(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0015425
(43) 공개일자 2022년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 31/573 (2021.01) *A61K 9/51* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/0083 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7042162
(22) 출원일자(국제) 2020년05월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년12월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/034865
(87) 국제공개번호 WO 2020/243261
국제공개일자 2020년12월03일
(30) 우선권주장
62/853,647 2019년05월28일 미국(US)

(71) 출원인
셀렉타 바이오사이언시즈, 인크.
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 그로브 스트리트 65
(72) 발명자
키시모토, 다까시, 케이
미국 02420 메사추세츠주 렉싱턴 쿨리지 애비뉴 46
일인스키, 페트르
미국 02140 메사추세츠주 캠브리지 펨버톤 스트리트 177 유닛 13
(74) 대리인
양영준, 김영

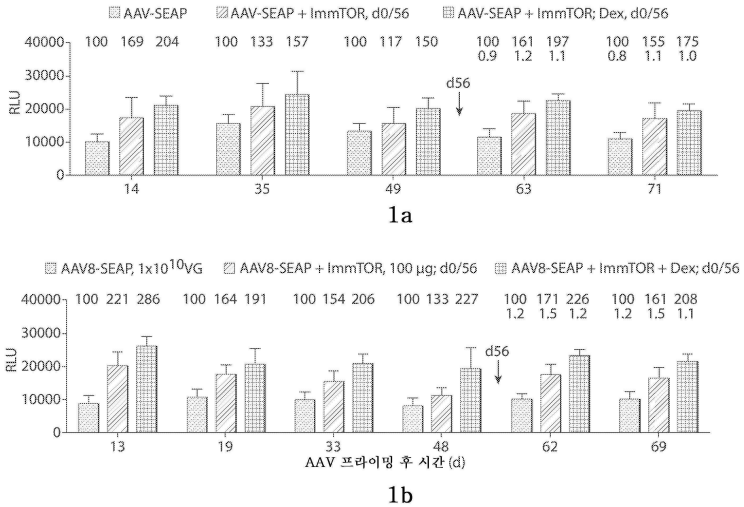
전체 청구항 수 : 총 58 항

(54) 발명의 명칭 **약화된 항바이러스 전달 벡터 면역 반응을 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

바이러스 전달 벡터를, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드와 조합하여 투여하기 위한 방법 및 관련 조성물 또는 키트가 본원에 제공된다.

대 표 도



1a

1b

(52) CPC특허분류
A61K 31/573 (2013.01)
A61K 48/0075 (2013.01)
A61K 9/5153 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

바이러스 전달 벡터, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 및 나노담체에 커플링되지 않은 코르티코스테로이드

를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 코르티코스테로이드가 베타메타손, 코르티손, 덱사메타손, 에타메타손, 히드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 프레디니솔론, 및 트리암시놀론으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 코르티코스테로이드가 덱사메타손인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 레트로바이러스 전달 벡터, 아데노바이러스 전달 벡터, 렌티바이러스 전달 벡터 또는 아데노-연관 바이러스 전달 벡터인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 아데노바이러스 전달 벡터이고, 아데노바이러스 전달 벡터가 하위군 A, 하위군 B, 하위군 C, 하위군 D, 하위군 E, 또는 하위군 F 아데노바이러스 전달 벡터인 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 렌티바이러스 전달 벡터이고, 렌티바이러스 전달 벡터가 HIV, SIV, FIV, EIAV 또는 양 렌티바이러스 벡터인 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 아데노-연관 바이러스 전달 벡터이고, 아데노-연관 바이러스 전달 벡터가 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 또는 AAV11 아데노-연관 바이러스 전달 벡터인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 키메라 바이러스 전달 벡터인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 키메라 바이러스 전달 벡터가 AAV-아데노바이러스 전달 벡터인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진이 유전자 요법 트랜스진, 유전자 편집 트랜스진, 엑손 스키핑 트랜스진 또는 유전자 발현 조정 트랜스진을 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체가 지질 나노입자, 중합체 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀젼, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 또는 펩티드 또는 단백질 입자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 합성 나노담체가 중합체 나노입자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 중합체 나노입자가 비-메톡시-말단, 플루로닉 중합체가 아닌 중합체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 중합체 나노입자가 폴리에스테르, 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 폴리사카라이드, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함하는 것인 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 폴리에스테르가 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 중합체 나노입자가 폴리에스테르 및 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함하는 것인 조성물.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리에테르가 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체 집단의 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균이 110nm 초과의 직경인 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 직경이 150nm 초과인 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 직경이 200nm 초과인 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 직경이 250nm 초과인 조성물.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 직경이 5㎛ 미만인 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 직경이 4㎛ 미만인 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 직경이 3㎛ 미만인 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 직경이 2㎛ 미만인 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 직경이 1㎛ 미만인 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 직경이 500nm 미만인 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 직경이 450nm 미만인 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 직경이 400nm 미만인 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 직경이 350nm 미만인 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 직경이 300nm 미만인 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체에 포함된 면역억제제의 로드가 합성 나노담체에 걸쳐 평균 0.1% 내지 50% (중량/중량)인 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 로드가 0.1% 내지 40%, 35%, 30% 또는 25%인 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 로드가 1% 내지 40%, 35%, 30% 또는 25%인 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 로드가 2%, 4% 또는 8% 내지 40%, 35%, 30% 또는 25%인 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 로드가 2%, 4% 또는 8% 내지 20%, 2%, 4% 또는 8% 내지 15%, 또는 2%, 4% 또는 8% 내지 10%인 조성물.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 NF-kB 경로의 억제제인 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 mTOR 억제제인 조성물.

청구항 39

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 라파로그인 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 면역억제제가 라파마이신인 조성물.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체 집단의 종횡비가 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 이상인 조성물.

청구항 42

대상체에게 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 나노담체에 커플링되지 않은 코르티코스테로이드를 병용 투여함으로써, 대상체에서 항바이러스 벡터 약화된 반응을 확립하는 것

을 포함하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 항바이러스 전달 벡터 약화된 반응이 바이러스 전달 벡터에 대한 IgG 또는 IgM 반응인 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 코르티코스테로이드의 적어도 1회의 반복 용량을 추가로 포함하는 방법.

청구항 45

제42항 또는 제43항에 있어서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 코르티코스테로이드의 적어도 2회의 반복 용량을 추가로 포함하는 방법.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 항바이러스 벡터 약화된 반응이, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 코르티코스테로이드의 적어도 반복 용량 동안 유지되는 것인 방법.

청구항 47

대상체에게 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 나노담체에 커플링되지 않은 코르티코스테로이드를 대상체에게 반복적으로, 병용 투여함으로써, 대상체에서 바이러스 전달 벡터의 트랜스진 발현을 확대시키는 것

을 포함하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 코르티코스테로이드의 적어도 1, 2 또는 3회의 병용 투여를 포함하는 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 바이러스 전달 벡터의 확대된 트랜스진 발현이, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 코르티코스테로이드의 적어도 1, 2 또는 3회의 병용 투여 동안 유지되는 것인 방법.

청구항 50

제42항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 코르티코스테로이드가 덱사메타손인 방법.

청구항 51

제42항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 것인 방법.

청구항 52

제42항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체가 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 것인 방법.

청구항 53

제42항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 병용 투여가 동시 투여인 방법.

청구항 54

제42항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 전달 벡터 및/또는 합성 나노담체가 정맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 55

제42항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 코르티코스테로이드가 정맥내로 또는 경구로 투여되는 것인 방법.

청구항 56

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항의 조성물 및 사용에 대한 지침서를 포함하는 키트.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 바이러스 전달 벡터, 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 합성 나노담체, 제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 코르티코스테로이드, 및 사용에 대한 지침서를 포함하는 키트.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 사용에 대한 지침서가 제42항 내지 제55항 중 어느 한 항의 방법을 수행하는 것에 대한 지침서를 포함하는 것인 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 하에 2019년 5월 28일에 출원된 미국 가출원 번호 62/853,647의 이익을 주장하며, 그의 전체 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 대상체에게 바이러스 전달 벡터를, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드와 함께 투여하기 위한 방법 및 관련 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, 방법 및 조성물은 증가된 트랜스진 발현 및/또는 바이러스 전달 벡터에 대한 약화된 면역 반응을 달성하고, 보다 바람직하게는 증가된 트랜스진 발현 및/또는 바이러스 전달 벡터에 대한 약화된 면역 반응은 바이러스 전달 벡터, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드의 다중, 예를 들어 2, 3회 또는 그 초과의 투여에 걸쳐 유지된다.

발명의 내용

[0005] 한 측면에서, 대상체에게 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 나노담체에 커플링되지 않은 코르티코스테로이드를 병용 투여함으로써, 대상체에서 항바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 확립하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.

[0006] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항바이러스 전달 벡터 약화된 반응은 바이러스 전달 벡터에 대한 IgG 및/또는 IgM 반응이다.

[0007] 또 다른 측면에서, 대상체에게 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 나노담체에 커플링되지 않은 코르티코스테로이드를 반복적으로, 병용 투여함으로써, 대상체에서 바이러스 전달 벡터의 트랜스진 발현을 확대시키는 것을 포함하는 방법이 제공된다.

[0008] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 바이러스 전달 벡터, 및 나노담체에 커플링되지 않은 코르티코스테로이드의 병용 투여는 반복된다 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는

5회).

[0009] 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터는 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터 중 어느 하나, 예컨대 청구항 중 어느 한 항에 정의된 이러한 벡터 중 어느 하나이다.

[0010] 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 합성 나노담체 중 어느 하나, 예컨대 청구항 중 어느 한 항에 정의된 이러한 합성 나노담체 중 어느 하나이다.

[0011] 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 코르티코스테로이드는 베타메타손, 코르티손, 덱사메타손, 에타메타손, 히드로코르티손, 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 프레디니솔론, 및 트리암시놀론으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0012] 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 코르티코스테로이드는 전신 투여되거나 또는 전신 전달을 위해 제제화된다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 조성물 또는 조성물의 조합 중 어느 하나를 포함하는 키트가 제공된다. 제공된 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 키트는 사용에 대한 지침서를 추가로 포함한다. 제공된 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 사용에 대한 지침서는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나를 수행하는 것에 대한 지침서를 포함한다.

[0014] 또 다른 측면에서, 실시예 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 방법 또는 조성물이 제공된다.

[0015] 또 다른 측면에서, 조성물 중 어느 하나는 제공된 방법 중 어느 하나에서 사용하기 위한 것이다.

[0016] 또 다른 측면에서, 방법 또는 조성물 중 어느 하나는 본원에 기재된 질환 또는 상태 중 어느 하나를 치료하는데 사용하기 위한 것이다. 또 다른 측면에서, 방법 또는 조성물 중 어느 하나는 항바이러스 전달 벡터 반응 (예를 들어, IgG 및/또는 IgM 반응)을 약화시키고/거나, 약화된 항바이러스 전달 벡터 반응 (예를 들어, IgG 및/또는 IgM 반응)을 확립하고/거나, 트랜스진 발현을 확대시키고/거나, 바이러스 전달 벡터의 반복 투여를 위해 사용하기 위한 것이다.

[0017] 또 다른 측면에서, 실시예의 작용제의 임의의 조합을 투여하는 방법이 제공된다. 또 다른 측면에서, 작용제의 이들 조합 중 어느 하나를 포함하는 조성물 또는 키트가 또한 제공된다.

[0018] 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법, 조성물 또는 키트는 또 다른 면역 반응, 예컨대 체액성 또는 세포성 면역 반응에 더하여 IgG 및/또는 IgM 반응을 약화시키기 위한 것이다.

[0019] 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법, 조성물 또는 키트는 트랜스진 발현을 증가시키는 것에 더하여 IgG 및/또는 IgM 반응을 약화시키기 위한 것이다.

[0020] 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법, 조성물 또는 키트는 또 다른 면역 반응, 예컨대 체액성 또는 세포성 면역 반응에 더하여 IgG 및/또는 IgM 반응을 약화시키고, 뿐만 아니라 트랜스진 발현을 증가시키기 위한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a-1b는 혈청 SEAP 발현을 보여준다. 동일한 AAV, ImmTOR™ 및 덱사메타손 (Dex) 주사 스케줄 및 유사한 채혈 스케줄을 사용한 2가지의 유사한 연구가 도 1a 및 도 1b에 제시된다. 각 시점에 대한 발현 수준을 100으로서의 비처리 마우스에서의 발현 수준에 대비하여 표시하였고 (윗줄), 부스팅-후 대 부스팅-전 비도 포스팅하였다 (아랫줄).

도 2a-2b는 혈청 SEAP 발현을 보여준다. 동일한 AAV, ImmTOR™ 및 덱사메타손 (Dex) 주사 스케줄 및 유사한 채혈 스케줄을 사용한 2가지의 유사한 연구가 도 2a 및 도 2b에 제시된다. 각 시점에 대한 발현 수준을 100으로서의 비처리 마우스에서의 발현 수준에 대비하여 표시하였고 (윗줄), 부스팅-후 대 부스팅-전 비도 포스팅하였다 (아랫줄). 부스팅은 화살표로 제시되고, d20에서의 모든 군에서의 상대적 SEAP 발현은 도 2a에서 점선으로 표시된다.

도 3은 AAV에 대한 IgM 반응의 역학을 보여준다. 동일한 AAV, ImmTOR™ 및 덱사메타손 (Dex) 주사 스케줄 및 유사한 채혈 스케줄을 사용한 2가지 유사한 연구를 실행하였고, 그의 IgM 분석의 데이터를 통합하였다. 부스팅은 화살표로 제시된다.

도 4는 AAV에 대한 IgG 반응의 역학을 보여준다. 도 1b에 제시된 것과 동일한 연구로부터의 샘플을 ELISA에서 AAV에 대한 그의 IgG의 수준에 대해 분석하였다. 부스팅은 화살표로 제시된다. (전체 중에서) 제104일까지 ImmTOR™ 단독으로 또는 덱사메타손과 조합되어 처리된 군에서의 IgG-양성 마우스의 수가 제시된다.

도 5a는 최고 OD (D6, 13, 20, 34, 49, 62, 69, 76, 90, 104, 142, 154, 161, 168, 182, 196, 및 231)에 대한 AAV IgM을 보여준다. 도 5b는 최고 OD (d231)에 대한 AAV IgM을 보여준다.

도 6은 AAV-SEAP, AAV-SEAP + ImmTOR, AAV-SEAP + ImmTOR/Dex, 및 AAV-SEAP/Dex에 대한 항-AVV IgG 최고 OD (450-570)를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 특정하게 예시된 물질 또는 공정 파라미터로 제한되지 않으며, 물론 변경될 수 있는 것으로 이해해야 한다. 본원에 사용된 용어는 단지 본 발명의 특정한 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 설명하기 위한 대체 용어의 사용을 제한하고자 하는 것이 아님을 이해해야 한다.

[0023] 본원에 인용된 모든 공개, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 이와 같이 참조로 포함되는 것은, 본원에 인용된 포함되는 공개, 특허 및 특허 출원 중 임의의 것이 선행 기술을 구성한다는 것을 인정하는 것으로 의도되지 않는다.

[0024] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 내용이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 예를 들어, "중합체"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 분자의 혼합물 또는 상이한 분자량의 단일 중합체 종의 혼합물을 포함하고, "합성 나노담체"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 합성 나노담체의 혼합물 또는 복수의 이러한 합성 나노담체를 포함하며, "DNA 분자"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 DNA 분자의 혼합물 또는 복수의 이러한 DNA 분자를 포함하고, "면역억제제"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 면역억제제 분자의 혼합물 또는 복수의 이러한 면역억제제 분자를 포함하는 등이다.

[0025] 본원에 사용된 용어 "포함하다" 또는 그의 변형, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 임의의 나열된 정수 (예를 들어, 특색, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 정수들 군 (예를 들어, 특색들, 요소들, 특징들, 특성들, 방법/공정 단계들 또는 제한들)을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수들 군을 배제하지 않는다는 것을 표시하는 것으로 판독되어야 한다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "포함하는"은 포괄적이며 추가의 나열되지 않은 정수 또는 방법/공정 단계를 배제하지 않는다.

[0026] 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 실시양태에서, "포함하는"은 "로 본질적으로 이루어진" 또는 "로 이루어진"으로 대체될 수 있다. 어구 "로 본질적으로 이루어진"은 명시된 정수(들) 또는 단계뿐만 아니라 청구된 본 발명의 특징 또는 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 요구하기 위해 본원에 사용된다. 본원에 사용된 용어 "로 이루어진"은 나열된 정수 (예를 들어, 특색, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 정수들 군 (예를 들어, 특색들, 요소들, 특징들, 특성들, 방법/공정 단계들 또는 제한들) 단독의 존재를 표시하기 위해 사용된다.

[0027] A. 서론

[0028] 바이러스 전달 벡터는 유전자 요법, 유전자 편집, 유전자 발현 조정 및 엑손 스키핑과 같은 다양한 적용을 위한 유망한 치료제이다. 따라서, 바이러스 전달 벡터는 치료 단백질 또는 핵산을 코딩하는 트랜스진을 포함할 수 있다. 불행하게도, 이들 치료제의 유망성은 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응으로 인해 많은 부분에 있어서 완전히 실현되지 못하였다.

[0029] 그러나, 유전자 요법 및 다른 적용에서 바이러스 벡터의 사용은 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응, 예를 들어 IgG 및 IgM 항체 반응으로 인해 제한되었다. 또한, 이러한 면역 반응은, 예를 들어 감소된 트랜스진 발현에 의해 제시되는 바와 같이, 바이러스 벡터의 감소된 효능을 발생시킬 수 있다. 바이러스 벡터에 대한 세포성 및 체액성 면역 반응 둘 다는 효능을 저하시키고/거나 이러한 치료제를 사용하는 능력을 감소시킬 수 있다. 이들 면역 반응은 항체 반응을 포함하고, 바이러스 벡터의 바이러스 항원, 예컨대 바이러스 캡시드 또는 코트 단백질, 또는 그의 펩티드에 특이적일 수 있다.

[0030] 본 발명자들은 놀랍게도, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드, 예를 들어 나노담체에 커플링되지 않은 코르티코스테로이드를 바이러스 전달 벡터와 함께 병용 투여하는 것이, 예를 들어 바이러스 전달 벡터 단독을 투여받은 대상체에 비해, 대상체에서 약화된 면역 반응, 예를 들어 감소된 IgG 및/또는 IgM 항

체 반응, 및/또는 개선된 트랜스진 발현을 달성할 수 있다는 것을 발견하였다. 중요한 것으로, 이러한 효과는 바이러스 전달 벡터, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드의 다중, 예를 들어 2, 3회 또는 그 초과의 투여에 걸쳐 유지된다.

[0031] 치료를 위해 바이러스 전달 벡터를 효과적으로 사용하는 것에 대한 장애물의 해결책을 제공하는 방법 및 조성물이 본원에 제공된다. 특히, 예상외로, 본원에 제공된 방법 및 관련 조성물을 이용하여 항바이러스 전달 벡터 면역 반응을 단독으로 또는 다른 면역 반응과 조합하여 약화시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다. 방법 및 조성물은 바이러스 전달 벡터를 이용한 치료의 효능을 증가시킬 수 있고, 특히 바이러스 전달 벡터, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드의 투여가 반복되는 경우, 예를 들어 2, 3회 또는 그 초과로 투여되는 경우, 면역 약화를 제공할 수 있다.

[0032] 본 발명은 지금부터 하기에서 보다 상세하게 기재될 것이다.

[0033] B. 정의

[0034] "투여하는" 또는 "투여" 또는 "투여하다"는 약리학상 유용한 방식으로 물질을 대상체에게 제공하거나 또는 투약하는 것을 의미한다. 용어는 "투여되도록 하는 것"을 포함하는 것으로 의도된다. "투여되도록 하는 것"은 또 다른 당사자가 물질을 투여하도록 직접적으로 또는 간접적으로 유발, 촉구, 장려, 조장, 유도 또는 지시하는 것을 의미한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 바이러스 전달 벡터를 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드와 병용 투여하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 병용 투여는 반복적으로 수행된다. 추가 실시양태에서, 병용 투여는 동시 투여이다.

[0035] 본원에 제공된 바와 같이 대상체에게 투여하기 위한 조성물 또는 투여 형태의 맥락에서 "유효한 양"은 대상체에서 한 가지 이상의 목적하는 결과, 예를 들어 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응, 예컨대 IgG 또는 IgM 반응의 감소 또는 제거, 또는 항바이러스 전달 벡터 약화된 반응의 생성을 발생시키는 조성물 또는 투여 형태의 양을 지칭한다. 유효한 양은 시험관내 또는 생체내 목적을 위한 것일 수 있다. 생체내 목적을 위한 양은 바이러스 전달 벡터의 투여에 따른 결과로서 바람직하지 않은 면역 반응을 경험할 수 있는 대상체에 대해 임상 이익을 가질 수 있을 것으로 임상의가 믿는 양일 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에서, 투여되는 조성물(들)은 본원에 제공된 바와 같은 유효한 양 중 어느 하나일 수 있다.

[0036] 유효한 양은 바람직하지 않은 면역 반응의 수준을 감소시키는 것을 수반할 수 있지만, 일부 실시양태에서, 이는 바람직하지 않은 면역 반응을 완전히 방지하는 것을 수반한다. 유효한 양은 또한, 바람직하지 않은 면역 반응의 발생을 지연시키는 것을 수반할 수 있다. 유효한 양은 또한, 목적하는 치료 종점 또는 목적하는 치료 결과를 발생시키는 양일 수 있다. 유효한 양은 바람직하게, 대상체에서 항원, 예컨대 바이러스 전달 벡터 항원에 대한 면역관용성 면역 반응을 발생시킨다. 유효한 양은 또한 바람직하게, 증가된 트랜스진 발현을 발생시킬 수 있다 (트랜스진은 바이러스 전달 벡터에 의해 전달됨). 이는 대상체 내의 다양한 관심 조직 또는 시스템에서 트랜스진 발현을 측정함으로써 결정될 수 있다. 이러한 증가된 발현은 국부로 또는 전신으로 측정될 수 있다. 유효량은 또한 본원에 기재된 바와 같은 결과 중 1종 이상을 달성하는 양일 수 있다. 유효량은 또한 대상체에 대한 치료 효능에 유익한 임의의 바람직한 결과를 생성하는 양일 수 있다. 상기 중 임의의 것의 달성은 상용 방법에 의해 모니터링될 수 있다.

[0037] 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 유효한 양은 목적하는 면역 반응, 예컨대 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응의 감소 또는 제거 또는 항바이러스 전달 벡터 약화된 반응의 생성을 대상체에서 적어도 1주, 적어도 2주 또는 적어도 1개월 동안 지속시키는 양이다. 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 유효한 양은 목적하는 면역 반응을 대상체에서 조성물 또는 투여 형태의 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5회의 투여 동안 지속시키는 양이다. 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 유효한 양은 측정가능한 목적하는 면역 반응, 예컨대 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응의 감소 또는 제거, 또는 항바이러스 전달 벡터 약화된 반응의 생성을 발생시키는 양이다. 일부 실시양태에서, 유효한 양은 적어도 1주, 적어도 2주 또는 적어도 1개월 동안 (예를 들어, 특이적 바이러스 전달 벡터 항원에 대한) 측정가능한 목적하는 면역 반응을 발생시키는 양이다. 일부 실시양태에서, 유효한 양은 측정가능한 목적하는 면역 반응을 조성물 또는 투여 형태의 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5회의 투여 동안 발생시키는 양이다.

[0038] 유효한 양은 물론, 치료될 특정한 대상체; 상태, 질환 또는 장애의 중증도; 연령, 신체 조건, 크기 및 체중을 포함한 개별 환자 파라미터; 치료 지속기간; (존재하는 경우) 공동 요법의 성질; 구체적 투여 경로; 및 건강 진료의의 지식 및 전문성 내의 기타 인자에 좌우될 것이다. 이들 인자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널

리 공지되어 있고, 상용 실험만으로 해결될 수 있다.

[0039] "항바이러스 전달 벡터 면역 반응" 또는 "바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응" 등은 바이러스 전달 벡터에 대한 임의의 바람직하지 않은 면역 반응을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 바람직하지 않은 면역 반응은 바이러스 전달 벡터 또는 그의 항원에 대한 항원-특이적 면역 반응이다. 일부 실시양태에서, 면역 반응은 바이러스 전달 벡터의 바이러스 항원에 대해 특이적이다. 면역 반응은 항바이러스 전달 벡터 항체 반응, 예컨대 IgG 또는 IgM 반응일 수 있다. 항바이러스 전달 벡터 면역 반응은 대상체 또는 또 다른 대상체에서 예상되거나 또는 측정된 반응과 비교해서 또는 그것이 대상체에서 일부 방식으로 감소되거나 제거되는 경우에 "항바이러스 전달 벡터 약화된 반응"이라고 한다. 일부 실시양태에서, 대상체에서의 항바이러스 전달 벡터 약화된 반응은 본원에 제공된 바와 같은 병용 투여 후 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 이용하여 측정된 항바이러스 전달 벡터 면역 반응 (예를 들어, IgG 또는 IgM 항체 반응)이, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드의 병용 투여 없이 바이러스 전달 벡터를 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게 투여한 후, 이러한 다른 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 이용하여 측정된 항바이러스 전달 벡터 면역 반응과 비교하여 감소된 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항바이러스 전달 벡터 약화된 반응은 대상체의 생물학적 샘플에 대해 수행된 후속 바이러스 전달 벡터 시험관내 챌린지 시 본원에 제공된 바와 같은 병용 투여 후 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플에서의 항바이러스 전달 벡터 면역 반응 (예를 들어, IgG 및/또는 IgM 항체 반응)이, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드의 병용 투여 없이 바이러스 전달 벡터를 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게 투여한 후, 이러한 다른 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플에 대해 수행된 바이러스 전달 벡터 시험관내 챌린지 시 검출된 항바이러스 전달 벡터 면역 반응과 비교하여 감소된 것이다.

[0040] "항원"은 B 세포 항원 또는 T 세포 항원을 의미한다. "항원의 유형(들)"은 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 항원 특징을 공유하는 분자를 의미한다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 지단백질, 당지질, 폴리뉴클레오티드, 폴리사카라이드 등일 수 있다.

[0041] "부착하다" 또는 "부착된" 또는 "커플링되다" 또는 "커플링된" (등)은 하나의 실체 (예를 들어, 모이어티)가 또 다른 실체와 화학적으로 회합된 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 부착은 공유 부착이며, 이는 부착이 2개의 실체 간의 공유 결합의 존재의 맥락에서 일어난다는 것을 의미한다. 비-공유 실시양태에서, 비-공유 부착은 전하 상호작용, 친화도 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 스택킹 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스(van der Waals) 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용, 및/또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-공유 상호작용에 의해 매개된다. 실시양태에서, 캡슐화는 부착의 한 형태이다.

[0042] 본원에 사용된 "평균"은 달리 나타내지 않는 한 산술 평균을 지칭한다.

[0043] 본원에 사용된 "코르티코스테로이드"는 예컨대 척추동물의 부신 피질에서 생산된 스테로이드 호르몬, 뿐만 아니라 이들 호르몬의 합성 유사체를 지칭한다. 코르티코스테로이드는 신체의 모든 조직에 영향을 미칠 수 있고, 다양한 세포 효과를 생성할 수 있다. 예를 들어, 이들 스테로이드는 탄수화물, 지질, 단백질 생합성 및 대사, 뿐만 아니라 물 및 전해질 균형을 조절할 수 있다. 세포 생합성 또는 대사에 영향을 미치는 코르티코스테로이드는 글루코코르티코이드로 지칭되며, 물 및 전해질 균형에 영향을 미치는 것은 미네랄로코르티코이드이다. 글루코코르티코이드 및 미네랄로코르티코이드 둘 다는 부신의 피질로부터 방출된다. 코르티코스테로이드는, 예를 들어 감염, 이식 거부 및 자가면역 장애로부터 발생한 것을 비롯한 염증성 상태의 치료에 유용한 치료제의 부류이다. 코르티코스테로이드는 일반적으로, 예를 들어 콜레스테롤, 디히드록시콜레스테롤, 스티그마스테롤, 및 라노스테롤 구조에서 발견되는 바와 같은 4개의 융합된 고리의 스테로이드 핵의 존재를 특징으로 한다. 코르티코스테로이드에 대한 임의의 언급은 자연 발생, 합성, 또는 반합성 기원의 것을 포함한다. 본원에 사용된 "코르티코스테로이드"는 코르티코스테로이드로부터 형성될 수 있는 그의 염 또는 유도체에 대한 언급을 포함한다. 가능한 염 또는 유도체의 예는 나트륨 염, 술포벤조에이트, 포스페이트, 이소니코티네이트, 아세테이트, 프로피오네이트, 디히드로겐 포스페이트, 팔미테이트, 피발레이트, 파르네실레이트, 아세포네이트, 술렙타네이트, 프레드니카르베이트, 푸로에이트 또는 아세토니드를 포함한다. 일부 경우에, 코르티코스테로이드는 또한 그의 수화물 형태로 발생할 수 있다.

[0044] "병용"은 시간상 상관된 방식으로, 바람직하게는 시간상 충분히 상관된 방식으로 2개 이상의 물질/작용제를 대상체에게 투여하여 면역 반응에 조정을 제공하는 것을 의미하고, 보다 더 바람직하게는 2개 이상의 물질/작용제는 조합되어 투여된다. 실시양태에서, 병용 투여는 2개 이상의 물질/작용제를 명시된 기간 내에, 바람직하게 1개월 내에, 보다 바람직하게 1주 내에, 보다 더 바람직하게 1일 내에, 및 보다 더 바람직하게 1시간 내에 투여

하는 것을 포괄할 수 있다. 실시양태에서, 물질/작용제는 반복적으로 병용 투여될 수 있고; 이는 1회 초과의 병용 투여이다.

[0045] "투여 형태"는 대상체에게 투여하기에 적합한 매질, 담체, 비히클 또는 장치에서의 약리학상 및/또는 면역학상 활성 물질을 의미한다. 본원에 제공된 조성물 또는 용량 중 어느 하나가 투여 형태로 존재할 수 있다.

[0046] "캡슐화하다"는 물질의 적어도 일부를 합성 나노담체 내에 봉입하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 물질은 합성 나노담체 내에 완전히 봉입된다. 다른 실시양태에서, 캡슐화된 물질의 대부분 또는 모두는 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출되지 않는다. 다른 실시양태에서, 물질의 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% (중량/중량) 이하가 국부 환경에 노출된다. 캡슐화는 물질의 대부분 또는 모두를 합성 나노담체의 표면 상에 위치시키고, 물질을 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출된 채로 두는 흡수와 구별된다.

[0047] "트랜스진 발현을 확대시키는 것"은 대상체에서 바이러스 전달 벡터의 트랜스진 발현 생성물의 수준을 증가시키는 것을 지칭하며, 이때 트랜스진은 바이러스 전달 벡터에 의해 전달된다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 발현 생성물의 수준은 대상체 내의 다양한 관심 조직 또는 시스템에서 트랜스진 발현을 측정함으로써 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 발현 생성물은 단백질이다. 다른 실시양태에서, 트랜스진 발현 생성물은 핵산이다. 트랜스진 발현을 확대시키는 것은, 예를 들어 대상체로부터 수득된 샘플 중의 트랜스진 발현 생성물의 양을 측정하고, 이를 이전의 샘플과 비교함으로써 결정될 수 있다. 샘플은 조직 샘플일 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 발현 생성물은 유동 세포측정법을 이용하여 측정될 수 있다.

[0048] "엑손 스키핑 트랜스진"은 엑손 스키핑을 생성할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 다른 작용제를 코딩하는 임의의 핵산을 의미한다. "엑손 스키핑"은 단백질 생산 동안 프리-mRNA 수준에서 스키핑되고 제거되는 엑손을 지칭한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 엑손 내의 스플라이스 부위 또는 조절 요소를 방해할 수 있다. 이는 유전자 돌연변이의 존재에도 불구하고 말단절단된, 부분적으로 기능적인 단백질을 발생시킬 수 있다. 일반적으로, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 돌연변이-특이적일 수 있고, 프리-메신저 RNA 내의 돌연변이 부위에 결합하여 엑손 스키핑을 유도할 수 있다.

[0049] 대상체는 엑손 스키핑이 유익할 질환 또는 장애를 갖는 것일 수 있다. 대상체는 엑손 스키핑을 생성시키는 것이 유익할 본원에 제공된 질환 또는 장애 중 어느 하나, 예컨대 이영양증을 가질 수 있다. 또한, 엑손 스키핑 트랜스진은 엑손 스키핑의 결과가 이익을 부여할, 임의의 내인성 단백질의 발현 동안 엑손 스키핑을 생성시킬 수 있는 작용제를 코딩할 수 있다. 이러한 단백질의 예는 본원에 제공된 질환 또는 장애, 예컨대 본원에 제공된 이영양증 중 임의의 것과 연관된 단백질이다. 단백질은 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 치료 단백질 중 어느 하나의 내인성 버전일 수 있다.

[0050] "유전자 편집 트랜스진"은 유전자 편집 프로세스에 수반되는 작용제 또는 성분을 코딩하는 임의의 핵산을 의미한다. "유전자 편집"은 일반적으로, 게놈 DNA에 대한 장기적 또는 영구적 변형, 예컨대 표적화된 DNA 삽입, 대체, 돌연변이유발 또는 제거를 지칭한다. 유전자 편집은 발현된 단백질의 일부 또는 전부를 코딩하는 DNA 서열을 표적화할 수 있거나 또는 표적 유전자(들)의 발현에 영향을 미치는 DNA의 비-코딩 서열을 표적화할 수 있다. 유전자 편집은 관심 DNA 서열을 코딩하는 핵산을 전달하고, 관심 서열을 엔도뉴클레아제를 이용하여 게놈 DNA 내의 표적화된 부위에 삽입하는 것을 포함할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 게놈 내의 목적하는 위치에서 이중 가닥 DNA에 파괴를 생성할 수 있고, 숙주 세포의 메카니즘을 이용하여 상동 재조합, 비상동 말단 연결 등을 사용하여 파괴를 복구할 수 있다. 유전자 편집을 위해 사용될 수 있는 엔도뉴클레아제의 부류는 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부(들) (CRISPR) 및 귀소 엔도뉴클레아제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0051] 본원에 제공된 바와 같은 대상체는 본원에 제공된 바와 같은 질환 또는 장애 중 어느 하나를 갖는 것일 수 있고, 트랜스진은 본원에 제공된 바와 같은 단백질 중 어느 하나, 또는 그의 내인성 버전에서 결함을 교정하는 데 사용될 수 있는 유전자 편집 작용제를 코딩하는 것이다. 대안적으로, 일부 실시양태에서 유전자 편집 바이러스 전달 벡터는 또한, 본원에 제공된 바와 같은 치료 단백질 또는 그의 부분 또는 핵산을 코딩하는 트랜스진을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 편집 바이러스 전달 벡터는 본원에 제공된 치료 단백질 또는 그의 부분 또는 핵산을 코딩하는 트랜스진을 갖는 바이러스 전달 벡터와 함께 대상체에게 투여될 수 있다.

[0052] "유전자 발현 조정 트랜스진"은 유전자 발현 조정제를 코딩하는 임의의 핵산을 지칭한다. "유전자 발현 조정제"는 1개 이상의 내인성 유전자의 발현을 증진, 억제 또는 조정할 수 있는 분자를 지칭한다. 따라서, 유전자 발현 조정제는 DNA-결합 단백질 (예를 들어, 인공 전사 인자)뿐만 아니라 RNA 간섭을 매개하는 분자를 포

함한다. 유전자 발현 조정제는 RNAi 분자 (예를 들어, dsRNA 또는 ssRNA), miRNA, 및 트리플렉스-형성 올리고뉴클레오티드 (TFO)를 포함한다. 유전자 발현 조정제는 또한, 상기 RNA 분자 중 임의의 것의 변형된 버전을 포함한, 변형된 RNA를 포함할 수 있다.

[0053] 본원에 제공된 바와 같은 대상체는 본원에 제공된 바와 같은 질환 또는 장애 중 어느 하나를 갖는 것일 수 있고, 트랜스진은 본원에 제공된 단백질 중 어느 하나의 발현을 제어하는데 사용될 수 있는 유전자 발현 조정제를 코딩하는 것이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 대상체의 단백질의 내인성 버전에 결함이 있거나 또는 이것이 제한된 양으로 생산되거나 전혀 생산되지 않는 질환 또는 장애를 갖고, 유전자 발현 조정제는 이러한 단백질의 발현을 제어할 수 있다. 따라서, 유전자 발현 조정제는 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 단백질 중 어느 하나, 또는 그의 내인성 버전 (예컨대, 본원에 제공된 바와 같은 치료 단백질의 내인성 버전)의 발현을 제어할 수 있다.

[0054] "유전자 요법 트랜스진"은 발현 생성물, 예컨대 단백질 또는 핵산을 코딩하고, 세포 내로 도입될 때 단백질 또는 핵산의 발현을 지시할 수 있는 핵산을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 단백질은 치료 단백질일 수 있다. 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터에 의해 유전자 요법 트랜스진이 투여되는 대상체는 대상체의 단백질의 내인성 버전에 결함이 있거나 또는 이것이 제한된 양으로 생산되거나 전혀 생산되지 않는 질환 또는 장애를 갖는다. 일부 실시양태에서, 코딩된 단백질은 어떠한 인간 대응물도 갖지 않지만, 질환 또는 장애를 치료하는데 있어서 치료상 유익한 효과를 제공할 것으로 예측된다.

[0055] "면역억제제"는 바람직하게는 APC에 대한 그의 효과를 통해 면역관용성 효과를 유발하는 화합물을 의미한다. 면역관용성 효과는 일반적으로, 항원에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 지속적인 방식으로 감소, 억제 또는 방지하는, APC 또는 다른 면역 세포에 의한 전신 및/또는 국부 조정을 지칭한다. 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+CD25고FoxP3+ Treg 세포)의 생산, 유도, 자극 또는 동원 등으로 특징화될 수 있다. 이는 CD4+ T 세포 또는 B 세포가 조절 표현형으로 전환된 것의 결과일 수 있다. 이는 또한, FoxP3이 다른 면역 세포, 예컨대 CD8+ T 세포, 대식세포 및 iNKT 세포에서 유도된 것의 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.

[0056] 일부 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체의 구조를 구성하는 물질에 부가적인 요소이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 중합체로 구성되는 경우, 면역억제제는 하나 이상의 중합체에 부가된, 일부 실시양태에서는 그에 부착된, 화합물이다. 또 다른 예로서, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 지질로 구성되는 경우, 면역억제제는 다시, 하나 이상의 지질에 부가되고, 일부 실시양태에서는 그에 부착된다. 다른 실시양태에서, 합성 나노담체의 물질이 또한 면역관용성 효과를 발생시키는 경우에, 면역억제제는 면역관용성 효과를 발생시키는 합성 나노담체의 물질에 추가적으로 존재하는 요소이다.

[0057] 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 (즉, 라파로그); TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 트리코스타틴 A; 미토콘드리아 기능 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF-κβ 억제제, 예컨대 6Bio, 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; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시솜 증식자-활성화된 수용체 길항제; 퍼옥시솜 증식자-활성화된 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, 레티노산, 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. 다른 예시적인 면역억제제는 소분자 약물, 천연 생성물, 항체 (예를 들어, CD20, CD3, CD4에 대한 항체), 생물제제-기반 약물, 탄수화물-기반 약물, RNAi, 안티센스 핵산, 압타머, 메토트렉세이트, NSAID; 핑골리모드; 나탈리주맙; 알렘투주맙; 항-CD3; 타크롤리무스 (FK506), 아바타셉트, 벨라타셉트 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "라파로그"는 라파마이신과 구조상

관련된 (유사체) 분자 (시롤리무스)를 지칭한다. 라파로그의 예는, 비제한적으로, 템시롤리무스 (CCI-779), 에베롤리무스 (RAD001), 리다포롤리무스 (AP-23573), 및 조타롤리무스 (ABT-578)를 포함한다. 라파로그의 추가의 예는, 예를 들어 WO 공개 WO 1998/002441 및 미국 특허 번호 8,455,510에서 확인할 수 있고, 그의 라파로그는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0058] 추가의 면역억제제가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명은 이러한 측면으로 제한되지 않는다. 실시양태에서, 면역억제제는 본원에 제공된 작용제 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0059] "로드"는, 합성 나노담체와 커플링된 경우, 전체 합성 나노담체 중의 물질의 총 건조 레시피 중량에 기초한, 합성 나노담체와 커플링된 면역억제제의 양이다 (중량/중량). 일반적으로, 이러한 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로서 계산된다. 한 실시양태에서, 합성 나노담체에 걸친 평균 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 나노담체의 집단에 걸친 평균으로 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 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% 또는 적어도 25%이다. 추가 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로 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 실시양태 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하이다. 실시양태에서, 로드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 계산된다. 합성 나노담체에 포함되는 면역억제제의 로드는 본원에 제공된 로드 중 어느 하나일 수 있다.

[0060] "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, 폭 또는 길이 중 가장 작은 것일 것인 한편, 합성 나노담체의 최대 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 가장 큰 것일 것이다. 한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상이다. 한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 5 μm 이하이다. 바람직하게는, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 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, 및 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, 및 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 10:1로 달라질 수 있다. 바람직하게는, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 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, 및 보다 더 바람직하게는 500 nm 이하이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 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, 및 보다 더 바람직하게는 150 nm 이상이다. 합성 나노담체 치수 (예를 들어, 유효 직경)의 측정은 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 액체 (통상적으로 수성) 매질에 현탁시키고 동적 광 산란 (DLS) (예를 들어, 브룩헤븐 제타팔스(Brookhaven ZetaPALS) 기기를 사용함)을 사용함으로써 수득할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 현탁액을 수성 완충제로부터 정제수 내로 희석시켜 대략 0.01 내지 0.1 mg/mL의 최종 합성 나노담체 현탁액 농도를 달성할 수 있다. 희석된 현탁액은 내부에서 직접 제조되거나, 또는 DLS 분석에 적합한 큐벳으로 옮겨질 수 있다. 이어서, 큐벳을 DLS에 두고, 제어 온도로 평형이 되도록 한 다음, 충분한 시간 동안 스캐닝하여 매질의 점도 및 샘플의 굴절률에 대한 적절한 입력에 기초하여 안정하고 재현가능한 분포를 획득할 수 있다. 이어서, 유효 직경, 또는 분포의 평균을 보고한다. 높은 종횡비, 또는 비-구형 합성 나노담체의 유효 크기를 결정하는 것은 보다 정확한 측정치를 수득하기 위해 확대 기술, 예컨대 전자 현미경검사를 필요로 할 수 있다. 합성 나노담체의 "치수" 또는 "크기" 또

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

[0061] "비-메톡시-말단 중합체"는 메톡시 이외의 모이어티로 종결되는 적어도 1개의 말단을 갖는 중합체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 메톡시 이외의 모이어티로 종결되는 적어도 2개의 말단을 갖는다. 다른 실시양태에서, 중합체는 메톡시로 종결되는 말단을 갖지 않는다. "비-메톡시-말단, 플루로닉 중합체"는 양쪽 말단에서 메톡시를 갖는 선형 플루로닉 중합체 이외의 중합체를 의미한다. 본원에 제공된 바와 같은 중합체 나노입자는, 일부 실시양태에서, 비-메톡시-말단 중합체 또는 비-메톡시-말단, 플루로닉 중합체를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 중합체 나노입자는 이러한 중합체를 포함하지 않는다.

[0062] "제약상 허용되는 부형제" 또는 "제약상 허용되는 담체"는 약리학적 활성 물질과 함께 조성물을 제제화하는 데 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 공지된 다양한 물질을 포함한다.

[0063] "프로토콜"은 대상체에게 투여하는 패턴을 의미하고, 대상체에 대한 1종 이상의 물질의 임의의 투여 요법을 포함한다. 프로토콜은 요소 (또는 변수)로 구성되고; 따라서 프로토콜은 1종 이상의 요소를 포함한다. 이러한 프로토콜의 요소는 투여량 (용량), 투여 빈도, 투여 경로, 투여 지속기간, 투여 속도, 투여 사이의 간격, 상기 중 임의의 것의 조합 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로토콜은 본 발명의 하나 이상의 조성물을 하나 이상의 시험 대상체에게 투여하는데 사용될 수 있다. 이어서 이들 시험 대상체에서 면역 반응을 평가하여 프로토콜이 목적하는 또는 목적하는 수준의 면역 반응 또는 치료 효과를 생성하는데 효과적인지 여부를 결정할 수 있다. 임의의 치료 및/또는 면역학적 효과가 평가될 수 있다. 프로토콜의 요소 중 1종 이상은 시험 대상체, 예컨대 비-인간 대상체에서 사전 입증된 다음 인간 프로토콜로 해석될 수 있다. 예를 들어, 비-인간 대상체에서 입증된 투여량을 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 방법 중 임의의 것을 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. 예시적인 프로토콜은 바이러스 전달 벡터 항원에 대해 면역관용성 면역 반응을 초래하는 것으로 이전에 입증되거나 또는 본원에 기재된 유익한 결과 중 어느 하나를 달성하는 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 조성물은 프로토콜을 구성하는 요소들 중 하나 이상 또는 모두 또는 실질적으로 모두를 이용하여 대상체에게 투여되며, 단 선택된 요소(들)는 대상체에게서 목적하는 결과를 달성하는 것으로 예상되어야 한다. 이러한 예상은 시험 대상체에서 결정된 프로토콜 및 필요한 경우 스케일링에 근거할 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 항바이러스 전달 벡터 면역 반응을 약화시키고/거나, 바이러스 전달 벡터의 반복 투여를 가능하게 하고/거나, 바이러스 전달 벡터에 대한 1종 이상의 다른 면역 반응의 약화를 발생시키고/거나, 증가된 트랜스진 발현을 발생시키는 것으로 제시된 프로토콜에 따라, 본원에 기재된 바와 같은 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드와 조합하여 바이러스 전달 벡터의 용량을 투여하는 단계를 포함할 수 있거나 추가로 포함할 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 본원에 기재된 유익한 결과 중 어느 하나 이상을 달성하는 이러한 프로토콜을 결정하는 단계를 포함할 수 있거나 추가로 포함할 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 본원에 기재된 유익한 결과 중 어느 하나 이상을 달성하는 프로토콜에 따라 투여하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다.

[0064] "반복 용량" 또는 "반복 투여" 등은 동일한 물질의 이전 용량 또는 투여에 후속하여 대상체에게 투여되는 적어도 1회의 추가의 용량 또는 투여를 의미한다. 예를 들어, 바이러스 전달 벡터의 반복 용량은 동일한 물질의 이전 용량 후 바이러스 전달 벡터의 적어도 1회의 추가의 용량이다. 물질은 동일할 수 있지만, 반복 용량에서 물질의 양은 이전 용량과 상이할 수 있다. 반복 용량은 본원에 제공된 바와 같이, 예컨대 실시예의 간격으로 투여될 수 있다. 반복 투여는 그것이 대상체에게 유익한 효과를 발생시키는 경우에 효과적인 것으로 간주된다. 바람직하게는, 효과적인 반복 투여는 약화된 항바이러스 전달 벡터 반응과 함께 유익한 효과, 예컨대 치료 효과를 발생시킨다.

[0065] "동시"는 동일한 시간에, 또는 임상의가 목적하는 치료 성과에 미치는 영향에 대해 사실상 무의미하거나 무시할

수 있는 투여 사이의 임의의 시간인 것으로 간주할 실질적으로 동일한 시간에 투여하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 동시는 투여가 5, 4, 3, 2, 1분 또는 그 미만으로 이루어지는 것을 의미한다.

[0066] "대상체"는 온혈 포유동물 예컨대 인간 및 영장류; 조류; 가정용 또는 농장용 가축 예컨대 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험 동물 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그; 어류; 파충류; 동물원 및 야생 동물 등을 포함한 동물을 의미한다. 본원에 사용된 대상체는 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나를 필요로 하는 것일 수 있다.

[0067] "합성 나노담체(들)"는 자연에서 발견되지 않고, 크기가 5 마이크로미터 이하인 적어도 하나의 치수를 보유하는 개별 대상을 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.

[0068] 합성 나노담체는 지질-기반 나노입자 (본원에서 지질 나노입자, 즉 그들의 구조를 구성하는 대다수의 물질이 지질인 나노입자로서 지칭되기도 함), 중합체 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀젼, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 (즉, 주로 바이러스 구조 단백질로 구성되지만, 감염성이 아니거나 또는 낮은 감염성을 갖는 입자), 펩티드 또는 단백질-기반 입자 (본원에서 단백질 입자, 즉 그들의 구조를 구성하는 대다수의 물질이 펩티드 또는 단백질인 입자로서 지칭되기도 함) (예컨대, 알부민 나노입자) 및/또는 나노물질의 조합을 사용하여 개발된 나노입자, 예컨대 지질-중합체 나노입자 중 1개 또는 복수개일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 합성 나노담체는 구형, 입방형, 피라미드형, 직사각형, 원통형, 토로이드형 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) 공개된 미국 특허 출원 20060002852 (Saltzman et al.)의 중합체 나노입자, (3) 공개된 미국 특허 출원 20090028910 (DeSimone et al.)의 리소그래픽적으로 구축된 나노입자, (4) WO 2009/051837 (von Andrian et al.)의 개시내용, (5) 공개된 미국 특허 출원 2008/0145441 (Penades et al.)에 개시된 나노입자, (6) 공개된 미국 특허 출원 20090226525 (de los Rios et al.)에 개시된 단백질 나노입자, (7) 공개된 미국 특허 출원 20060222652 (Sebbel et al.)에 개시된 바이러스-유사 입자, (8) 공개된 미국 특허 출원 20060251677 (Bachmann et al.)에 개시된 핵산 부착된 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 나노침전된 나노입자, (11) 미국 공개 번호 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.

[0069] 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화하는 히드록실 기를 갖는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화하는 히드록실 기가 아닌 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 실질적으로 활성화하는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 실질적으로 활성화하지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화하는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화하지 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 이상, 또는 1:10 이상의 종횡비를 보유할 수 있다.

[0070] "치료 단백질"은 본원에 제공된 바와 같은 유전자 요법 트랜스진으로부터 발현될 수 있는 임의의 단백질을 의미한다. 치료 단백질은 단백질 대체 또는 단백질 보충을 위해 사용되는 것일 수 있다. 치료 단백질은 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 시토카인, 성장 인자 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 치료 단백질의 예가 본원의 다른 곳에서 제공된다. 대상체는 본원에 제공된 치료 단백질 중 어느 하나에 의한 치료를 필요로 하는 것일 수 있다.

[0071] "바이러스 전달 벡터의 트랜스진"은 바이러스 전달 벡터를 사용하여 세포 내로 수송되고, 일단 세포 내에 있으

면 발현되어, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 치료 용도를 위한 단백질 또는 핵산 분자를 생산할 수 있는 핵산 물질을 지칭한다. 트랜스진은 유전자 요법 트랜스진, 유전자 편집 트랜스진, 유전자 발현 조정 트랜스진 또는 엑손 스키핑 트랜스진일 수 있다. "발현된" 또는 "발현" 등은 트랜스진으로 세포가 형질도입되고 형질도입된 세포에 의해 프로세싱된 후의 기능적 (즉, 원하는 목적을 위한 생리학상 활성인) 유전자 생성물의 합성을 지칭한다. 이러한 유전자 생성물은 또한 본원에서 "트랜스진 발현 생성물"로 지칭된다. 따라서, 발현된 생성물은 트랜스진에 의해 코딩된, 결과적인 단백질 또는 핵산, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 치료 RNA를 포함한다.

[0072] "바이러스 전달 벡터"는 본원에 제공된 바와 같은 핵산, 예컨대 트랜스진을 전달하도록 적합화된 바이러스 벡터를 의미하고, 이러한 핵산을 포함한다. "바이러스 벡터"는 바이러스 전달 벡터의 모든 바이러스 성분을 지칭한다. 따라서, "바이러스 항원"은 바이러스 전달 벡터의 바이러스 성분의 항원, 예컨대 캡시드 또는 코트 단백질을 지칭하지만, 그것이 전달하는 핵산, 예컨대 트랜스진, 또는 그것이 코딩하는 임의의 생성물을 지칭하는 것은 아니다. "바이러스 전달 벡터 항원"은 그의 바이러스 성분을 포함한 바이러스 전달 벡터의 임의의 항원뿐만 아니라, 전달되는 핵산, 예컨대 트랜스진, 또는 그의 임의의 발현 생성물을 지칭한다. 트랜스진은 유전자 요법 트랜스진, 유전자 편집 트랜스진, 유전자 발현 조정 트랜스진 또는 엑손 스키핑 트랜스진일 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 본원에 제공된 단백질, 예컨대 치료 단백질, DNA-결합 단백질 또는 엔도뉴클레아제를 코딩하는 것이다. 다른 실시양태에서, 트랜스진은 가이드 RNA, 안티센스 핵산, snRNA, RNAi 분자 (예를 들어, dsRNA 또는 ssRNA), miRNA, 또는 트리플렉스-형성 올리고뉴클레오티드 (TFO) 등을 코딩하는 것이다. 바이러스 벡터는, 비제한적으로, 레트로바이러스 (예를 들어, 뮤린 레트로바이러스, 조류 레트로바이러스, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), 하비 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스 (GaLV) 및 라우스 육종 바이러스 (RSV)), 렌티바이러스, 포진 바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 알파바이러스 등에 기초할 수 있다. 다른 예가 본원의 다른 곳에서 제공되거나 또는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 바이러스 벡터는 바이러스의 천연 변이체, 균주, 또는 혈청형, 예컨대 본원에 제공된 것 중 어느 하나에 기초할 수 있다. 바이러스 벡터는 또한, 분자 진화를 통해 선택된 바이러스에 기초할 수 있다. 바이러스 벡터는 또한 조작된 벡터, 재조합 벡터, 돌연변이체 벡터, 또는 하이브리드 벡터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 "키메라 바이러스 벡터"이다. 이러한 실시양태에서, 이는 바이러스 벡터가 1종 초과의 바이러스 또는 바이러스 벡터로부터 유래된 바이러스 성분으로 구성된 것을 의미한다.

[0073] C. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물

[0074] 중요한 것으로, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응, 예컨대 IgG 및/또는 IgM 반응을 약화시키는 것으로 밝혀졌다. 추가적으로, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 트랜스진 발현을 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 중요한 것으로, 이러한 효과는 청구된 조성물의 반복, 예를 들어 2, 3회 또는 그 초과의 투여에 걸쳐 유지된다. 본원에 제공된 방법 및 조성물은 바이러스 전달 벡터를 사용하여 대상체를 치료하는데 유용하다. 바이러스 전달 벡터는 유전자 요법, 유전자 편집, 유전자 발현 조정 및 엑손 스키핑을 포함한, 다양한 목적을 위해 핵산, 예컨대 트랜스진을 전달하는데 사용될 수 있고, 본원에 제공된 방법 및 조성물이 또한 적용가능하다.

[0075] 트랜스진

[0076] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 유전자 요법 트랜스진일 수 있고, 이는 대상체, 예컨대 질환 또는 장애를 갖는 대상체에게 유익한 임의의 단백질 또는 그의 부분을 코딩할 수 있다. 단백질은 세포외, 세포내 또는 막-결합 단백질일 수 있다. 단백질은 치료 단백질일 수 있고, 바이러스 전달 벡터에 의해 유전자 요법 트랜스진이 투여되는 대상체는 대상체의 단백질의 내인성 버전에 결함이 있거나 또는 이것이 제한된 양으로 생산되거나 전혀 생산되지 않는 질환 또는 장애를 가질 수 있다. 따라서 대상체는 본원에 제공된 바와 같은 질환 또는 장애 중 어느 하나를 갖는 것일 수 있고, 트랜스진은 본원에 제공된 바와 같은 치료 단백질 중 어느 하나 또는 그의 부분을 코딩하는 것일 수 있다.

[0077] 치료 단백질의 예는 주입가능하거나 주사가능한 치료 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고 인자, 시토카인 및 인터페론, 성장 인자, 아디포카인 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0078] 주입가능하거나 주사가능한 치료 단백질의 예는, 예를 들어 토실리주맙 (로슈(Roche)/악템라(Actemra)®), 알파-1 항트립신 (카마다(Kamada)/AAT), 헤마티드(Hematide)® (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 바이오젠(Biogen)), 벨리무맙 (글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)/벤리스타(Benlysta)®), 페글로티카제 (사비엔트 파마슈티칼스(Savient Pharmaceuticals)/크리스텍사(Krystexxa)™), 탈리글루세라제 알파 (프로탈릭스(Protalix)/유플리소(Uplyso)), 아갈시다제 알파 (샤이어(Shire)/레플라갈(Replagal)®), 및 벨라글루세라제 알파 (샤이어)를 포함한다.

[0079] 효소의 예는 리소자임, 옥시도리덕타제, 트랜스퍼라제, 히드롤라제, 리아제, 이소머라제, 아스파라기나제, 우리카제, 글리코시다제, 프로테아제, 뉴클레아제, 콜라게나제, 히알루로니다제, 헤파리나제, 헤파라나제, 키나제, 포스파타제, 리신 및 리가제를 포함한다. 효소의 다른 예는 이미글루세라제 (예를 들어, 세레자임(CEREZYME)™), a-갈락토시다제 A (a-gal A) (예를 들어, 아갈시다제 베타, 파브리자임(FABRYZYME)™), 산 a-글루코시다제 (GAA) (예를 들어, 알글루코시다제 알파, 루미자임(LUMIZYME)™, 미오자임(MYOZYME)™), 및 아릴술파타제 B (예를 들어, 라로니다제, 알두라자임(ALDURAZYME)™, 이두르술파제, 엘라프라제(ELAPRASE)™, 아릴술파타제 B, 나글라자임(NAGLAZYME)™)를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 효소 대체 요법에 사용되는 것을 포함한다.

[0080] 호르몬의 예는 고나도트로핀, 갑상선-자극 호르몬, 멜라노코르틴, 뇌하수체 호르몬, 바소프레신, 옥시토신, 성장 호르몬, 프로락틴, 오렉신, 나트륨이뇨 호르몬, 부갑상선 호르몬, 칼시토닌, 에리트로포이에틴 및 췌장 호르몬을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0081] 혈액 또는 혈액 응고 인자의 예는 인자 I (피브리노겐), 인자 II (프로트롬빈), 조직 인자, 인자 V (프로악셀레린, 불안정성 인자), 인자 VII (안정한 인자, 프로콘버틴), 인자 VIII (항혈우병 글로불린), 인자 IX (크리스마스 인자 또는 혈장 트롬보플라스틴 성분), 인자 X (스튜어트-프라워(Stuart-Prower) 인자), 인자 Xa, 인자 XI, 인자 XII (하게만(Hageman) 인자), 인자 XIII (피브린-안정화 인자), 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자, 폰 헬데브란트(von Heldebrant) 인자, 프레칼리크레인 (플레처(Fletcher) 인자), 고분자량 키니노겐 (HMWK) (피츠제랄드(Fitzgerald) 인자), 피브로넥틴, 피브린, 트롬빈, 항트롬빈, 예컨대 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, 프로크리트)를 포함한다.

[0082] 시토카인의 예는 림포카인, 인터류킨, 및 케모카인, 유형 1 시토카인, 예컨대 IFN-γ, TGF-β, 및 유형 2 시토카인, 예컨대 IL-4, IL-10, 및 IL-13을 포함한다.

[0083] 성장 인자의 예는 아드레노메둘린 (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-촉진 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), 종양 괴사 인자-알파 (TNF-α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), Wnt 신호전달 경로, 태반 성장 인자 (PlGF), [(소 태아 소마토트로핀)] (FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, 및 IL-7을 포함한다.

[0084] 아디포카인의 예는 렙틴 및 아디포넥틴을 포함한다.

[0085] 치료 단백질의 추가의 예는 수용체, 신호전달 단백질, 세포골격 단백질, 스캐폴드 단백질, 전사 인자, 구조 단백질, 막 단백질, 시토졸 단백질, 결합 단백질, 핵 단백질, 분비된 단백질, 골지 단백질, 내형질 세망 단백질, 미토콘드리아 단백질, 및 소포성 단백질 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0086] 본원에 제공된 유전자 요법 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 대상체에서 그의 내인성 버전의 일부 결함 (내인성 버전의 발현의 결함을 포함함)을 통해 대상체에서 질환 또는 장애를 초래하는 임의의 단백질의 기능적 버전을 코딩할 수 있다. 이러한 질환 또는 장애의 예는 리소좀 축적 질환/장애, 예컨대 산타부오리-할티아병 (영아 신경 세로이드 리포푸신증 유형 1), 얀스키-빌쇼스키병 (후기 영아 신경 세로이드 리포푸신증, 유형 2), 배튼병 (소아 신경 세로이드 리포푸신증, 유형 3), 쿠프스병 (신경 세로이드 리포푸신증, 유형 4), 폰 기에르케병 (글리코겐 축적 질환, 유형 Ia), 글리코겐 축적 질환, 유형 Ib, 폼페병 (글리코겐 축적 질환, 유형 II), 포르베스 또는 코리병 (글리코겐 축적 질환, 유형 III), 점액지질증 II (I-세포 질환), 점액지질증 III (슈도-후를러 다발이영양증), 점액지질증 IV (시알로지질증), 시스틴축적증 (성인 비신병증성 유형), 시스틴축적증 (영아 신병증성 유형), 시스틴축적증 (소아 또는 청소년 신병증성), 살라병/영아 시알산 축적 장애, 및 사포신 결핍증; 지

질 및 스핑고지질 분해 장애, 예컨대 GM1 강글리오시드증 (영아, 후기 영아/소아, 및 성인/만성), 테이-삭스병, 샌드호프병, GM2 강글리오시드증, Ab 변이체, 파브리병, 고셔병, 유형 I, II 및 III, 이염성 백질이영양증, 크라베병 (초기 및 후기 발병), 니만-픽병, 유형 A, B, C1, 및 C2, 파버병, 및 윌만병 (콜레스테릴 에스테르 축적 질환); 뮤코폴리사카라이드 분해 장애, 예컨대 후를러 증후군 (MPSI), 샤이에 증후군 (MPS IS), 후를러-샤이에 증후군 (MPS IH/S), 헌터 증후군 (MPS II), 산필리포 A 증후군 (MPS IIIA), 산필리포 B 증후군 (MPS IIIB), 산필리포 C 증후군 (MPS IIIC), 산필리포 D 증후군 (MPS IIID), 모르키오 A 증후군 (MPS IVA), 모르키오 B 증후군 (MPS IVB), 마로토-라미 증후군 (MPS VI), 및 슬라이 증후군 (MPS VII); 당단백질 분해 장애, 예컨대 알파 만노시드축적증, 베타 만노시드축적증, 푸코시드축적증, 아스파르틸글루코사민뇨, 점액지질증 I (시알산증), 갈락토시알산증, 쉰들러병, 및 쉰들러병, 유형 II/간자키병; 및 백질이영양증 질환/장애, 예컨대 무베타지단백혈증, 신생아 부신백질이영양증, 카나반병, 뇌건성 황색종증, 펠리제우스 메르츠바허병, 탄지에르병, 영아 레프숨병, 및 전형적 레프숨병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0087] 본원에 제공된 바와 같은 대상체의 이러한 질환/장애의 추가의 예는 산성 말타제 결핍 (예를 들어, 폼페병, 글리코겐증 유형 2, 리소솜 축적 질환); 카르니틴 결핍; 카르니틴 팔미틸 트랜스퍼라제 결핍; 탈분지 효소 결핍 (예를 들어, 코리 또는 포르브스병, 글리코겐증 유형 3); 락테이트 데히드로게나제 결핍 (예를 들어, 글리코겐증 유형 11); 미오아데닐레이트 데아미나제 결핍; 포스포프룩토키나제 결핍 (예를 들어, 타루이병, 글리코겐증 유형 7); 포스포글리세레이트 키나제 결핍 (예를 들어, 글리코겐증 유형 9); 포스포글리세레이트 뮤타제 결핍 (예를 들어, 글리코겐증 유형 10); 포스포릴라제 결핍 (예를 들어, 맥아들병, 미오포스포릴라제 결핍, 글리코겐증 유형 5); 고셔병 (예를 들어, 염색체 1, 효소 글루코세레브로시다제 영향을 받음); 연골무형성증 (예를 들어, 염색체 4, 섬유모세포 성장 인자 수용체 3 영향을 받음); 헌팅톤병 (예를 들어, 염색체 4, 헌팅틴); 혈색소증 (예를 들어, 염색체 6, HFE 단백질); 낭성 섬유증 (예를 들어, 염색체 7, CFTR); 프리드라이히 운동실조 (염색체 9, 프라탁신); 베스트병 (염색체 11, VMD2); 겸상 적혈구 질환 (염색체 11, 헤모글로빈); 페닐케톤뇨 (염색체 12, 페닐알라닌 히드록실라제); 마르판 증후군 (염색체 15, 피브릴린); 근긴장성 이영양증 (염색체 19, 근긴장성 이영양증 단백질 키나제); 부신백질이영양증 (x-염색체, 퍼옥시솜 내 리그노세로일-CoA 리가제); 뒤시엔느 근육 이영양증 (x-염색체, 디스트로핀); 레트 증후군 (x-염색체, 메틸CpG-결합 단백질 2); 레베르 유전성 시신경병증 (미토콘드리아, 호흡 단백질); 미토콘드리아 뇌병증, 락트산 산증 및 졸중 (MELAS) (미토콘드리아, 전달 RNA); 및 우레아 사이클 효소 결핍을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0088] 이러한 질환 또는 장애의 추가의 예는 겸상 적혈구성 빈혈, 근세관성 근병증, B형 혈우병, 지단백질 리파제 결핍, 오르니틴 트랜스카르브아밀라제 결핍, 크리글러-나자르 증후군, 점액지질증 IV, 니만-픽 A, 산필리포 A, 산필리포 B, 산필리포 C, 산필리포 D, b-지중해빈혈 및 뒤시엔느 근육 이영양증을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 질환 또는 장애의 추가의 예는 지질 및 스핑고지질 분해, 뮤코폴리사카라이드 분해, 당단백질 분해, 백질이영양증 등에 있어서의 결함의 결과인 것을 포함한다.

[0089] 본원에 제공된 질환 또는 장애 중 어느 하나의 결함 단백질의 기능적 버전은 유전자 요법 바이러스 전달 벡터의 트랜스진에 의해 코딩될 수 있고, 이는 또한 치료 단백질로 간주된다. 따라서, 치료 단백질은 또한, 미오포스포릴라제, 글루코세레브로시다제, 섬유모세포 성장 인자 수용체 3, 헌팅틴, HFE 단백질, CFTR, 프라탁신, VMD2, 헤모글로빈, 페닐알라닌 히드록실라제, 피브릴린, 근긴장성 이영양증 단백질 키나제, 리그노세로일-CoA 리가제, 디스트로핀, 메틸CpG-결합 단백질 2, 베타 헤모글로빈, 미오튜불라린, 카텝신 A, 인자 IX, 지단백질 리파제, 베타 갈락토시다제, 오르니틴 트랜스카르브아밀라제, 이두로네이트-2-술파타제, 산-알파 글루코시다제, UDP-글루쿠로노실트랜스퍼라제 1-1, GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제, GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제, 뮤코리핀-1, 마이크로솜 트리글리세리드 전달 단백질, 스핑고미엘리나제, 산 세라미다제, 리소솜 산 리파제, 알파-L-이두로니다제, 헤파란 N-술파타제, 알파-N-아세틸글루코사미니다제, 아세틸-CoA 알파-글루코사미니드 아세틸트랜스퍼라제, N-아세틸글루코사민 6-술파타제, N-아세틸갈락토사민-6 술파타제, 알파-만노시다제, 알파-갈락토시다제 A, 낭성 섬유증 전도 막횡단 조절제, 및 호흡 단백질을 포함하게 된다.

[0090] 추가의 예로서, 치료 단백질은 또한, 지질 및 스핑고지질 분해 장애와 연관된 단백질 (예를 들어, β-갈락토시다제-1, β-헥소사미니다제 A, β-헥소사미니다제 A 및 B, GM2 활성화 단백질, 8-갈락토시다제 A, 글루코세레브로시다제, 글루코세레브로시다제, 글루코세레브로시다제, 아릴술파타제 A, 갈락토실세라미다제, 스핑고미엘리나제, 스핑고미엘리나제, NPC1, HE1 단백질 (콜레스테롤 교환 결함), 산 세라미다제, 리소솜 산 리파제); 뮤코폴리사카라이드 분해 장애와 연관된 단백질 (예를 들어, L-이두로니다제, L-이두로니다제, L-이두로니다제, 이두로네이트 술파타제, 헤파란 N --술파타제, N-아세틸글루코사미니다제, 아세틸-CoA-글루코사미니다제, 아세틸트랜스퍼라제, 아세틸글루코사민-6-술파타제, 갈락토사민-6-술파타제, 아릴술파타제 B, 글루쿠로니다제); 당단백

질 분해 장애와 연관된 단백질 (예를 들어, 만노시다제, 만노시다제, 1-푸코시다제, 아스파르틸글리코사미니다제, 뉴라미니다제, 리소솜 보호 단백질, 리소솜 8-N-아세틸갈락토사미니다제, 리소솜 8-N-아세틸갈락토사미니다제); 리소솜 축적 장애와 연관된 단백질 (예를 들어, 팔미토일-단백질 티오에스테라제, 적어도 4가지 하위유형, 리소솜 막 단백질, 미지, 글루코스-6-포스파타제, 글루코스-6-포스페이트 트랜스로카제, 산 말타제, 탈분지 효소 아밀로-1,6 글루코시다제, N-아세틸글루코사민-1- 포스포트랜스퍼라제, N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제, 강글리오시드 시알리다제 (뉴라미니다제), 리소솜 시스틴 수송 단백질, 리소솜 시스틴 수송 단백질, 리소솜 시스틴 수송 단백질, 시알산 수송 단백질 사포신, A, B, C, D) 및 백질이영양증과 연관된 단백질 (예를 들어, 마이크로솜 트리글리세리드 전달 단백질/아포지단백질 B, 퍼옥시솜 막 전달 단백질, 퍼옥신, 아스파르토아실라제, 스테롤-27-히드록실라제, 단백질지질 단백질, ABC1 수송체, 퍼옥시솜 막 단백질 3 또는 퍼옥시솜 생물발생 인자 1, 피탄산 옥시다제)의 기능적 버전을 포함한다.

[0091] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 유전자 편집에 사용될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 유전자 편집 트랜스진이다. 이러한 트랜스진은 유전자 편집 프로세스에 수반되는 작용제 또는 성분을 코딩한다. 일반적으로, 이러한 프로세스는 게놈 DNA에 대한 장기 지속적 또는 영구적 변형, 예컨대 표적화된 DNA 삽입, 대체, 돌연변이유발 또는 제거를 발생시킨다. 유전자 편집은 관심 DNA 서열을 코딩하는 핵산을 전달하고, 관심 서열을 엔도뉴클레아제를 이용하여 게놈 DNA 내의 표적화된 부위에 삽입하는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 유전자 편집 트랜스진은 삽입하기 위한 관심 DNA 서열을 코딩하는 이들 핵산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 삽입을 위한 DNA 서열은 본원에 제공된 치료 단백질 중 어느 하나를 코딩하는 DNA 서열이다. 대안적으로 또는 그에 더하여, 유전자 편집 트랜스진은 유전자 편집 프로세스를 수행하는 하나 이상의 성분을 코딩하는 핵산을 단독으로, 또는 유전자 편집 프로세스를 수행하는 다른 성분과 조합하여 포함할 수 있다. 본원에 제공된 유전자 편집 트랜스진은 엔도뉴클레아제 및/또는 가이드 RNA 등을 코딩할 수 있다.

[0092] 엔도뉴클레아제는 게놈 내의 목적하는 위치에서 이중 가닥 DNA에 파괴를 생성할 수 있고, 숙주 세포의 메카니즘을 이용하여 상동 재조합, 비상동 말단 연결 등을 사용하여 파괴를 복구할 수 있다. 유전자 편집을 위해 사용될 수 있는 엔도뉴클레아제의 부류는 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부(들) (CRISPR) 및 귀소 엔도뉴클레아제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터의 유전자 편집 트랜스진은 본원에 제공된 엔도뉴클레아제 중 어느 하나를 코딩할 수 있다.

[0093] 메가뉴클레아제는 일반적으로 DNA 서열 (~14-40개 염기 쌍)을 인식하고 컷팅하는 그의 능력을 특징으로 한다. 또한, 공지된 기술, 예컨대 돌연변이유발 및 고처리량 스크리닝 및 조합 어셈블리를 이용하여 맞춤 메가뉴클레아제를 생성할 수 있고, 여기서 단백질 서브유닛이 회합 또는 융합될 수 있다. 메가뉴클레아제의 예는 미국 특허 번호 8,802,437, 8,445,251 및 8,338,157; 및 미국 공개 번호 20130224863, 20110113509 및 20110033935에서 확인할 수 있고, 그의 메가뉴클레아제는 본원에 참조로 포함된다.

[0094] 아연 핑거 뉴클레아제는 전형적으로, 핵산 분자 내의 특이적 표적 부위에 결합하는 아연 핑거 도메인, 및 결합 도메인에 의해 결합된 표적 부위 내에서 또는 그 근처에서 핵산 분자를 컷팅하는 핵산 절단 도메인을 포함한다. 전형적인 조작된 아연 핑거 뉴클레아제는 3 내지 6개의 개별 아연 핑거 모티프 및 9개 염기 쌍 내지 18개 염기 쌍의 길이 범위의 결합 표적 부위를 갖는 결합 도메인을 포함한다. 아연 핑거 뉴클레아제는 절단하기 위한 주어진 핵산 분자 내의 사실상 임의의 목적 서열을 표적화하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 목적하는 특이성을 갖는 아연 핑거 결합 도메인은 공지된 특이성의 개별 아연 핑거 모티프를 조합함으로써 설계될 수 있다. DNA에 결합된 아연 핑거 단백질 Zif268의 구조는 본 분야에서 많은 연구 결과를 얻었고, 64개의 가능한 염기 쌍 트리플렛 각각에 대해 아연 핑거를 수득한 다음, 이들 모듈 아연 핑거를 혼합 및 매칭하여 임의의 목적하는 서열 특이성을 갖는 단백질을 설계하는 개념이 기재되어 있다 (Pavletich NP, Pabo CO (May 1991). "Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 A". Science 252 (5007): 809-17, 그의 전체 내용은 본원에 포함됨). 일부 실시양태에서, 박테리아 또는 파지 디스플레이를 이용하여, 목적하는 핵산 서열, 예를 들어 목적하는 엔도뉴클레아제 표적 부위를 인식하는 아연 핑거 도메인을 개발한다. 아연 핑거 뉴클레아제는 일부 실시양태에서, 아연 핑거 결합 도메인, 및 링커, 예를 들어 폴리펩티드 링커를 통해 서로 융합되거나 달리 접합된 절단 도메인을 포함한다. 링커의 길이는 아연 핑거 도메인에 의해 결합된 핵산 서열로부터의 컷팅 거리를 결정할 수 있다. 아연 핑거 뉴클레아제의 예는 미국 특허 번호 8,956,828; 8,921,112; 8,846,578; 8,569,253에서 확인할 수 있고, 그의 아연 핑거 뉴클레아제는 본원에 참조로 포함된다.

[0095] 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN)는 특이적 DNA 결합 도메인을 일반적 DNA 절단 도메인과 융합시킴으로써 생성된 인공 제한 효소이다. 임의의 목적하는 DNA 서열에 결합하도록 설계될 수 있는 DNA 결합 도메

인은 식물을 감염시키는 특정 박테리아에 의해 배설되는 DNA-결합 단백질인 전사 활성화제-유사 (TAL) 이펙터로부터 비롯된다. 전사 활성화제-유사 이펙터 (TALE)는 실질적으로 임의의 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있거나 또는 DNA 절단 도메인과 조합되어 함께 어레이 내로 연결될 수 있다. TALEN은 아연 핑거 뉴클레아제를 설계하도록 유사하게 사용될 수 있다. TALEN의 예는 미국 특허 번호 8,697,853; 뿐만 아니라 미국 공개 번호 20150118216, 20150079064, 및 20140087426에서 확인할 수 있고, 그의 TALEN은 본원에 참조로 포함된다.

[0096] CRISPR (클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부)/Cas 시스템이 또한 유전자 편집에 사용될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템에서, 가이드 RNA (gRNA)는 (예를 들어, 플라스미드 상에) 게놈에 의해 또는 에피솜에 의해 코딩된다. gRNA는 전사 후, 엔도뉴클레아제, 예컨대 Cas9 엔도뉴클레아제와 복합체를 형성한다. 이어서 복합체는, 전형적으로 세포의 게놈 내에 위치한 DNA 표적 서열로 gRNA의 특이성 결정 서열 (SDS)에 의해 가이드된다. Cas9 또는 Cas9 엔도뉴클레아제는 Cas9 단백질 또는 그의 단편을 포함하는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 (예를 들어, Cas9의 활성 또는 불활성 DNA 절단 도메인 또는 부분 불활성 DNA 절단 도메인 (예를 들어, Cas9 니카제), 및/또는 Cas9의 gRNA 결합 도메인을 포함하는 단백질)를 지칭한다. Cas9는 CRISPR 반복 서열 내의 짧은 모티프 (PAM 또는 프로토스페이서 인접 모티프)를 인식하여 자기 대 비-자기를 구분하는 것을 돕는다. Cas9 엔도뉴클레아제 서열 및 구조는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 ["Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes." Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L. expand/collapse author list McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011); 및 "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)] 참조). 단일 가이드 RNA ("sgRNA", 또는 간단히 "gNRA")는 crRNA 및 tracrRNA 둘 다의 측면이 단일 RNA 종 내로 혼입하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)]을 참조한다.

[0097] Cas9 오르토로그는 에스. 피오게네스(S. pyogenes) 및 에스. 써모필루스(thermophilus)를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 종에 기재되어 있다. 추가의 적합한 Cas9 엔도뉴클레아제 및 서열은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 이러한 Cas9 엔도뉴클레아제 및 서열은 문헌 [Chylinski, Rhun, and Charpentier, "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems" (2013) RNA Biology 10:5, 726-737]에 개시된 유기체 및 유전자좌로부터의 Cas9 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 편집 트랜스진은 야생형 Cas9, 단편 또는 Cas9 변이체를 코딩한다. "Cas9 변이체"는 자연에서 발생한 Cas9 야생형 엔도뉴클레아제와 동일하지 않은 Cas9 기능을 갖는 임의의 단백질이다. 일부 실시양태에서, Cas9 변이체는 야생형 Cas9, 또는 그의 단편과 상동성을 공유한다. 일부 실시양태에서 Cas9 변이체는 스트렙토코쿠스 피오게네스 (Streptococcus pyogenes) 또는 에스. 써모필루스 Cas9 단백질에 대해 적어도 40% 서열 동일성을 갖고, Cas9 기능성을 보유한다. 바람직하게는, 서열 동일성은 적어도 90%, 95%, 또는 그 초과이다. 보다 바람직하게는, 서열 동일성은 적어도 98% 또는 99% 서열 동일성이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한 Cas9 변이체 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 서열 동일성은 아미노산 서열 동일성이다. Cas9 변이체는 또한 Cas9 이량체, Cas9 융합 단백질, Cas9 단편, 최소화 Cas9 단백질, 절단 도메인이 없는 Cas9 변이체, gRNA 도메인이 없는 Cas9 변이체, Cas9-레콤비나제 융합체, fCas9, FokI-dCas9 등을 포함한다. 이러한 Cas9 변이체의 예는, 예를 들어, 미국 공개 번호 20150071898 및 20150071899에서 확인할 수 있고, Cas9 단백질 및 Cas9 변이체의 설명은 본원에 참조로 포함된다. Cas9 변이체는 또한 Cas9의 단일 엔도뉴클레아제 도메인을 불활성화시키는 돌연변이(들)를 포함하는 Cas9 니카제를 포함한다. 이러한 니카제는 이중 가닥 파괴와 대조적으로 표적 핵산에 단일 가닥 파괴를 유도할 수 있다. Cas9 변이체는 또한 1개의 뉴클레아제 도메인이 돌연변이에 의해 불활성화된 Cas9 변이체인 Cas9 널 뉴클레아제를 포함한다. 추가의 Cas9 변이체 및/또는 추가의 Cas9 변이체를 확인하는 방법의 예는 미국 공개 번호 20140357523, 20150165054 및 20150166980에서 확인할 수 있고, Cas9 단백질, Cas9 변이체 및 그의 확인 방법에 관한 그의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0098] Cas9 변이체의 또 다른 예는 오직 니카제 활성만을 갖는, Cas9D10A로 공지된 돌연변이체 형태를 포함한다. Cas9D10A는 유전자좌가 인접한 DNA 닉을 생성하도록 설계된 쌍형성된 Cas9 복합체에 의해 표적화될 때 표적 특이성의 면에서 흥미롭다. Cas9 변이체의 또 다른 예는 뉴클레아제-결핍 Cas9 (dCas9)이다. HNH 도메인 내 돌연변이 H840A 및 RuvC 도메인 내 D10A는 절단 활성을 불활성화시키지만, DNA 결합을 막지 않는다. 따라서, 이

러한 변이체는 절단 없이 게놈의 임의의 영역을 서열-특이적으로 표적화하는데 사용될 수 있다. 대신에, 다양한 이펙터 도메인과 융합함으로써, dCas9가 유전자 침묵 또는 활성화 도구로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 편집 트랜스진은 본원에 제공된 Cas9 변이체 중 어느 하나를 코딩할 수 있다.

[0099] 부위 특이적 절단을 위해 (예를 들어, 게놈을 변형시키기 위해) RNA-프로그램가능한 엔도뉴클레아제, 예컨대 Cas9를 사용하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013); Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823-826 (2013); Hwang, W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nature biotechnology 31, 227-229 (2013); Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471 (2013); Dicarlo, J.E. et al. Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. Nucleic acids research (2013); Jiang, W. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature biotechnology 31, 233-239 (2013)] 참조).

[0100] 귀소 엔도뉴클레아제는, 여러 개 또는 단일 위치에서, 이를 합성하기 위해 사용된 게놈 DNA의 가수분해를 촉매함으로써, 그의 유전자를 숙주 내에 수평 전달하여 그의 대립 유전자의 빈도를 증가시킬 수 있다. 귀소 엔도뉴클레아제는 일반적으로 긴 인식 서열을 갖고, 이에 의해 낮은 무작위 절단 확률을 갖는다. 하나의 대립유전자는 전달 전에 유전자 (귀소 엔도뉴클레아제 유전자 +, HEG+)를 보유하지만, 다른 것은 그렇지 않고 (HEG-), 효소 절단에 감수성이다. 일단 합성되면, 효소는 HEG- 대립유전자에서 염색체를 파괴하여, 엔도뉴클레아제에 대한 유전자를 함유하는 재조합, 비손상 DNA 대립유전자, HEG+를 사용하여, 대향하는 패턴을 취하는 세포 DNA 복구 시스템으로부터 반응을 개시한다. 따라서, 유전자는 초기에는 이를 갖지 않았던 또 다른 대립유전자에 카피되고, 이는 연속적으로 전파된다. 귀소 엔도뉴클레아제의 예는, 예를 들어, 미국 공개 번호 20150166969; 및 미국 특허 번호 9,005,973에서 확인할 수 있고, 그의 귀소 엔도뉴클레아제는 본원에 참조로 포함된다.

[0101] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 유전자 발현 조정에 사용될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 유전자 발현 조정 트랜스진이다. 이러한 트랜스진은 1개 이상의 내인성 유전자의 발현을 증진, 억제 또는 조정할 수 있는 유전자 발현 조정제를 코딩한다. 내인성 유전자는 본원에 제공된 바와 같은 단백질 중 어느 하나를 코딩할 수 있고, 단 단백질은 대상체의 내인성 단백질이다. 따라서, 대상체는 유전자 발현 조정에 의해 제공되는 이익이 존재하는, 본원에 제공된 질환 또는 장애 중 어느 하나를 갖는 것일 수 있다.

[0102] 유전자 발현 조정제는 DNA-결합 단백질 (예를 들어, 인공 전사 인자, 예컨대 미국 공개 번호 20140296129의 것, 그의 인공 전사 인자는 본원에 참조로 포함됨; 및 미국 공개 번호 20030125286의 전사 사일렌서 단백질 NRF, 그의 전사 사일렌서 단백질 NRF는 본원에 참조로 포함됨) 뿐만 아니라 치료 RNA를 포함한다. 치료 RNA는 mRNA 번역 억제제 (안티센스), RNA 간섭 작용제 (RNAi), 촉매 활성 RNA 분자 (리보자임), 전달 RNA (tRNA) 및 단백질 및 다른 분자 리간드에 결합하는 RNA (압타머)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 유전자 발현 조정제는 상기의 임의의 작용제를 포함하고, 안티센스 핵산, RNAi 분자 (예를 들어, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 단일 가닥 RNA (ssRNA), 마이크로 RNA (miRNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)) 및 트리플렉스-형성 올리고뉴클레오티드 (TFO)를 포함한다. 유전자 발현 조정제는 또한 상기 RNA 분자 중 임의의 것의 변형된 버전을 포함할 수 있고, 따라서 변형된 mRNA, 예컨대 합성 화학적으로 변형된 RNA를 포함할 수 있다.

[0103] 유전자 발현 조정제는 안티센스 핵산일 수 있다. 안티센스 핵산은 유전자 발현 (예를 들어, 돌연변이체 단백질, 우성 활성 유전자 생성물, 독성과 연관된 단백질, 또는 감염원, 예컨대 바이러스에 의해 세포 내로 도입된 유전자 생성물의 발현)의 표적화된 억제를 제공할 수 있다. 따라서, 유전자 발현 조정 바이러스 전달 벡터는 우성-음성 또는 기능-획득 병인론적 메카니즘과 연관된 질환 또는 장애, 암 또는 감염를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 대상체는 바이러스 감염, 염증성 장애, 심혈관 질환, 암, 유전 장애 또는 자가면역 질환을 갖는 대상체일 수 있다. 안티센스 핵산은 또한 mRNA 스플라이싱 기구를 방해하고, 정상 세포 mRNA 프로세싱을 교란시킬 수 있다. 따라서, 유전자 발현 조정 트랜스진은 스플라이세오솜 단백질과 상호작용하는 요소를 코딩할 수 있다. 안티센스 핵산 (및 관련 구축물)의 예는, 예를 들어, 미국 공개 번호 20050020529 및 20050271733에서 확인할 수 있고, 그의 안티센스 핵산 및 구축물은 본원에 참조로 포함된다.

[0104] 유전자 발현 조정제는 또한 리보자임 (즉, 다른 RNA, 예컨대 단일-가닥 RNA를 절단할 수 있는 RNA 분자)일 수 있다. 이러한 분자는 RNA 분자 내의 특이적 뉴클레오티드 서열을 인식하고 이를 절단하도록 조작될 수 있다

(Cech, J. Amer. Med. Assn., 260:3030, 1988). 예를 들어, 리보자임은 리보자임을 함유하는 구축물에 상보적인 서열을 갖는 mRNA만이 불활성화되도록 조작될 수 있다. 리보자임의 유형 및 관련 구축물을 제조하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (Hasselhoff, et al., Nature, 334:585, 1988; 및 미국 공개 번호 20050020529, 이러한 리보자임 및 방법에 관한 그의 교시내용은 본원에 참조로 포함됨).

[0105] 유전자 발현 조정제는 간섭 RNA (RNAi)일 수 있다. RNA 간섭은 간섭 RNA에 의해 매개되는 서열-특이적 전사-후 유전자 침묵 프로세스를 지칭한다. 일반적으로, dsRNA의 존재는 RNAi 반응을 촉발할 수 있다. 다양한 시스템에서 RNAi가 연구되었다. 문헌 [Fire et al., 1998, Nature, 391, 806, RNAi in C. elegans; Bahramian and Zarbl, 1999, Molecular and Cellular Biology, 19, 274-283 and Wianny and Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70, RNAi mediated by dsRNA in mammalian systems; Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293, RNAi in Drosophila cells; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494, RNAi induced by introduction of duplexes of synthetic 21-nucleotide RNAs in cultured mammalian cells]. 이러한 작업은, 다른 것과 함께, RNAi 활성을 매개하기 위해 RNAi 분자의 구축에 도움이 되는 길이, 구조, 화학 조성 및 서열에 관한 안내를 제공한다. 다양한 간행물은 유전자 발현 조정제로서 사용될 수 있는 RNAi 분자의 예를 제공한다. 이러한 간행물은 미국 특허 번호 8,993,530, 8,877,917, 8,293,719, 7,947,659, 7,919,473, 7,790,878, 7,737,265, 7,592,322; 및 미국 공개 번호 20150197746, 20140350071, 20140315835, 20130156845 및 20100267805를 포함하며, RNAi 분자의 유형 뿐만 아니라 그의 생산에 관한 교시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0106] 압타머는 다양한 단백질 표적에 결합할 수 있고, 그러한 단백질이 다른 단백질과 상호작용하는 것을 교란시킬 수 있다. 따라서, 유전자 발현 조정제는 압타머일 수 있고, 유전자 발현 조정 트랜스진은 이러한 압타머를 코딩할 수 있다. 압타머는 조절 단백질의 DNA-결합 부위에 특이적으로 결합함으로써 유전자의 전사를 막는 능력에 대해 선택될 수 있다. PCT 공개 번호 WO98/29430 및 WO00/20040은 유전자 발현을 조정하는데 사용되는 압타머의 예를 제공하고; 미국 공개 번호 20060128649는 또한 이러한 압타머의 예를 제공하며, 이들 각각의 압타머는 본원에 참조로 포함된다.

[0107] 추가의 예로서, 유전자 발현 조정제는 트리플렉스 올리고머일 수 있다. 이러한 분자는 전사를 지연시킬 수 있다. 일반적으로, 이는 올리고머가 이중-나선 DNA에 감겨서 3-가닥 나선을 형성하기 때문에 트리플렉스 전략으로서 공지되어 있다. 이러한 분자는 선택된 유전자 상의 고유한 부위를 인식하도록 설계될 수 있다 (Maher, et al., Antisense Res. and Dev., 1(3):227, 1991; Helene, C., Anticancer Drug Design, 6(6):569, 1991).

[0108] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 또한 엑손 스키핑에 사용될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 엑손 스키핑 트랜스진이다. 이러한 트랜스진은 엑손 스키핑을 생성할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 다른 작용제를 코딩한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 엑손 내의 스플라이스 부위 또는 조절 요소를 방해하여, 유전자 돌연변이의 존재에도 불구하고 말단절단된, 부분적으로 기능적인 단백질을 발생시킬 수 있다. 추가적으로, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 돌연변이-특이적일 수 있고, 프리-메신저 RNA 내의 돌연변이 부위에 결합하여 엑손 스키핑을 유도할 수 있다. 엑손 스키핑을 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 일반적으로 AON으로 지칭된다. 이러한 AON은 snRNA를 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드, 그를 설계하는 방법 및 관련 생산 방법의 예는, 예를 들어, 미국 공개 번호 20150225718, 20150152415, 20150140639, 20150057330, 20150045415, 20140350076, 20140350067, 및 20140329762에서 확인할 수 있고, 그의 AON 뿐만 아니라 기재된 관련 방법, 예컨대 AON의 설계 및 생산 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0109] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 그를 필요로 하는 대상체의 세포에서 엑손 스키핑을 발생시키는데 사용될 수 있다. 대상체는 엑손 스키핑이 이익을 제공할 임의의 질환 또는 장애를 가질 수 있고, 이러한 질환 또는 장애와 관련된 적절한 단백질 (그의 발현 동안 엑손 스키핑이 이익이 될 것임)에 기초하여 안티센스 올리고뉴클레오티드가 설계될 수 있다. 질환 및 장애 및 관련 단백질의 예가 본원에 제공된다. 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 이영양증 중 어느 하나, 예컨대 근육 이영양증 (예를 들어, 뒤시엔느 근육 이영양증)을 갖는다. 따라서, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 엑손 스키핑 트랜스진은 본원에 제공된 이영양증 중 어느 하나와 연관된 또한 본원에 제공된 단백질 중 어느 하나에서 엑손 스키핑을 발생시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 다른 작용제를 코딩한다. 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 다른 작용제는 디스트로핀에서 엑손 스키핑을 발생시킬 수 있다.

[0110] 트랜스진의 서열은 또한, 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 발현 제어 DNA 서열은 프로모터, 인핸서, 및 오퍼

레이터를 포함하고, 이는 일반적으로, 발현 구축물이 활용될 발현 시스템에 기초하여 선택된다. 일부 실시양태에서, 프로모터 및 인핸서 서열은 유전자 발현을 증가시킬 수 있는 능력에 대해 선택되는 반면, 오퍼레이터 서열은 유전자 발현을 조절할 수 있는 능력에 대해 선택될 수 있다. 트랜스진은 또한 숙주 세포 내에서의 상동 재조합 및/또는 포장을 용이하게 하고, 바람직하게는 촉진하는 서열을 포함할 수 있다. 트랜스진은 또한 숙주 세포에서의 복제에 필요한 서열을 포함할 수 있다.

[0111] 예시적인 발현 제어 서열은 프로모터 서열, 예를 들어 시토메갈로바이러스 프로모터; 라우스 육종 바이러스 프로모터; 및 원숭이 바이러스 40 프로모터; 뿐만 아니라 본원의 다른 곳에 개시되거나 또는 관련 기술분야에 달리 공지되어 있는 임의의 다른 유형의 프로모터를 포함한다. 일반적으로, 프로모터는 목적하는 발현 생성물을 코딩하는 서열의 상류 (즉, 5')에 작동가능하게 연결된다. 트랜스진은 또한, 코딩 서열의 하류 (즉, 3')에 작동가능하게 연결된 적합한 폴리아데닐화 서열 (예를 들어, SV40 또는 인간 성장 호르몬 유전자 폴리아데닐화 서열)을 포함할 수 있다.

[0112] 바이러스 벡터

[0113] 바이러스는 이들이 감염시킨 세포 내부에서 자신의 게놈을 수송하기 위한 전문화된 메카니즘을 진화시켜 왔고; 이러한 바이러스에 기초한 바이러스 벡터는 세포를 형질도입하기 위해 특정한 적용에 맞출 수 있다. 본원에 제공된 바와 같이 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있거나 또는 본원에 기재되어 있다. 적합한 바이러스 벡터는, 예를 들어 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 (HSV)-기반 벡터, 아데노바이러스-기반 벡터, 아데노-연관 바이러스 (AAV)-기반 벡터, 및 AAV-아데노바이러스 키메라 벡터를 포함한다.

[0114] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 레트로바이러스에 기초할 수 있다. 레트로바이러스는 광범위한 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 단일 가닥 양성 센스 RNA 바이러스이다. 감염 시, 레트로바이러스 게놈은 그의 RNA 게놈으로부터 DNA를 생성하는 자신의 리버스 트랜스크립타제 효소를 이용하여, 그의 숙주 세포의 게놈 내로 통합된다. 이어서, 바이러스 DNA는 숙주 세포 DNA와 함께 복제되어, 바이러스 및 숙주 유전자를 번역하고 전사한다. 레트로바이러스 벡터는 바이러스 복제-부적격하도록 조작될 수 있다. 따라서, 레트로바이러스 벡터는 생체내 안정한 유전자 전달에 특히 유용한 것으로 여겨진다. 레트로바이러스 벡터의 예는, 예를 들어 미국 공개 번호 20120009161, 20090118212, 및 20090017543에서 확인할 수 있고, 이러한 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0115] 렌티바이러스 벡터는 본원에 제공된 바와 같은 바이러스 전달 벡터의 생성을 위해 사용될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 예이다. 렌티바이러스는 유전자 전달 벡터의 보다 효율적인 방법에 해당하는 특성인, 비분열 세포를 감염시킬 수 있는 능력을 갖는다 (예를 들어, 문헌 [Durand et al., Viruses. 2011 Feb; 3(2): 132-159] 참조). 렌티바이러스의 예는 HIV (인간), 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV), 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV), 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV) 및 비스나 바이러스 (양 렌티바이러스)를 포함한다. 다른 레트로바이러스와 달리, HIV-기반 벡터는 그의 패신저 유전자를 비분열 세포 내로 혼입시키는 것으로 공지되어 있다. 렌티바이러스 벡터의 예는, 예를 들어 미국 공개 번호 20150224209, 20150203870, 20140335607, 20140248306, 20090148936, 및 20080254008에서 확인할 수 있고, 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0116] 단순 포진 바이러스 (HSV)-기반 바이러스 벡터가 또한, 본원에 제공된 바와 같이 사용하기에 적합하다. 많은 복제-결핍 HSV 벡터는 복제를 방지하기 위해 하나 이상의 중간-초기 유전자를 제거하는 결실을 함유한다. 포진 벡터의 이점은 장기간 DNA 발현을 발생시킬 수 있는 잠복기 진입 능력, 및 최대 25 kb의 외인성 DNA를 수용할 수 있는 그의 대형 바이러스 DNA 게놈이다. HSV-기반 벡터의 설명에 관해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,837,532, 5,846,782, 5,849,572, 및 5,804,413, 및 국제 특허 출원 WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637, 및 WO 99/06583을 참조하고, 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법에 관한 설명은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0117] 아데노바이러스 (Ad)는 DNA를 다양한 상이한 표적 세포 유형으로 생체내 전달할 수 있는 비-외피보유 바이러스이다. 바이러스는 바이러스 복제에 필요한 선택 유전자를 결실시킴으로써 복제-결핍으로 만들 수 있다. 소모성 비-복제 필수 E3 영역이 또한 빈번하게 결실되어, 더 큰 DNA 삽입물에 대한 추가의 공간을 허용한다. 바이러스 전달 벡터는 아데노바이러스에 기초할 수 있다. 아데노바이러스 전달 벡터는 높은 역가로 생산될 수 있고, DNA를 복제 및 비-복제 세포로 효율적으로 전달할 수 있다. 렌티바이러스와 달리, 아데노바이러스 DNA는 게놈 내로 통합되지 못하므로, 세포 분열 동안에는 복제되지 않고, 대신 숙주의 복제 기구를 이용하여 숙주 세

포의 핵에서 복제된다.

[0118] 바이러스 전달 벡터의 기초가 될 수 있는 아데노바이러스는 임의의 기원, 임의의 하위군, 임의의 하위유형, 하위유형의 혼합물, 또는 임의의 혈청형으로부터 비롯될 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스는 하위군 A (예를 들어, 혈청형 12, 18, 및 31), 하위군 B (예를 들어, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 및 50), 하위군 C (예를 들어, 혈청형 1, 2, 5, 및 6), 하위군 D (예를 들어, 혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 및 42-48), 하위군 E (예를 들어, 혈청형 4), 하위군 F (예를 들어, 혈청형 40 및 41), 분류되지 않은 혈청군 (예를 들어, 혈청형 49 및 51), 또는 임의의 다른 아데노바이러스 혈청형의 것일 수 있다. 아데노바이러스 혈청형 1 내지 51은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection) (ATCC, 미국 버지니아주 마나사스)으로부터 입수가능하다. 비-그룹 C 아데노바이러스, 및 심지어 비-인간 아데노바이러스를 이용하여, 복제-결핍 아데노바이러스 벡터를 제조할 수 있다. 비-그룹 C 아데노바이러스 벡터, 비-그룹 C 아데노바이러스 벡터의 생성 방법, 및 비-그룹 C 아데노바이러스 벡터의 사용 방법이, 예를 들어 미국 특허 번호 5,801,030, 5,837,511, 및 5,849,561, 및 국제 특허 출원 WO 97/12986 및 WO 98/53087에 개시된다. 임의의 아데노바이러스, 심지어 키메라 아데노바이러스가 아데노바이러스 벡터에 대한 바이러스 게놈의 공급원으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 아데노바이러스가 복제-결핍 아데노바이러스 벡터에 대한 바이러스 게놈의 공급원으로서 사용될 수 있다. 아데노바이러스 벡터의 추가의 예는 미국 공개 번호 20150093831, 20140248305, 20120283318, 20100008889, 20090175897 및 20090088398에서 확인할 수 있고, 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법에 관한 설명은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0119] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 또한 아데노-연관 바이러스 (AAV)에 기초할 수 있다. AAV 벡터는 본원에 기재된 것과 같은 치료 용도에서 사용하기 위한 것으로 특히 관심 대상이다. AAV는 인간 질환을 유발하는 것으로 공지되어 있지 않은 DNA 바이러스이다. 일반적으로, AAV는 효율적인 복제를 위해, 헬퍼 바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 또는 포진 바이러스)와의 공동-감염, 또는 헬퍼 유전자의 발현을 필요로 한다. AAV는 특이적 부위에서 숙주 세포 게놈을 안정적으로 감염시킬 수 있는 능력을 갖고, 이는 레트로바이러스보다 더 예측 가능하게 만들지만; 일반적으로 벡터의 클로닝 용량은 4.9 kb이다. 유전자 요법 분야에 사용되어 왔던 AAV 벡터는 일반적으로 모 게놈의 대략 96%가 결실되었으므로, DNA 복제 및 패키징을 위한 인식 신호를 함유하는 말단 반복부 (ITR) 만이 남아 있다. AAV-기반 벡터의 설명에 관해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 8,679,837, 8,637,255, 8,409,842, 7,803,622, 및 7,790,449, 및 미국 공개 번호 20150065562, 20140155469, 20140037585, 20130096182, 20120100606, 및 20070036757을 참조하고, 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. AAV 벡터는 재조합 AAV 벡터일 수 있다. AAV 벡터는 또한 자기-상보적 (sc) AAV 벡터일 수 있고, 이는 예를 들어, 미국 특허 공개 2007/01110724 및 2004/0029106, 및 미국 특허 번호 7,465,583 및 7,186,699에 기재되어 있고, 벡터 및 그의 생산 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0120] 바이러스 전달 벡터의 기초가 될 수 있는 아데노-연관 바이러스는 임의의 혈청형 또는 혈청형의 혼합물의 것일 수 있다. AAV 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 및 AAV11을 포함한다. 예를 들어, 바이러스 전달 벡터가 혈청형의 혼합물을 기초로 하는 경우, 바이러스 전달 벡터는 하나의 AAV 혈청형 (예를 들어, AAV 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 및 11 중 어느 하나로부터 선택됨)으로부터 취한 캡시드 신호 서열 및 상이한 혈청형 (예를 들어, AAV 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 및 11 중 어느 하나로부터 선택됨)으로부터의 패키징 서열을 함유할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV 2/8 벡터이다. 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV 2/5 벡터이다.

[0121] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 또한 알파바이러스에 기초할 수 있다. 알파바이러스는 신드비스(Sindbis) (및 VEEV) 바이러스, 아우라(Aura) 바이러스, 바반키(Babanki) 바이러스, 바마 포레스트(Barmah Forest) 바이러스, 베바루(Bebaru) 바이러스, 카바소우(Cabassou) 바이러스, 치쿤군야(Chikungunya) 바이러스, 동부 말 뇌염(Eastern equine encephalitis) 바이러스, 에버글레이즈(Everglades) 바이러스, 포트 모건(Fort Morgan) 바이러스, 게타(Getah) 바이러스, 하이랜즈 J(Highlands J) 바이러스, 키지라가흐(Kyzylagach) 바이러스, 마야로(Mayaro) 바이러스, 메 트리(Me Tri) 바이러스, 미델뷔르흐(Middelburg) 바이러스, 모쏘 다스 페드라스(Mosso das Pedras) 바이러스, 무캄보(Mucambo) 바이러스, 엔두무(Ndumu) 바이러스, 오니옹니옹(O'nyong-nyong) 바이러스, 픽수나(Pixuna) 바이러스, 리오 네그로(Rio Negro) 바이러스, 로스강(Ross River) 바이러스, 연어 췌장 질환(Salmon pancreas disease) 바이러스, 셈리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스, 남방 코끼리 물범(Southern elephant seal) 바이러스, 토나테(Tonate) 바이러스, 트로카라(Trocara) 바이러스, 우나(Una) 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염(Venezuelan equine encephalitis) 바이러스, 서부 말 뇌염(Western equine

encephalitis) 바이러스, 및 화타로아(Whataroa) 바이러스를 포함한다. 일반적으로, 이러한 바이러스의 게놈은 숙주 세포의 세포질에서 번역될 수 있는 비구조 단백질 (예를 들어, 레플리콘) 및 구조 단백질 (예를 들어, 캡시드 및 외피)을 코딩한다. 로스강 바이러스, 신드비스 바이러스, 셈리키 포레스트 바이러스 (SFV), 및 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 (VEEV)는 모두, 트랜스진 전달을 위한 바이러스 전달 벡터를 개발하는데 사용되어 왔다. 유사형화 바이러스는 알파바이러스 외피 당단백질 및 레트로바이러스 캡시드를 조합함으로써 형성될 수 있다. 알파바이러스 벡터의 예는 미국 공개 번호 20150050243, 20090305344, 및 20060177819에서 확인할 수 있고; 벡터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0122] 코르티코스테로이드

[0123] 코르티코스테로이드는 예컨대 척추동물의 부신 피질에서 생산된 스테로이드 호르몬, 뿐만 아니라 이들 호르몬의 합성 유사체이다. 코르티코스테로이드는 글루코코르티코이드 및 미네랄로코르티코이드를 포함한다.

[0124] 코르티코스테로이드의 예는 알클로메타손, 암시노니드, 베클로메타손, 베타메타손, 부데소니드, 시클레소니드, 클로베타솔, 클로베타손, 클로코르톨론, 클로프레드놀, 코르티바졸, 데플라자코르트, 데옥시코르티코스테론, 데소니드 데스옥시메타손, 덱사메타손, 디플로라손, 디플루코르톨론, 디플루프레드네이트, 플루클로롤론, 플루드로코르티손, 플루드록시코르티드, 플루메타손, 플루니솔리드, 플루오시놀론 아세토니드, 플루오시노니드, 플루오코르틴, 플루오코르톨론, 플루오로메톨론, 플루페롤론, 플루티카손, 플루티카손 프로피오네이트, 플루프레드니덴, 포르모코르탈, 할시노니드, 할로메타손, 히드로코르티손 아세포네이트, 히드로코르티손 부테프레이트, 히드로코르티손 부티레이트, 로테프레드놀, 메드리손, 메프레드니손, 메틸프레드니솔론, 메틸프레드니솔론 아세포네이트, 모메타손 푸로에이트, 파라메타손, 프레드니카르베이트, 프레드니손, 프레드니솔론, 프레드닐리덴, 리멕솔론, 틱소코르톨, 트리암시놀론 및 울로베타솔, 또는 그의 조합, 임의로 그의 라세미체, 그의 거울상이성질체, 그의 부분입체이성질체의 형태 및 그의 혼합물, 및 임의로 그의 약리학상 상용성인 산 부가염을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 코르티코스테로이드는 덱사메타손 (Dex), 메틸프레드니솔론 또는 그의 유도체이다. 메틸프레드니솔론의 유도체는, 예를 들어, 메틸프레드니솔론 숙신산나트륨 및 메틸프레드니솔론 아세테이트를 포함한다. 덱사메타손의 유도체는, 예를 들어, 덱사메타손 인산나트륨 및 덱사메타손 아세테이트를 포함한다.

[0125] 코르티코스테로이드의 또 다른 예는 천연인 것 (예를 들어, 11-데히드로코르티코스테론 (11-옥소코르티코스테론, 17-데옥시코르티손) = 21-히드록시프레근-4-엔-3,11,20-트리온; 11-데옥시코르티코스테론 (데옥시코르톤, 데스옥시코르톤; 21-히드록시프로게스테론) = 21-히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 11-데옥시코르티솔 (코르토독손, 코르텍솔론) = 17α,21-디히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 11-케토프로게스테론 (11-옥소프로게스테론; 케토게스틴) = 프레근-4-엔-3,11,20-트리온; 11β-히드록시프레그네놀론 = 3β,11β-디히드록시프레근-5-엔-20-온; 11β-히드록시프로게스테론 (21-데옥시코르티코스테론) = 11β-히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 11β,17α,21-트리히드록시프레그네놀론 = 3β,11β,17α,21-테트라히드록시프레근-5-엔-20-온; 17α,21-디히드록시프레그네놀론 = 3β,17α,21-트리히드록시프레근-5-엔-20-온; 17α-히드록시프레그네놀론 = 3β,17α-디히드록시프레근-5-엔-20-온; 17α-히드록시프로게스테론 = 17α-히드록시프레근-4-엔-3,11,20-트리온; 18-히드록시-11-데옥시코르티코스테론 = 18,21-디히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 18-히드록시코르티코스테론 = 11β,18,21-트리히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 18-히드록시프로게스테론 = 18-히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 21-데옥시코르티솔 = 11β,17α-디히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 21-데옥시코르티손 = 17α-히드록시프레근-4-엔-3,11,20-트리온; 21-히드록시프레그네놀론 (프레베디올론) = 3β,21-디히드록시프레근-5-엔-20-온; 알도스테론 = 11β,21-디히드록시프레근-4-엔-3,18,20-트리온; 코르티코스테론 (17-데옥시코르티솔) = 11β,21-디히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 코르티솔 (히드로코르티손) = 11β,17α,21-트리히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 코르티손 = 17α,21-디히드록시프레근-4-엔-3,11,20-트리온; 프레그네놀론 = 프레근-5-엔-3β-올-20-온; 및 프로게스테론 = 프레근-4-엔-3,20-디온); 합성인 것, 예컨대 프로게스테론-유형 (예를 들어, 플루게스톤 (플루로게스톤) = 9α-플루오로-11β,17α-디히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 플루오로메톨론 = 6α-메틸-9α-플루오로-11β,17α-디히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 메드리손 (히드록시메틸프로게스테론) = 6α-메틸-11β-히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 및 프레베디올론 아세테이트 (21-아세톡시프레그네놀론) = 3β,21-디히드록시프레근-5-엔-20-온 21-아세테이트) 및 프로게스테론 유도체 프로게스틴 (예를 들어, 클로르마디논 아세테이트, 시프로테론 아세테이트, 메드로게스톤, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 메게스트롤 아세테이트, 및 세게스테론 아세테이트); 히드로코르티손-유형 (예를 들어, 클로로프레드니손 = 6α-클로로-17α,21-디히드록시프레그나-1,4-디엔-3,11,20-트리온; 클로프레드놀 = 6-클로로-11β,17α,21-트리히드록시프레그나-1,4,6-트리엔-3,20-디온; 디플루프레드네이트 = 6α,9α-디플루오

로-11β,17α,21-트리히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 17α-부티레이트 21-아세테이트; 플루드로코르티손 = 9α-플루오로-11β,17α,21-트리히드록시프레근-4-엔-3,20-디온; 플루오시놀론 = 6α,9α-디플루오로-11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 플루페롤론 = 9α-플루오로-11β,17α,21-트리히드록시-21-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 플루프레드니솔론 = 6α-플루오로-11β,17α,21-트리히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 로테프레드놀 = 11β,17α,디히드록시-21-옥사-21-클로로메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 메틸프레드니솔론 = 6α-메틸-11β,17α,21-트리히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 프레드니카르베이트 = 11β,17α,21-트리히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 17α-에틸카르보네이트 21-프로피오네이트; 프레드니솔론 = 11β,17α,21-트리히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 프레드니손 = 17α,21-디히드록시프레그나-1,4-디엔-3,11,20-트리온; 틱소코르톨 = 11β,17α-디히드록시-21-술파닐프레근-4-엔-3,20-디온; 및 트리암시놀론 = 9α-플루오로-11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온); 메타손-유형 (16-메틸화) (예를 들어, 메타손; 알클로메타손 = 7α-클로로-11β,17α,21-트리히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 베클로메타손 = 9α-클로로-11β,17α,21-트리히드록시-16β-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 베타메타손 = 9α-플루오로-11β,17α,21-트리히드록시-16β-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 클로베타솔 = 9α-플루오로-11β,17α-디히드록시-16β-메틸-21-클로로프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 클로베타손 = 9α-플루오로-16β-메틸-17α-히드록시-21-클로로프레그나-1,4-디엔-3,11,20-트리온; 클로코르톨론 = 6α-플루오로-9α-클로로-11β,21-디히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 데스옥시메타손 = 9α-플루오로-11β,21-디히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 덱사메타손 = 9α-플루오로-11β,17α,21-트리히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 디플로라손 = 6α,9α-디플루오로-11β,17α,21-트리히드록시-16β-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 디플루오코르톨론 = 6α,9α-디플루오로-11β,21-디히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 플루클로롤론 = 6α-플루오로-9α,11β-디클로로-16α,17α,21-트리히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 플루메타손 = 6α,9α-디플루오로-11β,17α,21-트리히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 플루오코르틴 = 6α-플루오로-11β,21-디히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20,21-트리온; 플루오코르톨론 = 6α-플루오로-11β,21-디히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 플루프레드니덴 = 9α-플루오로-11β,17α,21-트리히드록시-16-메틸렌프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 플루티카손 = 6α,9α-디플루오로-11β,17α-디히드록시-16α-메틸-21-티아-21-플루오로메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 플루티카손 푸로에이트 = 6α,9α-디플루오로-11β,17α-디히드록시-16α-메틸-21-티아-21-플루오로메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 17α-(2-푸로에이트); 할로메타손 = 2-클로로-6α,9α-디플루오로-11β,17α,21-트리히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 메프레드니손 = 16β-메틸-17α,21-디히드록시프레그나-1,4-디엔-3,11,20-트리온; 모메타손 = 9α,21-디클로로-11β,17α-디히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 모메타손 푸로에이트 = 9α,21-디클로로-11β,17α-디히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 17α-(2-푸로에이트); 파라메타손 = 6α-플루오로-11β,17α,21-트리히드록시-16α-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 프레드닐리덴 = 11β,17α,21-트리히드록시-16-메틸렌프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 리멕솔론 = 11β-히드록시-16α,17α,21-트리메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-디온; 및 울로베타솔 (할로베타솔) = 6α,9α-디플루오로-11β,17α-디히드록시-16β-메틸-21-클로로프레그나-1,4-디엔-3,20-디온); 아세토니드 및 관련된 것 (예를 들어, 암시노니드 = 9α-플루오로-11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + 시클로펜타논, 21-아세테이트; 부데소니드 = 11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + 부티르알데히드; 시클레소니드 = 11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + (R)-시클로헥산카르복스알데히드, 21-이소부티레이트; 데플라자코르트 = 11β,21-디히드록시-2'-메틸-5'H-프레그나-1,4-디에노[17,16-d]옥사졸-3,20-디온 21-아세테이트; 데소니드 = 11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + 아세톤; 포르모코르탈 (플루오로포르밀론) = 3-(2-클로로에톡시)-9α-플루오로-11β,16α,17α,21-테트라히드록시-20-옥소프레그나-3,5-디엔-6-카르복스알데히드 시클릭 16α,17α-아세탈 + 아세톤, 21-아세테이트; 플루클로롤론 아세토니드 (플루클로로니드) = 6α-플루오로-9α,11β-디클로로-16α,17α,21-트리히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + 아세톤; 플루드록시코르티드 (플루란드레놀론, 플루란드레놀리드) = 6α-플루오로-11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레근-4-엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + 아세톤; 플루니솔리드 = 6α-플루오로-11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + 아세톤; 플루오시놀론 아세토니드 = 6α,9α-디플루오로-11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + 아세톤; 플루오시노니드 = 6α,9α-디플루오로-11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + 아세톤, 21-아세테이트; 할시노니드 = 9α-플루오로-11β,16α,17α-트리히드록시-21-클로로프레근-4-엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아세탈 + 아세톤; 및 트리암시놀론 아세토니드 = 9α-플루오로-11β,16α,17α,21-테트라히드록시프레그나-1,4-디엔-3,20-디온 시클릭 16α,17α-아

세탈 + 아세톤); 및 또 다른 것 (예를 들어, 코르티바졸 = 6,16α-디메틸-11β,17α,21-트리히드록시-2'-페닐[3,2-c]피라졸로프레그나-4,6-디엔-20-온 21-아세테이트; 및 RU-28362 = 6-메틸-11β,17β-디히드록시-17α-(1-프로피닐)안드로스타-1,4,6-트리엔-3-온)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0126] 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 코르티코스테로이드는 합성 나노담체에 커플링되지 않는다.

[0127] 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체

[0128] 매우 다양한 합성 나노담체가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 구체 또는 구형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 편평하거나 또는 플레이트 모양이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 정육면체 또는 입방체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 계란형 또는 타원이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 원통형, 원뿔형 또는 피라미드형이다.

[0129] 일부 실시양태에서, 각각의 합성 나노담체가 유사한 특성을 갖도록 크기 또는 형상 면에서 비교적 균일한 합성 나노담체의 집단을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노담체의 총수에 기초하여, 본원에 제공된 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 합성 나노담체의 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는, 이러한 합성 나노담체의 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10%, 또는 20% 이내에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다.

[0130] 합성 나노담체는 고체 또는 중공일 수 있고, 1개 이상의 층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각 층은 다른 층(들)과 비교해서 고유한 조성 및 고유한 특성을 갖는다. 하나의 예로, 합성 나노담체는 코어/쉘 구조를 가질 수 있고, 여기서 코어는 1개의 층이고 (예를 들어, 중합체 코어), 쉘은 제2의 층 (예를 들어, 지질 이중층 또는 단층)이다. 합성 나노담체는 복수의 상이한 층을 포함할 수 있다.

[0131] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 지질을 임의로 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 중합체 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 비-중합체 코어 (예를 들어, 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자, 골 입자, 바이러스 입자, 단백질, 핵산, 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.

[0132] 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체 합성 나노담체는 비-중합체 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0133] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 친양쪽성 실체를 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 실체는 증가된 안정성, 개선된 균일성, 또는 증가된 점도를 갖는 합성 나노담체의 생성을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 실체는 지질 막 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)의 내부 표면과 회합될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 많은 친양쪽성 실체가 본 발명에 따라 합성 나노담체를 제조하는데 사용하기에 적합하다. 이러한 친양쪽성 실체는 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 (스판(Span)®85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트 (스판®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 스테아레이트; 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; 카오트로픽 염; 이온 쌍형성

작용제; 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 친양쪽성 실체 성분은 상이한 친양쪽성 실체의 혼합물일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이것이 계면활성제 활성을 갖는 물질의 포괄적인 목록이 아니라 예시적인 목록이라는 것을 인식할 것이다. 임의의 친양쪽성 실체가 본 발명에 따라 사용될 합성 나노담체의 생성에 사용될 수 있다.

[0134] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 탄수화물을 임의로 포함할 수 있다. 탄수화물은 천연 또는 합성일 수 있다. 탄수화물은 유도된 천연 탄수화물일 수 있다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 모노사카라이드 또는 디사카라이드를 포함하며, 이는 글루코스, 프룩토스, 갈락토스, 리보스, 락토스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 셀로비오스, 만노스, 크실로스, 아라비노스, 글루쿠론산, 갈락토론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민, 및 뉴람산을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 폴리사카라이드이며, 이는 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 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 탄수화물, 예컨대 폴리사카라이드를 포함하지 않는다 (또는 구체적으로 배제한다). 특정 실시양태에서, 탄수화물은 탄수화물 유도체, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 크실리톨, 에리트리톨, 말티톨 및 락티톨을 포함하나 이에 제한되지는 않는 당 알콜을 포함할 수 있다.

[0135] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체인 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 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)가 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 모든 중합체가 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-종결 중합체인 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 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)가 비-메톡시-종결 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 모든 중합체가 비-메톡시-종결 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 플루로닉 중합체를 포함하지 않는 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 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)가 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 모든 중합체가 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 이러한 중합체는 코팅 층 (예를 들어, 리포솜, 지질 단층, 미셀 등)에 의해 둘러싸일 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 요소가 상기 중합체에 부착될 수 있다.

[0136] 면역억제제는 수많은 방법 중 임의의 것에 의해 합성 나노담체와 커플링될 수 있다. 일반적으로, 부착은 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합에 따른 결과일 수 있다. 이러한 결합으로 인해, 면역억제제가 합성 나노담체의 표면에 부착되게 하고/거나 합성 나노담체 내에 함유 (캡슐화)될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 대한 결합보다는 오히려 합성 나노담체의 구조에 따른 결과로서 합성 나노담체에 의해 캡슐화된다. 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함하고, 면역억제제는 중합체에 부착된다.

[0137] 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합에 따른 결과로서 부착이 일어나는 경우, 이러한 부착은 커플링 모이어티를 통해 일어날 수 있다. 커플링 모이어티는, 이를 통해 면역억제제가 합성 나노담체와 결합되는 임의의 모이어티일 수 있다. 이러한 모이어티는 공유 결합, 예컨대 아미드 결합 또는 에스테르 결합을 포함할 뿐만 아니라 면역억제제를 합성 나노담체와 (공유 또는 비공유) 결합시켜 주는 별개의 분자를 포함한다. 이러한 분자는 링커 또는 중합체 또는 그의 유닛을 포함한다. 예를 들어, 커플링 모이어티는 면역억제제와 정전기적으로 결합하는, 하전된 중합체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 커플링 모이어티는 그와 공유 결합되는 중합체 또는 그의 유닛을 포함할 수 있다.

[0138] 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함한다. 이들 합성 나노담체는 완전하게 중합체성일 수 있거나 또는 중합체와 다른 물질의 혼합물일 수 있다.

[0139] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 중합체들이 회합하여 중합체 매트릭스를 형성한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 성분, 예컨대 면역억제제는 이러한 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 공유 회합될 수 있다. 일

부 실시양태에서, 공유 회합은 링커에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 성분은 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 비공유 회합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 성분은 중합체 매트릭스 내에 캡슐화될 수 있고/거나, 이러한 매트릭스에 의해 둘러싸일 수 있고/거나 상기 매트릭스 전반에 걸쳐 분산될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 성분은 소수성 상호작용, 전하 상호작용, 반 데르 발스 힘 등에 의해 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 회합될 수 있다. 광범위한 중합체 및 그로부터 중합체 매트릭스를 형성하는 방법은 통상적으로 공지되어 있다.

[0140] 중합체는 천연 또는 비천연 (합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 단독중합체이거나 또는 2개 이상의 단량체를 포함하는 공중합체일 수 있다. 순서의 면에서, 공중합체는 무작위 또는 블록일 수 있거나 또는 무작위 및 블록 순서의 조합을 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따른 중합체는 유기 중합체이다.

[0141] 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, 중합체가 생분해성인 것이 바람직하다. 따라서, 이들 실시양태에서, 중합체가 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛을 포함하는 경우, 중합체는 폴리에테르와 생분해성 중합체의 블록 공중합체를 포함하여, 중합체가 생분해성이 되도록 하는 것이 바람직하다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리에테르 또는 그의 유닛, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛을 단독으로 포함하지 않는다.

[0142] 본 발명에 사용하기 적합한 중합체의 다른 예는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트 (예를 들어, 폴리(1,3-디옥산-2온)), 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)), 폴리프로필푸마레이트, 폴리아미드 (예를 들어, 폴리카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-코-글리콜리드, 폴리카프로락톤, 폴리히드록시산 (예를 들어, 폴리(β-히드록시알카노에이트))), 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 및 폴리아민, 폴리리신, 폴리리신-PEG 공중합체, 및 폴리(에틸렌이민), 폴리(에틸렌 이민)-PEG 공중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0143] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 중합체는 21 C.F.R. § 177.2600 하에 미국 식품 의약품국 (FDA)에 의해 인간에게 사용하도록 승인된 중합체를 포함하며, 이는 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리발레롤락톤, 폴리(1,3-디옥산-2온)); 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리시아노아크릴레이트를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0144] 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 중합체 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 합성 나노담체 내에 친수성 환경을 생성한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 중합체 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 합성 나노담체 내에 소수성 환경을 생성한다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노담체 내에 혼입되는 물질의 성질에 강력한 영향을 미칠 수 있다.

[0145] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 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 번호 WO2009/051837 (Von Andrian et al.)의 일반적 교시를 이용하여 이루어질 수 있다.

[0146] 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.

[0147] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에스테르일 수 있고, 이는 락트산과 글리콜산 유닛을 포함하는 공중합체, 예

컨대 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드) (본원에서 집합적으로 "PLGA"로서 지칭됨); 및 글리콜산 유닛을 포함하는 단독중합체 (본원에서 "PGA"로서 지칭됨); 및 락트산 유닛을 포함하는 단독중합체, 예컨대 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드, 및 폴리-D,L-락티드 (본원에서 집합적으로 "PLA"로서 지칭됨)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예시적인 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리히드록시산; 락티드와 글리콜리드의 공중합체 및 PEG 공중합체 (예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체), 및 그의 유도체를 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.

[0148] 일부 실시양태에서, 중합체는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산과 글리콜산의 생체적합성 및 생분해성 공중합체이고, 다양한 형태의 PLGA는 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.

[0149] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴 중합체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 아크릴 중합체는, 예를 들어 아크릴산과 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 하나 이상을 포함하는 조합물을 포함한다. 아크릴 중합체는 4급 암모늄 기의 함량이 낮은 아크릴산과 메타크릴산 에스테르의 완전 중합된 공중합체를 포함할 수 있다.

[0150] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 핵산의 음으로 하전된 가닥을 응축 및/또는 보호할 수 있다. 아민-함유 중합체, 예컨대 폴리(리신) (문헌 [Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; 및 Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7]), 폴리(에틸렌 이민) (PEI; 문헌 [Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297]), 및 폴리(아미도아민) 덴드리머 (문헌 [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])가 생리학상 pH에서 양으로-하전되어, 핵산과 이온 쌍을 형성한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 양이온성 중합체를 포함하지 않을 수 있다 (또는 이를 배제할 수 있다).

[0151] 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) (문헌 [Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010]), 폴리(세린 에스테르) (문헌 [Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399]), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (문헌 [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) (문헌 [Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633])를 포함한다.

[0152] 이들 및 다른 중합체의 특성, 및 이들의 제조 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 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 번호 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446, 및 6,818,732)에 기재되어 있다.

[0153] 일부 실시양태에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 덴드리머일

수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 서로 실질적으로 가교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 가교가 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 가교 단계를 거치지 않으면서 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 합성 나노담체는 상기 및 다른 중합체 중 임의의 것의 블록 공중합체, 그라프트 공중합체, 블렌드, 혼합물 및/또는 부가물을 포함할 수 있는 것으로 추가로 이해되어야 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 열거된 중합체가 본 발명에 따라 사용될 수 있는 중합체의 포괄적인 목록이 아니라 예시적인 목록을 나타낸다는 것을 인식할 것이다.

[0154] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체 성분을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체 합성 나노담체는 비-중합체 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0155] 본원에 제공된 바와 같은 임의의 면역억제제는, 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 커플링될 수 있다. 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 ("라파로그"); TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제; 미토콘드리아 기능의 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; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시솜 증식자-활성화된 수용체 길항제; 퍼옥시솜 증식자-활성화된 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제 및 산화된 ATP를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한, IDO, 비타민 D3, 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오퓨린, 6-메르캅토퓨린, 아스피린, 니플룸산, 에스트리올, 트리폴리드, 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-10), 시클로스포린 A, siRNA 표적화 시토카인 또는 시토카인 수용체 등을 포함한다.

[0156] 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 소재의 셀렉(Selleck)으로부터 입수 가능함)를 포함한다.

[0157] 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.

[0158] 본원에 사용된 "라파로그"는 라파마이신과 구조상 관련된 (유사체) 분자 (시롤리무스)를 지칭한다. 라파로그의 예는, 비제한적으로, 템시롤리무스 (CCI-779), 에베롤리무스 (RAD001), 리다포롤리무스 (AP-23573), 및 조타롤리무스 (ABT-578)를 포함한다. 라파로그의 추가의 예는, 예를 들어 WO 공개 WO 1998/002441 및 미국 특허 번호 8,455,510에서 확인할 수 있고, 그의 라파로그는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0159] 추가의 면역억제제가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명은 이러한 측면으로 제한되지 않는다. 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 실시양태에서, 면역억제제는 본원에 제공된 바와 같은 작용제 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0160] 본 발명에 따른 조성물은 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 보존제, 완충제, 염수, 또는 포스페이트 완충 염수를 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제작 및 배합 기술을 이용하여 만들 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사하기 위해 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.

[0161] D. 조성물의 사용 및 제조 방법

[0162] 바이러스 전달 벡터는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되거나 또는 본원에 달리 기재된 바와 같은 방법을 이용하여 만들 수 있다. 예를 들어, 바이러스 전달 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,797,368 및 문헌 [Laughlin et al., Gene, 23, 65-73 (1983)]에 제시된 방법을 이용하여 구축 및/또는 정제할 수 있다.

[0163] 예로서, 복제-결핍 아데노바이러스 벡터는 높은 역가의 바이러스 전달 벡터 스톡을 생성하기 위해 적절한 수준에서, 복제-결핍 아데노바이러스 벡터에 존재하지 않지만, 바이러스 전파를 위해 필요한 유전자 기능을 제공하

는 상보성 세포주에서 생성될 수 있다. 이러한 상보성 세포주는 모든 아데노바이러스 기능 (예를 들어, 아데노바이러스 앰플리콘의 전파를 가능하게 하는 것)을 포함한, 초기 영역, 후기 영역, 바이러스 패키징 영역, 바이러스-연관 RNA 영역, 또는 그의 조합에 의해 코딩된 적어도 한 가지의 복제-필수 유전자 기능에 있어서의 결핍을 보완시켜 줄 수 있다. 상보성 세포주의 구축은 표준 분자 생물학 및 세포 배양 기술, 예컨대 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), 및 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)]에 기재된 것을 포함한다.

[0164] 아데노바이러스 벡터를 생성하기 위한 상보성 세포주는 293 세포 (예를 들어, 문헌 [Graham et al., J. Gen. Virol., 36, 59-72 (1977)]에 기재됨), PER.C6 세포 (예를 들어, 국제 특허 출원 WO 97/00326, 및 미국 특허 번호 5,994,128 및 6,033,908에 기재됨), 및 293-ORF6 세포 (예를 들어, 국제 특허 출원 WO 95/34671 및 문헌 [Brough et al., J. Virol., 71, 9206-9213 (1997)]에 기재됨)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 상보성 세포는 필요한 모든 아데노바이러스 유전자 기능을 보완하지 않을 것이다. 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스 벡터의 복제를 가능하게 하는 세포성 또는 아데노바이러스 게놈에 의해 코딩되지 않은 트랜스에서의 유전자 기능을 제공하기 위해 이용될 수 있다. 아데노바이러스 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,965,358, 5,994,128, 6,033,908, 6,168,941, 6,329,200, 6,383,795, 6,440,728, 6,447,995, 및 6,475,757, 미국 특허 출원 공개 번호 2002/0034735 A1, 및 국제 특허 출원 WO 98/53087, WO 98/56937, WO 99/15686, WO 99/54441, WO 00/12765, WO 01/77304, 및 WO 02/29388 뿐만 아니라 본원에서 확인된 다른 참고문헌에 제시된 물질 및 방법을 이용하여 구축, 전파 및/또는 정제할 수 있다. 아데노바이러스 혈청형 35 벡터를 포함한, 비-그룹 C 아데노바이러스 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,837,511 및 5,849,561, 및 국제 특허 출원 WO 97/12986 및 WO 98/53087에 제시된 방법을 이용하여 생성할 수 있다.

[0165] AAV 벡터는 재조합 방법을 이용하여 생성할 수 있다. 전형적으로, 방법은 AAV 캡시드 단백질 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 서열; 기능적 rep 유전자; AAV 역전된 말단 반복부 (ITR) 및 트랜스진으로 구성된 재조합 AAV 벡터; 및 재조합 AAV 벡터를 AAV 캡시드 단백질 내로 패키징하는 것을 가능하게 하는데 충분한 헬퍼 기능을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터는 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 및 그의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 AAV 혈청형의 역전된 말단 반복부 (ITR)를 포함할 수 있다.

[0166] rAAV 벡터를 AAV 캡시드 내에 패키지하기 위해 숙주 세포에서 배양하고자 하는 성분은 이러한 숙주 세포에 트랜스로 제공될 수 있다. 대안적으로, 필요한 성분들 (예를 들어, 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열, 및/또는 헬퍼 기능) 중 임의의 하나 이상은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 이용하여 상기 필요한 성분들 중 하나 이상을 함유하도록 조작한 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게, 상기 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하에 상기 필요한 성분(들)을 함유할 수 있다. 그러나, 이러한 필요한 성분(들)은 구성적 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 본 발명의 rAAV를 생산하는데 필요한 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열, 및 헬퍼 기능은 임의의 적절한 유전 요소를 이용하여 패키징되는 숙주 세포에 전달할 수 있다. 선택된 유전 요소는 본원에 기재된 방법을 포함한, 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 본 발명의 임의의 실시양태를 구축하는데 사용되는 방법은 핵산 조작에 있어서의 기술자에게 공지되어 있고, 이는 유전 공학, 재조합 공학, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]을 참조한다. 유사하게, rAAV 비리온을 생성하는 방법은 널리 공지되어 있고, 적합한 방법의 선택은 본 발명에 대해 제한적이지 않다. 예를 들어, 문헌 [K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1993)] 및 미국 특허 번호 5,478,745를 참조한다.

[0167] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 벡터는 삼중 형질감염 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,001,650에 상세히 기재된 바와 같고, 삼중 형질감염 방법에 관한 그의 내용은 본원에 참조로 포함됨)을 이용하여 생성할 수 있다. 전형적으로, 재조합 AAV는 숙주 세포를 AAV 입자 내로 패키지될 재조합 AAV 벡터 (트랜스진을 포함함), AAV 헬퍼 기능 벡터, 및 보조 기능 벡터로 형질감염시킴으로써 생성된다. 일반적으로, AAV 헬퍼 기능 벡터는 생산적 AAV 복제 및 캡시드화를 위해 트랜스로 기능하는 AAV 헬퍼 기능 서열 (rep 및 cap)을 코딩한다. 바람직하게, AAV 헬퍼 기능 벡터는 임의의 검출 가능한 야생형 AAV 비리온 (즉, 기능적 rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 비리온)을 생성하지 않으면서도 효율적인 AAV 벡터 생성을 뒷받침한다. 보조 기능 벡터는 AAV가 복제에 대해 의존적인 비-AAV 유래 바이러스 및/또는 세포성 기능에 대한 뉴클레오티드 서열을 코딩할 수 있다. 보조 기능은 AAV 복제에 필요한 기능을 포함하며, 이는 AAV 유전자 전사의 활성화, 단계 특이적 AAV mRNA 스플라이싱,

AAV DNA 복제, cap 발현 생성물의 합성, 및 AAV 캡시드 어셈블리에 관여한 모이어티를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바이러스-기반 보조 기능은 공지된 헬퍼 바이러스, 예컨대 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 (단순 포진 바이러스 유형-1 이외의 바이러스), 및 백시니아 바이러스 중 임의의 것으로부터 유래될 수 있다.

[0168] 렌티바이러스 벡터는 관련 기술분야에 공지된 수많은 방법 중 임의의 것을 사용하여 생산될 수 있다. 렌티바이러스 벡터 및/또는 그의 생산 방법의 예는, 예를 들어, 미국 공개 번호 20150224209, 20150203870, 20140335607, 20140248306, 20090148936, 및 20080254008에서 확인할 수 있고, 이러한 렌티바이러스 벡터 및 생산 방법은 본원에 참조로 포함된다. 예로서, 렌티바이러스 벡터가 통합-부적격인 경우에, 렌티바이러스 게놈은 복제 기점 (ori)을 추가로 포함하며, 그의 서열은 렌티바이러스 게놈이 발현되어야 하는 세포의 성질에 의존한다. 상기 복제 기점은 진핵생물 기원, 바람직하게는 포유동물 기원, 가장 바람직하게는 인간 기원의 것일 수 있다. 렌티바이러스 게놈이 세포 숙주 게놈 내로 통합되지 않기 때문에 (결함있는 인테그라제로 인함), 렌티바이러스 게놈은 빈번한 세포 분열을 겪는 세포에서 손실될 수 있고; 이는 특히 면역 세포, 예컨대 B 또는 T 세포에서 그러하다. 복제 기점의 존재는 일부 경우에 유익할 수 있다. 벡터 입자는 상기 플라스미드에 의한, 또는 다른 프로세스에 의한 293 T 세포와 같은 적절한 세포의 형질감염 후에 생산될 수 있다. 렌티바이러스 입자의 발현에 사용된 세포에서, 플라스미드의 전부 또는 일부는 그의 코딩 폴리뉴클레오티드를 안정하게 발현시키거나, 또는 그의 코딩 폴리뉴클레오티드를 일시적으로 또는 반-안정하게 발현시키는데 사용될 수 있다.

[0169] 본원에 제공된 바와 같은 다른 바이러스 벡터의 생산 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 이는 상기 예시된 방법과 유사할 수 있다. 또한, 바이러스 벡터는 상업적으로 입수가능하다.

[0170] 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 특정 합성 나노담체를 제조할 때, 면역억제제를 합성 나노담체에 부착시키는 방법이 유용할 수 있다.

[0171] 특정 실시양태에서, 부착시키는 것은 공유 링커일 수 있다. 실시양태에서, 본 발명에 따른 면역억제제는 알킨 기를 함유하는 면역억제제와 아지도 기와의 1,3-양극성 고리화첨가 반응에 의해 형성되거나 또는 아지도 기를 함유하는 면역억제제와 알킨과의 1,3-양극성 고리화첨가 반응에 의해 형성된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 외부 표면에 공유 부착될 수 있다. 이러한 고리화첨가 반응은 바람직하게, Cu(II) 화합물을 촉매적 활성 Cu(I) 화합물로 환원시키는 환원제 및 적합한 Cu(I)-리간드와 함께 Cu(I) 촉매의 존재 하에 수행된다. 이러한 Cu(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (CuAAC)는 클릭 반응으로서 지칭될 수도 있다.

[0172] 추가적으로, 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.

[0173] 아미드 링커는 하나의 성분, 예컨대 면역억제제 상의 아민과 제2의 성분, 예컨대 나노담체의 카르복실산 기 사이의 아미드 결합을 통해 형성된다. 이러한 링커 내의 아미드 결합은 적합하게 보호된 아미노산과 활성화 카르복실산, 예컨대 N-히드록시숙신이미드-활성화된 에스테르의 통상적인 아미드 결합 형성 반응 중 임의의 것을 이용하여 제조될 수 있다.

[0174] 디술피드 링커는, 예를 들어 R1-S-S-R2의 형태의 2개의 황 원자 사이의 디술피드 (S-S) 결합의 형성을 통해 제조된다. 디술피드 결합은 티올/메르캅탄 기 (-SH)를 함유하는 성분을 또 다른 활성화 티올 기로 티올 교환하거나, 또는 티올/메르캅탄 기를 함유하는 특정 성분을 활성화 티올 기를 함유하는 특정 성분으로 티올 교환함으로써 형성될 수 있다.

[0175] 트리아졸 링커, 구체적으로 형태  의 1,2,3-트리아졸 (여기서, R1 및 R2는 임의의 화학적 실체일 수 있음)은 제1 성분에 부착된 아지드와 제2 성분, 예컨대 면역억제제에 부착된 말단 알킨의 1,3-양극성 고리화첨가 반응에 의해 제조된다. 이러한 1,3-양극성 고리화첨가 반응은 1,2,3-트리아졸 관능기를 통해 상기 2개의 성분을 연결하는 촉매의 존재 또는 부재 하에, 바람직하게는 Cu(I)-촉매의 존재 하에 수행된다. 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 상세히 기재되어 있고, 종종 "클릭" 반응 또는 CuAAC로서 지칭된다.

[0176] 티오에테르 링커는, 예를 들어 R1-S-R2의 형태의 황-탄소 (티오에테르) 결합의 형성에 의해 제조된다. 티오에

테르는 하나의 성분 상의 티올/메르캅탄 (-SH) 기를 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드 또는 에폭시드로 알킬화시킴으로써 제조될 수 있다. 티오에테르 링커는 또한, 하나의 성분 상의 티올/메르캅탄 기를, 마이클 수용체로서 말레이미드 기 또는 비닐 술폰 기를 함유하는 제2 성분 상의 전자-결핍 알켄 기에 마이클 첨가함으로써 형성될 수 있다. 또 다른 방식으로, 티오에테르 링커는 하나의 성분 상의 티올/메르캅탄 기를 제2 성분 상의 알켄 기와 라디칼 티올-엔 반응시킴으로써 제조할 수 있다.

[0177] 히드라존 링커는 하나의 성분 상의 히드라지드 기를 제2 성분 상의 알데히드/케톤 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0178] 히드라지드 링커는 하나의 성분 상의 히드라진 기를 제2 성분 상의 카르복실산 기와 반응시킴으로써 형성된다. 이러한 반응은 일반적으로, 카르복실산을 활성화 시약으로 활성화시키는 아미드 결합의 형성과 유사한 화학을 이용하여 수행된다.

[0179] 이민 또는 옥심 링커는 하나의 성분 상의 아민 또는 N-알콕시아민 (또는 아미노옥시) 기를 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기와 반응시킴으로써 형성된다.

[0180] 우레아 또는 티오우레아 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 이소시아네이트 또는 티오이소시아네이트 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0181] 아미딘 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 이미도에스테르 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0182] 아민 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드, 에폭시드, 또는 술포네이트 에스테르 기와 알킬화 반응시킴으로써 제조된다. 대안적으로, 아민 링커는 또한, 하나의 성분 상의 아민 기를, 적합한 환원 시약, 예컨대 소듐 시아노보로히드라이드 또는 소듐 트리아세톡시보로히드라이드를 이용하여 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기로 환원성 아미노화함으로써 제조될 수 있다.

[0183] 술폰아미드 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 술포닐 할라이드 (예컨대 술포닐 클로라이드) 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0184] 술폰 링커는 친핵체를 비닐 술폰에 마이클 첨가함으로써 제조된다. 비닐 술폰 또는 친핵체 중 하나는 나노담체의 표면 상에 있거나 또는 특정 성분에 부착될 수 있다.

[0185] 이러한 성분은 또한, 비-공유 접합 방법을 통해 접합될 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 면역억제제는 정전기 흡착을 통해 양으로 하전된 성분과 접합될 수 있다. 금속 리간드를 함유하는 성분이 또한, 금속-리간드 착물을 통해 금속 착물과 접합될 수 있다.

[0186] 실시양태에서, 성분은 합성 나노담체의 어셈블리에 앞서, 중합체, 예를 들어 폴리락트산-블록-폴리에틸렌 글리콜에 부착될 수 있거나 또는 합성 나노담체는 그의 표면 상의 반응성 또는 활성화될 수 있는 기와 함께 형성될 수 있다. 후자의 경우에, 성분은 합성 나노담체의 표면에 의해 제시되는 부착 화학과 적합성인 기를 이용하여 제조할 수 있다. 다른 실시양태에서, 펩티드 성분은 적합한 링커를 이용하여 VLP 또는 리포솜에 부착시킬 수 있다. 링커는 2개의 분자를 함께 커플링할 수 있는 화합물 또는 시약이다. 특정 실시양태에서, 링커는 문헌 [Hermanson 2008]에 기재된 바와 같은 동종이관능성 또는 이종이관능성 시약일 수 있다. 예를 들어, 표면 상에 카르복실기를 함유하는 VLP 또는 리포솜 합성 나노담체는 EDC의 존재 하에 동종이관능성 링커인 아디프산 디히드라지드 (ADH)로 처리하여, 이러한 ADH 링커를 갖는 상응하는 합성 나노담체를 형성할 수 있다. 이어서, 이로써 생성되는 ADH 연결된 합성 나노담체를, 나노담체 상의 ADH 링커의 다른 말단을 통해 산 기를 함유하는 펩티드 성분과 접합시켜 상응하는 VLP 또는 리포솜 펩티드 접합체를 생성한다.

[0187] 실시양태에서, 중합체 쇄에 대해 말단인 아지드 또는 알킨 기를 함유하는 중합체가 제조된다. 이어서, 이러한 중합체를 사용하여, 복수 개의 알킨 또는 아지드 기가 합성 나노담체의 표면 위에 위치하는 방식으로 합성 나노담체를 제조한다. 대안적으로, 이러한 합성 나노담체는 또 다른 경로에 의해 제조한 다음, 연속해서 알킨 또는 아지드 기로 관능화할 수 있다. 성분은 알킨 기의 존재 하에 (중합체가 아지드를 함유하는 경우) 또는 아지드 기의 존재 하에 (중합체가 알킨을 함유하는 경우) 제조된다. 이어서, 상기 성분은, 이러한 성분을 1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 입자에 공유 부착시켜 주는 촉매의 존재 또는 부재 하에 1,3-양극성 고리화첨가 반응을 통해 상기 나노담체와 반응될 수 있다.

[0188] 성분이 소분자인 경우, 합성 나노담체의 어셈블리에 앞서, 상기 성분을 중합체에 부착시키는 것이 유리할 수 있다. 실시양태에서, 성분을 중합체에 부착시킨 다음 이러한 중합체 접합체를 합성 나노담체의 구축에 사용하기보다는 오히려 이들 표면 기의 사용을 통해 상기 성분을 합성 나노담체에 부착시키기 위해 사용되는 표면 기를

갖는 합성 나노담체를 제조하는 것이 또한 유리할 수 있다.

[0189] 이용가능한 접합 방법에 관한 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008]을 참조할 수 있다. 공유 부착 외에도, 상기 성분은 미리 형성된 합성 나노담체에 흡착시킴으로써 부착시킬 수 있거나 또는 합성 나노담체의 형성 동안 캡슐화함으로써 부착시킬 수 있다.

[0190] 합성 나노담체는 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체는 나노침전, 유체 채널을 이용한 유동 포커싱, 분무 건조, 단일 및 이중 에멀젼 용매 증발, 용매 추출, 상 분리, 밀링, 마이크로에멀젼 절차, 마이크로제작, 나노제작, 희생 층, 단순 및 복잡 코아세르베이션과 같은 방법, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 방법에 의해 형성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 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 번호 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).

[0191] 물질은 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 이용하여 바람직한 바와 같이 합성 나노담체 내로 캡슐화할 수 있다. 물질을 합성 나노담체 내로 캡슐화하기에 적합한 다른 방법을 사용할 수 있고, 이는 2003년 10월 14일자로 허여된 미국 특허 번호 6,632,671 (Unger)에 개시된 방법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0192] 특정 실시양태에서, 합성 나노담체는 나노침전 과정 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 합성 나노담체를 제조하는데 사용된 조건은 목적하는 크기 또는 특성 (예를 들어, 소수성, 친수성, 외부 형태, "점착성", 형상 등)의 입자를 생성하기 위해 변경시킬 수 있다. 합성 나노담체의 제조 방법 및 사용된 조건 (예를 들어, 용매, 온도, 농도, 공기 유량 등)은 합성 나노담체에 부착될 물질 및/또는 중합체 매트릭스의 조성에 좌우될 수 있다.

[0193] 상기 방법 중 임의의 것에 의해 제조된 합성 나노담체가 목적하는 범위를 벗어난 크기 범위를 갖는 경우, 합성 나노담체는, 예를 들어 체를 이용하여 사이징될 수 있다.

[0194] 합성 나노담체의 요소들은, 예를 들어 하나 이상의 공유 결합에 의해 전체 합성 나노담체에 부착될 수 있거나, 또는 하나 이상의 링커를 통해 부착될 수 있다. 합성 나노담체를 관능화하는 추가의 방법은 공개된 미국 특허 출원 2006/0002852 (Saltzman et al.), 공개된 미국 특허 출원 2009/0028910 (DeSimone et al.), 또는 공개된 국제 특허 출원 WO/2008/127532 A1 (Murthy et al.)로부터 적합화될 수 있다.

[0195] 대안적으로 또는 추가적으로, 합성 나노담체는 비-공유 상호작용을 통해 성분들에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 비-공유 실시양태에서, 비-공유 부착은 전하 상호작용, 친화도 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 스태킹 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용, 및/또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-공유 상호작용에 의해 매개된다. 이러한 부착은 합성 나노담체의 외부 표면 또는 내부 표면 상에 있도록 배열될 수 있다. 실시양태에서, 캡슐화 및/또는 흡수가 부착의 한 형태이다.

[0196] 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, 폴리옥시에틸렌 9-10 노닐 페놀, 소듐 데스옥시콜레이트),

용액 및/또는 냉동/동결 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), 중합체 안정화제 및 점도-조정제 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 폴록사머 488, 카르복시메틸셀룰로스) 및 공-용매 (예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올)를 포함할 수 있다.

[0197] 본 발명에 따른 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제작 및 배합 기술을 이용하여 만들 수 있다. 본 발명을 실시하는데 사용하기 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 확인할 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사하기 위해 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.

[0198] 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 방식으로 제조될 수 있고, 본 발명은 본원에 기재된 방법을 이용하여 생성될 수 있는 조성물로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 적절한 제작 방법을 선택하기 위해 연관된 특정한 모이어티의 특성에 주의를 기울여야 할 수 있다.

[0199] 일부 실시양태에서, 조성물은 멸균 조건 하에 제작되거나 또는 최종적으로 멸균된다. 이는 이로써 생성되는 조성물이 멸균이면서 비-감염성이라는 것을 보장하므로, 비-멸균 조성물과 비교해서 안전성을 개선시킬 수 있다. 이것은, 특히 조성물을 투여받는 대상체가 면역 결함이 있고/거나, 감염으로 인해 고통받고 있고/거나 감염되기 쉬운 경우에, 중요한 안전 조치를 제공한다.

[0200] 본 발명에 따른 투여는 피하, 비강내, 경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 경점막, 경점막, 설하, 직장, 안부, 폐, 피내, 경피, 경피부 또는 피내 또는 이들 경로의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의할 수 있다. 투여 경로는 또한 흡입 또는 폐 에어로졸에 의한 투여를 포함한다. 에어로졸 전달 시스템을 제조하는 기술은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Sciarra and Cutie, "Aerosols," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp. 1694-1712] 참조; 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터, 면역억제제를 포함하는 나노담체, 및 코르티코스테로이드는 동일한 경로를 통해 (예를 들어, 정맥내로) 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터 및 면역억제제를 포함하는 나노담체는 코르티코스테로이드와 상이한 경로를 통해 투여된다. 예를 들어, 바이러스 전달 벡터 및 면역억제제를 포함하는 나노담체는 정맥내로 투여될 수 있는 한편, 코르티코스테로이드는 경구로 투여될 수 있다. 본원에 언급된 조성물은 통상적인 방법을 이용하여 투여하기 위해, 예를 들어 병용 투여하기 위해 제작 및 제조될 수 있다.

[0201] 본 발명의 조성물은 유효량, 예컨대 본원의 다른 곳에 기재되어 있는 유효량으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터 및/또는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및/또는 코르티코스테로이드는 항바이러스 전달 벡터 면역 반응, 예컨대 IgG 및/또는 IgM 반응을 약화시키고/거나 바이러스 전달 벡터를 대상체에 재투여하는 것을 허용하고/거나 바이러스 전달 벡터의 트랜스진 발현을 증가시키는데 유효한 양의 투여 형태로 존재한다. 본 발명의 투여 형태는 다양한 빈도로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드와 함께 바이러스 전달 벡터를 반복 투여하는 것이 수행된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조성물 (예를 들어, 바이러스 전달 벡터, 면역억제제를 포함하는 나노담체, 및 코르티코스테로이드)의 적어도 2회 투여, 적어도 3회 투여, 적어도 4회 투여, 또는 적어도 5회 투여가 이용된다. 일부 실시양태에서, 코르티코스테로이드는 바이러스 전달 벡터 및 면역억제제를 포함하는 나노담체와 동시에 투여된다.

[0202] 본 발명의 측면은 본원에 제공된 바와 같은 투여 방법을 위한 프로토콜을 결정하는 것에 관한 것이다. 프로토콜은 적어도, 바이러스 전달 벡터의, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의, 및/또는 코르티코스테로이드의, 빈도, 투여량을 달리하고, 후속적으로 목적하는 또는 바람직하지 않은 면역 반응을 평가함으로써 결정될 수 있다. 본 발명의 실시를 위해 바람직한 프로토콜은 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응, 예컨대 IgG 및/또는 IgM 반응을 약화시키고/거나 바이러스 전달 벡터에 대한 또 다른 바람직하지 않은 면역 반응을 약화시키고/거나 트랜스진 발현을 확대시킨다. 일부 실시양태에서, 프로토콜은 적어도 바이러스 전달 벡터, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 코르티코스테로이드의 투여 빈도 및 용량을 포함할 수 있다.

[0203] 개시내용의 또 다른 측면은 키트에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나 이상 또는 본원에 제공된 조성물의 조합물 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 바이러스

전달 벡터를 포함하는 하나 이상의 조성물 및/또는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 포함하는 하나 이상의 조성물 및/또는 코르티코스테로이드를 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함한다. 바람직하게는, 조성물(들)은 본원에 제공된 바와 같은 어느 하나 이상의 용량을 제공하는 양으로 존재한다. 조성물(들)은 키트에서 1개의 용기 또는 1개 초과의 용기 내에 존재할 수 있다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 용기는 바이알 또는 앰플이다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 조성물(들)은 각각 별개의 용기 또는 동일한 용기 내의 동결건조 형태이고, 이에 따라 이들은 후속 시점에 재구성될 수 있다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 키트는 재구성, 혼합, 투여 등에 대한 지침서를 추가로 포함한다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 지침서는 본원에 기재된 방법 중 어느 하나에 대한 설명을 포함한다. 지침서는 임의의 적합한 형태로, 예를 들어, 인쇄 삽입물 또는 라벨로서 존재할 수 있다. 본원에 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에게 생체내로 조성물(들)을 전달할 수 있는 1개 이상의 시린지 또는 다른 장치(들)를 추가로 포함한다.

[0204] 실시예

[0205] 본원에 기재된 본 발명이 보다 완전하게 이해될 수 있도록, 하기 실시예를 제시한다. 본 출원에 기재된 실시예는 본원에 제공된 시스템 및 방법을 예시하기 위해 제공되며, 어떠한 방식으로도 그의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0206] 실시예 1: 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체

[0207] 면역억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체를 포함하는 합성 나노담체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 생성할 수 있다. 바람직하게는, 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 미국 공개 번호 US 2016/0128986 A1 및 미국 공개 번호 US 2016/0128987 A1의 방법 중 어느 하나에 의해 생성되고, 기재된 이러한 생성 방법 및 생성된 합성 나노담체는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 포함된 합성 나노담체이다.

[0208] 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 포함된 합성 나노담체이다. 라파마이신을 캡슐화하는 생분해성 PLA + PLA-PEG 나노입자인 ImmTOR는 이러한 합성 나노담체의 예를 지칭한다 (Kishimoto TK, Maldonado RA. Nanoparticles for the induction of antigen-specific immunological tolerance. Front Immunol. 2018;9:230. Sands E, Kivitz AJ, DeHaan W, et al. Update of SEL-212 phase 2 clinical data in symptomatic gout patients: SVP-rapamycin combined with pegadricase mitigates immunogenicity and enables sustained reduction of serum uric acid levels, low rate of gout flares and monthly dosing. Poster presentation at: 2018 American College of Rheumatology/Association of Reproductive Health Professionals (ACR/ARHP) Annual Meeting; October 19-24, 2018; Chicago, IL. Poster #2254).

[0209] 라파마이신 또는 라파마이신 유사체를 포함하는 합성 나노담체를 이들 포함된 방법과 적어도 유사한 방법으로 생성하고, 하기 실시예에서 사용하였다.

[0210] 실시예 2: 나노입자-캡슐화된 라파마이신 및 전신 덱사메타손의 조합물의 단일 또는 다중 주사에 의한 생체내 AAV-구동된 트랜스진 발현의 상승작용적 증진.

[0211] C57BL/6 암컷 마우스의 3개의 군 (각각 6마리의 마우스)에게 제0일 및 제56일에 1x1010 VG의 AAV8-SEAP를, 임의의 나노입자의 부재 하에 (1개의 군) 또는 100 μg 라파마이신으로의 ImmTOR™의 존재 하에 (라파마이신을 포함하는 합성 나노담체, 예컨대 실시예 1에서 생성된 것; 2개의 군) 주사하였다 (r.o.). 전자의 2개의 군 중에서, 1개의 군은 비처리로 두고, 1개는 주사 제0일 및 제56일에 전신 덱사메타손으로 추가적으로 처리하였다 (i.p., 주사당 100 μL 중 200 μg).

[0212] 도 1a 및 1b에 표시된 시간 (제14일, 제35일, 제49일, 제63일 및 제71일 또는 제13일, 제19일, 제33일, 제48일, 제62일 및 제69일)에, 마우스에서 채혈하고, 전혈로부터 혈청을 분리하고, 분석시까지 -20 ± 5℃에서 저장하였다. 혈청 중 SEAP 수준을 써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific) (미국 매사추세츠주 월섬)으로부터의 검정 키트를 사용하여 측정하였다. 간략하게, 혈청 샘플 및 양성 대조군을 희석 완충제 중에 희석하고, 65℃에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 실온으로 냉각시키고, 96-웰 포맷으로 플레이팅하였다. 이어서, 검정 완충제 (5분) 및 기질 (20분)을 첨가하고, 플레이트를 발광측정기 (477 nm) 상에서 판독하였다.

[0213] 이 실험을 2회 반복하였고, 결과는 유사하였다 (도 1a 및 1b). 비처리군과 ImmTOR™ (라파마이신을 포함하는

합성 나노담체)만으로 처리된 군 사이에 초기 SEAP 발현 수준 (각각 도 1a 및 1b의 d13 및 d14)에서 즉각적인 차이가 존재하였다. 그러나, 덱사메타손으로 추가적으로 처리된 군에서 훨씬 더 강한 차이가 관찰되었고, 이는 나중에 (각각 도 1a 및 1b에서 d48 및 d49), ImmTOR™ 단독의 효과가 진정되었을 때 특히 현저해졌다. 제56일 부스팅 후에 유사한 효과가 관찰되었고, 전신 덱사메타손과 조합되어 ImmTOR™로 처리된 마우스에서의 SEAP 발현 수준이 비처리 마우스보다 대략 2-배 더 높은 SEAP 발현을 나타낸 반면, ImmTOR™ 단독의 효과는 더욱 보통 정도였다 (50-70%).

[0214] 이는 일련의 추가의 연구를 필요로 하였고, C57BL/6 암컷 마우스의 4개의 군 (각각 6마리의 마우스)에게 제0일, 제56일 및 제140일 또는 제147일에 1x1010 VG의 AAV8-SEAP를, 임의의 나노입자의 부재 하에 (2개의 군) 또는 100 μg 라파마이신으로의 ImmTOR™의 존재 하에 (라파마이신을 포함하는 합성 나노담체; 2개의 군) 주사하였다 (r.o.). 둘 다의 부문 (비처리된 것 또는 ImmTOR™로 처리된 것)에서, 1개의 군은 임의의 추가의 처리를 제공하지 않은 반면에, 또 다른 군은 주사 제0일, 제56일 및 제140일 또는 제147일에 전신 덱사메타손으로 추가적으로 처리하였다 (i.p., 주사당 100 μL 중 200 μg). 도 2a 및 2b에 표시된 시간 (제13일, 제20일, 제49일, 제62일, 제69일, 제76일, 제142일, 제154일, 제161일, 제182일 및 제196일 또는 제13일, 제20일, 제48일, 제62일, 제69일, 제77일, 제104일, 제146일, 제153일 및 제174일)에, 마우스에서 채혈하고, 혈청을 상기 기재된 바와 같이 SEAP 발현에 대해 분석하였다.

[0215] 이 실험을 2회 반복하였고, 결과는 유사하였다 (도 2a 및 2b). 다시, 비처리군과 ImmTOR™로 처리된 군 사이에 초기 SEAP 발현 (d13)에서 즉각적인 차이가 존재하였고, 덱사메타손으로 추가적으로 처리된 군에서 더 큰 차이가 관찰되었고, 이는 나중에 (d48/d49), ImmTOR™ 단독의 효과가 진정되었을 때 더 현저해졌다. 유사한 효과가 제56일 부스팅 후에 관찰되었다. 덱사메타손 단독도 또한 개선된 SEAP 발현을 제공하였지만, 이는 ImmTOR™ 단독 군보다 적거나 동일하였고, ImmTOR™ 및 덱사메타손의 조합물에 의해 제공된 것보다 열등하였다. 이는 d140 (도 2a) 또는 d147 (도 2b)에서의 제2 부스팅 후에 훨씬 더 분명해졌으며, 이 시점에서 덱사메타손 단독에 의해서는 중간 정도의 이익이 관찰되었고 (10-80% 대 비처리), ImmTOR™ 단독에 의해서는 더 강한 효과가 나타났다 (40-110% 대 비처리). 놀랍게도, 이 시점에서 ImmTOR™ 및 덱사메타손의 조합물은 훨씬 더 높은 SEAP 발현 수준을 제공하였고, 이 효과는 일반적으로 상승작용적이었고: 전신 덱사메타손과 조합되어 ImmTOR™로 처리된 군에서의 SEAP 수준 상승은 ImmTOR™ 및 덱사메타손에 의해 개별적으로 도달된 상승의 합보다 더 높았고, 예를 들어 도 2a에서 d196에 115% 대 53% 또는 도 2b에서 231% 대 176%였다. 집합적으로, 비처리 마우스와 비교하여 제2 부스팅 후에 ImmTOR™ 및 덱사메타손 조합물로 처리한 군에서 2.1-3.3-배 더 높은 SEAP 발현이 관찰되었다.

[0216] 실시예 3: 나노입자-캡슐화된 라파마이신 (ImmTOR™) 및 전신 덱사메타손의 조합물에 의한 AAV에 대한 IgM 및 IgG의 상승작용적 감소.

[0217] 실시예 2와 동일한 일련의 연구에서, AAV에 대한 IgM 및 IgG 항체를 ELISA를 사용하여 다음과 같이 측정하였다: 96-웰 플레이트를 AAV로 밤새 코팅하고, 다음날 세척하고 차단하였다. 이어서, 희석된 혈청 샘플 (1:40)을 플레이트에 첨가하고, 인큐베이션하고; 플레이트를 세척하고, 당나귀 항-마우스 IgM 또는 염소 항-마우스 IgG 특이적-HRP를 첨가하였다. 또 다른 인큐베이션 및 세척 후에, TMB 기질을 첨가하고 450 nm의 흡광도에서 570 nm의 참조 파장으로 측정함으로써 AAV에 대한 IgM 또는 IgG 항체의 존재를 검출하였다 (최고 광학 밀도, OD로서 제시되는 신호의 강도는 샘플 내의 IgM/IgG 항체의 양에 정비례함).

[0218] 이전에 제시된 바와 같이, AAV와 공투여된 ImmTOR™는 AAV IgM의 초기 유도를 억제하였고, 특히 프라이밍 후에 그의 출현을 지연시켰다 (도 3). 그러나, 이는 d56 부스팅 후에 덜 현저하였고, d63-d106 구간 동안 ImmTOR™만으로 처리된 군에서 현저한 IgM 상승이 발생하였다. 동시에, ImmTOR™ 및 전신 덱사메타손으로 처리된 군에서의 IgM 생산은 훨씬 더 강하고 통계적으로 보다 현저한 IgM 반응의 억제를 나타내었고, 이는 심지어 d56 부스팅 전에도 ImmTOR™만으로 처리된 군에서보다 더 낮았다 (도 3).

[0219] 이는 또한 훨씬 더 낮은 IgG 전환율로 해석되었다 (도 4). 다시, 이전에 제시된 바와 같이, AAV와 공투여된 ImmTOR™는 AAV IgG의 초기 유도를 억제하였고, 그의 출현을 지연시켰지만, d56 부스팅 전 및 특히 후기에 여러 돌파가 관찰되었으며, 이는 이러한 군에서 6마리의 마우스 중 4마리가 d104까지 IgG-양성이 되도록 하였다. 동시에, ImmTOR™ 및 전신 덱사메타손으로 처리된 군에서는 최대 d104까지 단일 IgG 전환이 존재하지 않았다 (도 4).

[0220] 실시예 4: 전신 덱사메타손과 조합된 나노입자-캡슐화된 라파마이신 (ImmTOR™)의 상승 작용에 의한 AAV 벡터의 다중 투여에 대한 장기 IgM 면역 반응의 감소.

[0221] C57BL/6 암컷 마우스의 4개의 군 (각각 6마리의 마우스)에게 제0일, 제56일 및 제147일에 1x1010 VG (d0 및 56) 또는 2x1010 VG (d147)의 AAV8-SEAP를, ImmTOR™ 나노입자의 부재 하에 (2개의 군) 또는 100 μg (d0 및 56) 또는 200 μg (d147)의 라파마이신으로의 ImmTOR™ 나노입자의 존재 하에 (2개의 군) 3회 주사하였다 (i.v., 안와후 신경총). 군의 쌍 중에서, 1개의 군은 AAV 및 ImmTOR™ 주사 시 (제0일, 제56일, 제147일)에 전신 덱사메타손 (i.p., 200 μg)으로 추가적으로 처리하였다. 집합적으로, 연구에서 1개의 군을 AAV8 단독으로 처리하고, 1개를 ImmTOR™와 조합된 AAV8로 처리하고, 1개를 전신 덱사메타손과 조합된 AAV8로 처리하고, 1개를 ImmTOR™ 및 전신 덱사메타손 (Dex) 둘 다와 조합된 AAV8로 처리하였다.

[0222] 도 5a에 표시된 시간 (제6일, 제13일, 제20일, 제34일, 제49일, 제62일, 제69일, 제76일, 제90일, 제104일, 제142일, 제154일, 제161일, 제168일, 제182일, 제196일 및 제231일)에, 마우스에서 채혈하고, 전혈로부터 혈청을 분리하고, 분석시까지 -20 ± 5℃에서 저장하였다. 이어서, AAV에 대한 IgM 항체를 ELISA를 사용하여 다음과 같이 측정하였다: 96-웰 플레이트를 AAV로 밤새 코팅한 후, 다음날 세척하고 차단하였다. 희석된 혈청 샘플 (1:40)을 플레이트에 첨가하고, 인큐베이션하고, 플레이트를 세척하고, 당나귀 항-마우스 IgM 특이적-HRP를 첨가하고, 또 다른 인큐베이션 및 세척 후에, TMB 기질을 첨가하고 450 nm의 흡광도에서 570 nm의 참조 파장으로 측정함으로써 AAV에 대한 IgM 항체의 존재를 검출하였다 (최고 광학 밀도, OD로서 제시되는 신호의 강도는 샘플 내의 IgM 항체의 양에 정비례함).

[0223] 이전에 제시된 바와 같이, AAV와 공투여된 ImmTOR™ 나노입자는 AAV IgM의 초기 유도를 억제하였고, 특히 프라이밍 후에 그의 출현을 지연시켰다. 그러나, 이는 d56 및 d147 부스팅 (화살표로 표시됨) 후에, 특히 제3 AAV 투여 (d147) 후에 덜 현저하였고, ImmTOR™ 나노입자로만 처리된 군에서 현저한 IgM 상승이 발생하였다 (도 5a). 동시에, ImmTOR™ 나노입자 및 전신 덱사메타손으로 처리된 군에서의 IgM 생산은 보다 강하고 통계적으로 보다 현저한 IgM 반응의 억제를 나타내었고, 이는 ImmTOR™ 나노입자만으로 처리된 군에서보다 더 낮았고, 제56일 및 제147일에 반복된 AAV 투여 후에 통계적으로 유의하게 되었고, 특히 마지막 AAV 투여의 84일 후 또는 제231일에 통계적으로 상이하게 유지되었다 (도 5b).

[0224] d231즈음에, ImmTOR™로 처리되지 않은 군에서의 IgM 수준은, 이들 군에서의 IgM 생산이 초기 AAV 투여 후에 보다 일찍 (d6 및 13) 피크에 도달하였기 때문에 비교적 낮았으며, 이는 실시예 5에 제시된 바와 같이 이들 군에서 항-AAV IgG 생산으로의 효율적인 이행으로 이어졌음에 주목한다.

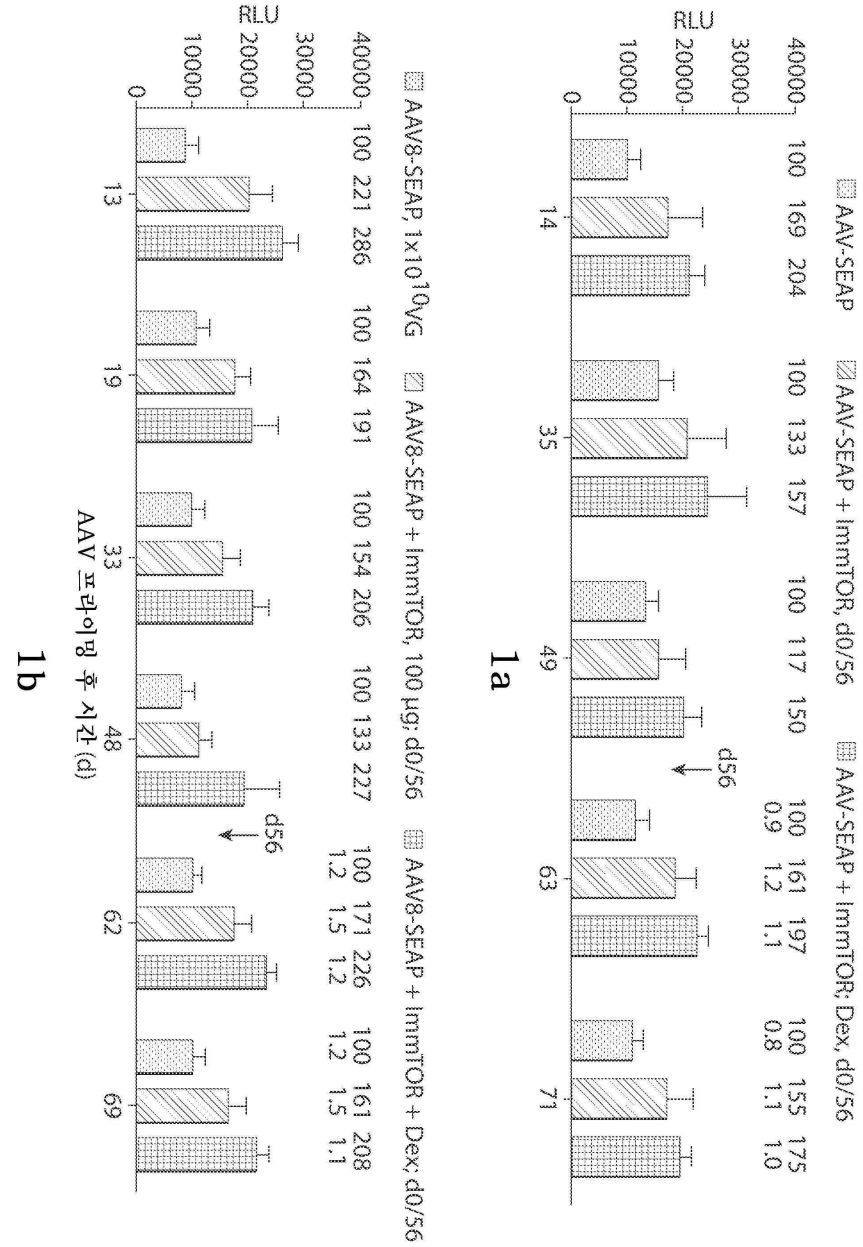
[0225] 실시예 5: 나노입자-캡슐화된 라파마이신 (ImmTOR™) 및 전신 덱사메타손의 조합물에 의해 보다 낮은 수준의 AAV IgG 돌파가 유도된다

[0226] 실시예 4에 기재된 연구로부터의 혈청 샘플을 또한 ELISA에 의해 측정되는 AAV IgG의 존재에 대해 시험하였다. ELISA는 염소 항-마우스 IgG 특이적-HRP를 사용한 것을 제외하고는 IgM 수준을 결정하는데 사용된 것과 유사하였다. 앞서 제시된 바와 같이, AAV와 공투여된 ImmTOR™는 대다수의 실험 동물에서 AAV IgG의 유도를 억제하였지만, 몇몇은 실험 후반에 IgG를 발생시키기 시작하였다 (이는 이러한 군에서의 지연된 IgM 동역학과 상관됨). 구체적으로, 이러한 군에서 6마리의 동물 중 2마리는 제56일의 제1 부스팅 후에 검출가능한 IgG를 나타내었고, 6마리 중 3마리는 제90일 (제1 부스팅 34일 후)에 IgG-양성이었고, 6마리 중 5마리는 제147일의 제2 부스팅 직후 (7일 후)에 (즉, 제154일에) 전환되었고, 이러한 군의 모든 동물은 제196일 (제2 부스팅 또는 제3 AAV 투여 51일 후)에 AAV에 대한 IgG의 존재를 입증하였다. 제231일까지 ImmTOR™ 및 덱사메타손의 조합물로 처리된 군에서는 확인된 IgG 돌파가 존재하지 않았고, 이는 또한 실시예 3에 제시된 바와 같은 IgM의 낮은 수준 및 일시적 생산 및 그의 동역학에서의 보다 현저한 지연과 상관되었다. 덱사메타손과 조합된 ImmTOR™의 존재 하에 AAV의 반복 투여 후에 관찰된 AAV에 대한 이들 극도로 낮은 IgG의 수준은 연구의 후기 단계, 즉 제142일 내지 제231일 전반에 걸쳐 ImmTOR™와만 조합된 AAV로 처리된 군에서 관찰된 것과 통계적으로 상이하였다 ($0.001<p<0.05$). AAV로만 처리된 군에서와 같이 덱사메타손 단독으로 처리된 군에서는 IgG 억제 또는 지연이 존재하지 않았다.

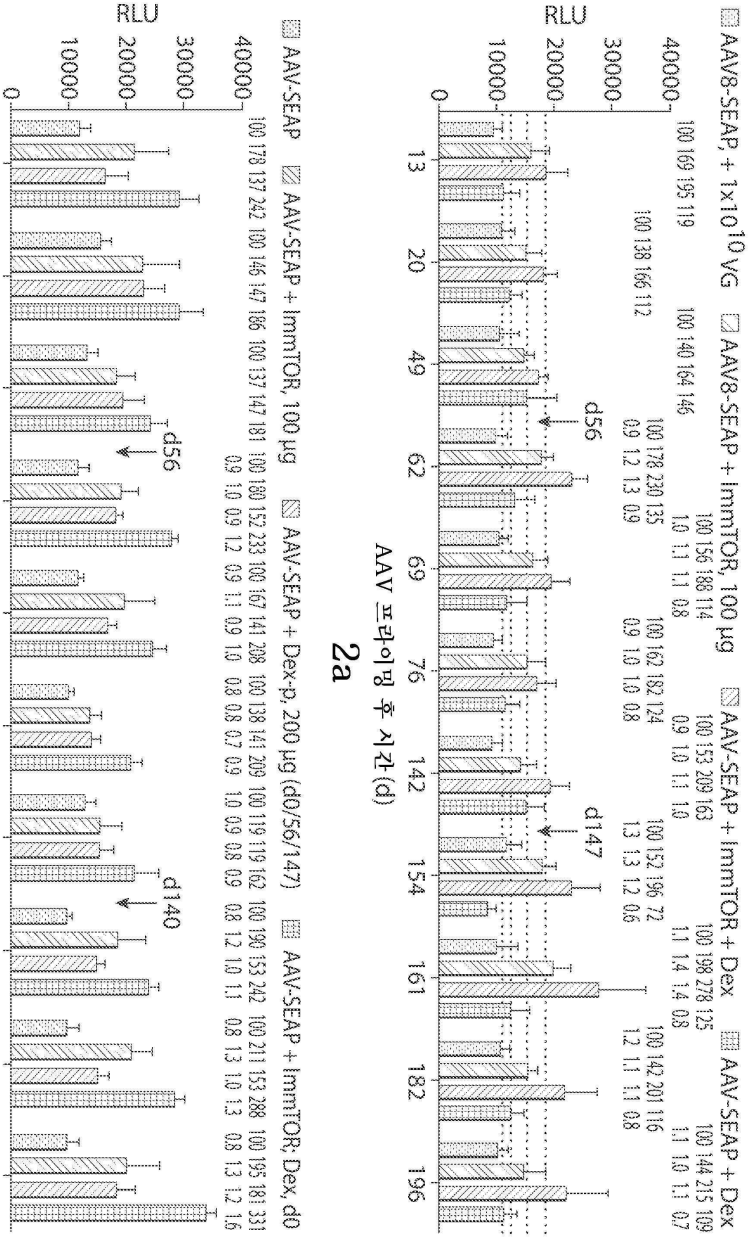
[0227] 집합적으로, ImmTOR™ 단독은 AAV IgM/IgG 지연 및 억제에 대한 이익을 나타내었고, 덱사메타손 단독은 각각을 전혀 나타내지 않았지만, 둘 다의 처리의 조합은 특히 반복된 AAV 투여 후에 AAV-특이적 IgM/IgG 억제에서 훨씬 우수하였다.

도면

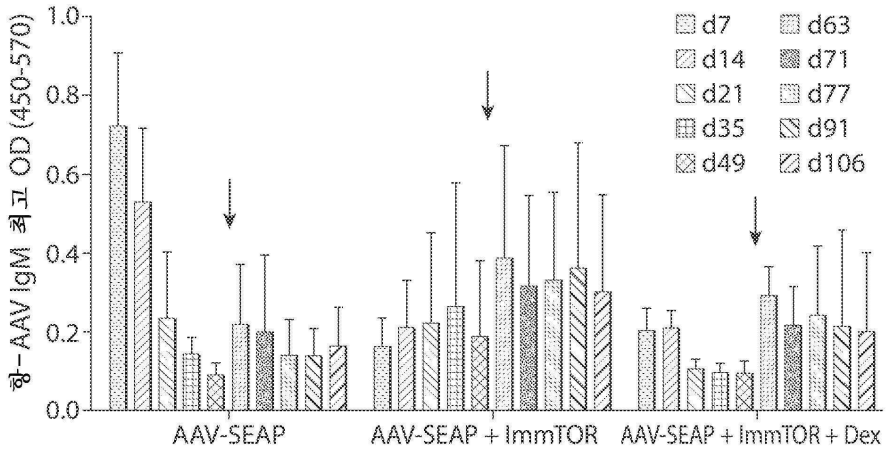
도면1


AAV-SEAP
AAV-SEAP + ImmTOR, d0/56
AAV-SEAP + ImmTOR; Dex, d0/56
RLU
40000
30000
20000
10000
0
100 169 204
100 133 157
100 117 150
100 161 197
0.9 1.2 1.1
100 155 175
0.8 1.1 1.0
d56
14
35
49
63
71
1a
AAV8-SEAP, 1x10^10VG
AAV8-SEAP + ImmTOR, 100 µg; d0/56
AAV8-SEAP + ImmTOR + Dex; d0/56
100 221 286
100 164 191
100 154 206
100 133 227
100 171 226
1.2 1.5 1.2
100 161 208
1.2 1.5 1.1
d56
13
19
33
48
62
69
AAV 프라이밍 후 시간 (d)
1b

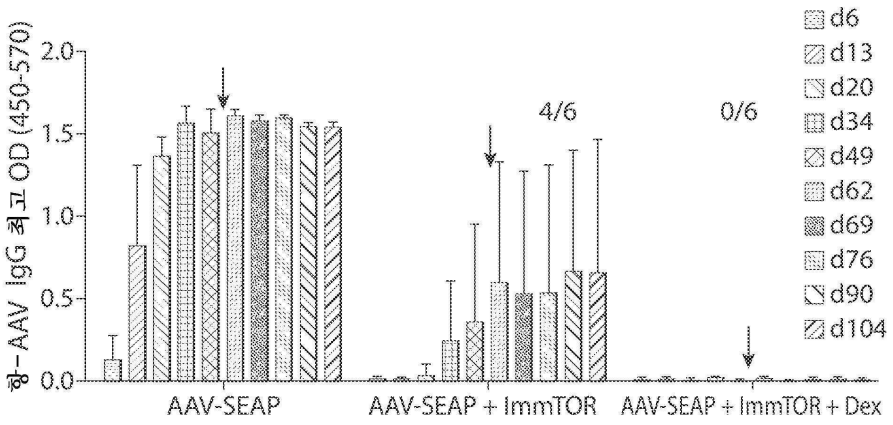
도면2


AAV8-SEAP, + 1x10^10 vG
AAV8-SEAP + ImmTOR, 100 μg
AAV-SEAP + ImmTOR + Dex
AAV-SEAP + Dex
RLU
d56
d147
AAV 프라이밍 후 시간(d)
2a
AAV-SEAP
AAV-SEAP + ImmTOR, 100 μg
AAV-SEAP + Dex-P, 200 μg (d0/56/147)
AAV-SEAP + ImmTOR; Dex, d0
RLU
d56
d140
AAV 프라이밍 후 시간(d)
2b

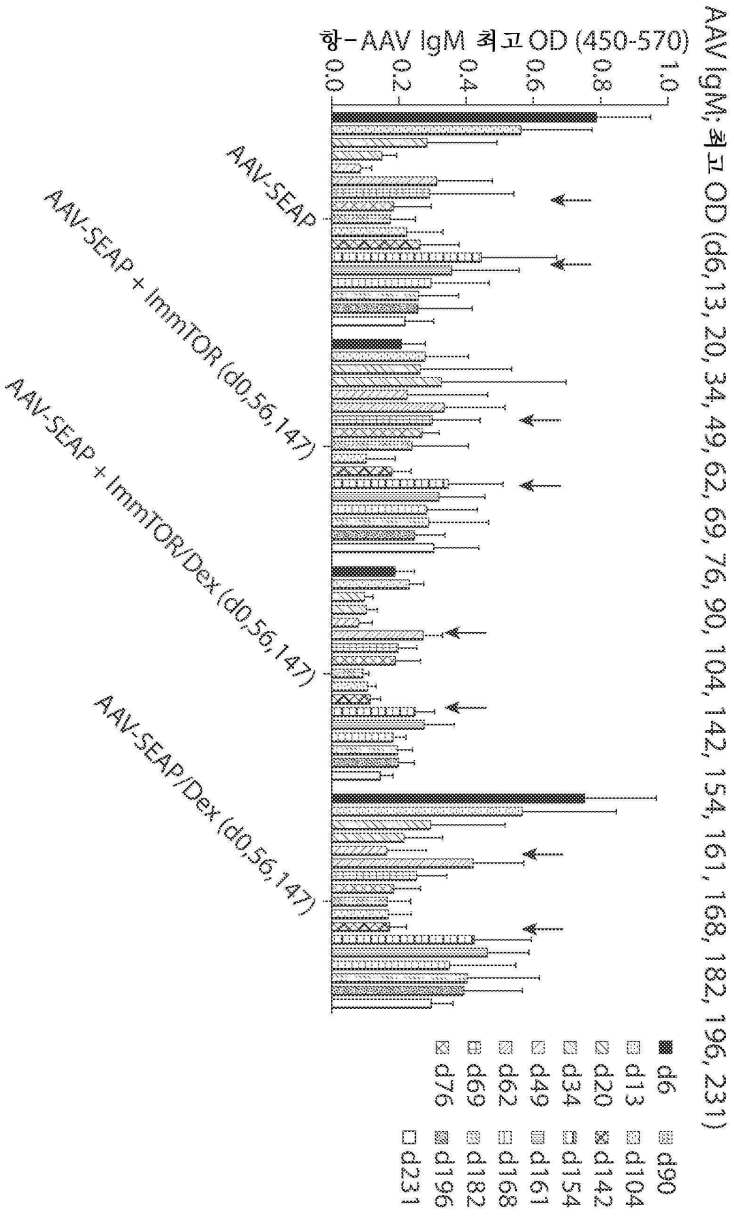
도면3


항-AAV IgM 최고 OD (450-570)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
d7
d14
d21
d35
d49
d63
d71
d77
d91
d106
AAV-SEAP
AAV-SEAP + ImmTOR
AAV-SEAP + ImmTOR + Dex

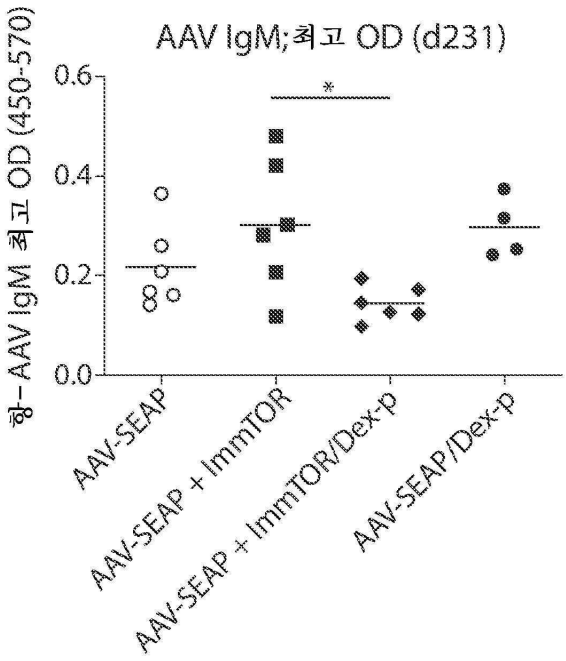
도면4


항-AAV IgG 최고 OD (450-570)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4/6
0/6
d6
d13
d20
d34
d49
d62
d69
d76
d90
d104
AAV-SEAP
AAV-SEAP + ImmTOR
AAV-SEAP + ImmTOR + Dex

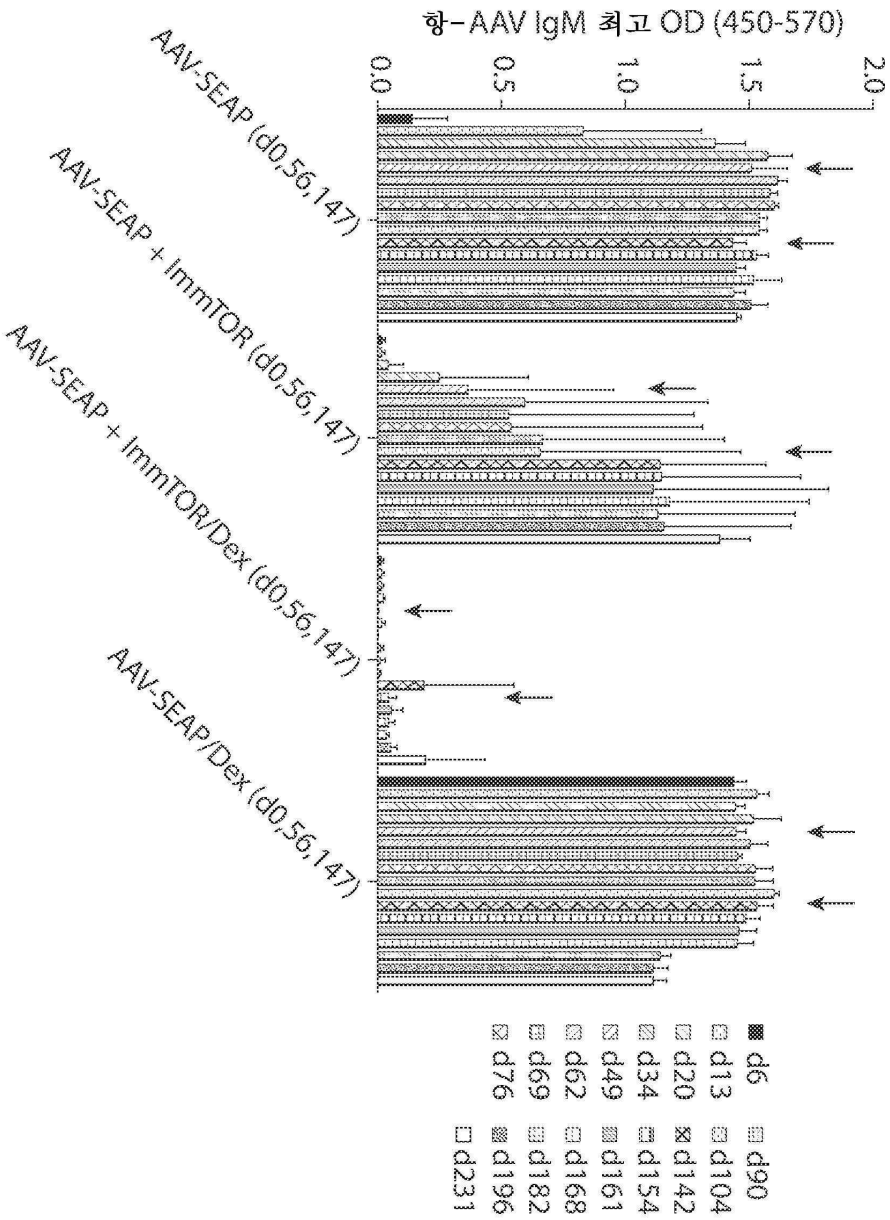
도면5a


AAV IgM, 최고 OD (d6,13, 20, 34, 49, 62, 69, 76, 90, 104, 142, 154, 161, 168, 182, 196, 231)
항-AAV IgM 최고 OD (450-570)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
AAV-SEAP
AAV-SEAP + ImmTOR (d0,56,147)
AAV-SEAP + ImmTOR/Dex (d0,56,147)
AAV-SEAP/Dex (d0,56,147)
d6
d13
d20
d34
d49
d62
d69
d76
d90
d104
d142
d154
d161
d168
d182
d196
d231

도면5b


AAV IgM;최고 OD (d231)
항-AAV IgM 최고 OD (450-570)
0.6
0.4
0.2
0.0
*
AAV-SEAP
AAV-SEAP + ImmTOR
AAV-SEAP + ImmTOR/Dex-p
AAV-SEAP/Dex-p

도면6


항-AAV IgM 최고 OD (450-570)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
AAV-SEAP (d0,56,147)
AAV-SEAP + ImmTOR (d0,56,147)
AAV-SEAP + ImmTOR/Dex (d0,56,147)
AAV-SEAP/Dex (d0,56,147)
d6
d13
d20
d34
d49
d62
d69
d76
d90
d104
d142
d154
d161
d168
d182
d196
d231