



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월18일
(11) 등록번호 10-2557336
(24) 등록일자 2023년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/69 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/40 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6901 (2017.08)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7009451
(22) 출원일자(국제) 2017년09월13일
심사청구일자 2020년08월25일
(85) 번역문제출일자 2019년04월02일
(65) 공개번호 10-2019-0053206
(43) 공개일자 2019년05월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/051376
(87) 국제공개번호 WO 2018/053010
국제공개일자 2018년03월22일
(30) 우선권주장
62/393,839 2016년09월13일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02005021706 A2

(73) 특허권자
노쓰 캐롤라이나 스테이트 유니버시티
미국 노쓰 캐롤라이나 27606 롤리 메인 캠퍼스 드
라이브 1021 세컨드 플로어 오피스 오브 리서치
커머셜리제이션
(72) 발명자
구, 쟈
미국, 노쓰 캐롤라이나 27502, 아팩스, 브라이어
필드 드라이브 112
왕, 차오
미국, 노쓰 캐롤라이나 27606, 롤리, 킹스 카운티
3035비
(74) 대리인
한인열

전체 청구항 수 : 총 6 항

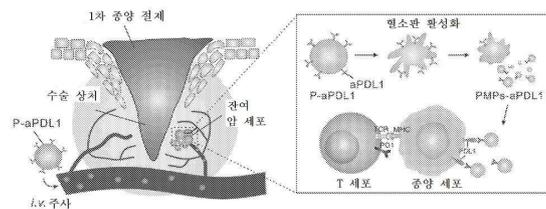
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 혈소판 조성물 및 치료제의 전달 방법

(57) 요약

본 개시내용은 치료제의 표적화된 전달을 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 개시내용은 치료제(예를 들어, 면역치료제)가 로딩된 혈소판을 사용하여 암의 전이 또는 재발을 치료하거나 예방하는 방법을 추가로 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 39/40 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암의 전이 또는 재발을 예방하기 위한 약학 조성물로서,

혈소판 세포;

화학 링커 모이어티; 및

치료제를 포함하되;

상기 치료제는 상기 화학 링커 모이어티를 통해 상기 혈소판 세포에 공유로 연결되고, 상기 치료제는 면역치료제로서 항-PDL1 항체이고, 상기 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커인, 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 혈소판 세포는 인간 혈소판 세포인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혈소판 세포는 자가 혈소판 세포인, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암은 고형 종양인, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 암은 흑색종인, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 암은 유방암인, 약학 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

이 암 전이의 촉진을 유도할 수 있다는 것이 또한 제안되어 있다. 많은 환자는 상당한 이환율 및 사망률을 발생시킬 수 있는 수술 후 재발성 질환을 발생시킨다. 그러므로, 수술 후 암 재발을 예방하기 위한 효과적인 전략을 개발하는 데 막대한 관심이 있다. 이들 중에서, 암 면역치료는 최근에 상당한 관심을 얻었다. 면역치료제는 종양을 직접 공격하지 않지만, 신체의 면역계를 부스팅하여서 암 세포를 사멸시킨다. 면역 관문 봉쇄는 환자의 하위집단에서 영속적인 항종양 반응 및 장기간 관해를 유발하였다. 특히, 관문 저해제는 림프구 상의 예정 세포사 단백질 1(programmed cell death protein 1: PD1) 및 항원 제시 세포(antigen presenting cell: APC) 상의 예정 세포사 1 리간드 1(PDL1)과의 상호작용을 차단하고, 종양 세포는 암의 다양한 유형을 치료하는 데 흥미진진한 결과를 나타냈다. 더구나, 아테졸리주맙인 제1 PD-L1 저해제는 최근에 FDA에 의해 가속 승인을 받았다. 주목할만한 진행에도 불구하고, 관문 봉쇄 치료의 본 방법은 많은 환자에서 치료학적 이익을 제한한다. 임상 실험에서 관찰된 가장 큰 제한은 부작용, 예컨대 자가면역 장애의 중증도일 수 있다. 면역 관문 봉쇄 치료에 의해 치료될 때 등급 3/4 부작용이 때때로 생겼다. 한편, 환자의 많은 비율은 이 물질에 대한 반응에 실패하였다. 암 면역치료의 객관적 반응률(objective response rate: ORR)은 여전히 개선을 요한다. 어떻게 암 면역치료를 증대시키는지의는 암 면역학 및 면역치료의 분야에서 중요 주제 중 하나가 되었다. 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 이들 수요 및 다른 수요를 다룬다.

발명의 내용

- [0006] 본 개시내용은 질환, 예를 들어 암의 치료 및 예방을 위한 혈소판 조성물 및 방법을 제공한다. 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법에서, 치료제(예를 들어, 면역치료제)는 혈소판 세포에 공유로 연결된다. 본 발명자들은 혈소판 세포의 표면에 접합된 면역치료제(예를 들어, 항-PDL1)가 1차 종양의 절제 후 암의 재발을 감소(및/또는 전이를 감소)시킬 수 있다는 것을 발견하였다.
- [0007] 일 양태에서,
- [0008] 혈소판 세포;
- [0009] 화학 링커 모이어티; 및
- [0010] 치료제를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고;
- [0011] 여기서 치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0012] 또 다른 양태에서,
- [0013] 혈소판 세포;
- [0014] 화학 링커 모이어티; 및
- [0015] 치료제를 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 전이 또는 재발을 예방하는 방법이 본 명세서에 제공되고;
- [0016] 여기서 치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0017] 추가의 양태에서,
- [0018] 혈소판 세포;
- [0019] 화학 링커 모이어티; 및
- [0020] 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료제의 표적화된 전달을 위한 방법이 본 명세서에 제공되고;
- [0021] 여기서 치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결되고;
- [0022] 조성물은 혈소판 세포의 활성화를 통해 상처 또는 수술 절제 부위로 표적화된다.
- [0023] 추가적인 양태에서,
- [0024] 혈소판 세포;
- [0025] 화학 링커 모이어티; 및
- [0026] 치료제를 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관 질환

을 치료하거나 예방하는 방법이 본 명세서에 제공되고;

[0027] 여기서 치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.

도면의 간단한 설명

[0028] 본 명세서에 포함되고 이의 일부를 구성하는 첨부된 도면은 하기에 기재된 몇몇 양태를 예시한다.

도 1a 내지 도 1f. 항-PDL1을 갖는 혈소판(P-aPDL1)의 인시츄 활성화는 치료제의 방출을 촉진한다. (도 1a) 혈소판에 의한 1차 종양 절제 부위를 향한 항-PDL1 항체(aPDL1)의 전달의 도식적 예시. (도 1b) 활성화 전(i)에 및 후(ii 및 iii)에 P-aPDL1의 TEM 영상화. 적색 화살표는 혈소판으로부터 방출된 PMP를 나타낸다. 다량의 생성된 PMP 입자는 전자 현미경검사 하에 관찰되었다. 축적 막대, 0.5 μ m. (도 1c) 상이한 시점에 불활성화된 및 활성화된 혈소판으로부터 방출된 aPDL1의 백분율. (도 1d 내지 도 1e) 상이한 시점에 불활성화된 및 활성화된 혈소판으로부터 방출된 TNF- α (f) 및 IL-1 β (도 1g)의 양. (도 1f) 트랜스웰 시스템(기공 크기, 1 μ m)에서 불활성화된 (왼쪽) 및 활성화된 (오른쪽) P-aPDL1과 동시향온처리된 B16 암 세포의 공초점 면역형광 영상. P-aPDL1 및 B16 암 세포를 각각 상부 구획 및 하부 구획에서 배양하였다. 적색 색상은 aPDL1 신호를 나타내고, 청색 및 녹색 형광은 각각 DAPI 및 Alexa fluor 488 접합체 맥아 응집소로부터의 핵 및 혈장 막을 나타낸다. 축적 막대, 20 μ m. 오차 막대는 3중 반복 샘플의 표준 편차(SD)에 기초한다.

도 2a 내지 도 2j. P-aPDL1 치료에 의한 수술 베드에서 재발성 흑색종 종양의 생체내 감소. (도 2a) 주사 후 상이한 시점에 수집된 혈액에서 aPDL1의 수준을 측정함으로써 마우스에서의 P-aPDL1, 유리 aPDL1 및 혈소판+aPDL1 혼합물의 혈액-순환 곡선. 오차 막대는 주사 후 2시간에 P-aPDL1 또는 유리 aPDL1의 동등한 용량의 *i.v.* 주사 후 마우스의 3중 반복 샘플(n=3)(도 2b) 형광 영상화(aPDL1-Cy5.5)의 표준 편차(SD)에 기초한다. (도 2c) P-aPDL1 또는 유리 aPDL1의 *i.v.* 주사 후 2시간에 잔여 종양을 갖는 상처의 생체외 영상화. (도 2d) (c)에 도시된 마우스의 상이한 상처에서의 평균 aPDL1-Cy5.5 형광성 신호 강도. 오차 막대는 3중 반복 샘플의 평균 (s.e.m.)의 표준 오차에 기초한다. (도 2e) (b)에 도시된 바와 같은 마우스로부터 취한 잔여 종양 슬라이스의 공초점 영상, 여기서 청색 및 적색은 각각 DAPI 및 Cy5.5로부터의 핵 및 aPDL1 신호를 나타낸다. 축적 막대, 20 μ m. (도 2f) 불완전한 수술 종양 모델의 치료를 위한 P-aPDL1 치료의 도식적 예시. (도 2g) 1차 종양의 제거 후 상이한 그룹의 B16F10 종양의 생체내 생물발광 영상화. 치료 그룹마다 3마리의 대표적인 마우스가 도시되어 있다. (도 2h) 표시된 다양한 치료 후 마우스의 상이한 그룹의 정량화된 종양 신호. (도 2i 내지 도 2j) 치료된 및 대조군 마우스의 종양 성장 곡선(i) 및 생존 곡선(j). 생존 연구에 대해 치료 그룹마다 8마리의 마우스가 도시되어 있다. 오차 막대는 평균 (s.e.m.)의 표준 오차에 기초한다. P 값: *, $P < 0.05$.

도 3a 내지 도 3h. P-aPDL1은 튼튼한 T 세포 매개된 항종양 면역 반응을 촉발하였다. (도 3a) 잔여 종양의 면역형광은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 침윤을 보여주었다. 축적 막대, 50 μ m. (도 3b) 종양 중량 및 (도 3c) 종양의 그램당 CD3+ 세포의 절대 수. 오차 막대는 평균 (s.e.m.)(n=4)의 표준 오차에 기초한다. (도 3d) 전체 CD3+ 세포의 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 백분율, 및 표시된 바대로 치료된 마우스의 잔여 종양에서의 대표적인 점도표. 모든 4개의 사분면에서 더 높은 세포 집단은 종양 부위에서 훨씬 더 많은 CD3+ 종양 침윤 림프구를 나타냈다. (도 3e) 전체 CD3+ 세포의 CD4+Foxp3+ T 세포의 백분율, 및 표시된 바대로 치료된 마우스의 잔여 종양에서의 대표적인 점도표. (도 3f) 다양한 치료 시 종양의 그램당 CD8+ 세포의 절대 수. (도 3g 내지 도 3h) 다양한 치료 시 잔여 종양에서 조절 T 세포에 대한 종양 침윤 CD8+ T 세포 및 효과적인 CD4+ T 세포의 비율. 오차 막대는 평균 (s.e.m.)(n=4)의 표준 오차에 기초한다. 통계 유의성은 터키(Tukey) 후시험을 이용하여 1방향 ANOVA에 의해 계산되었다. P 값: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$.

도 4a 내지 도 4f. P-aPDL1 치료는 국부 재발성 흑색종 종양 및 전이성 질환의 성장에 영향을 미쳤다. (도 4a) 마우스의 불완전한 수술 및 전이성 종양 모델의 치료에 대한 P-aPDL1 치료의 도식적 예시. (도 4b) 상이한 시점에 1차 종양의 제거 후 상이한 그룹의 B16F10 전이의 생체내 생물발광 영상화. 치료 그룹마다 3마리의 대표적인 마우스가 도시되어 있다. 표시된 상이한 치료 후 마우스로부터 수집된 (도 4c) 대표적인 폐 사진 및 (도 4d) H&E 염색된 폐 슬라이스. 검정 화살표는 폐에서의 전이성 종양을 나타낸다. 축적 막대, 500 μ m. (도 4e) 상이한 치료에 의한 마우스에 대한 폐 전이 결절의 정량화. 결과는 평균 \pm SEM(n=3)으로 제시된다. (도 4f) 치료된 및 대조군 마우스에 대한 생존 곡선. 생존 연구에 대해 치료 그룹마다 8마리의 마우스가 도시되어 있다. P 값: *, $P < 0.05$.

도 5a 내지 도 5e. 수술 후 4T1 재발성 암을 치료하기 위한 P-aPDL1. (도 5a) 상이한 시점에 1차 종양의 제거

후 상이한 그룹의 4T1 전이의 생체내 생물발광 영상화. (도 5b) 수술 후 2주에 대표적인 마우스 사진. 검정 화살표는 수술 베드에서의 재발성 종양을 나타낸다. (도 5c) 표시된 상이한 치료 후 마우스로부터 수집된 대표적인 폐 사진. 적색 화살표는 폐에서의 종양 결절을 나타낸다. (도 5d) 상이한 치료에 의한 마우스에 대한 폐 전이 결절의 정량화. 결과는 평균 \pm SEM(n=3)으로 제시된다. (도 5e) 치료된 및 대조군 마우스에 대한 생존 곡선. 생존 연구에 대해 각각의 치료 그룹마다 8마리의 마우스가 도시되어 있다. P 값: *, $P < 0.05$.

도 6. aPDL1 커플링된 혈소판의 공초점 면역형광 영상. FITC 접합된 2차 항체는 혈소판 상의 영상 aPDL1을 검출 하도록 사용되었다. 축적 막대, 20 μ m.

도 7. aPDL1 커플링된 혈소판의 유세포분석법 검정. 혈소판을 상이한 실험 환경 하에 aPDL1과 항온처리하고, FITC인 염소 항-래트 IgG(H+L) 2차 항체를 사용하여 유세포분석법에 의해 분석하였다. 혈소판의 표면 상의 aPDL1의 성공적인 부착은 설프하이드릴 및 말레이미드 결합을 통해 검증되었다.

도 8a 내지 도 8c. aPDL1 커플링된 혈소판의 접합 및 안정성. (도 8a) aPDL1의 다양한 양을 접합을 위해 혈소판에 첨가하였다. 혈소판에 대한 aPDL1 접합(첨가된 aPDL1/접합된 aPDL1)의 효율은 혈소판마다 0.2pg의 aPDL1이 첨가될 때 약 75%이었다. (도 8b) aPDL1 변형 후 혈소판의 안정성. P-aPDL1의 수는 0시간 및 24시간에 혈소판 수 분석에 기초하여 측정되었다. (도 8c) 시간에 걸친 혈소판에 대한 aPDL1의 안정성. 오차 막대는 3중 반복 샘플(n=6)의 표준 편차(SD)에 기초한다.

도 9. 나이브 및 aPDL1 접합된 혈소판에 대한 표면 단백질 발현(CD62P 및 CD40L은 활성화 후 조사되었다).

도 10a 내지 도 10b. 활성화 후 P-aPDL1의 투과 전자 현미경검사(TEM). (도 10a) 활성화된 혈소판으로부터 떨어진 혈소판 마이크로입자(PMP). (도 10b) 다수의 PMP는 P-aPDL1 활성화 후 TEM 하에 발견될 수 있다. 크기 막대, 도 10a에서의 100nm 및 도 10b에서의 2 μ m.

도 11. 활성화 후 P-aPDL1의 면역형광 영상화. 혈소판은 칼세인에 의해 로딩되고, 녹색 형광에 의해 가시화되었다. aPDL1은 Cy3 염소 항-래트 IgG 2차 항체에 의해 표지되고, 적색 형광에 의해 가시화되었다. 흰색 화살표는 혈소판으로부터 방출된 PMP를 나타낸다.

도 12a 내지 도 12b. 트랜스웰 시스템에서 P-aPDL1과 동시항온처리된 B16 암 세포의 공초점 면역형광 영상. (도 12a) 트랜스웰 시스템의 도식. P-aPDL1 및 B16 암 세포를 각각 상부 구획 및 하부 구획에서 배양하였다. (도 12b) 트랜스웰 시스템(기공 크기, 1 μ m)에서 불활성화된 및 활성화된 P-aPDL1과 동시항온처리된 B16 암 세포의 공초점 면역형광 영상. 적색 (Cy3) 형광은 aPDL1 신호를 나타내고, 청색 (DAPI) 및 녹색 (Alexa Fluor(등록상표) 488) 형광은 각각 핵 및 세포 막으로부터의 신호를 나타낸다. 축적 막대, 20 μ m.

도 13a 내지 도 13c. 마우스에서의 aPDL1 커플링된 혈소판의 생물분포. (도 13a) 유리 Cy5.5-aPDL1 및 P-aPDL1-Cy5.5의 형광 스펙트럼. Cy5.5의 강도는 aPDL1이 혈소판에 접합한 후 유의미하게 영향을 받는 것으로 발견되지 않았다. (도 13b) P-aPDL1 및 유리 aPDL1의 i.v. 주사 후 2시간에 마우스의 상이한 기관에서의 생체외 Cy5.5-aPDL1 형광 영상화. L: 간, Lu: 폐, Sp: 비장, H: 심장, K: 신장. (도 13c) (b)에 도시된 마우스의 상이한 기관에서의 평균 Cy5.5 형광 신호 강도. 각각의 치료 그룹마다 3마리의 마우스가 도시되어 있다. 결과는 평균 \pm SD로 제시된다. 통계 유의성은 t-시험에 의해 계산되었다. P 값: ***, $P < 0.005$.

도 14a 내지 도 14b. 잔여 종양 슬라이스의 공초점 영상. (도 14a) 잔여 종양 슬라이스의 공초점 영상, 여기서 청색 및 적색은 DAPI 및 Cy5.5로부터의 핵 및 aPDL1 신호를 나타낸다. (도 14b) (a)의 P-aPDL1에서의 잔여 종양 슬라이스의 높은 확대 영상. 흰색 화살표는 혈소판으로부터 방출된 PMP 및 aPDL1을 나타낸다.

도 15. 마우스 꼬리 가로절단 출혈 모델에서의 지혈 효과. 통계 유의성은 t-시험에 의해 계산되었다. n.s., 무의미. 오차 막대는 3중 반복 샘플(n=10)의 표준 편차(SD)에 기초한다.

도 16a 내지 도 16d. 치료 후 마우스의 사이토카인 수준. 표시된 치료 후 마우스의 (도 16a) 국부 및 (도 16b) 전신 사이토카인 수준. PD-L1 분석의 (도 16c) 대표적인 유세포분석 분석 영상 및 (도 16d) 면역형광 영상(상부, 혈소판 부재; 하부, 혈소판 존재). (CD11b+ GFP-에서 게이팅된 대식세포, GFP+, CD45-에서 게이팅된 종양 세포, CD20+ GFP-에서 게이팅된 B 세포 및 CD11c+ GFP-에서 게이팅된 DC). 오차 막대는 3중 반복 샘플의 s.e.m.에 기초한다. 통계 유의성은 터키 후시험을 이용하여 1방향 ANOVA에 의해 계산되었다. P 값: *, $P < 0.05$, n.s., 무의미.

- 도 17. 잔여 종양의 면역형광은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 침윤을 보여주었다. 축적 막대, 50 μ m.
- 도 18. 표시된 상이한 치료에 의한 Ki67을 발현하는 CD8+, CD4+Foxp3 및 CD4+Foxp3+ T 세포의 백분율. 통계 유의성은 터키 후시험을 이용하여 1방향 ANOVA에 의해 계산되었다. P 값: *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.005.
- 도 19a 내지 도 19c. 1차 종양의 제거 후 PMP-aPDL1 및 높은 용량의 aPDL1의 항종양 효율. (도 19a) 1차 종양의 제거 후 상이한 그룹의 B16F10 종양의 생체내 생물발광 영상화. (도 19b) 표시된 다양한 치료 후 마우스의 상이한 그룹의 종양 성장 곡선. (도 19c) 표시된 다양한 치료 후 60일에 마우스의 생존 곡선. 각각의 치료 그룹마다 5마리의 마우스가 도시되어 있다.
- 도 20. 폐 조직의 형광 영상화. 청색 및 녹색 형광은 각각 DAPI 및 GFP 암 세포로부터의 핵을 나타낸다. 축적 막대, 100 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 개시내용은 질환, 예를 들어 암의 치료 및 예방을 위한 혈소판 조성물 및 방법을 제공한다. 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법에서, 치료제(예를 들어, 면역치료제)는 혈소판 세포에 공유로 연결된다. 본 발명자들은 혈소판 세포의 표면에 접합된 면역치료제(예를 들어, 항-PDL1)가 1차 종양의 절제 후 암의 재발을 감소(및/또는 전이를 감소)시킨다는 것을 발견하였다.
- [0030] 본 발명의 실시형태에 참고가 이제 이루어질 수 있고, 이의 예는 도면 및 실시예에 예시되어 있다. 그러나, 본 발명은 많은 상이한 형태로 구현될 수 있고, 본 명세서에 기재된 실시형태를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0031] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 당해 분야의 당업자에게 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "포함하는" 및 이의 변형어는 용어 "함유하는" 및 이의 변형어와 동의어로 사용되고, 개방적인 비제한적인 용어이다. 용어 "포함하는" 및 "함유하는"이 다양한 실시형태를 기재하도록 본 명세서에 사용되지만, 용어 "본질적으로 이루어진" 및 "이루어진"은 더 구체적인 실시형태를 제공하도록 "포함하는" 및 "함유하는" 대신에 사용될 수 있고, 또한 개시되어 있다.
- [0032] **전문용어**
- [0033] 본 명세서 및 청구항에 사용된 바대로, 단수 형태 "일", "하나" 및 "이"는 문맥이 명확히 달리 기재하지 않는 한, 복수 지시어를 포함한다. 예를 들어, 용어 "하나의 세포"는 이들의 혼합물을 포함하는 복수의 세포를 포함한다.
- [0034] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "일 수 있다", "선택적으로" 및 "선택적으로 일 수 있다"는 상호 교환되어 사용되고, 조건이 발생하는 경우 및 조건이 발생하지 않는 경우를 포함하도록 의도된다. 따라서, 예를 들어 제제가 "부형제를 포함할 수 있다"는 진술은 제제가 부형제를 포함하는 경우, 및 제제가 부형제를 포함하지 않는 경우를 포함하도록 의도된다.
- [0035] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "유리한 물질" 및 "활성제"는 유리한 생물학적 효과를 갖는 화학 화합물 또는 조성물을 의미하도록 본 명세서에서 상호 교환되어 사용된다. 유리한 생물학적 효과는 치료학적 효과, 즉 장애 또는 다른 바람직하지 않은 생리학적 병태의 치료, 및 예방학적 효과, 즉 장애 또는 다른 바람직하지 않은 생리학적 병태(예를 들어, 암)의 예방 둘 다를 포함한다. 상기 용어는 또한 본 명세서에 구체적으로 언급된 유리한 물질의 약제학적으로 허용 가능한, 약물학적으로 활성인 유도체, 예를 들어 염, 에스터, 아마이드, 프로드럭, 활성 대사물질, 이성질체, 단편, 유사체 등(이들로 제한되지는 않음)을 포함한다. 용어 "유리한 물질" 또는 "활성제"가 사용될 때, 이후, 또는 특정한 물질이 구체적으로 확인될 때, 상기 용어가 물질 자체, 및 약제학적으로 허용 가능한, 약물학적으로 활성인 염, 에스터, 아마이드, 프로드럭, 접합체, 활성 대사물질, 이성질체, 단편, 유사체 등을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0036] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 대상체의 "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애, 또는 질환 또는 장애의 증상의 예방, 치유, 힐링, 완화, 경감, 변경, 교정, 개선, 향상, 안정화 또는 영향을 미침의 목적으로 대상체에 대한 약물의 투여를 포함한다. 용어 "치료하는" 및 "치료"는 증상의 증증도 및/또는 빈도의 감소, 증상 및/또는 이의 기초하는 원인의 제거, 증상 및/또는 이의 기초하는 원인의 발생의 예방, 및 손상의 개선 또는 교정을 또한 의미할 수 있다.

- [0037] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "대상체에서 장애 또는 원치않는 생리학적 사건을 "예방하는"은 구체적으로 증상 및/또는 이의 기초하는 원인의 발생의 예방을 의미하고, 여기서 대상체는 장애 또는 사건에 대한 강조된 감수성을 나타내거나 나타내지 않을 수 있다.
- [0038] 용어 "치료제의 "유효량"이란 원하는 효과를 제공하기에 유리한 물질의 비독성이지만 충분한 양이 의도된다. "효과적인" 유리한 물질의 양은 대상체의 연령 및 일반 컨디션, 특정한 유리한 물질 또는 물질들 등에 따라 대상체마다 변할 것이다. 따라서, 항상 정확한 "유효량"을 기재할 수 없다. 그러나, 임의의 해당 사례에서의 적절한 "효과적인" 양은 일상적인 실험을 이용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 또한, 본 명세서에 사용된 바와 같은, 구체적으로 달리 기재하지 않는 한, 유리한 물질의 "유효량"은 또한 치료학적 유효량 및 예방학적 유효량 둘 다를 포괄하는 양을 의미할 수 있다.
- [0039] 치료학적 효과를 달성하는 데 필요한 약물의 "유효량"은 인자, 예컨대 대상체의 연령, 성별 및 체중에 따라 변할 수 있다. 투약량 섭생은 최적 치료학적 반응을 제공하도록 조정 가능할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 분할 용량은 매일 투여될 수 있거나, 용량은 치료학적 상황의 응급상황에 의해 표시된 바대로 비례하여 감소할 수 있다.
- [0040] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 치료제의 "치료학적 유효량"은 원하는 치료학적 결과를 달성하기에 효과적인 양을 의미하고, 치료제의 "예방학적 유효량"은 원치 않는 생리학적 병태를 예방하기에 효과적인 양을 의미한다. 소정의 치료제의 치료학적 유효량 및 예방학적 유효량은 통상적으로 치료되는 장애 또는 질환의 유형 및 중증도, 대상체의 연령, 성별 및 체중과 같은 인자와 관련하여 변할 것이다.
- [0041] 용어 "치료학적 유효량"은 또한 원하는 치료학적 효과를 촉진하기에 효과적인 치료제의 양, 또는 치료제의 전달의 속도(예를 들어, 시간에 걸친 양)를 의미할 수 있다. 정확한 원하는 치료학적 효과는 치료되는 병태, 대상체의 관용성, 투여되는 약물 및/또는 약물 제제(예를 들어, 치료제(약물)의 효력, 제제 내의 약물의 농도 등), 및 당업자에 의해 이해되는 다양한 다른 인자에 따라 변할 것이다.
- [0042] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "약제학적으로 허용 가능한" 성분은 생물학적으로 또는 달리 바람직한 성분을 의미할 수 있고, 즉 성분은, 임의의 상당한 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하지 않거나 이것이 함유된 제제의 임의의 다른 성분과 해로운 방식으로 상호작용하지 않으면서, 본 발명의 약제학적 제제로 혼입되고, 본 명세서에 기재된 바대로 대상체에게 투여될 수 있다. 용어 "약제학적으로 허용 가능한"이 부형제를 의미하도록 사용될 때, 성분이 독성학적 및 제조 시험의 필요한 표준을 충족시킨다는 것 또는 이것이 미국 식약청에 의해 준비된 비활성 성분 가이드에 포함된다는 것이 일반적으로 나타난다.
- [0043] 또한, 본 명세서에 사용된 바와 같은, "약물학적으로 활성인" 유도체 또는 유사체에서처럼, 용어 "약물학적으로 활성인"(또는 단순히 "활성인")은 모 화합물과 동일한 유형의 약물학적 활성을 갖고 정도가 대략 균등한 유도체 또는 유사체(예를 들어, 염, 에스터, 아마이드, 접합체, 대사물질, 이성질체, 단편 등)를 의미할 수 있다.
- [0044] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "혼합물"은 혼합물의 성분이 완전히 혼화성인 용액, 및 혼합물의 성분이 완전히 혼화성이 아닌 현탁액 및 에멀션을 포함할 수 있다.
- [0045] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "대상체"는 살아 있는 유기체, 예컨대 포유류, 예를 들어 인간, 가축, 개, 고양이 및 다른 포유류(이들로 제한되지는 않음)를 의미할 수 있다. 치료제의 투여는 투약량에서 및 대상체의 치료에 효과적인 시간의 기간 동안 수행될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 시스템의 약동학적 프로파일은 수컷 및 암컷 대상체에 대해 유사하다.
- [0046] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 구절 "병용 투여", "조합된 투여", "동시 투여" 또는 "동시에 투여된다"는 화합물이 동일한 시점에 또는 서로 직후에 투여된다는 것을 의미한다. 후자의 경우에, 2종의 화합물은 화합물이 동일한 시점에 투여될 때 달성되는 것으로부터 관찰된 결과가 구별 불가능한 충분히 가까운 시간에 투여된다.
- [0047] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "항체" 또는 "항체들"은 다이설파이드 결합에 의해 상호연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)인 4개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 면역글로불린 분자를 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "항체" 또는 "항체들"은 당해 분야에 공지된 바와 같은 재조합 기술에 의해 생성된 재조합 항체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. "항체" 또는 "항체들"은 포유류 종, 예컨대 인간, 비인간 영장류(예를 들어, 인간, 예컨대 침팬지, 개코, 레서스 또는 사이노몰거스 원숭이), 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼 또는 기니아 피그), 염소, 소 또는 말 종; 또는 조류 종, 예컨대 닭 항체 또는 어류 종, 예컨대 상어 항체 기원을 포함하는 임의의 기원일 수 있다. "항체" 또는 "항체들"은 임의의 아이소유형의 항체, 예를 들어 인간 아이소유형 IgA₁, IgA₂, IgD, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgG₄, IgE 및 IgM 및 이의 변형된 변이체를 포함한

다. 본 명세서에서 항체는 관심 대상의 "항원"에 대항하여 지향된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩타이드이고, 질환 또는 장애를 겪는 포유류에 대한 항체의 투여는 그 포유류에서 치료학적 이익을 발생시킬 수 있다. 그러나, 비폴리펩타이드 항원에 대항하여 지향된 항체가 또한 고려된다.

[0048] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "항체 단편" 또는 "항체 단편들"은 하나 이상의 도메인 또는 하나 이상의 아미노산이 결합된 천연 발생 항체를 의미한다. 통상적으로, 항체 단편은 이러한 천연 발생 항체의 전체 항원 결합 또는 이의 가변 영역을 함유한다. 항체 단편의 예는 Fc 부분이 결합된 임의의 항체를 포함한다. 항체 단편의 예는 또한 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 및 scFv 단편; 다이아바디; 트라이아바디; 테트라바디; 미니바디; 본질적으로 단일, 2개 또는 3개의 면역글로불린 도메인(들)으로 이루어진 항체, 예컨대 Domain antibodies(상표명); 단쇄 항체; 임의의 상기의 이중특이적, 삼중특이적, 사중특이적 또는 다중특이적 변이체를 포함한다.

[0049] **조성물**

- [0050] 일 양태에서,
- [0051] 혈소판 세포;
- [0052] 화학 링커 모이어티; 및
- [0053] 치료제를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고;
- [0054] 여기서 치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0055] 일 실시형태에서, 치료제는 면역치료제이다. 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-PDL1 항체, 항-PD1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-CD47 항체, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-PDL1 항체이다.
- [0056] 일 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커, PEG 링커, PAS실화 및 HES실화로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커이다.
- [0057] 일 실시형태에서, 혈소판 세포는 인간 혈소판 세포이다. 일 실시형태에서, 혈소판 세포는 자가 혈소판 세포이다.
- [0058] 일 실시형태에서,
- [0059] 혈소판 세포;
- [0060] 화학 링커 모이어티; 및
- [0061] 면역치료제를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고;
- [0062] 여기서 면역치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0063] 일 실시형태에서,
- [0064] 혈소판 세포;
- [0065] 화학 링커 모이어티; 및
- [0066] 항-PDL1 항체를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고;
- [0067] 여기서 항-PDL1 항체는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0068] 일 실시형태에서,
- [0069] 혈소판 세포;
- [0070] 말레이미드 링커; 및
- [0071] 면역치료제를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고;
- [0072] 여기서 면역치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0073] 일 실시형태에서,
- [0074] 혈소판 세포;

- [0075] 말레이미드 링커; 및
- [0076] 항-PDL1 항체를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고;
- [0077] 여기서 항-PDL1 항체는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0078] 치료학적 유효량의 하나 이상의 개시된 혈소판 조성물 및 억제학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 억제학적 조성물이 개시되어 있다. 본 명세서에 제공된 조성물의 투여에 적합한 억제학적 담체는 특정한 투여 방식에 적합한 것으로 당업자에게 공지된 임의의 이러한 담체를 포함한다. 또한, 상기 조성물은 억제학적 조성물 중의 유일한 억제학적으로 활성 성분으로서 제제화될 수 있거나, 다른 활성 성분과 조합될 수 있다.
- [0079] 본 명세서에 기재된 바와 같은, 활성 화합물(예를 들어, 혈소판 세포에 접합된 면역치료제) 및 몇몇 종류의 부형제를 포함하는 조성물은 다양한 분야에서 유용할 수 있다.
- [0080] "부형제"는 원하는 특정한 투약량 형태에 적합한 바대로 임의의 및 모든 용매, 희석제 또는 다른 액체 비히클, 분산 또는 현탁 조제, 표면 활성제, 등장화제, 점증제 또는 유화제, 보존제, 고체 결합제, 활택제 등을 포함한다. 제제 및/또는 제조에서의 일반 고려사항은 예를 들어 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), 및 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2005)]에서 발견될 수 있다. 억제학적으로 허용 가능한 부형제는 또한 하나 이상의 필러, 결합제, 활택제, 유동화제, 붕괴제 등을 포함할 수 있다.
- [0081] 예시적인 부형제는 임의의 비독성, 불활성 고체, 반고체 또는 액체 필러, 희석제, 캡슐화 재료 또는 임의의 유형의 제제 보조를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 부형제로서 작용할 수 있는 재료의 몇몇 예는 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말화 트라카칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유; 홍화유; 참깨유; 올리브유; 옥수수유 및 대두유; 글라이콜, 예컨대 프로필렌 글라이콜; 에스터, 예컨대 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 세제, 예컨대 Tween 80; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 발열원 비함유 물; 등장성 식염수; 링거액; 에틸 알코올; 및 인산염 완충 용액, 및 다른 비독성 상용성 활택제, 예컨대 라우릴 황산 나트륨 및 스테아르산마그네슘, 및 착색제, 방출제, 코팅제, 감미료, 향료 및 향수 물질을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않고, 보존제 및 항산화제는 또한 제형학자의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 것처럼, 부형제는 조성물이 유용한 것에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 억제학적 조성물에 의해, 부형제의 선택은 투여 방식, 전달된 물질, 물질의 전달의 시간 과정 등에 따라 달라질 것이고, 경구로, 직장으로, 비경구로, 낭내로, 질내로, 비강으로, 복강내로, 국소로(분말, 크림, 연고, 또는 드롭으로서), 협측으로, 또는 경구 또는 비강 스프레이로서 인간 및/또는 동물에게 투여될 수 있다. 특정한 실시형태에서, 조성물은 중앙의 절제 부위에서 또는 그 근처에서 주사된다.
- [0082] 예시적인 희석제는 탄산칼슘, 탄산나트륨, 인산칼슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 인산수소칼슘, 인산나트륨 락토스, 수크로스, 셀룰로스, 미결정질 셀룰로스, 카올린, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 염화나트륨, 건조 전분, 옥수수 전분, 분말화 당 등, 및 이들의 조합물을 포함한다.
- [0083] 예시적인 과립화제 및/또는 분산제는 감자 전분, 옥수수 전분, 타피오카 전분, 나트륨 전분 글라이콜레이트, 점토, 알긴산, 구아 검, 시트러스 펄프, 한천, 벤토나이트, 셀룰로스 및 목재 제품, 천연 스펀지, 양이온 교환 수지, 탄산칼슘, 실리케이트, 탄산나트륨, 가교결합된 폴리(비닐-피롤리돈)(크로스포비돈), 나트륨 카복시메틸 전분(나트륨 전분 글라이콜레이트), 카복시메틸 셀룰로스, 가교결합된 나트륨 카복시메틸 셀룰로스(크로스카르멜로스), 메틸셀룰로스, 전호화 전분(전분 1500), 미결정질 전분, 수불용성 전분, 칼슘 카복시메틸 셀룰로스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트(비검(Veegum)), 라우릴 황산 나트륨, 4차 암모늄 화합물 등, 및 이들의 조합물을 포함한다.
- [0084] 예시적인 표면 활성제 및/또는 유화제는 천연 유화제(예를 들어, 아카시아, 한천, 알긴산, 알긴산나트륨, 트라카칸트, 콘드릭스(chondrux), 콜레스테롤, 잔탄, 펙틴, 젤라틴, 난황, 카제인, 양모지, 콜레스테롤, 왁스, 및 레시틴), 콜로이드성 점토(예를 들어, 벤토나이트[알루미늄 실리케이트] 및 비검[마그네슘 알루미늄 실리케이트]), 장쇄 아미노산 유도체, 고분자량 알코올(예를 들어, 스테아릴 알코올, 세틸 알코올, 올레일 알코올, 트라이아세틴 모노스테아레이트, 에틸렌 글라이콜 디스테아레이트, 글라이세릴 모노스테아레이트 및 프로필렌 글라이콜 모노스테아레이트, 폴리비닐 알코올), 카보머(예를 들어, 카복시 폴리메틸렌, 폴리아크릴산, 아

크릴산 중합체 및 카복시비닐 중합체), 카라기난, 셀룰로스 유도체(예를 들어, 카복시메틸셀룰로스 나트륨, 분말화 셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스), 소르비탄 지방산 에스터(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트[Tween 20], 폴리옥시에틸렌 소르비탄[Tween 60], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트[Tween 80], 소르비탄 모노팔미테이트[Span 40], 소르비탄 모노스테아레이트[Span 60], 소르비탄 트라이스테아레이트[Span 65], 글라이세릴 모노올레에이트, 소르비탄 모노올레에이트[Span 80]), 폴리옥시에틸렌 에스터(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트[Myrj 45], 폴리옥시에틸렌 수소화된 캐스터유, 폴리에톡실화 캐스터유, 폴리옥시메틸렌 스테아레이트 및 Solutol), 수크로스 지방산 에스터, 폴리에틸렌 글라이콜 지방산 에스터(예를 들어, Cremophor), 폴리옥시에틸렌 에터, (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 라우릴 에터[Brij 30]), 폴리(비닐-피롤리돈), 다이에틸렌 글라이콜 모노라우레이트, 트라이에탄올아민 올레에이트, 나트륨 올레에이트, 칼륨 올레에이트, 에틸 올레에이트, 올레산, 에틸 라우레이트, 라우릴 황산 나트륨, Pluronic F 68, 폴록사머 188, 세트리모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 두코세이트 나트륨 등 및/또는 이들의 조합물을 포함한다.

[0085] 예시적인 결합제는 전분(예를 들어, 옥수수 전분 및 전분 페이스트), 젤라틴, 당(예를 들어, 수크로스, 글루코스, 텍스트로스, 텍스트린, 몰라세, 락토스, 락티톨, 만니톨 등), 천연 및 합성 검(예를 들어, 아카시아, 알긴산나트륨, 아이리쉬 모스(Irish moss)의 추출물, 판와르 검(panwar gum), 가티 검, 이사폴 겹껍질(isapol husk)의 겹껍질, 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 하이드록시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 미결정질 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 폴리(비닐-피롤리돈), 마그네슘 알루미늄 실리케이트(비검) 및 낙엽송 아라보갈락탄), 알기네이트, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리에틸렌 글라이콜, 무기 칼슘염, 규산, 폴리메타크릴레이트, 왁스, 물, 알코올 등, 및/또는 이들의 조합물을 포함한다.

[0086] 예시적인 보존제는 항산화제, 킬레이트화제, 항균성 보존제, 항진균성 보존제, 알코올 보존제, 산성 보존제 및 다른 보존제를 포함한다.

[0087] 예시적인 항산화제는 알파 토코페롤, 아스코르브산, 아코르빌 팔미테이트, 뷰틸화 하이드록시아니솔, 뷰틸화 하이드록시톨루엔, 모노티오글라이세롤, 칼륨 메타설파이트, 프로피온산, 프로필 갈레이트, 아스코르브산나트륨, 아황산수소나트륨, 메타아황산수소나트륨 및 아황산나트륨을 포함한다.

[0088] 예시적인 킬레이트화제는 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA) 및 이의 염 및 수화물(예를 들어, 나트륨 에데테이트, 이나트륨 에데테이트, 트라이나트륨 에데테이트, 칼슘 이나트륨 에데테이트, 다이칼륨 에데테이트 등), 시트르산 및 이의 염 및 수화물(예를 들어, 시트르산 일수화물), 푸마르산 및 이의 염 및 수화물, 말산 및 이의 염 및 수화물, 인산 및 이의 염 및 수화물, 및 타르타르산 및 이의 염 및 수화물을 포함한다. 예시적인 항균성 보존제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤질 알코올, 브로노폴, 세트리마이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크레솔, 클로르옥실렌올, 크레솔, 에틸 알코올, 글라이신, 헥세티딘, 이미드우레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알코올, 페닐질산수은, 프로필렌 글라이콜, 및 티메로살을 포함한다.

[0089] 예시적인 항진균성 보존제는 뷰틸 파라벤, 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산, 하이드록시벤조산, 칼륨 벤조에이트, 칼륨 소르베이트, 나트륨 벤조에이트, 나트륨 프로피오네이트 및 소르브산을 포함한다.

[0090] 예시적인 알코올 보존제는 에탄올, 폴리에틸렌 글라이콜, 페놀, 페놀성 화합물, 비스페놀, 클로로부탄올, 하이드록시벤조에이트 및 페닐에틸 알코올을 포함한다.

[0091] 예시적인 산성 보존제는 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E, 베타-카로텐, 시트르산, 아세트산, 테하이드로아세트산, 아스코르브산, 소르브산 및 피트산을 포함한다.

[0092] 다른 보존제는 토코페롤, 토코페롤 아세테이트, 데테록심 메실레이트, 세트라마이드, 뷰틸화 하이드록시아니솔(BHA), 뷰틸화 하이드록시톨루엔화(BHT), 에틸렌다이아민, 라우릴 황산 나트륨(SLS), 라우릴 에터 황산 나트륨(SLES), 아황산수소나트륨, 메타아황산수소나트륨, 아황산칼륨, 메타아황산칼륨, Glydant Plus, Phenonip, 메틸 파라벤, Germall 115, Germaben II, Neolone, Kathon 및 Euxyl을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 보존제는 항산화제이다. 다른 실시형태에서, 보존제는 킬레이트화제이다.

[0093] 예시적인 완충제는 시트레이트 완충 용액, 아세테이트 완충 용액, 인산염 완충 용액, 염화암모늄, 탄산칼슘, 염화칼슘, 시트르산칼슘, 글루비오산칼슘, 칼슘 글루셉테이트, 글루콘산칼슘, D-글루콘산, 칼슘 글라이세로포스페이트, 칼슘 락톤, 프로판산, 레블린산칼슘, 펜탄산, 이염기성 인산칼슘, 인산, 삼염기성 인산칼슘, 칼슘 하이드록사이드 포스페이트, 아세트산칼륨, 염화칼륨, 글루콘산칼륨, 칼륨 혼합물, 이염기성 인산칼륨, 일염기성 인산

칼륨, 인산칼륨 혼합물, 아세트산나트륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 시트르산나트륨, 나트륨 락톤, 이염기성 인산나트륨, 일염기성 인산나트륨, 인산나트륨 혼합물, 트로메타민, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄, 알긴산, 발열원 비함유 물, 등장성 식염수, 링거액, 에틸 알코올 등, 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0094] 예시적인 활택제는 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산, 실리카, 탈크, 맥아, 글라이세릴 베헤네이트, 수소화된 식물성 오일, 폴리에틸렌 글라이콜, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 류신, 라우릴 황산 마그네슘, 라우릴 황산 나트륨 등, 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0095] 예시적인 천연 오일은 아몬드, 아프리카트 커널, 아보카도, 바바수, 버가못, 블랙 커런트 시드, 보리지, 케이드, 캐모마일, 캐놀라, 캐러웨이, 카나우바, 캐스터, 시나몬, 코코아 버터, 코코넛, 간유, 커피, 옥수수, 목화씨, 예뮬, 유칼립투스, 달맞이꽃, 어류, 아마씨, 게라니올, 박(gourd), 포도씨, 헤이즐넛, 히습, 아이소프로필 미리스테이트, 호호바, 쿠쿠이넛, 라반딘, 라벤더, 레몬, 메이창(litsea cubeba), 마카다미아 너트, 아욱, 망고씨, 매도우썬씨, 밍크, 넉맥, 올리브, 오렌지, 오렌지 러피, 팜, 팜핵, 복숭아씨, 땅콩, 양귀비씨, 호박씨, 유채, 쌀겨, 로즈마리, 잇꽃, 샌달우드, 사스쿠아나(sasquana), 세이보리, 산자나무, 참깨, 시어 버터, 실리콘, 대두, 해바라기, 티트리, 영경귀, 츠바키(tsubaki), 베티버, 호두나무 및 맥아 오일을 포함한다. 예시적인 합성 오일은 뷰틸 스테아레이트, 카프릴릭 트라이글라이세라이드, 카프릭 트라이글라이세라이드, 사이클로메티콘, 다이에틸 세바케이트, 다이메티콘 360, 아이소프로필 미리스테이트, 광유, 옥틸도데칸올, 올레일 알코올, 실리콘 오일, 및 이들의 조합물을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0096] 추가적으로, 조성물은 중합체를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 예시적인 중합체는 셀룰로스 중합체 및 공중합체, 예를 들어 셀룰로스 에터, 예컨대 메틸셀룰로스(MC), 하이드록시에틸셀룰로스(HEC), 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC), 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스(HPMC), 메틸하이드록시에틸셀룰로스(MHEC), 메틸하이드록시프로필셀룰로스(MHPC), 카복시메틸 셀룰로스(CMC) 및 이의 다양한 염, 예를 들어 나트륨염, 하이드록시에틸카복시메틸셀룰로스(HECMC) 및 이의 다양한 염, 카복시메틸하이드록시에틸셀룰로스(CMHEC) 및 이의 다양한 염, 다른 다당류 및 다당류 유도체, 예컨대 전분, 텍스트란, 텍스트란 유도체, 키토산, 및 알긴산 및 이의 다양한 염, 카라기난, 다양한 검, 예를 들어 잔탄검, 구아검, 아라비아검, 카라야검, 가티검, 곤약 및 트라가칸트검, 글라이코사미노글라이킨 및 프로테오글라이킨, 예컨대 히알루론산 및 이의 염, 단백질, 예컨대 젤라틴, 콜라겐, 알부민, 및 피브린, 다른 중합체, 예를 들어 폴리하이드록시산, 예컨대 폴리락타이드, 폴리글라이콜라이드, 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드) 및 폴리(.엡실론.-카프로락톤-코-글라이콜라이드)-, 카복시비닐 중합체 및 이의 염(예를 들어, 카보머), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리아크릴산 및 이의 염, 폴리아크릴아마이드, 폴리아크릴산/아크릴아마이드 공중합체, 폴리알킬렌 옥사이드, 예컨대 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드, 폴리(에틸렌 옥사이드-프로필렌 옥사이드), 및 Pluronic 중합체, 폴리옥시에틸렌(폴리에틸렌 글라이콜), 폴리언하이드라이드, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌아민 및 폴리피리딘, 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 중합체, 예컨대 폐길화된 지질(예를 들어, PEG-스테아레이트, 1,2-다이스테아로일-sn-글라이세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글라이콜)-1000], 1,2-다이스테아로일-sn-글라이세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글라이콜)-2000], 및 1,2-다이스테아로일-sn-글라이세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글라이콜)-5000]), 공중합체 및 이의 염을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0097] 추가적으로, 조성물은 유화제를 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 유화제는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG), 폴리프로필렌 글라이콜, 폴리비닐 알코올, 폴리-N-비닐 피롤리돈 및 이들의 공중합체, 폴록사머 비이온성 계면활성제, 천연 수용성 다당류(예를 들어, 텍스트란, 피콜(Ficoll), 셀룰로스), 비양이온성 폴리(메트)아크릴레이트, 비양이온성 폴리아크릴레이트, 예컨대 폴리(메트)아크릴산, 및 이의 에스터 아마이드 및 하이드록시알킬 아마이드, 천연 유화제(예를 들어, 아카시아, 한천, 알긴산, 알긴산나트륨, 트라가칸트, 콘드릭스, 콜레스테롤, 잔탄, 펙틴, 젤라틴, 난황, 카제인, 양모지, 콜레스테롤, 왁스, 및 레시틴), 콜로이드성 점토(예를 들어, 벤토나이트[알루미늄 실리케이트] 및 비검[마그네슘 알루미늄 실리케이트]), 장쇄 아미노산 유도체, 고분자량 알코올(예를 들어, 스테아릴 알코올, 세틸 알코올, 올레일 알코올, 트리아세틴 모노스테아레이트, 에틸렌 글라이콜 다이스테아레이트, 글라이세릴 모노스테아레이트 및 프로필렌 글라이콜 모노스테아레이트, 폴리비닐 알코올), 카보머(예를 들어, 카복시 폴리메틸렌, 폴리아크릴산, 아크릴산 중합체 및 카복시비닐 중합체), 카라기난, 셀룰로스 유도체(예를 들어, 카복시메틸셀룰로스 나트륨, 분말화 셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스), 소르비탄 지방산 에스터(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트[Tween 20], 폴리옥시에틸렌 소르비탄[Tween 60], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트[Tween 80], 소르비탄 모노팔미테이트[Span 40], 소르비탄 모노스테아레이트[Span 60], 소르비탄 트라이스테아레이트[Span 65], 글라이세릴 모노올레이트, 소르비탄 모노올레이트[Span 80]), 폴리옥시에틸렌 에스터

(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트[Myrj 45], 폴리옥시에틸렌 수소화된 캐스터유, 폴리에톡실화 캐스터유, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트 및 Solutol), 수크로스 지방산 에스터, 폴리에틸렌 글라이콜 지방산 에스터(예를 들어, Cremophor), 폴리옥시에틸렌 에터, (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 라우릴 에터[Brij 30]), 폴리(비닐-피롤리돈), 다이에틸렌 글라이콜 모노라우레이트, 트라이에탄올아민 올레에이트, 나트륨 올레에이트, 칼륨 올레에이트, 에틸 올레에이트, 올레산, 에틸 라우레이트, 라우릴 황산 나트륨, Pluronic F 68, 폴록사머 188, 세트리모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 두코세이트 나트륨 등 및/또는 이들의 조합물을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 소정의 실시형태에서, 유화제는 콜레스테롤이다.

[0098] 액체 조성물은 에멀션, 마이크로에멀션, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 화합물(예를 들어, 혈소판 세포에 접합된 면역치료제)(혈소판 세포에 접합된 면역치료제) 이외에, 액체 조성물은 당해 분야에서 흔히 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알코올, 아이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글라이콜, 1,3-부틸렌 글라이콜, 다이메틸폼아마이드, 오일(특히, 면실유, 땅콩, 옥수수유, 배아, 올리브유, 캐스터유 및 땅콩유), 글라이세롤, 테트라하이드로푸르피릴 알코올, 소르비탄의 폴리에틸렌 글라이콜 및 지방산 에스터, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 또한 애주버트, 예컨대 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미료, 향료 및 향수 물질 등을 포함할 수 있다.

[0099] 주사용 조성물, 예를 들어 주사용 수성 또는 유성 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 공지된 분야에 따라 제제화될 수 있다. 무균 주사용 제제는 또한 예를 들어 1,3-부탄다이올 중의 용액으로서 비독성의 비경구로 허용 가능한 희석제 또는 용매 중의 주사용 용액, 현탁액 또는 에멀션일 수 있다. 사용될 수 있는 약제학적 또는 화장품용 조성물에 대한 허용 가능한 비히클 및 용매 중에서 물, 링거액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 무균의 고정유는 편리하게는 용매 또는 현탁 매질로서 사용된다. 합성 모노- 또는 다이글라이세라이드를 포함하는 임의의 완화성 고정유를 사용할 수 있다. 또한, 주사제의 제조에서 지방산, 예컨대 올레산을 사용한다. 소정의 실시형태에서, 입자는 1%(w/v) 나트륨 카복시메틸 셀룰로스 및 0.1%(v/v) Tween 80을 포함하는 캐리어 유체 중에 현탁된다. 주사용 조성물은 예를 들어 박테리아 보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 전에 무균 물 또는 다른 무균 주사용 매질 중에 용해되거나 분산될 수 있는 무균 고체 조성물의 형태의 무균화제를 혼입함으로써 무균화될 수 있다.

[0100] 몇몇 실시형태에서, 조성물 또는 치료제(예를 들어, 본 명세서에 개시된 조성물과 조합되어 주어진 추가적인 치료제)는 고체 조성물로 투여될 수 있다. 고체 조성물은 캡슐, 정제, 환제, 분말 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 조성물에서, 입자는 적어도 하나의 부형제 및/또는 a) 필러 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산, b) 결합제, 예컨대 카복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리딘, 수크로스 및 아카시아 등, c) 습윤제, 예컨대 글라이세롤, d) 붕괴제, 예컨대 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 소정의 실리카이트 및 탄산나트륨, e) 용해 지연제, 예컨대 파라핀, f) 흡수 가속제, 예컨대 4차 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예컨대 세틸 알코올 및 글라이세롤 모노스테아레이트 등, h) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토, 및 i) 활택제, 예컨대 탈크, 칼슘 스테아레이트, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글라이콜, 라우릴 황산 나트륨, 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우에, 투약량 형태는 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토스 또는 유당, 및 고분자량 폴리에틸렌 글라이콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질 충전된 젤라틴 캡슐에서 필러로서 사용될 수 있다.

[0101] 정제, 캡슐, 환제 및 과립은 코팅 및 셸, 예컨대 장용 코팅 및 약제학적 제제화 분야에서 널리 공지된 다른 코팅에 의해 제조될 수 있다. 이들은 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있고, 또한 선택적으로 지연된 방식으로 오직 또는 우선적으로 장관의 소정의 부분에서 활성 성분(들)을 방출하는 조성일 수 있다. 사용될 수 있는 임베딩 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다.

[0102] 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토스 또는 유당, 및 고분자량 폴리에틸렌 글라이콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질 충전된 젤라틴 캡슐에서 필러로서 사용될 수 있다.

[0103] 국소 또는 경피 투여를 위한 조성물은 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치를 포함한다. 활성 화합물(예를 들어, 혈소판 세포에 접합된 면역치료제)은 부형제와 혼합되고, 임의의 필요한 보존제 또는 완충제가 필요할 수 있다.

[0104] 연고, 페이스트, 크림 및 겔은, 활성 화합물(예를 들어, 혈소판 세포에 접합된 면역치료제) 이외에, 부형제, 예컨대 동물 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글라이콜, 실

리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

- [0105] 분말 및 스프레이는, 활성 화합물/조성물 이외에, 부형제, 예컨대 락토스, 탈크, 규산, 수산화알루미늄, 규산칼슘, 및 폴리아마이드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이는 관례적인 압축가스, 예컨대 클로로플루오로하이드로카본을 추가적으로 함유할 수 있다.
- [0106] 경피 패치는 신체로의 화합물의 제어된 전달을 제공하는 것의 부가 이점을 갖는다. 이러한 투여형은 나노입자를 적절한 매질 중에 용해시키거나 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 흡수 증대제는 피부를 통한 화합물의 플럭스를 증가시키도록 또한 사용될 수 있다. 속도는 속도 제어 막을 제공함으로써 또는 입자를 중합체 매트릭스 또는 겔 중에 분산시킴으로써 제어될 수 있다.
- [0107] 몇몇 실시형태에서, 치료제는 나노입자 중에 캡슐화될 수 있다. 일 실시형태에서,
- [0108] 혈소판 세포;
- [0109] 화학 링커 모이어티; 및
- [0110] 치료제를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고;
- [0111] 여기서 치료제는 나노입자 내에 캡슐화된다.
- [0112] 몇몇 실시형태에서, 나노입자는 화학 링커 모이어티를 통해 공유로 연결된다. 몇몇 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 선택적이고, 나노입자는 혈소판 세포에 공유로 연결되지 않는다.
- [0113] 나노입자는 하나 이상의 중합체로부터 제조될 수 있다. 몇몇 예에서, 중합체는 폴리카복실산 또는 이의 염, 카복실산 무수물(예를 들어, 말레산 무수물)과 다른 단량체(예를 들어, 메틸(메트)아크릴레이트, 아크릴산 등)의 공중합체, 친수성 비닐 중합체, 예컨대 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈(PVP), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리(비닐 피롤리돈-코-비닐 아세테이트), 폴리메타크릴레이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 에터, 폴리옥시에틸렌 캐스터유, 폴리카프로락탐, 폴리락트산, 폴리글라이콜산, 폴리(락트산-글라이콜산), 폴리(락트산-코-글라이콜산)(PLGA), 셀룰로스 유도체, 예컨대 하이드록시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필셀룰로스 등을 포함한다. 일 예에서, 중합체는 50:50 PLGA 공중합체이다. 다른 예에서, 중합체는 천연 중합체, 예컨대 키토산, 콜라겐, 알기네이트, 젤라틴, 히알루론산, 및 이의 비독성 금속염을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 중합체는 하이드로겔, 예를 들어 알기네이트 하이드로겔이다. 친수성 중합체 및 다른 비히클은 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있고, 증대된 구조 통합성은 부분 결정화, 이온 결합, 가교결합 등에 의해 비히클에 부여될 수 있다.
- [0114] 입자로 약물 또는 치료제를 캡슐화하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 흔한 캡슐화 기법은 분무 건조, 계면 중합, 핫 멜트 캡슐화, 상 분리 캡슐화(자발적인 에멀전 마이크로캡슐화, 용매 증발 마이크로캡슐화 및 용매 제거 마이크로캡슐화), 코아세르베이션, 저온 마이크로구 형성 및 상 반전 나노캡슐화(phase inversion nanoencapsulation: PIN)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 이 방법의 간단한 요약은 하기에 제시된다.
- [0115] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물 중에 혼입된 나노입자는 다중 벽 나노입자이다. 본 명세서에 개시된 조성물에서 유용한 다중 벽 나노입자는 예를 들어 "순차적인 상 반전 나노캡슐화"(sPIN)를 이용하여 제조될 수 있다.
- [0116] 1. 분무 건조
- [0117] 분무 건조 기법을 이용하여 마이크로구/나노구를 형성하는 방법은 미국 특허 제6,620,617호(Mathiowitz 등)에 기재되어 있다. 이 방법에서, 중합체는 유기 용매, 예컨대 메틸렌 클로라이드 또는 물 중에 용해된다. 입자에 혼입되는 하나 이상의 활성제의 공지된 양은 중합체 용액 중에 (불용성 활성제의 경우에) 현탁되거나 (가용성 활성제의 경우에) 동시용해된다. 용액 또는 분산액은 압축 가스의 흐름에 의해 추진된 미분화 노즐을 통해 펌핑되고, 생성된 에어로졸은 공기의 가열된 사이클론 중에 현탁되어서, 용매가 마이크로액적으로부터 증발되게 하여서 입자를 형성한다. 0.1 내지 10마이크론의 범위의 마이크로구/나노구는 이 방법을 이용하여 얻어질 수 있다.
- [0118] 2. 계면 중합
- [0119] 계면 중합은 또한 하나 이상의 활성제를 캡슐화하도록 사용될 수 있다. 이 방법을 이용하여, 단량체 및 활성제(들)는 용매 중에 용해된다. 제2 단량체는 제1 용매와 혼화성인 제2 용매(통상적으로 수성) 중에 용해된다. 예

멸선은 제2 용액 중에 교반을 통해 제1 용액을 현탁시킴으로써 형성된다. 에멀션이 안정화되면, 개시제는 에멀션의 각각의 액적의 계면에서 계면 중합을 일으키는 수상에 첨가된다.

[0120] 3. 핫 멜트 마이크로캡슐화

[0121] 마이크로구는 문헌[Mathiowitz et al., Reactive Polymers, 6:275 (1987)]에 기재된 바대로 핫 멜트 마이크로캡슐화 방법을 이용하여 중합체, 예컨대 폴리에스터 및 폴리엔하이드라이드로부터 형성될 수 있다. 이 방법에서, 3 내지 75,000달톤의 분자량을 갖는 중합체의 사용이 바람직하다. 이 방법에서, 중합체는 처음에 용융되고, 이후 50마이크론 미만으로 체질된 혼입되는 하나 이상의 활성제의 고체 입자와 혼합된다. 혼합물은 비혼화성 용매(실리콘 오일과 같음) 중에 현탁되고, 연속 교반에 의해, 중합체의 용점의 5°C 초과로 가열된다. 에멀션이 안정화되면, 중합체 입자가 고화될 때까지 이것은 냉각된다. 생성된 마이크로구는 자유 유동 분말을 생성하도록 석유 에터에 의한 경사여과에 의해 세척된다.

[0122] 4. 상 분리 마이크로캡슐화

[0123] 상 분리 마이크로캡슐화 기법에서, 중합체 용액은 선택적으로 캡슐화되는 하나 이상의 활성제의 존재 하에 교반된다. 교반을 통해 재료를 균일하게 현탁시키기를 계속하면서, 중합체에 대한 비용매는 중합체의 용해도를 감소시키도록 용액에 천천히 첨가된다. 용매 및 비용매 중의 중합체의 용해도에 따라, 중합체는 침전하거나 중합체 농후 및 중합체 희박 상으로 상 분리한다. 적절한 조건 하에, 중합체 농후 상 중의 중합체는 연속 상과의 계면으로 이동하여서, 외부 중합체 셀에 의해 액적에서 활성제(들)를 캡슐화한다.

[0124] in. 자발적인 에멀션 마이크로캡슐화

[0125] 자발적인 유화는 온도의 변화, 용매의 증발 또는 화학 가교결합제의 첨가에 의해 상기로부터 유화된 액체 중합체 액적을 고화시킴을 수반한다. 봉합제의 물리 및 화학 특성, 및 초기의 입자로 선택적으로 혼입된 하나 이상의 활성제의 특성은 캡슐화의 적합한 방법을 기재한다. 소수화도, 분자량, 화학 안정성 및 열 안정성과 같은 인자는 캡슐화에 영향을 미친다.

[0126] ii. 용매 증발 마이크로캡슐화

[0127] 용매 증발 기법을 이용한 마이크로구를 형성하는 방법은 문헌[E. Mathiowitz et al., J. Scanning Microscopy, 4:329 (1990); L. R. Beck et al., Fertil. Steril., 31:545 (1979); L. R. Beck et al Am J Obstet Gynecol 135(3) (1979); S. Benita et al., J. Pharm. Sci., 73:1721 (1984)]; 및 미국 특허 제3,960,757호(Morishita 등)에 기재되어 있다. 중합체는 휘발성 유기 용매, 예컨대 메틸렌 클로라이드 중에 용해된다. 혼입되는 하나 이상의 활성제는 용액에 선택적으로 첨가되고, 혼합물은 표면 활성제, 예컨대 폴리(비닐 알코올)을 함유하는 수성 용액 중에 현탁된다. 생성된 에멀션은 대부분의 유기 용매가 증발되어서 고체 마이크로구/나노구가 남을 때까지 교반된다. 이 방법은 비교적 안정한 중합체, 예컨대 폴리에스터 및 폴리스타이렌에 유용하다. 그러나, 불안정한 중합체, 예컨대 폴리엔하이드라이드는 물의 존재로 인해 제작 공정 동안 분해할 수 있다. 이 중합체에 대해, 완전히 무수인 유기 용매 중에 수행된 하기 방법 중 몇몇은 더 유용하다.

[0128] iii. 용매 제거 마이크로캡슐화

[0129] 용매 제거 마이크로캡슐화 기법은 폴리엔하이드라이드에 대해 주로 설계되고, 예를 들어 WO 93/21906호(Brown University Research Foundation)에 기재되어 있다. 이 방법에서, 혼입되는 물질은 휘발성 유기 용매, 예컨대 메틸렌 클로라이드 중에 선택된 중합체의 용액 중에 분산되거나 용해된다. 이 혼합물은 에멀션을 형성하도록 유기 오일, 예컨대 실리콘 오일 중에 교반함으로써 현탁된다. 1 내지 300마이크론의 범위인 마이크로구는 이 절차에 의해 얻어질 수 있다. 마이크로구로 혼입될 수 있는 물질은 의약품, 살충제, 영양제, 조영제 및 금속 화합물을 포함한다.

[0130] 5. 코아세르베이션

[0131] 코아세르베이션 기법을 이용한 다양한 물질에 대한 캡슐화 절차는 당해 분야에서, 예를 들어 제GB-B-929 406호; 제GB-B-929 401호; 및 미국 특허 제3,266,987호, 제4,794,000호 및 제4,460,563호에 공지되어 있다. 코아세르베이션은 2개의 혼화성 액상으로서의 거대분자 용액의 분리를 수반한다. 1개의 상은 높은 농도의 중합체 봉합제(및 선택적으로 하나 이상의 활성제)를 함유하는 진한 코아세르베이트 상인 한편, 제2 상은 낮은 농도의 중합체를 함유한다. 진한 코아세르베이트 상 내에, 중합체 봉합제는 나노스케일 또는 마이크로스케일 액적을 형성한다. 코아세르베이션은 온도 변화, 비용매의 첨가 또는 마이크로염의 첨가(단순한 코아세르베이션), 또는

중합체간 복합체를 형성하는 또 다른 중합체의 첨가(복잡한 코아세르베이션)에 의해 유도될 수 있다.

[0132]

6. 마이크로구의 저온 캐스팅

[0133]

서방형 마이크로구의 매우 낮은 온도의 캐스팅을 위한 방법은 미국 특허 제5,019,400호(Gombotz 등)에 기재되어 있다. 이 방법에서, 중합체는 선택적으로 하나 이상의 용해되거나 분산된 활성화제와 용매 중에 용해된다. 이후, 혼합물은 중합체 액적을 냉동시키는 중합체-물질 용액의 어는점보다 낮은 온도에서 액체 비용매를 함유하는 용기로 분무화된다. 중합체에 대한 비용매 및 액적이 가운되면서, 액적 중의 용매는 해동하고 비용매로 추출되어서, 마이크로구의 경화를 생성시킨다.

[0134]

7. 상 반전 나노캡슐화(PIN)

[0135]

나노입자는 또한 상 반전 나노캡슐화(PIN) 방법을 이용하여 형성될 수 있고, 여기서 중합체는 "우수한" 용매 중에 용해되고, 혼합되는 물질의 미세한 입자, 예컨대 약물은 중합체 용액 중에 혼합되거나 용해되고, 혼합물은 중합체에 대한 강한 비용매에 부어져서 양호한 조건 하에 중합체 마이크로구를 자발적으로 생성하고, 여기서 중합체는 입자에 의해 코팅되거나 입자는 중합체 중에 분산된다. 예를 들어, 미국 특허 제6,143,211호(Mathiowitz 등)를 참조한다. 상기 방법은 광범위한 크기, 예를 들어 약 100나노미터 내지 약 10마이크론 등의 나노입자 및 마이크로입자의 단분산성 집단을 생성하도록 이용될 수 있다.

[0136]

유리하게는, 예멸선은 침전 전에 형성될 필요는 없다. 공정은 열가소성 중합체로부터 마이크로구를 형성하도록 이용될 수 있다.

[0137]

8. 순차적인 상 반전 나노캡슐화(sPIN)

[0138]

다중 벽의 나노입자는 또한 본 명세서에서 "순차적인 상 반전 나노캡슐화"(sPIN)이라 칭하는 공정에 의해 형성될 수 있다. sPIN은 특히 나노입자의 단분산성 집단을 형성하기에 적합하여서, 나노입자의 단분산성 집단을 달성하도록 추가적인 분리 단계의 필요를 피한다.

[0139]

sPIN에서, 코어 중합체는 제1 용매 중에 용해된다. 활성화제는 코어 중합체 용매 중에 용해되거나 분산된다. 코어 중합체, 코어 중합체 용매 및 캡슐화되는 물질은 코어 중합체 용매가 연속 상인 연속 상을 갖는 혼합물을 형성한다. 셸 중합체는 코어 중합체에 대해 비용매인 셸 중합체 용매 중에 용해된다. 코어 중합체 및 셸 중합체의 용액은 함께 혼합된다. 셸 중합체 용매의 존재로 인한 이의 운점에서의 코어 중합체의 용해도의 이에 따른 감소는 코어 중합체의 우선적인 상 분리 및, 선택적으로, 물질의 캡슐화를 발생시킨다. 코어 중합체 및 셸 중합체에 대한 비용매가 이의 불안정한 혼합물에 첨가될 때, 셸 중합체는 이중 벽의 나노입자를 형성하도록 상 반전이 완료되면서 코어 중합체를 에워싼다.

[0140]

sPIN은 거의 자발적이고 용매의 유희를 필요로 하지 않는 다중 벽의 입자, 예컨대 이중 벽의 나노입자의 제제에 대한 1단계 절차를 제공한다. 다중 벽의 입자를 형성하는 방법은 미국 공보 제2012-0009267호(Cho 등)(이의 개시내용은 본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시되어 있다.

[0141]

입자는 덴드리머 입자일 수 있다. 덴드리머는 중심 코어에 대한 분지된 분자의 층 또는 셸의 연속 첨가에 의해 성장한 3차원 중합체이다. 덴드리머는 선형 중합체에 비해 몇몇 이점을 가지는데, 왜냐하면 이것은 제어 가능한 구조, 분자량의 분포보다는 단일 분자량 및 다수의 제어 가능한 표면 기능성, 및 소정의 크기가 달성되면 구형 구성을 채택하려는 성향을 갖기 때문이다. 이것은 단분산성, 나무 유사 및/또는 세대간 구조 중합체 구조를 생성하도록 고도로 분지된 단량체를 함께 반응시킴으로써 제조된다. 개별 덴드리머는 중심 코어 분자로 이루어지고, 수지상 웨지(wedge)는 각각의 기능성 부위에 부착된다. 덴드리머 표면 층은 제제 동안 사용된 어셈블리 단량체에 따라 위에 배치된 다양한 작용기를 가질 수 있다. 일반적으로, 덴드리머 작용기는 개별 덴드리머 유형의 특성을 기재한다. 이의 설계의 결과로서, 덴드리머 코어는 널찍하고, 코어, 셸, 및 특히 표면 층의 화학 특성을 변형시킴으로써, 이의 물리적 특성은 미세하게 조율될 수 있다. 조율 가능한 특성은 용해도, 독성, 면역원성 및 생물부착 능력을 포함한다.

[0142]

폴리아미도아민, 폴리프로필렌아민, 폴리아릴에터 및 폴리에틸렌아민은 생물약학 분야에 조사된 덴드리머의 예이다. 폴리아미도아민 덴드리머는 에틸렌디아민 코어 및 아미도아민 반복 분지 구조에 기초한다. 이것은 다양한 잘 한정된 분자량으로 합성될 수 있다. 이의 크기 및 표면 작용기(1차 아민)는 단량체 단위의 다수의 제어된 반복 첨가에 의해 한정되어서 상이한 절반의 또는 전체의 생성을 발생시킨다. 이들은 수용성이고, 이들은 단분산성인 덴드리머의 유일한 종류인 것으로 보고되어 있다. 게다가, 이들은 분자의 표면에 제한된 높은 전하 밀도를 보여준다.

- [0143] 덴드리머는 덴드리머 내의 캐비티에 약물을 포획함으로써, 또는 약물 분자를 표면에 공유로 연결함으로써 치료학적 화합물에 대한 캐리어로서 사용된다. 이것은 문헌[Svenson, S., Eur J Pharm Biopharm (2009) 71:445-462 및 Cheng, Y., J. Pharm. Sci. (2007) 97:123-143]에 검토되어 있다. 덴드리머 캐비티 내의 포획은 소분자로 제한되고, 공유 부착 접근법은 이제까지는 작은 약물이 덴드리머 표면으로부터 가수분해로 또는 효소로 절단되는 시스템으로 제한된다.
- [0144] **방법**
- [0145] 일 양태에서,
- [0146] 혈소판 세포;
- [0147] 화학 링커 모이어티; 및
- [0148] 치료제를 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 전이 또는 재발을 예방하는 방법이 본 명세서에 개시되어 있고;
- [0149] 여기서 치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0150] 일 실시형태에서, 치료제는 면역치료제이다. 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-PDL1 항체, 항-PD1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-CD47 항체, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-PDL1 항체이다.
- [0151] 일 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커, PEG 링커, PAS실화 및 HES실화로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커이다.
- [0152] 일 실시형태에서, 혈소판 세포는 인간 혈소판 세포이다. 일 실시형태에서, 혈소판 세포는 자가 혈소판 세포이다.
- [0153] 일 실시형태에서, 암은 고형 종양이다. 일 실시형태에서, 암은 흑색종이다. 일 실시형태에서, 암은 유방암이다. 일 실시형태에서, 조성물은 추가적인 치료제와 조합되어 투여된다. 일 실시형태에서, 추가적인 치료제는 항신생물제이다.
- [0154] 일 양태에서,
- [0155] 혈소판 세포;
- [0156] 화학 링커 모이어티; 및
- [0157] 치료제를 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하거나 예방하는 방법이 본 명세서에 개시되어 있고;
- [0158] 여기서 치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0159] 추가의 양태에서,
- [0160] 혈소판 세포;
- [0161] 화학 링커 모이어티; 및
- [0162] 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료제의 표적화된 전달을 위한 방법이 본 명세서에 개시되어 있고;
- [0163] 여기서 치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결되고;
- [0164] 조성물은 혈소판 세포의 활성화를 통해 상처 또는 수술 절제 부위로 표적화된다.
- [0165] 일 실시형태에서, 상기 방법은 혈소판 세포의 활성화 시 상처 또는 절제 부위에서 혈소판 유래 마이크로입자에서 추가로 방출되는 치료제를 제공한다.
- [0166] 일 실시형태에서, 치료제는 면역치료제이다. 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-PDL1 항체, 항-PD1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-CD47 항체, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-PDL1 항체이다.
- [0167] 일 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커, PEG 링커, PAS실화 및 HES실화로부터 선택된다. 일

실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커이다.

[0168] 일 실시형태에서, 혈소판 세포는 인간 혈소판 세포이다. 일 실시형태에서, 혈소판 세포는 자가 혈소판 세포이다.

[0169] **암 및 고형 종양**

[0170] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 혈소판 조성물 및 방법은 암의 전이 또는 재발을 치료하거나 예방하기에 유용하다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 혈소판 조성물 및 방법은 절제된 고형 종양의 재발의 예방에 유용하다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 절제된 고형 종양의 전이의 예방에 유용하다. 또 다른 실시형태에서, 예방되는 암 재발은 흑색종이다. 또 다른 실시형태에서, 예방되는 암 재발은 유방암이다. 추가의 실시형태에서, 예방되는 암 재발은 전립선암이다.

[0171] 일 양태에서, 본 명세서에 기재된 방법은 기타 중에서 고형 종양 재발 또는 전이, 예를 들어 흑색종, 폐암(폐선암, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 거대 세포 암종, 기관지폐포 암종, 기관지성 암종, 비소세포 암종, 소세포 암종, 악성중피종 포함); 유방암(관 암종, 소엽 암종, 염증성 유방암, 투명 세포 암종, 점액소 암종, 장막강 유방암종 포함); 결장직장암(결장암, 직장암, 결장직장 선암); 항문암; 췌장암(췌장 선암, 소도 세포 암종, 신경내분비 종양 포함); 전립선암; 전립선 선암; 난소암종(난소 상피 암종 또는 표면 상피-기질 종양, 예를 들어 장액성 종양, 자궁내막양 종양 및 점액소 낭선암종, 성근기질 종양); 간 및 담도 암종(간세포 암종, 담관암종, 혈관종 포함); 식도 암종(식도 선암 및 편평 세포 암종 포함); 경구 및 구강인두 편평 세포 암종; 침샘 선암; 방광암; 방광 암종; 자궁의 암종(자궁내막 선암, 눈, 자궁 유두상 장액성 암종, 자궁 투명 세포 암종, 자궁 육종, 평활근육종, 혼합된 빌러 종양 포함); 신경교종, 신경교아종, 수모세포종 및 뇌의 다른 종양; 신장암(신장 세포 암종, 투명 세포 암종, 윌름스 종양 포함); 두경부암(편평 세포 암종 포함); 위의 암(위암, 위 선암, 위장관 기질 종양); 고환암; 생식 세포 종양; 신경내분비 종양; 자궁경부암; 위장관, 유방 및 다른 기관의 암양종; 인환 세포 암종; 중간엽 종양, 예를 들어 육종, 섬유육종, 혈관종, 혈관종종, 혈관주위세포종, 가성 혈관종 기질 과형성, 근섬유모세포종, 섬유종종, 염증성 근섬유모세포 종양, 지방종, 혈관지방종, 과립 세포 종양, 신경섬유종, 신경초종, 혈관육종, 지방육종, 횡문근육종, 골육종, 평활근종, 평활근육종, 피부, 예를 들어 흑색종, 자궁경부, 망막모세포종, 두경부암, 췌장, 뇌, 갑상선, 고환, 신장, 방광, 연조직, 부신, 요도, 음경의 암, 점액육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 악성 섬유성 조직구종, 림프관육종, 악성중피종, 편평 세포 암종; 표피 암종, 악성 피부 부속기 종양, 선암, 간세포암, 간세포 암종, 신장 세포 암종, 부신종, 담관암종, 전이성 세포 암종, 용모암, 정상피종, 배아 세포 암종, 역형성 신경교종; 다형성 신경교아종, 신경모세포종, 수모세포종, 악성 뇌수막종, 악성 신경초종, 신경섬유육종, 부갑상선 암종, 갑상선의 수질 암종, 기관지 암양종, 갈색세포종, 소도 세포 암종, 악성 암양종, 악성 부신경절종, 흑색종, 메르켈 세포 신생물, 엽상 낭육종, 침샘암, 흉선 암종 및 질의 암을 예방하는 데 사용된다.

[0172] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 혈소판 조성물 및 방법은 암을 치료하거나 예방하는 데 유용하다. 몇몇 경우에, 암은 순환 암 세포(순환 종양 세포)이다. 몇몇 경우에, 암은 전이성 암 세포이다.

[0173] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 혈소판 조성물은 생체내 순환 종양 세포(CTC)를 제거하거나 감소시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 혈소판 조성물은 종양 전이를 상당히 저해할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 혈소판 조성물은 (예를 들어, 고형 종양의 절제 후) 암의 재발을 상당히 저해할 수 있다.

[0174] **혈소판**

[0175] 혈소판은 거핵구로부터 방출된 무핵화 세포 단편이고, 지혈에서 이의 기능에 대해 최고로 공지되어 있다. 순환 혈소판의 평균 수명은 8일 내지 9일이고, 이는 정맥내로 주사된 치료제의 약동학을 크게 개선할 수 있다. 더구나, 수혈된 혈소판은 수술 상처의 부위로 이동할 수 있고, 여기서 잔여 종양은 수술 후 생존할 수 있다. 다른 측에서, 1차 종양으로부터 맥관구조로 떨어져 전이를 발생시키는 혈소판이 순환 종양 세포(CTC)를 인식하고 이것과 상호작용하는 능력을 가진다는 것을 증거가 나타낸다. 이의 내인성 상처 및 CTC 속성 특성 이외에, 혈소판은 많은 염증성 병태를 개시시키고 개선하는 면역 "세포"로서 또한 생각될 수 있다.

[0176] 몇몇 경우에, 혈소판 조성물은 자가이고, 즉 대상체로부터 얻은 혈소판으로부터 생성된다. 몇몇 경우에, 혈소판 조성물은 이종이고, 즉 치료되는 대상체 이외의 소스로부터 얻은 혈소판으로부터 생성된다.

[0177] 몇몇 실시형태에서, 전체 혈소판 세포는 치료제에 접합될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 치료제는 혈소판 유래 마이크로입자에서 전달될 수 있다. 혈소판 유래 마이크로입자(PMPS)는 혈소판 활성화 시 혈장 막으로부터 유래

하고; 활성화된 혈소판은 부착 분자 및 케모카인을 보유하는 PMP를 방출하여서, PMP 침착의 부위에서 단핵구 트랩을 촉진한다. 이 PMP는 (예를 들어, 트롬빈에 의해) 혈소판의 활성화 이후에 혈소판으로부터 방출된다.

[0178] **치료제**

[0179] 일 실시형태에서, 링커를 통해 혈소판에 접합되는 치료제는 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 항체, 항체 단편, 핵산 또는 치료학적 약물(예를 들어, 소분자)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0180] 일 실시형태에서, 치료제는 면역치료제이다. 일 실시형태에서, 치료제는 항체 또는 항체 단편이다. 몇몇 실시형태에서, 치료제는 항신생물제이다. 몇몇 실시형태에서, 혈소판 조성물은 혈관 질환을 치료하기 위한 치료제의 전달을 표적화할 수 있다.

[0181] **면역치료제**

[0182] 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-PDL1 항체, 항-PD1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-CD47 항체, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0183] 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-PDL1 항체이다. 일 실시형태에서, 항-PDL1 항체는 아테졸리주맙, 데르발루맙 또는 아벨루맙으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 항-PDL1 항체는 아테졸리주맙(MPD3280A)(Roche)이다. 일 실시형태에서, 항-PDL1 항체는 데르발루맙(MEDI4736)이다. 일 실시형태에서, 항-PDL1 항체는 아벨루맙(MS0010718C)이다.

[0184] 일 실시형태에서, 면역치료제는 예정 사멸 단백질 1(PD-1) 저해제 또는 예정 사멸 단백질 리간드 1 또는 2 저해제이다. PD-1 저해제는 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 니볼루맙(BMS), 펌브롤리주맙(Merck), 피딜리주맙(CureTech/Teva), AMP-244(Amplimmune/GSK), BMS-936559(BMS) 및 MEDI4736(Roche/Genentech)을 포함한다.

[0185] 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-PD1 항체이다. 일 실시형태에서, 항-PD1 항체는 니볼루맙이다. 일 실시형태에서, 항-PD1 항체는 펌브롤리주맙이다.

[0186] 일 실시형태에서, 면역치료제는 항-CTLA4 항체이다. 일 실시형태에서, 항-CTLA4 항체는 이필리무맙이다.

[0187] 몇몇 실시형태에서, 면역치료제는 추가적인 치료제와 조합되어 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 면역치료제는 항신생물제와 조합되어 투여된다.

[0188] **항신생물제**

[0189] 몇몇 실시형태에서, 치료제는 항신생물제이다. 예를 들어, 항신생물제는 아비라테론 아세테이트, 아비트렉세이트(Abitrexate)(메토틱렉세이트), 아브락산(Abraxane)(파클리탁셀 알부민 안정화된 나노입자 제제), ABVD, ABVE, ABVE-PC, AC, AC-T, 아드세트리스(Adcetris)(브렌톡시맙 베도틴), ADE, 아도-트라스투주맙 엠탄신, 아드리아마이신(Adriamycin)(독소루비신 하이드로클로라이드), 아드루실(Adrucil)(플루오로우라실), 아파티닙 다이말레에이트, 아피니토(Afinitor)(에버롤리무스), 아킨지오(Akynzeo)(네투피탄트 및 팔로노세트론 하이드로클로라이드), 알다라(Aldara)(이미퀴모드), 알테스류긴, 알렘투주맙, 알림타(Alimta)(페메트렉세드 이나트륨), 엘록사이(Aloxi)(팔로노세트론 하이드로클로라이드), 암보클로린(Ambochlorin)(클로로암부실), 암보클로린(Ambochlorin)(클로로암부실), 아미노레블린산, 아나스트로졸, 아프레피탄트, 아레디아(Aredia)(팔미드로네이트 이나트륨), 아리미덱스(Arimidex)(아나스트로졸), 아로마신(Aromasin)(엑스메스탄), 아레논(Arranon)(넬라라빈), 삼산화비소, 아르제라(Arzerra)(오파투무맙), 아스파라기나제 에르위니아 크리스안데미(Erwinia chrysanthemi), 아바스틴(Avastin)(베바시주맙), 악시티닙, 아자시티딘, BEACOPP, 베세눔(Becenum)(카르무스틴), 벨레오담(Beleodaq)(벨리노스타트), 벨리노스타트, 벤다무스틴 하이드로클로라이드, BEP, 베바시주맙, 벡사로텐, 벡사(Bexxar)(토시투모맙 및 요오드 I 131 토시투모맙), 바이칼루타미드, BiCNU(카르무스틴), 블레오마이신, 블리나투모맙, 블린사이토(Blinicyto)(블리나투모맙), 보르테조밐, 보술립(Bosulif)(보수티닙), 보수티닙, 브렌톡시맙 베도틴, 부숴판, 보술렉스(Busulfex)(부숴판), 카마지탁셀, 카보잔티닙-S-멜레이트, CAF, 캠펜스(Campath)(알렘투주맙), 캠펜사(Camptosar)(이리노테칸 하이드로클로라이드), 카페시타빈, CAPOX, 카보플라틴, 카보플라틴-탁솔, 카르필조밐, 카르무브리스(Carmubris)(카르무스틴), 카르무스틴, 카르무스틴 임플란트, 카소덱스(Casodex)(바이칼루타미드), CeeNU(로무스틴), 세리티닙, 세루비딘(Cerubidine)(다우노루비신 하이드로클로라이드), 서바릭스(Cervarix)(재조합 HPV 2가 백신), 세톡시맙, 클로르암부실, 클로르암부실-프레드니손, CHOP, 시스틀라틴, 클라펜(Clafen)(사이클로포스파마이드), 클로파라빈, 클로파렉스(Clofarex)(클로파라빈), 클로라(Clolar)(클로파라빈), CMF, 코메트립(Cometriq)(카보자티닙-S-멜레이트), COPP, COPP-ABV, 코스메겐(Cosmegen)(닥티노마이신), 크리조티닙, CVP, 사이클로포스파마이드, 사이포스

(Cyfos)(이포스파미드), 사이람자(Cyramza)(라무시루맘), 사이타라빈, 사이타라빈, 리포숨, 싸이토사(Cytosar)-U(사이타라빈), 사이톡산(Cytoxan)(사이클로포스파마이드), 차브라페닙, 다카르바진, 다코겐(Dacogen)(테시타빈), 닥티노마이신, 다사티닙, 다우노루비신 하이드로클로라이드, 테시타빈, 데가렐릭스, 데니류킨 디프티톡스, 데노수맘, 데포사이트(DepoCyt)(리포숨 사이타라빈), 데포폼(DepoFoam)(리포숨 사이타라빈), 텍스라족산 하이드로클로라이드, 디누톡시맘, 도세탁셀, 독실(Doxil)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포숨), 독소루비신 하이드로클로라이드, 독소루비신 하이드로클로라이드 리포숨, Dox-SL(독소루비신 하이드로클로라이드 리포숨), DTIC-돔(다카르바진), 이퓨텍스(Efudex)(플루오로우라실), 엘리트렉(Elitek)(라스부리카제), 엘렌스(Ellence)(에피루비신 하이드로클로라이드), 엘록사틴(Eloxatin)(옥살리플라틴), 엘트롬보프로그올라민, 에멘드(Emend)(아프레피탄트), 엔잘루타미드, 에피루비신 하이드로클로라이드, EPOCH, 얼비투스(Erbitux)(세톡시맘), 에리블린 메실레이트, 에리벤티지(Erivedge)(비스모데길), 에플로티닙 하이드로클로라이드, 어윈아즈(Erwinaze)(아스파라기나제 에르위니아 크리산데미), 에토포포스(Etopophos)(에토포사이드 포스페이트), 에토포사이드, 에토포사이드 포스페이트, 에바세트(Evacet)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포숨), 에버롤리무스, 에비스타(Evista)(랄록시펜 하이드로클로라이드), 엑스메스탄, 파레스톤(Fareston)(토레미펜), 파리닥(Farydak)(파노비노스타트), 파슬로텍스(Faslodex)(폴베스트란트), FEC, 페마라(Femara)(레트로졸), 필그라스팀, 플루다라(플루다라빈 포스페이트), 플루다라빈 포스페이트, 플루오플렉스(Fluoroplex)(플루오로우라실), 플루오로우라실, 플로렉스(Folex)(메토티렉세이트), 플로렉스 PFS(메토티렉세이트), 폴피리(FOLFIRI), 폴피리-베바시주맘, 폴피리-세톡시맘, 폴피리녹스(FOLFIRINOX), 폴폭스(FOLFOX), 폴로틴(Folotyn)(프랄라트렉세이트), FU-LV, 폴베스트란트, 가다실(Gardasil)(재조합 HPV 4가 백신), 가다실 9(재조합 HPV 9가 백신), 가짜이바(Gazyva)(오비누투주맘), 겐피티닙, 겐시타빈 하이드로클로라이드, 겐시타빈-시스틀라틴, 겐시타빈-옥살리플라틴, 겐투주맘 오조가미신, 겐자(Gemzar)(겐시타빈 하이드로클로라이드), 길로트리프(Gilotrif)(아파티닙 디말레이트), 글리벡(Gleevec)(이마티닙 메실레이트), 길리아델(Gliadel)(카르무스틴 임플란트), 길리아델 웨이퍼(카르무스틴 임플란트), 글루카르피다제, 고세렐린 아세테이트, 할라벤(Halaven)(에리블린 메실레이트), 허셉틴(Herceptin)(트라스투주맘), HPV 2가 백신, 재조합, HPV 9가 백신, 재조합, HPV 4가 백신, 재조합, 하이캄틴(Hycamtin)(토포테칸 하이드로클로라이드), 하이퍼-CVAD, 이브란스(Ibrance)(팔보시클립), 이브루티모맷티옥세탄, 이브루티닙, ICE, 아이클루시그(Iclusig)(포나티닙 하이드로클로라이드), 이다마이신(Idamycin)(이다루비신 하이드로클로라이드), 이다루비신하이드로클로라이드, 이델라리시브, 이펙스(Ifex)(이포스파미드), 이포스파미드, 이포스파미둠(Ifosfamidum)(이포스파미드), 이마티닙 메실레이트, 임브루비카(Imbruvica)(이브루티닙), 이미퀴모드, 인라이타(Inlyta)(악시티닙), 인터페론 알파-2b, 재조합, 인트론 A(재조합 인터페론 알파-2b), 요오드 I 131 토시투모맘 및 토시투모맘, 이필리무맘, 이레사(Iressa)(게피티닙), 이리노테칸 하이드로클로라이드, 이스토닥스(Istodax)(로미렙신), 익사베필론, 익셈프라(Ixempra)(익사베필론), 자카피(Jakafi)(록솔리티닙 포스페이트), 제브타나(Jevtana)(카바지탁셀), 캐싸일라(Kadcyla)(아도-트라스투주맘 엠탄신), 케옥시펜(Keoxifene)(랄록시펜 하이드로클로라이드), 케피반스(Kepivance)(팔리페르민), 키트루다(Keytruda)(렘브롤리주맘), 키프롤리스(Kyprolis)(카르필조뎀), 란레오타이드 아세테이트, 라파티닙 디톡실레이트, 레날리도미드, 렌바티닙 메실레이트, 렌비마(Lenvima)(렌바티닙 메실레이트), 레트로졸, 류코보린 칼슘, 류케란(Leukeran)(클로르암부실), 류프롤라이드 아세테이트, 레볼란(Levulan)(아미노레블린산), 린폴리진(Linfolizin)(클로르암부실), 리포독스(LipoDox)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포숨), 리포숨 사이타라빈, 로무스틴, 류프론(Lupron)(류프롤라이드 아세테이트), 류프론 데포(류프롤라이드 아세테이트), 류프론 데포-페드(류프롤라이드 아세테이트), 류프론 데포-3 먼스(류프롤라이드 아세테이트), 류프론 데포-4 먼스(류프롤라이드 아세테이트), 린파자(Lynparza)(올라파뎀), 마키보(Marqibo)(빈크리스틴 설페이트 리포숨), 마툴란(Matulane)(프로카바진 하이드로클로라이드), 메클로르에타민 하이드로클로라이드, 메게이스(Megace)(메게스트롤 아세테이트), 메게스트롤 아세테이트, 메키니스트(Mekinist)(트라메티닙), 머캄토푸린, 메스나, 메스넥스(Mesnex)(메스타), 메타졸라스톤(Methazolastone)(테모졸로미드), 메토티렉세이트, 메토티렉세이트 LPF(메토티렉세이트), 맥세이트(Mexate)(메토티렉세이트), 맥세이트-AQ(메토티렉세이트), 미토마이신 C, 미톡산트론 하이드로클로라이드, 미토지트렉스(Mitozytrex)(미토마이신 C), MOPP, 모조빌(Plerixafor), 무스타르겐(Mustargen)(메클로르에타민 하이드로클로라이드), 뮤타마이신(Mutamycin)(미토마이신 C), 마이레란(Myleran)(부술판), 마이로사(Mylosar)(아자시티딘), 마이로타그(Mylotarg)(겐투주맘 오조가미신), 나노입자 파클리탁셀(파클리탁셀 알부민-안정화된 나노입자 제제), 나벨빈(Navelbine)(비노렐빈 타르트레이트), 빌라라빈, 네오사(Neosar)(사이클로포스파마이드), 네투피탄트 및 팔로노세트론 하이드로클로라이드, 뉴포겐(Neupogen)(필그라스팀), 넥사바(Nexavar)(소라페닙 토실레이트), 닐로티닙, 니볼루맘, 놀바텍스(Nolvadex)(타목시펜 시트레이트), 엔플레이트(Nplate)(로미플로스티뎀), 오비누투주맘, 오돔조(Odomzo)(소니데길), OEPA, 오파투무맘, OFF, 올라파뎀, 오마세탁신 메페속시네이트, 온카스파(Oncaspar)(페그아스파르가제), 온단세트론 하이드로클로라이드, 온탁

(Ontak)(데닐루킨 디피티톡스), 오프디보(Opdivo)(니볼루맵), OPPA, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 파클리탁셀 알부민-안정화된 나노입자 제제, PAD, 팔보시클립, 팔리페르민, 팔로노세트론 하이드로클로라이드, 팔로노세트론 하이드로클로라이드 및 네투피탄트, 팔미드로네이트 이나트륨, 파니투무맵, 파노비노스타트, 파라플라트(Paraplat)(카보플라틴), 파라플라틴(카보플라틴), 파조파닙 하이드로클로라이드, 페그아스파르가제, 페그인터페론 알파-2b, PEG-인트론(페그인터페론 Alfa-2b), 펌블리주맵, 페메트렉세드 이나트륨, 퍼제타(페르투주맵), 페르투주맵, 플라티놀(Platinol)(시스틀라틴), 플라티놀-AQ(시스틀라틴), 플레릭사포르, 포말리도미드, 포말리스트(Pomalyst)(포말리도미드), 포나티닙 하이드로클로라이드, 프랄라트렉세이트, 프레드니손, 프로카르바진 하이드로클로라이드, 프로류킨(Proleukin)(알데스류킨), 프롤리아(Prolia)(데노수맵), 프로막타(Promacta)(엘트롬보파그 올라민), 프로벤지(Provence)(시플루셀-T), 푸리네톨(Purinethol)(메르캅토푸린), 푸릭산(Purixan)(메르캅토푸린), 라툼 223 다이클로라이드, 랄록시펜 하이드로클로라이드, 라무시루맵, 라스부리카제, R-CHOP, R-CVP, 재조합 인간 유두종 바이러스(HPV) 2가 백신, 재조합 인간 유두종 바이러스(HPV) 7가 백신, 재조합 인간 유두종 바이러스(HPV) 4가 백신, 재조합 인터페론 알파-2b, 레고라페닙, R-EPOCH, 레블리미드(Revlimid)(레날리도미드), 류마트렉스(Rheumatrex)(메토티렉세이트), 리톡산(Rituxan)(리톡시맵), 리톡시맵, 로미렘신, 로미플로스티움, 루비도마이신(Rubidomycin)(다우노루비신 하이드로클로라이드), 룩솔리티닙 포스페이트, 스크레로솔(Sclerosol) 흉강내 에어로졸(탈크), 실톡시맵, 시플루셀-T, 소마툴린 데포(란레오타이드 아세테이트), 소니데깁, 소라페닙 토실레이트, 스프라이셀(Sprycel)(다사티닙), STANFORD V, 무균 탈크 분말(탈크), 세리탈크(탈크), 스티바가(Stivarga)(레고라페닙), 수니티닙 멜레이트, 수텐트(Sutent)(수니티닙 멜레이트), 실라트론(Sylatron)(페그인터페론 알파-2b), 실반트(Sylvant)(실톡시맵), 사이노버(Synovir)(타리도미드), 신리보(Synribo)(오마세탁신 메페속시네이트), TAC, 타핀라(Tafinlar)(차브라페닙), 탈크, 타목시펜 시트레이트, 타라빈 PFS(사이타라빈), 타르세바(Tarceva)(에블로티닙 하이드로클로라이드), 타르그레틴(Targretin)(백사로텐), 타시그나(Tasigna)(닐로티닙), 탁솔(Taxol)(파클리탁셀), 탁소테레(Taxotere)(도세탁셀), 테모다(Temodar)(테모졸로미드), 테모졸로미드, 템시롤리무스, 탈로도미드, 탈로미드(Thalomid)(탈리도미드), 티오테파, 토포사(Toposar)(에토포시드), 토포테칸 하이드로클로라이드, 토레미펜, 토리셀(Torise)I(템시롤리무스), 토시투모맵 및 요오드 I 131 토시투모맵, 토텍트(Totect)(텍스라족산 하이드로클로라이드), TPF, 트라메티닙, 트라스트주맵, 트레안다(Treanda)(벤다무스틴 하이드로클로라이드), 트리세녹스(Trisenox)(삼산화비소), 타이커브(Tykerb)(라파티닙 디톡실레이트), 유니투신(Unituxin)(디누톡시맵), 반데타닙, VAMP, 벡티빅스(Vectibix)(파니투무맵), VeIP, 벨반(Velban)(빈블라스틴 설페이트), 벨케이드(Velcade)(보르테조미드), 벨사(Velsar)(빈블라스틴 설페이트), 베무라페닙, VePesid(에토포시드), 비아두르(Viadur)(류프롤라이드 아세테이트), 비다자(Vidaza)(아사티딘), 빈블라스틴 설페이트, 빈카사(Vincasar) PFS(빈크리스틴 설페이트), 빈크리스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트 리포솜, 비노렐빈 타르트레이트, VIP, 비스모데깁, 보락산(Voraxaze)(글루카르피다제), 보리노스타트, 보트리엔트(파조파닙 하이드로클로라이드), 웰코보린(Wellcovorin)(류코보린 칼슘), 켈코리(Xalkori)(크리조티닙), 켈로다(카페시타빈), XELIRI, XELOX, 엑스지바(Xgeva)(데노수맵), Xofigo(라툼 223 다이클로라이드), 엑스탄디(Xtandi)(엔잘루타미드), 여보이(Yervoy)(이필리무맵), 잘트랩(Zaltrap)(Ziv-아프리베르셉트), 켈보라프(Zelboraf)(베무라페닙), 제발린(이브리투모맵 티옥세탄), 지네카드(Zinecard)(텍스라족산 하이드로클로라이드), Ziv-아프리베르셉트, 조프란(Zofran)(온단세트론 하이드로클로라이드), 졸라덱스(Zoladex)(고세렐린 아세테이트), 졸레드론산, 졸린자(Zolinza)(보리노스타트), 조메타(Zometa)(졸레드론산), Zydelig(자이델릭)(이델랄리십), 자이카디아(Zykadia)(세리티닙) 및 자이티가(Zytiga)(아비라테론 아세테이트)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0190] **혈관 질환을 치료하는 방법**

[0191] 혈소판이 또한 손상된 혈관을 밀봉하고 출혈을 중지시키는 플러그를 형성함으로써 몇몇 생리학적 및 병리학적 과정, 예컨대 지혈 및 혈전증에서 중요한 역할을 하므로, 이 플랫폼은 관련 혈관 질환을 치료하기 위해 또한 사용될 수 있다.

[0192] 본 명세서에 개시된 혈소판 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 수반하는 대상체에서 혈관 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 개시되어 있다. 이 실시형태에서, 혈소판은 혈관 질환, 예를 들어 응고 장애 또는 관상동맥 재협착증을 치료하기 위해 약물을 전달한다. 예를 들어, 약물은 헤파린 또는 독소루비신일 수 있다.

[0193] 일 양태에서,

[0194] 세포;

[0195] 화학 링커 모이어티; 및

- [0196] 치료제를 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈관 질환을 치료하거나 예방하는 방법이 본 명세서에 제공되고;
- [0197] 여기서 치료제는 화학 링커 모이어티를 통해 혈소판 세포에 공유로 연결된다.
- [0198] 일 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커, PEG 링커, PAS실화 및 HES실화로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커이다.
- [0199] 일 실시형태에서, 혈소판 세포는 인간 혈소판 세포이다. 일 실시형태에서, 혈소판 세포는 자가 혈소판 세포이다.
- [0200] 일 실시형태에서, 혈관 질환은 조직 손상, 염증 또는 심혈관 질환이다. 일 실시형태에서, 조성물은 추가적인 치료제와 조합되어 투여된다.
- [0201] 몇몇 실시형태에서, 혈소판 조성물은 혈관 질환, 예를 들어 응고 장애 또는 관상동맥 재협착증을 치료하거나 예방하기 위한 치료제의 전달을 표적화할 수 있다.
- [0202] 예를 들어, 몇몇 경우에, 치료제는 Adcirca(타다라필), Adempas(리오시구앗), Agrylin(아나그렐리드 HCL), Angiomax(비발리루딘), Atac및 (칸테사르탄 실렉세틸), Atryn(재구성을 위한 항트롬빈 재조합 동결건조된 분말), Azor(암로디핀 베실레이트; 올메사르탄 메독소밀), Baycol(세리바스타틴 나트륨), BiDil(이소소르비드 디니트레이트/하이드랄라진 하이드로클로라이드), Brilinta(티카그렐러), Caduet(암로디핀/아토르바스타틴), 캅토프릴, Cardizem(R)(주사용 딜티아젯 HCl) Monvial(R), 셀셉트(CellCept), Cleviprex(클레비디핀), Corlanor(이바브라딘), 코르로팜(Corlopam), 코르베트(Corvert) 주사(이부틸리드 푸마레이트 주사), Covera-HS(베라파필), Crestor(로수바스타틴 칼슘), 딜티아젯 HCL, Diovan(발사탄), 독소루비신, DynaCirc CR, Edarbi(아질사르탄 메독소밀), Edarbyclor(아질사르탄 메독소밀 및 클로르탈리돈), Efient(프라수그렐), Eliquis(아픽사반), Entresto(사쿠비트릴 및 발사탄), Epanova(오메가-3-카복실산), 페노피브레이트, 헤파린, Innohep(틴자파린 나트륨) 주사용, 인테그릴린(Integrilin), Juxtapid(로미타피드), Kengreal(칸그렐러), Kynamro(미포메르센 나트륨), Lescol(플루바스타틴 나트륨), Lescol(플루바스타틴 나트륨) 캡슐, Rx, Letairis(암브리센탄), Levitra(바르데나필), Lexxel(에날라프릴 말레에이트-펠로디핀 ER), Lipitor(아토르바스타틴 칼슘), Liptruzet(에제티미브 및 아토르바스타틴), Livalo(피타바스타틴), Mavik(트란도라프릴), Micardis(텔미사르탄), Micardis HCT(텔미사르탄 및 하이드로클로로티아자이드), Microzide(하이드로클로로티아자이드), Multaq(드로네다론), Natrecor(네시리티드), 니아스판(Niaspan), 노르미플로(Normiflo), Nymalize(니모디핀), Opsumit(마시텐탄), 펜톡시필린(Pentoxifylline), 핀돌롤(Pindolol), Plavix(클로피도그렐 바이설페이트), Plavix(클로피도그렐 바이설페이트), 포시코르(Posicor), 프라닥사(Pradaxa)(다비가트란 에텍실레이트 메실레이트), Pravachol(프라바스타틴 나트륨), Pravachol(프라바스타틴 나트륨), Prestalia(페린도프릴 아르기닌 및 암로디핀 베실레이트), Prinivil 또는 Zestril(리시노프릴), ProAmatine(미도드린), Ranexa(라놀라진), Remodulin(트레프로스티닐), 레오프로(ReoPro), REPRONEX(주사용 메노트로핀스, USP), Retavase(레테플라제), 리트몰(Rythmol), Savaysa(에독사반), Soliris(에쿨리주맙), Teczem(에날라프릴 말레에이트/딜티아젯 멜레이트), Tekamlo(알리스키렌 + 암로디핀), Tekturna(알리스키렌), Teveten(에프로사르탄 메실레이트와 하이드로클로로티아자이드), Teveten(에프로사르탄 메실레이트), Tiazac(딜티아젯 하이드로클로라이드), Tiazac(딜티아젯 하이드로클로라이드), Tiazac(딜티아젯 하이드로클로라이드), Toprol-XL(메토프롤롤 숙시네이트), Tribenzor(올메사르탄 메독소밀 + 암로디핀 + 하이드로클로로티아자이드), Tricor(페노피브레이트), 트라이lipix(페노피브르산), Tyvaso(트레프로스티닐), Varithena(폴리도카놀 주사용 폼), Vascepa(이코사펜트 에틸), Visipaque(이오덕사놀), Xarelto(리바록사반), Xarelto(리바록사반), Zocor, Zontivity(보라팍사)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0203] **링커**
- [0204] 공유 접근법은 화학 링커를 통해 혈소판을 변형시키도록 이용될 수 있다. 화학 링커를 사용하는 것의 이익 중 하나는 이것이 유전 변형의 필요를 우회한다는 것이다. 이러한 이작용성 화학 링커는 치료제를 혈소판 세포에 연결할 수 있다. 이작용성 링커 그룹의 예는 모이어티, 예컨대 당, 아미노산, 아미노 알코올, 카복시 알코올, 아미노 티올 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0205] 몇몇 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커, PEG 링커, PAS실화 및 HES실화로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 화학 링커 모이어티는 말레이미드 링커이다.
- [0206] **실시예**

- [0207] 하기 실시예는 개시된 대상에 따라 조성물, 방법 및 결과를 예시하도록 하기 기재되어 있다. 이 실시예는 대표적인 방법 및 결과를 예시하기 보다는 본 명세서에 개시된 대상의 모든 양태를 포함하도록 의도되지 않는다. 이 실시예는 당업자에게 명확한 본 발명의 등가물 및 변형을 배제하도록 의도되지 않는다.
- [0208] **실시예 1. 수술 후 암 면역치료에 대한 관문 저해제에 의한 혈소판의 인시츄 활성화**
- [0209] 수술은 대부분의 고형 종양에 대한 주요 치료 선택사항이다. 수술 기법의 부단한 개선에도 불구하고, 종양 절제 후 잔류 미세종양 및/또는 CTC는 도전과제로 있다¹⁻³. 추가적으로, 수술이 암 전이의 촉진을 유도할 수 있다는 것이 또한 제안되어 있다^{4, 5}. 많은 환자는 상당한 이환율 및 사망률을 발생시킬 수 있는 수술 후 재발성 질환을 발생시킨다. 그러므로, 수술 후 암 재발을 예방하기 위한 효과적인 전략을 개발하는 데 막대한 관심이 있다. 이들 중에서, 암 면역치료는 최근에 상당한 관심을 얻었다⁶. 면역치료제는 종양을 직접 공격하지 않지만, 신체의 면역계를 부스팅하여서 암 세포를 사멸시킨다⁷. 면역 관문 봉쇄는 환자의 하위집단에서 영속적인 항종양 반응 및 장기간 관해를 유발하였다⁸⁻¹⁰. 특히, 관문 저해제는 림프구 상의 예정 세포사 단백질 1(PD1) 및 항원 제시 세포(APC) 상의 예정 세포사 1 리간드 1(PDL1)과의 상호작용을 차단하고, 종양 세포는 암의 다양한 유형을 치료하는데 흥미진진한 결과를 나타냈다¹¹⁻¹⁴. 더구나, 아테졸리주맙인 제1 PD-L1 저해제는 최근에 미국 식약청(FDA)에 의해 가속 승인을 받았다¹⁵. 주목할만한 진행에도 불구하고, 관문 봉쇄 치료의 본 방법은 많은 환자에서 치료학적 이익을 제한한다. 임상 시험에서 관찰된 가장 큰 제한은 부작용, 예컨대 자가면역 장애의 증증도일 수 있다¹⁶⁻¹⁸. 면역 관문 봉쇄 치료에 의해 치료될 때 등급 3/4 부작용이 때때로 생겼다^{15, 19}. 한편, 환자의 많은 비율은 이 물질에 대한 반응에 실패하였다^{8, 10, 15}. 항-PD 치료의 객관적 반응률은 여전히 개선을 요한다. 어떻게 항-PD 치료를 증대시키지는 암 면역학 및 면역치료의 분야에서 중요 주제 중 하나가 되었다^{6, 11}.
- [0210] 항-PD 치료의 약화된 치료 효능을 설명할 수 있는 하나의 기전은 정맥내 점적주사될 때 정상 조직에 대한 오프 타겟 항체이다^{16, 18, 20, 21}. 이 맥락에서, 미래의 암 면역치료가 면역계의 전신 활성화보다 특이적으로 종양 부위에 집중하는 것이 바람직하다²⁰. 더구나, 제한된 효능은 또한 항-PD 치료로부터의 임상 이익과 긍정적으로 연관된 PDL1의 더 높은 발현을 함유하는 T 세포 염증화 종양 미세환경 및 불충분한 종양 림프구성 침윤으로 인할 수 있다²²⁻²⁵.
- [0211] 세포 기반 시스템은 최근에 적혈구, 박테리아 고스트 및 유전자 조작된 줄기 및 면역 세포를 포함하는 생물학적 약물 캐리어로서 생겼다^{26, 27}. 이들 중에서, 혈소판은 거핵구로부터 방출된 무핵화 세포 단편이고, 지혈에서 이의 기능에 대해 최고로 공지되어 있다²⁸⁻³¹. 순환 혈소판의 평균 수명은 8일 내지 9일이고^{27, 32}, 이는 정맥내로 주사된 치료제의 약동학을 크게 개선할 수 있다. 더구나, 수혈된 혈소판은 수술 상처의 부위로 이동할 수 있고³³, 여기서 잔여 종양은 수술 후 생존할 수 있다. 다른 측에서, 1차 종양으로부터 맥관구조로 떨어져 전이를 발생시키는 혈소판이 CTC를 인식하고 이것과 상호작용하는 능력을 가진다는 것³⁴⁻³⁶을 생기는 증거가 나타난다. 혈소판의 도움에 의해, aPDL1은 치료제의 오프 타겟 효과를 감소시키면서 수술 후 암 세포에 표적화될 수 있다. 이의 내인성 상처 및 CTC 속성 특성 이외에, 혈소판은 많은 염증성 병태를 개시시키고 개선하는 면역 "세포"로서 또한 생각된다³⁷⁻³⁹. 혈소판 유래 케모카인은 T 세포, 및 다른 면역 세포를 동원하고 깨운다. 가용성 CD40L(sCD40L)의 주요 소스로서, 혈소판은 T 세포 면역을 부스트할 수 있고, 면역글로불린 G의 생성을 스위칭하는 수지상 세포(DC) 성숙 및 B 세포 아이소유형을 유도하는 것이 필요하다⁴⁰. PDL1 및 PDL2가 염증에 대한 반응에서 상향조절된다는 것이 또한 보고되었고^{41, 42}, 이는 PDL1 양성 종양을 발생시켜서 종양이 항-PD 치료에 더 민감하게 하고 ORR을 잠재적으로 개선한다.
- [0212] 이 실시예에서, 항-PDL1(aPDL1)은 수술 후 종양 재발을 예방하기 위해 혈소판의 표면에 로딩되었다(도 1a). 놀랍게도, 본 발명자들은 불활성화된 혈소판에 대한 aPDL1의 결합이 매우 안정한 한편, aPDL1의 방출이 혈소판의 활성화 시 유의미하게 촉진될 수 있다는 것을 발견하였다. 따라서, aPDL1 방출은 활성화된 혈소판의 혈장 막으로부터 생성된 혈소판 유래 마이크로입자(PMP)로부터 생길 수 있다⁴³. 이러한 구조 변경은 aPDL1을 APC 및 종양 세포에 데려가 놓는 것을 촉진할 수 있다. 1차 종양의 절제 후 B16 흑색종 및 4T1 유방 암종 종양 보유 마우스

에 대한 aPDL1 접합된 혈소판(P-aPDL1)의 정맥내 주사에 의해, 혈소판이 aPDL1이 잔여 미세종양을 갖는 수술 베드, 및 혈액에서의 CTC를 수송하고 이를 향해 축적하게 하는 것을 도울 수 있다는 것이 입증되었다. T 세포 염증화 종양 미세환경은 종양 부위에 대한 증가된 PDL1 발현과 함께 활성화 시 혈소판에 의해 또한 생성되었다. 한편, aPDL1은 면역 및 종양 세포에서 PDL1을 차단하도록 혈소판 활성화 후 방출될 수 있다. 이 결과는 혈소판이 수술 후 암 재발을 예방하는 표적화된 및 제어된 방출 방식으로 치료제(예를 들어, aPDL1) 전달에 대한 캐리어로서 작용할 수 있다는 것을 보여준다.

[0213] **aPDL1에 의해 장식된 혈소판의 조작**

[0214] 편리하게는 유전자 변형의 수요를 우회하는 이작용성 말레이미드 링커를 통해 aPDL1에 의해 혈소판을 변형시키기 위해 공유 접근법이 이용되었다⁴⁴. 혈소판에 대한 aPDL1의 결합은 면역형광에 의해 조사되었다(도 6). 추가적으로, 말레이미드 비함유 aPDL1은 혈소판에 대한 최소 비특이적 결합을 보여주었다(도 7). 효소 연결된 면역흡착 검정(ELISA)은 혈소판이 혈소판마다 약 0.3pg까지 aPDL1과 용이하게 커플링될 수 있다는 것을 보여주었다(도 8a). 혈소판마다 0.1 및 0.2pg의 aPDL1의 커플링이 이의 생존능력에 대한 유의미한 효과를 갖지 않는다는 것이 또한 발견되었다(도 8b). 이러한 공유 결합은 고도로 안정하고, 2일 내에 유의미한 방출을 나타내지 않았다(도 8c). 더구나, 세포 집착 및 이동을 조정하는 혈소판의 몇몇 표면 단백질은 조사되었다(도 9). 총체적으로, aPDL1과의 접합은 이 혈소판 세포에 유의미한 손상을 유도하지 않았다.

[0215] **혈소판의 활성화는 치료제의 방출을 촉진한다**

[0216] 혈소판 활성화는 접착이 생기는 경우 생긴다⁴⁵. 혈소판은 면역 기능을 갖는 많은 분자를 함유하는 약 60개의 과립을 함유한다³⁸. 활성화 시, 이 과립은 세포외 환경으로 이의 내부의 카고를 방출한다. 많은 이들 내용물은 면역 분자로서 역할을 한다. 예를 들어, 이것은 다른 면역 세포를 동원하고 활성화하고, T 세포 이동을 유도하고, DC로의 단핵구 분화를 중지시킬 수 있다. 추가적으로, PMP는 혈소판 활성화 시 혈장 막으로부터 유래되고⁴³; 활성화된 혈소판은 부착 분자 및 케모카인을 보유하는 PMP를 방출하여서, PMP 침착의 부위에서 단핵구 트랩을 촉진한다⁴⁶. aPDL1 변형된 혈소판(P-aPDL1)이 자극 시 활성화될 수 있는지를 조사하기 위해, 트롬빈은 시험관내 P-aPDL1을 활성화하도록 사용되었다. 활성화 전에 및 후에 P-aPDL1의 투과 전자 현미경검사(TEM) 영상의 관찰로부터, 다량의 생성된 PMP는 전자 현미경 하에 관찰되었다(도 1b, 도 10). 혈소판의 수지상 및 스프레드 형태 변화가 또한 관찰되었다. 더 흥미롭게도, 활성화된 혈소판으로부터의 aPDL1의 유의미한 방출은 ELISA 검정에 의해 모니터링되었다(도 1c). 주목할만한 aPDL1 방출은 혈소판 활성화 시 혈장 막으로부터 분해된 PMP에 기인하였다. 이 가설을 시험하기 위해, 활성화된 P-aPDL1의 면역형광 영상화를 수행하였다. 혈소판을 갈세인에 의해 염색하고, aPDL1을 형광성 2차 항체에 의해 염색하였다(도 11). 혈소판의 활성화 후 aPDL1이 PMP에 존재한다는 것이 검출되었다.

[0217] 흥미롭게도, 몇몇 전염증성 사이토카인은 활성화 시 aPDL1과 함께 또한 방출되었다(도 1d 내지 도 1e). PMP 생성에 의한 혈소판으로부터의 aPDL1 방출을 추가로 조사하기 위해, 트랜스웰 배양 시스템을 도입하였다. aPDL1 접합된 혈소판을 트랜스웰 배양 시스템의 상부 구획에서 배양하는 한편, B16 암 세포를 하부 구획에서 성장시켰다(도 12). 인서트 막에서 미세기공은 1 μ m의 직경을 가져서, PMP가 막에 걸쳐 자유로이 횡단하게 하였다. B16 암 세포를 면역염색 전 12시간에 불활성화된 및 활성화된 혈소판과 동시향온처리하였다. 도 1f 및 도 12에 도시된 바대로, aPDL1은 혈소판이 활성화될 때 암 세포의 막에 결합하는 것으로 발견되었다. 불활성화된 혈소판과 향온처리된 암 세포에 대해서처럼, 하부 구획에서 암 세포에서 아주 적은 신호가 검출될 수 있었다. 총체적으로, 데이터는 aPDL1이 활성화된 혈소판으로부터 방출되고 암 세포에 결합할 수 있다는 것을 보여준다.

[0218] **재발성 종양에 대한 생체내 P-aPDL1 치료**

[0219] 혈소판의 표면에 대한 aPDL1의 커플링은 이의 생체내 거동을 변경할 가능성을 갖는다. 따라서, 전신 투여 이후에 P-aPDL1의 생체내 약동학은 건강한 마우스에서 평가되었다. aPDL1, P-aPDL1 및 동시주사된 비접합된 혈소판 + a-PDL1을 동등한 aPDL1 용량으로 마우스에 정맥내 주사하였다. 혈액으로부터의 aPDL1의 ELISA 분석은 유리 aPDL1(5.2시간) 및 혼합물(5.5시간)과 비교하여 혈소판에 연결된 aPDL1에 대해 크게 연장된 혈액-순환 반감기(34.8시간)가 달성된다는 것을 보여주었다(도 2a). 임상에서의 치료학적 항체와 비교된 비교적 짧은 혈액-순환 시간은 래트 항-마우스 IgG의 더 높은 면역원성 및 비특이적 결합에 기인한다. 이후, 이의 상처 속성 역량은 수술에 의해 1차 종양의 불완전한 제거 후 시험되었다. aPDL1은 Cy5.5에 의해 표지되고, 이후 혈소판에 접합되었다. 생체내 형광 영상화는 P-aPDL1 또는 유리 aPDL1의 주사 후 2시간에 수행되었고, 주요 기관은 생체의 형광

영상화를 위해 수집되었다(도 13). 이것이 혈소판에 접합될 때 잔여 종양을 갖는 수술 상처 주위에 aPDL1이 농축화된 한편, 유리 aPDL1에 대해 상처 부위에서 무의미한 형광 신호가 검출된다는 것이 관찰되었다(도 2b). 주요 기관, 및 잔여 미세종양을 갖는 상처의 생체의 영상화는 P-aPDL1의 상처 속성 역량을 추가로 확인시켜주었다(도 2c, 도 13). 유리 aPDL1에 의해 주사된 마우스의 간에서 주요 aPDL1 형광 신호가 검출된다는 것이 나타나는 한편, P-aPDL1은 동일한 aPDL1 용량에서 유리 aPDL1 주사된 마우스로부터의 것보다 간에서 유의미하게 더 낮은 aPDL1 신호를 보여주어서, P-aPDL1의 더 긴 혈액 순환 시간을 보여준다. 한편, 유의미하게, 잔여 미세종양을 갖는 수술 상처 주위에 강한 aPDL1 신호가 검출되는 한편, 유리 aPDL1과 연관된 샘플에서 무의미한 신호가 검출되었다. 형광성 신호의 정량화는 P-aPDL1의 상처에서의 축적이 *i.v.* 주사 후 2시간에 유리 aPDL1의 것보다 9.4배 더 효율적이라는 것을 보여주었다(도 2d). 미세종양 슬라이스의 공초점 영상은 또한 혈소판에서 접합될 때 aPDL1의 유의미하게 증가된 종양 흡수를 확인시켜주었다(도 2e, 도 14a). 더구나, 혈소판으로부터 방출된 aPDL1은 형광 영상화에 의해 생체내 명확히 관찰되었다(도 14b). 변형된 혈소판의 지혈 효과가 또한 조사되었다. 수혈 후 마우스 꼬리 출혈 시간은 P-aPDL1 치료된 마우스가 나이브 혈소판 수혈에 의해 치료된 것과 비교하여 출혈 시간의 통계적으로 유의미한 차이를 갖지 않는다는 것을 보여주었다(도 15).

[0220] 생체내 전염증성 환경을 조사하기 위해, 수술 부위에서의 사이토카인 수준을 평가하였다. 1차 종양을 수술로 제거한 후, 마우스를 혈소판에 의해 *i.v.* 주사하였다. 2시간 후, 상처 조직을 수집하고 24시간 동안 배지에서 배양하였다. 이후, 사이토카인의 활성화에 대해 상처 조직으로부터의 배지를 시험하였다. IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 sCD40L의 수준이 모두 비치료된 대조군 및 상처 보유 마우스로부터의 것과 비교하여 명확한 상승을 나타낸다는 것이 발견되었다(도 16a). 혈청으로부터의 사이토카인을 또한 시험하였다. 흥미롭게도, 혈소판은 혈청에서의 이 전염증성 사이토카인의 분비를 유도하지 않았다(도 16b). 이 결과는 전신 염증보다 국부 염증성 환경이 혈소판 주사에 의해 유도될 수 있다는 것을 보여준다. 국부 전염증성 환경은 종양 부위에서의 활성화된 림프구로 휴지 전구체 림프구를 전환함으로써 aPDL1 면역치료에 도움이 된다⁴⁷. 또한, 종양 부위에서의 PDL1 발현은 또한 조사되었다. 혈소판 유도된 염증성 부담이 종양-침윤 면역 세포 및 종양 세포의 PDL1 발현을 상향조절할 수 있다는 것이 발견되었다(도 16c 내지 도 16d). 종양 내의 PDL1 양성 세포의 증가가 항-PDL1 면역치료를 추가로 증대시키고 ORR을 증가시킬 수 있다^{41, 42}.

[0221] 수술 후 남은 잔여 미세종양을 치료하기 위해, 수술 후 국부 재발을 모방하도록 B16F10 마우스 흑색종 불완전한 종양 절제 모델을 이용하였다(도 2f). 대부분의 종양(약 99%)을 수술로 제거한 후, 마우스를 단일 용량의 PBS, 혈소판, aPDL1 또는 P-aPDL1(aPDL1=1mg/kg)에 의해 *i.v.* 주사하였다. B16F10 세포의 생물발광 신호에 의해 종양 성장을 모니터링하였다. P-aPDL1을 받은 마우스가 가장 작은 재발된 종양 용적을 나타낸다는 것이 입증되었다. 8마리 중 6마리의 마우스는 임의의 검출 가능한 종양 없이 강한 반응을 보여주었다. 한편, 유리 aPDL1 치료된 마우스는 종양 성장의 보통의 지연을 보여주지만, 수술 베드에서 종양 재발을 예방하지 않았다. 오직 혈소판에 의해 치료된 마우스에서의 종양 재발의 예방은 PBS 대조군의 것과 유사한 효과를 보여주었다(도 2g 내지 도 2h). 마우스에서의 종양 크기는 또한 이의 생존과 상관되었다. 마우스의 약 75%는 P-aPDL1에 의한 치료 후 60일에 생존하였다. 대조적으로, 마우스는 60일 후 모든 대조군에서 생존하지 않았다(도 2i).

[0222] **P-aPDL1 치료에 의해 촉발된 T 세포 매개된 면역 반응**

[0223] 또한, 재발 종양으로부터의 종양 침윤 림프구(TIL)를 수확하고, 16일에 면역형광 및 유세포분석법에 의해 수확하고 분석하였다. 면역형광 염색은 대조군에서의 잔여 종양이 제한된 T 세포 침윤을 갖는다는 것을 밝혀냈다. 대조적으로, P-aPDL1 치료된 마우스로부터의 잔여 종양은 CD8+ 및 CD4+ T 세포 둘 다에 의해 현저히 침윤되었다(도 3a, 도 17). 종양 중량은 10일에 P-aPDL1 치료된 마우스에서 유의미하게 더 낮고(도 3b), 이는 또한 잔여 종양에서의 CD3+ 세포의 절대 수의 증가에 상응하였다(도 3c). 더 현저히, 종양의 1그램당 CD8+ T 세포의 절대 수는 PBS 대조군과 비교하여 P-aPDL1 치료된 마우스에서 거의 10배 증가하고 유리 aPDL1 치료된 마우스에 비해 3배 증가하였다(도 3d 내지 도 3f). 추가적으로, 종양 침윤 CD4+ FoxP3+ T 세포를 연구하였다(도 3e). T 효과기 세포 대 조절 T(Treg) 세포의 종양내 비율은 P-aPDL1 치료 후 마우스에서 유의미하게 증대되었다(도 3f 내지 도 3h). 또한, P-aPDL1 마우스의 종양 내의 높은 CD8+ 및 CD4+ 효과기 T 세포 증식은, 세포 주기 연관된 단백질 Ki67의 발현에 의해 측정된 바대로, 관찰되었다. 효과기 T 세포와 대조적으로, P-aPDL1 치료에 의한 종양 침윤 Treg 세포에 의한 유의미한 증식 증가가 없었다(도 18). 종합하면, 이 관찰은 P-aPDL1이 aPDL1을 종양 미세환경에 효과적으로 전달할 수 있어서, 튼튼한 및 T 세포 매개된 항종양 면역 반응을 촉발한다는 것을 보여준다.

[0224] **전이성 질환에 대한 P-aPDL1 치료**

[0225] CTC를 치료하는 것의 P-aPDL1의 효력을 추가로 입증하기 위해, 수술 후 B16F10 세포의 *i.v.* 주사에 의해 마우스

를 시험감염시켜서, 1차 종양으로부터 혈액 순환으로 CTC 회피를 모방함으로써 P-aPDL1을 실험 전이 종양 모델에서 처음에 시험하였다⁴⁸(도 4a, 도 19). 마우스에 수술 직후에 단일 용량의 PBS, 혈소판, aPDL1(aPDL1=1mg/kg 또는 2mg/kg) 또는 P-aPDL1(aPDL1=1mg/kg)을 *i.v.* 주사하였다. 마우스에서의 B16F10 세포의 생물발광 신호에 따라(도 4b, 도 19), 유리 aPDL1 치료가 전이성 암을 예방할 수 있지만, 가능하게는 수술 후 이 잔여 미세종양에 대한 aPDL1의 불량한 축적으로 인해, 2mg/kg의 더 높은 용량에서도 수술 부위에서의 국부 종양 재발을 예방할 수 있다는 것이 입증되었다(도 13). 대조적으로, 수술 베드에서의 종양의 현저히 감소한 재발, 및 폐 전이는, 이의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 영상화(도 4c 내지 도 4d) 및 폐 조직의 형광 영상화(도 20)에 의해 함께 전체 폐의 사진에 의해 확인된 바대로, P-aPDL1 치료 후 달성되었다. 폐에서의 전이성 부위의 평균 수가 P-aPDL1에 의해 치료될 때 극적으로 감소하였다(도 4e). 게다가, 치료된 마우스의 생존 시간은 대조군과 비교하여 유의미하게 증가하였다(도 4f). 유리 aPDL1과 비교하여, P-aPDL1의 더 양호한 항암 효과는 부분적으로 암 세포 주위의 항체의 증가된 국부 농도로 인했다(도 13). 한편, 혈소판 활성화가 접합된 aPDL1을 방출할 수 있을 뿐만 아니라 TME로 많은 다른 면역 세포 침윤물을 동원하는 것을 도우므로, 활성화는 또한 항암 효과의 기능성 성분이었다. PDL1 봉쇄에 의해, 이 면역 세포는 강한 항암 면역 반응을 유도할 수 있었다.

[0226] P-aPDL1의 인시츄 활성화가 항암 효과에 기여하는지를 추가로 검증하기 위해, PMP를 수집하고 aPDL1에 의해 변형시켰다(도 19). 이 마이크로입자를 직접적으로 주사하는 것이 유리 aPDL1보다 양호하지 않더라도 전체 혈소판과 비교하여 항암 효과를 제한한다는 것이 명확히 나타났다(도 4). PMP가 순환으로의 도입 이후에 신속히 청소될 수 있다는 것을 입증한 이전의 연구에 의해 이것이 설명될 수 있었다^{49, 50}. 이 결과는 종양 부위에서의 P-aPDL1의 인시츄 활성화가 P-aPDL1의 항암 효과를 증대시키기 위한 필수 성분이라는 것을 입증하였다.

[0227] **수술 후 4T1 재발성 암에 대한 P-aPDL1**

[0228] 수술 후 암 재발의 또 다른 유형을 예방하는 데 있어서 P-aPDL1의 효력을 평가하기 위해, 삼중 음성 유방암(TNBC) 4T1 암종 종양 모델에서 시험을 수행하였다. 이 실험에서, BABL/c 마우스에 4T1 종양 세포를 피하로(*s.c.*) 주사하였다. *s.c.* 종양 접종 후 14일에, 1차 종양을 수술에 의해 제거하여서, 약 1%의 잔여 미세종양이 뒤에 남았다. aPDL1과 커플링된 치료학적 혈소판을 수술 직후 마우스에 *i.v.* 주사하였다. 이 모델에서, P-aPDL1 치료의 단일 과정은 수술 후 잔여 종양의 성장에 영향을 미치기에 충분히 유의미하였다(도 5a 내지 도 5b). 또한, 유리 aPDL1 치료된 마우스에서 발견된 16개의 결절 및 혈소판 치료된 및 비치료된 마우스에서 발견된 약 30개의 결절의 중위와 반대로, P-aPDL1 치료된 마우스의 폐에서 오직 약간의 결절이 발견되면서, 폐 전이에 대한 치료의 효과는 또한 인상적이었다(도 5c 내지 도 5d). 수술 후 P-aPDL1 치료를 받은 마우스는 대조군과 대조적으로 실질적인 생존 이익을 유도하였다. 종양 접종 후 60일에 75%의 마우스가 생존하였다(도 5e).

[0229] 요약하면, 이 실시예는 aPDL1의 축진된 전달에 혈소판의 인시츄 활성화를 이용하였고, 이는 수술 후 잔여 종양 세포를 실질적으로 근절하고 암 재발을 예방할 수 있다. P-aPDL1 치료는 수술 중재의 효과를 최대화하고 1차 종양의 절제 후 암 재발 및 전이의 위험을 감소시킬 수 있다. aPDL1 전달에 대한 혈소판의 이용을 넘어, 이 전달 방법은 또한 치료제의 바이오-반응성 방출 및 표적화된 전달에 대한 바이오-미립자를 적용하는 치료 및 다른 치료제를 적용하였다⁵¹.

[0230] **방법 및 재료**

[0231] **세포주**

[0232] 마우스 흑색종 세포주 B16F10 및 마우스 유방 암종 세포주 4T1을 미국 균주 은행(American Type Culture Collection)으로부터 구입하였다. B16F10-luc-GFP 및 4T1-luc-GFP 세포는 노스 캐롤라이나 대학교(채플 힐)의 Leaf Huang 박사로부터 기증되었다. B16F10 세포를 10% 소 태아 혈청(인비트로젠(Invitrogen)(캘리포니아주 칼스바드)), 100U/ml의 페니실린(인비트로젠) 및 100U/ml의 스트렙토마이신(인비트로젠)이 보충된 둘베코 변형 이글 배지(깁코(Gibco), 인비트로젠)에서 유지시켰다. 4T1 세포를 10% 소 태아 혈청(인비트로젠(캘리포니아주 칼스바드)), 100U/ml의 페니실린(인비트로젠) 및 100U/ml의 스트렙토마이신(인비트로젠)이 보충된 RPMI-1640 배지(깁코, 인비트로젠)에서 유지시켰다. 마스터 및 워킹 세포 은행은 수취 시 바로 생성되었다. 종양 실험에 대해 제3 및 제4 계대배양을 이용하였다. 잠재적인 마이코플라스마에 대해 3개월마다 세포를 시험하였다. 수취 시 세포의 재입증이 수행되지 않았다.

[0233] **마우스**

[0234] C57BL/6 마우스 및 BALB/c 마우스를 Jackson Lab(미국)으로부터 구입하였다. 연령 일치된(6 내지 10주령) 암컷

동물은 모든 실험에 걸쳐 사용하였다. 노스 캐롤라이나 대학교(채플 힐) 및 노스 캐롤라이나 주립 대학교에서 동물 관리 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)가 승인한 동물 프로토콜의 맥락에서 모든 마우스 연구를 수행하였다. 통계 검증력, 실행가능성 및 윤리적 양태를 균형화시키도록 정의된 후 동물 복지에 대한 규제 기관에 의해 실험 그룹 크기가 승인되었다. 모든 마우스는 노스 캐롤라이나 대학교(채플 힐) 및 노스 캐롤라이나 주립 대학교에서 동물 조사에 대한 연방 및 주립 정책에 따라 유지되었다.

[0235] **항체**

[0236] 생체내 사용된 항-PDL1 항체(aPDL1)를 Biolegend Inc(카탈로그 124329호, 클론: 10F.9G2)로부터 구입하였다. 염색 항체는 제조사의 설명서에 따라 형광-활성화된 세포 분류(FACS) 분석에 대해 CD3(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 A18644호), CD4(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 A18667호), CD8(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 A18609호), PD1(Biolegend, 카탈로그 135227호), CD11c(Biolegend, 카탈로그 117309호), PDL1(Biolegend, 카탈로그 124311호), CD20(Biolegend, 카탈로그 150411호), CD11b(Biolegend, 카탈로그 101211호), CD9(Biolegend, 카탈로그 124805호), CD41(Biolegend, 카탈로그 133905호), CD61(Biolegend, 카탈로그 104307호), CD62P(Biolegend, 카탈로그 148305호), CD40L(Biolegend, 카탈로그 106505호), 세포내 Ki67(Biolegend, 카탈로그 652405호) 및 세포내 Foxp3(eBioscience, 카탈로그 71-5775-40호)을 포함하였다. 염색된 세포를 Calibur FACS 장치(BD)에서 분석하고, FlowJo 소프트웨어(버전 10)를 이용하여 분석하였다. 염소 항-랫 IgG(H+L) 2차 항체(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 A18866호), 토끼 항-랫 IgG(H+L) 2차 항체(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 A18920호), 염소 항-랫 IgG(최소 x-반응성) 항체(Biolegend, 카탈로그 405408호)를 포함하는 2차 항체를 면역염색에 사용하였다.

[0237] **aPDL-1 접합된 혈소판의 제조**

[0238] 쥐과 혈소판을 기재한 바대로 단리하였다⁵². 간단히, 전혈을 1.0ml의 시트레이트-포스페이트-텍스트로스(16mM 시트르산, 90mM 시트르산나트륨, 16mM NaH₂PO₄, 142mM 텍스트로스, pH 7.4)를 함유하는 플라스틱 주사기로 C57BL/6(또는 BALB/c) 마우스(안와 부비강 또는 복제 정맥으로부터, 비말단 혈액 수집, 20마리의 마우스를 혈액 수집에 사용하였음)로부터 수집하고, 중단 없이 실온에서 20분 동안 100g에서 스피닝하였다. 혈소판 농후 혈장 (PRP)을 이동 피펫(넓은 오리피스)을 사용하여 별개의 관으로 옮기고, PGE1을 1µM의 최종 농도로 각각의 관에 첨가하였다. (주의: PRP가 적색의 색상이면, 이 샘플을 버린다). 800g에서 10분 동안 스피닝함으로써(중단 없이) 혈소판을 PRP로부터 단리하였다. 혈장을 버리고, 혈소판을 Tyrode 완충제(134mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 2.9mM KCl, 0.34mM Na₂HPO₄, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES, pH 7.4) 또는 PGE1을 포함하는 PBS(1µM 최종 농도) 중에 조심스럽게 그리고 천천히 재현탁시켰다(주의: 관 벽을 따라 완충제를 천천히 방출시키고, 아지태이션의 양을 최소화한다). 각각의 생체내 주사에 500 내지 600µl의 전혈이 필요하였다.

[0239] 이후, 혈소판의 표면을 3개의 단계에서 aPDL-1에 의해 작용기화하였다. 우선, 100µl의 혈소판(1x10⁸)을 PGE1(1µM)을 포함하는 400µl의 PBS(pH=8) 중에 재현탁시키고, 실온(RT)에서 30분 동안 Traut 시약(0.1mg/ml)(2-이미노티올란, Pierce)과 항온처리하였다. 반응의 30분 후, 과량의 Traut 시약을 800g에서 10분 동안 원심분리에 의해 제거하고, Tyrode 완충제(PGE1(1µM) 포함)에 의해 (필불요한 혈소판 활성화를 피하도록 재현탁 없이) 3회 세척하였다. 한편, aPDL-1을 4°C에서 2시간 동안 1:1.2의 물비로 PBS(pH=7.4) 중에 설포숙신이미딜-4-(*N*-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트(Sulfo-SMCC, Pierce)와 혼합하였다. 과량의 설포-SMCC를 원심분리 필터 장치(분자량 컷오프(MWCO)=10kDa)를 사용하여 제거하여 SMCC 활성화된 항체를 정제하였다. 마지막으로, 혈소판 및 항체를 Tyrode 완충제(PGE1(1µM) 포함) 중에 혼합하였다. RT에서 반응의 2시간 후, 과량의 항체를 원심분리(10분 동안 800g)에 의해 제거하였다. 침전물 분획은 보유하고 Tyrode 완충제(PGE1(1µM) 포함)에 의해 2회 세척되었다. 혈소판 회수는 혈소판 수 분석에 기초하여 접합 후 80%보다 높았다. 얻은 aPDL1-혈소판을 사용까지 실온에서 Tyrode 완충제(PGE1(1µM) 포함) 중에 저장하였다. 접합된 혈소판으로부터 비접합된 혈소판을 분리하지 않았다. 혈소판에 대한 aPDL1의 최종 접합된 양은 ELISA에 의해 측정되었다(랫 IgG 전체 ELISA 키트, eBioscience, 카탈로그 88-50490-22호). 새로 단리된 혈소판은 6시간 내에 사용되었다. 혈소판 활성화를 평가하기 위해 혈소판 활성화 마커 CD62P를 사용하였다. 모든 혈소판 조작은 실온에서 수행되었다. 접합 효율을 연구하기 위해, 접합을 위해 aPDL1의 다양한 양을 혈소판에 첨가하였다. 비접합된 aPDL1을 상청액 중의 원심분리(10분 동안 800g)에 의해 제거하였다. 이후, 침전물 P-aPDL1을 원심분리(10분 동안 800g)에 의해 Tyrode 완충제(PGE1(1µM) 포함)에 의해 2회 세척하였다. 이후, P-aPDL1을 100µl의 탈이온수 중에 용해시키고, 세포 용해를 위해 초음파에 의해 처리하여 aPDL1을 방출시켰다. 혈소판에 대한 aPDL1의 접합된 양은 ELISA 분석에 의해 측정

되었다. 혈소판에 대한 aPDL1 접합(첨가된 aPDL1/접합된 aPDL1)의 효율은 혈소판마다 0.2pg의 aPDL1이 첨가될 때 약 75%이었다. aPDL1 변형 후 혈소판의 안정성을 연구하기 위해, 0시간 및 24시간에 혈소판 수 분석에 기초하여 P-aPDL1의 수를 측정하였다. 시간에 걸친 혈소판에 대한 aPDL1의 안정성을 연구하기 위해, P-aPDL1을 RT에서 Tyrode 완충제(PGE1(1 μM) 포함) 중에 저장하였다. 상이한 시간에 50 μl의 P-aPDL1을 추출하였다. 상청액 중의 방출된 aPDL1을 원심분리(10분 동안 800g)에 의해 제거하였다. P-aPDL1을 100 μl의 탈이온수 중에 용해시키고, 용해를 위해 초음파에 의해 처리하여 aPDL1을 방출시켰다. 혈소판에 대한 aPDL1의 접합된 양은 ELISA 분석에 의해 측정되었다. 혈소판을 활성화하기 위해, 0.5U 트롬빈/ml를 혈소판 현탁액에 첨가하였다. 혈소판 활성화 전에 PGE1을 제거하였다. 37°C에서 30분 동안 혈소판을 활성화하였다.

[0240] 이전에 기재된 바대로 혈소판으로부터 PMP를 제조하였다⁵³. 실험 전에, 혈소판 농축물을 30분 동안 트롬빈(2U/ml)에 의해 활성화하고, 800g에서 10분 동안 원심분리하고, PMP 중에 농축된 상청액을 수집하였다. 항-마우스 aIIbβ3 항체 및 항-마우스 CD62P(P 선택된) 항체를 사용하여 유세포분석법 분석에 의해 상청액을 조사하였다. 다음에, 상기 기재된 바대로 PMP를 aPDL1에 의해 커플링하였다. 커플링 효율 및 안정성은 ELISA에 의해 조사되었다.

[0241] **투과 전자 현미경검사(TEM)**

[0242] 후속하는 제제 단계에 의한 혈소판의 급격한 변화를 피하기 위해 혈소판을 10% 완충 폼알데하이드 용액과 혼합함으로써 혈소판의 예비고정을 수행하였다. 예비고정 직후에, 샘플을 800g에서 실온에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액을 버린 후, 혈소판을 4°C에서 90분 동안 카코딜레이트 완충제(pH 7.2) 중의 2.5% 글루타라알데하이드에 의해 고정하였다(활성화된 혈소판에 대해, TEM 영상화를 위해 상청액을 또한 수집하였다). 고정 후, 800g에서 4°C에서 10분 동안 원심분리에 의해 혈소판을 세척하였다. 이후, 혈소판을 5분 동안 순차적인 단계에서 2% 우라닐 아세테이트 및 시트르산납에 의해 염색하고, 이후 구리 그리드로 옮겼다⁵⁴. 80kV에서 JEOL 2000FX TEM 장치를 통해 혈소판의 TEM 영상을 얻었다.

[0243] **혈소판으로부터의 항-PDL1 및 사이토카인 방출**

[0244] P-aPDL1을 활성화하기 위해, 0.5U 트롬빈/ml를 37°C에서 30분 동안 P-aPDL1(500 μl의 Tyrode 완충제 중의 약 1x10⁸ 개의 혈소판, n=3) 현탁액에 첨가하였다. 상이한 시간에 50 μl의 P-aPDL1을 추출하였다. 상청액 중에 혈소판으로부터 방출된 aPDL1 및 사이토카인을 800g에서 10분 동안 원심분리에 의해 수집하였다. 불활성화된 P-aPDL1을 대조군으로서 사용하였다. 상청액 용액 중의 방출된 aPDL1 및 사이토카인의 양을 ELISA 검정에 의해 측정하였다. (eBioscience, 카탈로그 88-50490-22호(래트 IgG), 88-7013-22호(IL1β), 88-7064-22호(IL6), 88-7324-22호(TNF-α), BMS6010호(sCD40L)). Infinite(등록상표) 200 PRO 플레이트 판독기에서 흡광도를 기록하였다.

[0245] **생체내 약동학**

[0246] 3마리의 마우스에 유리 aPDL1, P-aPDL1 또는 비접합된 혈소판+a-PDL1 혼합물(각각의 마우스에 대해 200 μl의 PBS 중의 aPDL1, 2mg/kg, 혈소판, 2x10⁸)을 *i.v.* 주사하였다. 항응고 관을 사용하여 상이한 시점에 꼬리로부터 10 μl의 혈액을 추출하였다. 각각의 샘플을 100 μl의 물(Sigma, 카탈로그 W4502호) 중에 용해시키고, 세포 용해를 위해 초음파에 의해 처리하여 접합된 aPDL1을 방출시켰다. 래트 IgG 전체 ELISA 키트(eBioscience, 카탈로그 88-50490-22호)에 의해 aPDL1을 측정하였다. 생체내 생물분포 연구를 위해, 약 1%의 잔여 조직을 갖는 1차 종양의 제거가 뒤에 남은 후, 마우스에 Cy5.5 표지된 유리 aPDL1 또는 P-aPDL1을 *i.v.* 주사하였다. IVIS 시스템(Cy5.5에 대해 제공된 여기/방출 필터를 가짐, 노출 시간, 1초)에 의해 생체내 형광 영상을 기록하였다. 생체외 영상화를 위해, 주사 후 2시간에 치료된 마우스를 희생시켰다. 주요 기관 및 조직을 수집하고, IVIS 영상화 시스템(Cy5.5에 대해 제공된 여기/방출 필터를 가짐, 노출 시간, 1초)(Perkin Elmer Ltd) 하에 영상화하였다.

[0247] **생체내 종양 모델**

[0248] 암 재발에 대한 효과를 측정하기 위해, 1x10⁶ 개의 B16F10(또는 4T1) 또는 루시페라제 태그화된 B16F10(또는 4T1) 종양 세포를 마우스의 오른쪽 옆구리로 이식한 후 7일에(종양이 약 300mm³에 도달함); 종양을 절제하여서, 약 1% 잔류 조직이 뒤에 남아서 수술 베드에서 잔여 미세종양을 모방하였다³. 간단히, 동물을 챔버 유도를 통해 아이소플루란(유지를 위해 1% 내지 3%; 유도를 위해 5% 이하) 마취에 의해 마취시키고, 노즈콘을 통해 유지시켰다. 종양 부위를 클리핑하고 무균으로 준비하였다. 무균 장치를 사용하여 종양의 대략 99%를 제거하였다.

Autoclip Wound Clip 시스템에 의해 상처를 밀폐하였다. 실험 전이 모델에 대해, 200 μ l의 PBS 중의 1x10⁵개의 루시퍼라제 태그화된 B16F10(또는 4T1) 종양 세포를 1차 종양의 절제 후 꼬리 정맥을 통해 마우스에 정맥내 점적주사하였다. 마우스를 칭량하고 상이한 그룹으로 무작위로 나눴다(n=8). 수술 후, 마우스에 이후 바로 상이한 약물 제제에 의해 *i.v.* 주사하였다(aPDL1=1mg/kg, 마우스마다 200 μ l의 PBS 중의 1 내지 2x10⁸개의 혈소판)(여기서 사용된 새로 제조된 혈소판은 건강한 마우스의 동일한 균주로부터 수집되었다). 암 세포의 생물발광 신호에 의해 종양 부담을 모니터링하였다. 마우스를 클리핑하고 영상화 전에 체모제 크림을 사용하여 체모하였다. IVIS Lumina 영상화 시스템(Caliper(미국))을 사용하여 영상을 취했다. 디지털 캘리퍼에 의해 종양을 또한 측정하였다. 종양 용적(mm³)은 (긴 직경 x 짧은 직경²)/2로서 계산되었다. 생물발광에 의해 전이성 부담을 평가하였다. 폐를 칭량하고, 마이크로전이를 계수하였다. 손상된 건강의 징후를 나타낼 때 또는 종양의 용적이 2cm³을 초과할 때 동물을 마취시켰다.

[0249] 도 5c에서 전이성 폐 종양에 대해, 표준 프로토콜에 따라 폐 전이를 더 잘 가시화하도록 인디아 잉크(India ink)를 사용하였다⁵⁵. 마우스를 희생시키고, 기관내 잉크(85ml H₂O, 15ml의 잉크, 암모니아 물의 2방울) 주사 및 Fekete 용액(5ml의 70% 에탄올, 0.5ml의 포르말린 및 0.25ml의 빙초산)에 의한 고정 후 자각한 채 종양 부담을 정량화하였다. 2 내지 6시간 후, 종양 병변은 표백되는 한편, 정상 폐 조직은 염색된 채 있었다.

[0250] 또한, 종양을 치료 후 마우스로부터 절제하고, 면역형광 염색을 위해 최적 커팅 배지(O.C.T.)에서 급속 냉동시켰다. 형광 표지된 2차 항체를 사용하여 aPDL1 및 혈소판 또는 PMP를 검출하였다. H&E 염색을 위해, 분석을 위해 폐 종양을 갖는 동물을 희생시켰다. 표준 프로토콜에 따라 H&E에 의해 폐 조직 절편을 염색하였다. 모든 H&E 염색 절편을 Leica 현미경(Leica DM5500 B) 하에 조사하였다.

[0251] **사이토카인 검출**

[0252] IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 sCD40L의 국부 및 혈장 수준을 ELISA(eBioscience)에 의해 측정하였다. 상처에서 상이한 사이토카인의 농도를 결정하기 위해, 혈소판 주사 후 6시간에, 상처 조직을 수집하고 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양하였다. 100 μ l의 배지를 제거하고, 분석을 위해 -80 $^{\circ}$ C에서 동결시켰다. 혈장에서 사이토카인 수준을 결정하기 위해, 혈소판 주사 후 6시간에, 혈장 샘플을 다양한 치료 후 마우스로부터 단리하고, 분석을 위해 희석하였다. IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 sCD40L 농도를 ELISA(Thermo Scientific)에 의해 결정하였다. 3중 반복으로 모든 측정을 수행하였다.

[0253] **공초점 현미경검사**

[0254] 종양을 마우스로부터 절제하고, O.C.T.에서 급속 동결시켰다. 수 마이크로미터 절편을 크리오톰(cryotome)를 사용하여 절단하고 슬라이드에 탑재하였다. 절편을 PBS에 의한 재수화 전에 10분 동안 아주 차가운 아세톤 중에 고정하였다. BSA(3%)에 의한 차단 후, 절편을 밤새 4 $^{\circ}$ C에서 1차 항체에 의해 염색하였다. 형광 표지된 2차 항체의 첨가 이후에, 공초점 현미경(Zeiss LSM 710)을 사용하여 슬라이드를 분석하였다.

[0255] **생체내 생물발광 및 영상화**

[0256] IVIS Spectrum Imaging System(Perkin Elmer Ltd)에 의해 생물발광 영상을 수집하였다. Living Image 소프트웨어(Perkin Elmer Ltd)를 이용하여 동물(10 μ l/체중(g))로의 DPBS(15mg/ml) 중의 d-루시페린(Thermo Scientific (상표명) Pierce(상표명), 카탈로그 PI88291호)의 복강내 주사 후 10분에 데이터를 획득하였다. 생물발광 영상화에 대한 노출 시간은 5분이었다. (관독 시간을 최적화하기 위해, IVIS Imaging System을 사용하여 1분 노출 시간에 의해 30분 동안 생물발광 강도를 획득하였다.) 관심 대상의 영역(region of interest: ROI)은 평균 빛 (색상 막대로 표시된, 광자 s⁻¹ cm⁻² sr⁻¹)(IVIS Living Image 4.2)으로 정량화되었다.

[0257] **꼬리 출혈 검정**

[0258] 원위 마우스 꼬리의 끝으로부터 3mm를 제거하고 즉시 37 $^{\circ}$ C PBS 중에 꼬리를 액침시킴으로써 꼬리 출혈 시간을 결정하였다. 출혈의 완전한 중단은 출혈 시간의 종점으로 정의된다.

[0259] **통계 분석**

[0260] 모든 결과는 나타낸 바대로 평균 \pm s.d., 평균 \pm s.e.m.으로 표시된다. 생물학적 반복실험은, 달리 기재되지 않는 한, 모든 실험에서 사용되었다. 2개 초과 그룹이 비교될 때, 그리고 유의미한 것으로 결정될 때(P \leq 0.05), 변량의 1방향 분석(ANOVA)을 수행하고, 터키 사후 시험을 이용하여 다중 비교를 수행하였다. 로그-랭크 시험에 의

해 생존 이익을 결정하였다. GraphPad Prism(5.0)에 의해 모든 통계 분석을 수행하였다. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. 동물 또는 다른 실험에 대한 샘플 크기를 미리 결정하도록 통계 방법을 이용하지 않았다.

[0261]

참고문헌

1. Baker, D., Masterson, T., Pace, R., Constable, W. & Wanebo, H. The influence of the surgical wound on local tumor recurrence. *Surgery* **106**, 525-532 (1989).
2. Lukianova-Hleb, E.Y. et al. Intraoperative diagnostics and elimination of residual microtumors with plasmonic nanobubbles. *Nat. Nanotechnol.* (2016).
3. Stephan, S.B. et al. Biopolymer implants enhance the efficacy of adoptive T-cell therapy. *Nat. Biotechnol.* **33**, 97-101 (2015).
4. Demicheli, R., Retsky, M., Hrushesky, W., Baum, M. & Gukas, I. The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Ann. Oncol.*, mdn386 (2008).
5. Ceelen, W., Pattyn, P. & Mareel, M. Surgery, wound healing, and metastasis: Recent insights and clinical implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **89**, 16-26 (2014).
6. Klevorn, L.E. & Teague, R.M. Adapting Cancer Immunotherapy Models for the Real World. *Trends Immunol.* (2016).
7. O'Sullivan, D. & Pearce, E.L. Targeting T cell metabolism for therapy. *Trends Immunol.* **36**, 71-80 (2015).
8. Robert, C. et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2521-2532 (2015).
9. Postow, M.A. et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2006-2017 (2015).
10. Sharma, P. & Allison, J.P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56-61 (2015).
11. Wang, C., Ye, Y., Hochu, G.M., Sadeghifar, H. & Gu, Z. Enhanced Cancer Immunotherapy by Microneedle Patch-Assisted Delivery of Anti-PD1 Antibody. *Nano Lett.* **16**, 2334-2340 (2016).
12. Zou, W., Wolchok, J.D. & Chen, L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci. Transl. Med.* **8**, 328rv324 (2016).
13. Buchbinder, E.I. & Hodi, F.S. Melanoma in 2015: Immune-checkpoint blockade - durable cancer control. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 77-78 (2016).
14. Smyth, E.C. & Cunningham, D. Encouraging results for PD-1 inhibition in gastric cancer. *Lancet Oncol.* (2016).
15. Rosenberg, J.E. et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet* **387**, 1909-1920 (2016).
16. Naidoo, J. et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann. Oncol.*, mdv383 (2015).
17. Mellati, M. et al. Anti-PD-1 and Anti-PDL-1 Monoclonal Antibodies Causing Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **38**, e137-138 (2015).
18. Boutros, C. et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in

[0262]

- combination. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2016).
19. Larkin, J. et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **373**, 23-34 (2015).
 20. Chen, L. & Han, X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J. Clin. Invest.* **125**, 3384-3391 (2015).
 21. Weber, J.S., Kahler, K.C. & Hauschild, A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2691-2697 (2012).
 22. Woo, S.R., Corrales, L. & Gajewski, T.F. The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment. *Trends Immunol.* **36**, 250-256 (2015).
 23. Hegde, P.S., Karanikas, V. & Evers, S. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1865-1874 (2016).
 24. Spranger, S. et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Sci. Transl. Med.* **5**, 200ra116-200ra116 (2013).
 25. Gajewski, T.F., Schreiber, H. & Fu, Y.X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* **14**, 1014-1022 (2013).
 26. Fesnak, A.D., June, C.H. & Levine, B.L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 566-581 (2016).
 27. Yoo, J.W., Irvine, D.J., Discher, D.E. & Mitragotri, S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 521-535 (2011).
 28. Tamagawa-Mineoka, R. Important roles of platelets as immune cells in the skin. *J. Dermatol. Sci.* **77**, 93-101 (2015).
 29. Franco, A.T., Corken, A. & Ware, J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood* **126**, 582-588 (2015).
 30. Hu, C.M. et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature* **526**, 118-121 (2015).
 31. Textor, J. in *Platelet-Rich Plasma* 61-94 (Springer, 2014).
 32. Harker, L.A. et al. Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood* **95**, 2514-2522 (2000).
 33. Nurden, A.T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I. & Anitua, E. Platelets and wound healing. *Front Biosci.* **13**, 3532-3548 (2008).
 34. Gay, L.J. & Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumor metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 123-134 (2011).
 35. Nash, G.F., Turner, L.F., Scully, M.F. & Kakkar, A.K. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* **3**, 425-430 (2002).
 36. Hu, Q. et al. Anticancer Platelet-Mimicking Nanovehicles. *Adv. Mater.* **27**, 7043-7050

[0263]

(2015).

37. Garraud, O. Editorial: Platelets as immune cells in physiology and immunopathology. *Front Immunol.* **6**, 1-3 (2015).
38. Morrell, C.N., Aggrey, A.A., Chapman, L.M. & Modjeski, K.L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* **123**, 2759-2767 (2014).
39. Semple, J.W., Italiano, J.E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 264-274 (2011).
40. Elzey, B.D. et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* **19**, 9-19 (2003).
41. Seifert, L. et al. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature* **532**, 245-249 (2016).
42. Topalian, S.L., Drake, C.G. & Pardoll, D.M. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 207-212 (2012).
43. Siljander, P.R.M. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb. Res.* **127**, S30-S33 (2011).
44. Li, J., Sharkey, C.C., Wun, B., Liesveld, J.L. & King, M.R. Genetic engineering of platelets to neutralize circulating tumor cells. *J. Control Release* **228**, 38-47 (2016).
45. Ruggeri, Z.M. & Mendolicchio, G.L. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ. Res.* **100**, 1673-1685 (2007).
46. Mause, S.F., von Hundelshausen, P., Zerneck, A., Koenen, R.R. & Weber, C. Platelet microparticles - A transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1512-1518 (2005).
47. Tripathi, S. & Guleria, I. Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to the fetus. *Biomed. J.* **38**, 25-31 (2015).
48. Headley, M.B. et al. Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature* **531**, 513-517 (2016).
49. Flaumenhaft, R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol. Dis.* **36**, 182-187 (2006).
50. Rand, M.L., Wang, H., Bang, K.W., Packham, M.A. & Freedman, J. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J. Thromb Haemost* **4**, 1621-1623 (2006).
51. Lu, Y., Aimetti, A.A., Langer, R. & Gu, Z. Bioresponsive materials. *Nature Reviews Materials* **1**, 16075 (2016).
52. Cazenave, J.-P. et al. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Platelets and Megakaryocytes: Volume 1: Functional Assays*, 13-28 (2004).
53. Janowska-Wieczorek, A. et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment after transplantation. *Blood* **98**, 645a-645a (2001).
54. Cheville, N.F. & Stasko, J. Techniques in electron microscopy of animal tissue. *Veterinary pathology* **51**, 28-41 (2014).
55. Zimmerman, M., Hu, X. & Liu, K. Experimental metastasis and CTL adoptive transfer immunotherapy mouse model. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2010).
56. Wang, C. et al. Dataset for In situ Activation of Platelets with Checkpoint Inhibitors for Post-Surgical Cancer Immunotherapy. Figshare <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.4231766> (2016).

[0264]

[0265]

[0266]

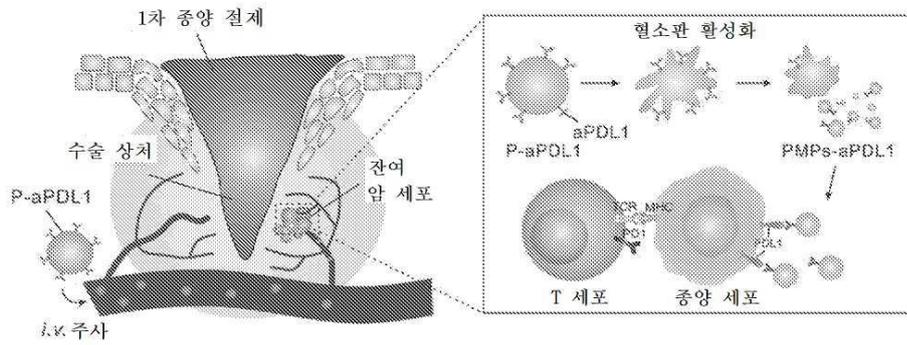
[0267]

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 당해 분야의 당업자에게 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 인용된 공보 및 이것이 인용한 자료는 구체적으로 참고로 포함된다.

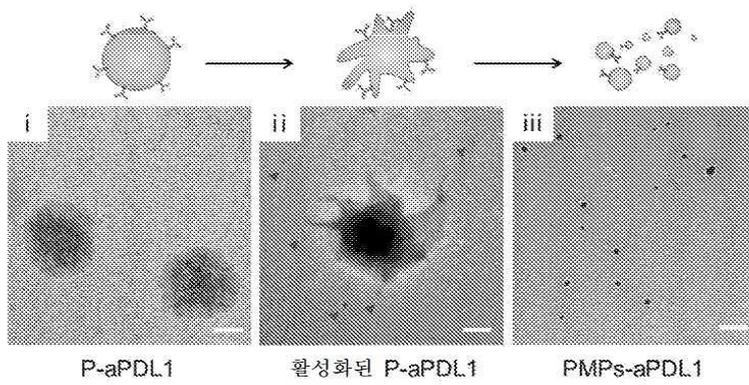
당업자는 본 발명의 바람직한 실시형태에 변경 및 변형이 이루어질 수 있고, 이러한 변경 및 변형이 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 첨부된 청구항이 본 발명의 진정한 사상 및 범위 내에 해당하는 모든 이러한 균등한 변경을 포괄하는 것으로 의도된다.

도면

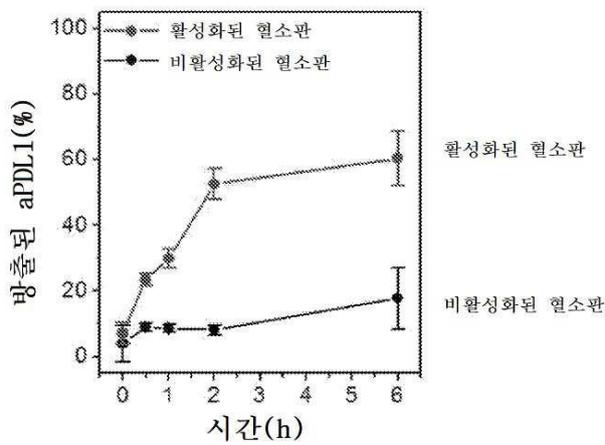
도면1a



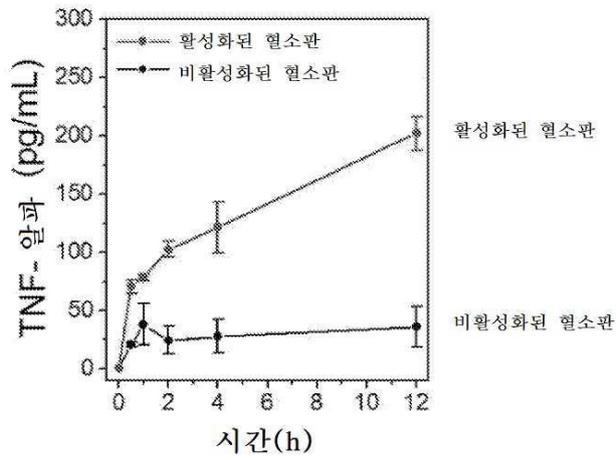
도면1b



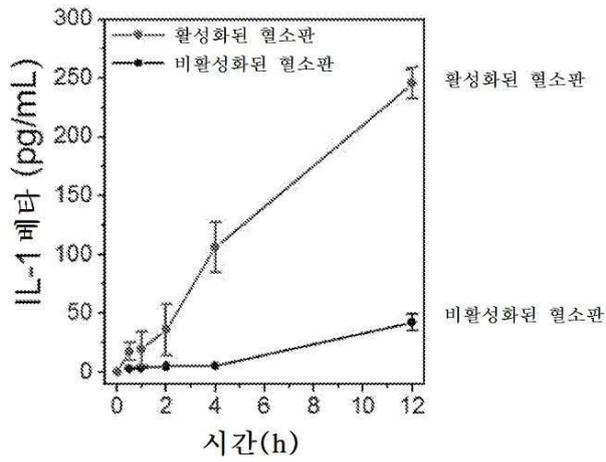
도면1c



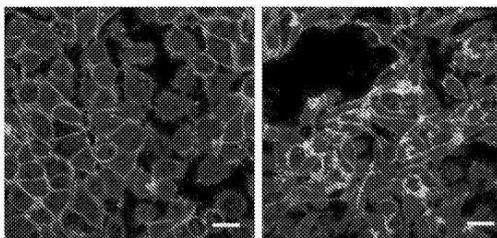
도면1d



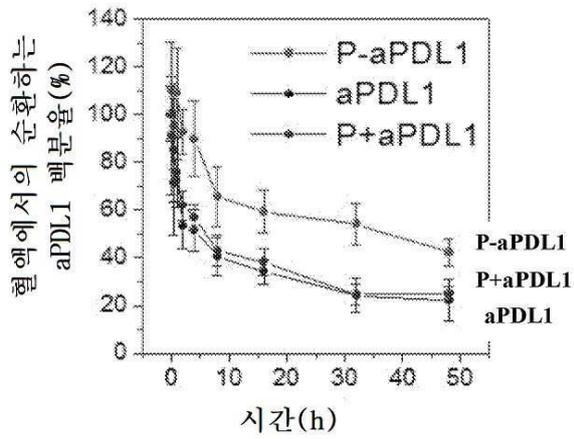
도면1e



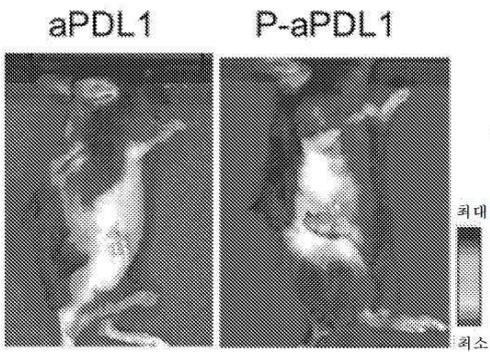
도면1f



도면2a



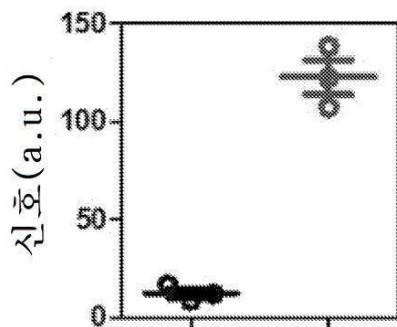
도면2b



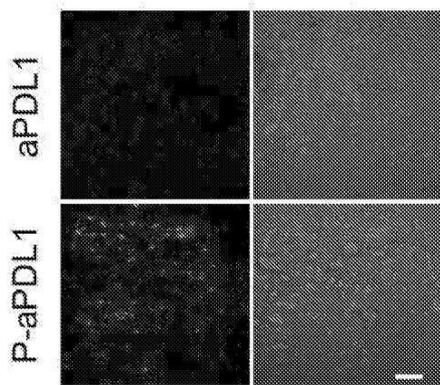
도면2c



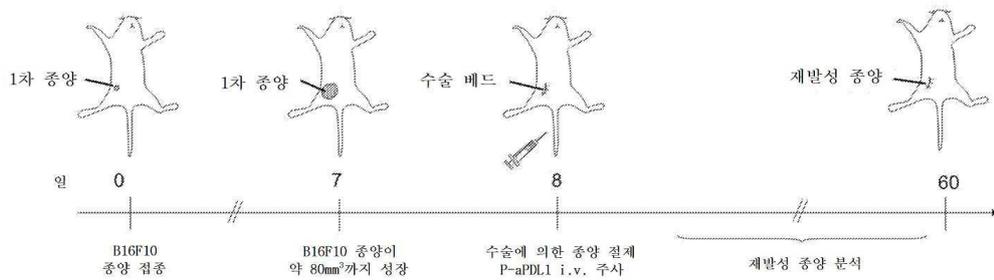
도면2d



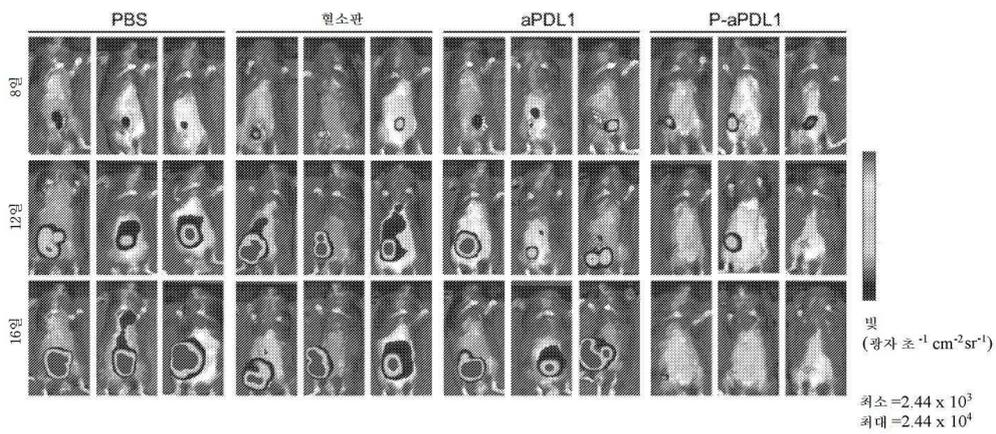
도면2e



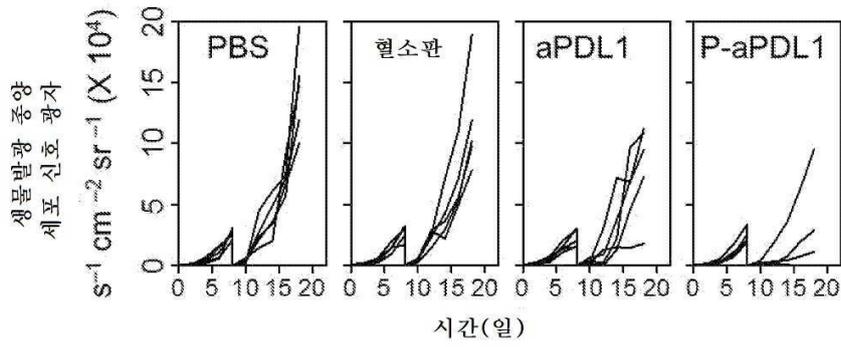
도면2f



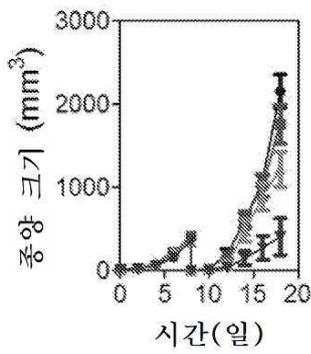
도면2g



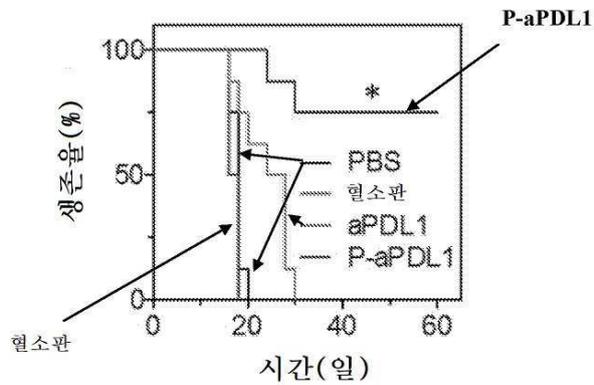
도면2h



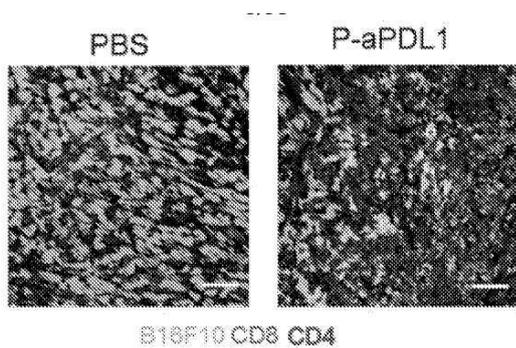
도면2i



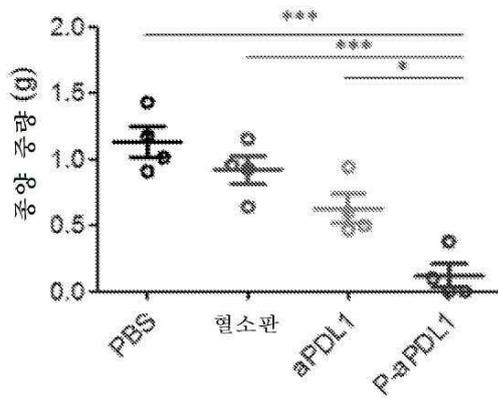
도면2j



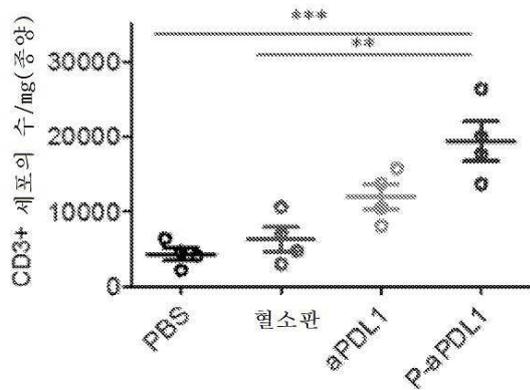
도면3a



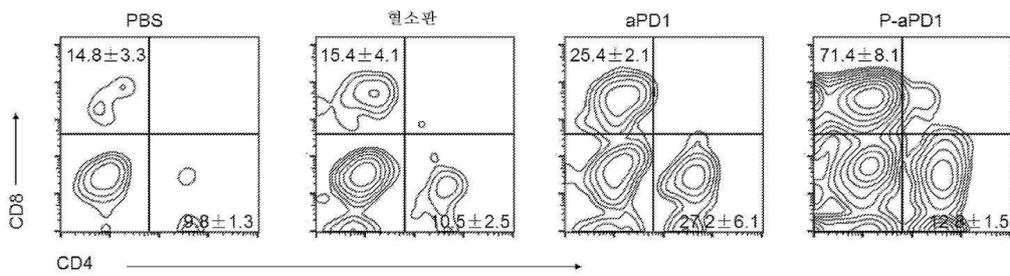
도면3b



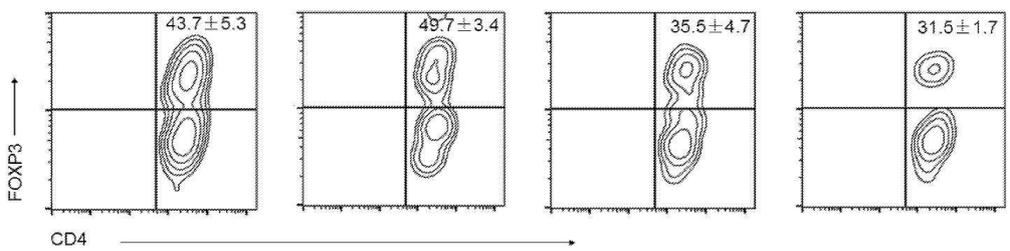
도면3c



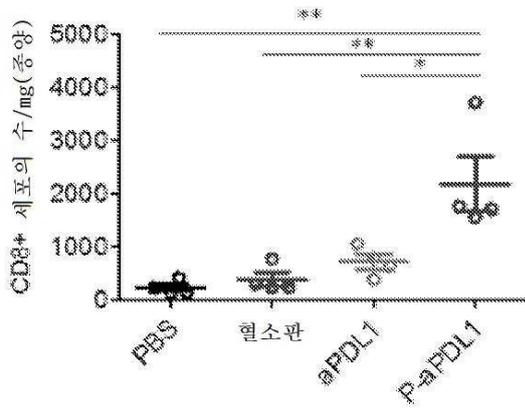
도면3d



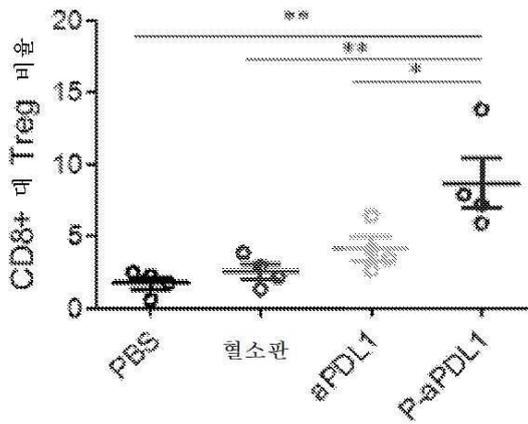
도면3e



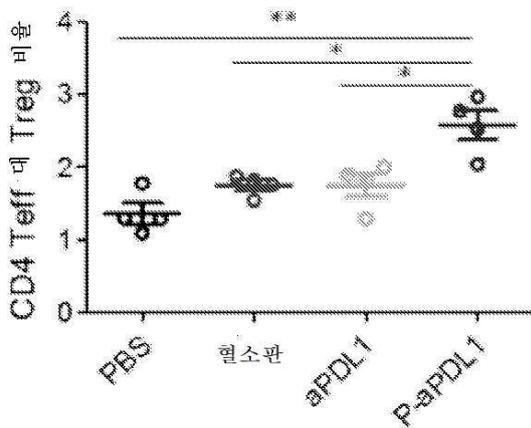
도면3f



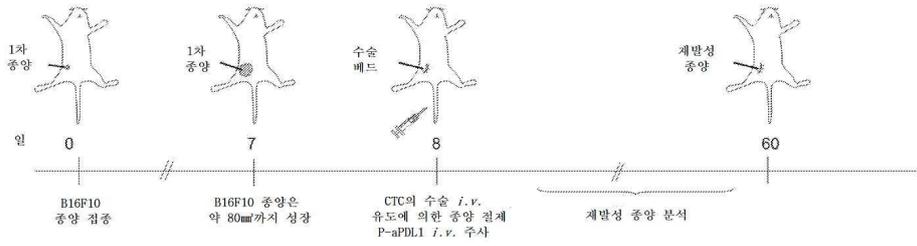
도면3g



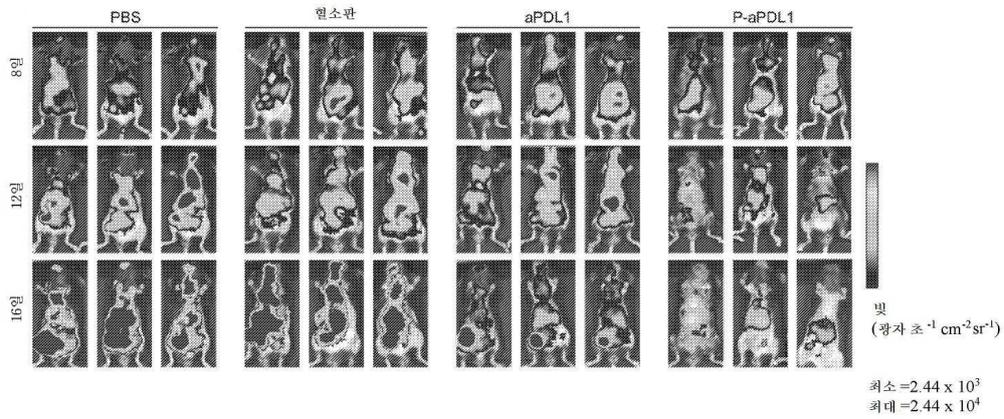
도면3h



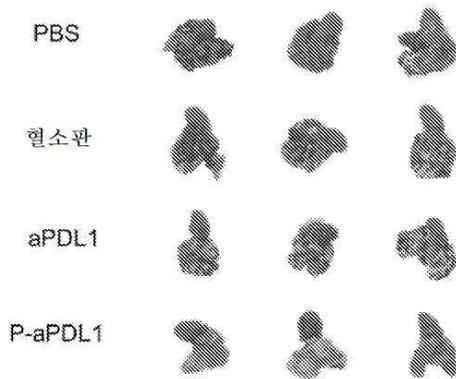
도면4a



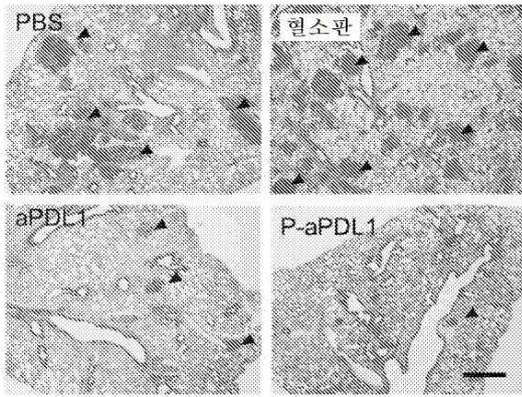
도면4b



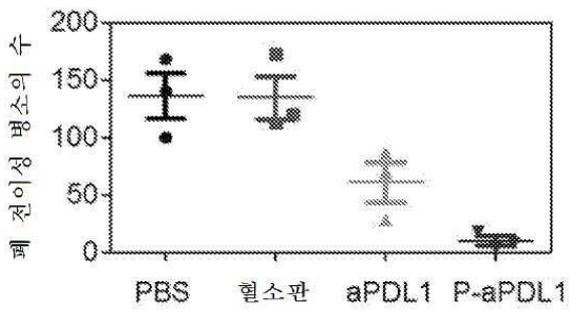
도면4c



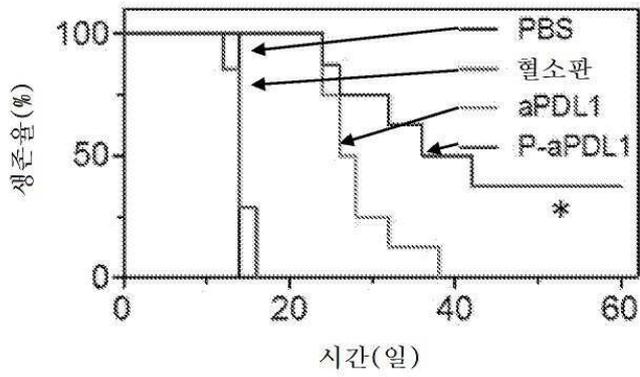
도면4d



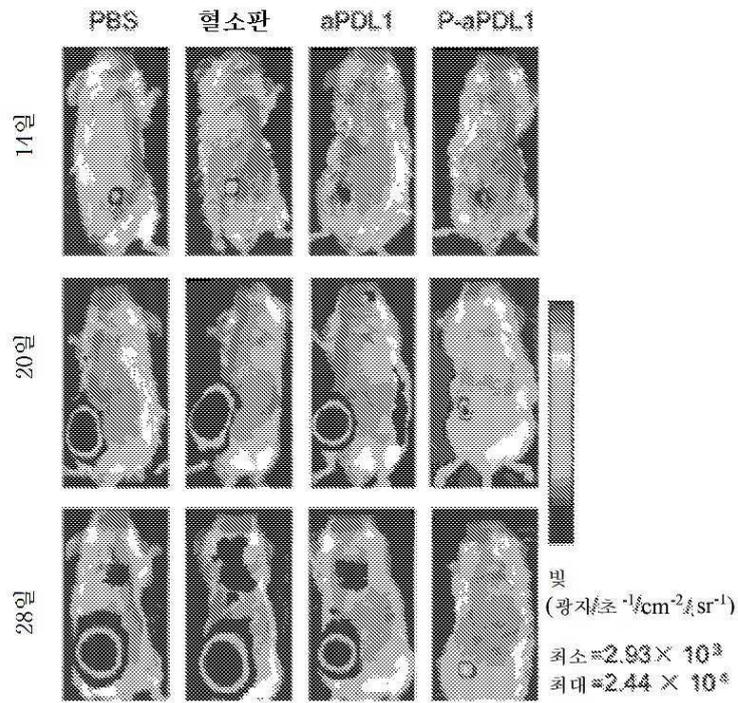
도면4e



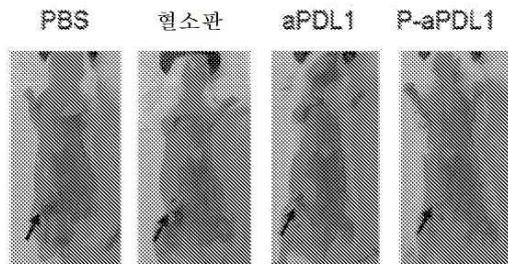
도면4f



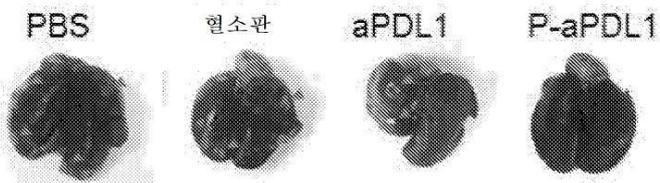
도면5a



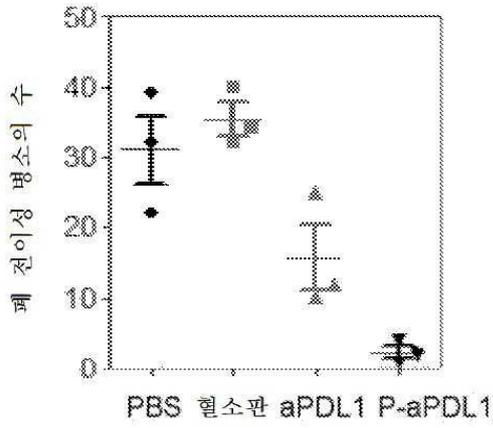
도면5b



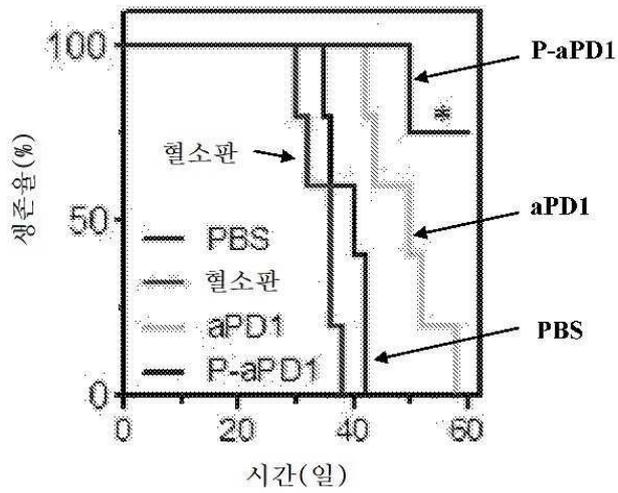
도면5c



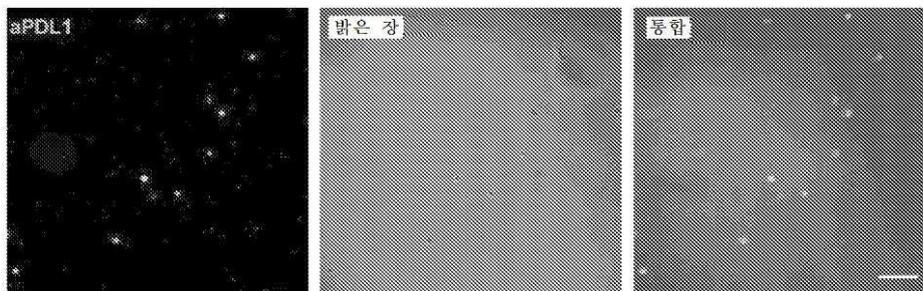
도면5d



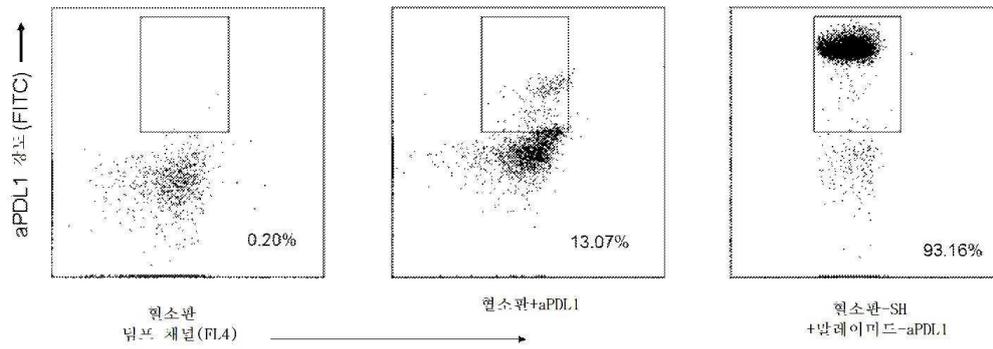
도면5e



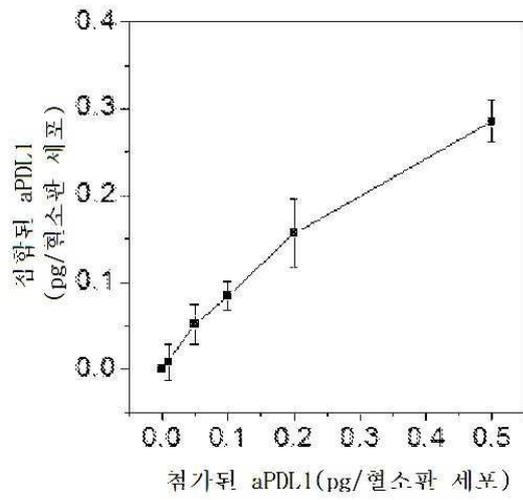
도면6



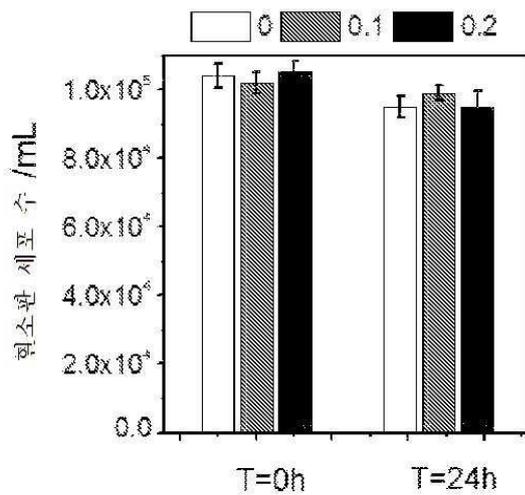
도면7



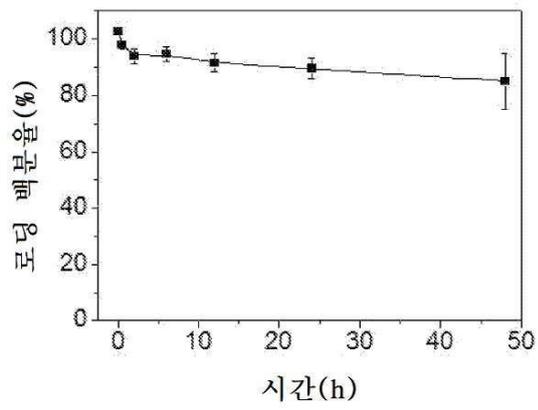
도면8a



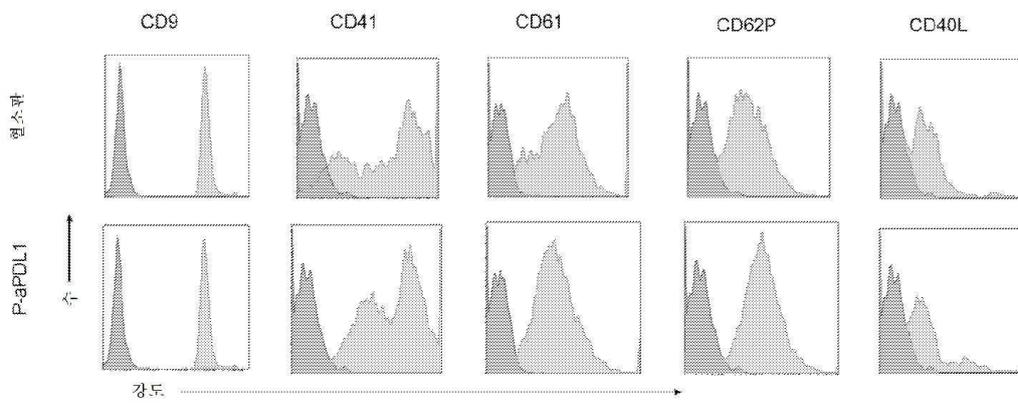
도면8b



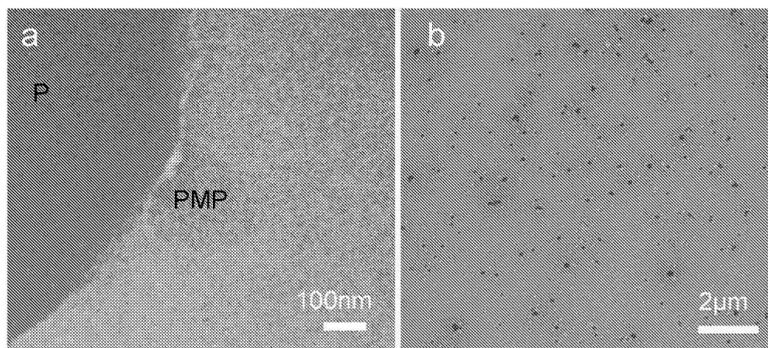
도면8c



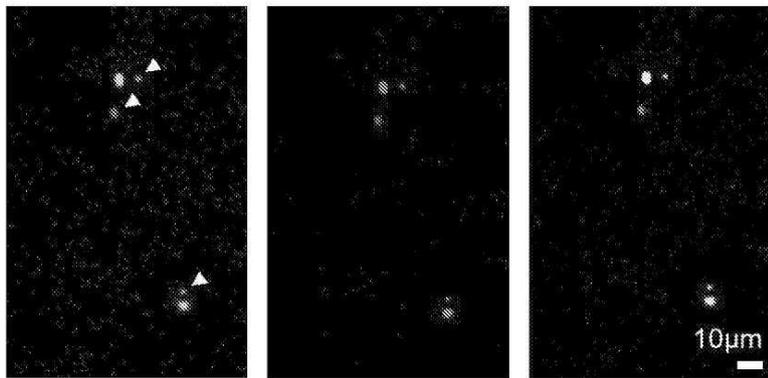
도면9



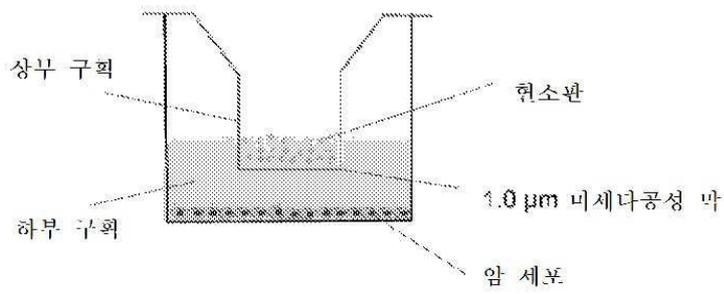
도면10



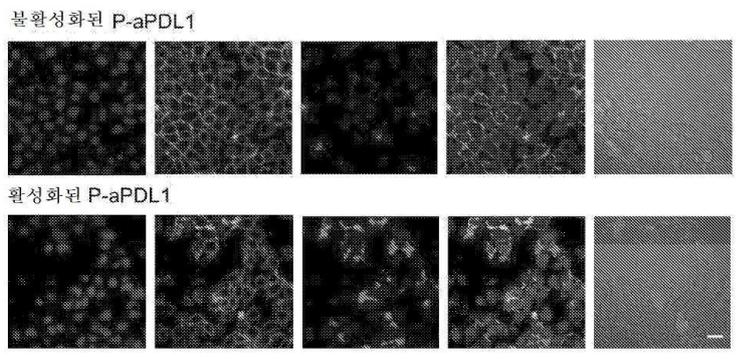
도면11



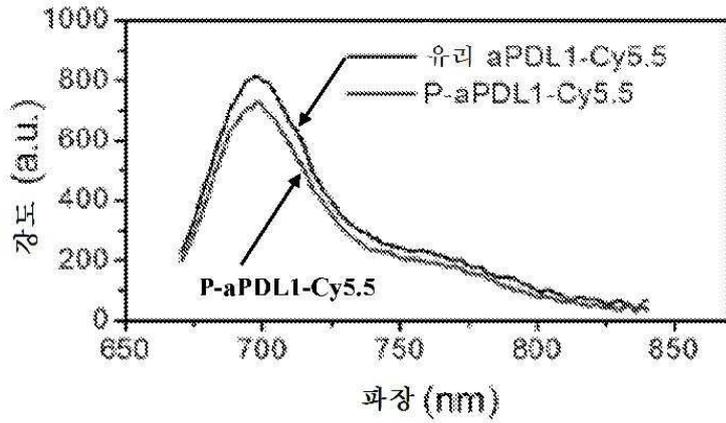
도면12a



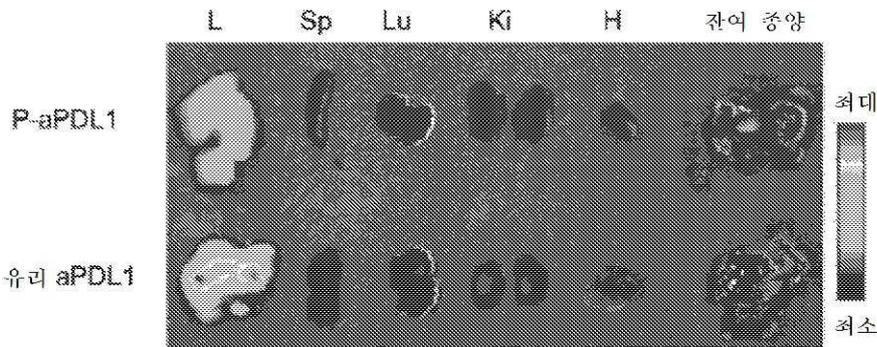
도면12b



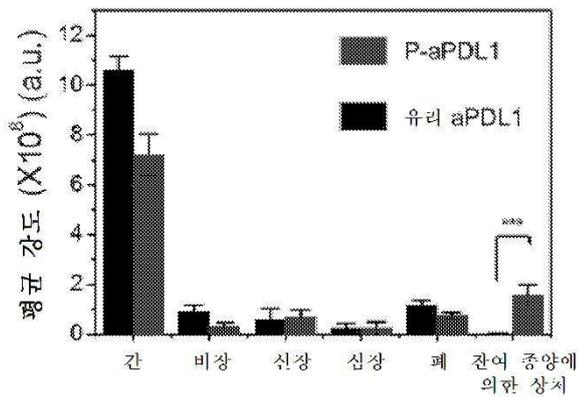
도면13a



도면13b

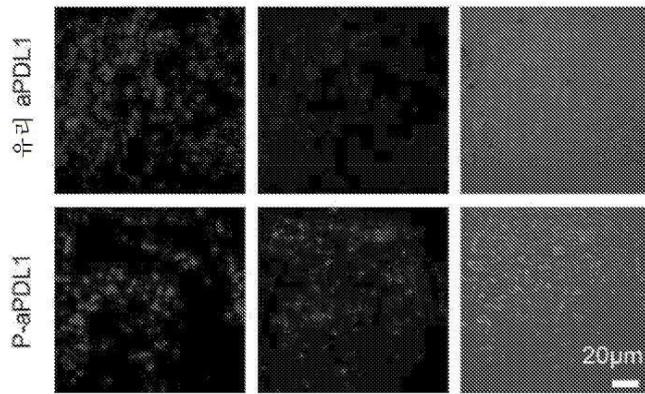


도면13c

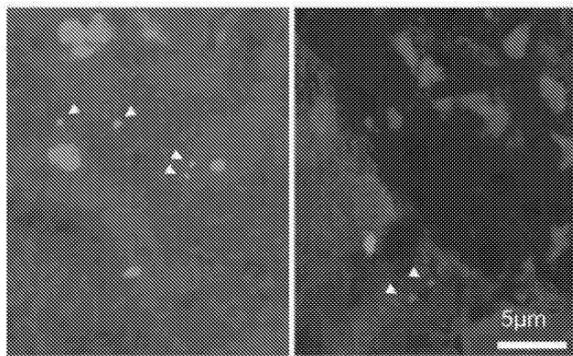


	유리 aPDL1		P-aPDL1			
간	11.05	10.78	10.02	7.244	8.860	8.491
비장	1.185	0.809	0.736	0.488	0.232	0.189
신장	0.410	0.299	1.100	0.603	1.009	0.500
심장	0.450	0.141	0.092	0.526	0.129	0.090
폐	1.364	1.142	1.043	0.906	0.715	0.656
잔여 중양에 의한 상치	0.017	0.0479	0.0335	2.029	1.442	1.219

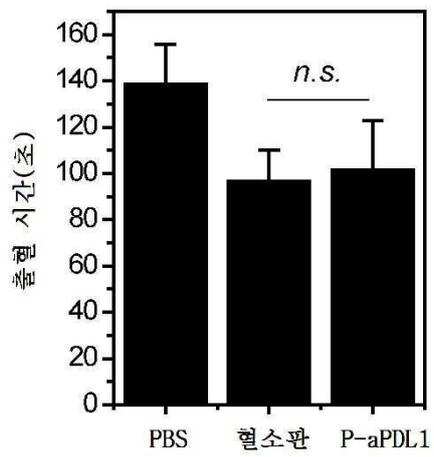
도면14a



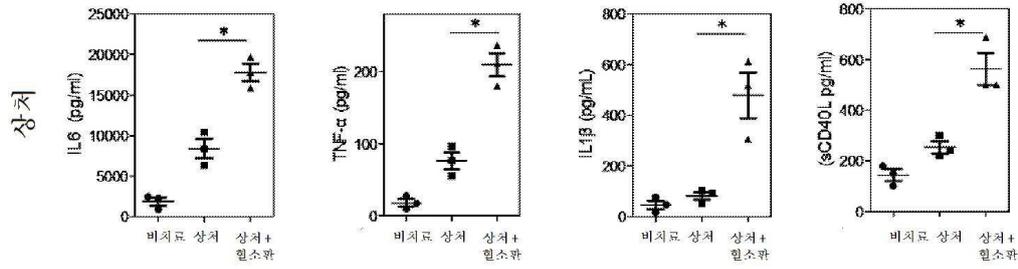
도면14b



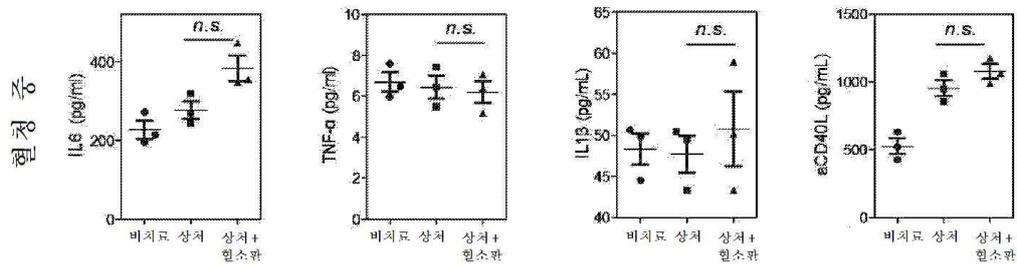
도면15



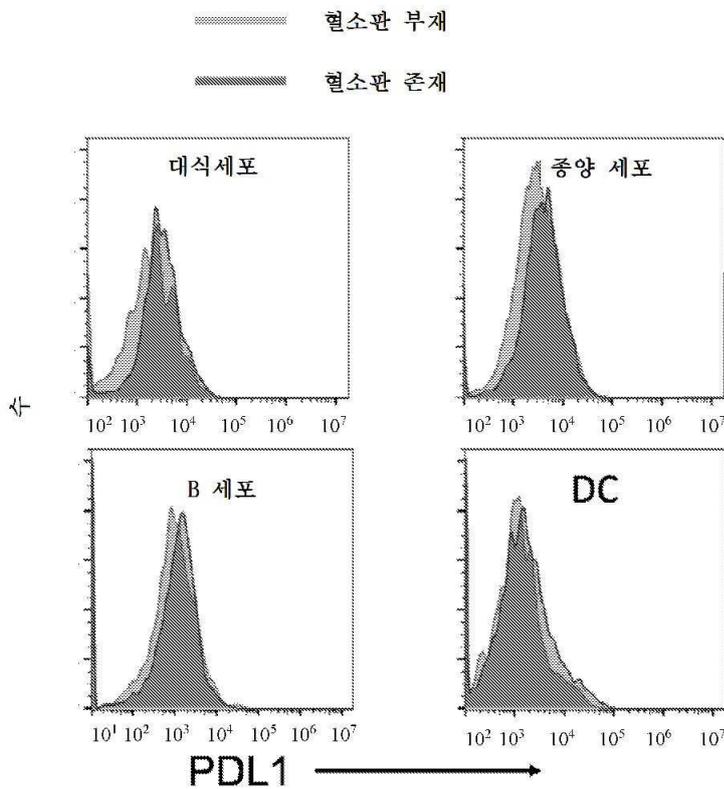
도면16a



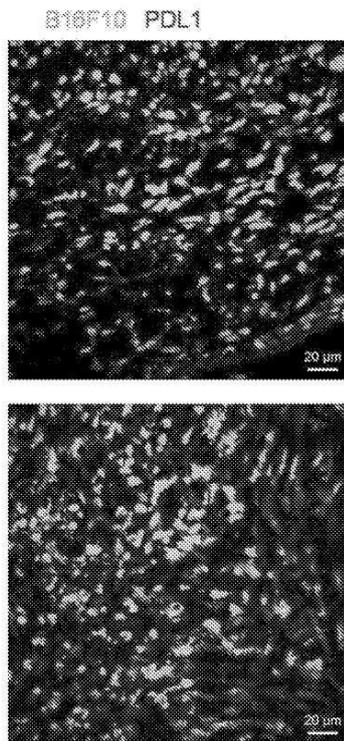
도면16b



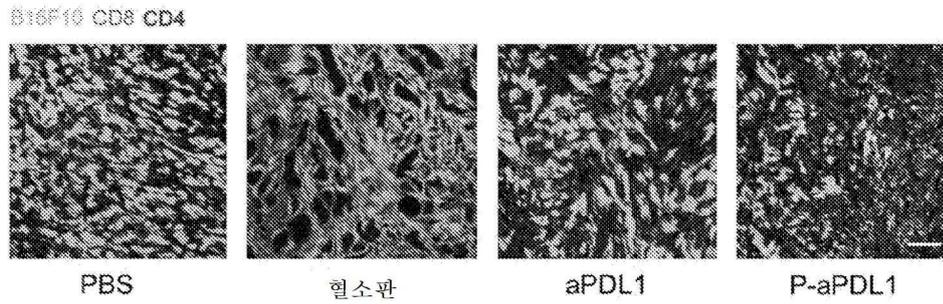
도면16c



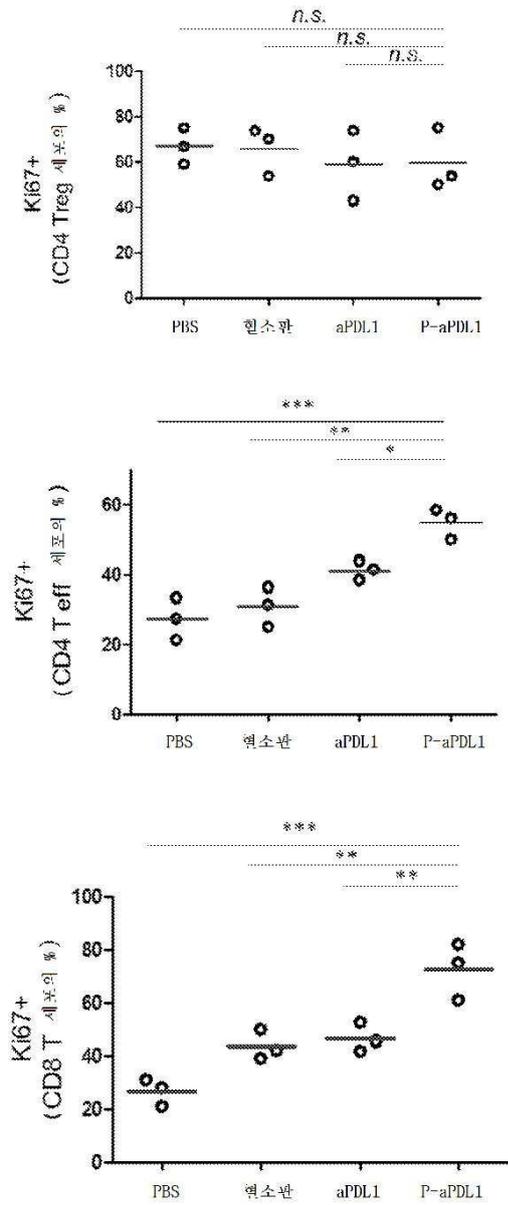
도면16d



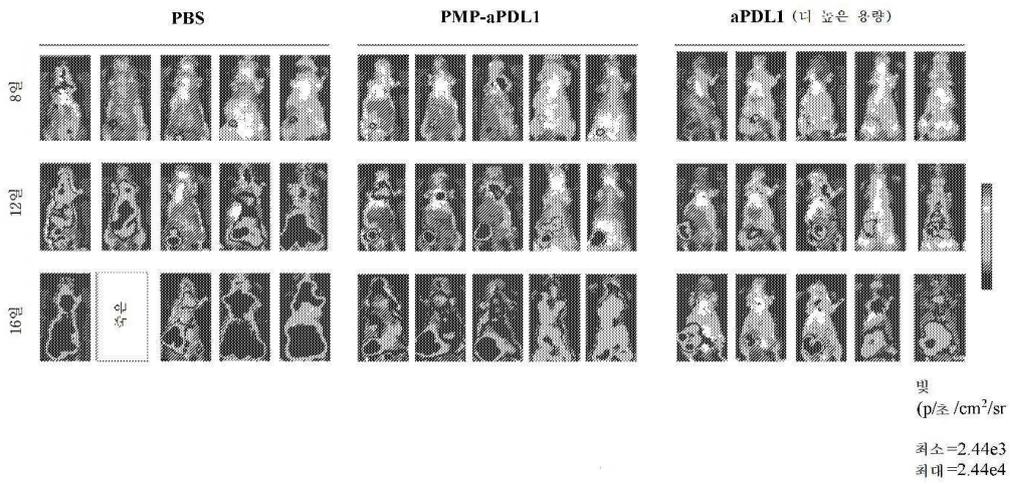
도면17



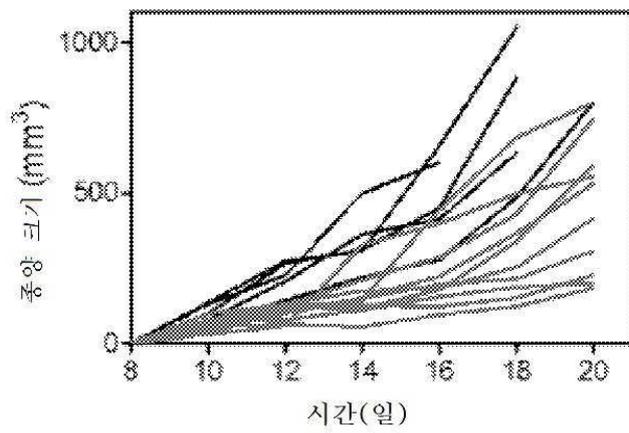
도면18



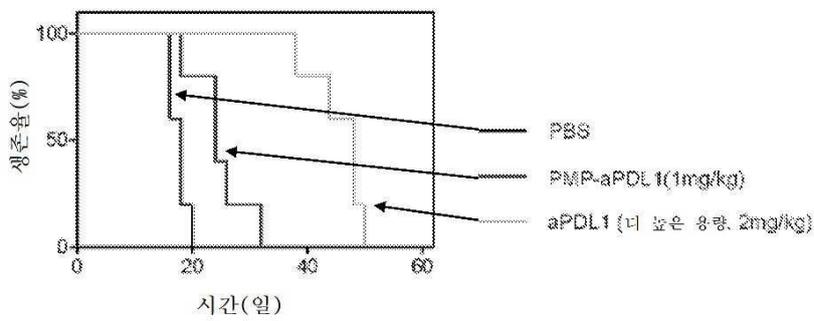
도면19a



도면19b



도면19c



도면20

