성 나노담체는 투여 전에 공동-제제화되지 않았다. 이어서, 합성 나노담체 및 mmRNA의 공동-제제화되지 않은 투여 용량을 정규 임상 실시에 이용가능하게 만들었다.

[0268] 실시예 12: 항-PEG 면역 반응의 평가 (예측)

[0269] C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷에게 키홀 림펫 헤모시아닌 및 폴리에틸렌 글리콜의 접합체 (KLH-PEG) 250㎍을 매주 (제0일, 제7일, 제14일, 제21일, 제28일, 제35일, 제42일, 제49일), 첫번째 5회 주사에 대해서는 0.47mg의 나노결정질 라파마이신과 함께 (제0일, 제7일, 제14일, 제21일, 제28일) 또는 그 없이 꼬리 정맥에 i.v. 주사하였다. 뒤에 오는 3회의 주사는 동일한 양의 KLH-PEG로만 이루어졌다. PEG에 대한 IgM 항체 반응을 이들 동물의 혈액에서 매주 (제12일, 제20일, 제34일, 제40일, 제47일, 제54일) 모니터링하였다.

[0270] 단지 KLH-PEG (및 나노결정질 라파마이신 부재)를 제공받은 동물과 비교하여 KLH-PEG와 병용으로 나노결정질 라파마이신의 용량을 제공받은 동물에서 KLH-특이적 IgM 항체의 역가가 감소하였다는 것은, 라파마이신의 나노결정질 형태가 PEG화 단백질과 병용투여될 때 항체 형성을 감소시키거나 또는 방지할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0271] 실시예 13: 합성 나노담체를 사용하는 인자 VIII-특이적 CD4+ Treg의 증진 (예측)

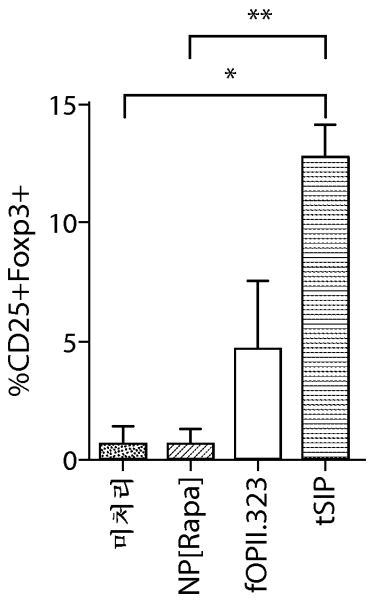
[0272] 가용성 인자 VIII 및 나노결정질 라파마이신을 사용하여 비-인간 영장류 대상체에 대해 파일럿 시험을 수행하였으며, 이때 인자 VIII 및 나노결정질 라파마이신은 투여 전에 공동-제제화되지 않았다. 50마리의 비-인간 영장류 대상체를 5개의 아암에 무작위로 배정하였다: 위약, 및 이어서 용량 범위설정을 위해 선택된 4개 용량 수준의 나노결정질 라파마이신. 용량 범위설정은 인자 VIII-특이적일 CD4+ Treg (CD4+ 조절 T 세포)의 최적 증진을 선택하도록 확립되었다. 제0일에, 각 활성 아암의 대상체 모두에게 나노결정질 라파마이신의 용량을 피하로 투여하고, 나노결정질 라파마이신 투여 24시간 내에 인자 VIII의 표준 주입 용량을 주입하였다. 2주 후에, 각 동물을 가용성 인자 VIII의 표준 용량으로 챌린지하고, 인자 VIII-특이적 CD4+ Treg의 수 또는 백분율을 표준 기술을 사용하여 측정하였다. 인자 VIII-특이적 CD4+ Treg의 유의한 증진을 보여주는, 4개 활성 아암 중으로부터

의 나노결정질 라파마이신의 최하위 용량을 시험 용량으로서 선택하였다.

[0273] 이어서, 나노결정질 라파마이신의 시험 용량을 인간 대상체에게의 투여에 대해 알로메트릭 스케일링하고, 가용성 인자 VIII의 표준 용량과 함께 사용된 나노결정질 라파마이신의 투여 용량 수준의 범위를 결정하기 위해 인간 임상 시험에 사용하였다. 또한, 인자 VIII 및 나노결정질 라파마이신은 투여 전에 공동-제제화되지 않았다. 이어서, 나노결정질 라파마이신 및 인자 VIII의 공동-제제화되지 않은 투여 용량을 정규 임상 실시에 이용가능하게 만들었다.

도면

도면1



도면2

