(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0152263
(43) 공개일자 2022년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/19 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61K 47/26* (2017.01)
A61K 47/34 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/19 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7034578
(22) 출원일자(국제) 2021년03월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/021939
(87) 국제공개번호 WO 2021/183781
국제공개일자 2021년09월16일
(30) 우선권주장
62/988,347 2020년03월11일 미국(US)

(71) 출원인
셀렉타 바이오사이언시즈, 인크.
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 그로브 스트리트 65
(72) 발명자
존스턴, 로이드
미국 02478 매사추세츠 벨몬트 오클리 로드 24
(74) 대리인
양영준, 김영

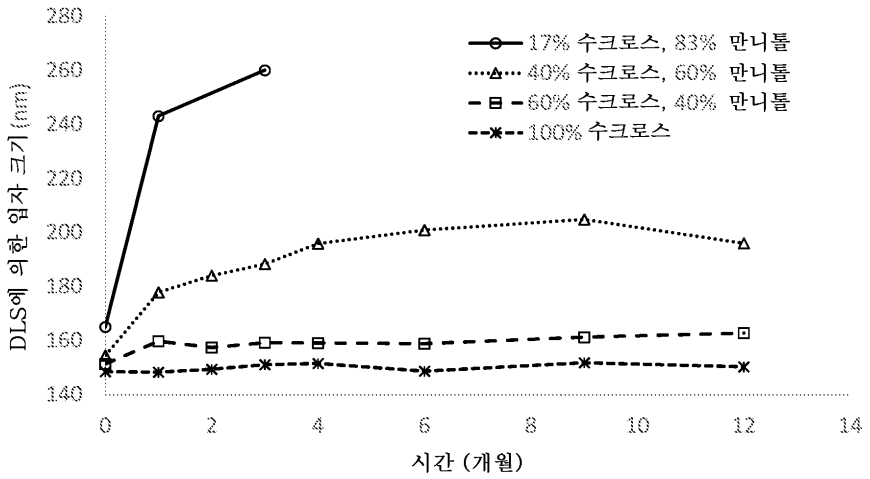
전체 청구항 수 : 총 85 항

(54) 발명의 명칭 **합성 나노담체와 관련된 방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 합성 나노담체, 및 합성 나노담체 조성물이 동결건조될 수 있거나, 동결건조된 형태로 존재하거나, 또는 그의 재구성된 조성물인 경우를 포함하는 관련 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/18 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 47/34 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 합성 나노담체를 포함하는 조성물이며:

소수성 담체 물질 및 면역억제제;

여기서 조성물은 동결건조될 수 있거나, 동결건조 형태, 예컨대 동결건조된 분말 형태이거나, 또는 그의 재구성한 버전인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 합성 나노담체가 본원에 기재된 합성 나노담체 중 어느 하나인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 재구성 시 가시적인 응집체, 예컨대 눈으로 가시적인 입자를 갖지 않고/거나; 재구성 시 안정한 평균 입자 직경, 예컨대 적어도 12개월 동안 10% 이내의 평균 입자 직경을 갖고/거나; 동결건조 후 적어도 12-36개월 동안 2 내지 8℃에서 저장될 수 있고/거나; 동결건조 후 적어도 12개월 동안 20-30℃에서 저장될 수 있고/거나; 용액으로 존재하는 경우 중성 또는 거의-중성인 pH (예를 들어, 25℃에서 7.3의 pH)를 갖는 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 포스페이트 완충제 또는 포스페이트 계면활성제를 포함하지 않는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제, 예컨대 비-포스페이트 완충제를 포함하는 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조보호제를 포함하는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제, 예컨대 비-포스페이트 완충제, 및 동결건조보호제를 포함하는 조성물.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제가 트리스 완충제인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 트리스 완충제가 10 mM의 농도로 존재하는 것인 조성물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 트리스 완충제가 트리스 HCl 및 트로메타민을 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조보호제가 수크로스 또는 수크로스/만니톨 혼합물을 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 동결건조보호제가 수크로스를 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 트로메타민, 트리스 HCl, 및 수크로스 중 적어도 하나를 포함하는 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 트로메타민, 트리스 HCl, 및 수크로스를 포함하는 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 트로메타민이 1.3 mM의 농도로 존재하는 것인 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 트리스 HCL이 8.7 mM의 농도로 존재하는 것인 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 수크로스가 4-9.6 wt%인 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 수크로스가 9.6 wt%인 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 25℃에서 pH 7.3 용액인 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 유리 바이알 (예를 들어, 20 mL 유리 바이알, 추가로 20 mm 마개를 임의로 포함함)에 저장된 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 2 내지 8℃에서 (예를 들어, 동결건조 형태에서) 저장된 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조될 예정인 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 재구성된 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 동결건조 분말로서 동결건조된 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 라파로그인 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 라파로그가 라파마이신인 조성물.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 라파로그 또는 라파마이신이 2 mg/mL의 농도로 존재하는 것인 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가 합성 나노담체에 캡슐화된 것인 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가, 50 중량% 미만의 라파마이신/소수성 담체 물질인 안정한 과포화량으로 합성 나노담체에 존재하는 것인 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제가, 7 중량% 초과인 안정한 과포화량으로 존재하는 것인 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 소수성 담체 물질이 1종 이상의 소수성 중합체 또는 지질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 소수성 담체 물질이 1종 이상의 소수성 중합체를 포함하고, 1종 이상의 소수성 중합체는 폴리에스테르를 포함하는 것인 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 폴리에스테르가 PLA, PLG, PLGA 또는 폴리카프로락톤을 포함하는 것인 조성물.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 소수성 담체 물질이 PLA-PEG, PLGA-PEG 또는 PCL-PEG를 포함하거나, 또는 추가적으로 포함하는 것인 조성물.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체에서의 소수성 담체 물질의 양이 5-95 중량% 소수성 담체 물질/총 고체인 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 합성 나노담체에서의 소수성 담체 물질의 양이 60-95 중량% 소수성 담체 물질/총 고체인 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제제의 양이 ≥6 내지 ≤50 중량% 면역억제제/소수성 담체 물질 중량인 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 면역억제제의 양이 ≥7 내지 ≤30 중량% 면역억제제/소수성 담체 물질 중량인 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 면역억제제의 양이 ≥8 내지 ≤24 중량% 면역억제제/소수성 담체 물질 중량인 조성물.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체가 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제를 추가적으로 포함하는 것인 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제가 소르비탄 에스테르, 지방 알콜, 지방산 에스테르, 에톡실화 지방 알콜, 폴록사머 또는 지방산을 포함하는 것인 조성물.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제가 SPAN 40, SPAN 20, 올레일 알콜, 스테아릴 알콜, 이소프로필 팔미테이트, 글리세롤 모노스테아레이트, BRIJ 52, BRIJ 93, 플루로닉 P-123, 플루로닉 L-31, 팔미트산, 도데칸산, 글리세릴 트리팔미테이트 또는 글리세릴 트리리놀레에이트를 포함하는 것인 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제가 SPAN 40인 조성물.

청구항 45

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제가 합성 나노담체에 캡슐화되거나, 합성 나노담체의 표면 상에 존재하거나, 또는 둘 다인 조성물.

청구항 46

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양이 ≥0.01 내지 ≤20 중량% 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질 중량인 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양이 ≥0.1 내지 ≤15 중량% 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질 중량인 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 용액으로 존재하는 경우, 예컨대 동결건조 전에 0.22 μm 필터를 통해 초기에 멸균 여과가능한 조성물.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체의 동적 광 산란을 사용하여 수득되는 입자 크기 분포의 평균이 110 nm 초과의 직경인 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 직경이 120nm 초과인 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 직경이 150nm 초과인 조성물.

청구항 52

제51항에 있어서, 직경이 200nm 초과인 조성물.

청구항 53

제52항에 있어서, 직경이 250nm 초과인 조성물.

청구항 54

제49항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 직경이 300nm 미만인 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, 직경이 250nm 미만인 조성물.

청구항 56

제55항에 있어서, 직경이 200nm 미만인 조성물.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 10-20% 합성 나노담체, 소수성 담체 물질, 및 면역억제제; 80-90% 수크로스, 0.1-5% 트로메타민; 및 0.1-5% 트리스 HCL을 포함하는 조성물.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 항원을 포함하는 조성물.

청구항 59

하기를 포함하는 키트:

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항의 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한 키트.

청구항 61

제60항에 있어서, 사용 지침서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 62

제61항에 있어서, 사용 지침서가 본원에서 제공되는 방법 중 어느 하나에 대한 설명을 포함하는 것인 키트.

청구항 63

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 항원을 포함하는 키트.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항의 조성물 중 어느 하나의 조성물을 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 항원을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 66

하기를 포함하는, 합성 나노담체를 포함하는 조성물의 제조 방법:

용액 중에서 제1항 내지 제 65항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 합성 나노담체를 제조 또는 수득하는 단계, 및

용액에 완충제 및 동결건조보호제 중 적어도 하나를 첨가하는 단계.

청구항 67

제66항에 있어서, 완충제가 비-포스페이트 완충제인 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 완충제가 트리스 완충제 (예를 들어, 10mM의 농도)인 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 트리스 완충제가 트리스 HCl 및 트로메타민을 포함하는 것인 방법.

청구항 70

제66항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조보호제가 수크로스 또는 만니톨/수크로스 혼합물을 포함하는 것인 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 동결건조보호제가 수크로스를 포함하는 것인 방법.

청구항 72

제66항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제 및 동결건조보호제가 첨가되는 것인 방법.

청구항 73

제66항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 트로메타민, 트리스 HCl, 및 수크로스 중 적어도 하나가 용액에 첨가되는 것인 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 트로메타민, 트리스 HCl, 및 수크로스가 첨가되는 것인 방법.

청구항 75

제66항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 트로메타민이 용액에서 1.3 mM의 농도로 첨가되는 것인 방법.

청구항 76

제66항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 트리스 HCL이 용액에서 8.7 mM의 농도로 첨가되는 것인 방법.

청구항 77

제66항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 수크로스가 4-9.6 wt%로 첨가되는 것인 방법.

청구항 78

제66항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 용액이 25℃에서 pH 7.3이거나 또는 이러한 pH로 조정되는 것인 방법.

청구항 79

제66항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중의 합성 나노담체를 동결건조하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 동결건조가 분말 형태가 되는 것인 방법.

청구항 81

제66항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 합성 나노담체를 재구성하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 82

제66항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체가 유리 바이알 (예를 들어, 20 mL 유리 바이알)에 저장되는 것인 방법.

청구항 83

제66항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 합성 나노담체가 2 내지 8℃에 저장되는 것인 방법.

청구항 84

제66항 내지 제83항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 조성물.

청구항 85

제84항의 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 하에 2020년 3월 11일에 출원된 미국 가출원 번호 62/988,347을 우선권 주장하며, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 합성 나노담체, 및 합성 나노담체 조성물이 동결건조될 수 있거나, 동결건조된 형태로 존재하거나, 또는 그의 재구성된 조성물인 경우를 포함하는 관련 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질, 및 면역억제제, 예컨대 라파로그, 예컨대 라파마이신을 포함한다. 라파로그, 예컨대 라파마이신과 같은 면역억제제는 안정한 과포화량으로 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 초기에 멸균 여과가능하다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 또한 10 이하의 친수성-친유성 균형 (HLB) 값을 갖는 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

발명의 내용

[0005] 발명의 개요:

[0006] 바람직하게는 동결건조될 수 있거나, 동결건조된 형태로 존재하거나, 또는 그의 재구성된 조성물인, 합성 나노담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 재구성 시, 합성 나노담체 조성물은 예컨대 항원에 대한 면역 반응을 억제 또는 감소시키고/거나 다른 유익한 생체내 효과를 유발하기 위해 사용될 수 있다.

[0007] 한 측면에서, 동결건조될 수 있거나, 동결건조된 형태이거나, 동결건조된 형태의 재구성된 조성물인 합성 나노담체 (본원에 기재된 합성 나노담체 중 어느 하나일 수 있음)가 본원에 제공된다. 다양한 성분이 동결건조를 용이하게 하고/거나, (예를 들어, 재구성 후) 응집을 감소시키고/거나, (예를 들어, 동결건조 후) 2-8℃에서 장기간 저장을 가능하게 할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 본원에 제공된 합성 나노담체 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 장기 저장 지속기간은 36개월 이상이다. 따라서, 본원에 제공된 합성 나노담체 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 합성 나노담체 조성물은 이러한 성분 중 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0008] 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 이러한 성분 중 1종 이상은 동결건조보호제를 포함한다. 이러한 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 동결건조보호제는 수크로스, 트레할로스, 만니톨, 또는 수크로스/만니톨 혼합물을 포함한다. 이러한 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 동결건조보호제는 수크로스를 포함한다. 이러한 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 수크로스는 4 wt% 내지 9.6 wt% 범위의 농도이다.

[0009] 또한, 계면활성제의 사용은 라파마이신과 같은 면역억제제의 가용화 및/또는 합성 나노담체의 붕괴로 이어질 수

있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 한 측면에서, 이러한 계면활성제를 포함하지 않는 합성 나노담체 조성물 (본원에 기재된 합성 나노담체 중 어느 하나일 수 있다)이 또한 제공된다. 이러한 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체 조성물은 포스페이트 완충제 또는 포스페이트 계면활성제를 포함하지 않는다. 이러한 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체 조성물은 비-포스페이트 완충제 또는 비-포스페이트 계면활성제를 포함한다.

[0010] 또한, 일부 실시양태에서, 중성 또는 거의-중성 pH를 유지하는 것을 돕는 완충제 성분의 이점이 밝혀졌다. 따라서, 한 측면에서 완충제를 포함하고/거나 중성 또는 거의-중성 pH인 합성 나노담체 조성물 (이는 본원에 기재된 합성 나노담체 중 어느 하나일 수 있다)이 또한 제공된다. 이러한 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 완충제는 비-포스페이트 완충제이다. 이러한 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 완충제는 트리스(Tris) 완충제이다. 이러한 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 트리스 완충제는 10 mM의 농도이다. 이러한 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 트로메타민 (트리스(히드록시메틸)아미노메탄) 및 트리스 히드로클로라이드 (트리스 HCl)는 트리스 완충제의 성분이다. 이러한 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 트리스 완충제는 1.3 mM 농도의 트로메타민 및 8.7 mM 농도의 트리스 HCL을 포함한다.

[0011] 본원에 제공된 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체 조성물은 동결건조보호제, 예컨대 수크로스 (예를 들어, 4-9.6 wt%의 농도), 및 완충제, 예컨대 비-포스페이트 완충제 또는 트리스 완충제 (예를 들어, 10 mM)를 추가로 포함한다. 이러한 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 트리스 완충제는 트로메타민 (트리스(히드록시메틸)아미노메탄) (예를 들어, 1.3 mM) 및 트리스 히드로클로라이드 (트리스 HCl) (예를 들어, 8.7 mM)를 포함한다. 동결건조보호제 및 완충제는 각각 본원에 제공된 동결건조보호제 및 완충제 중 어느 하나일 수 있다.

[0012] 본원에서 제공되는 합성 나노담체 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 조성물은 10-20 wt%의 합성 나노담체, 소수성 담체 물질, 및 면역억제제; 80-90 wt% 수크로스, 0.1-5 wt% 트로메타민; 0.1-5 wt% 트리스 HCL을 포함한다.

[0013] 본원에 제공된 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 조성물은 7.3의 pH (예를 들어, 25℃)이다.

[0014] 본원에 제공된 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 면역억제제, 예컨대 라파로그, 예컨대 라파마이신은 2 mg/mL 면역억제제의 농도로 존재한다.

[0015] 본원에 제공된 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 조성물은 20 mL 바이알 내에 있다.

[0016] 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은 동결건조 형태, 예컨대 동결건조 분말 형태이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은, 예컨대 동결건조 분말 형태로 동결건조되는 조성물이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은 동결건조된 형태의 재구성된 조성물이다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은 유리 바이알에 저장된다. 본원에 제공된 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 유리 바이알은 20 mL 유리 바이알이다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은 2 내지 8℃에서 저장된다.

[0017] 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질은 PLA, PLG, PLGA 또는 폴리카프로락톤을 포함한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질은 PLA-PEG, PLGA-PEG 또는 PCL-PEG를 추가로 포함한다.

[0018] 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체 중 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질의 양은 5-95 중량% 소수성 담체 물질/총 고체이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체 중 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질의 양은 60-95 중량% 소수성 담체 물질/총 고체이다.

[0019] 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 라파로그, 예컨대 라파마이신은 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질의 중량에 대하여 라파로그, 예컨대 라파마이신의 중량을 기준으로 50 중량% 미만인 안정한 과포화량으로 존재한다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의

한 실시양태에서, 라파로그, 예컨대 라파마이신은 45 중량% 미만, 40 중량% 미만, 35 중량% 미만, 30 중량% 미만, 25 중량% 미만, 20 중량% 미만, 15 중량% 미만, 또는 10 중량% 미만인 안정한 과포화량으로 존재한다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 라파로그, 예컨대 라파마이신은 7 중량%를 초과하는 안정한 과포화량으로 존재한다.

[0020] 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 라파로그의 양은 ≥6 내지 ≤50 중량% 라파로그/소수성 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 라파로그의 양은 ≥7 내지 ≤30 중량% 라파로그/소수성 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 라파로그의 양은 ≥8 내지 ≤24 중량% 라파로그/소수성 담체 물질이다.

[0021] 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 라파로그는 합성 나노담체에 캡슐화된다.

[0022] 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 라파로그는 라파마이신이다.

[0023] 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 조성물은 초기에 0.22 ㎛ 필터를 통하여 멸균 여과가능하다.

[0024] 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체는 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제를 추가로 포함한다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥0.01 내지 ≤20 중량% 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질이다.

[0025] 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제는 합성 나노담체 내에 캡슐화되거나, 합성 나노담체의 표면 상에 존재하거나 둘 다에 존재한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥0.1 내지 ≤15 중량% 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥1 내지 ≤13 중량% 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥1 내지 ≤9 중량% 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질이다.

[0026] 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제는 소르비탄 에스테르, 지방 알콜, 지방산 에스테르, 에톡실화 지방 알콜, 폴록사머, 지방산, 콜레스테롤, 콜레스테롤 유도체, 또는 담즙산 또는 염을 포함한다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제는 SPAN 40, SPAN 20, 올레일 알콜, 스테아릴 알콜, 이소프로필 팔미테이트, 글리세롤 모노스테아레이트, BRIJ 52, BRIJ 93, 플루로닉(Pluronic) P-123, 플루로닉 L-31, 팔미트산, 도데칸산, 글리세릴 트리팔미테이트 또는 글리세릴 트리리놀레에이트를 포함한다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제는 SPAN 40이다.

[0027] 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 중량은 합성 나노담체의 제제화 동안 조합되는 물질들의 처방 중량이다. 본원에 제공된 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 중량은 생성된 합성 나노담체 조성물 중 물질의 중량이다.

[0028] 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나의 실시양태에서, 합성 나노담체의 동적 광 산란을 사용하여 수득되는 입자 크기 분포의 평균은 110 nm 초과의 직경이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 직경은 120nm 초과이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 직경은 150nm 초과이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 실시양태에서, 직경은 200nm 초과이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 실시양태에서, 직경은 250nm 초과이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 실시양태에서 직경은 300nm 미만이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 실시양태에서 직경은 250nm 미만이다. 본원에 제공된 조성물 및 방법 중 어느 하나의 실시양태에서 직경은 200nm 미만이다.

[0029] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나를 포함하는 키트가 제공된다. 제공된 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 키트는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한 것이다. 제공된 키트 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 키트는 사용 지침서를 추가로 포함한다. 제공된 키트 중 어느 하나의 한 실시양태

에서, 사용 지침서는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 설명을 포함한다.

[0030] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 방법은 대상체에게 항원을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 본원에 제공된 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 투여는 피내, 근육내, 정맥내, 복강내 또는 피하 투여에 의한 것이다.

[0031] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나를 제조하는 방법이 제공된다. 이러한 방법 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 제조 방법은 본원에서 제공되는 방법 중 어느 하나의 단계를 포함한다.

[0032] 또 다른 측면에서, 본원에서 제공되는 조성물 또는 키트 중 어느 하나의, 대상체에서 면역 관용을 촉진하기 위한 의약의 제조를 위한 용도가 제공된다. 본원에 제공된 용도 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 용도는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나를 달성하기 위한 것이다.

[0033] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 조성물 또는 키트 중 어느 하나는 본원에 제공된 방법 중 어느 하나에 사용하기 위한 것일 수 있다.

[0034] 또 다른 측면에서는, 면역 관용을 촉진할 것을 목적으로 하는 의약의 제조 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 의약은 본원에 제공된 조성물의 어느 하나를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 동결건조 제제의 안정성에 대한 입자 크기 시험의 효과를 묘사하는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 발명의 상세한 설명

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

[0038] 전기 또는 하기를 막론하고, 본원에서 인용되는 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적에 있어서 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0039] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 내용이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 예를 들어, "중합체"라는 언급에는 2종 이상의 이러한 분자들의 혼합물 또는 다양한 분자량의 단독중합체 종들의 혼합물이 포함되며, "합성 나노담체"라는 언급에는 2종 이상의 이러한 합성 나노담체들 또는 다수의 이러한 합성 나노담체들의 혼합물 등이 포함된다.

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

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

[0042] A. 서론

[0043] 놀랍게도, 합성 나노담체의 조성물, 예컨대 본원에 기재된 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나의 동결건조를 용이하게 하고, 저장 안정성을 유지하고, 응집을 감소시킬 수 있는 등의 특정 성분이 발견되었다. 따라서, 본원에서 제공되는 것은 그와 같은 합성 나노담체 조성물의 동결건조 형태 뿐만 아니라 그의 재구성된 조성물, 및 관련 방법이다.

[0044] 본 발명은 지금부터 하기에서 보다 상세하게 기재될 것이다.

[0045] B. 정의

[0046] “투여하는 것" 또는 "투여" 또는 "투여하다"는 약리학적으로 유용한 방식으로 대상체에게 물질을 제공하는 것을 의미한다. 상기 용어는 일부 실시양태에서 투여되도록 유발하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. "투여되도록 하는 것"은 또 다른 당사자가 물질을 투여하도록 직접적으로 또는 간접적으로 유발, 촉구, 장려, 조장, 유도 또는 지시하는 것을 의미한다.

[0047] 대상체에의 투여를 위한 조성물 또는 용량 맥락에서의 "유효량"은 대상체에서 1종 이상의 목적한 반응, 예를 들어 면역관용성 면역 반응의 발생을 도출하는 조성물 또는 용량의 양을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 약역학적 유효량이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 유효량은 본원에 제공된 바와 같은 목적한 치료 효과 및/또는 면역 반응 중 하나 이상을 생성하는 본원에 제공된 조성물 또는 용량의 임의의 양이다. 이러한 양은 시험관내 또는 생체내 목적을 위한 것일 수 있다. 생체내 목적의 경우, 상기 양은 임상의가 항원-특이적 면역 관용을 필요로 하는 대상체에게 임상적 이익이 있을 수 있다고 여기는 것일 수 있다. 본원에서 제공되는 바와 같은 조성물들 중 어느 하나는 유효량으로 존재할 수 있다.

[0048] 유효한 양은 바람직하지 않은 면역 반응의 수준을 감소시키는 것을 수반할 수 있지만, 일부 실시양태에서, 이는 바람직하지 않은 면역 반응을 완전히 방지하는 것을 수반한다. 유효한 양은 또한, 바람직하지 않은 면역 반응의 발생을 지연시키는 것을 수반할 수 있다. 유효한 양은 또한 목적한 치료 종점 또는 목적한 치료 결과를 생성하는 양일 수 있다. 다른 실시양태에서, 유효량은 바람직한 반응, 예컨대 치료 종점 또는 결과의 수준을 증진시키는 것을 수반할 수 있다. 유효량은, 일부 실시양태에서, 대상체에서 항원에 대한 면역관용성 면역 반응을 생성한다. 상기 중 임의의 것의 달성은 상용 방법에 의해 모니터링될 수 있다.

[0049] 유효한 양은 물론, 치료될 특정한 대상체; 상태, 질환 또는 장애의 중증도; 연령, 신체 조건, 크기 및 체중을 포함하는 개별 환자 파라미터; 치료 지속기간; (존재하는 경우) 공동 요법의 성질; 구체적 투여 경로; 및 건강 진료의의 지식 및 전문성 내의 기타 인자에 좌우될 것이다. 이들 인자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 단지 상용 실험으로 다룰 수 있다. 일반적으로, 최대 용량, 즉, 타당한 의학적 판단에 따라 최고로 안전한 용량을 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 의학적 이유, 심리적 이유 또는 실질적으로 임의의 다른 이유로 환자가 보다 낮은 용량 또는 허용 용량을 요구할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0050] 일반적으로, 본 발명 조성물 중 성분들의 용량은 성분의 양을 지칭한다. 대안적으로, 용량은 목적한 양을 제공하는 합성 나노담체의 수를 기준으로 투여될 수 있다.

[0051] "항원-특이적"은 항원 또는 그의 부분의 존재에 기인하거나, 또는 항원을 특이적으로 인식하거나 거기에 결합하는 분자를 발생시키는 임의의 면역 반응을 지칭한다. 예를 들어, 면역 반응이 항원-특이적 항체 생산인 경우에, 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 생산된다. 또 다른 예로서, 면역 반응이 항원-특이적 B 세포 또는 CD4+ T 세포 증식 및/또는 활성인 경우에, 증식 및/또는 활성은 단독으로 또는 MHC 분자, B 세포 등과 복합체로서 항원 또는 그의 부분의 인식으로부터 유도된다.

[0052] 본원에 사용된 "평균"은 달리 나타내지 않는 한 산술 평균을 지칭한다.

[0053] "캡슐화하다"는 물질의 적어도 일부를 합성 나노담체 내에 봉입하는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 물질은 합성 나노담체 내에 완전히 봉입된다. 다른 실시양태에서, 캡슐화된 물질의 대부분 또는 모두는 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출되지 않는다. 다른 실시양태에서, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% (중량/중량) 이하가 국부 환경에 노출된다. 캡슐화는 물질의 대부분 또는 모두를 합성 나노담체의 표면 상에 위치시키고, 물질을 합성 나노담체 외부의 국부 환경에 노출된 채로 두는 흡수와 구별된다.

[0054] "소수성 담체 물질"은 소수성 특징을 갖고 1종 이상의 중합체 또는 그의 단위를 포함하고 1종 이상의 분자를 전달할 수 있는 임의의 제약상 허용되는 담체를 지칭한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 소수성 담체 물질은 소수성 특징을 갖고 1종 이상의 폴리에스테르 중합체 및 그의 단위를 포함하고 1종 이상의 분자를 전달할 수 있는 임의의 제약상 허용되는 담체를 지칭하는 "소수성 폴리에스테르 담체 물질"이다. 폴리에스테르 중합체는 PLA, PLGA, PLG 및 폴리카프로락톤을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 소수성 담체 물질에는 합성 나노담체 또는 그의 부분을 형성할 수 있으며, 1종 이상의 분자 (예를 들어, 면역억제제, 예컨대 라파로그, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제)를 포함하거나 그것을 로딩할 수 있는 물질이 포함된다. 일반적으로, 담체 물질

은 표적 부위 또는 표적 세포로의 1종 이상의 분자의 전달, 1종 이상의 분자의 제어 방출, 및 다른 목적 활성을 가능하게 할 수 있다. "소수성"은 물에 대한 수소 결합에 실질적으로 참여하지 않는 물질을 지칭한다. 이러한 물질은 일반적으로 비-극성이거나, 주로 비-극성이거나, 또는 하전상 중성이다. 본원에서 기재되는 조성물에 적합한 담체 물질은 그것이 어느 수준으로 소수성을 나타내는지를 기준으로 선택될 수 있다. 이에 따라, 소수성 폴리에스테르 담체 물질은 전체적으로는 소수성인 것이고, 완전히 소수성 폴리에스테르 또는 그의 단위로 구성될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 소수성 폴리에스테르 담체 물질은 전체적으로는 소수성이며 소수성 폴리에스테르 또는 그의 단위를 포함하지만, 다른 중합체 또는 그의 단위와 조합되어 있다. 이들 다른 중합체 또는 그의 단위는 소수성일 수 있으나, 반드시 그러한 것은 아니다. 소수성 담체 물질은 중합체 또는 그의 단위의 매트릭스가 소수성으로 간주된다면 1종 이상의 다른 중합체 또는 그의 단위를 포함할 수 있다.

[0055] "초기에 멸균 여과가능한"은 이전에는 여과되지 않았으나 적어도 50 그램 나노담체/필터 막 표면적 m^2의 처리량으로 0.22 ㎛ 필터와 같은 필터를 통하여 여과될 수 있는 합성 나노담체의 조성물을 지칭한다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 처리량은 9 mL 부피의 합성 나노담체 현탁액을 취하고, 그것을 본원에서 제공된 바와 같은 필터들 중 어느 하나가 구비된 10 mL 주사기에 위치시키는 것에 의해 측정된다. 이후, 추가적인 현탁액 물질이 필터를 통과하지 않을 때까지 필터를 통하여 합성 나노담체 현탁액을 밀어낸다. 처리량은 이후 필터를 통하여 밀어내어진 물질 및 주사기 내의 잔류 현탁액 물질을 바탕으로 계산될 수 있다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 초기에 멸균 여과가능한 조성물은 비-멸균성이고 및/또는 생체내 투여에 적합하지 않다 (즉 실질적으로 순수하지 않으며, 생체내 투여에 바람직하다고 할 수 없는 가용성 성분들을 포함함). 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 초기에 멸균 여과가능한 조성물은 제조되었으나 임상 등급 물질을 생성하기 위하여 추가적으로 처리되지는 않은 합성 나노담체를 포함한다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 초기에 멸균 여과가능한 조성물은 이전에는 여과되지 않았으나, 적어도 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 160, 200, 250, 300, 350, 500, 750, 1000 또는 1500 그램 나노담체/필터 막 표면적 m^2의 처리량으로 0.22 ㎛ 필터와 같은 필터를 통하여 여과될 수 있다. 상기 0.22 ㎛ 필터는 0.22 ㎛의 세공 크기를 갖는 임의의 필터일 수 있다. 이러한 필터는 폴리에틸렌 술폰, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 혼합 셀룰로스 에스테르, 무용매 셀룰로스 아세테이트, 재생 셀룰로스, 나일론 등과 같은 다양한 물질로 제조될 수 있다. 필터의 구체적인 예는 밀리포어(Millipore) SLGPM33R, 밀리포어 SLGVM33RS, 밀리포어 SLGSM33SS, 사르토리우스(Sartorius) 16534, 사르토리우스 17764, 사르토리우스 17845 등을 포함한다.

[0056] 본원에 사용된 "동결건조된"은 제제를 동결시킨 다음, 관련 기술분야에 공지된 임의의 동결-건조 방법을 사용하여 (예를 들어, 상업적으로 입수가능한 동결 건조 장치를 사용하여) 동결된 내용물로부터 얼음을 승화시킴으로써 건조된 합성 나노담체 조성물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 생성된 동결건조물은 0.1%(w/w) 내지 5%(w/w)의 잔류 수분 수준을 가지며, 안정한 분말로서 존재한다. 동결건조물은 재구성 매질 중에 재구성될 수 있다. "재구성된 합성 나노담체"는 합성 나노담체가 희석제 전체에 걸쳐 분산되도록, 합성 나노담체를 포함하는 동결건조된 조성물을 희석제 재구성 매질에 용해시킴으로써 제조된 것이다. 일부 실시양태에서, 희석제 재구성 매질은 주사용 멸균수를 포함한다. 일부 실시양태에서, 재구성된 합성 나노담체는 대상체에게 투여하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 동결건조된 또는 동결건조될 또는 재구성된 조성물은 본원에 제공된 바와 같은 완충제 및/또는 동결건조보호제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 비-포스페이트 완충제이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 인산나트륨, 인산칼륨, 시트레이트, 히스티딘, 트로메타민 (트리스(히드록시메틸)아미노메탄), 트리스 히드로클로라이드 (트리스 HCl), 또는 그의 조합이다. 일부 실시양태에서, 동결건조보호제는 수크로스, 트레할로스, 말토스, 락토스, 소르비톨, 덱스트란, 또는 그의 조합을 포함한다. 한 실시양태에서, 동결건조보호제는 이당류 (예를 들어, 수크로스)이다. 한 실시양태에서, 조성물은 완충제 및 이당류 (예를 들어, 수크로스)를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 트리스 완충제 및 수크로스를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 트로메타민, 트리스 HCl, 및 수크로스를 포함한다. 이들 성분 모두 중 어느 하나의 양은 각각 본원에 제공된 농도 중 어느 하나일 수 있다.

[0057] 일부 실시양태에서, 트로메타민은 0.5 mM - 3 mM, 0.5 mM - 2.5 mM, 0.5 mM - 2.0 mM, 0.5 mM - 1.5 mM, 0.5 mM - 1 mM, 1 mM- 3 mM, 1 mM - 2.5 mM, 1 mM - 2 mM, 1 mM - 1.9 mM, 1 mM - 1.8 mM, 1 mM - 1.7 mM, 1 mM - 1.6 mM, 1 mM - 1.5 mM, 1 mM - 1.4 mM, 1 mM - 1.3 mM, 1 mM- 1.2 mM, 1 mM - 1.1 mM, 1.2 mM - 3 mM, 1.2 mM - 2.5 mM, 1.2 mM - 2 mM, 1.2 mM - 1.9 mM, 1.2 mM - 1.8 mM, 1.2 mM - 1.7 mM, 1.2 mM - 1.6 mM, 1.2 mM - 1.5 mM, 1.2 mM - 1.4 mM, 1.2 mM - 1.3 mM, 1.4 mM - 3 mM, 1.4 mM - 2.5 mM, 1,4 mM - 2 mM, 1.4 mM - 1.9 mM, 1.4 mM - 1.8 mM, 1.4 mM - 1.7 mM, 1.4 mM - 1.6 mM, 1.4 mM - 1.5 mM, 1.5 mM - 3 mM, 1.5 mM -2.5

mM, 1.5 mM - 2 mM, 2 mM - 3 mM, 또는 2 mM - 2.5 mM의 농도로 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 존재한다. 일부 실시양태에서, 트로메타민은 0.5 mM, 0.6 mM, 0.7 mM, 0.8 mM, 0.9 mM, 1 mM, 1.1 mM, 1.2 mM, 1.3 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 mM, 1.7 mM, 1.8 mM, 1.9 mM, 2 mM, 또는 그 초과의 농도로 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 존재한다.

[0058] 일부 실시양태에서, 트리스 HCl은 7.5 mM - 10 mM, 7.5 mM - 9.5 mM, 7.5 mM - 9 mM, 7.5 mM - 8.5 mM, 7.5 mM - 8 mM, 8 mM - 10 mM, 8 mM - 9.5 mM, 8 mM - 9 mM, 8 mM - 8.9 mM, 8 mM - 8.8 mM, 8 mM - 8.7 mM, 8 mM - 8.6 mM, 8 mM - 8.5 mM, 8 mM - 8.4 mM, 8 mM - 8.3 mM, 8 mM - 8.2 mM, 8 mM - 8.1 mM, 8.2 mM - 10 mM, 8.2 mM - 9.5 mM, 8.2 mM - 9 mM, 8.2 mM - 8.9 mM, 8.2 mM - 8.8 mM, 8.2 mM - 8.7 mM, 8.2 mM - 8.6 mM, 8.2 mM - 8.5 mM, 8.2 mM - 8.4 mM, 8.2 mM - 8.3 mM, 8.4 mM - 10 mM, 8.4 mM - 9.5 mM, 8.4 mM - 9 mM, 8.4 mM - 8.9 mM, 8.4 mM - 8.8 mM, 8.4 mM - 8.7 mM, 8.4 mM - 8.6 mM, 8.4 mM - 8.5 mM, 8.6 mM - 10 mM, 8.6 mM - 9.5 mM, 8.6 mM - 9 mM, 8.6 mM - 8.9 mM, 8.6 mM - 8.8 mM, 8.6 mM - 8.7 mM, 8.8 mM - 10 mM, 8.8 mM - 9.5 mM, 8.8 mM - 9 mM, 8.8 mM - 8.9 mM, 8.8 mM - 10 mM, 8.8 mM - 9.5 mM, 8.8 mM - 9 mM 또는 8.8 mM - 8.9 mM의 농도로 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 존재한다. 일부 실시양태에서, 트리스 HCl은 7.5 mM, 7.6 mM, 7.7 mM, 7.8 mM, 7.9 mM, 8 mM, 8.1 mM, 8.2 mM, 8.3 mM, 8.4 mM, 8.5 mM, 8.6 mM, 8.7 mM, 8.8 mM, 8.9 mM, 9 mM, 9.1 mM, 9.2 mM, 9.3 mM, 9.4 mM, 9.5 mM, 9.6 mM, 9.7 mM, 9.8 mM, 9.9 mM, 10 mM, 또는 그 초과의 농도로 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 존재한다.

[0059] 일부 실시양태에서, 수크로스는 8.5 wt% - 10.5 wt%, 8.5 wt% - 10 wt%, 8.5 wt% - 9.5 wt%, 8.5 wt% - 9 wt%, 9 wt% - 10.5 wt%, 9 - 10 wt%, 9 wt% - 9.9 wt%, 9 wt%-9.8 wt%, 9 wt%-9.7 wt%, 9 wt%-9.6 wt%, 9 wt%-9.5 wt%, 9 wt%-9.4 wt%, 9 wt%-9.3 wt%, 9 wt%-9.2 wt%, 9 wt%-9.1 wt%, 9.2 wt% - 10.5 wt%, 9.2 - 10 wt%, 9.2 wt% - 9.9 wt%, 9.2 wt%-9.8 wt%, 9.2 wt%-9.7 wt%, 9.2 wt%-9.6 wt%, 9.2 wt%-9.5 wt%, 9.2 wt%-9.4 wt%, 9.2 wt%-9.3 wt%, 9.4 wt% - 10.5 wt%, 9.4 - 10 wt%, 9.4 wt% - 9.9 wt%, 9.4 wt%-9.8 wt%, 9.4 wt%-9.7 wt%, 9.4 wt%-9.6 wt%, 9.4 wt%-9.5 wt%, 9.6 wt% - 10.5 wt%, 9.6 - 10 wt%, 9.6 wt% - 9.9 wt%, 9.6 wt%-9.8 wt%, 9.6 wt%-9.7 wt%, 9.8 wt% - 10.5 wt%, 9.8 - 10 wt%, 9.8 wt% - 9.9 wt% 또는 10 wt% - 10.5 wt%의 농도로 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 존재한다. 일부 실시양태에서, 수크로스는 8.5 wt%, 8.6 wt%, 8.7 wt%, 8.8 wt%, 8.9 wt%, 9 wt%, 9.1 wt%, 9.2 wt%, 9.3 wt%, 9.4 wt%, 9.5 wt%, 9.6 wt%, 9.7 wt%, 9.8 wt%, 9.9 wt%, 10 wt%, 10.1 wt%, 10.2 wt%, 10.3 wt%, 10.4 wt%, 10.5 wt%, 또는 그 초과의 농도로 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 존재한다.

[0060] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은 10-20 wt%의 합성 나노담체, 소수성 담체 물질, 및 면역억제제; 80-90 wt% 수크로스, 0.1-5 wt% 트로메타민; 및 0.1-5 wt% 트리스 HCL을 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체, 소수성 담체 물질, 및 면역억제제는 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 5-10 wt%, 5-15 wt%, 5-20 wt%, 5-25 wt%, 10-15 wt%, 10-20 wt%, 10-25 wt%, 15-20 wt%, 15-25 wt%, 또는 20-25 wt%로 존재한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 5 wt%, 6 wt%, 7 wt%, 8 wt%, 9 wt%, 10 wt%, 11 wt%, 12 wt%, 13 wt%, 14 wt%, 15 wt%, 16 wt%, 17 wt%, 18 wt%, 19 wt%, 20 wt%, 21 wt%, 22 wt%, 23 wt%, 24 wt%, 또는 25 wt%의 합성 나노담체, 소수성 담체 물질, 및 면역억제제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 수크로스는 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 75-95 wt%, 예를 들어, 75-80 wt%, 75-85 wt%, 75-90 wt%, 80-85 wt%, 80-90 wt%, 80-95 wt%, 85-90 wt%, 85-95 wt% 또는 90-95 wt%로 존재한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 75 wt%, 76 wt%, 77 wt%, 78 wt%, 79 wt%, 80 wt%, 81 wt%, 82 wt%, 83 wt%, 84 wt%, 85 wt%, 86 wt%, 87 wt%, 88 wt%, 89 wt%, 90 wt%, 91 wt%, 92 wt%, 93 wt%, 94 wt%, 또는 95 wt%의 수크로스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 트로메타민은 0.1-5 wt%, 예를 들어, 0.1-0.2 wt%, 0.1-0.3 wt%, 0.1-0.4 wt%, 0.1-0.5 wt%, 0.1-0.6 wt%, 0.1-0.7 wt%, 0.1-0.8 wt%, 0.1-0.9 wt%, 0.1-1 wt%, 0.1-1.5 wt%, 0.1-2 wt%, 0.1-2.5 wt%, 0.1-3 wt%, 0.1-3.5 wt%, 0.1-4 wt%, 0.1-4.5 wt%, 0.2-0.3 wt%, 0.2-0.4 wt%, 0.2-0.5 wt%, 0.2-0.6 wt%, 0.2-0.7 wt%, 0.2-0.8 wt%, 0.2-0.9 wt%, 0.3-0.4 wt%, 0.3-0.5 wt%, 0.3-0.6 wt%, 0.3-0.7 wt%, 0.3-0.8 wt%, 0.3-0.9 wt%, 0.4-0.5 wt%, 0.4-0.6 wt%, 0.4-0.7 wt%, 0.4-0.8 wt%, 0.4-0.9 wt%, 0.5-0.6 wt%, 0.5-0.7 wt%, 0.5-0.8 wt%, 0.5-0.9 wt%, 0.6-0.7 wt%, 0.6-0.8 wt%, 0.6-0.9 wt%, 0.7-0.8 wt%, 0.7-0.9 wt%, 0.8-0.9 wt%, 0.5-1.5 wt%, 0.5-2 wt%, 0.5-2.5 wt%, 0.5-3 wt%, 0.5-4 wt%, 0.5-5 wt%, 1-2 wt%, 1-3 wt%, 1-4 wt%, 또는 1-5 wt%로 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 0.1 wt%, 0.2 wt%, 0.3 wt%, 0.4 wt%, 0.5 wt%, 0.6 wt%, 0.7 wt%, 0.8 wt%, 0.9 wt%, 1 wt%, 1.2 wt%, 1.4 wt%, 1.5 wt%, 1.6 wt%, 1.8 wt%, 2 wt%, 2.5 wt%, 3 wt%, 3.5 wt%, 4 wt%, 4.5 wt%, 또는 5 wt%의 트로메타민을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 트리스 HCL은 0.1-5 wt%, 예를 들어, 0.1-0.2 wt%, 0.1-0.3 wt%, 0.1-0.4 wt%, 0.1-0.5 wt%, 0.1-0.6 wt%, 0.1-0.7 wt%, 0.1-0.8 wt%, 0.1-0.9 wt%, 0.1-1 wt%, 0.1-1.5 wt%, 0.1-2 wt%, 0.1-2.5 wt%, 0.1-3

wt%, 0.1-3.5 wt%, 0.1-4 wt%, 0.1-4.5 wt%, 0.2-0.3 wt%, 0.2-0.4 wt%, 0.2-0.5 wt%, 0.2-0.6 wt%, 0.2-0.7 wt%, 0.2-0.8 wt%, 0.2-0.9 wt%, 0.3-0.4 wt%, 0.3-0.5 wt%, 0.3-0.6 wt%, 0.3-0.7 wt%, 0.3-0.8 wt%, 0.3-0.9 wt%, 0.4-0.5 wt%, 0.4-0.6 wt%, 0.4-0.7 wt%, 0.4-0.8 wt%, 0.4-0.9 wt%, 0.5-0.6 wt%, 0.5-0.7 wt%, 0.5-0.8 wt%, 0.5-0.9 wt%, 0.6-0.7 wt%, 0.6-0.8 wt%, 0.6-0.9 wt%, 0.7-0.8 wt%, 0.7-0.9 wt%, 0.8-0.9 wt%, 0.5-1.5 wt%, 0.5-2 wt%, 0.5-2.5 wt%, 0.5-3 wt%, 0.5-4 wt%, 0.5-5 wt%, 1-2 wt%, 1-3 wt%, 1-4 wt%, 또는 1-5 wt%로 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 0.1 wt%, 0.2 wt%, 0.3 wt%, 0.4 wt%, 0.5 wt%, 0.6 wt%, 0.7 wt%, 0.8 wt%, 0.9 wt%, 1 wt%, 1.2 wt%, 1.4 wt%, 1.5 wt%, 1.6 wt%, 1.8 wt%, 2 wt%, 2.5 wt%, 3 wt%, 3.5 wt%, 4 wt%, 4.5 wt%, 또는 5 wt%의 트리스 HCL을 포함할 수 있다.

[0061] 일부 실시양태에서, 동결건조된 조성물은 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 1.5주, 2주, 2.5주, 3주, 3.5주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 24개월, 25개월, 26개월, 27개월, 28개월, 29개월, 30개월, 31개월, 32개월, 33개월, 34개월, 35개월, 36개월 또는 더 오랫동안 안정성이다 (예를 들어, 면역억제제 함량, 순도, 시험관내 방출, 입자 크기, 외관, 및 pH가 유지됨). 일부 실시양태에서, 동결건조된 조성물은 적어도 1-2주, 2-4주, 1-2개월, 2-4개월, 3-6개월, 3-9개월, 3-12개월, 6-12개월, 6-18개월, 6-24개월, 6-30개월, 6-36개월, 1-2년, 1-3년, 또는 2-3년 동안 안정성이다.

[0062] 일부 실시양태에서, 동결건조된 조성물을 -20℃ ± 5℃ (예를 들어, -25℃, -24℃, -23℃, -22℃, -21℃, -20℃, -19℃, -18℃, -17℃, -16℃, 또는 -15℃)에 저장한다. 일부 실시양태에서, 동결건조된 조성물을 5℃ ± 3℃ (예를 들어, 2℃, 3℃, 4℃, 5℃, 6℃, 7℃, 또는 8℃) 또는 25℃ ± 5℃ (예를 들어, 20℃, 21℃, 22℃, 23℃, 24℃, 25℃, 26℃, 27℃, 28℃, 29℃ 또는 30℃)에 저장한다.

[0063] "합성 나노담체의 최대 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 나노담체의 가장 큰 치수를 의미한다. "합성 나노담체의 최소 치수"는 합성 나노담체의 임의의 축을 따라 측정된 합성 나노담체의 가장 작은 치수를 의미한다. 예를 들어, 구형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수는 실질적으로 동일할 것이고, 그의 직경의 크기일 것이다. 유사하게, 입방형 합성 나노담체의 경우에, 합성 나노담체의 최소 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 가장 작은 것일 것인 한편, 합성 나노담체의 최대 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 가장 큰 것일 것이다. 한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상이다. 한 실시양태에서, 샘플 중 전체 합성 나노담체 수를 기준으로 샘플 중 합성 나노담체의 75%, 바람직하게는 80%, 더 바람직하게는 90% 이상의 최대 치수가 5㎛ 이하이다. 바람직하게는, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 110 nm 초과, 보다 바람직하게는 120 nm 초과, 보다 바람직하게는 130 nm 초과, 및 보다 더 바람직하게는 150 nm 초과이다. 합성 나노담체의 최대 및 최소 치수의 종횡비는 실시양태에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 최대 대 최소 치수의 종횡비는 1:1 내지 1,000,000:1, 바람직하게는 1:1 내지 100,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 10,000:1, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1000:1, 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 100:1, 및 보다 더 바람직하게는 1:1 내지 10:1로 달라질 수 있다.

[0064] 바람직하게는, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 3 μm 이하, 보다 바람직하게는 2 μm 이하, 보다 바람직하게는 1 μm 이하, 보다 바람직하게는 800 nm 이하, 보다 바람직하게는 600 nm 이하, 및 보다 더 바람직하게는 500 nm 이하이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플 내 합성 나노담체의 총수에 기초한 샘플 내 합성 나노담체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100 nm 이상, 보다 바람직하게는 120 nm 이상, 보다 바람직하게는 130 nm 이상, 보다 바람직하게는 140 nm 이상, 및 보다 더 바람직하게는 150 nm 이상이다. 합성 나노담체 치수 (예를 들어, 유효 직경)의 측정은, 일부 실시양태에서, 합성 나노담체를 액체 (통상적으로 수성) 매질 중에 현탁시키고 동적 광 산란 (DLS)을 사용함으로써 (예를 들어, 브룩헤이븐 제타팔스(Brookhaven ZetaPALS) 기기를 사용하여) 수득될 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체의 현탁액을 대략 0.01 내지 0.5 mg/mL의 최종 합성 나노담체 현탁액 농도를 달성하기 위해 수성 완충제로부터 정제수로 희석할 수 있다. 희석된 현탁액은 직접 내부에서 제조되거나, 또는 적합한 DLS 분석용 큐벳으로 옮겨질 수 있다. 이어서, 큐벳을 DLS에 두고, 제어 온도로 평형이 되도록 한 다음, 충분한 시간 동안 스캐닝하여 매질의 점도 및 샘플의 굴절률에 대한 적절한 입력에 기초하여 안정하고 재현가능한 분포를 획득할 수 있다. 이어서, 유효 직경, 또는 분포의 평균을 보고한다. 높은 종횡비, 또는 비-구형 합성 나노담체의 유효 크기를 결정하는 것

은 보다 정확한 측정치를 수득하기 위해 확대 기술, 예컨대 전자 현미경검사를 필요로 할 수 있다. 합성 나노담체의 "치수" 또는 "크기" 또는 "직경"은, 예를 들어, 동적 광 산란을 사용하여 수득된 입자 크기 분포의 평균을 의미한다.

[0065] 본원에서 사용된 바와 같이, "10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제" 또는 "저HLB 계면활성제"는 적어도 하나의 소수성 꼬리 및 친수성 머리를 포함하는 구조를 가지거나, 또는 소수성 기 또는 영역 및 친수성 기 또는 영역을 갖는 비-이온성 양친매성 분자를 지칭한다. 계면활성제의 꼬리 부분은 일반적으로 탄화수소 사슬로 이루어진다. 계면활성제는 친수성 머리 부분 또는 기 또는 영역의 전하 특성을 기반으로 분류될 수 있다. 본원에서 사용된 "HLB"는 계면활성제의 친수성-친유성 균형 또는 친수-친지질 균형을 지칭하는 것으로써, 계면활성제의 친수성 또는 친유성 특성의 척도이다.

[0066] 본원에서 제공되는 계면활성제들 중 어느 하나의 HLB는 그리핀법(Griffin's method) 또는 데이비법(Davie's method)을 사용하여 계산할 수 있다. 예를 들어, 그리핀법을 사용하여, 계면활성제의 HLB는 20에 계면활성제의 친수성 부분의 분자 질량을 곱한 것을 전체 계면활성제의 분자 질량으로 나눈 값이다. HLB 값은 0 내지 20의 규모로 존재하는데, 0은 완전히 소수성 (친유성)인 분자에 해당하며, 20은 완전히 친수성 (소유성)인 분자에 해당한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 계면활성제의 HLB는 (예를 들어 그리핀법 또는 데이비법에 의해 측정되었을 때) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법 중 어느 하나에서 사용하기 위한 이러한 계면활성제의 예는 비제한적으로 소르비탄 에스테르, 예컨대 SPAN 40, SPAN 20; 지방 알콜, 예컨대 올레일 알콜, 스테아릴 알콜; 지방산 에스테르, 예컨대 이소프로필 팔미테이트, 글리세롤 모노스테아레이트; 에톡실화 지방 알콜, 예컨대 BRIJ 52, BRIJ 93; 폴록사머, 예컨대 플루로닉 P-123, 플루로닉 L-31; 지방산, 예컨대 팔미트산, 도데칸산; 트리글리세리드, 예컨대 글리세릴 트리팔미테이트, 글리세릴 트리리놀레에이트; 콜레스테롤; 콜레스테롤 유도체, 예컨대 나트륨 콜레스테릴 숙페이트, 콜레스테릴 도데카노에이트; 및 담즙염 또는 산, 예컨대 리토콜산, 나트륨 리토콜레이트를 포함한다. 이러한 계면활성제의 추가적인 예는 소르비탄 모노스테아레이트 (SPAN 60), 소르비탄 트리스테아레이트 (SPAN 65), 소르비탄 모노올레에이트 (SPAN 80), 소르비탄 세스퀴올레에이트 (SPAN 83), 소르비탄 트리올레에이트 (SPAN 85), 소르비탄 세스퀴올레에이트 (아를라셀(Arlacel) 83), 소르비탄 디팔미테이트, 지방산의 모노 및 디글리세리드, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 트리올레에이트 (트윈(Tween) 85), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 헥사올레에이트 (G 1086), 소르비탄 모노이소스테아레이트 (몬탄(Montane) 70), 폴리옥시에틸렌 알콜, 폴리옥시에틸렌 글리콜 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 (2) 올레일 에테르 (BRIJ 93), 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르 (BRIJ 52), 폴리에틸렌 글리콜 도데실 에테르 (BRIJ L4); 1-모노테트라데카노일-rac-글리세롤; 글리세릴 모노스테아레이트; 글리세롤 모노팔미테이트; 에틸렌디아민 테트라드키스 테트롤 (테트로닉(Tetronic) 90R4, 테트로닉 701), 폴리옥시에틸렌 (5) 노닐페닐에테르 (IGEPAL CA-520), 메르폴(MERPOL) A 계면활성제, 메르폴 SE 계면활성제, 및 폴리(에틸렌 글리콜) 소르비톨 헥사올레에이트를 포함한다. 추가적인 예들 역시 관련 기술분야 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0067] "제약상 허용되는 부형제" 또는 "제약상 허용되는 담체"는 약리학적 활성 물질과 함께 조성물을 제제화하는 데 사용되는 약리학적 불활성 물질을 의미한다. 제약상 허용되는 부형제는 사카라이드 (예컨대 글루코스, 락토스 등), 보존제 예컨대 항미생물제, 재구성 보조제, 착색제, 염수 (예컨대 포스페이트 완충 염수), 및 완충제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 다양한 물질을 포함한다.

[0068] "제공하는 것"은 사람이 본 발명의 실시에 필요한 항목 또는 일련의 항목 또는 방법을 제공하는 것을 수행하는 작용 또는 일련의 작용을 의미한다. 작용 또는 일련의 작용은 직접적으로 스스로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다.

[0069] "라파로그"는 라파마이신 및 라파마이신 (시롤리무스(SIROLIMUS))과 구조적으로 관련된 분자 (유사체)를 지칭하고, 바람직하게는 소수성이다. 라파로그의 예는, 비제한적으로, 템시롤리무스 (CCI-779), 데포롤리무스, 에베롤리무스 (RAD001), 리다포롤리무스 (AP-23573), 조타롤리무스 (ABT-578)를 포함한다. 라파로그의 추가의 예는, 예를 들어, WO 공개 WO1998/002441 및 미국 특허 8,455,510에서 찾아볼 수 있으며, 이러한 라파로그의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0070] "대상체"는 온혈 포유동물, 예컨대 인간 및 영장류; 조류; 가정용 또는 농장용 가축 예컨대 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험 동물 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그; 어류; 파충류; 동물원 및 야생 동물 등을 포함하는 동물을 의미한다.

[0071] "과포화"는 평형 조건하에서 거기에 용해될 수 있는 것에 비해 더 많은 용질 (예를 들어, 면역억제제)을 함유하

는 조성물 (예를 들어, 합성 나노담체 조성물)을 지칭한다. 다른 말로 하면, 과포화 농도를 갖는 조성물은 포화 농도를 넘어서는 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 면역억제제는 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질 (예를 들어, 제제화 과정의 수성 상에서 단독으로 또는 용매와 조합하여)에 대한 그의 포화 한계를 초과할 수 있다. 조성물 중의 면역억제제의 양은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 조성물 중의 분자의 농도를 결정하고 그 농도를 예측된 포화 농도와 비교함으로써 과포화된 것인지를 결정할 수 있다.

[0072] 면역억제제가 과포화량으로 존재하는지 여부를 결정하기 위한 다른 방법에는 필름 캐스팅, X-선 산란 및 전자 현미경법이 포함된다. 전자 현미경법의 형태는 주사 전자 현미경법 (SEM), 투과 전자 현미경법 (TEM), 및 극저온 투과 전자 현미경법 (크리오-TEM)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 과포화량의 면역억제제는 바람직하게는 "안정성"이다. 일부 실시양태에서, 과포화량의 면역억제제는 합성 나노담체가 현탁액 중에 있을 때 이러한 양을 유지하는 경우에 합성 나노담체 중에서 안정성이다. 바람직하게는, 안정한 과포화량의 면역억제제를 포함하는 합성 나노담체는 초기에 멸균 여과가능하기 때문에, 초기 멸균 여과성은 합성 나노담체에서의 과포화량 면역억제제의 안정성 시험으로 사용될 수 있다.

[0073] "계면활성제"는 2종 액체들 사이 또는 액체 및 고체 사이의 표면 장력을 낮출 수 있는 화합물을 지칭한다. 계면활성제는 세제, 습윤제, 유화제, 발포제, 및 분산제로 작용할 수 있으며, 본원에서 제공되는 바와 같은 합성 나노담체의 형성에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제이다.

[0074] "합성 나노담체(들)"는 자연에서 발견되지 않고, 크기가 5 마이크로미터 이하인 적어도 하나의 치수를 보유하는 개별 대상을 의미한다. 본원에 제공된 합성 나노담체는 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질을 포함한다. 합성 나노담체는 소수성 폴리에스테르 나노입자를 포함하는 합성 나노담체일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 합성 나노담체는 구형, 입방형, 피라미드형, 직사각형, 원통형, 토로이드형 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 상이한 형상일 수 있다. 본 발명에 따른 합성 나노담체는 하나 이상의 표면을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노담체는 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, 또는 1:10 이상의 종횡비를 가질 수 있다.

[0075] 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화하는 히드록실 기를 갖는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화하는 히드록실 기가 아닌 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 실질적으로 활성화하는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 실질적으로 활성화하지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 약 100 nm 이하, 바람직하게 100 nm 이하의 최소 치수를 갖는 본 발명에 따른 합성 나노담체는 보체를 활성화하는 표면을 포함하지 않거나 또는 대안적으로 보체를 활성화하지 않는 모이어티로 본질적으로 이루어진 표면을 포함한다.

[0076] "총 고체"는 합성 나노담체의 조성물 또는 현탁액에 함유되어 있는 모든 성분들의 총 중량을 지칭한다. 본원에 제공된 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 총 고체의 양은 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량으로서 결정된다. 이는 중량측정법(gravimetric method)에 의해 측정될 수 있다.

[0077] "중량%"는 일 중량의 또 다른 중량에 대한 비 곱하기 100을 지칭한다. 예를 들어, 중량%는 하나의 중량의 또 다른 것에 대한 중량의 비 곱하기 100 또는 하나의 성분의 1종 초과의 성분의 총 중량에 대한 중량의 비 곱하기 100일 수 있다. 일반적으로, 중량%는 합성 나노담체의 집단에 걸친 평균 또는 조성물 또는 현탁액 중 합성 나노담체에 걸친 평균으로서 측정된다.

[0078] C. 조성물 및 관련 방법

[0079] 개선된 동결건조, 저장 등의 특성을 갖는 합성 나노담체의 조성물이 본원에 제공된다. 본원에서는 합성 나노담체 조성물의 동결건조된 형태, 그의 재구성된 조성물, 뿐만 아니라 동결건조될 합성 나노담체 조성물로서 제공된다. 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은 중성 또는 거의-중성 pH (예를 들어, 7.3의 pH, 예컨대 25℃에서)를 갖는다. 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은 동결건조된 형태, 예컨대 동결건조된 분말 형태이다. 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은, 예컨대 동결건조된 분말 형태로 동결건조되는 것이다. 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은 동결건조된 형태

의 재구성된 조성물이다. 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은 유리 바이알에 저장된다. 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 유리 바이알은 20 ㎜ 마개를 임의로 포함하는 20 mL 유리 바이알이다. 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나의 한 실시양태에서, 합성 나노담체의 조성물은 2 내지 8℃에서 저장된다.

[0080] 본원에 제공된 조성물은 그를 필요로 하는 대상체에게, 예컨대 면역관용성 면역 반응을 촉진하기 위해 투여될 수 있다.

[0081] 바람직하게는, 본원에서 제공되는 조성물들 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 합성 나노담체 조성물에서의 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질의 양은 5-95 중량% 소수성 담체 물질/총 고체이다. 본원에서 제공되는 조성물들 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질의 양은 10-95, 15-90, 20-90, 25-90, 30-80, 30-70, 30-60, 30-50 중량% 등의 소수성 담체 물질/총 고체이다. 본원에서 제공되는 조성물들 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질의 양은 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 또는 95 중량% 소수성 담체 물질/총 고체이다.

[0082] 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 안정한 과포화량으로 라파로그, 예컨대 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체는 ≥6 내지 ≤50 중량% 라파로그, 예컨대 라파마이신/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질을 포함한다. 본원에서 제공되는 조성물들 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 ≥6 내지 ≤45, ≥6 내지 ≤40, ≥6 내지 ≤35, ≥6 내지 ≤30, ≥6 내지 ≤25, ≥6 내지 ≤20, ≥6 내지 ≤15 중량%의 라파로그, 예컨대 라파마이신/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질을 포함한다. 본원에서 제공되는 조성물들 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 ≥7 내지 ≤45, ≥7 내지 ≤40, ≥7 내지 ≤35, ≥7 내지 ≤30, ≥7 내지 ≤25, ≥7 내지 ≤20, ≥7 내지 ≤15 중량%의 라파로그, 예컨대 라파마이신/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질을 포함한다. 본원에서 제공되는 조성물들 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체는 ≥8 내지 ≤24 중량%의 라파로그, 예컨대 라파마이신/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질을 포함한다. 본원에서 제공되는 조성물들 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 45 중량% 또는 그 이상의 라파로그, 예컨대 라파마이신/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질을 포함한다.

[0083] 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥0.01 내지 ≤20 중량% 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥0.1 내지 ≤15, ≥0.5 내지 ≤13, ≥1 내지 ≤9 또는 10 중량% 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 다른 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥0.01 내지 ≤17, ≥0.01 내지 ≤15, ≥0.01 내지 ≤13, ≥0.01 내지 ≤12, ≥0.01 내지 ≤11, ≥0.01 내지 ≤10, ≥0.01 내지 ≤9, ≥0.01 내지 ≤8, ≥0.01 내지 ≤7, ≥0.01 내지 ≤6, ≥0.01 내지 ≤5 중량% 등의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥0.1 내지 ≤15, ≥0.1 내지 ≤14, ≥0.1 내지 ≤13, ≥0.1 내지 ≤12, ≥0.1 내지 ≤11, ≥0.1 내지 ≤10, ≥0.1 내지 ≤9, ≥0.1 내지 ≤8, ≥0.1 내지 ≤7, ≥0.1 내지 ≤6, ≥0.1 내지 ≤5 중량% 등의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥0.5 내지 ≤15, ≥0.5 내지 ≤14, ≥0.5 내지 ≤13, ≥0.5 내지 ≤12, ≥0.5 내지 ≤11, ≥0.5 내지 ≤10, ≥0.5 내지 ≤9, ≥0.5 내지 ≤8, ≥0.5 내지 ≤7, ≥0.5 내지 ≤6, ≥0.5 내지 ≤5 중량% 등의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥1 내지 ≤9, ≥1 내지 ≤8, ≥1 내지 ≤7, ≥1 내지 ≤6, ≥1 내지 ≤5 중량% 등의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 또 다른 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 ≥5

내지 ≤15, ≥5 내지 ≤14, ≥5 내지 ≤13, ≥5 내지 ≤12, ≥5 내지 ≤11, ≥5 내지 ≤10, ≥5 내지 ≤9, ≥5 내지 ≤8, ≥5 내지 ≤7, ≥5 내지 ≤6 중량% 등의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 합성 나노담체에서의 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 중량% 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제/소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질이다. 본원에서 제공되는 HLB 값들 중 어느 하나는 그리핀법 또는 데이비법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0084] 본원에서 제공되는 조성물들 중 어느 하나를 위한 본원에서 언급되는 바와 같은 성분 또는 물질의 양은 관련 기술분야 통상의 기술자에게 알려져 있는 방법 또는 본원에서 제공되는 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 10 이하의 HLB 값을 갖는 비-이온성 계면활성제의 양은 추출 후 이어지는 HPLC법에 의한 정량에 의해 측정될 수 있다. 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 폴리에스테르 담체 물질의 양은 HPLC를 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 양의 결정은 일부 실시양태에서는 소수성 담체 물질의 정체를 확인하기 위한 양성자 NMR 또는 다른 직교 방법, 예컨대 MALDI-MS 등의 사용에 따를 수 있다. 유사한 방법을 사용하여 본원에 제공된 조성물 중 어느 하나에서 면역억제제 (예를 들어, 라파로그, 예컨대 라파마이신)의 양을 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역억제제 (예를 들어, 라파로그, 예컨대 라파마이신)의 양은 HPLC를 이용하여 결정된다. 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나에서, 성분 또는 물질의 양은 나노담체 제제의 처방 중량을 기준으로 결정될 수도 있다. 이에 따라, 본원에서 제공되는 조성물 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 성분들 중 어느 하나의 양은 합성 나노담체의 제제화 동안의 수성 상에서의 성분의 양이다. 본원에서 제공되는 조성물들 또는 방법 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 성분들 중 어느 하나의 양은 제조 공정의 결과로 제조되는 합성 나노담체 조성물 중 성분들의 양이다.

[0085] 본원에서 제공되는 바와 같은 합성 나노담체는 소수성 담체 물질, 예컨대 소수성 중합체 또는 지질을 포함한다. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 합성 나노담체는 1종 이상의 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 이중층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 단층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 지질 층 (예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 중합체 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 추가적인 소수성 담체 물질에는 지질 (합성 및 천연), 지질-중합체 접합체, 지질-단백질 접합체, 및 가교결합가능-오일, 왁스, 지방 등이 포함된다. 본원에서 제공되는 바와 같은 소수성 담체 물질로 사용하기 위한 지질 물질의 추가적인 예는 예를 들어 PCT 공개 번호 WO2000/006120 및 WO2013/056132에서 찾아볼 수 있으며, 이러한 물질의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 개재된다.

[0086] 이에 따라, 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 합성 나노담체는 리포솜일 수 있다. 리포솜은 문헌 [Kim et al. (1983, Biochim. Biophys. Acta 728, 339-348); Liu et al. (1992, Biochim. Biophys. Acta 1104, 95-101); Lee et al. (1992, Biochim. Biophys. Acta. 1103, 185-197), Brey et al. (U.S. Pat. Appl. Pub. 20020041861), Hass et al. (U.S. Pat. Appl. Pub. 20050232984), Kisak et al. (U.S. Pat. Appl. Pub. 20050260260) 및 Smyth-Templeton et al. (U.S. Pat. Appl. Pub. 20060204566)]에 의해 보고된 것과 같은 표준 방법에 의해 생산될 수 있고, 이러한 리포솜 및 그의 제조 방법의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0087] 본원에서 제공되는 바와 같은 소수성 담체 물질은 1종 이상의 소수성 중합체 또는 그의 단위를 포함한다. 그러나, 일부 실시양태에서는, 소수성 담체 물질이 전체적으로는 소수성이면서, 소수성 담체 물질이 소수성이 아닌 중합체 또는 그의 단위를 포함할 수도 있다.

[0088] 본원에 제공된 바와 같은 소수성 담체 물질은 폴리에스테르를 포함할 수 있으며, 이는 락트산 및 글리콜산 단위를 포함하는 공중합체, 예컨대 본원에서 집합적으로 "PLGA"로 지칭되는 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드); 본원에서 "PGA"로 지칭되는 글리콜산 단위를 포함하는 단독중합체, 및 락트산 단위를 포함하는 단독중합체, 예컨대 본원에서 집합적으로 "PLA"로 지칭되는 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드, 폴리-D,L-락티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 예시적인 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리히드록시산; PEG 공중합체 및 락티드 및 글리콜리드의 공중합체 (예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체), 및 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리에스테르는, 예를 들어 폴리(카프로락톤), 폴리(카프로락톤)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 그의 유도체를 포함

한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 폴리에스테르는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산 및 글리콜산의 생체적합성 및 생분해성 공중합체이고, 다양한 형태의 PLGA는 락트산:글리콜산의 비를 특징으로 한다. 락트산은 L-락트산, D-락트산, 또는 D,L-락트산일 수 있다. PLGA의 분해 속도는 락트산:글리콜산 비를 변경시킴으로써 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용될 PLGA는 대략 85:15, 대략 75:25, 대략 60:40, 대략 50:50, 대략 40:60, 대략 25:75, 또는 대략 15:85의 락트산:글리콜산 비를 특징으로 한다.

[0090] 본원에서 제공되는 바와 같은 소수성 폴리에스테르 담체 물질은 전체 소수성 폴리에스테르 담체 물질이 소수성이며 1종 이상의 폴리에스테르 또는 그의 단위를 포함한다면, 1종 이상의 비-폴리에스테르 소수성 중합체 또는 그의 단위, 및/또는 소수성이 아닌 중합체 또는 그의 단위를 포함할 수 있다.

[0091] 본원에서 제공되는 바와 같은 소수성 담체 물질은 비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체인 1종 이상의 중합체, 또는 그의 단위를 포함할 수 있다. "비-메톡시-종결 중합체"는 메톡시 이외의 모이어티로 종결되는 적어도 1개의 말단을 갖는 중합체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 메톡시 이외의 모이어티로 종결되는 적어도 2개의 말단을 갖는다. 다른 실시양태에서, 중합체는 메톡시로 종결되는 말단을 갖지 않는다. "비-메톡시-종결, 플루로닉 중합체"는 양쪽 말단에서 메톡시를 갖는 선형 플루로닉 중합체 이외의 중합체를 의미한다.

[0092] 일부 실시양태에서, 소수성 담체 물질은 폴리히드록시알카노에이트, 폴리아미드, 폴리에테르, 폴리올레핀, 폴리아크릴레이트, 폴리카르보네이트, 폴리스티렌, 실리콘, 플루오로중합체, 또는 이들의 단위를 포함할 수 있다. 본원에서 제공되는 소수성 담체 물질에 포함될 수 있는 중합체의 추가적인 예에는 폴리카르보네이트, 폴리아미드, 또는 폴리에테르, 또는 이들의 단위가 포함된다. 다른 실시양태에서, 소수성 담체 물질의 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 이들의 단위를 포함할 수 있다.

[0093] 일부 실시양태에서, 소수성 담체 물질은 생분해성인 중합체를 포함하는 것이 바람직하다. 따라서, 이러한 실시양태에서, 소수성 담체 물질의 중합체는 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 이들의 단위를 포함할 수 있다. 추가적으로, 중합체는 중합체가 생분해성이 되도록 폴리에테르 및 생분해성 중합체의 블록-공중합체를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 중합체는 폴리에테르 또는 그의 단위, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리프로필렌 글리콜 또는 그의 단위를 단독으로 포함하지 않는다.

[0094] 본 발명에 사용하기 적합한 중합체의 다른 예는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트 (예를 들어, 폴리(1,3-디옥산-2온)), 폴리무수물 (예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)), 폴리프로필푸마레이트, 폴리아미드 (예를 들어, 폴리카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르 (예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리락티드-코-글리콜리드, 폴리카프로락톤, 폴리히드록시산 (예를 들어, 폴리(β-히드록시알카노에이트))), 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 및 폴리아민, 폴리리신, 폴리리신-PEG 공중합체, 및 폴리(에틸렌이민), 폴리(에틸렌 이민)-PEG 공중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0095] 소수성 담체 물질에 포함될 수 있는 중합체의 또 다른 예는 아크릴 중합체, 예를 들어 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리시아노아크릴레이트, 및 전기 중합체들 중 1종 이상을 포함하는 조합을 포함한다.

[0096] 일부 실시양태에서, 소수성 담체 물질의 중합체는 회합되어 중합체 매트릭스를 형성할 수 있다. 광범위한 중합체 및 그로부터 중합체 매트릭스를 형성하는 방법은 통상적으로 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 중합체 매트릭스를 포함하는 합성 나노담체는 이러한 합성 나노담체 내에 소수성 환경을 생성한다.

[0097] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 모이어티 및/또는 관능기에 의해 변형될 수 있다. 다양한 모이어티 또는 관능기가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 탄수화물; 및/또는 폴리사카라이드로부터 유래된 비-시클릭 폴리아세탈에 의해 변형될 수 있다 (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). 특정 실시양태는 그레프(Gref) 등의 미국 특허 번호 5,543,158, 또는 폰 안드리안(Von Andrian) 등의 WO 공보 WO2009/051837의 일반적인 교시를 사용하여 이루어질 수 있다.

[0098] 일부 실시양태에서, 중합체는 지질 또는 지방산 기에 의해 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산,

또는 리그노세르산 중 하나 이상일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 팔미톨레산, 올레산, 바센산, 리놀레산, 알파-리놀레산, 감마-리놀레산, 아라키돈산, 가돌레산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 도코사헥사엔산, 또는 에루스산 중 하나 이상일 수 있다.

[0099] 일부 실시양태에서, 중합체가 생분해성인 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 중합체는 미국 식품 의약품국 (FDA)에 의해 21 C.F.R. § 177.2600 하에 인간에서의 용도에 대해 승인된 중합체를 포함한다.

[0100] 중합체는 천연 또는 비천연 (합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 단독중합체이거나 또는 2개 이상의 단량체를 포함하는 공중합체일 수 있다. 연쇄 면에서, 공중합체는 무작위 또는 블록일 수 있거나 또는 무작위 및 블록 연쇄의 제품 코드제품 코드함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명에 따른 중합체는 유기 중합체이다.

[0101] 일부 실시양태에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 덴드리머일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 서로 실질적으로 가교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 가교가 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 가교 단계를 거치지 않으면서 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 합성 나노담체는 상기 및 다른 중합체 중 임의의 것의 블록 공중합체, 그라프트 공중합체, 블렌드, 혼합물 및/또는 부가물을 포함할 수 있는 것으로 추가로 이해되어야 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 열거된 중합체가 이들이 바람직한 기준에 충족한다면 본 발명에 따라 사용될 수 있는 중합체의 포괄적인 목록이 아니라 예시적인 목록을 나타낸다는 것을 인식할 것이다.

[0102] 이들 및 기타 중합체들의 특성, 및 이들의 제조 방법에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있다 (예를 들어 U.S. 특허 6,123,727호; 5,804,178호; 5,770,417호; 5,736,372호; 5,716,404호; 6,095,148호; 5,837,752호; 5,902,599호; 5,696,175호; 5,514,378호; 5,512,600호; 5,399,665호; 5,019,379호; 5,010,167호; 4,806,621호; 4,638,045호; 및 4,946,929호; 문헌 [Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc, 123:9480]; [Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc, 123:2460]; [Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94]; [Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7]; 및 [Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181] 참조). 더 일반적으로는, 소정의 적합한 중합체의 다양한 합성 방법이 문헌 [Concise Encyclopedia of Polymer Science 및 Polymeric Amines 및 Ammonium Salts, Ed. by Goethals, Pergamon Press, 1980]; [Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2004]; [Contemporary Polymer Chemistry by Allcock et al., Prentice-Hall, 1981]; [Deming et al., 1997, Nature, 390:386]; 및 미국 특허 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446, 및 6,818,732에 기재되어 있다.

[0103] 매우 다양한 합성 나노담체가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노담체는 구체 또는 스페로이드이다. 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.

[0104] 일부 실시양태에서, 각각의 합성 나노담체가 유사한 특성을 갖도록 크기 또는 형상 면에서 비교적 균일한 합성 나노담체의 집단을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노담체의 총수에 기초한 합성 나노담체의 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 합성 나노담체의 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10%, 또는 20% 내에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다.

[0105] 본 발명에 따른 조성물은 요소를 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 보존제, 완충제, 염수, 또는 포스페이트 완충 염수와 조합하여 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제조 및 배합 기술을 이용하여 만들 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물, 예컨대 합성 나노담체를 포함하는 조성물은 보존제와 함께 주사용 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.

[0106] 일부 실시양태에서는, 본원에서 제공되는 바와 같은 합성 나노담체의 소정 성분이 단리될 수 있다. 단리된이란 요소가 그의 천연 환경으로부터 분리되고 그의 확인 또는 사용을 허용하는 충분한 양으로 제공되는 것을 지칭한다. 이는 예를 들어 크로마토그래피 또는 전기영동과 같은 것에 의해 요소가 정제될 수 있다는 것을 의미한다. 단리된 요소는, 실질적으로 순수할 수 있지만, 그러할 필요는 없다. 단리된 요소는 제약 제제 내에서 제약상 허용되는 부형제와 함께 혼합될 수 있기 때문에, 요소는 제제의 중량을 기준으로 단지 작은 중량%만을 포함할 수 있다. 그럼에도 불구하고 요소는 생물계 내에서 회합되어 있을 수 있는 물질로부터 분리되었다는 점에서 단리, 즉 다른 지질 또는 단백질로부터 단리된다. 본원에 제공된 임의의 요소는 단리될 수 있고, 조성물 중에 포함되거나 또는 단리된 형태로 방법에서 사용될 수 있다.

[0107] D. 조성물의 제조 및 사용 방법 및 관련 방법

[0108] 합성 나노담체는 관련 기술분야에 공지된 매우 다양한 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노담체는 방법 예컨대 나노침전, 유체 채널을 사용하는 유동 포커싱, 분무 건조, 단일 및 이중 에멀젼 용매 증발, 용매 추출, 상 분리, 밀링 (냉동밀링 포함), 초임계 유체 (예컨대 초임계 이산화탄소) 처리, 마이크로에멀젼 절차, 마이크로제작, 나노제작, 희생 층, 단순 및 복합 코아세르베이션, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 방법에 의해 형성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 단분산 반도체, 전도성, 자기성, 유기 및 다른 나노물질에 대한 수성 및 유기 용매 합성이 기재되어 있다 (문헌 [Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; 및 Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843]). 추가적인 방법은 문헌에서 기술된다 (예를 들어 문헌 [Doubrow, Ed., "Microcapsules 및 Nanoparticles in Medicine 및 Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; 및 Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755; US Patents 5578325 및 6007845; P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate 및 Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]을 참조한다).

[0109] 다양한 물질은 문헌 [C. Astete et al., "Synthesis 및 characterization of PLGA nanoparticles" J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, number 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) 및 Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties 및 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 및 Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)]를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 방법을 사용하여 바람직한 합성 나노담체 내로 캡슐화될 수 있다. 물질을 합성 나노담체 내로 캡슐화하기에 적합한 다른 방법을 사용할 수 있고, 이는 2003년 10월 14일자로 허여된 미국 특허 6,632,671 (Unger)에 개시된 방법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0110] 특정 실시양태에서, 합성 나노담체는 나노침전 과정 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 합성 나노담체를 제조하는데 사용된 조건은 목적하는 크기 또는 특성 (예를 들어, 소수성, 친수성, 외부 형태, "점착성", 형상 등)의 입자를 생성하기 위해 변경시킬 수 있다. 합성 나노담체를 제조하는 방법 및 사용되는 조건 (예를 들어, 용매, 온도, 농도, 공기 유량 등)은 합성 나노담체에 포함될 물질 및/또는 담체 매트릭스의 조성에 따라 달라질 수 있다.

[0111] 상기 방법 중 임의의 것에 의해 제조된 합성 나노담체가 바람직한 범위 밖의 크기 범위를 갖는 경우에, 이러한 합성 나노담체는, 예를 들어, 체를 사용하여 크기조정될 수 있다.

[0112] 실시양태에서, 합성 나노담체는 동일한 비히클 또는 전달 시스템에서 혼합하는 것에 의해 항원 또는 다른 조성물과 조합될 수 있다.

[0113] 본원에 제공된 조성물은 무기 또는 유기 완충제 (예를 들어, 포스페이트, 카르보네이트, 아세테이트 또는 시트레이트의 나트륨 또는 칼륨 염) 및 pH 조정제 (예를 들어, 염산, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨, 시트레이트 또는 아세테이트의 염, 아미노산 및 그의 염), 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 알파-토코페롤), 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌9-10 노닐 페놀, 소듐 데스옥시콜레이트), 용액 및/또는 냉동/동결 안정화제 (예를 들어, 수크로스, 락토스, 만니톨, 트레할로스), 삼투 조정제 (예를 들어, 염 또는 당), 항박테리아제 (예를 들어, 벤조산, 페놀, 겐타미신), 소포제 (예를 들어, 폴리디메틸실로존), 보존제 (예를 들어, 티메로살, 2-페녹시에탄올, EDTA), 중합체 안정화제 및 점도-조정제 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 폴록사머 488, 카르복시메틸셀룰로스) 및 공-용매 (예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올)를 포함할 수 있다.

[0114] 본 발명에 따른 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 조성물은 유용한 투여 형태에 도달하기 위한 통상적인 제약 제조 및 배합 기술을 이용하여 만들 수 있다. 본 발명을 실행하는데 사용하기에 적절한 기술은 문헌 [Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Edited by Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; and Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd Ed. Edited by M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone] 에서 발견할 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 보존제와 함께 주사용 멸균 염수 용액 중에 현탁된다.

[0115] 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 방식으로 제조될 수 있고, 본 발명은 본원에 기재된 방법을 이용하여 생성될

수 있는 조성물로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 적절한 제조 방법의 선택은 연관되어 있는 특정한 요소의 특성에 대한 주의를 필요로 할 수 있다.

[0116] 일부 실시양태에서, 조성물은 멸균 조건 하에 제조되거나 또는 처음에 또는 마지막에 멸균된다. 이는 이로써 생성되는 조성물이 멸균이면서 비-감염성이라는 것을 보장하므로, 비-멸균 조성물과 비교해서 안전성을 개선시킬 수 있다. 이것은, 특히 조성물을 투여받는 대상체가 면역 결함이 있고/거나, 감염으로 인해 고통받고 있고/거나 감염되기 쉬운 경우에, 중요한 안전 조치를 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 장기간 동안 활성을 상실하지 않으면서 제제 전략에 따라 동결건조되고 현탁액 중에서 또는 동결건조된 분말로서 보관될 수 있다.

[0117] 본 발명에 따른 투여는 비제한적으로 진피내, 근육내, 피하, 정맥내 및 복막내 경로를 포함하는 다양한 경로에 의할 수 있다. 본원에 언급된 조성물은 통상적인 방법을 사용하여 투여를 위해 제작 및 제조될 수 있다.

[0118] 본 발명의 조성물은 유효량, 예컨대 본원의 다른 곳에 기재된 유효량으로 투여될 수 있다. 투여 형태의 용량은 다양한 양의 본 발명에 따른 요소들을 함유할 수 있다. 본 발명의 투여 형태에 존재하는 요소들의 양은 그의 특성, 달성될 치료적 이익, 및 기타 해당 파라미터들에 따라 달라질 수 있다. 실시양태에서는, 투여 형태에 존재할 최적 치료량을 확립하기 위하여, 용량 범위 연구가 수행될 수 있다. 실시양태에서, 요소들은 대상체에의 투여 시 목적 효과 및/또는 감소된 면역 반응을 발생시키는 데에 효과적인 양으로 투여 형태 중에 존재한다. 대상체에서 통상적인 용량 범위 연구 및 기술을 사용하면, 목적한 결과를 달성하는 양을 결정하는 것이 가능할 수 있다. 본 발명의 투여 형태는 다양한 빈도로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에서 제공되는 조성물의 적어도 1회 투여로써 약리학적 관련 반응을 생성시키는 데에 충분하다.

[0119] 개시내용의 또 다른 측면은 키트에 관한 것이다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 제공된 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나를 포함한다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 키트는 항원을 추가로 포함한다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 합성 나노담체 조성물 중 어느 하나를 포함하는 용기는 바이알 또는 앰플이다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 조성물은 동결건조된 형태이고, 후속 시간에 재구성될 수 있다. 제공된 키트 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 키트는 재구성, 혼합, 투여 등에 대한 지침서를 추가로 포함한다. 제공되는 키트들 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 상기 지침에는 본원에서 기재되는 방법에 대한 설명이 포함된다. 지침서는 임의의 적합한 형태로, 예를 들어, 인쇄 삽입물 또는 라벨로서 존재할 수 있다. 본원에서 제공되는 키트들 중 어느 하나의 일부 실시양태에서, 키트는 추가적으로 대상체에게 생체내로 합성 나노담체를 전달할 수 있는 하나 이상의 주사기 또는 다른 장치(들)를 포함한다.

[0120] 실시예:

[0121] 실시예 1 - 동결건조된 합성 나노담체

[0122] 동결건조 조성물의 다양한 성분이 동결건조를 용이하게 하고/거나, (예를 들어, 재구성 후) 응집을 감소시키고/거나, (예를 들어, 동결건조 후) 2-8℃에서의 장기 저장을 가능하게 할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 계면활성제의 사용은 라파마이신과 같은 면역억제제의 가용화 및/또는 합성 나노담체의 붕괴로 이어질 수 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 일부 실시양태에서, 중성 pH를 유지하는 것을 돕는 완충제 성분의 이점이 발견된다.

[0123] 예로서, 트리스 완충제는 동결시 포스페이트 완충제에 의해 발생할 수 있는 pH의 강하를 회피하는 것을 도울 수 있는 것으로 밝혀졌다. 트리스 완충제를 제조하기 위해, 트로메타민 (트리스(히드록시메틸)아미노메탄) 및 트리스 히드로클로라이드 (트리스 HCl)를 혼합하였고, 바람직하게는 일부 실시양태에서, pH를 거의 중성으로 유지한다. 일부 실시양태에서, 트리스 완충제는 10 mM의 농도 및/또는 pH 7.3 (25℃)이었다. 일부 실시양태에서, 트리스 완충제는 1.3 mM 농도의 트로메타민 및 8.7 mM 농도의 트리스 HCL을 포함하였다.

[0124] 실험 제제를 또한 동결건조 후 그리고 보관 동안 나노입자 응집을 방지하는 그들의 능력에 기초하여 평가하였다. 수크로스, 트레할로스, 만니톨, 및 수크로스/만니톨 혼합물을 포함하는 다양한 제제를 시험하였다. 제제, 예컨대 수크로스를 함유하는 제제는 일관되게 적합한 생성물을 제공하고, 신속한 재구성을 제공하며, 재구성 시 가시적인 응집체가 없고, 동결건조 후 입자 크기 증가를 거의 내지 전혀 나타내지 않았다. 수크로스를 함유하는 제제는 또한 12개월의 안정성 시험을 통해 이들 특성을 계속 나타내었다. 다수의 수크로스 농도, 예컨대 4 wt% 내지 9.6 wt% 범위의 것들은 응집에 대해 유사한 보호를 나타내는 것으로 밝혀졌다 (도 1).

[0125] 이들 연구에 기초하여, 동결건조를 위해 선택된 예시적인 제제는 2 mg/mL 라파마이신의 농도의 본원에 제공된 바와 같은 합성 나노담체, 9.6 wt% 농도의 수크로스, 및 10 mM pH 7.3 트리스 완충제를 함유하는 제제인 것으로

밝혀졌다. 바이알 크기는 동결건조 동안 건조 속도를 돕기 위해 20 mL였다.

[0126] 실시예 2 - 과포화량의 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체

[0127] 수-중-오일 에멀젼 증발법을 사용하여, 중합체 PLGA (3:1 락티드:글리콜리드, 고유 점도 0.39 dL/g) 및 PLA-PEG (5 kDa PEG 블록, 고유 점도 0.36 dL/g), 및 작용제인 라파마이신 (RAPA)을 함유하는 나노담체 조성물을 합성하였다. 디클로로메탄 중에 중합체 및 RAPA를 용해시키는 것에 의해, 유기 상을 형성시켰다. 계면활성제 폴리비닐알콜 (PVA)을 함유하는 수성 상 중에 유기 상을 균질화하는 것에 의해, 에멀젼을 형성시켰다. 다음에, 상기 에멀젼을 더 많은 양의 수성 완충제와 합하고 혼합함으로써, 용매의 증발을 가능케 하였다. RAPA 함량을 증가시키면서 조성물이 시스템의 RAPA 포화 한계를 통과하도록, 다양한 조성물에서 RAPA 함량을 다르게 하였다. 조성물의 포화 한계에서의 RAPA 함량은 수성 상 및 분산된 나노담체 상에서의 RAPA의 용해도를 사용하여 계산하였다. 수성 상에 주 용질로서 PVA를 함유하는 조성물의 경우, 수성 상에서의 RAPA 용해도가 PVA 농도에 비례함으로써, RAPA가 용해된 PVA에 대하여 1:125의 질량비에서 가용성이라는 것이 밝혀졌다. 나노담체 중합체로서 기재된 PLGA 및 PLA-PEG를 함유하는 조성물의 경우, 분산된 나노담체 상에서의 RAPA 용해도가 7.2 wt%/wt인 것으로 밝혀졌다. 조성물에 대한 포화 한계에서의 RAPA 함량을 계산하는 데에는 하기의 수학식이 사용될 수 있다:

[0128] $RAPA\ 함량 = V(0.008c_{PVA} + 0.072c_{pol})$

[0129] c_{PVA}는 PVA의 질량 농도이며, c_{pol}은 중합체들의 합한 질량 농도이고, V는 증발 종료시의 나노담체 현탁액의 부피이다.

샘플 ID	과포화 계산치 (%)	RAPA 로드 (%)	직경 (nm)
1	-50	2.5	143
2	-25	3.8	146
3	1	4.9	147
4	23	4.9	130
5	48	8.1	160
6	73	9.8	189
7	98	12.4	203

[0130]

[0131] 1, 2 및 3의 경우, 일관된 60 %의 RAPA가 회수되지 않았고, 이는 수성 상 및 유기 상 사이의 포화-미만인 평형 상황을 나타낸다. 더 많은 양의 RAPA를 함유하는 나머지 나노담체의 경우, 일관된 6.8 mg의 RAPA가 회수되지 않았다. 이와 같은 일관된 절대 질량 손실은 시스템이 과포화된 상황에 있다는 것 (즉, 하나 이상의 상에서 과포화되어 있다는 것)을 나타낸다.

[0132] 실시예 3 - 과포화량의 라파마이신을 포함하는 합성 나노담체

[0133] 실시예 2에 기재되어 있는 수-중-오일 에멀젼 증발법을 사용하여, 중합체 PLA (고유 점도 0.41 dL/g) 및 PLA-PEG (5 kDa PEG 블록, 고유 점도 0.50 dL/g), 및 작용제인 RAPA를 함유하는 나노담체 조성물을 합성하였다. RAPA 함량을 증가시키면서 조성물이 시스템의 RAPA 포화 한계를 통과하도록, 다양한 조성물에서의 RAPA 함량을 다르게 하였다. 조성물의 포화 한계에서의 RAPA 함량은 실시예 2에 기재되어 있는 방법을 사용하여 계산하였다. 나노담체 중합체로서 기재된 PLA 및 PLA-PEG를 함유하는 조성물의 경우, 분산된 나노담체 상에서의 RAPA 용해도가 8.4 wt%/wt인 것으로 밝혀졌다. 조성물에 대한 포화 한계에서의 RAPA 함량을 계산하는 데에는 하기의 수학식이 사용될 수 있다:

[0134] $RAPA\ 함량 = V(0.008c_{PVA} + 0.084c_{pol})$

[0135] c_{PVA}는 PVA의 질량 농도이며, c_{pol}은 중합체들의 합한 질량 농도이고, V는 증발 종료시의 나노담체 현탁액의 부피이다. 모든 나노담체 로트는 형성 종료시에 0.22 ㎛ 필터를 통하여 여과하였다.

샘플 ID	과포화 계산치 (%)	RAPA 로드 (%)	미세적 직경 (nm)	최종 직경 (nm)	필터 처리량 (g/m^2)
10	-10	5.4	145	149	>171
11	0	6.2	150	155	>180
12	10	6.1	151	154	>170
13	20	6.1	148	148	80
14	30	6.2	171	151	28
15	40	5.8	202	154	16

[0136]

[0137] 나노담체 12-15에는 증가량의 RAPA를 첨가하였음에도 불구하고, 필터 처리량이 감소하는 한편 나노담체에서의 최종 RAPA 함량은 증가하지 않는다. 이는 조성물이 RAPA로 과포화되었으며, 세척 및/또는 여과 동안 과량의 RAPA가 제거되었다는 것을 나타낸다.

[0138] 실시예 4 - 보다 빠른 용매 증발 및 저HLB 계면활성제가, 과포화량의 라파마이신을 포함하고 또한 초기에 멸균 여과가능한 합성 나노담체를 제공한다

[0139] 물질 및 방법

[0140] 0.41 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLA는 제품 코드 100 DL 4A로 에보니크 인더스트리즈 AG(Evonik Industries AG) (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 소재)로부터 구매하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.50 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE로 에보니크 인더스트리즈 AG (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 소재)로부터 구매하였다. 라파마이신은 제품 코드 시롤리무스로 콩코드 바이오테크 리미티드(Concord Biotech Limited), 인도 아흐메다바드, 돌카 382225, 1482-1486 트라사드 로드 소재로부터 구매하였다. 제품 코드 시롤리무스. 엠프로브®(EMPROVE®) 폴리비닐 알콜 4-88 (PVA), USP (85-89 % 가수분해, 3.4-4.6 mPa·s의 점도)는 제품 코드 1.41350으로 EMD 케미칼 인코포레이션(EMD Chemicals Inc) (뉴저지 08027, 480 사우스 데모크라트 로드 깁스타운 소재)으로부터 구매하였다. 셀그로(Cellgro) PBS 1X (PBS)는 부품 번호 21-040-CV로 코닝 인코포레이티드(Corning Incorporated) (미국 뉴욕 14831, 원 리버프론트 플라자 코닝 소재)로부터 구매하였다. 둘베코 포스페이트 완충 식염수 1X (DPBS)는 제품 코드 17-512Q로 론자(Lonza) (스위스 CH-4002 바젤, 뮌첸스타이너스트라쎄 38 소재)로부터 구매하였다. 소르비탄 모노팔미테이트는 제품 코드 SPAN 40으로 크로다 인터내셔널 사(Croda International) (뉴저지 08837, 에디슨, 300-A 콜로부스 서클 소재)로부터 구매하였다.

[0141] 샘플 1의 경우, 하기와 같이 용액을 제조하였다:

[0142] 용액 1: 디클로로메탄 중에 18.75 mg/mL의 PLA, 6.25 mg/mL의 PLA-PEG-Ome 및 4.7 mg/mL의 라파마이신을 용해시킴으로써, 중합체 및 라파마이신 혼합물을 제조하였다. 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중에 50 mg/mL로 PVA를 제조하였다.

[0143] 소형 유리 압력 튜브에서 용액 1 (1.0 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 합함으로써 O/W 에멀젼을 제조하고, 10초 동안 볼텍싱 혼합한 다음, 브란슨 디지털 소니파이어(Branson Digital Sonifier) 250을 사용하여 압력 튜브를 얼음 수조에 침지시킨 상태로 1분 동안 30 % 진폭에서 초음파처리에 의해 에멀젼화하였다. 다음에, DPBS (30 mL)를 함유한 개방 500 mL 비커에 에멀젼을 첨가하였다. 상기와 동일한 물질 및 방법을 사용하여 제2 O/W 에멀젼을 제조한 다음, 제1 에멀젼 및 DPBS를 함유한 동일한 용기에 첨가하였다. 다음에, 실온에서 이를 2시간 동안 교반함으로써, 디클로로메탄이 증발되고 나노담체가 형성되도록 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨, 75,600xg 및 4℃로 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, 0.25 % w/v PVA를 함유하는 DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 나노담체의 부분을 세척하였다. 상기 세척 절차를 반복한 다음, 0.25 % w/v PVA를 함유하는 DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 별도의 500 mL 비커에서 동일한 제제를 제조한 후, 동일하게 처리하고, 멸균 여과 직전에 제1 제제와 함께 풀링하였다. 다음에, 33 mm 직경의 0.22 ㎛ PES 멤브레인 주사기 필터 (밀리포어 부품 번호 SLGP033RB)를 사용하여 나노담체 현탁액을 여과하였다. 다음에, 여과된 나노담체 현탁액을 -20℃로 저장하였다.

[0144] 샘플 2의 경우, 하기와 같이 용액을 제조하였다:

[0145] 용액 1: 디클로로메탄 중에 75 mg/mL의 PLA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-Ome 및 16 mg/mL의 라파마이신을 용해시킴으로써, 중합체 및 라파마이신 혼합물을 제조하였다. 용액 2: 디클로로메탄 중에 Span 40 20 mg/mL를 용해시킴으로써, 소르비탄 모노팔미테이트 혼합물을 제조하였다. 용액 3: 폴리비닐 알콜을 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중에서 50 mg/mL로 제조한다. 용액 4: 0.20 ㎛ PTFE 멤브레인 주사기 필터 (VWR 부품 번호 28145-491)를 사용하여 디클로로메탄을 여과하였다.

[0146] 소형 유리 압력 튜브에서 용액 1 (0.5 mL), 용액 2 (0.125 mL) 및 용액 4 (0.375 mL), 및 용액 3 (3.0 mL)을 합함으로써 O/W 에멀젼을 제조하고, 10초 동안 볼텍싱 혼합한 다음, 브란슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 압력 튜브를 얼음 수조에 침지시킨 상태로 1분 동안 30 % 진폭에서 초음파처리에 의해 에멀젼화하였다. 다음에, 에멀젼을 DPBS (30 mL)를 함유한 50 mL 비커에 첨가하였다. 상기와 동일한 물질 및 방법을 사용하여 제2 O/W 에멀젼을 제조한 다음, 제1 에멀젼 및 DPBS를 함유한 동일한 비커에 첨가하였다. 다음에, 나노담체 현탁액을 샘플 1과 동일한 방식으로 처리하였다.

[0147] 샘플 3의 경우, 하기와 같이 용액을 제조하였다:

[0148] 용액 1: 디클로로메탄 중에 37.5 mg/mL의 PLA, 12.5 mg/mL의 PLA-PEG-Ome 및 8 mg/mL의 라파마이신을 용해시킴으로써, 중합체 및 라파마이신 혼합물을 제조하였다. 용액 2: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중에 75 mg/mL로 폴리비닐 알콜을 제조하였다.

[0149] 소형 유리 압력 튜브에서 용액 1 (1 mL) 및 용액 2 (3.0 mL)를 합함으로써 O/W 에멀젼을 제조하고, 10초 동안 볼텍싱 혼합한 다음, 브란슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 압력 튜브를 얼음 수조에 침지시킨 상태로 1분 동안 30 % 진폭에서 초음파처리에 의해 에멀젼화하였다. 상기 샘플 1에 대하여 기재된 것과 동일한 방법을 사용하여 O/W 에멀젼을 형성시켰다. 초음파처리에 의한 에멀젼화 후, DPBS (30 mL)를 함유한 50 mL 비커에 에멀젼을 첨가하였다. 상기와 동일한 물질 및 방법을 사용하여 제2 O/W 에멀젼을 제조한 다음, 동일한 용매 증발 용기에 첨가하였다. 상기 에멀젼을 2시간 동안 교반시킴으로써, 유기 용매가 증발되고 나노담체가 형성되도록 하였다. 다음에, 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨, 75,600xg으로 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, PBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 나노담체의 부분을 세척하였다. 상기 세척 절차를 반복한 다음, PBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 다음에, 33 mm 직경의 0.22 ㎛ PES 멤브레인 주사기 필터 (밀리포어 부품 번호 SLGP033RB)를 사용하여 나노담체 현탁액을 여과하였다. 다음에, 여과된 나노담체 현탁액을 -20℃로 저장하였다.

[0150] 나노담체 크기를 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0151]

로트 번호	SE 용기	저 HLB 계면활성제	용기의 표면적 (cm^2)	필터 처리량 계산치 (g NP/m^2)	라파마이신 로드 (%)	크기 (nm)	수율 (%)
1	500 mL 비커	없음	64	>133	9.84	148	81
2	50 mL 비커	SPAN 40	14	>178	9.32	165	93
3	50 mL 비커	없음	14	47	7.38	119	73

플그	로트 ID	SE 용기	저 HLB 계면활성제	DLS 직경 (nm)	RAPA 로드 (%)	여과성 (g NP/m²)
1	PBS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	샘플 1	500 mL 비커	없음	148	9.8	>133
12	샘플 2	50 mL 비커	SPAN 40	165	9.3	>178
전체	KLH, 시그마 #H7017					

[0152]

[0153] 실시예 5 - 과포화의 결정 방법

[0154] 물질 및 방법

[0155] 0.41 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLA는 제품 코드 100 DL 4A로 에보니크 인더스트리즈 AG (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 소재)로부터 구매하였다. 라파마이신은 제품 코드 시롤리무스로 콩코드 바이오테크 리미티드 (인도 아흐메다바드, 돌카 382225, 1482-1486 트라사드 로드 소재)로부터 구매하였다. 제품 코드 시롤리무스.

[0156] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0157] 용액 1: 디클로로메탄 중에 100 mg/mL로 PLA를 용해시킴으로써, 중합체 용액을 제조하였다. 용액 2: 디클로로메탄 100 mg/mL로 라파마이신을 용해시킴으로써, 라파마이신 용액을 제조하였다.

[0158] 유리 현미경 슬라이드를 70 % 이소프로판올로 세정한 후, 화학용 흄 후드(fume hood) 내의 깨끗하고 편평한 표면상에서 건조시켰다. 내용매성 스크류 캡이 구비된 유리 바이알에서 100 μL의 용액 1을 100 μL의 디클로로메탄과 혼합함으로써 혼합물 1을 제조하고, 볼텍스 혼합에 의해 혼합하였다. 100 μL의 용액 1, 33.3 μL의 용액 2 및 66.7 μL의 디클로로메탄을 사용하여 혼합물 1에서와 동일한 방법으로 혼합물 2를 제조하였다. 100 μL의 용액 1과 함께 66.7 μL의 용액 2 및 33.3 μL의 디클로로메탄을 사용하여 혼합물 1에서와 동일한 방법으로 혼합물 3을 제조하였다. 다음에, 50 μL의 각 혼합물을 깨끗한 유리 슬라이드 상의 개별 위치에 적용하고, 실온의 흄 후드에서 밤새 건조시켰다. 각 건조 필름의 디지털 이미지를 촬영하고, 이미지 분석 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 정규화된 평균 강도 증가는 포화점 초과에서 필름이 불투명하게 되는 것을 보여줄 수 있다.

	필름						Bgrd				
혼합물	면적	평균 강도	표준 편차	최소	최대	면적	평균 강도	표준 편차	최소	최대	정규화된 평균 강도
1	45153	39.9	7.3	18	174	45588	38.6	6	18	123	1.3
2	43444	47.6	7.7	16	148	49698	40.5	5.7	19	95	7.1
3	63995	57.1	35.9	12	232	64441	23.4	4.4	8	85	33.7

[0159]

[0160] 실시예 6 - 저HLB 계면활성제인 SM은 RAPA 로딩량 및 합성 나노담체 여과성을 증가시킨다

[0161] 저HLB 계면활성제인 소르비탄 모노팔미테이트 (SM)의 첨가를 수반하여 또는 첨가하지 않고, 수-중-오일 에멀젼 증발법을 사용하여, 중합체 PLA (고유 점도 0.41 dL/g) 및 PLA-PEG (5 kDa PEG 블록, 고유 점도 0.50 dL/g), 및 소수성 약물 라파마이신 (RAPA)을 함유하는 나노담체 조성물을 합성하였다. 디클로로메탄 중에 중합체 및 RAPA를 용해시키는 것에 의해, 유기 상을 형성시켰다. 프로브-팁 초음파처리장치를 사용하여 계면활성제 PVA를 함유하는 수성 상 중에서 유기 상을 균질화하는 것에 의해, 에멀젼을 형성시켰다. 다음에, 상기 에멀젼을 보다 많은 양의 수성 완충제와 합하고 혼합함으로써, 용해 및 용매 증발을 가능케 하였다. 생성 나노담체를 세척하고, 0.22 ㎛ 필터를 통하여 여과하였다. 모든 조성물이 100 mg의 중합체를 함유하였다. 다양한 조성물에서의 RAPA 함량을 다르게 하였다.

샘플 ID	조성물에 첨가된 RAPA (mg)	조성물에 첨가된 SM (mg)	미세적 직경 (nm)	최종 직경 (nm)	RAPA 로드 (%)	필터 처리량 (g/m^2)
1	12.2	0	148	148	6.1	80
2	13.3	0	171	151	6.2	28
3	14.3	0	202	154	5.8	16
4	13.6	5	156	161	9.2	>174
5	17	5	168	170	11.8	>184
6	20.4	5	181	179	14.9	77

[0162]

[0163] 계면활성제 SM을 함유하지 않는 조성물 (샘플 1, 2 및 3)의 경우, 증가량의 RAPA가 첨가되면서 나노담체 조성물에 RAPA를 완전히 도입하는 능력을 제한하는 몇 가지 징후들이 관찰되었다. SM 부재하에서의 더 높은 RAPA 제제화 수준에서의 여과-전 및 -후 나노담체 크기 사이의 증가하는 차이는 세척 및/또는 여과 과정 동안 제거되는 더 큰 미립자 (개별 입자 또는 응집체)의 존재를 나타내었다. 이는 또한 막힘 전의 감소되는 필터 처리량으로도 나타났다. 마지막으로, SM이 없는 나노담체 조성물에 증가량의 RAPA를 첨가하는 것이 RAPA 로딩량의 증가를 유도하지 못하였고 (예를 들어 샘플 3과 비교한 샘플 1), 이는 대부분의 나노담체로부터 추가적인 RAPA가 분리 가능하였고, 세척 및/또는 여과 단계 동안 제거되었음을 나타낸다.

[0164] 반면, 계면활성제 SM을 함유하는 조성물은 증가된 양의 RAPA를 용이하게 도입하였다. 나노담체 크기는 여과에 의해 영향을 받지 않았으며, 조성물에 첨가되는 RAPA의 양을 증가시키는 것은 나노담체의 증가된 RAPA 로딩량으로 이어졌다. 최고 로딩량 수준 (샘플 6)에서 약간의 필터 처리량 감소가 관찰되었으나, 이는 본질적으로 보다 큰 나노담체 크기로 인한 것일 수 있다. 종합하면, SM의 도입은 합성 나노담체 조성물의 RAPA 로딩량 및 여과성을 증가시키는 것을 도왔다.

[0165] 실시예 7 - SM 및 콜레스테롤은 RAPA 로딩량 및 여과성을 증가시킨다

[0166] 나노담체 조성물을 실시예 6에서 기재된 바와 같은 물질 및 방법을 사용하여 제조하였다. RAPA 로딩량 수준을 변화시키면서 중합체 및 RAPA를 함유하는 나노담체를 제조하였다. 또한, 3.2:1의 부형제:RAPA 질량비로 부형제인 계면활성제 SM 또는 콜레스테롤을 사용하여, RAPA가 고도로 로딩된 나노담체를 또한 제조하였다.

샘플 ID	부형제	직경 (nm)	RAPA 로드 (%)	필터 처리량 (g/m^2)
7	-	131	5.6	>148
8	-	138	7.9	37
9	SM	165	9.3	>178
10	콜레스테롤	166	14.3	>180

[0167]

[0168] 부형제의 부재 하에서 제조된 나노담체의 샘플 (샘플 7 및 8)은 겉보기 나노담체 포화점을 넘어서는 RAPA 로딩량의 증가가 필터 처리량의 감소로 이어지는 경향이 있는 것을 입증하였다. SM 또는 콜레스테롤 중 어느 하나의 첨가는 안정성을 유지하면서도 보다 큰 RAPA 로딩량으로 이어졌다 (샘플 9 및 10).

[0169] 실시예 8 - RAPA 로딩량 및 여과성에 대한 저HLB 계면활성제의 효과

[0170] 물질 및 방법

[0171] 0.41 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLA는 레이크쇼어 바이오머티리얼즈(Lakeshore Biomaterials) (미국 앨라배마주 35211 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)로부터 구입하였다 (제품 코드 100 DL 4A). 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.50 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 레이크쇼어 바이오머티어리얼스 (35211 앨라배마주 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756)에서, 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE로 구입하였다. 라파마이신은 제품 코드 시롤리무스로 콩코드 바이오테크 리미티드 (인도 아흐메다바드, 돌카 382225, 1482-1486 트라사드 로드 소재)로부터 구매하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해, 점도 3.4-4.6 mPa · s)는 EMD 케미칼 인코포레이션 (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480)에서, 제품 코드 1.41350으로 구입하였다. 둘베코 포스페이트 완충 식염수 1X (DPBS)는 제품 코드 17-512Q로 론자 (스위스

CH-4002 바젤, 묀첸스타이너스트라쎄 38 소재)로부터 구매하였다. 소르비탄 모노팔미테이트는 제품 코드 SPAN 40으로 크로다 인터내셔널 (뉴저지 08837, 에디슨, 300-A 콜로부스 서클 소재)로부터 구매하였다. 폴리소르베이트 80은 제품 코드 폴리소르베이트80 (HX2)으로 NOF 미국 코포레이션 ((뉴욕 10601, 슈트 912 화이트 플레인, 원 노쓰 브로드웨이 소재)으로부터 구매하였다. 소르비탄 모노라우레이트 (SPAN 20)는 제품 코드 L12099로 알파 아에사르(Alfa Aesar) (매사추세츠 01835, 26 파크리지 Rd 와드 힐 소재)로부터 구매하였다. 소르비탄 스테아레이트 (SPAN 60)는 제품 코드 S7010으로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다. 소르비탄 모노올레에이트 (SPAN 80)는 제품 코드 S0060으로 토쿄 케미칼 인더스트리 코포레이션 리미티드(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (오리건 97203, 9211 노스 하버게이트 스트리트 포틀랜드 소재)로부터 구매하였다. 옥틸 β-D-글루코피라노시드는 제품 코드 O8001로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다. 올레일 알콜은 제품 코드 A18018로 알파 아에사르 (매사추세츠 01835, 26 파크리지 Rd 와드 힐 소재)로부터 구매하였다. 이소프로필 팔미테이트는 제품 코드 W515604로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다. 폴리에틸렌 글리콜 헥사데실 에테르 (BRIJ 52)는 제품 코드 388831로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다. 폴리에틸렌 글리콜 올레일 에테르 (BRIJ 93)는 제품 코드 388866으로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다. 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜) (플루로닉 L-31)은 제품 코드 435406으로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다. 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜) (플루로닉 P-123)은 제품 코드 435465로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다. 팔미트산은 제품 코드 P0500으로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다. DL-α-팔미틴은 제품 코드 M1640으로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다. 글리세릴 트리팔미테이트는 제품 코드 T5888로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다.

[0172] 샘플 11의 경우, 하기와 같이 용액을 제조하였다:

[0173] 용액 1: 디클로로메탄 중에 75 mg/mL의 PLA, 25 mg/mL의 PLA-PEG-Ome 및 16 mg/mL의 라파마이신을 용해시킴으로써, 중합체 및 라파마이신 혼합물을 제조하였다. 용액 2: 디클로로메탄 중에 폴리소르베이트80 80 mg/mL를 용해시킴으로써, 폴리소르베이트80 혼합물을 제조하였다. 용액 3: 폴리비닐 알콜을 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중에서 50 mg/mL로 제조한다.

[0174] 소형 유리 압력 튜브에서 용액 1 (0.5 mL), 용액 2 (0.1 mL), 디클로로메탄 (0.4 mL) 및 용액 3 (3.0 mL)을 합함으로써 O/W 에멀젼을 제조하고, 10초 동안 볼텍싱 혼합한 다음, 브란슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 압력 튜브를 얼음 수조에 침지시킨 상태로 1분 동안 30 % 진폭으로 초음파처리하였다. 다음에, 에멀젼을 DPBS (30 mL)를 함유한 50 mL 비커에 첨가하였다. 상기와 동일한 물질 및 방법을 사용하여 제2 O/W 에멀젼을 제조한 다음, 제1 에멀젼 및 DPBS를 함유한 동일한 용기에 첨가하였다. 다음에, 실온에서 이를 2시간 동안 교반함으로써, 디클로로메탄이 증발되고 나노담체가 형성되도록 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨, 75,600xg 및 4℃로 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, 0.25 % w/v PVA를 함유하는 DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 나노담체의 부분을 세척하였다. 상기 세척 절차를 반복한 다음, 0.25 % w/v PVA를 함유하는 DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 다음에, 0.22 ㎛ PES 멤브레인 주사기 필터 (밀리포어 부품 번호 SLGP033RB)를 사용하여 나노담체 현탁액을 여과하였다. 다음에, 여과된 나노담체 현탁액을 -20℃로 저장하였다.

[0175] 샘플 12-25의 경우, 하기와 같이 용액을 제조하였다:

[0176] 용액 1: 디클로로메탄 중에 PLA 75 mg/mL, PLA-PEG-Ome 25 mg/mL 및 라파마이신 16 mg/mL를 용해시킴으로써, 중합체 및 라파마이신 혼합물을 제조하였다. 용액 2: 디클로로메탄 중에 HLB 계면활성제 5.0 mg/mL를 용해시킴으로써, HLB 혼합물을 제조하였다. HLB 계면활성제에는 SPAN 20, SPAN 40, SPAN 60, SPAN 80, 옥틸 β-D-글루코피라노시드, 올레일산, 이소프로필 팔미테이트, BRIJ 52, BRIJ 93, 플루로닉 L-31, 플루로닉 P-123, 팔미트산, DL-α-팔미틴, 및 글리세릴 트리팔미테이트가 포함되었다. 용액 3: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중에 62.5 mg/mL로 폴리비닐 알콜을 제조하였다.

[0177] 소형 유리 압력 튜브에서 용액 1 (0.5 mL), 용액 2 (0.5 mL) 및 용액 3 (3.0 mL)을 합함으로써 O/W 에멀젼을 제조하고, 10초 동안 볼텍싱 혼합한 다음, 브란슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 압력 튜브를 얼음 수조에

침지시킨 상태로 1분 동안 30 % 진폭으로 초음파처리하였다. 다음에, 에멀젼을 DPBS (30 mL)가 들어 있는 50 mL 비커에 첨가하였다. 상기와 동일한 물질 및 방법을 사용하여 제2 O/W 에멀젼을 제조한 다음, 제1 에멀젼 및 DPBS가 들어 있는 동일한 비커에 첨가하였다. 다음에, 실온에서 이를 2시간 동안 교반함으로써, 디클로로메탄이 증발되고 나노담체가 형성되도록 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨, 75,600xg 및 4℃로 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, 0.25 % w/v PVA를 함유하는 DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 나노담체의 부분을 세척하였다. 상기 세척 절차를 반복한 다음, 0.25 % w/v PVA를 함유하는 DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 다음에, 0.22 ㎛ PES 멤브레인 주사기 필터 (밀리포어 부품 번호 SLGP033RB)를 사용하여 나노담체 현탁액을 여과하였다. 다음에, 여과된 나노담체 현탁액을 -20℃로 저장하였다.

샘플	유기상 계면활성제	계면활성제의 HLB	크기 (nm)	여과	필터 번호	계산치 g NP/m²	수율 (%)	라파마이신 로드 (%)
11	폴리소르베이트 80	15	184	밀렉스 0.22 μm	>1	22	91	9.7
12	SPAN 20	8.6	148	밀렉스 0.22 μm	1	>144	71	11.2
13	SPAN 40	6.7	149	밀렉스 0.22 μm	1	>154	77	11.2
14	SPAN 60	4.7	151	밀렉스 0.22 μm	1	>154	77	11.0
15	SPAN 80	4.3	144	밀렉스 0.22 μm	1	>169	85	11.1
16	옥틸 β-D-글루코피라노시드	12	127	밀렉스 0.22 μm	3	47	64	6.7
17	올레일 알콜	1.3	165	밀렉스 0.22 μm	1	>157	78	12.5
18	이소프로필 팔미테이트	2.9	171	밀렉스 0.22 μm	1	>144	71	10.9
19	브리즈 52	5	182	밀렉스 0.22 μm	1	>138	77	11.2
20	브리즈 93	4	174	밀렉스 0.22 μm	1	>158	79	11.9
21	플루로닉 L-31	1-7	169	밀렉스 0.22 μm	4	31	70	8.5
22	플루로닉 P-123	7-9	162	밀렉스 0.22 μm	1	>145	72	10.7
23	팔미트산	3.2	132	밀렉스 0.22 μm	1	>141	71	1.0
24	DL-α-팔미틴	7.2	153	밀렉스 0.22 μm	3	51	68	7.4
25	글리세릴 트리팔미테이트	4.3	168	밀렉스 0.22 μm	1	>146	73	10.0

[0178]

[0179] 공중 이용가능한 정보를 사용하여 저HLB 계면활성제들 대부분의 HLB를 결정하였다. DL-α-팔미틴의 경우, HLB는 하기 식을 이용하여 계산하였다: Mw = 330.5 g/mol, 친수성 부분 = 119.0 g/mol; HLB = 119.0 / 330.5 * 100 / 5 = 7.2. 글리세릴 팔미테이트의 경우, HLB는 하기 식을 이용하여 계산하였다: Mw = 807.3 g/mol, 친수성 부분 = 173.0 g/mol; HLB = 173.0 / 807.3 * 100 / 5 = 4.3. 이소프로필 팔미테이트의 경우, HLB는 하기 식을 이용하여 계산하였다: Mw = 298.5 g/mol, 친수성 부분 = 44.0 g/mol; HLB = 44.0 / 298.5 * 100 / 5 = 2.9. 올레일 알콜의 경우, HLB는 하기 식을 이용하여 계산하였다: Mw = 268.5 g/mol, 친수성 부분 =17.0 g/mol; HLB = 17.0 / 268.5 * 100 / 5 = 1.3. 또한, 추출 후 이어지는 HPLC법에 의한 정량에 의해, 저HLB 계면활성제의 로딩량을 측정하였다.

[0180] 실시예 9 - 합성 나노담체 여과성에 대한 저HLB 계면활성제의 효과

[0181] 물질 및 방법

[0182] 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.50 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE로 에보니크 인더스트리즈 (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 45128 소재)로부터 구매하였다. 0.41 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLA는 제품 코드 100 DL 4A로 에보니크 인더스트리즈 (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 45128 소재)로부터 구매하였다. 라파마이신은 제품 코드 시롤리무스로

콩코드 바이오테크 리미티드 (인도 아흐메다바드, 돌카 382225, 1482-1486 트라사드 로드 소재)로부터 구매하였다. 제품 코드 시롤리무스. 소르비탄 모노팔미테이트는 제품 코드 SPAN 40으로 크로다 (델라웨어 19720, 315 체리 레인 뉴 캐슬 소재)로부터 구매하였다. 디클로로메탄은 부품 번호 M1266으로 스펙트럼(Spectrum) 90248-2027, 14422 S 산 페드로 가르데나 CA 소재)로부터 구매하였다. 부품 번호 M1266. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa·s)는 EMD 케미칼 인코포레이션 (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480)에서, 제품 코드 1.41350으로 구입하였다. 칼슘 및 마그네슘이 없는 둘베코 포스페이트 완충 식염수 1X 0.0095 M (PO4)는 부품 번호 #12001 제품 코드 론자 DPBS로 바이오휘태커 (BioWhittaker) (일리노이 61547, 8316 웨스트 루트 24 메이플턴 소재)로부터 구매하였다. 에멀젼화는 1/8" 테이퍼드 팁 티타늄 프로브가 구비된 브란슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 수행하였다.

[0183] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0184] 용액 1: 디클로로메탄 중에 50 mg/mL의 PLA-PEG-OMe (100 DL mPEG 5000 5CE) 및 150 mg/mL의 PLA (100 DL 4A)를 용해시킴으로써, 중합체 혼합물을 제조하였다. 용액 2: 디클로로메탄 중에 160 mg/mL로 라파마이신을 용해시켰다. 용액 5: 디클로로메탄 중에 50 mg/mL로 소르비탄 모노팔미테이트 (SPAN 40)를 용해시켰다. 용액 6: 0.2 ㎛ PTFE 멤브레인 주사기 필터 (VWR 부28145-491)를 사용하여 디클로로메탄을 멸균 여과하였다. 용액 7: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중에 75 mg/mL로 폴리비닐 알콜 (엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88)을 용해시킴으로써, 폴리비닐 알콜 용액을 제조하였다. 용액 8: 둘베코 포스페이트 완충 식염수 1X, 0.0095 M (PO4) (론자 DPBS) 중에 2.5 mg/mL로 폴리비닐 알콜 (엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88)을 용해시킴으로써, 폴리비닐 알콜 및 둘베코 포스페이트 완충 식염수, 1X, 0.0095 M (PO4) 혼합물을 제조하였다.

[0185] 샘플 26의 경우, 소형 유리 압력 튜브에서 용액 1 (0.5 mL), 용액 2 (0.1 mL), 용액 5 (0.1 mL) 및 용액 6 (0.30 mL)을 합함으로써, O/W 에멀젼을 제조하였다. 반복적인 피펫팅에 의해 용액을 혼합하였다. 다음에, 용액 7 (3.0 mL)을 첨가하고, 제제를 10초 동안 볼텍싱 혼합하였다. 다음에, 압력 튜브를 얼음 조에 침지시킨 상태로 1분 동안 30 % 진폭으로 제제를 초음파처리하였다. 다음에, 론자 DPBS (30 mL)를 함유한 개방 50 mL 비커에 에멀젼을 첨가하였다. 다음에, 실온에서 이를 2시간 동안 교반함으로써, 디클로로메탄이 증발되고 나노담체가 형성되도록 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨, 75,600xg 및 4℃로 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, 용액 8에 펠릿을 재-현탁함으로써, 나노담체의 부분을 세척하였다. 상기 세척 절차를 반복한 다음, 용액 8에 펠릿을 재-현탁함으로써, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 0.22 ㎛ PES 멤브레인 주사기 필터 (밀렉스 부품 번호 SLGP033RS)를 사용하여 나노담체 제제를 여과하였다. 나노담체 용액 필터 처리량 질량을 측정하였다. 다음에, 여과된 나노담체 용액을 -20℃로 저장하였다.

[0186] 샘플 27의 경우, 소형 유리 압력 튜브에서 용액 1 (0.5 mL), 용액 2 (0.1 mL) 및 용액 6 (0.40 mL)을 합함으로써, O/W 에멀젼을 제조하였다. 반복적인 피펫팅에 의해 용액을 혼합하였다. 다음에, 용액 7 (3.0 mL)을 첨가하고, 제제를 10초 동안 볼텍싱 혼합하였다. 다음에, 압력 튜브를 얼음 조에 침지시킨 상태로 1분 동안 30 % 진폭으로 제제를 초음파처리하였다. 다음에, 론자 DPBS (30 mL)를 함유한 개방 50 mL 비커에 에멀젼을 첨가하였다. 다음에, 실온에서 이를 2시간 동안 교반함으로써, 디클로로메탄이 증발되고 나노담체가 형성되도록 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨, 75,600xg 및 4℃로 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, 용액 8에 펠릿을 재-현탁함으로써, 나노담체의 부분을 세척하였다. 상기 세척 절차를 반복한 다음, 용액 8에 펠릿을 재-현탁함으로써, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 0.22 ㎛ PES 리포솜 주사기 필터 (밀렉스 부품 번호 SLGP033RS)를 사용하여 나노담체 제제를 여과하였다. 나노담체 용액 필터 처리량 질량을 측정하였다. 다음에, 여과된 나노담체 용액을 -20℃로 저장하였다.

[0187] 나노담체 크기를 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다. 여과성은 제1 필터를 통과하는 여과액의 양으로 평가하였다.

[0188] 데이터는 라파마이신에 대해, 합성 나노담체에의 SPAN 40의 도입이 합성 나노담체 조성물의 여과성 증가로 이어졌다는 것을 보여준다.

[0189]

나노담체 ID	라파마이신	저 HLB 계면활성제	유효 직경 (nm)	라파마이신 함량 (% w/w)	나노담체 수율 (%)	0.22μm 필터 처리량 (g/m^2)
26	라파마이신	SPAN 40	179	17.19	80	98
27	라파마이신	없음	226	17.56	75	10

[0190] 실시예 10 - SPAN 40은 폴리에스테르 중합체를 포함하는 합성 나노담체의 여과성을 크게 증가시킨다

[0191] 물질 및 방법

[0192] 0.41 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLA (100 DL 4A)는 제품 코드 100 DL 4A로 에보니크 인더스트리즈 AG (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 소재)로부터 구매하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.50 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE로 에보니크 인더스트리즈 AG (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 소재)로부터 구매하였다. 라파마이신은 제품 코드 시롤리무스로 콩코드 바이오테크 리미티드 (인도 아흐메다바드, 돌카 382225, 1482-1486 트라사드 로드 소재)로부터 구매하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88 (PVA), USP (85-89 % 가수분해, 3.4-4.6 mPa·s의 점도)는 제품 코드 1.41350으로 EMD 케미칼 인코포레이션 (뉴저지 08027, 480 사우스 데모크라트 로드 깁스타운 소재)으로부터 구매하였다. 둘베코 포스페이트 완충 식염수 1X (DPBS)는 제품 코드 17-512Q로 론자 (스위스 CH-4002 바젤, 뮌첸스타이너스트라쎄 38 소재)로부터 구매하였다. 소르비탄 모노팔미테이트 (SPAN 40)는 제품 코드 SPAN 40으로 크로다 인터내셔널 (뉴저지 08837, 에디슨, 300-A 콜로부스 서클 소재)로부터 구매하였다. 대략 54 wt%의 락티드 및 46 wt%의 글리콜리드를 포함하며, 0.24 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA (5050 DLG 2.5A)는 제품 코드 5050 DLG 2.5A로 에보니크 인더스트리즈 AG (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 소재)로부터 구매하였다. 대략 73 wt%의 락티드 및 27 wt%의 글리콜리드를 포함하며, 0.39 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLGA (7525 DLG 4A)는 제품 코드 7525 DLG 4A로 에보니크 인더스트리즈 AG (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 소재)로부터 구매하였다. 평균 Mw 14,000 Da 및 10,000 Da의 Mn을 갖는 폴리카프로락톤 (PCL)은 제품 코드 440752로 시그마-알드리치 (미주리 63103, 세인트루이스, 3050 스프루스 St. 소재)로부터 구매하였다.

[0193] 샘플 1, 3, 5 및 7의 경우, 하기와 같이 용액을 제조하였다:

[0194] 용액 1: 디클로로메탄 중에 50 mg/mL의 PLA-PEG-Ome, 10 mg/mL의 Span 40 및 32 mg/mL의 라파마이신을 용해시켰다. 용액 2: 디클로로메탄 중에 150 mg/mL로 100 DL 4A를 용해시켰다. 용액 3: 디클로로메탄 중에 150 mg/mL로 5050 DLG 2.5A를 용해시켰다. 용액 4: 디클로로메탄 중에 150 mg/mL로 7525 DLG 4A를 용해시켰다. 용액 5: 디클로로메탄 중에 150 mg/mL로 PCL을 용해시켰다. 용액 6: PVA는 100 mM pH 8 포스페이트 완충제에서 75 mg/mL로 제조되었다.

[0195] 용액 1 (0.5 mL)을 두꺼운 벽체의 유리 압력 튜브로 옮김으로써, O/W 에멀젼을 제조하였다. 여기에, 로트 1은 용액 2 (0.5 mL)를 첨가하고, 로트 3은 용액 3 (0.5 mL)을 첨가하고, 로트 5는 4 (0.5 mL)를 첨가하고, 로트 7은 용액 5 (0.5 mL)를 첨가하였다. 다음에, 반복적인 피펫팅에 의해 2종의 용액을 혼합하였다. 다음에, 용액 6 (3.0 mL)을 첨가하고, 튜브를 10초 동안 볼텍싱 혼합한 다음, 브란슨 디지털 소니파이어 250을 사용한 압력 튜브를 얼음 수조에 침지시킨 상태로 1분 동안 30 % 진폭으로의 초음파처리에 의해 에멀젼화하였다. 다음에, 에멀젼을 DPBS (30 mL)를 함유한 50 mL 비커에 첨가하였다. 다음에, 실온에서 이를 2시간 동안 교반함으로써, 디클로로메탄이 증발되고 나노담체가 형성되도록 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨, 75,600xg으로 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 나노담체의 부분을 세척하였다. 상기 세척 절차를 반복한 다음, DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 0.22 ㎛ PES 멤브레인 주사기 필터 (밀리포어 부품 번호 SLGP033RB), 및 필요시: 0.45 μm PES 막 시린지 필터 (PALL 부품 번호 4614) 및/또는 1.2 μm PES 막 시린지 필터 (PALL 부품 번호 4656)를 사용하여 나노담체 현탁액을 여과하였다. 다음에, 여과된 나노담체 현탁액을 -20℃로 저장하였다.

[0196] 나노담체 크기를 동적 광 산란에 의해 결정하였다. 나노담체 내의 라파마이신의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다. 여과성은 제1 멸균 0.22 ㎛ 필터의 유통물 중량을 수율과 비교하여 필터가 막히기 전에 통과된 나노담체의 실제 질량 또는 제1 및 유일 필터를 통과한 총량을 측정하는 것에 의해 결정하였다. 현탁액 mL당 총 건조-나노담체 질량은 중량측정 방법에 의해 결정하였다.

[0197] 샘플 2, 4, 6 및 8의 경우, 하기와 같이 용액을 제조하였다:

[0198] 용액 1: 디클로로메탄 중에 50 mg/mL의 PLA-PEG-Ome 및 32 mg/mL의 라파마이신을 용해시킴으로써, 중합체 및 라파마이신 혼합물을 제조하였다. 용액 2: 디클로로메탄 중에 150 mg/mL로 100 DL 4A를 용해시켰다. 용액 3: 디클로로메탄 중에 150 mg/mL로 5050 DLG 2.5A를 용해시켰다. 용액 4: 디클로로메탄 중에 150 mg/mL로 7525 DLG 4A를 용해시켰다. 용액 5: 디클로로메탄 중에 150 mg/mL로 PCL을 용해시켰다. 용액 6: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중에 75 mg/mL로 폴리비닐 알콜을 제조하였다.

[0199] 용액 1 (0.5 mL)을 두꺼운 벽체의 유리 압력 튜브로 옮김으로써, O/W 에멀젼을 제조하였다. 여기에, 로트 2는 용액 2 (0.5 mL)를 첨가하고, 로트 4는 용액 3 (0.5 mL)을 첨가하고, 로트 6은 4 (0.5 mL)를 첨가하고, 및 로트 8은 용액 5 (0.5 mL)를 첨가하였다. 반복적인 피펫팅에 의해 2종의 용액을 이어서 혼합하였다. PVA 용액의 첨가, 세척, 여과 및 저장은 상기한 바와 동일하다.

[0200] 나노담체 크기는 상기한 바와 동일하게 평가하였다.

[0201] 결과는 합성 나노담체에 SPAN 40를 포함함으로써 폴리에스테르 중합체를 포함하는 합성 나노담체의 여과성에서의 상당한 증가를 보여준다.

[0202]

로트 번호	코어 중합체	부형제	크기 (nm)	필터 처리량 (g NP/m²)	Rapa 로드 (%)	NP 수율 (%)
1	100 DL 4A	SPAN 40	160	>148	12.65	75
2	100 DL 4A	없음	197	17	10.88	71
3	5050 DLG 2.5A	SPAN 40	153	>139	13.09	70
4	5050 DLG 2.5A	없음	188	59	13.40	64
5	7525 DLG 4A	SPAN 40	164	>158	11.81	78
6	7525 DLG 4A	없음	196	28	11.64	73
7	폴리카프로락톤	SPAN 40	164	112	10.62	75
8	폴리카프로락톤	없음	173	52	10.29	78

[0203] 실시예 11 - SPAN 40은 라파마이신의 여과성을 증가시킨다

[0204] 물질 및 방법

[0205] 0.41 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLA는 제품 코드 100 DL 4A로 에보니크 인더스트리즈 AG (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 소재)로부터 구매하였다. 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.50 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE로 에보니크 인더스트리즈 AG (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 소재)로부터 구매하였다. 라파마이신은 제품 코드 시롤리무스로 콩코드 바이오테크 리미티드 (인도 아흐메다바드, 돌카 382225, 1482-1486 트라사드 로드 소재)로부터 구매하였다. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88, USP (85-89% 가수분해됨, 점도 3.4-4.6 mPa·s)는 EMD 케미칼 인코포레이션 (08027 뉴저지주 깁스타운 사우스 데모크라트 로드 480)에서, 제품 코드 1.41350으로 구입하였다. 둘베코 포스페이트 완충 식염수 1X (DPBS)는 제품 코드 17-512Q로 론자 (스위스 CH-4002 바젤, 뮌첸스타이너스트라쎄 38 소재)로부터 구매하였다. 소르비탄 모노팔미테이트는 제품 코드 SPAN 40으로 크로다 인터내셔널 (뉴저지 08837, 에디슨, 300-A 콜로부스 서클 소재)로부터 구매하였다.

[0206] 용액을 다음과 같이 제조하였다. 용액 1: PLA 150 mg/mL 및 PLA-PEG-Ome 50 mg/mL를 용해시킴으로써, 중합체 및 라파마이신 혼합물을 제조하였다. 용액 2: 디클로로메탄 중에 100 mg/mL로 라파마이신 용액을 제조하였다. 용액 6: 디클로로메탄 중에 SPAN 40 50 mg/mL를 용해시킴으로써, 소르비탄 모노팔미테이트 용액을 제조하였다. 용액 7: 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중에 75 mg/mL로 폴리비닐 알콜을 제조하였다.

[0207] 용액 1 (0.5mL)을 두꺼운 벽체의 압력 튜브에 첨가함으로써, O/W 에멀젼을 제조하였다. 로트 1의 경우, 이를 용액 6 (0.1 mL) 및 디클로로메탄 (0.28 mL)과 합하였다. 다음에, 로트 1은 이를 용액 2 (0.12 mL)와 합하였다. 유사한 방식으로, 로트 2를 디클로로메탄 (0.38 mL)과 합한 다음, 로트 2를 용액 2 (0.12 mL)와 합하였다. 이에 따라, 각 개별 로트에 있어서, 유기 상의 총 부피는 1 mL이었다. 반복적인 피펫팅에 의해 조합된 유기 상 용액을 혼합하였다. 다음에, 용액 7 (3.0 mL)을 첨가하고, 압력 튜브를 10초 동안 볼텍싱 혼합한 다음, 브란슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 압력 튜브를 얼음 수조에 침지시킨 상태로 1분 동안 30 % 진폭으로 초음파처

리하였다. 다음에, 에멀젼을 DPBS (30 mL)을 함유한 50 mL 비커에 첨가하였다. 다음에, 실온에서 이를 2시간 동안 교반함으로써, 디클로로메탄이 빠르게 증발되어 나노담체가 형성되도록 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨, 75,600xg 및 4℃로 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, 0.25 % w/v PVA를 함유하는 DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 나노담체의 부분을 세척하였다. 상기 세척 절차를 반복한 다음, 0.25 % w/v PVA를 함유하는 DPBS 중에 펠릿을 재-현탁함으로써, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 이어서, 0.22 ㎛ PES 멤브레인 주사기 필터 (밀리포어 부품 번호 SLGP033RB)를 사용하여 나노담체 현탁액을 여과하였다. 이어서, 여과된 나노담체 현탁액을 -20℃로 저장하였다.

[0208] 결과는 합성 나노담체에의 SPAN 40의 도입이 라파마이신의 여과성을 증가시켰다는 것을 보여준다.

로트 번호	라파마이신	저 HLB 계면활성제	필터 처리량 계산치 (g NP/m2)	크기 (nm)	수율 (%)	라파마이신 로드 (%)
1	라파마이신	SPAN 40	>117	163	60	10.41
2	라파마이신	없음	21	189	58	11.38

[0209]

[0210] 실시예 12 - 라파마이신 로딩량 및 합성 나노담체 여과성에 대한 성분량의 효과 제시

[0211] 물질 및 방법

[0212] 대략 5,000 Da의 메틸 에테르 종결 PEG 블록 및 0.50 DL/g의 전체 고유 점도를 갖는 PLA-PEG-OMe 블록 공-중합체는 제품 코드 100 DL mPEG 5000 5CE로 에보니크 인더스트리즈 (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 45128 소재)로부터 구매하였다. 0.41 dL/g의 고유 점도를 갖는 PLA는 제품 코드 100 DL 4A로 에보니크 인더스트리즈 (독일 에쎈, 렐링하우저 스트라쎄 1-11 45128 소재)로부터 구매하였다. 라파마이신은 제품 코드 시롤리무스로 콩코드 바이오테크 리미티드 (인도 아흐메다바드, 돌카 382225, 1482-1486 트라사드 로드 소재)로부터 구매하였다. 제품 코드 시롤리무스. 소르비탄 모노팔미테이트는 제품 코드 SPAN 40으로 크로다 (델라웨어 19720, 315 체리 레인 뉴 캐슬 소재)로부터 구매하였다. 디클로로메탄은 부품 번호 M1266으로 스펙트럼 (90248-2027, 14422 S 산 페드로 가르데나 CA 소재)으로부터 구매하였다. 파트 번호 M1266. 엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88 (PVA), USP (85-89 % 가수분해, 3.4-4.6 mPa·s의 점도)는 제품 코드 1.41350으로 EMD 케미칼 인코포레이션 (뉴저지 08027, 480 사우스 데모크라트 로드 깁스타운 소재)으로부터 구매하였다. 칼슘 및 마그네슘이 없는 둘베코 포스페이트 완충 식염수 (DPBS) 1X 0.0095 M (PO4)는 부품 번호 #12001 제품 코드 론자 DPBS로 바이오휘태커 (일리노이 61547, 8316 웨스트 루트 24 메이플턴 소재)로부터 구매하였다. 에멀젼화는 1/8" 테이퍼드 팁 티타늄 프로브가 구비된 브란슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 수행하였다.

[0213] 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0214] 중합체 용액: PLA-PEG-OMe (100 DL mPEG 5000 5CE) 및 PLA (100 DL 4A)를 디클로로메탄 중에 1:3의 PLA-PEG 대 PLA 비로 표시된 mg/mL로 용해시킴으로써, 중합체 혼합물을 제조하였다. 라파마이신 용액: 라파마이신을 디클로로메탄 중에 표시된 1 mL 당 mg으로 용해시켰다. SPAN 40 용액: 소르비탄 모노팔미테이트 (SPAN 40)를 디클로로메탄 중에 표시된 mg/mL로 용해시켰다. CH_2Cl_2 용액: 0.2 ㎛ PTFE 멤브레인 주사기 필터 (VWR 부품 번호 28145-491)를 사용하여 디클로로메탄 (CH_2Cl_2)을 멸균 여과하였다. PVA 용액: 폴리비닐 알콜 (엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88)을 100 mM pH 8 포스페이트 완충제 중에 표시된 1 mL 당 mg으로 용해시킴으로써, 폴리비닐 알콜 용액을 제조하였다. DPBS PVA 용액: 폴리비닐 알콜 (엠프로브® 폴리비닐 알콜 4-88)을 둘베코 포스페이트 완충 식염수 1X, 0.0095 M (PO4) (론자 DPBS) 중에 2.5 mg/mL로 용해시킴으로써, 폴리비닐 알콜 및 둘베코 포스페이트 완충 식염수, 1X, 0.0095 M (PO4) 혼합물을 제조하였다.

[0215] 두꺼운 벽체의 유리 압력 튜브에서 중합체 용액, 라파마이신 용액, SPAN 40 용액 및/또는 CH_2Cl_2 용액 (총 부피 1-2 mL)을 합함으로써, O/W 에멀젼을 제조하였다. 반복적인 피펫팅에 의해 용액을 혼합하였다. 다음에, PVA 용액 (3 내지 6 mL)을 첨가하였다 (1 mL의 유기 상 및 3 mL의 수성 PVA 용액을 포함하는 단일 에멀젼, 또는 하나씩 차례로 제조된 2개의 단일 에멀젼 중 어느 하나로). 제제를 10초 동안 볼텍싱 혼합한 다음, 압력 튜브를 얼음 조에 침지시킨 상태로 30 % 진폭으로 1분 동안 초음파처리하였다. 다음에, 론자 DPBS (30 mL)를 함유한 개방 50 mL 비커에 에멀젼을 첨가하였다. 다음에, 실온에서 이를 2시간 동안 교반함으로써, 디클로로메탄이 증발되고 나노담체가 형성되도록 하였다. 나노담체 현탁액을 원심분리 튜브로 옮겨, 75,600xg 및 4℃로 50분 동안 원심분리하고, 상청액을 제거한 후, DPBS PVA 용액에 펠릿을 재-현탁함으로써, 나노담체의 부분을 세척하였

다. 상기 세척 절차를 반복한 다음, DPBS PVA 용액에 펠릿을 재-현탁함으로써, 중합체 기준 10 mg/mL의 공칭 농도를 갖는 나노담체 현탁액을 달성하였다. 0.22 ㎛ PES 멤브레인 주사기 필터 (밀렉스 부품 번호 SLGP033RS)를 사용하여 나노담체 제제를 여과하였다. 나노담체 용액 필터 처리량 질량을 측정하였다. 다음에, 여과된 나노담체 용액을 -20℃로 저장하였다.

[0216] 여과성은 밀리포어, 부품 번호 SLGP033RB인 하나의 33 ㎜ PES 멤브레인 0.22 ㎛ 주사기 필터를 통과하는 나노담체 측정치의 g/필터 멤브레인 표면적 m^2로 제시된다.

[0217] 결과는 생체내에서 효과적일 것으로 예상되는 양의 라파마이신을 함유하는 초기 멸균 여과가능한 합성 나노담체를 제공할 수 있는 수많은 합성 나노담체에서의 다양한 성분들의 양을 보여준다.

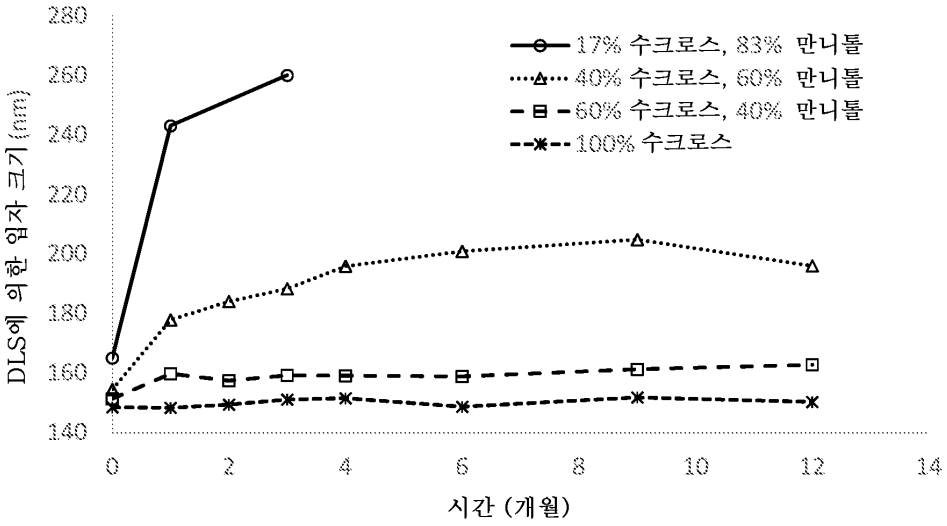
[0218]

로트#	중합체 (mg/mL)	SPAN 40 (mg/mL)	라파마이신 (mg/mL)	PVA (mg/mL)	크기 (nm)	여과성 (g NP/m^2)	수율	wt% HLB/Rapa	wt% HLB/중합체
1[a]	50	0	8	62.5	135	52	70.7	0.00	0.00
2[a]	50	0.1	8	62.5	135	26	68.6	1.23	0.20
3[a]	50	0.25	8	62.5	148	27	70.9	3.03	0.50
4[a]	50	0.5	8	62.5	166	146	73.2	5.88	0.99
5[a]	50	1	8	62.5	147	151	75.7	11.11	1.96
6[a]	50	1.5	8	62.5	161	146	72.2	15.79	2.91
7[a]	50	2.5	8	62.5	149	176	85.0	23.81	4.76
8[a]	50	2.5	8	50	182	209	103.5	23.81	4.76
9[a]	50	2.5	8	75	132	155	76.7	23.81	4.76
10[a]	50	3	8	62.5	143	140	69.4	27.27	5.66
11[a]	62.5	3	8	62.5	151	205	80.9	27.27	4.58
12[a]	37.5	3	8	62.5	139	203	60.9	27.27	7.41
13[a]	50	4.5	8	62.5	149	149	73.6	36.00	8.26
14[a]	50	5	6.66	50	148	193	94.4	42.88	9.09
15[a]	50	5	8.33	50	176	176	86.2	37.48	9.09
16[a]	50	10	8	50	173	38	66.1	55.56	16.67
17	100	10	11.32	75	153	178	88.2	46.90	9.09
18	100	10	14.16	75	160	200	98.9	41.39	9.09
19	100	10	17	75	177	182	101.0	37.04	9.09
20	100	7.5	24	75	188	125	70.4	23.81	6.98
21	75	11.25	30	75	197	17	82.5	27.27	13.04
22	100	15	32	75	201	17	108.1	31.91	13.04
23	100	15	40	75	217	9	82.6	27.27	13.04
24	100	15	40	75	193	14	116.5	27.27	13.04

[0219] [a]이 제제는 2 mL 유기 상, 6 mL PVA 용액과 함께 제조되었다.

도면

도면1


280
260
240
220
200
180
160
140
DLS에 의한 입자 크기 (nm)
0
2
4
6
8
10
12
14
시간 (개월)
17% 수크로스, 83% 만니톨
40% 수크로스, 60% 만니톨
60% 수크로스, 40% 만니톨
100% 수크로스