

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 9월 7일 (07.09.2018)



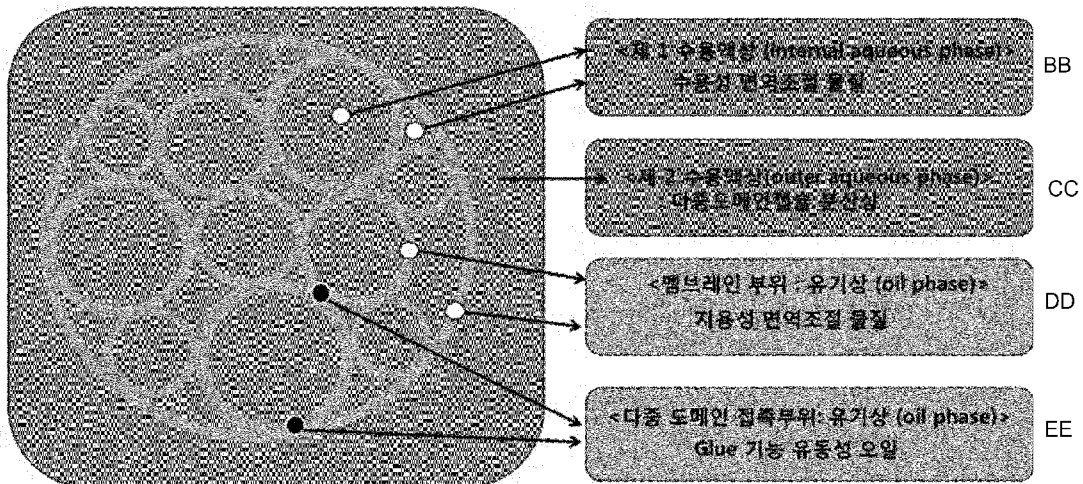
(10) 국제공개번호
WO 2018/160026 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 9/50* (2006.01) *A61K 9/107* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/002516
- (22) 국제출원일: 2018년 3월 2일 (02.03.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0027303 2017년 3월 2일 (02.03.2017) KR
10-2018-0024900 2018년 2월 28일 (28.02.2018) KR
- (71) 출원인: 단디바이오사이언스 주식회사 (DANDI BIOSCIENCE INC) [KR/KR]; 05029 서울시 광진구 능동로 120, 304호 (화양동, 의생명과학연구원), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 임용택 (LIM, Yong Taik); 13599 경기도 성남시 분당구 내정로166번길 7-6, 139동 901호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층 (대치동), Seoul (KR).
- (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: MULTI-DOMAIN VESICLE COMPRISING IMMUNOACTIVE MATERIAL, PRODUCTION METHOD THEREFOR AND IMMUNOMODULATORY COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 면역활성물질을 포함하는 다중도메인캡슐, 이의 제조방법, 및 이를 포함하는 면역조절 조성물

면역기능조절 다중도메인캡슐(imMDV) 개념도 AA
[imMDV: immunomodulatory Multi-Domain Vesicle]



- AA ... Conceptual diagram of immunomodulatory multi-domain vesicle (imMDV)
- BB ... <First aqueous phase (internal aqueous phase)> Water-soluble immunomodulatory material
- CC ... <Second aqueous phase (outer aqueous phase)>: Multi-domain vesicle dispersed phase
- DD ... <Membrane site: oil phase> Fat-soluble immunomodulatory material
- EE ... <Multi-domain-contacting site: oil phase> Glue-function fluid oil

(57) Abstract: The present invention relates to a multi-domain vesicle comprising an immunoactive material, a production method for the multi-domain vesicle and an immunomodulatory composition comprising the multi-domain vesicle. According to one aspect of the present invention, the multi-domain vesicle comprises: at least two liposomes making contact and connected with each other; and a multi-domain vesicle outer wall surrounding the at least two liposomes. The multi-domain vesicle is formed from an oil phase and an aqueous phase, wherein: the oil phase comprises a first immunomodulatory material and a fluid oil; the oil phase forms a membrane of the liposomes, and the multi-domain vesicle outer wall; the aqueous phase comprises a second immunomodulatory material; the



WO 2018/160026 A1

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

aqueous phase is an internal aqueous phase of the membrane of the liposomes, and an outer aqueous phase of the membrane of the liposomes; the first immunomodulatory material is a fat-soluble immunoactive material; the second immunomodulatory material is a water-soluble immunoactive material; and the fluid oil increases the structural stability of the at least two liposomes making contact and connected with each other.

(57) 요약서: 본 발명은, 면역활성물질을 포함하는 다중도메인캡슐, 상기 다중도메인캡슐의 제조방법, 및 상기 다중도메인캡슐을 포함하는 면역조절 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 일 측면에 따르면, 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜, 및 상기 둘 이상의 리포솜을 둘러싸는 다중도메인캡슐 외벽을 포함하는 다중도메인캡슐로서, 상기 다중도메인캡슐은 유기상과 수용액상으로 이루어지고, 상기 유기상은 제1면역조절물질 및 유동성 오일을 포함하며, 상기 유기상은 상기 리포솜의 멤브레인, 및 상기 다중도메인캡슐 외벽을 형성하고, 상기 수용액은 제2면역조절물질을 포함하며, 상기 수용액은 상기 리포솜 멤브레인의 내부 수용액상 및 리포솜 멤브레인의 외부 수용액상이며, 상기 제1면역조절물질은 지용성 면역활성물질이고, 상기 제2면역조절물질은 수용성 면역활성물질이며, 상기 유동성 오일은 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜의 구조 안정성을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐이 제공된다.

명세서

발명의 명칭: 면역활성물질을 포함하는 다중도메인캡슐, 이의 제조방법, 및 이를 포함하는 면역조절 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은, 면역활성물질을 포함하는 다중도메인캡슐, 상기 다중도메인캡슐의 제조방법, 및 상기 다중도메인캡슐을 포함하는 면역조절 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 현재 다양한 약물이 봉입된 리포솜 소재들이 사용되고 있다. 하지만, 이러한 단일 리포솜(single liposome) 소재를 이용한 기술에서는, 낮은 로딩 효율과 생체 내에서의 불안정성이 큰 단점으로 지적되고 있다.
- [3] 최근, 면역 세포를 활성화 하기 위해 면역활성화 물질이 탑재된 다양한 리포솜 및 에멀전 소재(예를 들어, GSK사의 ASO1, ASO2, AS15 및 노바티스사의 MF59)들이 다양한 감염성 질환 및 암을 예방하거나 치료하기 위한 면역활성화 물질로 사용되고 있다. 상기 단일 리포솜 기반 소재들은 감염성 질환 예방 백신 조성물로, 현재 임상 시험 단계에 있으나, 항원 및 면역활성화 물질의 낮은 지속 시간으로 인하여, 생체 내 면역세포를 효과적으로 활성화시키기 위해서는 이러한 물질을 일정 기간을 두고 2 내지 3회씩 추가적으로 주입해야 한다는 단점이 있었다.
- [4] 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근에 MIT의 Irvive Darrel 그룹에서는 다층 라멜라 리포솜(multilamellar liposome) 구조를 갖는 면역활성화 암 백신을 개발하였다(Nature Materials, 10, 243-251, 2011). 상기 암 백신은 다층 라멜라 구조를 갖는 리포솜 내부에 항원 및 면역활성화 물질을 로딩한 후에, 각 지질 층을 다가성 금속 이온 또는 화학적 링커를 이용하여 가교(chemical crosslinking) 구조를 만들어 줌으로써, 단일 리포솜 소재가 갖고 있었던 근본적인 단점이었던 낮은 봉입 효율과 안정성 문제를 해결하려는 시도였다.
- [5] 하지만, 다층 라멜라 구조를 갖는 리포솜의 형태가 매우 불균일하며, 특정 구조를 갖는 다층 라멜라 구조를 제조하기 위한 제조 과정이 임의적이기 때문에, 제조 시마다 균일한 특성을 갖는 백신 조성물을 얻을 수 없다는 단점이 있었고, 화학적 가교 결합을 이용하기 때문에, 인체에 독성을 야기할 수 있다는 한계가 있었다.
- [6] 또한, 이와 유사한 형태로, 종래에 다중 리포솜(multivesicular liposome)이라 부르는 약물 전달체가 미국 캘리포니아대학의 김신일 연구팀[Biochimica Biophysica Acta 1983 Mar. 9 728 (3) 339-348], 2002년 Mantripragada의 연구팀[Progress of Lipids Research 41 (2002) 392-406], 2007년 Wafa의 연구팀[International Journal of Pharmaceutics 331 (2007) 182-185]등에서 발표된 바 있다. 이러한 다중 리포솜은, 중성지질과 콜레스테롤 및 트리올레인(triolein)으로

이루어진 군에서 선택된 물질들의 혼합물로 이루어진다.

- [7] 종래의 다중 리포솜에 있어서 미소 소포체(vesicle)가 한 덩어리의 마이크로 클러스터를 유지하는 원리는, 개개 소포체의 지질막 사이에서 트리올레인 물질이 접촉하는 지질막의 급격한 커브 변화에서도 이중막이 파괴되지 않고 흩어지지 않도록 고정하기 때문이었다. 이러한 다중 리포솜은 현재 통증조절제(pain management)인 부피바케인(bupivacaine)이 로딩된 약품으로 개발되어 EXPAREL β 라는 상품명으로 시판 중이다.
- [8] 그러나, 이렇게 제조된 다중 리포솜은 트리올레인에 의한 구조 안정화 효율이 매우 낮아 준비과정 중(예를 들어, 원심분리 및 온도 변화 등)에 마이크로 클러스터가 붕괴되어 크기나 모양이 불균일하게 되는 문제점이 있다. 또한, 현재까지 면역활성화 약물이 도입된 다중 리포솜 형태는 발견되지 않은 것으로 조사 되었다. 한편, 이러한 면역활성화(immunostimulation) 기술과 더불어 면역기능 조절에서 중요한 것이 체내의 면역억제(immunosuppression)를 조절할 수 있는 기술의 개발이다. 특히, 현재 항암면역치료의 낮은 치료효율과 부작용을 해결하기 위해서는 암 미세환경에서의 면역억제 현상을 극복할 수 있는 기술의 개발의 매우 시급한 실정이다.
- [9] 체내의 면역시스템을 이용하여 암을 치료하는 항암면역치료방법은 기존의 화학적 요법이나 방사선 치료방법에 비하여 부작용을 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 항암면역치료기법 중에는 치료용 면역세포인 T 세포(CAR-T 포함), 수지상세포(Dendritic Cells), 자연살해세포(Natural Killer Cells) 등을 체외에서 활성화 시킨 후에 체내에 직접 주입하는 세포치료제방법과 암 항원과 면역활성화 물질을 체내에 주입함으로써, 체내에 존재하는 면역세포를 직접적으로 활성화함으로써 항암효능을 높이는 항암백신에 대한 방법 등이 활발하게 진행되고 있다. 하지만, 이러한 세포치료제나 항암백신은 주로 혈액암 관련 질병에 주로 사용되고 있고, 고형암에서는 대부분 그 치료효능이 매우 낮다는 단점을 갖고 있다.
- [10] 이러한 이유 중의 하나는 고형암 주위에서 면역기능을 억제하는 미세환경 요인에 기인한다. 실제로, 종양미세환경에서 면역세포의 기능을 저하시키는 세포 (MDSC: myeloid-derived stromal cells, Treg: regulatory T cell, TAM: tumor-associated macrophages)나 면역억제유발 사이토카인, 대사체 등이 활발하게 작용함으로써, 면역활성화 물질과 치료용 면역세포의 활성을 급격하게 저하시키는 것이다. 따라서, 고형암의 치료효율을 높이기 위해서는 고형암 미세환경에서 면역억제인자를 제어할 수 있는 새로운 치료 플랫폼 기술의 개발이 매우 시급하다.
- [11] 최근, 종양미세환경 내의 다양한 면역억제인자들을 제어할 수 있는 약물 개발에 대한 연구가 전 세계적으로 활발하게 진행되고 있다. 그러나, 이러한 약물들은 체내에 주입시에 생체 내의 다양한 생리적 환경 및 효소에 의해 쉽게 분해되거나, 종양 부위가 아닌 다른 조직으로 전달되어 원하지 않는 다양한

부작용을 초래하는 단점을 갖고 있다.

[12] 이러한 단점을 극복하기 위해서, 실제 임상분야에서는 고용량(high-dose)의 약물을 반복적으로 투여함으로써, 면역치료효과를 증진시키려는 시도가 진행되고 있으나, 다양한 약물독성 및 부작용으로 인해, 치료효과를 감소시키는 결과를 초래하고 있다.

[13] 따라서, 고형암 미세환경에서, 면역치료제의 치료기능을 저해하는 면역억제환경 인자들을 제어할 수 있는 약물을 고형암 주위에서 서방형으로 방출함으로써, 면역억제인자를 효과적으로 타겟하고, 약물에 의한 부작용을 최소화 할 수 있는 항암면역치료제 및 이를 이용한 항암면역치료의 치료효과 향상 기술 개발이 매우 시급한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[14] 본 발명은, 면역활성물질을 포함하는 다중도메인캡슐, 상기 다중도메인캡슐의 제조방법, 및 상기 다중도메인캡슐을 포함하는 면역조절 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[16] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜, 및 상기 둘 이상의 리포솜을 둘러싸는 다중도메인캡슐 외벽을 포함하는 다중도메인캡슐로서, 상기 다중도메인캡슐은 유기상과 수용액상으로 이루어지고, 상기 유기상은 제1면역조절물질 및 유동성 오일을 포함하며, 상기 유기상은 상기 리포솜의 멤브레인, 및 상기 다중도메인캡슐 외벽을 형성하고, 상기 수용액은 제2면역조절물질을 포함하며, 상기 수용액은 상기 리포솜 멤브레인의 내부 수용액상 및 리포솜 멤브레인의 외부 수용액상이며, 상기 제1면역조절물질은 지용성 면역활성물질이고, 상기 제2면역조절물질은 수용성 면역활성물질이며, 상기 유동성 오일은 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜의 구조 안정성을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐을 제공할 수 있다.

[17] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 다중도메인캡슐 및 항원을 포함하는, 면역조절 물질을 제공할 수 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 제1면역조절물질 및 유동성 오일을 용매에 용해하여 오일상 용액을 제조하는 단계; 제2면역조절물질을 포함하는 제1수용액 상을 상기 오일상 용액에 분산시켜 유중-수(W/O) 에멀전을 제조하는 단계; 및 상기 유중-수 에멀전을 제2수용액과 혼합하고, 상기 용매를 증발시키는 단계; 를 포함하고, 상기 제1면역조절물질은 지용성 면역활성물질이고, 상기

제2면역조절물질은 수용성 면역활성물질인 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐의 제조방법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [19] 본 발명은, 면역조절물질을 기본성분으로 복수의 리포솜이 각각의 도메인을 형성하면서 서로 연결되고, 도입된 유동성 오일 성분에 의해 연결된 복수 리포솜의 구조적 안정성이 향상된 마이크로 크기의 캡슐 형태를 가지는 면역조절 다중도메인캡슐을 제공할 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명에 따른 면역조절 조성물은, 다양한 약학적 조성물로서 사용되고 있는 단일 리포솜 소재의 낮은 봉입 효율 및 짧은 유효 지속 시간의 단점을 극복하고, 면역조절 효과의 유효 지속 시간을 늘릴 수 있는 장점을 가진다.
- [21] 그리고, 본 발명에 따른 다중도메인 캡슐의 제조방법은, 종래 다중 리포솜의 구조적 안정성을 유지하기 위해 도입되었던 트리올레인 대신, 스쿠알렌과 같은 유동성 오일을 도입함으로써, 다중도메인캡슐의 제조 과정에서의 안정성 및 저장 안정성을 향상시킬 수 있으며, 상기 유동성 오일의 도입으로 인하여, 일반적인 유기 용매에 녹지 않는 대표적인 난용성 면역조절 물질들을 용이하게 가용화할 수 있으며, 그에 따라 상기 다양한 난용성 면역조절 물질을 포함하는 다중도메인캡슐을 제조할 수 있다는 장점이 있다.
- [22] 또한, 본 발명에 따른 다중도메인캡슐은, 다중도메인캡슐의 표면 전하를 조율함으로써, 반대의 전하 특성을 갖는 항원 및 면역조절 물질의 봉입 효율 및 유효 지속시간을 증가시킬 수 있고, 양이온성 지질을 포함하여 다중도메인캡슐을 구성함으로써, 음이온성 및/또는 음전하를 띠는 다양한 면역조절물질 및 DNA, RNA와 같은 바이오소재가 다중도메인캡슐에 효과적으로 로딩될 수 있다.
- [23] 그리고, 다중도메인캡슐의 외벽부터 안쪽 멤브레인으로 서서히 붕괴가 일어나면서 다중도메인캡슐의 외벽 및 내부에 로딩된 항원 및/또는 면역조절물질이 방출되므로, 항원 및 면역조절물질의 유효 지속시간이 증가될 수 있다는 장점을 갖는다.
- [24] 한편, 본 발명에 따른 다중도메인캡슐은, 리포솜의 멤브레인 및/또는 상기 다중도메인캡슐의 외벽에 친유성 성질을 갖는 다양한 면역조절물질을 로딩함으로써, 면역조절물질의 유효 지속시간을 증가시킬 수 있고, 리포솜의 내부에 친수성 성질을 갖는 다양한 면역조절물질을 로딩함으로써, 면역조절물질의 유효 지속시간을 증가시킬 수 있으며, 리포솜의 내부에 친수성 성질을 갖는 다양한 면역조절물질, 리포솜의 멤브레인 및/또는 상기 캡슐의 외벽에 친유성 면역조절화 물질을 동시에 로딩함으로써, 면역조절물질의 유효 지속시간을 증가시킬 수 있다.
- [25] 아울러, 본 발명에 따른 다중도메인캡슐은 계면활성제가 다중도메인캡슐의 외부에 코팅되어 다중도메인캡슐이 수용액 내에 안정되게 분산될 수 있도록 할

수 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 면역기능 조절 다중도메인캡슐(imMDV)의 구조를 나타낸 모식도이다.
- [27] 도 2의 (a) 내지 (d)는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인캡슐의 광학 현미경 이미지(a) 및 크기 분포를 나타낸 그래프(c), 및 스쿠알렌을 포함하지 않는 다중도메인캡슐의 광학 현미경 이미지(b) 및 크기 분포를 나타낸 그래프(d)이다 (스케일 바: 20 μm).
- [28] 도 3의 (a) 내지 (c)는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인캡슐의 광학 현미경 이미지이며, (d) 내지 (f)는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 스쿠알렌을 포함하지 않는 다중도메인캡슐의 광학 현미경 이미지이다 (스케일 바: 4 μm).
- [29] 도 4의 (a) 내지 (d)는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 다중도메인캡슐의 안정성 분석 결과로서, 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인캡슐의 원심분리 전(a) 및 원심분리 후(c)의 현미경 이미지, 및 스쿠알렌을 포함하지 않는 다중도메인캡슐의 원심분리 전(b) 및 원심분리 후(d)의 현미경 이미지이다.
- [30] 도 5는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 스쿠알렌 기반의 MPLA를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV(MPLA))의 광학 현미경 이미지이다.
- [31] 도 6은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, imMDV(SQ)를 BMDC에 처리했을 때 분비되는 사이토카인의 발현량을 나타낸다 (a: TNF-alpha, b: IL-6).
- [32] 도 7은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, imMDV(MPLA)를 BMDC에 처리했을 때 분비되는 사이토카인의 발현량을 나타낸다 (a: TNF-alpha, b: IL-6, c: IL-12p70).
- [33] 도 8은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 단백질 항원(OVA, ovalbumin)가 로딩된 다중도메인캡슐에서 스쿠알렌 포함여부에 따른 OVA의 방출거동을 나타낸 그래프이다.
- [34] 도 9는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 면역활성화 물질인 이미퀴모드(acid 및 base 구조)가 로딩된 면역기능 조절용 다중도메인캡슐을 나타낸 것이다(a: imMDV(R837-HCl) sample, b: imMDV(R837-base) sample, c: imMDV[R837-HCl:R837-base (1:1) sample]).
- [35] 도 10은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 면역조절용 다중도메인캡슐(imMDV(R837-HCl))에서 시간에 따른 R837의 방출거동을 나타낸 것이다.
- [36] 도 11은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐(imMDV(R837-HCl))를 BMDC에 농도가 다르게 처리했을 때 분비되는 IL-6사이토카인의 발현량을 나타낸다.
- [37] 도 12a는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된

- 다중도메인캡슐에 대하여, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 1 week after injection)를 나타낸 그래프이다(imMDV(R837-HCl) 샘플 / 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV sample).
- [38] 도 12b는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 1 week after injection)를 나타낸 그래프이다(imMDV(R837-base) 샘플 / 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV sample).
- [39] 도 12c는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 1 week after injection)를 나타낸 그래프이다(imMDV[R837-HCl:R837-base (1:1) / 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV sample).
- [40] 도 13a는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 3 week after injection)를 나타낸 그래프이다(imMDV(R837-HCl) 샘플 / 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV sample).
- [41] 도 13b는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 3 week after injection)를 나타낸 그래프이다(imMDV(R837-base) 샘플 / 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV sample).
- [42] 도 13c는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 3 week after injection)를 나타낸 그래프이다(imMDV[R837-HCl:R837-base (1:1) 샘플 / 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV sample).
- [43] 도 14a는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 5 week after injection)를 나타낸 그래프이다(imMDV(R837-HCl) 샘플, 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV).
- [44] 도 14b는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 5 week after injection)를 나타낸 그래프이다(imMDV(R837-base) 샘플, 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV).
- [45] 도 14c는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 5 week after injection)를 나타낸 그래프이다(imMDV[R837-HCl:R837-base (1:1) 샘플, 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV).
- [46] 도 15a는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된

- 다중도메인캡슐에 대하여, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 1 week after boosting of 5 weeks mice)를 나타낸 그래프이다(imMDV(R837-HCl) 샘플 / 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV sample).
- [47] 도 15b는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 1 week after boosting of 5 weeks mice)를 나타낸 그래프이다(imMDV(R837-base) 샘플 / 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV sample).
- [48] 도 15c는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐에 대하여, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 1 week after boosting of 5 weeks mice)를 나타낸 그래프이다(imMDV[R837-HCl:R837-base (1:1) 샘플 / 1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: OVA+imMDV sample).
- [49] 도 16은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, imMDV(R837-HCl)+OVA sample을 immunization한 후에, 5주차에 boosting을 한 마우스와 boosting을 하지않은 마우스에서 OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG)를 나타낸 그래프이다 (1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: imMDV(R837-HCl)+OVA).
- [50] 도 17은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, imMDV(R837-base)+OVA sample을 immunization한 후에, 5주차에 boosting을 한 마우스와 boosting을 하지않은 마우스에서 OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG)를 나타낸 그래프이다 (1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: imMDV(R837-base)+OVA).
- [51] 도 18은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, imMDV[R837-HCl:R837-base(1:1) sample]+OVA sample을 immunization한 후에, 5주차에 boosting을 한 마우스와 boosting을 하지않은 마우스에서 OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG)를 나타낸 그래프이다 (1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: imMDV[R837-HCl:R837-base (1:1) sample].
- [52] 도 19는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, imMDV(R837-HCl)+OVA sample을 immunization하고, 5주차에 boosting을 하였다. Boosting후 1, 2, 6주차에 지속적으로 나타내는 OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG)를 나타낸 그래프이다 (1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: imMDV(R837-HCl)+OVA sample).
- [53] 도 20은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, imMDV(R837-base)+OVA sample을 immunization하고, 5주차에 boosting을 하였다. Boosting후 1, 2, 6주차에 지속적으로 나타내는 OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG)를 나타낸 그래프이다 (1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: imMDV(R837-base)+OVA sample).
- [54] 도 21은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, imMDV[R837-HCl:R837-base (1:1)

- sample]+OVA sample을 immunization하고, 5주차에 boosting을 하였다. Boosting 후 1, 2, 6주차에 지속적으로 나타내는 OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG)를 나타낸 그래프이다 (1: PBS, 2: OVA, 3: OVA+R837-HCl, 4: imMDV[R837-HCl:R837-base (1:1) sample]).
- [55] 도 22는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, imMDV(R837-HCl)+OVA sample을 immunization하고, 1-4 주차에 나타내는OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG)를 오일 형태의 아주번트 (DMSO(R837)+OVA)와 비교한 데이터이다 (1: OVA, 2: imMDV(R837-HCl)+OVA, 3: DMSO(R837)+OVA, 4:DMSO).
- [56] 도 23은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 두 가지 백신[imMDV(R837-HCl)+OVA와 DMSO(R837)+OVA]을 마우스에 immunization한 후에, 나타나는 염증반응 효과를 비교한 것이다.
- [57] 도 24는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, HA(hemagglutinin) 바이러스 항원에 대한 면역조절 물질들의 체액성 면역 효과(근육 주사 2 주 후)를 나타낸 그래프이다.
- [58] 도 25는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, HA(hemagglutinin) 바이러스 항원에 대한 면역조절 물질들의 체액성 면역 효과(근육 주사 4 주 후)를 나타낸 그래프이다.
- [59] 도 26은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 면역조절 물질들의 체액성 면역 효과를 나타낸 그래프이다.
- [60] 도 27은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, OVA(ovalbumin) 암 항원에 대한 면역조절 물질들의 세포성 면역 유도 효과를 나타낸 그래프이다.
- [61] 도 28은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 다중도메인캡슐 imMDV(SQ-Gem), imMDV(OA-Gem), 및 imMDV(Gem) 시료의 광학현미경 이미지를 나타낸 것이다.
- [62] 도 29는, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인 캡슐에서는 로딩된 쥘시타빈이 서서히 방출되는 반면, 스쿠알렌을 포함하지 않은 다중도메인캡슐에서는 24시간 내에 로딩된 대부분의 약물이 방출됨을 확인한 그래프이다.
- [63] 도 30은, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 스쿠알렌과 같은 동물성 오일 대신에 올레산 식물성 오일을 사용했을 경우, 로딩된 쥘시타빈의 서방형 방출거동이 24-72시간 동안에 플래투(plateau) 형상을 보이다가, 72시간 이후에 선형(linear) 거동을 보이는 것을 확인한 그래프이다.
- [64] 도 31은, 본 발명의 실시예 4-2에 있어서, imMDV(paclitaxel) 및 이의 약물방출 거동을 나타낸 그래프이다.
- [65] 도 32는, 본 발명의 실시예 4-2에 있어서, imMDV(doxorubicin)를 나타낸 것이다.
- [66] 도 33은, 본 발명의 실시예 4-2에 있어서, imMDV(methotrexate)를 나타낸 것이다.

- [67] 도 34는, 본 발명의 실시예 4-2에 있어서, imMDV(oxaliplatin)를 나타낸 것이다.
- [68] 도 35는, 본 발명의 실시예 4-3에 있어서, imMDV(MK-2206)를 나타낸 것이다.
- [69] 도 36은, 본 발명의 실시예 4-4에 있어서, imMDV(PF-04691502)를 나타낸 것이다.
- [70] 도 37은, 본 발명의 실시예 4-5에 있어서, imMDV(Azacitidine)를 나타낸 것이다.
- [71] 도 38은, 본 발명의 실시예 4-5에 있어서, imMDV(Resmonostat), 및 이의 약물방출 거동을 나타낸 그래프이다.
- [72] 도 39는, 본 발명의 실시예 4-5에 있어서, imMDV(Panobinostat), 및 이의 약물방출 거동을 나타낸 그래프이다.
- [73] 도 40은, 본 발명의 실시예 4-5에 있어서, imMDV(OTX015(iBET))를 나타낸 것이다.
- [74] 도 41은, 본 발명의 실시예 4-6에 있어서, imMDV(BLZ945)를 나타낸 것이다.
- [75] 도 42는, 본 발명의 실시예 4-7에 있어서, imMDV(Celecoxib)를 나타낸 것이다.
- [76] 도 43은, 본 발명의 실시예 5에 있어서, imMDV(GEM/R837)를 나타낸 것이다.
- [77] 도 44는, 본 발명의 실시예 5에 있어서, imMDV(BLZ945/R837)를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [78] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [79] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 “연결”되어 있다고 할 때, 이는 “직접적으로 연결”되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 “전기적으로 연결”되어 있는 경우도 포함한다.
- [80] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 “상에” 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [81] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는

“~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.

- [82] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [83] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [84] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [85] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜, 및 상기 둘 이상의 리포솜을 둘러싸는 다중도메인캡슐 외벽을 포함하는 다중도메인캡슐로서, 상기 다중도메인캡슐은 유기상과 수용액상으로 이루어지고, 상기 유기상은 제1면역조절물질 및 유동성 오일을 포함하며, 상기 유기상은 상기 리포솜의 멤브레인, 및 상기 다중도메인캡슐 외벽을 형성하고, 상기 수용액상은 제2면역조절물질을 포함하며, 상기 수용액상은 상기 리포솜 멤브레인의 내부 수용액상 및 리포솜 멤브레인의 외부 수용액상이며, 상기 제1면역조절물질은 지용성 면역활성물질이고, 상기 제2면역조절물질은 수용성 면역활성물질이며, 상기 유동성 오일은 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜의 구조 안정성을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐이 제공될 수 있다.
- [86] 도 1은, 본 발명의 일 구현예에 따른 면역기능 조절용 다중도메인캡슐(immunomodulatory multidomain vesicle, imMDV)의 구조를 도시한 단면도이다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 다중도메인캡슐은 지용성 면역활성물질을 포함하는 다중도메인캡슐의 외벽을 포함하며, 상기 둘 이상의 리포솜을 둘러싼 상기 다중도메인캡슐의 외벽 내부에, 둘 이상의 리포솜이 각각의 도메인을 형성하고 있는, 약 1 μm 내지 약 100 μm 크기의 캡슐 구조일 수 있다.
- [87] 상기 둘 이상의 리포솜을 포함하고 있는 다중도메인캡슐은, 종래의 단일 리포솜 및 단독 에멀전에 비하여, 면역세포 활성화 물질의 지속 시간, 면역세포 활성화 효율, 봉입 효율, 또는 생리학적 안정성이 향상된 것일 수 있다.
- [88] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 도 1에 나타낸 바와 같이 상기 리포솜 멤브레인의 내부는 내부 수용액 상을 의미하며, 상기 리포솜 멤브레인의 외부는 외부 수용액 상을 의미하고, 상기 내부 수용액 상 및 상기 외부 수용액 상 모두는 “제 1 수용액상”을 의미한다. 상기 리포솜 멤브레인의 외부인 외부 수용액상은, 상기 리포솜 멤브레인과 상기 다중도메인캡슐의 외벽 사이의 공간을 의미한다. 또한, 상기 다중도메인캡슐은 용매에 분산되어 있는 것일 수 있으며, 이때 다중도메인캡슐이 분산되는 분산상, 즉 다중도메인캡슐의 외부는 “제 2 수용액상”을 의미한다.

- [89] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 다중도메인캡슐의 크기는 약 1 μm 내지 약 100 μm , 약 1 μm 내지 약 80 μm , 약 1 μm 내지 약 60 μm , 약 1 μm 내지 약 40 μm , 약 1 μm 내지 약 20 μm , 약 1 μm 내지 약 10 μm , 약 10 μm 내지 약 100 μm , 약 10 μm 내지 약 80 μm , 약 10 μm 내지 약 60 μm , 약 10 μm 내지 약 40 μm , 약 10 μm 내지 약 20 μm , 약 20 μm 내지 약 100 μm , 약 20 μm 내지 약 80 μm , 약 20 μm 내지 약 60 μm , 약 20 μm 내지 약 40 μm , 약 40 μm 내지 약 100 μm , 약 40 μm 내지 약 80 μm , 약 40 μm 내지 약 60 μm , 약 60 μm 내지 약 100 μm , 약 60 μm 내지 약 80 μm , 또는 약 80 μm 내지 약 100 μm 범위일 수 있다.
- [90] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 다중도메인캡슐은, 상기 캡슐의 바깥쪽을 구성하는 외벽에서부터, 상기 둘 이상의 리포솜을 포함하고 있는 안쪽 멤브레인으로 서서히 붕괴가 일어나므로, 상기 캡슐에 로딩된 항원 및/또는 면역조절 물질이 방출 시간을 단일 리포솜 또는 단일 에멀전에 비해 연장시킬 수 있으며, 결과적으로는 장시간에 걸쳐 생체 내의 면역세포의 기능을 조절할 수 있다.
- [91] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 둘 이상의 리포솜은 외피가 서로 접촉하고 있는 리포솜을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 다중도메인캡슐의 리포솜은 외피간의 계면접촉이 이루어지며, 그에 따라 외피가 서로 떨어져 있는 다중 리포솜에 비하여 리포솜이 쉽게 깨지지 않으므로, 다중도메인캡슐의 구조적 안정성 및 서방성 효과가 향상되는 것일 수 있다.
- [92] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유동성 오일은 각 리포솜으로 구성된 도메인 사이에 글루(glue) 역할을 함으로써, 상기 다중도메인캡슐의 안정성을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 다중도메인캡슐은 유동성 오일을 상기 도메인캡슐의 외벽에 도입하고, 상기 리포솜들의 외벽을 접촉시킴으로써 상기 다중도메인캡슐의 안정성이 향상되는 것일 수 있으며, 이에 따라 서방성 효과 및 구조 안정성이 증대되는 것일 수 있다.
- [93] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유동성 오일에 의하여 상기 지용성 면역활성물질이 상기 다중도메인캡슐에 용이하게 로딩되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 유동성 오일에 의하여, 일반적인 유기 용매에 가용화하기 힘든 난용성 면역조절 물질인, 이미퀴모드(R837) 등이 쉽게 가용화되어, 리포솜과 리포솜 사이의 공간에 유동성 오일과 함께 다중도메인캡슐에 로딩될 수 있다.
- [94] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유동성 오일은 면역세포의 활성화를 돕는 아주번트 역할을 수행할 수 있으며, 예를 들어, 동물성 오일, 식물성 오일, 토크페롤, 미네랄 오일, 캐스터 오일, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함할 수 있다.
- [95] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 동물성 오일은 어류 오일을 포함하는 것일 수 있다.
- [96] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 어류 오일은 대사 가능한 오일이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 대구간 오일, 상어간 오일, 또는 고래 오일

- 등을 포함할 수 있다. 상기 상어간 오일은 스쿠알렌, 2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥사엔으로서 알려진 분자, 불포화 테르펜을 함유하며, 스쿠알란에 대한 포화 유사체도 포함할 수 있다. 스쿠알렌 또는 스쿠알란을 포함하는 어류 오일의 경우, 시중의 공급원으로부터 용이하게 이용 가능하거나 또는 당업계에 공지된 방법으로 획득될 수 있다.
- [97] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 동물성 유래 오일은 라드, 수지(tallow) 오일, 또는 우지 등을 포함하는 것일 수 있다.
- [98] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식물성 유래 오일은 견과, 종자, 또는 곡물 등으로부터 유래된 오일일 수 있으며, 예를 들어, 땅콩 오일, 대두 오일, 코코넛 오일, 또는 올리브 오일 등을 포함할 수 있다.
- [99] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 토코페롤은 비타민 E가 함유된 토코페롤일 수 있다. 다양한 토코페롤이 존재하지만(α , β , γ , δ , ϵ 또는 ξ), 일반적으로 α -토코페롤이 사용될 수 있으며, 예를 들어, DL- α -토코페롤이 사용될 수 있다.
- [100] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유동성 오일을 상기 다중도메인캡슐에 도입함으로써, 상기 면역조절물질을 용이하게 가용화할 수 있으며, 상기 다중도메인캡슐의 구조적 안정성을 강화할 수 있다. 예를 들어, 상기 유동성 오일로서 스쿠알렌 및 올레인산을 이용할 경우, 친유성 또는 난용성 면역조절물질을 용이하게 가용화 할 수 있으며, 스쿠알렌 및 올레인산 자체의 면역활성화효과에 의하여 상기 면역조절과의 시너지 효과를 나타낼 수 있고, 상기 다중도메인캡슐의 구조적 안정성을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [101] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 지용성 및 수용성 면역활성물질은 스트레스를 받은 암세포에서 발현되는 면역조절 물질, 예를 들어 열-충격 단백질(heat-shock protein)일 수 있으며, 또는 T 세포의 활성화를 유도하는 물질일 수 있다.
- [102] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 지용성 및 수용성 면역활성물질은 톨-유사 수용체 아고니스트(toll-like receptor agonist), 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라마솜 유도제(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD ligand), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [103] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 직접적 리간드로서 또는 간접적 리간드로서, 내인성 또는 외인성 리간드의 생성을 통해 TLR 신호전달 경로를 통한 신호전달 반응을 야기시킬 수 있는 성분을 의미하는 것일 수 있다.
- [104] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 천연 톨-유사 수용체 아고니스트 또는 합성 톨-유사 수용체 아고니스트일 수 있다.

- [105] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 TLR-1을 통해 신호전달 반응을 야기시킬 수 있는 것일 수 있으며, 예를 들어, 트리-아실화된 지질펩티드(LP); 페놀-가용성 모듈린(modulin); 코박테리움튜베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 지질펩티드; S-(2,3-비스(팔미토일옥시)-(2-RS)-프로필)-N-팔미토일-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH; 보렐리아 부르그도르페이(*Borrelia burgdorferi*)로부터의 박테리아 지질펩티드; OspA 지질펩티드의 아세틸화된 아미노 말단을 모방하는 트리히드로클로라이드(Pam3Cys) 지질펩티드; 및 이들의 조합들로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [106] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 TLR-2 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, Pam3Cys-Lip을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [107] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-3 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 폴리아이시 계열로서 Poly(I:C), Poly(ICLC), Poly(IC12U), ampligen 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [108] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-4 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 시겔라 플렉시네리(*Shigella flexneri*) 외막 단백질 제조물, AGP, CRX-527, MPLA, PHAD, 3D-PHAD, GLA, 및 이들의 조합들로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [109] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-5 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 플라젤린(flagellin) 또는 이의 단편을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [110] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-7 아고니스트 또는 TLR-8 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 이미퀴모드, R837, 레스퀴모드, 또는 R848와 같은 이미다조퀴놀린 분자; VTX-2337; CRX642; 인지질 기 또는 포스포노지질 기에 공유적으로 결합된 이미다조퀴놀린; 및 이들의 조합들로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [111] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-9 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 면역 자극성 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [112] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역 자극성 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 CpG 모티프를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [113] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 사포닌은 QS21, QuilA, QS7, QS17, β-에스킨, 디지토닌 및 이들의 조합들로 이루어진 균으로부터 선택된 것일 수

- 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [114] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항바이러스성 펩티드는 케이엘케이(KLK)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [115] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 인플러머좀 인두서는 TDB(trehalose-6,6-dibehenate)일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [116] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 NOD 리간드는 M-TriLYS(NOD2 아고니스트-합성 무라밀 트리펩티드) 또는 NOD2 아고니스트(N-glycolylated muramyl dipeptide)일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [117] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 CDS 리간드는 Poly(dA:dT)일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [118] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 STING 리간드는 cGAMP, di-AMP, 또는 di-GMP 일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [119] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역조절물질은 하나 또는 둘 이상의 톨-유사 수용체 아고니스트의 조합을 포함할 수 있으며, 예를 들어, CL401(듀얼 TLR2 및 TLR7 아고니스트) 또는 CL429(듀얼 TLR2 및 NOD2 아고니스트)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [120] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 다중도메인캡슐에 포함되는 면역조절물질은, 예를 들어, Pam3Cys-Lip, 폴리아이시, CRX-527, MPLA, 플라젤린, 이미퀴모드, 레스퀴모드, CpG, QS21, M-TriLys(MurNAc-Ala-D-isoGln-Lys), TDB(trehalose-6,6-dibehenate), 8837, Poly(dA:dT), cGAMP, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [121] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 지용성 면역활성물질은, 예를 들어, 양이온성 지질, MPLA, AGP, CRX-527, PHAD, 3D-PHAD, GLA, 지질 펩타이드, Pam3Cys, Pam3Cys-Lip, DDA, 이미퀴모드(base form), 레스퀴모드 (base form), VTX-2337, CRX642, 사포닌(QS21), TDB, CL401, CL429, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것일 수 있다.
- [122] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 친수성 면역활성물질은, 예를 들어, CpG, 이미퀴모드(HCl form), 레스퀴모드(HCl form), Poly(I:C), STING, 플라젤린(flagellin), 사포닌, KLK 펩타이드, NOD 아고니스트 펩타이드, Poly(dA:dT), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 친수성 물질은 말단기의 화학적 결합기를 통해서도 상기 다중도메인캡슐의 외벽에 컨주게이션될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [123] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 양이온성 지질에 의하여, 음이온성인 세포막과의 정전기적 인력이 유도되어, 상기 면역조절 물질의 세포 내 전달 효율이 더 향상될 수 있다.
- [124] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 양이온성 지질을 포함하여 다중도메인캡슐을 구성함으로써, 음이온성 및/또는 음전하를 띠는 다양한 면역조절 물질 및 DNA,

RNA와 같은 바이오소재가 상기 다중도메인캡슐에 효과적으로 로딩될 수 있다. 예를 들어, 음이온성 또는 음전하를 띠는 바이오소재 및/또는 DNA, RNA 아미노산 기반의 면역조절 물질은, 양이온 특성을 나타내는 상기 다중도메인캡슐의 외벽 또는 내부 리포솜의 멤브레인에 정전기적 결합을 통하여 로딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [125] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 양이온성 지질은 DC-콜레스테롤(3β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride), DDA (dimethyldioctadecylammonium), DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane), DOTMA (1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane), EPC (1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine), MVL5 (N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino]butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleyloxy]-benzamide), DODAP (lipids1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [126] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 계면활성제가 다중도메인캡슐의 외부에 코팅되어 상기 다중도메인캡슐이 수용액 내에서 안정되게 분산될 수 있도록 하는 것을 특징으로 한다.

- [127] 상기 계면활성제는 상기 다중도메인캡슐의 외부에 코팅되어 상기 다중도메인캡슐이 수용액 내에 분산될 수 있도록 하는 것으로, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제(일반적으로 Tween 라고 불림), 특히 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80; 에틸렌 옥사이드(EO), 프로필렌 옥사이드(PO), 및/또는 부틸렌 옥사이드(BO)의 코폴리머; 옥토시놀(예를 들면, 트리톤 X-100, 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올); (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올 (IGEPAL CA-630/NP-40); 포스포리피드 (인지질 성분)로서, 포스파티딜콜린(레시틴) 포스파티딜에탄올아닐린, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딘산, 스펅고미엘린 및 카디올리핀; Tergitol™ NP 시리즈와 같은 노닐페놀 에톡실레이트; 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르 (Brij 30)과 같은 라우릴, 세틸 및 오레일 알코올(Brij 계면활성제로 알려진)로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 패티 에테르; 및 소르비탄 트리올레이트 (Span85) 및 소르비탄 모노라우레이트와 같은 소르비탄 에스테르 (일반적으로 SPAN로 알려짐)를 단독으로 사용하거나, 2종 이상의 계면활성제를 조합하여 함께 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 계면활성제는 이들 계면활성제의 혼합물, 예를 들면 Tween 80/Span 85 혼합물이 이용될 수 있다. 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및 옥토시놀의 조합이 또한 사용될 수 있다. 다른 유용한 조합은 라우레스 9, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및/또는 옥토시놀을 포함할 수 있다. 상기 계면활성제는 전체 상기

다중도메인캡슐 총 중량에 대하여 0.001 내지 20%의 중량으로 사용될 수 있으며, 예를 들어, 0.01 내지 1%, 0.001 내지 0.1%, 0.005 내지 0.02%; 0.1 내지 20%, 0.1 내지 10%, 0.1 내지 1% 또는 약 0.5%의 중량으로 사용될 수 있다.

[128]

[129] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명에 따른 다중도메인캡슐 및 항원을 포함하는, 면역조절 물질을 제공한다.

[130] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항원은 단백질, 유전자, 세포, 바이러스, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 단백질은 오버알부민, 재조합 단백질, 서브유닛(subunit), 스플릿(split) 단백질 항원을 포함할 수 있으며, 상기 세포는, 예를 들어, 수지상 세포, T 세포를 포함할 수 있으며, 상기 바이러스는, 예를 들어, 인플루엔자, HBV(hepatitis B virus), HAV(hepatitis A virus), HPV(human papilloma virus)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[131] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항원은 약독화된 살아있는 완전체 미생물, 불활성 미생물, 파열 미생물, 병원체의 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 펩티드, 다당류, 지질다당류, 리포펩티드, 폴리뉴클레오티드, 세포, 바이러스, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 항원은 인플루엔자 유래 항원 또는 암세포 유래 항원을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 피내 투여용 면역조절 물질은 하나 이상의 항원을 포함함으로써 체내에서 다중 면역 반응을 유도될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[132] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암세포는 암세포 주(cell line)를 이용하여 수득되거나, 체내에 존재하는 암 조직(tumor tissue)으로부터 분리되는 것일 수 있다. 또한, 실제 암 조직에서 항암제나 방사선을 가함으로써 세포 내 스트레스와 관련된 단백질의 생성을 유도한 후에, 암세포를 용해함으로써 제조되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[133] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암세포는 폐, 결장, 중추신경계, 피부, 난소, 신장, 유방, 위, 또는 대장의 암세포를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[134]

[135] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 제1면역조절물질 및 유동성 오일을 용매에 용해하여 오일상 용액을 제조하는 단계; 제2면역조절물질을 포함하는 제1수용액 상을 상기 오일상 용액에 분산시켜 유중-수(W/O) 에멀전을 제조하는 단계; 및 상기 유중-수 에멀전을 제2수용액과 혼합하고, 상기 용매를 증발시키는 단계; 를 포함하고, 상기 제1면역조절물질은 지용성 면역활성물질이고, 상기 제2면역조절물질은 수용성 면역활성물질인 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐의 제조방법이 제공된다.

[136] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 다중도메인캡슐은, 상기 캡슐의 바깥쪽을

구성하는 외벽에서부터, 상기 둘 이상의 리포솜을 포함하고 있는 안쪽 멤브레인으로 서서히 붕괴가 일어나므로, 상기 캡슐에 로딩된 항원 및/또는 면역조절 물질이 방출 시간을 단일 리포솜 또는 단일 에멀전에 비해 연장시킬 수 있으며, 결과적으로는 장시간에 걸쳐 생체 내의 면역세포의 기능을 조절할 수 있다.

[137] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 둘 이상의 리포솜은 외피가 서로 접촉하고 있는 리포솜을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 다중도메인캡슐의 리포솜은 외피간의 계면접촉이 이루어지며, 그에 따라 외피가 서로 떨어져 있는 다중 리포솜에 비하여 리포솜이 쉽게 깨지지 않으므로, 다중도메인캡슐의 구조적 안정성 및 서방성 효과가 향상되는 것일 수 있다.

[138] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유동성 오일은 각 리포솜으로 구성된 도메인 사이에 글루(glue) 역할을 함으로써, 상기 다중도메인캡슐의 안정성이 향상되는 것을 특징으로 한다. 예를 들어, 상기 다중도메인캡슐은 유동성 오일을 상기 도메인캡슐의 외벽에 도입하고, 상기 리포솜들의 외벽을 접촉시킴으로써 상기 다중도메인캡슐의 안정성이 향상되는 것일 수 있으며, 이에 따라 서방성 효과 및 구조 안정성이 증대되는 것일 수 있다.

[139] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유동성 오일에 의하여 상기 친유성 면역조절 물질이 상기 다중도메인캡슐에 용이하게 로딩되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 유동성 오일에 의하여, 일반적인 유기 용매에 가용화하기 힘든 난용성 면역조절 물질인, 이미퀴모드(R837) 등이 쉽게 가용화되어, 리포솜과 리포솜 사이의 공간에 유동성 오일과 함께 다중도메인캡슐에 로딩될 수 있다.

[140] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유동성 오일은 면역세포의 활성화를 돕는 아주번트 역할을 수행할 수 있으며, 예를 들어, 동물성 오일, 식물성 오일, 토코페롤, 미네랄 오일, 캐스터 오일, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함할 수 있다.

[141] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 동물성 오일은 어류 오일을 포함하는 것일 수 있다.

[142] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 어류 오일은 대사 가능한 오일이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 대구간 오일, 상어간 오일, 또는 고래 오일 등을 포함할 수 있다. 상기 상어간 오일은 스쿠알렌, 2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥사엔으로서 알려진 분자, 불포화 테르펜을 함유하며, 스쿠알란에 대한 포화 유사체도 포함할 수 있다. 스쿠알렌 또는 스쿠알란을 포함하는 어류 오일의 경우, 시중의 공급원으로부터 용이하게 이용 가능하거나 또는 당업계에 공지된 방법으로 획득될 수 있다.

[143] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 동물성 유래 오일은 라드, 수지(tallow) 오일, 또는 우지 등을 포함하는 것일 수 있다.

[144] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식물성 유래 오일은 견과, 종자, 또는 곡물등으로부터 유래된 오일일 수 있으며, 예를 들어, 땅콩 오일, 대두 오일,

코코넛 오일, 또는 올리브 오일 등을 포함할 수 있다.

- [145] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 토코페롤은 비타민 E가 함유된 토코페롤일 수 있다. 다양한 토코페롤이 존재하지만(α , β , γ , δ , ϵ 또는 ξ), 일반적으로 α -토코페롤이 사용될 수 있으며, 예를 들어, DL- α -토코페롤이 사용될 수 있다.
- [146] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유동성 오일을 상기 다중도메인캡슐에 도입함으로써, 상기 면역조절물질을 용이하게 가용화할 수 있으며, 상기 다중도메인캡슐의 구조적 안정성을 강화할 수 있다. 예를 들어, 상기 유동성 오일로서 스쿠알렌 및 올레인산을 이용할 경우, 친유성 또는 난용성 면역조절물질을 용이하게 가용화할 수 있으며, 스쿠알렌 및 올레인산 자체의 면역활성화효과에 의하여 상기 면역조절 물질과의 시너지 효과를 나타낼 수 있고, 상기 다중도메인캡슐의 구조적 안정성을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [147] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 지용성 및 수용성 면역활성물질은 스트레스를 받은 암세포에서 발현되는 면역조절 물질, 예를 들어 열-충격 단백질(heat-shock protein)일 수 있으며, 또는 T 세포의 활성화를 유도하는 물질일 수 있다.
- [148] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 지용성 및 수용성 면역활성 물질은 톨-유사 수용체 아고니스트(toll-like receptor agonist), 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라마좀 인두서(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD ligand), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [149] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 직접적 리간드로서 또는 간접적 리간드로서, 내인성 또는 외인성 리간드의 생성을 통해 TLR 신호전달 경로를 통한 신호전달 반응을 야기시킬 수 있는 성분을 의미하는 것일 수 있다.
- [150] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 천연 톨-유사 수용체 아고니스트 또는 합성 톨-유사 수용체 아고니스트일 수 있다.
- [151] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 TLR-1을 통해 신호전달 반응을 야기시킬 수 있는 것일 수 있으며, 예를 들어, 트리-아실화된 지질펩티드(LP); 페놀-가용성 모듈린(modulin); 코박테리움튜베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis) 지질펩티드; S-(2,3-비스(팔미토일옥시)-(2-RS)-프로필)-N-팔미토일-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH; 보렐리아 부르그도르페이(Borrelia burgdorferi)로부터의 박테리아 지질펩티드; OspA 지질펩티드의 아세틸화된 아미노 말단을 모방하는 트리히드로클로라이드(Pam3Cys) 지질펩티드; 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에

- 제한되지 않을 수 있다.
- [152] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨-유사 수용체 아고니스트는 TLR-2 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, Pam3Cys-Lip을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [153] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-3 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 폴리아이시 계열로서 Poly(I:C), Poly(ICLC), Poly(IC12U), ampligen 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [154] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-4 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 시겔라 플렉시네리(*Shigella flexineri*) 외막 단백질 제조물, AGP, CRX-527, MPLA, PHAD, 3D-PHAD, GLA, 및 이들의 조합들로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [155] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-5 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 플라젤린(flagellin) 또는 이의 단편을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [156] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-7 아고니스트 또는 TLR-8 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 이미퀴모드, R837, 레스퀴모드, 또는 R848와 같은 이미다조퀴놀린 분자; VTX-2337; CRX642; 인지질 기 또는 포스포노지질 기에 공유적으로 결합된 이미다조퀴놀린; 및 이들의 조합들로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [157] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 톨 유사 아고니스트는 TLR-9 아고니스트를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 면역 자극성 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [158] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역 자극성 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 CpG 모티프를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [159] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 사포닌은 QS21, QuilA, QS7, QS17, β -에스킨, 디지토닌 및 이들의 조합들로 이루어진 균으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [160] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항바이러스성 펩티드는 케이엘케이(KLK)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [161] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 인플러머좀 인두서는 TDB(trehalose-6,6-dibehenate)일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [162] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 NOD 리간드는 M-TriLYS(NOD2 아고니스트-합성 무라밀 트리펩티드) 또는 NOD2 아고니스트(N-glycolylated muramyl dipeptide)일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [163] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 CDS 리간드는 Poly(dA:dT)일 수 있으나,

- 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [164] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 STING 리간드는 cGAMP, di-AMP, 또는 di-GMP 일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [165] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역조절 물질은 하나 또는 둘 이상의 톨-유사 수용체 아고니스트의 조합을 포함할 수 있으며, 예를 들어, CL401(듀얼 TLR2 및 TLR7 아고니스트) 또는 CL429(듀얼 TLR2 및 NOD2 아고니스트)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [166] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 다중도메인캡슐에 포함되는 면역조절물질은, 예를 들어, Pam3Cys-Lip, 폴리아이시, CRX-527, MPLA, 플라젤린, 이미퀴모드, 레스퀴모드, CpG, QS21, M-TriLys(MurNAc-Ala-D-isoGln-Lys), TDB(trehalose-6,6-dibehenate), 8837, Poly(dA:dT), cGAMP, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [167] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 지용성 면역조절 물질은, 예를 들어, 양이온성 지질, MPLA, AGP, CRX-527, PHAD, 3D-PHAD, GLA, 지질 펩타이드, Pam3Cys, Pam3Cys-Lip, DDA, 이미퀴모드(base form), 레스퀴모드 (base form), VTX-2337, CRX642, 사포닌(QS21), TDB, CL401, CL429, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것일 수 있다.
- [168] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 친수성 면역조절 물질은, 예를 들어, CpG, 이미퀴모드(HCl form), 레스퀴모드(HCl form), Poly(I:C), STING, 플라젤린(flagellin), 사포닌, KLK 펩타이드, NOD 아고니스트 펩타이드, Poly(dA:dT), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 친수성 물질은 말단기의 화학적 결합기를 통해서도 상기 다중도메인캡슐의 외벽에 컨쥬게이션될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [169] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 양이온성 지질에 의하여, 음이온성인 세포막과의 정전기적 인력이 유도되어, 상기 면역조절 물질의 세포 내 전달 효율이 더 향상될 수 있다.
- [170] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 양이온성 지질을 포함하여 다중도메인캡슐을 구성함으로써, 음이온성 및/또는 음전하를 띠는 다양한 면역조절 물질 및 DNA, RNA와 같은 바이오소제가 상기 다중도메인캡슐에 효과적으로 로딩될 수 있다. 예를 들어, 음이온성 또는 음전하를 띠는 바이오소제 및/또는 DNA, RNA 아미노산 기반의 면역조절 물질은, 양이온 특성을 나타내는 상기 다중도메인캡슐의 외벽 또는 내부 리포솜의 멤브레인에 정전기적 결합을 통하여 로딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [171] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 양이온성 지질은 DC-콜레스테롤 (3β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbonyl]cholesterol hydrochloride), DDA (dimethyldioctadecylammonium), DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane), DOTMA

(1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane), EPC
 (1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine), MVL5
 (N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino]butylcarboxamid
 o)ethyl]-3,4-di[oleyloxy]-benzamide), DODAP
 (lipids1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane), 및 이들의 조합들로 이루어진
 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수
 있다.

- [172] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 계면활성제가 다중도메인캡슐의 외부에
 코팅되어 상기 다중도메인캡슐이 수용액 내에서 안정되게 분산될 수 있도록
 하는 것을 특징으로 한다.
- [173] 상기 계면활성제는 상기 다중도메인캡슐의 외부에 코팅되어 상기
 다중도메인캡슐이 수용액 내에 분산될 수 있도록 하는 것으로, 예를 들어,
 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제(일반적으로 Tween 라고 불림),
 특히 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80; 에틸렌 옥사이드(EO), 프로필렌
 옥사이드(PO), 및/또는 부틸렌 옥사이드(BO)의 코폴리머; 옥토시놀(예를 들면,
 트리톤 X-100, 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올);
 (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올 (IGEPAL CA-630/NP-40); 포스포리피드 (인지질
 성분)로서, 포스파티딜콜린(레시틴) 포스파티딜에탄올아닐린, 포스파티딜세린,
 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딘산, 스펅고미엘린 및
 카디올리핀; Tergitol™ NP 시리즈와 같은 노닐페놀 에톡실레이트;
 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르 (Brij 30)과 같은 라우릴, 세틸 및 오레일
 알코올(Brij 계면활성제로 알려진)로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 패티 에테르;
 및 소르비탄 트리올레이트 (Span85) 및 소르비탄 모노라우레이트와 같은
 소르비탄 에스테르 (일반적으로 SPAN로 알려짐)를 단독으로 사용하거나, 2종
 이상의 계면활성제를 조합하여 함께 사용할 수 있다.
- [174] 예를 들어, 상기 계면활성제는 이들 계면활성제의 혼합물, 예를 들면 Tween
 80/Span 85 혼합물이 이용될 수 있다. 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및
 옥토시놀의 조합이 또한 사용될 수 있다. 다른 유용한 조합은 라우레스 9,
 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및/또는 옥토시놀을 포함할 수 있다. 상기
 계면활성제는 전체 상기 다중도메인캡슐 총 중량에 대하여 0.001 내지 20%의
 중량으로 사용될 수 있으며, 예를 들어, 0.01 내지 1%, 0.001 내지 0.1%, 0.005 내지
 0.02%; 0.1 내지 20%, 0.1 내지 10%, 0.1 내지 1% 또는 약 0.5%의 중량으로 사용될
 수 있다.
- [175]
- [176] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜,
 및 상기 둘 이상의 리포솜을 둘러싸는 다중도메인캡슐 외벽을 포함하는
 다중도메인캡슐로서, 상기 다중도메인캡슐은 유기상과 수용액상으로
 이루어지고, 상기 유기상은 제1면역조절물질 및 유동성 오일을 포함하며, 상기

유기상은 상기 리포솜의 멤브레인, 및 상기 다중도메인캡슐 외벽을 형성하고, 상기 수용액상은 제2면역조절물질을 포함하며, 상기 수용액상은 상기 리포솜 멤브레인의 내부 수용액상 및 리포솜 멤브레인의 외부 수용액상이며, 상기 제1면역조절물질, 및 제2면역조절물질은 면역억제인자 제어물질이고, 상기 유동성 오일은 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜의 구조 안정성을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐이 제공될 수 있다.

[177] 상기 제1면역조절물질, 및 제2면역조절물질은 상술한 면역활성물질을 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 제1면역조절물질, 및 제2면역조절물질은 면역활성물질과 함께 면역억제인자 제어물질을 포함할 수 있다.

[178] 그리고, 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 다중도메인캡슐 및 항원을 포함하는, 면역조절 물질이 제공될 수 있다.

[179] 또한, 제1면역조절물질 및 유동성 오일을 용매에 용해하여 오일상 용액을 제조하는 단계; 제2면역조절물질을 포함하는 제1수용액 상을 상기 오일상 용액에 분산시켜 유중-수(W/O) 에멀전을 제조하는 단계; 및 상기 유중-수에멀전을 제2수용액과 혼합하고, 상기 용매를 증발시키는 단계; 를 포함하고, 상기 제1면역조절물질, 및 제2면역조절물질은 면역억제인자 제어물질인 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐의 제조방법이 제공될 수 있다.

[180] 본 발명에서 다중도메인캡슐기반 고힘압 미세환경 제어 조성물은 암의 미세환경을 조절하기 위한 새로운 형태의 면역조절 조성물로서, 앞서서 언급했던 생체 내 면역세포를 활성화 하는 물질 이외에, 고힘압 미세환경에서 나타나는 면역억제세포 및 면역억제물질의 기능을 제어할 수 있는 약물(면역억제인자 제어물질)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[181] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 면역억제인자 즉, 면역억제세포 및 면역억제물질의 기능을 제어할 수 있는 면역억제인자 제어물질을 기본성분으로 복수의 리포솜이 각각의 도메인을 형성하면서 서로 연결되고, 도입된 유동성 오일 성분에 의해 연결된 복수 리포솜의 구조적 안정성이 향상된 마이크로 크기의 캡슐 형태를 가지는 면역조절용 다중도메인캡슐을 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 다양한 약학적 조성물로서 사용되고 있는 단일 리포솜 소재의 낮은 봉입 효율 및 짧은 유효 지속 시간의 단점을 극복하고, 면역기능 조절효과의 유효 지속 시간을 늘릴 수 있는 새로운 다중도메인캡슐 기반의 항암면역치료제 조성물을 제조할 수 있다.

[182] 본 발명의 일 구현예에 따른 다중도메인캡슐은, 상기 캡슐의 외벽부터 안쪽 멤브레인으로서 서서히 붕괴가 일어나면서 상기 캡슐의 외벽 및 내부에 로딩된 면역억제세포 및 면역억제물질의 기능을 제어할 수 있는 면역억제인자 제어물질이 방출되므로, 면역기전 조절 물질의 유효 지속시간이 증가될 수 있다는 장점을 갖는다.

[183] 또한, 본 발명의 일 구현예에 따른 다중도메인캡슐은, 리포솜의 멤브레인 및/또는 상기 다중도메인캡슐의 외벽에 친유성 성질을 갖는 다양한

- 면역억제세포 및 면역억제물질의 기능을 제어할 수 있는 면역억제인자 제어물질을 로딩함으로써, 면역활성물질의 유효 지속시간을 증가시킬 수 있다.
- [184] 본 발명의 일 구현예에 따른 다중도메인 캡슐은, 리포솜의 내부에 친수성 성질을 갖는 다양한 면역억제세포 및 면역억제물질의 기능을 제어할 수 있는 면역억제인자 제어물질을 로딩함으로써, 면역억제인자 제어물질의 유효 지속시간을 증가시킬 수 있다.
- [185] 본 발명의 일 구현예에 따른 다중도메인캡슐은, 리포솜의 내부에 친수성 성질을 갖는 다양한 면역억제인자 제어물질, 리포솜의 멤브레인 및/또는 상기 캡슐의 외벽에 친유성 면역억제인자 제어물질을 동시에 로딩함으로써, 면역억제세포 및 면역억제물질의 기능을 제어할 수 있는 면역억제인자 제어물질의 유효 지속시간을 증가시킬 수 있다.
- [186] 본 발명의 한 예에서 MDSC(Myeloid-Derived SuppressorCell)의 기능을 제어할 수 있는 약물, 즉 면역억제인자 제어물질로는, Tadalafil, Sildenafil, L-AME, Nitrospirin, Celecoxib, NOHA, Bardoxolone methyl, D,L-1-methyl-tryptophan, 5-Fluorouracil, Gemcitabine, 17-DMAG, Peptide-Fc fusionproteins, ATRA, Vitamin A, Vitamin D3, Vitamin E, GR1 antibodies, Zoledronic acid, Sunitinib, Axitinib, Decetaxel, Sorafenib, CucurbitacinB, JSI-124, Anti IL-17 antibodies, Anti-glycan antibodies, Anti-VEGF antibodies, Bevacizumab, Antracycline, Tasquinimod, Imatinib, cyclophosphamide 이 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [187] 본 발명의 한 예에서, PI3K inhibitors는 PX-866, Wortmannin, PI-103, Pictilisib, GDC-0980, PF-04691502, BEZ235, XL765, XL147, BAY80-6946, GSK-2126458, Buparlisib, BYL719, AZD8186, GSK-2636771, CH5132799, INK-1117 등 인 것을 특징으로 한다.
- [188] 본 발명의 한 예에서 PI3Kdelta inhibitors 물질로는 AMG-319, Idelalisib, TRG-1202, INCB050465, IPI-145, Duvelisib, Acalisib, TG-1202, RV1729, RP-6530, GDC-0032 등 인 것을 특징으로 한다.
- [189] 본 발명의 한 예에서 PI3Kgamma inhibitors 물질로는 IPI-549, IPI-145 등 인 것을 특징으로 한다.
- [190] 본 발명의 한 예에서 Treg (Regulatory T cell)의 기능을 제어할 수 있는 약물, 즉 면역억제인자 제어물질로는 Anti-CD25 antibodies (daclizumab), Basiliximab, LMB-2, Denileukin diftitox(Ontak), Bivalent IL-2 fusiontoxin, Anti-TGF-beta antibodies, fresolimumab, TGF-betaR kinase inhibitors, LY2157299, Soluble TGF-betaR I/II, Ipilimumab, Tremelimumab, Pembrolizumab, Nivolumab, TIM-3 antibodies, LAG-3 antibodies, Anti-CD39 antibodies, Anti-73 antibodies, A(2A)R inhibitors, Celecoxib, Indomethacin, Diclofenac, Ibuprofen, TNFR2 antibodies, Anti-GITR antibodies, Bevacizumab, Anti-OX40(CD134) antibodies, soluble GITR ligand, Blockades for chemokine receptors (CCR4, 5, 6,10), cyclophosphamide, Sunitinib, Fludarabine, PI3K p110(delta) inhibitors, CliniMACs, Mogamulizumab,

Fingolimod, Regulators for miRNA (miR-155, miR-146a, miR-181a), 5-aza-2-deoxycytidine, paclitaxel, Imatinib, Sorafenib, Cyclosporin A, Tacrolimus, Dasatinib, Poly-G-oligonucleotide, TLR8 ligands, gemcitabine 및 5-fluorouracil 이 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [191] 본 발명의 한 예는 TAM (tumor associated macrophage) 의 기능을 조절할 수 있는 약물, 즉 면역억제인자 제어물질로는 Macrophage의 recruitment를 저해할 수 있는 약물로서, CCL2/CCR2 inhibitors (Yondeli, RS102895), M-CSF나 M-CSFR inhibitors (anti-M-CSF antibodies, JNJ-28312141, GW2580), chemoattractants (CCL5, CXCL-12, VEGF)와 그 수용체들에 대한 inhibitors, HIFs inhibitors 들인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [192] 또한, TAM의 생존을 억제할 수 있는 약물, 즉 면역억제인자 제어물질로서, Bisphosphonates, Clodronate, Dasatinib, anti-FRbeta antibodies, Shigella flexneri, Legumain과 CD1d의 발현을 유도할 수 있는 약물인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [193] 그리고, M1 macrophage의 특성을 향상시킬 수 있는 약물, 즉 면역억제인자 제어물질로서, NF-kB 아고니스트인 TLR아고니스트, Anti-CD40 antibodies, Thiazolidinediones, Tasquinimod, Anti-IL-10R antibodies, Anti-IL-10 antibodies, 올리고뉴클레오타이드(Anti-IL-10R Anti-IL-10), STAT1 아고니스트인 인터페론(interferon), M1 pathway를 유도할 수 있는 SHIP과 GM-CSF, IL-12, Thymosin alpha1 등인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [194] 또한, M2 macrophage 기반의 암세포 성장을 돕는 메커니즘을 저해할 수 있는 약물, 즉 면역억제인자 제어물질로는 STAT3 inhibitor인 sunitinib, sorafenib, WP1066, corosolic acid, oleanolic acid, STAT6 inhibitors들과 M2 pathway (c-Myc, PPAR-alpha/gamma, PI3K, KLF4, HIFs, Ets2, DcR3, mTOR) inhibitors와 HRG, CuNG,MDXAA, Silibinin, PPZ 인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [195] 그리고, 종양미세환경하에서 macrophage의 기능을 제어할 수 있는 타겟 miRNA는 miR-155, miR-511-3p, miR-26a)인 것을 특징으로 한다.
- [196] 그리고, 종양미세환경하에서 Macrophage를 타겟팅함으로써, 항암효능을 높일 수 있는 타겟 약물로는 Paclitaxel, Docetaxel, 5-Fluorouracil, Alendronate, Doxorubicin, Simvastatin, Hydrazinocurcumin, Amphotericin B, Ciprofloxacin, Rifabutin, Rifampicin, Efavirenz, Cisplatin, Theophylline, Pseudomonas exotoxin A, Zoledronic acid, Trabectedin, Siltuximab (Anti-IL-6 antibodies), Dasatinib, CpG-ODN, Interferon-alpha, beta, gamma, GM-CSF, IL-12, Thymosin alpha-1, Sunitinib,5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid, Silibinin, CCL2-CCR2 inhibitors (PF-04136309, Trabectedin, Carlumab), CSF1-CSF1R 신호전달 blocker (BLZ945, PLX3397, Emactuzumab(RG7155), AMG-820, IMC-CS4, GW3580, PLX6134)와 톨유사수용체7의 리간드(imiquimod, 852A), NF-kB inhibitors (N-acetyl-l-cystein, Vitamin C, bortezomib, aspirin, salicylates, Indolecarboxamide derivatives,

- quinazolineanalogues, Thalidomide, prostaglandin metabolites), HIF-1 inhibitors (2ME2, 17-AAG, Camptothecin, Topotecan, Pleurotin, 1-methylpropyl, 2-imidazolyl disulphide, YC-1), CXCR4 아고니스트(AMD3100, AMD1498), ALX40-4C, T22, T140, CGP64222, KRH-1636)인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [197] 본 발명의 한 예는 면역억제환경인자 억제인자 (Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibitors, Nitro aspirin, Cyclooxygenase-2(COX2) inhibitors, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors, Phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors, Anti-Interleukin 10 (IL-10)) 약물을 함유하는 다중도메인 캡슐기반 조성물을 제공할 수 있다.
- [198] 본 발명의 한 예에서 TGF-beta inhibitor 는 SB-505124, LY-364974 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [199] 본 발명의 한 예에서 Nitro aspirin은 NCX 4040 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [200] 본 발명의 한 예에서 COX-2 inhibitor 는 Celecoxib 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [201] 본 발명의 한 예에서 IDO inhibitor 는 Indoximod, NLG919 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [202] 본 발명의 한 예에서 PDE-5 inhibitor 는 Tadalafil (Cialis) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [203] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 다중도메인 캡슐이 함유하는 고행암 미세환경 면역억제인자 제어물질은 위의 약물이 2개 이상의 조합들로 이루어질 수 있다.
- [204] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 체내에 존재하는 암세포를 찾아 직접 사멸시키는 치료능을 갖고 있는 자연살해세포 및 T 세포가 체내에서 효과적으로 생존하며, 치료효능을 향상시킬 수 있는 다중도메인캡슐을 포함하는 면역조절 물질일 수 있다.
- [205] 본 발명의 한 예는 고행암 미세환경에서 직접 결합을 통한 T 세포 활성화 방법으로 면역체크포인트(PD-1, PDL-1 CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CEACAM1)의 억제 역할을 하는 항체들을 포함하는 다중도메인 캡슐기반 조성물을 제공할 수 있다.
- [206] 본 발명의 한 예에서 Anti-CTLA-4 antibody 는 Ipilimumab 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [207] 본 발명의 한 예에서 Anti-PD1-antibody 는 Nivolumab 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [208] 본 발명의 한 예에서 Anti-PDL1 antibody 는 Atezolizumab 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [209] 본 발명의 한 예에서 Anti-LAG-3 antibody 는 BMS-986016 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [210] 본 발명의 한 예에서 Anti-TIM-3 antibody 는 TSR-022 등을 포함하나, 이에

- 한정되지 않는다.
- [211] 본 발명의 한 예에서 Anti-CEACAM1 antibody 는 CM-24 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [212] 본 발명의 한 예는 고형암 미세환경에서 직접 결합을 통한 T 세포 활성화 방법으로 보조활성인자 (OX40, CD137, CD27, CD40) 등을 포함하는 다중도메인 캡슐기반 조성물을 제공한다.
- [213] 본 발명의 한 예에서 Anti-OX40는 RG7888 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [214] 본 발명의 한 예에서 Anti-CD137은 Urelumab 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [215] 본 발명의 한 예에서 Anti-CD27은 Varlilumab 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [216] 본 발명의 한 예에서 Anti-CD40은 BMS-986090 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [217] 본 발명의 한 예는 고형암 미세환경에서 간접 결합을 통한 T 세포 활성화 방법으로 면역억제 유발인자(Treg, MDSC, TAM, IDO, PD-L1) 들을 억제할 수 있는 약물을 함유하는 다중도메인 캡슐기반 조성물을 제공한다.
- [218] 본 발명의 한 예는 화학요법을 통한 면역학적 세포 사멸(immunogenic cell death) 유도를 통해 면역세포의 효능을 증가시키는 항암제를 포함하는 다중도메인 캡슐기반 조성물을 제공할 수 있다.
- [219] 본 발명의 한 예는 에피제네틱 기전(epigenetic machinery)을 통하여 암 세포를 사멸하거나, 종양미세환경을 제어할 수 있는 약물을 포함하는 다중도메인 캡슐기반 조성물을 제공한다.
- [220] 본 발명에서 에피제네틱 기전의 한 예로 디엔에이 메틸트랜스페라아제 인히비터 (DNMTi) 물질로는 5-Azacytidine, 5-Aza-2-deoxycytidine, Decitabine, SGI-110, Zebularine, CP-4200, Cladribine, Fludarabine, Clofarabine, Procainamide, Procaine, Hydralazine, Disulfiram, RG108, Nanaomycin A, Genistein, Equol, Curcumin, EGCG, Resveratrol, Parthenolide 등에서 선택되는 것을 특징으로 하나, 이에 한정되지 않는다.
- [221] 본 발명에서 에피제네틱 기전의 한 예로, 히스톤 디아세틸레이즈 인히비터 (HDACi) 물질로는 Vorinostat, Abexinostat, Suberoylanilide, Hydroxamic acid, Belinostat, Panobinostat, Romidepsin, Valproic acid, Entinostat, Givinostat, Resminostat, Quisinostat, Pracinostat, Dacinostat, Pyroxamide, CHR-3996, CBHA, Trichostatin A, Oxamflatin, MC1568, Tubacin, PCI-30451, Tacedinaline, Mocetinostat, Chidamide, BML-210, M344, Butyrate, Sodium butyrate, Trapoxin A, Apicidin, Nicotinamide, Splitomicin, EX-527, Dihydrocoumarin, Tenovin-D3, AGK2, AEM1, AEM2, Cambinol, Sirtinol, Salermide, Tenovin-6, TMP-269, Psammaplin A, Nexturastat A, RGFP966 등에서 선택되는 것을 특징으로 하나, 이에 한정되지

않는다.

[222] 이하, 본 발명의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시하는 것 일뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[223]

[224] **실시예 1. 면역조절물질을 포함하는 다중도메인캡슐 제조 및 특성화**

[225] 본 발명의 실시예에서는 다중도메인캡슐을 다음과 같이 제조하였다.

[226]

[227] **1-1. 스쿠알렌 기반의 다중도메인캡슐(imMDV(SQ)) 제조 및 특성화**

[228] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤

트리올레이트(glycerol trioleate, 12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 다이클로로메탄 용액에 분산시켰다. 감압 증류기를 사용하여 상기 다이클로로메탄을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다. 또한, 스쿠알렌을 포함하지 않는 것을 제외하고는 상기 실시예와 동일한 방법으로 대조군을 함께 제조하였다.

[229] 상기와 같이 다중도메인캡슐의 구조를 광학 현미경과 DLS(dynamic light scattering, 오즈카)를 이용하여 관찰한 결과, 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인캡슐이 스쿠알렌을 포함하지 않는 대조군에 비하여 크기가 균일하였으며, 분산상과의 계면에서도 뚜렷한 경계를 보였다[도 2의 (a) 및 (b)]. 이에 비하여 스쿠알렌을 포함하지 않는 대조군에서는 불균일한 크기와 모양을 유지하는 것을 알 수 있었다[도 2의 (c) 및 (d)].

[230] 또한, 도 3의 (a) 내지 (c)는, 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인캡슐의 광학 현미경 이미지이며, 도 3의 (d) 내지 (f)는, 스쿠알렌을 포함하지 않는 다중도메인캡슐의 광학 현미경 이미지이다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 오일상 용액에 로다민 형광 염료를 가용함으로써, 다중도메인캡슐 구조를 뚜렷하게 관찰할 수 있었으며, 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인캡슐의 경우가 뚜렷한 경계점을 보이며, 수용액 상에 분산되어 있음을 알 수 있었다.

[231] 제조 후 안정성 분석을 위하여, 불순물을 제거하는 과정이나 또는 다중도메인캡슐을 크기별로 분류하기 위하여 원심분리(약 2500 rpm) 공정을 수행하였을 경우, 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인캡슐의 구조[도 4의 (a) 및 (c)]는 원심분리 전후에 형상이 거의 변하지 않고, 안정한 구조를 이루고 있으나, 스쿠알렌을 포함하지 않는 대조군에서는 대부분의 구조가 파괴된다는 것을

확인할 수 있었다[도 4의 (b) 및 (d)].

[232]

[233] 1-2. 스쿠알렌 기반의 MPLA를 포함하는

다중도메인캡슐(imMDV-1:imMDV(MPLA)) 제조 및 특성화

[234] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), MPLA[monophosphoryl lipid A, 10 mg, 아반티 폴라 리피드(Avanti Polar Lipids), 미국], 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(glycerol trioleate, 12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose)1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 다이클로로메탄 용액에 분산시켰다. 감압 증류기를 사용하여 상기 다이클로로메탄을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다. 도 5는 스쿠알렌 기반의 MPLA를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-1:imMDV(MPLA))의 광학 현미경 이미지이다.

[235]

[236] 제조된 다중도메인캡슐의 면역세포 활성화 효과 평가

[237] 실시예 1-1과 1-2에서 제조된 imMDV(SQ)와 imMDV(MPLA) 샘플이 골수유래수지상세포 (Bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)와 골수유래대식세포 (Bone marrow-derived macrophage, BMMCs) 활성화에 미치는 영향을 전구염증 사이토카인 (TNF- α , IL-6, IL-12)의 분비량을 이엘라이에스에이(ELISA) 실험방법을 이용하여 분석하였다.

[238] 도 6에서 imMDV(SQ)를 처리 하였을 경우, TNF- α 와 IL-6의 분비가 처리해준 농도에 비례하여 증가되는 것으로 확인하였고, 또한 도 7에서 imMDV(MPLA)를 처리 하였을 경우에도 TNF- α , IL-6, IL-12의 분비가 처리해준 다중도메인캡슐의 농도에 비례하여 증가됨을 확인 할 수가 있었다.

[239]

[240] 스쿠알렌 기반의 항원(오브알부민)을 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV) 제조 및 방출거동 특성화

[241] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(glycerol trioleate, 12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 오브알부민(5mg, 시그마알드리치, 미국)을 포함하는 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose)1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을

다이클로로메탄 용액에 분산시켰다. 감압 증류기를 사용하여 상기 다이클로로메탄을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다. 또한, 스쿠알렌을 포함하지 않는 것을 제외하고는 상기 실시예와 동일한 방법으로 대조군을 함께 제조하였다.

- [242] 오브알부민 항원과 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV(SQ-OVA))과 오브알부민 항원만을 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV(OVA))의 방출거동을 확인한 결과, 스쿠알렌이 포함된 다중도메인캡슐에서 오브알부민 항원의 방출거동이 지연되어 서서히 방출됨을 확인할 수 있었다 [도 8].

[243]

[244] **1-3. 스쿠알렌 기반의 DDA를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-2) 제조**

- [245] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), DDA(10 mg, 아반티 폴라 리피드(Avanti Polar Lipids), 미국), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 그 후, 원심분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[246]

[247] **1-4. 스쿠알렌 기반의 MPLA/TDB를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-3) 제조**

- [248] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), MPLA(10 mg), 스쿠알렌(12 mg), TDB(10 mg, 아반티 폴라 리피드(Avanti Polar Lipids), 미국), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[249]

[250] **1-5. 스쿠알렌 기반의 MPLA/DDA를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-4) 제조**

[251] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), MPLA(10 mg), DDA(10 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[252]

[253] **1-6. 스쿠알렌 기반의 MPLA/QS21을 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-5) 제조**

[254] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), MPLA(10 mg), QS21(10 mg, Desert King, 미국), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[255]

[256] **1-7. 스쿠알렌 기반의 CpG를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-6) 제조**

[257] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose, CpG 1 mg, Bioneer, 대한민국) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[258]

- [259] **1-8. 스쿠알렌 기반의 Poly(I:C)를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-7) 제조**
- [260] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose, Poly(I:C)(Sigma-Aldrich, 미국) 1 mg] 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.
- [261]
- [262] **1-9. 스쿠알렌 기반의 레스퀴모드를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-8) 제조**
- [263] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose, 레스퀴모드(Sigma-Aldrich, 미국) 5 mg) 1 mL 에 호모지나이저(homogenizer, 20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.
- [264]
- [265] **1-10. 스쿠알렌 기반의 이미퀴모드를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-9) 제조 및 면역반응 유도효과 확인**
- [266] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 올레산(2 mg, Sigma-Aldrich, 미국), 이미퀴모드 (base form, Sigma-Aldrich, 미국)(5 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다. 수용액에 용해되는 HCl 형태의 이미퀴모드는 base 형태의

이미퀴모드를 다음과 같은 과정을 통하여 제조하였다. 이미퀴모드 400g을 증류수 2000ml와 n-butanol(혹은 1-butanol) 900ml 혼합용액에 녹인다. Stirring 해주면서 동시에 37% HCl solution 150ml를 추가로 넣어준다. 이 용액을 60~65도 범위에서 imiquimod가 전부 녹을때까지 교반한 후에, imiquimod가 전부 녹으면 20~25도로 cooling down시킨 후 30분 가량 유지한다. 남은용액을 상온의 건조기에서 건조시키면 HCl Imiquimod 을 얻을 수 있다. 이렇게 제조된 HCl-imiquimod는 위의 imMDV 제조과정에서 내부 수용액상에 용해한 후에, 동일 과정을 거쳐서 제조 하였다. 도 9는 HCl 형태의 이미퀴모드와 base 형태의 이미퀴모드, 및 두가지 형태의 이미퀴모드가 동시에 로딩된 다중도메인캡슐의 광학현미경 이미지를 나타낸다. 수득된 다중도메인캡슐 중에서 (imMDV(R837-HCl))에서, 이미퀴모드의 방출 거동을 트랜스웰(transwell)을 이용하여, 37°C에서 분석하였다. 방출되는 약물의 양은 분광계(UV-Vis spectrometer)를 이용하여 정량화 하였다(도 10). 도 10 에 나타낸 바와 같이, 8 일 동안 로딩된 약물의 약 70%가 방출되었다. 또한, imMDV(R837-HCl) 샘플을 골수유래수지상세포 (Bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)에 처리했을 때, Th1 면역반응과 관련된 대표적인 전구염증 사이토카인 IL-6의 분비량을 이엘아이에스에이(ELISA) 실험방법을 이용하여 분석하였다. 도 11에서 보는 바와 같이 IL-6의 분비가 처리해준 농도에 비례하여 증가되는 것으로 확인하였고, 대조군으로 사용된 R837-HCl과 유사한 거동을 보임을 확인함으로써, 다중도메인캡슐내에 봉입된 R837-HCl이 방출되어 면역세포를 활성화 시킴을 알 수 있다.

- [267] 상기 실시예에서 제조된 이미퀴모드를 포함하는 다중도메인캡슐 [imMDV(R837-HCl), imMDV(R837-base), imMDV[R837-HCl:R837-base]의 오브알부민 모델항원에 대한 항체형성 효과를, 마우스 실험(C57BL/6, 6 내지 7 주령 암컷)을 통해 검증하였다. 마우스에게 다중도메인캡슐을 50 μ g를 주입함에 따라 체액성 면역 반응이 증가하는 것을 ELISA(Enzyme linked Immunosorbent assay)법으로 측정하였다.
- [268] 도 12a, 12b, 및 12c에서 알 수 있듯이, OVA(ovalbumin) 모델 항원에 대한 체액성 면역 효과(IgG, 1 week after injection)가 이미퀴모드가 로딩된 다중도메인캡슐 샘플(12a:imMDV(R837-HCl) sample, 12b: imMDV(R837-base) sample, 12c: imMDV[R837-HCl:R837-base (1:1) sample])을 투여한 실험군에서 현저하게 증가함을 확인할 수 있다. 또한 이렇게 증가된 체액성 면역효과는 주입 후 3주(도 13a, 13b 및 13c)과 5주(도 14a, 14b 및 14c)가 지났을 때도, 지속됨을 확인할 수 있다.
- [269] 체액성 면역증강효과는 첫번째 주입 후 5주가 지난 시점에서 추가적으로 1회 boosting을 해 주었을 때, 현저하게 증가됨을 알 수 있다(도 15a, 15b, 15c, 16, 17, 및 18). 이러한 증가된 체액성 면역효과는 5주차 boosting후에 1, 2, 6주차에도 지속적으로 유지됨을 확인할 수 있다(도 19, 20, 및 21). 이러한

다중도메인캡슐기반 아주번트에 의한 면역증강유도 및 지속성 효과를 임상단계에서 사용되고 있는 오일형태의 아주번트(DMSO(R837))와 비교하였을 경우에도, 매우 우수함을 확인할 수 있다(도 22). 무엇보다도, 오일형태의 아주번트(DMSO(R837))를 투여했을 때 발생하는 염증현상이 다중도메인캡슐기반 아주번트(imMDV(R837-HCl))를 사용했을 때는 전혀 발생하지 않는 점이 가장 큰 장점이다(도 23).

[270]

[271] **1-11. 스쿠알렌 기반의 STING (cyclic DNA)을 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-10) 제조**

[272] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose, STING (InvivoGen, 미국) 1 mg) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[273]

[274] **1-12. 스쿠알렌 기반의 MPLA/CpG를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-11) 제조**

[275] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), MPLA(10 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose, CpG 1 mg) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[276]

[277] **1-13. 스쿠알렌 기반의 MPLA와 Poly(I:C)를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-12) 제조**

[278] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), MPLA(10 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상[internal aqueous phase, 5% sucrose, Poly(I:C)

1 mg] 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[279]

[280] **1-14. 스쿠알렌 기반의 CpG/Poly(I:C)를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-13) 제조**

[281] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose, CpG 1 mg, Poly(I:C) 1 mg] 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[282]

[283] **1-15. 캐스터 오일 기반의 MPLA를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-14) 제조**

[284] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), MPLA(10 mg), 캐스터 오일(12 mg, Sigma-Aldrich, 미국), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[285]

[286] **1-16. 미네랄 오일 기반의 MPLA를 포함하는 다중도메인캡슐(imMDV-15) 제조**

[287] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), MPLA(10 mg), 미네랄 오일(12 mg, Sigma-Aldrich, 미국), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에

녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 리포솜을 수득하였다.

[288]

[289] 실시예 2. 바이러스 항원에 대한 다중도메인캡슐의 면역 향상 효능 평가

[290] 실시예 1에서 제조된 면역기능 조절 물질을 포함하는 다중도메인캡슐 샘플들의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 특이적 면역효과를 조사하기 위하여, 항체 특이적인 면역 반응 중, 특히 항체 생산과 관련이 있는 B 세포에 의한 체액성 면역 반응에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저, 암컷 BALB/c 및 C57BL/6 마우스(5-6주령)을 KOATECH(대한민국, 평택)에서 구입하였다. 마우스를 사용한 모든 실험은 실험실 연구 동물의 관리 및 사용에 대한 한국 NIH 지침에 따라 실시되었다.

[291] 첫 번째 근육 주사 2 주(도 24) 및 4 주(도 25) 후에 마우스 혈청을 채취하여, 혈청 중의 HA 단백질에 대한 항체 역가(titer)를 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)법으로 측정하였다. 상기 ELISA법은 HA 단백질이 코팅된 플레이트를 PBS/3% BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 블록킹 한 후, 대조 실험군 혈청을 다양한 일련의 희석율에서 인큐베이션하였다. 그 후, 호스래디쉬 퍼옥사이드(horseradish peroxidase)가 부착된 마우스 IgG 를 첨가하였다. 상기 모든 인큐베이션은 37°C에서 1 시간 동안 수행되었으며, 언급된 각각의 단계 후에는 PBS/0.05 % Tween 20을 사용하여 3 회씩 세척하였다. 기질로는 TMB(tetramethylbenzidine, BD biosciences, USA) 100 μ L를 첨가하여 반응을 전개시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 ELISA 판독기로 측정하고 그 결과를 도 24 및 도 25에 나타냈다.

[292]

[293] 실시예 3. 암 항원에 대한 다중도메인캡슐의 면역 향상 효능 평가

[294]

[295] 3-1: 다중도메인캡슐의 OVA 특이 항체 생성 확인

[296] 상기 실시예 1에서 제조된 면역기능 조절 물질을 포함하는 다중도메인캡슐의 암 예방 백신의 효과를, 마우스 실험(C57BL/6, 6 내지 7 주령 암컷)을 통해 검증하였다. 마우스에게 다중도메인캡슐을 포함하는 면역조절 물질(암 예방 백신)을 50 μ g를 주입함에 따라 체액성 면역 반응이 증가하는 것을 ELISA(Enzyme linked Immunosorbent assay)법으로 측정하고, 그 결과를 도 26에 나타냈다(IgG 생성량 측정). 체액성 면역 반응은 백신 접종이 끝난 후,

마우스에서 안과 채혈을 실시하여 면역 글로불린 IgG의 생성량을 대조군과 비교함으로써 확인하였다.

[297]

[298] **3-2: 다중도메인캡슐의 세포매개 특정 T 세포 반응 확인**

[299]

면역기능 조절 물질을 포함하는 다중도메인캡슐에 의한 마우스 비장 내 T 세포의 세포성 면역 반응을 조사하였다. 상기 실시예 3-1에서 접종된 마우스 중, OVA 및 OVA-다중도메인캡슐 그룹 중 3 마리의 마우스를 선택하여 2 주 후에 각각의 마우스에서 비장을 적출한 후, 멸균된 페트리디쉬에 상기 비장 조직을 옮기고, 셀 스트레이너(cell strainer)를 이용하여 상기 비장을 갈아 조직 피막으로부터 세포를 분리하였다. 상기 페트리디쉬 내의 모든 내용물을 50 mL 튜브에 옮기고 RPMI 배지로 가득 채운 후, 1,500 rpm에서 5 분간 원심분리한 후, 상층액을 제거한 펠렛에 적혈구 용출 버퍼(sigma Aldrich, Germany)를 5 mL 넣고 30°C 수조에서 5 분 내지 10 분간 방치하여, 적혈구를 용혈시켰다. 튜브에 포함된 세포를 PBS로 세척한 후, RPMI 배지에 부유시켜 비장세포(splenocyte)를 분리하였다. 분리된 비장세포를 IFN-gamma로 코팅된 플레이트에 5×10^5 cell/100 μ L로 96-웰에 깔고 MHC 클래스 I-제한 OVA 펩티드를 5 μ g/mL의 농도로 48 시간 동안 처리하였다. 그 후, 호스레디쉬 피육사이드가 부착된 IFN-gamma를 첨가하였다. 기질로는 ACE(3-amino-9-ethyl-carbazole, BD biosciences, USA) 100 μ L를 첨가하여 반응을 전개시킨 후, ELSPOT(enzyme-linked immunospot)법으로 측정하였다(도 27).

[300]

[301] **실시예 4. 고히압 미세환경 조절용 약물이 로딩된 다중도메인 캡슐 제조**

[302]

[303] **4-1. MDSC 세포 제거 물질을 함유하는 다중도메인 캡슐 제조**

[304]

DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose, 젬시타빈 (Gemcitabine: Gemzar® (Eli Lilly and Company, Indianapolis, Ind., USA)), 5mg) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 후, 상기 혼합 용액을 외부 수용액 상(external aqueous phase, 7.5% glucose, 40 mM lysine) 3 mL 에 10초간 보텍스(vortex) 해주었다. 최종적으로, 이 형성된 이중 에멀전을 감압 증류기를 사용하여 상기 클로로포름을 제거하고, 온도를 37°C로 상승시켜 잔여 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 다중도메인캡슐 분산액을 저온에서 침전시키거나, 원심 분리기로 가라앉혀 상등액을 제거하고 다중도메인캡슐(imMDV(SQ-Gem))을 수득하였다. 스쿠알렌 유동성 오일대신에 올레산 오일을 포함하면서 젬사타빈이 로딩된 다중도메인캡슐(imMDV(OA-Gem))과 스쿠알렌을 포함하지 않으면서 젬사타빈이 로딩된 다중도메인캡슐(imMDV(Gem))은 위의 과정과 동일한

과정을 통하여 제조될 수 있다. 도 28은 이렇게 제조된 세가지 시료의 광학현미경 이미지를 나타낸다. 스쿠알렌을 포함하는 다중도메인 캡슐에서는 로딩된 쯔시타빈이 서서히 방출되는 반면, 스쿠알렌을 포함하지 않은 다중도메인캡슐에서는 24시간내에 로딩된 대부분의 약물이 방출됨을 확인할 수 있다(도 29). 또한 스쿠알렌과 같은 동물성 오일 대신에 올레산 식물성 오일을 사용했을 경우, 로딩된 쯔시타빈의 서방형 방출거동이 24-72시간 동안에 플래투(plateau) 형상을 보이다가, 72시간 이후에 선형(linear) 거동을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이는 유동성 오일을 이용하여, 로딩된 약물의 방출거동을 조절할 수 있음을 의미한다(도 30).

[305]

[306] **4-2. 면역학적 세포 사멸(immunogenic cell death)을 유도하는 약물을 포함하는 다중도메인 캡슐 제조**

[307] 암세포의 사멸을 유도함으로써, 항원제시세포가 효과적으로 암항원을 인식할 수 있도록 하는 역할을 하는 항암제 중에서 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 메토틱렉세이트(methotrexate) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)을 선정하여, 이들 약물이 로딩된 다중도메인 캡슐을 제조하였다. 실시예 4-1 에서와 동일한 방법을 이용하여 제조하되, imMDV(paclitaxel)(도 31)은 파클리탁셀 약물을 오일상 용액에 첨가하여 사용하였으며, imMDV(doxorubicin)(도 32), imMDV(methotrexate)(도 33) 및 imMDV(oxaliplatin)(도 34)는 각각의 약물을 내부 수용액상에 첨가하여 다중도메인캡슐을 제조하였다. 도 31에서 알 수 있듯이, 로딩된 약물이 2주간에 걸쳐 서서히 방출됨을 확인할 수 있었다.

[308]

[309] **4-3. Treg 세포 제거 물질을 함유하는 다중도메인 캡슐 제조**

[310] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 MK-2206 (an Akt inhibitor, SelleckChem, 5mg)가 용해되어 있는 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose,(Imatinib: Gleevec® (NovartisPharmaceuticals Corp, East Hanover, NJ, USA)) 5mg) 1 mL 에 호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 이후 과정은 상기 실시 예 4-1과 동일한 과정을 거쳐서 다중도메인캡슐을 제조 하였다(도 35).

[311]

[312] **4-4. PI3K 신호전달을 제어할 수 있는 약물을 함유하는 다중도메인 캡슐 제조**

[313] DOPC(10 mg), 콜레스테롤(8 mg), 스쿠알렌(12 mg), 글리세롤 트리올레이트(12 mg)를 클로로포름(1 mL)에 녹여서 오일상 용액을 제조하였다. 제조된 오일상 용액을 PF-04691502(PI3K inhibitor, SelleckChem, 5mg)가 용해되어 있는 내부 수용액 상(internal aqueous phase, 5% sucrose,(Imatinib: Gleevec® (NovartisPharmaceuticals Corp, East Hanover, NJ, USA)) 5mg) 1 mL 에

호모지나이저(20,000 X g)를 사용하여 10 분간 분산시켰다. 그 이후 과정은 상기 실시 예 4-1과 동일한 과정을 거쳐서 다중도메인캡슐을 제조하였다 (도 36).

[314]

[315] **4-5. 에피제네틱 기전(epigenetic machinery)을 제어할 수 있는 약물을 포함하는 다중도메인 캡슐 제조**

[316] 에피제네틱 기전을 유도할 수 있는 약물 중에서 Azacytidine, Resminostat, Panobinostat 및 OTX015(iBET)을 선정하여, 이들 약물이 로딩된 다중도메인 캡슐을 제조하였다. 구체적으로, 실시예 4-1 에서와 동일한 방법을 이용하여 imMDV(Azacytidine)(도 37), imMDV(Resmonostat)(도 38), imMDV(Panobinostat)(도 39) 및 imMDV(OTX015(iBET))(도 40)는 각각의 약물을 내부 수용액상에 첨가하여 다중도메인캡슐을 제조하였다. 도 38, 39 에서 알 수 있듯이, 로딩된 약물이 2주간에 걸쳐 서서히 방출됨을 확인할 수 있었다.

[317]

[318] **4-6. TAM 세포 제거 물질을 함유하는 다중도메인 캡슐 제조**

[319] 실시예 4-1과 같은 공정을 사용하되, TAM 세포를 제거할 수 있는 약물인 BLZ945 (CSF-1R kinase inhibitor) 오일상에 용해한 후에, 다중도메인캡슐을 제조 하였다(도 41).

[320]

[321] **4-7. 중앙 면역억제 사이토카인 저해제(inhibitor)를 함유하는 다중도메인 캡슐 제조**

[322] 실시예 4-1 에서 중앙 면역억제 사이토카인 저해제 약물 (Celecoxib, Sigma-Aldrich) 5mg 을 오일상에 용해한 후에, 다중도메인캡슐을 제조 하였다(도 42).

[323]

[324] **실시예 5. 고히암 미세환경 면역조절물질이 조합된 다중도메인 캡슐 제조**

[325] 고히암 미세환경내 면역기능을 조절하는 물질이 조합된 다중도메인 캡슐 제조의 한 실시 예로 MDSC 및 암세포를 사멸할 수 있는 켐시타빈(실시예 4-1)과 면역세포 활성화 작용을 하는 톨유사 수용체인 이미퀴모드(실시예 1-9)를 동시에 함유하면서 안정한 구조를 갖는 다중도메인캡슐(imMDV(GEM/R837))을 제조하였다 (도 43).

[326] 또한, TAM 세포를 제거할 수 있는 약물인 BLZ945 (실시예 4-6)과 면역세포 활성화 작용을 하는 톨유사 수용체인 이미퀴모드(실시예 1-9)를 동시에 함유하면서 안정된 구조를 갖는 다중도메인캡슐(imMDV(BLZ945/R837))을 제조하였다(도 44).

[327]

[328] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 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. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

산업상 이용가능성

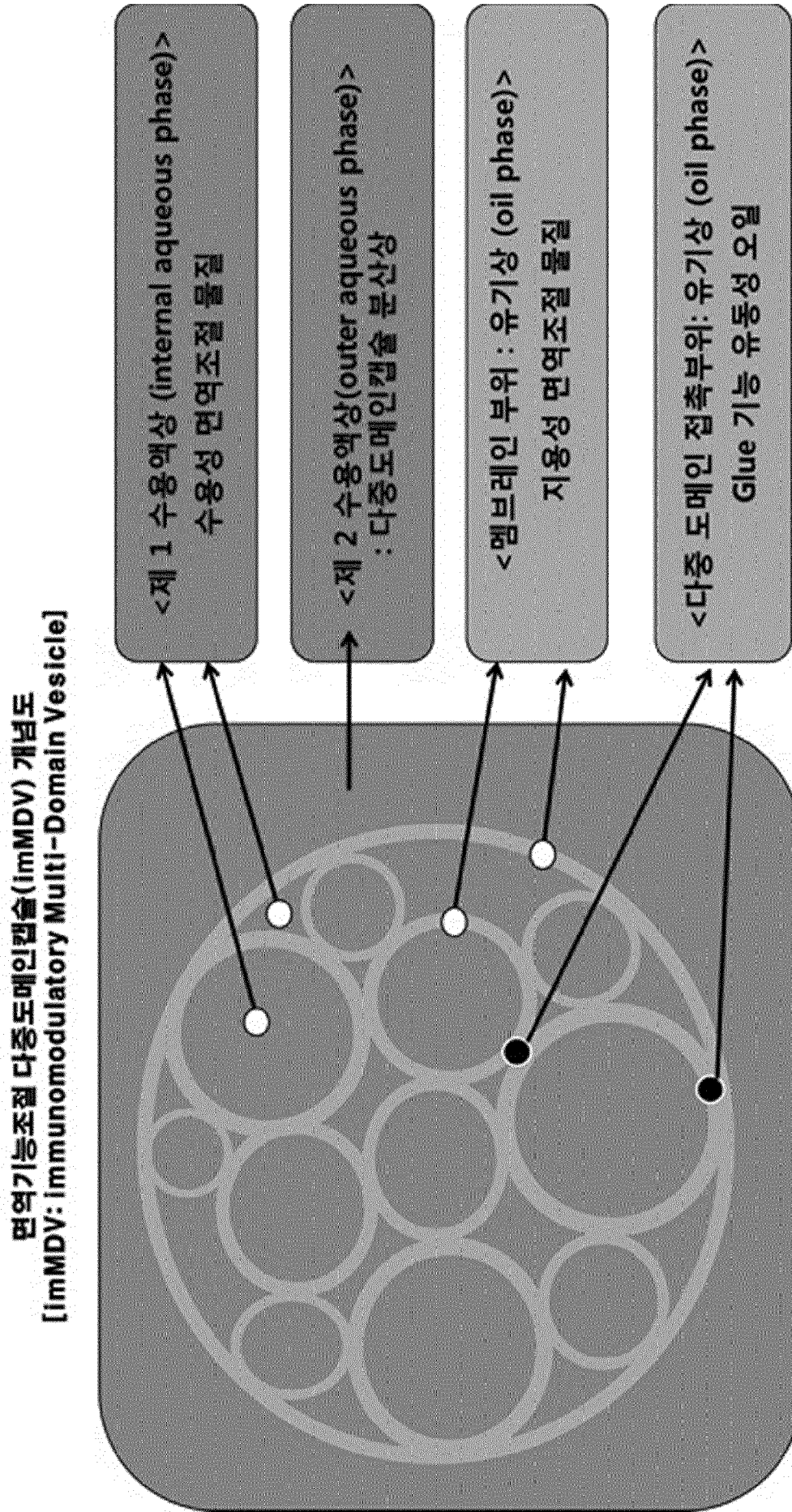
- [329] 본 발명에 따른 다중도메인캡슐은, 리포솜의 내부에 친수성 성질을 갖는 다양한 면역조절물질, 리포솜의 멤브레인 및/또는 상기 캡슐의 외벽에 친유성 면역조절화 물질을 동시에 로딩함으로써, 면역조절물질의 유효 지속시간을 증가시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 다중도메인 캡슐의 제조방법은, 스쿠알렌과 같은 유동성 오일을 도입함으로써, 다중도메인캡슐의 제조 과정에서의 안정성 및 저장 안정성을 향상시킬 수 있으며, 상기 유동성 오일의 도입으로 인하여, 일반적인 유기 용매에 녹지 않는 대표적인 난용성 면역조절 물질들을 용이하게 가용화할 수 있으며, 그에 따라 상기 다양한 난용성 면역조절 물질을 포함하는 다중도메인캡슐을 제조할 수 있다는 장점이 있다.

청구범위

- [청구항 1] 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜, 및 상기 둘 이상의 리포솜을 둘러싸는 다중도메인캡슐 외벽을 포함하는 다중도메인캡슐로서,
상기 다중도메인캡슐은 유기상과 수용액상으로 이루어지고,
상기 유기상은 제1면역조절물질 및 유동성 오일을 포함하며, 상기 유기상은 상기 리포솜의 멤브레인, 및 상기 다중도메인캡슐 외벽을 형성하고,
상기 수용액상은 제2면역조절물질을 포함하며, 상기 수용액상은 상기 리포솜 멤브레인의 내부 수용액상 및 리포솜 멤브레인의 외부 수용액상이며,
상기 제1면역조절물질은 지용성 면역활성물질이고, 상기 제2면역조절물질은 수용성 면역활성물질이며,
상기 유동성 오일은 서로 접촉하고 연결되어 있는 둘 이상의 리포솜의 구조 안정성을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 다중도메인캡슐의 크기는 1 μm 내지 100 μm 인 것인, 다중도메인캡슐.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 유동성 오일은 동물성 오일, 식물성 오일, 토코페롤, 미네랄 오일, 캐스터 오일, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함하는 것인, 다중도메인캡슐.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 동물성 오일은 스쿠알렌이고, 상기 식물성 오일은 올레인산인 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 지용성 및 수용성 면역활성물질은 항원제시세포, B 세포, 또는 T 세포의 활성화를 유도하는 물질을 포함하는 것인, 다중도메인캡슐.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 지용성 면역활성물질은 양이온성 지질, MPLA, AGP, CRX-527, PHAD, 3D-PHAD, GLA, 지질 펩타이드, Pam3Cys, Pam3Cys-Lip, 이미퀴모드(base form), 레스퀴모드 (base form), VTX-2337, CRX642, 사포닌(QS21), TDB, CL401, CL429, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인, 다중도메인캡슐.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 수용성 면역활성물질은 CpG, 이미퀴모드(HCl form), 레스퀴모드(HCl form), Poly(I:C), STING, 플라젤린(flagellin), 사포닌, KLK 펩타이드, NOD 아고니스트 펩타이드, Poly(dA:dT), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인, 다중도메인캡슐.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 DC-콜레스테롤, DDA, DOTAP, DOTMA, EPC, MVL5, DODAP, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터

- 선택되는 물질을 포함하는 것인, 다중도메인캡슐.
- [청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 다중도메인캡슐 및 항원을 포함하는, 면역조절 물질.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 항원은 단백질, 유전자, 세포, 바이러스, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 면역조절 물질.
- [청구항 11] 제1면역조절물질 및 유동성 오일을 용매에 용해하여 오일상 용액을 제조하는 단계;
제2면역조절물질을 포함하는 제1수용액 상을 상기 오일상 용액에 분산시켜 유중-수(W/O) 에멀전을 제조하는 단계; 및
상기 유중-수 에멀전을 제2수용액과 혼합하고, 상기 용매를 증발시키는 단계; 를 포함하고,
상기 제1면역조절물질은 지용성 면역활성물질이고, 상기 제2면역조절물질은 수용성 면역활성물질인 것을 특징으로 하는, 다중도메인캡슐의 제조방법.

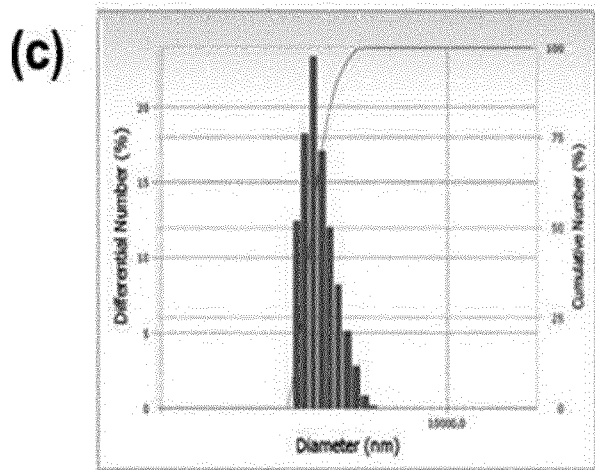
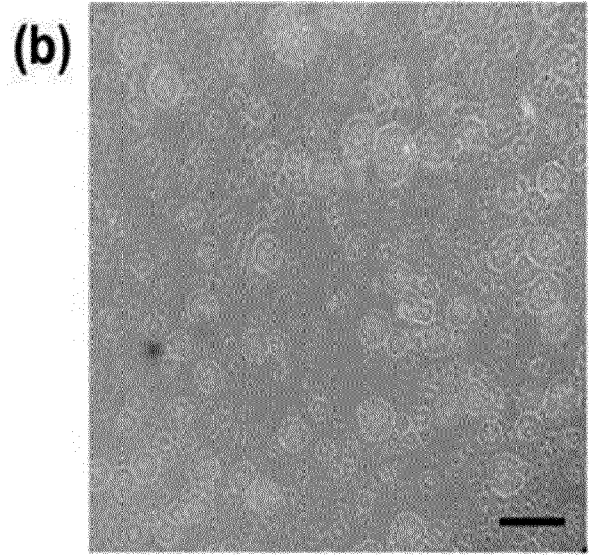
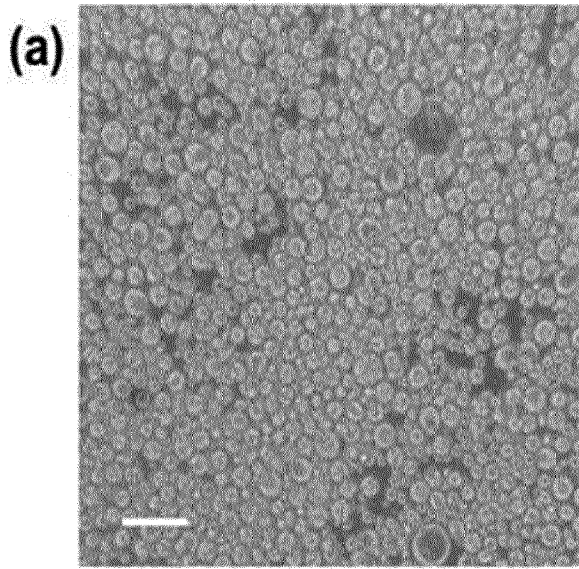
[도1]



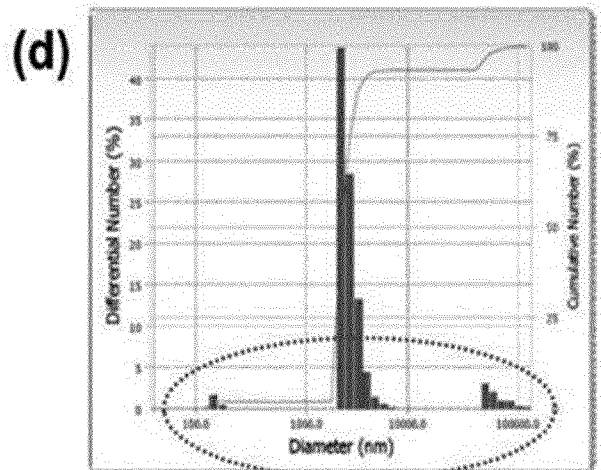
[도2]

With squalene

Without squalene

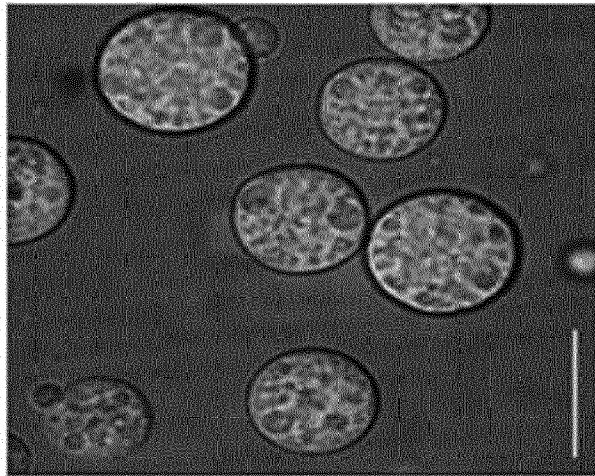


$4.18 \pm 0.48 \mu\text{m}$

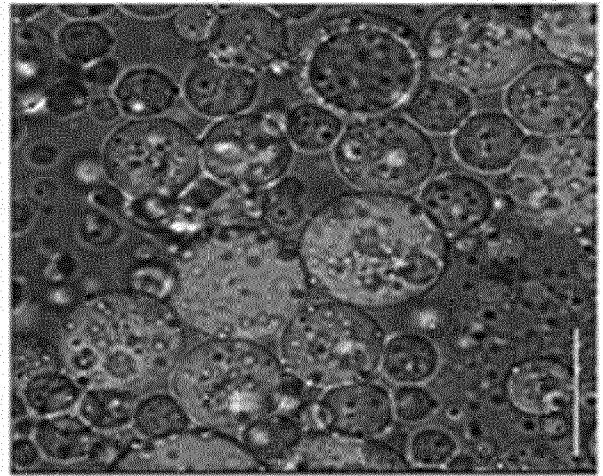


Broad size distribution

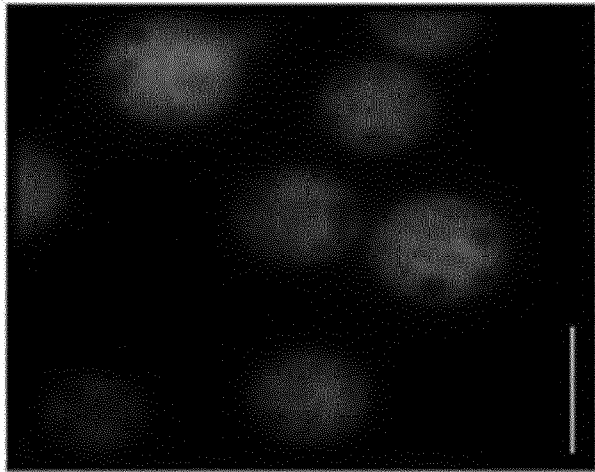
[도3]



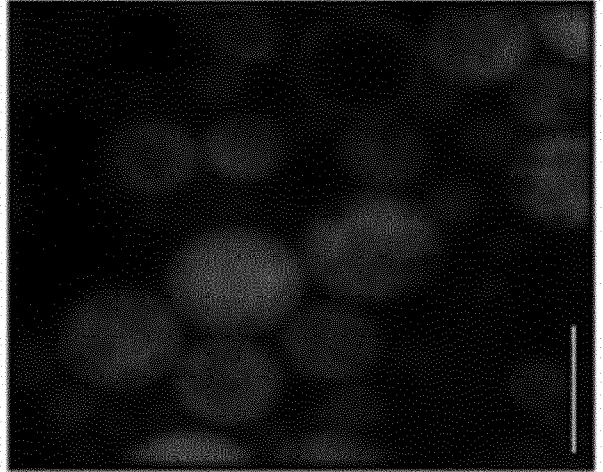
(c)



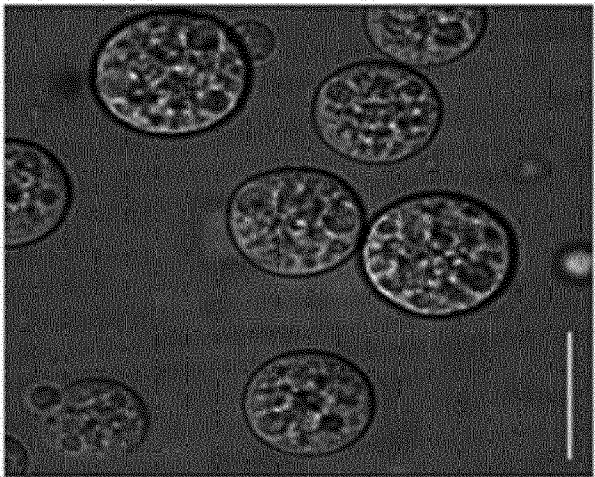
(f)



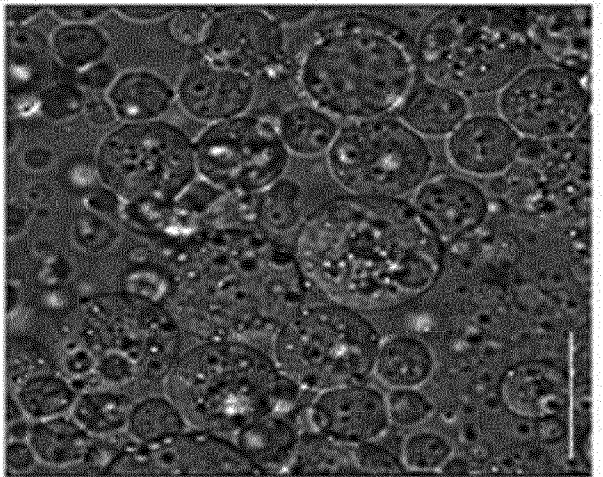
(b)



(e)

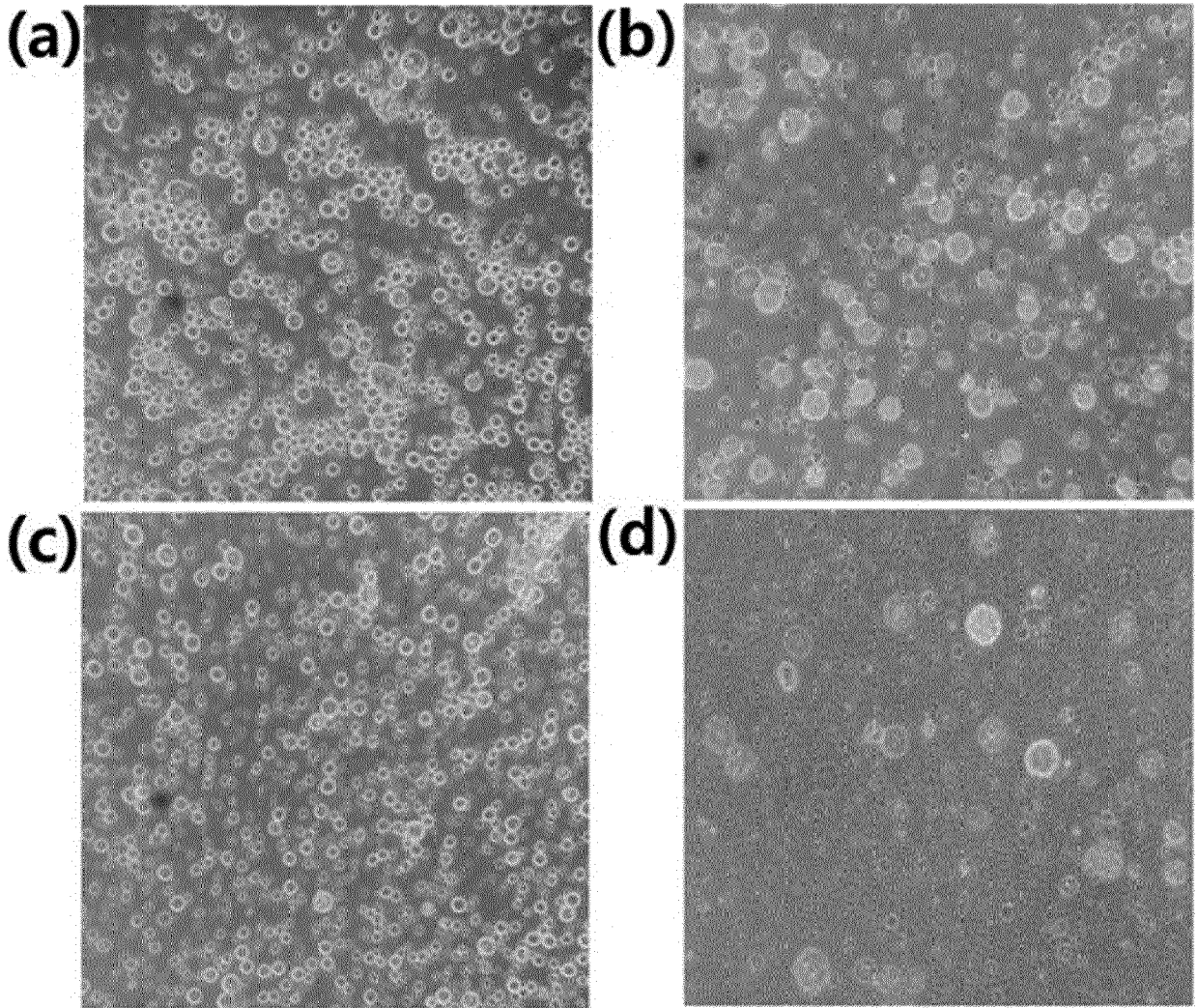


(a)



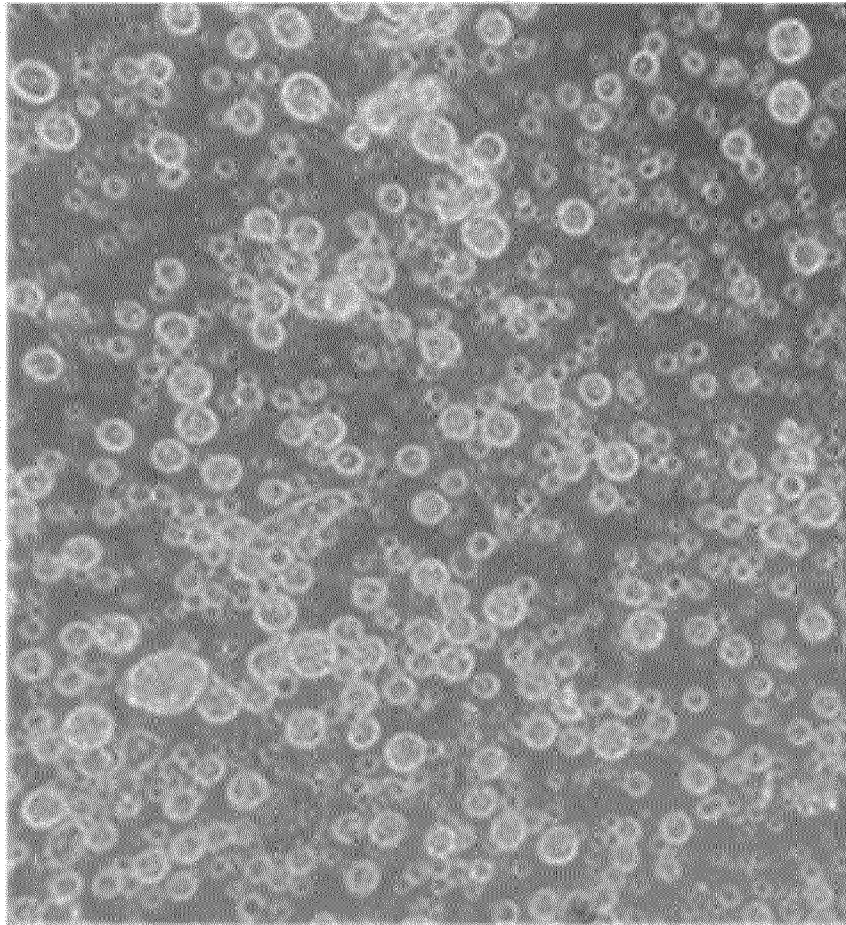
(d)

[도4]

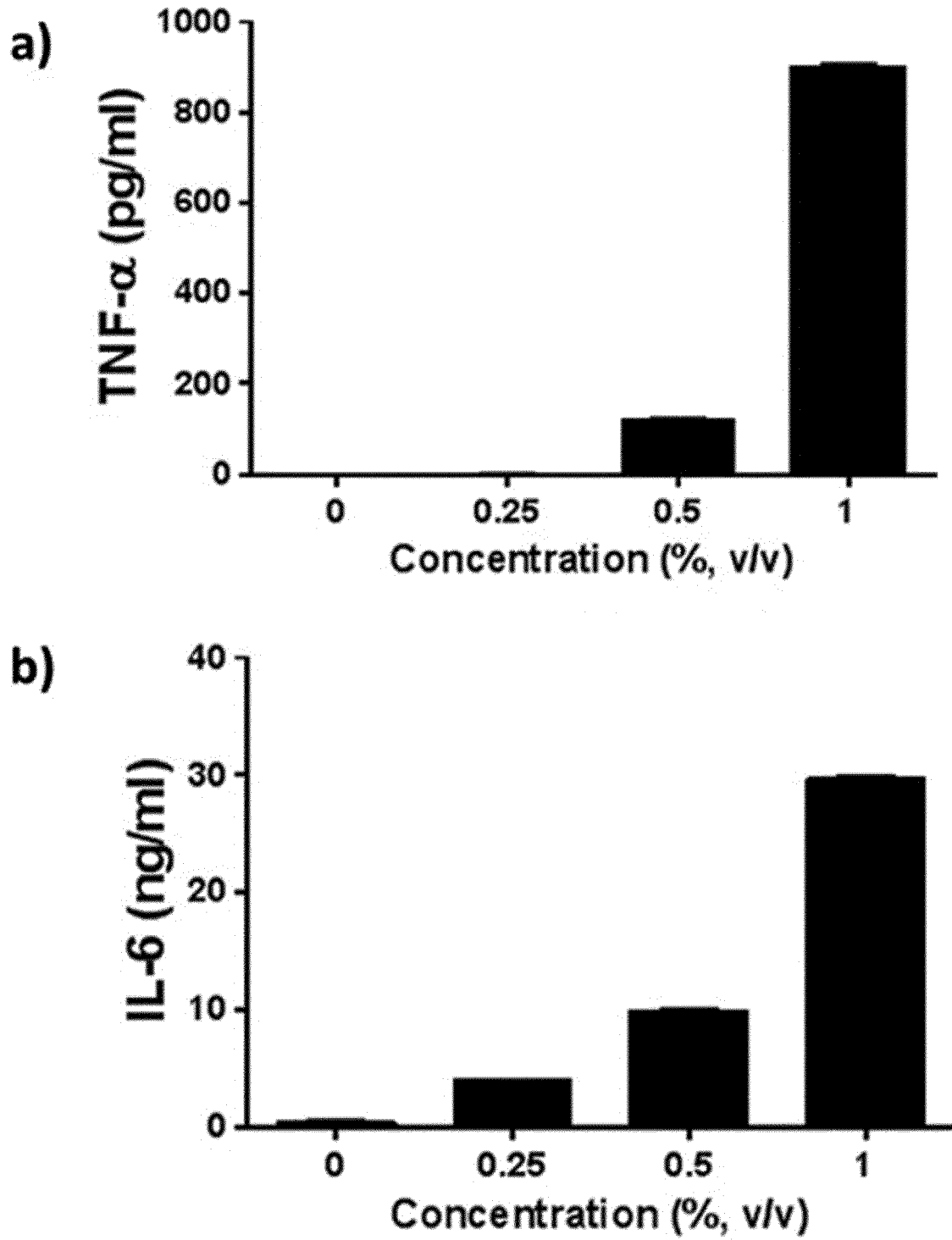


[도5]

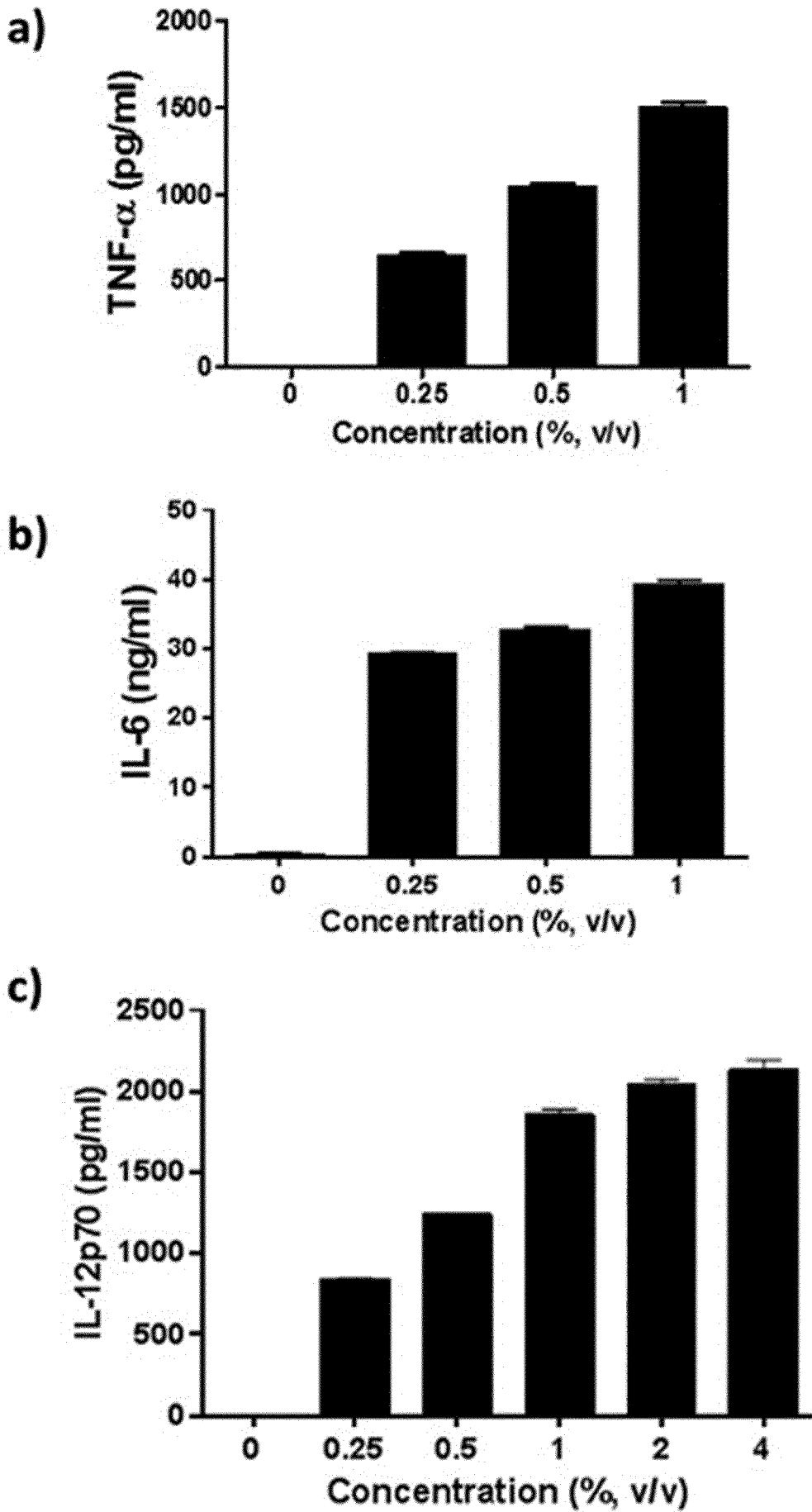
imMDV (MPLA)



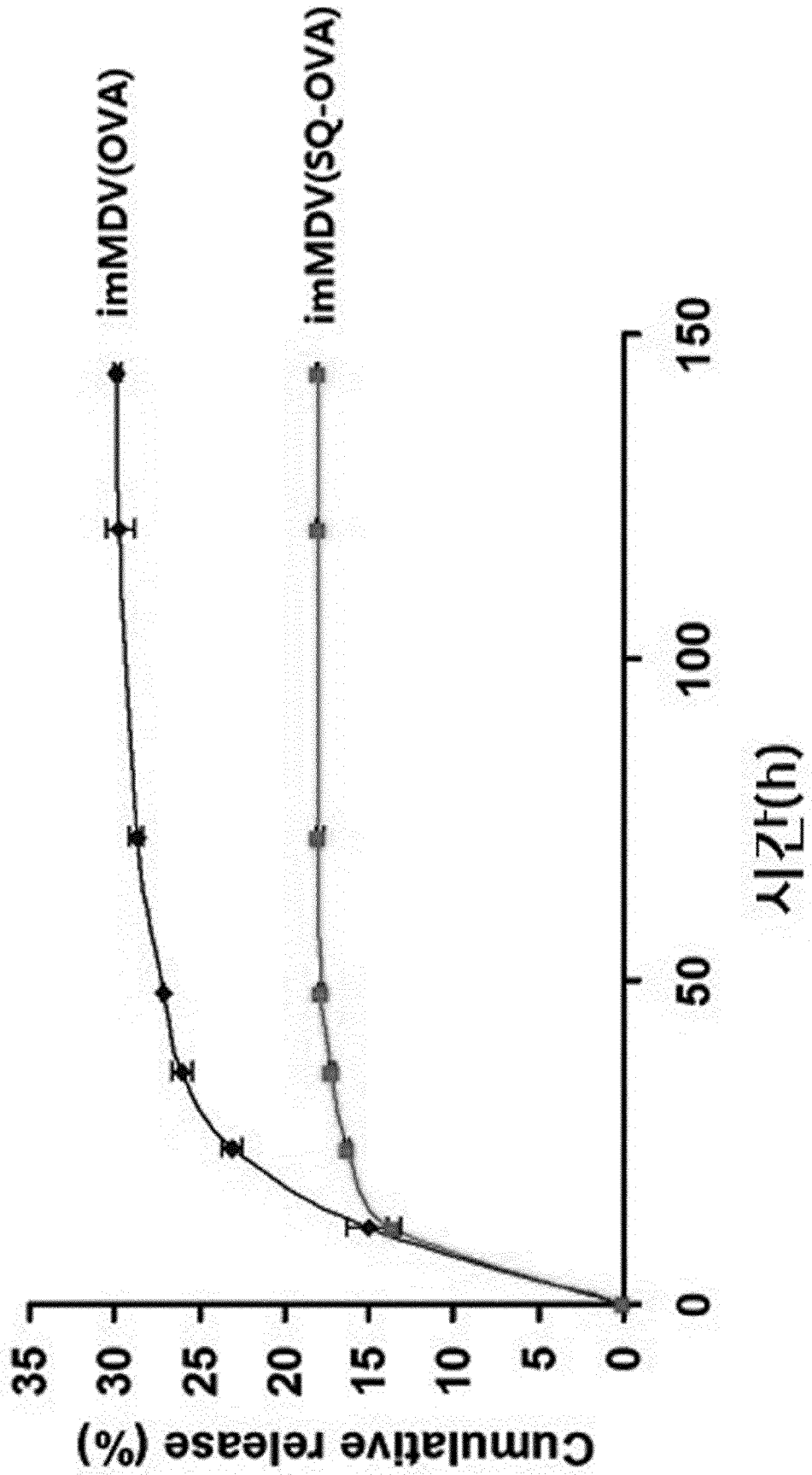
[도6]



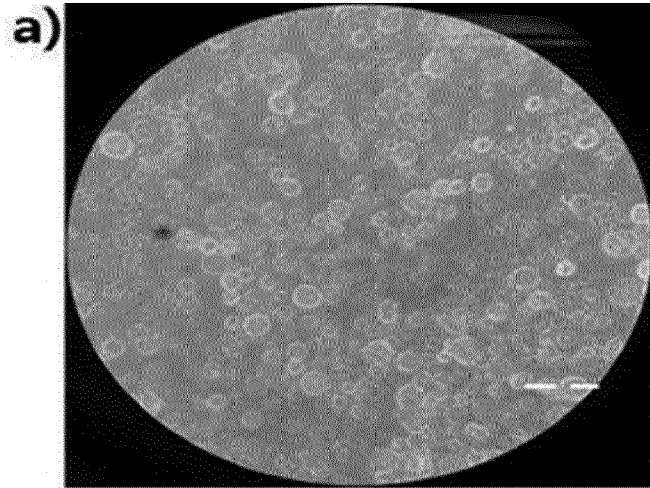
[도7]



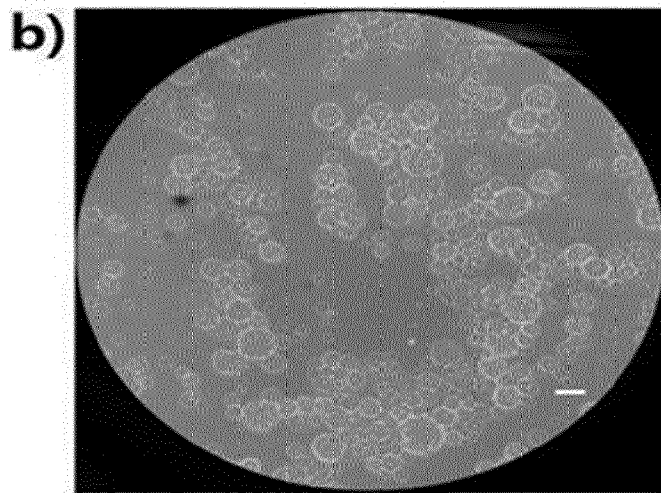
[도8]



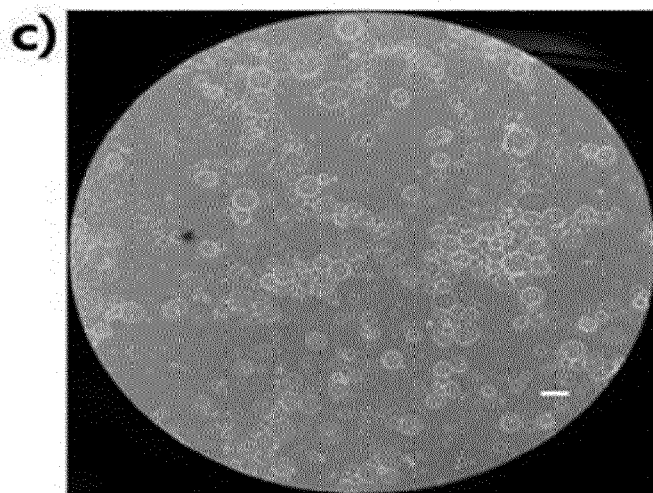
[도9]



**imMDV
(R837-HCl)**

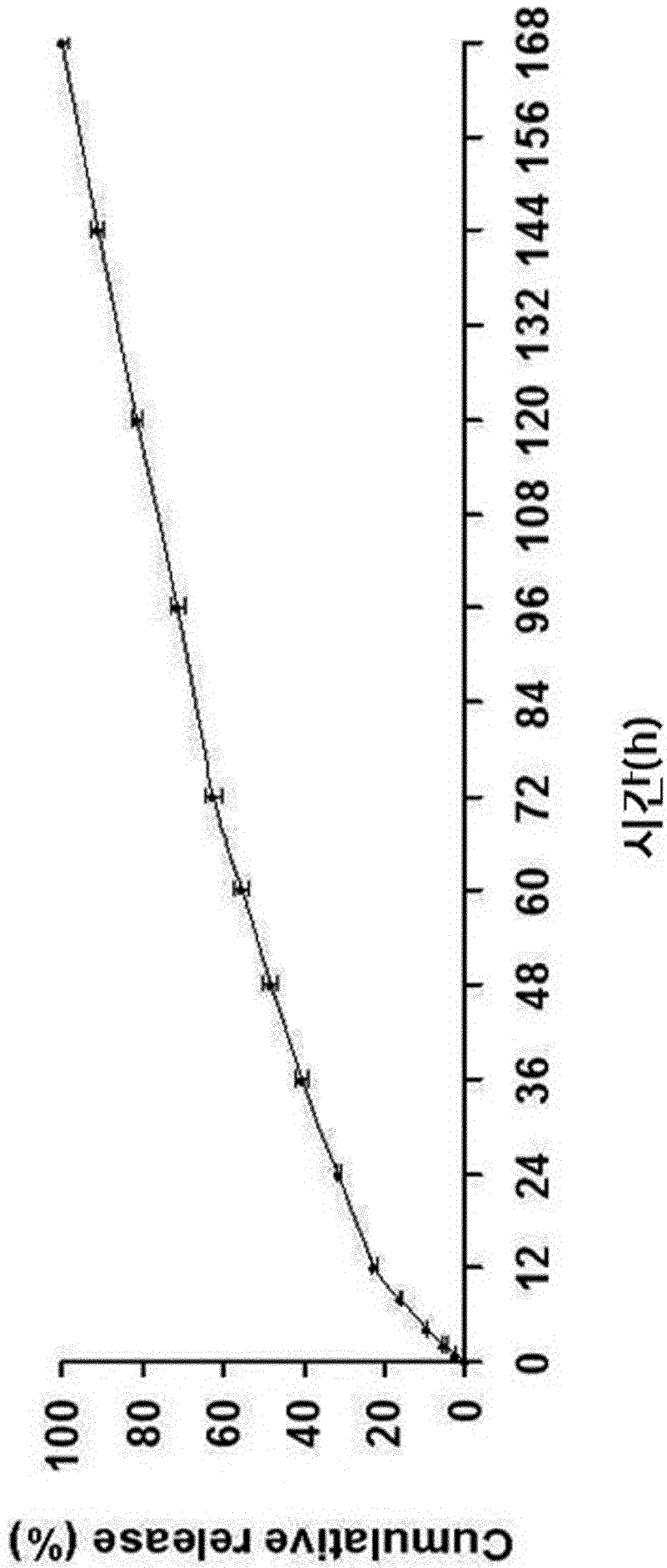


**imMDV
(R837-Base)**

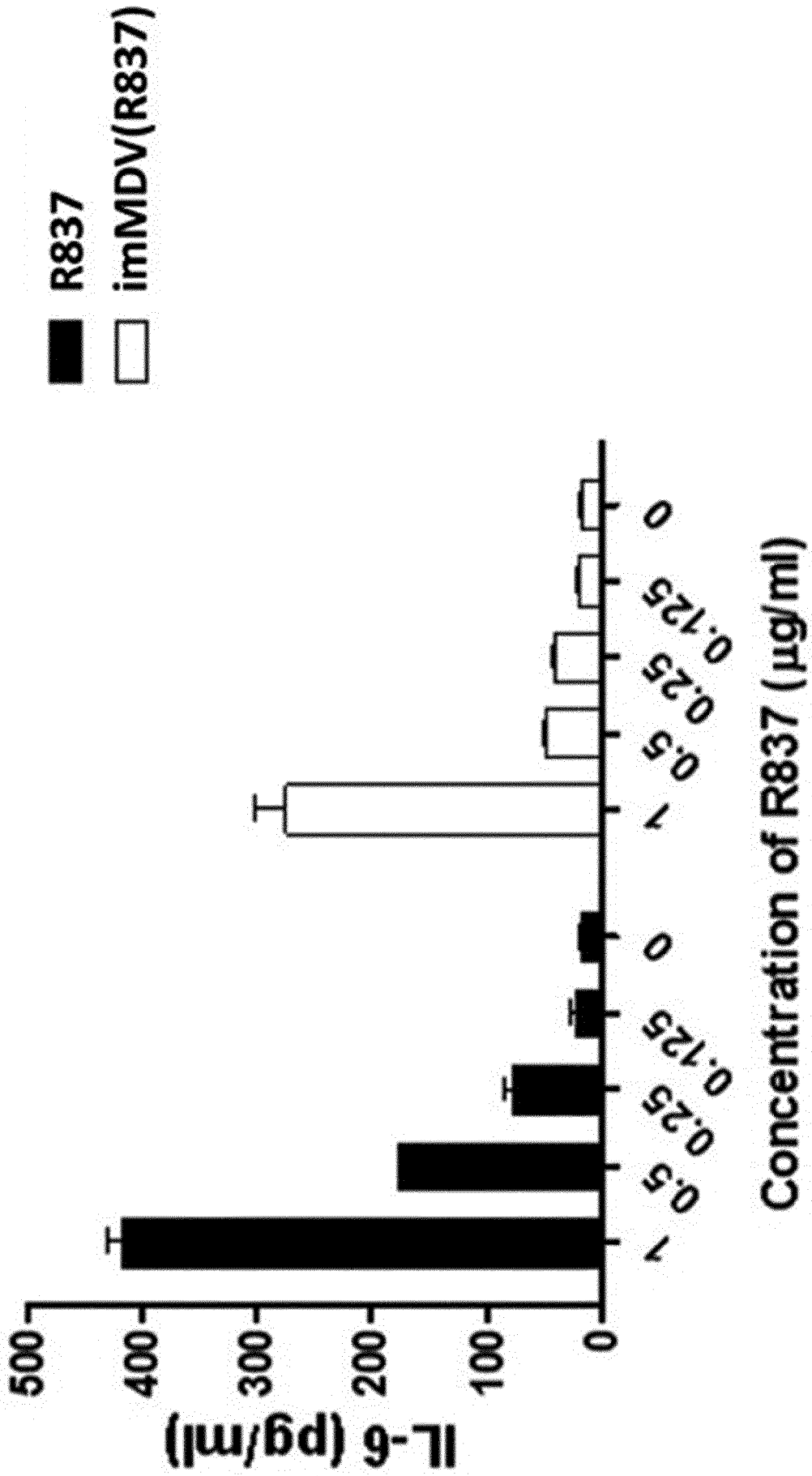


**imMDV
(R837-HCl+R837-Base)**

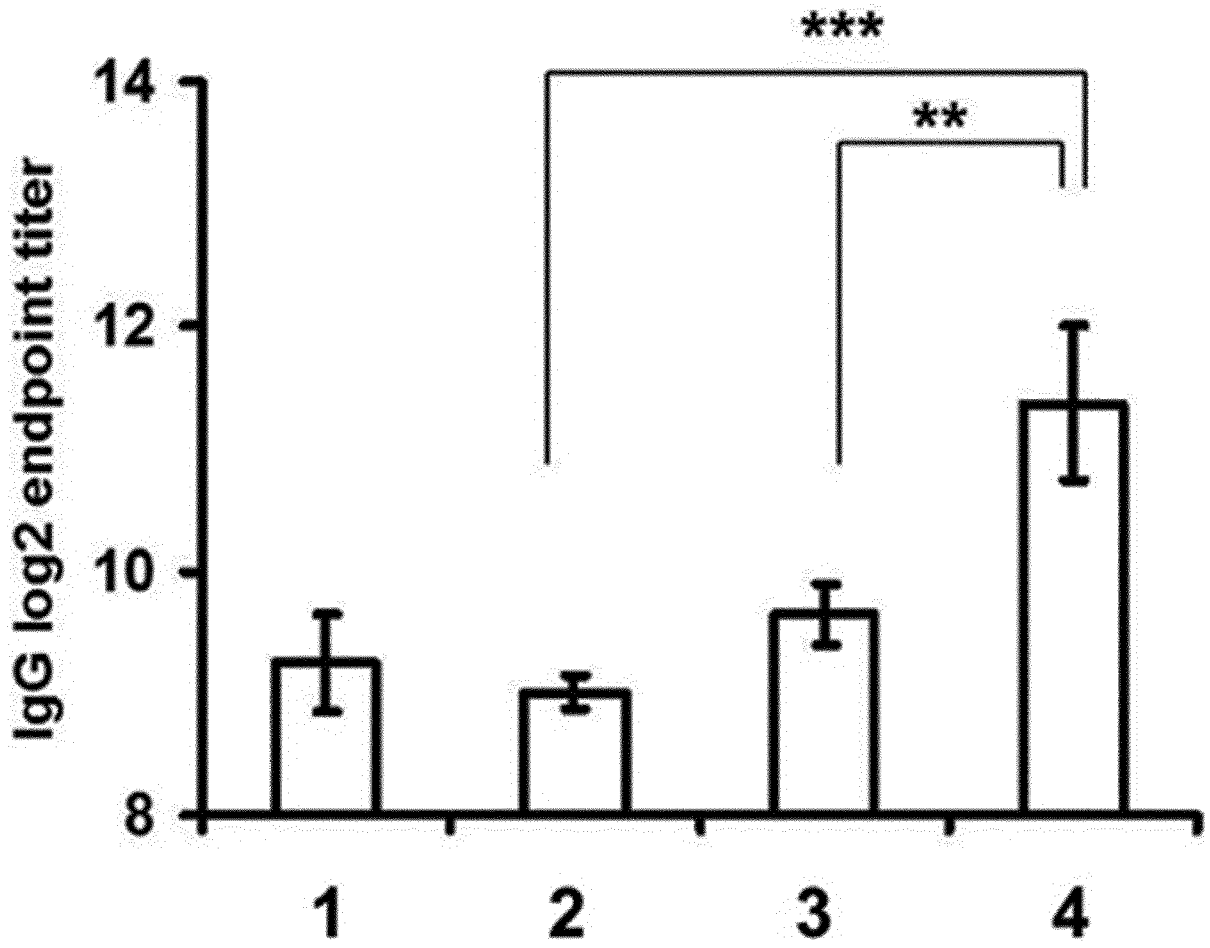
[도10]



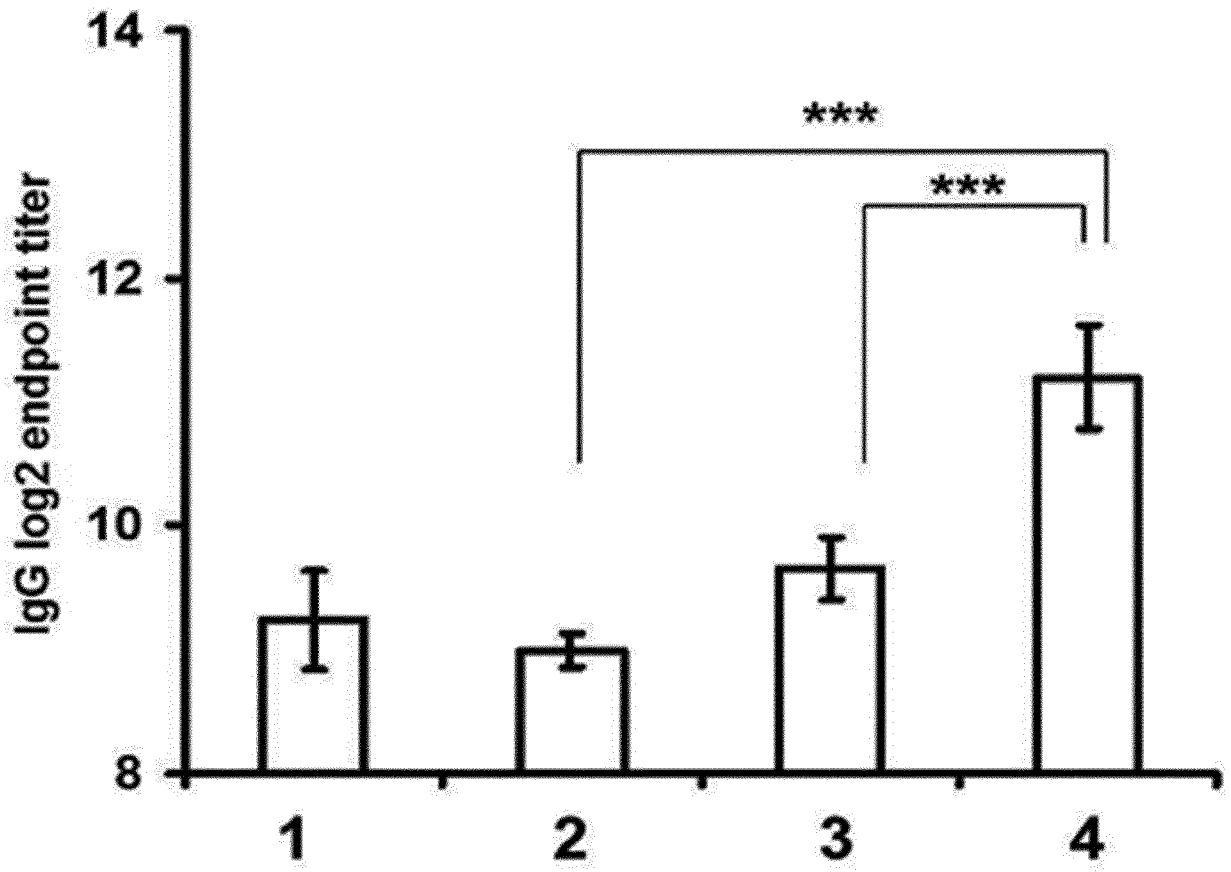
[도11]



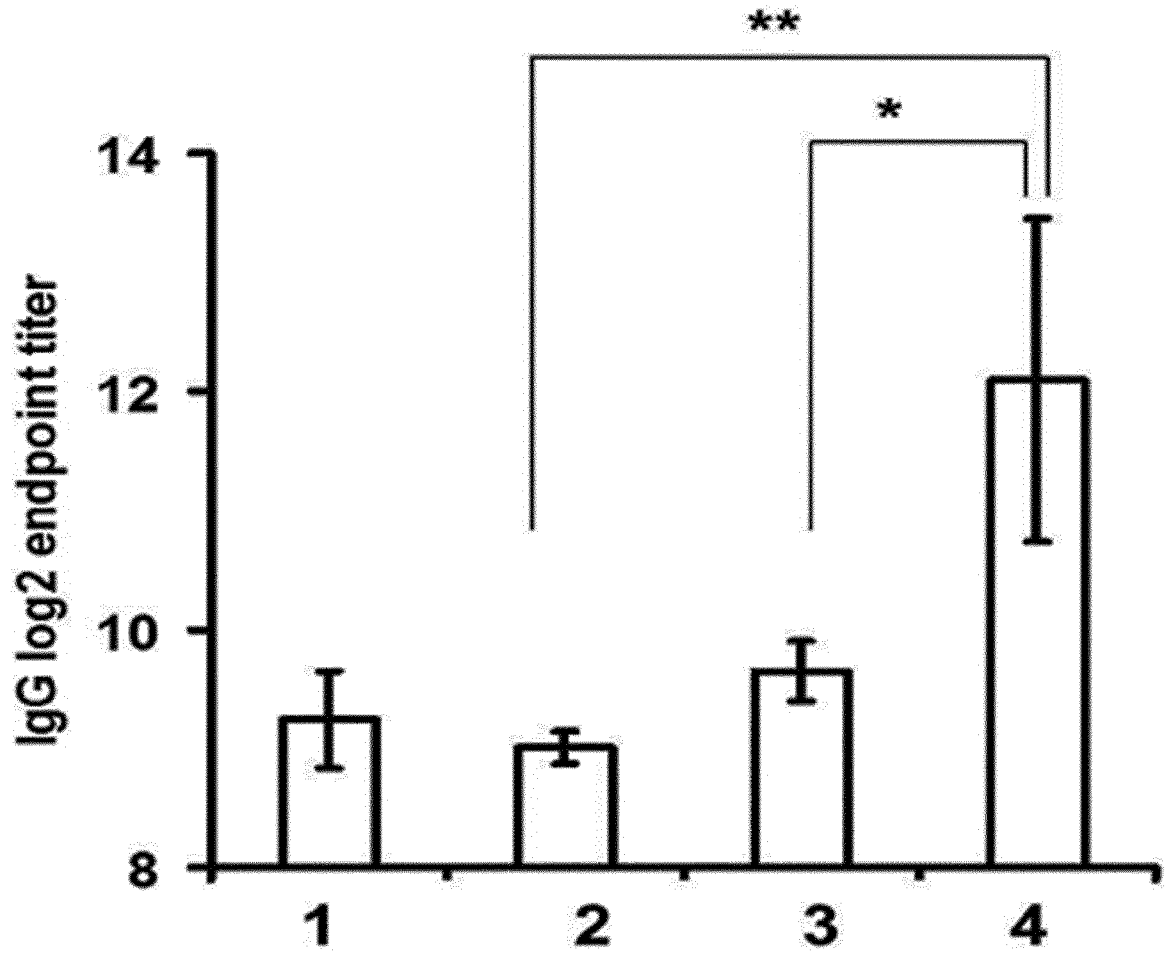
[도 12a]



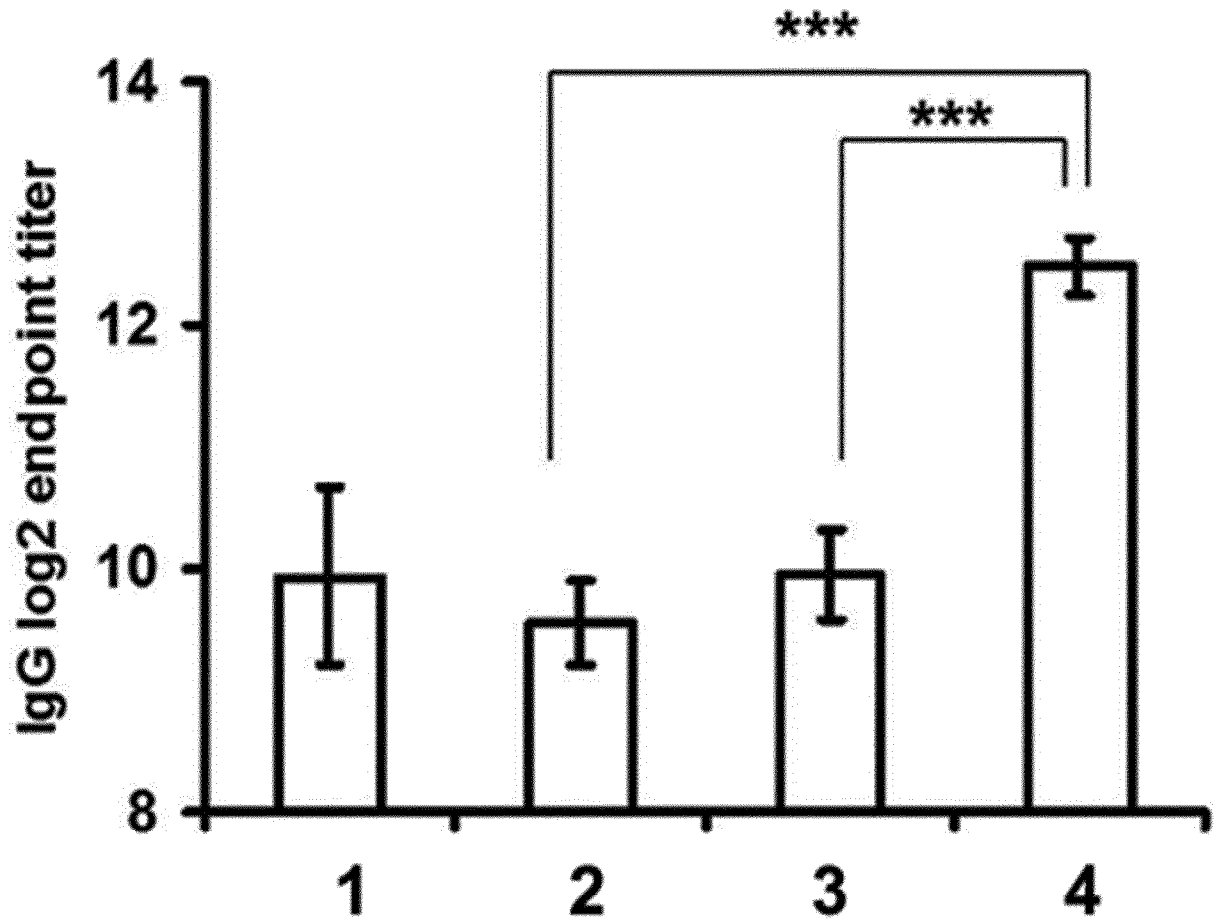
[도 12b]



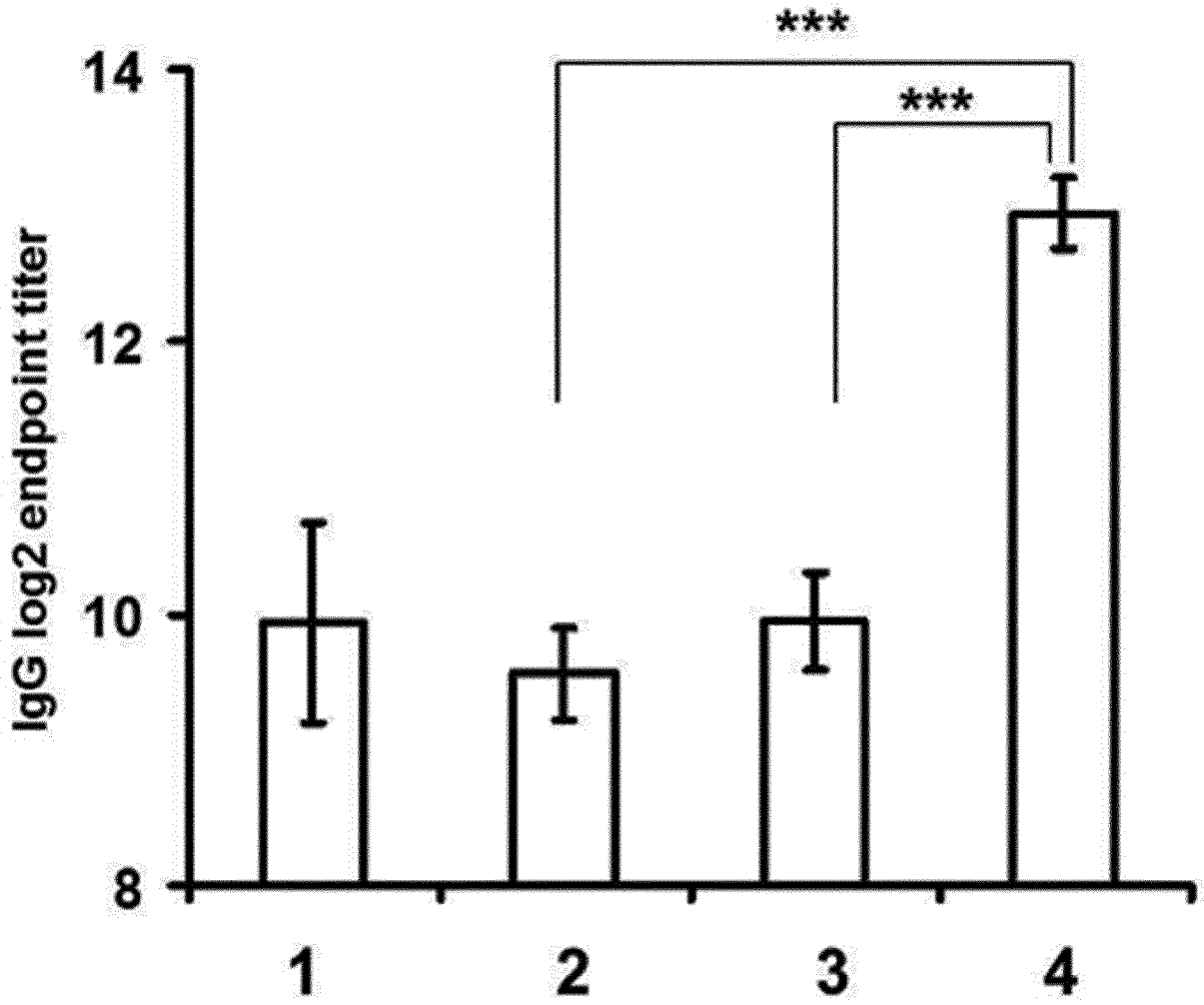
[도 12c]



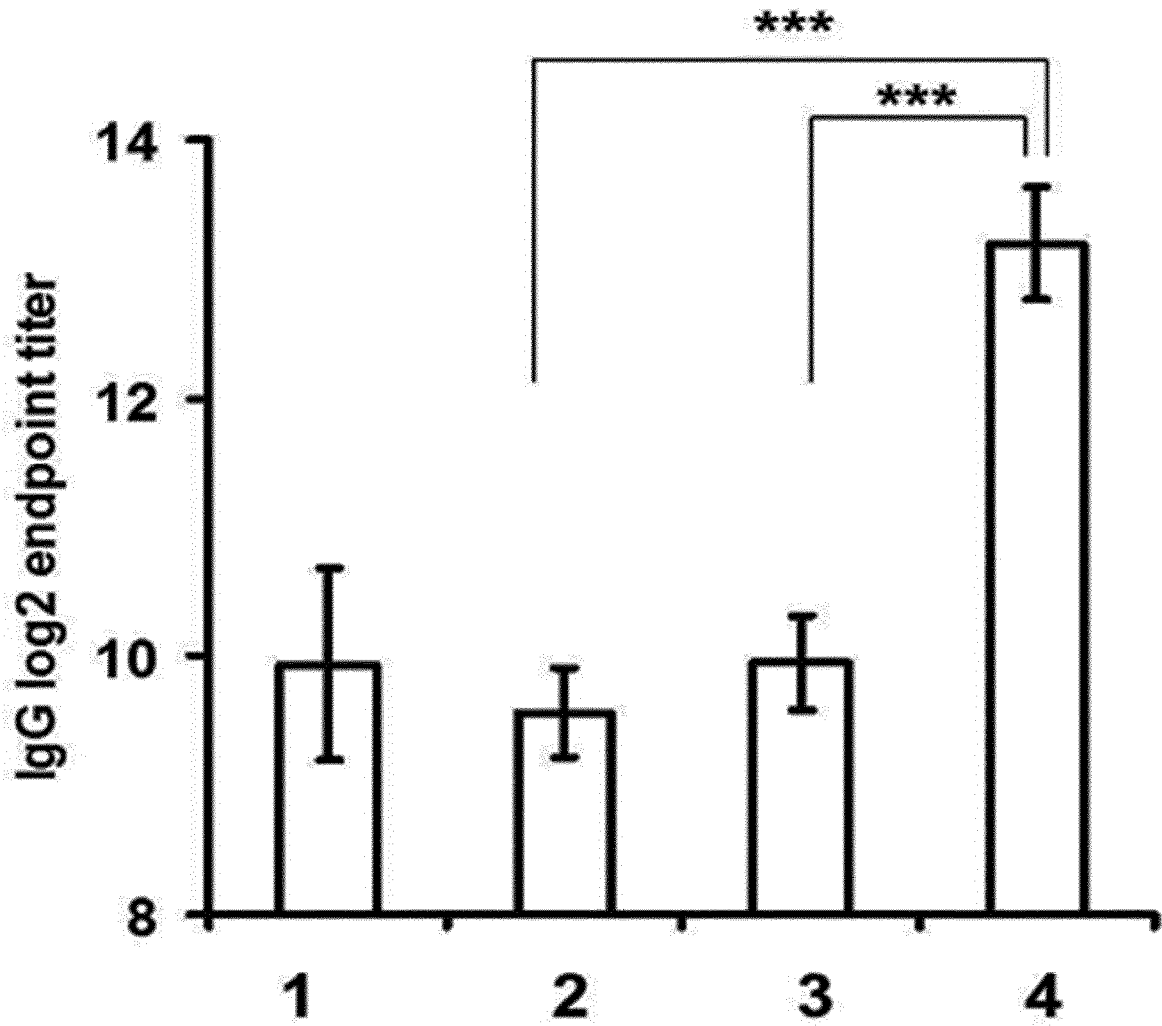
[도13a]



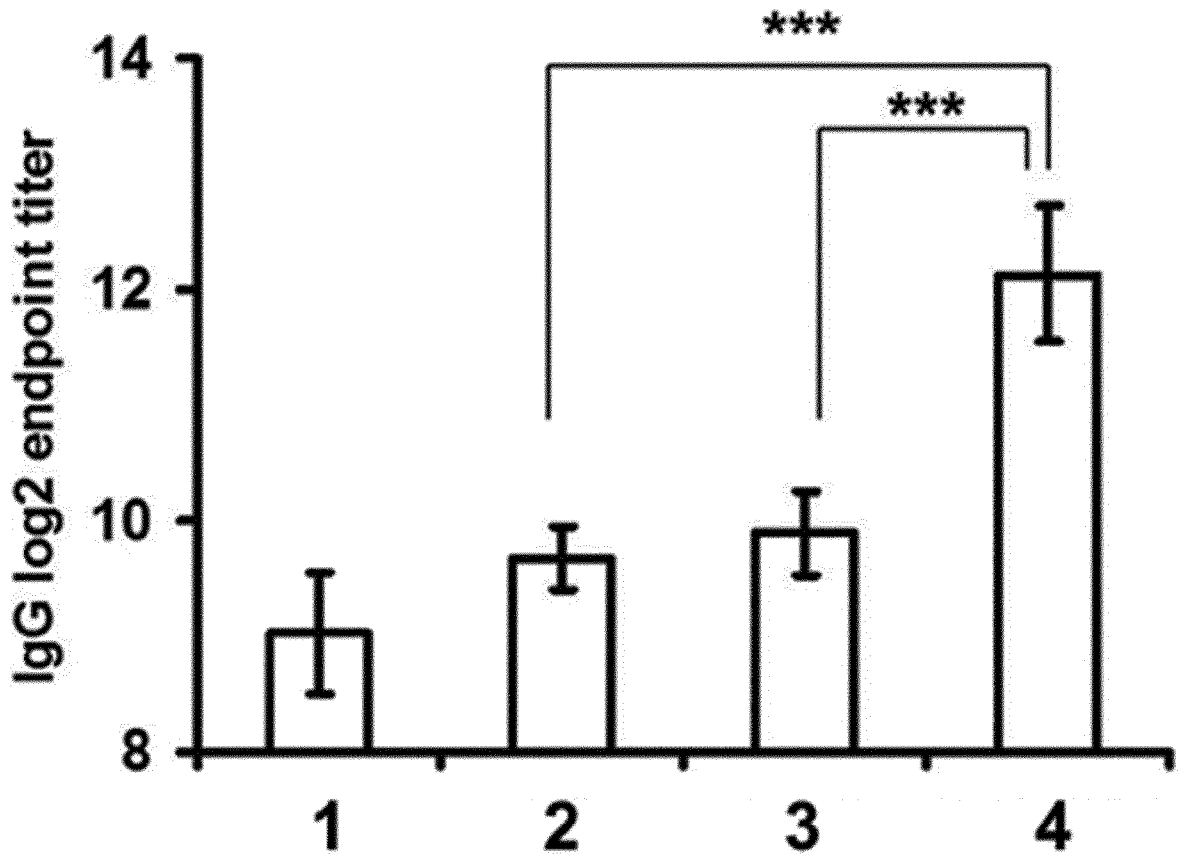
[도 13b]



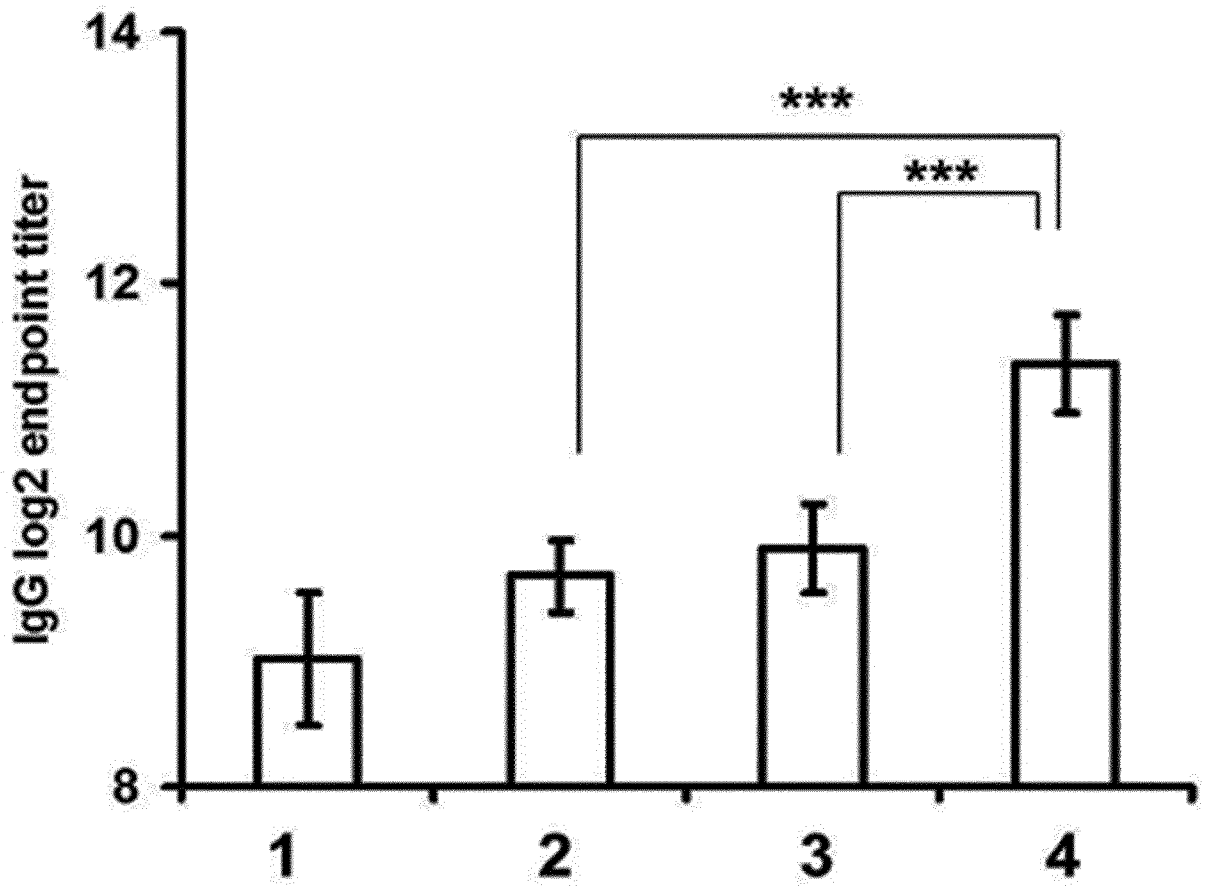
[도13c]



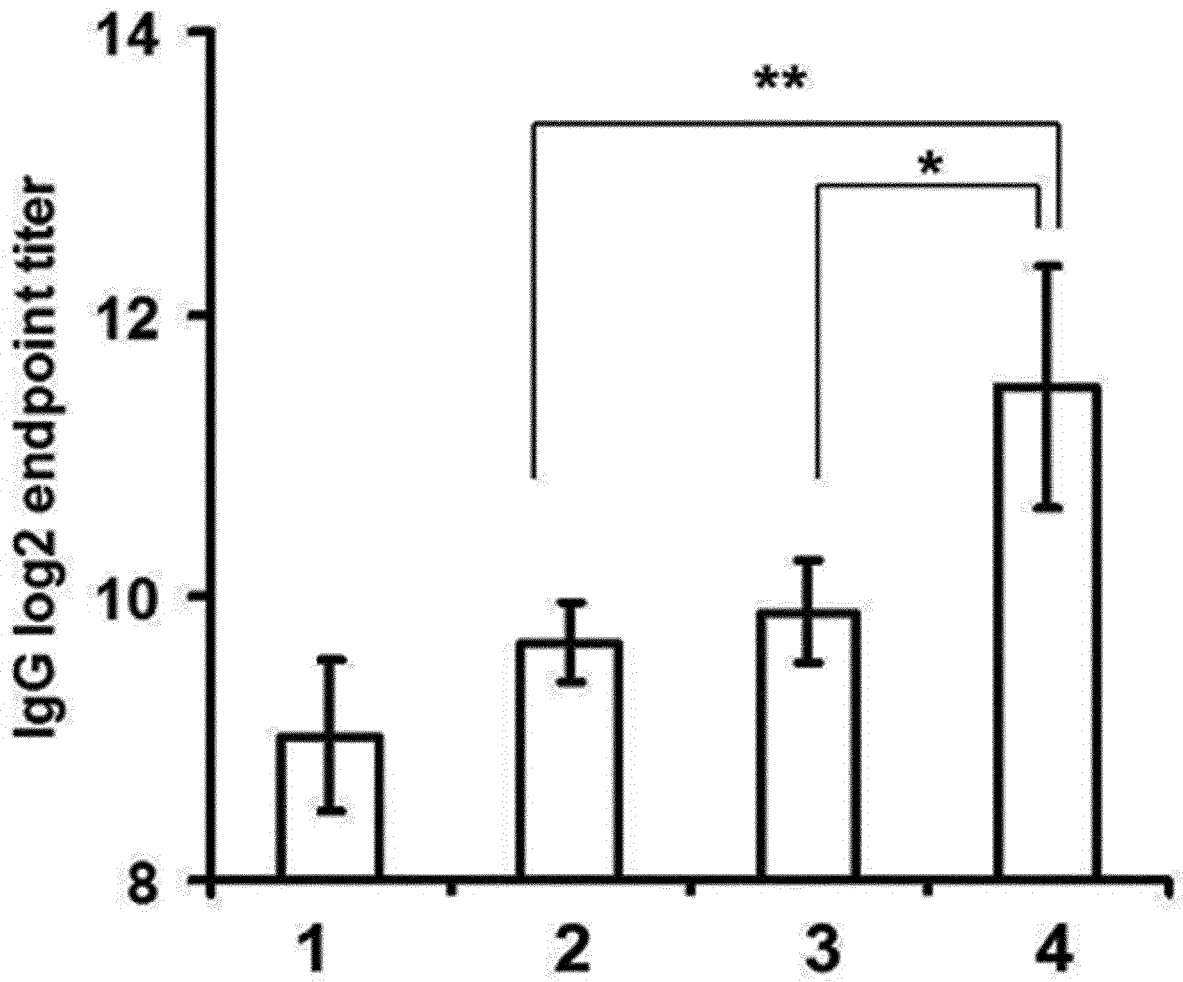
[도 14a]



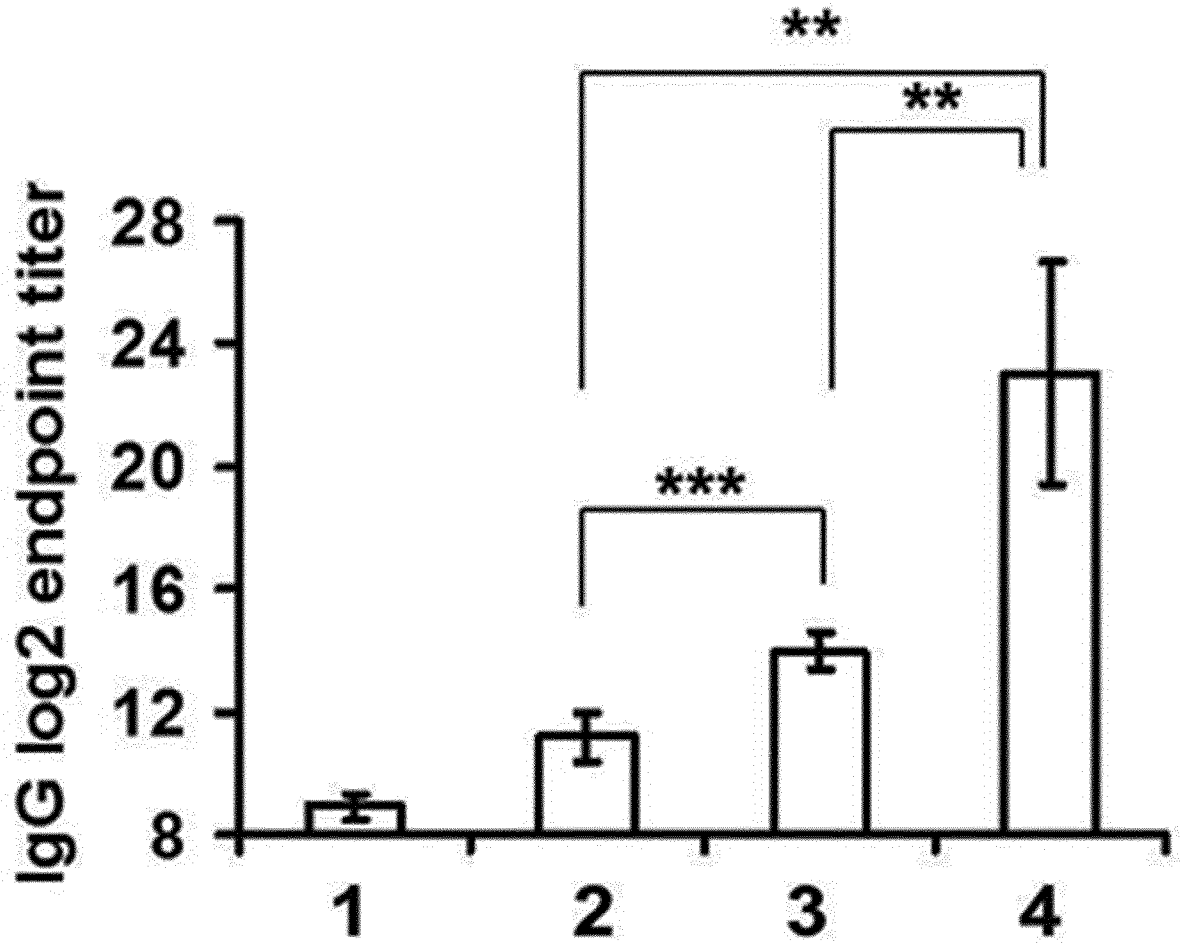
[도 14b]



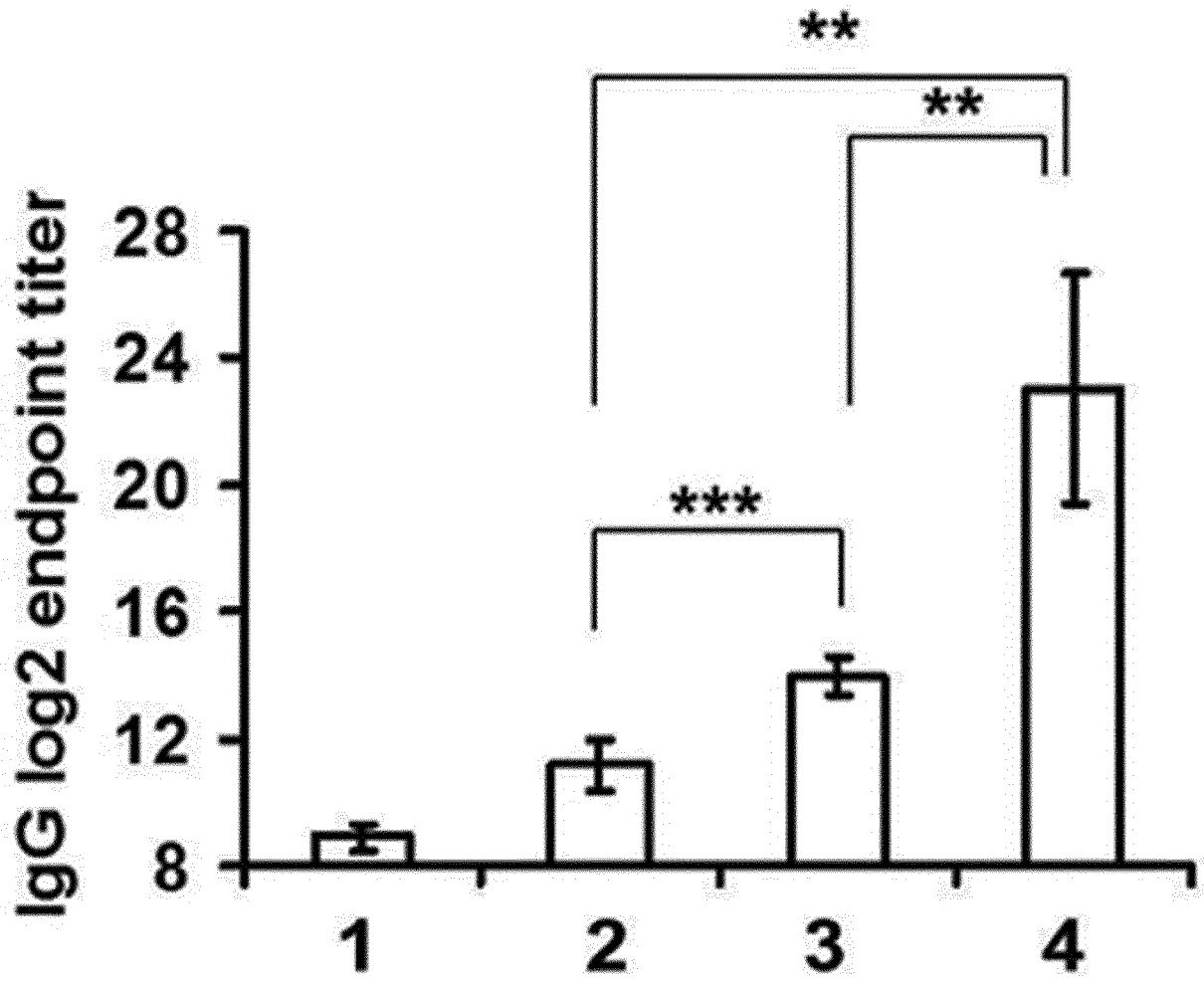
[도14c]



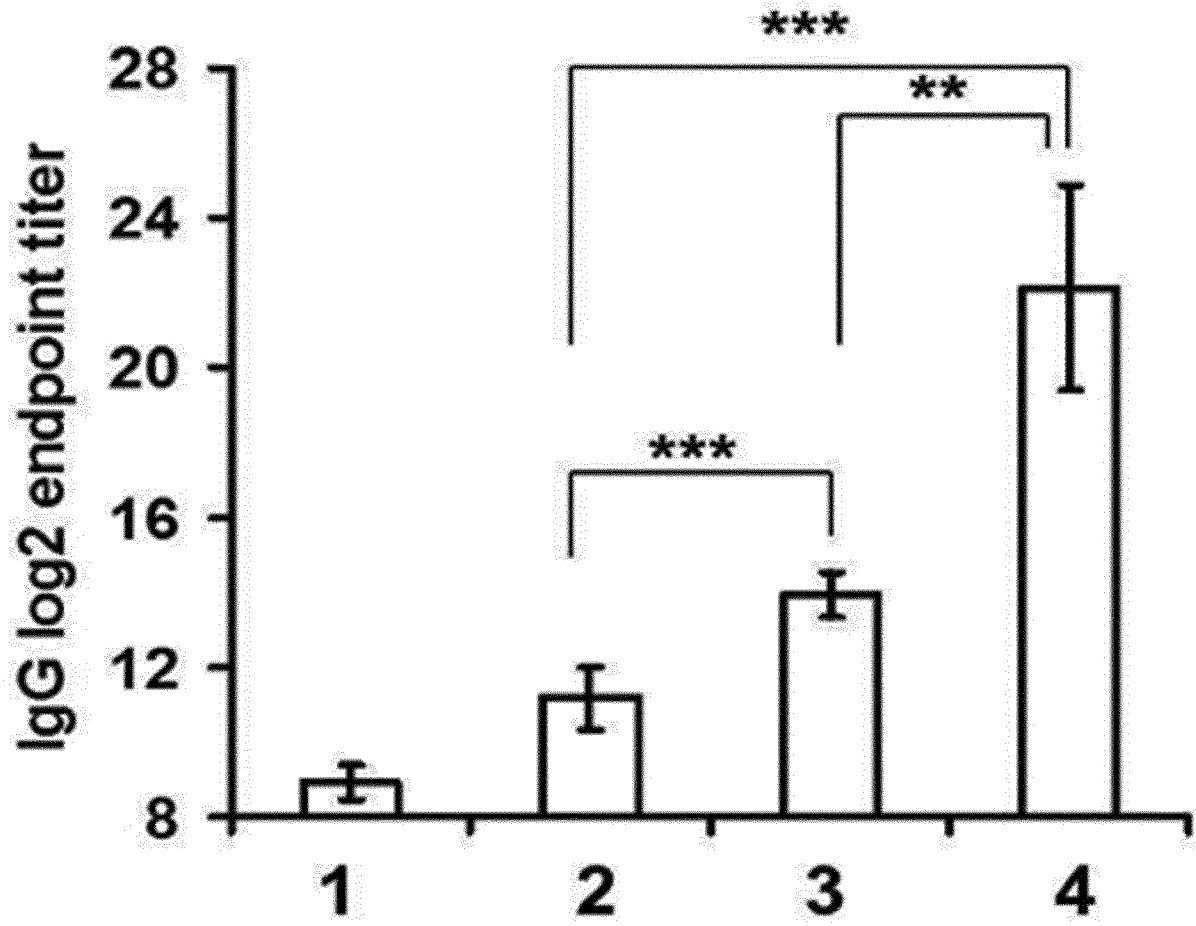
[도 15a]



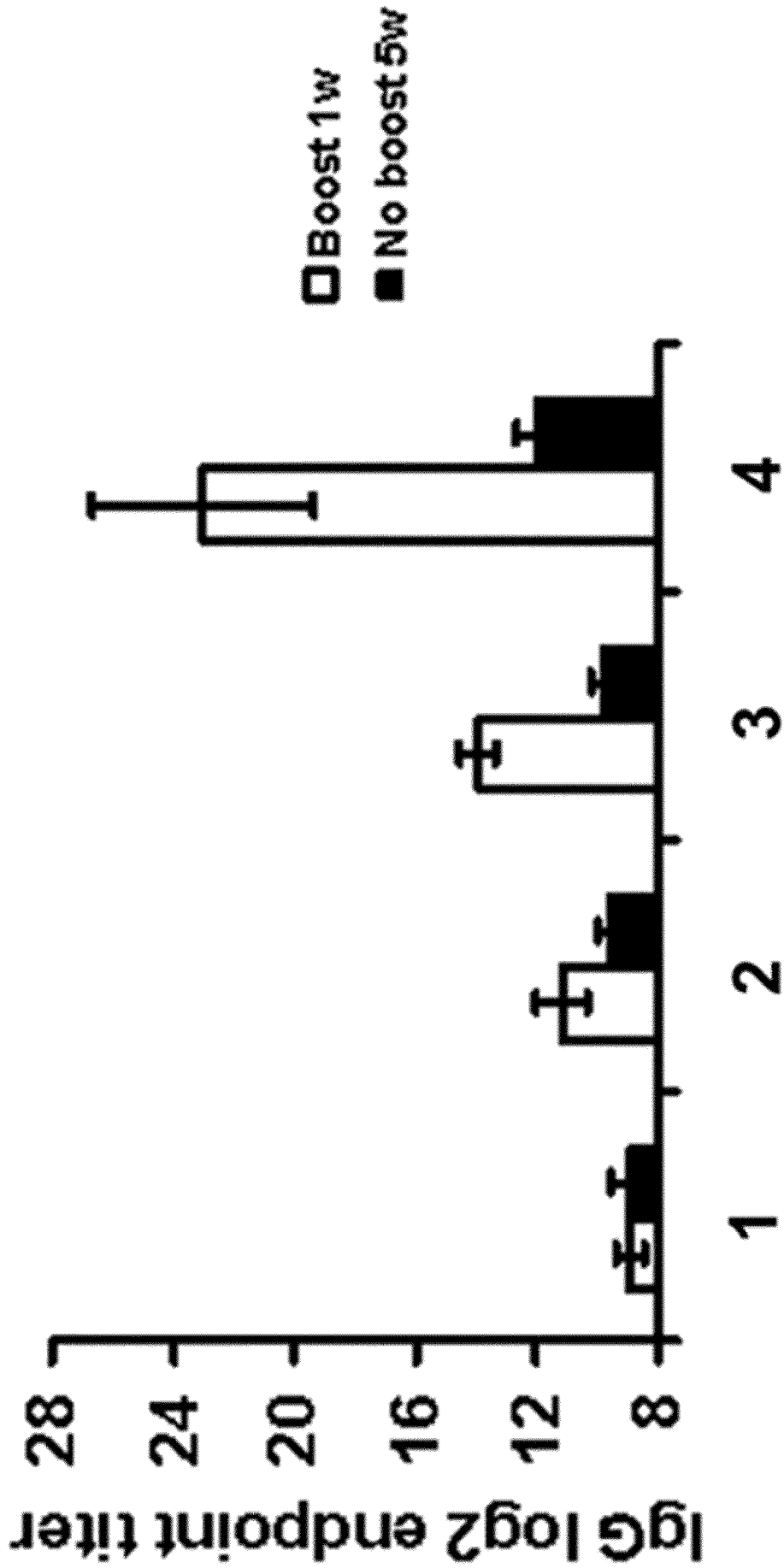
[도 15b]



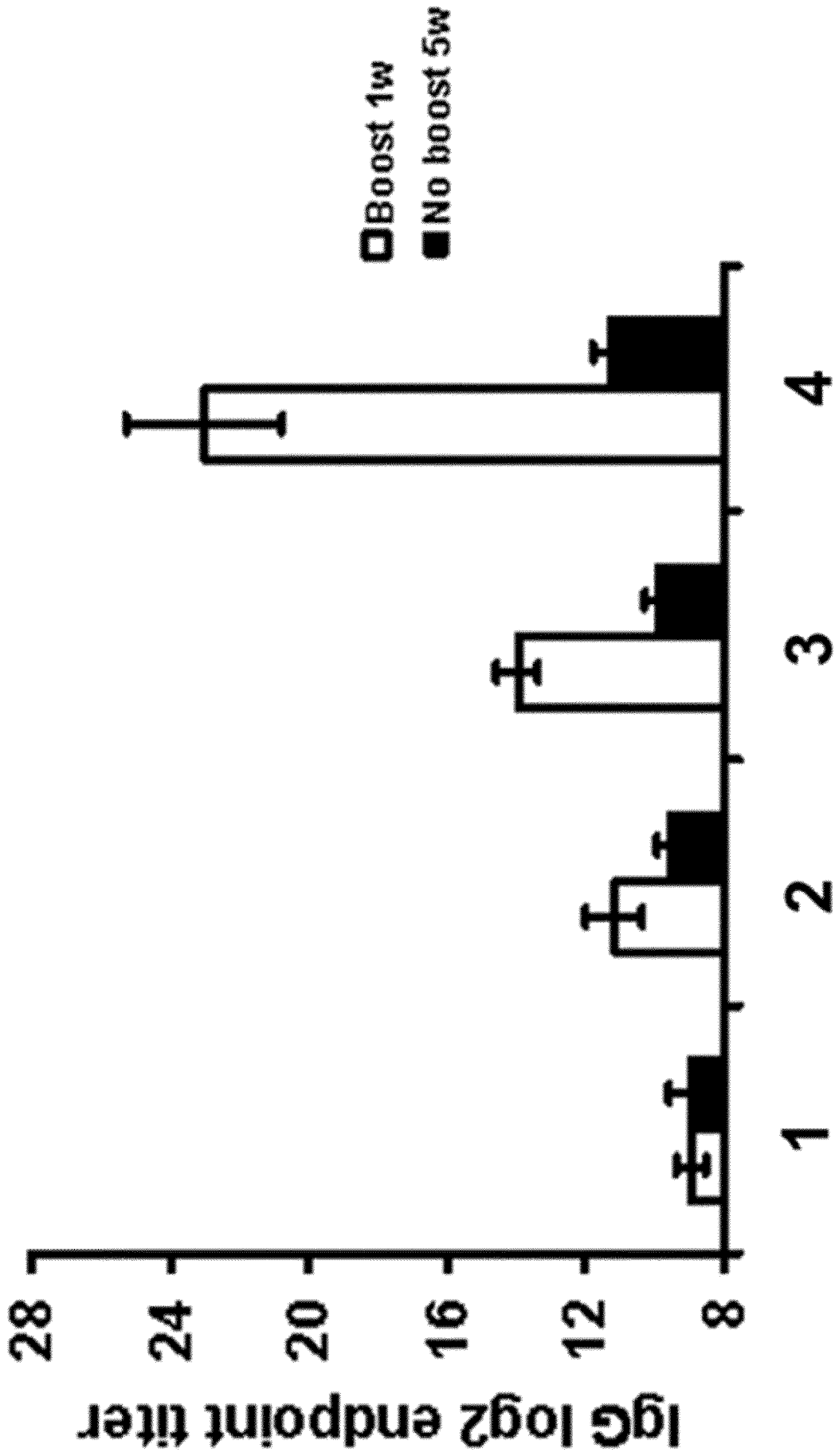
[도 15c]



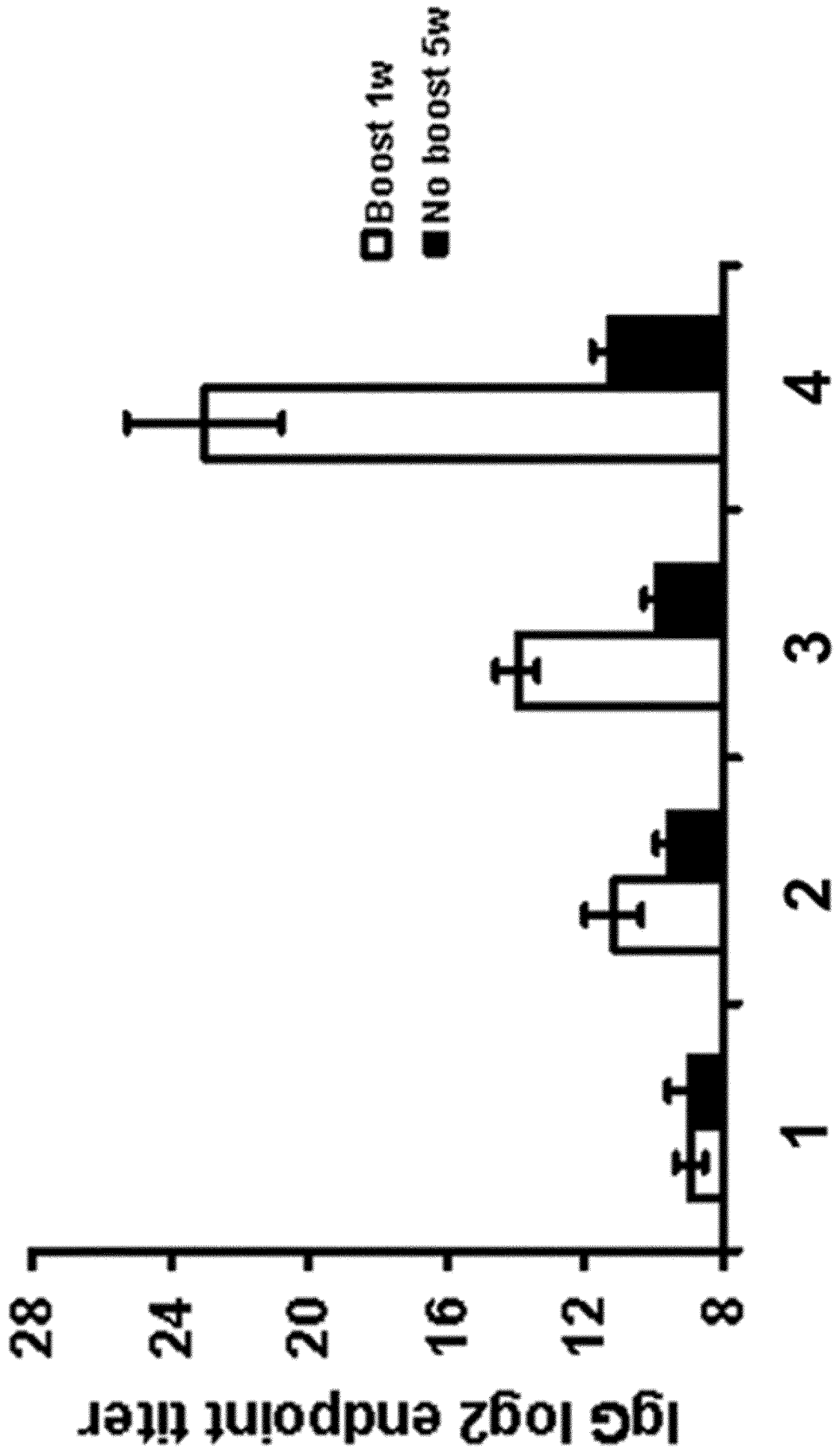
[도16]



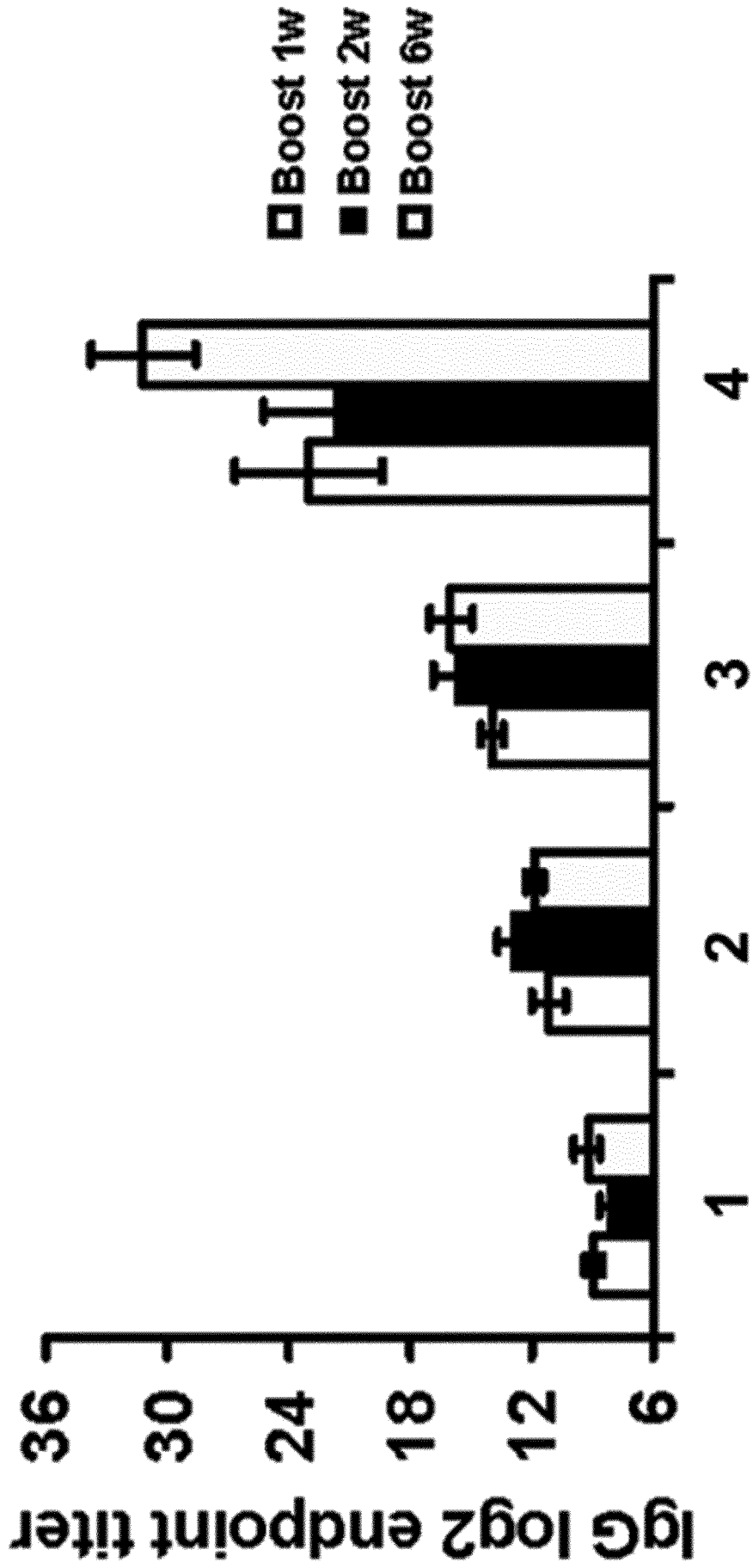
[도17]



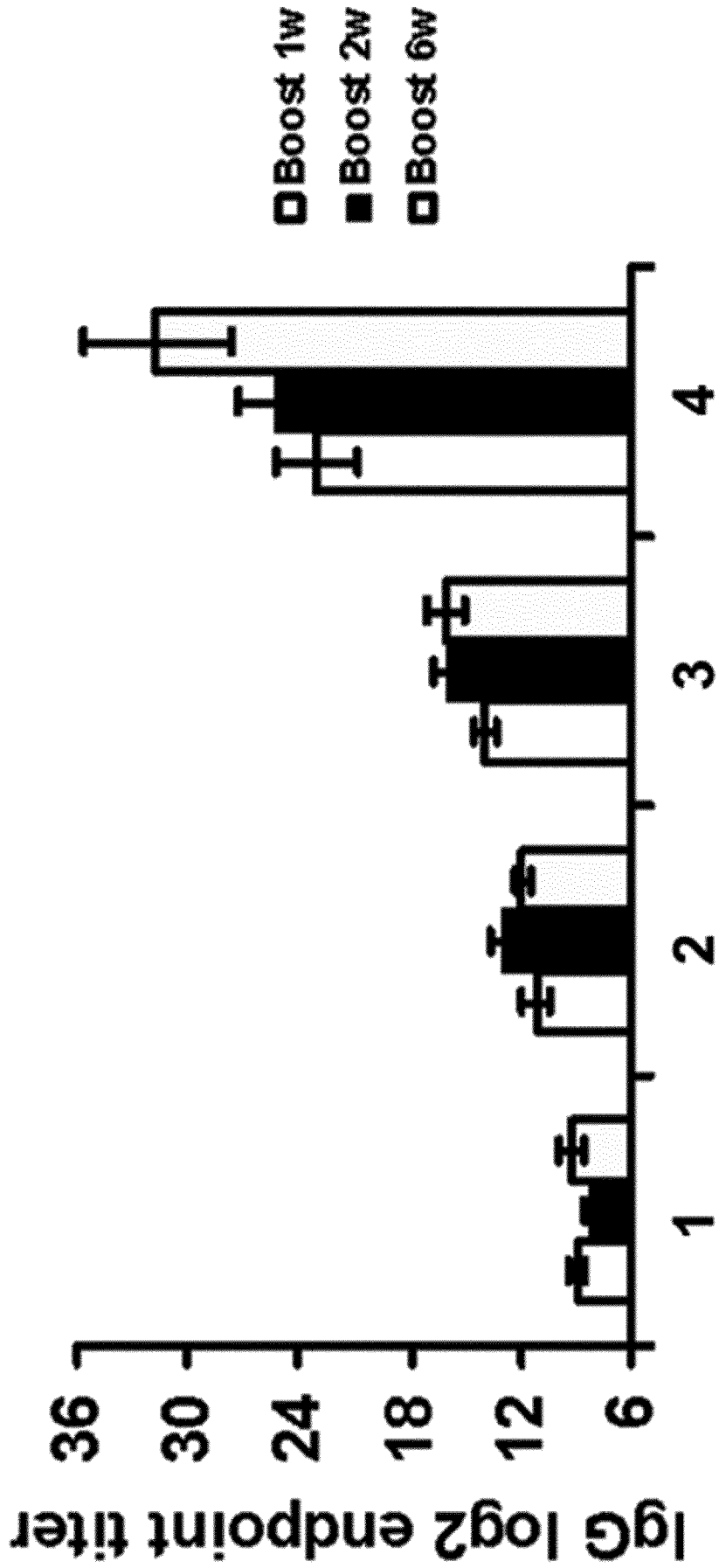
[도18]



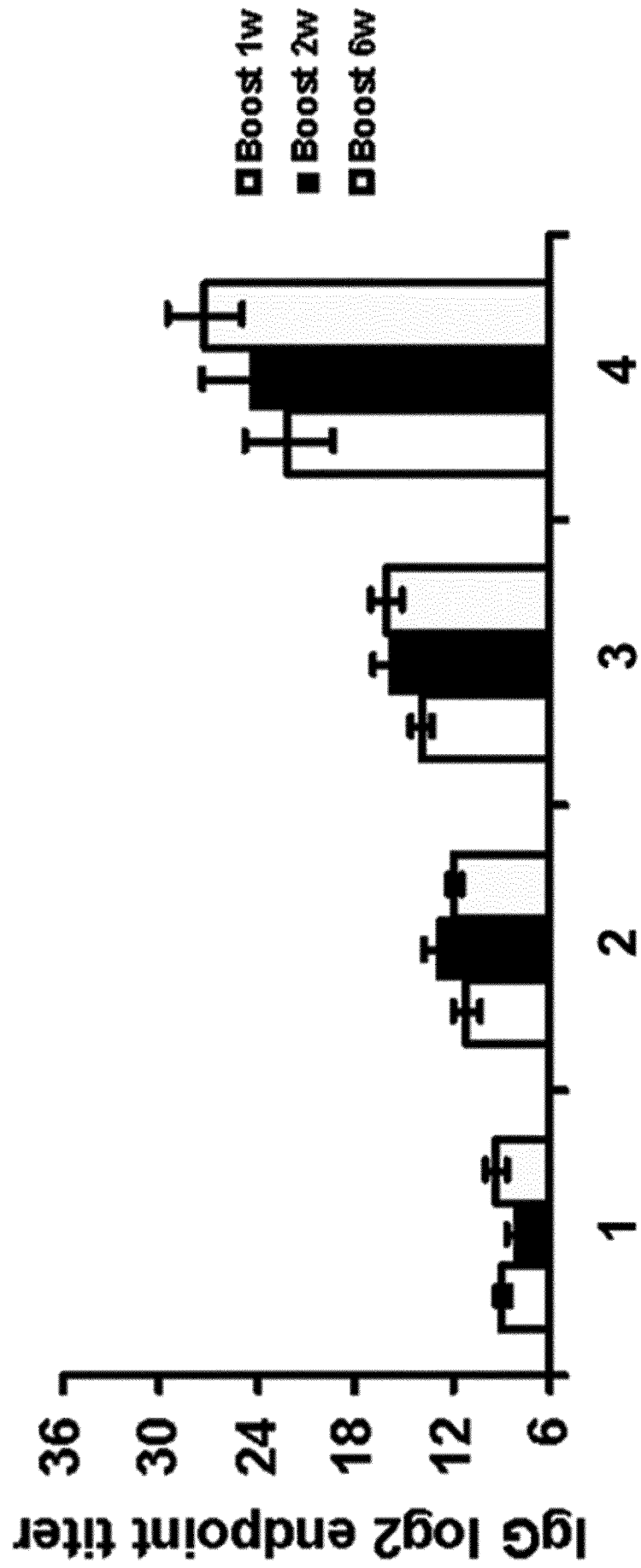
[도19]



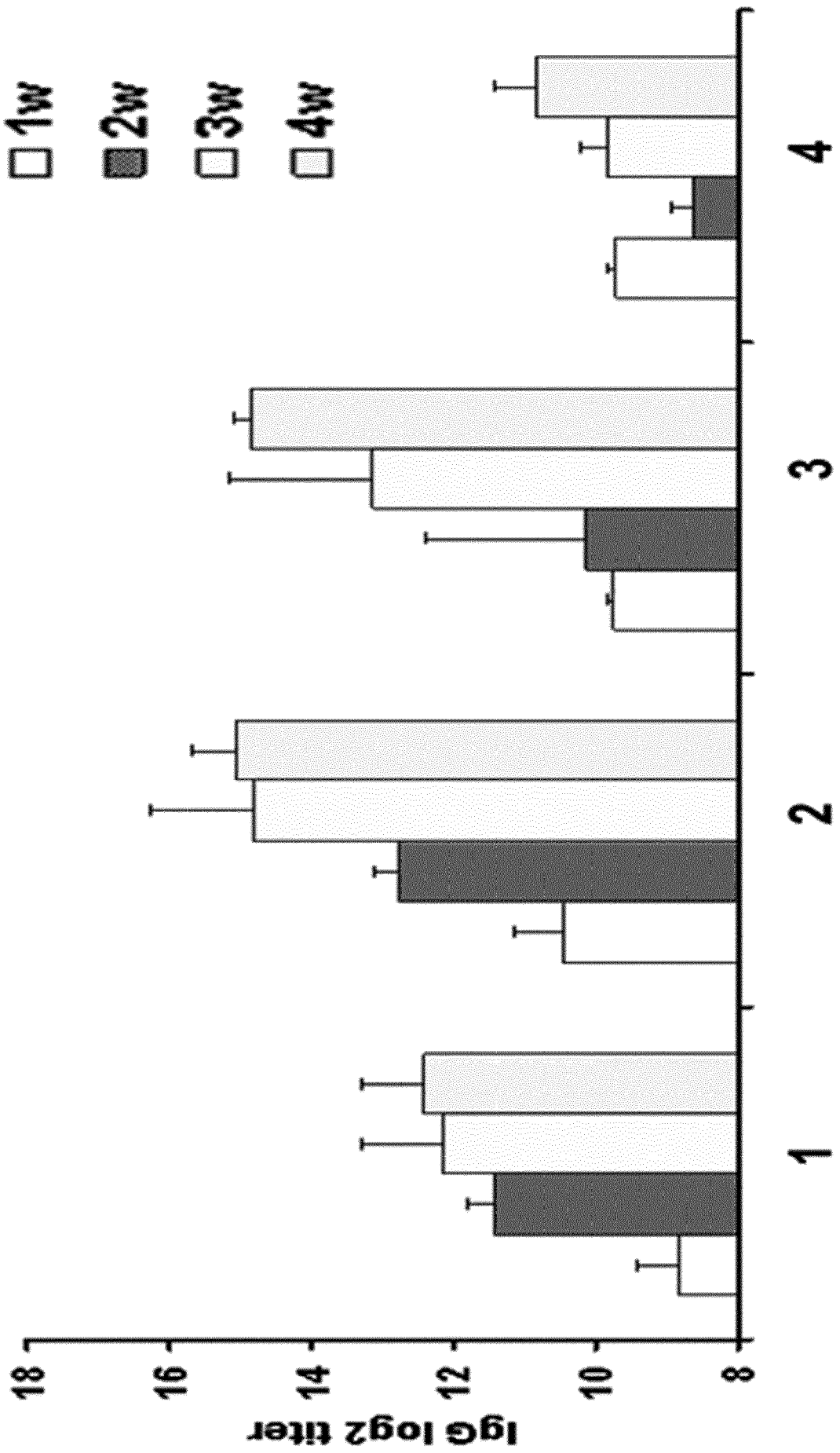
[도20]



[도21]



[도22]



[도23]

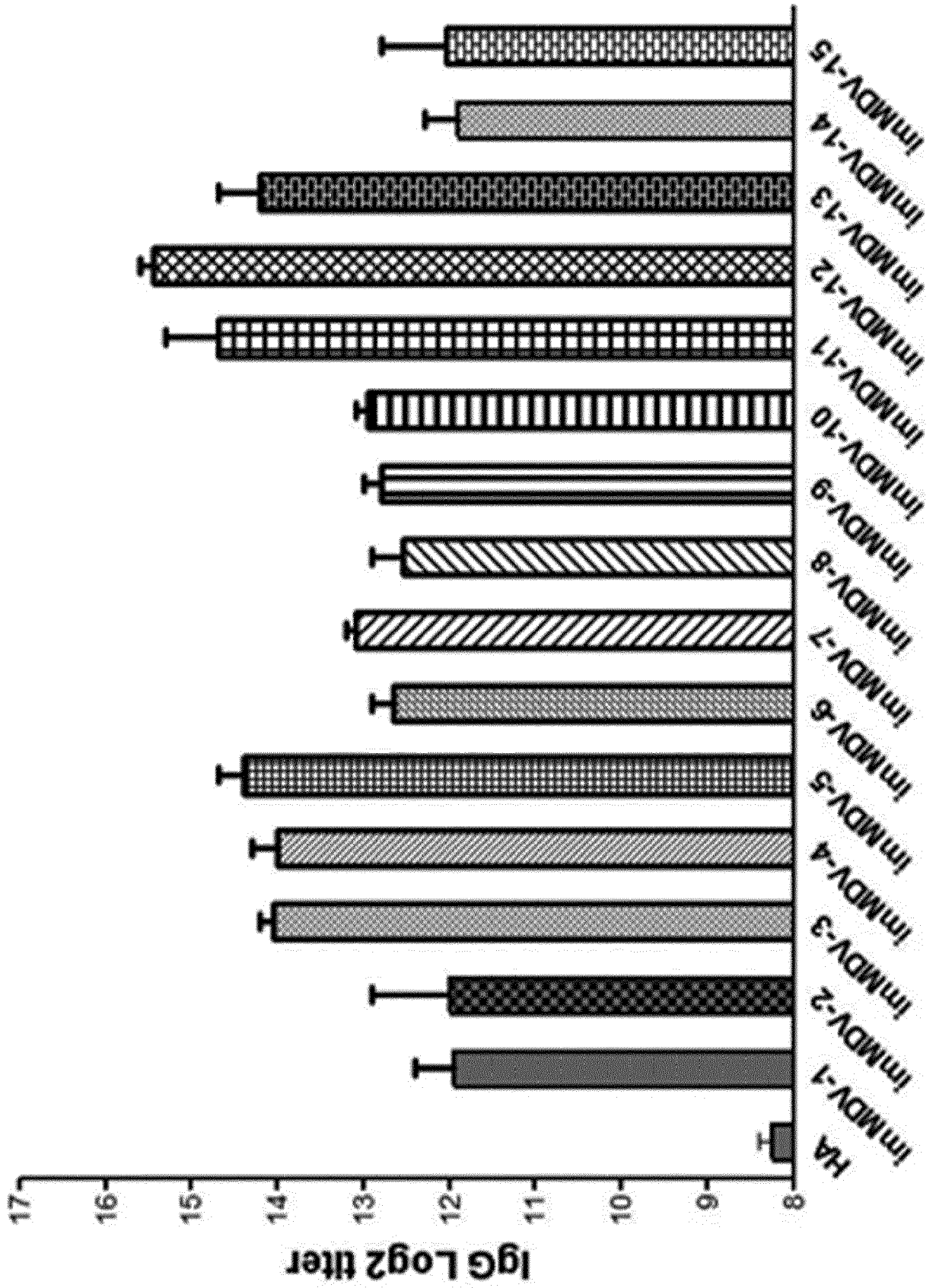
DMSO(R837)+OVA



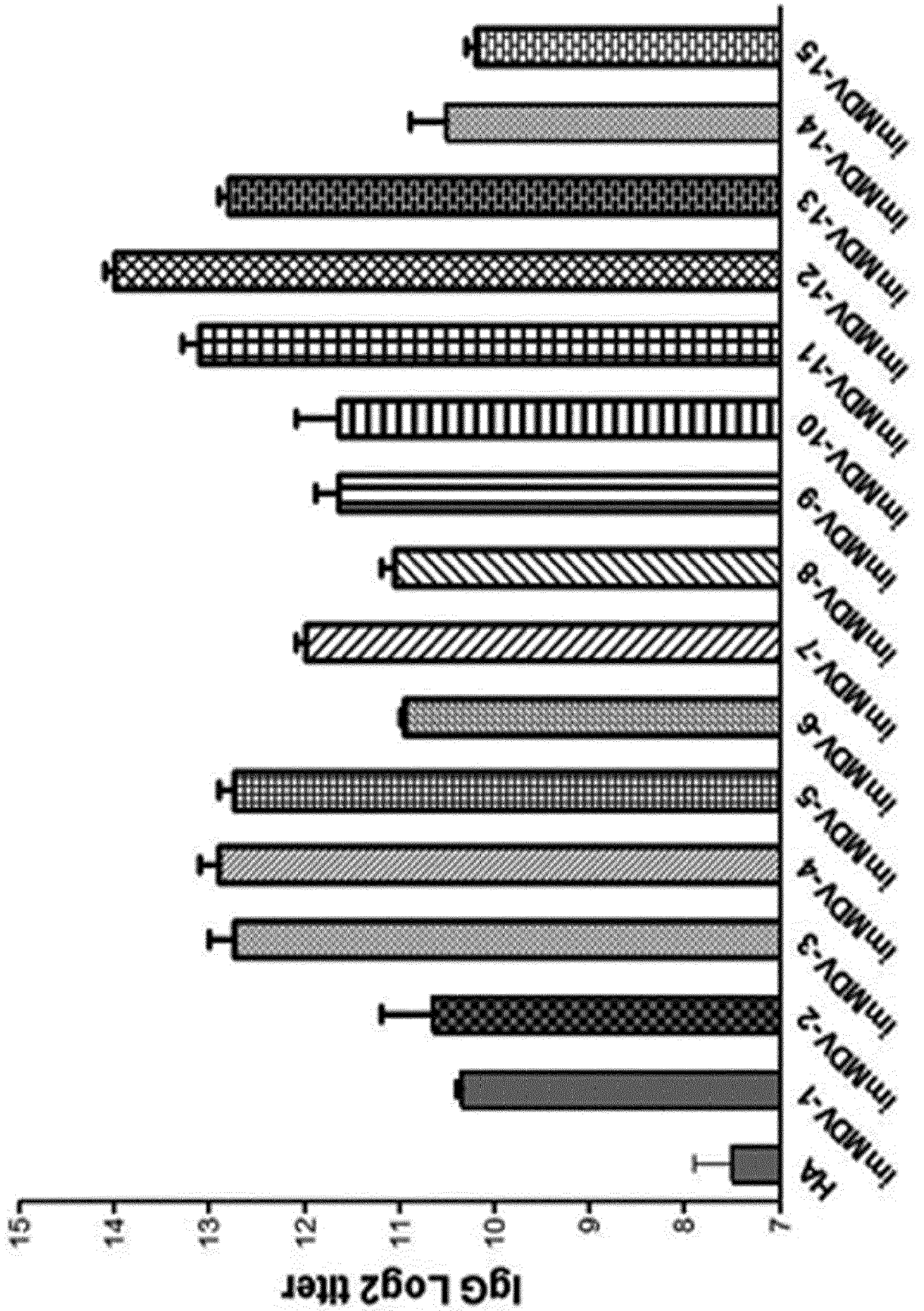
[imMDV(R837-HCl)+OVA]



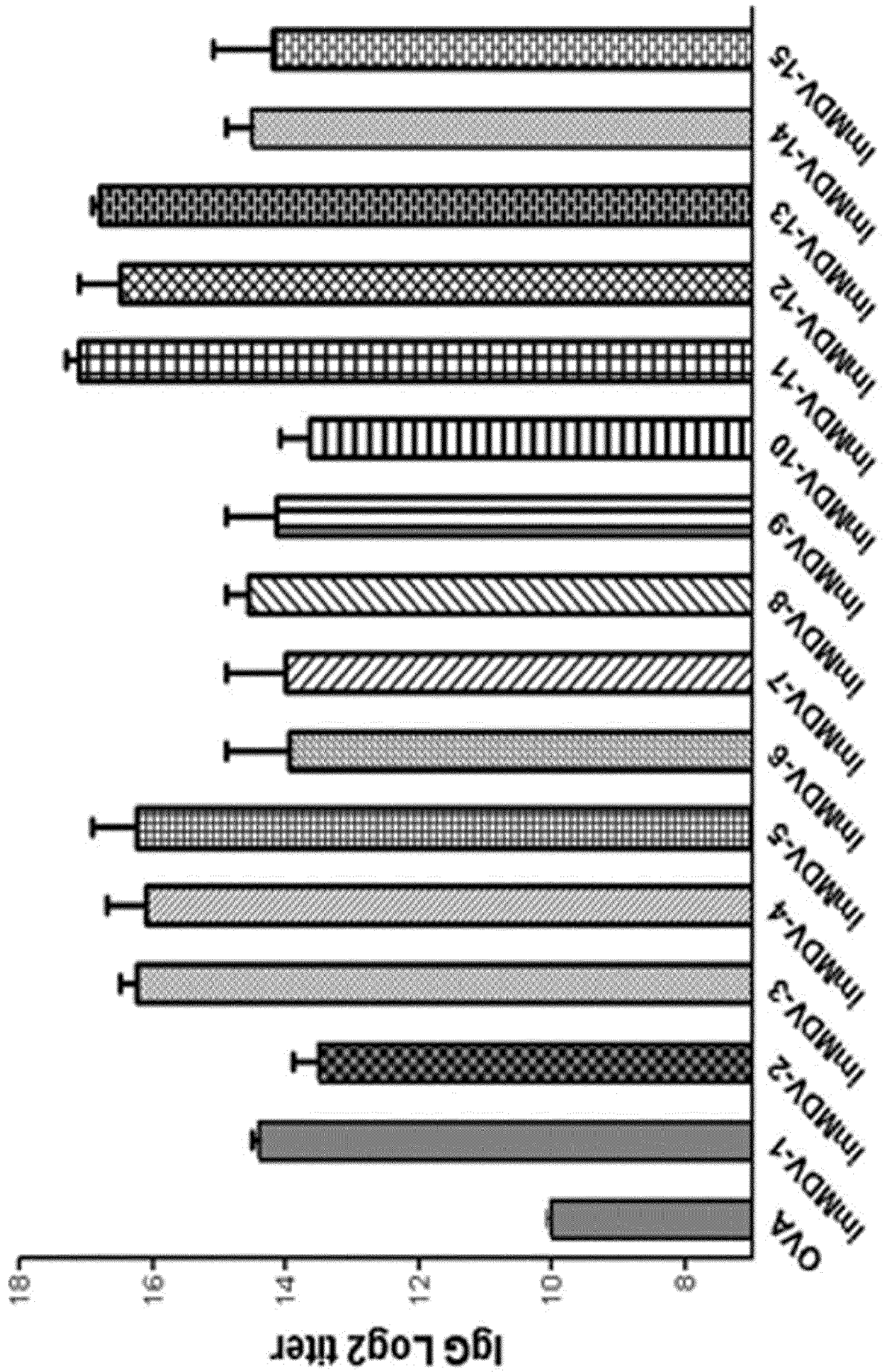
[도24]



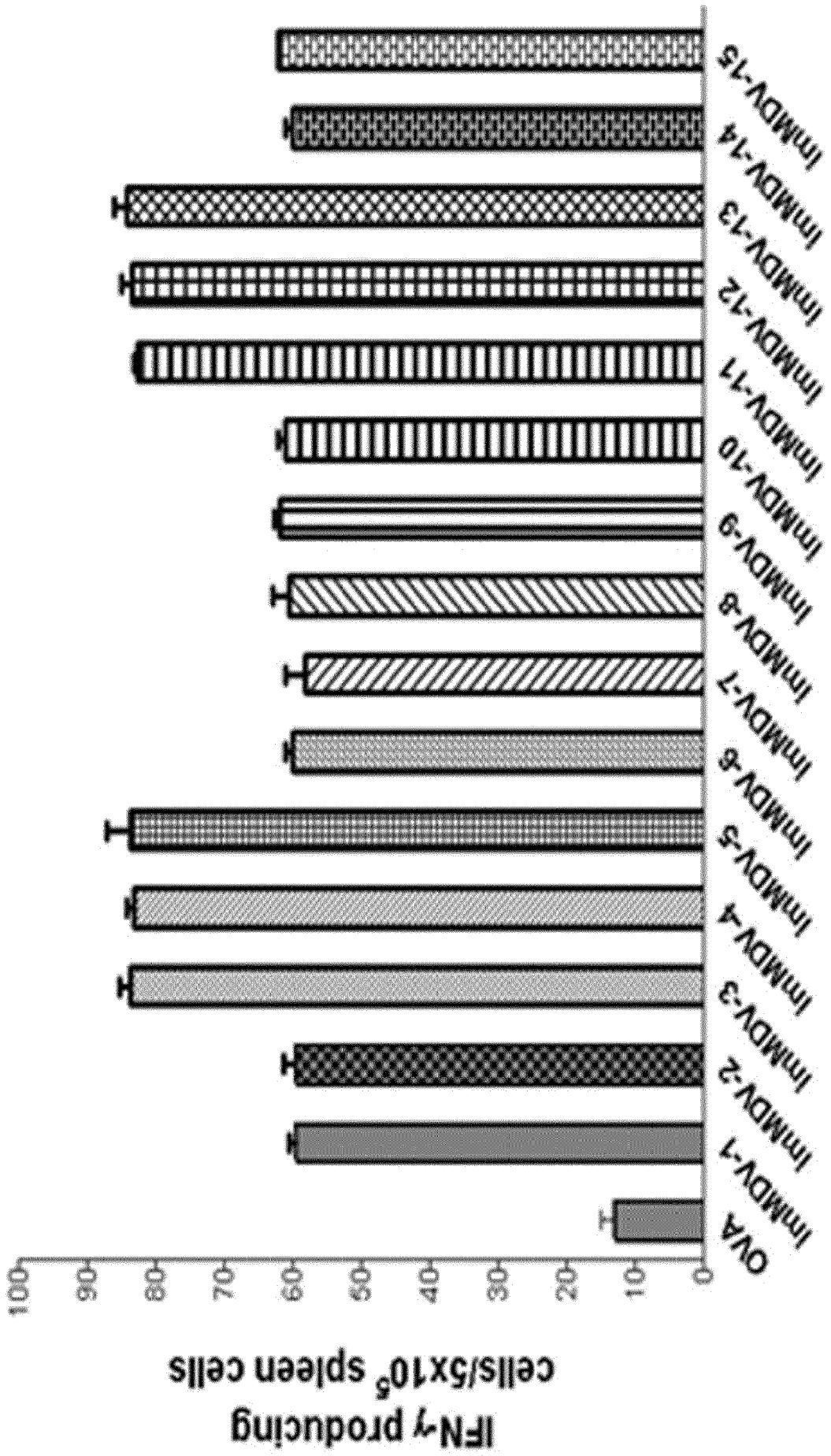
[도25]



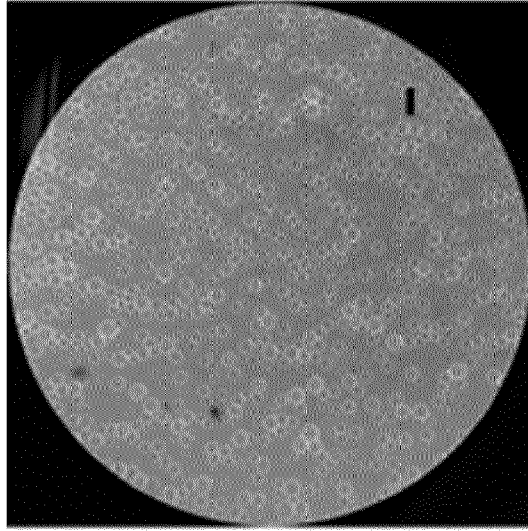
[도26]



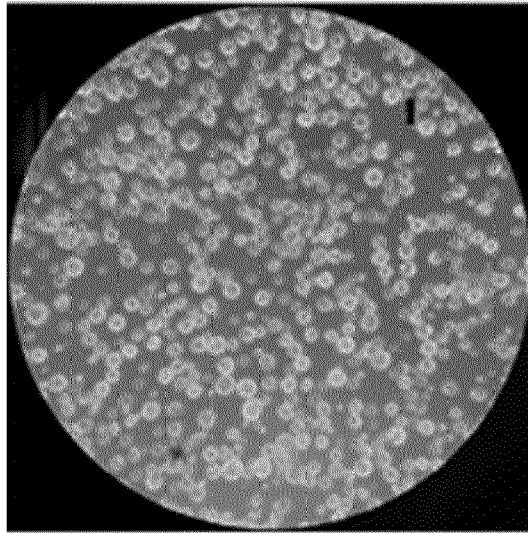
[도27]



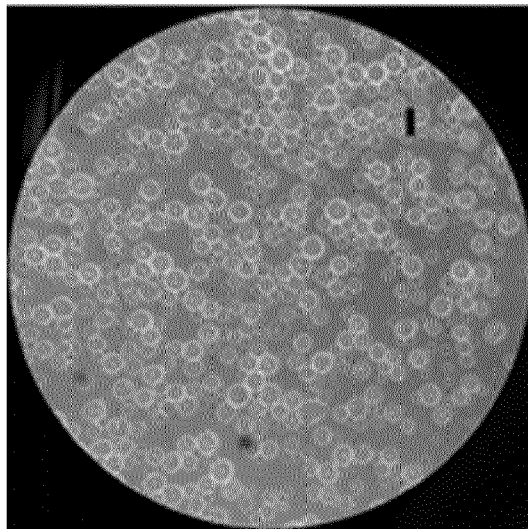
[도28]



imMDV(OA-Gem)

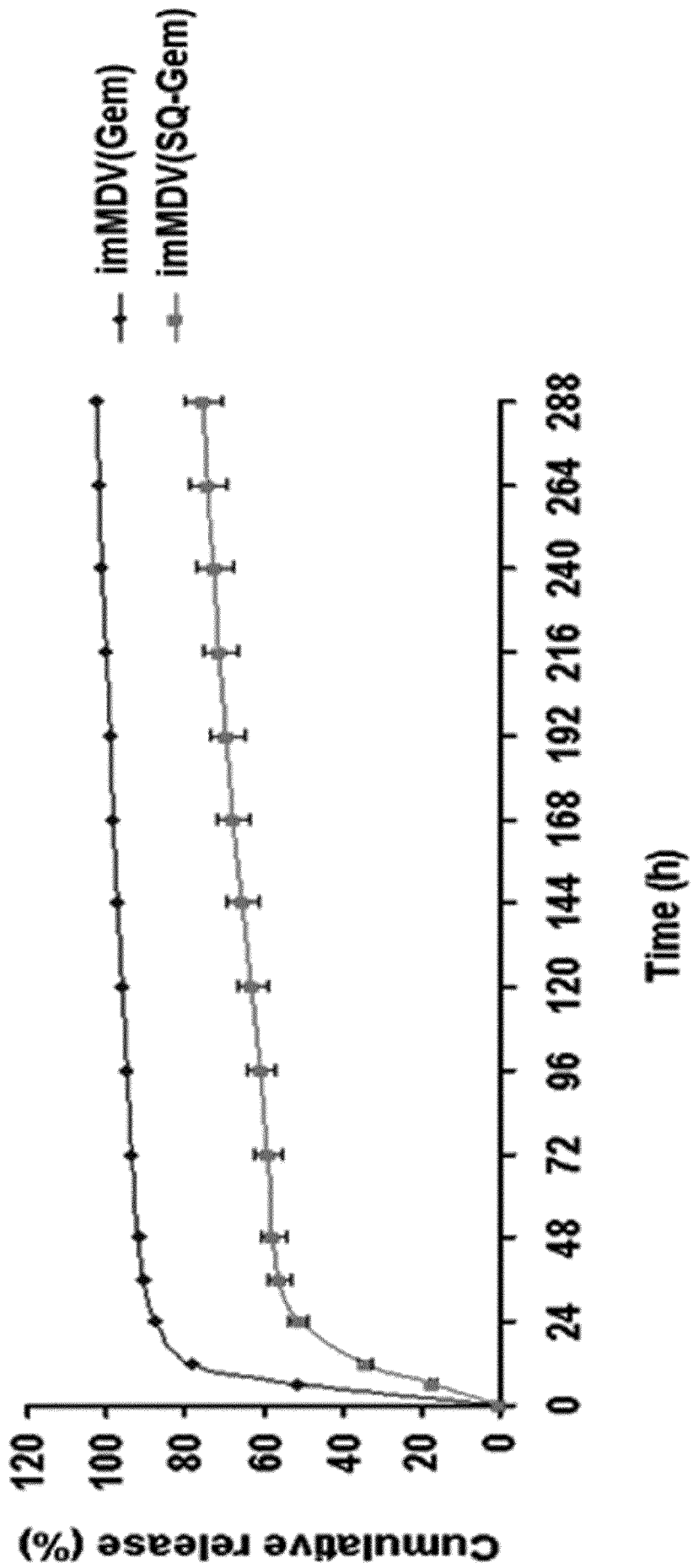


imMDV(SQ-Gem)

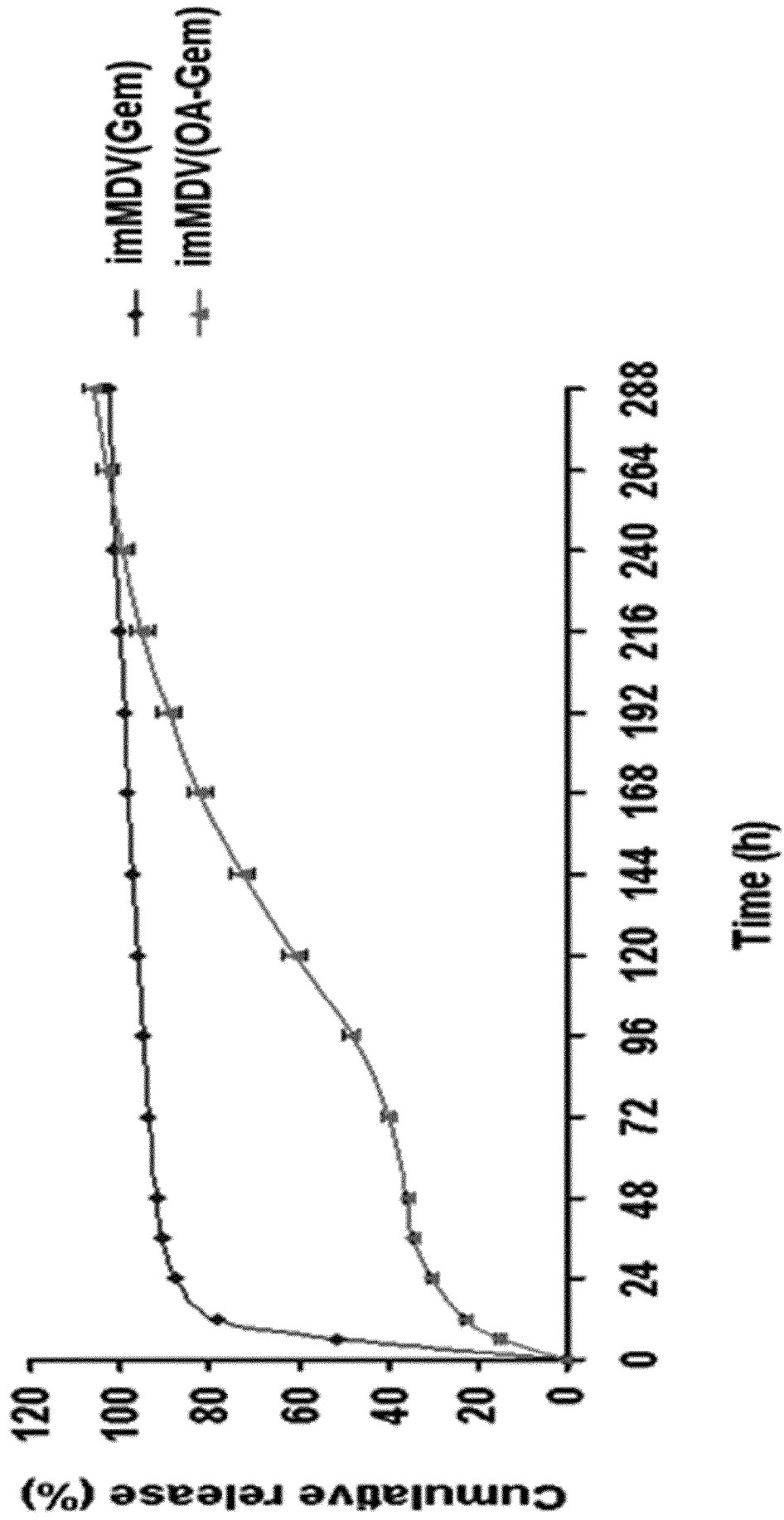


imMDV(Gem)

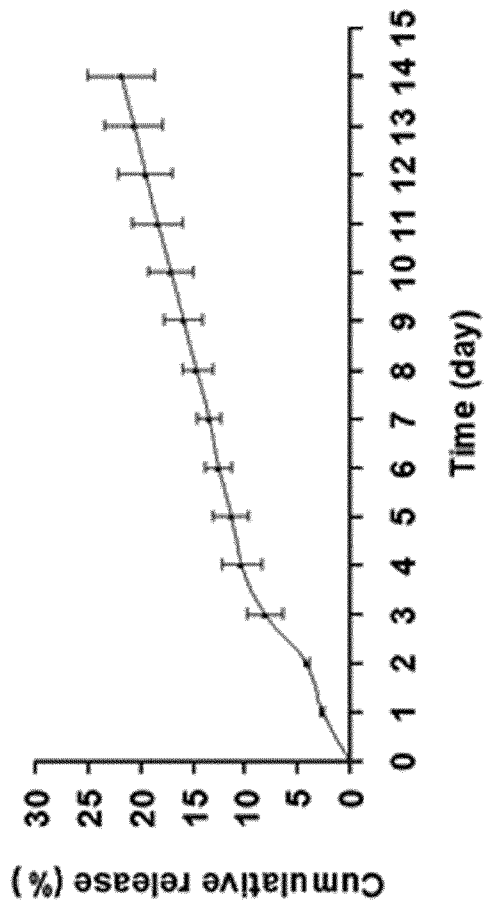
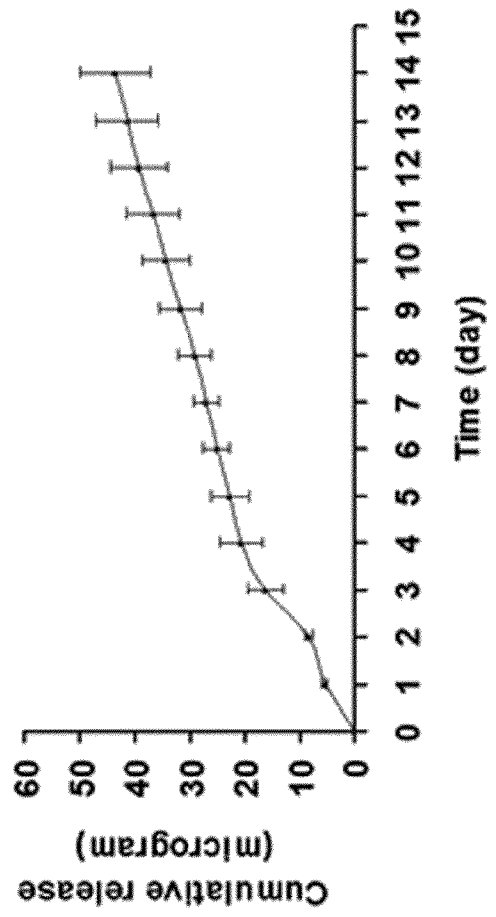
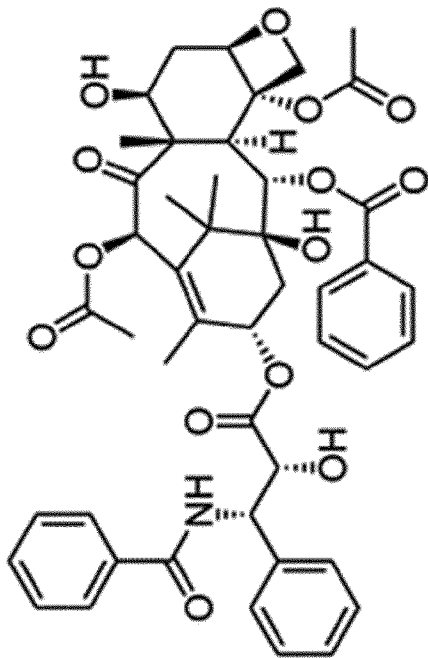
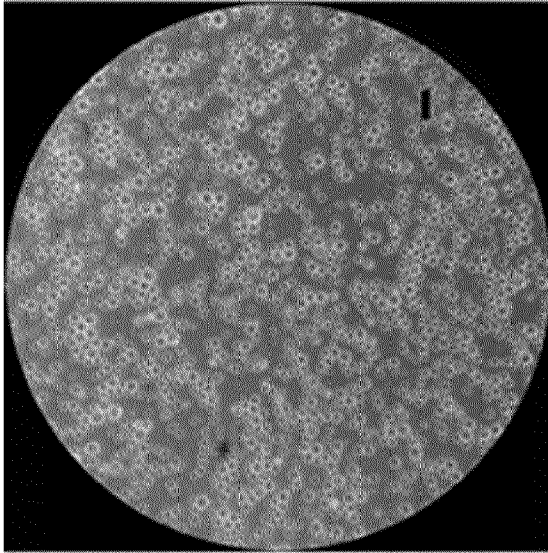
[도29]



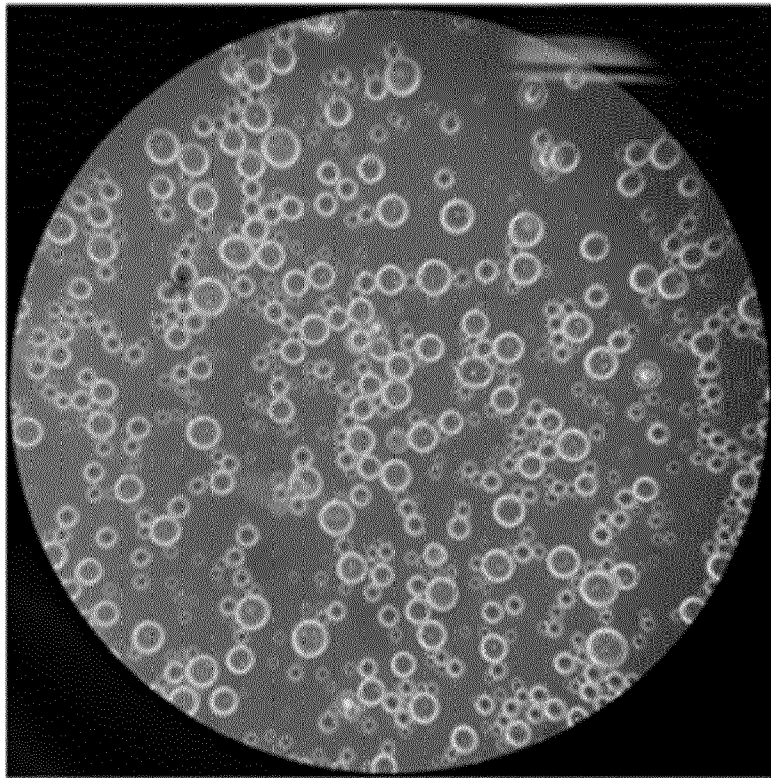
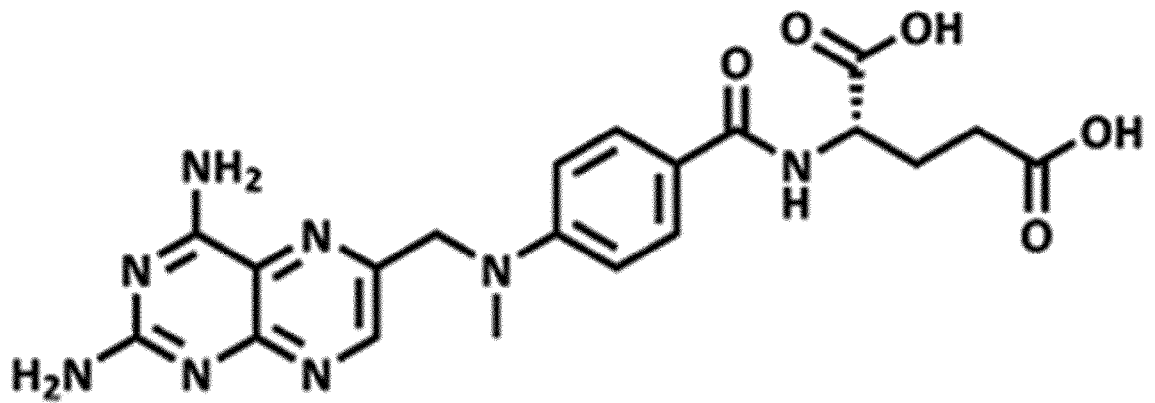
[도30]



[도31]

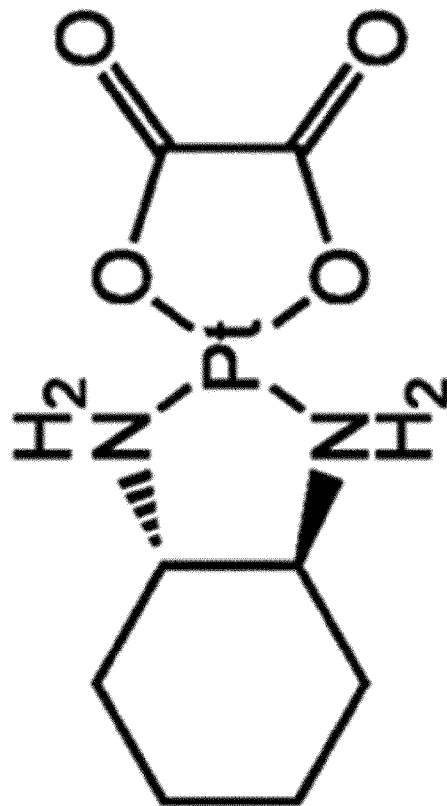
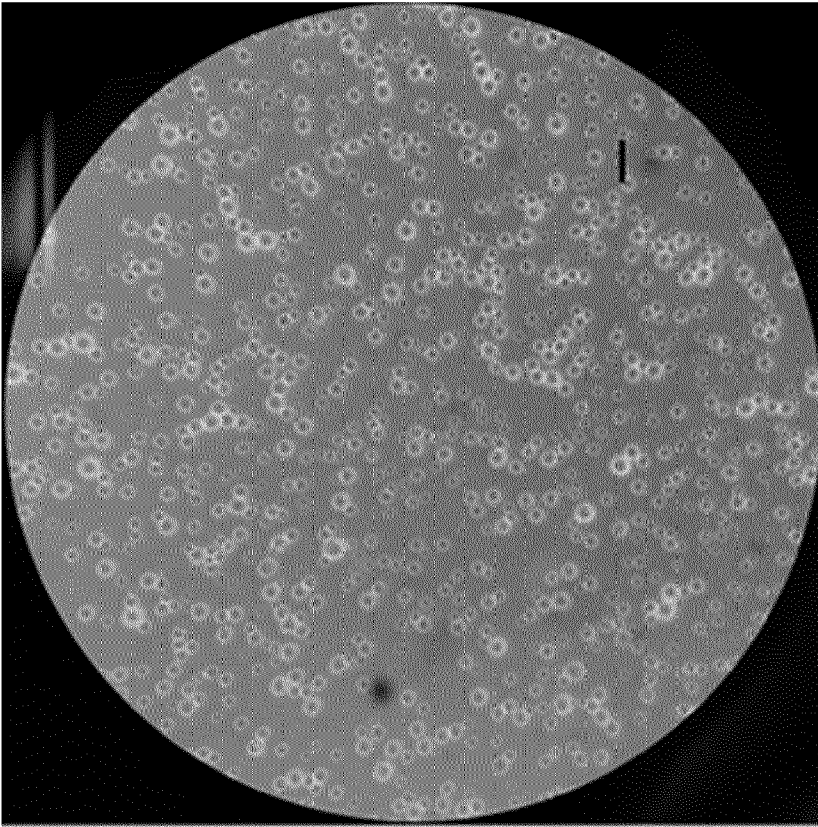


[도33]



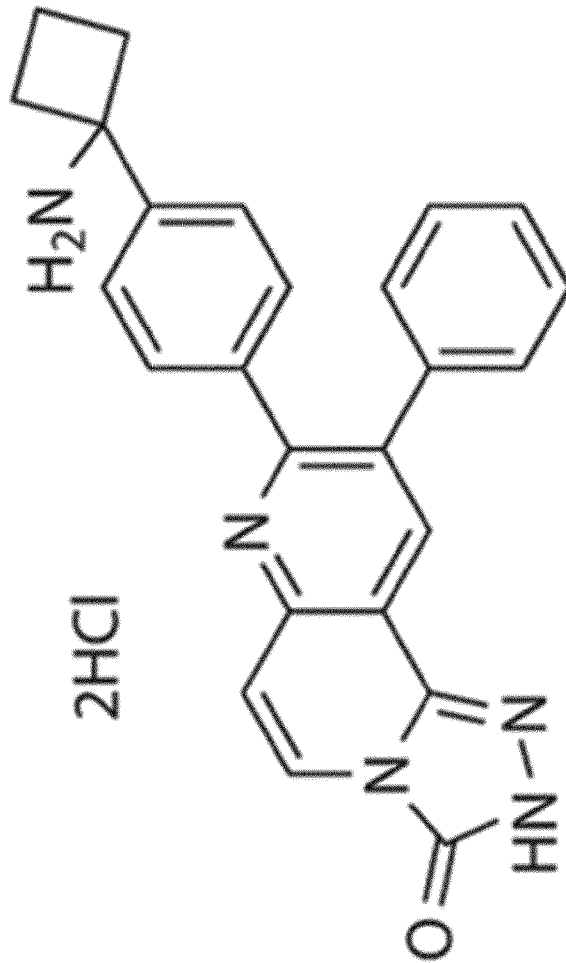
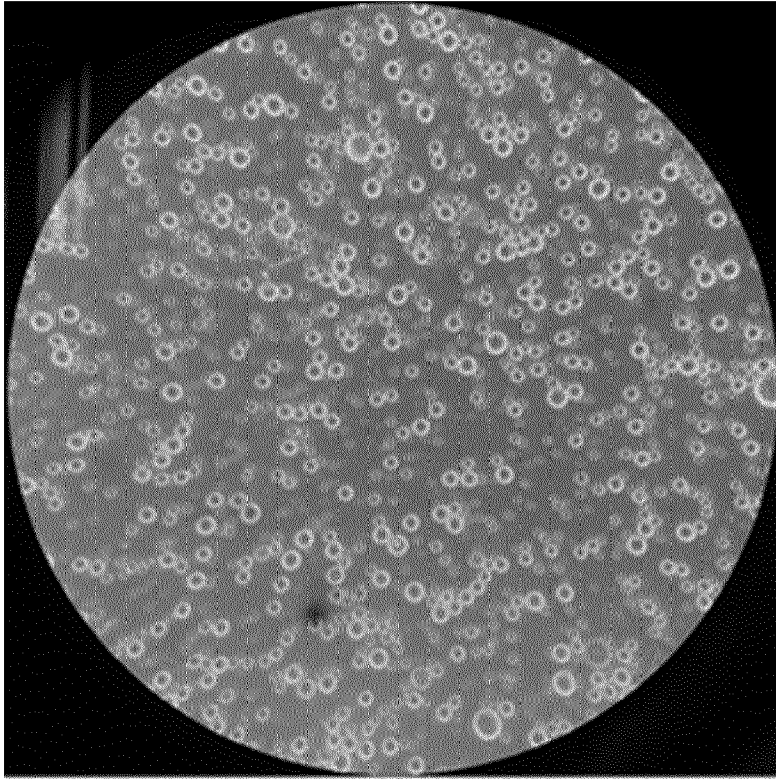
imMDV (Methotrexate)

[도34]



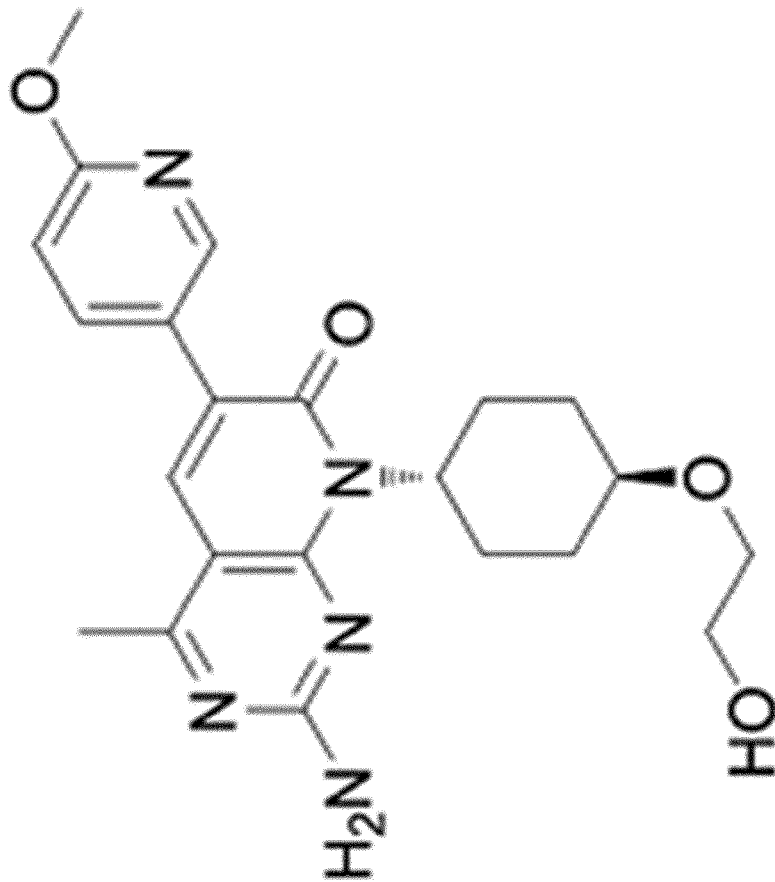
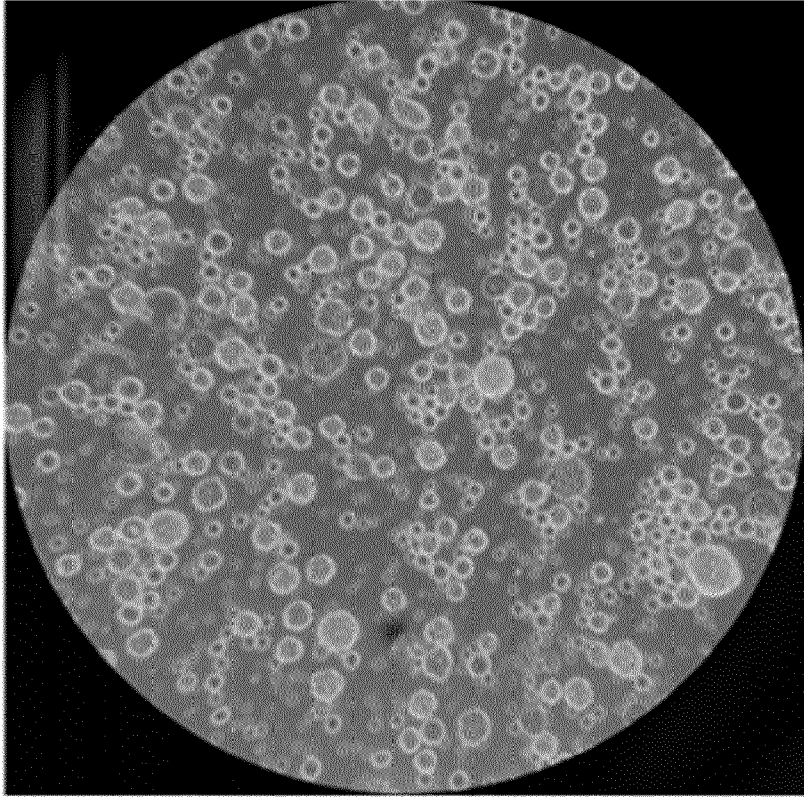
imMDV (Oxaliplatin)

[도35]



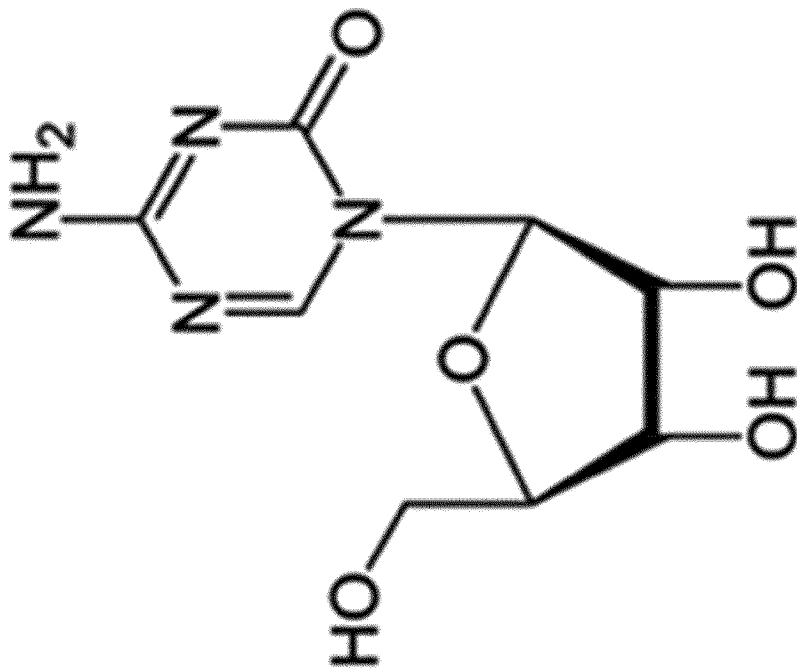
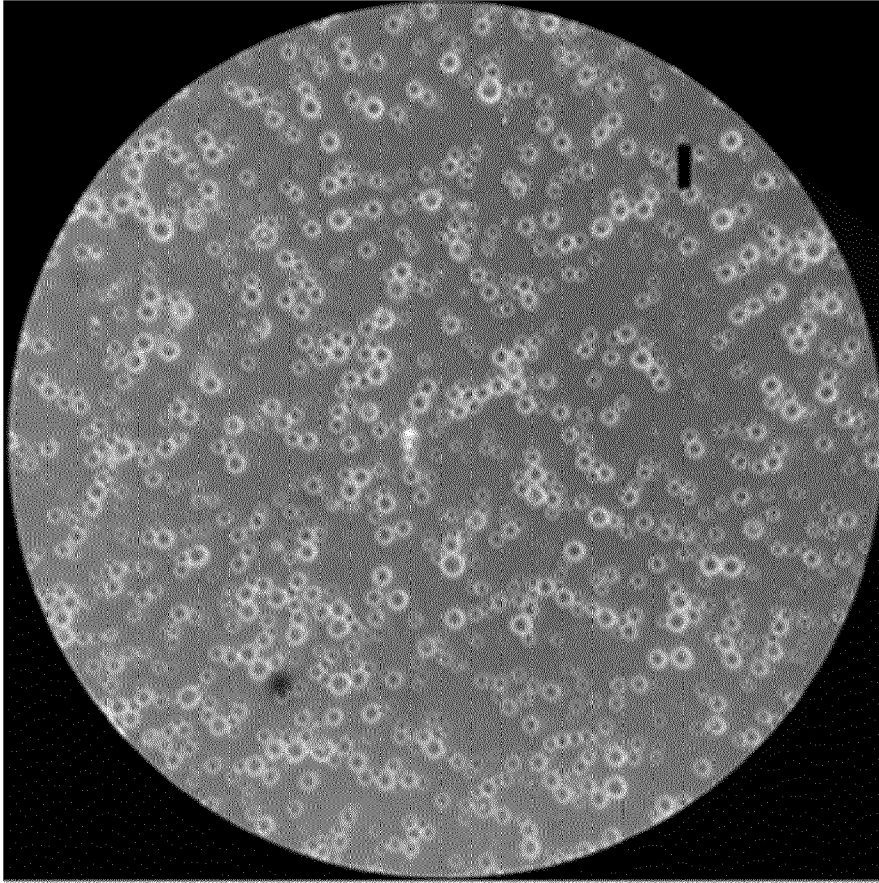
imMDV(MK-2206)

[도36]



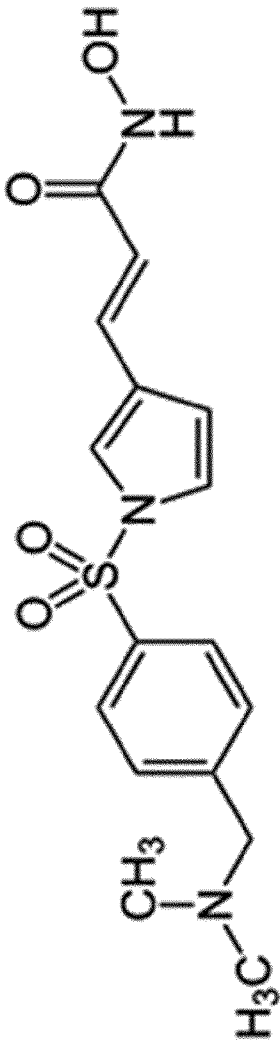
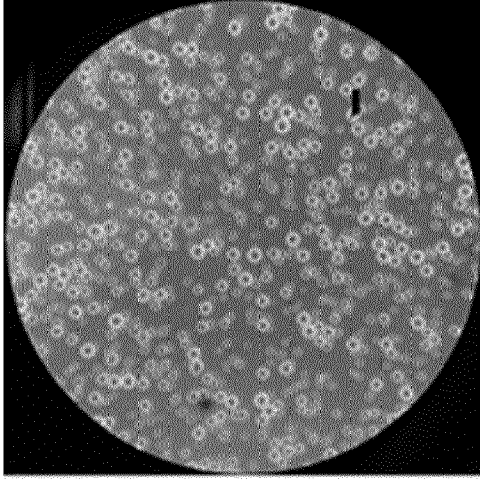
imMDV(PF-04691502)

[도37]

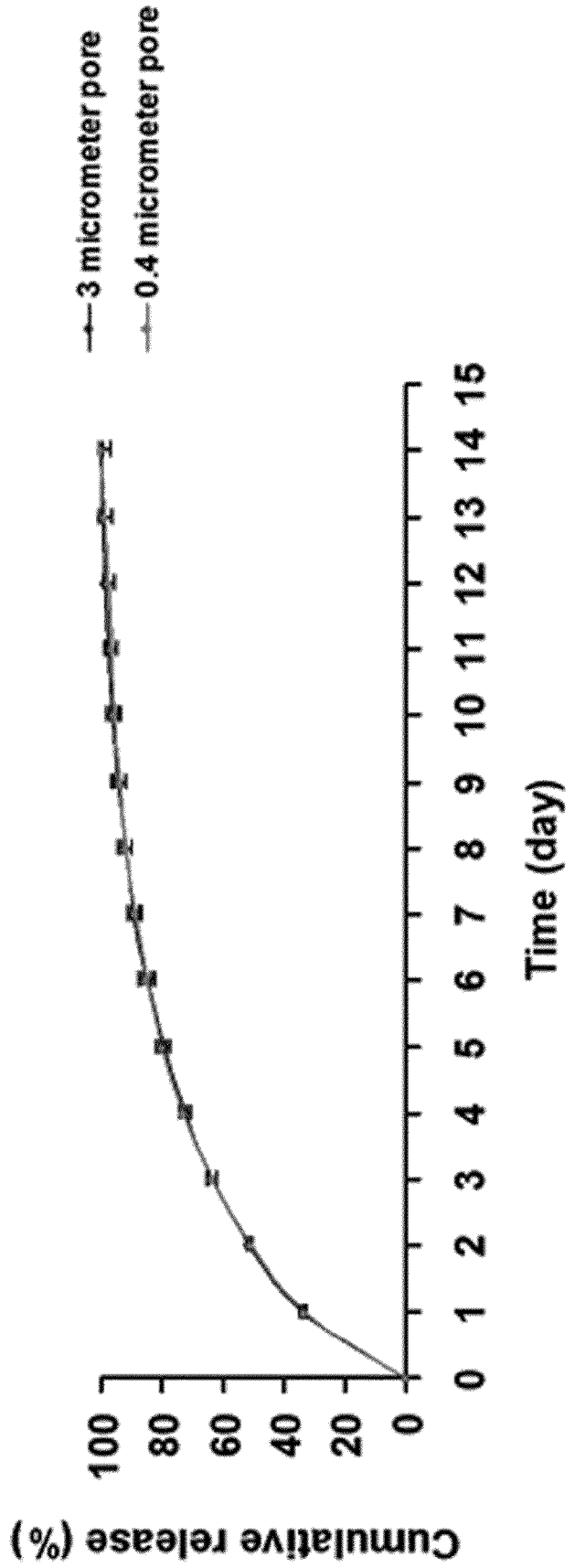


imMDV(Azacytidine)

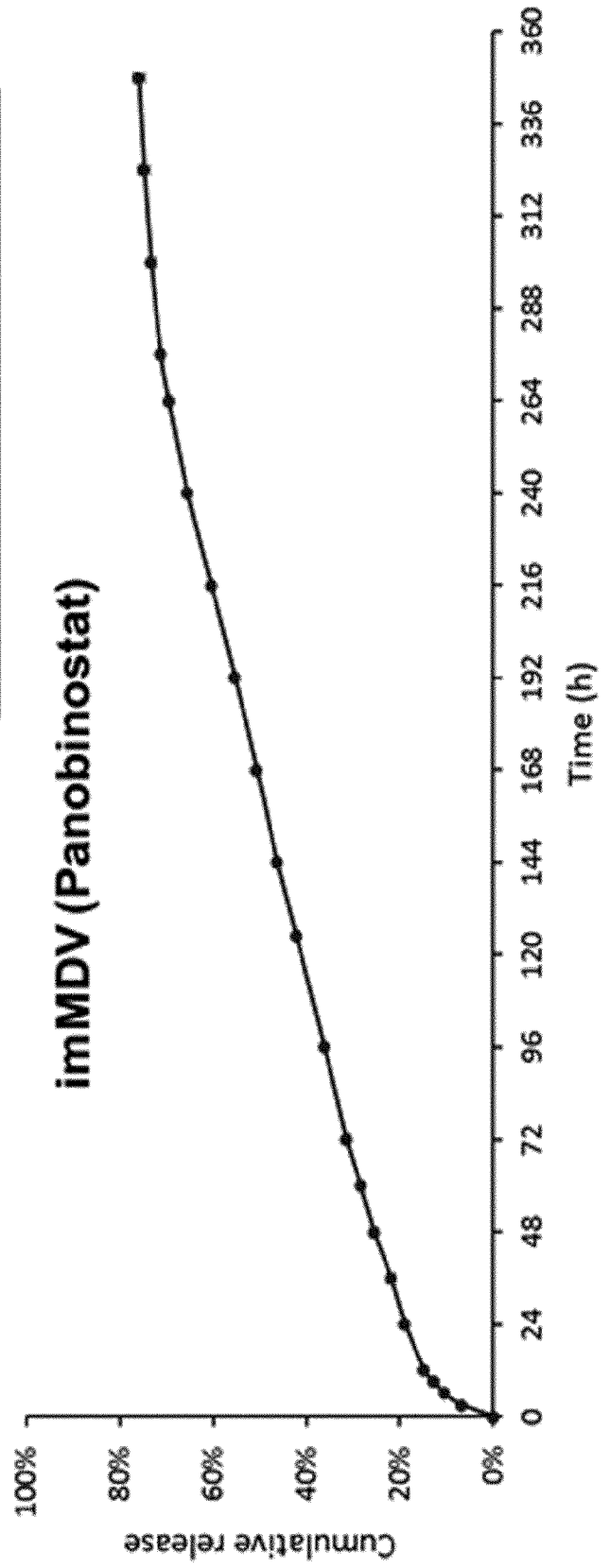
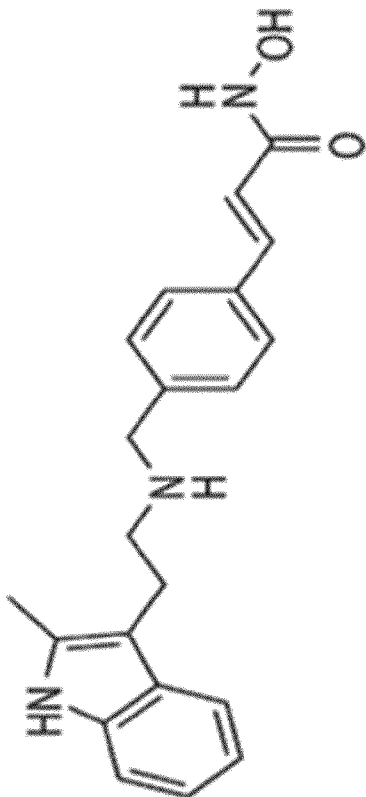
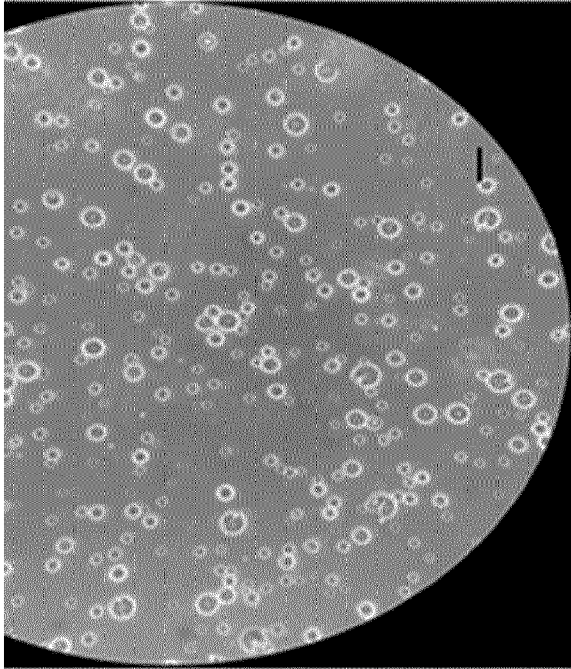
[도38]



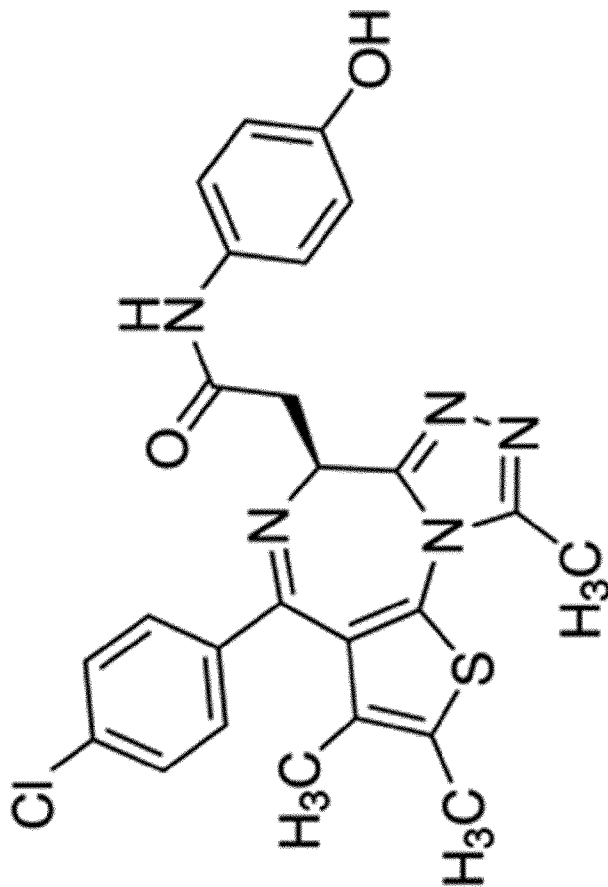
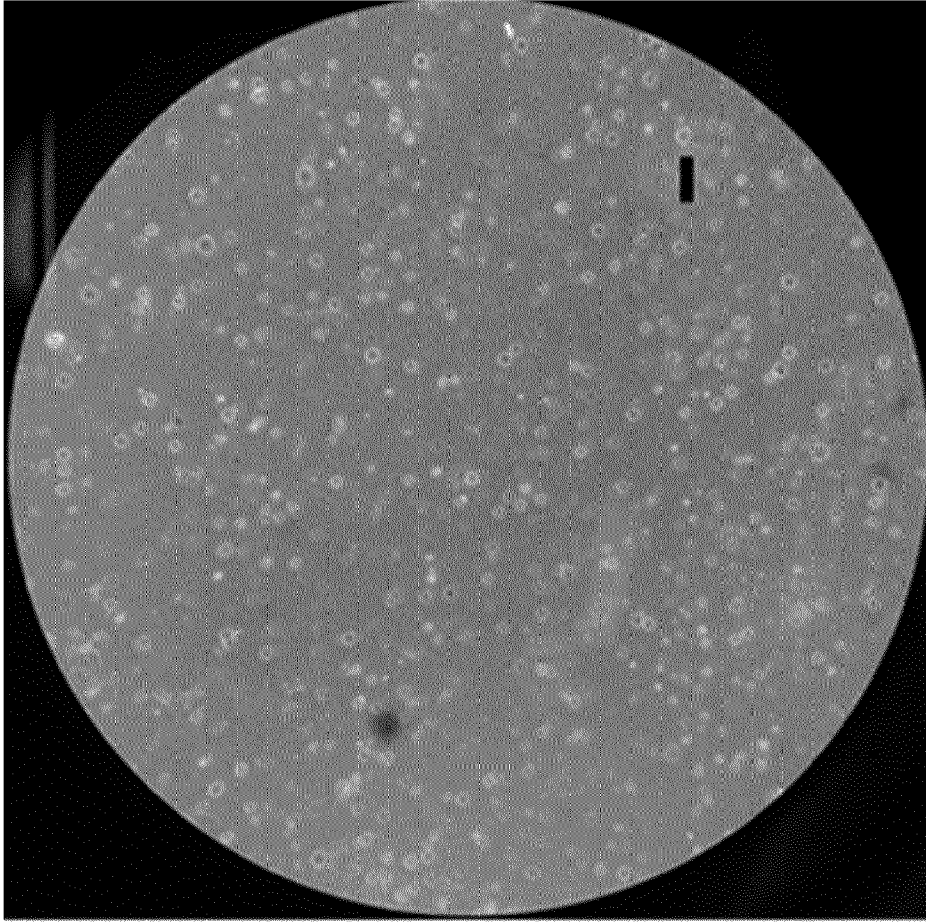
imMDV (Resminostat)



[도39]

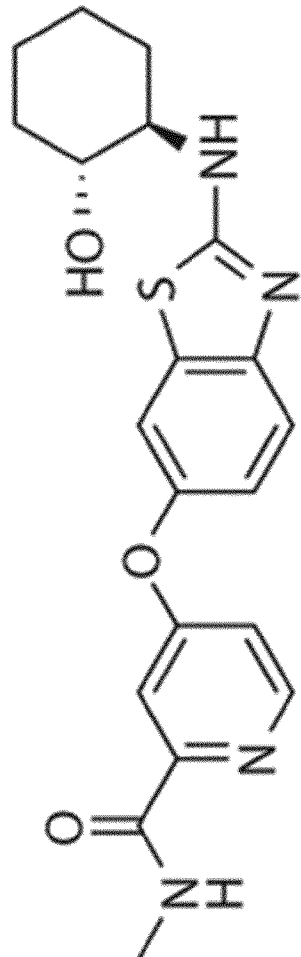
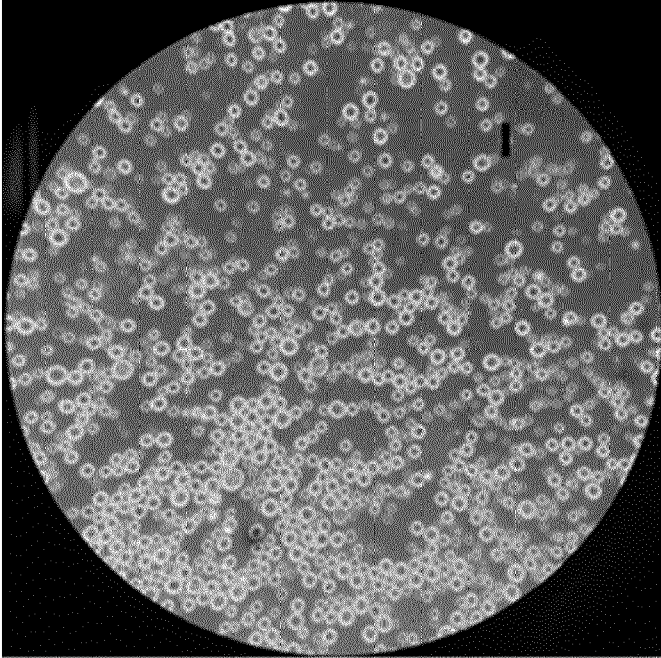


[도40]



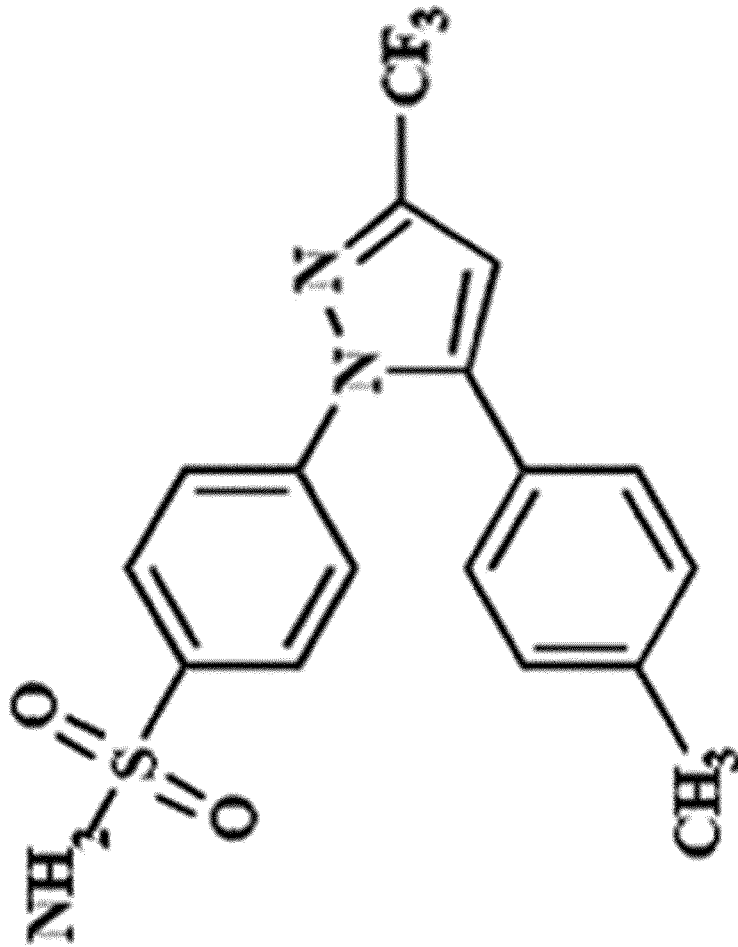
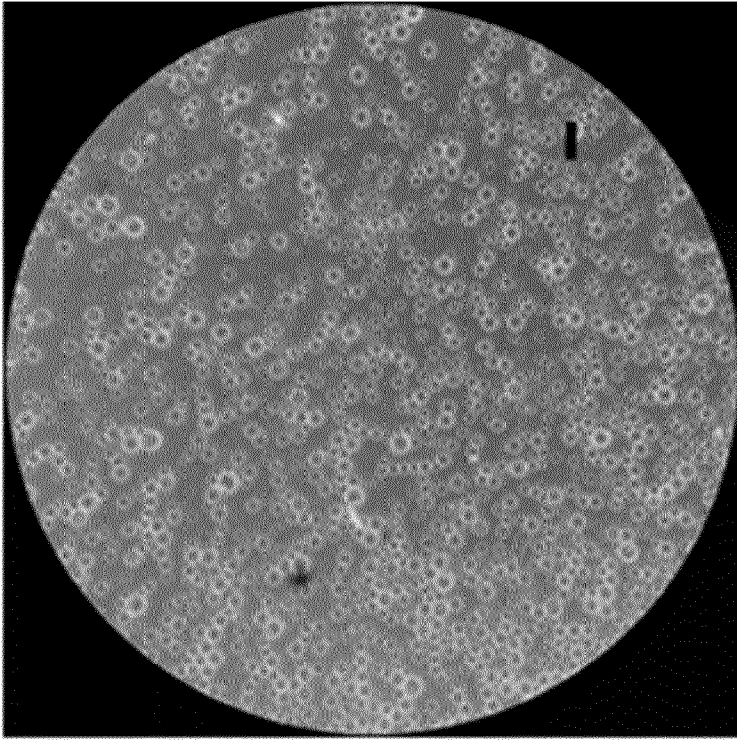
imMDV(OTX015 (iBET))

[도41]



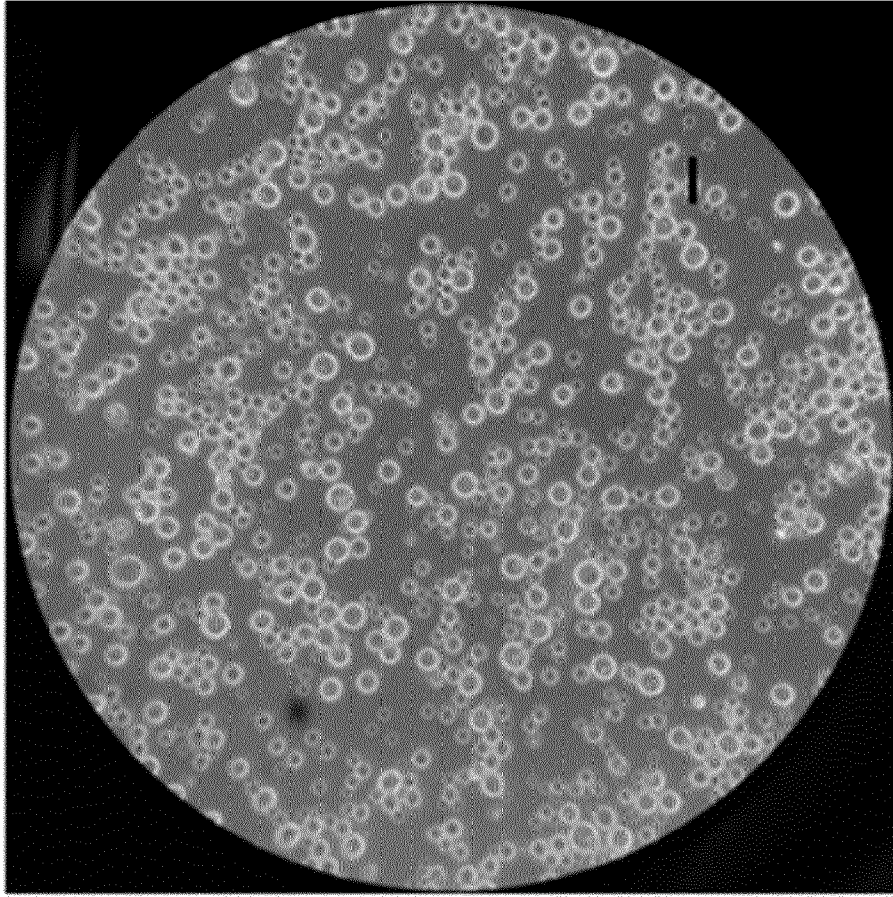
imMDV(BLZ945)

[도42]

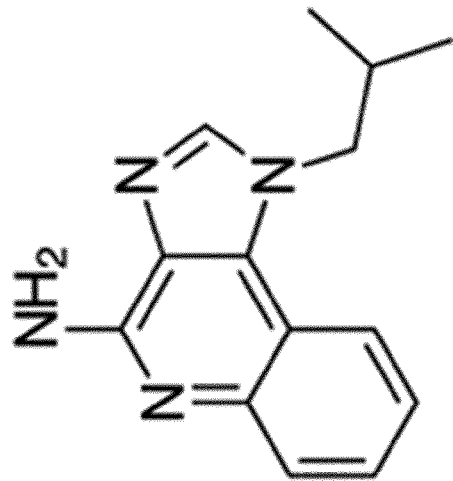
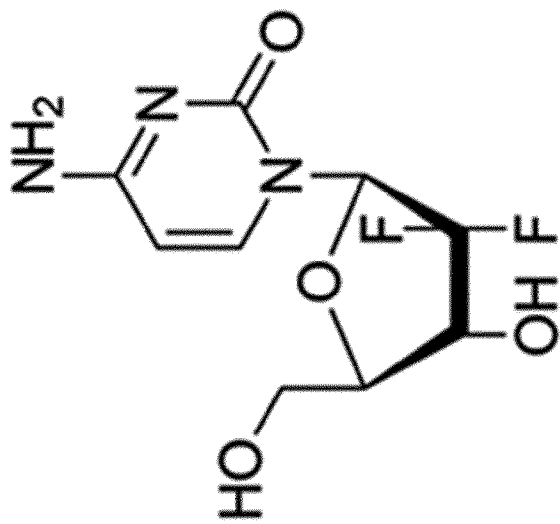


imMDV(Celecoxib)

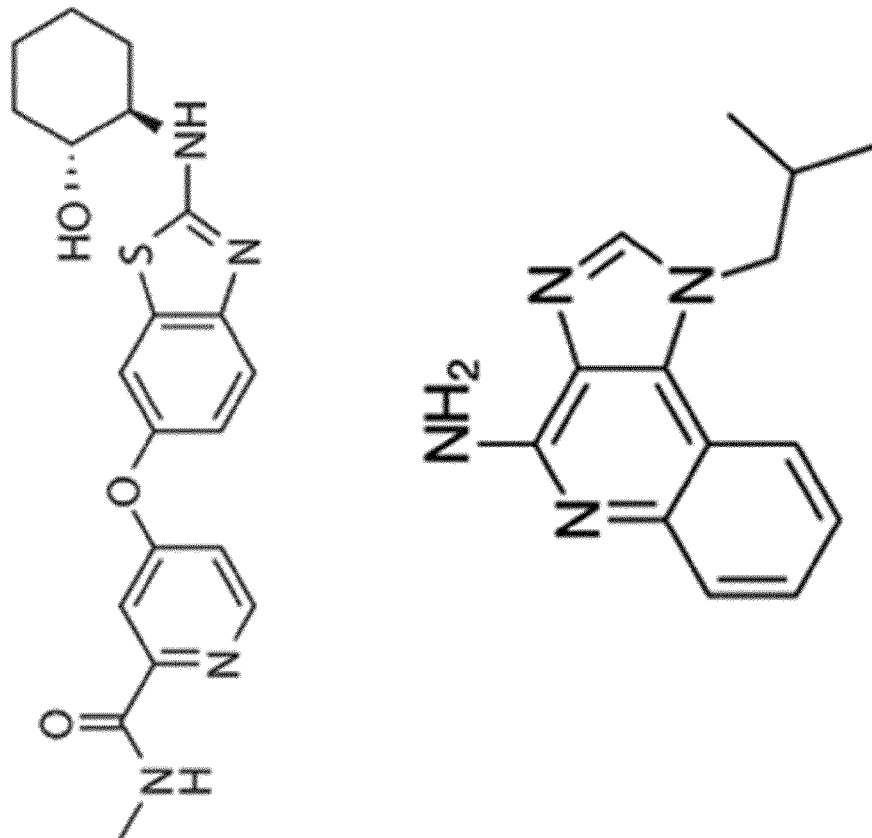
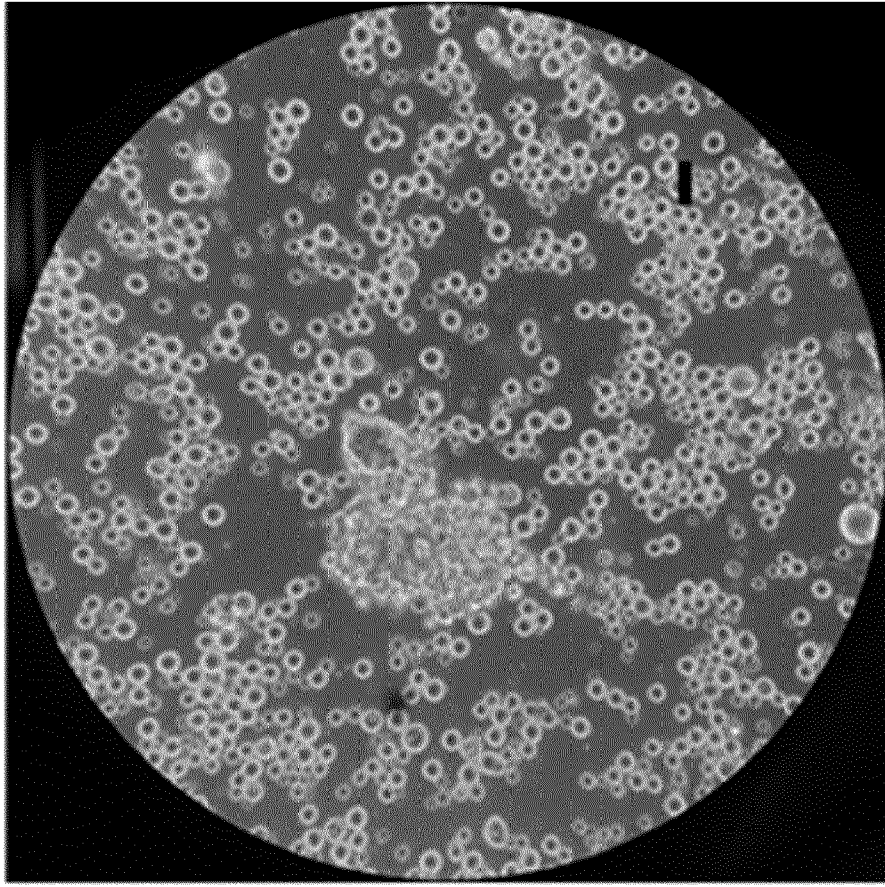
[도43]



imMDV(Gem/R837)



[도44]



imMDV(BLZ945/R837)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/002516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/50(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61K 9/107(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 9/50; A61K 39/39; A61K 9/127; A61K 8/14; A61K 47/48; A61K 9/107; A61K 39/00

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: liposome, multi-domain, immunoactive substance, organic phase, water phase, vaccine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002-0039596 A1 (HARTOUNIAN, Hartoun et al.) 04 April 2002 See claims 1, 33-34; paragraphs [0017]-[0026]; and example 2.	1-11
Y	US 2014-0112979 A1 (ANDREASEN, Lars Vibe et al.) 24 April 2014 See claims 1, 6, 11-12; paragraphs [0054]-[0055]; and examples 4, 14.	1-11
A	US 6071534 A (KIM, Simil et al.) 06 June 2000 See the entire document.	1-11
A	JAIN, Sanjay K. et al., "Design and Development of Multivesicular Liposomal Depot Delivery System for Controlled Systemic Delivery of Acyclovir Sodium", AAPS PharmSciTech, 2005, vol. 6, no. 1, pages E35-E41 See the entire document.	1-11
A	JP 2014-058469 A (KYOTO UNIV et al.) 03 April 2014 See the entire document.	1-11



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

"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

07 JUNE 2018 (07.06.2018)

Date of mailing of the international search report

07 JUNE 2018 (07.06.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/002516

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2002-0039596 A1	04/04/2002	AU 1407599 A	07/06/1999
		AU 1999-14075 A1	07/06/1999
		AU 1999-14075 B2	03/10/2002
		AU 2002-301268 B2	06/10/2005
		AU 2006-200044 A1	02/02/2006
		AU 2008-203032 A1	31/07/2008
		AU 2008-203032 B2	13/05/2010
		AU 2010-212347 A1	09/09/2010
		AU 2010-212347 B2	22/03/2012
		AU 2012-203661 A1	12/07/2012
		AU 2012-203661 B2	23/10/2014
		AU 2015-200303 A1	12/02/2015
		AU 2015-200303 B2	24/11/2016
		CA 2309548 A1	27/05/1999
		EP 1030652 A1	30/08/2000
		EP 1030652 B1	25/04/2012
		FR 1318802 A	22/02/1963
		IL 135989 A	11/02/2009
		IL 193778 A	04/05/2009
		JP 2001-522870 A	20/11/2001
		JP 2010-285438 A	24/12/2010
		JP 4575592 B2	04/11/2010
		NZ 504188 A	26/10/2001
		US 2007-0235889 A1	11/10/2007
		US 2014-0004173 A1	02/01/2014
		US 9585838 B2	07/03/2017
WO 99-25319 A1	27/05/1999		
US 2014-0112979 A1	24/04/2014	CN 103619325 A	05/03/2014
		EP 2729127 A2	14/05/2014
		WO 2013-004234 A2	10/01/2013
		WO 2013-004234 A3	02/05/2013
US 6071534 A	06/06/2000	CA 1323568 C	26/10/1993
		EP 0280503 A2	31/08/1988
		EP 0280503 B1	07/04/1993
		EP 0280503 B9	21/04/2004
		JP 01-125318 A	17/05/1989
		JP 2843566 B2	06/01/1999
		KR 10-1997-0004907 B1	08/04/1997
		US 5723147 A	03/03/1998
		US 6807572 A	15/09/1998
JP 2014-058469 A	03/04/2014	CN 103655213 A	26/03/2014
		JP 2014-058468 A	03/04/2014
		JP 5988263 B2	07/09/2016
		JP 6000033 B2	28/09/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 9/50(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61K 9/107(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 9/50; A61K 39/39; A61K 9/127; A61K 8/14; A61K 47/48; A61K 9/107; A61K 39/00 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: 리포솜, 다중도메인, 면역활성물질, 유기상, 수용상, 백신		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2002-0039596 A1 (HARTOUNIAN, HARTOUN 등) 2002.04.04 청구항 1, 33-34; 문단 [0017]-[0026]; 및 실시예 2 참조.	1-11
Y	US 2014-0112979 A1 (ANDREASEN, LARS VIBE 등) 2014.04.24 청구항 1, 6, 11-12; 문단 [0054]-[0055]; 및 실시예 4, 14 참조.	1-11
A	US 6071534 A (KIM, SINIL 등) 2000.06.06 전체 문헌 참조.	1-11
A	JAIN, SANJAY K. 등, `Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for controlled systemic delivery of acyclovir sodium`, AAPS PharmSciTech, 2005, 6권, 1호, 페이지 E35-E41 전체 문헌 참조.	1-11
A	JP 2014-058469 A (KYOTO UNIV 등) 2014.04.03 전체 문헌 참조.	1-11
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 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 2018년 06월 07일 (07.06.2018)	국제조사보고서 발송일 2018년 06월 07일 (07.06.2018)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2002-0039596 A1	2002/04/04	AU 1407599 A	1999/06/07
		AU 1999-14075 A1	1999/06/07
		AU 1999-14075 B2	2002/10/03
		AU 2002-301268 B2	2005/10/06
		AU 2006-200044 A1	2006/02/02
		AU 2008-203032 A1	2008/07/31
		AU 2008-203032 B2	2010/05/13
		AU 2010-212347 A1	2010/09/09
		AU 2010-212347 B2	2012/03/22
		AU 2012-203661 A1	2012/07/12
		AU 2012-203661 B2	2014/10/23
		AU 2015-200303 A1	2015/02/12
		AU 2015-200303 B2	2016/11/24
		CA 2309548 A1	1999/05/27
		EP 1030652 A1	2000/08/30
		EP 1030652 B1	2012/04/25
		FR 1318802 A	1963/02/22
		IL 135989 A	2009/02/11
		IL 193778 A	2009/05/04
		JP 2001-522870 A	2001/11/20
		JP 2010-285438 A	2010/12/24
		JP 4575592 B2	2010/11/04
		NZ 504188 A	2001/10/26
		US 2007-0235889 A1	2007/10/11
		US 2014-0004173 A1	2014/01/02
US 9585838 B2	2017/03/07		
WO 99-25319 A1	1999/05/27		
US 2014-0112979 A1	2014/04/24	CN 103619325 A	2014/03/05
		EP 2729127 A2	2014/05/14
		WO 2013-004234 A2	2013/01/10
		WO 2013-004234 A3	2013/05/02
US 6071534 A	2000/06/06	CA 1323568 C	1993/10/26
		EP 0280503 A2	1988/08/31
		EP 0280503 B1	1993/04/07
		EP 0280503 B9	2004/04/21
		JP 01-125318 A	1989/05/17
		JP 2843566 B2	1999/01/06
		KR 10-1997-0004907 B1	1997/04/08
		US 5723147 A	1998/03/03
		US 6807572 A	1998/09/15
JP 2014-058469 A	2014/04/03	CN 103655213 A	2014/03/26
		JP 2014-058468 A	2014/04/03
		JP 5988263 B2	2016/09/07
		JP 6000033 B2	2016/09/28