



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0004121
(43) 공개일자 2022년01월11일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 31/436</i> (2006.01)
 <i>A61K 9/51</i> (2006.01) <i>A61P 43/00</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/88</i> (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 48/0058</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/436</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7038381</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년04월28일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년11월24일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2020/030217</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/223205
 국제공개일자 2020년11월05일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/839,771 2019년04월28일 미국(US)
 (뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
 셀렉타 바이오사이언시즈, 인크.
 미국 02472 매사추세츠주 워터타운 그로브 스트리트 65</p> <p>(72) 발명자
 기시모토, 다카시 게이
 미국 02420 매사추세츠주 렉싱턴 쿨리지 애비뉴 46
 일린스키, 페트르
 미국 02140 매사추세츠주 케임브리지 웹버턴 스트리트 177 유닛 13</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 김영</p> |
|---|--|

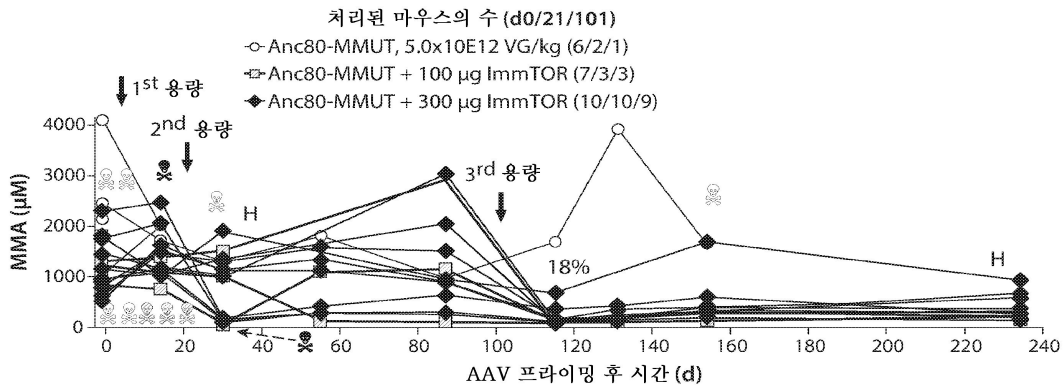
전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 갖는 대상체의 치료 방법

(57) 요약

면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 함께 바이러스 벡터를 대상체에게 투여하기 위한 방법 및 관련 조성물이 본원에 제공된다. 이러한 대상체는 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖는 대상체일 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 48/0083 (2013.01)
A61K 9/5153 (2013.01)
A61P 43/00 (2018.01)
C12N 15/88 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14171 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/924,103 2019년10월21일 미국(US)
62/981,555 2020년02월26일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 대상체에게 투여하는 단계이며, 여기서 대상체는 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖는 것인 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 대상체가 기존의 면역으로 인해 바이러스 벡터에 의한 치료로부터 달리 배제될 대상체인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 대상체가 모체-전달된 항체를 갖는 신생 대상체인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 대상체에게 이전에 투여되지 않았던 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 대상체에게 이전에 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 병용 투여되지 않았던 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체가 대상체에게 이전에 투여되지 않았던 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터의 적어도 1회의 후속 병용 투여를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터의 후속 병용 투여가 반복되는 것인 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 후속 병용 투여(들)의 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체가 바이러스 벡터와 혼합된 것인 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 1회 이상의 후속 병용 투여(들)가 대상체에게의 이전 투여 후 2개월 내에 이루어지는 것인 방법.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 1회 이상의 후속 병용 투여(들)가 대상체에게의 이전 투여 후 1개월 내에 이루어지는 것인 방법.

청구항 12

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 1회 이상의 후속 병용 투여(들)가 대상체에게의 이전 투여 후 1주 내에 이루어지는 것인 방법.

청구항 13

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 1회 이상의 후속 병용 투여(들)가 대상체에게의 이전 투여의 적어도 1개월 후에 이루어지는 것인 방법.

청구항 14

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 1회 이상의 후속 병용 투여(들)가 대상체에게의 이전 투여의 적어도 1주 후에 이루어지는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게의 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 바이러스 벡터의 임의의 투여 전에 대상체에서 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 결정하는 단계가 대상체에게의 투여 전에 대상체에서 항바이러스 벡터 항체의 수준을 측정하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 결정하는 단계가 대상체에게의 투여 전에 대상체에서 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 T 세포 반응의 수준을 측정하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터의 양이, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 병용 투여되지만 혼합되지 않은 경우 또 다른 대상체에서 바이러스 벡터의 트랜스진 발현을 증가시키는 바이러스 벡터의 양보다 적고,

임의로 여기서 또 다른 대상체는 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖는 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 양이, 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖지 않는 대상체에게 바이러스 벡터와 함께 투여되는 경우 바이러스 벡터의 트랜스진 발현을 증가시키고/거나 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 면역 반응, 예컨대 항체의 감소를 발생시키는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 양보다 더 많은 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 양이 적어도 2배 더 많은 것인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 양이 적어도 3배 더 많은 것인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 바이러스 벡터와 함께 투여하는 것 및/또는 1회 이상의 후속 병용 투여(들)가 정맥내 투여에 의한 것인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 1개 이상의 발현 제어 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 1개 이상의 발현 제어 서열이 간-특이적 프로모터를 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 1개 이상의 발현 제어 서열이 구성적 프로모터를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티 바이러스 벡터 또는 아데노-연관 바이러스 벡터인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스 벡터인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 아데노-연관 바이러스 벡터가 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 또는 AAV11 아데노-연관 바이러스 벡터인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체의 면역억제제가 NF- κ B 경로의 억제제인 면역억제제를 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 mTOR 억제제인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, mTOR 억제제가 라파마이신 또는 라파로그인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 합성 나노담체에 커플링된 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 면역억제제가 합성 나노담체 내에 캡슐화된 것인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체가 지질 나노입자, 중합체 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀전, 텐드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 또는 펩티드 또는 단백질 입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 합성 나노담체가 중합체 나노입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 중합체 나노입자가 폴리에스테르, 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 폴리사카라이드, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 중합체 나노입자가 폴리에스테르 또는 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함하는 것인 방

법.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 폴리에스테르가 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 나노입자가 폴리에스테르 및 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리에테르가 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체 집단의 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균이 110nm 초과인 직경인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 직경이 150nm 초과인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 직경이 200nm 초과인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 직경이 250nm 초과인 방법.

청구항 45

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 직경이 5 μm 미만인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 직경이 4 μm 미만인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 직경이 3 μm 미만인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 직경이 2 μm 미만인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 직경이 1 μm 미만인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 직경이 750nm 미만인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 직경이 500nm 미만인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 직경이 450nm 미만인 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 직경이 400nm 미만인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 직경이 350nm 미만인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 직경이 300nm 미만인 방법.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체에 포함된 면역억제제의 로드가 합성 나노담체 전반에 걸쳐 평균 0.1% 내지 50% (중량/중량)인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 로드가 0.1% 내지 25%인 방법.

청구항 58

제56항에 있어서, 로드가 적어도 4%이지만 40% 미만인 방법.

청구항 59

제57항에 있어서, 로드가 2% 내지 25%인 방법.

청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체 집단의 중량비가 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 이상인 방법.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 기재된 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 조성물.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 시점에서 대상체에서 바이러스 벡터에 대한 IgG 또는 IgM 또는 중화 항체 반응을 평가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, IgG 또는 IgM 또는 중화 항체 반응을 평가하는 시점 중 적어도 하나가 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 바이러스 벡터와 함께 투여한 후인 것인 방법.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 시점에서 대상체에서 트랜스진 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 트랜스진 발현 수준을 측정하는 시점 중 적어도 하나가 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 바이러스 벡터와 함께 투여한 후인 것인 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2019년 4월 28일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/839,771; 2019년 10월 21일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/924,103; 및 2020년 2월 26일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/981,555의 우선권의 이익을 주장하며; 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은, 적어도 부분적으로, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 혼합된 바이러스 벡터를 투여하기 위한 방법 및 관련 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 및 조성물은, 예컨대 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역을 갖는 대상체에서, 증가된 트랜스진 발현 및/또는 감소된 면역 반응, 예컨대 바이러스 벡터에 대한 하향조절된 면역 반응을 달성한다.

발명의 내용

[0005] 한 측면에서, 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖는다.

[0006] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 대상체 내의 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역 수준으로 인해 바이러스 벡터에 의한 치료로부터 달리 배제될 대상체이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 벡터, 예컨대 AAV 벡터 (예를 들어, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 혼합되지 않은 것)에 의한 치료에 대한 적격성에 대해 역치 수준을 초과하는 기존의 면역, 예컨대 항바이러스 벡터 항체의 역가 또는 수준을 갖는 대상체이다. 역치는 본원에 제공된 또는 달리 관련 기술분야의 통상의 기술자, 예컨대 임상의학에 의해 이해될 기존의 면역 수준 중 어느 하나일 수 있다.

[0007] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 유아 또는 소아 대상체이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 벡터의 1종 이상의 항원에 대한 모체-전달된 항체를 갖는 유아 또는 소아 대상체이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 신생 대상체이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 벡터의 1종 이상의 항원에 대한 모체-전달된 항체를 갖는 신생 대상체이다.

[0008] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역은 바이러스 벡터에 대한 기존의 항체, 예컨대 중화 항체를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역은 바이러스 벡터에 대한 기존의 항체, 예컨대 중화 항체 및 총 항-AAV 캡시드 항체의 조합을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역은 바이러스 벡터에 대한 기존의 항체, 예컨대 중화 항체 및 항-AAV 캡시드 IgG 항체의 조합을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역은 기존의 항체, 예컨대 중화 항체, 항-AAV IgG, 및 항-AAV 캡시드 IgM 항체의 조합을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역은 바이러스 벡터의 바이러스 캡시드에 대한 기존의 항체를 포함한다.

[0009] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 예컨대 바이러스 벡터의 투여 전에 대상체에서 기존의 면역 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 중간 수준의 기존의 면역을 갖는다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 대상체에게 바이러스 벡터의 투여 전에 대상체에서 기존의 항바이러스 벡터 항체의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 벡터, 예컨대 AAV 벡터 (예를 들어, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 혼합되지 않은 것)에 의한 치료에 대한 적격성에 대해 역치 수준을 초과하는 항바이러스 벡터 항체의 역가 또는 수준을 갖는 대상체이다. 역치는 본원에 제공된 또는 달리 통상의 기술자, 예컨대 임상의학에 공지될 기존의 면역 수준 중 어느 하나일 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 결정된 대상체에서의 기존의 면역 수준과 역치 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함한다.

[0010] 한 측면에서, 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 바이러스 벡터의 양은, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 함께 투여되지 않은 경우 바이

러스 벡터의 트랜스진 발현을 증가시키는 바이러스 벡터의 양보다 적은 것인 방법이 제공된다. 한 측면에서, 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 바이러스 벡터의 양은, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 병용 투여되지 않은 경우 바이러스 벡터의 트랜스진 발현을 증가시키는 바이러스 벡터의 양보다 적은 것인 방법이 제공된다. 한 측면에서, 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 바이러스 벡터의 양은, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 혼합되어 투여되지 않은 경우 바이러스 벡터의 트랜스진 발현을 증가시키는 바이러스 벡터의 양보다 적은 것인 방법이 제공된다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 투여를 위한 대상체인 대상체는 제1 대상체이고, 또 다른 양에 대한 비교는 제2 대상체에 대한 또 다른 양의 투여에 기초한다.

- [0011] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 제1 대상체는 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖고, 제2 대상체도 또한 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖는다.
- [0012] 한 측면에서, 방법은 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 양은, 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖지 않는 대상체에게 바이러스 벡터와 함께 투여되는 경우 바이러스 벡터의 트랜스진 발현을 증가시키고/거나 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 면역 반응, 예컨대 항체의 감소를 발생시키는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 양보다 더 많다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 투여를 위한 대상체인 대상체는 제1 대상체이고, 또 다른 양에 대한 비교는 제2 대상체에 대한 또 다른 양의 투여에 기초한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 제1 대상체는 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖고, 제2 대상체는 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖지 않는다.
- [0013] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 제1 및/또는 제2 대상체에게 이전에 투여되지 않았거나, 또는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터는 제1 및/또는 제2 대상체에게 이전에 병용 투여되지 않았거나, 또는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터는 제1 및/또는 제2 대상체에게 이전에 혼합되어 투여되지 않았다.
- [0014] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터의 용량은 동일하거나 유사한 수준의 효능, 예컨대 동일하거나 유사한 트랜스진 발현 수준을 발생시키는데 필요할 것으로 달리 예상되는 것보다 더 적은 용량이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터의 용량은 적어도 1-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배 또는 그 초과로 더 적다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 언급된 용량은 바이러스 벡터의 적어도 1회 이상의 모든 투여에 대한 용량이다.
- [0015] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 용량은 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역을 갖지 않는 대상체에게 전달되는 경우에 동일하거나 유사한 수준의 효능을 발생시키는데 필요할 것으로 달리 예상되는 것보다 더 많은 용량이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 용량은 적어도 2-배 또는 3-배 또는 그 초과로 더 많다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 언급된 용량은 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 적어도 1회 이상의 모든 투여에 대한 용량이다.
- [0016] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 적어도 또는 오직 제1 투여는 바이러스 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 혼합 조성물이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 모든 투여는 바이러스 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 혼합 조성물이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 각각의 공투여를 위해 혼합된다.
- [0017] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 바이러스 벡터와 혼합되고, 혼합물은 대상체에게 적어도 제1 공투여로서 투여된다.
- [0018] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 바이러스 벡터와 혼합되고, 혼합물은 대상체에게 적어도 제1 및 제2 공투여로서 투여된다.
- [0019] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 바이러스 벡터와 혼합되고, 혼합물은 대상체에게 적어도 제1, 제2 및 제3 공투여로서 투여된다.
- [0020] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체

및/또는 적어도 1회의 반복 용량의 투여는 정맥내 투여에 의한다.

- [0021] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 1개 이상의 발현 제어 서열을 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 1개 이상의 발현 제어 서열은 간-특이적 프로모터를 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 1개 이상의 발현 제어 서열은 구성적 프로모터를 포함한다.
- [0022] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 간에서의 트랜스진 발현을 위한 것이다.
- [0023] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 하나 이상의 시점에서 대상체에서 트랜스진 발현, 바이러스 벡터에 대한 IgM 및/또는 IgG 반응, 및/또는 중화 항체 반응을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, IgM 및/또는 IgG 반응 및/또는 중화 항체를 평가하는 시점 중 적어도 하나는 공투여한 후이다.
- [0024] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 아데노-연관 바이러스 벡터이다.
- [0025] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 아데노-연관 바이러스 벡터는 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 또는 AAV11 아데노-연관 바이러스 벡터이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 재조합, 합성, 조작된 또는 키메라 벡터이다.
- [0026] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터 및/또는 1회 이상의 후속 병용 투여(들) 또는 1회 이상의 반복 용량(들)과 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 면역억제제는 NF- κ B 경로의 억제제이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 공투여 및/또는 반복 용량의 면역억제제는 mTOR 억제제이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, mTOR 억제제는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체이다.
- [0027] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 커플링된다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체 내에 캡슐화된다.
- [0028] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터 및/또는 1회 이상의 후속 병용 투여(들) 또는 1회 이상의 반복 용량(들)과 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 합성 나노담체는 지질 나노입자, 중합체 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀전, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 또는 펩티드 또는 단백질 입자를 포함한다.
- [0029] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체 나노입자를 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 중합체 나노입자는 폴리에스테르, 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 폴리사카라이드, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 중합체 나노입자는 폴리에스테르 또는 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 폴리에스테르는 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 중합체 나노입자는 폴리에스테르 및 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 폴리에테르는 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함한다.
- [0030] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체 집단의 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균은 110nm 초과인 직경이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 150nm 초과이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 200nm 초과이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 250nm 초과이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 5 μ m 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 4 μ m 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 3 μ m 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 2 μ m 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 1 μ m 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 750nm 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 500nm 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 450nm 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 400nm 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 350nm 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 300nm 미만이다.
- [0031] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체에 포함된 면역억제제의 로드는 합성 나노담체 전

반에 걸쳐 평균 0.1% 내지 50% (중량/중량)이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 40%이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 로드는 4% 초과이지만 40% 미만이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 로드는 2% 내지 25%이다.

[0032] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체 집단의 중형비는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 이상이다.

[0033] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터의 트랜스진은 본원에 제공된 단백질 중 어느 하나, 예컨대 효소를 코딩한다.

[0034] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 벡터의 트랜스진에 의해 코딩된 단백질의 발현을 필요로 하는 대상체이다.

[0035] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 메틸말론산혈증 또는 OTC 결핍을 갖는 대상체이다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 인간 공여자 8, 31, 35, 44, 및 45로부터의 혈청에서의 중화 활성 및 IgG 항-AAV 항체의 수준을 보여준다. 중화 활성은 루시페라제 발현 (정규화된 RLU)으로서 막대로 플롯팅되고, 높은 수준의 루시페라제 발현은 낮은 중화 항체 활성에 상응하고, 낮은 수준의 루시페라제 발현은 높은 중화 항체 활성에 상응한다. 항-AAV IgG 중화 항체는 선으로 플롯팅된다.

도 2는 중화 항체를 함유하는 인간 혈청을 사용한 나이브 마우스의 처리에 이어서 AAV-SEAP 벡터 또는 AAV-SEAP 벡터 및 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (일부 도면에서 ImmTOR)의 주사를 보여준다. 혈청 SEAP 활성을 주사 후에 측정하였다. 막대 위의 숫자는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체가 투여되지 않은 마우스와 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체가 투여된 마우스 사이의 혈청 SEAP 활성에서의 변화를 나타낸다. 점선을 사용하여 혈청 SEAP 활성 수준을 정규화하였다.

도 3은 AAV-SEAP 벡터, 또는 AAV-SEAP 벡터 및 항-AAV 중화 항체를 함유하는 혈청의 1:100 희석물과 혼합된 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체를 사용한 나이브 마우스의 주사를 보여준다. 막대 위의 숫자는 혈청을 주사하지 않은 마우스 대비 혈청 SEAP 활성 수준을 나타낸다. 점선을 사용하여 혈청 SEAP 활성 수준을 정규화하였다.

도 4는 Anc80-Mut로 처리된 Mck-MUT 마우스의 자손에서의 모체 전달된 항-Anc80 IgG를 보여준다.

도 5는 기존 모체 전달된 항-Anc80 IgG: MMA를 갖는 Mck-MUT 마우스에서의 고용량 Anc80-MUT 및 ImmTOR을 보여준다.

도 6은 기존 모체 전달된 항-Anc80 IgG: MMA를 갖는 Mck-MUT 마우스에서의 고용량 Anc80-MUT 및 ImmTOR을 보여준다.

도 7은 기존 모체 전달된 항-Anc80 IgG: MMA를 갖는 Mck-MUT 마우스에서의 고용량 Anc80-MUT 및 ImmTOR을 보여준다.

도 8 (도 8a-8b)은 Anc80-MUT ± ImmTOR로 반복적으로 처리된, 기존 모체 전달된 항-Anc80 IgG를 갖는 Mck-MUT 마우스의 생존을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 특정하게 예시된 물질 또는 공정 파라미터로 제한되지 않으며, 물론 변경될 수 있는 것으로 이해해야 한다. 본원에 사용된 용어는 단지 본 발명의 특정한 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 설명하기 위한 대체 용어의 사용을 제한하고자 하는 것이 아님을 이해해야 한다.

[0038] 상기 또는 하에서 본원에 인용된 모든 공개, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 이와 같이 참조로 포함되는 것은, 본원에 인용된 포함되는 공개, 특허 및 특허 출원 중 임의의 것이 선행 기술을 구성한다는 것을 인정하는 것으로 의도되지 않는다.

[0039] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 내용이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 예를 들어, "중합체"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 분자의 혼합물 또는 상이한 분자량의 단일 중합체 종의 혼합물을 포함하고, "합성 나노담체"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 합성 나노담체의 혼합물 또

는 복수의 이러한 합성 나노담체를 포함하며, "DNA 분자"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 DNA 분자의 혼합물 또는 복수의 이러한 DNA 분자를 포함하고, "면역억제제"에 대한 언급은 2개 이상의 이러한 면역억제제 분자의 혼합물 또는 복수의 이러한 면역억제제 분자를 포함하는 등이다.

[0040] 본원에 사용된 용어 "포함하다" 또는 그의 변형, 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 임의의 나열된 정수 (예를 들어, 특색, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 정수들 군 (예를 들어, 특색들, 요소들, 특징들, 특성들, 방법/공정 단계들 또는 제한들)을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수들 군을 배제하지 않는다는 것을 표시하는 것으로 판독되어야 한다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "포함하는"은 포괄적이며 추가의 나열되지 않은 정수 또는 방법/공정 단계를 배제하지 않는다.

[0041] 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 실시양태에서, "포함하는"은 "로 본질적으로 이루어진" 또는 "로 이루어진"으로 대체될 수 있다. 어구 "로 본질적으로 이루어진"은 명시된 정수(들) 또는 단계뿐만 아니라 청구된 본 발명의 특징 또는 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것을 요구하기 위해 본원에 사용된다. 본원에 사용된 용어 "로 이루어진"은 나열된 정수 (예를 들어, 특색, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 정수들 군 (예를 들어, 특색들, 요소들, 특징들, 특성들, 방법/공정 단계들 또는 제한들) 단독의 존재를 표시하기 위해 사용된다.

[0042] A. 서론

[0043] 바이러스 벡터, 예컨대 아데노-연관 바이러스 (AAV)에 기초한 것은 치료 용도, 예컨대 유전자 요법에서 큰 잠재력을 나타내었다. 그러나, 유전자 요법 및 다른 용도에서 바이러스 벡터의 사용은 예컨대 바이러스 항원 노출의 결과로서 기존의 면역으로 인해 제한되었다. AAV에 대한 기존의 항체는 자연 발생 야생형 AAV 감염에 반응하여 또는 AAV-감작화된 모체로부터 그의 신생아로의 항체의 모체 전달을 통해 형성될 수 있다. 실제로, 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역은 바이러스 벡터에 대한 면역 반응 및, 예를 들어 감소된 트랜스진 발현에 의해 제시되는 바와 같은, 바이러스 벡터의 감소된 효능을 발생시킬 수 있다. 바이러스 벡터에 대한 세포성 및 체액성 면역 반응 둘 다는 효능을 저하시킬 수 있고/거나 이러한 치료제의 사용 능력을 감소시킬 수 있다. 이들 면역 반응은 항체, B 세포 및 T 세포 반응을 포함하고, 바이러스 벡터의 바이러스 항원, 예컨대 바이러스 캡시드 또는 코트 단백질 또는 그의 펩티드에 특이적일 수 있다. 본 발명자들은 놀랍게도 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체가 심지어 바이러스 벡터의 바이러스 항원(들)에 대한 기존의 면역을 갖는 것에서도 바이러스 벡터와 조합되어 사용될 수 있다는 것을 발견하였다. 본원에 제공된 바와 같은 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 대상체를 바이러스 벡터로 치료하는 것을 가능하게 할 수 있다.

[0044] 본 발명자들은 또한 놀랍게도 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체가 대상체, 예를 들어 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역을 갖는 대상체에서 개선된 트랜스진 발현을 달성할 수 있다는 것을 발견하였다. 투여가 바이러스 벡터의 제1 투여인 경우에, 면역 반응 감소 및/또는 트랜스진 발현에서의 이러한 개선은 유의하다.

[0045] 또한, 놀랍게도, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터의 이러한 혼합 투여가 바이러스 벡터의 제1 투여 시 개선된 트랜스진 발현을 달성하지만, 혼합이 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터의 후속 투여의 효능에 반드시 필요한 것은 아니라는 것을 추가로 발견하였다.

[0046] 추가적으로, 놀랍게도, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터의 이러한 혼합 투여가 트랜스진 발현의 감소 없이 바이러스 벡터의 감소된 용량을 달성하는데 사용될 수 있다는 것을 발견하였다. 바이러스 벡터의 감소된 용량의 투여는 바이러스 벡터의 투여와 연관된 바람직하지 않은 효과를 완화시킬 수 있다.

[0047] 추가로, 놀랍게도, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 보다 높은 용량이 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역을 갖는 대상체에서 바이러스 벡터의 효과적인 투여를 달성하는데 또한 도움이 될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0048] 이에 따라, 본 발명자들은 놀랍게도 예상외로 상기 언급된 문제점 및 제한이 본원에 개시된 본 발명을 실시함으로써 극복될 수 있다는 것을 발견하였다. 치료용 바이러스 벡터의 효과적인 사용을 위한 상기 언급된 장애에 대한 해결책을 제공하는 방법 및 조성물이 제공된다. 예컨대 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 혼합된, 본원에 제공된 바이러스 벡터 구축물 중 어느 하나를 포함하는 바이러스 벡터로 대상체를 치료하기 위한 방법 및 조성물이 본원에 제공된다. 제공된 방법 및 관련 조성물은 바이러스 벡터의 보다 넓고 개선된 사용을 가능하게 할 수 있고, 바람직하지 않은 면역 반응의 감소를 발생시키고/거나, 예컨대 증가된 트랜스진 발현을 통해 개선된 효능을 발생시킬 수 있다.

- [0049] 본 발명은 지금부터 하기에서 보다 상세하게 기재될 것이다.
- [0050] B. 정의
- [0051] "투여하는" 또는 "투여" 또는 "투여하다"는 약리학상 유용한 방식으로 물질을 대상체에게 제공하거나 또는 투여하는 것을 의미한다. 용어는 "투여되도록 하는 것"을 포함하는 것으로 의도된다. "투여되도록 하는 것"은 또 다른 당사자가 물질을 투여하도록 직접적으로 또는 간접적으로 유발, 촉구, 장려, 조장, 유도 또는 지시하는 것을 의미한다. 투여 사이에 시간 주기가 언급되는 경우에, 시간 주기는 달리 기재된 경우를 제외하고 투여의 개시 사이의 시간이다.
- [0052] 본원에 사용된 "혼합하다"는 2종 이상의 성분이 조성물 중에 함께 존재하고 조성물의 투여가 대상체에게 2종 이상의 성분을 제공하도록 2종 이상의 성분을 혼합하는 것을 지칭한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 공투여 중 어느 하나는 혼합물로서 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 2종의 성분을 혼합하는 것은 2종의 성분, 예를 들어 예컨대 바이러스 전달 벡터 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 용해, 분산, 현탁, 조합, 연결, 또는 블렌딩하는 것을 포함한다. 혼합 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 표준 제약 혼합 방법, 예컨대 액체-액체 혼합, 분말-분말 혼합, 액체-분말 혼합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 생성된 혼합물은 균질 혼합물이며; 즉, 바이러스 벡터는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 균일하게 혼합될 수 있다. 다른 실시양태에서, 생성된 혼합물은 불균질 혼합물이며, 즉 바이러스 벡터는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 균일하게 혼합되지 않는다.
- [0053] 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체에 이어서, 바이러스 벡터와 병용으로 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 1회 이상의 투여 및/또는 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 1회 이상의 후속 투여 (각각 1회 이상의 후속 병용 투여(들) 또는 1회 이상의 반복 용량(들))가 이어진다. 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터의 후속 병용 투여 또는 반복 용량은 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 또는 그 초과 후에 투여된다.
- [0054] 본원에 제공된 바와 같이 대상체에게 투여하기 위한 조성물의 맥락에서 "유효한 양"은 대상체에서 한 가지 이상의 목적하는 결과, 예를 들어 바이러스 벡터에 대한 면역 반응, 예컨대 IgM 및/또는 IgG 면역 반응의 감소 또는 제거 및/또는 효과적이거나 증가된 트랜스진 발현을 발생시키는 조성물의 양을 지칭한다. 유효한 양은 시험관 내 또는 생체내 목적을 위한 것일 수 있다. 생체내 목적을 위한 양은 바이러스 벡터의 투여의 결과로서 바람직하지 않은 면역 반응을 겪을 수 있는 대상체에 대해 임상 이익을 가질 수 있을 것으로 임상의가 믿는 양일 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에서, 투여되는 조성물(들)은 본원에 제공된 바와 같은 유효한 양 중 어느 하나일 수 있다.
- [0055] 유효한 양은 바람직하지 않은 면역 반응의 수준을 감소시키는 것을 수반할 수 있지만, 일부 실시양태에서, 이는 바람직하지 않은 면역 반응을 완전히 방지하는 것을 수반한다. 유효한 양은 또한, 바람직하지 않은 면역 반응의 발생을 지연시키는 것을 수반할 수 있다. 유효한 양은 또한, 목적하는 치료 종점 또는 목적하는 치료 결과를 발생시키는 양일 수 있다. 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 유효한 양은 목적하는 면역 반응, 예컨대 바이러스 벡터에 대한 면역 반응, 예컨대 IgM 및/또는 IgG 반응을 감소 또는 제거하고/거나 효과적이거나 증가된 트랜스진 발현을 생성하는 양이다. 상기 중 임의의 것의 달성은 상용 방법에 의해 모니터링될 수 있다.
- [0056] 유효한 양은 물론, 치료될 특정한 대상체; 상태, 질환 또는 장애의 중증도; 연령, 신체 조건, 크기 및 체중을 포함한 개별 환자 파라미터; 치료 지속기간; (존재하는 경우) 공동 요법의 성질; 구체적 투여 경로; 및 건강 진료의 지식 및 전문성 내의 기타 인자에 좌우될 것이다. 이들 인자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 상용 실험만으로 해결될 수 있다.
- [0057] 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 없이 투여되는 바이러스 벡터의 유효한 양은 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖는 대상체에서보다 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖지 않는 대상체에서 더 적다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 혼합되어 투여되는 경우의 바이러스 벡터의 유효한 양은 대상체, 예컨대 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 갖는 대상체에서 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 혼합되지 않은 경우, 예컨대 병용으로 투여되지만 혼합되지 않은 경

우 또는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 부재 하의 바이러스 벡터의 유효한 양보다 더 적다. 일부 실시양태에서, 대상체는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및/또는 바이러스 벡터를 이전에 투여받은 적이 없다.

[0058] "면역 반응의 평가"는 시험관내 또는 생체내 면역 반응의 수준, 존재 또는 부재, 감소, 증가 등의 임의의 측정 또는 결정을 지칭한다. 이러한 측정 또는 결정은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 샘플에 대해 수행될 수 있다. 이러한 평가는 ELISA-기반 검정을 포함한, 본원에 제공되거나 또는 달리 관련 기술분야에 공지된 방법 중 어느 하나에 의해 수행될 수 있다. 평가는 예컨대 대상체로부터의 샘플에서의 항체, 예컨대 IgM 및/또는 IgG 항체, 예컨대 바이러스 벡터에 특이적인 것의 수 또는 백분율의 평가일 수 있다. 평가는 또한 면역 반응과 관련된 임의의 효과의 평가, 예컨대 시토카인, 세포 표현형 등의 존재 또는 부재의 측정일 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 바이러스 벡터 또는 그의 항원에 대한 면역 반응을 평가하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다. 평가는 직접적으로 또는 간접적으로 수행될 수 있다. 상기 용어는 또 다른 당사자가 면역 반응을 평가하도록 유발하거나, 촉구하거나, 장려하거나, 보조하거나, 유도하거나 또는 지시하는 행위를 포함하는 것으로 의도된다.

[0059] 본원에 사용된 "평균"은 달리 나타내지 않는 한 산술 평균을 지칭한다.

[0060] "병용으로"는 시간상 상관된 방식으로, 바람직하게는 시간상 충분히 상관된 방식으로 2개 이상의 물질/작용제를 대상체에게 투여하여 면역 반응에 조정을 제공하는 것을 의미하고, 보다 더 바람직하게는 2개 이상의 물질/작용제는 조합되어 투여된다. 실시양태에서, 병용 투여는 2개 이상의 물질/작용제를 명시된 기간 내에, 바람직하게 1개월 내에, 보다 바람직하게 1주 내에, 보다 더 바람직하게 1일 내에, 및 보다 더 바람직하게 1시간 내에 투여하는 것을 포괄할 수 있다. 실시양태에서, 물질/작용제는 반복해서 병용 투여될 수 있고; 이는 실시예에 제공된 바와 같은 1회 초과 병용 투여이다.

[0061] "커플링" 또는 "커플링된" (등)은 하나의 실체 (예를 들어, 모이어티)를 또 다른 실체와 화학적으로 회합시키는 것을 의미한다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 커플링은 공유적이고, 이는 부차 이 2개의 실체 사이의 공유 결합의 존재의 맥락에서 일어난다는 것을 의미한다. 비-공유 실시양태에서, 비-공유 커플링은 전하 상호작용, 친화도 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 스택킹 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용, 및/또는 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 비-공유 상호작용에 의해 매개된다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 실시양태에서, 캡슐화는 커플링의 형태이다.

[0062] "용량"은 주어진 시간 동안 대상체에게 투여하기 위한 약리학 및/또는 면역학적 활성 물질의 구체적 양을 지칭한다. 일반적으로, 본 발명의 방법 및 키트를 포함한 조성물에서 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및/또는 바이러스 벡터의 용량은 달리 제공되지 않는 한 합성 나노담체에 포함된 면역억제제의 양 및/또는 바이러스 벡터의 양을 지칭한다. 대안적으로, 용량은 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 용량을 지칭하는 경우에, 목적하는 양의 면역억제제를 제공하는 합성 나노담체의 수에 기초하여 투여될 수 있다. 용량이 반복 투여의 상황에서 사용되는 경우에, 용량은 동일하거나 상이할 수 있는 반복 용량 각각의 양을 지칭한다.

[0063] "캡슐화하다"는 물질의 적어도 일부를 합성 나노담체 내에 봉입하는 것을 의미한다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 물질은 합성 나노담체 내에 완전히 봉입된다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 캡슐화된 물질의 대부분 또는 모두는 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출되지 않는다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% (중량/중량) 이하가 국부 환경에 노출된다. 캡슐화는 물질의 대부분 또는 모두를 합성 나노담체의 표면 상에 위치시키고, 물질을 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출된 채로 두는 흡수와 구별된다.

[0064] "발현 제어 서열"은 발현에 영향을 미칠 수 있는 임의의 서열이고, 프로모터, 인핸서, 및 오퍼레이터를 포함할 수 있다. 벡터 내의 발현 제어 서열 또는 제어 요소는 적절한 핵산 전사, 번역, 바이러스 패키징 등을 용이하게 할 수 있다. 일반적으로, 제어 요소는 시스로 작용하지만, 이는 또한 트랜스로 작용할 수 있다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 발현 제어 서열은 프로모터, 예컨대 구성적 프로모터 또는 조직-특이적 프로모터이다. 편재성 또는 혼재성 프로모터로도 불리는 "구성적 프로모터"는 일반적으로 활성이고, 특정 세포에 대해 독점적이거나 우선적이지 않은 것으로 생각되는 것이다. "조직-특이적 프로모터"는 특정한 세포 유형 또는 조직에서 활성인 것이며, 이러한 활성은 특정한 세포 유형 또는 조직에 대해 독점적일 수 있다. 본원에 제공된 핵산 또는 바이러스 벡터 중 어느 하나에서 프로모터는 본원에 제공된 프로모터 중 어느 하나일 수 있다. 본원에 제공된 핵산 또는 바이러스 벡터 중 어느 하나에서 프로모터는 간-특이적 프로모터일 수

있다.

[0065] "바이러스 벡터에 대한 면역 반응" 등은 바이러스 벡터에 대한 임의의 바람직하지 않은 면역 반응, 예컨대 항체 (예를 들어, IgM 또는 IgG) 또는 세포 반응을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 바람직하지 않은 면역 반응은 바이러스 벡터 또는 그의 항원에 대한 항원-특이적 면역 반응이다. 일부 실시양태에서, 면역 반응은 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 특이적이다. 다른 실시양태에서, 면역 반응은 바이러스 벡터의 트랜스진에 의해 코딩된 단백질 또는 펩티드에 특이적이다. 일부 실시양태에서, 면역 반응은 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 특이적이고, 바이러스 벡터의 트랜스진에 의해 코딩된 단백질 또는 펩티드에는 특이적이지 않다.

[0066] 일부 실시양태에서, 대상체에서의 감소된 항바이러스 벡터 반응은 본원에 제공된 바와 같은 투여 없이 바이러스 벡터를 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게 투여한 후에 이러한 다른 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 사용하여 측정된 항바이러스 벡터 면역 반응과 비교하여, 본원에 제공된 바와 같은 투여 후에 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 사용하여 측정된 감소된 항바이러스 벡터 면역 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항바이러스 벡터 면역 반응은 본원에 제공된 바와 같은 투여 없이 바이러스 벡터를 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게 투여한 후에 다른 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플에 대해 수행된 바이러스 벡터 시험관내 챌린지 시 검출된 항바이러스 벡터 면역 반응과 비교하여, 본원에 제공된 바와 같은 투여 후에 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플에서의, 대상체의 생물학적 샘플에 대해 수행된 후속 바이러스 벡터 시험관내 챌린지 시의 감소된 항바이러스 벡터 면역 반응이다. 다른 실시양태에서, 면역 반응은 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체로부터의 샘플에서 평가될 수 있으며, 여기서 다른 대상체에 대한 결과는, 척도화와 관계 없이, 이슈가 되는 대상체에서 무엇이 발생하고 있는지 또는 발생하였는지를 나타낼 것으로 예상될 것이다. 일부 실시양태에서, 대상체에서의 감소된 항바이러스 벡터 반응은 상이한 시점에, 예컨대 본원에 제공된 바와 같은 투여가 없는 시점에, 예를 들어 본원에 제공된 바와 같은 투여 전에 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 사용하여 측정된 항바이러스 벡터 면역 반응과 비교하여 본원에 제공된 바와 같은 투여 후에 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 사용하여 측정된 감소된 항바이러스 벡터 면역 반응을 포함한다.

[0067] "면역억제제"는 바람직하게는 APC에 대한 그의 효과를 통해 면역관용성 효과를 유발할 수 있는 화합물을 의미한다. 면역관용성 효과는 일반적으로, 항원에 대한 바람직하지 않은 면역 반응을 지속적인 방식으로 감소, 억제 또는 방지하는, APC 또는 다른 면역 세포에 의한 전신 및/또는 국부 조절을 지칭한다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 APC가 하나 이상의 면역 이펙터 세포에서 조절 표현형의 축진을 유발하는 것이다. 예를 들어, 조절 표현형은 항원-특이적 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 생산, 유도, 자극 또는 동원의 억제; 항원-특이적 항체의 생산의 억제, Treg 세포 (예를 들어, CD4+CD25고FoxP3+ Treg 세포)의 생산, 유도, 자극 또는 동원 등으로 특징화될 수 있다. 이는 CD4+ T 세포 또는 B 세포가 조절 표현형으로 전환된 것의 결과일 수 있다. 이는 또한, FoxP3이 다른 면역 세포, 예컨대 CD8+ T 세포, 대식세포 및 iNKT 세포에서 유도된 것의 결과일 수 있다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 항원을 프로세싱한 후 APC의 반응에 영향을 미치는 것이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 항원의 프로세싱을 방해하는 것이 아니다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 추가 실시양태에서, 면역억제제는 아포토시스-신호전달 분자가 아니다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 인지질이 아니다.

[0068] 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 (즉, 라파로그); TGF- β 신호전달 작용제; TGF- β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 트리코스타틴 A; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF- κ β 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 퓌리프람; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시좀 증식자-활성화된 수용체 길항제; 퍼옥시좀 증식자-활성화된 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스파타제 억제제; PI3KB 억제제, 예컨대 TGX-221; 자가포식 억제제, 예컨대 3-메틸아데닌; 아릴 탄화수소 수용체 억제제; 프로테아솜 억제제 I (PSI); 및 산화 ATP, 예컨대 P2X 수용체 차단제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한 IDO, 비타민 D3, 레티노산, 시클로스포린, 예컨대 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오프린 (Aza), 6-메르캅토프린 (6-MP), 6-티오구아닌 (6-TG), FK506, 상글리페린 A, 살메테롤, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF), 아스피린 및 다른 COX 억제제, 니플람산, 에스트리올 및 트리플리드를 포함한다. 다른 예시적인 면역억제제는 소분자 약물, 천연 생성물, 항체 (예를 들어, CD20, CD3, CD4에 대한 항

체), 생물제제-기반 약물, 탄수화물-기반 약물, RNAi, 안티센스 핵산, 압타머, 메토틱렉세이트, NSAID; 펄크리 모드; 나탈리주맙; 알렘투주맙; 항-CD3; 타크롤리무스 (FK506), 아바타셉트, 벨라타셉트 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 "라파로그"는 라파마이신과 구조상 관련된 (유사체) 분자 (시롤리무스)를 지칭한다. 라파로그의 예는, 비제한적으로, 템시롤리무스 (CCI-779), 에베롤리무스 (RAD001), 리다포롤리무스 (AP-23573), 및 조타롤리무스 (ABT-578)를 포함한다. 라파로그의 추가의 예는, 예를 들어 WO 공개 WO 1998/002441 및 미국 특허 번호 8,455,510에서 확인할 수 있고, 그의 라파로그는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 추가의 면역억제제가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명은 이러한 측면으로 제한되지 않는다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 실시양태에서, 면역억제제는 본원에 제공된 작용제 중 어느 하나, 예컨대 상기 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0069] "트랜스진 발현을 증가시키는 것"은 대상체에서 바이러스 벡터의 트랜스진 발현의 수준을 증가시키는 것을 지칭하며, 트랜스진은 바이러스 벡터에 의해 전달된다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 발현의 수준은 대상체의 다양한 관심 조직 또는 시스템에서 트랜스진 단백질 농도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 대안적으로, 트랜스진 발현 생성물이 핵산인 경우에, 트랜스진 발현의 수준은 트랜스진 핵산 생성물에 의해 측정될 수 있다. 트랜스진 발현을 증가시키는 것은, 예를 들어 대상체로부터 수득된 샘플에서 트랜스진 발현의 양을 측정하고, 이를 이전 샘플과 비교함으로써 결정될 수 있다. 샘플은 조직 샘플일 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 발현은 유동 세포측정법을 사용하여 측정될 수 있다. 다른 실시양태에서, 증가된 트랜스진 발현은 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체로부터의 샘플에서 평가될 수 있으며, 여기서 다른 대상체에 대한 결과는, 척도화와 관계없이, 이슈가 되는 대상체에서 무엇이 발생하고 있는지 또는 발생하였는지를 나타낼 것으로 예상될 것이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 증가된 트랜스진 발현을 발생시킬 수 있다.

[0070] "로드"는, 면역억제제가 합성 나노담체에 포함된 경우, 예컨대 그에 커플링된 경우, 전체 합성 나노담체 내의 물질의 총 건조 레시피 중량에 기초한 합성 나노담체 내의 면역억제제의 양 (중량/중량)이다. 일반적으로, 이러한 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로서 계산된다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체에 걸친 평균 로드는 0.1% 내지 99%이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 50%이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 20%이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 추가 실시양태에서, 로드는 0.1% 내지 10%이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 추가 실시양태에서, 로드는 1% 내지 10%이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 추가 실시양태에서, 로드는 7% 내지 20%이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로 적어도 0.1%, 적어도 0.2%, 적어도 0.3%, 적어도 0.4%, 적어도 0.5%, 적어도 0.6%, 적어도 0.7%, 적어도 0.8%, 적어도 0.9%, 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 11%, 적어도 12%, 적어도 13%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 적어도 20%, 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. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 추가 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20%이다. 상기 실시양태 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 로드는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균으로 25% 이하이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 실시양태에서, 로드는 관련 기술분야에 공지되어 있는 바와 같이 계산된다.

[0071] "합성 나노담체의 최대 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 나노담체의 가장 큰 치수를 의미한다. "합성 나노담체의 최소 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 합성 나노담체의 가장 작은 치수를 의미한다. 예를 들어, 구형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수는 실질적으로 동일할 것이고, 그의 직경의 크기일 것이다. 유사하게, 입방형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최소 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 가장 작은 것일 것인 한편, 합성 나노담체의 최대 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 가장 큰 것일 것이다. 한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상이다. 한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 5 μ m 이하이다. 바람직하게는, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 110 nm 초과, 보다 바람직하게는 120 nm 초과, 보다 바람직하게는 130 nm 초과, 및 보다 더 바람직하게는 150 nm 초과이다. 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수의 중형비는 실시양태에 따라

달라질 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 최대 대 최소 치수의 중형비는 1:1 내지 1,000,000:1, 바람직하게는 1:1 내지 100,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 10,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1000:1, 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 100:1, 및 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 10:1로 달라질 수 있다. 바람직하게는, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 3 μm 이하, 보다 바람직하게는 2 μm 이하, 보다 바람직하게는 1 μm 이하, 보다 바람직하게는 800 nm 이하, 보다 바람직하게는 600 nm 이하, 및 보다 더 바람직하게는 500 nm 이하이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상, 보다 바람직하게는 120 nm 이상, 보다 바람직하게는 130 nm 이상, 보다 바람직하게는 140 nm 이상, 및 보다 더 바람직하게는 150 nm 이상이다. 합성 나노담체 치수 (예를 들어, 유효 직경)의 측정은 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 액체 (통상적으로 수성) 매질에 현탁시키고 동적 광 산란 (DLS) (예를 들어, 브룩헤븐 제타팔스(Brookhaven ZetaPALS) 기기를 사용함)을 사용함으로써 수행할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 현탁액을 수성 완충제로부터 정제수 내로 희석시켜 대략 0.01 내지 0.1 mg/mL의 최종 합성 나노담체 현탁액 농도를 달성할 수 있다. 희석된 현탁액은 내부에서 직접 제조되거나, 또는 DLS 분석에 적합한 큐벳으로 옮겨질 수 있다. 이어서, 큐벳을 DLS에 두고, 제어 온도로 평형이 되도록 한 다음, 충분한 시간 동안 스캐닝하여 매질의 점도 및 샘플의 굴절률에 대한 적절한 입력에 기초하여 안정하고 재현가능한 분포를 획득할 수 있다. 이어서, 유효 직경, 또는 분포의 평균을 보고한다. 높은 중형비, 또는 비-구형 합성 나노담체의 유효 크기를 결정하는 것은 보다 정확한 측정치를 획득하기 위해 확대 기술, 예컨대 전자 현미경검사를 필요로 할 수 있다. 합성 나노담체의 "치수" 또는 "크기" 또는 "직경"은, 예를 들어, 동적 광 산란을 사용하여 획득된 입자 크기 분포의 평균을 의미한다.

[0072] "이전에 투여되지 않은"은 대상체에게 전혀 투여되지 않았거나 또는 치료를 위한 바이러스 벡터를 투여하기 위한 투여 요법이 시작될 때 약역학적 효과를 발생시킬 시간프레임 내에 투여되지 않은 조성물을 지칭한다.

[0073] "제약상 허용되는 부형제" 또는 "제약상 허용되는 담체"는 약리학적 활성 물질과 함께 조성물을 제제화하는 데 사용되는 약리학적 불활성 물질을 의미한다. 제약상 허용되는 부형제는 사카라이드 (예컨대 글루코스, 락토스 등), 보존제 예컨대 항미생물제, 재구성 보조제, 착색제, 염수 (예컨대 포스페이트 완충 염수), 및 완충제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 다양한 물질을 포함한다.

[0074] "반복 용량" 또는 "반복 투여" 등은 동일한 물질(들)의 이전 용량 또는 투여에 후속하여 대상체에게 투여되는 물질 또는 물질의 세트의 적어도 1회의 추가의 용량 또는 투여를 의미한다. 물질은 동일할 수 있지만, 반복 용량 또는 투여에서 물질의 양은 이전 용량과 상이할 수 있다.

[0075] "바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역"은 대상체에서의 항체, T 세포 및/또는 B 세포의 존재를 지칭하며, 그러한 세포는 이전에 바이러스 벡터의 항원 또는 다른 바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는 교차반응성 항원에 대한 사전 노출에 의해 프라이밍되었다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역은 바이러스 벡터의 바이러스 캡시드에 대한 것이다. 상기 용어는 또한 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 모체-전달된 항체를 갖는 대상체를 포함하는 것으로 의도되고, 따라서 본원에 제공된 대상체는 바이러스 벡터에 대한 모체-전달된 항체를 갖는 신생 대상체를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역은 바이러스 벡터에 대한 기존의 항체, 예컨대 중화 항체를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역은 바이러스 벡터에 대한 기존의 항체, 예컨대 중화 항체 및 총 항-AAV 캡시드 항체의 조합을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역은 바이러스 벡터에 대한 기존의 항체, 예컨대 중화 항체 및 항-AAV 캡시드 IgG 항체의 조합을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역은 기존의 항체, 예컨대 중화 항체, 항-AAV IgG, 및 항-AAV 캡시드 IgM 항체의 조합을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터에 대한 모체-전달된 항체는 바이러스 벡터에 대한 중화 항체를 포함한다.

[0076] 일부 실시양태에서, 이러한 기존의 면역은 바이러스 벡터의 효능을 방해하는 항바이러스 벡터 면역 반응(들)을 발생시킬 것으로 예상되는 수준이다. 일부 실시양태에서, 이러한 기존의 면역은 달리 대상체가 바이러스 벡터로 치료되지 못하게 할 수준이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역 수준은 1:5의 역가에서 바이러스 벡터, 예컨대 AAV 형질도입의 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%를 중화시키기에 충분하다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역 수준은 1:10의 역가에서 바이러스 벡터, 예컨대 AAV 형질도입의 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%를 중화시키기에 충분하다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바

이러스 백터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역 수준은 1:20의 역가에서 바이러스 백터, 예컨대 AAV 형질도입의 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%를 중화시키기에 충분하다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 백터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역 수준은 1:100의 역가에서 바이러스 백터, 예컨대 AAV 형질도입의 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%를 중화시키기에 충분하다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 백터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역 수준은 1:5, 1:10; 1:20, 1:50, 1:100의 역가에서 50%를 중화시키기에 충분하다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 상기 언급된 기존의 면역 수준 중 어느 하나를 갖는다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 중 어느 하나는 역치 수준이다.

[0077] 일부 실시양태에서, 이러한 기존의 면역은 바이러스 백터에 대한 후속 노출 시 항바이러스 백터 면역 반응(들)을 발생시킬 것으로 예상되는 수준이다. 기존의 면역은 대상으로부터의 샘플, 예컨대 혈액 샘플에 존재하는 바이러스 백터에 대한 항체, 예컨대 중화 항체의 수준을 결정함으로써 평가될 수 있다. 항체, 예컨대 중화 항체의 수준을 평가하기 위한 검정은 본원에서 적어도 실시예에 기재되어 있고, 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 이러한 검정은 세포-기반 검정일 수 있다. 항체, 예컨대 IgM 또는 IgG 또는 중화 항체의 수준을 평가하기 위한 검정. 이러한 검정은 ELISA 검정일 수 있다. APC에 의해 제시된 바이러스 백터 항원 또는 MHC 부류 I 또는 MHC 부류 II 분자 상에 제시된 바이러스 항원 에피토프로 생체내 또는 시험관내 자극된 면역 세포, 예컨대 B 또는 T 세포의 항원 회상 반응을 결정함으로써 기존의 면역을 또한 평가할 수 있다. 항원-특이적 회상 반응에 대한 검정은 ELISpot, 세포내 시토카인 염색, 세포 증식, 및 시토카인 생산 검정을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 이들 및 다른 검정은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 나타내지 않는 대상체는 음성인 것으로 간주될 항바이러스 백터 항체, 예컨대 중화 항체, 또는 기억 B 또는 T 세포의 수준을 갖는 것이다. 다른 실시양태에서, 바이러스 백터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역을 나타내지 않는 대상체는 평균 음성 대조군보다 3 표준 편차 이하인 항바이러스 백터 반응의 수준을 갖는 것이다.

[0078] "대상체"는 온혈 포유동물 예컨대 인간 및 영장류; 조류; 가정용 또는 농장용 가축 예컨대 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험 동물 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그; 어류; 파충류; 동물원 및 야생 동물 등을 포함한 동물을 의미한다. 본원에 사용된 대상체는 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나를 필요로 하는 것일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 대상체는 모체-전달된 항체를 갖는 신생 대상체 또는 기존의 면역 수준이 달리 대상체가 바이러스 백터로 치료되지 못하게 할 대상체이다. 본원에 제공된 "제2 대상체" 또는 "또 다른 대상체"는 투여가 제공되는 대상체와 상이한 또 다른 대상체를 지칭한다. 이 대상체는 임의의 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체일 수 있으며, 대상체는 동일하거나 상이한 종일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 제2 대상체는 바이러스 백터에 대한 기존의 면역을 갖는 대상체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 제2 대상체는 바이러스 백터에 대한 기존의 면역을 갖지 않는 대상체이다. 다른 실시양태에서, 이러한 제2 대상체는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 없이 또는 동일한 방식으로 투여된 (상이한 방식으로 투여된, 예컨대 병용으로 투여되지만 혼합되지는 않은) 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 없이 바이러스 백터가 투여된 대상체이다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 제2 또는 다른 대상체가 상이한 종인 경우에, 양은 대상체의 종이 투여를 제공받기에 적절하도록 척도화될 수 있으며, 이러한 척도화된 양은 본원에 제공된 바와 같은 총량으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 알로메트릭 척도화 또는 다른 척도화 방법이 사용될 수 있다. 제2 대상체 또는 다른 대상체에서의 면역 반응 뿐만 아니라 트랜스진 발현은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 상용 방법을 사용하여 또는 달리 본원에 제공된 바와 같이 평가될 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 본원에 기재된 바와 같은 제2 또는 다른 대상체에서 이들 양 중 하나 이상을 결정하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다.

[0079] "합성 나노담체(들)"는 자연에서 발견되지 않고, 크기가 5 마이크로미터 이하인 적어도 하나의 치수를 보유하는 개별 대상을 의미한다. 일부는 나노입자가 일반적으로 합성 나노담체로서 포함되지만, 특정 실시양태에서 합성 나노담체는 일부는 나노입자를 포함하지 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 키토산을 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질-기반 나노입자가 아니다. 추가 실시양태에서, 합성 나노담체는 인지질을 포함하지 않는다.

[0080] 합성 나노담체는 지질-기반 나노입자 (본원에서 지질 나노입자, 즉 그들의 구조를 구성하는 대다수의 물질이 지질인 나노입자로서 지칭되기도 함), 중합체 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제-기반 에멀전, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자 (즉, 주로 바이러스 구조 단백질로 구성되지만, 감염성이 아니거나 또는 낮은 감염성을 갖는 입자), 펩티드 또는 단백질-기반 입자 (본원에서 단백질 입자, 즉 그들의 구조를 구성하는

대다수의 물질이 펩티드 또는 단백질인 입자로서 지칭되기도 함) (예컨대, 알부민 나노입자) 및/또는 나노물질의 조합을 사용하여 개발된 나노입자, 예컨대 지질-중합체 나노입자 중 1개 또는 복수개일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 합성 나노담체는 구형, 입방형, 피라미드형, 직사각형, 원통형, 토로이드형 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 상이한 형상일 수 있다. 본 발명에 따른 합성 나노담체는 하나 이상의 표면을 포함한다. 본 발명의 실시예 사용하기 위해 적합화될 수 있는 예시적인 합성 나노담체는 (1) 미국 특허 5,543,158 (Gref et al.)에 개시된 생분해성 나노입자, (2) 공개된 미국 특허 출원 20060002852 (Saltzman et al.)의 중합체 나노입자, (3) 공개된 미국 특허 출원 20090028910 (DeSimone et al.)의 리소그래픽적으로 구축된 나노입자, (4) WO 2009/051837 (von Andrian et al.)의 개시내용, (5) 공개된 미국 특허 출원 2008/0145441 (Penades et al.)에 개시된 나노입자, (6) 공개된 미국 특허 출원 20090226525 (de los Rios et al.)에 개시된 단백질 나노입자, (7) 공개된 미국 특허 출원 20060222652 (Sebbel et al.)에 개시된 바이러스-유사 입자, (8) 공개된 미국 특허 출원 20060251677 (Bachmann et al.)에 개시된 핵산 부착된 바이러스-유사 입자, (9) WO2010047839A1 또는 WO2009106999A2에 개시된 바이러스-유사 입자, (10) 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" *Nanomedicine*. 5(6):843-853 (2010)]에 개시된 나노침전된 나노입자, (11) 미국 공개 번호 2002/0086049에 개시된 아포토시스 세포, 아포토시스체 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.

[0081] 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 일부 실시양태에서 보체를 활성화하는 히드록실 기를 갖는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화하는 히드록실 기가 아닌 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 실질적으로 활성화하는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 실질적으로 활성화하지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화하는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화하지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 바이러스-유사 입자를 배제한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, 또는 1:10 이상의 중량비를 보유할 수 있다.

[0082] "바이러스 벡터의 트랜스진" 또는 "트랜스진" 등은 바이러스 벡터를 사용하여 세포 내로 수송되고, 바람직하게는 일부 실시양태에서, 일단 세포 내에 있으면, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 치료 용도를 위해 각각 단백질 또는 핵산 분자를 생산하도록 발현되는 핵산 물질을 지칭한다. "발현된" 또는 "발현" 등은 트랜스진으로 세포가 형질도입되고 형질도입된 세포에 의해 프로세싱된 후의 기능적인 (즉, 원하는 목적을 위해 생리학상 활성인) 유전자 생성물의 합성을 지칭한다. 이러한 유전자 생성물은 또한 본원에서 "트랜스진 발현 생성물"로 지칭된다. 따라서, 발현된 생성물은 트랜스진에 의해 코딩된 결과적인 단백질 또는 핵산, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 치료 RNA이다.

[0083] "바이러스 벡터"는 페이로드, 예컨대 핵산(들)을 세포에 전달할 수 있거나 전달하는 바이러스-기반 전달 시스템을 의미한다. 일반적으로, 상기 용어는 페이로드를 포함할 수 있거나 또는 또한 포함하는 (그리고 그렇게 개조된), 바이러스 성분 예컨대 캡시드 및/또는 코트 단백질을 갖는 바이러스 벡터 구축물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 트랜스진을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 본원에 제공된 단백질, 예컨대 치료 단백질, DNA-결합 단백질 또는 엔도뉴클레아제를 코딩하는 것이다. 다른 실시양태에서, 트랜스진은 가이드 RNA, 안티센스 핵산, snRNA, RNAi 분자 (예를 들어, dsRNA 또는 ssRNA), miRNA, 또는 트리플렉스-형성 올리고뉴클레오타이드 (TFO) 등을 코딩한다. 다른 실시양태에서, 페이로드는 그 자체가 치료제(들)인 핵산(들)이고, 전달된 핵산(들)의 발현은 요구되지 않는다. 예를 들어, 핵산(들)은 siRNA, 예컨대 합성 siRNA일 수 있다.

[0084] 일부 실시양태에서, 페이로드는 또한 다른 성분, 예컨대 역전된 말단 반복부 (ITR), 마커 등을 코딩할 수 있다. 페이로드는 또한 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 발현 제어 DNA 서열은 프로모터, 인핸서, 및 오퍼레이터를 포함하고, 이는 일반적으로, 발현 구축물이 활용될 발현 시스템에 기초하여 선택된다. 일부 실시양태에서, 프로모터 및 인핸서 서열은 유전자 발현을 증가시킬 수 있는 능력에 대해 선택되는 반면, 오퍼레이터 서열은 유전자 발현을 조절할 수 있는 능력에 대해 선택될 수 있다. 페이로드는 또한 일부 실시양태에서, 숙주 세포에서 상동 재조합을 용이하게 하고, 바람직하게는 촉진하는 서열을 포함할 수 있다.

[0085] 예시적인 발현 제어 서열은 프로모터 서열, 예를 들어 시토메갈로바이러스 프로모터; 라우스 육종 바이러스 프

로모터; 및 원숭이 바이러스 40 프로모터; 뿐만 아니라 본원의 다른 곳에 개시되거나 또는 달리 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 유형의 프로모터를 포함한다. 일반적으로, 프로모터는 목적하는 발현 생성물을 코딩하는 서열의 상류 (즉, 5')에 작동가능하게 연결된다. 페이로드는 또한 코딩 서열의 하류 (즉, 3')에 작동가능하게 연결된 적합한 폴리아데닐화 서열 (예를 들어, SV40 또는 인간 성장 호르몬 유전자 폴리아데닐화 서열)을 포함할 수 있다.

[0086] 일반적으로, 바이러스 벡터는 1개 이상의 목적하는 핵산으로 세포를 형질도입할 수 있도록 조작된다. 또한, 본원에 제공된 치료 용도를 위해, 바이러스 벡터는 복제-결손인 것이 바람직하다는 것이 이해될 것이다. 바이러스 벡터는 비제한적으로 레트로바이러스 (예를 들어, 뮤린 레트로바이러스, 조류 레트로바이러스, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), 하비 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스 (GaLV) 및 라우스 육종 바이러스 (RSV)), 렌티바이러스, 포진 바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 알파바이러스 등에 기초할 수 있다. 다른 예는 본원의 다른 곳에 제공되거나 또는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 바이러스 벡터는 바이러스의 천연 변이체, 균주, 또는 혈청형, 예컨대 본원에 제공된 것 중 어느 하나에 기초할 수 있다. 바이러스 벡터는 또한 분자 진화를 통해 선택된 바이러스에 기초할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [J.T. Koerber et al., Mol. Ther. 17(12):2088-2095] 및 미국 특허 번호 6,09,548 참조). 바이러스 벡터는 비제한적으로 아데노-연관 바이러스 (AAV), 예컨대 AAV8 또는 AAV2에 기초할 수 있다. 바이러스 벡터는 또한 Anc80에 기초할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 AAV 벡터 또는 Anc80 벡터는 각각 AAV 또는 Anc80에 기초한 바이러스 벡터이고, 핵산 물질의 전달을 위해 패키징될 수 있는 바이러스 성분, 예컨대 캡시드 및/또는 코트 단백질을 갖는다. AAV 벡터의 다른 예는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74, 또는 AAV-2i8 또는 그의 변이체에 기초한 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바이러스 벡터는 또한 조작된 벡터, 재조합 벡터, 돌연변이체 벡터, 또는 하이브리드 벡터일 수 있다. 이러한 벡터를 생성하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 "키메라 바이러스 벡터"이다. 이러한 실시양태에서, 이는 바이러스 벡터가 1종 초과 바이러스 또는 바이러스 벡터로부터 유래된 바이러스 성분으로 구성된다는 것을 의미한다. 예를 들어, PCT 공개 W001/091802 및 W014/168953, 및 미국 특허 번호 6,468,771을 참조한다. 이러한 바이러스 벡터는, 예를 들어, AAV8/Anc80 또는 AAV2/Anc80 바이러스 벡터일 수 있다.

[0087] 추가 바이러스 벡터 요소는 시스 또는 트랜스로 기능할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 또한 표적 (공여자) 서열의 5' 또는 3' 말단에 플랭킹된 1개 이상의 역전된 말단 반복부 (ITR) 서열(들), 전사를 촉진하는 발현 제어 요소 (예를 들어, 프로모터 또는 인핸서), 인트론 서열, 스테퍼/필러 폴리뉴클레오타이드 서열 (일반적으로, 불활성 서열), 및/또는 표적 (공여자) 서열의 3' 단부에 위치한 폴리 (A) 서열을 포함하는 벡터 게놈을 포함한다.

[0088] C. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물

[0089] 중요한 것으로, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 바이러스 벡터의 바이러스 항원에 대한 기존의 면역 및/또는 바이러스 벡터의 투여에 의한 개선된 효과를 갖는 대상체에게 바이러스 벡터를 투여하는 것을 제공한다. 따라서, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 모체-전달된 항체를 갖는 신생 대상체 및 달리 기존의 면역 수준으로 인해 바이러스 벡터를 사용한 치료로부터 배제될 대상체를 포함한 대상체를 바이러스 벡터로 치료하는데 유용하다. 이러한 바이러스 벡터는 유전자 요법 등을 포함한 다양한 목적을 위해 핵산을 전달하는데 사용될 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역은 그의 효능에 불리한 영향을 미칠 수 있고, 또한 그의 재투여를 방해할 수 있다. 중요한 것으로, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 트랜스진의 개선된 발현을 달성하고/거나 바이러스 벡터에 대한 면역 반응을 감소시킴으로써 상기 언급된 장애를 극복하는 것으로 확인되었다. 본 발명자들은 놀랍게도 바이러스 벡터와 혼합된 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체가 대상체에서, 예를 들어 바이러스 벡터에 대한 기존의 면역을 갖는 대상체에서, 예컨대 바이러스 벡터가 대상체에게 이전에 투여되지 않은 경우에 개선된 트랜스진 발현을 달성할 수 있다는 것을 발견하였다. 또한, 놀랍게도, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터의 이러한 혼합 투여가 바이러스 벡터의 제1 투여 시 대상체에서 개선된 트랜스진 발현을 달성하지만, 혼합이 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터의 후속 투여의 효능에 반드시 필요한 것은 아니라는 것을 또한 발견하였다. 추가로, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 보다 높은 용량이 또한 기존의 면역을 갖는 대상체의 치료를 가능하게 할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0090] 또한 상기 언급된 바와 같이, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체 및 바이러스 벡터의 혼합 투여가 트랜스진 발현을 감소시키지 않으면서 바이러스 벡터의 감소된 용량을 달성하는데 사용될 수 있다는 것을 발견하였다.

- [0091] 트랜스진
- [0092] 바이러스 벡터의 페이로드는 트랜스진일 수 있다. 예를 들어, 트랜스진은 목적하는 발현 생성물, 예컨대 폴리펩티드, 단백질, 단백질 혼합물, DNA, cDNA, 기능적 RNA 분자 (예를 들어, RNAi, miRNA), mRNA, RNA 레플리콘, 또는 다른 관심 생성물을 코딩할 수 있다.
- [0093] 예를 들어, 트랜스진의 발현 생성물은 대상체, 예컨대 질환 또는 장애를 갖는 대상체에게 유익한 단백질 또는 그의 부분일 수 있다. 단백질은 세포외, 세포내 또는 막-결합된 단백질일 수 있다. 트랜스진은, 예를 들어 효소, 혈액 유도제, 호르몬, 림포카인, 예컨대 인터류킨 및 인터페론, 응고제, 성장 인자, 신경전달물질, 종양 억제자, 아포지단백질, 항원, 및 항체를 코딩할 수 있다. 대상체는 대상체의 단백질의 내인성 버전에 결함이 있거나 또는 이를 제한된 양으로 생산하거나 또는 전혀 생산하지 않는 질환 또는 장애를 가질 수 있거나 또는 갖는 것으로 의심될 수 있다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 트랜스진의 발현 생성물은 대상체에게 유익한 유전자 또는 그의 부분일 수 있다.
- [0094] 치료 단백질의 예는 주입가능하거나 주사가 가능한 치료 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고 인자, 시토카인 및 인터페론, 성장 인자, 아디포카인 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0095] 주입가능하거나 주사가 가능한 치료 단백질의 예는, 예를 들어 토실리주맙 (로슈(Roche)/악템라(Actemra)®), 알파-1 항트립신 (카마다(Kamada)/AAT), 헤마티드(Hematide)® (아피맥스(Affymax) 및 다케다(Takeda), 합성 펩티드), 알빈테르페론 알파-2b (노파르티스(Novartis)/잘빈(Zalbin)™), 루신(Rhucin)® (파밍 그룹(Pharming Group), C1 억제제 대체 요법), 테사모델린 (테라테크놀로지스(Theratechnologies)/에그리프타(Egrifta), 합성 성장 호르몬-방출 인자), 오크렐리주맙 (제넨테크(Genentech), 로슈 및 바이오젠(Biogen)), 벨리무맙 (글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)/벤리스타(Benlysta)®), 페글로티카제 (사비엔트 파마슈티칼스(Savient Pharmaceuticals)/크리스텍사(Krystexxa)™), 탈리글루세라제 알파 (프로탈릭스/유플리소), 아갈시다제 알파 (샤이어(Shire)/레프라갈(Replagal)®), 및 벨라글루세라제 알파 (샤이어(Shire))를 포함한다.
- [0096] 효소의 예는 리소자임, 옥시도리덕타제, 트랜스퍼라제, 히드롤라제, 리아제, 이소머라제, 아스파라기나제, 우리카제, 글리코시다제, 프로테아제, 뉴클레아제, 콜라게나제, 히알루로니다제, 헤파리나제, 헤파라나제, 키나제, 포스파타제, 리신 및 리가제를 포함한다. 효소의 다른 예는 이미글루세라제 (예를 들어, 세레자임(CEREZYME)™), a-갈락토시다제 A (a-gal A) (예를 들어, 아갈시다제 베타, 파브리자임(FABRYZYME)™), 산 a-글루코시다제 (GAA) (예를 들어, 알글루코시다제 알파, 루미자임(LUMIZYME)™, 미오자임(MYOZYME)™), 및 아틸솔파타제 B (예를 들어, 라로니다제, 알두라자임(ALDURAZYME)™, 이두르솔파제, 엘라프라제(ELAPRASE)™, 아틸솔파타제 B, 나글라자임(NAGLAZYME)™)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 효소 대체 요법에 사용되는 것을 포함한다.
- [0097] 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), 항윌러관 호르몬 (또는 윌러관 억제 인자 또는 호르몬), 아디포넥틴, 부신피질자극 호르몬 (또는 코르티코트로핀), 안지오텐시노겐 및 안지오텐신, 항이뇨 호르몬 (또는 바소프레신, 아르기닌 바소프레신), 심방-나트륨이뇨 펩티드 (또는 아트리오펩틴), 칼시토닌, 콜레시스토킨, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 에리트로포이에틴, 여포-자극 호르몬, 가스트린, 그렐린, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩티드 (GLP-1), GIP, 고나도트로핀-방출 호르몬, 성장 호르몬-방출 호르몬, 인간 융모성 고나도트로핀, 인간 태반 락토겐, 성장 호르몬, 인히빈, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (또는 소마토메딘), 렙틴, 황체형성 호르몬, 멜라닌세포 자극 호르몬, 오렉신, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, 프로락틴, 렐락신, 세크레틴, 소마토스타틴, 트롬보포이에틴, 갑상선-자극 호르몬 (또는 티로트로핀), 티로트로핀-방출 호르몬, 코르티솔, 알도스테론, 테스토스테론, 데히드로에피안드로스테론, 안드로스텐디온, 디히드로테스토스테론, 에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 프로게스테론, 칼시트리올 (1,25-디히드록시비타민 D3), 칼시디올 (25-히드록시비타민 D3), 프로스타글란딘, 류코트리엔, 프로스타시클린, 트롬복산, 프로락틴 방출 호르몬, 리포트로핀, 뇌 나트륨이뇨 펩티드, 뉴로펩티드 Y, 히스타민, 엔도텔린, 체장 폴리펩티드, 레닌, 및 엔케팔린을 포함한다.
- [0098] 혈액 또는 혈액 응고 인자의 예는 인자 I (피브리노겐), 인자 II (프로트롬빈), 조직 인자, 인자 V (프로악셀레린, 불안정한 인자), 인자 VII (안정한 인자, 프로콘버틴), 인자 VIII (항혈우병성 글로불린), 인자 IX (크리스마스 인자 또는 혈장 트롬보플라스틴 성분), 인자 X (스튜어트-프라우 인자), 인자 Xa, 인자 XI, 인자 XII (하계만 인자), 인자 XIII (피브린-안정화 인자), 폰 빌레브란트 인자, 폰 헬데브란트 인자, 프리칼리크레인 (플레처 인자), 고분자량 키니노겐 (HMWK) (피츠제랄드 인자), 피브로넥틴, 피브린, 트롬빈, 항트롬빈, 예컨대 항트

롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제자 (ZPI), 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA), 우로키나제, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (PAI1), 플라스미노겐 활성화제 억제제-2 (PAI2), 암 응고촉진제, 및 에포에틴 알파 (에포젠, 프로크리트)를 포함한다.

[0099] 시토카인의 예는 림포카인, 인터류킨, 및 케모카인, 유형 1 시토카인, 예컨대 IFN- γ , TGF- β , 및 유형 2 시토카인, 예컨대 IL-4, IL-10, 및 IL-13을 포함한다.

[0100] 성장 인자의 예는 아드레노메둘린 (AM), 안지오프이에틴 (Ang), 자가분비 운동성 인자, 골 형태발생 단백질 (BMP), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 표피 성장 인자 (EGF), 에리트로포이에틴 (EPO), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 신경교 세포 라인-유도된 신경영양 인자 (GDNF), 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간세포암-유래 성장 인자 (HDGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 이동-자극 인자, 미오스타틴 (GDF-8), 신경 성장 인자 (NGF) 및 다른 뉴로트로핀, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 트롬보포이에틴 (TPO), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF- α), 형질전환 성장 인자 베타 (TGF- β), 종양 괴사 인자-알파 (TNF- α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), Wnt 신호전달 경로, 태반 성장 인자 (PlGF), [(소 태아 소마토트로핀)] (FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, 및 IL-7을 포함한다.

[0101] 아디포카인의 예는 렙틴 및 아디포넥틴을 포함한다.

[0102] 치료 단백질의 추가의 예는 수용체, 신호전달 단백질, 세포골격 단백질, 스캐폴드 단백질, 전사 인자, 구조 단백질, 막 단백질, 시토솔 단백질, 결합 단백질, 핵 단백질, 분비된 단백질, 골지 단백질, 내형질 세망 단백질, 미토콘드리아 단백질, 및 소포 단백질 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0103] 트랜스진은 대사성 간 질환, 예를 들어, 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) 및 비알콜성 지방간염 (NASH)); 또는 유전성 대사 장애, 예를 들어, 알라질 증후군, 알파-1 항트립신 결핍, 크리글러-나자르 증후군, 갈락토스혈증, 고셔병, 길버트 증후군, 혈액소증, 리소솜 산 리파제 결핍 (LAL-D), 유기 산혈증, 라이 증후군, 제I형 글리코겐 축적 질환, 우레아 사이클 장애, 및 월슨병을 치료하기 위한 효소를 코딩하는 것일 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 상기 중 어느 하나를 갖는 것이다. 예를 들어, 대상체는 유기 산혈증, 예컨대 메틸말로산혈증 (MMA) 또는 우레아 사이클 장애, 예컨대 오르니틴 카르바밀라제 결핍을 갖는 것일 수 있다. 따라서, 트랜스진은 일부 실시양태에서 메틸말로노일-CoA 뮤타제 (MUT) 또는 오르니틴 트랜스카르바밀라제 (OTC)를 코딩한다.

[0104] 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 발현 생성물은 표적 유전자 또는 표적 유전자의 일부를 파괴, 교정/복구, 또는 대체하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부/Cas (CRISPR/Cas) 시스템이 정확한 게놈 편집을 위해 사용될 수 있다. 시스템에서, 단일 CRISPR-연관 뉴클레아제 (Cas 뉴클레아제)는 염기 서열의 짧은 반복을 함유하는 DNA 유전자좌를 포함하는 특이적 DNA 표적을 인식하도록 가이드 RNA (짧은 RNA)에 의해 프로그램화될 수 있다. 각각의 CRISPR 유전자좌는 바이러스 게놈 물질로부터 유래된 스페이서 DNA의 짧은 절편에 플랭킹된다. 가장 통상적인 시스템인 유형 II CRISPR 시스템에서, 스페이서 DNA는 트랜스-활성화 RNA (tracrRNA)와 혼성화하고, 이는 CRISPR-RNA (crRNA)로 프로세싱된 다음 Cas 뉴클레아제와 회합하여 복합체를 형성하고, 이는 RNase III 프로세싱을 개시하여 외래 DNA의 분해를 발생시킨다. 표적 서열은 바람직하게는 인식되도록 하기 위해 그의 3' 단부 상에 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM) 서열을 함유한다. 시스템은 다수의 방식으로 변형될 수 있고, 예를 들어 합성 가이드 RNA는 CRISPR 벡터에 융합될 수 있고, 다양한 상이한 가이드 RNA 구조 및 요소가 가능하다 (헤어핀 및 스캐폴드 서열 포함).

[0105] 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 트랜스진 서열은 CRISPR/Cas 시스템의 임의의 1종 이상의 성분, 예컨대 발현되는 경우에 검출가능한 신호를 생성하는 리포터 서열을 코딩할 수 있다. 이러한 리포터 서열의 예는 β -락타마제, β -갈락토시다제 (LacZ), 알칼리성 포스파타제, 티미딘 키나제, 녹색 형광 단백질 (GFP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT), 루시페라제, 예를 들어 CD2, CD4, CD8을 포함한 막 결합 단백질, 및 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 리포터는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0106] 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 또 다른 예에서, 트랜스진은 RNA 생성물, 예컨대 tRNA, dsRNA, 리보솜 RNA, 촉매 RNA, siRNA, RNAi, miRNA, 소형 헤어핀 RNA (shRNA), 트랜스-스플라이싱 RNA, 및 안티센스 RNA를 코딩할 수 있다. 예를 들어, 특이적 RNA 서열은 대상체에서 표적화된 핵산 서열의 발현을 억제 또는 소멸시키는

위해 생성될 수 있다. 적합한 표적 서열은, 예를 들어 종양성 표적 및 바이러스성 질환을 포함한다.

- [0107] 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 트랜스진 서열은 발현되는 경우에 검출가능한 신호를 생성하는 리포터 서열을 코딩할 수 있거나, 또는 트랜스진 서열은 질환의 동물 모델을 생성하는데 사용될 수 있는 단백질 또는 기능적 RNA를 코딩할 수 있다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 또 다른 예에서, 트랜스진은 연구 목적을 위해, 예를 들어 트랜스진을 보유하는 체세포 트랜스제닉 동물 모델을 생성하기 위해, 예를 들어 트랜스진 생성물의 기능을 연구하기 위해 사용되도록 의도되는 단백질 또는 기능적 RNA를 코딩한다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 이러한 발현 생성물의 의도는 치료를 위한 것이다. 트랜스진의 다른 용도는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.
- [0108] 트랜스진의 서열은 발현 제어 서열을 또한 포함할 수 있다. 발현 제어 서열은 프로모터, 인핸서, 및 오퍼레이터를 포함하고, 이는 일반적으로, 발현 구축물이 활용될 발현 시스템에 기초하여 선택된다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 프로모터 및 인핸서 서열은 유전자 발현을 증가시킬 수 있는 능력에 대해 선택되는 반면, 오퍼레이터 서열은 유전자 발현을 조절할 수 있는 능력에 대해 선택될 수 있다. 전형적으로, 프로모터 서열은 목적하는 발현 생성물을 코딩하는 핵산 서열의 상류 (즉, 5')에 위치하고, 인접 서열에 작동가능하게 연결되어, 그에 의해 발현되는 목적하는 생성물의 양은 프로모터의 부재 하에 발현되는 양과 비교하여 증가된다. 일반적으로 프로모터 서열의 상류에 위치하는 인핸서 서열은 목적하는 생성물의 발현을 추가로 증가시킬 수 있다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 인핸서 서열(들)은 프로모터의 하류 및/또는 트랜스진 내에 위치할 수 있다. 트랜스진은 또한 숙주 세포 내에서의 상동 재조합 및/또는 패키징을 용이하게 하고, 바람직하게는 촉진하는 서열을 포함할 수 있다. 트랜스진은 또한 숙주 세포에서의 복제에 필요한 서열을 포함할 수 있다.
- [0109] 예시적인 발현 제어 서열은 간-특이적 프로모터 서열 및 구성적 프로모터 서열, 예컨대 본원에 제공될 수 있는 어느 하나를 포함한다. 다른 조직-특이적 프로모터는 특히 눈, 망막, 중추 신경계, 척수를 포함한다. 편재성 또는 흔재성 프로모터 및 인핸서의 예는 시토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 프로모터/인핸서 서열, 라우스 육종 바이러스 (RSV) 프로모터/인핸서 서열 및 다양한 포유동물 세포 유형에서 활성인 다른 바이러스 프로모터/인핸서, 또는 자연에 존재하지 않는 합성 요소 (예를 들어, 문헌 [Boshart et al., Cell, 41 :521-530 (1985)] 참조), SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR) 프로모터, 세포질 β -액틴 프로모터 및 포스포글리세롤 키나제 (PGK) 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0110] 오퍼레이터 또는 조절가능한 요소는 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 증가 또는 감소시킬 수 있는 신호 또는 자극에 반응성이다. 유도성 요소는 신호 또는 자극에 반응하여 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 증가시키는 것, 예를 들어 호르몬 유도성 프로모터이다. 억제성 요소는 신호 또는 자극에 반응하여 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 감소시키는 것이다. 전형적으로, 억제성 및 유도성 요소는 존재하는 신호 또는 자극의 양에 비례하여 반응한다. 트랜스진은 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나에서 이러한 서열을 포함할 수 있다.
- [0111] 트랜스진은 또한 코딩 서열의 하류 (즉, 3')에 작동가능하게 연결된 적합한 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다.
- [0112] 예를 들어, 유전자 요법을 위해 트랜스진을 전달하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Smith, Int. J. Med. Sci. 1(2): 76-91 (2004); Phillips, Methods in Enzymology: Gene Therapy Methods, Vol. 346, Academic Press (2002)] 참조). 본원에 기재된 트랜스진 중 임의의 것은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 본원에 기재된 바이러스 벡터 중 임의의 것 내로 혼입될 수 있으며, 예를 들어 미국 특허 번호 7,629,153을 참조한다.
- [0113] 바이러스 벡터
- [0114] 바이러스는 이들이 감염시킨 세포 내부에서 자신의 게놈을 수송하기 위한 전문화된 메커니즘을 진화시켜 왔고; 이러한 바이러스에 기초한 바이러스 벡터는 세포를 형질도입하기 위해 특정한 적용에 맞출 수 있다. 본원에 제공된 바와 같이 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있거나 또는 본원에 기재되어 있다. 적합한 바이러스 벡터는, 예를 들어 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 (HSV)-기반 벡터, 아데노바이러스-기반 벡터, 아데노-연관 바이러스 (AAV)-기반 벡터, 및 AAV-아데노바이러스 키메라 벡터를 포함한다.
- [0115] 본원에 제공된 바이러스 벡터는 레트로바이러스에 기초할 수 있다. 레트로바이러스는 단일-가닥 양성 센스 RNA 바이러스이다. 레트로바이러스 벡터는 바이러스 복제-부적격이 되도록 조작될 수 있다. 따라서, 레트로바이러스

스 박터는 생체내 안정한 유전자 전달에 특히 유용한 것으로 생각된다. 레트로바이러스 박터의 예는, 예를 들어 미국 공개 번호 20120009161, 20090118212, 및 20090017543에서 찾아볼 수 있으며, 바이러스 박터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0116] 렌티바이러스 박터는 본원에 제공된 바와 같은 바이러스 박터의 생산에 사용될 수 있는 레트로바이러스 박터의 예이다. 렌티바이러스의 예는 HIV (인간), 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV), 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV), 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV) 및 비스나 바이러스 (양 렌티바이러스)를 포함한다. 렌티바이러스 박터의 예는, 예를 들어 미국 공개 번호 20150224209, 20150203870, 20140335607, 20140248306, 20090148936, 및 20080254008에서 찾아볼 수 있으며, 바이러스 박터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0117] 단순 포진 바이러스 (HSV)-기반 바이러스 박터가 또한 본원에 제공된 바와 같이 사용하기에 적합하다. 많은 복제-결핍 HSV 박터는 복제를 방지하기 위해 1개 이상의 중간-초기 유전자를 제거하는 결실을 함유한다. HSV-기반 박터의 설명에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,837,532, 5,846,782, 5,849,572, 및 5,804,413, 및 국제 특허 출원 WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637, 및 WO 99/06583을 참조하고, 바이러스 박터 및 그의 제조 방법에 관한 설명은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0118] 바이러스 박터는 아데노바이러스에 기초할 수 있다. 바이러스 박터의 기초가 될 수 있는 아데노바이러스는 임의의 기원, 임의의 하위군, 임의의 하위유형, 하위유형의 혼합물, 또는 임의의 혈청형으로부터의 것일 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스는 하위군 A (예를 들어, 혈청형 12, 18, 및 31), 하위군 B (예를 들어, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 및 50), 하위군 C (예를 들어, 혈청형 1, 2, 5, 및 6), 하위군 D (예를 들어, 혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 및 42-48), 하위군 E (예를 들어, 혈청형 4), 하위군 F (예를 들어, 혈청형 40 및 41), 미분류 혈청군 (예를 들어, 혈청형 49 및 51), 또는 임의의 다른 아데노바이러스 혈청형의 것일 수 있다. 아데노바이러스 혈청형 1 내지 51은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC, 버지니아주 마나사스)으로부터 입수가 가능하다. 비-군 C 아데노바이러스, 및 심지어 비-인간 아데노바이러스를 사용하여 복제-결핍 아데노바이러스 박터를 제조할 수 있다. 비-군 C 아데노바이러스 박터, 비-군 C 아데노바이러스 박터의 생성 방법, 및 비-군 C 아데노바이러스 박터의 사용 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,801,030, 5,837,511, 및 5,849,561, 및 국제 특허 출원 WO 97/12986 및 WO 98/53087에 개시되어 있다. 임의의 아데노바이러스, 심지어 키메라 아데노바이러스가 아데노바이러스 박터에 대한 바이러스 계놈의 공급원으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 아데노바이러스는 복제-결핍 아데노바이러스 박터에 대한 바이러스 계놈의 공급원으로서 사용될 수 있다. 아데노바이러스 박터의 추가의 예는 미국 공개 번호 20150093831, 20140248305, 20120283318, 20100008889, 20090175897 및 20090088398에서 찾아볼 수 있으며, 바이러스 박터 및 그의 제조 방법에 관한 설명은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0119] 본원에 제공된 바이러스 박터는 또한 아데노-연관 바이러스 (AAV)에 기초할 수 있다. AAV 박터는 본원에 기재된 것과 같은 치료 용도에서 사용하기 위한 것으로 특히 관심 대상이다. AAV-기반 박터의 설명에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 8,679,837, 8,637,255, 8,409,842, 7,803,622, 및 7,790,449, 및 미국 공개 번호 20150065562, 20140155469, 20140037585, 20130096182, 20120100606, 및 20070036757을 참조한다. AAV 박터는 재조합 AAV 박터일 수 있다. AAV 박터는 또한 자기-상보적 (sc) AAV 박터일 수 있고, 이는 예를 들어, 미국 특허 공개 2007/01110724 및 2004/0029106, 및 미국 특허 번호 7,465,583 및 7,186,699에 기재되어 있으며, 바이러스 박터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

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

[0121] 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 바이러스 박터의 기초가 되는 바이러스는 합성, 예컨대 Anc80일 수 있다.

[0122] 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 바이러스 박터는 AAV/Anc80 박터, 예컨대 AAV8/Anc80 박터 또는 AAV2/Anc80 박터이다.

- [0123] 벡터의 기초가 될 수 있는 다른 바이러스는 AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, AAV10, AAV11, rh10, rh74 또는 AAV-2i8, 및 그의 변이체를 포함한다.
- [0124] 본원에 제공된 바이러스 벡터는 또한 알파바이러스를 기초로 할 수 있다. 알파바이러스는 신드비스(Sindbis) (및 VEEV) 바이러스, 아우라(Aura) 바이러스, 바반키(Babanki) 바이러스, 바마 포레스트(Barmah Forest) 바이러스, 베바루(Bebaru) 바이러스, 카바소우(Cabassou) 바이러스, 치쿤구니야(Chikungunya) 바이러스, 동부 말 뇌염(Eastern equine encephalitis) 바이러스, 에버글레이즈(Everglades) 바이러스, 포트 모건(Fort Morgan) 바이러스, 게타(Getah) 바이러스, 하이랜드스 J(Highlands J) 바이러스, 키지라가흐(Kyzylgach) 바이러스, 마야로(Mayaro) 바이러스, 메 트리(Me Tri) 바이러스, 미델뷔르흐(Middelburg) 바이러스, 모소 다스 페드라스(Mosso das Pedras) 바이러스, 무캄보(Mucambo) 바이러스, 엔두무(Ndumu) 바이러스, 오니옹-니옹(O'nyong-nyong) 바이러스, 픽수나(Pixuna) 바이러스, 리오 네그로(Rio Negro) 바이러스, 로스강(Ross River) 바이러스, 연어 채장 질환(Salmon pancreas disease) 바이러스, 쉼리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스, 남방 코끼리 물범(Southern elephant seal) 바이러스, 토나테(Tonate) 바이러스, 트로카라(Trocara) 바이러스, 우나(Una) 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염(Venezuelan equine encephalitis) 바이러스, 서부 말 뇌염(Western equine encephalitis) 바이러스, 및 화타로아(Whataroa) 바이러스를 포함한다. 알파바이러스 벡터의 예는 미국 공개 번호 20150050243, 20090305344, 및 20060177819에서 찾아볼 수 있고; 벡터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0125] 본원에 제공된 바이러스 벡터 중 어느 하나는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0126] 면역억제제
- [0127] 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF- β 신호전달 작용제; TGF- β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능의 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF- κ β 억제제; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제; 프로테아솜 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 커플링된 수용체 효능제; G-단백질 커플링된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토키인 억제제; 시토키인 수용체 억제제; 시토키인 수용체 활성화제; 과옥시즘 증식자-활성화된 수용체 길항제; 과옥시즘 증식자-활성화된 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스포타제 억제제 및 산화된 ATP를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 면역억제제는 또한,IDO, 비타민 D3, 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오프린, 6-메르캅토프린, 아스피린, 니플람산, 에스트리올, 트리폴리드, 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-10), 시클로스포린 A, siRNA 표적화 시토키인 또는 시토키인 수용체 등을 포함한다.
- [0128] 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)®)를 포함한다.
- [0129] 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), 테포롤리무스 (MK-8669), 에베롤리무스 (RAD0001), KU-0063794, PI-103, PP242, 템시롤리무스, 및 WYE-354 (미국 텍사스주 휴스턴 소재의 셀렉(Selleck)으로부터 입수 가능함)를 포함한다.
- [0130] 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, 노긴, 코르딘, DAN, 레프티, LTBP1, THBS1, 데코린)를 포함한다.
- [0131] 미토콘드리아 기능의 억제제의 예는 아트락틸로시드 (이칼륨 염), 봉크랙산 (트리암모늄 염), 카르보닐 시아나이드 m-클로로페닐히드라존, (예를 들어, 아트락틸리스 구미페라(Atractylis gummifera)로부터의) 카르복시아트락틸로시드, CGP-37157, (예를 들어, 문둘레아 세리세아(Mundulea sericea)로부터의) (-)-데구엘린, F16, 핵소키나제 II VDAC 결합 도메인 펩티드, 올리고마이신, 로테논, Ru360, SFK1, 및 (예를 들어, 스트렙토미세스 풀비시무스(Streptomyces fulvissimus)로부터의) 발리노마이신 (이엠디4바이오사이언시스(EMD4Biosciences), 미

국)을 포함한다.

- [0132] P38 억제제의 예는 SB-203580 (4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸술피닐페닐)-5-(4-피리딜)1H-이미다졸), SB-239063 (트랜스-1-(4-히드록시시클로헥실)-4-(플루오로페닐)-5-(2-메톡시-피리미딘-4-일) 이미다졸), SB-220025 (5-(2-아미노-4-피리미디닐)-4-(4-플루오로페닐)-1-(4-피페리디닐)이미다졸)), 및 ARRY-797을 포함한다.
- [0133] NF (예를 들어, $\text{NK-}\kappa\beta$) 억제제의 예는 IFRD1, 2-(1,8-나프티리딘-2-일)-페놀, 5-아미노살리실산, BAY 11-7082, BAY 11-7085, CAPE (카페인산 페네틸에스테르), 디에틸말레에이트, IKK-2 억제제 IV, IMD 0354, 락타시 스티, MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO], NF κB 활성화 억제제 III, NF- κB 활성화 억제제 II, JSH-23, 파르테놀리 드, 페닐아르신 옥시드 (PAO), PPM-18, 피롤리딘디티오카르바산 암모늄 염, QNZ, RO 106-9920, 로카글라미드, 로카글라미드 AL, 로카글라미드 C, 로카글라미드 I, 로카글라미드 J, 로카글라올, (R)-MG-132, 살리실산나트륨, 트리프톨리드 (PG490), 및 웨델로락톤을 포함한다.
- [0134] 아데노신 수용체 효능제의 예는 CGS-21680 및 ATL-146e를 포함한다.
- [0135] 프로스타글란딘 E2 효능제의 예는 E-프로스타노이드 2 및 E-프로스타노이드 4를 포함한다.
- [0136] 포스포디에스테라제 억제제 (비-선택적 및 선택적 억제제)의 예는 카페인, 아미노필린, IBMX (3-이소부틸-1-메 틸크산틴), 파라크산틴, 펜톡시필린, 테오브로민, 테오필린, 메틸화 크산틴, 빈포세틴, EHNA (에리트로-9-(2-히 드록시-3-노닐)아데닌), 아나그렐리드, 에녹시몬 (페르판(PERFAN)TM), 밀리논, 레보시멘돈, 메셈브린, 이부딜라 스트, 피클라밀라스트, 루테올린, 드로타베린, 로플루밀라스트 (다사스(DAXAS)TM, 달리레스프(DALIRESP)TM), 실 테나필 (레바티온(REVATION)[®]), 비아그라(VIAGRA)[®]), 타달라필 (애드서카(ADCIRCA)[®], 시알리스(CIALIS)[®]), 바르테나필 (레비트라(LEVITRA)[®], 스타신(STAXYN)[®]), 우데나필, 아바나필, 이카리인, 4-메틸피페라진 및 피라 졸로 피리미딘-7-1을 포함한다.
- [0137] 프로테아솜 억제제의 예는 보르테조미, 디술피람, 에피갈로카테킨-3-갈레이트 및 살리노스포라미드 A를 포함한 다.
- [0138] 키나제 억제제의 예는 베마시주맵, BIBW 2992, 세톡시맵 (에르비투스(ERBITUX)[®]), 이마티닙 (글리벡(GLEEVEC)[®]), 트라스투주맵 (헤르셉틴(HERCEPTIN)[®]), 게피티닙 (이레사(IRESSA)[®]), 라니비주맵 (루센티스(LUCENTIS)[®]), 페갑타닙, 소라페닙, 다사티닙, 수니티닙, 에를로티닙, 닐로티닙, 라파티닙, 파니투무 맵, 반데타닙, E7080, 파조파닙, 및 무브리티닙을 포함한다.
- [0139] 글루코코르티코이드의 예는 히드로코르티손 (코르티솔), 코르티손 아세테이트, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸 프레드니솔론, 텍사메타손, 베타메타손, 트리암시놀론, 베클로메타손, 플루드로코르티손 아세테이트, 데옥시코 르티코스테론 아세테이트 (DOCA), 및 알도스테론을 포함한다.
- [0140] 레티노이드의 예는 레티놀, 레티날, 트레티노인 (레티노산, 레틴-A(RETIN-A)[®]), 이소트레티노인 (아큐탄 (ACCUTANE)[®], 암네스탐(AMNESTEEM)[®], 클라라비스(CLARAVIS)[®], 소트레트(SOTRET)[®]), 알리트레티노인 (판레 틸(PANRETIN)[®]), 에트레티네이트 (테기손(TEGISON)TM) 및 그의 대사물 아시트레틴 (소리아탄(SORIATANE)[®]), 타자로텐 (타조락(TAZORAC)[®], 아바게(AVAGE)[®], 조락(ZORAC)[®]), 백사로텐 (탈그레틴(TARGRETIN)[®]), 및 아다 팔렌 (디페린(DIFFERIN)[®])을 포함한다.
- [0141] 시토키인 억제제의 예는 IL1ra, IL1 수용체 길항제, IGFBP, TNF-BF, 우로모듈린, 알파-2-마크로글로불린, 시클 로스포린 A, 펜타미딘, 및 펜톡시필린 (펜토팍(PENTOPAK)[®], 펜톡실(PENTOXIL)[®], 트렌탈(TRENTAL)[®])을 포함한 다.
- [0142] 퍼옥시솜 증식자-활성화된 수용체 길항제의 예는 GW9662, PPAR γ 길항제 III, G335, 및 T0070907 (이엠디4바이 오사이언시스, 미국)을 포함한다.
- [0143] 퍼옥시솜 증식자-활성화된 수용체 효능제의 예는 피오글리타존, 시글리타존, 클로피브레이트, GW1929, GW7647, L-165,041, LY 171883, PPAR γ 활성화제, Fmoc-Leu, 트로글리타존, 및 WY-14643 (이엠디4바이오사이언시스, 미 국)을 포함한다.
- [0144] 히스톤 데아세틸라제 억제제의 예는 히드록삼산 (또는 히드록사메이트) 예컨대 트리코스타틴 A, 시클릭 테트라 펩티드 (예컨대 트라프킨 B) 및 펩시펩티드, 벤즈아미드, 친전자성 케톤, 지방족 산 화합물 예컨대 페닐부티레 이트 및 발프로산, 히드록삼산 예컨대 보리노스타트 (SAHA), 벨리노스타트 (PXD101), LAQ824 및 파노비노스타트 (LBH589), 벤즈아미드 예컨대 엔티노스타트 (MS-275), CI994 및 모세티노스타트 (MGCD0103), 니코틴아미드,

NAD의 유도체, 디히드로쿠마린, 나프토피라논, 및 2-히드록시나프알데히드를 포함한다.

[0145] 칼시뉴린 억제제의 예는 시클로스포린, 피메크롤리무스, 보클로스포린, 및 타크롤리무스를 포함한다.

[0146] 포스파타제 억제제의 예는 BN82002 히드로클로라이드, CP-91149, 칼리쿨린 A, 칸타리드산, 칸타리딘, 시페르메트린, 에틸-3,4-테포스타틴, 포스트리에신 소듐 염, MAZ51, 메틸-3,4-테포스타틴, NSC 95397, 노르칸타리딘, 프로로센트롬 콘카복으로부터의 오카다산 암모늄 염, 오카다산, 오카다산 칼륨 염, 오카다산 소듐 염, 페닐아르신 옥시드, 다양한 포스파타제 억제제 각테일, 단백질 포스파타제 1C, 단백질 포스파타제 2A 억제제 단백질, 단백질 포스파타제 2A1, 단백질 포스파타제 2A2, 및 오르토바나듐산나트륨을 포함한다.

[0147] 합성 나노담체

[0148] 본원에 제공된 방법은 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 투여를 포함한다. 일반적으로, 면역억제제는 합성 나노담체의 구조를 구성하는 물질에 부가적인 요소이다. 예를 들어, 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 중합체로 구성되는 경우, 면역억제제는 하나 이상의 중합체에 부가된, 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서는 그에 부착된, 화합물이다. 합성 나노담체의 물질이 또한 면역관용성 효과를 발생시키는 경우의 실시양태에서, 면역억제제는 면역관용성 효과를 발생시키는 합성 나노담체의 물질에 추가적으로 존재하는 요소이다.

[0149] 매우 다양한 합성 나노담체가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 구체 또는 구형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 편평하거나 또는 플레이트 모양이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 정육면체 또는 입방체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 계란형 또는 타원이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 원통형, 원뿔형 또는 피라미드형이다.

[0150] 일부 실시양태에서, 각각의 합성 나노담체가 유사한 특성을 갖도록 크기 또는 형상 면에서 비교적 균일한 합성 나노담체의 집단을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노담체의 총수에 기초하여, 본원에 제공된 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 합성 나노담체의 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는, 이러한 합성 나노담체의 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10%, 또는 20% 이내에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다.

[0151] 합성 나노담체는 고체 또는 중공일 수 있고, 1개 이상의 층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각 층은 다른 층(들)과 비교해서 고유한 조성 및 고유한 특성을 갖는다. 하나의 예로, 합성 나노담체는 코어/셸 구조를 가질 수 있고, 여기서 코어는 1개의 층이고 (예를 들어, 중합체 코어), 셸은 제2의 층 (예를 들어, 지질 이중층 또는 단층)이다. 합성 나노담체는 복수의 상이한 층을 포함할 수 있다.

[0152] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 지질을 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 리포솜을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 이중층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 단층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 미셀을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 중합체 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 비-중합체 코어 (예를 들어, 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자, 골 입자, 바이러스 입자, 단백질, 핵산, 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.

[0153] 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체 합성 나노담체는 비-중합체 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.

[0154] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 친양쪽성 실체를 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 실체는 증가된 안정성, 개선된 균일성, 또는 증가된 점도를 갖는 합성 나노담체의 생성을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친양쪽성 실체는 지질 막 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)의 내부 표면과 회합될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 많은 친양쪽성 실체가 본 발명에 따라 합성 나노담체를 제조하는데 사용하기에 적합하다. 이러한 친양쪽성 실체는 포스포글리세리드; 포스파티딜콜린; 디팔미토일 포스파티딜콜린 (DPPC); 디올레일포스파티딜 에탄올아민 (DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄 (DOTMA); 디올레일포스파티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤숙시네이트; 디포스파티딜 글리세롤 (DPPG); 핵산데칸올; 지방 알콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 표면 활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세리드; 지방산 디글리세리드; 지방산 아마이드; 소르비탄 트리올레이트 (스판(Span)®85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트 (스

관®20); 폴리소르베이트 20 (트윈(Tween)®20); 폴리소르베이트 60 (트윈®60); 폴리소르베이트 65 (트윈®65); 폴리소르베이트 80 (트윈®80); 폴리소르베이트 85 (트윈®85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서팩틴; 폴록사머; 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 트리올레에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스파티딜세린; 포스파티딜이노시톨; 스펅고미엘린; 포스파티딜에탄올아민 (세팔린); 카르디올리핀; 포스파티드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스파티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실-아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀레에이트; 헥사데실 스테아레이트; 이소프로필 미리스테이트; 킬록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스파티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 인지질; 높은 계면활성제 특성을 갖는 합성 및/또는 천연 세제; 데옥시콜레이트; 시클로덱스트린; 카오트로픽 염; 이온 쌍형성 작용제; 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 친양쪽성 실체 성분은 상이한 친양쪽성 실체의 혼합물일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이것이 계면활성제 활성을 갖는 물질의 포괄적인 목록이 아니라 예시적인 목록이라는 것을 인식할 것이다. 임의의 친양쪽성 실체가 본 발명에 따라 사용될 합성 나노담체의 생성에 사용될 수 있다.

[0155] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 탄수화물을 임의로 포함할 수 있다. 탄수화물은 천연 또는 합성일 수 있다. 탄수화물은 유도된 천연 탄수화물일 수 있다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 모노사카라이드 또는 디사카라이드를 포함하며, 이는 글루코스, 프룩토스, 갈락토스, 리보스, 락토스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 셀로비오스, 만노스, 크실로스, 아라비노스, 글루쿠론산, 갈락토론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민, 및 뉴람산을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 폴리사카라이드이며, 이는 폴루란, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 히드록시셀룰로스 (HC), 메틸셀룰로스 (MC), 텍스트란, 시클로덱스트란, 글리코젠, 히드록시에틸전분, 카라기난, 글리콘, 아밀로스, 키토산, N,O-카르복실메틸키토산, 알긴 및 알긴산, 전분, 키틴, 이눌린, 곤약, 글루코만난, 푸스툴란, 헤파린, 히알루론산, 커들란 및 크산탄을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 탄수화물, 예컨대 폴리사카라이드를 포함하지 않는다 (또는 구체적으로 배제한다). 특정 실시양태에서, 탄수화물은 탄수화물 유도체, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 크실리톨, 에리트리톨, 말티톨 및 락티톨을 포함하나 이에 제한되지는 않는 당 알콜을 포함할 수 있다.

[0156] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-중결, 플루로닉 중합체인 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)가 비-메톡시-중결, 플루로닉 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 모든 중합체가 비-메톡시-중결, 플루로닉 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-중결 중합체인 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)가 비-메톡시-중결 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 모든 중합체가 비-메톡시-중결 중합체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 플루로닉 중합체를 포함하지 않는 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)가 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 모든 중합체가 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 이러한 중합체는 코팅 층 (예를 들어, 리포솜, 지질 단층, 미셀 등)에 의해 둘러싸일 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 요소가 상기 중합체에 부착될 수 있다.

[0157] 면역억제제는 수많은 방법 중 임의의 것에 의해 합성 나노담체와 커플링될 수 있다. 일반적으로, 부착은 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합에 따른 결과일 수 있다. 이러한 결합으로 인해, 면역억제제가 합성 나노담체의 표면에 부착되게 하고/거나 합성 나노담체 내에 함유 (캡슐화)될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 대한 결합보다는 오히려 합성 나노담체의 구조에 따른 결과로서 합성 나노담체에 의해 캡슐화된다. 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함하고, 면역억제제는 중합체에 부착된다.

[0158] 면역억제제와 합성 나노담체 사이의 결합에 따른 결과로서 부착이 일어나는 경우, 이러한 부착은 커플링 모이어티를 통해 일어날 수 있다. 커플링 모이어티는, 이를 통해 면역억제제가 합성 나노담체와 결합되는 임의의 모이어티일 수 있다. 이러한 모이어티는 공유 결합, 예컨대 아마이드 결합 또는 에스테르 결합을 포함할 뿐만 아니라 면역억제제를 합성 나노담체와 (공유 또는 비공유) 결합시켜 주는 별개의 분자를 포함한다. 이러한 분자는

링커 또는 중합체 또는 그의 유닛을 포함한다. 예를 들어, 커플링 모이어티는 면역억제제와 정전기적으로 결합하는, 하전된 중합체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 커플링 모이어티는 그와 공유 결합되는 중합체 또는 그의 유닛을 포함할 수 있다.

[0159] 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함한다. 이들 합성 나노담체는 완전하게 중합체성일 수 있거나 또는 중합체와 다른 물질의 혼합물일 수 있다.

[0160] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 중합체들이 회합하여 중합체 매트릭스를 형성한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 성분, 예컨대 면역억제제는 이러한 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 공유 회합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공유 회합은 링커에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 성분은 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 비공유 회합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 성분은 중합체 매트릭스 내에 캡슐화될 수 있고/거나, 이러한 매트릭스에 의해 둘러싸일 수 있고/거나 상기 매트릭스 전반에 걸쳐 분산될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 성분은 소수성 상호작용, 전하 상호작용, 반 데르 발스 힘 등에 의해 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 회합될 수 있다. 광범위한 중합체 및 그로부터 중합체 매트릭스를 형성하는 방법은 통상적으로 공지되어 있다.

[0161] 중합체는 천연 또는 비천연 (합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 단독중합체이거나 또는 2개 이상의 단량체를 포함하는 공중합체일 수 있다. 순서의 면에서, 공중합체는 무작위 또는 블록일 수 있거나 또는 무작위 및 블록 순서의 조합을 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따른 중합체는 유기 중합체이다.

[0162] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리아미드, 또는 폴리에테르, 또는 그의 유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산), 또는 폴리카프로락톤, 또는 그의 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체가 생분해성인 것이 바람직하다. 따라서, 이들 실시양태에서, 중합체가 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛을 포함하는 경우, 중합체는 폴리에테르와 생분해성 중합체의 블록 공중합체를 포함하여, 중합체가 생분해성이 되도록 하는 것이 바람직하다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리에테르 또는 그의 유닛, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 유닛을 단독으로 포함하지 않는다.

[0163] 본 발명에 사용하기 적합한 중합체의 다른 예는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트 (예를 들어, 폴리(1,3-디옥산-2온)), 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)), 폴리프로필푸마레이트, 폴리아미드 (예를 들어, 폴리 카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-코-글리콜리드, 폴리카프로락톤, 폴리히드록시산 (예를 들어, 폴리(β -히드록시알카노에이트))), 폴리(오르토에스테르), 폴리스시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 및 폴리아민, 폴리리신, 폴리리신-PEG 공중합체, 및 폴리(에틸렌이민)-PEG 공중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0164] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 중합체는 21 C.F.R. § 177.2600 하에 미국 식품 의약품국 (FDA)에 의해 인간에게 사용하도록 승인된 중합체를 포함하며, 이는 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리발레놀락톤, 폴리(1,3-디옥산-2온)); 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리스시아노아크릴레이트를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0165] 일부 실시양태에서, 중합체는 친수성일 수 있다. 예를 들어, 중합체는 음이온성 기 (예를 들어, 포스페이트 기, 술페이트 기, 카르복실레이트 기); 양이온성 기 (예를 들어, 4급 아민 기); 또는 극성 기 (예를 들어, 히드록실 기, 티올 기, 아민 기)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 합성 나노담체 내에 친수성 환경을 생성한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 중합체 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 합성 나노담체 내에 소수성 환경을 생성한다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노담체 내에 혼입되는 물질의 성질에 강력한 영향을 미칠 수 있다.

[0166] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 모이어티 및/또는 관능기에 의해 변형될 수 있다. 다양한 모이어티 또는 관능기가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 탄수화물; 및/또는 폴리사카라이드로부터 유래된 비-시클릭 폴리아세탈에 의해 변형될 수 있다 (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). 특정 실시양태는 미국 특허 번호 5543158 (Gref et al.), 또는 WO 공개 번호

WO2009/051837 (Von Andrian et al.)의 일반적 교시를 이용하여 이루어질 수 있다.

- [0167] 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 에루산 중 하나 이상일 수 있다.
- [0168] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에스테르일 수 있고, 이는 락트산과 글리콜산 유닛을 포함하는 공중합체, 예컨대 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드) (본원에서 집합적으로 "PLGA"로서 지칭됨); 및 글리콜산 유닛을 포함하는 단독중합체 (본원에서 "PGA"로서 지칭됨); 및 락트산 유닛을 포함하는 단독중합체, 예컨대 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드, 및 폴리-D,L-락티드 (본원에서 집합적으로 "PLA"로서 지칭됨)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예시적인 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리히드록시산; 락티드와 글리콜리드의 공중합체 및 PEG 공중합체 (예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체), 및 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리(카프로락톤), 폴리(카프로락톤)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[α -(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 그의 유도체를 포함한다.
- [0169] 일부 실시양태에서, 중합체는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산과 글리콜산의 생체적합성 및 생분해성 공중합체이고, 다양한 형태의 PLGA는 락트산:글리콜산의 비를 특징으로 한다. 락트산은 L-락트산, D-락트산, 또는 D,L-락트산일 수 있다. PLGA의 분해 속도는 락트산:글리콜산 비를 변경시킴으로써 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용될 PLGA는 대략 85:15, 대략 75:25, 대략 60:40, 대략 50:50, 대략 40:60, 대략 25:75, 또는 대략 15:85의 락트산:글리콜산 비를 특징으로 한다.
- [0170] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴 중합체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 아크릴 중합체는, 예를 들어 아크릴산과 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리스시아노아크릴레이트, 및 상기 중합체 중 하나 이상을 포함하는 조합물을 포함한다. 아크릴 중합체는 4급 암모늄 기의 함량이 낮은 아크릴산과 메타크릴산 에스테르의 완전 중합된 공중합체를 포함할 수 있다.
- [0171] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 핵산의 음으로 하전된 가닥을 응축 및/또는 보호할 수 있다. 아민-함유 중합체, 예컨대 폴리(리신) (문헌 [Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; 및 Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7]), 폴리(에틸렌 이민) (PEI; 문헌 [Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297]), 및 폴리(아미도아민) 덴드리머 (문헌 [Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; 및 Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372])가 생리학상 pH에서 양으로-하전되어, 핵산과 이온 쌍을 형성한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 양이온성 중합체를 포함하지 않을 수 있다 (또는 이를 배제할 수 있다).
- [0172] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 측쇄를 보유하는 분해성 폴리에스테르일 수 있다 (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; 및 Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399). 이들 폴리에스테르의 예는 폴리(L-락티드-코-L-리신) (문헌 [Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010]), 폴리(세린 에스테르) (문헌 [Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399]), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (문헌 [Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633]), 및 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (문헌 [Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633])를 포함한다.
- [0173] 이들 및 다른 중합체의 특성, 및 이들의 제조 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,123,727; 5,804,178; 5,770,417; 5,736,372; 5,716,404; 6,095,148; 5,837,752; 5,902,599; 5,696,175; 5,514,378; 5,512,600; 5,399,665; 5,019,379; 5,010,167; 4,806,621; 4,638,045; 및 4,946,929; 문헌 [Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460;

Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; 및 Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181] 참조). 보다 일반적으로, 특정의 적합한 중합체를 합성하는 다양한 방법이 문헌 ([Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386]; 및 미국 특허 번호 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446, 및 6,818,732)에 기재되어 있다.

- [0174] 일부 실시양태에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 덴드리머일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 서로 실질적으로 가교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 가교가 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 가교 단계를 거치지 않으면서 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 합성 나노담체는 상기 및 다른 중합체 중 임의의 것의 블록 공중합체, 그래프트 공중합체, 블렌드, 혼합물 및/또는 부가물을 포함할 수 있는 것으로 추가로 이해되어야 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 열거된 중합체가 본 발명에 따라 사용될 수 있는 중합체의 포괄적인 목록이 아니라 예시적인 목록을 나타낸다는 것을 인식할 것이다.
- [0175] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체 성분을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체 합성 나노담체는 비-중합체 성분의 응집체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 응집체이다.
- [0176] 본 발명에 따른 조성물은 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 보존제, 완충제, 염수, 또는 포스페이트 완충 염수를 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제작 및 배합 기술을 이용하여 만들 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사하기 위해 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.
- [0177] D. 조성물의 사용 및 제조 방법
- [0178] 바이러스 벡터는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되거나 또는 본원에 달리 기재된 바와 같은 방법을 이용하여 만들 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,797,368 및 문헌 [Laughlin et al., Gene, 23, 65-73 (1983)]에 제시된 방법을 이용하여 구축 및/또는 정제할 수 있다.
- [0179] 예로서, 복제-결핍 아데노바이러스 벡터는 높은 역가의 바이러스 벡터 스톡을 생성하기 위해 적절한 수준에서, 복제-결핍 아데노바이러스 벡터에 존재하지 않지만 바이러스 증식에 필요한 유전자 기능을 제공하는 상보성 세포주에서 생산될 수 있다. 상보성 세포주는 모든 아데노바이러스 기능 (예를 들어, 아데노바이러스 앰플리콘의 증식을 가능하게 함)을 포함하여, 초기 영역, 후기 영역, 바이러스 패키징 영역, 바이러스-연관 RNA 영역, 또는 그의 조합에 의해 코딩된 적어도 1종의 복제-필수 유전자 기능의 결핍을 보완할 수 있다. 상보성 세포주의 구축은 표준 분자 생물학 및 세포 배양 기술, 예컨대 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), 및 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)]에 기재된 것을 수반한다.
- [0180] 아데노바이러스 벡터를 생산하기 위한 상보성 세포주는 HEK 293 세포 (예를 들어, 문헌 [Graham et al., J. Gen. Virol., 36, 59-72 (1977)]에 기재됨), PER.C6 세포 (예를 들어, 국제 특허 출원 WO 97/00326, 및 미국 특허 번호 5,994,128 및 6,033,908에 기재됨), 및 293-ORF6 세포 (예를 들어, 국제 특허 출원 WO 95/34671 및 문헌 [Brough et al., J. Virol., 71, 9206-9213 (1997)]에 기재됨)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 상보성 세포는 모든 필요한 아데노바이러스 유전자 기능을 보완하지는 않을 것이다. 헬퍼 바이러스를 사용하여 아데노바이러스 벡터의 복제를 가능하게 하는 세포 또는 아데노바이러스 게놈에 의해 코딩되지 않는 유전자 기능을 트랜스로 제공할 수 있다. 아데노바이러스 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,965,358, 5,994,128, 6,033,908, 6,168,941, 6,329,200, 6,383,795, 6,440,728, 6,447,995, 및 6,475,757, 미국 특허 출원 공개 번호 2002/0034735 A1, 및 국제 특허 출원 WO 98/53087, WO 98/56937, WO 99/15686, WO 99/54441, WO 00/12765, WO 01/77304, 및 WO 02/29388, 뿐만 아니라 본원에서 확인되는 다른 참고문헌에 제시된 물질 및 방법을 사용하여 구축, 증식, 및/또는 정제될 수 있다. 아데노바이러스 혈청형 35 벡터를 비롯한 비-군 C 아데노바이러스 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,837,511 및 5,849,561, 및 국제 특허 출원 WO 97/12986 및 WO 98/53087에 제시된 방법을 사용하여 생산될 수 있다.
- [0181] 바이러스 벡터, 예컨대 AAV 벡터는 재조합 방법을 이용하여 생성할 수 있다. 예를 들어, 방법은 AAV 캡시드 단백질 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 서열; 기능적 rep 유전자; AAV 역전된 말단 반복부 (ITR) 및 트랜스지온

로 구성된 재조합 AAV 벡터; 및 재조합 AAV 벡터를 AAV 캡시드 단백질 내로 패키징하는 것을 가능하게 하는데 충분한 헬퍼 기능을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 것을 수반할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11로 이루어진 군으로부터 선택된 AAV 혈청형 및 그의 변이체의 역전된 말단 반복부 (ITR)를 포함할 수 있다.

[0182] 바이러스 벡터를 캡시드 내에 패키징하기 위해 숙주 세포에서 배양하고자 하는 성분은 이러한 숙주 세포에 트랜스로 제공될 수 있다. 대안적으로, 필요한 성분들 (예를 들어, 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열, 및/또는 헬퍼 기능) 중 임의의 하나 이상은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 이용하여 상기 필요한 성분들 중 하나 이상을 함유하도록 조작한 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게, 상기 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하에 상기 필요한 성분(들)을 함유할 수 있다. 그러나, 이러한 필요한 성분(들)은 구성적 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 바이러스 벡터를 생산하는데 필요한 재조합 바이러스 벡터, rep 서열, cap 서열, 및 헬퍼 기능은 임의의 적절한 유전 요소를 이용하여 패키징 숙주 세포에 전달할 수 있다. 선택된 유전 요소는 본원에 기재된 방법을 포함한, 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 다른 방법은 핵산 조작에 있어서의 기술자에게 공지되어 있고, 이는 유전 공학, 재조합 공학, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]을 참조한다. 유사하게, rAAV 비리온을 생성하는 방법은 널리 공지되어 있고, 적합한 방법의 선택은 본 발명에 대해 제한적이지 않다. 예를 들어, 문헌 [K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1993)] 및 미국 특허 번호 5,478,745를 참조한다.

[0183] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 전달 벡터는 삼중 형질감염 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,001,650, 미국 특허 번호 6,593,123, 뿐만 아니라 문헌 [X. Xiao et al., J. Virol. 72:2224-2232 (1998), 및 T. Matsushita et al., Gene Ther. 5(7): 938-945 (1998)]에 상세히 기재된 바와 같고, 삼중 형질감염 방법에 관한 그의 내용은 본원에 참조로 포함됨)을 이용하여 생성할 수 있다. 예를 들어, 재조합 AAV는 숙주 세포를 AAV 입자 내로 패키징될 재조합 AAV 전달 벡터 (트랜스진을 포함함), AAV 헬퍼 기능 벡터, 및 보조 기능 벡터로 형질감염시킴으로써 생성될 수 있다. 일반적으로, AAV 헬퍼 기능 벡터는 생산적 AAV 복제 및 캡슐화를 위해 트랜스로 기능하는 AAV 헬퍼 기능 서열 (rep 및 cap)을 코딩한다. 바람직하게는, AAV 헬퍼 기능 벡터는 임의의 검출 가능한 야생형 AAV 비리온 (즉, 기능적 rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 비리온)을 생성하지 않으면서도 효율적인 AAV 벡터 생성을 뒷받침한다. 보조 기능 벡터는 AAV가 복제에 대해 의존적인 비-AAV 유래 바이러스 및/또는 세포성 기능에 대한 뉴클레오티드 서열을 코딩할 수 있다. 보조 기능은 AAV 복제에 필요한 기능을 포함하며, 이는 AAV 유전자 전사의 활성화, 단계 특이적 AAV mRNA 스플라이싱, AAV DNA 복제, cap 발현 생성물의 합성, 및 AAV 캡시드 어셈블리에 관여한 모이어티를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바이러스-기반 보조 기능은 공지된 헬퍼 바이러스, 예컨대 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 (단순 포진 바이러스 유형-1 이외의 바이러스), 및 백시니아 바이러스 중 임의의 것으로부터 유래될 수 있다.

[0184] 바이러스 벡터를 생산하는 다른 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 또한, 바이러스 벡터는 상업적으로 입수가능하다.

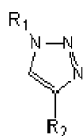
[0185] 면역억제제에 커플링된 합성 나노담체와 관련하여, 성분을 합성 나노담체에 부착시키는 방법이 유용할 수 있다.

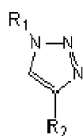
[0186] 실시양태에서, 성분을, 예를 들어 합성 나노담체에 부착시키는 방법이 유용할 수 있다. 특정 실시양태에서, 부착시키는 것은 공유 링커일 수 있다. 실시양태에서, 본 발명에 따른 면역억제제는 알킨 기를 함유하는 면역억제제와 아지도 기와의 1,3-양극성 고리화첨가 반응에 의해 형성되거나 또는 아지도 기를 함유하는 면역억제제와 알킨과의 1,3-양극성 고리화첨가 반응에 의해 형성된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 외부 표면에 공유 부착될 수 있다. 이러한 고리화첨가 반응은 바람직하게, Cu(II) 화합물을 촉매적 활성 Cu(I) 화합물로 환원시키는 환원제 및 적합한 Cu(I)-리간드와 함께 Cu(I) 촉매의 존재 하에 수행된다. 이러한 Cu(I)-촉매된 아지도-알킨 고리화첨가 (CuAAC)는 클릭 반응으로서 지칭될 수도 있다.

[0187] 추가적으로, 공유 커플링은 아미드 링커, 디설피드 링커, 티오에테르 링커, 히드라존 링커, 히드라지드 링커, 이민 또는 옥심 링커, 우레아 또는 티오우레아 링커, 아미딘 링커, 아민 링커, 및 술폰아미드 링커를 포함하는 공유 링커를 포함할 수 있다.

[0188] 아미드 링커는 하나의 성분, 예컨대 면역억제제 상의 아민과 제2 성분, 예컨대 나노담체의 카르복실산 기 사이의 아미드 결합을 통해 형성된다. 이러한 링커 내의 아미드 결합은 적합하게 보호된 아미노산과 활성화 카르복실산, 예컨대 N-히드록시숙신이미드-활성화된 에스테르의 통상적인 아미드 결합 형성 반응 중 임의의 것을 이용하여 제조될 수 있다.

[0189] 디설파이드 링커는, 예를 들어 R1-S-S-R2의 형태의 2개의 황 원자 사이의 디설파이드 (S-S) 결합의 형성을 통해 제조된다. 디설파이드 결합은 티올/메르캡탄 기 (-SH)를 함유하는 성분을 또 다른 활성화 티올 기로 티올 교환하거나, 또는 티올/메르캡탄 기를 함유하는 특정 성분을 활성화 티올 기를 함유하는 특정 성분으로 티올 교환함으로써 형성될 수 있다.



[0190] 트리아졸 링커, 구체적으로 형태  의 1,2,3-트리아졸 (여기서, R1 및 R2는 임의의 화학적 실체일 수 있음)은 제1 성분에 부착된 아지드와 제2 성분, 예컨대 면역억제제에 부착된 말단 알킨의 1,3-양극성 고리화첨가 반응에 의해 제조된다. 이러한 1,3-양극성 고리화첨가 반응은 1,2,3-트리아졸 관능기를 통해 상기 2개의 성분을 연결하는 촉매의 존재 또는 부재 하에, 바람직하게는 Cu(I)-촉매의 존재 하에 수행된다. 이러한 화학은 문헌 [Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002) 및 Meldal, et al., Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015]에 상세히 기재되어 있고, 종종 "클릭" 반응 또는 CuAAC로서 지칭된다.

[0191] 티오에테르 링커는, 예를 들어 R1-S-R2의 형태의 황-탄소 (티오에테르) 결합의 형성에 의해 제조된다. 티오에테르는 하나의 성분 상의 티올/메르캡탄 (-SH) 기를 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드 또는 에폭시드로 알킬화시킴으로써 제조될 수 있다. 티오에테르 링커는 또한, 하나의 성분 상의 티올/메르캡탄 기를, 마이클 수용체로서 말레이미드 기 또는 비닐 술폰 기를 함유하는 제2 성분 상의 전자-결핍 알켄 기에 마이클 첨가함으로써 형성될 수 있다. 또 다른 방식으로, 티오에테르 링커는 하나의 성분 상의 티올/메르캡탄 기를 제2 성분 상의 알켄 기와 라디칼 티올-엔 반응시킴으로써 제조할 수 있다.

[0192] 히드라존 링커는 하나의 성분 상의 히드라지드 기를 제2 성분 상의 알데히드/케톤 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0193] 히드라지드 링커는 하나의 성분 상의 히드라진 기를 제2 성분 상의 카르복실산 기와 반응시킴으로써 형성된다. 이러한 반응은 일반적으로, 카르복실산을 활성화 시약으로 활성화시키는 아마이드 결합의 형성과 유사한 화학을 이용하여 수행된다.

[0194] 이민 또는 옥심 링커는 하나의 성분 상의 아민 또는 N-알콕시아민 (또는 아미노옥시) 기를 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기와 반응시킴으로써 형성된다.

[0195] 우레아 또는 티오우레아 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 이소시아네이트 또는 티오이소시아네이트 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0196] 아마이드 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 이미도에스테르 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0197] 아민 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드, 에폭시드, 또는 술포네이트 에스테르 기와 알킬화 반응시킴으로써 제조된다. 대안적으로, 아민 링커는 또한, 하나의 성분 상의 아민 기를, 적합한 환원 시약, 예컨대 소듐 시아노보로하이드라이드 또는 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드를 이용하여 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기로 환원성 아미노화함으로써 제조될 수 있다.

[0198] 술포아미드 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 술포닐 할라이드 (예컨대 술포닐 클로라이드) 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0199] 술폰 링커는 친핵체를 비닐 술폰에 마이클 첨가함으로써 제조된다. 비닐 술폰 또는 친핵체 중 하나는 나노담체의 표면 상에 있거나 또는 특정 성분에 부착될 수 있다.

[0200] 이러한 성분은 또한, 비-공유 접합 방법을 통해 접합될 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 면역억제제는 정전기 흡착을 통해 양으로 하전된 성분과 접합될 수 있다. 금속 리간드를 함유하는 성분이 또한, 금속-리간드 착물을 통해 금속 착물과 접합될 수 있다.

[0201] 실시양태에서, 성분은 합성 나노담체의 어셈블리에 앞서, 중합체, 예를 들어 폴리락트산-블록-폴리에틸렌 글리콜에 부착될 수 있거나 또는 합성 나노담체는 그의 표면 상의 반응성 또는 활성화될 수 있는 기와 함께 형성될 수 있다. 후자의 경우에, 성분은 합성 나노담체의 표면에 의해 제시되는 부착 화학과 적합성인 기를 이용하여 제조할 수 있다. 다른 실시양태에서, 펩티드 성분은 적합한 링커를 이용하여 VLP 또는 리포솜에 부착시킬 수 있다. 링커는 2개의 분자를 함께 커플링할 수 있는 화합물 또는 시약이다. 특정 실시양태에서, 링커는 문헌

[Hermanson 2008]에 기재된 바와 같은 동종이관능성 또는 이종이관능성 시약일 수 있다. 예를 들어, 표면 상에 카르복실기를 함유하는 VLP 또는 리포솜 합성 나노담체는 EDC의 존재 하에 동종이관능성 링커인 아디프산 디히드라지드 (ADH)로 처리하여, 이러한 ADH 링커를 갖는 상응하는 합성 나노담체를 형성할 수 있다. 이어서, 이로써 생성되는 ADH 연결된 합성 나노담체를, 나노담체 상의 ADH 링커의 다른 말단을 통해 산 기를 함유하는 펩티드 성분과 접합시켜 상응하는 VLP 또는 리포솜 펩티드 접합체를 생성한다.

[0202] 실시양태에서, 중합체 쉼에 대해 말단인 아지드 또는 알킨 기를 함유하는 중합체가 제조된다. 이어서, 이러한 중합체를 사용하여, 복수 개의 알킨 또는 아지드 기가 합성 나노담체의 표면 위에 위치하는 방식으로 합성 나노담체를 제조한다. 대안적으로, 이러한 합성 나노담체는 또 다른 경로에 의해 제조한 다음, 연속해서 알킨 또는 아지드 기로 관능화할 수 있다. 성분은 알킨 기의 존재 하에 (중합체가 아지드를 함유하는 경우) 또는 아지드 기의 존재 하에 (중합체가 알킨을 함유하는 경우) 제조된다. 이어서, 상기 성분은, 이러한 성분을 1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 입자에 공유 부착시켜 주는 촉매의 존재 또는 부재 하에 1,3-양극성 고리화점가 반응을 통해 상기 나노담체와 반응될 수 있다.

[0203] 성분이 소분자인 경우, 합성 나노담체의 어셈블리에 앞서, 상기 성분을 중합체에 부착시키는 것이 유리할 수 있다. 실시양태에서, 성분을 중합체에 부착시킨 다음 이러한 중합체 접합체를 합성 나노담체의 구축에 사용하기 보다는 오히려 이들 표면 기의 사용을 통해 상기 성분을 합성 나노담체에 부착시키기 위해 사용되는 표면 기를 갖는 합성 나노담체를 제조하는 것이 또한 유리할 수 있다.

[0204] 이용가능한 접합 방법에 관한 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008]을 참조할 수 있다. 공유 부착 외에도, 상기 성분은 미리 형성된 합성 나노담체에 흡착시킴으로써 부착시킬 수 있거나 또는 합성 나노담체의 형성 동안 캡슐화함으로써 부착시킬 수 있다.

[0205] 합성 나노담체는 관련 기술분야에 공지된 매우 다양한 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체는 나노침전, 유체 채널을 이용한 유동 포커싱, 분무 건조, 단일 및 이중 예멸전 용매 증발, 용매 추출, 상 분리, 밀링, 마이크로예멸전 절차, 마이크로제작, 나노제작, 희생 층, 단순 및 복잡 코아세르베이션과 같은 방법, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 방법에 의해 형성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 단분산 반도체, 전도성, 자기성, 유기 및 다른 나노물질에 대한 수성 및 유기 용매 합성이 기재되어 있다 (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; 및 Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). 추가의 방법이 문헌에 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; 및 Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755]; 미국 특허 번호 5578325 및 6007845; 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)] 참조).

[0206] 물질은 문헌 [C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8-21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 방법을 이용하여 바람직한 바와 같이 합성 나노담체 내로 캡슐화할 수 있다. 물질을 합성 나노담체 내로 캡슐화하기에 적합한 다른 방법을 사용할 수 있고, 이는 2003년 10월 14일자로 허여된 미국 특허 번호 6,632,671 (Unger)에 개시된 방법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0207] 특정 실시양태에서, 합성 나노담체는 나노침전 과정 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 합성 나노담체를 제조하는데 사용된 조건은 목적하는 크기 또는 특성 (예를 들어, 소수성, 친수성, 외부 형태, "점착성", 형상 등)의 입자를 생성하기 위해 변경시킬 수 있다. 합성 나노담체의 제조 방법 및 사용된 조건 (예를 들어, 용매, 온도, 농도, 공기 유량 등)은 합성 나노담체에 부착될 물질 및/또는 중합체 매트릭스의 조성에 좌우될 수 있다.

[0208] 상기 방법 중 임의의 것에 의해 제조된 합성 나노담체가 목적하는 범위를 벗어난 크기 범위를 갖는 경우, 합성 나노담체는, 예를 들어 체를 이용하여 사이징될 수 있다.

- [0209] 합성 나노담체의 요소들은, 예를 들어 하나 이상의 공유 결합에 의해 전체 합성 나노담체에 부착될 수 있거나, 또는 하나 이상의 링커를 통해 부착될 수 있다. 합성 나노담체를 관능화하는 추가의 방법은 공개된 미국 특허 출원 2006/0002852 (Saltzman et al.), 공개된 미국 특허 출원 2009/0028910 (DeSimone et al.), 또는 공개된 국제 특허 출원 WO/2008/127532 A1 (Murthy et al.)로부터 적합화될 수 있다.
- [0210] 대안적으로 또는 추가적으로, 합성 나노담체는 비-공유 상호작용을 통해 성분들에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 비-공유 실시양태에서, 비-공유 부착은 전하 상호작용, 친화도 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 스택킹 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용, 및/또는 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-공유 상호작용에 의해 매개된다. 이러한 부착은 합성 나노담체의 외부 표면 또는 내부 표면 상에 있도록 배열될 수 있다. 실시양태에서, 캡슐화 및/또는 흡수가 부착의 한 형태이다.
- [0211] 본원에 제공된 조성물은 무기 또는 유기 완충제 (예를 들어, 포스페이트, 카르보네이트, 아세테이트 또는 시트레이트의 나트륨 또는 칼륨 염) 및 pH 조정제 (예를 들어, 염산, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨, 시트레이트 또는 아세테이트의 염, 아미노산 및 그의 염), 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 알파-토코페롤), 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌9-10 노닐 페놀, 소듐 데스옥시콜레이트), 용액 및/또는 냉동/동결 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), 중합체 안정화제 및 점도-조정제 (예를 들어, 폴리비닐 피롤리돈, 폴록사머 488, 카르복시메틸셀룰로스) 및 공-용매 (예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올)를 포함할 수 있다.
- [0212] 본 발명에 따른 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제작 및 배합 기술을 이용하여 만들 수 있다. 본 발명을 실시하는데 사용하기 적합한 기술은 문헌 [Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Edited by Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; 및 Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone]에서 확인할 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사하기 위해 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.
- [0213] 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 방식으로 제조될 수 있고, 본 발명은 본원에 기재된 방법을 이용하여 생성될 수 있는 조성물로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 적절한 제작 방법을 선택하기 위해 연관된 특정한 모이어티의 특성에 주의를 기울여야 할 수 있다.
- [0214] 일부 실시양태에서, 조성물은 멸균 조건 하에 제작되거나 또는 최종적으로 멸균된다. 이는 이로써 생성되는 조성물이 멸균되면서 비-감염성이라는 것을 보장하므로, 비-멸균 조성물과 비교해서 안전성을 개선시킬 수 있다. 이것은, 특히 조성물을 투여받는 대상체가 면역 결함이 있고/거나, 감염으로 인해 고통받고 있고/거나 감염되기 쉬운 경우에, 중요한 안전 조치를 제공한다.
- [0215] 본 발명에 따른 투여는 피하, 정맥내, 근육내 및 복강내 경로를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의할 수 있다. 본원에 언급된 조성물은 투여를 위해, 일부 실시양태에서 통상적인 방법을 이용하여 혼합물로서 제작 및 제조될 수 있다.
- [0216] 본 발명의 조성물은 유효량, 예컨대 본원의 다른 곳에 기재되어 있는 유효량으로 투여될 수 있다. 투여 형태는 다양한 빈도로 투여될 수 있다. 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터와 함께 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 반복 투여하는 것이 수행된다.
- [0217] 실시예
- [0218] 실시예 1: 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 합성 (예측)
- [0219] 면역억제제, 예컨대 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 바람직하게는, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 미국 공개 번호 US 2016/0128986 A1 및 미국 공개 번호 US 2016/0128987 A1의 방법 중 어느 하나에 의해 생산되고, 기재된 이러한 생산 방법 및 생성된 합성 나노담체는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나에서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 혼입된 합성 나노담체이다. 라파마이신을 캡슐화한 생분해성 PLA + PLA-PEG 나노입

자인 ImmTOR은 이러한 합성 나노담체의 예를 지칭한다 (Kishimoto TK, Maldonado RA. Nanoparticles for the induction of antigen-specific immunological tolerance. Front Immunol. 2018;9:230. Sands E, Kivitz AJ, DeHaan W, et al., Update of SEL-212 phase 2 clinical data in symptomatic gout patients: SVP-rapamycin combined with pegadricase mitigates immunogenicity and enables sustained reduction of serum uric acid levels, low rate of gout flares and monthly dosing. Poster presentation at: 2018 American College of Rheumatology/Association of Reproductive Health Professionals (ACR/ARHP) Annual Meeting; October 19-24, 2018; Chicago, IL. Poster #2254).

[0220] 실시예 2: AAV 벡터를 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 혼합하는 것은 항-AAV 항체를 갖는 마우스에서 트랜스진 발현을 억제한다

[0221] 혼합된 AAV 벡터 및 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자)가 항-AAV 항체를 갖는 마우스에서 트랜스진 발현을 억제하는 능력을 검사하였다. 먼저, 정상 인간 공여자로부터의 혈청을 시험관내 검정에서 AAV에 대한 기존 중화 및 IgG 항체의 존재에 대해 스크리닝하였다. 간략하게, Huh7 간-유래 세포를 정상 인간 공여자로부터의 혈청의 존재 하에 AAV8-루시페라제와 함께 인큐베이션하였다. Huh7 세포의 형질도입 후에 루시페라제 발현을 평가하였다. 인간 공여자 8로부터의 혈청과 함께 인큐베이션된 세포는 높은 수준의 루시페라제 활성을 나타내었고, 이는 유의한 수준의 중화 항체의 부재를 나타낸다. 대조적으로, 인간 공여자 45로부터의 혈청과 함께 인큐베이션된 세포는 루시페라제 발현을 거의 또는 전혀 나타내지 않았고, 이는 높은 수준의 중화 항체의 존재를 나타낸다. 마찬가지로, 인간 공여자 44로부터의 혈청과 함께 인큐베이션된 세포도 또한 루시페라제 발현을 거의 나타내지 않았고, 이는 중간-높은 수준의 중화 항체의 존재를 나타낸다. 인간 공여자 31 및 35로부터의 혈청과 함께 인큐베이션된 세포는 중간 수준의 루시페라제 발현을 나타내었고, 이는 중간 수준의 중화 항체의 존재를 나타낸다. 상기 기재된 기능적 중화 항체 검정에 기초한 중화 항체의 예측된 수준은 항-AAV IgG 항체의 관찰된 수준과 상관관계가 있는 것으로 발견되었다 (도 1).

[0222] 인간 공여자 8, 31, 35, 44, 및 45로부터의 혈청 80 마이크로리터 (80 μ L)를 정맥내 주사에 의해 개별 마우스에게 전달하였다. 대략 24시간 후에, 마우스에게 AAV8-SEAP 벡터 5.0E11 vg/kg 또는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자) 100 μ g과 혼합된 AAV8-SEAP 벡터 5.0E11 vg/kg을 주사하였다. 12 일 후, 마우스로부터 혈청을 수집하고, 혈청 SEAP 활성 수준을 측정하였다.

[0223] 결과를 도 2에 제시한다. 인간 공여자 8로부터의 혈청에 이어 AAV8-SEAP 벡터를 제공받은 마우스는 AAV8-SEAP만을 제공받은 대조군 마우스와 유사한 수준의 SEAP 활성을 나타내었고, 이는 인간 공여자 8로부터의 혈청이 유의한 수준의 중화 항-AAV8 항체를 갖지 않는다는 것을 확인시켜 준다 (백색 공여자 8 막대를 백색 대조군 "혈청 부재" 막대와 비교함). 인간 공여자 31 및 35로부터의 혈청에 이어 AAV8-SEAP 벡터를 제공받은 마우스는 혈청 부재 대조군 마우스에 비해 대략 46-47% SEAP 활성을 나타내었고, 이는 인간 공여자 31 및 35로부터의 혈청 중의 중간 정도의 중화 항체의 존재를 확인시켜 준다 (백색 공여자 31 및 35 막대를 백색 대조군 "혈청 부재" 막대와 비교함). 그러나, 인간 공여자 31 및 35로부터의 혈청을 제공받은 마우스에서 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자)를 AAV8-SEAP 벡터와 혼합한 것은 AAV8-SEAP 벡터만을 제공받은 혈청 부재 대조군 마우스와 대등하게 SEAP 트랜스진 발현 및 활성 수준을 증진시킨다는 것을 발견하였다 (유색 공여자 31 및 35 막대를 백색 대조군 "혈청 부재" 막대와 비교함). 이들 결과는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자)를 AAV8-SEAP 벡터의 제1 용량과 혼합하는 것이 중간 수준의 중화 항체를 갖는 마우스에서 트랜스진 발현 및 활성을 억제할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0224] 실시예 3: AAV 벡터를 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 혼합하는 것은 항-AAV 항체가 주사된 마우스에서 트랜스진 발현을 억제한다

[0225] AAV8-SEAP 벡터를 동일 부피의 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자) 50 μ g 또는 염수와 실온에서 20분 동안 혼합한 다음, 정상, 나이브 마우스 혈청 또는 항-AAV 항체를 함유하는 마우스 혈청의 1:100 희석물과 실온에서 1시간 동안 혼합하였다. 생성된 혼합물을 나이브 마우스 내로 주사하고, 33일 후에, SEAP 트랜스진의 혈청 발현을 측정하였다. SEAP 트랜스진의 혈청 발현을 혈청과의 혼합 없이 AAV8-SEAP 벡터를 주사한 대조군 마우스와 비교하였다.

[0226] 결과를 도 3에 제시한다. 항-AAV 항체를 함유하지 않는 정상 혈청과 혼합된 AAV8-SEAP 벡터로 주사된 마우스는 대조군 마우스와 대등한 혈청 SEAP 활성을 나타내었고, 항-AAV 항체를 함유하는 혈청과 혼합된 AAV8-SEAP 벡터로 주사된 마우스는 대조군 마우스와 비교하여 감소된 SEAP 혈청 활성을 나타내었다. 대조적으로, 항-AAV 항체를 함유하는 혈청과 혼합하기 전에 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자) 50 μ g

을 AAV8-SEAP 벡터와 혼합하는 것은 SEAP 발현을 혈청 부재 대조군과 대등한 수준으로 억제한다는 것을 발견하였다.

[0227] 실시예 4: 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 모체-전달된 항체를 개선시킨다

[0228] 모체-전달된 항-AAV 항체를 보유하는 마우스에서 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자)가 트랜스진 발현을 억제하는 능력을 검사하였다. 메틸말로노일-CoA 뮤타제 (MUT)의 발현이 결핍되고 근육-특이적 프로모터 하에 MUT에 대한 트랜스진을 발현하는 저차형 유전자 마우스 (Mck-MUT 마우스)를 사용하였다 (Manoli et al., 2018). 이들 마우스는 메틸말로노산혈증의 중증 형태를 나타내었다. 수컷 및 암컷 동형접합 Mck-MUT 마우스에게 AAV Anc80-hAAT-MUT 벡터를 이용한 유전자 요법을 제공하여 간에서의 MUT 유전자 발현 결핍을 교정하였다. 이어서, 마우스를 사육하였고, 그의 자손으로부터의 모든 신생 새끼는 기존의 항-Anc80 항체를 보유하고, 이는 모체로부터 자궁내 전달된 것으로 추정되었다 (도 4).

[0229] 대략 26일령제에, Mck-MUT 마우스는 여전히 유의한 수준의 모체-전달된 항-Anc80 항체를 나타내었다. 마우스를 무작위화하고, 5.0e12 vg/kg Anc80-Mut 단독으로 처리하거나, 또는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예컨대, ImmTOR 나노입자) 100 µg 또는 300 µg과 혼합하였다. Anc80-MUT 단독으로 처리된 4마리 마우스 중 2마리는 유전자 전달 후 수일 내에 사망하였다. 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자) 100 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 5마리 마우스 중 3마리는 유전자 전달 직후에 사망하였다. 또한, 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자) 300 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 7마리의 동물은 모두 생존하였다. 이들 데이터는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자)를 AAV Anc80-hAAT-MUT 벡터의 제1 용량에 혼합하는 것이 마우스의 생존을 용량-의존적 방식으로 증진시켰음을 나타낸다.

[0230] 실시예 5: Anc80 AAV-Mut 벡터로 처리된 모체-전달된 항체를 갖는 메틸말로노산혈증의 마우스 모델에서 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 효과

[0231] 집합적으로, Anc80에 대한 기존의 IgG를 갖는 23마리의 Mck-MMUT 마우스를 생성하였다. 이들 중, 6마리의 마우스를 AAV Anc80-MMUT 5x10¹² vg/kg으로 처리하고, 7마리의 마우스를 ImmTOR 나노입자 100 µg과 혼합된 동일한 용량의 AAV Anc80-MMUT로 처리하고, 10마리의 마우스를 ImmTOR 300 µg과 혼합된 동일한 용량의 AAV Anc80-MMUT로 처리하였다.

[0232] 어떠한 군도 pMMA 수준에 의해 측정된 바와 같이 초기 치료 후에 이익을 나타내지 않았다. 또한, Anc80-MMUT 단독으로 처리된 6마리의 마우스 중 4마리 및 ImmTOR 나노입자 100 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 7마리의 마우스 중 4마리는 유전자 전달 직후에 사망하였다. 동시에, ImmTOR 나노입자 300 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 군의 모든 10마리의 마우스는 21일 동안 생존하였고, 이 시점에 제2 처리를 모든 생존 마우스에게 투여하였다. 이번에는 ImmTOR 300 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 마우스의 대략 절반이 제2 유전자 전달 후 9일째에 pMMA 수준에서 실질적인 감소를 나타내었고, ImmTOR 100 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 군에서의 3마리의 남은 마우스 중 1마리도 또한 pMMA 감소를 나타내었다. Anc80-MMUT 단독으로 처리된 남은 2마리의 마우스에서는 어떠한 이익도 없었고, 이들 마우스 중 1마리는 수일 내에 질환으로 사망하였다.

[0233] ImmTOR 300 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 10마리의 마우스 중 9마리는 3개월 초과 동안 생존하였고, 이 시점에 이들은 고도로 가변적인 수준의 pMMA를 나타내었고, 초기 치료 후 101일째에 3번째 처리하였다. 이러한 개입은 이러한 군의 모든 마우스에서 (18%까지 vs. 처리-전) 및 또한 ImmTOR 100 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 모든 생존 마우스에서 pMMA 수준의 현저한 감소로 이어졌다. Anc80-MMUT 단독으로 처리된 단일 생존 마우스에서는 어떠한 이익도 관찰되지 않았고, 이는 곧 질환으로 사망하였다.

[0234] 집합적으로, ImmTOR 300 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 군과, Anc80-MUT 단독으로 (p<0.0001) 또는 ImmTOR 100 µg과 혼합되어 (p<0.05) 처리된 군 사이에는 생존율에 있어서 통계적으로 유의한 차이가 존재하였다.

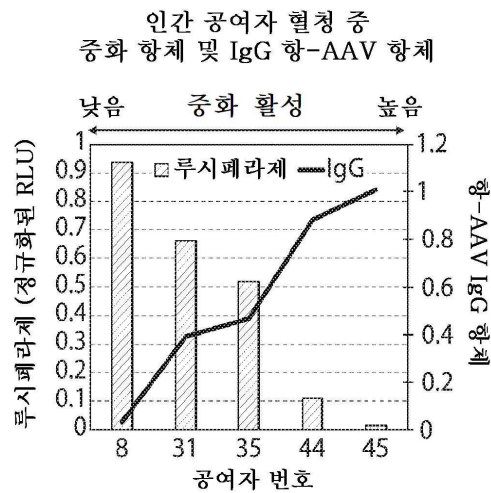
[0235] 또한, ImmTOR 300 µg과 혼합된 Anc80-MUT로 처리된 거의 모든 마우스 (9/10)는 연구 제115일 (즉, 3회 처리 후)까지 신생 Anc80 IgG 형성의 부재를 나타내었다. 이들 데이터는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (예를 들어, ImmTOR 나노입자)를 AAV Anc80-hAAT-MMUT 벡터의 제1 용량과 혼합하는 것이 마우스의 생존을 용량-의존적 방식으로 증진시켰고, 반복 투여 후에 pMMA의 수준을 개선시켰음을 나타낸다. 데이터를 도 5-8에 제시한다.

[0236] 이에 따라, 합성 나노담체에 혼합된 Anc80-MUT의 제1 용량에 의해, 재처리 후, 혈청 MMA의 부분적인 감소가 관찰되었다 (Anc80-MUT + 300 µg ImmTOR로 처리된 마우스에서). 추가로, Anc80-MUT + 300 µg ImmTOR로 처리된

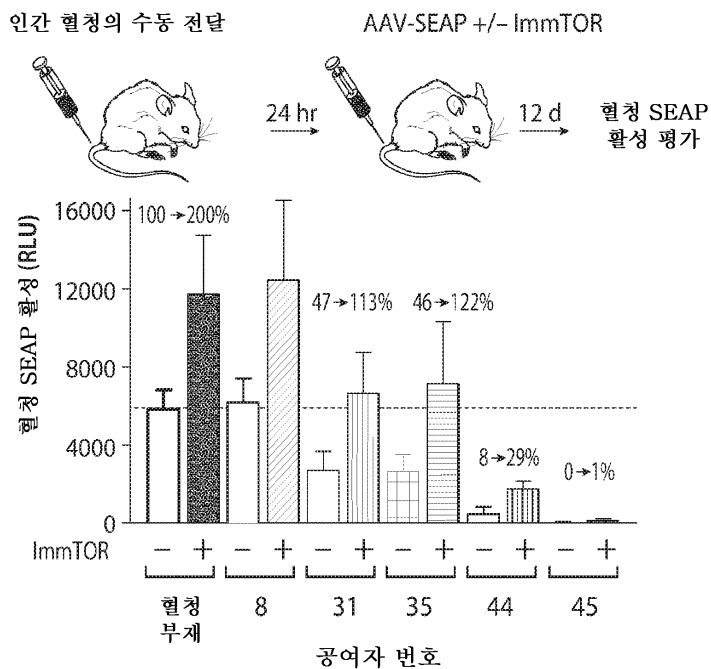
마우스에서의 제2 재처리 후, 결과는 혈청 MMA의 균일한 감소를 보여주었다. 면역억제제를 포함하는 혼합된 합성 나노담체와 함께 Anc80-MUT로 반복적으로 처리된, 기존의 모체 전달된 항-Anc80 IgG를 갖는 Mck-MUT 마우스는 보다 높은 초기 생존율을 가졌다. 모체-전달된 항-Anc80 IgG를 갖는 마우스에서의 기존의 체액성 면역은 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체, 예컨대 라파마이신의 투여로 인해 바이러스 벡터를 이용한 치료를 배제하지 않는다. 데이터는 또한 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 보다 높은 용량이 초기 생존을 가능하게 할 수 있고, 이어서 신생 IgG 형성을 지연시키면서 반복 투여 시 치료 효능을 제공할 수 있다는 것을 보여준다.

도면

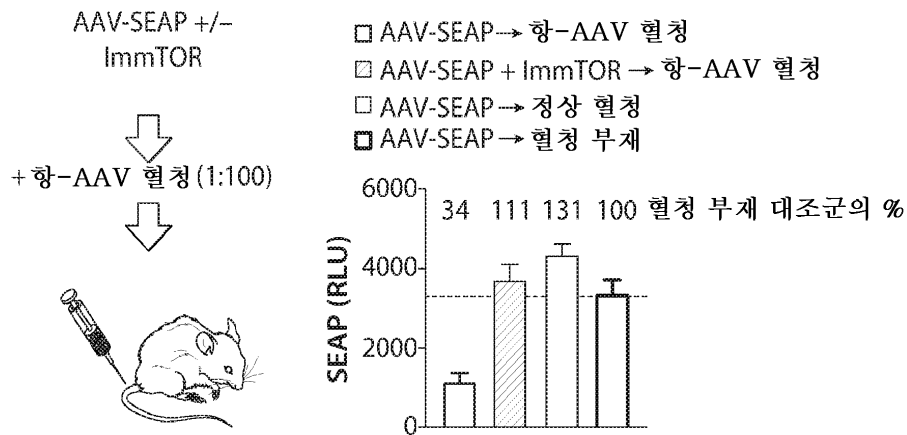
도면1



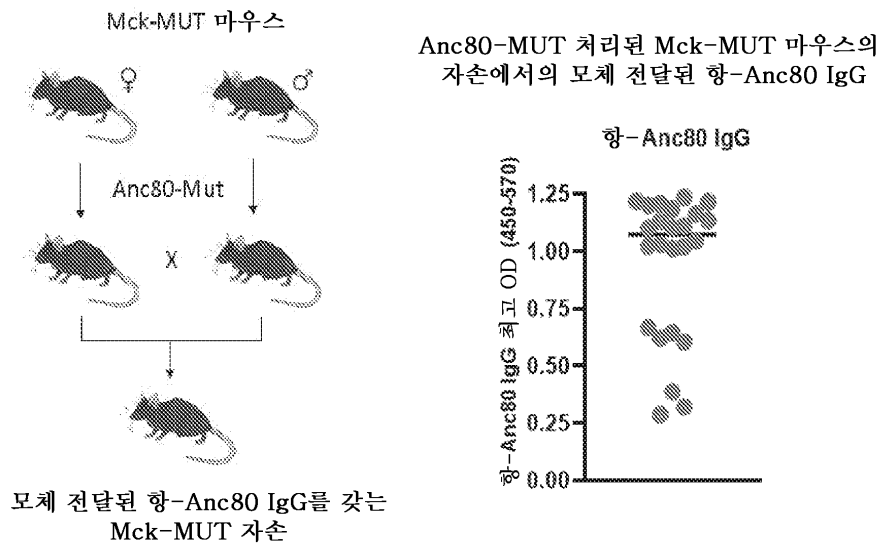
도면2



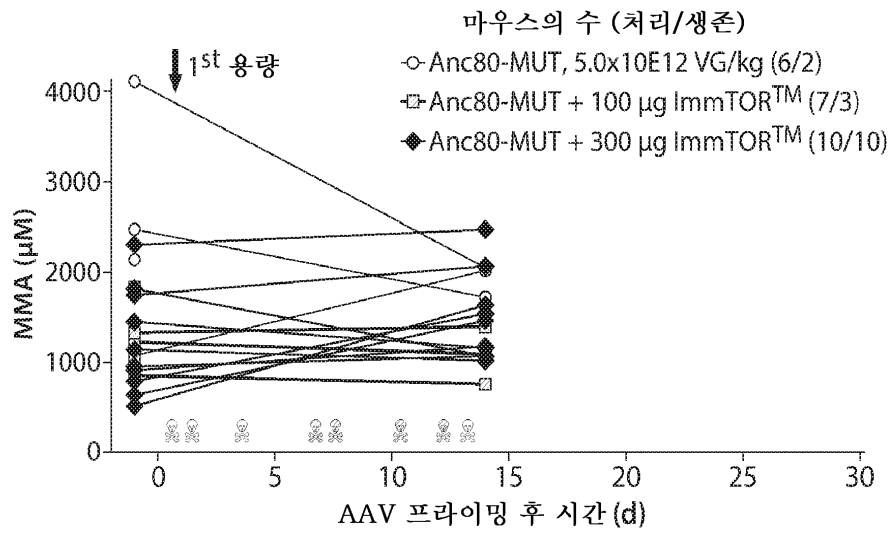
도면3



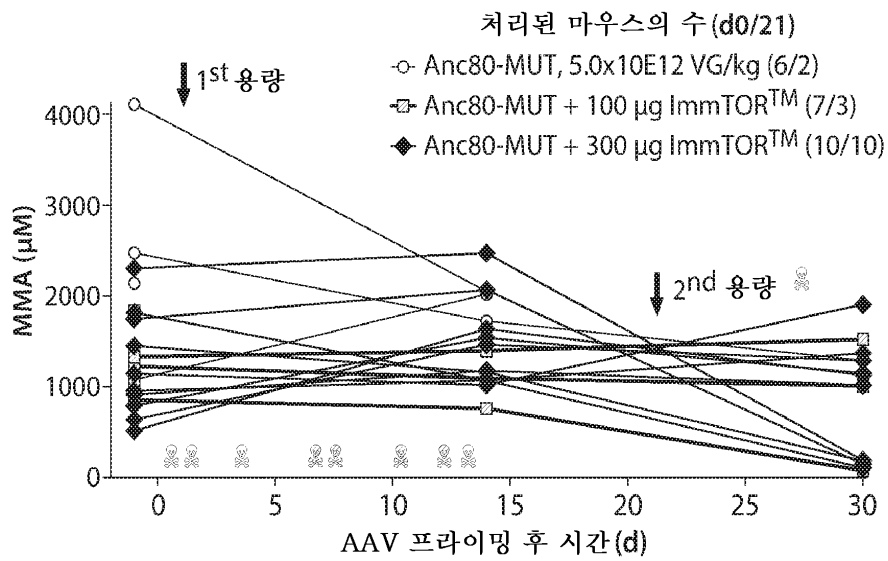
도면4



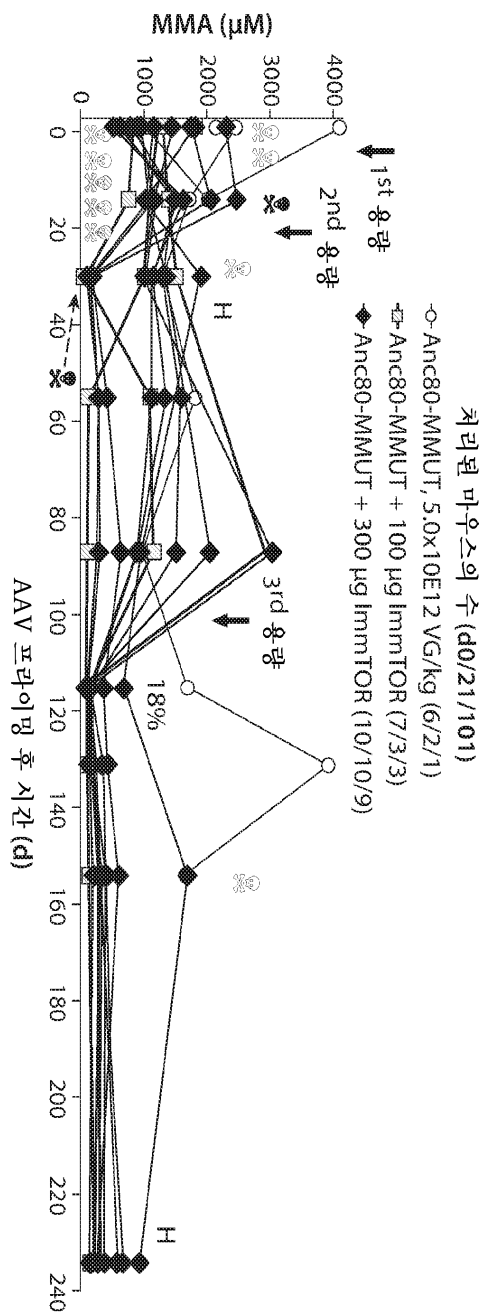
도면5



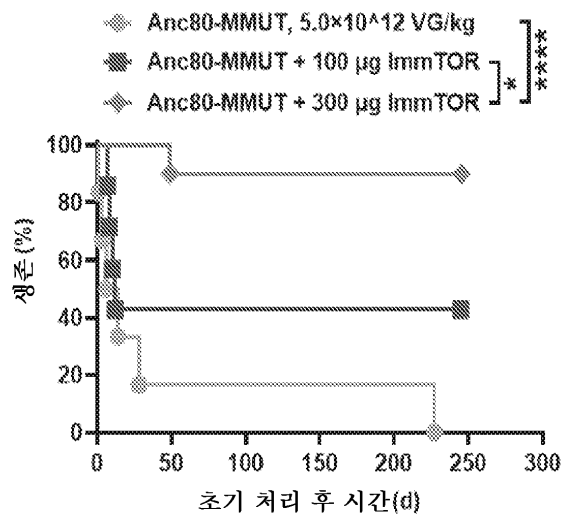
도면6



도면7



도면8a



도면8b

