



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0055145
(43) 공개일자 2020년05월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/14 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01)
A61K 39/38 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/30 (2017.01) A61K 47/50 (2017.01)
A61K 9/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/141 (2013.01)
A61K 31/445 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7013389(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2012년04월27일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2013-7031612
원출원일자(국제) 2012년04월27일
심사청구일자 2017년04월25일
- (85) 번역문제출일자 2020년05월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/035366
- (87) 국제공개번호 WO 2012/149255
국제공개일자 2012년11월01일
- (30) 우선권주장
61/480,946 2011년04월29일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
셀렉타 바이오사이언시즈, 인크.
미국 02472 메사추세츠주 워터타운 빌딩 원 아스
날 스트리트 480
- (72) 발명자
프레이저, 크리스토퍼
미국 02476 메사추세츠주 알링턴 유닛 #2 폴 리비
어 로드 88
키시모토, 다카시, 케이
미국 02420 메사추세츠주 렉싱턴 컬리지 애비뉴
46
말도나도, 로베르토, 에이.
미국 02130 메사추세츠주 자마이카 플레인 로브슨
스트리트 #1 38
- (74) 대리인
양영준, 김영

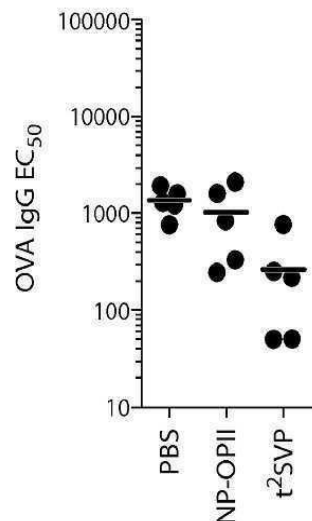
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 치료적 단백질에 대해 면역 반응을 감소시키는 관용원성 합성 나노운반체

(57) 요약

치료적 단백질에 특이적인 관용원성 면역 반응을 제공하는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원 및 면역억제제를 포함하는, 합성 나노운반체 조성물 및 관련된 방법이 개시되어 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 39/38 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 47/30 (2013.01)
A61K 47/50 (2017.08)
A61K 9/16 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/513,514	2011년07월29일	미국(US)
61/531,168	2011년09월06일	미국(US)
61/531,153	2011년09월06일	미국(US)
61/531,180	2011년09월06일	미국(US)
61/531,147	2011년09월06일	미국(US)
61/531,215	2011년09월06일	미국(US)
61/531,209	2011년09월06일	미국(US)
61/531,175	2011년09월06일	미국(US)
61/531,194	2011년09월06일	미국(US)
61/531,164	2011년09월06일	미국(US)
61/531,204	2011년09월06일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

면역억제제와 결합된 중합체 합성 나노운반체를 포함하는 조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119에 따라서 미국 가출원 제61/480,946호(출원일: 2011년 4월 29일), 제61/513,514호(출원일: 2011년 7월 29일), 제61/531,147호(출원일: 2011년 9월 6일), 제61/531,153호(출원일: 2011년 9월 6일), 제61/531,164호(출원일: 2011년 9월 6일), 제61/531,168호(출원일: 2011년 9월 6일), 제61/531,175호(출원일: 2011년 9월 6일), 제61/531,180호(출원일: 2011년 9월 6일), 제61/531,194호(출원일: 2011년 9월 6일), 제61/531,204호(출원일: 2011년 9월 6일), 제61/531,209호(출원일: 2011년 9월 6일), 제61/531,215호(출원일: 2011년 9월 6일)의 이익을 주장하며, 이들 각각의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명의 기술분야

[0004] 본 발명은 치료적 단백질 항원 제시 세포(antigen-presenting cell: APC) 제시가능 항원과 면역억제제가 있는 합성 나노운반체 조성물, 및 관련된 방법에 관한 것이다. 본 조성물 및 방법은 APC에 의한 효율적인 흡수로 치료적 단백질에 특이적인 관용원성 면역 반응 발생에 유리하게 면역 반응을 바꿀 수 있게 한다. 따라서 제공된 조성물 및 방법은 치료적 단백질의 투여가 원치 않는 면역 반응을 일으키거나 일으킬 것으로 예상되는 대상체에서 관용원성 면역 반응을 발생시키는데 사용될 수 있다.

배경 기술

[0005] 치료적 처치, 예컨대 단백질 또는 효소 대체 치료법은 종종 특정 치료에 대해 원치 않는 면역 반응을 일으킨다. 이와 같은 경우에, 면역계의 세포가 박테리아 및 바이러스와 같은 감염성 유기체를 파괴하려고 시도하는 것과 같이, 면역계의 세포는 치료제를 외래 물질로서 인식하고 이를 파괴하려고 시도한다. 이와 같은 원치 않는 면역 반응은 면역억제 약물의 사용을 통해 감소될 수 있다. 그러나 통상적인 면역억제 약물은 광범위하게 작용한다. 추가적으로, 면역억제를 유지하기 위하여, 면역억제 약물 치료법은 일반적으로 평생의 과제이다. 불행하게도, 광범위하게 작용하는 면역억제제의 사용은 종양, 감염, 신독성 및 대사 장애와 같은 심각한 부작용의 위험과 관련이 있다. 따라서, 새로운 면역억제제 치료법이 유리할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0006] 일 양태에서, (i) 면역억제제와 결합된 합성 나노운반체의 제1 집단, 및 (ii) 치료적 단백질 APC 제시가능 항원과 결합된 합성 나노운반체의 제2 집단을 포함하는 조성물이 제공된다. 일 실시형태에서, 제1 집단과 제2 집단은 동일한 집단이다. 다른 실시형태에서, 제1 집단과 제2 집단은 상이한 집단이다.

[0007] 또 다른 실시형태에서, 면역억제제는 스타틴, mTOR 저해제, TGF- β 신호전달제, 코르티코스테로이드, 미토콘드리아 기능의 저해제, P38 저해제, NF- κ B 저해제, 아데노신 수용체 효능제(agonist), 프로스타글란딘 E2 효능제, 포스포디에스테라제 4 저해제, HDAC 저해제 또는 프로테아좀 저해제를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, mTOR 저해제는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체이다.

- [0008] 일부 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 합성 나노운반체에 치료적 단백질을 결합시킴으로써 제공된다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 치료적 단백질로부터 얻어지거나 또는 유래된 폴리펩티드 또는 펩티드를 결합함으로써 제공된다. 추가 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 치료적 단백질의 MHC 클래스 I-제한 및/또는 MHC 클래스 II-제한 에피토프 및/또는 B 세포 에피토프를 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 치료적 단백질의 MHC 클래스 II-제한 에피토프를 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 치료적 단백질의 B 세포 에피토프를 실질적으로 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 MHC 클래스 II-제한 에피토프를 포함하며, 치료적 단백질의 B 세포 에피토프를 실질적으로 포함하지 않는다.
- [0009] 일 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 단백질 대체 또는 단백질 보충 치료법을 위한 치료적 단백질, 또는 이의 단편 또는 유도체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 주입가능하거나 또는 주사가능한 치료적 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고인자, 사이토카인, 인터페론, 성장인자, 단클론성 항체, 다클론성 항체 또는 폼페병과 관련된 단백질, 또는 상기한 것 중 임의의 것의 단편 또는 유도체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 주입가능하거나 또는 주사가능한 치료적 단백질은 토실리주맙(Tocilizumab), 알파-1 항트립신, 헤마타이드(Hematide), 알빈터페론 알파-2b, 루신(Rhucin), 테사모렐린, 오크렐리주맙, 벨리무맙, 페글로티카제, 탈리글루세라제 알파, 아갈시다제 알파 또는 벨라글루세라제 알파를 포함한다. 다른 실시형태에서, 효소는 산화환원효소, 트랜스퍼라제, 가수분해효소, 리아제, 이소머라제 또는 리가제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 효소는 리소좀 저장 장애에 대한 효소 대체 치료법을 위한 효소를 포함한다. 다른 실시형태에서, 리소좀 저장 장애에 대한 효소 대체 치료법을 위한 효소는 이미글루세라제, a-갈락토시다제 A(a-gal A), 아갈시다제 베타, 산 a-글루코시다제(GAA), 알글루코시다제 알파, 루미자임(LUMIZYME), 마이오자임(MYOZYME), 아틸설파타제 B, 라로니다제, 알두라자임(ALDURAZYME), 이두르설파제, 엘라프라제(ELAPRASE), 아틸설파타제 B 또는 나글라자임(NAGLAZYME)을 포함한다. 다른 실시형태에서, 사이토카인은 림포카인, 인터류킨, 케모카인, 1형 사이토카인 또는 2형 사이토카인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 혈액 및 혈액 응고 인자는 인자 I, 인자 II, 조직 인자, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 Xa, 인자 XII, 인자 XIII, 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand factor), 프레칼리크레인, 고분자량 키니노젠, 피브로넥틴, 항트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 저해제(Z-related protease inhibitor: ZPI), 플라스미노젠, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제(tissue plasminogen activator: tPA), 유로키나제, 플라스미노겐 활성화제 저해제-1(plasminogen activator inhibitor-1: PAI1), 플라스미노겐 활성화제 저해제-2(PAI2), 암 응혈촉진제 또는 에포에틴 알파를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 치료적 단백질은 세포 기반 치료법의 세포에서, 세포에 의해, 또는 세포 상에서 발현된다.
- [0010] 일 실시형태에서, 조성물은 항원이 얻어지거나 또는 유래되는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원 또는 치료적 단백질에 대해 관용원성 면역 반응을 발생시키는 유효량으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 대상체에 투여될 때 치료적 단백질에 특이적인 항체의 발생을 감소시키는 유효량으로 존재한다.
- [0011] 다른 실시형태에서, 합성 나노운반체의 제1 및/또는 제2 집단에 걸쳐 평균적으로 면역억제제 및/또는 항원의 로드(load)는 0.0001% 내지 50%이다. 또 다른 실시형태에서, 합성 나노운반체의 제1 및/또는 제2 집단에 걸쳐 평균적으로 면역억제제 및/또는 항원의 로드는 0.1% 내지 10%이다.
- [0012] 일 실시형태에서, 제1 집단 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 지질 나노입자, 중합체 나노입자, 금속 나노입자, 계면활성제 기반 에멀전, 덴드리머, 버키볼(buckyball), 나노와이어, 바이러스 유사 입자, 또는 펩티드 또는 단백질 입자를 포함한다. 다른 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 지질 나노입자를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 리포솜을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 금속 나노입자를 포함한다. 추가 실시형태에서, 금속 나노입자는 금 나노입자를 포함한다. 또한 추가 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 중합체 나노입자를 포함한다. 다른 실시형태에서, 중합체 나노입자는 비-메톡시-말단 플루로닉 중합체(pluronic polymer)인 중합체를 포함한다. 또한 추가 실시형태에서, 중합체 나노입자는 폴리에스테르, 폴리에테르에 결합된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 다당류, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함한다. 다른 실시형태에서, 폴리에스테르는 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락틱-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 중합체 나노입자는 폴리에스테르 및 폴리에테르에 결합된 폴리에스테르를 포함한다. 다른 실시형태에서, 폴리에테르는 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함한다.
- [0013] 다른 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체의 동적 광산란을 사용하여 얻은 입자 크기 분포의

평균은 직경이 100nm 초과이다. 다른 실시형태에서, 직경은 150nm 초과이다. 다른 실시형태에서, 직경은 200nm 초과이다. 다른 실시형태에서, 직경은 250nm 초과이다. 다른 실시형태에서, 직경은 300nm 초과이다.

- [0014] 추가 실시형태에서, 제1 집단 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체의 중형비는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 초과이다.
- [0015] 또 다른 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함한다.
- [0016] 다른 양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물 중 임의의 것을 포함하는 투여형이 제공된다.
- [0017] 다른 양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물 또는 투여형 중 임의의 것을 치료적 단백질이 투여되고 있거나 또는 투여될 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 방법은 대상체에 치료적 단백질을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질은 조성물 또는 투여형의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투여 후 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물 또는 투여형의 하나 이상의 유지 용량이 대상체에게 투여된다.
- [0018] 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 조성물 또는 투여형 및/또는 치료적 단백질의 투여 전, 및/또는 투여 후 대상체에서 원치 않는 면역 반응의 발생을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 원치 않는 면역 반응은 치료적 단백질에 특이적인 항체의 발생이다. 다른 실시형태에서, 원치 않는 면역 반응은 치료적 단백질에 대해 특이적인 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성이다. 또 다른 실시형태에서, 원치 않는 면역 반응은 치료적 단백질에 대해 특이적인 B 세포 증식 및/또는 활성이다.
- [0019] 일 실시형태에서, 치료적 단백질은 단백질 대체 또는 단백질 보충 치료법을 위한 치료적 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질은 주입가능하거나 또는 주사가능한 치료적 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고인자, 사이토카인, 인터페론, 성장인자, 단클론성 항체, 다클론성 항체 또는 폼페병과 관련된 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 주입가능하거나 또는 주사가능한 치료적 단백질은 토실리주맙, 알파-1 항트립신, 헤마타이드, 알빈터페론 알파-2b, 루신, 테사모렐린, 오크렐리주맙, 벨리무맙, 페글로티카제, 탈리글루세라제 알파, 아갈시다제 알파 또는 벨라글루세라제 알파를 포함한다. 다른 실시형태에서, 효소는 산화 환원효소, 트랜스퍼라제, 가수분해효소, 리아제, 이소머라제 또는 리가제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 효소는 리소좀 저장 장애에 대한 효소 대체 치료법을 위한 효소를 포함한다. 다른 실시형태에서, 리소좀 저장 장애에 대한 효소 대체 치료법을 위한 효소는 이미글루세라제, a-갈락토시다제 A(a-gal A), 아갈시다제 베타, 산 a-글루코시다제(GAA), 알글루코시다제 알파, 루미자임, 마이오자임, 아릴설파타제 B, 라로니다제, 알두라자임, 이두르설파제, 엘라프라제, 아릴설파타제 B 또는 나글라자임을 포함한다. 다른 실시형태에서, 사이토카인은 림포카인, 인터류킨, 케모카인, 1형 사이토카인 또는 2형 사이토카인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 혈액 및 혈액 응고 인자는 인자 I, 인자 II, 조직 인자, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 Xa, 인자 XII, 인자 XIII, 폰 빌레브란트 인자, 프레칼리크레인, 고분자량 키니노젠, 피브리노겐, 항트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 저해제(ZPI), 플라스미노젠, 알파 2-항 플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA), 유로키나제, 플라스미노겐 활성화제 저해제-1(PAI1), 플라스미노겐 활성화제 저해제-2(PAI2), 암 응혈촉진제 또는 에포에틴 알파를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 치료적 단백질은 세포 기반 치료법의 세포에서, 세포에 의해 또는 세포 상에서 발현된다.
- [0020] 일 실시형태에서, 합성 나노운반체의 제1 및/또는 제2 집단 및/또는 치료적 단백질의 투여는 정맥내, 복강내, 경점막, 경구, 피하, 폐, 비강내, 피내 또는 근육내 투여에 의한다. 다른 실시형태에서, 합성 나노운반체 및/또는 치료적 단백질의 제1 및/또는 제2 집단의 투여는 흡입 또는 정맥내, 피하 또는 경점막 투여에 의한다.
- [0021] 또 다른 양태에서, (i) 면역억제제와 결합된 합성 나노운반체의 제1 집단, 및 (ii) 치료적 단백질 APC 제시가능 항원과 결합된 합성 나노운반체의 제2 집단을 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 조성물은 치료적 단백질 APC 제시가능 항원에 대해 원치 않는 면역 반응의 발생을 감소시키는 유효량으로 존재한다. 또 다른 양태에서, (i) 면역억제제와 결합된 합성 나노운반체의 제1 집단, 및 (ii) 치료적 단백질 APC 제시가능 항원과 결합된 합성 나노운반체의 제2 집단을 포함하는 조성물을 투여함으로써 대상체에서 원치 않는 면역 반응의 발생을 감소시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 추가 양태에서, 한 명 이상의 시험 대상체에서 치료적 단백질 APC 제시가능 항원에 대해 원치 않는 면역 반응의 발생을 감소시키는 것으로 이전에 나타난 프로토콜에 따라 대상체에 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 조성물은 (i) 면역억제제와 결합된 합성 나노운반체의 제1 집단, 및 (ii) 치료적 단백질 APC 제시가능 항원에 결합된 합성 나노운반체의 제2 집단을 포함한다. 일 실시형태에서, 제1 집단 및 제2 집단은 동일한 집단이다. 다른 실시형태에서, 제1 집

단 및 제2 집단은 상이한 집단이다.

- [0022] 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 대상체를 제공하거나 또는 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 조성물의 투여 전 및/또는 투여 후 대상체에서 원치 않는 면역 반응의 발생을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 원치 않는 면역 반응은 치료적 단백질에 특이적인 항체의 발생 및/또는 치료적 단백질에 특이적인 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성화, 및/또는 치료적 단백질에 특이적인 B 세포 증식 및/또는 활성화이다.
- [0023] 다른 실시형태에서, 면역억제제는 스타틴, mTOR 저해제, TGF- β 신호전달제, 코르티코스테로이드, 미토콘드리아 기능의 저해제, P38 저해제, NF- κ B 저해제, 아데노신 수용체 효능제, 프로스타글란딘 E2 효능제, 포스포디에스테라제 4 저해제, HDAC 저해제 또는 프로테아좀 저해제를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, mTOR 저해제는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체이다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 합성 나노운반체에 치료적 단백질을 결합시킴으로써 제공된다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 치료적 단백질로부터 얻거나 또는 유래된 폴리펩티드 또는 펩티드를 결합시킴으로써 제공된다. 추가 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 MHC 클래스 I-제한 및/또는 MHC 클래스 II-제한 에피토프, 및/또는 치료적 단백질의 B 세포 에피토프를 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 치료적 단백질의 MHC 클래스 II-제한 에피토프를 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 치료적 단백질의 B 세포 에피토프를 실질적으로 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 MHC 클래스 II-제한 에피토프를 포함하며, 치료적 단백질의 B 세포 에피토프를 실질적으로 포함하지 않는다.
- [0025] 일 실시형태에서, 치료적 단백질은 단백질 대체 또는 단백질 보충 치료법을 위한 치료적 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질은 주입가능하거나 또는 주사가능한 치료적 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고인자, 사이토카인, 인터페론, 성장인자, 단클론성 항체, 다클론성 항체 또는 폼페병과 관련된 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 주입가능하거나 또는 주사가능한 치료적 단백질은 토실리주맙, 알파-1 항트립신, 헤마타이드, 알빈테페론 알파-2b, 루신, 테사모렐린, 오크렐리주맙, 벨리루맙, 페글로티카제, 탈리글루세라제 알파, 아갈시다제 알파 또는 벨라글루세라제 알파를 포함한다. 다른 실시형태에서, 효소는 산화 환원효소, 트랜스퍼라제, 가수분해효소, 리아제, 이소머라제 또는 리가제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 효소는 리소좀 저장 장애에 대한 효소 대체 치료법을 위한 효소를 포함한다. 다른 실시형태에서, 리소좀 저장 장애에 대한 효소 대체 치료법을 위한 효소는 이미글루세라제, a-갈락토시다제 A(a-gal A), 아갈시다제 베타, 산 a-글루코시다제(GAA), 알글루코시다제 알파, 루미자임, 마이오자임, 아틸설파타제 B, 라로니다제, 알두라자임, 이두르설파제, 엘라프라제, 아틸설파타제 B 또는 나글라자임을 포함한다. 다른 실시형태에서, 사이토카인은 림포카인, 인터류킨, 케모카인, 1형 사이토카인 또는 2형 사이토카인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 혈액 및 혈액 응고 인자는 인자 I, 인자 II, 조직 인자, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 Xa, 인자 XII, 인자 XIII, 폰 빌레브란트 인자, 프레칼리크레인, 고분자량 키니노젠, 피브로넥틴, 항트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 저해제(ZPI), 플라스미노젠, 알파 2-항 플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA), 유로키나제, 플라스미노겐 활성화제 저해제-1(PAI1), 플라스미노겐 활성화제 저해제-2(PAI2), 암 응혈촉진제 또는 에포에틴 알파를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 치료적 단백질은 세포 기반 치료법의 세포에서, 세포에 의해 또는 세포 상에서 발현된다.
- [0026] 일 실시형태에서, 조성물은 치료적 단백질에 특이적인 항체의 발생 및/또는 치료적 단백질에 특이적인 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성화 및/또는 치료적 단백질에 특이적인 B 세포 증식 및/또는 활성을 감소시키는 유효량으로 존재한다.
- [0027] 다른 실시형태에서, 합성 나노운반체의 제1 및/또는 제2 집단에 걸쳐 평균적으로 면역억제제 및/또는 항원의 로드는 0.0001% 내지 50%이다. 또 다른 실시형태에서, 합성 나노운반체의 제1 및/또는 제2 집단에 걸쳐 평균적으로 면역억제제 및/또는 항원의 로드는 0.1% 내지 10%이다.
- [0028] 일 실시형태에서, 제1 집단 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 지질 나노입자, 중합체 나노입자, 금속 나노입자, 계면활성제 기반 에멀전, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스 유사 입자 또는 펩티드 또는 단백질 입자를 포함한다. 다른 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 지질 나노입자를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 리포솜을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 금속 나노입자를 포함한다. 추가 실시형태에서, 금속 나노입자는 금 나노입자를 포함한다. 또한 추가 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체는 중합체 나노입자를

포함한다. 다른 실시형태에서, 중합체 나노입자는 비-메톡시-말단 플루로닉 중합체인 중합체를 포함한다. 또한 추가 실시형태에서, 중합체 나노입자는 폴리에스테르, 폴리에테르에 결합된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리 카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 다당류, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 폴리에스테르는 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락틱-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 중합체 나노입자는 폴리에스테르 및 폴리에테르에 결합된 폴리에스테르를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 폴리에테르는 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함한다.

- [0029] 다른 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체의 동적 광산란을 사용하여 얻은 입자 크기 분포의 평균은 직경이 100nm 초과이다. 다른 실시형태에서, 직경은 150nm 초과이다. 다른 실시형태에서, 직경은 200nm 초과이다. 다른 실시형태에서, 직경은 250nm 초과이다. 다른 실시형태에서, 직경은 300nm 초과이다.
- [0030] 추가 실시형태에서, 제1 집단 및/또는 제2 집단의 합성 나노운반체의 종횡비는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 초과이다.
- [0031] 또한 추가 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함한다.
- [0032] 또한 추가 실시형태에서, 본 방법은 대상체에 치료적 단백질을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 치료적 단백질은 조성물의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투여 후 투여된다.
- [0033] 다른 실시형태에서, 조성물의 1회 이상의 유지 용량이 대상체에 투여된다.
- [0034] 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 조성물 및/또는 치료적 단백질의 투여 전 및/또는 투여 후 대상체에서 원치 않는 면역 반응의 발생을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 원치 않는 면역 반응은 치료적 단백질에 특이적인 항체의 발생, 및/또는 치료적 단백질에 특이적인 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성화, 및/또는 치료적 단백질에 특이적인 B 세포 증식 및/또는 활성화이다.
- [0035] 일 실시형태에서, 합성 나노운반체 및/또는 치료적 단백질의 제1 및/또는 제2 집단의 투여는 정맥내, 복강내, 경점막, 경구, 피하, 폐, 비강내, 피내 또는 근육내 투여에 의한다. 다른 실시형태에서, 합성 나노운반체 및/또는 치료적 단백질의 제1 및/또는 제2 집단의 투여는 흡입 또는 정맥내, 피하 또는 경점막 투여에 의한다.
- [0036] 추가 양태에서, (i) 면역억제제와 결합된 합성 나노운반체의 제1 집단을 생성하는 단계, 및 (ii) 치료적 단백질 APC 제시가능 항원과 결합된 합성 나노운반체의 제2 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 제1 집단 및 제2 집단은 동일한 집단이다. 다른 실시형태에서, 제1 집단 및 제2 집단은 상이한 집단이다. 또 다른 실시형태에서, 생성된 합성 나노운반체의 제1 및 제2 집단은 본 명세서의 어디에서나 제공되는 바와 같이 정의된 바와 같다.
- [0037] 일 실시형태에서, 본 방법은 생성된 합성 나노운반체의 제1 및 제2 집단을 포함하는 조성물의 투여형을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 투여를 위해 대상체에 대해 이용가능한 합성 나노운반체의 제1 집단 및 제2 집단 또는 투여형을 포함하는 조성물의 제조 단계를 추가로 포함한다. 추가 실시형태에서, 본 방법은 합성 나노운반체의 제1 집단 및 제2 집단을 포함하는 조성물에 의한 원치 않는 면역 반응의 감소를 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 원치 않는 면역 반응은 치료적 단백질에 특이적인 항체의 발생 및/또는 치료적 단백질에 특이적인 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성화, 및/또는 치료적 단백질에 특이적인 B 세포 증식 및/또는 활성화이다.
- [0038] 또한 추가 양태에서, (i) 면역억제제와 결합된 합성 나노운반체의 제1 집단, 및 (ii) 치료적 단백질 APC 제시가능 항원과 결합된 합성 나노운반체의 제2 집단을 포함하는 조성물 또는 투여형을 생성하기 위한 공정이 제공되되, 본 공정은 본 명세서에 제공된 방법 중 어떤 것에서 정의된 바와 같은 단계를 포함한다.
- [0039] 다른 양태에서, 본 명세서에 제공된 방법 또는 공정 중 임의의 것에 의해 얻을 수 있는 조성물 또는 투여형이 제공된다.
- [0040] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물 또는 투여형 중 임의의 것은 치료 또는 예방에서의 사용을 위한 것일 수 있다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물 또는 투여형 중 임의의 것은 치료적 단백질 항원에 대해 관용원성 면역 반응을 유도하는 방법, 세포 기반 치료법, 단백질 대체 치료법, 단백질 보충 치료법 또는 본 명세서에 제공된 방법 중 임의의 것에서의 사용을 위한 것일 수 있다.
- [0042] 추가 양태에서, 치료적 단백질 항원에 대해 관용원성 면역 반응을 유도하는 방법, 세포 기반 치료법, 단백질 대

체 치료법, 단백질 보충 치료법 또는 본 명세서에 제공된 방법 중 임의의 것에서의 사용을 위한 의약의 제조를 위해 본 명세서에 제공된 조성물 또는 투여형 중 임의의 것의 용도가 제공된다.

[0043] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물 중 임의의 것을 포함하는 투여형이 제공된다.

[0044] 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 예방적으로, 면역 반응의 초기에(예를 들어, IgM 단계 동안), 및/또는 성숙 기억 반응 및/또는 IgG 항체 반응의 확립 전에 투여된다. 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 실시형태에서, 조성물 및 방법은 항원에 반응하는 이펙터 T 세포의 빈도 및/또는 전염증 사이토카인을 생성하는 이펙터 T 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 다른 실시형태에서, 조성물 및 방법은 원치 않는 치료적 단백질 면역 반응의 발생 정도를 감소시키는 억제 조절 T 또는 B 세포의 빈도를 증가시킨다.

[0045] 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 실시형태에서, 앞서 언급한 에피토프를 포함하는 단백질인 항원은 합성 나노운반체에 결합될 수 있다. 다른 실시형태에서, 에피토프(들)의 말단 중 하나 또는 둘 다에 측접한 추가적인 아미노산을 제외한 앞서 언급한 에피토프를 포함하는 폴리펩티드 또는 펩티드는 합성 나노운반체에 결합될 수 있다. 다른 실시형태에서, 에피토프 그 자체는 합성 나노운반체에 결합된다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 Treg의 유세포측정법 분석의 결과를 나타낸다.

도 2는 (1회 주사 후) 면역억제제(라파마이신 또는 심바스타틴)를 포함하는 본 발명의 합성 나노운반체에 의한 항원 특이적 이펙터 T 세포의 수에 대한 효과를 나타낸다.

도 3 은 (다회 주사 후) 면역억제제(라파마이신 또는 심바스타틴)를 포함하는 본 발명의 합성 나노운반체를 지니는 슬와 림프절 세포 수의 감소를 나타낸다.

도 4는 면역억제제 라파마이신 및 ova 항원을 포함하는 합성 나노운반체에 의한 항 OVA IgG 항체의 감소를 나타낸다.

도 5는 대조군 및 수동적 군에서 면역억제제 라파마이신 및 OVA 항원을 포함하는 합성 나노운반체와 함께, 항 OVA IgG 항체의 감소를 나타낸다.

도 6은 ova 펩티드 및 면역억제제 라파마이신을 포함하는 합성 나노운반체의 투여와 함께, 항원 특이적 IgG 수준의 감소를 나타낸다.

도 7은 ova 펩티드 및 면역억제제 라파마이신을 포함하는 합성 나노운반체와 함께, 항원 특이적 B 세포의 개수의 감소를 나타낸다.

도 8은 ova 펩티드 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노운반체로 처리된 천식 모델 동물 대상체 유래의 세척 샘플 중 CD4+ T 세포 개수의 감소를 나타낸다.

도 9는 천식 모델 동물 대상체에서 ova 펩티드 및 면역억제제 라파마이신을 포함하는 합성 나노운반체로의 처리의 결과로서 CD4+ T 세포 분열 백분율의 감소를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 본 발명을 상세하게 기재하기 전에, 본 발명은 물론 다양할 수 있는 구체적으로 예시되어 있는 재료 또는 공정 파라미터에 제한되지 않는 것이 이해되어야 한다. 또한, 본 명세서에 사용된 용어는 본 발명의 특정 실시형태를 설명하기 위한 목적일 뿐이며, 본 발명을 기재하는 대안적 용어의 사용에 제한되고자 하지 않음이 이해되어야 한다.

[0048] 상기 또는 이하에서 본 명세서에 인용된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 본 명세서에서 모든 목적을 위해 이들 전문이 참고로 포함된다.

[0049] 본 명세서 및 첨부되는 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태("a" "an" 및 "the")는 문맥상 명백히 다르게 지시하지 않는 한 다수 대상을 포함한다. 예를 들어, "중합체"에 대한 참조는 둘 이상의 이러한 분자의 혼합물 또는 상이한 분자량의 단일의 중합체 화학종의 혼합물을 포함하며, "합성 나노운반체"에 대한 참조는 둘 이상의 이러한 합성 나노운반체 또는 복수의 이러한 합성 나노운반체의 혼합물을 포함하고, "DNA 분자"에 대한 참조는 둘 이상의 이러한 DNA 분자 또는 복수의 이러한 DNA 분자의 혼합물을 포함하며, "면역억제제"에 대한 참

조는 둘 이상의 이러한 물질 또는 복수의 면역억제제 분자의 혼합물을 포함하는 등이다.

[0050] 본 명세서에 사용되는 용어 "포함하다(comprise)" 또는 "포함한다" 또는 "포함하는"과 같은 이의 변이형은, 임의의 다른 정수 또는 정수들의 그룹을 배제하지 않고, 임의의 언급한 정수(예를 들어 특성, 요소, 특징, 속성, 방법/공정 단계 또는 한정) 또는 정수들의 그룹(예를 들어 특성들, 요소들, 특징들, 속성들, 방법/공정 단계들 또는 한정들)의 포함을 나타내는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 본 명세서에 사용된 용어 "포함하는"은 포괄적인 것이며, 추가적인, 언급되지 않은 정수들 또는 방법/공정 단계들을 배제하지 않는다.

[0051] 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 실시형태에서, "포함하는"은 "본질적으로 이루어진" 또는 "이루어진"으로 대체될 수 있다. 어구 "본질적으로 이루어진"은 본 명세서에서 특정 정수(들) 또는 단계들뿐 아니라 청구된 발명의 특징 또는 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들을 필요로 하는 것으로 사용된다. 본 명세서에 사용되는 용어 "이루어진"은 언급된 정수(예를 들어 특성, 요소, 특징, 속성, 방법/공정 단계 또는 한정) 또는 정수들의 그룹(예를 들어 특성들, 요소들, 특징들, 속성들, 방법/공정 단계들 또는 한정들) 단독의 존재를 나타내는 것으로 사용된다.

[0052] A. 도입

[0053] 앞서 언급한 바와 같이, 현존하는 통상적인 면역억제제는 광범위하게 작용하며, 일반적으로 면역계의 전반적인 전신 하향조절을 일으킨다. 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법은, 예를 들어 관심이 있는 면역 세포에 표적화된 전달을 가능하게 함으로써 더 표적화된 면역 효과를 가능하게 한다. 따라서, 조성물 및 방법은 더 규제된 방식으로 면역 억제제를 달성할 수 있다. MHC 클래스 II-제한 에피토프를 포함하는 면역억제제 및 항원을 전달하는 것은 항원 특이적 항체의 생성을 효과적으로 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 항원 특이적 CD4+ T 세포 및 B 세포의 발생을 감소시킬 수 있는 것으로 발견되었다. 이와 같은 면역 반응은 치료적 단백질에 의한 치료적 처치 동안 발생한 원치 않는 면역 반응에 대항하는 것에 있어서 유리할 수 있기 때문에, 본 발명은 원치 않는 면역 반응이 발생하거나 또는 발생할 것으로 예상되는 치료적 단백질을 투여받았거나, 투여받고 있거나 또는 투여받을 대상체에서 관용원성 면역 반응을 촉진하는데 유용하다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 특정 치료적 처치의 유리한 효과를 중화할 수 있는 원치 않는 면역 반응을 방지하거나 또는 억제한다.

[0054] 본 발명자들은 예상치 못하게 그리고 놀랍게도 상기 언급한 문제 및 한계점이 본 명세서에 개시된 발명을 실시함으로써 극복될 수 있다는 것을 발견하였다. 특히, 본 발명자는 치료적 단백질에 대한 관용원성 면역 반응을 유도하는 합성 나노운반체 조성물 및 관련된 방법을 제공할 수 있다는 것을 예상치 못하게 발견하였다. 본 명세서에 기재된 조성물은 (i) 면역억제제와 결합된 합성 나노운반체의 제1 집단, 및 (ii) 치료적 단백질 APC 제시 가능 항원과 결합된 합성 나노운반체의 제2 집단을 포함하는 조성물을 포함한다.

[0055] 다른 양태에서, 본 명세서의 조성물 중 임의의 것의 투여형이 제공된다. 이와 같은 투여형은 대상체, 예컨대 이와 같은 투여형이 필요한(예를 들어, 치료적 단백질에 특이적인 관용원성 면역 반응이 필요한) 대상체에게 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 대상체는 원치 않는 면역 반응이 발생하거나 또는 발생할 것으로 예상되는 치료적 단백질로 처치되었거나, 처치되고 있거나 또는 처치될 대상이다.

[0056] 다른 양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물 중 어떤 것은 대상체에게 투여된다. 조성물은 하나 이상의 치료적 단백질에 대해 원치 않는 면역 반응의 발생을 감소시키는 유효량으로 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 대상체에서 치료적 단백질에 대한 원치 않는 면역 반응의 발생을 감소시키는 것으로 이전에 나타난 프로토콜에 따라 대상체에게 투여된다. 원치 않는 면역 반응은 치료적 단백질에 특이적인 항체의 발생, CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성화, 또는 B 세포 증식 및/또는 활성화 또는 이의 조합일 수 있다. 원치 않는 면역 반응은 또한 상기한 것으로부터 하류의 기타 다른 면역 반응의 발생일 수 있다. 실시형태에서, 유효량 또는 프로토콜은 원하는 면역 반응을 발생시키거나 또는 발생시킨 것으로 나타났다. 이와 같은 면역 반응은 상기한 것 중 임의의 것, 또는 상기한 것의 조합의 감소를 포함한다. 이와 같은 면역 반응은 본 명세서에 기재된 것과 같은 임의의 관용원성 면역 반응을 포함한다.

[0057] 조성물은 대상체에게 치료적 단백질의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투여 후 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 합성 나노운반체 조성물은 대상체에게 성숙 기억 반응의 확립 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, 제공된 방법은 치료적 단백질을 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 실시형태에서, 제공된 조성물은 또한 치료적 단백질을 투여받았거나, 투여받고 있거나 또는 투여받을 대상체에게 1회 이상의 유지 용량으로서 투여될 수 있다. 이와 같은 실시형태에서, 제공된 조성물은 특정 시간 길이 동안 원치 않는 면역 반응의 발생이 감소되도록 투여된다. 이와 같은 시간 길이의 예는 본 명세서 다른 곳에서 제공된다.

- [0058] 또 다른 양태에서, (i) 면역억제제와 결합된 합성 나노운반체의 제1 집단을 생성하는 단계, 및 (ii) 치료적 단백질 APC 제시가능 항원과 결합된 합성 나노운반체의 제2 집단을 생성하는 단계의 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 해당 방법은 합성 나노운반체의 제1 및 제2 집단을 포함하는 투여형을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0059] 본 발명은 이제 이하에 더욱 상세하게 기재될 것이다.
- [0060] B. 정의
- [0061] "투여하는" 또는 "투여"는 약학적으로 유용한 방식으로 대상체에게 물질을 제공하는 것을 의미한다.
- [0062] 피험체에 투여를 위한 조성물 또는 투여형의 내용에서 "유효량"은 대상체에서 하나 이상의 원하는 면역 반응, 예를 들어 관용원성 면역 반응의 발생(예를 들어, 항원 특이적 CD4⁺ T 세포 또는 항원 특이적 B 세포의 증식, 활성화, 유도, 동원의 감소, 또는 항원 특이적 항체의 생성의 감소)을 생성하는 조성물 또는 투여형의 양을 지칭한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 유효량은 원하는 면역 반응 중 하나 이상을 생성하는 본 명세서에 제공된 조성물의 임의의 양이다. 이 양은 시험관내 또는 생체내 목적을 위한 것일 수 있다. 생체내 목적을 위해, 양은 임상적이 항원 특이적 관용이 필요한 대상체에 대해 임상적 이점을 가질 수 있다고 믿는 양일 수 있다.
- [0063] 유효량은 오직 원치 않는 면역 반응의 수준을 감소시키는 것만을 포함할 수 있지만, 일부 실시형태에서는, 이는 원치 않는 면역 반응을 완전히 방지하는 것을 포함한다. 또한, 유효량은 원치 않는 면역 반응의 발생을 지연시키는 것을 포함할 수 있다. 또한, 유효한 양은 원하는 치료적 중점 또는 원하는 치료적 결과를 생성하는 본 명세서에 제공된 조성물의 양일 수 있다. 유효량은 바람직하게는 대상체에서 항원에 대한 관용원성 면역 반응을 야기한다. 이들 중 임의의 것의 달성은 통상의 방법에 의해 모니터링할 수 있다.
- [0064] 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 일부 실시형태에서, 유효량은 대상체에서 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 1년, 적어도 2년, 적어도 5년 이상 동안 원하는 면역 반응이 계속되는 것이다. 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 다른 실시형태에서, 유효량은 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 1년, 적어도 2년, 적어도 5년 이상 동안 측정 가능한 원하는 면역 반응, 예를 들어 측정가능한 면역 반응(예를 들어, 특정 항원에 대한)의 감소를 생성하는 것이다.
- [0065] 유효량은 물론 보건의의 지식 및 의견 내에서 치료되는 특정 대상체; 증상, 질환 또는 장애의 중증도; 연령, 신체 상태, 크기 및 체중을 포함하는 개별 환자의 파라미터; 치료 기간; 동반 치료(존재시)의 특성; 특정 투여 경로 등의 요인에 좌우될 것이다. 이러한 요인은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 이는 통상적인 실험 내에서 다루어질 수 있다. 일반적으로, 최대 용량, 즉 확실한 임상적 판단에 따른 안전한 가장 높은 용량이 사용되는 것이 바람직하다. 그러나, 환자는 임상적 이유, 심리학적 이유 또는 실질적으로 임의의 다른 이유로 보다 적은 용량 또는 관용 용량을 고수할 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.
- [0066] 일반적으로, 본 발명의 조성물 중의 면역억제제 및/또는 항원의 용량은 약 10 μ g/kg 내지 약 100,000 μ g/kg의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 용량은 약 0.1mg/kg 내지 약 100mg/kg의 범위일 수 있다. 다른 실시형태에서, 용량은 약 0.1mg/kg 내지 약 25mg/kg, 약 25mg/kg 내지 약 50mg/kg, 약 50mg/kg 내지 약 75mg/kg 또는 약 75mg/kg 내지 약 100mg/kg의 범위일 수 있다. 대안적으로, 용량은 원하는 양의 면역억제제 및/또는 항원을 제공하는 합성 나노운반체의 개수에 기초하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 유용한 용량은 용량당 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ 또는 10¹⁰ 개 초과와 합성 나노운반체를 포함한다. 다른 유용한 용량의 예에는 용량당 약 1 $\times$ 10⁶ 내지 약 1 $\times$ 10¹⁰, 약 1 $\times$ 10⁷ 내지 약 1 $\times$ 10⁹ 개 또는 약 1 $\times$ 10⁸ 내지 약 1 $\times$ 10⁹ 개의 합성 나노운반체가 포함된다.
- [0067] "항원"은 B 세포 항원 또는 T 세포 항원을 의미한다. "항원의 유형(들)"은 동일하거나 실질적으로 동일한 항원 특징을 공유하는 분자를 의미한다. 일부 실시형태에서, 항원은 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 리포단백질(lipoprotein), 당지질(glycolipid), 폴리뉴클레오티드, 다당류일 수 있거나, 세포 내에 함유되거나 세포 내에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 항원이 잘 정의되거나 특성화되지 않은 경우, 항원은 세포 또는 조직 체제, 세포 데브리시(debris), 세포 엑소좀(exosome), 조절된 배지 등 내에 함유될 수 있다. 항원은 대상체가 노출되는 것과 동일한 유형의 합성 나노운반체와 조합되어, 원치 않는 면역 반응을 야기할 수 있으나, 이의 단편 또는 유도체일 수도 있다. 그러나, 단편 또는 유도체의 경우, 이러한 대상체가 마주치는 형태에 대한 원하는 면역 반응이 제공된 조성물 및 방법의 바람직한 결과이다.

- [0068] "항원 특이적"은 항원 또는 이의 부분의 존재로부터 야기되거나, 항원을 특이적으로 인식하거나 이에 결합하는 분자를 생성하는 임의의 면역 반응을 지칭한다. 예를 들어, 면역 반응이 항원 특이적 항체 생성인 경우, 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 생성된다. 다른 예로서, 면역 반응이 항원 특이적 B 세포 또는 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성인 경우, 증식 및/또는 활성은 단독으로 또는 MHC 분자, B 세포 등과의 복합체에서 항원 또는 이의 부분의 인식으로부터 야기된다.
- [0069] "면역 반응의 평가"는 시험관내 또는 생체내에서의 면역 반응의 수준, 존재 또는 부재, 감소, 증가 등의 임의의 측정 또는 결정을 지칭한다. 이러한 측정 또는 결정은 대상체로부터 획득되는 하나 이상의 샘플 상에서 수행할 수 있다. 이러한 평가는 본 명세서에 제공되거나 다르게는 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법으로 수행될 수 있다.
- [0070] "위험이 있는" 대상체는 건강한 참여자가 본 명세서에 제공되는 바와 같은 질환, 장애 또는 증상을 가질 기회를 갖는 것으로 여겨지는 대상체, 또는 본 명세서에 제공된 원치 않는 면역 반응을 경험할 기회를 갖는 것으로 여겨지는 대상체이다.
- [0071] 본 명세서에서 사용되는 "평균"은 달리 언급되지 않는다면 산술 평균을 지칭한다.
- [0072] "B 세포 항원"은 B 세포 내 면역 반응이거나 또는 B 세포에 의해 인식되고 B 세포 내 면역 반응을 촉발시키는 임의의 항원(예를 들어, B 세포 또는 B 세포 상의 수용체에 의해 특이적으로 인식된 항원)을 의미한다. 일부 실시형태에서, T 세포 항원인 항원은 또한 B 세포 항원이다. 다른 실시형태에서, T 세포 항원은 또한 B 세포 항원이 아니다. B 세포 항원은 단백질, 펩티드 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, B 세포 항원은 비단백질 항원(즉, 단백질 또는 펩티드 항원이 아님)을 포함한다.
- [0073] "동시"는 2개 이상의 물질을 시간적으로 상관되는, 바람직하게는 시간적으로 충분히 상관되는 방식으로 대상체에게 투여하여, 면역 반응의 조절을 제공하는 것을 의미한다. 실시형태에서, 동시 투여는 동일한 투여형 중의 둘 이상의 물질의 투여를 통하여 발생할 수 있다. 다른 실시형태에서, 동시 투여는 상이한 투여형 중에 있으나 특정 기간 내의, 바람직하게는 1개월 내의, 더욱 바람직하게는 1주 내의, 더더욱 바람직하게는 1일 내의, 보다 바람직하게는 1시간 내의 둘 이상의 물질의 투여를 포함할 수 있다.
- [0074] "결합" 또는 "결합된" 또는 "결합들" (등)은 하나의 독립체(entity)(예를 들어, 하나의 모이어티(moiety))를 다른 것에 화학적으로 회합시키는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 결합은 공유이며, 이는 결합이 2개의 독립체 사이의 공유 결합의 존재의 맥락에서 발생하는 것을 의미한다. 비-공유 실시형태에서, 비-공유 결합은 전하 상호작용, 친화성 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착(absorption), 호스트-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 스택킹(stacking) 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반데르발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 및/또는 이들의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 비-공유 상호작용에 의해 매개된다. 실시형태들에서, 캡슐화는 결합의 형태이다.
- [0075] "유래된"은 물질로부터 또는 물질과 관련된 정보로부터 제조되었지만, 물질로부터 "얻지" 않은 것을 의미한다. 이와 같은 물질은 생물학적 물질로부터 직접 취한 물질의 실질적으로 변형되거나 또는 가공된 형태일 수 있다. 이와 같은 물질은 또한 생물학적 물질과 관련된 정보로부터 생성된 물질을 포함한다.
- [0076] "투여형"은 대상체로의 투여에 적절한 매질, 운반체, 비히클 또는 장치 중의 약리학적 및/또는 면역학적 활성 물질을 의미한다.
- [0077] "캡슐화"는 합성 나노운반체 내에 적어도 일부의 물질이 둘러싸이는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 물질이 합성 나노운반체 내에서 완전히 둘러싸인다. 다른 실시형태에서, 캡슐화되는 대부분의 물질 또는 모든 물질은 합성 나노운반체의 외부 국소 환경에 노출되지 않는다. 다른 실시형태들에서, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5%(중량/중량) 이하가 국소 환경에 노출된다. 캡슐화는 합성 나노운반체의 표면 상에 대부분의 물질 또는 모든 물질을 배치하고, 물질이 합성 나노운반체의 외부의 국소 환경에 노출되게 남겨두는 흡착과는 상이하다.
- [0078] 항원 결정기로도 공지되어 있는 "에피토프"는 면역계에 의해, 구체적으로, 예를 들어, 항체, B 세포 또는 T 세포에 의해 인식되는 항원의 부분이다. 본 명세서에 사용되는 "MHC 클래스 I-제한된 에피토프"는 유핵(nucleated) 세포상에서 관찰되는 MHC 클래스 I 분자에 의해 면역 세포에 제시되는 에피토프이다. "MHC 클래스 II-제한된 에피토프"는 항원 제시 세포(APC) 상에서, 예를 들어, 전문적 항원-제시 면역 세포, 예를 들어, 대식 세포, B 세포 및 수지상 세포상에서 또는 비-조혈계 세포, 예를 들어, 간세포상에서 관찰되는 MHC 클래스 II 분자에 의해 면역 세포에 제시되는 에피토프이다. "B 세포 에피토프"는 항체 또는 B 세포에 의해 인식되는 분자

구조이다. 일부 실시형태에서, 에피토프 자체는 항원이다.

[0079] 수많은 에피토프가 당업자에게 공지되어 있으며, 본 발명의 일부 양태에 따라 적절한 예시적인 에피토프에는 면역 에피토프 데이터베이스(Immune Epitope Database)(www.immuneepitope.org, Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Emami H, Hoof I, Salimi N, Damle R, Sette A, Peters B. The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan;38(Database issue):D854-62; IEDB 버전 2.4의 전체 내용 뿐 아니라 모든 데이터베이스 엔트리, 2011년 8월, 및 특히 상기 문헌에 개시된 모든 에피토프가 본 명세서에 참고로 포함됨)에 열거된 것들이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 또한, 에피토프는 종종 이용가능한 알고리즘, 예를 들어, 문헌[Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, Peters B. 2010. peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics* 2010, 11:568]; 문헌[Wang P, Sidney J, Dow C, Mothe B, Sette A, Peters B. 2008. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol.* 4(4):e1000048]; 문헌[Nielsen M, Lund O. 2009. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics.* 10:296]; 문헌[Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. 2007. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics.* 8:238]; 문헌[Bui HH, Sidney J, Peters B, Sathiamurthy M, Sinichi A, Purton KA, Mothe BR, Chisari FV, Watkins DI, Sette A. 2005. *Immunogenetics.* 57:304-314]; 문헌[Sturniolo T, Bono E, Ding J, Radrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol.* 17(6):555-561]; 문헌[Nielsen M, Lundegaard C, Wornig P, Lauemoller SL, Lamberth K, Buus S, Brunak S, Lund O. 2003. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci* 12:1007-1017]; 문헌[Bui HH, Sidney J, Peters B, Sathiamurthy M, Sinichi A, Purton KA, Mothe BR, Chisari FV, Watkins DI, Sette A. 2005. Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools: ARB matrix applications. *Immunogenetics* 57:304-314]; 문헌[Peters B, Sette A. 2005. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC Bioinformatics* 6:132]; 문헌[Chou PY, Fasman GD. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 47:45-148]; 문헌[Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol* 55:836-839]; 문헌[Karplus PA, Schulz GE. 1985. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72:212-213]; 문헌[Kolaskar AS, Tongaonkar PC. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276:172-174]; 문헌[Parker JM, Guo D, Hodges RS. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25:5425-5432]; 문헌[Larsen JE, Lund O, Nielsen M. 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2:2]; 문헌[Ponomarenko JV, Bourne PE. 2007. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Struct Biol* 7:64]; 문헌[Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. 2006. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* 15:2558-2567]; 문헌[Ponomarenko JV, Bui H, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, Peters B. 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 9:514]; 문헌[Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Peters B, Sette A, Justesen S, Buus S, and Lund O. 2008. *PLoS Comput Biol.* 4(7):e1000107. Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan]에 기재된 알고리즘으로 식별될 수 있으며; 각각의 전체 내용은 에피토프의 식별을 위한 방법 및 알고리즘의 개시 내용을 위한 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0080] "생성하는"은 스스로 직접적으로, 또는 비제한적으로 단어 또는 행위에 의존하여 행동을 하는 관련되지 않은 제 3자와 같이 간접적으로, 면역 반응(예를 들어, 관용원성 면역 반응)과 같은 작용이 발생하게 하는 것을 의미한다.

[0081] "확인하는"은 임상의가 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물로부터 유익할 수 있는 것으로 대상체를 인식하게 하는 임의의 행동 또는 일련의 행동이다. 바람직하게는, 확인된 대상체는 본 명세서에 제공된 바와 같은 관용원성 면역 반응을 필요로 하는 대상체이다. 행동 또는 일련의 행동은 스스로 직접적으로, 또는 비제한적으로 단어 또

는 행위에 의존하여 행동을 하는 관련되지 않은 제3자와 같이 간접적으로 이루어질 수 있다.

[0082] "면역억제제"는 APC가 면역억제성(예를 들어, 관용원성 효과)을 갖게 하는 화합물을 의미한다. 면역억제 효과는 일반적으로 원치 않는 면역 반응을 줄이거나, 저해하거나 예방하거나, 또는 원하는 면역 반응을 촉진시키는 APC에 의한 사이토카인 또는 기타 인자의 생성 또는 발현을 지칭한다. APC가 APC에 의해 제시되는 항원을 인식하는 면역 세포상에서 면역억제 효과를 야기하는 경우, 면역억제 효과는 제시된 항원에 특이적인 것으로 지칭된다. 또한, 이러한 효과는 본 명세서에 관용원성 효과로 지칭된다. 임의의 특정 이론에 제한되지 않고, 면역억제제가 바람직하게는 항원(예를 들어, 투여되는 항원 또는 생체내에 이미 존재하는 항원)의 존재 하에서 APC로 전달되는 면역억제제의 결과인 것으로 여겨진다. 따라서, 면역억제제는 동일한 조성물 또는 상이한 조성물에 제공되거나 제공되지 않을 수 있는 항원에 대한 관용원성 면역 반응을 제공하는 화합물을 포함한다. 일 실시형태에서, 면역억제제는 APC가 하나 이상의 면역 이펙터 세포에서 조절 표현형을 촉진하게 하는 것이다. 예를 들어, 조절 표현형은 항원 특이적 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 생성, 유도, 자극 또는 동원의 억제, 항원 특이적 항체 생성의 억제, Treg 세포(예를 들어, CD4+CD25highFoxP3+ Treg 세포)의 생성, 유도, 자극 또는 동원을 특징으로 한다. 이는 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 조절 표현형으로의 전환의 결과일 수 있다. 이는 또한 기타 면역 세포, 예를 들어, CD8+ T 세포, 대식세포 및 iNKT 세포에서의 FoxP3의 유도의 결과일 수 있다. 일 실시형태에서, 면역억제제는 APC가 항원을 처리한 후에, APC의 반응에 영향을 미치는 것이다. 다른 실시형태에서, 면역억제제는 항원의 처리를 간섭하는 것이 아니다. 추가의 실시형태에서, 면역억제제는 세포자멸사-신호전달 분자가 아니다. 다른 실시형태에서, 면역억제제는 인지질이 아니다.

[0083] 면역억제제에는 스타틴; mTOR 저해제, 예를 들어, 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF- β 신호전달제; TGF- β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 저해제, 예를 들어, 트리코스타틴(Trichostatin) A; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능의 저해제, 예를 들어, 로테논; P38 저해제; NF- κ β 저해제, 예를 들어, 6Bio, 텍사메타손, TCPA-1, IKK VII; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제(PGE2), 예를 들어, 미소프로스톨(Misoprostol); 포스포다이에스테라제 저해제, 예를 들어, 포스포다이에스테라제 4 저해제(PDE4), 예를 들어, 롤리프람(Rolipram); 프로테아좀 저해제; 키나제 저해제; G-단백질 결합 수용체 효능제; G-단백질 결합 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 사이토카인 저해제; 사이토카인 수용체 저해제; 사이토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시좀 증식제-활성화 수용체 길항제; 퍼옥시좀 증식제-활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 저해제; 칼시뉴린 저해제; 포스파타제 저해제; PI3KB 저해제, 예를 들어, TGX-221; 자가소화작용(autophagy) 저해제, 예를 들어, 3-메틸아데닌; 아릴 탄화수소 수용체 저해제; 프로테아좀 저해제 I(PSI); 및 산화된 ATP, 예를 들어, P2X 수용체 차단제가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 또한, 면역억제제는 IDO, 비타민 D3, 사이클로스포린, 예를 들어, 사이클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 저해제, 레스베라트롤, 아자티오피린(Aza), 6-머캅토피린(6-MP), 6-티오구아닌(6-TG), FK506, 상글리페린(sangliferin) A, 살메테롤(salmeterol), 미코페놀레이트 모페틸(MMF), 아스피린 및 기타 COX 저해제, 니플룸산(niflumic acid), 에스트리올(estriol) 및 트립톨리드(triptolide)를 포함한다. 실시형태에서, 면역억제제는 본 명세서에 제공되는 작용제 중 임의의 것을 포함할 수 있다.

[0084] 면역억제제는 APC 상에 면역억제(예를 들어, 관용원성) 효과를 직접적으로 제공하는 화합물일 수 있거나, 또는 이는 간접적으로(즉, 투여 후 몇몇 방식으로 처리된 후에) 면역억제(예를 들어, 관용원성) 효과를 제공하는 화합물일 수 있다. 따라서, 면역억제제는 본 명세서에 제공된 화합물 중 임의의 것의 프로드럭(prodrug) 형태를 포함한다.

[0085] 또한, 면역억제제는 면역억제(예를 들어, 관용원성) 면역 반응을 야기하는 본 명세서에 제공되는 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 따라서, 실시형태들에서, 면역억제제는 면역억제(예를 들어, 관용원성) 면역 반응을 야기하는 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 핵산이고, 이는 합성 나노반체에 결합되는 핵산이다.

[0086] 핵산은 DNA 또는 RNA, 예를 들어, mRNA일 수 있다. 실시형태들에서, 본 발명의 조성물은 본 발명에 제공되는 핵산의 임의의 것의 상보체, 예를 들어, 전장 상보체 또는 축퇴물(유전 코드의 축퇴성에 기인함)을 포함한다. 실시형태들에서, 핵산은 세포주로 트랜스펙션되는 경우 진사될 수 있는 발현 벡터이다. 실시형태들에서, 발현 벡터는 다른 것들 중 특히 플라스미드, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스를 포함할 수 있다. 핵산은 표준 분자생물학 방법을 사용하여, 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응을 사용하여 핵산 단편을 생성하고, 이를 정제하고, 발현 벡터 내로 클로닝함으로써 단리되거나 합성될 수 있다. 본 발명의 실시예 유용한 추가의 기술은 문헌[Current Protocols in Molecular Biology 2007 by John Wiley and Sons, Inc.]; 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition) Joseph Sambrook, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne,

Australia]; 문헌[David Russell, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Cold Spring Harbor]에서 찾을 수 있다.

[0087] 실시형태들에서, 본 명세서에 제공되는 면역억제제는 합성 나노운반체에 결합된다. 바람직한 실시형태들에서, 면역억제제는 합성 나노운반체의 구조를 이루는 물질에 더하여 존재하는 요소이다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 합성 나노운반체가 하나 이상의 중합체로 이루어지는 경우, 면역억제제는 하나 이상의 중합체에 더하여 존재하며, 이에 결합되는 화합물이다. 다른 예로서, 일 실시형태에서, 합성 나노운반체가 하나 이상의 지질로 이루어지는 경우, 면역억제제는 다시 하나 이상의 지질에 더하여 존재하며 이에 결합된다. 또한, 합성 나노운반체의 물질이 면역억제(예를 들어, 관용원성) 효과를 야기하는 실시형태들에서, 면역억제제는 면역억제(예를 들어, 관용원성) 효과를 야기하는 합성 나노운반체의 물질에 더하여 존재하는 요소이다.

[0088] 다른 예시적인 면역억제제에는 소분자 약물, 천연 산물, 항체(예를 들어, CD20, CD3, CD4에 대한 항체), 생물체제(biologics)-기반의 약물, 탄수화물-기반의 약물, 나노입자, 리포솜, RNAi, 안티센스 핵산, 압타머, 메토타렉세이트, NSAID; 핑골리모드(fingolimod); 나탈리주맙(natalizumab); 알렘투주맙(alemtuzumab); 항-CD3; 타크롤리무스(FK506) 등이 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 추가의 면역억제제는 당업자에게 공지되어 있으며, 발명은 이러한 양태에 제한되지 않는다.

[0089] 면역억제제 또는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원의 “로드”는 전체 합성 나노운반체에서 물질의 전체 중량을 기준으로 합성 나노운반체에 결합된 면역억제제 또는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원의 양(중량/중량)이다. 일반적으로, 로드는 합성 나노운반체의 집단에 걸친 평균으로서 계산된다. 일 실시형태에서, 합성 나노운반체의 제1 집단에 걸친 평균적인 면역억제제의 로드는 0.0001% 내지 50%이다. 다른 실시형태에서, 합성 나노운반체의 제1 및/또는 제2 집단에 걸친 평균적인 치료적 단백질 APC 제시가능 항원의 로드는 0.0001% 내지 50%이다. 또 다른 실시형태에서, 면역억제제 및/또는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원의 로드는 0.01% 내지 20%이다. 추가 실시형태에서, 면역억제제 및/또는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원의 로드는 0.1% 내지 10%이다. 또한 추가 실시형태에서, 면역억제제 및/또는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원의 로드는 1% 내지 10%이다. 또 다른 실시형태에서, 면역억제제 및/또는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원의 로드는 합성 나노운반체의 집단에 걸쳐 평균적으로 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% 또는 적어도 20%이다. 또한 추가 실시형태에서, 면역억제제 및/또는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원의 로드는 합성 나노운반체의 집단에 걸쳐 평균적으로 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 실시형태 중 일부 실시형태에서, 면역억제제 및/또는 치료적 단백질 APC 제시가능 항원의 로드는 합성 나노운반체의 집단에 걸쳐 평균적으로 25% 이하이다. 실시형태에서, 로드는 실시예에 기재된 바와 같이 계산된다.

[0090] 제공되는 임의의 조성물 및 방법의 실시형태들에서, 로드는 하기와 같이 계산된다: 대략 3mg의 합성 나노운반체를 수집하고, 원심분리하여, 합성 나노입자 펠렛으로부터 상청액을 분리한다. 아세트오니트릴을 펠렛에 첨가하고, 샘플을 초음파분해하고, 원심분리하여, 임의의 불용성 물질을 제거한다. 상청액 및 펠렛을 RP-HPLC 상에 주입하고, 278nm에서 흡광도를 판독한다. 펠렛에서 관찰되는 μg 을 사용하여, 포집(로드)%를 계산하고, 상청액 및 펠렛 중의 μg 을 사용하여 회수되는 총 μg 을 계산한다.

[0091] "유지 용량"은 초기의 용량이 대상체에서 면역억제(예를 들어, 관용원성) 반응을 야기한 후에, 대상체에게 투여되어, 원하는 면역억제(예를 들어, 관용원성) 반응을 지속시키는 용량을 지칭한다. 예를 들어, 유지 용량은 초기 용량 후에 달성되는 관용원성 효과를 유지하거나, 대상체에서 원치 않는 면역 반응을 예방하거나, 대상체가 원치 않는 수준의 면역 반응을 포함하는 원치 않는 면역 반응을 경험할 위험이 있는 대상체가 되는 것을 예방하는 것일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 유지 용량은 적절한 수준의 원하는 면역 반응을 지속하는데 충분한 것이다.

[0092] "합성 나노운반체의 최대 치수"는 합성 나노운반체의 임의의 축을 따라 측정되는 나노운반체의 가장 큰 치수를 의미한다. "합성 나노운반체의 최소 치수"는 합성 나노운반체의 임의의 축을 따라 측정되는 합성 나노운반체의 가장 작은 치수를 의미한다. 예를 들어, 타원형 합성 나노운반체에 있어서, 합성 나노운반체의 최대 및 최소 치수는 실질적으로 동일할 것이며, 이의 직경의 크기일 것이다. 유사하게, 입방형 합성 나노운반체에 있어서, 합성 나노운반체의 최소 치수는 이의 높이, 너비 또는 길이 중 가장 작은 것일 것이며, 합성 나노운반체의 최대

치수는 이의 높이, 너비 또는 길이 중 가장 큰 것일 것이다. 일 실시형태에서, 샘플 중의 합성 나노운반체의 총 개수에 기초하여, 샘플 중의 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100nm 이상이다. 일 실시형태에서, 샘플 중의 합성 나노운반체의 총 개수에 기초하여, 샘플 중의 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 5 μ m 이하이다. 바람직하게는, 샘플 중의 합성 나노운반체의 총 개수에 기초하여, 샘플 중의 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 110nm 초과, 더욱 바람직하게는 120nm 초과, 더욱 바람직하게는 130nm 초과, 더욱 바람직하게는 150nm 초과이다. 본 발명의 합성 나노운반체의 최대 대 최소 치수의 중형비는 실시형태에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 합성 나노운반체의 최대 대 최소 치수의 중형비는 1:1 내지 1,000,000:1, 바람직하게는 1:1 내지 100,000:1, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 10,000:1, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 1000:1, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 100:1, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 10:1로 달라질 수 있다. 바람직하게는, 샘플 중의 합성 나노운반체의 총 개수에 기초하여, 샘플 중의 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 3 μ m 이하, 더욱 바람직하게는 2 μ m 이하, 더욱 바람직하게는 1 μ m 이하, 더욱 바람직하게는 800nm 이하, 더욱 바람직하게는 600nm 이하, 더욱 바람직하게는 500nm 이하이다. 바람직한 실시형태들에서, 샘플 중의 합성 나노운반체의 총 개수에 기초하여, 샘플 중의 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100nm 이상, 더욱 바람직하게는 120nm 이상, 더욱 바람직하게는 130nm 이상, 더욱 바람직하게는 140nm 이상, 더욱 바람직하게는 150nm 이상이다. 합성 나노운반체 치수(예를 들어, 직경)의 측정은 합성 나노운반체를 액체(통상 수성) 매질 중에 현탁화시키고, 동적 광산란(DLS)(예를 들어, 브룩하벤(Brookhaven) ZetaPALS 기기를 사용)을 사용하여 수득된다. 예를 들어, 합성 나노운반체의 현탁액은 수성 완충제로부터 정제수로 희석하여, 대략 0.01mg/ml 내지 0.1mg/ml의 최종 합성 나노운반체 현탁액 농도를 달성할 수 있다. 희석된 현탁액은 내측에서 직접적으로 제조되거나, DLS 분석에 적절한 큐벳(cuvette)으로 전달될 수 있다. 이어서, 큐벳을 DLS에 배치하고, 조절된 온도로 평형화되게 한 다음, 충분한 시간 동안 스캐닝하여, 매질의 점도 및 샘플의 굴절률에 대한 적절한 입력에 기초하여, 안정한 재현가능한 분포를 획득할 수 있다. 이어서, 유효 직경 또는 분포의 평균을 기록한다. 합성 나노운반체의 "치수", "크기" 또는 "직경"은 동적 광산란을 사용하여 수득되는 입자 크기 분포의 평균을 의미한다.

[0093] "MHC"는 세포 표면상의 처리된 단백질의 단편 또는 에피토프를 나타내는 MHC 분자를 인코딩하는 대부분의 척추동물에서 관찰되는 구조적합성 복합체, 큰 게놈 영역 또는 유전자 패밀리를 지칭한다. 세포 표면상의 MHC:펩티드의 제시는 면역 세포, 통상 T 세포에 의한 감시를 가능하게 한다. 2가지의 일반적 MHC 분자의 분류가 존재한다: 클래스 I 및 클래스 II. 일반적으로, 클래스 I MHC 분자는 유핵 세포상에서 관찰되며, 펩티드를 세포독성 T 세포에 제시한다. 클래스 II MHC 분자는 소정의 면역 세포, 주로, 집합하여 전문적 APC로 알려져 있는 대식세포, B 세포 및 수지상 세포상에서 관찰된다. MHC 영역 내의 가장 잘 알려져 있는 유전자는 세포 표면상의 항원-제시 단백질을 인코딩하는 서브셋이다. 인간에서, 이들 유전자는 인간 백혈구 항원(HLA) 유전자로 지칭된다.

[0094] "비-메톡시-말단 중합체"는 메톡시 이외의 모이어티로 종결되는 적어도 하나의 말단을 갖는 중합체를 의미한다. 일부 실시형태들에서, 중합체는 메톡시 이외의 모이어티로 종결되는 적어도 2개의 말단을 갖는다. 다른 실시형태들에서, 중합체는 메톡시로 종결되는 말단을 갖지 않는다. "비-메톡시-말단 플루로닉(pluronic) 중합체"는 양 말단에 메톡시를 갖는 선형 플루로닉 중합체 이외의 중합체를 의미한다. 본 명세서에 제공되는 바와 같은 중합체 나노입자는 비-메톡시-말단 중합체 또는 비-메톡시-말단 플루로닉 중합체를 포함할 수 있다.

[0095] "언어진"은 물질로부터 직접 취해지며, 실질적으로 변형 및/또는 가공없이 사용되는 것을 의미한다.

[0096] "약제학적으로 허용가능한 부형제"는 본 발명의 조성물을 제형화하기 위해 열거된 합성 나노운반체와 함께 사용되는 약리학적 불활성 물질을 의미한다. 약제학적으로 허용가능한 부형제는 당류(예를 들어, 글루코스, 락토스 등), 보존제, 예를 들어, 항미생물제, 재구성 보조제, 착색제, 염수(예를 들어, 인산염 완충 염수) 및 완충제를 포함하나 이들에 한정되지 않는 당업계에 공지되어 있는 다양한 물질을 포함한다.

[0097] "프로토콜"은 하나 이상의 물질의 대상체로의 임의의 투여 치료법을 지칭한다. 투여 치료법은 투여의 양, 빈도 및/또는 방식을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 이러한 프로토콜을 사용하여 본 발명의 하나 이상의 조성물을 하나 이상의 시험 대상체에게 투여할 수 있다. 이어서, 이들 시험 대상체에서 면역 반응을 평가하여, 프로토콜이 원치 않는 면역 반응을 줄이고, 원하는 면역 반응(예를 들어, 관용원성 효과의 촉진)을 생성하는데 효과적이지 여부를 결정할 수 있다. 또한, 임의의 다른 치료적 및/또는 예방적 효과가 상기 언급된 면역 반응 대신에 또는 이에 더하여 평가될 수 있다. 프로토콜이 원하는 효과를 갖는지 여부는 본 명세서에 제공되거나, 다르게는 당업계에 공지되어 있는 방법 중 임의의 것을 사용하여 결정할 수 있다. 예를 들어, 세포의 집단은 본

명세서에 제공된 조성물이 특정 프로토콜에 따라 투여되는 대상체로부터 수득하여, 특정 면역 세포, 사이토카인, 항체 등이 감소되는지, 생성되는지, 활성화되는지 등의 여부를 결정할 수 있다. 면역 세포의 존재 및/또는 개수를 검출하기 위한 유용한 방법에는 유세포측정법(예를 들어, FACS) 및 면역조직화학 방법이 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 면역 세포 마커의 특이적 염색을 위한 항체 및 기타 결합체가 상업적으로 입수가능하다. 이러한 키트는 전형적으로, 다수의 항원을 위한 염색 시약을 포함하며, 이는 세포의 비균질 집단으로부터 원하는 세포 집단의 FACS-기반의 검출, 분리 및/또는 정량화를 가능하게 한다.

[0098] "대상체의 제공"은 임상의가 대상체와 접촉하게 하고, 본 명세서에 제공된 조성물을 이에 투여하거나 이에 대하여 본 명세서에 제공되는 방법을 수행하는 임의의 행동 또는 일련의 행동이다. 바람직하게는, 대상체는 본 명세서에 제공된 바와 같은 관용원성 면역 반응을 필요로 하는 대상체이다. 행동 또는 일련의 행동은 스스로 직접적으로, 또는 비제한적으로 단어 또는 행위에 의존하여 행동을 하는 관련되지 않은 제3자와 같이 간접적으로, 이루어질 수 있다.

[0099] "대상체"는 온혈 동물, 예를 들어 인간 및 영장류; 조류; 가정 또는 농장 동물, 예를 들어, 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험실 동물, 예를 들어, 마우스, 랫트 및 기니아 피그; 어류; 파충류; 동물원 및 야생 동물; 등을 포함하는 동물을 의미한다.

[0100] "B 세포 에피토프가 실질적으로 없는"은 B 세포 반응의 실질적인 활성화를 자극하는(항원의 상황 내에서 단독으로, 운반체와 함께 또는 본 발명의 조성물과 함께) 양의 B 세포 에피토프가 없는 것을 지칭한다. 실시형태에서, B 세포 에피토프가 실질적으로 없는 조성물은 항원의 B 세포 에피토프의 측정가능한 양을 함유하지 않는다. 다른 실시형태에서, 이와 같은 조성물은 항원의 B 세포 에피토프의 측정가능한 양을 포함할 수 있지만, 상기 양은(항원의 상황 내에서 단독으로, 운반체와 함께 또는 본 발명의 조성물과 함께) 측정가능한 B 세포 면역 반응, 예컨대 항원 특이적 항체 생성 또는 항원 특이적 B 세포 증식 및/또는 활성을 발생시키는데 효과적이지 않거나, 또는 상당한 측정가능한(항원의 상황 내에서 단독으로, 운반체와 함께 또는 본 발명의 조성물과 함께) B 세포 면역 반응을 발생시키는데 효과적이지 않다. 일부 실시형태에서, 상당한 측정가능한 B 세포 면역 반응은 대상체에 부정적인 임상적 결과를 생성하거나 또는 생성할 것으로 예상되는 것이다. 다른 실시형태에서, 상당한 측정가능한 B 세포 면역 반응은 대조군 항원(예를 들어, 항원의 B 세포 에피토프를 포함하지 않거나 또는 B 세포 면역 반응을 자극하지 않는 것으로 알려진 것)에 의해 생성된 동일 유형의 면역 반응(예를 들어, 항원 특이적 항체 생성 또는 항원 특이적 B 세포 증식 및/또는 활성)의 수준보다 더 큰 것이다. 일부 실시형태에서, 상당한 측정가능한 B 세포 면역 반응, 예컨대 항체 역가의 측정(예를 들어, ELISA에 의함)은 대조군(예를 들어, 대조군 항원)에 의해 생성된 동일 유형의 반응보다 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배 이상이다. 다른 실시형태에서, B 세포 에피토프가 실질적으로 없는 조성물은 항원 특이적 항체 역가를(항원의 상황 내에서, 운반체와 함께 또는 본 발명의 조성물과 함께) 거의 내지 전혀 생성하지 않는 것이다. 이와 같은 조성물은 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20 또는 10 미만의 항체 역가(EC50 값으로서)를 생성하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상당한 측정가능한 B 세포 면역 반응은 대조군에 의해 생성된 동일 유형의 반응보다 10%, 25%, 50%, 100%, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배 이상인 B 세포의 수 또는 증식의 측정이다. B 세포 반응을 측정하기 위한 기타 다른 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0101] 실시형태에서, 조성물이 B 세포 에피토프를 실질적으로 포함하지 않는 것을 보장하기 위해서, 항원은 본 명세서에 제공된 바와 같은 합성 나노운반체에 결합을 위한 B 세포 에피토프를 포함하지 않도록 선택된다. 다른 실시형태에서, 조성물이 항원의 B 세포 에피토프를 실질적으로 포함하지 않는 것을 보장하기 위해서, 항원에 결합된 합성 나노운반체가 생성되고, B 세포 면역 반응(예를 들어, 항원 특이적 항체 생성, B 세포 증식 및/또는 활성)에 대해 시험된다. 그 다음 원하는 특성을 나타내는 조성물이 선택될 수 있다.

[0102] "합성 나노운반체(들)"는 자연에서 관찰되지 않으며, 크기가 5 μ m 이하인 적어도 하나의 치수를 갖는 별개의 대상체를 의미한다. 일부인 나노입자는 일반적으로 합성 나노운반체로서 포함되나, 특정 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 일부인 나노입자를 포함하지 않는다. 실시형태들에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 키토산을 포함하지 않는다. 다른 실시형태들에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 지질-기반의 나노입자가 아니다. 추가의 실시형태들에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 인지질을 포함하지 않는다.

[0103] 합성 나노운반체는 비제한적으로, 하나 또는 복수의 지질-기반의 나노입자(본 명세서에서 지질 나노입자, 즉 이들의 구조를 이루는 대다수의 물질이 지질인 나노입자로도 지칭됨), 중합체 나노입자, 금속 나노입자, 계면활성제-기반의 에멀전, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스-유사 입자(즉, 주로 바이러스 구조 단백질을 이루나, 감염성을 갖지 않거나, 감염성이 낮은 입자), 펩티드 또는 단백질-기반의 입자(본 명세서에서 단백질 입자,

즉, 이들의 구조를 이루는 대다수의 물질이 펩티드 또는 단백질인 입자로도 지칭됨)(예를 들어, 알부민 나노입자) 및/또는 지질-중합체 나노입자와 같은 나노물질의 조합을 사용하여 개발된 나노입자일 수 있다. 합성 나노운반체는 타원형, 입방형, 피라미드형, 직사각형, 원통형, 도넛형 등을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 상이한 형상일 수 있다. 본 발명에 따른 합성 나노운반체는 하나 이상의 표면을 포함한다. 본 발명의 실시예에 사용하기 위해 조정될 수 있는 예시적인 합성 나노운반체에는 (1) 미국 특허 제5,543,158호(Gref et al.)에 개시된 생분해성 나노입자, (2) 미국 특허 출원 제20060002852호(Saltzman et al.)의 중합체 나노입자, (3) 미국 특허 출원 공개 제20090028910호(DeSimone et al.)의 리소그래피로 구축되는 나노입자, (4) WO 2009/051837호(von Andrian et al.)의 개시내용, (5) 미국 특허 출원 공개 제2008/0145441호(Penades et al.)에 개시된 나노입자, (6) 미국 특허 출원 공개 제20090226525호(de los Rios et al.)에 개시된 단백질 나노입자, (7) 미국 특허 출원 공개 제20060222652호(Sebbel et al.)에 개시된 바이러스-유사 입자, (8) 미국 특허 출원 공개 제20060251677호(Bachmann et al.)에 개시된 핵산 결합된 바이러스-유사 입자, (9) WO2010047839A1호 또는 WO2009106999A2호에 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 나노침전형(nanoprecipitated) 나노입자, 또는 (11) 미국 공개 제2002/0086049호에 개시된 세포자멸사 세포, 세포자멸사 소체(apoptotic body), 또는 합성 또는 반합성 모방체가 포함된다. 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 초과 또는 1:10 초과 중형비를 가질 수 있다.

[0104] 약 100nm 이하, 바람직하게는 100nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노운반체는 보체를 활성화시키는 히드록실기를 지니는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화시키는 히드록실기가 아닌 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 약 100nm 이하, 바람직하게는 100nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노운반체는 보체를 실질적으로 활성화시키는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 실질적으로 활성화시키지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 더 바람직한 실시형태에서, 약 100nm 이하, 바람직하게는 100nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노운반체는 보체를 활성화시키는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화시키지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 실시형태에서, 합성 나노운반체는 바이러스 유사 입자를 제외한다. 실시형태에서, 합성 나노운반체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 초과 또는 1:10 초과 중형비를 가질 수 있다.

[0105] “T 세포 항원”은 CD4+ T 세포 항원 또는 CD8+ 세포 항원을 의미한다. “CD4+ T 세포 항원”은 CD4+ T 세포에 의해 인식되고, CD4+ T 세포 내 면역 반응을 촉발시키는 임의의 항원, 예를 들어 클래스 II 구조적 복합체 분자(major histocompatibility complex molecule: MHC)에 결합된 항원 또는 이의 일부의 제시를 통해 CD4+T 세포 상의 T 세포 수용체에 의해 특이적으로 인식되는 항원을 의미한다. “CD8+ T 세포 항원”은 CD8+ T 세포에 의해 인식되고, CD8+ T 세포 내 면역 반응을 촉발시키는 임의의 항원, 예를 들어 클래스 II 구조적 복합체 분자(MHC)에 결합된 항원 또는 이의 일부의 제시를 통해 CD8+T 세포 상의 T 세포 수용체에 의해 특이적으로 인식되는 항원을 의미한다. 일부 실시형태에서, T 세포 항원인 항원은 또한 B 세포 항원이다. 다른 실시형태에서, T 세포 항원은 또한 B 세포 항원이 아니다. T 세포 항원은 일반적으로 단백질 또는 펩티드다.

[0106] “치료적 단백질”은 대상체에게 투여될 수 있고, 치료적 효과를 갖는 임의의 단백질 또는 단백질-기반의 치료법을 지칭한다. 이러한 치료법은 단백질 대체 및 단백질 보충 치료법을 포함한다. 또한, 이러한 치료법은 외인성 또는 외래 단백질의 투여, 항체 치료법 및 세포 또는 세포 기반의 치료법을 포함한다. 치료적 단백질에는 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 사이토카인, 성장 인자, 단일클론 항체 및 다중클론 항체가 포함된다. 다른 치료적 단백질의 예는 본 명세서의 다른 곳에 제공되어 있다. 치료적 단백질은 세포 내에서, 세포상에서 또는 세포에 의해 생성될 수 있으며, 이러한 세포로부터 수득되거나 이러한 세포의 형태로 투여될 수 있다. 실시형태들에서, 치료적 단백질은 포유류 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 박테리아 세포, 식물 세포, 트랜스제닉 동물 세포, 트랜스제닉 식물 세포 등 내에서, 이들 상에서 또는 이들에 의해 생성된다. 치료적 단백질은 이러한 세포에서 재조합에 의해 생성될 수 있다. 치료적 단백질은 바이러스로 형질전환된 세포 내에서, 바이러스로 형질전환된 세포상에서 또는 바이러스로 형질전환된 세포에 의해 생성될 수 있다. 또한, 치료적 단백질은 이를 발현하도록 트랜스펙션되거나, 형질도입되거나, 다르게는 조작된 자가 세포 내에서, 이러한 자가 세포상에서 또는 이러한 자가 세포에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 치료적 단백질은 핵산으로서 또는 핵산을 바이러스, VLP, 리포솜 등으로 도입시킴으로써 투여될 수 있다. 대안적으로, 치료적 단백질은 이러한 형태로부터 수득되고, 치료적 단백질 자체로서 투여될 수 있다. 이에 따라, 대상체는 이들 중 임의의 것을 제공한 적이 있거나, 이를 제공하고 있거나, 이를 제공할 임의의 대상체를 포함한다. 이러한 대상체는 유전자 치료법; 치료적

단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 발현하도록 트랜스펙션되거나, 형질도입되거나, 다르게는 조작된 자가 세포; 또는 치료적 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 발현하는 세포를 제공받은 적이 있거나, 이를 제공받고 있거나, 또는 이를 제공받을 대상체를 포함한다.

[0107] “치료적 단백질 APC 제시가능 항원”은 치료적 단백질과 관련된 항원을 의미한다(즉, 치료적 단백질 또는 이의 단편은 치료적 단백질에 대해 면역 반응을 발생(예를 들어, 치료적 단백질에 특이적인 항체의 생성)시킬 수 있다). 일반적으로, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 면역계에 의한 인식(예를 들어, 이로 제한되지 않지만, 수지상 세포, B 세포 또는 마크로파지를 포함하는 항원 제시 세포에 의해 제시되는 것과 같은 면역계의 세포)을 위해 제시될 수 있다. 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은, 예를 들어 T 세포에 의한 인식을 위해 제시될 수 있다. 이와 같은 항원은 클래스 I 또는 클래스 II 주조직적합성 복합체 분자(MHC)에 결합된 항원의 에피토프의 제시를 통해 T 세포에 의해 인식되고, T 세포 내 면역 반응을 촉발시킬 수 있다. 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 일반적으로 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 리포단백질을 포함하거나, 또는 세포 내에서, 세포 상에서 또는 세포에 의해 함유되거나 또는 발현된다. 일부 실시형태에서, 치료적 단백질 항원은 합성 나노운반체에 결합되고, MHC 클래스 I-제한 에피토프 및/또는 MHC 클래스 II-제한 에피토프 및/또는 B 세포 에피토프를 포함한다. 다른 실시형태에서, 예컨대 B세포 에피토프의 포함이 원치 않는 면역 반응을 악화시킬 때, 항원은 B 세포 에피토프를 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 항원은 MHC 클래스 II-제한 에피토프를 포함하며, B 세포 에피토프를 실질적으로 포함하지 않는다. 바람직하게, 치료적 단백질에 특이적인 하나 이상의 관용원성 면역 반응은 본 명세서에 제공된 조성물에 의한 결과이다.

[0108] “관용원성 면역 반응”은 항원, 또는 이러한 항원을 발현하는 세포, 조직, 기관 등에 특이적인 면역 억제를 야기할 수 있는 임의의 면역 반응을 의미한다. 이러한 면역 반응은 항원, 또는 이러한 항원을 발현하는 세포, 조직, 기관 등에 특이적인 원치 않는 면역 반응의 임의의 감소, 지연 또는 저해를 포함한다. 이러한 면역 반응은 또한 항원, 또는 이러한 항원을 발현하는 세포, 조직, 기관 등에 특이적인 원하는 면역 반응의 임의의 자극, 생성, 유도, 촉진 또는 동원을 포함한다. 따라서, 관용원성 면역 반응은 항원 반응성 세포에 의해 매개될 수 있는 항원에 대한 원치 않는 면역 반응의 부재 또는 감소뿐만 아니라 억제 세포의 존재 또는 촉진을 포함한다. 본 명세서에 제공되는 바와 같은 관용원성 면역 반응은 면역학적 관용을 포함한다. “관용원성 면역 반응의 생성”은 항원, 또는 이러한 항원을 발현하는 세포, 조직, 기관 등에 특이적인 전술한 임의의 면역 반응의 생성을 지칭한다. 관용원성 면역 반응은 MHC 클래스 I-제한된 제시 및/또는 MHC 클래스 II-제한된 제시 및/또는 B 세포 제시 및/또는 CD1d에 의한 제시 등의 결과일 수 있다.

[0109] 관용원성 면역 반응은 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 또는 B 세포 증식 및/또는 활성의 임의의 감소, 지연 또는 저해를 포함한다. 또한, 관용원성 면역 반응은 항원-특이적 항체 생성의 감소를 포함한다. 관용원성 면역 반응은 또한 조절 세포, 예를 들어, CD4+ Treg 세포, CD8+ Treg 세포, Breg 세포 등의 자극, 유도, 생성 또는 동원을 야기하는 임의의 반응을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 관용원성 면역 반응은 조절 세포의 생성, 유도, 자극 또는 동원을 특징으로 하는 조절 표현형으로의 전환을 야기하는 것이다.

[0110] 관용원성 면역 반응은 또한 CD4+ Treg 세포 및/또는 CD8+ Treg 세포의 자극, 생성 또는 동원을 야기하는 임의의 반응을 포함한다. CD4+ Treg 세포는 전사 인자 FoxP3를 발현할 수 있으며, 염증 반응 및 자가-면역 염증 질환을 저해할 수 있다(문헌[Human regulatory T cells in autoimmune diseases. Cvetanovich GL, Hafler DA. Curr Opin Immunol. 2010 Dec;22(6):753-60]; 문헌[Regulatory T cells and autoimmunity. Vila J, Isaacs JD, Anderson AE. Curr Opin Hematol. 2009 Jul;16(4):274-9]). 이러한 세포는 또한 B-세포에 대한 T-세포 지원을 억제하고 자가 및 외래 항원 둘 모두에 대하여 관용을 유도한다(문헌[Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. Miyara M, Wing K, Sakaguchi S. J Allergy Clin Immunol. 2009 Apr;123(4):749-55]). CD4+ Treg 세포는 APC상의 클래스 II 단백질에 의해 제시되는 경우 항원을 인식한다. 클래스 I(및 Qa-1)에 의해 제시되는 항원을 인식하는 CD8+ Treg 세포도 또한 B-세포에 대한 T-세포 지원을 억제하고, 항원-특이적 억제의 활성화를 야기하여, 자가 및 외래 항원 둘 모두에 대하여 관용을 유도할 수 있다. Qa-1과 CD8+ Treg 세포의 상호작용의 방해는 면역 반응의 조절을 불량하게 하는 것으로 나타났으며, 자가-항체 형성 및 자가-면역 치사 전신-홍반성 낭창의 발병을 야기한다(문헌[Kim et al., Nature. 2010 Sep 16, 467 (7313): 328-32]). CD8+ Treg 세포는 또한 류마티스 관절염 및 대장염을 포함하는 자가면역 염증 질환의 모델을 저해하는 것으로 나타났다(문헌[CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune arthritis. Oh S, Rankin AL, Caton AJ. Immunol Rev. 2010 Jan;233(1):97-111]; 문헌[Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. Boden EK, Snapper SB. Curr Opin Gastroenterol. 2008 Nov;24(6):733-41]). 일부 실시형태들에서, 제공되는 조성물은 둘 모두의 반응을 효율적으로 야기할 수 있다(CD4+ Treg 및 CD8+ Treg).

다른 실시형태에서, FoxP3는 다른 면역 세포, 예를 들어, 대식세포, iNKT 세포 등에서 유도될 수 있으며, 본 명세서에 제공되는 조성물은 또한 하나 이상의 이들 반응을 야기할 수 있다.

[0111] 또한, 관용원성 면역 반응에는 조절 사이토카인, 예를 들어, Treg 사이토카인의 유도; 저해성 사이토카인의 유도; 염증성 사이토카인(예를 들어, IL-4, IL-1b, IL-5, TNF- α , IL-6, GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-9, IL-12, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, M-CSF, C 반응성 단백질, 급성기 단백질), 케모카인(예를 들어, MCP-1, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIG, ITAC 또는 IP-10), 항 염증성 사이토카인(예를 들어, IL-4, IL-13, IL-10 등), 케모카인(예를 들어, CCL-2, CXCL8), 프로테아제(예를 들어, MMP-3, MMP-9), 류코트리엔(예를 들어, CysLT-1, CysLT-2), 프로스타글란딘(예를 들어, PGE2) 또는 히스타민의 생성의 저해; Th17, Th1 또는 Th2 면역 반응에 대한 분극의 저해; 이펙터 세포-특이적 사이토카인: Th17(예를 들어, IL-17, IL-25), Th1(IFN- γ), Th2(예를 들어, IL-4, IL-13)의 저해; Th1-, Th2- 또는 TH17-특이적 전사 인자의 저해; 이펙터 T 세포의 증식의 저해; 이펙터 T 세포의 세포자멸사의 유도; 관용원성 수지상 세포-특이적 유전자의 유도, FoxP3 발현의 유도, IgE 유도 또는 IgE-매개의 면역 반응의 저해; 항체 반응(예를 들어, 항원-특이적 항체 생성)의 저해; T 헬퍼 세포 반응의 저해; TGF- β 및/또는 IL-10의 생성; 자가항체의 이펙터 기능의 저해(예를 들어, 세포의 고갈, 세포 또는 조직 손상 또는 상보체 활성화의 저해) 등이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0112] 전술한 것들 중 임의의 것은 하나 이상의 동물 모델에서 생체내에서 측정하거나, 시험관내에서 측정할 수 있다. 당업자는 이러한 생체내 또는 시험관내 측정에 익숙하다. 원치 않는 면역 반응 또는 관용원성 면역 반응은 예를 들어, 면역 세포 개수 및/또는 기능의 평가, 테트라머 분석, ELISPOT, 사이토카인 발현, 사이토카인 분비의 유세포측정-기반의 분석, 사이토카인 발현 프로파일링, 유전자 발현 프로파일링, 단백질 발현 프로파일링, 세포 표면 마커의 분석, 면역 세포 수용체 유전자 사용(문헌[T. Clay et al., "Assays for Monitoring Cellular Immune Response to Active Immunotherapy of Cancer" Clinical Cancer Research 7:1127-1135 (2001)] 참조)의 PCR-기반의 검출 방법 등을 사용하여 모니터링할 수 있다. 원치 않는 면역 반응 또는 관용원성 면역 반응은 또한 예를 들어, 혈장 또는 혈청 중의 단백질 수준의 평가 방법, 면역 세포 증식 및/또는 기능적 검정 등을 사용하여 모니터링할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 관용원성 면역 반응은 FoxP3의 유도를 평가함으로써 모니터링할 수 있다. 또한, 특정 방법이 실시예에서 더욱 상세하게 기재된다.

[0113] 바람직하게는 관용원성 면역 반응은 본 명세서에 기재되는 질환, 장애 또는 증상의 발병, 진행 또는 병적측면의 저해를 야기한다. 본 발명의 조성물이 본 명세서에 기재된 질환, 장애 또는 증상의 발병, 진행 또는 병적측면의 저해를 야기할 수 있는지 여부는 이러한 질환, 장애 또는 증상의 동물 모델로 측정할 수 있다.

[0114] 일부 실시형태들에서, 원치 않는 면역 반응의 감소 또는 관용원성 면역 반응의 생성은 임상적 종점, 임상 효능, 임상 징후, 질환 바이오마커 및/또는 임상 점수를 결정함으로써 평가할 수 있다. 또한, 원치 않는 면역 반응 또는 관용원성 면역 반응은 진단 시험으로 평가하여, 본 명세서에 제공된 바와 같은 질환, 장애 또는 증상의 존재 또는 부재를 평가할 수 있다. 원치 않는 면역 반응은 대상체에서 치료적 단백질 수준 및/또는 기능을 측정하는 방법에 의해 더 평가할 수 있다.

[0115] 일부 실시형태에서, 대상체에서 원치 않는 면역 반응 또는 관용원성 면역 반응의 발생을 모니터링하거나 또는 평가하는 것은 본 명세서에 제공된 합성 나노운반체 조성물의 투여 전 및/또는 치료적 단백질의 투여 전일 수 있다. 다른 실시형태에서, 원치 않는 면역 반응 또는 관용원성 면역 반응의 발생을 평가하는 것은 본 명세서에 제공된 합성 나노 운반체 조성물의 투여 후 및/또는 치료적 단백질의 투여 후일 수 있다. 일부 실시형태에서, 평가는 합성 나노운반체의 조성물의 투여 후, 그러나 치료적 단백질의 투여 전에 행해질 수 있다. 다른 실시형태에서, 평가는 치료적 단백질의 투여 후, 그러나 조성물의 투여 전에 행해진다. 또 다른 실시형태에서, 평가는 합성 나노운반체와 치료적 단백질 둘 다의 투여 후 수행된다. 추가 실시형태에서, 평가는 합성 나노운반체 및/또는 치료적 단백질의 투여 전과 투여 후에 수행된다. 또 다른 실시형태에서, 평가는 바람직한 면역 상태가 대상체, 예컨대 치료적 단백질이 투여된 적이 있거나, 투여되고 있거나 투여될 대상체에서 유지되는지를 결정하기 위해 대상체에 대하여 1회 초과 수행된다.

[0116] 항체 반응은 하나 이상의 항체 역가를 결정함으로써 평가할 수 있다. "항체 역가"는 측정가능한 수준의 항체 생성을 의미한다. 항체 역가의 측정 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 효소-결합 면역흡착 검정(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)을 포함한다. 실시형태들에서, 항체 반응은 예를 들어, 항체의 개수, 항체의 농도 또는 역가로서 정량화될 수 있다. 값은 절대치이거나 상대치일 수 있다. 항체 반응의 정량화 검정은 항체 포획 검정, 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA), 저해 액상 흡착 검정(ILPAA), 로켓 면역전기영동(RIE) 검정 및 선 면역

전기영동(LIE) 검정을 포함한다. 항체 반응을 다른 항체 반응과 비교하는 경우, 바람직하게는 동일한 유형의 정량적 값(예를 들어, 역가) 및 측정 방법(예를 들어, ELISA)을 사용하여 비교를 행한다.

[0117] 항체 역가를 측정하기 위한 ELISA 방법, 예를 들어, 전형적인 샌드위치 ELISA는 하기의 단계로 이루어질 수 있다: (i) 대상 항체 표적이 기질 중합체 또는 다른 적절한 물질에 결합되도록 ELISA-플레이트 코팅 물질을 제조하는 단계, (ii) 수용액(예를 들어, PBS) 중에 코팅 물질을 제조하고, 멀티웰 플레이트 상으로의 코팅의 밤샘 침착을 위해 코팅 물질 용액을 멀티웰 플레이트의 웰에 전달하는 단계, (iii) 세척 완충제(예를 들어, PBS 중의 0.05% 트윈(Tween)-20)로 멀티웰 플레이트를 완전히 세척하여, 과잉의 코팅 물질을 제거하는 단계, (iv) 희석 용액(예를 들어, PBS 중의 10% 우태아혈청)을 적용함으로써 비특이적인 결합에 대하여 플레이트를 블로킹하는 단계, (v) 세척 용액을 사용하여 플레이트로부터 블로킹/희석 용액을 세척하는 단계, (vi) 항체 및 적절한 표준 물질(양성 대조군)을 함유하는 혈청 샘플(들)을 필요에 따라 희석제로 희석하여 ELISA 반응을 적절하게 포화시키는 농도를 수득하는 단계, (vii) ELISA 반응 곡선을 생성하기에 적절한 농도의 범위를 보장하도록 멀티웰 플레이트 상에서 혈장 샘플을 단계 희석하는 단계, (viii) 플레이트를 인큐베이션시켜, 항체-표적 결합을 가능하게 하는 단계, (ix) 플레이트를 세척 완충제로 세척하여, 항원에 결합되지 않은 항체를 제거하는 단계, (x) 동일한 희석제 중의 적절한 농도의 2차 검출 항체, 예를 들어, 1차 항체에 결합할 수 있는 비오틴-결합 검출 항체를 첨가하는 단계, (xi) 플레이트를 적용되는 검출 항체와 인큐베이션시킨 후, 세척 완충제로 세척하는 단계, (xii) 비오틴화된 항체 상에서 관찰되는 비오틴에 결합할 효소, 예를 들어, 스트렙타비딘-HRP(호스 래디쉬 퍼옥시다제(horse radish peroxidase))를 첨가하고 인큐베이션시키는 단계, (xiii) 멀티웰 플레이트를 세척하는 단계, (xiv) 기질(들)(예를 들어, TMB 용액)을 플레이트에 첨가하는 단계, (xv) 발색이 완료되는 경우 중지 용액(예를 들어, 2N 황산)을 적용하는 단계, (xvi) 기질에 대하여 특정 파장에서 플레이트 웰의 광학 밀도를 관독하는 단계(450nm(570nm에서의 관독을 제함)), (xvii) 적절한 멀티파라미터 곡선 피트를 데이터에 적용하고, 최대-절반 유효 농도(half-maximal effective concentration, EC50)를 플레이트 표준물질에 대한 최대 OD 값의 절반이 달성되는 곡선상의 농도로 정의하는 단계.

[0118] "원치 않는 면역 반응"은 항원에 대한 노출로부터 야기되거나, 본 명세서에 제공된 질환, 장애 또는 증상(또는 이의 징후)을 촉진하거나 악화시키거나, 본 명세서에 제공된 질환, 장애 또는 증상의 징후인 임의의 원치 않는 면역 반응을 지칭한다. 이러한 면역 반응은 일반적으로, 대상체의 건강에 부정적인 영향을 갖거나, 대상체의 건강에 부정적인 영향의 징후이다. 원치 않는 면역 반응은 항원 특이적 항체 생성, 항원 특이적 B 세포 증식 및/또는 활성화, 또는 항원 특이적 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성을 포함한다.

[0119] C. 본 발명의 조성물

[0120] 면역억제제 및 치료적 단백질 APC 제시가능 항원을 포함하는 관용원성 합성 나노운반체 조성물 및 관련된 방법이 본 명세서에 제공된다. 이와 같은 조성물 및 방법은 원치 않는 면역 반응의 발생을 감소시키고, 치료적 단백질에 특이적인 관용원성 면역 반응의 발생을 촉진하는데 유용하다. 조성물은 치료적 단백질에 대한 관용원성 면역 반응이 바람직한 대상체에게 투여될 수 있다. 이와 같은 대상체는 치료적 단백질이 투여된 적이 있거나, 투여되고 있거나 또는 투여될 대상체를 포함한다. 실시형태에서, 대상체는 본 명세서에 제공된 합성 나노운반체가 투여되고, 그 다음에 하나 이상의 치료적 단백질이 투여된다. 다른 실시형태에서, 대상체는 치료적 단백질이 투여된 다음, 합성 나노운반체가 제공된다. 또 다른 실시형태에서, 합성 나노운반체 및 하나 이상의 치료적 단백질은 동시에 투여된다.

[0121] 상기 언급한 바와 같이, 합성 나노운반체는 면역억제제 및, 일부 실시형태에서 관용원성 효과가 요구되는 항원을 포함하도록 설계된다. 실시형태에서, 항원은 면역억제제와 함께 제시될 때 관용원성 효과, 예컨대 항원 특이적 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성화의 감소를 가져올 수 있는 MHC 클래스 II-제한 에피토프를 포함한다. 생성된 관용원성 효과는 또한 항원 특이적 B 세포 증식 및/또는 활성화의 감소, 및/또는 항원 특이적 항체 생성의 감소를 포함한다. 매우 다양한 합성 나노운반체가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 구체 또는 타원체이다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 편평하거나 판-형상이다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 정육면체 또는 입방체이다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 타원형 또는 타원이다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 원통형, 원뿔형 또는 피라미드형이다.

[0122] 일부 실시형태들에서, 각 합성 나노운반체가 유사한 특성을 갖도록 크기, 형상 및/또는 조성의 면에서 상대적으로 균일한 합성 나노운반체의 집단을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노운반체의 총 개수에 기초하여, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 합성 나노운반체가 합성 나노운반체의 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10% 또는 20%에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노

운반체의 집단은 크기, 형상 및/또는 조성에 관하여 이질적일 수 있다.

- [0123] 합성 나노운반체는 고체 또는 중공체(hollow)일 수 있으며, 하나 이상의 층을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 각 층은 다른 층(들)에 비하여 독특한 조성 및 독특한 특성을 갖는다. 그러나 일 예를 제공하기 위하여, 합성 나노운반체는 코어/셸 구조를 가질 수 있으며, 여기서, 코어는 하나의 층(예를 들어, 중합체 코어)이며, 셸은 제2 층(예를 들어, 지질 이중층 또는 단층)이다. 합성 나노운반체는 복수의 상이한 층을 포함할 수 있다.
- [0124] 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 선택적으로 하나 이상의 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 리포솜을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 지질 이중층을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 지질 단층을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 미셀(micelle)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 지질 층(예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)으로 둘러싸인 중합체 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 지질층(예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)으로 둘러싸인 비-중합체 코어(예를 들어, 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자, 골분(bone particle), 바이러스 입자, 단백질, 핵산, 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.
- [0125] 다른 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 비-중합체 합성 나노운반체는 비-중합체 구성성분의 응집물, 예를 들어, 금속 원자(예를 들어, 금 원자)의 응집물이다.
- [0126] 일부 실시형태에서, 합성 나노운반체는 선택적으로 하나 이상의 양친매성 독립체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 양친매성 독립체는 안정성이 증가되거나, 균일성이 개선되거나, 또는 점성도가 증가된 합성 나노운반체의 생성을 촉진할 수 있다. 일부 실시형태에서, 양친매성 독립체는 지질막의 내부 표면(예를 들어, 지질 이중층, 지질 단일층 등)과 결합될 수 있다. 당업계에 공지된 다수의 양친매성 독립체는 본 발명에 따른 합성 나노운반체의 제조에서의 사용에 적합하다. 이와 같은 양친매성 독립체는 포스포글리세라이드; 포스포티딜콜린; 디팔미토일 포스포티딜콜린(dipalmitoyl phosphatidylcholine: DPPC); 디올레일포스포티딜 에탄올아민(dioleyolphosphatidyl ethanolamine: DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄(dioleyloxypropyltriethylammonium: DOTMA); 디올레일포스포티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤석시네이트; 디포스포티딜 글리세롤(diphosphatidyl glycerol: DPPG); 핵산데칸올; 지방산, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol: PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 표면 활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세라이드; 지방산 디글리세라이드; 지방산 아미드; 소르비탄 트리올리에이트(스판(Span)(등록 상표)85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트(스판(Span)(등록 상표)20); 폴리소르베이트 20(트윈(Tween)(등록 상표)20); 폴리소르베이트 60(트윈(Tween)(등록 상표)60); 폴리소르베이트 65(트윈(Tween)(등록 상표)65); 폴리소르베이트 80(트윈(Tween)(등록 상표)80); 폴리소르베이트 85(트윈(Tween)(등록 상표)85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서팩틴; 폴록사머; 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 트리올리에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스포티딜세린; 포스포티딜이노시톨; 스펅고마이엘린; 포스포티딜에탄올아민(세팔린); 카디올리핀; 포스포티드산; 세레브로사이드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스포티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실-아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀리에이트; 헥사데실 스테아레이트; 이소프로필 미리스테이트; 틸록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스포티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 인지질; 높은 계면활성 특성을 갖는 합성 및/또는 천연 계면활성제; 데옥시콜레이트; 사이클로덱스트린; 카오토프릭(chaotropic) 염; 이온쌍 형성제; 및 이의 조합물을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 양친매성 독립체 성분은 상이한 양친매성 독립체의 혼합물일 수 있다. 당업자는 이것이 계면활성 활성을 지니는 물질의 예시적인 열거일 뿐, 포괄적인 것이 아니라는 것을 인식할 것이다. 임의의 양친매성 독립체가 본 발명에 따라 사용되는 합성 나노운반체의 생성에 사용될 수 있다.
- [0127] 일부 실시형태에서, 합성 나노운반체는 하나 이상의 탄수화물을 선택적으로 포함할 수 있다. 탄수화물은 천연 또는 합성일 수 있다. 탄수화물은 유도체화된 천연 탄수화물일 수 있다. 특정 실시형태에서, 탄수화물은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 리보스, 락토스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 셀비오스, 만노스, 자일로스, 아라비노스, 글루코론산, 갈락토론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민 및 뉴라민산을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 당당류 또는 이당류를 포함한다. 특정 실시형태에서, 탄수화물은 폴루란, 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(hydroxypropyl methylcellulose: HPMC), 하이드록시셀룰로스(hydroxycellulose: HC), 메틸셀룰로스(methylcellulose: MC), 텍스트란, 사이클로덱스트란, 글리코젠, 하이드록시에틸전분, 카르기난, 글리콘, 아밀로스, 키토산, N,O-카르복시메틸키토산, 알긴 및 알긴산, 전분, 키틴, 이눌린, 곤약, 글루코만

난(glucomannan), 푸스틀란, 헤파린, 히알루론산, 커들란 및 잔탄을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 다당류이다. 실시형태에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 탄수화물, 예컨대 다당류를 포함하지 않는다(또는 특별히 제외하지 않는다). 특정 실시형태에서, 탄수화물은 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨 및 락티톨을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 당 알코올과 같은 탄수화물 유도체를 포함할 수 있다.

[0128] 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 비-메톡시-말단 플루로닉 중합체인 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체를 이루는 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)는 비-메톡시-말단 플루로닉 중합체다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체를 구성하는 모든 중합체는 비-메톡시-말단 플루로닉 중합체다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 비-메톡시-말단 중합체인 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체를 이루는 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)는 비-메톡시-말단 중합체다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체를 이루는 모든 중합체는 비-메톡시-말단 중합체다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 플루로닉 중합체를 포함하지 않는 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체를 이루는 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)는 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체를 이루는 모든 중합체는 플루로닉 중합체를 포함하지 않는다. 일부 실시형태들에서, 이러한 중합체는 코팅층(예를 들어, 리포솜, 지질 단층, 미셀 등)으로 둘러싸일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체의 다양한 요소는 중합체와 결합될 수 있다.

[0129] 면역억제제 및/또는 항원은 다수의 방법 중 임의의 것에 의해 합성 나노운반체에 결합될 수 있다. 일반적으로, 결합은 면역억제제 및/또는 항원 및 합성 나노운반체 간의 결합의 결과일 수 있다. 이러한 결합은 면역억제제 및/또는 항원이 합성 나노운반체의 표면에 부착되고/부착되거나 합성 나노운반체 내에 함유(캡슐화)되게 할 수 있다. 그러나, 일부 실시형태들에서, 면역억제제 및/또는 항원은 합성 나노운반체에 대한 결합보다는 합성 나노운반체의 구조의 결과로서 합성 나노운반체에 의해 캡슐화된다. 바람직한 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 본 명세서에 제공된 바와 같은 중합체를 포함하며, 면역억제제 및/또는 항원은 중합체에 결합된다.

[0130] 결합이 면역억제제 및/또는 항원과 합성 나노운반체 간의 결합의 결과로 발생하는 경우, 결합은 결합 모이어티를 통해 발생할 수 있다. 결합 모이어티는 이를 통하여 면역억제제 및/또는 항원이 합성 나노운반체에 결합되는 임의의 모이어티일 수 있다. 이러한 모이어티는 공유 결합, 예를 들어, 아마이드 결합 또는 에스테르 결합뿐 아니라 면역억제제 및/또는 항원을 합성 나노운반체에 (공유적으로 또는 비공유적으로) 결합시키는 개별 분자를 포함한다. 이러한 분자는 링커 또는 중합체 또는 이의 단위를 포함한다. 예를 들어, 결합 모이어티는 면역억제제 및/또는 항원이 정전기적으로 결합하는 하전된 중합체를 포함할 수 있다. 다른 예로서, 결합 모이어티는 이것이 공유 결합되는 중합체 또는 이의 단위를 포함할 수 있다.

[0131] 바람직한 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 본 명세서에 제공된 바와 같은 중합체를 포함한다. 이들 합성 나노운반체는 전적으로 중합체거나, 이들은 중합체 및 다른 물질의 혼합물일 수 있다.

[0132] 일부 실시형태들에서, 합성 나노운반체의 중합체는 회합되어, 중합체 매트릭스를 형성한다. 이들 실시형태들 중 일부에서, 구성성분, 예를 들어, 면역억제제 또는 항원은 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 공유적으로 회합될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 공유적 회합은 링커에 의해 매개된다. 일부 실시형태들에서, 구성성분은 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 비공유적으로 회합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태들에서, 구성성분은 중합체 매트릭스 내에 캡슐화되고/캡슐화되거나 이에 의해 둘러싸이고/둘러싸이거나 이의 도처에 분산될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 구성성분은 소수성 상호작용, 전하 상호작용, 반데르발스 힘 등에 의해 중합체 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 회합될 수 있다. 매우 다양한 중합체 및 이로부터 중합체 매트릭스의 형성 방법은 관례적으로 공지되어 있다.

[0133] 중합체는 천연 또는 비천연(합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 둘 이상의 단량체를 포함하는 단독중합체 또는 공중합체일 수 있다. 서열에 관하여, 공중합체는 랜덤, 블록일 수 있거나 또는 랜덤 및 블록 서열의 조합을 포함한다. 전형적으로, 본 발명에 따른 중합체는 유기 중합체다.

[0134] 일부 실시형태들에서, 중합체는 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리아미드 또는 폴리에테르 또는 이의 단위를 포함한다. 다른 실시형태들에서, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락틱-코-글리콜산), 또는 폴리카프로락탐 또는 이의 단위를 포함한다. 일부 실시형태들에

서, 중합체가 생분해성인 것이 바람직하다. 따라서, 이들 실시형태들에서, 중합체가 폴리에테르, 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 이의 단위를 포함한다면, 중합체가 생분해성이 되도록 중합체가 폴리에테르 및 생분해성 중합체의 블록-공중합체를 포함하는 것이 바람직하다. 다른 실시형태들에서, 중합체는 단독으로 폴리에테르 또는 이의 단위, 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 이의 단위를 포함하지 않는다.

[0135] 본 발명에 사용하기에 적절한 중합체의 다른 예에는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트(예를 들어, 폴리(1,3-다이옥산-2온)), 폴리무수물(예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)), 폴리프로필푸메레이트, 폴리아미드(예를 들어, 폴리 카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르(예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-코-글리콜리드, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시산(예를 들어, 폴리(β -하이드록시알카노에이트))), 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌 및 폴리아민, 폴리라이신, 폴리라이신-PEG 공중합체 및 폴리(에틸렌이민), 폴리(에틸렌 이민)-PEG 공중합체가 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0136] 일부 실시형태들에서, 본 발명에 따른 중합체에는 폴리에스테르(예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락틱-코-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리발레로락톤, 폴리(1,3-다이옥산-2온)); 폴리무수물(예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리시아노아크릴레이트를 포함하나 이들에 한정되지 않는 21 C.F.R. § 177.2600 하에 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration, FDA)에 의해 인간에서의 사용을 위해 승인된 중합체가 포함된다.

[0137] 일부 실시형태들에서, 중합체는 친수성일 수 있다. 예를 들어, 중합체는 음이온성 기(예를 들어, 포스페이트기, 설페이트기, 카복실레이트기); 양이온성 기(예를 들어, 4차 아민기); 또는 극성 기(예를 들어, 하이드록실기, 티올기, 아민기)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 친수성 중합체 매트릭스를 포함하는 합성 나노운반체는 합성 나노운반체 내에 친수성 환경을 생성한다. 일부 실시형태들에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 소수성 중합체 매트릭스를 포함하는 합성 나노운반체는 합성 나노운반체 내에 소수성 환경을 생성한다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노운반체 내에 혼입되는(예를 들어, 결합되는) 물질의 성질에 영향을 가질 수 있다.

[0138] 일부 실시형태들에서, 중합체는 하나 이상의 모이어티 및/또는 작용기로 변형될 수 있다. 다양한 모이어티 또는 작용기가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 탄수화물 및/또는 다당류 유래의 비환식 폴리아세탈로 변형될 수 있다(문헌[Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301]). 특정 실시형태들은 미국 특허 제5543158호(Gref et al.) 또는 WO 공개 W02009/051837호(Von Andrian et al.)의 일반적 교시를 사용하여 이루어질 수 있다.

[0139] 일부 실시형태들에서, 중합체는 지질 또는 지방산기로 변형될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 지방산기는 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산 또는 리그노세르산 중 하나 이상일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 지방산기는 팔미톨레산, 올레산, 박센산, 리놀레산, 알파-리놀레산, 감마-리놀레산, 아라키돈산, 가돌레산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 도코사헥사엔산 또는 에루산 중 하나 이상일 수 있다.

[0140] 일부 실시형태들에서, 중합체는 폴리에스테르일 수 있는데, 이에 는 락트산 및 글리콜산 단위를 포함하는 공중합체, 예를 들어 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드)(본 명세서에서 집합적으로 "PLGA"로서 지칭됨); 및 글리콜산 단위를 포함하는 단독중합체(본 명세서에서 "PGA"로서 지칭됨), 및 락트산 단위를 포함하는 단독중합체, 예를 들어 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드, 및 폴리-D,L-락티드(본 명세서에서 집합적으로 "PLA"로서 지칭됨)가 포함된다. 일부 실시형태들에서, 예시되는 폴리에스테르에는, 예를 들어 폴리하이드록시산; 락티드 및 글리콜리드의 PEG 공중합체 및 공중합체(예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체, 및 이의 유도체)가 포함된다. 일부 실시형태에서, 폴리에스테르에는, 예를 들어 폴리(카프로락톤), 폴리(카프로락톤)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-코-L-라이신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[α -(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 이의 유도체가 포함된다.

[0141] 일부 실시형태에서, 중합체는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산과 글리콜산의 생체 적합성 및 생분해성 공중합체고, 각종 형태의 PLGA는 락트산:글리콜산의 비에 의해 특성화된다. 락트산은 L-락트산, D-락트산, 또는 D,L-락트산일 수 있다. PLGA의 분해 속도는 락트산:글리콜산 비를 변경시킴으로써 조절할 수 있다. 일부

실시형태에서, 본 발명에 따라 사용되는 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.

[0142] 일부 실시형태에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴계 중합체일 수 있다. 특정 실시형태에서, 아크릴계 중합체에는, 예를 들어 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리스시아노아크릴레이트, 및 전술한 중합체 중 하나 이상을 포함하는 조합이 포함된다. 아크릴계 중합체는 아크릴산 및 메타크릴산 에스테르와 저 함량의 4차 암모늄기와의 완전히 중합된 공중합체를 포함할 수 있다.

[0143] 일부 실시형태에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 핵산(예를 들어, DNA, 또는 이의 유도체)의 음 전하를 띤 가닥을 축합 및/또는 보호할 수 있다. 아민 함유 중합체, 예를 들어 폴리(라이신)(문헌[Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97]; 및 문헌[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]; 문헌[Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703]; 및 문헌[Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372])는 생리적 pH에서 양으로 하전되며, 핵산과 이온쌍을 형성하며, 다양한 세포주에서 트랜스펙션을 매개한다. 실시형태들에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 양이온성 중합체를 포함하지 않을 수 있다(또는 배제할 수 있다).

[0144] 일부 실시형태들에서, 중합체는 양이온성 측쇄를 갖는 분해가능한 폴리에스테르일 수 있다(문헌[Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658]; 문헌[Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010]; 문헌[Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250]; 문헌[Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633]; 및 문헌[Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399]). 이들 폴리에스테르의 예에는 폴리(L-락티드-코-L-라이신)(문헌[Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010]), 폴리(세린 에스테르)(문헌[Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399]), 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르)(문헌[Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658]; 및 문헌[Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633]) 및 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르)(문헌[Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658]; 및 문헌[Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633])가 포함된다.

[0145] 이들 중합체 및 기타 중합체의 특성 및 이들의 제조 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,123,727호; 제5,804,178호; 제5,770,417호; 제5,736,372호; 제5,716,404호; 제6,095,148호; 제5,837,752호; 제5,902,599호; 제5,696,175호; 제5,514,378호; 제5,512,600호; 제5,399,665호; 제5,019,379호; 제5,010,167호; 제4,806,621호; 제4,638,045호; 및 제4,946,929호; 문헌[Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480]; 문헌[Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460]; 문헌[Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94]; 문헌[Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7]; 및 문헌[Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181] 참조). 더욱 일반적으로, 소정의 적절한 중합체를 합성하는 다양한 방법은 문헌[Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980]; 문헌[Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004]; 문헌[Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981]; 문헌[Deming et al., 1997, Nature, 390:386]; 및 미국 특허 제6,506,577호, 제6,632,922호, 제6,686,446호 및 제6,818,732호에 기재되어 있다.

[0146] 일부 실시형태들에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 중합체는 덴드리머일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 중합체는 실질적으로 서로 교차결합될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 중합체는 교차 결합이 실질적으로 없을 수 있다. 일부 실시형태들에서, 중합체는 교차 결합 단계를 겪지 않고, 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 합성 나노운반체가 블록 공중합체, 그래프트 공중합체, 이들 및 기타 중합체 중 임의의 것의 배합물, 혼합물 및/또는 부가물을 포함할 수 있는 것이 더 이해될 것이다. 당업자는 본 명세서에 열거된 중합체가 본 발명에 따라 사용될 수 있는 중합체의 예시적이나 포괄적이지 않은 목록을 나타내는 것을 인식할 것이다.

[0147] 일부 실시형태에서, 합성 나노운반체는 중합체 성분을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 합성 나노운반체는

금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비중합체 합성 나노운반체는 비중합체 성분의 응집물, 예컨대 금속 원자(예를 들어, 금 원자)의 응집물이다.

[0148] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제, 예를 들어, 보존제, 완충제, 염수 또는 인산염 완충 염수와 조합된 합성 나노운반체를 포함한다. 조성물은 통상의 약제학적 제조 및 배합 기술을 사용하여 제조하여, 유용한 투여형에 이를 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 보존제와 함께 주사 용 멸균 염수 용액 중에 현탁화한다.

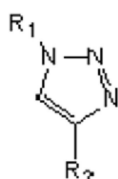
[0149] 실시형태들에서, 운반체로서 합성 나노운반체를 제조하는 경우, 구성성분을 합성 나노운반체에 결합시키는 방법이 유용할 수 있다. 구성성분이 소분자이면, 합성 나노운반체의 어셈블리(assembly) 전에 구성성분을 중합체에 부착시키는 것이 유리할 수 있다. 실시형태들에서, 또한, 구성성분을 중합체에 부착시킨 다음, 이러한 중합체 컨쥬게이트를 합성 나노운반체의 구축에 사용하는 것보다는 표면기를 갖는 합성 나노운반체를 제조하여, 구성성분을 표면기의 사용을 통하여 합성 나노운반체에 결합시키는데 사용하는 것이 유리할 수 있다.

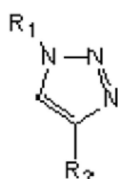
[0150] 특정 실시형태들에서, 결합은 공유 링커일 수 있다. 실시형태들에서, 본 발명에 따른 펩티드는 나노운반체의 표면상의 아지도기와 알킬렌기를 함유하는 항원 또는 면역억제제의 1,3-쌍극성 고리부가 반응에 의해, 또는 나노운반체의 표면상의 알킨과 아지도기를 함유하는 항원 또는 면역억제제의 1,3-쌍극성 고리부가 반응에 의해 형성되는 1,2,3-트리아졸 링커를 통하여 외표면에 공유 결합될 수 있다. 이러한 고리부가 반응은 바람직하게는 적절한 Cu(I)-리간드 및 Cu(II) 화합물을 촉매적 활성 Cu(I) 화합물로 환원시키기 위한 환원제와 함께 Cu(I) 촉매의 존재 하에 수행한다. 이러한 Cu(I)-촉매작용된 아지드-알킨 고리부가(CuAAC)는 또한 클릭(click) 반응으로도 지칭될 수 있다.

[0151] 추가로, 공유 결합은 아마이드 링커, 다이설피드 링커, 티오에테르 링커, 하이드라존 링커, 하이드라지드 링커, 이민 또는 옥심 링커 또는 우레아 또는 티오우레아 링커, 아마딘 링커, 아민 링커 및 설포아미드 링커를 포함하는 공유 링커를 포함할 수 있다.

[0152] 아마이드 링커는 하나의 구성성분, 예를 들어, 항원 또는 면역억제제상의 아민과 제2 구성성분, 예를 들어, 나노운반체의 카르복실산기 사이의 아마이드 결합을 통해 형성된다. 링커 내의 아마이드 결합은 적절하게 보호된 아미노산 및 활성화된 카르복실산, 예를 들어, N-하이드록시석신이미드-활성화 에스테르와의 통상의 아마이드 결합 형성 반응 중 임의의 것을 사용하여 이루어질 수 있다.

[0153] 다이설피드 링커는 예를 들어, R1-S-S-R2의 형태의 2개의 황 원자 간의 다이설피드(S-S) 결합의 형성을 통해 이루어진다. 다이설피드 결합은 티올/머캡탄기(-SH)를 함유하는 구성성분과 중합체 또는 나노운반체상의 다른 활성화된 티올기, 또는 티올/머캡탄기를 함유하는 나노운반체와 활성화된 티올기를 함유하는 구성성분의 티올 교환에 의해 형성될 수 있다.



[0154] 트리아졸 링커, 구체적으로 형태  의 1,2,3-트리아졸(여기서, R1 및 R2는 임의의 화학적 독립체일 수 있다)은 제1 구성성분, 예를 들어, 나노운반체에 부착된 아지드와, 제2 구성성분, 예를 들어, 면역억제제 또는 항원에 부착된 말단 알킨의 1,3-쌍극성 고리부가 반응에 의해 제조된다. 1,3-쌍극성 고리부가 반응은 촉매와 함께 또는 이것 없이, 바람직하게는 Cu(I)-촉매와 함께 수행되며, 이는 1,2,3-트리아졸 작용기를 통해 2개의 구성성분은 연결한다. 이러한 화합물은 문헌[Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002)] 및 문헌[Meldal, et al, Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015]에 상세하게 기재되어 있으며, 종종 "클릭" 반응 또는 CuAAC로 지칭된다.

[0155] 실시형태들에서, 중합체 사슬에 대하여 말단인 아지드 또는 알킨기를 함유하는 중합체를 제조한다. 이어서, 이러한 중합체를 사용하여, 복수의 알킨 또는 아지드가 나노운반체의 표면 상에 배치되는 방식으로 합성 나노운반체를 제조한다. 대안적으로, 합성 나노운반체는 다른 경로에 의해 제조되고, 이후에, 알킨 또는 아지드로 관능화될 수 있다. 구성성분은 알킨(중합체가 아지드를 함유한다면) 또는 아지드(중합체가 알킨을 함유한다면) 기 중 어느 하나의 존재 하에 제조한다. 이어서, 구성성분이 1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 구성성분을 입자에 공유적으로 결합시키는 촉매와 함께 또는 이것 없이 1,3-쌍극성 고리부가 반응을 통해 나노운반체

와 반응되게 한다.

- [0156] 티오에테르 링커는 예를 들어, R1-S-R2의 형태의 황-탄소(티오에테르) 결합의 형성에 의해 생성된다. 티오에테르는 하나의 구성성분상의 티오/머캡탄(-SH)기의 제2 구성성분상의 알킬화기, 예를 들어, 할라이드 또는 에폭시드와의 알킬화에 의해 생성될 수 있다. 티오에테르 링커는 또한 하나의 구성성분상의 티오/머캡탄기의 마이클 수용체로서 말레이미드기 또는 비닐 설폰기를 함유하는 제2 구성성분상의 결전자 알켄기와의 마이클 부가에 의해 형성될 수 있다. 다른 방식으로, 티오에테르 링커는 하나의 구성성분상의 티올/머캡탄기의 제2 구성성분상의 알켄기와의 라디칼 티올-렌 반응에 의해 생성될 수 있다.
- [0157] 하이드라존 링커는 하나의 구성성분상의 하이드라지드기와 제2 구성성분 상의 알데히드/케톤기의 반응에 의해 생성된다.
- [0158] 하이드라지드 링커는 하나의 구성성분상의 하이드라진기와 제2 구성성분상의 카르복실산기의 반응에 의해 형성된다. 이러한 반응은 일반적으로 아미드 결합의 형성과 유사한 화학물질을 사용하여 수행되며, 여기서, 카르복실산은 활성화 시약으로 활성화된다.
- [0159] 이민 또는 옥심 링커는 하나의 구성성분상의 아민 또는 N-알콕시아민(또는 아미노옥시)기와 제2 구성성분상의 알데히드 또는 케톤기의 반응에 의해 형성된다.
- [0160] 우레아 또는 티오우레아 링커는 하나의 구성성분상의 아민기와 제2 구성성분상의 아이소시아네이트 또는 티오아이소시아네이트기의 반응에 의해 생성된다.
- [0161] 아미딘 링커는 하나의 구성성분상의 아민기와 제2 구성성분상의 이미도에스테르기의 반응에 의해 생성된다.
- [0162] 아민 링커는 하나의 구성성분상의 아민기와 제2 구성성분상의 알킬화기, 예를 들어, 할라이드, 에폭시드 또는 설포네이트 에스테르기의 알킬화 반응에 의해 생성된다. 대안적으로, 아민 링커는 또한 적절한 환원 시약, 예를 들어, 나트륨 시아노보로하이드라이드 또는 나트륨 트리아아세톡시보로하이드라이드를 사용한, 하나의 구성성분상의 아민기와 제2 구성성분상의 알데히드 또는 케톤기의 환원성 아미노화에 의해 생성될 수 있다.
- [0163] 설포아미드 링커는 하나의 구성성분상의 아민기와 제2 구성성분상의 설포닐 할라이드(예를 들어, 염화설포닐)기의 반응에 의해 생성된다.
- [0164] 설포 링커는 친핵체의 비닐 설폰으로의 마이클 부가에 의해 생성된다. 비닐 설포 또는 친핵체 중 어느 하나는 나노운반체의 표면 상에 존재하거나 구성성분에 부착될 수 있다.
- [0165] 또한, 구성성분은 비-공유 컨쥬게이션 방법을 통하여 나노운반체에 컨쥬게이션될 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 항원 또는 면역억제제는 정전 흡착을 통해 양으로 하전된 나노운반체에 컨쥬게이션될 수 있다. 또한, 금속 리간드를 함유하는 구성성분은 금속-리간드 복합체를 통하여 금속 복합체를 함유하는 나노운반체에 컨쥬게이션될 수 있다.
- [0166] 실시형태들에서, 구성성분은 합성 나노운반체의 어셈블리 전에 중합체, 예를 들어, 폴리락트산-블록-폴리에틸렌 글리콜에 부착될 수 있거나, 합성 나노운반체는 이의 표면 상의 반응성 또는 활성화가능한 기와 함께 형성될 수 있다. 후자의 경우, 구성성분은 합성 나노운반체의 표면에 의해 제시되는 부착 화학물질과 양립가능한 기와 함께 제조될 수 있다. 다른 실시형태들에서, 펩티드 구성성분은 적절한 링커를 사용하여 VLP 또는 리포솜에 부착될 수 있다. 링커는 2개의 분자를 함께 결합시킬 수 있는 화합물 또는 시약이다. 일 실시형태에서, 링커는 문헌[Hermanson 2008]에 기재된 바와 같은 동종이작용성(homobifunctional) 또는 이종이작용성(heterobifunctional) 시약일 수 있다. 예를 들어, 표면에 카르복실산기를 함유하는 VLP 또는 리포솜 합성 나노운반체는 EDC의 존재 하에 동종이작용성 링커, 아디픽 다이하이드라지드(ADH)로 처리하여, ADH 링커가 있는 상응하는 합성 나노운반체를 형성할 수 있다. 이어서, 생성된 ADH 연결된 합성 나노운반체는 NC 상의 ADH 링커의 다른 말단을 통하여 산성기를 함유하는 펩티드 구성성분과 컨쥬게이션되어, 상응하는 VLP 또는 리포솜 펩티드 컨쥬게이트를 생성한다.
- [0167] 이용가능한 컨쥬게이션 방법의 상세한 설명에 대해서는, 문헌[Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008]을 참조한다. 공유적 부착에 더하여, 구성성분은 사전-형성된 합성 나노운반체에 대한 흡착에 의해 결합될 수 있거나, 이는 합성 나노운반체의 형성 동안 캡슐화에 의해 결합될 수 있다.
- [0168] 본 명세서에 제공된 바와 같은 임의의 면역억제제는 합성 나노운반체에 결합될 수 있다. 면역억제제에는

스타틴; mTOR 저해제, 예를 들어, 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF- β 신호전달제; TGF- β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제(HDAC); 코르티코스테로이드; 미토콘드리아 기능의 저해제, 예를 들어, 로테논; P38 저해제; NF- κ β 저해제; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제; 포스포다이에스테라제 저해제, 예를 들어, 포스포다이에스테라제 4 저해제; 프로테아좀 저해제; 키나제 저해제; G-단백질 결합 수용체 효능제; G-단백질 결합 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 사이토카인 저해제; 사이토카인 수용체 저해제; 사이토카인 수용체 활성화제; 퍼옥시좀 증식제-활성화 수용체 길항제; 퍼옥시좀 증식제-활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 저해제; 칼시뉴린 저해제; 포스파타제 저해제; 및 산화된 ATP가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 또한, 면역억제제에는 IDO, 비타민 D3, 사이클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 저해제, 레스베라트롤, 아자티오프린, 6-머캅토프린, 아스피린, 니플롬산, 에스트리올, 트리폴리드, 인터류킨(예를 들어, IL-1, IL-10), 사이클로스포린 A, siRNA 표적화 사이토카인 또는 사이토카인 수용체 등이 포함된다.

[0169] 스타틴의 예에는 아토르바스타틴(atorvastatin)(리피토르(LIPITOR)(등록 상표), 토르바스트(TORVAST)(등록 상표)), 세리바스타틴(cerivastatin), 플루바스타틴(fluvastatin)(레스콜(LESCOL)(등록 상표), 레스콜(등록 상표) XL), 로바스타틴(lovastatin)(메바코르(MEVACOR)(등록 상표), 알토코르(ALTOCOR)(등록 상표), 알토프레브(ALTOPREV)(등록 상표)), 메바스타틴(mevastatin)(컴팩틴(COMPACTIN)(등록 상표)), 피타바스타틴(pitavastatin)(리발로(LIVALO)(등록 상표), 피아바(PIAVA)(등록 상표)), 로수바스타틴(rosuvastatin)(프라바콜(PRAVACHOL)(등록 상표), 선택티네(SELEKTINE)(등록 상표), 리포스타트(LIPOSTAT)(등록 상표)), 로수바스타틴(rosuvastatin)(크레스토르(CRESTOR)(등록 상표)) 및 심바스타틴(simvastatin)(조코르(ZOCOR)(등록 상표), 리펙스(LIPEX)(등록 상표))이 포함된다.

[0170] mTOR 저해제의 예에는 라파마이신 및 이의 유사체(예를 들어, CCL-779, RAD001, AP23573, C20-메탈릴라파마이신(C20-Marap), C16-(S)-부틸설펜아미도라파마이신(C16-BSrap), C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신(C16-iRap)(문헌 [Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107])), AZD8055, BEZ235(NVP-BEZ235), 크리스판산(chrysophanic acid)(크리소파놀(chrysophanol)), 데포롤리무스(deforolimus)(MK-8669), 에베롤리무스(everolimus)(RAD0001), KU-0063794, PI-103, PP242, 템시롤리무스(temsirolimus) 및 WYE-354(미국 텍사스주 휴스턴 소재의 셀렉(Selleck)으로부터 입수할 수 있음)가 포함된다.

[0171] TGF- β 신호전달제의 예에는 TGF- β 리간드(예를 들어, 액티빈(activin) A, GDF1, GDF11, 골형성단백질, 노달(nodal), TGF- β) 및 이들의 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 저해제(예를 들어, 폴리스타틴(follistatin), 노긴, 코딘(chordin), DAN, 레프티(lefty), LTBP1, THBS1, 데코린(Decorin))가 포함된다.

[0172] 미토콘드리아 기능의 저해제의 예에는 아트락틸로시드(2칼륨 염), 봉크레크산(bongkreikic acid)(트라이암모늄 염), 카르보닐 시아나이드 m-클로로페닐하이드라존, 카르복시아트락틸로시드(예를 들어, 아트락틸리스 굼미페라(Atractylis gummifera) 유래), CGP-37157, (-)-데구엘린(예를 들어, 문둘레아 세리세아(Mundulea sericea) 유래), F16, 헥소키나제 II VDAC 결합 도메인 펩티드, 올리고마이신, 로테논, Ru360, SFK1 및 발리노마이신(valinomycin)(예를 들어, 스트렙토마이세스 풀비시무스(Streptomyces fulvissimus) 유래)(미국 소재의 EMD4Biosciences)이 포함된다.

[0173] P38 저해제의 예에는 SB-203580(4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸설피닐페닐)-5-(4-피리딜)1H-이미다졸), SB-239063(트랜스-1-(4하이드록시사이클로헥실)-4-(플루오로페닐)-5-(2-메톡시-피리미딘-4-일)이미다졸), SB-220025(5-(2아미노-4-피리미디닐)-4-(4-플루오로페닐)-1-(4-피페리디닐)이미다졸) 및 ARRY-797이 포함된다.

[0174] NF(예를 들어, NF- κ β) 저해제의 예에는 IFRD1, 2-(1,8-나프티리딘-2-일)-페놀, 5-아미노살리실산, BAY 11-7082, BAY 11-7085, CAPE(카페인산 펜에틸에스테르), 다이에틸말레에이트, IKK-2 저해제 IV, IMD 0354, 락타시스틴(lactacystin), MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO], NF κ B 활성화 저해제 III, NF- κ B 활성화 저해제 II, JSH-23, 파테놀리드(parthenolide), 페닐아르신 옥시드(Phenylarsine Oxide, PAO), PPM-18, 피롤리딘다이티오카르밤산 암모늄 염, QNZ, RO 106-9920, 로카글라미드(rocaglamide), 로카글라미드 AL, 로카글라미드 C, 로카글라미드 I, 로카글라미드 J, 로카글라올(rocaglaol), (R)-MG-132, 살리실산나트륨, 트리프톨리드(triptolide)(PG490), 웨델로락톤(wedelolactone)이 포함된다.

[0175] 아데노신 수용체 효능제의 예에는 CGS-21680 및 ATL-146e가 포함된다.

[0176] 프로스타글란딘 E2 효능제의 예에는 E-프로스타노이드(Prostanoid) 2 및 E-프로스타노이드 4가 포함된다.

- [0177] 포스포다이에스테라제 저해제(비선택적 및 선택적 저해제)의 예에는 카페인, 아미노필린, IBMX(3-아이소부틸-1-메틸잔틴), 파라잔틴, 펜톡시필린, 테오브로민, 테오필린, 메틸화 잔틴, 빈포세틴, EHNA(에리트로-9-(2-하이드록시-3-노닐)아데닌), 아나그렐리드(anagrelide), 에녹시몬(enoximone)(페르판(PERFAN)(상표명)), 밀리논(milrinone), 레보시멘돈(levosimendon), 메셈브린(mesembrine), 아이부딜라스트(ibudilast), 피클라밀라스트(piclamilast), 루테올린(luteolin), 드로타베린(drotaverine), 로플루밀라스트(roflumilast)(닥사스(DAXAS)(상표명), 달리레프(상표명)), 실데나필(sildenafil)(레바티온(REVATION)(등록 상표), 비아그라(VIAGRA)(등록 상표), 타달라필(tadalafil)(아드시르카(ADCIRCA)(등록 상표), 시알리스(CIALIS)(등록 상표)), 바르테나필(vardenafil)(레비트라(LEVITRA)(등록 상표), 스타신(STAXYN)(등록 상표)), 우데나필(udenafil), 아바나필(avanafil), 이카리인(icariin), 4-메틸피페라진 및 피라졸로 피리미딘-7-1이 포함된다.
- [0178] 프로테아좀 저해제의 예에는 보르테조미브(bortezomib), 디설퍼람(disulfiram), 에피갈로카테킨-3-갈레이트 및 살리노스포르아미드 A가 포함된다.
- [0179] 키나제 저해제의 예에는 베바시주맵(bevacizumab), BIBW 2992, 세톡시맵(cetuximab)(에르비투스(ERBITUX)(등록 상표)), 이마티닙(imatinib)(글리벡(GLEEVEC)(등록 상표)), 트라스투주맵(trastuzumab)(헤르셉틴(HERCEPTIN)(등록 상표)), 게피티닙(gefitinib)(이레사(IRESSA)(등록 상표)), 라니비주맵(ranibizumab)(루센티스(LUCENTIS)(등록 상표)), 페갑타닙(pegaptanib), 소라페닙(sorafenib), 다사티닙(dasatinib), 수니티닙(sunitinib), 에를로티닙(erlotinib), 닐로티닙(nilotinib), 라파티닙(lapatinib), 파니투무맵(panitumumab), 반데타닙(vandetanib), E7080, 파조파닙(pazopanib), 무브리티닙(mubritinib)이 포함된다.
- [0180] 글루코코르티코이드의 예에는 하이드로코르티손(코르티솔), 코르티손 아세테이트, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 텍사메타손, 베타메타손, 트라이암시놀론, 베클로메타손, 플루드로코르티손 아세테이트, 데옥시코르티코스테론 아세테이트(DOCA) 및 알도스테론이 포함된다.
- [0181] 레티노이드의 예는 레티놀, 레티날, 트레티노인(레티노산, 레틴-에이(RETIN-A(등록 상표)), 이소트레티노인(어큐테인(Accutane)(등록 상표), 암네스팀(Amnesteam)(등록 상표), 클라비스(Claravis)(등록 상표), 소트레트(Sotret)(등록 상표)), 알리트레티노인(판레틴(PANRETIN)(등록 상표)), 에트레티네이트(테기손(TEGISON)(상표명)) 및 이의 대사물질 아시트레틴(소리아탄(SORIATANE)(등록 상표)), 타자로텐(타조락(Tazorac)(등록 상표), 아바게(Avage)(등록 상표), 조락(Zorac)(등록 상표), 벅사로텐(bexarotene)(타르그레틴(TARGRETIN)(등록 상표)), 및 아다팔렌(디페린(DIFFERIN)(등록 상표))을 포함한다.
- [0182] 사이토카인 저해제의 예는 IL1ra, IL1 수용체 길항제, IGFBP, TNF-BF, 유로모듈린, 알파-2-마크로글로불린, 사이클로스포린 A, 펜타미딘 및 펜톡시필린(펜토팍(Pentopak)(등록 상표), 펜톡실(Pentoxil)(등록 상표), 트렌탈(Trental)(등록 상표))을 포함한다.
- [0183] 퍼옥시좀 증식제-활성화 수용체 길항제의 예에는 GW9662, PPAR γ 길항제 III, G335, T0070907(미국 소재의 EMD4Biosciences)이 포함된다.
- [0184] 퍼옥시좀 증식제-활성화 수용체 효능제의 예에는 피오글리타존(pioglitazone), 시글리타존(ciglitazone), 클로피브레이트(clofibrate), GW1929, GW7647, L-165,041, LY 171883, PPAR γ 활성화제, Fmoc-Leu, 트로글리타존(troglitazone) 및 WY-14643(미국 소재의 EMD4Biosciences)이 포함된다.
- [0185] 히스톤 데아세틸라제 저해제의 예에는 하이드록삼산(또는 하이드록사메이트), 예를 들어, 트리코스타틴 A, 사이클릭 테트라펩티드(예를 들어, 트라포신(trapoxin) B) 및 펩시펩티드(depsipeptide), 벤즈아미드, 친전자성 케톤, 지방족 화합물, 예를 들어, 페닐부티레이트 및 발프로산, 하이드록삼산, 예를 들어, 보리노스타트(vorinostat)(SAHA), 벨리노스타트(belinostat)(PXD101), LAQ824 및 파노비노스타트(panobinostat)(LBH589), 벤즈아미드, 예를 들어, 엔티노스타트(entinostat)(MS-275), CI994 및 모세티노스타트(mocetinostat)(MGCD0103), 니코틴아미드, NAD의 유도체, 다이하이드로쿠마린, 나프토피라논 및 2-하이드록시나프알데히드가 포함된다.
- [0186] 칼시뉴린 저해제의 예에는 사이클로스포린, 피메크롤리무스(pimecrolimus), 보클로스포린(voclosporin) 및 타크롤리무스(tacrolimus)가 포함된다.
- [0187] 포스파타제 저해제의 예에는 BN82002 하이드로클로라이드, CP-91149, 칼리쿨린(calyculin) A, 칸다리드산(cantharidic acid), 칸타리딘(cantharidin), 사이퍼메트린(cypermethrin), 에틸-3,4-테포스타틴, 포스트리에신 나트륨 염, MAZ51, 메틸-3,4-테포스타틴, NSC 95397, 노르칸타리딘(norcantharidin), 프로로센트룸 콘카봄

(prorocentrum concavum) 유래의 오카다산 암모늄 염, 오카다산, 오카다산 칼륨 염, 오카다산 나트륨 염, 페닐 아르신 옥사이드, 다양한 포스파타제 저해제 콕테일, 단백질 포스파타제 1C, 단백질 포스파타제 2A 저해제 단백질, 단백질 포스파타제 2A1, 단백질 포스파타제 2A2, 나트륨 오르토티바나테이트가 포함된다.

[0188] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 또한 합성 나노운반체에 결합된다. 일부 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 면역억제제가 결합되는 합성 나노운반체와 동일 또는 상이한 합성 나노운반체에 결합된다. 다른 실시형태에서, 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 임의의 합성 나노운반체에 결합되지 않는다. 치료적 단백질 APC 제시가능 항원은 본 명세서에 제공된 치료적 단백질 또는 이의 단편 또는 유도체 중 임의의 것을 포함한다.

[0189] 치료적 단백질에는 불용융성(infusible) 치료적 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 사이토 카인 및 인터페론, 성장 인자, 단일클론 항체 및 다중클론 항체(예를 들어, 대체 치료법으로 대상체에게 투여되는 것) 및 폼페병과 관련된 단백질(예를 들어, 알글루코시다제 알파(alglucosidase alfa), rhGAA(예를 들어, 마이오자임(Myozyme) 및 루미자임(Lumizyme)(젠자임(Genzyme)))가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 치료적 단백질에는 또한 혈액 응고 캐스케이드에 수반되는 단백질이 포함된다. 치료적 단백질에는 인자 VIII, 인자 VII, 인자 IX, 인자 V, 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자, 폰 헬데브란트(von Heldebrant) 인자, 조직 플라스미노 겐 활성화제, 인슐린, 성장 호르몬, 에리트로포이에틴 알파, VEGF, 트롬보포이에틴, 라이소자임, 항트롬빈 등이 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 또한, 치료적 단백질에는 아디포카인(adipokine), 예를 들어, 렙틴(leptin) 및 아디포넥틴(adiponectin)이 포함된다. 치료적 단백질의 다른 예는 하기와 본 명세서의 다른 곳에 기재된 바와 같다. 또한, 항원으로 제공되는 치료적 단백질 중 임의의 것의 단편 또는 유도체가 포함된다.

[0190] 리소솜 축적 장애(lysosomal storage disorder)를 갖는 대상체의 효소 대체 치료법에 사용되는 치료적 단백질의 예에는 고셔병의 치료를 위한 이미글루세라제(imiglucerase)(예를 들어, 세레자임(CEREZYME)(상표명)), 페브리 병의 치료를 위한 α -갈락토시다제 A(α -gal A)(예를 들어, α 갈락토시다제 베타, 파브라이자임(FABRYZYME)(상표명)), 폼페병의 치료를 위한 산 α -글루코시다제(GAA)(예를 들어, 알글루코시다제 알파, 루미자임(LUMIZYME)(상표명), 마이오자임(MYOZYME)(상표명)), 점액성 다당류증의 치료를 위한 아릴설파타제 B(예를 들어, 라로니다 제(laronidase), 알두라자임(ALDURAZYME)(상표명), 이두르설파제(idursulfase), 엘라프라제(ELAPRASE)(상표 명), 아릴설파타제 B, 나글라자임(NAGLAZYME)(상표명))가 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0191] 효소의 예에는 산화환원효소, 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 리아제(lyase), 이소머라제(isomerase) 및 리가제(ligase)가 포함된다.

[0192] 호르몬의 예에는 멜라토닌(N-아세틸-5-메톡시트립타민), 세로토닌, 티록신(또는 테트라아이오도티로닌)(갑상선 호르몬), 트라이아이오도티로닌(갑상선 호르몬), 에피네프린(또는 아드레날린), 노르에피네프린(또는 노르아드레날린), 도파민(또는 프로락틴 저해성 호르몬), 항물러관 호르몬(또는 물러관 저해 인자 또는 호르몬), 아디포 넥틴, 부신피질 자극 호르몬(또는 코르티코트로핀), 안지오텐시노제 및 안지오텐신, 항이뇨 호르몬(또는 바소프 레신, 아르기닌 바소프레신), 심방성 나트륨 이뇨 펩티드(Atrial-natriuretic peptide)(또는 아트리오렙틴 (atriopeptin)), 칼시토닌(Calcitonin), 콜레시스토킨(Cholecystokinin), 코르티코트로핀-방출 호르몬, 에리 트로포이에틴, 여포 자극 호르몬, 가스트린(Gastrin), 그렐린(Ghrelin), 글루카곤, 글루카곤-유사 펩티드(GLP-1), GIP, 성선자극호르몬-방출 호르몬, 성장 호르몬-방출 호르몬, 인간 융모성 생식선 자극호르몬, 인간 태반성 락토젠, 성장 호르몬, 인히빈, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자(또는 소마토메딘(somatomedin)), 렙틴, 황체형성 호르몬, 멜라닌 세포 자극 호르몬, 옥렉신, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, 프로락틴, 렐락신, 세크레틴, 소마토스 타틴, 트롬보포이에틴, 갑상선-자극 호르몬(또는 티로트로핀(thyrotropin)), 티로트로핀-방출 호르몬, 코르티솔, 알도스테론, 테스토스테론, 데하이드로에피안드로스테론, 안드로스테다이온, 다이하이드로테스토스테 론, 에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 프로게스테론, 칼시트리올(1,25-다이하이드록시비타민 D3), 칼시디올 (25-하이드록시비타민 D3), 프로스타글란딘, 류코트리엔, 프로스타사이클린, 트롬복산, 프로락틴 방출 호르몬, 리포르핀, 여성 나트륨 이뇨 펩티드, 뉴로펩티드 Y, 히스타민, 엔도텔린, 췌장 폴리펩티드, 레닌 및 엔케팔린 이 포함된다.

[0193] 혈액 및 혈액 응고 인자의 예에는 인자 I(피브리노겐), 인자 II(프로트롬빈), 조직 인자, 인자 V(프로악셀레린 (proaccelerin), 불안정 인자), 인자 VII(안정 인자, 프로컨버틴(proconvertin)), 인자 VIII(항혈우병 글로불 린), 인자 IX(크리스마스 인자 또는 혈장 트롬보플라스틴 구성성분), 인자 X(스튜어트-프로워 인자(Stuart-Prower factor)), 인자 Xa, 인자 XI, 인자 XII(하게만(Hageman) 인자), 인자 XIII(피브린-안정화 인자), 폰 필 레브란트 인자, 프레칼리크레인(prekallikrein)(플레처(Fletcher) 인자), 고분자량 키니노젠(HMWK)(피츠제럴드

(Fitzgerald) 인자), 피브로넥틴, 피브린, 트롬빈, 항트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 저해제(ZPI), 플라스미노겐, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA), 우로키나제(urokinase), 플라스미노겐 활성화제 저해제-1(PAI1), 플라스미노겐 활성화제 저해제-2(PAI2), 암 전구응고제(procoagulant) 및 에포에틴 알파(epoetin alfa)(에포젠(Epogen), 프로크리트(Procrit)).

[0194] 사이토카인의 예에는 림포카인, 인터류킨 및 케모카인, 1형 사이토카인, 예를 들어, IFN- γ , TGF- β 및 2형 사이토카인, 예를 들어, IL-4, IL-10 및 IL-13이 포함된다.

[0195] 성장 인자의 예에는 아드레노메둘린(AM), 안지오프이에틴(Ang), 자가분비 운동성 인자, 뼈 형성 단백질(BMP), 뇌유래 항신경성 인자(BDNF), 표피 성장 인자(EGF), 에리트로포이에틴(EPO), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 신경교 세포-유래 항신경성 인자(GDNF), 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 성장 분화 인자-9(GDF9), 간세포 성장 인자(HGF), 간암-유래 성장 인자(HDGF), 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 이동-자극 인자, 마이오스타틴(Myostatin)(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), [(우태아 소마토포트로핀(Somatotrophin))](FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-7이 포함된다.

[0196] 단일클론 항체의 예에는 아바고보맙(Abagovomab), 아브식시맙(Abciximab), 아달리무맙(Adalimumab), 아데카투무맙(Adecatumumab), 아펠리모맙(Afelimomab), 아프투주맙(Afutuzumab), 알라시주맙 페골(Alacizumab pegol), ALD, 알람투주맙, 알투모맙 펜테테이트(Altumomab pentetate), 아나투모맙 마페나톡스(Anatumomab mafenatox), 안루킨주맙(Anrukizumab), 항-흉선세포 글로빈(Anti-thymocyte globin), 아폴리주맙(Apolizumab), 아르시투모맙(Arcitumomab), 아셀리주맙(Aselizumab), 아틀리주맙(Atlizumab)(토실리주맙(tocilizumab)), 아톨리무맙(Atorolimumab), 바피뉴주맙(Bapineuzumab), 바실릭시맙(Basiliximab), 바비투시맙(Bavituximab), 베크투모맙(Bectumomab), 벨리무맙(Belimomab), 벤달리주맙(Benralizumab), 베르틸리무맙(Bertilimumab), 베실레소맙(Besilesomab), 베바시주맙, 비시로맙(Biciromab), 비바투주맙 메르탄신(Bivatuzumab mertansine), 블리나투모맙(Blinatumomab), 브렌투시맙 베도틴(Brentuximab vedotin), 브리아키누맙(Briakinumab), 카나키누맙(Canakinumab), 칸투주맙 메르탄신(Cantuzumab mertansine), 카프로맙 펜테티드(Capromab pendetide), 카투막소맙(Catumaxomab), 세텔리주맙(Cedelizumab), 세르톨리주맙 페골(Certolizumab pegol), 세톡시맙, 시타투주맙 보가톡스(Citatzumab bogatox), 식수투무맙(Cixutumumab), 클레놀릭시맙(Clenoliximab), 클리바투주맙 테트라세탄(Clivatuzumab tetraxetan), 코나투무맙(Conatumumab), 다세투주맙(Dacetuzumab), 다클리주맙(Daclizumab), 다라투무맙(Daratumumab), 데노수맙(Denosumab), 데투모맙(Detumomab), 도리모맙 아리톡스(Dorlimomab aritox), 도릭시주맙(Dorlixizumab), 에크로멕시맙(Ecromeximab), 에쿨리주맙(Eculizumab), 에도바코맙(Edobacomab), 에드레콜로맙(Edrecolomab), 에팔리주맙(Efalizumab), 에폰구맙(Efungumab), 엘로투주맙(Elotuzumab), 엘실리모맙(Elsilimumab), 엔리모맙 페골(Enlimomab pegol), 에피투모맙 시톡세탄(Epitumomab cituxetan), 에프라투주맙(Epratuzumab), 에리주맙(Erlizumab), 에르투막소맙(Ertumaxomab), 에타라시주맙(Etaracizumab), 엑시비비루맙(Exbivirumab), 파놀레소맙(Fanolesomab), 파랄리모맙(Faralimumab), 파레투주맙(Farletuzumab), 펠비주맙(Felvizumab), 페자키누맙(Fezakinumab), 피지투무맙(Figitumumab), 폰톨리주맙(Fontolizumab), 포라비루맙(Foravirumab), 프레솔리무맙(Fresolimumab), 갈릭시맙(Galiximab), 잔테네루맙(Gantenerumab), 자빌리모맙(Gavilimumab), 겐투주맙 오조가미신(Gemtuzumab ozogamicin), GC1008, 지렌투시맙(Girentuximab), 글렘바투무맙 베도틴(Glembatumumab vedotin), 골리무맙(Golimumab), 고밀릭시맙(Gomiliximab), 이발리주맙(Ibalizumab), 이브리투모맙 티옥세탄(Ibritumomab tiuxetan), 아이고보맙(Igovomab), 임시로맙(Imciromab), 인플릭시맙(Infliximab), 인테투무맙(Intetumumab), 이놀리모맙(Inolimomab), 이노투주맙 오조가미신(Inotuzumab ozogamicin), 이필리무맙(Ipilimumab), 이라투무맙(Iratumumab), 켈릭시맙(Keliximab), 라베투주맙(Labetuzumab), 레브리키주맙(Lebrikizumab), 레말레소맙(Lemalesomab), 레르델리무맙(Lerdelimumab), 렉사투무맙(Lexatumumab), 리비비루맙(Libivirumab), 린투주맙(Lintuzumab), 로보투주맙 메르탄신(Lorvotuzumab mertansine), 루카투무맙(Lucatumumab), 루밀릭시맙(Lumiliximab), 마파투무맙(Mapatumumab), 마슬리모맙(Maslimomab), 마투주맙(Matuzumab), 메폴리주맙(Mepolizumab), 메텔리무맙(Metelimumab), 밀라투주맙(Milatuzumab), 민레투모맙(Minretumomab), 미투모맙(Mitumomab), 모롤리무맙(Morolimumab), 모타비주맙(Motavizumab), 무로모넵(Muromonab)-CD3, 나콜로맙 타페나톡스(Nacolomab tafenatox), 나프투모맙 에스타페나톡스(Naptumomab estafenatox), 나탈리주맙, 네바쿠맙(Nebacumab), 네시투무맙(Necitumumab), 네렐리모맙(Nerelimomab), 니모투주맙(Nimotuzumab), 노페투모맙 메르

펜탄(Nofetumomab merpentan), 오크렐리주맙(Ocrelizumab), 오둘리모맙(Odulimomab), 오파투무맙(Ofatumumab), 올라라투맙(Olaratumab), 오말리주맙(Omalizumab), 오포르투주맙 모나톡스(Oportuzumab monatox), 오레고보맙(Oregovomab), 오텔릭시주맙(Otelixizumab), 파기박시맙(Pagibaximab), 팔리비주맙(Palivizumab), 파니투무맙, 파노바쿠맙(Panobacumab), 파스콜리주맙(Pascalizumab), 펨투모맙(Pentumomab), 페르투주맙(Pertuzumab), 펙셀리주맙(Pexelizumab), 핀투모맙(Pintumomab), 프릴릭시맙(Priliximab), 프리투무맙(Pritumumab), 라피비루맙(Rafivirumab), 라무시루맙(Ramucirumab), 라니비주맙, 락시바쿠맙(Raxibacumab), 레가비루맙(Regavirumab) 레슬리주맙(Reslizumab), 릴로투무맙(Rilotumumab), 리톡시맙(Rituximab), 로바투무맙(Robatumumab), 론탈리주맙(Rontalizumab), 로벨리주맙(Rovelizumab), 루플리주맙(Ruplizumab), 사투모맙 켄데티드(Satumomab pendetide), 세비루맙(Sevirumab), 시브로투주맙(Sibrotuzumab), 시팔리무맙(Sifalimumab), 실톡시맙(Siltuximab), 시플리주맙(Siplizumab), 솔라네주맙(Solanezumab), 소네프시주맙(Sonepcizumab), 손투주맙(Sontuzumab), 스타물루맙(Stamulumab), 술레소맙(Sulesomab), 타카투주맙 테트락세탄(Tacatuzumab tetraxetan), 타도시주맙(Tadocizumab), 탈리주맙(Talizumab), 타네주맙(Tanezumab), 타플리투모맙 팜톡스(Taplitzumomab paptox), 테피바주맙(Tefibazumab), 텔리모맙 아리톡스(Telimomab aritox), 테나투모맙(Tenatumomab), 테넬릭시맙(Teneliximab), 테플리주맙(Teplizumab), 티실리무맙(Ticilimumab)(트레멜리무맙(tremelimumab)), 티가투주맙(Tigatuzumab), 토실리주맙(아틀리주맙(atlizumab)), 토랄리주맙(Toralizumab), 토시투모맙(Tositumomab), 트라스투주맙, 트레멜리무맙(Tremelimumab), 투코투주맙 셀모투킨(Tucotuzumab celmoleukin), 투비루맙(Tuvirumab), 우르톡사주맙(Urtioxazumab), 유스테키누맙(Ustekinumab), 바팔릭시맙(Vapaliximab), 베돌리주맙(Vedolizumab), 벨투주맙(Veltuzumab), 베팔리모맙(Vepalimumab), 비실리주맙(Visilizumab), 볼로식시맙(Volociximab), 보투무맙(Votumumab), 갈루투무맙(Zalutumumab), 자놀리무맙(Zanolimumab), 지랄리무맙(Ziralimumab) 및 졸리모맙 아리톡스(Zolimomab aritox)가 포함된다.

[0197] 주입 치료법 또는 주사가 가능한 치료적 단백질의 예에는 예를 들어, 토실리주맙(로슈(Roche)/아크템라(Actemra) (등록 상표)), 알파-1 항트립신(카마다(Kamada)/AAT), 헤마티드(Hematide)(등록 상표)(아피맥스(Affymax) 및 타케다(Takeda), 합성 펩티드), 알빈테르페론(albinterferon) 알파-2b(노바티스(Novartis)/잘빈(Zalbin)(등록 상표)), 류신(Rhucin)(등록 상표)(파밍 그룹(Pharming Group), C1 저해제 대체 치료법), 테사모렐린(tesamorelin)(테라테크놀로지스(Theratechnologies)/에그리프타(Egrifta), 합성 성장 호르몬-방출 인자), 오크렐리주맙(제네테크(Genentech), 로슈 및 바이오젠(Biogen)), 벨리무맙(글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)/벤리스타(Benlysta)(등록 상표)), 페글로티카제(pegloticase)(사비엔트 파마슈티칼즈(Savient Pharmaceuticals)/크리스텍사(Krystexxa)(상표명)), 탈리글루세라제(taliglucerase) 알파(프로탈릭스(Protalix)/유플리소(Uplyso)), 아갈시다제(agalsidase) 알파(시르(Shire)/레플라갈(Replagal)(등록 상표)), 벨라글루세라제(velaglucerase) 알파(시르)가 포함된다.

[0198] 본 발명의 양태에 따라 유용한 추가의 치료적 단백질은 당업자에게 명백할 것이며, 본 발명은 이러한 양태에 제한되지 않는다.

[0199] 일부 실시형태들에서, 구성성분, 예를 들어, 항원 또는 면역억제제는 분리될 수 있다. 분리된이란 이의 고유 환경으로부터 분리되고 이의 확인 또는 사용을 가능하게 하기에 충분한 양으로 존재하는 요소를 지칭한다. 이는 예를 들어, 요소가 (i) 발현 클로닝에 의해 선택적으로 생성되거나 (ii) 크로마토그래피 또는 전기영동에 의해 서와 같이 정제될 수 있음을 의미한다. 분리된 요소는 실질적으로 순수할 수 있지만, 그럴 필요는 없다. 분리된 요소가 약제학적 제제에서 약제학적으로 허용가능한 부형제와 혼합될 수 있기 때문에, 요소는 제제의 중량 기준으로 오직 적은 비로 포함될 수 있다. 그렇지만, 요소는 이것이 생명계에서 회합될 수 있는 물질로부터 분리된다는 점에서 분리되며, 다시 말하면, 다른 지질 또는 단백질로부터 분리된다. 본 명세서에 제공된 구성요소 중 임의의 것은 분리될 수 있고, 분리된 형태로 조성물 내에 포함될 수도 있다.

[0200] D. 본 발명의 조성물의 제조 및 사용 방법, 및 관련 방법

[0201] 합성 나노운반체는 당업계에 공지되어 있는 매우 다양한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 합성 나노운반체는 나노침전법(nanoprecipitation), 유체 채널을 사용한 유동 포커싱(flow focusing), 분무 건조, 단일 및 이중 에멀전 용매 증발, 용매 추출, 상 분리, 밀링(milling), 마이크로에멀전 절차, 마이크로제작(microfabrication), 나노제작(nanofabrication), 희생층(sacrificial layer), 단순 및 복합 코아세르베이션(coacervation) 및 당업자에게 널리 공지되어 있는 기타 방법과 같은 방법에 의해 형성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 단분산 반도체, 전도성, 자성, 유기 및 기타 나노물질을 위한 수성 및 유기 용매 합성이 기재되어 있다(문헌[Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48]; 문헌[Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545]; 및 문헌[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]; 문헌[Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13]; 문헌[Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275]; 및 문헌[Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755]; 미국 특허 제5578325호 및 제6007845호; 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)]).

[0202] 다양한 물질이 문헌[C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-89 (2006)]; 문헌[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)]; 문헌[C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8-21 (2006)]; 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)]을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 방법을 사용하여 바람직한 합성 나노운반체로 캡슐화될 수 있다. 미국 특허 제 6,632,671호(Unger, 2003년 10월 14일)에 개시된 방법을 포함하나 이에 한정되지 않는 물질을 합성 나노운반체에 캡슐화하는데 적절한 다른 방법이 사용될 수 있다.

[0203] 특정 실시형태들에서, 합성 나노운반체는 나노침전 과정 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 합성 나노운반체의 제조에 사용되는 조건을 변경시켜, 원하는 크기 또는 특성(예를 들어, 소수성, 친수성, 외부 형태, "점착성", 형상 등)의 입자를 제공할 수 있다. 사용되는 합성 나노운반체의 제조 방법 및 조건(예를 들어, 용매, 온도, 농도, 공기 흐름 속도 등)은 합성 나노운반체 및/또는 중합체 매트릭스의 조성물에 결합될 물질에 따라 달라질 수 있다.

[0204] 상기 방법 중 임의의 것에 의해 제조되는 입자가 원하는 범위 밖의 크기 범위를 갖는다면, 입자는 예를 들어, 체(sieve)를 사용하여 사이징(sized)될 수 있다.

[0205] 본 발명의 합성 나노운반체의 요소(다시 말하면, 구성성분)(예를 들어, 면역특징(immunofeature) 표면이 포함되는 모이어티, 표적화 모이어티, 중합체 매트릭스, 항원, 면역억제제 등)는 예를 들어, 하나 이상의 공유 결합에 의해, 전체 합성 나노운반체에 결합될 수 있거나, 하나 이상의 링커의 수단에 의해 결합될 수 있다. 합성 나노운반체를 작용화시키는 추가의 방법은 미국 특허 출원 공개 제2006/0002852호(Saltzman et al.), 미국 특허 출원 공개 제2009/0028910호(DeSimone et al.) 또는 국제 특허 출원 공개 제WO/2008/127532 A1호(Murthy et al.)로부터 조정될 수 있다.

[0206] 대안적으로 또는 추가로, 합성 나노운반체는 비-공유 상호작용을 통하여 직접적으로 또는 간접적으로 구성성분에 결합될 수 있다. 비공유 실시형태들에서, 비-공유 결합은 전하 상호작용, 친화성 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트 상호작용, 소수성 상호작용, TT 스택킹 상호작용, 수소 결합 상호작용, 반데르발스 상호작용, 자기적 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 및/또는 이들의 조합을 포함하나 이들에 한정되지 않는 비-공유 상호작용에 의해 매개된다. 이러한 결합은 본 발명의 합성 나노운반체의 외표면 또는 내표면 상에 존재하도록 배열될 수 있다. 실시형태들에서, 캡슐화 및/또는 흡착은 결합의 한 형태이다.

[0207] 실시형태들에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 동일한 비히클 또는 전달 시스템에서 혼합함으로써 항원과 조합될 수 있다.

[0208] 합성 나노운반체의 집단을 조합하여, 통상의 약제학적 혼합 방법을 사용하여 본 발명에 따른 약제학적 투여형을 형성할 수 있다. 이들에는 각각이 하나 이상의 서브셋의 나노운반체를 함유하는 둘 이상의 현탁액을 직접 조합하거나, 희석제를 함유하는 하나 이상의 용기를 통해 섞는 액체-액체 혼합이 포함된다. 또한, 합성 나노운반체가 분말 형태로 생성되거나 저장될 수 있기 때문에, 통상의 매질 중의 둘 이상의 분말의 재현탁액과 같이 건조 분말-분말 혼합을 수행할 수 있다. 나노운반체의 특성 및 이들의 상호작용 가능성에 따라, 하나의 또는 다른 경로의 혼합으로 부여되는 이점이 존재할 수 있다.

[0209] 합성 나노운반체를 포함하는 전형적인 본 발명의 조성물은 무기 또는 유기 완충제(예를 들어, 인산염, 탄산염, 아세트산염 또는 시트르산염의 나트륨 또는 칼륨 염) 및 pH 조절제(예를 들어, 염산, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨, 시트르산염 또는 아세트산염, 아미노산 및 이들의 염), 산화방지제(예를 들어, 아스코르브산, 알파-토코페롤), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌9-10 노닐 페놀, 소듐 데속시콜레이트), 용액 및/또는 동결/분산 안정화제(예를 들어, 수크로스, 락토스, 만니톨, 트레할로스), 삼투압

조절제(예를 들어, 염 또는 당), 항박테리아제(예를 들어, 벤조산, 페놀, 젠타미신), 소포제(예를 들어, 폴리다이메틸실로존), 보존제(예를 들어, 티메로살, 2-페녹시에탄올, EDTA), 중합체 안정화제 및 점도-조절제(예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 폴록사머 488, 카르복시메틸셀룰로스) 및 공-용매(예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올)를 포함할 수 있다.

[0210] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제와 조합된 본 발명의 합성 나노운반체를 포함한다. 조성물은 통상의 약제학적 제조 및 배합 기술을 사용하여 제조되어, 유용한 투여형에 이를 수 있다. 본 발명을 실시하는데 사용하기에 적절한 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 문헌[Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone]에서 찾을 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 보존제와 함께 주사용 멸균 염수 용액 중에 현탁화시킨다.

[0211] 본 발명의 조성물이 임의의 적절한 방식으로 제조될 수 있으며, 본 발명이 결코 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생성될 수 있는 조성물에 제한되지 않음이 이해될 것이다. 적절한 방법의 선택은 회합되는 특정 모이어티의 특성에 주의할 필요가 있을 수 있다.

[0212] 일부 실시형태들에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 멸균 조건 하에서 제조되거나 최종적으로 멸균된다. 이는 생성된 조성물이 멸균이며, 비-감염성이어서, 비-멸균 조성물에 비하여 안전성이 향상되는 것을 보장할 수 있다. 이는 특히 합성 나노운반체를 제공하는 대상체가 면역 결핍을 갖고/갖거나, 감염을 앓고 있고/있거나 감염되기 쉬운 경우에, 가치있는 안전성 정도를 제공한다. 일부 실시형태들에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 동결건조될 수 있으며, 활성의 소실 없이 연장된 기간 동안 제형 전략에 따라 현탁액 중에 또는 동결건조 분말로서 저장될 수 있다.

[0213] 본 발명의 조성물은 피하, 비강내, 경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 경점막, 경점막, 설하, 직장, 눈, 폐, 피내, 경피(transdermal), 피부관통(transcutaneous) 또는 피내를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다양한 경로에 의해 또는 이들 경로의 조합에 의해 투여될 수 있다. 또한, 투여 경로는 흡입 또는 폐 에어로졸에 의한 투여를 포함한다. 에어로졸 전달 시스템의 제조 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다(예를 들어, 참고로 포함되는 문헌[Sciarra and Cutie, "Aerosols," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp. 1694-1712] 참조).

[0214] 본 발명의 세포 기반의 치료법으로 제공되는 치료적 단백질은 비경구, 동맥내, 비강내 또는 정맥내 투여에 의해, 또는 림프절 또는 전안방으로의 주사에 의해, 또는 대상 기관 또는 조직으로의 국소 투여에 의해 투여될 수 있다. 투여는 피하, 척추강내, 심실내, 근육내, 복강내, 관상동맥내, 체장내, 간내 또는 기관지 주사에 의해 이루어질 수 있다.

[0215] 본 발명의 조성물은 유효량, 예를 들어, 본 명세서에서 다른 곳에 기재된 유효량으로 투여될 수 있다. 투여형의 용량은 본 발명에 따른 다양한 양의 합성 나노운반체의 집단 및/또는 다양한 양의 면역억제제 및/또는 항원을 함유한다. 본 발명의 투여형에 존재하는 합성 나노운반체 및/또는 면역억제제 및/또는 항원의 양은 항원 및/또는 면역억제제의 특성, 달성되어야 하는 치료적 이익 및 이러한 기타 파라미터에 따라 달라질 수 있다. 실시형태들에서, 투여형에 존재해야 하는 합성 나노운반체의 집단 및 면역억제제 및/또는 항원의 최적의 치료량을 확립하기 위한 용량 범위 연구가 행해질 수 있다. 실시형태들에서, 합성 나노운반체 및/또는 면역억제제 및/또는 항원은 대상체로의 투여시에 항원에 대한 관용원성 면역 반응을 생성하기 위한 유효량으로 투여형에 존재한다. 대상체에서 통상의 용량 범위 연구 및 기술을 사용하여 관용원성 면역 반응을 생성하기 위한 면역억제제 및/또는 항원의 유효량을 결정하는 것이 가능할 수 있다. 본 발명의 투여형은 다양한 빈도로 투여될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 투여형의 적어도 1회의 투여가 약리학적으로 관련 있는 반응을 생성하기에 충분하다. 더욱 바람직한 실시형태들에서, 투여형의 적어도 2회의 투여, 적어도 3회의 투여 또는 적어도 4회의 투여를 사용하여 약리학적으로 관련 있는 반응을 보장한다.

[0216] 본 발명의 조성물의 예방적 투여는 질환, 장애 또는 증상의 발병 전에 개시될 수 있거나, 치료적 투여는 장애, 장애 또는 증상이 확립되기 전에 개시될 수 있다.

[0217] 일부 실시형태에서, 합성 나노운반체의 투여는, 예를 들어 치료적 단백질의 투여 전에 시작된다. 예시적인 실시형태에서, 합성 나노운반체는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 치료적 단백질의 투여 전30일, 25일, 20일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 8일, 7일, 6일, 5일, 4일, 3일, 2일, 1일 또는 0일을 포함하여 1회 이상

으로 투여된다. 추가로 또는 대안적으로, 합성 나노운반체는 치료적 단백질 투여 후 대상체에게 투여될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 합성 나노운반체는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 치료적 단백질의 투여 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 20일, 25일, 30일 등을 포함하여 1회 이상 투여된다.

[0218] 일부 실시형태들에서, (예를 들어, 본 명세서에 제공되는 합성 나노운반체 조성물의) 유지 용량은 초기 투여가 대상체에서 관용원성 반응을 야기한 후에 예를 들어, 초기 용량 후 달성되는 관용원성 효과를 유지하기 위하여, 대상체에서 원치 않는 면역 반응을 방지하기 위하여, 또는 대상체가 원치 않는 면역 반응 또는 원치 않는 수준의 면역 반응을 경험할 위험이 있는 대상체가 되는 것을 방지하기 위하여, 대상체에게 투여한다. 일부 실시형태들에서, 유지 용량은 대상체에게 제공한 초기 용량과 동일한 용량이다. 일부 실시형태들에서, 유지 용량은 초기 용량보다 낮은 용량이다. 예를 들어, 일부 실시형태들에서, 유지 용량은 초기 용량의 약 3/4, 약 2/3, 약 1/2, 약 1/3, 약 1/4, 약 1/8, 약 1/10, 약 1/20, 약 1/25, 약 1/50, 약 1/100, 약 1/1,000, 약 1/10,000, 약 1/100,000 또는 약 1/1,000,000(중량/중량)이다.

[0219] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 관용원성 면역 반응을 유도하거나 또는 향상시키고/향상시키거나 면역 억제 목적을 위해 원치 않는 면역 반응을 억제하거나, 조절하거나, 지시하거나 또는 전향시키기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 치료적 단백질이 투여된 적이 있거나, 투여되고 있거나 또는 투여될 대상체에서 관용원성 면역 반응의 발생을 위해 사용될 수 있다.

[0220] **실시예**

[0221] **실시예 1: 오브알부민 펩티드(323 내지 339)와 함께 또는 오브알부민 펩티드 없이 결합된 라파마이신을 지니는 합성 나노운반체의 면역 반응**

[0222] **재료**

[0223] 오브알부민 단백질의 T 및 B 세포 에피토프인 것으로 공지된 17개의 아미노산 펩티드인 오브알부민 펩티드 323 내지 339를 Bachem Americas Inc.(3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609)로부터 구입하였다. 라파마이신을 TSZ CHEM(185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; 제품 카탈로그 # R1017)으로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 제품 코드 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 폴리비닐 알코올(85% 내지 89% 가수분해됨)을 EMD Chemicals(제품 번호 1.41350.1001)로부터 구입하였다.

[0224] 용액 1: 희석 염산 수용액 중 20mg/mL의 오브알부민 펩티드 323 내지 339. 실온에서 0.13M 염산 용액에 오브알부민 펩티드를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0225] 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 50mg/mL의 라파마이신. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 라파마이신을 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0226] 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLGA. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLGA를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0227] 용액 4: 100mM pH 8 인산염 완충액 중 50mg/mL의 폴리비닐 알코올.

[0228] **라파마이신 및 오브알부민(323 내지 339)을 함유하는 합성 나노운반체를 제조하기 위한 방법**

[0229] 일차 유증수 에멀전을 먼저 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2mL), 용액 2(0.2mL), 및 용액 3(1.0mL)을 합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 그 다음에, 용액 4(3.0mL)와 일차 W1/O1 에멀전을 합하고, 10초 동안 볼텍싱하며, Branson Digital Sonifier 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)을 제조하였다.

[0230] W1/O1/W2 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 합성 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 합성 나노운반체 현탁액을 옮기고, 1시간 동안 21,000×g 및 4°C에서 원심분리하며, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 합성 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10mg/mL의 최종 합성 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시켰다.

[0231] 합성 나노운반체 내의 펩티드 및 라파마이신의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액의 mL 당 전체 건조-합성 나노운반체 질량을 중량법(gravimetric method)에 의해 결정하였다.

[0232] **라파마이신을 함유하는 합성 나노운반체에 대한 방법**

[0233] 일차 유중수 에멀전을 먼저 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 0.13M 염산 용액(0.2ml), 용액 2(0.2ml), 및 용액 3(1.0ml)을 합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 그 다음에, 용액 4(3.0ml)와 일차 W1/O1 에멀전을 합하고, 10초 동안 불텍싱하며, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)을 제조하였다.

[0234] W1/O1/W2 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30ml)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 합성 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 합성 나노운반체 현탁액을 옮기고, 1시간 동안 21,000×g 및 4℃에서 원심분리하며, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 합성 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10mg/ml의 최종 합성 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시켰다.

[0235] 합성 나노운반체 내의 라파마이신의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액의 ml 당 전체 건조-합성 나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

[0236] **라파마이신 로드를 측정하기 위한 방법**

[0237] 약 3mg의 합성 나노운반체를 수거하고, 원심분리하여 합성 나노운반체 펠렛으로부터 상청액을 분리시켰다. 아세토니트릴을 펠렛에 첨가하고, 샘플을 음파처리하며, 원심분리하여 임의의 불용성 물질을 제거하였다. 상청액 및 펠렛을 RP-HPLC 상에 주입하고, 흡광도를 278nm에서 관독하였다. 펠렛에서 발견된 μg 을 포집(로드)된 %를 계산하기 위해 사용하였고, 상청액 및 펠렛의 μg 을 회수된 전체 μg 을 계산하기 위해 사용하였다.

[0238] **오브알부민(323 내지 339) 로드를 측정하기 위한 방법**

[0239] 약 3mg의 합성 나노운반체를 수거하고, 원심분리하여 합성 나노운반체 펠렛으로부터 상청액을 분리시켰다. 트리플루오로에탄올을 펠렛에 첨가하고, 샘플을 음파처리하여 중합체를 용해시켰으며, 0.2% 트리플루오로아세트산을 첨가하고, 샘플을 음파처리한 후, 원심분리하여 임의의 불용성 물질을 제거하였다. 상청액 및 펠렛을 RP-HPLC 상에 주입하고, 흡광도를 215nm에서 관독하였다. 펠렛에서 발견된 μg 을 포집(로드)된 %를 계산하기 위해 사용하였고, 상청액 및 펠렛의 μg 을 회수된 전체 μg 을 계산하기 위해 사용하였다.

[0240] **Treg 세포 발달에 대한 항원 특이적 관용원성 수지상 세포(Tdc) 활성**

[0241] 본 검정은 면역 우세 오브알부민 펩티드(323 내지 339)에 특이적인 유전자식 T 세포 수용체를 갖는 OTII 마우스의 사용을 포함하였다. 항원 특이적 tDC를 생성시키기 위해, CD11c^+ 비장세포를 분리시키고, 오브알부민 펩티드(323 내지 339)를 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 시험관내 첨가하거나, 항원을 첨가하지 않았다. 그 다음에, 가용성 또는 나노운반체-캡슐화된 라파마이신을 2시간 동안 DC에 첨가한 후, 이를 광범위하게 세척하여, 배양물로부터 유리 라파마이신을 제거하였다. 정제된 반응자 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ 세포를 OTII 마우스로부터 분리시키고, 10:1의 T 대 DC 비로 tDC에 첨가하였다. 그 다음에, tDC 및 OTII T 세포의 혼합물을 4일 내지 5일 동안 배양하고, Treg 세포($\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{FoxP3}^+$)의 빈도를 도 1에 제시된 바와 같이 유세포측정법에 의해 분석하였다. 아이소타입 대조군을 기초로 하여 영역을 선택하였다.

[0242] **실시예 2: 결합된 이부프로펜을 갖는 메조포러스 실리카 나노입자(예언적 실시예)**

[0243] 메조포러스 SiO_2 나노입자 코어는 졸-겔 방법을 통해 생성된다. 헥사데실트리메틸-암모늄 브로마이드(CTAB)(0.5g)는 탈이온수(500ml)에 용해된 후, 2M NaOH 수용액(3.5ml)이 CTAB 용액에 첨가된다. 용액이 30분 동안 교반된 후, 테트라에톡시실란(TEOS)(2.5ml)이 용액에 첨가된다. 생성된 겔은 80℃의 온도에서 3시간 동안 교반된다. 형성된 백색 침전물이 여과에 의해 획득된 후, 탈이온수로 세척되고, 실온에서 건조된다. 이후, 잔존 계면활성제는 HCl의 에탄올성 용액 중에서의 밤새 현탁에 의해 입자로부터 추출된다. 입자는 에탄올로 세척되고, 원심분리되고, 초음파처리 하에서 재분산된다. 이러한 세척 절차는 추가 2회 반복된다.

[0244] 이후, SiO_2 나노입자는 (3-아미노프로필)-트리에톡시실란(APTMS)을 이용하여 아미노기로 작용기화된다. 이를 수행하기 위해, 입자는 에탄올(30ml)에 현탁되고, APTMS($50\mu\text{l}$)가 현탁액에 첨가된다. 현탁액은 2시간 동안 실온에서 방치된 후, 주기적으로 에탄올을 첨가하여 부피를 일정하게 유지시키면서 4시간 동안 비등된다. 잔존 반응물은 원심분리에 의한 세척 및 순수한 에탄올 중 재분산의 5회 주기에 의해 제거된다.

[0245] 독립된 반응에서, 1nm 내지 4nm 직경의 금 시드(seed)가 생성된다. 본 반응에서 사용된 모든 물은 먼저 탈이온

화된 후, 유리로부터 증류된다. 물(45.5ml)이 100ml 둥근-바닥 플라스크에 첨가된다. 교반하면서, 0.2M 수성 NaOH(1.5ml)가 첨가된 후, 테트라키스(하이드록시메틸)포스포늄 클로라이드(THPC)의 1% 수용액(1.0ml)이 첨가된다. THPC 용액의 첨가 2분 후, 최소한 15분 숙성된 클로로금산(2ml)의 10mg/ml 수용액이 첨가된다. 금 시드가 물에 대한 투석을 통해 정제된다.

[0246] 코어-껍질 나노운반체를 형성시키기 위해, 상기에서 형성된 아미노-작용기화된 SiO₂ 나노입자가 먼저 실온에서 2시간 동안 금 시드와 혼합된다. 금-장식된 SiO₂ 입자가 원심분리를 통해 수거되고, 클로로금산 및 중탄산칼륨의 수용액과 혼합되어 금 껍질을 형성한다. 이후, 입자가 원심분리에 의해 세척되고, 물 내에 재분산된다. 이부프로펜은 72시간 동안 소듐 이부프로펜(1mg/L)의 용액에 입자를 현탁시킴으로써 로딩된다. 이후, 유리 이부프로펜이 원심분리 및 물 내의 재분산에 의해 입자로부터 세척된다.

[0247] **실시예 3: 사이클로스포린 A를 함유하는 리포솜(예언적 실시예)**

[0248] 리포솜은 얇은 필름 수화를 이용하여 형성된다. 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC)(32 μmol), 콜레스테롤(32 μmol), 및 사이클로스포린 A(6.4 μmol)이 순수한 클로로포름(3ml)에 용해된다. 이러한 지질 용액이 50ml 둥근-바닥 플라스크에 첨가되고, 용매가 60℃의 온도에서 회전 증발기 상에서 증발된다. 이후, 플라스크가 질소 가스로 플러싱(flushing)되어 잔존 용매를 제거한다. 인산염 완충 염수(2ml) 및 5개의 유리 비드가 플라스크에 첨가되고, 지질 필름이 1시간 동안 60℃에서의 진탕에 의해 수화되어 현탁액을 형성한다. 현탁액이 작은 압력 튜브로 옮겨지고, 각각의 펄스 사이의 30초 지연과 함께 30초 펄스의 4회 주기 동안 60℃에서 음파처리된다. 이후, 완전한 수화를 가능케 하기 위해 현탁액이 2시간 동안 실온에서 평온하게 방치된다. 리포솜이 원심분리 후, 신선한 인산염 완충 염수 내의 재현탁에 의해 세척된다.

[0249] **실시예 4: 중합체-라파마이신 컨쥬게이트를 함유하는 중합체 나노운반체(예언적 실시예)**

[0250] PLGA-라파마이신 컨쥬게이트의 제조:

[0251] 산 말단 기를 갖는 PLGA 중합체(7525 DLG1A, 산가 0.46mmol/g, Lakeshore Biomaterials; 5g, 2.3mmol, 1.0당량)가 30ml의 디클로로메탄(DCM)에 용해된다. N,N-디사이클로헥실카르보디이미드(1.2당량, 2.8mmol, 0.57g)가 첨가된 후, 라파마이신(1.0당량, 2.3mmol, 2.1g) 및 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)(2.0당량, 4.6mmol, 0.56g)이 첨가된다. 혼합물이 2일 동안 실온에서 교반된다. 이후, 혼합물이 여과되어 불용성 디사이클로헥실우레아가 제거된다. 여과액이 약 10ml 부피로 농축되고, 100ml의 이소프로필 알코올(IPA)에 첨가되어, PLGA-라파마이신 컨쥬게이트가 침전된다. IPA 층이 제거된 후, 중합체가 50ml의 IPA 및 50ml의 메틸 t-부틸 에테르(MTBE)로 세척된다. 이후, 중합체가 2일 동안 35℃에서 진공하에서 건조되어, 백색 고체(약, 6.5g)로서 PLGA-라파마이신이 제공된다.

[0252] PLGA-라파마이신 컨쥬게이트 및 오브알부민 펩티드(323 내지 339)를 함유하는 나노운반체의 제조:

[0253] PLGA-라파마이신을 함유하는 나노운반체는 하기와 같이 실시예 1에 기재된 절차에 따라 제조된다:

[0254] 나노운반체 형성을 위한 용액은 하기와 같이 제조된다:

[0255] 용액 1: 희석된 염산 수용액 중 20mg/ml의 오브알부민 펩티드 323 내지 339. 실온에서 0.13M 염산 용액에 오브알부민 펩티드를 용해시킴으로써 용액이 제조된다. 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/ml의 PLGA-라파마이신. 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLGA-라파마이신을 용해시킴으로써 용액이 제조된다. 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/ml의 PLA-PEG. 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLA-PEG를 용해시킴으로써 용액이 제조된다. 용액 4: 100mM pH 8 인산염 완충액 중 50mg/ml의 폴리비닐 알코올.

[0256] 일차 유중수 에멀전이 먼저 제조된다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2ml), 용액 2(0.75ml), 및 용액 3(0.25ml)을 조합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1이 제조된다. 이후, 용액 4(3.0ml)와 일차 W1/O1 에멀전을 조합하고, 10초 동안 볼텍싱(vortexing)하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)이 제조된다. W1/O1/W2 에멀전이 70mM pH 8 인산염 완충액(30ml)을 함유하는 비커에 첨가되고, 2시간 동안 실온에서 교반되어, 메틸렌 클로라이드가 증발되고, 나노운반체가 형성된다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 35분 동안 75,600×g 및 4℃에서 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부가 세척된다. 세척 절차가 반복되고, 펠렛이 약 10mg/ml의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 재현탁된다.

[0257] **실시예 5: 라파마이신을 함유하는 금 나노운반체(AuNC)의 제조(예언적 실시예)**

[0258] HS-PEG-라파마이신의 제조:

[0259] 건성 DMF 중 PEG 산 이황화물(1.0당량), 라파마이신(2.0당량 내지 2.5당량), DCC(2.5당량) 및 DMAP(3.0당량)의 용액이 밤새 실온에서 교반된다. 불용성 디사이클로헥실우레아가 여과에 의해 제거되고, 여과액이 이소프로필 알코올(IPA)에 첨가되어, PEG-이황화물-디-라파마이신 에스테르가 침전되고, IPA로 세척되고, 건조된다. 이후, 중합체가 DMF 중 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드로 처리되어, PEG 이황화물이 티올 PEG 라파마이신 에스테르(HS-PEG-라파마이신)로 환원된다. 생성된 중합체는 IPA로부터의 침전에 의해 회수되고, 이전에 기재된 바와 같이 건조되고, H NMR 및 GPC에 의해 분석된다.

[0260] 금 NC(AuNC)의 형성:

[0261] 500ml의 1mM HAuCl₄의 수용액이 응축기가 장비된 1L 둥근-바닥 플라스크에서 강한 교반과 함께 10분 동안 가열 환류된다. 이후, 50ml의 40mM 트리스듐 시트레이트의 용액이 교반 용액에 신속히 첨가된다. 생성된 질은 포도주 빛 용액이 25분 내지 30분 동안 환류에서 유지되고, 열이 철회되고, 용액이 실온으로 냉각된다. 이후, 용액이 0.8μm 막 필터를 통해 여과되어, AuNC 용액이 제공된다. AuNC는 가시광선 분광법 및 투과 전자 현미경검사법을 이용하여 특성규명된다. AuNC는 520nm에서 피크 흡수를 갖는 시트레이트에 의해 캡핑된 약 20nm의 직경이다.

[0262] HS-PEG-라파마이신과의 AuNC 컨쥬게이트:

[0263] 150μl의 HS-PEG-라파마이신(10mM pH 9.0 카르보네이트 완충액 중 10 μM)의 용액이 1ml의 20nm 직경의 시트레이트-캡핑된 금 나노운반체(1.16nM)에 첨가되어, 2500:1의 티올 대 금의 몰비가 생성된다. 혼합물이 1시간 동안 아르곤 하에서 실온에서 교반되어, 금 나노운반체 상에서 시트레이트에 의한 티올의 완전한 교환이 가능해진다. 이후, 표면 상에 PEG-라파마이신을 갖는 AuNC가 30분 동안 12,000g에서의 원심분리에 의해 정제된다. 상청액이 따라내어진 후, AuNC-S-PEG-라파마이신을 함유하는 펠렛이 펠렛화되고, 1× PBS 완충액으로 세척된다. 이후, 정제된 금-PEG-라파마이신 나노운반체가 추가 분석 및 생물학적 검정을 위해 적합한 완충액에 재현탁된다.

[0264] **실시예 6: 오브알부민을 함유하는 메조포러스 실리카-금 코어-겍질 나노운반체(예언적 실시예)**

[0265] 메조포러스 SiO₂ 나노입자 코어가 졸-겔 방법을 통해 생성된다. 헥사데실트리메틸-암모늄 브로마이드(CTAB)(0.5g)가 탈이온수(500ml)에 용해된 후, 2M NaOH 수용액(3.5ml)이 CTAB 용액에 첨가된다. 용액이 30분 동안 교반된 후, 테트라에톡시실란(TEOS)(2.5ml)이 용액에 첨가된다. 생성된 겔이 80℃의 온도에서 3시간 동안 교반된다. 형성된 백색 침전물이 여과에 의해 획득된 후, 탈이온수로 세척되고, 실온에서 건조된다. 이후, 잔존 계면활성제는 HCl의 에탄올성 용액 중에서의 밤새 현탁에 의해 입자로부터 추출된다. 입자는 에탄올로 세척되고, 원심분리되고, 초음파처리 하에서 재분산된다. 이러한 세척 절차는 추가 2회 반복된다.

[0266] 이후, SiO₂ 나노입자는 (3-아미노프로필)-트리에톡시실란(APTMS)을 이용하여 아미노기로 작용기화된다. 이를 수행하기 위해, 입자는 에탄올(30ml)에 현탁되고, APTMS(50μl)가 현탁액에 첨가된다. 현탁액은 2시간 동안 실온에서 방치된 후, 주기적으로 에탄올을 첨가하여 부피를 일정하게 유지시키면서 4시간 동안 비등된다. 잔존 반응물은 원심분리에 의한 세척 및 순수한 에탄올 중 재분산의 5회 주기에 의해 제거된다.

[0267] 독립된 반응에서, 1nm 내지 4nm 직경의 금 시드가 생성된다. 본 반응에서 사용된 모든 물은 먼저 탈이온화된 후, 유리로부터 증류된다. 물(45.5ml)이 100ml 둥근-바닥 플라스크에 첨가된다. 교반하면서, 0.2M 수성 NaOH(1.5ml)가 첨가된 후, 테트라키스(하이드록시메틸)포스포늄 클로라이드(THPC)의 1% 수용액(1.0ml)이 첨가된다. THPC 용액의 첨가 2분 후, 최소한 15분 숙성된 클로로금산(2ml)의 10mg/ml 수용액이 첨가된다. 금 시드가 물에 대한 투석을 통해 정제된다.

[0268] 코어-겍질 나노운반체를 형성시키기 위해, 상기에서 형성된 아미노-작용기화된 SiO₂ 나노입자가 먼저 실온에서 2시간 동안 금 시드와 혼합된다. 금-장식된 SiO₂ 입자가 원심분리를 통해 수거되고, 클로로금산 및 중탄산칼륨의 수용액과 혼합되어 금 겍질을 형성한다. 이후, 입자가 원심분리에 의해 세척되고, 물 내에 재분산된다. 티올화된 오브알부민(오브알부민에 2-이미노티올란 하이드로클로라이드를 처리함으로써 제조됨)은 72시간 동안 티올화된 오브알부민(1mg/L)의 용액에 입자를 현탁시킴으로써 로딩된다. 이후, 입자는 1× PBS(pH 7.4)로 펠렛 세척되어, 유리 단백질이 제거된다. 이후, 오브알부민을 함유하는 생성된 실리카-금 코어-겍질 나노운반체는 추가 분석 및 검정을 위해 1× PBS에 재현탁된다.

[0269] **실시예 7: 라파마이신 및 오브알부민을 함유하는 리포솜(예언적 실시예)**

[0270] 리포솜은 얇은 필름 수화에 의해 형성된다. 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC)(32 μmol), 콜레스테롤(32 μmol), 및 라파마이신(6.4 μmol)이 순수한 클로로포름(3ml)에 용해된다. 이러한 지질 용액은 10ml 유리 튜브에 첨가되고, 용매는 질소 가스 스트림 하에서 제거되고, 진공하에서 6시간 동안 건조된다. 다층 소포가 과량의 오브알부민을 함유하는 2.0ml의 25mM MOPS 완충액 pH 8.5을 이용한 필름의 수화에 의해 수득된다. 지질 필름이 튜브 표면으로부터 벗겨질때까지 불텍싱된다. 다층 소포를 단층으로 분해시키기 위해, 10회 주기의 동결(액체 질소) 및 해동(30℃ 워터 배쓰)이 적용된다. 이후, 샘플이 25mM MOPS 완충액 pH 8.5 중 1ml로 희석된다. 생성된 리포솜의 크기는 200nm 포어 폴리카르보네이트 필터를 통해 샘플을 10회 통과시킴으로써 압출에 의해 균일화된다. 이후, 생성된 리포솜은 추가 분석 및 생물학적 검정에 사용된다.

[0271] **실시예 8: 표면 컨쥬게이션된 오브알부민을 갖는 변형된 폴리(아미노산)로 구성된 중합체 나노입자(예언적 실시예)**

[0272] 단계-1. L-페닐알라닌 에틸 에스테르(L-PAE)로 변형된 폴리(γ -글루탐산)(γ -PGA)의 제조: 4.7 unit mmol의 γ -PGA(Mn= 300kD)가 0.3N-NaHCO₃ 수용액(50ml)에 용해된다. L-PAE(4.7mmol) 및 EDC.HCl(4.7mmol)이 용액에 첨가되고, 4℃에서 30분 동안 교반된다. 이후, 용액이 24시간 동안 교반과 함께 실온에서 유지된다. MWCO 50kD를 갖는 투석 막을 이용한 투석에 의해 저분자량 화학물질이 제거된다. 생성된 γ -PGA-이식편-L-PAE가 동결-건조에 의해 수득된다.

[0273] 단계-2. γ -PGA-이식편-L-PAE 중합체로부터의 나노입자의 제조: γ -PGA-이식편-L-PAE로 구성된 나노입자는 침전 및 투석 방법에 의해 제조된다. γ -PGA-이식편-L-PAE(20mg)는 2ml의 DMSO에 용해된 후, 2ml의 물이 첨가되어, 투명한 용액이 형성되었다. 이후, 용액은 셀룰로스 막 관류(50,000 MWCO)를 이용하여 증류수에 대해 투석되어, 나노입자가 형성되고, 실온에서 72시간 동안 유기 용매가 제거된다. 증류수는 12시간의 간격으로 교환된다. 이후, 생성된 나노입자 용액(물 중 10mg/ml)이 항원 컨쥬게이션에 사용된다.

[0274] 단계-3. γ -PGA 나노입자로의 오브알부민 컨쥬게이션: γ -PGA 나노입자(10mg/ml)의 표면 카르복실산기가 먼저 주위 온도에서 2시간 동안 EDC 및 NHS(각각 인산염 완충액 중 10mg/ml, pH 5.8)에 의해 활성화된다. 과량의 EDC/NHS를 제거하기 위한 펠렛 세척 후, 활성화된 나노입자가 인산염-완충 염수(PBS, pH 7.4) 중에서 1ml의 오브알부민(10mg/ml)과 혼합되고, 혼합물이 24시간 동안 4 내지 8℃에서 인큐베이션된다. 생성된 오브알부민 컨쥬게이션된 γ -PGA 나노입자는 PBS로 2회 세척되고, 추가 분석 및 생물학적 검정을 위해 PBS 중에 5mg/ml로 재현탁된다.

[0275] **실시예 9: 에리트로포이어틴(EPO)-피막화된 γ -PGA 나노입자(예언적 실시예)**

[0276] EPO-피막화된 γ -PGA 나노입자를 제조하기 위해, 0.25mg 내지 4mg의 EPO가 1ml의 PBS(pH 7.4)에 용해되고, 1ml의 γ -PGA-이식편-L-PAE(DMSO 중 10mg/ml)가 EPO 용액에 첨가된다. 생성된 용액은 15분 동안 14,000× g에서 원심분리되고, PBS로 반복적으로 행구어진다. 이후, 생성된 EPO-피막화된 γ -PGA 나노입자는 추가 분석 및 생물학적 검정을 위해 PBS(5mg/ml)에 재현탁된다.

[0277] **실시예 10: 오브알부민을 함유하는 금 나노입자(AuNC)의 제조(예언적 실시예)**

[0278] 단계-1. 금 NC(AuNC)의 형성: 500ml의 1mM HAuCl₄의 수용액이 응축기가 장비된 1L 둥근-바닥 플라스크에서 강한 교반과 함께 10분 동안 가열 환류된다. 이후, 50ml의 40mM 트리소듐 시트레이트의 용액이 교반하는 용액에 신속히 첨가된다. 생성된 진한 포도주빛 용액이 25분 내지 30분 동안 환류하에 유지되고, 열이 철회되고, 용액이 실온으로 냉각된다. 이후, 용액이 0.8 μm 막 필터를 통해 여과되어, AuNC 용액이 제공된다. AuNC는 가시광선 분광법 및 투과 전자 현미경검사법을 이용하여 특성규명된다. AuNC는 520nm에서 피크 흡수를 갖는 시트레이트에 의해 캡핑된 약 20nm의 직경이다.

[0279] 단계-2. AuNC로의 오브알부민의 컨쥬게이션: 150 μl 의 티올화된 오브알부민(10mM pH 9.0 카르보네이트 완충액 중 10 μM)의 용액이 1ml의 20nm 직경의 시트레이트-캡핑된 금 나노입자(1.16nM)에 첨가되어, 2500:1의 티올 대 금의 몰 비가 생성된다. 혼합물이 1시간 동안 아르곤 하에서 실온에서 교반되어, 금 나노입자 상에서 시트레이트에 의한 티올의 완전한 교환이 가능해진다. 이후, 표면 상에 오브알부민을 갖는 AuNC가 30분 동안 12,000g에서의 원심분리에 의해 정제된다. 상청액이 따라내어진 후, AuNC-오브알부민을 함유하는 펠렛이 펠렛화되고, 1× PBS 완충액으로 세척된다. 이후, 정제된 금-오브알부민 나노입자가 추가 분석 및 생물학적 검정을 위해 적합한 완충액에 재현탁된다.

[0280] **실시예 11: 생체내 이포이어틴 알파에 대한 관용원성 면역 반응의 평가(예언적)**

[0281] CD4+ T 세포 증식을 유도하기 위하여 불완전 프로인트 애주번트 중 이포이에틴 알파로 Balb/c 마우스를 면역화시키고, 세포 증식 수준을 평가한다. 후속적으로, 이포이에틴 알파 및 면역억제제의 MHC 클래스 II-제한 에피토프를 포함하는 본 발명의 조성물을 용량 의존적 방식으로 피하에 투여한다. 그 다음에 동일한 마우스를 다시 이포이에틴 알파에 노출시키고, CD4+ T세포 증식 수준을 다시 평가한다. 그 다음에 관용원성 면역 반응을 나타내는 이포이에틴 알파에 의한 후속 시험감염 시 CD4+ T 세포 증식의 감소로 CD4+ T 세포 집단의 변화를 모니터링한다.

[0282] **실시예 12: 생체내 면역억제제 및 APC 제시가능 항원을 포함하는 합성 나노운반체에 의한 관용원성 면역 반응의 평가**

[0283] **합성 나노운반체 생성의 재료 및 방법**

[0284] **나노운반체 1**

[0285] 라파마이신을 TSZ CHEM(185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; 제품 카탈로그 # R1017)으로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 제품 코드 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 약 5,000Da의 PEG 블록 및 약 20,000Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체를 합성하였다. 폴리비닐 알코올(85% 내지 89% 가수분해됨)을 EMD Chemicals(제품 번호 1.41350.1001)로부터 구입하였다.

[0286] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0287] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 50mg/mL의 라파마이신. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 라파마이신을 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0288] 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLGA. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLGA를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0289] 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLA-PEG. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLA-PEG를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0290] 용액 4: 100mM pH 8 인산염 완충액 중 50mg/mL의 폴리비닐 알코올.

[0291] 수중유 에멀전을 사용하여 나노운반체를 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2mL), 용액 2(0.75mL), 용액 3(0.25mL), 및 용액 4(3.0mL)를 합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 O/W 에멀전을 제조하였다. O/W 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 45분 동안 21,000×g 및 4°C에서 원심분리하며, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10mg/mL의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시켰다.

[0292] 동적 광산란에 의해 나노운반체 크기를 결정하였다. 나노운반체 내 라파마이신의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액의 mL 당 전체 건조-나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

표 1

나노운반체 ID	유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
나노운반체 1	215	9.5

[0294] **나노운반체 2**

[0295] 오브알부민 단백질의 T 및 B 세포 에피토프인 것으로 공지된 17개의 아미노산 펩티드인 오브알부민 펩티드 323 내지 339를 Bachem Americas Inc.(3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609)로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 제품 코드 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 약 5,000Da의 PEG 블록 및 약 20,000Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체를 합성하였다. 폴리비닐 알코올(85% 내지 89% 가수분해됨)을 EMD Chemicals(제품 번호 1.41350.1001)로부터 구입하였다.

[0296] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0297] 용액 1: 희석 염산 수용액 중 20mg/mL의 오브알부민 펩티드 323 내지 339. 실온에서 0.13M 염산 용액에 오브알부민 펩티드를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0298] 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLGA. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLGA를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0299] 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLA-PEG. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLA-PEG를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0300] 용액 4: 100mM pH 8 인산염 완충액 중 50mg/mL의 폴리비닐 알코올.

[0301] 일차 유중수 에멀전을 먼저 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2mL), 용액 2(0.75mL), 및 용액 3(0.25mL)을 합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 그 다음에, 용액 4(3.0mL)와 일차 W1/O1 에멀전을 합하고, 10초 동안 볼텍싱하며, Branson Digital Sonifier 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)을 제조하였다.

[0302] W1/O1/W2 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 35분 동안 75,600×g 및 4°C에서 원심분리하며, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10mg/mL의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시켰다.

[0303] 동적 광산란에 의해 나노운반체 크기를 결정하였다. 나노운반체 내 펩티드의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액의 mL 당 전체 건조-나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

표 2

[0304]

나노운반체 ID	유효직경 (nm)	펩티드 함량 (% w/w)
나노운반체 2	234	2.1

[0305] **나노운반체 3**

[0306] 심바스타틴을 LKT Laboratories, Inc.(2233 University Avenue West, St. Paul, MN 55114; 제품 카탈로그 # S3449)로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 제품 코드 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 약 5,000Da의 PEG 블록 및 약 20,000Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체를 합성하였다. 폴리비닐 알코올 (85% 내지 89% 가수분해됨)을 EMD Chemicals(제품 번호 1.41350.1001)로부터 구입하였다.

[0307] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0308] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중 50mg/mL의 심바스타틴. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 심바스타틴을 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0309] 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLGA. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLGA를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0310] 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLA-PEG. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLA-PEG를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0311] 용액 4: 100mM pH 8 인산염 완충액 중 50mg/mL의 폴리비닐 알코올.

[0312] 수중유 에멀전을 사용하여 나노운반체를 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.15mL), 용액 2(0.75mL), 용액 3(0.25mL), 및 용액 4(3.0mL)를 합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 O/W 에멀전을 제조하였다. O/W 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 35분 동안 75,600×g 및 4°C에서 원심분리하며, 상청액을 제거하고, 인산

염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10mg/ml의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시켰다.

[0313] 동적 광산란에 의해 나노운반체 크기를 결정하였다. 나노운반체 내 심바스타틴의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액의 ml 당 전체 건조-나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

표 3

나노운반체 ID	유효직경	심바스타틴 함량
	(nm)	(% w/w)
나노운반체 3	196	8.0

[0315] 나노운반체 4

[0316] 오브알부민 단백질의 T 및 B 세포 에피토프인 것으로 공지된 17개의 아미노산 펩티드인 오브알부민 펩티드 323 내지 339를 Bachem Americas Inc.(3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609)로부터 구입하였다. 라파마이신을 TSZ CHEM(185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; 제품 카탈로그 # R1017)으로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 제품 코드 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 약 5,000Da의 PEG 블록 및 약 20,000Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체를 합성하였다. 폴리비닐 알코올(85% 내지 89% 가수분해됨)을 EMD Chemicals(제품 번호 1.41350.1001)로부터 구입하였다.

[0317] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0318] 용액 1: 희석 염산 수용액 중 20mg/ml의 오브알부민 펩티드 323 내지 339. 실온에서 0.13M 염산 용액에 오브알부민 펩티드를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0319] 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 50mg/ml의 라파마이신. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 라파마이신을 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0320] 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/ml의 PLGA. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLGA를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0321] 용액 4: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLA-PEG. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLA-PEG를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0322] 용액 5: 100mM pH 8 인산염 완충액 중 50mg/ml의 폴리비닐 알코올.

[0323] 일차 유중수 에멀전을 먼저 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2ml), 용액 2(0.2ml), 용액 3(0.75ml), 및 용액 4(0.25ml)를 합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 그 다음에, 용액 5(3.0ml)와 일차 W1/O1 에멀전을 합하고, 10초 동안 볼텍싱하며, Branson Digital Sonifier 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)을 제조하였다.

[0324] W1/O1/W2 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30ml)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 45분 동안 21,000×g 및 4℃에서 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 펠렛을 약 10mg/ml의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 재현탁시켰다.

[0325] 나노운반체 크기를 동적 광산란에 의해 결정하였다. 나노운반체 내의 펩티드 및 라파마이신의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 ml 당 전체 건조-나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

표 4

나노운반체 ID	유효직경	라파마이신 함량	펩티드 함량
	(nm)	(% w/w)	(% w/w)
4	227	9.0	2.5

[0327]

나노운반체 5

[0328]

오브알부민 단백질의 T 및 B 세포 에피토프인 것으로 공지된 17개의 아미노산 펩티드인 오브알부민 펩티드 323 내지 339를 Bachem Americas Inc.(3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609)로부터 구입하였다. 심바스타틴을 LKT Laboratories, Inc.(2233 University Avenue West, St. Paul, MN 55114; 제품 카탈로그 # S3449)로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 제품 코드 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 약 5,000Da의 PEG 블록 및 약 20,000Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체를 합성하였다. 폴리비닐 알코올 (85% 내지 89% 가수분해됨)을 EMD Chemicals(제품 번호 1.41350.1001)로부터 구입하였다.

[0329]

용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0330]

용액 1: 희석 염산 수용액 중 20mg/mL의 오브알부민 펩티드 323 내지 339. 실온에서 0.13M 염산 용액에 오브알부민 펩티드를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0331]

용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 50mg/mL의 심바스타틴. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 심바스타틴을 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0332]

용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLGA. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLGA를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0333]

용액 4: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLA-PEG. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLA-PEG를 용해시켜 용액을 제조하였다.

[0334]

용액 5: 100mM pH 8 인산염 완충액 중 50mg/mL의 폴리비닐 알코올.

[0335]

일차 유중수 에멀전을 먼저 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2mL), 용액 2(0.15mL), 용액 3(0.75mL), 및 용액 4(0.25mL)를 합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 그 다음에, 용액 5(3.0mL)와 일차 W1/O1 에멀전을 합하고, 10초 동안 볼텍싱하며, Branson Digital Sonifier 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)을 제조하였다. W1/O1/W2 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 35분 동안 75,600×g 및 4℃에서 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 펠렛을 약 10mg/mL의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 재현탁시켰다.

[0336]

나노운반체 크기를 동적 광산란에 의해 결정하였다. 나노운반체 내의 펩티드 및 심바스타틴의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL 당 전체 건조-나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

표 5

[0337]

나노운반체 ID	유효직경 (nm)	심바스타틴 함량 (% w/w)	펩티드 함량 (% w/w)
나노운반체 5	226	2.7	1.9

[0338]

생체내 투여 1

[0339]

B6.Cg-Tg(TcrαTcrβ)425Cbn/J(OTII) 및 C57BL/6(B6) 마우스로부터 비장을 채취하였고, 기계적으로 해리시켰으며, 70 μM 체를 통해 개별적으로 여과시켜 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 그 다음에 정제된 CD4⁺CD25⁺ 세포를 2단계 과정으로 추출하였다. Miltenyi Biotec AutoMACS 자기 세포분류기를 사용하여 비장 세포를 우선 CD4⁺ T 세포 분리 키트 II로 표지하였고, 미표지 분획은 CD25⁺ 고갈 키트로 CD25⁺ 세포를 고갈시켰다. 정제된 B6 세포를 세포내 염료인 카르복시플루오레신 석신이미딜 에스테르(Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester: CFSE)에 의해 염색한 후 정제된 OTII 세포와 동일한 농도에서 혼합하였다. 그 다음에 그것들을 정맥내로 (i.v.) B6.SJL-*Ptprca*^a/BoyAi(CD45.1) 수용체 마우스에 주사하였다.

[0340]

다음날 수용체 CD45.1 마우스를 표적화된 관용원성 합성 백신 입자(t²SVP)로 표적화하였다. 그것들을 오브알부

민 펩티드(323-339)(OVA³²³⁻³³⁹), 라파마이신(Rapa) 및/또는 심바스타틴(Simva)의 조합물과 함께 로딩시켰고, 피하로(s.c.) 투여하였다.

[0341] 주사액은 관용원성 처리를 구성하며, 그 다음에 각각 2주 간격을 두고 4회 더 주사하였다. 처리 스케줄을 완료한 후, 수용체 CD45.1 동물을 죽이고, 비장 및 슬와 림프절을 채취하였으며, 기계적으로 해리시켰고, 70 μ M 체를 통해 개별적으로 여과시켜 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 비장 세포는 RBC 라이시스 버퍼(스템 셀 테크놀로지스(Stem Cell Technologies))와 함께 인큐베이션에 의해 적혈구 세포(red blood cell: RBC)를 고갈시켰고, 비장과 림프절 둘 다에 대한 세포 계측을 수행하였다.

[0342] 비장 또는 림프절 세포를 10U/ml IL-2로 보충한 CM(완전 배지) 중에서 배양시켰고, 96웰 둥근 바닥(round bottom: RB) 플레이트 내 0.3x10⁶ 세포/웰에서 OPPI에 의해 재자극시켰으며, 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션시켰다. 세포를 제2일에 분할시켰고, 제5일에 채취하였다. 상청액을 수집하였고, 냉동시킨 한편, 세포를 유세포분석기에 의한 표현형 분석을 위해 염색하였다. 세포를 Becton Dickinson FACSanto 유세포분석기 상에서 분석하였다.

[0343] **생체내 투여 2**

[0344] B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J(OTII) 및 C57BL/6(B6) 마우스로부터 비장을 채취하였고, 기계적으로 해리시켰으며, 70 μ M 체를 통해 개별적으로 여과시켜 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 그 다음에 정제된 CD4⁺CD25⁺ 세포를 Miltenyi Biotec AutoMACS 자기 세포분류기를 사용하여 2단계 과정으로 추출하였다. Miltenyi CD4⁺T 세포 분리 키트 II를 사용하여 비장 세포를 표지하였다. 그 다음에 미표지 CD4⁺T 세포 분획은 CD25 고갈 키트로 CD25⁺ 세포를 고갈시켰다. 그 다음에 B6 마우스로부터 정제된 CD4 세포를 세포내 염료인 카르복시플루오레신 식신이미딜 에스테르(CFSE)에 의해 염색한 후 정제된 OTII 세포와 동일한 농도에서 혼합하였다. 그 다음에 이를 정맥내로(i.v.) B6.SJL-Ptprc^a/BoyAi(CD45.1) 수용체 마우스에 주사하였다.

[0345] 다음날 수용체 CD45.1 마우스를 표적화된 관용원성 합성 백신 입자로 처리하였다. 그것들은 오브알부민 펩티드(323-339)(OVA³²³⁻³³⁹), 라파마이신(Rapa) 및 심바스타틴(Simva)의 조합을 포함하였고, 피하로(s.c.) 또는 정맥내로(i.v.) 투여하였다.

[0346] 처리 스케줄을 완료한 후, 수용체 CD45.1 동물을 죽이고, 비장 및 슬와 림프절을 채취하였으며, 기계적으로 해리시켰고, 70 μ M 체를 통해 개별적으로 여과시켜 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 비장 세포는 RBC 라이시스 버퍼(Stem Cell Technologies)와 함께 인큐베이션에 의해 적혈구 세포(red blood cell: RBC)를 고갈시켰고, 비장과 림프절 둘 다에 대한 세포 계측을 수행하였다.

[0347] 비장 또는 림프절 세포를 10U/ml IL-2로 보충한 CM 중에서 배양시켰고, 96웰 둥근 바닥(round bottom: RB) 플레이트 내 0.3x10⁶ 세포/웰에서 1 μ M OPPI에 의해 재자극시켰으며, 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션시켰다. 세포를 제2일에 분할시켰고, 제5일에 채취하였다. 상청액을 수집하였고, 냉동시킨 한편, 세포를 유세포분석기에 의한 표현형 분석을 위해 염색하였다. 세포를 Becton Dickinson FACSanto 유세포분석기 상에서 분석하였다.

[0348] **결과**

[0349] 결과는 도 2 및 3에 나타내어져 있다(면역조절제 1: 라파마이신; 면역조절제 2: 심바스타틴). 도면은 생체내 효과를 나타내며, 이는 항원을 면역조절 분자와 함께, 그리고 면역조절 분자 없이 포함하는 합성 나노운반체 또는 항원 단독에 비해 항원 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노운반체에 의해 이펙터 면역 세포의 항원 특이적 팽창이 감소된다는 것을 나타낸다.

[0350] **실시예 13: 합성 나노운반체에 의한 관용원성 면역 반응**

[0351] **재료 및 방법**

[0352] **나노운반체 1**

[0353] 오브알부민 단백질을 Worthington Biochemical Corporation(730 Vassar Avenue, Lakewood, NJ 08701; Product Code 3048)로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 제품 코드 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 폴

리비닐 알코올(85% 내지 89% 가수분해됨)을 EMD Chemicals(제품 번호 1.41350.1001)로부터 구입하였다. 약 5,000Da의 PEG 블록 및 약 20,000Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체를 합성하였다. 소듐 콜레이트 수화물을 Sigma-Aldrich Corp.(3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103; Product Code C6445)으로부터 구입하였다.

[0354] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0355] 용액 1: 인산염 완충 식염수 용액 중 50mg/mL의 오발부민. 실온에서 인산염 완충 식염수 용액에 오브알부민을 용해시켜 용액을 제조하였다. 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLGA. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLGA를 용해시켜 용액을 제조하였다. 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLA-PEG. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLA-PEG를 용해시켜 용액을 제조하였다. 용액 4: 100mM pH 8 인산염 완충액 중 50mg/mL의 폴리비닐 알코올 및 10mg/mL의 소듐 콜레이트 수화물.

[0356] 일차 유중수 에멀전을 먼저 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2mL), 용액 2(0.75mL), 및 용액 3(0.25mL)를 합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 그 다음에, 용액 4(3.0mL)와 일차 W1/O1 에멀전을 합하고, 10초 동안 볼텍싱하며, Branson Digital Sonifier 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)을 제조하였다. W1/O1/W2 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 35분 동안 75,600×g 및 4℃에서 원심분리하며, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10mg/mL의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시켰다.

[0357] 동적 광산란에 의해 나노운반체 크기를 결정하였다. 나노운반체 내 단백질의 양을 o-프탈알데히드 형광 분석에 의해 결정하였다. 현탁액의 mL 당 전체 건조-나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

표 6

나노운반체 ID	유효직경 (nm)	단백질 함량 (% w/w)
1	191	10.1

[0359] 나노운반체 2

[0360] 오브알부민 단백질을 Worthington Biochemical Corporation(730 Vassar Avenue, Lakewood, NJ 08701; Product Code 3048)로부터 구입하였다. 라파마이신을 TSZ CHEM(185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; 제품 카탈로그 # R1017)으로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; 제품 코드 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 약 5,000Da의 PEG 블록 및 약 20,000Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체를 합성하였다. 폴리비닐 알코올(85% 내지 89% 가수분해됨)을 EMD Chemicals(제품 번호 1.41350.1001)로부터 구입하였다. 소듐 콜레이트 수화물을 Sigma-Aldrich Corp.(3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103; Product Code C6445)으로부터 구입하였다.

[0361] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0362] 용액 1: 인산염 완충 식염수 용액 중 50mg/mL의 오발부민. 실온에서 인산염 완충 식염수 용액에 오브알부민을 용해시켜 용액을 제조하였다. 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 50mg/mL의 라파마이신. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 라파마이신을 용해시켜 용액을 제조하였다. 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLGA. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLGA를 용해시켜 용액을 제조하였다. 용액 4: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLA-PEG. 순수한 메틸렌 클로라이드 중에 PLA-PEG를 용해시켜 용액을 제조하였다. 용액 5: 100mM pH 8 인산염 완충액 중 50mg/mL의 폴리비닐 알코올 및 10mg/mL의 소듐 콜레이트 수화물.

[0363] 일차 유중수 에멀전을 먼저 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2mL), 용액 2(0.2mL), 용액 3(0.75mL), 및 용액 4(0.25mL)를 합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 그 다음에, 용액 5(3.0mL)와 일차 W1/O1 에멀전을 합하고, 10초 동안 볼텍싱하며, Branson Digital Sonifier 250을 사용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)을 제조하였다.

W1/O1/W2 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 35분 동안 75,600×g 및 4℃에서 원심분리하며, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 약 10mg/mL의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시켰다.

[0364] 동적 광산란에 의해 나노운반체 크기를 결정하였다. 나노운반체 내 라파마이신의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 나노운반체 내 단백질의 양을 o-프탈알데히드 형광 분석에 의해 결정하였다. 현탁액의 mL 당 전체 건조-나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

표 7

나노운반체 ID	유효직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)	단백질 함량 (% w/w)
2	172	7.4	7.6

[0366] 면역화

[0367] 이 실험의 목적은 항원 특이적 면역글로불린을 측정함으로써 진행중인 항체 반응에 대한 캡슐화된(t^2 SVP) 면역억제제의 효과를 평가하는 것이다. 동물의 한 그룹은 대조군으로서 면역화시키지 않은 채로 두었다. 오브알부민의 "수동 투여" 또는 3회 주사(제0일, 제14일 및 제28일)로 OVA 및 CpG에 의한 활성 면역화를 사용하여 두 그룹의 동물을 면역화시킨 후, 항체 역가를 평가하고, 1주 또는 2주 휴식을 취하였다. 다른 두 그룹은 동일한 면역화를 받았지만, 2주마다 처리제를 받음과 동시에 촉진제를 받았다. 이들 그룹 각각을 3개의 하위 그룹으로 분할하여 유도된 Ig 역가를 변형시키는 상이한 처리 능력을 시험하였다. 대조군 하위그룹은 관용원성 처리를 받지 않았다. 단지 OVA 단백질로 또는 면역억제제와 조합으로 수행되는 NP를 포함하는 기타 다른 하위 그룹에 두 가지 다른 처리를 적용하였다.

[0368] 면역화를 위해, 동물은 둘 다 100 μ L 중 25 μ g의 OVA i.v.로 또는 뒷다리 s.c.로 20 μ L/사지의 OVA+CpG(12.5 μ g OVA+10 μ g CpG)를 투여받았다. 관용원성 처리는 10 μ g의 OVA를 사용하여 200 μ L t^2 SVP i.v.의 투여를 포함하였다. 500 μ g/mL의 OVA 함량으로 나노입자를 제공하였다. 동일 양의 OVA를 모든 그룹에 주사하는 방식으로 t^2 SVP를 희석시켰다.

[0369] IgG의 측정

[0370] IgG 항체의 수준을 측정하였다. PBS(Thermo Fisher, Catalog #37528) 중 차단제 카제인을 희석제로 사용하였다. 2리터의 10× PBS 스톡(PBS: OmniPur(등록 상표) 10× PBS 액체 농축물, 4L, EMD Chemicals, 카탈로그 #6505) 및 18리터의 탈이온수에 10mL의 Tween-20(Sigma, 카탈로그 #P9416-100mL)을 첨가하여 제조된 PBS 중 0.05% Tween-20을 세척 완충액으로 사용하였다.

[0371] 5mg/mL의 스톡 농도의 OVA 단백질을 코팅 물질로 사용하였다. 5 μ g/mL로의 1:1000 희석을 작업 농도로 사용하였다. 검정 플레이트의 각각의 웰을 웰 당 100 μ L 희석된 OVA로 코팅하고, 플레이트를 밀봉 필름(VWR 카탈로그 #60941-120)으로 밀봉하고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. Costar9017 96-웰 편평 바닥 플레이트를 검정 플레이트로서 사용하였다, Costar9017.

[0372] 저결합 폴리프로필렌 96-웰 플레이트 또는 튜브를 셋업(set-up) 플레이트로 사용하였고, 여기서 검정 플레이트로 전달되기 전에 샘플을 제조하였다. 셋업 플레이트는 어떠한 항원도 함유하지 않았고, 따라서 혈청 항체는 샘플의 셋업 동안 플레이트에 결합하지 않았다. 항원 코팅 플레이트가 샘플을 제조하기 위해 사용된 경우 샘플의 제조 또는 피페팅(pipetting) 동안 일어날 수 있는 결합을 최소화시키기 위해 셋업 플레이트를 샘플 제조에 사용하였다. 셋업 플레이트에서 샘플을 제조하기 전, 웰을 임의의 비특이적 결합을 차단하기 위해 희석제로 덮고, 플레이트를 밀봉하였으며, 밤새 4℃에서 인큐베이션하였다.

[0373] 검정 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하고, 마지막 세척 후 세척 완충액을 웰로부터 완전히 흡인하였다. 세척 후, 300 μ L 희석액을 검정 플레이트(들)의 각각의 웰에 첨가하여 비특이적 결합을 차단하고, 플레이트를 실온에서 적어도 2시간 인큐베이션하였다. 혈청 샘플을 적절한 시작 희석으로 셋업 플레이트에서 제조하였다. 때때로, 시작 희석을 또한 희석액을 이용하여 1.5mL 튜브에서 제조하였다. 이용가능한 경우 이전 데이터를 기초로

하여 적절한 시작 희석을 결정하였다. 이전 데이터가 이용가능하지 않은 경우, 가장 낮은 시작 희석은 1:40이었다. 일단 희석되면, 혈청 샘플의 시작 희석액의 200 μ l를 셋업 플레이트의 적절한 웰로 옮겼다.

[0374] 예시적 셋업 플레이트 설계는 다음과 같이 기재된다: 2열 및 11열은 1 μ g/ml(1:4000 희석)으로 희석된 항-오브알 부민 단일클론 IgG2b 아이소타입(AbCam, ab17291) 표준을 함유하였다. 3열 내지 10열은 혈청 샘플(적절한 희석액)을 함유하였다. 1열 및 12열은 모서리 효과(edge effect)로 인한 측정의 임의의 편향을 피하기 위해 샘플 또는 표준에 대해 사용하지 않았다. 대신, 1열 및 12열은 200 μ l 희석액을 함유하였다. 1:40로 희석된 정상 마우스 혈청을 음성 대조군으로 사용하였다. 0.5mg/ml 스톡(BD Bioscience)으로부터 1:500으로 희석된 항-마우스 IgG2a를 아이소타입 대조군으로 사용하였다.

[0375] 일단 모든 샘플이 셋업 플레이트에서 제조된 후, 플레이트를 밀봉하고, 검정 플레이트의 차단이 완료될 때까지 4°C에서 저장하였다. 검정 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하고, 세척 완충액을 마지막 세척 후에 완전히 흡인하였다. 세척 후, 100 μ l의 희석액을 검정 플레이트의 B행 내지 H행의 모든 웰에 첨가하였다. 12-채널 피펫을 셋업 플레이트로부터 검정 플레이트로 샘플을 전달하기 위해 사용하였다. 위아래로 3회 150 μ l의 희석된 혈청을 피펫팅함으로써 전달 전에 샘플을 혼합하였다. 혼합 후, 150 μ l의 각각의 샘플을 셋업 플레이트로부터 전달하고, 각각의 검정 플레이트의 A행에 첨가하였다.

[0376] 일단 각각의 샘플의 시작 희석액을 셋업 플레이트로부터 검정 플레이트의 A행으로 전달한 후, 단계 희석액을 다음과 같이 검정 플레이트에서 피펫팅하였다: 50 μ l의 각각의 혈청 샘플을 12-채널 피펫을 이용하여 A행으로부터 제거하고, B행의 각각의 웰에 이전에 첨가된 100 μ l의 희석액과 혼합하였다. 이러한 단계를 전체 플레이트 아래에서 반복하였다. 최종 행의 희석액을 피펫팅한 후, 50 μ l의 유체를 최종 행 내의 웰로부터 제거하고, 폐기하여, 검정 플레이트의 각각의 웰에서 100 μ l의 최종 부피로 만들었다. 일단 샘플 희석액을 검정 플레이트에서 제조한 후, 플레이트를 적어도 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다.

[0377] 인큐베이션 후, 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 검출 항체(염소 항-마우스 항-IgG, HRP 컨쥬게이션됨, AbCam ab98717)를 희석액에서 1:1500(0.33 μ g/ml)로 희석하고, 100 μ l의 희석된 항체를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세척 완충액으로 3회 세척하였으며, 각각의 세척 단계는 적어도 30초의 적실 시간을 포함한다.

[0378] 세척 후, 검출 기질을 웰에 첨가하였다. 동등부의 기질 A 및 기질 B(BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set, catalog #555214)를 검정 플레이트로의 첨가 직전에 합하였고, 100 μ l의 혼합된 기질 용액을 각각의 웰에 첨가하였으며, 어두운 곳에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 10분의 기간 후 각각의 웰에 50 μ l의 중지 용액(2N H2SO4)을 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 웰의 광학 밀도(OD)를 570nm에서의 공제와 함께 450nm에서 플레이트 판독기 상에 중지 용액을 첨가한 직후에 평가하였다. 데이터 분석을 Molecular Device의 소프트웨어 SoftMax Pro v5.4를 이용하여 수행하였다. 일부 경우에, 4-파라미터 산정 곡선-적합 그래프를 x-축(log 스케일) 상의 희석 및 y-축(선형 스케일) 상의 OD 값을 이용하여 제조하였고, 각각의 샘플에 대한 최대 절반 값(EC50)을 결정하였다. 배치 상단의 플레이트 주형을 조정하여 각각의 샘플의 희석을 반영시켰다(열 당 1개).

[0379] **결과**

[0380] 도 4는 펩티드만을 포함하는 나노운반체에 비해 펩티드 항원과 면역억제제를 포함하는 나노운반체에 의한 항원 특이적 항체 생성의 감소를 나타낸다. **패널 3**은 강한 면역 조절제인 CpG의 사용이 일부 예에서 라파마이신을 포함하는 합성 나노운반체의 관용원성 효과에 대항하는 것으로 나타났다.

[0381] **실시예 14: 합성 나노운반체에 의한 관용원성 면역 반응**

[0382] **재료 및 방법**

[0383] 상기 예(실시예 13)에서와 같이 나노운반체를 제조하였다.

[0384] **면역화**

[0385] 이 실험의 목적은 면역원과 NP 처리를 동시에 받은 동물에서 항원 특이적 면역글로불린을 측정함으로써 나타나는 항체 반응에 대한 캡슐화된(t^2 SVP) 면역억제제의 효과를 평가하는 것이다. 동물의 한 그룹은 대조군으로서 비면역화된 채로 남아있었다(그러나 처리는 받음). 동물의 제2 그룹을 오브알부민의 "수동 투여"를 사용하여 면역화시켰고, 제3 그룹을 건갑골 밀 영역에서 OVA 및 CpG로 면역화시켰다. 이들 그룹의 각각은 2주마다 나노입자(nanoparticle: NP)의 주사가 제공되었고, 촉진제 전달에 항OVA Ig 수준을 모니터링하였다. 면역화를 위해, 100

μl 의 OVA+CpG s.c.(견갑골) 또는 $100\mu\text{l}$ 중 $25\mu\text{g}$ 의 OVA를 i.v.로 동물에 투여하였다. $100\mu\text{l}$ t²SVP i.v. 나노운반체의 투여를 포함하는 관용원성 처리를 $5\text{mg}/\text{ml}$ 로 제공하였다. 동일한 양의 OVA를 모든 그룹에 주사하는 방식으로 t²SVP를 희석시켰다. 제0일, 제14일, 제28일, 제42일, 제56일에 주사를 수행하였다.

[0386] IgG의 측정

[0387] IgG 항체의 수준을 측정하였다. PBS(Thermo Fisher, Catalog #37528) 중 차단제 카제인을 희석제로 사용하였다. 2리터의 $10\times$ PBS 스톡(PBS: OmniPur(등록 상표) $10\times$ PBS 액체 농축물, 4L, EMD Chemicals, 카탈로그 #6505) 및 18리터의 탈이온수에 10ml 의 Tween-20(Sigma, 카탈로그 #P9416-100ml)을 첨가하여 제조된 PBS 중 0.05% Tween-20을 세척 완충액으로 사용하였다.

[0388] $5\text{mg}/\text{ml}$ 의 스톡 농도의 OVA 단백질을 코팅 물질로 사용하였다. $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 로의 1:1000 희석을 작업 농도로 사용하였다. 검정 플레이트의 각각의 웰을 웰 당 $100\mu\text{l}$ 희석된 OVA로 코팅하고, 플레이트를 밀봉 필름(VWR 카탈로그 #60941-120)으로 밀봉하고, 4°C 에서 밤새 인큐베이션하였다. Costar9017 96-웰 편평 바닥 플레이트를 검정 플레이트로서 사용하였다, Costar9017.

[0389] 저결합 폴리프로필렌 96-웰 플레이트 또는 튜브를 셋업(set-up) 플레이트로 사용하였고, 여기서 검정 플레이트로 전달되기 전에 샘플을 제조하였다. 셋업 플레이트는 어떠한 항원도 함유하지 않았고, 따라서 혈청 항체는 샘플의 셋업 동안 플레이트에 결합하지 않았다. 항원 코팅 플레이트가 샘플을 제조하기 위해 사용된 경우 샘플의 제조 또는 피페팅(pipetting) 동안 일어날 수 있는 결합을 최소화시키기 위해 셋업 플레이트를 샘플 제조에 사용하였다. 셋업 플레이트에서 샘플을 제조하기 전, 웰을 임의의 비특이적 결합을 차단하기 위해 희석제로 덮고, 플레이트를 밀봉하였으며, 밤새 4°C 에서 인큐베이션하였다.

[0390] 검정 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하고, 마지막 세척 후 세척 완충액을 웰로부터 완전히 흡인하였다. 세척 후, $300\mu\text{l}$ 희석액을 검정 플레이트(들)의 각각의 웰에 첨가하여 비특이적 결합을 차단하고, 플레이트를 실온에서 적어도 2시간 인큐베이션하였다. 혈청 샘플을 적절한 시작 희석으로 셋업 플레이트에서 제조하였다. 때때로, 시작 희석을 또한 희석액을 이용하여 1.5ml 튜브에서 제조하였다. 이용가능한 경우 이전 데이터를 기초로 하여 적절한 시작 희석을 결정하였다. 이전 데이터가 이용가능하지 않은 경우, 가장 낮은 시작 희석은 1:40이었다. 일단 희석되면, 혈청 샘플의 시작 희석액의 $200\mu\text{l}$ 를 셋업 플레이트의 적절한 웰로 옮겼다.

[0391] 예시적 셋업 플레이트 설계는 다음과 같이 기재된다: 2열 및 11열은 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ (1:4000 희석)으로 희석된 항-오브알부민 단일클론 IgG2b 아이소타입(AbCam, ab17291) 표준을 함유하였다. 3열 내지 10열은 혈청 샘플(적절한 희석액)를 함유하였다. 1열 및 12열은 모서리 효과(edge effect)로 인한 측정의 임의의 편향을 피하기 위해 샘플 또는 표준에 대해 사용하지 않았다. 대신, 1열 및 12열은 $200\mu\text{l}$ 희석액을 함유하였다. 1:40로 희석된 정상 마우스 혈청을 음성 대조군으로 사용하였다. $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 스톡(BD Bioscience)으로부터 1:500으로 희석된 항-마우스 IgG2a를 아이소타입 대조군으로 사용하였다.

[0392] 일단 모든 샘플이 셋업 플레이트에서 제조된 후, 플레이트를 밀봉하고, 검정 플레이트의 차단이 완료될 때까지 4°C 에서 저장하였다. 검정 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하고, 세척 완충액을 마지막 세척 후에 완전히 흡인하였다. 세척 후, $100\mu\text{l}$ 의 희석액을 검정 플레이트의 B행 내지 H행의 모든 웰에 첨가하였다. 12-채널 피펫을 셋업 플레이트로부터 검정 플레이트로 샘플을 전달하기 위해 사용하였다. 위아래로 3회 $150\mu\text{l}$ 의 희석된 혈청을 피페팅함으로써 전달 전에 샘플을 혼합하였다. 혼합 후, $150\mu\text{l}$ 의 각각의 샘플을 셋업 플레이트로부터 전달하고, 각각의 검정 플레이트의 A행에 첨가하였다.

[0393] 일단 각각의 샘플의 시작 희석액을 셋업 플레이트로부터 검정 플레이트의 A행으로 전달한 후, 단계 희석액을 다음과 같이 검정 플레이트에서 피페팅하였다: $50\mu\text{l}$ 의 각각의 혈청 샘플을 12-채널 피펫을 이용하여 A행으로부터 제거하고, B행의 각각의 웰에 이전에 첨가된 $100\mu\text{l}$ 의 희석액과 혼합하였다. 이러한 단계를 전체 플레이트 아래에서 반복하였다. 최종 행의 희석액을 피페팅한 후, $50\mu\text{l}$ 의 유체를 최종 행 내의 웰로부터 제거하고, 폐기하여, 검정 플레이트의 각각의 웰에서 $100\mu\text{l}$ 의 최종 부피로 만들었다. 일단 샘플 희석액을 검정 플레이트에서 제조한 후, 플레이트를 적어도 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다.

[0394] 인큐베이션 후, 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 검출 항체(염소 항-마우스 항-IgG, HRP 컨쥬게이션됨, AbCam ab98717)를 희석액에서 1:1500($0.33\mu\text{g}/\text{ml}$)로 희석하고, $100\mu\text{l}$ 의 희석된 항체를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세척 완충액으로 3회 세척하였으며, 각각의 세척 단계는 적어도 30초의 적실 시간을 포함한다.

[0395] 세척 후, 검출 기질을 웰에 첨가하였다. 동등부의 기질 A 및 기질 B(BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set, catalog #555214)를 검정 플레이트로의 첨가 직전에 합하였고, 100 μ l의 혼합된 기질 용액을 각각의 웰에 첨가하였으며, 어두운 곳에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 10분의 기간 후 각각의 웰에 50 μ l의 중지 용액(2N H2SO4)을 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 웰의 광학 밀도(OD)를 570nm에서의 공제와 함께 450nm에서 플레이트 판독기 상에 중지 용액을 첨가한 직후에 평가하였다. 데이터 분석을 Molecular Device의 소프트웨어 SoftMax Pro v5.4를 이용하여 수행하였다. 일부 경우에, 4-파라미터 산정 곡선-적합 그래프를 x-축(log 스케일) 상의 회석 및 y-축(선형 스케일) 상의 OD 값을 이용하여 제조하였고, 각각의 샘플에 대한 최대 절반 값(EC50)을 결정하였다. 배치 상단의 플레이트 주형을 조정하여 각각의 샘플의 회석을 반영시켰다(열 당 1개).

[0396] **결과**

[0397] 도 5는 항원을 단독으로 포함하는 나노운반체와 비교하여 항원 및 면역억제제를 포함하는 나노운반체에 의한 항원 특이적 항체 생성의 감소를 나타낸다. 또한 데이터는 강한 면역 자극제인 CpG의 사용이 일부 예에서 라파마 이신을 포함하는 합성 나노운반체의 관용원성 효과에 대항하는 것으로 나타났다.

[0398] **실시예 15: 면역 반응에 대한 항원 및 면역억제제를 갖는 나노운반체의 효과 평가**

[0399] **재료 및 방법**

[0400] **나노운반체 1**

[0401] 오브알부민 단백질의 T 및 B 세포 에피토프인 것으로 공지된 17개의 아미노산 펩티드인 오브알부민 펩티드 323 내지 339를 Bachem Americas Inc.(3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609)로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 약 5,000 Da의 PEG 블록 및 약 20,000 Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체를 합성하였다. 폴리비닐 알코올(85% 내지 89% 가수 분해됨)을 EMD Chemicals(Product Number 1.41350.1001)로부터 구입하였다.

[0402] 용액을 하기와 같이 제조하였다:

[0403] 용액 1: 회석 염산 수용액 중 20mg/ml의 오브알부민 펩티드 323 내지 339. 용액을 실온에서 0.13M 염산 용액에 오브알부민 펩티드를 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/ml의 PLGA. 용액을 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLGA를 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/ml의 PLA-PEG. 용액을 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLA-PEG를 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 4: 100mM pH 8 포스페이트 완충액 중 50mg/ml의 폴리비닐 알코올.

[0404] 일차 유중수 에멀전을 먼저 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2ml), 용액 2(0.75ml), 및 용액 3(0.25ml)을 조합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 이후, 용액 4(3.0ml)와 일차 W1/O1 에멀전을 조합하고, 10초 동안 볼텍싱하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)을 제조하였다. W1/O1/W2 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30ml)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 35분 동안 75,600 $\times$ g 및 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 펠렛을 약 10mg/ml의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 재현탁시켰다.

[0405] 나노운반체 크기를 동적 광산란에 의해 결정하였다. 나노운반체 내의 펩티드의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 ml 당 전체 건조-나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

표 8

나노운반체 ID	유효 직경 (nm)	펩티드 함량 (% w/w)
1	234	2.1

[0406]

[0407] **나노운반체 2**

[0408] 오브알부민 단백질의 T 및 B 세포 에피토프인 것으로 공지된 17개의 아미노산 펩티드인 오브알부민 펩티드 323 내지 339를 Bachem Americas Inc.(3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505; Part # 4065609)로부터 구입하였다. 라파마이신을 TSZ CHEM(185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; Product Catalogue # R1017)로부터 구입하였다. 3:1의 락티드:글리콜리드 비 및 0.75dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA를 SurModics Pharmaceuticals(756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211; Product Code 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 약 5,000Da의 PEG 블록 및 약 20,000Da의 PLA 블록을 갖는 PLA-PEG 블록 공중합체를 합성하였다. 폴리비닐 알코올(85% 내지 89% 가수분해됨)을 EMD Chemicals(Product Number 1.41350.1001)로부터 구입하였다.

[0409] 용액을 하기와 같이 제조하였다:

[0410] 용액 1: 희석 염산 수용액 중 20mg/mL의 오브알부민 펩티드 323 내지 339. 용액을 실온에서 0.13M 염산 용액에 오브알부민 펩티드를 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중 50mg/mL의 라파마이신. 용액을 순수한 메틸렌 클로라이드에 라파마이신을 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 3: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLGA. 용액을 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLGA를 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 4: 메틸렌 클로라이드 중 100mg/mL의 PLA-PEG. 용액을 순수한 메틸렌 클로라이드에 PLA-PEG를 용해시킴으로써 제조하였다. 용액 5: 100mM pH 8 포스페이트 완충액 중 50mg/mL의 폴리비닐 알코올.

[0411] 일차 유중수 에멀전을 먼저 제조하였다. 작은 압력 튜브에서 용액 1(0.2mL), 용액 2(0.2mL), 용액 3(0.75mL), 및 용액 4(0.25mL)를 조합하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 40초 동안 50% 진폭에서 음파처리하여 W1/O1을 제조하였다. 이후, 용액 5(3.0mL)와 일차 W1/O1 에멀전을 조합하고, 10초 동안 볼텍싱하고, Branson Digital Sonifier 250을 이용하여 60초 동안 30% 진폭에서 음파처리하여 이차 에멀전(W1/O1/W2)을 제조하였다. W1/O1/W2 에멀전을 70mM pH 8 인산염 완충 용액(30mL)을 함유하는 비커에 첨가하고, 2시간 동안 실온에서 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고, 나노운반체를 형성시켰다. 원심분리 튜브로 나노운반체 현탁액을 옮기고, 45분 동안 21,000×g 및 4℃에서 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 인산염 완충 염수에 펠렛을 재현탁시킴으로써 나노운반체의 일부를 세척하였다. 세척 절차를 반복하고, 펠렛을 약 10mg/mL의 최종 나노운반체 분산액으로 인산염 완충 염수에 재현탁시켰다.

[0412] 나노운반체 크기를 동적 광산란에 의해 결정하였다. 나노운반체 내의 펩티드 및 라파마이신의 양을 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL 당 전체 건조-나노운반체 질량을 중량법에 의해 결정하였다.

표 9

나노운반체 ID	유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)	펩티드 함량 (% w/w)
2	227	9.0	2.5

[0413]

[0414] **면역화**

[0415] 동물에게 이들이 치료를 받는 것과 동시에 2주 마다 면역화를 제공하였다. 상기 그룹 각각을 유도된 Ig 역가를 변화시키는 다양한 처리의 능력을 시험하기 위해 서브그룹으로 나누었다. 대조군 서브그룹에는 관용원성 처리를 제공하지 않았다. 2개의 서브그룹에 단지 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 펩티드 또는 라파마이신과 조합된 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 펩티드를 갖는 나노운반체를 제공하였다.

[0416] 하기 경로를 통해 면역화를 제공하였다(값은 동물마다의 값임): 둘 모두의 뒷다리에 피하로 20μL/다리의 OVA+CpG(12.5μg OVA+10μg CpG). 관용원성 처리를 하기 경로를 통해 제공하였다(값은 동물마다의 값임): 200μL 나노운반체를 100μg/mL의 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 함량으로 제공하였다.

[0417] **IgG의 측정**

[0418] IgG 항체의 수준을 측정하였다. PBS(Thermo Fisher, Catalog #37528) 중 차단제 카제인을 희석제로 사용하였다. 2리터의 10× PBS 스톱(PBS: OmniPur(등록 상표) 10× PBS 액체 농축물, 4L, EMD Chemicals, 카탈

로그 #6505) 및 18리터의 탈이온수에 10ml의 Tween-20(Sigma, 카탈로그 #P9416-100ml)을 첨가하여 제조된 PBS 중 0.05% Tween-20을 세척 완충액으로 사용하였다.

- [0419] 5mg/ml의 스톡 농도의 OVA 단백질을 코팅 물질로 사용하였다. 5 μ g/ml로의 1:1000 희석을 작업 농도로 사용하였다. 검정 플레이트의 각각의 웰을 웰 당 100 μ l 희석된 OVA로 코팅하고, 플레이트를 밀봉 필름(VWR catalog #60941-120)으로 밀봉하고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. Costar9017 96-웰 편평 바닥 플레이트를 검정 플레이트로서 사용하였다, Costar9017.
- [0420] 저-결합 폴리프로필렌 96-웰 플레이트 또는 튜브를 셋-업(set-up) 플레이트로 사용하였고, 여기서 검정 플레이트로 전달되기 전에 샘플을 제조하였다. 셋업 플레이트는 어떠한 항원도 함유하지 않았고, 따라서 혈청 항체는 샘플의 셋업 동안 플레이트에 결합하지 않았다. 항원-코팅된 플레이트가 샘플을 제조하기 위해 사용된 경우 샘플의 제조 또는 피펫팅(pipetting) 동안 발생할 수 있는 결합을 최소화시키기 위해 셋업 플레이트를 샘플 제조에 사용하였다. 셋업 플레이트에서 샘플을 제조하기 전, 웰을 임의의 비특이적 결합을 차단하기 위해 희석제로 덮고, 플레이트를 밀봉하고, 밤새 4℃에서 인큐베이션하였다.
- [0421] 검정 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하고, 마지막 세척 후 세척 완충액을 웰로부터 완전히 흡인하였다. 세척 후, 300 μ l 희석액을 검정 플레이트(들)의 각각의 웰에 첨가하여 비특이적 결합을 차단하고, 플레이트를 실온에서 적어도 2시간 인큐베이션하였다. 혈청 샘플을 적절한 시작 희석으로 셋업 플레이트에서 제조하였다. 때때로, 시작 희석을 또한 희석액을 이용하여 1.5 ml 튜브에서 제조하였다. 이용가능한 경우 이전 데이터를 기초로 하여 적절한 시작 희석을 결정하였다. 이전 데이터가 이용가능하지 않은 경우, 가장 낮은 시작 희석은 1:40이었다. 희석된 후, 혈청 샘플의 시작 희석액의 200 μ l를 셋업 플레이트의 적절한 웰로 옮겼다.
- [0422] 예시적 셋업 플레이트 설계는 다음과 같이 기재된다: 2열 및 11열은 1 μ g/ml(1:4000 희석)으로 희석된 항-오브알부민 단일클론 IgG2b 아이소형(AbCam, ab17291) 표준을 함유하였다. 3열 내지 10열은 혈청 샘플(적절한 희석액)을 함유하였다. 1열 및 12열은 모서리 효과(edge effect)로 인한 측정의 임의의 편향을 피하기 위해 샘플 또는 표준에 대해 사용하지 않았다. 대신, 1열 및 12열은 200 μ l 희석액을 함유하였다. 1:40로 희석된 정상 마우스 혈청을 음성 대조군으로 사용하였다. 0.5mg/ml 스톡(BD Bioscience)으로부터 1:500으로 희석된 항-마우스 IgG2a를 아이소형 대조군으로 사용하였다.
- [0423] 모든 샘플이 셋업 플레이트에서 제조된 후, 플레이트를 밀봉하고, 검정 플레이트의 차단이 완료될때까지 4℃에서 저장하였다. 검정 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하고, 세척 완충액을 마지막 세척 후에 완전히 흡인하였다. 세척 후, 100 μ l의 희석액을 검정 플레이트의 B행 내지 H행에 모든 웰에 첨가하였다. 12-채널 피펫을 셋업 플레이트로부터 검정 플레이트로 샘플을 전달하기 위해 사용하였다. 위아래로 3회 150 μ l의 희석된 혈청을 피펫팅함으로써 전달 전에 샘플을 혼합하였다. 혼합 후, 150 μ l의 각각의 샘플을 셋업 플레이트로부터 전달하고, 각각의 검정 플레이트의 A행에 첨가하였다.
- [0424] 각각의 샘플의 시작 희석액을 셋업 플레이트로부터 검정 플레이트의 A행으로 전달한 후, 연속 희석액을 다음과 같이 검정 플레이트에서 피펫팅하였다: 50 μ l의 각각의 혈청 샘플을 12-채널 피펫을 이용하여 A행으로부터 제거하고, B행의 각각의 웰에 이전에 첨가된 100 μ l의 희석액과 혼합하였다. 이러한 단계를 전체 플레이트 아래에서 반복하였다. 최종 행의 희석액을 피펫팅한 후, 50 μ l의 유체를 최종 행 내의 웰로부터 제거하고, 폐기하여, 검정 플레이트의 각각의 웰에서 100 μ l의 최종 부피를 생성시켰다. 샘플 희석액을 검정 플레이트에서 제조한 후, 플레이트를 적어도 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다.
- [0425] 인큐베이션 후, 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 검출 항체(염소 항-마우스 항-IgG, HRP 컨쥬게이션됨, AbCam ab98717)를 희석액에서 1:1500(0.33 μ g/ml)로 희석하고, 100 μ l의 희석된 항체를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세척 완충액으로 3회 세척하였으며, 각각의 세척 단계는 적어도 30초의 적실 시간을 포함한다.
- [0426] 세척 후, 검출 기질을 웰에 첨가하였다. 동등부의 기질 A 및 기질 B(BD Biosciences TMB Substrate Reagent Set, catalog #555214)를 검정 플레이트로의 첨가 직전에 조합하였고, 100 μ l의 혼합된 기질 용액을 각각의 웰에 첨가하였고, 어두운 곳에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 10분의 기간 후 각각의 웰에 50 μ l의 중지 용액(2N H2SO4)을 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 웰의 광학 밀도(OD)를 570nm에서의 공제와 함께 450nm에서 플레이트 판독기 상에 중지 용액을 첨가한 직후에 평가하였다. 데이터 분석을 Molecular Device의 소프트웨어 SoftMax Pro v5.4를 이용하여 수행하였다. 일부 경우에, 4-파라미터 산정 곡선-적합 그래프를 x-축(log 스케일) 상의 희석 및 y-축(선형 스케일) 상의 OD 값을 이용하여 제조하였고, 각각의 샘플에 대한 최대 절반 값(EC50)을 결정하

였다. 배치 상단의 플레이트 주형을 조정하여 각각의 샘플의 희석을 반영시켰다(열 당 1).

[0427] **OVA+ 분열하는 B 세포 %의 결정**

[0428] 오브알부민 + B-세포 분열을 유세포측정법에 의해 평가하였다. 실험 동물로부터의 비장세포를 장기간 세포 표지에 적합한 티올-반응성 형광 프로브인 Cell Tracker Orange(CTO)로 염색하고, 3일 동안 오브알부민 단백질 또는 펩티드와 함께 37C, 5% CO₂에서 완전 배지 중에서 배양하였다. 3일에, 세포를 세척하고, 항-CD16/32 항체로 차단한 후, B220 및 CD19에 특이적인 컨쥬게이션된 항체로 염색하였다. Alexa 647 컨쥬게이션된 오브알부민 단백질을 또한 세포와 함께 인큐베이션하여, 오브알부민 특이적 BCR을 표시하였다. CD19+ B220+ OVA-Alexa647+였던 상기 비장세포를 차별적 CTO 염색을 비교함으로써 증식에 대해 평가하였다. CTO 저(low)였던 것을 증식하는 오브알부민+ B-세포로 표시하였고, CTO 고(high) 오브알부민+ B-세포와 비교하여 백분율을 정량하였다.

[0429] **결과**

[0430] 도 6은 ova 펩티드 및 면역억제제 라파마이신을 포함하는 합성 나노운반체의 투여에 의한 항원 특이적 IgG 수준의 감소를 나타낸다. 도 7은 또한 합성 나노운반체에 의한 항원 특이적 B 세포의 수의 감소를 나타낸다. 이들 결과는 합성 나노운반체에 의한 원치 않는 면역 반응의 감소가 ova 펩티드(MHC 클래스 II 제한 에피토프를 포함) 및 면역억제제에 결합된다는 것을 입증한다. 이 결과는 항원 특이적 B 세포가 이점을 제공하는 경우 적절하다.

[0431] **실시예 16: 알리지 천식에 대한 항원 및 면역억제제를 갖는 나노운반체의 효과 평가**

[0432] **나노운반체**

[0433] 나노운반체를 상기 제공된 방법(실시예 15)에 따라 제조하였다.

[0434] **면역화**

[0435] 나노운반체를 해동하고, 평형화시켰다. 최초 희석액을 10× 스톱 용액으로 구성하고, OVA₃₂₃₋₃₃₉ 중에 100μg/ml의 농도, 또는 1× 용액으로 추가로 희석시켰다. 이러한 1× 용액을 정맥내 주사 당 200μl로 주사에 사용하였다. 동물을 OVA 단백질(OVA)로 면역화시키고, OVA₃₂₃₋₃₃₉ 펩티드로 처리하여, B 세포 항원의 부재하에서 면역 반응을 조절하는 나노운반체의 능력을 평가하였다. 면역화 경로는 다음과 같았다: 각각의 Balb/C 면역학적 나이브 암컷 마우스 당 400μl 중 10μg의 OVA+ 4mg의 백반(Alum) 복강내. 실험군은 각각 5 마리의 동물로 구성되었다. 비장 세포를 CFSE 또는 CTO를 이용하여 항원으로 재자극하여, Ag-특이적 증식의 양을 결정하였다.

[0436] **특정 유형의 면역 세포의 수준**

[0437] FCS 파일을 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 7AAD 양성 세포(사멸된 세포를 표시하는 핵 염료) 양성 세포를 배제시켰고, CD4, CD8, Gr-1, F4/80, B220, TCRb 및 CD11b의 발현에 좌우되는 세포 형태를 정량하였다.

[0438] T-세포 서브셋에 대한 게이팅(gating) 전략 → 7AAD- F4/80- GR-1- TCRb+ CD4+/- CD8+/-

[0439] B-세포 서브셋에 대한 게이팅 전략 → 7AAD- B220+ TCRb-

[0440] 호산구에 대한 게이팅 전략 → 7AAD- F4/80- Gr-1+ TCRb- CD11b+ Gr-1+

[0441] **분열하는 CD4+ T 세포 %의 결정**

[0442] 오브알부민 반응성 CD4⁺ T 세포의 빈도를 유세포측정법에 의해 계산하였다. 실험 동물로부터의 비장세포를 장기간 세포 표지에 적합한 티올-반응성 형광 프로브인 CFSE로 염색하고, 3일 동안 오브알부민 단백질과 함께 37C, 5% CO₂에서 완전 배지에서 배양하였다. 3일에, 세포를 세척하고, 항-CD16/32 항체로 차단한 후, TCR CD4 및 CD8a에 특이적인 컨쥬게이션된 항체로 염색하였다. TCR+CD4 또는 TCR+CD8a+였던 비장세포를 차별적 CFSE 염색을 비교함으로써 증식에 대해 평가하였다.

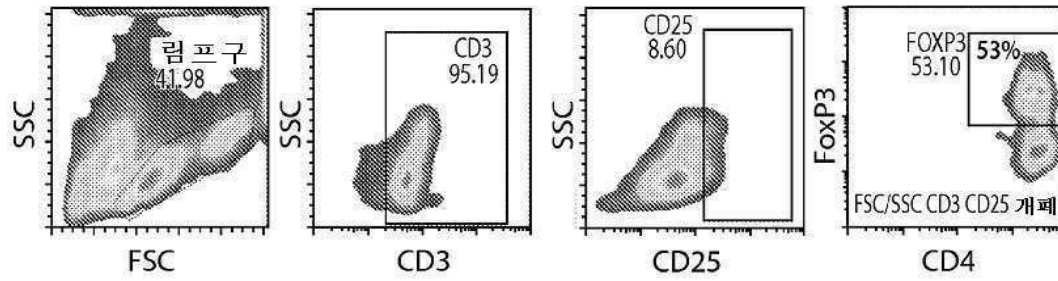
[0443] **결과**

[0444] 도 8 및 9는 동물 모델에서의 나노운반체의 효과를 나타낸다. 특히, 도 8은 OVA₃₂₃₋₃₃₉(MHC 클래스 II-제한 에피토프) 및 면역억제제를 포함하는 합성 나노운반체로 처리된 동물 대상체로부터의 세척 샘플 내의 CD4+ T 세포의 수에서의 감소를 나타낸다. 도 9는 동일 처리의 결과로서 분열하는 CD4+ T 세포의 백분율에서의 감소를 나타낸

다.

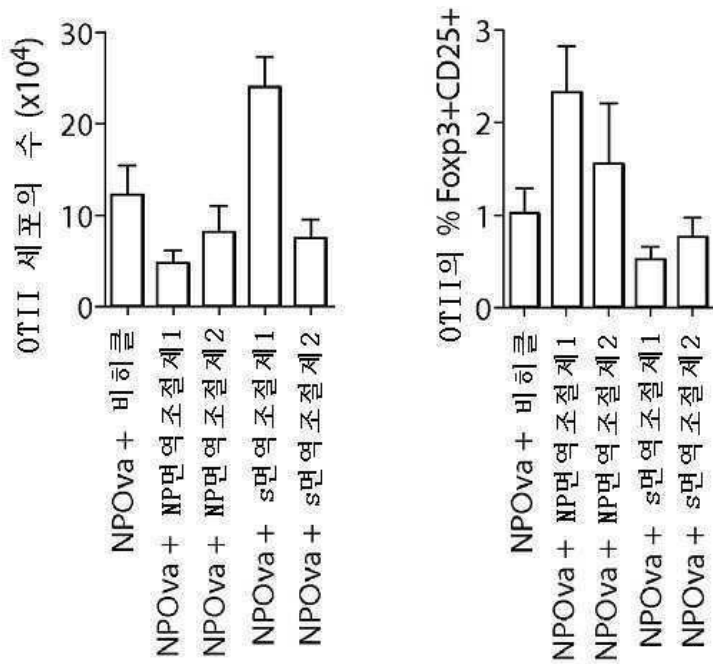
도면

도면1

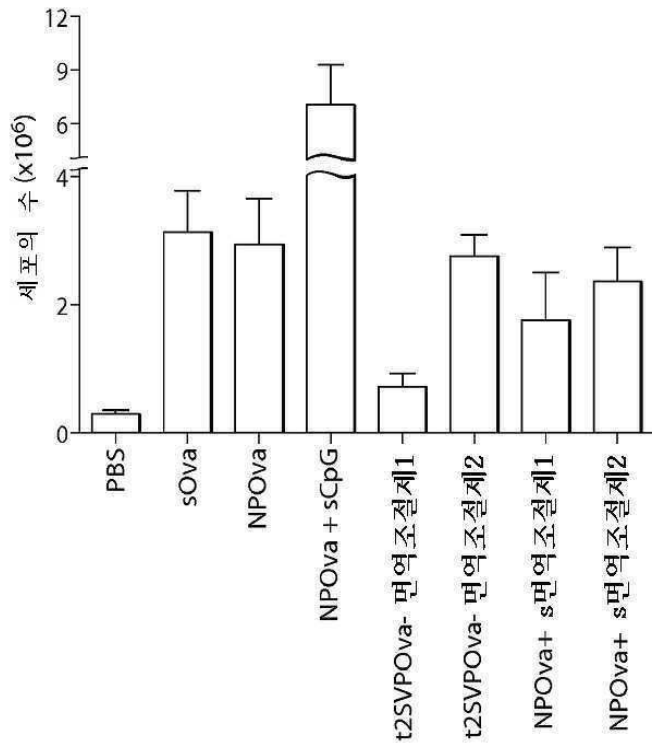


도면2

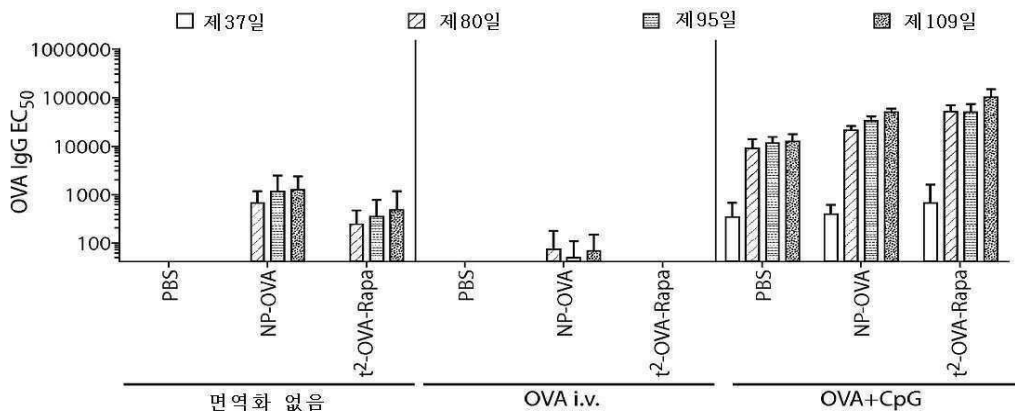
1회 주사 후 tsSVP의 생체내 효과



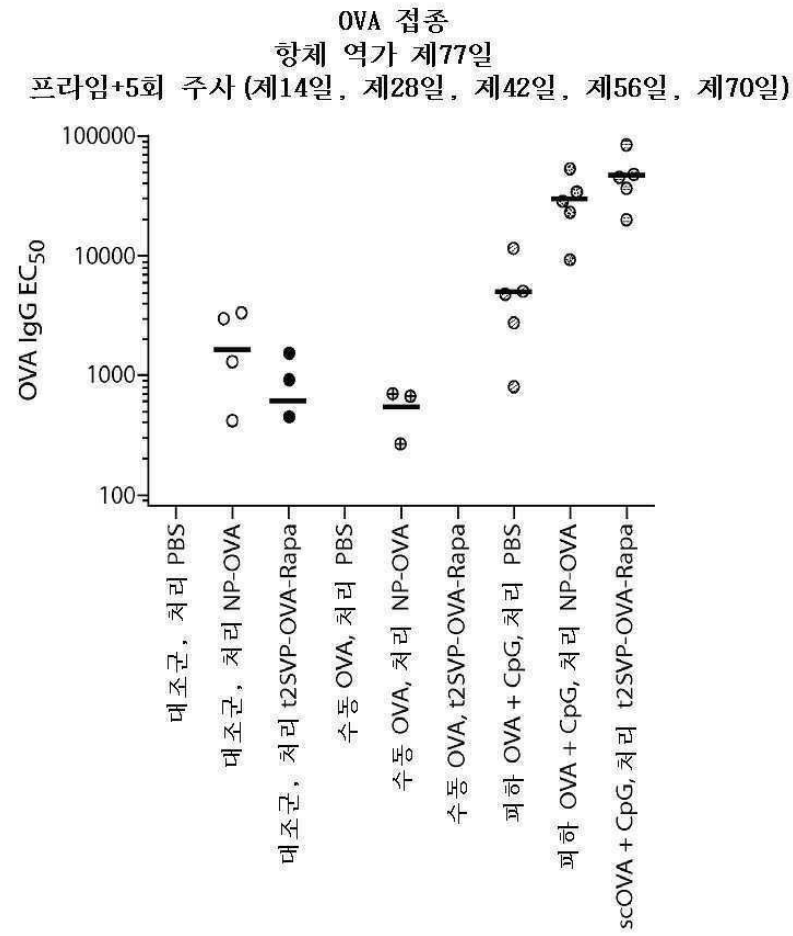
도면3



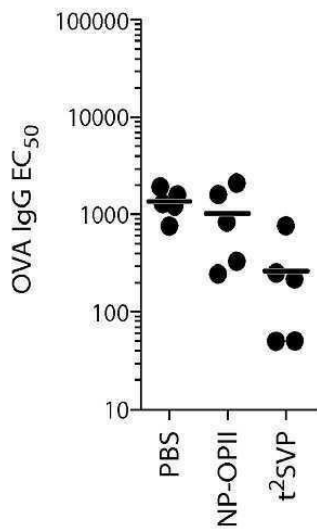
도면4



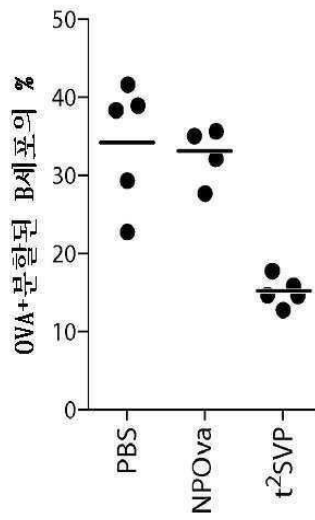
도면5



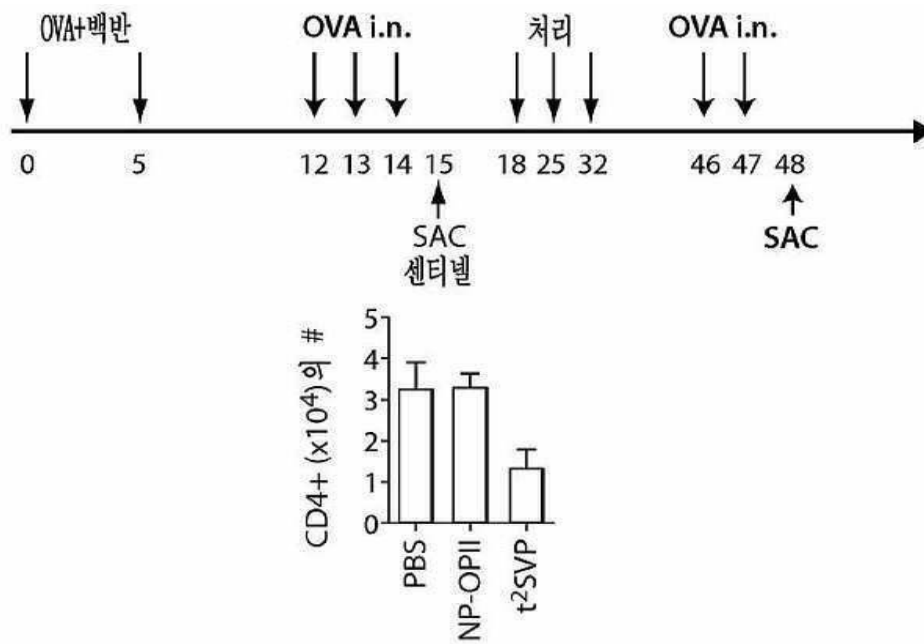
도면6



도면7



도면8



도면9

