(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 2 월 10 일 (10.02.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/031011 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 39/39 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/010239

(22) 국제출원일: 2021 년 8 월 4 일 (04.08.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0097551 2020 년 8 월 4 일 (04.08.2020) KR
10-2021-0102216 2021 년 8 월 3 일 (03.08.2021) KR

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

(72) 발명자: 임용택 (**LIM, Yong Taik**); 13597 경기도 성남시 분당구 내정로 151, 524동 1301호, Gyeonggi-do (KR). 진승모 (**JIN, Seung Mo**); 06709 서울시 서초구 반포대로7길 45, 5층 103동 605호, Seoul (KR). 유연정 (**YOO, Yeon Jeong**); 13559 경기도 성남시 분당구 성남대로 275, A동 1503호, Gyeonggi-do (KR).

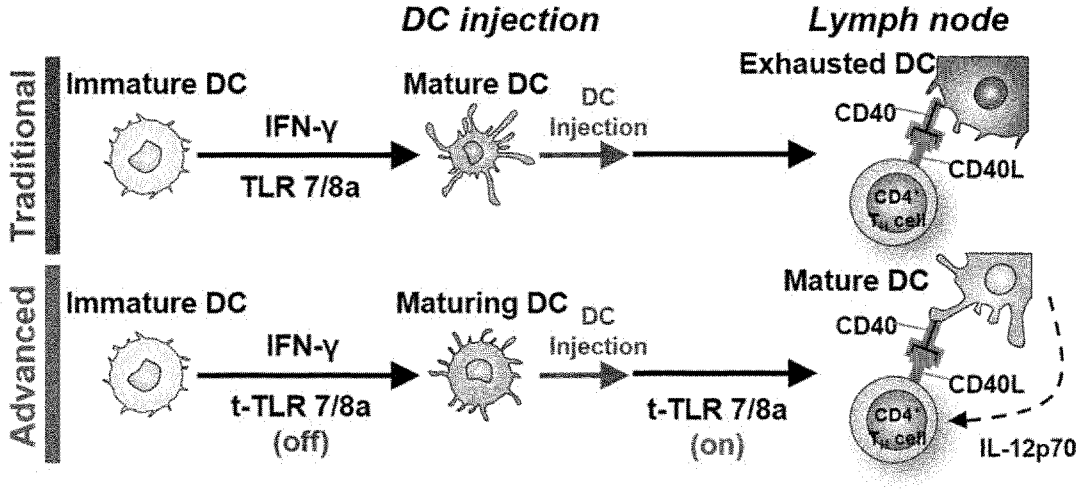
(74) 대리인: 이명진 (**LEE, Myoung-Jin**); 06158 서울시 강남구 테헤란로 445, 13층, Seoul (KR).

(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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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), 유

(54) **Title:** KINETICALLY ACTING ADJUVANT ENSEMBLE

(54) **발명의 명칭:** 동력학적으로 작용하는 아주번트 앙상블



(57) **Abstract:** The present invention relates to an adjuvant ensemble in which two or more immunostimulatory substances for inducing the activation of various immune cells are combined, and to a novel concept of a kinetically acting adjuvant ensemble and use thereof, in which, when combining immunostimulatory substances having different signaling pathways in an immunostimulatory mechanism, the treatment order and the time interval are adjusted to maximize the finally exhibited synergistic immunostimulatory response. The kinetic action is characterized in that the second immunostimulatory substance responds to intrinsic factors (enzymes, redox potential, GSH, and pH) and extrinsic factors (redox, pH, temperature, photo/light, magnetism, ultrasound, and electrical response) in immune cells, and thus chemical binding at a binding site is cleaved, and the active site is exposed so that function is kinetically recovered, or two or more immunostimulatory substances are sequentially released from a carrier at regular time intervals, thus inducing immune activity. In such a novel immunostimulatory adjuvant ensemble, a first immunostimulatory substance and a second immunostimulatory substance can be selected in a personalized manner according to applications, and the adjuvant ensemble can be used for anticancer effects and the development of drugs for the prevention and treatment of infectious diseases.

WO 2022/031011 A1

[다음 쪽 계속]

럽 (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))

(57) 요약서: 본 발명은 다양한 면역세포 활성화를 유도하는 2개 이상의 면역활성화 물질이 조합된 아주번트 앙상블에 관한 것으로, 면역활성화 메커니즘에서 서로 다른 신호전달 체계를 갖고 있는 면역활성화 물질을 조합 할 때, 그 처리 순서 및 시간 간격을 조절함으로써, 최종적으로 나타나는 시너지 면역활성화 반응을 극대화할 수 있는 새로운 개념의 동력학적으로 작용하는 아주번트 앙상블 및 그 용도에 관한 것이다. 동력학적 작용은 제 2 의 면역활성화 물질이 면역세포 내의 내인성 요인(효소, Redox potential, GSH 및 pH) 및 외인성 요인(redox, pH, temperature, photo/light, magnetic, ultrasound, and electrical responsive) 에 반응하여, 결합 부위의 화학적 결합이 절단(cleavage) 되고, 활성화 부위가 노출되어 동력학적으로 기능이 회복되거나, 2가지 이상의 면역활성화 물질을 전달체에서 일정시간 간격을 두고 순차적으로 방출되어 면역활성을 유도하는 것을 특징으로 한다. 이러한 신규 면역활성 아주번트 앙상블은 용도에 맞게 제1 면역활성화 물질과 제2 면역활성화 물질을 맞춤형으로 선택할 수 있으며, 항암효과 및 감염성 질환의 예방 및 치료 약물 개발로 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 동력학적으로 작용하는 아주번트 앙상블

기술분야

[1] 본 발명은 작용시간이 동력학적으로 조절되는, 면역세포를 활성화시키는 2개 이상의 면역활성화 물질을 포함하는 신규 아주번트 앙상블에 관한 것으로, 보다 자세하게는, 주입 후에, 제1의 면역활성화 물질이 수용체와 먼저 결합하여 면역반응을 1차적으로 유도하고, 그 이후에 제2의 면역활성화 물질이 수용체와 결합하여 순차적으로(sequentially) 면역반응이 유도되도록 설계된 아주번트 앙상블에 관한 것이다.

배경기술

[2] 면역반응은 활성화된 면역세포가 외래성 및 내인성 물질, 즉, 항원(antigen)에 대하여 일으키는 일련의 반응으로서, 세균, 바이러스 등을 포함하는 미생물, 생체의 이물질 등이 생체 내로 유입되게 되면, 면역세포가 이를 인식하고 활성화되어, 사이토카인 등의 인자를 분비하여 염증 반응을 유발한다. 최근에는 감염 초기에 비특이적으로 작용하는 선천성 면역반응 단계에서의 기작에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이 중 톨-유사 수용체(Toll-like receptor; TLR)는 염증 초기의 병원체를 인식할 수 있는 수용체로서, 병원체의 원형질막 구성물, 핵산 구성물 등을 인식하여 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 이를 이용하여, 면역 세포를 활성화시키기 위한 다양한 톨-유사 수용체 리간드(Toll Like Receptor ligand; TLR ligand)들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(미국공개특허 2012-0294885).

[3] 톨-유사 수용체 작용자는 엔도좀 내의 톨-유사 수용체의 작용자로써 체액성 면역뿐만 아니라, 세포성 면역 또한 효과적으로 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 다기능성 톨-유사 수용체 작용자는 그 분자 구조로 인하여 수용액에 분산되는데 어려움이 있다. 또한, DMSO, 메탄올 등과 같은 특수 유기용매에만 용해되고, 일반적으로 사용되고 있는 유기 용제에는 용해되지 않기 때문에 다양한 제형의 면역 활성화 약제를 제조하는데 한계점을 가지고 있다. 따라서 다양한 계면활성제를 혼합한 크림 형태의 제형(예, Aldara cream 등)으로 상용화되고 있다. 일부 연구에서는, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 염(salt)의 형태로 제조하여 수용액에 용해시킬 수 있도록 하였으나, 염의 형태로 제조된 톨-유사 수용체 작용자는 체내에서 혈관으로 흡수되어, 혈관 내의 면역반응(systemic immune response)을 유도함으로써, 많은 부작용(예, 사이토카인 폭풍(cytokine storm), 여러가지 비특이적 과민 면역반응 등)을 유발하기 때문에, 사용이 용이하지 않은 실정이다. 또한, 이러한 부작용 문제로 인하여, 실질적으로 치료에 사용하기 위해서는 유효량(effective dose)보다 적은 농도를 처리해야 하기 때문에, 효능 저하의 요인이 되기도 한다. 일부

제약기업에서는 이러한 문제점을 극복하기 위하여 친유성 특성을 보이는 리피디를 도입하거나, 거대한 크기를 갖는 고분자 사슬에 직접 화학적으로 결합시킴으로써 혈관으로 직접 흡수되는 것을 방지하기 위한 시도도 진행되고 있다. 하지만, 이러한 방법에 의해 제조된 톨-유사 수용체 작용자는 그 활성부위가 여전히 외부로 노출되어 있기 때문에, 체내에서 비특이적 면역 반응을 유도함으로써, 독성을 유발할 수 있는 가능성을 여전히 가지고 있다.

[4] 이러한 톨-유사 수용체 작용자를 포함하여, 다양한 선천성 면역 유도 물질은 혼합하여 사용할 경우, 선천성 면역 반응의 효과가 증대된다는 것이 지속적으로 보고되고 있다. 특별히, 면역 활성화 기작에서 서로 다른 신호전달 체계를 가지고 있는 톨-유사 수용체 리간드들은 단독으로 사용하였을 때보다, 두 가지 이상 조합하여 사용할 때, 면역세포 활성화 능력이 20 내지 50배 이상 증가된다고 보고된 바 있다. 그러나 서로 다른 신호전달 체계를 가지고 있는 선천성 면역 유도 물질들은 그 기작이 서로 상이하기 때문에, 처리하는 순서 및/또는 처리 시간 간격에 따라 면역 활성화 반응의 효과가 매우 상이하게 나타난다. 그러나 복수 개의 선천성 면역 유도 물질, 즉, 아주번트(adjuvant)를 체내에 일정 시간 간격으로 별도로 투여하는 것은 비실용적일 뿐만 아니라, 별도로 투여된 복수개의 아주번트들이 동일 면역세포를 자극하여 면역 활성화 효과를 증가시킬 확률은 매우 낮기 때문에, 실질적으로 의료 분야에 있어서, 서로 다른 시간에 서로 다른 종류의 선천성 면역 유도 물질들을 투여하는 것(asynchronous treatment)은 용이하지 않다.

[5] 따라서 복수 개의 아주번트를 동시에 투여하나(synchronous treatment), 체내에 주입된 각각의 아주번트가 일정 시간 간격으로 각각의 수용체와 결합하여, 면역 활성화를 위한 시간 간격(time interval)을 최적화함으로써, 면역 활성화 효과를 극대화할 수 있는 아주번트 앙상블이 개발된다면, 이를 이용함으로써 백신의 효과를 현저히 향상시킬 수 있으므로 차세대 백신 시장에서 매우 큰 파급효과를 가져올 것으로 기대된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 서로 다른 아주번트, 예를 들어, 톨-유사 수용체 작용자, 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라머좀 인듀서(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD ligand), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드 등이 정해진 순서와 일정한 시간 간격으로 작용할 수 있도록 설계된 동력학적 작용 아주번트 앙상블, 이의 용도 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[7] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이

속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[8] 본 발명은 동력학적으로 작용하는 아주번트 앙상블 조성물로서, 상기 조성물은 2 종류 이상의 아주번트를 포함하고 있으며, 제1 아주번트는 면역세포 수용체와 먼저 결합하여 1차 면역반응을 유도하는 것이며, 제2 아주번트는 활성화 부위에 절단 가능한 링커(cleavable linker)가 결합되어 있는 결합체로 순차적으로 면역세포 수용체와 결합하여 2차 면역반응을 유도하는 것을 특징으로 하는 아주번트 앙상블 조성물을 제공한다.

[9] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 동력학적 작용은 제2 아주번트의 활성화 부위에 절단 가능한 링커가 결합되어 있어 비활성화(inactive) 상태가 유지되다가, 2 내지 12 시간 이내에, 더욱 바람직하게는 3 내지 9 시간 이내에 활성화 부위를 블로킹하고 있던 절단 가능한 링커가 절단되어 면역활성화 물질의 활성이 시간적으로 지연되어 나타나는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 아주번트 앙상블 조성물은 2 종류 이상의 면역활성화 물질이 동시에 투여되었을 때, 일정 시간 간격을 두고 작용하는 동력학적 앙상블을 제공함으로써, 면역학적 반응의 시너지 효과를 최대로 이끌어낼 수 있다. 상기 동력학적 앙상블은 분자스케일(molecular scale) 및/또는 거시스케일(macro scale)에서 작용할 수 있다.

[10] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 절단 가능한 링커는 바람직하게는 다이설파이드(disulfide), 카바메이트(carbamate), 하이드라진(hydrazine), 에스터(ester), 펩타이드(peptide), 아자이드(azide), 아마이드(amide), 하이드라존(hydrazone), 티오이써(thioether), 포스포디에스터(phosphodiester), 티오케탈(thioketal) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 결합을 포함하고 있는 것을 특징으로 한다. 그러나 생체의 내인성 요인(효소, Redox potential, GSH, pH 등) 및/또는 외인성 요인(redox, pH, temperature, photo/light, magnetic, ultrasound, electrical responsive 등)에 의하여 결합이 절단될 수 있는 형태라면 이에 제한되지 않는다.

[11] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 절단 가능한 링커는 효소, pH, 산화환원 전위(redox potential), 온도, 초음파, 자성, 및 광원으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 요인에 의하여 결합 부위의 화학적 결합이 절단되는 것을 특징으로 한다.

[12] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 절단 가능한 링커는 양측 말단 또는 일측 말단에 에틸렌옥사이드(ethylene oxide) 또는 에틸렌글라이콜(ethylene glycol) 등의 알킬유도체를 추가로 포함함으로써, 결합체의 수용액에서의 용해도 및 유연성을 높이는 것을 특징으로 한다.

[13] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 절단 가능한 링커의 말단에는

콜레스테롤, 지질, 단백질, 아미노산, 펩타이드 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 물질이 결합되어 있는 것을 특징을 하며, 상기 물질은 제2 아주번트의 활성화 부분을 블록킹하는 역할로서, 친수 또는 친유 그룹을 가지고 있는 다양한 물질일 수 있다.

[14] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 제2 아주번트는 나노리포좀, 나노에멀젼, 나노마이셀, 하이드로겔, 스캐폴드, 고형 나노입자 및 고분자 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 약물 전달체에 로딩되어 있는 것을 특징으로 한다. 상기 로딩은 결합과 관계없이 단순히 내포되어 있는 형태일 수 있으며, 또는 나노 입자 구조 사이에 끼어 들어가 있는 형태이거나, 결합되어 있는 형태일 수도 있으나, 본 발명의 mRNA 항원과 면역활성화 물질을 포함하고 있는 형태라면 이에 제한되지 않는다.

[15] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 약물 전달체는 제1 아주번트를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[16] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 약물 전달체는 면역세포 표면, 또는 엔도좀 또는 사이토졸 내에 존재하는 수용체와 반응할 수 있는 리간드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[17] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 약물 전달체는 톨-유사 수용체 작용자, 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라머좀 인듀서(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD ligand), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 병원균의 외벽성분, 알룸(alum), 리피드(lipids), 이들의 조합 및 이들의 유사체(derivative)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 면역활성화 물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[18] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 제2 아주번트는 바람직하게는 톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 톨-유사 수용체 1 작용자, 톨-유사 수용체 2 작용자, 톨-유사 수용체 3 작용자, 톨-유사 수용체 4 작용자, 톨-유사 수용체 5 작용자, 톨-유사 수용체 6 작용자, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자, 및 톨-유사 수용체 9 작용자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[19] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 제1 아주번트는 톨-유사 수용체 작용자, 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라머좀 인듀서, NOD 리간드, CDS 리간드, STING 리간드, 병원균의 외벽성분, 알룸, 리피드, 이들의 조합 및 이들의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 면역활성화 물질일 수 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 면역세포는 항원제시세포(dendritic cells, macrophage), 자연살해세포(NK cell), T 세포, B 세포, 조절 T 세포(regulatory T cell), MDSC(myeoloid derived suppressor cells), 및 M2 macrophage로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[21] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 약물 전달체는 두 종류 이상의 아주번트가 순차적으로 방출(release)되도록 설계된 앙상블일 수 있으며, 리포좀, 마이셀, 에멀젼, 자기조립입자, 고분자 나노입자 등 2개 이상의 층상구조(layered structure)를 가지는 코어-셸(Core-shell)을 포함하는 구조로서, 1차적으로 빠르게 방출되는 아주번트(Firstly release of payload)와 2차적으로 방출되는 아주번트(Secondly release of payload)를 포함할 수 있다.

[22] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 약물 전달체는 자극감응형(stimuli-responsive) block을 포함할 수 있으며, 상기 자극은 세포 내의 내인성 요인(효소, Redox potential, GSH, pH, 세포내 단백질 등), 외인성 요인(redox, pH, temperature, photo/light, magnetic, ultrasound, electrical responsive 등) 및 생체 내의 다양한 생리적 환경/면역인자 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 자극감응형 block은 2 종류 이상의 자극감응형 block을 포함할 수 있으며, 서로 다른 자극에 의하여 순차적으로 반응할 수 있다. 또는 자극의 강도에 따라 순차적으로 반응할 수도 있다.

[23] 또한, 본 발명은 상기 아주번트 앙상블 조성물을 유효성분으로 포함하는, 감염성 질환(infectious disease), 암(cancer), 대사증후군(metabolic syndrome), 자가면역질환(autoimmune disease) 또는 희귀질환(rare disease)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[24] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 항원, 화학 항암제, 또는 면역관문억제제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[25] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 항원은 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 유전자, 펩티드, 다당류, 지질다당류, 폴리뉴클레오티드, 세포, 세포 용해물(lysate), 박테리아 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[26] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암의 증식, 전이, 재발 또는 항암 치료 요법에 대한 내성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[27] 또한, 본 발명은 상기 아주번트 앙상블 조성물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 감염성 질환(infectious disease), 암(cancer), 대사증후군(metabolic syndrome), 자가면역질환(autoimmune disease) 또는 희귀질환(rare disease)의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 상기 아주번트 앙상블 조성물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 감염성 질환(infectious disease), 암(cancer), 대사증후군(metabolic syndrome), 자가면역질환(autoimmune disease) 또는 희귀질환(rare disease)의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 상기 아주번트 앙상블 조성물의 감염성 질환(infectious disease), 암(cancer), 대사증후군(metabolic syndrome), 자가면역질환(autoimmune disease) 또는 희귀질환(rare disease)의 예방 또는 치료에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

[30] 본 발명에서 아주번트의 작용시간이 동력학적으로 조절된 신규 아주번트에는 기존에 두 가지 물질을 동시에 투여하는 것에 비하여, 시너지 효과를 증대시킬 뿐만 아니라, 아주번트의 잠재적 독성문제를 최소화할 수 있다. 특별히, 맞춤형으로 선택된 2 종류 이상의 면역활성화 물질이 조합된 앙상블은 향상된 면역증강 효과로 인하여 항암 백신 및 감염성 질환 등 다양한 질환의 효과적인 예방 및 치료제로서 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[31] 도 1은 거시스케일에서의 동력학적 면역기능제어를 위한 아주번트 앙상블의 개념도를 나타낸 개념도이다.

[32] 도 2는 분자스케일에서의 동력학적 면역기능제어를 위한 아주번트(톨-유사 수용체 7/8 작용자)의 한 예를 나타낸 것이다. 상단은 동력학적으로 작동하는 톨-유사수용체 7/8 작용자의 개념도이고, 하단은 절단가능한 링커의 특성을 나타낸 도면이다.

[33] 도 3은 동력학적 제어가 가능한 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자가 면역 세포(수지상 세포)에 작용 후 기존 면역기능 조절제와 다르게 작용하는 메커니즘을 도식화한 도면이다.

[34] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀의 세포내 이입을 IL-12의 양으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[35] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 항원 제시 세포에서 GILT를 발현하는지 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[36] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀이 GILT에 의하여 화학적 결합이 절단되는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[37] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀의 면역세포 조절을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[38] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀의 수지상세포의 성숙도에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[39] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀의 지속적인 면역 반응 유도 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[40] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀의 CD4+ T 세포의 Th1 반응으로의 분화 유도 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[41] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 톨-유사 수용체 3 작용자와 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자와의 복합 투여 효과를 IL-12의 분비량으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[42] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 톨-유사 수용체 4 작용자와 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자와의 복합 투여 효과를 IL-12의 분비량으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[43] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 앙상블에 의한 면역활성화 효능을 TNF-α와 IL-6의 분비량으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[44] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 앙상블에 의한 세포의 성숙도를 보조자극 분자들의 발현량으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[45] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 앙상블에 의한 지속적 면역 반응 유도 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[46] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체의 안정화 정도를 EMSA로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[47] 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체의 세포 내에서의 안정성을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[48] 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체의 지속적인 면역 반응 유도 효능을 in vivo에서 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[49] 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체의 항 종양 효과를 in vivo에서 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[50] 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체에 의한 종양 조직 및 림프절에 모집된 면역 세포들을 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

[51] 도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체에 의한 종양 조직 및 림프절에 모집된 면역 세포들을 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

[52] 도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체에 의한 종양 조직 및 림프절에 모집된 면역 세포들을 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

[53] 도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체에 의한 종양 조직 및 림프절에 모집된 면역 세포들을 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

[54] 도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체에 의한 림프절에서의 면역 반응 유도 효과를 사이트코인 분비능으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[55] 도 25는 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체에 의한 종양 조직에서의 면역 반응 유도 효과를 사이트코인 분비능으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[56] 도 26은 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-12가 아주번트 혼합체의 면역활성화 효능에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[57] 도 27은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체의 국소 접종을 통한 전이암에 대한 항종양 효능을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[58] 도 28은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체의 국소 접종을 통한 폐 전이 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[59] 도 29는 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체의 국소 접종을 통한 동소 종양에 대한 항종양 효능을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[60] 도 30은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체와 면역관문억제제 요법의 조합을 통한 항종양 효능을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[61] 도 31은 본 발명의 일 실시예에 따른 아주번트 혼합체와 화학 요법의 조합을 통한 항종양 효능을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[62] 본 발명자들은 두 종류 이상의 아주번트를 복합적으로 사용할 때, 아주번트들의 시너지 효과에는 순서와 시간차가 중요한 요인으로 작용하는 것을 확인하고, 복합 아주번트를 사용하여 면역활성화를 유도할 때, 그 효과를 최대한 증가시키기 위해서는 각각의 아주번트들의 활성화 시점을 조절할 수 있는 동력학적 제어(kinetical control)가 가능한 아주번트 앙상블 시스템에 대하여 예의 연구한 결과, 제1 아주번트가 1차적으로 작동하고, 제2 아주번트는 활성화 부위에 절단 가능한 링커를 연결하여 일시적으로 활성이 저해된 상태로 유지되다가, 체내 투여 후 목표로 하는 조직, 또는 세포에 도달한 후, 즉, 2 내지 12 시간 이내에 링커가 절단되어 2차적으로 아주번트의 활성이 나타내는 동력학적 제어가 가능한 아주번트 앙상블 조성물을 발명하였다.

[63] 도 1 및 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 아주번트 앙상블 조성물은 분자스케일(molecular scale)과 거시스케일(macro scale)에서 모두 조절이 가능하며, 제2 아주번트의 활성화 부위에 절단 가능한 링커가 결합되어 있어 비활성화(inactive) 상태가 유지되다가, 2 내지 12 시간 이내에, 더욱 바람직하게는 3 내지 9 시간 이내에 활성화 부위를 블로킹하고 있던 절단 가능한 링커가 절단되어 면역활성화 물질의 활성이 시간적으로 지연되어 나타나는 시스템으로서, 면역학적 반응의 시너지 효과를 최대로 이끌어낼 수 있다.

[64] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 아주번트 앙상블 조성물은 수지상세포를 고갈 상태(exhaustion), 즉, 면역 반응을 유도하지 못하는 상태가 아니라, 성숙상태(maturing), 즉, 면역 반응을 유도할 수 있는 상태로 장기간 동안 유지시켜, 지속적인 면역 반응을 유도할 수 있다. 또한, 림프노드에서 naive T 세포와 만나, 항원을 제시하는 과정에서 CD40-CD40L 작용과 함께, 강한 면역 활성화 유도를 통하여, IL-12와 같은 Thl 면역반응 유도 사이토카인을 효과적으로 유도할 수 있다.

[65]

[66] 본 명세서에 있어서, "아주번트(adjuvant)"란, 면역활성화 물질(immune modulator)로서 면역계의 정상적인 면역 기능을 활성화시키거나, 유도하거나, 회복시키는 역할을 하는 물질을 총칭한다. 상기 아주번트란 면역 반응을 향상시키기 위하여, 항원과 함께 사용되는 물질을 의미하며, 항원과 함께 사용함으로써 항체의 생성을 증가시키고, 체액성 면역 및/또는 세포성 면역을

증가시킬 수 있다. 상기 면역활성화 물질로는 바람직하게는 톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist), 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라머좀 인듀서(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD ligand), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 에멀젼(emulsion), 알룸(alum), 불완전 프로인드 보조제, 프로인드 보조제, 또는 이들의 조합들을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 톨-유사 수용체 작용자를 포함할 수 있다.

[67] 본 명세서에 있어서, "톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist)"란 선천성 면역에 관여하는 막 단백질인 톨-유사 수용체에 직접적으로 또는 간접적으로 작용하는 리간드로서, 내인성 또는 외인성 리간드의 생성을 통해 신호전달 경로를 통한 신호전달 반응을 야기시킬 수 있는 성분을 의미하는 것일 수 있다. 본 명세서에 있어서, 톨-유사 수용체 작용자는 천연 톨-유사 수용체 작용자 또는 합성 톨-유사 수용체 작용자일 수도 있고, 톨-유사 수용체 1 작용자, 톨-유사 수용체 2 작용자, 톨-유사 수용체 3 작용자, 톨-유사 수용체 4 작용자, 톨-유사 수용체 5 작용자, 톨-유사 수용체 6 작용자, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자, 톨-유사 수용체 9 작용자 등일 수 있다.

[68] 상기 톨-유사 수용체 1 작용자는 TLR-1을 통해 신호전달 반응을 유도할 수 있는 리간드를 의미하며, 일례로, 트리-아실화된 지질펩티드(LP); 페놀-가용성 모듈린(modulin); 코박테리움튜베르쿨로시스(Mycobacteriumtuberculosis)의 지질펩티드;
S-(2,3-비스(팔미토일옥시)-(2-RS)-프로필)-N-팔미토일-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH; 보렐리아 부르그도르페이(Borrelia burgdorfei)의 지질펩티드; OspA 지질펩티드의 아세틸화된 아미노 말단을 모방하는 트리히드로클로라이드(Pam3Cys) 지질펩티드 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[69] 상기 톨-유사 수용체 2 작용자는 TLR-2를 통해 신호전달 반응을 유도할 수 있는 리간드를 의미하며, 일례로, 펩티도글라이칸(peptidoglycan), 자이모산(zymosan), HSP 70, HMGB1, HA, bam3Cys-Lip 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[70] 상기 톨-유사 수용체 3 작용자는 TLR-3을 통해 신호전달 반응을 유도할 수 있는 리간드를 의미하며, 일례로, 폴리아이시 계열로서 Poly(I:C), Poly(ICLC), Poly(IC12U), ampligen 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[71] 상기 톨-유사 수용체 4 작용자는 TLR-4를 통해 신호전달 반응을 유도할 수 있는 리간드를 의미하며, 일례로, 시겔라 플렉시네리(Shigella flexineri)의 외막 단백질 제조물, AGP, CRX-527, MPLA, PHAD, 3D-PHAD, GLA, LPS 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[72] 상기 톨-유사 수용체 5 작용자는 TLR-5를 통해 신호전달 반응을 유도할 수 있는 리간드를 의미하며, 일례로, 플라겔린(Flagellin) 등일 수 있으나, 이에

제한되지 않는다.

[73] 상기 톨-유사 수용체 6 작용자는 TLR-6를 통해 신호전달 반응을 유도할 수 있는 리간드를 의미하며, 일례로, 다이아실 리포펩타이드(Diacyl lipopeptide), 리포테이코익산(lipoteichoic acid) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[74] 상기 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자는 TLR-7 또는 8을 통해 신호전달 반응을 유도할 수 있는 리간드를 의미하며, 일례로, 이미다조퀴놀린 계열 작용자(imidazoquinoloine-based agonist), 하이드록시아데닌계열 작용자(8-hydroxyadenine-based agonist), 프테리돈 계열 작용자(pteridone-based agonist), 아미노피리미딘 계열 작용자(2-aminopyrimidine-based agonist), 벤조아제핀 계열 작용자(benzoazepine-based agonist), 타이아옥소구아노신 계열 작용자(7-thia-8-oxoguanosine-based agonist) 등일 수 있으며, 상기 이미다조퀴놀린 계열의 화합물은 WO 2018 196823, WO 2011 049677, WO 2011 027022, WO 2017 102652, WO 2019 040491 등에서 언급된 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 하이드록시아데닌 계열의 화합물은 WO 2012 080730, WO 2013 068438, WO 2019 036023, WO 2019 035969, WO 2019 035970, WO 2019 035971, WO 2019 035968, CN 108948016, US 2014 8846697, WO 2016 023511, WO 2017 133683, WO 2017 133686, WO 2017 133684, WO 2017 133687, WO 2017 076346, WO 2018 210298, WO 2018 095426, WO 2018 068593, WO 2018 078149, WO 2018 041763 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 상기 프테리돈 계열의 화합물은 US 2010 0143301, WO 2016 007765, WO 2016 044182, WO 2017 035230, WO 2017 219931, WO 2011 057148, CN 1087 94486 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 상기 아미노피리미딘 계열 화합물은 WO 2010 133885, WO 2012066335, WO 2012 066336, WO 2012 067268, WO 2013 172479, WO 2012 136834, WO 2014 053516, WO 2014 053595, US 2018 0215720, WO 2012 156498, WO 2014 076221, WO 2016 141092, WO 2018 045144, WO 2015 014815, WO 2018 233648, WO 2014 207082, WO 2014 056593, WO 2018 002319, WO 2013 117615 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 상기 벤조아제핀 계열 화합물은 WO 2007 024612, WO 2010 014913, WO 2010 054215, WO 2011 022508, WO 2011 022509, WO 2012 097177, WO 2012 097173, WO 2016 096778, WO 2016 142250, WO 2017 202704, WO 2017 202703, WO 2017 216054, WO 2017 046112, WO 2017 197624 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 상기 타이아옥소구아노신 계열 화합물은 WO 2016 180691, WO 2016 055553, WO 2016 180743, WO 2016 091698 등에서 언급한 유형의 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 이외에도 PCT/US2009/035563, PCT/US2015/028264, PCT/US2016/020499, WO 2015 023598, PCT/US 2015/039776

등에서 언급한 톨-유사 수용체 7 또는 8 화합물 또는 제약상 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. 또한, 이미퀴모드(Imiquimod), 레시퀴모드(Resiquimod), 닥토리십(Dactolisib), 가디퀴모드(Gardiquimod), 수마니롤(Sumanirole), 모톨리모드 (Motolimod), 베사톨리모드(vesatolimod), 록소리바인(loxoribine), SM360320, CL264, 3M-003, IMDQ, Compound 54 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 당 업계에 종사하는 사람이 용이하게 추측하여 사용할 수 있는 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 경우를 모두 포함한다.

[75] 상기 톨-유사 수용체 9 작용자는 TLR-9를 통해 신호전달 반응을 유도할 수 있는 리간드를 의미하며, 일례로, 면역 자극성 올리고뉴클레오티드 등일 수 있으며, 상기 면역 자극성 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 CpG 모티프를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[76] 본 명세서에 있어서, “사포닌(saponin)”이란 양친매성 배당체로서, 계면활성제로서 작용한다. 일례로, QS21, Quil A, QS7, QS17, β-에스킨, 디지토닌 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[77] 본 명세서에 있어서, “항바이러스성 펩티드(antiviral peptide)"란 항바이러스 효과를 나타내는 펩티드를 총칭하며, 일례로, 케이엘케이(KLK) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[78] 본 명세서에 있어서, “인플라머좀 인듀서(inflammasome inducer)”란 진핵세포의 세포질 내에서 위험신호를 인식하고 활성화하는 단백질 복합체인 염증소체(inflammasome)을 유도하는 물질들을 총칭하며, 일례로, TDB(trehalose-6,6-dibehenate) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[79] 본 명세서에 있어서, “NOD 리간드(NOD ligand)"란 Nod-like receptor를 활성화시키는 리간드를 총칭하며, 일례로, M-TriLYS, N-glycolylated muramyldipeptid 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[80] 본 명세서에 있어서, “CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand)”란 DNA 센서인 cGAS를 활성화시키는 리간드를 총칭하며, 일례로, Poly(dA:dT) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[81] 본 명세서에 있어서, “STING 리간드(stimulator of interferon genes ligand)”란 면역세포가 암을 탐지하는데 사용하는 센서인 스팅을 활성화시키는 리간드를 총칭하며, 일례로, cGAMP, di-AMP, di-GMP 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[82] 본 명세서에 있어서, “콜레스테롤(cholesterol)”이란 지질(lipid)의 한 종류로 소수성 성질을 가지는 스테로이드 계열의 유기물질을 총칭하며, 상기 콜레스테롤은 콜레스테롤 구조를 기반으로 하는 다양한 유사체, 콜레스테롤의 일부를 화학적으로 변화시켜 획득할 수 있는 화합물을 모두 포함할 수 있다. 바람직하게는, bile acid(cholic acid, deoxycholic acid, lithocholic acid, chenodeoxycholic acid), Vitamin D, steroid hormones(testosteron, estradiol, cortisol, aldosteron, prednisolone, prednisone) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지

않는다. 또한, 상기 콜레스테롤은 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 다양한 형태의 나노 입자의 표면 및 내부에 위치하게 도와주는 물질로서, 이와 유사한 기능을 하는 리피드 물질, 예를 들어, phospholipids와 같은 natureal lipid, synthetic lipid 등으로 대체될 수도 있으며, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 활성화 부위에 결합하여 비활성화 상태로 만드는 동시에, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자가 체내에서 혈관으로 흡수되지 않게 하는 용도이기 때문에, 알려져 있는 지질의 종류라면 제한이 없다.

[83] 본 명세서에 있어서, "절단 가능한 링커(cleavable linker)"란 절단 가능한 결합을 포함하고 있어, 종양미세환경, 세포 내의 엔도좀 및 라이소좀의 생리학적 환경 등 체내의 low pH, 효소, 글루타치온 등의 조건; 또는 외부의 자극, 즉, 온도, redox potential, ultrasound, magnetic filed, near-infrared light 등의 특정 자극에 의하여 절단이 일어날 수 있는 링커를 총칭하며, 바람직하게는 카바메이트(carbamate), 다이설파이드(disulfide), 에스터(ester), 펩타이드(peptide), 아자이드(azide) 등의 결합을 포함하고 있는 링커를 의미하나, 절단 가능한 형태라면 이에 제한되지 않는다. 절단 가능한 링커의 일례로, 효소에 의해 절단 가능한 링커 그룹은 tobacco etch virus protease (TEV), trypsin, thrombin, cathepsin B, cathespin D, cathepsin K, caspase 1, matrix metalloproteinase sequences, phosphodiester, phospholipid, ester, beta-galactose 등이 있으며, Nucleophilic/basic reagent에 의해 절단 가능한 링커 그룹은 Dialkyl dialkoxysilane, cyanoethyl group, sulfone, ethylene glycolyl disuccinate, 2-N-acyl nitrobenzenesulfonamide, a-thiophenylester, unsaturated vinyl sulfide, sulfonamide after activation, malondialdehyde (MDA)-indole derivative, levulinoyl ester, hydrazone, acylhydrazone, alkyl thioester 등이 있다. 또한, reducing agent에 의해 절단 가능한 링커 그룹은 disulfide bridges, azo compounds 등이 있으며, oxidizing agent에 의해 절단 가능한 링커 그룹은 vicinal diols, selenium compounds 등이 있으며, organometallic 또는 metal catalyst에 의해 절단 가능한 링커 그룹은 disulfide bridges, azo compounds 등이 있다. 또한, electrophilic/acidic reagents에 의해 절단 가능한 링커 그룹은 Paramethoxybenzyl derivative, tert-butylcarbamate analogue, dialkyl or diaryl dialkoxysilane, orthoester, acetal, aconityl, hydrazone, b-thiopropionate, phosphoramidate, imine, trityl, vinyl ether, polyketal, alkyl 2-(diphenylphosphino)benzoate derivatives 등이 있으며, photo-irradiation에 의해 절단 가능한 링커 그룹은 2-Nitrobenzyl derivatives, phenacyl ester, 8-quinolinyl benzenesulfonate, coumarin, phosphotriester, bis-arylhydrazone, bimane bi-thiopropionic acid derivative 등이 있다.

[84] 본 명세서에 있어서, "병용 투여"란 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자와 콜레스테롤의 결합체와 항원, 면역관문억제제, 면역항원보강제, 면역활성화 물질, 화학항암제 등 다양한 물질과 함께 투여하는 것으로서 그 종류 및 형태에는 제한이 없다.

[85] 본 명세서에 있어서, "화학 항암제"란 당업자에게 알려져 있는 암 치료에

사용되고 있는 화합물이라면 제한이 없으며, 그 일례로 Paclitaxel, Docetaxel, 5-Flurouracil, Alendronate, Doxorubicin, Simvastatin, Hydrazinocurcumin, Amphotericin B, Ciprofloxacin, Rifabutin, Rifampicin, Efavirenz, Cisplatin, Theophyline, Pseudomonas exotoxin A, Zoledronic acid, Trabectedin, Siltuximab, Dasatinib, Sunitinib, Apatinib, 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid, Silibinin, PF-04136309, Trabectedin, Carlumab, BLZ945, PLX3397, Emactuzumab, AMG-820, IMC-CS4, GW3580, PLX6134, N-acetyl-l-cystein, Vitamin C, bortezomib, aspirin, salicylates, Indolecarboxamide derivatives, quinazoline analogues, Thalidomide, prostaglandin metabolites, 2ME2, 17-AAG, Camptothecin, Topotecan, Pleurotin, 1-methylpropyl, 2-imidazolyl dissulphide, Tadalafil, Sildenafil, L-AME, Nitroaspirin, Celecoxib, NOHA, Bardoxolone methyl, D,L-1-methyl-tryptophan, Gemcitabine, Axitinib, Sorafenib, Cucurbitacin B, JSI-124, Anti IL-17 antibodies, Anti-glycan antibodies, Anti-VEGF antibodies, Bevacizumab, Antracycline, Tasquinimod, Imatinib, cyclophosphamide 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[86] 본 명세서에 있어서, "면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)"란 인체가 가지고 있는 면역 세포의 면역 기능을 활성화시켜 암 세포와 싸우게 하는 암 치료 방법을 총칭하며, 그 일례로 anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4, anti-KIR, anti-LAG3, anti-CD137, anti-OX40, anti-CD276, anti-CD27, anti-GITR, anti-TIM3, anti-41BB, anti-CD226, anti-CD40, anti-CD70, anti-ICOS, anti-CD40L, anti-BTLA, anti-TCR, anti-TIGIT 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[87] 본 명세서에 있어서, "항원(antigen)"이란 체내에서 면역 반응을 일으키는 모든 물질을 총칭하며, 바람직하게는 병원균 (박테리아, 바이러스 등), 화합물질, 꽃가루, 암세포, 새우 등 또는 이들의 일부 펩타이드 또는 단백질이며, 더욱 바람직하게는 암 항원 펩타이드이나, 체내에서 면역 반응을 일으킬 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다. 상기 항원은 바람직하게는 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 유전자, 펩티드, 다당류, 지질다당류, 폴리뉴클레오티드, 세포, 세포 용해물(lysate), 박테리아, 바이러스 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는, 암 항원 펩타이드일 수 있다. 상기 당백질은 항체, 항체의 단편, 구조 단백질, 조절 단백질, 전사인자, 독소 단백질, 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소의 단편, 수송 단백질, 수용체(receptor), 수용체의 단편, 생체방어 유도 물질, 저장 단백질, 이동 단백질(movement protein), 익스플로이티브 단백질(exploitive protein), 리포터 단백질 등일 수 있다. 그러나 생체에서 항원으로 작용하여 면역 반응을 유도할 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다.

[88] 본 명세서에 있어서, "예방(prevention)"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 감염성 질환, 암, 대사증후군, 자가면역질환, 희귀질환 등의 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[89] 본 명세서에 있어서, "치료(treatment)"란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 감염성 질환, 암, 대사증후군, 자가면역질환, 희귀질환 등의 증세가 호전되거나

이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[90] 본 명세서에 있어서, "개체(individual 또는 subject)"란 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 그 대상에는 제한이 없다.

[91] 본 명세서에 있어서, "감염성 질환(infectious disease)"이란 바이러스, 세균, 진균 등 이종의 생명체에 의한 감염으로 인하여 유도된 질병을 총칭한다.

[92] 본 명세서에 있어서, "암(cancer)"이란 침윤에 의해 국부적으로 그리고 전이를 통해 체계적으로 확장할 수 있는 각종 혈액암, 악성 고형 종양 등을 총칭한다. 특별히 이에 제한되지는 않지만, 암의 구체적인 예로는 대장암, 부신암, 골암, 뇌암, 유방암, 기관지암, 결장암 및/또는 직장암, 담낭암, 위장관암, 두부 및 목의 암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 신경조직암, 췌장암, 전립선암, 부갑상선암, 피부암, 위암, 갑상선암 등이 포함된다. 암의 다른 예로는, 선암, 선종, 기저세포암, 자궁경부 이형성증 및 상피 내암, Ewing 육종, 편평세포암종, 액선세포암, 악성 뇌종양, 모세포암, 장의 신경절신경종, 과다형성 각막신경암, 섬세포암, Kaposi 암, 평활근종, 백혈병, 림프종, 악성 암양종, 악성 흑색종, 악성 고칼슘혈증, Marpanoidhabitus 암, 수양암, 전이성 피부암, 점막 신경종, 골수이형성 증훈군, 골수종, 사상식육종, 신경아세포종, 골육종, 골원성 및 기타 육종, 난소암, 크롬 친화성 세포종, 진성 적혈구 증가증, 원발성 뇌종양, 소세포성 폐암, 궤양성 및 유두상 편평상피암, 정낭피종, 연조직 육종, 망막아종, 횡문근아세포종, 신세포 종양 또는 신세포암(renal cell carcinoma, RCC), 망상세포성 육종, 및 빌름스 종양이 포함된다. 또한 성상 세포종, 위장 기저종양(gastrointestinal stromal tumor, GIST), 신경교종 또는 신경교아종, 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC), 췌장 신경내분비암 등이 포함된다.

[93] 본 명세서에 있어서, "대사증후군(metabolic syndrome)"이란 심장질환, 당뇨병, 뇌졸중을 비롯하여 건강 문제의 위험성을 증가시키는 5가지 위험요소들(고혈압, 고혈당, 고중성지방 혈증, 낮은 고밀도지단백 콜레스테롤, 및 중심비만) 중 3가지 이상을 한 개인이 가지고 있는 것을 의미하며, 일례로, 비만, 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심장병, 통풍 등의 대사성 질환(metabolic disease)을 포함하나, 대사증후군으로 인하여 발병되는 모든 질환을 총칭한다.

[94] 본 명세서에 있어서, "자가면역질환(autoimmune disease)"이란 자가 항원에 대한 병적 반응에 의한 질환을 총칭하며, 전신홍반성낭창(systemic lupus erythematosus; SLE), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis; RA), 다발성 경화증(multiple sclerosis; MS) 등과 같은 전신성 자가면역질환, 인슐린 의존성 당뇨(insulin-dependent diabetes mellitus; IDDM), 그레이브스 병(grave's disease), 알레르기(allergy) 등이 포함된다.

[95] 본 명세서에 있어서, "희귀질환(rare disease)"이란 인구 중 적은 비중에만 영향을 미치는 모든 질환을 통칭하며, 일반적으로 유전성을 가지고 있으며, 질환의 발병률이나 유병률이 매우 낮아 진단이 어렵고, 제대로 된 치료법이 없는 경우를 의미한다. 나라마다 정의가 조금씩 다르지만, 우리나라는 희귀질환

관리법 제2조에 의거해 “희귀질환이란 유병인구가 2만 이하이거나 진단이 어려워 유병인구를 알 수 없는 질환으로 보건복지부령으로 정한 절차와 기준에 따라 정한 질환을 말한다”라고 정의하고 있다. WHO(세계보건기구)는 유병률이 인구 1,000명당 약 0.65-1명 이하인 경우로, 미국은 전체 환자 수가 20만 명 미만인 경우로, 유럽(EU)은 10,000명당 5명 이하인 경우로 희귀질환을 지정하고 있다.

[96] 본 명세서에 있어서, “약학적 조성물(pharmaceutical composition)”이란 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

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

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

[99] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될

특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 500 mg/kg 또는 0.001 내지 500 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

[100]

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

[102]

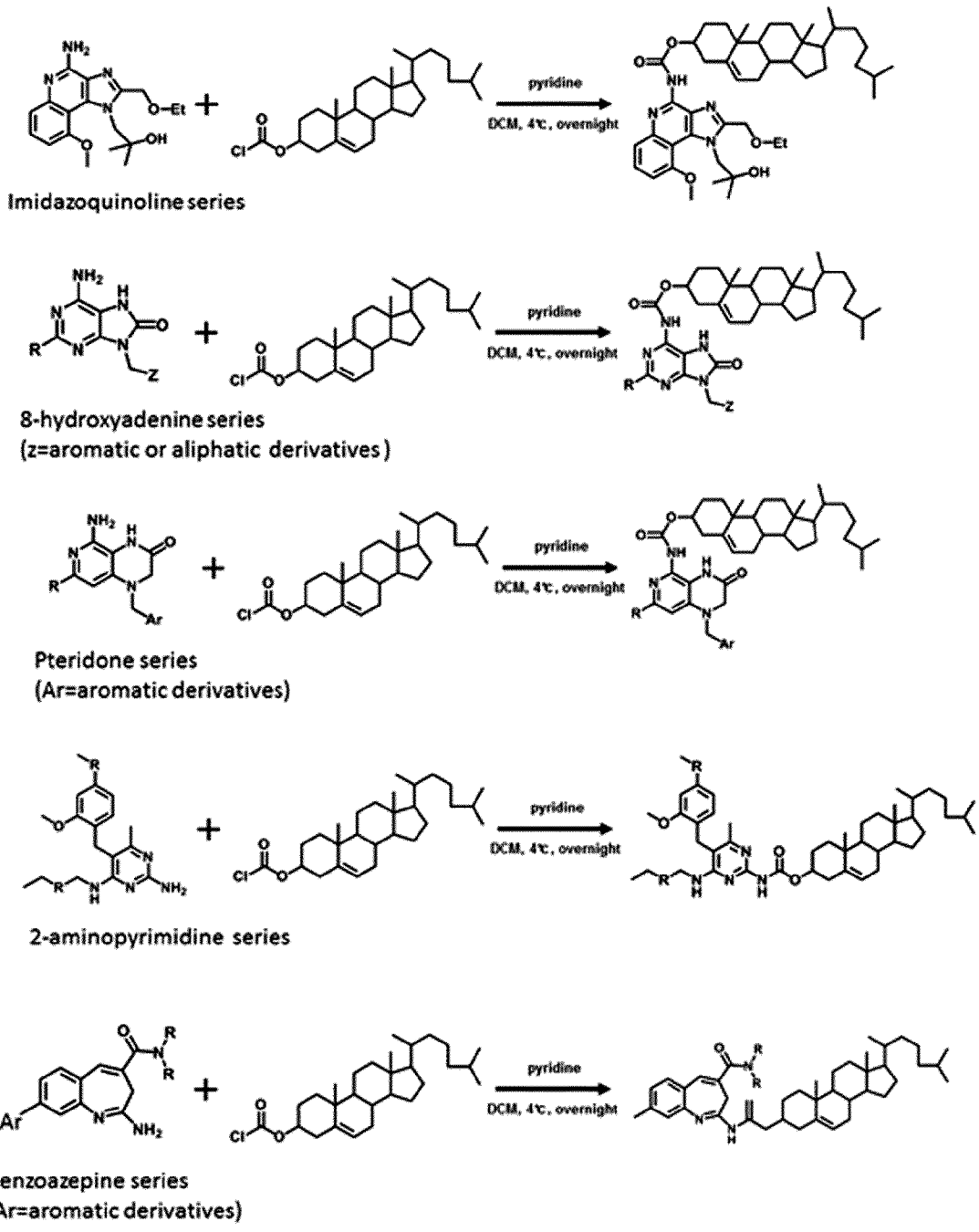
[103] **[실시예]**

[104] **실시예 1: 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 작용자의 합성법**

[105] 초기에는 비활성화 상태(inactive form)로 존재하고 있으나, 체내의 종양미세환경, 면역세포 등 표적하는 세포 내로 전달된 이후에 생리학적 환경(low pH, 효소, 글루타치온 등)에 의하여 활성화 상태로 전환되어 면역 활성화 효능을 나타낼 수 있는 동력학적으로 활성의 제어가 가능한(kinetically controlled activity) 톨-유사 수용체 작용자(TLR agonist)를 제작하기 위하여, 다양한 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자(이미다조퀴놀린 계열 작용자(imidazoquinoloine-based agonist), 하이드록시아데닌계열 작용자(8-hydroxyadenine-based agonist), 프테리돈 계열 작용자(pteridone-based agonist), 아미노피리미딘 계열 작용자(2-aminopyrimidine-based agonist), 벤조아제핀 계열 작용자(benzoazepine-based agonist), 타이아옥소구아노신 계열 작용자(7-thia-8-oxoguanosine-based agonist) 등)의 활성화 부위(active site), 즉, 아민기(NH_2) 부위에 콜레스테롤을 결합시킨 결합체(conjugate)를 하기 반응식 1 또는 2의 화학 반응을 통하여 제작하였다. 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자와 콜레스테롤의 결합은 절단 가능한 결합(cleavable bond)인 카바메이트(carbamate), 다이설파이드(disulfide), 에스터(ester), 펩타이드(peptide), 또는 아자이드(azide) 결합을 통해 콜레스테롤(Sigma-Aldrich)과 결합시켰다.

[106] **[반응식 1]**

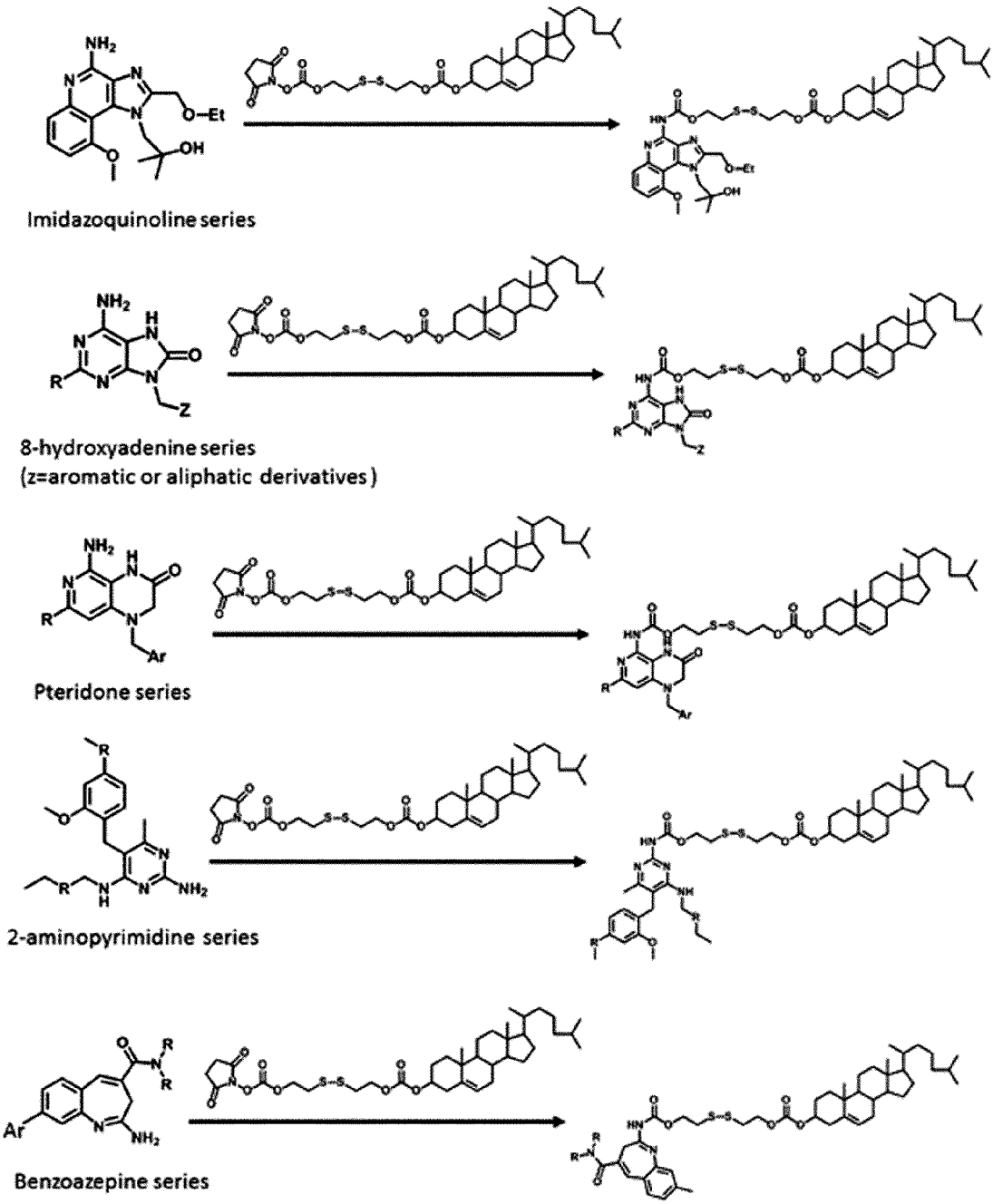
[107]



[108] 상기 R은 aliphatic 또는 aromatic 그룹을 포함하는 곁가지이며, -NH-、-CO-、-CONH-、-CSNH-、-COO-、-CSO-、-SO_2NH-、-SO_2-, -SO-, -O- 등을 포함할 수 있다.

[109] **[반응식 2]**

[110]



[111] 상기 R은 aliphatic 또는 aromatic 그룹을 포함하는 곁가지 이며, -NH-、-CO-、-CONH-、-CSNH-、-COO-、-CSO-、-SO_2NH-、-SO_2-, -SO-, -O- 등을 포함할 수 있다.

[112] **실시예 2: 2-메틸-1-(3-니트로퀴놀린-4-일아미노)프로판-2-올의 합성**

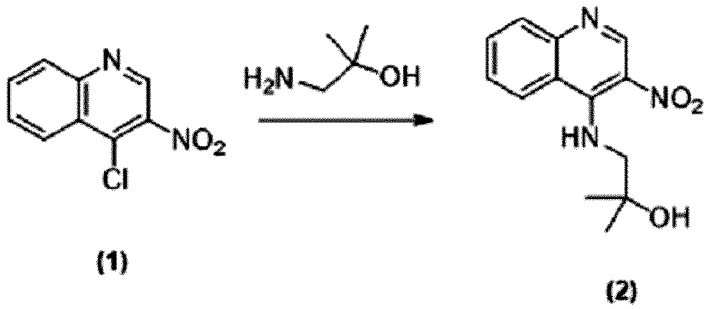
[113] 하기 반응식 3의 방법을 이용하여 2-메틸-1-(3-니트로퀴놀린-4-일아미노)프로판-2-올(화합물 2)을 합성하였다. 보다 자세하게는, 10 내지 20℃에서 화합물 1(30g)이 첨가된 디클로로메탄(450ml)에 1-아미노-2-메틸프로판-2-올(14g) 및 테트라에틸아민(9.6g)을 첨가하고, 2시간 동안 교반시켜 혼합물을 제조하였다.

그리고 진공상태에서 용매를 증발시켜 혼합물을 농축시킨 후에, 메틸터트-부틸에테르(150ml)를 이용하여 저작하였다. 저작된 혼합물은 필터를 이용하여 분리한 후 저압 상태에서 농축시켜 화합물 2(32g, 85.2%, 황색 고체)를 획득하였다. 획득된 화합물 2의 구조는 ^{1}H NMR을 이용하여 검증하였다.

[114] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 9.91 (brs, 1H), 9.18 (s, 1H)), 8.46 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 7.83-7.92 (m, 2H), 7.56-7.60 (m, 1H), 5.15 (s, 1H), 3.86 (d, *J* = 4.8Hz, 2H), 1.15 (s, 6H).

[115] **[반응식 3]**

[116]



(1) (2)

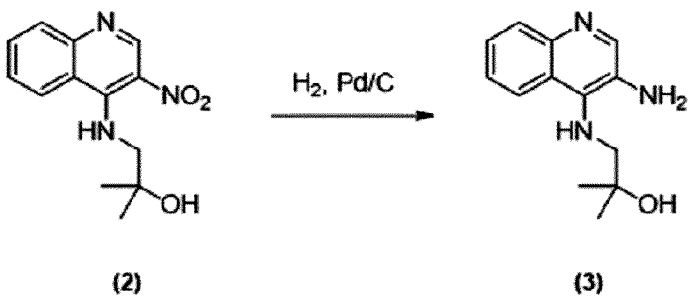
[117] **실시예 3: 1-(3-아미노퀴놀린-4-일아미노)-2-메틸프로판-2-올의 합성**

[118] 하기 반응식 4의 방법을 이용하여 1-(3-아미노퀴놀린-4-일아미노)-2-메틸프로판-2-올(화합물 3)을 합성하였다. 보다 자세하게는, 10 내지 20℃의 리액터에 화합물 2(32g), 메탄올(500ml), 그리고 Pd/C 촉매(3.2g)를 혼합한 후, 혼합물은 수소를 이용하여 3회 디게싱(degassing) 및 플러싱(flushing)하였다. 수소는 기체화되어 1 atm을 유지하게 한 후 실온에서 5시간 동안 교반시켰다. 이후 혼합물은 메틸터트-부틸에테르(100ml)를 이용하여 저작하였다. 저작된 혼합물은 필터를 이용하여 분리한 후 저압 상태에서 농축시켜 화합물 3(27g, 95.4%, 황색 고체)을 획득하였다. 획득된 화합물 3의 구조는 ^{1}H NMR을 이용하여 검증하였다.

[119] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.37 (s, 1H)), 7.99-8.01 (m, 1H), 7.72-7.74 (m, 1H), 7.32-7.39 (m, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.77 (brs, 1H), 4.67-4.70 (m, 1H), 4.12 (brs, 2H), 1.15 (s, 6H).

[120] **[반응식 4]**

[121]



(2) (3)

[122] **실시예 4:**

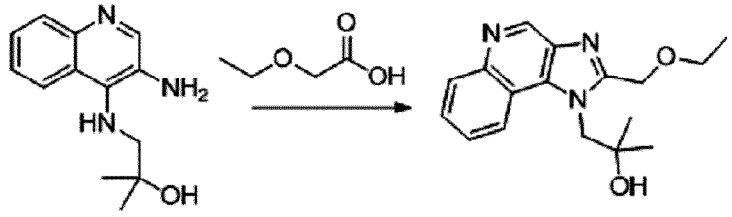
1-(2-에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-2-메틸프로판-2-올의 합성

[123] 하기 반응식 5의 방법을 이용하여 1-(2-에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-2-메틸프로판-2-올(화합물 4)을 합성하였다. 보다 자세하게는, 10 내지 20℃의 리액터에 화합물 3(27g) 및 2-에톡시아세트산(30ml)을 첨가한 후, 5시간 동안 120 내지 130℃에서 5시간 동안 교반시켰다. 이후 혼합물을 20 내지 25℃로 냉각시키고, 포화된 탄산나트륨(150ml)을 첨가하였다. 그리고 디클로로메탄과 메탄올(10/1, v/v)의 혼합용액을 이용하여 반응물을 추출하였다. 추출된 유기용액 층을 염수(brine)로 세척한 후 황산나트륨(10g)을 이용하여 수분을 제거하였다. 그리고 수분이 제거된 유기용액 층은 필터를 이용하여 필터링한 후 저압 상태에서 농축시켜 화합물 4(30g, 85.8%, 황색 겔)를 획득하였다. 획득된 화합물 4의 구조는 ^{1}H NMR을 이용하여 검증하였다.

[124] ^{1}HNMR (DMSO_d6 400 MHz): δ 9.18 (s, 1H)), 8.63 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 8.13 (dd, *J* = 1.6, 8.0Hz, 1H), 7.63-7.71 (m, 2H), 4.91 (s, 2H), 4.78 (brs, 2H), 3.54 (q, *J* = 6.8Hz, 2H), 1.10-1.18 (m, 9H).

[125] **[반응식 5]**

[126]



(3) (4)

[127] **실시예 5:**

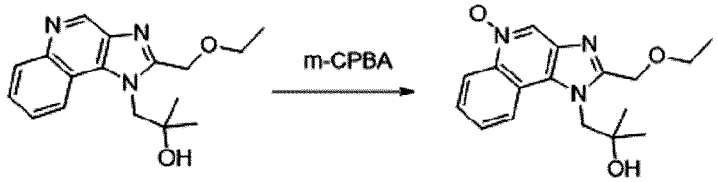
2-(에톡시메틸)-1-(2-하이드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린 5-옥사이드의 합성

[128] 하기 반응식 6의 방법을 이용하여 2-(에톡시메틸)-1-(2-하이드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린 5-옥사이드(화합물 5)를 합성하였다. 보다 자세하게는, 10 내지 20℃의 리액터에 화합물 4(30g), 디클로로메탄(350ml), 및 메타클로로퍼옥시 벤조산(26g)을 첨가한 후 실온에서 4시간 동안 교반시켰다. 그리고 교반된 혼합물에 포화된 탄산나트륨 용액(150ml) 과 황산나트륨 용액(150ml)을 첨가한 후, 디클로로메탄과 메탄올(10/1, v/v)의 혼합용액을 이용하여 반응물을 추출하였다. 추출된 유기용액 층의 수분은 황산나트륨(30g)을 이용하여 제거한 후 필터를 이용하여 필터링한 후 저압 상태에서 농축시켰다. 이후 농축시킨 반응물을 에틸 아세테이트(50ml)를 이용하여 저작하고, 필터를 이용하여 분리한 후 저압 상태에서 건조시켜 화합물 5(30g, 94.9%, 황색 고체)를 획득하였다. 획득된 화합물 5의 구조는 ^{1}H NMR을 이용하여 검증하였다.

[129] ^{1}HNMR (DMSO_d6 400 MHz): δ 9.04 (s, 1H)), 8.79 (d, *J* = 8.4Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 8.4Hz, 1H), 7.77-7.80 (m, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.73 (brs, 2H), 3.54 (q, *J* = 6.8Hz, 2H), 1.12-1.18 (m, 9H).

[130] **[반응식 6]**

[131]



(4) (5)

[132] **실시예 6:**

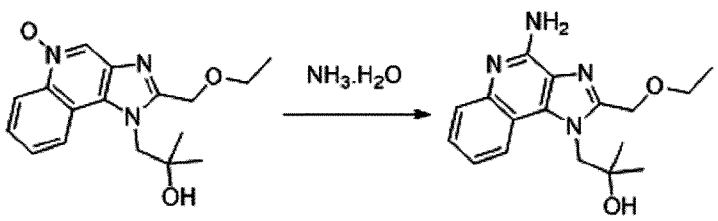
1-(4-아미노-2-에톡시메틸)-1H-이미다조[4.5-c]퀴놀린-1-일)-2-메틸프로판-2-올의 합성

[133] 하기 반응식 7의 방법을 이용하여 1-(4-아미노-2-에톡시메틸)-1H-이미다조[4.5-c]퀴놀린-1-일)-2-메틸프로판-2-올(화합물 6)을 합성하였다. 보다 자세하게는, 10 내지 20℃의 리액터에 화합물 5(30g), DCM(600ml), 4-메틸벤젠-1-술포닐 클로라이드(18.2g), 및 암모니아수($NH_3.H_2O$, 180ml)를 첨가한 후 실온에서 16시간 동안 교반시켰다. 그리고 교반된 혼합물에 증류수를 첨가한 후, 디클로로메탄과 메탄올(10/1, v/v)의 혼합용액을 이용하여 혼합물을 분리하였다. 분리된 유기용액 층은 염수(brine)를 이용하여 세척한 후 무수 황산나트륨(50g)을 이용하여 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 유기용액 층은 필터를 이용하여 필터링한 후 저압 상태에서 농축시키고, 농축시킨 반응물을 메틸터트-부틸에테르와 메탄올(15/1, v/v)의 혼합용액을 이용하여 30분간 저작하였다. 이후 필터를 이용하여 분리한 후 저압상태에서 건조시켜 화합물 6(18g, 60%, 황색 고체)을 획득하였다. 획득된 화합물 6의 구조는 ^{1}H NMR을 이용하여 검증하였다.

[134] ^{1}HNMR (DMSO_d6 400 MHz): δ 8.27 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 7.6Hz, 1H), 7.40 (t, *J* = 7.2Hz, 1H), 7.21 (t, *J* = 7.2Hz, 1H), 6.57 (brs, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.68 (brs, 2H), 3.52 (q, *J* = 6.8Hz, 2H), 1.11-1.17 (m, 9H).

[135] **[반응식 7]**

[136]



(5) (6)

[137] **실시예 7:**

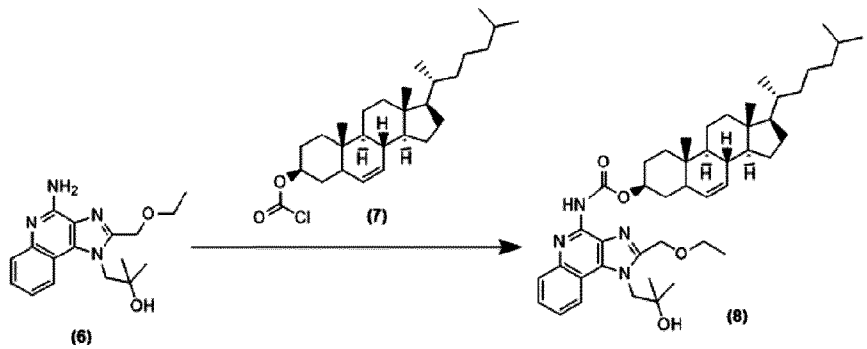
10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카하이드로-1H-사이클로[a]페난트렌-3-일 2-(에톡시메틸)-1-(2-하이드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-일 카바메이트의 합성

[138] 하기 반응식 8의 방법을 이용하여 10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카하이드로-1H-사이클로[a]페난트렌-3-일 2-(에톡시메틸)-1-(2-하이드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-일 카바메이트(화합물 8)를 합성하였다. 우선, 화합물 7(TCI, 50g, Cholesterol chloroformate)을 250g의 실리카 겔이 충진된 컬럼 크로마토그래피(0%~20% 아세트산에틸 in n-헥산)를 이용하여 순수한 화합물 7(30g)을 획득하였다. 그리고 10 내지 20℃의 리액터에 화합물 6(15g)과 디클로로메탄(198.9g)을 첨가한 후, 순수한 화합물 7(30g)과 테트라에틸아민(9.6g)을 순서대로 첨가하고, 20 내지 25℃에서 16시간 동안 교반시켰다. 교반된 혼합물에 물을 첨가한 후, 디클로로메탄을 첨가하여 반응물을 추출하였다. 추출된 유기용액 층은 염수를 이용하여 세척한 후 무수 황산나트륨(195g)을 이용하여 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 유기용액 층은 필터를 이용하여 필터링한 후, 저압 상태에서 농축시켰다. 그리고 농축시킨 반응물은 메틸터트-부틸에테르와 메탄올(10/1, v/v)의 혼합용액을 이용하여 저작하였다. 이후 필터를 이용하여 분리한 후 저압상태에서 건조시켜 화합물 8(10.2g, 55.1%, 백색 고체)을 획득하였다. 획득된 화합물 8의 구조는 ^{1}H NMR을 이용하여 검증하였다. ^{1}H NMR 결과를 통하여, 레시퀴모드(resiquimod; R848)와 콜레스테롤이 카바메이트 결합으로 연결된 결합체가 제조된 것을 확인하였다.

[139] ^{1}H NMR ($CDCl_3$ 400 MHz): δ 8.13-8.19 (m, 2H), 7.59-7.63 (m, 1H)), 7.46-7.50 (m, 1H), 5.42-5.43 (m, 1H), 4.92 (brs, 2H), 4.72-4.80 (m, 3H), 3.68 (q, J = 6.8Hz, 2H), 3.24 (s, 1H), 2.51-2.59 (m, 1H), 2.36-2.47 (m, 1H), 1.96-2.11 (m, 3H), 1.81-1.95 (m, 2H), 1.45-1.75 (m, 9H), 1.02-1.35 (m, 27H), 0.94 (d, J = 6.4Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.4Hz, 6H), 0.71 (s, 3H).

[140] **[반응식 8]**

[141]



[142] **실시예 8: 비스(2,5-디옥소피로리딘-1-일)**

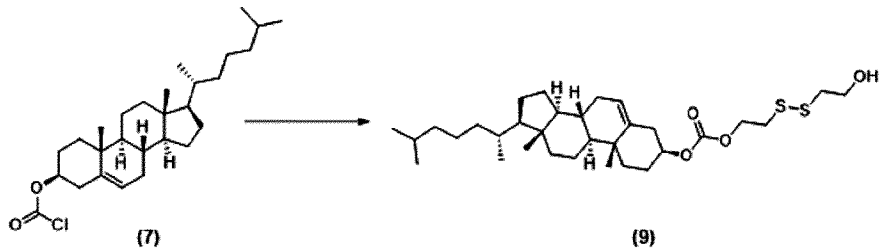
2,2'-디설페인디일비스(에테인-2,1-디일) 디카보네이트의 합성

[143] 하기 반응식 9의 방법을 이용하여 비스(2,5-디옥소피로리딘-1-일) 2,2'-디설페인디일비스(에테인-2,1-디일) 디카보네이트(화합물 9)를 합성하였다. 우선, 화합물 7(TCI, 70g)을 350g의 실리카 겔이 충진된 컬럼 크로마토그래피(0%~20% 아세트산에틸 in n-헥산)를 이용하여 순수한 화합물 7(40g)을 획득하였다. 그리고 10 내지 15℃의 리액터에 순수한 화합물 7(40g) 및 디클로로메탄(100ml)을 첨가한 후, 비스(2-하이드록시에틸) 디설파이드가 첨가되어 있는 디클로로메탄(250ml) 용액과 피리딘(21g)을 순서대로 첨가하였다. 혼합물을 2시간 동안 실온에서 교반시킨 후 증류수(200ml)를 첨가하였다. 이어서 디클로로메탄(150ml)을 3회 첨가하여 반응물을 추출하였다. 추출된 유기용액 층은 염수를 이용하여 세척한 후 무수 황산나트륨(20g)을 이용하여 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 반응물은 필터를 이용하여 필터링한 후, 저압 상태에서 농축시켰다. 이후 컬럼 크로마토그래피(실리카 겔, 300g, 10%~30% 아세트산에틸 in n-헥산)를 이용하여 화합물 9(20g, 39.6%, 황색 겔)를 획득하였다. 획득된 화합물 9의 구조는 ^{1}H NMR을 이용하여 검증하였다.

[144] ^{1}HNMR ($CDCl_3$ 400 MHz): δ 5.41-5.42 (m, 1H), 4.46-4.56 (m, 1H), 4.41 (t, J = 6.8Hz, 2H), 3.91 (t, J = 6.0Hz, 2H), 2.98 (t, J = 6.8Hz, 2H), 2.91 (t, J = 6.0Hz, 2H), 2.35-2.47 (m, 2H), 1.79-2.08 (m, 6H), 1.43-1.73 (m, 7H), 1.25-1.42 (m, 5H), 1.06-1.22 (m, 7H), 0.97-1.03 (m, 5H), 0.93 (d, J = 6.4Hz, 3H), 0.88 (dd, J = 1.6, 6.8Hz, 6H), 0.69 (s, 3H).

[145] **[반응식 9]**

[146]



(7) (9)

[147] **실시예 9: 화합물 10의 합성**

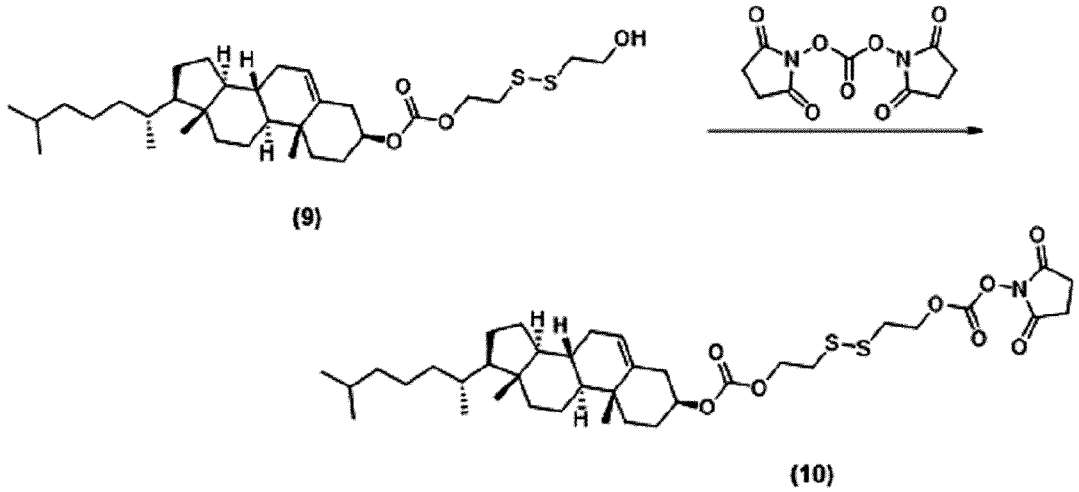
[148] 하기 반응식 10의 방법을 이용하여 화합물 10을 합성하였다. 보다 자세하게는, 10 내지 15℃의 리액터에 화합물 9(20g)와 디클로로메탄(200ml)을 첨가한 후, 비스(2,5-디옥소피로리딘-1-일) 카보네이트(18g)와 테트라에틸아민(10.7g)을 순서대로 첨가하였다. 혼합물은 3시간 동안 실온에서 교반시킨 후 증류수(300ml)를 첨가하고, 이어서 디클로로메탄(150ml)을 3회 첨가하여 반응물을 추출하였다. 추출된 유기용액 층은 염수를 이용하여 세척한 후 무수 황산나트륨(20g)을 이용하여 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 반응물은 필터를 이용하여 필터링한 후, 여과물을 저압 상태에서 농축시켰다. 이후 컬럼 크로마토그래피(실리카 겔, 200g, 5%~20% 아세트산에틸 in n-헥산)를 이용하여 화합물 10(18g, 72%, 황색 겔)을 획득하였다. 획득된 화합물 10의 구조는 ^{1}H

NMR을 이용하여 검증하였다.

[149] ^{1}HNMR ($CDCl_3$ 400 MHz): δ 5.39-5.40 (m, 1H), 4.57 (t, *J* = 6.8Hz, 2H), 4.43-4.52 (m, 1H), 4.37 (t, *J* = 6.4Hz, 2H), 2.96-3.03 (m, 4H), 2.84 (s, 4H), 2.34-2.44 (m, 2H), 1.78-2.04 (m, 5H), 1.42-1.73 (m, 7H), 1.22-1.40 (m, 5H), 1.06-1.20 (m, 7H), 0.95-1.04 (m, 5H), 0.91 (d, *J* = 6.0Hz, 3H), 0.86 (d, *J* = 6.4Hz, 6H), 0.67 (s, 3H).

[150] **[반응식 10]**

[151]



(9)

(10)

[152] **실시예 10:**

2-((2-((10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카하이드로-1H-사이클로[a]페난트렌-3-일옥시)카보닐옥시)에틸)디설바닐)에틸

2-(에톡시메틸)-1-(2-하이드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-일 카바메이트의 합성

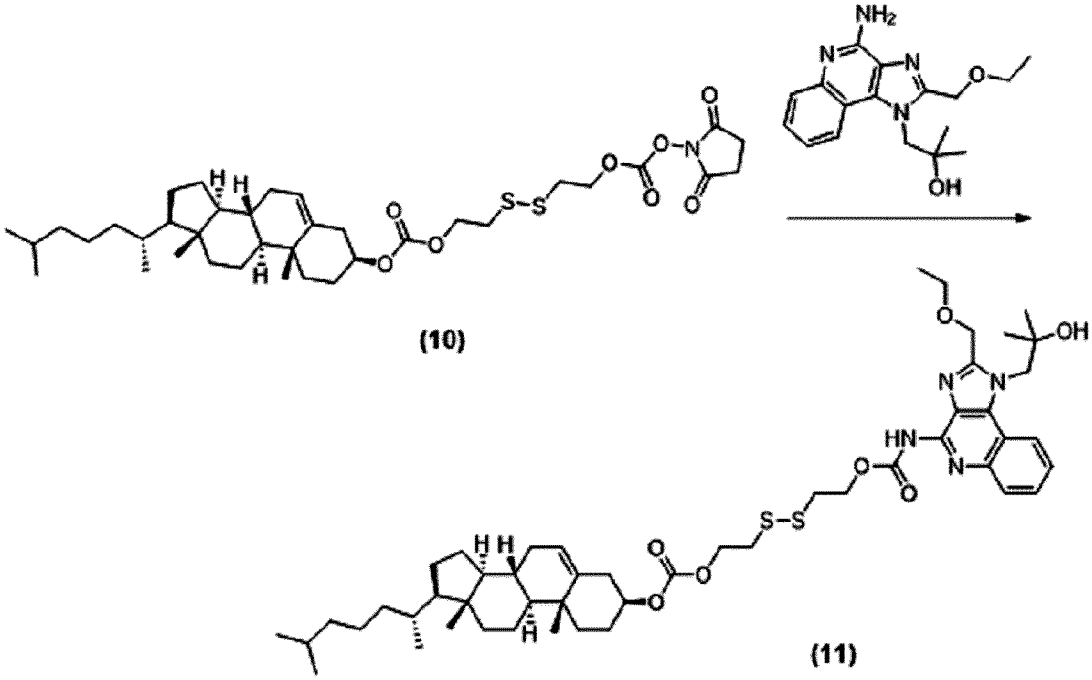
[153] 하기 반응식 11의 방법을 이용하여 2-((2-((10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카하이드로-1H-사이클로[a]페난트렌-3-일옥시)카보닐옥시)에틸)디설바닐)에틸 2-(에톡시메틸)-1-(2-하이드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-일 카바메이트(화합물 11)를 합성하였다. 보다 자세하게는, 10 내지 20℃의 리액터에 화합물 6(15g)과 디클로로메탄(198.9g)을 첨가한 후, 화합물 10(40.5g)과 테트라에틸아민(9.6g)을 순서대로 첨가하였다. 혼합물은 20 내지 25℃에서 16시간 동안 교반시킨 후, 증류수(225ml)를 첨가하였다. 이어서 디클로로메탄(99.45g)을 5회 첨가하여 반응물을 추출하였다. 추출된 유기용액층은 염수를 이용하여 세척한 후 무수 황산나트륨(195g)을 이용하여 수분을 제거하였다. 그리고 수분이 제거된 반응물은 필터를 이용하여 필터링한 후 여과물을 저압 상태에서 농축시켰다. 이후 컬럼 크로마토그래피(실리카 겔, 100g, 10%~50% 아세트산에틸 in n-헥산)를 이용하여 화합물 11(10.8g, 37.4%, 백색 고체)을 획득하였다. 획득된 화합물 11의 구조는 ^{1}H NMR을 이용하여

검증하였다. ^{1}H NMR 결과를 통하여, R848과 콜레스테롤이 다이설파이드로 교차결합된 결합체가 제조되었다는 것을 확인하였다.

[154] ^{1}H NMR ($CDCl_3$ 400 MHz): δ 8.15-8.17 (m, 2H), 7.60-7.64 (m, 1H)), 7.47-7.51 (m, 1H), 5.39-5.40 (m, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.81 (s, 2H), 4.56 (t, *J* = 6.4Hz, 2H), 4.45-4.54 (m, 1H), 4.41 (t, *J* = 6.4Hz, 2H), 3.68 (q, *J* = 6.8Hz, 2H), 3.13 (s, 1H), 3.09 (t, *J* = 6.4Hz, 2H), 3.01 (t, *J* = 6.4Hz, 2H), 2.34-2.47 (m, 2H), 1.92-2.06 (m, 3H), 1.79-1.90 (m, 2H), 1.23-1.72 (m, 21H), 1.06-1.21 (m, 7H), 0.96-1.05 (m, 5H), 0.93 (d, *J* = 6.4Hz, 3H), 0.88 (dd, *J* = 1.6, 6.4Hz, 6H) , 0.69 (s, 3H).

[155] **[반응식 11]**

[156]



[157] **실시예 11: 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 결합체를 포함하는 나노 입자의 제조**

[158] 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 결합체는 콜레스테롤을 포함하고 있기 때문에, 다양한 나노 입자 형태로 용이하게 제조될 수 있으며, 이를 통하여 면역세포와의 상호작용을 극대화할 수 있다.

[159] **11.1. 콜레스테롤이 결합된 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 나노리포좀 제조**

[160] 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀(nanoliposome)을 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 제조한 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체 중의 하나인 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 이용하여 나노리포좀을 제조하였다. 보다 자세하게는, 0.5ml의 클로로포름(chloroform)에 5mg의 DOPC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Avanti), 1.5mg의 DDAB (dimethyldioctadecylammonium bromide, Avanti), 그리고 1mg의

콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 용해시켜 혼합물을 제조하였다. 상기 혼합물을 회전식 증발기(rotary evaporator, 30분)를 이용하여 클로로포름을 증발시켜, 여러 겹의 얇은 필름 형태로 제조하고, 여기에 2ml의 인산염완충용액(phosphate buffered saline; PBS)을 첨가하고 상온에서 2시간 교반시켰다. 그리고 팁 초음파 분해기(Tip sonication, amplitude: 20%, 2분)를 이용하여 균질화 단계를 거쳐 단일 층의 리포좀을 획득한 후에, 나노리포좀의 균질화를 위하여 소형 압축기(mini extruder)를 거쳐 안정한 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀을 제조하였다. 제조된 나노리포좀은 자외선 및 가시광선 분광분석법(UV-Vis spectrophotometer)을 이용하여 내부에 포함되어 있는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 양을 정량하였다.

[161] **11.2. 콜레스테롤이 결합된 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 나노에멀젼 제조**

[162] 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노에멀젼(nanoemulsion)을 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 제조한 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체 중의 하나인 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 이용하여나노에멀젼을 제조하였다. 보다 자세하게는, 1ml의 클로로포름에 1mg의 DOPC, 240μg의 콜레스테롤(Sigma-Aldrich), 및 240μg의 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 첨가한 후 용해시켜 혼합물을 제조하였다. 그리고 상기 혼합물을 둥근 바닥 플라스크로 옮겨 담은 후에 회전농축기(rotary evaporator)를 이용하여 클로로포름을 완전히 증발시켜 얇은 지질막(thin-film) 형태를 제조하였다. 그리고 인산염완충용액 2ml에 Squalene(5%v/v), Tween 80(0.5%v/v), 및 Span 85(0.5%v/v)를 첨가하여 용해시킨 후에, 상기 용액을 지질막 위에 첨가하고 초음파 분산기(Tip sonicator)를 이용하여서 1분 동안 분산시키고, 회전기(tube revolve)를 이용하여 2시간 정도 교반시켜, 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노에멀젼을 제조한 후에 사용 전까지 4℃ 냉장고에 보관하였다.

[163] **11.3. 콜레스테롤이 결합된 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 및 사포닌으로 구성된 나노마이셀 제조**

[164] 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체 및 사포닌으로 구성되는 나노마이셀(nanomicelle)을 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 제조한 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체 중의 하나인 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 이용하여 나노마이셀을 제조하였다. 보다 자세하게는, 포스패티딜콜린 : 사포닌 : 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 5 : 3 : 2의 무게 비율로 혼합한 후에 14mg/ml의 농도가 되도록 에테르에 첨가하고 용해시켜 지질을 포함하는 에테르 용액을 제조하였다. 그리고 사포닌은 1.5mg/ml의 농도로 4ml의 증류수에 용해시킨 후에 20ml의 유리병에 담고

고무마개로 유리병을 막은 후에 55℃의 워터 재킷에 보관하였다. 그리고 1ml의 지질을 포함하는 에테르 용액을 주사기 펌프를 이용하여 0.2ml/min의 속도로 사포닌이 담겨있는 유리병에 첨가하며 2시간 동안 교반시켰다. 이 때, 주사기 바늘의 끝은 사포닌을 포함하는 수용액의 표면보다 아래에 위치하게 하였고, 환기를 위하여 두 번째 바늘은 고무마개에 꽂아두었다. 그리고 상온으로 유리병을 옮기고 3일 동안 교반시켜 안정화시키는 단계를 거쳐 콜레스테롤이 결합된 레시퀴모드 및 사포닌으로 구성된 나노마이셀을 제조하였다.

[165] **11.4. 콜레스테롤이 결합된 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자로 구성된 고분자 나노입자제조**

[166] 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체로 구성된 고분자 나노입자를 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 제조한 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체 중의 하나인 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 이용하여 고분자 나노입자를 제조하였다. 보다 자세하게는, Lactide와 glycolide 조성비가 50 : 50인 PLGA 고분자(Eudragit) 60mg을 1ml의 Chloroform 용매에 녹여주었다. 그리고 5mg의 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 용매에 첨가하고, 초음파 세척기(ultrasonic bath, Emerson Model CPX5800H-E)를 이용하여 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체와 고분자를 용해시켰다. 그리고 2.5% PVA 수용액 10ml에 상기 용해시킨 용액을 200μl씩 첨가해주며, 초음파 분산기(Tip sonicator, Sonics&Materials Model VCX 750)를 이용하여 1분간 분산시켰다. 이때, 분산기의 출력은 750watt이고, 진동강도는 20kHz이며, Amplitude는 20%로 설정하였다. 그리고 PLGA가 용해된 유기용매를 완전히 증발시키기 위하여 제조된 수용액을 600rpm으로 실온에서 8시간 이상 교반하였다. 반응하지 않은 고분자와 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 제거하기 위해 원심분리기(Centrifuge, Hanil, Combi-514R)를 이용하여 12,000rpm, 12분의 조건으로 원심분리를 실시하였으며, 상층액은 제거한 후 초순수 10ml을 첨가하고, 초음파 분산기에 30초간 분산시켰다. 상기 과정을 3회 반복한 후, 동결건조 방법을 사용하여 건조 시킨 후 -20℃에서 보관하였다.

[167] **<u>실시예 12: 엔도라이소좀(endolysosome)에 존재하는 감마 인터페론 유도성 리소좀 티올 환원 효소에 의한 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 화학적 결합 절단 효과 확인</u>**

[168] **12.1. 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 나노리포좀의 세포내 이입**

[169] 상기 실시예 11.1과 동일한 방법으로 제조한 콜레스테롤과 레시퀴모드가 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 결합된 결합체를 포함하는 나노리포좀이 세포내 이입(endocytosis)을 통해 세포내로 이동하는지 확인하기 위하여, 골수 유래 수지상 세포(bone marrow derived dendritic cell; BMDC)를 이용하여 실험을 진행하였다. 보다 자세하게는, BMDC에 세포내 이입을 억제하는 Dynasore(40μg)를 처리하고, 1시간 동안 배양하였다. 그리고 콜레스테롤-톨-유사

수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀을 처리하고, 4, 8, 12, 및 24시간 후에 각각 세포 배양액을 획득하였다. 그리고 획득한 세포 배양액은 1,500rpm에서 3분 동안 원심분리하여 세포와 상층액을 분리한 후에, 상층액 내에 포함되어 있는 인터루킨 12(interleukin-12; IL-12)의 양을 효소면역측정법(ELISA)으로 측정하였다. 이후 모든 실험은 최소 세 번 이상 반복하였으며, 결과는 평균값±표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's t-test로 확인하였고, $P < 0.05$이면, 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[170] 도 4에 나타난 바와 같이, 세포내 이입 억제제를 처리한 그룹에서는 매우 낮은 양의 IL-12를 분비하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀은 세포 내로 정상적으로 이동하여 면역활성화 반응을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[171] **12.2. BMDC와 대식세포에서의 감마 인터페론 유도성 리소좀 티올 환원 효소의 발현 여부 확인**

[172] BMDC와 대식세포에서 감마 인터페론 유도성 리소좀 티올 환원 효소(Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase; GILT)를 발현하는지 확인하기 위하여, BMDC와 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 실험을 진행하였다. 보다 자세하게는, BMDC 및 RAW 264.7 세포의 총 리보핵산(RNA)을 Trizol 시약을 이용하여 분리하였다. 그리고 분리된 RNA를 주형으로 하여 상보적 디옥시리보 핵산(cDNA)을 Maxime RT PreMix tool을 사용하여 합성하였다. 그리고 합성된 cDNA를 이용하여 실시간중합효소연쇄반응 (RT-PCR)을 실시하고, PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동(agarose gel electrophoresis)하여 GILT의 발현량을 확인하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[173] 도 5에 나타난 바와 같이, 항원 제시 세포(Antigen presenting cell)인 수지상세포와 대식세포에서 GILT가 발현되는 것을 확인하였다.

[174] **12.3. GILT에 의한 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 화학적 결합 절단 여부 확인**

[175] 콜레스테롤과 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 화학적 결합인 다이설파이드 결합(disulfide bond)이 endolyososome에 존재하는 GILT에 의하여 절단(cleavage)되는지 확인하기 위하여, 상기 실시예 11.1과 동일한 방법으로 제조한 콜레스테롤과 레시퀴모드가 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 결합된 결합체를 포함하는 나노리포좀 50μl를 5ml의 튜브에 담았다. 그리고 GILT를 포함하거나 또는 포함하지 않는 PBS에 각각 용해시킨 시스테인(cysteine)을 나노리포좀과 혼합하고, 37℃ 진탕 배양기에서 배양하며 시간별로 시료를 획득하였다. 그리고 획득된 시료는 액체 질소를 이용하여 급속 냉동시키고, -20℃ 냉동고에서 보관하였다. 12시간 후에 획득한 모든 시료를

진공 동결 건조기에서 10 파스칼, 그리고 -80℃ 조건에서 24시간 동안 동결건조하였다. 그리고 동결건조된 시료를 액체 크로마토그래피-질량 분석법(LC-MS)으로 분석하여 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체에서 분리되어 나온 레시퀴모드(R848)의 양을 정량하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[176] 도 6에 나타난 바와 같이, 콜레스테롤과 R848의 다이설파이드 결합이 GILT에 의하여 절단되어 R848이 분리된 형태로 검출되는 것을 확인하였다.

[177]

[178] 상기 결과들을 통하여, 콜레스테롤과 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자가 다이설파이드 결합으로 연결된 결합체를 포함하는 나노리포좀은 세포내 이입을 통하여 세포 내로 이동하고, 세포 내의 endolysosome에 존재하는 GILT에 의하여 결합이 절단되어 콜레스테롤과 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자가 분리되어 면역활성화 작용을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[179] **실시예 13: 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자에 의한 면역 반응 유도 효과 확인**

[180] **13.1. 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 나노리포좀에 의한 동역학적으로 제어되는 면역세포의 활성화 확인**

[181] 상기 실시예 11.1과 동일한 방법으로 제조한 콜레스테롤과 레시퀴모드가 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 결합된 결합체를 포함하는 나노리포좀이 면역 세포의 면역 기능 조절에 미치는 영향을 확인하기 위하여, BMDC에 나노리포좀을 처리한 후 시간에 따른 사이토카인 분비량과 보조자극 분자(co-stimulatory molecule)의 발현을 확인하였다. 보다 자세하게는, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 농도가 1μg/ml이 되도록 나노리포좀 또는 R848을 각각 $1x10^6$개의 BMDC 세포에 처리하고 4시간 후부터, 4시간 간격으로 세포 배양액을 획득하였다. 획득한 세포 배양액은 1,500rpm에서 3분간 원심분리하여 세포와 상층액을 분리한 한 후, 상층액 내에 포함되어 있는 인터루킨-10(IL-10)과 인터루킨-12(IL-12)의 분비량을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다. 또한, 획득한 세포는 세포의 성숙도를 확인하기 위하여 형광이 달린 항체를 이용하여 세포를 염색을 한 후, BD Canto II flow cytometry를 이용하여 수지상세포의 보조자극 분자들의 발현을 확인하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[182] 도 7에 나타난 바와 같이, R848을 단독으로 처리한 실험군에 비해 콜레스테롤-R848 결합체를 포함하는 나노리포좀을 처리한 실험군(t-TLR7/8a)에서 IL-10가 분비되는 시점이 4시간 정도 느려진 것을 확인하였다. 또한, 사이토카인의 양은 24시간 이후에도 지속적으로 증가되는 것을 확인하였다.

[183] 도 8에 나타난 바와 같이, 수지상세포의 성숙도를 의미하는 보조자극 분자들, 즉, CD80과 CD86의 발현을 확인한 결과, R848을 단독으로 처리한 실험군은

성숙도를 의미하는 보조자극 분자들의 발현량이 시간이 지나도 증가하지 않는 반면에, 콜레스테롤-R848 결합체를 포함하는 나노리포좀(t-TLR7/8a)을 처리한 실험군은 보조자극분자들의 발현량이 시간이 지날수록 증가되는 것을 확인하였다.

[184] 상기 결과들을 통하여, 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체는 동력학적 제어가 가능한 면역기능 조절제로, 기존의 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자인 R848과 비교하여, 4시간 정도의 시간이 흐른 후에 면역반응을 유도할 수 있을 뿐 아니라, 지속적인 면역 반응을 유도할 수 있는 것을 확인하였다. 또한, 이를 통해 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체가 수지상세포를 고갈 상태(exhaustion), 즉, 면역 반응을 유도하지 못하는 상태가 아니라, 성숙상태(maturing), 즉, 면역 반응을 유도할 수 있는 상태로 길게 유지 시켜줄 수 있다는 것을 확인하였다.

[185] **13.2. 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 나노리포좀에 의한 지속적인 면역 반응 유도 효과 확인**

[186] 상기 실시예 11.1과 동일한 방법으로 제조한 콜레스테롤과 레시퀴모드가 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 결합된 결합체를 포함하는 나노리포좀이 지속적으로 면역 반응을 유도하는지 확인하기 위하여, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 농도가 1μg/ml이 되도록 나노리포좀 또는 R848을 각각 $1x10^6$개의 BMDC 세포에 처리하고 12시간 후에 세포 배양액을 획득하였다. 획득한 세포 배양액은 1,500rpm에서 3분간 원심분리하여 세포와 상층액을 분리한 한 후, 획득한 상층액을 이용하여 IL-12의 분비량을 측정하였다. 그리고 획득한 세포는 새로운 배지에 다시 분주하고, 4시간 간격으로 세포 상층액을 획득하여 IL-12의 분비량을 ELISA를 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다.

[187] 도 9에 나타낸 바와 같이, 새로운 배지로 교체하여 다시 배양한 후(After)의 결과를 보면 R848을 처리한 대조군에서는 IL-12가 더이상 관찰되지 않았으나, 나노리포좀을 처리한 실험군(t-TLR7/8a)에서는 16시간까지 IL-12의 분비가 지속되는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 단독으로 처리한 경우에는 수지상세포의 고갈 상태를 빨리 유도하나, 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체는 수지상세포의 성숙 상태를 장기간 동안 유지시켜, 지속적인 면역 반응을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

[188] **13.3. 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤과 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀에 의한 CD4 양성 T 세포의 Th1 반응으로의 분화 유도 효과 확인**

[189] 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀에 의한 지속적 면역 반응이 $CD4^+$T 세포의 Th1 반응으로의 분화를 유도하는지 확인하기 위하여, 일차적으로 C57BL/6 쥐에서 비장을 채취하여 단일 세포로 만든 후에 $CD4^+$T 세포 분리 키트를 사용하여 $CD4^+$T 세포를 분리하였다. 그리고 OVA(10μg/ml)와 함께, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 농도가 1μg/ml이

되도록 나노리포좀 또는 R848을 각각 1x10^{6}개의 BMDC 세포에 처리하고 12시간 동안 배양하였다. 이후, 96-웰 플레이트에 BMDC와 CD4$^+$T 세포의 비율이 1 : 10이 되도록 분주하고 함께 배양하였다. 배양 5일 후에 배양 상층액을 획득하고, ELISA를 이용하여 인터루킨 4(IL-4)와 인터페론 감마(IFN-γ)의 분비량을 측정하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[190] 도 10에 나타낸 바와 같이, IFN-γ의 분비량은 R848 및 OVA를 처리한 대조군(R848)과 나노리포좀 및 OVA를 처리한 실험군(t-TLR7/8a)과 비교하여 유의성있는 차이를 나타내지 않으나, IL-4의 분비량은 나노리포좀 및 OVA를 처리한 실험군(t-TLR7/8a)에서 감소된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀이 처리된 BMDC에서 IL-12의 분비가 촉진되고, 이에 의하여, CD4$^+$T 세포를 Th1으로 분극화시킴으로써 IFN-γ/IL-4 비율이 증가된다는 것을 확인할 수 있었다.

[191] **실시예 14: 아주번트 복합 투여에 의한 시너지 효과 확인**

[192] **14.1. 톨-유사 수용체 3 작용자 및 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 나노리포좀의 조합에 의한 시너지 효과 확인**

[193] 복합 아주번트 투여에 의한 시너지 효과를 확인하기 위하여, 아주번트로 알려져 있는 톨-유사 수용체 3 작용자인 poly(I:C)와 R848을 BMDC에 처리하였다. 보다 자세하게는, BMDC에 poly(I:C)를 먼저 처리하고, 시간 간격을 두고 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자인 R848을 처리한 실험군(R848 after poly(I:C)), 그리고 R848을 먼저 처리하고, 시간 간격을 두고 poly(I:C)를 처리한 실험군(poly(I:C)) after R848), 즉, asynchronous treatment를 실시하였다. asynchronous treatment의 대조군으로는 R848과 poly(I:C)를 동시에 처리한 세포를 이용하였으며, 동시 처리 시에 분비된 IL-12의 양을 기준점인 100으로 하여, 상대적인 값을 환산하였다. 또한, 동시 처리(synchronous treatment) 그룹으로는 대조군으로는 R848과 poly(I:C)를 각각 단독으로 처리한 대조군과 R848과 poly(I:C)를 동시에 처리한 대조군(R848+poly(I:C))을 사용하였으며, 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 포함하는 나노리포좀과 poly(I:C)를 처리한 실험군(t-TLR7/8a+poly(I:C))을 준비하였다. 그리고 처리가 완료된 후 36시간 동안 배양하고 세포 배양액을 획득하였다. 획득한 세포 배양액은 1,500rpm에서 3분간 원심분리 하여 세포와 상층액을 분리한 한 후, 상층액 내에 포함되어 있는 IL-12의 분비량을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 도 11에 나타내었다.

[194] 도 11에 나타낸 바와 같이, R848을 먼저 처리하고 poly(I:C)를 처리한 실험군에서는 동시 처리한 대조군과 비교하여 IL-12의 분비량이 감소되는 것을 확인하였다. 즉, 톨-유사 수용체 3 작용자와 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자간의 시너지 효과가 없다는 것을 확인하였다. 그러나 반대로 poly(I:C)를 먼저 처리하고, R848을 처리한 실험군에서는 2시간 내지 4시간의 간격을 두고 R848을 처리한 실험군에서 IL-12의 분비가 증가되며, 이는 동시에 처리한 대조군과

비교하여 130% 정도 상승된 값인 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 제1 아주번트를 처리하고, 제1 아주번트가 작동한 후에, 2시간 내지 4시간의 시간 차이를 두고 제2 아주번트가 작동할 때 면역활성화 작용이 최대화되는 것을 확인할 수 있었다.

[195] 또한, 동시 처리 실험에서는 나노리포좀과 poly(I:C)를 동시에 처리한 실험군에서 가장 높은 IL-2의 발현량을 나타내는 것을 확인하였다. 이는 poly(I:C)가 먼저 작동하고, 이후 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀이 세포 내로 이동하여 GILT에 의하여 콜레스테롤이 분리됨으로써 레시퀴모드가 비활성화 상태에서 활성화 상태로 전환되며, 활성을 나타냄으로써 시간 간격을 두고 처리한 실험군과 동일한 결과를 나타내는 것임을 확인할 수 있었다.

[196] **14.2. 톨-유사 수용체 4 작용자 및 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함하는 나노리포좀의 조합에 의한 시너지 효과 확인**

[197] 복합 아주번트 투여에 의한 시너지 효과를 확인하기 위하여, 톨-유사 수용체 4 작용자인 LPS, 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자인 레시퀴모드, 그리고 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀을 이용하여 실시예 14.1과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

[198] 도 12에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하고 4시간 정도의 시간 간격을 두고 R848을 처리한 실험군에서 가장 높은 IL-12의 분비량을 나타내며, 동시 처리 실험에서도 LPS와 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀을 동시에 처리한 실험군에서 가장 높은 IL-12의 분비량을 나타내는 것을 확인하였다.

[199]

[200] 상기 결과들을 통하여, 아주번트들의 시너지 효과에는 순서와 시간차가 중요한 요인으로 작용하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 복합 아주번트를 사용하여 면역활성화를 유도할 때, 그 효과를 증가시키기 위해서는 각각의 아주번트들의 활성화 시점을 조절할 수 있는 동력학적 제어(kinetically control)가 중요한 것을 확인하였다.

[201] **실시예 15: 아주번트 앙상블에 의한 면역활성화 효능 확인**

[202] **15.1. 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀과 톨-유사 수용체 3 작용자 또는 톨-유사 수용체 4 작용자의 조합에 의한 면역활성화 효능 확인**

[203] 제1 아주번트와 동력학적으로 작용하는 제2 아주번트의 복합 투여에 의한 면역활성화 효능을 확인하기 위하여, 제1 아주번트로는 poly(I:C) 또는 LPS를 사용하고, 제2 아주번트로는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀을 이용하여 실험을 진행하였다. BMDC에 LPS, poly(I:C), R848, 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는

나노리포좀을 각각 단독 투여한 대조군과 LPS 및 R848을 동시 투여한 실험군, poly(I:C) 및 R848을 동시 투여한 실험군, LPS 및 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀을 동시 투여한 실험군, poly(I:C) 및 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀을 동시 투여한 실험군을 각각 준비한 후, 36시간 동안 배양하고, 세포 배양액을 획득하였다. 획득한 세포 배양액은 1,50 rpm에서 3분간 원심분리하여 세포와 상층액으로 분리한 한 후, 상층액을 이용해서는 상층액 내에 포함되어 있는 종양괴사인자(TNF-α)와 IL-6의 분비량을 측정하였고, 세포는 형광이 달린 항체를 이용하여 표지한 후, BD Canto II flow cytometry를 이용하여 수지상 세포의 보조자극 분자들의 발현을 확인하여 세포의 성숙도를 확인하였다. 그 결과는 도 13 및 14에 나타내었다.

[204] 도 13에 나타낸 바와 같이, 각각을 단독 투여한 대조군과 비교하여, 각각을 동시투여한 실험군에서는 TNF-α와 IL-6의 분비량이 증가되었으나, 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀과 아주번트를 복합투여한 실험군에서는 현저히 높은 TNF-α와 IL-6의 분비량을 나타내는 것을 확인하였다.

[205] 또한, 도 14에 나타난 바와 같이, 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀과 아주번트를 복합투여한 실험군에서 가장 높은 보조자극 분자들의 발현량을 나타내는 것을 확인하였다.

[206] 상기 결과들을 통하여, 투여 직후에는 비활성화 상태를 유지하다가 2 내지 4시간 정도 후에 지연된 면역반응을 유도하는 동력학적 제어가 가능한 아주번트와 일반 아주번트를 복합 투여함으로써, 단순히 각각의 아주번트를 복합 투여한 경우와 비교하여 현저히 증가된 면역활성화 효과를 나타낼 수 있다는 것을 확인하였다.

[207] **15.2. 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀과 톨-유사 수용체 3 작용자 또는 톨-유사 수용체 4 작용자의 조합에 의한 지속적 면역 반응 유도 효과 확인**

[208] 제1 아주번트와 동력학적으로 작용하는 제2 아주번트의 복합 투여에 의한 면역활성화 효능을 확인하기 위하여, 제1 아주번트로는 poly(I:C) 또는 LPS를 사용하고, 제2 아주번트로는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀을 이용하여 실험을 진행하였다. 보다 자세하게는, BMDC에 LPS 및 R848, poly(I:C) 및 R848, LPS 및 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀, 또는 poly(I:C) 및 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀을 처리하고, 24시간 및 36시간 후에 세포 배양액을 획득하였다. 획득한 세포 배양액은 1,500rpm에서 3분간 원심분리하여 세포와 상층액으로 분리한 후, 상층액 내에 포함되어 있는 IL-12, IL-6, 및 TNF-α의 분비량을

ELISA를 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 15에 나타내었다.

[209] 도 15에 나타낸 바와 같이, poly(I:C) 또는 LPS와 R848을 동시에 처리한 실험군은 모든 시료에서 24시간과 36시간에 분비된 사이토카인의 양이 비슷하거나 감소된 반면, poly(I:C) 또는 LPS와 레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자를 포함한 나노리포좀을 동시에 처리한 실험군은 모든 시료에서 36시간 후에 분비된 사이토카인의 양이 24시간 후에 분비된 사이토카인의 양보다 증가된 것을 확인 하였다. 상기 결과를 통하여, 동력학적으로 작용하는 제2 아주번트와 제1 아주번트의 복합 투여를 통하여, 지속적인 면역 반응을 유도할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[210] **실시예 16: 아주번트 앙상블 시스템 제조**

[211] **16.1. 톨-유사 수용체 3 작용자와 동력학적으로 작용하는 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀으로 구성된 아주번트 혼합체의 제조**

[212] 상기 실시예 11.1과 동일한 방법으로 제조한 콜레스테롤과 레시퀴모드가 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 결합된 결합체를 포함하는 나노리포좀과 poly(I:C)를 질량비 4 : 1로 혼합하고, 볼텍스 믹서(vortex mixer, 3초)를 이용하여 안정한 파티클 형태의 아주번트 혼합체를 제조하였다. 본 명세서에서, 나노리포좀의 질량은 나노리포좀 내에 포함되어 있는 톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자의 질량으로 환산하여 계산하였다.

[213] **16.2. 아주번트 혼합체의 안정화 정도 확인**

[214] 실시예 16.1과 동일한 방법으로 제조한 아주번트 혼합체가 전기적 인력에 의하여 안정적인 혼합체를 형성하였는지 확인하기 위하여, 혼합체를 형성하지 못한 poly(I:C)가 주변에 남아 있는지 전기영동 이동성 변화분석(electrophoresis mobility shift assay; EMSA)를 이용하여 확인하였다. 보다 자세하게는, TAE buffer에 agarose(1g)를 첨가하고 열을 가하여 녹여준 후에 틀에 부어 30분 정도 굳혀주어 agarose gel을 제조하였다. 그리고 사이즈 마커(100bp), 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 포함하는 나노리포좀, poly(I:C), 혼합체(K-nanoadjuvant)를 차례대로 처리한 후 1시간 동안 전기영동하였다. 그 결과는 도 16에 나타내었다.

[215] 도 16에 나타낸 바와 같이, poly(I:C)와 콜레스테롤-레시퀴모드 결합체를 포함하는 나노리포좀으로 구성된 동력학적으로 작용하는 아주번트 혼합체에서는 poly(I:C)가 모두 결합되어 안정적인 혼합체를 이루고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[216] **16.3. 아주번트 혼합체의 세포내 안정성 확인**

[217] 아주번트 혼합체가 세포 내에서도 안정한 복합체 상태를 유지하는지 확인하기 위하여, R848, FITC가 결합된 콜레스테롤(chol-FITC), 그리고 Rhodamine이 결합된 poly(I:C)(Rhodamine-poly(I:C))를 이용하여, 실시예 16.1과 동일한 방법으로 아주번트 혼합체를 제조하였다. 그리고 ibidiμ-slide-8-well microscopy

chamber에 BMDC(4x10^{4}cells/well)를 분주하고, 아주번트 혼합체를 처리였다. 이후, 37℃에서 4시간 동안 배양하고, PBS를 이용하여 세척한 후, endolysosome은 LysoTracker DeepRed로, 핵은 Hoechst 33342로 염색하였다. 그리고 Deltaviosion PD를 이용하여 세포 이미지를 획득하였다. 그 결과는 도 17에 나타내었다.

[218] 도 17에 나타낸 바와 같이, chol-FITC를 포함하는 나노리포좀의 형광과 Rhodamine-poly(I:C)의 형광이 같은 위치에서 확인됨을 통하여 세포 내에서도 안정적인 혼합체를 유지하고 있다는 것을 확인하였다.

[219] **실시예 17: 아주번트 혼합체의 효능 확인**

[220] **17.1. 아주번트 혼합체의 종양 배출 림프절에서의 지속적인 면역 반응 유도 효능 확인**

[221] 실시예 16.1과 동일한 방법으로 제조한 아주번트 혼합체가 종양 배출 림프절에서의 면역 반응 유도 효능을 확인하기 위하여, C57BL/6 쥐에 R848(25μg), poly(I:C)(6.25μg), 또는 동일한 양의 R848 및 poly(I:C)를 포함하는 아주번트 혼합체를 SIINFEKL 항원과 혼합하여 피하에 단일 접종하였다. 그리고 접종 후 6, 12, 24, 48, 및 72시간 후에 림프절을 적출하고, 적출된 림프절은 세포 용해 완충액(CellLytic MT cell lysis)에 현탁한 후, 기계적으로 파쇄하였다. 세포가 파쇄된 용액은 4℃에서 10,000xg로 10분간 원심분리하여 불순물이 제거된 상층액을 획득하였다. 그리고 획득한 상층액 내에 포함되어 있는 IL-12p70의 양을 ELISA를 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 18에 나타내었다.

[222] 도 18에 나타난 바와 같이, R848과 poly(I:C)를 동시에 처리한 대조군은 림프절에서 IL-12p70의 분비가 12시간 이후로 감소되는 아주번트 혼합체를 처리한 실험군은 48시간까지 지속적으로 IL-12p70을 분비하고 있는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 동력학적으로 작용하는 아주번트 혼합체는 제1 아주번트와 제2 아주번트의 작용 시점이 다르기 때문에 체내에서 지속적으로 면역 반응을 유도하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[223] **17.2. 아주번트 혼합체의 항종양 효능 확인**

[224] 실시예 16.1과 동일한 방법으로 제조한 아주번트 혼합체의 항종양 효능을 확인하기 위하여, 일차적으로 B16OVA 흑색종 세포 5x10^5 cells를 쥐의 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하여, 암 동물 모델을 제작하였다. 그리고 암 동물 모델에 R848(25μg), poly(I:C)(6.25μg), 또는 동일한 양의 R848 및 poly(I:C)를 포함하는 아주번트 혼합체를 SIINFEKL 항원과 혼합하여 3일에 한번씩 피하에 단일 접종하였다. 그리고 종양 크기 및 생존 여부를 지속적으로 확인하였다. 종양의 부피는 "장축 직경X단축 직경^2/2"로 계산하였다. 그 결과는 도 19에 나타내었다.

[225] 도 19에 나타낸 바와 같이, 아주번트 혼합체를 투여한 5마리의 쥐 중 2마리가 36일까지 생존하였으며, 종양의 부피도 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여, 동력학적으로 작용하는 아주번트 혼합체를 이용함으로써 항암 효과를 현저히 증가시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[226] **17.3. 아주번트 혼합체의 종양 배출 림프절과 종양미세환경에서의 면역 반응**

유도 효능 확인

[227] 실시예 16.1과 동일한 방법으로 제조한 아주번트 혼합체의 종양 배출 림프절(TDLN)과 종양미세환경(TME)에서의 면역 반응 유도 효능을 확인하기 위하여, 일차적으로 B16OVA 흑색종 세포 $5x10^5$ cells를 쥐의 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하여, 암 동물 모델을 제작하였다. 그리고 암 동물 모델에 R848(25μg), poly(I:C)(6.25μg), 또는 동일한 양의 R848 및 poly(I:C)를 포함하는 아주번트 혼합체를 SIINFEKL 항원과 혼합하여 3일 간격으로 3회 피하에 단일 접종하였다. 그리고 마지막 접종 후 3일 후에 종양 조직 및 종양 배출 림프절을 적출하였다. 그리고 종양 조직 및 림프절에 모집된 면역 세포들을 분석하기 위하여 종양 조직과 림프절을 기계적으로 파쇄한 후, 콜라겐 분해 효소 D(collagenase D, 1mg/ml)가 첨가된 배지에 재현탁하고, 37℃에서 40분 동안 진탕 배양기에서 배양하였다. 이후 70μm 세포 여과기(cell strainer)를 이용하여 여과하고, PBS를 이용하여 2회 세척하여 단일 세포를 획득하였다. 획득된 단일 세포는 형광이 결합되어 있는 다양한 항체를 이용하여 염색한 후, BD Canto II flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 그 결과는 도 20 내지 23에 나타내었다.

[228] 도 20 내지 23에 나타난 바와 같이, 동력학적으로 작용하는 아주번트 혼합체는 종양 배출 림프절에서 성숙한 수지상세포를 생성하는 것을 확인하였다. 보다 자세하게는, 아주번트 혼합체를 투여한 마우스의 종양 조직과 종양 배출 림프절에서는 R848과 poly(I:C)를 동시에 투여한 실험군과 비교하여, $CD8^+$ T 세포에서 상당히 높은 빈도로 다작용성 IFN-γ^+ Granzyme-B^+ 및 CD69를 유도하는 것을 확인하였다. 또한, R848과 poly(I:C)를 동시에 처리한 실험군의 $CD8^+$ T 세포에서는 T cell의 고갈 상태를 의미하는 PD-1, TIM-3, 그리고 LAG-3의 발현 수준이 증가된 반면, 아주번트 혼합체를 처리한 실험군에서는 대조군(PBS 처리)과 유사한 것을 확인하였다. 또한, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, 자연 살해 세포(Natural Killer cell; NK cell), 그리고 자연 살해 T세포(Natural Killer T cell)에서는 CD69의 발현을 유도하였으며, 면역 억제 세포를 대표하는 골수 유래 억제 세포(Myeloid derived suppressor cell; MDSC)의 생성은 억제하는 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 아주번트 혼합체는 in vivo에서도 T 세포의 고갈 상태를 억제하고, 면역활성화 효과를 증진시킬 뿐만 아니라, 면역 반응의 지속 기간을 연장시킴으로써 단순히 아주번트들을 복합투여하는 것과 비교하여 현저히 높은 면역 조절 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[229] 또한, 종양 조직 및 림프절 조직에서 분비된 사이토카인을 확인하기 위하여, 획득한 종양 조직은 세포 용해 완충액(CellLytic MT cell lysis)를 이용하여 현탁시킨 후, 기계적으로 파쇄하였다. 그리고 4℃에서 10,000xg로 10분간 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 그리고 림프절 조직은 기계적으로 파쇄하고, 콜라겐 분해 효소 D(1mg/ml)가 첨가되어 있는 배지에 재현탁시켰다. 그리고 재현탁시킨 용액은 37℃에서 40분 동안 진탕 배양기에서 배양한 후에, 70μm 세포 여과기(cell strainer)를 이용하여 여과하였다. 그리고 PBS를 이용하여

2회 세척한 후, 1,500rpm에서 3분간 원심분리하여 단일 세포를 획득한 후에, 플레이트에 분주하고, 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 세포 배양액을 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 그리고 획득된 상층액들에 포함되어 있는 IL-12p70 및 IFN-γ의 분비량을 ELISA를 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 24 및 25에 나타내었다.

[230] 도 24 및 25에 나타낸 바와 같이, 아주번트 혼합체는 종양 조직 및 종양 배출 림프절에서 모두 IL-12p70 및 IFN-γ의 분비를 효과적으로 유도하는 것을 확인하였다.

[231] 상기 결과들을 통하여, 동력학적으로 작용하는 아주번트 혼합체는 다양한 면역 세포들의 증식 능력 향상, 사이토카인 생산량 증가, 그리고 $CD8^+$ T 세포의 고갈 상태를 유도하지 않고 용해 과립 생산을 증가시킴으로써, $CD8^+$ T 세포의 효과 인자(effector)의 기능을 향상시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[232] **실시예 18: IL-12 중화 항체를 이용한 아주번트 혼합체의 효능 확인**

[233] 아주번트 혼합체에 의해 향상된 면역 세포의 증식 및 면역활성화능이 IL-12p70의 지속적인 생산에 의하여 매개되는지 확인하기 위하여, 일차적으로 B16OVA 흑색종 세포 $5x10^5$ cells를 쥐의 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하여, 암 동물 모델을 제작하였다. 그리고 암 동물 모델에 아주번트 혼합체를 접종하기 전에 항-마우스 IL-12p75(300μg)를 3일 간격으로 5회 복강내 투여하였다. 그리고 5회 투여하고, 3일 후에 아주번트 혼합체를 SIINFEKL 항원과 혼합하여 3일에 간격으로 3회 피하에 단일 접종하였다. 그리고 종양 크기 및 생존 여부를 지속적으로 확인하였다. 그 결과는 도 26에 나타내었다.

[234] 도 26에 나타낸 바와 같이, 항-IL-12를 처리한 실험군에서는 아주번트 혼합체의 항종양 효과가 감소되는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, IL-12가 톨-유사 수용체 3 작용자 및 콜레스테롤-톨-유사 수용체 7 또는 8 작용자 결합체를 포함하는 나노리포좀으로 구성된, 동력학적으로 작용하는 아주번트 혼합체의 선천성 면역 자극 및 적응 면역 반응 사이에 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다.

[235] **실시예 19: 아주번트 혼합체의 국소 접종을 통한 항종양 면역 반응 유도 효과 확인**

[236] **19.1. 아주번트 혼합체의 국소 접종을 통한 전이암에 대한 항종양 효능 확인**

[237] 아주번트 혼합체의 국소 접종을 통해, 전이암에 대한 항종양 효능을 나타내는지 확인하기 위하여, TC-1 세포 $5x10^5$ cells를 쥐의 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하여, 암 동물 모델을 제작하였다. 그리고 4일 후에 이차로 TC-1 세포 $2.5x10^5$ cells를 쥐의 왼쪽 옆구리에 피하로 접종하였다. 그리고 암 동물 모델에 아주번트 혼합체를 SIINFEKL 항원과 혼합하여 3일 간격으로 4회 피하에 단일 접종하였다. 그리고 마지막 접종 후 3일 후에 종양 조직 및 종양 배출 림프절을 적출하였다. 종양 크기 및 생존 여부는 지속적으로 확인하였다. 그 결과는 도 27에 나타내었다.

[238] 도 27에 나타난 바와 같이, 아주번트 혼합체를 접종한 실험군에서는 일차 종양 뿐만 아니라 이차 종양의 성장도 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

[239] **19.2. 아주번트 혼합체의 국소 접종을 통한 폐 전이 억제 효과 확인**

[240] 아주번트 혼합체의 국소 접종이 암의 전이를 억제하는지 확인하기 위하여, 일차적으로 4T1 세포 $5x10^5$ cells를 쥐의 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하여, 암 동물 모델을 제작하였다. 그리고 5일 후에 종양 용해물(tumor lysate, 10μg)과 아주번트 혼합체를 혼합하여 3일 간격으로 4회 피하에 단일 접종하였다. 그리고 30일 후에 쥐를 안락사시킨 후에 인디아 잉크(47ml)와 PBS(3ml)를 혼합한 용액을 기관내 주사하여 폐를 염색하였다. 염색된 폐는 적출하고 PBS로 세척한 후, 고정용액(70% 에탄(40ml), 4% 포름알데히드(1ml) 및 아세트산(0.5 ml))에 담가 고정시키고, 폐 전이성 결절은 육안 관찰로 계수하였다. 그 결과는 도 28에 나타내었다.

[241] 도 28에 나타난 바와 같이, 대조군에서는 폐 전이성 종양 결절이 다수 확인되었지만, 아주번트 혼합체를 투여한 실험군에서는 폐의 전이가 관찰되지 않는 것을 확인하였다.

[242] **19.3. 아주번트 혼합체의 국소 접종을 통한 전이암에 대한 동소 종양에 대한 항종양 효능 확인**

[243] 아주번트 혼합체의 국소 접종을 통해, 동소(orthotopic) 종양에 대한 항종양 효능을 나타내는지 확인하기 위하여, 일차적으로 C57BL/6 쥐를 호흡기 마취로 마취하였다. 그리고 흉부 피부의 오른쪽을 절개 한 후, 폐엽의 오른쪽에 TC-1 세포 $5x10^5$ cells를 접종하였다. 그리고 3일 후에 아주번트 혼합체를 Long-E7 peptide와 함께 혼합하여 3일 간격으로 4회 피하 단일 접종하였다. 그리고 마지막 접종 3일 후에 쥐를 안락삭시킨 후, 폐를 적출하고, 적출된 폐는 절편하여 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 그 결과는 도 29에 나타내었다.

[244] 도 29에 나타난 바와 같이, 폐에 직접 접종된 종양 세포는 아무 것도 처리하지 않은 대조군에서는 공격적으로 성장한 반면에, 아주번트 혼합체를 투여한 실험군에서는 종양의 성장이 완전히 저해된 것을 확인하였다.

[245] 상기 결과들을 통하여, 동력학적으로 작용 아주번트 혼합체의 국소 투여 방식으로도 전신 항종양 면역 반응을 생성하여, 효과적으로 항종양 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[246] **실시예 20: 아주번트 혼합체와 면역관문억제제 요법 또는 화학 요법과의 조합을 통한 항종양 효능 확인**

[247] 아주번트 혼합체의 면역 활성화 작용을 통하여, 다양한 항암 치료에 대한 치료 효과를 향상시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 실험을 진행하였다.

[248] **20.1. 아주번트 혼합체와 면역관문억제제 요법의 조합을 통한 항종양 효능 확인**

[249] 아주번트 혼합체와 면역관문억제제 요법(ICBT therapy)의 조합을 통한 항종양 효능을 확인하기 위하여, 일차적으로 TC-1 세포 $5x10^5$ cells를 쥐의 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하여, 암 동물 모델을 제작하였다. 그리고 4일 후에,

아주번트 혼합체와 Long-E7 peptide를 혼합하여 3일 간격으로 6회 피하에 단일 접종하였다. 그리고 항-PD-L1은 2일 간격으로 8회 복강 내 투여하였다. 마지막 투여 3일 후에, 종양 조직 내의 PD-L1의 발현 정도를 확인하고, 종양 크기 및 생존 여부는 지속적으로 확인하였다. 그 결과는 도 30에 나타내었다.

[250] 도 30에 나타난 바와 같이, 어주번트 혼합체와 면역관문억제제 요법을 조합한 경우에 PD-L1의 발현이 현저히 증가되며, 암의 성장 또한 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다. 그리고 어주번트 혼합체와 면역관문억제제 요법을 조합한 경우에는 120일 이상 생존하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 아주번트 혼합체는 종양미세환경에서 세포독성림프구의 활성 증가와 IFN-γ 분비 증가를 유도함으로써, PD-L1의 발현을 증가시키고, 종양미세환경 내에서 면역 반응을 조절함으로써, 면역관문억제제 요법에 의한 항암 효과를 더욱 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[251] **20.2. 아주번트 혼합체와 화학 요법의 조합을 통한 항종양 효능 확인**

[252] 아주번트 혼합체와 화학 요법(chemotherapy)의 조합을 통한 항종양 효능을 확인하기 위하여, 일차적으로 TC-1 세포 $5x10^5$ cells를 쥐의 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하여, 암 동물 모델을 제작하였다. 그리고 4일 후에, 아주번트 혼합체와 Long-E7 peptide를 혼합하여 3일 간격으로 5회 피하에 단일 접종하였다. 그리고 독소루비신 리포좀 제형(80μg)은 6일 간격으로 2회 정맥주사하였다. 그리고 종양 크기 및 생존 여부를 지속적으로 확인하였다. 그 결과는 도 31에 나타내었다.

[253] 도 31에 나타난 바와 같이, 어주번트 혼합체와 화학 요법을 조합한 경우에 암의 성장이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다. 또한, 어주번트 혼합체와 면역관문억제제 요법을 조합한 경우에는 160일 이상 생존하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 아주번트 혼합체와 화학 요법과의 병용 요법을 통하여 효과적으로 암을 치료할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[254]

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

산업상 이용가능성

[256] 본 발명의 동력학적으로 작용하는 아주번트 앙상블 조성물은 2 종류 이상의 면역활성화 물질이 동시에 투여되었을 때, 일정 시간 간격을 두고 작용하는 동력학적 앙상블을 제공함으로써, 면역학적 반응의 시너지 효과를 최대로 이끌어낼 수 있을 뿐만 아니라, 약물 전달체에 다양한 기능성 약물을 용이하게 포함시켜 순차적으로 분비되도록 조절함으로써 아주번트를 이용하여 치료할 수

있는 다양한 질환에 적용이 가능할 뿐만 아니라, 치료 효과 또한 현저히 증가시킬 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 동력학적으로 작용하는 아주번트 앙상블 조성물로서,
상기 조성물은 2 종류 이상의 아주번트를 포함하고 있으며, 제1 아주번트는 면역세포 수용체와 먼저 결합하여 1차 면역반응을 유도하는 것이며,
제2 아주번트는 활성화 부위에 절단 가능한 링커(cleavable linker)가 결합되어 있는 결합체로 순차적으로 면역세포 수용체와 결합하여 2차 면역반응을 유도하는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 동력학적 작용은 제2 아주번트의 활성화 부위에 절단 가능한 링커가 결합되어 있어 비활성화(inactive) 상태가 유지되다가, 2 내지 12 시간 이내에 활성화 부위를 블로킹하고 있던 절단 가능한 링커가 절단되어 면역활성화 물질의 활성이 시간적으로 지연되어 나타나는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 절단 가능한 링커는 다이설파이드(disulfide), 카바메이트(carbamate), 하이드라진(hydrazine), 에스터(ester), 펩타이드(peptide), 아자이드(azide), 아마이드(amide), 하이드라존(hydrazone), 티오이써(thioether), 포스포디에스터(phosphodiester), 티오케탈(thioketal) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 결합을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 절단 가능한 링커는 양측 말단 또는 일측 말단에 에틸렌옥사이드(ethylene oxide) 또는 에틸렌글라이콜(ethylene glycol)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 절단 가능한 링커는 효소, pH, 산화 환원 전위(redox potential), 온도, 초음파, 자성, 및 광원으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 요인에 의하여 결합 부위의 화학적 결합이 절단되는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 절단 가능한 링커의 말단에는 콜레스테롤, 지질, 단백질, 아미노산, 펩타이드 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 물질이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 제2 아주번트는 나노리포좀, 나노에멀젼, 나노마이셀, 하이드로겔,

스캐폴드, 고형 나노입자 및 고분자 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 약물 전달체에 로딩되어 있는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 약물 전달체는 제1 아주번트를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 9] 제 7 항에 있어서,
상기 약물 전달체는 면역세포 표면 또는 엔도좀 또는 사이토졸 내에 존재하는 수용체와 반응할 수 있는 리간드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 10] 제 7 항에 있어서,
상기 약물 전달체는 톨-유사 수용체 작용자, 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라머좀 인듀서(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD ligand), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 병원균의 외벽성분, 알룸(alum), 리피드(lipids), 이들의 조합 및 이들의 유사체(derivative)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 면역활성화 물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 11] 제 1 항에 있어서,
상기 제2 아주번트는 톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist)인 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 12] 제 1 항에 있어서,
상기 제1 아주번트는 톨-유사 수용체 작용자, 사포닌, 항바이러스성 펩티드, 인플라머좀 인듀서(inflammasome inducer), NOD 리간드(NOD ligand), CDS 리간드(cytosolic DNA sensor ligand), STING(stimulator of interferon genes) 리간드, 병원균의 외벽성분, 알룸(alum), 리피드(lipids), 이들의 조합 및 이들의 유사체(derivative)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 면역활성화 물질인 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 13] 제 1 항에 있어서,
상기 면역세포는 항원제시세포(dendritic cells, macrophage), 자연살해세포(NK cell), T 세포, B 세포, 조절 T 세포(regulatory T cell), MDSC(myeoloid derived suppressor cells), 및 M2 macrophage로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 아주번트 앙상블 조성물.

[청구항 14] 제 1 항의 아주번트 앙상블 조성물을 유효성분으로 포함하는, 감염성 질환(infectious disease), 암(cancer), 대사증후군(metabolic syndrome), 자가면역질환(autoimmune disease) 또는 희귀질환(rare disease)의 예방

또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 15] 제 14 항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 항원, 화학 항암제, 또는 면역관문억제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 16] 제 15 항에 있어서,
상기 항원은 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 유전자, 펩티드, 다당류, 지질다당류, 폴리뉴클레오티드, 세포, 세포 용해물(lysate), 박테리아 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

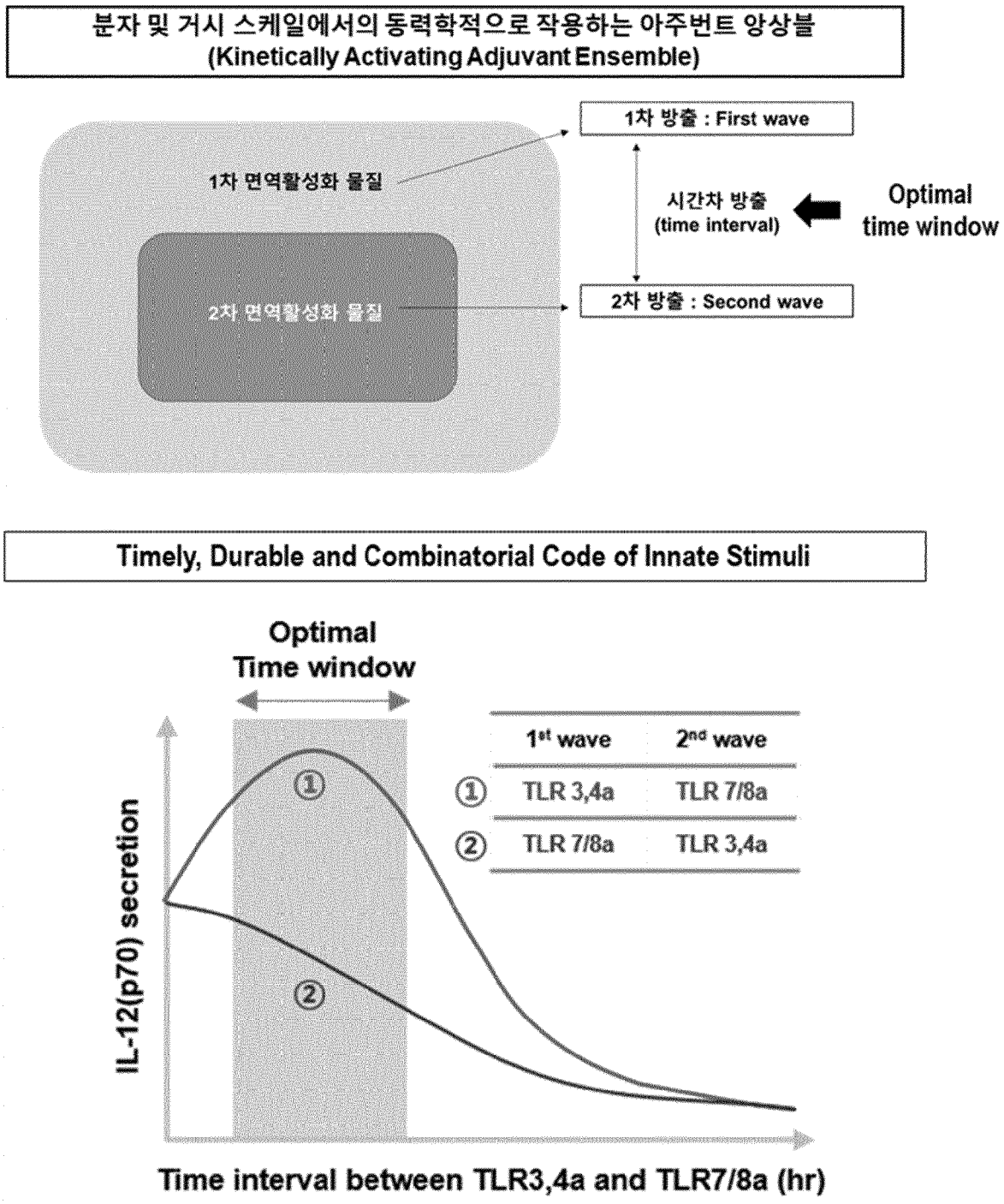
[청구항 17] 제 14 항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 암의 증식, 전이, 재발 또는 항암 치료 요법에 대한 내성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 18] 제 1 항의 아주번트 앙상블 조성물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 감염성 질환(infectious disease), 암(cancer), 대사증후군(metabolic syndrome), 자가면역질환(autoimmune disease) 또는 희귀질환(rare disease)의 예방 또는 치료 방법.

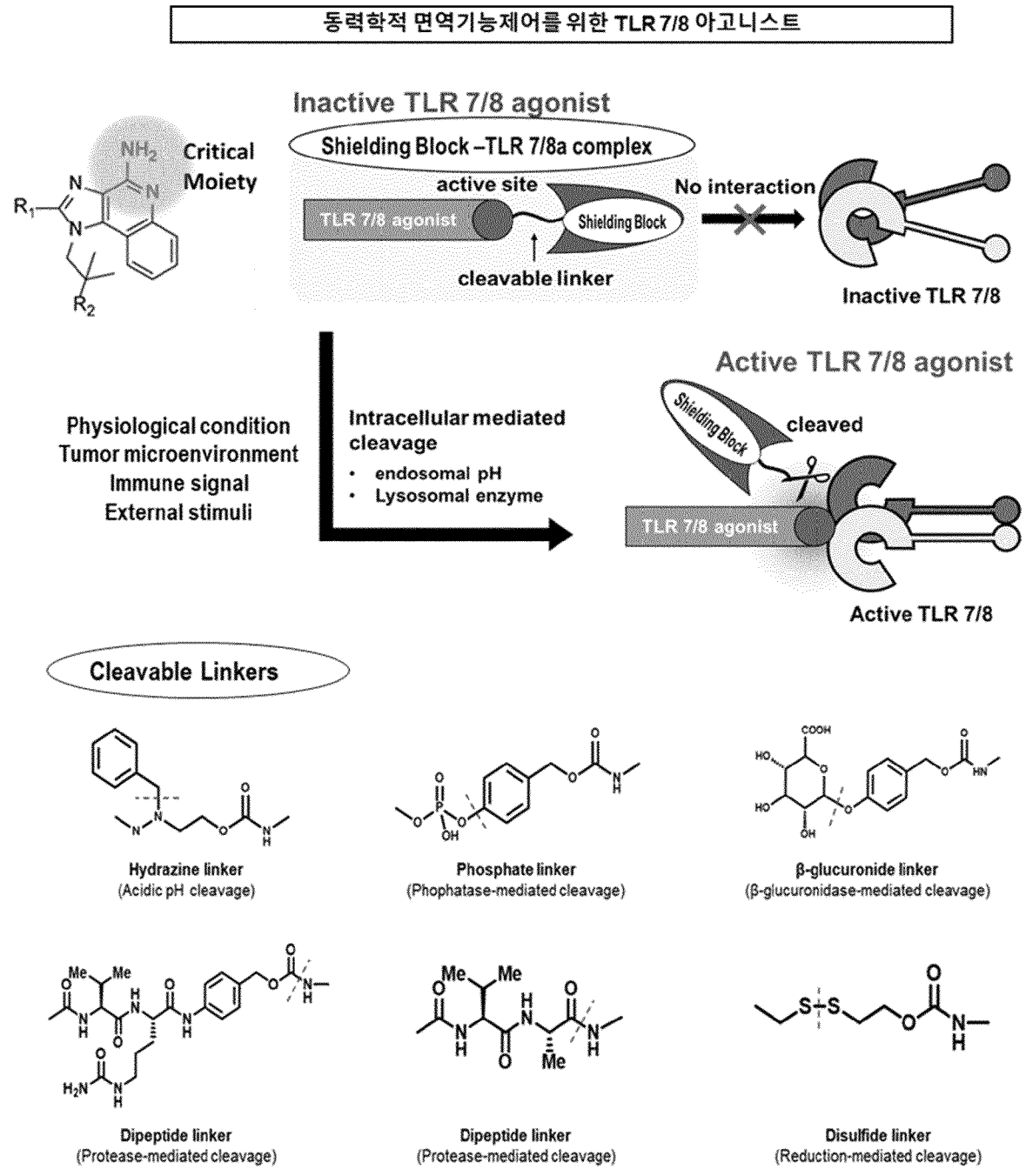
[청구항 19] 제 1 항의 아주번트 앙상블 조성물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 감염성 질환(infectious disease), 암(cancer), 대사증후군(metabolic syndrome), 자가면역질환(autoimmune disease) 또는 희귀질환(rare disease)의 예방 또는 치료 용도.

[청구항 20] 제 1 항의 아주번트 앙상블 조성물의 감염성 질환(infectious disease), 암(cancer), 대사증후군(metabolic syndrome), 자가면역질환(autoimmune disease) 또는 희귀질환(rare disease)의 예방 또는 치료에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도.

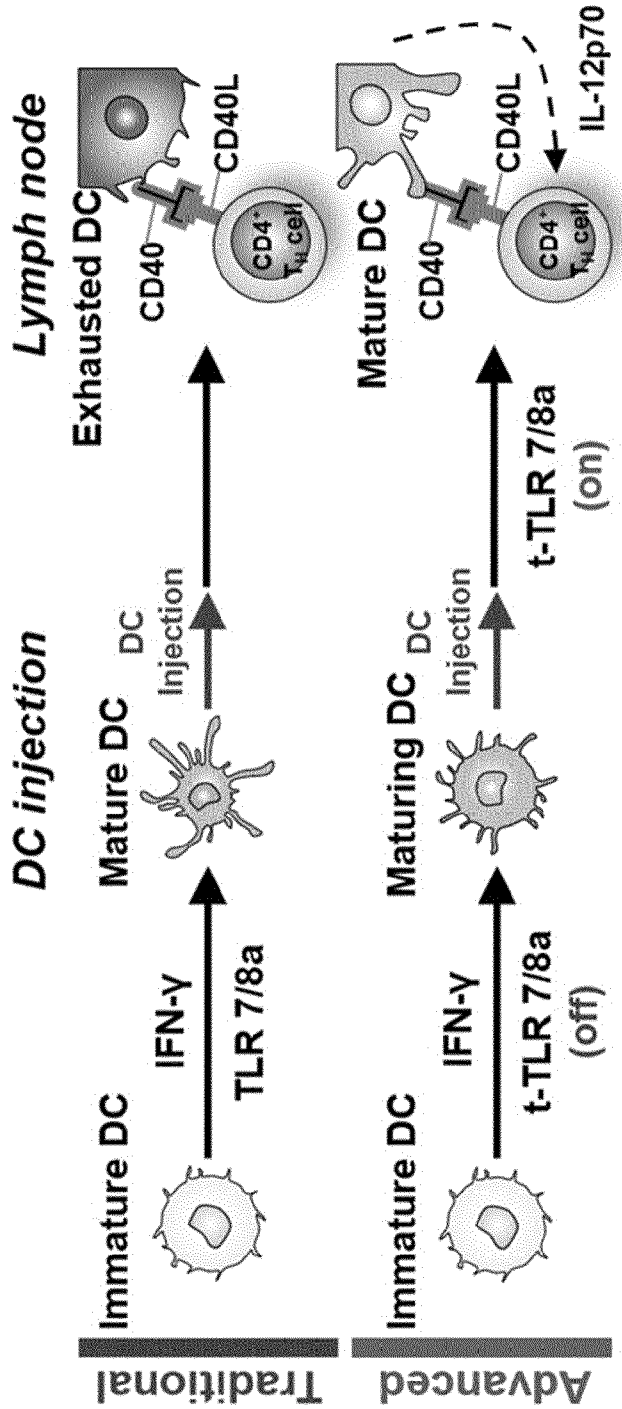
[도1]


분자 및 거시 스케일에서의 동력학적으로 작용하는 아주번트 앙상블
(Kinetically Activating Adjuvant Ensemble)
1차 방출 : First wave
1차 면역활성화 물질
시간차 방출
(time interval)
Optimal
time window
2차 면역활성화 물질
2차 방출 : Second wave
Timely, Durable and Combinatorial Code of Innate Stimuli
Optimal
Time window
1st wave
2nd wave
① TLR 3,4a TLR 7/8a
② TLR 7/8a TLR 3,4a
IL-12(p70) secretion
Time interval between TLR3,4a and TLR7/8a (hr)

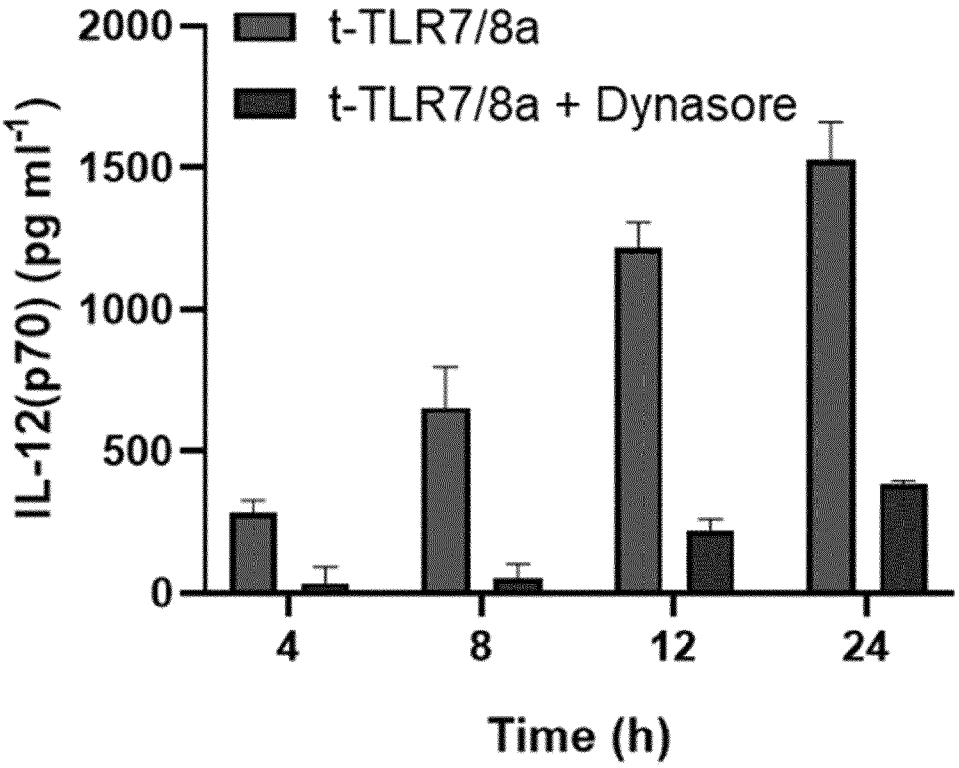
[도2]


동력학적 면역기능제어를 위한 TLR 7/8 아고니스트
Inactive TLR 7/8 agonist
Critical Moiety
Shielding Block –TLR 7/8a complex
active site
TLR 7/8 agonist
Shielding Block
cleavable linker
No interaction
Inactive TLR 7/8
Physiological condition
Tumor microenvironment
Immune signal
External stimuli
Intracellular mediated cleavage
• endosomal pH
• Lysosomal enzyme
Active TLR 7/8 agonist
Shielding Block
cleaved
TLR 7/8 agonist
Active TLR 7/8
Cleavable Linkers
Hydrazine linker
(Acidic pH cleavage)
Phosphate linker
(Phophatase-mediated cleavage)
β-glucuronide linker
(β-glucuronidase-mediated cleavage)
Dipeptide linker
(Protease-mediated cleavage)
Dipeptide linker
(Protease-mediated cleavage)
Disulfide linker
(Reduction-mediated cleavage)

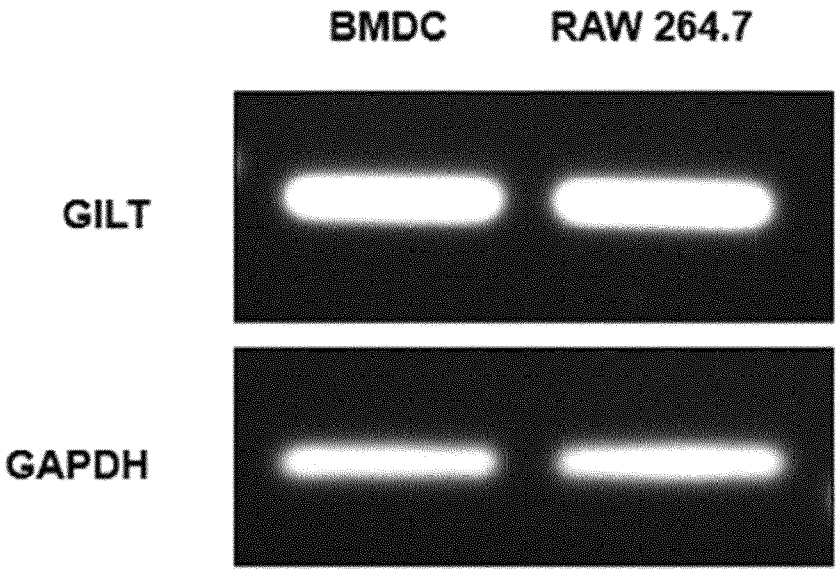
[도3]


Traditional
Advanced
DC injection
Lymph node
Immature DC
IFN-γ
TLR 7/8a
Mature DC
DC Injection
Exhausted DC
CD40
CD40L
CD4+ TH1 cell
Immature DC
IFN-γ
t-TLR 7/8a (off)
Maturing DC
DC Injection
t-TLR 7/8a (on)
Mature DC
CD40
CD40L
IL-12p70
CD4+ TH1 cell

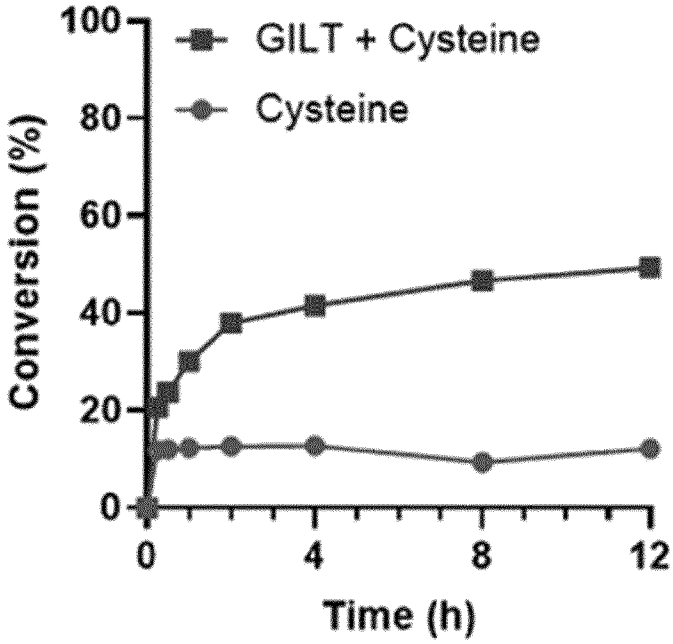
[도4]


2000
1500
1000
500
0
IL-12(p70) (pg ml-1)
t-TLR7/8a
t-TLR7/8a + Dynasore
4
8
12
24
Time (h)

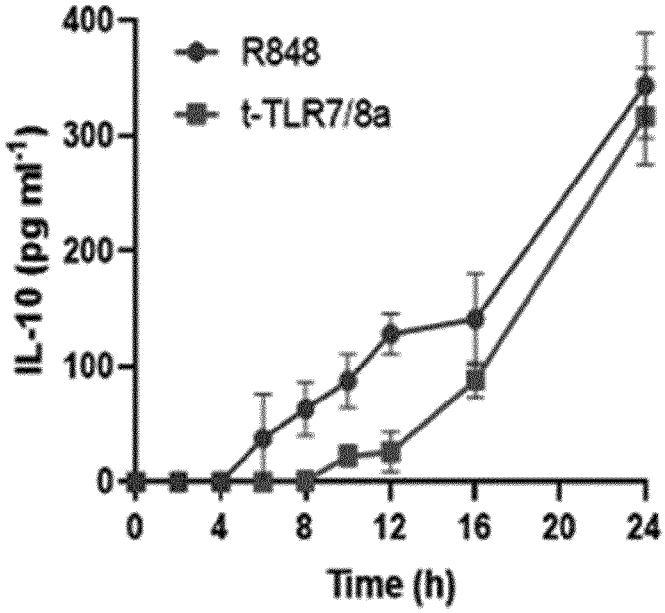
[도5]


BMDC
RAW 264.7
GILT
GAPDH

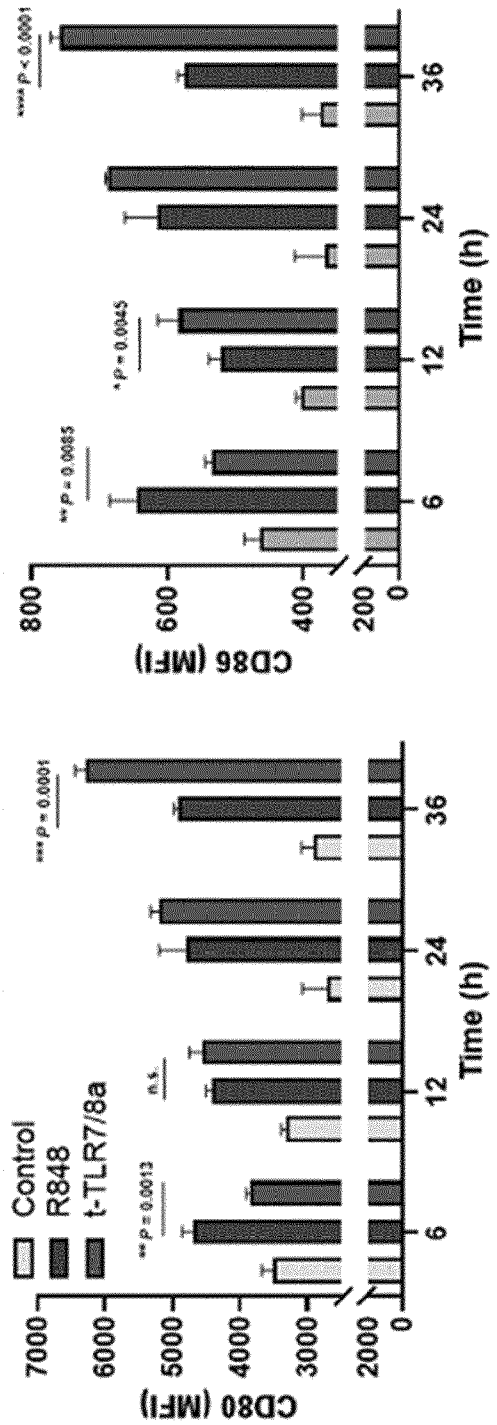
[도6]


GILT + Cysteine
Cysteine
Conversion (%)
100
80
60
40
20
0
0
4
8
12
Time (h)

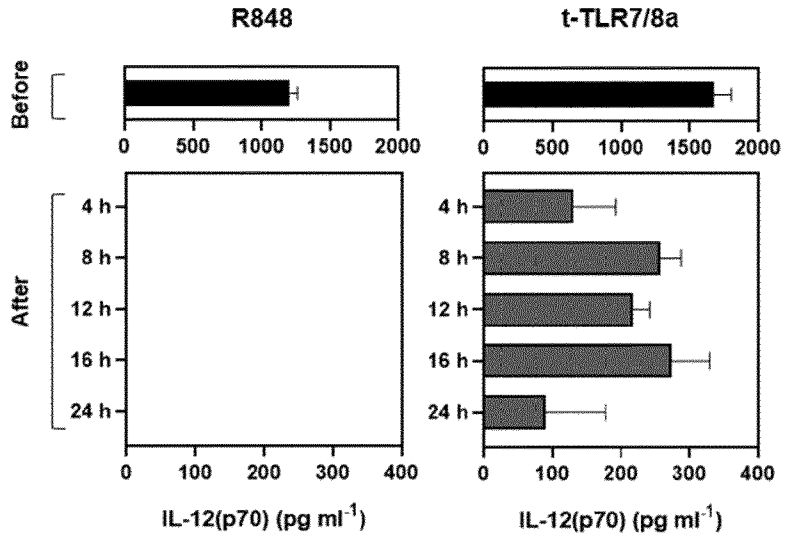
[도7]


R848
t-TLR7/8a
IL-10 (pg ml-1)
400
300
200
100
0
0
4
8
12
16
20
24
Time (h)

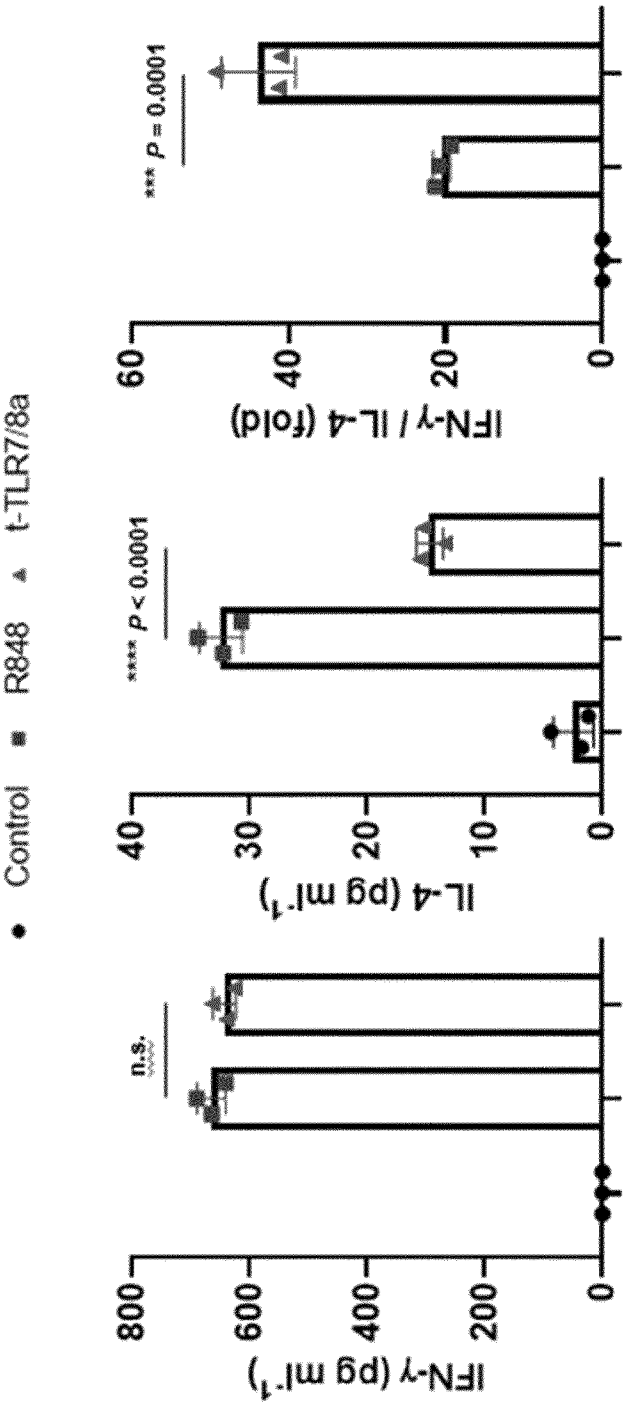
[도8]


CD86 (MFI)
800
600
400
200
0
** P = 0.0083
* P = 0.0045
**** P < 0.0001
6
12
24
36
Time (h)
CD80 (MFI)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
0
Control
R848
t-TLR7/8a
** P = 0.0013
n.s.
*** P = 0.0001
6
12
24
36
Time (h)

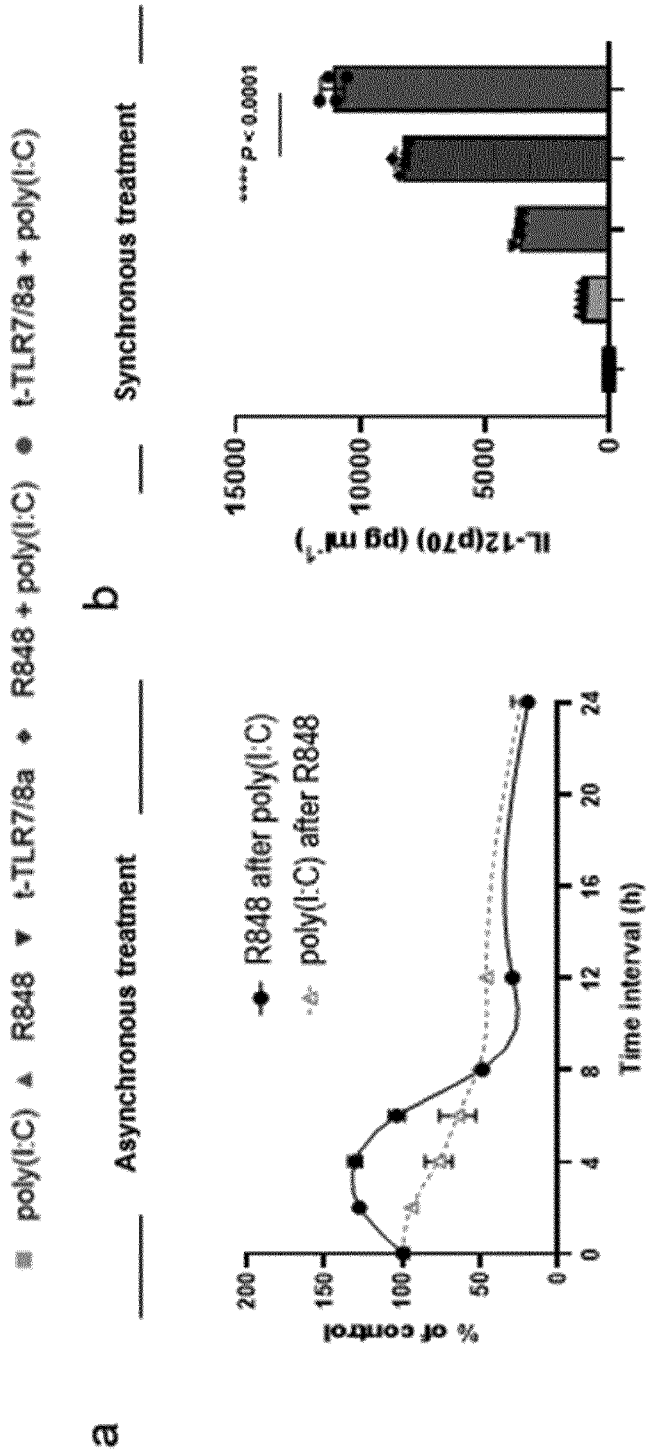
[도9]


R848
t-TLR7/8a
Before
After
4 h
8 h
12 h
16 h
24 h
0
500
1000
1500
2000
100
200
300
400
IL-12(p70) (pg ml-1)
IL-12(p70) (pg ml-1)

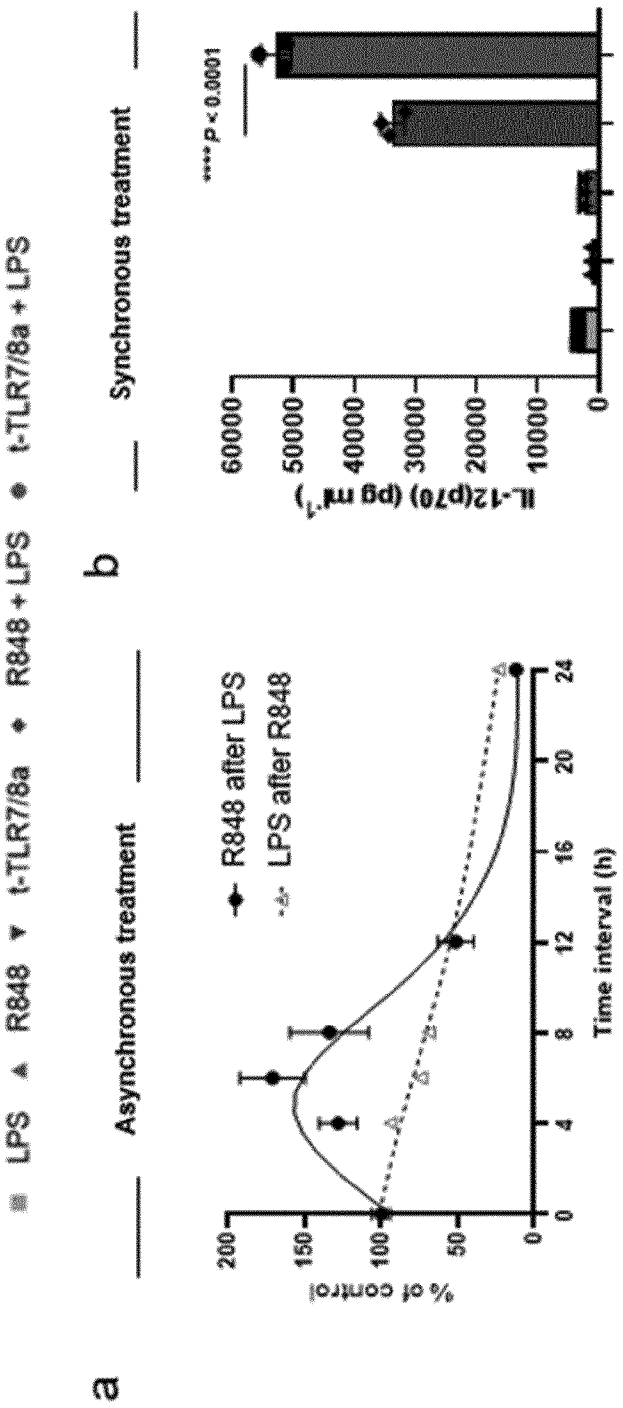
[도10]


Control
R848
t-TLR7/8a
IFN-γ (pg ml⁻¹)
n.s.
IL-4 (pg ml⁻¹)
**** P < 0.0001
IFN-γ / IL-4 (fold)
*** P = 0.0001

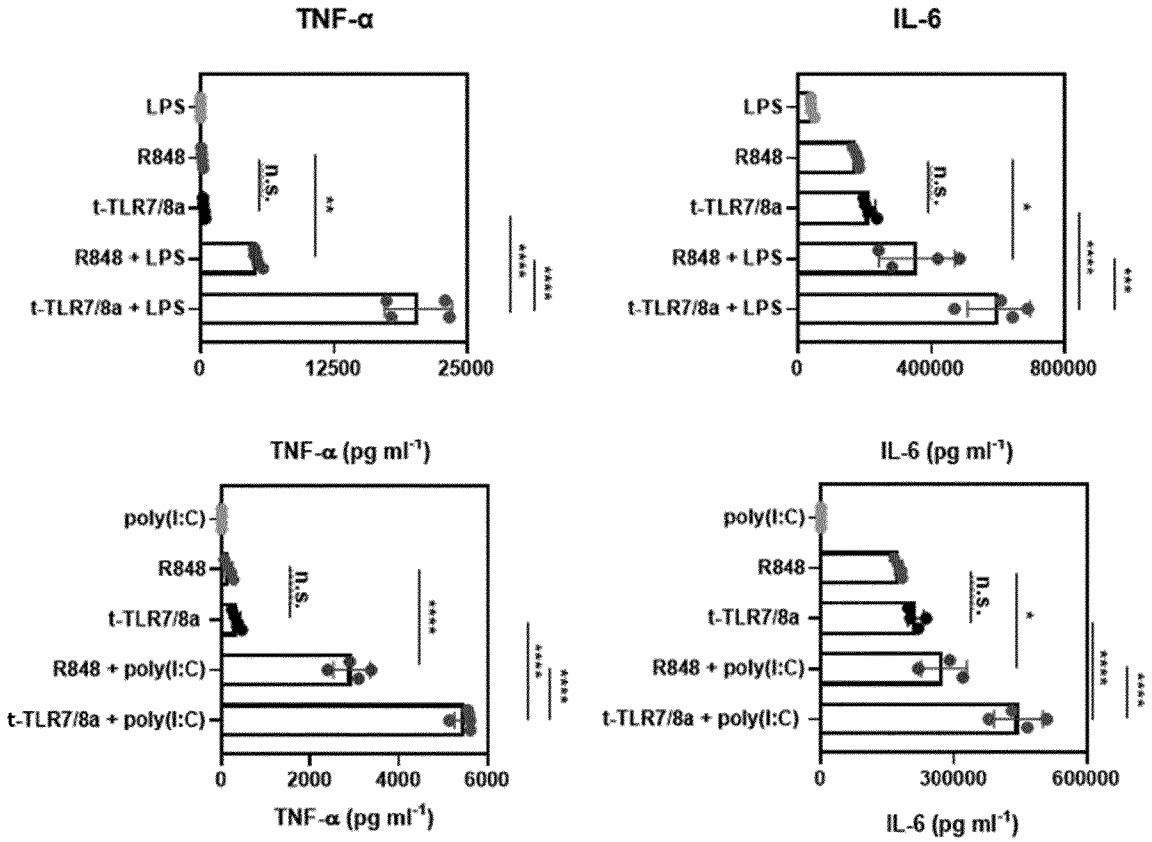
[도11]


poly(I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
t-TLR7/8a + poly(I:C)
a
Asynchronous treatment
R848 after poly(I:C)
poly(I:C) after R848
% of control
Time interval (h)
b
Synchronous treatment
**** P < 0.0001
IL-12(p70) (pg ml-1)

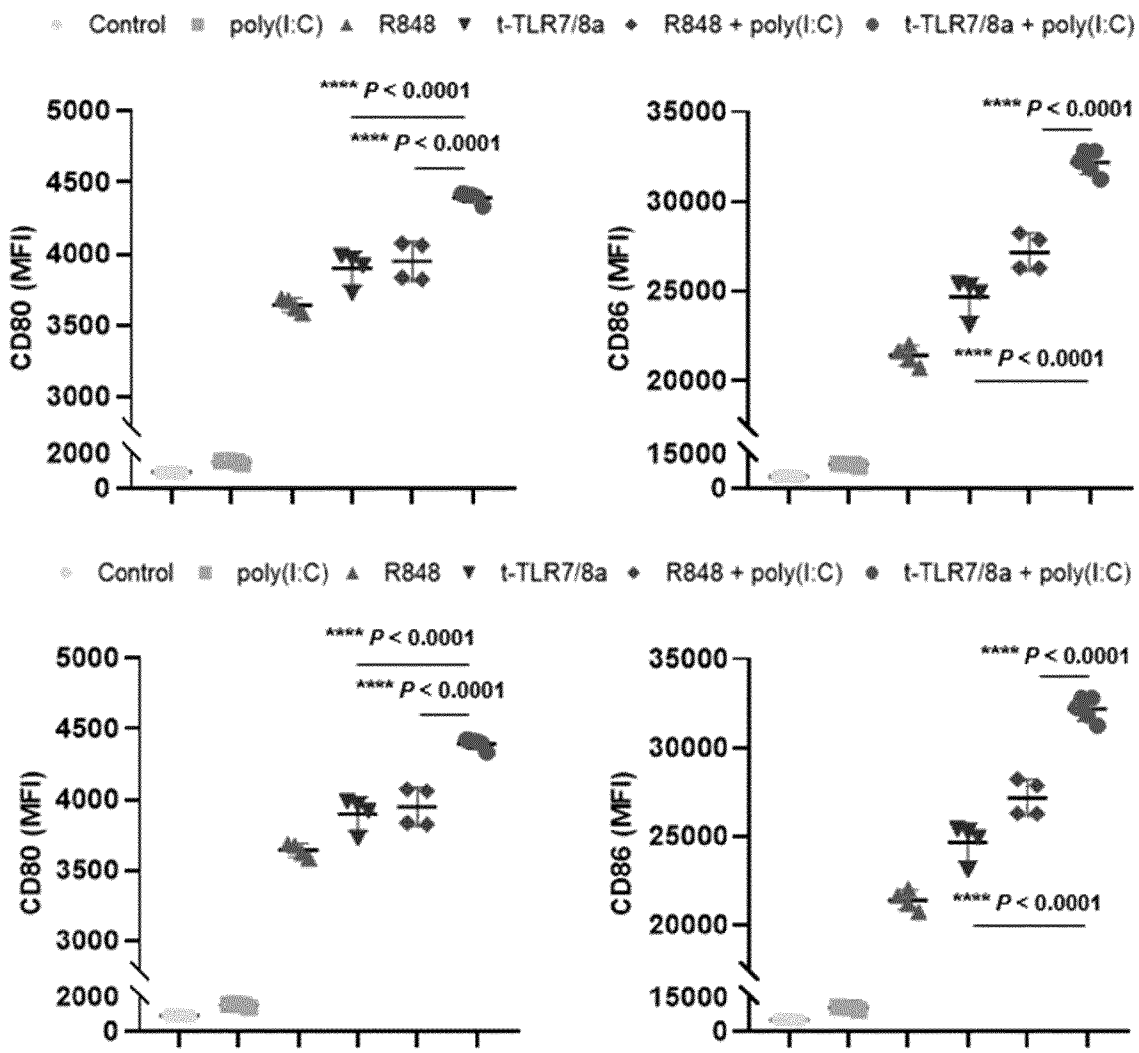
[도12]


LPS
R848
t-TLR7/8a
R848 + LPS
t-TLR7/8a + LPS
a
Asynchronous treatment
R848 after LPS
LPS after R848
% of control
Time interval (h)
b
Synchronous treatment
**** p < 0.0001
IL-12(p70) (pg ml-1)

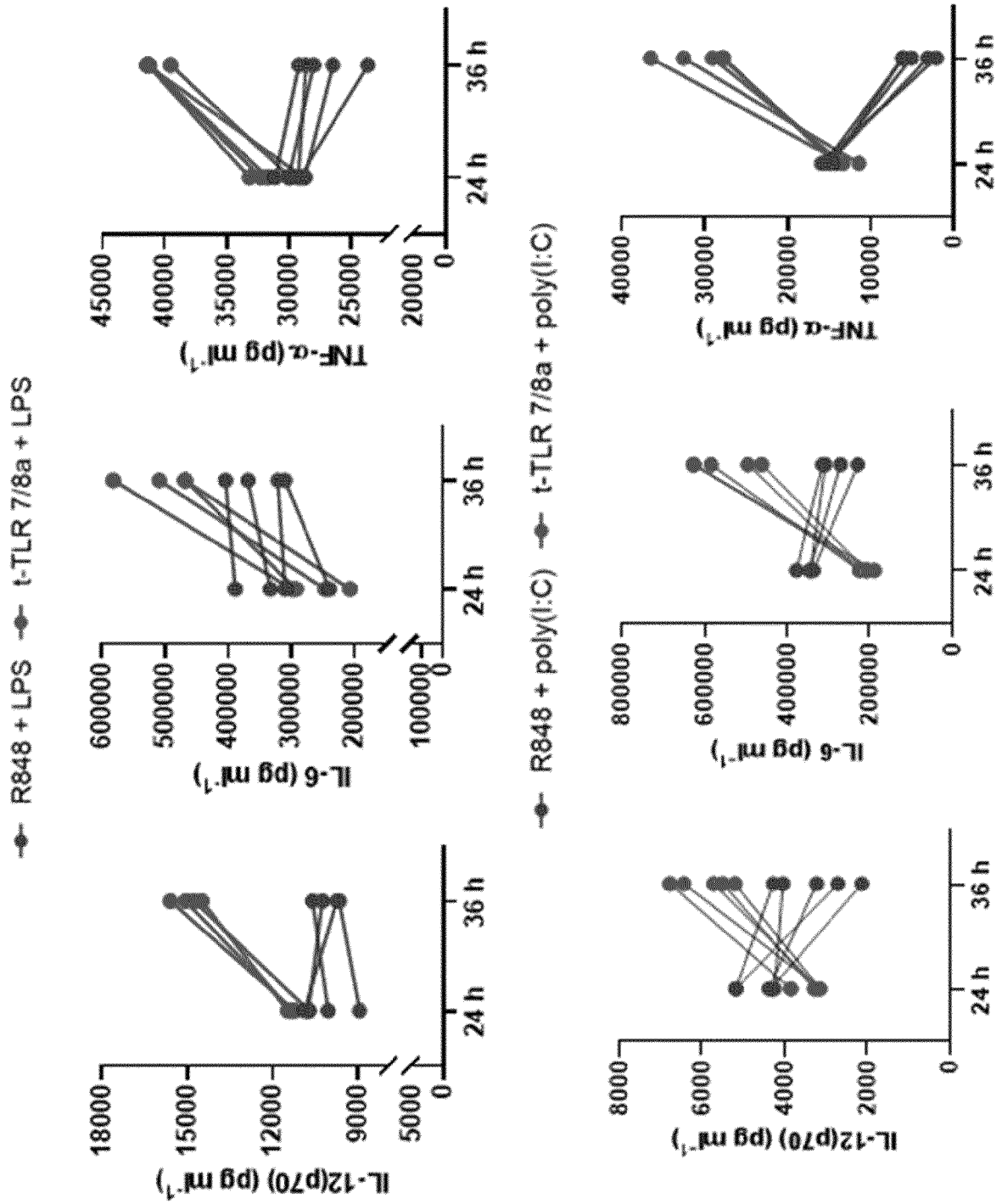
[도13]


TNF-α
LPS
R848
t-TLR7/8a
R848 + LPS
t-TLR7/8a + LPS
n.s.
**
****
****
0
12500
25000
TNF-α (pg ml-1)
IL-6
LPS
R848
t-TLR7/8a
R848 + LPS
t-TLR7/8a + LPS
n.s.
*
****
***
0
400000
800000
IL-6 (pg ml-1)
poly(I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
t-TLR7/8a + poly(I:C)
n.s.
****
****
****
0
2000
4000
6000
TNF-α (pg ml-1)
poly(I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
t-TLR7/8a + poly(I:C)
n.s.
*
****
****
0
300000
600000
IL-6 (pg ml-1)

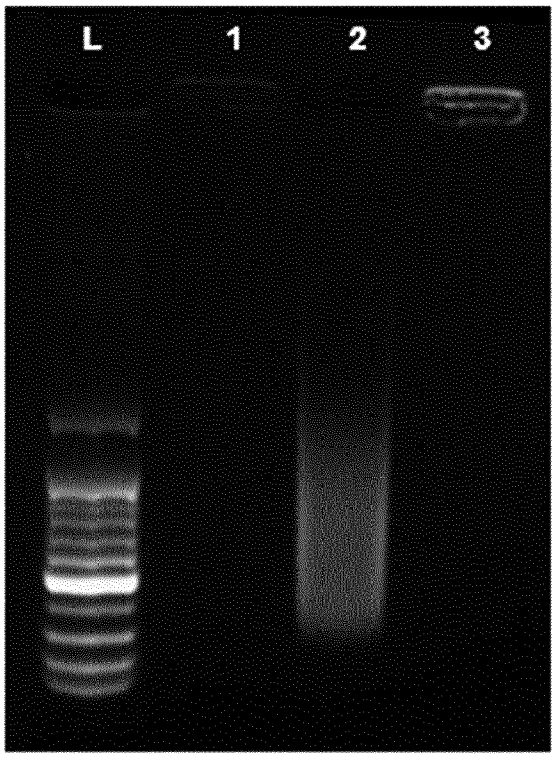
[도14]


Control
poly(I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
t-TLR7/8a + poly(I:C)
CD80 (MFI)
CD86 (MFI)
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001

[도15]

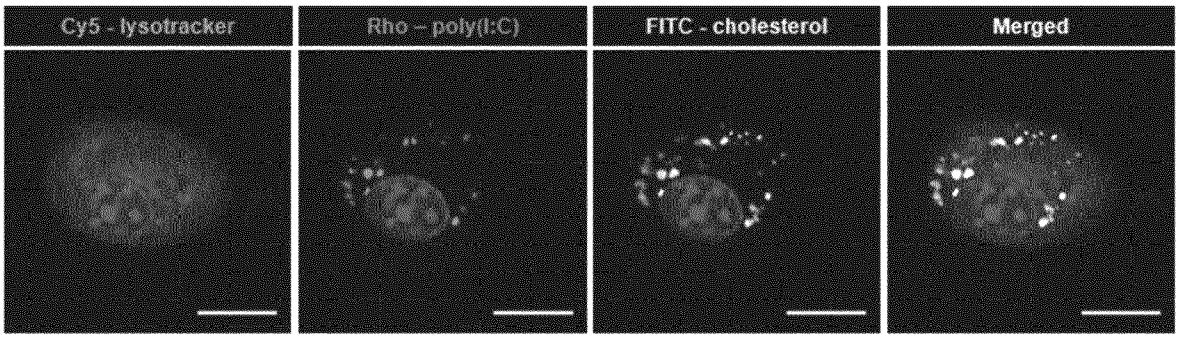

R848 + LPS
t-TLR 7/8a + LPS
R848 + poly(I:C)
t-TLR 7/8a + poly(I:C)
TNF-α (pg ml-1)
IL-6 (pg ml-1)
IL-12(p70) (pg ml-1)
24 h
36 h

[도16]

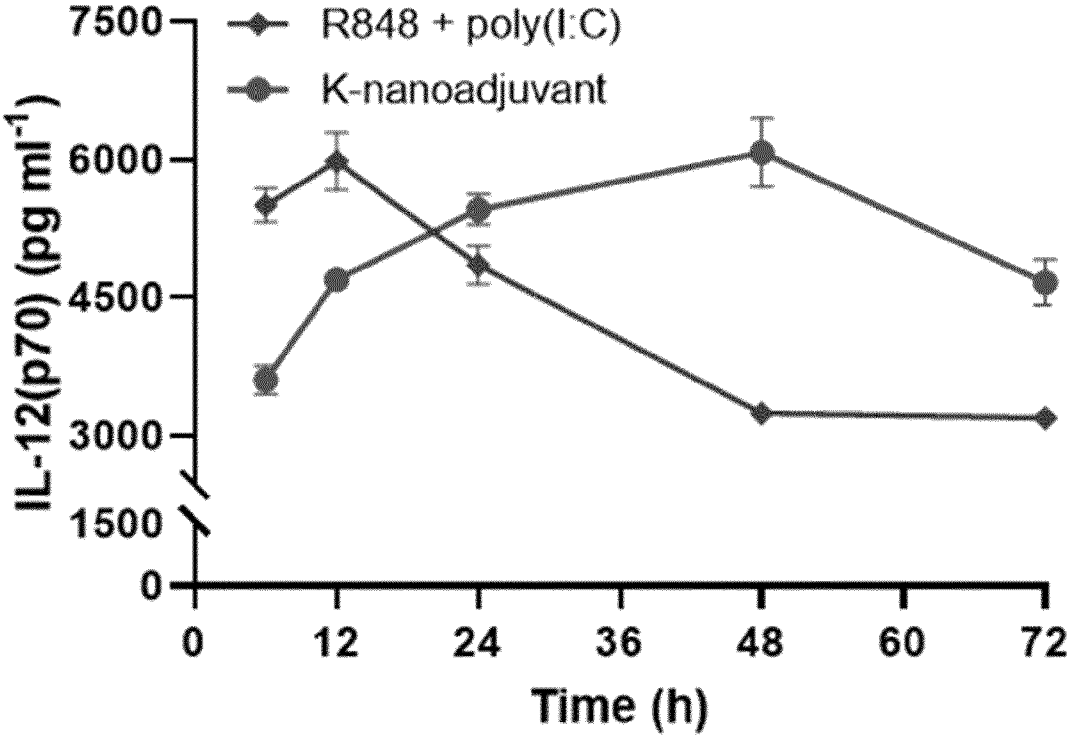


L : 100 bp ladder
1 : t-TLR7/8a
2 : poly(I:C)
3 : K-nanoadjuvant

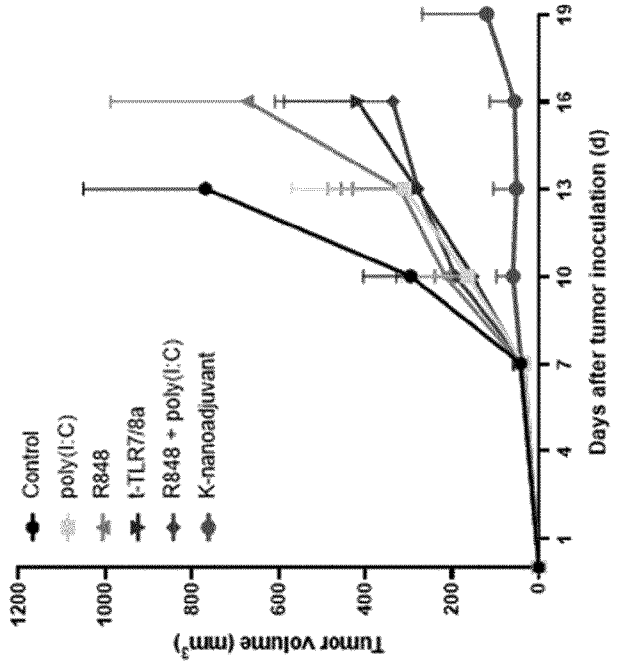
[도17]

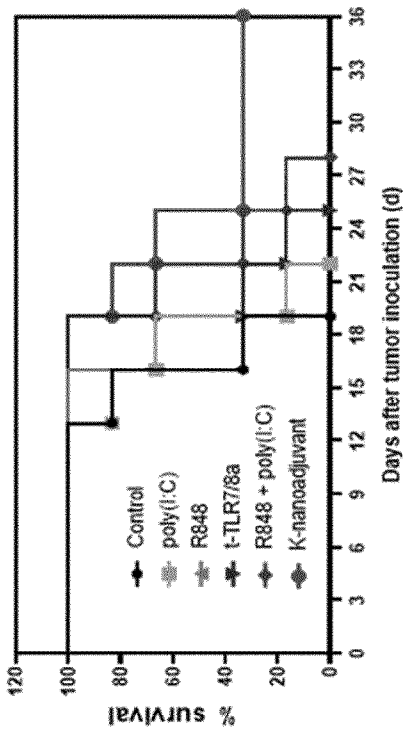


[도18]

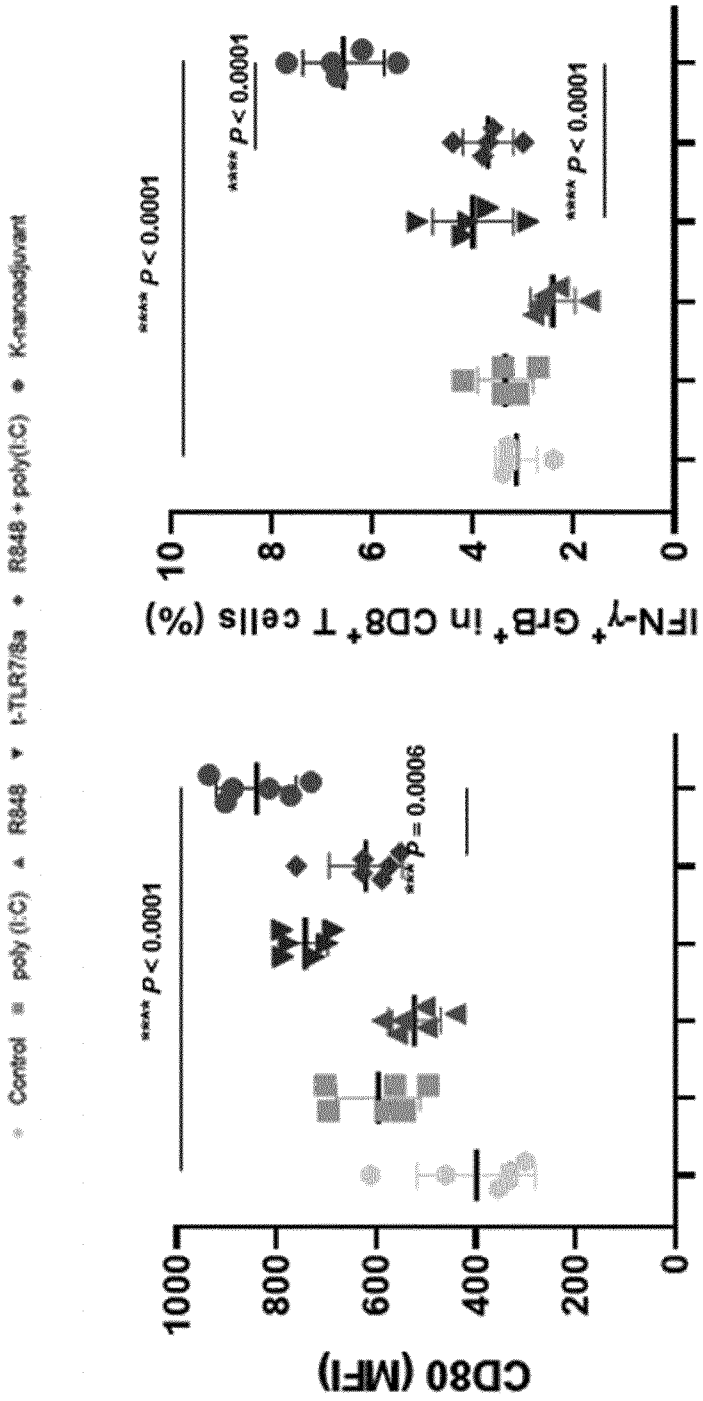

R848 + poly(I:C)
K-nanoadjuvant
IL-12(p70) (pg ml-1)
7500
6000
4500
3000
1500
0
0
12
24
36
48
60
72
Time (h)

[도19]

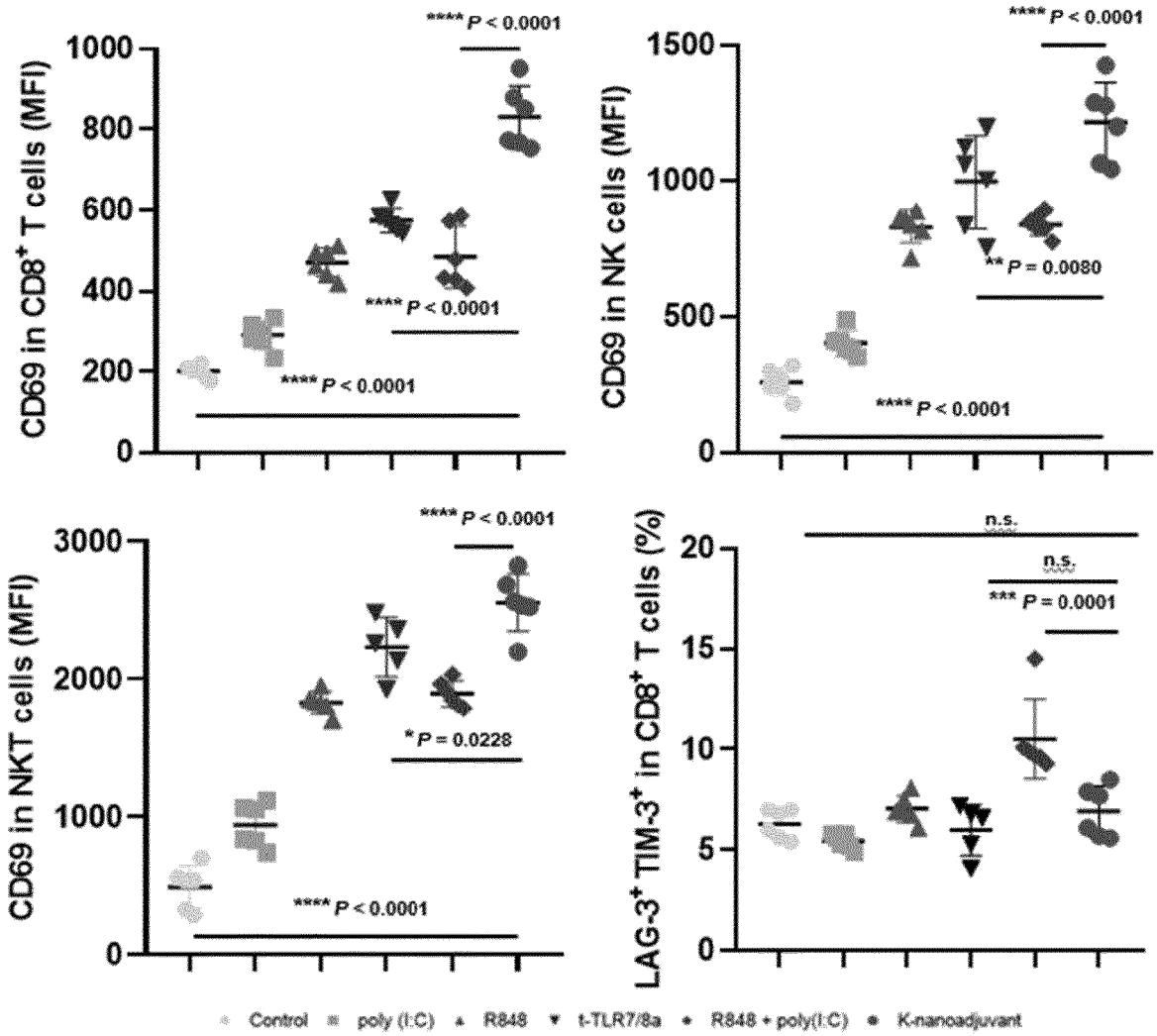

Tumor volume (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
1
4
7
10
13
16
19
Days after tumor inoculation (d)
Control
poly(I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
K-nanoadjuvant


% survival
120
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
36
Days after tumor inoculation (d)
Control
poly(I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
K-nanoadjuvant

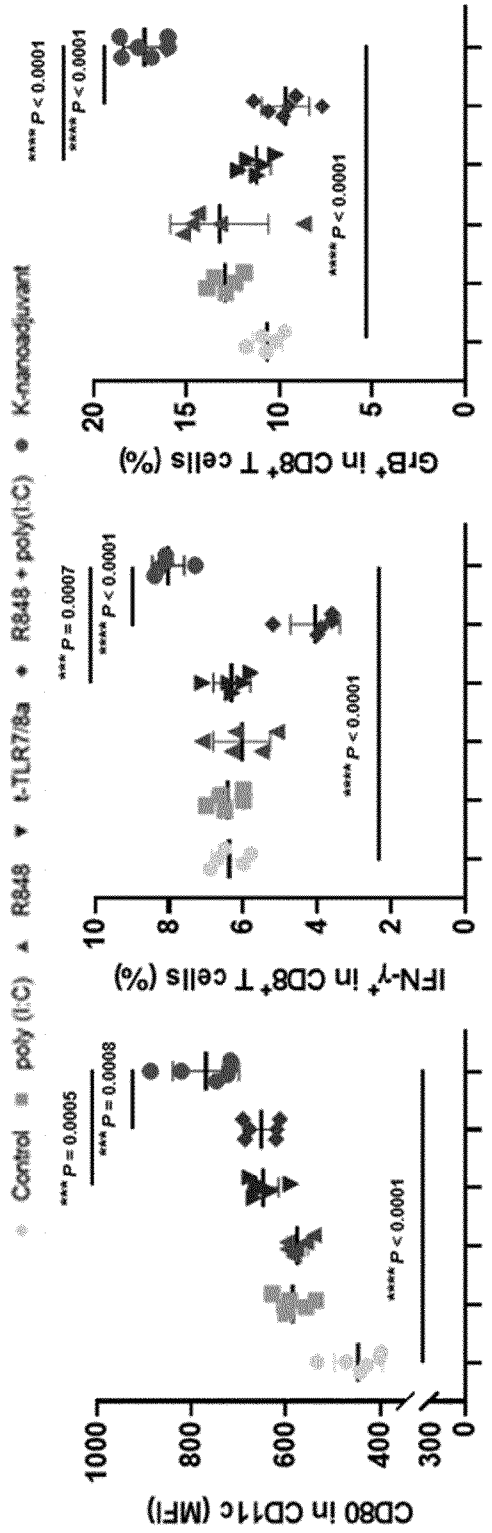
[도20]


Control
poly (I:C)
R848
i-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
K-nanoadjuvant
CD80 (MFI)
1000
800
600
400
200
0
**** P < 0.0001
*** P = 0.0006
IFN-γ+ GrB+ in CD8+ T cells (%)
10
8
6
4
2
0
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001

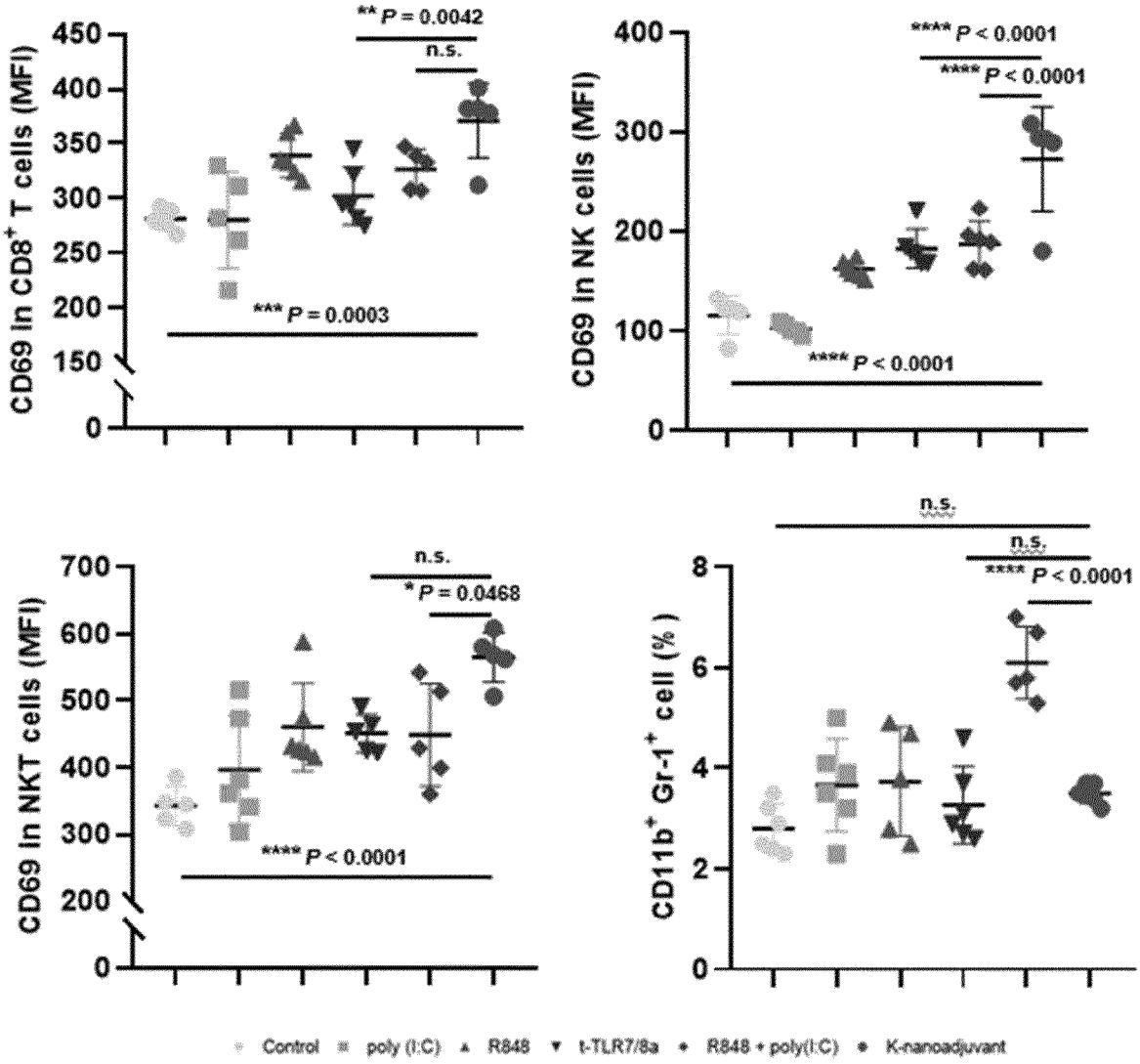
[도21]


CD69 in CD8+ T cells (MFI)
1000
800
600
400
200
0
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
CD69 in NK cells (MFI)
1500
1000
500
0
**** P < 0.0001
** P = 0.0080
**** P < 0.0001
CD69 in NKT cells (MFI)
3000
2000
1000
0
**** P < 0.0001
* P = 0.0228
**** P < 0.0001
LAG-3+ TIM-3+ in CD8+ T cells (%)
20
15
10
5
0
n.s.
n.s.
*** P = 0.0001
Control
poly (I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
K-nanoadjuvant

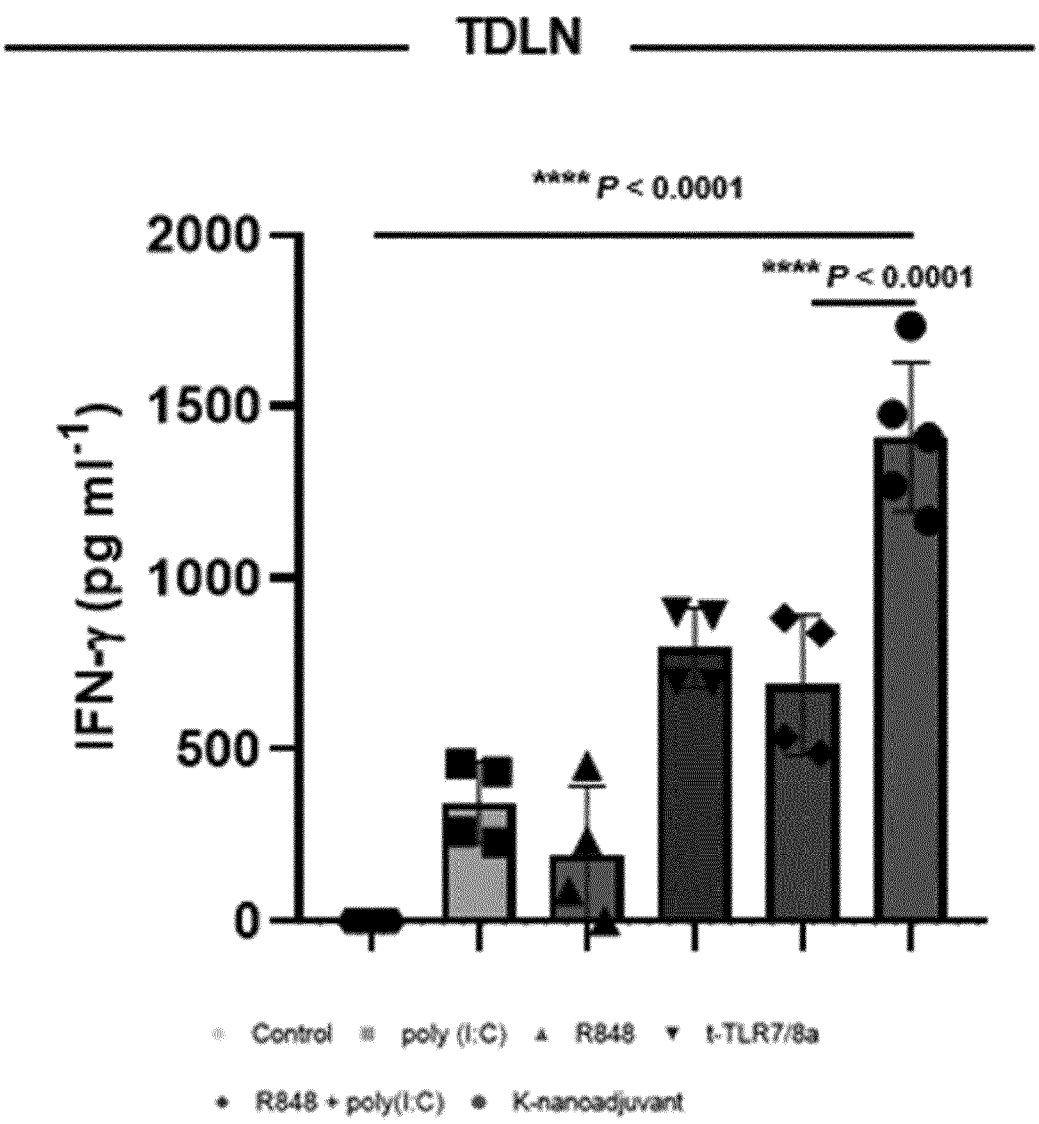
[도22]


Control
poly (I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
K-nanoadjuvant
CD80 in CD11c (MFI)
IFN-γ+ in CD8+ T cells (%)
GrB+ in CD8+ T cells (%)
*** P = 0.0005
*** P = 0.0008
**** P < 0.0001
*** P = 0.0007
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001

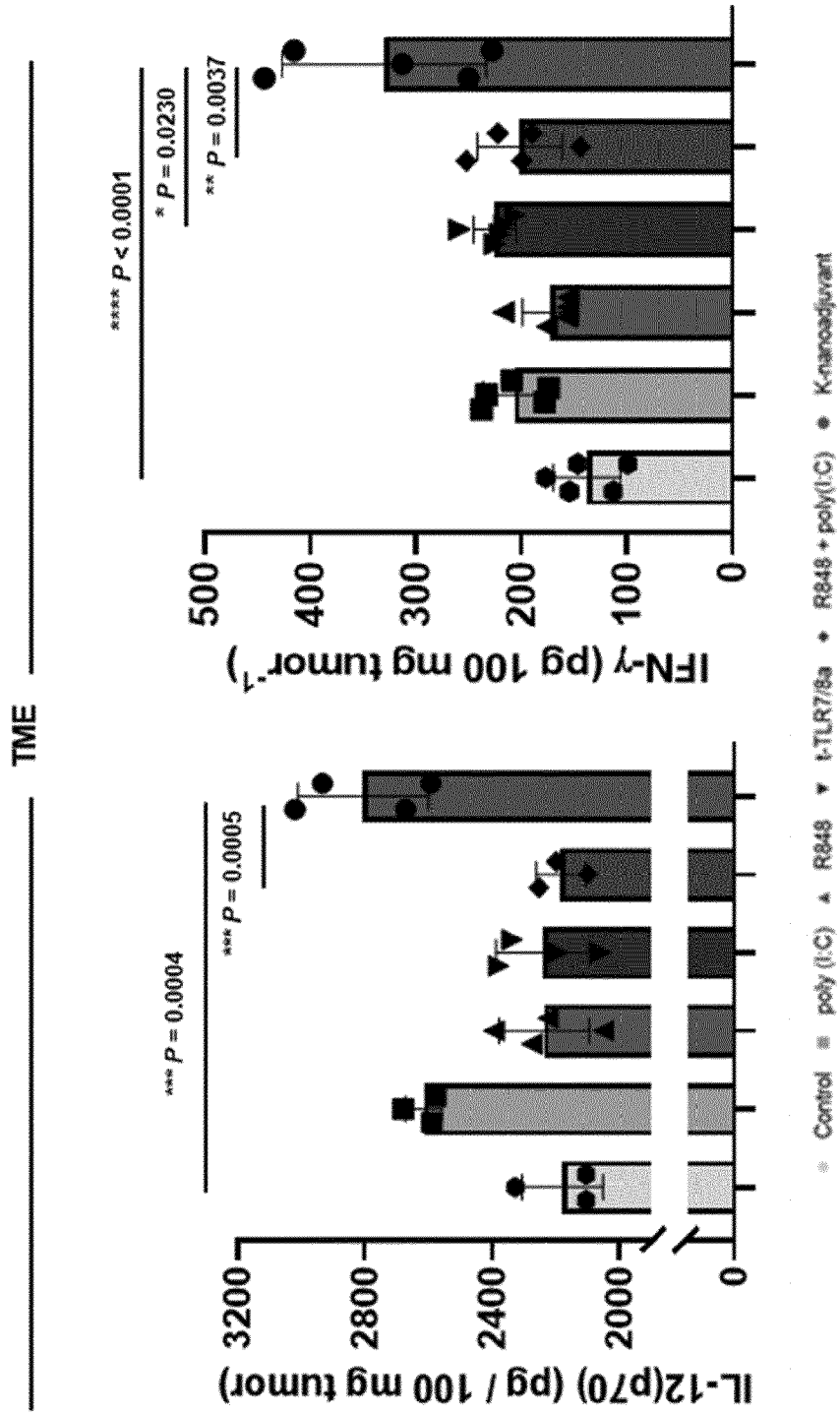
[도23]


CD69 in CD8+ T cells (MFI)
** P = 0.0042
n.s.
*** P = 0.0003
CD69 in NK cells (MFI)
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
CD69 in NKT cells (MFI)
n.s.
* P = 0.0468
**** P < 0.0001
CD11b+ Gr-1+ cell (%)
n.s.
n.s.
**** P < 0.0001
Control
poly (I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
K-nanoadjuvant

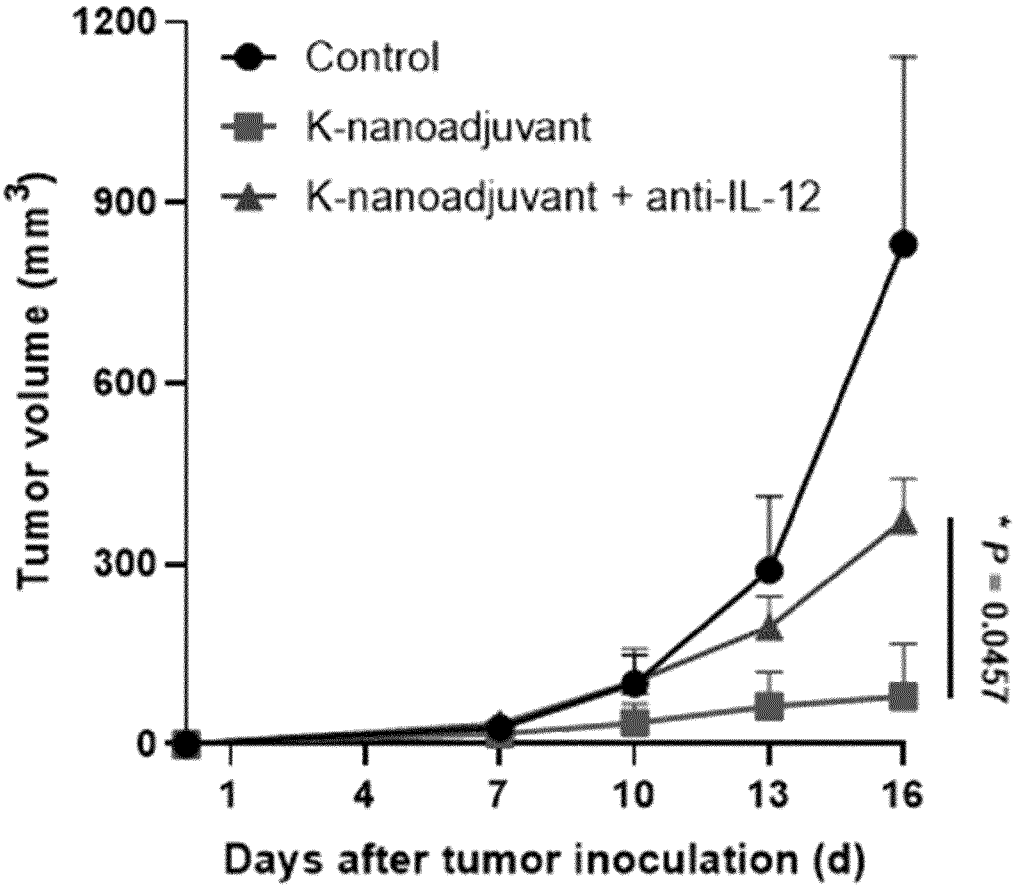
[도24]


TDLN
**** P < 0.0001
**** P < 0.0001
2000
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg ml-1)
Control
poly (I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
K-nanoadjuvant

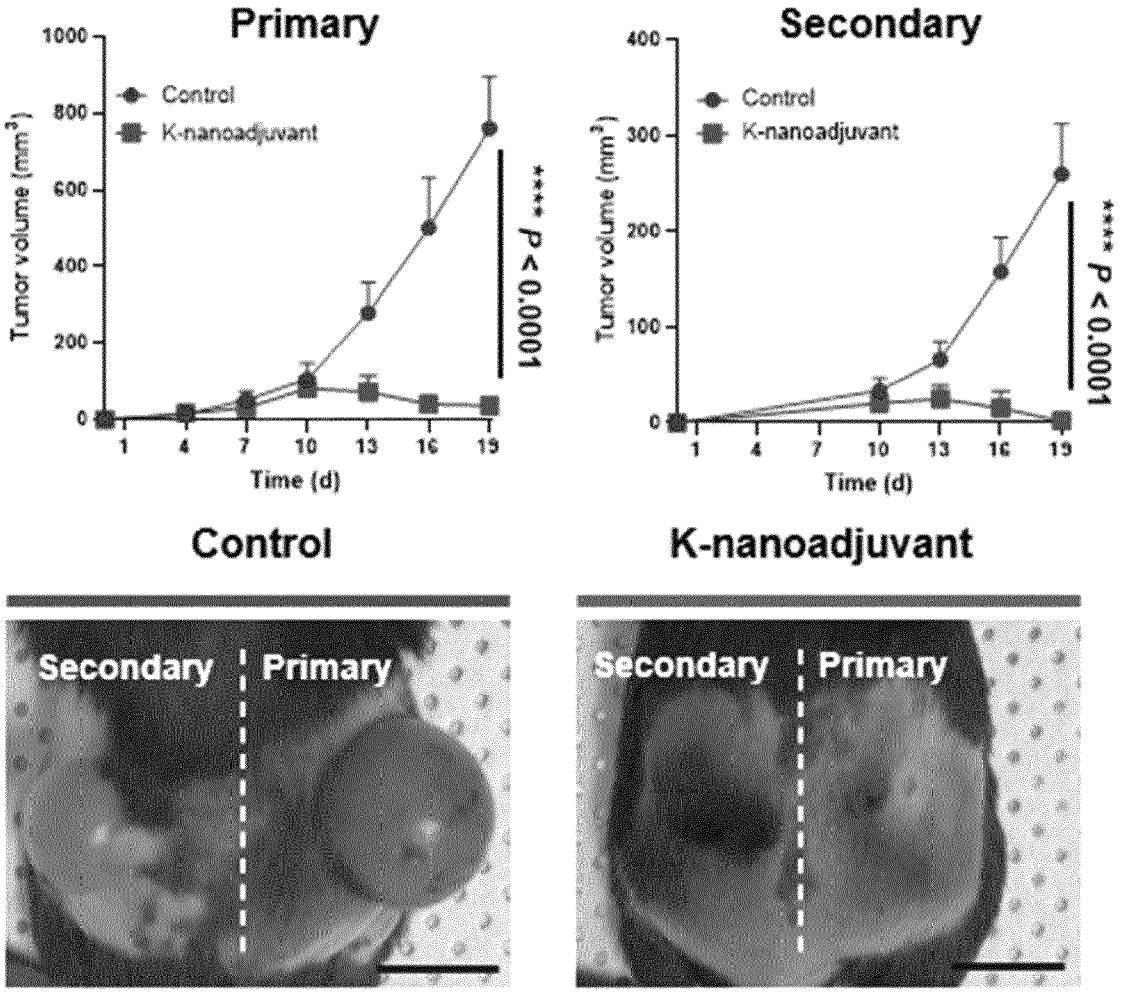
[도25]


TME
IL-12(p70) (pg / 100 mg tumor)
3200
2800
2400
2000
0
*** P = 0.0004
*** P = 0.0005
IFN-γ (pg 100 mg tumor-1)
500
400
300
200
100
0
**** P < 0.0001
* P = 0.0230
** P = 0.0037
Control
poly (I:C)
R848
t-TLR7/8a
R848 + poly(I:C)
K-nanoadjuvant

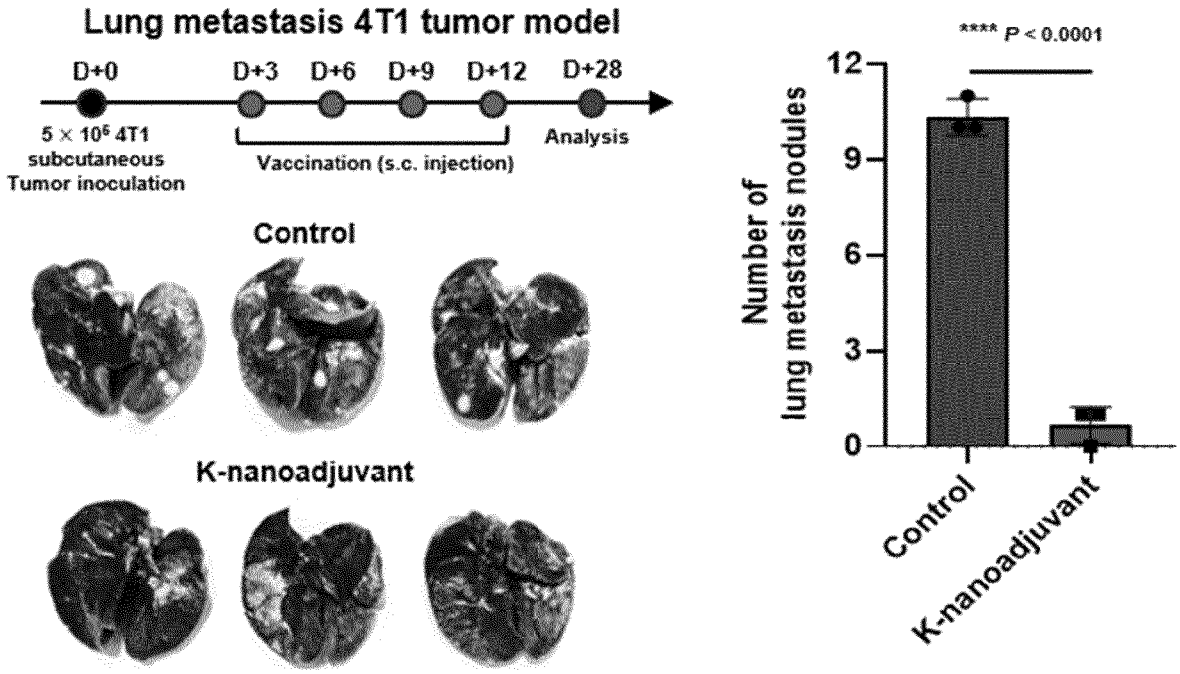
[도26]


1200
900
600
300
0
Tumor volume (mm3)
Control
K-nanoadjuvant
K-nanoadjuvant + anti-IL-12
* P = 0.0457
1
4
7
10
13
16
Days after tumor inoculation (d)

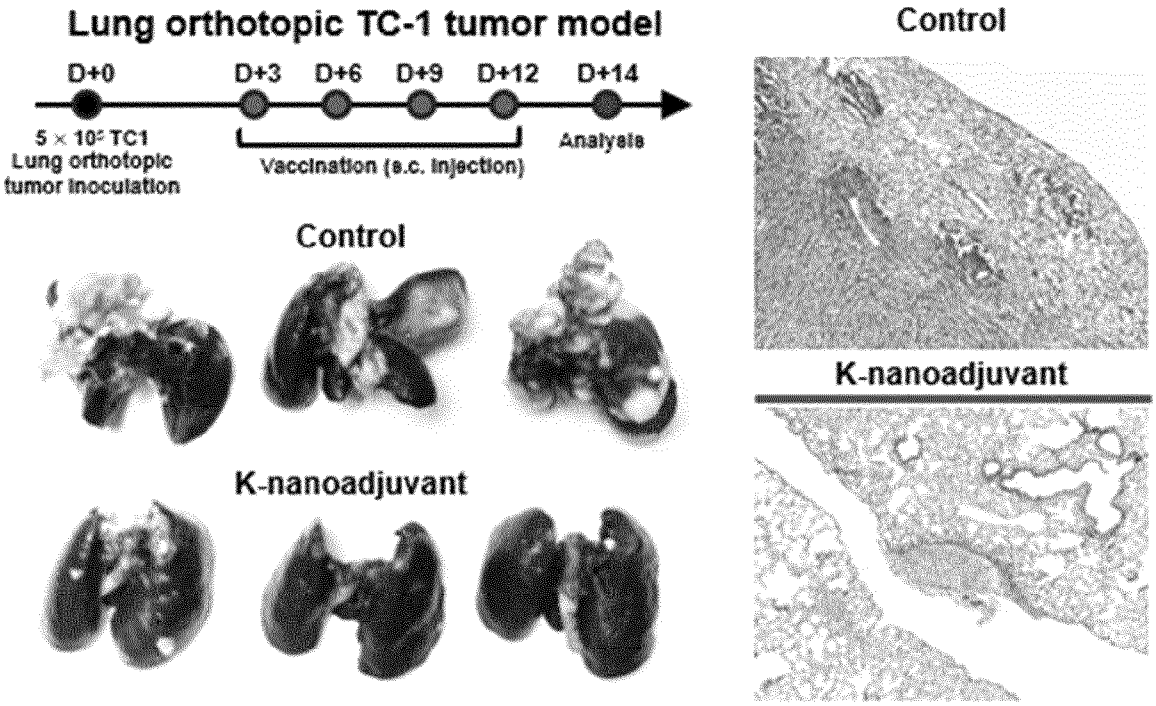
[도27]


Primary
Secondary
Control
K-nanoadjuvant
Tumor volume (mm³)
Time (d)
**** P < 0.0001
Control
K-nanoadjuvant
Secondary
Primary

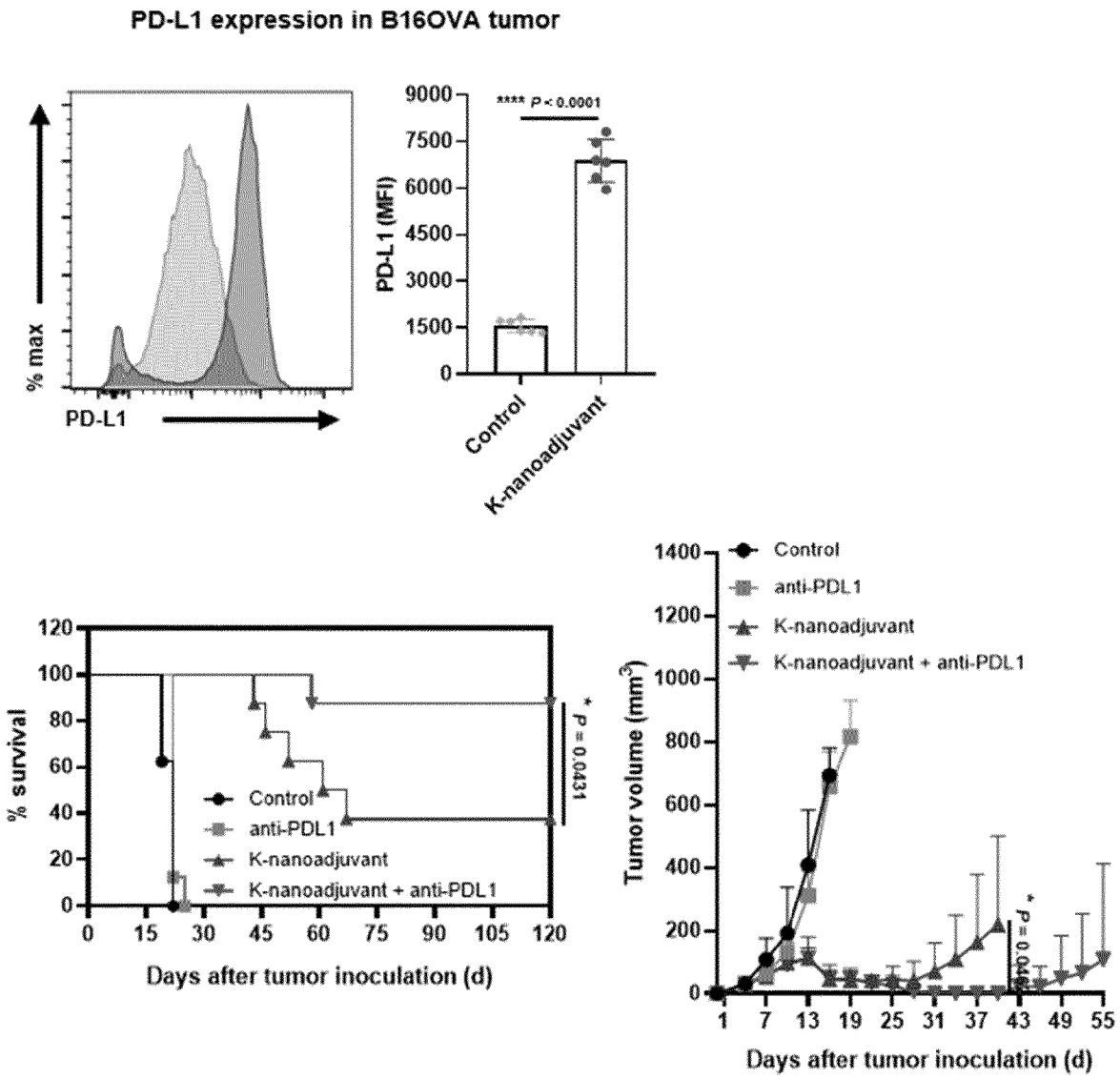
[도28]


Lung metastasis 4T1 tumor model
D+0
D+3
D+6
D+9
D+12
D+28
5 × 10⁵ 4T1 subcutaneous Tumor inoculation
Vaccination (s.c. injection)
Analysis
Control
K-nanoadjuvant
**** P < 0.0001
Number of lung metastasis nodules
Control
K-nanoadjuvant

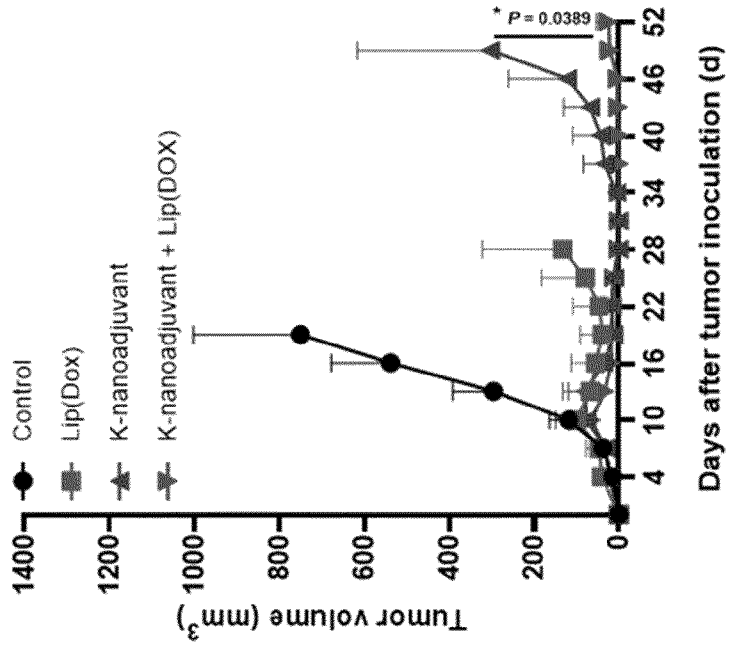
[도29]

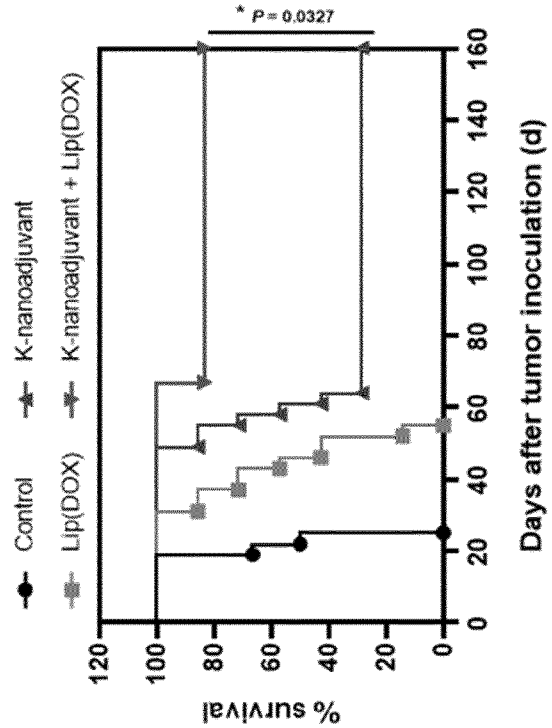

Lung orthotopic TC-1 tumor model
D+0
D+3
D+6
D+9
D+12
D+14
5 × 10⁵ TC1
Lung orthotopic
tumor inoculation
Vaccination (s.c. injection)
Analysis
Control
K-nanoadjuvant
Control
K-nanoadjuvant

[도30]


PD-L1 expression in B16OVA tumor
% max
PD-L1
PD-L1 (MFI)
**** P < 0.0001
Control
K-nanoadjuvant
% survival
Days after tumor inoculation (d)
Control
anti-PDL1
K-nanoadjuvant
K-nanoadjuvant + anti-PDL1
* P = 0.0431
Tumor volume (mm³)
Days after tumor inoculation (d)
* P = 0.0

[도31]


Control
Lip(Dox)
K-nanoadjuvant
K-nanoadjuvant + Lip(DOX)
* P = 0.0389
Tumor volume (mm3)
Days after tumor inoculation (d)


Control
Lip(DOX)
K-nanoadjuvant
K-nanoadjuvant + Lip(DOX)
* P = 0.0327
% survival
Days after tumor inoculation (d)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/010239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/39(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 39/39(2006.01); A61K 31/4745(2006.01); A61K 47/48(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C07F 9/6558(2006.01); C07F 9/6561(2006.01)

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 아주번트(adjuvant), 결합체(conjugate), 절단 가능한 링커(cleavable linker), 동력학적 제어(kinetic control), 면역반응(immune response), 톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014-0127253 A1 (SALEM, A. K. et al.) 08 May 2014 (2014-05-08) See claims 1, 2 and 5; and paragraphs [0051]-[0053], [0059] and [0107].	1-17,19,20
Y	US 2019-0151462 A1 (DYNAVAX TECHNOLOGIES CORPORATION) 23 May 2019 (2019-05-23) See abstract; claims 1, 77, 86, 97, 101, 102, 107 and 111; and paragraphs [0003], [0004], [0006], [0083], [0106], [0146], [0158], [0364], [0382], [0383], [0385], [0400] and [0671].	1-17,19,20
A	US 2018-0273560 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, SA) 27 September 2018 (2018-09-27) See entire document.	1-17,19,20
A	IGNACIO, B. J. et al. Toll-like receptor agonist conjugation: a chemical perspective. Bioconjugate Chemistry. 29 January 2018, vol. 29, pp. 587-603. See entire document.	1-17,19,20
A	DOWLING, D. J. Recent advances in the discovery and delivery of TLR7/8 agonists as vaccine adjuvants. ImmunoHorizons. 2018, vol. 2, no. 6, pp. 185-197. See entire document.	1-17,19,20

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 November 2021	**19 November 2021**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOCKELMANN, J. et al. Control over Imidazoquinoline Immune Stimulation by pH-Degradable Poly (norbornene) Nanogels. Biomacromolecules. 07 April 2020, vol. 21, pp. 2246-2257. See entire document.	1-17,19,20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/010239

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 18 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/010239

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2014-0127253 A1	08 May 2014	US 9572894 B2	21 February 2017
		WO 2012-054425 A2	26 April 2012
		WO 2012-054425 A3	13 September 2012
US 2019-0151462 A1	23 May 2019	EP 3710059 A1	23 September 2020
		JP 2021-503005 A	04 February 2021
		US 10722591 B2	28 July 2020
		WO 2019-099412 A1	23 May 2019
US 2018-0273560 A1	27 September 2018	CA 3008054 A1	22 June 2017
		CN 108368138 A	03 August 2018
		EP 3390416 A1	24 October 2018
		EP 3390416 B1	19 August 2020
		ES 2831162 T3	07 June 2021
		JP 2019-505489 A	28 February 2019
		MX 2018007321 A	06 September 2018
		US 10774099 B2	15 September 2020
		US 2021-0024553 A1	28 January 2021
		WO 2017-102654 A1	22 June 2017

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/010239

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 39/39(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 39/39(2006.01); A61K 31/4745(2006.01); A61K 47/48(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C07F 9/6558(2006.01); C07F 9/6561(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아주번트(adjuvant), 결합체(conjugate), 절단 가능한 링커(cleavable linker), 동력학적 제어(kinetic control), 면역반응(immune response), 톨-유사 수용체 작용자(toll-like receptor agonist)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2014-0127253 A1 (SALEM, A. K. 등) 2014.05.08 청구항 1, 2, 5; 단락 [0051]-[0053], [0059], [0107]	1-17,19,20
Y	US 2019-0151462 A1 (DYNAVAX TECHNOLOGIES CORPORATION) 2019.05.23 요약; 청구항 1, 77, 86, 97, 101, 102, 107, 111; 단락 [0003], [0004], [0006], [0083], [0106], [0146], [0158], [0364], [0382], [0383], [0385], [0400], [0671]	1-17,19,20
A	US 2018-0273560 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, SA) 2018.09.27 전체 문헌	1-17,19,20
A	IGNACIO, B. J. 등, 'Toll-like receptor agonist conjugation: a chemical perspective', Bioconjugate Chemistry, 2018.01.29, 29권, 587-603 페이지 전체 문헌	1-17,19,20
A	DOWLING, D. J., 'Recent advances in the discovery and delivery of TLR7/8 agonists as vaccine adjuvants', ImmunoHorizons, 2018, 2권, 6호, 185-197 페이지 전체 문헌	1-17,19,20

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년11월19일(19.11.2021)	**2021년11월19일(19.11.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	정다원
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/010239

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **18**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 18은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2021/010239

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KOCKELMANN, J. 등, 'Control over Imidazoquinoline Immune Stimulation by pH-Degradable Poly (norbornene) Nanogels', Biomacromolecules, 2020.04.07, 21권, 2246-2257 페이지 전체 문헌	1-17,19,20

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/010239

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0127253 A1	2014/05/08	US 9572894 B2	2017/02/21
		WO 2012-054425 A2	2012/04/26
		WO 2012-054425 A3	2012/09/13
US 2019-0151462 A1	2019/05/23	EP 3710059 A1	2020/09/23
		JP 2021-503005 A	2021/02/04
		US 10722591 B2	2020/07/28
		WO 2019-099412 A1	2019/05/23
US 2018-0273560 A1	2018/09/27	CA 3008054 A1	2017/06/22
		CN 108368138 A	2018/08/03
		EP 3390416 A1	2018/10/24
		EP 3390416 B1	2020/08/19
		ES 2831162 T3	2021/06/07
		JP 2019-505489 A	2019/02/28
		MX 2018007321 A	2018/09/06
		US 10774099 B2	2020/09/15
		US 2021-0024553 A1	2021/01/28
		WO 2017-102654 A1	2017/06/22