

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2021/177679 A1

2021 년 9 월 10 일 (10.09.2021) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

이상남 (LEE, Sang Nam); 16417 경기도 수원시 장안구 화산로 203번길 24, 3동 605호, Gyeonggi-do (KR).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2021/002508

(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06158 서울시 강남구 테헤란로 445, 13층, Seoul (KR).

(22) 국제출원일:

2021 년 2 월 26 일 (26.02.2021)

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0025780 2020 년 3 월 2 일 (02.03.2020) KR

10-2021-0026013 2021 년 2 월 25 일 (25.02.2021) KR

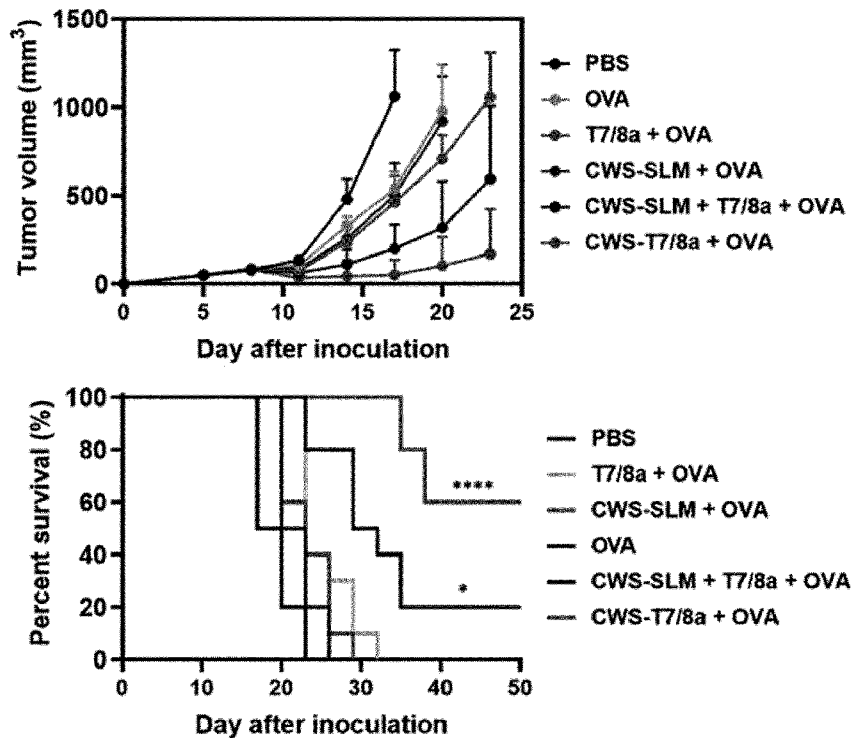
(71) 출원인: 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 임용택 (LIM, Yong Taik); 13597 경기도 성남시 분당구 내정로 151, 524동 1301호, Gyeonggi-do (KR).

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: LIVE-PATHOGEN-MIMETIC NANOPARTICLES BASED ON PATHOGEN CELL WALL SKELETON, AND PRODUCTION METHOD THEREOF

(54) 발명의 명칭: 병원균 외벽 성분 기반 생병원체 모방 나노 입자 및 그 제조 방법



(57) Abstract: The present invention relates to: a lyophilized preparation of a pathogen cell wall skeleton, the preparation containing the pathogen cell wall skeleton as an active ingredient; various live-pathogen-mimetic nanoparticles produced by using the lyophilized preparation and antagonists of toll-like receptor 7 or 8 which can induce the efficacy of the live pathogen; a use thereof; and a production method thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 병원균의 외벽 성분(pathogen cell wall skeleton)을 유효성분으로 포함하는 병원균 외벽 성분의 동결 건조 제제, 상기 동결 건조 제제와 생병원체 효능을 유도할 수 있는 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 이용하여 제조되는 다양한 생병원체 모방 나노 입자, 이의 용도, 이의 제조 방법 등에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/177679 A1

ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 병원균 외벽 성분 기반 생병원체 모방 나노 입자 및 그 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 병원균 외벽 성분 기반 생병원체 모방 나노 입자 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 구체적으로 수용액에 용이하게 분산되는 병원균 외벽 성분의 동결 건조 제제와 생병원체 효능을 유도할 수 있는 면역활성화 물질을 이용하여 제조된 병원균 외벽 성분 기반 생병원체 모방 나노 입자, 이의 용도, 이의 제조 방법 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 백신(vaccine)이란 인간을 비롯한 동물에 후천성 면역을 부여하는 의약품으로서, 사멸되거나 약독화된 병원체, 단백질, 합성 펩티드 등과 같은 면역원성을 유도할 수 있는 물질을 이용하여, 미생물 감염병은 물론 악성 종양(암), 알레르기 질환 등을 예방하거나 치료하는데 광범위하게 이용되고 있다. 일반적으로 백신은 생백신, 약독화백신, 사백신, 재조합 백신이 있으며, 이 중 생백신 및 약독화백신의 경우 바이러스의 제조 시일이 오래 걸리고 생산 단가가 높을 뿐만 아니라 안전성 문제를 수반하고 있다. 이에 따라, 안전성이 뛰어나고 생산 효율이 좋은 재조합 백신에 대한 연구가 활발히 진행되었으나, 재조합 백신의 경우에는 기존 바이러스 유래 백신과 비교하여 면역원성이 낮아 치료 효율이 떨어진다는 문제점을 가지고 있다(대한민국공개특허 10-2014-0041134). 이러한 단점들을 극복하기 위하여 최근 병원균의 외벽 성분을 이용한 새로운 대체 의약품 개발에 대한 관심이 증가되고 있으나, 대부분의 외벽 성분을 이용한 의약품 제제는 다음과 같은 문제점을 갖고 있다. 첫째, 대부분의 병원균의 외벽성분은 지용성 특성을 보이기 때문에 다양한 의약품 제형으로 개발하기에는 한계를 가지고 있다. 둘째, 병원균 외벽성분을 이용한 백신 성분은 불활성화 사백신(killed or inactivated vaccine) 또는 약독화 백신(live attenuated vaccine)에 비해서 안전성(safety)은 우수하나, 면역원성이 약하다는 치명적인 한계점을 가지고 있다. 따라서, 효과적인 면역 치료제의 개발을 위해서는 대량 생산이 가능하며, 높은 안정성 및 우수한 면역원성을 가지고 있으며, 동시에 다양한 제형으로 제조가 가능한 병원균 기반 신규 개념의 백신 개발이 절실히 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [3] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 대량 생산이 가능하며, 높은 안전성 및 높은 면역원성을 가지며, 동시에 다양한 제형으로 제조가 가능한 생병원체 모방 나노 입자, 이의 용도, 이의 제조 방법

등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

- [4] 본 발명의 병원균 외벽 성분, 및 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 생병원체 모방 나노 입자는 일차적으로 병원균의 외벽 성분을 기반으로 하여, 병원체 인식을 통하여 세포의 면역반응을 활성화시키고, 이후 식포작용을 통하여 면역 세포의 내부로 전달된 후, 살아있는 병원균의 live/death 신호와 관련이 있는 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자가 작동되어 신호 전달 및 세포성 면역반응을 활성화시키는 작용을 통하여 면역원성을 증가시킬 수 있으며, 이를 통하여 높은 면역원성을 가지는 생병원체 모방 나노 입자를 제공할 수 있다(도 1).
- [5] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

기술적 해결방법

- [6] 본 발명은 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자, 및 병원균의 외벽 성분(pathogen cell wall skeleton) 기반 나노분산체를 유효성분으로 포함하는, 생병원체 모방 나노 입자를 제공한다. 상기 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자는 활성화 부위에 지질이 결합되어 비활성화 상태인 것이 바람직하다. 상기 지질은 바람직하게는 지방산(Fatty acids) 계열, 스테로이드(Steroids) 계열, 글리세라이드(Glycerides) 계열, 인지질(Phospholipids) 계열, 콜레스테롤(Cholesterol) 계열, 지용성 비타민(Fat-soluble vitamin) 계열 등이거나, 상기 지질은 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 활성화 부위에 결합하여 비활성화 상태로 만드는 동시에, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자가 체내에서 혈관으로 흡수되지 않게 하는 용도이기 때문에, 알려져 있는 지질의 종류라면 제한이 없다.
- [7] 그리고 상기 병원균 외벽 성분 기반 나노분산체는 지질 및 막단백질이 제거된 병원균 외벽 성분이 수용액에 분산되어 있는 형태를 의미하며, 상기 수용액(aqueous solution)은 용매를 물로 하여 제조된 모든 용액을 총칭하며, 바람직하게는 완충용액(buffer), 양이온성 완충용액 등이거나, 용매가 물이라면 제한이 없다.
- [8] 본 발명에 있어서, 상기 병원균 외벽 성분은 종(species)과 균주(strain)에 따라 달라질 수 있으며, 병원균을 물리적으로 파쇄한 후에 뉴클리에이즈(nuclease), 프로테이즈(protease) 및 유기용제 세척 등을 포함하는 정제과정(purification process)을 거쳐 얻어진 비가용성 잔여물들(insoluble residues)을 총칭하며, 일반적으로 생체고분자(biopolymer) 물질로 구성되어 있으며, 일 예로, 긴-사슬지방산(long-chain fatty acid), 당사슬(sugar chain), 펩티도글리칸(peptide glycan) 등을 포함할 수 있다. 그러나 일반적으로 병원균의 외벽 성분에 포함되어 있는 요소라면 이에 제한되지 않는다.

- [9] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 병원균 외벽 성분은 동결 건조되어 수용액에 쉽게 분산되는 것을 특징으로 한다.
- [10] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 병원균은 질병을 유발하는 미생물을 총칭하며, 바람직하게는 병원성 세균(pathogenic bacteria), 바이러스(virus), 곰팡이(fungi) 등이며, 더욱 바람직하게는 BCG(bacille Calmette-Guerin) 균주, 미코박테리움속 세균, 노카르디아속 세균, 코리네박테리움속 세균, 로도코커스속 세균, 고르도나 속 세균, 코로나 바이러스 등이나, 이에 제한되지 않는다.
- [11] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자와 지질의 결합은 분리가 가능한(cleavable) 형태이며, 상기 분리가 가능한 형태의 결합은 바람직하게는 카바메이트(carbamate), 다이설파이드(disulfide), 에스터(ester), 펩타이드(peptide), 아자이드(azide), 아마이드(amide), 하이드라존(hydrazone), 티오이써(thioether), 포스포디에스터(phosphodiester), 티오케탈(thioketal), 이의 조합 등의 방식으로 결합되는 것이나, 종양미세환경, 또는 세포내의 엔도솜 및 라이소솜의 효소 및 pH에 반응하여, 결합 부위의 화학적 결합이 절단(cleavage)되는 형태이거나, 온도, redox potential, ROS, ATP, ultrasound, magnetic field, light 등의 특정 자극에 의하여 절단이 되는 형태라면 이에 제한되지 않는다. 상기 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자는 상기 절단에 의하여 활성화 부위가 노출되어 4 일내에 동력학적으로 기능이 회복되는 것을 특징으로 한다. 상기 효소는 세포 내에 존재하는 다양한 효소라면 제한이 없으나, 바람직하게는 Acid phosphatase, Acid phosphatase, Phosphodiesterase, Phosphoprotein phosphatase, Phosphatidic acid phosphatase, Arylsulfatase, Proteases, Cathepsins, Collagenase, Arylamidase, Peptidase, Acid ribonuclease, Acid deoxyribonuclease, Lipases, Triglyceride lipase, Phospholipase, Esterase, Carboxylesterase, Glucocerebrosidase, Galactocerebrosidase, Sphingomyelinase, Glycosidases, alpha-Glucosidase, beta-Glucosidase, beta-Galactosidase, alpha-Mannosidase, alpha-mannosidase, beta-Xylosidase, alpha-N-Acetylhexosaminidase, beta-N-Acetylhexosaminidase, Sialidase, Lysozyme, Hyaluronidase, beta-Glucuronidase 등일 수 있다.
- [12] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자는 바람직하게는 이미다조퀴놀린(imidazoquinoline) 계열, 하이드록시아데닌(hydroxyadenine) 계열, 프테리돈(pteridone) 계열, 아미노피리미딘(aminopyrimidine) 계열, 벤조아제핀(benzazepine) 계열, 타이아옥소구아노신(thia-oxoguanosine) 계열, 이들의 유사체(derivative) 등이나, 알려져 있는 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자라면 이에 제한되지 않는다.
- [13] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 나노 입자는 병원균의 외벽 성분 기반 나노분산체가 구형의 나노 입자를 형성하고, 상기 구형의 나노 입자에 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자가 결합된 형태일 수도 있고, 또는 결합과 관계없이

내포되어 있는 형태일 수 있으며, 또는 나노 입자 표면에 부착되어 있는 형태일 수도 있으며, 또는 나노 입자 구조 사이에 끼어들어가 있는 형태일 수도 있으며, 또는 정전기적 상호작용을 통해 결합되어 있는 형태일 수도 있으나, 본 발명의 나노 입자에 포함될 수 있는 형태라면 이에 제한되지 않는다.

- [14] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 나노 입자는 바람직하게는 20 내지 500 nm의 직경을 가지며, 더욱 바람직하게는 50 내지 300 nm일 수 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 나노 입자는 나노리포좀, 나노에멀전, 나노마이셀, 고분자 나노 입자 등의 형태일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 나노 입자는 체액성 면역을 활성화시키는 물질, 세포성 면역을 활성화시키는 물질, 면역유도제(immunostimulatory agents), 면역보조제(아주번트, adjuvant) 등을 세포 외벽 성분 이외에 추가로 포함할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자(agonist), 톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist), 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라마좀 유도서(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD 리간드), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 항원, 에멀전(emulsion), 알루미늄(Alum), 화학 항암제, 면역관문억제제, 이들의 조합 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 나노 입자를 유효성분으로 포함하는, 면역항원보강제(adjuvant) 조성물을 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 상기 면역항원보강제 조성물 및 항원을 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [19] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 항원은 바람직하게는 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 유전자, 펩티드, 다당류, 지질다당류, 폴리뉴클레오티드, 세포, 세포 용해물(lysate), 박테리아, 바이러스, 암 항원 등이나 일반적으로 알려져 있는 항원이라면 이에 제한되지 않는다.
- [20] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 백신 조성물은 미생물에 의한 감염성 질환, 결핵, 암 등의 질병을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있으며, 상기 암의 예방 또는 치료는 암의 증식, 전이, 재발 등을 억제하거나, 항암 치료 요법에 대한 내성을 억제하는 것을 특징으로 하나, 일반적으로 사용되는 암 치료 방법의 일환이라면, 이에 제한되지 않는다.
- [21] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 암은 방광암, 유방암, 대장암, 직장암, 폐암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 난소암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 자궁암, 위암, 골암, 혈액암 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [22] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 백신 조성물은 화학 항암제 또는 면역관문억제제를 추가로 포함할 수 있다.
- [23] 또한, 본 발명은 상기 나노 입자를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에

- 투여하는 단계를 포함하는, 질병의 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다.
- [24] 또한, 본 발명은 상기 나노 입자를 유효성분으로 포함하는 조성물의 질병의 예방 및/또는 치료 용도를 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 상기 나노 입자의 질병의 예방 및/또는 치료에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.
- [26] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 질병은 바람직하게는 감염성 질환, 결핵, 암 등이나, 본 발명의 나노 입자를 포함함으로써 기존 백신의 면역원성을 현저히 향상시킬 수 있기 때문에 기존에 백신을 이용하여 예방 또는 치료를 할 수 있다고 알려져 있는 질병이라면 이에 제한되지 않는다.
- [27] 또한, 본 발명은 (a) 병원균을 파쇄하는 단계; (b) 상기 파쇄물로부터 지질을 제거하는 단계; (c) 상기 지질이 제거된 파쇄물로부터 막단백질을 제거하는 단계; (d) 상기 막단백질이 제거된 파쇄물을 원심분리하여 병원균의 외벽 성분을 분리하는 단계; (e) 상기 분리된 병원균의 외벽 성분을 동결건조시켜 동결 건조 제제를 제조하는 단계; (f) 상기 동결 건조 제제, 계면활성제 및 양전하성 완충용액을 혼합하는 단계; 및 (g) 상기 (f) 단계의 혼합물에 지질(lipid), 지질 결합체(lipid conjugates), 또는 활성화 부위에 지질이 결합된 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 첨가하고 초음파 처리하여 나노 입자를 제조하는 단계를 포함하는, 생병원체 모방 나노 입자(live pathogen-mimetic nano-molecules)의 제조 방법을 제공한다.
- [28] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 (f) 단계의 동결 건조 제제를 수용액에 안정하게 분산시키기 위해 사용되는 계면활성제로는 대표적으로 SDS(sodium dodecyl sulfate), DMAB(didodecyltrimethylammonium bromide), Pluronic F68, Pluronic F127, PVA(polyvinyl alcohol), Tween-80, Span-85, 올레인산(Oleic acid) 등과 이들의 조합을 사용할 수 있으나, 일반적으로 알려져 있는 계면활성제의 종류라면 이에 제한되지 않는다.
- [29] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 (f) 단계의 동결 건조 제제를 수용액에 안정하게 분산시키기 위해 사용되는 양전하성 완충용액으로는 대표적으로 L-Lysine(L-Lys) 완충용액, L-Arginine(L-Arg) 완충용액, L-Histidine(L-His) 완충용액, L-Tyrosine(L-Tyr) 완충용액, L-Aspartic acid(L-Asp) 완충용액, L-Glutamine(L-Glu) 완충용액 등과 이들의 조합을 사용할 수 있으나, 일반적으로 알려져 있는 양전하성 완충용액의 종류라면 이에 제한되지 않는다.
- [30] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 제조 방법은 (g) 단계 이후에 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자(agonist), 톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist), 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라마좀 유도제(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD 리간드), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 항원, 에멀전(emulsion), 알루미늄(Alum), 화학 항암제, 면역관문억제제, 이들의 조합 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 첨가하고 혼합하여 초음파 처리하는 단계를

추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [31] 본 발명에 따른 지질(lipid) 및 막단백질이 제거된 병원균의 외벽 성분(pathogen cell wall skeleton)을 유효성분으로 포함하는 병원균 외벽 성분의 동결 건조 제제, 즉, 병원균의 외벽 성분을 기반으로 하는 나노분산체는 일반적으로 강한 지용성 성분을 가지는 병원균의 외벽 성분을 수용액에 용이하게 분산되게 함으로써, 이를 이용하여 다양한 제형의 생병원체 모방 나노 입자를 제조할 수 있다. 또한, 추가적으로 세포성 면역을 유도할 수 있는 다양한 물질들을 손쉽게 포함시킴으로써, 병원균 외벽 성분을 이용하여 체액성 면역을 유도할 뿐만 아니라 세포성 면역도 함께 유도함으로써 기존 백신의 낮은 면역원성의 한계점을 극복할 수 있다. 또한, 세포 자체를 이용하지 않기 때문에 안정성을 증가시킬 수 있고, 대량 생산이 가능하다. 따라서, 본 발명의 병원균 외벽 성분 기반의 생병원체 모방 나노 입자를 이용함으로써 감염성 질환, 결핵, 암 등의 다양한 질환의 예방 또는 치료를 위한 백신으로 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 병원균 외벽 성분 기반 나노분산체의 작용 기전을 간략히 나타낸 도면이다.
- [33] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 BCG-CWS 나노분산체를 합성함에 있어서, 다양한 종류의 계면활성제와 양전하성 완충용액을 이용하였을 때 안정화된 정도를 확인한 도면이다. A는 non-detection을 의미한다.
- [34] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 BCG-CWS 나노분산체의 면역세포 활성화 특성을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [35] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 CWS-T7/8a를 투과전자현미경 및 DLS를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 도면이다.
- [36] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 CWS-T7/8a 또는 그 구성 성분들을 각각 마우스의 면역세포에 처리하였을 때 분비되는 사이토카인을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다. ND는 non-detection을 의미한다.
- [37] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 CWS-T7/8a 또는 그 구성 물질들을 각각 마우스에 투여한 후에 시간에 따른 혈액 내 AST와 ALT 변화량을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [38] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 CWS-T7/8a 또는 그 구성 물질들을 각각 항원과 혼합하여 마우스에 투여한 후에 항체가의 변화를 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [39] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 CWS-T7/8a 또는 그 구성 물질들을 각각 항원과 혼합하여 마우스에 투여한 후에 비장에서 세포성 면역의 활성화 정도를 유세포 분석기 및 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

- [40] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 CWS-T7/8a 또는 그 구성 물질들을 각각 항원과 혼합하여 마우스에 투여한 후에 혈액 내의 항원 특이적 T 세포의 활성화 정도를 유세포 분석기를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [41] 도 10은 발명의 일 실시예에 따른 CWS-T7/8a 또는 그 구성 물질들을 각각 코로나 바이러스(SARS-CoV-2) 재조합 단백질과 혼합하여 마우스에 투여한 후에 혈액 내의 항체가 ELISA로, 비장에서의 세포성 면역 활성화 정도는 유세포 분석기 및 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [42] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 CWS-T7/8a 또는 그 구성 물질들을 각각 암 세포의 항원과 혼합하여 암 세포가 이식된 마우스에 투여한 후에 암의 성장이 억제되는 정도 및 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [43] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 CWS-T7/8a 또는 그 구성 물질들을 각각 암 세포의 항원과 혼합하여 암의 발생이 유도된 마우스에 투여한 후에 암의 성장이 억제되는 정도 및 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [44] 본 발명의 지질 및 막단백질이 제거된 병원균의 외벽 성분을 유효성분으로 포함하는 병원균 외벽 성분의 동결 건조 제제는 강한 지용성을 가지고 있는 병원균의 외벽 성분을 수용액에 용이하게 분산되게 함으로써, 다양한 제형으로 제조될 수 있을 뿐만 아니라, 세포성 면역을 유도할 수 있는 물질, 면역 활성화 물질, 화학 항암제 등 다양한 물질을 용이하게 포함시켜 나노리포좀, 나노마이셀, 고형 나노 입자, 나노에멀전 등의 나노 입자를 제조할 수 있다. 따라서, 본 발명의 지질 및 막단백질이 제거된 병원균의 외벽 성분을 유효성분으로 포함하는 병원균 외벽 성분의 동결 건조 제제를 이용함으로써 다양한 형태의 생병원체 모방 나노 입자를 용이하게 제조할 수 있고, 이를 이용함으로써 감염성 질환, 결핵, 암 등의 다양한 질환의 예방 또는 치료를 위한 백신으로 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.
- [45]
- [46] 본 명세서에 있어서, “톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 물질(Toll-like receptor 7/8 agonist-based materials)”이란 톨-유사 수용체 7 또는 8의 작용자로서, 이미다조퀴놀린(imidazoquinoline) 계열, 하이드록시아데닌(8-hydroxyadenine) 계열, 프테리돈(pteridone) 계열, 아미노피리미딘(2-aminopyrimidine) 계열, 벤조아제핀(benzoazepine) 계열, 타이아옥소구아노신(7-thia-8-oxoguanosine) 계열로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 상기 이미다조퀴놀린 계열의 화합물은 WO 2018 196823, WO 2011 049677, WO 2011 027022, WO 2017 102652, WO 2019 040491 등에서 언급된 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 하이드록시아데닌 계열의 화합물은 WO 2012 080730, WO 2013 068438, WO 2019 036023, WO 2019 035969, WO 2019 035970, WO 2019 035971, WO 2019 035968, CN 108948016, US 2014 8846697, WO

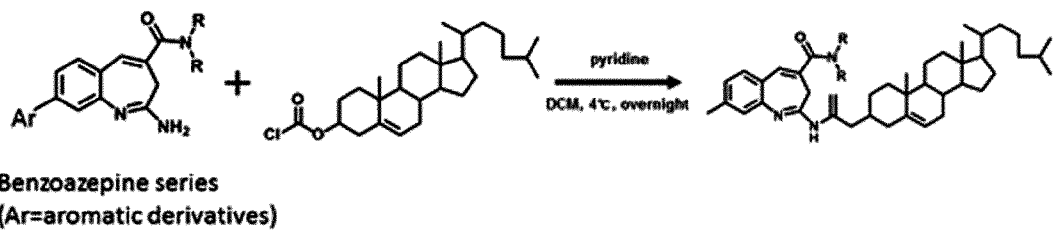
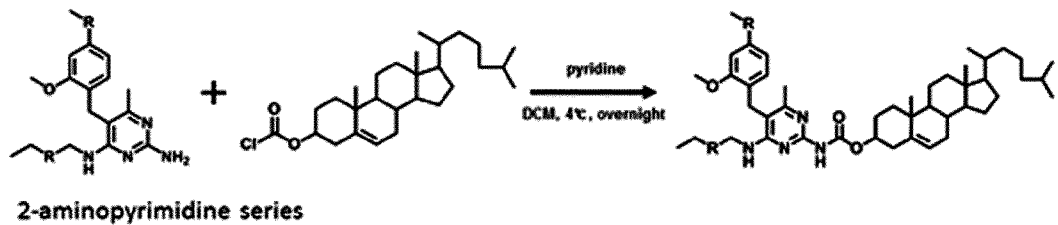
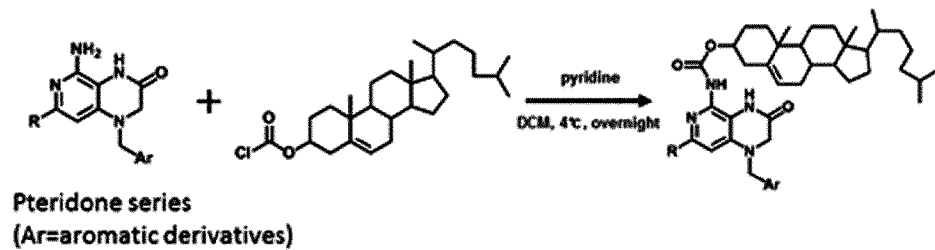
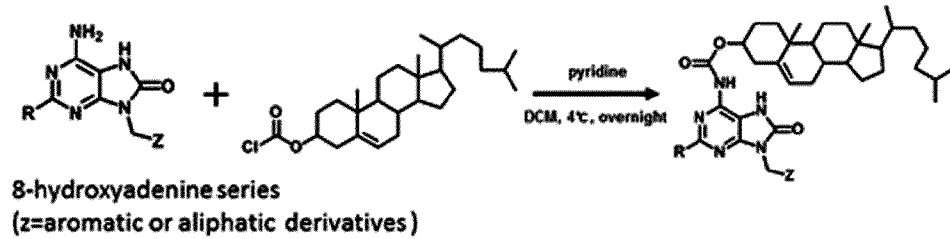
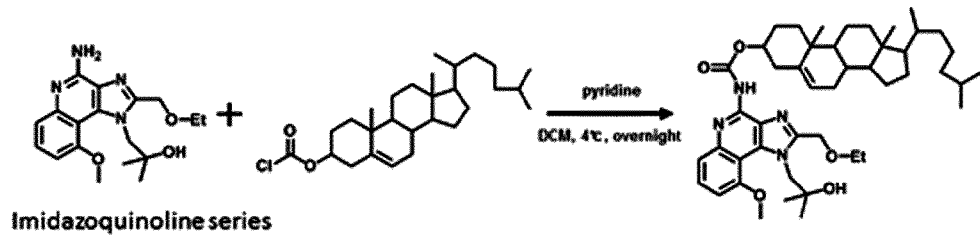
2016 023511, WO 2017 133683, WO 2017 133686, WO 2017 133684, WO 2017 133687, WO 2017 076346, WO 2018 210298, WO 2018 095426, WO 2018 068593, WO 2018 078149, WO 2018 041763 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 상기 프테리돈 계열의 화합물은 US 2010 0143301, WO 2016 007765, WO 2016 044182, WO 2017 035230, WO 2017 219931, WO 2011 057148, CN 1087 94486 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 상기 아미노피리미딘 계열 화합물은 WO 2010 133885, WO 2012066335, WO 2012 066336, WO 2012 067268, WO 2013 172479, WO 2012 136834, WO 2014 053516, WO 2014 053595, US 2018 0215720, WO 2012 156498, WO 2014 076221, WO 2016 141092, WO 2018 045144, WO 2015 014815, WO 2018 233648, WO 2014 207082, WO 2014 056593, WO 2018 002319, WO 2013 117615 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 상기 벤조아제핀 계열 화합물은 WO 2007 024612, WO 2010 014913, WO 2010 054215, WO 2011 022508, WO 2011 022509, WO 2012 097177, WO 2012 097173, WO 2016 096778, WO 2016 142250, WO 2017 202704, WO 2017 202703, WO 2017 216054, WO 2017 046112, WO 2017 197624 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 상기 타이아옥소구아노신 계열 화합물은 WO 2016 180691, WO 2016 055553, WO 2016 180743, WO 2016 091698 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 이외에도 PCT/US2009/035563, PCT/US2015/028264, PCT/US2016/020499, WO 2015 023598, PCT/US 2015/039776 등에서 언급한 톨-유사 수용체 7 또는 8 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함할 수 있으며, 이에 한정되지 않고, 당업계에 종사하는 사람이 용이하게 추측하여 사용할 수 있는, 예를 들어, 이미퀴모드(Imiquimod), 레시퀴모드(Resiquimod), 닥토리십(Dactolisib), 가디퀴모드(Gardiquimod), 수마니롤(Sumanirrole), 모톨리모드 (Motolimod), 베사톨리모드(vesatolimod), 록소리바인(loxoribine), SM360320, CL264, 3M-003, IMDQ, Compound 54 등의 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 경우를 모두 포함한다.

- [47] 본 명세서에 있어서, 활성화 부위에 지질이 결합(conjugation)된 다양한 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자는 국내공개특허인 10-2020-0097656의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 보다 자세하게는, 콜레스테롤과 같은 리피드 성분이 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 활성화 부위인 아민기(NH_2) 부위와 카바메이트(carbamate), 다이설파이드(disulfide), 에스터(ester), 펩타이드(peptide), 아자이드(azide), 아마이드(amide), 하이드라존(hydrazone), 티오이써(thioether), 포스포디에스터(phosphodiester), 티오케탈(thioetal) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 결합을 통하여 제조될 수 있다. 그 대표적인 예로 카바메이트 결합(반응식 1)과 다이설파이드 결합(반응식

2)를 나타낸다.

[48] [반응식 1]

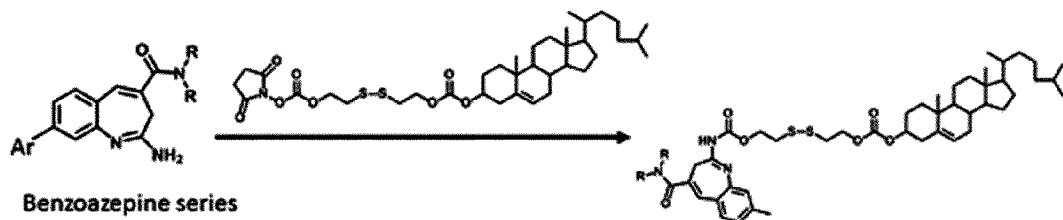
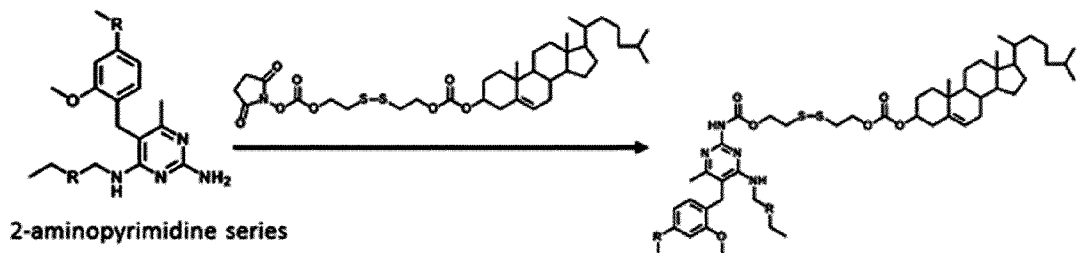
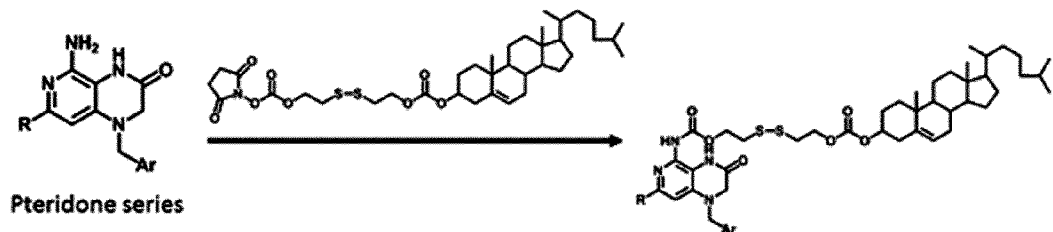
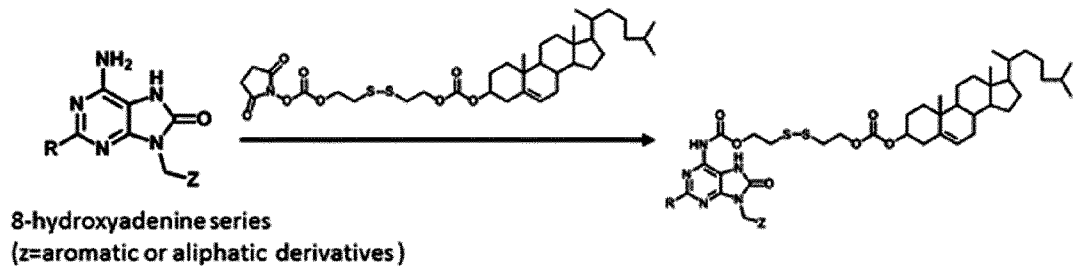
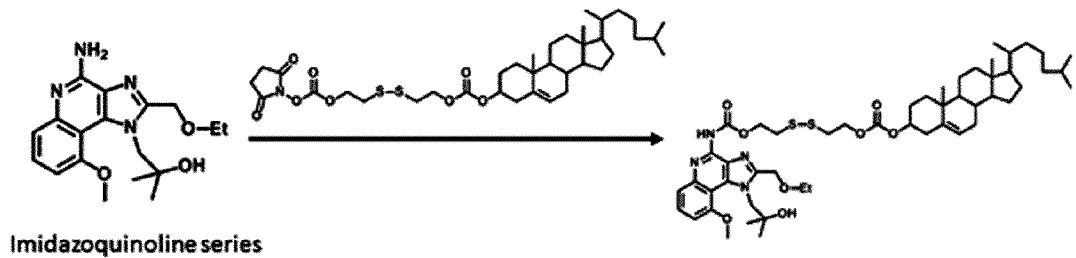
[49]



[50] 상기 R은 aliphatic 또는 aromatic 그룹을 포함하는 결가지이며,
-NH-, -CO-, -CONH-, -CSNH-, -COO-, -CSO-, -SO₂NH-, -SO₂-, -SO-, -O-
등을 포함할 수 있다.

[51] [반응식 2]

[52]



[53]

[54] 상기 R은 aliphatic 또는 aromatic 그룹을 포함하는 걸가지이며, -NH-, -CO-, -CONH-, -CSNH-, -COO-, -CSO-, -SO₂NH-, -SO₂-, -SO-, -O- 등을 포함할 수 있다.

[55] 본 명세서에 있어서, “톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 물질(Toll-like receptor 7/8 agonist-based materials)”이란 톨-유사 수용체 7 또는 8의 작용자로서, single stranded ribonucleic acids (ssRNAs), guanosine(G)-rich, uridine(U)-rich 및 adenosine(A)-rich 올리고뉴클레오타이드, small-interfering RNA(siRNA), microRNA (miRNA) 등의 네츨릴 리간드(natural ligands) 등을 포함한다.

- [56] 본 명세서에 있어서, “톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist)”란 TLR-1을 통해 신호전달 반응을 야기시킬 수 있는 것일 수 있으며, 일례로, 트리-아실화된 지질펩티드(LP); 페놀-가용성 모듈린(modulin); 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 지질펩티드; S-(2,3-비스(팔미토일옥시)-(2-RS)-프로필)-N-팔미토일-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH; 보렐리아 부르그도르페이(*Borrelia burgdorfei*) 유래 지질펩티드; OspA 지질펩티드의 아세틸화된 아미노 말단을 모방하는 트리히드로클로라이드(Pam3Cys) 지질펩티드; 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질일 수도 있다. 또는 Pam3Cys-Lip 등의 TLR-2 작용자일 수도 있고, Poly(I:C), Poly(ICLC), Poly(IC12U), ampligen 등의 TLR-2 작용자일 수도 있다. 또는 시겔라 플렉시네리(*Shigella flexneri*) 외막 단백질 제조물, AGP, CRX-527, MPLA, PHAD, 3D-PHAD, GLA 등과 같은 TLR-4 작용자일 수도 있으며, 또는 플라젤린(flagellin), 플라젤린 단편 등과 같은 TLR-5 작용자일 수도 있다. 또는 면역 자극성 올리뉴클레오티드 등과 같은 TLR-9 작용자일 수도 있으나, 이에 한정되지 않고, 당업계에 종사하는 사람이 용이하게 추측하여 사용할 수 있는 톨-유사 수용체 작용자라면 모두 포함할 수 있다.
- [57] 본 명세서에 있어서, “사포닌(saponin)”은 다양한 식물 중에 존재하는 양친매성 배당체(amphipathic glycoside)로서, 일례로 QS21, Quil A, QS7, QS17, β -에스킨, 디지토닌, 이들의 조합 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [58] 본 명세서에 있어서, “항바이러스성 펩티드”는 바이러스의 증식을 억제할 수 있는 펩티드로서, 일례로 KKK 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 본 명세서에 있어서, “인플라마좀 인두서”는 TDB(trehalose-6,6-dibehenate), NLRC4, Nalp3 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [60] 본 명세서에 있어서, “NOD 리간드”는 M-TriLYS(NOD2 아고니스트-합성 무라밀 트리펩티드), NOD2 아고니스트(N-glycolylated muramyl dipeptide), mDAP, MDP 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 본 명세서에 있어서, “CDS 리간드”는 Poly(dA:dT) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [62] 본 명세서에 있어서, “STING 리간드”는 cGAMP, di-AMP, di-GMP 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [63] 본 명세서에 있어서, “지질(lipid)”은 지방산(Fatty acids) 계열, 스테로이드(Steroids) 계열, 글리세라이드(Glycerides) 계열, 인지질(Phospholipids) 계열, 콜레스테롤(Cholesterol) 계열, 지용성 비타민(Fat-soluble vitamin) 계열 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그리고 “지질 결합체”란 상기 지질과 결합되어 있는 모든 화합물을 총칭한다.
- [64] 또한, 상기 추가로 포함할 수 있는 물질은 각각의 복합 면역조절화 물질일 수 있으며, 일례로 CL401(TLR-2 및 TLR-7의 작용자), CL429(TLR-2 및 NOD2 작용자) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [65] 본 명세서에 있어서, 화학 항암제란 당업자에게 알려져 있는 암 치료에 사용되고 있는 화합물이라면 제한이 없으며, 그 일례로 Paclitaxel, Docetaxel, 5-Fluorouracil, Alendronate, Doxorubicin, Simvastatin, Hydrazinocurcumin, Amphotericin B, Ciprofloxacin, Rifabutin, Rifampicin, Efavirenz, Cisplatin, Theophylline, Pseudomonas exotoxin A, Zoledronic acid, Trabectedin, Siltuximab, Dasatinib, Sunitinib, Apatinib, 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid, Silibinin, PF-04136309, Trabectedin, Carlumab, BLZ945, PLX3397, Emactuzumab, AMG-820, IMC-CS4, GW3580, PLX6134, N-acetyl-l-cystein, Vitamin C, bortezomib, aspirin, salicylates, Indolecarboxamide derivatives, quinazoline analogues, Thalidomide, prostaglandin metabolites, 2ME2, 17-AAG, Camptothecin, Topotecan, Pleurotin, 1-methylpropyl, 2-imidazolyl disulphide, Tadalafil, Sildenafil, L-AME, Nitroaspirin, Celecoxib, NOHA, Bardoxolone methyl, D,L-1-methyl-tryptophan, Gemcitabine, Axitinib, Sorafenib, Cucurbitacin B, JSI-124, Anti IL-17 antibodies, Anti-glycan antibodies, Anti-VEGF antibodies, Bevacizumab, Antracycline, Tasquinimod, Imatinib, cyclophosphamide 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [66] 명세서에 있어서, “면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)”란 인체가 가지고 있는 면역 세포의 면역 기능을 활성화시켜 암 세포와 싸우게 하는 암 치료 방법을 총칭하며, 그 일례로 anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4, anti-KIR, anti-LAG3, anti-CD137, anti-OX40, anti-CD276, anti-CD27, anti-GITR, anti-TIM3, anti-41BB, anti-CD226, anti-CD40, anti-CD70, anti-ICOS, anti-CD40L, anti-BTLA, anti-TCR, anti-TIGIT 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [67] 본 명세서에 있어서, 상기 “항원(antigen)”이란 체내에서 면역 반응을 일으키는 모든 물질을 총칭하며, 바람직하게는 병원균 (박테리아, 바이러스 등), 화합물질, 꽃가루, 암세포, 새우 등 또는 이들의 일부 펩타이드 또는 단백질이며, 더욱 바람직하게는 암 항원 펩타이드이나, 체내에서 면역 반응을 일으킬 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다. 상기 항원은 바람직하게는 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 유전자, 펩티드, 다당류, 지질다당류, 폴리뉴클레오티드, 세포, 세포 용해물(lysate), 박테리아, 바이러스 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는, 암 항원 펩타이드일 수 있다. 상기 단백질은 항체, 항체의 단편, 구조 단백질, 조절 단백질, 전사인자, 독소 단백질, 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소의 단편, 수송 단백질, 수용체(receptor), 수용체의 단편, 생체방어 유도 물질, 저장 단백질, 이동 단백질(movement protein), 익스플로이티브 단백질(exploitive protein), 리포터 단백질 등일 수 있다. 그러나 생체에서 항원으로 작용하여 면역 반응을 유도할 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다.
- [68] 본 명세서에 있어서, “백신(vaccine)”이란 생체에 면역 반응을 일으키는 항원을 함유하는 생물학적인 제제로서, 암, 결핵, 감염증 등의 질환의 예방 또는 치료를 위하여 사람이나 동물에 주사하거나 경구 투여함으로써 생체에 면역이 생기게 하는 면역원을 말한다. 상기 동물은 인간 또는 비인간 동물로서, 상기 비인간

동물은 돼지, 소, 말, 개, 염소, 양 등을 지칭하나, 이에 제한되지 않는다.

- [69] 본 명세서에 있어서, “예방(prevention)”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 감염성 질환, 결핵, 암 등의 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [70] 본 명세서에 있어서, “치료(treatment)”란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 감염성 질환, 결핵, 암 등의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [71] 본 명세서에 있어서, “개체(individual)”란 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 그 대상에는 제한이 없다.
- [72] 본 명세서에 있어서, “암(cancer)”이란 침윤에 의해 국부적으로 그리고 전이를 통해 체계적으로 확장할 수 있는 각종 혈액암, 악성 고형 종양 등을 총칭한다. 특별히 이에 제한되지는 않지만, 암의 구체적인 예로는 대장암, 부신암, 골암, 뇌암, 유방암, 기관지암, 결장암 및/또는 직장암, 담낭암, 위장관암, 두부 및 목의 암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 신경조직암, 췌장암, 전립선암, 부갑상선암, 피부암, 위암, 갑상선암 등이 포함된다. 암의 다른 예로는, 선암, 선종, 기저 세포암, 자궁경부 이형성증 및 상피 내암, Ewing 육종, 편평세포암종, 액선 세포암, 악성 뇌종양, 모세포암, 장의 신경절신경종, 과다형성 각막신경암, 섬세포암, Kaposi 암, 평활근종, 백혈병, 림프종, 악성 암양종, 악성 흑색종, 악성 고칼슘혈증, Marfanoid habitus 암, 수양암, 전이성 피부암, 점막 신경종, 골수이형성 증후군, 골수종, 사상식육종, 신경아세포종, 골육종, 골원성 및 기타 육종, 난소암, 크롬 친화성 세포종, 진성 적혈구 증가증, 원발성 뇌종양, 소세포성 폐암, 폐양성 및 유두상 편평상피암, 정낭피종, 연조직 육종, 망막아종, 횡문근아세포종, 신세포 종양 또는 신세포암, 망상세포성 육종, 및 빌름스 종양이 포함된다. 또한 정상 세포종, 위장 기저 종양(gastrointestinal stromal tumor, GIST), 신경교종 또는 신경교아종, 신세포암(renal cell carcinoma, RCC), 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC), 췌장 신경내분비암 등이 포함된다.
- [73] 본 명세서에 있어서, “백신 조성물(vaccine composition)”이란 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 백신 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 백신 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 백신 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 백신 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게

제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[74] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[75] 본 발명에 따른 백신 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 백신 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[76] 본 발명의 백신 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 500 mg/kg 또는 0.001 내지 500 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 백신 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

[77] 또한, 본 발명에 따른 백신 조성물은 추가로 기존에 알려져 있는 "아주번트(adjutant)"를 추가로 포함할 수 있다. 상기 아주번트는 일반적으로 항원에 대한 체액 및/또는 세포 면역 반응을 증가시키는 임의의 물질을 총칭하며, 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다. 또한 상기 백신 조성물의 경우에는 필요에 따라 초기 용량에 이어 임의로 반복된 항원 자극을 수행할 수 있다.

[78]

[79] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[80]

[81] [실시예]

[82] 실시예 1: 병원균 외벽 성분 기반 나노분산체의 제조

[83] 병원균의 외벽 성분(cell wall skeleton; CWS)을 기반으로 하는 나노분산체를 제조할 수 있는지 확인하기 위하여, 일차적으로 BCG(bacille Calmette-Guerin) 균주(중양백신)를 이용하여 나노분산체를 제조하였다. 보다 자세하게는, 인산염완충용액(phosphate buffered saline; PBS)에 균주를 분산시킨 후에, 초음파 분산기(Sonics & Materials)를 이용하여 균체를 파쇄하였다. 그리고 1000 xg로 3분간 원심분리하여 파쇄된 균체를 획득한 후, 파쇄된 균체에 1 % Triton X-100 용액을 첨가하고 90 °C에서 초음파 분산기(Emerson)를 이용하여 2 시간 동안 초음파를 가해주며 중탕하여 지질을 분리하였다. 그리고 10,000 xg로 원심분리하여 상층액을 제거하고, 펠릿(pellet)에는 1 % SDS를 첨가하고 다시 90 °C에서 초음파 분산기(Emerson)를 이용하여 2 시간 동안 초음파를 가해주며 중탕하여 막단백질을 분리하였다. 이후, 10,000 xg로 원심분리하고 상층액을 제거하여, 지질 및 막단백질 성분이 제거된 BCG-외벽 성분(BCG-CWS)을 획득하였다. 획득된 BCG-CWS는 에탄올을 이용하여 다시 분산시킨 후에, 액체 질소를 이용하여 급속 냉동하였다. 그리고 냉동된 균체는 동결건조기를 이용하여 에탄올은 제거하고 파우더 형태로 제조하였다. 그리고 파우더 형태로 제조된 BCG-CWS를 1 mg/mL의 농도가 되도록 40 mM의 L-(+)-Lysine 용액에 첨가하고, 초음파 분산기를 이용하여 60 °C에서 24 시간 동안 분산시켜 BCG-CWS 나노분산체를 제조하였다. 본 발명의 병원균 외벽 성분 기반 나노분산체의 작용 기전은 도 1에 간략히 나타내었다.

[84] 일반적으로 BCG의 외벽 성분은 강한 소수성 성질을 가지고 있어, 유기상에서만 분산되는 특징을 가지기 때문에, 본 발명의 방법으로 제조된 BCG-CWS는 다양한 계면활성제와 양전하성 완충용액(buffer)에 용이하게 분산되는지 확인하기 위하여, SDS(sodium dodecyl sulfate), Tween, Pluronic F, PVA(polyvinyl alcohol), Span, 올레인산(Oleic acid) 등의 계면활성제와 다양한 종류의 양전하성 완충용액에 BCG-CWS 나노분산체를 각각 첨가하고, PDI(Polydispersity Index)를 측정하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[85] 도 2에 나타난 바와 같이, BCG-CWS 나노분산체는 다양한 계면활성제와 양전하성 완충용액에 용이하게 분산되며 안정성을 나타내는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 본 발명의 방법을 이용하면, 용이하게 수용액에 분산되는 다양한 병원성 외벽 성분 기반 나노분산체를 제조할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[86]

[87] 실시예 2: 병원균 외벽 성분 기반 나노분산체의 면역세포 활성화 특성 확인

[88] 실시예 1과 동일한 방법으로 제조한 BCG-CWS 나노분산체가 면역세포 활성화 특성을 가지는지 확인하기 위하여, 골수 유래 수지상세포(bone marrow-derived dendritic cells; BMDC)에 BCG-CWS 나노분산체를 1, 5, 10, 25, 및 50 µg/mL의

농도로 각각 처리하였다. 그리고 7 일 동안 배양하며 염증성 반응의 대표적인 지표인 TNF- α (tumor necrosis factor- α)와 IL-6(interleukin-6)의 분비량을 ELISA 키트를 이용하여 확인하였다. 양성 대조군으로는 염증 반응을 유도하는 것으로 알려져 있는 LPS(lipopolysaccharide)를 처리하여 비교하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

- [89] 도 3에 나타난 바와 같이, BCG-CWS 나노분산체를 처리한 골수 유래 수지상세포에서 TNF- α 와 IL-6의 분비량이 증가된 것을 확인하였으며, 이를 통하여, 본 발명의 방법으로 제조된 병원균 외벽 성분 기반 나노분산체가 면역세포를 효과적으로 활성화시키는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명의 방법으로 제조된 병원균 외벽 성분 기반 나노분산체를 생병원체 모방 나노 입자로 사용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[90]

[91] 실시예 3: 병원균 외벽 성분 기반 나노분산체를 이용한 생병원체 모방 나노 입자의 제조

[92] **3.1. 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자와 콜레스테롤 결합체의 합성**

- [93] 50 g(0.5 molar equivalent, AmBeed. USA)의 Bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)(disulfanediylbis(ethane-2,1-diyl))dicarbonate와 1 L의 DCM(dichloromethane, 다이클로로메테인, SIGMA)을 상온에서 반응기(reactor)에 첨가하고 혼합하였다. 혼합된 용액에 콜레스테롤(Cholesterol) 49 g(0.55 molar equivalent, AVANTI Polar lipid)과 TEA(Triethylamine, 트리에틸아민, SIGMA) 23 g(1.0 molar equivalent)을 첨가하고 다시 상온에서 3 시간 동안 교반한 후에 1.5 L의 증류수를 첨가하였다. 500 mL의 DCM을 이용하여 혼합이 완료된 용액에서 수용성 층(aqueous layer)을 추출하였다. 높은 순도를 얻기 위해 상기 추출 과정을 3 회 반복하였다. 그리고 추출이 완료된 용액 중에 포함되어 있는 유기 층(organic layer)은 1 L의 brine(높은 농도의 소금물)을 이용하여 제거해준 후, 100 g의 anhydrous Na₂SO₄(Sodium sulfate, 무수 황산 나트륨, SIGMA)를 이용하여 감압하여 건조하였다. 건조가 완료된 물질은 300 g의 실리카 겔(silica gel)이 충전된 컬럼 크로마토그래피 (Column chromatography)에 넣고, 5 - 20 %의 EtOAc가 첨가된 n-헥산 용액을 이용하여 추출하여, 콜레스테롤 화합물을 준비하였다. 이후, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자(Toll-like receptor 7/8 agonist; TLR 7/8 agonist)와 콜레스테롤을 결합시키기 위하여, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 중의 하나인 레시퀴모드(Resiquimod) 7.0 g과 DCM 6.5 g, 콜레스테롤 화합물 0.6 g, 및 TEA 0.3 g을 상온에서 반응기에 첨가하고 10 시간 이상 교반하였다. 이후 전체 용액 부피의 20 배가 되도록 증류수를 첨가해준 후, 3.3 g의 DCM을 이용하여 수용성 층을 5 회 이상 반복하여 추출하였다. 그리고 추출이 완료된 용액에 포함되어 있는 유기 층은 1 L의 brine을 이용하여 제거해준 후에 7 g의 anhydrous Na₂SO₄를 이용하여 감압하여 건조하였다. 건조된 물질은 100 g의 실리카 겔이 충전된 컬럼 크로마토그래피에 첨가하고, 10 - 50 %의

EtOAc가 첨가된 n-헥산 용액을 이용하여 추출하여, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자와 콜레스테롤의 결합체를 합성하였으며, 이를 T7/8a라 명명하였다.

[94]

[95] **3.2. BCG-CWS 나노분산체 및 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 생병원체 모방 나노 입자의 제조**

[96] BCG-CWS 나노분산체 및 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 이용하여 생병원체 모방 나노 입자(live pathogen-mimetic nano-molecules)를 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 제조된 BCG-CWS 나노분산체와 T7/8a를 1 : 1 비율(w:w)로 클로로포름 용액에 첨가하여 용해시키고, 상기 용액을 둥근 바닥 플라스크에 옮겨 담은 후, 회전증발농축기를 이용하여 필름 형태가 되도록 유기용매를 완전히 증발시켰다. 그리고 상기 플라스크에 최종 농도가 1 %가 되도록 Span-85가 첨가된 40 mM의 L-(+)-Lysine 용액을 BCG-CWS 나노분산체가 1 mg/mL의 농도가 되도록 첨가해준 후 60 °C에서 300 rpm으로 1 시간 동안 교반하여 완전히 분산시켰다. 그리고 1 시간 동안 안정화시켜 BCG-CWS 나노분산체 및 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 생병원체 모방 나노 입자를 제조하였으며, CWS-T7/8a라 명명하였다.

[97]

[98] **3.3. 생병원체 모방 나노 입자의 특성 확인**

[99] DLS(dynamic light scattering)와 전자 현미경을 이용하여 실시예 3.2와 동일한 방법으로 제조된 생병원체 모방 나노 입자의 특성을 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[100] 도 4에 나타난 바와 같이, 생병원체 모방 나노 입자는 약 120 nm의 평균 직경을 가지고 있으며, 음전하를 띠고 있는 것을 확인하였다.

[101]

[102] **3.4. 생병원체 모방 나노 입자의 면역 반응 활성화 효과 확인**

[103] 실시예 3.2와 동일한 방법으로 제조된 생병원체 모방 나노 입자가 면역 반응을 활성화시키는지 확인하기 위하여, 골수 유래 수지상 세포와 골수 유래 대식 세포(Bone marrow-derived macrophage, BMDM)에 CWS 나노분산체(CWS-SLM), T7/8a, 그리고 생병원체 모방 나노 입자(CWS-T7/8a)를 각각 다른 농도로 희석하여 처리하였다. 그리고 7 일 동안 배양하며 염증성 반응의 대표적인 지표인 TNF- α , IL-6, 및 IL-12의 분비량을 ELISA 키트를 이용하여 확인하였다. 이후 모든 실험은 최소 세 번 이상 반복하였으며, 결과는 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's t-test로 확인하였고, *는 $P < 0.05$, **는 $P < 0.01$, ***는 $P < 0.001$, ****는 $P < 0.0001$ 을 나타낸다. $P < 0.05$ 이면, 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[104] 도 5에 나타난 바와 같이, 면역 세포에서 염증성 면역 반응에 관여하는 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 분비가 크게 증가하였을 뿐만 아니라, 세포성 면역 반응의 중요 지표인 IL-12(p70)의 분비도 증가된 것을 확인하였다. 상기

결과를 통하여, 본 발명의 생병원체 모방 나노 입자는 일차적으로 병원균의 외벽 성분을 기반으로 하여, 병원체 인식을 통한 세포성 면역 반응을 활성화시키고, 이후, 이차적으로 식포작용을 통하여 면역 세포 내부로 전달되고, 전달된 생병원체 모방 나노 입자의 live/death 신호와 관련이 있는 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자가 엔도라이소좀(endo-lysosome)내에서 콜레스테롤과 분리되어 신호 전달 및 세포성 면역 반응을 활성화시키는 작용을 통하여 면역 세포에서 염증성 면역 반응에 관여하는 사이토카인이 분비되는 것을 확인할 수 있었다(도 1).

[105]

[106] 3.5. 생병원체 모방 나노 입자의 독성 평가

[107] 생병원체 모방 나노 입자의 독성을 평가하기 위하여, 생병원체 모방 나노 입자, CWS-나노분산체, 레스퀴모드(R848)(free drug), 그리고 CWS-나노분산체와 레스퀴모드(R848)(free drug)를 각각 레스퀴모드의 농도가 25 μg 이 되도록 50 μL 의 인산염완충용액(phosphate buffered saline, PBS)에 첨가해준 후에, C57BL/6 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 그리고 시간 간격에 따라 마우스로부터 혈액을 추출하고, 12,000 rpm에서 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 그리고 ELISA를 이용하여 분리된 혈장 내에 포함되어 있는 AST(aspartate transaminase)와 ALT(alanine transaminase)의 농도를 측정하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[108] 도 6에 나타난 바와 같이, free drug로서 레스퀴모드를 처리한 실험군에서는 초기에 간독성의 지표인 AST와 ALT가 증가되나, CWS-나노분산체와 생병원체 모방 나노 입자의 경우에는 AST 및 ALT의 농도가 거의 변화되지 않는 것을 확인하였다.

[109]

[110] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 생병원체 모방 나노 입자는 체내에서 거의 독성을 나타내지 않으며, 면역 세포에서 염증성 면역 반응을 효과적으로 유도할 뿐만 아니라, 세포성 면역 반응 또한 증가시키는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 효과적인 면역 활성화제로 사용가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

[111]

[112] 실시예 4: 생병원체 모방 나노입자를 활용한 백신의 제조 및 응용

[113] 4.1. 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신의 제조

[114] 실시예 3과 동일한 방법으로 제조된 생병원체 모방 나노 입자를 백신으로 이용하기 위하여, 항원 단백질인 Ovalbumin(OVA) 0.2 mg/mL을 생병원체 모방 나노 입자와 1:1 부피비로 혼합하여준 후에, 교반기를 통하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 300 rpm의 속도로 30 분간 교반하여, 생병원체 모방 나노 입자와 항원이 상호작용할 수 있도록 하였다. 대조군으로는 CWS-나노분산체, 레스퀴모드, 그리고 콜레스테롤-레스퀴모드 결합체를 포함하는 리포솜(T7/8a liposome)을 각각 단독으로 또는 혼합하여 항원 단백질과 반응시켜 준비하였다.

[115]

[116] **4.2. 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신의 항체 생성 효능 확인**

[117] 실시예 4.1과 동일한 방법으로 제조된 백신의 항원성 및 효능을 확인하기 위하여, C57BL/6 마우스에 백신을 2 주 간격으로 100 μ L씩 2회 주사하였다. 그리고 마지막으로 주사하고 일주일 후에, 마우스로부터 혈액과 비장(spleen)을 추출하였다. 그리고 추출된 혈액을 12,000 rpm에서 원심분리하여 혈장을 분리하고, 항체가(IgG titer)를 측정하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[118] 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 생병원체 모방 나노 입자를 활용하여 제조된 백신이 항원 단독, 또는 다른 대조군들과 비교하여 모든 지표에서 높은 항체가를 나타내는 것을 확인하였다.

[119]

[120] **4.3. 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신의 T 세포 활성화 효능 확인**

[121] 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신의 T 세포 활성화 효능을 확인하기 위하여, 실시예 4.2와 동일한 방법으로 추출한 비장으로부터 비장세포(splenocyte)를 추출하여 1×10^6 cells가 되도록 6-well plate(Corning)에 씨딩하고 배양하였다. 그리고 배양된 비장 세포에 OVA 40 μ g을 첨가하고, 2 일 동안 배양하였다. 그리고 세포 배양액의 상층액을 획득하여, ELISA를 이용하여 IFN γ 의 농도를 측정하고, 유세포 분석기(FACS)를 이용하여 CD4 + T 세포와 CD8 + T 세포를 측정하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[122] 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명의 생병원체 모방 나노 입자를 활용하여 제조된 백신이 항원 단독, 또는 다른 대조군들과 비교하여 IFN γ 분비량 및 CD4 + T 세포와 CD8 + T 세포의 비율이 모두 가장 높은 것을 확인하였다.

[123]

[124] **4.4. 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신의 항원 특이적 T 세포 생성 효능 확인**

[125] 항원 특이적 T 세포의 생성 효능을 확인하기 위하여, 실시예 4.2와 동일한 방법으로 추출한 혈액으로부터 Percoll을 이용하여 PBMC(Peripheral Blood Monocytic Cell)를 분리하였다. 그리고 OVA의 작용 부위로 알려져 있는 SIINFEKLE과 반응하는 형광 항체(Fluorescence antibody)를 PBMC에 처리하고, 유세포 분석기를 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다.

[126] 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명의 생병원체 모방 나노 입자를 활용하여 제조된 백신이 항원 단독, 또는 다른 대조군들과 비교하여 혈액 내의 항원 특이적 T 세포의 비율이 현저히 높은 것을 확인하였다.

[127]

[128] **4.5. 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 코로나 백신의 제조 및 효능 확인**

[129] 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 코로나 백신을 제조하기 위하여, SARS-CoV-2의 제조합 S1 단백질(Arigo)을 생병원체 모방 나노 입자와 1:1 부피비로 혼합하여준 후에, 교반기를 통하여 4 $^{\circ}$ C에서 300 rpm의 속도로 30 분간 교반하여, 생병원체 모방 나노 입자와 항원이 상호작용할 수 있도록 하여 백신을

제조하였다. 그리고 제조된 백신을 C57BL/6 마우스에 2 주 간격으로 100 μ L 씩 2 회 주사하였다. 마지막으로 주사하고 일주일 후에, 마우스로부터 혈액과 비장을 추출하고, 실시예 4.2 및 실시예 4.3과 동일한 방법으로 백신의 효능을 확인하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[130] 도 10에 나타난 바와 같이, 항원을 단독으로 투여한 대조군과 비교하여 모든 지표에서 높은 항체가를 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 항원을 단독으로 투여한 대조군에서는 PBS와 유사한 IFN γ 분비량 및 CD4 $^{+}$ T 세포와 CD8 $^{+}$ T 세포의 비율을 나타내는 반면, 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 코로나 백신의 경우에는 IFN γ 분비량 및 CD4 $^{+}$ T 세포와 CD8 $^{+}$ T 세포의 비율이 모두 증가된 것을 확인하였다.

[131]

[132] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신은 항원만을 이용한 백신과 비교하여, 면역 세포인 T 세포의 비율 및 항체가를 현저히 증가시킬 수 있으며, 이를 통하여, 본 발명의 생병원체 모방 나노 입자를 다양한 기존 백신에 활용하여 백신 효능을 현저히 높일 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

[133]

[134] **실시예 5: 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 항암 면역치료 효과 확인**

[135] 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신의 암 예방 효능을 확인하기 위하여, 실시예 4.1과 동일한 방법으로 제조된 백신을 C57BL/6 마우스에 1 주 간격으로 100 μ L 씩 2 회 주사하였다. 그리고 일주일 후에 5×10^5 cells의 B16-OVA 암 세포를 C57/BL6 마우스에 피하주사하여, 암을 유발시키고 암의 성장 및 생존률을 확인하였다. 그 결과는 도 11에 나타내었다.

[136] 도 11에 나타난 바와 같이, 백신을 접종한 실험군의 경우에는 암의 성장이 저해되었으며, 생존률도 유의성 있게 증가되는 것을 확인하였다.

[137] 또한, 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신의 암 치료 효능을 확인하기 위하여, C57BL/6 마우스에 5×10^5 cells의 B16-OVA 암 세포를 피하주사하여 암을 유발시키고, 암의 크기가 50 mm³에 도달하였을 때, 실시예 4.1과 동일한 방법으로 제조된 백신을 1 주 간격으로 100 μ L 씩 2 회 주사하였다. 그리고 암의 성장 및 생존률을 확인하였다. 암의 성장은 50 mm³에서 증가된 암의 크기로 측정하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

[138] 도 12에 나타난 바와 같이, 백신을 접종한 실험군의 경우에는 암의 성장이 저해되었으며, 생존률도 유의성 있게 증가되는 것을 확인하였다.

[139] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신은 암의 예방 및 치료 효과를 나타냄을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 본 발명의 생병원체 모방 나노 입자를 활용한 백신을 면역항암제로서 사용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[140]

[141] 일반적으로 병원균의 외벽 성분은 강한 소수성 성질을 가지고 있어 유기상에서만 분산되는 특징을 가지나, 본 발명의 방법으로 제조된 병원균의 외벽 성분을 기반으로 하는 나노분산체는 지용성 용매를 사용하지 않고도 수용액에 용이하게 분산되는 성질을 가짐으로써 나노리포좀, 나노에멀전, 나노마이셀, 고분자 나노 입자 등 다양한 나노 입자 형태로 용이하게 제조할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 방법으로 제조된 병원균의 외벽 성분을 기반으로 하는 나노분산체는 병원균 자체의 면역세포 활성화 효능을 그대로 유지하고 있으므로, 이를 이용하여 다양한 의약품 제형으로 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 면역 활성화 치료제로서 다양한 질환에 폭넓게 적용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 병원균의 외벽 성분을 기반으로 하는 나노분산체에 추가적으로 다양한 아쥘번트를 포함함으로써 체액성 면역뿐만 아니라 세포성 면역을 효과적으로 유도할 수도 있고, 그 면역원성 효과 또한 더욱 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[142]

[143] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

[144] 본 발명의 병원균의 외벽 성분을 기반으로 하는 나노분산체는 수용액에 용이하게 분산되므로, 다양한 제형의 백신으로 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 다양한 항원(antigen) 및/또는 아쥘번트(adjuvant)와 혼합함으로써 면역원성을 현저히 증가시킬 수 있기 때문에, 다양한 질환의 면역 활성화 치료제로서 사용할 수 있다. 따라서, 다양한 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 백신 분야에 폭넓게 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

청구범위

- [청구항 1] 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자, 및 병원균의 외벽 성분(pathogen cell wall skeleton) 기반 나노분산체를 유효성분으로 포함하는, 생병원체 모방 나노 입자로서,
상기 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자는 활성화 부위에 지질이 결합되어 비활성화 상태인 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 병원균 외벽 성분은 동결 건조된 병원균 외벽 성분을 수용액에 분산시킨 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자.
- [청구항 3] 제 1 항에서,
상기 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자와 지질의 결합은 분리가 가능한(cleavable) 형태인 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 분리가 가능한 형태의 결합은 카바메이트(carbamate), 다이설파이드(disulfide), 에스터(ester), 펩타이드(peptide), 아자이드(azide), 아마이드(amide), 하이드라존(hydrazone), 티오이썸(thioether), 포스포디에스터(phosphodiester), 티오케탈(thioacetal) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자는
이미다조퀴놀린(imidazoquinoline) 계열,
하이드록시아데닌(hydroxyadenine) 계열, 프테리돈(pteridine) 계열,
아미노피리미딘(aminopyrimidine) 계열, 벤조아제핀(benzazepine) 계열,
타이아옥소구아노신(thia-oxoguanosine) 계열 및 이들의
유사체(derivative)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인
것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자와 지질의 결합은 중양미세환경,
또는 세포내의 엔도솜 및 라이소솜의 효소 및 pH에 반응하여, 결합
부위의 화학적 결합이 절단(cleavage)되고 톨-유사 수용체 7 또는 8
작용자의 활성화 부위가 노출되어 4 일내에 동력학적으로 기능이
회복되는 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 나노 입자는 20 내지 500 nm의 직경을 가지는 것을 특징으로 하는,
생병원체 모방 나노 입자.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,

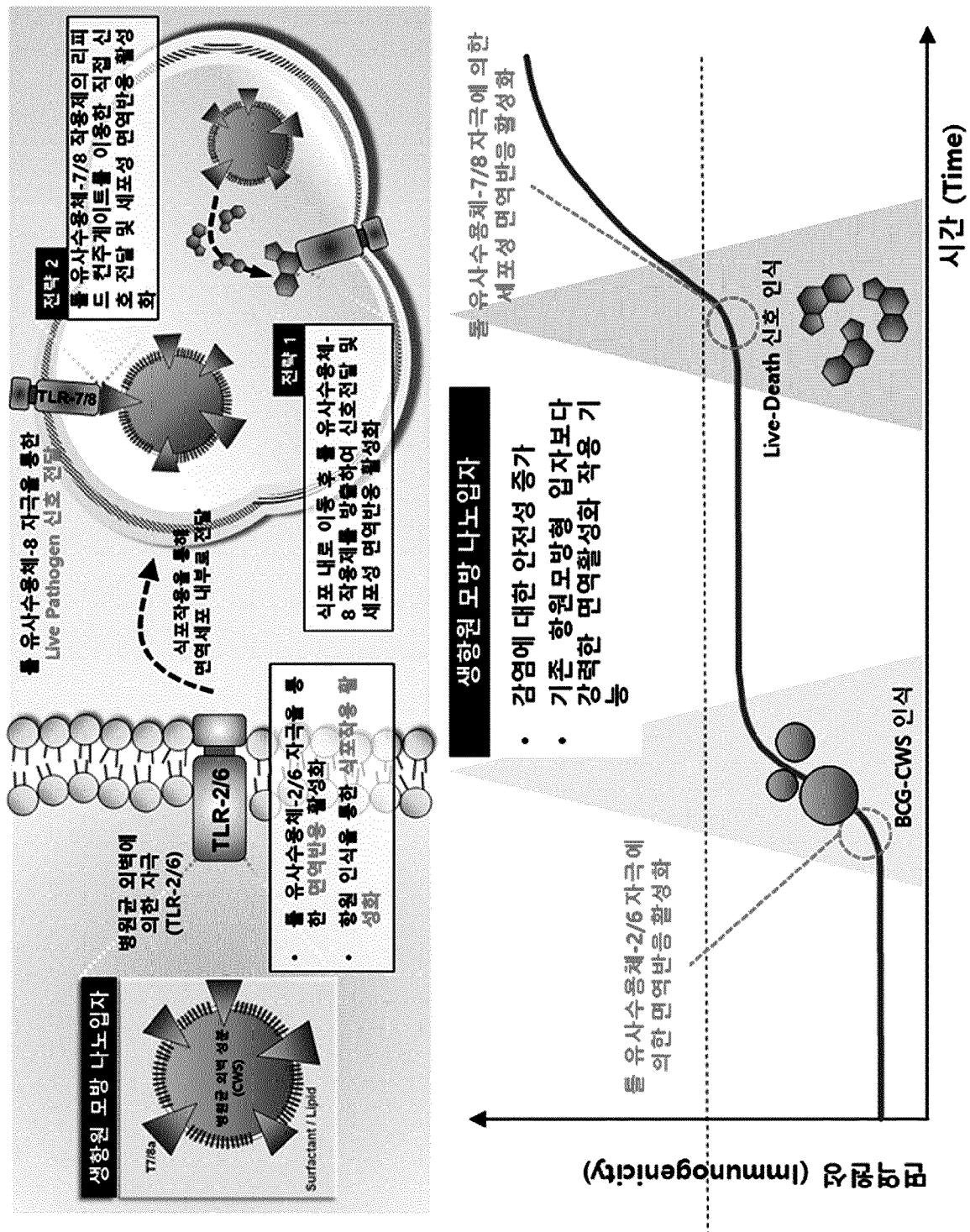
상기 나노 입자는 나노리포좀, 나노에멀전, 나노마이셀, 및 고분자 나노 입자로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자.

- [청구항 9] 제 1 항에 있어서,
상기 나노 입자는 톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist), 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라마좀 유도제(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD 리간드), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 항원, 알루미늄(Alum), 화학 항암제, 면역관문억제제 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자.
- [청구항 10] 제 1 항의 나노 입자를 유효성분으로 포함하는, 면역항원보강제(adjuvant) 조성물.
- [청구항 11] 제 10 항의 면역항원보강제 조성물 및 항원을 유효성분으로 포함하는, 백신 조성물.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 항원은 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 유전자, 펩티드, 다당류, 지질다당류, 폴리뉴클레오티드, 세포, 세포 용해물(lysate), 박테리아 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.
- [청구항 13] 제 11 항에 있어서,
상기 백신 조성물은 화학 항암제 또는 면역관문억제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.
- [청구항 14] 제 11 항에 있어서,
상기 백신 조성물은 암의 예방 또는 치료 용도인 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서,
상기 백신 조성물은 암의 증식, 전이, 재발 또는 항암 치료 요법에 대한 내성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 백신 조성물.
- [청구항 16] (a) 병원균을 파쇄하는 단계;
(b) 상기 파쇄물로부터 지질을 제거하는 단계;
(c) 상기 지질이 제거된 파쇄물로부터 막단백질을 제거하는 단계;
(d) 상기 막단백질이 제거된 파쇄물을 원심분리하여 병원균의 외벽 성분을 분리하는 단계;
(e) 상기 분리된 병원균의 외벽 성분을 동결건조시켜 동결 건조 제제를 제조하는 단계;
(f) 상기 동결 건조 제제, 계면활성제 및 양전하성 완충용액을 혼합하는 단계; 및

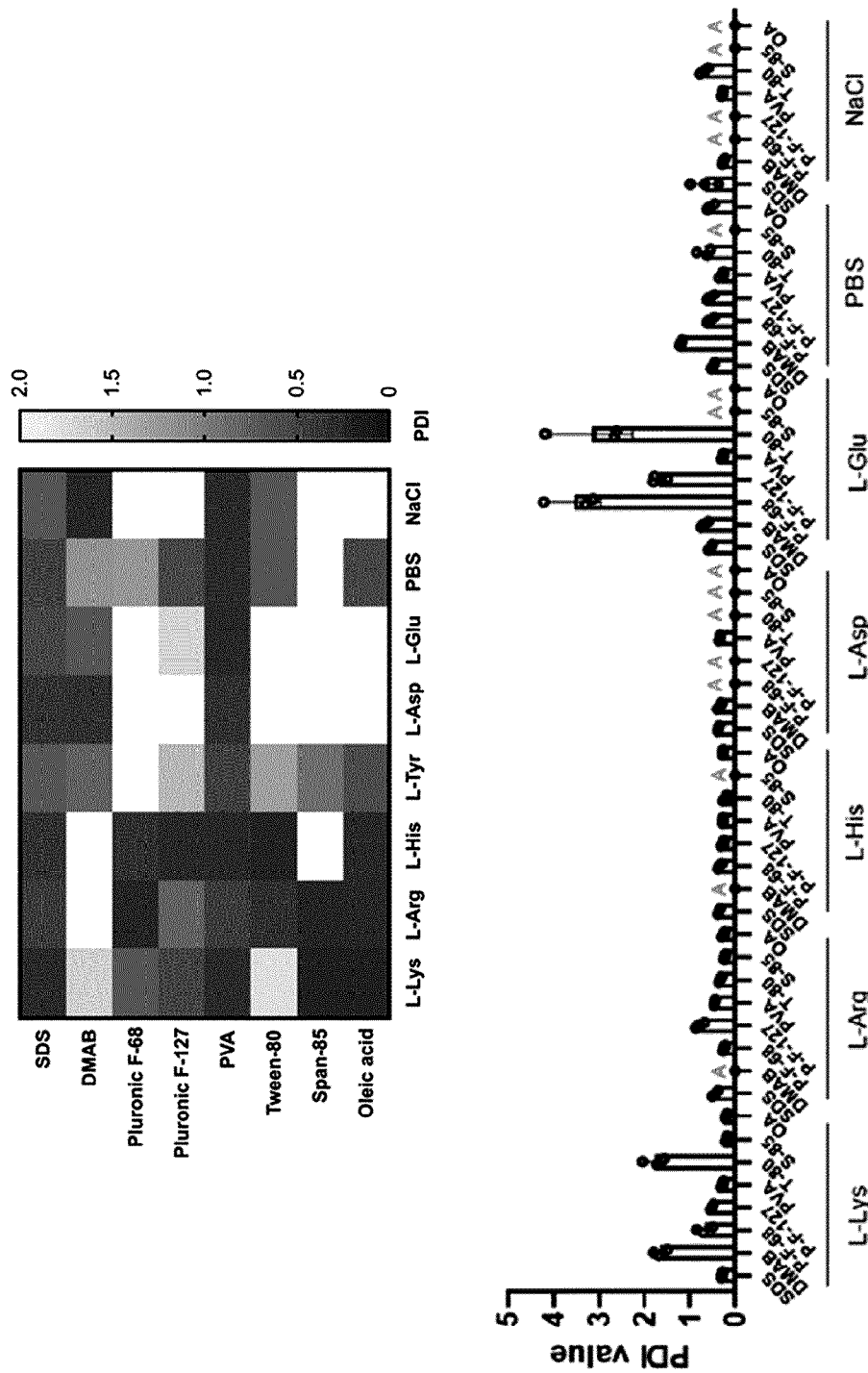
(g) 상기 (f) 단계의 혼합물에 지질(lipid), 지질 결합체(lipid conjugates), 또는 활성화 부위에 지질이 결합된 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 첨가하고 초음파 처리하여 나노 입자를 제조하는 단계를 포함하는, 생병원체 모방 나노 입자의 제조 방법.

- [청구항 17] 제 16 항에 있어서,
상기 제조 방법은 (g) 단계 이후에 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자(agonist), 톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist), 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라마좀 인두서(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD 리간드), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 항원, 알루미늄(Alum), 화학 항암제, 면역관문억제제 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 첨가하고 혼합하여 초음파 처리하는 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자의 제조 방법.
- [청구항 18] 제 16 항에 있어서,
상기 (f) 단계의 계면활성제는 SDS(sodium dodecyl sulfate), DMAB(didodecyldimethylammonium bromide), Pluronic F68, Pluronic F127, PVA(polyvinyl alcohol), Tween-80, Span-85, 올레인산(Oleic acid) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자의 제조 방법.
- [청구항 19] 제 16 항에 있어서,
상기 (f) 단계의 양전하성 완충용액은 L-Lysine(L-Lys) 완충용액, L-Arginine(L-Arg) 완충용액, L-Histidine(L-His) 완충용액, L-Tyrosine(L-Tyr) 완충용액, L-Aspartic acid(L-Asp) 완충용액, L-Glutamine(L-Glu) 완충용액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 생병원체 모방 나노 입자의 제조 방법.
- [청구항 20] 제 1 항의 나노 입자를 유효성분으로 포함하는 조성물의 질병의 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 21] 제 1 항의 나노 입자를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 질병의 예방 또는 치료 방법.

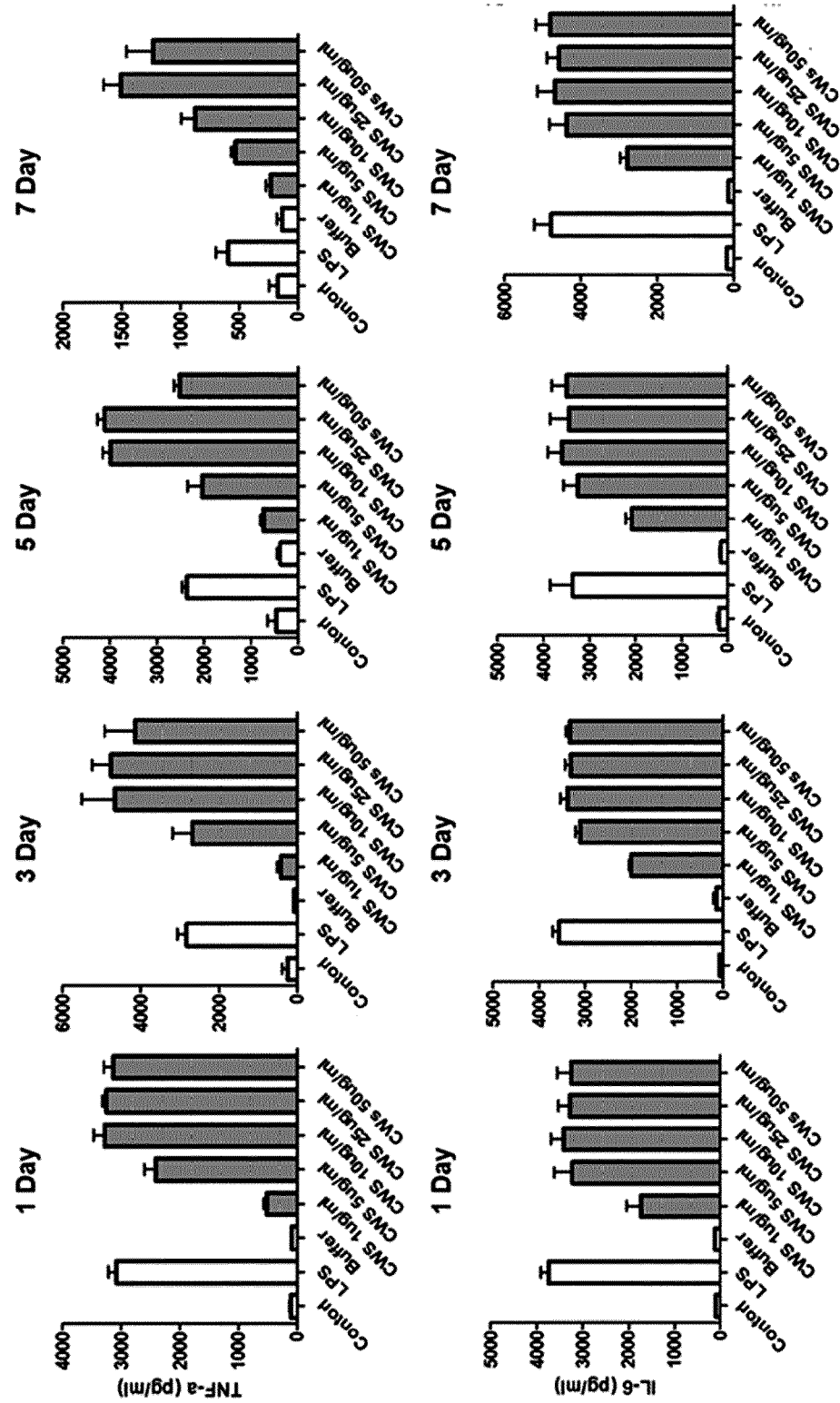
[도 1]



[도2]

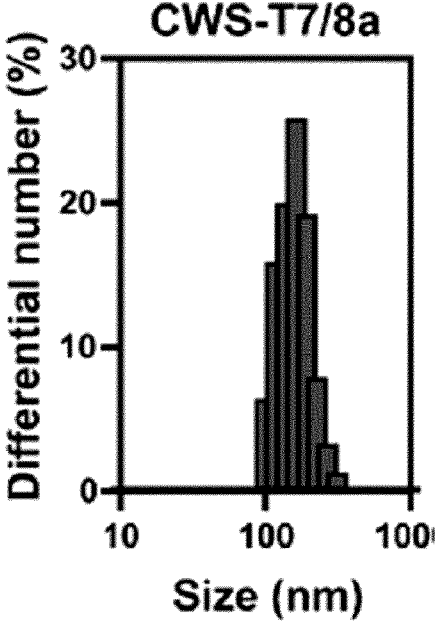
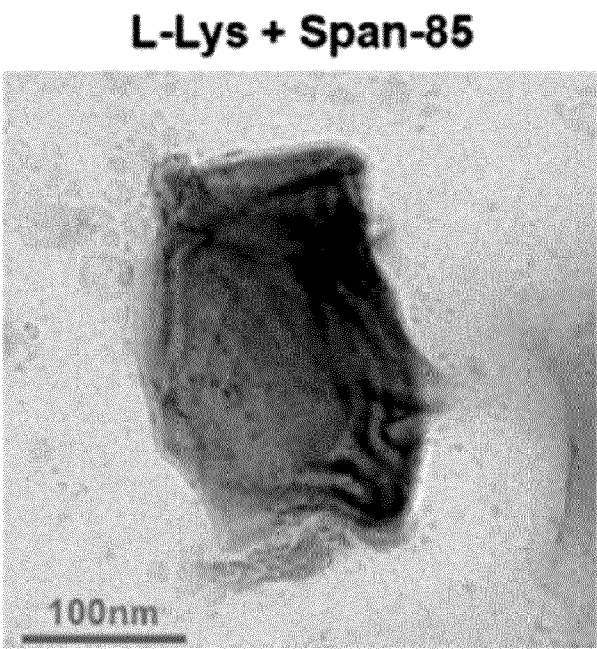


[도3]

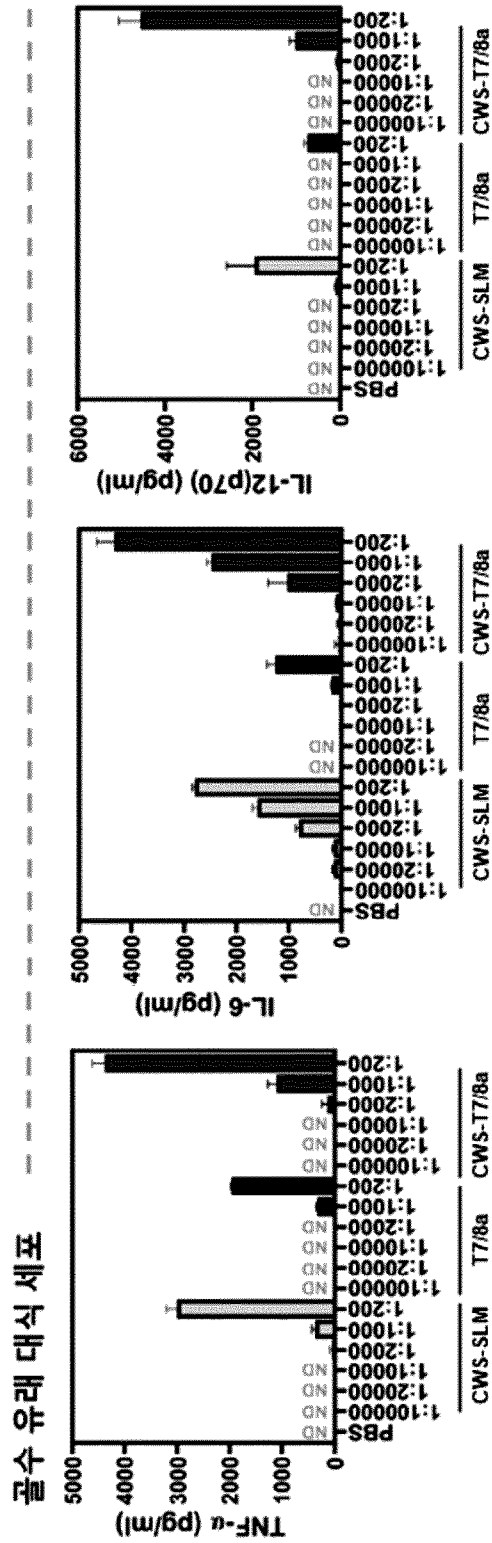
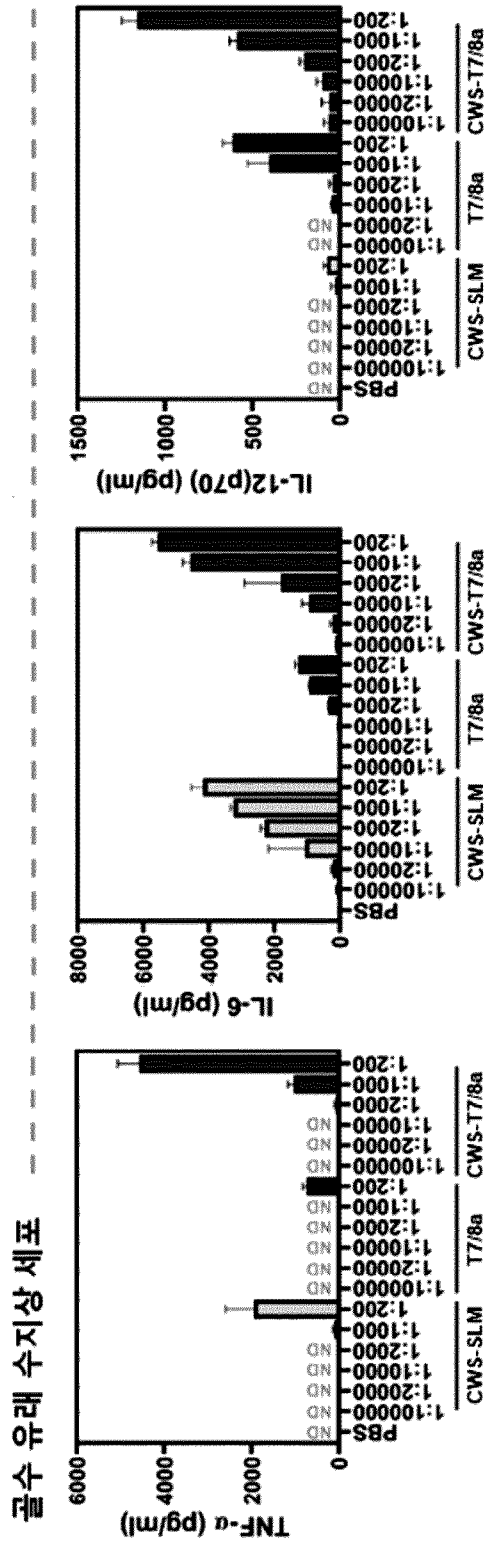


[도4]

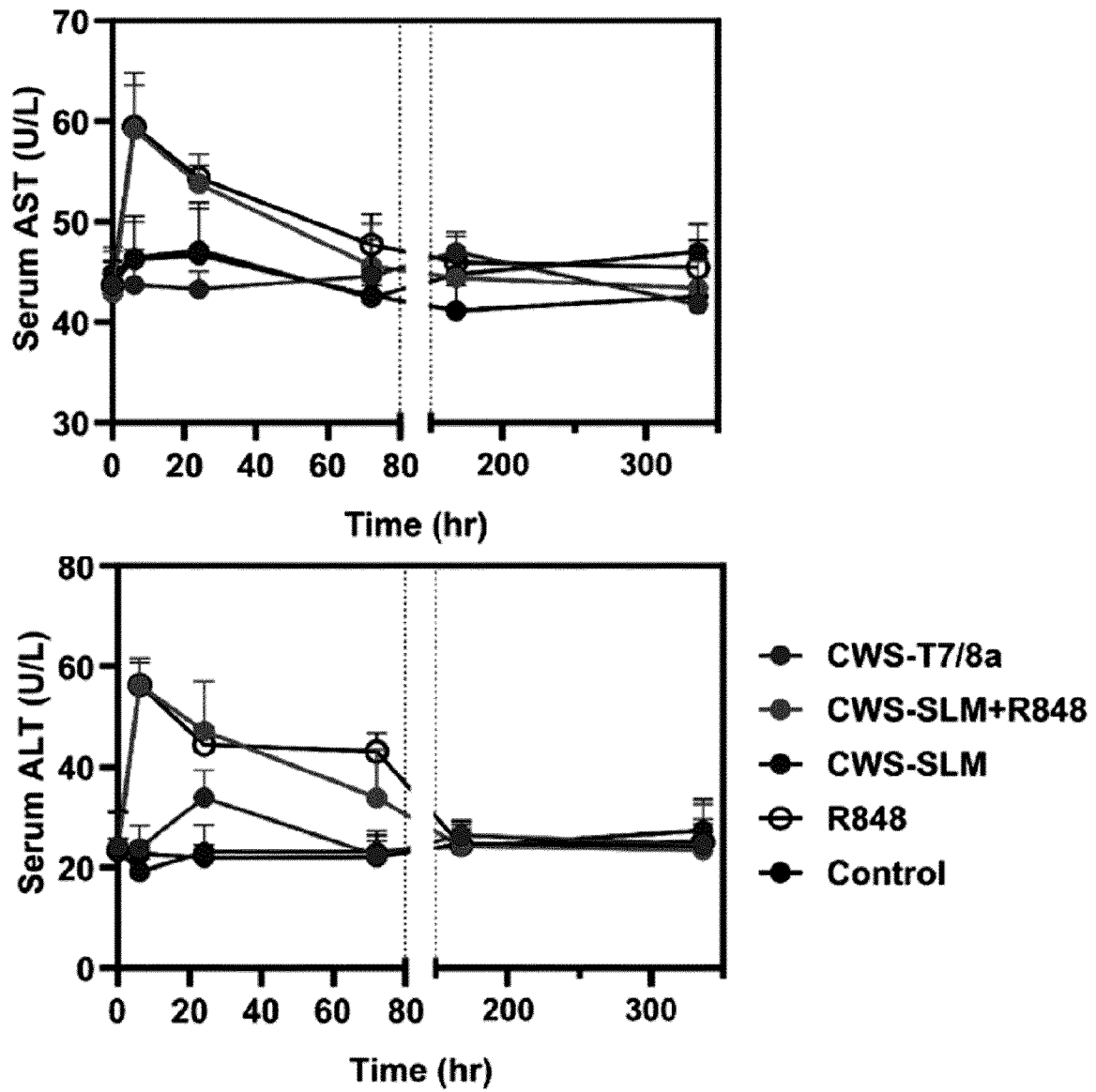
Buffer	Surfactant	Size distribution [nm]	Zeta potential [mV]
L-Lys	1% Span 85	123.6 ± 31.5	-35.63 ± 4.95



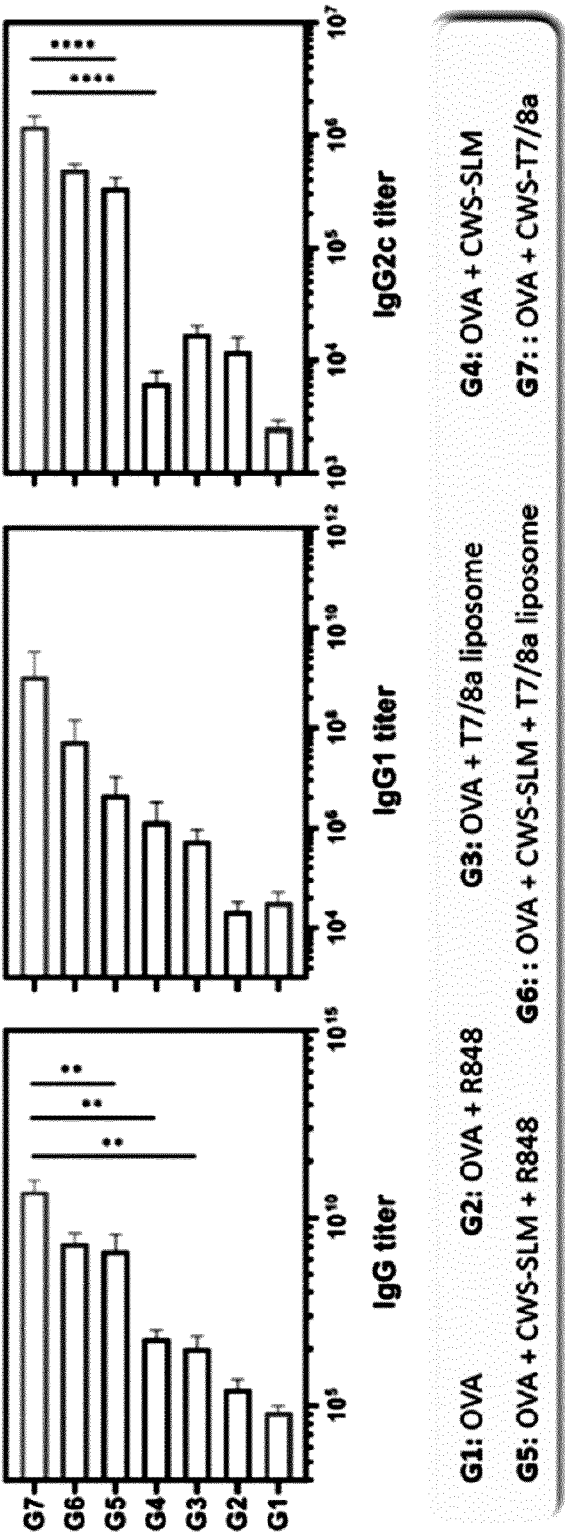
[도5]



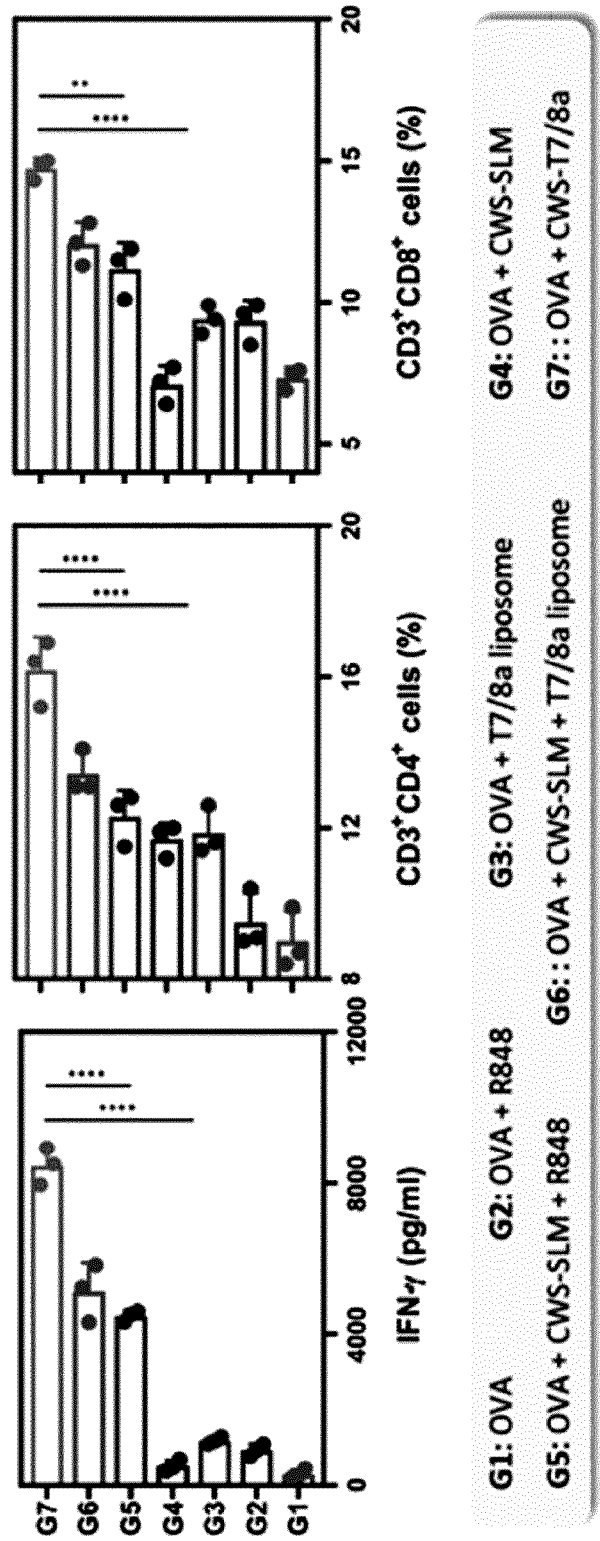
[도6]



[도7]

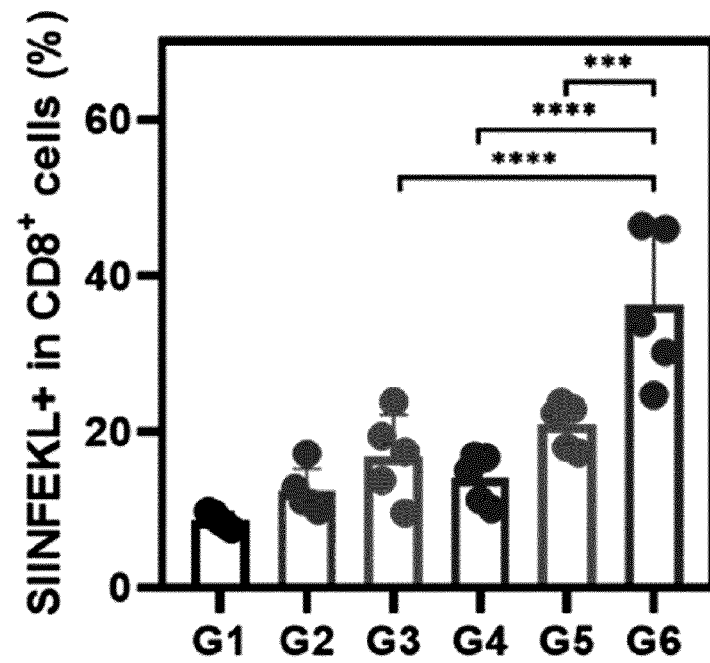


[도8]



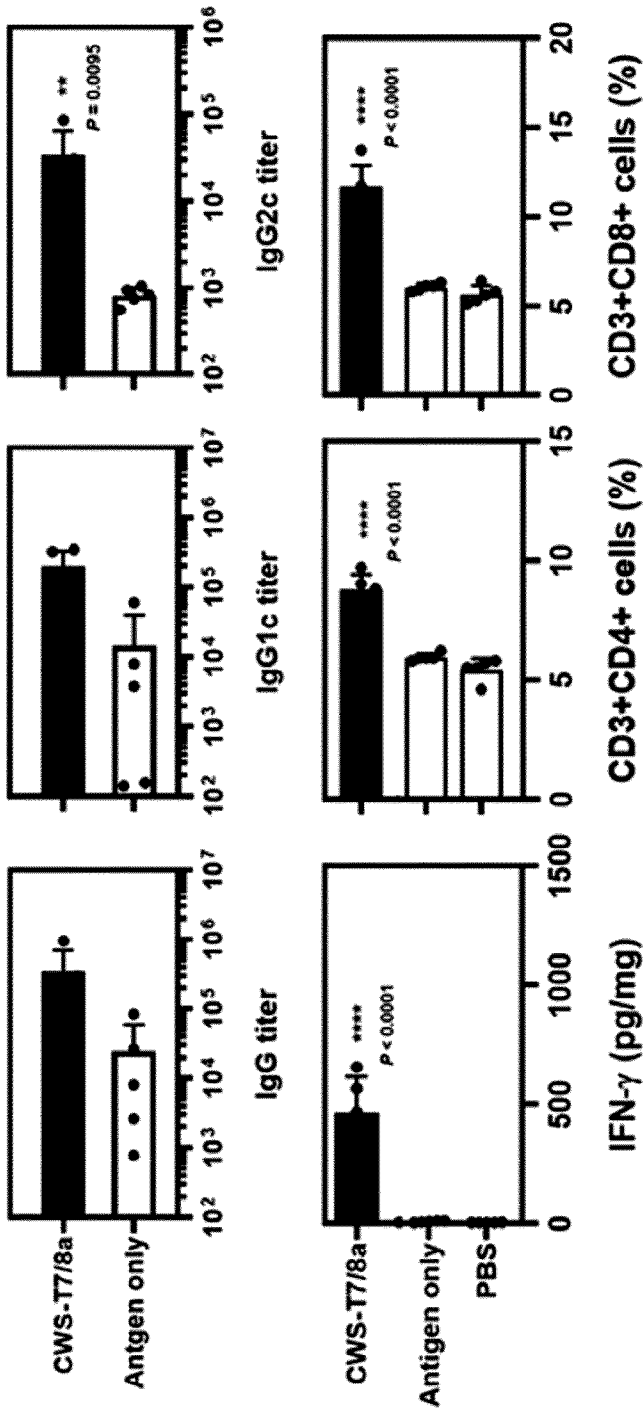
[도9]

- **G1**
PBS
- **G2**
OVA only
- **G3**
R848
- **G4**
CWS-SLM
- **G5**
CWS-SLM + R848
- **G6**
CWS-T7/8a

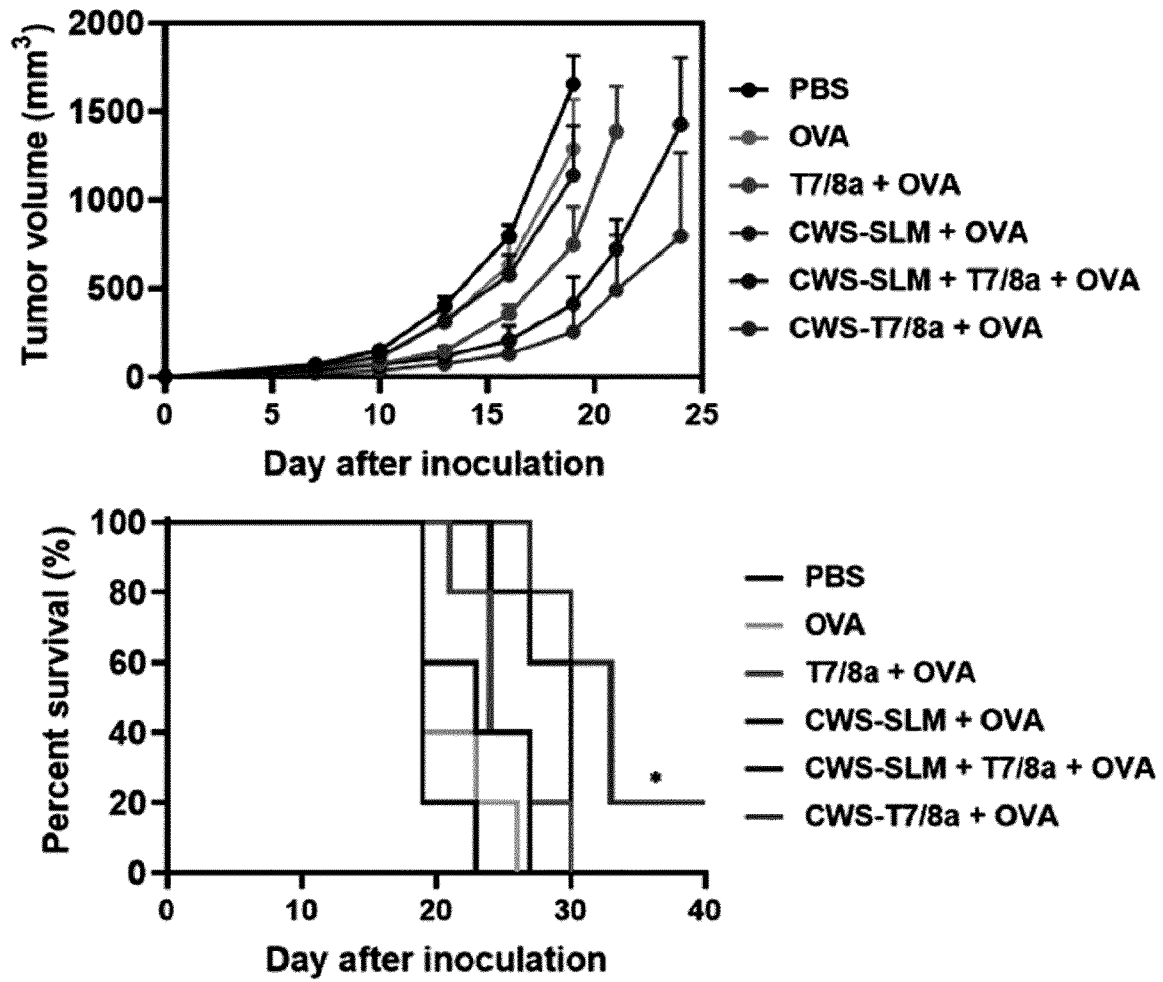


[도10]

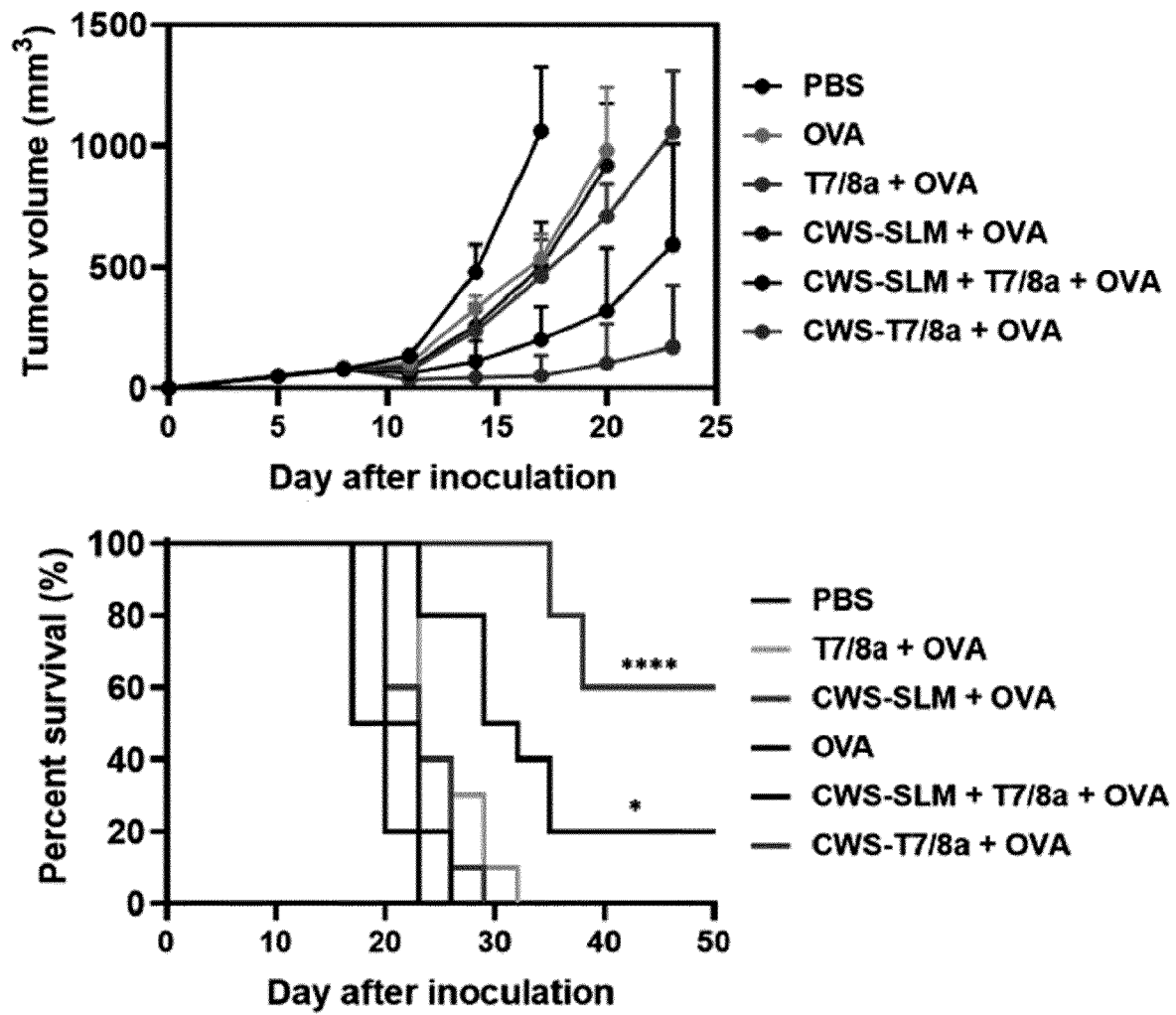
SRAS-CoV-2 S1 Recombinant Vaccination with CWS-T7/8a



[도11]



[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/39(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 39/39(2006.01); A61K 47/14(2006.01); A61K 47/44(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 병원균의 외벽성분(pathogen cell wall skeleton), 톨-유사 수용체 7(Toll-like receptor 7), 톨-유사 수용체 8(Toll-like receptor 8), 작용자(agonist), 모방(mimetic), 나노입자(nanoparticle)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	NAKAMURA, T. et al. Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy. Journal of controlled release. 2014, vol. 176, pp. 44-53. See abstract; figure 1; and pages 45, 47 and 52-53.	1-5,7-20 6
Y	DOWLING, D. J. Recent advances in the discovery and delivery of TLR7/8 agonists as vaccine adjuvants. ImmunoHorizons. 2018, vol. 2, no. 6, pp. 185-197. See abstract; figure 1; tables 1 and 4; and pages 186-190.	1-5,7-20
Y	IGNACIO, B. J. et al. Toll-like receptor agonist conjugation: a chemical perspective. Bioconjugate chemistry. 2018, vol. 29, pp. 587-603. See table 2; and page 595.	1-5,7-20
A	KR 10-2018-0093813 A (DANDI BIOSCIENCE INC) 22 August 2018 (2018-08-22) See abstract; and claims 1-17.	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 2021

Date of mailing of the international search report

23 June 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002508

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0061741 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 05 June 2019 (2019-06-05) See abstract; and claims 1-9.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/002508

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 21 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/002508

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2018-0093813	A	22 August 2018	AU	2018-218721	A1	29 August 2019
				CA	3052940	A1	16 August 2018
				CN	110430868	A	08 November 2019
				EP	3581170	A1	18 December 2019
				JP	2020-506938	A	05 March 2020
				RU	2019128380	A	15 March 2021
				US	2020-0046831	A1	13 February 2020
				WO	2018-147710	A1	16 August 2018
KR	10-2019-0061741	A	05 June 2019	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 39/39(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 39/39(2006.01); A61K 47/14(2006.01); A61K 47/44(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 병원균의 외벽성분(pathogen cell wall skeleton), 톨-유사 수용체 7(Toll-like receptor 7), 톨-유사 수용체 8(Toll-like receptor 8), 작용자(agonist), 모방(mimetic), 나노입자(nanoparticle)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y A	NAKAMURA, T. 등, Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy, Journal of controlled release, 2014, 176권, 페이지 44-53 초록; 도면 1; 페이지 45, 47, 52-53	1-5,7-20 6
Y	DOWLING, D. J., Recent advances in the discovery and delivery of TLR7/8 agonists as vaccine adjuvants, ImmunoHorizons, 2018, 2권, 6호, 페이지 185-197 초록; 도면 1; 표 1, 4; 페이지 186-190	1-5,7-20
Y	IGNACIO, B. J. 등, Toll-like receptor agonist conjugation: a chemical perspective, Bioconjugate chemistry, 2018, 29권, 페이지 587-603 표 2; 페이지 595	1-5,7-20
A	KR 10-2018-0093813 A (단디바이오사이언스 주식회사) 2018.08.22 요약; 청구항 1-17	1-20
A	KR 10-2019-0061741 A (성균관대학교산학협력단) 2019.06.05 요약; 청구항 1-9	1-20
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년06월23일(23.06.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년06월23일(23.06.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0093813 A	2018/08/22	AU 2018-218721 A1	2019/08/29
		CA 3052940 A1	2018/08/16
		CN 110430868 A	2019/11/08
		EP 3581170 A1	2019/12/18
		JP 2020-506938 A	2020/03/05
		RU 2019128380 A	2021/03/15
		US 2020-0046831 A1	2020/02/13
		WO 2018-147710 A1	2018/08/16
KR 10-2019-0061741 A	2019/06/05	없음	