



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2017년09월28일  
 (11) 등록번호 10-1783068  
 (24) 등록일자 2017년09월22일

- |  |   |
|--|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/30 (2017.01)<br>(21) 출원번호 10-2012-7027175<br>(22) 출원일자(국제) 2011년03월19일<br>심사청구일자 2016년03월21일<br>(85) 번역문제출일자 2012년10월18일<br>(65) 공개번호 10-2013-0016301<br>(43) 공개일자 2013년02월14일<br>(86) 국제출원번호 PCT/US2011/000502<br>(87) 국제공개번호 WO 2011/115684<br>국제공개일자 2011년09월22일<br>(30) 우선권주장<br>61/315,485 2010년03월19일 미국(US)<br>61/319,709 2010년03월31일 미국(US)<br>(56) 선행기술조사문헌<br>US06120751 A<br>US20020040203 A1<br>US20030054027 A1 | (73) 특허권자<br>메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지<br>미국 02139 메사추세츠 캠프리지 메사추세츠 애브뉴 77<br>(72) 발명자<br>어빈, 대럴, 제이.<br>미국 02476 메사추세츠주 알링턴 그레이 스트리트 17<br>문, 재현<br>미국 02140 메사추세츠주 캠프리지 #10 데븐포트 스트리트 1<br>(74) 대리인<br>양영준, 김영 |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 92 항

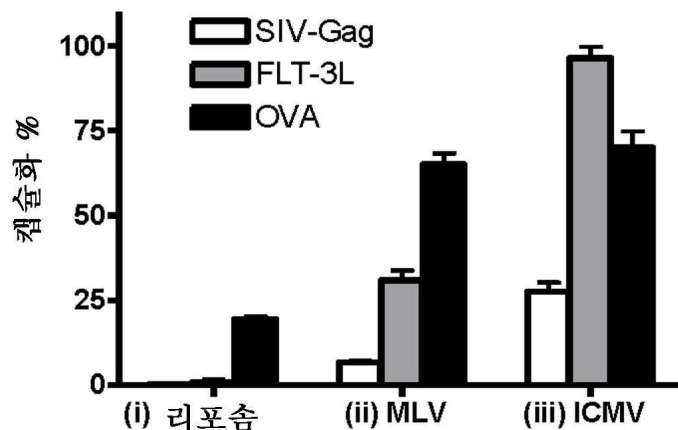
심사관 : 김훈석

**(54) 발명의 명칭 지질 소포 조성물 및 사용 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 안정화된 다층 소포로 구성된 전달 시스템은 물론, 그의 조성물, 합성 방법 및 사용 방법을 제공한다. 상기 안정화된 다층 소포는 예방제, 치료제 및/또는 진단제를 포함할 수 있다.

**대표도** - 도4a



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

지질 이중층들 사이에 공유 가교결합을 갖는 다층 지질 소포이며,  
여기서 상기 다층 지질 소포 내의 2개 이상의 지질 이중층이 서로 공유 가교결합되어 있는 것인 다층 지질 소포.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 관능화 지질을 포함하는 다층 지질 소포.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 포스포콜린을 포함하는 다층 지질 소포.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 포스포글리세롤을 포함하는 다층 지질 소포.

#### 청구항 5

제2항에 있어서, 관능화 지질이 말레이미드 관능화 지질인 다층 지질 소포.

#### 청구항 6

제1항, 제2항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 작용제를 포함하는 다층 지질 소포.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 작용제가 예방제, 치료제, 또는 진단제인 다층 지질 소포.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 작용제가 항원인 다층 지질 소포.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 작용제가 아주반트인 다층 지질 소포.

#### 청구항 10

제6항에 있어서, 작용제가 단백질인 다층 지질 소포.

#### 청구항 11

제6항에 있어서, 작용제가 소포 내에 캡슐화된 것인 다층 지질 소포.

#### 청구항 12

제6항에 있어서, 작용제가 지질 이중층들 사이에 캡슐화된 것인 다층 지질 소포.

#### 청구항 13

제1항, 제2항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)에 접합된 다층 지질 소포.

#### 청구항 14

제1항, 제2항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, DOPC, DOPG 및 말레이미드 관능화 지질을 포함하는 다층 지질

소포.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 말레이미드 관능화 지질이 말레이미드 관능화 포스포에탄올아민인 다층 지질 소포.

**청구항 16**

제1항, 제2항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 다층 지질 소포 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 17**

제1항, 제2항 및 제5항 중 어느 한 항에 따른 다층 지질 소포 및 동결건조에 적합한 부형제를 포함하는 조성물.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 동결건조에 적합한 부형제가 수크로스를 포함하는 것인, 다층 지질 소포를 포함하는 조성물.

**청구항 19**

관능화 지질을 포함하는 리포솜을 2가의 양이온과 접촉시켜 융합된 리포솜을 형성시키는 것, 및 융합된 리포솜을 가교제와 접촉시켜 지질 이중층들 사이에 공유 가교결합을 갖는 다층 지질 소포를 형성시키는 것을 포함하는 방법이며, 여기서 상기 다층 지질 소포 내의 2개 이상의 지질 이중층이 서로 공유 가교결합되어 있는 것인 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 관능화 지질이 말레이미드-관능화 지질인 방법.

**청구항 21**

제19항 또는 제20항에 있어서, 리포솜이 포스포콜린을 포함하는 것인 방법.

**청구항 22**

제19항 또는 제20항에 있어서, 리포솜이 포스포글리세롤을 포함하는 것인 방법.

**청구항 23**

제19항에 있어서, 리포솜이 말레이미드-관능화 지질, 포스포콜린 및 포스포글리세롤을 포함하는 것인 방법.

**청구항 24**

제19항, 제20항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 관능화 지질이 관능화 포스포에탄올아민인 방법.

**청구항 25**

제23항에 있어서, 말레이미드-관능화 지질이 말레이미드-관능화 포스포에탄올아민인 방법.

**청구항 26**

제19항, 제20항, 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 가교제가 디티올 가교제인 방법.

**청구항 27**

제19항, 제20항, 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 가교제가 디티올트리에톨 (DTT)인 방법.

**청구항 28**

제19항, 제20항, 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 지질 이중층들 사이에 공유 가교결합을 갖는 다층 지질 소포의 표면에 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 접합시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 29**

제19항, 제20항, 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 2가 양이온이  $Ca^{2+}$ 인 방법.

**청구항 30**

제19항, 제20항, 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 2가 양이온이  $Mg^{2+}$ 인 방법.

**청구항 31**

제19항, 제20항, 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 접촉이 수성 완충제 중에서 이루어지는 것인 방법.

**청구항 32**

제19항, 제20항, 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜이 작용제를 포함하는 것인 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 작용제가 예방제, 치료제, 또는 진단제인 방법.

**청구항 34**

제19항, 제20항, 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜이 DOPC, DOPG 및 말레이미드 관능화 지질을 40:10:50의 몰비로 사용하여 제조된 것인 방법.

**청구항 35**

제26항에 있어서, 디티올 가교제 대 말레이미드 관능화 지질의 몰비가 1:2인 방법.

**청구항 36**

관능화 지질을 포함하는 다층 지질 소포를 가교제와 접촉시켜, 지질 이중층들 사이에 공유 가교결합을 갖는 다층 지질 소포를 형성시키는 것

을 포함하는 방법이며,

여기서 상기 다층 지질 소포 내의 2개 이상의 지질 이중층이 서로 공유 가교결합되어 있는 것인 방법.

**청구항 37**

공유 가교결합된 지질 이중층을 가지며 작용제를 포함하는 유효량의 다층 지질 소포를 포함하는 조성물이며,

여기서 상기 다층 지질 소포 내의 2개 이상의 지질 이중층이 서로 공유 가교결합되어 있는 것인 조성물.

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

제37항에 있어서, 다층 지질 소포가 인지질을 포함하는 것인 조성물.

**청구항 40**

제37항에 있어서, 다층 지질 소포가 포스포콜린, 포스포글리세롤 및/또는 포스포에탄올아민을 포함하는 것인 조성물.

**청구항 41**

제37항에 있어서, 다층 지질 소포가 관능화 지질을 포함하는 것인 조성물.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 관능화 지질이 말레이미드 관능화 지질인 조성물.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 말레이미드 관능화 지질이 말레이미드 관능화 포스포에탄올아민인 조성물.

**청구항 44**

제37항에 있어서, 작용제가 예방제인 조성물.

**청구항 45**

제37항에 있어서, 작용제가 치료제인 조성물.

**청구항 46**

제37항에 있어서, 작용제가 항원인 조성물.

**청구항 47**

제37항에 있어서, 작용제가 아주반트인 조성물.

**청구항 48**

제37항에 있어서, 다층 지질 소포가 하나 초과인 작용제를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 49**

제37항에 있어서, 다층 지질 소포가 2종의 작용제를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 다층 지질 소포가 항원 및 아주반트를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 51**

제37항에 있어서, 다층 지질 소포가 그의 외부 표면에서 PEG에 접합된 것인 조성물.

**청구항 52**

지질 이중층들 사이에 공유 가교결합을 가지며 작용제를 포함하는 다층 지질 소포를 시험관 내에서 세포와 접촉시키는 것

을 포함하는 방법이며,

여기서 상기 다층 지질 소포 내의 2개 이상의 지질 이중층이 서로 공유 가교결합되어 있는 것인 방법.

**청구항 53**

제6항에 있어서, 상기 작용제가 항체, 항체 단편, 융합 단백질, 효소, 보조-인자, 수용체, 리간드, 시토카인 또는 케모카인인 다층 지질 소포.

**청구항 54**

제53항에 있어서, 상기 작용제가 항체 또는 항체 단편인 다층 지질 소포.

**청구항 55**

제54항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편이 각각 면역자극 항체 또는 면역자극 항체 단편인 다층 지질 소포.

**청구항 56**

제54항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편이 암 항원에 결합하는 것인 다층 지질 소포.

**청구항 57**

제56항에 있어서, 상기 암 항원이 암 세포의 표면에서 발현되는 것인 다층 지질 소포.

**청구항 58**

제8항에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 다층 지질 소포.

**청구항 59**

제8항에 있어서, 상기 항원이 인간 유두종 바이러스 (HPV) 단백질인 다층 지질 소포.

**청구항 60**

제59항에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 다층 지질 소포.

**청구항 61**

제1항에 있어서, 제1 면역조절제 및 제2 면역조절제를 포함하고, 상기 제1 및 제2 면역조절제가 상이한 것인 다층 지질 소포.

**청구항 62**

제6항에 있어서, 상기 작용제가 면역조절제인 다층 지질 소포.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 상기 면역조절제가 면역자극제 또는 면역억제제인 다층 지질 소포.

**청구항 64**

제62항에 있어서, 상기 면역조절제가 항체 또는 항체 단편인 다층 지질 소포.

**청구항 65**

제64항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편이 암 항원에 결합하는 것인 다층 지질 소포.

**청구항 66**

제63항에 있어서, 상기 면역조절제가 시토카인, 항체, 스테로이드, 항-CTLA-4 항체, 항-CD28 항체, 항-CD3 항체 및 시클로포스파미드 (CPM)로 이루어진 군으로부터 선택된 면역자극제인 다층 지질 소포.

**청구항 67**

제62항에 있어서, 상기 면역조절제가 암 항원인 다층 지질 소포.

**청구항 68**

제67항에 있어서, 상기 암 항원이 gp100, NY-ESO-1, 뮤신 (MUC) 패밀리의 일원, 흑색종-관련 항원 (MAGE)-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4 및 MAGE-05로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 다층 지질 소포.

**청구항 69**

제62항에 있어서, 상기 면역조절제가 인터류킨 (IL)인 다층 지질 소포.

**청구항 70**

제69항에 있어서, 상기 인터류킨이 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , GM-CSF 및 FLT3 리간드로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 다층 지질 소포.

**청구항 71**

제63항에 있어서, 상기 면역조절제가 시토카인, 항-염증제, 류코트리엔 길항제, IL-4 뮤테인, 가용성 IL-4 수용체, 항-IL-4 항체, IL-4 길항제, 항-IL-5 항체, 가용성 IL-13 수용체-Fc 융합 단백질, 항-IL-9 항체, CCR3 길항제, CCR5 길항제, VLA-4 억제제 및 항-IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 면역억제제인 다층 지질 소포.

**청구항 72**

제62항에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 다층 지질 소포.

**청구항 73**

제62항의 다층 지질 소포를 포함하는, 대상체에게 면역조절제를 전달하기 위한 조성물.

**청구항 74**

2개 이상의 지질 이중층 사이에 공유 가교결합을 형성하기 위해 공유 가교제와 반응하는 헤드기를 통해 서로 공유 가교결합된 2개 이상의 지질 이중층을 갖는 다층 지질 소포; 및

작용제

를 포함하는 조성물.

**청구항 75**

제74항에 있어서, 상기 다층 지질 소포가 작용제를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 76**

제74항에 있어서, 상기 작용제가 항체, 항체 단편, 융합 단백질, 효소, 보조-인자, 수용체, 리간드, 시토카인 또는 케모카인인 조성물.

**청구항 77**

제76항에 있어서, 상기 작용제가 암 항원에 결합하는 항체 또는 항체 단편인 조성물.

**청구항 78**

제76항에 있어서, 상기 작용제가 항원이고, 아주반트를 추가로 포함하는 조성물.

**청구항 79**

제78항에 있어서, 상기 다층 지질 소포가 아주반트를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 80**

제78항에 있어서, 상기 작용제가 인간 유두종 바이러스 (HPV) 단백질인 조성물.

**청구항 81**

제74항에 있어서, 상기 작용제가 면역조절제인 조성물.

**청구항 82**

제81항에 있어서, 상기 다층 지질 소포가 면역조절제를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 83**

제82항에 있어서, 상기 면역조절제가 면역자극제 또는 면역억제제인 조성물.

**청구항 84**

제82항에 있어서, 상기 면역조절제가 항체 또는 항체 단편인 조성물.

**청구항 85**

제84항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편이 암 항원에 결합하는 것인 조성물.

**청구항 86**

제83항에 있어서, 상기 면역조절제가 시토카인, 항체, 스테로이드, 항-CTLA-4 항체, 항-CD28 항체, 항-CD3 항체 및 시클로포스파미드 (CPM)로 이루어진 군으로부터 선택된 면역자극제인 조성물.

**청구항 87**

제82항에 있어서, 상기 면역조절제가 암 항원인 조성물.

**청구항 88**

제87항에 있어서, 상기 암 항원이 gp100, NY-ESO-1, 뮤신 (MUC) 패밀리의 일원, 흑색종-관련 항원 (MAGE)-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4 및 MAGE-O5로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

**청구항 89**

제82항에 있어서, 상기 면역조절제가 인터류킨인 조성물.

**청구항 90**

제89항에 있어서, 상기 인터류킨이 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , GM-CSF 및 FLT3 리간드로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

**청구항 91**

제82항에 있어서, 상기 면역조절제가 시토카인, 항-염증제, 류코트리엔 길항제, IL-4 뮤테인, 가용성 IL-4 수용체, 항-IL-4 항체, IL-4 길항제, 항-IL-5 항체, 가용성 IL-13 수용체-Fc 융합 단백질, 항-IL-9 항체, CCR3 길항제, CCR5 길항제, VLA-4 억제제 및 항-IgE로 이루어진 군으로부터 선택된 면역억제제인 조성물.

**청구항 92**

제82항에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 조성물.

**청구항 93**

제82항에 있어서, 제1 면역조절제 및 제2 면역조절제를 포함하고, 상기 제1 및 제2 면역조절제가 상이한 것인 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] <관련 출원>

[0002] 본 출원은, 35 U.S.C. § 119(e)에 따라, 2010년 3월 19일자로 출원된 발명의 명칭 "MICRO- AND NANOPARTICLES WITH SELF-ASSEMBLED LIPID COATINGS FOR SURFACE DISPLAY OF DRUGS SUCH AS VACCINE ANTIGENS AND ADJUVANTS"의 U.S. 가출원 일련 번호 61/315,485, 및 2010년 3월 31일자로 출원된 발명의 명칭 "INTERBILAYER CROSSLINKED MULTILAMELLAR VESICLES"의 U.S. 가출원 일련 번호 61/319,709에 대하여 우선권을 주장하는 바, 이들 모두는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] <연방 연구 지원>

[0004] 본 발명은 NIH 승인 번호 CA140476 및 국방성 승인 번호 W911NF-07-D-0004에 따라 정부의 지원하에 이루어졌다. 정부는 본 발명에 있어서 소정의 권리를 가진다.



**배경 기술**

[0005] 소형 분자용 전달 비히클로서 리포솜이 널리 사용되어 왔으나; 리포솜 내의 많은 거대분자 약물의 고수준 캡슐화를 달성하는 것은 여전히 어려우며, 많은 약물 제제들이 유용한 약물 전달 동역학을 유지하기에는 너무 빠르게 리포솜으로부터 누출된다. 마이크로- 및 나노입자에 의한 약물 전달이 단백질 및 소형-분자 약물을 캡슐화할 수 있기는 하지만, 아직도 그것은 통상적으로 보통 약 10  $\mu\text{g}$ (약물)/mg(입자) 수준인 매우 낮은 입자 질량 당 캡슐화되는 약물의 총 질량을 산출한다. 또한, 중합체 입자 합성에 사용되는 유기 용매, 및 이들 입자 내의 소수성/산성 환경은 치료제의 파괴로 이어질 수 있다 (문헌 [Zhu et al. Nat. Biotechnol. 2000 18:52-57] 참조).

**발명의 내용**

**과제의 해결 수단**

- [0006] [발명의 개요]
- [0007] 본 발명은 더 고도의 적재 능력, 소수성 및 친수성 작용제 모두를 동시에 고농도로 격리하는 능력, 및 더 긴 방출 프로파일을 가지는 신규하고 진보적인 약물 전달 시스템을 제공한다. 이러한 전달 시스템의 일부 측면은 가교결합된 지질 이중층을 가지는 안정화된 다층(multilamellar) 지질 소포 (본원에서는 이중층간-가교결합된 다층 소포 또는 ICMV로 지칭됨)를 포함한다.
- [0008] 실시예에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 소포는 예상치 못한 향상된 캡슐화 효율 (예컨대 일부 경우에는, 단순 리포솜에 비해 100배 더 효율적임)을 가지며, 혈청의 존재하에서도 느리고 지속적인 동역학을 통하여 캡슐화되어 있는 (또는 다르게는 포획되어 있는) 작용제를 방출할 수 있는데, 이는 그것을 생체내 지속 전달 비히클로서 매우 바람직하게 만든다. 또한, 본원에서 매우 상세하게 기술되는 바와 같이, 본 발명의 소포는 수성 환경에서 합성됨으로써, 유기 용매의 사용 및/또는 산성 환경을 포함하여, 여러 선행 기술 방법에서는 보편적인 가혹 조건들이 회피될 수 있다. 그 결과, 이러한 합성 방법은 그와 같은 선행 기술 방법을 사용하게 되면 통상적으로 구조적 및/또는 기능적으로 훼손될 수 있는 것을 포함한 다양한 작용제에 더욱 적합하다. 그 결과로 생성되는 소포에는 유기 용매가 없으며, 그것은 생분해성 지질을 포함한 지질, 및 그 내부에 또는 그를 통하여 캡슐화되는 임의의 작용제만으로 구성될 수 있다.
- [0009] 본원에서 매우 상세하게 기술되는 바와 같이, 본 발명은 부분적으로 본 발명 소포의 이들 또는 기타 놀랍고도 예상치 못한 특징들을 바탕으로 한다. 따라서, 본 발명은 이러한 안정화된 소포, 이러한 소포를 포함하는 조성물, 이러한 소포의 제조 방법, 및 그의 사용 방법을 제공한다.
- [0010] 이에 따라 일 측면에서, 본 발명은 지질 이중층 간에 가교결합을 갖는 다층 지질 소포, 또는 지질 이중층 간에 가교결합을 갖는 다수의 다층 지질 소포 또는 다층 지질 소포 군집을 제공한다. 상기 다수는  $1-10^3$ ,  $1-10^4$ ,  $1-10^5$ ,  $1-10^6$ ,  $1-10^7$ ,  $1-10^8$ , 또는  $1-10^9$ 개일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 소포에 대한 다양한 측면들이 하기되는데, 다르게 언급되지 않는 한, 이러한 측면들은 다수의 소포 또는 소포 군집에도 동일하게 적용되는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 소포는 단순히 외부 (또는 최외곽) 이중층 또는 이중층 표면의 성분들 간 가교결합만이 아니라, 내부 인접 (또는 나란한) 이중층들의 성분들 간 결합을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 상기 소포는 관능화 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 관능화 지질은 말레이미드 관능화 지질이다. 관능화 지질은 포스포에탄올아민일 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 소포는 관능화된, 바람직하게는 직접적으로 관능화 지질 이중층 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소포는 비제한적으로 DOPC와 같은 포스포콜린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소포는 비제한적으로 DOPG와 같은 포스포글리세롤을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소포는 DOPC, DOPG, 및 비제한적으로 관능화 포스포에탄올아민과 같은 관능화 지질을 포함한다. 상기 관능화 지질은 말레이미드를 함유하는 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소포는 DOPC, DOPG, 및 말레이미드 관능화 지질을 포함한다. 상기 관능화 지질은 비제한적으로 MPB와 같은 말레이미드 관능화 포스포에탄올아민일 수 있다. 일부 실시양태에서, DOPC:DOPG:관능화 지질의 몰비는 40:10:50이다. 일부 실시양태에서, 소포는 DOPC 및 MPB를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 소포는 DOPC, DOTAP 및 MPB를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, DOPC:DOTAP:관능화 지질의 몰비는 40:10:50이다. 일부 실시양태에서, 관능화 지질은 25% 이상의 몰 백분율로 존재한다.

- [0012] 일부 실시양태에서, 소포는 하나 이상의 작용제를 포함하는 작용제를 포함한다. 본원에서 사용될 때, 하나 이상의 작용제는 서로 다른 하나 이상의 작용제를 의미한다. 일부 실시양태에서, 작용제는 예방제, 치료제 또는 진단제이다. 일부 실시양태에서, 작용제는 항원이다. 일부 실시양태에서, 작용제는 전단백질(whole protein) 항원을 포함한 단백질 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 아주반트이다. 상기 아주반트는 TLR4, TLR7, TLR8 및 TLR9 효능제와 같은 TLR 효능제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 소포는 항원, 및 2종 이상의 아주반트 예컨대 TLR4 및 TLR7 효능제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제는 단백질이다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 소포는 지질 (또는 입자) mg 당 300  $\mu$ g을 초과하는 작용제, 또는 지질 (또는 입자) mg 당 400  $\mu$ g을 초과하는 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 소포는 지질 (또는 입자) mg 당 300-400  $\mu$ g의 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 소포는 지질 (또는 입자) mg 당 325  $\mu$ g의 작용제, 또는 지질 (또는 입자) mg 당 407  $\mu$ g의 작용제를 포함한다. 관련 실시양태에서, 작용제는 단백질 항원일 수 있다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 작용제는 소포 내에 캡슐화되어 있다. 일부 실시양태에서, 작용제는 소포의 코어(core)에 존재한다. 일부 실시양태에서, 작용제는 지질 이중층들 사이에 존재한다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 소포는 일 작용제를 코어에, 또 다른 작용제를 지질 이중층들 사이에 포함한다. 일부 실시양태에서, 코어의 작용제는 단백질 항원과 같은 항원일 수 있으며, 지질 이중층들 사이의 작용제는 비제한적으로 MPLA와 같은 아주반트일 수 있다. 일부 실시양태에서는, 항원이 코어에 존재하며, 2종의 아주반트가 내부 지질 이중층들 사이에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 2종의 아주반트는 MPLA 및 R-848이다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 소포는 일 작용제를 코어에, 또 다른 작용제를 외부 이중층에 포함한다. 일부 실시양태에서, 코어의 작용제는 단백질 항원과 같은 항원일 수 있으며, 외부 이중층의 작용제는 비제한적으로 MPLA와 같은 아주반트일 수 있다. 일부 실시양태에서는, 항원이 코어에 존재하며, 2종의 아주반트가 외부 이중층에 존재한다. 일부 실시양태에서는, 항원이 코어에 존재하며, 하나 이상의 아주반트가 내부 이중층들 사이 및/또는 외부 이중층 표면에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 2종의 아주반트는 MPLA 및 R-848이다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 소포는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)에 접합되어 있다. 일부 실시양태에서, 소포는 PEG에 표면 접합될 수 있다.
- [0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 전기한 다층 지질 소포 (또는 소포 군집) 중 어느 것 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 전기한 다층 지질 소포 (또는 소포 군집) 중 어느 것 및 동결건조에 적합한 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 동결건조에 적합한 상기 부형제는 수크로스를 포함한다. 상기 소포는 단독형으로 사용될 수 있거나, 또는 본원에서 기술되는 작용제들 중 어느 것을 포함한 다른 작용제와 조합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 그들은 세포와 함께 투여되지 않을 것이며, 예컨대 대상에의 투여 전에, 세포에 접합 (또는 다르게는 물리적으로 부착)되지도 않을 것이다. 그러나 소포는, 그것을 신체의 특정 세포 또는 부위로 표적화하기 위하여, 표적화 리간드에 접합될 수 있다.
- [0020] 또 다른 측면에서, 본 발명은 관능화 지질을 포함하는 리포솜을 다가 (예컨대 2가)의 양이온과 접촉시킴으로써, 융합된 리포솜을 형성시키는 것, 및 융합된 리포솜을 가교제와 접촉시킴으로써, 전기한 소포들 중 어느 것을 포함하여, 지질 이중층들 사이에 가교결합을 갖는 다층 지질 소포를 형성시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 상기 관능화 지질은 말레이미드-관능화 지질이다. 일부 실시양태에서, 관능화 지질은 관능화 포스포에탄올아민이다. 일부 실시양태에서, 관능화 지질은 말레이미드 관능화 지질이다. 일부 실시양태에서, 관능화 지질은 말레이미드 관능화 포스포에탄올아민이다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 비제한적으로 DOPC와 같은 포스포콜린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 비제한적으로 DOPG와 같은 포스포글리세롤을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 말레이미드-관능화 지질, 포스포콜린 및 포스포글리세롤을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 40:10:50의 몰비로 DOPC, DOPG 및 말레이미드 관능화 지질 (예컨대 MPB)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 DOPC 및 말레이미드 관능화 지질 예컨대 MPB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 임의로 40:10:50의 몰비로 DOPC, DOTAP 및 말레이미드 관능화 지질 (예컨대 MPB)을 포함한다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 링커는 막 투과성 링커이다. 일부 실시양태에서, 가교제는 디티올 가교제이다. 일부 실시양태에서, 가교제는 디티올트리에톨 (DTT)이다. 일부 실시양태에서, 디티올 가교제 대 말레이미드 관능화 지질의 몰비는 1:2이다.

- [0023] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 지질 이중층들 사이에 가교결합을 갖는 다층 지질 소포의 표면에 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 접합시키는 것을 추가로 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 다가 양이온은 비제한적으로  $Ca^{2+}$  또는  $Mg^{2+}$ 와 같은 2가의 양이온이다. 이들은 단독으로, 또는 조합되어 사용될 수 있다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 상기 접촉은 수성 완충제 중에서 이루어진다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 리포솜은 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 작용제는 예방제, 치료제 또는 진단제이다.
- [0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 관능화 지질과 같은 관능화 지질 이중층 성분을 포함하는 다층 지질 소포를 가교제와 접촉시킴으로써, 지질 이중층들 간에 가교결합을 갖는 다층 지질 소포를 형성시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 가교결합된 지질 이중층을 가지며 작용제를 포함하는 유효량의 다층 지질 소포를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 가교결합된 지질 이중층을 가지는 상기 다층 지질 소포는 가교결합된 지질 이중층을 가지는 전기한 다층 지질 소포들 중 어느 것, 또는 본원에서 기술되는 것들 중 어느 것일 수 있다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 상기 다층 지질 소포는 생분해성 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다층 지질 소포는 인지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다층 지질 소포는 포스포콜린, 포스포글리세롤, 및/또는 포스포에탄올아민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다층 지질 소포는 관능화 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 관능화 지질은 말레이미드 관능화 지질이다. 일부 실시양태에서, 상기 말레이미드 관능화 지질은 말레이미드 관능화 포스포에탄올아민이다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 상기 작용제는 예방제이다. 일부 실시양태에서, 작용제는 치료제이다. 일부 실시양태에서, 작용제는 항원이다. 일부 실시양태에서, 작용제는 아주반트이다. 일부 실시양태에서, 상기 소포는 2종 이상의 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 소포는 항원 및 아주반트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 소포는 항원 및 2종의 아주반트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 소포는 단백질 항원, 및 TLR4 효능제 및 TLR7 효능제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질 항원과 같은 상기 항원은 소포의 코어에 존재하며, 아주반트(들)는 소포의 내부 이중층들 사이에 존재한다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 다층 지질 소포는 그의 외부 표면에서 PEG에 접합된다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 암에 걸려 있거나 그를 발병할 위험성이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 감염에 걸려 있거나 그에 걸릴 위험성이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 알레르기 또는 천식에 걸려 있거나 그를 발병할 위험성을 있거나, 또는 천식 발작을 경험하고 있거나 그를 경험할 위험성이 있다.
- [0033] 일부 실시양태에서, 유효량은 대상체에서 면역 반응을 자극하는 양이다. 상기 면역 반응은 체액성 반응 또는 세포성 반응일 수 있거나, 또는 체액성 및 세포성 반응이 조합된 것일 수 있다. 상기 세포성 반응은 CD8 T 세포의 자극을 포함할 수 있다.
- [0034] 또 다른 양태에서, 본 발명은 가교결합된 지질 이중층을 가지며 항원을 포함하는 다층 지질 소포를 투여하는 것에 의해, 면역 반응의 자극을 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 자극하는 것을 포함하며, 이 때 유효량의 항원이 대상체에게 투여되는 것인 방법을 제공한다. 가교결합된 지질 이중층을 가지는 상기 다층 지질 소포는 전기한 해당 소포들 중 어느 것 또는 본원에서 기술되는 것들 중 어느 것일 수 있다. 상기 소포는 추가로 하나 이상의 아주반트를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 소포는 단백질 항원을 포함한 항원을 그의 코어에, 그리고 아주반트를 그의 지질 이중층들 사이에 포함한다. 상기 단백질 항원은 전단백질 항원일 수 있다. 상기 아주반트는 MPLA와 같은 TLR4 효능제 및 R-848과 같은 TLR7 효능제일 수 있으나, 이제 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 소포는 지질 mg 당 300-400  $\mu$ g의 항원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소포는 1회만 투여된다 (즉, 초회감작(priming) 용량이면 충분함). 일부 실시양태에서, 소포는 1회를 초과하여 투여된다 (즉, 초회감작 및 추가 용량). 일부 실시양태에서, 항원은 박테리아 항원, 바이러스 항원, 진균 항원, 기생충 항원, 또는 미코박테리아 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 암 항원이다. 일부 실시양태에서, 면역 반응은 상승 작용적 면역 반응이다.
- [0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 가교결합된 지질 이중층을 가지며 작용제를 포함하는 다층 지질 소포를 시험관 내

에서 세포 또는 세포 군집과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 상기 세포 또는 세포 군집은 수지상 세포 또는 기타 항원 제시 세포일 수 있다. 가교결합된 지질 이중층을 가지는 상기 다층 지질 소포는 가교결합된 지질 이중층을 가지는 전기한 다층 지질 소포들 중 어느 것 또는 본원에서 기술되는 것들 중 어느 것일 수 있다.

[0036] 전기한 개념들 및 하기에 더욱 상세하게 논의되는 추가적인 개념들의 모든 조합은 (해당 개념들이 상호 모순되지 않는다는 전제하에) 본원에서 개시되는 발명 주제의 일부가 되는 것으로 고려된다는 것을 알아야 한다. 특히, 본 개시의 말미에 나타난 청구범위 주제의 모든 조합은 본원에서 개시되는 발명 주제의 일부가 되는 것으로 고려된다. 본원에서 명시적으로 사용되고 참조로 포함되는 임의의 문헌에서도 출현할 수 있는 용어는 본원에서 개시되는 구체적인 개념과 가장 일치하는 의미에 따라야 한다는 것 역시 알아야 한다.

**도면의 간단한 설명**

[0037] 도 1A. 이중층간-가교결합 다층 소포 (ICMV) 합성의 개략도. 2가 양이온-매개 융합이 DTT에 의해 인접 이중층들이 가교결합되어 있는 다층 소포의 형성을 야기한다. 생성되는 ICMV는 PEG-티올을 사용한 반응에서 PEG화되었다.

도 1B. 다층 소포에서 2개의 지질 헤드기(headgroup)를 함께 접합함으로써 형성된 ICMV의 도식.

도 2a-d. ICMV의 합성. (a) ICMV 합성의 개략도 및 냉동전자 현미경 영상: (i) 건조된 지질 필름으로부터 음이온성의 말레이미드-관능화 리포솜이 제조되고, (ii) 리포솜의 융합 및 MLV의 형성을 유도하기 위하여 2가의 양이온이 첨가되고, (iii) 막-투과성 디티올이 첨가되어, 소포 벽 내 나란한 지질 이중층들 상의 말레이미드-지질들을 가교결합시키고, (iv) 생성되는 지질 입자는 티올-말단 PEG에 의해 PEG화된다. 각 합성 단계에서의 냉동-EM 영상은 (i) 최초 리포솜, (ii) MLV, 및 (iii) 두꺼운 지질 벽을 가지는 ICMV를 나타낸다. 축척 막대 = 100 nm. (iii)의 우측 영상은 ICMV 벽의 확대된 영상을 나타내는데, 적층된 이중층들이 전자-조밀 줄무늬로 해상되어 있으며; 축척 막대 = 20 nm이다. (b) 동적 광 산란에 의해 측정된 ICMV 입자 크기 히스토그램. (c,d) 냉동-EM 영상에서의 ICMV 특성의 히스토그램으로써, (c) 입자 당 지질 이중층의 수, 및 (d) 지질 벽 두께에 대한 입자 반경의 비를 나타낸다 (n = 165개의 분석 입자).

도 3a-b. (a) 동적 광 산란에 의해 측정된 입자 직경의 히스토그램. (b) ICMV 입자의 냉동-EM 영상.

도 4a-e. 단백질 캡슐화 및 ICMV로부터의 방출. (a) 각 ICMV 합성 단계에서 수집된 지질 소포에서의 구상 단백질인 SIV-gag, FLT-3L, 또는 OVA의 캡슐화 효율. (b,c) 탈수-재수화 소포 (DRV) 또는 PLGA 나노입자에 대한 ICMV에서의 (b) OVA 캡슐화 효율, 및 (c) 입자 질량 당 총 단백질 적재의 비교. (d) 시험관 내에서 30일에 걸쳐 측정된, 10% 혈청을 포함하는 RPMI 배지 중에서 37°C로 인큐베이션된 단순 리포솜, MLV 또는 ICMV (모두 4:5:1의 DOPC:MPB:DOFG 기제 지질 조성을 가짐)로부터의 OVA의 방출 동역학. 비교를 위하여, 콜레스테롤 및 PEG-지질을 사용하여 안정화된 리포솜 (38:57:5의 DOPC:cho1:PEG-DOPE)에 대한 방출 동역학도 나타내었다. (e) 서로 다른 엔도리소솜 환경 측면을 모의한 완충제들인 완원 완충제, PBS 중 100 mM 베타-메르캅토에탄올 (베타-ME); 산성 완충제, 50 mM 시트르산나트륨 pH 5.0; 리포제-함유 완충제, PBS 중 500 ng/mL의 리포제 A에서, ICMV로부터의 OVA의 방출을 측정하였다. 데이터는 n=3인 3회 이상 실험의 평균 ± s.e.m을 나타낸다.

도 5a-b. (a) 입자에 캡슐화된 OVA의 분율 및 (b) 총 입자 질량 당 캡슐화된 OVA의 양을 나타내는, 통상적인 리포솜, 지질-코팅 PLGA 입자 및 ICMV에서의 OVA 캡슐화 비교.

도 6a-b. (a) PBS 및 (b) 10% 혈청을 포함하는 RPMI 배지에서의, 초음파처리된 리포솜, Mg<sup>2+</sup>에 의해 융합된 MLV, 및 Mg<sup>2+</sup> 및 DTT에 의해 형성된 ICMV로부터 방출된 OVA.

도 7a-c. TLR 효능제 MPLA가 보충된 ICMV에 의한 시험관내 면역 반응 자극. (a) 0.1 µg/mL MPLA의 존재 또는 부재하에서의, 0.7 µg/mL의 가용성 OVA, ICMV에 적재된 등가 용량의 OVA, 또는 무관한 단백질 (삼일열 말라리아 단백질, VMP)가 적재된 ICMV를 사용한 18시간 인큐베이션 후, 비장 수지상 세포 (DC)에서의 세포 표면 공동자극 마커 CD40, CD80, 및 CD86 발현에 대한 유동 세포측정법 분석. (b) 0.05 µg/mL MPLA의 존재 또는 부재하에, 10 µg/mL의 SIINFEKL 펩티드 (OVA<sub>257-264</sub>), 5.0 µg/mL의 가용성 OVA, ICMV에 적재된 등가 용량의 OVA, 또는 VMP-적재 ICMV를 사용하여 18시간 동안 비장 DC를 인큐베이션하고, H-2K<sup>b</sup>와 복합체화된 SIINFEKL을 인식하는 25-D1.16 mAb를 사용하여 염색된 세포의 유동 세포측정법 분석에 의해 OVA의 교차-제시 정도를 평가하였다. (c) 5-(6)-카르복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜 디에스테르 (CFSE)-표지된 OVA-특이적 비경험 OT-I CD8<sup>+</sup>



T-세포를 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 MPLA와 혼합된 가용성인 0.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  OVA, 또는 MPLA와 혼합된 등가 용량의 OVA-적재 ICMV에 의해 촉발된 동계 비장 DC와 함께 공동-배양하였다. 항원이 없는 빈 ICMV, 또는 무관한 항원인 VMP가 적재된 ICMV를 음성 대조군으로서 포함시켰다. 3일차에, OT-I  $\text{CD8}^+$  T-세포 중 CFSE 회색액의 유동 세포측정법 분석에 의해  $\text{CD8}^+$  T-세포의 증식을 평가하고; CFSE 형광의 히스토그램으로 나타내었다. 각 히스토그램의 게이트 (gate)는 각 샘플에서의 분열된 세포의 백분율을 나타낸다. 데이터는  $n=3-4$ 인 3회 이상 실험의 평균  $\pm$  s.e.m을 나타낸다.

도 8a-b. MPLA 및/또는 R-848이 도입된 ICMV에 반응하여 나타나는 (a) DC 성숙 및 (b) 활성화.

도 9a-f. 가용성 항원, 또는 비-가교결합 소포에 캡슐화된 항원에 대한 ICMV에 의한 생체내 면역화. 각각 0.1  $\mu\text{g}$ 의 MPLA와 혼합되어 가용성, 리포솜, MLV 또는 ICMV 제제 중에 전달되는 10  $\mu\text{g}$ 의 OVA 단일 주사를 사용하여, a, b, C57B1/6 마우스를 피하 (s.c.) 면역화하였다. (a) 형광성 OVA 펩티드-MHC 사량체를 사용한 면역화 7일 후, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 유동 세포측정법 분석에 의해 항원-특이적  $\text{CD8}^+$  T-세포의 백분율을 측정하였다. (b) 면역화 21일 후, 면역화된 마우스로부터의 혈청을 ELISA에 의해 OVA-특이적 IgG에 대하여 분석하였다. (c,d) 0.1  $\mu\text{g}$ 의 MPLA와 혼합된 10  $\mu\text{g}$ 의 형광단-접합 OVA를 가용성, 리포솜 또는 ICMV 제제로 C57B1/6 마우스에 주사하고, 2일차에, OVA를 내재화한 배액성 서혜부 림프절 (dLN) 세포를 평가하였다. (c) OVA 흡수에 대하여 양성인 DC ( $\text{CD11c}^+$ ), 대식세포 ( $\text{F4}/80^+$ ), B 세포 ( $\text{B220}^+$ ), 및 형질세포양 DC ( $\text{CD11c}^+\text{B220}^+$ )의 백분율, 및 (d)  $\text{OVA}^+$  군집의 평균 형광 강도 (MFI)를 나타내었다. (e,f) C57B1/6 마우스에 가용성, 리포솜 또는 ICMV 제제로 0.1  $\mu\text{g}$ 의 MPLA와 혼합된 10  $\mu\text{g}$ 의 OVA를 주사하고, 2일 후, 유동 세포측정법에 의해 배액성 서혜부 LN으로부터 단리된 DC를 분석함으로써, DC 활성화 및 항원 교차-제시를 평가하였다. (e) 중복된 히스토그램은 DC에서의 공동자극 마커 ( $\text{CD40}$  및  $\text{CD86}$ ) 및 MHC-II 발현을 나타낸다. (f) 좌측 패널은 SIINFEKL- $\text{K}^{\text{b}}$  복합체에 대한 염색된 서혜부 LN DC의 중복된 히스토그램을 나타내며, 평균 MFI 수준은 우측 패널에 나타내었다. 데이터는  $n=3-4$ 로 수행된 2-3회의 독립적인 실험들의 평균  $\pm$  s.e.m을 나타낸다. 터키(Tukey's) HSD 후 일방향 ANOVA에 의해 분석하였을 때, \*  $p<0.05$ , 그리고 \*\*  $p<0.01$ 이었다.

도 10a-b. (a)  $\text{CD8}$ 에 대한 항체, 및 OVA-유래 펩티드 SIINFEKL과 복합체화된 펩티드-MHC 사량체로 염색된 세포에 대한 유동 세포측정법 분석에 의한 평가시, 추가접종 7일 후 말초 혈액 중 OVA-특이적  $\text{CD8}^+$  T-세포. (b) 면역화 21일차에 ELISA에 의해 측정된 항-OVA 항체 역가.

도 11a-e. 수성 코어에 항원을 보유하며, 소포 벽에 MPLA가 매립되어 있는 ICMV는 강력한 항체 및  $\text{CD8}^+$  T-세포 반응을 도출한다. (a) 백신 군의 개략도: MPLA와 혼합된 가용성 OVA (MPLA), 외부 표면에만 MPLA를 포함하는 OVA-적재 ICMV (ext-MPLA ICMV), 또는 지질 다층 전체에 걸쳐 MPLA를 포함하는 OVA-적재 ICMV (int-MPLA ICMV). (b-e) 0, 21 및 35일차에, MPLA, ext-MPLA ICMV, 또는 int-MPLA ICMV 중 어느 하나로 제제화된 10  $\mu\text{g}$ 의 OVA와 0.1  $\mu\text{g}$  또는 1.0  $\mu\text{g}$  중 어느 하나의 MPLA를 사용하여, 꼬리 기부에 피하로 C57B1/6 마우스를 면역화하였다. (b) 혈청 중 총 OVA-특이적 IgG의 ELISA 분석. (c) 사량체 $^+$  $\text{CD8}^+$  T-세포의 유동 세포측정법 분석을 통하여 10  $\mu\text{g}$  OVA 및 0.1  $\mu\text{g}$  MPLA를 사용한 백신접종에 대해 시간에 따라 평가된, 말초 혈액 중 OVA-특이적 T-세포의 빈도. 비교를 위하여, 가용성 OVA + 1  $\mu\text{g}$  MPLA (MPLA 10 $\times$ )를 사용한 백신접종에 대한 반응도 나타내었다. 나타낸 것은 41일차 개별 마우스로부터의 대표적인 유동 세포측정법 산란 플롯, 및 시간에 대한 마우스 군으로부터의 평균 사량체 $^+$  값이다. (d) 41일차 말초 혈액으로부터의 사량체 $^+$  세포 상에서의  $\text{CD44}/\text{CD62L}$  염색에 의한, 말초 혈액 중 T-세포 효과기/효과기 기억/중추 기억 표현형의 분석. 나타낸 것은, 41일차의, 개별 마우스로부터의 대표적인 세포측정법 플롯, 및  $\text{CD8}^+$  T-세포 중  $\text{tet}^+\text{CD44}^+\text{CD62L}^+$  세포의 평균 백분율이다. (e) 49일차에, 시험관내 OVA 펩티드에 의한 PBMC의 생체의 재자극 후 세포내 IFN- $\gamma$  염색을 사용하여, 항원-특이적  $\text{CD8}^+$  T-세포의 기능성을 검정하였다. 개별 마우스로부터의 IFN- $\gamma$  $^+$  $\text{CD8}^+$  T-세포의 대표적인 유동 세포측정법 히스토그램, 및 군의 평균 결과를 나타내었다. 데이터는  $n=3$ 으로 수행된 2회 독립 실험의 평균  $\pm$  s.e.m을 나타낸다. c, sol OVA + MPLA와 비교하였을 때, \*  $p<0.05$ , 및 ext-MPLA ICMV와 비교하였을 때 #  $p<0.05$ 이었다. (d,e) 터키 HSD 후 쌍방향 ANOVA에 의해 분석하였을 때, \*  $p<0.05$ , 및 \*\*  $p<0.01$ 이었다.

도 12A-B. "클릭(click)" 화학을 사용하는 대안적인 이중중간-가교결합 반응. (A) DOPE 및 알킨 전구체로부터

알킨-헤드기 지질을 합성하였다. (B) 알킨-말단 지질을 사용하여 리포솜을 형성시킨 후,  $Mg^{2+}$ 에 의해 MLV가 형성되도록 유도하였다. 이후의 디아지드 및 표시된 바와 같은 촉매를 사용한 알킨-보유 MLV의 인큐베이션은 저속 원심분리 조건을 사용한 입자 회수 후 측정하였을 때 83%의 입자 수율을 가지는 성공적인 ICMV의 형성을 야기하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0038] 본 발명은 특히 작용제의 전달에서의 사용을 위한 안정화된 다층 지질 소포를 제공한다. 제조합 단백질 기재의 선행 기술 백신은 생 백신 (예컨대 바이러스) 백터와 관련된 독성 및 항-백터 면역을 회피하지만, 특히  $CD8^+$  T-세포 (CD8T) 반응에 대하여, 그의 면역원성이 저조하다. 하위단위 백신(subunit vaccine)을 강화하기 위하여, 항원 및 아주반트 분자를 보유하는 합성 입자들이 개발되어 왔지만, 일반적으로 이러한 물질들은 전임상 동물 모델에서 생 백터에 필적할만한 CD8T 반응을 이끌어내는데 실패하였다. 이러한 선행 기술 조성물 및 방법들과 달리, 본 발명은 안정화된 다층 소포, 예컨대 다층 소포 내 인접한 지질 이중층의 헤드기들을 가교결합시킴으로써 형성되는 이중층간-가교결합 다층 소포 (ICMV)를 제공한다. 이러한 소포는 세포의 조건하에서 특히 단백질 항원을 소포 코어에, 그리고 지질-기재 면역자극성 분자를 소포 벽에 안정하게 포획하나, 엔도리소솜성 (endolysosomal) 리파제의 존재하에서는 빠른 방출을 나타낸다. 단독으로, 또는 아주반트의 존재하에 항원을 전달하는 데에 사용될 경우, 본 발명의 소포는 최강의 백신 백터에 필적하는 내인성 T-세포 및 항체 반응을 이끌어 내는 극히 강력한 백신 (예컨대 전-단백질 백신)을 형성한다.
- [0039] 상기 소포는 그의 지질 이중층들의 내부 결합 (예컨대 가교결합)에 의해 안정화된다. 이러한 소포의 안정화된 특성은 단순 리포솜, 또는 지질 코팅 나노- 또는 마이크로입자에 비해, 그것이 더 많은 양의 작용제를 도입하고 그와 같은 작용제를 더 긴 시간 기간 동안 유지하도록 해준다. 특히 혈청 존재하에서의 그의 지속 방출 동역학은 느리고 일정하며 연장된 방출이 바람직하거나, 또는 세포의 환경에서는 느린 방출이, 그러나 세포 내에서는 빠른 방출이 바람직한 생체내 작용제 전달에 있어서 유용해지도록 해준다. 본원에서 매우 상세하게 기술되는 바와 같이, 본 발명은 예방제, 치료제 및/또는 진단제를 포함한 다수의 다양한 작용제들과 함께 그와 같은 소포를 사용할 것을 고려한다. 이에 따라, 본 발명은 상기-언급된 소포를 포함하는 조성물, 그의 합성 방법, 및 그의 사용 방법을 제공한다.
- [0040] *안정화된 다층 지질 소포 (MLV)*
- [0041] 본 발명은 인접한 (또는 나란한) 지질 이중층들을 서로 결합시킴으로써 안정화된 MLV를 제공한다. 본원에서 사용될 때, 다층 소포는 2개 이상의 동심원으로 배열된 지질 이중층들로 구성되는 셸(shell)을 가지는 나노- 또는 마이크로구체이다. 본원에서 사용될 때, 인접하거나 나란한 지질 이중층 (또는 지질 이중층 표면)은 서로 매우 근접하여 있으나 그밖에는 별개의 것으로서 보통 물리적으로 분리되어 있는 이중층 또는 표면을 의미한다. 이 용어가 단일 이중층 중 2개 단층 사이의 관계를 전형으로 의미하는 것은 아니다.
- [0042] 본원에서 사용될 때, "결합하는"은 소정의 생리화학적 수단에 의해 서로 안정하게 결합되어 있는 2개의 실체를 의미한다. 공유 결합이 바람직하기는 하지만, 공유 또는 비공유 결합을 포함하여, 당업자에게 알려져 있는 어떠한 결합도 사용될 수 있다. 본원에서 기술되는 일부 중요한 실시양태에서, MLV 중 인접한 (또는 나란한) 지질 이중층들 사이의 공유 결합은 가교제, 및 지질 이중층의 관능화된 성분의 사용을 통하여 달성된다. 그러나, 본 발명은 공유 결합을 포함한 결합이 다른 방식으로 수행될 수 있는 것도 고려한다. 그 예로서, 본 발명은 상보적 반응성 기들이 인접한 이중층들 표면의 성분에 존재하고, 가교제의 부재하에서라도 이들 기를 서로 반응시킴으로써 이중층들 표면 사이의 결합이 수행되는 방법을 고려한다. 적합한 상보적 반응성 기에 대해서는 당업계에 알려져 있으며, 본원에서 기술된다.
- [0043] 소포의 내부는 통상적으로 수성 환경으로써, 비제한적으로 예방제, 치료제 또는 진단제와 같은 작용제를 포함할 수 있다. 일부 경우, 소포는 고체 코어, 예컨대 고체 중합체 코어 (예를 들면 합성 중합체 코어)를 포함하지 않는다. 그 대신, 상기에서 논의된 바와 같이, 해당 작용제를 포함하는 유체 코어를 가질 수 있다. 일부 경우에는, 코어가 히드로겔 코어로의 중합을 위한 단량체를 포함할 수 있다. 본원에서는, 소포가 나노- 또는 마이크로입자를 포함한 입자로 지칭될 수도 있는데, 하지만 그와 같은 나노- 또는 마이크로-입자는 본 발명의 안정화된 MLV 및 이중층간 가교결합 다층 지질 소포 (ICMV)의 속성을 가지는 것으로 이해되어야 한다.
- [0044] 도 1A, 1B 및 2A에 나타난 바와 같이, 소포는 그의 코어에 허공 부피를 가질 수 있거나, 및/또는 그의 코어 및/또는 인접한 (또는 나란한) 지질 이중층들 사이에 하나 이상의 작용제를 포함할 수 있다. 작용제는 통상적으로

합성 과정 동안 지질 용액에 포함되며, 그와 같은 방식으로 합성 동안 소포에 (예컨대 캡슐화에 의해) 도입된다. 소포가 형성되면서, 친유성 분자가 직접적으로 지질 이중층에 도입될 수도 있으며, 또는 친유성 테일(tail)을 가지는 분자가 소포 형성 동안 지질 이중층에 고정될(anchored) 수 있다. 소포는 유기 용매와 같은 가혹 용매의 부재하에 제조될 수 있으며, 그 결과, 유기 용매 등에 대하여 민감할 수 있는 것들을 포함한 매우 다양한 작용제들을 캡슐화할 수 있다.

[0045] 소포 내 작용제의 양은 가변적일 수 있어서, 작용제의 특성에 따라 달라질 수 있다. 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명의 소포에는, 지질 mg 당 300-400  $\mu\text{g}$ 의 단백질 작용제가 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 소포는 지질 mg 당 약 100  $\mu\text{g}$ 의 작용제, 또는 약 150  $\mu\text{g}$ 의 작용제, 또는 약 200  $\mu\text{g}$ 의 작용제, 또는 약 250  $\mu\text{g}$ 의 작용제, 또는 약 300  $\mu\text{g}$ 의 작용제, 또는 약 325  $\mu\text{g}$ 의 작용제, 또는 약 350  $\mu\text{g}$ 의 작용제, 또는 약 375  $\mu\text{g}$ 의 작용제, 또는 약 400  $\mu\text{g}$ 의 작용제, 또는 약 410  $\mu\text{g}$ 의 작용제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 작용제는 단백질 항원과 같은 단백질일 수 있다.

[0046] 본 발명의 소포는 그의 보유 프로파일(retention profile)에 의해 특성화될 수도 있다. 일부 실시양태에서, 혈청 함유 배지 (예컨대 10% 혈청) 중에 위치시키고 37°C로 유지할 경우, 소포는 주 당 약 25%의 속도로 작용제를 방출한다. 일부 실시양태에서, 소포는 이러한 조건하에서 1주차에 약 25%의 작용제를 방출하며, 약 30일 후에는 약 90%까지를 방출한다. 일부 실시양태에서, 소포는 4°C로 30일 동안 완충제 (예컨대 PBS) 중에서 저장될 때 그의 작용제를 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상 유지한다.

[0047] 각 소포에서의 지질 이중층의 수는 2개 이상 내지 약 50개, 또는 2개 이상 내지 약 25개, 또는 2개 이상 내지 약 15개, 또는 2개 이상 내지 약 10개, 또는 2개 이상 내지 약 5개의 통상적인 범위로 가변적일 수 있다.

[0048] 소포의 직경은 가변적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 소포는 약 125 내지 약 300 nm, 약 150 내지 약 300 nm, 약 175 내지 약 275 nm를 포함하여, 약 100 내지 약 500 nm 범위의 직경을 가지게 된다. 일부의 경우, 직경은 약 150 내지 약 250 nm의 범위이다. 실시예에서 기술되는 바와 같이 제조되는 ICMV에 있어서의 직경 프로파일도 2b 및 3a에 제시되어 있다. 어떠한 소포의 제조에 있어서도, 소포 직경, 지질 이중층들의 수, 적체되는 작용제의 양 등과 관련하여서는 소포들 간에 균질성이 존재하게 된다는 것이 이해될 것이다. 그와 같은 분포는 실시예에 제시되어 있다.

[0049] 본원에서 사용될 때, 본 발명의 소포는 리포솜 (예를 들면 안정화된 다층 리포솜, 또는 하기에 논의되어 있는 바와 같은 이중층간 가교결합 다층 리포솜)으로 지칭될 수도 있다. 따라서, "소포"라는 용어의 사용이 소포의 공급원 또는 기원을 전달하고자 하는 것은 아니다. 하기에 매우 상세하게 논의되는 바와 같이, 본 발명의 소포는 합성 소포 (즉 시험관 내에서 제조됨)이다.

[0050] 소포는 분리될 수 있는데, 그들이 합성되는 환경으로부터 전체 또는 일부가 물리적으로 분리된다는 것을 의미한다. 그 예로서, 작용제 (즉 해당 "화물(cargo)" 또는 "탑재물(payload)")를 포함하는 소포가 작용제가 결핍되어 있는 소포 (즉 빈 소포)로부터 전체적으로 또는 부분적으로 분리될 수 있으며, 이후 "단리된 소포"로 지칭될 수 있다. 분리는 중량 (또는 질량), 밀도 (부유 밀도(buoyant density) 포함), 크기, 색상 등을 바탕으로 이루어질 수 있다 (예를 들면 소포의 화물은 그의 에너지 방출에 의해 검출가능함). 실시예에서 기술되는 바와 같이, 단순 리포솜, 또는 가교결합된 이중층을 가지지 않는 동일 지질 조성의 MLV로부터 본 발명의 소포를 분리하는 데에는, 원심분리가 사용될 수 있다. 약 14,000 g에서의 약 4분 동안의 원심분리이면, 상기 다른 입자 유형들로부터 펠렛인 본 발명의 소포를 분리하는 데에 충분하다.

[0051] *이중층간 가교결합된 다층 지질 소포*

[0052] 본 발명의 안정화된 MLV의 예는 이중층간 가교결합 다층 (지질) 소포 (ICMV)이다. 상기한 안정화 MLV와 마찬가지로, ICMV는 본원에 기술되어 있는 바와 같이 서로 접합된 2개 이상의 동심원으로 배열된 지질 이중층으로 구성되는 셸을 가지는 나노- 또는 마이크로구체이다. ICMV를 포함한 안정화 다층 소포에서의 지질 이중층의 수는 약 2-30개로 가변적일 수 있으나, 더욱 통상적으로는 2-15개의 범위이다. 따라서, 다양한 실시양태에서, 층의 수는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 또는 그 이상일 수 있다. 한 가지 대표적인 ICMV 합성으로부터 생성되는 이중층 수의 도수 분포가 도 2c에 제시되어 있다. 이중층은 통상적으로 친수성의 헤드 및 소수성의 테일을 가지며 세포 막과 유사한 방식 (즉, 친수성 헤드가 통상적으로 수성인 환경으로 노출되고, 소수성인 테일이 이중층에 매립되어 있음)으로 배열되는 지질로 구성된다.

[0053] ICMV는 그의 지질 이중층들 사이의 가교결합을 통하여 안정화되며, 그에 따라 "이중층간 가교결합된" MLV로 지칭된다. 본원에서 사용될 때, 이는 소포 셸 내 2개 이상의 지질 이중층이 서로 가교결합되어 있다는 것을 의미

한다. 가교결합된 이중층은 통상적으로 서로 나란하거나 인접한 것들이다. 쉘 내 지질 이중층 대부분 또는 전체는 그의 나란한 쉘 내 지질 이중층과 가교결합될 수 있다. 지질 이중층들 사이에는 하나 이상의 가교결합이 존재할 수 있다. 통상적으로는, 수많은 가교결합들이 지질 이중층들 사이에 존재하게 된다. 그와 같은 가교결합의 배열 및 배치는 무작위 또는 비-무작위일 수 있다. 가교결합도 (및 그에 따른 결과적인 소포의 안정성)는 소포를 제조하는 데에 사용되는 관능화 지질 (또는 다른 지질 이중층 성분)의 비율, 및 가교결합 조건 (예컨대 소포의 가교제와의 인큐베이션 시간 포함)에 따라 달라지게 된다. 다른 모든 인자 및 파라미터가 동일하다면, 소포 중 관능화 지질 (또는 다른 지질 이중층 성분)의 비율이 높을수록, 형성될 수 있는 가교결합이 많아진다는 것이 이해될 것이다. 마찬가지로, 조건이 가교결합에 더 바람직할수록, 달성될 수 있는 가교결합도는 더 커진다.

[0054] 합성 방법

[0055] 대표적인 합성 방법은 하기와 같다: 지질 및 임의로 다른 이중층 성분을 조합하여, 균질 혼합물을 형성시킨다. 이는 지질을 건조하여 지질 필름을 형성시키는 건조 단계를 통하여 이루어질 수 있다. 다음에, 지질을 수성 용매와 조합한다 (예를 들면 재수화함). 상기 수성 용매는 약 7의 pH를 포함하여, 약 6 내지 약 8 범위의 pH를 가질 수 있다. 통상적으로 저농도의 염을 포함하는, 소포 용합에 상용성인 완충제가 사용된다. 실시예에서 사용되는 용매는 10 mM 비스-트리스 프로판 (BTP) 완충제 pH 7.0이다. 표 1A에 나타난 바와 같이, 완충제의 특성은 인큐베이션의 길이에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 모든 다른 것들이 동일하다면, PBS와 같은 완충제는 BTP와 같은 완충제에 비해 더 긴 인큐베이션 시간을 필요로 할 수 있다. 완충제가 PBS인 경우라면, 인큐베이션 시간은 약 6-24시간, 또는 8-16시간, 또는 10-12시간일 수 있다. 완충제가 BTP인 경우라면, 인큐베이션 시간은 1-4시간, 또는 1-2시간을 포함하여, 더 짧을 수 있다. 따라서, 충분한 인큐베이션 시간이 함께 사용된다는 전제하에, 다양한 수성 완충제들이 사용될 수 있다. 이와 같은 단계는 소포에 도입될 작용제(들)의 존재를 포함할 수도 있다. 이후, 생성되는 리포솜은 그들을 다층 소포로 융합하기 위하여, 하나 이상의 2가 양이온과 함께 인큐베이션된다. 적합한 2가 양이온에는  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ , 또는  $Sr^{2+}$ 가 포함된다. 다가이거나 중합체성인 양이온이 소포 용합에 사용될 수도 있다. 소포 용합은 또한 양이온성 소포를 2가 또는 더 높은 원자가의 음이온과 혼합하는 것을 통하여 달성될 수도 있는데; 그 예는 양이온성 리포솜의 DNA 올리고뉴클레오티드 또는 DNA 플라즈미드와의 융합일 것이다. 이는 초음파처리, 볼텍싱 등과 같은 교반하에 수행될 수 있다. 리포솜이 작용제의 존재하에 제조되는 경우, MLV는 그의 코어, 및/또는 동심원으로 배열된 지질 이중층들 사이에 작용제를 포함하게 된다. 본 발명은 서로 다른 작용제를 보유하는 리포솜들을 융합시킴으로써, 해당 작용제들을 포함하는 MLV를 형성시키는 것을 고려한다.

[0056] 이어서, 생성되는 MLV는 가교제, 바람직하게는 막-투과성 가교제와 함께 인큐베이션된다. 본원에서 언급될 때, 가교제의 특성은 함께 결합되는 반응성 기의 특성에 따라 달라지게 된다. 실시예에 나타난 바와 같이, 디티올-함유 가교제 예컨대 DTT 또는 (1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오)-프로피온아미도]부탄)이 말레이미드 관능화 지질 (또는 다른 관능화 지질 이중층 성분)으로 구성되는 MLV를 가교결합시키는 데에 사용될 수 있거나, 또는 도 12에 나타난 바와 같이, 디아지드 가교제가 "클릭" 화학을 통하여 알킨 헤드기 지질을 가교결합시키는 데에 사용될 수 있다. 이러한 다양한 인큐베이션은 모두 수성 조건하에서 약 6 내지 약 8, 또는 약 6.5 내지 약 7.5, 또는 약 7 범위의 pH로 수행된다. 가교결합 단계는 실온 (예컨대 20-25°C), 또는 예컨대 37°C 이하 또는 초과를 포함한 승온에서 수행될 수 있다.

[0057] 이어서, 생성되는 가교결합 소포는 수집되어 (예컨대 원심분리 또는 다른 펠릿화 수단에 의함), 세척된 다음, 티올-PEG와 함께 인큐베이션됨으로써, 그의 최외곽 또는 외부 표면에서 PEG화될 수 있다 (예를 들면, 본원에서 사용될 때, 소포는 "표면-PEG화됨" 또는 PEG에 "표면-접합됨" 것으로 지칭될 수 있음). PEG는 비제한적으로 0.1-10 kDa, 0.5-5 kDa, 또는 1-3 kDa를 포함하여, 임의의 크기를 가질 수 있다. 실시예에서는 티올에 의해 관능화된 2 kDa PEG가 사용된다. 인큐베이션 기간은 약 10분 내지 2시간의 범위일 수 있지만, 온도, 농도 등과 같은 다른 조건에 따라서는 더 짧거나 더 길 수 있다. PEG화 단계는 실온 (예컨대 20-25°C), 또는 예컨대 37°C 이하 또는 초과를 포함한 승온에서 수행될 수 있다. 실시예의 대표적인 합성 방법에서는, 30분의 인큐베이션 기간이 사용된다. 다음에, 소포는 수집되어 (예컨대 원심분리 또는 다른 펠릿화 수단에 의함), 물 또는 다른 수성 완충제로 세척될 수 있다.

[0058] 소포는 비제한적으로 PBS와 같은 완충 용액 중에서 4°C로 저장될 수 있거나, 또는 적합한 냉동보존제 (cryopreservant)의 존재하에 동결건조된 다음, -20°C에서 저장될 수 있다. 적합한 냉동보존제에는 수크로스를 포함하는 것들 (예컨대 1-5% 수크로스, 바람직하게는 약 3% 수크로스 용액)이 포함된다.



- [0059] 가교결합은 하나의 이중층 내 반응성 기와 인접 이중층 내의 상보적인 반응성 기 사이를 커플링하는 것에 의해 달성될 수도 있다. 예를 들면, 숙신이미드 에스테르-관능화 지질 (A) 헤드기 및 1급-아민-함유 (B) 헤드기를 함유하는 융합 소포는 인접 이중층 중 A와 B 지질 사이의 계내 반응에 의해 가교결합을 달성할 수 있다. 당업자에게 익숙한 다른 다양한 상보성 관능화 지질들이 유사한 방식으로 사용될 수 있다.
- [0060] 관능화 지질 (또는 지질 이중층의 다른 관능화 성분) 대 가교제의 몰비는 조건에 따라 가변적일 수 있다. 일부 실시양태에서는, 2의 몰비 (즉, 관능화 지질 (또는 성분) 대 가교제의 몰비가 2:1임)이면 충분하다. 소포의 지질 이중층들을 가교결합하는 데에 2:1의 몰비의 말레이미드 관능화 지질 대 DTT가 사용되는 합성 방법이 실시예에 기술되어 있다. 인큐베이션 시간은 1시간 내지 24시간, 2-18시간, 2 내지 12시간, 또는 2 내지 6시간의 범위일 수 있다. 일부 경우에서, 그것은 약 2시간일 수 있다. 다른 경우, 그것은 밤새 (예컨대 약 12시간)일 수 있다.
- [0061] 소포에서의 관능화 지질의 몰%는 1% 내지 100%, 또는 일부 경우 약 10% 내지 약 60%, 또는 일부 경우 약 25% 내지 약 55%의 범위일 수 있다. 일부 경우에서, 소포 중 관능화 지질의 몰%는 통상적으로 10% 이상, 바람직하게는 15% 이상, 더욱 바람직하게는 20% 이상, 더욱 더 바람직하게는 25% 이상이다. 표 1A 및 1B는 관능화 지질의 부재하에서는 소포가 형성되지 않음을 보여준다.
- [0062] 역으로, 비-관능화 지질은 약 0% 내지 99%의 몰%로 존재할 수 있다. 더욱 통상적으로는, 비-관능화 지질은 약 40%-75% 또는 40% 내지 60%의 몰%로 존재할 수 있다.
- [0063] 중요한 일 실시양태에서, 소포는 DOPC, DOPG 및 말레이미드-관능화 DSPE를 사용하여 합성된다. 서로에 대한 이러한 지질들의 비는 가변적일 수 있다. 표 1A 및 1B는 소포 수율에 대한 가변적인 DOPC:DOPG:말레이미드 관능화 지질 비의 효과를 보여준다. DOPC의 몰%는 1-50%의 범위일 수 있으며, DOPG의 몰%는 1-50%의 범위일 수 있고, 말레이미드 관능화 지질의 몰%는 1-80%의 범위일 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태는 40:10:50의 DOPC:DOPG:말레이미드 관능화 지질 비를 가지는 소포를 제공한다. 일부 실시양태는 60:15:25의 DOPC:DOPG:말레이미드 관능화 지질 비를 가지는 소포를 제공한다. 일부 실시양태는 DOPG 및 말레이미드 관능화 지질로 구성되는 소포를 제공한다.
- [0064] 지질
- [0065] 소포는 하나 이상의 지질로 구성된다. 지질의 유형, 수 및 비는 그들이 집합적으로 구형의 이중층 (즉 소포)을 형성한다는 전제하에 가변적일 수 있다. 상기 지질은 자연 발생 공급원으로부터 단리될 수 있거나, 또는 어떠한 자연 발생 공급원과도 관계없이 합성될 수 있다.
- [0066] 지질들 중 하나 이상 (또는 일부)은 친수성 및 소수성 부분 (통상적으로 친수성 헤드 및 소수성 테일)을 가지는 것으로 정의되는 양쪽성 지질이다. 소수성인 부분은 통상적으로 (예컨대 이중층 내에서) 소수성 상으로 배향되는 반면, 친수성 부분은 통상적으로 수성 상 (예컨대 이중층의 외부, 및 어쩌면 인접한 나란한 이중층 표면들 사이)을 향해 배향된다. 상기 친수성 부분은 탄수화물, 포스페이트, 카르복실, 술페이트, 아미노, 술프히드릴, 니트로, 히드록시 및 기타 유사 기와 같은 극성이거나 하전된 기를 포함할 수 있다. 소수성 부분은 비제한적으로 장쇄인 포화 및 불포화 지방족 탄화수소 기, 및 하나 이상의 방향족, 고리-방향족 또는 헤테로시클릭 기 (들)에 의해 치환된 기를 포함한 비극성 기를 포함할 수 있다. 양친매성 화합물의 예에는 인지질, 아미노지질 및 스펅고지질이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 통상적으로, 지질은 인지질이다. 인지질에는 비제한적으로 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜세린 등이 포함된다. 콜레스테롤, 스펅고마이엘린, 카르디올리핀 등과 같은 다른 지질 막 성분들이 사용될 수도 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0068] 지질은 음이온성 및 중성 인지질을 포함한 음이온성 및 중성 (쯔비터이온성 및 극성 포함)의 지질일 수 있다. 중성 지질은 선택된 pH에서 비하전이거나 중성의 쯔비터이온성인 형태로 존재한다. 생리학적 pH에서, 그와 같은 지질에는 예를 들면 디올레오일포스파티딜글리세롤 (DOPG), 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드, 스펅고마이엘린, 세팔린, 콜레스테롤, 세레브로시드 및 디아실글리세롤이 포함된다. 쯔비터이온성 지질의 예에는 비제한적으로 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC) 및 디올레오일포스파티딜세린 (DOPS)이 포함된다. 음이온성 지질은 생리학적 pH에서 음성으로 하전되는 지질이다. 이러한 지질에는 비제한적으로 포스파티딜글리세롤, 카르디올리핀, 디아실포스파티딜세린, 디아실포스파티드산, N-도데카노일 포스파티딜에탄올아민, N-숙시닐 포스파티딜에탄올아민, N-글루타릴포스파티딜에탄올아민, 리실포스파티딜글리세롤, 팔미토일올레일포스파티딜글리세롤 (POPG), 및 중성 지질에 결합된 기타 음이온성 개질 기

들이 포함된다.

- [0069] 본원에서, 음이온성 및 중성 지질은 집합적으로 비-양이온성 지질로 지칭된다. 이와 같은 지질들은 인을 함유할 수 있으나, 그것으로 제한되는 것은 아니다. 비-양이온성 지질의 예에는 레시틴, 리소레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소포스파티딜에탄올아민, 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민 (DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민 (DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민 (DSPE), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린 (POPC), 계란 포스파티딜콜린 (EPC), 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤 (DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 (DPPG), 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤 (POPG), 16-0-모노메틸 PE, 16-0-디메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE), 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE), 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스프링고마이엘린, 세팔린, 카르디올리핀, 포스파티드산, 세레브로시드, 디세틸포스페이트, 및 콜레스테롤이 포함된다.
- [0070] 추가적인 비인 함유 지질에는 스테아릴아민, 도데실아민, 헥사데실아민, 아세틸 팔미테이트, 글리세롤리시놀레이트, 헥사데실 스테레이트, 이소프로필 미리스테이트, 양쪽성 아크릴 중합체, 트리에탄올아민-라우릴 술페이트, 알킬-아릴 술페이트 폴리에틸옥실화 지방산 아마이드, 디옥타데실디메틸 암모늄 브로미드 등, 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 세라미드, 스프링고마이엘린, 세팔린, 및 세레브로시드가 포함된다. 일부 경우에는, 리소포스파티딜콜린 및 리소포스파티딜에탄올아민과 같은 지질이 사용될 수 있다. 비양이온성 지질에는 또한 폴리에틸렌 글리콜-기재 중합체 예컨대 PEG 2000, PEG 5000, 및 인지질 또는 세라미드 (PEG-Cer로 지칭됨)에 접합된 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다.
- [0071] 일부 경우에는, 형광단과 같은 검출가능한 표지를 사용하여 개질된 형태를 포함하여, 개질된 지질 형태가 사용될 수 있다. 일부 경우, 지질은 신호 (예컨대 형광 신호)를 방출하는 지질 유사체이다. 그 예에는 비제한적으로 1,1'-디옥타데실-3,3',3'-테트라메틸인도트리카르보시아닌 아이오다이드 (DiR) 및 1,1'-디옥타데실-3,3',3'-테트라메틸인도디카르보시아닌 (DiD)이 포함된다.
- [0072] 바람직하게는, 생체 내 및/또는 시험관 내에서의 캡슐화된 작용제의 방출을 가능케 하도록, 지질은 생분해성이다. 생분해성 지질에는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (디올레오일-포스포콜린, DOPC), 음이온성 1,2-디-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포-(1'-rac-글리세롤) (디올레오일-포스포글리세롤, DOPG), 및 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (디스테아로일-포스포에탄올아민, DSPE)이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 콜레스테롤과 같은 비-지질 막 성분이 도입될 수도 있다.
- [0073] *관능화 지질 또는 이중층 성분*
- [0074] 지질 이중층 중 하나 이상의 성분은 관능화 (또는 반응성화) 되어야 한다. 본원에서 사용될 때, 관능화 성분은 다층 소포의 인접 이중층들을 가교결합시키는 데에 사용될 수 있는 반응성 기를 포함하는 성분이다. 이중층 성분은 반응성 기를 포함하도록 개질될 수 있다.
- [0075] 소포의 합성에 사용되는 지질들 중 하나 이상은 관능화 지질일 수 있다. 본원에서 사용될 때, 관능화 지질은 다층 소포의 인접 이중층들을 가교결합시키는 데에 사용될 수 있는 반응성 기를 가지는 지질이다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 가교제 (또는 다른 모이어티)와 반응하여 해당 관능화 지질들 사이에 (및 그에 따라 소포 내 지질 이중층들 사이에) 가교결합을 형성시키게 되는 것이다. 반응성 기는 지질이 가교제와 접촉하여 인접한 나란한 이중층 내 또 다른 지질에 가교결합되는 것을 가능케 하는 지질 상의 어떠한 곳에도 위치될 수 있다. 일부 실시양태에서, 그것은 예컨대 인지질을 포함한 지질의 헤드 기에 존재한다. 반응성 기의 예는 말레이미드 기이다. 말레이미드 기들은 비제한적으로 디티올트리에톨 (DTT)와 같은 디티올 가교제의 존재하에 서로 가교결합될 수 있다. 관능화 지질의 예는 본원에서 MPB로 지칭되는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[4-(p-말레이미도페닐) 부티르아미드]이다. 본 발명 소포의 합성에서의 이와 같은 관능화 지질의 용도는 실시예에 나타내었다. 관능화 지질의 또 다른 예는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌 글리콜)2000] (말레이미드-PEG 2k-PE로도 지칭됨)이다. 관능화 지질의 또 다른 예는 디올레오일-포스파티딜에탄올아민-4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (DOPE-mal)이다.
- [0076] 본 발명이 다른 관능화 지질, 다른 관능화 지질 이중층 성분, 다른 반응성 기, 및 다른 가교제의 사용을 고려한다는 것이 이해되어야 한다. 말레이미드 기 이외에도, 반응성 기의 다른 예에는 다른 티올 반응성 기, 아미노기 예컨대 1급 및 2급 아민, 카르복실 기, 히드록실 기, 알데히드 기, 알킨 기, 아지드 기, 카르보닐, 할로아세틸 (예컨대 아이오도아세틸) 기, 이미도에스테르 기, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 술폰히드릴 기, 피리딜

디올피드 기 등이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077] 관능화 및 비-관능화 지질들은 아반티 폴라 리피즈(Avanti Polar Lipids) (알라바마 알라바스터 소재)를 포함한 수많은 시중의 공급처로부터 구입가능하다.

[0078] 본 발명이 다층 소포 내 인접 이중층들을 서로 결합시키기 위한 다양한 방식들을 고려한다는 것이 이해되어야 한다. 일부 경우에는, 인접 이중층들 사이의 결합을 수행하는 데에 가교제가 사용된다. 그러나, 본 발명이 그에 제한되는 것은 아니다.

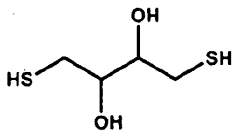
[0079] 그 예로서, 소포는 클릭 화학을 사용하여 형성될 수 있다. 대표적인 합성 방법은 하기와 같이 알킨-개질된 지질 및 알킨-아지드 화학을 사용한다. 5 mL의  $CDCl_3$  중에서 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE, 744 mg, 1 mmol)과 같은 지질을 프로피올산의 N-히드록시숙신이미드 에스테르 (167 mg, 1 mmol) 및  $Et_3N$  (202 mg, 2 mmol)과 혼합함으로써, 알킨-개질 지질을 제조하였다. 반응은 NMR에 의해 모니터링하였다. 실온에서 3시간 후, 반응이 완료되었다. 5 mL의 5%  $Na_2CO_3$ , 1% HCl 및 염수를 사용하여 유기 용액을 세척한 후,  $Na_2SO_4$ 하에서 건조하고, 증발시킨 후, 알킨-개질된 DOPE를 칭량하였다. 1:1의 몰비의 DOPC 및 알킨-DOPE를 포함하는 1.26  $\mu$ mol의 지질 필름을 제조하고, 수화시켜, 초음파처리한 후, 전기한 바와 같이 10 mM의  $Mg^{2+}$ 를 사용하여 융합되도록 유도하였다. 알킨-관능화 지질을 포함하는 MLV를 2.5 mM의  $CuSO_4$ , 구리 와이어, 및 1.5 mM의 1,14-디아지도-3,6,9,12-테트라옥사테트라데칸과 함께 실온에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 원심분리를 사용하여 3× 세척 후에, 입자 수율을 측정하였다.

[0080] 가교제

[0081] 가교제는 서로 결합되는 지질 이중층 내 반응성 기의 특성에 따라 동종이관능성(homobifunctional) 가교제 또는 이종이관능성(heterobifunctional) 가교제일 수 있다. "가교제" 및 "가교결합제"라는 용어는 본원에서 교환가능하게 사용된다. 동종이관능성 가교제는 2개의 동일한 반응성 기를 가진다. 이종이관능성 가교제는 2개의 서로 다른 반응성 기를 가진다.

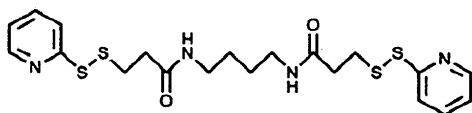
[0082] 일 경우에는, 인접한 이중층들은 동일한 관능화 지질 (또는 다른 이중층 성분) 및 가교제 (예컨대 동종이관능성 가교제)를 사용하여 서로 가교결합된다. 또 다른 경우에는, 인접한 이중층들이 서로 다른 관능화 지질 (또는 다른 이중층 성분) 및 가교제 (예컨대 이종이관능성 가교제)를 사용하여 서로 가교결합된다.

[0083] 다양한 유형의 상업적으로 입수가능한 가교제들이 하기의 기들 중 하나 이상에 대해 반응성이다: 말레이미드, 1급 아민, 2급 아민, 술포히드릴, 카르복실, 카르보닐 및 탄수화물. 아민-특이적 가교제의 예는 비스(술포숙신이미딜) 수베레이트, 비스[2-(숙신이미도옥시카르보닐옥시)에틸] 술포, 디숙신이미딜 수베레이트, 디숙신이미딜 타르타레이트, 디메틸 아디피메이트.2HCl, 디메틸 피멜리메이트.2HCl, 디메틸 수베라이미테이트.2HCl, 및 에틸렌 글리콜 비스-[숙신이미딜-[숙시네이트]]이다. 술포히드릴 기와 반응성인 가교제에는 비스말레이미도핵산, 1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오)-프로피온아미도]부탄, 1-[p-아지도살리실아미도]-4-[아이오도아세트아미도]부탄, 및 N-[4-(p-아지도살리실아미도)부틸]-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드가 포함된다. 주로 탄수화물과 반응성인 가교제에는 아지도벤조일 히드라진이 포함된다. 주로 카르복실 기와 반응성인 가교제에는 4-[p-아지도살리실아미도]부틸아민이 포함된다. 디티올티에틀 (DTT), 1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오)-프로피온아미도]부탄 (DPDPB), 및 일부 경우에는 티올 함유 중합체 예컨대 (PEG)-SH2와 같은 디티올 가교제는 말레이미드 반응성 기를 가교결합하는 데에 사용될 수 있다. DTT의 구조는 하기이다.



[0084]

[0085] DPDPB의 구조는 하기이다.



[0086]

- [0087] 알킨 기와 반응성인 가교제에는 디아지드, 예컨대 1,14-디아지도-3,6,9,12-테트라옥사테트라데칸, 및 "클릭" 화학과 상용성인 다른 기들이 포함된다.
- [0088] 아민 및 술폰히드릴과 반응하는 이중이관능성 가교제에는 N-숙신이미딜-3-[2-피리딜디티오]프로피오네이트, 숙신이미딜[4-아이오도아세틸]아미노벤조에이트, 숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]시클로hexan-1-카르복실레이트, m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르, 술폰숙신이미딜 6-[3-[2-피리딜디티오]프로피온아미도]헥사노에이트, 및 술폰숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]시클로hexan-1-카르복실레이트가 포함된다. 카르복실 및 아민 기와 반응하는 이중이관능성 가교-결합제에는 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]-카르보디이미드 히드로클로라이드가 포함된다. 탄수화물 및 술폰히드릴과 반응하는 이중이관능성 가교제에는 4-[N-말레이미도메틸]-시클로hexan-1-카르복실히드라이드.2HCl, 4-(4-N-말레이미도페닐)-부티르산 히드라이드.2HCl, 및 3-[2-피리딜디티오]프로피오닐 히드라이드가 포함된다. 기타 가교제로는 비스-[β-4-아지도살리실아미도)에틸]디설피드 및 글루타르알데히드가 있다.
- [0089] 가교제는 또한 바람직하게는 막 투과성 (또는 지질 가용성)이어서, 하나 이상의 MLV 중 이중층을 통하여 확산됨으로써 여러 인접 층들 사이에 가교결합을 수행할 수 있다. 임의의 약하게 극성/비하전인 이관능성 또는 이중이관능성 소형 분자가, 특히 해당 분자가 비제한적으로 말레이미드, 숙신이미딜 에스테르, 아지드, 티올 등과 같은 반응성 기를 포함하는 경우에는, 효과적인 막 투과성 가교제일 수 있다. 막 투과성 가교제의 예에는 DTT 및 1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오)-프로피온아미도]부탄 (DPDPB)이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0090] PEG화
- [0091] ICMV는 추가로 개질될 수 있다. 실시예에 기술되어 있는 바와 같이, ICMV는 그의 표면에서 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 접합될 수 있다. PEG화는 임상적으로 스텔스(STEALTH) 리포솜을 포함한 여러 작용제들의 반감기를 증가시키는 데에 사용된다. PEG화는 안정화된 MLV 표면상의 관능화 지질을 상보적인 관능화 PEG와 반응시키는 것에 의해 수행될 수 있다. 지질은 바람직하게는 ICMV 합성 전에는 PEG에 접합되지 않는데, 대신 PEG는 합성 후에 ICMV 외부 표면에 접합되거나, 또는 "후-삽입" 공정에 의해 입자의 외부 막 층에 PEG-지질 접합체가 도입된다.
- [0092] ICMV를 PEG화하는 데에 사용될 반응성 기들은 이중층을 가교결합시키는 데에 사용되는 것들과 동일할 수 있는데, 이 경우, 추가적인 관능화 지질 (또는 다른 관능화 성분)은 필요하지 않다. 예로서, ICMV가 말레이미드 관능화 지질을 포함하는 경우라면, 관능화된 PEG는 티올-PEG일 수 있다. 다르게는, 소포를 안정화하는 데에 사용되는 반응성 기는 PEG를 외부 표면에 접합시키는 데에 사용되는 것들과 다를 수 있다. 당업자라면, 소포 지질 이중층 내 관능화 지질 (또는 성분)에서의 반응성 기의 특성에 따라 다른 개질 버전의 PEG가 사용될 수 있다는 것을 알고 있을 것이다. 적합한 반응성 기에는 비제한적으로 아미노 기 예컨대 1급 및 2급 아민, 카르복실 기, 술폰히드릴 기, 히드록실 기, 알데히드 기, 아지드 기, 카르보닐, 말레이미드 기, 할로아세틸 (예컨대 아이오도아세틸) 기, 이미도에스테르 기, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 및 피리딜 디설피드 기가 포함된다.
- [0093] 표 2는 합성 직후 및 PBS 중에서 7일 후의 ICMV 직경에 대한 PEG화의 효과를 도시한다. 합성 직후, PEG화된 ICMV는 비-PEG화 ICMV에 비해 약간 더 큰 직경을 가진다 (예를 들면, 일 실험에서는, PEG화 ICMV 경우 272 +/- 39 nm이고, 이에 비해 비-PEG화 경우 234 +/- 45 nm임).
- [0094] 생성된 안정화 소포에 대해서는, 특히 크기 및 표면 전하 (예컨대 동적 광 산란에 의함), 해당 외부 표면에서의 지질의 분율 (예컨대 층판도(lamellarity) 검정에 의함), 거기에 또는 그를 통하여 도입되는 작용제의 양 (예컨대 FACS에 의함) 등을 측정하기 위하여, 다양한 시험들이 수행될 수 있다. 소포에 대하여 수행될 수 있는 다른 시험에는 공초점 현미경법 및 냉동-굴착(cryo-tunneling) 전자 현미경법 (TEM)이 포함된다.
- [0095] 하기의 표들은 안정화된 소포에 대하여 수행된 다양한 시험들의 결과를 제공한다.

[0096] <표 1A>

수율 %	지질 조성	완충제	양이온	DTT	인큐베이션
40	DOPC/GMPB (40:10:50)	10mM BTP pH 7.0	10mM MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	2 hr
45	DOPC/GMPB (40:10:50)	10mM BTP pH 7.0	10mM CaCl <sub>2</sub>	1.5mM	2 hr
0	DOPC/GMPB (40:10:50)	10mM BTP pH 7.0	10mM MgCl <sub>2</sub>		2 hr
5	DOPC/GMPB (40:10:50)	10mM BTP pH 7.0		15mM	2 hr
5	DOPC/GMPB (40:10:50)	10mM BTP pH 7.0		1.5mM	2 hr
0	DOPC/GMPB (40:10:50)	10mM BTP pH 7.0	20mM NaCl	1.5mM	2hr
0	DOPC/GMPB (40:10:50)	PBS pH7.0	10mM MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	2 hr
40	DOPC/GMPB (40:10:50)	PBS pH7.0	10mM MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	O/N
45	DOPC/GMPB (40:10:50)	10mM BTP pH 7.0	10mM MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	2 hr
15	DOPC/GMPB (60:15:25)	10mM BTP pH 7.0	10mM MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	2 hr
0	DOPC/GMPB (72:18:10)	10mM BTP pH 7.0	10mM MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	2 hr
0	DOPC/DOPG (80:20)	10mM BTP pH 7.0	10mM MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	2 hr
0	DOPC	10mM BTP pH 7.0	10mM MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	2 hr

합성 조건 변화에 따른 ICMV 수율

[0097]

[0098] <표 1B>

항목	지질 조성 (몰비) <sup>a</sup>	양이온 <sup>b</sup>	가교결합제 <sup>c</sup>	수율 % <sup>d</sup>
1	DOPC/DOPG/MPB (40:10:50)	MgCl <sub>2</sub>	DTT	45
2	DOPC/DOPG/MPB (40:10:50)	CaCl <sub>2</sub>	DTT	50
3	DOPC/DOPG/MPB (40:10:50)	20 mM NaCl	DTT	0
4	DOPC/DOPG/MPB (40:10:50)	MgCl <sub>2</sub>	-	0
5	DOPC/DOPG/MPB (40:10:50)	-	DTT	7
6	DOPC/DOPG/MPB (40:10:50)	-	15 mM DTT	4
7	DOPC/DOPG/MPB (60:15:25)	MgCl <sub>2</sub>	DTT	15
8	DOPC/DOPG/MPB (72:18:10)	MgCl <sub>2</sub>	DTT	0
9	DOPC/DOPG (80:20)	MgCl <sub>2</sub>	DTT	0
10	DOPC/DOPG/MPB (40:10:50)	MgCl <sub>2</sub>	DPDPB <sup>e</sup>	48
11	DOPC/DOPG/MPB (40:10:50)	MgCl <sub>2</sub>	(PEG)-SH <sub>2</sub> <sup>f</sup>	3

<sup>a</sup> pH 7.0에서 10 mM의 비스-트리스 프로판을 사용하여 수화; <sup>b</sup> 다르게 주지되지 않는 한 10 mM에서; <sup>c</sup> 다르게 주지되지 않는 한 1.5 mM에서

<sup>d</sup> 합성 및 14,000×g에서의 4분 동안의 원심분리 후 회수되는 지질 질량의 백분율

<sup>e</sup> 1,4-디-[3'-(2'-피리딜디티오)-프로피온아미도]부탄 (MW 482); <sup>f</sup> MW 2000

합성 조건 변화에 따른 ICMV 수율

[0099]



[0100] <표 2>

합성 단계 (도 2aa 및 2ab)	샘플	유체역학적 직경 <sup>a</sup> (nm)	다분산도 지수	제타 전위 (mV)	4°C에서 7일 후 직경 (nm)	동결건조 후 직경 (nm)	3% 수크로스 사용한 동결건조 후 직경 (nm)
(i)	리포솜	192 ± 39	0.385 ± 0.11	-0.141 ± 0.44	N/A	N/A	N/A
(ii)	Mg <sup>2+</sup> -융합 MLV	220 ± 26	0.217 ± 0.053	-0.151 ± 0.67	N/A	N/A	N/A
(iii)	ICMV	244 ± 17	0.223 ± 0.11	-0.415 ± 0.33	1610 ± 570	N/A	N/A
(iv)	PEG화 ICMV	263 ± 20	0.183 ± 0.025	-2.34 ± 0.44	265 ± 27	2960 ± 1800	269 ± 41

<sup>a</sup> 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정됨

<sup>b</sup> 층판도 검정에 의해 측정시, 이중중간-가교결합 후 감소된 소포 외부 표면상에 노출된 지질의 분율 (문헌 [Lutsiak et al. Pharm Res 19, 1480-1487 (2002)] 참조)

\* 모든 값은 평균±SD임

합성 공정 각 단계에서의 소포 특성화

[0101]

[0102]

작용제

[0103]

본 발명은 ICMV를 포함한 본 발명의 안정화 지질 소포를 사용한 생체 내 또는 시험관 내에서의 영역, 조직 또는 세포로의 작용제의 전달 (일부 경우에는 지속 전달 포함)을 고려한다. 본원에서 사용될 때, 작용제는 대상체에 대한 이익 (비제한적으로 예방적 또는 치료적 이익 포함)을 제공하는 데에 사용될 수 있거나, 또는 생체 내에서의 진단 및/또는 검출 (예를 들면 영상화)에 사용될 수 있거나, 또는 시험관 내 적용에서 용도를 가지는 소정의 원자 또는 분자 또는 화합물이다.

[0104]

본원에서 제공되는 ICMV와 같은 안정화된 MLV 내로 (전체에 걸친 것 포함) 그것이 캡슐화될 수 있거나, 또는 다르게는 거기에 보유될 수 있다는 전제하에, 어떠한 작용제도 본 발명의 조성물 (예를 들면 안정화된 MLV 예컨대 ICMV, 및 그의 제약 조성물을 포함한 그의 조성물) 및 방법을 사용하여 전달될 수 있다. 예를 들면, 작용제는 해당 소포에 대한 합성 및 임의로 저장 과정을 견디어야 할 수 있어야 한다. 소포는 예를 들면 바람직하게는 수크로스 기재 부형제와 함께 동결건조된 형태로 합성 및 저장될 수 있다. 합성 동안 소포에 도입될 경우, 작용제는 그와 같은 저장 절차 및 시간 동안 안정해야 한다.

[0105]

작용제는 비제한적으로 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 핵산, 소형 분자 (예컨대 유기 또는 무기에 관계없이, 화학물질) 약물, 바이러스-유사 입자, 스테로이드, 프로테오글리칸, 지질, 탄수화물, 및 이들의 유사체, 유도체, 혼합물, 융합체, 조합 또는 접합체일 수 있다. 작용제는 생체내에서 대사됨으로써 그의 활성인 (및/또는 안정한) 형태로 전환되는 전구약물일 수 있다.

[0106]

작용제는 자연 발생의 것이거나 비-자연 발생의 것일 수 있다. 자연 발생 작용제에는 소포가 투여되는 대상체에 의해 합성될 수 있는 것들이 포함된다. 비-자연 발생의 것은 식물, 동물, 미생물 또는 기타 살아있는 유기체에 의해 생산되는지에 관계없이, 정상적으로는 자연에는 존재하지 않는 것들이다.

[0107]

작용제의 일 종류는 (단일 또는 다중-사슬) 단백질 및 펩티드와 같은 펩티드-기재 작용제이다. 그 예에는 항체, 단일 사슬 항체, 항체 단편, 효소, 보조-인자(co-factor), 수용체, 리간드, 전사 인자 및 기타 조절 인자, 일부 항원 (하기에서 논의되는 바와 같음), 시토카인, 케모카인 등이 포함된다. 이러한 펩티드-기재 작용제는 자연 발생의 것일 수 있거나, 또는 자연 발생의 것은 아니나, 예컨대 유전적으로 조작된 세포의 사용을 통하여 대상 내에서 합성될 수 있다.

[0108]

본 발명의 소포를 사용하여 전달될 수 있는 또 다른 종류의 작용제에는 펩티드-기재의 것이 아닌 작용제들이 포함된다. 그 예에는 비-자연 발생의 것인 화합물, 또는 포유동물 (및 특히 인간) 세포에 의해서는 자연적으로 합성되지 않는 화합물이 포함된다.

[0109]

치료 또는 진단 목적으로 현재 사용되고 있는 다양한 작용제들이 본 발명에 따라 전달될 수 있는데, 여기에는 비제한적으로 영상화제, 면역조절제 예컨대 면역억제제 및 면역억제제, 항원, 아주반트, 시토카인, 케모카인, 항암제, 항-감염제, 핵산, 항체 또는 그의 단편, 융합 단백질 예컨대 시토카인-항체 융합 단백질, Fc-융합 단백질 등이 포함된다.

[0110]

**영상화제.** 본원에서 사용될 때, 영상화제는 신호를 방출하고, 그에 의해 직접 또는 간접적으로 생체 내에서의 그의 검출을 가능케 하는 작용제이다. 조영제 및 방사성 작용제와 같은 영상화제는 핵 의학 스캔 및 자기 공명 영상화 (MRI)와 같은 의료용 영상화 기술을 사용하여 검출될 수 있다. 자기 공명 영상화 (MRI)용 영상화제에는

Gd(DOTA), 산화철 또는 금 나노입자가 포함되며; 핵 의학용 영상화제에는 <sup>201</sup>Tl, 감마-방출 방사성핵종 <sup>99m</sup>Tc가 포함되고; 양전자-방출 단층촬영 (PET)용 영상화제에는 양전자-방출 동위원소, (18)F-플루오로데옥시글루코스 ((18)FDG), (18)F-플루오라이드, 구리-64, 가도아미드, 및 Pb(II)의 방사성동위원소 예컨대 <sup>203</sup>Pb 및 <sup>111</sup>In이 포함되며; 생체내 형광 영상화용 영상화제는 예컨대 형광 염료 또는 염료-접합 나노입자이다. 다른 실시양태에서, 전달될 작용제는 영상화제에 접합 또는 융합되거나, 또는 그와 혼합 또는 조합된다.

[0111] **면역자극제.** 본원에서 사용될 때, 면역자극제는 단독인지 또는 또 다른 작용제와의 조합인지에 관계없이, 그것이 투여되는 대상체에서 면역 반응 (기존의 면역 반응을 강화하는 것 포함)을 자극하는 작용제이다. 그 예에는 항원, 아주반트 (예컨대 TLR 리간드 예컨대 이미퀴모드 및 레시퀴모드, 이미다조퀴놀린, 비메틸화 CpG 디뉴클레오타이드를 포함하는 핵산, 모노포스포릴 지질 A (MPLA) 또는 기타 지질다당류 유도체, 단일-가닥 또는 이중-가닥 RNA, 플라젤린, 뮤라밀 디펩티드), 인터류킨을 포함한 시토카인 (예컨대 IL-2, IL-7, IL-15 (또는 이들 시토카인의 초효능제/돌연변이 형태), IL-12, IFN-감마, IFN-알파, GM-CSF, FLT3-리간드 등), 면역자극 항체 (예컨대 항-CTLA-4, 항-CD28, 항-CD3, 또는 이러한 분자들의 단일 사슬/항체 단편) 등이 포함된다.

[0112] **항원.** 항원은 비제한적으로 암 항원, 자체 또는 자가면역 항원, 미생물 항원, 알레르겐, 또는 환경적 항원일 수 있다. 항원은 자연상의 펩티드, 지질, 또는 탄수화물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0113] **암 항원.** 암 항원은 주로 암 세포에 의해 발현되는 항원으로써 (즉 비-암 세포에서에 비해 암 세포에서 더 고 농도로 발현됨), 일부 경우에는 암 세포에 의해서만 발현된다. 암 항원은 암 세포 내에서, 또는 암 세포의 표 면에서 발현될 수 있다. 암 항원은 MART-1/Melan-A, gp100, 아테노신 테아미나제-결합 단백질 (ADAbp), FAP, 시클로필린 b, 결합조직 관련 항원 (CRC)--C017-1A/GA733, 암배아 항원 (CEA), CAP-1, CAP-2, etv6, AML1, 전립선 특이적 항원 (PSA), PSA-1, PSA-2, PSA-3, 전립선-특이적 막 항원 (PSMA), T 세포 수용체/CD3-제타 사슬, 및 CD20일 수 있다. 암 항원은 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5으로 구성되는 군에서 선택될 수 있다. 암 항원은 GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9로 구성되는 군에서 선택될 수도 있다. 암 항원은 BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 티로시나제, p53, MUC 패밀리를 포함하며, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α-태아단백질, E-카드헤린, α-카테닌, β-카테닌, γ-카테닌, p120ctn, gp100<sup>Pmel117</sup>, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, 선종성 결장폴립증 단백질 (APC), 포드린, 코넥신 37, Ig-이디오타입, p15, gp75, GM2 ganglioside, GD2 ganglioside, 인간 유두종 바이러스 단백질, Smad 패밀리의 중앙 항원, Imp-1, P1A, EBV-코딩 핵 항원 (EBNA)-1, 뇌 글리코젠 포스포릴라제, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 및 CT-7, CD20, 및 c-erbB-2로 구성되는 군에서 선택될 수도 있다.

[0114] **미생물 항원.** 미생물 항원은 비제한적으로 박테리아, 바이러스, 진균, 기생충 및 미코박테리아 종과 같은 미생물 종으로부터 유래하는 항원이다. 따라서, 미생물 항원에는 박테리아 항원, 바이러스 항원, 진균 항원, 기생충 항원, 및 미코박테리아 항원이 포함된다. 박테리아, 바이러스, 진균, 기생충 및 미코박테리아 종의 예는 본원에 제공되어 있다. 미생물 항원은 미생물 종의 일부일 수 있거나, 또는 전체 미생물일 수 있다.

[0115] **알레르겐.** 알레르겐은 대상체에서 알레르기 또는 천식 반응을 유도할 수 있는 항원이다. 알레르겐에는 비제한적으로 화분, 곤충 독, 동물 비듬 먼지, 진균 포자 및 약물 (예컨대 페니실린)이 포함된다. 자연, 동물 및 식물 알레르겐의 예에는 하기 속 고유의 단백질들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다: 개(*Canine*) (*카니스 파밀리아리스*(*Canis familiaris*)); 먼지 진드기(*Dermatophagoides*) (예컨대 *더마토파고이테스 파리나에*(*Dermatophagoides farinae*)); 고양이(*Felis*) (*펠리스 도메스티쿠스*(*Felis domesticus*)); 암브로시아(*Ambrosia*) (*암브로시아 아르테미스폴리아*(*Ambrosia artemisiifolia*)); 롤리움(*Lolium*) (예컨대 *롤리움 페렌네*(*Lolium perenne*) 또는 *롤리움 멀티플로룸*(*Lolium multiflorum*)); 삼나무(*Cryptomeria*) (*크립토메리아 자포니카*(*Cryptomeria japonica*)); 알테르나리아(*Alternaria*) (*알테르나리아 알테르나타*(*Alternaria alternata*)); 알더(*Alder*); 알누스(*Alnus*) (*알누스 굴티노아사*(*Alnus gultinoasa*)); 베틀라(*Betula*) (*베틀라 베루코사*(*Betula verrucosa*)); 퀘르쿠스(*Quercus*) (*퀘르쿠스 알바*(*Quercus alba*)); 올레아(*Olea*) (*올레아 유로파*(*Olea europa*)); 아르테미시아(*Artemisia*) (*아르테미시아 불가리스*(*Artemisia vulgaris*)); 플라타고(*Plantago*) (예컨대 *플라타고 란세올라타*(*Plantago lanceolata*)); 파리에타리아(*Parietaria*) (예컨대 *파리에타리아 오피시날리스*(*Parietaria officinalis*) 또는 *파리에타리아 주다이카*(*Parietaria judaica*)); 블라텔라(*Blattella*) (예컨대 *블라텔라 게르마니카*(*Blattella germanica*)); 아피스(*Apis*) (예컨대 *아피스 멀티플로룸*(*Apis multiflorum*)); 쿠프레수스(*Cupressus*) (예컨대 *쿠프레수스 셉페르비렌스*(*Cupressus sempervirens*), *쿠프레수스 아리조니카*

(*Cupressus arizonica*) 및 *쿠프레수스 마크로카르파(Cupressus macrocarpa)*); *주니페루스(Juniperus)* (예컨대 *주니페루스 사비노이데스(Juniperus sabinoides)*, *주니페루스 버지니아나(Juniperus virginiana)*, *주니페루스 콤무니스(Juniperus communis)* 및 *주니페루스 아스헤이(Juniperus ashei)*); *투이아(Thuya)* (예컨대 *투이아 오리엔탈리스(Thuya orientalis)*); *카마에시파리스(Chamaecyparis)* (예컨대 *카마에시파리스 오브투스(Chamaecyparis obtusa)*); *페리플라네타(Periplaneta)* (예컨대 *페리플라네타 아메리카나(Periplaneta americana)*); *아그로피론(Agrophyron)* (예컨대 *아그로피론 레펜스(Agrophyron repens)*); *세칼레(Secale)* (예컨대 *세칼레 세레알레(Secale cereale)*); *트리티쿰(Triticum)* (예컨대 *트리티쿰 아에스터븀(Triticum aestivum)*); *닥틸리스(Dactylis)* (예컨대 *닥틸리스 글로메라타(Dactylis glomerata)*); *페스투카(Festuca)* (예컨대 *페스투카 엘라티오르(Festuca elatior)*); *포아(Poa)* (예컨대 *포아 프라텐시스(Poa pratensis)* 또는 *포아 콤프레사(Poa compressa)*); *아베나(Avena)* (예컨대 *아베나 사티바(Avena sativa)*); *홀쿠스(Holcus)* (예컨대 *홀쿠스 라나투스(Holcus lanatus)*); *안투산툼(Anthoxanthum)* (예컨대 *안투산툼 오도라툼(Anthoxanthum odoratum)*); *아레나테룸(Arrhenatherum)* (예컨대 *아레나테룸 엘라티우스(Arrhenatherum elatius)*); *아그로스티스(Agrostis)* (예컨대 *아그로스티스 알바(Agrostis alba)*); *플레움(Phleum)* (예컨대 *플레움 프라텐세(Phleum pratense)*); *팔라리스(Phalaris)* (예컨대 *팔라리스 아룬디나세아(Phalaris arundinacea)*); *파스팔룸(Paspalum)* (예컨대 *파스팔룸 노트툼(Paspalum notatum)*); *소르굼(Sorghum)* (예컨대 *소르굼 할레펜시스(Sorghum halepensis)*); 및 *브로무스(Bromus)* (예컨대 *브로무스 이네르미스(Bromus inermis)*).

[0116] **아주반트.** 아주반트는 비제한적으로 알룸 (예컨대 수산화 알루미늄, 인산 알루미늄); *큐. 사포나리아(Q. saponaria)* 나무의 수피에서 정제된 사포닌 예컨대 QS21 (HPLC 분별 (안티제닉스, 인크.(Antigenics, Inc.)), 메사추세츠 워체스터 소재)에서 21번째 피크에 용리되는 글리코지질; 폴리[디(카르복실레이토페녹시)포스파젠 (PCPP 중합체; 바이러스 리서치 인스티튜트(Virus Research Institute), 미국 소재), Flt3 리간드, *리슈마니아(Leishmania)* 연장 인자 (정제된 *리슈마니아* 단백질; 코릭사 코포레이션(Corixa Corporation), 워싱턴 시애틀 소재), ISCOMS (혼합 사포닌, 지질을 함유하며 항원을 보유할 수 있는 포자와 바이러스-크기의 입자를 형성하는 면역자극 복합체; CSL, 호주 멜버른 소재), Pam3Cys, SB-AS4 (알룸 및 MPL을 함유하는 스미스클라인 비캠 (SmithKline Beecham) (벨기에 SBB 소재) 아주반트 시스템 #4), 미셀(micelle)을 형성하는 비-이온성 블록 공중합체 예컨대 CRL 1005 (이것은 폴리옥시에틸렌의 사슬이 측면동반된 소수성 폴리옥시프로필렌의 선형 사슬을 함유함, 박셀, 인크.(Vaxcel, Inc.), 조지아 노르트로스 소재), 및 몬타니드(Montanide) IMS (예컨대 IMS 1312, 가용성 면역자극제와 조합된 수-기재 나노입자, 세픽(Seppic))일 수 있다.

[0117] 아주반트는 TLR 리간드일 수 있다. TLR3을 통하여 작용하는 아주반트에는 비제한적으로 이중-가닥 RNA가 포함된다. TLR4를 통하여 작용하는 아주반트에는 비제한적으로 지질다당류의 유도체 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPLA; 리비 이뮤노켄 리서치, 인크.(Ribi ImmunoChem Research, Inc.) 사, 몬타나 해밀턴 소재), 및 뮤라밀 디펩티드 (MDP; 리비) 및 트레오닐-뮤라밀 디펩티드 (t-MDP; 리비); OM-174 (지질 A 관련 글루코사민 디사카라이드; OM 파르마 SA(OM Pharma SA), 스위스 메이린 소재)가 포함된다. TLR5를 통하여 작용하는 아주반트에는 비제한적으로 플라젤린이 포함된다. TLR7 및/또는 TLR8을 통하여 작용하는 아주반트에는 단일-가닥 RNA, 올리고리보뉴클레오티드 (ORN), 합성 저분자량 화합물 예컨대 이미다조퀴놀린아민 (예컨대 이미퀴모드 (R-837), 레시퀴모드 (R-848))이 포함된다. TLR9를 통하여 작용하는 아주반트에는 바이러스 또는 박테리아 기원의 DNA, 또는 합성 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN), 예컨대 CpG ODN이 포함된다. 또 다른 아주반트 종류는 포스포로티오 에이트 함유 분자 예컨대 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 유사체 및 포스포로티오에이트 골격 결합을 함유하는 핵산이다.

[0118] **면역억제제.** 본원에서 사용될 때, 면역억제제는 단독인지 또는 또 다른 작용제와의 조합인지에 관계없이, 그것이 투여되는 대상체에서 면역 반응을 억제하는 작용제이다. 그 예에는 스테로이드, 레티노산, 텍사메타손, 시클로포스파미드, 항-CD3 항체 또는 항체 단편, 및 기타 면역억제제들이 포함된다.

[0119] **항암제.** 본원에서 사용될 때, 항암제는 짧은 기간 동안만이라 할지라도 암과 관련된 전체 또는 부분적 증상을 억제하는 것을 포함하여, 암의 발병 또는 진행을 적어도 부분적으로 억제하는 작용제이다. 몇 가지 항암제들은 DNA 손상 작용제로 범주화될 수 있는데, 여기에는 토포이소머라제 억제제 (예컨대 에토포시드, 램프토테신, 토포테칸, 테니포시드, 미톡산트론), DNA 알킬화제 (예컨대 시스플라틴, 메클로레타민, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 멜팔란, 코람부실, 부솔판, 티오테파, 카르무스틴, 로무스틴, 카르보플라틴, 다카르바진, 프로카르바진), DNA 가닥 파괴 유도제 (예컨대 블레오마이신, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 미토마이신 C), 항-미세소관제 (예컨대 빈크리스틴, 빈블라스틴), 항-대사제 (예컨대 시타라빈, 메토틱세이트, 히드록시우레아, 5-플루오로우라실, 플록수리딘, 6-티오구아닌, 6-메르캅토피린, 플루다라빈, 쉐토스타틴, 클로로데옥



시아테노신), 안트라시클린, 빈카 알칼로이드 또는 에피포도필로톡신이 포함된다.

[0120] 항암제의 예에는 비제한적으로 아시비신; 아클라루비신; 아코다줄 히드로클로라이드; 아크로닌; 아도젤레신; 알테스류킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테트이미드; 암사클린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스페를린; 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조데파; 비칼루타미드; 비산트렌 히드로클로라이드; 비스나피드 디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 술페이트; 보르테조미브 (벨케이드(VELCADE)); 브레퀴나르 나트륨; 브로피리딘; 부솔판; 각티노마이신; 칼루스테론; 카라세미드; 카르베티메르; 카르보플라틴 (백금-함유 요법); 카르무스틴; 카루비신 히드로클로라이드; 카르젤레신; 세데핑골; 클로람부실; 시롤레마이신; 시스플라틴 (백금-함유 요법); 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 시클로포스파미드; 시타라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신; 데시타빈; 텍소르마플라틴; 데자구아닌; 디아지쿠온; 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)); 독소루비신; 드롤록시펜; 드로모스타놀론; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로르니틴; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신; 에르블로졸; 에를로티니브 (타르세바(TARCEVA)); 에소루비신; 에스트라무스틴; 에타니다졸; 에토포시드; 에토프린; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티니드; 플루숙리딘; 플루다라빈; 5-플루오로우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신; 제피티니브 (이레싸(IRESSA)); 켈시타빈; 히드록시우레아; 이다루비신; 이포스파미드; 일모포신; 이마티니브 메실레이트 (글리박(GLEEVEC)); 인터페론 알파-2a; 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 인터페론 베타-1a; 인터페론 감마-1b; 이프로플라틴; 이리노테칸; 란레오티드; 레날리도미드 (레블리미드(REVLIMID), 레비미드(REVIMID)); 레트로졸; 류프롤리드; 리아로졸; 로메트렉솔; 로무스틴; 로속산트론; 마소프로콜; 마이탄신; 메클로레타민; 메게스트롤; 멜렌게스트롤; 멜팔란; 메노가릴; 메르캅토피린; 메토트렉세이트; 메토프린; 메투레데파; 미틴도미드; 미토카르신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스페르; 미토탄; 미톡산트론; 미코페놀산; 노코다줄; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페메트렉세드 (알림타(ALIMTA)); 페가스파르가세; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 펜토몬; 페플로마이신; 페르포스파미드; 피포브로만; 피포술판; 피리트렉십 이세티오네이트; 피록산트론; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피메르; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카르바진; 푸로마이신; 피라조핀; 리보프린; 로글레티미드; 사핑골; 세무스틴; 심트라젠; 시토글루시드; 스파르포세이트; 스파르소마이신; 스피로게르마니움; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트랩토니그린; 스트랩토조신; 술로페누르; 탈리소마이신; 탐솔로신; 탁솔; 탁소테레; 테코갈란; 테가푸르; 텔록산트론; 테모포르핀; 테모졸로미드 (테모다르(TEMODAR)); 테니포시드; 테록시론; 테스톨락톤; 탈리도미드 (탈로미드(THALOMID)) 및 그의 유도체; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조핀; 티라파자민; 토포테칸; 토레미펜; 트레스톨론; 트리시리빈; 트리메트렉세이트; 트리프로렐린; 튜블로졸; 우라실 무스타르드; 우레데파; 바프레오티드; 베르테포르핀; 빈블라스틴; 빈크리스틴; 빈데신; 비네피딘; 빈글리시네이트; 빈류로신; 비노렐빈; 빈로시딘; 빈줄리딘; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신이 포함된다.

[0121] 항암제는 비제한적으로 티로신 키나제 억제제, CDK 억제제, MAP 키나제 억제제, 또는 EGFR 억제제를 포함한 효소 억제제일 수 있다. 티로신 키나제 억제제는 비제한적으로 게니스테인 (4',5,7-트리히드록시이소플라본), 티르포스틴 25 (3,4,5-트리히드록시페닐)메틸렌]-프로판디니트릴, 헤르비마이신 A, 다이드제인 (4',7-디히드록시이소플라본), AG-126, 트랜스-1-(3'-카르복시-4'-히드록시페닐)-2-(2",5"-디히드록시페닐)에탄, 또는 HDBA (2-히드록시-5-(2,5-디히드록시벤질아미노)-2-히드록시벤조산일 수 있다. CDK 억제제는 비제한적으로 p21, p27, p57, p15, p16, p18, 또는 p19일 수 있다. MAP 키나제 억제제는 비제한적으로 KY12420 (C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>), CNI-1493, PD98059, 또는 4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸술폰페닐 페닐)-5-(4-피리딜) 1H-이미다졸일 수 있다. EGFR 억제제는 비제한적으로 에를로티니브 (타르세바), 제피티니브 (이레싸), WHI-P97 (퀴나졸린 유도체), LFM-A12 (레플루노미드 대사물 유사체), ABX-EGF, 라파티니브, 카네르티니브, ZD-6474 (작티마(ZACTIMA)), AEE788, 및 AG1458 일 수 있다.

[0122] 항암제는 비제한적으로 베바시주마브 (아바스틴(AVASTIN)), 라니비주마브 (루센티스(LUCENTIS)), 페가프타니브 (마쿠젠(MACUGEN)), 소라페니브, 수니티니브 (수텐트(SUTENT)), 바탈라니브, ZD-6474 (작티마), 아네코르타베 (레타아네(RETAAANE)), 스쿠알라민 락테이트, 및 세마포린을 포함한 VEGF 억제제일 수 있다.

[0123] 항암제는 비제한적으로 베바시주마브 (아바스틴), 트라스투주마브 (헤르세프틴(HERCEPTIN)), 알렘투주마브 (캄파트(CAMPATH)), B 세포 만성 림프구성 백혈병용으로 표시되어 있음), 켈투주마브 (밀로타르그(MYLOTARG)), hP67.6, 항-CD33, 급성 골수성 백혈병과 같은 백혈병으로 표시되어 있음), 리투시마브 (리투산(RITUXAN)), 도시투모마브 (벡사르(BEXXAR)), 항-CD20, B 세포 암용으로 표시되어 있음), MDX-210 (HER-2/neu 중양유전자 단백질 생성물, 및 이뮤노글로불린 G (IgG)를 위한 유형 I Fc 수용체 (Fc 감마 RI)에 동시에 결합하는 이특이적 항체), 오레고보마브 (오바렉스(OVAREX)), 난소암용으로 표시되어 있음), 에드레콜로마브 (파노렉스(PANOREX)), 다클리

주마브 (제나팍스(ZENAPAX)), 팔리비주마브 (시나지스(SYNAGIS), RSV 감염과 같은 호흡기 이상용으로 표시되어 있음), 이브리투모마브 티옥세탄 (제발린(ZEVALIN), 비-호지킨 림프종용으로 표시되어 있음), 세톡시마브 (에르비투스(ERBITUX)), MDX-447, MDX-22, MDX-220 (항-TAG-72), IOR-C5, IOR-T6 (항-CD1), IOR EGF/R3, 셀로고바브 (온코센트(ONCOSCINT) OV103), 에프라투주마브 (림포시드(LYMPHOCIDE)), 캄투모마브 (테라긴(THERAGYN)), 및 글리오마브-H (뇌암, 흑색종용으로 표시되어 있음)를 포함한 항체 또는 항체 단편일 수 있다.

[0124] **조혈 분화제.** 본 작용제는 하나 이상 계통으로의 조혈 선조 세포의 분화를 자극하는 것일 수 있다. 그 예에는 비제한적으로 IL-3, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, 트롬보포에이틴, 에리트로포에이틴, Wnt5A, Wnt11A 등이 포함된다.

[0125] **조혈 자가-재생제.** 본 작용제는 조혈모세포의 자가-재생(self-renewal)을 자극하는 것일 수 있다. 그 예에는 비제한적으로 kit 리간드, GSK3-베타 억제제, SLF와 함께인 Wnt5A, 노치1 활성화제, Lnk 억제제, 프로스타글란딘 E2 (PGE2)가 포함되며, PGE2, PGI2, 리놀레산, 13(s)-HODE, LY171883, 미드산, 에이코사트리엔산, 에폭시 에이코사트리엔산, ONO-259, Cay1039, 16,16-디메틸 PGE2인 PGE2 수용체 효능제, 19(R)-히드록시 PGE2, 16,16-디메틸 PGE2 p-(p-아세트아미도벤즈아미도) 페닐 에스테르, 11-데옥시-16,16-디메틸 PGE2, 9-데옥시-9-메틸렌-16,16-디메틸 PGE2, 9-데옥시-9-메틸렌 PGE2, 부타프로스트, 술프로스토, PGE2 세리놀 아마이드, PGE2 메틸 에스테르, 16-페닐 테트라노르 PGE2, 15(S)-15-메틸 PGE2, 15(R)-15-메틸 PGE2, BIO, 8-브로모-cAMP, 포르스콜린, 바프타-AM, 펜딜린, 니카르디핀, 니페디핀, 피모지드, 스트로판티딘, 리나토시드, L-Arg, 나트륨 니트로프루시드, 나트륨 바나데이트, 브라디키닌, 메베베린, 플루란드레놀리드, 아테놀롤, 핀돌롤, 가복사돌, 키누렌산, 히드랄라진, 티아벤다졸, 비쿠클린, 베사미콜, 페루보시드, 이미프라민, 클로르프로파미드, 1,5-헨타메틸렌테트라졸, 4-아미노피리딘, 디아족시드, 벤포티아민, 12-메톡시도데센산, N-포르밀-Met-Leu-Phe, 갈라민, IAA 94, 클로로트리아니센, 및 이들의 유도체 등을 포함하여, PGE2 경로를 자극하는 작용제들이 포함된다.

[0126] **항-감염제.** 본 작용제는 비제한적으로 항-박테리아제, 항-바이러스제, 항-기생충제, 항-진균제, 및 항-미코박테리아제를 포함한 항-감염제일 수 있다.

[0127] **항-박테리아제**는 비제한적으로 β-락탐 항생제, 페니실린 (예컨대 천연 페니실린, 아미노페니실린, 페니실리나제-내성 페니실린, 카르복시 페니실린, 우레이도 페니실린), 세팔로스포린 (제1 세대, 제2 세대, 및 제3 세대 세팔로스포린), 기타 β-락탐들 (예컨대 이미페넴, 모노박탐), β-락타마제 억제제, 반코마이신, 아미노글리코시드 및 스펙티노마이신, 테트라시클린, 클로르암페니콜, 에리트로마이신, 린코마이신, 클린다마이신, 리팜핀, 메트로니다졸, 폴리믹신, 술폰아미드 및 트리메토프림, 또는 퀴놀린일 수 있다.

[0128] 기타 항-박테리아제는 비제한적으로 아세다손; 아세토솔폰 나트륨; 알라메신; 알렉시딘; 암디노실린; 암디노실린 피복질; 아미시클린; 아미플록사신; 아미플록사신 메실레이트; 아미카신; 아미카신 술페이트; 아미노살리실산; 아미노살리실레이트 나트륨; 아목시실린; 암포마이신; 암피실린; 암피실린 나트륨; 아팔실린 나트륨; 아프라마이신; 아스파르토신; 아스트로미신 술페이트; 아빌라마이신; 아보파르신; 아지트로마이신; 아즐로실린; 아즐로실린 나트륨; 바캄피실린 히드로클로라이드; 바시트라신; 바시트라신 메틸렌 디살리실레이트; 바시트라신 아연; 밤베르마이신; 벤조일파스 칼슘; 베리트로마이신; 베타미신 술페이트; 비아페넴; 비니라마이신; 비펜아민 히드로클로라이드; 비스피리티온 마그슘염; 부티카신; 부티로신 술페이트; 카프레오마이신 술페이트; 카르바독스; 카르베니실린 디나트륨; 카르베니실린 인다닐 나트륨; 카르베니실린 페닐 나트륨; 카르베니실린 칼슘; 카루모남 나트륨; 세파클로르; 세파드록실; 세파만돌; 세파만돌 나페이트; 세파만돌 나트륨; 세파파롤; 세파트리진; 세파자플루르 나트륨; 세파졸린; 세파졸린 나트륨; 세프부페라존; 세프디니르; 세페팜; 세페팜 히드로클로라이드; 세페테콜; 세픽심; 세프메녹심 히드로클로라이드; 세프메타졸; 세프메타졸 나트륨; 세포니시드 모노나트륨; 세포니시드 나트륨; 세포페라존 나트륨; 세포라니드; 세포탁심 나트륨; 세포테탄; 세포테탄 디나트륨; 세포티암 히드로클로라이드; 세폭시틴; 세폭시틴 나트륨; 세프피미졸; 세프피미졸 나트륨; 세프피라미드; 세프피라미드 나트륨; 세프피롬 술페이트; 세프포독심 프록세틸; 세프프로질; 세프록사딘; 세프솔로딘 나트륨; 세프타지담; 세프티부텐; 세프티죽심 나트륨; 세프트리악손 나트륨; 세푸록심; 세푸록심 약세틸; 세푸록심 피복세틸; 세푸록심 나트륨; 세파세틸 나트륨; 세팔렉신; 세팔렉신 히드로클로라이드; 세팔로글리신; 세팔로리딘; 세팔로틴 나트륨; 세파피린 나트륨; 세프라딘; 세토시클린 히드로클로라이드; 세토페니콜; 클로르암페니콜; 클로람페니콜 팔미테이트; 클로르암페니콜 펜토테네이트 복합체; 클로르암페니콜 나트륨 숙시네이트; 클로르헥시딘 포스파닐레이트; 클로록실레놀; 클로르테트라시클린 비술페이트; 클로르테트라시클린 히드로클로라이드; 시녹사신; 시프로플록사신; 시프로플록사신 히드로클로라이드; 시클레마이신; 클라리트로마이신; 클리나플록사신 히드로클로라이드; 클린다마이신; 클린다마이신 히드로클로라이드; 클린다마이신 팔미테이트 히드로클로라이드; 클린다마이신 포스페이트; 클로파지민; 클록사실린 벤자틴; 클록사실린 나트륨; 클록시퀸; 콜리스티메테이트 나트륨; 콜리스틴 술페이트; 쿠메르마이신; 쿠메르마이신 나트륨; 시클라실린; 시클로세린; 달포프리스틴;

다프손; 다프토마이신; 데메클로시클린; 데메클로시클린 히드로클로라이드; 데메시클린; 데노퐁진; 디아베리딘; 디클록사실린; 디클록사실린 나트륨; 디히드로스트렙토마이신 술페이트; 디피리티온; 디리트로마이신; 독시시클린; 독시시클린 칼슘; 독시시클린 포스포텍스; 독시시클린 히클레이트; 드록사신 나트륨; 예녹사신; 예피실린; 예피테트라시클린 히드로클로라이드; 에리트로마이신; 에리트로마이신 아시스트레이트; 에리트로마이신 에스톨레이트; 에리트로마이신 에틸숙시네이트; 에리트로마이신 글루세프테이트; 에리트로마이신 락토비오네이트; 에리트로마이신 프로피오네이트; 에리트로마이신 스테아레이트; 에탐부톨 히드로클로라이드; 에티온아미드; 플레록사신; 플록사실린; 플루달라닌; 플루메퀸; 포스포마이신; 포스포마이신 트로메타민; 푸목시실린; 푸라졸람 클로라이드; 푸라졸람 타르트레이트; 푸시데이트 나트륨; 푸시드산; 겐타미신 술페이트; 글록시모남; 그라미시딘; 할로프로진; 헤타실린; 헤타실린 칼륨; 핵세딘; 이바플록사신; 이미페뎀; 이소코나졸; 이세파미신; 이소니아지드; 조사마이신; 카나마이신 술페이트; 기타사마이신; 레보푸랄타돈; 레보프로필실린 칼륨; 렉시트로마이신; 린코마이신; 린코마이신 히드로클로라이드; 로메플록사신; 로메플록사신 히드로클로라이드; 로메플록사신 메실레이트; 로라카르베프; 마페니드; 메클로시클린; 메클로시클린 술폰살리실레이트; 메갈로미신 칼륨 포스페이트; 메퀴독스; 메로페넴; 메타시클린; 메타시클린 히드로클로라이드; 메텐아민; 메텐아민 히푸레이트; 메텐아민 만델레이트; 메티실린 나트륨; 메티오프림; 메트로니다졸 히드로클로라이드; 메트로니다졸 포스페이트; 메즐로실린; 메즐로실린 나트륨; 미노시클린; 미노시클린 히드로클로라이드; 미린카마이신 히드로클로라이드; 모넨신; 모넨신 나트륨; 나프실린 나트륨; 날리딕세이트 나트륨; 날리딕산; 나타마이신; 네브라마이신; 네오마이신 팔미테이트; 네오마이신 술페이트; 네오마이신 운데실레네이트; 네틸미신 술페이트; 뉴트라마이신; 니푸라텔; 니푸랄테존; 니푸라텔; 니푸라트론; 니푸르다질; 니푸리미드; 니푸르피리놀; 니푸르퀴나졸; 니푸르티아졸; 니트로시클린; 니트로푸란토인; 니트로미드; 노르플록사신; 노보비오신 나트륨; 오폴록사신; 오르메토프림; 옥사실린 나트륨; 옥시모남; 옥시모남 나트륨; 옥솔린산; 옥시테트라시클린; 옥시테트라시클린 칼슘; 옥시테트라시클린 히드로클로라이드; 팔디마이신; 파라클로로페놀; 파울로마이신; 페플록사신; 페플록사신 메실레이트; 페나메실린; 페니실린 G 벤자틴; 페니실린 G 칼륨; 페니실린 G 프로카인; 페니실린 G 나트륨; 페니실린 V; 페니실린 V 벤자틴; 페니실린 V 히드라바민; 페니실린 V 칼륨; 펜티지돈 나트륨; 페닐 아미노살리실레이트; 피페라실린 나트륨; 피르베니실린 나트륨; 피리디실린 나트륨; 피를리마이신 히드로클로라이드; 피탐피실린 히드로클로라이드; 피탐피실린 과모에이트; 피탐피실린 프로베네이트; 폴리믹신 B 술페이트; 포르피로마이신; 프로피카신; 피라진아미드; 피리티온 아연; 퀴데카민 아세테이트; 퀴누프리스트인; 라세페니콜; 라모플라닌; 라니마이신; 렐로마이신; 레프로미신; 리파부틴; 리파메탄; 리파맥실; 리파미드; 리팜핀; 리파헨틴; 리팍시민; 롤리테트라시클린; 롤리테트라시클린 니트레이트; 로사라미신; 로사라미신 부티레이트; 로사라미신 프로피오네이트; 로사라미신 나트륨 포스페이트; 로사라미신 스테아레이트; 로속사신; 록사르손; 록시트로마이신; 산시클린; 산페트리넴 나트륨; 사르목시실린; 사르피실린; 스코파퐁진; 시소미신; 시소미신 술페이트; 스파르플록사신; 스펙티노마이신 히드로클로라이드; 스피라마이신; 스타리마이신 히드로클로라이드; 스테피마이신; 스트렙토마이신 술페이트; 스트렙토니코지드; 술폰벤즈; 술폰벤즈아미드; 술폰세타미드; 술폰세타미드 나트륨; 술폰시틴; 술폰디아진; 술폰디아진 나트륨; 술폰독신; 술폰팔렌; 술폰메라진; 술폰메테르; 술폰메타진; 술폰메티졸; 술폰페톡사졸; 술폰파노메톡신; 술폰파몰; 술폰닐레이트 아연; 술폰니트란; 술폰살라진; 술폰소미졸; 술폰피아졸; 술폰자메트; 술폰스옥사졸; 술폰스옥사졸 아세틸; 술폰스옥사졸 디올아민; 술폰믹신; 술폰페넴; 술폰미실린; 순실린 나트륨; 탈람피실린 히드로클로라이드; 테이코플라닌; 테마플록사신 히드로클로라이드; 데모실린; 테트라시클린; 테트라시클린 히드로클로라이드; 테트라시클린 포스페이트 복합체; 테트록소프림; 티암페니콜; 티펜실린 칼륨; 티카르실린 크레질 나트륨; 티카르실린 디나트륨; 티카르실린 모노나트륨; 티클라톤; 티오도늄 클로라이드; 토브라마이신; 토브라마이신 술페이트; 토수플록사신; 트리메토프림; 트리메토프림 술페이트; 트리 술폰피리미딘; 트롤레안도마이신; 트로스펙토마이신 술페이트; 티로트리신; 반코마이신; 반코마이신 히드로클로라이드; 비르기니아마이신; 또는 조르바마이신일 수 있다. 항-미코박테리아제는 비제한적으로 미암부톨 (에탐부톨 히드로클로라이드), 다프손 (4,4'-디아미노디페닐술폰), 파제르 과립 (아미노살리실산 과립), 프리프틴 (리파헨틴), 피라진아미드, 이소니아지드, 리파딘 (리팜핀), 리파딘 IV, 리파메이트 (리팜핀 및 이소니아지드), 리파테르 (리팜핀, 이소니아지드, 및 피라진아미드), 스트렙토마이신 술페이트 또는 트레케이터-SC (에티온아미드)일 수 있다.

[0129] 항-바이러스제는 비제한적으로 아만티딘 및 리만타딘, 리비바린, 아시클로비르, 비다라빈, 트리플루오로티미딘, 간시클로비르, 지도부딘, 레티노비르 및 인터페론일 수 있다.

[0130] 항-바이러스제는 또한 비제한적으로 아세만난; 아시클로비르, 아시클로비르 나트륨; 아데포비르; 알로부딘; 알비르셉트 수도독스; 아만타딘 히드로클로라이드; 아라노틴; 아렐돈; 아테비르딘 메실레이트; 아브리딘; 시도포비르; 시팜필린; 시타라빈 히드로클로라이드; 텔라비르딘 메실레이트; 데씨클로비르; 디다노신; 디속사릴; 에독

수딘; 엔비라덴; 엔비록심; 팜시클로비르; 파모틴 히드로클로라이드; 피아시타빈; 피알루리딘; 포사틸레이트; 포스카르네트 나트륨; 포스포네트 나트륨; 간시클로비르; 간시클로비르 나트륨; 이독수리딘; 케톡살; 라미부딘; 로부카비르; 메모틴 히드로클로라이드; 메티사존; 네비라핀; 펜시클로비르; 피로다비르; 리바비린; 리만타딘 히드로클로라이드; 사퀴나비르 메실레이트; 소만타딘 히드로클로라이드; 소리부딘; 스타톨론; 스타부딘; 티로론 히드로클로라이드; 트리플루리딘; 발바시클로비르 히드로클로라이드; 비다라빈; 비다라빈 포스페이트; 비다라빈 나트륨 포스페이트; 비록심; 잘시타빈; 지도부딘; 진비록심 또는 인테그라제 억제제일 수 있다.

[0131] 항-진균제는 비제한적으로 이미다졸 및 트리아졸, 폴리엔 마크롤리드 항생제, 그리세오폴빈, 암포테리신 B, 및 플루시토실일 수 있다. 항기생충제에는 중금속, 향말라리아 퀴놀린, 염산 길항제, 니트로이미다졸, 벤즈이미다졸, 아베르멕틴, 프락시쿠안텔, 오르니틴 데카르복실라제 억제제, 페놀 (예컨대 비티오놀, 니클로사미드); 합성 알칼로이드 (예컨대 데히드로에메틴); 피페라진 (예컨대 디에틸카르바마진); 아세트아닐리드 (예컨대 딜록사니드 푸로네이트); 할로젠화 퀴놀린 (예컨대 아이오도퀴놀 (디아이오도히드록시퀴)); 니트로퓨란 (예컨대 니푸르티목스); 디아미딘 (예컨대 펜타미딘); 테트라히드로피리미딘 (예컨대 피란텔 파모에이트); 또는 술페이트화 나프틸아민 (예컨대 수라민)이 포함된다. 기타 항-감염제는 비제한적으로 디플록사신 히드로클로라이드; 라우릴 이소퀴놀리늄 브로미드; 목사락탐 디나트륨; 오르니다졸; 펜티소미신; 사라플록사신 히드로클로라이드; HIV 및 기타 레트로바이러스의 프로테아제 억제제; HIV 및 기타 레트로바이러스의 인테그라제 억제제; 세파클로르 (세클로르); 아시클로비르 (조비락스); 노르플록사신 (노록신); 세프시탄 (메폭신); 세푸록심 약제질 (세프틴); 시프로플록사신 (시프로); 아미나크린 히드로클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 비티오놀레이트 나트륨; 브롬클로레논; 카르바미드 피옥시드; 세탈코늄 클로라이드; 세틸피리디늄 클로라이드; 클로르헥시딘 히드로클로라이드; 클리오퀴놀; 도미펜 브로미드; 펜티클로르; 플루다조늄 클로라이드; 염기성 푸크신; 푸라졸리돈; 겐티안 바이올렛; 할퀴놀; 헥사클로로펜; 과산화수소; 이크탐몰; 이미데실 아이오딘; 아이오딘; 이소프로필 알콜; 마페니드 아세테이트; 메탈레인 나트륨; 메르큐페놀 클로라이드; 암모니아화 수은; 메틸벤제토늄 클로라이드; 니트로퓨라존; 니트로메르솔; 옥테니딘 히드로클로라이드; 옥시클로로센; 옥시클로로센 나트륨; 캄포화 파라클로로페놀; 칼륨 퍼망가네이트; 포비돈-아이오딘; 세파조늄 클로라이드; 은 니트레이트; 술파디아진 실버; 심클로센; 티메르포네이트 나트륨; 티메로살; 또는 트로클로센 칼륨일 수 있다.

[0132] 핵산 작용제. 본 발명에 따라 대상체에게 전달될 수 있는 핵산에는 자연 발생 또는 비-자연 발생 DNA (cDNA, 게놈 DNA, 핵 DNA, 미토콘드리아 DNA 포함), RNA (mRNA, rRNA, tRNA 포함), 올리고뉴클레오티드, 3중-나선 형성 분자, 번역자극 핵산 예컨대 US 6194388호 (번역자극 CpG 핵산과 관련된 이의 교시는 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있는 것들, 유전자 발현을 조절하는 데에 사용되는 소형 간섭 RNA (siRNA) 또는 마이크로RNA (miRNA), 유전자 발현을 조절하는 데에 사용되는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 압타머, 리보자임, 유전자 또는 유전자 단편, 조절 서열, 이들의 유사체, 유도체 및 조합이 포함된다. 이러한 핵산들은 예를 들면 표적 조직 및/또는 세포에 대한 그의 결합 및/또는 그에 의한 흡수를 촉진하기 위하여, 순수하게 또는 또 다른 실체에 복합되어 투여될 수 있다.

[0133] 항-염증제. 항-염증제는 염증을 감소시키거나 제거하는 작용제이다. 여기에는 알클로페낙; 알클로메타손 디프로피오네이트; 알게스톤 아세토니드; 알파 아밀라제; 암시나팔; 암시나피드; 암페낙 나트륨; 아미프릴로스 히드로클로라이드; 아나킨라; 아니롤락; 아니트라자펜; 아파존; 발살라지드 디나트륨; 벤다자; 베녹사프로펜; 벤지다민 히드로클로라이드; 브로멜라인스; 브로페라몰; 부데소니드; 카르프로펜; 시클로프로펜; 신타존; 클리프로펜; 클로메타솔 프로피오네이트; 클로메타손 부티레이트; 클로피락; 클로티카손 프로피오네이트; 코르메타손 아세테이트; 코르토독손; 데플라자코르트; 데소니드; 데속시메타손; 텍사메타손 디프로피오네이트; 디클로페낙 칼륨; 디클로페낙 나트륨; 디플로라손 디아세테이트; 디플루미돈 나트륨; 디플루니살; 디플루프레드네이트; 디프탈론; 디메틸 술폰; 드로시노니드; 엔드리손; 엔리모마브; 에놀리감 나트륨; 에피리졸; 에토돌락; 에토페나메이트; 펠비낙; 페나몰; 펜부펜; 펜클로페낙; 펜클로락; 펜도살; 펜피팔론; 펜티아작; 플라잘론; 플루아자코르트; 플루페남산; 플루미졸; 플루니솔리드 아세테이트; 플루닉신; 플루닉신 메글루민; 플루오코르틴 부틸; 플루오로메톨론 아세테이트; 플루쿠아존; 플루르비프로펜; 플루레토펜; 플루티카손 프로피오네이트; 푸라프로펜; 푸로부펜; 할시노니드; 할로메타졸 프로피오네이트; 할로프레돈 아세테이트; 이부페낙; 이부프로펜; 이부프로펜 알루미늄; 이부프로펜 피코닐; 일로니다프; 인도메타신; 인도메타신 나트륨; 인도프로펜; 인독솔; 인트라졸; 이소플루프레돈 아세테이트; 이속세팍; 이속시감; 케토프로펜; 로페미졸 히드로클로라이드; 로르녹시감; 로테프레드놀; 에타보네이트; 메클로페나메이트 나트륨; 메클로페남산; 메클로리손 디부티레이트; 메페남산; 메살라민; 메세클라존; 메틸프레드니솔론 술폰에이트; 모르니플루메이트; 나부메톤; 나프록센; 나프록센 나트륨; 나프록솔; 니마존; 올살라진 나트륨; 오르코데인; 오르파녹신; 옥사프로진; 옥시펜부타존; 파라닐린 히드로클로라이드; 펜토산 폴리술페이트 나트륨; 펜부타존 나트륨 글리세레이트; 피르페니돈; 피록시감; 피록시감 신나메이트;



피록시캄 올라민; 피르프로펜; 프레드나제이트; 프리펠론; 프로돌산; 프로쿠아존; 프록사졸; 프록사졸 시트레이트; 리벡솔론; 로마자리트; 살콜렉스; 살나세딘; 살살레이트; 살리실레이트; 상귀나리움 클로라이드; 세클라존; 세르메타신; 수독시캄; 술린닥; 수프로펜; 탈메타신; 탈니플루메이트; 탈로살레이트; 테부펠론; 테니다프; 테니다프 나트륨; 테녹시캄; 테시캄; 테시미드; 테트리다민; 티오피낙; 텍소코르톨 피발레이트; 톨메틴; 톨메틴 나트륨; 트리클로니드; 트리플루미데이트; 지도메타신; 글루코코르티코이드; 조메피락 나트륨이 포함된다. 바람직한 일 항-염증제는 아스피린이다.

[0134] 기타 작용제. 작용제는 비제한적으로 아드레날린성 작용제; 부신피질 스테로이드; 부신피질 억제제; 알콜 억제제; 알도스테론 길항제; 암모니아 해독제; 아미노산; 근위축성 측삭 경화증 작용제; 동화제(anabolic); 각성제; 진통제; 안드로겐; 마취제; 식욕억제제; 식욕감퇴제(anorexetic); 뇌하수체 전엽 활성화제; 뇌하수체 전엽 억제제; 구충제; 항-여드름제; 항-아드레날린제; 항-알레르기제; 항-아메바제; 항-안드로겐제; 항-빈혈제; 항-협심증제; 항-불안제; 항-관절염제;  $\beta$ -아드레날린성 작용제, 메틸코산틴, 비만 세포 안정화제, 항콜린제, 부신피질 스테로이드 예컨대 글루코코르티코이드를 포함한 항-천식제; 항-죽상경화증제; 항-담석증제; 항담석형성제; 항콜린제; 항응고제; 항록시디아제; 항경련제; 항우울제; 항당뇨병제; 지사제; 항이노제; 해독제; 항이상운동제; 항구토제; 항-간질제; 항-에스트로겐제; 항섬유소용해제; 항녹내장제; 지혈제; 항혈류제(antithrombotic); 항히스타민제; 항고지혈증제; 항고지단백혈증제; 항고혈압제; 항저혈압제; 항-감염제; 항-염증제; 항케라틴화제; 항편두통제; 항유사분열제; 항진균제; 항구역제; 항중성구감소증제; 항강박증제; 항산화제; 항과민성병제; 항연동제; 항폐포자충제; 항전립선비대증제; 항원생동물제; 항가려움제; 항건선제; 항정신병제; 항류마티스제; 항주혈흡충제; 항지루제; 항분비제; 항연축제; 항혈전제; 항기침제; 항-궤양제; 항-요석제; 식욕 억제제; 혈당 조절제; 골 흡수 억제제; 기관지확장제; 탄소 안히드라제 억제제; 심 억제제; 심장보호제; 강심제; 심혈관 작용제; 대뇌 허혈제; 이담제; 콜린성제; 콜린성 작용제; 콜리네스테라제 불활성화제; 콕시디아치료제; 인지 아주반트; 인지 향상제; 결막염제; 조영제; 억제제; 진단 조제; 이노제; 도파민성 작용제; 외부기생충구제제; 구토제; 효소 억제제; 에스트로겐; 에스트로겐 수용체 작용제; 섬유소용해제; 형광제; 자유 산소 라디칼 포획제; 위산 억제제; 위장관 운동성 작용제; 노인의학 작용제; 글루코코르티코이드; 생식샘 자극 성분; 모발 성장 자극제; 지혈제; 본초 활성화제; 히스타민 H2 수용체 길항제; 호르몬; 저콜레스테롤혈증제; 저혈당제; 저지질혈증제; 저혈압제; HMGCoA 리덕타제 억제제; 발기부전 요법 아주반트; 염증성 창자병 작용제; 각질용해제; LHRH 효능제; 간 장애 작용제; 항체용해제; 기억 아주반트; 정신 능력 향상제; 무기질; 기분 조절제; 점액용해제; 점막 보호제; 다발성 경화증 작용제; 동공확대제; 비충혈제거제; 신경이완제; 신경근차단제; 신경보호제; NMDA 길항제; 비-호르몬성 스테롤 유도제; 영양분; 급속분만제; 파제트병 작용제; 플라즈미노겐 활성화제; 혈소판 활성화 인자 길항제; 혈소판 응집 억제제; 뇌졸중-후 및 뇌 외상-후 작용제; 프로게스틴; 프로스타글란딘; 전립선 성장 억제제; 프로티로트로핀; 정신작용제; 방사성 작용제; 이완제; 비염 작용제; 욕액; 경화제; 진정제; 진정-수면제; 선택성 아데노신 A1 길항제; 격절형성제; 세로토닌 길항제; 세로토닌 억제제; 세로토닌 수용체 길항제; 스테로이드; 자극제; 억제제; 갑상샘 호르몬; 갑상샘 억제제; 갑상샘호르몬 모방제; 신경안정제; 불안정성 협심증 작용제; 요산배설촉진제; 혈관수축제; 혈관확장제; 상처치료제; 상처 치유제; 또는 크산틴 옥시다제 억제제일 수 있다.

[0135] 대상체

[0136] 본 발명은 본원에서 고려되는 바와 같은 작용제의 전달에 의해 이익을 얻을 가능성이 있는 사실상 모든 대상체 유형에서 실시될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서는, 인간 대상체가 바람직한 대상체이다. 대상체에는 가정의 애완동물 (예컨대 개, 고양이, 토끼, 흰담비 등), 가축 또는 농장 동물 (예컨대 소, 돼지, 양, 닭 및 기타 가금류), 말 예컨대 소로브레드 말, 실험실용 동물 (예컨대 마우스, 래트, 토끼 등) 등과 같은 동물들도 포함된다. 대상체에는 또한 물고기 및 기타 수생 종들이 포함된다.

[0137] 작용제가 전달되는 대상체는 정상적인 대상체일 수 있다. 다르게는, 그것은 하나 이상 특정 작용제의 전달에 의해 진단될 수 있거나 이익을 얻을 수 있는 병태를 가지고 있거나, 또는 그의 발병 위험성이 있는 것일 수 있다.

[0138] 그와 같은 병태에는 암 (예컨대 고형 종양 암 또는 비-고형 암 예컨대 백혈병), 감염 (신체의 특정 영역 또는 조직에 국한된 감염 포함), 자가면역 장애, 알레르기 또는 알레르기성 병태, 천식, 이식 거부 등이 포함된다.

[0139] 본 발명에 의해 포괄되는 다양한 병태들을 진단하기 위한 시험에 대해서는 업계에 알려져 있으며, 일반 의료 개원의에게 익숙할 것이다. 해당하는 실험실용 시험에는 비제한적으로 현미경 분석, 배양 의존 시험 (예컨대 배양액), 및 핵산 검출 시험이 포함된다. 여기에는 습윤 탐재 염색-강화 현미경법, 면역 현미경법 (예컨대,

FISH), 혼성화 현미경법, 입자 응집, 효소-연관 면역흡착 분석, 소변 스크리닝 시험, DNA 프로브 혼성화, 혈청 시험 등이 포함된다. 의료 개원의라면, 일반적으로 상기에 열거된 실험실용 시험을 전개하는 것에 더하여, 완전한 이력을 숙지하고 완전한 진찰 역시 수행할 것이다.

[0140] 암에 걸린 대상체는 검출가능한 암 세포를 가지고 있는 대상체이다. 암을 발병할 위험성이 있는 대상체는 암을 발병할 가능성을 정상보다 더 높게 가지는 대상체이다. 이러한 대상체에는 예를 들면 더 높은 암 발병 가능성과 연관되어 있는 것으로 입증된 유전적 이상을 가지는 대상체, 암에 대한 가족적 소인을 가지는 대상체, 암 유발 작용제 (즉, 발암물질) 예컨대 담배, 석면, 또는 기타 화학적 독소에 노출되어 있는 대상체, 그리고 이전에 암으로 치료받은 적이 있으며 명시적으로 완화되어 있는 대상체가 포함된다.

[0141] 감염에 걸린 대상체는 비제한적으로 열, 오한, 근육통, 눈부심, 인두염, 급성 림프절병증, 비장비대, 급성위장관연동이상항진(gastrointestinal upset), 백혈구증가증 또는 백혈구감소증을 포함한 해당 증상을 나타내는 대상체, 및/또는 감염 병원체 또는 그의 부산물이 검출될 수 있는 대상체이다.

[0142] 감염에 걸릴 위험성이 있는 대상체는 감염 병원체에 대한 노출의 위험성이 있는 대상체이다. 그와 같은 대상체에는 해당 병원체가 존재하는 것으로 알려져 있으며 해당 감염이 보편적인 지역에 사는 대상체가 포함된다. 그러한 대상체에는 또한 바늘을 함께 사용하는 것, 보호되지 않는 성적 활동에 연관되는 것, 감염된 대상체 샘플 (예컨대 의료 개원의), 비제한적으로 복부 수술 등을 포함한 수술을 받은 사람들과의 일상적인 접촉과 같이, 위험성이 높은 활동과 연관되는 대상체가 포함된다.

[0143] 대상체는 박테리아 감염, 바이러스 감염, 진균 감염, 기생충 감염 또는 미코박테리아 감염과 같은 감염에 걸릴 수 있거나, 또는 그의 발병 위험성이 있을 수 있다. 해당 실시양태에서는, 소포가 항-미생물체 예컨대 항-박테리아제, 항-바이러스제, 항-진균제, 항-기생충제, 또는 항-미코박테리아제를 포함할 수 있으며, 세포 담체 (예컨대 T 세포)가 감염에 대한 면역 반응을 자극하는 데에, 또는 잠재적으로 감염을 치료하는 데에 유용한 또 다른 작용제를 생산하도록 유전적으로 조작될 수 있다.

[0144] 암

[0145] 본 발명은 본 발명의 소포를 사용하여, 예를 들면 고형 종양 암을 포함한 암에 걸려 있거나 또는 그의 발병 위험성이 있는 대상체에게 작용제를 투여하는 것을 고려한다. 상기 작용제는 화학치료제, 항체 기제 치료제, 호르몬 기제 치료제, 및 효소 억제제 작용제를 포함한 항암제일 수 있거나, 및/또는 항원 (예컨대 암 항원) 및/또는 아주반트와 같은 면역자극제일 수 있거나, 및/또는 진단제 (예컨대 영상화제) 또는 본원에서 기술되는 임의의 다른 작용제일 수 있다. 본 발명은 본 발명의 소포가 많은 양의 해당 작용제를 단독 또는 조합으로써 해당 대상체에게 전달할 수 있거나, 및/또는 느리고 일정한 방출 프로파일을 통하여 해당 작용제에 대한 대상체의 장 기간 노출을 가능케 할 수 있는 것으로 고려된다.

[0146] 상기 암은 암종, 육종 또는 흑색종일 수 있다. 암종에는 비제한적으로 기저 세포 암종, 담도암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 융모막암종, CNS 암, 결장직장암, 신장 또는 콩팥 세포 암, 후두암, 간암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC, 샘암종, 거대 (또는 쿠리) 세포 암종, 및 편평 세포 암종 포함), 구강암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 피부암 (기저 세포 암 및 편평 세포 암 포함), 위암, 고환암, 갑상샘암, 자궁암, 직장암, 호흡계의 암, 및 비뇨기계의 암이 포함된다.

[0147] 육종은 골 (골육종) 및 연조직 (섬유육종)에서 발행하는 희귀한 중간엽 종양이다. 육종에는 비제한적으로 지방육종 (점액모양 지방육종 및 다형 지방육종 포함), 평활근육종, 횡문근육종, 악성 말초 신경초 종양 (악성 슈반 세포종, 신경섬유육종 또는 신경성 육종으로도 지칭됨), 유잉 종양 (골의 유잉 육종, 외골격 (즉, 골이 아님) 유잉 육종, 및 원시 신경외배엽 종양 포함), 운할막 육종, 혈관육종, 혈관성육종, 림프관육종, 카포시 육종, 혈관내피종, 테스모이드 종양 (침습성 섬유종증으로도 지칭됨), 용기피부섬유육종 (DFSP), 악성 섬유 조직구종 (MFH), 혈관주위세포종, 악성 중간엽종, 폐포 연질부 육종, 상피모양 육종, 투명 세포 육종, 결합조직형성 소세포 종양, 위장관 간질 종양 (GIST) (GI 간질 육종으로도 알려져 있음), 및 연골육종이 포함된다.

[0148] 흑색종은 피부 및 기타 기관의 멜라닌세포계에서 발생하는 종양이다. 흑색종의 예에는 비제한적으로 악성 흑점 흑색종, 얇은 확산 흑색종, 결절성 흑색종, 및 말단 흑자 흑색종이 포함된다. 암은 고형 종양 림프종일 수도 있다. 그 예에는 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 및 B 세포 림프종이 포함된다.

[0149] 암은 비제한적으로 골암, 뇌암, 유방암, 결장직장암, 결합조직암, 소화 계통의 암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 두경부의 암, 위암, 상피내 종양, 흑색종 신경모세포종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 전립선암, 망막모

세포종, 또는 횡문근육종일 수 있다.

[0150] 감염

[0151] 본 발명은 본 발명의 소포를 사용하여, 박테리아 감염, 바이러스 감염, 진균 감염, 기생충 감염 또는 미코박테리아 감염과 같은 감염에 걸려 있거나 또는 그의 발병 위험성이 있는 대상체에게 작용제를 투여하는 것을 고려한다. 상기 작용제는 항-박테리아제, 항-바이러스제, 항-진균제, 항-기생충제, 및 항-미코박테리아제를 포함한 항-감염제, 면역자극제 예컨대 항원 (예를 들면 미생물 항원 예컨대 박테리아 항원, 바이러스 항원, 진균 항원, 기생충 항원, 및 미코박테리아 항원) 및/또는 아주반트, 진단제 (예컨대 영상화제), 또는 본원에서 기술되는 임의의 다른 작용제일 수 있다. 본 발명은 본 발명의 소포가 많은 양의 해당 작용제를 단독 또는 조합으로써 해당 대상체에게 전달할 수 있고/거나, 느리고 일정한 방출 프로파일을 통하여 해당 작용제에 대한 대상체의 장기 노출을 가능케 할 수 있는 것으로 고려된다.

[0152] 박테리아 감염은 비제한적으로 이. 콜라이(E. coli) 감염, 스타필로코쿠스 감염, 스트렙토코쿠스 감염, 슈도모나스(Pseudomonas) 감염, 클로스트리듐 디피실(Clostridium difficile) 감염, 레지오넬라(Legionella) 감염, 뉴모코쿠스(Pneumococcus) 감염, 하에모필루스(Haemophilus) 감염, 클렙시엘라(Klebsiella) 감염, 엔테로박터(Enterobacter) 감염, 시트로박터(Citrobacter) 감염, 네이세리아(Neisseria) 감염, 쉬겔라(Shigella) 감염, 살모넬라(Salmonella) 감염, 리스테리아(Listeria) 감염, 파스튜렐라(Pasteurella) 감염, 스트렙토바실루스(Streptobacillus) 감염, 스피릴룸(Spirillum) 감염, 트레포네마(Treponema) 감염, 악티노마이세스(Actinomyces) 감염, 보렐리아(Borrelia) 감염, 코리네박테리움(Corynebacterium) 감염, 노카르디아(Nocardia) 감염, 가르드네렐라(Gardnerella) 감염, 캄필로박터(Campylobacter) 감염, 스피로카에타(Spirochaeta) 감염, 프로테우스(Proteus) 감염, 박테리오데스(Bacteriodes) 감염, 에이치. 파이롤리(H. pylori) 감염, 또는 탄저병 감염일 수 있다.

[0153] 미코박테리아 감염은 비제한적으로 각각 엠. 튜버쿨로시스(M. tuberculosis) 및 엠. 레프라에(M. leprae) 종에 의해 야기되는 결핵 또는 나병일 수 있다.

[0154] 바이러스 감염은 비제한적으로 헤르페스 심플렉스(Herpes simplex) 바이러스 1 감염, 헤르페스 심플렉스 바이러스 2 감염, 거대세포바이러스 감염, A형 간염 바이러스 감염, B형 간염 바이러스 감염, C형 간염 바이러스 감염, 인간 유두종 바이러스 감염, 엡스타인 바르(Epstein Barr) 바이러스 감염, 로타바이러스 감염, 아데노바이러스 감염, 인플루엔자 바이러스 감염, 인플루엔자 A 바이러스 감염, H1N1 (돼지 인플루엔자) 감염, 호흡기 세포융합(respiratory syncytial) 바이러스 감염, 수두-대상포진 바이러스 감염, 천연두 감염, 원숭이 폭스(monkey pox) 감염, SARS 감염 또는 조류 인플루엔자 감염일 수 있다.

[0155] 진균 감염은 비제한적으로 칸디다증, 버짐, 히스토플라스마증, 분아균증, 파라콕시디오이테스진균증, 크립토코시스(cryptococcosis), 아스페르길루스증, 색소진균증, 진균증 감염, 슈달레세리아증(pseudallescheriasis), 또는 어루러기 감염일 수 있다.

[0156] 기생충 감염은 비제한적으로 아메바증, 트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi) 감염, 파시올리아시스(Fascioliasis), 레이슈마니아시스(Leishmaniasis), 플라즈모듐(Plasmodium) 감염, 온코세르시아시스(Onchocerciasis), 파라고니미아시스(Paragonimiasis), 트리파노소마 브루세이(Trypanosoma brucei) 감염, 뉴모시스티스(Pneumocystis) 감염, 트리코모나스 바기날리스(Trichomonas vaginalis) 감염, 타에니아(Taenia) 감염, 히메놀렙시스(Hymenolepsis) 감염, 에키노코쿠스(Echinococcus) 감염, 쉬스토소미아시스(Schistosomiasis), 신경낭미충증, 네카토르 아메리카누스(Necator americanus) 감염, 또는 트리쿠리스 트리쿠리아(Trichuris trichuria) 감염일 수 있다.

[0157] 알레르기 및 천식

[0158] 본 발명은 알레르기 또는 천식에 걸려 있거나 또는 그의 발병 위험성이 있는 대상체에 대한 작용제의 투여를 고려한다. 상기 작용제는 알레르겐, Th1 반응을 자극하는 작용제를 포함한 면역자극제, Th2 반응을 억제하는 작용제를 포함한 면역저해제 또는 면역억제제, 항-염증제, 류코트리엔 길항제, IL-4 뮤테인, 가용성 IL-4 수용체, 항-IL-4 항체, IL-4 길항제, 항-IL-5 항체, 가용성 IL-13 수용체-Fc 융합 단백질, 항-IL-9 항체, CCR3 길항제, CCR5 길항제, VLA-4 억제제, 및 기타 IgE의 하향조절제 예컨대 비제한적으로 항-IgE, 시토카인 예컨대 Th1 시토카인 예컨대 IL-12 및 IFN-감마, 프레드니솔론과 같은 피질스테로이드를 포함한 스테로이드일 수 있고/거나, 진단제 (예컨대 영상화제), 또는 본원에서 기술되는 임의의 다른 작용제일 수 있다. 본 발명은 본 발명의 소포가 많은 양의 해당 작용제를 단독 또는 조합으로써 해당 대상체에게 전달할 수 있고/거나, 느리고 일정한 방출 프

로파일을 통하여 해당 작용제에 대한 대상체의 장기간 노출을 가능케 할 수 있는 것으로 고려된다.

[0159] 알레르기는 알레르겐에 대한 후천성 과민이다. 알레르기 병태에는 습진, 알레르기성 비염 또는 코감기, 건초열, 기관지 천식, 담마진 (두드러기) 및 식품 알레르기, 그리고 기타 아토피성 이상이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알레르기는 일반적으로 유해 알레르겐에 대항하는 IgE 항체 생성에 의해 야기된다. 천식은 염증, 기도의 협소화 및 흡입제에 대한 기도의 증가된 반응성을 특징으로 하는 호흡계의 장애이다. 전적인 것은 아니지만, 천식은 종종 아토피성 또는 알레르기성 증상과 연관된다.

[0160] 자가면역 질환

[0161] 본 발명은 자가면역 질환 또는 장애에 걸려 있거나 또는 그의 발병 위험성이 있는 대상체에 대한 작용제의 투여를 고려한다. 상기 작용제는 Th1 반응을 억제하는 것들을 포함한 면역저해제 또는 면역억제제, Th2 반응을 자극하는 면역자극제, 시토카인 예컨대 IL-4, IL-5 및 IL-10, 항-염증제일 수 있고/거나, 진단제 (예컨대 영상화제), 또는 본원에서 기술되는 임의의 다른 작용제일 수 있다. 본 발명은 본 발명의 소포가 많은 양의 해당 작용제를 단독 또는 조합으로써 해당 대상에게 전달할 수 있고/거나, 그리고 일정한 방출 프로파일을 통하여 해당 작용제에 대한 대상체의 장기간 노출을 가능케 할 수 있는 것으로 고려된다.

[0162] 자가면역 질환은 대상체 자신의 항체가 숙주 조직과 반응하거나, 또는 면역 작용인자 T 세포가 내생인 자기 펩티드에 대하여 자가반응성이어서 조직의 파괴를 야기하는 질환의 종류이다. 따라서, 자가 항원으로 지칭되는 대상체 자신의 항원에 대하여 면역 반응이 설정된다. 자가면역 질환은 일반적으로 Th1 편향적인 것으로 생각되고 있다. 그 결과, Th2 면역 반응 또는 Th2 유사 시토카인의 유도가 유익할 수 있다.

[0163] 자가면역 질환에는 류마티스성 관절염, 크론병, 다발성 경화증, 전신 홍반 루푸스 (SLE), 자가면역 뇌척수염, 중증 근무력증 (MG), 하시모토 갑상샘염, 굿파스처 증후군, 천포창 (예컨대 보통천포창), 그레이브병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소성 자반증, 항-콜라겐 항체를 동반한 공피증, 혼합 결합 조직 질환, 다발근육염, 악성 빈혈, 특발성 애디슨병, 자가면역-관련 불임, 사구체신염 (예컨대 초승달 사구체신염, 증식성 사구체신염), 수포성 유천포창, 쇼그렌 증후군, 인슐린 내성, 및 자가면역 당뇨병이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0164] 이식 요법

[0165] 본 발명은 세포 또는 기관 이식을 받는 대상체에 대한 작용제의 투여를 고려한다. 상기 작용제는 면역저해제 또는 면역억제제, 항-염증제일 수 있고/거나, 진단제 (예컨대 영상화제), 또는 본원에서 기술되는 임의의 다른 작용제일 수 있다. 본 발명은 본 발명의 소포가 많은 양의 해당 작용제를 단독 또는 조합으로써 해당 대상에게 전달할 수 있고/거나, 그리고 일정한 방출 프로파일을 통하여 해당 작용제에 대한 대상체의 장기간 노출을 가능케 할 수 있는 것으로 고려된다.

[0166] 본원에서 제공되는 조성물 및 방법은 이식 요법에 있어서 면역 반응을 조절하는 데에 사용될 수도 있다. 이식 성공은 종종 신체의 면역 시스템에 의한 이식된 조직의 거부에 의해 제한된다. 그 결과, 이식 수용자는 보통 이식된 조직이 생존하는 것이 가능하도록 하기 위하여 장기간의 시간 동안 면역억제된다. 이식 거부를 최소화하기 위하여, 본 발명은 이식 부위에 대한 면역조절제, 특히 면역억제제의 전달을 고려한다. 따라서, 본 발명은 이식을 받을 예정이거나, 받는 중이거나, 또는 받은 대상체에 대한 투여를 고려한다.

[0167] 전기한 항목들은 포괄적인 것이 아니라 대표적인 것을 의미하고자 하는 것이다. 당업자라면, 본 발명의 방법을 사용한 예방 및 치료에 적합한 각 이상 유형의 다른 예들을 파악하고 있을 것이다.

[0168] 유효량, 처방계획, 제제

[0169] 작용제는 안정화된 MLV의 형태로, 그리고 유효량으로 투여된다. 유효량은 의학적으로 바람직한 결과를 제공하는 데에 충분한 작용제의 투여량이다. 유효량은 원하는 결과, 치료 또는 예방되는 특정 병태, 치료되는 대상체의 연령 및 신체 상태, 병태의 중증도, 치료 기간, 동시 또는 조합 치료 (존재할 경우)의 특성, 구체적인 투여 경로, 그리고 건강 요원의 지식 및 전문지식에 속하는 기타 요인들에 따라 달라지게 된다. 일반적으로는, 최대 투여량, 즉 적절한 의학적 판단에 따른 최고의 안전 투여량이 사용되는 것이 바람직하다.

[0170] 예를 들어, 대상체가 종양을 가지고 있는 경우, 유효량은 종양 부피 또는 하중 (예를 들면 종양을 영상화하여 측정하였을 때의)을 감소시키는 양일 수 있다. 유효량은 혈액 또는 기타 체액 또는 조직 중 암 세포의 존재 및 /또는 빈도 (예, 생검)에 의해 산정될 수도 있다. 종양이 조직 또는 기관의 정상적인 기능에 영향을 주는 경우



라면, 유효량은 조직 또는 기관의 정상적인 기능을 측정하는 것에 의해 산정될 수 있다.

- [0171] 일부 경우에서, 유효량은 하나 이상, 바람직하게는 모든 증상을 경감 또는 제거하는 데에 요구되는 양이다. 예를 들어, 알레르기에 걸려 있거나 천식 발작을 겪고 있는 대상체에서, 작용제의 유효량은 알레르기 또는 천식 발작과 연관된 증상을 경감 또는 제거하는 양일 수 있다. 거기에는 재채기, 두드러기, 비 출혈, 호흡 곤란이 포함될 수 있다. 마찬가지로, 감염에 걸린 대상체에서, 작용제의 유효량은 감염과 연관된 증상을 경감 또는 제거하는 양일 수 있다. 여기에는 열 및 권태감이 포함될 수 있다. 작용제가 진단제인 경우, 유효량은 해당되는 신체 영역 또는 세포의 가시화를 가능케 하는 양일 수 있다. 작용제가 항원인 경우, 유효량은 항원에 대한 면역 반응을 촉발하고, 항원이 유래하는 병원체에 대하여 바람직하게는 단기간, 더욱 더 바람직하게는 장기간의 보호를 제공하는 양일 수 있다. 일부 경우에는 본 발명이 작용제의 단일 투여를 고려하며, 일부 경우에는 본 발명이 작용제의 다중 투여를 고려한다는 것이 이해될 것이다. 예를 들어, 항원은 초회감작 용량 및 추가 용량으로 투여될 수 있지만, 일부 경우에는 본 발명이 충분한 항원 및 임의로 아주반트의 전달을 제공함으로써, 추가 용량이 필요하지 않다.
- [0172] 본 발명은 제약 조성물을 제공한다. 제약 조성물은 바람직하게는 제약상-허용가능한 담체 내에 본 발명의 소포 및 바람직하게는 작용제(들)를 포함하는 멸균 조성물이다. "제약상-허용가능한 담체"라는 용어는 본 발명에 의해 고려되는 인간 또는 다른 대상체에의 투여에 적합한 하나 이상의 상용성인 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다.
- [0173] "담체"라는 용어는 투여를 용이하게 하기 위하여 소포 및 바람직하게는 작용제(들)가 조합되는, 천연 또는 합성의 것인 유기 또는 무기 성분을 나타낸다. 제약 조성물의 성분은 그의 원하는 제약상 효능을 실질적으로 손상할지도 모를 상호작용을 배제하는 방식으로 혼합된다.
- [0174] 적합한 완충제에는 아세트산과 염 (1-2% W/V); 시트르산과 염 (1-3% W/V); 붕산과 염 (0.5-2.5% W/V); 및 인산과 염 (0.8-2% W/V)가 포함된다. 적합한 보존제에는 벤즈알코늄 클로라이드 (0.003-0.03% W/V); 클로로부탄올 (0.3-0.9% W/V); 및 파라벤 (0.01-0.25% W/V)이 포함된다.
- [0175] 다르게 언급되지 않는 한, 본원에서는 다양한 투여 경로들이 가용하다. 물론, 선택되는 구체적인 양식은 선택되는 특정 활성 작용제, 치료되는 특정 병태 및 치료 효능을 위하여 요구되는 투여량에 따라 달라지게 된다. 일반적으로 말하자면, 제공되는 방법은 의학적으로 허용가능한 모든 투여 양식, 즉 임상적으로 허용가능하지 않은 부작용을 야기하지 않으면서 효과적인 수준의 원하는 반응을 산출하는 모든 양식을 사용하여 실시될 수 있다. 일 투여 양식은 비경구 경로이다. "비경구"라는 용어에는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내 주사 또는 주입 기술이 포함된다. 다른 투여 양식에는 경구, 점막, 직장, 질, 설하, 비내, 기관내, 흡입, 안구, 경피 등이 포함된다.
- [0176] 경구 투여를 위하여, 화합물은 당업계에 잘 알려져 있는 제약상 허용가능한 담체와 소포를 조합하는 것에 의해 용이하게 제제화될 수 있다. 그와 같은 담체는 치료될 대상에 의한 경구 섭취를 위한 정제, 환제, 당의정, 캡슐, 액체, 겔, 시럽, 슬러리, 필름, 현탁액 등으로서의 제제화를 가능케 한다. 적합한 부형제로는 특히 충전제 예컨대 락토스, 수크로스, 만니톨 또는 소르비톨을 포함한 당; 셀룰로스 제제, 예를 들면 메이즈(maize) 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검, 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸-셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 및/또는 폴리비닐피롤리돈 (PVP)이 있다. 임의로, 경구용 제제는 내부 산 조건을 중화하기 위한 염수 또는 완충제 중에서 제제화될 수도 있거나, 또는 어떠한 담체도 없이 제제화될 수도 있다.
- [0177] 경구로 사용될 수 있는 제약 제제에는 젤라틴으로 제조되어 밀어 맞추는 캡슐은 물론, 젤라틴 및 가소제 예컨대 글리세롤 또는 소르비톨로 제조된 연질의 밀봉 캡슐이 포함된다. 밀어 맞추는 캡슐은 수용액, 완충 용액, 지방 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 액체 중에 현탁된 소포를 함유할 수 있다. 또한, 안정화제가 첨가될 수도 있다. 경구 투여를 위한 모든 제제는 그와 같은 투여에 적합한 투여량의 것이어야 한다.
- [0178] 협측 투여를 위해서는, 조성물이 통상적인 방식으로 제제화된 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.
- [0179] 흡입에 의한 투여의 경우, 조성물은 통상적으로 적합한 추진제, 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적합한 기체를 사용하는 가압 팩 또는 분무기로부터의 에어로졸 분무 제공의 형태로 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공하는 것에 의해 결정될 수 있다.
- [0180] 전신성으로 본 발명의 조성물을 전달하는 것이 바람직한 경우, 그것은 주사, 예컨대 볼루스 주사 또는 연속 주

입에 의한 비경구 투여용으로 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 단위 투여량 형태로, 예를 들면 앰플 또는 다중-용량 용기 중에 제공될 수 있다. 비경구 제약 제제에는 성분들의 수용액이 포함된다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 다르게는, 오일-기재 현탁액으로 소포의 현탁액이 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 소포에는 지방 오일 예컨대 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스테르, 예컨대 에틸 올레레이트 또는 트리글리세리드가 포함된다.

[0181] 다르게는, 소포는 사용 전의 적합한 담체, 예컨대 멸균 무-발열원수로의 구성을 위한 분말 형태 또는 동결건조 형태의 것일 수 있다.

[0182] 조성물은 또한 직장 또는 질 조성물, 예컨대 코코아 버터 또는 다른 글리세리드와 같은 통상적인 좌제 베이스를 함유하는 좌제 또는 정체 관장제로써 제제화될 수도 있다.

[0183] 시험관내 사용

[0184] 추가로, 본 발명은 비제한적으로 세포 성장 인자 등과 같은 하나 이상 작용제의 일정한 공급원을 가질 필요가 있거나, 또는 그것을 가지게 되면 더욱 편리해지게 되는, 세포 배양 및 조직 조작(tissue engineering)과 같은 시험관내 적용을 고려한다.

[0185] 키트

[0186] 본 발명은 또한 본 발명의 소포를 포함하는 키트를 고려한다. 소포는 하나 이상의 관심 작용제를 포함할 수 있다. 키트가 소포에 도입될 하나 이상의 관심 작용제를 포함할 수도 있다. 이러한 키트는 또한 소포의 사용 지침과 같은 기록 자료를 포함할 수 있다. 소포는 완충제 중에, 또는 바람직하게는 수크로스-함유 부형제와 함께 동결건조된 형태로 제공될 수 있다.

[0187] 본 발명은 또한 본 발명의 소포를 합성하는 데에 필요한 여러 물질, 반응물 및 촉매를 포함하는 키트를 고려한다. 그와 같은 키트는 예를 들면 지질 예컨대 본원에서 기술되는 것들, 지질 이중층의 관능화된 성분 예컨대 관능화 지질, 하나 이상의 가교제 예컨대 막 투과성 가교제, 다가 양이온 예컨대 2가 양이온 등을 포함할 수 있다. 이러한 키트 역시 소포를 합성하기 위한 지침과 같은 기록 자료를 포함할 수 있다. 키트는 또한 관심 작용제를 포함할 수 있다.

[0188] 하기의 실시예에 의해 본 발명이 추가 예시되는 바, 절대로 추가적인 제한으로 간주되어서는 아니 된다. 본 출원 전체에 걸쳐 인용되는 모든 참고문헌 (문헌상의 참고문헌, 공고된 특허, 공개된 특허 출원, 및 공동-계류중인 특허 출원 포함)의 전체 내용은 의거 명시적으로 참조로 포함된다.

[0189] [실시예]

[0190] 실시예 1

[0191] 선행 기술 방법에서의 한계를 해소하기 위하여, 본 발명자들은 다층 소포 (MLV) 내 인접 지질 층들의 헤드기를 연결하는 가교결합을 형성시키는 것에 의해 안정화되는 지질 입자의 합성을 계획하였다. 2가의 양이온은 MLV로의 리포솜의 융합을 유도하는 것으로 알려져 있다 (문헌 [Duzgunes et al., J Membrane Biol. 1981;59:115-125] 참조). 본 발명자들은 말레이미드-관능화 지질 (예컨대 MPB)을 소포에 도입하고, 디티올-가교제를 사용하여 MPB의 층들을 가교결합시킴으로써 (예컨대 도 1A에 나타낸 합성 개략도), 이와 같은 과정을 변형하였다. 생성되는 이중층간-가교결합 다층 지질 소포 (ICMV)는 대단히 향상된 단백질 캡슐화 효율 (단순 리포솜과 비교하여 100배, 도 5a), 입자 질량 당 단백질 적재량 (단순 리포솜과 비교하여 20배, 도 5b), 및 느리고 지속적인 방출 동역학을 동반하는, 혈청 존재하에서의 포획된 적재물의 지속 보유 (도 6a 및 6b)와 같은 매력적인 특징들을 나타내었다. 합성은 전체적으로 취약한 단백질 적재물의 포획에 적합한 수성 완충제 중에서 수행되어, 생분해성 지질로만 구성되는 입자를 생성시킨다. 이와 같은 신중 입자의 생물학적인 적용을 위한 시험-상으로, 본 발명자들은 항원 및 아주반트용 전달 비히클로서의 ICMV를 조사하였다. 구체적으로는, 본 발명자들은 백신 적용 분야를 위해, 난알부민 (OVA)을 모델 항원으로 사용하여, 생체 내에서 톨-유사 수용체(toll-like receptor) 효능제 (TLRa)의 공동-전달(co-delivery)을 시험하였다.

[0192] 물질 및 방법

[0193] 지질 (40:10:50의 몰비의 DOPC:DOPG:말레이미드-관능화 지질)을 건조하여 지질 필름을 형성시키고, 적재물 분자의 존재하에 10 mM 비스-트리스 프로판 (BTP) 중에서 pH 7.0으로 1시간 동안 재수화하였다. 도 1A에 나타낸 바

와 같이, 생성 리포솜을 초음파처리한 후,  $Mg^{2+}$  및  $Ca^{2+}$  와 같은 2가 양이온의 첨가에 의해 융합되도록 유도하였다. 생성되는 MLV를 DTT와 함께 (말레이미드:DTT 비 2:1) 인큐베이션함으로써, 말레이미드-관능화 지질의 대향 층을 접합시켜 가교결합된 ICMV를 형성시켰다. 생성 구조체를 원심분리하고, 세척한 다음, 2 kDa PEG-티올과의 30분 동안의 인큐베이션에 의해 PEG화하였다. 최종 생성물을 원심분리하고, 탈이온수를 사용하여  $3\times$  세척하였다. 90플러스(90Plus) 입자 크기 분석기 (브룩헤이븐 인스트루먼트(Brookhaven Instruments))를 사용한 동적 광 산란 (DLS)에 의해 입자 크기 및 표면 전하를 측정하였다. 공초점 현미경 및 냉동-TEM을 사용하여 입자를 분석하였다. 입자의 외부 표면에 노출된 지질의 분율을 정량하기 위하여, 이전에 기술된 바와 같이 층판도 검정을 수행하였다 (문헌 [Girard et al., Biophysical journal 2004;87:419-429] 참조). 캡슐화 연구를 위해서는, 알렉사-플루오르(alexa-fluor) 555에 의해 개질된 난알부민 (OVA)을 사용하여, PEG화된 리포솜, 지질-코팅된 PLGA 입자 (문헌 [Bershteyn et al., Soft Matter 2008;4:1787-1791]에서 전기한 바와 같음), 및 ICMV에 캡슐화되는 양을 측정하였다. 일부 검정에서는, 알렉사-플루오르 555에 의해 개질된 SIV-Gag 및 FLT-3 리간드를 사용하였다. 이러한 입자로부터의 OVA의 방출은 100 kDa의 MW 컷오프를 사용하여 투석 막에서 수행하였다.

[0194] 시험관내 수지상 세포 (DC) 활성화 연구를 위하여, 각각 모노포스포릴 지질 A (MPLA) 및 R-848, TLR4 및 TLR7 효능제와 조합하여 OVA를 캡슐화하고 있는 ICMV와 함께 골수-유래 또는 비장 DC를 인큐베이션하였다. 세포를 염색한 후, 유동 세포측정법에 의해 분석함으로써, DC 활성화 및 입자 내재화의 정도를 조사하였다. ELISA (R&D 시스템즈(R&D Systems))에 의해, IL12p70 발현에 대하여 배양 배지를 분석하였다. 백신 담체로서의 ICMV의 생체내 기능의 분석을 위하여, 볼루스 주사, 또는 ICMV (TLR 효능제와 함께 또는 그것 없이) 및 21일 후의 추가접종 중 어느 하나로 전달되는 70  $\mu$ g의 OVA를 사용하여, C57Bl/6 마우스의 군을 옆구리에 피하로 면역화하였다. 말초 혈액 단핵 세포의 유동 세포측정법 분석에 의해, 면역화에 의해 도출되는 OVA-특이적 T-세포 및 인터페론-감마 생산 T-세포의 빈도를 측정하였다. 면역화된 마우스로부터의 혈청의 ELISA 분석에 의해, 항-OVA 역가를 측정하였다. 이후의 NIH, 상태 및 국지적 지침에 대하여 동물들을 관찰하였다.

[0195] *결과 및 논의*

[0196] MLV를 형성하기 위한 통상적인 프로토콜을 변형시켜 안정한 ICMV를 합성하였다 (도 1A). 먼저, 단백질 또는 약물 적재물 용액의 존재하에서 초음파처리에 의해 지질 필름을 재수화함으로써, 50 mol% 이하의 MPB를 함유하는 리포솜을 형성시켰다. 2가 양이온의 첨가에 의해 생성 리포솜들 간의 융합을 유도함으로써, 전기한 바와 같은 MLV를 형성시켰다 (문헌 [Duzgunes et al., J Membrane Biol. 1981;59:115-125] 참조). 이어서, 본 발명자들은 막-투과성 시약으로서 DTT를 도입함으로써, MLV 내 나란한 지질 막들의 말레이미드 헤드기들 사이에 공유 가교결합을 형성시켰다 (도 1B). 표 1A 및 1B에 나타난 바와 같이, 40%를 초과하는 유의성 있는 수율로 안정한 ICMV를 형성시키기 위해서는 2가 양이온 및 DTT 모두가 요구되며;  $Mg^{2+}$  또는 DTT 중 어느 하나 단독으로 형성되는 MLV는 유의성 있는 양의 10K $\times$ g로 원심분리되는 지질 입자를 생성시키지 못하였다. 20 mM 염화나트륨의 존재는 입자 형성을 방해하였는데, 1가의 양이온이 2가 양이온에 의해 매개되는 소포의 융합을 억제하는 것으로 알려져 있는 바와 같다 (문헌 [Duzgunes et al., J Membrane Biol. 1981;59:115-125] 참조). 유의성 있는 입자 수율을 달성하기 위해서는 적어도 25 mol% 이상의 MPB가 요구되었으므로, 본 발명자들은 이후 DOPC:DOPG:MPB 몰비 40:10:50의 지질 조성을 사용하여 작업하는 것을 선택하였다.

[0197] 생성되는 ICMV는 250 $\pm$ 40 nm의 전형적인 평균 직경을 가졌으며, 다분산도 지수는 약 0.08이었다 (도 3a). 입자의 냉동EM(CryoEM) 영상은 단일 지질 이중층보다 더 두꺼운 전자 조밀 밴드로 구성된 다층 구조를 나타냄으로써, 지질 막을 횡단하여 접합된 지질의 다층을 암시하였다 (도 3b). 층판도 검정을 사용하여 입자의 외부 표면에 나타나는 지질의 분율을 측정하였다. 초음파처리된 리포솜은 37 $\pm$ 2.3%의 외부 표면상 지질을 가진 반면,  $Mg^{2+}$  및 DTT를 사용하여 리포솜을 개질한 후에 형성되는 ICMV에서는 그 값이 19 $\pm$ 1.0%로 감소함으로써, 그의 다층 구조를 암시하였다. 표면에 나타난 MPB를 PEG-티올 (2 kDa MW)와 반응시킴으로써, ICMV를 PEG화하였다. PEG화는 ICMV의 직경을 272 $\pm$ 40 nm로 증가시켰으며, PBS 중에서 7일 동안 저장된 입자는 그의 원래 크기를 유지하였다 (표 2, 일부 데이터는 미제시). ICMV는 부형제로서 첨가되는 3% 수크로스를 사용한 동결 건조에 적합하였는데, 동결건조 후 완충 용액에 재현탁되는 입자가 그의 전체적인 형태 및 크기 특성을 유지하였기 때문이다 (표 2).

[0198] 리포솜 및 PLGA 입자는 단백질 전달의 비히클용으로 광범위하게 사용되어 왔으므로, 본 발명자들은 해당 비히클 내의 단백질 캡슐화를 ICMV와 비교하였다. 도 5a 및 5b에 나타난 바와 같이, ICMV가 통상적인 PEG화 스텔스 리포솜 및 지질-코팅 PLGA 입자에 비해 뛰어난 OVA 캡슐화 효율을 나타내었다 (각각 108배 및 4배 증가). 마찬가지로

지로, 총 입자 질량 당 캡슐화된 OVA의 양은 ICMV에서 각각 21배 및 10배 향상되었다. 다음에, 본 발명자들은 해당 합성 과정 동안 ICMV에 캡슐화되는 다양한 단백질들의 양을 조사하였다 (도 4a). 캡슐화되는 SIV-gag, FLT-3 리간드, 및 OVA의 양은 초음파처리된 리포솜으로부터, Mg<sup>2+</sup>-매개 융합에 의해 형성된 MLV, Mg<sup>2+</sup> 및 DTT에 의해 형성된 ICMV까지 점차적으로 증가하였다. 구체적으로, ICMV의 경우 지질 mg 당 407.5±18.7 μg OVA로써, 처음에 적재된 OVA의 70%를 초과하여 캡슐화되었다. OVA를 모델 단백질로 사용하여, 해당 소포로부터의 적재물 방출을 비교하였다 (도 6a 및 6b). 혈청을 포함하는 배지 중에서, ICMV로부터는 OVA가 느리고 연속적인 방식으로 방출된 반면, 리포솜 및 MLV로부터는 OVA가 폭발적으로 방출되었다.

[0199] 모델 백신 항원으로서 OVA를 사용하여, 본 발명자들은 백신 전달용 플랫폼으로서의 ICMV를 조사하였다. OVA 및 톨-유사 수용체 효능제, MPLA (TLR4 리간드) 및/또는 레시퀴모드 (TLR7/8 리간드)를 ICMV에 적재하였다. 시험관 내에서 OVA-적재 ICMV와 함께 인큐베이션되는 수지상 세포 (DC)는 입자를 맹렬하게 흡수하였다. OVA-적재 ICMV 단독은 시험관 내에서 DC를 활성화시키지 않았으나, TLR 효능제 (TLRa)를 보유하는 입자는 시험관 내에서 공동자극 분자 (예컨대 CD40, CD80, CD86, 및 MHC II)의 상호조절, 및 DC에 의한 IL-12p70 분비를 촉발하였으며; TLR4 및 TLR7 효능제를 모두 보유하는 입자는 상승작용적인 DC 활성화를 촉진하였다 (도 8a 및 8b).

[0200] 생체 내에서 백신용 OVA와의 조합되어 TLRa를 공동-전달하는 입자의 효능을 시험하기 위하여, C57Bl/6 마우스를 OVA-적재 ICMV로 면역화하고, 등가 용량의 가용성 OVA와 비교하였다. 흥미롭게도, OVA의 볼루스 주사와 비교하였을 때, OVA-적재 ICMV는 항원-특이적 CD8<sup>+</sup> T-세포의 증식을 17배 향상시킴으로써, 추가접종 후에는 전체 CD8<sup>+</sup> T-세포 중 약 7%에 달하였다 (도 10a 및 10b). 이러한 OVA-적재 입자는 또한 기능적으로 적합한 인터페론-감마 (IFN-감마)-생산 OVA-특이적 T-세포의 최고 빈도를 도출하였다. 그러나, 특히 OVA에 대한 항체 반응은 최대 역가를 위해서는 TLRa의 존재를 필요로 하였으며, TLR4 및 TLR7 효능제와 함께 공동-캡슐화된 OVA-적재 ICMV는 동일 용량의 가용성 OVA/TLRa와 비교하여 약 10배 더 높은 항-OVA 항체 역가를 도출하였다 (도 10b).

[0201] ICMV가 항원에 대하여 임상적으로 관련된 병원체로부터 도출될 수 있다는 면역 반응의 이해를 시작하기 위하여, 본 발명자들은 감염성 작용체로부터의 항원을 사용한 면역화를 시험하였다. 항원이 그 내부에 캡슐화되어 있으며, 또한 그의 이중층들에 MPLA가 도입되어 있는 다양한 용량의 ICMV를 사용하여 마우스를 면역화하였다. 초회 감작 및 추가 요법 후, 34일차부터 혈청에서 검출하였을 때, 항원에 대하여 강한 항체 역가가 생성된 반면, 가용성 항원 및 MPLA에 의해 전달된 등가 용량은 훨씬 더 약한 항체 역가를 도출하였다 (데이터 미제시). 이러한 결과는 면역화를 위한 항원 전달용의 효과적인 비히클로서의 ICMV를 암시한다.

[0202] 이와 같은 연구에서, 본 발명자들은 매력적인 특징들을 나타내는 신규한 다층 지질 입자를 개발하였다: 유기 용매를 사용하지 않고도, ICMV에서 단백질 캡슐화가 크게 향상되었다. 이러한 입자는 콜로이드 안정성을 나타내며, 지질-기재 입자가 완전히 생분해성이다. 백신 전달용 플랫폼으로서의 ICMV의 재능이 입증되었다. 이러한 연구는 ICMV가 다양한 생체내 약물 전달 적용분야에서 광범위하게 유용할 수 있다는 것을 암시한다.

[0203] 실시예 2

[0204] 하기의 실시예는 실시예 1에서 기술된 일부 실험 및 결과의 더욱 포괄적인 설명 및 기록이다.

[0205] 현재 상품화되어 있는 백신 아주반트들 (예컨대 수산화 알루미늄 및 수-중-유 에멀전 MF59)은 세포성 면역의 자극 없이, 주로 체액성 면역 반응을 도출하는 것에 의해 면역을 촉진한다<sup>1,2</sup>. 암 또는 세포내 병원체 예컨대 HIV, 말라리아 및 C형 간염에 대한 백신용으로는 강한 CD8<sup>+</sup> T 세포 (CD8T) 반응이 필요할 수 있기 때문에, 조화된 체액성 및 세포성 면역 반응을 촉진하는 기술에 있어 커다란 관심이 존재한다<sup>3,4</sup>. 이를 위하여, 무린 모델에서 강력한 항체 반응 및 기능적 항원-특이적 CD8<sup>+</sup> T-세포의 대량 증대 모두를 유도할 수 있는 조작된 생 백신 벡터 예컨대 비-복제 재조합 바이러스가 개발된 바 있다<sup>5-7</sup>. 그러나, 생 벡터 및 항-벡터 면역의 안전성 문제는 생 벡터 백신 설계를 복잡하게 할 수 있다<sup>7</sup>. 기존의 벡터-특이적 면역 반응들은 임상 시험에서 생 벡터-기재 백신의 면역원성을 감소시켰으며<sup>8</sup>, 초회감작 면역화 후 생 벡터에 대하여 생성되는 면역 반응은 동일 벡터를 사용한 추가 면역화를 의심스럽게 할 수 있다<sup>7</sup>.

[0206] 반면, 정해진 항원을 전달하는 비-생 합성 백신은 항-벡터 면역을 회피하도록 합리적으로 설계될 수 있다<sup>9</sup>. 그와 같은 "하위단위" 백신은 표적 병원체의 구조 중에 정상적으로 존재하는 하나 또는 수개의 선택된 재조합 단



백질 또는 폴리사카라이드로 구성된다. 그러나, 하위단위 백신은 낮은 교차-제시(cross-presentation) (자연 CD8<sup>+</sup> T-세포에 대한 클래스 I MHC 분자 상에서의 제시를 위한, 면역 세포에 의한 세포외 항원의 흡수 및 프로세싱) 효율로 인하여, 저조하거나 비-기존성인 CD8T 반응을 도출한다<sup>10</sup>. 교차-제시를 촉진하기 위하여, 병원체에 의한 감염 동안 면역 시스템에 제공되는 신호를 환원주의적 방식으로 흉내내어, 단백질 항원 및 정해진 면역자극 분자가 적재된 합성 입자가 사용되어 왔다<sup>11-17</sup>. 리포솜은 이와 같은 적용분야에 특히 매력적인 물질인데, 그의 낮은 독성 및 면역원성, 임상 사용에서의 경로 기록의 안전성, 제조의 용이성, 및 상업적 규모에서의 입증된 제조가능성 때문이다<sup>18,19</sup>. 단층, 다층 또는 중합된 소포 형태의 지질 소포들을 백신 전달 물질로서 시험하여, 일부 성공을 거두기도 하였다<sup>19-23</sup>. 지질 소포에 포획된 항원이 생체 내에서 교차-제시되며<sup>19,24,25</sup>, 리포솜 단백질 백신은 소형-동물 모델에서 보호성 T-세포-매개 항-미생물 및 항-종양 면역 반응을 도출하는 것으로 밝혀진 바 있다<sup>23,26,27</sup>. 그러나, HIV 및 암과 같은 질환의 경우에는, 현재 바이러스/종양을 조절하는 데에 극히 강력한 T-세포 반응 (체액성 면역과 조화된)이 필요할 것으로 여겨지며, 그에 따라 여전히 더욱 강력한 T-세포 백신이 탐색되고 있다<sup>3,4</sup>.

[0207] 백신 전달에서의 지질 소포의 능력에 영향을 주는 잠재적인 인자는 혈청 성분 존재하에서의 그의 제한된 안정성이다. 고온에서 프로세싱되거나 사전-형성된 소포 막을 통한 확산에 의해 적재될 수 있는 리포솜 적재물에 있어서, 특히 콜레스테롤 및/또는 PEG화와 조합되는 경우에는, 고-T<sub>m</sub> 지질을 사용하는 것에 의해, 향상된 소포 안정성이 달성될 수 있다<sup>28</sup>. 단층 및 다층 소포는 이중층의 표면에서 반응성 헤드기들을 중합하는 것<sup>29</sup>, 인지질 아실 테일(tail)의 반응성 기들을 중합하는 것<sup>20,29</sup>, 또는 막의 소수성 내부에 흡착된 소수성 단량체들을 중합하는 것<sup>30</sup>에 의해 안정화될 수도 있다. 이러한 접근법들 각각에 있어서 공통적인 것은 이중층의 평면에서 성분들을 중합하는 개념이다. 그러나, 백신 항원과 상용성인 온건 조건에서 수행될 수 있는 중합 화학을 찾아내는 것은 도전 과제이다<sup>20</sup>.

[0208] 본원에서, 본 발명자들은 소포 벽 내 인접하여 견고하게 적층된 이중층들의 나란한 면을 횡단하여 지질 헤드기들을 연결하는 짧은 공유 가교결합을 사용하여 다층 소포를 안정화시키는 것에 의해 형성되는, 새로운 부류의 지질 약물 담체인 이중층간-가교결합 다층 소포 (ICMV)를 기술한다. ICMV는, 동일 지질 조성의 단순 리포솜 또는 다층 소포 (MLV)에 비해, 고수준의 단백질을 캡슐화하여 안정하게 보유하며, 혈청에 노출되었을 때 (30일에 걸쳐) 포획된 적재물을 매우 느리게 방출하였다. 그러나, 이러한 소포는 세포내 구획 내에서는 일반적으로 고수준으로 발견되는 리포솜의 존재하에 빠르게 분해되었다<sup>31</sup>. 고수준의 모델 단백질 항원 (난알부민, OVA) 및 지질-유사 면역자극 리간드 (모노모스포릴 지질 A, MPLA)를 공동-포획하는 데에 이와 같은 신규 소포 구조를 사용하는 것에 의해 본 발명자들은 마우스에서 면역화 연구를 수행함으로써, ICMV가 동일한 지질 조성의 단순 리포솜에 비해 약 1000배 더 크며, MLV에 비해서는 약 10배 더 큰 강력한 항체 역가를 도출한다는 것을 발견하였다. 종종 벡터-비경험(vector-naive) 개체에 투여된 단일 주사에만 효과적인 생 벡터와 달리<sup>7</sup>, 이러한 합성 소포는 반복 투여 후 일정하게 증가하는 체액성 및 CD8<sup>+</sup> T-세포성 반응을 촉발하며, 초회감작 및 2회의 추가 면역화 후에는 항원-특이적 T-세포가 혈액 중 총 CD8<sup>+</sup> T-세포를 최대 거의 30%까지 증대된다. 따라서, 이러한 새로운 물질은 체액성 및 세포성 면역 모두를 생성시킴에 있어서 안전함과 동시에 매우 효과적인 하위단위 백신으로 가는 문을 열 수 있다.

[0209] 물질 및 방법

[0210] ICMV의 합성. 클로로포름 중 1.26 μmol의 지질 (통상적인 지질 조성: DOPC(1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린):DOPG(1,2-디-(9Z-옥타데세노일)-*sn*-글리세로-3-포스포-(1'-*rac*-글리세롤)):MPB (1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[4-(p-말레이미도페닐)부티르아מיד])=4:1:5 몰비, 모든 지질들은 알라바마 알라바스터 소재 아반티 폴리 리피즈(Avanti Polar Lipids)로부터 구입)을 유리 바이알에 넣고, 진공하에서 밤새 유기 용매를 증발시켜, 건조된 얇은 지질 필름을 제조하였다. 상기 지질 필름을 10 mM 비스-트리스 프로판 (BTP) 중에서 적재물 단백질과 함께 매 10분 마다 강하게 볼텍싱하면서 1시간 동안 pH 7.0으로 재수화한 다음, 얼음 상에서 5분 동안 30초 간격으로의 6 와트 및 3 와트의 교류 전력 주기에서 초음파처리하였다 (미소닉스 카이크로손(Misonix Microson) XL 프로브 팁 초음파처리기, 뉴욕 파밍데일 소재). 이와 같은 제1 단계에서 형성

된 리포솜을 최종 농도 10 mM의  $Mg^{2+}$  및  $Ca^{2+}$  와 같은 2가 양이온의 첨가에 의해 용합되도록 유도하였다. 생성 MLV를 1.5 mM의 DTT와 함께 (말레이미드:DTT 몰비 2:1) 37°C로 1시간 동안 인큐베이션하여, 말레이미드-관능화 지질의 대향 이중층을 접합함으로써 가교결합된 ICMV를 형성시키고; 14,000 ×g에서 4분 동안의 원심분리에 의해 생성된 소포를 회수한 후, 탈이온수로 2회 세척하였다. PEG화를 위하여, 말레이미드 기에 대하여 1.5배 몰 과량인 PEG-SH 중에서 37°C로 1시간 동안 2 kDa PEG-티올 (레이산 바이오(Laysan Bio), 알라바마 아라브 소재)과 함께 입자를 인큐베이션하였다. 생성되는 입자를 원심분리한 후, 탈이온수를 사용하여 3× 세척하였다. 최종 생성물을 4°C로 PBS 중에서 저장하거나, 또는 냉동보호제로서의 3% 수크로스 존재하에 동결건조한 후 -20°C에서 저장하였다. 일부 검정을 위하여, 가교결합 전에 옵티마(Optima) 초원심분리기를 사용한 6시간 동안의 115K g에서의 초원심분리에 의해 (베크만 코울터(Beckman Coulter)), 단순 리포솜 또는 Mg-용합 MLV를 수확하였다.

[0211] 시험관내 단백질 적재 및 약물 방출. 캡슐화 연구를 위하여, 난알부민 (OVA, 워팅턴(Worthington), 뉴저지 레이크우드 소재), SIV-gag (어드밴스드 바이오사이언스 래보라토리즈(Advanced Bioscience Laboratories), 매릴랜드 켄싱턴 소재), 및 FLT-3L (페프로테크(Peprotech), 뉴저지 로키 힐 소재)을, 포획된 단백질의 양을 직접 형광 정량하도록, 알렉사-플루오르 555 (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아 칼스배드 소재)로 표지하였다. 전기한 바와 같이, DRV 및 PLGA 나노입자에도 OVA를 캡슐화하였다<sup>43,44</sup>. 일부 실험에서는, ICMV를 비관련 항원 대조로서의 재조합 삼일열 말라리아 단백질 (VMP) (월터 리드 아미 인스티튜트 오브 리서치(Walter Reed Army Institute of Research)의 안잘리 야다바(Anjali Yadava) 박사 제공)과 함께 적재하였다<sup>49</sup>. 1.5 mM TCEP와 함께 실온에서 1시간 동안 1 mg의 OVA를 인큐베이션함으로써 캡핑-티올 OVA를 제조한 후, 이어서 37°C에서 1시간 동안 1.5 mM의 에틸-말레이미드 (피어스(Pierce), 일리노이 록포드 소재)와 함께 인큐베이션하였다. 티올 보호의 정도는 엘만 검정(Elman's assay)으로 평가하였을 때 >95%이었다<sup>50</sup>. 10% 소 태아 혈청이 보충된 RPMI 배지에서 투석 막을 사용하여 37°C에서 100 kDa의 MW 컷오프에 따라 지질 소포로부터의 알렉사-플루오르 555로 표지된 OVA의 방출을 정량하였다. 규칙적인 간격으로, 형광의 정량을 위하여 방출되는 배지를 제거하고, 약물 방출의 연속적인 모니터링을 위하여 동일 부피의 새로운 배지로 교체하였다. 1% 트리톤 X-100 처리를 사용한 소포의 지질 추출 및 형광 분광광도측정법에 의한 방출 단백질의 측정에 의해, 시간-과정 종료시 남은 잔류 OVA를 측정하였다. 500 ng/ml의 포스포리파제 A (시그마(Sigma), 미주리 세인트루이스 소재)가 보충된 헵크 완충(Hank's buffered) 염수 용액 중에서 OVA 방출 검정도 또한 수행하였다. 캡슐화된 적재물 분자의 안정성을 조사하기 위하여, 1% 트리톤 X-100 처리를 사용하여 ICMV에 캡슐화된 단일클론 래트 IgG를 회수하여, 은 염색 (피어스(Pierce))에 의한 비-한원 조건하에서 SDS-PAGE로 분석하였다.

[0212] ICMV를 사용한 백신화 연구. C57Bl/6 마우스 (잭슨 래보라토리즈(Jackson Laboratories))의 균을 꼬리 기부에서 표시된 용량의 OVA (TLR 효능제 MPLA와 함께, 또는 그것 없이)로 피하 면역화하였다. DAPI (생/사멸 세포를 구별하기 위함), 항-CD8 알파, 항-CD44, 항-CD62L, 및 SIINFEKL/H-2K<sup>b</sup> 펩티드-MHC 사량체 (벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용한 염색 후 선택된 시점에서의 PBMC의 유동 세포측정법 분석에 의해, OVA-특이적 CD8<sup>+</sup> T-세포의 빈도 및 면역화에 의해 도출되는 그의 표현형을 측정하였다. 초회감작된 CD8<sup>+</sup> T-세포의 기능성을 평가하기 위하여, 1 μM의 OVA-펩티드 SIINFEKL을 사용하고 골기플러그(GolgiPlug) (벡톤 디킨슨)를 사용하여 6시간 동안 생체 외에서 PBMC를 자극한 후, 고정하고, 투과화하여, 항-IFN-감마 및 CD8 알파로 염색한 후, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 면역화된 마우스로부터의 혈청의 ELISA 분석에 의해, 450 nm OD 관독값이 0.5인 혈청의 희석율로 정의되는 항-OVA IgG 역가를 측정하였다. NIH, 상태 및 국지적 지침에 따라 동물들을 관리하였다.

[0213] 통계 분석. Jmp 5.1 (SAS 인스티튜트 인크(SAS Institute Inc), 노스 캐롤라이나 캐리 소재)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 일방향 또는 쌍방향 분산 분석 (ANOVA), 및 다중 비교를 위한 이후의 터키 HSD 시험을 사용하여 데이터 세트를 분석하였다. 0.05 미만의 p-값을 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 모든 값들은 평균 ± s.e.m.으로 기록하였다.

[0214] 결과

[0215] 본 발명자들은 사전형성된 MLV 내 인접하여 나란한 이중층들의 관능화 지질 헤드기들 사이에 공유 가교결합을 도입함으로써, ICMV를 형성시켰다 (도 2a). 통상적인 합성으로써, 4:1:5의 몰비로 DOPC, 음이온성 DOPG, 및 음이온성 말레이미드-헤드기 지질 MPB를 함유하는 건조된 인지질 필름을 수화한 후 초음파처리함으로써, 단순 리포솜을 형성시켰다 (단계 (i)). 2가 양이온 (예컨대  $Mg^{2+}$ )을 리포솜에 첨가하여, 전기한 바와 같은 소포 용합

및 MLV의 형성을 유도하였다<sup>32</sup> (단계 (ii)). 다음에, MLV 내 인접 이중층들 사이에 가교결합을 도입하기 위하여, 막-투과성 가교제로 작용하는 디티올트리에톨 (DTT)을 소포 현탁액에 첨가함으로써, 소포 층들 사이에 형성된 양이온 염 가교에 의해 근접하게 된 나란한 막들의 말레이미드 헤드기들 사이에 공유 결합을 형성시켰다 (단계 (iii)). PEG화는 혈청 안정성 및 지질 소포의 혈액 순환 반감기를 증가시키기 위한 잘 알려져 있는 전략이다<sup>18</sup>. 따라서, 최종 단계로서, 소포를 세척하고, 입자의 외부 표면에 노출된 잔류 말레이미드 기를 티올-종결 PEG로 캡핑하였다 (단계 (iv)).

[0216]

입자의 직경/다분산도는 해당 입자를 내재화할 수 있는 세포 유형을 결정하게 되는 반면<sup>33</sup>, 소포 벽을 구성하는 이중층의 수는 소포의 안정성, 및 혈청의 존재하에서 적재물을 보유/느리게 방출하는 그의 능력에 영향을 줄 것으로 예상될 수 있다. 이러한 특성을 평가하고 ICMV 형성 과정을 더 깊이 이해하기 위하여, 본 발명자들은 각 합성 단계에서의 생성물들을 특성화하였다: 초음파처리 (단계 (i))에 의해 형성되는 최초의 리포솜은 약 190 nm의 수력학적 직경을 가졌으며, Mg<sup>2+</sup>-매개 소포 용합 (단계 (ii)) 및 이후의 이중층의 DTT "고정(stapling)" (단계 (iii), 표 2) 후 약 240 nm까지 크기가 약간 증가하였다. 생성되는 ICMV는 단일모드의 비교적 좁은 크기 분포 (통상적인 지질 소포 또는 중합체 나노입자 제제에 비해<sup>12,21</sup>)를 나타내었으며, 동적 광 산란 (DLS) 또는 냉동 전자 현미경법으로 볼 때, 가교결합 단계 동안의 총체적인 입자 응집의 증거는 없었다 (도 2a, b, 및 표 2). DTT-처리된 소포에 대한 티올-종결 PEG의 첨가는 MLV 표면상의 나머지 검출가능 말레이미드 기들을 쉐칭하였으며, ICMV의 표면-노출 지질 중 약 2 mol%에 PEG 사슬을 도입하였지만, 입자 직경을 유의성 있게 변경시키지는 않았다 (표 2, 데이터 미제시). PBS 중에서 4°C 또는 37°C로 저장된 PEG화 ICMV는 7일 넘게 안정하게 유지되었으며, 부형제로서 첨가되는 3% 수크로스를 사용한 동결건조에 적합하였으므로<sup>34</sup>, 장기간 저장 조건에 대한 그의 부합성을 드러내었다 (표 2, 데이터 미제시). 본 발명자들은 냉동전자 현미경법에 의해 최초 리포솜, Mg<sup>2+</sup>-용합 MLV, 및 최종 ICMV를 영상화함으로써 (도 2a), DTT를 사용한 가교결합이 약 4-5 nm의 전자-조밀 줄무늬로 해상되는 견고하게 적층된 이중층으로 구성되는 두꺼운 다층 벽을 가지는 소포의 형성을 야기한다는 것을 확인하였다. 입자 당 이중층 수의 중앙값은 4.4 (4분위수간 영역(interquartile range) [IQR], 3.3-6.9)이었으며, 지질 벽 두께에 대한 입자 반경 중앙값 비는 3.8 (IQR, 2.4-6.8)이었다 (도 2c, d). 흥미롭게도, 대부분의 ICMV가 동심원 이중층들로 구성되는 소포 벽을 가졌지만, 불완전한 외부 지질 층의 형태로 표면 결합을 가지는 소수 예의 ICMV도 발견할 수 있었다 (데이터 미제시). 양이온-매개 용합 및 DTT 가교결합 후에 전자 현미경법 영상화에 의해 관찰되는 소포의 증가된 층판도에 부합하여, 소포의 외부 표면에 노출된 지질의 분율은 벌크 염료-쉐칭(bulk dye-quenching) 층판도 검정으로 측정하였을 때 합성의 단계 (ii) 및 (iii)에서 감소하였다<sup>35</sup> (표 2). DTT 처리 후 말레이미드-지질들 사이 가교결합의 화학적 증거는 ICMV 상에서의 박층 크로마토그래피 및 MALDI-TOF 측정에서 발견되었다 (데이터 미제시). 중요한 것은, 입자 크기 및 개체 층판도 분포 모두가 단일모드로, 오염성인 단층 소포가 3% 미만이었으며, 입자의 기능적 특성 (예컨대 단백질 방출)을 왜곡할 수 있는 대규모 응집은 없었다는 것이다. ICMV는 단핵구 및 수지상 세포에 의해 맹렬하게 흡수될 수 밖에 없는 크기<sup>36</sup>, 및 통상적인 단층 또는 다층 리포솜에 비해 단백질 포획을 안정화하게 되는 가교결합 다층 벽 구조를 가진다.

[0217]

안정한 소포를 형성하는 데에 필요한 조건의 분석은 ICMV 형성 기작에 대한 정보를 제공하였다. 이중층간-가교결합 후, ICMV는 14,000 ×g에서의 4분 동안의 ("저속 조건") 원심분리에 의해 수집할 수 있었던 반면, 동일한 지질 조성의 단순 리포솜 또는 MLV는 펠릿으로의 초원심분리를 필요로 하였다. 가교결합 소포 수율의 대체 척도로서의 저속 원심분리에 의해 수집되는 입자의 질량을 사용하여, 본 발명자들은 ICMV 형성에는 2가 양이온-매개 용합 (도 2a 단계 (ii), Mg<sup>2+</sup> 또는 Ca<sup>2+</sup> 중 어느 하나) 및 DTT 처리 (단계 (iii)) 모두가 필요하다는 것을 발견하였다 (표 1A, B). Mg<sup>2+</sup> 또는 DTT 단독 중 어느 하나에 의해 처리된 전구체 소포는 말레이미드 기에 비해 10 배 물 초과량에서도 유의성 있는 입자 수율을 생성시키지 못하였다 (표 1A, B). 또한, 25 mol% 이상의 MPB가 ICMV를 형성하는 데에 요구되었는데 (표 1A, B); 실질적인 ICMV 수율을 위하여 요구되는 반응성 헤드기의 높은 수준은 이중층-내 (동일 이중층 상 헤드기들 사이의) 및 이중층-간 가교결합 형성 사이의 경쟁을 반영하는 것일 수 있다. DTT는 또 다른 막-투과성 디티올인 DPDPB에 의해 대체될 수 있었으나, 사용된 조건하에서 2 kDa PEG-디티올로는 대체될 수 없었다 (표 1A, B). ICMV는 또한 DOPC 및 MPB 지질만을 사용하여, 또는 DOPG 대신 양이온성 DOTAP를 사용하여 형성될 수 있었다 (데이터 미제시). ICMV를 형성하는 대안적인 방법으로서, 말레이미드-디티올 가교결합은 소포 형성에 알킨-종결 지질을 사용하고 가교결합에 디아지드를 사용하는<sup>37,38</sup> 생물-직교(bio-orthogonal) 클릭 화학에 의해 대체될 수 있었다 (도 12, 데이터 미제시). 따라서, 안정화된 소포의 형성



을 위한 이중층간-가교결합은 다른 지질/가교제 화학에 적합화될 수 있는 일반적인 전략이다. 그의 고도의 합성 수율 및 콜로이드 안정성에 기초할 때, 본 발명자들은 단백질/백신 전달 비히클로서의 추가 시험용으로는 DOPC:DOPG:MPB 몰비 4:1:5의 지질 조성을 가지는 PEG화 ICMV에 초점을 맞추어 선택하였다.

[0218] 단백질 전달에 있어서의 ICMV의 적합성을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 수종의 구상 단백질, 즉 SIV-gag, HIV 백신 항원; FLT-3L, 치료용 시토카인; 및 모델 백신 항원인 난알부민 (OVA)의 포획을 조사하였다. 단백질 캡슐화는 합성 단계 (i)에서의 단백질 용액을 사용하여 건조 지질을 재수화함으로써 달성되었다 (도 2a). 캡슐화된 단백질의 양은 ICMV 제조의 각 단계에서 증가하였는데 (도 4a), 이는 단계 (ii) 및 (iii) 모두에서 소포 융합이 발생하면서 이루어지는 추가적인 단백질 포획을 반영하는 것일 수 있다. TCEP를 사용하여 사전-환원되고, 단백질 상의 모든 티올기를 차단하기 위하여 에틸-말레이미드로 처리된 OVA가 비개질 단백질과 유사한 수준으로 ICMV 내에 캡슐화되었기 때문에 (캡핑-티올 대 비개질 OVA는  $76.1 \pm 6.3\%$  대  $83.3 \pm 8.4\%$ ;  $p=0.17$ ), ICMV에서의 단백질 포획이 적재물 단백질 상의 티올의 말레이미드-관능화 지질 소포와의 접합에 의해 매개된 것은 아니었다. 본 발명자들은 모델 단백질 적재물에서의 디설피드 연결이 소포 형성 과정 동안 DTT 가교제에 의해 환원되지 않는다는 것, 및 ICMV 캡슐화가 단백질 응집을 촉발하지는 않는다는 것 역시 확인하였다 (데이터 미제시). ICMV에 의해 달성되는 단백질 적재의 효율 및 양을 가장 보편적인 유형의 약물 전달 비히클<sup>39-41</sup> 중 2종과 직접적으로 비교하기 위하여, 본 발명자들은 리포솜, PLGA 나노입자, 및 ICMV에서의 OVA의 캡슐화를 비교하였다. 포스포콜린, PEG-지질 및 콜레스테롤로 구성된 안정한 모델 지질 조성<sup>42</sup>을 사용하여, 본 발명자들은 리포솜을 위한 가장 효율적인 수성 포획 접근법 중 하나로서의 DRV를 형성시키고<sup>43</sup>, 이중-에멀전 용매-증발 공정<sup>44</sup>을 사용하여 OVA-적재 PLGA 입자를 제조하였다. ICMV는 DRV 또는 PLGA 입자 중 어느 하나에 비해 뛰어난 캡슐화 효율 (약 75%) (각각 2배 및 4배 증가; 도 4b)을 나타내었고, 총 입자 질량 당 캡슐화된 OVA의 양 (입자 mg 당 약 325  $\mu\text{g}$  OVA)은 DRV 또는 PLGA 입자에 비해 ICMV에서 각각 1.8배 및 9배 증가하였다 (도 4c). 따라서, ICMV는 다양한 구상 단백질들을 캡슐화하는 데에 효과적인 것으로 보이며, 적어도 모델 항원 OVA에 있어서는, ICMV가 통상적인 대안 단백질 담체들에 비해 더 효율적으로 단백질을 적재하였다.

[0219] 다음으로, 본 발명자들은 이중층간 가교결합이 지지 소포가 생분해성을 보유하는 동시에 혈청 존재하에서의 단백질 보유를 증가시킬 수 있도록 하였는지 여부를 확인하였다. OVA를 모두 동일한 지질 조성을 가지는 PEG화 리포솜, Mg<sup>2+</sup>-융합 MLV, 또는 ICMV에 적재하고, 10% 소 태아 혈청을 함유하는 배지 중에서 37°C로 단백질 방출의 동역학을 정량하였다. 단층 리포솜은 약 2일 이내에 그의 전체 포획 OVA 적재물을 빠르게 방출한 반면, 다층 Mg<sup>2+</sup>-융합 MLV는 동일한 시간 기간 동안에 그의 포획된 적재물 중 약 50%를 방출하였다 (도 4d). 그러나, ICMV는 1주까지 그의 적재물의 약 25% 만을, 그리고 30일 후에 약 90%를 방출함으로써, 상당히 향상된 단백질 보유력을 나타내었다 (도 4d). 특히, ICMV는 또한 콜레스테롤의 함입에 의해 안정화된 단층 리포솜<sup>42</sup>에 비해 상당히 더 느리게 단백질을 방출하였다 (도 4d). 가교결합된 소포는 또한 4°C에서 30일 이상 동안 PBS 중에서 저장되었을 때 그의 포획 단백질 중 약 95%를 보유하였다 (도 4e). 세포내 구획을 모델링한 조건에서의 ICMV로부터의 단백질 방출도 조사하였다: 환원 또는 산성 조건에서 37°C로 1일 동안 인큐베이션된 소포는 포획된 OVA 중 >95%를 보유한 반면, 포스포리파제 A와 함께 인큐베이션은 >90%의 OVA 방출 및 빠른 소포 분해를 야기하였다 (도 4e). 따라서, ICMV는 통상적인 리포솜 제제에 비해 혈청의 존재하에서 향상된 안정성을 나타내지만, 세포 내의 엔도리소솜 구획 내에 존재하는 효소<sup>31</sup>의 존재하에서는 빠르게 파괴됨으로써, 세포에 의한 내재화 후 촉발된 적재물의 세포내 방출에 대한 기작을 제공하였다. 생체내 투여시 세포에 의한 내재화 전에 소포 내에서의 약간의 단백질 분해가 가능할 수 있기는 하지만, 백신 전달에서의 면역화 후 최초 수일 이내에 항원의 빠른 흡수 및 프로세싱이 이루어지게 되며<sup>45</sup>, 이 경우, 그와 같은 분해 과정은 최소화될 수 있다.

[0220] 본 발명자들은 세포의 환경에서는 캡슐화된 단백질 항원의 효율적인 보유력을 가지나 엔도솜/리소솜에서는 빠르게 방출하는 ICMV의 독특한 구조가 향상된 백신 반응을 제공하리라는 가설을 확립하였다. 백신 ICMV를 생성시키기 위하여, 모델 항원인 OVA (OVA-ICMV)를 보유하는 소포를 제조한 후, 해당 소포를 분자 아주반트인 모노포스포릴 지질 A (MPLA)와 혼합하였다. MPLA는 수지상 세포, B-세포 및 선천 면역 세포에 의해 발현되며 백신 반응을 강력하게 증폭시키는, 톨-유사 수용체 (TLR) 4에 대한 FDA-승인 효능제이다<sup>1,46</sup>. MPLA와 혼합된 항원-적재 ICMV는 시험관 내에서 비장 및 골수 수지상 세포 (DC) 상의 공동자극 분자의 상향조절을 MPLA가 없는 ICMV에 의해 촉발된 DC에 비해 촉진하였다 (도 7a, 데이터 미제시). MHC 클래스 I H-2K<sup>b</sup> 분자와 복합체화된 SIINFEKL 펩



티드 (OVA<sub>257-264</sub>)를 인식하는 25-D1.16 mAb를 사용하여 DC를 염색함으로써 측정하였을 때, ICMV에 의해 촉발된 DC는 가용성 OVA (MPLA가 첨가되었거나 첨가되지 않음)에 의해 촉발된 것들에 비해 크게 향상된 효율로 OVA로부터 유래하는 펩티드를 교차-제시하였다 ( $p < 0.001$ , 가용성 OVA, 또는 비관련 항원 [삼일열 말라리아 단백질, VMP]이 적재된 ICMV와 비교, 도 7b). 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE) 희석 검정에 의해 평가하였을 때, OVA-ICMV+MPLA와 함께 인큐베이션된 비장 DC는 시험관 내에서 OVA-특이적 비경험 OT-1 CD8<sup>+</sup> T-세포의 강력한 증식을 촉발하였다. 반면, 동일 용량의 가용성 OVA 및 MPLA, 빈 ICMV, 또는 VMP-ICMV를 사용하여 DC를 촉발하였을 경우, 약한 T-세포 반응이 검출됨으로써, ICMV에 의해 도출되는 T-세포 반응의 특이성을 보여주었다 (도 7c). 이러한 결과는 MPLA의 첨가가 ICMV 또는 가용성 OVA에 의한 증가의 DC 활성화를 가능케 하나, 미립자 항원 전달에 대하여 예상되는 바와 같이, ICMV가 향상된 항원의 교차-제시를 촉발한다는 것을 암시한다.

[0221] 생체 내에서의 면역 반응에 대한 소포 구조의 영향을 확인하기 위하여, 증가 용량의 OVA, MPLA 및 지질 (각각 10  $\mu\text{g}$ , 0.1  $\mu\text{g}$ , 및 142  $\mu\text{g}$ )을 사용하여 PEG화 단층 리포솜, MLV 또는 ICMV 형태로 C57B1/6 마우스에 백신을 접종하였다. 면역화 7일 후, 본 발명자들은 유동 세포측정법에 의해 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 중 OVA 펩티드-MHC 사랑체<sup>+</sup> (항원-특이적) CD8<sup>+</sup> T-세포의 빈도를 분석함으로써 내인성 CD8<sup>+</sup> T-세포 반응의 강도를 평가하였고, 가용성 OVA < 리포솜 < Mg<sup>2+</sup>-융합 MLV < ICMV 순서로 T-세포 반응이 증가하는 경향을 발견하였다 (도 9a). 면역화 3주 후, Mg<sup>2+</sup>-융합 MLV는 동물의 혈청 중에서 가용성 OVA 또는 단층 리포솜에 비해 약 100배 더 큰 OVA-특이적 IgG 역가를 도출하였다. 그러나, ICMV 면역화는 가용성 OVA ( $p < 0.01$ ) 및 비-가교결합 MLV 면역화 ( $p < 0.05$ )보다 각각 약 1000배 및 약 10배 더 큰, 실질적으로 더 강한 체액성 반응을 생성시켰다 (도 9b). 따라서, ICMV의 안정화된 구조는 T-세포 및 항체 반응 모두를 촉진하였다. 다른 제제들에 비해 ICMV를 사용한 면역화에 대한 T-세포 및 항체 반응이 향상된 것은 항원-제시 세포 (APC)로의 향상된 항원 전달, 향상된 DC 활성화, 향상된 항원 교차-제시 (시험관 내에서 관찰된 바와 같음), 또는 이러한 인자들의 조합에 기인할 수 있었다. 이러한 가능성들 사이를 구별하기 위하여, 가용성, 리포솜 또는 ICMV 제제로서 MPLA와 혼합된 형광단-접합 OVA를 사용하여 마우스를 면역화하고, 2일차에 OVA를 내재화한 배액성 서혜부 림프절(drainage inguinal lymph node) 세포를 평가하였다. ICMV에 의해 전달된 OVA는 배액 림프절 (dLN)의 전체 DC, 대식세포 및 형질세포양 (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) DC에서 용이하게 검출된 반면, 가용성 및 리포솜 제제는 바탕을 거의 넘지 않는 형광을 나타내었다 ( $p < 0.01$ , 도 9c, d). 비표지 OVA를 사용하여 이와 같은 분석을 반복함으로써, 본 발명자들은 MPLA를 포함하는 OVA-ICMV의 투여가 가용성 또는 리포솜 OVA+MPLA에 비해 dLN의 DC 중 공동-자극 마커 및 MHC-II 발현의 약간의 향상을 촉발하였다는 것을 발견하였다 (도 9e, 데이터 미제시). 그러나, OVA 펩티드 제시를 검출하기 위하여 25-D1.16 항체를 사용한 경우, 본 발명자들이 ICMV 면역화 후에는 dLN의 DC에서 OVA 펩티드-MHC 복합체가 용이하게 검출한 반면, 가용성 OVA 또는 리포솜 OVA 주사는 자가-펩티드 MHC 복합체<sup>47</sup>와의 25-D1.16의 예상되었던 바탕 교차-반응성을 넘는 염색을 생성시키지 못하였다 (도 9f). 모두 합쳐, 이와 같은 결과는 ICMV의 가교결합 다층 구조에서의 향상된 포획 항원 보유력이 APC로의 향상된 항원 전달, 및 이후의 향상된 교차-제시로 이어진다는 것을 암시한다.

[0222] ICMV의 다층 구조는 단백질 항원 (수성 코어 내에)뿐만 아니라 친유성 분자도 (소포 벽 내에) 격리할 기회를 부여한다. 따라서, 본 발명자들은 ICMV의 벽 전체에 걸쳐 MPLA를 매립하는 것이 항원과 함께 MPLA를 소포에 더 잘 보유하게 함으로써 생체내 면역 반응에 영향을 주게 되는지 여부를 시험하였다. 합성의 제1 단계에서 다른 지질들과 함께 MPLA를 공동-용해시킴으로써 TLR 효능제를 소포 층들 전체에 걸쳐 도입하고 (int-MPLA ICMV), 후-삼입 접근법을 통하여 소포 표면에만 도입된 동일한 양의 MPLA를 보유하는 ICMV (ext-MPLA ICMV, 도 11a, 데이터 미제시)와 상기 소포를 비교하였다. ICMV 또는 가용성 형태로의 OVA (10  $\mu\text{g}$ ) 및 MPLA (0.1  $\mu\text{g}$  또는 1.0  $\mu\text{g}$ )를 사용하여 마우스를 피하 면역화하고, 동일한 제제를 사용하여 21일차 및 35일차에 추가접종하였다. 도 11b에 나타난 바와 같이, 저용량의 MPLA를 사용한 면역화는 가용성 OVA에 대해서는 2회의 추가접종 후에도 거의 검출할 수 없는 항체 반응을 야기한 반면, int-MPLA 및 ext-MPLA ICMV 양자는 56일차까지 강한 항-OVA 혈청 IgG 역가를 도출하였다. 가용성 OVA에 대한 IgG 반응은 10배 더 많은 MPLA를 사용하여 수득될 수 있었지만, 1.0  $\mu\text{g}$ 의 MPLA를 포함하는 int-MPLA ICMV는 가용성 단백질보다 더 높은 역가 (56일차에 약 13배 더 큼)를 도출하였다. 반면, 본 발명자들은 본 면역화 연구 내내, ICMV의 지질 성분에 대하여 유도되는 임의의 유의성 있는 수준의 항체는 조금도 관찰하지 못했다 (데이터 미제시).

[0223] ICMV의 다층 내에 MPLA를 매립하는 것은 백신접종에 대한 CD8<sup>+</sup> T-세포 반응에 더욱 놀라운 효과를 가졌다. 0.1  $\mu\text{g}$ 의 MPLA와 혼합된 가용성 OVA는 PBMC에서의 사랑체 염색으로 평가하였을 때 거의 검출할 수 없는 항원-특이적

T-세포 증식을 도출하였으며; ext-MPLA ICMV 전달은 d41까지 2.5배 증가된 사랑체<sup>+</sup> T-세포 군집을 야기하였다 (도 11c,  $p < 0.05$ ). 10배 더 많은 MPLA의 첨가에 의해 가용성 OVA 면역화는 중국에는 추가접종 후의 ext-MPLA ICMV와 등가인 T-세포 반응에 도달할 수 있게 되었다. 반면, int-MPLA ICMV를 사용한 면역화는 매우 더 강한 CD8<sup>+</sup> T-세포 반응을 도출하였으며, 이는 각 추가접종 후 계속 증대되어, 41일차까지 CD8<sup>+</sup> T-세포 군집 중 최대 28%의 사랑체<sup>+</sup> T-세포에 도달하였다 (ext-MPLA ICMV에 비해 5배 더 크며 ( $p < 0.05$ ), 가용성 OVA+MPLA에 비해 14배 더 큼 ( $p < 0.01$ ), 도 11c). 특히, int-MPLA ICMV는 전체적으로 상당히 더 높은 빈도의 사랑체<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> 세포 (병원체 및 종양에 대하여 오래 지속되는 보호를 제공하는 것으로 알려져 있는 중추 기억 T-세포의 표현형<sup>48</sup>)를 도출하였다 ( $p < 0.01$ , 도 11d). int-MPLA ICMV에 의해 도출된 항원 특이적 T-세포는 최종 추가접종 후 1개월 후에도 CD8<sup>+</sup> T-세포 중 약 11%의 사랑체<sup>+</sup> T-세포로 지속되었다 (ext-MPLA ICMV 및 가용성 OVA+MPLA에 비해 각각 3배 및 8배 더 큼, 모두  $p < 0.05$ , 도 11c). 이러한 면역화에 의해 증대되는 T-세포의 기능을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 49일차에 생체외에서 재자극시 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )를 생산하는 말초 혈액 유래 CD8<sup>+</sup> T-세포의 능력을 평가하였다. int-MPLA ICMV에 의해 면역화된 마우스는 ext-MPLA ICMV 또는 가용성 OVA-면역화를 받는 마우스에 비해 훨씬 더 높은 수준의 IFN- $\gamma$ -적격 T-세포를 가졌다 ( $p < 0.05$ , 도 11e). 알고 있는 한, 항원-특이적 T-세포 증대의 정도, 기억 세포의 지속성, 및 IFN- $\gamma$  기능성 면에서, 이것은 단백질 백신에 대하여 기록된 적이 없는 가장 강한 내인성 T-세포 반응들 중 하나로, 재조합 바이러스와 같은 강한 생 벡터에 비견될 만한 것이다<sup>5,6</sup>. 특히, 이것은 동일한 입자 제제를 사용한 반복 면역화로써, 병원체-기재 전달 벡터 자체에 대하여 발생하는 면역 반응<sup>7</sup>으로 인하여 많은 생 벡터에서는 사용될 수 없는 전략인, "동종(homologous)" 추가접종을 통하여 달성된다.

[0224] 본 연구는 생물의학 적용분야를 위한 수많은 매력적인 특징들이 조합되어 있는, 가교결합 다층 지질 소포 기재인 새로운 부류의 마이크로미터 이하 입자 시약의 합성을 입증하는 바; 상기 입자 합성은 유기 용매에 대한 단백질 적재물의 노출을 필요로 하지 않으며, 입자의 지질 기재가 그것을 본질적으로 대사가 가능한 부산물로 분해가 능하도록 해주고, 인지질 셀은 친유성 및 친수성 적재물 모두의 모듈식(modular) 포획을 가능케 하며, 단백질이 입자 질량 당 매우 높은 수준으로 캡슐화되고, 입자로부터의 단백질 방출이 매우 오랜 기간 동안 지속될 수 있다. 이러한 결과는 ICMV가 생체거대분자를 전달하는 데에, 그리고 특히 백신 적용분야를 위하여 매우 효과적인 비히클이 될 수 있음을 암시한다. 합성 입자 백신을 사용하여 그와 같이 강하게 조합된 T-세포 및 항체 반응을 달성하는 능력은 감염성 질환 및 암의 환경에서의 백신접종을 위한 새로운 가능성을 열 수 있다.

[0225] [참고 문헌]

1. Guy, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* **5**, 505-517 (2007).
2. Perrie, Y., Mohammed, A.R., Kirby, D.J., McNeil, S.E. & Bramwell, V.W. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm* **364**, 272-280 (2008).
3. Reed, S.G., Bertholet, S., Coler, R.N. & Friede, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* **30**, 23-32 (2009).
4. Walker, B.D. & Burton, D.R. Toward an AIDS vaccine. *Science* **320**, 760-764 (2008).
5. Haglund, K., et al. Robust recall and long-term memory T-cell responses induced by prime-boost regimens with heterologous live viral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env proteins. *J Virol* **76**, 7506-7517 (2002).
6. Flatz, L., et al. Development of replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8+ T cell immunity. *Nat Med* **16**, 339-345 (2010).
7. Brave, A., Ljungberg, K., Wahren, B. & Liu, M.A. Vaccine delivery methods using viral vectors. *Mol Pharm* **4**, 18-32 (2007).
8. Priddy, F.H., et al. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis* **46**, 1769-1781 (2008).

[0226]

9. Hubbell, J.A., Thomas, S.N. & Swartz, M.A. Materials engineering for immunomodulation. *Nature* **462**, 449-460 (2009).
10. Heath, W.R. & Carbone, F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* **1**, 126-134 (2001).
11. Kwon, Y.J., James, E., Shastri, N. & Frechet, J.M. In vivo targeting of dendritic cells for activation of cellular immunity using vaccine carriers based on pH-responsive microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18264-18268 (2005).
12. Hamdy, S., *et al.* Enhanced antigen-specific primary CD4+ and CD8+ responses by codelivery of ovalbumin and toll-like receptor ligand monophosphoryl lipid A in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* **81**, 652-662 (2007).
13. Heit, A., Schmitz, F., Haas, T., Busch, D.H. & Wagner, H. Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity. *Eur J Immunol* **37**, 2063-2074 (2007).
14. Schlosser, E., *et al.* TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine* **26**, 1626-1637 (2008).
15. Heffernan, M.J., Kasturi, S.P., Yang, S.C., Pulendran, B. & Murthy, N. The stimulation of CD8+ T cells by dendritic cells pulsed with polyketal microparticles containing ion-paired protein antigen and poly(inosinic acid)-poly(cytidylic acid). *Biomaterials* **30**, 910-918 (2009).
16. Demento, S.L., *et al.* Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine* **27**, 3013-3021 (2009).
17. Reddy, S.T., *et al.* Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol* **25**, 1159-1164 (2007).
18. Torchilin, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 145-160 (2005).
19. Gregoriadis, G., Gursel, I., Gursel, M. & McCormack, B. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *Journal of Controlled Release* **41**, 49-56 (1996).
20. Jeong, J.M., Chung, Y.C. & Hwang, J.H. Enhanced adjuvant property of polymerized liposome as compared to a phospholipid liposome. *J Biotechnol* **94**, 255-263 (2002).
21. Vangala, A., *et al.* Comparison of vesicle based antigen delivery systems for delivery of hepatitis B surface antigen. *J Control Release* **119**, 102-110 (2007).
22. Steers, N.J., Peachman, K.K., McClain, S., Alving, C.R. & Rao, M. Liposome-encapsulated HIV-1 Gag p24 containing lipid A induces effector CD4+ T-cells, memory CD8+ T-cells, and pro-inflammatory cytokines. *Vaccine* **27**, 6939-6949 (2009).
23. Bhowmick, S., Mazumdar, T., Sinha, R. & Ali, N. Comparison of liposome based antigen delivery systems for protection against *Leishmania donovani*. *J Control Release* **141**, 199-207 (2010).
24. Reddy, R., Zhou, F., Nair, S., Huang, L. & Rouse, B.T. In vivo cytotoxic T lymphocyte induction with soluble proteins administered in liposomes. *J Immunol* **148**, 1585-1589 (1992).
25. Collins, D.S., Findlay, K. & Harding, C.V. Processing of exogenous liposome-encapsulated antigens in vivo generates class I MHC-restricted T cell responses. *J Immunol* **148**, 3336-3341 (1992).
26. Wakita, D., *et al.* An indispensable role of type-1 IFNs for inducing CTL-mediated complete eradication of established tumor tissue by CpG-liposome co-encapsulated with model tumor antigen. *Int Immunol* **18**, 425-434 (2006).

[0227]

27. Popescu, M.C., *et al.* A novel proteoliposomal vaccine elicits potent antitumor immunity in mice. *Blood* **109**, 5407-5410 (2007).
28. Allen, T.M., Mumbengegwi, D.R. & Charrois, G.J. Anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin improves the therapeutic efficacy in murine B-cell lymphoma and ameliorates the toxicity of liposomes with varying drug release rates. *Clin Cancer Res* **11**, 3567-3573 (2005).
29. Cashion, M.P. & Long, T.E. Biomimetic Design and Performance of Polymerizable Lipids. *Accounts of Chemical Research* **42**, 1016-1025 (2009).
30. Hotz, J. & Meier, W. Vesicle-templated polymer hollow spheres. *Langmuir* **14**, 1031-1036 (1998).
31. Mahadevan, S. & Tappel, A.L. Lysosomal lipases of rat liver and kidney. *J Biol Chem* **243**, 2849-2854 (1968).
32. Papahadjopoulos, D., Nir, S. & Duzgunes, N. Molecular mechanisms of calcium-induced membrane fusion. *J Bioenerg Biomembr* **22**, 157-179 (1990).
33. Zauner, W., Farrow, N.A. & Haines, A.M. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J Control Release* **71**, 39-51 (2001).
34. Mohammed, A.R., Bramwell, V.W., Coombes, A.G. & Perrie, Y. Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. *Methods* **40**, 30-38 (2006).
35. Girard, P., *et al.* A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys J* **87**, 419-429 (2004).
36. Lutsiak, M.E., Robinson, D.R., Coester, C., Kwon, G.S. & Samuel, J. Analysis of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanosphere uptake by human dendritic cells and macrophages in vitro. *Pharm Res* **19**, 1480-1487 (2002).
37. Huisgen, R. Cycloadditions - definition classification and characterization. *Angewandte Chemie-International Edition* **7**, 321-& (1968).
38. Wang, Q., *et al.* Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J Am Chem Soc* **125**, 3192-3193 (2003).
39. Allen, T.M. & Cullis, P.R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* **303**, 1818-1822 (2004).
40. Mundargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P. & Aminabhavi, T.M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* **125**, 193-209 (2008).
41. Vasir, J.K. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 718-728 (2007).
42. Gabizon, A., *et al.* Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res* **54**, 987-992 (1994).
43. Kirby, C. & Gregoriadis, G. Dehydration-rehydration vesicles - a simple method for high-yield drug entrapment in liposomes. *Bio-Technology* **2**, 979-984 (1984).
44. Bershteyn, A., *et al.* Polymer-supported lipid shells, onions, and flowers. *Soft Matter* **4**, 1787-1791 (2008).
45. McKee, A.S., Munks, M.W. & Marrack, P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity* **27**, 687-690 (2007).
46. Mata-Haro, V., *et al.* The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* **316**, 1628-1632 (2007).

[0228]

47. Porgador, A., Yewdell, J.W., Deng, Y., Bennink, J.R. & Germain, R.N. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* **6**, 715-726 (1997).
48. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**, 745-763 (2004).
49. Yadava, A., *et al.* A novel chimeric Plasmodium vivax circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. *Infect Immun* **75**, 1177-1185 (2007).
50. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**, 70-77 (1959).

[0229]

[0230] [등가물]

[0231]

본원에서는 본 발명의 몇 가지 실시양태가 기술 및 예시되었지만, 당업자라면, 해당 기능을 수행하고/거나 본원에 기술되어 있는 결과 및/또는 하나 이상의 이익을 얻기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조들이 용이하게 떠오를 것인 바, 그와 같은 변종 및/또는 변형 각각은 본원에 기술되어 있는 본 발명 실시양태의 영역에 속하는 것으로 간주된다. 더 일반적으로, 당업자라면, 본원에 기술되어 있는 모든 파라미터, 치수, 물질 및 구성들이 대표적인 것을 의미한다는 것, 그리고 실제 파라미터, 치수, 물질 및/또는 구성은 본 발명의 교시가 사용되는 구체적인 적용분야 또는 적용분야들에 따라 달라지게 된다는 것을 잘 알고 있을 것이다. 당업자라면, 일상적인 실험만을 사용하여, 본원에 기술되어 있는 구체적인 본 발명의 실시양태들에 대한 많은 등가물들을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 전기한 실시양태들은 단지 예로써 제공된 것이며, 첨부된 청구범위 및 그의



등가물의 영역 내에서, 본 발명의 실시양태가 구체적으로 기술 및 청구된 것과 다르게 실시될 수도 있다는 것이 이해되어야 한다. 본 개시내용의 본 발명 실시양태는 본원에 기술되어 있는 각 개별 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 그와 같은 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법들이 상호 모순되지 않는 경우, 그와 같은 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법들 2종 이상의 어떠한 조합도 본 개시의 발명 영역 내에 포함된다.

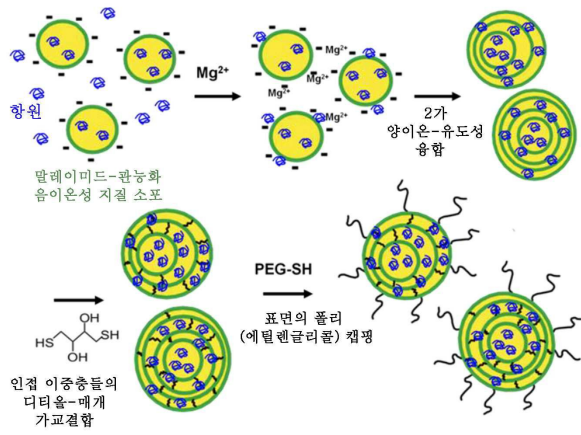
- [0232] 본원에서 정의 및 사용될 때의 모든 정의는 사전적 정의, 참조로 포함되는 문헌에서의 정의, 및/또는 정의되는 용어의 일반적인 의미보다 우선하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0233] 본원에 개시되어 있는 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원들은 각각이 인용되는 주제와 관련하여 참조로 포함되는데, 일부 경우, 그것은 전체 문헌을 포괄할 수 있다.
- [0234] 본원의 명세서 및 청구범위에서 사용될 때의 부정관사 "a" 및 "an"은 분명하게 다른 것으로 표시되지 않는 한 "하나 이상"을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0235] 본원의 명세서 및 청구범위에서 사용될 때의 "및/또는"이라는 구는 그렇게 한데 묶인 요소들 중 "어느 하나 또는 둘 모두", 즉 어떤 경우에는 한데 묶여 존재하며 다른 경우에는 분리되어 존재하는 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는"을 사용하여 열거되는 다수의 요소들은 동일한 양식, 즉 그렇게 한데 묶인 요소들 중 "하나 이상"으로 간주되어야 한다. 구체적으로 확인된 해당 요소와 관련되어 있는지 또는 무관한지에 관계 없이, "및/또는" 구에 의해 구체적으로 확인되어 있는 요소가 아닌 다른 요소가 임의로 존재할 수도 있다. 따라서, 비제한적인 예로서, "포함하는"과 같은 개방형 언어와 함께 사용되는 경우, "A 및/또는 B"라는 언급은 일 실시양태에서는 A만을 (임의로 B가 아닌 다른 요소 포함); 또 다른 실시양태에서는 B만을 (임의로 A가 아닌 다른 요소 포함); 또 다른 실시양태에서는 A와 B 모두를 (임의로 다른 요소 포함) 지칭할 수 있는 등이다.
- [0236] 본원의 명세서 및 청구범위에서 사용될 때, "또는"은 상기 정의된 바와 같은 "및/또는"과 동일한 의미를 가지는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 목록에서 항목들을 분리할 때, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것으로, 즉 하나 이상뿐만 아니라, 하나 초과를 포함하여 수많은 요소 또는 요소 목록, 그리고 임의로는 추가적인 비열거 항목들도 포함하는 것으로 해석될 수 있다. "중 하나만" 또는 "중 정확히 하나", 또는 청구범위에서 사용될 때의 "로 구성되는"과 같이 분명하게 다르게 표시되는 용어만이 수많은 요소들 또는 요소 목록 중 정확하게 하나의 요소를 포함하는 것을 지칭하게 된다. 일반적으로, "어느 하나", "중 하나", "중 하나만" 또는 "중 정확히 하나"와 같은 배제성의 용어가 선행하는 경우, 본원에서 사용될 때의 "또는"이라는 용어는 배제적인 대안 (즉, "하나 또는 다른 하나, 그러나 둘 모두는 아님")을 표시하는 것으로만 해석될 수 있다. 청구범위에서 사용될 때의 "본질적으로 ~로 구성되는"은 특허법 분야에서 사용될 때의 그의 일반적인 의미를 가질 수 있다.
- [0237] 본원의 명세서 및 청구범위에서 사용될 때, 하나 이상 요소들의 목록에 대한 언급에서의 "하나 이상"이라는 구는 요소 목록의 요소들 중 임의의 하나 이상에서 선택되는 하나 이상의 요소를 의미하나, 요소 목록 내에 구체적으로 열거되어 있는 각각 및 모든 요소들 중 하나 이상을 반드시 포함할 필요는 없으며, 요소 목록 내 요소들의 임의 조합을 배제하는 것은 아닌 것으로 이해되어야 한다. 이와 같은 정의는 또한 구체적으로 확인되어 있는 요소들과 관련되어 있는지 또는 무관한지에 관계 없이, "하나 이상"이라는 구가 지칭하는 요소 목록 내에서 구체적으로 확인되는 요소가 아닌 다른 요소가 임의로 존재할 수 있도록 허용한다. 따라서, 비제한적인 예로서, "A 및 B 중 하나 이상" (또는 등가로서 "A 또는 B 중 하나 이상", 또는 등가로서 "A 및/또는 B 중 하나 이상")은 일 실시양태에서는 임의로 하나 초과를 포함하여 B가 존재하지 않는 하나 이상의 A를 (및 임의로 B가 아닌 다른 요소 포함); 또 다른 실시양태에서는 임의로 하나 초과를 포함하여 A가 존재하지 않는 하나 이상의 B를 (및 임의로 A가 아닌 다른 요소 포함); 또 다른 실시양태에서는 임의로 하나 초과를 포함하여 하나 이상의 A, 및 임의로 하나 초과를 포함하여 하나 이상의 B를 (및 임의로 다른 요소 포함) 지칭할 수 있는 등이다.
- [0238] 분명하게 다르게 표시되지 않는 한, 하나를 초과하는 단계 또는 작용을 포함하는 임의의 본원 청구 방법들에서, 방법 단계 또는 작용의 순서는 반드시 방법 단계 또는 작용이 언급되어 있는 순서로 제한될 필요는 없다는 것 역시 이해되어야 한다.
- [0239] 청구범위는 물론 상기한 명세서에서, "포함하는", "포함한", "보유하는", "가지는", "함유하는", "수반한", "유지하는", "를 포함하여 구성되는" 등과 같은 모든 전이성(transitional) 구들은 개방형인 것으로, 즉 포함하나 그에 제한되지는 않음을 의미하는 것으로 이해될 수 있다. 미국 특허청 특허 심사 절차 매뉴얼 섹션 2111.03에 제시되어 있는 바와 같이, "로 구성되는" 및 "본질적으로 ~로 구성되는"이라는 전이성 구만이 각각 폐쇄형 또는



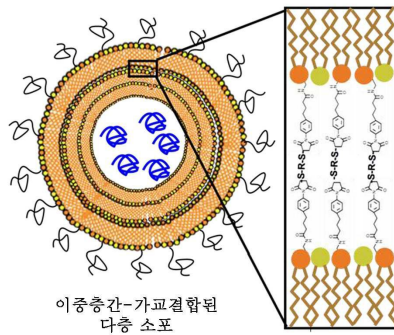
반-폐쇄형 전이 구일 수 있다.

도면

도면1

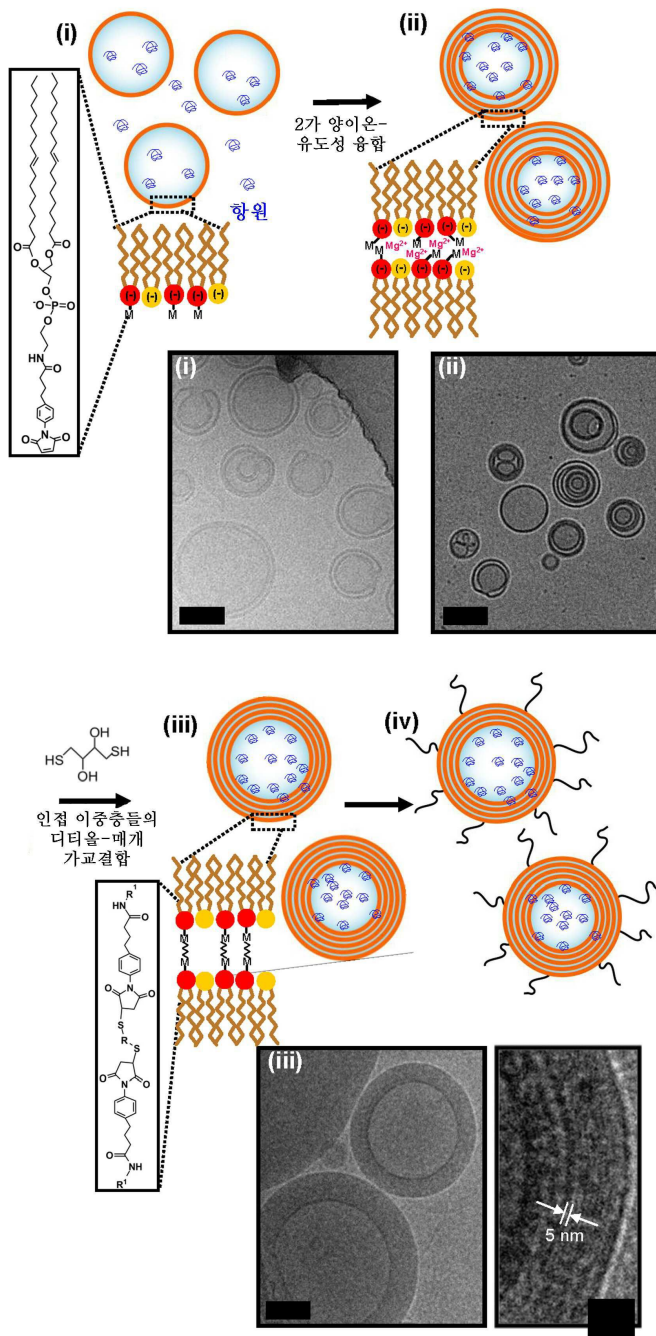


1A

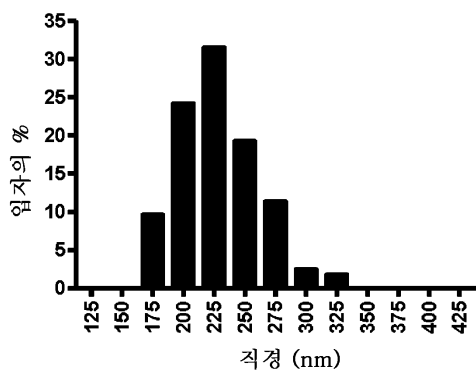


1B

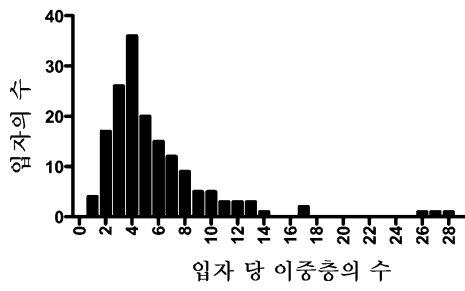
도면2a



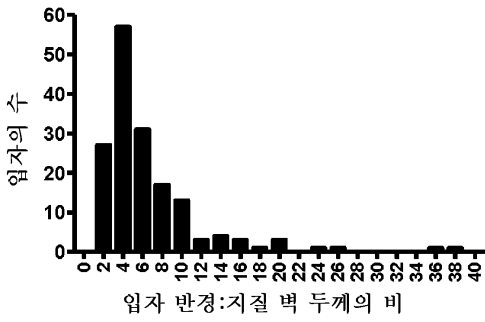
도면2b



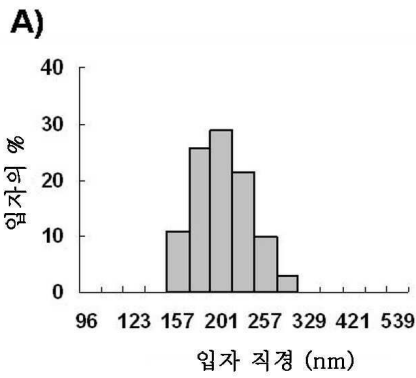
도면2c



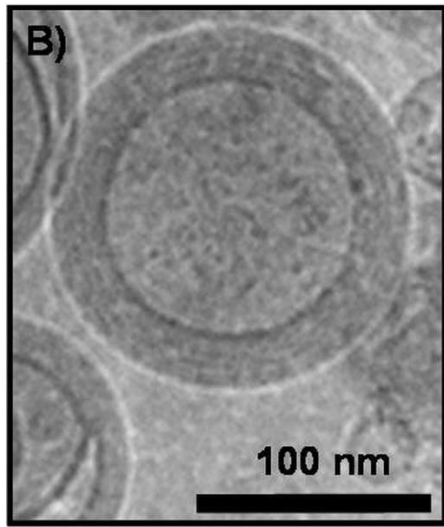
도면2d



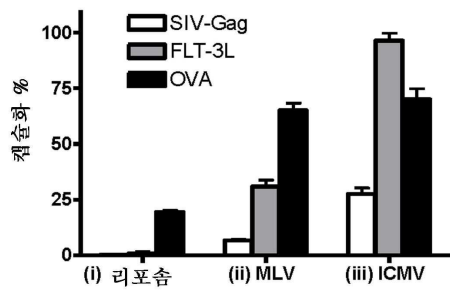
도면3a



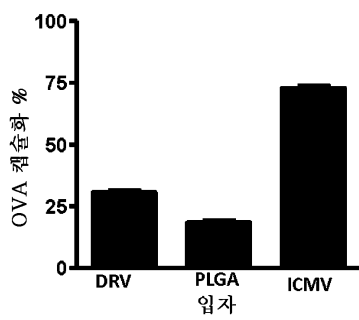
도면3b



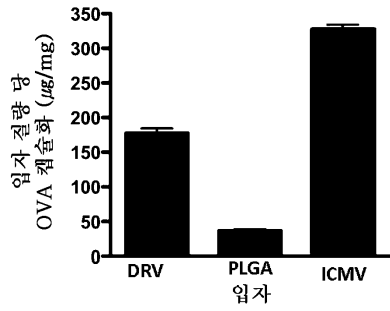
도면4a



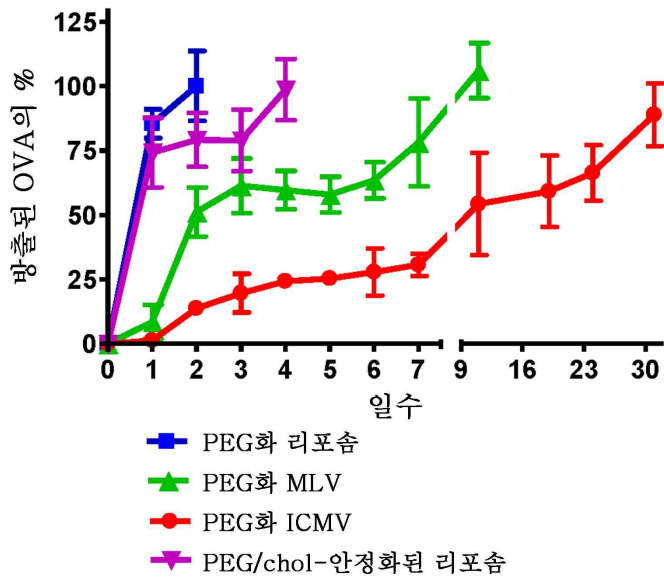
도면4b



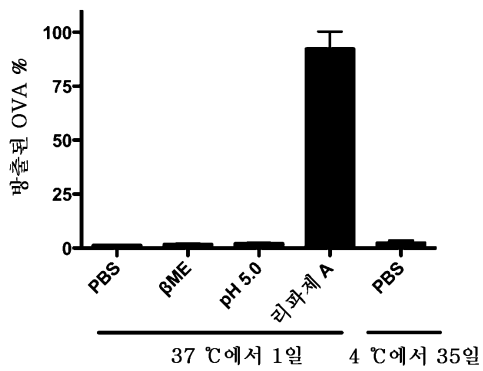
도면4c



도면4d

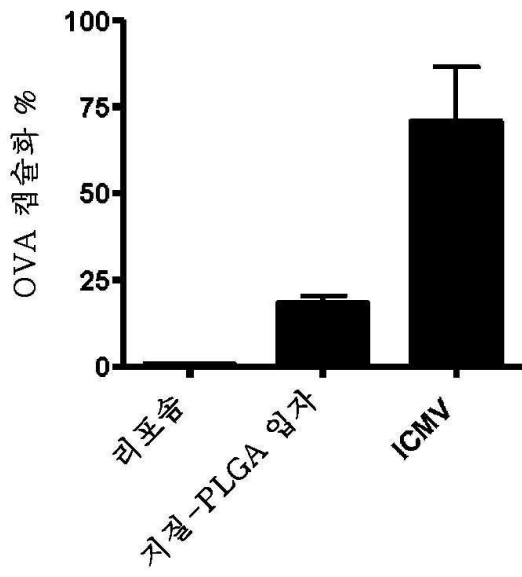


도면4e

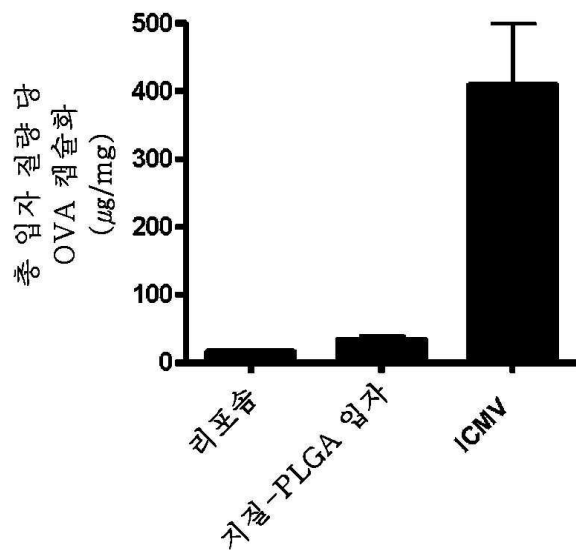




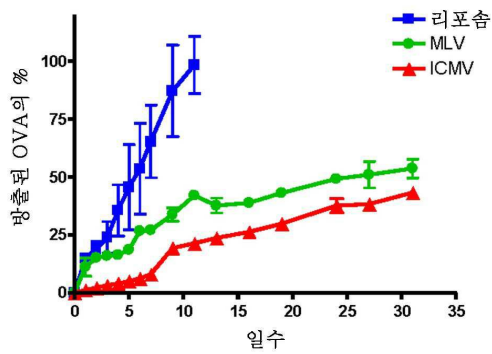
도면5a



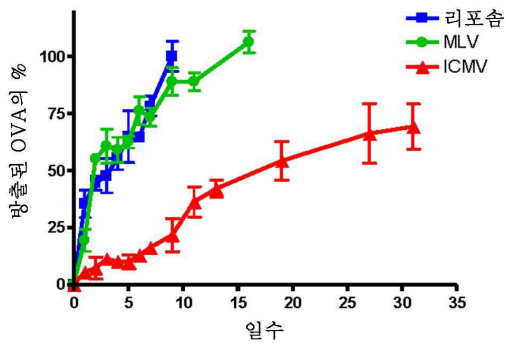
도면5b



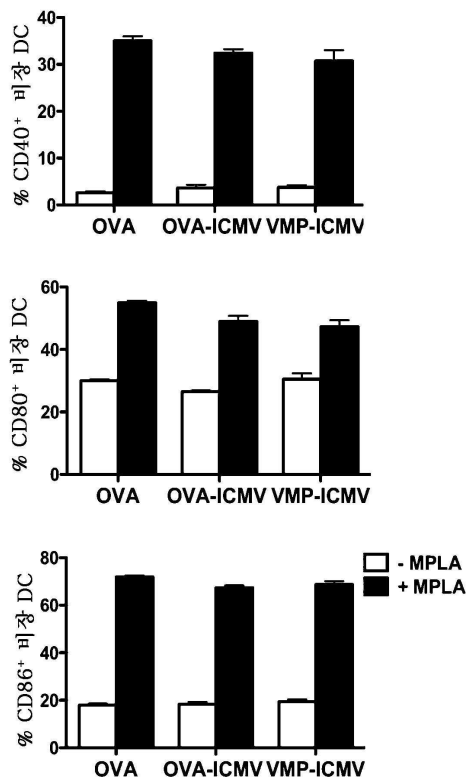
도면6a



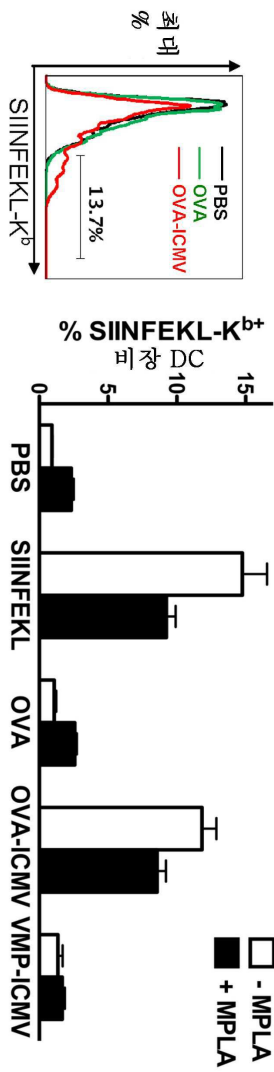
도면6b



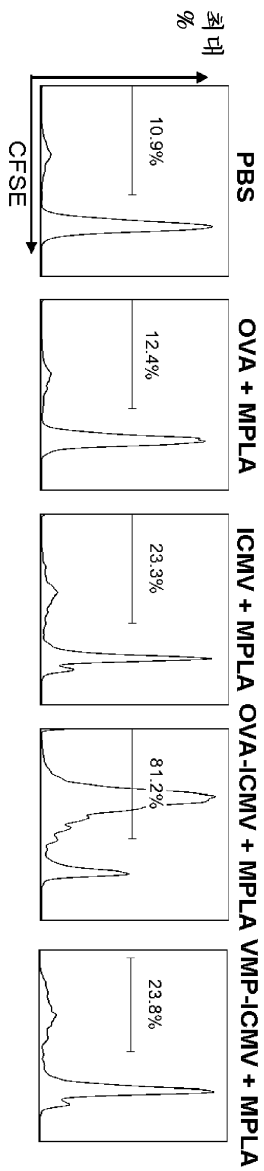
도면7a



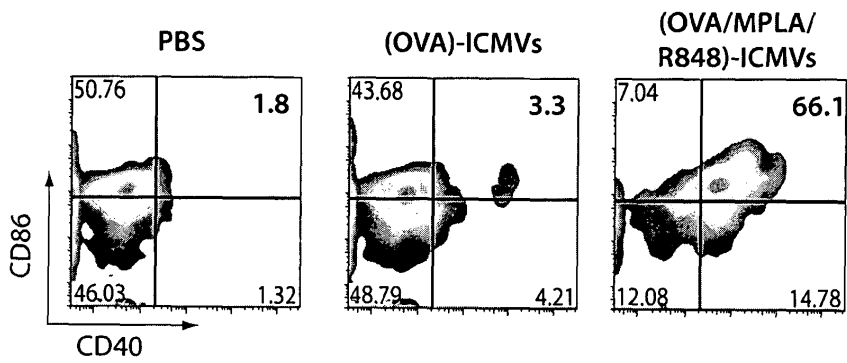
도면7b



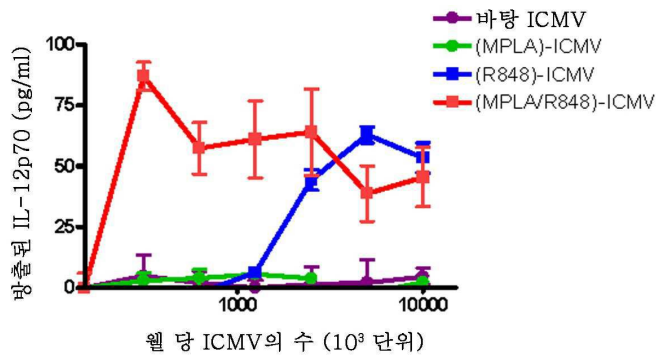
도면7c



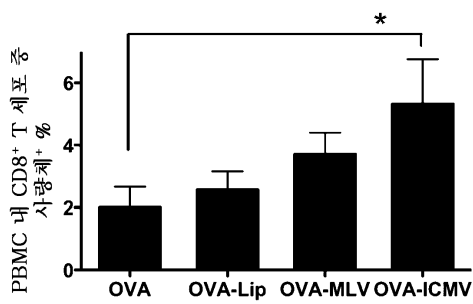
도면8a



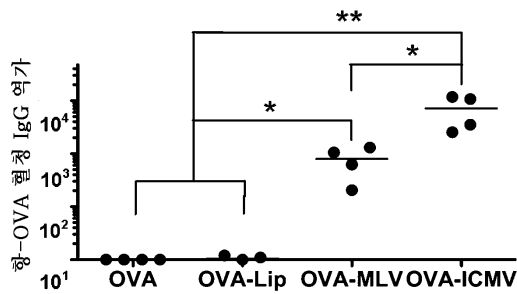
도면8b



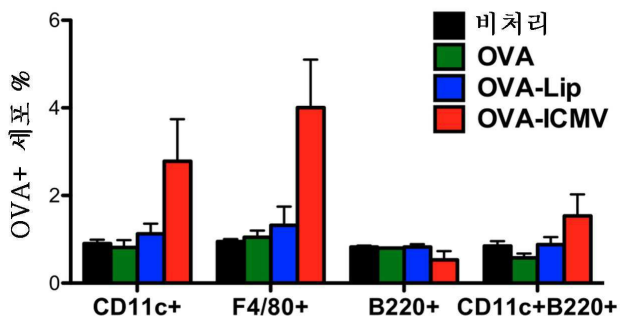
도면9a



도면9b

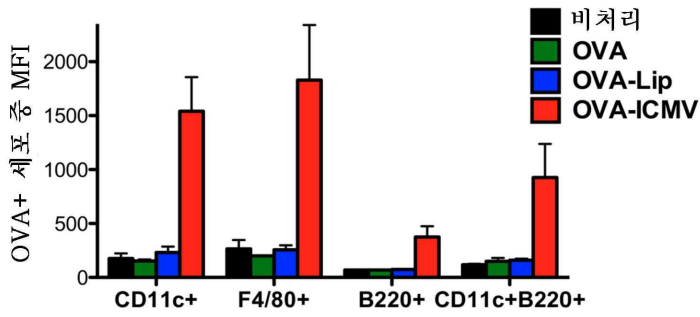


도면9c

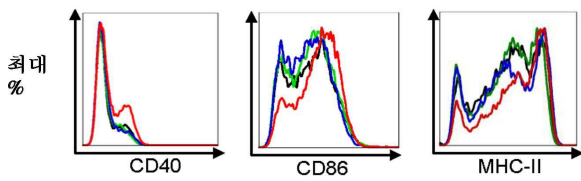




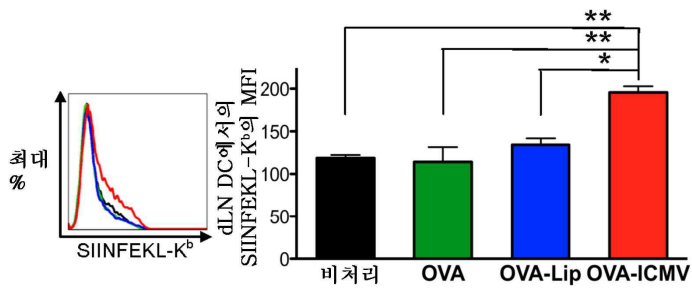
도면9d



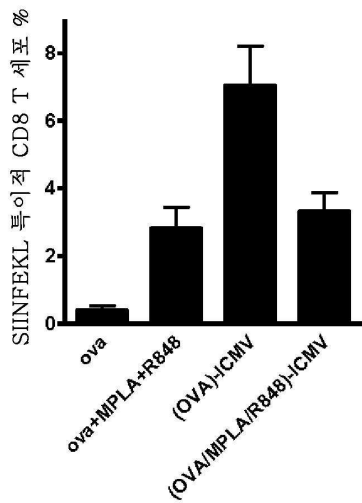
도면9e



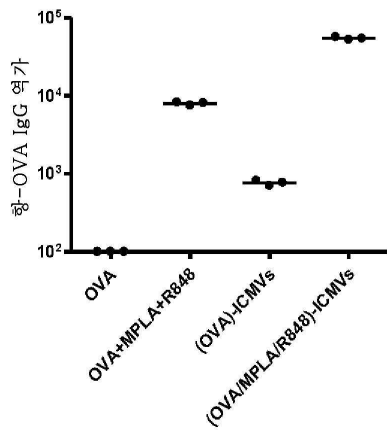
도면9f



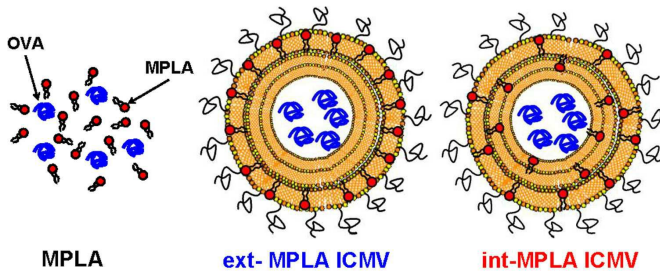
도면10a



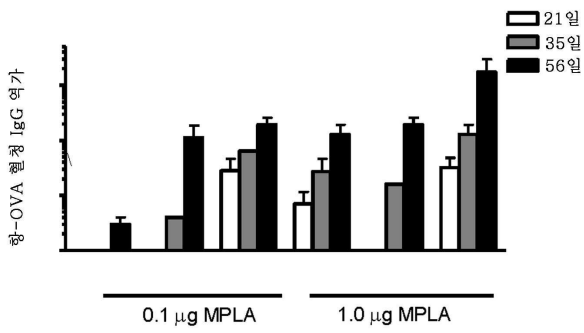
도면10b



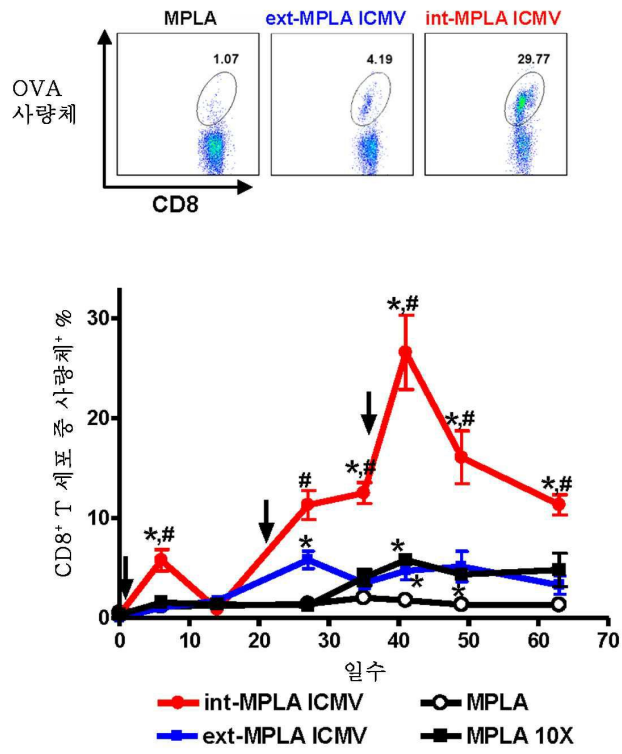
도면11a



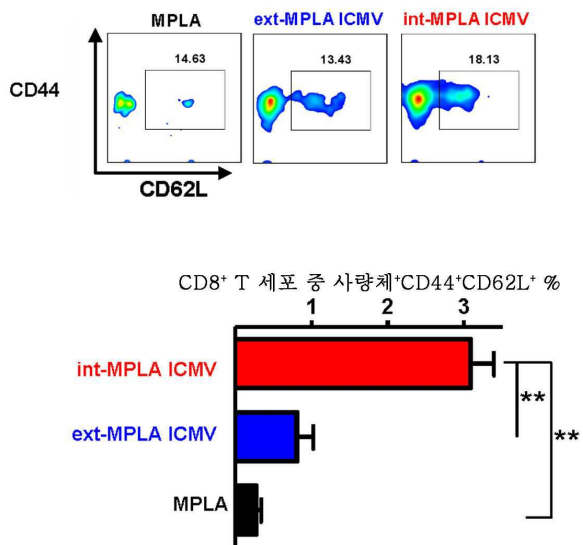
도면11b



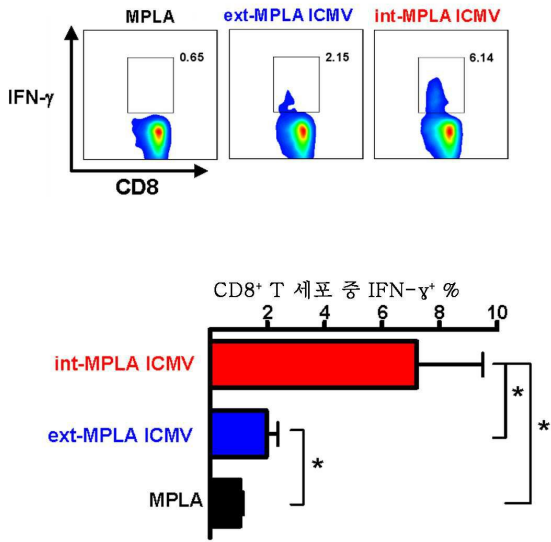
도면11c



도면11d



도면11e



도면12

