



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0026571
(43) 공개일자 2018년03월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01) A61K 47/58 (2017.01)
A61K 47/59 (2017.01) A61K 47/60 (2017.01)
A61K 47/64 (2017.01) A61K 47/69 (2017.01)
A61K 9/51 (2006.01) B82Y 5/00 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/39 (2013.01)
A61K 39/385 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7006036(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년05월26일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2011-7030991
원출원일자(국제) 2010년05월26일
심사청구일자 2015년05월26일
(85) 번역문제출일자 2018년02월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/001560
(87) 국제공개번호 WO 2010/138193
국제공개일자 2010년12월02일
(30) 우선권주장
61/217,129 2009년05월27일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
셀렉타 바이오사이언시즈, 인크.
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 빌딩 원 아스
날 스트리트 480
(72) 발명자
제프, 찰스
미국 01037 매사추세츠주 하드워 피.오. 박스 347
노스 로드 940
가오, 윤
미국 01772 매사추세츠주 사우스보로 데이비스 로
드 7
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

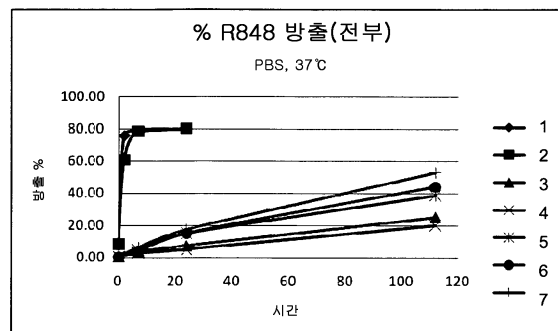
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 면역조절제를 pH 감응성으로 방출하는 표적화된 합성 나노운반체

(57) 요약

본 발명은 세포, 예컨대 항원제시 세포(APC)의 작용 부위를 표적으로 삼고, pH 감응식으로 합성 나노운반체로부터 분리되는 면역조절제를 포함하는 합성 나노운반체의 조성물 및 관련 방법에 관한 것이다. 또한 pH 감응식으로 합성 나노운반체로부터 분리되는 불안정성 면역조절제를 캡슐화하는 합성 나노운반체에 관한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/58 (2017.08)
A61K 47/59 (2017.08)
A61K 47/593 (2017.08)
A61K 47/60 (2017.08)
A61K 47/64 (2017.08)
A61K 47/6925 (2017.08)
A61K 9/5138 (2013.01)
A61K 2039/62 (2013.01)
B82Y 5/00 (2013.01)

(72) 발명자

키간, 마크, 제이.

미국 01450 매사추세츠주 그로튼 노스우즈 로드 137

발드윈, 샘

미국 01886 매사추세츠주 웨스트포드 알메리아 서클 12

푸, 펜-니

미국 01532 매사추세츠주 노스보로 버크힐 로드 2

존스톤, 로이드

미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 오클리 로드 24

립포드, 그레이슨, 비.

미국 02472 매사추세츠주 워터타운 그렌빌 로드 45

(30) 우선권주장

61/217,116	2009년05월27일	미국(US)
61/217,117	2009년05월27일	미국(US)
61/217,124	2009년05월27일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 미국 특허법 35 U.S.C. § 119에 따라 2009년 5월 27일에 출원된 미국 가출원 제61/217,129호, 제61/217,117호, 제61/217,124호 및 제61/217,116호를 우선권 주장하며, 이들 가출원 각각의 내용은 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 출원은 세포, 예컨대 항원제시 세포(APC)의 작용 부위를 표적화하고, pH에 감응성인 방식으로 합성 나노운반체로부터 분리되는 면역조절제를 포함하는 합성 나노운반체의 조성물 및 관련 방법에 관한 것이다. 추가적으로 본 발명은 합성 나노운반체의 캡슐화(encapsulation)에 의한 불안정성 면역조절제의 보호에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 면역조절제는 대상체의 면역 반응을 일으키는데 사용된다. 선천 면역 또는 후천 면역, 또는 이들 둘다의 자극을 포함하는 면역 시스템의 자극은 숙주에게 방어적인 또는 불리한 생리적 결과를 유발할 수 있는 복잡한 현상이다. 근래에, 후천 면역을 개시하고 지지하는 것으로 생각되는 선천 면역에 관여하는 메카니즘에 대한 관심이 높아졌다. 이러한 관심은 부분적으로 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)의 수용체로서 선천 면역에 관련되는 것으로 생각되는 톨(Toll) 유사 수용체(TLR)로서 알려진 고도로 보존된 패턴인식 수용체 단백질 부류의 최근의 발견에 힘입었다.

[0006] 따라서 선천 면역을 조절하기에 유용한 조성물 및 방법은 염증, 알레르기, 천식, 감염, 암 및 면역결핍 등이 관련된 상태에 대한 치료학적 접근에 영향을 줄 수 있기 때문에 관심이 지대하다.

[0007] 때로는 상기 면역조절제를 전달체에 커플링(coupling)시키는 것이 유리하다. 그러나, 전달체로부터 상기 면역조절제, 특히 불안정성 면역조절제의 방출을 어떻게 제어할 수 있는지와 어떤 종류의 방출이 최적의 생체내 효과를 위해 제공되는지에 관한 정보가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 최적의 방출을 허용하는 면역조절제를 전달하기 위한 신규 전달체 및 관련 방법에 대한 필요성이 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 측면은 합성 나노운반체에 커플링된 면역조절제를 포함하는 합성 나노운반체를 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 이 때 면역조절제는 관계식 $I_{Arel(4.5)_{24\%}}/I_{Arel(7.4)_{24\%}} \geq 1.2$ 에 따라 합성 나노운반체로부터 분리되고, 식중, $I_{Arel(4.5)_{24\%}}$ 는 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 24시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량을, 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 24시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량과 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 24시간 동안 노출될 때 합성 나노운반체에 보유되는 면역조절제의 중량의 합으로 나눈 것으로서 정의되며, 중량%로서 표현되고, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취하여지며, $I_{Arel(7.4)_{24\%}}$ 는 합성 나노운반체가 pH 7.4의 시험관내 수성 환경에 24시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량을, 합성 나노운반체가 pH 7.4의 시험관내 수성 환경에 24시간 동안 노출

될 때 방출되는 면역조절제의 중량과 합성 나노운반체가 pH 7.4의 시험관내 수성 환경에 24시간 동안 노출될 때 합성 나노운반체에 보유되는 면역조절제의 중량의 합으로 나눈 것으로서 정의되고, 중량%로서 표현되며, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취하여진다.

- [0010] 일부 실시양태에서, 면역조절제는 면역조절제 커플링 잔기(moiety)에 의해 합성 나노운반체에 커플링된다. 특정 실시양태에서, 면역조절제는 합성 나노운반체 내에 캡슐화된다. 일부 실시양태에서, 면역조절제는 불안정성 면역조절제, 예컨대 이미다조퀴놀린, 아데닌 유도체, 또는 5'-CG-3'을 포함하는 올리고뉴클레오타이드(이 때, C는 메틸화되어 있지 않고, 이 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 불안정성 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 주쇄를 포함함)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이미다조퀴놀린은 이미다조퀴놀린 아민, 이미다조피리딘 아민, 6,7-융합 시클로알킬이미다조피리딘 아민, 이미퀴모드 또는 레지퀴모드를 포함한다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 주쇄는 생리적 조건하에 주쇄를 안정화하도록 기능하는 안정화 화학적 변형을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 주쇄는 포스포로티오에이트 안정화 화학적 변형을 포함하도록 변형되지 않은 주쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역조절제는 보강제이다. 특정 실시양태에서, 보강제는 톨 유사 수용체(TLR) 작용제, 예컨대 TLR 3 작용제, TLR 7 작용제, TLR 8 작용제, TLR 7/8 작용제 또는 TLR 9 작용제를 포함한다.
- [0012] 일부 실시양태에서, TLR 작용제는 면역자극성 핵산, 예컨대 면역자극성 DNA 또는 면역자극성 RNA이다. 특정 실시양태에서, 면역자극성 핵산은 생리적 조건하에 주쇄를 안정화하도록 기능하는 하나 이상의 안정화 화학적 변형을 포함하는 CpG 함유 면역자극성 핵산이다. 일부 실시양태에서, 보강제는 일반적인 T 세포 항원을 포함한다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 B 세포 항원 및/또는 T 세포 항원을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 합성 나노운반체는 항원제시 세포(APC) 표적화(targeting) 특징부를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 하나 이상의 생분해성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역조절제는 면역조절제 커플링 잔기에 의해 하나 이상의 생분해성 중합체에 커플링된다. 특정 실시양태에서, 생분해성 중합체는 폴리(락티드), 폴리(글리콜리드) 또는 폴리(락티드-코-글리콜리드)를 포함한다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 생분해성 중합체는 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 결정된 바와 같이, 중량 평균 분자량이 800달톤 내지 10,000달톤의 범위에 있다. 특정 실시양태에서, 면역조절제 커플링 잔기는 아마이드 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역조절제 커플링 잔기는 에스테르 결합을 포함한다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 지질 기재의 나노입자, 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제 기재의 유화액, 텐드리머, 버키볼(buckyball), 나노와이어(nanowire), 바이러스 유사 입자, 펩티드 또는 단백질 기재의 입자, 나노물질의 조합물을 포함하는 나노입자, 구형 나노입자, 입방형 나노입자, 피라미드형 나노입자, 장방형 나노입자, 원통형 나노입자 또는 도넛형 나노입자를 포함한다.
- [0016] 본 발명의 측면은 합성 나노운반체에 커플링된 면역조절제를 포함하는 합성 나노운반체를 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 이 때 면역조절제는 관계식 $IA(4.5)_{24}/IA(4.5)_6 \geq 1.2$ 에 따라 합성 나노운반체로부터 분리되고, 식 중, $IA(4.5)_{24}$ 는 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 24시간 동안 노출될 때 방출되는, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취한 면역조절제의 중량으로서 정의되며, $IA(4.5)_6$ 은 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 6시간 동안 노출될 때 방출되는, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취한 면역조절제의 중량으로서 정의된다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 면역조절제는 합성 나노운반체 내에 캡슐화된 불안정성 면역조절제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 불안정성 면역조절제는 이미다조퀴놀린, 아데닌 유도체 또는 5'-CG-3'을 포함하는 올리고뉴클레오타이드(이 때, C는 메틸화되어 있지 않고, 이 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 불안정성 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 주쇄를 포함함)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이미다조퀴놀린은 이미다조퀴놀린 아민, 이미다조피리딘 아민, 6,7-융합 시클로알킬이미다조피리딘 아민, 이미퀴모드 또는 레지퀴모드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 주쇄는 생리적 조건하에 주쇄를 안정화하도록 기능하는 안정화 화학적 변형을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 주쇄는 포스포로티오에이트 안정화 화학적 변형을 포함하도록 변형되지 않은 주쇄를 포함한다.
- [0018] 본 발명의 추가 측면은, 면역조절제가 관계식 $6 \leq IA(4.5)_{24}/IA(4.5)_6 \leq 1.2$ 에 따라 합성 나노운반체로부터 분리되는, 합성 나노운반체에 커플링된 면역조절제를 포함하는 합성 나노운반체를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 식 중, $IA(4.5)_{24}$ 는 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 24시간 동안 노출될 때 방출되는, 합성 나노

온반체 샘플의 평균으로서 취한 면역조절제의 중량으로서 정의되고, IA(4.5)₆은 합성 나노온반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 6시간 동안 노출될 때 방출되는, 합성 나노온반체 샘플의 평균으로서 취한 면역조절제의 중량으로서 정의된다.

- [0019] 일부 실시양태에서, 면역조절제는 합성 나노온반체 내에 캡슐화된 불안정성 면역조절제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 불안정성 면역조절제는 이미다조퀴놀린, 아데닌 유도체, 또는 5'-CG-3'을 포함하는 올리고뉴클레오타이드(이 때, C는 메틸화되어 있지 않고, 이 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 불안정성 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 주쇄를 포함함)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이미다조퀴놀린은 이미다조퀴놀린 아민, 이미다조피리딘 아민, 6,7-융합 시클로알킬이미다조피리딘 아민, 이미퀴모드 또는 레지퀴모드를 포함한다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 주쇄는 생리적 조건하에 주쇄를 안정화하도록 기능하는 안정화 화학적 변형을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 주쇄는 포스포로티오에이트 안정화 화학적 변형을 포함하도록 변형되지 않은 주쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 면역조절제는 면역조절제 커플링 잔기에 의해 합성 나노온반체에 커플링된다. 일부 실시양태에서, 면역조절제는 합성 나노온반체 내에 캡슐화된다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 면역조절제는 보강제이다. 특정 실시양태에서, 보강제는 톨 유사 수용체(TLR) 작용제, 예컨대 TLR 3 작용제, TLR 7 작용제, TLR 8 작용제, TLR 7/8 작용제 또는 TLR 9 작용제를 포함한다. 특정 실시양태에서, TLR 작용제는 면역자극성 핵산, 예컨대 면역자극성 DNA 또는 면역자극성 RNA이다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 면역자극성 핵산은 생리적 조건하에 주쇄를 안정화하도록 기능하는 하나 이상의 안정화 화학적 변형을 포함하는 CpG 함유 면역자극성 핵산이다. 특정 실시양태에서, 보강제는 일반적인 T 세포 항원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노온반체는 B 세포 항원 및/또는 T 세포 항원을 추가로 포함한다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 합성 나노온반체는 항원제시 세포(APC) 표적화 특징부를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 합성 나노온반체는 하나 이상의 생분해성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역조절제는 면역조절제 커플링 잔기에 의해 하나 이상의 생분해성 중합체에 커플링된다. 특정 실시양태에서, 생분해성 중합체는 폴리(락티드), 폴리(글리콜리드) 또는 폴리(락티드-코-글리콜리드)를 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 생분해성 중합체는 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 결정된 바와 같이, 중량 평균 분자량이 800달톤 내지 10,000달톤의 범위에 있다. 특정 실시양태에서, 면역조절제 커플링 잔기는 아마이드 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역조절제 커플링 잔기는 에스테르 결합을 포함한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 합성 나노온반체는 지질 기재의 나노입자, 중합체성 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제 기재의 유화액, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스 유사 입자, 펩티드 또는 단백질 기재의 입자, 나노물질의 조합물을 포함하는 나노입자, 구형 나노입자, 입방형 나노입자, 피라미드형 나노입자, 장방형 나노입자, 원통형 나노입자 또는 도넛형 나노입자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명과 관련된 조성물은 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0026] 본 발명의 추가 측면은 본 발명과 관련된 임의의 조성물을 포함하는 백신을 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명의 추가 측면은 본 발명과 관련된 임의의 조성물을 대상체에게 투여함을 포함하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 면역 반응을 유도하거나 향상시키기에 유효한 양이다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 암, 감염성 질환, 비자가면역 대사성 질환, 퇴행성 질환 또는 중독에 걸려 있다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명은 세포, 예컨대 항원제시 세포(APC)의 작용 부위를 표적화하고, pH에 감응성인 방식으로 합성 나노온반체로부터 분리되는 면역조절제를 포함하는 합성 나노온반체의 조성물 및 관련 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 pH 7.4, 37°C에서 합성 나노온반체 제형으로부터의 레지퀴모드(R848)의 방출을 설명한다.
- 도 2는 pH 4.5, 37°C에서 합성 나노온반체 제형으로부터의 R848의 방출을 설명한다.
- 도 3은 pH 7.4 및 pH 4.5에서 24시간 동안 합성 나노온반체 제형으로부터의 R848의 방출을 설명한다.
- 도 4는 CpG 함유 면역자극성 핵산을 갖지 않는 합성 나노온반체(1군)에 의한 항체 유도 수준과 비교하여, CpG 함유 면역자극성 핵산을 갖는 합성 나노온반체(2군 및 3군)에 의한 항체 유도 수준을 나타낸다.

도 5는 포스포디에스테르, 비티오화 CpG 함유 면역자극성 핵산 또는 티오화 CpG 함유 면역자극성 핵산을 방출하는 합성 나노운반체에 의한 항체 유도 수준을 나타낸다.

도 6은 상이한 속도로 R848을 방출하는 합성 나노운반체에 의한 항체 유도 수준을 나타낸다.

도 7은 NC-Nic/PO-CpG로 명명되는, 포획된 포스포디에스테르(PO) CpG를 갖는 합성 나노운반체에 의한 항체 유도 수준을 나타낸다.

도 8은 pH 4.5 대 pH 7.5에서 나노운반체로부터의 포획된 PO-CpG의 방출을 나타낸다. 이 데이터는 불안정성 면역조절제, 예컨대 PO-CpG가 합성 나노운반체 내로의 캡슐화에 의해 보호됨을 설명한다. 이러한 불안정성 면역조절제는 pH가 4.5인 바람직한 작용 부위에서(예를 들어, 엔도솜/리소솜에서) 방출될 수 있고, pH 7.4(예를 들어, 일반적으로 엔도솜/리소솜의 외부 pH)에서는 낮은 수준의 방출이 일어난다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 특별히 예시된 물질 또는 공정 변수는 물론 달라질 수 있으므로 본 발명은 이에 제한되지는 않음을 이해해야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어들은 본 발명의 특정 실시양태를 설명하기 위한 것에 지나지 않고, 본 발명을 설명하기 위한 대체 용어의 사용을 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다.
- [0031] 본원에 인용된 모든 공개 문헌, 특허 및 특허출원은, 상기이든 하기이든, 모든 목적을 위해 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0032] 본 명세서 및 첨부된 청구의 범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 내용이 분명히 달리 지시하지 않으면 복수의 지시대상을 포함한다. 예를 들어, “중합체”에 대한 언급은 둘 이상의 그런 분자의 혼합물을 포함하고, “용매”에 대한 언급은 둘 이상의 그런 용매의 혼합물을 포함하며, “접착제”에 대한 언급은 둘 이상의 그런 물질의 혼합물을 포함한다.
- [0034] 서론
- [0035] 본 발명은 유익한 면역 반응을 일으키고/일으키거나 반표적(off-target) 효과 및 독성을 감소시킬 관심의 세포, 특히 항원제시 세포의 작용 부위에 면역조절제를 더 직접적으로 방출하는 방법을 제공한다는 점에서 유용한데, 대부분의 면역조절제의 방출은 관심의 세포의 작용 부위에서일 것이다. 이는 보강제의 전달에 있어서 특히 흥미롭다. 제어 방출 특성은 처음으로 면역조절제를 관심의 면역 세포로 전달하는 제어된 방식을 제공하고, 면역 시스템에 더 정확한 개입(장기간에 걸쳐 면역조절제를 방출하는 능력을 포함함)을 허용한다. 이 모든 것은 매우 조정가능한 시스템을 면역조절제의 최적의 방출을 얻도록 이끌어, 바람직한 세포의 작용 부위에서 주로 방출할 것이다.
- [0036] 본 발명자들은 또한 본 발명의 합성 나노운반체 내에 불안정성 면역조절제를 캡슐화함으로써 본 발명의 합성 나노운반체 내에 불안정성 면역조절제를 커플링시키고, 바람직하게는 장기간에 걸쳐 관심의 면역 세포에 불안정성 면역조절제를 전달하는 제어된 방법을 제공함으로써 불안정성 면역조절제의 표적화된 전달을 일으키는 한편, 면역조절제의 반표적 효과, 특히 면역조절제의 전신 투여와 관련된 반표적 효과를 최소화한다. 추가적으로, 이러한 접근법은 바람직한 수준의 약리학적 활성을 갖지 않을 수도 있는, 제거 반감기가 짧은 불안정성 면역조절제의 성능을 향상시킬 수 있다.
- [0037] 한 실시양태에서, 본 발명은 특정 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 최근에, CpG 핵산, GU 풍부 ssRNA 및 이중나선 RNA를 포함한 특정 유형의 핵산 분자의 면역자극 효과를 설명하는 다수의 보고가 있었다. 흥미롭게는, 최근에 톨 유사 수용체 9(TLR9)는 세균 DNA 및 CpG 모티프(이 때, 시토신이 메틸화되어 있지 않음)를 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 인식한다고 보고되었다(Hemmi H et al. (2000) Nature 408:740-5; Bauer S. et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:9237-42). CpG 함유 올리고뉴클레오타이드의 면역 조절에 대한 영향은 미국 특허들, 예컨대 미국 특허 제6,194,388호, 제6,207,646호, 제6,239,116호 및 제6,218,371호, 및 국제 특허출원 공개공보, 예컨대 WO 98/37919 호, WO 98/40100호, WO 98/52581호, 및 WO 99/56755호에 광범위하게 기술되었다. 면역자극성 핵산 전체는 비메틸화될 수 있고, 또는 일부분이 비메틸화될 수 있으나 적어도 5'-CG-3'의 C는 비메틸화되어야 한다.
- [0038] 천연 DNA 올리고뉴클레오타이드는 세포외 환경에 있는 핵산분해효소에 의해 신속하게 절단되는 포스포디에스테르 연결을 함유한다(Yu, D., et al., Potent CpG oligonucleotides containing phosphodiester linkages: in

vitro and in vivo immunostimulatory properties. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 297(1): p. 83-90 (“Yu et al.”); Heeg, K., et al., Structural requirements for uptake and recognition of CpG oligonucleotides. Int J Med Microbiol, 2008. 298(1-2): p. 33-8 (“Heeg et al.”). 이러한 천연 올리고뉴클레오티드는 불안정성 면역조절제로 생각될 수 있다. 따라서, 상기 포스포디에스테르 연결기를 포스포로티오에이트 기로 대체함으로써 그 연결을 화학적으로 안정화하는 방법이 상기 문헌에 광범위하게 보고되었다. 미국 특허 제6,811,975호(Phosphorothioate Oligonucleotides Having Modified Internucleoside Linkages)을 참조한다.

[0039] 포스포로티오에이트 CpG 함유 올리고뉴클레오티드는 백신 보강제로서 전신 투여되었다(Yu et al.의 문헌). 그러나, 안정화된 CpG 올리고뉴클레오티드의 전신 투여는 반표적 면역자극 효과, 예컨대 전신 염증, 림프구의 비특이 활성화 및 독감 유사 증상을 가져올 수 있다(Haas, T., et al., Sequence independent interferon-alpha induction by multimerized phosphodiester DNA depends on spatial regulation of Toll-like receptor-9 activation in plasmacytoid dendritic cells. Immunology, 2009. 126(2): p. 290-8 (“Haas et al.”)). 따라서, 상기 올리고뉴클레오티드는 이하에 더 상세하게 기술되는 바와 같이 본 발명의 실시예에 유용하게 포함될 수 있다.

[0040] 본 발명자들은 예상외로 놀랍게도 본원에 개시된 본 발명을 실시함으로써 상기 문제점 및 제한을 극복할 수 있음을 발견하였다. 특히, 본 발명자들은 예상외로 관련 방법들과 함께, 합성 나노운반체에 커플링된 면역조절제를 포함하는 합성 나노운반체를 포함하고, 면역조절제, 바람직하게는 불안정성 면역조절제가 하기 관계식에 따라 합성 나노운반체로부터 분리되는 조성물을 제공하는 것이 가능함을 발견하였으며,

[0041] $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$

[0042] 식중, $I_{Arel(4.5)_t}$ 는 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량을, 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량과 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 합성 나노운반체에 보유되는 면역조절제의 중량의 합으로 나눈 것으로서 정의되며, 중량%로서 표현되고, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취하여지며; $I_{Arel(7.4)_t}$ 는 합성 나노운반체가 pH 7.4의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량을, 합성 나노운반체가 pH 7.4의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량과 합성 나노운반체가 pH 7.4의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 합성 나노운반체에 보유되는 면역조절제의 중량의 합으로 나눈 것으로서 정의되고, 중량%로서 표현되며, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취하여지고; t는 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 또는 30시간이다.

[0043] 일부 실시양태에서, 면역조절제, 바람직하게 불안정성 면역조절제는 하기 관계식에 따라 합성 나노운반체로부터 분리된다: $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.3$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.4$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.6$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.7$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.8$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.9$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 2$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 2.2$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 2.5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 2.7$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 3$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 3.5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 4$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 4.5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 5.5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 6$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 6.5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 7$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 7.5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 8$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 8.5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 9$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 9.5$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 10$, $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 10.5$ 또는 $I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 11$ (식중, $I_{Arel(4.5)_t}$, $I_{Arel(7.4)_t}$ 및 t는 상기 정의된 바와 같음)..

[0044] 다른 실시양태에서, 면역조절제, 바람직하게 불안정성 면역조절제는 하기 관계식에 따라 합성 나노운반체로부터 분리된다: $2 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $2.5 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $3 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $3.5 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $4 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $4.5 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $5 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $6 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $7 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $8 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$, $9 \leq I_{Arel(4.5)_t} / I_{Arel(7.4)_t} \geq 1.2$.

≥ 1.2 , $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 1.2$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 2$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 2.5$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 3$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 3.5$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 4$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 4.5$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 5$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 6$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 7$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 8$, $10 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 9$, $3 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 2$, $4 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 3$, $5 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 4$, $6 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 5$, $7 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 6$, $8 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 7$ 또는 $9 \leq \text{IArel}(4.5)_t / \text{IArel}(7.4)_t \leq 8$ (식중, $\text{IArel}(4.5)_t$, $\text{IArel}(7.4)_t$ 및 t 는 상기 정의된 바와 같음). 일부 실시양태에서, t 는 24시간이다.

[0045] 따라서, 본 발명은 중성 및 산성 pH에서 유의적으로 상이한 속도로 면역조절제를 방출하는 합성 나노운반체를 포함하는 조성물 및 그 방법에 관한 것이다. 면역조절제의 전달에 있어서, 가장 강력한 효과를 발휘하기 위하여 면역조절제의 대부분이 이들이 바람직한 효과를 발휘할 수 있는 APC 안으로 방출되는 것이 바람직하다. 면역조절제가 유리형으로 주입되거나, 또는 APC 밖으로 합성 나노입자로부터 방출되는 경우, 면역조절제의 소량만이 APC에 이르게 되고, 한편 나머지는 신체를 통해 확산하며, 이 때 면역 자극은 덜할 것이고, 유해한 효과를 일으킬 수 있다. 본원에 제공된 본 발명의 합성 나노운반체는 차별적으로 APC에 의해 흡수된다. APC에 의해 흡수되자마자, 합성 나노운반체는 세포 밖의 중성 pH와는 대조적으로 pH가 더 산성으로 되는 엔도솜/리소좀 구획내로 흡수되는 것으로 추정된다. 이러한 조건하에, 면역조절제는 합성 나노운반체로부터(예를 들어, 면역조절제 커플링 잔기로부터)의 pH 감응성 분리를 나타내고, 합성 나노운반체로부터 방출된다. 그러면, 면역조절제는 유리되어 엔도솜/리소좀과 관련된 수용체와 상호작용하고 바람직한 면역 반응을 자극한다. 중성 pH 또는 대략 중성의 pH에서, 또는 생리적 pH(즉, pH=7.4) 또는 대략 생리적인 pH에서의 실시양태에서 면역조절제를 덜 방출하지만, pH 4.5 또는 약 4.5의 pH에서의 방출은 증가시키는 본 발명의 합성 나노운반체의 특성은 합성 나노운반체가 표적화하는 APC의 엔도솜/리소좀 구획으로 면역조절제를 표적화하기 때문에 바람직하다.

[0046] 면역조절제는 여러 많은 방법에 의해 합성 나노운반체에 커플링될 수 있다. 일반적으로 커플링은 면역조절제와 합성 나노운반체 사이의 결합의 결과일 수 있다. 이 결합에 의해 면역조절제는 합성 나노운반체의 표면에 부착되고/부착되거나 합성 나노운반체 내에 함유(캡슐화)될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서 면역조절제는 합성 나노운반체와의 결합보다는 합성 나노운반체 구조의 결과로서 합성 나노운반체에 의해 캡슐화된다.

[0047] 커플링이 면역조절제와 합성 나노운반체 사이의 결합의 결과로서 일어나는 경우, 커플링은 면역조절제 커플링 잔기에 의해 일어난다. 면역조절제 커플링 잔기는 이를 통해 면역조절제가 합성 나노운반체에 결합되는 임의의 잔기일 수 있다. 이러한 잔기는 공유 결합, 예컨대 아미드 결합 또는 에스테르 결합, 및 면역조절제를 합성 나노운반체에 (공유적으로 또는 비공유적으로) 결합시키는 별개의 분자를 포함한다. 이러한 분자로는 연결기 또는 중합체 또는 그의 단위가 있다. 예를 들어, 면역조절제 커플링 잔기는 면역조절제(예를 들어, 면역조절성 핵산)가 정전기 결합하는 하전된 중합체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 면역조절제 커플링 잔기는 면역조절제가 공유 결합하는 중합체 또는 그의 단위를 포함할 수 있다.

[0048] 일부 실시양태에서, 중합체 또는 그의 단위는 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리아미드 또는 폴리에테르, 또는 그의 단위를 포함한다. 다른 실시양태에서, 중합체 또는 그의 단위는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤, 또는 그의 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 생분해성인 것이 바람직하다. 따라서, 이들 실시양태에서 중합체가 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 그의 단위를 포함하는 경우, 그 중합체는 폴리에테르와 생분해성 중합체의 블록 공중합체를 포함하여 중합체가 생분해성이 되는 것이 바람직하다. 다른 실시양태에서, 상기 중합체는 오로지 폴리에테르 또는 그의 단위, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 그의 단위만을 포함하지는 않는다. 따라서, 본원에 제공된 면역조절제 커플링 잔기는 전술한 중합체 또는 그의 단위 중 하나(예를 들어, 락티드 또는 글리콜리드)를 포함할 수 있다.

[0049] 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체의 일부로서 사용하기 위하여, 본원에 제공된 화합물 또는 공액결합물(conjugate)의 중합체는 pH 7.4, 25°C의 물에 불용성이거나, 생분해성이거나, 또는 둘다이다. 다른 실시양태에서, 상기 중합체는 pH 7.4, 25°C의 물에 불용성이지만, pH 4.5, 25°C에서는 가용성이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 중합체는 pH 7.4, 25°C의 물에 불용성이지만, pH 4.5, 25°C에서는 가용성이고 생분해성이다. 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 중합체는 겔 투과 크로마토그래피에 의해 결정된 바와 같이, 중량 평균 분자량이 약 800Da 내지 10,000Da(예를 들어, 2,000Da)일 수 있다.

[0050] 하나의 실시양태에서, 면역조절제는 보강제, 예컨대 이미다조퀴놀린이다. 이미다조퀴놀린은 이미퀴모드 및 레지퀴모드(R848으로도 알려져 있음)와 같은 화합물을 포함한다. 이러한 보강제는 상기 제공된 바와 같은 중합체에 커플링될 수 있다. 예로서, 레지퀴모드는 약 2,000Da의 폴리락트산(PLA) 중합체에 공액결합되었다. 시험관내 방출 실험에서, 상기 실시양태는 pH가 7.4에서 4.5로 떨어졌을 때 R848 방출이 3 내지 6배 증가함을 입증하였다. 하기 표 1에 시험한 입자의 조성을 기재하였다. R848을 캡슐화한 2가지 제형, PLA가 R848 아민에 의해 R848에 공유적으로 커플링되어 있는 2가지 제형, 및 PLA가 (개환 방법에 의해) R848에 공유적으로 커플링되어 있는 4가지 제형이 포함되어 있다. 모든 제형에서, R848의 방출은 더 낮은 pH에서 상당히 증가되었다. 캡슐화 방출 속도는 공액결합 방출 속도보다 훨씬 더 빠르며, 또한 공액결합 방법에 따라 방출 속도에 차이가 있다.

표 1

[0051] 공액결합된 R848을 갖는 제형 표적

제형	R848 첨가량*	난백 펩티드 첨가량	PLA-PEG-NIC	PLA-R848 공액결합물 유형**	PLA (15-20K, BI R202H)	화학 성질
1	E1.5%	1.1-2.2%	25%		75%	
2	E1.5%++	1.1-2.2%	25%		75%	
3	C75%	0.15-0.31%	25%	방법 1		아민
4	C75%	0.15-0.31%	25%	방법 1		아민
5	C75%	0.15-0.31%	25%	방법 5		ROP-hi MW
6	C75%	0.15-0.31%	25%	방법 5		ROP-lo MW
7	C50%	0.15-0.31%	25%	방법 5	25%	ROP-lo MW
8	C25%	0.15-0.31%	25%	방법 5	50%	ROP-lo MW

[0052] * C=공유 결합 R848; E=R848의 캡슐화

[0053] 상기 예는 PLA를 사용한 것이었지만, 면역조절제, 예컨대 R848은 다른 중합체 또는 그의 단위, 예컨대 폴리락트드-코-글리콜리드(PLGA) 블록 공중합체 또는 그의 단위를 포함한, 상기 및 본원의 다른 곳에 제공된 것에 커플링될 수 있다. 면역조절제, 예컨대 R848은 아미드 결합 또는 에스테르 결합에 의해 이러한 중합체 또는 그의 단위와 커플링될 수 있다. 이러한 커플링을 일으키는 방법의 예는 본원의 다른 곳 및 실시예에 제공되어 있다.

[0054] 본 발명자들은 또한 예상외로 관련 방법들과 함께, 합성 나노운반체에 커플링된 면역조절제를 포함하는 합성 나노운반체를 포함하고, 면역조절제, 바람직하게는 불안정성 면역조절제가 하기 관계식에 따라 합성 나노운반체로부터 분리되는 조성물을 제공하는 것이 가능함을 발견하였으며,

[0055] $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$

[0056] 식중, $IA(4.5)_{t1}$ 은 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t_1 시간 동안 노출될 때 방출되는, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취한 면역조절제의 중량으로서 정의되고, $IA(4.5)_{t2}$ 는 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t_2 시간 동안 노출될 때 방출되는, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취한 면역조절제의 중량으로서 정의되며; t_1 은 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 또는 30시간이고; t_2 는 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 또는 28시간이며; $t_1 > t_2$ 이다. 일부 실시양태에서, t_1 은 24시간이고, t_2 는 6시간이다.

[0057] 일부 실시양태에서, 면역조절제, 바람직하게 불안정성 면역조절제는 하기 관계식에 따라 합성 나노운반체로부터 분리된다: $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.5$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2.5$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 3$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 3.5$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 4$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 4.5$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 5$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 6$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 7$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 8$, $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 9$ 또는 $IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 10$ (식중, $IA(4.5)_{t1}$, $IA(4.5)_{t2}$, t_1 및 t_2 는 상기 정의된 바와 같음). 일부 실시양태에서, t_1 은 24시간이고, t_2 는 6시간이다.

[0058] 일부 실시양태에서, 면역조절제, 바람직하게 불안정성 면역조절제는 하기 관계식에 따라 합성 나노운반체로부터 분리된다: $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2.5$, $10 \leq$

$IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 3$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 3.5$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 4$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 4.5$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 5$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 6$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 7$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 8$, $10 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 9$, $9 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $8 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $7 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $6 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $4.5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $4 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $3.5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $3 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $2.5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $2 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $1.5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $3 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2$, $4 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 3$, $5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 4$, $6 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 5$, $7 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 6$, $8 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 7$ 또는 $9 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 8$ (식중, $IA(4.5)_{t1}$, $IA(4.5)_{t2}$, $t1$ 및 $t2$ 는 상기 정의된 바와 같음). 일부 실시양태에서, $t1$ 은 24시간이고, $t2$ 는 6시간이다.

[0059] 본 발명의 합성 나노운반체는 또한 특이적 항원에 대한 체액 면역 반응을 증가시키는 특성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이러한 증가된 체액 면역 반응은, 일부 실시양태에서 면역조절제가 더 빨리 방출되면서 상승된 것으로 나타났다. 하나의 실시양태에서, 면역조절제는 CpG 함유 면역자극성 핵산이고, CpG 함유 면역자극성 핵산은 합성 나노운반체 내에 캡슐화된다. 시험관내 실험에서, 이후 실시예에 추가로 기술되는 바와 같이, 합성 나노운반체로부터 CpG 함유 면역자극성 핵산의 최적의 방출은 니코틴에 대한 상승된 체액 면역 반응을 나타낸 것으로 나타났는데, 니코틴도 또한 합성 나노운반체에 커플링되었다. 일부 실시양태에서, 이러한 최적의 방출은 항원에 대한 항체 반응을 더 증가시킨 것으로 나타났다.

[0060] 최적의 방출은 최상 수준의 바람직한 효과(들)를 일으키는 합성 나노운반체로부터의 면역자극제의 분리이다. 일부 실시양태에서, 바람직한 효과는 바람직한 수준의 즉각적인 면역 반응(즉, 합성 나노운반체의 투여 후 바로 일어나는 면역 반응)이다. 일반적으로, 즉각적인 면역 반응은 대략 초, 분 또는 수시간으로 측정되는 것이다. 다른 실시양태에서, 바람직한 효과는 수시간 후에 일어나는 바람직한 수준의 면역 반응이다. 또 다른 실시양태에서, 바람직한 효과는 장기간, 예컨대 1, 2, 5, 10, 15시간 또는 그 이상 지속되는 바람직한 수준의 면역 반응이다. 다른 실시양태에서, 장기간은 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30일 또는 그 이상이다. 추가 실시양태에서, 장기간은 1, 2, 5, 10개월 또는 그 이상이다. 추가 실시양태에서, 장기간은 1, 2, 5, 10년 또는 그 이상이다. 일부 실시양태에서, 최적의 방출을 제공하는 합성 나노운반체의 조성물은 면역조절제가 상기 관계식 중 하나에 따라 합성 나노운반체로부터 분리되는 것이다.

[0061] 실시양태에서, 합성 나노운반체로부터 중간 속도로 분리되는 면역조절제, 바람직하게 불안정성 면역조절제는 하기 관계식을 만족시킨다: $6 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $4 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $3 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $2 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.2$, $6 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2$, $6 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2.5$, $6 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 3$, $6 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 3.5$, $6 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 4$, $6 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 5$, $4 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.5$, $3.5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.5$, $3 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.5$, $2.5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 1.5$, $5 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2$, $4 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2$ 또는 $3 \leq IA(4.5)_{t1}/IA(4.5)_{t2} \geq 2$ (식중, $IA(4.5)_{t1}$, $IA(4.5)_{t2}$, $t1$ 및 $t2$ 는 상기 정의된 바와 같음). 일부 실시양태에서, $t1$ 은 24시간이고, $t2$ 는 6시간이다.

[0062] 다른 예로서, 레지퀴모드는 합성 나노운반체 내에 캡슐화된다. 하기 실시예에서 추가로 기술되는 시험관내 실험에서, 합성 나노운반체에 함유된 레지퀴모드는 합성 나노운반체에 또한 커플링되어 있는 니코틴에 대한 체액 면역 반응을 증가시킨 것으로 밝혀졌다. 또한 합성 나노운반체로부터의 레지퀴모드의 중간 속도의 방출이 최적임이 밝혀졌는데, 이는 레지퀴모드의 중간 속도의 방출이 레지퀴모드의 빠른 또는 느린 방출보다 더 높은 수준의 항체 유도를 일으켰기 때문이다.

[0063] 따라서, 본원에 제공된 합성 나노운반체는 또한 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다. 항원은 B 세포 항원 또는 T 세포 항원 또는 이들의 조합일 수 있다. 이들 항원은 합성 나노운반체에 커플링될 수 있어서, 일부 실시양태에서는 이들이 합성 나노운반체의 표면에 존재하게 되거나, 나노운반체 내에 캡슐화되거나, 또는 이들 둘다이다. 실시양태에서, 면역조절제는 상기 항원에 대한 면역 반응을 증가시킨다. 상기 언급한 바와 같이, 항원은 또한 합성 나노운반체에 커플링될 수 있다. 그러나, 다른 실시양태에서 상기 항원은 합성 나노운반체에 커플링되지 않는다. 실시양태들 중 일부에서, 상기 항원은 대상체에 동시투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항원은 대상체에 동시투여되지 않는다.

[0065] 정의

[0066] “보강제”는 특정 항원을 구성하지 않지만, 항원에 대한 면역 반응의 강도 및 지속성을 상승시키는 제제를 의미한다. 이들 보강제는 패턴 인식 수용체(예컨대 톨 유사 수용체, RIG-1 및 NOD 유사 수용체(NLR)), 무기염(예컨대 명반, 장내 세균(예컨대, 에스케리시아 콜리(*Escherichia coli*), 살모넬라 미네소타(*Salmonella minnesota*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 쉬겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*))의 모노포스포릴 지질(MPL) A와 조합되거나 또는 특히 MPL[®](AS04), 전술한 각 세균의 MPL A와 조합된 명반), 사포닌(예컨대, QS-21, Quil-A, ISCOM, ISCOMATRIX[™]), 유화액(예컨대, MF59[™], 몬타니드(Montanide)[®] ISA 51 및 ISA 720, AS02(QS21+스쿠알렌+MPL[®])), 리포솜 및 리포솜 제형(예컨대, AS01), 합성된 또는 특별 제조된 극미립자 및 미립담체(예컨대, 나이세리아 고노레아(*N. gonorrhoeae*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*) 등의 세균 유래의 외막 소포(OMV), 또는 키토산 입자), 저장 형성제(depot-forming agent)(예컨대, 플루로닉(Pluronic)[®] 블록 공중합체), 특별하게 변형된 또는 제조된 펩티드(예컨대, 무라밀 디펩티드), 아미노알킬 글루코스아미니드 4-포스페이트(예컨대, RC529), 또는 단백질(예컨대, 세균 변성독소 또는 독소 단편)의 자극물질을 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다. 실시양태에서, 보강제는 톨 유사 수용체(TLR), 특히 TLR 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 및/또는 이들의 조합을 포함한(이들에 제한되지는 않음) 패턴 인식 수용체(PRR)의 작용제를 포함한다. 다른 실시양태에서, 보강제는 톨 유사 수용체 3의 작용제, 톨 유사 수용체 7 및 8의 작용제, 또는 톨 유사 수용체 9의 작용제를 포함하고, 바람직하게 인용된 보강제는 이미다조퀴놀린, 예컨대 레지퀴모드(R848로도 알려져 있음); 아데닌 유도체, 예컨대 미국 특허 제6,329,381호(스미토모 파마슈티컬 컴퍼니(Sumitomo Pharmaceutical Company))에 개시된 것; 면역자극성 DNA; 또는 면역자극성 RNA를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 합성 나노운반체는 톨 유사 수용체(TLR) 7 & 8의 작용제(“TLR 7/8 작용제”)인 보강제 화합물로서 포함된다. 유용한 것은, 이미다조퀴놀린 아민, 이미다조피리딘 아민, 6,7-융합된 시클로알킬이미다조피리딘 아민 및 1,2-가교된 이미다조퀴놀린 아민을 포함한(이들에 제한되지는 않음), 미국 특허 제6,696,076호(Tomai et al.)에 개시에 개시된 TLR 7/8 작용제 화합물이다. 바람직한 보강제는 이미퀴모드 및 레지퀴모드를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 보강제는 DC 표면 분자 CD40의 작용제일 수 있다. 특정 실시양태에서, 합성 나노운반체는 DC 성숙(미분화 T 세포의 효과적인 프라이밍(priming)에 필요함) 및 I형 인터페론과 같은 사이토카인의 생성을 촉진하고 결과적으로 바람직한 항원에 대한 항체 및 세포독성 면역 반응을 자극하는 보강제를 포함한다. 실시양태에서, 보강제는 또한 면역자극성 RNA 분자, 예컨대 dsRNA 또는 폴리 I:C(TLR3 자극제), 및/또는 문헌[F. Heil et al., “Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8” Science 303(5663), 1526-1529 (2004)], [J. Vollmer et al., “Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides”, WO 2008/033432호 A2], [A. Forsbach et al., “Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway”, WO 2007/062107호 A2], [E. Uhlmann et al., “Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity”, 미국 특허출원 공개공보 제2006/241076호], [G. Lipford et al., “Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections”, WO 2005/097993호 A2], [G. Lipford et al., “Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods”, WO 2003086280호 A2]에 개시된 것(이들에 제한되지는 않음)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 보강제는 TLR-4 작용제, 예컨대 세균 리포폴리사카리드(LPS), VSV-G 및/또는 HMGB-1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 보강제는 TLR-5 작용제, 예컨대 미국 특허 제6,130,082호, 제6,585,980호 및 제7,192,725호에 개시된 것을 포함한(이들에 제한되지는 않음) 플라젤린, 또는 그의 일부분 또는 유도체를 포함할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 합성 나노운반체는 I형 인터페론 분비를 유도하고, T 세포 및 B 세포 활성화를 자극하여 항체 생성 및 세포독성 T 세포 반응을 증가시키는 톨 유사 수용체(TLR)-9의 리간드, 예컨대 5'-CG-3' 모티프(이 때, C는 메틸화되어 있지 않음)를 포함하는 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 분자를 포함한다(Krieg et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. Nature. 1995. 374:546-549; Chu et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. J. Exp. Med. 1997. 186:1623-1631; Lipford et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. Eur.J. Immunol. 1997. 27:2340-2344; Roman et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. Nat. Med. 1997. 3:849-854; Davis et al. CpG DNA is a potent enhancer

of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. J. Immunol. 1998. 160:870-876; Lipford et al., Bacterial DNA as immune cell activator. Trends Microbiol. 1998. 6:496-500). 일부 실시양태에서, 보강제는 피사 세포로부터 방출된 염증전 자극물질(예를 들어, 요산 결정)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 보강제는 보체 연쇄반응의 활성화된 성분(예를 들어, CD21, CD35 등)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 보강제는 면역 복합체의 활성화될 성분일 수 있다. 보강제는 또한 보체 수용체 작용제, 예를 들어 CD21 또는 CD35에 결합하는 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 보체 수용체 작용제는 합성 나노 운반체의 내인성 보체 옵소닌화(opsonization)를 유도한다. 일부 실시양태에서, 보강제는 세포에 의해 방출되고 세포-세포 상호작용, 의사소통 및 다른 세포의 거동에 특별한 영향을 주는 소단백질 또는 생물학적 인자(5kD 내지 20kD의 범위)인 사이토카인이다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 수용체 작용제는 소분자, 항체, 융합 단백질 또는 압타머이다.

[0067] “투여하는 것” 또는 “투여”는 환자에게 약물을 약리학적으로 유용한 방식으로 제공함을 의미한다.

[0068] “APC 표적화 특징부”는 전문 항원제시 세포(“APC”), 예를 들어 수지상 세포, SCS 대식세포, 여포성 수지상 세포 및 B 세포(이들에 제한되지는 않음)로 합성 나노운반체를 표적화하는, 본 발명의 합성 나노운반체를 구성하는 하나 이상의 부분을 의미한다. 실시양태에서, APC 표적화 특징부는 APC상의 공지의 표적에 결합하는 면역 특징부 표면(들) 및/또는 표적화 잔기를 포함할 수 있다. 실시양태에서, APC 표적화 특징부는 합성 나노운반체의 표면에 존재하는 하나 이상의 B 세포 항원을 포함할 수 있다. 실시양태에서, APC 표적화 특징부는 또한 APC에 의한 흡수를 촉진하도록 선택되는 하나 이상 치수의 합성 나노입자를 포함할 수 있다.

[0069] 실시양태에서, 대식세포(“Mph”)상의 공지의 표적의 표적화 잔기는 두드러지게 발현되고/발현되거나 대식세포에 존재하는 임의의 실재물(예를 들어, 단백질, 지질, 탄수화물, 소분자 등)에 특히 결합하는 임의의 표적화 잔기(즉, 피막하용 대식세포 표지자(subcapsular sinus-Mph marker))를 포함한다. 예시적인 SCS-Mph 표지자로는 CD4(L3T4, W3/25, T4); CD9(p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a(LFA-1 α , α L 인테그린 사슬); CD11b(α M 인테그린 사슬, CR3, Mo1, C3nIR, Mac-1); CD11c(α X 인테그린, p150, 95, AXb2); CDw12(p90-120); CD13(APN, gp150, EC 3.4.11.2); CD14(LPS-R); CD15(X-합텐, 루이스, X, SSEA-1, 3-FAL); CD15s(시알릴 루이스 X); CD15u(3' 술포 루이스 X); CD15su(6 술포-시알릴 루이스 X); CD16a(FcRIIIA); CD16b(Fc γ RIIIb); CDw17(락토실세라미드, LacCer); CD18(인테그린 β 2, CD11a,b,c β -서브유닛); CD26(DPP IV 체외효소, ADA 결합 단백질); CD29(혈소판 GPIIa, β -1 인테그린, GP); CD31(PECAM-1, 엔도칸); CD32(FC γ RII); CD33(gp67); CD35(CR1, C3b/C4b 수용체); CD36(GpIIb, GPIV, PASIV); CD37(gp52-40); CD38(ADP-리보실 시클라제, T10); CD39(ATP 탈수소효소, NTP 탈수소효소-1); CD40(Bp50); CD43(시알로포린, 류코시알린); CD44(EMCR1, H-CAM, Pgp-1); CD45(LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO(UCHL-1); CD46(MCP); CD47(gp42, IAP, OA3, 뉴로필린); CD47R(MEM-133); CD48(블라스트-1, 홀림(Hulym)3, BCM-1, OX-45); CD49a(VLA-1 α , α 1 인테그린); CD49b(VLA-2 α , gp1a, α 2 인테그린); CD49c(VLA-3 α , α 3 인테그린); CD49e(VLA-5 α , α 5 인테그린); CD49f(VLA-6 α , α 6 인테그린, gp1c); CD50(ICAM-3); CD51(인테그린 α , VNR- α , 비트로넥틴-R α); CD52(CAMPATH-1, HE5); CD53(OX-44); CD54(ICAM-1); CD55(DAF); CD58(LFA-3); CD59(1F5Ag, H19, 프로텍틴, MACIF, M1RL, P-18); CD60a(GD3); CD60b(9-O-아세틸 GD3); CD61(GP IIIa, β 3 인테그린); CD62L(L-셀렉틴, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD63(LIMP, MLA1, gp55, NGA, LAMP-3, ME491); CD64(Fc γ RI); CD65(세라미드, VIM-2); CD65s(시알릴화-CD65, VIM2); CD72(Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD74(Ii, 불변 사슬); CD75(시알로 은페된 락토사민); CD75S(α 2,6 시알릴화 락토사민); CD80(B7, B7-1, BB1); CD81(TAPA-1); CD82(4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD84(p75, GR6); CD85a(ILT5, LIR2, HL9); CD85d(ILT4, LIR2, MIR10); CD85j(ILT2, LIR1, MIR7); CD85k(ILT3, LIR5, HM18); CD86(B7-2/B70); CD87(uPAR); CD88(C5aR); CD89(IgA Fc 수용체, Fc α R); CD91(α 2M-R, LRP); CDw92(p70); CDw93(GR11); CD95(APO-1, FAS, TNFRSF6); CD97(BL-KDD/F12); CD98(4F2, FRP-1, RL-388); CD99(MIC2, E2); CD99R(CD99 Mab 제한됨); CD100(SEMA4D); CD101(IGSF2, P126, V7); CD102(ICAM-2); CD111(PVRL1, HveC, PRR1, 넥틴 1, HIgR); CD112(HveB, PRR2, PVRL2, 넥틴2); CD114(CSF3R, G-CSRF, HG-CSFR); CD115(c-fms, CSF-1R, M-CSFR); CD116(GMCSFR α); CDw119(IFN γ R, IFN γ RA); CD120a(TNFR1, p55); CD120b(TNFR1, p75, TNFR p80); CD121b(타입 2 IL-1R); CD122(IL2R β); CD123(IL-3R α); CD124(IL-4R α); CD127(p90, IL-7R, IL-7R α); CD128a(IL-8Ra, CXCR1(가칭 CD181로 개명됨)); CD128b(IL-8Rb, CSCR2(가칭 CD182로 개명됨)); CD130(gp130); CD131(공통 β 서브유닛); CD132(공통 γ 사슬, IL-2R γ); CDw136(MSP-R, RON, p158-ron); CDw137(4-1BB, ILA); CD139; CD141(트롬보모듈린, 페토모듈린); CD147(바시긴, EMMPRIN, M6, OX47); CD148(HPTP- η , p260, DEP-1); CD155(PVR); CD156a(CD156, ADAM8, MS2); CD156b(TACE, ADAM17, cSVP); CDw156C(ADAM10); CD157(Mo5, BST-1); CD162(PSGL-1); CD164(MGC-24, MUC-24); CD165(AD2, gp37); CD168(RHAMM, IHABP, HMMR); CD169(시알로 로아드헤신, 시글렉-1); CD170(시글렉 5); CD171(L1CAM, NILE); CD172(SIRP-1 α , MyD-1); CD172b(SIRP β);

CD180(RP105, Bgp95, Ly64); CD181(CXCR1(이전에는 CD128a로 알려졌음)); CD182(CXCR2(이전에는 CD128b로 알려졌음)); CD184(CXCR4, NPY3R); CD191(CCR1); CD192(CCR2); CD195(CCR5); CDw197(CCR7(CDw197이었음)); CDw198(CCR8); CD204(MSR); CD205(DEC-25); CD206(MMR); CD207(랑게린); CDw210(CK); CD213a(CK); CDw217(CK); CD220(인슐린 R); CD221(IGF1 R); CD222(M6P-R, IGF1I-R); CD224(GGT); CD226(DNAM-1, PTA1); CD230(프라이온 단백질(PrP)); CD232(VESP-R); CD244(2B4, P38, NAIL); CD245(p220/240); CD256(APRIL, TALL2, TNF(리간드) 상과, 구성원 13); CD257(BLYS, TALL1, TNF(리간드) 상과, 구성원 13b); CD261(TRAIL-R1, TNF-R 상과, 구성원 10a); CD262(TRAIL-R2, TNF-R 상과, 구성원 10b); CD263(TRAIL-R3, TNF-R 상과, 구성원 10c); CD264(TRAIL-R4, TNF-R 상과, 구성원 10d); CD265(TRANSE-R, TNF-R 상과, 구성원 11a); CD277(BT3.1, B7과: 부티로필린 3); CD280(TEM22, ENDO180); CD281(TLR1, 톨 유사 수용체 1); CD282(TLR2, 톨 유사 수용체 2); CD284(TLR4, 톨 유사 수용체 4); CD295(LEPR); CD298(ATP1B3, Na K ATPase, β 3 서브유닛); CD300a(CMRF-35H); CD300c(CMRF-35A); CD300e(CMRF-35L1); CD302(DCL1); CD305(LAIR1); CD312(EMR2); CD315(CD9P1); CD317(BST2); CD321(JAM1); CD322(JAM2); CDw328(시글렉7); CDw329(시글렉9); CD68(gp 110, 매크로시알린); 및/또는 만노스 수용체를 포함하고(이들에 제한되지는 않음), 괄호 안에 열거된 명칭은 또 다른 명칭을 나타낸다.

[0070]

실시양태에서, 수지상 세포(“DC”)상의 공지의 표적의 표적화 잔기는 두드러지게 발현되고/발현되거나 DC에 존재하는 임의의 실재물(예를 들어, 단백질, 지질, 탄수화물, 소분자 등)에 특히 결합하는 임의의 표적화 잔기(즉, DC 표지자)를 포함한다. 예시적인 DC 표지자로는 CD1a(R4, T6, HTA-1); CD1b(R1); CD1c(M241, R7); CD1d(R3); CD1e(R2); CD11b(α M 인테그린 사슬, 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 탈수소효소, NTP 탈수소효소-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'뉴클레오타이드 분해효소); CD74(Ii, 불변 사슬); 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(TMFR1, p55); CD120b(TNFR1, p75, TNFR p80); CD123(IL-3R α); CD139; CD148(HPTP- η , DEP-1); CD150(SLAM, IPO-3); CD156b(TACE, ADAM17, cSVP); CD157(Mo5, BST-1); CD167a(DDR1, trkE, cak); CD168(RHAMM, IHABP, HMMR); CD169(시알로아드헤신, 시글렉-1); CD170(시글렉-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(DCSIGN); CDw218a(IL18R α); CDw218b(IL18R β); CD227(MUC1, PUM, PEM, EMA); CD230(프라이온 단백질(PrP)); CD252(OX40L, TNF(리간드) 상과, 구성원 4); CD258(LIGHT, TNF(리간드) 상과, 구성원 14); CD265(TRANSE-R, TNF-R 상과, 구성원 11a); CD271(NGFR, p75, TNFR 상과, 구성원 16); CD273(B7DC, PDL2); CD274(B7H1, PDL1); CD275(B7H2, ICOSL); CD276(B7H3); CD277(BT3.1, B7과: 부티로필린 3); CD283(TLR3, 톨 유사 수용체 3); CD289(TLR9, 톨 유사 수용체 9); CD295(LEPR); CD298(ATP1B3, Na K ATPase β 3 서브유닛); 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); II형 MHC; BDCA-1; 시글렉-H를 포함하고(이들에 제한되지는 않음), 괄호 안에 기재된 명칭은 또 다른 명칭을 나타낸다.

[0071]

실시양태에서, 표적화는 두드러지게 발현되고/발현되거나 B 세포에 존재하는 임의의 실재물(예컨대, 단백질, 지질, 탄수화물, 소분자 등)에 특히 결합하는 임의의 표적화 잔기(즉, B 세포 표지자)에 의해 달성될 수 있다. 예시적인 B 세포 표지자로는 CD1c(M241, R7); CD1d(R3); CD2(E-로세트 R, T11, LFA-2); CD5(T1, Tp67, Leu-1, Ly-1); CD6(T12); CD9(p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a(LFA-1 α , α L 인테그린 사슬); CD11b(α M 인테그린 사슬, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1); CD11c(α X 인테그린, P150, 95, AXb2); CDw17(락토실세라미드, LacCer); CD18(인테그린 β 2, CD11a, b, c β -서브유닛); CD19(B4); CD20(B1, Bp35); CD21(CR2, EBV-R, C3dR); CD22(BL-CAM, Lyb8, 시글렉-2); CD23(Fc ϵ R1I, B6, BLAST-2, Leu-20); CD24(BBA-1, HSA); CD25(Tac 항원, IL-2R α , p55); CD26(DPP IV 체외효소, ADA 결합 단백질); CD27(T14, S152); CD29(혈소판 GPIIa, β -1 인테그린, GP); CD31(PECAM-1, 엔도칸); CD32(Fc γ R1I); CD35(CR1, C3b/C4b 수용체); CD37(gp52-40); CD38(ADP리보실 시클라제, T10); CD39(ATP 탈수소효소, NTP 탈수소효소-1); CD40(Bp50); CD44(ECMR1I, H-CAM, Pgp-1); CD45(LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO(UCHL-1); CD46(MCP); CD47(gp42, IAP, OA3, 뉴로필린); CD47R(MEM-133); CD48(블라스트-1, 홀림3, BCM-1, OX-45); CD49b(VLA-2 α , gp1a, α 2 인테그린); CD49c(VLA-3 α , α 3 인테그린); CD49d(VLA-4 α , α 4 인테그린); CD50(ICAM-3); CD52(CAMPATH-1, HES);

CD53(OX-44); CD54(ICAM-1); CD55(DAF); CD58(LFA-3); CD60a(GD3); CD62L(L-셀렉틴, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD72(Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD73(엑토-5'-뉴클레오타이드 분해효소); CD74(Ii, 불변 사슬); CD75(시알로 은폐된 락토사민); CD75S(α 2, 6 시알릴화 락토사민); CD77(Pk 항원, BLA, CTH/Gb3); CD79a(Ig α , MB1); CD79b(Ig β , B29); CD80; CD81(TAPA-1); CD82(4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD83(HB15); CD84(P75, GR6); CD85j(ILT2, LIR1, MIR7); CDw92(p70); CD95(APO-1, FAS, TNFRSF6); CD98(4F2, FRP-1, RL-388); CD99(MIC2, E2); CD100(SEMA4D); CD102(ICAM-2); CD108(SEMA7A, JMH 혈액형 항원); CDw119(IFN γ R, IFN γ Ra); CD120a(TNFR1, p55); CD120b(TNFR2, p75, TNFR p80); CD121b(타입 2 IL-1R); CD122(IL2R β); CD124(IL-4R α); CD130(gp130); CD132(공통 γ 사슬, IL-2R γ); CDw137(4-1BB, ILA); CD139; CD147(바시긴, EMMPRIN, M6, OX47); CD150(SLAM, IPO-3); CD162(PSGL-1); CD164(MGC-24, MUC-24); CD166(ALCAM, KG-CAM, SC-1, BEN, DM-GRASP); CD167a(DDR1, trkE, cak); CD171(LICMA, NILE); CD175s(시알릴-Tn(S-Tn)); CD180(RP105, Bgp95, Ly64); CD184(CXCR4, NPY3R); CD185(CXCR5); CD192(CCR2); CD196(CCR6); CD197(CCR7(CDw197이었음)); CDw197(CCR7, EB11, BLR2); CD200(OX2); CD205(DEC-205); CDw210(CK); CD213a(CK); CDw217(CK); CDw218a(IL18R α); CDw218b(IL18R β); CD220(인슐린 R); CD221(IGF1 R); CD222(M6P-R, IGFII-R); CD224(GGT); CD225(Leu13); CD226(DNAM-1, PTA1); CD227(MUC1, PUM, PEM, EMA); CD229(Ly9); CD230(프라이온 단백질 (Prp)); CD232(VESP-R); CD245(p220/240); CD247(CD3 제타 사슬); CD261(TRAIL-R1, TNF-R 상과, 구성원 10a); CD262(TRAIL-R2, TNF-R 상과, 구성원 10b); CD263(TRAIL-R3, TNF-R 상과, 구성원 10c); CD264(TRAIL-R4, TNF-R 상과, 구성원 10d); CD265(TRANSE-R, TNF-R 상과, 구성원 11a); CD267(TACI, TNF-R 상과, 구성원 13B); CD268(BAFFR, TNF-R 상과, 구성원 13C); CD269(BCMA, TNF-R 상과, 구성원 16); CD275(B7H2, ICOSL); CD277(BT3.1.B7과: 부티로필린 3); CD295(LEPR); CD298(ATP1B3 Na K ATPase β 3 서브유닛); CD300a(CMRF-35H); CD300c(CMRF-35A); CD305(LAIR1); CD307(IRT2); CD315(CD9P1); CD316(EW12); CD317(BST2); CD319(CRACC, SLAMF7); CD321(JAM1); CD322(JAM2); CDw327(시글렉6, CD33L); CD68(gp 100, 매크로시알린); CXCR5; VLA-4; II형 MHC; 표면 IgM; 표면 IgD; APRL; 및/또는 BAFF-R을 포함하고(이들에 제한되지는 않음), 팔호 안에 기재된 명칭은 또 다른 명칭을 나타낸다. 표지자의 예로는 본원의 다른 곳에 제공된 것들을 포함한다.

[0072] 일부 실시양태에서, B 세포 표적화는 두드러지게 발현되고/발현되거나 활성화된 B 세포에 존재하는 임의의 실재물(예컨대, 단백질, 지질, 탄수화물, 소분자 등)에 특히 결합하는 임의의 표적화 잔기(즉, 활성화된 B 세포 표지자)에 의해 달성될 수 있다. 예시적인 활성화된 B 세포 표지자로는 CD1a(R4, T6, HTA-1); CD1b(R1); CD15s(시알릴 루이스 X); CD15u(3' 술포 루이스 X); CD15su(6 술포-시알릴 루이스 X); CD30(Ber-H2, Ki-1); CD69(AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA); CD70(Ki-24, CD27 리간드); CD80(B7, B7-1, BB1); CD86(B7-2/B70); CD97(BLKDD/F12); CD125(IL-5R α); CD126(IL-6R α); CD138(신데칸-1, 헤파란 황산 프로테오글리칸); CD152(CTLA-4); CD252(OX40L, TNF(리간드) 상과, 구성원 4); CD253(TRAIL, TNF(ligand) 상과, 구성원 10); CD279(PD1); CD289(TLR9, 톨 유사 수용체 9); 및 CD312(EMR2)를 포함하고(이들에 제한되지는 않음), 팔호 안에 기재된 명칭은 또 다른 명칭을 나타낸다. 표지자의 예로는 본원의 다른 곳에 제공된 것들을 포함한다.

[0073] “B 세포 항원”은 B 세포에 의해 자연적으로 인식되거나 또는 B 세포에 의해 인식되도록 가공될 수 있고, (자연적으로 또는 당업계에 알려진 바와 같이 가공되어) B 세포에서 면역 반응을 촉발하는 임의의 항원(예를 들어, B 세포에서 B 세포 수용체에 의해 특히 인식되는 항원)을 의미한다. 일부 실시양태에서, T 세포 항원인 항원도 또한 B 세포 항원이다. 다른 실시양태에서, T 세포 항원은 또한 B 세포 항원이 아니다. B 세포 항원으로는 단백질, 펩티드, 소분자 및 탄수화물을 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, B 세포 항원은 비단백질 항원이다(즉, 단백질 또는 펩티드 항원이 아님). 일부 실시양태에서, B 세포 항원은 감염원과 회합된 탄수화물이다. 일부 실시양태에서, B 세포 항원은 감염원과 회합된 당단백질 또는 당펩티드이다. 감염원은 세균, 바이러스, 진균, 원생동물, 기생충 또는 프라이온일 수 있다. 일부 실시양태에서, B 세포 항원은 면역원성이 불량한 항원이다. 일부 실시양태에서, B 세포 항원은 남용되는 물질 또는 그의 일부분이다. 일부 실시양태에서, B 세포 항원은 중독성 물질 또는 그의 일부분이다. 중독성 물질로는 니코틴, 마약, 기침억제제, 신경안정제 및 진정제를 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, B 세포 항원은 독소, 예컨대 화학 무기 또는 천연 유래의 독소, 또는 오염물질이다. B 세포 항원은 유해한 환경관련 제제일 수도 있다. 다른 실시양태에서, B 세포 항원은 동종항원, 알레르겐, 피부 감각물질, 퇴행성 질환 항원, 합텐, 감염성 질환 항원, 암 항원, 아토피성 질환 항원, 중독성 물질, 이종항원 또는 대사성 질환 효소 또는 그의 효소 생성물이다.

[0074] “생분해성 중합체”는 대상체의 신체에 도입될 때 시간이 흐르면서 분해되는 중합체를 의미한다. 생분해성 중합체로는 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리케탈 또는 폴리아미드를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 중합체는 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 생분해성 중합체는 폴리에테르(예컨대, 폴리(에틸렌 글리콜)), 폴리에스테르, 폴리카

르보네이트 또는 폴리아미드, 또는 다른 생분해성 중합체의 블록 공중합체를 포함한다. 실시양태에서, 생분해성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤의 블록 공중합체를 포함한다. 그러나, 일부 실시양태에서 생분해성 중합체는 폴리에테르, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하지 않거나, 폴리에테르만으로 이루어진다. 일반적으로, 합성 나노운반체의 일부로서 사용하도록, 생분해성 중합체는 pH 7.4, 25℃의 물에 불용성이다. 실시양태에서, 생분해성 중합체는 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 결정된 바와 같이, 중량 평균 분자량이 약 800 내지 약 50,000달톤의 범위에 있다. 일부 실시양태에서, 중량 평균 분자량은 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 결정된 바와 같이, 약 800달톤 내지 약 10,000달톤, 바람직하게는 800달톤 내지 10,000달톤이다. 다른 실시양태에서, 겔 투과 크로마토그래피에 의해 결정된 바와 같이, 중량 평균 분자량은 1,000달톤 내지 10,000달톤이다. 실시양태에서, 생분해성 중합체는 폴리케탈을 포함하지 않는다.

[0075] “동시 투여됨”은 대상체에게 둘 이상의 약물을 제 시간에 연관되는 방식으로 투여함을 의미한다. 실시양태에서, 동시 투여는 둘 이상의 약물을 동일한 투여형으로 투여함으로써 일어날 수 있다. 다른 실시양태에서, 동시 투여는 둘 이상의 약물을 상이한 투여형으로, 단 명시된 기간 이내에, 바람직하게는 1개월 이내, 더 바람직하게는 1주 이내, 더욱 더 바람직하게는 1일 이내, 더욱 더 바람직하게는 1시간 이내에 투여함을 포함할 수 있다.

[0076] “커플링” 또는 “커플링된” 또는 “커플링들”(등)은 합성 나노운반체에 부착되거나 합성 나노운반체 내에 함유됨을 의미한다. 일부 실시양태에서, 커플링은 공유성이다. 일부 실시양태에서, 공유 커플링은 하나 이상의 연결기, 중합체 또는 그의 단위에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 커플링은 비공유성이다. 일부 실시양태에서, 비공유 커플링은 전하의 상호작용, 친화성 상호작용, 금속 배위, 물리적 흡착, 호스트-게스트(hostguest) 상호작용, 소수성 상호작용, TT 적층 상호작용, 수소결합 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기 상호작용, 정전기 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용, 및/또는 이들의 조합에 의해 매개된다. 실시양태에서, 커플링은 종래의 기법을 사용하여 합성 나노운반체 내에 캡슐화의 맥락에서 일어날 수 있다. 전술한 임의의 커플링을 표면 위에 또는 본 발명의 합성 나노운반체 내에 있도록 배열할 수 있다.

[0077] “유래한”은 원래 공급원으로부터 개조된 또는 변형됨을 의미한다. 예를 들어 비제한적인 예로서, 감염성 균주로부터 유래한 펩티드 항원은 감염성 균주에 있는 원래 항원에 존재하는 천연 아미노산 잔기를 대체하는 몇가지의 비천연 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 개조 또는 변형은 증가된 특이성, 더 용이한 항원 가공, 또는 개선된 안전성을 포함한(이에 제한되지는 않음) 다양한 이유 때문일 수 있다.

[0078] “투여형”은 대상체에게 투여하기에 적합한 매질, 담체, 비히클 또는 장치 내의 약물을 의미한다.

[0079] 본 발명 조성물의 “유효량”은 특정 목적에 효과적인 양이다. 예를 들어, 유효량이 치료 목적을 위한 것인 경우, 그 양은 본원에 제공된 질환, 장애, 및/또는 상태의 하나 이상의 증상 또는 특징을 치료하고, 완화하며, 개선하고, 경감시키며, 그 개시를 지연시키고, 진행을 억제하며, 중증도를 감소시키고/감소시키거나, 발생률을 감소시키기에 효과적인 양이다.

[0080] “캡슐화하다”는 합성 나노운반체 내로 둘러싸고, 바람직하게는 합성 나노운반체 내로 완전히 둘러싸움을 의미한다. 캡슐화된 물질의 대부분 또는 전부는 합성 나노운반체 외부의 국지 환경에 노출되지 않는다. 캡슐화는 흡수와는 구별되는데, 흡수는 물질의 대부분 또는 전부를 합성 나노운반체의 표면 위에 위치시키고, 그 물질을 합성 나노운반체 외부의 국지 환경에 노출시킨다.

[0081] “pH 감응성 분리를 나타낸다”는 두 실재물 사이, 예컨대 면역조절제와 합성 나노운반체 또는 면역조절제 커플링 잔기 사이의 커플링이 주위의 pH 변화에 의해 상당히 감소되거나 제거됨을 의미한다. 실시양태에서, 관련 pH 감응성 분리는 본원에 제공된 임의의 관계 또는 그의 조합을 만족시킬 수 있다.

[0082] “IArel(4.5),%”는 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량을, 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량과 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 합성 나노운반체에 보유되는 면역조절제의 중량의 합으로 나눈 것으로서 정의되며, 중량%로서 표현되고, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취하여진다. 실시양태에서, t는 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 또는 30시간이다. 바람직한 실시양태에서, t는 24시간이다.

[0083] “IArel(7.4),%”는 합성 나노운반체가 pH 7.4의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제의 중량을, 합성 나노운반체가 pH 7.4의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 방출되는 면역조절제

의 중량과 합성 나노운반체가 pH 7.4의 시험관내 수성 환경에 t시간 동안 노출될 때 합성 나노운반체에 보유되는 면역조절제의 중량의 합으로 나눈 것으로서 정의되며, 중량%로서 표현되고, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취하여진다. 실시양태에서, t는 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 또는 30시간이다. 바람직한 실시양태에서, t는 24시간이다.

[0084] “IA(4.5)_{t1}”은 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t1시간 동안 노출될 때 방출되는, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취한 면역조절제의 중량으로서 정의된다. “IA(4.5)_{t2}”는 합성 나노운반체가 pH 4.5의 시험관내 수성 환경에 t2시간 동안 노출될 때 방출되는, 합성 나노운반체 샘플의 평균으로서 취한 면역조절제의 중량으로서 정의된다. t1은 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 또는 30시간이고; t2는 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 또는 28시간이고; t1>t2이다. 바람직한 실시양태에서, t1은 24시간이고, t2는 6시간이다.

[0085] “면역조절제”는 면역 반응을 조절하는 제제를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, “조절한다”는 면역 반응을 유도하거나, 향상시키거나, 자극하거나, 또는 안내함을 가리킨다. 이러한 제제로는 항원에 대한 면역 반응을 자극(또는 상승)하지만, 항원이 아니거나 항원으로부터 유래하는 것이 아닌 보강제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역조절제는 합성 나노운반체의 표면에 있고/있거나 합성 나노운반체 내에 포함된다. 실시양태에서, 면역조절제는 중합체 또는 그의 단위에 의해 합성 나노운반체에 커플링된다.

[0086] 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체의 모든 면역조절제는 서로 동일하다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 다수의 상이한 유형의 면역조절제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 다수의 개별 면역조절제를 포함하는데, 이들은 모두 서로 동일하다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 정확하게 한 가지 유형의 면역조절제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 정확하게 구별되는 두 가지 유형의 면역조절제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 구별되는 두 가지 초과 유형의 면역조절제를 포함한다.

[0087] “면역조절제 커플링 잔기”는 이를 통해 면역조절제가 합성 나노운반체에 결합되는 임의의 잔기이다. 이러한 잔기로는 공유 결합, 예컨대 아마이드 결합 또는 에스테르 결합, 및 면역조절제를 합성 나노운반체에 (공유적으로 또는 비공유적으로) 결합시키는 별개의 분자를 포함한다. 이들 분자는 연결기 또는 중합체 또는 그의 단위를 포함한다. 예를 들어, 면역조절제 커플링 잔기는 면역조절제(예를 들어, 면역조절성 핵산)가 정전기적으로 결합하는 하전된 중합체를 포함할 수 있다. 다른 예로서, 면역조절제 커플링 잔기는 면역조절제가 공유적으로 결합하는 중합체 또는 그의 단위를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 잔기는 폴리에스테르를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 잔기는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락트산-코-글리콜산) 또는 폴리카프로락톤을 포함한다. 상기 잔기는 또한 상기 임의의 중합체의 단위, 예컨대 락티드 또는 글리콜리드를 포함할 수 있다.

[0088] “불안정성 면역조절제(들)”는 생리적 조건하에 불안정하고, 더 이상 약리학적으로 활성이 아닌 정도로 분해되는 면역조절제 또는 면역조절제들을 의미한다. 실시양태에서, 불안정성 면역조절제는 전신 소실 반감기가 24시간 미만, 바람직하게는 12시간 미만, 더 바람직하게는 10시간 미만, 더욱 더 바람직하게는 8시간 미만, 더욱 더 바람직하게는 6시간 미만인 것으로 관측되었다. 실시양태에서, 불안정성 면역조절제는 이미다조퀴놀린, 아데닌 유도체, 또는 5'-CG-3'을 포함하는 올리고뉴클레오타이드(이 때, C는 메틸화되어 있지 않고, 이 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 불안정한 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 주쇄를 포함함)를 포함한다. 실시양태에서, 이미다조퀴놀린은 이미다조퀴놀린 아민, 이미다조피리딘 아민, 6,7-융합된 시클로알킬이미다조피리딘 아민, 이미퀴모드 또는 레지퀴모드를 포함한다.

[0089] “합성 나노운반체의 최대 치수”는 합성 나노운반체의 임의의 축을 따라 측정된 나노운반체의 가장 긴 치수를 의미한다. “합성 나노운반체의 최소 치수”는 합성 나노운반체의 임의의 축을 따라 측정된 합성 나노운반체의 가장 짧은 치수를 의미한다. 예를 들어, 구형 합성 나노운반체의 경우, 합성 나노운반체의 최대 및 최소 치수는 실질적으로 동일하고, 그의 직경 크기일 것이다. 유사하게, 입방형 합성 나노운반체의 경우, 합성 나노운반체의 최소 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 최소일 것이고, 반면 합성 나노운반체의 최대 치수는 그의 높이, 폭 또는 길이 중 최대일 것이다. 실시양태에서, 샘플내 합성 나노운반체의 총수를 기준으로 샘플내 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 100nm 초과이다. 실시양태에서, 샘플내 합성 나노운반체의 총수를 기준으로 샘플내 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 5 μ m 이하이다. 바람직하게, 샘플내 합성 나노운반체의 총수를 기준으로 샘플내 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%의 최소 치수는 110nm 이상, 더 바람직하게는 120nm 이상, 더 바람직하게는 130nm 이상, 더 바람직하게는 150nm 이

상이다. 바람직하게, 샘플내 합성 나노운반체의 총수를 기준으로 샘플내 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 $3\mu\text{m}$ 이하, 더 바람직하게는 $2\mu\text{m}$ 이하, 더 바람직하게는 $1\mu\text{m}$ 이하, 더 바람직하게는 800nm 이하, 더 바람직하게는 600nm 이하, 더 바람직하게는 500nm 이하이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플내 합성 나노운반체의 총수를 기준으로 샘플내 합성 나노운반체의 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%의 최대 치수는 100nm 이상, 더 바람직하게는 120nm 이상, 더 바람직하게는 130nm 이상, 더 바람직하게는 140nm 이상, 더 바람직하게는 150nm 이상이다. 합성 나노운반체 크기의 치수는 합성 나노운반체를 액체(보통 수성) 매질에 현탁시키고, 동적 광산란을 사용하여(예를 들어, 브룩헤이븐 제타PALS(Brookhaven ZetaPALS) 기기를 사용하여) 얻는다.

[0090] “얻어진”은 원래 공급원으로부터 개조 또는 변형 없이 얻음을 의미한다. 예를 들어, 실시양태에서, 공급원으로부터 얻어진 항원은 그 공급원에 있는 원래의 아미노산 잔기 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 예를 들어 공급원으로부터 얻어진 항원은 그 공급원에 있는 원래의 분자 구조를 포함할 수 있다.

[0091] “올리고뉴클레오타이드”는 6 내지 100개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 8 내지 75개의 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 10 내지 50개의 뉴클레오타이드, 더욱 더 바람직하게는 15 내지 25개의 뉴클레오타이드, 더욱 더 바람직하게는 20개의 뉴클레오타이드를 갖는 뉴클레오타이드 분자를 의미한다. 본 발명에 따른 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 100개 미만의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 50개 미만의 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 25개 미만의 뉴클레오타이드, 더욱 더 바람직하게는 10개 미만의 뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드를 구성할 수 있는 5'-CG-3' 서열에 존재하는 임의의 시토신 뉴클레오타이드(“C”)는 메틸화되지 않을 수 있고, 올리고뉴클레오타이드를 구성할 수 있는 5'-CG-3' 서열 이외의 올리고뉴클레오타이드의 부분에 존재하는 C는 메틸화될 수 있거나 또는 메틸화되지 않을 수 있다. 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 불안정성 뉴클레오타이드간 연결(생리적 조건하에 불안정한 뉴클레오타이드간 연결을 의미함)을 포함하는 주쇄를 포함한다. “불안정성 뉴클레오타이드간 연결”은 올리고뉴클레오타이드를 구성하는, 주쇄를 안정화하도록 화학적으로 변형되지 않거나, 또는 생리적 조건하에 올리고뉴클레오타이드의 주쇄를 불안정화하도록 화학적으로 변형된 두 개 뉴클레오타이드 사이의 연결을 뜻한다. 불안정성 뉴클레오타이드간 연결의 예는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결이다. 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 주쇄는 생리적 조건하에 주쇄를 안정화하는 기능을 하는 안정화 화학적 변형을 포함하지 않는다. 실시양태에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 주쇄는 포스포로티오에이트 안정화 화학적 변형을 포함하도록 변형되지 않은 주쇄를 포함한다.

[0092] “제약상 허용되는 부형제”는 본 발명의 조성물의 투여를 더 용이하게 하기 위하여 본 발명의 조성물에 첨가된 약리학상 불활성인 물질을 의미한다. 제약상 허용되는 부형제의 비제한적인 예로는 탄산 칼슘, 인산 칼슘, 다양한 희석제, 다양한 당 및 다양한 종류의 전분, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0093] “방출 속도”는 시험관내 방출 시험에서 포착된 면역조절제가 조성물, 예컨대 합성 나노운반체로부터 주위의 매질로 나오는 속도를 의미한다. 먼저, 적당한 시험관내 방출 매질에 넣음으로써 방출 시험을 위한 합성 나노운반체를 준비한다. 이는 일반적으로 원심분리하여 합성 나노운반체를 펠렛화한 후 완충제를 교환하고, 온화한 조건을 사용하여 합성 나노운반체를 재구성함으로써 이루어진다. 분석은 적당한 온도 제어 장치에서 샘플을 37°C 에 넣음으로써 시작된다. 다양한 시간대에서 샘플을 취한다.

[0094] 합성 나노운반체는 원심분리하여 합성 나노운반체를 펠렛화함으로써 방출 매질로부터 분리된다. 방출 매질은 합성 나노운반체로부터 분산된 면역조절제에 대하여 분석한다. 면역조절제의 함량 및 질을 결정하기 위하여 HPLC를 사용하여 면역조절제를 측정하였다. 남아 있는 포착된 면역조절제를 함유하는 펠렛을 용매에 용해시키거나 염기에 의해 가수분해시켜 합성 나노운반체로부터 포착된 면역조절제를 유리시킨다. 그 다음, 주어진 시간대에서 방출되지 않은 면역조절제의 함량 및 질을 결정하기 위하여 HPLC를 사용하여 면역조절제를 함유하는 펠렛을 또한 측정한다.

[0095] 방출 매질로 방출된 면역조절제와 합성 나노운반체에 남아 있는 면역조절제 사이에 물질 균형이 맞춰진다. 데이터는 방출된 분획으로서 또는 시간에 따라 방출된 μg 으로서 제공된 순 방출량으로서 제시된다.

[0096] “대상체”는 포유동물, 예컨대 인간 및 영장류를 포함한 동물; 조류; 가축 또는 농장 동물, 예컨대 고양이, 개, 양, 염소, 소, 말 및 돼지; 실험 동물, 예컨대 마우스, 래트 및 기니아 피그; 어류 등을 의미한다.

[0097] “합성 나노운반체(들)”은 자연에 존재하지 않고, 크기가 5 마이크로미터 이하인 적어도 하나의 치수를 갖는 별개의 대상을 뜻한다. 알부민 나노입자는 합성 나노운반체로서 분명히 포함된다.

- [0098] 합성 나노운반체는 중합체성 나노입자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 하나 이상의 중합체성 나노입자를 포함할 수 있다. 그러나, 합성 나노운반체는 또한 다른 나노물질을 포함할 수 있고, 예를 들어 지질 중합체 나노입자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체성 매트릭스는 코팅층(예를 들어, 리포솜, 지질 단층, 미셀 등)에 의해 둘러싸일 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 미셀이 아니다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 지질층(예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 중합체성 매트릭스를 포함하는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체의 다양한 원소는 중합체성 매트릭스와 커플링될 수 있다.
- [0099] 합성 나노운반체는 하나 이상의 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 리포솜을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 지질 이중층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 지질 단층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 미셀을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 지질층(예컨대, 지질 이중층, 지질 단층 등)에 의해 둘러싸인 비중합체성 코어(예를 들어, 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자, 뼈 입자, 바이러스 입자, 단백질, 핵산, 탄수화물 등)를 포함할 수 있다.
- [0100] 합성 나노운반체는 지질 기재의 나노입자, 금속성 나노입자, 계면활성제 기재의 유화액, 덴드리머, 버키볼, 나노와이어, 바이러스 유사 입자, 펩티드 또는 단백질 기재의 입자(예컨대, 알부민 나노입자)를 포함할 수 있다. 합성 나노운반체는 구형, 입방형, 피라미드형, 장방형, 원통형, 도넛형 등을 포함한(이들에 제한되지는 않음) 여러 가지의 상이한 모양일 수 있다. 본 발명에 따른 합성 나노운반체는 하나 이상의 표면을 포함한다. 본 발명의 실시예에 사용하도록 적합화될 수 있는 예시적인 합성 나노운반체는 (1) 미국 특허 제5,543,158호(Gref et al.)에 개시된 생분해성 나노입자, (2) 미국 특허출원 공개공보 제2006/0002852호(Saltzman et al.)의 중합체성 나노입자, (3) 미국 특허출원 공개공보 제2009/0028910호(DeSimone et al.)의 리소그래피로(lithographically) 구성된 나노입자, (4) WO 2009/051837호(von Andrian et al.)의 개시, 또는 (5) 미국 특허출원 공개공보 제2008/0145441호(Penades et al.)에 개시된 나노입자를 포함한다.
- [0101] 최소 치수가 약 100nm 이하, 바람직하게는 100nm 이하인 본 발명에 따른 합성 나노운반체는 보체를 활성화하는 히드록실 기를 갖는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 활성화하는 히드록실 기가 아닌 잔기로 본질적으로 이루어지는 표면을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 최소 치수가 약 100nm 이하, 바람직하게는 100nm 이하인 본 발명에 따른 합성 나노운반체는 보체를 실질적으로 활성화하는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 실질적으로 활성화하지 않는 잔기로 본질적으로 이루어지는 표면을 포함한다. 더 바람직한 실시양태에서, 최소 치수가 약 100nm 이하, 바람직하게는 100nm 이하인 본 발명에 따른 합성 나노운반체는 보체를 활성화하는 표면을 포함하지 않거나, 또는 대안적으로 보체를 활성화하지 않는 잔기로 본질적으로 이루어지는 표면을 포함한다. 실시양태에서, 합성 나노운반체는 중형비가 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 또는 1:10보다 클 수 있다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 구형 또는 회전 타원체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 편평하거나 판형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 입방체 또는 입방형이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 계란형 또는 타원체이다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 원통형, 원뿔형 또는 피라미드형이다.
- [0103] 종종, 크기, 모양 및/또는 조성에 있어서 비교적 균일한 합성 나노운반체의 집단을 사용하여 각각의 합성 나노운반체가 유사한 특성을 갖도록 하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 합성 나노운반체의 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 평균 직경 또는 평균 치수의 5%, 10% 또는 20% 이내에 속하는 최소 치수 또는 최대 치수를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체의 집단은 크기, 모양 및/또는 조성에 있어서 불균질할 수 있다.
- [0104] 합성 나노운반체는 속이 차 있거나 비어 있을 수 있고, 하나 이상의 층을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 층은 다른 층(들)에 비하여 고유의 조성 및 고유의 특성을 갖는다. 오직 하나의 예를 들자면, 합성 나노운반체는 코어/셸(core/shell) 구조를 가질 수 있는데, 이 때 코어는 하나의 층(예를 들어, 중합체성 코어)이고, 셸은 또 하나의 층(예를 들어, 지질 이중층 또는 단층)이다. 합성 나노운반체는 다수의 상이한 층들을 포함할 수 있다.
- [0105] “T 세포 항원”은 T 세포에 의해 인식되고 T 세포에서 면역 반응을 촉발하는 임의의 항원을 의미한다(예를 들어, I형 또는 II형 주 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 분자에 결합되거나, CD1 복합체에 결합된 항원 또는 그의 일부분의 제시에 의해 T 세포의 T 세포 수용체 또는 NKT 세포에 의해 특히 인

식되는 항원). 일부 실시양태에서, T 세포 항원인 항원은 또한 B 세포 항원이다. 다른 실시양태에서, T 세포 항원은 또한 B 세포 항원이 아니다. T 세포 항원은 일반적으로 단백질 또는 펩티드이다. T 세포 항원은 CD8+ T 세포 반응, CD4+ T 세포 반응, 또는 이들 둘다를 자극하는 항원일 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서 T 세포 항원은 두 유형의 반응을 모두 효과적으로 자극할 수 있다.

[0106] 일부 실시양태에서, T 세포 항원은 T 세포 도움의 자극에 의해 관계 없는 B 세포 항원에 증가된 반응을 일으킬 수 있는 T 세포 항원인 보조 T 세포 항원이다. 실시양태에서, 보조 T 세포 항원은 파상풍 변성 독소, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 풍진 바이러스, 거대세포 바이러스, 아데노바이러스, 디프테리아 변성독소 또는 파드레(PADRE) 펩티드로부터 유래한 하나 이상의 펩티드를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 보조 T 세포 항원은 α -갈락토실세라미드(α -GalCer), α 연결된 글리코스핑고리피드(스핑고모나스 속(*Sphingomonas* spp.) 유래), 갈락토실 디아실글리세롤(보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*) 유래), 리포포스포글리칸(레이쉬마니아 도노바니(*Leishmania donovani*) 유래) 및 포스포티딜이노시톨 테트라만노시드(PIM4)(미코박테리움 레프라이(*Mycobacterium leprae*) 유래)를 포함한(이들에 제한되지는 않음), 하나 이상의 지질 또는 당지질을 포함할 수 있다. 보조 T 세포 항원으로서 유용한 추가의 지질 및/또는 당지질에 대하여는 문헌[V. Cerundolo et al., “Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies.”, *Nature Rev. Immunol.*, 9:28-38(2009)]을 참조한다. 실시양태에서, CD4+ T 세포 항원은 공급원, 예컨대 천연 공급원으로부터 얻어진 CD4+ T 세포 항원의 유도 체일 수 있다. 이러한 실시양태에서, CD4+ T 세포 항원 서열, 예컨대 MHC II에 결합하는 펩티드류는 상기 공급원으로부터 얻어진 항원에 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 동일성을 가질 수 있다. 실시양태에서, T 세포 항원, 바람직하게 보조 T 세포 항원은 합성 나노운반체에 커플링되거나 또는 그로부터 떨어질 수 있다.

[0107] “그의 단위”는 중합체의 단량체성 단위를 가리키고, 중합체는 일반적으로 일련의 연결된 단량체로 구성된다.

[0108] “백신”은 특정 병원균 또는 질환에 대한 면역 반응을 개선시키는 물질의 조성물을 의미한다. 백신은 통상적으로 대상체의 면역 시스템을 자극하여 특정 항원을 이물질로서 인식하여 이를 대상체의 신체로부터 제거하는 인자를 함유한다. 백신은 또한 면역 '기억'을 확립하여, 사람이 다시 항원 투여받는다면 항원을 재빨리 인식하고 그 항원에 반응할 것이다. 백신은 예방성(예를 들어, 임의의 병원균에 의한 미래의 감염을 예방하기 위하여)이거나, 또는 치료성(예를 들어, 암의 치료를 위한 암특이성 항원에 대한 백신)일 수 있다. 본 발명에 따른 백신은 본원에 제공된 합성 나노운반체 또는 조성물 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0110] 본 발명의 화합물, 공액결합물 또는 합성 나노운반체의 제조 방법

[0111] 면역조절제는 합성 나노운반체로부터의 면역조절제의 분리가 본원에 제공된 분리 관계식을 만족시키는 임의의 방식으로 합성 나노운반체에 커플링될 수 있다. 합성 나노운반체의 면역조절제가 본원에 제공된 분리 관계식을 만족시키는지의 여부를 결정하는 방법은 상기 다른 곳 및 실시예에 제공되어 있다.

[0112] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 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)]을 포함한(이들에 제한되지는 않음) 다양한 방법을 사용하여 합성 나노운반체에 캡슐화될 수 있다. 미국 특허 제6,632,671호(Unger, 2003년 10월 14일 허여)에 개시된 방법을 포함하여(이에 제한되지는 않음) 합성 나노운반체에 올리고뉴클레오타이드를 캡슐화하기에 적합한 다른 방법을 사용할 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 면역조절제는 면역조절제 커플링 잔기(예를 들어, 중합체 또는 그의 단위)에 의해 합성 나노운반체에 공유적으로 커플링된다. 일반적으로, 중합체 또는 그의 단위는 몇가지 방법으로 면역조절제와 공유적으로 커플링될 수 있다.

[0114] 하기 방법 또는 제공된 방법의 임의의 단계는 예시적이며, 임의의 적합한 조건하에 수행될 수 있다. 일부 경우에서, 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계는 용매 또는 용매 혼합물의 존재 하에 수행될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 용매의 비제한적인 예로는 *p*-크레졸, 톨루엔, 크실렌, 메시틸렌, 디에틸 에테르, 글리콜, 석유 에테르, 헥산, 시클로헥산, 펜탄, 디클로로메탄(또는 메틸렌 클로라이드), 클로로포름, 디옥산, 테

트라히드로푸란(THF), 디메틸 술폭시드(DMSO), 디메틸포름아미드(DMF), 에틸 아세테이트(EtOAc), 트리에틸아민, 아세토니트릴, 메틸-*t*-부틸 에테르(MTBE), *N*-메틸피롤리돈(NMP), 디메틸아세트아미드(DMAC), 이소프로판올(IPA), 이들의 혼합물 등을 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다. 일부 경우에서, 용매는 에틸 아세테이트, 메틸렌 클로라이드, THF, DMF, NMP, DMAC, DMSO, 톨루엔, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0115] 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계는 임의의 적합한 온도에서 수행될 수 있다. 일부 경우에서, 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계는 약 실온(예를 들어, 약 25℃, 약 20℃, 약 20℃ 내지 약 25℃ 등)에서 수행된다. 그러나, 일부 경우에서 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계는 실온 미만의 온도 또는 실온 초과 온도, 예를 들어 약 -20℃, 약 -10℃, 약 0℃, 약 10℃, 약 30℃, 약 40℃, 약 50℃, 약 60℃, 약 70℃, 약 80℃, 약 90℃, 약 100℃, 약 120℃, 약 140℃, 약 150℃ 또는 그보다 높은 온도에서 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계는 0℃ 내지 120℃의 온도에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계는 한 가지 초과 온도에서 수행될 수 있다(예를 들어, 반응물이 제1 온도에서 첨가되고 반응 혼합물이 제2 온도에서 교반되며, 이 때 제1 온도로부터 제2 온도로의 전이는 점진적이거나 신속할 수 있음).

[0116] 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계를 임의의 적합한 기간 동안 진행시킬 수 있다. 일부 경우에서, 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계를 약 10분, 약 20분, 약 30분, 약 40분, 약 50분, 약 1시간, 약 2시간, 약 4시간, 약 8시간, 약 12시간, 약 16시간, 약 24시간, 약 2일, 약 3일, 약 4일 또는 그보다 긴 기간 동안 진행시킨다. 일부 경우에서, 반응 혼합물의 분취량을 취하여 중간 시간에서 분석하여 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계의 진행을 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법의 반응 또는 임의의 단계는 무수 조건의 불활성 분위기하에(예를 들어, 질소 또는 아르곤, 무수 용매 등의 분위기하에) 수행될 수 있다.

[0117] 일반적으로 알려져 있는 기법을 사용하여, (예를 들어, 증류, 컬럼 크로마토그래피, 추출, 침전 등에 의해) 반응 생성물 및/또는 중간 생성물을 분리하고/단리하거나, (예를 들어, 기액 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피, 핵 자기 공명 분광법 등에 의해) 분석할 수 있다. 일부 경우에서, 합성 나노운반체는 예를 들어 역상 HPLC를 사용하여 면역조절제의 첨가량을 결정하도록 분석할 수 있다.

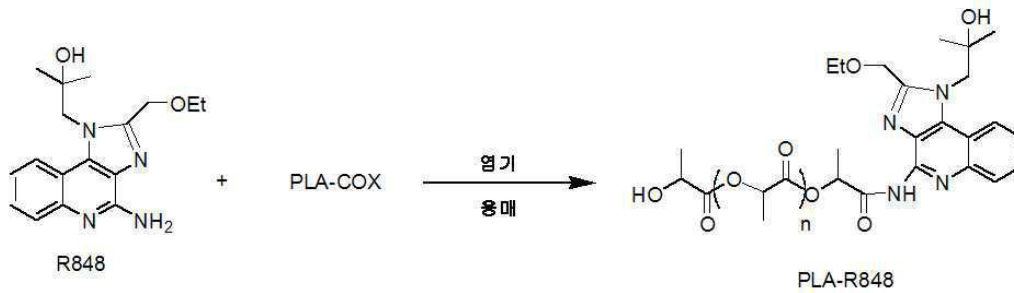
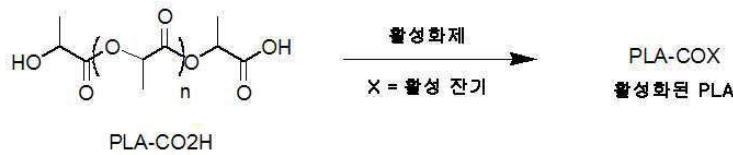
[0118] 중합체는 임의의 적합한 분자량을 가질 수 있다. 예를 들어, 중합체는 낮거나 높은 분자량을 가질 수 있다. 비제한적인 분자량 값으로는 100Da, 200Da, 300Da, 500Da, 750Da, 1,000Da, 2,000Da, 3,000Da, 4,000Da, 5,000Da, 6,000Da, 7,000Da, 8,000Da, 9,000Da, 10,000Da, 또는 그보다 높은 값을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 중량 평균 분자량이 약 800Da 내지 약 10,000Da이다. 중합체의 분자량은 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 결정될 수 있다.

[0119] 이하에 예시적인 반응을 제공하는데, 이에 제한시키려는 것은 아니다.

[0121] 방법 1

[0122] 아미드 합성에 일반적으로 사용되는 활성화제를 사용하여, 적어도 하나의 산 말단기를 갖는 중합체(예를 들어, PLA, PLGA) 또는 그의 단위를 반응성 아실화제, 예컨대 아실 할리드, 아실이미다졸, 활성 에스테르 등으로 변환시킨다.

[0123] 이 2단계 방법에서, 생성된 활성화된 중합체 또는 그의 단위(예를 들어, PLA, PLGA)를 단리한 다음, 염기의 존재 하에 면역조절제(예를 들어, R848)와 반응시켜, 예를 들어 하기 반응식에 도시된 바와 같이, 바람직한 공액 결합물(예를 들어, PLA-R848)을 제공한다.



[0124]

[0125]

PLA 또는 PLGA와 같은 중합체 또는 그의 단위를 활성화된 아실화 형태로 변환시키는데 사용될 수 있는 활성화제는 시아누르산 플루오라이드, N,N-테트라메틸플루오로포름아미디움 헥사플루오로포스페이트(TFFH); 아실이미다졸, 예컨대 카르보닐 디이미다졸(CDI), N,N'-카르보닐비스(3-메틸이미다졸륨) 트리플레이트(CBMIT); 및 카르보디이미드, 예컨대 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드(DCC), N-에틸-N'-(3-(디메틸아미노)프로필)카르보디이미드 히드록로라이드(EDC) 또는 N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC)의 존재 하에 활성 에스테르, 예컨대 N-히드록실숙신이미드(NHS 또는 HOSu); N,N'-디숙신이미딜 카르보네이트(DSC); DCC 또는 EDC 또는 DIC의 존재 하에 펜타플루오로페놀; 펜타플루오로페닐 트리플루오로아세테이트를 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다.

[0126]

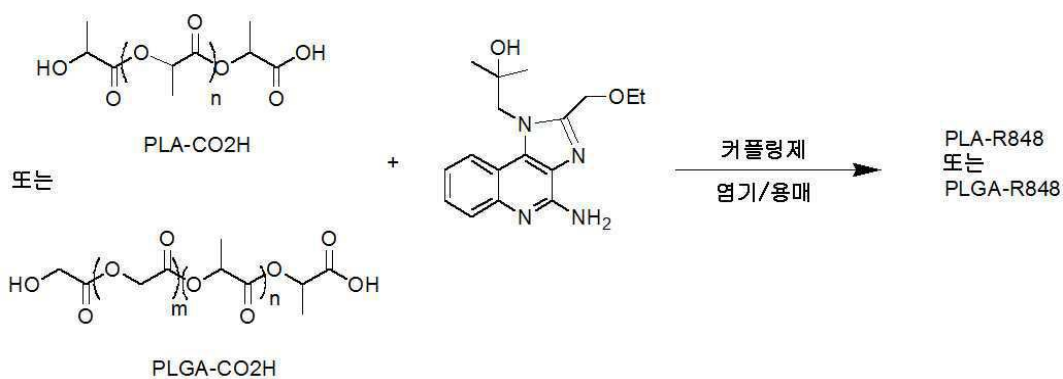
활성화된 중합체 또는 그의 단위는 활성화 후 (예를 들어, 침전, 추출 등에 의해) 분리되고/단리되거나 적합한 조건하에 (예를 들어, 저온, 아르곤하에) 보관될 수 있거나, 또는 즉시 사용될 수 있다. 활성화된 중합체 또는 그의 단위는 임의의 적합한 조건하에 면역조절제와 반응시킬 수 있다. 일부 경우에서, 상기 반응은 염기 및/또는 촉매의 존재 하에 수행된다. 염기/촉매의 비제한적인 예로는 디이소프로필에틸아민(DIPEA) 및 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)을 포함한다.

[0128]

방법 2

[0129]

산 말단기를 갖는 중합체 또는 그의 단위(예를 들어, 임의의 적합한 분자량을 갖는 PLA, PLGA)는, 중합체 또는 그의 단위(예를 들어, PLA, PLGA)를 동일 반응계 내에서 반응성 아실화제로 변환시키는 활성화제 또는 커플링제의 존재 하에, 면역조절제(예를 들어, R848)와 반응하여, 바람직한 공액결합물(예를 들어, PLA-R848, PLGA-R848)을 제공한다.



[0130]

[0131]

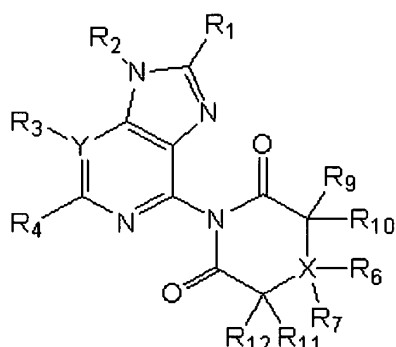
커플링제 또는 활성화제로는 카르보디이미드, 예컨대 EDC 또는 DCC 또는 DIC의 존재 하에 사용되는 활성화제, 예컨대 1-히드록시벤조트리아졸(HOBT), 1-히드록시-7-아자벤조트리아졸(HOAt), 3,4-디히드로-3-히드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트리아진(HO-Dhbt), N-히드록시숙신이미드(NHS 또는 HOSu), 펜타플루오로페놀(PFP); 카르보디이미드의 부재 하의 활성화제; 포스포늄 염, 예컨대 0-벤조트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노) 포스포늄 헥사플루오로포스페이트(BOP), 0-벤조트리아졸-1-일옥시트리스(피롤리디노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyBOP), 7-아자벤조트리아졸-1-일옥시트리스(피롤리디노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyAOP); 우로늄 염, 예컨대 0-벤조트리아졸-1-일옥시트리스-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트(TBTU) 및 헥사플루오로포스페

이트(HBTU), 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HATU), 0-(1,2-디히드로-2-옥소-1-피리딜)-1,1,3,3-테트라메틸-우로늄 테트라플루오로보레이트(TPTU); 할로우로늄 및 할로포스포늄 염, 예컨대 비스(테트라메틸렌)플루오로포름아미디늄 헥사플루오로포스페이트(BTFFH), 브로모트리스(디메틸아미노) 포스포늄 헥사플루오로-포스페이트(BroP), 브로모트리피롤리디노 포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyBroP) 및 클로로트리피롤리디노 포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyClOp); 벤조트리아진 유도체, 예컨대 0-(3,4-디히드로-4-옥소-1,2,3-벤조트리아진-3-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트(TDBTU) 및 3-(디에틸옥시포스포릴옥시)-1,2,3-벤조트리아진-4-(3H)-온(DEPBT)을 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다. 적합한 용매의 비제한적인 예로는 본원에 기술된 바와 같이 DMF, DCM, 톨루엔, 에틸 아세테이트 등을 포함한다.

[0133] 방법 3

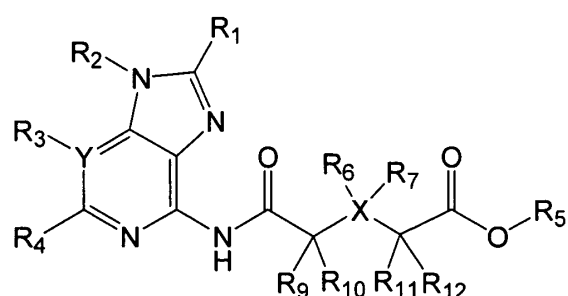
[0134] 면역조절제, 예컨대 R848도 또한 히드록실 기로 종결되는 중합체 또는 그의 단위에 커플링될 수 있다. 이러한 중합체 또는 그의 단위로는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리락티드, 폴리락티드-코-글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 및 폴리에스테르와 같은 기타, 또는 이들의 단위를 포함한다. 일반적으로 상기 반응은 다음과 같이 진행되고, 이때 화학식 IV의 이미드는 락톤 개환 중합에 사용되는 촉매를 사용하여 전술한 중합체 또는 그의 단위의 종결 히드록실과 반응할 것이다. 생성되는 반응 생성물(화학식 II)은 면역조절제의 아마이드를 에스테르 결합에 의해 중합체 또는 그의 단위에 연결시킨다. 화학식 IV 및 화학식 II의 화합물은 다음과 같다:

[0135] [화학식 IV]



[0136]

[0137] [화학식 II]



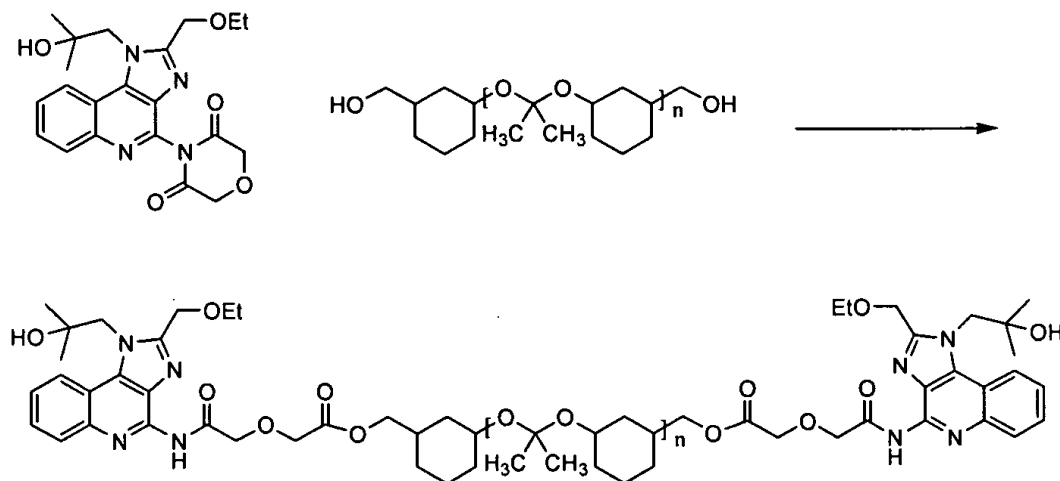
[0138]

[0139] 상기 식에서, R₁은 H, OH, SH, NH₂, 또는 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 알콕시, 알킬티오 또는 알킬아미노이고; R₂는 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며; Y는 N 또는 C이고; Y가 N이면, R₃은 존재하지 않거나; 또는 Y가 C이면, R₃은 H, 알킬, 치환된 알킬이거나, 또는 R₄와 함께 결합하여 이들이 연결되어 있는 피리딘 고리의 탄소 원자와 탄소환 또는 헤테로환을 형성하며; R₄는 R₃과 결합하지 않은 경우에는 H, 또는 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 알콕시, 알킬티오 또는 알킬아미노이어서 이들이 연결되어 있는 피리딘 고리의 탄소 원자와 탄소환 또는 헤테로환을 형성하거나; 또는 R₃과 결합하여 이들이 연결되어 있는 피리딘 고리의 탄소 원자와 탄소환 또는 헤테로환을 형성하고; R₅는 중합체 또는 그의 단위이며; X는 C, N, O 또는 S이고; R₆ 및 R₇은 각각 독립적으로 H이거나 치환되며; R₉, R₁₀, R₁₁ 및 R₁₂는 각각 독립적으로 H, 할로젠, OH, 티오, NH₂, 또는 치환되거나 치환되지 않은 알

킬, 아릴, 헤테로환, 알콕시, 아릴옥시, 알킬티오, 아릴티오, 알킬아미노 또는 아릴아미노이다.

[0140] 촉매로는 포스파진 염기, 1,8-디아자비시클로운데크-7-엔(DBU), 1,4,7-트리아자비시클로테센(TBD) 및 N-메틸-1,4,7-트리아자비시클로테센(MTDB)을 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다. 기타 촉매는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Kamber et al., Organocatalytic Ring-Opening Polymerization, *Chem. Rev.* 2007, 107, 58-13-5840]에 제공되어 있다. 적합한 용매의 비제한적인 예로는 메틸렌 클로라이드, 클로로포름 및 THF를 포함한다.

[0141] 상기 방법에 의해 완성된 반응의 구체적인 예는 다음에 나타내었다.



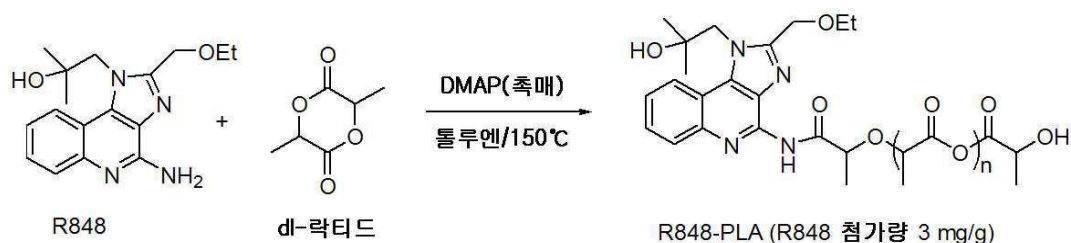
[0142]

[0143] 상기 식에서, R₅-OH는 2개의 히드록실 기(예를 들어, 디올, HO-R₅-OH)를 함유하고, 이들은 각각 R848과 회합된 이미드와의 반응에 의해 관능화된다. 일부 경우에서, HO-R₅-OH는 폴리-디올, 예컨대 폴리(헥사메틸 카르보네이트) 디올 또는 폴리카프로락톤 디올이다.

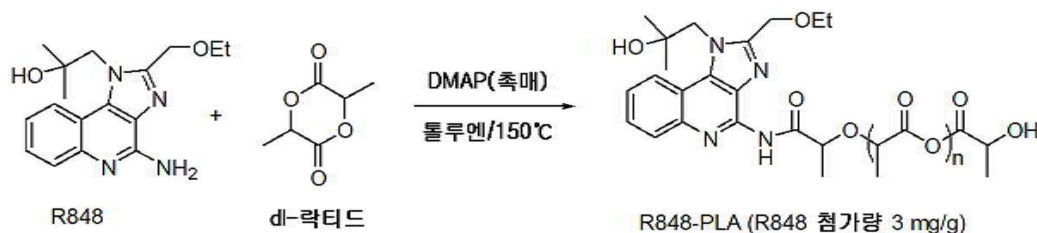
[0144] 폴리-디올이 사용되는 실시양태에서, 디올 기 중 하나는 보호기(예를 들어, *t*-부틸옥시카르보닐)로 보호될 수 있고, 따라서 폴리-디올은 화학식 HO-R₅-OP(식에서, P는 보호기임)의 화합물일 것이다. 면역조절제와 반응하여 면역조절제-R₅-OP 공액결합물을 형성한 후, 보호기를 제거할 수 있고, 또 하나의 디올 기를 임의의 적합한 시약(예를 들어, PLGA, PLA)과 반응시킬 수 있다.

[0146] 방법 4

[0147] 촉매의 존재 하에, 예를 들어 하기 반응식에 나타낸 바와 같이, 면역조절제(예를 들어, R848)와 중합체 또는 그 단위(예를 들어, D/L-락티드)의 단일 용기 내 개환 중합에 의해 공액결합물(예를 들어, R848-PLA)을 형성할 수 있다.



[0148]



[0149]

[0150]

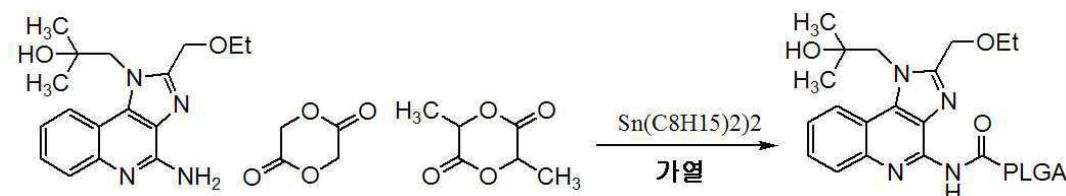
단일 단계 과정에서, 면역조절제 및 중합체 또는 그의 단위는 촉매를 포함하는 하나의 반응 혼합물로 조합될 수 있다. 이 반응은 적합한 온도에서(예를 들어, 약 150°C에서) 진행될 수 있고, 생성되는 공액결합물은 일반적으로 알려져 있는 기법을 사용하여 분리될 수 있다. 적합한 촉매의 비제한적인 예로는 DMAP 및 주석 에틸헥사노에이트를 포함한다.

[0152]

방법 5

[0153]

촉매의 존재 하에, 예를 들어 하기 반응식에 나타난 바와 같이, 면역조절제(예를 들어, R848)와 하나 이상의 중합체 또는 그의 단위(예를 들어, D/L-락티드 및 글리콜리드)의 2단계 개환 중합에 의해 공액결합물을 형성할 수 있다.



[0154]

[0155]

상기 중합체 또는 그의 단위는 먼저 조합될 수 있고, 일부 경우에서 가열되어(예를 들어, 135°C) 용액을 형성한다. 중합체 또는 그의 단위를 포함하는 용액에 면역조절제를 첨가한 후, 촉매(예를 들어, 주석 에틸헥사노에이트)를 첨가할 수 있다. 생성되는 공액결합물은 일반적으로 알려져 있는 기법을 사용하여 분리할 수 있다. 적합한 촉매의 비제한적인 예로는 DMAP 및 주석 에틸헥사노에이트를 포함한다.

[0156]

일부 실시양태에서, 면역조절제, 항원 및/또는 표적화 잔기는 중합체성 매트릭스와 공유적으로 회합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 공유성 회합은 연결기에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 면역조절제, 항원 및/또는 표적화 잔기는 중합체성 매트릭스와 비공유적으로 회합할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 면역조절제, 항원 및/또는 표적화 잔기는 중합체성 매트릭스 내에 캡슐화되거나, 중합체성 매트릭스에 의해 둘러싸이고/둘러싸이거나, 중합체성 매트릭스 전체에 걸쳐 분산될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 면역조절제, 항원 및/또는 표적화 잔기는 소수성 상호작용, 전하 상호작용, 반 데르 발스력 등에 의해 중합체성 매트릭스와 회합할 수 있다.

[0157]

면역조절제는 또한 나노운반체 내에 캡슐화될 수 있다. 따라서, 나노운반체는 pH 감응성인 임의의 물질일 수 있고, 단 생성되는 본 발명의 합성 나노운반체는 본원에 제공되는 분리 관계식을 만족시킨다. 이러한 합성 나노운반체는 당업계에 잘 알려져 있고, 폴리케탈 나노운반체, pH 감응성 리포솜, 산 팽윤, 가교결합된 나노입자, 예컨대 문헌[Griset et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 2469-2471]의 것(그의 초기 상태는 소수성이지만, 세포내 함입(cellular internalization)시 친수성 구조(히드로겔 입자)로 변환됨), 및 중합체성 나노입자, 예컨대 문헌[Griset, Dissertation entitled: Delivery of Paclitaxel via pH-Responsive Polymeric Nanoparticles for Prevention of LungCancer and Mesothelioma Recurrence, Ohio State University, 2003]의 것을 포함한다. pH 감응성 합성 나노운반체로는 또한 pH 6 미만에서 용해되는 중합체 또는 산성 pH에서 팽윤되는 중합체를 포함하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 비폴리케탈 물질이다. 다른 실시양태에서, 합성 나노운반체는 미셀이 아니다.

[0158]

광범위하게 다양한 중합체 및 그로부터 중합체성 매트릭스를 형성하는 방법은 통상적으로 알려져 있다. 일반적으로, 중합체성 매트릭스는 하나 이상의 중합체를 포함한다. 중합체는 천연 또는 비천연(합성) 중합체일 수 있다. 중합체는 둘 이상의 단량체를 포함하는 단독중합체 또는 공중합체일 수 있다. 서열의 관점에서 보면, 공중합체는 랜덤, 블록일 수 있거나, 또는 랜덤 및 블록 서열의 조합을 포함할 수 있다. 통상적으로, 본 발명에 따

른 중합체는 유기 중합체이다.

- [0159] 본 발명에 사용하기에 적합한 중합체의 예로는 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트(예를 들어, 폴리(1,3-디옥산-2-온)), 폴리무수물(예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)), 폴리히드록시산(예를 들어, 폴리(β -히드록시알카노에이트)), 폴리프로필푸메레이트, 폴리카프로락톤, 폴리아미드(예를 들어, 폴리카프로락탐), 폴리아세탈, 폴리에테르, 폴리에스테르(예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드), 폴리(오르토에스테르), 폴리시아노아크릴레이트, 폴리비닐 알콜, 폴리우레탄, 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리우레아, 폴리스티렌, 폴리아민 및 폴리스카리드(예를 들어, 키토산)를 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 중합체로는 폴리에스테르(예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리발레로락톤, 폴리(1,3-디옥산-2-온)); 폴리무수물(예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 및 폴리시아노아크릴레이트를 포함하여(이들에 제한되지는 않음), 미국 식품 의약국(FDA)에 의해 21 C.F.R. § 177.2600 하에 인간에서의 사용이 승인된 중합체를 포함한다.
- [0161] 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 나노운반체는 합성 나노운반체 내에 친수성 환경을 생성한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 소수성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소수성 중합체성 매트릭스를 포함하는 합성 나노운반체는 합성 나노운반체 내에 소수성 환경을 생성한다. 중합체의 친수성 또는 소수성의 선택은 합성 나노운반체 내에 포함되는(예를 들어, 커플링되는) 물질의 특질에 영향을 줄 수 있다.
- [0162] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 잔기 및/또는 관능기로 변형될 수 있다. 다양한 잔기 또는 관능기가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 PEG, 탄수화물 및/또는 폴리스카리드로부터 유도된 비환식 폴리아세탈로 변형될 수 있다(Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301).
- [0163] 일부 실시양태에서, 중합체는 지질 또는 지방산 기로 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지방산 기는 하나 이상의 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, 에이코사펜타에노산, 도코사헥사에노산 또는 에루크산 중 하나 이상일 수 있다.
- [0164] 일부 실시양태에서, 중합체는 락트산과 글리콜산 단위를 포함하는 공중합체, 예컨대 폴리(락트산-코-글리콜산) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드)(본원에서 집합적으로 “PLGA”로 불림); 및 글리콜산 단위를 포함하는 단독중합체(본원에서 “PGA”로 불림) 및 락트산 단위를 포함하는 단독중합체, 예컨대 폴리-L-락트산, 폴리-D-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-L-락티드, 폴리-D-락티드 및 폴리-D,L-락티드(본원에서 집합적으로 “PLA”로 불림)를 포함하는 폴리에스테르일 수 있다. 일부 실시양태에서, 예시적인 폴리에스테르는 예를 들어 폴리히드록시산; PEG 공중합체 및 락티드와 글리콜리드의 공중합체(예를 들어, PLA-PEG 공중합체, PGA-PEG 공중합체, PLGA-PEG 공중합체), 및 이들의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리에스테르는 예를 들어 폴리무수물, 폴리(오르토 에스테르), 폴리(오르토 에스테르)-PEG 공중합체, 폴리(카프로락톤), 폴리(카프로락톤)-PEG 공중합체, 폴릴리신, 폴릴리신-PEG 공중합체, 폴리(에틸렌이민), 폴리(에틸렌 이민)-PEG 공중합체, 폴리(L-락티드-코-L-리신), 폴리(세린 에스테르), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르), 폴리[α -(4-아미노부틸)-L-글리콜산], 및 이들의 유도체를 포함한다.
- [0165] 일부 실시양태에서, 중합체는 PLGA일 수 있다. PLGA는 락트산과 글리콜산의 생체 적합하고 생분해성인 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 바꿈으로써 조절할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용되는 PLGA는 약 85:15, 약 75:25, 약 60:40, 약 50:50, 약 40:60, 약 25:75 또는 약 15:85의 락트산:글리콜산 비를 특징으로 한다.
- [0166] 일부 실시양태에서, 중합체는 하나 이상의 아크릴 중합체이다. 특정 실시양태에서, 아크릴 중합체는 예를 들어 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴레이트 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴레이트, 시아노에틸 메타크릴레이트, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 메타크릴산 알킬아미드 공중합체, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴산 무수물), 메틸 메타크릴레이트,

폴리메타크릴레이트, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리아크릴아미드, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 글리시딜 메타크릴레이트 공중합체, 폴리시아노아크릴레이트, 및 상기 중합체들 중 하나 이상을 포함하는 조합물을 포함한다. 아크릴 중합체는 4급 암모늄 기의 함량이 낮은, 아크릴산 에스테르와 메타크릴산 에스테르의 완전-중합된 공중합체를 포함할 수 있다.

[0167] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 중합체일 수 있다. 일반적으로, 양이온성 중합체는 음으로 하전된 핵산 사슬(예를 들어, DNA, RNA, 또는 이들의 유도체)을 축합하고/축합하거나 보호할 수 있다. 아민 함유 중합체, 예컨대 폴리(리신)(Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; and Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7), 폴리(에틸렌 이민)(PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297) 및 폴리(아미도아민) 덴드리머(Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; 및 Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372)는 생리적 pH에서 양으로 하전되고, 핵산과 이온쌍을 형성하며, 다양한 세포주에서 형질감염을 매개한다.

[0168] 일부 실시양태에서, 중합체는 양이온성 측쇄를 갖는 분해성 폴리에스테르일 수 있다(Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; 및 Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399). 상기 폴리에스테르의 예로는 폴리(L-락티드-코-L-리신)(Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010), 폴리(세린 에스테르)(Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399), 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르)(Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633) 및 폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르)(Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; 및 Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633)를 포함한다.

[0169] 상기 중합체 및 다른 중합체의 특성, 및 이들의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제 6,123,727호, 제5,804,178호, 제5,770,417호, 제5,736,372호, 제5,716,404호, 제6,095,148호, 제5,837,752호, 제5,902,599호, 제5,696,175호, 제5,514,378호, 제5,512,600호, 제5,399,665호, 제5,019,379호, 제5,010,167호, 제4,806,621호, 제4,638,045호 및 제4,946,929호, 문헌[Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480], [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 일반적으로, 특정한 적합한 중합체를 합성하기 위한 다양한 방법은 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 제 6,506,577호, 제6,632,922호, 제6,686,446호 및 제6,818,732호에 기술되어 있다.

[0170] 일부 실시양태에서, 중합체는 선형 또는 분지형 중합체이다. 일부 실시양태에서, 중합체는 덴드리머일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 서로 가교결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 실질적으로 가교결합이 없을 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체는 본 발명에 따라 가교결합 단계를 겪지 않고 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물 및 합성 나노운반체는 임의의 상기 및 기타 중합체의 블록 공중합체, 그래프트 공중합체, 블렌드, 혼합물, 및/또는 부가물을 포함할 수 있음이 추가로 이해되어야 한다. 당업자는 본원에 열거된 중합체가 본 발명에 따라 유용할 수 있는, 예시적이고 포괄적이지 않은 중합체 목록을 나타냄을 인식할 것이다.

[0171] 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 금속 입자, 양자점, 세라믹 입자 등을 포함할 수 있다.

[0172] 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 선택적으로 하나 이상의 양쪽 친매체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 양쪽 친매체는 증가된 안정성, 개선된 균일성, 또는 증가된 점도를 갖는 합성 나노운반체의 생성을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 양쪽 친매체는 지질막(예를 들어, 지질 이중층, 지질 단층 등)의 내부 표면에 회합될 수 있다. 당업계에 알려져 있는 다수의 양쪽 친매체는 본 발명에 따른 합성 나노운반체의 제조에 사용하기에 적합하다. 이러한 양쪽 친매체로는 포스포글리세리드; 포스파티딜콜린; 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC); 디올레일포스파티딜 에탄올아민(DOPE); 디올레일옥시프로필트리에틸암모늄(DOTMA); 디올레일포스파티딜콜린; 콜레스테롤; 콜레스테롤 에스테르; 디아실글리세롤; 디아실글리세롤숙시네이트; 디포스파디딜 글리세롤(DPPG); 헥산데칸올; 지방 알콜, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG); 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 표면활성 지방산, 예컨대 팔미트산 또는 올레산; 지방산; 지방산 모노글리세리드; 지방산 디글리세리드; 지방산 아마이드; 소르비탄 트리올레이트(스판(Span)[®] 85) 글리코콜레이트; 소르비탄 모노라우레이트(스판(Span)[®] 20); 폴리소르베이트 20(트윈

(Tween)[®] 20); 폴리소르베이트 60(트윈(Tween)[®] 60); 폴리소르베이트 65(트윈[®] 65); 폴리소르베이트 80(트윈[®] 80); 폴리소르베이트 85(트윈[®] 85); 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트; 서팩틴(surfactin); 폴록사머; 소르비탄 지방산 에스테르, 에컨대 소르비탄 트리올리에이트; 레시틴; 리소레시틴; 포스파티딜세린; 포스파티딜이노시톨; 스펅고미엘린; 포스파티딜에탄올아민(세팔린); 카르디올리핀; 포스파디드산; 세레브로시드; 디세틸포스페이트; 디팔미토일포스파티딜글리세롤; 스테아릴아민; 도데실아민; 헥사데실-아민; 아세틸 팔미테이트; 글리세롤 리시놀리에이트; 헥사데실 스테아레이트; 이소프로필 미리스테이트; 킬록사폴; 폴리(에틸렌 글리콜)5000-포스파티딜 에탄올아민; 폴리(에틸렌 글리콜)400-모노스테아레이트; 인지질; 높은 계면활성제 특성을 갖는 합성 및/또는 천연 세제; 데옥시콜레이트; 시클로텍스트린; 카오트로픽(chaotropic) 염; 이온쌍 형성제; 및 이들의 조합물을 포함하지만, 이들에 제한되지는 않는다. 양쪽 친매체 성분은 상이한 양쪽 친매체의 혼합물일 수 있다. 당업자는 이것이 계면활성제 활성을 갖는 예시적이고 포괄적이지 않은 물질의 목록임을 인식할 것이다. 임의의 양쪽 친매체는 본 발명에 따라 사용되는 합성 나노운반체의 생성에 사용될 수 있다.

[0173] 일부 실시양태에서, 합성 나노운반체는 선택적으로 하나 이상의 탄수화물을 포함할 수 있다. 탄수화물은 천연 또는 합성일 수 있다. 탄수화물은 유도체화된 천연 탄수화물일 수 있다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 글루코스, 프락토스, 갈락토스, 리보스, 락토스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 셀비오스, 만노스, 크실로스, 아라비노스, 글루코론산, 갈락토론산, 만누론산, 글루코사민, 갈락토사민 및 뉴람산을 포함한(이들에 제한되지는 않음) 모노사카리드 또는 디사카리드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 폴루란, 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC), 히드록시셀룰로스(HC), 메틸셀룰로스(MC), 텍스트란, 시클로텍스트란, 글리코젠, 전분, 히드록시에틸전분, 카라기난, 글리콘, 아밀로스, 키토산, N,O-카르복시메틸키토산, 알긴 및 알긴산, 전분, 키틴, 헤파린, 곤약, 글루코만난, 푸스톨란, 헤파린, 히알루론산, 커들란 및 크산탄을 포함한(이들에 제한되지는 않음) 폴리사카리드이다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 만니톨, 소르비톨, 크실리톨, 에리트리톨, 말티톨 및 락티톨을 포함한(이들에 제한되지는 않음) 당알콜이다.

[0174] 합성 나노운반체는 당업계에 알려져 있는 광범위하게 다양한 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 합성 나노운반체는 나노침전, 유로관을 사용한 유동 집속, 분무 건조, 단일 및 이중 유하액 용매 증발, 용매 추출, 상분리, 분쇄, 미세유화액 과정, 미세가공, 나노가공, 희생층, 단순 및 복합 코아세르베이션과 같은 방법, 및 당업자에게 잘 알려져 있는 다른 방법에 의해 형성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 단분산성 반도체, 전도성, 자성, 유기 및 다른 나노물질을 위한 수성 및 유기 용매 합성이 기술된 바 있다(Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; 및 Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). 문헌에 추가의 방법이 기술되어 있다(예를 들어, 문헌[Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992], [Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13], [Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275] 및 [Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755], 및 또한 미국 특허 제5,578,325호 및 제6,007,845호 참조).

[0175] 특정 실시양태에서, 합성 나노운반체는 나노침전 방법 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 합성 나노운반체의 제조에 사용된 조건을 변화시켜 원하는 크기 또는 특징(예를 들어, 소수성, 친수성, 외부 형태, "점착성", 모양 등)의 입자를 얻을 수 있다. 합성 나노운반체를 제조하는 방법 및 사용된 조건(예를 들어, 용매, 온도, 농도, 공기 유량 등)은 합성 나노운반체에 커플링되는 물질 및/또는 중합체 매트릭스의 조성에 좌우될 수 있다.

[0176] 임의의 상기 방법에 의해 제조되는 입자가 바람직한 범위 밖의 크기 범위를 갖는다면, 입자는 예를 들어 체를 사용하여 크기에 따라 분류할 수 있다.

[0177] 커플링은 여러 가지의 상이한 방법으로 달성될 수 있고, 공유성 또는 비공유성일 수 있다. 이러한 커플링은 표면에 있거나 본 발명의 합성 나노운반체 이내에 있도록 배열될 수 있다. 본 발명의 합성 나노운반체의 원소(예컨대, 면역특정부 표면을 구성하는 잔기, 표적화 잔기, 중합체성 잔기 등)는, 예를 들어 하나 이상의 공유 결합에 의해 서로 직접 커플링될 수 있거나, 또는 하나 이상의 연결기에 의해 커플링될 수 있다. 합성 나노운반체를 관능화하는 추가의 방법은 미국 특허출원 공개공보 제2006/0002852호(Saltzman et al.), 미국 특허출원 공개공보 제2009/0028910호(DeSimone et al.), 또는 국제 특허출원 공개공보 WO 2008/127532호 A1(Murthy et al.)으로부터 개조될 수 있다.

[0178] 본 발명에 따라 임의의 적합한 연결기를 사용할 수 있다. 연결기는 아마이드 연결, 에스테르 연결, 디술피드 연결 등을 형성하기 위하여 사용될 수 있다. 연결기는 탄소 원자 또는 헤테로원자(예를 들어, 질소, 산소, 황 등)를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결기는 지방족 또는 헤테로지방족 연결기이다. 일부 실시양태에서, 연결기는 폴리알킬 연결기이다. 특정 실시양태에서, 연결기는 폴리에테르 연결기이다. 특정 실시양태에서, 연결기는

폴리에틸렌 연결기이다. 특정한 구체적 실시양태에서, 연결기는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 연결기이다.

- [0179] 일부 실시양태에서, 연결기는 절단가능한 연결기이다. 오직 소수의 예를 들자면, 절단가능한 연결기로는 프로테아제 절단가능한 펩티드 연결기, 뉴클레아제 감응성 핵산 연결기, 리파제 감응성 지질 연결기, 글리코시다제 감응성 탄수화물 연결기, pH 감응성 연결기, 저산소 감응성 연결기, 광으로 절단가능한 연결기, 열-불안정성 연결기, 효소로 절단가능한 연결기(예를 들어, 에스테라제 절단가능한 연결기), 초음파 감응성 연결기, x선으로 절단가능한 연결기 등이 있다. 일부 실시양태에서, 연결기는 절단가능한 연결기가 아니다.
- [0180] 다양한 방법을 사용하여 합성 나노운반체의 연결기 또는 다른 원소와 합성 나노운반체를 커플링할 수 있다. 일반적인 전략으로는 수동식 흡착(예를 들어, 정전기 상호작용에 의해), 다가 킬레이트화, 특정 결합쌍의 구성원 사이의 고친화성 비공유 결합, 공유 결합 형성 등을 포함한다(Gao et al., 2005, Curr.Op. Biotechnol., 16:63). 일부 실시양태에서, 클릭 화학(click chemistry)을 사용하여 물질과 합성 나노운반체를 회합시킬 수 있다.
- [0181] 비공유성 특정 결합 상호작용을 사용할 수 있다. 예를 들어, 입자 또는 생체 분자는 비오틴으로 관능화될 수 있고, 기타는 스트렙타비딘으로 관능화될 수 있다. 이러한 2가지 잔기는 특히 서로 비공유적으로 고친화성으로 결합하고, 그렇게 함으로써 입자와 생체분자를 회합한다. 다른 특정 결합쌍은 유사하게 사용될 수 있었다. 대안적으로, 히스티딘-표지 생체 분자는 니켈-니트로트리아세트산(Ni-NTA)에 공액결합된 입자와 회합할 수 있다.
- [0182] 커플링에 대한 추가의 일반적인 정보에 대하여는, 문헌[Journal Bioconjugate Chemistry, American Chemical Society 발행, Columbus OH, PO Box 3337, Columbus, OH, 43210]; [“Cross-Linking”, Pierce Chemical Technical Library(Pierce 웹 사이트에서 이용가능, 원래 1994-95 Pierce 카탈로그로 발행), 및 그 안에 인용된 참고문헌]; [Wong SS, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press Publishers, Boca Raton, 1991]; 및 [Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc., San Diego, 1996]을 참조한다.
- [0183] 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 방식으로 제조될 수 있으며, 본 발명은 결코 본원에 기술된 방법을 사용하여 생성될 수 있는 조성물에 제한되지 않음을 이해해야 한다. 적당한 방법의 선택은 회합될 특정 잔기의 특성에 대한 주의를 필요로 할 수 있다.
- [0185] 제약 조성물 및 사용 방법
- [0186] 본 발명에 따른 조성물은 본 발명의 합성 나노운반체를 제약상 허용되는 부형제와 함께 포함한다. 이 조성물은 종래의 제약 제조 및 배합 기법을 사용하여 제조하여 유용한 투여형을 얻을 수 있다. 실시양태에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 주사용 멸균 식염수 용액에 보존제와 함께 현탁된다.
- [0187] 일부 실시양태에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 멸균 조건하에 제조되거나 최종적으로 멸균된다. 이로써 생성된 조성물은 확실하게 멸균성이고 비감염성이므로, 비멸균성 조성물에 비하여 안전성을 개선시킬 수 있다. 이는, 특히 합성 나노운반체를 투여받는 대상체가 면역 결핍을 가지고, 감염증을 앓고 있고/있거나 감염되기 쉬운 경우, 중요한 안전성 조치를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 합성 나노운반체는 활성의 손실이 없는, 장기간 제형화 전략에 따라 동결 건조되어 현탁액에 또는 동결 건조된 분말로서 보관될 수 있다.
- [0188] 본 발명의 조성물은 피하, 근육 내, 진피 내, 경구, 비경구, 비강 내, 경점막, 직장; 안구, 피부, 경피를 포함한(이들에 제한되지는 않음) 다양한 투여 경로에 의해 또는 이들 경로의 조합에 의해 투여될 수 있다.
- [0189] 본원에 기술된 조성물 및 방법은 면역 반응을 유도하거나, 향상시키거나, 자극하거나, 조절하거나, 안내하는데 사용될 수 있다. 본원에 기술된 조성물 및 방법은 상태, 예컨대 암, 감염성 질환, 대사성 질환, 퇴행성 질환, 염증성 질환, 면역 질환, 또는 다른 장애 및/또는 상태의 진단, 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 본원에 기술된 조성물 및 방법은 또한 중독, 예컨대 니코틴 또는 마약 중독의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 본원에 기술된 조성물 및 방법은 또한 독소, 유해 물질, 환경 독소, 또는 다른 유해 제제에 대한 노출이 원인인 상태의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0191] 실시예
- [0192] 실시예 1: 활성화된 중합체의 제조

- [0193] PLA(dl-폴리락티드)(보링거-잉겔하임(Boehringer-Ingelheim)사의 레조머(Resomer) R202H, KOH 당량 산가: 0.21mmol/g, 고유 점도(iv): 0.21dl/g)(10g, 2.1mmol, 1.0eq)를 디클로로메탄(DCM)(35ml)에 용해시켰다. EDC(2.0g, 10.5mmol, 5eq) 및 NHS(1.2g, 10.5mmol, 5eq)를 첨가하였다. 초음파 처리로 고체를 용해시켰다. 생성된 용액을 실온에서 6일 동안 교반하였다. 이 용액을 농축하여 DCM의 대부분을 제거하고, 잔류물을 디에틸 에테르 250ml 및 MeOH 5ml의 용액에 첨가하여 활성화된 PLA-NHS 에스테르를 침전시켰다. 용매를 제거하고, 중합체를 에테르로 2회 세척하며(2×200ml), 진공하에 건조시켜, 백색 포말성 고체로서 PLA-NHS 활성화된 에스테르(약 8g 회수, ¹H NMR을 사용하여 NHS 에스테르의 존재를 확인하였음)를 얻었다. PLA-NHS 에스테르는 사용하기 전에 -10℃ 미만의 냉동기에 아르곤하에 보관하였다.
- [0194] 대안적으로, 상기 반응을 DCM 대신에 DMF, THF, 디옥산 또는 CHCl₃에서 수행할 수 있다. EDC 대신에 DCC를 사용할 수 있다(생성된 DCC-우레아를 여과한 후, 에테르로부터 PLA-NHS 에스테르를 침전시킴). EDC 또는 DCC 및 NHS의 양은 PLA의 2 내지 10eq의 범위 내일 수 있다.
- [0195] 동일한 방식으로, iv 0.33dl/g 및 산가 0.11mmol/g의 PLA 또는 PLGA(레조머 RG653H, 65% 락티드-35% 글리콜리드, iv: 0.39dl/g 및 산가: 0.08mmol/g) 또는 PLGA(레조머 RG752H, 75% 락티드-25% 글리콜리드, iv: 0.19dl/g 및 산가: 0.22mmol/g)를 상응하는 PLA-NHS 또는 PLGA-NHS 활성화된 에스테르로 변환시키고, 사용하기 전에 -10℃ 미만의 냉동기에 아르곤하에 보관한다.
- [0197] **실시예 2: 활성화된 중합체의 제조**
- [0198] PLA(R202H, 산가: 0.21mmol/g)(2.0g, 0.42mmol, 1.0eq)를 무수 아세트니트릴 10ml에 용해시켰다. N,N'-디숙신이미딜 카르보네이트(DSC)(215mg, 1.26mmol, 3.0eq) 및 촉매작용량의 4-(N,N-디메틸아미노)피리딘(DMAP)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 아르곤하에 1일 동안 교반하였다. 생성된 용액을 농축시켜 거의 건조시켰다. 그 다음, 잔류물을 에테르 40ml에 첨가하여 중합체를 침전시켰으며, 이를 에테르로 2회 세척하고(2×30ml), 진공하에 건조시켜, PLA-NHS 활성화된 에스테르를 얻었다(¹H NMR 결과, NHS 에스테르의 양은 약 80%이었음).
- [0200] **실시예 3: 활성화된 중합체의 제조**
- [0201] PLA(R202H)(5.0g, 1.05mmol)를 무수 DCM 25ml 및 무수 DMF 2.5ml에 용해시켰다. DCC(650mg, 3.15mmol, 5.0eq) 및 펜타플루오로페놀(PFP)(580mg, 3.15mmol, 5.0eq)을 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 6일 동안 교반한 다음, 농축하여 DCM을 제거하였다. 생성된 잔류물을 에테르 250ml에 첨가하여 활성화된 PLA 중합체를 침전시켰고, 이를 에테르로 세척하고(2×100ml), 진공하에 건조시켜, 백색 포말성 고체(4.0g)로서 PLA-PFP 활성화된 에스테르를 얻었다.
- [0203] **실시예 4: 면역조절제의 공액결합**
- [0204] PLA-NHS(1.0g), R848(132mg, 0.42mmol) 및 디이소프로필에틸아민(DIPEA)(0.073ml, 0.42mmol)을 아르곤하에 무수 DMF 2ml에 용해시켰다. 생성된 용액을 50 내지 60℃에서 2일 동안 가열하였다. 이 용액을 실온으로 냉각시키고, 탈이온(DI)수 40ml에 첨가하여 중합체 생성물을 침전시켰다. 그 다음, 중합체를 DI수(40ml) 및 에테르(2×40ml)로 세척하고, 진공하에 30℃에서 건조시켜, 백색 포말성 고체(0.8g, ¹H NMR 결과, R848은 아마이드 결합에 의해 PLA에 공액결합되었음)로서 R848-PLA 공액결합물을 얻었다. R848의 중합체와의 공액결합(첨가) 정도는 다음과 같이 HPLC 분석에 의해 확인되었다: 칭량된 양의 중합체를 THF/MeOH에 용해시키고, 15% NaOH로 처리하였다. 생성된 가수분해된 중합체 생성물을 HPLC에 의해 R848의 양에 대해 표준 곡선과 비교하여 분석하였다.
- [0206] **실시예 5: 면역조절제의 공액결합**
- [0207] PLA-NHS(1.0g, 0.21mmol, 1.0eq), R848(132mg, 0.42mmol, 2.0eq), DIPEA(0.15ml, 0.84mmol, 4.0eq) 및 DMAP(25mg, 0.21ml, 1.0eq)를 아르곤하에 무수 DMF 2ml에 용해시켰다. 생성된 용액을 50 내지 60℃에서 2일 동안 가열하였다. 이 용액을 실온으로 냉각시키고, 탈이온(DI)수 40ml에 첨가하여 중합체 생성물을 침전시켰다. 그 다음, 중합체를 DI수(40ml) 및 에테르(2×40ml)로 세척하고, 진공하에 30℃에서 건조시켜, 백색 포말성 고체

(0.7g)로서 PLA-R848 공액결합물을 얻었다. 중합체 20mg을 THF 0.2ml, MeOH 0.1ml 및 15% NaOH 0.1ml의 용액에서 가수분해시켰다. 중합체상의 R848의 양은 역상 HPLC 분석(C18 컬럼, 이동상 A: 물 내 0.1% TFA, 이동상 B: CH₃CN 내 0.1% TFA, 구배)에 의해 약 35mg/g인 것으로 결정되었다.

[0209] 실시예 6: 면역조절제의 공액결합

[0210] PLA(R202H)(2.0g, 0.42mmol, 1.0eq), DCC(260mg, 1.26mmol, 3.0eq), NHS(145mg, 1.26mmol, 3.0eq), R848(200mg, 0.63mmol, 1.5eq), DMAP(77mg, 0.63mmol, 1.5eq) 및 DIPEA(0.223ml, 1.26mmol, 3.0eq)를 무수 DMF 4ml에 용해시켰다. 이 혼합물을 50 내지 55℃에서 3일 동안 가열하였다. 이 혼합물을 실온으로 냉각시키고, DCM으로 희석시켰다. DCC-우레아를 여과하고, 여액을 농축하여 DCM을 제거하였다. 생성된 DMF 내 잔류물을 물(40ml)에 첨가하여 중합체 생성물을 침전시켰고, 이를 물(40ml), 에테르/DCM(40ml/4ml) 및 에테르(40ml)로 세척하였다. 진공하에 30℃에서 건조시킨 후, 원하는 PLA-R848 공액결합물을 백색의 포말성 고체(1.5g)로서 얻었다.

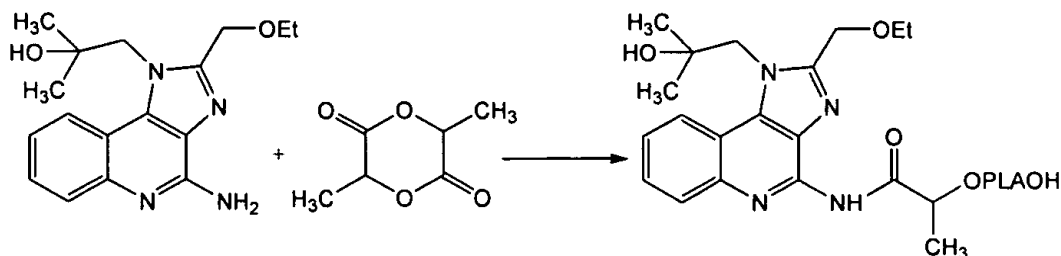
[0212] 실시예 7: 면역조절제의 공액결합

[0213] PLA(R202H)(2.0g, 0.42mmol, 1.0eq), EDC(242mg, 1.26mmol, 3.0eq), HOAt(171mg, 1.26mmol, 3.0eq), R848(200mg, 0.63mmol, 1.5eq) 및 DIPEA(0.223ml, 1.26mmol, 3.0eq)를 무수 DMF 4ml에 용해시켰다. 이 혼합물을 50 내지 55℃에서 2일 동안 가열하였다. 이 용액을 실온으로 냉각시키고, 물(40ml)에 첨가하여 중합체 생성물을 침전시켰고, 이를 물(40ml), 에테르/MeOH(40ml/2ml) 및 에테르(40ml)로 세척하였다. 주황색 중합체를 DCM 4ml에 용해시키고, 생성된 용액을 에테르 40ml에 첨가하여 주황색이 거의 없는 중합체를 침전시켰다. 연한 색의 중합체를 에테르(40ml)로 세척하였다. 진공하에 30℃에서 건조시킨 후, 원하는 PLA-R848 공액결합물을 연한 갈색의 포말성 고체(1.5g)로서 얻었다.

[0215] 실시예 8: 면역조절제의 공액결합

[0216] PLA(R202H)(1.0g, 0.21mmol, 1.0eq), EDC(161mg, 0.84mmol, 4.0eq), HOBt · H₂O(65mg, 0.42mmol, 2.0eq), R848(132mg, 0.42mmol, 2.0eq) 및 DIPEA(0.150ml, 0.84mmol, 4.0eq)를 무수 DMF 2ml에 용해시켰다. 이 혼합물을 50 내지 55℃에서 2일 동안 가열하였다. 이 용액을 실온으로 냉각시키고, 물(40ml)에 첨가하여 중합체 생성물을 침전시켰다. 주황색 중합체를 DCM 2ml에 용해시키고, 생성된 용액을 에테르 40ml에 첨가하여 중합체를 침전시켰고, 이를 물/아세톤(40ml/2ml) 및 에테르(40ml)로 세척하였다. 진공하에 30℃에서 건조시킨 후, 원하는 PLA-R848 공액결합물을 회백색의 포말성 고체(1.0g, R848의 중합체로의 첨가량은 HPLC 분석에 근거하여 약 45mg/g이었고, ¹H NMR에 의해 확인되었음)로서 얻었다. 동일한 방식으로, PLGA(75% 락티드)-R848 및 PLGA(50% 락티드)-R848을 제조하였다.

[0218] 실시예 9: 면역조절제의 공액결합

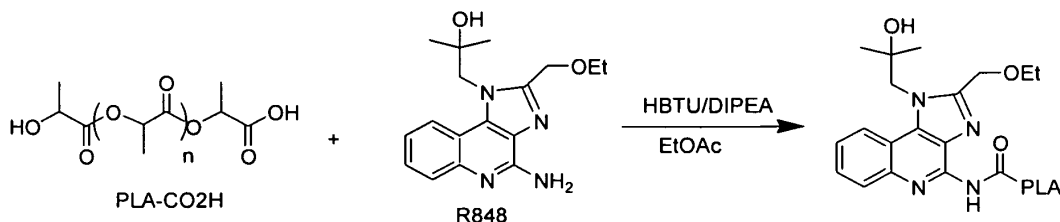


[0219]

[0220] 교반 막대 및 응축기가 장착된 환저 플라스크에 이미다조퀴놀린, 레지퀴모드(R-848, 218mg, 6.93×10^{-4} 몰), D/L 락티드(1.0g, 6.93×10^{-3} 몰) 및 무수 황산 나트륨(800mg)을 첨가하였다. 플라스크와 내용물을 진공하에 55℃에서 8시간 동안 건조시켰다. 냉각한 후, 플라스크를 아르곤으로 세정하고, 톨루엔(50ml)을 첨가하였다. 이 반응물을, 모든 락티드가 용해될 때까지 120℃로 맞춰진 오일조에서 교반한 다음, 피펫에 의해 주석 에틸헥사노

에이트(19mg, 15 μ l)를 첨가하였다. 아르곤하에 16시간 동안 계속 가열하였다. 냉각한 후, 반응물을 에테르(200 ml)로 희석하고, 용액을 물(200ml)로 세척하였다. 이 용액을 황산 마그네슘상에서 건조시키고, 여과시키며, 진공하에 증발시켜, 조질의 폴리락트산-R-848 공액결합물 880mg을 얻었다. 조질의 중합체를 용리액으로서 메틸렌 클로라이드 내 10% 메탄올을 사용하여, 실리카상에서 크로마토그래피하였다. 공액결합물을 함유하는 분획을 모아 증발시켜 정제된 공액결합물을 얻었다. 이를 고 진공하에 건조시켜 공액결합물을 단단한 포말로서 702mg (57.6%)의 수득량으로 제공하였다. 퀴놀린의 방향족 양성자의 NMR 신호를 적분하고, 이를 락트산 CH 양성자의 적분 강도에 비교함으로써, 공액결합물의 분자량이 약 2KD인 것으로 결정되었다. GPC 결과, 공액결합물은 유리 R848을 5% 미만으로 함유하였다.

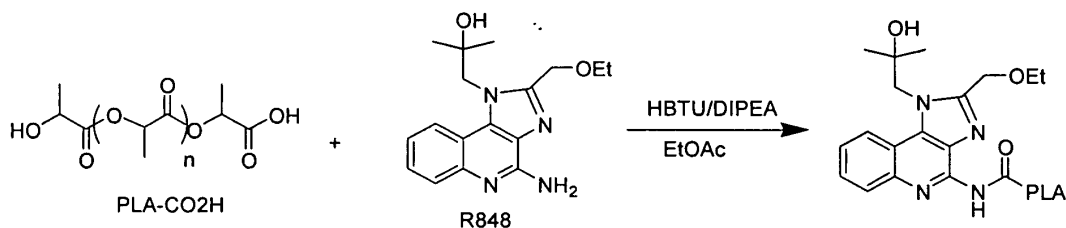
[0222] 실시예 10: 저 MW의 PLA-R848 공액결합물의 제조



[0223]

[0224] EtOAc(120ml) 내 PLA-CO₂H(평균 MW: 950, DPI: 1.32; 5.0g, 5.26mmol) 및 HBTU(4.0g, 10.5mmol)의 용액을 실온에서 아르곤하에 45분 동안 교반하였다. 화합물 R848(1.65g, 5.26mmol)을 첨가한 후, DIPEA(5.5ml, 31.6mmol)를 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 다음, 50 내지 55℃에서 15시간 동안 교반하였다. 냉각한 후, 혼합물을 EtOAc(150ml)로 희석시키고, 1% 시트르산 용액(2×40ml), 물(40ml) 및 염수 용액(40ml)으로 세척하였다. 이 용액을 Na₂SO₄(10g)상에서 건조시키고 겔상의 잔류물로 농축시켰다. 그 다음, 메틸 *t*-부틸 에테르 (MTBE)(150ml)를 첨가하고, 중합체 공액결합물이 용액으로부터 침전하였다. 그 다음, 중합체를 MTBE(50ml)로 세척하고, 진공하에 실온에서 2시간 동안 백색 포말(5.3g, GPC에 의한 평균 MW은 1200임, PDI: 1.29; R848 첨가량은 HPLC에 의해 20%임)로서 건조시켰다.

[0226] 실시예 11: 저 MW의 PLA-R848 공액결합물의 제조



[0227]

[0228] EtOAc(120ml) 내 PLA-CO₂H(평균 MW: 1800, DPI: 1.44; 9.5g, 5.26mmol) 및 HBTU(4.0g, 10.5mmol)의 용액을 실온에서 아르곤하에 45분 동안 교반하였다. 화합물 R848(1.65g, 5.26mmol)을 첨가한 후, DIPEA(5.5ml, 31.6mmol)를 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 다음, 50 내지 55℃에서 15시간 동안 교반하였다. 냉각한 후, 혼합물을 EtOAc(150ml)로 희석시키고, 1% 시트르산 용액(2×40ml), 물(40ml) 및 염수 용액(40ml)으로 세척하였다. 이 용액을 Na₂SO₄(10g)상에서 건조시키고 겔상의 잔류물로 농축시켰다. 그 다음, 메틸 *t*-부틸 에테르 (MTBE)(150ml)를 첨가하고, 중합체 공액결합물이 용액으로부터 침전하였다. 그 다음, 중합체를 MTBE(50ml)로 세척하고, 진공하에 실온에서 2시간 동안 백색 포말(9.5g, GPC에 의한 평균 MW은 1900임, PDI: 1.53; R848 첨가량은 HPLC에 의해 17%임)로서 건조시켰다.

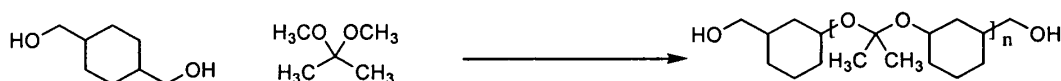
[0230] 실시예 12: 이미드 개환반응에 의한 R848의 PCADK에의 공액결합

[0231] 하기 실시예는 하기 단계 1에 예시된 바와 같이, WO 2008/127532호(Pulendran et al.)에 제공된 방법에 따라 폴리케탈 PCADK의 합성을 기술한다.

[0232] PCADK는 단거리 증류 헤드에 연결된 50ml의 2구 플라스크에서 합성하였다. 먼저, 재결정화된 p-톨루엔술포산 5.5mg(0.029mmol, 알드리치(Aldrich)사, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)을 에틸 아세테이트 6.82ml에 용해시키고, 1,4-시클로헥산디메탄올(12.98g, 90.0mmol, 알드리치사)을 함유한 벤젠 용액(100℃에서 유지시킴) 30ml에 첨가하였다. 에틸 아세테이트를 끓여서 제거하고, 증류된 2,2-디메톡시프로판(10.94ml, 90.0mmol, 알드리치사)을 상기 벤젠 용액에 첨가하여, 중합 반응을 개시하였다. 그 뒤에, 반응물에 추가 투여량의 2,2-디메톡시프로판(5 ml) 및 벤젠(25ml)을 계량 깔때기에 의해 6시간 동안 1시간 마다 첨가하고, 증류하여 제거된 2,2-디메톡시프로판 및 벤젠을 보충하였다. 8시간 후, 트리에틸아민 500 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 차가운 헥산(-20℃에서 보관됨)에서 침전시킨 후 진공 여과시켜, 중합체를 분리하였다. PCADK의 분자량은 자외선(UV) 검출기가 장착된 겔 투과 크로마토그래피(GPC)(시마즈(Shimadzu)사, 일본 코토 소재)에 의해 결정하였다. 이동상으로서 유량 1ml/분의 THF를 사용하였다. 폴리머 래버러토리즈(Polymer Laboratories, 미국 매사추세츠주 암허스트 소재)로부터의 폴리스티렌 표준물질을 사용하여 분자량 보정 곡선을 수립하였다. 이 화합물을 사용하여 모든 이후의 실험에서 PCADK 입자를 생성하였다.

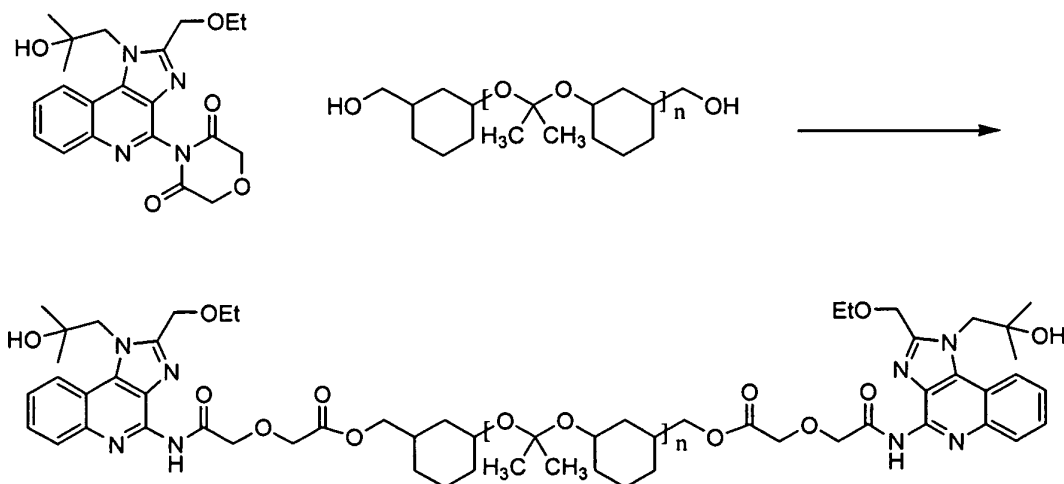
[0233] R848은 하기 나타난 단계 2에 따라 이미드 개환반응에 의해 분자량 6000의 PCADK의 말단 알콜기에 공액결합할 수 있다.

[0234] 단계 1: PCADK의 제조



[0235]

[0236] 단계 2: PCADK의 R848에의 공액결합

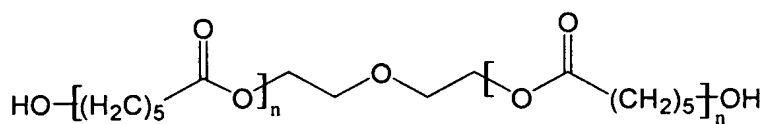


[0237]

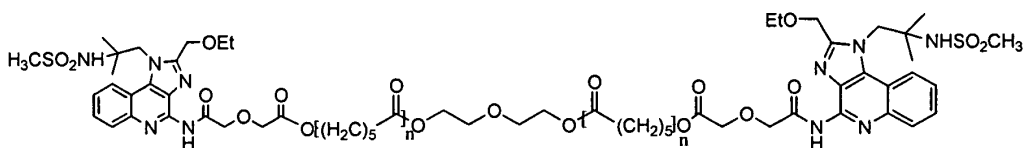
[0238] 단계 2에서, 단계 1으로부터의 중합체(12g, 2.0×10^{-3} 몰)를 메틸렌 클로라이드 100ml에 용해시키고, R848의 락탐(3.3g, 8.0×10^{-3} 몰)을 첨가하였다. 1,5,7-트리아자비시클로-[4,4,0]데크-5-엔(TBD, 0.835g, 6×10^{-3} 몰)을 하나의 분량으로 첨가하면서 이 슬러리를 교반하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 투명한 용액을 형성하였다. 이 용액을 메틸렌 클로라이드(100ml)로 희석시키고, 용액을 5% 시트르산으로 세척하였다. 이 용액을 황산 나트륨상에서 건조시킨 후, 여과하고 진공하에 증발시켰다. 고 진공하에 건조시킨 후, 중합체 11.3g(81%)을 얻었다. 일부분을 산에서 가수분해하고, R848 함량은 9중량%인 것으로 결정하였다.

[0240] 실시예 13: 이미드 개환반응에 의한 R848의 폴리카프로락톤디올에의 공액결합

[0241] 이미드 개환반응을 사용하여 R854를 분자량 2,000의 폴리카프로락톤디올의 말단 알콜기에 부착하였다. 폴리카프로락톤 디올은 알드리치 케미컬 컴퍼니(Aldrich Chemical Company)사로부터 구입하였고(Cat.#189421), 하기의 구조를 갖는다:



폴리카프로락톤 디올-R854 공액결합물은 하기의 구조를 갖는다:



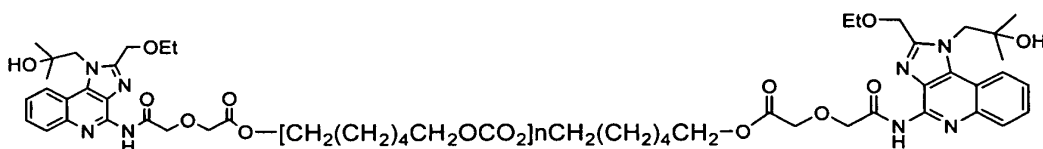
중합체(5g, 2.5×10^{-3} 몰)를 메틸렌 클로라이드 25ml에 용해시키고, R854(2.4g, 5.0×10^{-3} 몰)의 락탐을 첨가하였다. 1,5,7-트리아자비시클로-[4,4,0]데크-5-엔(TBD, 0.557g, 4×10^{-3} 몰)을 하나의 분량으로 첨가하면서, 이 슬러리를 교반하였다. 실온에서 15분 동안 교반한 후, 투명한 담황색의 용액을 형성하였다. 이 용액을 메틸렌 클로라이드(100ml)로 희석시키고, 용액을 5% 시트르산으로 세척하였다. 이 용액을 황산 나트륨상에서 건조시킨 후, 여과하고 진공하에 증발시켰다. 고 진공하에 건조시킨 후, 중합체 5.2g(70%)을 얻었다. 일부분을 산에서 가수분해하고, R848 함량은 18.5중량%인 것으로 결정하였다.

실시예 14: 이미드 개환반응에 의한 R848의 폴리(헥사메틸렌 카르보네이트) 디올에의 공액결합

이미드 개환반응을 사용하여 R848을 분자량 2,000의 폴리(헥사메틸렌 카르보네이트)디올의 말단 알콜기에 부착하였다. 폴리(헥사메틸렌 카르보네이트) 디올은 알드리치 케미컬 컴퍼니사로부터 구입하였고(Cat.#461164), 하기의 구조를 갖는다:

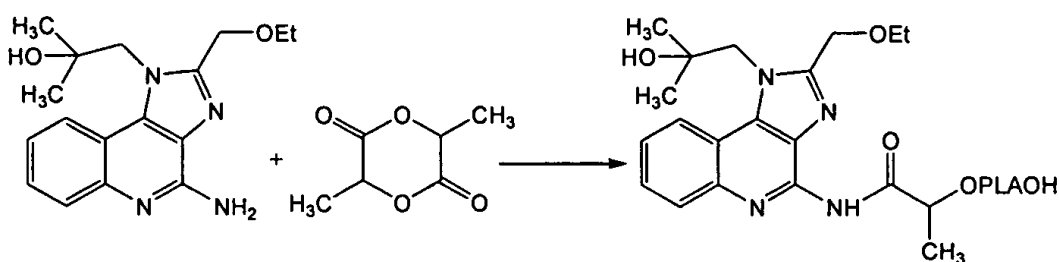


폴리(헥사메틸렌 카르보네이트) 디올-R848 공액결합물은 하기의 구조를 갖는다:



중합체(5g, 2.5×10^{-3} 몰)를 메틸렌 클로라이드 25ml에 용해시키고, R848(2.06g, 5.0×10^{-3} 몰)의 락탐을 첨가하였다. 1,5,7-트리아자비시클로-[4,4,0]데크-5-엔(TBD, 0.557g, 4×10^{-3} 몰)을 하나의 분량으로 첨가하면서, 이 슬러리를 교반하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 투명한 담황색의 용액을 형성하였다. 이 용액을 메틸렌 클로라이드(100ml)로 희석시키고, 용액을 5% 시트르산으로 세척하였다. 이 용액을 황산 나트륨상에서 건조시킨 후, 여과하고 진공하에 증발시켰다. 고 진공하에 건조시킨 후, 중합체 5.9g(84%)을 얻었다. NMR을 사용하여 R848의 함량을 결정하였고, 이는 21%인 것으로 결정하였다.

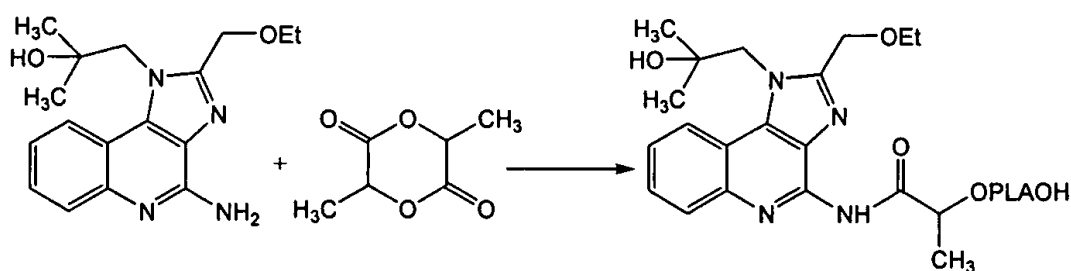
실시예 15: 주석 에틸헥사노에이트 촉매를 사용한 이미다조퀴놀린의 폴리락트산 공액결합물



교반 막대 및 응축기가 장착된 2구의 환저 플라스크에 이미다조퀴놀린, 레지퀴모드(R-848, 100mg, 3.18×10^{-4}

물), D/L 락티드(5.6g, 3.89×10^{-2} 몰) 및 무수 황산 나트륨(4.0g)을 첨가하였다. 플라스크와 내용물을 진공하에 50℃에서 8시간 동안 건조시켰다. 그 다음, 플라스크를 아르곤으로 세정하고, 톨루엔(100ml)을 첨가하였다. 이 반응물을, 모든 락티드가 용해될 때까지, 120℃로 맞춰진 오일조에서 교반한 다음, 피펫에 의해 주석 에틸헥사노에이트(75mg, 60 μ l)를 첨가하였다. 아르곤하에 16시간 동안 계속 가열하였다. 냉각한 후, 물(20ml)을 첨가하고, 30분 동안 계속 교반하였다. 반응물을 추가의 톨루엔(200ml)으로 희석시킨 다음, 물(200ml)로 세척하였다. 그 다음, 톨루엔 용액을 5%의 진한 염산(200ml)을 함유하는 10% 염화 나트륨 용액으로 세척한 후, 포화 중탄산 나트륨(200ml)으로 차례로 세척하였다. TLC(실리카, 메틸렌 클로라이드 내 10% 메탄올) 결과, 상기 용액은 유리 R-848을 함유하지 않았다. 이 용액을 황산 마그네슘상에서 건조시키고, 여과시키며, 진공하에 증발시켜, 폴리락트산-R-848 공액결합물 3.59g을 얻었다. 중합체의 일부분을 염기에서 가수분해시키고 HPLC에 의해 R-848 함량에 대하여 검사하였다. R-848 농도 대 HPLC 반응의 표준 곡선에 비교함으로써, 중합체가 중합체 1g 당 R-848 4.51 mg을 함유한 것으로 결정하였다. 중합체의 분자량은 GPC에 의해 약 19,000인 것으로 결정하였다.

[0258] 실시예 16: 이미다조퀴놀린의 저 분자량의 폴리락트산 공액결합물

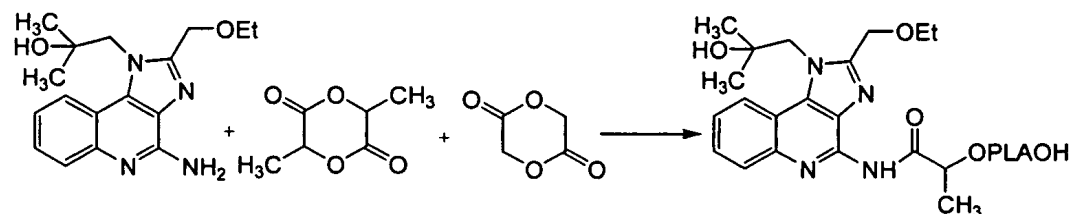


[0259]

[0260]

교반 막대 및 응축기가 장착된 환저 플라스크에 이미다조퀴놀린, 레지퀴모드(R-848, 218mg, 6.93×10^{-4} 몰), D/L 락티드(1.0g, 6.93×10^{-3} 몰) 및 무수 황산 나트륨(800mg)을 첨가하였다. 플라스크와 내용물을 진공하에 55℃에서 8시간 동안 건조시켰다. 냉각한 후, 플라스크를 아르곤으로 세정하고, 톨루엔(50ml)을 첨가하였다. 이 반응물을 모든 락티드가 용해될 때까지, 120℃로 맞춰진 오일조에서 교반한 다음, 피펫에 의해 주석 에틸헥사노에이트(19 mg, 15 μ l)를 첨가하였다. 아르곤하에 16시간 동안 계속 가열하였다. 냉각한 후, 반응물을 에테르(200ml)으로 희석시키고, 이 용액을 물(200ml)로 세척하였다. 이 용액을 황산 마그네슘상에서 건조시키고, 여과시키며, 진공하에 증발시켜, 조질의 폴리락트산-R-848 공액결합물 880mg을 얻었다. 조질의 중합체를, 용리액으로서 메틸렌 클로라이드 내 10% 메탄올을 사용하여 실리카상에서 크로마토그래피하였다. 공액결합물을 함유하는 분획을 모으고 증발시켜 정제된 공액결합물을 얻었다. 이것을 고 진공하에 건조시켜, 공액결합물을 단단한 포말로서 702mg (57.6%)의 수득량으로 제공하였다. 퀴놀린의 방향족 양성자의 NMR 신호를 적분하고, 이를 락트산 CH 양성자의 적분 강도에 비교함으로써, 공액결합물의 분자량이 약 2KD인 것으로 결정하였다. GPC 결과, 공액결합물은 유리 R848을 5% 미만으로 함유하였다.

[0262] 실시예 17: 이미다조퀴놀린의 저 분자량의 폴리락트산-코-글리콜산 공액결합물



[0263]

[0264]

교반 막대 및 응축기가 장착된 환저 플라스크에 이미다조퀴놀린, 레지퀴모드(R-848, 436mg, 1.39×10^{-3} 몰), 글리콜리드(402mg, 3.46×10^{-3} 몰), D/L 락티드(2.0 g, 1.39×10^{-2} 몰) 및 무수 황산 나트륨(1.6g)을 첨가하였다. 플라스크와 내용물을 진공하에 55℃에서 8시간 동안 건조시켰다. 냉각한 후, 플라스크를 아르곤으로 세정하고, 톨루엔(60ml)을 첨가하였다. 이 반응물을 모든 R848, 글리콜리드 및 락티드가 용해될 때까지, 120℃로 맞춰진 오일조에서 교반한 다음, 피펫에 의해 주석 에틸헥사노에이트(50mg, 39 μ l)를 첨가하였다. 아르곤하에 16시간 동안

계속 가열하였다. 냉각한 후, 반응물을 에틸 아세테이트(200ml)로 희석시키고, 이 용액을 물(200ml)로 세척하였다. 이 용액을 황산 마그네슘상에서 건조시키고, 여과시키며, 진공하에 증발시켜, 조질의 PLGA-R-848 공액결합물을 얻었다. 조질의 중합체를 용리액으로서 메틸렌 클로라이드 내 10% 메탄올을 사용하여 실리카상에서 크로마토그래피하였다. 공액결합물을 함유하는 분획을 모으고 증발시켜 정제된 공액결합물을 얻었다. 이것을 고 진공하에 건조시켜, 공액결합물을 단단한 포말로서 1.55g(54.6%)의 수득량으로 얻었다. 퀴놀린의 방향족 양성자의 NMR 신호를 적분하고, 이를 락트산 CH 양성자의 적분 강도에 비교함으로써, 공액결합물의 분자량이 약 2KD인 것으로 결정하였다. GPC 결과, 공액결합물은 검출가능한 유리 R848을 함유하지 않았다.

[0266] 실시예 18: 리튬 디이소프로필아미드 촉매를 사용한 이미다조퀴놀린의 폴리락트산 공액결합물

[0267] 이미다조퀴놀린(R-848), D/L 락티드 및 관련 유리 제품을 사용하기 전에 모두 진공하에 50℃에서 8시간 동안 건조시켰다. 교반 막대 및 응축기가 장착된 환저 플라스크에 R-848(33mg, 1.05×10^{-4} 몰) 및 무수 톨루엔(5ml)을 첨가하였다. 이것을 가열 환류시켜 R-848을 전부 용해시켰다. 이 용액을 질소하에 교반시키고 실온으로 냉각시켜, 미분된 R-848의 현탁액을 제공하였다. 이 현탁액에 리튬 디이소프로필 아미드(THF 내 2.0M, 50 μ l, 1.0×10^{-4} 몰)의 용액을 첨가한 후, 실온에서 5분 동안 계속 교반하였다. 형성된 담황색의 용액을 질소하에 D/L 락티드(1.87g, 1.3×10^{-3} 몰)의 뜨거운(120℃) 용액에 주사기에 의해 첨가하였다. 열원을 제거하고, 담황색의 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용액을 메틸렌 클로라이드(200ml)로 희석시킨 다음, 이를 1% 염산(2 \times 50ml)으로 세척하고 포화 중탄산 나트륨 용액(50ml)으로 세척하였다. 이 용액을 황산 마그네슘상에서 건조시키고, 여과시키며, 진공하에 증발시켜, 폴리락트산-R-848 공액결합물을 얻었다. TLC(실리카, 메틸렌 클로라이드 내 10% 메탄올) 결과, 상기 용액은 유리 R-848을 함유하지 않았다. 중합체를 메틸렌 클로라이드(10ml)에 용해시키고, 이 용액을 교반되는 헥산(200ml)에 점적하였다. 경사 분리(decantation)에 의해 침전된 중합체를 분리하고 진공하에 건조시켜 폴리락트산-R-848 공액결합물 1.47g을 백색 고체로서 얻었다. 중합체의 일부분을 염기에서 가수분해시키고, R-848 함량에 대하여 HPLC에 의해 검사하였다. R-848 농도 대 HPLC 반응의 표준곡선에 비교함으로써, 중합체가 중합체 1g 당 R-848 10.96mg을 함유한 것으로 결정하였다.

[0269] 실시예 19: 면역조절제의 저 MW PLA에의 부착

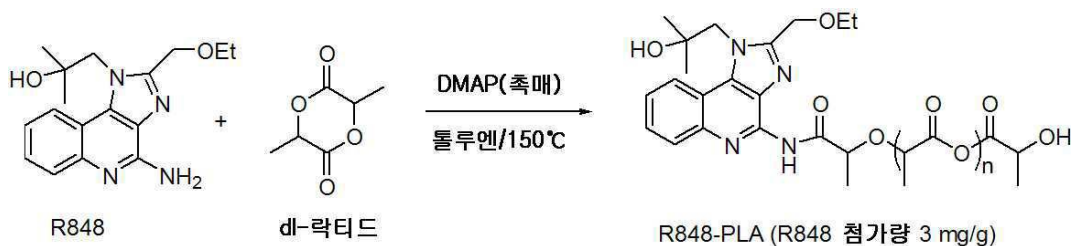
[0270] MW 5,000의 PLA(D/L-폴리락티드)(10.5g, 2.1mmol, 1.0eq)를 디클로로메탄(DCM)(35ml)에 용해시켰다. EDC(2.0g, 10.5mmol, 5eq) 및 NHS(1.2g, 10.5mmol, 5eq)를 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 3일 동안 교반하였다. 이 용액을 농축하여 대부분의 DCM을 제거하고, 잔류물을 디에틸 에테르 250ml와 MeOH 5ml의 용액에 첨가하여 활성화된 PLA-NHS 에스테르를 침전시켰다. 용매를 제거하고, 중합체를 에테르로 2회 세척하며(2 \times 200ml), 진공하에 건조시켜, PLA-NHS 활성화된 에스테르를 백색의 포말성 고체로서 얻었다(약 8g 회수, ¹H NMR을 사용하여 NHS 에스테르의 존재를 확인할 수 있음). PLA-NHS 에스테르는 사용하기 전에 아르곤하에 -10℃ 미만의 냉동기에 보관하였다.

[0271] 대안적으로, 상기 반응을 DCM 대신에 DMF, THF, 디옥산 또는 CHCl₃에서 수행할 수 있다. EDC 대신에 DCC를 사용할 수 있다(생성된 DCC-우레아를 여과한 후, 에테르로부터 PLA-NHS 에스테르를 침전시킴). EDC 또는 DCC 및 NHS의 양은 PLA의 2 내지 10eq의 범위 내일 수 있다.

[0273] 실시예 20: 면역조절제의 저 MW PLGA에의 부착

[0274] 중합체 활성화에 대하여 상기 제공된 것과 동일한 방식으로, 글리콜리드 50 내지 75%를 갖는 저 MW PLGA를 상응하는 PLGA-NHS 활성화된 에스테르로 변환시키고, 사용하기 전에 아르곤하에 -10℃ 미만의 냉동기에 보관하였다.

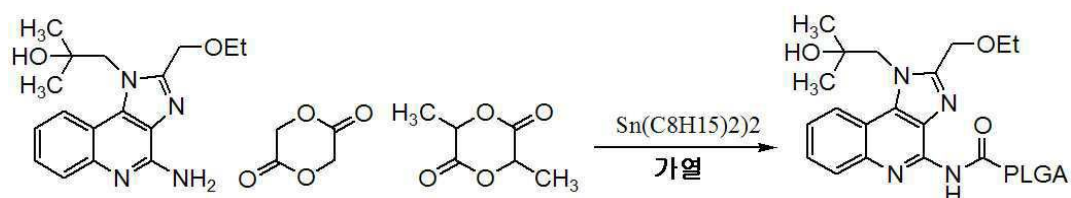
[0276] 실시예 21: 축매의 존재하에 D/L-락티드를 사용한, R848의 단일 용기내 개환 중합



[0277]

[0278] 무수 톨루엔 2ml 내 R848(0.2mmol, 63mg), D/L-락티드(40mmol, 5.8g) 및 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)(50mg, 0.4mmol)의 혼합물을 150°C(오일조 온도)로 천천히 가열하고, 이 온도에서 18시간 동안 유지시켰다(3시간 후, R848은 남아있지 않았음). 이 혼합물을 주위 온도로 냉각하고, 생성된 혼합물을 물(50ml)로 퀀칭시켜 생성된 중합체, R848-PLA를 침전시켰다. 그 다음, 중합체를 MeOH, iPrOH, 및 에틸 에테르 각각 45ml로 순서대로 세척하였다. 중합체를 진공하에 30°C에서 건조시켜 회백색의 부푼 고체(5.0g)를 얻었다. 중합체성 구조는 CDCl_3 에서 ^1H NMR에 의해 확인하였다. 중합체의 소량의 샘플을 THF/MeOH 내 2N NaOH(수성)로 처리하여, 역상 HPLC에 의해 중합체상의 R848의 첨가량을 결정하였다. R848의 첨가량은 중합체 1g 당 3mg이었다(첨가량 0.3% - 이론치의 27.5%).

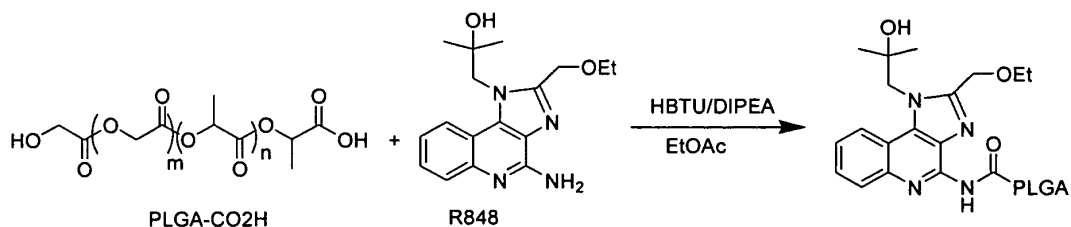
[0280] 실시예 22: D/L-락티드 및 글리콜리드를 사용한, R848의 2단계 개환 중합



[0281]

[0282] D/L-락티드(10.8g, 0.075mmol) 및 글리콜리드(2.9g, 0.025몰)의 혼합물을 아르곤하에 135°C로 가열하였다. 일단 모든 물질이 용융되어 투명한 용액이 생성되면, R848(1.08g, 3.43×10^{-3} 몰)을 첨가하였다. 이 용액을 느린 기류의 아르곤하에 135°C에서 1시간 동안 교반하였다. 주석 에틸헥사노에이트($150\mu\text{l}$)를 첨가하고, 4시간 동안 계속 가열하였다. 냉각한 후, 단단한 연갈색의 덩어리를 메틸렌 클로라이드(250ml)에 용해시키고, 이 용액을 5% 타르타르산 용액($2 \times 200\text{ml}$)으로 세척하였다. 메틸렌 클로라이드 용액을 황산 마그네슘상에서 건조시키고, 여과시킨 다음, 진공하에 농축시켰다. 잔류물을 메틸렌 클로라이드(20ml)에 용해시키고, 교반하면서 2-프로판올(250ml)을 첨가하였다. 분리된 중합체를 2-프로판올의 경사 분리에 의해 분리하고, 고 진공하에 건조시켰다. NMR 결과, 중합체는 락티드 71.4% 및 글리콜리드 28.6%이고, 분자량이 4,000이었다. NMR에 의하면, R848의 첨가량은 이론치에 가까웠다.

[0284] 실시예 23: PLGA-R848 공액결합물의 제조

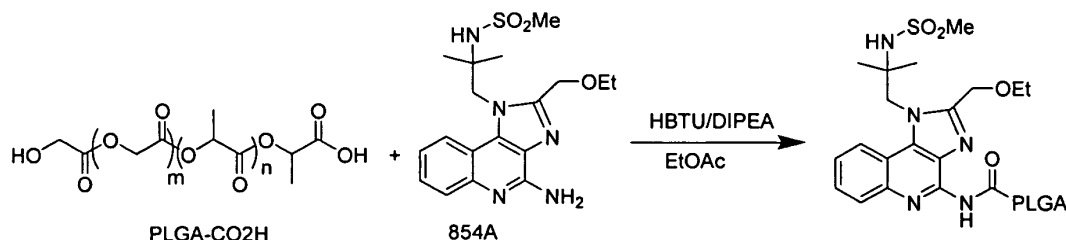


[0285]

[0286] 무수 EtOAc(160ml) 내 PLGA(레이크쇼어스 폴리머스(Lakeshores Polymers), MW 약 5,000, 7525DLG1A, 산가 0.7mmol/g, 10g, 7.0mmol) 및 HBTU(5.3g, 14mmol)의 혼합물을 실온에서 아르곤하에 50분 동안 교반하였다. 화합물 R848(2.2g, 7mmol)을 첨가한 후, 디이소프로필에틸아민(DIPEA)(5ml, 28mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 다음, 50 내지 55°C에서 밤새(약 16시간 동안) 교반하였다. 냉각한 후, 혼합물을 EtOAc(200ml)로 희석시키고, 포화 NH_4Cl 용액($2 \times 40\text{ml}$), 물(40ml) 및 염수 용액(40ml)으로 세척하였다. 이 용액을

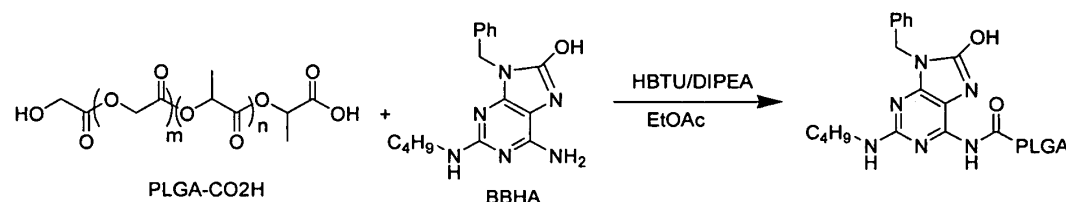
Na₂SO₄(20g)상에서 건조시키고 겔상의 잔류물로 농축시켰다. 그 다음, 이소프로필 알콜(IPA)(300ml)을 첨가하고, 중합체 공액결합물을 용액으로부터 침전시켰다. 그 다음, 중합체를 IPA(4×50ml)로 세척하여 잔류 시약을 제거하고, 진공하에 35 내지 40℃에서 3일 동안 건조시켜, 백색 분말(10.26g, GPC에 의한 MW는 5,200이고, R848 첨가량은 HPLC에 의해 12%임)이 되었다.

[0288] 실시예 24: PGLA-854A 공액결합물의 제조



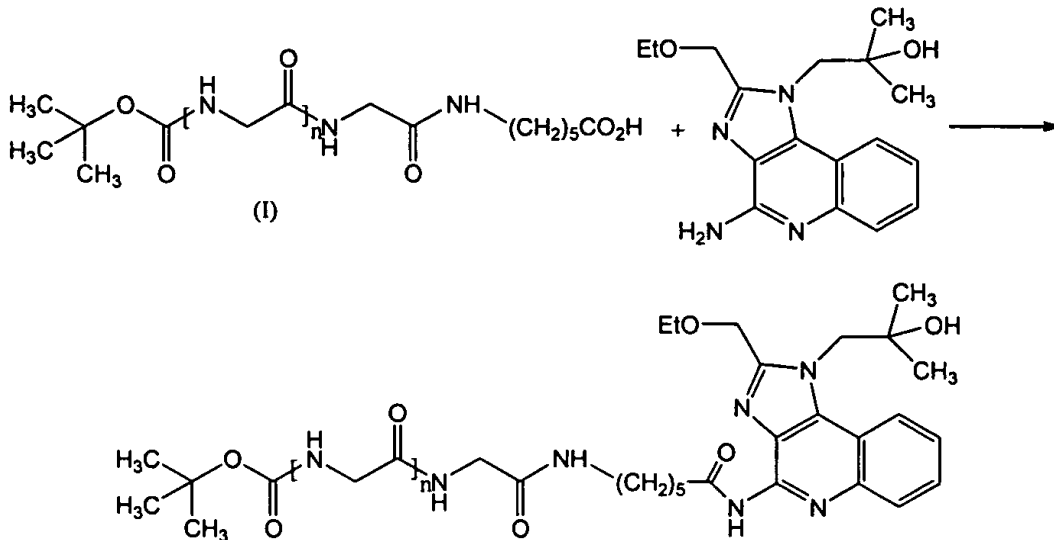
무수 EtOAc(20ml) 내 PLGA(레이크쇼어스 폴리머스, MW 약 5,000, 7525DLG1A, 산가 0.7mmol/g, 1.0g, 7.0mmol) 및 HBTU(0.8g, 2.1mmol)의 혼합물을 실온에서 아르곤하에 45분 동안 교반하였다. 화합물 845A(0.29g, 0.7mmol)를 첨가한 후, 디이소프로필에틸아민(DIPEA)(0.73ml, 4.2mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 다음, 50 내지 55℃에서 밤새(약 15시간 동안) 교반하였다. 냉각한 후, 혼합물을 EtOAc(100ml)로 희석시키고, 포화 NH₄Cl 용액(2×20ml), 물(20ml) 및 염수 용액(20ml)으로 세척하였다. 이 용액을 Na₂SO₄(10g)상에서 건조시키고 겔상의 잔류물로 농축시켰다. 그 다음, 이소프로필 알콜(IPA)(40ml)을 첨가하고, 중합체 공액결합물을 용액으로부터 침전시켰다. 그 다음, 중합체를 IPA(4×25ml)로 세척하여 잔류 시약을 제거하고, 진공하에 35 내지 40℃에서 2일 동안 건조시켜, 백색 분말(1.21g, GPC에 의한 MW는 4,900이고, 854A 첨가량은 HPLC에 의해 14%임)이 되었다.

[0292] 실시예 25: PGLA-BBHA 공액결합물의 제조



무수 EtOAc(30ml) 내 PLGA(레이크쇼어스 폴리머스, MW 약 5,000, 7525DLG1A, 산가 0.7mmol/g, 1.0g, 7.0mmol) 및 HBTU(0.8g, 2.1mmol)의 혼합물을 실온에서 아르곤하에 30분 동안 교반하였다. 무수 DMSO 2ml 내 화합물 BBHA(0.22g, 0.7mmol)를 첨가한 후, 디이소프로필에틸아민(DIPEA)(0.73ml, 4.2mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 추가량의 HBTU(0.53g, 1.4mmol) 및 DIPEA(0.5ml, 2.8mmol)를 첨가하고, 이 혼합물을 50 내지 55℃에서 4시간 동안 가열하였다. 냉각한 후, 혼합물을 EtOAc(100ml)로 희석시키고, 포화 NH₄Cl 용액(20ml), 물(2×20ml) 및 염수 용액(20ml)으로 세척하였다. 이 용액을 Na₂SO₄(10g)상에서 건조시키고 겔상의 잔류물로 농축시켰다. 그 다음, 이소프로필 알콜(IPA)(35ml)을 첨가하고, 갈색을 띤 중합체 공액결합물을 용액으로부터 침전시켰다. 그 다음, 중합체를 IPA(2×20ml)로 세척하여 잔류 시약을 제거하고, 진공하에 35 내지 40℃에서 2일 동안 건조시켜, 갈색을 띤 분말(1.1g)이 되었다.

[0296] 실시예 26: 폴리아미드인 폴리글리신에의 R848의 공액결합



[0297]

[0298]

Aliferis et al.의 방법(*Biomacromolecules*, 5, 1653, (2004))에 의해 6-아미노헥산산 벤질 에스테르(알드리치 cat #S33465)를 사용하여 글리신 N-카르복시무수물(알드리치 cat #369772)의 개환 중합에 의해 *t*-부틸옥시카르보닐(tBOC) 보호된 폴리글리신 카르복실산(I)을 제조하였다. *t*-BOC 카르바메이트로서 말단 아미노 기를 보호한 후, 탄소상 팔라듐 위에서 수소화하여 벤질 에스테르를 제거함으로써, BOC 보호된 폴리글리신 카르복실산(I)의 합성을 완성하였다.

[0299]

무수 DMF(100ml) 내 BOC-보호된 폴리글리신 카르복실산(5g, MW=2,000, 2.5×10^{-3} 몰) 및 HBTU(3.79g, 1.0×10^{-2} 몰)의 혼합물을 실온에서 아르곤하에 50분 동안 교반하였다. 그 다음, R848(1.6g, 5.0×10^{-3} 몰)을 첨가한 후, 디이소프로필에틸아민(4ml, 2.2×10^{-2} 몰)을 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 다음, 50 내지 55℃에서 밤새(16시간) 교반하였다. 냉각한 후, DMF를 진공하에 증발시키고, 잔류물을 EtOAc(100ml)에서 분쇄하였다. 중합체를 여과에 의해 단리한 다음, 중합체를 2-프로판올(4×25ml)로 세척하여 잔여 시약을 제거하고, 진공하에 35 내지 40℃에서 3일 동안 건조시켰다. 중합체를 희백색의 고체로서 5.1g(88%)의 수득량으로 단리하였다. R848 첨가량은 NMR에 의해 결정할 수 있는데, 10.1%이었다.

[0300]

트리플루오로아세트산을 사용하여 *t*-BOC 보호기를 제거하고, 생성된 중합체를 종래의 방법에 의해 카르복실 말단을 갖는 PLA에 그래프트하였다.

[0302]

실시예 27: 폴리글리신/R848 중합체의 PLGA 공액결합물의 제조

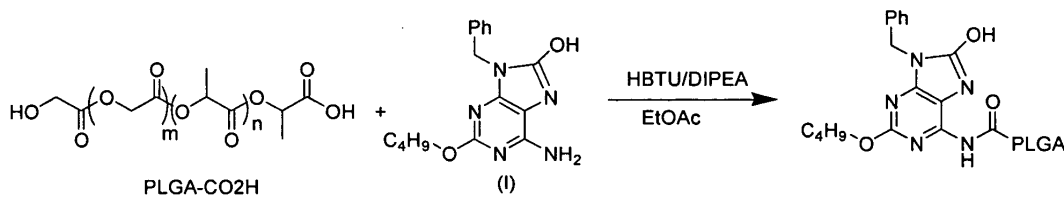
[0303]

단계 1: *t*-BOC 보호된 폴리글리신/R848 공액결합물(5g)을 트리플루오로아세트산(25ml)에 용해시키고, 이 용액을 50℃에서 1시간 동안 가운시켰다. 냉각한 후, 트리플루오로아세트산을 진공하에 제거하고, 잔류물을 에틸 아세테이트(25ml)에서 분쇄하였다. 중합체를 여과에 의해 단리하고, 2-프로판올로 잘 세척하였다. 진공하에 건조시킨 후, 희백색의 고체로서 중합체 4.5g을 얻었다.

[0304]

단계 2: 무수 DMF(100ml) 내 PLGA(레이크쇼어스 폴리머스, MW 약 5,000, 7525DLG1A, 산가 0.7mmol/g, 1.0g, 7.0mmol) 및 HBTU(5.3g, 14mmol)의 혼합물을 실온에서 아르곤하에 50분 동안 교반하였다. 무수 DMF(20ml)에 용해된 상기 중합체(1.4g, 7mmol)를 첨가한 후, 디이소프로필에틸아민(DIPEA)(5ml, 28mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 다음, 50 내지 55℃에서 밤새(16시간) 교반하였다. 냉각한 후, DMF를 진공하에 증발시키고, 잔류물을 메틸렌 클로라이드(50ml)에 용해시켰다. 2-프로판올(200ml)을 첨가하여 중합체를 침전시켰다. 중합체를 경사 분리에 의해 단리하고, 2-프로판올(4×50ml)로 세척하여, 잔여 시약을 제거한 다음, 진공하에 35 내지 40℃에서 밤새 건조시켰다. 블록 공중합체 9.8g(86%)을 얻었다.

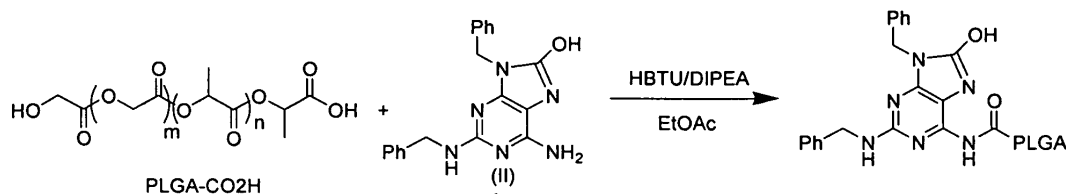
[0306] 실시예 28: PLGA-2-부톡시-8-히드록시-9-벤질 아데닌 공액결합물의 제조



[0307]

[0308] 무수 EtOAc(30ml) 내 PLGA(레이크쇼어스 폴리머스, MW 약 5,000, 7525DLG1A, 산가 0.7mmol/g, 1.0g, 7.0mmol) 및 HBTU(0.8g, 2.1mmol)의 혼합물을 실온에서 아르곤하에 30분 동안 교반하였다. 무수 DMSO 2ml 내 화합물 (I)(0.22g, 0.7mmol)을 첨가한 후, 디이소프로필에틸아민(DIPEA)(0.73ml, 4.2mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 추가량의 HBTU(0.53g, 1.4mmol) 및 DIPEA(0.5ml, 2.8mmol)를 첨가하고, 이 혼합물을 50 내지 55℃에서 4시간 동안 가열하였다. 냉각한 후, 혼합물을 EtOAc(100ml)로 희석시키고, 포화 NH₄Cl 용액(20ml), 물(2×20ml) 및 염수 용액(20ml)으로 세척하였다. 이 용액을 Na₂SO₄(10g)상에서 건조시키고 겔상의 잔류물로 농축시켰다. 그 다음, 이소프로필 알콜(IPA)(35ml)을 첨가하고, 갈색을 띤 중합체 공액결합물을 용액 으로부터 침전시켰다. 그 다음, 중합체를 IPA(2×20ml)로 세척하여 잔류 시약을 제거하고, 진공하에 35 내지 40℃에서 2일 동안 건조시켜, 갈색을 띤 분말이 되었다(1.0g).

[0310] 실시예 29: PLGA-2,9-디벤질-8-히드록시아데닌 공액결합물의 제조



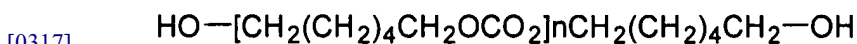
[0311]

[0312] 무수 EtOAc(30ml) 내 PLGA(레이크쇼어스 폴리머스, MW 약 5,000, 7525DLG1A, 산가 0.7mmol/g, 1.0g, 7.0mmol) 및 HBTU(0.8g, 2.1mmol)의 혼합물을 실온에서 아르곤하에 30분 동안 교반하였다. 무수 DMSO 2ml 내 화합물 (II)(0.24g, 0.7mmol)을 첨가한 후, 디이소프로필에틸아민(DIPEA)(0.73ml, 4.2mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 추가량의 HBTU(0.53g, 1.4mmol) 및 DIPEA(0.5ml, 2.8mmol)를 첨가하고, 이 혼합물을 50 내지 55℃에서 4시간 동안 가열하였다. 냉각한 후, 혼합물을 EtOAc(100ml)로 희석시키고, 포화 NH₄Cl 용액(20ml), 물(2×20ml) 및 염수 용액(20ml)으로 세척하였다. 이 용액을 Na₂SO₄(10g)상에서 건조시키고 겔상의 잔류물로 농축시켰다. 그 다음, 이소프로필 알콜(IPA)(35ml)을 첨가하고, 갈색을 띤 중합체 공액결합물을 용액 으로부터 침전시켰다. 그 다음, 중합체를 IPA(2×20ml)로 세척하여 잔류 시약을 제거하고, 진공하에 35 내지 40℃에서 2일 동안 건조시켜, 갈색을 띤 분말(1.2g)이 되었다.

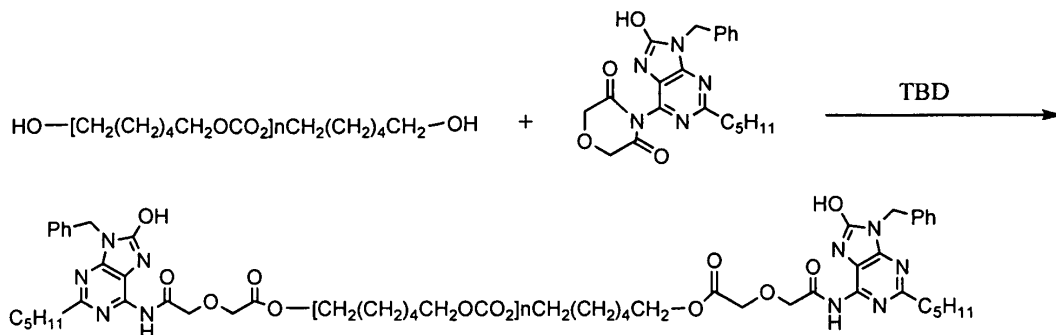
[0314] 실시예 30: 2-벤틸-8-히드록시-9-벤질아데닌을 분자량 2,000의 폴리(헥사메틸렌 카르보네이트)디올의 말단 알콜기에 부착시키는데 사용된 이미드 개환반응

[0315] 폴리(헥사메틸렌 카르보네이트)디올은 알드리치 케미컬 컴퍼니(Cat. #461164)로부터 구입하였다.

[0316] 폴리(헥사메틸렌 카르보네이트)디올:



[0318] 폴리(헥사메틸렌 카르보네이트)디올-8-옥소아데닌 공액결합물:



[0319]

[0320] 중합체(5g, 2.5×10^{-3} 몰)를 메틸렌 클로라이드 25ml에 용해시키고, 2-펜틸-8-히드록시-9-벤질아데닌(2.05g, 5.0×10^{-3} 몰)의 락탐을 첨가하였다. 1,5,7-트리아자비시클로-[4,4,0]데크-5-엔(TBD, 0.557g, 4×10^{-3} 몰)을 하나의 분량으로 첨가하면서, 이 슬러리를 교반하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 투명한 담황색의 용액을 형성하였다. 이 용액을 메틸렌 클로라이드(100ml)로 희석시키고, 용액을 5% 시트르산으로 세척하였다. 이 용액을 황산 나트륨상에서 건조시킨 후, 여과하고 진공하에 증발시켰다. 고 진공하에 건조시킨 후, 중합체 5.5g(78%)을 얻었다. NMR을 사용하여 벤질아데닌 함량을 결정하였고, 이는 18%이었다.

[0322] 실시예 31: 니코틴-PEG-PLA 공액결합물

[0323] 3-니코틴-PEG-PLA 중합체를 다음과 같이 합성하였다:

[0324] 먼저, 분자량 3.5KD의 젠캠(JenKem)[®]으로부터의 모노아미노 폴리(에틸렌 글리콜)(0.20g, 5.7×10^{-5} 몰) 및 과량의 4-카르복시코티닌(0.126g, 5.7×10^{-4} 몰)을 디메틸포름아미드(5.0ml)에 용해시켰다. 이 용액을 교반하고, 디시클로헥실카르보디이미드(0.124g, 6.0×10^{-4} 몰)를 첨가하였다. 이 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 물(0.10ml)을 첨가하고, 추가의 15분 동안 계속 교반하였다. 디시클로헥실우레아의 침전물은 여과에 의해 제거하고, 여액은 진공하에 증발시켰다. 잔류물을 메틸렌 클로라이드(4.0ml)에 용해시키고, 이 용액을 디에틸 에테르(100ml)에 첨가하였다. 이 용액을 냉각기에서 2시간 동안 냉각시키고, 침전된 중합체는 여과에 의해 분리하였다. 디에틸 에테르로 세척한 후, 단단한 백색 중합체를 고 진공하에 건조시켰다. 수득량은 0.188g이었다. 이 중합체는 다음 단계를 위한 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0325] 질소하에 무수 테트라히드로푸란(10ml)에 코티닌/PEG 중합체(0.20g, 5.7×10^{-5} 몰)를 용해시키고, 테트라히드로푸란(2.0M, 2.85×10^{-3} 몰의 1.43ml) 내 리튬 알루미늄 히드라이드 용액을 첨가하면서 이 용액을 교반하였다. 리튬 알루미늄 히드라이드의 첨가에 의해 중합체가 젤라틴성 덩어리로서 침전하였다. 이 반응물을 느린 기류의 질소하에 80℃로 가열하고, 테트라히드로푸란을 증발시켰다. 그 다음, 잔류물을 80℃에서 2시간 동안 가열하였다. 냉각한 후, 물(0.5ml)을 조심스럽게 첨가하였다. 일단 수소 발생이 중지되면, 메틸렌 클로라이드(50ml) 내 10% 메탄올을 첨가하고, 중합체가 용해될 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. 이 혼합물을 셀라이트(Celite)[®] 상표의 규조토(EMD 인코포레이티드(EMD Inc.)로부터 셀라이트[®] 545, 부품 #CX0574-3)으로서 입수가능함)를 통해 여과하고, 여액을 진공하에 증발시켜 건조시켰다. 잔류물을 메틸렌 클로라이드(4.0ml)에 용해시키고, 이 용액을 디에틸 에테르(100ml)에 천천히 첨가하였다. 중합체는 백색의 양모상 고체로서 분리하고, 원심분리에 의해 분리하였다. 디에틸 에테르로 세척한 후, 고체는 진공하에 건조시켰다. 수득량은 0.129g이었다.

[0326] 그 다음, 교반 막대 및 환류 응축기가 장착된 100ml의 환저 플라스크에 PEG/니코틴 중합체(0.081g, 2.2×10^{-5} 몰), D/L 락티드(0.410g, 2.85×10^{-3} 몰) 및 무수 황산 나트륨(0.380g)을 충전하였다. 이를 진공하에 55℃에서 8시간 동안 건조시켰다. 플라스크를 냉각시키고, 아르곤으로 세정한 다음, 무수 톨루엔(10ml)을 첨가하였다. 플라스크를 120℃로 맞춰진 오일조에 놓고, 일단 락티드가 용해되면 주석 에틸헥사노에이트(5.5mg, 1.36×10^{-5} 몰)를 첨가하였다. 이 반응을 120℃에서 16시간 동안 진행시켰다. 실온으로 냉각시킨 후, 물(15ml)을 첨가하고 30분 동안 계속 교반하였다. 메틸렌 클로라이드(200ml)를 첨가하고, 분리 깔때기에서 교반한 후, 상들을

정치시켰다. 메틸렌 클로라이드 층을 분리하고, 무수 황산 마그네슘상에서 건조시켰다. 여과에 의해 건조제를 제거한 후, 여액을 진공하에 증발시켜 중합체를 무색 포말로서 얻었다. 이 중합체를 테트라히드로푸란(10ml)에 용해시키고, 이 용액을 교반하면서 물(150ml)에 천천히 첨가하였다. 침전된 중합체는 원심분리에 의해 분리하고, 고체는 메틸렌 클로라이드(10ml)에 용해시켰다. 메틸렌 클로라이드를 진공하에 제거하고, 잔류물을 진공하에 건조시켰다. 3-니코틴-PEG-PLA 중합체 수득량은 0.38g이었다.

[0328] 실시예 32: 합성 나노입자 제형화

[0329] 캡슐화된 보강제 제형화를 위하여, 미국 특허 제5,389,640호(Gerster et al.)의 실시예 99에 제공된 합성에 따라 레지퀴모드(R848로도 알려짐)를 합성하였다.

[0330] 상기 제공된 방법에 의해 R848을 PLA에 공액결합시키고, PLA 구조는 NMR에 의해 확인하였다.

[0331] PLA-PEG-니코틴 공액결합물은 실시예 31에 따라 제조하였다.

[0332] PLA를 구입하였다(비링거 잉겔하임 케미컬스 인코포레이티드, 미국 버지니아주 23805 피터스버그 노쓰 노르만드 드라이브 2820 소재). 폴리비닐 알코올(Mw=11KD 내지 31KD, 85 내지 89% 가수분해됨)은 VWR 사이언티픽(scientific)으로부터 구입하였다. 난백 알부민 펩티드 323-339는 바켄 어메리카스 인코포레이티드(Bachem Americas Inc., 미국 캘리포니아주 90505 토렌스 카시와 스트리트 3132 소재)로부터 얻었다(부품 #4064565).

[0333] 상기 물질을 사용하여 다음과 같은 용액을 제조하였다:

[0334] 1. 메틸렌 클로라이드 내 레지퀴모드(R848)(10mg/ml) 및 PLA(100mg/ml), 또는 메틸렌 클로라이드 내 PLA-R848 공액결합물(100mg/ml)

[0335] 2. 메틸렌 클로라이드 내 PLA-PEG-니코틴(100mg/ml)

[0336] 3. 메틸렌 클로라이드 내 PLA(100mg/ml)

[0337] 4. 물 내 난백 알부민 펩티드 323-339(10 또는 69mg/ml)

[0338] 5. 물 내 폴리비닐 알코올(50mg/ml).

[0339] 작은 바이알에 용액 #1(0.25 내지 0.75ml), 용액 #2(0.25ml), 용액 #3(0.25 내지 0.5ml) 및 용액 #4(0.1ml)를 합치고, 이 혼합물을 브랜슨 디지털 소니파이어(Branson Digital Sonifier) 250을 사용하여 50% 진폭에서 40초 동안 초음파 처리하였다. 이 유화액에 용액 #5(2.0ml)를 첨가하고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 40초 동안 35% 진폭으로 초음파 처리하여 제2 유화액을 형성하였다. 이를 포스페이트 완충액(30ml)을 함유하는 비이커에 첨가하고, 이 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하여 나노입자를 형성하였다.

[0340] 입자를 세척하기 위하여, 나노입자 분산액의 일부분(7.4ml)을 원심분리 시험관으로 옮기고, 5,300g에서 1시간 동안 원심분리하였으며, 상청액을 제거하고, 펠렛을 포스페이트 완충된 식염수 7.4ml에 재현탁하였다. 원심분리 과정을 반복하고, 약 10mg/ml의 최종 나노입자 분산액을 위하여 포스페이트 완충된 식염수 2.2ml에 펠렛을 재현탁시켰다.

[0342] 실시예 33: 다수의 초유제를 사용한 이중 유화액

[0343] 물질

[0344] 난백 알부민 단백질의 T 세포 항원결정인자인 것으로 알려진 17개 아미노산 펩티드인 난백 알부민 펩티드 323-339를 바켄 어메리카스 인코포레이티드(미국 캘리포니아주 90505 토렌스 카시와 스트리트 3132 소재)로부터 구입하였다.

[0345] 레지퀴모드(R848로도 알려짐)는 미국 특허 제6,608,201호에 제공된 방법에 따라 합성하였다.

[0346] PLA-R848, 레지퀴모드를 상기 제공된 방법에 따라 분자량 약 2,500Da의 PLA에 공액결합시켰다.

[0347] PLGA-R848, 레지퀴모드를 상기 제공된 방법에 따라 분자량 약 4,100Da의 PLGA에 공액결합시켰다.

[0348] 나트륨 반대이온(counter-ion)과 함께 뉴클레오타이드 서열 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3'을 갖는 완전 포스포티오화된 주체를 갖는 PS-1826 DNA 올리고뉴클레오타이드는 올리고스 등(Oligos Etc., 미국 오레곤주 97070

월슨빌 SW 커머스 서클 C-6 9775 소재)으로부터 구입하였다.

[0349] 나트륨 반대이온과 함께 뉴클레오타이드 서열 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3'을 갖는 포스포디에스테르 주쇄를 갖는 PO-1826 DNA 올리고뉴클레오타이드는 올리고스 등(미국 오리건주 97070 월슨빌 SW 커머스 서클 C-6 9775 소재)으로부터 구입하였다.

[0350] 고유 점도 0.21dL/g의 PLA는 서모딕스 파마슈티컬즈(SurModics Pharmaceuticals, 미국 앨라배마주 35211 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756 소재)로부터 구입하였다(생성물 코드 100 DL 2A).

[0351] 고유 점도 0.71dL/g의 PLA는 서모딕스 파마슈티컬즈(미국 앨라배마주 35211 버밍햄 톰 마틴 드라이브 756 소재)로부터 구입하였다(생성물 코드 100 DL 7A).

[0352] 고유 점도 0.19dL/g의 PLA는 비링거 인켈하임 케미컬스 인코포레이티드(미국 버지니아주 피터스버그 소재)로부터 구입하였다(생성물 코드 R202H).

[0353] 상기 제공된 방법에 따라 분자량 약 18,500 내지 22,000Da의 PLA-PEG-니코틴을 제조하였다.

[0354] 상기 제공된 방법에 따라 분자량 약 15,000Da의 PLA-PEG-R848을 합성하였다.

[0355] 폴리비닐 알콜(Mw=11,000 내지 31,000, 87 내지 89% 가수분해됨)은 J.T. 베이커(J.T. Baker)로부터 구입하였다(부품 번호 U232-08).

[0356] 다수의 조유제를 사용한 이중 유화액 방법을 사용하여 배치를 생성하였다. 하기 표는 용액 접미사(예를 들어, 용액 #1 컬럼 내 B는 용액 #1B가 사용되었음을 나타냄) 및 사용된 용액의 체적으로 표시하였다.

샘플 번호	용액 #1(체적)	용액 #2 (체적)	용액 #3 (체적)	용액 #4 (체적)	용액 #5 (체적)
1	B(0.1ml)	C(1.0ml)	A(0.1ml)	C(1.0ml)	A(2.0ml)
2	A(0.2ml)	A(1.0ml)	A(0.1ml)	A(1.0ml)	A(3.0ml)
3	A(0.2ml)	B(1.0ml)	A(0.1ml)	B(1.0ml)	A(3.0ml)
4	A(0.2ml)	B(1.0ml)	A(0.1ml)	B(1.0ml)	A(3.0ml)

[0357]

[0358] 용액 1A: 묽은 염산 수용액 내 난백 알부민 펩티드 323-339(35mg/mL). 이 용액은 난백 알부민 펩티드를 실온의 0.13N 염산 용액에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0359] 용액 1B: 묽은 염산 수용액 내 난백 알부민 펩티드 323-339(70mg/mL). 이 용액은 난백 알부민 펩티드를 실온의 0.13N 염산 용액에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0360] 용액 2A: 메틸렌 클로라이드 내 0.21-IV PLA(75mg/mL) 및 PLA-PEG-니코틴(25mg/mL). 이 용액은 먼저 실온에서 두 가지 별개의 용액, 즉 순수한 메틸렌 클로라이드 내 0.21-IV PLA(100mg/mL) 및 순수한 메틸렌 클로라이드 내 PLA-PEG-니코틴(100mg/mL)을 제조함으로써 제조하였다. 최종 용액은 PLA-PEG-니코틴 용액 1부 당 PLA 용액 3부를 첨가함으로써 제조하였다.

[0361] 용액 2B: 메틸렌 클로라이드 내 0.71-IV PLA(75mg/mL) 및 PLA-PEG-니코틴(25mg/mL). 이 용액은 먼저 실온에서 두 가지 별개의 용액, 즉 순수한 메틸렌 클로라이드 내 0.71-IV PLA(100mg/mL) 및 순수한 메틸렌 클로라이드 내 PLA-PEG-니코틴(100mg/mL)을 제조함으로써 제조하였다. 최종 용액은 PLA-PEG-니코틴 용액 1부 당 PLA 용액 3부를 첨가함으로써 제조하였다.

[0362] 용액 2C: 메틸렌 클로라이드 내 0.19-IV PLA(75mg/mL) 및 PLA-PEG-니코틴(25mg/mL). 이 용액은 먼저 실온에서 두 가지 별개의 용액, 즉 순수한 메틸렌 클로라이드 내 0.19-IV PLA(100mg/mL) 및 순수한 메틸렌 클로라이드 내 PLA-PEG-니코틴(100mg/mL)을 제조함으로써 제조하였다. 최종 용액은 PLA-PEG-니코틴 용액 1부 당 PLA 용액 3부를 첨가함으로써 제조하였다.

[0363] 용액 3A: 정제수 내 올리고뉴클레오타이드(PS-1826 또는 PO-1826)(200mg/mL). 이 용액은 올리고뉴클레오타이드를 실온의 정제수에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0364] 용액 4A: 용액 #2A와 동일하다.

[0365] 용액 4B: 용액 #2B와 동일하다.

[0366] 용액 4C: 용액 #2C와 동일하다.

- [0367] 용액 5A: 100mM 포스페이트 완충제(pH 8) 내 폴리비닐 알콜(50mg/ml).
- [0368] 오일 유화액 내 두 가지 별개의 일차수를 제조하였다. W1/O2는 용액 1과 용액 2를 미세압력 시험관에서 합치고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 40초 동안 50% 진폭으로 초음파 처리함으로써 제조하였다. W3/O4는 용액 3과 용액 4를 미세압력 시험관에서 합치고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 40초 동안 50% 진폭으로 초음파 처리함으로써 제조하였다. 두 가지 내부 유화액([W1/O2, W3/O4]/W5)을 갖는 제3 유화액은 각 초제유(W1/O2 및 W3/O4) 0.5ml와 용액 5를 합치고, 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 40 내지 60초 동안 30% 진폭으로 초음파 처리함으로써 제조하였다.
- [0369] 제3 유화액을 70mM 포스페이트 완충액(30ml)을 함유하는 비이커에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하여 메틸렌 클로라이드가 증발하고 나노운반체가 형성되도록 하였다. 나노운반체 현탁액을 원심분리 시험관에 옮기고 13,823g에서 1시간 동안 원심분리하며, 상청액을 제거하고, 펠렛을 포스페이트 완충된 식염수에 재현탁함으로써 나노운반체의 일부분을 세척하였다. 세척 과정을 반복하고, 펠렛은 약 10mg/ml의 최종 나노운반체 분산액을 위한 포스페이트 완충된 식염수에 재현탁하였다.
- [0370] 나노운반체 내 올리고뉴클레오타이드 및 펩티드의 양은 HPLC 분석에 의해 결정하였다.

[0372] **실시예 34: 표준의 이중 유화액**

[0373] **물질**

[0374] 상기 실시예 33에 제공된 바와 같다.

[0375] 표준의 이중 유화액 공정을 사용하여 배치를 생성하였다. 하기 표는 용액 접미사(예를 들어, 용액 #1 컬럼 내 B는 용액 #1B가 사용되었음을 나타냄) 및 사용된 용액의 체적으로 표시하였다.

샘플 번호	용액 #1(체적)	용액 #2(체적)	용액 #3(체적)	용액 #4(체적)	용액 #5(체적)
1	A(0.1ml)	A(0.75ml)	A(0.25ml)	없음	A(2.0ml)
2	A(0.1ml)	없음	A(0.25ml)	A(0.75ml)	A(2.0ml)
3	A(0.1ml)	B(0.75ml)	A(0.25ml)	없음	A(2.0ml)
4	B(0.1ml)	C(0.75ml)	A(0.25ml)	없음	B(2.0ml)
5	B(0.1ml)	D(0.25ml)	A(0.25ml)	A(0.50ml)	B(2.0ml)
6	C(0.2ml)	없음	A(0.25ml)	A(0.75ml)	B(2.0ml)
7	D(0.1ml)	없음	A(0.25ml)	A(0.75ml)	B(2.0ml)

- [0376]
- [0377] 용액 1A: 탈이온수 내 난백 알부민 펩티드 323-339(69mg/ml). 이 용액은 실온에서 혼합하면서 난백 알부민 펩티드를 물에 천천히 첨가함으로써 제조하였다.
- [0378] 용액 1B: 묽은 염산 수용액 내 난백 알부민 펩티드 323-339(70mg/ml). 이 용액은 난백 알부민 펩티드를 실온의 0.13N 염산 용액에 용해시킴으로써 제조하였다.
- [0379] 용액 1C: 정제수 내 올리고뉴클레오타이드(PS-1826)(50mg/ml). 이 용액은 올리고뉴클레오타이드를 실온의 정제수에 용해시킴으로써 제조하였다.
- [0380] 용액 1D: 묽은 염산 수용액 내 난백 알부민 323-339(17.5mg/ml). 이 용액은 난백 알부민(70mg/ml)을 실온의 0.13N 염산 용액에 용해시킨 다음, 이 용액을 출발 용액 1부 당 정제수 3부로 용액을 희석함으로써 제조하였다.
- [0381] 용액 2A: 실온에서 제조된 순수한 메틸렌 클로라이드 내 R848(10mg/ml) 및 0.19-IV PLA(100mg/ml).
- [0382] 용액 2B: 실온에서 제조된 순수한 메틸렌 클로라이드 내 PLA-R848(100mg/ml).
- [0383] 용액 2C: 실온에서 제조된 순수한 메틸렌 클로라이드 내 PLGA-R848(100mg/ml).
- [0384] 용액 2D: 실온에서 제조된 순수한 메틸렌 클로라이드 내 PLA-PEG-R848(100mg/ml).
- [0385] 용액 3A: 실온에서 제조된 순수한 메틸렌 클로라이드 내 PLA-PEG-니코틴(100mg/ml).
- [0386] 용액 4A: 실온에서 제조된 순수한 메틸렌 클로라이드 내 0.19-IV PLA(100mg/ml).

- [0387] 용액 5A: 탈이온수 내 폴리비닐 알콜(50mg/ml).
- [0388] 용액 5B: 100mM 포스페이트 완충제(pH 8) 내 폴리비닐 알콜(50mg/ml).
- [0389] 유중수형(W/O) 초제유는 용액 1 및 용액 2, 용액 3, 및 용액 4를 미세압 시험관에서 합치고 브랜슨 디지털 소니 파이어 250을 사용하여 50% 진폭에서 40초 동안 초음파 처리하였다. 수중유중수형(W/O/W) 이중 유화액은 용액 5를 초제유에 첨가하고 브랜슨 디지털 소니파이어 250을 사용하여 30% 내지 35% 진폭에서 40초 동안 초음파 처리하였다.
- [0390] 포스페이트 완충액(30ml)을 함유하는 비이커에 이중 유화액을 첨가하고 실온에서 2시간 동안 교반하여, 메틸렌 클로라이드를 증발시키고 나노운반체를 형성시켰다. 나노운반체 현탁액을 원심분리기 시험관에 옮기고 5,000 내지 9,500RPM에서 1시간 동안 원심분리하며, 상청액을 제거하고, 펠렛을 포스페이트 완충된 식염수에 재현탁함으로써 나노운반체의 일부분을 세척하였다. 세척 과정을 반복하고, 펠렛을 약 10mg/ml의 최종 나노운반체 분산액을 위한 포스페이트 완충된 식염수에 재현탁하였다.
- [0392] **실시예 35: 제제 양의 결정**
- [0393] R848 및 펩티드를 위한 방법(예를 들어, 난백 펩티드, 인간 펩티드, TT2pDT5t)
- [0394] R848(면역자극제) 및 난백 펩티드(T 세포 항원)의 양은 애질런트 조르박스(Agilent Zorbax) SB-C18 컬럼(3.5 μ m, 75 \times 4.6mm. 컬럼 온도=40 $^{\circ}$ C(부품 번호 866953-902))이 장착된, 적당한 파장(R848의 경우에는 λ =254nm 및 난백 펩티드의 경우에는 215nm)의 애질런트 1100 시스템에서 물 95%/아세트니트릴 5%/TFA 0.1%의 이동상 A(MPA) 및 아세트니트릴 90%/물 10%/TFA 0.09%의 이동상 B(MPB)(구배: 7분 동안 B를 5%에서 45%로; 9분까지 B를 95%로 증가; 9.5분까지 B를 5%로 다시 감소시키고 끝까지 평형 유지함)를 사용하여 역상 HPLC를 사용하여 측정하였다. 총 실행 시간은 1ml/분의 유량으로 13분이었다.
- [0396] CpG를 위한 방법
- [0397] CpG(면역자극제)의 양은 워터스 엑스브릿지(Waters XBridge) C-18(2.5 μ m 입자, 50 \times 4.6mm ID(부품 번호 186003090), 컬럼 온도 600 $^{\circ}$ C)이 장착된, 260nm의 애질런트 1100 시스템에서 100mM TEA-아세트산 완충제 내 2% 아세트니트릴(pH 약 8.0)의 이동상 A 및 아세트니트릴 90%, 물 10%의 이동상 B(컬럼을 B를 5%에서 평형화함; 8.5분 동안 B를 5%에서 55%로 증가; 그 다음, 12분까지 B를 90%로 증가. B의 강도를 1분만에 급속히 5%로 다시 감소시키고, 정지 시간(16분)이 될 때까지 평형화시킴. 유량은 방법이 끝날 때까지(16분) 1ml/분임)를 사용하여 역상 HPLC를 사용하여 측정하였다.
- [0399] 니코틴 유사체를 위한 방법
- [0400] 니코틴 유사체는 워터스 엑스브릿지 C-18(5 μ m 입자, 100 \times 4.6mm ID, 컬럼 온도 400 $^{\circ}$ C)이 장착된, 254nm의 애질런트 1100 시스템에서 물 95%/아세트니트릴 5%/TFA 0.1%의 이동상 A(MPA) 및 아세트니트릴 90%/물 10%/TFA 0.09%의 이동상 B(MPB)(구배: 컬럼을 B를 5%에서 평형화시키고, 14분 동안 B를 45%로 증가시킴. 그 다음, 14분에서 20분까지 B를 95%로 증가시킴. 이동상 B 강도를 5%까지 급속히 다시 감소시키고, 방법이 끝날 때까지 재평형화시킴)를 사용하여 역상 HPLC를 사용하여 측정하였다. 방법의 유량은 0.5ml/분으로 유지시켰고, 총 실행 시간은 25분이었다. NC 현탁액은 입도에 따라 14,000rpm에서 약 15 내지 30분 동안 원심분리하였다. 수집된 펠렛을 진한 NH₄OH(8M) 200 μ l로 2시간 동안 처리하고, 용액이 투명해질 때까지 교반하였다. 1% TFA 200 μ l를 첨가하여 혼합물 용액을 중화시켰는데, 이로써 펠렛 용액의 총 체적이 200 μ l가 되었다. 용액 중 50 μ l의 분취량을 MPA(또는 물)로 희석하여 200 μ l로 만들고, 상기와 같이 HPLC에서 분석하여 펠렛에 존재하는 양을 결정하였다.
- [0402] 나노운반체에 유리 R848을 캡슐화함
- [0403] NC 현탁액 0.5ml를 14,000rpm에서 약 15분 동안 원심분리하였다. 수집된 펠렛을 아세트니트릴 0.3ml로 용해시키고, 14,000rpm에서 짧게 원심분리하여 임의의 잔여 불용물을 제거하였다. 투명한 용액을 동일 체적의 MPA로 추

가 4차례 회석시키고, 전술한 역상 HPLC에서 분석하였다.

- [0405] 나노운반체에 캡슐화된 CpG
- [0406] 제조시 얻은 NC 현탁액 330 μ l(PBS 내 약 10mg/ml 현탁액)를 14,000rpm에서 입도에 따라 15 내지 30분 동안 원심 분리하였다. 수집된 펠렛을 물 500 μ l로 재현탁시키고 30분 동안 초음파 처리하여 입자를 완전히 분산시켰다. 그 다음, NC를 600℃에서 10분 동안 가열하였다. 상기 혼합물에 추가로 200 μ l의 1N NaOH를 첨가하고, 혼합물이 투명해질 때까지 또 한 번 5분 동안 가열하였다. 가수분해된 NC 용액을 14,000rpm에서 짧게 원심분리하였다. 그 다음, 물을 사용하여 투명한 용액을 마지막으로 2회 회석하고 전술한 역상 HPLC에서 분석하였다.
- [0408] 캡슐화된 T 세포 항원(예를 들어, 난백 펩티드, 또는 인간 펩티드, TT2pDT5t)
- [0409] 제조시 얻은 NC 현탁액 330 μ l(PBS 내 약 10mg/ml 현탁액)를 14,000rpm에서 15 내지 30분 동안 원심분리하였다. 펠렛에 아세트오니트릴 100 μ l를 첨가하여 NC의 중합체 성분을 용해시켰다. 이 혼합물을 격렬하게 교반하고 1 내지 5분 동안 초음파 처리하였다. 이 혼합물에 0.2% TFA 100 μ l를 첨가하여 펩티드를 추출하고 또 한 번 5분 동안 초음파 처리하여 확실하게 집합체를 분해시켰다. 이 혼합물을 14,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 임의의 불용성 물질(예를 들어, 중합체)을 분리하였다. MPA(또는 물) 150 μ l로 회석시킨 상청액 중 50 μ l의 분취량을 취하여 전술한 역상 HPLC에서 분석하였다.
- [0411] 나노운반체 내 공액결합된 니코틴 유사체(B 세포 항원)의 양
- [0412] NC 현탁액 1.5ml를 14,000rpm에서 약 15분 동안 원심분리하고, 용액이 투명해질 때까지 진한 NH₄OH(8M) 150 μ l를 사용하여 약 2 내지 3시간 동안 펠렛을 가수분해하였다. 펠렛 혼합물에 2% TFA(수성) 용액 150 μ l를 첨가하여 용액을 중화하였다. 혼합물의 100 μ l 분취량을 물 200 μ l로 희석하고, 전술한 역상 HPLC에서 분석하며, 제조에 사용된 PLA-PEG-니코틴의 전구체(PEG-니코틴)를 사용하여 수립한 표준곡선에 근거하여 정량화하였다.
- [0414] **실시예 36: 방출 속도 시험**
- [0415] 합성 나노운반체(나노입자)로부터의 T 세포 항원, 난백 펩티드 및 보강제 R848의 37℃의 PBS(100mM, pH=7.4) 및 시트레이트 완충제(100mM, pH=4.5) 내로의 방출은 다음과 같이 수행하였다:
- [0416] 분석 방법: 방출된 R848 및 난백 펩티드의 양은 애질런트 조르박스 SB-C18 컬럼(3.5 μ m, 75×4.6mm, 컬럼 온도=40℃(부품 번호 866953-902))이 장착된, λ =215nm의 애질런트 1100 시스템에서 물 98%/아세트오니트릴 2%/TFA 0.1%의 이동상 A(MPA) 및 아세트오니트릴 90%/물 10%/TFA 0.09%의 이동상 B(MPB)(구배: 7분 동안 B를 5%에서 45%로; 9분까지 B를 95%로 증가; 끝까지 재평형화함)를 사용하여 역상 HPLC를 사용하여 측정하였다. 실행 시간: 13분. 유량=1ml/분.
- [0417] 나노입자에 존재하는 R848 및 난백 펩티드의 총량은 표 1에 나타난 바와 같았다. 그 다음, 시험한 합성 나노운반체의 수성 현탁액을 PBS에 의해 최종 체적 4.4ml로 희석하였다.
- [0418] (A) PBS(pH=7.4)에서의 시험관내 방출 속도 측정:
- [0419] T0 샘플의 경우, 각각의 NP 샘플로부터 즉시 200 μ l의 분취량을 취하고, 마이크로센트리퓨지(Microcentrifuge, 모델: 갤럭시(Galaxy) 16)를 사용하여 미량 원심분리관에서 14,000rpm으로 원심분리하였다. 상청액 100 μ l를 취하여 HPLC 이동상 A(MPA)로 희석하여 200 μ l로 만들고, 역상 HPLC에서 방출된 R848 및 난백 펩티드의 양에 대하여 분석하였다.
- [0420] 시간대별 측정의 경우: 각각의 샘플 9×200 μ l를 미량 원심분리관에 첨가하고(공액결합되지 않은 경우, 3×200), 상기 각 분취량에 37℃ PBS 300 μ l를 첨가하며, 이들 샘플을 즉시 37℃ 오븐에 넣었다. 24시간, 48시간, 96시간 및 144시간(공액결합된 R848의 경우), 또는 2시간, 16시간 및 24시간(공액결합되지 않은(캡슐화된) R848의 경우)의 시간대에서, 샘플을 원심분리하고 상기 T0 샘플에서와 같은 방식으로 방출된 R848 및 난백 펩티드의 양에 대하여 분석하였다.

- [0421] (B) 시트레이트 완충제(pH=4.5)에서의 시험관내 방출 속도 측정:
- [0422] T0 샘플의 경우, 각각의 샘플로부터 200 μ l의 분취량을 취하고, 6,000rpm에서 20분 동안 원심분리하며, 상청액을 제거하였다. 잔류 나노입자를 시트레이트 완충제 200 μ l에 재현탁시키고, 14,000rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 상청액 100 μ l를 취하고 MPA로 희석하여 200 μ l로 만들고, R848 및 펩티드에 대하여 상기와 같이 분석하였다.
- [0423] 시간대별 측정의 경우: 각각의 샘플 9 \times 200 μ l를 미량 원심분리관에 첨가하고(공액결합되지 않은 경우, 3 \times 200), 6,000rpm에서 20분 동안 원심분리하며, 상청액을 제거하였다. 그 다음, 잔류 NP를 시트레이트 완충제 500 μ l에 재현탁하고, 37 $^{\circ}$ C 오븐에 넣었다. 24시간, 48시간, 96시간 및 144시간(공액결합된 R848의 경우), 또는 2시간, 16시간 및 24시간(공액결합되지 않은(캡슐화된) R848의 경우)의 시간대에서, 샘플을 원심분리하고 상기 T0 샘플에서와 같이 방출된 R848 및 난백 펩티드의 양에 대하여 분석하였다.
- [0424] PBS 및 시트레이트 완충제에서의 상기 측정으로부터 물질 균형을 갖추기 위하여, 각 샘플의 남은 펠렛(공액결합된 R848 샘플만)을 진한 NH₄OH(8M) 200 μ l로 3시간 동안 혼합하면서 처리하였다. 이 혼합물을 정치시킨 후, 1% TFA 200 μ l를 첨가하여 펠렛의 총 체적을 400 μ l로 만들었다. 이 용액의 50 μ l 분취량을 MPA로 희석하여 200 μ l로 만들고, 상기와 같이 HPLC에서 분석하여, 시험관내 방출 후에 펠렛에 남아 있는 R848 및 난백 펩티드의 양을 결정하여 물질 균형을 맞추었다. 공액결합되지 않은 샘플의 경우, 샘플을 아세토니트릴 내 TFA로 희석하고 R848 및 펩티드에 대하여 상기와 같이 분석하였다.
- [0425] 그 결과를 도 1 내지 도 3에 요약하였다.
- [0427] 물질 및 방법
- [0428] HPLC - 애질런트 1100. λ =215nm. 컬럼 온도=40 $^{\circ}$ C.
- [0429] 컬럼 - 애질런트 조르박스 SB-C18, 3.5 μ m. 75 \times 4.6mm(부품 번호 866953-902)
- [0430] C18 가드(guard) 컬럼
- [0431] 이동상 A(MPA) - 물 98%/아세토니트릴 2%/TFA 0.1%
- [0432] 이동상 B(MPB) - 아세토니트릴 90%/물 10%/TFA 0.09%
- [0433] 구배: 7분 동안 B를 5 내지 45%; 9분까지 B를 95%로 증가; 끝까지 재평형화.
- [0434] 실행 시간: 13분. 유량=1ml/분.
- [0435] PBS - 100mM, pH=7.4.
- [0436] 시트레이트 완충제 - 100mM, pH=4.5.
- [0437] 오븐
- [0438] 미량 원심분리기 - 갤럭시 16
- [0439] 미량 원심분리관
- [0440] 초음파 처리기
- [0441] 피펫 - 20, 200, 1000 μ l 조절가능
- [0442] HPLC 등급 수 - EMD - #WX0008-1.
- [0443] NH₄OH - 약 8M. 말린크로트(Mallinkrodt)
- [0444] TFA, 0.2%. 제조일자 2009.04.27.
- [0445] TFA, 1%. 제조일자 2009.05.13.
- [0446] 온도계
- [0448] 샘플 - “6-1” 및 “6-2”는 R848을 포착하였다. 나머지 모두는 R848을 공액결합시켰다. 추정치는 “62” 계열

로부터의 첨가량 결과에 근거한 것이다.

표 2

[0449]

합성 나노운반체 내 R848 및 난백 펩티드의 추정치

샘플 번호	NP 내 R848의 추정치($\mu\text{g/mL}$)	NP 내 난백 펩티드의 추정치($\mu\text{g/mL}$)
1	54	146
2	166	184
3	119	32
4	114	34
5	465	37
6	315	34
7	116	40

[0450]

샘플 체적은 계획했던 것보다 약간 적었다. 모든 시간대에서 확실하게 충분한 물질이 이용될 수 있도록, 샘플에 하기 체적의 PBS를 첨가하여, 전부 4.4mL가 되게 하였다.

표 3

[0451]

샘플 번호	샘플 체적(mL)	첨가된 PBS 체적(mL)
1	4.35	0.05
2	4.23	0.17
3	4.21	0.19
4	4.20	0.20
5	4.21	0.19
6	4.19	0.21
7	4.20	0.20

[0452]

과정1) T=0 샘플 제조

[0453]

a. PBS

[0454]

i. 각 샘플로부터 200 μL 의 분취량을 취한다.

[0455]

14,000rpm에서 미량 원심분리한다. 상청액을 제거한다.

[0456]

ii. 상청액 100 μL 를 MPA에서 희석하여 200 μL 초과로 만든다(DF=2).

[0457]

iii. 펩티드 및 R848에 대하여 분석한다.

[0458]

b. 시트레이트

[0459]

i. 각 샘플로부터 200 μL 의 분취량을 취한다.

[0460]

6,000rpm에서 20분 동안 미량 원심분리한다. 상청액을 제거한다.

[0461]

ii. 시트레이트 완충제 200 μL 를 첨가하고, 완전히 재현탁한다.

[0462]

iii. 14,000rpm에서 15분 동안 미량 원심분리한다. 상청액을 제거한다.

[0463]

iv. 상청액 100 μL 를 MPA에서 희석하여 200 μL 초과로 만든다(DF=2).

[0464]

v. 펩티드 및 R848에 대하여 분석한다.

[0465]

2) PBS IVR

[0466]

a. 각 샘플의 9 \times 200 μL 를 미량 원심분리관에 첨가한다(공액결합되지 않은 경우에는 3 \times 200).

[0467]

b. 각 분취량에 37 $^{\circ}\text{C}$ PBS 300 μL 를 첨가한다.

[0468]

c. 즉시 샘플을 37 $^{\circ}\text{C}$ 오븐에 넣는다.

- [0469] 3) 시트레이트 IVR
- [0470] a. 각 샘플의 $9 \times 200 \mu\text{l}$ 를 미량 원심분리관에 첨가한다(공액결합되지 않은 경우에는 3×200).
- [0471] b. 6,000rpm에서 20분 동안 원심분리한다.
- [0472] c. 상청액을 제거한다.
- [0473] d. 각 시험관에, 시트레이트 완충제 $500 \mu\text{l}$ 를 첨가하고, 완전히 재현탁한다.
- [0474] e. 샘플을 37°C 오븐에 넣는다.
- [0475] 4) 로트(lot) 1 내지 4 및 8에 있어서, 하기 시간대에서 샘플(단계 6을 참조)을 취한다.
- [0476] a. 공액결합된 경우
- [0477] i. 24시간
- [0478] ii. 48시간(2일)
- [0479] iii. 96시간(4일)
- [0480] iv. 144시간(6일)
- [0481] v. 상기 데이터에 근거한 추가의 시간대 TBD
- [0482] b. 공액결합되지 않은 경우
- [0483] i. 2시간
- [0484] ii. 16시간
- [0485] iii. 24시간
- [0486] 5) 로트 6 및 7에 있어서, 하기 시간대에서 샘플을 취한다.
- [0487] a. PBS
- [0488] i. 24시간
- [0489] ii. 48시간(2일)
- [0490] iii. 96시간(4일)
- [0491] iv. 144시간(6일)
- [0492] v. 상기 데이터에 근거한 추가의 시간대 TBD
- [0493] b. 시트레이트
- [0494] i. 2시간
- [0495] ii. 16시간
- [0496] iii. 24시간
- [0497] iv. 48시간(2일)
- [0498] v. 72시간(3일)
- [0499] vi. 96시간(4일)
- [0500] vii. 120시간(5일)
- [0501] viii. 상기 데이터에 근거한 추가의 시간대 TBD
- [0502] 6) 다음과 같이 샘플을 취한다:
- [0503] a. 14,000rpm에서 15분 동안 미량 원심분리한다.
- [0504] b. 상청액을 제거한다.

- [0505] c. 100 μ l를 MPA에서 회석하여 200 μ l가 되게 한다(DF=2).
- [0506] 7) 펩티드 및 R848에 대하여 분석한다. 이는 각 시간대에서 방출된 양을 제공할 것이다.
- [0507] 물질 균형을 맞추기 위하여, 하기를 수행한다:
- [0508] 8) 남아 있는 펠렛(공액결합된 경우만)에 NH_4OH 200 μ l를 첨가한다.
- [0509] 9) 짧게 격렬하게 교반하고, 초음파 처리하여 분산한다.
- [0510] 10) 교반 막대를 가한다. 투명해질 때까지 방치한다(적어도 3시간).
- [0511] 11) 1% TFA의 200 μ l를 첨가한다(총 펠렛 체적=400 μ l).
- [0512] 12) 50 μ l를 MPA에서 회석하여 200 μ l가 되게 한다. HPLC에 의해 분석하여 펠렛에 남은 펩티드 및 R848을 결정한다.(DF=4).
- [0513] 13) 공액결합되지 않은 로트의 경우, 통상적인 AcN/TFA 방법으로 펩티드 및 R848에 대하여 분석한다.
- [0515] **실시예 37: 방출 속도 시험**
- [0516] 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 포스페이트 완충된 식염수 용액(PBS)(100mM, pH=7.4) 및 시트레이트 완충제(100mM, pH=4.5) 내 합성 나노운반체로부터 항원(예를 들어, 난백 펩티드, T 세포 항원) 및 면역자극제(예를 들어, R848, CpG)의 방출을 다음과 같이 결정하였다:
- [0517] 공액결합된 R848 및 난백 펩티드로 이루어진 나노운반체로부터의 R848의 방출은 제조시 얻어진 시험된 합성 나노운반체의 바람직한 양(예를 들어, PBS 내 약 10mg/ml)의 수성 현탁액을 원심분리 및 재현탁에 의해 동일한 체적의 적당한 방출 매질(시트레이트 완충제 100mM)로 교환함으로써 달성하였다.
- [0519] PBS(pH=7.4)에서의 시험관내 방출 속도 측정
- [0520] PBS 현탁액 NC 1ml를 입도에 따라 일반적으로 15 내지 30분 동안 미량 원심분리관에서 14,000rpm으로 원심분리하였다. 그 다음, 수집된 상청액을 동일한 체적인 이동상 A(MPA) 또는 물로 회석하고, 보관하는 동안의 R848 방출량에 대하여 역상 HPLC에서 분석하였다. 남아 있는 펠렛을 재현탁시켜 PBS 1ml 내 균질 현탁액으로 만들고, 일정하게 서서히 교반하면서 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 열챔버에 놓았다.
- [0521] T0 샘플의 경우, NC 현탁액으로부터 즉시 150 μ l의 분취량을 취한 후, NC 현탁액을 37 $^{\circ}\text{C}$ 열챔버에 놓고, 미량 원심분리기(모델: 겔럭시 16)를 사용하여 미량 원심분리관에서 14,000rpm으로 원심분리하였다. 상청액 100 μ l를 취하여 HPLC 이동상 A(MPA) 또는 물로 회석하여 200 μ l로 만들고, 역상 HPLC에서 R848 및 난백 펩티드의 방출량에 대하여 분석하였다.
- [0522] 시간대 측정을 위하여, 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 NC 샘플 현탁액으로부터 150 μ l의 분취량을 취하여, 샘플을 원심분리하고, T0 샘플에서와 같은 방식으로 R848 및 난백 펩티드의 방출량에 대하여 분석하였다. 방출된 R848 및 난백 펩티드를 경로 추적에 위해 6시간, 24시간에서 시험하였고, 완전한 방출 프로파일 수립을 위해 추가의 2시간, 48시간, 96시간 및 144시간에서 시험하였다.
- [0524] 시트레이트 완충제(pH=4.5)에서의 시험관내 방출 속도 측정
- [0525] PBS 완충제(pH=7.4) 대신에, 100mM 나트륨 시트레이트 완충제(pH=4.5)를 적용하여 원래의 NC 보관 용액(예를 들어, PBS)을 교환하였다. PBS 및 시트레이트 완충제에서의 상기 측정으로부터 물질 균형을 맞추기 위하여, 용액이 투명해질 때까지 각 시간대의 남은 펠렛을 교반하면서 NH_4OH (8M) 100 μ l로 2시간(또는 그 이상) 동안 처리하였다. 1% TFA 100 μ l를 첨가하여 혼합물을 중화하고, 펠렛 용액의 총 체적을 200 μ l로 만들었다. 혼합물의 50 μ l 분취량을 MPA(또는 물)로 회석하여 200 μ l로 만들고, 상기와 같이 HPLC에서 분석하여 시험관내 방출 후 펠렛에 남아 있는 방출되지 않은 R848의 양을 결정하여 물질 균형을 맞추었다. 공액결합되지 않은 샘플의 경우, 샘플을 아세트ونی트릴 내 TFA로 회석하고, 상기에서와 같이 R848에 대하여 분석하였다.

- [0526] 샘플 제조 및 추적된 시간대에 있어서 R848 및 난백 펩티드의 측정과 유사하게 CpG의 방출을 결정하였다. 그러나, 전술한 역상 HPLC 방법에 의해 방출 매질 내 CpG의 양을 분석하였다.
- [0528] **실시예 38: CpG 보강제를 갖는 NC-Nic에 의한 면역**
- [0529] 마우스 5마리의 군을 NC-Nic 100 μ g으로 2주 간격(0일, 14일 및 28일)으로 3회 면역시켰다(피하, 뒷다리). NC-Nic는 외부 표면에 니코틴을 나타내는 나노운반체의 조성물이었고, 1군을 제외한 모든 마우스 군은 CpG-1826(티오화) 보강제를 갖고 있었고, 이는 나노운반체로부터 상이한 방출 속도로 방출되었다. 나노운반체는 상기 제공된 방법에 따라 제조하였다. 그 다음, 26일 및 40일에 혈청내 항니코틴 항체를 측정하였다. 표준의 ELISA로 측정된 바와 같이, 폴리로신-니코틴에 대한 항니코틴 항체의 EC₅₀을 도 4에 나타내었다.
- [0530] 1군 마우스에게 난백 펩티드 및 중합체(그의 75%는 PLA이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임)를 함유하는, CpG-1826이 없는 NC-Nic를 투여하였다. 2군 마우스에게 난백 펩티드, 중합체(그의 75%는 PLA이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 CpG-1826 3.2%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였고; 24시간에서의 방출 속도는 NC 1mg 당 CpG 4.2 μ g이었다. 3군 마우스에게 NC-Nic 함유 중합체(그의 75%는 PLA이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 CpG-1826 3.1%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였고; 24시간에서의 방출 속도는 NC 1mg 당 CpG 15 μ g이었다. 방출은 pH 4.5에서 결정하였다.
- [0531] 도 4에 나타난 결과는 보강제의 나노운반체 내로의 포착은 NC 회합된 항원에 대한 면역 반응에 유리하고, 게다가 나노운반체(NC) 내로부터 포착된 CpG 보강제의 24시간에서의 방출 속도가 더 빠르면, CpG 보강제(TLR9 작용제)의 방출 속도가 더 느린 NC에 의해 유도된 것에 비하여 상승된 면역 반응을 일으키는 것을 입증한다.
- [0533] **실시예 39: 두 형태의 CpG 보강제를 갖는 NC-Nic에 의한 면역**
- [0534] 마우스 5마리의 군을 NC-Nic 100 μ g으로 4주 간격(0일 및 28일)으로 2회 면역시킨 다음(피하, 뒷다리), 12일, 24일 및 40일에 혈청내 항니코틴 항체를 측정하였다. NC-Nic는 외부 표면에 니코틴을 나타내고, 두 형태의 CpG-1826 보강제 중 하나를 갖는 나노운반체의 조성물이었다. 상기 제공된 방법에 따라 나노운반체를 제조하였다. 표준의 ELISA로 측정된 바와 같이, 폴리로신-니코틴에 대한 항니코틴 항체의 EC₅₀을 도 5에 나타내었다.
- [0535] 1군 마우스에게 난백 펩티드, 중합체(그의 75%는 PLA이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 CpG-1826(티오화) 6.2%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였고; 24시간에서의 방출 속도는 NC 1mg 당 CpG 16.6 μ g이었다. 2군 마우스에게 난백 펩티드, 중합체(그의 75%는 PLA이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 CpG-1826(티오화) 7.2%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였고; 24시간에서의 방출 속도는 NC 1mg 당 CpG 13.2 μ g이었다. 3군 마우스에게 난백 펩티드, 중합체(그의 75%는 PLA이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 CpG-1826(포스포디에스테르 또는 PO, 비티오화) 7.9%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였고; 24시간에서의 방출 속도는 NC 1mg 당 CpG 19.6 μ g이었다. 4군 마우스에게 난백 펩티드, 중합체(그의 75%는 PLA이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 CpG-1826(PO, 비티오화) 8.5%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였고; 24시간에서의 방출 속도는 NC 1mg 당 CpG 9.3 μ g이었다. 방출은 pH 4.5에서 결정하였다.
- [0536] 도 5에 나타난 결과는 나노운반체로부터의 포착된 보강제(CpG, TLR9작용제)의 방출 속도는 항체의 NC 결합된 항원(니코틴)으로의 생성에 영향을 주고, 24시간에서 더 높은 방출 속도를 나타내는 나노운반체가 더 강한 체액 면역 반응을 유도함을 입증한다(1군>2군 및 3군>4군). 이는 사용된 CpG 형태(더 안정한, 티오화 형태 또는 덜 안정한, 티오화되지 않은 형태)에 상관없이 그러하였다.
- [0538] **실시예 40: R848을 갖는 NC-Nic에 의한 면역**
- [0539] 마우스 5마리의 군을 NC-Nic 100 μ g에 의해 2주 간격(0일, 14일 및 28일)으로 3회 면역시킨 다음(피하, 뒷다리), 26일, 40일 및 54일에 혈청내 항니코틴 항체를 측정하였다. 상기 제공된 방법에 따라 나노운반체를 제조하였다. 표준의 ELISA로 측정된 바와 같이, 폴리로신-니코틴에 대한 항니코틴 항체의 EC₅₀을 도 6에 나타내었다.
- [0540] 1군 마우스에게 난백 펩티드 및 중합체(그의 75%는 PLA이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임)를 함유하는(단, 보강제는 없음) NC-Nic를 투여하였다. 2군 마우스에게 난백 펩티드, 중합체(그의 75%는 PLA이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 R848 1.0%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였는데; 그의 92%는 2시간에서 방출되었고, 6시간에서 96% 초과가 방출되었다. 3군 마우스에게 난백 펩티드, 중합체(그의 75%는 PLA-R848이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 R848

1.3%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였으며; 6시간에서 그의 29.4%가 방출되고 24시간에서 67.8%가 방출되었다. 4군 마우스에게 난백 펩티드, 중합체(그의 75%는 PLA-R848이고, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 R848 1.4%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였으며; 그의 20.4%는 6시간에서 방출되고, 41.5%는 24시간에서 방출된다. 5군 마우스에게 난백 펩티드, 중합체(그의 25%는 PLA-PEG-R848이고, 50%는 PLA이며, 25%는 PLA-PEG-Nic임), 및 R848 0.7%를 함유하는 NC-Nic를 투여하였고; 24시간에서 그의 1% 미만이 방출되었다. 방출은 pH 4.5에서 결정하였다.

[0541] 도 6에 나타난 결과는 NC에 함유된 R848 보강제(TLR 7/8 작용제)가 NC 회합된 항원에 대한 체액 면역 반응을 증강시켰음(2 내지 5군>>1군)을 입증한다. 게다가, R848의 빠른 방출(2군)도, R848의 느린 방출(5군)도 중간 속도로 R848을 방출하는 NC와 동일한 수준으로 면역 반응을 상승시키지 않았다(3군?4군>2군?5군).

[0543] 실시예 41: 포착된 PO CpG를 갖는 NC-Nic에 의한 면역

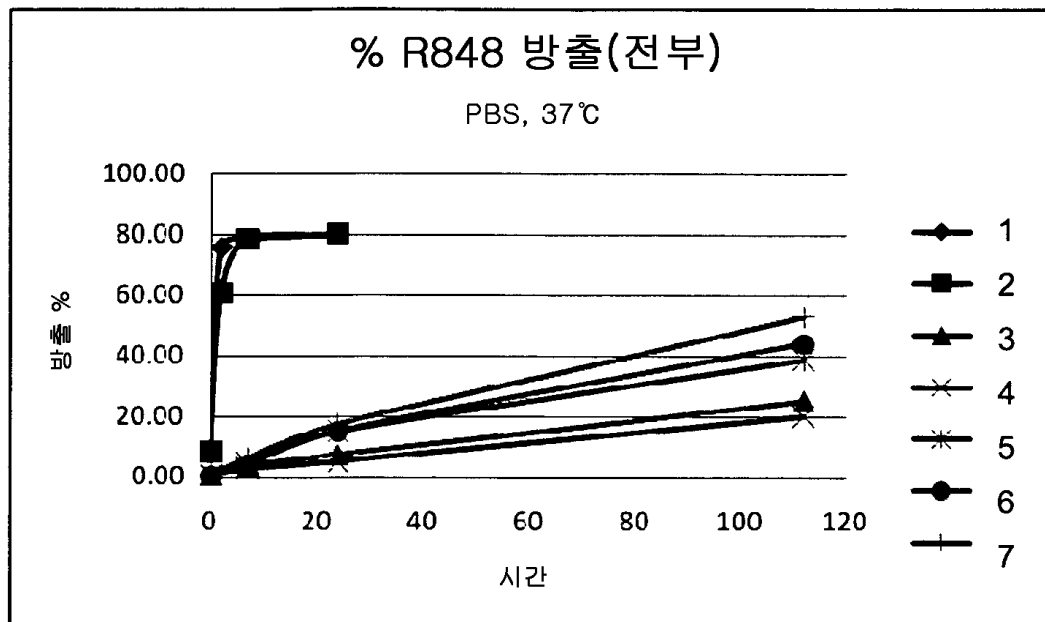
[0544] 마우스 5마리의 군을 포착된 PO-CpG를 가지는 또는 유리 PO-CpG와 혼합되어 있는 포착된 PO-CpG를 함유하지 않는 NC-Nic(외부 표면에 니코틴을 나타내는 나노운반체) 100 μ g으로 2주 간격(0일, 14일 및 28일)으로 3회 면역시켰다(피하, 뒷다리). 상기 제공된 방법에 따라 합성 나노운반체를 제조하였다. 그 다음, 26일 및 40일에 2개 군 모두에서 혈청내 항니코틴 항체를 측정하였다. 표준의 ELISA로 측정된 바와 같이, 폴리리신-니코틴에 대한 항니코틴 항체의 EC₅₀을 도 7에 나타내었다.

[0545] 1군 마우스를 1826 PO-CpG 및 난백 알부민(Ov-II)으로부터의 MHC-II 보조 펩티드가 캡슐화되어 있는(PO-CpG 6.6%; Ov-II 2.3%) NC-Nic로 면역하였다. 2군 마우스를 유리 1826 PO-CpG 20 μ g과 혼합되어 있는, 포착된 Ov-II 0.7%를 가지는 NC-Nic로 면역하였다.

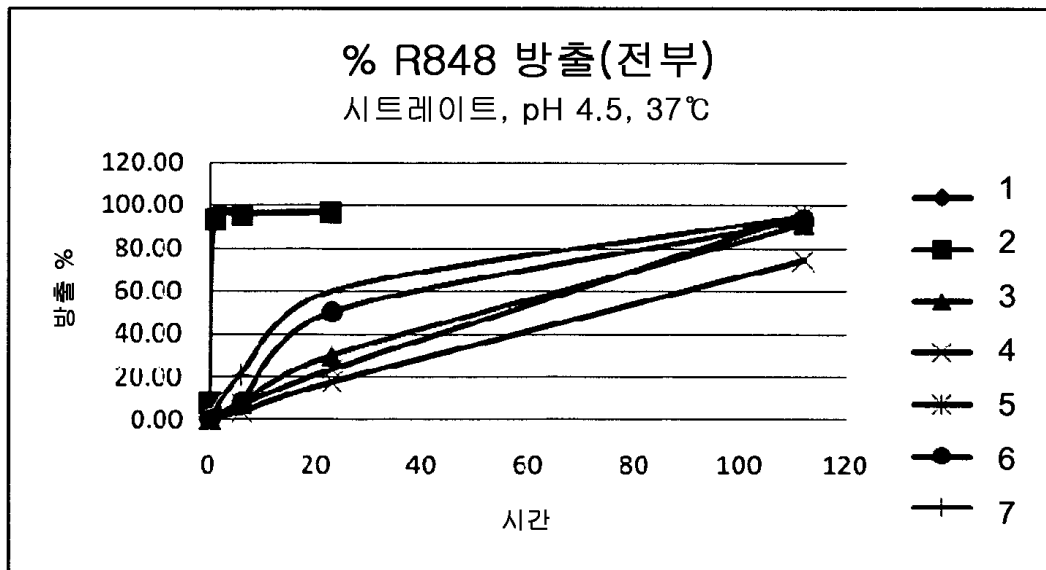
[0546] 이 실험은 나노운반체(NC) 내의 PO-CpG의 포착이 체액 면역 반응을 생성하고, 이는 포착된 PO-CpG 없이 약 3배 더 높은 투여량의 유리 PO-CpG를 NC에 혼합한 경우 유도된 것보다 더 우수함(1군에서의 항체 역가>2군에서의 항체 역가)을 입증한다.

도면

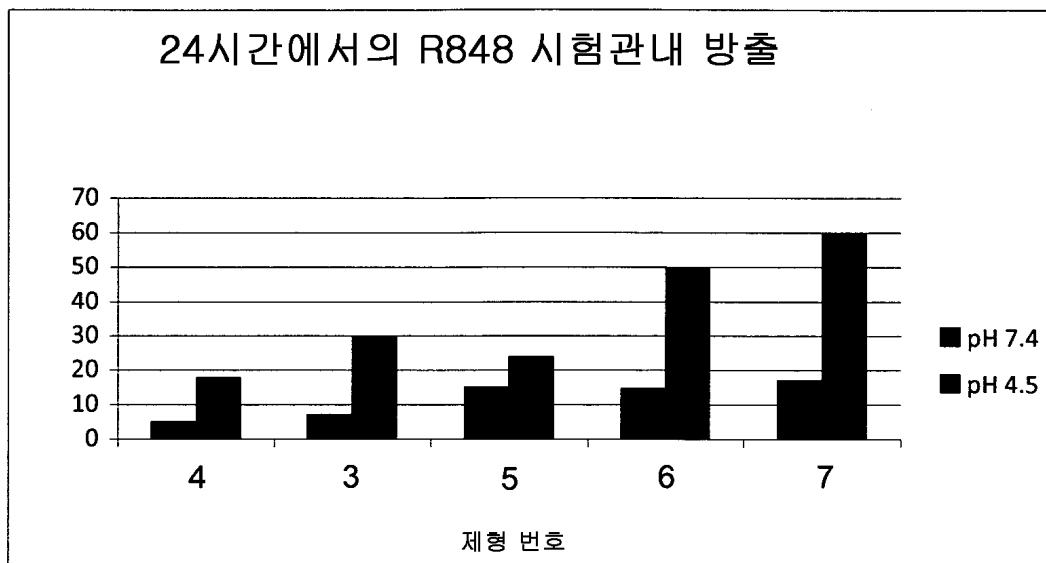
도면1



도면2



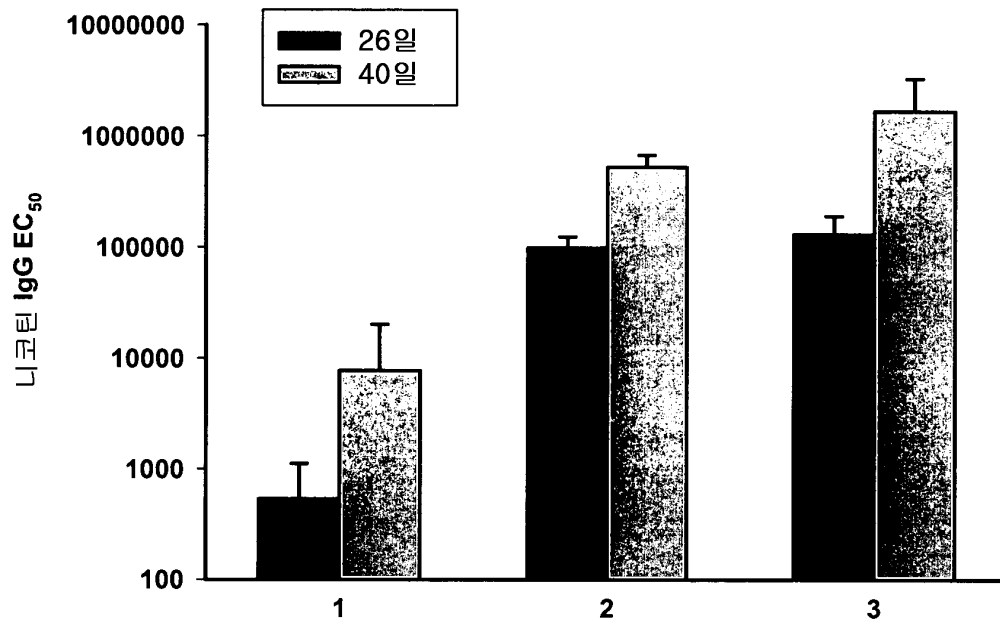
도면3



* 상기 제형은 각각 pH 4.5에서 방출이 더 많다.

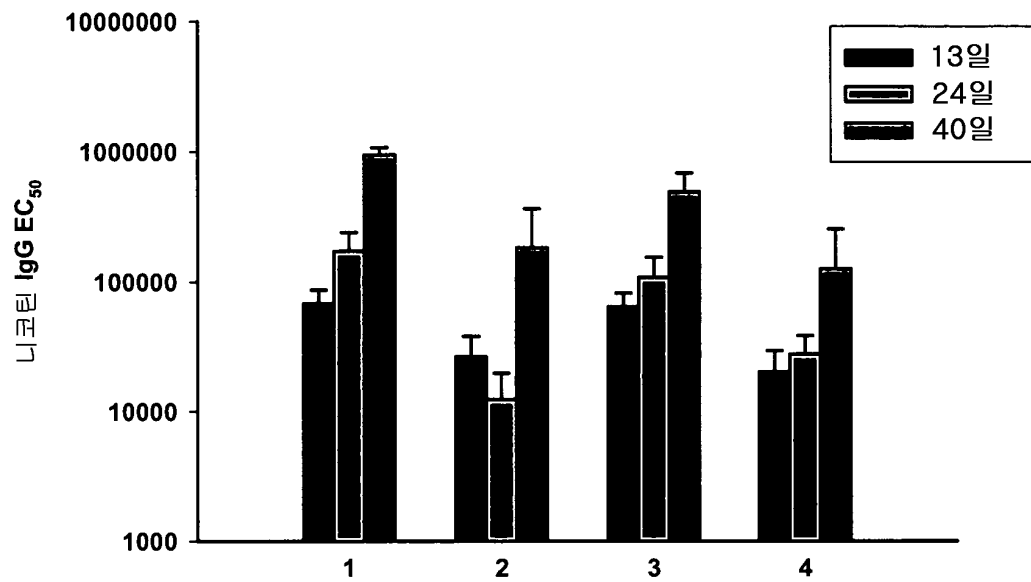
도면4

CpG 방출 속도가 상이한, NC±CpG에 의한 항체 유도



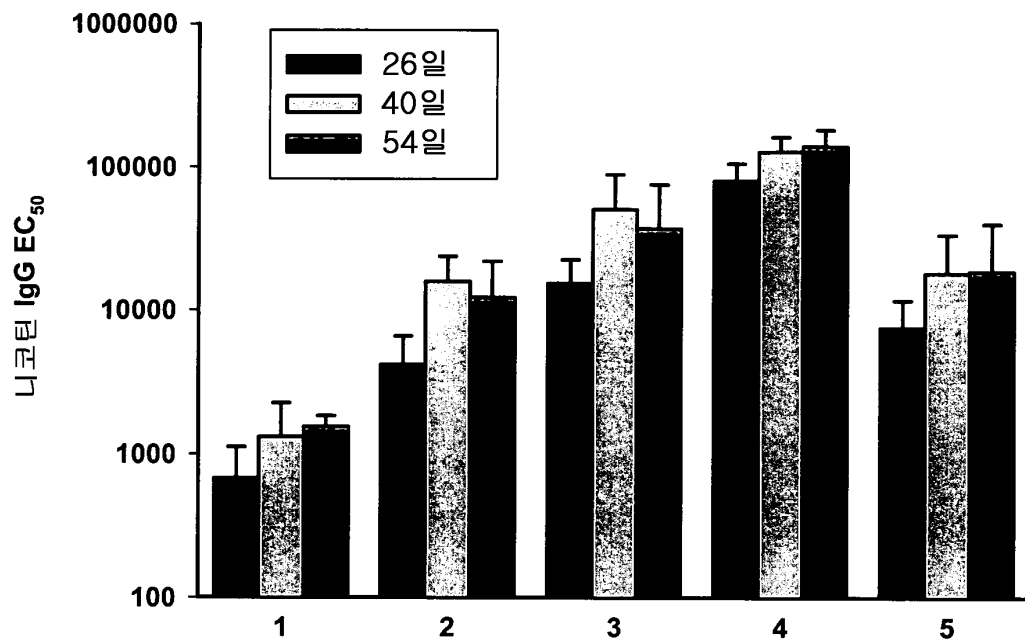
도면5

상이한 속도로 두 형태의 CpG를 방출하는 NC에 의한 항체 유도



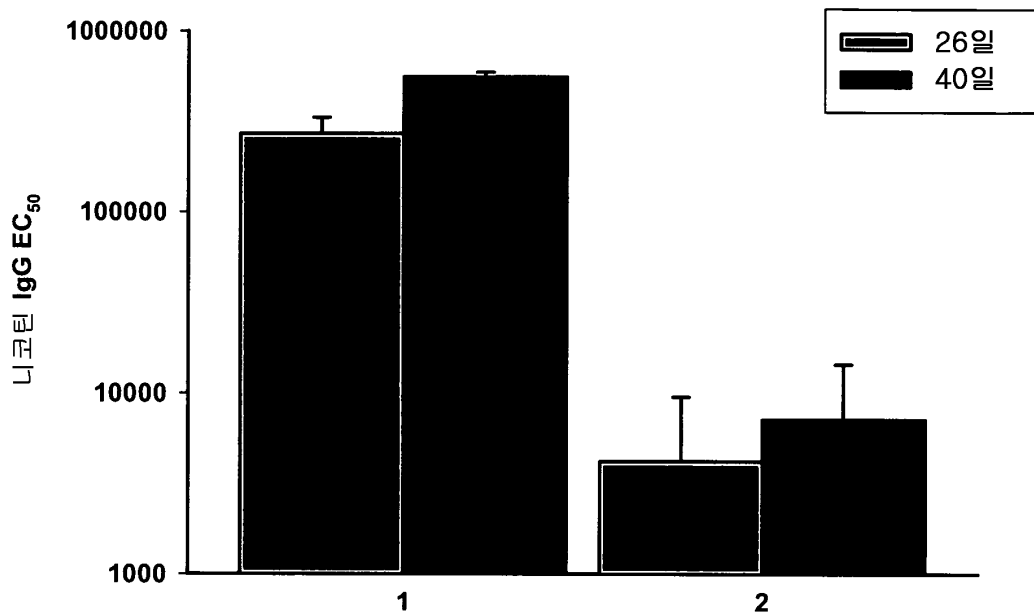
도면6

상이한 속도로 R848을 방출하는 NC에 의한 항체 유도



도면7

NC-Nic/(PO-CpG)로 면역화한 후 항니코틴 항체



도면8

CPG 방출

로트	시트레이트, pH 4.5			PBS, pH 7.5	
	시간(hr)	rel($\mu\text{g}/\text{mg}$ NP)	rel(첨가율%)	rel($\mu\text{g}/\text{mg}$ NP)	rel(첨가율%)
PO CPG	-1	0.54	1.21%	0.54	1.21%
	0	3.87	8.7%	0.27	0.6%
	2	6.72	15.1%	0.68	1.1%
	6	10.14	22.8%	0.90	1.5%
	24	15.14	34.1%	1.44	3.2%
	72				
	168				
	336				