



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0042391  
(43) 공개일자 2023년03월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/69 (2017.01) A61P 31/18 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) A61P 39/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 47/6921 (2017.08)  
A61K 47/6923 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2023-7008615(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년10월02일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2017-7011587  
원출원일자(국제) 2015년10월02일  
심사청구일자 2020년09월29일
- (85) 번역문제출일자 2023년03월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/053748
- (87) 국제공개번호 WO 2016/054522  
국제공개일자 2016년04월07일
- (30) 우선권주장  
62/059,628 2014년10월03일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인  
나노텍스 엘엘씨  
미국 캘리포니아주 94941 밀 밸리 쇼어라인 하이웨이 100 #100비
- (72) 발명자  
호손, 루이스  
미국 캘리포니아주 94941 밀 밸리 미드베일 웨이 531
- (74) 대리인  
특허법인 광장리앤코

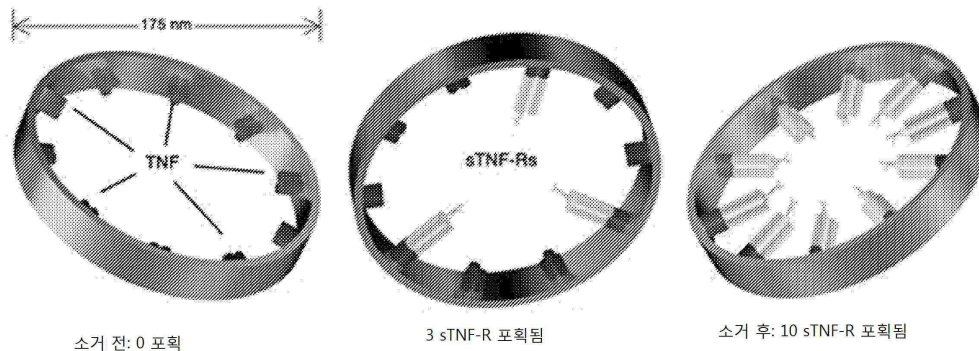
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 가용성 생물분자의 생물학적 활성을 억제하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 다른 것들 중에서도, 가용성 생물분자에 결합하고 그의 생물학적 활성을 억제하는 조성물 및 그의 약학 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 조성물이 유용한 많은 응용(예를 들어, 치료적 응용)을 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

*A61K 47/6937* (2017.08)

*A61P 31/18* (2018.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*A61P 39/02* (2018.01)

(30) 우선권주장

62/198,519 2015년07월29일 미국(US)

62/198,541 2015년07월29일 미국(US)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

발명의 설명에 기재된 모든 발명

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 2014년 10월 3일에 출원된 미국 가출원 제62/059,628호, 2015년 7월 29일에 출원된 미국 가출원 제 62/198,519호, 2015년 7월 29일에 출원된 미국 가출원 제62/198,541호에 대한 우선권을 주장하며, 그 각각은 전체가 참고로 본 발명에 통합된다.

**배경기술**

[0002] 임상적으로 이용가능하거나 개발중인 수십 가지의 항암 치료법은 면역계가 암을 인식하거나 파괴하는 능력 또는 두 가지 능력 모두의 자극에 관련된다. 가장 두드러지는 것 중 세 가지는 항-체크포인트(checkpoint) 억제제인 브리스톨-마이어스 스쿼브(Bristol-Myers Squibb)로부터의 예르보이(Yervoy)(이피리무맙(Ipilimumab)), 머크(Merck)로부터의 케이트루다(Keytruda)(렘브로리주맙(Pembrolizumab)), 이전에는 람브로리주맙(Lambrolizumab) 및 모피트 암 센터/국립 암 연구소(Moffitt Cancer Center/National Cancer Institute)로부터의 종양 침윤 림프구를 이용한 입양 세포 이식(ACT/TIL)으로 알려진 세포 치료법이다. 그러나, 이들 및 다른 접근법은 개체의 면역계의 전체적인 상향-조절에 관련되어, 자가면역 질환과 유사한 잠재적으로 심각한 증상 및/또는 다른 중요한 부작용을 유도한다.

[0003] 자가-면역을 피하는 개체의 능력을 방해하지 않고, 암, 특히 전이성 암을 치료하기 위한 보다 효과적인 약리학 적 접근법이 당업계에서 필요하다. 다른 것들 중에서도, 본 발명은 종양 미세환경을 탈억제하는 것(dis-inhibiting), 즉, 자극하는 면역 세포에 대한 종양의 방어 시스템을 약화시키는 것을 비롯한, 암에 대한 개체 자신의 면역계를 활용하는 대안적 접근법에 기초한 방법과 조성물을 제공한다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0004] (특허문헌 0001) 국제 특허 출원 공개 WO 2013/011764호, WO 2013/029278호 및 WO 2014/151381호, 미국 특허 출원 공개 제2014/0271886호, 국제 특허 출원 공개 WO 2010/084088호, 미국 특허 출원 공개 제20140199352호, 제20080277346호, 및 제20040105821호, 미국 특허 제8,778,830호 및 제8,586,096호, 미국 특허 제5,814,272호 및 제7,932,311호; 및 미국 특허 출원 공개 제20040166166호, 국제 특허 출원 공개 WO 2012/085891호, 미국 특허 출원 공개 제2014/0096274호, PCT 특허 출원 공개 WO2014/170899호, 미국 특허 제7,918,842호, 미국 특허 출원 공개 제2013/0039848호 및 제2014/0248210호, 미국 특허 출원 공개 제2011/0028662호, 미국 특허 출원 공개 제2013/0337070호, 미국 특허 출원 공개 제2014/0235803호, 제2014/0147387호, 제2013/0196450호 및 제 2012/0141797호 및 미국 특허 제8,574,549호, 미국 특허 제8,685,538호 및 미국 특허 출원 공개 제 2013/0323182호, 미국 특허 출원 공개 제2008/0241223호; 미국 특허 제5,501,856호; 제5,164,188호; 제 4,863,457호; 및 제3,710,795호; EP488401호; 및 EP430539호

**발명의 내용**

[0005] 본 발명은 다른 것들 중에서도, 가용성 생물분자에 결합하고 그의 생물학적 활성을 억제하는 조성물 및 그의 약 학 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 조성물이 유용한 많은 응용을 제공한다. 예를 들어, 본원에 개시된 조성물은 암세포와 같은 세포의 증식, 성장 및/또는 생존을 억제하는데 유용하다. 다른 예에서, 본원에 개시된 조성물은 독소(예를 들어, 동물독소, 세균 독소 및/또는 식물 독소), 바이러스, 또는 개체의 순환계 내의 다른

외래 화합물에 결합하고 중화시키는 데 유용할 수 있다.

[0006] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 상호교환되어 사용되며, 길이 또는 번역후 변형에 관계없이, 임의의 펩티드-연결된 아미노산 쇄를 의미한다.

[0007] 달리 정의되지 않으면, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 관련되는 기술분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 바람직한 방법과 물질이 하기에 개시되지만, 본원에 개시된 것들과 유사하거나 동등한 방법과 물질 또한 본원에 개시된 방법과 조성물의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있다. 본원에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 그 전체가 참고로 통합된다.

[0008] 본원은 전술한 양태 및 실시양태의 임의의 것들의 모든 조합, 및 상세한 설명과 실시예에 개시된 임의의 실시양태와의 조합을 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

[0009] 도 1은 TNF 수용체(TNFR)의 가용성 형태에 결합하는 입자의 예시적인 실시양태를 도시한다. 입자는  $1 \mu\text{m}^3$ 이다. 입자의 내면 표면은 고정된 TNF를 함유하며, 이것은 가용성 TNFR에 결합하여 그의 천연 리간드로부터 TNFR을 격리(소거)시킬 수 있다.

도 2는 TNF 수용체(TNFR)의 가용성 형태에 결합하는 입자의 예시적인 실시양태를 도시한다. 고리 모양의 입자는 175 nm의 직경을 갖는다. 입자의 내면 표면은 고정된 TNF를 함유하며, 이것은 가용성 TNFR에 결합하여 그의 천연 리간드로부터 TNFR을 격리(소거)시킬 수 있다.

도 3은 TNF 수용체(TNFR)의 가용성 형태에 결합하는 입자의 예시적인 실시양태를 도시한다. 도면의 좌측의 입자는 최장 치수가 100 내지 150 nm인 코어를 가진 8면체이다. 도면의 우측의 입자는 최장 치수가 200 내지 300 nm인 코어를 가진 20면체이다. 각 입자는 추가로 코어 다면체 구조의 꼭짓점으로부터 밖으로 향하는 분자 돌출부를 포함한다. 돌출부는 입자에 결합된 TNF와 세포 표면 TNFR 사이의 상호작용을 억제하는 "세포 반발자(repeller)"로서 작용한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0010] 본 발명은 가용성 생물분자를 그의 천연 환경으로부터 격리시켜, 예를 들어, 가용성 생물분자의 생물학적 활성을 억제하기 위한 조성물과 방법을 특징으로 한다. 예를 들어, 본 발명은 가용성 생물분자에 선택적으로 결합하는 제제(예를 들어, 입자의 표면에 고정된)를 포함하는 표면을 가진, 입자 또는 다수의 입자를 제공한다. 가용성 생물분자가 제제에 의해 결합되면, 가용성 생물분자가 가용성 생물분자의 다른 천연 결합 파트너와 상호작용하는 능력이 감소되도록(예를 들어, 상당히 감소된 능력 또는 무능력) 생물분자는 입자에 의해 격리된다. 따라서, 가용성 생물분자는 불활성이 된다.

[0011] I. 생물분자

[0012] 가용성 생물분자는 일반적으로 특이적 결합 쌍의 첫번째 구성원이다. 본원에서 사용된 "결합 파트너", "특이적 결합 파트너" 또는 "특이적 결합 쌍의 구성원"은 일반적으로 상당한 친화성과 특이성으로 서로 결합하는 한 쌍의 결합 구성원의 임의의 구성원을 포함한다. 한 쌍의 결합 파트너는 샘플의 적어도 대부분 또는 적어도 실질적으로 모든 다른 성분들을 실질적으로 배제하는 정도로 서로 결합할 수 있고/있거나 다른 것 중에서도 약  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , 또는  $10^{-8}$  M 미만의 해리 상수를 가질 수 있다. 한 쌍의 결합 파트너는 특이성 및 친화성을 협동적으로 증가시키기 위해 다수의 원자 상호작용에 의존하는 소정의 방식으로 서로 "맞을" 수 있다. 결합 파트너는 생물학적 시스템(예를 들어, 수용체-리간드 상호작용), 화학적 상호작용으로부터 및/또는 다른 것들 중에서도 분자 임프린팅 기술에 의해 유도될 수 있다. 특이적 결합 쌍으로도 불리는, 예시적인 대응 결합 파트너 쌍은 표 1에 나타나며, "제1" 및 "제2"는 임의적이며 상호교환가능하다.

[0013] 본원에서 사용된 용어 "생물분자"는 살아있는 유기체에 영향을 줄 수 있는 임의의 분자를 말한다. 일부 실시양태에서, 생물분자는 리튬 또는 납과 같은 원자이다(예를 들어, 생물분자는 금속 양이온일 수 있다). 일부 실시양태에서, 생물분자는 원자 또는 금속 이온이 아니다. 예를 들어, 생물분자는 유기 화합물 또는 무기 화합물과 같은 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물분자는 와파린과 같은 약물이다. 생물분자는 디아세틸모르핀과 같은 향정신성 약물일 수 있다. 생물분자는 독, 독소 또는 백신일 수 있다. 생물분자는 알레르겐일 수 있다. 생물분자는 발암물질일 수 있다. 생물분자는 신경작용제와 같은 화학 무기 제제일 수 있다. 생물분자는 바이러스

또는 비로이드일 수 있다. 생물분자는 호르몬, 사이토카인, 신경전달자, 가용성 세포의 수용체, 항체 또는 가용성 매트릭스 단백질과 같은 유기체에 내인성(endogenous)인 분자일 수 있다. 생물분자는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 탄수화물 또는 당일 수 있다. 생물분자는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 탄수화물 또는 당을 포함할 수 있다. 생물분자는 지질, 스테로이드 또는 콜레스테롤일 수 있다.

[0014] 생물분자는 세포 표면 수용체의 리간드일 수 있다. 리간드는 천연-발생 리간드 또는 합성 리간드일 수 있다. 리간드는 수용체의 천연 리간드(예를 들어, 생체내(in vivo)에서 개체에 의해 생산되는 리간드) 또는 비천연 리간드(예를 들어, 바이러스 또는 약물과 같은, 개체내로 도입되는 리간드)일 수 있다. 생물분자는 세포질 수용체 또는 핵 수용체에 대한 리간드일 수 있다.

**표 1**

[0015] 특이적 결합 쌍의 예

제1 결합 파트너	제2 결합 파트너
세포 표면 수용체(예를 들어, TNF 수용체)	천연 리간드(예를 들어, TNF α)
바이러스 코트 또는 외피 단백질(예를 들어, HIV-1 gp120)	대응 세포 수용체(예를 들어, CD4)
보툴리눔 독소	시넵토타그민 II 세포 표면 수용체
가용성 수용체(예를 들어, 가용성 TNFR 또는 가용성 IL-2 수용체)	천연 리간드(예를 들어, TNF α 또는 IL-2)

[0016] 상기에 개시한 바와 같이, 종양 세포는 사이토카인 수용체의 가용성 형태를 발산(shedding)함으로써 숙주 면역 감시로부터 자신을 보호하는 것으로 알려져 있으며, 가용성 수용체는 종양 미세환경에서 면역 세포에 의해 생산된 사이토카인에 결합한다. 예를 들어, 암세포는 IL-2 수용체 및 TRAIL 수용체와 같은 TNF 수용체 및 다른 사이토카인 수용체의 가용성 형태를 발산한다. 이들 가용성 수용체는 TNF α, IL-2, 및 TRAIL의 프로-세포사멸(pro-apoptotic) 효과를 세포로부터 덜어줌으로써 암세포에 성장 이점을 부여한다. 카르파토타 등(Karpatova et al.)은 종양 침윤 및 전이를 증대시킬 수 있는 인간 암세포에 의한 67kD 라미닌 수용체의 발산을 발표하였다((1996) *J Cell Biochem* 60(2):226-234). 따라서, 본원에서 개시된 입자는 예를 들어, 암의 치료에 사용하기 위해, 세포 표면 수용체 단백질의 가용성 형태를 소거하기 위해 조작될 수 있다.

[0017] 따라서, 일부 실시양태에서, 세포 표면 수용체 단백질은 암 세포에 의해 발현되고/되거나 세포 표면 수용체 단백질은 암세포에 의해 세포 표면 수용체 단백질의 가용성 형태로서 발산되는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 수용체 단백질은 활성화되면, 세포사멸을 유도한다(예를 들어, 사멸 수용체). 일부 실시양태에서, 세포 표면 수용체 단백질은 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 단백질(예를 들어, TNFR-1 또는 TNFR-2)이다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 수용체 단백질은 Fas 수용체 단백질이다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 수용체 단백질은 TNF-관련 세포사멸-유도 리간드 수용체(TRAILR) 단백질, 4-1BB 수용체 단백질, CD30 단백질, EDA 수용체 단백질, HVEM 단백질, 림프독소 베타 수용체 단백질, DR3 단백질 또는 TWEAK 수용체 단백질이다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 수용체 단백질은 인터루킨 수용체 단백질, 예를 들어, IL-2 수용체 단백질이다. 그러한 실시양태에서, 표적 가용성 생물분자는 예를 들어, 암세포로부터 발산되는, 세포 표면 수용체의 가용성 형태일 수 있다.

[0018] 당업자는 또한 본원에 개시된 입자가 또한 그 생물학적 활성이 예를 들어, 바람직하지 않을 수 있는 매우 다양한 가용성 생물분자를 소거하기 위해 유용함을 이해할 것이다. 예를 들어, 입자는 바이러스 캡시드 또는 외피의 성분에 결합하여 개체의 혈액으로부터 바이러스를 격리하기 위해 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 입자는 개체의 순환계에서 독소(예를 들어, 세균 독소, 식물 독소 및 뱀독의 하나 이상의 성분과 같은 동물 독소)에 결합하여 격리하기 위해 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 입자는 개체의 순환계로부터 소분자(예를 들어, 불법 마약 또는 소분자 독소)에 결합하여 격리하기 위해 조작될 수 있다. 그러한 실시양태에서, 입자는 예를 들어, 뱀 또는 곤충에 물린 후, 신체로부터 독소를 제거하기 위해 유용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 입자는 (예를 들어, 과민성 면역 반응을 야기하는 항원을 소거함으로써) 개체에서 과민성 충격을 치료하거나, 예방하거나, 개시를 지연시키거나 그 심각성을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[0019] 일부 실시양태에서, 가용성 생물분자는 제제에 의해 결합되는 바이러스, 예를 들어, 바이러스 구조 단백질(예를 들어, 바이러스 캡시드 또는 바이러스 외피 단백질)이다. 그러한 실시양태에서, 입자는 예를 들어, 바이러스에 감염되거나 바이러스에 감염될 위험이 있는 개체를 위한 항-바이러스 치료법으로서 유용하다.



- [0020] 일부 실시양태에서, 가용성 생물분자는 소분자 또는 거대분자이다. 일부 실시양태에서, 가용성 생물분자의 최장 치수는 600 nm 이하(예를 들어, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 또는 25 nm 미만)이다. 생물분자는 약 1 Å 내지 약 1 μm, 예를 들어, 약 1 Å 내지 약 100 nm, 약 1 Å 내지 약 20 nm, 약 1 nm 내지 약 1 μm, 약 1 nm 내지 약 100 nm 또는 약 1 nm 내지 약 20 nm의 분자 반경을 가질 수 있다. 생물분자는 약 3 amu 내지 약 10<sup>7</sup> amu, 예를 들어, 약 100 amu 내지 약 10<sup>7</sup> amu, 약 3 amu 내지 약 10<sup>6</sup> amu, 약 3 amu 내지 약 10<sup>5</sup> amu, 약 100 amu 내지 약 10<sup>6</sup> amu 또는 약 400 amu 내지 약 10<sup>6</sup> amu의 분자량을 가질 수 있다.
- [0021] 본원에서 사용된 용어 "특이적 결합", "특이적으로 결합하는", "선택적 결합", "선택적으로 결합하는" 및 유사한 문법적 용어는 생리학적 조건하에서 상대적으로 안정한 복합체를 두 분자가 형성함을 말한다. 전형적으로, 결합은 결합 상수( $k_a$ )가 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>보다 높을 때 특이적으로 간주된다. 따라서, 특이적 결합 쌍의 제1 구성원은 적어도 10<sup>6</sup> (또는 더 큰)(예를 들어, 적어도 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup>, 10<sup>12</sup>, 10<sup>13</sup>, 10<sup>14</sup>, 또는 10<sup>15</sup> 이상 또는 더 큰) M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>의  $k_a$ 로 결합 쌍의 제2 구성원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 선택적 상호작용은 10<sup>-3</sup> (예를 들어, 8 x 10<sup>-4</sup>, 5 x 10<sup>-4</sup>, 2 x 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-4</sup> 또는 10<sup>-5</sup>) s<sup>-1</sup> 이하의 해리 상수( $k_d$ )를 갖는다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 선택적 상호작용은 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-11</sup> 또는 10<sup>-12</sup> M 미만의  $K_D$ 를 갖는다. 평형 상수  $K_D$ 는 운동 속도 상수의 비  $-k_d/k_a$ 이다. 일부 실시양태에서, 선택적 상호작용은 1 x 10<sup>-9</sup> M 미만의  $K_D$ 를 갖는다.
- [0023] 본원에서 사용된 두 분자 사이의 상호작용을 말할 때 용어 "상호작용"은 분자 서로간의 물리적 접촉(예를 들어, 결합)을 말한다. 일반적으로, 그러한 상호작용은 상기 분자 중 하나 또는 둘 모두의 활성(생물학적 효과를 생산함)을 야기한다. 그러한 상호작용의 역제는 상호작용에 관련된 하나 이상의 분자의 활성의 파괴를 야기한다.
- [0024] 본원에서 사용된 용어 "억제하는" 및 그의 문법적 등가물은 특정 작용, 기능 또는 상호작용의 감소, 제한 및/또는 차단을 말한다. 일 실시양태에서, 이 용어는 주어진 결과물 또는 파라미터의 수준을 대응하는 대조군에서의 양보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 적거나 또는 그 미만인 양(예를 들어, 특이적 결합 쌍의 두 구성원 사이의 상호작용의 배경 수준)으로 감소시키는 것을 말한다. 주어진 결과물 또는 파라미터의 감소된 수준이 결과물 또는 파라미터의 절대적 부재를 의미할 필요는 없지만 그럴 수도 있다. 본 발명은 결과물 또는 파라미터를 전적으로 제거하는 방법을 요구하지 않으며 이에 제한되지 않는다. 실질적인 억제는 예를 들어, 두 생물분자(예를 들어, 결합 쌍의 제1 및 제2 구성원) 사이의 상호작용의 적어도 50 (예를 들어, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 또는 95 이상) % 억제이다.
- [0025] 다른 생물분자에 대한 하나의 생물분자의 상호작용을 검출하거나, 친화성을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 두 생물분자의 결합은 생물층 간섭계법(BioLayer Interferometry)(BLI), 웨스턴 블롯, 닷 블롯, 표면 플라즈몬 공명법(SPR), 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA), 알파스크린(AlphaScreen)® 또는 알파리사(AlphaLISA)® 분석 또는 질량분광법 기반 방법과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다양한 기술을 이용하여 검출 및/또는 정량될 수 있다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 결합은 두 생물분자의 상호작용의 동역학적 파라미터를 규명하기 위하여 당업계에 알려진 임의의 SPR-기반 분석을 이용하여 분석될 수 있다. 비아코어(BIAcore) 장비(비아코어 에이비(Biacore AB); 스웨덴 옘살라); 라시스(1Asys) 장비(어피니티 센서(Affinity Sensors); 매사추세츠주, 프랭클린); 아이비스(IBIS) 시스템(윈저 사이언티픽 리미티드(Windsor Scientific Limited); 영국, 벅스), 에스피알-셀리아(SPR-CELLIA) 시스템(니폰 레이저 앤드 일렉트로닉스 랩(Nippon Laser and Electronics Lab); 일본, 호카이도), 및 SPR 디텍터 스프리타(Detector Spreeta)(텍사스 인스트루먼트(Texas Instruments); 텍사스주, 달라스)를 포함하며, 이에 제한되지 않는 구매가능한 임의의 SPR 장비가 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, Mullett et al. (2000) *Methods* 22: 77-91; Dong et al. (2002) *Reviews in Mol Biotech* 82: 303-323; Fivash et al. (1998) *Curr Opin Biotechnol* 9: 97-101; 및 Rich et al. (2000) *Curr Opin Biotechnol* 11: 54-61을 참고한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 두 생물분자 사이의 생물분자 상호작용은 옥테트(Octet) (포르테바이오 인크.(ForteBio Inc.))에서의 BLI를 이용하여 분석할 수 있다. BLI는 실시간으로 바이오센서 팁 상의 단백질 층의 두께 변화를 측정하여 바이오센서 팁에 고정된 리간드와 용액 내의 분석물 사이의 결합을 감지하는 무라벨 광학 분석 기술이

다.

- [0028] 일부 실시양태에서, 알파스크린(펄킨엘머(PerkinElmer)) 분석은 두 생물분자의 결합을 규명하기 위해 이용될 수 있다. 두분자어 알파(ALPHA)는 증폭 발광 근접성 균질 분석(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)을 나타낸다. 알파스크린은 공여체 및 수용체 비드 사이의 에너지 전달에 의해 생성된 신호를 측정함으로써 공여체 및 수용체 비드에 부착된 분자들 사이의 결합을 감지하는 비드-기반 근접성 분석이다.(예를 들어, Eglen et al. (2008) *Curr Chem Genomics* 1:2-10 참고).
- [0029] 일부 실시양태에서, 알파리사®(펄킨엘머) 분석이 두 생물분자의 결합을 규명하기 위해 사용될 수 있다. 알파리사는 유로폼-함유 수용체 비드를 포함시키기 위해 상기에 개시한 알파스크린 분석으로부터 변형되며 전통적인 ELISA 분석에 대한 대안으로 기능한다.(예를 들어, Eglen et al. (2008) *Curr Chem Genomics* 1:2-10 참고.)
- [0030] 경쟁적 및 비경쟁적 면역분석을 비롯한 다양한 면역분석 기술이 이용될 수 있다. 용어 "면역분석"은 유세포분석, FACS, 효소 면역분석(EIA), 예를 들어, 효소 증폭 면역분석 기술(enzyme multiplied immunoassay technique)(EMIT), 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA), IgM 항체 포획 ELISA(MAC ELISA) 및 미세입자 효소 면역분석(MEIA), 또한 모세관 전기영동 면역분석(CEIA), 방사성-면역분석(RIA), 면역방사측정법(immunoradiometric assays)(IRMA), 형광 편광 면역분석(FPIA) 및 화학발광 분석(CL)을 제한없이 포함하는 기술을 포함한다. 소망하는 경우, 그러한 면역분석은 자동화될 수 있다. 면역분석은 또한 레이저 유도 형광과 함께 사용될 수 있다. 유도-주입 리포솜 면역분석 및 리포솜 면역센서와 같은 리포솜 면역분석이 또한 본 발명에서의 사용에 적합하다. 또한, 예를 들어, 생물분자 복합체의 형성이 마커 농도의 함수로서 최고 속도 신호로 변환되는 광 산란 증가를 야기하는 비탁분석이 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합하다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 항온처리 생성물은 ELISA, RIA, 형광면역분석(FIA) 또는 가용성 입자 면역분석(SPIA)에 의해 검출된다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 두 생물분자의 결합은 시차주사형광측정법(DSF) 및 시차 정적 광산란(differential static light scattering)(DLS)과 관련된 열변성 방법을 이용하여 분석할 수 있다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 두 생물분자의 결합은 질량 분광법에 결합된 친화성 선별(affinity selection coupled to mass spectrometry)(AS-MS) 플랫폼과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 질량분광법 기반 방법을 이용하여 분석될 수 있다. 이것은 단백질과 시험 화합물이 항온처리되고, 미결합 분자는 세척하여 제거되고 단백질-리간드 복합체는 탈복합체화 단계에 이어 리간드 동정을 위해 MS에 의해 분석되는 무표지 방법이다.
- [0033] 일부 실시양태에서, 두 생물분자의 결합은 면역분석에 의해 또는 크로마토그래피 검출에 의해, 예를 들어, 방사성표지된(예를 들어, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C 또는 <sup>3</sup>H), 형광 표지된(예를 들어, FITC), 또는 효소적 표지된 생물분자와 같은 검출가능하게 표지된 단백질을 이용함으로써 정량될 수 있다.
- [0034] 일부 실시양태에서, 본 발명은 직접적으로 또는 간접적으로 두 생물분자 사이의 상호작용 정도를 측정함에 있어서 형광 편광 분석 및 형광 공명 에너지 전이(FRET) 분석의 사용을 포함한다.
- [0035] II. 입자
- [0036] 본원에서 사용된 용어 "입자"는 알루미늄, 금속(예를 들어, 금 또는 백금), 유리, 실리카, 라텍스, 플라스틱, 아가로즈, 폴리아크릴아미드, 메타크릴레이트 또는 임의의 중합성 물질과 같은 임의의 물질을 포함할 수 있으며 임의의 크기 및 모양일 수 있는 작은 덩어리를 말한다. 일부 실시양태에서, 입자 또는 입자들은 규소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2013/011764호, WO 2013/029278호 및 WO 2014/151381호 및 미국 특허 출원 공개 제2014/0271886호를 참고하며, 각각의 내용은 그 전체가 참고로 본 발명에 통합된다. 일부 실시양태에서, 입자는 전분을 포함하거나 전분으로 이루어질 수 있다(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2010/084088호 참고).
- [0037] 또한 본 발명은 입자의 집합을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 다수의 입자는 좁거나 넓은 다분산성을 가진다. 본원에서 사용된 "다분산성"은 특정 입자 집단 내의 입자들의 크기 범위를 말한다. 즉, 매우 다분산성인 집단은 평균 크기가 1 마이크로미터이며 개별 입자는 0.1 내지 4 마이크로미터 범위인 입자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, "좁은 다분산성"이 바람직하다. 즉, 특정 평균 입자 크기가 주어질 때, 집단 내의 개별 입자는 평균 입자 크기로부터 ±20% 이하, 바람직하게는 ± 15% 이하, 그리고 가장 바람직하게는 ± 10% 이하만큼 상이한 것이 현 재로서는 바람직하다. 보다 구체적으로, 입자 집단은 바람직하게는 약 1 마이크로미터 이하의 평균 입자 크기를 갖는다. 따라서, 만일 1 마이크로미터의 평균 입자 크기가 선택된다면, 집단 내의 개별 입자는 가장 바람직하게는 약 0.8 내지 약 1.2 마이크로미터의 범위 이내일 것이다. 일부 실시양태에서, 입자 집단은 약 0.3 내지 약 1 마이크로미터, 예를 들

어, 약 0.4 내지 약 0.9, 약 0.5 내지 약 0.9, 약 0.4 내지 약 0.8, 약 0.5 내지 약 0.7, 약 0.3 내지 약 0.9, 또는 약 0.3 내지 약 0.7 미크론의 평균 입자 크기를 갖는다.

- [0038] 일부 실시양태에서, 본 발명은 한정된 평균 입자 크기를 갖는 다수의 입자 또는 입자 집단을 특징으로 한다. 본원에서 사용된 "평균 입자 크기"는 개별 입자 크기를 측정하고 이어서 전체 입자 수로 나눔으로써 얻어진다. 평균 입자 크기의 결정은 당업계에 공지되어 있다. 전형적으로, 입자의 최장 평균 치수는 1  $\mu\text{m}$  이하이다. 일부 실시양태에서, 입자는 나노입자이다. 일부 실시양태에서, 입자의 최장 평균 치수는 900 (예를 들어, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 또는 150) nm 이하이다. 일부 실시양태에서, 입자는 개체(예를 들어, 인간 개체)의 혈액 또는 혈관계(예를 들어, 동맥, 정맥 및 모세혈관)에서 순환하기 위한 모양과 크기이다. 예시적인 입자 디자인은 도 1 내지 3에 개시된다.
- [0039] 일부 실시양태에서, 다수의 입자는 다면체, 예를 들어, 정육면체이다. 일부 실시양태에서, 다수의 입자는 구형이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 입자는 다공성일 수 있다. 그러한 다공성 입자는 입자의 기공의 외부 표면과 내면 표면을 포함한다. 제체는 예를 들어, 내면 표면 상에 고정된다. 일부 실시양태에서, 다수의 기공은 적어도 50 nm의 단면적 치수를 갖는다. 일부 실시양태에서, 다수의 기공은 적어도 100 nm의 단면적 치수를 갖는다. 다공성 나노입자는 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제20140199352호, 제20080277346호, 및 제20040105821호에 개시되었으며, 각각의 내용은 그 전체가 참고로 본 발명에 통합된다. 구형 입자는 예를 들어, 미국 특허 제8,778,830호 및 제8,586,096호에 개시되며, 각각은 참고로 본 발명에 통합된다.
- [0040] 일부 실시양태에서, 구형 입자는 추가로 입자의 구형 표면으로부터 연장되는 2개의 교차 융기부(intersecting ridges)를 포함할 수 있으며, 이때 각 구조의 최장 치수는 1  $\mu\text{m}$  이하이며, 융기부는 (i) 구형 입자의 표면에 고정된 제체가 세포 표면 수용체 단백질에 결합하거나 이를 활성화하는 것을 억제하거나 및/또는 (ii) 가용성 생물분자가 제체에 결합될 때, 가용성 생물분자와 가용성 생물분자가 제1 구성원인 특이적 결합 쌍의 제2 구성원의 상호작용을 억제하기 위한 크기와 배향을 갖는다.
- [0041] 일부 실시양태에서, 다수의 입자는 환상형이다. 그러한 실시양태에서, 제체는 입자의 내면 원주 표면 상에 고정될 수 있다(예를 들어, 구멍 주위 - 도 2 참조). 일부 실시양태에서, 입자의 직경은 600(예를 들어, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 200, 또는 150) nm 이하이다.
- [0042] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 입자는 수지상이다. 그러한 입자는 예를 들어, Du et al. (2015) *Small* 11(4):392-413; 미국 특허 제5,814,272호 및 제7,932,311호; 및 미국 특허 출원 공개 제20040166166호에 개시되며, 각각의 내용은 참고로 본 발명에 통합된다. 하기에 상술하는 바처럼, 일부 실시양태에서 수지상 입자의 기하학적 구조는 입자의 내면 표면에 고정된 제체가 세포 표면상의 생물분자와 상호작용하는 능력이 감소되거나 실질적으로 감소되고 및/또는 제체에 의해 입자에 결합된 가용성 생물분자가 그의 짝 리간드(특이적 결합 쌍의 제2 구성원)와 상호작용하는 능력이 감소되거나 실질적으로 감소되도록 하는 것이다.
- [0043] 일부 실시양태에서, 다수의 입자는 규칙적이든 불규칙적이든, 다면체, 예를 들어, 8면체 또는 20면체이다(예를 들어, 도 3 참조). 입자는 그들의 꼭짓점 중 적어도 하나로부터의 적어도 하나의 돌출부를 포함할 수 있다(예를 들어, 도 3 참조). 입자는 그들의 꼭짓점으로부터의 돌출부를 2 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 이상) 포함할 수 있다. 그러한 돌출부는 예를 들어, (i) 구형 입자의 표면에 고정된 제체가 세포 표면 수용체 단백질에 결합하거나 이를 활성화하는 것을 억제하고/하거나 (ii) 가용성 생물분자가 제체에 결합될 때, 가용성 생물분자와 가용성 생물분자가 제1 구성원인 특이적 결합 쌍의 제2 구성원의 상호작용을 억제하기 위한 크기를 갖고/갖거나 배향될 수 있다.
- [0044] III. 기공을 포함하는 입자
- [0045] 일부 실시양태에서, 입자를 만들기 위해 사용되는 물질(예를 들어, 규소)은 약 40% 내지 약 95%, 예를 들어, 약 60% 내지 약 80%의 다공성을 가질 수 있다. 본원에서 사용된 다공성은 물질 내의 빈 공간의 척도이며, 물질의 전체 부피에 대한 빈 공간의 부피의 비율이다. 특정 실시양태에서, 담체 물질은 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 심지어 적어도 약 90%의 다공성을 갖는다. 구체적 실시양태에서, 다공성은 약 40% 초과, 예를 들어, 약 50% 초과, 약 60% 초과 또는 심지어 약 70% 초과이다.
- [0046] 특정 실시양태에서, 제체는 물질의 표면으로부터 적어도 약 0.005 미크론, 적어도 0.05 미크론, 적어도 약 0.1 미크론, 적어도 약 0.2 미크론, 적어도 약 0.3 미크론, 적어도 약 0.4 미크론, 적어도 약 0.5 미크론, 적어도 약 0.6 미크론, 또는 적어도 약 0.7 미크론의 기공 깊이까지 분포된다. 특정 실시양태에서, 제체는 담체 물질의



기공 내에 실질적으로 균일하게 분포된다.

- [0047] 제제는 입자의 총 폭에 대한 비율로 측정되는 깊이까지 입자 내에 로딩될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제는 입자 내로 적어도 약 10%의 깊이까지, 입자 내로 적어도 약 20%까지, 입자 내로 적어도 약 30%까지, 입자 내로 적어도 약 40%까지, 입자 내로 적어도 약 50%까지 또는 입자 내로 적어도 약 60%까지 분포된다.
- [0048] 기공 크기는 생물분자의 방출을 제어하기 위하여 제제 및 표적 생물분자의 치수 특징에 대하여 사전선택될 수 있다. 전형적으로, 너무 작은 기공 크기는 제제의 로딩 및/또는 생물분자의 결합을 배제한다. 예를 들어, 물질을 위한 평균 기공 직경은 예를 들어, 200,000-500,000 amu의 고분자량 분자에 대해 예를 들어, 15 nm 내지 40 nm의 큰 기공 및, 예를 들어, 10,000-50,000 amu의 저분자량 분자에 대해 예를 들어, 2 nm 내지 10 nm의 작은 기공으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 직경이 약 6 nm인 평균 기공 크기는 약 14,700 amu와 같은 약 14,000 내지 15,000 amu의 분자량의 분자를 위해 적합할 수 있다. 직경이 약 10 nm인 평균 기공 크기는 약 48,000 amu와 같은 약 45,000 내지 50,000 amu의 분자량의 분자를 위해 선택될 수 있다. 직경이 약 25-30 nm인 평균 기공 크기는 약 150,000 amu의 분자량의 분자를 위해 선택될 수 있다.
- [0049] 기공 크기는 제제 또는 생물분자의 분자 반경에 맞추기 위해 사전선택될 수 있다. 예를 들어, 직경이 약 25 nm 내지 약 40 nm인 평균 기공 크기는 최대 분자 반경이 약 6 nm 내지 약 8 nm인 분자를 위해 적합할 수 있다. 분자 반경은 X-선 결정학 데이터에 기초한 분자의 물리적 치수를 이용하거나 분자의 용액 상태 크기를 나타내는 유체역학적 반경을 이용하는 것과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 계산할 수 있다. 용액 상태 계산은 계산이 이루어지는 용액의 특성에 의존하므로, 일부 측정은 X-선 결정학 데이터에 기초한 분자의 물리적 치수를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 본원에서 사용된 최대 분자 반경은 치료제의 최대 치수의 절반을 반영한다.
- [0050] 특정 실시양태에서, 평균 기공 직경은 기공 내의, 분자, 예를 들어, 단백질의 응집을 제한하도록 선택된다. 단백질과 같은 생물분자가 담체 물질내에서 응집하는 것을 방지하는 것이 유익할 것이며, 그 이유는 응집은 생물계 내로의 분자의 제어된 방출을 방해하는 것으로 생각되기 때문이다. 따라서, 그 크기와 생물분자의 크기 사이의 관계로 인해 예를 들어, 단지 하나의 생물분자만이 한번에 기공 내로 들어가도록 하는 기공은 다수의 생물분자가 함께 기공에 들어가서 기공 내에서 응집하게 하는 기공보다 바람직할 것이다. 특정 실시양태에서, 다수의 생물분자가 기공 내로 로딩될 수 있으나, 기공의 깊이로 인해 기공의 이 깊이 전체에 걸쳐 분포된 단백질은 덜 응집할 것이다.
- [0051] IV. 제제
- [0052] 일부 실시양태에서, 입자의 기하형태는 고정된 제제가 세포 표면상의 생물분자와 상호작용하는 능력이 감소되거나 실질적으로 감소되도록 하는 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 입자의 표면 상에 고정된 TNF $\alpha$  또는 IL-2는 자유 TNF $\alpha$  또는 IL-2가 세포 표면 상의 TNF $\alpha$  수용체 또는 IL-2 수용체에 결합하는 능력의 50(예를 들어, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1%) 미만을 갖는다. 일부 실시양태에서, 입자에 결합된 가용성 생물분자는 그의 짝 리간드(특이적 결합 쌍의 제2 구성원)와 상호작용하는 능력이 감소되거나 실질적으로 감소된다. 예를 들어, 본원에 개시된 입자에 결합된 가용성 TNFR은 자유 가용성 TNFR이 자유 TNF $\alpha$ 와 상호작용하는 능력의 50(예를 들어, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1%) 미만을 갖는다. 다른 예에서, 본원에 개시된 입자에 결합된 가용성 비리온은 자유 비리온이 그의 짝 세포 표면 수용체(들)과 상호작용하고 세포를 감염시키는 능력의 50(예를 들어, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1%) 미만을 갖는다. 제제와 세포 표면상의 생물분자의 상호작용 또는 입자에 결합된 생물분자와 그의 짝 리간드 사이의 상호작용을 감소시키거나 실질적으로 감소시킬 수 있는 예시적인 입자 기하형태는 도 1 내지 3에 개시되며 본원에 개시된다.
- [0053] 일부 실시양태에서, 입자의 표면 상에 고정된 제제는 소분자, 환형거대분자 화합물(macrocyclic compound), 폴리펩티드, 펩티드모방체 화합물, 앵타머, 핵산 또는 핵산 유사체이다. 본원에서 사용된 "소분자"는 분자량이 약 6 kDa 미만이고 가장 바람직하게는 약 2.5 kDa 미만인 제제를 말한다. 많은 제약 회사는 소분자, 종종 본 출원의 임의의 분석으로 스크리닝될 수 있는 진균, 세균 또는 조류 추출물의 에레이를 포함하는 화학적 및/또는 생물학적 혼합물의 방대한 라이브러리를 갖는다. 본 출원은 다른 것들 중에서도, 소 화합물 라이브러리, 펩티드 라이브러리 또는 천연 생성물의 집합의 이용을 고려한다. 탄 등(Tan et al.)은 소형화된 세포-기반 분석과 양립성인 2백만이 넘는 합성 화합물을 가진 라이브러리를 개시하였다(J Am Chem Soc (1998) 120:8565-8566).
- [0054] 펩티드모방체는 대상 폴리펩티드의 적어도 일부가 변형된 화합물일 수 있으며, 펩티드모방체의 삼차 구조는 대상 폴리펩티드의 삼차 구조와 실질적으로 동일하게 유지된다. 펩티드모방체는 그 자체가 대상 폴리펩티드 서열

내에 하나 이상의 치환 또는 다른 변형을 함유한 폴리펩티드인, 본원의 대상 폴리펩티드의 유사체일 수 있다. 대안적으로, 대상 폴리펩티드 서열의 적어도 일부는 대상 폴리펩티드의 삼차 구조가 실질적으로 유지되도록 비펩티드 구조로 교체될 수 있다. 다시 말하면, 대상 폴리펩티드 서열 내의 하나, 둘 또는 세 아미노산 잔기가 비펩티드 구조에 의해 교체될 수 있다. 또한, 대상 폴리펩티드의 다른 펩티드 부분이 비펩티드 구조로 교체될 수 있으나, 그럴 필요는 없다. 펩티드모방체(펩티드 및 비펩티드 유사체 둘 모두)는 개선된 특성(예를 들어, 단백질 분해 감소, 체류 증가 또는 생체이용률 증가)을 가질 수 있다. 펩티드모방체는 일반적으로 개선된 경구 이용 가능성을 가지며, 이는 그들을 인간 또는 동물의 치료에 특히 적합하도록 한다. 펩티드모방체는 유사한 이차 화학 구조를 갖거나 갖지 않을 수 있으나, 공통된 삼차 구조 특징 및 기하형태를 공유함을 유의해야 한다. 각각의 펩티드모방체는 추가로 하나 이상의 독특한 추가의 결합 요소를 가질 수 있다.

[0055] 앵타머는 세포 표면 단백질을 비롯한 거의 모든 분자를 인식하고 특이적으로 결합하기 위해 사용될 수 있는 짧은 올리고뉴클레오티드 서열이다. 지수적 농축에 의한 리간드의 체계적 진화(SELEX) 과정은 강력하며 그러한 앵타머를 동정(同定)하기 위하여 쉽게 사용될 수 있다. 앵타머는 치료 및 진단을 위해 중요한 광범위한 단백질, 예를 들어, 성장 인자 및 세포 표면 항원을 위해 제조될 수 있다. 이들 올리고뉴클레오티드는 항체와 유사한 친화성과 특이성으로 그들의 표적에 결합한다(예를 들어, Uirich (2006) *Handb Exp Pharmacol* 173:305-326 참고).

[0056] 상기에 기재한 대로, 용어 "항체"는 IgM, IgG, IgA, IgD 및 IgE 항체와 같은 상이한 동종(isotype)의 항체를 비롯한 전체 항체를 말한다. 용어 "항체"는 다클론 항체, 단클론 항체, 키메라화된 또는 키메라 항체, 인간화 항체, 영장류화된 항체(primatized antibody), 탈면역된 항체(deimmunized antibody) 및 완전 인간 항체를 포함한다. 항체는 임의의 다양한 종, 예를 들어, 인간, 비인간 영장류(예를 들어, 오랑우탄, 개코원숭이 또는 침팬지), 말, 소, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 게르빌루스쥐, 햄스터, 래트 및 마우스와 같은 포유류에서 만들어지거나 이로부터 유도될 수 있다. 항체는 정제 또는 재조합 항체일 수 있다.

[0057] 용어 "항체 단편", "생물분자-결합 단편" 또는 유사 용어는 표적 항원에 결합하는 능력을 보유한 항체 단편을 말한다. 그러한 단편은 예를 들어, 단일쇄 항체, 단일쇄 Fv 단편(scFv), Fd 단편, Fab 단편, Fab' 단편 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 포함한다. scFv 단편은 scFv가 유래되는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 모두를 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄이다. 또한, 인트라바디(intrabodies), 미니바디(minibodies), 트리아바디(triabodies) 및 디아바디(diabodies) 또한 항체의 정의에 포함되며 본원에 개시된 방법에서 사용하기에 적합하다(예를 들어, Todorovska et al. (2001) *J Immunol Methods* 248(1):47-66; Hudson and Kortt (1999) *J Immunol Methods* 231(1): 177-189; Poljak (1994) *Structure* 2(12): 1121-1123; Rondon and Marasco (1997) *Annual Review of Microbiology* 51:257-283을 참고하며, 각각의 내용은 그 전체가 참고로 본 발명에 통합됨). (DVD-Ig 항체를 비롯한) 이특이적 항체 또한 용어 "항체"에 의해 포함된다. 이특이적 항체는 적어도 두 가지 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 가진 단클론, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체이다.

[0058] 본원에서 사용된 "항체"는 또한 예를 들어, 낙타과 유래 단일 도메인 항체(camelized single domain antibodies)와 같은 단일 도메인 항체를 포함한다. 예를 들어, Muyldermans et al. (2001) *Trends Biochem Sci* 26:230-235; Nuttall et al. (2000) *Curr Pharm Biotech* 1:253-263; Reichmann et al. (1999) *J Immunol Meth* 231:25-38; PCT 출원 공개 WO 94/04678호 및 WO 94/25591호; 및 미국 특허 제6,005,079호, 제6,015,695호 및 제7,794,981호를 참고하며, 이들 모두는 그 전체가 참고로 본 발명에 통합된다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 단일 도메인 항체가 형성되도록 변형을 가진 두 VH 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체를 제공한다.

[0059] 일부 실시양태에서, 제제는 비-항체, 스캐폴드 단백질이다. 이들 단백질은 일반적으로 기존의 리간드- 또는 항원-결합 단백질의 조합 화학-기반 적응을 통해 획득된다. 예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체를 위한 인간 트랜스페린의 결합 부위는 그 중 일부가 상이한 항원에 대한 친화성을 획득한 트랜스페린 변이체의 다양한 라이브러리를 생성하도록, 조합 화학을 이용하여 변형될 수 있다(Ali et al. (1999) *J Biol Chem* 274, 24066-24073 참고). 수용체 결합에 관여하지 않는 인간 트랜스페린의 부분은 변하지 않으며 항체의 골격 영역처럼, 가변 결합 부위를 제시하기 위한 스캐폴드로서 작용한다. 이어서 라이브러리는 항체 라이브러리처럼, 표적 항원에 대해 최적의 선택성과 친화성을 가진 변이체를 동정하기 위하여 관심 표적 항원에 대하여 스크리닝된다. 기능에 있어서 항체와 유사한 한편, 비-항체 스캐폴드 단백질은 항체에 비교할 때 많은 이점을 갖는 것을 장점으로 하며, 이러한 이점에는 다른 것들 중에서도 가용성 향상 및 조직 침투력 향상, 제조 비용 감소, 및 다른 관심 분자에의 접합 용이성이 포함된다(Hey et al. (2005) *TRENDS Biotechnol* 23(10) :514-522 참고).

[0060] 당업자는 비-항체 스캐폴드 단백질의 스캐폴드 부분이 예를 들어, 에스. 아우레우스(*S. aureus*) 단백질 A의 Z

도메인, 인간 트랜스페린, 인간 10번째 피브로넥틴 타입 III 도메인, 인간 트립신 억제제의 쿠니츠 도메인 (kunitz domain), 인간 CTLA-4, 안키린 반복 단백질, 인간 리포칼린, 인간 크리스탈린, 인간 유비퀴틴 또는 *이. 에라테리움(E. elaterium)*으로부터의 트립신 억제제의 모두 또는 일부를 포함할 수 있다는 점을 인식할 것이다 (Hey et al. (2005) *TRENDS Biotechnol* 23(10):514-522 참고).

[0061] 일부 실시양태에서, 제제는 표적 생물분자의 천연 리간드이다. 예를 들어, 제제는 사이토카인일 수 있다. 본원에서 사용된 "사이토카인"은 세포의 기능에 영향을 주며 면역, 염증 또는 조혈 반응에서 세포 사이의 상호작용을 조절하는 분자인 임의의 분비된 폴리펩티드를 말한다. 사이토카인은 그들을 생산하는 세포에 관계없이, 모노카인 및 림포카인을 포함하며 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 모노카인은 일반적으로 대식세포 및/또는 단핵구와 같은 단핵 세포에 의해 생산되고 분비되는 것을 말한다. 그러나, 천연 킬러 세포, 섬유아세포, 호염기구, 호중구, 내피 세포, 뇌 별아교세포, 골수 기질세포, 상피 각질세포 및 B-림프구와 같은 많은 다른 세포 또한 모노카인을 생산한다. 림포카인은 일반적으로 림프구 세포에 의해 생산되는 것으로 알려져 있다. 사이토카인의 예는 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-8(IL-8), 중앙 괴사 인자-알파(TNF- $\alpha$ ) 및 중앙 괴사 인자 베타(TNF- $\beta$ )를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0062] 일부 실시양태에서, 제제는 중앙 괴사 인자(TNF) 패밀리를 리간드이며, 예를 들어, TNF 패밀리를 리간드는 TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ , Fas 리간드, 림프독소, 림프독소 알파, 림프독소 베타, 4-1BB 리간드, CD30 리간드, EDA-A1, LIGHT, TLA1, TWEAK, TNF  $\beta$  및 TRAIL로부터 선택된다.

[0063] 일부 실시양태에서, 제제는 표적 생물분자를 위한 천연 리간드의 변이체, 예를 들어, 변이체 IL-2 또는 변이체 TNF  $\alpha$ 와 같은 변이체 인터루킨 폴리펩티드이다. 본 발명의 일부 실시양태에 따라, 변이체는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 함유할 수 있다. 치환은 보존적이거나 비보존적일 수 있다. 본원에서 사용된 "보존적 치환"은 주어진 폴리펩티드의 천연 서열에 존재하는 아미노산이 유사한 입체 특성을 가진 천연 또는 비천연 발생 아미노산으로 교체되는 것을 말한다. 교체되는 천연 아미노산의 측쇄가 극성 또는 소수성인 경우, 보존적 치환은 역시 극성 또는 소수성이며 선택적으로 교체된 아미노산의 측쇄와 동일하거나 유사한 입체 특성을 가진 천연 발생 아미노산 또는 비천연 발생 아미노산으로 이루어진다. 보존적 치환은 전형적으로 하기 그룹 내의 치환을 포함한다: 글리신과 알라닌; 발린, 이소류이신 및 류이신; 아스파르트산 및 글루탐산; 아스파라긴, 글루타민, 세린, 및 트레오닌; 리신, 히스티딘 및 아르기닌; 및 페닐알라닌 및 티로신. 1문자 아미노산 약자는 다음과 같다: 알라닌(A); 아르기닌(R); 아스파라긴(N); 아스파르트산(D); 시스테인(C); 글리신(G); 글루타민(Q); 글루탐산(E); 히스티딘(H); 이소류이신(I); 류이신(L); 리신(K); 메티오닌(M); 페닐알라닌(F); 프롤린(P); 세린(S); 트레오닌(T); 트립토판(W), 티로신(Y); 및 발린(V). 변이체는 또한 전질이 야생형 천연 리간드의 단편 및 단편이 유래되는 야생형 전질이 천연 리간드에 비하여 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하는 단편을 포함한다.

[0064] 본원에서 사용된 어구 "비보존적 치환"은 모 서열에 존재하는 아미노산이 상이한 전기화학적 및/또는 입체 특성을 가진 다른 천연 또는 비천연 발생 아미노산에 의해 교체되는 것을 말한다. 따라서, 치환 아미노산의 측쇄는 치환되는 천연 아미노산의 측쇄보다 상당히 더 클(작을) 수 있고/있거나 치환되는 아미노산과 상당히 상이한 전자 특성을 가진 기능기를 가질 수 있다.

[0065] 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 그것이 유래된 야생형 전질이 폴리펩티드에 비하여, 적어도 2(예를 들어, 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 100 초과) 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 그것이 유래된 야생형 전질이 폴리펩티드에 비하여, 150 이하(예를 들어, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2 이하) 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드(예를 들어, 변이체 IL-2 또는 TNF  $\alpha$  폴리펩티드)는 그것이 유래된 야생형 전질이 폴리펩티드가 표적 생물분자(예를 들어, 야생형 전질이 폴리펩티드가 구성원인 특이적 결합 쌍의 구성원)에 결합하는 능력의 적어도 10(예를 들어, 적어도 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100)%를 보유한다. 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 그것이 유래된 야생형 전질이 폴리펩티드보다 표적 생물분자에 대해 더 큰 친화성을 가질 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 변이체 폴리펩티드가 유래된 야생형 전질이 폴리펩티드보다 표적 생물분자에 대해 2(3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 또는 심지어 1000)배 더 큰 친화성을 갖는다. 두 단백질 사이의 상호작용을 검

출하거나 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며 상기에 개시되어 있다.

[0067] 일부 실시양태에서, 야생형 전질이 천연 리간드는 세포 표면 수용체의 활성을 조절한다. 따라서, 천연 리간드의 변이체는 야생형 천연 리간드의 활성에 비하여, 수용체의 활성을 조절하는 능력이 향상되거나 감소될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 변이체가 유래된 전질이 야생형 폴리펩티드가 세포 표면 수용체 단백질을 활성화시키는 능력의 90(예를 들어, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5 미만) % 미만을 갖는다. 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 그것이 결합하는 수용체를 활성화시키지 않는다.

[0068] 그러한 예시적인 변이체 폴리펩티드는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 WO 2012/085891호는 삼량체화하는 능력이 감소되어 TNF 패밀리 수용체를 활성화하는 능력이 감소된 TNF 패밀리 리간드 변이체를 개시한다(또한 미국 특허 출원 공개 제2014/0096274호를 참고하며 참고로 본 발명에 포함됨). 그러나 변이체 TNF 리간드는 TNF 패밀리 수용체에 결합하는 능력을 보유한다. 변이체와 야생형 천연 리간드 사이의 활성 비교를 위해 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 가용성 생물분자는 세포 표면 수용체에 대한 리간드, 예를 들어, 당업계에 알려지거나 본원에 개시된 것들 중 임의의 것과 같은, 사이토카인 또는 케모카인이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 종양 괴사 인자(TNF) 패밀리 리간드 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, TNF 패밀리 리간드는 TNF α 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, TNF 패밀리 리간드는 Fas 리간드, 림프독소, 림프독소 알파, 림프독소 베타, 4-1BB 리간드, CD30 리간드, EDA-A1, LIGHT, TLA1, TWEAK, TNF β, TRAIL 또는 전술한 임의의 것의 변이체이다.

[0070] 일부 실시양태에서, 가용성 생물분자는 표 2에 동정된 것이다.

**표 2**

예시적 가용성 생물분자 및/또는 제제

[0071]

특이적 결합쌍의 제1 구성원(가용성 생물분자 또는 제제)	유전자 약자	분자 부류	관련 질병 상태	특이적 결합 쌍의 제2 구성원
종양 괴사 인자 알파	TNF	사이토카인	AD	sTNF-R
가용성 인터루킨-2 수용체	IL2RA	디코이(Decoy)	암	sIL-2R
가용성 종양 괴사 인자 수용체-1	TNFRSF1A	디코이	암	rTNF
가용성 종양 괴사 인자 수용체-2	TNFRSF1B	디코이	암	rTNF
인터루킨-2	IL2	사이토카인	AD	sIL-2R
인터루킨-6	IL6	사이토카인	AD	sIL-6R
인터루킨-8	CXCL8	사이토카인	AD	sIL-8R
인터루킨-1A	IL1A	사이토카인	AD	sIL-1RA
인터루킨-1B	IL1B	사이토카인	염증	
C-X-C 모티프 케모카인 10	CXCL10	케모카인	면역 활성화	CXCR3
디코이 수용체-3	FAS	디코이	암	FAS-L
가용성 사멸 수용체-4	TNFRSF10A	디코이	암	TRAIL-R1
가용성 사멸 수용체-5	TNFRSF10B	디코이	암	TRAIL-R2
Fas 리간드	FASLG	사이토카인	AD	sDcR3
TNF-관련 세포사멸 유도 리간드	TNFSF10	사이토카인	AD	sDR4/5
케모카인(C-X-C 모티프) 리간드 1(흑색종 성장 자극 활성, 알파)	CXCL1	케모카인	암	
세포사멸의 TNF-관련 약한 유도자	TNFSF12	사이토카인	TBD	sDR3



매트릭스 메탈로펩티다제 1(사이질 콜라게나제)	MMP1	프로테아제	암	
매트릭스 메탈로펩티다제 2(젤라티나제 A, 72kDa 젤라티나제, 72kDa 타입 IV 콜라게나제)	MMP2	프로테아제	OA/암	
매트릭스 메탈로펩티다제 3(스트로메리신 1, 프로젤라티나제)	MMP3	프로테아제	암	
매트릭스 메탈로펩티다제 9(젤라티나제 B, 92kDa 젤라티나제, 92kDa 타입 IV 콜라게나제)	MMP9	프로테아제	OA/암	
매트릭스 메탈로펩티다제 10(스트로메리신 2)	MMP10	프로테아제	암	
매트릭스 메탈로펩티다제 12(대식세포 엘라스타제)	MMP12	프로테아제	암	
인돌아민 2,3-다이옥시게나제	IDO1	효소	암	
인터루킨-5	IL5	사이토카인	AD	<u>메포리주말</u>
가용성 인터루킨-5 수용체	IL5RA	디코이	암	IL-5
가용성 인터루킨-6 수용체	IL6R	디코이	암	IL-6
가용성 인터루킨-8 수용체	CXCR1	디코이	암	IL-8
가용성 인터루킨-1A 수용체	IL1R1	디코이	암	IL-1A
C-반응성 단백질	CRP	단백질	염증 마커	
가용성 사멸 수용체-3	TNFRSF25	디코이		TWEAK

[0072] "AD"는 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환을 말한다. "OA"는 골관절염을 말한다.

[0073] 일부 실시양태에서, 각 입자는 다수의 제제를 포함한다. 다수의 제제는 약 10<sup>3</sup> 내지 약 10<sup>7</sup> 제제의 복제 또는 약 10<sup>4</sup> 내지 약 10<sup>6</sup> 제제의 복제와 같은, 10 내지 약 10<sup>9</sup> 제제의 복제를 포함할 수 있다.

[0074] V. 항체 생산 방법

[0075] 상기에서 개시한 바처럼, 일부 실시양태에서, 입자 또는 입자들의 표면 상에 고정된 제제는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 항체는 당업계에 공지된 방법에 의해 유도될 수 있다. 예를 들어, 마우스, 햄스터 또는 토끼와 같은 포유류는 가용성 생물분자(예를 들어, 가용성 TNFR, 독소 또는 바이러스 단백질)의 면역원성 형태로 면역될 수 있다. 대안적으로, 면역화는 관찰된 면역원 반응을 야기하는 생물분자(예를 들어, 가용성 단백질을)를 생체내 발현하는 핵산을 이용함으로써 일어날 수 있다. 단백질 또는 펩티드에 면역원성을 부여하는 기술은 당업계의 접합 또는 당업계에 잘 알려진 다른 기술을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 펩티드 부분은 아쥬반트의 존재하에서 투여될 수 있다. 면역화의 진행은 혈장 또는 혈청 내의 항체 역가를 검출하여 모니터링할 수 있다. 표준 ELISA 또는 다른 면역분석이 항체 수준을 평가하기 위하여 항원으로서 면역원을 이용하여 사용될 수 있다.

[0076] 면역화 후, 본 발명의 폴리펩티드와 반응성인 항혈청이 수득될 수 있으며, 소망하는 경우, 혈청으로부터 다클론 항체가 분리될 수 있다. 단클론 항체를 생산하기 위하여, 항체 생산 세포(립프구)가 면역된 동물로부터 수집되고 골수종 세포와 같은 불멸화 세포와의 표준 체세포 융합 절차에 의해 융합되어 하이브리도마 세포를 생성할 수 있다. 그러한 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 하이브리도마 기술(Kohler 및 Milstein에 의해 원천 개발됨, (1975) Nature, 256: 495-497), 예를 들어, 인간 B 세포 하이브리도마 기술(Kozbar et al.,



(1983) Immunology Today, 4: 72) 및 인간 단클론 항체를 생산하기 위한 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)을 포함한다. 하이브리도마 세포는 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 반응성인 항체의 생산에 대해 면역화학적으로 스크린될 수 있으며 단클론 항체가 분리될 수 있다.

[0077] VI. 입자 클리어런스(clearance)

[0078] 일부 실시양태에서, 입자는 클리어런스 제제(clearance agent)를 포함한다. 클리어런스 제제는 소변으로 배출, 분해, 간담즙 경로에 의한 배출 및/또는 식세포작용에 의해서와 같은 생물학적 경로를 통한 입자의 클리어런스를 촉진할 수 있다.

[0079] 예를 들어, 입자는 저장소를 포함할 수 있으며, 저장소는 클리어런스 제제를 포함한다. 저장소는 입자 몸체 내의 구멍 또는 공극, 예를 들어, 다공성 규소 입자의 몸체 내의 공극일 수 있다.

[0080] 기공을 포함하는 입자의 경우, 저장소는 기공일 수 있거나 저장소는 평균 기공 크기보다 크거나 작을 수 있다. 저장소는 입자의 몸체 내의 리세스(recess)(예를 들어, 얇은 리세스)로 이루어질 수 있으며, 이때 리세스의 폭 또는 직경은 평균 기공 크기의 폭 또는 직경보다 크다. 저장소의 폭 또는 직경은 평균 기공 크기의 폭 또는 직경의 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 또는 심지어 약 500배 크기일 수 있다. 저장소의 폭 또는 직경은 평균 기공 크기의 폭 또는 직경의 약 2배 내지 약 8배 또는 약 2배 내지 약 6배와 같은, 평균 기공 크기의 폭 또는 직경의 약 2배 내지 약 10배일 수 있다. 저장소의 폭 또는 직경은 평균 기공 크기의 폭 또는 직경의 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 또는 심지어 약 500배 크기일 수 있다.

[0081] 저장소는 개구를 포함할 수 있다. 개구는 캡 또는 부재에 의해 덮여서 클리어런스 제제와 세포 및/또는 세포의 단백질(예를 들어, 항체) 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 캡 또는 부재는 생분해성 중합체와 같은 중합체를 포함할 수 있다. 캡 또는 부재는 소정의 기간 후에 (예를 들어, 가수분해에 의해) 분해되어, 클리어런스 제제를 세포 및/또는 세포의 단백질에 노출시킬 수 있다. 캡 또는 부재는 약 1일 내지 약 5년, 예를 들어, 약 1일 내지 약 3년 또는 약 1일 내지 약 1년 동안 생물학적 유체(예를 들어, 혈장 또는 세포의 유체)에 노출된 후 분해될 수 있다.

[0082] 소정의 기간은 입자가 액체(예를 들어, 수성 액체)내에 있는 기간일 수 있다. 소정의 기간은 입자의 생체내 체류 기간일 수 있다(예를 들어, 생물학적 유체, pH, 효소 및/또는 온도에의 노출). 소정의 기간은 생물분자에 대한 입자의 결합에 의해 적어도 부분적으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 입자는 생물분자의 결합이 클리어런스 제제를 세포 및/또는 세포의 단백질에 노출시키도록 하는 형태를 가질 수 있다(예를 들어, 참고로 본 발명에 통합되는 PCT 특허 출원 공개 W02014/170899호 참고). 소정의 기간은 약 1일 내지 약 5년, 예를 들어, 약 1일 내지 약 3년 또는 약 1일 내지 약 1년일 수 있다.

[0083] 캡 또는 막으로 사용하기에 적합한 예시적인 물질은 참고로 본 발명에 통합되는 미국 특허 제7,918,842호에 개시된다. 일반적으로, 이들 물질은 효소적 가수분해 또는 생체내 또는 시험관내(in vitro)에서 물에 대한 노출에 의해 또는 표면 또는 대량 부식에 의해 분해되거나 용해된다. 대표적인 합성 생분해 중합체는 폴리(아미노산) 및 폴리(펩티드)와 같은 폴리(아미드); 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 폴리(락틱-코-글리콜산) 및 폴리(카프로락톤)과 같은 폴리(에스테르); 폴리(안하이드라이드); 폴리(오르토에스테르); 폴리(카보네이트); 및 그의 화학적 유도체(치환, 화학기의 부가, 예를 들어, 알킬, 알킬렌, 하이드록실화, 산화 및 당업자에 의해 일상적으로 이루어지는 다른 변형), 그의 공중합체 및 혼합물을 포함한다. 캡 또는 막에 사용될 수 있는 다른 중합체는 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(에틸렌 글리콜) 및 폴리(테트라메틸렌 옥사이드)와 같은 폴리(에테르); 비닐 중합체 - 폴리(아크릴레이트) 및 폴리(메타크릴레이트), 예를 들어, 메틸, 에틸, 다른 알킬, 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 아크릴 및 메타크릴 산, 및 기타, 예를 들어, 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐 피롤리돈) 및 폴리(비닐 아세테이트); 폴리(우레탄); 셀룰로오스 및 그 유도체, 예를 들어, 알킬, 하이드록시알킬, 에테르, 에스테르, 니트로셀룰로오스 및 다양한 셀룰로오스 아세테이트; 폴리(실록산); 및 그의 임의의 화학 유도체(치환, 화학기의 부가, 예를 들어, 알킬, 알킬렌, 하이드록실화, 산화 및 당업자에 의해 일상적으로 이루어지는 다른 변형), 그의 공중합체 및 혼합물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 저장소 캡은 가교된 폴리비닐 알코올과 같은 하나 이상의 가교된 중합체로부터 형성된다.

- [0084] 일부 실시양태에서, 입자는 코팅을 포함한다. 일부 실시양태에서, 코팅은 클리어런스 제제를 포함한다. 코팅은 클리어런스 제제를 가릴 수 있다.
- [0085] 입자는 제1 표면과 제2 표면을 포함할 수 있으며; 제제는 제1 표면 상에 고정될 수 있으며; 코팅은 제2 표면의 적어도 일부를 덮을 수 있다. 제1 표면은 내부 표면 또는 내면 표면일 수 있으며, 예를 들어, 제1 표면은 제제가 세포 표면 상의 분자에 결합하는 능력이 감소되도록 배향될 수 있다. 내부 표면 또는 내면 표면의 예는 기공, 저장소 또는 튜브의 내면벽, 환상형의 내면 원주 표면, 또는 오목한 표면의 중공을 포함한다. 내부 표면 또는 내면 표면의 다른 예는 입자의 외부 표면을 포함하며, 이때 외부 표면은 하나 이상의 돌출부에 의해 세포와의 상호작용으로부터 보호된다. 제2 표면은 외부 표면일 수 있으며, 예를 들어, 제2 표면은 코팅이 세포와 상호작용할 수 있도록 배향될 수 있다.
- [0086] 코팅은 입자 사이의 상호작용을 억제할 수 있으며, 예를 들어, 코팅은 응집물을 형성하는 입자의 성향을 감소시킬 수 있다. 코팅은 예를 들어, 생물학적으로 불활성인 표면을 제시함으로써, 입자와 세포 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 코팅은 세포와 분자와의 비특이적 상호작용, 예를 들어, 생물분자의 비특이적 흡착을 억제할 수 있다. 코팅은 세포 또는 세포의 분자와의 특이적 상호작용을 억제할 수 있으며, 예를 들어, 코팅은 입자의 배출 또는 식세포작용을 불리하게 하거나 지연시킬 수 있다. 코팅은 배출 또는 식세포작용을 위해 입자를 표적화할 수 있다. 코팅 또는 배출 또는 식세포작용을 위해 입자를 표적화하는 다른 특징(예를 들어, "배출-유도 화합물")은 예를 들어, 소정의 기간 동안 혈류내에서 입자의 유지를 촉진하기 위하여, 입자의 배출 또는 식세포작용을 지연시키는 코팅(예를 들어, 제2 코팅)에 의해 가려질 수 있다.
- [0087] 입자는 제2 코팅을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 제2 코팅은 제2의 다수의 코팅 분자로 이루어진다. 입자는 제2의 다수의 코팅 분자를 포함할 수 있다. 제2 코팅 및/또는 제2의 다수의 코팅 분자는 예를 들어, 코팅 및/또는 다수의 코팅 분자를 가림으로써, 생체내 입자의 클리어런스를 감소시킬 수 있다. 제2 코팅 및/또는 제2의 다수의 코팅 분자는 예를 들어, 소정의 기간 후에 세포 및/또는 세포의 단백질에 코팅 및/또는 다수의 코팅 분자를 노출시키기 위하여, 생분해성일 수 있다. 제2 코팅 및/또는 제2의 다수의 코팅 분자는 생분해성 중합체를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 제2의 다수의 코팅 분자의 각 분자는 생분해성 중합체를 포함할 수 있다. 제2 코팅 및/또는 제2의 다수의 코팅 분자는 식세포작용을 억제하는 CD47을 포함할 수 있다.
- [0088] 일부 실시양태에서, 입자는 제1 표면(예를 들어, 내부 표면) 및 제2 표면(예를 들어, 외부 표면)을 포함하며; 제제는 제1 표면 상에 고정되고; 코팅은 제2 표면의 적어도 일부를 덮는다. 제1 표면의 배향은 제제가 세포 표면 상의 분자와 상호작용하는 능력을 감소시킬 수 있다. 제2 표면의 배향은 코팅과 세포, 세포의 분자 및/또는 상이한 입자 사이의 상호작용을 허용할 수 있다. 코팅과 세포, 세포의 분자 및/또는 상이한 입자 사이의 "상호작용"은 예를 들어, 세포, 세포의 분자 또는 다른 입자에 대한 입자의 안정한 결합을 불리하게 하기 위하여, 약한, 중성의 또는 불리한 상호작용일 수 있다. 대안적으로, 코팅과 세포 및/또는 세포의 분자 사이의 상호작용은 예를 들어, 식세포작용과 같은 생물학적 경로를 통한 입자의 클리어런스에 유리하도록, 특이적인 또는 설계된 상호작용일 수 있다. 특정 바람직한 실시양태에서, 제2 표면은 실질적으로 제제가 없다. 특정 바람직한 실시양태에서, 제1 표면은 실질적으로 코팅이 없다. 특정 바람직한 실시양태에서, 코팅은 실질적으로 모든 제2 표면을 덮는다.
- [0089] 일부 실시양태에서, 입자는 제1 표면(예를 들어, 내부 표면) 및 제2 표면(예를 들어, 외부 표면)을 포함하며; 제제는 제1 표면 및 제2 표면 상에 고정되고; 코팅은 제2 표면의 적어도 일부를 덮는다. 그러한 실시양태에서, 코팅(및/또는 제2 코팅)은 제제와 세포 표면 상의 분자 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 특정 바람직한 실시양태에서, 코팅은 실질적으로 모든 제2 표면을 덮는다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 입자는 제1 표면(예를 들어, 내부 표면) 및 제2 표면(예를 들어, 외부 표면)을 포함하며; 제제는 제1 표면 상에 고정되고; 코팅은 제1 표면의 적어도 일부 및 제2 표면의 적어도 일부를 덮는다. 그러한 실시양태에서, 코팅은 바람직하게는 제제가 생물분자에 특이적으로 결합하는 능력에 영향을 주지 않는다. 특정 바람직한 실시양태에서, 코팅은 실질적으로 모든 제2 표면을 덮는다.
- [0091] 일부 실시양태에서, 입자는 표면을 포함하고; 제제는 표면 상에 고정되고; 코팅은 표면의 적어도 일부를 덮는다. 그러한 실시양태에서, 코팅은 제제가 생물분자에 특이적으로 결합하는 능력에 영향을 주지 않을 수 있다. 코팅은 제제의 일부가 생물분자에 특이적으로 결합하는 것을 허용하고 제제의 일부와 생물분자 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 코팅은 제제와 세포 표면 상의 분자 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 특정 바람직한 실시양태에서, 코팅은 실질적으로 모든 표면을 덮는다.

- [0092] 코팅은 코팅 분자를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 코팅은 다수의 코팅 분자로 이루어질 수 있거나 코팅은 코팅 분자 집단으로 이루어질 수 있다. 본원에서 사용된 "다수의 코팅 분자" 및 "코팅 분자 집단"은 각각 코팅을 말한다. 그러나, 용어 "코팅"은 하이드로겔과 같은 추가의 조성물을 말할 수 있다. 코팅 분자는 클리어런스 제제일 수 있다(그리고 따라서, 클리어런스 제제는 코팅 분자일 수 있다).
- [0093] 입자는 다수의 코팅 분자를 포함할 수 있다. 입자는 표면과 표면 상에 고정된 다수의 제제를 포함할 수 있으며, 다수의 코팅 분자 중 적어도 한 분자는 표면에 결합될 수 있다. 예를 들어, 다수의 코팅 분자의 모든 또는 실질적으로 모든 분자가 표면에 결합될 수 있다.
- [0094] 입자는 표면과 제2 표면을 포함할 수 있으며, 표면 상에 고정된 다수의 제제 및 다수의 코팅 분자 중 적어도 한 분자는 제2 표면에 결합될 수 있다. 예를 들어, 다수의 코팅 분자 중 모든 또는 실질적으로 모든 분자가 제2 표면에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 다수의 코팅 분자 중 일부 분자는 표면에 결합되며 다수의 코팅 분자 중 일부 분자는 제2 표면에 결합된다.
- [0095] 일부 실시양태에서, 코팅 분자는 *생체내*에서 입자의 클리어런스를 증가시킨다. 예를 들어, 코팅 분자는 병원균-관련 분자 패턴을 포함할 수 있다.
- [0096] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 입자는 배출-유도 화합물을 포함하는 코팅을 가지며, 이는 예를 들어, 신장, 간/장(예를 들어, 담즙을 통해) 또는 식세포작용(예를 들어, 항원-제시 세포에 의해)을 통해, 순환계로부터 입자의 제거를 촉진한다. 다수의 코팅 분자는 다수의 배출-유도 화합물일 수 있다. 예를 들어, 입자가 환상형인 실시양태에서, 내면 원주 표면(예를 들어, 제1 표면)은 고정된 제제를 포함할 수 있으며 외부 표면(예를 들어, 제2 표면)은 예를 들어, 신장, 간 또는 대식세포에 의한 입자의 클리어런스를 유도하는 화합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 배출-유도 화합물은 프로그램된다. 즉, 화합물은 시간(예를 들어, 소정의 기간)에 걸쳐 (예를 들어, 효소 작용, 가수분해 또는 점진적 용해를 통해) 분해되어 배출-유도 화합물 또는 클리어런스 속도를 증가시키는 다른 특징을 노출시키는 코팅으로 덮일 수 있다. 코팅은 약 1일 내지 약 3년 또는 약 1일 내지 약 1년과 같은 약 1일 내지 약 5년동안 생물학적 유체(예를 들어, 혈장 또는 세포외 유체)에 노출된 후 분해될 수 있다. 따라서, 입자의 *생체내* 체류는 변형되고/되거나 제어될 수 있다.
- [0097] 코팅은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 유기 중합체를 포함할 수 있다. 유기 중합체는 입자에 부착될 수 있으며, 예를 들어, 입자의 표면에 부착될 수 있다. 유기 중합체는 PEG, 폴리락테이트, 폴리락트산, 당, 지질, 폴리글루탐산, 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리(락틱-코-글리콜 산)(PLGA), 폴리비닐 아세테이트(PVA) 및 그 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 입자는 PEG에 공유적으로 접합되며, 이는 혈청 단백질의 흡착을 막고 효율적인 소변 배출을 촉진하고 입자의 응집을 감소시킨다(예를 들어, Burns et al. *Nano Letters*, 9(1):442-448 (2009) 및 미국 특허 출원 공개 제2013/0039848호 및 제2014/0248210호를 참고하며 각각은 참고로 본 발명에 통합됨).
- [0098] 하나의 실시양태에서, 코팅은 적어도 하나의 친수성 모이어티(moiety), 예를 들어, 플루로닉(Pluronic)® 타입 중합체(일반식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$ )를 가진 비이온성 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체), 삼블록 공중합체 폴리(에틸렌 글리콜-b-(DL-락트산-코-글리콜 산)-b-에틸렌 글리콜)(PEG-PLGA-PEG), 이블록 공중합체 폴리카프로락톤-PEG(PCL-PEG), 폴리(비닐리덴 플루오라이드)-PEG (PVDF-PEG), 폴리(락트산-코-PEG)(PLA-PEG), 폴리(메틸 메타크릴레이트)-PEG (PMMA-PEG) 및 기타를 포함한다. 그러한 모이어티를 가진 실시양태에서, 친수성 모이어티는 [메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]-트라이메톡시실란(예를 들어,  $\text{CH}_3(\text{OC}_2\text{H}_4)_{6-9}(\text{CH}_2)\text{OSi}(\text{OCH}_3)_3$ ), [메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]-다이메톡시실란(예를 들어,  $\text{CH}_3(\text{OC}_2\text{H}_4)_{6-9}(\text{CH}_2)\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2$ ), 또는 [메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]-모노메톡시실란(예를 들어,  $\text{CH}_3(\text{OC}_2\text{H}_4)_{6-9}(\text{CH}_2)\text{OSi}(\text{OCH}_3)$ )와 같은 PEG 모이어티이다. 적합한 코팅은 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2011/0028662호(참고로 본 발명에 통합됨)에 개시된다.
- [0099] 코팅은 천연 중합체 또는 다중-하이드록실화 중합체, 다당류, 탄수화물, 폴리올, 폴리비닐 알코올, 폴리세린과 같은 폴리아미노산 또는 2-(하이드록시에틸)메타크릴레이트와 같은 다른 중합체 또는 그 조합을 포함하는 하이드록실-함유 중합체와 같은 폴리하이드록실화 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리하이드록실화 중합체는 다당류이다. 다당류는 만난, 풀루란, 말토덱스트린, 전분, 셀룰로오스 및 셀룰로오스 유도체, 검, 잔탄 검, 로쿠스트빈 검, 또는 펙틴, 그 조합을 포함한다(예를 들어, 참고로 본 발명에 통합되는 미국 특허 출원 공개 제2013/0337070호 참고).

- [0100] 일부 실시양태에서, 코팅은 쌍성이온 중합체를 포함한다(예를 들어, 각각이 참고로 본 발명에 통합되는 미국 특허 출원 공개 제2014/0235803호, 제2014/0147387호, 제2013/0196450호 및 제2012/0141797호 및 미국 특허 제 8,574,549호 참고).
- [0101] 다른 적합한 코팅은 폴리-알과 하이드록시 산(폴리락트산 또는 폴리락티드, 폴리글리콜산 또는 폴리글리콜리드 포함), 폴리-베타 하이드록시산(예를 들어, 폴리하이드록시부티레이트 또는 폴리하이드록시발레레이트), 에폭시 중합체(폴리에틸렌 옥사이드(PEO) 포함), 폴리비닐 알코올, 폴리에스테르, 폴리오르토에스테르, 폴리아미도에스테르, 폴리에스테르아미드, 폴리포스포에스테르 및 폴리포스포에스테르-우레탄을 포함한다. 분해성 폴리에스테르의 예는 폴리(락트산) 또는 (폴리락티드, PLA), 폴리(글리콜산) 또는 폴리글리콜리드(PGA), 폴리(3-하이드록시부티레이트), 폴리(4-하이드록시부티레이트), 폴리(3-하이드록시발레레이트), 및 폴리(카프로락톤), 또는 폴리(발레로락톤)을 포함하는 폴리(하이드록시알카노에이트)를 포함한다. 폴리옥사이에스테르의 예는 폴리(에틸렌 옥살레이트) 및 아미도기를 함유한 폴리옥사이에스테르와 같은 폴리(알킬렌 옥살레이트)를 포함한다. 다른 적합한 코팅 물질은 폴리글리콜, 에테르-에스테르 공중합체(코폴리(에테르-에스테르)) 및 폴리카보네이트를 포함하는 폴리에테르를 포함한다. 생분해성 폴리카보네이트의 예는 폴리오르토카보네이트, 폴리이미노카보네이트, 폴리알킬카보네이트, 예를 들어, 폴리(트리메틸렌 카보네이트), 폴리(1,3-다이옥산-2-온), 폴리(p-다이옥산논), 폴리(6,6-다이메틸-1,4-다이옥산-2-온), 폴리(1,4-다이옥세판-2-온), 및 폴리(1,5-다이옥세판-2-온)을 포함한다. 적합한 생분해성 코팅은 또한 폴리안하이드라이드, 폴리이민(예를 들어, 폴리(에틸렌 이민)(PEI)), 폴리아미드(폴리-N-(2-하이드록시프로필)-메타크릴아미드 포함), 폴리(아미노산)(폴리-L-리신과 같은 폴리리신 또는 폴리-L-글루탐산과 같은 폴리글루탐산 포함), 폴리포스포젠(예를 들어, 폴리(페녹시-코-카르복실아토펜옥시포스포젠), 폴리오르가노포스포젠, 폴리시아노아크릴레이트 및 폴리알킬시아노아크릴레이트(폴리부틸시아노아크릴레이트 포함), 폴리이소시아네이트 및 폴리비닐피롤리돈을 포함할 수 있다.
- [0102] 중합체 코팅 분자의 쇠 길이는 약 4 내지 약 25 단위와 같은, 약 1 내지 약 100 단량체 단위일 수 있다.
- [0103] 입자는 피브린, 피브리노젠, 엘라스틴, 카제인, 콜라겐, 키토산, 세포외 매트릭스(ECM), 카라기난, 콘드로이틴, 펙틴, 알지네이트, 알긴산, 알부민, 텍스트린, 텍스트란, 젤라틴, 만니톨, n-할라민, 다당류, 폴리-1,4-글루칸, 전분, 하이드록시에틸 전분(HES), 다이알데히드 전분, 글리코젠, 아밀라제, 하이드록시에틸 아밀라제, 아밀로펙틴, 글루코소-글리칸, 지방산(및 그의 에스테르), 히아루론산, 프로타민, 폴리아스파르산, 폴리글루탐산, D-만누론산, L-글루론산, 제인 및 다른 프롤아민, 알긴산, 구아검 및 포스포틸콜린, 및 그의 공중합체 및 유도체를 포함하는 천연 발생 중합체로 코팅될 수 있다. 코팅은 또한 셀룰로오스, 키틴, 텍스트란, 전분, 하이드록시에틸 전분, 폴리글루코네이트, 히아루론산 및 엘라틴 및 그의 공중합체 및 유도체와 같은 변형된 다당류를 포함할 수 있다.
- [0104] 입자는 하이드로젤로 코팅될 수 있다. 하이드로젤은 예를 들어, 폴리(하이드록시알킬 (메트)아크릴레이트), 폴리에스테르, 폴리(메트)아크릴아미드, 폴리(비닐 피롤리돈) 또는 폴리비닐 알코올과 같은 임의의 적합한 중합체로부터 선택된 베이스 중합체를 이용하여 형성될 수 있다. 가교제는 과산화물, 황, 이염화황, 금속 산화물, 셀레늄, 텔루륨, 다이아민, 다이이소시아네이트, 알킬 페닐 다이설파이드, 테트라알킬 티우람 다이설파이드, 4,4'-다이티오모르폴린, p-퀴닌 다이옥심 및 테트라클로로-p-벤조퀴논 중 하나 이상일 수 있다. 또한, 보론산-함유 중합체가 선택적인 광중합성 기를 가지고, 하이드로젤에 통합될 수 있다.
- [0105] 특정 바람직한 실시양태에서, 코팅은 미국 식약청(FDA)에 의해 사용 허가된 물질을 포함한다. 이들 FDA-허가 물질은 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리글락틴(Polyglactin) 910(9:1 비의 글리콜리드/락티드 단위를 포함하며, 비크릴(VICRYL)<sup>TM</sup>로도 알려짐), 폴리글리코네이트(9:1 비의 글리콜리드/트리메틸렌 카보네이트 단위를 포함하며, 맥손(MAXON)<sup>TM</sup>으로도 알려짐), 및 폴리다이옥사논(PDS)을 포함한다.
- [0106] 입자에 대한 코팅의 부착은 공유 결합 또는 비공유 결합에 의해, 예를 들어, 이온 결합, 수소 결합, 소수성 결합, 배위, 접착제 또는 물리적 흡수 또는 상호작용에 의해 이루어질 수 있다.
- [0107] 종래의 나노입자 코팅법은 건식 및 습식 접근법을 포함한다. 건식 방법은 (a) 물리적 증착(Zhang, Y. et al. Solid State Commun. 115:51 (2000)), (b) 플라즈마 처리(Shi, D. et al. Appl. Phys. Lett. 78: 1243 (2001); Vollath, D. et al. J. Nanoparticle Res. 1 :235 (1999)), (c) 화학적 증착(Takeo, O. et al. J. Mater. Chem. 8: 1323 (1998)) 및 (d) 매트릭스 내에 나노입자의 *인 시추(in situ)* 침전을 위한 중합체 또는 비중합체 유기 물질의 열분해(Sglavo, V. M. et al. J. Mater. Sci. 28:6437 (1993))를 포함한다. 입자 코팅을 위한 습식 방법은 (a) 졸-겔 공정 및 (b) 유화 및 용매 증발 기술(Cohen, H. et al. Gene Ther. 7: 1896 (2000); Hrkach, J. S. et al. Biomaterials 18:27 (1997); Wang, D. et al. J. Control. Rel. 57:9 (1999))



을 포함한다. 코팅은 전기도금, 분무코팅, 딥 코팅, 스퍼터링, 화학적 증착 또는 물리적 증착에 의해 도포될 수 있다. 부가적으로, 다당류를 가진 다양한 나노입자를 코팅하는 방법이 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 각각이 참고로 본 발명에 통합되는 미국 특허 제8,685,538호 및 미국 특허 출원 공개 제2013/0323182호 참고).

[0108] 일부 실시양태에서, 입자는 신장 배출에 의한 클리어런스를 촉진하기 위해 맞춰질 수 있다. 정상 신장 기능을 가진 개체를 위한 신장 클리어런스는 일반적으로 15 nm 미만인 적어도 하나의 치수를 가진 입자를 요구한다(예를 들어, Choi, H.S., et al. Nat Biotechnol 25(1): 1165 (2007); Longmire, M. et al, Nanomedicine 3(5):703 (2008) 참고). 그럼에도 불구하고, 더 큰 입자가 소변으로 배출될 수 있다. 입자가 신장 클리어런스하기에는 너무 큰 실시양태의 경우에는, 그럼에도 불구하고 입자는 더 작은 크기로 생체내 분해 후 제거될 수 있다.

[0109] 일부 실시양태에서, 입자는 간담즙 배출에 의한 클리어런스를 촉진하도록 맞춰질 수 있다. 간 내의 쿠퍼 세포를 포함하는, 단핵 식세포 시스템(MPS)은 나노입자의 간 흡수 및 후속 담즙 배출에 관련된다. 나노입자의 특정 크기 및 표면 특성은 간에서 MPS에 의한 흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다(각각이 참고로 본 발명에 통합되는 Choi et al, J. of Dispersion Sci. Tech. 24(3/4):475-487 (2003); 및 Brannon-Peppas et al, J. Drug Delivery Sci. Tech. 14(4):257-264 (2004) 참고). 예를 들어, 입자의 소수성을 증가시키는 것은 MPS에 의한 흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서, 당업자는 담즙 배출을 조절하기 위하여 소정의 특징을 가진 입자를 선택할 수 있다. 간담도계는 신장계를 통해 배출될 수 있는 입자(예를 들어, 10 내지 20 nm)보다 다소 큰 입자의 배출을 허용한다. 입자가 간담즙 배출을 하기에는 너무 큰 실시양태의 경우, 입자는 그럼에도 불구하고 작은 크기로의 생체내 분해 후 제거될 수 있다. 그러한 실시양태에서, 간담즙 배출에 의한 클리어런스를 촉진하는 코팅은 입자의 분해 후 코팅이 노출되도록 입자의 내면 표면의 일부를 덮을 수 있다. 입자는 표면의 일부를 덮는 다수의 코팅 분자, 예를 들어, 소수성 분자를 포함할 수 있다. 표면은 입자의 분해 후 노출되어, 분해된 입자의 클리어런스를 허용할 수 있다.

[0110] 일부 실시양태에서, 입자는 식세포작용에 의한 클리어런스를 촉진하기 위하여 맞춰진다. 예를 들어, 입자는 클리어런스 제제를 포함할 수 있으며, 클리어런스 제제는 예를 들어, 대식세포에 의한 인식을 위하여, 병원균-관련 분자 패턴을 포함한다. 병원균-관련 분자 패턴(PAMP)은 비메틸화 CpG DNA(세균), 이중쇄 RNA(바이러스), 지질다당류(세균), 펩티도글리칸(세균), 리포아라비노만란(세균), 지모산(효모), MALP-2와 같은 마이코플라스마 지질단백질(세균), 플라젤린(세균), 폴리(이노신-시티딜)산(세균), 리포테이코산(세균) 및 이미다조퀴놀린(합성)을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, PAMP 클리어런스 제제는 입자가 하나 이상의 표적에 결합하기 전에 대식세포가 입자를 집어삼키지 않도록 가려진다. 예를 들어, PAMP 클리어런스 제제는 전술한 코팅 중 어느 하나(예를 들어, 생분해성 중합체 코팅과 같은 중합체 코팅)에 의해 가려질 수 있다. 대식세포는 20 μm 만큼 큰 입자를 집어삼킬 수 있다(예를 들어, Cannon, G.J. and Swanson, J.A., J. Cell Science 101 :907-913 (1992); Champion, J.A., et al. Pharm Res 25(8): 1815-1821 (2008) 참고). 일부 실시양태에서, 식세포작용에 의한 클리어런스를 촉진하는 클리어런스 제제는 클리어런스 제제가 입자의 분해 후 노출되도록 입자의 내면 표면의 일부를 덮을 수 있다. 입자는 표면의 일부를 덮는 다수의 클리어런스 제제, 예를 들어, PAMP를 포함할 수 있다. 표면은 입자의 분해 후 노출되어, 분해된 입자의 클리어런스를 허용할 수 있다. 클리어런스 제제는 제제를 포함하는 표면과 중복되는 표면의 일부를 덮을 수 있다. 클리어런스 제제(예를 들어, PAMP)는 예를 들어, 제2 코팅의 분해 후 또는 입자의 분해 후, 입자에 대한 면역 반응을 유발할 수 있다.

[0111] 일부 실시양태에서, 클리어런스 제제(예를 들어, PAMP)에 대한 면역 반응은 제제 및/또는 제제/생물분자 복합체에 대한 면역 반응을 뛰어넘어, 제제 및/또는 제제/생물분자 복합체에 대한 면역 반응을 억제하거나 개시를 지연시킬 수 있다. 예를 들어, 입자의 분해는 클리어런스 제제 및 제제(및/또는 제제/생물분자 복합체) 둘 모두를 백혈구에 노출시킬 수 있다. PAMP 클리어런스 제제는 대식세포에 의해 분해된 입자의 신속한 클리어런스를 허용하여 제제 및/또는 제제/생물분자 복합체에 대한 면역 반응(예를 들어, B-세포 매개 면역 반응)을 지연시킬 수 있다.

[0112] 클리어런스 제제는 식세포작용을 유도하는 칼레티쿨린일 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 입자는 약 1일 내지 약 5년, 예를 들어, 약 1일 내지 약 3년 또는 약 1일 내지 약 1년 내에 유기체에 의해 제거될 수 있다.

[0114] VII. 투여 방법

[0115] 본 발명은 본원에 개시된 조성물(예를 들어, 본원에서 일반적으로 또는 구체적으로 개시된 입자 또는 다수의 입



자 중 임의의 것)이 시험관내 및/또는 생체내에서 세포와 조직에 투여될 수 있음을 고려한다. 생체내 투여는 임의 동물 모델과 같은 질병의 동물 모델에의 투여 또는 그를 필요로 하는 개체에 대한 투여를 포함한다. 적합한 세포, 조직 또는 개체는 반려 동물, 가축, 동물원 동물, 멸종위기 종, 희귀 동물, 비인간 영장류 및 인간과 같은 동물을 포함한다. 예시적인 반려 동물은 개와 고양이를 포함한다.

- [0116] 배양 중인 세포 또는 조직에 및/또는 그 주위와 같은, 시험관내 전달을 위해, 조성물은 예를 들어, 미세환경과 접촉하거나 배양 배지내의 가용성 물질과 접촉하거나 세포와 접촉하거나 심지어 세포에 침투하기 위해서, 배양 배지에 첨가될 수 있다. 원하는 활성 부위는 조성물(예를 들어, 본원에 개시된 입자)의 투여를 위한 전달 기전 및 수단에 영향을 준다.
- [0117] 생체내 세포 또는 조직에(세포와 조직의 미세환경을 포함) 및/또는 이를 필요로 하는 개체와 같은, 생체내 전달을 위해, 많은 투여 방법이 구상된다. 구체적인 방법은 입자 조성물 및 구체적인 응용 및 환자에 기초하여 선택될 수 있다. 다양한 전달 시스템이 공지되어 있으며 본 발명의 제제를 투여하기 위해 사용될 수 있다. 임의의 그러한 방법이 본원에 개시된 임의의 제제를 투여하기 위해 사용될 수 있다. 도입 방법은 장 또는 피내, 근육내, 복강내, 심근내, 정맥내, 피하, 폐, 비내, 안내, 경막외를 포함하며 이에 제한되지 않는 비경구 및 경구 경로일 수 있다. 본 발명의 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들어, 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막피부 내벽(예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있으며, 다른 생물학적 활성 제제와 함께 (동시에 또는 순차적으로) 투여될 수 있다. 투여는 전신성 또는 국소적일 수 있다.
- [0118] 특정 실시양태에서, 조성물은 정맥내로, 예를 들어, 볼루스 주사 또는 주입에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 경구로, 피하로, 근육내로 또는 복강내로 투여된다.
- [0119] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물을 치료를 필요로 하는 영역에(예를 들어, 종양 내로의 주사에 의해서와 같이, 종양 부위에) 국소 투여하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0120] 간은 빈번한 전이 부위이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물의 전달은 간으로 향한다. 예를 들어, 정맥 카테터는 본 발명의 제제를 간에 전달하기 위해 간문맥에 위치될 수 있다. 간문맥을 통한 다른 전달 방법 또한 고려된다.
- [0121] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 정맥 주입에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20 또는 적어도 30분의 기간에 걸쳐 주입된다. 다른 실시양태에서, 제제는 적어도 60, 90 또는 120분의 기간에 걸쳐 주입된다. 주입 기간에 관계없이, 본 발명은 특정 실시양태에서, 각 주입이 일정 기간 동안 제제가 규칙적인 스케줄에 따라(예를 들어, 매주, 매월 등) 투여되는 전체 치료 계획의 일부임을 고려한다. 그러나, 다른 실시양태에서, 조성물은 예를 들어, 일정 기간 동안 규칙적인 스케줄에 따라 제제가 투여되는 전체 치료의 일부로서, 볼루스 주입에 의해 전달된다.
- [0122] 임의의 전술한 경우를 위해, (하나의 제제 또는 둘 이상의 그러한 제제의 조합을 포함하는) 본 발명의 조성물은 임의의 적합한 경로 또는 방법을 통해 시험관내 또는 생체내로 투여될 수 있음이 고려된다. 조성물은 특정 스케줄에 따르는 것을 포함하여, 한번 또는 여러번 조성물이 투여되는 치료 요법의 일부로서 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물이 투여 경로 및 구체적인 응용을 위하여 적절하게 제제화될 것임을 고려한다. 본 발명은 전술한 특징의 임의의 조합 및 본원에 개시된 본 발명의 임의의 양태와 실시양태의 조합을 고려한다.
- [0123] 전술한 내용은 단독으로 또는 조합되어 사용되고 본원에 개시된 임의의 방법을 위해 사용되는 본 발명의 임의의 조성물(예를 들어, 입자 또는 다수의 입자)에 적용된다. 본 발명은 구체적으로 본 발명의 그러한 조성물, 조성물 및 방법의 특징과 본 섹션과 이하에서 개시된 다양한 약학 조성물 및 투여 경로를 위해 개시된 특징의 임의의 조합을 고려한다.
- [0124] VIII. 약학 조성물
- [0125] 특정 실시양태에서, 본 발명의 대상 입자 또는 입자들은 약학적 허용 담체로 제형화된다. (예를 들어, 본원에 개시된 입자 또는 다수의 입자를 포함하는)하나 이상의 조성물은 단독으로 또는 약학 제형(조성물)의 성분으로 투여될 수 있다. 본원에서 일반적으로 또는 구체적으로 개시된 본 발명의 임의의 조성물은 본원에 개시된 대로 제형화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 둘 이상의 본 발명의 입자를 포함하거나 제2 치료제와 제형화된 본 발명의 입자를 포함한다.
- [0126] 본 발명의 조성물은 인간 또는 수의과 의약에서 사용하기 위하여 임의의 편리한 방식으로 투여하기 위해 제형화

될 수 있다. 습윤제, 유화제 및 활택제, 예를 들어, 소듐 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아레이트, 및 착색제, 방출제, 코팅제, 감미제, 착향료 및 향수 제제, 방부제 및 항산화제가 또한 조성물에 존재할 수 있다.

[0127] 대상 입자 또는 입자들의 제형은 예를 들어, 경구, 코, 국소, 비경구, 직장 및/또는 질내 투여에 적합한 것들을 포함한다. 제형은 편리하게는 단위 투여 형태로 존재할 수 있으며 약학 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 숙주와 구체적인 투여 방식에 따라 변화될 것이다. 단일 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생산하는 화합물의 양일 것이다.

[0128] 특정 실시양태에서, 이들 제형 또는 조성물을 제조하는 방법은 하나 이상의 입자와 담체 및, 선택적으로 하나 이상의 보조 성분을 조합하는 것을 포함한다. 일반적으로, 제형은 액체 담체 또는 미분된 고형 담체 또는 둘 모두와 제조되고 그 후 필요하면 제품을 성형한다.

[0129] 경구 투여를 위한 제형은 캡슐, 카시에낭(cachet), 알약, 정제, 로젠지(보통 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트의 착향 베이스를 이용), 분말, 과립, 또는 수성 또는 비수성 액체 내의 용액 또는 현탁액, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀전, 또는 엘릭시르 또는 시럽, 또는 캔디(젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아와 같은 불활성 기체를 이용) 및/또는 구강세정액 등의 형태일 수 있으며, 각각은 소정의 양의 본 발명의 입자를 함유한다. 현탁액은 활성 화합물에 더하여, 예특실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 솔비톨 및 솔비탄 에스테르, 미세결정 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 아가-아가 및 트라가칸트, 및 그 혼합물과 같은 현탁제를 함유할 수 있다.

[0130] 경구 투여를 위한 고형 투여 형태(캡슐, 정제, 알약, 당제, 분말, 과립 등)에서, 본 발명의 하나 이상의 조성물은 소듐 시트레이트 또는 다이칼슘 포스페이트, 및/또는 하기 중 임의의 것과 같은 하나 이상의 약학적 허용 담체와 혼합될 수 있다: (1) 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 규산과 같은 충전제 또는 증량제; (2) 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로오스, 알지네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아와 같은 결합제; (3) 글리세롤과 같은 보습제; (4) 아가-아가, 칼슘 카보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 소정의 실리케이이트 및 소듐 카보네이트와 같은 붕해제; (5) 파라핀과 같은 용액 지연제; (6) 4차 암모늄 화합물과 같은 흡수 가속화제; (7) 예를 들어, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트와 같은 습윤제; (8) 카올린 및 벤토나이트 점토와 같은 흡수제; (9) 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트, 및 그 혼합물과 같은 활택제; 및 (10) 착색제. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 약학 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고형 조성물은 또한 락토스 또는 유당 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 이용하여 연질 및 경질-충전 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 약학적 허용 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 성분에 더하여, 액체 투여 형태는 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예를 들어, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(구체적으로, 면화씨, 땅콩, 옥수수, 싹, 올리브, 피마자, 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라하이드로퓨틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 솔비탄의 지방산 에스테르 및 그 혼합물과 같은, 당업계에서 일반적으로 사용되는 불활성 희석제를 함유할 수 있다. 불활성 희석제외에, 경구 조성물은 또한 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 착향제, 착색제, 향수제 및 방부제와 같은 보조제를 포함할 수 있다.

[0131] 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법은 자궁경관 및 질의 점막과 같은 점막 또는 피부에의 국소 투여를 포함한다. 국소 제형은 추가로 피부 또는 각질층 침투 향상제로서 효과적인 것으로 알려진 매우 다양한 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 이들의 예는 2-피롤리돈, N-메틸-2-피롤리돈, 다이메틸아세트아미드, 다이메틸포름아미드, 프로필렌 글리콜, 메틸 또는 이소프로필 알코올, 다이메틸 설폭사이드 및 아존이다. 제형을 화학적으로 허용가능하게 하기 위하여 추가의 제제가 더 포함될 수 있다. 이들의 예는 지방, 왁스, 오일, 염료, 향료, 방부제, 안정화제 및 표면 활성 제제이다. 당업계에 공지된 바와 같은 각질용해제 또한 포함될 수 있다. 예로는 살리실산과 황이 있다. 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 형태는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 본 발명의 대상 제제는 멸균 상태에서 약학적 허용 담체와 그리고 요구될 수 있는 임의의 방부제, 완충제, 또는 압축가스와 혼합될 수 있다. 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 본 발명의 대상 제제에 더하여, 부형제, 예를 들어, 동물 및 식물 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 그 혼합물을 함유할 수 있다. 분말과 스프레이는 본 발명의 대상 제제에 더하여, 부형제, 예를 들어, 락토스, 탈크, 규산, 알루미늄 하이드록사이드, 칼슘 실리케이이트 및 폴리아미드 분말 또는 이들 물질의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이는 추가적으로 관례적인 압축가스, 예를 들어, 클로로플루오로탄화수소 및 휘발성 비치환 탄화수소, 예를 들어, 부탄

및 프로판올 함유할 수 있다.

- [0132] 비경구 투여에 적합한 약학 조성물은 하나 이상의 약학적 허용 멸균 등장 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 또는 사용 직전에 멸균 주사용 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합된 본 발명의 하나 이상의 조성물을 포함할 수 있으며, 이는 항산화제, 완충제, 세균발육정지제, 제형이 의도된 수용체의 혈액과 등장성이 되도록 하는 용질, 또는 현탁 또는 증점 제제를 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 이용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 적합한 그의 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어, 올리브 오일 및 주사용 유기에스테르, 예를 들어, 에틸 올리에이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0133] 이들 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물의 작용 방지는 다양한 항균 및 항진균 제제, 예를 들어, 과라벤, 클로로부탄올, 페놀 솔브산 등을 포함시켜 보장할 수 있다. 또한 당, 염화나트륨 등과 같은 등장제를 조성물 내로 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사용 약학 형태의 지연된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은, 흡수를 지연시키는 제제의 포함에 의해 이루어질 수 있다.
- [0134] 주사용 디팟(depot) 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 중합체에서 하나 이상의 입자의 마이크로인캡슐(microencapsule) 매트릭스를 형성함으로써 제조된다. 약물 대 중합체의 비율 및 이용되는 구체적인 중합체의 특성에 따라, 약물 방출 속도가 제어될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(안하이드라이드)를 포함한다. 디팟 주사용 제형은 또한 신체 조직과 양립성인 리포솜 또는 마이크로에멀전 내에 약물을 포획시킴으로써 제조된다.
- [0135] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 일상적인 절차에 따라 인간 또는 반려 동물과 같은 동물에의 정맥내 투여를 위해 맞춰진 약학 조성물로서 제형화된다. 필요한 경우, 조성물은 또한 가용화제 및 주사 부위의 고통을 덜어주기 위한 리도카인과 같은 국소 마취제를 포함할 수 있다. 조성물이 주입에 의해 투여되어야 하는 경우, 멸균 약학 등급 물 또는 염수를 함유한 주입 병을 이용하여 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 염수 앰플이 제공될 수 있다.
- [0136] 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물(예를 들어, 입자 또는 입자들)은 인간 또는 반려 동물과 같은 동물에 대한 피하, 복강내 또는 근육내 투여를 위해 제형화된다.
- [0137] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제 및 입자는 종양에 대한 국소 전달, 예를 들어, 종양내 주사를 위한 전달을 위해 제형화된다.
- [0138] 특정 실시양태에서, 조성물은 간문맥을 통한 간에 대한 국소 투여를 목적으로 하며, 이에 따라 제제 및 입자가 제형화될 수 있다.
- [0139] 특정 실시양태에서, 구체적인 제형은 한 가지 보다 많은 경로를 통한 전달 맥락에서 사용하기에 적합하다. 따라서, 예를 들어, 정맥내 주입을 위해 적합한 제형은 또한 간문맥을 통한 전달을 위해 적합할 수 있다. 그러나, 다른 실시양태에서, 제형은 한 가지 전달 경로의 맥락에서 사용하기에 적합하지만, 두 번째 전달 경로의 맥락에서 사용하기에 적합하지 않다.
- [0140] 암과 같은 질환의 치료에서 효과적이고/이거나 가용성 TNFR을 중화시키는데 효과적이고/이거나 가용성 TNFR, 특히 종양 미세환경에, 선택적으로 혈장에 존재하는 가용성 TNFR의 양 또는 TNF 알파 결합 활성을 감소시키는데 효과적이고/이거나 시험관내 또는 생체내에서 종양 세포 증식, 성장 또는 생존을 억제하는 데 효과적인 본 발명의 제제 또는 입자의 양은 표준 임상 또는 실험실 기술에 의해 결정될 수 있다. 또한, 최적의 투여량 범위를 확인하는 것을 돕기 위하여 시험관내 분석이 선택적으로 이용될 수 있다. 제형에서 이용될 정확한 투여량은 또한 투여 경로 및 질환의 심각도에 의존할 것이며, 실무자의 판단과 각 개체의 환경에 따라 결정되어야 한다. 인간 또는 동물에 대한 투여를 위한 유효량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유도된 투여량-응답 곡선으로부터 외삽될 수 있다.
- [0141] 특정 실시양태에서, 약학 제제를 포함하는 본 발명의 조성물은 비-발열성이다. 다시 말하면, 특정 실시양태에서, 조성물은 실질적으로 발열인자가 없다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 제형은 내독소 및/또는 관련 발열성 물질이 실질적으로 없는 무-발열인자 제형이다. 내독소는 미생물 내부에 한정되어 있고 미생물이 파괴되거나 사멸할 때만 방출되는 독소를 포함한다. 발열성 물질은 또한 세균 및 다른 미생물의 외막으로부터의

열-유도, 열안정성 물질(당단백질)을 포함한다. 이들 물질 모두는 인간에게 투여되면 열, 저혈압 및 쇼크를 야기할 수 있다. 잠재적인 유해 효과로 인해, 심지어 소량의 내독소도 정맥내 투여되는 약학적 약물 용액으로부터 제거되어야 한다. 식약청("FDA")은 정맥내 약물 적용의 경우 단일 1시간 기간 내에 5 내독소 단위(EU)/투여량/kg체중의 상한선을 설정하였다(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). 치료 단백질이 상대적으로 많은 투여량으로 및/또는 연장된 기간에 걸쳐(예를 들어, 환자의 전 생애 동안) 투여되는 경우, 심지어 소량의 유해하고 위험한 내독소도 위험할 수 있다. 일부 특정 실시양태에서, 조성물 내의 내독소 및 발열인자 수준은 10 EU/mg 미만, 또는 5 EU/mg 미만, 또는 1 EU/mg 미만, 또는 0.1 EU/mg 미만, 또는 0.01 EU/mg 미만 또는 0.001 EU/mg 미만이다.

[0142] 전술한 내용은 본원에 개시된 본 발명의 임의의 제제, 조성물 및 방법에 적용된다. 본 발명은 특히 본원에 개시된 본 발명의 제제, 조성물 및 방법(단독 또는 조합)의 특징과 본 섹션 및 상기에서 개시된 다양한 약학 조성물과 투여 경로를 위해 개시된 특징의 임의의 조합을 고려한다.

[0143] 본 발명은 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합한 제제 및 제제의 카테고리의 많은 일반적인 구체적이고 구체적인 예를 제공한다("본 발명의 제제"). 본 발명은 임의의 그러한 제제 또는 제제의 카테고리가 시험관내 또는 생체내 투여를 위해 본원에 개시된 대로 제형화될 수 있음을 고려한다.

[0144] 또한, 일부 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 약학적 허용 담체 및/또는 부형제로 제형화된 본원에 개시된 본 발명의 임의의 제제를 포함하는 약학 조성물을 비롯한 조성물을 고려한다. 그러한 조성물은 본원에서 제공된 본 발명의 제제의 기능적 및/또는 구조적 특징 중 임의의 것을 이용하여 개시될 수 있다. 임의의 그러한 조성물 또는 약학 조성물은 본 발명의 임의의 방법에서 시험관내 또는 생체내에서 사용될 수 있다.

[0145] 유사하게, 본 발명은 분리되거나 정제된 본 발명의 제제를 고려한다. 본원에 개시된 제제의 임의의 기능적 및/또는 구조적 특징에 기초하여 개시된 본 발명의 제제는 분리된 제제 또는 정제된 제제로서 제공될 수 있다. 그러한 분리되거나 정제된 제제는 본원에서 개시된 임의의 시험관내 또는 생체내 방법에서의 사용을 포함해, 많은 시험관내 또는 생체내에서의 용도를 갖는다.

[0146] IX. 응용

[0147] 본원에 개시된 조성물(예를 들어, 입자 및 그의 약학 조성물)은 다양한 진단 및 치료 응용에서 유용하다. 예를 들어, 본원에 개시된 입자는 암을 치료하기 위해, 개체를 해독시키기 위해, 또는 바이러스 또는 세균 감염을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0148] 치료적 응용은 본원에 개시된 하나 이상의 조성물을, 부분적으로 투여 경로에 의존하는 다양한 방법을 이용하여, 개체, 예를 들어, 인간 개체에 투여하는 것을 포함한다. 경로는 예를 들어, 정맥내 주사 또는 주입(IV), 피하 주사(SC), 복강내(IP) 주사, 또는 근육내 주사(IM)일 수 있다.

[0149] 투여는 예를 들어, 국소 주입, 주사에 의해, 또는 임플란트의 수단에 의해 이루어질 수 있다. 임플란트는 다공성, 비다공성, 또는 실라스틱 막과 같은 막을 포함한 젤라틴성 물질, 또는 섬유일 수 있다. 임플란트는 조성물이 개체에게 지속적으로 또는 주기적으로 방출되도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 20080241223호; 미국 특허 제5,501,856호; 제5,164,188호; 제4,863,457호; 및 제3,710,795호; EP488401호; 및 EP430539호를 참고하며, 각각의 내용은 그 전체가 참고로 본 발명에 통합된다. 조성물은 예를 들어, 확산, 침식, 또는 대류 시스템, 예를 들어, 삼투 펌프, 생분해성 임플란트, 전기확산 시스템, 전기삼투압 시스템, 증기압 펌프, 전해 펌프, 기포 펌프, 압전 펌프, 침식-기반 시스템 또는 전기기계 시스템에 기초한 이식가능한 장치를 통해 개체에 전달될 수 있다.

[0150] 본원에서 사용된 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 생체내 배경에서, 치료될 질환의 하나 이상의 증상을 치료, 억제 또는 완화하거나, 그렇지 않으면 소망하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 제공하며, 예를 들어, 항원에 대한 면역 반응을 조절(예를 들어, 향상)하기 위한 충분한 투여량을 의미한다. 정확한 투여량은 개체-의존성 변수(예를 들어, 연령, 면역계 건강 등), 질병 및 이루고자 하는 치료와 같은 다양한 인자에 따라 변할 것이다.

[0151] 본원에서 사용된 포유류는 인간, 비인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 개코원숭이 또는 침팬지), 말, 소, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 케르빌루스쥐, 햄스터, 래트 또는 마우스일 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유류는 유아(예를 들어, 인간 유아)이다.

[0152] 본원에서 사용된 "예방을 필요로 하는", "치료를 필요로 하는" 또는 "이를 필요로 하는" 개체 포유류는 적절한 의료 실무자(예를 들어, 인간의 경우에는 의사, 간호사, 또는 간호 실무자; 비인간 포유류의 경우에는 수의사)



의 판단에 의해 주어진 치료로부터 합리적으로 이득을 볼 개체를 말한다.

- [0153] 용어 "예방하는"은 당업계에서 인식되며, 질환과 관련하여 사용될 경우 당업계에서 잘 이해되며, 조성물이 투여되지 않는 개체에 비하여 개체 포유류에서 의학적 질환의 증상의 빈도를 감소시키거나 개시를 지연시키는 조성물의 투여를 포함한다.
- [0154] 본원에 개시된 임의의 조성물의 적합한 인간 투여량은 추가로 예를 들어, I 단계 투여량 확대 연구(Phase I dose escalation studies)에서 평가될 수 있다. 예를 들어, van Gurp et al. (2008) *Am J Transplantation* 8(8): 1711-1718; Hanouska et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13(2, part 1):523-531; 및 Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3499-3500를 참고한다.
- [0155] 그러한 조성물의 독성 및 치료 효능은 세포 배양 또는 실험 동물(예를 들어, 암, 독성 또는 감염의 동물 모델)에서의 공지의 약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 이들 절차는 예를 들어, LD<sub>50</sub>(집단의 50%에 치명적인 투여량) 및 ED<sub>50</sub>(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 투여량)을 결정하기 위해 이용될 수 있다. 독성 및 치료 효과 사이의 투여량 비율은 치료 지수이며 비율 LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>로서 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 제제가 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 조성물이 이용될 수 있는 한편, 그러한 화합물을 질병 조직의 부위에 표적화하는 전달 시스템을 설계하고 정상 세포에 대한 잠재적 손상을 최소화하여 부작용을 감소시키기 위해 주의 기울여야 한다.
- [0156] 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 수득한 데이터는 인간에서의 사용을 위한 투여량 범위를 정하는데 사용될 수 있다. 그러한 조성물의 투여량은 일반적으로 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED<sub>50</sub>을 포함하는 조성물의 순환 농도 범위 이내이다. 투여량은 이용되는 투여 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 이 범위 이내에서 변화될 수 있다. 치료 유효량은 처음에는 세포 배양 분석으로부터 추정될 수 있다. 투여량은 세포 배양에서 결정된 IC<sub>50</sub>(즉, 증상의 1/2 최대 억제력을 이루는 항체의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 이루기 위해 동물 모델에서 공식화될 수 있다. 그러한 정보는 인간에서 유용한 투여량을 보다 정확하게 결정하기 위해 이용될 수 있다. 혈장 내 수준은 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 국소 투여가 필요한 경우, 세포 배양 또는 동물 모델링은 국소 부위 내에서 치료 유효 농도를 이루기 위해 필요한 투여량을 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0157] 본원에 개시된 임의의 방법의 일부 실시양태에서, 입자는 하나 이상의 추가의 치료제(예를 들어, 감염을 치료하거나 암을 치료하기 위한 치료제)와 함께 포유류에 투여될 수 있다.
- [0158] 일부 실시양태에서, 입자와 추가의 치료제는 상이한 투여 경로를 이용하여 포유류에 투여될 수 있다. 예를 들어, 추가의 치료제는 피하로 또는 근육내로 투여될 수 있고 입자는 정맥내로 투여될 수 있다.
- [0159] X. 신생물에 관련된 선택된 응용
- [0160] 일부 실시양태에서, 본 원에서 개시된 입자는 암을 가진 개체를 치료하는데 유용할 수 있다. 본원에 개시된 입자 조성물에서 유용한 예시적인 제제 및/또는 그러한 입자에 의해 소거될 수 있는 가용성 생물분자는 본원에 개시되며(예를 들어, 표 2) 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, sTNFR, MMP2, MMP9, sIL-2R, sIL-1 수용체 등을 소거할 수 있는 입자는 암의 치료를 위해 및/또는 면역 탈억제를 완화시킴으로써 암에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해 유용하다.
- [0161] 면역요법에의 면역 탈억제 접근법은 부분적으로 많은 암환자가 일반적으로 전체적으로는 면역력을 갖추고 있지만 그들의 면역계가 그들의 종양의 미세환경에서는 국소적으로 억제된다는 개념에 기초한다. 만일 면역계의 이러한 억제가 본 발명의 입자의 투여에 의해 완화되면, 환자 자신의 면역계가 종양에 작용할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 입자는 면역 반응을 유발하기 위하여 세포 표면 수용체에 결합하기 위한 외인성 활성 사이토카인을 첨가하여 환자의 면역계를 과자극할 필요없이 및/또는 이와 다르게 환자의 면역계를 과자극할 필요없이, 면역요법 접근법을 제공한다.
- [0162] 이론에 구애되지 않고, 암 환자는 일반적으로, 면역력을 갖추고 있으므로, 림프구가 종양 항원을 인식하는 능력이 일반적으로 종양에 의해 영향을 받지 않는다. 따라서, 림프구는 그들이 임의의 이상 세포 집단으로 이동되는 것처럼 종양 미세환경으로 이동되며, 이 지점에서 종양 괴사 인자(TNF, 예를 들어, TNF 알파, 면역계의 주요 세포독성 "검(sword)")와 같은 사이토카인과 세포독성 인자가 림프구로부터 미세환경 내로 절단된다. 만일 암세포가 대신에 바이러스 감염된 세포라면, (TNF 알파와 같은) TNF는 감염된 세포의 표면 상의 TNF 수용체(TNFR)에



결합하여, TNF에 대한 R1 또는 R2 타입 수용체가 결합되는지 여부에 따라 세포사멸 또는 산화성 스트레스에 의해 신속한 파괴를 야기한다. 다시 말해, 종양 및/또는 종양 항원의 존재에 의해 자극되지 않는 정상 면역 반응의 맥락에서, 림프구에 의해 배치된 TNF는 시작하는 면역 반응의 일부로서 세포 표면 TNF 수용체(R1 및/또는 R2 수용체)에의 결합에 이용가능해질 것이다. 심지어 종양 맥락에서, 림프구는 종양 부위로 배치된다.

[0163] 그러나, 많은 유형의 암세포가 TNF 수용체(두 유형 모두)를 과생산하고 종양 주위의 구름 내로 그들을 발산한다는 점에서, 많은 유형의 암세포는 바이러스 감염 세포와 같은 다른 이상 세포 유형과 상이하게 거동한다. 따라서, 암 세포 및/또는 종양의 미세환경은 일정량의 가용성 TNF 수용체를 포함한다. 이론에 구애됨없이, 종양 미세환경 내의 가용성 TNF 수용체 수준은 동일한 조직 유형의 건강한 세포와 같은 건강한 세포의 미세환경에서 발견되는 수준을 초과한다.

[0164] 부가적으로 또는 대안적으로, TNF 수용체 발산의 속도와 정도는 건강한 세포로부터 보다 암세포에 대해 더 크다. 또한, 이론에 구애됨없이, 특정 실시양태에서, 암 환자의 혈장에서 발견되는 가용성 TNF 수용체의 수준은 건강한 환자에서 보다 더 높을 수 있다.

[0165] 기전에 관계없이, 이 모델에서, 이들 발산된 가용성 TNF 수용체는 모집된 림프구에 의해 내인성으로 방출된 TNF에 결합하여, 내인성 TNF를 중화하고 종양 주위에 약간의 면역 특권을 효과적으로 생성하며, 면역 특권 내에서 종양은 계속 성장하고 추가의 TNF 수용체를 발산한다. 다시 말해, 발산된 가용성 TNF 수용체는 림프구에 의해 내인성으로 생산된 TNF 알파를 흡수하고 TNF가 암세포 상의 세포 표면 TNF 수용체에 결합하는 것을 방지하거나 억제한다. 이는 암세포 상의 세포표면 TNF 수용체에 결합할 수 있는 TNF를 감소시키거나 제거한다. 가용성 TNF 수용체는 본질적으로 TNF 알파의 결합에 대해 더 뛰어나며, 따라서 TNF 알파와 같은 TNF의 세포 표면 TNF 수용체 결합 활성을 감소시킨다.

[0166] 상기 시나리오는 유사하게 IL-2 및 발산된 가용성 IL-2 수용체의 맥락에서 일어날 수 있다.

[0167] 본 발명은 암에서 발산된 수용체에 의해 생성된 면역계의 억제를 완화하기 위해(예를 들어, 면역 탈억제) 전신적으로 또는 국소적으로 이용될 수 있는 약리학적 접근법을 제공한다. 본 발명은 암세포 및 종양의 미세환경에서와 같은 가용성 TNF 수용체 및/또는 가용성 IL-2 수용체(또는 면역 탈억제를 야기하는 임의의 다른 가용성 생물분자)의 양 및/또는 활성 감소(예를 들어, 활성 중화)를 위한 방법과 조성물을 제공한다. 이론에 구애됨없이, (예를 들어, 종양 미세환경에서와 같이) 예를 들어, 가용성 TNF 수용체의 양 및/또는 활성 감소는 암세포와 같은 세포의 증식, 성장 또는 생존 억제를 위한 방법의 일부로서 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 암세포와 같은 세포의 생존을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 방법과 제제는 본원에 개시된다.

[0168] 조절 T 세포(TREG)는 예를 들어, 과반응성 T 세포 또는 지연된 T 세포 기능에 의해 야기된 자가면역 질병을 피하기 위하여 면역 반응을 억제하는 방식으로 암세포와 동일한 리간드를 분비할 수 있다. 예를 들어, CD80/B7-1 및 CD86/B7-2는 T-세포 상의 CTLA-4 수용체에 결합하며 T 세포 활성을 억제한다. CTLA-4 수용체를 차단하기 보다는, 본원에 개시된 입자는 CD80/B7-1 및/또는 CD86/B7-2를 소거하도록 설계될 수 있다. 유사하게, 본원에 개시된 입자는 예를 들어, PD-1 수용체를 포함하는 입자를 이용하여, PD-1과 같은 다른 면역 체크포인트 억제자를 소거하도록 설계될 수 있다. 그러한 입자 조성물은 암 치료를 위하여 면역계를 자극하는 다른 접근법에 비하여 여러 이득을 제공한다.

[0169] 일부 실시양태에서, 개체는 암에 걸렸거나, 암에 걸린 것으로 의심되거나 또는 암에 걸릴 위험이 있는 개체이다. 일부 실시양태에서, 개체는 자가면역 질병에 걸렸거나 자가면역 질병에 걸린 것으로 의심되거나, 자가면역 질병에 걸릴 위험이 있는 개체이다.

[0170] 본원에서 사용된 암에 "걸릴 위험이 있는" 개체는 암에 걸릴 위험 인자를 하나 이상(예를 들어, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱 또는 여덟 이상) 가진 개체이다. 예를 들어, 암에 걸릴 위험이 있는 개체는 암에 걸릴 소인(즉, 종양 억제자 유전자에서의 돌연변이(예를 들어, BRCA1, p53, RB, 또는 APC에서의 돌연변이)와 같은 암에 걸릴 유전적 소인)을 가질 수 있거나 또는 질환을 야기할 수 있는 조건에 노출되었다. 따라서, 개체가 소정의 화합물(예를 들어, 아크롤레인, 비소, 벤젠, 벤조[아]안트라센, 벤조[아]피렌, 폴로늄-210(라돈), 우레탄 또는 비닐 클로라이드와 같은 담배 연기 중의 발암 화합물)의 돌연변이유발 또는 발암 수준에 노출되었을 때 개체는 암에 "걸릴 위험이 있는" 개체일 수 있다. 또한, 개체가 예를 들어, 대량의 자외선 또는 X-선에 노출되었거나 파필로마바이러스, 엡스타인-바 바이러스, B형 간염 바이러스 또는 인간 T-세포 백혈병-림프종 바이러스와 같은 종양-야기/관련 바이러스에 노출(예를 들어, 감염)된 경우, 개체는 "암에 걸릴 위험이 있을" 수 있다. 암은 세포의 제어되지 않는 분열 및 이들이 침윤을 통해 인접 조직 내로 직접 성장하거나 전이에 의해 떨어진 부위 내로 이

식되어(이 경우 암세포는 혈류 또는 림프계를 통해 수송됨) 확산하는 능력을 특징으로 하는 질병 또는 질환의 부류이다. 암은 모든 연령의 사람들이 걸릴 수 있지만, 연령에 따라 위험이 증가하는 경향이 있다.

[0171] 암의 유형은 예를 들어, 폐암, 유방암, 결장암, 췌장암, 신장암, 위암, 간암, 골암, 혈액암, 신경 조직 암(예를 들어, 다형성 교모세포종과 같은 교모세포종), 흑색종, 갑상선암, 난소암, 고환암, 전립선암, 자궁경부암, 질암 또는 방광암을 포함할 수 있다.

[0172] 유사하게, 감염을 일으킬 위험이 있는 개체는 병원성 미생물에의 노출 가능성을 증가시키는 하나 이상의 위험 인자를 가진 개체이다.

[0173] 암 또는 감염에 "걸린 것으로 의심되는" 개체는 암 또는 감염의 하나 이상의 증상을 가진 개체이다. 암 또는 감염에 걸릴 위험이 있거나 걸린 것으로 의심되는 개체가 관심 종 내의 모든 개체를 포함하지는 않는다는 것이 이해되어야 한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 본 방법은 개체가 암 또는 자가면역 질병을 가지고 있는지를 결정하는 것을 포함한다.

[0175] XI. 염증성 및 자가면역 질환에 관련된 선택된 응용

[0176] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 입자는 염증성 질환 및/또는 자가면역 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 개시된 입자 조성물에서 유용한 예시적인 제제 및/또는 그러한 입자에 의해 소거될 수 있는 가용성 생물분자는 본원에서 개시되며(예를 들어, 표 2) 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 사이토카인(예를 들어, TNF $\alpha$  또는 인터루킨, 예를 들어, IL-2, IL-6, 또는 IL-1) 또는 케모카인(예를 들어, CXCL8 또는 CXCL1)을 소거할 수 있는 입자는 다양한 자가면역 및/또는 염증성 질환의 치료를 위해 유용할 수 있다.

[0177] 일부 실시양태에서, 자가면역 또는 염증성 질환은 과민 반응이다. 본원에서 사용된 "과민증"은 바람직하지 않은 면역계 반응을 말한다. 과민증은 4가지 카테고리로 나뉜다. 타입 I 과민증은 알러지(예를 들어, 아토피, 아나필락시스 또는 천식)를 포함한다. 타입 II 과민증은 세포독성/항체 매개된다(예를 들어, 자가면역 용혈성 빈혈, 혈소판감소증, 태아적아구증 또는 굿파스처 증후군(Goodpasture's Syndrome)). 타입 III는 면역 복합체 질병(예를 들어, 혈청병, 아더스 반응(Arthus reaction) 또는 SLE)이다. 타입 IV는 지연형 과민증(DTH), 세포-매개 면역 기억 반응 및 항체-독립적(예를 들어, 접촉성 피부염, 투베르쿨린 피부반응 검사 또는 만성 이식 거부)이다. 본원에서 사용된 "알러지"는 IgE에 의한 비만 세포 및 호염기구의 지나친 활성화를 특징으로 하는 질환을 의미한다. 특정 경우에, IgE에 의한 비만 세포 및 호염기구의 지나친 활성화는 (부분적으로 또는 전체적으로) 염증 반응을 야기한다. 특정 경우에, 염증 반응은 국소적이다. 특정 경우에, 염증 반응은 기도 협착(즉, 기관지 수축)을 야기한다. 특정 경우에, 염증 반응은 코의 염증(즉, 비염)을 야기한다. 특정 경우에, 염증 반응은 전신성(즉, 아나필락시스)이다.

[0178] XII. 병원균 및 독소에 관련된 선택된 응용

[0179] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 입자는 미생물(예를 들어, 바이러스 또는 세균) 또는 내독소와 같은 미생물의 성분에 결합하도록 설계될 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 입자는 예를 들어, 감염성 질병(예를 들어, HPV, HBV, C형 간염 바이러스(HCV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV-1 및 HIV-2)와 같은 레트로바이러스, 엡스타인 바 바이러스(EBV), 사이토메갈로바이러스(CMV), HSV-1 및 HSV-2와 같은 헤르페스 바이러스 및 인플루엔자 바이러스를 비롯한 바이러스 감염성 질병)을 치료하기 위해 유용할 수 있다. 또한, 아스페질러스(*Aspergillus*), 브루기아(*Brugia*), 칸디다(*Candida*), 클라미디아(*Chlamydia*), 콕시디아(*Coccidia*), 크립토크커스(*Cryptococcus*), 디로피라리아(*Dirofilaria*), 임균(*Gonococcus*), 히스토플라스마(*Histoplasma*), 리슈마니아(*Leishmania*), 마이코박테리움(*Mycobacterium*), 마이코플라스마(*Mycoplasma*), 짚신벌레(*Paramecium*), 백일해(*Pertussis*), 말라리아 원충(*Plasmodium*), 폐렴균(*Pneumococcus*), 폐포자충(*Pneumocystis*), 리케차(*Rickettsia*), 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*Shigella*), 포도상구균(*Staphylococcus*), 연쇄상구균(*Streptococcus*), 톡소플라스마(*Toxoplasma*) 및 비브리오콜레라(*Vibrio cholerae*)와 같은 세균, 진균 및 다른 병원균 감염이 포함된다. 예시적인 종은 *나이세리아 고노레아(Neisseria gonorrhoea)*, *마이코박테리움 투버쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)*, *칸디다 알비칸스(Candida albicans)*, *칸디다 트로피칼리스(Candida tropicalis)*, *트리코모나스 바지날리스(Trichomonas vaginalis)*, *해모필루스 바지날리스(Haemophilus vaginalis)*, *그룹 B 스트렙토코커스 종(Group B Streptococcus sp.)*, *마이코플라스마 호미니스(Microplasma hominis)*, *해모필루스 두크레이(Hemophilus ducreyi)*, *그라누로마 인귀나레(Granuloma inguinale)*, *림포파티아 베네레움(Lymphopathia venereum)*, *트레포네마 팔리둠(Treponema pallidum)*, *브루셀라 아보르투스(Brucella abortus)*, *브루셀라 멜리텐시스(Brucella melitensis)*, *브루셀라 수이스(Brucella suis)*, *브루셀라 카니스(Brucella canis)*, *캠필로박*

터 페투스(*Campylobacter fetus*), 캄필로박터 페투스 인테스티날리스(*Campylobacter fetus intestinalis*), 렙토스피라 푸모나(*Leptospira pomona*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 브루셀라 오비스(*Brucella ovis*), 클라미디아 프시타시(*Chlamydia psittaci*), 트리코모나스 포에투스(*Trichomonas foetus*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 액티노바실러스 에쿠리(*Actinobacillus equuli*), 살모넬라 아보르투스 오비스(*Salmonella abortus ovis*), 살모넬라 아보르투스 에퀴(*Salmonella abortus equi*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 코리네박테리움 에퀴(*Corynebacterium equi*), 코리네박테리움 피오제네스(*Corynebacterium pyogenes*), 액티노바실러스 세미니스(*Actinobacillus seminis*), 마이코플라스마 보비제니탈리움(*Mycoplasma bovis genitalium*), 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 앱시디아 라모사(*Absidia ramosa*), 트리파노소마 에퀴페르둠(*Trypanosoma equiperdum*), 바베시아 카발리(*Babesia caballi*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*); 또는 예를 들어, 파라코크시디오이드 브라실리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*)와 같은 진균; 또는 다른 병원균, 예를 들어, 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*)을 포함한다. 또한 국립 알리지 및 감염성 질병 기관(NIAID) 우선권 병원균이 포함된다. 이들은 카테고리 A 제제, 예를 들어, 대두창(*variola major*)(천연두), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)(탄저병), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)(흑사병), 클로스트리듐 보툴리눔 독소(*Clostridium botulinum toxin*)(보툴리눔 식중독), 프란시셀라 투라렌시스(*Francisella tularensis*)(야토병), 필로바이러스(filoviruses)(에볼라 출혈열, 마르부르크(Marburg) 출혈열), 아레나바이러스(라사(Lassa)(라사열), 후닌(Junin)(아르헨티나 출혈열) 및 관련 바이러스); 카테고리 B 제제, 예를 들어, 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)(Q열), 브루셀라(*Brucella*) 종(브루셀라병), 부르크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*)(마비저), 알파바이러스(베네수엘라 뇌척수염(Venezuelan encephalomyelitis), 동부 및 서부 말 뇌척수염(eastern & western equine encephalomyelitis)), 리시누스 콰무니스(*Ricinus communis*)(피마자)로부터의 리신 독소, 클로스트리듐 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)의 입실론 독소; 포도상구균 장독소 B, 살모넬라(*Salmonella*) 종, 쉬겔라 디센테리아(*Shigella dysenteriae*), 에스케리치아 콜라이 균주 0157:H7, 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 크립토스포리디움 파르븀(*Cryptosporidium parvum*); 카테고리 C 제제, 예를 들어, 니파(nipah) 바이러스, 한타바이러스(hantaviruses), 진드기매개 출혈열 바이러스(tickborne hemorrhagic fever viruses), 진드기매개 뇌염 바이러스(tickborne encephalitis viruses), 황열 및 다제-내성 결핵; 기생충, 예를 들어, 슈스토소마(*Schistosoma*) 및 태니아(*Taenia*); 및 원생동물, 예를 들어, 리슈마니아(예를 들어, 엘. 멕시코나(*L. mexicana*)), 및 말라리아 원충을 포함한다.

[0180] XIII. 제제 투여를 위한 키트

[0181] 특정 실시양태에서, 본 발명은 또한 적어도 하나의 본 발명의 조성물(예를 들어, 입자 또는 입자들)로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약학 패키지 또는 키트를 제공한다. 선택적으로, 그러한 용기(들)와 연합되어 의약 또는 생물 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 안내문이 있을 수 있으며, 안내문은 (a) 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매의 기관에 의한 허가, (b) 사용을 위한 설명 또는 둘 모두를 반영한다.

[0182] 특정 실시양태에서, 키트는 대상 제제의 전달을 촉진하기 위한 추가의 물질을 포함한다. 예를 들어, 키트는 카테터, 튜빙, 주입백, 시린지 등 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, (예를 들어, 본원에 개시된 입자를 포함하는) 조성물은 동결건조된 형태로 포장되며, 키트는 적어도 2개의 용기: 동결건조된 조성물을 포함하는 용기 및 동결건조 물질을 재구성하기에 적합한 물, 완충제 또는 다른 액체를 포함하는 용기를 포함한다.

[0183] 전술한 내용은 본원에 개시된 임의의 조성물과 방법에 적용된다.

[0184] 본 발명은 그러한 조성물 및 방법(단독 또는 조합)의 특징과 본 섹션에서 개시된 다양한 키트를 위해 개시된 특징의 임의의 조합을 고려한다.

[0185] 본 발명의 이들 및 다른 양태는 하기 실시예를 고려하여 추가로 이해될 것이며, 실시예는 본 발명의 일부 구체적 실시형태를 예시하고자 하는 것이며 첨부된 청구범위에 의해 정의되는, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0186] 실시예

[0187] 실시예 1 - 암의 치료 방법

- [0188] 인간 환자는 의료 실무자에 의해 가용성 TNFR 또는 가용성 IL-2R을 발산하는 암(예를 들어, 폐, 결장, 유방, 뇌, 간, 췌장, 피부 또는 혈액 암)을 가진 것으로 확인된다. 환자는 암을 치료하기에 효과적인 양의, 가용성 TNFR 또는 IL-2R에 결합하고 격리시키는 (본원에 개시된) 입자를 포함하는 조성물이 투여된다. 선택적으로, 가용성 TNFR 또는 IL-2R의 효과의 역제를 유지하고 이에 의해 환자에서 암에 대한 면역 감시를 계속 향상시키기 위해 "유지 투여량"의 조성물이 환자에게 주어진다.
- [0189] 실시예 2 - 인간의 해독 방법
- [0190] 보툴리눔 독소와 관련된 독성의 증상을 가진 인간 환자가 존재한다. 환자는 독성과 관련된 하나 이상의 증상을 완화시키기 위해 효과적인 양의 가용성 보툴리눔 독소에 결합하고 격리시키는 (본원에 개시된) 입자를 포함하는 조성물이 투여된다.
- [0191] 실시예 3 - 바이러스 감염의 치료 방법
- [0192] 인간 환자는 HIV-1 감염을 가진 것으로 의료 실무자에 의해 확인된다. 환자는 환자의 순환계 내의 바이러스 역가를 감소시키기 위해 효과적인 양의, 가용성 HIV-1 비리온에 결합하고 격리시키는 (본원에 개시된) 입자를 포함하는 조성물이 투여된다. 환자는 HIV-1 비리온 역가의 감소를 유지하고 이에 의해 환자에서 감염을 억제하며 타인에게 바이러스 전파 가능성을 감소시키기 위한 "유지 투여량"의 조성물이 주어진다.
- [0193] 실시예 4 - 규소 입자의 제조 방법
- [0194] 다양한 기공 크기를 가지며 크기가 1000 nm X 400 nm 및 1000 nm X 800 nm인 다공성 규소 디스크를 제조한다. 기공 직경 및 디스크의 크기와 형태는 주사전자현미경에 의해 규명한다. 금 나노입자(Au)를 다공성 규소 디스크의 기공 내에 침적시킨다. 종양 괴사 인자(TNF)는 배위결합을 통해 금 나노입자의 표면에 접합시킨다. 리간드 밀도 및 TNF-Au 결합 안정성을 평가한다.
- [0195] 실시예 5 - 중합체 입자의 제조 방법
- [0196] 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA) 입자를 에멀전에 의해 제작한다. PLGA 입자의 크기 및 형태는 주사전자현미경, 원자력 현미경 및 투과전자현미경에 의해 규명한다. 입자는 대식세포 보충(즉, 식세포작용)을 위해, 4차 암 모뉴 베타-사이클로텍스트린으로 코팅한다. 코팅은 원자력 현미경 및 투과전자현미경으로 입증한다. 코팅 밀도 및 균일성은 투과전자 현미경 및 동적 광산란에 의해 규명한다.
- [0197] 베타-사이클로텍스트린-코팅된 PLGA 입자를 대식세포와 항온처리하며, 식세포작용을 형광현미경에 의해 그리고 유세포분석에 의해 모니터링한다.
- [0198] 베타-사이클로텍스트린-코팅된 PLGA 입자를 흡소닌작용 및 대식세포 흡수의 회피, 및 다른 입자에의 결합의 방지를 허용하기 위하여 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 티올 모이어티의 블렌드로 코팅한다. PEG와 티올 코팅의 균일성 및 밀도를 원자력 현미경에 의해 규명한다.
- [0199] 코팅 안정성은 다양한 기간 동안 매질에서 입자를 항온처리함으로써 규명한다. 입자의 회피 및 흡수는 상술한 대로, 대식세포와 입자를 항온처리함으로써 다양한 시점에서 모니터링한다.
- [0200] PLGA 입자는 종양 괴사 인자(TNF)로 코팅하고, 입자는 이황화결합에 의해 조합시켜 "스폰지"를 형성하며, 스폰지의 내부 표면 상에 TNF를 포함한다. 스폰지의 외부 표면은 선택적으로 스폰지의 TNF와 세포 사이의 상호작용을 방지하기 위하여 TNF를 포함하지 않는 입자로 차단된다.
- [0201] 실시예 6 - 중합체-기반 입자의 약동학
- [0202] 실시예 5의 스폰지(즉,  $10^3$  내지  $10^{12}$  스폰지와 같은, 실시예 5의 "스폰지"를 포함하는 조성물)를 원발암 및 전이암의 마우스 모델 및 건강한 대조군에게 정맥내로 또는 종양내로 투여한다. 스폰지의 독성은 각 투여 경로를 위한 LD<sub>50</sub>을 확인함으로써 결정한다. 스폰지의 반감기는 각 투여 경로에 대한 LC/MS 및 ICP에 의해 스폰지의 혈장 농도를 모니터링함으로써 결정한다. 스폰지의 생물학적 분배는 마우스의 생검을 수득하여 LC/MS, ICP, 및 공초점 현미경에 의해 스폰지 및 그 성분에 대해 조직을 분석함으로써 결정한다.
- [0203] 실시예 7 - 중합체-기반 입자의 효능
- [0204] 실시예 5의 스폰지(즉,  $10^3$  내지  $10^{12}$  스폰지와 같은, 실시예 5의 "스폰지"를 포함하는 조성물)을 MDA-MB-231 또는 4T1 이식편을 포함하는 마우스에 투여한다. MDA-MB-231 모델을 이용하여 종양 크기 및 성장의 감소를 평가하



고, 4T1 모델을 이용하여 전이 억제를 평가한다. 스폰지는 6주 동안 1주일에 한번씩 MDA-MB-231 마우스에 종양 내로 투여하며, 주기적으로 체중과 종양 크기를 모니터한다. 스폰지를 6주동안 1주일에 한번씩 4T1 마우스에 정맥내로 투여하고, 전이의 수를 모니터한다.

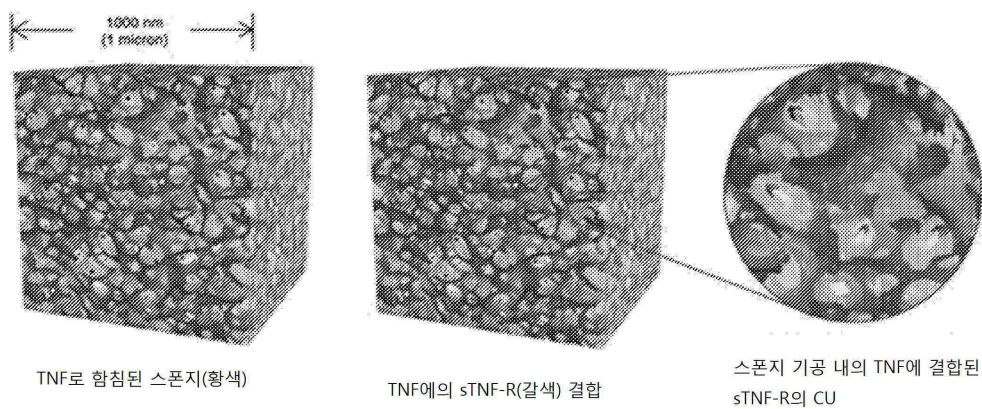
[0205] 실시예 8 - 규소/금-기반 입자의 약동학 및 효능

[0206] 실시예 6과 7의 실험을 실시예 5의 다공성 규소 입자로 반복한다.

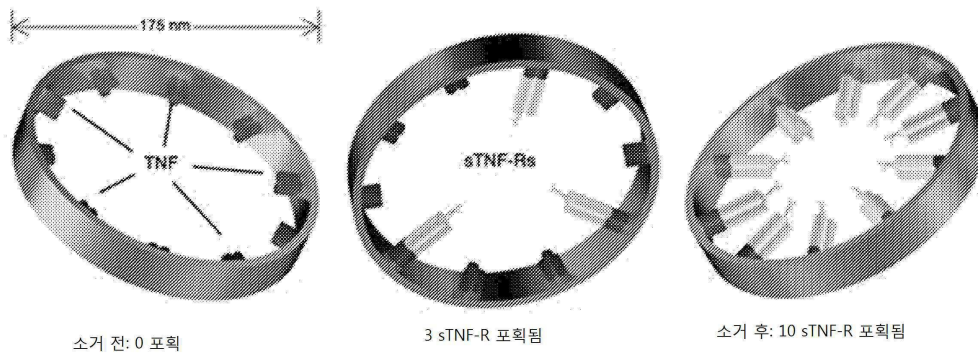
[0207] 본 발명이 구체적인 그의 실시형태를 참조하여 게시되었지만, 본 발명의 진정한 사상과 범위를 벗어나지 않고 다양한 변화가 이루어질 수 있으며 등가물이 치환될 수 있음이 당업자에 의해 이해되어야 한다. 또한, 특정 상황, 물질, 물질의 구성, 과정, 과정 단계 또는 단계들을 본 발명의 목적, 사상 및 범위에 적응시키기 위해 많은 변형이 이루어질 수 있다. 모든 그러한 변형은 본 발명의 범위 이내이다.

**도면**

**도면1**



**도면2**





도면3

