



공개특허 10-2022-0025906

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0025906  
(43) 공개일자 2022년03월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 47/69* (2017.01) *A61K 31/436* (2006.01)  
*A61K 9/51* (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 47/6937* (2017.08)  
*A61K 31/436* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7004756(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년05월02일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2015-7034143  
원출원일자(국제) 2014년05월02일  
심사청구일자 2019년05월02일
- (85) 번역문제출일자 2022년02월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/036687
- (87) 국제공개번호 WO 2014/179762  
국제공개일자 2014년11월06일
- (30) 우선권주장  
61/819,517 2013년05월03일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

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

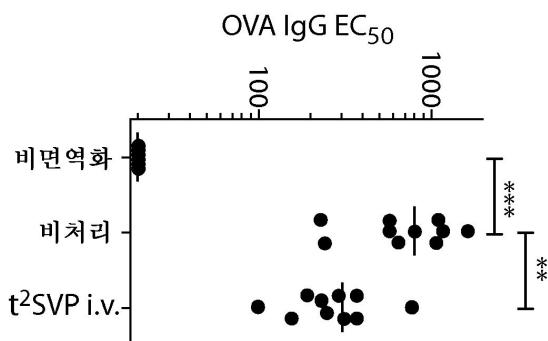
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 감소 또는 증진된 약역학적 효과를 위한 관용유발 합성 나노담체 및 치료 거대분자

### (57) 요약

치료 거대분자에 대해 특이적인 약역학적 효과를 제공하는 조성물 및 방법이 개시되어 있다. 효과는 면역억제제 용량과 조합된 치료 거대분자의 감소된 용량으로부터 생성될 수 있다. 효과는 또한 이러한 조성물에 의해 증진될 수 있다.

### 대 표 도



(52) CPC특허분류

*A61K 39/00* (2013.01)  
*A61K 47/6923* (2017.08)  
*A61K 9/5115* (2013.01)  
*A61K 9/5153* (2013.01)  
*A61P 37/06* (2018.01)

(30) 우선권주장

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

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

합성 나노담체의 용도.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 관련 출원

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

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은, 일부 실시양태에서 치료 거대분자와 병용 투여되는 합성 나노담체에 부착되어 있는 면역억제제 용량 및 관련 방법에 관한 것이다. 조성물 및 방법은 효율적인 약역학적 효과가 치료 거대분자에 대해 특이적이도록 한다. 따라서 제공된 조성물 및 방법은 치료 거대분자의 감소된 용량에서도 대상체에서 약역학적 반응을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 제공된 조성물 및 방법은 또한 목적하는 약역학적 및 면역학적 효과를 생성하기 위해 반복적으로 병용 투여될 수 있다.

### 배경기술

[0005] 치유적 치료, 예컨대 단백질 또는 효소 대체 요법은 종종 특정한 치료에 대해 바람직하지 않은 면역 반응을 야기한다. 이러한 경우에, 면역계 세포는 치료를 이물질로 인식하고, 박테리아 및 바이러스와 같은 감염 유기체를 파괴하고자 하는 것과 같이 그것을 중화시키거나 파괴하고자 한다. 이러한 바람직하지 않은 면역 반응은 치유적 치료의 효능을 중화시키거나, 치료에 대한 과민성 반응을 유발할 수 있다. 이러한 바람직하지 않은 반응은 면역억제제 약물의 사용을 통해 감소시킬 수 있다. 그러나 통상의 면역억제제 약물은 광범위하게 작용하고, 광범위하게 작용하는 면역억제제의 사용은 심각한 부작용, 예컨대 종양, 감염, 신독성 및 대사 장애의 위험과 연관된다. 따라서, 신규 요법이 유익할 것이다.

[0006] [배경기술이 개시된 선행기술문현]

[0007] 국제공개공보 WO 2012-149247 (공개일: 2012.11.1.)

[0008] 미국공개공보 US 2012-0014966 (공개일: 2012.1.19.)

[0009] 국제공개공보 WO 95-11696 (공개일: 1995.5.4.)

[0010] 미국공개공보 US 2007-0254897 (공개일: 2007.11.1.)

[0011] 한국공개공보 KR 10-2010-0099849 (2010.9.15.)

### 발명의 내용

[0012] 한 측면에서, 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 부착되어 있는 면역억제제 용량을 제공하는 것, 및 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량을 대상체에게 면역억제제 용량과 병용 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서 병용 투여는, 각각 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에, 면역억제제 용량과 병용 투여되지 않은 경우의 치료 거대분자의 투여와 비교하여, 면역억제제 용량과 병용 투여 시 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량에 의해 약역학적 효과를 생성하는 것으로 입증된 프로토콜에 따른다. 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량은 (A) 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 투여되고, (B) 면역억제제 용량과 병용 투여되지 않은 치료 거대분자의 약역학적 유효 용

량 미만이다.

[0013] 또 다른 측면에서, 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 부착되어 있는 면역억제제 용량을 제공하는 것, 및 약역학적 유효 용량의 치료 거대분자를 면역억제제 용량과 병용 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 병용 투여는, 각각 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에, 면역억제제 용량과 병용 투여되지 않은 경우의 치료 거대분자의 투여와 비교하여, 면역억제제 용량과의 병용 투여 시 치료 거대분자의 약역학적 효과를 증진시키는 것으로 입증된 프로토콜에 따른다.

[0014] 또 다른 측면에서, 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 부착되어 있는 면역억제제 용량을 제공하는 것, 및 약역학적 유효 용량의 치료 거대분자를 면역억제제 용량과 병용 투여하는 것, 및 병용 투여 후의 증진된 약역학적 효과를 기록하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.

[0015] 또 다른 측면에서, 하나 이상의 대상체에서 반복 투약 시 항-치료 거대분자 항체를 유발하거나 유발할 것으로 예상되는 치료 거대분자를 제공하는 것; 및 합성 나노담체에 부착되어 있는 면역억제제 용량을 제공하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 치료 거대분자를 대상체에게 동일하거나 더 낮은 용량으로 면역억제제 용량과 반복적으로 병용 투약하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병용 투여는 대상체에 대해 치료 거대분자의 2 또는 3회 용량에 걸쳐 치료 거대분자의 약역학적 효과의 유지를 생성하는 것으로 입증된 프로토콜에 따른다.

[0016] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 프로토콜을 결정하는 것을 추가로 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 약역학적 유효 용량, 예컨대 감소 또는 증진된 약역학적 유효 용량을 결정하는 것을 추가로 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 투여 전 및/또는 후에 대상체에서 약역학적 효과를 평가하는 것을 추가로 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 병용 투여는 1회 이상 반복된다. 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 투여는 정맥내, 복강내 또는 피하 투여에 의한 것이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 대상체는 항-치료 거대분자 항체 반응의 위험이 있다. 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 이러한 대상체는 항-치료 거대분자 반응이 일어날 것으로 예상되는 것이다.

[0017] 또 다른 측면에서, 일부 실시양태에서 면역억제제가 합성 나노담체에 부착되어 있는 면역억제제 용량, 및 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량을 포함하는 조성물 또는 키트가 제공된다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에서 사용하기 위한 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량을 포함하는 조성물 또는 키트가, 일부 실시양태에서 면역억제제가 합성 나노담체에 부착되어 있는 면역억제제 용량과 조합되어 제공된다.

[0019] 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 조성물 또는 키트는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에서 사용하기 위한 것이다. 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 조성물 또는 키트는 추가로 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0020] 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료 거대분자는 합성 나노담체에 부착되지 않는다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 거대분자는 합성 나노담체에 부착된다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 치료 거대분자 APC 제시 가능한 항원을 포함하지 않는다.

[0021] 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제 용량 및 치료 거대분자는 각각 용기 내에 수용된다. 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제 용량 및 치료 거대분자는 개별 용기 내에 수용된다. 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제 용량 및 치료 거대분자는 동일한 용기 내에 수용된다.

[0022] 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량은 (A) 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 투여되고, (B) 면역억제제 용량과 병용 투여되지 않은 치료 거대분자의 약역학적 유효 용량보다 적어도 30% 더 적다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 감소된 약역학적 유효 용량은 적어도 40% 더 적다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 감소된 약역학적 유효 용량은 적어도 50% 더 적다.

[0023] 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제 용량은 스타틴, mTOR 억제제, TGF- $\beta$  신호전달 작용제, 코르티코스테로이드, 미토콘드리아 기능 억제제, P38 억제제, NF- $\kappa$  B 억제제, 아데노

신 수용체 효능제, 프로스타글란딘 E2 효능제, 포스포디에스테라제 4 억제제, HDAC 억제제 또는 프로테아솜 억제제를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, mTOR 억제제는 라파마이신이다.

[0024] 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 단백질을 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 단백질은 단백질 대체 또는 단백질 보충 요법을 위한 것이다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 치료 거대분자는 주입가능하거나 주사가능한 치료 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고 인자, 시토카인, 인터페론, 성장 인자, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 품폐병 연관 단백질을 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 주입가능하거나 주사가능한 치료 단백질은 토실리주맙(Tocilizumab), 알파-1 항트립신, 헤마티드(Hematide), 알빈테르페론 알파-2b, 루신(Rhucin), 테사모렐린, 오크렐리주맙, 벨리무맙, 폐글로티카제, 폐그시티카제, 탈리글루세라제 알파, 아갈시다제 알파 또는 벨라글루세라제 알파를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 효소는 옥시도리덕타제, 트랜스페라제, 히드롤라제, 리아제, 이소미라제 또는 리가제를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 효소는 리소ーム 축적 장애에 대한 효소 대체 요법용 효소를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 리소ーム 축적 장애에 대한 효소 대체 요법용 효소는 이미글루세라제, a-갈락토시다제 A (a-gal A), 아갈시다제 베타, 산 a-글루코시다제 (GAA), 알글루코시다제 알파, 루미자임(LUMIZYME), 미오자임(MYOZYME), 아릴술파타제 B, 라로니다제, 알두라자임(ALDURAZYME), 이두르술파제, 엘라프라제(ELAPRASE), 아릴술파타제 B 또는 나글라자임(NAGLAZYME)을 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 효소는 크리스텍사(KRYSTEXXA) (폐글로티카제)를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 모노클로날 항체는 휴미라(HUMIRA) (아달리무맙)를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 시토카인은 럼포카인, 인터류킨, 케모카인, 제1형 시토카인 또는 제2형 시토카인을 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 혈액 또는 혈액 응고 인자는 인자 I, 인자 II, 조직 인자, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 Xa, 인자 XII, 인자 XIII, 폰 빌레브란트 인자, 프리칼리크레인, 고분자량 키니노겐, 피브로네틴, 항트롬빈 III, 혜파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제 (ZPI), 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA), 우로카나제, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2 (PAI2), 암 응고촉진제 또는 에포에틴 알파를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 혈액 또는 혈액 응고 인자는 인자 VIII이다.

[0025] 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체에 부착되어 있는 면역억제제 로드는 합성 나노담체에 대해 평균 0.1% 내지 50%이다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 20%이다.

[0026] 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 나노입자, 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀젼, 덴드리머, 베키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 또는 웨პ티드 또는 단백질 입자를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 나노입자를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 리포솜을 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속성 나노입자를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 금속성 나노입자는 금 나노입자를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체성 나노입자를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 비-메톡시-중결, 폴루로닉 중합체인 중합체를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 폴리에스테르, 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 폴리사카라이드, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 폴리에스테르는 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 폴리에스테르 및 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함한다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 폴리에테르는 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리

프로필렌 글리콜을 포함한다.

- [0027] 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균은 100nm 초과의 직경이다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 150nm 초과이다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 200nm 초과이다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 250nm 초과이다. 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 300nm 초과이다.
- [0028] 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 종횡비는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 초과이다.
- [0029] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나를 제조하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 제조하는 방법은 치료 거대분자의 용량 또는 투여 형태를 생성하는 것 및 면역억제제의 용량 또는 투여 형태를 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 거대분자의 용량 또는 투여 형태는 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량이다. 제공된 제조하는 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제의 용량 또는 투여 형태를 생성하는 단계는 면역억제제를 합성 나노담체에 부착하는 것을 포함한다. 제공된 제조하는 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 면역억제제의 용량 또는 투여 형태 및 치료 거대분자의 용량 또는 투여 형태를 키트 내에서 조합하는 것을 추가로 포함한다.
- [0030] 또 다른 측면에서, 대상체에서 항-치료 거대분자 항체 반응을 감소시키기 위한 의약의 제조를 위한, 본원에 제공된 임의의 조성물 또는 키트의 용도가 제공된다. 한 실시양태에서, 조성물 또는 키트는 면역억제제 및 치료 거대분자를 포함하며, 여기서 치료 거대분자는 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량으로 제공될 수 있다. 본원에 제공된 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다. 본원에 제공된 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 용도는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나를 달성하기 위한 것이다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에서 사용하기 위한 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물 또는 키트는 치료 거대분자의 하나 이상의 용량 또는 투여 형태 및/또는 면역억제제의 하나 이상의 용량 또는 투여 형태를 포함한다. 한 실시양태에서, 치료 거대분자의 용량은 감소된 약역학적 유효 용량이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 항-치료 거대분자 항체 반응을 감소시키기 위한 의약을 제조하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 의약은 면역억제제 및/또는 치료 거대분자를 포함하며, 여기서 치료 거대분자는 감소된 약역학적 유효 용량일 수 있다. 본원에 제공된 제조하는 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 본원에 제공된 바와 같은 병용 투여에 의한 순환 항원-특이적 항체 생산의 수준을 제시한다.
- 도 2는 본원에 제공된 바와 같은 병용 투여에 의한 순환 항원-특이적 항체 생산의 수준을 제시한다.
- 도 3은 본원에 제공된 바와 같은 병용 투여에 의한 항-OVA 항체 역가를 제공한다.
- 도 4는 본원에 제공된 바와 같은 병용 투여에 의한 항-KLH 항체 역가를 제공한다.
- 도 5는 최종 나노담체 및 FVIII 투약 1개월 후 FVIII에 대한 항체 회裳 반응을 제시한다.
- 도 6a 및 6b는 A형 혈우병 마우스에서의 나노담체 및 FVIII 투약의 효능을 제시한다.
- 도 7a 및 7b는 라파마이신에 부착된 나노담체의 존재 또는 부재 하에 휴미라/아달리무맙으로 처리된 마우스에서의 휴미라에 대한 면역 반응을 제시한다.
- 도 8은 라파마이신에 부착된 나노담체의 존재 또는 부재 하에 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH)으로 처리된 마우스에서의 항-KLH 항체 역가를 제시한다.
- 도 9는 라파마이신에 부착된 나노담체의 존재 또는 부재 하에 오브알부민 (OVA)으로 처리된 마우스에서의 항-OVA 항체 역가를 제시한다.

도 10은 라파마이신에 부착된 나노담체의 존재 또는 부재 하에 크리스텍사로 처리된 마우스에서의 항-크리스텍사 항체 역가를 제시한다.

도 11은 라파마이신에 부착된 나노담체의 존재 또는 부재 하에 OVA 및 KLH로 처리된 마우스에서의 항체 역가를 제시한다.

도 12a 및 12b는 라파마이신에 부착된 나노담체의 존재 또는 부재 하에 KLH로 처리된 마우스에서의 KLH에 대한 면역 반응을 제시한다.

도 13a 및 13b는 라파마이신에 부착된 나노담체의 존재 또는 부재 하에 휴미라/아달리무맙으로 처리된 마우스에서의 휴미라 /아달리무맙에 대한 면역 반응을 제시한다.

도 14는 본원에 제공된 방법을 실시하기 위한 예시적인 프로토콜을 제공한다.

도 15는 휴미라에 의한 요법과 관련하여 본원에 제공된 방법을 실시하는 것의 유익한 효과를 제시한다.

도 16은 본원에 제공된 방법을 실시하기 위한 예시적인 프로토콜을 제공한다.

도 17은 휴미라에 의한 요법과 관련하여 본원에 제공된 방법을 실시하는 것의 유익한 효과를 제시한다.

도 18은 합성 나노담체에 부착된 2종의 상이한 면역억제제의 결과로서, 항-단백질 항체 반응에서의 감소를 입증한다.

도 19는 휴미라에 의한 요법과 관련하여 본원에 제공된 방법을 실시하는 것의 또 다른 예시적인 프로토콜 및 유익한 효과를 제시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

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

[0035]

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

[0036]

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

[0037]

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

[0038]

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

[0039]

A. 서론

[0040]

본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트는 치료 거대분자에 대한 항체 반응이 개시된 대상체에서 치료 거대분자의 약역학적 효과(들)를 개선시키기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 또는 키트

는, 그렇지 않으면 항-치료 거대분자 항체 반응으로 인해 저하되는 치료 거대분자의 약역학적 효과(들)를 개선시키기 위해 사용될 수 있다. 특정한 이론에 얹매이는 것은 아니지만, 치료 거대분자에 대한 바람직하지 않은 체액성 면역 반응은 제공된 방법, 조성물 또는 키트를 사용하여 감소시킬 수 있을 것으로 여겨진다. 일부 실시양태에서, 방법, 조성물 또는 키트는 대상체에서, 달리 치료 거대분자가 제공된 바와 같은 면역억제제 용량의 병용 투여 없이 투여되는 경우에 야기될 바람직하지 않은 면역 반응을 감소시키는, 치료 거대분자에 대한 관용유발에 사용될 수 있고, 이러한 용량은 반복적으로 병용 투여될 수 있다. 이러한 바람직하지 않은 면역 반응은 치료 거대분자의 증진된 클리어런스, 또는 치료 거대분자의 치료 활성에 대한 다른 방해를 야기할 수 있다. 따라서 감소된 바람직하지 않은 면역 반응의 결과로서, 치료 거대분자의 약역학적 효과(들)는 증진될 수 있고/거나, 제공된 방법, 조성물 또는 키트로 동일한 수준의 효과를 달성하기 위해 감소된 투여량의 치료 거대분자가 사용될 수 있다. 감소된 바람직하지 않은 면역 반응의 또 다른 결과로서, 따라서 치료 거대분자의 반복 투약이 대상체에게 투여될 수 있다.

[0041] 면역억제제를, 바람직하게는 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 부착된 경우에, 치료 거대분자와 병용하여 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 전달하는 것이 증진된 약역학적 효과를 생성할 수 있다는 것은 예상외의 놀라운 발견이었다. 예를 들어, 상기 언급된 조합은 치료 거대분자의 목적하는 치료 효과를 방해하는 항-치료 거대분자-특이적 항체의 중화를 도울 수 있다. 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트는, 일부 실시양태에서, 치료 거대분자에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 감소시킬 뿐만 아니라, 달리 치료 거대분자가 단독으로 투여되는 경우에 (그러한 치료 거대분자에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 결과로서) 저하될 치료 거대분자의 목적하는 치료 효과를 증진시킨다. 따라서, 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트는 본원에 제공된 본 발명의 이익 없이 투여되는 경우에 치료 거대분자에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 보상하기 위해 일반적으로 증가되어야 할 치료 거대분자의 용량을 증가시킬 필요 없이, 대상체가 치료 거대분자의 치료 이익을 수득하는 것을 가능하게 할 수 있다. 놀랍게도, 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트는 심지어 동일한 치료 이익을 달성하기 위해 대상체가 감소된 용량의 치료 거대분자로 투여되게 한다.

[0042] 치료 거대분자에 의한 치유적 치료 동안 생성되는 바람직하지 않은 면역 반응은 제공된 방법, 조성물 또는 키트에 의해 상쇄될 수 있기 때문에, 본 발명은 치료 거대분자에 대한 바람직하지 않은 면역 반응이 생성되었거나 생성될 것으로 예상되는 대상체에서 증진된 약역학적 효과를 달성하거나 또는 감소된 약역학적 유효 용량을 사용하는데 유용하다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 이러한 바람직하지 않은 면역 반응의 위험이 있는 것일 수 있다.

[0043] 이제 본 발명을 이하에서 보다 상세하게 기재할 것이다.

#### B. 정의

[0045] "투여하는 것" 또는 "투여" 또는 "투여하다"는 약리학상 유용한 방식으로 대상체에게 물질을 제공하는 것을 의미한다. 상기 용어는 일부 실시양태에서 투여되도록 유발하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. "투여되도록 유발하는 것"은 또 다른 당사자가 직접적으로 또는 간접적으로 물질 투여를 유발하는 것, 압박하는 것, 권장하는 것, 보조하는 것, 유도하는 것 또는 지시하는 것을 의미한다.

[0046] 대상체에게 투여에 대한 조성물 또는 용량의 문맥에서 "유효량"은 대상체에서 하나 이상의 목적하는 반응의 생성, 예를 들어 관용유발 면역 반응 (예를 들어, 치료 거대분자-특이적 B 세포의 증식, 활성화, 유도, 생존, 동원에서의 감소 또는 치료 거대분자-특이적 항체의 생산에서의 감소)이 생성되게 하는 조성물 또는 용량의 양을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 약역학적 유효량이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 유효량은 본원에 제공된 바와 같은 하나 이상의 목적하는 약역학적 효과, 치료 효과 및/또는 면역 반응을 생성하는 본원에 제공된 조성물 또는 용량 (또는 본원에 제공된 바와 같은 다중 조성물 또는 용량)의 임의의 양이다. 이러한 양은 시험관내 또는 생체내 목적을 위한 것일 수 있다. 생체내 목적상, 상기 양은 임상의가 치료 거대분자 투여 및/또는 그에 대한 항원-특이적 면역 관용을 필요로 하는 대상체를 위해 임상 이익을 가질 수 있는 것으로 생각할 수 있다.

[0047] 유효량은, 일부 실시양태에서 바람직하지 않은 면역 반응을 전적으로 방지하는 것을 수반하기도 하지만, 바람직하지 않은 면역 반응의 수준을 감소시키는 것을 수반할 수 있다. 유효량은 또한 바람직하지 않은 면역 반응의 발생을 저연시키는 것을 수반할 수 있다. 유효한 양은 또한 목적하는 치료 종점 또는 목적하는 치료 결과를 생성하는 양일 수 있다. 다른 실시양태에서, 유효량은 목적하는 반응, 예컨대 치료 종점 또는 결과의 수준을 증진시키는 것을 수반할 수 있다. 유효량은, 바람직하게는, 대상체에서 항원, 예컨대 치료 거대분자에 대한 관용유발 면역 반응을 생성한다. 임의의 상기의 달성을 상용 방법에 의해 모니터링할 수 있다.

- [0048] 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 유효량은 목적하는 반응을 대상체에서 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 또는 그 초과 동안 지속시키는 양이다. 제공된 임의의 조성물 및 방법의 다른 실시양태에서, 유효량은 측정가능한 바람직한 반응을 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 또는 그 초과 동안 생성하는 양이다.
- [0049] 유효량은, 물론, 건강 진료의의 지식 및 전문성 내에서 치료할 특정한 대상체; 상태, 질환 또는 장애의 중증도; 연령, 신체 조건, 크기 및 체중을 비롯한 개별 환자 파라미터; 치료의 지속기간; 공동 요법 (존재하는 경우)의 속성; 구체적인 투여 경로 및 유사 인자에 의존할 것이다. 이들 인자는 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 상용을 넘지 않는 실현으로 다를 수 있다. 일반적으로, 최대 용량, 즉 타당한 의학적 판단에 따른 최고의 안전한 용량을 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 통상의 기술자는, 의학적 이유, 심리적 이유 또는 실질적으로 임의의 다른 이유로 환자가 더 낮은 용량 또는 관용가능한 용량을 고집할 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0050] 일반적으로, 본 발명의 조성물 중 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 용량은 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 양을 지칭한다. 대안적으로, 용량은 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 목적하는 양을 제공하는 합성 나노담체의 수를 기초로 하여 투여될 수 있다.
- [0051] "항-치료 거대분자 항체 반응" 또는 "항-치료 거대분자-특이적 항체 반응"은 치료 거대분자의 투여의 결과로서 항-치료 거대분자-특이적 항체의 생성, 또는 이러한 항체를 생산하는 과정의 유도이다. 실시양태에서, 이러한 반응은 치료 거대분자의 치료 효과를 상쇄시킨다.
- [0052] "항원"은 B 세포 항원 또는 T 세포 항원을 의미한다. "항원의 유형(들)"은 동일하거나 실질적으로 동일한 항원 특징을 공유하는 분자를 의미한다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 지단백질, 당지질, 폴리뉴클레오티드, 폴리사카라이드일 수 있거나, 또는 세포에 함유되어 있거나 세포에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 예컨대 항원이 잘 정의되거나 특성화되지 않은 경우에, 항원은 세포 또는 조직 표본, 세포 파편, 세포 액소솜, 조건화 배지 등에 함유되어 있을 수 있다.
- [0053] "항원-특이적"은 항원 또는 그의 부분의 존재로 인해 초래되거나, 또는 항원을 특이적으로 인식하고 그에 결합하는 분자를 생성하는 임의의 면역 반응을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항원이 치료 거대분자를 포함하는 경우에, 항원-특이적 치료 거대분자-특이적을 의미할 수 있다. 예를 들어, 면역 반응이 항원-특이적 항체 생산, 예컨대 치료 거대분자-특이적 항체 생산인 경우에, 항원 (예를 들어, 치료 거대분자)에 특이적으로 결합하는 항체가 생산된다. 또 다른 예로서, 면역 반응이 항원-특이적 B 세포 또는 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성화인 경우에, 증식 및/또는 활성은 단독으로 또는 MHC 분자, B 세포 등과 복합체로서 항원 또는 그의 부분의 인식으로부터 초래된다.
- [0054] "약역학적 효과를 평가하는 것"은 시험관내 또는 생체내 약역학적 효과의 수준, 존재 또는 부재, 감소, 증가 등의 임의의 측정 또는 결정을 지칭한다. 이러한 측정 또는 결정은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 샘플에 대해 수행될 수 있다. 이러한 평가는 본원에 제공되거나 또는 달리 관련 기술분야에 공지되어 있는 방법 중 어느 하나에서 수행될 수 있다.
- [0055] "위협이 있는" 대상체는 건강 진료의가 질환, 장애 또는 상태를 가질 가능성이 있는 것으로 여기는 것 또는 건강 진료의가 본원에 제공된 바와 같은 바람직하지 않은 항-치료 거대분자 항체 반응을 경험할 가능성이 있고 제공된 조성물 및 방법으로부터 이익을 얻을 것으로 여기는 것이다. 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 치료 거대분자에 대해 항-치료 거대분자 항체 반응을 가질 위협이 있는 것이다. 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 대상체는 치료 거대분자에 대해 항-치료 거대분자 항체 반응을 가질 것으로 예상되는 것이다.
- [0056] "부착하다" 또는 "부착된" 또는 "커플링시키다" 또는 "커플링된" (등)은 하나의 개체 (예를 들어 모이어티)를 또 다른 것과 화학적으로 회합시키는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 부착은 공유적이며, 이는 부착이 2개의 개체 사이에 공유 결합이 존재한다는 맥락에서 일어남을 의미한다. 비-공유적 실시양태에서, 비-공유적 부착은 전하 상호작용, 친화성 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 숙주-케스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 적층 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 및/또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-공유적 상호작용에 의해 매개된다. 실시양태에서, 캡슐화는 부착의 형태이다.

- [0057] 실시양태에서, 치료 거대분자 및 면역억제제는 서로 부착되지 않으며, 이는 치료 거대분자 및 면역억제제가 하나를 또 다른 것에 화학적으로 회합시키고자 특이적으로 의도되는 과정의 대상이 아님을 의미한다. 실시양태에서, 치료 거대분자 및/또는 면역억제제는 합성 나노담체에 부착되지 않으며, 이는 치료 거대분자 (및/또는 면역억제제) 및 합성 나노담체가 하나를 또 다른 것에 화학적으로 회합시키고자 특이적으로 의도되는 과정의 대상이 아님을 의미한다.
- [0058] 본원에 사용된 "평균"은 달리 나타내지 않는 한 산술 평균을 지칭한다.
- [0059] 2종 이상의 물질 및/또는 작용제 (본원에서 성분으로도 지칭됨)에 적용되는 바와 같은 "조합"은, 2종 이상의 물질/작용제가 회합된 물질을 정의하는 것으로 의도된다. 성분은, 예를 들어 제1 성분, 제2 성분, 제3 성분 등으로 개별적으로 확인될 수 있다. 따라서 이러한 문맥에서 용어 "조합된" 및 "조합하는"이 해석되게 된다.
- [0060] 조합에서 2종 이상의 물질/작용제의 회합은 물리적 또는 비-물리적일 수 있다. 물리적으로 회합된 조합 물질/작용제의 예는 하기를 포함한다:
- 2종 이상의 물질/작용제를 혼합물로 (예를 들어 동일한 단위 용량 내에) 포함하는 조성물 (예를 들어, 단일 제제);
  - 2종 이상의 물질/작용제가 화학적/물리화학적으로 연결된 (예를 들어 가교, 분자 응집 또는 공통 비히클 모이어티에의 결합에 의함) 물질을 포함하는 조성물;
  - 2종 이상의 물질/작용제가 화학적/물리화학적으로 공동-포장된 (예를 들어, 지질 소포, 입자 (예를 들어, 마이크로- 또는 나노입자) 또는 에멀젼 액적 상 또는 그 내에 배치된) 물질을 포함하는 조성물;
  - 2종 이상의 물질/작용제가 공동-포장되거나 공동-제공되는 (예를 들어, 단위 용량 어레이의 일부로서) 제약 키트, 제약 팩 또는 환자 팩.
- [0065] 비-물리적으로 회합된 조합 물질/작용제의 예는 하기를 포함한다:
- 2종 이상의 물질/작용제의 물리적 회합을 형성하기 위한 적어도 1종의 화합물/작용제의 즉석 회합에 대한 지침과 함께 2종 이상의 물질/작용제 중 적어도 1종을 포함하는 물질 (예를 들어, 비-단일 제제);
  - 2종 이상의 물질/작용제와의 조합 요법에 대한 지침과 함께 2종 이상의 물질/작용제 중 적어도 1종을 포함하는 물질 (예를 들어, 비-단일 제제);
  - 2종 이상의 물질/작용제 중 다른 것(들)이 투여된 (또는 투여되고 있는) 환자 집단에의 투여에 대한 지침과 함께 2종 이상의 물질/작용제 중 적어도 1종을 포함하는 물질;
  - 2종 이상의 물질/작용제 중 적어도 1종을 2종 이상의 물질/작용제 중 다른 것(들)과의 조합 사용을 위해 특이적으로 적합화된 양 또는 형태로 포함하는 물질.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "조합 요법"은 2종 이상의 물질/작용제의 조합 사용 (상기 정의된 바와 같음)을 포함하는 요법을 정의하는 것으로 의도된다. 따라서, 본원에서 "조합 요법", "조합" 및 물질/작용제"의 조합" 사용에 대한 언급은 동일한 전체 치료 요법의 일부로서 투여되는 물질/작용제를 지칭할 수 있다. 따라서, 2종 이상의 물질/작용제의 각각의 약량학은 상이할 수 있으며: 각각은 동시에 또는 상이한 시점에 투여될 수 있다. 따라서, 조합 물질/작용제는 동일한 제약 제제로 (즉, 함께) 또는 상이한 제약 제제로 (즉, 개별적으로) 순차적으로 (예를 들어, 전 또는 후에) 또는 동시에 투여될 수 있음이 인식될 것이다. 동일한 제제로 동시에 단일 제제로서인 반면에, 상이한 제약 제제로 동시에 비-단일이다. 조합 요법에서 2종 이상의 물질/작용제의 각각의 약량학은 또한 투여 경로와 관련하여 상이할 수 있다.
- [0071] "병용"은 2종 이상의 물질/작용제를 시간상 관련된, 바람직하게는 생리학적 또는 면역학적 반응에서 조절을 제공하도록 충분히 시간상 관련된 방식으로 대상체에게 투여하는 것을 의미하고, 보다 바람직하게는 2종 이상의 물질/작용제는 조합되어 투여된다. 실시양태에서, 병용 투여는 2종 이상의 물질/작용제의 명시된 시간 내, 바람직하게는 1개월 내, 보다 바람직하게는 1주 내, 보다 더 바람직하게는 1일 내, 더욱 바람직하게는 1시간 내 투여를 포괄할 수 있다. 실시양태에서, 물질/작용제는 1회 초과의 병용 투여로 반복적으로 병용 투여될 수 있고, 이는 예컨대 실시예에서 제공될 수 있다.

- [0072] "결정하는 것" 또는 "결정하다"는 사실 관계를 확인하는 것을 의미한다. 결정은 실험을 수행하는 것 또는 예측하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다수의 방식으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 면역억제제 또는 치료 거대분자의 용량은 시험 용량으로 출발하고 공지된 스케일링 기술 (예컨대 알로메트릭 또는 이소메트릭 스케일링)을 사용하여 투여를 위한 용량을 결정함으로써 결정될 수 있다. 이는 본원에 제공된 바와 같은 프로토콜을 결정하는데 또한 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 용량은 대상체에서 다양한 용량을 시험하고, 즉 경험에 기초한 직접 실험을 통하고, 데이터를 유도함으로써 결정될 수 있다. 실시양태에서, "결정하는 것" 또는 "결정하다"는 "결정되도록 유발하는 것"을 포함한다. "결정되도록 유발하는 것"은 직접적으로 또는 간접적으로, 또는 분명하게 또는 함축적으로를 포함하여, 개체와 협력하여 개체가 사실 관계를 확인하는 것을 유발하는 것, 압박하는 것, 권장하는 것, 보조하는 것, 유도하는 것 또는 지시하는 것 또는 작용하는 것을 의미한다.
- [0073] "투여 형태"는 대상체에 투여하는데 적합한 매체, 담체, 비히클, 또는 장치 내의 약리학적 및/또는 면역학적 활성 물질을 의미한다. 본원에 제공된 조성을 또는 용량 중 어느 하나는 투여 형태로 존재할 수 있다.
- [0074] "용량"은 주어진 시간 동안 대상체에게 투여하기 위한 약리학적 및/또는 면역학적 활성 물질의 특정 양을 지칭한다.
- [0075] "캡슐화하다"는 물질의 적어도 한 부분을 합성 나노담체 내에 봉입하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 물질은 합성 나노담체 내에 완전히 봉입된다. 다른 실시양태에서, 캡슐화되는 물질의 대부분 또는 모두는 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출되지 않는다. 다른 실시양태에서, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% (중량/중량) 이하가 국부 환경에 노출된다. 캡슐화는, 물질의 대부분 또는 모두가 합성 나노담체의 표면 상에 놓이고 물질이 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출된 채로 있게 되는 흡수와 구별된다.
- [0076] "생성하는 것"은 작용, 예컨대 생리학적 또는 면역학적 반응 (예를 들어, 관용유발 면역 반응)이 일어나도록 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 유발하는 것을 의미한다.
- [0077] "대상체를 확인하는 것"은 임상의가 대상체를 본원에 제공된 방법, 조성을 또는 키트로부터 이익을 얻을 수 있는 것으로서 인식하도록 하는 임의의 작용 또는 일련의 작용이다. 바람직하게는, 확인된 대상체는 본원에 제공된 바와 같은 치료 거대분자로부터 치료 이익을 필요로 하고 항-치료 거대분자-특이적 항체 반응이 일어났거나 일어난 것으로 의심되는 것이다. 작용 또는 일련의 작용은 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 본원에 제공된 바와 같은 방법, 조성을 또는 키트를 필요로 하는 대상체를 확인하는 것을 추가로 포함한다.
- [0078] "면역억제제"는 APC가 면역억제 효과를 갖도록, 또는 T 세포 또는 B 세포가 억제되도록 유발하는 (예를 들어, 관용유발 효과) 화합물을 의미한다. 면역억제 효과는 일반적으로 바람직하지 않은 면역 반응을 감소, 억제 또는 방지하거나 또는 목적하는 면역 반응, 예컨대 조절 면역 반응을 촉진하는 APC에 의한 시토카인 또는 다른 인자의 생산 또는 발현을 지칭한다. APC가 이러한 APC에 의해 제시된 항원을 인식하는 면역 세포에 대해 (면역억제 효과 하에) 면역억제 기능을 획득한 경우에, 면역억제 효과는 제시된 항원에 대해 특이적인 것으로 언급된다. 어떠한 특정한 이론에 얹매이는 것은 아니지만, 면역억제 효과는 면역억제제가 APC에게, 바람직하게는 항원의 존재 하에 전달된 결과인 것으로 여겨진다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 APC가 하나 이상의 면역 이팩터 세포에서 조절 표현형의 촉진을 유발하는 것이다. 예를 들어, 조절 표현형은 항원-특이적 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 생산, 유도, 자극 또는 동원의 억제, 항원-특이적 항체의 생산의 억제, Treg 세포 (예를 들어, CD4+CD25highFoxP3+ Treg 세포)의 생산, 유도, 자극 또는 동원 등을 특징으로 할 수 있다. 이는 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 조절 표현형으로의 전환의 결과일 수 있다. 이는 또한 다른 면역 세포, 예컨대 CD8+ T 세포, 대식세포 및 iNKT 세포에서의 FoxP3의 유도의 결과일 수 있다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 항원을 프로세싱한 후 APC의 반응에 영향을 미치는 것이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 항원의 프로세싱을 방해하는 것이 아니다. 추가 실시양태에서, 면역억제제는 아폽토시스-신호전달 분자가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 인지질이 아니다.
- [0079] 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF- $\beta$  신호전달 작용제; TGF- $\beta$  수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 트리코스타틴 A; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF- $\kappa$   $\beta$  억제제, 예컨대 6Bio, 텍사메타손, TCPA-1, IKK VII; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제 (PGE2), 예컨대 미소프로스톨; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제 (PDE4), 예컨대 롤리프람; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 페옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제; 페옥시솜 증식자-활성화

수용체 억제제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제; PI3KB 억제제, 예컨대 TGX-221; 자가포식 억제제, 예컨대 3-메틸아데닌; 아릴 탄화수소 수용체 억제제; 프로테아솜 억제제 I (PSI); 및 산화 ATP, 예컨대 P2X 수용체 차단제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한 IDO, 비타민 D3, 시클로스포린, 예컨대 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오피린 (Aza), 6-메르캅토퓨린 (6-MP), 6-티오구아닌 (6-TG), FK506, 상글리페린 A, 살메테롤, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF), 아스피린 및 다른 COX 억제제, 니플룸산, 에스트리올, 메토트렉세이트 및 트리프톨리드를 포함한다. 실시양태에서, 면역억제제는 본원에 제공된 임의의 작용제를 포함할 수 있다.

[0080] 면역억제제는 APC에 대해 면역억제 효과를 직접적으로 제공하는 화합물일 수 있거나, 또는 면역억제 효과를 간접적으로 (즉, 투여 후 일부 방식으로 프로세싱된 후에) 제공하는 화합물일 수 있다. 따라서 면역억제제는 본원에 제공된 임의의 화합물의 전구약물 형태를 포함한다.

[0081] 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 실시양태에서, 본원에 제공된 면역억제제는 합성 나노담체에 부착된다. 바람직한 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체의 구조를 구성하는 물질에 부가된 요소이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 중합체로 구성된 경우에, 면역억제제는 하나 이상의 중합체에 부가되고 부착된 화합물이다. 또 다른 예로서, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 지질로 구성된 경우에, 면역억제제는 또한 하나 이상의 지질에 부가되고 부착된다. 실시양태에서, 예컨대 합성 나노담체 물질이 또한 면역억제 효과를 생성하는 경우에, 면역억제제는 면역억제 효과를 생성하는 합성 나노담체 물질에 부가되어 존재하는 요소이다.

[0082] 다른 예시적인 면역억제제는 소분자 약물, 천연 산물, 항체 (예를 들어, CD20, CD3, CD4에 대한 항체), 생물제제-기반 약물, 탄수화물-기반 약물, 나노입자, 리포솜, RNAi, 안티센스 핵산, 압타머, 메토트렉세이트, NSAID; 평골리모드; 나탈리주맙; 알렘투주맙; 항-CD3; 타크롤리무스 (FK506); 시토카인 및 성장 인자, 예컨대 TGF-β 및 IL-10 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 추가의 면역억제제가 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명은 이러한 측면으로 제한되지 않는다.

[0083] 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 실시양태에서, 면역억제제는 나노결정질 형태와 같은 형태 내에 존재하고 그에 의해 면역억제제 그 자체의 형태는 입자이거나 입자-유사이다. 실시양태에서, 이러한 형태는 바이러스 또는 다른 외래 병원체를 모방한다. 많은 약물이 나노화되어 있고, 이러한 약물 형태를 생산하는 적절한 방법이 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다. 약물 나노결정, 예컨대 나노결정질 라파마이신은 통상의 기술자에게 공지되어 있다 (Katteboinaa, et al. 2009, International Journal of PharmTech Resesearch; Vol. 1, No. 3; pp682-694). 본원에 사용된 "약물 나노결정"은 담체 또는 매트릭스 물질을 포함하지 않는 약물 (예를 들어, 면역억제제)의 형태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 약물 나노결정은 90%, 95%, 98%, 또는 99% 또는 그 초과의 약물을 포함한다. 약물 나노결정을 생산하는 방법은, 제한 없이, 밀링, 고압 균질화, 침전, 분무 건조, 초임계 용액의 급속 팽창 (RESS), 나노에지(Nanoedge)® 기술 (백스터 헬스케어(Baxter Healthcare)) 및 나노크리스탈 테크놀로지(Nanocrystal Technology)™ (엘란 코포레이션(Elan Corporation))을 포함한다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 또는 안정화제는 약물 나노결정의 입체적 또는 정전기적 안정성을 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서 면역억제제의 나노결정 또는 나노결정질 형태는 면역억제제, 특히 불용성 또는 불안정성인 면역억제제의 용해도, 안정성 및/또는 생체이용률을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노결정질 형태의 면역억제제와 함께 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량의 병용 투여는 감소된 항-치료 거대분자 항체 반응을 생성한다.

[0084] "로드"는, 합성 나노담체에 부착된 경우에, 전체 합성 나노담체 내의 물질의 총 건조 레시피 중량을 기준으로 한 합성 나노담체에 부착된 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 양 (중량/중량)이다. 일반적으로, 로드는 합성 나노담체 집단에 대한 평균으로 계산된다. 한 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체에 대해 평균 0.1% 내지 99%이다. 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 50%이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 로드는 0.1% 내지 20%이다. 추가 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 로드는 0.1% 내지 10%이다. 추가 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 로드는 1% 내지 10%이다. 추가 실시양태에서, 면역억제제의 로드는 7% 내지 20%이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 로드는 합성 나노담체 집단에 대해 평균 적어도 0.1%, 적어도 0.2%, 적어도 0.3%, 적어도 0.4%, 적어도 0.5%, 적어도 0.6%, 적어도 0.7%, 적어도 0.8%, 적어도 0.9%, 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 11%, 적어도 12%, 적어도 13%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도

97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%이다. 추가 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 로드는 합성 나노담체 집단에 대해 평균 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20%이다. 상기 실시양태의 일부 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 로드는 합성 나노담체 집단에 대해 평균 25% 이하이다. 실시양태에서, 로드는 실시예에 기재될 수 있는 바와 같이 또는 관련 기술분야에 달리 공지되어 있는 바와 같이 계산된다.

[0085] 일부 실시양태에서, 면역억제제의 형태가 그 자체로 입자 또는 입자-유사, 예컨대 나노결정질 면역억제제인 경우에, 면역억제제의 로드는 입자 등으로의 면역억제제의 양 (중량/중량)이다. 이러한 실시양태에서, 로드는 97%, 98%, 99% 또는 그 초과에 접근할 수 있다.

[0086] "합성 나노담체의 최대 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 나노담체의 가장 큰 치수를 의미한다. "합성 나노담체의 최소 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 합성 나노담체의 가장 작은 치수를 의미한다. 예를 들어, 구형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수는 실질적으로 동일할 것이고, 그의 직경의 크기일 것이다. 유사하게, 입방형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최소 치수는 그의 높이, 가로 또는 세로 중 가장 작은 것일 것이고, 합성 나노담체의 최대 치수는 그의 높이, 가로 또는 세로 중 가장 큰 것일 것이다. 한 실시양태에서, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상이다. 한 실시양태에서, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 5 μm 이하이다. 바람직하게는, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 110 nm 초과, 보다 바람직하게는 120 nm 초과, 보다 바람직하게는 130 nm 초과, 보다 더 바람직하게는 150 nm 초과이다. 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수의 종횡비는 실시양태에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 최대 대 최소 치수의 종횡비는 1:1 내지 1,000,000:1, 바람직하게는 1:1 내지 100,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 10,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1000:1, 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 100:1, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 10:1로 달라질 수 있다. 바람직하게는, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 3 μm 이하, 보다 바람직하게는 2 μm 이하, 보다 바람직하게는 1 μm 이하, 보다 바람직하게는 800 nm 이하, 보다 바람직하게는 600 nm 이하, 보다 더 바람직하게는 500 nm 이하이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플 중 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상, 보다 바람직하게는 120 nm 이상, 보다 바람직하게는 130 nm 이상, 보다 바람직하게는 140 nm 이상, 보다 더 바람직하게는 150 nm 이상이다. 합성 나노담체 치수 (예를 들어, 유효 직경)의 측정치는, 일부 실시양태에서 합성 나노담체를 액체 (통상적으로 수성) 매질에 혼탁시키고 동적 광 산란 (DLS)을 사용함으로써 (예를 들어, 브룩하븐 제타팔스 (Brookhaven ZetaPALS) 기기를 사용함) 수득할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 혼탁액은 수성 완충제로부터 정제수로 희석되어 대략 0.01 내지 0.1 mg/mL의 최종 합성 나노담체 혼탁액 농도가 달성될 수 있다. 희석된 혼탁액은 내부에서 직접 제조될 수 있거나, 또는 DLS 분석에 적합한 큐벳으로 옮겨질 수 있다. 이어서 큐벳을 DLS 내에 놓고, 제어 온도와 평형이 되도록 한 다음, 충분한 시간 동안 스캐닝하여, 매질의 점도 및 샘플의 굴절률에 대한 적절한 입력을 기반으로 하여 안정하고 재생가능한 분포를 획득할 수 있다. 이어서 유효 직경 또는 분포의 평균을 보고한다. 높은 종횡비 또는 비-구형 합성 나노담체의 유효 크기를 결정하는 것은 보다 정확한 측정치를 수득하기 위해 확대 기술, 예컨대 전자 현미경검사를 필요로 할 수 있다. 합성 나노담체의 "치수" 또는 "크기" 또는 "직경"은 예를 들어 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균을 의미한다.

[0087] "비-메톡시-종결 중합체"는 메톡시 이외의 모이어티로 종결된 적어도 하나의 말단을 갖는 중합체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 메톡시 이외의 모이어티로 종결된 적어도 2개의 말단을 갖는다. 다른 실시양태에서, 중합체는 메톡시로 종결된 어떠한 말단도 갖지 않는다. "비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체"는 양쪽 말단에서 메톡시를 갖는 선형 플루로닉 중합체 이외의 중합체를 의미한다. 본원에 제공된 바와 같은 중합체성 나노입자는 비-메톡시-종결 중합체 또는 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체를 포함할 수 있다.

[0088] "제약상 허용되는 부형제" 또는 "제약상 허용되는 담체"는 조성물을 제제화하기 위해 약리학적 활성 물질과 함께 사용되는 약리학적 불활성 물질을 의미한다. 제약상 허용되는 부형제는 사카라이드 (예컨대 글루코스, 락토스 등), 보존제, 예컨대 항미생물제, 재구성 보조제, 착색제, 염수 (예컨대 포스페이트 완충 염수) 및 완충제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지되어 있는 다양한 물질을 포함한다.

[0089]

"약역학적 효과" 또는 "약역학적 반응"은 치료 거대분자의 투여의 결과로서 임의의 생리학적 또는 면역학적 반응을 의미한다. 이러한 반응은 치료 효과와 연관된 반응과 같은 목적하는 반응일 수 있다. 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트는, 일부 실시양태에서, 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 투여되는 경우에 증진된 약역학적 효과, 예컨대 증진된 치료 효과를 생성하는 것으로 발견되었다. 일부 경우에, 증진된 약역학적 효과는 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 본원에 제공된 바와 같은 면역억제제 용량의 병용 투여 없이 투여되는 경우의 치료 거대분자의 용량과 동일하거나 더 적은 치료 거대분자의 용량으로 수득될 수 있다. 물질/작용제가 약역학적으로 유효한지 여부는 표준 방법에 의해 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 제공된 방법, 조성물 또는 키트를 사용한 약역학적 효과는, 치료 거대분자가 그렇게 투여되지 않았지만 또한 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하인 경우의 약역학적 효과와 비교된다. 실시양태에서, 비교는 치료 거대분자가 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 단독으로 투여되는 경우의 약역학적 효과에 대한 것이다. 일반적으로, 약역학적 효과는 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에서의 투여에 의해 평가되며, 이는 방법, 조성물 또는 키트가 이러한 반응을 극복하는데 효과적인 것이 바람직하기 때문이다. 따라서, 약역학적 효과는 이러한 반응이 일어나고 있는 경우에 결정된다.

[0090]

"프로토콜"은 대상체에게 투여하는 패턴을 의미하고, 대상체에 대한 1종 이상의 물질의 임의의 투약 요법을 포함한다. 프로토콜은 요소 (또는 변수)로 구성되고; 따라서 프로토콜은 1종 이상의 요소를 포함한다. 이러한 프로토콜의 요소는 투약량, 투약 빈도, 투여 경로, 투약 지속기간, 투약률, 투약 사이의 간격, 임의의 상기의 조합 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 프로토콜은 하나 이상의 시험 대상체에게 본 발명의 1종 이상의 조성물을 투여하는데 사용될 수 있다. 이어서 이를 시험 대상체에서 면역 반응을 평가하여 프로토콜이 목적하는 또는 목적하는 수준의 약역학적 효과를 생성하는데 효과적인지 여부를 결정할 수 있다. 임의의 다른 치료 및/또는 면역 효과가 또한 상기 면역 반응 대신 또는 그에 더하여 평가될 수 있다. 프로토콜의 1종 이상의 요소는 시험 대상체, 예컨대 비-인간 대상체에서 사전 입증된 다음 인간 프로토콜로 해석될 수 있다. 예를 들어, 비-인간 대상체에서 입증된 투약량을 확립된 기술, 예컨대 알로메트릭 스케일링 또는 다른 스케일링 방법을 사용하여 인간 프로토콜의 요소로 스케일링할 수 있다. 프로토콜이 목적하는 효과를 갖는지 여부는 본원에 제공되거나 달리 관련 기술분야에 공지되어 있는 임의의 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 특정 면역 세포, 시토카인, 항체 등이 감소, 생성, 활성화되는지 등의 여부를 결정하기 위해 본원에 제공된 조성물을 특정 프로토콜에 따라 투여한 대상체로부터 샘플을 수득할 수 있다. 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 결합체는 상업적으로 입수 가능하다. 이러한 키트는 전형적으로 FACS-기반 검출, 목적하는 세포 집단의 이종 세포 집단으로부터의 분리 및/또는 정량화를 가능하게 하는 항원에 대한 염색 시약을 포함한다. 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 다수의 조성물을 프로토콜을 구성하는 1종 이상 또는 모든 또는 실질적으로 모든 요소를 사용하여 또 다른 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 프로토콜은 치료 거대분자에 의해 항체 반응의 감소 및/또는 개선된 약역학적 효과가 생성되는 것으로 입증되었다.

[0091]

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

[0092]

"대상체를 제공하는 것"은 임상의가 대상체와 접촉하게 하고 그에게 본원에 제공된 조성물을 투여하거나, 또는 그에 대해 본원에 제공된 방법을 수행하게 하는 임의의 작용 또는 일련의 작용이다. 바람직하게는, 대상체는 치료 거대분자 투여 및 그에 대한 항원-특이적 면역 관용을 필요로 하는 것이다. 작용 또는 일련의 작용은 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 대상체를 제공하는 것을 추가로 포함한다.

[0093]

"증진된 약역학적 효과를 기록하는 것"은 치료 거대분자 용량이 실제, 예상 또는 추정 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 증진된 약역학적 효과를 달성했음을 필기하는 것, 또는 이러한 필기가 임의의 문서적 또는 전자적 형태로 이루어질 것이라는 예상 하에 직접적으로 또는 간접적으로 활동하게 하는 것을 의미한다. 일반적으로, 이러한 상황에서 치료 거대분자 용량은 본원에 제공된 바와 같은 병용 투여의 시점에 이용 가능한 정보를 기반으로 하여 본원에 제공된 바와 같은 면역억제제 용량 없이 투여된다면 (예를 들어, 단독으로 투여된다면) 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 증진된 약역학적 효과를 달성할 것으로 예상되지 않을 것이다. 예를 들어, 이러한 상황에서, 치료 거대분자의 유효성은 면역억제제 용량 없이 투여된다면 저하될 것이지만, 본원에 제공된 바와 같은 병용 투여에 의하면 그 대신 증진된 약역학적 효과가 관찰될 것으로 예상될 것이다. 일부 실

시양태에서, 기록은 면역억제제 용량이 치료 거대분자 용량과 조합되어 대상체에게 투여된 때 또는 그 이후의 일부 시점에 일어난다. 이를 실시양태 중 일부에서, 치료 거대분자의 용량은 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 면역억제제 용량 없이 투여되는 치료 거대분자의 용량과 비교하여 감소된다 (또는 그 이하이다). 본원에 사용된 "문서적 형태"는, 종이와 같은 매체 상의 임의의 기록을 지칭한다. 본원에 사용된 "전자적 형태"는, 전자적 매체 상의 임의의 기록을 지칭한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 본원에 제공된 방법에 따라 처리를 제공받은 대상체에서 치료 및/또는 면역 반응을 기록하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0094] "감소된 약역학적 유효 용량"은 치료 거대분자가 면역억제제 용량과 함께 투여되지 않은 경우의 (예를 들어, 치료 거대분자가 단독으로 투여되는 경우의) 양과 비교하여 본원에 제공된 바와 같은 면역억제제 용량과 병용 투여되는 경우에 유사한 약역학적 효과를 달성할 수 있는 치료 거대분자의 감소된 양을 지칭한다. 본원에 사용된 유사한 약역학적 효과는 동일한 방식으로 측정된 또 다른 수준의 1 로그 내인 효과 수준이다. 바람직하게는, 유사한 약역학적 효과는 5-배 이하로 상이하다. 보다 바람직하게는, 유사한 약역학적 효과는 2-배 이하로 상이하다.

[0095] "대상체"는 온혈 포유동물, 예컨대 인간 및 영장류; 조류; 가정용 또는 농장 동물, 예컨대 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험 동물, 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그; 어류; 과충류; 동물원 및 야생 동물 등을 비롯한 동물을 의미한다.

[0096] "합성 나노담체(들)"는 천연에서는 발견되지 않고, 크기가 5 마이크로미터 이하인 적어도 하나의 치수를 갖는 개별 물체를 의미한다. 일부민 나노입자가 일반적으로 합성 나노담체로서 포함되지만, 특정 실시양태에서 합성 나노담체는 일부민 나노입자를 포함하지 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 키토산을 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질-기반 나노입자가 아니다. 추가 실시양태에서, 합성 나노담체는 인지질을 포함하지 않는다.

[0097] 합성 나노담체는 1개 또는 다수의 지질-기반 나노입자 (본원에서 지질 나노입자, 즉 그의 구조를 구성하는 대부분의 물질이 지질인 나노입자로도 지칭됨,), 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀젼, 덴드리머, 베키블, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 (즉, 주로 바이러스 구조 단백질로 구성되지만 감염성이지 않거나 낮은 감염성을 갖는 입자), 펩티드 또는 단백질-기반 입자 (본원에서 단백질 입자, 즉 그의 구조를 구성하는 대부분의 물질이 펩티드 또는 단백질인 입자로도 지칭됨) (예컨대 일부민 나노입자) 및/또는 지질-중합체 나노입자와 같이 나노물질의 조합을 사용하여 개발된 나노입자일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 합성 나노담체는 구형, 입방형, 파라미드형, 장방형, 실린더형, 도넛형 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 상이한 형상일 수 있다. 본 발명에 따른 합성 나노담체는 하나 이상의 표면을 포함한다. 본 발명의 실시에 사용하기 위해 적합화될 수 있는 예시적인 합성 나노담체는 (1) 미국 특허 5,543,158 (Gref et al.)에 개시된 생분해성 나노입자, (2) 공개 미국 특허 출원 20060002852 (Saltzman et al.)의 중합체성 나노입자, (3) 공개 미국 특허 출원 20090028910 (DeSimone et al.)의 리소그래피로 구축된 나노입자, (4) WO 2009/051837 (von Andrian et al.)의 개시내용, (5) 공개 미국 특허 출원 2008/0145441 (Penades et al.)에 개시된 나노입자, (6) 공개 미국 특허 출원 20090226525 (de los Rios et al.)에 개시된 단백질 나노입자, (7) 공개 미국 특허 출원 20060222652 (Sebbel et al.)에 개시된 바이러스-유사 입자, (8) 공개 미국 특허 출원 20060251677 (Bachmann et al.)에 개시된 혼합 부착 바이러스-유사 입자, (9) WO2010047839A1 또는 WO2009106999A2에 개시된 바이러스-유사 입자, (10) 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]에 개시된 나노침전 나노입자, (11) 미국 공개 2002/0086049에 개시된 아폽토시스 세포, 아폽토시스체 또는 합성 또는 반합성 모방체, 또는 (12) 문헌 [Look et al., Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice" J. Clinical Investigation 123(4):1741-1749(2013)]의 것을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 초파, 또는 1:10 초파의 종횡비를 가질 수 있다.

[0098] 약 100 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화시키는 히드록실 기가 있는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 활성화시키는 히드록실 기가 아닌 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 실질적으로 활성화시키는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 실질적으로 활성화시키지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화시키는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 활성화시키지 않

는 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 초파, 또는 1:10 초파의 종횡비를 가질 수 있다.

[0099] "치료 거대분자"는 대상체에게 투여될 수 있고 치료 효과를 갖는 임의의 단백질, 탄수화물, 지질 또는 핵산을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 치료 거대분자의 투여는 항-치료 거대분자-특이적 항체의 생산을 비롯하여 바람직하지 않은 면역 반응을 생성할 수 있다. 본원에 기재된 치료 거대분자의 면역억제제 용량과의 병용 투여는 예컨대 치료 거대분자에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 감소시킴으로써 그의 치료 유효성을 증진시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 폴리뉴클레오티드 또는 치료 단백질일 수 있다.

[0100] "치료 폴리뉴클레오티드"는 대상체에게 투여될 수 있고 치료 효과를 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드-기반 요법을 의미한다. 이러한 요법은 유전자 침묵을 포함한다. 이러한 요법의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 네이키드 RNA (메신저 RNA, 변형된 메신저 RNA, 및 RNAi 형태 포함)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다른 치료 폴리뉴클레오티드의 예가 본원의 다른 곳에서 제공된다. 치료 폴리뉴클레오티드는 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산될 수 있고, 또한 무세포를 사용하거나 완전 합성 시험관내 방법으로부터 수득될 수 있다. 따라서, 대상체는 임의의 상기의 것에 의한 치료를 필요로 하는 임의의 대상체를 포함한다. 이러한 대상체는 임의의 상기의 것을 제공받을 것을 포함한다.

[0101] "치료 단백질"은 대상체에게 투여될 수 있고 치료 효과를 갖는 임의의 단백질 또는 단백질-기반 요법을 의미한다. 이러한 요법은 단백질 대체 및 단백질 보충 요법을 포함한다. 이러한 요법은 또한 외인성 또는 외래 단백질의 투여, 항체 요법, 및 세포 또는 세포-기반 요법을 포함한다. 치료 단백질은 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 시토카인, 성장 인자, 모노클로날 항체, 항체-약물 접합체 및 폴리클로날 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 치료 단백질의 예가 본원의 다른 곳에서 제공된다. 치료 단백질은 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산될 수 있고, 이러한 세포로부터 수득될 수 있거나 이러한 세포의 형태로 투여될 수 있다. 실시양태에서, 치료 단백질은 포유동물 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 박테리아 세포, 식물 세포, 트랜스제닉 동물 세포, 트랜스제닉 식물 세포 등 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산된다. 치료 단백질은 이러한 세포에서 재조합적으로 생산될 수 있다. 치료 단백질은 바이러스 형질전환된 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 대상체는 임의의 상기의 것에 의한 치료를 필요로 하는 임의의 대상체를 포함한다. 이러한 대상체는 임의의 상기의 것을 제공받을 것을 포함한다.

[0102] "치료 거대분자 APC 제시가능한 항원"은 치료 거대분자 (즉, 치료 거대분자에 대한 면역 반응 (예를 들어, 항-치료 거대분자-특이적 항체의 생산)을 생성할 수 있는 치료 거대분자 또는 그의 단편)와 결합된 항원을 의미한다. 일반적으로, 치료 거대분자 항원-제시 세포 (APC) 제시가능한 항원은 면역계에 의한 인식을 위해 제시될 수 있다 (예를 들어, 면역계 세포, 예컨대 수지상 세포, B 세포 또는 대식세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 항원 제시 세포에 의해 제시됨). 치료 거대분자 APC 제시가능한 항원은 예를 들어 T 세포에 의한 인식을 위해 제시될 수 있다. 이러한 항원은 그에 의해 인식되어 부류 I 또는 부류 II 주요 조직적합성 복합체 분자 (MHC)에 결합된 항원의 에피토프의 제시를 통해 T 세포에서 면역 반응을 촉발할 수 있다. 치료 거대분자 APC 제시가능한 항원은 일반적으로 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 지단백질을 포함하거나, 세포 내에서, 그 상에서 또는 그에 의해 함유되거나 발현된다. 치료 거대분자 항원은, 일부 실시양태에서, 합성 나노담체에 부착되고, MHC 부류 I-제한된 에피토프 및/또는 MHC 부류 II-제한된 에피토프 및/또는 B 세포 에피토프를 포함한다. 바람직하게는, 치료 거대분자에 대해 특이적인 하나 이상의 관용유발 면역 반응이 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트에 의해 생성된다. 실시양태에서, 합성 나노담체 집단은 어떠한 부가된 치료 거대분자 APC 제시가능한 항원도 포함하지 않으며, 이는 어떠한 실질적인 양의 치료 거대분자 APC 제시가능한 항원도 그의 제조 동안 합성 나노담체에 의도적으로 부가되지 않음을 의미한다.

[0103] "바람직하지 않은 면역 반응"은 항원에 대한 노출로부터 생성되거나, 본원에 제공된 질환, 장애 또는 상태 (또는 그의 증상)를 촉진 또는 악화시키거나, 또는 본원에 제공된 질환, 장애 또는 상태의 증후인 임의의 바람직하지 않은 면역 반응을 지칭한다. 이러한 면역 반응은 일반적으로 대상체의 건강에 대해 부정적인 영향을 갖거나, 또는 대상체의 건강에 대한 부정적인 영향의 증후이다. 바람직하지 않은 면역 반응은 항원-특이적 항체 생산, 항원-특이적 B 세포 증식 및/또는 활성 또는 항원-특이적 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성을 포함한다. 일반적으로, 이들 바람직하지 않은 면역 반응은 치료 거대분자에 대해 특이적인 수 있고, 치료 거대분자에 의한 투여의 목적하는 유익한 효과를 상쇄시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 바람직하지 않은 면역 반응은 항-치료 거대분자 항체 반응이다.

## [0104] C. 조성물 및 관련 방법

[0105] 면역억제제 및 치료 거대분자를 포함하는 조성물 및 관련 방법 또는 키트가 본원에 제공된다. 이러한 방법, 조성물 또는 키트는 예컨대 치료 거대분자의 치료 이익을 저하시키는 치료 거대분자에 특이적인 바람직하지 않은 면역 반응의 감소 또는 억제를 통해, 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 치료 거대분자의 약역학적 효과를 증진시키는데 유용하다. 이러한 방법, 조성물 또는 키트는 또한 치료 거대분자의 반복 투약을 가능하게 하는데 유용하다. 따라서, 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트는 치료 거대분자의 목적하는 치료 효과를 달성하거나 증진시키는데 유용하다. 일부 실시양태에서, 이러한 치료 효과는 감소된 약역학적 유효 용량에서 달성되거나 증진될 수 있다. 제공된 방법, 조성물 또는 키트는 치료 거대분자의 치료 이익을 필요로 하는 임의의 대상체를 위해 사용될 수 있다.

[0106] 상기 언급된 바와 같이, 면역억제제를 바람직하게는 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 부착된 경우에, 치료 거대분자와 병용하여 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 전달하는 것이, 심지어 치료 거대분자의 감소된 용량에서의 약역학적 효과의 증진을 포함하여 증진된 약역학적 효과를 생성할 수 있음을 발견하였다. 예를 들어, 방법, 조성물 또는 키트는 치료 거대분자의 목적하는 치료 효과를 방해하는 항-치료 거대분자-특이적 항체의 중화를 도울 수 있다. 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트는 따라서 치료 거대분자가 면역억제제 용량 없이 투여되는 경우에 (예를 들어, 치료 거대분자가 단독으로 투여되는 경우에) 달리 저하될 치료 거대분자의 목적하는 치료 효과를 증진시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트는 본원에 제공된 본 발명의 이익 없이 투여되는 경우에 치료 거대분자에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 보상하기 위해 일반적으로 증가되어야 할 치료 거대분자의 용량을 증가시킬 필요 없이, 대상체가 치료 거대분자의 치료 이익을 수득하는 것을 가능하게 한다. 놀랍게도, 본원에 제공된 방법, 조성물 또는 키트는 심지어, 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 동일하거나 더 나은 치료 이익을 달성하기 위해 대상체가 감소된 용량의 치료 거대분자를 투여받는 것을 가능하게 한다.

[0107] 다양한 면역억제제가 본 발명의 실시에 사용될 수 있고, 이는 바람직하게는 합성 나노담체에 부착된다. 매우 다양한 합성 나노담체가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 구체 또는 구형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 평면 또는 판-형상이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 입방체 또는 입방형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 타원체 또는 타원형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 실린더형, 원뿔형, 또는 피라미드형이다.

[0108] 일부 실시양태에서, 각 합성 나노담체가 유사한 특성을 갖도록, 크기 또는 형상의 면에서 비교적 균일한 합성 나노담체 집단을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노담체의 총 수를 기준으로 합성 나노담체의 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 합성 나노담체의 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10% 또는 20% 내에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다.

[0109] 합성 나노담체는 고체 또는 중공일 수 있고, 1개 이상의 층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각 층은 다른 층(들)과 비교하여 고유한 조성 및 고유한 특성을 갖는다. 하나의 예를 제시하자면, 합성 나노담체는 코어가 1개의 층 (예를 들어, 중합체성 코어)이고, 쉘이 제2 층 (예를 들어, 지질 이중층 또는 단일층)인 코어/쉘 구조를 가질 수 있다. 합성 나노담체는 다수의 상이한 층을 포함할 수 있다.

[0110] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 임의로 하나 이상의 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 리포솜을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 이중층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 단층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 미셀을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 중합체성 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 비-중합체성 코어 (예를 들어, 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자, 바이러스 입자, 단백질, 핵산, 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.

[0111] 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체성 합성 나노담체는 비-중합체성 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0112] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 임의로 1종 이상의 친양쪽성 개체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 개체는 증가된 안정성, 개선된 균일성, 또는 증가된 점도를 갖는 합성 나노담체의 생성을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 개체는 지질 막 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)의 내부 표면과

회합될 수 있다. 관련 기술분야에 공지되어 있는 많은 친양쪽성 개체가 본 발명에 따라 합성 나노담체를 제조하는데 사용하기에 적합하다. 이러한 친양쪽성 개체는 포스포글리세리드; 포스파티딜콜린; 디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC); 디올레일포스파티딜 에탄올아민 (DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄 (DOTMA); 디올레오일포스파티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤숙시네이트; 디포스파티딜 글리세롤 (DPPG); 혁산데칸올; 지방 알콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 표면 활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세리드; 지방산 디글리세리드; 지방산 아미드; 소르비탄 트리올레에이트 (스팬(Span)®85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트 (스팬®20); 폴리소르베이트 20 (트윈(Tween)®20); 폴리소르베이트 60 (트윈®60); 폴리소르베이트 65 (트윈®65); 폴리소르베이트 80 (트윈®80); 폴리소르베이트 85 (트윈®85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서팩틴; 폴록사미; 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 트리올레에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스파티딜세린; 포스파티딜이노시톨; 스팽고미엘린; 포스파티딜에탄올아민 (세팔린); 카르디올리핀; 포스파티드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스파티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 혼사데실-아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀레에이트; 혼사데실 스테레이트; 이소프로필 미리스테이트; 틸록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스파티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 인지질; 높은 계면활성제 특성을 갖는 합성 및/또는 천연 세제; 데옥시콜레이트; 시클로덱스트린; 무질서 염; 이온 쌍형성 작용제; 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 친양쪽성 개체 성분은 상이한 친양쪽성 개체의 혼합물일 수 있다. 통상의 기술자라면, 이것이 계면활성제 활성을 갖는 물질의 포괄적이 아닌 예시적인 목록이라는 것을 인식할 것이다. 임의의 친양쪽성 개체가 본 발명에 따라 사용될 합성 나노담체의 생산에 사용될 수 있다.

[0113]

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

[0114]

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

[0115]

면역억제제 및/또는 치료 거대분자는 다수의 방법 중 임의의 것에 의해 합성 나노담체에 부착될 수 있다. 일반적으로, 부착은 면역억제제 및/또는 치료 거대분자와 합성 나노담체 사이의 결합의 결과일 수 있다. 이러한 결합은 면역억제제 및/또는 치료 거대분자가 합성 나노담체의 표면에 부착되게 하고/거나 합성 나노담체 내에 함유되게 (캡슐화되게) 할 수 있다. 그러나 일부 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자는 합성 나노담체의 구조의 결과로서 합성 나노담체에 결합되기 보다는 합성 나노담체에 의해 캡슐화된다. 바람직한 실시양

태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함하고, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자는 중합체에 부착된다.

[0116] 부착이 면역억제제 및/또는 치료 거대분자와 합성 나노담체 사이의 결합의 결과로서 일어나는 경우에, 부착은 커플링 모이어티를 통해 일어날 수 있다. 커플링 모이어티는 면역억제제 및/또는 치료 거대분자를 합성 나노담체에 결합시키는 임의의 모이어티일 수 있다. 이러한 모이어티는 공유 결합, 예컨대 아미드 결합 또는 에스테르 결합, 뿐만 아니라 면역억제제 및/또는 치료 거대분자를 합성 나노담체에 (공유적으로 또는 비-공유적으로) 결합시키는 개별 분자를 포함한다. 이러한 분자는 링커 또는 중합체 또는 그의 유닛을 포함한다. 예를 들어, 커플링 모이어티는 면역억제제 및/또는 치료 거대분자를 정전기적으로 결합시키는 하전된 중합체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 커플링 모이어티는 공유적으로 결합시키는 중합체 또는 그의 유닛을 포함할 수 있다.

[0117] 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함한다. 이들 합성 나노담체는 완전히 중합체성일 수 있거나, 또는 중합체 및 다른 물질의 믹스일 수 있다.

[0118] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 중합체는 회합되어 중합체성 매트릭스를 형성한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 성분, 예컨대 면역억제제 또는 치료 거대분자는 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 공유적으로 회합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공유 회합은 링커에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 성분은 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 비공유적으로 회합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 성분은 중합체성 매트릭스 내에 캡슐화되고거나, 그에 의해 둘러싸이고거나, 그 전반에 분산될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 성분은 소수성 상호작용, 전하 상호작용, 반 데르 발스 힘 등에 의해 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 회합될 수 있다. 매우 다양한 중합체 및 그로부터 중합체성 매트릭스를 형성하는 방법이 통상적으로 공지되어 있다.

[0119] 중합체는 천연 또는 비천연 (합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 단독중합체, 또는 2종 이상의 단량체를 포함하는 공중합체일 수 있다. 순서의 관점에서, 공중합체는 무작위, 블록일 수 있거나, 또는 무작위 및 블록 순서의 조합을 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따른 중합체는 유기 중합체이다.

[0120] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리아미드 또는 폴리에테르, 또는 그의 유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤, 또는 그의 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 생분해성이 바람직하다. 따라서, 이들 실시양태에서, 중합체가 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛을 포함하는 경우에, 중합체가 생분해성이도록 중합체는 폴리에테르와 생분해성 중합체의 블록-공-중합체를 포함하는 것이 바람직하다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리에테르 또는 그의 유닛, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛만을 포함하지 않는다.

[0121] 본 발명에서 사용하기에 적합한 중합체의 다른 예는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트 (예를 들어, 폴리(1,3-디옥산-2온)), 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)), 폴리프로필푸마레이트, 폴리아미드 (예를 들어, 폴리카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-코-글리콜리드, 폴리카프로락톤, 폴리히드록시산 (예를 들어, 폴리( $\beta$ -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.

[0122] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 중합체는 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리발레로락톤, 폴리(1,3-디옥산-2온)); 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레тан; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리시아노아크릴레이트를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 미국 식품 의약국 (FDA)에 의해 21 C.F.R. § 177.2600 하에 인간에서의 용도에 대해 승인받은 중합체를 포함한다.

[0123] 일부 실시양태에서, 중합체는 친수성일 수 있다. 예를 들어, 중합체는 음이온성 기 (예를 들어, 포스페이트기, 술페이트 기, 카르복실레이트 기); 양이온성 기 (예를 들어, 4급 아민 기); 또는 극성 기 (예를 들어, 히드록실 기, 티올 기, 아민 기)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 합성 나노담체 내에 친수성 환경을 생성한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 중합체성 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 합성 나노담체 내에 소수성 환경을

생성한다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노담체 내에 도입되는 (예를 들어, 부착되는) 물질의 속성에 영향을 미칠 수 있다.

[0124] 일부 실시양태에서, 중합체는 1종 이상의 모이어티 및/또는 관능기에 의해 변형될 수 있다. 다양한 모이어티 또는 관능기가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 탄수화물, 및/또는 폴리사카라이드로부터 유래된 비-시클릭 폴리아세탈에 의해 변형될 수 있다 (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). 특정 실시양태는 미국 특허 번호 5543158 (Gref et al.) 또는 WO 공개 WO2009/051837 (Von Andrian et al.)의 일반적 교시를 사용하여 제조될 수 있다.

[0125] 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.

[0126] 일부 실시양태에서, 중합체는 본원에서 "PLGA"로 총칭되는 락트산 및 글리콜산 유닛을 포함하는 공중합체, 예컨대 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드); 및 본원에서 "PGA"로 지칭되는 글리콜산 유닛, 및 본원에서 "PLA"로 총칭되는 락트산 유닛, 예컨대 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드 및 폴리-D,L-락티드를 포함하는 단독중합체를 비롯한 폴리에스테르일 수 있다. 일부 실시양태에서, 예시적인 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리히드록시산; PEG 공중합체 및 락티드와 글리콜리드의 공중합체 (예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체, 및 그의 유도체)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리(카프로락톤), 폴리(카프로락톤)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[ $\alpha$ -(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 그의 유도체를 포함한다.

[0127] 일부 실시양태에서, 중합체는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산과 글리콜산의 생체적합성 및 생분해성 공중합체이고, PLGA의 다양한 형태는 락트산:글리콜산의 비를 특징으로 한다. 락트산은 L-락트산, D-락트산 또는 D,L-락트산일 수 있다. PLGA의 분해 속도는 락트산:글리콜산 비를 변경시킴으로써 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용될 PLGA는 대략 85:15, 대략 75:25, 대략 60:40, 대략 50:50, 대략 40:60, 대략 25:75, 또는 대략 15:85의 락트산:글리콜산 비를 특징으로 한다.

[0128] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴 중합체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 아크릴 중합체는, 예를 들어 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리시아노아크릴레이트, 및 상기 중합체 중 1종 이상을 포함하는 조합을 포함한다. 아크릴 중합체는 낮은 함량의 4급 암모늄 기를 갖는, 아크릴산 및 메타크릴산 에스테르의 완전-중합 공중합체를 포함할 수 있다.

[0129] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 핵산의 음으로 하전된 가닥을 축합시키고/거나 보호할 수 있다. 아민-함유 중합체, 예컨대 폴리(리신) (Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; 및 Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7), 폴리(에틸렌 이민) (PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297), 및 폴리(아미노아민) 텐드리머 (Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; 및 Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372)는 생리학적 pH에서 양으로 하전되고, 핵산과 이온 쌍을 형성한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 양이온성 중합체를 포함하지 않을 수 있다 (또는 배제할 수 있다).

[0130] 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). 이를 폴리에스테르의 예는 폴리(L-락티드-코-L-리신) (Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010), 폴리(세린 에스테르) (Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am.

Chem. Soc., 121:5633), 및 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633)를 포함한다.

[0131] 이들 및 다른 중합체의 특성 및 그의 제조 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 6,123,727; 5,804,178; 5,770,417; 5,736,372; 5,716,404; 6,095,148; 5,837,752; 5,902,599; 5,696,175; 5,514,378; 5,512,600; 5,399,665; 5,019,379; 5,010,167; 4,806,621; 4,638,045; 및 4,946,929; 문헌 [Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; 및 Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181] 참조). 보다 일반적으로, 특정의 적합한 중합체를 합성하는 다양한 방법이 문헌 [Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386]; 및 미국 특허 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446, 및 6,818,732에 기재되어 있다.

[0132] 일부 실시양태에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 텐드리며일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 서로 가교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 가교가 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 가교 단계를 거치지 않고 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 또한, 합성 나노담체는 블록 공중합체, 그라프트 공중합체, 블렌드, 혼합물, 및/또는 상기 중 임의의 것 및 다른 중합체의 부가물을 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 통상의 기술자라면, 본원에 열거된 중합체가 본 발명에 따라 사용될 수 있는 중합체의 포괄적이 아닌 예시적인 목록을 나타낸다는 것을 인식할 것이다.

[0133] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체성 성분을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체성 합성 나노담체는 비-중합체성 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0134] 본 발명에 따른 조성물은 요소를 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 보존제, 완충제, 염수 또는 포스페이트 완충 염수와 조합하여 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위해 통상의 제약 제조 및 배합 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물, 예컨대 합성 나노담체를 포함하는 조성물은 보존제와 함께 주사용 멀균 염수 용액 중에 혼탁된다.

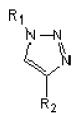
[0135] 실시양태에서, 합성 나노담체를 담체로서 제조하는 경우에, 성분을 합성 나노담체에 부착시키는 방법이 유용할 수 있다. 성분이 소분자인 경우에, 합성 나노담체의 어셈블리 전에 성분을 중합체에 부착시키는 것이 유익할 수 있다. 실시양태에서, 성분을 중합체에 부착시키는 것보다 표면 기를 사용한 다음 이러한 중합체 접합체를 합성 나노담체의 구축에 사용하는 것을 통하여, 성분을 합성 나노담체에 부착시키는데 사용되는 상기 표면 기를 갖는 합성 나노담체를 제조하는 것이 또한 유익할 수 있다.

[0136] 특정 실시양태에서, 부착은 공유 링커에 의할 수 있다. 실시양태에서, 본 발명에 따른 성분은 나노담체의 표면 상의 아지도 기와 알킨 기를 함유하는 성분의 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응에 의해 또는 나노담체의 표면 상의 알킨과 아지도 기를 함유하는 성분의 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응에 의해 형성된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 외부 표면에 공유적으로 부착될 수 있다. 이러한 고리화첨가 반응은 바람직하게는 적합한 Cu(I)-리간드와 함께 Cu(I) 촉매 및 Cu(II) 화합물을 촉매 활성 Cu(I) 화합물로 환원시키기 위한 환원제의 존재 하에 수행된다. 이러한 Cu(I)-촉매된 아지도-알킨 고리화첨가 (CuAAC)는 또한 클릭 반응으로 지칭될 수 있다.

[0137] 추가로, 공유 부착은 아미드 링커, 디솔피드 링커, 티오에테르 링커, 히드라존 링커, 히드라지드 링커, 아민 또는 옥심 링커, 우레아 또는 티오우레아 링커, 아미딘 링커, 아민 링커 및 술폰아미드 링커를 포함하는 공유 링커를 포함할 수 있다.

[0138] 아미드 링커는 한 성분 상의 아민과 제2 성분, 예컨대 나노담체의 카르복실산 기 사이의 아미드 결합을 통해 형성된다. 링커 내 아미드 결합은 적합하게 보호된 아미노산 및 활성화된 카르복실산, 예컨대 N-히드록시숙신이미드-활성화 에스테르에 의한 임의의 통상의 아미드 결합 형성 반응을 사용하여 만들어질 수 있다.

[0139] 디솔피드 링커는 예를 들어 R1-S-S-R2 형태인, 2개 황 원자 사이의 디솔피드 (S-S) 결합의 형성을 통해 만들어진다. 디솔피드 결합은 티올/메르캅탄 기(-SH)를 함유하는 성분의, 중합체 또는 나노담체 상의 또 다른 활성화 티올 기에 의한 티올 교환, 또는 티올/메르캅탄 기를 함유하는 나노담체의, 활성화 티올 기를 함유하는 성분에 의한 티올 교환에 의해 형성될 수 있다.



[0140] 트리아졸 링커, 구체적으로 R1 및 R2가 임의의 화학적 개체일 수 있는 형태의 1,2,3-트리아졸은, 제1 성분, 예컨대 나노담체에 부착된 아지드의 제2 성분, 예컨대 면역억제제 또는 치료 거대분자에 부착된 말단 알킨과의 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응에 의해 만들어진다. 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응은 촉매의 존재 또는 부재 하에, 바람직하게는 Cu(I)-촉매의 존재 하에 수행되며, 이는 1,2,3-트리아졸 관능을 통해 2개의 성분을 연결한다. 이러한 화학은 문헌 [Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002) 및 Meldal, et al., Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015]에 상세하게 기재되어 있고, 종종 "클릭" 반응 또는 CuAAC로 지칭된다.

[0141] 실시양태에서, 중합체 쇄에 대해 말단으로 아지드 또는 알킨 기를 함유하는 중합체가 제조된다. 이러한 중합체는 이어서 다수의 알킨 또는 아지드 기가 합성 나노담체의 표면 상에 배치되는 방식으로 그러한 나노담체를 제조하는데 사용된다. 대안적으로, 합성 나노담체는 또 다른 경로에 의해 제조될 수 있고, 그 후 알킨 또는 아지드 기에 의해 관능화될 수 있다. 성분은 알킨 (중합체가 아지드를 함유하는 경우) 또는 아지드 (중합체가 알킨을 함유하는 경우) 기의 존재 하에 제조된다. 이어서 성분은 1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 성분을 입자에 공유적으로 부착시키는 촉매의 존재 또는 부재 하에 1,3-쌍극자 고리화첨가 반응을 통해 나노담체와 반응하게 된다.

[0142] 티오에테르 링커는 황-탄소 (티오에테르) 결합의 형성에 의해 예를 들어 R1-S-R2의 형태로 만들어진다. 티오에테르는 한 성분 상의 티올/메르캅탄 (-SH) 기의, 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드 또는 에폭시드에 의한 알킬화에 의해 만들어질 수 있다. 티오에테르 링커는 또한 한 성분 상의 티올/메르캅탄 기의, 마이클 수용자로서 말레이미드 기 또는 비닐 술폰 기를 함유하는 제2 성분 상의 전자-결핍 알켄 기에 대한 마이클 첨가에 의해 형성될 수 있다. 또 다른 방식으로, 티오에테르 링커는 한 성분 상의 티올/메르캅탄 기의, 제2 성분 상의 알켄 기와의 라디칼 티올-엔 반응에 의해 제조될 수 있다.

[0143] 히드라존 링커는 한 성분 상의 히드라지도 기의, 제2 성분 상의 알데히드/케톤 기와의 반응에 의해 만들어진다.

[0144] 히드라지도 링커는 한 성분 상의 히드라진 기의, 제2 성분 상의 카르복실산 기와의 반응에 의해 형성된다. 이러한 반응은 일반적으로 활성화 시약을 사용하여 카르복실산을 활성화시키는 아미드 결합의 형성과 유사한 화학을 사용하여 수행된다.

[0145] 이민 또는 옥심 링커는 한 성분 상의 아민 또는 N-알콕시아민 (또는 아미노옥시) 기의, 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기와의 반응에 의해 형성된다.

[0146] 우레아 또는 티오우레아 링커는 한 성분 상의 아민 기의, 제2 성분 상의 이소시아네이트 또는 티오이소시아네이트 기와의 반응에 의해 제조된다.

[0147] 아미딘 링커는 한 성분 상의 아민 기의, 제2 성분 상의 이미도에스테르 기와의 반응에 의해 제조된다.

[0148] 아민 링커는 한 성분 상의 아민 기의, 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드, 에폭시드 또는 술포네이트 에스테르 기에 의한 알킬화 반응에 의해 만들어진다. 대안적으로, 아민 링커는 또한 소듐 시아노보로히드리드 또는 소듐 트리아세톡시보로히드리드와 같은 적합한 환원 시약의 존재 하에, 한 성분 상의 아민 기의 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기에 의한 환원성 아미노화에 의해 만들어질 수 있다.

[0149] 술폰아미드 링커는 한 성분 상의 아민 기의 제2 성분 상의 술포닐 할라이드 (예컨대 술포닐 클로라이드) 기와의 반응에 의해 만들어진다.

[0150] 술폰 링커는 비닐 술폰에 대한 친핵체의 마이클 첨가에 의해 만들어진다. 비닐 술폰 또는 친핵체는 나노담체의 표면 상에 존재할 수 있거나 성분에 부착될 수 있다.

[0151] 성분은 또한 비-공유 접합 방법을 통해 나노담체에 접합될 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 치료 거대분자 또는 면역억제제는 양으로 하전된 나노담체에 정전기적 흡착을 통해 접합될 수 있다. 금속 리간드를 함유하는 성분은 또한 금속 착물을 함유하는 나노담체에 금속-리간드 착물을 통해 접합될 수 있다.

[0152] 실시양태에서, 성분은 합성 나노담체의 어셈블리 전에 중합체, 예를 들어 폴리락트산-블록-폴리에틸렌 글리콜에 부착될 수 있거나, 또는 합성 나노담체는 그의 표면 상에 반응성 또는 활성화가능 기를 가진 상태로 형성될 수 있다. 후자의 경우에, 성분은 합성 나노담체의 표면에 의해 제공되는 부착 화학과 상용성인 기를 가진 상태로

제조될 수 있다. 다른 실시양태에서, 웹티드 성분은 적합한 링커를 사용하여 VLP 또는 리포솜에 부착될 수 있다. 링커는 2개의 분자를 함께 부착시킬 수 있는 화합물 또는 시약이다. 한 실시양태에서, 링커는 문헌 [Hermanson 2008]에 기재된 바와 같은 동종이관능성 또는 이종이관능성 시약일 수 있다. 예를 들어, 표면 상에 카르복실기를 함유하는 VLP 또는 리포솜 합성 나노담체는 EDC의 존재 하에 동종이관능성 링커, 아디프산 디히드라지드 (ADH)로 처리되어 ADH 링커를 갖는 상응하는 합성 나노담체를 형성할 수 있다. 생성된 ADH 연결된 합성 나노담체는 이어서 나노담체 상의 ADH 링커의 다른 말단을 통해 산 기를 함유하는 웹티드 성분과 접합되어 상응하는 VLP 또는 리포솜 웹티드 접합체를 생성한다.

[0153] 이용가능한 접합 방법의 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008]을 참조한다. 공유 부착에 더하여, 성분은 사전-형성된 합성 나노담체에의 흡착에 의해 부착될 수 있거나, 또는 합성 나노담체의 형성 동안 캡슐화에 의해 부착될 수 있다.

[0154] 본원에 제공된 바와 같은 임의의 면역억제제가 제공된 방법 또는 조성물에서 사용될 수 있고, 일부 실시양태에서 합성 나노담체에 부착될 수 있다. 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF-β 신호전달 작용제; TGF-β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF-κ β 억제제; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란дин E2 효능제; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제; 프로테아솔 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 페옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제; 페옥시솜 증식자-활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제 및 산화 ATP를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한 IDO, 비타민 D3, 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오푸린, 6-메르캅토푸린, 아스피린, 니플롭산, 에스트리올, 트리프롤리드, 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-10), 시클로스포린 A, siRNA 표적화 시토카인 또는 시토카인 수용체 등을 포함한다.

[0155] 스타틴의 예는 아토르바스타틴 (리피토르(LIPITOR)®, 토르바스트(TORVAST)®, 세리바스타틴, 플루바스타틴 (레스콜(LESCOL)®, 레스콜® XL), 로바스타틴 (메바코르(MEVACOR)®, 알토코르(ALTOCOR)®, 알토프레브(ALTOPREV)®, 메바스타틴 (콤팩틴(COMPACTIN)®, 피타바스타틴 (리발로(LIVALO)®, 피아바(PIAVA)®, 로수바스타틴 (프라바콜(PRAVACHOL)®, 셀렉틴(SELEKTINE)®, 리포스타트(LIPOSTAT)®, 로수바스타틴 (크레스토르(CRESTOR)®) 및 심바스타틴 (조코르(ZOCOR)®, 리펙스(LIPEX)®)을 포함한다.

[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 소재 셀렉크(Se11eck)에서 입수 가능)를 포함한다.

[0157] TGF-β 신호전달 작용제의 예는 TGF-β 리간드 (예를 들어, 액티빈 A, GDF1, GDF11, 골 형태발생 단백질, 노달, TGF-β) 및 그의 수용체 (예를 들어, ACVR1B, ACVR1C, ACVR2A, ACVR2B, BMPR2, BMPR1A, BMPR1B, TGF β RI, TGF β RII), R-SMADS/co-SMADS (예를 들어, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD8), 및 리간드 억제제 (예를 들어, 폴리스타틴, 노진, 코르딘, DAN, 레프티, LTBP1, THBS1, 데코린)를 포함한다.

[0158] 미토콘드리아 기능 억제제의 예는 아트락틸로시드 (이칼륨 염), 봉크렉산 (트리암모늄 염), 카르보닐 시아나이드 m-클로로페닐히드라존, 카르복시아트락틸로시드 (예를 들어, 아트락틸리스 구미페라(Atractylis gummifera)로부터), CGP-37157, (-)-데구엘린 (예를 들어, 문둘레아 세리세아(Mundulea sericea)로부터), F16, 헥소키나제 II VDAC 결합 도메인 웹티드, 올리고마이신, 로테논, Ru360, SFK1 및 발리노마이신 (예를 들어, 스트렙토미세스 풀비시무스(Streptomyces fulvissimus)로부터) (EMD4바이오사이언시스(EMD4Biosciences), 미국)을 포함한다.

[0159] P38 억제제의 예는 SB-203580 (4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸술피닐페닐)-5-(4-페리딜)1H-이미다졸), SB-239063 (트랜스-1-(4히드록시시클로헥실)-4-(플루오로페닐)-5-(2-메톡시-페리미딘-4-일) 이미다졸), SB-220025 (5-(2아미노-4-페리미디닐)-4-(4-플루오로페닐)-1-(4-페페리디닐)이미다졸)), 및 ARRY-797을 포함한다.

[0160] NF (예를 들어, NK-κ β) 억제제의 예는 IFRD1, 2-(1,8-나프ти리딘-2-일)-페놀, 5-아미노살리실산, BAY 11-

7082, BAY 11-7085, CAPE (카페인산 페네틸에스테르), 디에틸말레이트, IKK-2 억제제 IV, IMD 0354, 락타시스틴, MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO], NF-κB 활성화 억제제 III, NF-κB 활성화 억제제 II, JSH-23, 파르테놀리드, 페닐아르신 옥시드 (PAO), PPM-18, 피롤리딘디티오카르bam산 암모늄 염, QNZ, RO 106-9920, 로카글라미드, 로카글라미드 AL, 로카글라미드 C, 로카글라미드 I, 로카글라미드 J, 로카글라울, (R)-MG-132, 살리실산나트륨, 트리프톨리드 (PG490), 및 웨넬로락톤을 포함한다.

[0161] 아데노신 수용체 효능제의 예는 CGS-21680 및 ATL-146e를 포함한다.

[0162] 프로스타글란딘 E2 효능제의 예는 E-프로스타노이드 2 및 E-프로스타노이드 4를 포함한다.

[0163] 포스포디에스테라제 억제제 (비-선택적 및 선택적 억제제)의 예는 카페인, 아미노필린, IBMX (3-이소부틸-1-메틸크산틴), 파라크산틴, 펜톡시필린, 테오브로민, 테오필린, 메틸화 크산틴, 빈포세틴, EHNA (에리트로-9-(2-히드록시-3-노닐)아데닌), 아나그렐리드, 에녹시몬 (페르판(PERFAN)<sup>TM</sup>), 밀리논, 레보시멘단, 메SEMB린, 이부딜라스트, 피클라밀라스트, 루테올린, 드로타베린, 로플루밀라스트 (닥사스(DAXAS)<sup>TM</sup>, 달리레스프(DALIRESP)<sup>TM</sup>), 실데나필 (레바티온(REVATION)<sup>®</sup>, 비아그라(VIAGRA)<sup>®</sup>), 타달라필 (애드서카(ADCIRCA)<sup>®</sup>, 시알리스(CIALIS)<sup>®</sup>), 바르데나필 (레비트라(LEVITRA)<sup>®</sup>, 스택신(STAXYN)<sup>®</sup>), 우데나필, 아바나필, 이카리인, 4-메틸피페라진 및 피라졸로 피리미딘-7-1을 포함한다.

[0164] 프로테아솜 억제제의 예는 보르테조립, 디술피람, 에피갈로카테킨-3-갈레이트 및 살리노스포라미드 A를 포함한다.

[0165] 키나제 억제제의 예는 베바시주맙, BIBW 2992, 세툭시맙 (에르비툭스(ERBITUX)<sup>®</sup>), 이마티닙 (글리벡(GLEEVEC)<sup>®</sup>), 트라스투주맙 (헤르셉틴(HERCEPTIN)<sup>®</sup>), 게피티닙 (이레사(IRESSA)<sup>®</sup>), 라니비주맙 (루센티스(LUENTIS)<sup>®</sup>), 폐갑타닙, 소라페닙, 다사티닙, 수니티닙, 에를로티닙, 닐로티닙, 라파티닙, 파니투무맙, 반데타닙, E7080, 파조파닙 및 무브리티닙을 포함한다.

[0166] 글루코코르티코이드의 예는 히드로코르티손 (코르티솔), 코르티손 아세테이트, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 엑사메타손, 베타메타손, 트리암시놀론, 베클로메타손, 플루드로코르티손 아세테이트, 데옥시코르티코스테론 아세테이트 (DOCA) 및 알도스테론을 포함한다.

[0167] 레티노이드의 예는 레티놀, 레티날, 트레티노인 (레티노산, 레틴-A(RETIN-A)<sup>®</sup>), 이소트레티노인 (아큐탄(ACCUTANE)<sup>®</sup>, 암네스팀(AMNESTEEM)<sup>®</sup>, 클라라비스(CLARAVIS)<sup>®</sup>, 소트레트(SOTRET)<sup>®</sup>), 알리트레티노인 (판레틴(PANRETIN)<sup>®</sup>), 에트레티네이트 (테기손(TEGISON)<sup>TM</sup>) 및 그의 대사물 아시트레틴 (소리아탄(SORIATANE)<sup>®</sup>), 타자로텐 (타조락(TAZORAC)<sup>®</sup>, 아바게(AVAGE)<sup>®</sup>, 조락(ZORAC)<sup>®</sup>), 벡사로텐 (탈그레틴(TARGRETIN)<sup>®</sup>) 및 아다팔렌 (디페린(DIFFERIN)<sup>®</sup>)을 포함한다.

[0168] 시토카인 억제제의 예는 IL1ra, IL1 수용체 길항제, IGFBP, TNF-BF, 우로모들린, 알파-2-마크로글로불린, 시클로스포린 A, 펜타미딘 및 펜톡시필린 (펜토팍(PENTOPAK)<sup>®</sup>, 펜톡실(PENTOXIL)<sup>®</sup>, 트렌탈(TRENTAL)<sup>®</sup>)을 포함한다.

[0169] 페옥시솜 증식자-활성화 수용체 길항제의 예는 GW9662, PPAR γ 길항제 III, G335 및 T0070907 (EMD4바이오사이언시스, 미국)을 포함한다.

[0170] 페옥시솜 증식자-활성화 수용체 효능제의 예는 피오글리타존, 시글리타존, 클로피브레이트, GW1929, GW7647, L-165,041, LY 171883, PPAR γ 활성화제, Fmoc-Leu, 트로글리타존 및 WY-14643 (EMD4바이오사이언시스, 미국)을 포함한다.

[0171] 히스톤 데아세틸라제 억제제의 예는 히드록삼산 (또는 히드록사메이트), 예컨대 트리코스타틴 A, 시클릭 테트라펩티드 (예컨대 트라폭신 B) 및 뎁시펩티드, 벤즈아미드, 친전자성 케톤, 지방족 산 화합물, 예컨대 페닐부티레이트 및 발프로산, 히드록삼산, 예컨대 보리노스타트 (SAHA), 벨리노스타트 (PXD101), LAQ824 및 파노비노스타트 (LBH589), 벤즈아미드, 예컨대 엔티노스타트 (MS-275), CI994 및 모세티노스타트 (MGCD0103), 니코틴아미드, NAD 유도체, 디히드로코마린, 나프토피라논, 및 2-히드록시나프탈레히드를 포함한다.

[0172] 갈시뉴린 억제제의 예는 시클로스포린, 피메크롤리무스, 보클로스포린 및 타크롤리무스를 포함한다.

[0173] 포스파타제 억제제의 예는 BN82002 히드로클로라이드, CP-91149, 칼리큘린 A, 칸타리드산, 칸타리딘, 시페르메트린, 에틸-3,4-데포스타틴, 포스트리에신 나트륨 염, MAZ51, 메틸-3,4-데포스타틴, NSC 95397, 노르칸타리딘, 프로로센트룸 콘카븀(prorocentrum concavum)으로부터의 오카다산 암모늄 염, 오카다산, 오카다산 칼륨 염, 오

카다산 나트륨 염, 페닐아르신 옥시드, 다양한 포스파타제 억제제 각테일, 단백질 포스파타제 1C, 단백질 포스파타제 2A 억제제 단백질, 단백질 포스파타제 2A1, 단백질 포스파타제 2A2 및 오르토바나듐산나트륨을 포함한다.

[0174] 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 치료 거대분자는 또한 합성 나노단체에 부착된다. 다른 실시양태에서, 치료 거대분자는 임의의 합성 나노단체에 부착되지 않는다. 이러한 경우 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 치료 거대분자는 치료 거대분자 그 자체, 또는 그의 단편 또는 유도체의 형태로 전달될 수 있다.

[0175] 치료 거대분자는 치료 단백질 또는 치료 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 치료 단백질은 주입가능한 치료 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 시토카인 및 인터페론, 성장 인자, 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체 (예를 들어, 대체 요법으로서 대상체에게 투여됨) 및 품폐병 연관 단백질 (예를 들어, 산 글루코시다제 알파, rhGAA (예를 들어, 미오자임 및 루미자임 (겐자임))를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 단백질은 또한 혈액 응고 캐스케이드에 수반되는 단백질을 포함한다. 치료 단백질은 인자 VIII, 인자 VII, 인자 IX, 인자 V, 폰 빌레브란트 인자, 폰 헬데브란트 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 인슐린, 성장 호르몬, 에리트로포이에틴 알파, VEGF, 트롬보포이에틴, 리소자임, 항트롬빈 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료 단백질은 또한 아디포킨, 예컨대 렙틴 및 아디포넥틴을 포함한다. 치료 단백질의 다른 예는 하기 및 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같다.

[0176] 리소솜 축적 장애를 갖는 대상체의 효소 대체 요법에 사용되는 치료 단백질의 예는 고셔병의 치료를 위한 이미 글루세라제 (예를 들어, 세례자임(CEREZYME)<sup>TM</sup>), 파브리병의 치료를 위한 a-갈락토시다제 A (a-gal A) (예를 들어, 아갈시다제 베타, 파브리자임(FABRYZYME)<sup>TM</sup>), 품폐병의 치료를 위한 산 a-글루코시다제 (GAA) (예를 들어, 산 글루코시다제 알파, 루미자임<sup>TM</sup>, 미오자임<sup>TM</sup>), 뮤코폴리사카라이드증의 치료를 위한 아릴술파타제 B (예를 들어, 라로니다제, 알두라자임<sup>TM</sup>, 이두르술파제, 엘라프라제<sup>TM</sup>, 아릴술파타제 B, 나글라자임<sup>TM</sup>), 폐글로티카제 (크리스텍사) 및 폐그시티카제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0177] 효소의 예는 옥시도리덕타제, 트랜스퍼라제, 히드롤라제, 리아제, 이소머라제, 아스파라기나제, 우리카제, 글리코시다제, 아스파라기나제, 우리카제, 프로테아제, 뉴클레아제, 콜라제나제, 히알루로니다제, 해파리나제, 해파라나제, 리신 및 리가제를 포함한다.

[0178] 치료 단백질은 또한 임의의 효소, 독소, 또는 박테리아, 진균 또는 바이러스 공급원으로부터 단리되거나 유래된 다른 단백질 또는 웹티드를 포함할 수 있다.

[0179] 호르몬의 예는 멜라토닌 (N-아세틸-5-메톡시트립타민), 세로토닌, 티록신 (또는 테트라아이오도티로닌) (갑상선 호르몬), 트리아이오도티로닌 (갑상선 호르몬), 에피네프린 (또는 아드레날린), 노르에피네프린 (또는 노르아드레날린), 도파민 (또는 프로락틴 억제 호르몬), 항릴러관 호르몬 (또는 릴러 억제 인자 또는 호르몬), 아디포넥틴, 부신피질자극 호르몬 (또는 코르티코트로핀), 안지오텐시노겐 및 안지오텐신, 항이뇨 호르몬 (또는 바소프레신, 아르기닌 바소프레신), 심방-나트륨이뇨 웹티드 (또는 아트리오펩틴), 칼시토닌, 콜레시스토키닌, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 에리트로포이에틴, 여포-자극 호르몬, 가스트린, 그렐린, 글루카곤, 글루카곤-유사 웹티드 (GLP-1), GIP, 고나도트로핀-방출 호르몬, 성장 호르몬-방출 호르몬, 인간 용모성 고나도트로핀, 인간 태반락토겐, 성장 호르몬, 인히빈, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (또는 소마토메딘), 웹틴, 황체화 호르몬, 멜란세포 자극 호르몬, 오렉신, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, 프로락틴, 렐락신, 세크레틴, 소마토스타틴, 트롬보포이에틴, 갑상선-자극 호르몬 (또는 티로트로핀), 티로트로핀-방출 호르몬, 코르티솔, 알도스테론, 테스토스테론, 데히드로에피안드로스테론, 안드로스텐디온, 디히드로테스토스테론, 에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 프로게스테론, 칼시트리올 (1,25-디히드록시비타민 D3), 칼시디올 (25-히드록시비타민 D3), 프로스타글란дин, 류코트리엔, 프로스타시클린, 트롬복산, 프로락틴 방출 호르몬, 리포트로핀, 뇌 나트륨이뇨 웹티드, 뉴로펩티드 Y, 히스타민, 엔도텔린, 췌장 폴리펩티드, 레닌 및 엔케팔린을 포함한다.

[0180] 혈액 또는 혈액 응고 인자의 예는 인자 I (피브리노겐), 인자 II (프로트롬빈), 조직 인자, 인자 V (프로악셀레린, 불안정성 인자), 인자 VII (안정 인자, 프로콘버틴), 인자 VIII (항혈우병 글로불린), 인자 IX (크리스마스 인자 또는 혈장 트롬보플라스틴 성분), 인자 X (스튜어트-프라워 인자), 인자 Xa, 인자 XI, 인자 XII (하계만 인자), 인자 XIII (피브린-안정화 인자), 폰 빌레브란트 인자, 프리칼리크레이 (플레처 인자), 고분자량 키니노겐 (HMWK) (피츠제랄드 인자), 피브로넥틴, 피브린, 트롬빈, 항트롬빈 III, 해파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제 (ZPI), 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA), 우로카리나제, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2

(PAI2), 암 응고촉진제 및 에포에틴 알파 (에포젠(Epogen), 프로크리트(Procrit))를 포함한다.

[0181] 시토카인의 예는 림포카인, 인터류킨 및 케모카인, 제1형 시토카인, 예컨대 IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  및 제2형 시토카인, 예컨대 IL-4, IL-10 및 IL-13을 포함한다.

[0182] 성장 인자의 예는 아드레노메들린 (AM), 안지오포이에틴 (Ang), 자가분비 운동성 인자, 골 형태발생 단백질 (BMP), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 표피 성장 인자 (EGF), 에리트로포이에틴 (EPO), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 (GDNF), 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간세포암-유래 성장 인자 (HDGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 이동-자극 인자, 미오스타틴 (GDF-8), 신경 성장 인자 (NGF) 및 다른 뉴로트로핀, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 트롬보포이에틴 (TPO), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF- $\alpha$ ), 형질전환 성장 인자 베타 (TGF- $\beta$ ), 암\_괴사\_인자-알파 (TNF- $\alpha$ ), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), Wnt 신호전달 경로, 태반 성장 인자 (PIGF), (태아 소 소마토트로핀) (FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-7을 포함한다.

[0183] 모노클로날 항체의 예는 아바고보맙, 암식시맙, 아달리무맙, 아데카투무맙, 아푸투주맙, 알라치주맙 폐골, ALD, 일렘투주맙, 알투모맙 웬테테이트, 아나투모맙 메페나톡스, 안루킨주맙, 항-흉선세포 글로빈, 아폴리주맙, 아르시투모맙, 아셀리주맙, 아틀리주맙 (토실리주맙), 아토롤리무맙, 바피뉴주맙, 바실릭시맙, 바비툭시맙, 베투모맙, 벨리무맙, 벤랄리주맙, 베르틸리무맙, 베실레소맙, 베바시주맙, 비시로맙, 비바투주맙 메르탄신, 블리나투모맙, 브렌툭시맙 베도틴, 브리아키누맙, 카나키누맙, 칸투주맙 메르탄신, 카프로맙 웬데티드, 카투막소맙, 세렐리주맙, 세르톨리주맙 폐골, 세툭시맙, 시타투주맙 보가톡스, 식수투무맙, 클레놀릭시맙, 클리바투주맙 테트락세탄, 코나투무맙, 다세투주맙, 다클리주맙, 다라투무맙, 데노수맙, 데투모맙, 도클리모맙 아리톡스, 도클릭시주맙, 에크로멕시맙, 에콜리주맙, 에도바코맙, 에드레콜로맙, 에팔리주맙, 에핀구맙, 엘로투주맙, 엘실리모맙, 엔리모맙 폐골, 에피투모맙 시툭세탄, 에프라투주맙, 에를리주맙, 에르투막소맙, 에타라시주맙, 엑스비비루맙, 파놀레소맙, 파랄리모맙, 파를레투주맙, 웰비주맙, 페자키누맙, 퍼기투무맙, 폰톨리주맙, 포라비비루맙, 프레솔리무맙, 갈릭시맙, 간테네루맙, 가빌리모맙, 캡투주맙 오조가미신, GC1008, 기렌툭시맙, 글램바투무맙 베도틴, 골리무맙, 고밀릭시맙, 이발리주맙, 이브리투모맙 티옥세탄, 이고보맙, 임시로맙, 인플릭시맙, 인테투무맙, 이놀리모맙, 이노투주맙 오조가미신, 이필리무맙, 이라투무맙, 켈릭시맙, 라베티주맙, 레브리키주맙, 레말레소맙, 레르렐리무맙, 렉사투무맙, 리비비루맙, 린투주맙, 로르보투주맙 메르탄신, 루카투무맙, 루밀릭시맙, 마파투무맙, 마슬리모맙, 마투주맙, 메폴리주맙, 메텔리무맙, 밀라투주맙, 민레투모맙, 미투모맙, 모롤리무맙, 모타비주맙, 무로모납-CD3, 나콜로맙 타페나톡스, 나프투모맙 에스타페나톡스, 나탈리주맙, 네바쿠맙, 네시투무맙, 네렐리모맙, 니모투주맙, 노페투모맙 메르펜탄, 오크렐리주맙, 오돌리모맙, 오파투무맙, 올라라투맙, 오말리주맙, 오포르투주맙 모나톡스, 오레고보맙, 오텔릭시주맙, 파기박시맙, 팔리비주맙, 파니투무맙, 파노바쿠맙, 파스콜리주맙, 펜투모맙, 페르투주맙, 페셀리주맙, 핀투모맙, 프릴릭시맙, 프리투무맙, 라피비루맙, 라무시루맙, 라니비주맙, 락시바쿠맙, 레가비루맙 레슬리주맙, 릴로투무맙, 리툭시맙, 로바투무맙, 론탈리주맙, 로벨리주맙, 루풀리주맙, 사투모맙 웬데티드, 세비루맙, 시브로투주맙, 시팔리무맙, 실툭시맙, 시플리주맙, 솔라네주맙, 소넵시주맙, 손투주맙, 스타뮬루맙, 술레소맙, 타카투주맙 테트락세탄, 타도시주맙, 탈리주맙, 타네주맙, 타풀리투모맙 팵톡스, 테피바주맙, 텔리모맙 아리톡스, 테나투모맙, 테넬릭시맙, 테플리주맙, 티실리무맙 (트레멜리무맙), 티가투주맙, 토실리주맙 (아틀리주맙), 토랄리주맙, 토시투모맙, 트라스투주맙, 트레멜리무맙, 투코투주맙 셀모류킨, 투비루맙, 우르톡사주맙, 우스테키누맙, 바팔릭시맙, 베돌리주맙, 벨투주맙, 베팔리모맙, 비실리주맙, 볼로식시맙, 보투무맙, 잘루투무맙, 자놀리무맙, 지랄리무맙, 및 졸리모맙 아리톡스를 포함한다. 모노클로날 항체는 추가로 항-TNF- $\alpha$  항체를 포함한다.

[0184] 주입 요법 또는 주사 가능한 치료 단백질의 예는 예를 들어 토실리주맙 (로슈(Roche)/악템라(Actemra) $\circledR$ ), 알파-1 항트립신 (카마다(Kamada)/AAT), 해마티드 $\circledR$  (아피맥스(Affymax) 및 다케다(Takeda), 합성 웹티드), 알빈테르페론 알파-2b (노파르티스(Novartis)/잘빈(Zalbin) $^{\text{TM}}$ ), 루신 $\circledR$  (파밍 그룹(Pharming Group), C1 억제제 대체 요법), 테사모렐린 (테라테크놀로지스(Theratechnologies)/에그리프타(Egrifta), 합성 성장 호르몬-방출 인자), 오크렐리주맙 (제넨테크(Genentech), 로슈 및 비오젠(Biogen)), 벨리무맙 (글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)/벤리스타(Benlysta) $\circledR$ ), 페글로티카제 (사비엔트 파마슈티칼스(Savient Pharmaceuticals)/크리스텍사 $^{\text{TM}}$ ), 페그시티카제, 탈리글루세라제 알파 (프로탈릭스(Protalix)/유플리소(Uplyso)), 아갈시다제 알파 (샤이어(Shire)/레플라갈(Replagal) $\circledR$ ), 벨라그루세라제 알파 (샤이어) 및 키홀 립펫 혜모시아닌 (KLH)을 포함한다.

[0185] 추가의 치료 단백질은, 예를 들어 조작된 단백질, 예컨대 Fc 융합 단백질, 이중특이적 항체, 다중-특이적 항체,

나노바디, 항원-결합 단백질, 항체 단편 및 단백질 접합체, 예컨대 항체 약물 접합체를 포함한다.

[0186] 치료 폴리뉴클레오티드는 핵산 암타머, 예컨대 페갑타닙(Pegaptanib) (마큐겐(Macugen), PEG화 항-VEGF 암타머), 안티센스 치료제, 예컨대 안티센스 폴리- 또는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 항바이러스 약물 포미비르센, 또는 미포메르센, 콜레스테롤 수준을 감소시키기 위해 아포지단백질 B에 대한 메신저 RNA를 표적으로 하는 안티센스 치료); 소형 간섭 RNA (siRNA) (예를 들어, 고도의 효력을 갖는 RNAi를 매개하는 25-30 염기 쌍 비대칭 이중-가닥 RNA인 디아이서 기질 siRNA 분자 (DsiRNA)); 또는 변형된 메신저 RNA (mmRNA), 예컨대 미국 특허 출원 2013/0115272 (de Fougerolles et al.) 및 공개 미국 특허 출원 2012/0251618 (Schrum et al.)에 개시된 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0187] 본 발명의 측면에 따라 유용한 추가의 치료 거대분자는 통상의 기술자에게 분명할 것이고, 본 발명은 이러한 측면으로 제한되지 않는다.

[0188] 일부 실시양태에서, 성분, 예컨대 치료 거대분자 또는 면역억제제는 단리될 수 있다. 단리된 요소가 그의 천연 환경으로부터 분리되고 그의 확인 또는 사용을 허용하는 충분한 양으로 제공되는 것을 지칭한다. 이는, 예를 들어 요소가 (i) 발현 클로닝에 의해 선택적으로 생산될 수 있거나 또는 (ii) 크로마토그래피 또는 전기영동에 의해 정제될 수 있음을 의미한다. 단리된 요소는, 실질적으로 순수할 수 있지만, 그러할 필요는 없다. 단리된 요소는 제약 제제 내에서 제약상 허용되는 부형제와 함께 혼합될 수 있기 때문에, 요소는 제제의 중량을 기준으로 단지 작은 백분율만을 포함할 수 있다. 그럼에도 불구하고 요소는 살아있는 시스템 내에서 회합되어 있을 수 있는 물질로부터 분리되었다는 점에서 단리, 즉 다른 지질 또는 단백질로부터 단리된다. 본원에 제공된 임의의 요소는 단리될 수 있고, 조성물 중에 포함되거나 또는 단리된 형태로 방법에서 사용될 수 있다.

#### D. 조성물의 제조 및 사용 방법 및 관련 방법

[0189] 본 발명의 측면은 본원에 제공된 바와 같은 병용 투여 방법을 위한 프로토콜을 결정하는 것에 관한 것이다. 프로토콜은 치료 거대분자 및 면역억제제의 투여 빈도, 투여량 및 다른 측면을 변경하고, 후속적으로 이러한 변경을 기반으로 하여 약역학적 효과를 평가함으로써 결정될 수 있다. 변경된 투여는 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 이루어진다. 본 발명의 실시를 위한 바람직한 프로토콜은 목적하는 약역학적 효과를 유도하지만 항-치료 거대분자 항체 반응은 거의 내지 전혀 유도하지 않는다.

[0190] 본 발명의 일부 측면에서, 치료 거대분자의 목적하는 약역학적 효과는 특이적 반응을 자극하는 것 또는 억제하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 약역학적 효과는, 제한 없이, 시토카인, 케모카인, 신호전달 분자 또는 다른 분자의 생산 또는 분해; 특정한 세포 유형의 증식 또는 사멸의 유도; 특정한 세포 유형의 성숙 또는 국재화; 효소, 구조 단백질, 운반체 단백질, 또는 수용체 단백질과의 상호작용; 효소, 구조 단백질 또는 수용체 단백질의 활성의 조절 등을 수반한다. 일부 실시양태에서, 약역학적 효과는 시토카인, 예를 들어 염증-연관 시토카인, 예컨대 TNF, IL-1의 생산을 감소시키는 것이다. 일부 실시양태에서, 약역학적 효과는 시토카인의 활성을 감소시키는 것이다. 일부 실시양태에서, 약역학적 효과는 바람직하지 않은 분자의 생산을 감소시키는 것이다. 일부 실시양태에서, 약역학적 효과는 바람직하지 않은 분자, 예를 들어 요산 결정의 분해를 증가시키는 것이다. 일부 실시양태에서, 약역학적 효과는 효소의 활성이다.

[0191] 치료 거대분자의 약역학적 효과는 표준 방법에 의해 평가될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 약역학적 효과는 염증의 감소이다. 염증 수준은 제한 없이 임의의 하기 예시적인 방법, 염증성 증상, 예컨대 발적 또는 종창의 스코어링; 관절염성 증상, 예컨대 이동성, 통증, 또는 관절 파괴의 스코어링; 아나필락시스 증상, 예컨대 종창, 혈압, 숨가쁨의 스코어링; 조직학, 면역조직화학, 유동 세포측정법에 의한 세포 침윤의 검출 및/또는 정량화; ELISA에 의한 단백질 또는 염증-연관 시토카인, 예컨대 TNF, IL-1 농도의 측정, 전사 분석에 의한 유전자 또는 염증-연관 유전자의 발현의 평가; 염증-연관 시토카인의 활성의 측정 등에 의해 평가될 수 있다.

[0192] 본 발명의 일부 측면에서, 약역학적 효과는 바람직하지 않은 분자의 감소 또는 분해이다. 일부 실시양태에서, 약역학적 효과는 제한 없이, ELISA와 같은 방법에 의해 조직 또는 혈액 샘플 내의 바람직하지 않은 분자를 정량화함으로써 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약역학적 효과는 예컨대 ELISA에 의해 바람직하지 않은 분자의 파괴에 의해 생성된 분자를 정량화함으로써 평가될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 약역학적 효과는 이전에 나타나지 않았거나 충분히 나타나지 않은 효소의 활성이다. 이러한 실시양태에서, 효소의 활성은 효소 활성의 산물의 존재 또는 농도를 검출함으로써 평가될 수 있다.

[0193] 본 발명의 일부 측면에서, 약역학적 효과를 생성하기 위해 치료 거대분자의 감소된 용량이 투여된다. 이러한 목적을 위한 치료 거대분자의 감소된 용량은 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 면역억제제 용량과 병용

투여되지 않은 경우의 치료 거대분자에 의해 유사한 약역학적 효과를 달성하는데 필요한 용량보다 낮은, 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 면역억제제 용량의 병용 투여에 의해 약역학적 효과를 달성하는 치료 거대분자의 임의의 용량을 포함한다. 감소된 용량은 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 면역억제제 용량의 병용 투여와 함께 치료 거대분자를 특정 용량으로 투여하고, 약역학적 효과를 평가함으로써 결정될 수 있다. 이어서 약역학적 효과를 항-치료 거대분자 항체 반응의 존재 하에 면역억제제 용량의 병용 투여 없이 치료 거대분자의 투여를 통해 생성된 약역학적 효과와 비교할 수 있다. 이러한 비교에 의해 결정된 바와 같은, 유사한 약역학적 효과를 달성하는 보다 낮은 용량이 감소된 용량이다.

[0195]

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

[0196]

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

[0197]

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

[0198]

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

[0199]

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

[0200]

대안적으로 또는 추가로, 합성 나노담체는 비-공유적 상호작용을 통해 성분에 직접적으로 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 비-공유적 실시양태에서, 비-공유적 부착은 전하 상호작용, 친화도 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 숙주-캐스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 적층 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 태르 밸스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 및/또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-공유적 상호작용에 의해 매개된다. 이러한 커플링은 합성 나노담체의 외부 표면 또는 내부 표면 상에 배열될 수 있다. 실시양태에서, 캡슐화 및/또는 흡착이 부착 형태이다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 동일한 비히를 또는 전달 시스템 내에서의 혼합에 의해 치료 거대분자 또는 다른 조성물과 조합될 수 있다.

[0201]

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

[0202]

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

[0203]

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

[0204]

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

[0205]

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

[0206]

본 발명의 조성물은 유효량, 예컨대 본원의 다른 곳에 기재되어 있는 유효량으로 투여될 수 있다. 투여 형태의 용량은 본 발명에 따라 다양한 양의 면역억제제 및/또는 치료 거대분자를 함유할 수 있다. 본 발명의 투여 형태 내에 제공된 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 양은 치료 거대분자 및/또는 면역억제제의 속성, 달성하고자 하는 치료 이익, 및 다른 이러한 파라미터에 따라 변경될 수 있다. 실시양태에서, 투여 형태 내에 제공될 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 최적의 치료 양을 확립하기 위해 용량 범위설정 연구가 수행될 수 있다. 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 치료 거대분자는 대상체에게 투여 시 목적하는 약리학적 효과 및/또는 치료 거대분자에 대한 감소된 면역 반응을 생성하는데 유효한 양으로 투여 형태 내에 제공된다. 통상의 용량 범위설정 연구 및 기술을 사용하여 대상체에서 목적하는 결과를 달성하는데 유효한 면역억제제 및/또는 치료 거대분자의 양을 결정하는 것이 가능할 수 있다. 본 발명의 투여 형태는 다양한 빈도로 투여될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물의 적어도 1회의 투여가 약리학적 관련 반응을 생성하는데 충분하다. 보다 바람직한 실시양태에서, 약리학적 관련 반응을 보장하기 위해 적어도 2회의 투여 또는 적어도 3회의 투여가 사용된다. 일부 실시양태에서, 약리학적 관련 반응을 보장하기 위해 반복 투여가 사용된다.

[0207]

본 개시내용의 또 다른 측면은 키트에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 키트는 치료 거대분자의 약리학적 유효 용량 또는 하나 초과의 용량, 예컨대 감소된 약리학적 유효 용량을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 키트는 또한 면역억제제의 면역억제제 용량 또는 하나 초과의 용량을 포함할 수 있다. 면역억제제 용량 및 약리학적 유효 용량은 키트 내의 개별 용기 내에 또는 동일한 용기 내에 수용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 용기는 바이알 또는 앰플이다. 일부 실시양태에서, 약리학적 유효 용량의 치료 거대분자 및/또는 면역억제제 용량은, 약리학적 유효 용량의 치료 거대분자 및/또는 면역억제제 용량이 후속 시점에 용기에 첨가될 수 있도록 용기와 분리된 용액 내에 수용된다. 일부 실시양태에서, 약리학적 유효 용량의 치료 거대분자 및/또는 면역억제제 용량은 이들이 후속 시점에 재구성될 수 있도록 각각 개별 용기 내에 또는 동일한 용기 내에 동결건조 형태로 존재한다. 일부 실시양태에서, 키트는 재구성, 혼합, 투여 등에 대한 지침을 추가로 포함한다. 일부

실시양태에서, 지침은 본원에 기재된 방법의 설명을 포함한다. 지침은 임의의 적합한 형태로, 예를 들어 인쇄 삽입물 또는 라벨로서 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 1개 이상의 시린지를 추가로 포함한다.

[0208]

실시예

[0209]

실시예 1: 면역억제제 및 APC 제시가능한 항원을 포함하는 합성 나노담체에 의한 생체내 면역 반응의 평가

[0210]

물질

[0211]

오브알부민 단백질의 T 및 B 세포 에피토프로 공지되어 있는 17개의 아미노산 웨티드인 오브알부민 웨티드 323-339 ( $OVA_{323-339}$ )를 바켐 아메리카즈 인크.(Bachem Americas Inc.) (90505 캘리포니아주 토런스 카시와 스트리트 3132; 파트 # 4065609)에서 구입하였다. 라파마이신은 TSZ 캠(TSZ CHEM) (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185; 제품 카탈로그 # R1017)에서 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스(SurModics Pharmaceuticals) (35211 앤라배마주 버밍햄 톰 마틴 드 라이브 756; 제품 코드 7525 DLG 7A)에서 구입하였다. 폴리비닐 알콜 (85-89% 가수분해됨)은 EMD 케미칼스(EMD Chemicals) (제품 번호 1.41350.1001)에서 구입하였다.

[0212]

라파마이신 및 오브알부민 (323-339)을 함유하는 합성 나노담체를 제조하는 방법

[0213]

용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0214]

용액 1: 묽은 염산 수용액 중 20 mg/mL의  $OVA_{323-339}$ . 용액은 오브알부민 웨티드를 0.13 M 염산 용액 중에 실온에서 용해시킴으로써 제조하였다.

[0215]

용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100 mg/mL의 PLGA. 용액은 PLGA를 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0216]

용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100 mg/mL의 PLA-PEG. 용액은 PLA-PEG를 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0217]

용액 4: 메틸렌 클로라이드 중 50 mg/mL의 라파마이신. 용액은 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0218]

용액 5: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0219]

1차 유중수 에멀젼을 먼저 제조하였다. W1/01은 용액 1 (0.2 mL), 용액 2 (0.75 mL), 용액 3 (0.25 mL), 및 용액 4 (0.2 mL)를 소형 압력튜브 내에서 조합하고 브랜슨 디지털 소니파이어(Branson Digital Sonifier) 250을 사용하여 40초 동안 50% 진폭에서 초음파처리하여 제조하였다. 이어서, 2차 에멀젼 (W1/01/W2)은 용액 5 (3.0 mL)를 1차 W1/01 에멀젼과 조합하고, 10초 동안 볼텍싱하고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 제조하였다.

[0220]

W1/01/W2 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액 (30 mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 합성 나노담체가 형성되게 하였다. 합성 나노담체 혼탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600xg 및 4°C에서 35분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 합성 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 합성 나노담체 혼탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0221]

합성 나노담체 내의 웨티드 및 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-합성 나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0222]

라파마이신을 함유하는 합성 나노담체를 위한 방법

[0223]

1차 유중수 에멀젼을 먼저 제조하였다. W1/01은 0.13 M 염산 용액 (0.2 mL), 용액 2 (0.75 mL), 용액 3 (0.25 mL), 및 용액 4 (0.2 mL)를 소형 압력튜브 내에서 조합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 40초 동안 50% 진폭에서 초음파처리하여 제조하였다. 이어서, 2차 에멀젼 (W1/01/W2)은 용액 5 (3.0 mL)를 1차 W1/01 에멀젼과 조합하고, 10초 동안 볼텍싱하고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 제조하였다.

[0224]

W1/01/W2 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액 (30 mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 합성 나노담체가 형성되게 하였다. 합성 나노담체 혼탁액

을 원심분리 투브로 옮겨 21,000xg 및 4°C에서 1시간 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 합성 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 합성 나노담체 혼탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0225] 합성 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-합성 나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0226] 라파마이신 로드를 측정하는 방법

[0227] 대략 3 mg의 합성 나노담체를 수집하고 원심분리하여 상청액을 합성 나노담체 펠릿으로부터 분리시켰다. 아세토니트릴을 펠릿에 첨가하고, 샘플을 초음파처리하고, 원심분리하여 임의의 불용성 물질을 제거하였다. 상청액 및 펠릿을 RP-HPLC 상에 주입하고, 278nm에서 흡광도를 판독하였다. 펠릿에서 관찰되는  $\mu\text{g}$ 을 사용하여 % 포착 (로드)을 계산하고, 상청액 및 펠릿에서  $\mu\text{g}$ 을 사용하여 회수된 총  $\mu\text{g}$ 을 계산하였다.

[0228] 오브알부민 (323-339) 로드를 측정하는 방법

[0229] 대략 3 mg의 합성 나노담체를 수집하고 원심분리하여 상청액을 합성 나노담체 펠릿으로부터 분리시켰다. 트리플루오로에탄올을 펠릿에 첨가하고, 샘플을 초음파처리하여 중합체를 용해시키고, 0.2% 트리플루오로아세트산을 첨가하고, 샘플을 초음파처리한 다음 원심분리하여 임의의 불용성 물질을 제거하였다. 상청액 및 펠릿을 RP-HPLC 상에 주입하고, 215nm에서 흡광도를 판독하였다. 펠릿에서 관찰되는  $\mu\text{g}$ 을 사용하여 % 포착 (로드)을 계산하고, 상청액 및 펠릿에서  $\mu\text{g}$ 을 사용하여 회수된 총  $\mu\text{g}$ 을 계산하였다.

[0230] 면역화

[0231] 본 실험의 목적은 항원-특이적 이뮤노글로불린을 측정함으로써, 진행 중인 항체 반응에 대한 캡슐화된 면역억제의 효과를 평가하기 위한 것이다. 1개의 동물 군은 대조군으로서 비면역화상태로 남겨두었다. 2개의 동물 군은 발바닥에 닦 오브알부민 (OVA) 및 CpG를 사용하여 3회 주사 (d0, d14 및 d28)에 의해 면역화한 다음, 항체 역가를 평가하였다. 면역화를 위해, 동물에게 20  $\mu\text{l}$ /다리의 OVA+CpG (12.5  $\mu\text{g}$  OVA+10  $\mu\text{g}$  CpG)를 양쪽 뒷다리에 s.c로 제공하였다. 동일한 날에 투여된 처리는 i.v. (200  $\mu\text{l}$ ) 또는 s.c. (20  $\mu\text{l}$ ) 투여를 포함하였다. 동일한 양의 OVA<sub>323-339</sub>가 처리군에 주사되는 방식으로 나노담체를 희석시켰다.

[0232] IgG의 측정

[0233] IgG 항체의 수준을 측정하였다. 차단제 PBS 중 카세인 (씨모 피셔(Thermo Fisher), 카탈로그 #37528)을 희석제로서 사용하였다. 트윈-20 (시그마(Sigma), 카탈로그 #P9416-100mL) 10 mL를 2 리터의 10x PBS 원액 (PBS: 옴니푸르(OmniPur)® 10X PBS 액체 농축물, 4L, EMD 케미칼스, 카탈로그 #6505) 및 18 리터의 탈이온수에 첨가함으로써 제조된 PBS 중 0.05% 트윈-20을 세척 완충제로서 사용하였다.

[0234] OVA 단백질을 5 mg/mL의 원액 농도에서 코팅 물질로서 사용하였다. 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로의 1:1000 희석을 작업 농도로서 사용하였다. 검정 플레이트의 각각의 웰을 웰당 100  $\mu\text{l}$  희석된 OVA로 코팅하고, 플레이트를 밀봉 필름 (VWR 카탈로그 #60941-120)으로 밀봉하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 코스타(Costar) 9017 96-웰 편평 바닥 플레이트를 검정 플레이트로서 사용하였다 (코스타 9017).

[0235] 저-결합 폴리프로필렌 96-웰 플레이트 또는 투브를 셋-업 플레이트로 사용하여 여기서 샘플을 제조한 후, 이를 검정 플레이트로 옮겼다. 셋업 플레이트는 임의의 항원을 함유하지 않았고, 따라서 혈청 항체는 샘플 셋업 동안 플레이트에 결합되지 않았다. 셋업 플레이트를 샘플 제조에 사용하여, 항원-코팅된 플레이트를 샘플 제조에 사용할 경우에 샘플 제조 또는 피펫팅 동안 발생할 수 있는 결합을 최소화하였다. 셋업 플레이트에서 샘플을 제조하기 전에 웰을 희석제로 커버하여 임의의 비-특이적 결합을 차단하고, 플레이트를 밀봉하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0236] 검정 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척하고, 마지막 세척 후에 세척 완충제를 웰로부터 완전하게 흡인해내었다. 세척 후에, 300  $\mu\text{l}$  희석제를 검정 플레이트(들)의 각각의 웰에 첨가하여 비-특이적 결합을 차단하고, 플레이트를 실온에서 적어도 2시간 인큐베이션하였다. 혈청 샘플을 셋업 플레이트에서 적절한 출발 희석으로 제조하였다. 출발 희석은 때때로 또한 희석제를 사용하여 1.5 mL 투브에서 제조된 다음, 셋-업 플레이트로 옮겨졌다. 적절한 출발 희석은 이용가능한 경우에 이전 데이터를 기반으로 하여 결정하였다. 어떠한 이전 데이터도 이용가능하지 않은 경우에, 가장 낮은 출발 희석은 1:40이었다. 희석되면, 혈청 샘플의 출발 희석 200  $\mu\text{l}$ 를 투브로부터 셋업 플레이트의 적절한 웰로 옮겼다.

- [0237] 예시적인 셋업 플레이트 레이아웃을 하기 기재한다: 칼럼 2 및 3은 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석된 (1:4000 희석) 항-오브알부민 모노클로날 IgG2b 이소형 (암캡(AbCam), ab17291) 표준을 함유하였다. 칼럼 3-11은 혈청 샘플을 (적절한 희석으로) 함유하였다. 칼럼 1 및 12는 변연 효과로 인한 측정의 임의의 편향을 피하기 위해, 샘플 또는 표준에 사용되지 않았다. 대신에, 칼럼 1 및 12는 200  $\mu\text{l}$  희석제를 함유하였다. 1:40으로 희석된 정상 마우스 혈청을 음성 대조군으로서 사용하였다. 0.5mg/mL 원액 (BD 바이오사이언스)으로부터 1:500으로 희석된 항-마우스 IgG2a를 이소형 대조군으로서 사용하였다.
- [0238] 모든 샘플이 셋업 플레이트에서 제조되면, 플레이트를 밀봉하고, 검정 플레이트의 차단이 완료될 때까지 4°C에서 보관하였다. 검정 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척하고, 마지막 세척 후에 세척 완충제를 완전하게 흡입해내었다. 세척 후에, 100  $\mu\text{L}$ 의 희석제를 검정 플레이트 B-H 행의 모든 웰에 첨가하였다. 12-채널 피펫을 사용하여 샘플을 셋업 플레이트로부터 검정 플레이트로 옮겼다. 옮기기 전에 희석된 혈청 150  $\mu\text{l}$ 를 상하로 3회 피펫팅하여 샘플을 혼합하였다. 혼합 후에, 150  $\mu\text{l}$ 의 각각의 샘플을 셋업 플레이트로부터 옮기고, 각 검정 플레이트의 A 행에 첨가하였다.
- [0239] 각각의 샘플의 출발 희석이 셋업 플레이트로부터 검정 플레이트의 A 행으로 옮겨지면, 연속 희석을 하기와 같이 검정 플레이트 상에 피펫팅하였다: 12-채널 피펫을 사용하여 A 행으로부터 각각의 혈청 샘플 50  $\mu\text{l}$ 를 제거하고, B 행의 각 웰에 이전에 첨가된 희석제 100  $\mu\text{l}$ 와 혼합하였다. 이 단계를 전체 플레이트에 대해 반복하였다. 최종 행의 희석을 피펫팅한 후에, 최종 행 내 웰로부터 유체 50  $\mu\text{l}$ 를 제거하고 경사분리함으로써, 검정 플레이트의 모든 웰 내의 최종 부피가 100  $\mu\text{l}$ 가 되게 하였다. 샘플 희석이 검정 플레이트에서 제조되면, 플레이트를 실온에서 적어도 2시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0240] 인큐베이션 후에, 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척하였다. 검출 항체 (염소 항-마우스 항-IgG, HRP 접합됨, 암캡 ab98717)를 희석제 중에서 1:1500 (0.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )으로 희석하고, 희석된 항체 100  $\mu\text{l}$ 를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 세척 완충제로 3회 세척하였고, 각각의 세척 단계는 적어도 30초의 침지 시간을 포함하였다.
- [0241] 세척 후에, 검출 기질을 웰에 첨가하였다. 동일 부의 기질 A 및 기질 B (BD 바이오사이언시스 TMB 기질 시약 세트, 카탈로그 #555214)를 검정 플레이트에 첨가하기 직전에 조합하고, 혼합된 기질 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 각각의 웰에 첨가하고, 암실에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 10분의 기간 후에 각각의 웰에 정지 용액 (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 정지 용액을 첨가한 직후에 플레이트 판독기 상에서 450 nm에서 웰의 광학밀도 (OD)를 평가하고, 570 nm에서 차감하였다. 데이터 분석은 몰레큘라 디바이스(Molecular Device)의 소프트웨어 SoftMax Pro v5.4를 사용하여 수행하였다. x-축 상 희석 (로그 스케일) 및 y-축 상 OD 값 (선형 스케일)으로 4-파라미터 로지스틱 곡선-피트 그래프를 제작하고, 각각의 샘플에 대한 반수 최대 값 (EC<sub>50</sub>)을 결정하였다. 레이아웃의 상단의 플레이트 템플릿은 각각의 샘플의 희석을 반영하도록 조정하였다 (칼럼당 1).
- [0242] 결과
- [0243] 결과는 면역억제제 및 항원 둘 다가 나노담체에 부착되어 있는 항원과 조합된 면역억제제 용량을 사용하는 것의, 항원-특이적 항체 반응을 감소시키는 능력을 입증한다. 도 1은 정맥내 투여되는 경우의, 웨티드 항원 및 면역억제제를 포함하는 나노담체에 의한 순환 항원-특이적 항체 생산에서의 감소를 제시한다. 각각의 실험에서 5마리의 동물을 사용하여 2개의 독립적인 실험을 수행하였다. 도 2는 피하 투여되는 경우의, 웨티드 항원 및 면역억제제를 포함하는 나노담체에 의한 순환 항원-특이적 항체 생산에서의 감소를 제시한다. 각각의 실험에서 5마리의 동물을 사용하여 3개의 독립적인 실험을 수행하였다. 정규 일원 ANOVA 검정의 본페로니 사후-검정을 사용하여 P 값을 계산하였다 (\* = p<0.05, \*\* = p<0.01 및 \*\*\* = p<0.001).
- [0244] 이들 결과는 통상적으로 유의한 항-오브알부민 항체 반응을 생성할 조건 하에 투여되는 경우에 동일한 양의 오브알부민 단백질을 사용하여 증진된 효과를 수득할 수 있음을 입증한다. 또한, 이러한 약역학적 효과는 결과가 시사하는 바와 같이, 감소된 약역학적 유효 용량으로 수득될 수 있다. 마지막으로, 결과의 재현은 면역억제제 용량과의 병용 투여 시 치료 거대분자의 감소된 약역학적 유효 용량으로 약역학적 효과가 생성되는 것으로 입증된 프로토콜이 확립되었음을 지지한다.
- [0245] 실시예 2: 면역억제제 및 치료 단백질을 포함하는 합성 나노담체의 병용 투여 후의 면역 반응의 평가
- [0246] 물질
- [0247] 라파마이신을 TSZ 켐 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185; 제품 카탈로그 # R1017)에서 구입하

였다. 76% 락티드 및 24% 글리콜리드 함량 및 0.69 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앨라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756. 제품 코드 7525 DLG 7A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 PEG 블록 및 대략 40,000 Da의 PLA 블록을 함유하는 PLA-PEG 블록 공-중합체는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앨라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 폴리비닐 알콜 (85-89% 가수분해됨)은 EMD 케미칼스 (제품 번호 1.41350.1001)에서 구입하였다.

[0248] 합성 나노담체를 제조하는 방법

[0249] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0250] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA 및 25 mg/mL의 PLA-PEG. 용액은 PLGA 및 PLA-PEG를 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0251] 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100 mg/mL의 라파마이신. 용액은 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0252] 용액 3: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0253] 수중유 에멀젼을 나노담체를 제조하는데 사용하였다. O/W 에멀젼은 용액 1 (1 mL), 용액 2 (0.1 mL), 및 용액 3 (3 mL)을 소형 압력 튜브 내에서 조합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액 (30 mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 혼탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,000xg 및 4°C에서 35분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 혼탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0254] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
227	6.4

[0255]

[0256] 오브알부민에 대한 반응

[0257] C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷 마우스 (군당 5마리, 3군: 나이브 대조군, 비처리 대조군, 및 라파마이신과 함께 합성 나노담체에 의한 처리군)에게 그의 면역원성을 증가시키기 위해 응집체를 형성하도록 높은 시어를 사용하여 유도한 닭 오브알부민 (aggOVA) 25 µg과 함께 정맥내 주사하였다. 면역 반응의 프라이밍 및 부스팅을 위한 이들 i.v. 주사 후에 (제0일, 제14일 및 제28일 투여), 25 µg 오브알부민의 후속 부스팅을 복강내로 수행하고 (i.p. 제42일 및 제57일), 좌측 뒷다리에의 피하 12.5 µg pOVA 캘린지 (s.c. d62)에 이어서 CpG와 조합된 동일한 aggOVA를 사용하여 캘린지하였다 (s.c. 제90일, 제105일 및 제135일). 도 3은 이러한 면역화 프로토콜의 결과를 제시한다. 제25일 및 제40일에, 이들 동물에서 ELISA (일반적으로 실시에 1에 기재된 바와 같은 기술)를 사용하여 우세한 항-OVA 항체 (Ab) 반응을 검출할 수 있었다. aggOVA의 후속 주사는 이들 역ガ를 유지시키거나 또는 심지어 반응을 부스팅시키는 것으로 관찰되었다. 대조적으로, d0, 14 및 28에 항원과 3회의 최초 직면 동안에만 aggOVA와 병용하여 i.v. 투여되는 합성 나노담체 (100 µg의 라파마이신을 제공하는 것으로 계산된 용량)를 사용하여 마우스를 처리한 경우에, aggOVA를 포함하는 면역원성 혼합물로 4회 주사한 후에도 이후 60일 동안 어떠한 IgG 반응도 검출할 수 없었다. 도 3을 참조한다. 고도의 면역원성 조합인 aggOVA/KLH 및 CpG에 의한 3회 s.c. 주사 (s.c. 제90일, 제105일 및 제135일) 후에만 처리된 동물에서 크게 대단하지 않은 항-aggOVA IgG 반응을 검출할 수 있었다.

[0258] 키홀 립펫 혜모시아닌, 제2 항원에 대한 반응

[0259] 상기와 동일한 마우스에게 또한 0.05 µg의 제2 Ag, 키홀 립펫 혜모시아닌 (KLH)을 주사하였고, 여기서 KLH는 aggOVA와 혼합된 것으로, aggOVA에 대해 상기 기재된 스케줄에 따라 투여되었다. 항-KLH IgG 항체 역가는 실시에 1에 기재된 항-OVA IgG 적정 방법과 유사한 방법을 사용하여 결정하였다.

[0260] 도 4에서의 결과는, aggOVA와 달리, KLH가 Ag와의 제1 직면 단계에서는 면역원성이 아님을 제시한다 (d0-40).

그러나, KLH는 CpG의 존재 하에 KLH의 3회 s.c. 면역화 (s.c. 제90일, 제105일 및 제135일) 후에 합성 나노담체로 처리되지 않은 동물에서 면역원성이었다. 강력한 항-KLH 반응을 이들 대조군 마우스에서 관찰할 수 있었던 반면에, 이 프로토콜의 시작 시 항원과 조합되어 면역억제제를 함유하는 합성 나노담체로 3회 처리된 마우스는 KLH/CpG 캘린지 이후에도 어떠한 검출가능한 반응을 갖지 않았다.

[0261] 이를 결과는 본원에 제공된 조성물 및 방법에 의하면, 통상적으로 유의한 항체 반응을 생성할 조건 하에 투여되는 경우에, 증진된 효과를 수득할 수 있음을 입증한다. 또한, 결과는 약역학적 효과가 생성되는 것으로 입증된 프로토콜이 확립되었음을 지지한다.

[0262] 실시예 3: 라파마이신에 부착된 나노담체를 제조하는 방법

[0263] 물질

[0264] 라파마이신을 TSZ 캠 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 7525 DLG 7A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (Lakeshore Biochemicals) (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 엠프로브(EMPROVE)® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 김스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0265] 방법

[0266] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0267] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe, 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe, 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0268] 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0269] 수중유 (O/W) 에멀젼을 나노담체를 제조하는데 사용하였다. O/W 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 압력 퓨브 내에서 조합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 혼탁액을 원심분리 퓨브로 옮겨 75,600xg 및 4°C에서 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 혼탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0270] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하고, 표 1에 제시하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다 (표 1). 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0271] 라파마이신에 부착된 나노담체의 유효 직경 및 라파마이신 함량

나노담체 ID	유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
1	238	10.6
2	241	11.1
3	241	11.5

[0272]

물질

[0273] 라파마이신을 TSZ 캠 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 1:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 5050 DLG 2.5A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 김스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0275] 방법

[0276] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0277] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe, 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe, 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0278] 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0279] 용액 3: 70 mM 포스페이트 완충제, pH 8.

[0280] 수중유 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 유리 압력 투브 내에서 혼합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 생성하였다. 에멀젼을 용액 3 (30 mL)을 함유하는 개방 50 mL 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고 나노담체가 혼탁액 중에 형성되게 하였다. 이어서 나노담체 혼탁액을 원심분리 투브로 옮겨 75,600 rcf에서 40분 동안 회전시키고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 혼탁된 나노담체 부분을 세척하였다. 이러한 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공청 농도를 갖는 나노담체 혼탁액을 달성하였다. 혼탁액을 사용 시까지 -20°C에서 동결 보관하였다.

[0281] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0282] 라파마이신에 부착된 나노담체의 유효 직경 및 라파마이신 함량

나노담체 ID	유효 직경 (nm)	라파마이신 로드 (% w/w)
4	218	9.9

[0283]

[0284] 물질

[0285] 라파마이신을 TSZ 켐 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 1:1의 랙티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 5050 DLG 2.5A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. F8II.1723 웨프티드는 아나스펙(AnaSpec) (94555 캘리포니아주 프리몬트 캠퍼스 드라이브 34801)에서 구입하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0286] 방법

[0287] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0288] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe, 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe, 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0289] 용액 2: 50 mM pH 11.5 포스페이트 완충제 중 10 mg/mL의 F8II.1723 (ERLWDYGMSSSPHVL) 및 100 mg/mL의 수크로스. 용액은 수크로스를 50 mM pH 11.5 포스페이트 완충제 중에 용해시킨 다음, F8II.1723 웨프티드를 건조 분말로서 첨가하여 제조하였다.

[0290] 용액 3: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0291] 용액 4: 70 mM pH 8 포스페이트 완충제.

[0292] 먼저 1차 (W1/0) 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (0.2 mL)를 소형 유리 압력 투브 내에서 혼합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 40초 동안 50% 진폭에서 초음파처리하여 생성하였다.

[0293] 이어서 2차 (W1/0/W2) 에멀젼은 용액 3 (3.0 mL)을 1차 에멀젼에 첨가하고, 볼텍싱하여 조 혼탁액을 생성한 다음, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 형성하였다.

[0294] 2차 에멀젼을 용액 4 (30 mL)를 함유하는 개방 50 mL 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고 나노담체가 혼탁액 중에 형성되게 하였다. 이어서 나노담체 혼탁액을 원심분리 투브로

옮겨 75,600 rcf에서 35분 동안 회전시키고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 혼탁된 나노담체 부분을 세척하였다. 이러한 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 혼탁액을 달성하였다. 혼탁액을 사용 시까지 -20°C에서 동결 보관하였다.

[0295] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 F8II.1723의 양은 플루오레사민-기반 검정을 사용하여 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0296] 라파마이신에 부착된 나노담체의 유효 직경 및 라파마이신 함량

나노담체 ID	유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)	펩티드 함량 (% w/w)
5	202	8.9	1.1

[0297]

[0298] 물질

[0299] 라파마이신을 TSZ 캠 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 1:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 5050 DLG 2.5A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. F8II.75 펩티드는 아나스펙 (94555 캘리포니아주 프리몬트 캠퍼스 드라이브 34801)에서 구입하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 킵스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0300] 방법

[0301] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0302] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe, 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe, 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0303] 용액 2: 50 mM pH 2 포스페이트 완충제 중 10 mg/mL의 F8II.75 (VHLFNIKPRPPWMG) 및 100 mg/mL의 수크로스. 용액은 수크로스를 50 mM pH 2 포스페이트 완충제 중에 용해시킨 다음, F8II.75 펩티드를 건조 분말로서 첨가하여 제조하였다.

[0304] 용액 3: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0305] 용액 4: 70 mM pH 8 포스페이트 완충제.

[0306] 먼저 1차 (W1/0) 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (0.2 mL)를 소형 유리 압력 튜브 내에서 혼합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 40초 동안 50% 진폭에서 초음파처리하여 생성하였다.

[0307] 이어서 2차 (W1/0/W2) 에멀젼은 용액 3 (3.0 mL)을 1차 에멀젼에 첨가하고, 볼텍싱하여 조 혼탁액을 생성한 다음, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 형성하였다.

[0308] 2차 에멀젼을 용액 4 (30 mL)를 함유하는 개방 50 mL 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고 나노담체가 혼탁액 중에 형성되게 하였다. 이어서 나노담체 혼탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600 rcf에서 35분 동안 회전시키고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 혼탁된 나노담체 부분을 세척하였다. 이러한 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 혼탁액을 달성하였다. 혼탁액을 사용 시까지 -20°C에서 동결 보관하였다.

[0309] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 F8II.75의 양은 플루오레사민-기반 검정을 사용하여 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0310] 라파마이신에 부착된 나노담체의 유효 직경 및 라파마이신 함량

나노담체 ID	유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)	펩티드 함량 (% w/w)
6	199	9.3	1.1

[0311]

물질

[0312]

라파마이신을 TSZ 켐 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 1:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 5050 DLG 2.5A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. F8II.2210 펩티드는 아나스펙 (94555 캘리포니아주 프리몬트 캠퍼스 드라이브 34801)에서 구입하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 킵스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0314]

방법

[0315]

용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0316]

용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe, 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe, 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0317]

용액 2: 50 mM pH 2 포스페이트 완충제 중 10 mg/mL의 F8II.2210 (TASSYFTNMFATWSPSKAR) 및 100 mg/mL의 수크로스. 용액은 수크로스를 50 mM pH 2 포스페이트 완충제 중에 용해시킨 다음, F8II.2210 펩티드를 건조 분말로서 첨가하여 제조하였다.

[0318]

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

[0319]

용액 4: 70 mM pH 8 포스페이트 완충제.

[0320]

먼저 1차 (W1/0) 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (0.2 mL)를 소형 유리 압력 튜브 내에서 혼합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 40초 동안 50% 진폭에서 초음파처리하여 생성하였다.

[0321]

이어서 2차 (W1/0/W2) 에멀젼은 용액 3 (3.0 mL)을 1차 에멀젼에 첨가하고, 볼텍싱하여 조 혼탁액을 생성한 다음, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 형성하였다.

[0322]

2차 에멀젼을 용액 4 (30 mL)를 함유하는 개방 50 mL 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고 나노담체가 혼탁액 중에 형성되게 하였다. 이어서 나노담체 혼탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600 rcf에서 35분 동안 회전시키고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 혼탁된 나노담체 부분을 세척하였다. 이러한 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 혼탁액을 달성하였다. 혼탁액을 사용 시까지 -20°C에서 동결 보관하였다.

[0323]

나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 F8II.2210의 양은 플루오레사민-기반 검정을 사용하여 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0324]

라파마이신에 부착된 나노담체의 유효 직경 및 라파마이신 함량

나노담체 ID	유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)	펩티드 함량 (% w/w)
7	215	9.3	1.6

[0325]

물질

[0326]

1:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 5050 DLG 2.5A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 엠프로브

® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지 주 킵스타운 사우스 데모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0328] 방법

[0329] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0330] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA 및 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe. 용액은 PLGA 및 PLA-PEG-OMe를 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0331] 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0332] 용액 3: 70 mM 포스페이트 완충제, pH 8.

[0333] 수중유 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 유리 압력 튜브 내에서 혼합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 생성하였다. 에멀젼을 용액 3 (30 mL)을 함유하는 개방 50 mL 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고 나노담체가 혼탁액 중에 형성되게 하였다. 이어서 나노담체 혼탁액을 원심분리 튜브로 옮겨 75,600 rcf에서 40분 동안 회전시키고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 혼탁된 나노담체 부분을 세척하였다. 이러한 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공청 농도를 갖는 나노담체 혼탁액을 달성하였다. 혼탁액을 사용 시까지 -20°C에서 동결 보관하였다.

[0334] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

나노담체 ID	유효 직경 (nm)
8	183

[0335] [0336] 실시예 4: FVIII에 대한 면역 반응의 평가

[0337] A형 혈우병 마우스 (E16 마우스) (제0일에 n = 8)에게 혈액 응고 단백질, 인자 VIII (FVIII), 및 라파마이신에 부착된 합성 나노담체 (나노담체 ID 4), 또는 중공 나노입자 (NP) (나노담체 ID 8) 및 FVIII 또는 IVIG (정맥내 이뮤노글로불린) 및 FVIII을 연속 5주 동안 매주 병용 정맥내 (i.v.) 주사하였다. FVIII에 대한 항체 회상 반응을 평가하기 위해, FVIII 및 라파마이신에 부착된 나노담체의 최종 용량 1개월 후에, 도 5에 제공된 바와 같이 발색성 FVIII 활성 검정 키트 (코테스트(Coatest) SP4 FVIII)를 사용하여 베데스다 검정에 의해 억제제 역ガ를 결정하였다.

[0338] FVIII 및 라파마이신에 부착된 나노담체의 처리에 의해 유도되는 관용의 지속을 추가로 평가하기 위해, 도 6a에 개략적으로 제공된 바와 같이, A형 혈우병 마우스 (E16 마우스) (제0일에 n = 8)에게 합성 나노담체 및 FVIII 웨პ티드 (나노담체 ID 5, 6 및 7, 1:1:1 웨პ티드 질량 비가 되도록 혼합되고 함께 주사됨), 또는 라파마이신에 부착된 나노담체 (나노담체 ID 4) 및 FVIII 단백질, 또는 중공 NP (나노담체 ID 8) 및 FVIII, 또는 IVIG (정맥내 이뮤노글로불린) 및 FVIII을 5주 동안 매주 병용 i.v. 주사하였다. 제57일, 제81일, 및 제125일에, 마우스를 추가 처리의 부재 하에 FVIII로 챌린지하였다 (i.v. 또는 i.p.). 항-FVIII 항체 수준은 ELISA에 의해 결정하였다. 선택된 시점에서의 결과를 도 6b에 제공한다. 각각의 시점에서의 데이터를 평균 ± SEM으로 나타내었다. 통계적 분석을 위해, 나노담체 군 (단백질 또는 웨პ티드와 함께)을 중공 나노입자 대조군과 2개의 꼬리 분포에 의한 스튜던트 t-검정을 사용하여 비교하였다. \*p < 0.05 및 \*\*p < 0.01, 단백질과 함께 나노담체 ID 4 및 중공 NP 군 사이; #p < 0.05 및 ##p < 0.01, 나노담체 및 웨პ티드 (나노담체 ID 5, 6 및 7) 및 중공 NP 군 사이. 모든 FVIII 주사는 주사당 1 µg이었다. 모든 나노담체 ID 4의 주사는 주사당 100 µg이었다.

[0339] 데이터는 FVIII 또는 그의 웨პ티드와 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 투여가 항-인자 FVIII 항체 반응을 감소시킬 수 있음을 제시한다. 이는 비부착된 인자 FVIII 단백질 뿐만 아니라 합성 나노담체에 또한 부착된 인자 FVIII 웨პ티드와 조합되어 면역억제제 합성 나노담체를 사용하는 경우에도 마찬가지였다. 데이터는 또한 이러한 투여가 인자 VIII의 개선된 활성을 생성할 수 있음을 제시하였다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소 뿐만 아니라 개선된 효능을 입증하였다. 마지막으로, 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.

[0340] 실시예 5: 휴미라/아달리무맙에 대한 반응의 평가

- [0341] 대조군 C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷에게 제29일까지 1주에 1회 60  $\mu\text{g}$ 의 휴미라를 앞다리로 피하 (s.c.) 주사하였다 (d0, 7, 14, 21, 28에, 모든 군 및 조건에 대함). 또 다른 군에게도 유사하게 주사하였지만, 0.9 mg의 라파마이신에 부착된 나노담체 (나노담체 ID 1, 2 또는 3)를 제0일의 프라이밍 시 휴미라 용액과 혼합하였다. 도 7a에 제공된 결과는 제21일의 모든 동물의 혈액 중 항체 역가를 제시한다. 대조군 동물은 휴미라에 대해 강건한 항체 반응을 발생시킨 한편, 처리된 동물은 20일 후 및 처리 없이 휴미라의 2회 주사 후에도 완전한 음성을 유지하였다. 제29일에, 동물에게 한쪽 뒷다리에는 또 다른 챌린지를 제공하는 한편 다른 뒷다리에는 염수를 제공하여 국부 항체-매개 제I형 과민증 반응을 시험하였다. 이를 위해, 주사 1시간 후에 캘리퍼의 보조 하에 뒷다리의 두께를 측정하였다. 2개의 다리 사이의 두께에서 차이를 도 7b에 제공한다. 항체 결과와 유사하게, 나노담체에 의한 처리는 휴미라의 국부 투여에 의해 유도되는 염증 반응을 사라지게 하였다.
- [0342] 이들 결과는 휴미라와 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 투여가 바람직하지 않은 항-휴미라 항체 반응을 감소시킬 뿐만 아니라 면역억제제 나노담체 조성을 없이 휴미라의 투여로부터 생성될 수 있는 바람직하지 않은 염증 반응을 제거할 수 있음을 제시한다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소를 입증한다. 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.
- [0343] 실시예 6: 키홀 럼펫 혜모시아닌 (KLH)에 대한 반응의 평가
- [0344] 대조군 C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷에게 제0일 또는 제21일에 시작하여 제34일까지 1주에 1회 200  $\mu\text{g}$ 의 키홀 럼펫 혜모시아닌 (KLH)을 꼬리 정맥으로 정맥내 (i.v.) 주사하였다 (d0, 7, 14, 21, 28, 34에). 또 다른 군에게도 제0일에서 제34일까지 유사하게 주사하였지만, 제0일, 제14일 및 제21에는 0.47 mg의 라파마이신에 부착된 나노담체 (나노담체 ID 1, 2 또는 3)를 KLH 용액과 혼합한 다음, 제21일 및 제34일 사이에는 KLH를 단독으로 매주 주사하였다 (d21, 28, 34에). 도 8에 제공된 결과는 표시된 시점에서의 모든 동물의 혈액 중 항체 역가를 제시한다. 제0일 또는 제21일에 면역화를 개시한 대조군 동물은 동일한 양의 KLH를 사용한 3회의 주사 후 매우 유사한 반응 ( $\text{EC}50=3-5\times 10^3$ )을 발생시켰다 (각각 제26일 및 제40일). 대조적으로, 나노담체의 3회 주사를 제공받은 동물은 KLH 단독 3회 주사 후 완전한 음성을 유지하였다.
- [0345] 데이터는 KLH와 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 투여가 항-KLH 항체 반응을 감소시킬 수 있고, 이러한 감소는 나노담체 처리 후에 KLH를 투여한 이후에도 유지될 수 있음을 제시한다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소를 입증한다. 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.
- [0346] 실시예 7: 오브알부민에 대한 반응의 평가
- [0347] C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷에게 제-21일 및 제-13일에 1.2mg의 비부착 나노입자 (NP[중공]) (나노담체 ID 8), 유리 라파마이신 (fRapa) (100  $\mu\text{g}$ ), 22  $\mu\text{g}$ 의 유리 닦 오브알부민 (fOVA), fRapa 및 fOVA의 조합, 1.2mg의 라파마이신에 부착된 나노담체 (NP[Rapa], 라파마이신 함량 100  $\mu\text{g}$ ) (나노담체 ID 1, 2 또는 3) 단독 또는 22  $\mu\text{g}$ 의 fOVA와의 조합을 꼬리 정맥으로 i.v. 주사하였다. 제0일에 모든 동물에게 2  $\mu\text{g}$ 의 CpG와 혼합된 2.5  $\mu\text{g}$ 의 미립자 OVA (pOVA)를 뒷다리로 s.c. 주사한 다음, 제7일 및 제14일에 2.5  $\mu\text{g}$  pOVA를 주사하였다. 임의의 처리의 부재 하에 (NP[중공]), 동물은 항-OVA IgG 항체 역가에 의해 측정될 수 있는 OVA에 대한 강건한 면역 반응을 발생시켰다. 도 9에 제시된 제22일의 항체 역가는 동일한 용액으로 OVA와 병용 투여된 2회 용량의 합성 나노담체 (fOVA+NP[Rapa])가 OVA+CpG의 1회 주사 및 OVA 단독의 2회 주사 후에도 OVA에 대한 항체 형성을 방지하는데 효과적임을 입증하였다.
- [0348] 데이터는 OVA와 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 투여가 항-OVA 항체 반응을 감소시킬 수 있고, 이러한 감소는 OVA의 강력한 아주반트와의 조합 투여 후에도 유지될 수 있음을 제시한다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소를 입증한다. 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.
- [0349] 실시예 8: 크리스텍사에 대한 반응의 평가
- [0350] C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷의 대조군에게 PBS를 꼬리 정맥으로 i.v. 주사하는 한편, 처리군에게는 제-21일 및 제-14일에 0.9 mg의 라파마이신에 부착된 나노담체 (나노담체 ID 1, 2 또는 3)를 40  $\mu\text{g}$ 의 크리스텍사와 조합하여 주사하였다. 모든 동물에게 제0일에서 제28일까지 20  $\mu\text{g}$ 의 CpG와 조합된 100  $\mu\text{g}$ 의 크리스텍사를 뒷다리로 s.c.로 매주 주사하였다 (d0, 7, 12, 28). 대조군 동물은 항-크리스텍사 IgM 항체 역가에 의해 측정될 수 있는 크리스텍사에 대한 면역 반응을 발생시켰다. 도 10의 결과는 동일한 용액으로 크리스텍사와 병용 투여되

는 합성 나노담체로 동물을 처리하는 것이 장기간 동안 크리스텍사에 대한 항체 형성을 방지하는데 효과적임을 제시한다. 처리된 동물은 나노담체 없이 크리스텍사 +CpG의 5회의 주사 후에도 항-크리스텍사 반응을 발생시키지 않았다.

[0351] 데이터는 크리스텍사와 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 투여가 항-크리스텍사 항체 반응을 감소시킬 수 있고, 이러한 감소는 강력한 아주반트와 함께 나노담체 처리 후에 크리스텍사를 투여한 이후에도 유지될 수 있음을 제시한다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소를 입증한다. 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.

[0352] 실시예 9: 오브알부민 및 KLH에 대한 반응의 평가

[0353] C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷의 대조군에게 2.5  $\mu\text{g}$ 의 면역원성 형태의 미립자 오브알부민 (pOVA)을 꼬리 정맥으로 i.v.로, 2  $\mu\text{g}$ 의 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH)을 뒷다리로 s.c.로 49일 동안 1주에 1회 주사하였다 (d0, 7, 14, 20, 28, 35, 42, 49). 다른 동물 군에게는 pOVA 및 KLH를 동일한 경로 및 양으로 제공하였지만, 제0일, 제7일 및 제14일에는 0.2mg의 라파마이신에 부착된 나노담체 (나노담체 ID 1, 2 또는 3)와 혼합한 다음, 제20일 및 제42일 사이에는 pOVA 주사하였다 (이전과 동일한 양). 대조군 동물은 항-OVA 또는 항-KLH IgG 항체 역가에 의해 측정될 수 있는 OVA 및 KLH에 대한 강건한 면역 반응을 발생시켰다. 도 11에 제시된 제54일의 항체 역가는 동일한 용액으로 pOVA와 병용 투여된 3회 용량의 합성 나노담체가 장기간 동안 OVA에 대한 항체 형성을 감소 및 방지하는데 효과적이지만 KLH (또 다른 위치에 s.c.로 주사됨)는 그렇지 않음을 입증한다. 처리된 동물은 pOVA 단독의 5회 주사 후에도 항-OVA 반응을 발생시키지 않았다.

[0354] 데이터는 단백질과 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여가 항-단백질 항체 반응을 감소시킬 수 있지만, 이러한 반응은 동일한 경로에 의해 투여된 단백질에 대해 특이적임을 제시한다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소를 입증한다. 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.

[0355] 실시예 10: KLH에 대한 반응의 평가

[0356] 대조군 C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷에게 63일 동안 1주에 1회 200  $\mu\text{g}$ 의 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH)을 꼬리 정맥으로 i.v. 주사하였다 (d0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63). 다른 군에게 유사한 주사를 제공하였지만, 제0일, 제7일, 제14일 및 제21일에는 0.9 mg의 라파마이신에 부착된 나노담체 (나노담체 ID 1, 2 또는 3)를 KLH 용액과 혼합한 다음, 제28일 및 제63일 사이에는 KLH를 6회 주사하였다 (동일한 양). 대조군 동물은 항-KLH IgG 항체 역가에 의해 측정될 수 있는 KLH에 대한 강건한 면역 반응 뿐만 아니라 주사에 의해 유발된 아나필락시스성 반응을 발생시켰다. 도 12a에서의 결과는 표시된 시점에서의 모든 동물의 혈액 중 항체 역가를 제시하고, 항원의 주사에 의해 유발된 아나필락시스 스코어는 도 12b에 제공된다. KLH와 병용 투여된 4회 용량의 합성 나노담체는 장기간 동안 항체 형성 및 아나필락시스를 감소 및 방지하는데 효과적이었다. 실제로, 처리된 동물은 대조군 동물이 반응을 생성하는데 크게 충분한 KLH 단독의 4회 주사 후에도 항-KLH 반응을 발생시키지 않았다 (제26일).

[0357] 이들 결과는 본원에 제공된 조성물이 일정 기간에 걸쳐 단백질과 병용 투여되는 경우에 장기간 동안 항체 형성 및 아나필락시스를 감소 또는 방지할 수 있음을 제시한다. 아나필락시스 스코어는 3인의 독립적 관찰자에 의해 다음과 같이 결정하였다: 0=무증상, 1=무기력, 2=무기력 및 정위 불능, 3=빈사.

[0358] 이들 결과는 KLH와 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 투여가 바람직하지 않은 항-KLH 항체 반응을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 면역억제제 나노담체 조성물 없이 KLH 투여로부터 생성될 수 있는 바람직하지 않은 아나필락시스성 반응을 제거할 수 있음을 제시한다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소를 입증한다. 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.

[0359] 실시예 11: 관절염성 동물에서 항-휴미라 면역 반응의 평가

[0360] 인간 종양 괴사 인자 알파를 과다발현하는 트랜스제닉 동물 (huTNFaTg)은 출생시부터 20주의 기간에 걸쳐 진행성 류마티스 관절염이 발생한다. 이러한 과정은 완전 인간 항-인간 TNF  $\alpha$  항체 휴미라 /아달리무맙을 사용하는 것에 의해 방지될 수 있다. 그러나, 초기 치료 용량의 휴미라 (60  $\mu\text{g}$ )의 반복 투여는 치료 이익을 중화시키는 항-약물 항체 형성 (ADA)으로 이어진다. 이어서 매우 높은 용량만이 치료 이익을 유지시킬 수 있고, 면역 반응의 중화를 극복할 수 있다. 예를 들어, 이러한 마우스 모델의 예에서 염증의 최대 억제를 달성하기 위해 약

200  $\mu\text{g}$ 이 필요한 것으로 여겨진다 (Binder et al., *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 65 (No. 3), March 2013, pp. 608-617).

[0361]

연령-매칭 huTNFaTg 5주령 암컷 동물에게 염수 (PBS) 또는 60  $\mu\text{g}$ 의 휴미라를 매주 또는 휴미라 및 0.87 mg의 라파마이신에 부착된 나노담체 (나노담체 ID 1, 2 또는 3)의 혼합물을 첫번째 7회 주사 (제0일, 제7일, 제14일, 제21일, 제28일, 제35일, 제42일, 5 내지 12주령)에 이어서 휴미라 단독 (동일한 양)의 3회 주사 (제49일 내지 제63일, 13 내지 15주령) 동안 견갑골하 부위로 s.c. 주사하였다. 도 13a의 결과는 제21일의 모든 동물의 혈액 중 항체 역가를 제시한다. 휴미라를 제공받지 않은 대조군 동물은 예상한 바와 같이 어떠한 항-휴미라 역가도 갖지 않은 반면에; 휴미라만을 제공받은 대조군 동물에서는 강건한 항체 반응을 관찰할 수 있었다. 대조적으로, 나노담체로 처리된 동물은 처리 없이 휴미라의 3회 주사 후에도 완전한 음성을 유지하였다. 이들 동물의 다리의 모니터링으로, 대조군 동물에서 10주령에 이미 분명한 진행성 질환이 밝혀졌다. 휴미라 단독으로 처리된 동물은 질환 진행이 유의하게 차단되었지만, 이러한 요법에 대한 나노담체의 부가는 관절염성 증상의 출현을 현저하게 차단시켰다. 여기서 스코어는 하기와 같이 총 4개의 독립적인 스코어로 나타내어진다: 1)은 활막염, 관절 삼출액 및 연부 조직 종창을 나타내고 2)는 관절강으로 성장하는 염증발생 활막 조직의 증식 및 연골 파괴를 포함하고 3)은 연골의 광범위한 손실, 관절 변연 주위 미란, 및 변형을 제시하고 4)는 기능적 삶을 끝내는, 관절의 섬유성 또는 골성 강직을 동반하는 거의 말기 질환이다.

[0362]

이들 결과는 휴미라와 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 투여가 바람직하지 않은 항-휴미라 항체 반응을 감소시킬 수 있음을 제시한다. 병용 투여의 이익은 또한 휴미라의 개선된 효능을 입증하는 추가의 감소된 관절염성 스코어에 의해 증명된다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 치료 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소 뿐만 아니라 개선된 효능을 입증한다. 이는 또한, 본원에 제공된 본 발명의 병용 투여에 의하면 보다 높은 용량의 치료가 필요하지 않음을 입증한다. 또한, 동일한 용량의 휴미라에 의한 관절염성 스코어에서의 감소 수준에 기초하면, 본원에 제공된 바와 같은 면역억제제 용량의 병용 투여의 부재 하에 필요하게 될 휴미라의 양과 비교하여 개선된 효능을 제공할 감소된 양의 휴미라가 또한 사용될 수 있다. 본 실시예에 사용된 휴미라의 양은, 휴미라에 의해 염증의 최대 억제를 달성하기 위해 관련 기술분야에서 사용된 약 200  $\mu\text{g}$ 의 양과 비교하여 훨씬 감소된, 60  $\mu\text{g}$ 이었음을 주목하는 것이 중요하다 (Binder et al., *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 65 (No. 3), March 2013, pp. 608-617). 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.

[0363]

실시예 12: 일부프로펜이 부착된 메조다공성 실리카 나노입자 (예측)

[0364]

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

[0365]

이어서 SiO<sub>2</sub> 나노입자를 (3-아미노프로필)-트리에톡시실란 (APTMS)을 사용하여 아미노 기로 관능화하였다. 이를 위해, 입자를 (30 mL) 중에 혼탁시키고, APTMS (50  $\mu\text{L}$ )를 혼탁액에 첨가하였다. 혼탁액이 실온에서 2시간 동안 정치되도록 한 다음, 주기적으로 에탄올을 첨가하여 부피 상수를 유지시키면서 4시간 동안 비동시켰다. 남은 반응물은 5회 사이클의 원심분리에 의한 세척 및 순수한 에탄올 중 재분산에 의해 제거하였다.

[0366]

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

[0367]

코어-쉘 나노담체를 형성하기 위해, 상기 형성된 아미노-관능화 SiO<sub>2</sub> 나노입자를 먼저 금 시드와 실온에서 2시간 동안 혼합하였다. 금-장식된 SiO<sub>2</sub> 입자를 원심분리를 통해 수집하고, 클로로금산 및 중탄산칼륨의 수용액과 혼합하여 금 쉘을 형성하였다. 이어서 입자를 원심분리에 의해 세척하고, 물 중에 재분산시켰다. 일부프로펜은 입자를 소듐 일부프로펜 용액 (1 mg/L) 중에 72시간 동안 혼탁시켜 로딩시켰다. 이어서 유리 일부프로펜을 원심분리에 의해 입자로부터 세척하고, 물 중에 재분산시켰다.

[0368] 실시예 13: 시클로스포린 A를 함유하는 리포솜 (예측)

[0369] 리포솜을 박막 수화를 사용하여 형성하였다. 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC) ( $32 \mu\text{mol}$ ), 콜레스테롤 ( $32 \mu\text{mol}$ ), 및 시클로스포린 A ( $6.4 \mu\text{mol}$ )를 순수한 클로로포름 ( $3 \text{ mL}$ )에 용해시켰다. 이러한 지질 용액을  $50 \text{ mL}$  등근-바닥 플라스크에 첨가하고, 용매를  $60^\circ\text{C}$ 의 온도에서 회전 증발기 상에서 증발시켰다. 이어서 플라스크를 질소 기체로 풀러싱하여 남은 용매를 제거하였다. 포스페이트 완충 염수 ( $2 \text{ mL}$ ) 및 5개의 유리 비드를 플라스크에 첨가하고,  $60^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 진탕시킴으로써 지질 막을 수화시켜 혼탁액을 형성하였다. 혼탁액을 소형 압력 투브로 옮기고, 30초 펄스 및 각각의 펄스 사이에 30초 지연의 4주기 동안  $60^\circ\text{C}$ 에서 초음파 처리하였다. 이어서 혼탁액을 실온에서 2시간 동안 비교란 상태로 두어 완전히 수화되게 하였다. 리포솜을 원심분리에 의해 세척한 다음 새로운 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0370] 실시예 14: 라파마이신을 함유하는 금 나노담체 (AuNC)의 제조 (예측)

[0371] HS-PEG-라파마이신의 제조:

[0372] 건조 DMF 중 PEG 산 디슬퍼드 (1.0 eq), 라파마이신 (2.0-2.5 eq), DCC (2.5 eq) 및 DMAP (3.0 eq) 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 불용성 디시클로헥실우레이를 여과에 의해 제거하고, 여과물을 이소프로필 알콜 (IPA)에 첨가하여 PEG-디슬퍼드-디-라파마이신 에스테르를 침전시키고, IPA로 세척하고 건조시켰다. 이어서 중합체를 DMF 중 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드로 처리하여 PEG 디슬퍼드를 티올 PEG 라파마이신 에스테르 (HS-PEG-라파마이신)로 환원시켰다. 생성된 중합체를 IPA로부터 침전에 의해 회수하고, 상기 기재된 바와 같이 건조시키고, H NMR 및 GPC에 의해 분석하였다.

[0373] 금 NC (AuNC)의 형성:

[0374]  $1 \text{ mM}$  HAuCl<sub>4</sub>의  $500 \text{ mL}$  수용액을 응축기가 장착된  $1 \text{ L}$  등근-바닥 플라스크 내에서 격렬한 교반 하에 10분 동안 환류 가열하였다. 이어서  $40 \text{ mM}$  시트르산삼나트륨의  $50 \text{ mL}$  용액을 교반 용액에 신속하게 첨가하였다. 생성된 진한 와인 적색 용액을 25-30분 동안 환류 하에 유지시키고, 가열을 중단하고, 용액을 실온으로 냉각시켰다. 이어서 용액을  $0.8 \mu\text{m}$  막 필터를 통해 여과하여 AuNC 용액을 수득하였다. AuNC는 가시적 분광분석법 및 투과 전자 현미경검사를 사용하여 특성화하였다. AuNC는  $520 \text{ nm}$ 에서 피크 흡수를 갖는, 시트레이트에 의해 캡핑된 약  $20 \text{ nm}$  직경이었다.

[0375] HS-PEG-라파마이신과의 AuNC 접합체:

[0376] HS-PEG-라파마이신의  $150 \mu\text{l}$  용액 ( $10 \text{ mM}$  pH 9.0 카르보네이트 완충제 중  $10 \mu\text{M}$ )을  $20 \text{ nm}$  직경의 시트레이트-캡핑된 금 나노담체  $1 \text{ mL}$  ( $1.16 \text{nM}$ )에 첨가하여 2500:1의 티올 대 금 몰비를 생성하였다. 혼합물을 아르곤 하에 실온에서 1시간 동안 교반하여 금 나노담체 상의 시트레이트에 의해 티올이 완전히 교환되게 하였다. 이어서 표면 상에 PEG-라파마이신을 갖는 AuNC를  $12,000\text{g}$ 에서 30분 동안 원심분리에 의해 정제하였다. 상청액을 경사분리한 다음, AuNC-S-PEG-라파마이신을 함유하는 펠릿을  $1\times$  PBS 완충제로 펠릿 세척하였다. 정제된 금-PEG-라파마이신 나노담체를 이어서 추가의 분석 및 생물검정을 위해 적합한 완충제 중에 재현탁시켰다.

[0377] 실시예 15: 라파마이신 및 오브알부민을 함유하는 리포솜 (예측)

[0378] 리포솜을 박막 수화에 의해 형성하였다. 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC) ( $32 \mu\text{mol}$ ), 콜레스테롤 ( $32 \mu\text{mol}$ ), 및 라파마이신 ( $6.4 \mu\text{mol}$ )을 순수한 클로로포름 ( $3 \text{ mL}$ )에 용해시켰다. 이러한 지질 용액을  $10 \text{ mL}$  유리 투브에 첨가하고, 용매를 질소 기체 스트림 하에 제거하고, 진공 하에 6시간 동안 건조시켰다. 과량의 오브알부민을 함유하는  $25 \text{ mM}$  MOPS 완충제 pH 8.5  $2.0 \text{ mL}$ 로 막을 수화시켜 다층 소포를 수득하였다. 지질 막이 투브 표면으로부터 박리될 때까지 투브를 볼텍싱하였다. 다층 소포를 단층으로 파괴하기 위해, 10 사이클의 동결 (액체 질소) 및 해동 ( $30^\circ\text{C}$  수조)을 적용하였다. 이어서 샘플을  $25 \text{ mM}$  MOPS 완충제 pH 8.5 중  $1 \text{ mL}$ 로 회석시켰다. 생성된 리포솜의 크기는  $200 \text{ nm}$  세공 폴리카르보네이트 필터를 통해 샘플 10배를 통과시킴으로써 압출에 의해 균질화하였다. 이어서 생성된 리포솜을 추가의 분석 및 생물검정을 위해 사용하였다.

[0379] 실시예 16: 휴미라에 대한 관용유발 반응은 관절염 동물에서 중화 항-휴미라 반응의 형성을 방지한다

[0380] 물질

[0381] 라파마이신을 TSZ 캠 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및  $0.75 \text{ dL/g}$ 의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앤라배마 주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 7525 DLG 7A)에서 구입하였다. 대략  $5,000 \text{ Da}$ 의 메틸 에테르 종결

PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 엠프로브 ® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지 주 갑스타운 사우스 테모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0382] 방법

[0383] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0384] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe, 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe, 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0385] 수중유 에멀젼을 나노담체를 제조하는데 사용하였다. O/W 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 압력 퓨브 내에서 조합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 혼탁액을 원심분리 퓨브로 옮겨 75,600xg 및 4°C에서 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 혼탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0386] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 전조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
241	11.5

[0387]

[0388] 인간 종양 괴사 인자 알파를 과다발현하는 트랜스제닉 동물 (huTNF α Tg)은 출생시부터 20주의 기간에 걸쳐 진행성 류마티스 관절염이 발생한다. 이러한 과정은 완전 인간 항-인간 TNF α 항체 아달리무맙 또는 휴미라를 사용하는 것에 의해 방지될 수 있다. 그러나, 초기 치료 용량의 휴미라 (60 µg)의 반복 투여는 치료 이익을 중화시키는 항-약물 항체 형성 (ADA)으로 이어진다.

[0389] 연령-매칭 HuTNF α Tg 5주령 암컷 동물에게 염수 (PBS) 또는 60 µg의 휴미라를 매주 또는 휴미라 및 0.87mg의 관용유발 나노입자의 혼합물을 첫번째 7회 주사 (제0일 내지 제42일, 5 내지 11주령)에 이어서 휴미라 단독 (동일한 양)의 10회 매주 주사 (제49일 내지 제107일, 12 내지 20주령) 동안 견갑골하 부위로 s.c. 주사하였다. 프로토콜을 도 14에 제시하였다.

[0390] 도 15의 결과 (좌측 패널)는 상이한 시점에서의 모든 동물의 혈액 중 항체 역가를 제시한다. 대조군 모의-처리된 동물은 예상한 바와 같이 어떠한 역가도 갖지 않은 반면에, 휴미라만을 제공받은 동물에서는 강건한 항-휴미라 항체 반응을 관찰할 수 있었다. 5주령에서 11주령까지 관용유발 나노담체에 의한 처리는 관용유발 처리 없이 휴미라의 10회 주사 후에도 항-휴미라 역가 발생에 대한 완전한 내성으로 이어졌다 (제12주 내지 제20주). 이를 동물의 다리의 모니터링으로, 10주령에 이미 분명한 진행성 질환이 밝혀졌다. 휴미라 단독으로 질환 진행은 유의하게 차단되었지만, 이러한 요법에 대한 관용유발 나노담체의 부가는 관절염성 증상의 출현을 현저하게 차단시켰다. 여기서 스코어는 하기와 같이 평균 총 4개의 독립적인 스코어로 나타내어진다: 1)은 활막염, 관절 삼출액 및 연부 조직 종창을 나타내고 2)는 관절강으로 성장하는 염증발생 활막 조직의 증식 및 연골 파괴를 포함하고 3)은 연골의 광범위한 손실, 관절 변연 주위 미란, 및 변형을 제시하고 4)는 기능적 삶을 끝내는, 관절의 섬유성 또는 골성 강직을 동반하는 거의 말기 질환이다.

[0391] 이들 결과는 본원에 제공된 조성물이 일정 기간에 걸쳐 단백질과 병용 투여되는 경우에 장기간 동안 생물학적 치료에 대한 항체 형성을 감소 또는 방지할 수 있고, 따라서 그의 효능 및 치료 범위를 개선시킬 수 있음을 제시한다. 이들 결과는 또한 휴미라와 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 투여가 바람직하지 않은 항-휴미라 항체 반응을 감소시킬 수 있음을 제시한다. 병용 투여의 이익은 또한 휴미라의 개선된 효능을 입증하는 추가의 감소된 관절염성 스코어에 의해 증명된다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 치료 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소 뿐만 아니라 개선된 효능을 입증한다. 이는 또한, 본원에 제공된 본 발명의 병용 투여에 의하면 보다 높은 용량의 치료가 필요하지 않음을 입증한다. 또한, 동일

한 용량의 휴미라에 의한 관절염성 스코어에서의 감소 수준에 기초하면, 본원에 제공된 바와 같은 면역억제제 용량의 병용 투여의 부재 하에 필요하게 될 휴미라의 양과 비교하여 개선된 효능을 제공할 감소된 양의 휴미라가 또한 사용될 수 있다. 본 실시예에 사용된 휴미라의 양은, 휴미라에 의해 염증의 최대 억제를 달성하기 위해 관련 기술분야에서 사용된 약 200  $\mu\text{g}$ 의 양과 비교하여 훨씬 감소된, 60  $\mu\text{g}$ 이었음을 주목하는 것이 중요하다 (Binder et al., *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 65 (No. 3), March 2013, pp. 608-617). 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.

[0392] 실시예 17: 항-휴미라 면역 반응의 평가

[0393] 물질

[0394] 라파마이신을 TSZ 캠 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185; 제품 코드 R1017)에서 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 서모딕스 파마슈티칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 7525 DLG 7A)에서 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.5 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오케미칼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE)에서 구입하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 갑스타운 사우스 테모크라트 로드 480. 제품 코드 1.41350)에서 구입하였다.

[0395] 방법

[0396] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0397] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 75 mg/mL의 PLGA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-OMe, 및 12.5 mg/mL의 라파마이신. 용액은 PLGA, PLA-PEG-OMe, 및 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0398] 수중유 에멀젼을 나노담체를 제조하는데 사용하였다. O/W 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 압력 휨브 내에서 조합하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액을 함유하는 비커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드가 증발되게 하고 나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 혼탁액을 원심 분리 휨브로 옮겨 75,600xg 및 4°C에서 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 혼탁액을 위해 펠릿을 포스페이트 완충 염수 중에 재현탁시켰다.

[0399] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
238	10.6

[0400]

[0401] 라파마이신-함유 나노담체는 상기 기재된 물질 및 방법을 사용하여 생성하였다. 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
241	11.5

[0402]

[0403] 관절염성 동물에서 항-휴미라 면역 및 중화 반응을 평가하였다. 인간 종양 피사 인자 알파를 과다발현하는 트랜스제닉 동물 (huTNF  $\alpha$  Tg)은 출생시부터 20주의 기간에 걸쳐 진행성 류마티스 관절염이 발생한다. 이러한 과정은 완전 인간 항-인간 TNF  $\alpha$  항체 아달리무맙 또는 휴미라를 사용하는 것에 의해 방지될 수 있다. 그러나, 초기 치료 용량의 휴미라 (60  $\mu\text{g}$ )의 반복 투여는 치료 이익을 중화시키는 항-약물 항체 형성 (ADA)으로 이어진다. 보다 높은 양의 휴미라 (200  $\mu\text{g}$ )를 주사하여 이러한 길항 면역 반응을 극복하고 휴미라의 치료 효과를 허용할 수 있다.

[0404] 연령-매칭 HuTNF  $\alpha$  Tg 5주령 암컷 동물에게 염수 (PBS) 또는 60  $\mu\text{g}$  또는 200  $\mu\text{g}$ 의 휴미라를 매주 (제5주-제10주) 또는 60  $\mu\text{g}$ 의 휴미라 및 0.87mg의 관용유발 나노입자의 혼합물을 첫번째 3회 주사 (5 내지 7주령)에 이어서 휴

미라 단독 (동일한 양)의 3회 매주 주사 (8 내지 10주령) 동안 견갑골하 부위로 s.c. 주사하였다. 도 17의 결과 (좌측 패널)는 상이한 시점에서의 모든 동물의 혈액 중 항체 역가를 제시한다. 대조군 모의-처리된 동물은 예상한 바와 같이 어떠한 역가도 갖지 않은 반면에, 휴미라만을 제공받은 동물에서는 강건한 항-휴미라 항체 반응을 관찰할 수 있었다. 5주령에서 7주령까지 나노담체에 의한 처리는 처리 없이 휴미라의 3회 주사 후에도 항-휴미라 역가 발생에 대한 완전한 내성으로 이어졌다 (제8주 내지 제10주). 주목할 것은, 휴미라의 3회 주사가 대조군 동물에 대해 매우 높은 역가로 이어지는 반면에 (제7주 역가), 나노담체로 처리된 동물에서의 3회의 유사한 주사 (총 6회 동안)는 역가 발생에 완전히 내성이었다 (제10주). 도 16은 투약 요법을 예시한다.

[0405] 이들 동물의 다리의 모니터링으로, 6주령에 이미 분명한 진행성 질환이 밝혀졌다. 휴미라 단독으로 질환 진행은 유의하게 차단되었지만, 이러한 요법에 대한 나노담체의 부가는 관절염성 증상의 출현을 현저하게 차단시켰다. 스코어 (도 17 (우측 패널))는 하기와 같이 평균 총 4개의 독립적인 스코어로 나타내어진다: 1)은 활막염, 관절 삼출액 및 연부 조직 종창을 나타내고 2)는 관절강으로 성장하는 염증발생 활막 조직의 증식 및 연골 파괴를 포함하고 3)은 연골의 광범위한 손실, 관절 변연 주위 미란, 및 변형을 제시하고 4)는 기능적 삶을 끝내는, 관절의 섬유성 또는 골성 강직을 동반하는 거의 말기 질환이다.

[0406] 이들 결과는 본원에 제공된 방법 및 조성물이 치료 단백질에 대한 항체 형성을 감소 또는 방지할 수 있고 그의 효능을 개선시킬 수 있음을 제시한다. 구체적으로, 상기와 같이 이들 결과는 휴미라와 함께 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 투여가 바람직하지 않은 항-휴미라 항체 반응을 감소시킬 수 있음을 제시한다. 병용 투여의 이익은 또한 휴미라의 개선된 효능을 입증하는 추가의 감소된 관절염성 스코어에 의해 증명된다. 이는 합성 나노담체에 부착된 면역억제제의 병용 투여에 의한 치료 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소 뿐만 아니라 개선된 효능을 입증한다. 이는 또한, 본원에 제공된 본 발명의 병용 투여에 의하면 보다 높은 용량의 치료가 필요하지 않음을 입증한다. 또한, 동일한 용량의 휴미라에 의한 관절염성 스코어에서의 감소 수준에 기초하면, 본원에 제공된 바와 같은 면역억제제 용량의 병용 투여의 부재 하에 필요하게 될 휴미라의 양과 비교하여 개선된 효능을 제공할 감소된 양의 휴미라가 또한 사용될 수 있다. 본 실시예에 사용된 휴미라의 양은, 휴미라에 의해 염증의 최대 억제를 달성하기 위해 관련 기술분야에서 사용된 약 200 µg의 양과 비교하여 훨씬 감소된, 60 µg이었음을 주목하는 것이 중요하다 (Binder et al., *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 65 (No. 3), March 2013, pp. 608-617). 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.

[0407] 실시예 18: 캡슐화된 라파마이신에 의한 닦 오브알부민에 대한 항원-특이적 관용유발 반응

[0408] NP[Rapa] 물질 및 방법

[0409] 물질

[0410] 라파마이신은 TSZ 캠 (01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월슨 스트리트 185)에서, 제품 코드 R1017로 구입하였다. 1:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 레이크쇼어 바이오머티리얼스(Lakeshore Biomaterials) (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 5050 DLG 2.5A로 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.50 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-Ome 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오머티어리얼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE로 구입하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480)에서, 제품 코드 1.41350으로 구입하였다. 셀그로(Cellegro) 포스페이트 완충 염수 1X (PBS 1X)는 코닝(Corning) (20109 베지니아주 마나사스 디스커버리 불러바드 9345)에서, 제품 코드 21-040-CV로 구입하였다.

[0411] 방법

[0412] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0413] 용액 1: 중합체 및 라파마이신 혼합물을 1 mL당 75 mg의 PLGA, 1 mL당 25 mg의 PLA-PEG-Ome, 및 1 mL당 12.5 mg의 라파마이신을 디클로로메탄 중에 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 폴리비닐 알콜은 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중 50 mg/mL로 제조하였다.

[0414] O/W 에멀젼은 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 소형 유리 압력 퓨브 내에서 조합하고 브랜슨 디지털 소니 파이어 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 제조하였다. O/W 에멀젼을 70 mM pH 8 포스페이트 완충제 용액 (60 mL)을 함유하는 개방 비커에 첨가하였다. 3개의 추가의, 동일한 O/W 에멀젼을 제조하고, 제1과 동일한 비커에 첨가하였다. 이어서 이를 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고

나노담체가 형성되게 하였다. 나노담체 혼탁액을 원심분리 투브로 옮겨 75,600xg 및 4°C에서 35분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 혼탁액을 달성하였다. 동일한 제제를 개별 비커에서 상기와 같이 제조하고, 세척 단계 후에 제1과 조합하였다. 이어서 혼합된 나노담체 용액을 폴(Pall) 파트 번호 4656으로부터의 1.2 μm PES 막 시린지 필터를 사용하여 여과하고, -20°C에서 보관하였다.

[0415] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
220	11.85

[0416]

[0417] NP[OVA] 물질 및 방법

[0418] 물질

[0419] 오브알부민 단백질을 워딩톤 바이오케미칼 코포레이션(Worthington Biochemical Corporation) (08701 뉴저지주 레이크우드 바사르 애비뉴 730)에서, 제품 코드 LS003054로 구입하였다. 54% 락티드 및 46% 글리콜리드 함량 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 레이크쇼어 바이오머티리얼스 (35211 엘라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 5050 DLG 2.5A로 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 28,000 Da의 Mw, 0.38 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLA-PEG 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오머티리얼스 (35211 엘라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 100 DL mPEG 5000 4CE로 구입하였다. 85-89% 가수분해된, 점도 3.4-4.6 mPa · s의 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP는 EMD 케미칼스 인크. (08027 뉴저지주 갑스타운 사우스 데모크라트 로드 480)에서, 제품 코드 1.41350.1001로 구입하였다. 셀그로 포스페이트 완충 염수 1X (PBS 1X)는 코닝 (20109 버지니아주 마나사스 디스커버리 불러바드 9345)에서, 제품 코드 21-040-CV로 구입하였다.

[0420] 방법

[0421] 용액은 다음과 같이 제조하였다:

[0422] 용액 1: 50 mg/mL의 오브알부민 단백질은 10 중량% 수크로스를 함유하는 10mM 포스페이트 완충제 pH 8 중에서 제조하였다. 용액 2: PLGA는 화학 흡 후드 내에서 PLGA를 디클로로메탄 1 mL당 100 mg으로 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 3: PLA-PEG-OMe는 화학 흡 후드 내에서 PLA-PEG-OMe를 디클로로메탄 1 mL당 100 mg으로 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 4: 100mM 포스페이트 완충제, pH 8 중 65 mg/mL의 폴리비닐 알콜.

[0423] 먼저 1차 (W1/0) 에멀젼은 용액 1 내지 3을 혼합하여 생성하였다. 용액 1 (0.2 mL), 용액 2 (0.75 mL), 및 용액 3 (0.25mL)을 빙수조 내에서 >4분 사전-냉각시킨 소형 유리 압력 투브 내에서 조합하고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 빙조에 대해 40초 동안 50% 진폭에서 초음파처리하였다. 이어서 2차 (W1/0/W2) 에멀젼은 용액 4 (3 mL)를 1차 에멀젼에 첨가하고, 볼텍스 혼합하여 유백색 혼탁액을 생성한 다음, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 빙조에 대해 60초 동안 30% 진폭에서 초음파처리하여 형성하였다. 2차 에멀젼을 PBS 1X (30 mL)를 함유하는 개방 50 mL 비커에 첨가하였다. 제2 동일한 이중 에멀젼 제제를 상기 기재된 바와 같이 제조하고, 제1과 동일한 50 mL 비커에 첨가하였다. 2개의 제제를 실온에서 2시간 동안 교반하여, 디클로로메탄이 증발되게 하고 나노담체가 혼탁액 중에 형성되게 하였다. 나노담체 혼탁액을 원심분리 투브로 옮겨 75,600 rcf에서 50분 동안 회전시키고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 혼탁된 나노담체 부분을 세척하였다. 이러한 세척 절차를 반복한 다음, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 혼탁액을 달성하였다. 혼탁액을 사용 시까지 -20°C에서 동결 보관하였다.

유효 직경 (nm)	오브알부민 함량 (% w/w)
164	5.81

[0424]

[0425] NP[GSK1059615] 물질 및 방법

- [0426] 물질
- [0427] GSK1059615는 메드켐 익스프레스(MedChem Express) (08852 뉴저지주 스위트 102D 몬마우스 정션 디어 파크 드 라이브 11)에서, 제품 코드 HY-12036으로 구입하였다. 1:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA는 레이크쇼어 바이오머티리얼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 5050 DLG 2.5A로 구입하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.26 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오머티어리얼스 (35211 앤라배마주 베밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5K-E)에서 구입하였다. 셀그로 포스페이트 완충 염수 1X pH 7.4 (PBS 1X)는 코닝 (20109 베지니아주 마나사스 디스커버리 블러바드 9345)에서, 제품 코드 21-040-CV로 구입하였다.
- [0428] 방법
- [0429] 용액은 다음과 같이 제조하였다:
- [0430] 용액 1: PLGA (125 mg) 및 PLA-PEG-OMe (125 mg)를 아세톤 10 mL 중에 용해시켰다. 용액 2: GSK1059615는 N-메틸-2-페롤리디논 (NMP) 1 mL 중 10 mg으로 제조하였다.
- [0431] 나노담체는 용액 1 (4 mL) 및 용액 2 (0.25 mL)를 소형 유리 압력 투브 내에서 조합하고, 혼합물을 20 mL의 초-순수를 함유하는 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반 하에 적가하여 제조하였다. 플라스크를 회전 증발 장치 상에 장착하고, 김압 하에 아세톤을 제거하였다. 나노담체 혼탁액을 원심분리 투브로 옮겨 75,600 rcf 및 4°C에서 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 나노담체 부분을 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 펠릿을 PBS 1X 중에 재현탁시켜 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 혼탁액을 달성하였다. 이어서 세척된 나노담체 용액을 폴, 파트 번호 4656으로부터의 1.2 μm PES 막 시린지 필터를 사용하여 여과하였다. 동일한 나노담체 용액을 상기와 같이 제조하고, 여과 단계 후에 제1과 풀링하였다. 균질한 혼탁액을 -20°C에서 동결 보관하였다.
- [0432] 나노담체 크기는 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 GSK1059615의 양은 351nm에서 UV 흡수에 의해 결정하였다. 혼탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.
- | 유효 직경<br>(nm) | GSK1059615 함량<br>(% w/w) |
|---------------|--------------------------|
| 143           | 1.02                     |
- [0433]
- [0434] C57BL/6 연령-매칭 (5-6주) 암컷 마우스에게 제-21일 및 제-14일에 염수 (비처리), 1.2mg의 라파마이신-함유 나노담체 (NP[Rapa]) 또는 8mg의 GSK1059615-로딩된 나노담체 (NP[GSK1059615])와 조합된 1.1mg의 전체 오브알부민-로딩된 나노담체 (NP[OVA])를 꼬리 정맥으로 i.v. 주사하였다.
- [0435] 제0일에 모든 동물에게 뒷다리로 2 μg의 CpG와 혼합된 25 μg의 미립자 OVA (pOVA)를 s.c. 주사한 다음, 제7일 및 제14일에 25 μg pOVA만을 주사하였다. 제21일에 항체 역가를 측정하였다. 임의의 처리의 부재 하에, 동물은 항-OVA IgG 항체 역가에 의해 측정될 수 있는 OVA에 대한 강건한 면역 반응을 발생시켰다. 도 18에 제시된 제21일의 항체 역가는 동일한 용액으로 캡슐화된 OVA와 병용 투여된 2회 용량의 합성 관용유발 나노담체 (NP[OVA]+NP[Rapa] 또는 NP[GSK1059615])가 OVA+CpG의 1회 주사 및 OVA 단독의 2회 주사 후에도 OVA에 대한 항체 형성을 감소시키는데 효과적임을 입증하였다.
- [0436] 이들 결과는 캡슐화된 면역억제제 (예컨대 라파마이신 및 GSK1059615)가 단백질과 병용 전달되는 경우에, 다중 철린지 및 기간 동안 그 단백질에 대한 항체 형성을 방지할 수 있음을 제시한다. 이는 뿐만 아니라 2종의 상이한 종류의 면역억제제의 병용 투여에 의한 단백질에 대한 바람직하지 않은 면역 반응의 감소를 입증한다. 마지막으로, 상기 결과는 프로토콜이 본원에 제공된 바와 같이 확립되었음을 지지한다.
- [0437] 실시예 19: 감소된 약역학적 유효 용량을 사용한 본 발명의 방법 (예측)
- [0438] 일련의 임상 시험을 위해 류마티스 관절염을 앓고 있는 3200명의 인간 대상체를 동원하였다. 파일럿 용량 범위 설정 시험에서, 1,200명의 대상체를 4개의 아암으로 나누었다 (위약 및 실시예 3의 합성 나노담체의 3종의 상이한 용량 수준). 각각의 4개의 아암의 각각의 대상체에게 위약 또는 합성 나노담체와 병용하여 2라운드의 휴미라 40 mg을 s.c.로 제공하였다. 아암에서 항-휴미라 항체의 평균 수준을 최대로 감소시키는 합성 나노담체 용량을 시험을 위한 "면역억제제 용량"인 것으로 선언하였다.

[0439]

또 다른 파일럿 시험에서, 동원된 인간 대상체를 각각 500명의 대상체의 4개의 시험 아암으로 나누었다. 위약, 휴미라, 및 실시예 3의 합성 나노담체를 하기 표에 따라 병용 투여하였고 (시험 아암 1 제외), 합성 나노담체는 면역억제제 용량으로 투여되었다.

시험 아암 번호	휴미라 용량	NC 투여 (sc)
1	40 mg sc	-
2	40 mg sc	+
3	20 mg sc	+
4	10 mg sc	+
5	위약	위약

[0440]

표적 약역학적 효과 ("PD 효과")를 평가하였고, 이 경우에 이는 각각의 시험 아암에서 대상체에 대한 ACR 20, 50 및 70 반응의 평균이다. 시험 아암 1에서 대상체에 대한 PD 효과가 주목되었고, 시험 아암 1에서의 휴미라 용량을 임의적으로 휴미라의 약역학적 유효 용량 ("PD 유효 용량")으로서 정의하였다.

[0442]

이어서 시험 아암 2-4에 대한 PD 효과를 평가하고, PD 효과가 시험 아암 1 PD 효과와 유의하게 상이하지 않은 최저 용량을 휴미라의 감소된 약역학적 유효 용량인 것으로 선언하였다.

[0443]

파일럿 시험 동안 확립된 정보의 적용에서, 휴미라의 감소된 약역학적 유효 용량을 류마티스 관절염으로 진단되고 휴미라에 대한 항체를 발생시킬 위험이 있는 대상체에게 면역억제제 용량 (실시예 3의 합성 나노담체 함유)과 병용 투여하였다. 추가 실시양태에서, 파일럿 시험 동안 확립된 정보를 사용한 프로토콜을 제조하여, 류마티스 관절염으로 진단되고 휴미라에 대한 항체를 갖거나 가질 것으로 예상되는 인간 대상체에 대한 휴미라™ 및 실시예 3의 합성 나노담체의 병용 투약을 안내하였다. 이어서 이러한 프로토콜을 사용하여 인간 대상체에 대한 감소된 약역학적 유효 용량의 휴미라, 및 실시예 3의 합성 나노담체의 병용 투여를 안내하였다.

[0444]

실시예 20: 증진된 약역학적 효과를 입증하는 본 발명의 방법 (예측)

[0445]

일련의 임상 시험을 위해 류마티스 관절염을 앓고 있는 3700명의 인간 대상체를 동원하였다. 파일럿 용량 범위 설정 시험에서, 1,200명의 대상체를 4개의 아암으로 나누었다 (위약 및 실시예 3의 합성 나노담체의 3종의 상이한 용량 수준). 각각의 4개의 아암의 각각의 대상체에게 위약 또는 합성 나노담체와 병용하여 2라운드의 휴미라 40 mg을 s.c.로 제공하였다. 아암에서 항-휴미라 항체의 평균 수준을 최대로 감소시키는 합성 나노담체 용량을 시험을 위한 "면역억제제 용량"인 것으로 선언하였다.

[0446]

또 다른 파일럿 시험에서 동원된 인간 대상체를, 2개는 각각 1000명의 대상체가 속한 활성 시험 아암이고, 1개는 500명의 대상체가 속한 위약 아암인 3개의 시험 아암으로 나누었다. 위약, 휴미라, 및 실시예 3의 합성 나노담체를 하기 표에 따라 병용 투여하였고 (시험 아암 1 제외), 합성 나노담체는 면역억제제 용량으로 투여되었다.

시험 아암 번호	휴미라 용량	NC 투여 (sc)
1	40 mg sc	-
2	40 mg sc	+
3	위약	위약

[0447]

표적 약역학적 효과 ("PD 효과")를 평가하였고, 이 경우에 이는 각각의 시험 아암에서 대상체에 대한 ACR 20, 50 및 70 반응의 평균이다. 시험 아암 1에서 대상체에 대한 PD 효과가 주목되었고, 시험 아암 2에서의 PD 효과와 비교하였다. 시험 아암 2에서 면역억제제 용량과 병용 투여 시 휴미라의 약역학적 효과의 임의의 증진이 주목되었고, 시험 아암 1에서 관찰된 PD 효과와 비교하였다.

[0449]

파일럿 시험 동안 확립된 정보의 적용에서, 휴미라의 표준 40 mg 용량을 류마티스 관절염으로 진단되고 휴미라에 대한 항체를 발생시킬 위험이 있는 대상체에게 면역억제제 용량 (실시예 3의 합성 나노담체 함유)과 병용 투여하였다. 추가 실시양태에서, 파일럿 시험 동안 확립된 정보를 사용한 프로토콜을 제조하여, 류마티스 관절염으로 진단되고 휴미라에 대한 항체를 갖거나 가질 것으로 예상되는 인간 대상체에 대한 휴미라 및 실시예 3의 합성 나노담체의 병용 투약을 안내하였다. 이어서 이러한 프로토콜을 사용하여 인간 대상체에 대한 휴미라, 및 실시예 3의 합성 나노담체의 병용 투여를 안내하였다. 병용 투여 후의 임의의 증진된

약역학적 효과를 본원에 개시된 접근법을 사용하여 기록하였다.

[0450] 실시예 21: 증진된 약역학적 효과를 입증하는 본 발명의 방법 (예측)

[0451] 일련의 임상 시험을 위해 화학요법-관련 빈혈을 앓고 있는 3200명의 인간 대상체를 동원하였다. 파일럿 용량 범위설정 시험에서, 에리트로포이에틴을 코딩하는 변형된 mRNA를 미국 특허 출원 2013/0115272 (de Fougerolles et al.)에 따라 제조하였다 ("mmRNA"). 1200명의 대상체를 4개의 아암으로 나누었다 (위약 및 실시예 3의 합성 나노담체의 3종의 상이한 용량 수준). 각각의 4개의 아암의 각각의 대상체에게 위약 또는 합성 나노담체와 병용하여 치료 용량의 mmRNA를 제공하였다. 아암에서 항-mmRNA 항체의 평균 수준을 최대로 감소시키는 합성 나노담체 용량을 시험을 위한 "면역억제제 용량"인 것으로 선언하였다.

[0452] 또 다른 파일럿 시험에서, 동원된 인간 대상체를 각각 500명의 대상체의 4개의 시험 아암으로 나누었다. 위약, mmRNA, 및 실시예 3의 합성 나노담체를 하기 표에 따라 병용 투여하였고 (시험 아암 1 제외), 합성 나노담체는 면역억제제 용량으로 투여되었다.

시험 아암 번호	mmRNA 용량	NC 투여 (sc)
1	치료 용량 sc	-
2	치료 용량 sc	+
3	½ 치료 용량 sc	+
4	¼ 치료 용량 sc	+
5	위약	위약

[0453]

[0454] 표적 약역학적 효과 ("PD 효과")를 평가하였고, 이 경우에 이는 각각의 시험 아암에서 대상체에 대한 화학요법-유발 빈혈 반응의 평균이다. 시험 아암 1에서 대상체에 대한 PD 효과가 주목되었고, 시험 아암 1에서의 mmRNA 용량을 임의적으로 mmRNA의 약역학적 유효 용량 ("PD 유효 용량")으로서 정의하였다.

[0455] 이어서 시험 아암 2-4에 대한 PD 효과를 평가하고, PD 효과가 시험 아암 1 PD 효과와 유의하게 상이하지 않은 최저 용량을 mmRNA의 감소된 약역학적 유효 용량인 것으로 선언하였다. 파일럿 시험 동안 확립된 정보의 적용에서, mmRNA의 감소된 약역학적 유효 용량을 화학요법-관련 빈혈로 진단되고 mmRNA에 대한 항체를 발생시킬 위험이 있는 대상체에게 면역억제제 용량 (실시예 3의 합성 나노담체 함유)과 병용 투여하였다.

[0456] 추가 실시양태에서, 파일럿 시험 동안 확립된 정보를 사용한 프로토콜을 제조하여, 화학요법-관련 빈혈로 진단되고 mmRNA에 대한 항체를 갖는 것으로 공지되어 있거나 그러한 것으로 여겨지는 인간 대상체에 대한 mmRNA 및 실시예 3의 합성 나노담체의 병용 투약을 안내하였다. 이어서 이러한 프로토콜을 사용하여 인간 대상체에 대한 감소된 약역학적 유효 용량의 mmRNA, 및 실시예 3의 합성 나노담체의 병용 투여를 안내하였다.

[0457] 실시예 22: 다중투약 기간 동안 생물제제 약물의 효능을 유지시키는 방법

[0458] 생물제제 약물은 종종 다중 용량 후에 시간의 경과에 따라 활성을 잃는다. 효능 상실의 흔한 원인은 ADA의 형성이다. ADA는, 예를 들어 1) 약물의 클리어런스를 증진시켜 다중 용량 후의 약물의 PK가 단일 용량 후의 약물의 PK보다 실질적으로 낮게 함으로써 또는 2) 약물의 활성을 중화시켜 다중 용량 후의 약물의 생물학적 활성이 단일 용량 후의 생물학적 활성보다 실질적으로 낮게 함으로써 약물 효능의 상실을 유발할 수 있다. 다중 투약 과정에 걸쳐 생물학적 약물의 활성을 유지시키는 것이 바람직할 것이다.

[0459] 인간 TNF-α를 발현하는 트랜스제닉 마우스는 5-20주령의 기간에 걸쳐 관절염이 자발적으로 발생한다. 마우스를, 제5주-제11주부터 실시예 16으로부터의 합성 나노담체의 존재 또는 부재 하에 휴미라로 매주 처리하였다 (60 µg/주사). 패널 B (도 19)는 제1 용량 (제1일) 후의 휴미라의 혈청 수준을 제시한다. 휴미라의 6회 용량 후에, 휴미라의 혈액 수준은 휴미라 단독으로 처리된 마우스에서의 기준선에 근접하였고, 제20주까지 낮게 유지되었다 (패널 C, 도 19, 흑색 사각형). 대조적으로, 휴미라 및 합성 나노담체로 처리된 마우스는 제1 용량 후의 수준과 유사한 휴미라의 혈청 수준을 제시하였고 (패널 C, 도 19, 청색 삼각형), 이는 합성 나노담체 처리가 휴미라의 유효 혈액 수준을 다중 투약 후에도 유지시킬 수 있음을 나타낸다.

[0460] 휴미라 단독으로 처리된 마우스에서 혈청 휴미라 혈액 수준의 감소는 ADA의 발생으로 인한 것일 수 있다. 제11주쯤, 휴미라 단독으로 처리된 마우스는 높은 역가의 항-약물 항체를 발생시켰다 (패널 A, 도 19, 흑색 사각형 기호). 대조적으로 합성 나노담체로 처리된 마우스는 항-휴미라 항체 반응을 거의 또는 전혀 제시하지 않았다 (패널 A, 도 19, 청색 삼각형). 다중 투약에 의한 휴미라 혈청 수준의 감소의 영향은 상기 실시예 16에서와 같

은 관절염 질환 스코어에서 분명하다 (패널 D, 도 19). 휴미라 단독으로 처리된 마우스는 제10주-제20주에 관절염 스코어의 준최적 감쇠를 제시한다 (패널 D, 도 19, 흑색 사각형 및 흑색 원형 비교). 대조적으로, 합성 나노담체로 처리된 마우스는 관절염의 강력한 억제를 제시하였다 (패널 C, 도 19, 청색 삼각형).

[0461] 이들 결과는 다중 투약에 의한 약물 수준의 유지가 약물 효능을 위해 중요하고, 합성 나노담체에 부착된 면역억제제는 ADA 반응을 억제함으로써 다중 투약에 의한 약물 수준을 유지시킴을 나타낸다. 따라서, 이들 결과는 본원에 제공된 바와 같은 면역억제제와 병용하여 치료 거대분자의 반복적 투약의 이익을 입증한다. 상기 결과는 추가로, 대상체에서 목적하는 치료 효과 및/또는 감소된 ADA 반응을 달성할 수 있는 프로토콜을 결정하는 능력을 입증한다.

[0462] 실시예 23: 증진된 약역학적 효과를 입증하는 본 발명의 방법 (예측)

[0463] 일련의 임상 시험을 위해 류마티스 관절염을 앓고 있는 3700명의 인간 대상체를 동원하였다. 파일럿 용량 범위 설정 시험에서, 1,200명의 대상체를 4개의 아암으로 나누었다 (위약 및 나노결정질 라파마이신의 3종의 상이한 용량 수준). 각각의 4개의 아암의 각각의 대상체에게 위약 또는 나노결정질 라파마이신과 병용하여 2라운드의 휴미라 40 mg을 s.c.로 제공하였다. 아암에서 항-휴미라 항체의 평균 수준을 최대로 감소시키는 나노결정질 라파마이신 용량을 시험을 위한 "면역억제제 용량"인 것으로 선언하였다.

[0464] 또 다른 파일럿 시험에서 동원된 인간 대상체를, 2개는 각각 1000명의 대상체가 속한 활성 시험 아암이고, 1개는 500명의 대상체가 속한 위약 아암인 3개의 시험 아암으로 나누었다. 위약, 휴미라, 및 나노결정질 라파마이신을 하기 표에 따라 병용 투여하였고 (시험 아암 1 제외), 합성 나노담체는 면역억제제 용량으로 투여되었다.

시험 아암 번호	휴미라 용량	면역억제제 용량 (sc)
1	40 mg sc	-
2	40 mg sc	+
3	위약	위약

[0465]

[0466] 표적 약역학적 효과 ("PD 효과")를 평가하였고, 이 경우에 이는 각각의 시험 아암에서 대상체에 대한 ACR 20, 50 및 70 반응의 평균이다. 시험 아암 1에서 대상체에 대한 PD 효과가 주목되었고, 시험 아암 2에서의 PD 효과와 비교하였다. 시험 아암 2에서 면역억제제 용량과 병용 투여 시 휴미라의 약역학적 효과의 임의의 증진이 주목되었고, 시험 아암 1에서 관찰된 PD 효과와 비교하였다.

[0467] 파일럿 시험 동안 확립된 정보의 적용에서, 휴미라의 표준 40 mg 용량을 류마티스 관절염으로 진단되고 휴미라에 대한 항체를 발생시킬 위험이 있는 대상체에게 면역억제제 용량 (나노결정질 라파마이신 함유)과 병용 투여하였다. 추가 실시양태에서, 파일럿 시험 동안 확립된 정보를 사용한 프로토콜을 제조하여, 류마티스 관절염으로 진단되고 휴미라에 대한 항체를 갖는 것으로 공지되어 있거나 그러한 것으로 여겨지는 인간 대상체에 대한 휴미라 및 나노결정질 라파마이신의 병용 투약을 안내하였다. 이어서 이러한 프로토콜을 사용하여 인간 대상체에 대한 휴미라 및 나노결정질 라파마이신의 병용 투여를 안내하였다. 병용 투여 후의 임의의 증진된 약역학적 효과를 본원에 개시된 접근법을 사용하여 기록하였다.

[0468] 실시예 24: 증진된 약역학적 효과를 입증하는 본 발명의 방법 (예측)

[0469] 일련의 임상 시험을 위해 화학요법-관련 빈혈을 앓고 있는 3200명의 인간 대상체를 동원하였다. 파일럿 용량 범위 설정 시험에서, 에리트로포이에틴을 코딩하는 변형된 mRNA를 미국 특허 출원 2013/0115272 (de Fougerolles et al.)에 따라 제조하였다 ("mmRNA"). 1200명의 대상체를 4개의 아암으로 나누었다 (위약 및 나노결정질 라파마이신의 3종의 상이한 용량 수준). 각각의 4개의 아암의 각각의 대상체에게 위약 또는 나노결정질 라파마이신과 병용하여 치료 용량의 mmRNA를 제공하였다. 아암에서 항-mmRNA 항체의 평균 수준을 최대로 감소시키는 나노결정질 라파마이신 용량을 시험을 위한 "면역억제제 용량"인 것으로 선언하였다.

[0470] 또 다른 파일럿 시험에서, 동원된 인간 대상체를 각각 500명의 대상체의 4개의 시험 아암으로 나누었다. 위약, mmRNA, 및 실시예 3의 합성 나노담체를 하기 표에 따라 병용 투여하였고 (시험 아암 1 제외), 나노결정질 라파마이신은 면역억제제 용량으로 투여되었다.

시험 아암 번호	mmRNA 용량	나노결정질 라파마이신 (sc)
1	치료 용량 sc	-
2	치료 용량 sc	+
3	½ 치료 용량 sc	+
4	¼ 치료 용량 sc	+
5	위약	위약

[0471]

[0472] 표적 약역학적 효과 ("PD 효과")를 평가하였고, 이 경우에 이는 각각의 시험 아암에서 대상체에 대한 화학요법-유발 빈혈 반응의 평균이다. 시험 아암 1에서 대상체에 대한 PD 효과가 주목되었고, 시험 아암 1에서의 mmRNA 용량을 임의적으로 mmRNA의 약역학적 유효 용량 ("PD 유효 용량")으로서 정의하였다.

[0473]

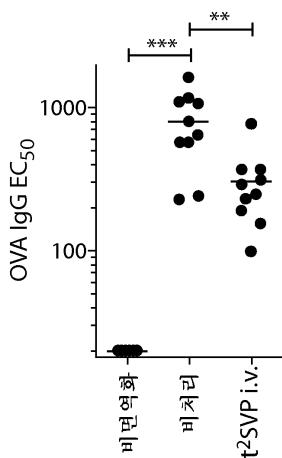
이어서 시험 아암 2-4에 대한 PD 효과를 평가하고, PD 효과가 시험 아암 1 PD 효과와 유의하게 상이하지 않은 최저 용량을 mmRNA의 감소된 약역학적 유효 용량인 것으로 선언하였다. 파일럿 시험 동안 확립된 정보의 적용에서, mmRNA의 감소된 약역학적 유효 용량을 화학요법-관련 빈혈로 진단되고 mmRNA에 대한 항체를 발생시킬 위험이 있는 대상체에게 면역억제제 용량 (나노결정질 라파마이신 함유)과 병용 투여하였다.

[0474]

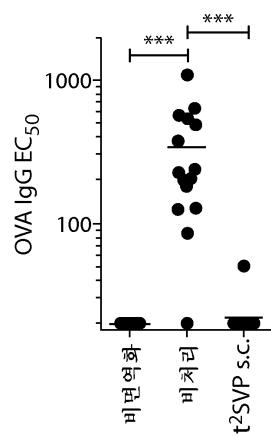
추가 실시양태에서, 파일럿 시험 동안 확립된 정보를 사용한 프로토콜을 제조하여, 화학요법-관련 빈혈로 진단되고 mmRNA에 대한 항체를 갖는 것으로 공지되어 있거나 그러한 것으로 여겨지는 인간 대상체에 대한 mmRNA 및 나노결정질 라파마이신의 병용 투약을 안내하였다. 이어서 이러한 프로토콜을 사용하여 인간 대상체에 대한 감소된 약역학적 유효 용량의 mmRNA 및 나노결정질 라파마이신의 병용 투여를 안내하였다.

## 도면

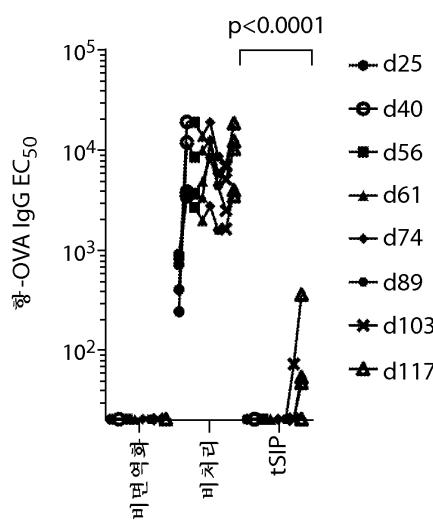
### 도면1



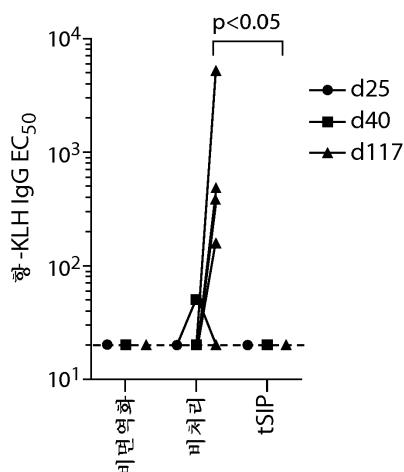
## 도면2



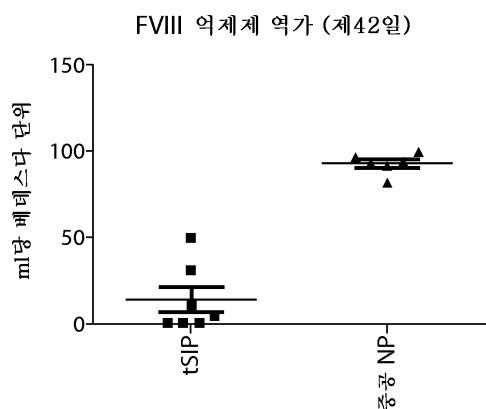
## 도면3



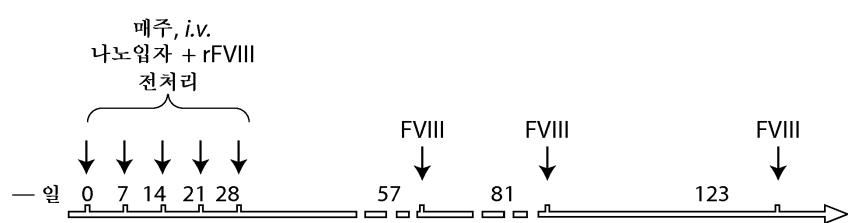
## 도면4



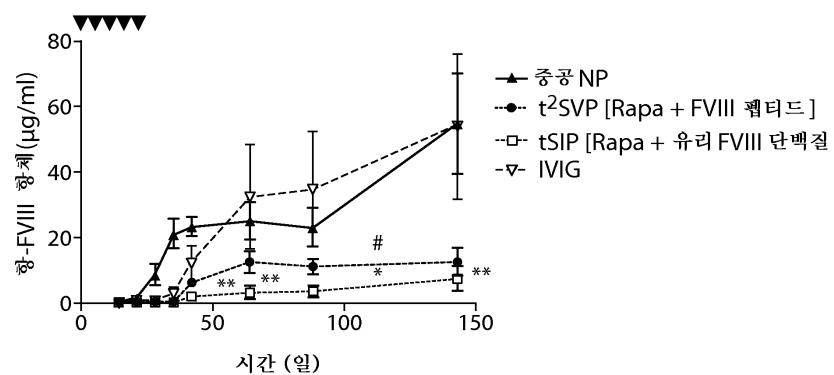
## 도면5



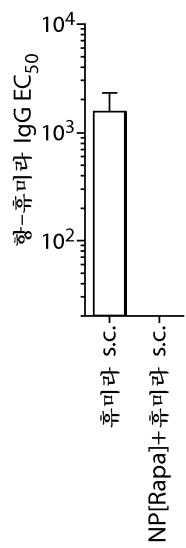
## 도면6a



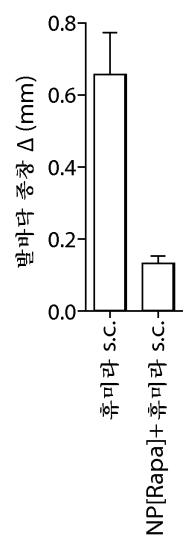
## 도면6b



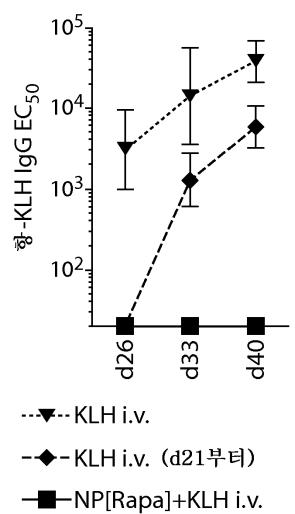
도면7a



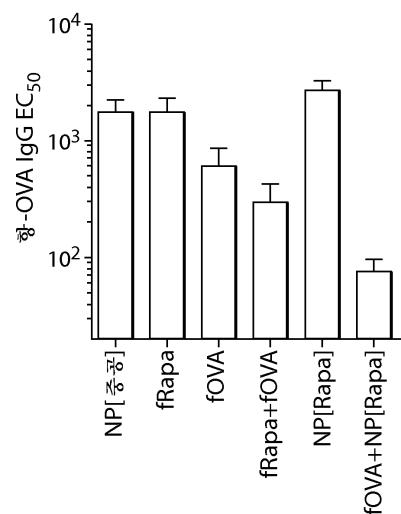
도면7b



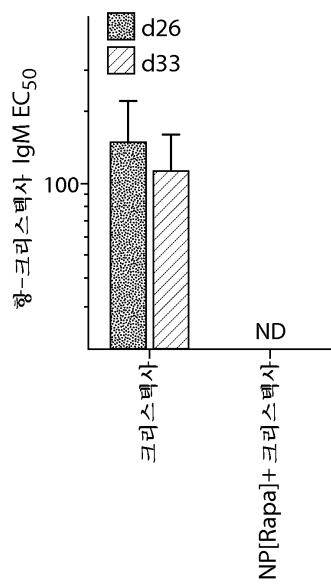
도면8



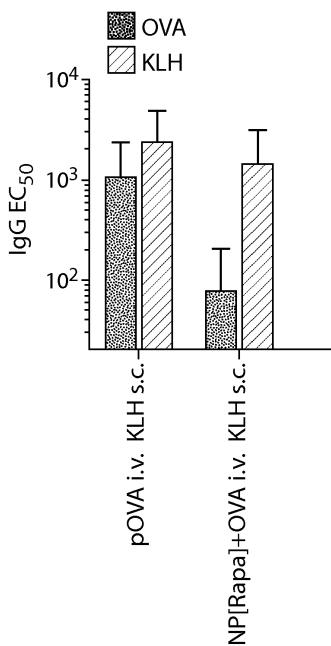
도면9



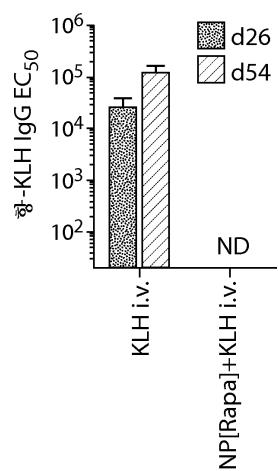
도면10



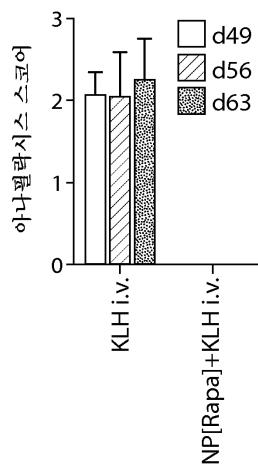
도면11



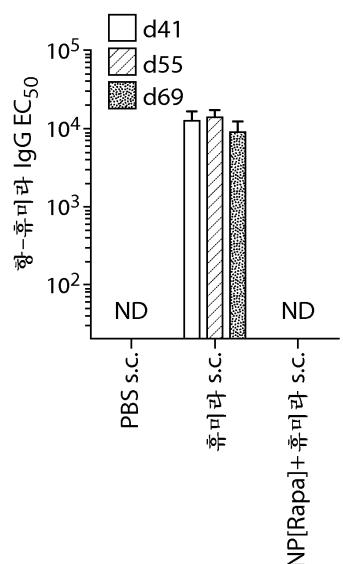
도면 12a



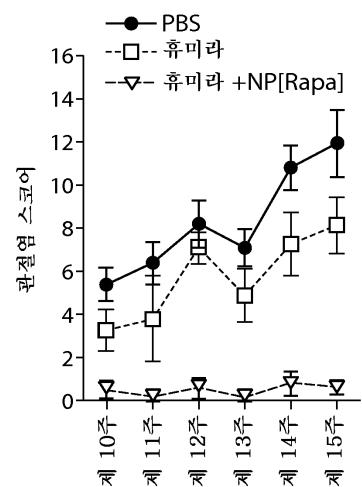
도면 12b



도면 13a



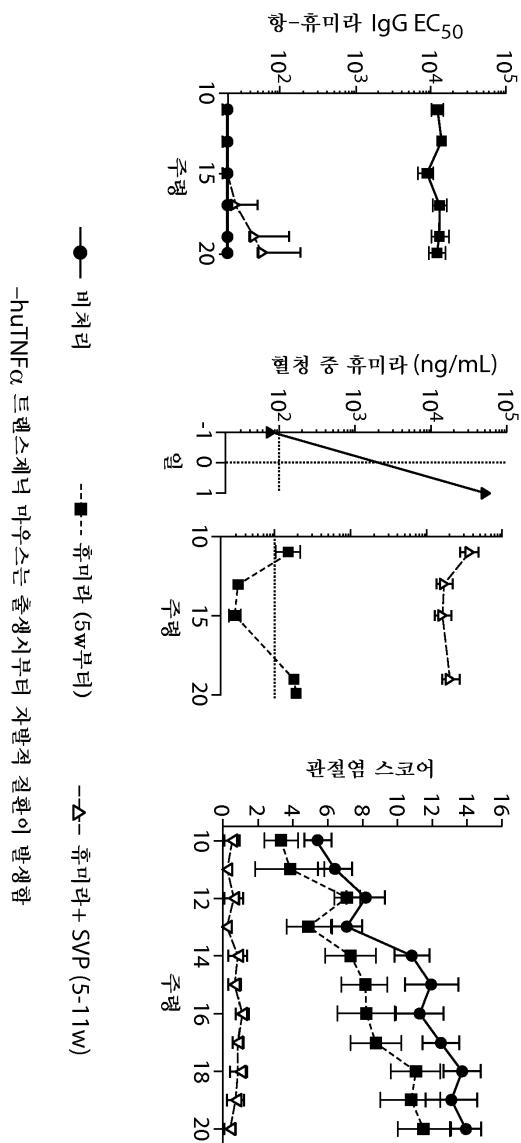
도면13b



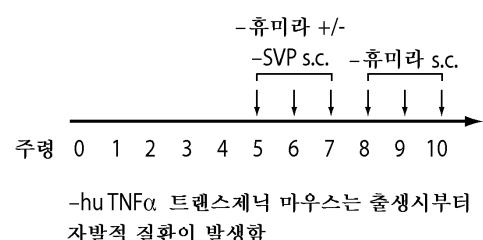
도면14



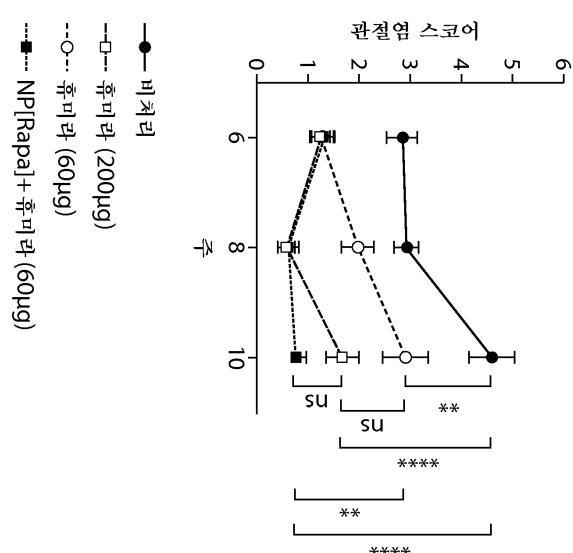
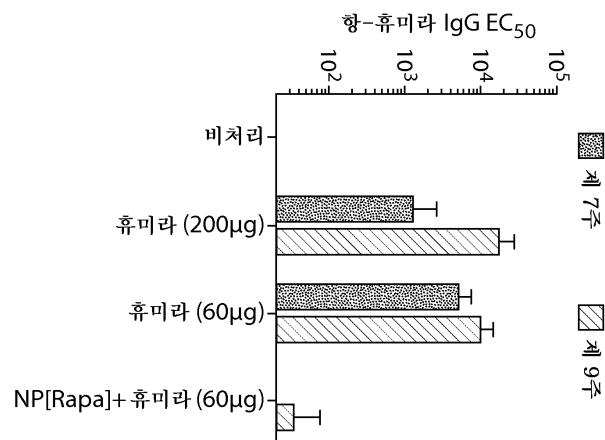
도면15



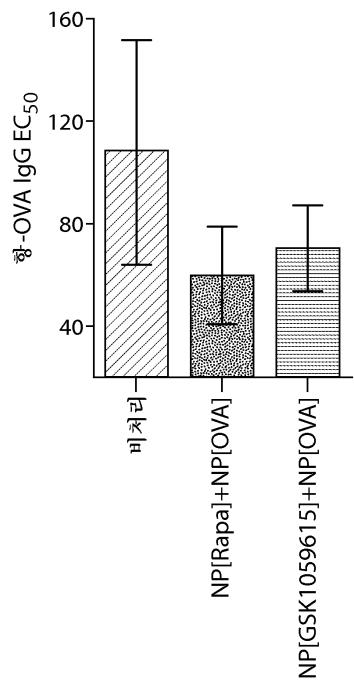
도면16



## 도면17



도면18



도면19

