



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0045344
(43) 공개일자 2017년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/436 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/436 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7009109
(22) 출원일자(국제) 2015년09월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년04월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/048768
(87) 국제공개번호 WO 2016/037162
국제공개일자 2016년03월10일
(30) 우선권주장
62/047,051 2014년09월07일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
셀렉타 바이오사이언시즈, 인크.
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 빌딩 원 아스
날 스트리트 480
(72) 발명자
기시모토, 다카시, 케이
미국 02420 매사추세츠주 렉싱턴 쿨리지 애비뉴
46
(74) 대리인
양영준, 김영

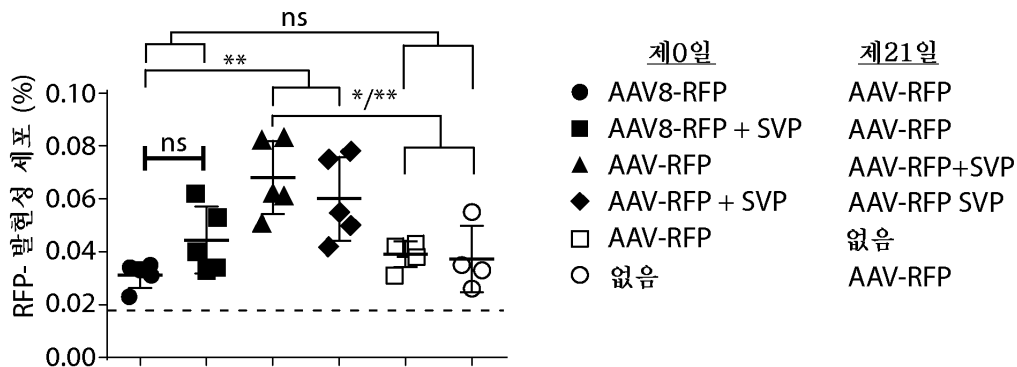
전체 청구항 수 : 총 117 항

(54) 발명의 명칭 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응을 약화시키기 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본원에는 바이러스 전달 벡터 및 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 투여하기 위한 방법 및 관련 조성물이 제공된다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61K 38/4846 (2013.01)
A61K 39/001 (2013.01)
A61K 47/482 (2013.01)
A61K 47/48861 (2013.01)
A61K 47/48884 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 9/5115 (2013.01)
A61K 9/5153 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/047,054	2014년09월07일	미국(US)
62/047,034	2014년09월07일	미국(US)
62/047,044	2014년09월07일	미국(US)
62/051,267	2014년09월16일	미국(US)
62/051,263	2014년09월16일	미국(US)
62/051,255	2014년09월16일	미국(US)
62/051,258	2014년09월16일	미국(US)
62/101,841	2015년01월09일	미국(US)
62/101,861	2015년01월09일	미국(US)
62/101,882	2015년01월09일	미국(US)
62/101,872	2015년01월09일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 동반 투여함으로써, 이러한 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 확립시키는 단계를 포함하며, 상기 대상체가 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 가지고 있지 않은 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응이 바이러스 전달 벡터에 대한 T 세포 반응이고; 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여에 앞서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 수반하지 않으면서 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여가 반복되는 (항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여) 방법.

청구항 4

항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 동반 투여함으로써 이러한 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 확립시키는 단계; 및

상기 대상체에게 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응이 바이러스 전달 벡터에 대한 T 세포 반응이고; 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여와 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량의 투여 둘 다에 앞서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 수반하지 않으면서 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 단독으로 또는 바이러스 전달 벡터와 조합하여 제공하거나 또는 수득하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 수반하지 않으면서 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 먼저 투여한 다음, 연속해서 이러한 대상체에게 바이러스 전달 벡터와 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 동반하여 투여함으로써, T 세포 반응인 항-바이러스 전달 벡터 반응을 약화시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 바이러스 전달 벡터와 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 대상체에게 동반 투여한 다음에, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하기에 앞서, 이러한 대상체에게서 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역 수준을 결정하는 단계;

상기 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 동반하여 투여하는 단계; 및
이 대상체에게 바이러스 전달 벡터의 특정 용량을 투여하는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 결정 단계가, 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하기에 앞서, 이러한 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 항체의 수준을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 결정 단계가 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하기에 앞서, 이러한 대상체에게서 바이러스 전달 벡터에 대한 T 세포 반응의 수준을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량을 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 기존의 면역 수준이 바이러스 전달 벡터의 바이러스 항원에 대한 것인 방법.

청구항 14

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 기존의 면역 수준이 바이러스 전달 벡터의 단백질 트랜스진 발현 생성물의 항원에 대한 것인 방법.

청구항 15

대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 반복해서 동반 투여함으로써, 이러한 대상체에게서 바이러스 전달 벡터의 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 대상체에게서 트랜스진 발현을 증가시켜 주는, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 반복된 동반 투여의 빈도 및 투여량을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 반복해서 동반 투여하는 단계; 및
바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 용량을, 바이러스 전달 벡터의 반복 투여로 인해 상기 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응이 발생할 것으로 예상되는 경우에 이러한 대상체에 대해 선택되었던 바이러스 전달 벡터의 용량보다 더 적게 선택하는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 18

제3항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 반복 용량(들) 중의 바이러스 전달 벡터의 양이, 이전 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양과 적어도 동등한 방법.

청구항 19

제3항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 반복 용량(들) 중의 바이러스 전달 벡터의 양이, 이전 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양보다 적은 방법.

청구항 20

제3항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 또한, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량과 동반하여 대상체에게 투여되는 방법.

청구항 21

제3항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 또한, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량 중 적어도 하나와 동반하여 대상체에게 투여되지 않는 방법.

청구항 22

제4항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 바이러스 전달 벡터에 대항한 기존의 면역을 가지고 있지 않은 것인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 동반 투여가 동시 투여인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게서 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 25

항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 동반 투여하면 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응이 초래된다는 것을 특정 실체에게 통고함으로써, 이러한 실체가 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 단독으로 또는 바이러스 전달 벡터와 조합하여 구입하거나 또는 수득하도록 유도시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 26

효과적인 반복된 바이러스 전달 벡터 투여는 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 동반 투여함으로써 가능하다는 것을 특정 실체에게 통고함으로써, 이러한 실체가 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 단독으로 또는 바이러스 전달 벡터와 조합하여 구입하거나 또는 수득하도록 유도시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 대상체가 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 가지고 있지 않은 것인 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 동반 투여가 동시 투여인 방법.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 통고하는 것이, 본원에 기재된 방법 중 어느 하나를 실시하기 위한 지침을 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 또는 바이러스 전달 벡터 또는 둘 다를 특정 실체에게 분배하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 생성시키기 위해 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이

러스 전달 벡터의 동반 투여의 빈도 및 투여량을 결정하는 단계; 및

결정된 빈도 및 투여량에 따라서 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여를 지시하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 32

대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 생성시키기 위해 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량과 조합하여 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여의 빈도 및 투여량을 결정하는 단계; 및

결정된 빈도 및 투여량에 따라서 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여와 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량의 투여 둘 다를 지시하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 적어도 하나의 반복 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양이, 이전 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양과 적어도 동등한 방법.

청구항 34

제32항에 있어서, 적어도 하나의 반복 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양이, 이전 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양보다 적은 방법.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 또한, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량과 동반하여 대상체에게 투여되는 방법.

청구항 36

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 또한, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량 중 적어도 하나와 동반하여 대상체에게 투여되지 않는 방법.

청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여와 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량의 투여 둘 다에 앞서, 이러한 대상체에게 바이러스 전달 벡터의 특정 용량을 투여하는 것을 지시하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 38

제31항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 바이러스 전달 벡터에 대항한 기존의 면역을 가지고 있지 않은 것인 방법.

청구항 39

제31항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 동반 투여가 동시 투여인 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가, 바이러스 전달 벡터를 이전에 투여한 적이 없었던 대상체인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 레트로바이러스 전달 벡터, 아데노바이러스 전달 벡터, 렌티바이러스 전달 벡터 또는 아데노 관련 바이러스 전달 벡터인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 아데노바이러스 전달 벡터이고, 이러한 아데노바이러스 전달 벡터가 서브그룹 A, 서브그룹 B, 서브그룹 C, 서브그룹 D, 서브그룹 E, 또는 서브그룹 F 아데노바이러스 전달 벡터인 방법.

청구항 43

제41항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 렌티바이러스 전달 벡터이고, 이러한 렌티바이러스 전달 벡터가 HIV, SIV, FIV, EIAV 또는 양(ovine) 렌티바이러스 벡터인 방법.

청구항 44

제41항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 아데노 관련 바이러스 전달 벡터이고, 이러한 아데노 관련 바이러스 전달 벡터가 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 또는 AAV11 아데노 관련 바이러스 전달 벡터인 방법.

청구항 45

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 전달 벡터가 키메라 바이러스 전달 벡터인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 키메라 바이러스 전달 벡터가 AAV-아데노바이러스 전달 벡터인 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진이 유전자 요법 트랜스진, 유전자 편집 트랜스진, 엑손 스킵핑 트랜스진 또는 유전자 발현 조정성 트랜스진을 포함하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 트랜스진이 유전자 요법 트랜스진인 경우, 이러한 유전자 요법 트랜스진이 치료용 단백질을 코딩하는 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 치료용 단백질이 주입 가능하거나 또는 주사 가능한 치료용 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고 인자, 시토킨, 인터페론 또는 성장 인자인 방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 치료용 단백질이 지질 및 스펅고지질 분해의 장애, 뮤코폴리사카라이드 분해의 장애, 당단백질 분해의 장애, 리소좀 축적 장애 또는 백질디스트로피와 연관된 단백질인 방법.

청구항 51

제47항에 있어서, 트랜스진이 유전자 편집 트랜스진인 경우, 이러한 유전자 편집 트랜스진이 엔도뉴클레아제를 코딩하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 엔도뉴클레아제가 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복서열(들) (CRISPR) 엔도뉴클레아제 또는 귀소 엔도뉴클레아제인 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 엔도뉴클레아제가 클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복서열(들) (CRISPR) 엔도뉴클레아제이고, 이러한 클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복서열(들) (CRISPR) 엔도뉴

클레아제가 Cas9 엔도뉴클레아제인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, Cas9 엔도뉴클레아제가 야생형 Cas9 엔도뉴클레아제인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, Cas9 엔도뉴클레아제가 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) (유형 II) 또는 에스. 테르모필루스 (*S. thermophilus*)의 것인 방법.

청구항 56

제53항에 있어서, Cas9 엔도뉴클레아제가 Cas9 엔도뉴클레아제 변이체인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, Cas9 변이체가 야생형 Cas9와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, Cas9 변이체가 적어도 95% 동일성을 갖는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, Cas9 변이체가 적어도 99% 동일성을 갖는 방법.

청구항 60

제56항에 있어서, Cas9 변이체가 Cas9 이량체, Cas9 융합 단백질, Cas9 단편, 최소화된 Cas9 단백질, 절단 도메인을 수반하지 않은 Cas9 변이체, gRNA 도메인을 수반하지 않은 Cas9 변이체 또는 Cas9-재조합효소 융합물인 방법.

청구항 61

제56항에 있어서, Cas9 변이체가 fCas9 또는 FokI-dCas9인 방법.

청구항 62

제47항에 있어서, 트랜스진이 유전자 편집 트랜스진인 경우, 이러한 유전자 편집 트랜스진이 가이드 RNA를 코딩하는 방법.

청구항 63

제47항에 있어서, 트랜스진이 유전자 발현 조정성 트랜스진인 경우, 이러한 유전자 발현 조정성 트랜스진이 DNA-결합성 단백질 또는 치료용 RNA를 코딩하는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, DNA-결합성 단백질이 인공 전사 인자인 방법.

청구항 65

제63항에 있어서, 치료용 RNA가 mRNA 번역의 억제제, RNA 간섭 (RNAi)의 작용제, 촉매적 활성 RNA 분자 (리보자임), 전이 RNA (tRNA), 또는 단백질 또는 다른 분자 리간드와 결합하는 RNA (애타머)인 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, RNAi의 작용제가 이중 가닥 RNA, 단일 가닥 RNA, 마이크로 RNA, 짧은 간섭 RNA, 짧은 헤어핀 RNA 또는 삼중체-형성 올리고뉴클레오타이드인 방법.

청구항 67

제47항에 있어서, 트랜스진이 엑손 스킵핑 트랜스진인 경우, 이러한 엑손 스킵핑 트랜스진이 안티센스 올리고뉴클레오티드를 코딩하는 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 snRNA인 방법.

청구항 69

제67항 또는 제68항에 있어서, 대상체에게 디스트로피(dystrophy)가 있는 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 대상체에게 근디스트로피가 있는 방법.

청구항 71

제67항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오티드가 디스트로핀과 결합되는 방법.

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 적혈구-결합성 치료제를 포함하는 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 적혈구-결합성 치료제가 ERY1, ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141 및 ERY162를 포함하는 방법.

청구항 74

제72항 또는 제73항에 있어서, 적혈구-결합성 치료제가 바이러스 전달 벡터 항원을 추가로 포함하는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 바이러스 전달 벡터 항원이 바이러스 항원인 방법.

청구항 76

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 음 전하를 띤 입자를 포함하는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 음 전하를 띤 입자가 폴리스티렌, PLGA, 또는 다이아몬드 입자인 방법.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서, 입자의 제타 전위가 음성인 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, 입자의 제타 전위가 -50 mV 미만인 방법.

청구항 80

제78항에 있어서, 입자의 제타 전위가 -100 mV 미만인 방법.

청구항 81

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 아포토시스 소체 모방체 및 하나 이상의 바이러스 전달 벡터 항원을 포함하는 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 아포토시스 소체 모방체가 하나 이상의 바이러스 전달 벡터 항원, 및 임의로 하나 이상의 아포토시스 시그널링 분자를 포함하는 입자인 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 하나 이상의 바이러스 전달 벡터 항원이 하나 이상의 바이러스 항원을 포함하는 방법.

청구항 84

제82항 또는 제83항에 있어서, 입자가 폴리글리콜산 중합체 (PGA), 폴리락트산 중합체 (PLA), 폴리세박산 중합체 (PSA), 폴리(락트산-코-글리콜산) 공중합체 (PLGA), 폴리(락트산-코-세박산) 공중합체 (PLSA), 폴리(글리콜산-코-세박산) 공중합체 (PGSA), 폴리락티드 코-글리콜리드 (PLG), 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하는 방법.

청구항 85

제76항 내지 제80항 및 제82항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 입자의 평균 직경이 0.1 내지 5 μm , 0.1 내지 4 μm , 0.1 내지 3 μm , 0.1 내지 2 μm , 0.1 내지 1 μm 또는 0.1 내지 500 nm인 방법.

청구항 86

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 포함하는 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 합성 나노담체가 바이러스 전달 벡터 항원을 추가로 포함하는 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 바이러스 전달 벡터 항원이 바이러스 항원인 방법.

청구항 89

제86항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제 및/또는 항원이 존재한다면, 이것이 합성 나노담체 내에 피막화되는 방법.

청구항 90

제86항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체가 지질 나노입자, 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제 기반 에멀션, 덴드리머, 버키볼, 나노 와이어, 바이러스-유사 입자, 또는 펩티드 또는 단백질 입자를 포함하는 방법.

청구항 91

제90항에 있어서, 합성 나노담체가 중합체성 나노입자를 포함하는 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 중합체성 나노입자가 비-메톡시-말단화된, 플루로닉 중합체인 중합체를 포함하는 방법.

청구항 93

제91항 또는 제92항에 있어서, 중합체성 나노입자가 폴리에스테르, 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 폴리사카라이드, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함하는 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 폴리에스테르가 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프롤락톤을 포함하는 방법.

청구항 95

제93항 또는 제94항에 있어서, 중합체성 나노입자가 폴리에스테르 및 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함하는 방법.

청구항 96

제93항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리에테르가 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함하는 방법.

청구항 97

제86항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체의 특정 집단의 동적 광산란을 이용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균이 110 nm 초과인 직경인 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 직경이 150 nm 초과인 방법.

청구항 99

제98항에 있어서, 직경이 200 nm 초과인 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 직경이 250 nm 초과인 방법.

청구항 101

제97항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 직경이 5 μm 미만인 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 직경이 4 μm 미만인 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 직경이 3 μm 미만인 방법.

청구항 104

제103항에 있어서, 직경이 2 μm 미만인 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 직경이 1 μm 미만인 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 직경이 500 nm 미만인 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 직경이 450 nm 미만인 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 직경이 400 nm 미만인 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 직경이 350 nm 미만인 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 직경이 300 nm 미만인 방법.

청구항 111

제86항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체에 포함된 면역억제제의 부하가, 합성 나노담체 전반에 걸쳐 평균적으로 0.1% 내지 50% (중량/중량)인 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 부하가 0.1% 내지 25%인 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, 부하가 1% 내지 25%인 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, 부하가 2% 내지 25%인 방법.

청구항 115

제86항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 NF- κ β 경로의 억제제인 방법.

청구항 116

제86항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 라파마이신인 방법.

청구항 117

제86항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체의 특정 집단의 중량비가 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 초과인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 하에, 2014년 9월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 62/047,034; 2014년 9월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 62/051,255; 2015년 1월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 62/101,841; 2014년 9월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 62/047,044; 2014년 9월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 62/051,258; 2015년 1월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 62/101,861; 2014년 9월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 62/047,054; 2014년 9월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 62/051,263; 2015년 1월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 62/101,872; 2014년 9월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 62/047,051; 2014년 9월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 62/051,267; 및 2015년 1월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 62/101,882를 우선권 주장하며; 이들 가출원 각각의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명은 바이러스 전달 벡터 및 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 투여하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

발명의 내용

[0004] 본원에는 바이러스 전달 벡터 및 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 투여하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 이러한 바이러스 전달 벡터는 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나에서 본원에 제공된 목적 중 어느 하나에 대한 치료 혜택을 가질 수 있는 단백질, 펩티드 또는 핵산을 코딩하는 트랜스진(transgene)을 포함한다.

- [0005] 한 측면에는, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 동반 투여함으로써, 이러한 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 확립시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 대상체는 바이러스 전달 벡터에 대항한 기존의 면역을 가지고 있지 않다.
- [0006] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응은 바이러스 전달 벡터에 대항한 T 세포 반응이고, 상기 방법은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여에 앞서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 수반하지 않으면서 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0007] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여를 반복한다 (항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여).
- [0008] 또 다른 측면에는, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 동반 투여함으로써 이러한 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 확립시키는 단계; 및 상기 대상체에게 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0009] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응은 바이러스 전달 벡터에 대항한 T 세포 반응이고, 상기 방법은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여와 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량의 투여 둘 다에 앞서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 수반하지 않으면서 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0010] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 단독으로 또는 바이러스 전달 벡터와 조합하여 제공하거나 또는 수득하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0011] 또 다른 측면에는, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 수반하지 않으면서 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 먼저 투여한 다음, 연속해서 이러한 대상체에게 바이러스 전달 벡터와 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 동반하여 투여함으로써, 항-바이러스 전달 벡터 반응 (여기서, 항-바이러스 전달 벡터 반응은 T 세포 반응이다)을 약화시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0012] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 바이러스 전달 벡터와 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 대상체에게 동반 투여한 다음에, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0013] 또 다른 측면에는, 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하기에 앞서, 이러한 대상체에게서 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역 수준을 결정하는 단계; 상기 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 동반하여 투여하는 단계; 및 이 대상체에게 바이러스 전달 벡터의 특정 용량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0014] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 결정 단계는 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하기에 앞서, 이러한 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 항체의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 결정 단계는 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하기에 앞서, 이러한 대상체에게서 바이러스 전달 벡터에 대항한 T 세포 반응의 수준을 측정하는 것을 포함한다.
- [0015] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량을 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0016] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역 수준은 바이러스 전달 벡터의 바이러스 항원에 대한 것이다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 기존의 면역 수준은 바이러스 전달 벡터의 단백질 트랜스진 발현 생성물의 항원에 대한 것이다.
- [0017] 또 다른 측면에는, 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 반복해서 동반 투여함으로써, 이러한 대상체에게서 바이러스 전달 벡터의 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0018] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게서 트랜스진 발현을 증가시켜 주는, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 반복된 동반 투여의 빈도 및 투여량을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0019] 또 다른 측면에는, 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 반복해서 동반 투여

하는 단계; 및 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 용량을, 바이러스 전달 벡터의 반복 투여로 인해 상기 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응이 발생할 것으로 예상되는 경우에 이러한 대상체에 대해 선택되었던 바이러스 전달 벡터의 용량보다 더 적게 선택하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

- [0020] 또 다른 측면에는, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 동반 투여하면 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응이 초래된다는 것을 특정 실체에게 통고함으로써, 이러한 실체가 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 단독으로 또는 바이러스 전달 벡터와 조합하여 구입하거나 또는 수득하도록 유도시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0021] 또 다른 측면에는, 효과적인 반복된 바이러스 전달 벡터 투여는 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 동반 투여함으로써 가능하다는 것을 특정 실체에게 통고함으로써, 이러한 실체가 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 단독으로 또는 바이러스 전달 벡터와 조합하여 구입하거나 또는 수득하도록 유도시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0022] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 통고하는 것은 본원에 기재된 방법 중 어느 하나를 실시하기 위한 지침, 또는 바이러스 전달 벡터를 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 동반 투여하는 것의 혜택을 설명하는 정보를 추가로 포함한다.
- [0023] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 또는 바이러스 전달 벡터 또는 둘 다를 특정 실체에게 분배하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0024] 또 다른 측면에는, 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 생성시키기 위해 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여의 빈도 및 투여량을 결정하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0025] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 결정된 빈도 및 투여량에 따라서 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여를 지시하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0026] 또 다른 측면에는, 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 생성시키기 위해 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량과 조합하여 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여의 빈도 및 투여량을 결정하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0027] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 결정된 빈도 및 투여량에 따라서 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여와 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량의 투여 둘 다를 지시하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0028] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여와 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량의 투여 둘 다에 앞서, 이러한 대상체에게 바이러스 전달 벡터의 특정 용량을 투여하는 것을 지시하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0029] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 전달 벡터를 이전에 투여한 적이 없었던 대상체이다.
- [0030] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 전달 벡터를 이전에 1회 이하 투여한 적이 있는 대상체이다.
- [0031] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 반복 용량(들) 중의 바이러스 전달 벡터의 양은 이전 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양과 적어도 동등하다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 반복 용량(들) 중의 바이러스 전달 벡터의 양은 이전 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양보다 적다.
- [0032] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 또한, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량과 동반하여 대상체에게 투여된다. 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 또한, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량 중 적어도 하나와 동반하여 대상체에게 투여되지 않는다.
- [0033] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 바이러스 전달 벡터에 대항한 기존의 면역을 가지고 있지 않다.
- [0034] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 동반 투여는 동시 투여이다.
- [0035] 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게서 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면

역 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

- [0036] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터는 레트로바이러스 전달 벡터, 아데노 바이러스 전달 벡터, 렌티바이러스 전달 벡터 또는 아데노 관련 바이러스 전달 벡터이다.
- [0037] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터는 아데노바이러스 전달 벡터이고, 이러한 아데노바이러스 전달 벡터는 서브그룹 A, 서브그룹 B, 서브그룹 C, 서브그룹 D, 서브그룹 E, 또는 서브그룹 F 아데노바이러스 전달 벡터이다.
- [0038] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터는 렌티바이러스 전달 벡터이고, 이러한 렌티바이러스 전달 벡터는 HIV, SIV, FIV, EIAV 또는 양(ovine) 렌티바이러스 벡터이다.
- [0039] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터는 아데노 관련 바이러스 전달 벡터이고, 이러한 아데노 관련 바이러스 전달 벡터는 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 또는 AAV11 아데노 관련 바이러스 전달 벡터이다.
- [0040] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터는 키메라 바이러스 전달 벡터이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 이러한 키메라 바이러스 전달 벡터는 AAV-아데노바이러스 전달 벡터이다.
- [0041] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 유전자 요법 트랜스진, 유전자 편집 트랜스진, 엑손 스킵핑(exon skipping) 트랜스진 또는 유전자 발현 조정성 트랜스진을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 트랜스진이 유전자 요법 트랜스진인 경우, 이러한 유전자 요법 트랜스진은 치료용 단백질을 코딩한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료용 단백질은 주입 가능하거나 또는 주사 가능한 치료용 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고 인자, 시토킨, 인터페론 또는 성장 인자이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료용 단백질은 지질 및 스펅고지질 분해의 장애, 뮤코폴리사카라이드 분해의 장애, 당단백질 분해의 장애, 리소좀 축적 장애 또는 백질디스트로피와 연관된 단백질이다.
- [0042] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 트랜스진이 유전자 편집 트랜스진인 경우, 이러한 유전자 편집 트랜스진은 엔도뉴클레아제를 코딩한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터(effector) 뉴클레아제 (TALEN), 클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복서열(들) (CRISPR) 엔도뉴클레아제 또는 귀소 엔도뉴클레아제이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복서열(들) (CRISPR) 엔도뉴클레아제이고, 이러한 클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복서열(들) (CRISPR) 엔도뉴클레아제는 Cas9 엔도뉴클레아제이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 야생형 Cas9 엔도뉴클레아제이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) (유형 II) 또는 에스. 테르모필루스 (*S. thermophilus*)의 것이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 Cas9 엔도뉴클레아제 변이체이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, Cas9 변이체는 야생형 Cas9와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, Cas9 변이체는 적어도 95% 동일성을 갖는다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, Cas9 변이체는 적어도 99% 동일성을 갖는다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, Cas9 변이체는 Cas9 이량체, Cas9 융합 단백질, Cas9 단편, 최소화된 Cas9 단백질, 절단 도메인을 수반하지 않은 Cas9 변이체, gRNA 도메인을 수반하지 않은 Cas9 변이체 또는 Cas9-재조합효소 융합물이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, Cas9 변이체는 fCas9 또는 FokI-dCas9이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 트랜스진이 유전자 편집 트랜스진인 경우, 이러한 유전자 편집 트랜스진은 가이드 RNA를 코딩한다.
- [0043] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 트랜스진이 유전자 발현 조정성 트랜스진인 경우, 이러한 유전자 발현 조정성 트랜스진은 DNA-결합성 단백질 또는 치료용 RNA를 코딩한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, DNA-결합성 단백질은 인공 전사 인자이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 치료용 RNA는 mRNA 번역의 억제제, RNA 간섭 (RNAi)의 작용제, 촉매적 활성 RNA 분자 (리보자임), 전이 RNA (tRNA), 또는 단백질 또는 다른 분자 리간드와 결합하는 RNA (애포타머)이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, RNAi의 작용제는 이중 가닥 RNA, 단일 가닥 RNA, 마이크로 RNA, 짧은 간섭 RNA,

짧은 헤어핀 RNA 또는 삼중체-형성 올리고뉴클레오타이드이다.

- [0044] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 트랜스진이 엑손 스킵핑 트랜스진인 경우, 이러한 엑손 스킵핑 트랜스진은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 코딩한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 snRNA이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 디스트로피(dystrophy)가 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 대상체는 근디스트로피(muscular dystrophy)가 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 디스트로핀(dystrophin)과 결합된다.
- [0045] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 적혈구-결합성 치료제를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 적혈구-결합성 치료제는 ERY1, ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141 및 ERY162를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 적혈구-결합성 치료제는 바이러스 전달 벡터 항원을 추가로 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터 항원은 바이러스 항원이다.
- [0046] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 음 전하를 띤 입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 음 전하를 띤 입자는 폴리스티렌, PLGA, 또는 다이아몬드 입자이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 입자의 제타 전위는 음성이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 입자의 제타 전위는 -50 mV 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 입자의 제타 전위는 -100 mV 미만이다.
- [0047] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 아포토시스 소체(apoptotic-body) 모방체 및 하나 이상의 바이러스 전달 벡터 항원을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 아포토시스 소체 모방체는 하나 이상의 바이러스 전달 벡터 항원을 포함하는 입자이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 하나 이상의 바이러스 전달 벡터 항원은 하나 이상의 바이러스 항원을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 입자는 또한, 아포토시스 시그널링 분자를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 입자는 폴리글리콜산 중합체 (PGA), 폴리락트산 중합체 (PLA), 폴리세박산 중합체 (PSA), 폴리(락트산-코-글리콜산) 공중합체 (PLGA), 폴리(락트산-코-세박산) 공중합체 (PLSA), 폴리(글리콜산-코-세박산) 공중합체 (PGSA), 폴리락티드 코-글리콜리드 (PLG), 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 입자의 평균 직경은 0.1 내지 5 μm , 0.1 내지 4 μm , 0.1 내지 3 μm , 0.1 내지 2 μm , 0.1 내지 1 μm 또는 0.1 내지 500 nm이다.
- [0048] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 이러한 합성 나노담체는 바이러스 전달 벡터 항원을 추가로 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터 항원은 바이러스 항원이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제 및/또는 항원이 존재한다면, 이는 합성 나노담체 내에 피막화된다.
- [0049] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 나노입자, 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제 기반 에멀션, 덴드리머, 버키볼(buckyball), 나노 와이어, 바이러스-유사 입자, 또는 펩티드 또는 단백질 입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체성 나노입자를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 비-메톡시-말단화된, 플루로닉 중합체인 중합체를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 폴리에스테르, 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리카르보네이트, 폴리아세탈, 폴리케탈, 폴리사카라이드, 폴리에틸옥사졸린 또는 폴리에틸렌이민을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 폴리에스테르는 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프롤락톤을 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 중합체성 나노입자는 폴리에스테르 및 폴리에테르에 부착된 폴리에스테르를 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 폴리에테르는 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함한다.
- [0050] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 특정 집단의 동적 광산란을 이용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균은 110 nm 초과인 직경이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 150 nm 초과이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 200 nm 초과이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 250 nm 초과이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 한

나의 한 실시양태에서, 직경은 5 μm 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 4 μm 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 3 μm 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 2 μm 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 1 μm 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 500 nm 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 450 nm 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 400 nm 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 350 nm 미만이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 300 nm 미만이다.

[0051] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체에 포함된 면역억제제의 부하는 합성 나노담체 전반에 걸쳐 평균적으로 0.1% 내지 50% (중량/중량)이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 부하는 0.1% 내지 25%이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 부하는 1% 내지 25%이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 부하는 2% 내지 25%이다.

[0052] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 NF- κ B 경로의 억제제이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제는 라파마이신이다.

[0053] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 특정 집단의 종횡비(aspect ratio)는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10 초과이다.

[0054] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 항-바이러스 전달 벡터 반응, 예컨대 항체, T 세포 또는 B 세포 반응을 약화시키거나, 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키거나 또는 항-바이러스 전달 벡터 반응을 확립시키는 프로토콜에 따라서 방법을 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 상기 방법은 항-바이러스 전달 벡터 반응, 예컨대 항체, T 세포 또는 B 세포 반응을 약화시키거나, 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키거나 또는 항-바이러스 전달 벡터 반응을 확립시키는 프로토콜을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0055] 제공된 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 바이러스 전달 벡터를 대상체에게 투여하기 전에, 투여하는 동안 또는 투여한 다음에, 바이러스 전달 벡터에 대항한 항체 면역 반응을 평가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0056] 또 다른 측면에는, 본 실시예 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 방법 또는 조성물이 제공된다.

[0057] 또 다른 측면에는, 상기 조성물 중 어느 하나가, 제공된 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한 것이다.

[0058] 또 다른 측면에는, 상기 방법 중 어느 하나가 본원에 기재된 질환 또는 장애 중 어느 하나를 치료하는 데 사용하기 위한 것이다. 또 다른 측면에는, 상기 방법 중 어느 하나가 항-바이러스 전달 벡터 반응을 약화시키거나, 약화된 항-바이러스 전달 벡터 반응을 확립시키거나, 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키거나 또는 바이러스 전달 벡터의 반복된 투여를 위해 사용하기 위한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 프라임 또는 부스트에서 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 AAV가 주사된 마우스의 간에서의 GFP 발현을 도시한 것이다. 현탁액 중의 모든 세포를 대상으로 하여, 첫 번째 '클린' 게이트에 의해 배제된 높은 부스리기 파편 (총 2 내지 3%, 콜라게나제 처리의 부산물)을 제외하고는 GFP 발현에 관하여 분석하였다. 나머지 세포 모두는 상대적 GFP 강도 (FL-1 채널)에 관하여 게이팅하였다. 제시된 숫자는 전체 모 집단의 GFP-양성 세포의 비율 (%)을 나타낸다.

도 2는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 부스트의 함수로서 AAV-주사된 마우스의 간에서의 GFP 발현을 도시한 것이다. 제시된 데이터는 도 1에서와 동일하지만, AAV 부스트가 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체와의 공동-투여를 이용하였는 지의 여부에 따라서 여러 군으로 나눈다 (군 5 및 6으로부터의 부스트되지 않은 샘플이 또한, 별도의 '슈퍼그룹'으로서 제시된다).

도 3은 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 AAV가 주사된 동물의 간에서의 GFP⁺ 세포 점유율을 명확하게 보여준 것이다. GFP-양성 세포 (도 1에 제시된 바와 같음)를 게이팅한 다음, 모 집단에서의 평균보다 10배 더 높은 평균 GFP 형광 세기를 갖는 집단을 다시 게이팅하였다. 제시된 숫자는 도 1에 도시된 바와 같은 모 GFP-양성 집단으로부터의 비율 (%)이다.

도 4는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체의 공동 투여를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 단일 AAV-GFP

접종한 후 제14일에 마우스를 출혈시켰고 그들의 혈청을 대상으로 하여 AAV에 대항한 항체에 관하여 검정한 실험으로부터의 결과를 도시한 것이다. 1:40 혈청 희석도에 대한 최고 OD가 모든 마우스에 대하여 제시된다. 배경 정상 마우스 혈청은 0.227의 OD를 나타내었다.

도 5는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체의 공동 투여 (정맥내)를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 단일 AAV-GFP 접종한 후 제14일, 제21일 및 제33일에 마우스를 출혈시켰고 그들의 혈청을 대상으로 하여 AAV에 대항한 항체에 관하여 검정한 실험으로부터의 결과를 도시한 것이다. 1:40 혈청 희석도에 대한 최고 OD가 모든 마우스에 대하여 제시된다. 배경 정상 마우스 혈청 활성이 제시된다. 통계적 유의성은 2-원 ANOVA를 이용하여 계산하였다.

도 6은 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체의 공동 투여 (정맥내)를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 제0일 및 제21일에 AAV-GFP를 마우스에게 하나의 주사 또는 둘 다의 주사로 주사한 다음, 제14일 및 제33일에 출혈시켰고 그들의 혈청을 대상으로 하여 AAV에 대항한 항체에 관하여 검정한 실험으로부터의 결과를 도시한 것이다. 1:40 혈청 희석도에 대한 최고 OD가 모든 마우스에 대하여 제시된다. 배경 정상 마우스 혈청 활성이 제시된다. 통계적 유의성은 2-원 ANOVA를 이용하여 계산하였다.

도 7은 제시된 개개의 마우스에 대한 관독치를 수반한, **도 6**에서와 동일한 데이터를 제공한다. 단지 부스트 면역화 (제21일)에서 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체로 처리된 군에서의 2마리 마우스는 제14일에 양성임에도 불구하고 제33일에 검출 가능한 항체를 나타내지 못하였다 (실선 화살표). 프라임에서 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체로 처리된 양 군에서 5마리 마우스 중 1마리가 제33일에 검출 가능한 항체 수준을 나타냈는데 (파선 화살표), 프라임과 부스트 둘 다에서 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체로 처리된 군으로부터의 마우스는 더 낮은 항체 수준을 나타내었다 (열린 다이아몬드).

도 8은 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체의 공동 투여를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 단일 AAV-GFP 접종한 후 제14일에 마우스를 출혈시켰고 그들의 혈청을 대상으로 하여 AAV에 대항한 항체에 관하여 검정한 실험으로부터의 결과를 도시한 것이다. 1:40 혈청 희석도에 대한 최고 OD가 모든 마우스에 대하여 제시된다. 배경 정상 마우스 혈청은 0.227의 OD를 나타내었다. N=군당 15마리 마우스.

도 9는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체의 공동 투여 (정맥내)를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 단일 AAV-GFP 접종한 후 제14일, 제21일 및 제33일에 마우스를 출혈시켰고 그들의 혈청을 대상으로 하여 AAV에 대항한 항체에 관하여 검정한 실험으로부터의 결과를 도시한 것이다. 1:40 혈청 희석도에 대한 최고 OD가 모든 마우스에 대하여 제시된다. 배경 정상 마우스 혈청 수준이 제시된다. 통계적 유의성은 2-원 ANOVA를 이용하여 계산하였다. N=제14일에는 군당 15마리 마우스이고, 제21일 및 제33일에는 군당 5마리 마우스이다.

도 10은 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체의 공동 투여 (정맥내)를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 제0일 및 제21일에 AAV8-GFP를, 마우스에게 표시된 바와 같이 하나의 주사 또는 둘 다의 주사로 주사한 다음, 제14일 및 제33일에 출혈시킨 실험으로부터의 결과를 도시한 것이다. 혈청을 대상으로 하여 AAV8에 대항한 항체에 관하여 ELISA에 의해 검정하였다. 1:40 혈청 희석도에 대한 OD가 모든 마우스에 대하여 제시된다. 정상 마우스 혈청의 배경 수준이 점선으로써 표시된다. 통계적 유의성은 2-원 ANOVA를 이용하여 계산하였다.

도 11은 프라임 또는 부스트에서 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 AAV가 주사된 마우스의 간에서의 GFP 발현을 도시한 것이다. 현탁액 중의 모든 세포를 대상으로 하여, 첫 번째 '클린' 게이트에 의해 배제된 높은 부스러기 파편 (총 2 내지 3%, 콜라게나제 처리의 부산물)을 제외하고는 GFP 발현에 관하여 분석하였다. 나머지 세포 모두는 상대적 GFP 강도 (FL-1 채널)에 관하여 게이팅하였다. 제시된 숫자는 전체 모 집단의 GFP-양성 세포의 비율 (%)을 나타낸다.

도 12는 프라임 및/또는 부스트에서 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 AAV가 주사된 마우스의 간에서의 RFP 발현을 도시한 것이다. 현탁액 중의 모든 세포를 대상으로 하여, 높은 부스러기 파편을 제외하고는 RFP 발현에 관하여 분석하였다. 제시된 숫자는 간 세포의 전체 모 집단의 RFP-양성 세포의 비율 (%)을 나타낸다.

도 13은 AAV-GFP를 단독으로 또는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체와 조합하여 면역시킨 마우스에서의 세포독성 활성을 도시한 것이다. 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 제0일 및 제21일에 동물에게 AAV8-GFP를 주사하였다 (정맥내). AAV 캡시드 단백질로부터의 우세한 세포독성 펩티드와 GFP 트랜스진의 조합으로 펄스된 표적 세포를 마지막 주사 후 7일 (제28일)에 투여하고, 18시간 후에 그들의 생존력을 측정한다. 이를 비-펩티드 펄스된 대조군 세포의 생존력과 비교하였다.

도 14는 AAV-GFP를 단독으로 또는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체와 조합하여 면역시킨 마우스에서의 AAV-특이적 IFN- γ 생성을 도시킨 것이다. NC를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 제0일 및 제17일에 동물에게 AAV-GFP를 주사하였다 (정맥내). 제25일에 비장세포를 단리하였고, 이를 7일 동안 AAV 캡시드 단백질로부터의 우세한 MHC 부류 I-결합성 펩티드와 함께 시험관 내에서 인큐베이션한 다음, 상기와 동일한 펩티드를 이용하여 ELISpot에 의해 검정하였다. 각 샘플을 이중으로 수행하였고, 공제된 배경과 함께 제시되었다.

도 15는 AAV-GFP를 단독으로 또는 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체와 조합하여 면역시킨 마우스에서의 GFP-특이적 IFN- γ 생성을 도시킨 것이다. 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 제0일 및 제17일에 동물에게 AAV8-GFP를 주사하였다 (정맥내). 비장세포를 단리하였고, 이를 7일 동안 GFP로부터의 MHC 부류 I-결합성 펩티드와 함께 시험관 내에서 인큐베이션한 다음, 상기와 동일한 펩티드를 이용하여 ELISpot에 의해 검정하였다. 각 샘플을 이중으로 수행하였고, 공제된 배경과 함께 제시되었다.

도 16은 특정 실험에 대한 설계를 도시킨 것이다.

도 17은 100 μ g의 라파마이신을 수반하는 합성 나노담체의 공동 투여를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 제0일에 rAAV2/8-루시페라제를 마우스에게 주사한 다음 (정맥내), 제14일에 AAV-hFIX를 정맥내 주사하면서 시험감염시킨 실험으로부터의 결과를 도시킨 것이다. 혈청을 표시된 바와 같은 각종 시점에 수집하고, AAV8에 대한 항체에 관하여 (왼쪽) 및 인간 인자 IX 단백질의 수준에 관하여 (오른쪽) 검정하였다.

도 18은 특정 실험에 대한 실험 설계를 도시킨 것이다.

도 19는 수컷 C57BL/6 마우스에게, 제0일에 100 μ g의 라파마이신을 수반하는 합성 나노담체와 동반하여 rAAV2/8-루시페라제를 주사한 다음 (정맥내), 제21일에 100 μ g의 라파마이신을 수반하는 합성 나노담체와 동반하여 rAAV2/8-hFIX를 주사한 실험으로부터의 결과를 도시킨 것이다. 대조군 동물은 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 대신, 비어있는(empty) 나노담체를 이용하여 유사하게 처리하였다. 혈청을 표시된 바와 같은 각종 시점에 수집하고, AAV에 대한 항체에 관하여 (왼쪽) 및 인간 FIX 단백질의 수준에 관하여 (오른쪽) ELISA에 의해 검정하였다. 간에서의 AAV2/8-FIX 벡터 카피 수 (중간)를 PCR에 의해 결정하였다.

도 20은 특정 실험에 대한 실험 설계를 도시킨 것이다.

도 21은 제0일에 라파마이신을 수반하는 합성 나노담체를 rAAV2/8 벡터 (AAV2/8-Luc)와 동반하여 정맥내 투여하는 것이, 제21일에 투여된 AAV5 벡터 (AAV5-hFIX)에 대한 항체 반응에 심오한 영향을 끼치지 못하였다는 것을 보여준 결과를 제공한다. 이와는 대조적으로, 상기 결과는 또한, 제0일에 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체와 rAAV2/8-Luc로 동반 처리된 마우스가 제21일에 완전 프로인트 아주반트 (CFA) 중에서의 재조합 hFIX 단백질로의 면역화에 대해 강력한 반응을 나타냈다는 것을 보여주었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0060] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 특별히 예시된 물질 또는 공정 파라미터로 제한되지 않으며, 물론 변경될 수 있는 것으로 이해해야 한다. 본원에 사용된 용어는 단지 본 발명의 특별한 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 설명하기 위한 대체 용어의 사용을 제한하고자 하는 것이 아님을 이해해야 한다.
- [0061] 본원 전체에 인용된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 이와 같이 참조로 포함되는 것은, 본원에 인용된 통합된 공보, 특허 및 특허 출원 중 임의의 것이 선행 기술을 구성한다는 것을 인정하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0062] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같은, 단수 형태는 문맥상 달리 명백히 지시되지 않는 한 복수의 언급 대상을 포함한다. 예를 들어, "중합체"에 대한 언급은 2개 이상의 상기 분자의 혼합물 또는 상이한 분자량의 단일 중합체 종의 혼합물을 포함하고, "합성 나노담체"에 대한 언급은 2개 이상의 상기 합성 나노담체의 혼합물 또는 복수 개의 상기 합성 나노담체를 포함하며, "DNA 분자"에 대한 언급은 2개 이상의 상기 DNA 분자의 혼합물 또는 복수 개의 상기 DNA 분자를 포함하고, "면역억제제"에 대한 언급은 2개 이상의 상기 면역억제제 분자의 혼합물 또는 복수 개의 상기 면역억제제 분자를 포함한다.
- [0063] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "포함하다" 또는 그의 변형, 예컨대 "포함하는"은 임의의 나열된 정수 (예를 들어, 특정 특색, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 정수들 군 (예를 들어, 특색들, 요소들, 특징들, 특성들, 방법/공정 단계들 또는 제한들)을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수들 군을 배제하지 않는다는 것을 표시하는 것으로 판독되어야 한다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "포함하는"은 포괄적이

며 부가의 나열되지 않은 정수 또는 방법/공정 단계를 배제하지 않는다.

[0064] 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 임의의 것의 실시양태에서, "포함하는"은 "~로 본질적으로 이루어진" 또는 "~로 이루어진"으로 대체될 수 있다. "~로 본질적으로 이루어진"이라는 문구는 명시된 정수(들) 또는 단계뿐만 아니라 청구된 발명의 특징 또는 기능에 실질적으로 영향을 주지 않는 것을 요구하기 위해 본원에 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "~로 이루어진"은 나열된 정수 (예를 들어, 특정 특색, 요소, 특징, 특성, 방법/공정 단계 또는 제한) 또는 정수들 군 (예를 들어, 특색들, 요소들, 특징들, 특성들, 방법/공정 단계들 또는 제한들) 단독의 존재를 표시하기 위해 사용된다.

[0065] A. 도입

[0066] 항-바이러스 전달 벡터는 각종 적용, 예컨대 유전자 요법, 유전자 편집, 유전자 발현 조정 및 엑손 스킵핑을 위한 유망한 치료제이다. 따라서, 바이러스 전달 벡터는 치료용 단백질 또는 핵산을 코딩하는 트랜스진을 포함할 수 있다. 이의 예는 엔도뉴클레아제 및/또는 가이드 RNA, 마이크로RNA (miRNA), 작은 간섭 RNA (siRNA) 뿐만 아니라 메신저 RNA 내의 돌연변이 부위와 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 [예컨대, 작은 핵 RNA (snRNA)]를 포함한다. 불행하게도, 이러한 치료제의 장래성은 바이러스 전달 벡터에 대한 항체 반응 및 체액성 면역 반응으로 인해 많은 부분에 있어서 아직까지 관련 기술분야에서 실현되지 못하였다. 이들 면역 반응은 항체, B 세포 및 T 세포 반응을 포함하고, 바이러스 전달 벡터의 바이러스 항원, 예컨대 바이러스 캡시드 또는 외피 단백질 또는 그의 캡티드에 대해 특이적일 수 있다.

[0067] 현재, 많은 가능한 환자는 바이러스 전달 벡터의 근거가 되는 바이러스에 대하여 일정 수준의 기존의 면역을 가지고 있다. 사실상, 바이러스 항원에 대한 항체, 예컨대 아데노 관련 바이러스에 대한 항체가 인간 집단에서 매우 보편적이다. 또한, 예를 들어 바이러스 전달 벡터의 낮은 면역원성으로 인해, 기존의 면역 수준이 낮은 경우일지라도, 이러한 낮은 수준은 여전히 성공적인 형질도입을 방지시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Jeune, et al., Human Gene Therapy Methods, 24:59-67 (2013)]). 따라서, 심지어 낮은 수준의 기존의 면역도 특이적 바이러스 전달 벡터의 사용을 방해할 수 있고, 이로 인해 임상적 효능으로 간주되지 않을 수 있는 상이한 혈청형의 바이러스를 기반으로 하는 바이러스 전달 벡터를 선택해야 하거나 또는 또 다른 바이러스 전달 벡터 요법을 사용할 수 없는 경우에는 상이한 유형의 요법을 채택할 수도 있다.

[0068] 부가적으로, 바이러스 벡터, 예컨대 아데노 관련 벡터는 고도로 면역원성일 수 있고, 특히 재투여와 관련하여 효능을 손상시킬 수 있는 체액성 및 세포 매개 면역을 유도시킬 수 있다. 사실상, 바이러스 전달 벡터에 대한 세포성 및 체액성 면역 반응은 이러한 바이러스 전달 벡터의 단일 투여 후에 발생할 수 있다. 바이러스 전달 벡터 투여 후, 중화 항체 역가는 증가될 수 있고 수년 동안 높게 유지될 수 있으며, 바이러스 전달 벡터의 재투여의 유효성을 저하시킬 수 있는데, 이는 바이러스 전달 벡터를 반복해서 투여하면 일반적으로, 바람직하지 못한 면역 반응이 증강되기 때문이다. 또한, 예컨대, 예를 들어 바이러스 항원, 예컨대 캡시드 단백질에 대한 제노출시 목적하는 트랜스진 생성물을 발현하는 형질도입된 세포를 제거하는 바이러스 전달 벡터-특이적 CD8+ T 세포가 발생할 수 있다. 실제로, AAV 캡시드 항원이 AAV 바이러스 전달 벡터로 형질도입된 간세포의 면역 매개 파괴를 촉발시킨 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, 문헌 [Manno et al., Nature Medicine, Vol. 12, No. 3, 2006]). 많은 치료적 적용에 대하여, 장기간의 혜택을 위해 바이러스 전달 벡터를 여러 차례 투여하는 것이 필요할 것으로 예상되며, 본원에 제공된 방법 및 조성물을 사용하지 않는 경우에는, 특히 재투여가 필요하다면 그렇게 할 수 있는 능력이 심각하게 제한될 것으로 예상된다.

[0069] 바이러스 전달 벡터 항원은 단일 투여 후 얼마 동안, 예컨대 적어도 수 주 동안 지속될 수 있기 때문에, 요법을 위해 바이러스 전달 벡터를 사용하는 것과 관련된 문제는 더욱 복잡해진다 (예를 들어, 문헌 [Nathawani et al., N Engl J Med 365; 25, 2011; Nathwani, et al., N Engl J Med 371; 21, 2014]). 특정 예로서, 아데노 관련 바이러스 혈청형 8 (AAV8) 바이러스 전달 벡터를 단일 주입한 환자에서, 장기간 지속되는 캡시드-특이적 체액성 면역이 발생된 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, 문헌 [Nathwani, et al., N Engl J Med 371; 21, 2014]). 항원의 지속성은 바이러스 전달 벡터를 성공적으로 사용할 수 있는 능력을 추가로 방해한다. 바이러스 전달 벡터를 이용한 요법이 성공적인 것으로 되기 위해서는, 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응을 피하는 것이 중요하다. 그러나, 본 발명 이전에는, 면역억제제를 장기간 투여할 필요없이 그렇게 할 수 있고 장기적인 면역 반응 약화를 달성할 수 있는 방법이 없었다.

[0070] 본 발명자들은 놀랍고도 예상치 못하게, 상기 언급된 문제점 및 제한 사항이 본원에 개시된 발명을 실시함으로써 극복될 수 있다는 사실을 밝혀내었다. 치료를 위해 바이러스 전달 벡터의 효과적인 사용에 대해 전술된 장애물에 대한 해결책을 제공하는 방법 및 조성물이 제공된다. 특히, 본원에 제공된 방법 및 관련 조성물을 이용

하여 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응을 약화시킬 수 있다는 사실이 예상치 못하게 밝혀졌다. 상기 방법 및 조성물은 바이러스 전달 벡터를 이용한 치료의 효능을 증가시킬 수 있고, 바이러스 전달 벡터의 투여가 반복될 필요가 있는 경우에도 장기간 면역 약화를 제공할 수 있다.

[0071] 본 발명은 다음에 보다 상세히 기재될 것이다.

[0072] B. 정의

[0073] "투여하는" 또는 "투여" 또는 "투여하다"는 약리학상 유용한 방식으로 특정 물질을 대상체에게 제공하거나 또는 투약하는 것을 의미한다. 상기 용어는 "투여되도록 유발시키는 것"을 포함한다. "투여되도록 유발시키는 것"은 또 다른 당사자가 상기 물질을 투여하도록 직접적으로 또는 간접적으로 유발, 촉구, 장려, 조장, 유도 또는 지시하는 것을 의미한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 동반 투여하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 동반 투여는 반복해서 수행된다. 또한 추가 실시양태에서, 동반 투여는 동시 투여이다.

[0074] 본원에 제공된 바와 같이 대상체에게 투여하기 위한 조성물 또는 투여 형태의 맥락에서 "유효한 양"은 이러한 대상체에게서 한 가지 이상의 목적하는 결과, 예를 들어 바이러스 전달 벡터에 대항한 면역 반응의 저하 또는 제거, 또는 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응의 생성을 야기시키는 조성물 또는 투여 형태의 양을 지칭한다. 유효한 양은 시험관내 또는 생체내 목적을 위한 것일 수 있다. 생체내 목적을 위한 양은 바이러스 전달 벡터의 투여에 따른 결과로서 바람직할 못한 면역 반응을 경험할 수 있는 대상체에 대하여 임상적 혜택을 나타낼 수 있을 것으로 임상가가 믿고 있는 양일 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에서, 투여된 조성물(들)은 본원에 제공된 바와 같은 유효한 양 중 어느 하나로 존재할 수 있다.

[0075] 유효한 양은 바람직하지 못한 면역 반응의 수준을 감소시키는 것과 관련될 수 있지만, 일부 실시양태에서, 이는 바람직하지 못한 면역 반응을 완전히 방지시키는 것과 관련이 있다. 유효한 양은 또한, 바람직하지 못한 면역 반응의 발생을 지연시키는 것과 관련될 수 있다. 유효한 양은 또한, 목적하는 치료 종말점 또는 목적하는 치료 결과를 초래하는 양일 수 있다. 유효한 양은 바람직하게, 특정 항원, 예컨대 바이러스 전달 벡터 항원에 대한 대상체 내에서의 관용원성 면역 반응을 초래한다. 유효한 양은 또한 바람직하게, 증가된 트랜스진 발현을 초래할 수 있다 (이러한 트랜스진은 바이러스 전달 벡터에 의해 전달된다). 이는 대상체 내의 각종 관심 조직 또는 시스템 중의 트랜스진 단백질 농도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 이와 같이 증가된 발현은 국소적으로 또는 전신으로 측정할 수 있다. 전술된 것 중 임의의 것의 달성은 일상적인 방법에 의해 모니터링할 수 있다.

[0076] 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 유효한 양은 목적하는 면역 반응, 예컨대 바이러스 전달 벡터에 대항한 면역 반응의 저하 또는 제어, 또는 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응의 생성을 대상체에게서 적어도 1주, 적어도 2주 또는 적어도 1개월 동안 지속시켜 주는 양이다. 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 유효한 양은 측정 가능한 목적하는 면역 반응, 예컨대 바이러스 전달 벡터에 대항한 면역 반응의 저하 또는 제어, 또는 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응의 생성을 야기시키는 양이다. 일부 실시양태에서, 유효한 양은 적어도 1주, 적어도 2주 또는 적어도 1개월 동안 (예를 들어, 특이적 바이러스 전달 벡터 항원에 대한) 측정 가능한 목적하는 면역 반응을 야기시키는 양이다.

[0077] 유효한 양은 물론, 치료받는 특별한 대상체; 병태, 질환 또는 장애의 중증도; 연령, 신체 조건, 크기 및 체중을 포함한 개개의 환자 파라미터; 치료 지속 기간; (존재하는 경우) 공동 요법의 성질; 구체적인 투여 경로; 및 보건 종사자의 지식과 전문성 내의 기타 요인에 좌우될 것이다. 이들 요인은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 일상적인 실험만으로 해결될 수 있다.

[0078] "항-바이러스 전달 벡터 면역 반응" 또는 "바이러스 전달 벡터에 대항한 면역 반응" 등은 바이러스 전달 벡터에 대항한 임의의 바람직하지 못한 면역 반응을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 바람직하지 못한 면역 반응은 바이러스 전달 벡터 또는 그의 항원에 대항한 항원-특이적 면역 반응이다. 일부 실시양태에서, 이러한 면역 반응은 바이러스 전달 벡터의 바이러스 항원에 대해 특이적이다. 다른 실시양태에서, 상기 면역 반응은 바이러스 전달 벡터의 트랜스진에 의해 코딩된 단백질 또는 펩티드에 대해 특이적이다. 일부 실시양태에서, 상기 면역 반응은 바이러스 전달 벡터의 바이러스 항원에 대해 특이적이고, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진에 의해 코딩되는 단백질 또는 펩티드에 대해서는 특이적이지 않다. 상기 면역 반응은 항-바이러스 전달 벡터 항체 반응, 항-바이러스 전달 벡터 T 세포 면역 반응, 예컨대 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포 면역 반응, 또는 항-바이러스 전달 벡터 B 세포 면역 반응일 수 있다.

[0079] 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응은 상기 대상체 또는 또 다른 대상체에게서 예상되거나 또는 측정된 반응과 비

교해서 또는 상기 대상체에게서 일부 방식으로 저하 또는 제거되는 경우에 "항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응"이라고 한다. 일부 실시양태에서, 대상체에서의 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응은 본원에 제공된 바와 같은 동반 투여 후 이러한 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 이용하여 측정된 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응 (예컨대, T 세포, B 세포 또는 항체 반응)이, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 동반 투여 없이 바이러스 전달 벡터를 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게 투여한 후, 이러한 다른 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 이용하여 측정된 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응과 비교해서 저하된 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 임의의 투여없이 바이러스 전달 벡터를 다른 대상체에게 투여한 후 이러한 다른 대상체로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응은 대상체의 생물학적 샘플 상에서 수행된 후속 바이러스 전달 벡터 시험관내 시험감염시 본원에 제공된 바와 같은 동반 투여 후 이러한 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플 중의 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응 (예컨대, T 세포, B 세포 또는 항체 반응)이, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 동반 투여 없이 바이러스 전달 벡터를 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게 투여한 후, 이러한 다른 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플 상에서 수행된 바이러스 전달 벡터 시험관내 시험감염시 검출된 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응과 비교해서 저하된 것이다. 일부 실시양태에서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응은 대상체에 투여된 후속 바이러스 전달 벡터 시험감염시 본원에 제공된 바와 같은 동반 투여 후 이러한 대상체에서의 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응 (예컨대, T 세포, B 세포 또는 항체 반응)이, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 동반 투여 없이 바이러스 전달 벡터를 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게 투여한 후, 이러한 다른 대상체에 투여된 바이러스 전달 벡터 시험감염시 상기 다른 대상체에서의 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응과 비교해서 저하된 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터는 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 임의의 투여 없이 투여된다.

[0080] "항원"은 B 세포 항원 또는 T 세포 항원을 의미한다. "항원의 유형(들)"은 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 항원 특징을 공유하는 분자를 의미한다. 일부 실시양태에서, 항원은 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 지질단백질, 당지질, 폴리뉴클레오타이드, 폴리사카라이드 등일 수 있다.

[0081] "항원 제시 세포 표적화 면역억제제"는 관용원성 효과를 나타내는 항원 제시 세포 (APC)를 초래하는 작용제를 의미한다. 이러한 면역억제제는 APC로의 전달과 관용원성 효과를 초래하는 담체와 커플링된 면역억제제뿐만 아니라 그들의 형태 또는 특징에 의거하여 APC 관용원성 효과를 초래할 수 있는 작용제를 포함할 수 있다. 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 예는 본원에 기재된 바와 같은 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체; APC를 표적으로 하는 항체 또는 그의 항원-결합성 단편 (또는 APC를 표적으로 하는 다른 리간드)과 커플링된, 본원에 기재된 바와 같은 면역억제제; 적혈구-결합성 치료제; 뿐만 아니라 그들의 특징에 의거하여 APC 관용원성 면역 반응 등을 야기시키는 입자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 특정 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체인 경우, 일부 실시양태에서, 이러한 면역억제제는 합성 나노담체의 구조를 구성하는 물질에 부가되는 요소이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 중합체로 구성되는 경우, 면역억제제는 하나 이상의 중합체에 부가되고, 일부 실시양태에서는 하나 이상의 중합체에 부착되는 화합물이다. 또 다른 예로서, 한 실시양태에서, 합성 나노담체가 하나 이상의 지질로 구성되는 경우, 면역억제제는 또한, 하나 이상의 지질에 부가되고, 일부 실시양태에서는 하나 이상의 지질에 부착된다. 항원 제시 세포 표적화 면역억제제가 특정 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체이고 이러한 합성 나노담체의 물질로 인해 관용원성 효과가 초래되기도 하는 실시양태에서, 면역억제제는 관용원성 효과를 초래하는 합성 나노담체의 물질에 부가하여 존재하는 요소이다.

[0083] "항원-특이적"은 관심 항원의 존재로부터 비롯되거나 또는 관심 항원을 특이적으로 인식하거나 또는 이와 결합하는 분자를 생성시키는 면역 반응을 지칭한다. 일반적으로, 이러한 반응은 관심 항원에 대항하여 측정 가능한 하지만, 이 반응은 다른 항원에 관해서는 저하되거나 또는 무시할 만한 수준이다. 예를 들어, 면역 반응이 항원-특이적 항체 생성인 경우, 관심 항원과는 선택적으로 결합하지만, 다른 항원과는 그렇지 않은 항체가 생성된다. 또 다른 예로서, 면역 반응이 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 생성과 관련되는 경우, 항원-특이적 CD4+ 또는 CD8+ T 세포는 항원 제시 세포 (APC)에 의해, 또는 CD8+ T 세포의 경우에는 항원이 생성되는 임의의 다른 세포 (예를 들어, 바이러스에 감염된 세포)에 의해, MHC 부류 I 또는 II 항원의 맥락에서 각각 제시될 때 관심 항원 또는 그의 일부와 결합할 수 있다. 면역 관용의 경우에, 항원 특이성은 무관하거나 또는 연관되지 않은 다른 항원 (예를 들어, 표적 항원으로부터 시간적 또는 공간적으로 이탈되는 항원)과 비교해서 표적 항원에 대한 특이적 면역 반응의 선택적 방지 또는 억제 지칭한다.

[0084] "면역 반응을 평가하는 것"은 시험관내 또는 생체내에서 면역 반응의 수준, 존재 또는 부재, 저하, 증가 등의 임의의 측정 또는 결정을 지칭한다. 이러한 측정 또는 결정은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 샘플 상에서

수행될 수 있다. 이러한 평가는 본원에 제공되거나 또는 관련 기술분야에 달리 공지된 방법 중 어느 하나를 이용하여 수행할 수 있다. 상기 평가는, 예컨대 대상체로부터의 샘플 중에서 항체 또는 T 세포, 예컨대 바이러스 전달 벡터에 대해 특이적인 항체 또는 T 세포의 수 또는 비율 (%)을 평가하는 것일 수 있다. 상기 평가는 또한, 면역 반응과 관련된 임의의 효과를 평가하는 것, 예컨대 시토카인, 세포 표현형 등의 존재 또는 부재를 측정하는 것일 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 바이러스 전달 벡터 또는 그의 항원에 대한 면역 반응을 평가하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다. 이러한 평가 단계는 직접 또는 간접적으로 수행될 수 있다. 상기 용어는 또 다른 당사자가 면역 반응을 평가하도록 유발, 촉구, 장려, 조장, 유도 또는 지시되는 행동들을 포함하고자 한다.

[0085] "부착하다" 또는 "부착된" 또는 "커플링되다" 또는 "커플링된" 등은 하나의 실체 (예를 들어, 특정 모이어티)를 또 다른 실체와 화학적으로 연합하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 이러한 부착은 공유적인데, 이는 부착이 두 실체 간의 공유 결합의 존재의 맥락에서 일어난다는 것을 의미한다. 비-공유적 실시양태에서, 비-공유적 부착은 전하 상호 작용, 친화 상호 작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트 상호 작용, 소수성 상호 작용, TT 스택킹 상호 작용, 수소 결합 상호 작용, 반 데르 발스(van der Waals) 상호 작용, 자기적 상호 작용, 정전기 상호 작용, 쌍극자-쌍극자 상호 작용, 및/또는 그의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 비-공유적 상호 작용에 의해 매개된다. 실시양태에서, 피막화가 부착의 특정 형태이다.

[0086] 본원에 사용된 바와 같은 "평균"은 달리 언급되지 않는 한 산술적 평균을 지칭한다.

[0087] "동반하여"는 시간상 상관이 있는 방식으로, 바람직하게 시간상 충분히 상관이 있는 방식으로 2개 이상의 물질/작용제를 대상체에게 투여하여 면역 반응에 있어서의 조절을 제공하는 것을 의미하고, 보다 더 바람직하게는 2개 이상의 물질/작용제를 조합하여 투여한다. 실시양태에서, 동반 투여는 2개 이상의 물질/작용제를 명시된 기간 내에, 바람직하게 1개월 내에, 보다 바람직하게 1주 내에, 더욱 더 바람직하게 1일 내에, 및 보다 더 바람직하게 1시간 내에 투여하는 것을 포괄할 수 있다. 실시양태에서, 상기 물질/작용제는 반복해서 동반하여 투여할 수 있는데; 즉, 본 실시예에 제공된 바와 같이 2회 이상으로 동반 투여한다.

[0088] "결정하는 것"은 객관적으로 무언가, 예컨대 사실, 관계 또는 양을 확인하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 대상체가 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 갖고 있는지의 여부를 결정할 수 있다. 상기 용어는 "결정되도록 유발시키는 것"을 포함하고자 한다. "결정되도록 유발시키는 것"은 또 다른 당사자가 본원에 제공된 바와 같은 결정 단계를 수행하도록 유발, 촉구, 장려, 조장, 유도 또는 지시하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 결정 단계는 대상체가 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 가지고 있는지의 여부를 결정할 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 대상체가 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 갖고 있는지의 여부를 결정하는 단계를 포함한다, 본원에 기재된 바와 같은 결정 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다.

[0089] "지시하는 것"은 또 다른 당사자의 행동에 영향을 미치는 방식으로 어떤 행동을 취하는 것과 같이 영향을 미치는 것을 의미하는데, 예컨대 본원에 제공된 바와 같은 하나 이상의 단계를 수행하는 방식으로 상대방의 행위를 유발하거나 통제한다. 일부 실시양태에서, 상대방은 지시를 수행하는 당사자의 대리인이다. 다른 실시양태에서, 상대방은 지시를 수행하는 당사자의 대리인이 아니지만, 상대방에 의해 수행된 단계(들)는 그러한 지시에 기인하거나 또는 지시에 따른 결과이다. 따라서, 지시하는 것은 하나 이상의 단계의 수행에 대해 조건화된 혜택을 받기 위해 하나 이상의 단계를 수행하기 위한 지침을 지시하거나 제공하는 것을 포함한다.

[0090] "투여 형태"는 대상체에게 투여하기에 적합한 매질, 담체, 비히클 또는 장치에서의 약리학상 및/또는 면역학상 활성 물질을 의미한다. 본원에 제공된 조성물 또는 용량 중 어느 하나가 투여 형태로 존재할 수 있다.

[0091] "용량"은 소정의 시간동안 대상체에게 투여하기 위한 약리학상 및/또는 면역학상 활성 물질의 특이적 양을 지칭한다. "이전 용량"은 물질의 초기 용량을 지칭한다. 일반적으로, 본 발명의 방법 및 조성물에서 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 및/또는 바이러스 전달 벡터의 용량은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 및/또는 바이러스 전달 벡터의 양을 지칭한다. 또 다른 한편으로, 상기 용량은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 제공하는 합성 나노담체의 수에 근거하여 투여할 수 있다. 반복 투여량의 맥락에서 용량이 사용되는 경우, 용량은 반복된 용량 각각의 양 (이는 동일하거나 상이할 수 있다)을 지칭한다.

[0092] "피막화하다"는 물질의 적어도 특정 부분을 합성 나노담체 내에 감싸는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 특정 물질은 합성 나노담체 내에 완전히 감싸진다. 다른 실시양태에서, 피막화되는 특정 물질의 대부분 또는 모

두가, 합성 나노담체 외부의 국지 환경에 노출되지 않는다. 다른 실시양태에서, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% (중량/중량) 이하가 국지 환경에 노출된다. 피막화는 물질의 대부분 또는 모두를 합성 나노담체의 표면 위에 놓아두고, 이러한 물질이 합성 나노담체 외부의 국지 환경에 노출된 채로 두는 흡수와는 별개이다.

[0093] "트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키는 것"은 대상체에서 바이러스 전달 벡터의 트랜스진 발현 생성물의 수준을 증가시키는 것을 지칭하는데, 이러한 트랜스진은 바이러스 전달 벡터에 의해 전달된다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 발현 생성물의 수준은 상기 대상체 내의 각종 관심 조직 또는 시스템 중의 트랜스진 단백질 농도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 또 다른 한편으로, 트랜스진 발현 생성물이 핵산인 경우, 트랜스진 발현 수준은 트랜스진 핵산 생성물에 의해 측정될 수 있다. 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키는 것은, 예를 들어 대상체로부터 수득된 샘플 중의 트랜스진 발현 생성물의 양을 측정하고, 이를 이전의 샘플과 비교함으로써 결정될 수 있다. 샘플은 조직 샘플일 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 발현 생성물은 유동 세포계수법을 이용하여 측정될 수 있다.

[0094] "확립시키는 것" 또는 "확립시키다"는 성과 또는 결과를 생성시키거나 또는 무언가, 예컨대 사실 또는 관계를 추론하는 것을 의미한다. 이러한 용어의 사용은 그것이 사용된 문맥에 근거하여 명백할 것이다. 성과 또는 결과를 생성하기 위해, 확립시킨다는 것은 그러한 성과 또는 결과를 달성하기 위한 단계를 취하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 수많은 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 물질(들)의 투여는 그러한 성과 또는 결과를 생성시킬 수 있다. 무언가, 예컨대 사실 또는 관계를 결정하기 위해, 확립시킨다는 것은 실험을 수행하거나, 또는 예상함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 전달 벡터의 투여가 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응을 생성시키는 것으로 예상된다고 확립시키는 것은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 샘플 상에서의 실험 결과를 포함한, 상기 대상체 상에서의 실험 결과에 근거할 수 있다. 일반적으로, 대상체에서 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응을 발생시킬 가능성은 본원에 제공된 바와 같은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 투여의 부재 하에 바이러스 전달 벡터의 투여 (일부 실시양태에서, 반복 투여)를 이용하여 상기 반응을 발생시킬 가능성이다. 마찬가지로, 대상체가 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 가지고 있다고 확립시키는 것은 또한, 대상체로부터 수득된 하나 이상의 샘플 상에서의 실험 결과를 포함한, 상기 대상체 상에서의 실험 결과에 근거할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 이러한 확립은 상기 대상체에게서의 면역 반응을 평가함으로써 결정될 수 있다. 투여하기 위한 용량을 확립시키는 것과 관련하여, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 또는 바이러스 전달 벡터의 용량은 시험 용량으로 시작하고 공지된 스케일링 기술 [예컨대, 알로메트릭(allometric) 또는 이소메트릭(isometric) 스케일링]을 이용하여 투여하기 위한 용량을 결정함으로써 결정될 수 있다. 이는 또한, 본원에 제공된 바와 같은 프로토콜을 확립시키기 위해 사용될 수 있다. "확립시키는 것" 또는 "확립시키다"는 "확립되도록 유발시키는 것"을 포함한다. "확립되도록 유발시키는 것"은 특정 실험체가 본원에 제공된 바와 같은 확립 단계를 수행하기 위해 이러한 실험체와 협조하여 유발, 촉구, 격려, 조장, 유도 또는 지시 또는 행동하는 것을 의미한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 확립 단계 중 어느 하나를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다.

[0095] "엑손 스킵핑 트랜스진"은 엑손 스킵핑을 생성시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 코딩하는 임의의 핵산을 의미한다. "엑손 스킵핑"은 단백질 생성 동안 프리-mRNA 수준에서 스킵핑되고 제거되는 엑손을 지칭한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 엑손 내의 스플라이스 부위 또는 조절성 요소를 방해할 수 있다. 이로써, 유전적 돌연변이의 존재에도 불구하고 말단절단되고 부분적으로 기능적인 단백질이 초래될 수 있다. 일반적으로, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 돌연변이-특이적일 수 있고, 프리-메신저 RNA 내의 돌연변이 부위와 결합하여 엑손 스킵핑을 유도시킬 수 있다.

[0096] 대상체는 엑손 스킵핑이 혜택을 줄 수 있는 질환 또는 장애가 있는 것일 수 있다. 대상체는 엑손 스킵핑을 생성시키는 것이 혜택이 될 것인, 본원에 제공된 질환 또는 장애 중 어느 하나, 예컨대 디스트로피가 있을 수 있다. 또한, 엑손 스킵핑 트랜스진은 그에 대한 엑손 스킵핑의 결과가 혜택을 부여할 것인 임의의 내인성 단백질의 발현 동안 엑손 스킵핑을 생성시킬 수 있는 작용제를 코딩할 수 있다. 이러한 단백질의 예는 본원에 제공된 질환 또는 장애, 예컨대 본원에 제공된 디스트로피 중 임의의 것과 연관된 단백질이다. 이러한 단백질은 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 치료용 단백질 중 어느 하나의 내인성 버전일 수 있다.

[0097] "빈도"는 항원 제시 세포 표적화 면역억제제, 바이러스 전달 벡터, 또는 둘 다를 조합하여 (예컨대, 동반 투여) 대상체에게 투여하는 시간 간격을 지칭한다.

[0098] "유전자 편집 트랜스진"은 유전자 편집 과정에 관여하는 특정 성분을 코딩하는 임의의 핵산을 의미한다. "유전

자 편집"은 일반적으로, 게놈 DNA에 대한 오래 지속되거나 또는 영구적인 변형, 예컨대 표적화된 DNA 삽입, 대체, 돌연변이 유발 또는 제거를 지칭한다. 유전자 편집은 발현된 단백질의 일부 또는 전부를 코딩하는 DNA 서열을 표적으로 할 수 있거나 또는 표적 유전자(들)의 발현에 영향을 미치는 DNA의 비-코딩 서열을 표적으로 할 수 있다. 유전자 편집은 관심 DNA 서열을 코딩하고 이러한 관심 서열을 엔도뉴클레아제를 이용하여 게놈 DNA 내의 표적화 부위에 삽입시키는 핵산의 전달을 포함할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 게놈 내의 목적하는 위치에 이중 가닥 DNA 상의 절단물을 창출시킬 수 있고; 상동 재조합, 비상동 말단 결합 등을 사용하여 상기 절단물을 복구시키기 위해 숙주 세포의 기전을 이용할 수 있다. 유전자 편집을 위해 사용될 수 있는 엔도뉴클레아제의 부류는 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복서열(들) (CRISPR) 및 귀소 엔도뉴클레아제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0099] 본원에 제공된 바와 같은 대상체는 본원에 제공된 바와 같은 질환 또는 장애 중 어느 하나를 수반한 것일 수 있고, 트랜스진은 본원에 제공된 바와 같은 단백질 중 어느 하나, 또는 그의 내인성 버전에서의 결함을 교정하기 위해 사용될 수 있는 유전자 편집 작용제를 코딩하는 것이다. 또 다른 한편으로, 일부 실시양태에서 유전자 편집 바이러스 전달 벡터는 또한, 본원에 제공된 바와 같은 치료용 단백질 또는 그의 일부를 코딩하는 트랜스진을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 편집 바이러스 전달 벡터는 본원에 제공된 치료용 단백질 또는 그의 일부를 코딩하는 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터와 함께 대상체에게 투여될 수 있다.

[0100] "유전자 발현 조정성 트랜스진"은 유전자 발현 조정인자를 코딩하는 임의의 핵산을 지칭한다. "유전자 발현 조정인자"는 하나 이상의 내인성 유전자의 발현을 증강, 억제 또는 조정할 수 있는 분자를 지칭한다. 따라서, 유전자 발현 조정인자는 DNA-결합성 단백질 (예를 들어, 인공 전사 인자)뿐만 아니라 RNA 간섭을 매개하는 분자를 포함한다. 유전자 발현 조정인자는 RNAi 분자 (예를 들어, dsRNAs 또는 ssRNAs), miRNA, 및 삼중체-형성 올리고뉴클레오타이드 (TFO)를 포함한다. 유전자 발현 조정인자는 또한, 전술된 RNA 분자 중 임의의 것의 변형된 버전을 포함한, 변형된 RNA를 포함할 수 있다.

[0101] 본원에 제공된 바와 같은 대상체는 본원에 제공된 바와 같은 질환 또는 장애 중 어느 하나를 수반한 것일 수 있고, 트랜스진은 본원에 제공된 단백질 중 어느 하나의 발현을 제어하기 위해 사용될 수 있는 유전자 발현 조정인자를 코딩하는 것이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 특정 질환 또는 장애가 있는데, 이로써 대상체의 단백질의 내인성 버전에 결함이 있거나 또는 이러한 내인성 버전이 제한된 양으로 생성되거나 전혀 생성되지 않으며, 유전자 발현 조정인자가 그러한 단백질의 발현을 제어할 수 있다. 따라서, 유전자 발현 조정인자는 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 단백질 중 어느 하나, 또는 그의 내인성 버전 (예컨대, 본원에 제공된 바와 같은 치료용 단백질의 내인성 버전)의 발현을 제어할 수 있다.

[0102] "유전자 요법 트랜스진"은 특정 단백질을 코딩하고 세포 내로 도입될 때 이러한 단백질의 발현을 지시하는 핵산을 지칭한다. 바람직하게, 상기 단백질은 치료용 단백질이다. 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터를 경유하여 유전자 요법 트랜스진을 투여한 대상체는 특정 질환 또는 장애가 있는데, 이로써 대상체의 단백질의 내인성 버전에 결함이 있거나 또는 이러한 내인성 버전이 제한된 양으로 생성되거나 전혀 생성되지 않는다. 일부 실시양태에서, 이와 같이 코딩된 단백질은 인간 대응물을 갖고 있지 않지만, 특정 질환 또는 장애를 치료하는 데 있어서 치료상 유리한 효과를 제공하는 것으로 예상된다.

[0103] "면역억제제"는 바람직하게 APC에 대한 그의 효과를 통하여 관용원성 효과를 유발시키는 화합물을 의미한다. 관용원성 효과는 일반적으로, 항원에 대한 바람직하지 못한 면역 반응을 지속적인 방식으로 저하, 억제 또는 방지시키는, APC 또는 다른 면역 세포에 의하여 전신적으로 및/또는 국소적으로 조정되는 것을 지칭한다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 하나 이상의 면역 이펙터 세포 내의 조절성 표현형을 증진시키도록 APC를 유발시키는 것이다. 예를 들어, 이러한 조절성 표현형은 항원-특이적 CD4+ T 세포 또는 B 세포의 생성, 유도, 자극 또는 동원의 억제; 항원-특이적 항체의 생성의 억제; Treg 세포 (예를 들어, CD4+CD25고FoxP3+ Treg 세포)의 생성, 유도, 자극 또는 동원 등으로써 특징지을 수 있다. 이는 CD4+ T 세포 또는 B 세포가 조절성 표현형으로 전환된 것의 결과일 수 있다. 이는 또한, FoxP3이 다른 면역 세포, 예컨대 CD8+ T 세포, 대식세포 및 iNKT 세포에서 유도된 것의 결과일 수 있다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 특정 항원을 프로세싱한 후에 APC의 반응에 영향을 미치는 것이다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 이러한 항원의 프로세싱을 간섭하는 것이 아니다. 추가 실시양태에서, 면역억제제는 아포토시스 시그널링 분자가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 면역억제제는 인지질이 아니다.

[0104] 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 [즉, 라파로그(rapalog)]; TGF-

β 시그널링 작용제; TGF- β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 트리코스타틴(Trichostatin) A; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아성 기능의 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF- κ β 억제제, 예컨대 6Bio, 덱사메타손(Dexamethasone), TCPA-1, IKK VII; 아테노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제 (PGE2), 예컨대 미소프로스톨(Misoprostol); 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제 (PDE4), 예컨대 롤리프람(Rolipram); 프로테아좀 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 결합된 수용체 효능제; G-단백질 결합된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 페록시좀 증식인자 활성화 수용체 길항제; 페록시좀 증식인자 활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스포타제 억제제; PI3KB 억제제, 예컨대 TGX-221; 자가포식 억제제, 예컨대 3-메틸아데닌; 아릴 탄화수소 수용체 억제제; 프로테아좀 억제제 I (PSI); 및 산화된 ATP, 예컨대 P2X 수용체 차단제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 면역억제제는 또한, IDO, 비타민 D3, 레티노산, 시클로스포린, 예컨대 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오프린 (Aza), 6-메르캅토프린 (6-MP), 6-티오구아닌 (6-TG), FK506, 상글리페린 A, 살메테롤, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF), 아스피린 및 다른 COX 억제제, 니플룩산, 에스트리올 및 트립톨리드를 포함한다. 다른 예시적인 면역억제제는 작은 분자 약물, 자연 생성물, 항체 (예를 들어, CD20, CD3, CD4에 대한 항체), 생물제제 기반 약물, 탄수화물 기반 약물, RNAi, 안티센스 핵산, 앵타머, 메토크세이트, NSAID; 팅글리모드; 나탈리주맙; 알렘투주맙; 항-CD3; 타크롤리무스 (FK506), 아바타셉트, 벨라타셉트 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. "라파로그"는 라파마이신과 구조상 관련된 (유사체) 분자 (시롤리무스)를 지칭한다. 라파로그의 예는 템시롤리무스 (CCI-779), 예베롤리무스 (RAD001), 리다포롤리무스 (AP-23573), 및 조타롤리무스 (ABT-578)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 라파로그의 부가 예는, 예를 들어 WO 공개 번호 WO 1998/002441 및 미국 특허 번호 8,455,510에서 찾을 수 있는데, 그의 라파로그는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0105] 면역억제제는 APC에 대한 관용원성 효과를 직접적으로 제공하는 화합물일 수 있거나 또는 관용원성 효과를 간접적으로 (즉, 투여 후 일부 방식으로 프로세싱된 후) 제공하는 화합물일 수 있다. 따라서, 면역억제제는 본원에 제공된 화합물 중 임의의 것의 프로드럭(prodrug) 형태를 포함한다. 추가의 면역억제제가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명은 이런 점에 제한되지 않는다. 실시양태에서, 면역억제제는 본원에 제공된 작용제 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0106] "구입하도록 유도하는 것"은 본원에 기재된 바와 같은 유리한 효과를 달성하거나 또는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나를 수행하기 위하여 항원 제시 세포 표적화 면역억제제, 바이러스 전달 벡터 또는 둘 다를 구입하도록 특정 실체에게 제안하는 임의의 행위를 지칭한다. 이러한 행위는 항-바이러스 전달 벡터 반응을 약화시키거나, 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키거나 또는 바이러스 전달 벡터의 반복된 투여를 허용하기 위하여 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여의 혜택을 서술하여, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제, 바이러스 전달 벡터 또는 둘 다를 패키징하는 것을 포함한다. 또 다른 한편으로, 이러한 패키징은 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 성능을 서술 또는 제안할 수 있다. 특정 실체가 구입하도록 유도시키는 행위는 또한, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제, 바이러스 전달 벡터, 또는 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터 생성물을, 본원에 기재된 유리한 효과 중 임의의 것 또는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나를 수행하기 위하여 상기 생성물을 사용하는 것을 서술하거나 또는 제안한 정보를 이용하여 마케팅하는 것을 포함한다. 또 다른 한편으로, 이러한 마케팅은 항-바이러스 전달 벡터 반응을 약화시키거나, 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키거나 또는 바이러스 전달 벡터의 반복된 투여를 위하여 상기 생성물을 사용하는 것을 서술하거나 또는 제안한 물질을 포함한다. 추가의 예로서, 유도시키는 행위는 또한, 전술된 것 중 임의의 것을 서술하거나 또는 제안한 정보를 통고하는 행위를 포함할 수 있다. 이러한 통고는 서면에 의해서든지 아니면 구두에 의해서든지 간에 어떠한 형태로든 수행될 수 있는 행동이다. 서면 형태인 경우, 상기 통고는 전자 또는 종이 기반 매체를 포함한 임의의 매체를 통하여 수행될 수 있다. 추가로, 유도시키는 행위는 또한, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제, 바이러스 전달 벡터 또는 둘 다를 분배하는 행위를 포함한다. 분배하는 행위는 본원에 기재된 혜택 또는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 단계 중 임의의 것, 또는 항-바이러스 전달 벡터 반응을 약화시키거나, 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키거나 또는 바이러스 전달 벡터의 반복된 투여를 허용할 수 있는 능력을 서술하거나, 지시하거나 또는 통고하는 정보, 패키징, 마케팅 물질 등을 이용하여, 특정 실체가 항원 제시 세포 표적화 면역억제제, 바이러스 전달 벡터 또는 둘 다를 이용할 수 있게 만드는 임의의 행동을 포함한다. 분배하는 행위는 판매, 판매의 청약 및 판매를 위한 수송 (예를 들어, 약국, 병원 등으로의 수송)을 포함한다.

[0107] 합성 나노담체와 커플링된 경우의 "부하"는 전체 합성 나노담체 중의 물질의 총 건조 레시피 중량을 근거로 한, 합성 나노담체와 커플링된 면역억제제의 양이다 (중량/중량). 일반적으로, 이러한 부하는 합성 나노담체의 특

정 집단 전반에 걸친 평균으로서 계산된다. 한 실시양태에서, 합성 나노담체 전반에 걸친 평균 부하는 0.1% 내지 99%이다. 또 다른 실시양태에서, 부하는 0.1% 내지 50%이다. 또 다른 실시양태에서, 부하는 0.1% 내지 20%이다. 추가 실시양태에서, 부하는 0.1% 내지 10%이다. 또한 추가의 실시양태에서, 부하는 1% 내지 10%이다. 또한 추가의 실시양태에서, 부하는 7% 내지 20%이다. 또한 또 다른 실시양태에서, 부하는 합성 나노담체의 특정 집단 전반에 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%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%이다. 또한 추가의 실시양태에서, 부하는 합성 나노담체의 특정 집단 전반에 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 실시양태 중 일부 실시양태에서, 부하는 합성 나노담체의 특정 집단 전반에 걸쳐 평균적으로 25% 이하이다. 실시양태에서, 부하는 본 실시예에 기재될 수 있는 바와 같이 또는 관련 기술분야에 달리 공지된 바와 같이 계산한다. 일부 실시양태에서, 면역억제제의 형태 그 자체가 입자이거나 또는 입자와 유사한, 예컨대 나노결정성 면역억제제인 경우, 면역억제제의 부하는 이러한 입자 또는 기타 중의 면역억제제의 양이다 (중량/중량). 이러한 실시양태에서, 부하는 97%, 98%, 99% 또는 그 초과에 접근할 수 있다.

[0108]

"합성 나노담체의 최대 치수"는 이러한 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 나노담체의 가장 큰 치수를 의미한다. "합성 나노담체의 최소 치수"는 이러한 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 합성 나노담체의 가장 작은 치수를 의미한다. 예를 들어, 회전 타원형 합성 나노담체의 경우에는, 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수가 실질적으로 동일할 것이고, 그의 직경의 크기일 것이다. 유사하게, 입방형 합성 나노담체의 경우에는, 합성 나노담체의 최소 치수가 그의 높이, 폭 또는 길이 중 가장 작은 것인 반면, 합성 나노담체의 최대 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 가장 큰 것일 것이다. 특정 실시양태에서, 특정 샘플 중에서의 합성 나노담체의 총 수를 근거로 하여, 이러한 샘플 중의 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게 적어도 80%, 보다 바람직하게 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상이다. 특정 실시양태에서, 특정 샘플 중에서의 합성 나노담체의 총수를 근거로 하여, 이러한 샘플 중의 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게 적어도 80%, 보다 바람직하게 적어도 90%의 최대 치수는 5 μ m 이하이다. 바람직하게, 특정 샘플 중에서의 합성 나노담체의 총수를 근거로 하여, 이러한 샘플 중의 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게 적어도 80%, 보다 바람직하게 적어도 90%의 최소 치수는 110 nm 초과, 보다 바람직하게 120 nm 초과, 보다 바람직하게 130 nm 초과, 및 더욱 더 바람직하게 150 nm 초과이다. 합성 나노담체의 최대 치수와 최소 치수의 중형비는 그 실시양태에 따라서 다양할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 최대 치수 대 최소 치수의 중형비는 1:1 내지 1,000,000:1, 바람직하게 1:1 내지 100,000:1, 보다 바람직하게 1:1 내지 10,000:1, 보다 바람직하게 1:1 내지 1000:1, 더욱 더 바람직하게 1:1 내지 100:1, 및 더욱 더 바람직하게 1:1 내지 10:1로 다양할 수 있다. 바람직하게, 특정 샘플 중에서의 합성 나노담체의 총수를 근거로 하여, 이러한 샘플 중의 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게 적어도 80%, 보다 바람직하게 적어도 90%의 최대 치수는 3 μ m 이하, 보다 바람직하게 2 μ m 이하, 보다 바람직하게 1 μ m 이하, 보다 바람직하게 800 nm 이하, 보다 바람직하게 600 nm 이하, 및 더욱 더 바람직하게 500 nm 이하이다. 바람직한 실시양태에서, 특정 샘플 중에서의 합성 나노담체의 총수를 근거로 하여, 이러한 샘플 중의 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게 적어도 80%, 보다 바람직하게 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상, 보다 바람직하게 120 nm 이상, 보다 바람직하게 130 nm 이상, 보다 바람직하게 140 nm 이상, 및 더욱 더 바람직하게 150 nm 이상이다. 합성 나노담체 치수 (예를 들어, 유효 직경)의 측정은 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 액체 (통상적으로 수성) 배지에 현탁시키고 동적 광산란 (DLS) [예를 들어, 브룩헤븐 제타PALS(Brookhaven ZetaPALS) 기기를 이용함]을 이용함으로써 획득할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 현탁액을 수성 완충제로부터 정제수 내로 희석시켜 대략 0.01 내지 0.1 mg/mL의 최종 합성 나노담체 현탁액 농도를 달성할 수 있다. 이와 같이 희석된 현탁액을, DLS 분석에 적합한 큐벳 내부에서 직접 제조하거나 또는 이러한 큐벳에 옮길 수 있다. 이어서, 상기 큐벳을 DLS 내에 놓아두고, 제어 온도로 평형시켜 둔 다음, 배지의 점도 및 샘플의 굴절률에 대한 적절한 입력을 근거로 한 안정하면서도 재현 가능한 분포를 획득하기에 충분한 시간 동안 스캐닝할 수 있다. 이어서, 이러한 분포의 유효 직경, 또는 평균을 기록한다. 높은 중형비, 또는 비-회전 타원형의 합성 나노담체의 유효 크기를 결정하기 위해서는, 증강 기술, 예컨대 전자 현미경이 필요한데, 이로써 보다 정확한 측정치를 획득할 수 있다. 합성 나노담체의 "치수" 또는 "크기" 또는 "직경"은, 예를 들어 동적 광산란을 이용하여 획득된 입자 크기 분포의 평균을 의미한다.

- [0109] "측정 가능한 수준"은 음성 대조군 수준 위이거나 또는 배경 또는 시그널 소음 위인 것으로 간주되는 임의의 수준을 지칭한다. 측정 가능한 수준은 분자의 존재가 측정된다는 것을 표시하는 수준인 것으로 간주되는 것이다.
- [0110] "비-메톡시-말단화된 중합체"는 메톡시 이외의 모이어티로 종결되는 적어도 1개의 말단을 갖는 중합체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 이러한 중합체는 메톡시 이외의 모이어티로 종결되는 적어도 2개의 말단을 갖는다. 다른 실시양태에서, 상기 중합체는 메톡시로 종결되는 말단을 갖고 있지 않다. "비-메톡시-말단화된, 플루로닉 중합체"는 양 말단에 메톡시를 수반하는 선형 플루로닉 중합체 이외의 중합체를 의미한다. 본원에 제공된 바와 같은 중합체성 나노입자는 비-메톡시-말단화된 중합체 또는 비-메톡시-말단화된, 플루로닉 중합체를 포함할 수 있다.
- [0111] "수득하는 것"은 특정 물질(들)을 임의의 수단에 의해 획득하는 행위를 의미한다. 이러한 물질은 이를 제작하거나, 이를 구입하거나, 이를 받음으로써 획득할 수 있다. 상기 용어는 "수득하도록 유발시키는 것"을 포함한다. "수득하도록 유발시키는 것"은 특정 실체가 본원에 제공된 바와 같은 특정 물질(들)을 수득하기 위해 이러한 실체와 협조하여 유발, 촉구, 격려, 조장, 유도 또는 지시 또는 행동하는 것을 의미한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 수득 단계 중 어느 하나를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다.
- [0112] "제약상 허용되는 부형제" 또는 "제약상 허용되는 담체"는 조성물을 제제화하기 위하여 약리학상 활성 물질과 함께 사용되는 약리학상 불활성 물질을 의미한다. 제약상 허용되는 부형제는 관련 기술분야에 공지된 각종 물질을 포함하는데, 이는 사카라이드 (예컨대, 글루코스, 락토스 등), 보존제, 예컨대 향미생물제, 재구성 보조제, 착색제, 식염수 (예컨대, 인산염 완충 식염수), 및 완충제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0113] "바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역"은 이러한 바이러스 전달 벡터의 항원 또는 교차 반응성 항원 (다른 바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다)에 대한 사전 노출에 의해 이전에 그의 세포를 프라임시켰던 대상체에 항체, T 세포 및/또는 B 세포가 존재하는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 이러한 기존의 면역은 바이러스 전달 벡터의 효능을 방해하는 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응(들)을 초래하는 것으로 예상되는 수준이다. 일부 실시양태에서, 상기 기존의 면역은 바이러스 전달 벡터에 대한 후속 노출시 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응(들)을 초래하는 것으로 예상되는 수준이다. 기존의 면역은 대상체로부터의 샘플, 예컨대 혈액 샘플에 존재하는 바이러스 전달 벡터에 대한 항체, 예컨대 중화 항체의 수준을 결정함으로써 평가할 수 있다. 항체, 예컨대 중화 항체의 수준을 평가하기 위한 검정은 본원, 적어도 본 실시예에 기재되어 있고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 또한 공지되어 있다. 이러한 검정은 ELISA 검정이다. 기존의 면역은 또한, APC에 의해 제시된 바이러스 전달 벡터 항원 또는 MHC 부류 I 또는 MHC 부류 II 분자 상에 제시된 바이러스 항원 에피토프로 생체내 또는 시험관 내에서 자극된 면역 세포, 예컨대 B 또는 T 세포의 항원 리콜 반응을 결정함으로써 평가할 수 있다. 항원-특이적 리콜 반응을 위한 검정은 ELISpot, 세포내 시토카인 염색, 세포 증식, 및 시토카인 생성 검정을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 이들 및 다른 검정은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 나타내지 않는 대상체는 음성인 것으로 간주될 것인, 항-바이러스 전달 벡터 항체, 예컨대 중화 항체, 또는 기억 B 또는 T 세포의 수준을 나타내는 것이다. 다른 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 나타내지 않는 대상체는 평균 음성 대조군보다 3 이하의 표준 편차인 항-바이러스 전달 벡터 반응의 수준을 나타내는 것이다.
- [0114] "생산하는 것"은 특정 물질의 제조를 초래하는 임의의 행동을 지칭한다. 생산하는 행위는 상기 물질을 제조하거나 또는 일부 방식으로 이를 처리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생산하는 행위는 상기 물질을 또 다른 사용자가 사용 가능하도록 만드는 임의의 행위를 포함한다. 이러한 용어는 "생산하도록 유발시키는 것"을 포함한다. "생산하도록 유발시키는 것"은 특정 실체가 본원에 제공된 바와 같은 특정 물질(들)을 만들기 위해 이러한 실체와 협조하여 유발, 촉구, 격려, 조장, 유도 또는 지시 또는 행동하는 것을 의미한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 생산 단계 중 어느 하나를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다.
- [0115] "프로토콜"은 대상체에 대한 투여 패턴을 의미하고, 대상체에 대한 하나 이상의 물질의 임의의 투여 요법을 포함한다. 프로토콜은 요소들 (또는 변수들)로 구성되므로; 프로토콜은 하나 이상의 요소를 포함한다. 이러한 프로토콜의 요소는 투여량 (용량), 투여 빈도, 투여 경로, 투여 지속 기간, 투여 속도, 투여 사이의 간격, 전술된 것 중 임의의 것의 조합 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로토콜은 본 발명의 하나 이상의 조성물을 하나 이상의 시험 대상체에게 투여하기 위해 사용될 수 있다. 이어서, 이들 시험 대상체에서의 면역 반응은, 상기 프로토콜이 목적하는 면역 반응 또는 치료 효과를 생성시키거나 또는 면역 반응 또는 치료 효과의 목

적하는 수준을 생성시키는 데 유효하였는지의 여부를 결정하기 위해 평가될 수 있다. 임의의 치료적 및/또는 면역학적 효과를 평가할 수 있다. 특정 프로토콜의 요소들 중 하나 이상은 이전에 시험 대상체, 예컨대 비-인간 대상체에서 입증되었을 수도 있고, 그 다음에 인간 프로토콜로 이어졌다. 예를 들어, 비-인간 대상체에서 입증된 투여량은 확립된 기술, 예컨대 알로메트릭 스케일링 또는 다른 스케일링 방법을 이용하여 인간 프로토콜의 요소로서 스케일링할 수 있다. 특정 프로토콜이 목적하는 효과를 나타내었는지의 여부는 본원에 제공되거나 또는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법 중 임의의 것을 이용하여 결정할 수 있다. 예를 들어, 특정 샘플은 특이적 면역 세포, 시토카인, 항체 등이 감소, 생성 또는 활성화되었는지를 결정하기 위해, 본원에 제공된 조성물을 특이적 프로토콜에 따라서 투여한 대상체로부터 수득할 수 있다. 예시적인 프로토콜은 바이러스 전달 벡터 항원에 대한 관용원성 면역 반응을 초래하는 것으로 이전에 입증되거나 또는 본원에 기재된 유리한 결과들 중 어느 하나를 달성하는 것으로 이전에 입증된 것이다. 면역 세포의 존재 및/또는 수를 검출하는 데 유용한 방법은 유동 세포계수법 (예를 들어, FACS), ELISpot, 증식 반응, 시토카인 생성, 및 면역조직화학 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 면역 세포 마커의 특이적 염색을 위한 항체 및 다른 결합성 작용제는 시판되고 있다. 이러한 키트는 전형적으로, 세포의 이질적 집단으로부터 목적하는 세포 집단의 FACS-기반 검출, 분리 및/또는 정량화를 허용해 주는, 항원에 대한 염색 시약을 포함한다. 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 조성물은 프로토콜을 구성하는 요소들 중 하나 이상 또는 모두 또는 실질적으로 모두를 이용하여 대상체에게 투여하는데, 단 이와 같이 선택된 요소(들)는 이러한 대상체에게서 목적하는 결과를 달성하는 것으로 예상되어야 한다. 이러한 예상은 시험 대상체에서 결정된 프로토콜 및 필요한 경우 스케일링에 근거할 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 용량을 단독으로 투여하거나, 또는 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응을 약화시키거나 또는 바이러스 전달 벡터의 반복된 투여를 허용하는 것으로 밝혀진 프로토콜에 따라서 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 용량과 함께 본원에 기재된 바와 같이 조합하여 투여하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나는 본원에 기재된 유리한 결과 중 어느 하나를 달성시켜 주는 상기 프로토콜을 결정하는 단계를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다.

[0116] "제공하는 것"은 개개인이 본 발명을 실시하기 위한 물질을 공급하는 것을 수행하는 행동 또는 일련의 행동을 의미한다. 제공하는 것은 상기 물질을 생산, 분배, 판매, 제공, 사용 가능, 처방 또는 투여하는 행위를 포함할 수 있다. 상기 행동 또는 일련의 행동은 직접 또는 간접적으로 취해질 수 있다. 따라서, 상기 용어는 "제공하도록 유발시키는 것"을 포함한다. "제공하도록 유발시키는 것"은 특정 실체가 본 발명을 실시하기 위한 물질을 공급하기 위해 이러한 실체와 협조하여 유발, 촉구, 격려, 조장, 유도 또는 지시 또는 행동하는 것을 의미한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 제공 단계 중 어느 하나를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다.

[0117] "반복 용량" 또는 "반복 투여량" 등은 동일한 물질의 초기 용량 또는 투여량에 연속해서 대상체에게 투여되는 적어도 1회의 부가 용량 또는 투여량을 의미한다. 예를 들어, 바이러스 전달 벡터의 반복된 용량은 동일한 물질을 이전 투여 후 바이러스 전달 벡터의 적어도 1회의 부가 용량이다. 물질이 동일할 수는 있지만, 반복된 용량 중의 상기 물질의 양은 초기 용량과 상이할 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 특정 실시양태에서, 반복된 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양은 초기 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양보다 적을 수 있다. 또 다른 한편으로, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 특정 실시양태에서, 반복된 용량은 초기 용량 중의 바이러스 전달 벡터의 양과 적어도 동등한 양일 수 있다. 반복 용량은 이전 용량 투여 후 수주, 수개월 또는 수년에 투여할 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 반복 용량 또는 투여량은 이러한 반복 용량 또는 투여량 직전에 일어난 용량 또는 투여량 후 적어도 1주에 투여한다. 반복 투여량은, 이로써 대상체에 대한 유리한 효과가 초래되는 경우에 효과적인 것으로 간주된다. 바람직하게, 효과적인 반복 투여로 인해, 약화된 항-바이러스 전달 벡터 반응과 연계해서 유리한 효과가 초래된다.

[0118] "바이러스 전달 벡터의 용량을 ~ 보다 적게 선택하는 것"은 이러한 바이러스 전달 벡터의 반복된 투여로 인해 바이러스 전달 벡터에 대한 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응이 대상체에게 발생한 경우에, 이러한 대상체에게 투여되도록 선택될 것인 바이러스 전달 벡터의 양보다 적은 용량의 바이러스 전달 벡터를 선택하는 것을 지칭한다. 상기 용어는 "선택하도록 유발시키는 것"을 포함한다. "선택하도록 유발시키는 것"은 특정 실체가 전술된 더 적은 투여량을 선택하기 위해 이러한 실체와 협조하여 유발, 촉구, 격려, 조장, 유도 또는 지시 또는 행동하는 것을 의미한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 선택 단계 중 어느 하나를 포함할 수 있거나 또는 추가로 포함할 수 있다.

- [0119] "동시에"는 동일한 시간에 투여하거나; 또는 임상의가 목적하는 치료 성과에 미치는 영향에 대해 사실상 무의미하거나 무시할 수 있는 투여 사이의 임의의 시간인 것으로 간주하는 실질적으로 동일한 시간에 투여하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 동시에는 5, 4, 3, 2, 1분 또는 그 아래의 분에 투여가 일어나는 것을 의미한다.
- [0120] "대상체"는 동물, 예를 들어 온혈 동물, 예컨대 인간 및 영장류; 조류; 가정용 동물 또는 농장 동물, 예컨대 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험실용 동물, 예컨대 마우스, 래트 및 기니아 피크; 어류; 양서류; 동물원 및 야생 동물 등을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같은, 대상체는 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나를 필요로 하는 것일 수 있다.
- [0121] "합성 나노담체(들)"는 자연에서 발견되지 않고, 그 크기가 5 마이크로미터 이하인 적어도 하나의 치수를 보유하고 있는 별개의 연구 대상을 의미한다. 알부민 나노입자가 일반적으로, 합성 나노담체로서 포함되지만, 특정 실시양태에서 합성 나노담체는 알부민 나노입자를 포함하지 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 키토산을 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 기반 나노입자가 아니다. 추가 실시양태에서, 합성 나노담체는 인지질을 포함하지 않는다.
- [0122] 합성 나노담체는 지질 기반 나노입자 (본원에서 지질 나노입자, 즉 그들의 구조를 구성하는 대다수의 물질이 지질인 나노입자로서 지칭되기도 한다), 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제 기반 에멀션, 덴드리머, 버키볼, 나노 와이어, 바이러스-유사 입자 (즉, 주로 바이러스 구조적 단백질로 구성되지만, 감염성이 아니거나 또는 낮은 감염력을 갖는 입자), 펩티드 또는 단백질-기반 입자 (본원에서 단백질 입자, 즉 그들의 구조를 구성하는 대다수의 물질이 펩티드 또는 단백질인 입자로서 지칭되기도 한다) (예컨대, 알부민 나노입자) 및/또는 나노물질의 조합물을 이용하여 발생되는 나노입자, 예컨대 지질-중합체 나노입자 중 1개 또는 복수 개일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 합성 나노담체는 회전 타원형, 입방형, 피라미드형, 직사각형, 원통형, 토로이드형 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 각종 상이한 형상일 수 있다. 본 발명에 따르는 합성 나노담체는 하나 이상의 표면을 포함한다. 본 발명의 실시예 사용하도록 적응시킬 수 있는 예시적인 합성 나노담체는 (1) 미국 특허 5,543,158 (Gref et al.)에 개시된 생분해성 나노입자, (2) 공개된 미국 특허 출원 20060002852 (Saltzman et al.)의 중합체성 나노입자, (3) 공개된 미국 특허 출원 20090028910 (DeSimone et al.)의 석판 인쇄로 구축된 나노입자, (4) WO 2009/051837 (von Andrian et al.)의 개시 내용, (5) 공개된 미국 특허 출원 2008/0145441 (Penades et al.)에 개시된 나노입자, (6) 공개된 미국 특허 출원 20090226525 (de los Rios et al.)에 개시된 단백질 나노입자, (7) 공개된 미국 특허 출원 20060222652 (Sebbel et al.)에 개시된 바이러스-유사 입자, (8) 공개된 미국 특허 출원 20060251677 (Bachmann et al.)에 개시된 핵산 부착된 바이러스-유사 입자, (9) WO2010047839A1 또는 WO2009106999A2에 개시된 바이러스-유사 입자, (10) 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" *Nanomedicine*. 5(6):843-853 (2010)]에 개시된 나노침전된 나노입자, (11) 미국 공개 번호 2002/0086049에 개시된 아포토시스 세포, 아포토시스 소체 또는 합성 또는 반합성 모방체, 또는 (12) 문헌 [Look et al., "Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice" *J. Clinical Investigation* 123(4):1741-1749(2013)]의 것을 포함한다.
- [0123] 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따르는 합성 나노담체는 보체를 활성화시키는 히드록실기를 수반한 표면을 포함하지 않거나 또는 또 다른 한편으로, 보체를 활성화시키는 히드록실기가 아닌 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따르는 합성 나노담체는 보체를 실질적으로 활성화시키지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따르는 합성 나노담체는 보체를 활성화시키는 표면을 포함하지 않거나 또는 또 다른 한편으로, 보체를 활성화시키지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 바이러스-유사 입자를 배제한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, 또는 1:10 초과와 중량비를 보유할 수 있다.
- [0124] "치료용 단백질"은 본원에 제공된 바와 같은 유전자 요법 트랜스진으로부터 발현될 수 있는 임의의 단백질을 의미한다. 치료용 단백질은 단백질 대체 또는 단백질 보충을 위해 사용된 것일 수 있다. 치료용 단백질은 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 응고 인자, 시토킨, 성장 인자 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 다른 치료용 단백질의 예는 본원의 다른 곳에 제공되어 있다. 대상체는 본원에 제공된 치료용 단백질 중 어느 하나

를 이용한 치료를 필요로 하는 것일 수 있다.

[0125] "바이러스 전달 벡터의 트랜스진"은 바이러스 전달 벡터를 이용하여 특정 세포 내로 수송되고, 이러한 세포에서 일단 발현되어, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 치료적 적용을 위하여 단백질 또는 핵산 분자를 각각 생성시키는 핵산 물질을 지칭한다. 상기 트랜스진은 유전자 요법 트랜스진, 유전자 편집 트랜스진, 유전자 발현 조정성 트랜스진 또는 엑손 스킵핑 트랜스진일 수 있다. "발현된" 또는 "발현" 등은 트랜스진을 세포 내로 형질도입시키고 이와 같이 형질도입된 세포에 의해 프로세싱된 후 기능적 (즉, 원하는 목적을 위해 생리학상 활성) 유전자 생성물의 합성을 지칭한다. 이러한 유전자 생성물이 본원에서 "트랜스진 발현 생성물"로서 지칭되기도 한다. 따라서, 이와 같이 발현된 생성물은 트랜스진에 의해 코딩된, 상기 생성된 단백질 또는 핵산, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 치료용 RNA이다.

[0126] "바이러스 전달 벡터"는 본원에 제공된 바와 같은 트랜스진을 전달하도록 적응시킨 바이러스 벡터를 의미한다. "바이러스 벡터"는 트랜스진을 전달하는 바이러스 전달 벡터의 바이러스 성분 모두를 지칭한다. 따라서, "바이러스 항원"은 바이러스 전달 벡터의 바이러스 성분, 예컨대 캡시드 또는 외피 단백질의 항원을 지칭하지만, 트랜스진 또는 이를 코딩하는 생성물을 지칭하지 않는다. "바이러스 전달 벡터 항원"은 그의 바이러스 성분을 포함한 바이러스 전달 벡터의 임의의 항원뿐만 아니라 단백질 트랜스진 발현 생성물을 지칭한다. 바이러스 벡터는 하나 이상의 목적하는 핵산을 세포 내로 형질도입하도록 조작된다. 트랜스진은 유전자 요법 트랜스진, 유전자 편집 트랜스진, 유전자 발현 조정성 트랜스진 또는 엑손 스킵핑 트랜스진일 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 본원에 제공된 단백질, 예컨대 치료용 단백질, DNA-결합성 단백질 또는 엔도뉴클레아제를 코딩하는 것이다. 다른 실시양태에서, 트랜스진은 가이드 RNA, 안티센스 핵산, snRNA, RNAi 분자 (예를 들어, dsRNA 또는 ssRNA), miRNA, 또는 삼중체-형성 올리고뉴클레오타이드 (TFO) 등을 코딩하는 것이다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스 [예를 들어, 뮤린 레트로바이러스, 조류 레트로바이러스, 모로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMuLV), 하비(Harvey) 뮤린 육종 바이러스 (HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스 (MuMTV), 긴팔 원숭이 유인원 백혈병 바이러스 (GaLV) 및 라우스(Rous) 육종 바이러스 (RSV)], 렌티바이러스, 포진 바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 알파바이러스 등에 근거할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 다른 예가 본원의 다른 곳에 제공되거나 또는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 바이러스 벡터는 바이러스의 자연 변이체, 균주, 또는 혈청형, 예컨대 본원에 제공된 것들 중 어느 하나에 근거할 수 있다. 바이러스 벡터는 또한, 분자 진화를 통하여 선택된 바이러스에 근거할 수 있다. 바이러스 벡터는 또한, 조작된 벡터, 재조합 벡터, 돌연변이체 벡터, 또는 혼성체 벡터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 "키메라 바이러스 벡터"이다. 이러한 실시양태에서, 이는 바이러스 벡터가 2개 이상의 바이러스 또는 바이러스 벡터로부터 유래되는 바이러스 성분으로 구성된다는 것을 의미한다.

[0127] **C. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물**

[0128] 상기 언급된 바와 같은, 바이러스 전달 벡터에 대한 세포성 및 체액성 면역 반응은 바이러스 전달 벡터 치료제의 효능에 불리한 영향을 미칠 수 있고, 또한 그들의 재투여를 방해하여, 많은 환자에 대하여 장기간 치료를 불가능하게 만들 수 있다. 관련 기술분야에서 입증된 바와 같이, 바이러스 전달 벡터를 이용한 치료는, 이러한 바이러스 전달 벡터의 근거가 되는 바이러스에 대한 사전 노출로 인해 일부 환자에 대해 성공적인 것으로 예상되지 못할 것이다. 또한, 특정 환자가 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 가지고 있지 않은 경우일지라도, 바이러스 전달 벡터의 단일 투여로 인해, 세포성 및 체액성 면역 반응, 예컨대 중화 항체 역가 및/또는 기억 T 세포의 활성화가 초래되는 것으로 예상되는데, 이는 성공적인 재투여를 허용하지 않을 것이다. 이들 문제를 더욱 복잡하게 만드는 것은 바이러스 전달 벡터 항원의 장기 지속성이다.

[0129] 중요하게도, 본원에 제공된 방법 및 조성물이, 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응을 약화시킴으로써 전술된 장애물을 극복하는 것으로 밝혀졌다. 본원에 제공된 방법 및 조성물은 또한, 바이러스 전달 벡터의 재투여를 허용해 주고, 장기간 면역억제를 필요로 하지 않으면서 바이러스 전달 벡터에 대한 장기간 지속되는 반응을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본원에 제공된 방법 및 조성물은 바이러스 전달 벡터를 이용하여 대상체를 치료하는 데 유용하다. 바이러스 전달 벡터는 유전자 요법, 유전자 편집, 유전자 발현 조정 및 엑손 스킵핑을 포함한, 각종 목적을 위해 트랜스진을 전달하는 데 사용될 수 있고, 본원에 제공된 방법 및 조성물이 또한 적용 가능하다.

[0130] *트랜스진*

[0131] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 유전자 요법 트랜스진일 수 있고, 이는 대상체, 예컨대 특정 질환 또는 장애를 수반한 대상체에게 유리한 임의의 단백질 또는 그의 일부를 코딩한다. 상기 단백질은

세포외, 세포내 또는 막 결합된 단백질일 수 있다. 일반적으로, 상기 단백질은 치료용 단백질이고, 유전자 요법 트랜스진이 바이러스 전달 벡터를 경유하여 투여되는 대상체는 특정 질환 또는 장애가 있는데, 이로써 대상체의 단백질의 내인성 버전에 결합이 있거나 또는 이러한 내인성 버전이 제한된 양으로 생성되거나 전혀 생성되지 않는다. 따라서, 대상체는 본원에 제공된 바와 같은 질환 또는 장애 중 어느 하나를 수반한 것일 수 있고, 트랜스진은 본원에 제공된 바와 같은 치료용 단백질 중 어느 하나 또는 그의 일부를 코딩하는 것이다.

[0132] 치료용 단백질의 예는 주입 가능하거나 또는 주사 가능한 치료용 단백질, 효소, 효소 보조인자, 호르몬, 혈액 또는 혈액 응고 인자, 시토카인 및 인터페론, 성장 인자, 아디포카인 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0133] 주입 가능하거나 또는 주사 가능한 치료용 단백질의 예는, 예를 들어 토실리주맙 [로슈(Roche)/악템라(Actemra®)], 알파-1 항트립신 [카마다(Kamada)/AAT], 헤마티드(Hematide®) [아피맥스(Affymax) 및 다케다(Takeda), 합성 펩티드], 알브인터페론 알파-2b [노바티스(Novartis)/잘빈(Zalbin™)], 루신(Rhucin®) [파밍 그룹(Pharming Group), C1 억제제 대체 요법], 테사모렐린 [테라테크놀로지(Theratechnologies)/에그리프타(Egrifta), 합성 성장 호르몬 방출 인자], 옥렐리주맙 [제넨테크(Genentech), 로슈 및 바이오젠(Biogen)], 벨리무맙 [글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)/벤리스타(Benlysta®)], 페글로티카세 [사비엔트 파마슈티칼즈(Savient Pharmaceuticals)/크리스텍사(Krystexxa™)], 탈리글루세라세 알파 [프로탈릭스(Protalix)/업리소(Uplyso)], 아갈시다제 알파 [시레(Shire)/레플라갈(Replagal®)], 및 벨라글루세라세 알파 (시레)를 포함한다.

[0134] 효소의 예는 리소자임, 산화환원효소, 트랜스퍼라제, 가수분해효소, 리아제, 이소메라제, 아스파라기나제, 우리카제, 글리코시다제, 프로테아제, 뉴클레아제, 콜라게나제, 히알루로니다제, 헤파리나제, 헤파라나제, 키나제, 포스파타제, 리신 및 리가제를 포함한다. 효소의 다른 예는 효소 대체 요법에 사용된 것을 포함하는데, 이는 이미글루세라제 (예를 들어, CERAZYME™), a-갈락토시다제 A (a-gal A) (예를 들어, 아갈시다제 베타, FABRYZYME™), 산 a-글루코시다제 (GAA) (예를 들어, 알글루코시다제 알파, LUMIZYME™, MYOZYME™), 및 아릴 술파타제 B (예를 들어, 라로니다제, ALDURAZYME™, 이두르술파제, ELAPRASE™, 아릴술파타제 B, NAGLAZYME™)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0135] 호르몬의 예는 멜라토닌 (N-아세틸-5-메톡시트립타민), 세로토닌, 티록신 (또는 테트라아이오도티로닌) (갑상선 호르몬), 트리아이오도티로닌 (갑상선 호르몬), 에피네프린 (또는 아드레날린), 노르에피네프린 (또는 노르아드레날린), 도파민 (또는 프로락틴 억제 호르몬), 항뮐러리안(Antimullerian) 호르몬 (또는 뮐러리안 억제 인자 또는 호르몬), 아디포넥틴, 부신피질자극 호르몬 (또는 코르티코트로핀), 안지오텐시노젠 및 안지오텐신, 항이뇨 호르몬 (또는 바소프레신, 아르기닌 바소프레신), 심방 나트륨이뇨 펩티드 (또는 아트리오펩틴), 칼시토닌, 콜레시스토키닌, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 에리트로포이에틴, 난포 자극 호르몬, 가스트린, 그렐린, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩티드 (GLP-1), GIP, 성선 자극 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 인간 융모성 성선 자극 호르몬, 인간 태반 락토젠, 성장 호르몬, 인히빈, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (또는 소마토메딘), 랩틴, 황체 형성 호르몬, 멜라닌 세포 자극 호르몬, 오렉신, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, 프로락틴, 렐라신, 세크레틴, 소마토스타틴, 트롬보포이에틴, 갑상선 자극 호르몬 (또는 갑상선 자극 호르몬), 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬, 코르티솔, 알도스테론, 테스토스테론, 데히드로에피안드로스테론, 안드로스테디온, 디히드로 테스토스테론, 에스트라디올, 에스트론, 에스트리올, 프로게스테론, 칼시트리올 (1,25-디히드록시비타민 D3), 칼시디올 (25-히드록시비타민 D3), 프로스타글란딘, 류코트리엔, 프로스타시클린, 트롬복산, 프로락틴 방출 호르몬, 리포르포핀, 뇌 나트륨이뇨 펩티드, 뉴로펩티드 Y, 히스타민, 엔도텔린, 췌장 폴리펩티드, 레닌, 및 엔케팔린을 포함한다.

[0136] 혈액 또는 혈액 응고 인자의 예는 인자 I (피브리노겐), 인자 II (프로트롬빈), 조직 인자, 인자 V (프로악셀레린, 불안정한 인자), 인자 VII (안정한 인자, 프로콘버틴), 인자 VIII (항혈우병성 글로불린), 인자 IX (크리스마스 인자 또는 혈장 트롬보플라스틴 성분), 인자 X [스튜어트-프라우(Stuart-Prower) 인자], 인자 Xa, 인자 XI, 인자 XII [하게만(Hageman) 인자], 인자 XIII (섬유소 안정화 인자), 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자, 폰 헬데브란트(von Heldebrant) 인자, 프레칼리크레인 [플레처(Fletcher) 인자], 고분자량 키니노젠(HMWK) [피츠제럴드(Fitzgerald) 인자], 피브로넥틴, 피브린, 트롬빈, 항트롬빈, 예컨대 항트롬빈 III, 헤파린 보조인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련 프로테아제 억제제 (ZPI), 플라스미노젠, 알파 2-항플라스민, 조직 플라스미노젠 활성화제 (tPA), 우로키나제, 플라스미노젠 활성화제 억제제-1 (PAI1), 플라스미노젠 활성화제 억제제-2 (PAI2), 암 응고 촉진제, 및 에포에틴 알파 [에포젠(Epogen), 프로크리트(Procrit)]를 포함한다.

[0137] 시토카인의 예는 림포카인, 인터류킨, 및 케모카인, 유형 1 시토카인, 예컨대 IFN- γ , TGF- β , 및 유형 2 시토

카인, 예컨대 IL-4, IL-10, 및 IL-13을 포함한다.

[0138] 성장 인자의 예는 아드레노메둘린 (AM), 안지오프로이오텐 (Ang), 자가분비 운동성 인자, 뼈 형성 단백질 (BMP), 뇌 유래 신경 영양 인자 (BDNF), 표피 성장 인자 (EGF), 에리트로포이오텐 (EPO), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 신경교 세포주 유래 신경영양 인자 (GDNF), 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 집락 자극 인자 (GM-CSF), 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간세포암 유래 성장 인자 (HDGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 이동 자극 인자, 미오스타틴 (GDF-8), 신경 성장 인자 (NGF) 및 다른 뉴트로핀, 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF), 트롬보포이오텐 (TPO), 전환 성장 인자 알파 (TGF- α), 전환성장 인자 베타 (TGF- β), 종양 괴사 인자-알파 (TNF- α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), Wnt 시그널링 경로, 태반 성장 인자 (PlGF), [(태아 소소마트로핀)] (FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, 및 IL-7을 포함한다.

[0139] 아디포카인의 예는 렙틴 및 아디포넥틴을 포함한다.

[0140] 치료용 단백질의 부가 예는 수용체, 시그널링 단백질, 세포골격 단백질, 스캐폴드(scaffold) 단백질, 전사 인자, 구조적 단백질, 막 단백질, 시토솔 단백질, 결합성 단백질, 핵 단백질, 분비된 단백질, 골지(golgi) 단백질, 세포질 세망 단백질, 미토콘드리아성 단백질, 및 소포성 단백질 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0141] 본원에 제공된 유전자 요법 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 대상체에서의 그의 내인성 버전 상의 일부 결합 (내인성 버전의 발현 상의 결합을 포함함)을 통하여, 이러한 대상체에게서 특정 질환 또는 장애를 초래하는 임의의 단백질의 기능적 버전을 코딩할 수 있다. 이러한 질환 또는 장애의 예는 리소좀 축적 질환/장애, 예컨대 산타부오리-할티아병 (Santavuori-Haltia disease) (유아기 신경원성 세로이드 리포푸신증 유형 1), 얀스키-빌쇼스키병(Jansky-Bielschowsky Disease) (늦은 유아기 신경원성 세로이드 리포푸신증, 유형 2), 배튼병 (유년기 신경원성 세로이드 리포푸신증, 유형 3), 쿠프스병(Kufs disease) (신경원성 세로이드 리포푸신증, 유형 4), 폰 기르케씨병(Von Gierke disease) (글리코겐 축적 질환, 유형 Ia), 글리코겐 축적 질환, 유형 Ib, 폼페병(Pompe disease) (글리코겐 축적 질환, 유형 II), 포르브스(Forbes) 또는 코리병(Cori disease) (글리코겐 축적 질환, 유형 III), 점액지질증 II (I-세포 병), 점액지질증 III [가성 헐러(Pseudo-Hurler) 다발성 디스트로피], 점액지질증 IV (시알로리피드증), 시스틴증 (성인 비신경병증성 유형), 시스틴증 (유아기 신경병증성 유형), 시스틴증 (유년기 또는 청년기 신경병증성), 살라병/유아기 시알산 축적 장애, 및 사포신(saposin) 결핍증; 지질 및 스펅고지질 분해의 장애, 예컨대 GM1 강글리오시드증 (유아기, 늦은 유아기/유년기, 및 성인/만성), 테이-새크스병(Tay-Sachs disease), 샌드호프병(Sandhoff disease), GM2 강글리오시드증, Ab 변이체, 파브리병(Fabry disease), 고세병(Gaucher disease), 유형 I, II 및 III, 이염성 백질디스트로피, 크라베병(Krabbe disease) (초기 및 후기 발병), 니만-피크병(Niemann-Pick disease), 유형 A, B, C1, 및 C2, 파버병(Farber disease), 및 월만병(Wolman disease) (콜레스테릴 에스테르 축적 질환); 뮤코폴리사카라이드 분해의 장애, 예컨대 헐러(Hurler) 증후군 (MPSI), 샤이에(Scheie) 증후군 (MPS IS), 헐러-샤이에 증후군 (MPS IH/S), 헌터(Hunter) 증후군 (MPS II), 산필리포(Sanfilippo) A 증후군 (MPS IIIA), 산필리포 B 증후군 (MPS IIIB), 산필리포 C 증후군 (MPS IIIC), 산필리포 D 증후군 (MPS IIID), 모르키오(Morquio) A 증후군 (MPS IVA), 모르키오 B 증후군 (MPS IVB), 마로토-라미(Maroteaux-Lamy) 증후군 (MPS VI), 및 슬라이 증후군 (MPS VII); 당단백질 분해의 장애, 예컨대 알파 만노시드증, 베타 만노시드증, 푸코시드축적증, 아스파르틸글루코사민노, 점액지질증 I (시알리도시스), 갈락토시알리도시스, 쉰들러병(Schindler disease), 및 쉰들러병, 유형 II/간자키병(Kanzaki disease); 및 백질디스트로피 질환/장애, 예컨대 무베타지질단백혈증, 신생아 부신백질디스트로피, 카나반병(Canavan disease), 뇌건성 황색종증, 펠리제우스 메르츠바하병(Pelizaeus Merzbacher disease), 탄지에르병(Tangier disease), 유아기 레프숨병(Refsum disease), 및 고전적 레프숨병을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0142] 본원에 제공된 바와 같은 대상체의 상기 질환/장애의 부가 예는 산성 말타제 결핍증 (예를 들어, 폼페병, 글리코겐증 유형 2, 리소좀 축적 질환); 카르니틴 결핍증; 카르니틴 팔미틸 트랜스퍼라제 결핍증; 탈분지 효소 결핍증 (예를 들어, 코리 또는 포르베병, 글리코겐증 유형 3); 락테이트 데히드로게나제 결핍증 (예를 들어, 글리코겐증 유형 11); 미오아데닐레이트 데아미나제 결핍증; 포스포프룩토키나제 결핍증 [예를 들어, 타루이병(Tarui disease), 글리코겐증 유형 7]; 포스포글리세레이트 키나제 결핍증 (예를 들어, 글리코겐증 유형 9); 포스포글리세레이트 무타제 결핍증 (예를 들어, 글리코겐증 유형 10); 포스포릴라제 결핍증 [예를 들어, 맥아들병(McArdle disease), 미오포스포릴라제 결핍증, 글리코겐증 유형 5]; 고세병 (예를 들어, 염색체 1, 효소 글루코세레브로시다제 영향받음); 연골 형성 부전증 (예를 들어, 염색체 4, 섬유모세포 성장 인자 수용체 3 영향받음); 헌팅턴병(Huntington's Disease) (예를 들어, 염색체 4, 헌팅턴); 혈색소 침착증 (예를 들어, 염색체 6, HFE 단백질); 낭포성 섬유증 (예를 들어, 염색체 7, CFTR); 프리드리히(Friedreich's) 운동실조증 (염색체 9,

프라탁신); 베스트병(Best Disease) (염색체 11, VMD2); 겸상 적혈구병 (염색체 11, 헤모글로빈); 페닐케톤뇨증 (염색체 12, 페닐알라닌 히드록실라제); 마르판(Marfan) 증후군 (염색체 15, 피브릴린); 근긴장성 디스트로피 (염색체 19, 디스트로피아 미오토니카 단백질 키나제); 부신백질디스트로피 (x-염색체, 페록시숨 내의 리그노세로일-CoA 리가제); 뒤시엔느(Duchenne) 근디스트로피 (x-염색체, 디스트로핀); 레트(Rett) 증후군 (x-염색체, 메틸CpG-결합성 단백질 2); 레베르(Leber) 유전성 시신경병증 (미토콘드리아, 호흡 단백질); 미토콘드리아 뇌병증, 락트산 산증 및 뇌졸증 (MELAS) (미토콘드리아, 전이 RNA); 및 우레아 사이클의 효소 결핍증을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0143] 또한, 상기 질환 또는 장애의 부가 예는 겸상 적혈구 빈혈, 근세관성 근병증, 혈우병 B, 지질단백질 리파제 결핍증, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 결핍증, 크리글러-나자르(Crigler-Najjar) 증후군, 점액지질증 IV, 니만-피크 A, 산필리포 A, 산필리포 B, 산필리포 C, 산필리포 D, b-지중해빈혈 및 뒤시엔느 근디스트로피를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 질환 또는 장애의 추가 예는 지질 및 스펅고지질 분해, 뮤코폴리사카라이드 분해, 당단백질 분해, 백질디스트로피 등에 있어서의 결함에 따른 결과인 것을 포함한다.

[0144] 본원에 제공된 질환 또는 장애 중 어느 하나의 결함 있는 단백질의 기능적 버전은 유전자 요법 바이러스 전달 벡터의 트랜스진에 의해 코딩될 수 있고, 또한 치료용 단백질로 간주된다. 치료용 단백질은 또한, 미오포스포릴라제, 글루코세레브로시다제, 섬유모세포 성장 인자 수용체 3, 헌팅틴, HFE 단백질, CFTR, 프라탁신, VMD2, 헤모글로빈, 페닐알라닌 히드록실라제, 피브릴린, 디스트로피아 미오토니카 단백질 키나제, 리그노세로일-CoA 리가제, 디스트로핀, 메틸CpG-결합성 단백질 2, 베타 헤모글로빈, 미오투볼라린, 카텝신 A, 인자 IX, 지질단백질 리파제, 베타 갈락토시다제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제, 이두로네이트-2-술포타제, 산-알파 글루코시다제, UDP-글루쿠로노실트랜스퍼라제 1-1, GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제, GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제, 무코리핀-1, 마이크로솜성 트리글리세리드 전이 단백질, 스펅고미엘리나제, 산 세라미다제, 리소좀 산 리파제, 알파-L-이두로니다제, 헤파란 N-술포타제, 알파-N-아세틸글루코사미니다제, 아세틸-CoA 알파-글루코사미니드 아세틸트랜스퍼라제, N-아세틸글루코사민 6-술포타제, N-아세틸갈락토사민-6 술포타제, 알파-만노시다제, 알파-갈락토시다제 A, 낭포성 섬유증 전도도 막형단 조절제, 및 호흡 단백질을 포함한다는 결론이 나온다.

[0145] 추가 예로서, 치료용 단백질은 또한, 지질 및 스펅고지질 분해의 장애와 연관된 단백질 [예를 들어, β -갈락토시다제-1, β -헥소아미니다제 A, β -헥소아미니다제 A 및 B, GM2 활성화제 단백질, 8-갈락토시다제 A, 글루코세레브로시다제, 글루코세레브로시다제, 글루코세레브로시다제, 아틸술포타제 A, 갈락토실세라미다제, 스펅고미엘리나제, 스펅고미엘리나제, NPC1, HE1 단백질 (콜레스테롤 교환 결함), 산 세라미다제, 리소좀 산 리파제]; 뮤코폴리사카라이드 분해의 장애와 연관된 단백질 (예를 들어, L-이두로니다제, L-이두로니다제, L-이두로니다제, 이두로네이트 술포타제, 헤파란 N-술포타제, N-아세틸글루코사미니다제, 아세틸-CoA-글루코사미니다제, 아세틸트랜스퍼라제, 아세틸글루코사민-6-술포타제, 갈락토사민-6-술포타제, 아틸술포타제 B, 글루쿠로니다제); 당단백질 분해의 장애와 연관된 단백질 (예를 들어, 만노시다제, 만노시다제, 1-푸코시다제, 아스파르틸글리코사미니다제, 뉴라미니다제, 리소좀 보호 단백질, 리소좀 8-N-아세틸갈락토사미니다제, 리소좀 8-N-아세틸갈락토사미니다제); 리소좀 축적 장애와 연관된 단백질 (예를 들어, 팔미토일-단백질 티오에스테라제, 적어도 4가지 하위유형, 리소좀 막 단백질, 공지되지 않음, 글루코스-6-포스포타제, 글루코스-6-포스포이트 트랜스로카제, 산성 말타제, 탈분지 효소 아밀로-1,6 글루코시다제, N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제, N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제, 강글리오시드 시알리다제 (뉴라미니다제), 리소좀 시스틴 수송 단백질, 리소좀 시스틴 수송 단백질, 시알산 수송 단백질 사포신, A, B, C, D) 및 백질디스트로피와 연관된 단백질 (예를 들어, 마이크로솜성 트리글리세리드 전이 단백질/아포지질단백질 B, 페록시숨 막 전이 단백질, 페록신, 아스파르토아실라제, 스테롤-27-히드록실라제, 프로테오지질 단백질, ABC1 수송체, 페록시숨 막 단백질 3 또는 페록시숨 생물발생 인자 1, 피탄산 옥시다제)의 기능적 버전을 포함한다.

[0146] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 유전자 편집을 위해 사용될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 유전자 편집 트랜스진이다. 이러한 트랜스진은 유전자 편집 과정에 관여하는 성분을 코딩한다. 일반적으로, 이러한 과정은 게놈 DNA에 대한 오래 지속되거나 또는 영구적인 변형, 예컨대 표적화된 DNA 삽입, 대체, 돌연변이 유발 또는 제거를 초래한다. 유전자 편집은 관심 DNA 서열을 코딩하고 이러한 관심 서열을 엔도뉴클레아제를 이용하여 게놈 DNA 내의 표적화 부위에 삽입시키는 핵산의 전달을 포함할 수 있다. 따라서, 유전자 편집 트랜스진은 삽입하기 위한 관심 DNA 서열을 코딩하는 이들 핵산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 삽입하기 위한 DNA 서열은 본원에 제공된 치료용 단백질 중 어느 하나를 코딩하는 DNA 서열이다. 또 다른 한편으로, 또는 이에 덧붙여, 유전자 편집 트랜스진은 유전자 편집 과정을 수행하는 하나 이상의 성분을 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 본원에 제공된 유전자 편집 트랜스진은 엔도뉴클레아제 및/또는 가이드

RNA 등을 코딩할 수 있다.

- [0147] 엔도뉴클레아제는 게놈 내의 목적하는 위치에 이중 가닥 DNA 상의 절단물을 창출시킬 수 있고; 상동 재조합, 비상동 말단 결합 등을 사용하여 상기 절단물을 복구시키기 위해 숙주 세포의 기전을 이용할 수 있다. 유전자 편집을 위해 사용될 수 있는 엔도뉴클레아제의 부류는 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복서열(들) (CRISPR) 및 귀소 엔도뉴클레아제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터의 유전자 편집 트랜스진은 본원에 제공된 엔도뉴클레아제 중 어느 하나를 코딩할 수 있다.
- [0148] 메가뉴클레아제는 일반적으로, DNA 서열 (약 14개 내지 40개 염기쌍)을 인식하고 커팅할 수 있는 그의 능력을 특징으로 한다. 또한, 공지된 기술, 예컨대 돌연변이 유발 및 고 처리량 스크리닝 및 조합 어셈블리를 이용하여 맞춤형 메가뉴클레아제를 창출시킬 수 있는데, 여기서는 단백질 서브유닛이 연합되거나 또는 융합될 수 있다. 메가뉴클레아제의 예는 미국 특허 번호 8,802,437, 8,445,251 및 8,338,157; 및 미국 공개 번호 20130224863, 20110113509 및 20110033935에서 찾을 수 있는데, 그의 메가뉴클레아제가 본원에 참조로 포함된다.
- [0149] 아연 핑거 뉴클레아제는 전형적으로, 핵산 분자 내의 특이적 표적 부위와 결합하는 아연 핑거 도메인, 및 결합성 도메인에 의해 결합된 표적 부위 내에서 또는 이러한 부위와 근접하여 핵산 분자를 커팅하는 핵산 절단 도메인을 포함한다. 전형적인 조작된 아연 핑거 뉴클레아제는 3개 내지 6개의 개별 아연 핑거 모티프 및 길이가 9개 염기쌍 내지 18개 염기쌍의 범위인 결합성 표적 부위를 갖는 결합성 도메인을 포함한다. 아연 핑거 뉴클레아제는 절단하기 위한 소정의 핵산 분자 내의 사실상 임의의 목적 서열을 표적으로 하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 목적하는 특이성을 지닌 아연 핑거 결합성 도메인은 공지된 특이성의 개개의 아연 핑거 모티프를 조합함으로써 설계할 수 있다. DNA와 결합된 아연 핑거 단백질 Zif268의 구조는 본 분야에서 많은 연구 결과를 얻었으며 가능한 64개 염기쌍 삼중체 각각에 대해 아연 핑거를 수득한 다음, 이들 모듈러 아연 핑거를 혼합 및 매칭하여 임의의 목적하는 서열 특이성을 지닌 단백질을 설계하는 개념이 보고되었다 [Pavletich NP, Pabo CO (May 1991). "Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å". Science 252 (5007): 809-17; 그 전문이 본원에 포함된다]. 일부 실시양태에서, 박테리아 또는 파지 디스플레이를 이용하여, 목적하는 핵산 서열, 예를 들어 목적하는 엔도뉴클레아제 표적 부위를 인식하는 아연 핑거 도메인을 발생시킨다. 아연 핑거 뉴클레아제는 일부 실시양태에서, 아연 핑거 결합성 도메인; 및 링커, 예를 들어 폴리펩티드 링커를 통하여 서로 융합되거나 또는 달리 결합된 절단 도메인을 포함한다. 링커의 길이는 아연 핑거 도메인에 의해 결합된 핵산 서열로부터의 커트의 거리를 결정할 수 있다. 아연 핑거 뉴클레아제의 예는 미국 특허 번호 8,956,828; 8,921,112; 8,846,578; 8,569,253에서 찾을 수 있는데, 그의 아연 핑거 뉴클레아제가 본원에 참조로 포함된다.
- [0150] 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN)는 특이적 DNA 결합성 도메인을 일반적 DNA 절단성 도메인과 융합시킴으로써 생성된 인공 제한 효소이다. 임의의 목적하는 DNA 서열과 결합하도록 설계될 수 있는 DNA 결합성 도메인은 식물을 감염시키는 특정의 박테리아에 의해 배출된 DNA-결합성 단백질인 전사 활성화제-유사 (TAL) 이펙터로부터 비롯된다. 전사 활성화제-유사 이펙터 (TALE)는 실제로 임의의 DNA 서열과 결합하도록 조작될 수 있거나 또는 DNA 절단 도메인과 조합하여 함께 어레이 내로 연결될 수 있다. TALEN은 아연 핑거 뉴클레아제를 설계하도록 유사하게 사용될 수 있다. TALEN의 예는 미국 특허 번호 8,697,853; 뿐만 아니라 미국 공개 번호 20150118216, 20150079064, 및 20140087426에서 찾을 수 있는데, 그의 TALEN이 본원에 참조로 포함된다.
- [0151] CRISPR (클러스터된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복서열)/Cas 시스템이 또한, 유전자 편집을 위한 도구로서 사용될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템에서, 가이드 RNA (gRNA)는 (예를 들어, 플라스미드 상에서) 게놈적으로 또는 에피솜에 의해 코딩된다. 이러한 gRNA는 전사 후, 엔도뉴클레아제, 예컨대 Cas9 엔도뉴클레아제와 복합체를 형성한다. 이어서, 이러한 복합체는 전형적으로 특정 세포의 게놈 내에 위치한 DNA 표적 서열에 대한 gRNA의 특이성 결정 서열 (SDS)에 의해 가이드된다. Cas9 또는 Cas9 엔도뉴클레아제는 Cas9 단백질, 또는 그의 단편 [예를 들어, Cas9의 활성 또는 불활성 DNA 절단 도메인 또는 부분적으로 불활성인 DNA 절단 도메인 (예를 들어, Cas9 니카제), 및/또는 Cas9의 gRNA 결합성 도메인을 포함하는 단백질]을 포함하는 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제를 지칭한다. Cas9는 CRISPR 반복 서열 내의 짧은 모티프 (PAM 또는 프로토스페이서 인접 모티프)를 인식하여 자기 대 비-자기를 구별하는 데 도움을 준다. Cas9 엔도뉴클레아제 서열 및 구조는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 ["Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*." Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z.,

Ren Q., Zhu H., Song L. expand/collapse author list McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011); and "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)] 참조). 단일 가이드 RNA ("sgRNA", 또는 간단히 "gRNA")는 crRNA와 tracrRNA 둘 다의 측면을 단일 RNA 종 내로 혼입시키도록 조작될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821 (2012)] 참조).

[0152] Cas9 오르소로그는 에스. 피오게네스 (*S. pyogenes*) 및 에스. 테르모필루스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 각종 종에 보고되었다. 부가의 적합한 Cas9 엔도뉴클레아제 및 서열은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 이러한 Cas9 엔도뉴클레아제 및 서열은 문헌 [Chylinski, Rhun, and Charpentier, "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems" (2013) RNA Biology 10:5, 726-737]에 개시된 유기체 및 유전자 자리로부터의 Cas9 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 편집 트랜스진은 야생형 Cas9, 단편 또는 Cas9 변이체를 코딩한다. "Cas9 변이체"는 자연에서 존재하는 바와 같은 Cas9 야생형 엔도뉴클레아제와 동일하지 않지만, Cas9 기능을 갖는 임의의 단백질이다. 일부 실시양태에서, Cas9 변이체는 야생형 Cas9, 또는 그의 단편과 상동성을 공유한다. Cas9 변이체는 일부 실시양태에서, 스트렙토코쿠스 피오게네스 또는 에스. 테르모필루스 Cas9 단백질과 적어도 40% 서열 동일성을 가지며, Cas9 기능성을 보유하고 있다. 바람직하게, 상기 서열 동일성은 적어도 90%, 95%, 또는 그 초과이다. 보다 바람직하게, 서열 동일성은 적어도 98% 또는 99% 서열 동일성이다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한 Cas9 변이체 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 서열 동일성은 아미노산 서열 동일성이다. Cas9 변이체는 또한, Cas9 이량체, Cas9 융합 단백질, Cas9 단편, 최소화된 Cas9 단백질, 절단 도메인을 수반하지 않은 Cas9 변이체, gRNA 도메인을 수반하지 않은 Cas9 변이체, Cas9-재조합효소 융합물, fCas9, FokI-dCas9 등을 포함한다. 이러한 Cas9 변이체의 예는, 예를 들어 미국 공개 번호 20150071898 및 20150071899에서 찾을 수 있는데, 그의 Cas9 단백질 및 Cas9 변이체에 관한 설명이 본원에 참조로 포함된다. Cas9 변이체는 또한, Cas9 내의 단일 엔도뉴클레아제 도메인을 불활성화시키는 돌연변이(들)를 포함하는 Cas9 니카제를 포함한다. 이러한 니카제는 이중 가닥 절단과는 대조적으로 표적 핵산 내의 단일 가닥 절단을 유도시킬 수 있다. Cas9 변이체는 또한, 하나의 뉴클레아제 도메인을 돌연변이에 의해 불활성화시킨 Cas9 변이체인 Cas9 기능없는(nul1) 뉴클레아제를 포함한다. 부가의 Cas9 변이체의 예 및/또는 부가의 Cas9 변이체의 확인 방법은 미국 공개 번호 20140357523, 20150165054 및 20150166980에서 찾을 수 있는데, Cas9 단백질, Cas9 변이체 및 그의 확인 방법에 관한 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0153] Cas9 변이체의 또한 다른 예는 니카제 활성만을 수반한, Cas9D10A로서 공지된 돌연변이체 형태를 포함한다. Cas9D10A는 인접한 DNA 닉(nick)을 생성하도록 설계된 Cas9 복합체 쌍에 의해 유전자 자리가 표적화될 때 표적 특이성 측면에서 흥미롭다. Cas9 변이체의 또 다른 예는 뉴클레아제-결핍성 Cas9 (dCas9)이다. HNH 도메인 내에서의 돌연변이 H840A와 RuvC 도메인 내에서의 돌연변이 D10A는 절단 활성을 불활성화시키지만, DNA 결합을 방지하지는 못한다. 따라서, 이러한 변이체는 절단을 수반하지 않으면서 게놈의 임의의 영역을 서열 특이적으로 표적화하는 데 사용될 수 있다. 대신, 각종 이펙터 도메인과 융합함으로써, dCas9는 유전자 침묵 또는 활성화 도구로서 사용될 수 있다. 유전자 편집 트랜스진은 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 Cas9 변이체 중 어느 하나를 코딩할 수 있다.

[0154] 부위-특이적 절단을 위하여 (예를 들어, 게놈을 변형시키기 위해), RNA-프로그램 가능한 엔도뉴클레아제, 예컨대 Cas9를 사용하는 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013); Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823-826 (2013); Hwang, W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nature biotechnology 31, 227-229 (2013); Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471 (2013); Dicarlo, J.E. et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. Nucleic acids research (2013); Jiang, W. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature biotechnology 31, 233-239 (2013)] 참조).

[0155] 귀소 엔도뉴클레아제는 여러 개 또는 단일 위치에서, 이를 합성하기 위해 사용된 게놈 DNA의 가수분해를 촉매함으로써, 그들의 유전자를 숙주 내에서 수평으로 전달하여 대립 유전자의 빈도를 증가시킬 수 있다. 귀소 엔도뉴클레아제는 일반적으로, 긴 인식 서열을 가짐으로써, 이들이 무작위로 절단될 확률은 낮다. 하나의 대립 유

전자는 전달에 앞서, 유전자 (귀소 엔도뉴클레아제 유전자 +, HEG+)를 보유하는 반면, 다른 대립 유전자는 그렇지 못하고 (HEG-), 효소 절단의 영향을 받기 쉽다. 상기 효소는 일단 합성되면, HEG- 대립 유전자 내의 염색체를 파괴하여, 세포 DNA 복구 시스템으로부터 특정 반응을 개시하는데, 이는 재조합, 손상되지 않은 DNA 대립 유전자, 즉 상기 엔도뉴클레아제에 대한 유전자를 함유하는 HEG+를 사용하여 그 반대의 패턴을 취한다. 따라서, 상기 유전자는 초기에는 갖지 못한 또 다른 대립 유전자에 카피되고, 연속적으로 전파된다. 귀소 엔도뉴클레아제의 예는, 예를 들어 미국 공개 번호 20150166969; 및 미국 특허 번호 9,005,973에서 찾을 수 있는데, 그의 귀소 엔도뉴클레아제가 본원에 참조로 포함된다.

[0156] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 유전자 발현 조절을 위해 사용될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 유전자 발현 조정성 트랜스진이다. 이러한 트랜스진은 하나 이상의 내인성 유전자의 발현을 증강, 억제 또는 조절할 수 있는 유전자 발현 조정인자를 코딩한다. 상기 내인성 유전자는 본원에 제공된 바와 같은 단백질 중 어느 하나를 코딩할 수 있는데, 단 이러한 단백질은 대상체의 내인성 단백질이어야 한다. 따라서, 대상체는 유전자 발현 조절에 의해 혜택이 제공될 것인, 본원에 제공된 질환 또는 장애 중 어느 하나가 있는 것일 수 있다.

[0157] 유전자 발현 조정인자는 DNA-결합성 단백질 [예를 들어, 인공 전사 인자, 예컨대 미국 공개 번호 20140296129에 기재된 것 (그의 인공 전사 인자가 본원에 참조로 포함된다); 및 미국 공개 번호 20030125286의 전사 침묵인자 단백질 NRF (그의 전사 침묵인자 단백질 NRF가 본원에 참조로 포함된다)] 뿐만 아니라 치료용 RNA를 포함한다. 치료용 RNA는 mRNA 번역의 억제제 (안티센스), RNA 간섭 (RNAi)의 작용제, 촉매상 활성 RNA 분자 (리보자임), 전이 RNA (tRNA), 및 단백질 및 다른 분자 리간드와 결합하는 RNA (애타머)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 유전자 발현 조정인자는 전술된 것 중 임의의 작용제이고, 안티센스 핵산, RNAi 분자 [예를 들어, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 단일 가닥 RNA (ssRNA), 마이크로 RNA (miRNA), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)] 및 삼중체-형성 올리고뉴클레오타이드 (TFO)를 포함한다. 유전자 발현 조정인자는 또한, 전술된 RNA 분자 중 임의의 것의 변형된 버전을 포함할 수 있으므로, 변형된 mRNA, 예컨대 화학적으로 변형된 합성 RNA를 포함한다.

[0158] 유전자 발현 조정인자는 안티센스 핵산일 수 있다. 안티센스 핵산은 유전자 발현 (예를 들어, 돌연변이체 단백질, 우성적으로 활성인 유전자 생성물, 독성과 연관된 단백질, 또는 감염체, 예컨대 바이러스에 의해 세포 내로 도입되는 유전자 생성물의 발현)의 표적화된 억제를 제공할 수 있다. 따라서, 유전자 발현 조정성 바이러스 전달 벡터는 우성 음성 또는 기능 획득 발병 기전과 연관된 질환 또는 장애, 암 또는 감염을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 대상체는 바이러스성 감염, 염증성 장애, 심혈관계 질환, 암, 유전 장애 또는 자가면역 질환이 있는 대상체일 수 있다. 안티센스 핵산은 또한, mRNA 스플라이싱 기구를 방해하고 정상적인 세포성 mRNA 프로세싱을 붕괴시킬 수 있다. 따라서, 유전자 발현 조정성 트랜스진은 스플라이스솜(spliceosome) 단백질과 상호 작용하는 요소를 코딩할 수 있다. 안티센스 핵산 (및 관련 구축물)의 예는, 예를 들어 미국 공개 번호 20050020529 및 20050271733에서 찾을 수 있는데, 그의 안티센스 핵산 및 구축물이 본원에 참조로 포함된다.

[0159] 유전자 발현 조정인자는 또한, 리보자임 (즉, 다른 RNA, 예컨대 단일 가닥 RNA를 절단할 수 있는 RNA 분자)일 수 있다. 이러한 분자는 RNA 분자 내의 특이적 뉴클레오타이드 서열을 인식하고 이를 절단하도록 조작될 수 있다 (Cech, J. Amer. Med. Assn., 260:3030, 1988). 예를 들어, 리보자임은 이러한 리보자임을 함유하는 구축물에 상보적인 서열을 수반한 mRNA 만을 불활성화시키도록 조작될 수 있다. 리보자임의 유형 및 관련 구축물의 제조 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (Hasselhoff, et al., Nature, 334:585, 1988; 및 미국 공개 번호 20050020529; 상기 리보자임 및 방법에 관한 그의 교시가 본원에 참조로 포함된다).

[0160] 유전자 발현 조정인자는 간섭 RNA (RNAi)일 수 있다. RNA 간섭은 RNA를 간섭함으로써 매개된 서열 특이적 전사 후 유전자 침묵 과정을 지칭한다. 일반적으로, dsRNA의 존재가 RNAi 반응을 촉발시킬 수 있다. RNAi는 각종 시스템에서 연구되어 왔다 [Fire et al., 1998, Nature, 391, 806, RNAi in C. elegans; Bahramian and Zarbl, 1999, Molecular and Cellular Biology, 19, 274-283 and Wianny and Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70, RNAi mediated by dsRNA in mammalian systems; Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293, RNAi in Drosophila cells; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494, RNAi induced by introduction of duplexes of synthetic 21-nucleotide RNAs in cultured mammalian cells]. 이러한 연구는 다른 연구들과 함께, RNAi 활성을 매개하기 위하여 RNAi 분자의 구축에 도움을 주는 길이, 구조, 화학적 조성 및 서열에 관한 지침을 제공하였다. 각종 공보는 유전자 발현 조정인자로서 사용될 수 있는 RNAi 분자의 예를 제공한다. 이러한 공보는 미국 특허 번호 8,993,530, 8,877,917, 8,293,719, 7,947,659, 7,919,473, 7,790,878, 7,737,265, 7,592,322; 및

미국 공개 번호 20150197746, 20140350071, 20140315835, 20130156845 및 20100267805를 포함하는데, RNAi 분자의 유형뿐만 아니라 그의 생성과 관련된 교시가 본원에 참조로 포함된다.

[0161] 앵타머는 각종 단백질 표적과 결합할 수 있고 이들 단백질과 다른 단백질의 상호 작용을 붕괴시킬 수 있다. 따라서, 유전자 발현 조정인자는 앵타머일 수 있고, 유전자 발현 조정성 트랜스진은 이러한 앵타머를 코딩할 수 있다. 앵타머는 조절성 단백질의 DNA-결합 부위와 특이적으로 결합함으로써 특정 유전자의 전사를 방지할 수 있는 그들의 능력에 대하여 선택될 수 있다. PCT 공개 번호 WO 98/29430 및 WO 00/20040은 유전자 발현을 조정하기 위해 사용되었던 앵타머의 예를 제공하고; 미국 공개 번호 20060128649는 또한, 이러한 앵타머의 예를 제공하는데, 각각의 앵타머가 본원에 참조로 포함된다.

[0162] 추가의 예로서, 유전자 발현 조정인자는 삼중체 올리고머일 수 있다. 이러한 분자는 전사를 지연시킬 수 있다. 일반적으로, 이는 올리고머가 이중 나선형 DNA 주위에 감겨서 3 가닥 나선을 형성하기 때문에 삼중체 전략으로서 공지된다. 이러한 분자는 선택된 유전자 상의 독특한 부위를 인식하도록 설계될 수 있다 (Maher, et al., Antisense Res. and Dev., 1(3):227, 1991; Helene, C., Anticancer Drug Design, 6(6):569, 1991).

[0163] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 또한, 엑손 스킵핑을 위해 사용될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 트랜스진은 엑손 스킵핑 트랜스진이다. 이러한 트랜스진은 엑손 스킵핑을 생성할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 코딩한다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 엑손 내의 조절성 요소 또는 스플라이스 부위를 방해하여, 유전적 돌연변이의 존재에도 불구하고 말단절단되고, 부분적으로 기능적인 단백질이 초래될 수 있다. 부가적으로, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 돌연변이 특이적일 수 있고, 프리-메신저 RNA 내의 돌연변이 부위와 결합하여 엑손 스킵핑을 유도시킬 수 있다. 엑손 스킵핑을 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 이는 일반적으로, AON으로서 지칭된다. 이러한 AON은 snRNA를 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 예, 이들의 설계 방법 및 관련 생성 방법은, 예를 들어 미국 공개 번호 20150225718, 20150152415, 20150140639, 20150057330, 20150045415, 20140350076, 20140350067, 및 20140329762에서 찾을 수 있는데, 그의 AON 뿐만 아니라 언급된 관련 방법, 예컨대 AON의 설계 및 생성 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0164] 본원에 제공된 방법 중 어느 하나를 이용하여, 엑손 스킵핑을 필요로 하는 대상체의 세포에서 엑손 스킵핑을 초래할 수 있다. 이러한 대상체는 엑손 스킵핑이 혜택을 제공할 것인 임의의 질환 또는 장애가 있을 수 있고, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이러한 질환 또는 장애와 관련된 적절한 단백질 (그의 발현 동안 엑손 스킵핑이 혜택이 될 것이다)에 근거하여 설계될 수 있다. 질환 및 장애 및 관련 단백질의 예가 본원에 제공된다. 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 디스트로피 중 어느 하나, 예컨대 근디스트로피 (예를 들어, 뒤시엔느 근디스트로피)가 있다. 따라서, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 엑손 스킵핑 트랜스진은 본원에 또한 제공된 디스트로피 중 어느 하나와 연관되는 본원에 제공된 단백질 중 어느 하나에서 엑손 스킵핑을 초래할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 코딩한다. 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 디스트로핀에서 엑손 스킵핑을 초래할 수 있다.

[0165] 트랜스진의 서열은 또한, 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 발현 제어 DNA 서열은 프로모터, 증강인자, 및 작동인자를 포함하고, 이는 일반적으로, 발현 구축물이 활용될 발현 시스템에 근거하여 선택된다. 일부 실시양태에서, 프로모터 및 증강인자 서열은 유전자 발현을 증가시킬 수 있는 능력에 대하여 선택되는 반면, 작동인자 서열은 유전자 발현을 조절할 수 있는 능력에 대하여 선택될 수 있다. 트랜스진은 또한, 숙주 세포에서의 상동 재조합을 촉진시켜 주는, 바람직하게 증진시켜 주는 서열을 포함할 수 있다. 트랜스진은 또한, 숙주 세포에서의 복제에 필요한 서열을 포함할 수 있다.

[0166] 예시적인 발현 제어 서열은 프로모터 서열, 예를 들어 시토메갈로바이러스 프로모터; 라우스 육종 바이러스 프로모터; 및 원숭이 바이러스 40 프로모터; 뿐만 아니라 본원의 다른 곳에 개시되거나 또는 관련 기술분야에 달리 공지되어 있는 임의의 다른 유형의 프로모터를 포함한다. 일반적으로, 프로모터는 목적하는 발현 생성물을 코딩하는 서열의 상류 (즉, 5')에 작동적으로 연결된다. 트랜스진은 또한, 코딩 서열의 하류 (즉, 3')에 작동적으로 연결된 적합한 폴리아데닐화 서열 (예를 들어, SV40 또는 인간 성장 호르몬 유전자 폴리아데닐화 서열)을 포함할 수 있다.

[0167] 바이러스 벡터

[0168] 바이러스는 이들이 감염시킨 세포 내부에서 자신의 게놈을 수송하기 위한 특수 기전을 발달시켜 왔고; 이러한

바이러스에 근거한 바이러스 벡터는 세포를 형질도입하기 위해 특이적 적용에 맞출 수 있다. 본원에 제공된 바와 같이 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있거나 또는 본원에 기재되어 있다. 적합한 바이러스 벡터는, 예를 들어 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 (HSV)-기반 벡터, 아데노바이러스-기반 벡터, 아데노 관련 바이러스 (AAV)-기반 벡터, 및 AAV-아데노바이러스 키메라 벡터를 포함한다.

[0169] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 레트로바이러스에 근거할 수 있다. 레트로바이러스는 광범위한 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 단일 가닥 양성 센스 RNA 바이러스이다. 감염시, 레트로바이러스 게놈은 그의 RNA 게놈으로부터 DNA를 생성시키는 자신의 역전사효소를 이용하여, 그의 숙주 세포의 게놈 내로 통합된다. 이어서, 이러한 바이러스 DNA는 숙주 세포 DNA와 함께 복제되어, 바이러스 유전자와 숙주 유전자를 번역하고 전사시킨다. 레트로바이러스 벡터는 바이러스 복제 부적격하도록 조작할 수 있다. 따라서, 레트로바이러스 벡터는 생체 내에서 안정한 유전자 전이에 특히 유용한 것으로 여겨진다. 레트로바이러스 벡터의 예는, 예를 들어 미국 공개 번호 20120009161, 20090118212, 및 20090017543에서 찾을 수 있는데, 이러한 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0170] 렌티바이러스 벡터는 본원에 제공된 바와 같은 바이러스 전달 벡터의 생성을 위해 사용될 수 있는 레트로바이러스 벡터의 예이다. 렌티바이러스는 비분열 세포를 감염시킬 수 있는 능력을 갖고 있는데, 이는 유전자 전달 벡터의 보다 효율적인 방법을 구성하는 특성이다 (예를 들어, 문헌 [Durand et al., Viruses. 2011 Feb; 3(2):132-159] 참조). 렌티바이러스의 예는 HIV (인간), 원숭이 면역결핍증 바이러스 (SIV), 고양이 면역결핍증 바이러스 (FIV), 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV) 및 비스나(visna) 바이러스 (양 렌티바이러스)를 포함한다. 다른 레트로바이러스와 달리, HIV-기반 벡터는 그들의 패신저 유전자를 비분열 세포 내로 혼입시키는 것으로 공지되어 있다. 렌티바이러스 벡터의 예는, 예를 들어 미국 공개 번호 20150224209, 20150203870, 20140335607, 20140248306, 20090148936, 및 20080254008에서 찾을 수 있는데, 상기 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0171] 단순 포진 바이러스 (HSV)-기반 바이러스 벡터가 또한, 본원에 제공된 바와 같이 사용하기에 적합하다. 많은 복제-결핍성 HSV 벡터는 복제를 방지하기 위하여 하나 이상의 중간-초기 유전자를 제거하는 결실을 함유한다. 상기 포진 벡터의 이점은 잠복기에 들어갈 수 있는 그의 능력인데, 이로써 장기간 DNA 발현이 초래될 수 있고, 25 kb 이하의 외인성 DNA를 수용할 수 있는 그의 큰 바이러스 DNA 게놈이 생성될 수 있다. HSV-기반 벡터의 설명에 관해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,837,532, 5,846,782, 5,849,572, 및 5,804,413, 및 국제 특허 출원 WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637, 및 WO 99/06583을 참조할 수 있는데, 상기 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법에 관한 설명은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0172] 아데노바이러스 (Ad)는 DNA를 생체 내에서 각종 상이한 표적 세포 유형에 전달할 수 있는, 외피를 보유하지 않은 바이러스이다. 이러한 바이러스는 바이러스 복제에 필요한 선택 유전자를 결실시킴으로써 복제 결핍성으로 만들 수 있다. 소모성 비-복제 필수 E3 영역이 또한 종종 결실되어, 더 큰 DNA 삽입물에 대한 부가의 공간을 허용한다. 바이러스 전달 벡터는 아데노바이러스에 근거할 수 있다. 아데노바이러스 전달 벡터는 고 역가로 생성될 수 있고, DNA를 복제성 및 비복제성 세포로 효율적으로 전달할 수 있다. 렌티바이러스와 달리, 아데노바이러스 DNA는 게놈 내로 통합되지 못하므로, 세포 분열 동안 복제되지 못하고, 대신 숙주의 복제 기구를 이용하여 숙주 세포의 핵에서 복제된다.

[0173] 바이러스 전달 벡터의 근거가 될 수 있는 아데노바이러스는 임의의 기원, 임의의 서브그룹, 임의의 하위유형, 하위유형의 혼합물, 또는 임의의 혈청형으로부터 비롯될 수 있다. 예를 들어, 아데노바이러스는 서브그룹 A (예를 들어, 혈청형 12, 18, 및 31), 서브그룹 B (예를 들어, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 및 50), 서브그룹 C (예를 들어, 혈청형 1, 2, 5, 및 6), 서브그룹 D (예를 들어, 혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 및 42-48), 서브그룹 E (예를 들어, 혈청형 4), 서브그룹 F (예를 들어, 혈청형 40 및 41), 분류되지 않은 혈청군 (예를 들어, 혈청형 49 및 51), 또는 임의의 다른 아데노바이러스 혈청형의 것일 수 있다. 아데노바이러스 혈청형 1 내지 51은 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 [American Type Culture Collection (ATCC); 미국 버지니아주 매너서스]으로부터 입수 가능하다. 비-그룹 C 아데노바이러스, 및 심지어 비-인간 아데노바이러스를 이용하여, 복제 결핍성 아데노바이러스 벡터를 제조할 수 있다. 비-그룹 C 아데노바이러스 벡터, 비-그룹 C 아데노바이러스 벡터의 생성 방법, 및 비-그룹 C 아데노바이러스 벡터의 사용 방법이, 예를 들어 미국 특허 번호 5,801,030, 5,837,511, 및 5,849,561, 및 국제 특허 출원 WO 97/12986 및 WO 98/53087에 개시된다. 임의의 아데노바이러스, 심지어 키메라 아데노바이러스가 아데노바이러스 벡터에 대한 바이러스 게놈의 공급원으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 아데노바이러스가 복제 결핍성 아데노바이러스 벡터에 대한 바

이러스 게놈의 공급원으로서 사용될 수 있다. 아데노바이러스 벡터의 추가 예는 미국 공개 번호 20150093831, 20140248305, 20120283318, 20100008889, 20090175897 및 20090088398에서 찾을 수 있는데, 상기 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법에 관한 설명은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0174] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 또한, 아데노 관련 바이러스 (AAV)에 근거할 수 있다. AAV 벡터는 치료적 적용, 예컨대 본원에 기재된 치료적 적용에 사용하는 데 특히 관심이 있어 왔다. AAV는 인간 질환을 유발시키는 것으로 공지되지 않은 DNA 바이러스이다. 일반적으로, AAV는 효율적인 복제를 위하여, 헬퍼(helper) 바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 또는 포진 바이러스)와의 공동-감염, 또는 헬퍼 유전자의 발현을 필요로 한다. AAV는 특이적 부위에서 숙주 세포 게놈을 안정적으로 감염시킬 수 있는 능력을 가지고 있어서, 레트로바이러스 보다 더 예측 가능하게 만들지만, 일반적으로 상기 벡터의 클로닝 능력은 4.9 kb이다. 유전자 요법 적용에 사용되어 왔던 AAV 벡터는 일반적으로, 모 게놈의 대략 96%가 결실되었으므로, DNA 복제와 패키징을 위한 인식 시그널을 함유하는 말단 반복 서열 (ITR) 만이 남아 있다. AAV-기반 벡터의 설명에 관해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 8,679,837, 8,637,255, 8,409,842, 7,803,622, 및 7,790,449, 및 미국 공개 번호 20150065562, 20140155469, 20140037585, 20130096182, 20120100606, 및 20070036757을 참조할 수 있는데, 상기 바이러스 벡터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. AAV 벡터는 재조합 AAV 벡터일 수 있다. AAV 벡터는 또한, 자기 상보성 (sc) AAV 벡터일 수 있는데, 이는 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2007/01110724 및 2004/0029106, 및 미국 특허 번호 7,465,583 및 7,186,699에 기재되어 있고, 상기 벡터 및 그의 생성 방법이 본원에 참조로 포함된다.

[0175] 바이러스 전달 벡터의 근거가 될 수 있는 아데노 관련 바이러스는 임의의 혈청형 또는 혈청형의 혼합물의 것일 수 있다. AAV 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 및 AAV11을 포함한다. 예를 들어, 바이러스 전달 벡터가 혈청형의 혼합물을 근거로 하는 경우, 이러한 바이러스 전달 벡터는 하나의 AAV 혈청형 (예를 들어, AAV 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 및 11 중 어느 하나로부터 선택됨)으로부터 취한 캡시드 시그널 서열 및 상이한 혈청형 (예를 들어, AAV 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 및 11 중 어느 하나로부터 선택됨)으로부터의 패키징 서열을 함유할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV 2/8 벡터이다. 본원에 제공된 방법 또는 조성물 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV 2/5 벡터이다.

[0176] 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터는 또한, 알파바이러스에 근거할 수 있다. 알파바이러스는 신드비스 (Sindbis) (및 VEEV) 바이러스, 아우라 바이러스, 바반키(Babanki) 바이러스, 바마 삼림(Barmah Forest) 바이러스, 베바루(Bebaru) 바이러스, 카바소우(Cabassou) 바이러스, 치쿤군야(Chikungunya) 바이러스, 동부 말 뇌염 바이러스, 에버글레이즈(Everglades) 바이러스, 포트 모건(Fort Morgan) 바이러스, 게타(Getah) 바이러스, 하이랜드 제이(Highlands J) 바이러스, 키질라가흐(Kyzylagach) 바이러스, 마야로(Mayaro) 바이러스, 메 트리(Me Tri) 바이러스, 미델부르크(Middelburg) 바이러스, 모소 다 페드라(Mosso das Pedras) 바이러스, 무캄보 (Mucambo) 바이러스, 엔두무(Ndumu) 바이러스, 옹농(Onyong-nyong) 바이러스, 피슈나(Pixuna) 바이러스, 리오 네그로(Rio Negro) 바이러스, 로스강(Ross River) 바이러스, 연어 체장 질환 바이러스, 셈리키(Semliki) 삼림 바이러스, 남방코끼리 물범 바이러스, 토네이트(Tonate) 바이러스, 트로카라(Trocar) 바이러스, 우나(Una) 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 서부 말 뇌염 바이러스, 및 화타로아(Whataroa) 바이러스를 포함한다. 일반적으로, 상기 바이러스의 게놈은 숙주 세포의 세포질에서 번역될 수 있는 비구조적 단백질 (예를 들어, 레플리콘) 및 구조적 단백질 (예를 들어, 캡시드 및 외피)을 코딩한다. 로스강 바이러스, 신드비스 바이러스, 셈리키 삼림 바이러스 (SFV), 및 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 (VEEV)는 모두, 트랜스진 전달을 위한 바이러스 전달 벡터를 개발하는 데 사용되어 왔다. 가짜형 바이러스는 알파바이러스 외피 당단백질과 레트로바이러스 캡시드를 조합함으로써 형성될 수 있다. 알파바이러스 벡터의 예는 미국 공개 번호 20150050243, 20090305344, 및 20060177819에서 찾을 수 있는데; 상기 벡터 및 그의 제조 방법은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0177] 항원 제시 세포 표적화 면역억제제

[0178] 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 그들의 형태 또는 특징을 통하여 APC 관용원성 효과를 초래할 수 있는 작용제를 포함할 수 있다. 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 또한, 면역억제제와 결합되는 담체를 포함하는 작용제를 포함한다.

[0179] 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 음 전하를 띤 입자, 예컨대 폴리스티렌, PLGA, 또는 특정 크기와 제타 전위의 다이아몬드 입자, 예컨대 미국 공개 번호 20150010631에 기재된 것을 포함하는데, 상기 입자 및 그의 생성 방법에 관한 설명이 본원에 참조로 포함된다. 이러한 입자는 임의의 입자 형상 또는 입체 형태를 가질 수

있다. 그러나, 일부 실시양태에서 생체 내에서 덜 클럼핑되는 것으로 예상되는 입자를 사용하는 것이 바람직하다. 한 실시양태에서, 이들 입자는 구체 형상을 갖는다. 일반적으로, 이러한 입자가 크기 면에서 균일할 필요는 없지만, 상기 입자는 일반적으로, 항원 제시 세포 또는 다른 MPS 세포에서 포식작용을 촉발시키기에 충분한 크기여야만 한다. 바람직하게, 이들 입자는 용해도를 증강시키고, 생체 내에서 응집에 의해 유발된 가능한 합병증을 피하며 세포흡수작용을 촉진시키기 위해, 그 크기가 미시적이거나 또는 나노 유효범위이다.

[0180] 이들 입자는 약 0.1 μm 내지 약 10 μm , 약 0.2 μm 내지 약 2 μm , 약 0.3 μm 내지 약 5 μm , 또는 약 0.5 μm 내지 약 3 μm 의 평균 직경을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 이들 입자는 약 0.1 μm , 약 0.2 μm , 약 0.3 μm , 약 0.4 μm , 약 0.5 μm , 약 1.0 μm , 약 1.5 μm , 약 2.0 μm , 약 2.5 μm , 약 3.0 μm , 약 3.5 μm , 약 4.0 μm , 약 4.5 μm , 또는 약 5.0 μm 의 평균 직경을 가질 수 있다. 이들 입자는 균일한 직경일 필요는 없고, 제약 제형은 입자 크기의 혼합물을 수반한 복수 개의 입자를 함유할 수 있다.

[0181] 일부 실시양태에서, 이들 입자는 비-금속성이다. 이들 실시양태에서, 이들 입자는 중합체로부터 형성될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 이들 입자는 생분해성이다. 적합한 입자의 예는 폴리스티렌 입자, PLGA 입자, 플루로닉 안정화 폴리프로필렌 술폰드 입자, 및 다이아몬드 입자를 포함한다. 부가적으로, 이들 입자는 광범위한 다른 물질로부터 형성될 수 있다. 예를 들어, 이들 입자는 유리, 실리카, 히드록시 카르복실산의 폴리에스테르, 디카르복실산의 폴리무수물, 또는 히드록시 카르복실산과 디카르복실산의 공중합체로 구성될 수 있다. 보다 일반적으로, 이들 입자는 미국 공개 번호 20150010631에 기재된 바와 같은 다른 물질로 구성될 수 있다.

[0182] 입자는 일반적으로, 특별한 제타 전위를 보유한다. 특정 실시양태에서, 이러한 제타 전위는 음성이다. 제타 전위는 약 -100 mV 미만 또는 약 -50 mV 미만일 수 있다. 특정 실시양태에서, 입자는 제타 전위 -100 mV 내지 0 mV, -75 mV 내지 0 mV, -60 mV 내지 0 mV, -50 mV 내지 0 mV, -40 mV 내지 0 mV, -30 mV 내지 0 mV, -20 mV 내지 +0 mV, -10 mV 내지 -0 mV, -100 mV 내지 -50 mV, -75 mV 내지 -50 mV, 또는 -50 mV 내지 -40 mV를 보유한다.

[0183] 또 다른 실시양태에서, 이들 입자는 또한, 본원에 제공된 바와 같은 하나 이상의 항원을 포함한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 이러한 하나 이상의 항원은 상기 입자 내에 피막화된다.

[0184] 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 또 다른 예는 나노 결정성 형태의 면역억제제인데, 이로써 면역억제제 자체의 형태가 입자이거나 입자와 유사하다. 이들 실시양태에서, 이러한 형태는 바이러스 또는 다른 외래 병원체를 모방한다. 많은 약물이 나노 크기화되어 왔고, 이러한 약물 형태를 생성시키는 데 적절한 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지될 것이다. 약물 나노결정, 예컨대 나노결정성 라파마이신이 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다 (Katteboinaa, et al. 2009, International Journal of PharmTech Resesarch; Vol. 1, No. 3; pp682-694). 본원에 사용된 바와 같은, "약물 나노결정"은 담체 또는 매트릭스 물질을 포함하지 않는 약물 (예를 들어, 면역억제제)의 형태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 약물 나노결정은 90%, 95%, 98%, 또는 99% 또는 그 초과 of 약물을 포함한다. 약물 나노결정의 생성 방법은 분쇄, 고압 균질화, 침전, 분무 건조, 초임계 용액의 급속 팽창 (RESS), 나노엣지(Nanoedge®) 기술 [박스터 헬스케어(Baxter Healthcare)], 및 나노결정 기술(Nanocrystal Technology™) [엘란 코퍼레이션(Elan Corporation)]을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 약물 나노결정의 입체적 또는 정전기 안정성을 위해 계면활성제 또는 안정화제를 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노결정 또는 나노결정성 형태의 면역억제제는 이러한 면역억제제, 특히 불용성이거나 불안정한 면역억제제의 용해도, 안정성 및/또는 생체내 이용 효율을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0185] 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 또한, 아포토시스 소체 모방체일 수 있고, 관련 항원(들)이 관용화되도록 한다. 이러한 모방체는 미국 공개 번호 20120076831에 기재되어 있는데, 상기 모방체 및 그의 제조 방법이 본원에 참조로 포함된다. 아포토시스 소체 모방체는 입자, 비드, 분지된 중합체, 덴드리머, 또는 리포솜일 수 있다. 바람직하게 상기 모방체는 미립자이고, 일반적으로 그 형상이 구형, 타원형, 막대 모양, 구상 또는 다면체이다. 그러나, 또 다른 한편으로, 상기 모방체가 불규칙하거나 분지된 형상일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 모방체는 생분해성인 물질로 구성된다. 일반적으로 순 음전하를 보유하는 세포 표면에 대한 비-특이적 결합을 저하시키기 위해서는, 상기 모방체가 순 중성 전하 또는 순 음전하를 갖는 것이 추가로 바람직하다. 바람직하게, 모방체 표면은 비-특이적 또는 불필요한 생물학적 상호 작용을 최소화시켜 주는 물질로 구성된다. 입자인 경우, 모방체 표면은 비특이적 상호 작용을 방지 또는 감소시켜 주는 물질로 코팅할 수 있다. 입자를 친수성 층, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 및 그의 공중합체, 예컨대 플루로닉스 [폴리(에틸렌 글리콜)-bl-

폴리(프로필렌 글리콜-b1-폴리(에틸렌 글리콜)의 공중합체 포함]로 코팅함으로써 입체적 안정화시키는 것이, 그 간질의 단백질과의 비-특이적 상호 작용을 감소시킬 수 있다.

[0186] 입자인 경우, 상기 모방체는 유리, 실리카, 히드록시 카르복실산의 폴리에스테르, 디카르복실산의 폴리무수물, 또는 히드록시 카르복실산과 디카르복실산의 공중합체로 구성된 입자일 수 있다. 이들 모방체는 양자점 (quantum dot)일 수 있거나, 또는 양자점, 예컨대 양자점 폴리스티렌 입자로 구성될 수 있다. 이들 모방체는 폴리글리콜산 중합체 (PGA), 폴리락트산 중합체 (PLA), 폴리세박산 중합체 (PSA), 폴리(락트산-코-글리콜산) 공중합체 (PLGA), 폴리(락트산-코-세박산) 공중합체 (PLSA), 폴리(글리콜산-코-세박산) 공중합체 (PGSA) 등을 포함한 물질을 포함할 수 있다. 상기 모방체는 또한, 폴리스티렌 비드일 수 있다.

[0187] 이들 모방체는 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다. 이러한 모방체는 그에 대한 관용이 요망되는 하나 이상의 항원과 직접 또는 간접적으로 접합될 수 있다. 일부 경우에, 모방체는 노출된 항원의 다중 카피를 가지며 관용 원성 반응의 가능성을 증가시키기 위해 다중 결합 부위를 가질 것이다. 모방체는 그의 표면 상에 1개의 항원을 가지거나 또는 그 표면 상에 다수의 상이한 항원을 가질 수 있다. 그러나, 또 다른 한편으로, 모방체는 접합성 모이어티가 화학적 결합 형성 없이 흡착될 수 있는 표면을 가질 수 있다.

[0188] 일부 실시양태에서, 상기 모방체는 또한, 아포토시스 시그널링 분자를 포함할 수 있지만, 폴리스티렌 비드와 같이 반드시 필요한 것은 아니다. 아포토시스 시그널링 분자는 미국 공개 번호 20050113297에 기재된 아포토시스 시그널링 분자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는데, 이러한 아포토시스 시그널링 분자가 본원에 참조로 포함된다. 이들 입자에 사용하기 적합한 분자는 대식세포, 수지상 세포, 단구 및 호중구를 포함하는 포식세포를 표적으로 하는 분자를 포함한다. 이러한 분자는 트롬보스폰딘 또는 아넥신 I일 수 있다.

[0189] 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 또한, 적혈구-결합성 치료제, 예컨대 미국 공개 번호 20120039989에 기재된 것일 수 있는데, 이러한 치료제 및 그의 제조 방법이 본원에 참조로 포함된다. 기재된 바와 같이, 적혈구 (적혈구로서 공지되기도 함)와 특이적으로 결합하는 펩티드가 밝혀졌다. 이들 펩티드는 혈액에 존재하는 다른 인자의 존재 하에서도 적혈구와 특이적으로 결합하고, 면역관용을 창출시키는 데 사용될 수 있다. 따라서, 적혈구-결합성 치료제는 그에 대한 관용이 요망되는 하나 이상의 항원, 및 적혈구 친화성 리간드를 포함한다. 이러한 하나 이상의 항원은 본원에 기재된 바와 같은 바이러스 전달 벡터 항원, 예컨대 하나 이상의 바이러스 항원 (예를 들어, 하나 이상의 바이러스 캡시드 단백질의 것)일 수 있다. 또한, 상기 하나 이상의 항원은 또한, 제공된 바와 같은 발현된 트랜스진의 하나 이상의 항원일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다. 상기 항원은 그에 대한 관용이 요망되는 혼합물을 형성할 수 있다.

[0190] 적혈구와 특이적으로 결합하는 펩티드의 예는 ERY1, ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141 및 ERY162를 포함한다. 적혈구와 결합하는 펩티드 외에도, 단백질, 예컨대 항체, 예를 들어 단일쇄 항체, 및 그의 항원 결합성 단편이 또한, 친화성 리간드로서 사용될 수 있다. 친화성 리간드는 또한, 적혈구 표면 성분에 대한 뉴클레오티드 앵타머 리간드를 포함할 수 있다. 따라서, 앵타머를 제조하여 다른 적혈구 친화성 리간드 대신 사용할 수 있다. DNA 및 RNA 앵타머를 사용하여 비-공유 적혈구 결합을 제공할 수 있다. 앵타머는 DNA 앵타머, RNA 앵타머, 또는 펩티드 앵타머로서 분류될 수 있다. 부가적으로, 친화성 리간드는 2개 이상의 친화성 리간드, 예컨대 적혈구-결합성 펩티드의 융합일 수 있다. 추가로, 적혈구-결합성 치료제의 성분이 담체, 예컨대 폴리머솜 (polymersome), 리포솜 또는 미셀 또는 일부 유형의 나노입자와 연합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 성분은 이러한 담체 내에 피막화된다. 일부 실시양태에서, 상기 담체는 본원에 기재된 바와 같은 친화성 리간드, 및 하나 이상의 항원을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 친화성 리간드와 하나 이상의 항원이 반드시 서로 접합될 필요는 없다.

[0191] 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 또한, APC를 표적으로 하는 담체와 커플링된 본원에 제공된 면역억제제 중 어느 하나를 포함한다. 이러한 담체는 일부 실시양태에서, APC 마커에 대해 특이적인 항체 또는 그의 항원 결합성 단편 (또는 일부 다른 리간드)일 수 있다. 이러한 마커는 CD1a (R4, T6, HTA-1); CD1b (R1); CD1c (M241, R7); CD1d (R3); CD1e (R2); CD11b (α M 인테그린쇄, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c (α X 인테그린, p150, 95, AXb2); CDw117 (락토실세라미드, LacCer); CD19 (B4); CD33 (gp67); CD 35 (CR1, C3b/C4b 수용체); CD 36 (GpIIb, GPIV, PASIV); CD39 (ATP 데히드로게나제, NTP 데히드로게나제-1); CD40 (Bp50); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD49d (VLA-4 α , α 4 인테그린); CD49e (VLA-5 α , α 5 인테그린); CD58 (LFA-3); CD64 (Fc γ RI); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD73 (엑토-5' 뉴클로티딜라제); CD74 (Ii, 불변쇄); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD81 (TAPA-1); CD83 (HB15); CD85a (ILT5, LIR3, HL9); CD85d (ILT4, LIR2, MIR10); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CD85k (ILT3, LIR5, HM18); CD86 (B7-2/B70);

CD88 (C5aB); CD97 (BL-KDD/F12); CD101 (IGSF2, P126, V7); CD116 (GM-CSFR α); CD120a (TMFRI, p55); CD120b (TNFRII, p75, TNFR p80); CD123 (IL-3R α); CD139; CD148 (HPTP- η , p260, DEP-1); CD150 (SLAM, IPO-3); CD156b (TACE, ADAM17, cSVP); CD157 (Mo5, BST-1); CD167a (DDR1, trkE, cak); CD168 (RHAMM, IHABP, HMMR); CD169 (시알로이드헤신, Siglec-1); CD170 (Siglec-5); CD171 (L1CAM, NILE); CD172 (SIRP-1 α , MyD-1); CD172b (SIRP β); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD193 (CCR3); CD196 (CCR6); CD197 (CCR7 (ws CDw197)); CDw197 (CCR7, EBI1, BLR2); CD200 (OX2); CD205 (DEC-205); CD206 (MMR); CD207 (랑게린); CD208 (DC-LAMP); CD209 (DC-SIGN); CDw218a (IL18R α); CDw218b (IL8R β); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD230 (프리온 단백질 (PrP)); CD252 (OX40L, TNF (리간드) 슈퍼패밀리, 구성원 4); CD258 (LIGHT, TNF (리간드) 슈퍼패밀리, 구성원 14); CD265 (TRANCE-R, TNF-R 슈퍼패밀리, 구성원 11a); CD271 (NGFR, p75, TNFR 슈퍼패밀리, 구성원 16); CD273 (B7DC, PDL2); CD274 (B7H1, PDL1); CD275 (B7H2, ICOSL); CD276 (B7H3); CD277 (BT3.1, B7 패밀리: 부티로필린 3); CD283 (TLR3, TOLL-유사 수용체 3); CD289 (TLR9, TOLL-유사 수용체 9); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3, Na K ATPase β 3 서브미트); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD301 (MGL1, CLECSF14); CD302 (DCL1); CD303 (BDCA2); CD304 (BDCA4); CD312 (EMR2); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD320 (8D6); 및 CD68 (gp110, 매크로시알린); 부류 II MHC; BDCA-1; 및 Siglec-H를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 항체-약물 접합체의 제조 방법은 미국 공개 번호 20150231241에서 찾을 수 있는데, 이러한 방법이 본원에 참조로 포함된다. 다른 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0192] 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 또한, 본원에 기재된 바와 같은 면역억제제 중 어느 하나를 포함하는 합성 나노담체일 수 있다. 이러한 합성 나노담체는 미국 공개 번호 20100151000의 것을 포함하고, 그의 합성 나노담체, 및 그의 제조 방법이 본원에 참조로 포함된다. 기재된 바와 같이, NF- κ β 억제제와 항원 둘 다를 포함하는 입자 (예를 들어, 리포솜 또는 중합체성 입자)를 투여함으로써 관용원성 반응을 생체 내에서 생성시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, NF- κ β 경로의 억제제와 하나 이상의 바이러스 전달 벡터 항원을 포함하는 입자가 본원에 제공된 바와 같은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 입자는 리포솜이다. 다른 실시양태에서, 상기 입자는 담체 입자, 예컨대 금속 입자 (예를 들어, 텅스텐, 금, 백금 또는 이리듐 입자)를 포함한다. 또한 다른 실시양태에서, 상기 입자는 중합체성 매트릭스 또는 담체를 포함하는데, 그의 예시되는 예는 생체 적합성 중합체성 입자 [예를 들어, 폴리(락티드-코-글리콜리드)와 함께 제작된 입자]를 포함한다. 또한 다른 실시양태에서, 상기 입자는 세라믹 또는 무기 매트릭스 또는 담체를 포함한다.

[0193] NF- κ β 경로의 억제제는 NF- κ β 경로의 구성원의 수준 또는 기능적 활성을 감소시킬 수 있고, 이는 BTK, LYN, BCR Ig.알파., BCR Ig.베타., Syk, Blnk, PLC.감마.2, PKC.베타., DAG, CARMA1, BCL10, MALT1, PI3K, PIPS, AKT, p38 MAPK, ERK, COT, IKK.알파., IKK.베타., IKK.감마., NIK, RelA/p65, P105/p50, c-Rel, RelB, p52, NIK, Leu13, CD81, CD19, CD21 및 보체 및 응고 캐스케이드에서의 그의 리간드, TRAF6, 유비퀴틴 리가제, Tab2, TAK1, NEMO, NOD2, RIP2, Lck, fyn, Zap70, LAT, GRB2, SOS, CD3 제타, Slp-76, GADS, ITK, PLC.감마.1, PKC.세타., ICOS, CD28, SHP2, SAP, SLAM 및 2B4로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, NF- κ β 경로 억제제는 RelA/p65, P105/p50, c-Rel, RelB 또는 p52 중 임의의 하나 이상의 수준 또는 기능적 활성을 감소시킨다.

[0194] 광범위한 다른 합성 나노담체가 본 발명에 따라서 사용될 수 있고, 일부 실시양태에서는, 특정 면역억제제와 커플링되어, 더욱 다른 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 구형 또는 회전 타원체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 편평하거나 또는 플레이트 모양이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 정육면체 또는 입방체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 계란형 또는 타원이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 원통형, 원뿔형 또는 피라미드형이다.

[0195] 일부 실시양태에서, 각각의 합성 나노담체가 유사한 특성을 지니도록, 크기 또는 형상 면에서 비교적 균일한 합성 나노담체의 집단을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노담체의 총수를 근거로 하여, 본원에 제공된 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 합성 나노담체의 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는, 이러한 합성 나노담체의 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10%, 또는 20% 이내에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다.

[0196] 합성 나노담체는 속이 꽉 차거나 속이 빌 수 있고, 하나 이상의 층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각 층은 다른 층(들)과 비교해서 독특한 조성과 독특한 특성을 갖는다. 하나의 예를 들자면, 합성 나노담체는 코어/셸 구조를 가질 수 있는데, 여기서 코어는 하나의 층이고 (예를 들어, 중합체성 코어), 셸은 제2의 층 (예를

들어, 지질 이중층 또는 단층)이다. 합성 나노담체는 복수 개의 상이한 층을 포함할 수 있다.

[0197] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 지질을 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 리포솜을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 이중층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 단층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 미셀을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 중합체성 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 비-중합체성 코어 (예를 들어, 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자, 뼈 입자, 바이러스 입자, 단백질, 핵산, 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.

[0198] 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체성 합성 나노담체는 비-중합체성 성분의 집합체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 집합체이다.

[0199] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 양친매성 실체를 임의로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 양친매성 실체는 증가된 안정성, 개선된 균일성, 또는 증가된 점도를 수반한 합성 나노담체의 생성을 증진시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 양친매성 실체는 지질 막 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)의 내부 표면과 연합될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 많은 양친매성 실체가 본 발명에 따라서 합성 나노담체를 제조하는 데 사용하기 적합하다. 이러한 양친매성 실체는 포스포글리세리드; 포스포티딜콜린; 디팔미토일 포스포티딜콜린 (DPPC); 디올레일포스포티딜 에탄올아민 (DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄 (DOTMA); 디올레오일포스포티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤숙시네이트; 디포스포티딜 글리세롤 (DPPG); 핵산데칸올; 지방 알콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 표면 활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세리드; 지방산 디글리세리드; 지방산 아마이드; 소르비탄 트리올레에이트 [스판(Span®)85] 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트 (스판®20); 폴리소르베이트 20 [트윈(Tween®)20]; 폴리소르베이트 60 (트윈®60); 폴리소르베이트 65 (트윈®65); 폴리소르베이트 80 (트윈®80); 폴리소르베이트 85 (트윈®85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서르팩틴(surfactin); 폴록사머; 소르비탄 지방산 에스테르, 예컨대 소르비탄 트리올레에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스포티딜세린; 포스포티딜이노시톨; 스펡고미엘린; 포스포티딜에탄올아민 (세팔린); 카르디오피린; 포스파티드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스포티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실-아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀레에이트; 헥사데실 스테아레이트; 이소프로필 미리스테이트; 킬록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스포티딜에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 인지질; 고 계면활성제 특성을 갖는 합성 및/또는 자연 세정제; 테옥시콜레이트; 시클로텍스트린; 카오토로픽 염; 이온 쌍 형성제; 및 그의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 양친매성 실체 성분은 상이한 양친매성 실체의 혼합물일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이것이 계면활성제 활성을 지닌 물질의 포괄적인 목록이 아니라 예시적인 목록이라는 것을 인식할 것이다. 임의의 양친매성 실체가 본 발명에 따라서 사용될 합성 나노담체의 생성에 사용될 수 있다.

[0200] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 탄수화물을 임의로 포함할 수 있다. 탄수화물은 자연 또는 합성일 수 있다. 탄수화물은 유도체화 자연 탄수화물일 수 있다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 모노사카라이드 또는 디사카라이드를 포함하는데, 이는 글루코스, 프룩토스, 갈락토스, 리보스, 락토스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 셀로비오스, 만노스, 크실로스, 아라비노스, 글루코론산, 갈락토론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민, 및 뉴람산을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 폴리사카라이드인데, 이는 풀루란, 셀룰로스, 미세결정성 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (HPMC), 히드록시셀룰로스 (HC), 메틸셀룰로스 (MC), 텍스트란, 시클로텍스트란, 글리코젠, 히드록시에틸전분, 카라기난, 글리콘, 아밀로스, 키토산, N,O-카르복실메틸키토산, 알긴 및 알긴산, 전분, 키틴, 이눌린, 콘작, 글루코만난, 푸스톨란, 헤파린, 히알루론산, 쿠르들란 및 크산탄을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 탄수화물, 예컨대 폴리사카라이드를 포함하지 않는다 (또는 구체적으로 배제한다). 특정 실시양태에서, 탄수화물은 탄수화물 유도체, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 크실리톨, 에리트리톨, 말티톨 및 락티톨을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 당 알콜을 포함할 수 있다.

[0201] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 비-메톡시-말단화된, 플루로닉 중합체인 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 구성하는 중합체의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% (중량/중량)가 비-메톡시-말단화된, 플루로닉 중합체

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

[0202] 면역억제제는 수많은 방법 중 임의의 것에 의해 합성 나노담체와 커플링될 수 있다. 일반적으로, 부착시키는 것은 면역억제제와 합성 나노담체 간의 결합에 따른 결과일 수 있다. 이러한 결합으로 인해, 면역억제제가 합성 나노담체의 표면에 부착되고/되거나 합성 나노담체 내에 함유 (피막화)될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 면역억제제는 합성 나노담체에 대한 결합보다는 오히려 합성 나노담체의 구조에 따른 결과로서 합성 나노담체에 의해 피막화된다. 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함하고, 면역억제제가 이러한 중합체에 부착된다.

[0203] 면역억제제와 합성 나노담체 간의 결합에 따른 결과로서 부착이 일어나는 경우, 이러한 부착은 커플링 모이어티를 통하여 일어날 수 있다. 커플링 모이어티는, 이를 통하여 면역억제제가 합성 나노담체와 결합되는 임의의 모이어티일 수 있다. 이러한 모이어티는 공유 결합, 예컨대 아미드 결합 또는 에스테르 결합을 포함할 뿐만 아니라 면역억제제를 합성 나노담체와 (공유적 또는 비공유적으로) 결합시켜 주는 별도의 분자를 포함한다. 이러한 분자는 링커 또는 중합체 또는 그의 특정 단위를 포함한다. 예를 들어, 커플링 모이어티는 면역억제제와 정전기적으로 결합하는, 전하를 띤 중합체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 커플링 모이어티는 그와 공유적으로 결합되는 중합체 또는 그의 단위를 포함할 수 있다.

[0204] 바람직한 실시양태에서, 합성 나노담체는 본원에 제공된 바와 같은 중합체를 포함한다. 이들 합성 나노담체는 완전하게 중합체성일 수 있거나 또는 중합체와 다른 물질의 혼합물일 수 있다.

[0205] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체의 중합체들이 연합하여 중합체성 매트릭스를 형성한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 특정 성분, 예컨대 면역억제제는 이러한 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 공유적으로 연합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공유적 연합은 링커에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 특정 성분은 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 비공유적으로 연합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 특정 성분은 중합체성 매트릭스 내에 피막화될 수 있고/있거나, 이러한 매트릭스에 의해 둘러싸일 수 있고/있거나 상기 매트릭스 전반에 걸쳐 분산될 수 있다. 또 다른 한편으로 또는 부가적으로, 특정 성분은 소수성 상호 작용, 전하 상호 작용, 반 데르 발스 힘 등에 의해 중합체성 매트릭스의 하나 이상의 중합체와 연합될 수 있다. 광범위한 중합체 및 그로부터 중합체성 매트릭스를 형성하는 방법은 통상적으로 공지되어 있다.

[0206] 중합체는 자연 또는 비자연 (합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 단독 중합체이거나 또는 2개 이상의 단량체를 포함하는 공중합체일 수 있다. 서열 면에서, 공중합체는 무작위 또는 블록일 수 있거나 또는 무작위 서열과 블록 서열의 조합을 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따르는 중합체는 유기 중합체이다.

[0207] 일부 실시양태에서, 상기 중합체는 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리아미드, 또는 폴리에테르, 또는 그의 단위를 포함한다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산), 또는 폴리카프롤락톤, 또는 그의 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체가 생분해성인 것이 바람직하다. 따라서, 이들 실시양태에서, 중합체가 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 단위를 포함하는 경우, 이러한 중합체는 폴리에테르와 생분해성 중합체의 블록 공중합체를 포함하여, 상기 중합체가 생분해성이 되도록 하는 것이 바람직하다. 다른 실시양태에서, 상기 중합체는 폴리에테르 또는 그의 단위, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 단위를 단독으로 포함하지 않는다.

[0208] 본 발명에 사용하기 적합한 중합체의 다른 예는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트 (예를 들어, 폴리(1,3-디옥산-2-온)), 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세박산 무수물)), 폴리프로필푸마레이트, 폴리아미드 (예를 들어, 폴리카프롤락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-코-글리

폴리드, 폴리카프롤락톤, 폴리히드록시산 (예를 들어, 폴리(β -히드록시알카노에이트)), 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 및 폴리아민, 폴리티신, 폴리티신-PEG 공중합체, 및 폴리(에틸렌이민), 폴리(에틸렌 이민)-PEG 공중합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0209] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따르는 중합체는 21 C.F.R. § 177.2600 하에 미국 식품의약국 (FDA)에 의해 인간에게 사용하도록 승인된 중합체를 포함하는데, 이는 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리카프롤락톤, 폴리발레롤락톤, 폴리(1,3-디옥산-2-온)); 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세박산 무수물)); 폴리에테르 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리시아노아크릴레이트를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0210] 일부 실시양태에서, 중합체는 친수성일 수 있다. 예를 들어, 중합체는 음이온성 기 (예를 들어, 포스페이트 기, 술페이트 기, 카르복실레이트 기); 양이온성 기 (예를 들어, 4급 아민 기); 또는 극성 기 (예를 들어, 히드록실 기, 티올 기, 아민 기)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체성 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 합성 나노담체 내에 친수성 환경을 생성시킨다. 일부 실시양태에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 중합체성 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 합성 나노담체 내에 소수성 환경을 생성시킨다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노담체 내에 혼입되는 물질의 성질에 강력한 영향을 미칠 수 있다.

[0211] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 모이어티 및/또는 관능성 기를 이용하여 변형시킬 수 있다. 각종 모이어티 또는 관능성 기가 본 발명에 따라서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 탄수화물; 및/또는 폴리스카라이드로부터 유래된 아사이클릭 폴리아세탈을 이용하여 변형시킬 수 있다 (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). 특정 실시양태는 미국 특허 번호 5543158 (Gref et al.), 또는 WO 공개 번호 W02009/051837 (Von Andrian et al.)의 일반적 교시를 이용하여 이루어질 수 있다.

[0212] 일부 실시양태에서, 중합체는 지질 또는 지방산 기를 이용하여 변형시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산, 또는 리그노세르산 중 하나 이상일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 팔미톨레산, 올레산, 박센산, 리놀레산, 알파-리놀레산, 감마-리놀레산, 아라키돈산, 가돌레산, 아라키돈산, 에이코사헨타에노산, 도코사헨타에노산, 또는 에룩산 중 하나 이상일 수 있다.

[0213] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에스테르일 수 있는데, 이는 락트산과 글리콜산 단위를 포함하는 공중합체, 예컨대 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드) (본원에서 집합적으로 "PLGA"로서 지칭됨); 및 글리콜산 단위를 포함하는 단독 중합체 (본원에서 "PGA"로서 지칭됨); 및 락트산 단위를 포함하는 단독 중합체, 예컨대 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드, 및 폴리-D,L-락티드 (본원에서 집합적으로 "PLA"로서 지칭됨)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예시적인 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리히드록시산; 락티드와 글리콜리드의 공중합체 및 PEG 공중합체 (예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체), 및 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리(카프롤락톤), 폴리(카프롤락톤)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[α -(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 그의 유도체를 포함한다.

[0214] 일부 실시양태에서, 중합체는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산과 글리콜산의 생체 적합성 및 생분해성 공중합체이고, 각종 형태의 PLGA는 락트산:글리콜산의 비로써 특징지을 수 있다. 락트산은 L-락트산, D-락트산, 또는 D,L-락트산일 수 있다. PLGA의 분해 속도는 락트산:글리콜산 비를 변경시킴으로써 조정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라서 사용될 PLGA는 대략 85:15, 대략 75:25, 대략 60:40, 대략 50:50, 대략 40:60, 대략 25:75, 또는 대략 15:85의 락트산:글리콜산 비로써 특징지을 수 있다.

[0215] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴성 중합체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 아크릴성 중합체는, 예를 들어 아크릴산과 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리시아노아크릴레이트, 및 전술된 중합체 중 하나 이상을 포함하는 조합물을 포함한다. 아크릴성 중합체는 4급 암모늄 기의 함량이 낮은 아크릴산과 메타크릴산 에스테르의 완전 중합된 공중합체를 포함할 수 있다.

- [0216] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 핵산의 음 전하를 띤 가닥을 응축 및/또는 보호할 수 있다. 아민 함유 중합체, 예컨대 폴리(리신) (문헌 [Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; and Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7]), 폴리(에틸렌 이민) (PEI; 문헌 [Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297]), 및 폴리(아미도아민) 덴드리머 (문헌 [Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; and Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372])가 생리학상 pH에서 음 전하를 띠어, 핵산과 이온 쌍을 형성한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 양이온성 중합체를 포함하지 않을 수 있다 (또는 이를 배제할 수 있다).
- [0217] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 측쇄를 보유하는 분해성 폴리에스테르일 수 있다 (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; and Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399). 이들 폴리에스테르의 예는 폴리(L-락티드-코-L-리신) (문헌 [Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010]), 폴리(세린 에스테르) (문헌 [Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399]), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (문헌 [Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; and Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633]), 및 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르) (문헌 [Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; and Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633])를 포함한다.
- [0218] 이들 및 다른 중합체의 특성, 및 이들의 제조 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,123,727; 5,804,178; 5,770,417; 5,736,372; 5,716,404; 6,095,148; 5,837,752; 5,902,599; 5,696,175; 5,514,378; 5,512,600; 5,399,665; 5,019,379; 5,010,167; 4,806,621; 4,638,045; 및 4,946,929; 문헌 [Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; and Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181] 참조). 보다 일반적으로, 특정의 적합한 중합체를 합성하는 각종 방법이 문헌 ([Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004; Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386]; 및 미국 특허 번호 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446, 및 6,818,732)에 기재되어 있다.
- [0219] 일부 실시양태에서, 중합체는 선형 또는 분지된 중합체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 덴드리머일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 서로 실질적으로 가교 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 가교 결합물이 실질적으로 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 가교 결합 단계를 진행하지 않으면서 본 발명에 따라서 사용될 수 있다. 합성 나노담체는 전술된 중합체 및 다른 중합체 중 임의의 것의 블록 공중합체, 그래프트 공중합체, 블렌드, 혼합물 및/또는 부가물을 포함할 수 있는 것으로 추가로 이해되어야 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 열거된 중합체가 본 발명에 따라서 사용될 수 있는 중합체의 포괄적인 목록이 아니라 예시적인 목록을 나타낸다는 것을 인식할 것이다.
- [0220] 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 중합체성 성분을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-중합체성 합성 나노담체는 비-중합체성 성분의 집합체, 예컨대 금속 원자 (예를 들어, 금 원자)의 집합체이다.
- [0221] 본원에 제공된 바와 같은 임의의 면역억제제는 일부 실시양태에서, 합성 나노담체, 항체 또는 그의 항원-결합성 단편 (또는 APC를 표적으로 하는 다른 리간드), 적혈구-결합성 펩티드 등과 커플링될 수 있다. 면역억제제는 스타틴; mTOR 억제제, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체; TGF- β 시그널링 작용제; TGF- β 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제; 코르티코스테로이드; 미토콘드리아성 기능의 억제제, 예컨대 로테논; P38 억제제; NF- κ B 억제제; 아데노신 수용체 효능제; 프로스타글란딘 E2 효능제; 포스포디에스테라제 억제제, 예컨대 포스포디에스테라제 4 억제제; 프로테아좀 억제제; 키나제 억제제; G-단백질 결합된 수용체 효능제; G-단백질 결합된 수용체 길항제; 글루코코르티코이드; 레티노이드; 시토카인 억제제; 시토카인 수용체 억제제; 시토카인 수용체 활성화제; 페록시좀 증식인자 활성화 수용체 길항제; 페록시좀 증식인자 활성화 수용체 효능제; 히스톤 데아세틸라제 억제제; 칼시뉴린 억제제; 포스포타제 억제제 및 산화된 ATP를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 면역억제제는 또한, IDO, 비타민 D3, 시클로스포린 A, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 레스베라트롤, 아자티오프린, 6-메르캅토프린, 아스피린, 니플람산, 에스트리올, 트리폴리드, 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-10), 시클로스포린 A, siRNA 표적화 시토카인 또는 시토카인 수용체 등을 포함한다.

- [0222] 스타틴의 예는 아토르바스타틴 (LIPITOR®, TORVAST®), 세리바스타틴, 플루바스타틴 (LESCOL®, LESCOL® XL), 로바스타틴 (MEVACOR®, ALTOCOR®, ALTOPREV®), 메바스타틴 (COMPACTIN®), 피타바스타틴 (LIVALO®, PIAVA®), 로수바스타틴 (PRAVACHOL®, SELEKTINE®, LIPOSTAT®), 로수바스타틴 (CRESTOR®), 및 심바스타틴 (ZOCOR®, LIPEX®)을 포함한다.
- [0223] mTOR 억제제의 예는 라파마이신 및 그의 유사체 (예를 들어, CCL-779, RAD001, AP23573, C20-메트알릴라파마이신 (C20-Marap), C16-(S)-부틸술폰아미도라파마이신 (C16-BSrap), C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신 (C16-iRap) (문헌 [Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107])), AZD8055, BEZ235 (NVP-BEZ235), 크리소판산 (크리소파놀), 데포롤리무스 (MK-8669), 에베롤리무스 (RAD0001), KU-0063794, PI-103, PP242, 템시롤리무스, 및 WYE-354 [셀렉 (Selleck; 미국 텍사스주 휴스턴)으로부터 입수 가능함]를 포함한다.
- [0224] TGF- β 시그널링 작용제의 예는 TGF- β 리간드 (예를 들어, 액티빈 A, GDF1, GDF11, 뼈 형성 단백질, 결절성, TGF- β) 및 그의 수용체 (예를 들어, ACVR1B, ACVR1C, ACVR2A, ACVR2B, BMPR2, BMPR1A, BMPR1B, TGF β RI, TGF β RII), R-SMADS/co-SMADS (예를 들어, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD8), 및 리간드 억제제 (예를 들어, 폴리스타틴, 노킨, 코르딘, DAN, 레프티, LTBP1, THBS1, 데코린)를 포함한다.
- [0225] 미토콘드리아성 기능의 억제제의 예는 아트락틸로시드 (디칼륨 염), 봉크레크산 (트리암모늄 염), 카르보닐 시아니드 m-클로로페닐히드라존, 카르복시아트락틸로시드 [예를 들어, 아트락틸리스 굼미페라 (*Atractylis gummifera*)로부터 유래됨], CGP-37157, (-)-데구엘린 [예를 들어, 문둘레아 세리세아 (*Mundulea sericea*)로부터 유래됨], F16, 헥소키나제 II VDAC 결합성 도메인 펩티드, 올리고마이신, 로테논, Ru360, SFK1, 및 발리노마이신 [예를 들어, 스트렙토마이세스 풀비시무스 (*Streptomyces fulvissimus*)로부터 유래됨] [EMD4바이오사이언스 (EMD4Biosciences; 미국)]을 포함한다.
- [0226] P38 억제제의 예는 SB-203580 (4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸술폰피닐페닐)-5-(4-피리딜)1H-이미다졸), SB-239063 (트랜스-1-(4-히드록시시클로헥실)-4-(플루오로페닐)-5-(2-메톡시-피리미딘-4-일)이미다졸), SB-220025 (5-(2-아미노-4-피리미디닐)-4-(4-플루오로페닐)-1-(4-피페리디닐)이미다졸), 및 ARRY-797을 포함한다.
- [0227] NF (예를 들어, NF- κ β) 억제제의 예는 IFRD1, 2-(1,8-나프티리딘-2-일)-페놀, 5-아미노살리실산, BAY 11-7082, BAY 11-7085, CAPE (카페산 켄에틸에스테르), 디에틸말레에이트, IKK-2 억제제 IV, IMD 0354, 락타시스틴, MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO], NF- κ β 활성화 억제제 III, NF- κ β 활성화 억제제 II, JSH-23, 파르테놀리드, 페닐아르신 옥사이드 (PAO), PPM-18, 피롤리딘디티오카르바산 암모늄 염, QNZ, RO 106-9920, 로카글라미드, 로카글라미드 AL, 로카글라미드 C, 로카글라미드 I, 로카글라미드 J, 로카글라울, (R)-MG-132, 소듐 살리실레이트, 트립톨리드 (PG490), 및 웨델로락톤을 포함한다.
- [0228] 아데노신 수용체 효능제의 예는 CGS-21680 및 ATL-146e를 포함한다.
- [0229] 프로스타글란딘 E2 효능제의 예는 E-프로스타노이드 2 및 E-프로스타노이드 4를 포함한다.
- [0230] 포스포디에스테라제 억제제 (비-선택적 및 선택적 억제제)의 예는 카페인, 아미노필린, IBMX (3-이소부틸-1-메틸크산틴), 파라크산틴, 펜톡시필린, 테오브로민, 테오픈린, 메틸화 크산틴, 빈포세틴, EHNA (에리트로-9-(2-히드록시-3-노닐)아데닌), 아나그렐리드, 에눅시몬 (PERFAN™), 밀리논, 레보시멘돈, 메세브린, 이부딜라스트, 피클라밀라스트, 루테올린, 드로타베린, 로플루밀라스트 (DAXAS™, DALIRESPT™), 실테나필 (REVATION®, VIAGRA®), 타달라필 (ADCIRCA®, CIALIS®), 바르데나필 (LEVITRA®, STAXYN®), 우데나필, 아바나필, 이카리인, 4-메틸피페라진, 및 피라졸로 피리미딘-7-1을 포함한다.
- [0231] 프로테아좀 억제제의 예는 보르테조미, 디술포람, 에피갈로카테킨-3-갈레이트, 및 살리노스포라미드 A를 포함한다.
- [0232] 키나제 억제제의 예는 베바시주맙, BIBW 2992, 세톡시맙 (ERBITUX®), 이마티닙 (GLEEVEC®), 트라스투주맙 (HERCEPTIN®), 게피티닙 (IRESSA®), 라니비주맙 (LUCENTIS®), 페갑타닙, 소라페닙, 다사티닙, 수니티닙, 에를로티닙, 닐로티닙, 라파티닙, 파니투무맙, 반데타닙, E7080, 파조파닙, 및 무브리티닙을 포함한다.
- [0233] 글루코코르티코이드의 예는 히드로코르티손 (코르티솔), 코르티손 아세테이트, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 텍사메타손, 베타메타손, 트리암시놀론, 베클로메타손, 플루드로코르티손 아세테이트, 데옥스코르티코스테론 아세테이트 (DOCA), 및 알도스테론을 포함한다.
- [0234] 레티노이드의 예는 레티놀, 레티날, 트레티노인 (레티노산, RETIN-A®), 이소트레티노인 (ACUTANE®, AMNESTEEM®, CLARAVIS®, SOTRET®), 알리트레티노인 (PANRETIN®), 에트레티네이트 (TEGISON™) 및 그의 대

사물 아시트레틴 (SORIATANE®), 타자로텐 (TAZORAC®, AVAGE®, ZORAC®), 벡사로텐 (TARGRETIN®), 및 아다 팔렌 (DIFFERIN®)을 포함한다.

- [0235] 시토카인 억제제의 예는 IL1ra, IL1 수용체 길항제, IGFBP, TNF-BF, 우로모듈린, 알파-2-매크로글로불린, 시클로스포린 A, 펜타미딘, 및 펜톡시필린 (PENTOPAK®, PENTOXIL®, TRENTAL®)을 포함한다.
- [0236] 페록시솜 증식인자 활성화 수용체 길항제의 예는 GW9662, PPAR γ 길항제 III, G335, 및 T0070907 [EMD4바이오 사이언스 (미국)]을 포함한다.
- [0237] 페록시솜 증식인자 활성화 수용체 효능제의 예는 피오글리타존, 시글리타존, 클로피브레이트, GW1929, GW7647, L-165,041, LY 171883, PPAR γ 활성화제, Fmoc-Leu, 트로글리타존, 및 WY-14643 [EMD4바이오사이언스 (미국)]을 포함한다.
- [0238] 히스톤 데아세틸라제 억제제의 예는 히드록삼산 (또는 히드록사메이트), 예컨대 트리코스타틴 A, 시클릭 테트라 펩티드 (예컨대 트라프신 B) 및 펩시펩티드, 벤자미드, 친전자성 케톤, 지방족산 화합물, 예컨대 페닐부티레이트 및 발프로산, 히드록삼산, 예컨대 보리노스타트 (SAHA), 벨리노스타트 (PXD101), LAQ824, 및 파노비노스타트 (LBH589), 벤자미드, 예컨대 엔티노스타트 (MS-275), CI994, 및 모세티노스타트 (MGCD0103), 니코틴아미드, NAD의 유도체, 디히드로코우마린, 나프토피라논, 및 2-히드록시나프알데히드를 포함한다.
- [0239] 칼시뉴린 억제제의 예는 시클로스포린, 피메크롤리무스, 보클로스포린, 및 타크롤리무스를 포함한다.
- [0240] 포스파타제 억제제의 예는 BN82002 히드로클로라이드, CP-91149, 칼리쿨린 A, 칸타리딘산, 칸타리딘, 시페르메 트린, 에틸-3,4-데포스타틴, 포스트리엔 나트륨 염, MAZ51, 메틸-3,4-데포스타틴, NSC 95397, 노르칸타리딘, 프로로센트룸 콘카BUM (prorocentrum concavum)으로부터의 오카다산 암모늄 염, 오카다산, 오카다산 칼륨 염, 오 카다산 나트륨 염, 페닐아르신 옥사이드, 각종 포스파타제 억제제 각테일, 단백질 포스파타제 1C, 단백질 포스 파타제 2A 억제제 단백질, 단백질 포스파타제 2A1, 단백질 포스파타제 2A2, 및 소듐 오르토바나데이트를 포함한 다.
- [0241] 본 발명에 따르는 조성물은 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 보존제, 완충제, 식염수, 또는 인산염 완충 식염수 를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제작 및 배합 기술을 이 용하여 만들 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사하기 위하여 멸균성 식염수 용액에 현 탁시킨다.
- [0242] **D. 조성물의 사용 및 제조 방법**
- [0243] 바이러스 전달 벡터는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되거나 또는 본원에 달리 기재된 바와 같은 방법 을 이용하여 만들 수 있다. 예를 들어, 바이러스 전달 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,797,368 및 문헌 [Laughlin et al., Gene, 23, 65-73 (1983)]에 제시된 방법을 이용하여 구축 및/또는 정제할 수 있다.
- [0244] 특정 예로서, 복제-결핍성 아데노바이러스 벡터는 고 역가의 바이러스 전달 벡터 스톱을 생성시키기 위해 적당 한 수준에서, 복제-결핍성 아데노바이러스 벡터에 존재하지 않지만, 바이러스 전파를 위해 필요한 유전자 기능 을 제공해 주는 상보성 세포주에서 생성될 수 있다. 이러한 상보성 세포주는 모든 아데노바이러스 기능 (예를 들어, 아데노바이러스 앰플리콘의 전파를 가능하게 해준다)을 포함한, 초기 영역, 후기 영역, 바이러스 패키징 영역, 바이러스 관련 RNA 영역, 또는 그의 조합에 의해 코딩된 적어도 한 가지의 복제-필수 유전자 기능에 있어 서의 결핍을 보완시켜 줄 수 있다. 상보성 세포주의 구축은 표준 분자 생물학 및 세포 배양 기술, 예컨대 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)]에 기재된 것을 포함한다.
- [0245] 아데노바이러스 벡터를 생성하기 위한 상보성 세포주는 293 세포 (예를 들어, 문헌 [Graham et al., J. Gen. Virol., 36, 59-72 (1977)]에 기재됨), PER.C6 세포 (예를 들어, 국제 특허 출원 WO 97/00326, 및 미국 특허 번호 5,994,128 및 6,033,908에 기재됨), 및 293-ORF6 세포 (예를 들어, 국제 특허 출원 WO 95/34671 및 문헌 [Brough et al., J. Virol., 71, 9206-9213 (1997)]에 기재됨)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 경 우에, 상보성 세포는 필요한 모든 아데노바이러스 유전자 기능을 보완하지 않을 것이다. 헬퍼 바이러스는 아데 노바이러스 벡터의 복제를 가능하게 해주는 세포성 또는 아데노바이러스 게놈에 의해 코딩되지 않은 트랜스에서 의 유전자 기능을 제공하기 위해 이용될 수 있다. 아데노바이러스 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,965,358, 5,994,128, 6,033,908, 6,168,941, 6,329,200, 6,383,795, 6,440,728, 6,447,995, 및 6,475,757,

미국 특허 출원 공개 번호 2002/0034735 A1, 및 국제 특허 출원 WO 98/53087, WO 98/56937, WO 99/15686, WO 99/54441, WO 00/12765, WO 01/77304, 및 WO 02/29388 뿐만 아니라 본원에서 확인된 다른 참고문헌에 제시된 물질 및 방법을 이용하여 구축, 전파 및/또는 정제할 수 있다. 아데노바이러스 혈청형 35 벡터를 포함한, 비-그룹 C 아데노바이러스 벡터는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,837,511 및 5,849,561, 및 국제 특허 출원 WO 97/12986 및 WO 98/53087에 제시된 방법을 이용하여 생성할 수 있다.

[0246] AAV 벡터는 재조합 방법을 이용하여 생성할 수 있다. 전형적으로, 이러한 방법은 AAV 캡시드 단백질 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 서열; 기능적 rep 유전자; AAV 역위 말단 반복 서열 (ITR) 및 트랜스진으로 구성된 재조합 AAV 벡터; 및 이러한 재조합 AAV 벡터를 AAV 캡시드 단백질 내로 패키징하는 것을 허용해 주는데 충분한 헬퍼 관능기를 함유하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터는 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 및 그의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 AAV 혈청형의 역위 말단 반복 서열 (ITR)을 포함할 수 있다.

[0247] rAAV 벡터를 AAV 캡시드에서 패키징하기 위해 숙주 세포에서 배양하고자 하는 성분은 이러한 숙주 세포에 트랜스로 제공될 수 있다. 또 다른 한편으로, 필요한 성분들 (예를 들어, 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열, 및/또는 헬퍼 관능기) 중 임의의 하나 이상은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 이용하여 상기 필요한 성분들 중 하나 이상을 함유하도록 조작시킨 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게, 상기 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하에 상기 필요한 성분(들)을 함유할 수 있다. 그러나, 이러한 필요한 성분(들)은 구성적 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 본 발명의 rAAV를 생성시키는 데 필요한 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열, 및 헬퍼 관능기는 임의의 적절한 유전 요소를 이용하여 패키징되는 숙주 세포에 전달할 수 있다. 이와 같이 선택된 유전 요소는 본원에 기재된 방법을 포함한, 임의의 적절한 방법에 의해 전달될 수 있다. 본 발명의 임의의 실시양태를 구축하기 위해 사용되는 방법은 핵산 조작에 있어서의 기술자에게 공지되어 있고, 이는 유전 공학, 재조합 공학, 및 합성 기술을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.] 참조). 유사하게, rAAV 비리온을 생성시키는 방법은 널리 공지되어 있고, 적합한 방법의 선택은 본 발명에 대해 제한적이지 않다 (예를 들어, 문헌 [K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1993)] 및 미국 특허 번호 5,478,745 참조).

[0248] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 벡터는 삼중 형질감염 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,001,650에 상세히 기재된 바와 같은데, 삼중 형질감염 방법에 관한 그의 내용이 본원에 참조로 포함된다)을 이용하여 생성할 수 있다. 전형적으로, 재조합 AAV는 숙주 세포를 AAV 입자 내로 패키징될 재조합 AAV 벡터 (트랜스진을 포함함), AAV 헬퍼 관능기 벡터, 및 보조 관능기 벡터로 형질감염시킴으로써 생성된다. 일반적으로, AAV 헬퍼 관능기 벡터는 생산적 AAV 복제 및 캡시드화를 위해 트랜스로 기능하는 AAV 헬퍼 관능기 서열 (rep 및 cap)을 코딩한다. 바람직하게, AAV 헬퍼 관능기 벡터는 임의의 검출 가능한 야생형 AAV 비리온 (즉, 기능적 rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 비리온)을 생성하지 않으면서도 효율적인 AAV 벡터 생성을 뒷받침해준다. 보조 관능기 벡터는 AAV가 복제에 대해 의존적인 비-AAV 유래 바이러스 및/또는 세포성 기능에 대한 뉴클레오타이드 서열을 코딩할 수 있다. 보조 관능기는 AAV 복제에 필요한 관능기를 포함하는데, 이는 AAV 유전자 전사의 활성화, 단계 특이적 AAV mRNA 스플라이싱, AAV DNA 복제, cap 발현 생성물의 합성, 및 AAV 캡시드 어셈블리에 관여한 모이어티를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 바이러스-기반 보조 관능기는 공지된 헬퍼 바이러스, 예컨대 아데노바이러스, 포진 바이러스 (단순 포진 바이러스 유형-1 이외의 바이러스), 및 백시니아 바이러스 중 임의의 것으로부터 유래될 수 있다.

[0249] 렌티바이러스 벡터는 관련 기술분야에 공지된 수많은 방법 중 임의의 것을 이용하여 생성될 수 있다. 렌티바이러스 벡터의 예 및/또는 그의 생성 방법은, 예를 들어 미국 공개 번호 20150224209, 20150203870, 20140335607, 20140248306, 20090148936, 및 20080254008에서 찾을 수 있는데, 이러한 렌티바이러스 벡터 및 생성 방법이 본원에 참조로 포함된다. 특정 예로서, 렌티바이러스 벡터가 통합-부적격한 경우, 이러한 렌티바이러스 게놈은 복제 기점 (ori)을 추가로 포함하는데, 그의 서열은 렌티바이러스 게놈이 발현되어야 할 세포의 성질에 의존적이다. 상기 복제 기점은 진핵 기원, 바람직하게 포유류 기원, 가장 바람직하게 인간 기원으로부터 유래될 수 있다. 렌티바이러스 게놈은 세포 숙주 게놈 내로 통합되지 않기 때문에 (결합하는 인테그라제에 기인함), 렌티바이러스 게놈은 빈번한 세포 분열을 겪는 세포에서 소실될 수 있는데; 이것은 면역 세포, 예컨대 B 또는 T 세포에서 특히 그렇다. 복제 기점의 존재는 일부 경우에 유리할 수 있다. 벡터 입자는 상기 플라스미드 또는 다른 과정에 의해 적절한 세포, 예컨대 293 T 세포의 형질감염 후에 생성될 수 있다. 렌티바이러스 입자의 발현을 위해 사용된 세포에서는, 상기 플라스미드의 전부 또는 일부를 이용하여 그들의 코딩 폴리뉴클레

오티드를 안정적으로 발현시킬 수 있거나, 또는 그들의 코딩 폴리뉴클레오티드를 일시적으로 또는 반안정적으로 발현시킬 수 있다.

[0250] 본원에 제공된 바와 같은 다른 바이러스 벡터의 생성 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 상기 예시된 방법과 유사할 수 있다. 더욱이, 바이러스 벡터는 시판되고 있다.

[0251] 실시양태에서, 특정의 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 제조하는 경우, 성분들을, 예를 들어 적혈구-결합성 펩티드, 항체 또는 그의 항원-결합성 단편 (또는 APC를 표적으로 하는 다른 리간드), 또는 합성 나노담체에 부착시키는 방법이 유용할 수 있다.

[0252] 특정 실시양태에서, 이러한 부착은 공유 링커일 수 있다. 실시양태에서, 본 발명에 따르는 면역억제제는 알킨기를 함유하는 면역억제제와 아지도 기와의 1,3-양극성 부가 환화 반응에 의해 형성되거나 또는 아지도기를 함유하는 면역억제제와 알킨과의 1,3-양극성 부가 환화 반응에 의해 형성된 1,2,3-트리아졸 링커를 통하여 외부 표면에 공유적으로 부착될 수 있다. 이러한 부가 환화 반응은 바람직하게, Cu(II) 화합물을 촉매적 활성 Cu(I) 화합물로 환원시켜 주는 환원제 및 적합한 Cu(I)-리간드와 함께 Cu(I) 촉매의 존재하에 수행된다. 이러한 Cu(I)-촉매된 아지도-알킨 부가 환화 (CuAAC)가 클릭(click) 반응으로서 지칭될 수도 있다.

[0253] 부가적으로, 공유 커플링은 아미드 링커, 디설피드 링커, 티오에테르 링커, 히드라존 링커, 히드라지드 링커, 이민 또는 옥심 링커, 우레아 또는 티오우레아 링커, 아미딘 링커, 아민 링커, 및 술폰아미드 링커를 포함하는 공유 링커를 포함할 수 있다.

[0254] 아미드 링커는 하나의 성분, 예컨대 면역억제제 상의 아민과 제2의 성분, 예컨대 나노담체의 카르복실산 기 간의 아미드 결합을 통하여 형성된다. 이러한 링커 내의 아미드 결합은 적합하게 보호된 아미노산과 활성화 카르복실산, 예컨대 N-히드록시숙신아미드-활성화 에스테르의 통상적인 아미드 결합 형성 반응 중 임의의 것을 이용하여 제조될 수 있다.

[0255] 디설피드 링커는, 예를 들어 R1-S-S-R2의 형태의 2개의 황 원자 간의 디설피드 (S-S) 결합의 형성을 통하여 제조된다. 디설피드 결합은 티올/머캅탄 기 (-SH)를 함유하는 특정 성분을 또 다른 활성화 티올 기로 티올 교환시키거나, 또는 티올/머캅탄 기를 함유하는 특정 성분을 활성화 티올 기를 함유하는 특정 성분으로 티올 교환시킴으로써 형성될 수 있다.



[0256] 트리아졸 링커, 구체적으로 형태  의 1,2,3-트리아졸 (여기서, R1 및 R2는 임의의 화학적 실체일 수 있다)은 제1 성분에 부착된 아지도와 제2 성분, 예컨대 면역억제제에 부착된 말단 알킨의 1,3-양극성 부가 환화 반응에 의해 제조된다. 이러한 1,3-양극성 부가 환화 반응은 1,2,3-트리아졸 관능기를 통하여 상기 2개의 성분을 연결시켜 주는 촉매의 존재 또는 부재하에, 바람직하게 Cu(I)-촉매의 존재하에 수행된다. 이러한 화학은 문헌 ([Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002)] 및 [Meldal, et al., Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015])에 상세히 기재되어 있고, 종종 "클릭" 반응 또는 CuAAC로서 지칭된다.

[0257] 티오에테르 링커는, 예를 들어 R1-S-R2의 형태의 황-탄소 (티오에테르) 결합의 형성에 의해 제조된다. 티오에테르는 하나의 성분 상의 티올/머캅탄 (-SH) 기를 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드 또는 에폭시드로 알킬화시킴으로써 제조될 수 있다. 티오에테르 링커는 또한, 하나의 성분 상의 티올/머캅탄 기를, 마이클 (Michael) 수용체로서 말레이미드 기 또는 비닐 술폰 기를 함유하는 제2 성분 상의 전자 결핍성 알켄 기에 마이클 부가함으로써 형성될 수 있다. 또 다른 방식에서, 티오에테르 링커는 하나의 성분 상의 티올/머캅탄 기를 제2 성분 상의 알켄 기와 라디칼 티올-엔 반응시킴으로써 제조할 수 있다.

[0258] 히드라존 링커는 하나의 성분 상의 히드라지드 기를 제2 성분 상의 알데히드/케톤 기와 반응시킴으로써 제조된다.

[0259] 히드라지드 링커는 하나의 성분 상의 히드라진 기를 제2 성분 상의 카르복실산 기와 반응시킴으로써 형성된다. 이러한 반응은 일반적으로, 카르복실산을 활성화 시약으로 활성화시키는 아미드 결합의 형성과 유사한 화학을 이용하여 수행된다.

[0260] 이민 또는 옥심 링커는 하나의 성분 상의 아민 또는 N-알콕시아민 (또는 아미노옥시) 기를 제2 성분 상의 알데

히드 또는 케톤 기와 반응시킴으로써 형성된다.

- [0261] 우레아 또는 티오우레아 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 이소시아네이트 또는 티오이소시아네이트 기와 반응시킴으로써 제조된다.
- [0262] 아미딘 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 이미도에스테르 기와 반응시킴으로써 제조된다.
- [0263] 아민 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 알킬화 기, 예컨대 할라이드, 에폭시드, 또는 술포네이트 에스테르 기와 알킬화 반응시킴으로써 제조된다. 또 다른 한편으로, 아민 링커는 또한, 하나의 성분 상의 아민 기를, 적합한 환원 시약, 예컨대 소듐 시아노보로하이드라이드 또는 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드를 이용하여 제2 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기로 환원적 아민화함으로써 제조될 수 있다.
- [0264] 술포아미드 링커는 하나의 성분 상의 아민 기를 제2 성분 상의 술포닐 할라이드 (예컨대 술포닐 클로라이드) 기와 반응시킴으로써 제조된다.
- [0265] 술포 링커는 친핵체를 비닐 술포에 마이클 부가함으로써 제조된다. 비닐 술포 또는 친핵체 중 하나는 나노담체의 표면 상에 있거나 또는 특정 성분에 부착될 수 있다.
- [0266] 이러한 성분은 또한, 비-공유 접합 방법을 통하여 접합될 수 있다. 예를 들어, 음 전하를 띤 면역억제제는 정전기 흡착을 통하여 양 전하를 띤 성분과 접합될 수 있다. 금속 리간드를 함유하는 성분이 또한, 금속-리간드 복합체를 통하여 금속 복합체와 접합될 수 있다.
- [0267] 실시양태에서, 상기 성분은 합성 나노담체의 어셈블리에 앞서, 중합체, 예를 들어 폴리락트산-블록-폴리에틸렌 글리콜에 부착될 수 있거나 또는 합성 나노담체는 그의 표면 상의 반응성 또는 활성화될 수 있는 기와 함께 형성될 수 있다. 후자의 경우에, 상기 성분은 합성 나노담체의 표면에 의해 제시되는 부착 화학과 적합성인 기를 이용하여 제조할 수 있다. 다른 실시양태에서, 펩티드 성분은 적합한 링커를 이용하여 VLP 또는 리포솜에 부착시킬 수 있다. 링커는 2개의 분자를 함께 커플링할 수 있는 화합물 또는 시약이다. 특정 실시양태에서, 링커는 문헌 [Hermanson 2008]에 기재된 바와 같은 동종 이관능성 또는 이종 이관능성 시약일 수 있다. 예를 들어, 표면 상에 카르복실기를 함유하는 VLP 또는 리포솜 합성 나노담체는 EDC의 존재하에 동종 이관능성 링커인 아디프산 디히드라이드 (ADH)로 처리하여, 이러한 ADH 링커를 수반하는 상응하는 합성 나노담체를 형성시킬 수 있다. 이어서, 이로써 생성되는 ADH 연결된 합성 나노담체를, 나노담체 상의 ADH 링커의 다른 말단을 통하여 산 기를 함유하는 펩티드 성분과 접합시켜 상응하는 VLP 또는 리포솜 펩티드 접합체를 생성시킨다.
- [0268] 실시양태에서, 특정 중합체 쇄에 대해 말단인 아지드 또는 알킨 기를 함유하는 중합체를 제조한다. 이어서, 이러한 중합체를 사용하여, 복수 개의 알킨 또는 아지드 기가 합성 나노담체의 표면 위에 위치하는 방식으로 합성 나노담체를 제조한다. 또 다른 한편으로, 이러한 합성 나노담체는 또 다른 경로에 의해 제조한 다음, 연속해서 알킨 또는 아지드 기로 관능성화할 수 있다. 상기 성분은 알킨 기의 존재하에 (중합체가 아지드를 함유하는 경우) 또는 아지드 기의 존재하에 (중합체가 알킨을 함유하는 경우) 제조한다. 이어서, 상기 성분은, 이러한 성분을 1,4-이치환된 1,2,3-트리아졸 링커를 통하여 입자에 공유적으로 부착시켜 주는 촉매의 존재 또는 부재 하에 1,3-양극성 부가 환화 반응을 통하여 상기 나노담체와 반응될 수 있다.
- [0269] 상기 성분이 작은 분자인 경우, 합성 나노담체의 어셈블리에 앞서, 상기 성분을 중합체에 부착시키는 것이 유리할 수 있다. 실시양태에서, 상기 성분을 중합체에 부착시킨 다음 이러한 중합체 접합체를 합성 나노담체의 구축에 사용하기 보다는 오히려 표면 기의 사용을 통하여 상기 성분을 합성 나노담체에 부착시키기 위해 사용되는 표면 기를 이용하여 합성 나노담체를 제조하는 것이 유리할 수도 있다.
- [0270] 이용 가능한 접합 방법에 관한 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition Published by Academic Press, Inc., 2008]을 참조할 수 있다. 공유 부착 외에도, 상기 성분은 미리 형성된 합성 나노담체에 흡착시킴으로써 부착시킬 수 있거나 또는 합성 나노담체의 형성 동안 피막화함으로써 부착시킬 수 있다.
- [0271] 합성 나노담체는 관련 기술분야에 공지된 각종 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체는 나노 침전, 유체 채널을 이용한 유동 포커싱, 분무 건조, 단일 및 이중 에멀션 용매 증발, 용매 추출, 상 분리, 분쇄, 마이크로에멀션 과정, 마이크로제작, 나노제작, 희생 층, 단순 및 복잡 액적 형성과 같은 방법, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 방법에 의해 형성될 수 있다. 또 다른 한편으로 또는 부가적으로, 단분산 반도체, 전도성, 자기, 유기 및 기타 나노물질에 대한 수성 및 유기 용매 합성이 다음 문헌에 기재되었다 (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; and

Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). 부가의 방법이 다음 문헌에 기재되었다 (예를 들어, 문헌 [Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; and Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755]; 미국 특허 번호 5578325 및 6007845; 문헌 [P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)] 참조).

- [0272] 물질은 문헌 [C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" Nanomedicine 2:8-21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 각종 방법을 이용하여 바람직한 바와 같이 합성 나노담체 내로 피막화시킬 수 있다. 물질을 합성 나노담체 내로 피막화시키기에 적합한 다른 방법을 사용할 수 있는데, 이는 2003년 10월 14일자로 허여된 미국 특허 번호 6,632,671 (Unger)에 개시된 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0273] 특정 실시양태에서, 합성 나노담체는 나노침전 과정 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 합성 나노담체를 제조하는 데 사용된 조건은 목적하는 크기 또는 특성 (예를 들어, 소수성, 친수성, 외부 형태, "점착성", 형상 등)의 입자를 산출하기 위해 변경시킬 수 있다. 합성 나노담체의 제조 방법 및 사용된 조건 (예를 들어, 용매, 온도, 농도, 공기 유속 등)은 합성 나노담체에 부착될 물질 및/또는 중합체 매트릭스의 구성에 좌우될 수 있다.
- [0274] 상기 방법 중 임의의 것에 의해 제조된 합성 나노담체가 목적하는 범위를 벗어난 크기 범위를 갖는 경우, 합성 나노담체는, 예를 들어 시빙(sieve)을 이용하여 크기를 바꿀 수 있다.
- [0275] 합성 나노담체의 요소들은, 예를 들어 하나 이상의 공유 결합에 의해 전체 합성 나노담체에 부착될 수 있거나, 또는 하나 이상의 링커를 통하여 부착될 수 있다. 합성 나노담체를 관능성화하는 부가의 방법은 공개된 미국 특허 출원 2006/0002852 (Saltzman et al.), 공개된 미국 특허 출원 2009/0028910 (DeSimone et al.), 또는 공개된 국제 특허 출원 WO/2008/127532 A1 (Murthy et al.)로부터 각색될 수 있다.
- [0276] 또 다른 한편으로 또는 부가적으로, 합성 나노담체는 비-공유적 상호 작용을 통하여 성분들에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 비-공유적 실시양태에서, 비-공유적 부착은 전하 상호 작용, 친화 상호 작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트 상호 작용, 소수성 상호 작용, TT 스택킹 상호 작용, 수소 결합 상호 작용, 반 데르 발스 상호 작용, 자기적 상호 작용, 정전기 상호 작용, 쌍극자-쌍극자 상호 작용, 및/또는 그의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 비-공유적 상호 작용에 의해 매개된다. 이러한 부착은 합성 나노담체의 외부 표면 또는 내부 표면 상에 있도록 배열될 수 있다. 실시양태에서, 피막화 및/또는 흡착이 부착의 한 형태이다.
- [0277] 본원에 제공된 조성물은 무기 또는 유기 완충제 (예를 들어, 인산염, 탄산염, 아세테이트 또는 시트레이트의 나트륨 또는 칼륨 염) 및 pH 조정제 (예를 들어, 염산, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨, 시트레이트 또는 아세테이트의 염, 아미노산 및 그의 염), 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 알파-토코페롤), 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌 9-10 노닐 페놀, 소듐 데속시콜레이트), 용해 및/또는 냉동/동결 안정화제 (예를 들어, 수크로스, 락토스, 만니톨, 트레할로스), 삼투압 조정제 (예를 들어, 염 또는 당), 항박테리아제 (예를 들어, 벤조산, 페놀, 젠타미신), 거품 억제제 (예를 들어, 폴리디메틸실로잔), 보존제 (예를 들어, 티메로살, 2-페녹시에탄올, EDTA), 중합체성 안정화제 및 점도 조정제 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 폴록사머 488, 카르복시메틸셀룰로스) 및 보조 용매 (예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올)를 포함할 수 있다.
- [0278] 본 발명에 따르는 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제작 및 배합 기술을 이용하여 만들 수 있다. 본 발명을 실시하는 데 사용하기 적합한 기술은 문헌 [Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Edited by Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; and Pharmaceuticals: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone]에서 찾을 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사하기 위하여 멸균성 식염수 용액에 현탁시킨다.

- [0279] 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 방식으로 제조할 수 있고, 본 발명은 본원에 기재된 방법을 이용하여 생성될 수 있는 조성물로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 적절한 제작 방법을 선택하기 위해서는 연관된 특별한 모어어티의 특성에 주의를 기울여야 할 수도 있다.
- [0280] 일부 실시양태에서, 조성물은 멸균성 조건하에 제작되거나 또는 최종적으로 멸균된다. 이는 이로써 생성되는 조성물이 멸균성이면서 비-감염성이라는 것을 보장하므로, 비-멸균성 조성물과 비교해서 안전성을 개선시킬 수 있다. 이것은, 특히 조성물을 투여받는 대상체가 면역 결함이 있고/있거나, 감염으로 인해 고통받고 있고/있거나 감염되기 쉬운 경우에, 중요한 안전 조치를 제공한다.
- [0281] 본 발명에 따르는 투여는 피하, 정맥내, 근육내 및 복강내 경로를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 각종 경로에 의할 수 있다. 본원에서 지칭된 조성물은 통상적인 방법을 이용하여 투여하기 위해, 일부 실시양태에서 동반 투여하기 위해 제작 및 제조할 수 있다.
- [0282] 본 발명의 조성물은 유효량, 예컨대 본원의 다른 곳에 기재된 유효량으로 투여할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 및/또는 바이러스 전달 벡터는 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응을 약화시키기에 유효하거나 또는 대상체에 대한 바이러스 전달 벡터의 재투여를 허용하는 데 유효한 양으로 투여 형태에 존재한다. 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 및/또는 바이러스 전달 벡터는 대상체에서의 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시키기에 유효한 양으로 투여 형태에 존재한다. 바람직한 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 및/또는 바이러스 전달 벡터는 대상체에게 동반 투여하는 경우와 같이, 바이러스 전달 벡터에 대한 면역 반응을 저하시키기에 유효한 양으로 투여 형태에 존재한다. 투여 형태는 각종 빈도로 투여할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 바이러스 전달 벡터와 함께 반복해서 투여하는 것이 진행된다.
- [0283] 본 발명의 측면은 본원에 제공된 바와 같은 투여 방법을 위한 프로토콜을 결정하는 것에 관한 것이다. 프로토콜은 바이러스 전달 벡터 및 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 적어도 빈도, 투여량을 다양하게 한 다음, 연속해서 목적하거나 또는 바람직하지 못한 면역 반응을 평가함으로써 결정될 수 있다. 본 발명을 실시하는 데 바람직한 프로토콜은 바이러스 전달 벡터에 대항한 면역 반응을 저하시키고/시키거나, 항-바이러스 전달 벡터 반응을 약화시키고/시키거나 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시켜 준다. 이러한 프로토콜은 바이러스 전달 벡터 및 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 적어도 투여 빈도 및 용량을 포함한다.
- [0284] **실시예**
- [0285] **실시예 1: 중합체-라파마이신 접합체를 함유하는 중합체성 나노담체 (예측)**
- [0286] PLGA-라파마이신 접합체의 제조:
- [0287] 산 말단기를 수반하는 PLGA 중합체 [7525 DLG1A, 산성도 지수 0.46 mmol/g,레이크쇼어 바이오머티리얼즈 (Lakeshore Biomaterials); 5 g, 2.3 mmol, 1.0 eq]를 30 mL의 디클로로메탄 (DCM)에 용해시킨다. N,N-디시클로헥실카르보디미드 (1.2 eq, 2.8 mmol, 0.57 g)를 가한 다음, 라파마이신 (1.0 eq, 2.3 mmol, 2.1 g) 및 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP) (2.0 eq, 4.6 mmol, 0.56 g)을 가한다. 이 혼합물을 실온에서 2일 동안 교반시킨다. 이어서, 혼합물을 여과시켜 불용성 디시클로헥실우레아를 제거한다. 여액을 약 10 mL 용적이 되도록 농축시키고, 100 mL의 이소프로필 알콜 (IPA)에 부가하여 PLGA-라파마이신 접합체를 침전시킨다. IPA 층을 제거한 다음, 중합체를 50 mL의 IPA 및 50 mL의 메틸 t-부틸 에테르 (MTBE)로 세척한다. 이어서, 상기 중합체를 35℃ 하에 2일 동안 진공하에 건조시켜 PLGA-라파마이신을 백색 고체로서 수득한다 (약 6.5 g).
- [0288] PLGA-라파마이신을 함유하는 나노담체를 다음과 같이 제조한다:
- [0289] 나노담체 형성을 위한 용액을 다음과 같이 제조한다:
- [0290] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중의 PLGA-라파마이신 @ 100 mg/mL. 이 용액은 PLGA-라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드에 용해시킴으로써 제조한다. 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중의 PLA-PEG @ 100 mg/mL. 이 용액은 PLA-PEG를 순수한 메틸렌 클로라이드에 용해시킴으로써 제조한다. 용액 3: 100 mM pH 8 인산염 완충제 중의 폴리비닐 알콜 @ 50 mg/mL.
- [0291] 1차 유증수 에멀션을 먼저 제조한다. W1/O1은 용액 1 (0.75 mL)과 용액 2 (0.25 mL)를 작은 압력 튜브에서 합하고, 브랜슨 디지털 소니파이어(Branson Digital Sonifier) 250을 이용하여 50% 진폭하에 40초 동안 초음파 처리함으로써 제조한다. 이어서, 2차 에멀션 (W1/O1/W2)은 용액 3 (3.0 mL)을 상기 1차 W1/O1 에멀션과 합하고, 10초 동안 와동시키며, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 이용하여 30% 진폭하에 60초 동안 초음파 처리

함으로써 제조한다. W1/O1/W2 에멀션을, 70 mM pH 8 인산염 완충제 용액 (30 mL)을 함유하는 비커에 가하고, 실온하에 2시간 동안 교반시켜 메틸렌 클로라이드를 증발시키고 나노담체를 형성할 수 있다. 이러한 나노담체의 특정 부분은, 나노담체 현탁액을 원심분리용 튜브에 옮기고, 75,600 xg 및 4℃에서 35분 동안 원심분리시켜 계면활성제를 제거하며 펠릿을 인산염 완충 식염수에 재현탁시킴으로써 세척한다. 이러한 세척 과정을 반복하고, 펠릿을 인산염 완충 식염수에 재현탁시켜 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 분산액이 되도록 한다.

[0292] 실시예 2: 라파마이신을 함유하는 금 나노담체 (AuNC)의 제조 (예측)

[0293] HS-PEG-라파마이신의 제조:

[0294] 무수 DMF 중의 PEG 산 디설피드 (1.0 eq), 라파마이신 (2.0-2.5 eq), DCC (2.5 eq) 및 DMAP (3.0 eq)의 용액을 실온하에 밤새 교반시킨다. 불용성 디시클로헥실우레아를 여과에 의해 제거하고, 여액을 이소프로필 알콜 (IPA)에 가하여 PEG-디설피드-디-라파마이신 에스테르를 침전시키며, IPA로 세척하고 건조시킨다. 이어서, 상기 중합체를 DMF 중의 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드록로라이드로 처리하여 PEG 디설피드를 티올 PEG 라파마이신 에스테르 (HS-PEG-라파마이신)로 환원시킨다. 이로써 생성되는 중합체는 IPA로부터 침전시킴으로써 회수하고, 이전에 기재된 바와 같이 건조시키며 H NMR 및 GPC에 의해 분석한다.

[0295] 금 NC (AuNC)의 형성:

[0296] 500 mL의 1 mM HAuCl₄의 수성 용액을, 응축기가 장착된 1 L용 환저 플라스크에서 격렬하게 교반시키면서 10분 동안 환류 가열한다. 이어서, 50 mL의 40 mM 시트르산삼나트륨의 용액을 상기 교반 용액에 신속하게 가한다. 이로써 생성되는 진한 와인 적색 용액을 25 내지 30분 동안 환류하에 유지시키고, 열을 제거한 다음, 용액을 실온으로 냉각시킨다. 이어서, 상기 용액을 0.8 μm 막 필터를 통하여 여과시켜 AuNC 용액을 수득한다. 이러한 AuNC는 가시적 분광법 및 전송 전자 현미경을 이용하여 명확하게 규명한다. AuNC는 520 nm 하에서의 피크 흡수를 나타내는 시트레이트에 의해 캡핑된 대략 20 nm 직경이다.

[0297] HS-PEG-라파마이신과의 AuNC 접합체:

[0298] 150 μL의 HS-PEG-라파마이신 용액 (10 mM pH 9.0 탄산염 완충제 중의 10 μM)을 1 mL의 20 nm 직경 시트레이트-캡핑된 금 나노담체 (1.16 nM)에 가하여 2,500:1의 티올 대 금의 몰 비를 생성시킨다. 이 혼합물을 아르곤 하에 실온에서 1시간 동안 교반시켜 티올을 금 나노담체 상의 시트레이트로 완전히 교환시킬 수 있다. 이어서, 그 표면 상에 PEG-라파마이신을 수반한 AuNC를 12,000 g에서 30분 동안 원심분리시킴으로써 정제한다. 상등액을 경사 제거한 다음, AuNC-S-PEG-라파마이신을 함유하는 펠릿을 1x PBS 완충제로 세척한다. 이어서, 정제된 금-PEG-라파마이신 나노담체를, 추가의 분석 및 생물 검정을 위하여 적합한 완충제에 재현탁시킨다.

[0299] 실시예 3: 이부프로펜이 부착된 메소다공성 실리카 나노입자 (예측)

[0300] 메소다공성 SiO₂ 나노입자 코어는 졸-겔 공정을 통하여 창출시킨다. 헥사데실트리메틸-암모늄 브로마이드 (CTAB) (0.5 g)를 탈이온수 (500 mL)에 용해시킨 다음, 2 M 수성 NaOH 용액 (3.5 mL)을 CTAB 용액에 가한다. 이 용액을 30분 동안 교반시킨 다음, 테트라에톡시실란 (TEOS) (2.5 mL)을 상기 용액에 가한다. 이로써 생성되는 겔을 80℃의 온도하에 3시간 동안 교반시킨다. 형성되는 백색 침전물을 여과시킴으로써 포획한 다음, 탈이온수로 세척하고 실온하에 건조시킨다. 이어서, HCl의 에탄올성 용액에 밤새 현탁시킴으로써 잔여 계면활성제를 입자로부터 추출한다. 이러한 입자를 에탄올로 세척하고, 원심분리한 다음, 초음파처리 하에 재분산시킨다. 이러한 세척 과정을 2회 더 반복한다.

[0301] 이어서, SiO₂ 나노입자를, (3-아미노프로필)-트리에톡시실란 (APTMS)을 이용하여 아미노기로 관능성화한다. 이를 위하여, 상기 입자를 에탄올 (30 mL)에 현탁시키고, APTMS (50 μL)를 이러한 현탁액에 부가한다. 이 현탁액을 실온하에 2시간 동안 정치시켜 둔 다음, 4시간 동안 비등시키고, 에탄올을 주기적으로 부가함으로써 용적을 일정하게 유지시켰다. 원심분리함으로써 세척하는 것을 5 사이클 수행하고, 순수한 에탄올에 재분산시킴으로써 잔여 반응물을 제거한다.

[0302] 별도의 반응에서는, 1 내지 4 nm 직경의 금 시드를 창출시킨다. 이러한 반응에 사용된 모든 물은 먼저, 탈이온화된 다음, 유리로부터 증류된다. 물 (45.5 mL)을 100 mL용 환저 플라스크에 가한다. 교반시키는 동안, 0.2 M 수성 NaOH (1.5 mL)를 가한 다음, 테트라키스(히드록시메틸)포스포늄 클로라이드 (THPC)의 1% 수성 용액 (1.0 mL)을 가한다. THPC 용액을 부가한지 2분 후에, 적어도 15분 동안 숙성시킨 클로로아우르산의 10 mg/mL 수성 용액 (2 mL)을 가한다. 상기 금 시드를 물에 대향하여 투석함으로써 정제한다.

[0303] 코어-셸 나노담체를 형성하기 위하여, 상기 형성된 아미노-관능성화 SiO₂ 나노입자를 먼저, 실온하에 2시간 동

안 상기 금 시드와 혼합한다. 이와 같이 금 장식된 SiO₂ 입자는 원심분리를 통하여 수집하고, 클로로아우르산 및 중탄산칼륨의 수성 용액과 혼합하여 금 셸을 형성한다. 이어서, 상기 입자를 원심분리함으로써 세척하고, 물에 재분산시킨다. 상기 입자를 소듐 이부프로펜 (1 mg/L) 용액에 72시간 동안 현탁시킴으로써 이부프로펜을 부하한다. 이어서, 유리 이부프로펜을 원심분리함으로써 상기 입자로부터 세척하고, 물에 재분산시킨다.

[0304] 실시예 4: 시클로스포린 A를 함유하는 리포솜 (예측)

상기 리포솜은 박막 수화를 이용하여 형성한다. 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC) (32 μmol), 콜레스테롤 (32 μmol), 및 시클로스포린 A (6.4 μmol)를 순수한 클로로포름 (3 mL)에 용해시킨다. 이러한 지질 용액을 50 mL용 환저 플라스크에 가하고, 용매를 60℃의 온도하에 회전 증발기 상에서 증발시킨다. 이어서, 상기 플라스크를 질소 기체로 플러시하여 잔여 용매를 제거한다. 인산염 완충 식염수 (2 mL) 및 5개의 유리 비드를 상기 플라스크에 가하고, 지질 막을 60℃에서 1시간 동안 진탕시킴으로써 수화시켜 현탁액을 형성시킨다. 이러한 현탁액을 작은 압력 튜브로 옮기고 각 펄스 사이에 30초 지연이 있는 30초 펄스의 4 사이클 동안 60℃에서 초음파 처리한다. 그 다음, 현탁액을 완전히 수화되도록 2시간 동안 실온하에 그대로 둔다. 리포솜은 원심 분리한 다음 신선한 인산염 완충 식염수에 재현탁시킴으로써 세척한다.

[0306] 실시예 5: 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체

[0307] 물질

라파마이신은 TSZ CHEM (미국 매사추세츠주 01702 프레이밍햄 윌슨 스트리트 185; 생성물 카탈로그 # R1017)으로부터 구입하였다. 76% 락티드 및 24% 글리콜리드 함량과 0.69 dL/g의 고유 점도를 수반한 PLGA는 수르모디스 파마슈티칼즈 (SurModics Pharmaceuticals; 미국 앨라배마주 35211 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756; 생성물 코드 7525 DLG 7A)로부터 구입하였다. 대략 5,000 Da의 PEG 블록과 대략 40,000 Da의 PLA 블록을 수반한 PLA-PEG 블록 공중합체는 수르모디스 파마슈티칼즈 (미국 앨라배마주 35211 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)로부터 구입하였다 (생성물 코드 100 DL mPEG 5000 5CE). 폴리비닐 알콜 (85 내지 89% 가수분해됨)은 EMD 케미칼즈 (Chemicals)로부터 구입하였다 (생성물 번호 1.41350.1001).

[0309] 방법

[0310] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0311] 용액 1: 메틸렌 클로라이드 중의 75 mg/mL 하의 PLGA 및 25 mg/mL 하의 PLA-PEG. 이 용액은 PLGA와 PLA-PEG를 순수한 메틸렌 클로라이드에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0312] 용액 2: 메틸렌 클로라이드 중의 100 mg/mL 하의 라파마이신. 이 용액은 라파마이신을 순수한 메틸렌 클로라이드에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0313] 용액 3: 100 mM pH 8 인산염 완충제 중의 50 mg/mL 하의 폴리비닐 알콜.

[0314] 수중유 에멀션을 사용하여 나노담체를 제조하였다. O/W 에멀션은 용액 1 (1 mL), 용액 2 (0.1 mL) 및 용액 3 (3 mL)을 작은 압력 튜브에서 합하고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 이용하여 30% 진폭하에 60초 동안 초음파 처리함으로써 제조하였다. 상기 O/W 에멀션을, 70 mM pH 8 인산염 완충제 용액 (30 mL)을 함유하는 비커에 가하고, 실온하에 2시간 동안 교반시켜 메틸렌 클로라이드를 증발시키고 나노담체를 형성할 수 있다. 이러한 나노담체의 특정 부분은, 나노담체 현탁액을 원심분리용 튜브에 옮기고, 75,000 xg 및 4℃에서 35분 동안 원심분리시켜 계면활성제를 제거하고 펠릿을 인산염 완충 식염수에 재현탁시킴으로써 세척하였다. 이러한 세척 과정을 반복하였고, 펠릿을 인산염 완충 식염수에 재현탁시켜 약 10 mg/mL의 최종 나노담체 분산액이 되도록 하였다.

[0315] 나노담체 크기를 동적 광산란에 의해 결정하였다. 나노담체 중의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 1 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량법에 의해 결정하였다.

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)
227	6.4

[0317] 실시예 6: GSK1059615를 포함하는 합성 나노담체

[0318]

물질

[0319]

GSK1059615는 메드켄 익스프레스 (MedChem Express; 미국 뉴저지주 08852 스위트 102D 몬모스 정션 디어 파크 드라이브 11)로부터 구입하였다 (생성물 코드 HY-12036). 1:1의 락티드:글리콜리드 비와 0.24 dL/g의 고유 점도를 수반한 PLGA는 레이크쇼어 바이오머티리얼즈 (미국 앨라배마주 35211 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)로부터 구입하였다 (생성물 코드 5050 DLG 2.5A). 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 말단화 PEG 블록과 0.26 DL/g의 전체 고유 점도를 수반한 PLA-PEG-OMe 블록 공중합체는 레이크쇼어 바이오머티리얼즈 (미국 앨라배마주 35211 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)로부터 구입하였다 (생성물 코드 100 DL mPEG 5000 5K-E). 셀그로(Cellgro) 인산염 완충 식염수 1X pH 7.4 (PBS 1X)는 코닝 (Corning; 미국 버지니아주 20109 매너서스 디스커버리 블러바드 9345)으로부터 구입하였다 (생성물 코드 21-040-CV).

[0320]

방법

[0321]

용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0322]

용액 1: PLGA (125 mg), 및 PLA-PEG-OMe (125 mg)를 10 mL의 아세톤에 용해시켰다. 용액 2: GSK1059615를 1 mL의 N-메틸-2-피롤리딘온 (NMP) 중에서 10 mg으로 제조하였다.

[0323]

용액 1 (4 mL)과 용액 2 (0.25 mL)를 작은 유리 압력 튜브에서 합하고, 이 혼합물을, 20 mL의 초순수 물을 함유하는 250 mL용 환저 플라스크에 교반하에 적가함으로써 나노담체를 제조하였다. 상기 플라스크를 회전 증발 장치 상에 고정시키고, 아세톤을 감압하에 제거하였다. 이러한 나노담체의 특정 부분은, 나노담체 현탁액을 원심 분리용 튜브에 옮기고 75,600 rcf 및 4°C에서 50분 동안 원심분리시키며, 계면활성제를 제거하고 펠릿을 PBS 1X에 재현탁시킴으로써 세척하였다. 이러한 세척 과정을 반복하였고, 펠릿을 PBS 1X에 재현탁시켜, 중합체를 기준으로 하여 10 mg/mL의 명목 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 이어서, 이와 같이 세척한 나노담체 용액을, 폴 (Pall; 부품 번호 4656)로부터의 1.2 µm PES 막 주사기 필터를 이용하여 여과하였다. 동일한 나노담체 용액을 상기와 같이 제조하였고, 여과 단계 후에 첫 번째 것과 함께 풀링하였다. 균질한 현탁액을 -20°C에서 동결 저장하였다.

[0324]

나노담체 크기는 동적 광산란에 의해 결정하였다. 나노담체 중의 GSK1059615의 양은 351 nm 하에서의 UV 흡광도에 의해 결정하였다. 현탁액 1 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량법에 의해 결정하였다.

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

[0325]

실시예 7: 바이러스 전달 벡터 항원을 수반한 적혈구-결합성 치료제 (예측)

[0326]

적혈구-결합성 치료제는 미국 공개 번호 20120039989의 교시에 근거하여 제조하고, 이를 항원 제시 세포 표적화 면역억제제로서 사용한다. 적혈구-결합성 치료제는 ERY1, ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141 및 ERY162 중 어느 하나, 및 본원에 기재된 바이러스 전달 벡터 항원, 예컨대 바이러스 벡터 항원, 예를 들어 캡시드 단백질 (또는 그로부터 유래된 펩티드 항원), 또는 단백질 (또는 그로부터 유래된 펩티드 항원), 예컨대 치료용 단백질 (또는 그로부터 유래된 펩티드 항원) (본원에 기재된 바와 같은 트랜스진에 의해 코딩된다) 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0328]

실시예 8: NF-κβ 경로의 억제제를 함유하는 입자 (예측)

[0329]

항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 미국 공개 번호 20100151000의 교시에 따라서 제조한다. 상기 입자는 리포솜 또는 중합체성 입자일 수 있고, 본원에 제공된 면역억제제 중 어느 하나, 또는 미국 공개 번호 20100151000에 제공된 NF-κβ 경로의 억제제 (이러한 억제제는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다) 중 어느 하나를 포함한다. 또한, 상기 리포솜 또는 중합체성 입자는 본원에 기재된 바이러스 전달 벡터 항원, 예컨대 바이러스 벡터 항원, 예를 들어 캡시드 단백질 (또는 그로부터 유래된 펩티드 항원), 또는 단백질 (또는 그로부터 유래된 펩티드 항원), 예컨대 치료용 단백질 (또는 그로부터 유래된 펩티드 항원) (본원에 기재된 바와 같은 트랜스진에 의해 코딩된다) 중 어느 하나를 추가로 포함할 수 있다.

[0330]

실시예 9: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 아데노바이러스 전달 벡터 (예측)

- [0331] 아데노바이러스 전달 벡터는 미국 특허 공개 번호 2004/0005293에 제공된 방법에 따라서 생성한다. 이러한 벡터는 본원에 제공된 바와 같은 트랜스진 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 알파1-항트립신 프로모터 (AAT)로부터의 인간 B-도메인 결실된 FVIII cDNA를 발현하는 Ad-AAT-hFVIII 벡터를 제조한다. HPRT 스택퍼(stuffer) 단편을 이용하여 벡터 크기를 최적화하고 벡터 재배열을 피한다 (Parks R J, Graham F L. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. J Virol. 1997, 71:3293-3298). Cre66 패키징 세포주를 사용한다.
- [0332] **실시예 10: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를, 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체와 동반 투여한다 (예측)**
- [0333] 본 실시예 중 어느 하나, 예컨대 **실시예 9**의 바이러스 전달 벡터를 본원에 제공된, 예컨대 **실시예 1 내지 8** 또는 **12**에 제공된 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 중 어느 하나와 동반하여, 예컨대 동일자로, 임상 시험을 위해 동원된 대상체에게 투여한다. 상기 바이러스 전달 벡터에 대항한 하나 이상의 면역 반응을 평가한다. 바이러스 전달 벡터에 대항한 하나 이상의 면역 반응의 수준(들)은, 바이러스 전달 벡터를 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 부재하에 투여한, 예컨대 바이러스 전달 벡터를 단독으로 투여한 경우의 대상체, 또는 대상체의 또 다른 군에서의 하나 이상의 면역 반응의 수준(들)과 비교함으로써 평가할 수 있다. 실시양태에서, 반복된 동반 투여를 유사한 방식으로 평가한다.
- [0334] 이러한 시험 동안 확립된 정보의 적용에서는, 바이러스 전달 벡터를 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 동반하여 투여하지 않은 경우에, 대상체가 이러한 바이러스 전달 벡터에 대항하여 바람직하지 못한 면역 반응을 나타내는 것으로 예상되는 경우 바이러스 전달 벡터를 필요로 하는 대상체에게 바이러스 전달 벡터와 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 동반하여 투여할 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 시험 동안 확립된 정보를 이용하는 프로토콜을 제조하여, 바이러스 전달 벡터를 이용한 치료를 필요로 하고, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 혜택 없이 바이러스 전달 벡터에 대항한 바람직하지 못한 면역 반응을 나타내거나 또는 이러한 반응을 나타내는 것으로 예상되는 대상체의 바이러스 전달 벡터와 합성 나노담체의 동반 투여량을 가이드할 수 있다. 그 다음, 이로써 제조된 프로토콜을 이용하여 대상체, 특히 인간 대상체를 치료할 수 있다.
- [0335] **실시예 11: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를, 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체와 투여한다**
- [0336] 재조합 그린 형광성 단백질을 발현하는 아데노 관련 바이러스 (AAV-GFP)를 2회 연속 정맥내 (i.v.) 접종하면, 나노담체-피막화된 면역억제제 (NC)가 부스트 단계에서 공동-주사되는 경우에 생체내 간세포에서의 GFP 발현이 더 높아졌다.
- [0337] **시험 방법**
- [0338] 수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다 (군당 5마리 마우스). 동물에게 200 μ L의 AAV-GFP 또는 AAV-GFP + 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체 (NC) 혼합물을 1회 주사하거나 또는 상이한 반복 하에 21일 간격에 걸쳐 2회 주사한다 (하기 표 1 참조). 첫 번째 주사 후 제33일 (= 2회 주사한 동물 군의 경우에는 두 번째 주사 후 제12일)에, 동물을 희생시키고, 그들의 간을 콜라게나제 4 [워딩턴 (Worthington; 미국 뉴저지주 레이크우드)]로 처리하며, 맛물리게 한 다음, GFP 발현을 알아보기 위하여 총 세포 현탁액을 FACS에 의해 분석하였다. 간략하게 설명하면, 조직을 초기에, 콜라게나제 (100 U)로 관류시키고, 37°C에서 인큐베이션하며 (30분), 콜라게나제 상등액을 제거하고, 2% FBS로 켄칭하였다. 이어서, 조직 샘플을 약 2 mm 세로로 커팅하며, 반복해서 진탕 시킴으로써 소화시키고 (콜라게나제, 400 U), 여과시키며 (나일론 메쉬), 침강시키고 (1,500 rpm), 펠릿을 빙냉 2% FBS에 재현탁시켰다.
- [0339] 첫 번째 주사 후 제14일에, 모든 동물을 출혈시키고, 그들의 혈청을 대상으로 하여 다음과 같이 ELISA를 이용하여 AAV에 대항한 항체에 관하여 분석하였다. 96-웰 플레이트를 탄산염 완충제 중에서 92시간 동안 2×10^9 vg/mL 하의 50 μ L의 AAV로 코팅한 다음, 300 μ L의 카세인으로 2시간 동안 차단시켰다. 샘플을 50 μ L의 카세인 중에서 1:40 희석도로 부가하고, 실온하에 2시간 동안 인큐베이션하였다. 토끼 항-마우스 IgG [잭슨 면역리서치 (Jackson ImmunoResearch; 미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브), 315-035-008]를 2차 항체로서 사용한 다음 (0.5 μ g/mL, 1시간), TMB 기질을 부가한 후 (10분), 정지 용액을 부가하였다. 이어서, 플레이트를 450 nm의 파장 하에 관독하였는데, 570 nm 하에서의 배경은 공제하였다. 마우스 모노클로날 항-AAV8 항체 [피츠제럴드 (미국 매사추세츠주 액턴), 10R-2136]가 양성 대조군으로서 제공되었다.

[0340] AAV-GFP의 양: 제0일 프라임에서 1×10^{10} 바이러스 게놈 (VG), 제21일 부스트에서 5×10^{10} VG.

[0341] 사용된 나노담체-피막화된 면역억제제 (라파마이신 또는 Rapa)의 양: 프라임 (군 2, 3 및 5) 또는 부스트 (군 3 및 4)에서 50 μ g의 나노담체-봉입된 Rapa.

[0342] <표 1>

[0343] 실험군

군 #	면역화, i.v.	NC (i.v., 제 0 일)	부스트, 제 21 일
1	AAV-GFP (1×10^{10} VG)	없음	AAV-GFP; 5×10^{10} VG
2	동일함	50 μ g 의 Rapa	동일함
3	동일함	동일함	AAV-GFP, 5×10^{10} VG + NC
4	동일함	없음	AAV-GFP, 5×10^{10} VG + NC
5	동일함	50 μ g 의 Rapa	없음
6	동일함	없음	없음

[0344]

[0345] 결과

[0346] AAV-GFP 만을 이용하여 프라임과 부스트 둘 다를 수행한 경우와 비교해서 AAV-GFP 만을 이용하여 프라임한 후 부스트 단계에서 NC를 활용하는 경우에는, AAV-주사된 마우스의 간에서 통계상 더 높은 수준의 GFP 발현이 관찰되었다 (도 1). AAV-GFP가 프라임과 부스트 둘 다에서 NC와 공동 주입된 경우에 더 높은 GFP 발현 경향이 있었지만, 단일 이상 값으로 인해, AAV-GFP 만을 이용하는 프라임-부스트에 비해 통계적으로 명백한 우위가 나타나지 않았다. 프라임 주사에서 NC 만을 활용하면, GFP 발현의 어떠한 단계적 상승도 초래되지 않았다 (도 1, 군 1 대 군 2 및 군 5 대 군 6). 집합적으로, 부스트에서 AAV-GFP와 NC를 공동-투여하면, 현재의 요법에 따라서 제조함 AAV를 2회 주사한 동물에게서 더 높은 GFP 발현이 구동되는 것으로 보였다. 이는 AAV-GFP 만으로 부스트된 (프라임에서 NC로 처리하든지 아니든지 간에) 동물 모두를, AAV-GFP + NC로 부스트된 동물 모두에 대항하여 폴룩한 경우에 분명해지는데 (도 2), NC의 존재하에 부스트된 10마리 동물 중 9마리가 NC의 부재하에 부스트된 동물 모두 (10마리 중 10마리) 보다 더 높은 GFP 발현을 나타내었다 (전자의 경우 평균 발현 증가는 > 50%이다). 유사하게, 단지 고도로 GFP 양성인 간 세포를 고려한 경우에는, 부스트 동안 NC를 활용하면, NC가 프라임 단계에서 활용되었는지 아니었는지 간에 NC를 수반하지 않으면서 AAV-GFP로 부스트된 것보다 통계상 더 많은 수가 생성되었다 (도 3). 이는 또한, NC를 수반하지 않은 AAV-GFP 부스트는 단일 프라임 면역화와 비교한 경우에도 저하된 GFP 발현을 초래하였다는 것이 명백하였다.

[0347] 별도로, 마우스를 제14일에 출혈시키고, 그들의 혈청을 대상으로 하여 AAV에 대한 항체의 존재에 관하여 시험하였다. 이 시점에, 모든 마우스에게 NC와의 공동 투여를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 AAV-GFP를 1회 주사하였다 (이로써 각각 15마리 마우스가 배정된 2개 군이 야기되었다). 도 4에 도시된 바와 같이, NC를 수반하지 않으면서 AAV-GFP를 1회 주사한 15마리 마우스 중 15마리 모두는 AAV에 대항하여 항체 반응성을 나타냈는데, 이로써 정상 혈청 대조군 (OD = 0.227) 보다 더 높은 최고 OD가 생성된 반면, AAV를 NC와 공동 투여한 마우스는 AAV에 대한 검출 가능한 수준의 항체를 전혀 나타내지 않았다. 단일 AAV 면역화만을 이용한 경우에는, 항-AAV 항체의 수준이, NC를 AAV와 공동 투여한 마우스에서 제21일에 기준선 아래에 머무른 반면, NC를 수반하지 않으면서 AAV가 투여된 마우스에서는 상승되었다 (도 5). 단일 주사 후 33일에는, 처리되지 않은 마우스에서의 이들 수준이 여전히 적당하게 증가한 반면, NC-처리된 군에서는 5마리 마우스 중 4마리에게서 AAV에 대한 검출 가능한 항체가 없었다 (도 5).

[0348] 마우스를 제21일에 AAV-GFP로 부스트한 경우에는, 처리되지 않은 마우스에서의 항체 수준이 상당히 지속적으로 성장한 반면, 부스트에서 NC 만을 투여한 마우스에서는 그 수준이 둔화되었다 (도 6 및 7). 흥미롭게도, 이러한 후자 군에 속한 2마리의 마우스는 제14일 (프라임에서의 처리 없음)에 양성이었지만, AAV에 대한 항체 수준은 제33일에 배경 아래로 떨어졌다 (도 7). 이와 동시에, 프라임에서 NC로 처리된 10마리 마우스 중 8마리는

제21일 부스트 후에도 제33일에 검출 가능한 항체를 나타내지 않았다 (도 6 및 7). AAV 부스트에서 NC를 적용하는 것이, AAV에 대한 항체의 생성을 차단하는 데 있어서 미미한 수준의 효과를 나타냈을 수도 있었지만, 이 시점에서는 부스트에서 NC 처리가 없다는 것이 통계상 유의적이지 않았다 (도 6 및 7). 따라서, 프라임에서의 NC 처리가 AAV에 대한 항체의 발생을 차단하는 데 중요한 것으로 여겨지는데, 나중 시점에 이를 투여하는 것이 또한 유익하다.

[0349] 이러한 결과는 특정 바이러스 전달 벡터에 대한 항체 반응을 저하시키기 위하여 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를 상기 바이러스 전달 벡터와 연계해서 투여하는 것의 혜택을 명확하게 보여준다. 이러한 혜택은 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를, 발현하기 위한 특정 단백질을 코딩하는 트랜스진을 포함하는 바이러스 전달 벡터와 연계해서 동반 투여하는 경우에 관찰되었다. 따라서, 항-바이러스 전달 벡터 항체 반응을 저하시키기 위한 프로토콜이 상기에 예시된다.

[0350] 실시예 12: 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체

[0351] 물질

[0352] 0.41 dL/g의 고유 점도를 수반한 PLA는 레이크쇼어 바이오머티리얼즈 (미국 앨라배마주 35211 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)로부터 구입하였다 (생성물 코드 100 DL 4A).

[0353] 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 말단화 PEG 블록과 0.50 DL/g의 전체 고유 점도를 수반한 PLA-PEG-OMe 블록 공중합체는 레이크쇼어 바이오머티리얼즈 (미국 앨라배마주 35211 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)로부터 구입하였다 (생성물 코드 100 DL mPEG 5000 5CE).

[0354] 라파마이신은 콘코드 바이오텍 리미티드 (Concord Biotech Limited; 인도 아메다바드 돌카 382225 트라사드 로드 1482-1486)로부터 구입하였다 (생성물 코드 SIROLIMUS).

[0355] 소르비탄 모노팔미테이트는 시그마-올드리치 (Sigma-Aldrich; 미국 미주리주 63103 세인트 루이스 스프루스 스트리트 3050)로부터 구입하였다 (생성물 코드 388920).

[0356] EMPROVE® 폴리비닐 알콜 (PVA) 4-88, USP (85 내지 89% 가수분해됨, 3.4 내지 4.6 mPa·s의 점도)는 EMD 케미칼즈 인크. (EMD Chemicals Inc.; 미국 뉴저지주 08027 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480)로부터 구입하였다 (생성물 코드 1.41350).

[0357] 둘베크코(Dulbecco) 인산염 완충 식염수 1X (DPBS)는 론자 (Lonza; 스위스 바젤 CH-4002 뮌헨슈타이너슈트라쎄 38)로부터 구입하였다 (생성물 코드 17-512Q).

[0358] 방법

[0359] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0360] **용액 1:** 중합체, 라파마이신, 및 소르비탄 모노팔미테이트 혼합물은 37.5 mg/mL 하의 PLA, 12.5 mg/mL 하의 PLA-PEG-OMe, 8 mg/mL 하의 라파마이신, 및 2.5 mg/mL 하의 소르비탄 모노팔미테이트를 디클로로메탄에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0361] **용액 2:** 폴리비닐 알콜은 100 mM pH 8 인산염 완충제 중에서 50 mg/mL로 제조하였다.

[0362] O/W 에멀션은 용액 1 (1.0 mL)과 용액 2 (3 mL)를 작은 유리 압력 튜브에서 합하고, 10초 동안 와동 혼합시킴으로써 제조하였다. 이어서, 이러한 제형을 30% 진폭하에 1분 동안 초음파 처리함으로써 균질화시켰다. 그 다음, 상기 에멀션을, DPBS (30 mL)를 함유하는 개방 비커에 가하였다. 제2의 O/W 에멀션은 상기와 동일한 물질 및 방법을 이용하여 제조한 다음, 이를 제1 에멀션 및 DPBS를 함유하는 동일한 비커에 부가하였다. 이어서, 이와 같이 합한 에멀션을 실온하에 2시간 동안 교반시켜 디클로로메탄을 증발시키고 나노담체를 형성할 수 있었다. 이러한 나노담체의 특정 부분은, 나노담체 현탁액을 원심분리용 튜브에 옮기고, 75,600 xg 및 4°C에서 50 분 동안 원심분리시키며, 상등액을 제거하고, 펠릿을 0.25% w/v PVA를 함유하는 DPBS에 재현탁시킴으로써 세척하였다. 이러한 세척 과정을 반복한 다음, 펠릿을 0.25% w/v PVA를 함유하는 DPBS에 재현탁시켜, 중합체를 기준으로 하여 10 mg/mL의 명목 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 이어서, 상기 나노담체 현탁액을, 0.22 µm PES 막 주사기 필터 [밀리포어(Millipore) 부품 번호 SLGP033RB]를 이용하여 여과하였다. 이어서, 이와 같이 여과시킨 나노담체 현탁액을 -20°C에서 저장하였다.

[0363] 나노담체 크기는 동적 광산란에 의해 결정하였다. 나노담체 중의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하

었다. 현탁액 1 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량법에 의해 결정하였다.

유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)	나노담체 농도 (mg/mL)
150	11.5	11.1

실시예 13. 유전자 요법 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터의 단일 투여는 항-벡터 항체 반응을 유도시키는 데, 이러한 항체 반응은 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체와의 동반 투여에 의해 억제될 수 있다

CMV 프로모터 하에 제조함 그린 형광성 단백질을 코딩하는 아데노 관련 바이러스 (AAV-GFP) [비로벡 (Virovek; 미국 캘리포니아주 헤이워드)]를 단일 정맥내 (i.v.) 투여하면 항-AAV 항체 반응이 초래되었는데, 이는 나노담체-피막화된 면역억제제 (실시예 12에 따라서 생성됨)와의 동반 처리에 의해 억제되었다.

실험 방법

수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다 (군당 5 내지 15마리 마우스). 동물에게 200 μ L의 AAV8-GFP 또는 AAV8-GFP + NC (라파마이신을 함유하는 PLGA 나노담체)의 혼합물을 정맥내 주사하였다 (하기 표 2 참조). 처리 후 제14일에, 모든 동물을 출혈시키고, 그들의 혈청을 대상으로 하여 ELISA에 의해 AAV8에 대한 항체에 관하여 분석하였다. 간략하게 설명하면, 96-웰 플레이트를 탄산염 완충제 중에서 92시간 동안 2×10^9 벡터 게놈 (vg)/mL 하의 50 μ L의 AAV8로 코팅한 다음, 300 μ L의 카세인으로 2시간 동안 차단시켰다. 샘플을 50 μ L의 카세인 중에서 1:40 희석도로 부가하고, 실온하에 2시간 동안 인큐베이션하였다. 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 토끼 항-마우스 IgG [잭슨 임뮤노리서치 (미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브), 315-035-008]를 2차 항체로서 사용한 다음 (0.5 μ g/mL, 1시간), TMB 기질을 부가한 후 (10분), 정지 용액을 부가하였다. 이어서, 플레이트를 450 nm의 파장 하에 판독하였는데, 570 nm 하에서의 배경은 공제하였다. 마우스 모노클로날 항-AAV8 항체 [피츠제럴드 (미국 매사추세츠주 액턴), 10R-2136]가 양성 대조군으로서 제공되었다.

AAV-GFP의 양: 제0일 (프라임)에서 1×10^{10} 바이러스 게놈 (vg) 및 제21일 (부스트)에서 5×10^{10} vg.

사용된 나노담체-피막화된 라파마이신 (Rapa)의 양: 50 μ g의 나노담체-봉입된 라파마이신.

<표 2>

실험군

군 #	면역화, i.v. 제 0 일	NC (i.v. 제 0 일)
1	AAV-GFP (1×10^{10} VG)	없음
2	AAV-GFP (1×10^{10} VG)	50 μ g 의 Rapa

마우스를 제14일에 출혈시키고, 그들의 혈청을 대상으로 하여 AAV8에 대한 항체의 존재에 관하여 시험하였다. 이 시점에, 모든 마우스에게 나노담체와의 공동 투여를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 AAV8-GFP를 1회 주사하였다 (각각 15마리 마우스). 도 8에 도시된 바와 같이, 나노담체를 수반하지 않으면서 AAV-GFP를 1회 주사한 마우스 모두는 AAV8에 대하여 항체 반응성을 나타냈는데, 이로써 정상 혈청 대조군 (OD = 0.227) 보다 더 높은 항체 수준이 생성된 반면, AAV8을 NC와 공동 투여한 마우스는 AAV8에 대한 검출 가능한 수준의 항체를 거의 또는 전혀 나타내지 않았다. 항-AAV8 항체의 수준은, NC 처리된 군 (n=5)에서 제21일에 기준선에 머무르거나 그 아래에 머무른 반면, NC를 수반하지 않으면서 AAV8-GFP가 투여된 마우스에서는 그 수준이 상승되었다 (도 9). AAV8-GFP의 단일 주사 후 33일에는, 처리되지 않은 마우스에서의 항-AAV8 항체 수준이 적당하게 지속적으로 증가한 반면, NC-처리된 군에서는 5마리 마우스 중 4마리에게서 AAV에 대한 검출 가능한 항체가 없었다 (도 9).

이러한 결과는 특정 바이러스 전달 벡터에 대한 항체 반응을 저하시키기 위하여 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를 상기 바이러스 전달 벡터와 연계해서 투여하는 것의 혜택을 명확하게 보여준다. 이러한 혜택은 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를, 발현하기 위한 특정 단백질을 코딩하는 트랜스진을 포함하는 바이러스

전달 벡터와 연계해서 동반 투여하는 경우에 관찰되었다. 따라서, 항-바이러스 전달 벡터 항체 반응을 저하시키기 위한 프로토콜이 본원에 제시된다.

실시예 14: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를, 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체와 동반 투여하면 항-AAV 항체 반응이 억제된다

실험 방법

수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다 (군당 5마리 마우스). 동물에게 200 μ L의 AAV8-GFP (비로백; 미국 캘리포니아주 헤이워드) 또는 AAV8-GFP + NC의 혼합물 (실시예 12에서 생성된 바와 같음)을 표 3에 표시된 바와 같이 제0일 및/또는 제21일에 주사하였다. 혈청을 제0일 및 제33일에 수집하고, 이를 대상으로 하여 상기 언급된 바와 같이 ELISA에 의해 항-AAV8 항체 수준에 관하여 분석하였다.

AAV-GFP의 양: 제0일 프라임에서 1×10^{10} 바이러스 게놈 (vg), 제21일 부스트에서 5×10^{10} vg.

사용된 나노담체-피막화된 면역억제제 (라파마이신 또는 Rapa)의 양: 프라임 (군 2 및 4) 또는 부스트 (군 3 및 4)에서 50 μ g의 나노담체-봉입된 Rapa.

<표 3>

실험군

	제 0 일		제 21 일	
군 #	바이러스 전달 벡터 (i.v.)	NC (i.v.)	바이러스 전달 벡터 (i.v.)	NC (i.v.)
1	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	없음	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	없음
2	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	없음	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	50 μ g 의 Rapa
3	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	50 μ g 의 Rapa	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	없음
4	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	50 μ g 의 Rapa	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	50 μ g 의 Rapa

결과

NC의 부재하에 제0일에 AAV8-GFP를 주사한 마우스는 강력한 항-AAV8 항체 반응을 나타냈는데, 이러한 반응은 제21일에 AAV8-GFP를 두 번째 주사한 후에 상당히 증가되었다 (도 10). 그러나, NC를 제21일에 AAV8-GFP와 동반하여 투여한 경우에는, 상기 항체 반응이 평균적으로 상당히 둔화되었다. 흥미롭게도, 제14일에 항체 양성이었던 상기 후자 군 내의 2마리 마우스는, 제33일에는 AAV8에 대한 검출 가능한 수준의 항체를 가지지 않았다 (도 10). 그러나, 항-AAV8 항체 역가는 2마리의 다른 마우스에서 증가되었다. 이와는 대조적으로, 첫 번째 AAV8-GFP 주사 시점 (제0일)에 동반 투여된 NC는 제14일에 항-AAV8 항체 반응을 완전히 억제하였다. 항-AAV8 항체는 또한, 제21일에 AAV8-GFP 단독을 두 번째 투여한 후 제33일에 5마리 마우스 중 4마리에게서 억제되었다. 제0일과 제21일 둘 다에서는 NC의 동반 투여가 유사한 경향을 나타내었다. 따라서, AAV의 첫 번째 투여 시점에 NC로 처리하는 것이 AAV에 대한 항체의 발생을 차단하는 데 있어서 중요하다. AAV의 반복 투여시 NC를 부가적으로 투여하는 것이 잠재적으로 유리할 수 있다.

이러한 결과는 특정 바이러스 전달 벡터에 대한 항체 반응을 저하시키기 위하여 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를 상기 바이러스 전달 벡터와 연계해서 투여하는 것의 혜택을 명확하게 보여준다. 이러한 혜택은 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를, 발현하기 위한 특정 단백질을 코딩하는 트랜스진을 포함하는 바이러스 전달 벡터와 연계해서 동반 투여하는 경우에 관찰되었다. 따라서, 항-바이러스 전달 벡터 항체 반응을 저하시

키기 위한 프로토콜이 본원에 예시된다.

실시예 15: 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를 치료적 투여하는 것이 바이러스 전달 벡터의 반복 투여시 트랜스진 발현의 유지를 증강시켜 준다

제조합 그린 형광성 단백질을 코딩하는 아데노 관련 바이러스 (AAV8-GFP) (비로백; 미국 캘리포니아주 헤이워드)를 2회 연속 정맥내 (i.v.) 접종하면, 나노담체-피막화된 면역억제제 (NC) (실시예 12에서 생성된 바와 같음)가, 발현하기 위한 특정 단백질을 코딩하는 트랜스진을 포함하는 바이러스 전달 벡터의 반복 투여 시점에 공동-주사되는 경우에 생체내 간세포에서의 GFP 발현이 더 높아졌다.

실험 방법

수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다 (군당 5마리 마우스). 동물에게 제0일에 NC의 부재하에 200 μ L의 AAV8-GFP를 주사하였다. 동물의 1개 군에게는 추가의 처리를 전혀 수행하지 않는 반면, 다른 군에게는 50 μ g 라파마이신을 포함하는 NC의 동반 투여를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 제21일에 AAV8-GFP의 두 번째 용량을 투여하였다 (하기 표 4 참조). 첫 번째 주사 후 제33일 (= 2회 주사한 동물 군의 경우에는 두 번째 주사 후 12일)에, 동물을 희생시키고, 그들의 간을 콜라게나제 4 (워딩턴; 미국 뉴저지주 레이크우드)로 처리하며, 맛물리케한 다음, GFP 발현을 알아보기 위하여 총 세포 현탁액을 유동 세포계수법에 의해 분석하였다. 간략하게 설명하면, 조직을 초기에, 콜라게나제 (100 U)로 관류시키고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 콜라게나제 상등액을 제거하고, 2% FBS로 켄칭하였다. 이어서, 조직 샘플을 약 2 mm 제곱으로 커팅하며, 반복해서 진탕시킴으로써 소화시키고 (콜라게나제, 400 U), 여과시키며 (나일론 메쉬), 침강시키고 (1,500 rpm), 펠릿을 빙냉 2% FBS에 재현탁시켰다.

AAV-GFP의 양: 제0일에 1×10^{10} 바이러스 게놈 (vg) 및 제21일에 5×10^{10} vg (군 2 및 3에서만).

사용된 나노담체-피막화된 면역억제제 (라파마이신 또는 Rapa)의 양: 제21일에 50 μ g의 나노담체-봉입된 Rapa (군 3).

<표 4>

실험군

	제 0 일	제 21 일	
군 #	바이러스 전달 벡터 (i.v.)	바이러스 전달 벡터 (i.v.)	NC (i.v.)
1	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	없음	없음
2	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	없음
3	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	50 μ g 의 Rapa

결과

NC를 제21일에 AAV8-GFP의 두 번째 주사와 동반하여 투여한 경우에는, NC의 부재하에 AAV8-GFP의 두 번째 주사가 제공된 동물과 비교해서, AAV8-GFP 처리된 마우스의 간에서 통계상 더 높은 수준의 GFP 발현이 관찰되었다 (도 11). AAV8-GFP + NC의 두 번째 주사가 제공된 마우스에서 관찰된 GFP 발현 수준은 제0일에 AAV8-GFP의 단일 용량만을 투여한 마우스에서 관찰된 것과 유사하였다. 이들 결과는 AAV8-GFP의 두 번째 투여 시점에 NC를 공동 투여하는 것이, 아마도 GFP를 발현하는 형질도입된 간 세포를 제거할 수 있었던 세포용해성 T 세포를 억제함으로써 GFP의 발현을 유지하는 데 중요하였다는 것을 표시한다.

이러한 결과는 특정 바이러스 전달 벡터 트랜스진의 발현을 유지하기 위하여 면역억제제와 커플링된 합성 나노

담체를 상기 바이러스 전달 벡터와 연계해서 투여하는 것의 혜택을 명확하게 보여준다. 이러한 혜택은 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를, 발현하기 위한 특정 단백질을 코딩하는 트랜스진을 포함하는 바이러스 전달 벡터와 연계해서 동반 투여하는 경우에 관찰되었다.

실시예 16: 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체의 동반 투여는 트랜스진 발현을 증강시킨다

실험 방법

수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다 (군당 5마리 마우스). 동물에게 제0일 (군 1 내지 5) 및/또는 제21일 (군 1 내지 4, 6)에 200 μ L의 AAV-레드 형광 단백질 (RFP) (비로백; 미국 캘리포니아주 헤이워드)을 주사하였다 (하기 표 5 참조). 50 μ g 라파마이신을 수반하는 NC를 제0일 (군 2, 4) 및/또는 제21일 (군 3, 4)에 동반 투여하였다. 첫 번째 주사 후 제33일 (= 2회 주사한 동물 군의 경우에는 두 번째 주사 후 12일)에, 동물을 희생시키고, 그들의 간을 콜라게나제 4 (워딩턴; 미국 뉴저지주 레이크우드)로 처리하며, 맛물리게 한 다음, RFP 발현을 알아보기 위하여 총 세포 현탁액을 유동 세포계수법에 의해 분석하였다. 간략하게 설명하면, 조직을 초기에, 콜라게나제 (100 U)로 관류시키고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 콜라게나제 상등액을 제거하고, 2% FBS로 켄칭하였다. 이어서, 조직 샘플을 약 2 mm 세폭으로 커팅하며, 반복해서 진탕시킴으로써 소화시키고 (콜라게나제, 400 U), 여과시키며 (나일론 메쉬), 침강시키고 (1,500 rpm), 펠릿을 빙냉 2% FBS에 재현탁시켰다.

<표 5>

실험군

	제 0 일		제 21 일	
군 #	바이러스 전달 벡터 (i.v.)	NC (i.v.)	바이러스 전달 벡터 (i.v.)	NC (i.v.)
1	AAV-RFP	없음	AAV-RFP	없음
2	AAV-RFP	50 μ g 의 Rapa	AAV-RFP	없음
3	AAV-RFP	없음	AAV-RFP	50 μ g 의 Rapa
4	AAV-RFP	50 μ g 의 Rapa	AAV-RFP	50 μ g 의 Rapa
5	AAV-RFP	없음	없음	없음
6	없음	없음	AAV-RFP	없음

결과

NC의 부재하에 AAV8-RFP를 1회 또는 2회 주사 투여한 동물은 제33일에 유사하게 낮은 수준의 RFP 발현을 나타내었다 (도 12). AAV8-RFP의 첫 번째 주사 시점에 NC를 동반하여 처리한 마우스는 RFP의 발현이 증가하는 추세를 보였는데, 이는 통계상 유의적이지 않았다. 이와는 대조적으로, AAV8-RFP의 두 번째 주사 시점 (제21일)에 NC를 동반하여 처리한 마우스는 RFP 발현에 있어서 통계상 유의적인 증가를 나타내었다. 제0일과 제21일 둘 다에서 NC로 처리되었던 마우스는 또한, 제0일 및 제21일에 NC의 부재하에 AAV8-RFP를 투여한 대조군 동물과 비교해서 RFP 발현에 있어서 유의적 증가를 나타내었다.

이러한 결과는 특정 바이러스 전달 벡터 트랜스진의 발현을 증강시키기 위하여 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를 상기 바이러스 전달 벡터와 연계해서 투여하는 것의 혜택을 명확하게 보여준다. 이러한 혜택은 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체를, 발현하기 위한 특정 단백질을 코딩하는 트랜스진을 포함하는 바이러스 전달 벡터와 연계해서 동반 투여하는 경우에 관찰되었다.

실시예 17: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를, 면역억제제와 커플링된 합성 나노담체와 함께 투여하면 CD8+ T 세포 활성화가 억제된다

제조합 그린 형광성 단백질을 발현하는 아데노 관련 바이러스 (AAV-GFP) (비로백; 미국 캘리포니아주 헤이워

드)를 2회 연속 정맥내 (i.v.) 접종하면, 나노담체-피막화된 면역억제제 (NC)가 양 AAV8-GFP 주사와 공동-주사되는 경우에 생체내에서 AAV 캡시드 단백질 및 GFP에 대하여 더 낮은 세포용해성 T 세포 (CTL) 활성이 초래되었다.

[0410] 실험 방법

[0411] 수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다 (군당 3마리 또는 6마리 마우스). 동물에게 제0일 및 제17일 또는 제21일에 200 μ L의 AAV-GFP 또는 AAV-GFP + NC의 혼합물을 주사하였다 (하기 표 6 참조). 제0일 및 제21일에 주사된 군 (n=군당 3마리 마우스)을 대상으로 하여, 첫 번째 주사 후 28일 (두 번째 주사 후 7일)에 항원-특이적 CTL 활성에 관하여 검정하였다. 간략하게 설명하면, 동계 나이브(naive) 마우스로부터의 비장 세포를 0.5 μ M, 또는 5 μ M CFSE로 표지시키면, CFSE^지 및 CFSE^고 세포 집단이 각각 생성되었다. CFSE^고 세포를 37°C에서 1시간 동안 AAV 캡시드로부터의 1 μ g/mL 우성 MHC 부류 I-결합성 펩티드 (서열 NSLANPGIA, 아미노산 517-525) 및 GFP로부터의 우성 MHC 부류 I 펩티드 (HYLSTQSAL, aa 200-208)와 함께 인큐베이션한 반면, CFSE^지 세포는 배지에서 단독으로 인큐베이션하였다. 대조군 CFSE^지 세포와 펩티드-펄스된 CFSE^고 표적 세포를 1:1 비로 혼합하고 (총 2.0×10^7 개 세포), 정맥내 주사하였다. 표지된 세포를 주사한지 18시간 후, 비장을 수거하고, 처리한 다음, 유동 세포계수법에 의해 분석하였다. 나이브 마우스에서의 대조군 회수 비 (RR)를 근거로 하여 특이적 세포독성을 계산하였다: (CFSE^지 세포의 비율)/(CFSE^고 세포의 비율). 특이적 용해 (%) = $100 \times [1 - (RR_{\text{나이브}}/RR_{\text{면역시킨}})]$.

[0412] 제0일 및 제17일에 주사된 군 (n=군당 6마리 마우스)을 대상으로 하여, 첫 번째 주사 후 제25일 (두 번째 주사 후 7일)에 항원-특이적 IFN- γ 생성에 관하여 검정하였다. 간략하게 설명하면, 비장 세포를 분리하고, 미리 흡착된 항-IFN- γ 항체와 함께 웰에 플레이팅하며, 시험관 내에서 7일 동안 AAV 캡시드 또는 GFP 펩티드 (1 μ g/mL)로 재자극하였다. 바이오티닐화 항-IFN- γ 항체 및 스트렙타비딘-HRP에 의해 ELISpot을 전개하였고, 스폿을 계수하였다. 비특이적 배경은 공제하였다.

[0413] AAV-GFP의 양: 제0일 프라임에서 1×10^{10} 바이러스 게놈 (vg), 제21일 부스트에서 5×10^{10} vg.

[0414] 사용된 나노담체-피막화된 면역억제제 (라파마이신 또는 Rapa)의 양: 프라임과 부스트 둘 다에서 (군 2) 50 μ g의 나노담체-봉입된 Rapa.

[0415] <표 6>

[0416] 실험군

	첫 번째 주사 i.v. (제 0 일)		두 번째 주사 i.v. (제 17 일 또는 제 21 일)	
군 #	AAV8-GFP	NC	시험감염	NC
1	1×10^{10} vg	없음	5×10^{10} vg	없음
2	1×10^{10} vg	50 μ g 라파마이신	5×10^{10} vg	50 μ g 라파마이신

[0417]

[0418] 결과

[0419] NC를 동반하여 처리된 동물은 AAV 캡시드와 GFP 우성 MHC 부류 I 펩티드의 조합물로 펄스된 표적 세포에 대하여 더 낮은 수준의 생체내 CTL 활성을 나타내었다 (도 13). 유사하게, NC를 동반하여 처리된 마우스는 비-NC-처리된 군과 비교해서 항원-특이적 IFN- γ -생산 세포 상의 상당한 감소를 나타내었다 (도 14 및 15). 특히, 6마리 마우스 중 4마리는 웰 밀도당 250,000개 세포에서 AAV 캡시드 단백질에 대한 리콜 반응을 명확하게 보여준 반면, NC-처리된 군에서는 이러한 펩티드에 대하여 반응을 보인 마우스가 없었다 (6마리 중 0마리) (도 14, p<0.05). 더욱이, AAV8-GFP-면역시킨 군에서는 6마리 마우스 중 3마리가 면역우성 GFP 펩티드에 대한 반응을 나타낸 반면, NC-처리된 군에서는 이러한 펩티드에 대하여 반응을 보인 마우스가 없었다 (6마리 중 0마리) (도 15, p=0.01).

[0420] 집합적으로, 프라임 및 부스트에서 AAV-GFP와 NC를 공동 투여하면, 바이러스 캡시드 및 트랜스제닉 단백질에 대한 세포독성 T 세포 반응이 저해되는 것으로 여겨졌다.

[0421] 실시예 18: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 함께 투여한다

[0422] 실험 방법

[0423] 수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다 (군당 5마리 마우스). 동물에게 제0일에 10^{10} vg의 rAAV2/8-루시페라제 (rAAV2/8-Luc) (본원, 예컨대 실시예 21 또는 22에 제공된 방법과 유사한 방식으로 생성됨) 또는 rAAV2/8-Luc + 100 μ g 라파마이신을 함유하는 합성 나노담체 (NC)를 정맥내 주사하였다 (하기 표 7 참조). 제14일에, 모든 동물에게 인간 인자 IX (hFIX)를 코딩하는 10^{10} vg의 rAAV2/8 (rAAV2/8-hFIX) (본원, 예컨대 실시예 21 또는 22에 제공된 방법과 유사한 방식으로 생성됨)을 정맥내 주사하였다. 혈청을 각종 시점에 수집하고, 이를 대상으로 하여 ELISA에 의해 항-AAV 항체 수준 및 hFIX 단백질 수준에 관하여 검정하였다.

[0424] 도 16에는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체의 투여 타이밍 및 프로토콜이 예시되어 있다. 100 μ g 라파마이신을 함유하는 합성 PLGA 나노담체 (NC) 또는 대조군인 비어있는 나노입자 (비어있는 NP)를 제0일에 rAAV2/8-Luc 벡터 (10^{10} vg)와 동반하여 정맥내 투여하였다 (N=5/군). 제14일에는 모든 군에게 인간 응고 인자 IX (hFIX)를 코딩하는 rAAV2/8 벡터를 정맥내 주사하였다. 그 데이터는 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 AAV8-Luc와 동반하여 단일 투여하면, 항-AAV8 항체의 개시가 방지 또는 지연될 수 있다는 것을 보여준다 (도 17). 중요하게도, NC를 rAAV2/8-루시페라제와 동반 투여하면, 제14일에 투여된 rAAV2/8-hFIX로부터 hFIX의 효율적인 발현을 가능하게 하기에 충분히 항-AAV8 항체 형성이 억제되었다. 이와는 대조적으로, 비어있는 NP로 처리된 동물에서는 항-AAV8 항체가 발생되었는데, 이는 제14일에 투여된 rAAV2/8-hFIX 벡터로부터 hFIX의 효율적인 발현을 방지시켰다. 이들 데이터는 AAV를 첫 번째 적용하는 시점에 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 동반 투여하는 것이, AAV의 동일한 혈청형의 효과적인 반복 투여를 가능하게 한다는 것을 표시한다.

[0425] <표 7>

[0426] 처리군

군	나노담체	rAAV2/8-Luc	rAAV2/8-FIX	N
1	NC, D0	D0	D14	5
2	비어있는 NP, D0	D0	D14	5

[0427]

[0428] 실시예 19: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체와 함께 수회 투여한다

[0429] 실험적 설계가 도 18에 도시된다. 수컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다 (군당 5마리 마우스). 라파마이신 (100 μ g 라파마이신)을 함유하는 합성 나노담체 (NC)를, 제0일에 rAAV2/8-Luc 벡터 (본원, 예컨대 실시예 21 또는 22에 제공된 방법과 유사한 방식으로 생성됨) (1×10^{11} vg)와 동반하여 정맥내 투여하였다 (N=5/군) (표 8). 이어서, 마우스를 제21일에 라파마이신 (100 μ g 라파마이신)을 함유하는 합성 나노담체와 동반 투여되는 rAAV2/8-hFIX (본원, 예컨대 실시예 21 또는 22에 제공된 방법과 유사한 방식으로 생성됨)로 시험감염시켰다. 대조군에게는 제0일 및 제21일에 NC 대신 비어있는 NP를 투여하였다.

[0430] <표 8>

[0431] 처리군

군	나노입자	rAAV2/8-Luc (10^{11} vg)	rAAV2/8-FIX (10^{11} vg)	N
1	NC, d 0, 21	d0	d21	5
2	비어있는 NP, d0, 21	d0	d21	5

[0432]

[0433] 그 결과는 합성 나노담체 주사를, 바이러스 전달 벡터의 첫 번째 주사 (rAAV2/8-Luc)와 두 번째 주사 (rAAV2/8-hFIX) 둘 다와 함께 동반 투여하면, 항-AAV8 항체 반응이 억제되었고 (도 19, 왼쪽 패널), AAV8에 대한 중화 항

체의 역가가 감소된 것으로 나타났다 (표 9). 항-AAV8 항체를 억제하면, 더 높은 수준의 AAV2/8-hFIX 벡터 카피 수가 가능하였는데 (도 19, 중간 패널), 이는 궁극적으로 hFIX 트랜스진의 강력한 발현을 제공하였다 (도 19, 오른쪽 패널). 비어있는 나노입자로 처리된 대조군에서는, 몇 마리의 동물이 제20일에 낮은 수준의 항체를 가졌다는 것에 주목해야 한다. 이들 동물 중 2마리는 제21일에 중간 수준의 벡터 카피 수를 가졌고, rAAV2/8-hFIX의 투여에 반응하여 hFIX의 일부 발현을 나타냈다. 그러나, 대조군 동물 중 3마리는 극히 낮은 벡터 카피 수를 나타냈고 검출 가능한 수준의 FIX 발현을 전혀 나타내지 않았다.

[0434] 따라서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체를 수회 투여하는 것이 항원-특이적 항-AAV8 항체의 유도를 완전히 방지시켜, AAV의 두 번째 주사시 고 수준의 트랜스진 발현을 허용할 수 있는 것으로 입증되었다.

[0435] <표 9>

[0436] 중화 항-AAV 항체 역가

AAV8 중화 항체 역가				
동물 #	NC		비어있는 NP	
	제 20 일	제 41 일	제 20 일	제 41 일
1	1:3.16	1:31.6	1:31.6	1:1000
2	<1:1	1:31.6	1:31.6	1:316
3	<1:1	1:31.6	1:31.6	1:316
4	<1:1	1:31.6	1:31.6	1:1000
5	<1:1	1:31.6	1:31.6	1:1000

[0437]

[0438] 실시예 20: 항원 특이성

[0439] 실험적 설계가 도 20에 도시된다. 면역억제제 (100 µg 라파마이신)를 포함하는 합성 나노담체 또는 대조군인 비어있는 나노입자를 제0일에 rAAV2/8-Luc 벡터 (본원, 예컨대 실시예 21 또는 22에 제공된 방법과 유사한 방식으로 생성됨) (1×10^{11} vg/마우스)와 동반하여 정맥내 투여하였다. 제21일에는 마우스에게 rAAV5-hFIX (본원, 예컨대 실시예 21 또는 22에 제공된 방법과 유사한 방식으로 생성됨) (1×10^{11} vg/마우스)를 정맥내 주사하거나 또는 완전 프로인트(Freund) 아주반트 (CFA) 중에 유화된 인간 인자 IX (hFIX) 단백질을 근육내 주사하였다 (표 10).

[0440] <표 10>

[0441] 처리군

군	나노입자	rAAV2/8-Luc (10^{11} vg)	rAAV5-hFIX (10^{11} vg)	FIX 단백질 CFA	N
1	NC, d0	d0	d21	-	5
2	비어있는 NP, d0	d0	d21	-	5
3	NC, d0	d0	-	d21	5
4	비어있는 NP, d0	d0	-	d21	5

[0442]

[0443] 그 결과는 제0일에 라파마이신을 수반하는 합성 나노담체를 rAAV2/8 벡터 (AAV2/8-Luc)와 동반하여 정맥내 투여하는 것이, 제21일에 투여된 AAV5 벡터 (AAV5-hFIX)에 대한 항체 반응에 대하여 심오한 영향력을 미치지 못하였다는 것을 보여주었다 (도 21, 왼쪽 패널). 라파마이신을 함유하는 NC로 처리된 동물은 비어있는 NP로 처리된 마우스와 비교해서 항-AAV5 항체 반응에 있어서 짧은 지연을 나타냈는데, 이는 아마도, AAV8에 대항하여 프라이밍되었고 AAV5와 교차 반응성인 비어있는 NP-처리된 마우스에 B 세포가 존재하였기 때문이다. 그러나, NC-처리된 마우스의 항-AAV5 항체 반응은 비어있는 NP-처리된 군의 항-AAV5 항체 반응과 신속하게 유사해진다.

- [0444] 이와는 대조적으로, 제21일에 AAV2/8-FIX를 투여한 동물은 항-AAV8 항체를 거의 또는 전혀 나타내지 않았다. 이들 데이터는 항-AAV 항체 반응을 억제하는 것에 대한 NC 처리의 효과가, 이와 공동 투여되는 AAV 혈청형 (즉, AAV8)에 대해 특이적이었고, 마우스를 만성적으로 면역억제된 상태로 만들지 못한다는 것을 표시한다. 유사하게, 제0일에 NC와 rAAV2/8-Luc를 동반하여 처리한 마우스는 제21일에 완전 프로인트 아주반트 (CFA) 중에서 제 조합 hFIX 단백질로의 면역화에 대한 강력한 반응을 나타내었다 (도 21, 오른쪽 패널). 항-hFIX 항체 반응은 제0일에 NC 대신 비어있는 NP로 처리되었던 마우스의 항체 반응과 구별할 수 없었다. 따라서, 면역억제제를 포함하는 합성 나노입자를 AAV와 동반 투여하는 것이 만성 면역억제를 초래하지 않는 것으로 입증되었다.
- [0445] **실시예 21: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 AAV5 전달 벡터 (예측)**
- [0446] ART-I02는 기존에 보고된 바와 같이 생성한다 (Matsushita T, et al. Gene Ther. 1998; 5: 938-945). 상기 플라스미드는 NF- κ B 프로모터 및 인간 성장 호르몬 폴리아데닐화 시그널의 제어 하에 본원에 제공된 트랜스진 중 어느 하나를 코딩한다. 관심 유전자는 또한, 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 트랜스진 카세트는 AAV-2 역위 말단 반복 서열에 의해 플랭킹되고, 문헌 [Gao GP, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 11854-11859]에 기재된 바와 같이 AAV5로부터의 캡시드에 패키징된다. 상기 벡터는 조합된 크로마토그래피와 세슘 클로라이드 밀도 구배 원심분리에 의해 정제하여, 비어있는 캡시드-무함유 분획을 생성시킨다. 특이적 프라이머 및 프로브를 이용하여 qPCR함으로써 벡터 역가를 결정할 수 있다. 유사하게, 특정 예로서, 개통벌레 루시페라제를 코딩하는 rAAV5 벡터를 생성시킬 수 있다.
- [0447] **실시예 22: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 AAV2/8 및 AAV2/5 전달 벡터 (예측)**
- [0448] scAAV 백본 플라스미드는 AAV2-HCR-hAAT-FIX로부터의 *MscIBsaI* 및 *BsaI* *Tsp45I* 단편을 원숭이 바이러스 40 후기 폴리A (SV40 LpA)와 라이게이션함으로써 구축한다. 이로써 생성되는 플라스미드는 무손상 5' 말단 용해 부위 (trs) 및 결실된 3' trs를 수반한 변형된 AAV2 백본을 함유한다. LP1 증강인자/프로모터는 인간 아포지질단백질 간 제어 영역 (HCR), 5' 비번역 영역을 포함한 인간 알파1항트립신 (hAAT) 유전자 프로모터의 연속되는 절편의 증폭을 수반하는 표준 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 방법을 이용하여 구축할 수 있고, 위치 4582 (g에서 c로), 4580 (g에서 c로), 4578 (a에서 c로), 및 4561 (a에서 t로)에서 변형된 SV40 작은 t 항원 인트론 (SV40 인트론)의 상류를 상기 변형된 AAV2 백본 내로 클로닝할 수 있다. 3' 비번역 영역 (UTR)을 수반하지 않는 야생형 hFIX cDNA 또는 다른 관심 cDNA는, AAV-HCR-hAAT-hFIX로부터 PCR 증폭시키고, 상기 변형된 SV40 인트론의 하류를 삽입하여 scAAV-LP1-hFIX를 만든다. 코돈 최적화된 hFIX는 고도로 발현된 진행 유전자에서 가장 자주 발견되는 코돈을 이용하여 생성시키고, 올리고뉴클레오타이드로서 합성한 다음, 라이게이션에 의해 어셈블리하고, PCR 증폭시키며, AAVLP1 백본 내로 클로닝하기에 앞서 서열 분석하여 sc-AAV-LP1-hFIXco를 창출시킨다. ss 및 scAAV 벡터는 아데노바이러스가 없는 일시적 형질감염 방법에 의해 만든다.
- [0449] AAV5-가짜형 벡터 입자는 XX2 및 pAAV5-2에 근거하여 pLT-RCO3으로 지칭되는 키메라 AAV2 Rep-5Cap 패키징 플라스미드를 이용하여 생성시킨다. 부가적으로, AAV8-가짜형 벡터는 패키징 플라스미드 pAAV8-2를 이용하여 만든다. AAV2/5 및 2/8 벡터는 이온 교환 크로마토그래피 방법에 의해 정제한다. 벡터 계놈 (vg) 역가는 표준물로서 초나선 플라스미드 DNA를 이용하여 정량적 슬롯블롯(slotblot)에 의해 결정할 수 있다. 이러한 바이러스 벡터는 본원에 제공된 바와 같은 트랜스진 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0450] **실시예 23: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 AAV8 전달 벡터 (예측)**
- [0451] 마우스 계놈 A1b 절편 (NCBI 참조 서열:NC_000071.6 중의 90474003-90476720)을 PCR 증폭시킬 수 있고, 이를 변형된 pTRUF 백본에서 BsrGI 및 SpeI 제한 부위로의 AAV2 역위 말단 반복 서열 사이에 삽입할 수 있다. 링커 코딩 서열 (글리신-세린-글리신)이 선행되고 NheI 제한 부위가 뒤따르는 최적화된 P2A 코딩 서열이 Bpu10I 제한 부위 내로 존재할 수 있다. 코돈-최적화된 F9 코딩 서열을 NheI 부위 내로 삽입하여 pAB269를 얻을 수 있는데, 이는 rAAV8 벡터의 구축에 제공될 수 있다. 역의 대조군을 구축하기 위하여, 적절한 PCR 프라이머를 이용하여 BsiWI 제한 부위에서 NheI 제한 부위까지의 내부 절편을 증폭시킬 수 있다. 최종 rAAV 생성 플라스미드는 엔도프리 플라스미드 메가프렙 키트(EndoFree Plasmid Megaprep Kit) [퀴아젠(Qiagen)]를 이용하여 생성시킬 수 있다.
- [0452] rAAV8 벡터는 Ca₃(PO₄)₂ 형질감염 프로토콜에 이어 CsCl 구배 정제를 이용하여 문헌 [Grimm, et al., J. Virol. 80, 426-439 (2006)]에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다. 벡터는 정량적 도트 블롯에 의해 측정할 수 있다.
- [0453] 문헌 [Barzel, et al., 364, Nature, Vol. 517, 2015]에 기재된 바와 같이, 혈우병 B 마우스에서 출혈성 소인의 완화는 상기 언급된 바와 같은 벡터를 이용하여 입증되었다. 특히, 이러한 벡터는 간세포 내의 알부민 대립

유전자 내로의 통합을 달성시켰다. F9가 표적에 적중한 통합으로부터 생성되었고, 리보솜 스키텍이 고도로 효율적이었다. 안정한 F9 혈장 수준을 수득하였고, 처리된 F9-결핍성 마우스는 정상적인 응고 시간을 가졌다.

[0454] **실시예 24: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 AAV9 전달 벡터 (예측)**

[0455] 문헌 [Kypson, et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 1998 and Akhter, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94:12100-12105]에 기재된 바와 같이, "1세대" E1/E3-결실된 복제-결핍성 아데노바이러스를 이용하여 아데노바이러스 구축물을 생성시킬 수 있다. b₂AR 구축물 (아데노-b₂AR) 및 트랜스진은 적절한 프로모터에 의해 구동될 수 있다. 감염된 엡스타인-바(Epstein-Barr) 핵 항원-형질감염된 293 세포로부터 아데노바이러스의 대규모 제제를 정제할 수 있다.

[0456] 문헌 [Shah et al., Circulation. 2000; 101:408-414]에 기재된 바와 같이, 좌 관상 동맥 또는 우 관상 동맥 중 하나의 경피적 부분선택적 카테터 삽입을 진행하였고 마커 트랜스진을 함유하는 상기와 같이 생성된 것과 같은 아데노바이러스 벡터를 주입한 토끼는 상기 트랜스진을 챔버 특이적 방식으로 발현하였다. 또한, 치료용 트랜스진의 경피적 아데노바이러스-매개된 관상내 전달을 실행할 수 있고, 급성 포괄적 좌심실 기능을 증강시킬 수 있는 것으로 결론지었다.

[0457] **실시예 25: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 렌티바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0458] 다음을 제조할 수 있다: 표적 세포 통합을 허용하기 위해 렌티바이러스 LTR 사이에 삽입된 트랜스진 및 패키징 서열을 함유하는 렌티바이러스 발현 플라스미드; pol, gag, rev 및 tat 바이러스 유전자를 코딩하고 rev-반응 요소를 함유하는 패키징 플라스미드; 및 바이러스 외피 유전자의 단백질을 코딩하는 가짜형 형성 플라스미드. HEK 293T 세포를 전술된 것에 의해 형질감염시킬 수 있다. HEK 293T 세포를 형질감염시킨 후, 재조합 렌티바이러스 벡터를 함유하는 세포 상등액으로부터 렌티바이러스 벡터를 수득할 수 있다.

[0459] **실시예 26: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 HIV 렌티바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0460] HIV 렌티바이러스 전달 벡터는 미국 공개 번호 20150056696의 방법에 따라서 제조한다. hPEDF CDS 단편은 적절한 프라이머를 사용하여 주형으로서 인간 망막 색소 상피 세포 계통 ARPE-19 (아메리칸 타입 컬처 컬렉션, ATCC)의 cDNA로부터 PCR 증폭시킨다. 본원에 기재된 단백질 중 어느 하나에 대한 대체 단편을 유사하게 수득할 수 있다. hPEDF 단편은 겔 회수함으로써 수득하고, 이를 제조업체의 지시에 따라서 TA 클로닝 과정에 의해 pLenti6.3/V5-TOPO.RTM. 벡터 [인비트로젠(Invitrogen)]와 라이게이션한다. 이와 같이 라이게이션된 hPEDF 단편의 서열을 서열 분석함으로써 검증할 수 있다.

[0461] **실시예 27: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 SIV 렌티바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0462] SIV 렌티바이러스 전달 벡터는 미국 공개 번호 20150056696의 방법에 따라서 제조한다. SIV 유전자 전달 벡터, 패키징 벡터, rev 발현 벡터, 및 VSV-G 발현 벡터를 수득하고, hPEDF 단편을 유전자 전달 벡터 내로 도입한다. 유전자 전달 벡터 내로 도입하기 위하여 본원에 기재된 단백질 중 어느 하나에 대한 대체 단편을 유사하게 수득할 수 있다.

[0463] 인간 태아 신장 세포로부터 유래된 세포주 293T 세포를, 15 cm의 직경을 갖는 플라스틱 페트리 디쉬당 대략 1x10⁷개의 세포의 세포 밀도로 시딩하고 (그 다음날 70 내지 80%의 세포 밀도), 10% 태아 소 혈청을 보충시킨 20 ml의 D-MEM 배양 배지 [집코(Gibco) BRL]에서 24시간 동안 배양한다. 배양한지 24시간 후에, 상기 배양 배지를 10 ml의 OPTI-MEM 배양 배지 (집코 BRL)로 대체시킨다.

[0464] 1개의 페트리 디쉬에 대하여, 10 µg의 유전자 전달 벡터, 5 µg의 패키징 벡터, 2 µg의 rev 발현 벡터 및 2 µg의 VSV-G 발현 벡터를 1.5 ml의 OPTI-MEM 배지에 용해시키고, 40 µl의 PLUS 리전트(Reagent) 시약 [인비트로 캄파니(Invitro Co.)]를 부가한다. 이로써 생성되는 혼합물을 교반시키고 실온 하에 15분 동안 정치시켜 둔다. 60 µl의 리포펙타민 리전트를 1.5 ml의 OPTI-MEM 배지로 희석시킴으로써 묽은 용액을 수득하고; 이로써 생성되는 혼합물을 교반시키며 실온 하에 15분 동안 정치시켜 둔다. 이로써 생성되는 DNA-복합체를 상기 언급된 페트리 디쉬 내의 세포 상으로 적가한다. 이러한 페트리 디쉬를 조심스럽게 진탕시켜 균일한 혼합을 달성시킨 다음, 인큐베이션한다. 20%의 태아 소 혈청을 포함하는 13 ml의 D-MEM 배지를 부가한다. 상등액을 회수한다.

[0465] **실시예 28: 유전자 요법 트랜스진을 수반한 HSV 전달 벡터 (예측)**

[0466] HSV 전달 벡터는 미국 공개 번호 20090186003의 방법에 따라서 제조한다. HSV-1 (F) 균주는 원형 HSV-1 균주로

서 사용된 낮은 계대접종 임상 단리물이다. 무린 초기-성장 반응-1 프로모터 (Egr-1)의 전사 제어하에 무린 인터류킨 12 (mIL-12)를 발현하는 M002를 구축한다. 또 다른 한편으로, 적절한 프로모터의 제어하에 본원에 기재된 단백질 중 어느 하나를 코딩하는 유사한 구축물을 제조할 수 있다. pBluescript-SK+ [스트라타젠 (Stratagene)]에서 mIL-12의 p40 및 p35 서브유닛을 함유하는 플라스미드를 수득한다. p40 서브유닛은 HindIII (5' 말단) 및 BamHI (3' 말단)로 소화시킴으로써 제거하고, p35 서브유닛은 NcoI (5' 말단) 및 EcoRI (3' 말단)로 소화시킴으로써 제거한다. 내부 리보솜 진입 부위, 또는 IRES, 서열은 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 및 적절한 프라이머를 이용하여 벡터 pCITE-4a+ [노바젠 (Novagen; 미국 위스콘신주 매디슨)]로부터 증폭시킨다. 플라스미드 pBS-IL12는 무린 p40, 무린 p35 및 IRES 서열을 pBS-SK+의 HindIII 및 EcoRI 부위 내로 3-방향 라이게이션함으로써 구축하여, IRES 서열이 p40 코딩 서열과 p35 코딩 서열을 분리시키도록 한다.

[0467] HSV 서플 플라스미드 pRB4878은 기존에 언급된 바와 같이 제조할 수 있다 [Andreansky et al. (1998) Gene Ther. 5, 121-130]. 플라스미드 4878-IL12는 다음과 같이 구축한다: pBS-mIL-12를 XhoI 및 SpeI로 소화시켜, 전체 IL-12 서브유닛 코딩 영역 (IRES 포함)을 함유하는 2.2 kb 단편을 제거하고, 클레노우(Klenow) 단편을 이용하여 말단 충전시키며, pRB4878 내의 B형 간염 바이러스 폴리A 서열과 Egr-1 프로모터 사이에 위치한 무딘 KpnI 부위와 라이게이션한다. M001 (tk-) 및 M002 (천연 유전자 자리에서 복구된 tk)는 기존에 언급된 바와 같이 상동 재조합을 통하여 구축한다 [Andreansky et al. (1998) Gene Ther. 5, 121-130]. 2개의 tk-복구된 바이러스 M002.29 및 M002.211은 1% 아가로스, 1 x TPE 겔 상에서 전기영동적으로 분리시키고 제타-프로브 막 [바이오-래드(Bio-Rad)]으로 옮긴, 제한 효소-소화된 바이러스 DNA의 서던 블롯 혼성화에 의해 확증된다. 이러한 블롯을 진 이미지 알크포스 다이렉트(Gene Images AlkPhos Direct) DNA 표지화 시스템 [아머삼-파마시아 바이오 테크 (Amersham-Pharmacia Biotech; 미국 뉴저지주 피스카타웨이)]을 이용하여 알칼리성 포스포타제에 표지된 적절한 DNA 프로브와 혼성화한다. IL-12 생성은 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 입증된다.

[0468] 실시예 29: CRISPR/Cas-9 트랜스젠을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)

[0469] 본원, 예컨대 상기 실시예에 기재된 바이러스 벡터 중 어느 하나를 이용하여, 유전자 편집 트랜스젠을 수반한 바이러스 전달 벡터를 생성할 수 있다. 또 다른 한편으로, 및 특정 예로서, 다음은 Cas9, 예컨대 Cas9 야생형 (유형 II)을 코딩하는 유전자 편집 트랜스젠을 수반한 바이러스 전달 벡터의 생성 방법을 제공한다.

[0470] HEK293T 세포를, 10% 태아 소 혈청 [시그마 (Sigma; 독일 슈타인하임)], 100 U/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 [라이프 테크놀로지 (Life Technologies; 독일 다름슈타트)]을 함유하는 DMEM 배지 (라이프 테크놀로지)에서 배양할 수 있다. Huh7 및 Hep56D 세포 배지는 부가적으로, 1% 비-필수 아미노산 (라이프 테크놀로지)을 함유할 수 있다. 저켓(Jurkat) 세포를, 10% 태아 소 혈청 (시그마), 100 U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신, 및 2 mM L-글루타민 (모두 라이프 테크놀로지)을 함유하는 RPMI 1640 배지 [GE 헬스케어 (GE Healthcare; 호주 패스킹)]에서 성장시킬 수 있다. 모든 세포주를 37°C 및 5% CO2에서 배양할 수 있다. 대규모 AAV 벡터 생성을 위하여, HEK293T 세포를 10개의 15 cm² 디쉬 (1개의 디쉬당 4 x 10⁶ 개 세포)에 시딩할 수 있다. 2일 후, 이들을 (i) AAV 벡터 플라스미드 (gRNA 및/또는 Cas9를 코딩함), (ii) AAV rep 및 cap 유전자를 수반하는 AAV 헬퍼 플라스미드, 및 (iii) AAV 생성을 위해 헬퍼 관능기를 제공하는 아데노바이러스 플라스미드로 삼중-형질감염시킬 수 있다.

[0471] AAV cap 유전자는 합성 단리물 AAV-DJ (문헌 [Grimm, et al., J. Virol. 2008, 82, 5887-5911])로부터 유래될 수 있거나 또는 새로운 변이체 AAVrh10A2로부터 유래될 수 있다. 간략하게 설명하면, AAVrh10A2는 7개 아미노산 길이의 펩티드를 AAV 혈청형 rh10의 캡시드의 노출된 영역 내로 삽입함으로써 창출될 수 있다. AAV 생성 플라스미드 및 프로토콜에 관한 추가의 세부 사항은 문헌 [Borner, et al., Nucleic Acids Res. 2013, 41, e199 and Grimm, Methods 2002, 28, 146-157]에 보고된 바와 같이 수행될 수 있다. 소규모 AAV 스톱을 생성하기 위하여, 웰당 2 x 10⁵ 개의 HEK293T 세포를 6-웰 플레이트에 시딩할 수 있고, 그 다음날 전술된 플라스미드들로 삼중-형질감염시킬 수 있다. 3일 후, 상기 세포를 배지 내로 긁어 내고, 1,500 rpm 하에 10분 원심분리함으로써 수집하며, 300 µL 1x PBS (라이프 테크놀로지)에 재현탁시킨 다음, 액체 질소 및 37°C에서 동결-해동 주기를 3회 수행할 수 있다. 10분 동안 원심분리하는 것은 13,200 rpm 하에 수행하여 세포 부스러기를 제거할 수 있고, 바이러스 전달 벡터 입자를 함유하는 상등액을 형질도입 실험에 직접 사용할 수 있거나 또는 -20°C 하에 동결시킬 수 있다.

[0472] 소규모 형질감염 및 후속 T7 검정을 위하여, 웰당 2.8 x 10⁴ 개의 HEK293T 세포 또는 1.2 x 10⁴ 개의 Huh7 세포를 96-웰 플레이트에 시딩하고, 그 다음날 상기 포맷에 대한 제조업체의 권장 사항에 따라서 리포펙타민 2000 (라

이프 테크놀로지)을 이용하여 형질감염시킬 수 있다 (각각 25 μ L 혈청 무함유 배지 중에 200 ng DNA 및 0.5 μ L 리포펙타민 2000). 200 ng DNA는 일체형 Cas9/gRNA 벡터로 이루어질 수 있거나, 또는 별도의 Cas9 구축물과 gRNA 구축물의 경우에는, 각각 100 ng로 이루어질 수 있다. 웨스턴 블롯팅을 위한 용해물을 수득하기 위해, HEK293T 세포를, 이러한 포맷에 대한 제조업체의 권장 사항에 따라서 리포펙타민 2000을 이용하여, 24-웰 플레이트에서 형질감염시킬 수 있다 (용해물당 1개의 웰). 형질도입 실험에서는, 세포를 96-웰 플레이트에서 성장시킬 수 있고, 시딩한지 1일 후에 10 μ L 비-정제된 AAV 또는 정제된 벡터로 형질도입시킬 수 있다. 3일 (형질감염) 내지 5일 (형질도입) 인큐베이션 후, 상기 세포를, 제조업체의 프로토콜에 따라서 0.2 μ g/mL 프로테이나제 K (로슈; 독일 만하임)를 보충시킨 다이렉트 PCR 용해 리전트 세포 (PeqLab; 독일 에를랑겐)로 용해시킬 수 있다.

[0473] 문헌 [Senis, et al. Biotechnol. J. 2014, 9, 1402-1412]에 기재된 바와 같이, 플라스미드 및 벡터, 예컨대 상기 벡터는 CRISPR 성분인 Cas9 및 키메라 (가이드) RNA의 전달을 달성할 수 있다. 또한, 간-특이적 프로모터 또는 간 miRNA 결합 부위 각각을 이용하여, Cas9 발현을 간세포로 향하게 하거나 멀어지게 할 수 있는 것으로 입증되었다. 이러한 벡터가 생체 내에서의 유전자 조작을 위해 사용될 수 있다는 추가의 증거가 제공되었다. 이는 성체 마우스의 예시된 간에서 수행되었다.

[0474] **실시예 30: Cas9 변이체 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0475] 실시예 30에서의 방법론을 또한 사용하여, 유전자 편집 트랜스진, 예컨대 Cas9 변이체, 예컨대 본원에 기재된 Cas9 변이체 중 어느 하나를 코딩하는 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를 생성할 수 있다. 또 다른 한편으로, 본원에 기재된 다른 바이러스 벡터 중 어느 하나를 대신 사용하여 상기 바이러스 전달 벡터를 생성할 수 있다. 제공된 Cas9 변이체 중 어느 하나는 본원에 제공된 유전자 편집 트랜스진 중 어느 하나에 의해 코딩될 수 있다.

[0476] Cas9 변이체를 만들기 위해, NLS 및 3 x FLAG 태그를 수반한 인간 코돈-최적화 스트렙토코쿠스 피오게네스 Cas9 뉴클레아제 [애드진(Addgene) 플라스미드 43861]를 야생형 Cas9 발현 플라스미드로서 사용할 수 있다. Cas9_Exp 프라이머를 수반한 주형으로서 야생형 Cas9 발현 플라스미드의 PCR 생성물은 깁슨(Gibson) 어셈블리 클로닝 키트 [뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)]를 이용하여 어셈블리하여 Cas9 및 FokI-dCas9 변이체를 구축할 수 있다. 단일 gRNA 구축물 (gRNA G1 내지 G13)을 코딩하는 발현 플라스미드를 또한 클로닝할 수 있다.

[0477] **실시예 31: 아연 핑거 뉴클레아제 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0478] 본원, 예컨대 상기 실시예에 기재된 바이러스 벡터 중 어느 하나를 이용하여, 아연 핑거 뉴클레아제를 코딩하는 유전자 편집 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를 생성할 수 있다. 또 다른 한편으로, 및 특정 예로서, 다음은 유전자 편집 트랜스진을 수반한 상기 바이러스 전달 벡터의 생성 방법을 제공한다.

[0479] TRBC-ZFN 및 TRAC-ZFN은 문헌 [Urnov, et al. Nature 435, 646-651 (2005)]에 기재된 바와 같이 설계 및 어셈블리할 수 있다. 사용된 인식 나선은 문헌 [Provasi, et al., Nature Medicine, Vol. 18, No. 5, May 2012]에 제공된 바와 같을 수 있다. TRBC-ZFN 및 TRAC-ZFN을 코딩하는 렌티바이러스 벡터는 HIV-유래 자기 불활성화 전달 구축물 pCCLsin.cPPT.SFFV.eGFP.Wpre로부터 생성될 수 있는데, 이는 HIV 인테그라제 내의 D64V 돌연변이를 수반하는 인테그라제-결합하는 3세대 패키징 구축물에 의해 패키징될 수 있고 VSV 외피에 의해 가짜형을 형성할 수 있다. Ad5/F35 아데노바이러스 벡터가 E1-E3-결실된 백본 상에서 생성될 수 있다. TRBC 또는 TRAC 유전자 중 하나를 표적으로 하는 ZFN은 2A 펩티드 서열을 이용하여 연결시킬 수 있고, 적절한 프로모터의 제어하에 pAdEasy-1/F35 벡터 내로 클로닝할 수 있으며, TReX 293T 세포를 이용하여 각 구축물에 대한 Ad5/F35 바이러스를 생성시킬 수 있다. 양방향 자기-불활성화 전달 벡터 pCCLsin.cPPT. Δ LNGFR.minCMV.hPGK.eGFP.Wpre로부터 및 pCCLsin.cPPT.hPGK.eGFP.Wpre로부터 WT1-특이적 TCR 채와 단일 α 21 또는 β 21 WT1-특이적 TCR 채 둘 다를 코딩하는 렌티바이러스 벡터는 인테그라제-적격한 3세대 구축물에 의해 생성 및 패키징할 수 있고, VSV 외피에 의해 가짜형을 형성할 수 있다.

[0480] 상기와 같은 벡터, 및 문헌 [Provasi, et al., Nature Medicine, Vol. 18, No. 5, May 2012]에 기재된 바와 같은 벡터를 이용하여, ZFN이 내인성 TCR β - 및 α -채 유전자의 붕괴를 증진시켰다는 것을 밝혀내었다. ZFN으로 처리된 림프구는 CD3-TCR의 표면 발현이 결여되었고, 인터류킨-7 (IL-7) 및 IL-15의 부가에 따라 확장되었다. 추가로, 윌름스(Wilms) 종양 1 (WT1) 항원에 대해 특이적인 TCR의 렌티바이러스 전달 후, 이러한 TCR-편집된 세포는 새로운 TCR을 고 수준으로 발현하였다 (문헌 [Provasi, et al., Nature Medicine, Vol. 18, No. 5, May

2012]에 또한 기재된 바와 같다).

[0481] **실시예 32: 아연 핑거 뉴클레아제 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0482] hF9mut 유전자 자리를 표적으로 하는 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN) 및 F9-표적화 벡터는 문헌 [Li, et al. Nature, 2011;475(7355):217-221]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 이러한 벡터는 혈우병 B (HB)의 신생아 마우스 모델에서 생체내 유전자 표적화를 위하여 성공적으로 사용된 것으로 밝혀졌다. 인간 F9 유전자를 표적으로 하는 ZFN 쌍을 코딩하는 AAV 벡터, 및 교정 cDNA 카세트를 플랜킹하는 상동성 아암(arm)을 수반한 유전자-표적화 벡터를 전신 전달하면, 상기 마우스의 간에서 마우스 게놈 내로 조작된 결합있는 hF9 유전자가 교정되었다. 추가로, 응고 시간을 정규화하는 데 충분한 인간 인자 IX 발현의 안정적 수준이 달성되었다.

[0483] **실시예 33: 메가뉴클레아제 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0484] 본원, 예컨대 상기 실시예에 기재된 바이러스 벡터 중 어느 하나를 이용하여, 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자 편집 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를 생성할 수 있다. 또 다른 한편으로, 및 특정 예로서, 다음에는 유전자 편집 트랜스진을 수반한 상기 바이러스 전달 벡터를 생성하기 위한 일반적인 방법론이 기재되어 있다. 메가뉴클레아제는 미국 공개 번호 20110033935 및 20130224863에 제공된 메가뉴클레아제 중 어느 하나일 수 있다.

[0485] 일부 실시양태에서, 특별한 바이러스 유전자를 불활성화시켜 이러한 바이러스의 재생을 방지한다. 바람직하게, 일부 실시양태에서, 특정 바이러스가 표적 세포 내에서 단지 전달 및 유지될 수는 있지만, 표적 세포 또는 조직 내에서 복제될 수 있는 능력을 보유하지 않도록 상기 바이러스를 변경시킨다. 메가뉴클레아제를 코딩하는 하나 이상의 DNA 서열을 상기 변경된 바이러스 게놈 내로 도입하여, 벡터와 같이 작용하는 바이러스 게놈을 생성시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 MFG 또는 pLJ 벡터이지만, 이에 제한되지 않는다. MFG 벡터는 pol 및 env 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 결실시켜 복제 결합있는 것으로 만드는 간소화한 몰로니 무린 백혈병 바이러스 벡터 (MoMLV)이다. p11 레트로바이러스 벡터가 또한, MoMLV의 특정 형태이다 (예를 들어, 문헌 [Korman et al. (1987), Proc. Nat'l Acad. Sci., 84:2150-2154] 참조). 다른 실시양태에서, 재조합 아데노바이러스 또는 아데노 관련 바이러스를 이용하여 바이러스 벡터를 생성할 수 있다.

[0486] **실시예 34: 엑손 스킵핑 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0487] 본원, 예컨대 상기 실시예에 기재된 바이러스 벡터 중 어느 하나를 이용하여, 엑손 스킵핑 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를 생성할 수 있다. 또 다른 한편으로, 및 특정 예로서, 다음은 특이적 엑손 스킵핑 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터의 생성 방법을 제공한다.

[0488] 단일 가닥 AAV1-U7ex235 및 AAV1-U7scr의 생성을 위한 pAAV(U7smOPT-SD23/BP22) 및 pAAV(U7smOPT-scr) 플라스미드; 및 자기 상보성 scAAV9-U7ex239를 위한 scAAV-U7ex23 플라스미드를 이용하는 3개의 플라스미드 형질감염 프로토콜을 사용할 수 있다. pAAV(U7smOPT-scr) 플라스미드는 임의의 무린 cDNA와 매치되지 않는 비특이적 서열 GGTGATATGCATGATATGT를 함유할 수 있다.

[0489] 상기에 따라서 생성된 바이러스 전달 벡터를 사용하면, 문헌 [Le Hir et al., Molecular Therapy vol. 21 no. 8, 1551-1558 Aug. 2013]에 기재된 바와 같이, 이러한 벡터가 디스트로핀을 복원시키는 데 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 이러한 복원은 3개월 내지 12개월에 상당히 저하되었는데, 이는 바이러스 게놈 상실과 상관이 있었다. 따라서, 본원에 제공된 조성물 및 방법은 이러한 처리 효과를 유지시키는 데 도움을 줄 수 있다.

[0490] **실시예 35: 엑손 스킵핑 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0491] 클론 U1#23은, 올리고 mU1anti5 (5'-CGAAATTTTCAGGTAAGCCGAGGTTATGAGATCTTGGGCCTCTGC-3') 및 mU1anti3 (5'-GAACTTTCAGAGCCTCAAAATTAATAGGGCAGGGAGATACCATGATC-3')를 이용하여, 인간 U1 snRNA 유전자 상에서 역 PCR함으로써 수득할 수 있다. 안티센스-함유 삽입물은 올리고 U1cas-up-NheI (5'-CTAGCTAGCGGTAAGGACCAGCTTCTTTG-3') 및 U1cas-down-NheI (5'-CTAGCTAGCGGTTAGCGTACAGTCTAC-3')를 이용하여, 상응하는 플라스미드로부터 증폭시킬 수 있다. 이로써 생성된 단편을 NheI-소화시킬 수 있고, pAAV2.1-CMV-EGFP 플라스미드의 정방향으로 클로닝할 수 있다.

[0492] AAV-U1#23 벡터는 293 세포를 삼중 형질감염시킴으로써 생성시키고, 이를 CsCl2 초원심분리함으로써 정제하며, 실시간 PCR-기반 검정과 도트-블롯 검정 둘 다를 이용함으로써 적정할 수 있다. 그린 형성 단위의 수는 293 세

포 상에서 일련으로 희석시킴으로써 평가할 수 있다. AAV 벡터는 AAV TIGEM 벡터 코어에 의해 생성될 수 있다.

[0493] 6주 생의 mdx 마우스의 꼬리 정맥에 AAV 벡터의 3 내지 4×10^{12} 게놈 카피를 투여할 수 있다. 바이러스 투여 후 6주 및 12주에, 동물을 사멸시킬 수 있고, 상이한 구역으로부터의 근육을 수거할 수 있다. EGFP 분석 및 해부는 형광성 입체 현미경 [레이카(Leica) MZ16FA]하에 수행할 수 있다.

[0494] 상기에 따라서 생성된 바이러스 전달 벡터를 사용하면, 문헌 [Denti et al., 3758-3763, PNAS, March 7, 2006, vol. 103, no. 10]에 기재된 바와 같이, 꼬리 정맥 주사에 의해 mdx 마우스에서 지속적인 엑손 스킵이 초래되었다. 상기 벡터를 전신 전달하면, 신체 전체에 걸친 효과적인 집락 형성, 생체내 기능적 특성의 상당한 회복 및 더 낮은 크레아틴 키나제 혈청 수준이 초래되었다. 이러한 결과는 근육 소모가 감소되었다는 것을 암시한다.

[0495] **실시예 36: 엑손 스킵핑 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0496] 특정의 엑손에 대해 특이적인 상이한 U7snRNA 구축물을, 예컨대 U7smOPT-SD23/BP22 (변형된 뮤린 U7snRNA 유전자)로부터 조작할 수 있다. 특정의 엑손을 표적으로 하는 안티센스 서열을, 안티센스 올리고뉴클레오타이드로서 엑손 스킵핑을 유도시키는 디스트로핀 mRNA의 엑손을 표적으로 하는 안티센스 서열로 대체시킬 수 있다. 서열을 U7snRNA 구축물 내로 삽입할 수 있다. 이어서, 이로써 생성되는 U7snRNA 단편을 추가의 렌티바이러스 생성을 위하여 렌티바이러스 벡터 구축물 내로 도입할 수 있거나 또는 AAV 생성을 위하여 AAV 벡터 구축물 내로 도입할 수 있다.

[0497] 렌티바이러스 벡터는 pRRLcPPT-hPGK-eGFP-WPRE 구축물에 근거할 수 있는데, 여기서는 hPGK-GFP 카세트를 제거하고, 이를 U7snRNA 구축물로 대체시킨다. 렌티바이러스 벡터는 293T 세포 내로, 패키징 구축물인 pCMVΔR8.74, 수포성 구내염 바이러스-G 외피를 생성하는 플라스미드 (pMD.G) 및 기존에 언급된 바와 같은 벡터 자체를 형질감염시킴으로써 생성될 수 있다. 바이러스 역가 (감염성 입자)는 12-웰 플레이트에서 NIH3T3 세포를 상기 벡터 제제의 일련의 희석물로 형질도입함으로써 결정할 수 있다. 72시간 후, 형질도입된 세포로부터의 게놈 DNA를, 게놈 DNA 정제용 키트 (퀴아젠; 영국 크롤리)를 이용하여 추출할 수 있다. 감염성 입자 역가 (감염성 입자/ml)는 다른 곳에 기재된 바와 같은 정량적 실시간 PCR에 의해 결정할 수 있다.

[0498] 후속 AAV 벡터 생성을 위하여, 상이한 U7snRNA 단편을 pSMD2 AAV2 벡터의 XbaI 부위에 도입할 수 있다. AAV2/1 가짜형 벡터는 293 세포에서 pAAV2-U7snRNA, 아데노바이러스 헬퍼 관능기를 코딩하는 pXX6, 및 AAV2 rep 및 AAV1 cap 유전자를 함유하는 pAAV1pITRCO2를 공동 형질감염시킴으로써 제조할 수 있다. 벡터 입자는 형질감염 후 48시간에 수득된 세포 용해물로부터 아이오딕사놀(Iodixanol) 구배 상에서 정제할 수 있고, 정량적 실시간 PCR에 의해 역가를 측정할 수 있다.

[0499] 문헌 [Goyenvalle, et al. The American Society of Gene & Cell Therapy, Vol. 20 No. 6, 1212-1221 June 2012]에 기재된 바와 같이, 상기 방법을 이용하여 U7 작은-핵 RNA를 코딩하고 상기 생성된 바와 같은 바이러스 전달 벡터는 시험관내와 생체내 둘 다에서 효율적인 엑손 스킵핑을 유도시킬 수 있다.

[0500] **실시예 37: 엑손 스킵핑 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0501] HSV 전달 벡터는 미국 공개 번호 20090186003 및 상기 실시예 28의 방법에 따라서 제조할 수 있는데, 단 트랜스진이 대신 엑손 스킵핑 트랜스진이 되도록 그 방법론을 변경시킬 수 있어야 한다. 이러한 엑손 스킵핑 트랜스진은 본원에 기재된 바와 같거나 또는 관련 기술분야에 달리 공지된 상기 트랜스진 중 어느 하나일 수 있다.

[0502] **실시예 38: 엑손 스킵핑 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0503] HIV 렌티바이러스 전달 벡터는 미국 공개 번호 20150056696 및 상기 실시예 26의 방법에 따라서 제조하는데, 단 트랜스진이 대신 엑손 스킵핑 트랜스진이 되도록 그 방법론을 변경시킬 수 있어야 한다. 이러한 엑손 스킵핑 트랜스진은 본원에 기재된 바와 같거나 또는 관련 기술분야에 달리 공지된 상기 트랜스진 중 어느 하나일 수 있다.

[0504] **실시예 39: 유전자 발현 조정성 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0505] 본원, 예컨대 상기 실시예에 기재된 바이러스 벡터 중 어느 하나를 이용하여, 유전자 발현 조정성 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를 생성할 수 있다. 또 다른 한편으로, 및 특정 예로서, 다음은 특이적 유전자 발현 조정성 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터의 생성 방법을 제공한다.

[0506] 바이러스 전달 벡터는 문헌 [Brown et al., Nat Med. 2006 May; 12(5):585-91]에 기재된 방법에 따라서 생성된

다. 간략하게 설명하면, RNA의 역전사, mRNA의 농도를 정량화하기 위한 정량적 PCR 분석, 및 정규화하기 위한 GAPDH 발현을 이용하여 특정 플라스미드를 구축한다. VSV-가짜형 3세대 렌티바이러스 벡터 (LV)는 293T 세포 내로 4개의 플라스미드를 일시적으로 공동 형질감염시킴으로써 생성시키고, 이를 초원심분리함으로써 정제한다. 벡터 입자는 HIV-1 gag p24 항원 면역포획에 의해 측정할 수 있다.

[0507] 문헌 [Brown et al., Nat Med. 2006 May; 12(5):585-91]에 기재된 바와 같이, 내인성 miRNA의 표적 서열을 코딩하는 상기 렌티바이러스 벡터는 상이한 조직에서의 유전자 발현을 격리시킬 수 있었던 miRNA의 생성을 초래하는 것으로 밝혀졌다. miRNA 조절의 증거가 제공되었고, 이는 상기 벡터가 치료적 적용에 사용될 수 있다는 것을 입증해준다.

[0508] **실시예 40: 유전자 발현 조정성 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0509] 특정 유전자 (예를 들어, 헌팅틴 유전자; AAV2/1-miRNA-Htt)에 대한 miRNA-기반 헤어핀을 코딩하는 AAV2/1 혈청형 벡터를 생성하기 위해, 상기 명시된 유전자 (예를 들어, 인간 HTT)에 대한 cDNA를, AAV2 역위 말단 반복 서열 (ITR) 및 1.6-kb 시토메갈로바이러스 증강인자/치킨 b-액틴 (CBA) 프로모터를 함유하는 서플 플라스미드 내로 클로닝할 수 있다. 대조군 벡터를 또한 발생시킬 수 있는데, 이는 비어있는 벡터 백본 (예를 들어, AAV2/1-Nu11)을 함유하거나 또는 동일한 프로모터 (AAV2/1-eGFP)의 제어하에 리포터, 예컨대 증강된 그린 형광성 단백질을 발현한다. 바이러스 전달 벡터는 특정 세포주, 예컨대 인간 293 세포를 삼중-플라스미드 공동-형질감염시킴으로써 생성시킬 수 있고, 이어서 재조합 비리온을 이전에 문헌 [Stanek et al., Human Gene Therapy. 2014;25:461-474]에 기재된 바와 같이 칼럼 정제할 수 있다. 그 다음, 이로써 생성된 AAV2/1-miRNA-Htt의 역가는 정량적 PCR을 이용하여 결정할 수 있다.

[0510] 문헌 [Stanek et al., Human Gene Therapy. 2014;25:461-474]에 기재된 바와 같이, 상기 바이러스 전달 벡터를 이용하여 생성된 데이터는 AAV-매개된 RNAi가 선조체에서 세포를 형질도입하는 데 유효할 수 있고, 이러한 영역에서 야생형과 돌연변이체 Htt 둘 다의 수준을 부분적으로 감소시킬 수 있다는 것을 명확하게 보여주었다.

[0511] **실시예 41: 유전자 발현 조정성 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0512] CD81 유전자는 역전사에 의해 증폭시킬 수 있다. cDNA는 적절한 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시킬 수 있다. 정방향 프라이머는 BamHI [바이오랩스 (Biolabs; 스위스 알슈빌)] 제한 부위에 이어 5' CD81 cDNA-특이적 서열을 함유할 수 있고; 역방향 프라이머는 3' CD81 cDNA-특이적 서열, 6 His-태그, 정지 코돈 및 Xho I (바이오랩스) 제한 부위를 함유할 수 있다. PCR 생성물을 소화시킬 수 있고, 이를 pTK431 내의 유사한 부위 내로 클로닝할 수 있다. pTK431은 전체 tet-오프-유도성 시스템, 중앙 폴리푸린 트랙 (cPPT) 및 우드척(woodchuck) 간염 바이러스 전사 후 조절성 요소를 함유하는 자기 불활성화 HIV-1 벡터이다. 플라스미드는 CsCl₂ 정제될 수 있다.

[0513] 한넨(Hannon)의 설계 기준에 근거한 CD81 mRNA 서열에 따라서 표적을 설계할 수 있다 (katahdin.cshl.org:9331/RNAi/html/rnai.html). 주형으로서의 pSilencer 1.0-U6 [암비온(Ambion)], 및 특정 제한 부위를 함유하는 U6 프로모터-특이적 정방향 프라이머를 이용하여, 각 shRNA 표적을 PCR에 의해 마우스 U6 프로모터에 부가할 수 있다. 이러한 PCR 생성물을 소화시킬 수 있고, pTK431 내의 유사한 부위 내로 클로닝할 수 있으며, 서열 분석하여 각 구축물의 완전성을 검증할 수 있다.

[0514] 벡터 플라스미드를 패키징 구축물 플라스미드 pΔNRF 및 외피 플라스미드 pMDG-VSVG와 함께, HEK293T 세포 내로 공동 형질감염시켜 바이러스 입자를 생성시킬 수 있다. 바이러스 역가는 p24 항원 측정 (KPL; 스위스 로잔)에 의해 결정할 수 있다.

[0515] 문헌 [Bahi, et al. J. Neurochem. (2005) 92, 1243-1255]에 제시된 바와 같이, CD81에 대항하여 표적화된 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 발현하는 렌티바이러스 (렌티-CD81-shRNA)는 시험관 내에서 HEK293T 세포의 감염 후에 유전자 침묵을 초래하였다. 또한, 렌티-CD81-shRNA를 생체내 전달하면, 내인성 CD81의 침묵이 야기되었다.

[0516] **실시예 42: 유전자 발현 조정성 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0517] 본원, 예컨대 상기 실시예에 기재된 바이러스 벡터 중 어느 하나를 이용하여, RNAi 작용제를 코딩하는 유전자 발현 조정성 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를 생성할 수 있다. 본원에 제공된 바와 같은 유전자 발현 조정성 트랜스진에 의해 코딩될 수 있는 RNAi 작용제의 예가 다음에 기재된다.

[0518] 발현 구축물은 3개 이상의 개별 shRNA 중의 발현을 구동시키는 프로모터를 포함할 수 있다. 작은 핵 RNA 및 전

이 RNA의 합성은 pol III-특이적 프로모터의 제어하에 RNA 중합효소 III (pol III)에 의해 지시될 수 있다. 이들 조절성 요소에 의해 지시된 전사체가 비교적 많은 양으로 존재하기 때문에, U6 및 H1 유전자로부터 유래된 것을 포함한 pol III 프로모터를 이용하여 1-x RNAi의 발현을 구동시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Domitrovich and Kunkel. Nucl. Acids Res. 31(9): 2344-52 (2003); Boden, et al. Nucl. Acids Res. 31(17): 5033-38 (2003a); and Kawasaki, et al. Nucleic Acids Res. 31(2): 700-7 (2003)] 참조). U6 프로모터를 이용하는 RNAi 발현 구축물은 HCV 게놈의 3개의 상이한 영역을 표적으로 하는 3개의 RNAi 작용제를 포함할 수 있다. 유전자 발현 조절성 트랜스진에 의해 코딩될 수 있는 RNAi 작용제의 추가의 예는 본원에 기재된 RNAi 작용제 중 어느 하나를 포함한다.

[0519] **실시예 43: 유전자 발현 조절성 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터 (예측)**

[0520] 본원, 예컨대 상기 실시예에 기재된 바이러스 벡터 중 어느 하나를 이용하여, 세르피나(Serpina)1 RNAi 작용제, 예컨대 미국 특허 공개 번호 20140350071에 기재된 상기 작용제 중 하나를 코딩하는 유전자 발현 조절성 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터를 생성할 수 있다. 이러한 트랜스진을 수반한 바이러스 전달 벡터는 본원에 제공된 바와 같거나 또는 관련 기술분야에 달리 공지된 유사한 방법론에 따라서 생성될 수 있다.

[0521] 예를 들어, 아데노 관련 바이러스 (AAV) 벡터를 사용할 수 있다 (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); 미국 특허 번호 5,436,146). iRNA는, 예를 들어 U6 또는 H1 RNA 프로모터, 또는 시토크롬 칼로바이러스 (CMV) 프로모터 중 하나를 갖는 재조합 AAV 벡터로부터 2개의 별도의 상보성 단일 가닥 RNA 분자로서 발현될 수 있다. 본 발명에서 특징인 dsRNA를 발현하는 데 적합한 AAV 벡터, 재조합 AAV 벡터의 구축 방법, 및 벡터를 표적 세포 내로 전달하는 방법이 문헌 ([Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol. 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826]; 미국 특허 번호 5,252,479; 미국 특허 번호 5,139,941; 국제 특허 출원 번호 WO 94/13788; 및 국제 특허 출원 번호 WO 93/24641; 그러한 정보의 전체 개시내용이 본원에 참조로 포함된다)에 기재되어 있다.

[0522] **실시예 44: 대상체에서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 확립시킨다 (예측)**

[0523] 본원, 예컨대 본 실시예 중 어느 하나에 제공된 바이러스 전달 벡터 중 어느 하나를, 각각 정맥내, 근육내, 피하 또는 복강내 투여되는 본원, 예컨대 본 실시예 중 어느 하나에 제공된 바와 같은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 중 어느 하나와 동반하여, 예컨대 동시에 정맥내, 근육내, 피하 또는 복강내 투여한다. 이러한 투여는 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 확립시켜 주는, 바이러스 전달 벡터 및 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 최소한의 빈도 및 용량을 포함한 프로토콜에 따라서 일어난다. 상기 대상체는 본원에 기재된 대상체 중 어느 하나, 예컨대 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 가지고 있지 않은 대상체 또는 바이러스 전달 벡터의 반복 투여가 요망되는 대상체일 수 있다.

[0524] 일부 실시양태에서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응이 바이러스 전달 벡터에 대항한 T 세포 반응인 경우, 이러한 바이러스 전달 벡터는 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터의 동반 투여에 앞서, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제를 수반하지 않으면서 대상체에게 투여한다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량은 상기 동반 투여와 이에 앞선 바이러스 전달 벡터의 투여 둘 다 이후에 대상체에게 투여한다.

[0525] 일부 실시양태에서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응이 바이러스 전달 벡터에 대항한 B 세포 반응인 경우, 대상체에게 바이러스 전달 벡터와 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 동반 투여에 앞서, 바이러스 전달 벡터를 투여하지 않는다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량을 대상체에게 투여하고, 각 반복 용량은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 동반하여 투여된다.

[0526] 다른 실시양태에서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응이 항-바이러스 전달 벡터 항체 반응인 경우, 대상체에게 바이러스 전달 벡터와 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 동반 투여에 앞서, 바이러스 전달 벡터를 투여하지 않는다. 이러한 실시양태에서, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량을 대상체에게 투여하고, 각 반복 용량은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 동반하여 투여된다.

[0527] 항체의 수준을 결정하는 방법은 ELISA 검정을 사용할 수 있다. 항원-특이적 B 세포 또는 T 세포 리콜 반응에 대한 검정은 ELISpot, 세포내 시토카인 염색, 세포 증식, 및 시토카인 생성 검정을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0528] 상기 실시양태 중 어느 하나에서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응은 바이러스 전달 벡터와 항원 제시 세포

표적화 면역억제제의 동반 투여 후에 평가된다.

- [0529] 상기 실시양태 중 어느 하나에서, 항-바이러스 전달 벡터 약화된 반응을 확립시키기 위한 프로토콜을 결정할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 상기 프로토콜은 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게서 결정한다. 이와 같이 결정된 프로토콜을 이용하여, 바이러스 전달 벡터를 이용한 치료를 필요로 하는 다른 대상체를 치료할 수 있다.
- [0530] **실시예 45: 바이러스 전달 벡터를 투여하기에 앞서 대상체에게서 기존의 면역 수준을 결정한다 (예측)**
- [0531] 본원에 제공된 바와 같은 바이러스 전달 벡터, 예컨대 본원, 예컨대 본 실시예 중 어느 하나에 제공된 바이러스 전달 벡터 중 어느 하나를 이용한 치료를 필요로 하는 대상체로부터 특정 샘플, 예컨대 혈액 샘플을 수득할 수 있다.
- [0532] 이러한 대상체로부터의 샘플을 이용하여, 항체, 예컨대 중화 항체의 수준 또는 면역 세포, 예컨대 T 세포 또는 B 세포의 항원 리콜 반응의 수준을 결정할 수 있다. 항체의 수준을 결정하는 방법은 ELISA 검정을 사용할 수 있다. 항원-특이적 B 세포 또는 T 세포 리콜 반응에 대한 검정은 ELISpot, 세포내 시토카인 염색, 세포 증식, 및 시토카인 생성 검정을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 리콜 반응은 상기 샘플을 바이러스 전달 벡터 또는 그의 항원과 접촉시킴으로써 평가할 수 있다. 또 다른 한편으로, 리콜 반응은 또한, 바이러스 전달 벡터 또는 그의 항원을 대상체에게 투여한 후에 이러한 대상체로부터 샘플을 취한 다음, 생성되는 B 세포 또는 T 세포 리콜 반응 또는 항체의 수준을 결정함으로써 평가할 수 있다.
- [0533] 일부 실시양태에서, 대상체에게서 항-바이러스 전달 벡터 항체의 수준 (또는 B 세포 반응)을 측정함으로써 결정된, 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 대상체가 가지고 있지 않은 경우, 이러한 대상체는 본원, 예컨대 본 실시예 중 어느 하나에 제공된 바이러스 전달 벡터 중 어느 하나를, 본원, 예컨대 본 실시예 중 어느 하나에 제공된 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 중 어느 하나와 동반하여, 예컨대 동시에 정맥내, 근육내, 피하 또는 복강내 투여한다. 항원 제시 세포 표적화 면역억제제는 동일한 경로에 의해 투여한다.
- [0534] 다른 실시양태에서, 대상체에게서 바이러스 전달 벡터에 대한 T 세포 반응의 수준에 의해 결정된, 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역을 대상체가 가지고 있지 않은 경우, 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 동반 투여를 수반하지 않으면서 바이러스 전달 벡터의 특정 용량을 대상체에게 투여한 후에, 이러한 대상체에게 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 바이러스 전달 벡터를 동반하여, 예컨대 동시에 정맥내, 근육내, 피하 또는 복강내 투여한다.
- [0535] 상기 실시양태 중 어느 하나에서, 바이러스 전달 벡터의 하나 이상의 반복 용량을 대상체에게 투여한다. 이들 반복 용량은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제와 동반하여 투여될 수 있다.
- [0536] **실시예 46: 대상체에서 바이러스 전달 벡터의 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시킨다 (예측)**
- [0537] 본원, 예컨대 본 실시예 중 어느 하나에 제공된 바이러스 전달 벡터 중 어느 하나를, 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시켜 주는 빈도 및 투여량에 따라서 (이러한 트랜스진은 바이러스 전달 벡터에 의해 전달된다), 본원, 예컨대 본 실시예 중 어느 하나에 제공된 바와 같은 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 중 어느 하나와 동반하여, 예컨대 동시에 정맥내, 근육내, 피하 또는 복강내 투여한다. 이는 대상체 내의 각종 관심 조직 또는 시스템에서의 트랜스진 단백질 농도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 트랜스진 발현이 단계적으로 확대되는지 아닌지의 여부는 상기 실시예에 기재된 바와 같은 방법에 따라서 결정될 수 있다. 이러한 투여는 대상체에게서 트랜스진 발현을 단계적으로 확대시켜 주는, 바이러스 전달 벡터 및 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 빈도 및 용량에 따라서 일어난다. 상기 대상체는 본원에 기재된 대상체 중 어느 하나, 예컨대 바이러스 전달 벡터에 대한 기존의 면역의 가지고 있지 않은 대상체 또는 바이러스 전달 벡터의 반복 투여가 요망되는 대상체일 수 있다.
- [0538] 상기 실시양태 중 어느 하나에서, 트랜스진 발현의 단계적 확대를 달성시켜 주는 빈도 및 용량은 또 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게서 결정된다. 이는 또한, 예를 들어 상기 언급된 바와 같은 방법을 이용하여, 다른 대상체 내의 각종 관심 조직 또는 시스템에서의 트랜스진 단백질 농도를 측정함으로써 결정할 수 있다. 이러한 빈도 및 용량이, 다른 대상체 내에서 측정된 트랜스진 단백질 농도에 의해 결정된 바와 같이 단계적으로 확대된 트랜스진 발현을 달성시킨 경우, 상기 빈도 및 용량에 따라서 바이러스 전달 벡터와 항원 제시 세포 표적화 면역억제제의 동반 투여, 예컨대 동시 투여를 이용하여, 바이러스 전달 벡터를 이용한 치료를 필요로 하는 다른 대상체를 치료할 수 있다.

[0539] **실시예 47: 더 낮은 용량을 이용한 반복된 동반 투여 (예측)**

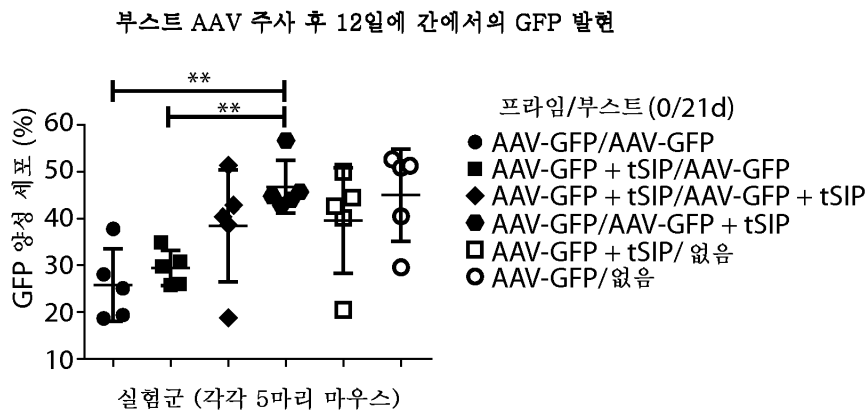
[0540] 본원에 제공된 바와 같이, 대상체를 대상으로 하여, 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터 중 어느 하나, 예컨대 본 실시예 중 어느 하나에 제공된 바이러스 전달 벡터 중 어느 하나에 대한 기존의 면역 수준에 관하여 평가할 수 있다. 또 다른 한편으로, 임상가는 대상체를 평가할 수 있고, 바이러스 전달 벡터를 이러한 대상체에게 반복해서 투여한 경우에 대상체에게 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응이 발생할 것으로 예상되는지 아닌지를 결정할 수 있다. 이러한 결정은 바이러스 전달 벡터가 그러한 결과를 야기시킬 가능성에 근거할 수 있고, 다른 대상체, 예컨대 시험 대상체에게서의 그러한 결과, 바이러스 전달 벡터를 생성시키기 위해 사용되었던 바이러스에 관한 정보, 대상체에 관한 정보 등에 근거할 수 있다. 일반적으로, 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응이 예상되는 것이라면, 임상가는 예상된 결과로서 바이러스 전달 벡터의 특정 용량을 선택한다. 그러나, 본 발명자의 연구 결과에 비추어 보면, 임상가는 대상체에 대해 선택되었던 것보다 더 낮은 용량의 바이러스 전달 벡터를 선택하고 사용할 수 있다. 더 낮은 용량의 혜택은 바이러스 전달 벡터의 투여량과 연관된 독성 감소, 및 표적을 벗어난 다른 효과의 감소를 포함할 수 있다.

[0541] 따라서, 본원에 제공된 대상체 중 어느 하나를, 본원에 제공된 바이러스 전달 벡터 중 어느 하나와 본원에 제공된 항원 제시 세포 표적화 면역억제제 중 어느 하나의 반복된 동반 투여, 예컨대 동시 투여를 이용하여 치료할 수 있는데, 여기서 바이러스 전달 벡터의 용량은, 바이러스 전달 벡터의 반복된 투여로 인해 대상체에게 항-바이러스 전달 벡터 면역 반응이 발생할 것으로 예상된 경우에 이러한 대상체에 대해 선택되어 왔었던 바이러스 전달 벡터의 용량보다 적은 양이 되도록 선택된다. 반복된 동반 투여의 바이러스 전달 벡터의 각 용량은, 달리 선택되어 왔었던 용량보다 적을 수 있다.

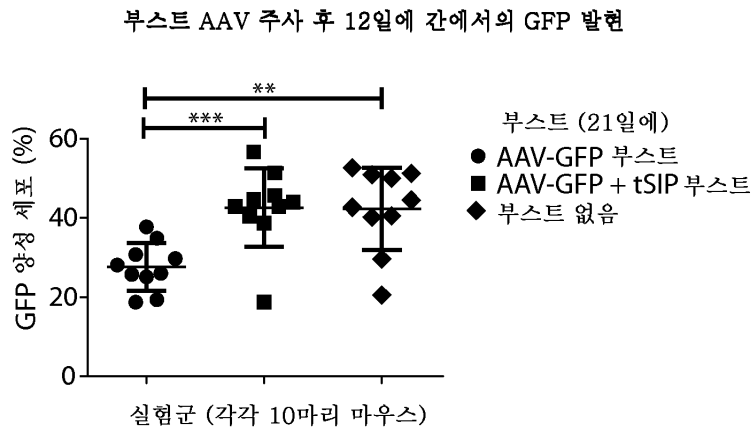
[0542]

도면

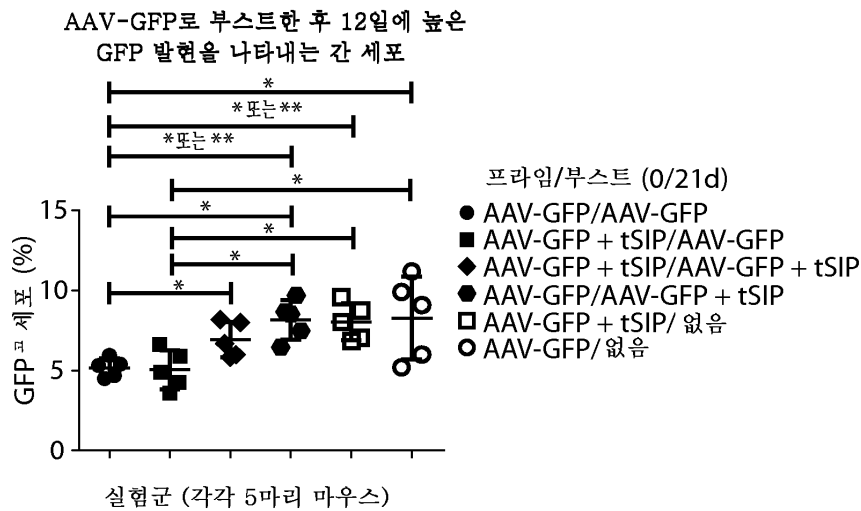
도면1



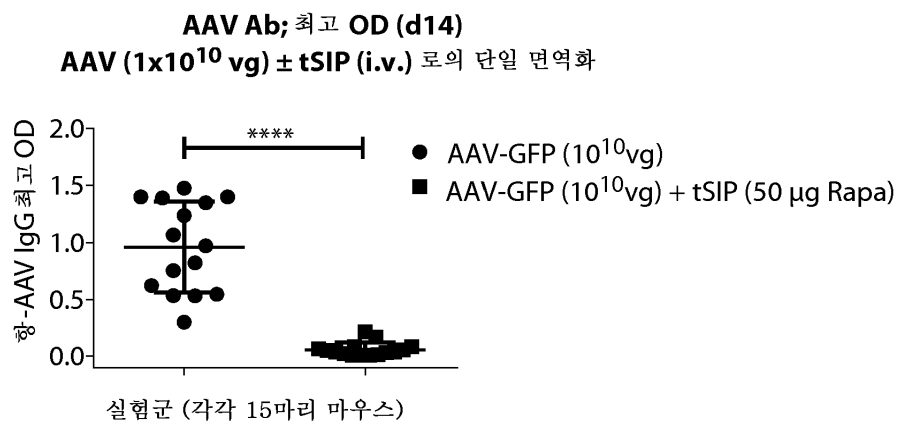
도면2



도면3

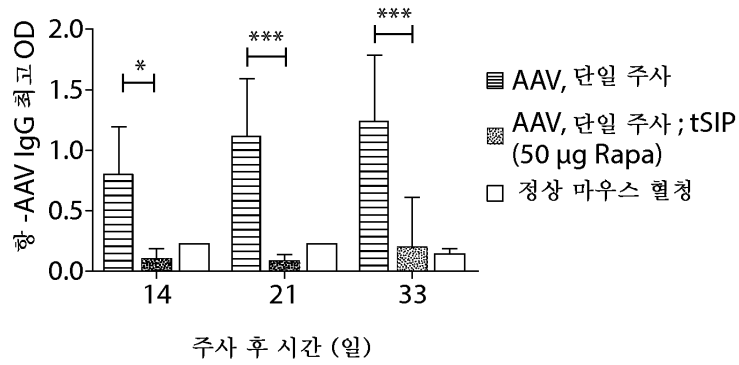


도면4



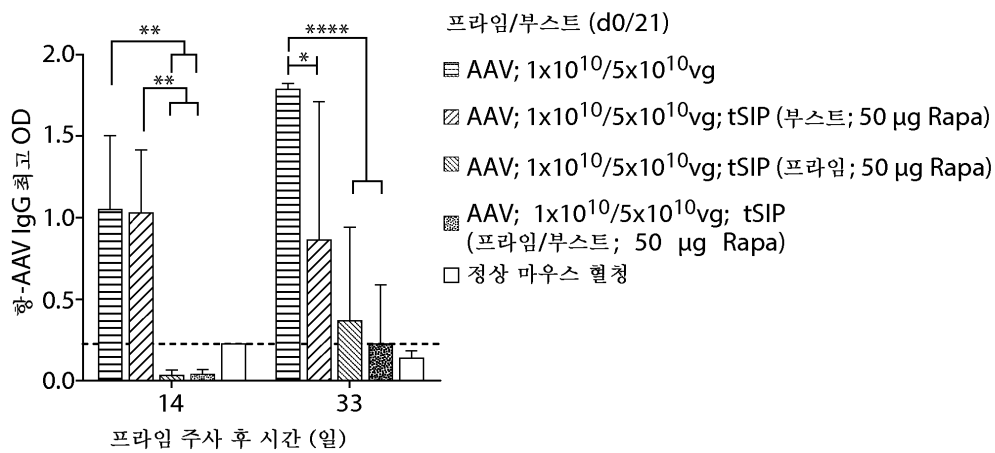
도면5

tSIP를 수반하거나 또는 수반하지 않으면서 단일 주사한 후 (i.v.)
AAV에 대한 항체의 유도

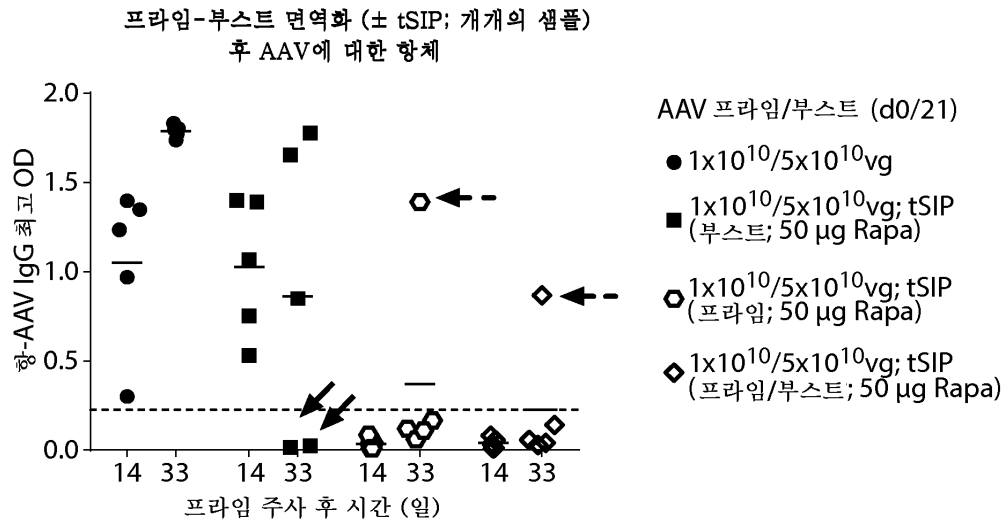


도면6

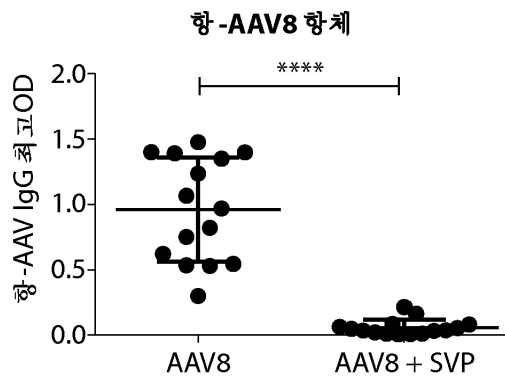
프라임-부스트 면역화 ± tSIP 후
AAV에 대한 항체



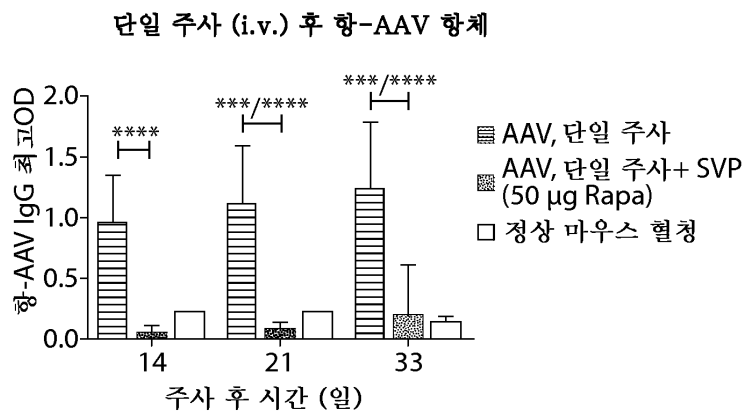
도면7



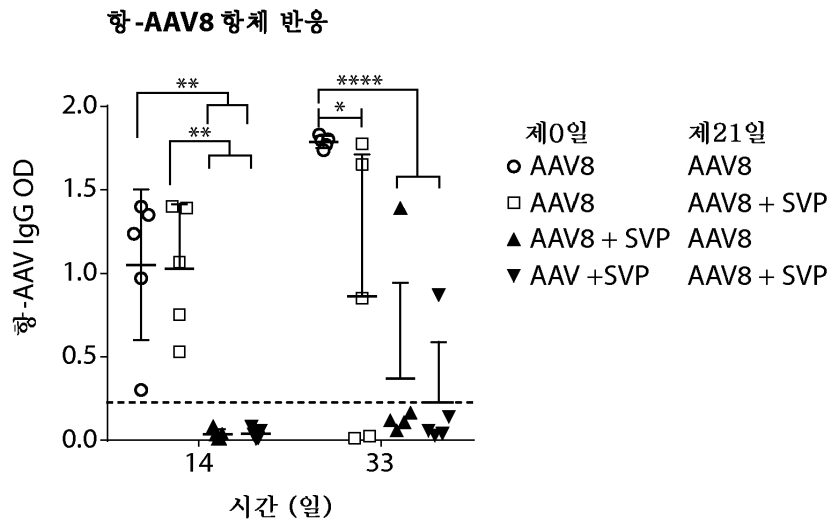
도면8



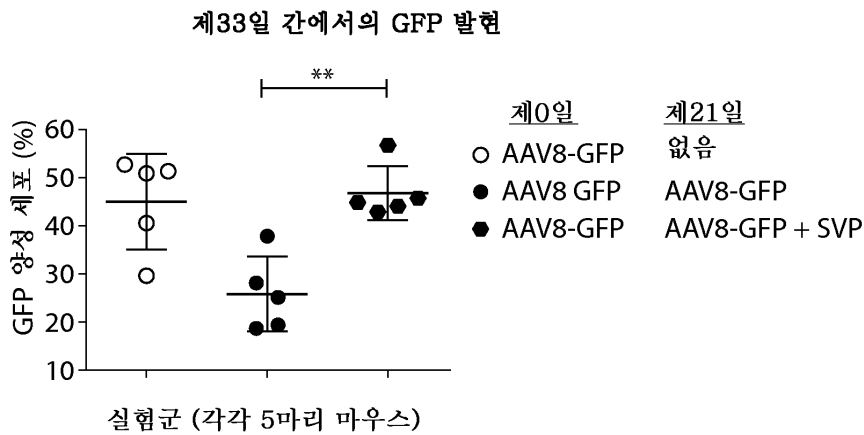
도면9



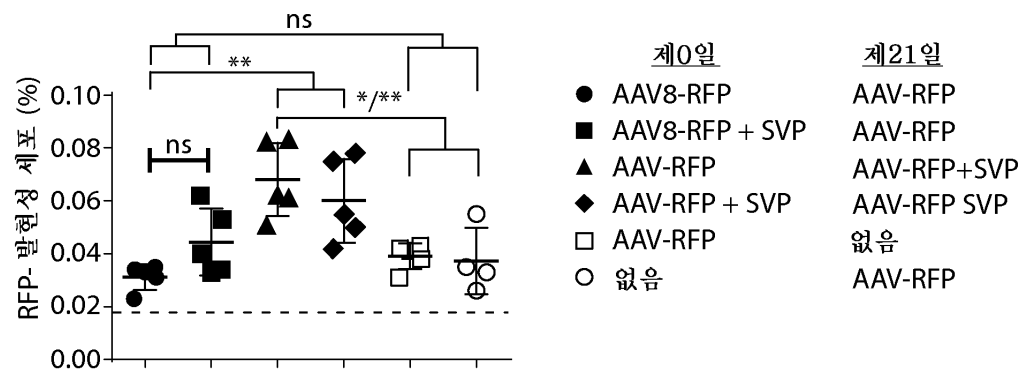
도면10



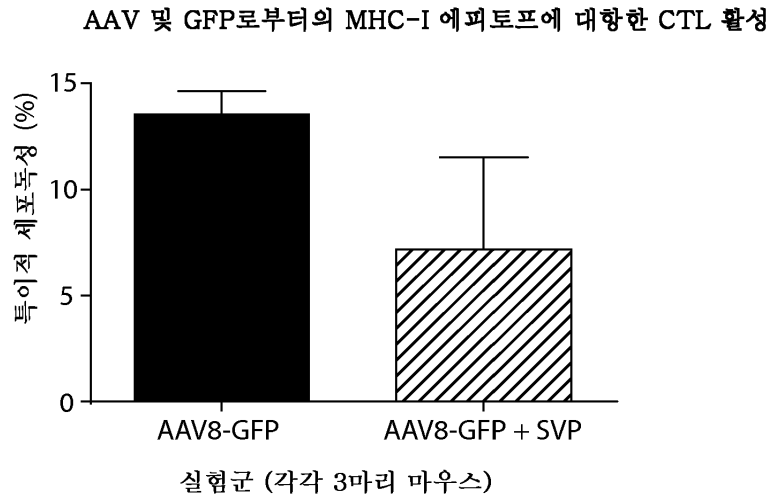
도면11



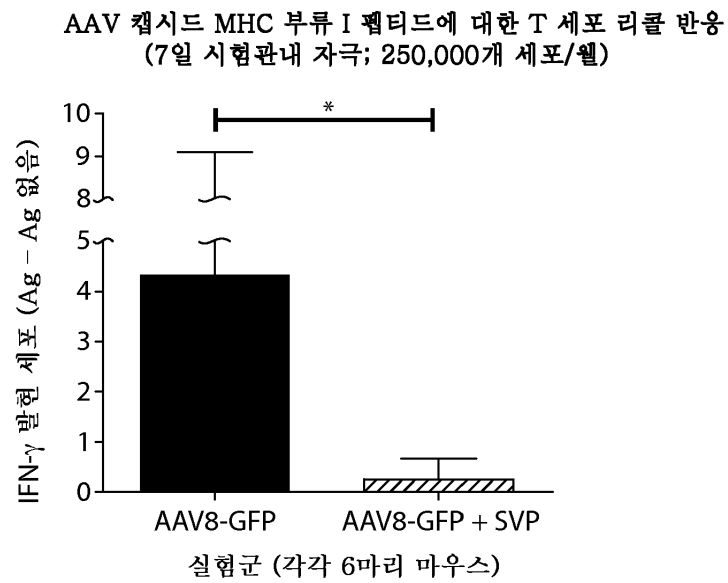
도면12



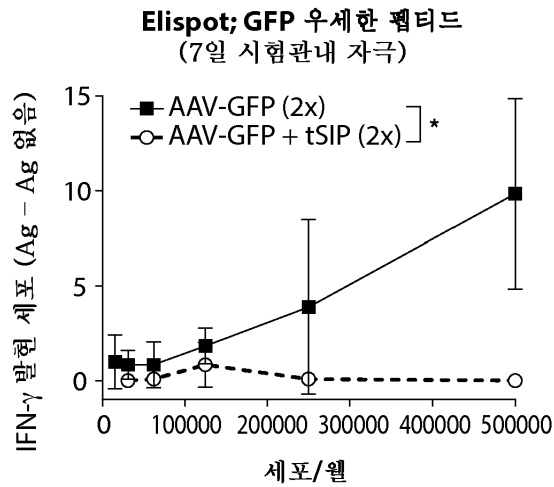
도면13



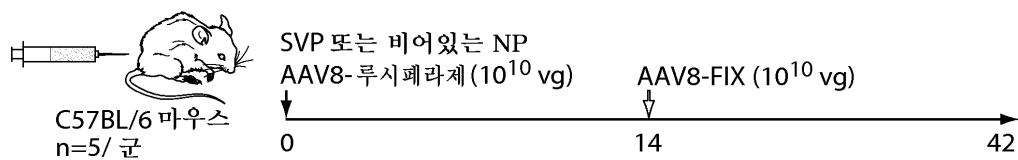
도면14



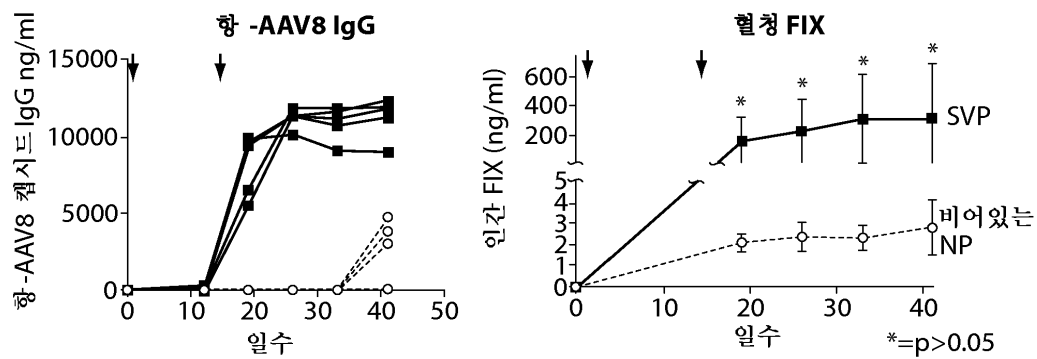
도면15



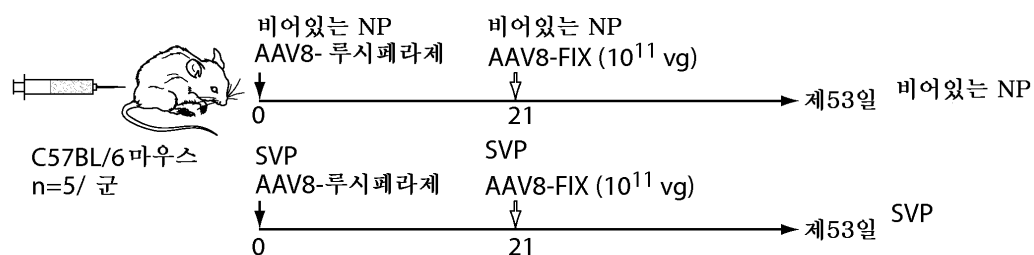
도면16



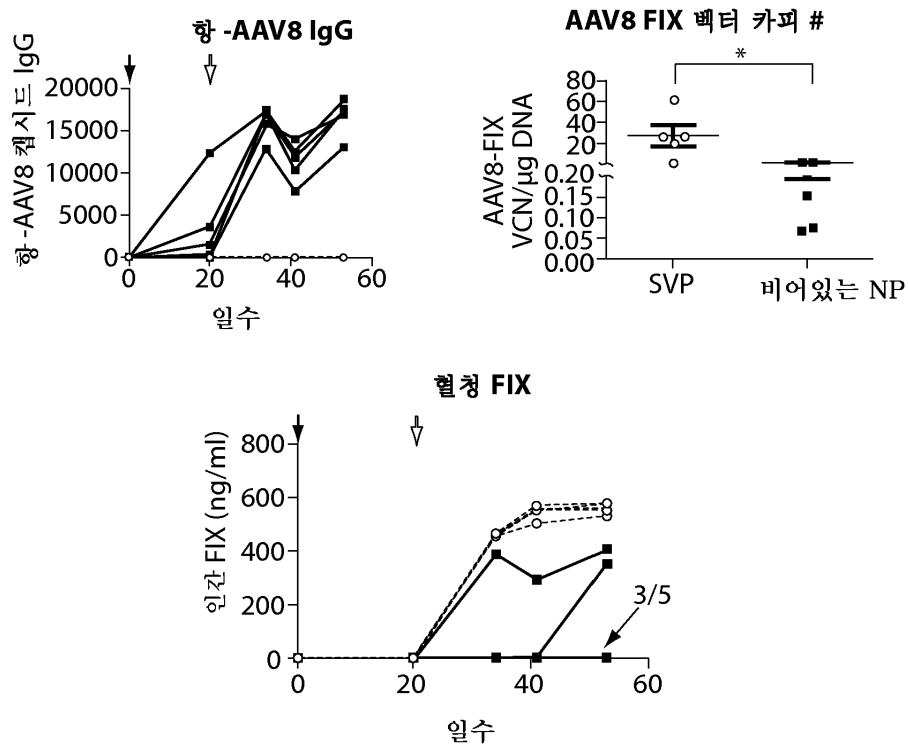
도면17



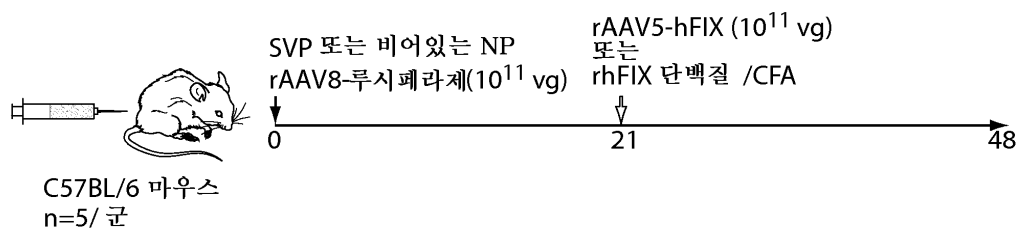
도면18



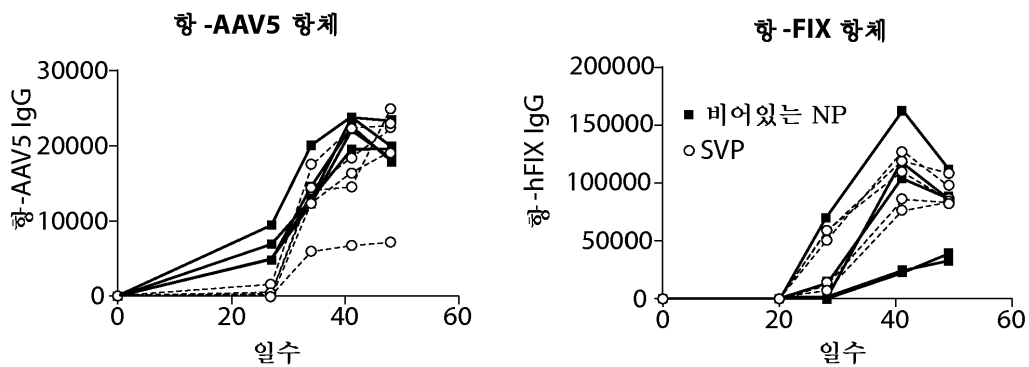
도면19



도면20



도면21



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Selecta Biosciences, Inc.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR ATTENUATING ANTI-VIRAL TRANSFER
VECTOR IMMUNE RESPONSES

<130> S1681.70074W000

<140> PCT/US2015/048768

<141> 2015-09-07

<150> US 62/101,841

<151> 2015-01-09

<150> US 62/101,861

<151> 2015-01-09

<150> US 62/101,872

<151> 2015-01-09

<150> US 62/101,882

<151> 2015-01-09

<150> US 62/051,255

<151> 2014-09-16

<150> US 62/051,258

<151> 2014-09-16

<150> US 62/051,263

<151> 2014-09-16

<150> US 62/051,267

<151> 2014-09-16

<150> US 62/047,034

<151> 2014-09-07

<150> US 62/047,044

<151> 2014-09-07

<150> US 62/047,054

<151> 2014-09-07

<150> US 62/047,051

<151> 2014-09-07

<160> 7

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu

1 5

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

ggtgtattgc atgatatgt

19

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

cgaaatttca ggtaagccga ggttatgaga tcttgggcct ctgc

44

<210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

gaactttgca gagcctcaaa attaaatagg gcaggggaga taccatgatc 50

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

ctagctagcg gtaaggacca gcttctttg 29

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

ctagctagcg gtttagctac agtctac 27