

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0120329
(43) 공개일자 2020년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/385 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/385 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-0043106
(22) 출원일자 2019년04월12일
심사청구일자 2019년04월12일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
영남대학교 산학협력단
경상북도 경산시 대학로 280 (대동)
(72) 발명자
곽민석
부산광역시 남구 분포로 113, 228동 104호(
용호동, 엘지메트로시티)
진준오
대구광역시 수성구 달구벌대로 3310, 102동 1102
(신매동, 한라하우젠트)
(74) 대리인
특허법인리체

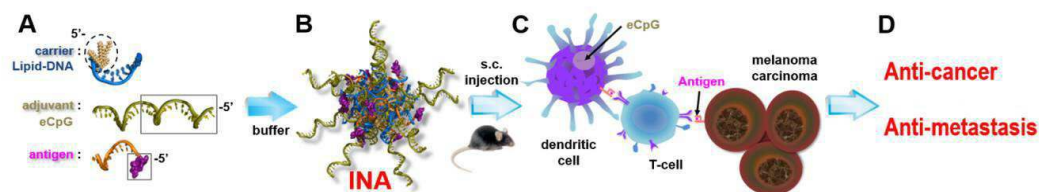
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 항원 전달용 조성물

(57) 요약

본 발명은 뉴클레오타이드 서열의 말단에 U_m (U 는 하기 화학식 1로 표시됨, m 은 1 내지 10의 정수)을 포함하는 10 내지 30 뉴클레오타이드 길이의 지질 DNA; 상기 지질 DNA에 혼성화된 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 PNA;를 포함하는 항원 전달용 구조체에 관한 것으로서, 상기 구조체는 매우 안정하게 항원을 세포 내로 전달할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/585 (2013.01)
A61K 2039/6018 (2013.01)
A61K 2039/6025 (2013.01)
A61K 2039/6031 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2017R1C1B1005804
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구/신진연구
연구과제명	지질 DNA 나노입자를 이용한 면역치료제 및 백신 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

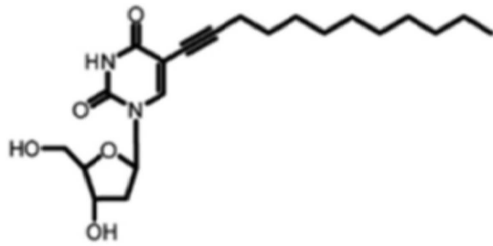
청구범위

청구항 1

뉴클레오타이드 서열의 말단에 U_m (U는 하기 화학식 1로 표시됨, m은 1 내지 10의 정수)을 포함하는 10 내지 30 뉴클레오타이드 길이의 지질 DNA;

상기 지질 DNA에 혼성화된 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 PNA;를 포함하는 항원 전달용 구조체:

[화학식 1]



청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 지질 DNA는 하기 화학식 2로 표시되는 것인 구조체:

[화학식 2]

$U_m X_n$

(식 중, X는 서로 독립적으로 A, T, G, C로 이루어진 군에서 선택되고, m은 1 내지 10의 정수, n은 9 내지 20의 정수).

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 지질 DNA는 전체 서열길이 100% 대비 U_m 의 서열길이가 30 내지 40%인 구조체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 지질 DNA는 서열번호 1 내지 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 구조체.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 지질 DNA는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 구조체.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 CpG는 지질 DNA의 적어도 일부와 상보적인 서열을 포함하는 구조체.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 PNA는 지질 DNA의 적어도 일부와 상보적인 서열을 포함하는 구조체.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 항원 전달용 구조체; 및 상기 PNA의 말단에 결합된 항원을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 항원 전달용 구조체; 및 상기 PNA의 말단에 결합된 항원을 포함하는 암 전이 억제용 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 항원 전달용 구조체; 및 상기 PNA의 말단에 결합된 항원을 포함하는 면역 요법용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안정적으로 표적 세포에 항원을 전달할 수 있는 항원 전달용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암세포는 일반 세포와 달리 무한 증식할 수 있는 능력을 가지고 있고 우리 몸의 방어체계인 면역으로부터 회피할 수 있는 기능을 가지고 있다. 또한, 우리 면역이 암을 발견하고 암세포를 사멸 시키지 못하게 암이 발병하는 동안 다양한 종류의 면역 억제 물질을 분비하는 것으로 잘 알려져 있다. 암세포가 우리 몸의 면역작용으로부터 회피할 수 있는 가장 큰 이유는 유전자 돌연변이에 의한 암 특이적인 항원을 면역 세포에게 전달하지 않는 것이다. 이에 따라, 면역 세포는 암세포의 증식을 질병으로 인식하지 못하게 되고 암은 급속도로 증식하게 되어 말초 조직을 파괴시키게 된다. 이에 최근에는 암을 치료하기 위한 면역요법으로 암 세포의 항원 부분을 면역 조절 물질과 함께 처리하여 암 항원 특이적인 세포 독성 T-세포를 증식 시켜 암에 대한 치료 및 백신(cancer vaccine)으로 개발이 시도되고 있다. 하지만 이러한 기술들은 대부분 체외에서 배양한 항원 표지 세포 (antigen presenting cells)를 이용해 연구가 되고 있고 체내에서 그 활성화 연구가 부족한 실정이다.

[0004] 암 외에도 최근 전 세계적으로 다양한 병원균의 감염으로 인류가 위협받고 있다. 이러한 감염 질환을 치료하고 방어하기 위해 감염 질환의 항원을 이용한 백신의 개발이 다양한 방법으로 진행되고 있으나 급속도로 변이하고 다양화되고 있는 병원균에 적절하게 대처하지 못하고 있다.

[0005] 그뿐만 아니라 감염질환 및 암 질환과는 반대 되는 질환으로 성인 대부분이 가지고 있는 만성 염증에 의한 자가 면역 질환도 인류 생존에 큰 위협이 되고 있다. 자가 면역 질환은 비 특이적으로 활성화된 면역 세포들이 정상 조직 세포를 사멸 시키고 조직을 파괴시키게 되어 조직의 기능을 파괴시켜 버리는 질병으로 아직 적절한 치료제가 개발되어 있지 않고 면역 억제제를 이용하여 질병을 완화시키는 정도이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2016-0048232호

발명의 내용

해결하려는 과제

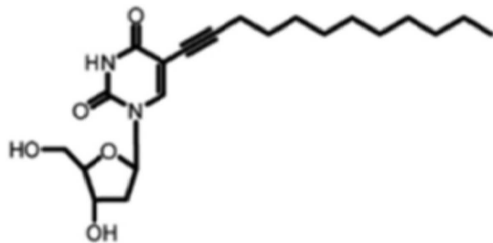
[0008] 본 발명은 높은 구조적 안정성을 갖고, 표적 세포 내로 원활히 전달될 수 있는 항원 전달용 구조체를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 1. 뉴클레오타이드 서열의 말단에 U_m (U 는 하기 화학식 1로 표시됨, m 은 1 내지 10의 정수)을 포함하는 10 내지 30 뉴클레오타이드 길이의 지질 DNA;

[0011] 상기 지질 DNA에 혼성화된 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 PNA;를 포함하는 항원 전달용 구조체:

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 2. 위 1에 있어서, 상기 지질 DNA는 하기 화학식 2로 표시되는 것인 구조체:

[0015] [화학식 2]

[0016] $U_m X_n$

[0017] (식 중, X 는 서로 독립적으로 A, T, G, C로 이루어진 군에서 선택되고, m 은 1 내지 10의 정수, n 은 9 내지 20의 정수).

[0018] 3. 위 1에 있어서, 상기 지질 DNA는 전체 서열길이 100% 대비 U_m 의 서열길이가 30 내지 40%인 구조체.

[0019] 4. 위 1에 있어서, 상기 지질 DNA는 서열번호 1 내지 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 구조체.

[0020] 5. 위 1에 있어서, 상기 지질 DNA는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 구조체.

[0021] 6. 위 1에 있어서, 상기 CpG는 지질 DNA의 적어도 일부와 상보적인 서열을 포함하는 구조체.

[0022] 7. 위 1에 있어서, 상기 PNA는 지질 DNA의 적어도 일부와 상보적인 서열을 포함하는 구조체.

[0023] 8. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 항원 전달용 구조체; 및 상기 PNA의 말단에 결합된 항원을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[0024] 9. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 항원 전달용 구조체; 및 상기 PNA의 말단에 결합된 항원을 포함하는 암 전이 억제용 조성물.

[0025] 10. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 항원 전달용 구조체; 및 상기 PNA의 말단에 결합된 항원을 포함하는 면역 요법용 조성물.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 항원 전달용 구조체는 매우 안정하고 세포 내로 원활히 전달되어, 항원으로부터 목적하는 효과를 안

정적으로 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 핵산 기반 면역요법의 도식적 표현이다.

도 2는 본 발명 구조체의 표적 전달과 관련한 지질 DNA의 최적화에 관련된 것으로서, (a)는 지질 DNA들의 서열, (b)는 다양한 시점에서 지질 DNA 나노파티클이 투여된 눈의 총 수 중 나노파티클이 있는 양성인 쥐 눈의 수에 대한 개요, (c)는 형광 점안액 누여 후 특정 시점에서 U4-12 나노파티클(녹색)과 쥐 각막 상피(청색)의 점착 이미지이다.

도 3은 본 발명 구조체(INA)에 의한 항원 특이적 면역 활성화 유도를 나타낸 것으로서, (a)는 Alexa 488로 표지된 pOVA 및 Texas Red로 표지된 eCpG를 C57BL/6 마우스에 1시간 동안 피하주사하여, pOVA 및 eCpG의 섭취를 사타구니 림프절(iLN)의 CD8 α + DC에서 측정된 것, (b)는 tumor-draining 림프절(drLN)에서의 OT-1 세포증식의 평균 백분율, (c)는 종양이 침투된 OT-1 세포의 평균 수, (d)는 종양이 침투한 OT-1 세포에서의 세포 내 IFN- γ 및 TNF- α 의 생성을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명 구조체(INA)의 모델 항원(OVA) 특이적 항암 및 항전이 효과를 나타낸 것으로서,

C57BL/6 마우스에 10×10^6 B16-OVA 세포를 피하주입하고, INA 치료를 종양세포 주사 후 7일과 14일에 수행하였고, (a)는 B16-OVA 종양세포 주입 후 21일째 종양의 크기, (b)는 종양-drLN의 OVA 펩티드 특이 IFN- γ 의 생성을 ELISPOT으로 분석한 것으로서 평균 스폿(spot)의 수를 표시한 것이고,

C57BL/6 마우스에 INA 피하주입 3일 후, 0.5×10^6 B16-OVA 흑색종 세포를 마우스 비장내에 접종하고, 3일 후에 동일한 INA 농도로 다시 처리하였고, (c)는 비장 내 종양의 크기, (d)는 종양 주입 후 14일째 비장의 중량, (e)는 14일째 B16-OVA 세포의 간 전이, (f)는 간에서의 B16-OVA 전이 절대값의 평균을 나타낸 것이다.

도 5는 흑색종(TRP2) 또는 암종(AH1)에 대한 항원을 포함하는 INA의 항원 특이적 항암 효과에 관한 것으로서,

C57BL/6 마우스에 B16 흑색종을 주입하고 7일과 14일에 pTRP2를 포함한 INA를 치료에 사용하였고, (a)는 흑색종 종양세포 도입 후 21일째 종양의 크기, (b)는 ELISPOT에 의해 TRP2 펩티드-특이적 IFN- γ 의 생성을 tumor-drLN에서 측정된 것이고,

Balb/c 마우스에 CT-26 암종 세포를 피하주입하고 7일 및 14일에 INA로 처리하였고, (c)는 암종 종양의 크기, (d)는 AH1 펩티드-특이적 IFN- γ 의 생산 및 평균 스폿 수를 나타낸 것이다.

도 6은 암의 면역치료를 위한 INA 성분을 나타낸 것으로서,

U4T는 4개의 우라실로 인해 물에서 마이셀을 형성할 가능성이 높고, 면역 보조제 및 항원과 같은 일부 생체 적합 물질을 전달할 수 있고,

보조제(eCpG)는 ODN1826(쥐 TLR9에 특이적인 클래스 B CpG ODN)으로 확장된 U4T의 완전히 상보적인 서열인 cU4T로 구성되는데, 녹색 뉴클레오티드는 혈청 함유 배지에서 핵산분해효소에 대한 민감도를 연장하기 위해 포스포로싸이오에이트그룹(PS)에 의해 연결되며,

PNA-펩티드(pOVA, pTRP2, pAH1)는 부분적으로 상보적인 PNA(8 PNA/DNA 염기쌍, 흑색), 여분의 핵산 또는 아미노산(파란색) 및 항원 에피토프(적색)의 원-팟(one pot) 합성 접합체이다.

도 7은 Alexa 488 및 TAMRA로 각각 표지된 이중가닥(ds) PNA/DNA의 용융온도(T_m) 분석으로서, (a)는 FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) 유도를 위한 Alexa 488(donor)과 TAMRA(acceptor)의 광 물리적 성질, (b)는 IDT 생물물리학 도구에 의해 계산된 ds U4T (DNA/DNA)의 이론적 인 T_m , (c)는 pre-annealed PNA/DNA 복합체의 열 변성시 PNA/DNA duplex의 T_m 을 측정하기 위해 RT-PCR(Thermo Scientific, USA)에서 Alexa 488 ($\lambda_{ex} = 495 \text{ nm}$)의 형광 강도를 기록한 것이다. (b), (c)에 대한 완충액 조건은 동일하다(2 mM MgCl_2 존재하에 5 μM).

도 8은 혈청 처리된 (a) eCpG 및 (b) 포스포로싸이오에이트(PS)-변형된 eCpG(1X TBE에서 10 %, 110V, 90 분)의

폴리아크릴아미드겔 전기영동 결과로서, 밴드상의 각 숫자는 혈청 함유 배지(FBS 및 DMEM)에서 eCpG 및 PS-변형된 eCpG의 배양시간을 나타낸다. 겔 밴드를 분석하여 ImageJ 소프트웨어(NIH, U.S.A.)를 사용하여 분해정도를 결정하였다.

도 9는 피하로 PBS, U4T, U4T+eCpG, U4T+pOVA, 및 INA를 각각 주입한 C57BL/6 마우스에 있어서, INA가 CD8 α+ DC에서 OVA 제시(presentation)이 증가됨을 나타내는 것으로서, (a)는 처리 1시간 후 anti-OVA 항체를 사용하여 비장 CD8 α+ 및 CD8 α-DC 상의 OVA 항원 에피토프의 표면 제시를 측정된 것이고, (b)는 표면에 OVA 펩타이드 양성 비장 CD8 α+ DC의 평균 개수를 표시한 것이다.

도 10은 OVA-제시 CD8 α+ DC에서의 공동 자극 분자 발현에 관한 것으로서, (a)는 OVA+ 또는 OVA- 비장 CD8 α+ DC에 대한 표면 공동 자극 분자 발현을 측정된 것이고, (b)는 OVA+ 또는 OVA- 비장 CD8 α+ DC에 대한 CD80, CD86 및 MHC 클래스 1 수준의 MFI를 나타낸 것이다.

도 11은 INA에 의한 OT-1 세포 증식의 증진을 나타낸 것으로서, 세포를 CSFE로 표지하고, CD45.1 congenic 마우스로 옮기고 24시간 후, PBS, pOVA, U4T+pOVA, eCpG+pOVA 및 INA로 마우스를 처리한 결과를 나타낸 것이다. 사타구니 림프절(iLN)에서의 OT-1 세포 증식은 처리 후 3일째에 측정되었고, 수치는 OT-1 세포를 증식시키는 CSFE의 희석을 나타낸다.

도 12는 INA에 의한 전염증성 사이토카인 생산의 촉진을 나타낸 것으로서, (a)는 IFN-γ, (b)는 TNF-α 생산 OT-1세포의 백분율을 INA 주입 후 측정된 것이다(검정색 막대).

도 13은 INA 처리에 의한 B16-OVA 종양 성장 예방효능을 나타낸 것으로서, C57BL/6 마우스에 1×10^6 B16-OVA 세포를 주입하고, 7일 후에 종양이 잘 자리잡으면 마우스에 PBS, U4T, U4T+eCpG, U4T+pOVA, 및 INA를 피하주입 하였으며, 14일째에 동일한 처리를 반복하였다. (a)는 마우스의 B16-OVA 종양 성장 곡선을 표시한 것이고, (b)는 tumor-draining 림프절(drLN)의 OVA 특이 IFN-γ의 생성을 ELISPOT 분석으로 측정된 것이다.

도 14는 B16 흑색종 종양 성장에서 INA의 억제 효과를 나타낸 것으로서, C57BL/6 마우스에 1×10^6 B16-OVA 세포를 주입하고, 7일 후에 PBS, U4T+eCpG, U4T+pTRP2 및 INA를 피하주입 하였고, 14일째에 동일한 처리를 반복하였다. (a)는 B16 흑색종 종양 성장을 나타낸 것이고, (b)는 TRP2 특이 IFN-γ 생산을 종양-drLN에서 측정된 것이다.

도 15는 AH1을 함유한 INA의 CT-26 암 종양 억제능을 확인한 것으로, Balb/C 마우스에 1×10^6 CT-26 세포를 피하주입한 후, PBS, U4T+eCPG, U4T+pAH1 및 INA를 7일째 및 14일째에 처리하였다. (a)는 CT-26 종양 체적을 표시한 것이고, (b)는 tumor-drLN의 AH1 특이적 IFN-γ 생성을 ELISPOT 분석에 의해 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0032]

본 발명의 항원 전달용 구조체는 지질 DNA와 이에 혼성화된 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 PNA를 포함한다.

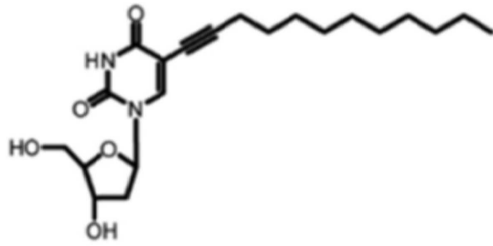
[0034]

본 발명에 따른 지질 DNA는 친수성 부분과 소수성 부분을 한 분자에 동시에 가져, 수계에서 여러 분자가 모여서 특정의 형태로 조립될 수 있는 것으로서, 그 서열의 말단에 지질 함유 핵염기인 도데시닐-1-우라실(이하, U로 표기한다)을 반복적으로 포함하고(U_n), 그 외에 추가적으로 염기를 더 포함하여 수계에서 자기조립될 수 있으며, 이는 상당히 희석된 조건하에서도 구조적으로 안정한 형태이다.

[0035]

상기 U는 하기 화학식 1로 표시되는 것일 수 있으나, 우라실의 C5 부분을 치환하여 지질 DNA 전체에 소수성을 부여할 수 있는 것이라면, 그 화학적 구조는 통상의 기술자에 의해 적절한 변형이 가해질 수 있다.

[0036] [화학식 1]



[0037]

[0038] 상기 U_m 에 있어서, m 은 1 내지 20, 1 내지 19, 1 내지 18, 1 내지 17, 1 내지 16, 1 내지 15, 1 내지 14, 1 내지 13, 1 내지 12, 1 내지 11 또는 1 내지 10의 정수일 수 있으나, 지질 DNA의 전체적 길이 및 이의 양친매성을 고려할 때, 바람직하게는 1 내지 10의 정수일 수 있다.

[0039] 상기 지질 DNA는 10 내지 40, 10 내지 39, 10 내지 38, 10 내지 37, 10 내지 36, 10 내지 35, 10 내지 34, 10 내지 33, 10 내지 32, 10 내지 31 또는 10 내지 30 뉴클레오타이드 길이일 수 있으나, 조립되는 구조체의 적절한 크기를 고려하여 세포 내 표적 전달 능력을 확보한다는 측면에서, 바람직하게는 10 내지 30 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0040] 상기 지질 DNA는 보다 구체적으로, 하기 화학식 2로 표시되는 것일 수 있다:

[0041] [화학식 2]

[0042] U_mX_n

[0043] (식 중, X 는 서로 독립적으로 A, T, G, C로 이루어진 군에서 선택되고, m 은 1 내지 10의 정수, n 은 9 내지 20의 정수).

[0044] 상기 지질 DNA의 전체서열 길이 대비, U_m 의 서열길이가 10 내지 50%, 12 내지 49%, 14 내지 48%, 16 내지 47%, 18 내지 46%, 20 내지 45%, 22 내지 44%, 24 내지 43%, 26 내지 42%, 28 내지 41% 또는 30 내지 40%일 수 있으나, 본원 명세서 내 실험데이터를 참조할 때, 세포 내 표적 전달의 우수성 및 지질 DNA에 대한 적절한 양친매성의 부가 측면에서, 바람직하게는 30 내지 40%일 수 있다.

[0045] 상기 U_m 의 서열길이 비율을 만족하는 범위 내에서, 전체 지질 DNA의 길이가 짧을수록 항원 수송능력 증대의 측면에서 바람직할 수 있고, 이에 관련한 구체적인 실험데이터를 하기 실시예에서 제시하였다.

[0046] 보다 구체적으로, 상기 지질 DNA는 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 상기 U_m 의 서열길이 비율 및 전체 지질 DNA의 길이를 고려한 항원 수송능력의 우수성 측면에서, 바람직하게는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0048] 본 발명의 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드는 번역을 활성화시키는 번역증가물질로서, 상기 지질 DNA에 혼성화된 다. 이를 위해 말단에 상기 지질 DNA의 적어도 일부와 상보적인 서열을 포함할 수 있다.

[0049] 상기 상보적인 서열은, 지질 DNA의 적어도 일부와 상보적으로 결합하여 혼성화를 이루기 위해 적절한 길이의 상보적 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있고, 이는 전체 지질 DNA 서열 대비, 1 내지 100%, 10 내지 100%, 20 내지 100%, 30 내지 100%, 40 내지 100%, 50 내지 100%, 60 내지 100%, 70 내지 100%, 80 내지 100% 또는 90 내지 100% 지질 DNA와 상보적일 수 있으나, 당업계 통상의 수준에서 혼성화의 정도를 고려하여 적절히 변형될 수 있다.

[0050] 상기 CpG는 올리고뉴클레오타이드의 인산기(포스페이트기)가 포스포로싸이오에이트로 개질된 올리고데옥시뉴클레오타이드로서, 개질되지 않은 올리고뉴클레오타이드 대비 핵산분해효소 등에의 안정성을 보일 수 있어, 세포 내 표적 전달효과가 더욱 우수할 수 있음을 입증하는 구체적인 실험데이터를 하기 실시예에서 제시하였다.

[0051] 구체적으로 예를 들면, 지질 DNA로 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 사용하는 경우, CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드는 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 사용할 수 있다.

- [0052] CpG 올리고데옥시뉴클레오티드가 지질 DNA에 혼성화됨으로써, 면역증가물질이 포함된 DNA 나노입자가 만들어질 수 있다. 이에 의해 항원과 함께 사용될 때, 항원 단독 사용에 의해 부가적인 면역 활성이 부족하여 항원에 대한 내성만 발생하는 것을 막을 수 있다.
- [0053] 또한, CpG 올리고데옥시뉴클레오티드가 구형의 구조체에 포함되는 것이므로, CpG 올리고뉴클레오티드를 단독으로 사용하는 경우에 비해 효소에 대한 분해 안정성이 우수하고, 세포에 보다 효율적으로 섭취되어 면역 활성 효과가 우수하다.
- [0055] 상기 PNA(Peptide Nucleic Acid)는 항원의 전달체로서 포함되는 것으로서, 항원의 세포 내 전달 및 분해 안정성을 현저히 개선할 수 있다.
- [0056] 또한, 항원이 PNA의 말단에 결합되어 전달되게 되는데, 항원을 PNA의 말단에 이어서 바로 합성할 수 있어, 제조시에 용이한 제조가 가능하다는 이점이 있다.
- [0057] 상기 항원을 PNA의 말단에 결합함에 있어서, PNA와 항원을 연결할 수 있는 방법이라면 특별히 제한되지는 않으나, 바람직하게는 PNA와 항원 간 공유결합에 의해 결합시키는 것일 수 있고, 이러한 경우 항원은 펩티드 항원일 수 있다.
- [0058] 상기 펩티드 항원을 PNA의 말단에 결합시키는 경우, PNA와 항원 간 안정적인 결합을 위해 일부 아미노산 서열이나 뉴클레오티드 서열을 일부 변형시킬 수 있고, 이러한 변형은 특별한 제한 없이 당업계에 주지된 방법에 의할 수 있다.
- [0059] 상기 PNA는 지질 DNA에 혼성화된다. 이를 위해 지질 DNA의 적어도 일부와 상보적인 서열을 가질 수 있다.
- [0060] 상기 상보적인 서열은, 지질 DNA의 적어도 일부와 상보적으로 결합하여 혼성화를 이루기 위해 적절한 길이의 상보적 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있고, 이는 전체 지질 DNA 서열 대비, 1 내지 100%, 10 내지 100%, 20 내지 100%, 30 내지 100%, 40 내지 100%, 50 내지 100%, 60 내지 100%, 70 내지 100%, 80 내지 100% 또는 90 내지 100% 지질 DNA와 상보적일 수 있으나, 당업계 통상의 수준에서 혼성화의 정도를 고려하여 적절히 변형될 수 있다.
- [0061] 상기 PNA는 지질 DNA에 혼성화되어, 결합된 항원을 전달할 수 있는 것인데, 타 항원 전달체(예를 들면, 압타머)를 사용하거나, PNA 사용 없이 항원을 전달하는 경우에 비해 분해 안정성, 세포 내 섭취, 항원의 전달이 더욱 개선될 수 있고, 이는 하기 실시예에서 구체적인 데이터로 입증하였다.
- [0062] 상기 항원은 PNA의 일 말단에 결합될 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 아니하나, 구체적으로 예를 들면, OVA, TRP2 또는 AH1일 수 있다.
- [0064] 본 발명의 항원 전달용 구조체는 입경이 2 내지 40 nm, 3 내지 38 nm, 4 내지 36 nm, 5 내지 34 nm, 5 내지 32 nm, 5 내지 30 nm, 5 내지 28 nm, 5 내지 26 nm, 5 내지 24 nm, 5 내지 22 nm 또는 5 내지 20nm일 수 있으나, 투여된 후에 혈액 및 신장 청정(renal clearance)으로 인해 곧바로 제거되지 않고, 나노구조체가 원하는 곳에 도착할 때까지 충분히 머물러 있도록 한다는 측면에서, 바람직하게는 5 내지 26 nm일 수 있다.
- [0066] 본 발명은 상기 항원 전달용 구조체; 및 상기 PNA의 말단에 결합된 항원을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0067] 상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 위암, 경부암, 갑상선암 및 편평세포암종을 포함하는 피부암을 포함하는 암종; 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨스 림프종, 비-호지킨스 림프종, 모발상 세포 림프종 및 버켓 림프종을 포함하는 림프계 조혈모 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수구 백혈병을 포함하는 골수형의 조혈 종양; 섬유 육종 및 횡문 근육종을 포함하는 간엽 유래 종양; 흑색종, 정상피종, 기형암종, 신경모세포종 및 신경교종을 포함하는 다른 종양; 성상세포종, 신경아세포종, 신경교종 및 신경초종을 포함하는 중추 및 말초 신경 시스템의 종양; 섬유육종, 횡문근육종 및 골육종을 포함하는 중간엽 유래 종양; 및 흑색종, 색소성 건피증, 각화극 세포종, 정상피종, 갑상선 여포상암 및 기형 암종을 포함하는 기타 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어

는 하나일 수 있다.

- [0068] 상기 항원은 PNA의 일 말단에 결합되어 구조체의 암 예방 또는 치료 효능을 발휘시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 아니하나, 구체적으로 예를 들면, OVA, TRP2 또는 AH1일 수 있다.
- [0069] 본 발명의 구조체를 포함하는 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로오스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 조성물은 본 발명의 구조체를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 붙 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.
- [0071] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양하며, 적절한 투여량은 예를 들면 환자의 체내에 축적된 약물의 양 및/또는 사용되는 구조체의 구체적 효능정도에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로 인비보 동물모델 및 인비트로에서 효과적인 것으로 측정된 EC50을 기초로 계산될 수 있으며, 예를 들면 체중 1kg당 0.01 µg 내지 1 g 일 수 있으며, 일별, 주별, 월별 또는 연별의 단위 기간으로, 단위 기간 당 일회 내지 수회 나누어 투여될 수 있으며, 또는 인퓨전 펌프를 이용하여 장기간 연속적으로 투여될 수 있다. 반복투여 횟수는 약물이 체내 머무는 시간, 체내 약물 농도 등을 고려하여 결정된다. 질환 치료 경과에 따라 치료가 된 후라도, 재발을 위해 조성물이 투여될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 조성물은 암의 치료와 관련하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 또한 선택적으로, 화학치료제, 항염증제, 항바이러스제 및/또는 면역조절제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0074] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- [0076] 본 발명은 항원 전달용 구조체; 및 상기 PNA의 말단에 결합된 항원을 포함하는 암 전이 억제용 조성물을 제공한다.
- [0077] 상기 항원은 PNA의 일 말단에 결합되어 구조체의 암 전이 억제 효능을 발휘시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 아니하나, 구체적으로 예를 들면, OVA, TRP2 또는 AH1일 수 있다.
- [0078] 상기 암의 종류, 조성물의 제형 및 구조체 등에 관련된 구체적 내용은 상술한 바와 같다.
- [0080] 본 발명은 항원 전달용 구조체; 및 상기 PNA의 말단에 결합된 항원을 포함하는 면역 요법용 조성물을 제공한다.
- [0081] 상기 면역 요법의 대상 질환으로서, 각종 암종 또는 감염 질환일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.

- [0082] 상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 위암, 경부암, 갑상선암 및 편평세포암종을 포함하는 피부암을 포함하는 암종; 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨스 림프종, 비-호지킨스 림프종, 모발상 세포 림프종 및 버켓 림프종을 포함하는 림프계 조혈모 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수구 백혈병을 포함하는 골수형의 조혈 종양; 섬유 육종 및 횡문 근육종을 포함하는 간엽 유래 종양; 흑색종, 정상피종, 기형암종, 신경모세포종 및 신경교종을 포함하는 다른 종양; 성상세포종, 신경아세포종, 신경교종 및 신경초종을 포함하는 중추 및 말초 신경 시스템의 종양; 섬유육종, 횡문근육종 및 골육종을 포함하는 중간엽 유래 종양; 및 흑색종, 색소성 건피증, 각화극 세포종, 정상피종, 갑상선 여포상암 및 기형 암종을 포함하는 기타 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0083] 본 발명의 상기 감염 질환은 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온에 의해 초래되는 감염 질환일 수 있다.
- [0084] 상기 바이러스는 장내바이러스, 로터바이러스, 아데노바이러스 및 간염 바이러스일 수 있고, 상기 바이러스 외에도 레트로바이러스과(예를 들어, HIV-I(또한 HTLV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV, 또는 HIV-III으로서도 언급됨)와 같은 인간 면역 결핍 바이러스; 및 HIV-LP와 같은 다른 분리물); 피코나바이러스과(Picornaviridae)(예를 들어, 폴리오 바이러스(polio virus), A형 간염 바이러스, 엔테로바이러스, 인간 콕사키바이러스(human Cocksackie virus), 리노바이러스(rhinovirus), 에코바이러스(echovirus)); 칼시바이러스과(Calciviridae)(예를 들어, 위장염의 원인이 되는 중); 토가바이러스과(Togaviridae)(예를 들어, 말 뇌염 바이러스(equine encephalitis virus), 풍진 바이러스(rubella virus)); 플라비바이러스과(Flaviviridae)(예를 들어, 뎡기 바이러스(dengue virus), 뇌염 바이러스(encephalitis virus), 황열 바이러스(yellow fever virus)); 코로나바이러스과(Coronaviridae)(예를 들어, 코로나바이러스(coronavirus)); 람도바이러스과(Rhabdoviridae)(예를 들어, 수포성구내염바이러스(vesicular stomatitis virus), 광견병 바이러스(rabies virus)); 필로바이러스과(예를 들어, 에볼라 바이러스(ebolavirus)); 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae)(예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 볼거리 바이러스(mumps virus), 홍역 바이러스(measles virus), 호흡기세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus)); 오소믹소바이러스과(Orthomyxoviridae)(예를 들어, 인플루엔자 바이러스(influenza virus)); 부니아바이러스(Bunyaviridae)(예를 들어, 한탄 바이러스(Hantaan virus), 부니아 바이러스(bunya virus), 플레보바이러스(phlebovirus) 및 나이로 바이러스(Nairo virus)); 아레나바이러스과(출혈열 바이러스(hemorrhagic fever virus)); 레오바이러스과(Reoviridae)(예를 들어, 레오바이러스(reovirus), 오르비바이러스(orbivirus) 및 로타바이러스(rotavirus)); 보르나바이러스과(Bornaviridae); 헤파드나바이러스과(Hepadnaviridae)(B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus)); 파보바이러스과(Parvoviridae)(파보바이러스(Parvoviridae)); 파포바이러스과(Papovaviridae)(유두종 바이러스(papilloma virus), 폴리오마 바이러스(polyoma virus)); 아데노바이러스과(Adenoviridae)(대부분의 아데노바이러스(Adenovirus)); 헤르페스바이러스과(Herpesviridae)(단순 포진 바이러스(herpes simplex virus, HSV) 1 및 2, 수두 대상 포진 바이러스(varicella zoster virus), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV), 헤르페스 바이러스(herpes virus); 폭스바이러스과(Poxviridae)(바리올라 바이러스(variola virus), 우두 바이러스(vaccinia virus), 폭스 바이러스(pox virus)); 및 이리도바이러스과(Iridoviridae)(예를 들어, 아프리카 돼지 콜레라 바이러스(African swine fever virus)); 및 미분류 바이러스들(예를 들어 델타 간염(delta hepatitis)(B형 간염의 결핍된 부수체(satellite)인 것으로 생각됨), C형 간염(Hepatitis C); 노워크(Norwalk) 및 관련 바이러스, 및 아스트로 바이러스(astro virus)의 제제)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0085] 상기 항원은 PNA의 일 말단에 결합되어 구조체의 암 전이 억제 효능을 발휘시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 아니하나, 구체적으로 예를 들면, OVA, TRP2 또는 AHI일 수 있다.
- [0086] 본 발명의 면역 요법용 조성물은 추가적으로 용매, 별도의 면역증강제(adjuvant) 및 부형제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 용매로는 생리식염수 또는 증류수가 있으며, 면역증강제로는 프로인트(Freund's) 불완전체 또는 완전체 어췌버트, 알루미늄 하이드록사이드 겔, 및 식물성 및 광물성 오일 등이 있으며, 부형제로는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드 또는 알루미늄 포타슘 설페이트(alum)가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 기술자에게 잘 알려진 백신 제조에 사용되는 공지의 물질을 더 모두 포함할 수 있다.
- [0087] 본 발명의 면역 요법용 조성물은 점막 투여, 비강내 투여, NALT 내 투여, 경구적 투여, 직장내 투여, 폐내 투여, 기관지내 투여, 경막내 투여, 결막내 투여, 질내 투여, 요도내 투여, 유방의 유관으로의 투여 또는 흡입 투여용으로 사용될 수 있고, 또한 상기 조성물은 비경구적 투여, 피하 내 투여, 경피적 투여, 정맥내 투여, 피

부내 투여 또는 근육내 투여에 사용될 수 있다.

[0088] 본 발명의 면역 요법용 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따 라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종 래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모 두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의 해 용이하게 결정될 수 있다.

[0090] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0092] 본 발명 구조체는 이하 'INA'로 약칭될 수 있다.

[0094] 실험방법

[0095] 1. 항체

[0096] 동종(isotype) 컨트롤 항체 (Abs) (IgG1, IgG2a, or IgG2b), CD11c (N418), CD40 (3/23), CD80 (16-10A1), CD86 (GL-1), anti-IL-6 (MP5-20F3) 및 anti-IL-12/23p40 (C17.8)은 BioLegend Inc. 에서 구입하였다. anti-MHC class I (AF6-88.5.3), anti-MHC class II (M5/114.15.2), and anti-TNF- α (MP6-XT22)는 eBioscience Inc. 에서 구입하였다.

[0098] 2. 유세포 분석

[0099] 비장, 사타구니 림프절(iLN) 및 tumor-draining 림프절(drLN)의 단일 세포를 0.5% 소 혈청 알부민이 들어있는 PBS로 세척하였다. 표지되지 않은 동종 컨트롤 항체를 15분 동안 세포와 함께 배양하고, 세포를 30분 동안 얼음 에서 배양하여 형광 표지된 항체로 염색하였다. PBS로 세척한 후, 세포를 FACS ARIA II (Becton Dickinson Biosciences) 상에서 분석하고, 데이터를 FlowJo 8.6 소프트웨어(FlowJo LLC)로 분석하였다. 잔해는 forward- 및 side- scatter gating에 의한 분석에서 제외되었다. 죽은 세포는 4', 6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI)(BioLegend Inc.) 염색 및 DAPI 음성 집단의 게이팅으로 제외시켰다. 비특이적 염색을 위한 대조군으로 동형-매칭된(isotype-matched) 무관한 mAB가 사용되었다.

[0101] 3. DC(Dendritic cell) 분석

[0102] 비장과 tumor-drLN 조직을 작은 조각으로 절단하고 실온에서 20분 동안 콜라게나아제를 함유하는 2% FBS로 소화 시켰다. 소화된 세포를 원심분리하여 펠렛으로 만들고, 펠렛을 1.077 histopaque (Sigma-Aldrich Co. LLC) 5 mL에 재현탁했다. 추가로 5mL의 histopaque를 아랫층에 형성하고, 배양 배지를 세포 현탁액의 윗층에 형성시킨 다음, 1700g에서 10분간 원심분리하였다. 광밀도 부분(<1.077 g/cm³)을 수집하고 20분간 다음과 같은 FITC 또는 PE-컨쥬게이션된 단일 클론 항체(mABs)와 함께 배양하였다: anti-CD3 (17A2), anti-Thy1.1 (OX-7), anti-B220 (RA3-6B2), anti-Gr-1 (RB68C5), anti-CD49b (DX5), and anti-TER-119 (TER-119). 계통-CD11c+ 세포는 비장 DC로 정의되었다. 분석은 유세포계측기((FACS Fortessa, Becton Dickinson)로 수행하였다.

[0104] 4. OT-I 세포의 증식

[0105] CD8 T세포 격리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 OT-I 형질전환 마우스로부터 CD8 T세포를 분리하였다. 세포 를 10 μ m CFSE(Invitrogen)로 표지하고 10분 동안 배양하였다. CFSE-표지된 세포(1x10⁶)를 CD45.1 컨지닉

(congenic) 마우스에 정맥주입하고, 24시간 후에 INA로 마우스를 처리하였다. 처리 3일 후, 비장을 수확하고, 유세포분석법을 통해 CFSE 형광 강도를 분석하여 OT-1 세포 증식을 측정하였다.

5. ELISPOT 분석

마우스 IFN- γ ELISPOT을 제조자의 프로토콜(Biolegend)에 따라 수행하였다. 즉, tumor-drLNs의 세포를 미리 코팅된 플레이트에 50 x 103 cell/well로 시딩(seeding)했다. 그 후, 세포를 표적 Ag 펩티드(2 μ g/mL) 또는 음성 대조군 펩티드와 함께 37°C에서 24시간 동안 배양했다. 대조군 펩타이드로 관찰된 스팟의 수를 각 샘플에서 뺀고, ELISPOT 플레이트를 CTL ELISPOT 판독기(CTL Europe GmbH)를 사용하여 자동으로 계수하였다.

실험결과

1. 지질 DNA의 구조적 특성과 표적 전달성 간 관계 확인

구조체의 표적 전달에 있어서의 지질 DNA의 구조적 특성을 확인하기 위해, 생쥐의 각막 상피에 각각 다른 지질 DNA 나노입자를 처리하였다. UX-Y로 표기된 U2-12, U4-12, U4-18, U6-12, U6-20의 일련의 DNA 양친매성 구조가 합성되었고, 여기서 X 및 Y는 각각 소수성 개질이 없는 테옥시우리딘 염기의 수와 총 뉴클레오타이드 수를 의미한다(도 2a).

직경이 약 10 nm인 매우 작은 지질 DNA 나노입자는 균일한 크기이고, 4 내지 27 mM 범위의 임계 마이셀 농도(CMC)를 나타낸다(도 2a). 이들은 형광표지된 상보적인 올리고뉴클레오타이드와 하이브리드화되어 조직 절편의 위치를 추적하였다. 20mM의 농도로 형광표지된 DNA 양친매성 물질을 함유하는 점안액을 30 mL 단일 방울을 사용하여 의식이 있는 쥐에 투여하였다. 소수성 개질이 없고, 형광표지된 동일 서열의 단일가닥(ss) 및 이중가닥(ds) DNA를 함유하는 대조군 점안액을 동일한 방식으로 투여하였다. 마우스는 투여 후 30분, 2시간 및 24시간 후에 희생시켰다. 처리된 눈의 절제부위는 형광 현미경으로 시각화하였다.

최고의 표적 전달은 양친매성 DNA를 나타내는 비율이 가장 높은 경우로 결정하였고, 비슷한 결과의 경우 절제부위를 시각적으로 비교하여 결정하였다(도 2b). 시험대상 지질 DNA 중 U4-12가 각막 상피에 가장 잘 밀착되었고(도 2c), 개질되지 않은 ss 및 ds 12mer 대조군 서열은 전혀 친화성을 나타내지 않았다(도 2d). 도 2의 결과를 종합적으로 고려할 때, 표적 전달에 있어서 가장 효율적인 개질 비율은 약 33%임을 추론할 수 있다. 더 낮은(U2-12) 또는 더 높은(U6-12) 비율을 갖는 ds 올리고뉴클레오타이드로 구성된 지질 DNA 나노입자는 유의하게 낮은 표적 전달(각막 상피에의 점착)능을 나타낸다. 양친매성 지질 DNA 서열 내 U 함량을 유사한 백분율(U4-12, U6-20)로 갖는 경우, 전체 서열이 짧은 지질 DNA가 더 우수한 표적 전달능을 나타내었다. 따라서, U 개질 뉴클레오타이드 수와 전체 뉴클레오타이드 수는 표적 전달을 결정하는 중요한 매개 변수로 판단된다.

2. 구조체의 항암 효과 확인

본 발명 구조체는 각 우라실(Uracil) 염기의 C5에서 소수성 -C₁₂H₂₁ 작용기를 갖는 4개의 5'-말단 뉴클레오타이드, 즉, U4T로 이루어진 12 뉴클레오타이드 길이의 지질 DNA 캐리어이다. 수성 매질에서, 단일가닥(ss) U4T는 8nm 직경의 구형 마이셀로 자조립된다. ss U4T의 마이셀은 CpG 모티프가 결합된 DNA와 단순히 염기쌍을 형성하여 Toll-like Receptor 9(TLR9)에 의한 면역 자극을 일으킬 수 있다. 항원의 결합은 펩티드 에피토프에 공유결합된 합성된 펩티드 핵산(peptide nucleic acid, PNA)과 one-pot에 간단히 혼합하여 이루어질 수 있다. 이러한 단지 10nm의 캐리어, 어쥬번트(adjuvant) 및 항원의 조립은 양친매성 지질 DNA 및 왓슨-크릭 염기쌍의 마이크로 상분리에 의해 동시에 이뤄질 수 있고, 이로써 INA 시스템을 면역학적 전달에 적용할 수 있다(도 1).

항원 특이적 면역 활성화 및 INA의 항암 효능을 평가하기 위해, 쥐 TLR-9 어쥬번트(eCpG; ODN1826)와 함께 3개의 독립적인 에피토프를 지질 DNA 마이셀에 도입하였다(도 1). 각각 다른 INA 체제에 대하여, 마이셀이 지질 DNA 나노 캐리어를 형성하지 않을 때, 항원과 CpG의 조합 처리와 대비하여 교차-제시(cross-presentation) 및 항원-특이적 CTL(Cytotoxic T lymphocyte) 활성화를 측정하였다(도 3). 마지막으로, 면역 치료 효능을 흑색종(melanoma) 및 암종(carcinoma)에 대한 생체 내 항암(anti-cancer) 및 항전이(anti-metasis) 효과로 평가하였다(도 4, 5).

고유의 면역 시스템에서, 수지상 세포(Dendritic cell, DC)는 가장 강력한 항원-제시(antigen-presenting) 세

포이다. CD8 α+ 쥐의 DC는 항원의 교차-제시에 의해 세포 독성 T 림프구(CTL)의 활성화를 유도한다. 활성화된 CTL은 효율적으로 암세포를 죽이기 때문에, 면역 요법과 암 백신으로 사용하기 위해서는 항원 특이적 CTL 활성화 유도가 필요하다.

[0120] 본 실험에서, 면역요법 암 치료를 위하여, DNA 보조제(eCpG)와 함께 U4T 기반 캐리어에 항원을 통합하기 위해, 원래의 이중가닥(ds) DNA로 구성된 나선보다 dna와 열적으로 더 안정한 나선을 형성하는 PNA(Peptide Nucleic acid)를 사용했다. PNA/DNA 하이브리드의 안정성을 분석하기 위해, PNA와 DNA를 각각 Alexa488과 Carboxytetramethylrhodamine(TAMRA)으로 표지했다. 동일한 서열 구성으로, PNA/DNA 하이브리드는 DNA/DNA 듀플렉스보다 높은 용융 온도를 보였다(56°C 대비 39.7°C, 도 7). 추가 안정화를 위해, 혈청 함유 배지에서 핵산 분해에 의한 가닥의 손상을 방지하고자 포스포로싸이오에이트-변형(phosphorothioate-modified, PS) CpG 모티프를 적용하였다. 이러한 백본의 변형은, 포스포디에스테르(phosphodiester, PO) 백본을 함유하여 변형되지 않은 CpG와 관련하여, PS-CpG의 반감기를 증가시켰다(108분, 38분, 도 8). 이러한 결과는, PNA/DNA 하이브리드와 PS-CpG(eCPG)가 열 및 효소 안정성 측면에서 각각 합성 항원 및 보조제로서 적합함을 암시하는 것이다.

[0121] 나노캐리어에 결합된 항원과 보조제의 전달은 암과 전염병을 효과적으로 치료할 수 있다. 또한, 면역 요법 제제는 건강한 조직에서 염증을 감소시킨다. 이는 원치 않는 비특이적 면역 활성화를 억제하기 때문이다. 그러나, 나노 환경에서 항원 및 보조제 전달을 위한 나노캐리어의 중요성은 아직 명확히 규명되지 않았다. 이러한 맥락에서, 항원-보조제 공동전달(co-delivery), PNA-OVA(pOVA)에 대한 유익한 효과를 입증하기 위해, C57BL/6 마우스에 s.c. 형광표지된 pOVA 및 eCpG와 함께 INA를 투여한 후, 1시간 후 마우스를 희생시켰다. 유세포분석법 분석 결과, 사타구니 림프절(iLN)의 CD8 α+ DC는 pOVA만을 투여한 마우스보다 U4T+pOVA를 투여한 마우스에서 Alexa 488 형광 수준이 더 높았고, 더 나아가, INA가 있는 경우, iLN의 Alexa 488 및 Texas Red 양성 CD8 α+ DC는 모두 U4T 조합이 없는 경우보다 훨씬 높다(도 3). 이러한 결과는, 항원과 보조제가 DNA 나노 캐리어에 공존하지 않는 경우에 비해, U4T가 항원과 보조제를 보다 효과적으로 전달할 수 있음을 나타내는 것이다. 도 9에서 확인할 수 있듯, CD8 α+ DC에서의 INA 처리에 의한 OVA 항원 제시는 다른 조합과 비교하여 현저히 증가하였고, OVA 항원 제시 세포는 OVA 항원 음성 CD8 α+ DC 대비, 훨씬 높은 수준의 공동 자극 분자(co-stimulatory molecules) 및 MHC class 1을 발현하였다(도 10). 또한, 우리는 INA가 B16-OVA 종양을 갖는 마우스에서 항원 특이적 CTL 활성화를 유도능을 결정하였는데, 이전의 실험결과와 유사하게, INA 처리는 tumor-draining 림프절(drLN)에서의 OT-I 세포의 증식 및 종양에서의 OT-I 세포의 침윤을 유도하였다(도 3B, 3C, 도 11). 반면, eCpG/pOVA 컨트롤만이 완만한 증가를 보였다. 또한, INA 처리는, 나노캐리어 없이 eCpG와 pOVA를 처리한 경우 대비, 종양 침윤 OT-I 세포의 인터페론-감마(IFN-γ) 및 종양괴사인자-알파(TNF-α)의 방출을 유발하였다. 이러한 데이터는 나노캐리어가 DC에 대한 항원 특이적 면역반응의 유도를 위해 항원 및 보조제를 효과적으로 전달할 수 있음을 나타내며, INA는 종양을 갖는 마우스에서 항원 특이적 면역반응을 유도하는데 매우 적합함을 암시하는 것이다.

[0122] INA 처리가 종양을 갖는 마우스에서 항원 특이적 세포 면역의 활성화를 촉진시킨 이후, OVA가 모델 항원으로서 작용하는 B16-OVA 종양 모델에 대한 INA의 항종양 효과를 평가하였고, INA 처리는 마우스에서 B16-OVA 종양의 성장을 억제했다(도 4A, 도 13A). INA의 항종양 효과는 IFN-γ의 항원 특이적 생산에 의해 매개된다(도 4B, 도 13B). 백신 성분은 항원 특이적 면역반응을 촉진하고 암 발병을 예방한다고 보고된 바 있다. 환자에서 치료 백신으로 치료하는 것은 종양 성장을 억제하고, 전이를 예방하기 위한 것으로서, INA의 전이 억제능을 더 확인하고자 하였다. B16-OVA 종양 세포의 간 전이를 확인하기 위해, B16-OVA를 마우스의 비장에 이식하였고, 종양 세포 주입 전 및 주입 3일 후에 마우스를 INA로 처리하였다. 비장에서의 B16-OVA 종양 성장은 다른 처리군 대비 크게 억제되었다(도 4C, 4D). 또한, B16-OVA 세포의 간 전이는 INA 예방 접종으로 효과적으로 예방되었다(도 4E, 4F). 이 결과는 INA가 항원 특이적 면역 활성화에 의한 C57BL/6 마우스의 생체 내 항종양 및 항전이 효과를 촉진함을 시사하는 것이다.

[0123] OVA-발현 모델에 대한 INA의 항암 및 항전이 효과의 관찰은 흑색종 및 암종에 대한 암항원-로딩된 INA의 효능 평가로 나아가게 하였다. 흑색종 항원의 경우, PNA에 공유결합된 TRP2 펩티드(pTRP)를 사용하였고, PNA/DNA 듀플렉스 하이브리드화 방법을 사용하였다. INA 처리는 종양-drLN 세포 내 B16 흑색종의 성장(도 5A, 도 14A) 및 TRP2-특이적 IFN-γ의 생산(도 5B, 도 14B)을 효과적으로 억제하였다. 또한, 동일한 로딩 방법으로 제조된 암종 펩티드(pAH1)을 갖는 INA는 AH1-특이적 면역반응에 의해 매개된 Balb/C 마우스에서 CT-26 암종의 성장을 실질적으로 억제하였다(도 5C, 5D, 도 15A, 15B). 여기서, 모든 3가지 INA 제제는, 전체 제형(total formulation) 대비, 상업적으로 입수할 수 있는 PNA-에피토프의 단지 4 내지 5 중량%의 아미노산 서열의 치환만을 필요로 한다. 이러한 데이터는 암 항원에 대한 INA의 도입이 암의 치료에 널리 사용될 수 있음을 암시한다.

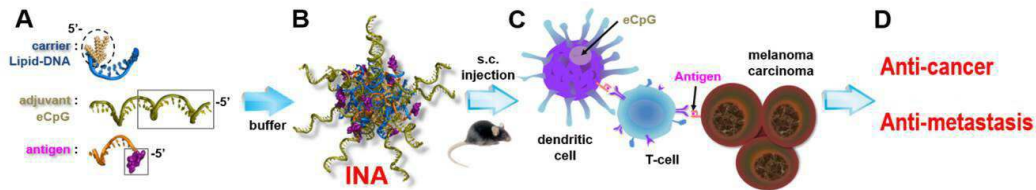
표 1

[0124]

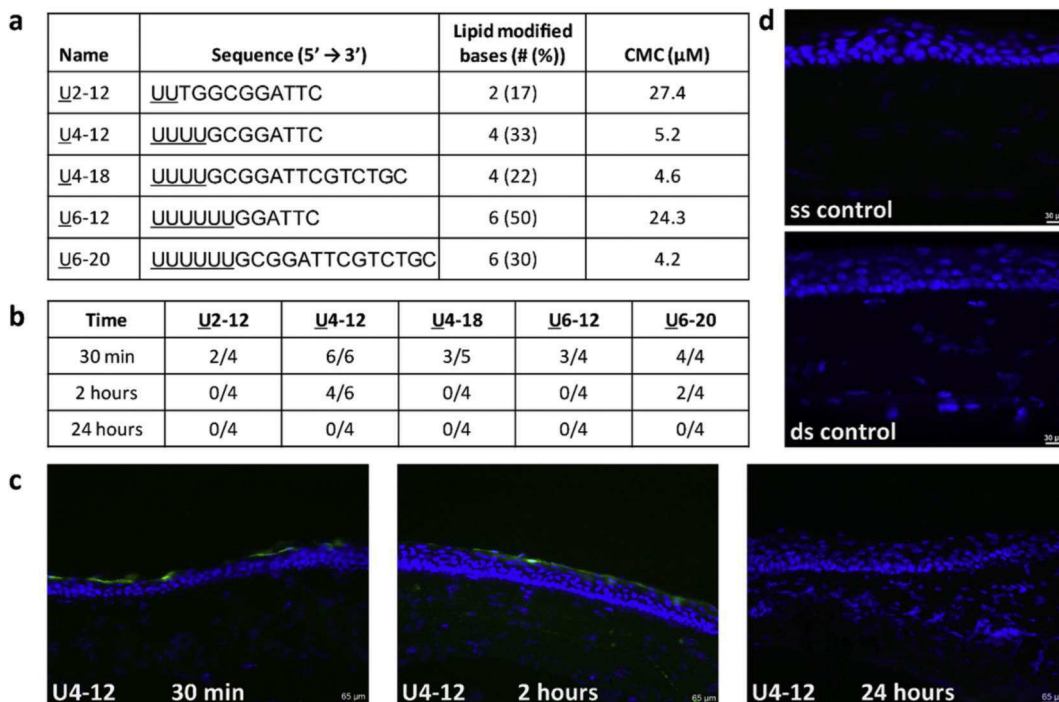
구분	서열 (5'→3', N→C)	서열번호
U2-12	UUTGGCGGATTC	서열번호 1
U4-12(U4T)	UUUUGCGGATTC	서열번호 2
U4-18	UUUUGCGGATTCGTCTGC	서열번호 3
U6-12	UUUUUUGGATTC	서열번호 4
U6-20	UUUUUUGCGGATTCGTCTGC	서열번호 5
eCpG	TCCATGACGTCCTGACGTGAATCCGCAAAA	서열번호 6
PNA-OVA	SI INFEKLTGAATCCGC	
PNA-TRP2	SVYDFVWLHGAATCCGC	
PNA-AH1	SPSYAYHQFEAATCCGC	
PNA	GAATCCGC	서열번호 7
OVA	SI INFEKLT	서열번호 8
TRP2	SVYDFVWLH	서열번호 9
AH1	SPSYAYHQFE	서열번호 10

도면

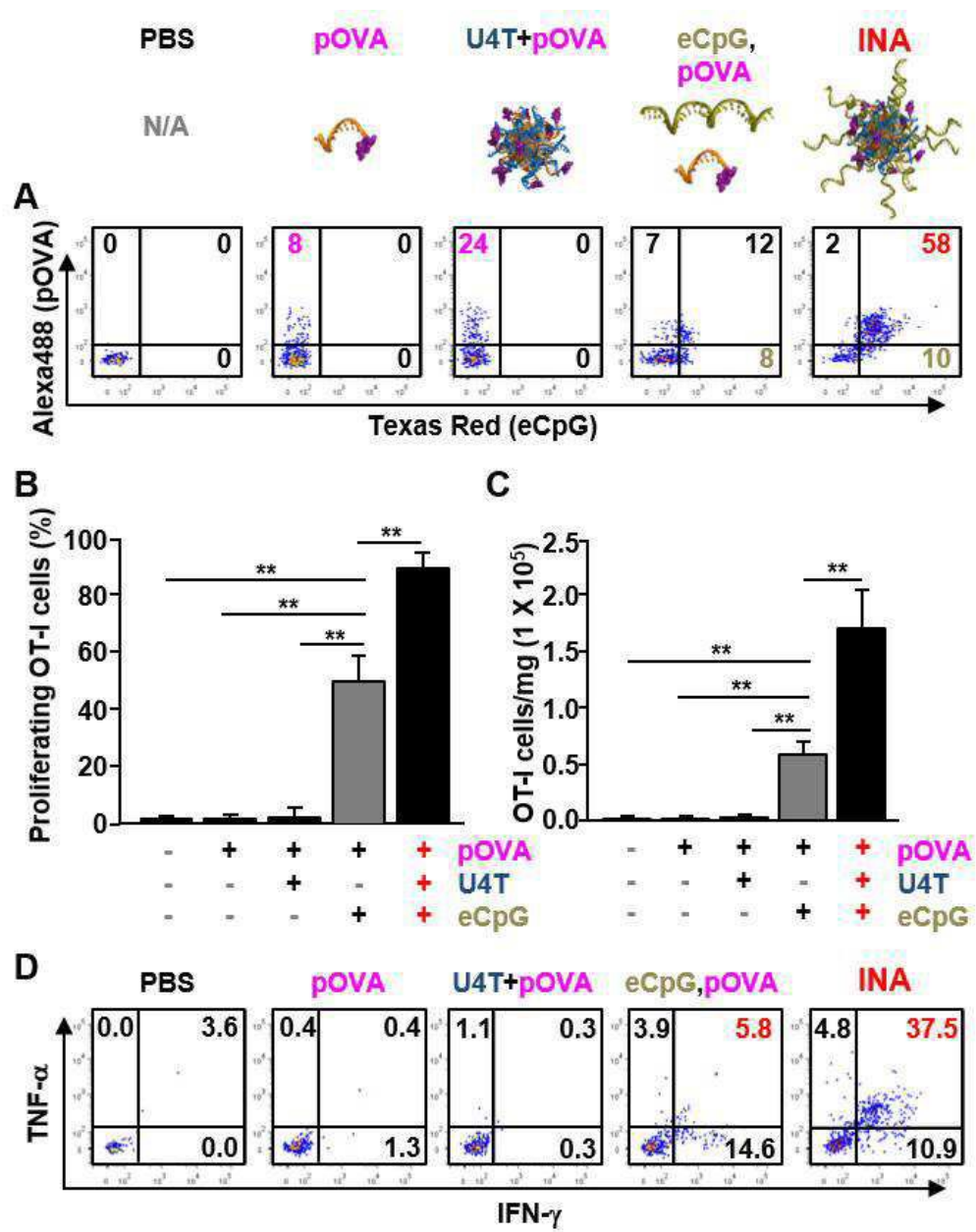
도면1



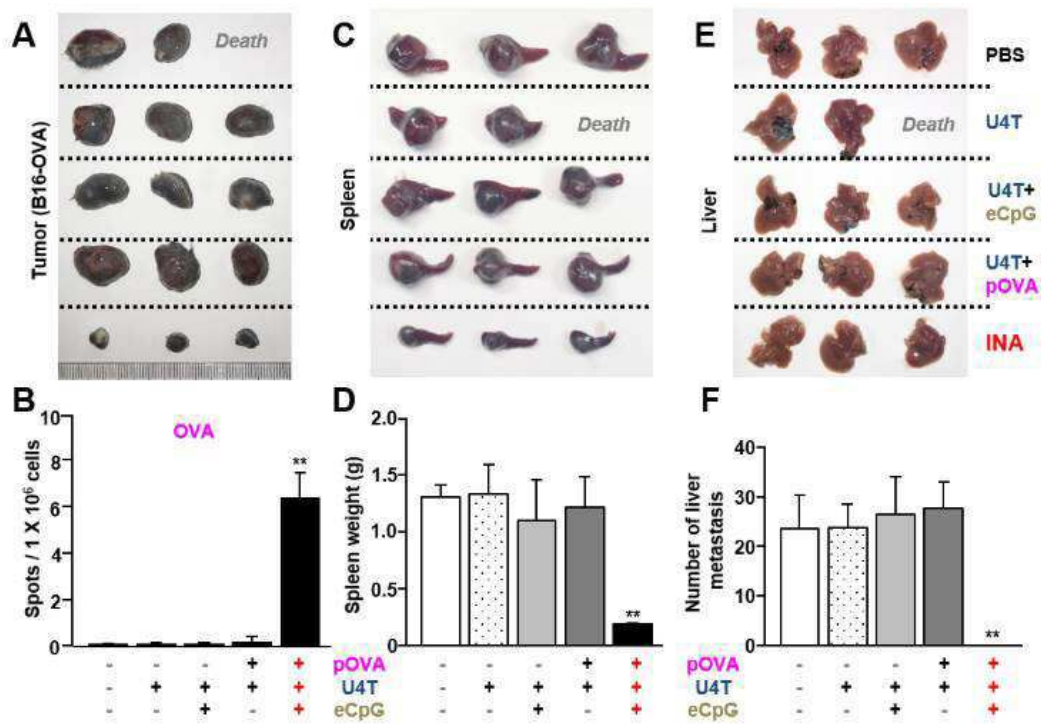
도면2



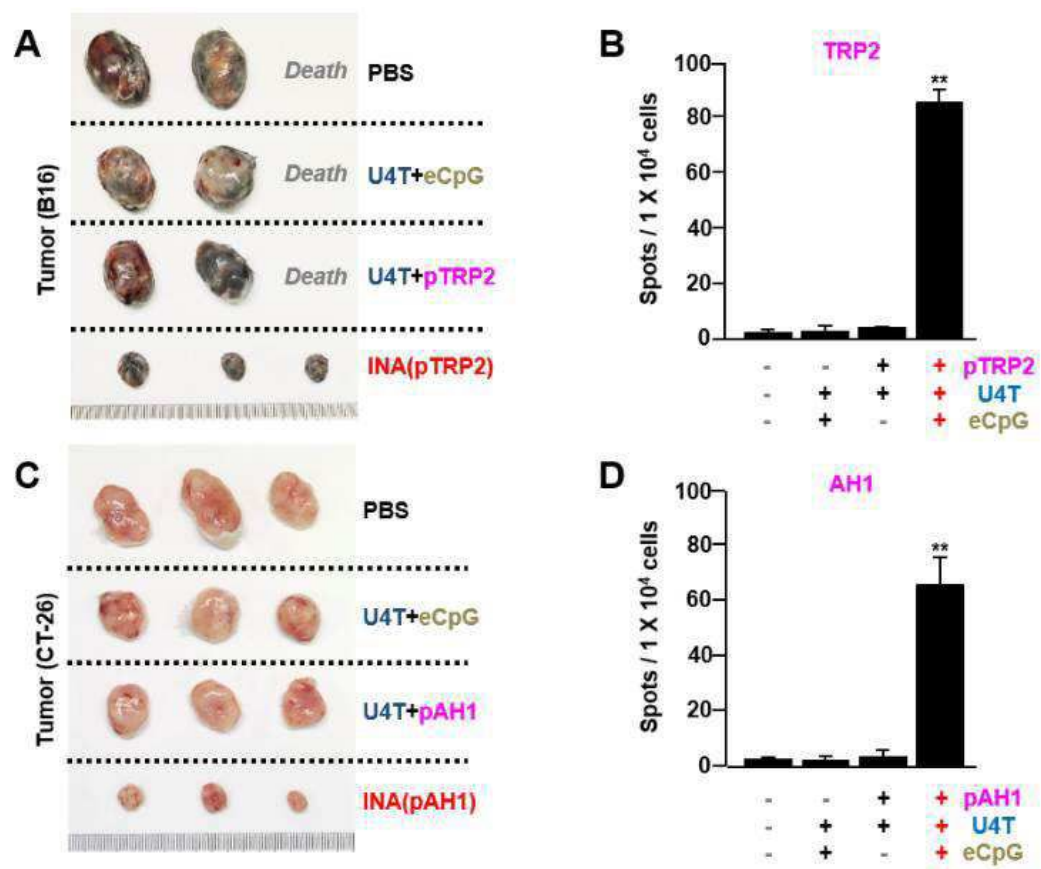
도면3



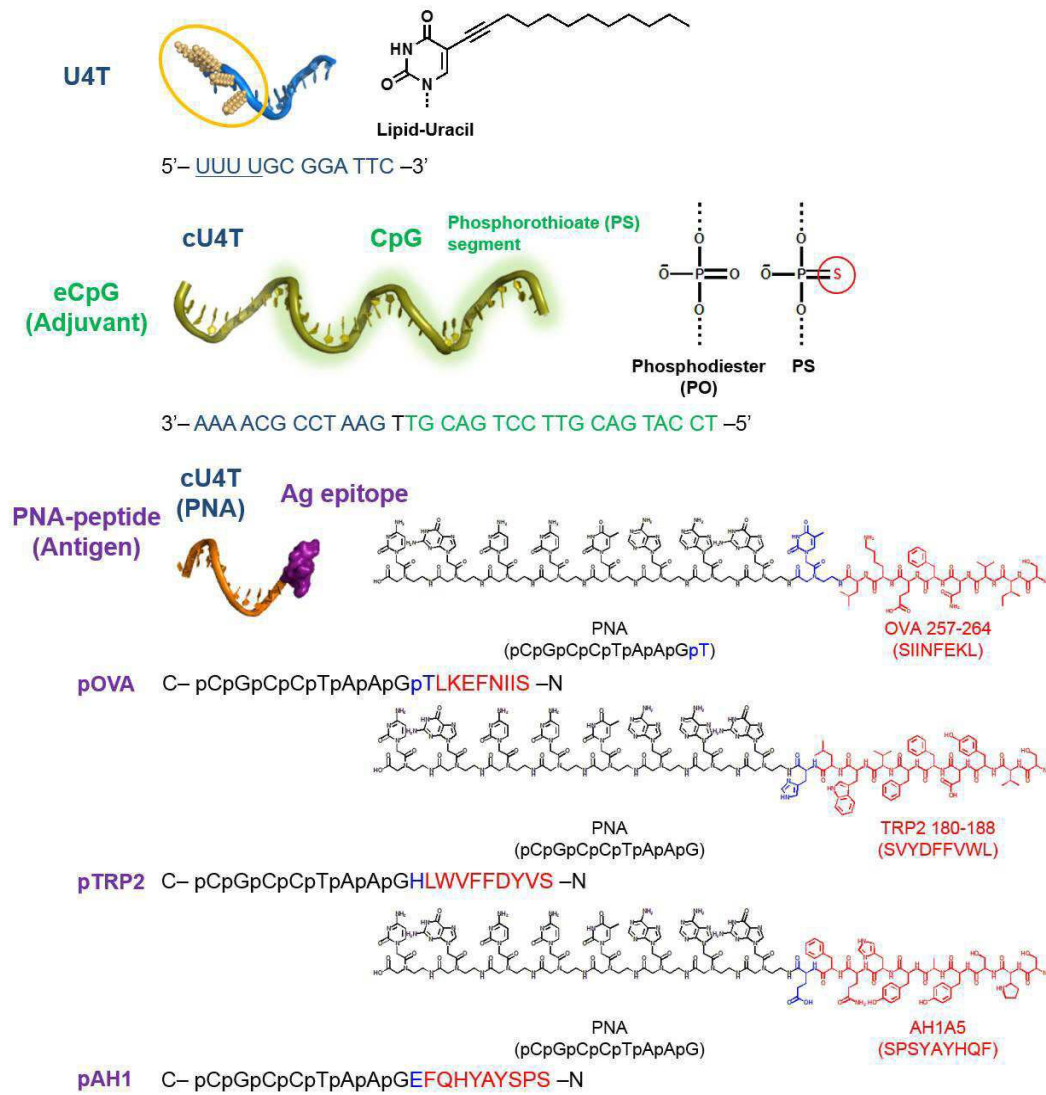
도면4



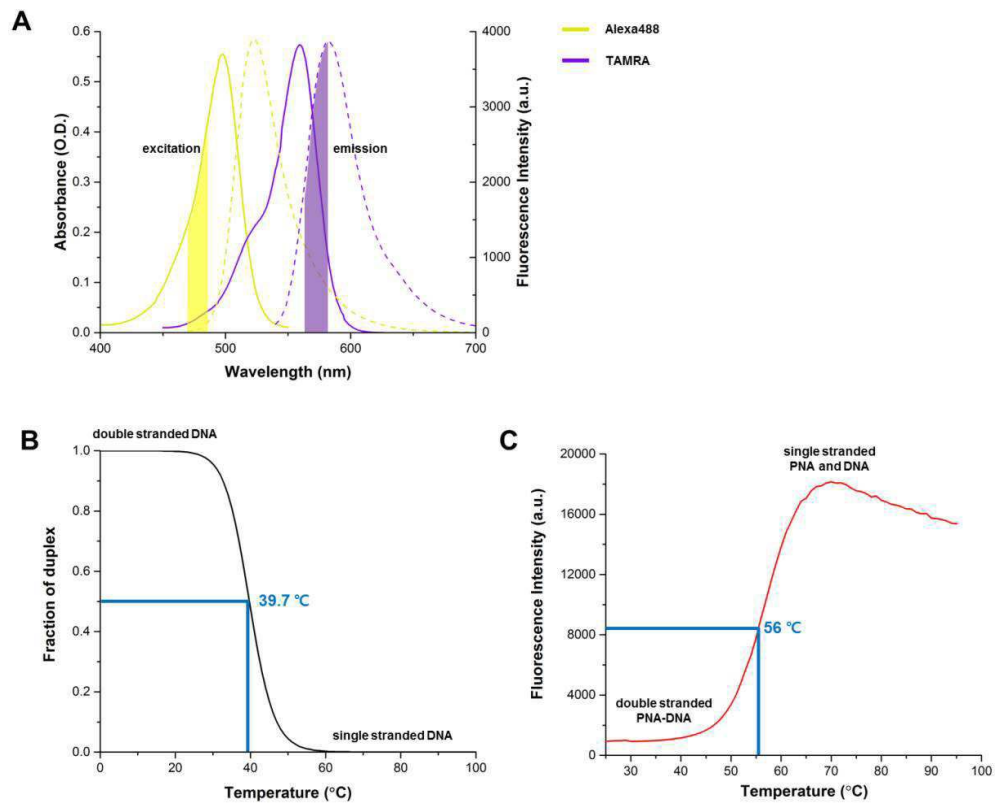
도면5



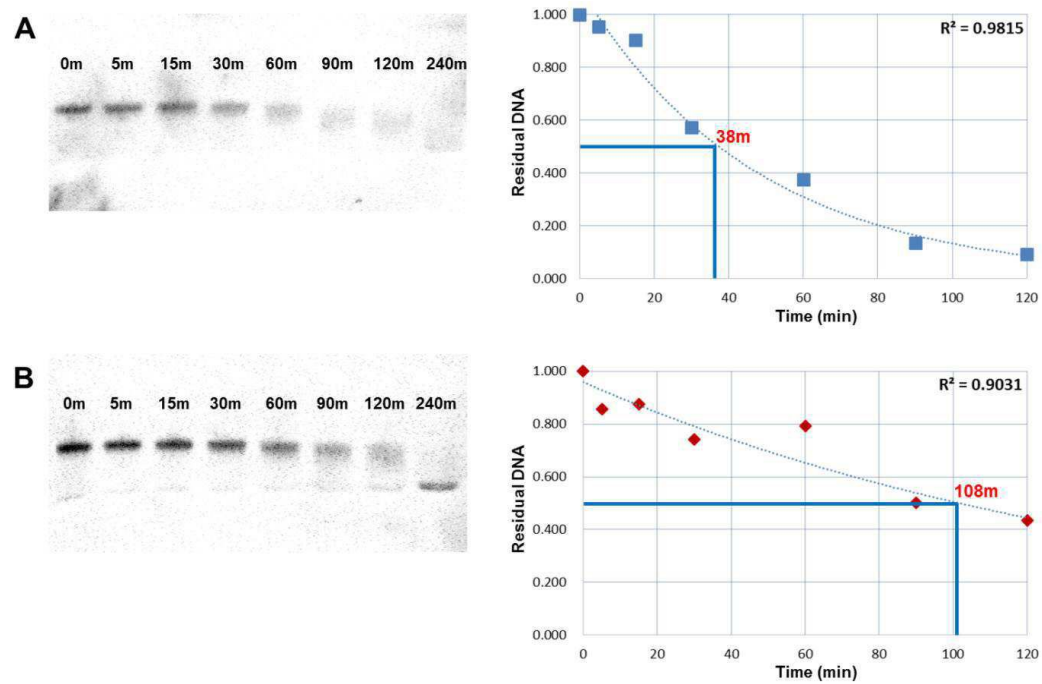
도면6



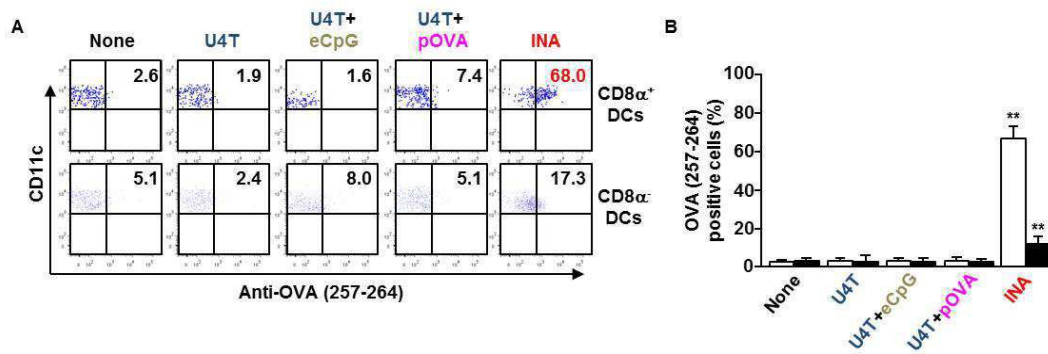
도면7



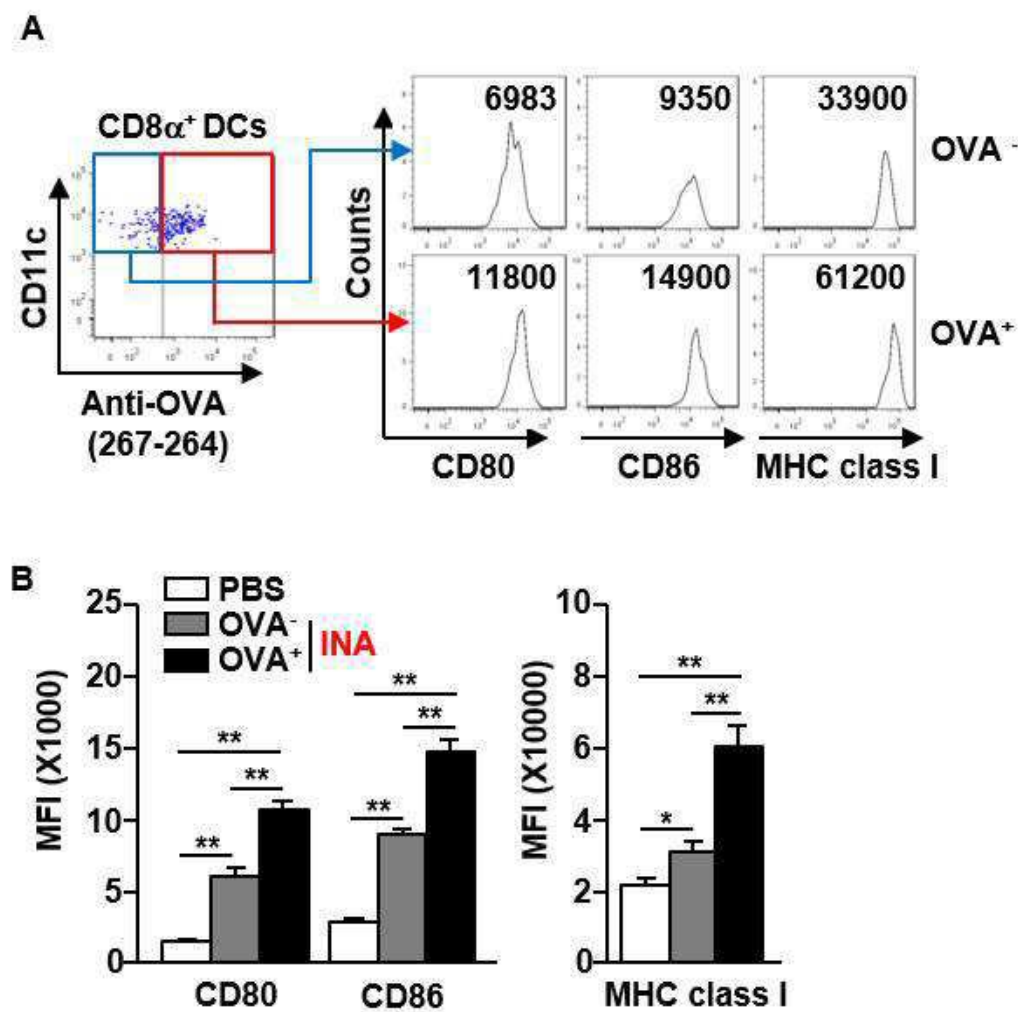
도면8



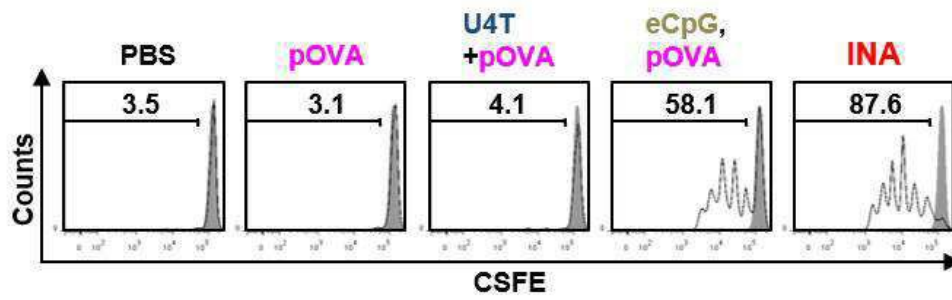
도면9



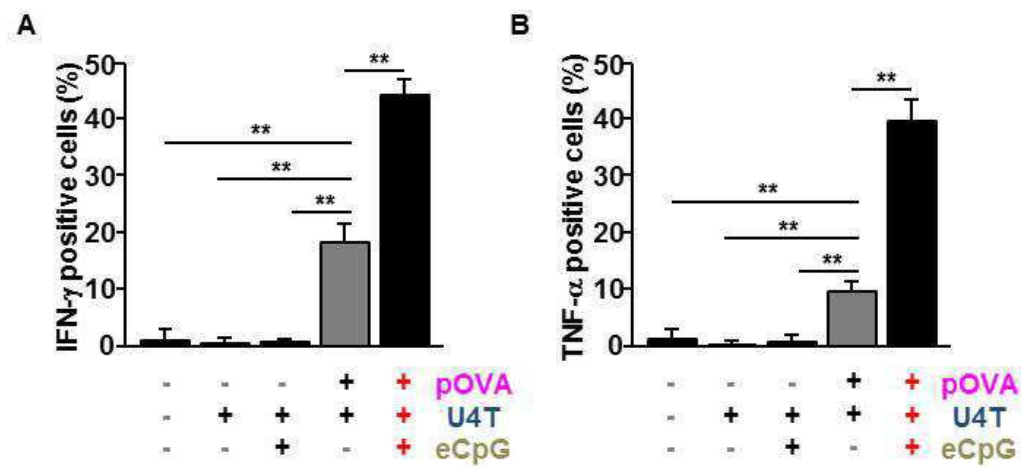
도면10



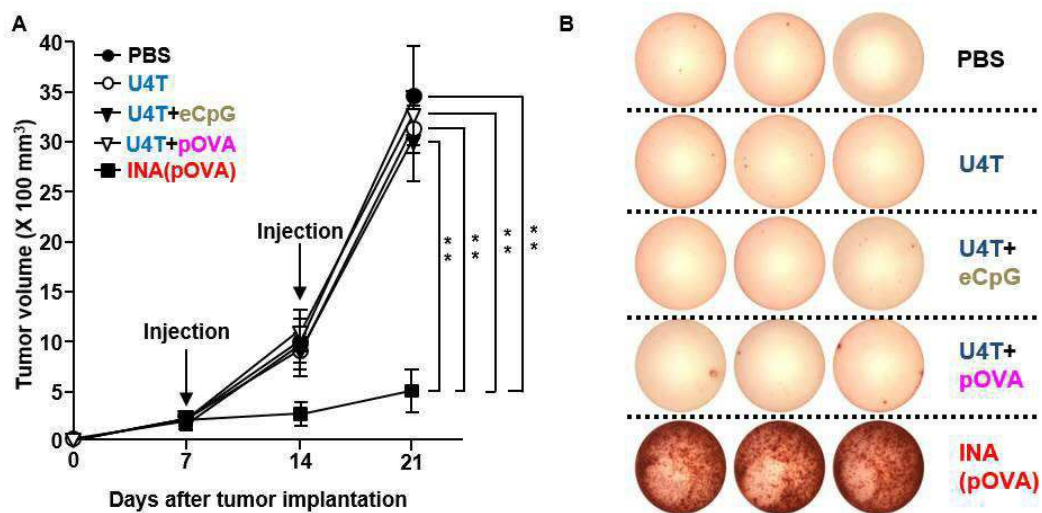
도면11



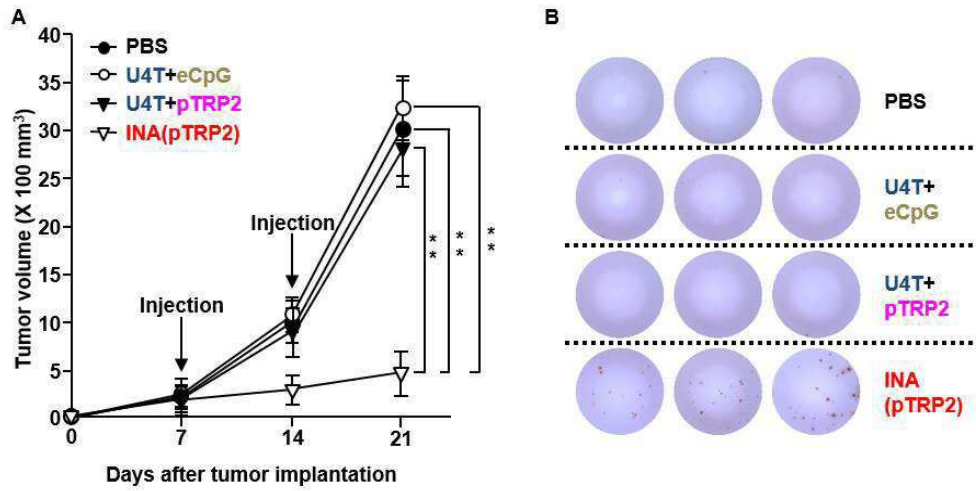
도면12



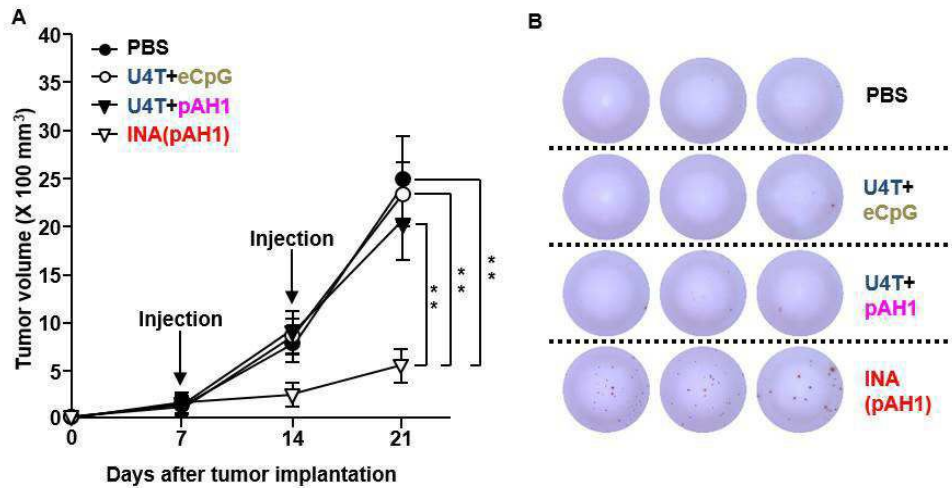
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> Research Cooperation Foundation of Yeungnam University
Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> COMPOSITION FOR DELIVERING OF ANTIGEN
- <130> 17P08029
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 12
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> U2-12
- <400> 1

uutggcgat tc	12
<210> 2	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> U4-12	
<400> 2	
uuuugcgat tc	12
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> U4-18	
<400> 3	
uuuugcgat tcgtctgc	18
<210> 4	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> U6-12	
<400> 4	
uuuuuugat tc	12
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> U6-20	
<400> 5	
uuuuuugcg attcgtctgc	20
<210> 6	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> eCpG

<400> 6

tccatgacgt tcctgacgtt gaatccgcaa aa 32

<210> 7

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PNA

<400> 7

gaatccgc 8

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OVA peptide

<400> 8

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRP2 peptide

<400> 9

Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu His

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AH1 peptide

<400> 10

Ser Pro Ser Tyr Ala Tyr His Gln Phe Glu

1

5

10