명세서

발명의 명칭: 면역유도용 고분자 나노입자 조성물 및 그 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 면역을 유도할 수 있는 고분자 나노입자 조성물 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 항원에 대한 T 세포 면역을 효과적으로 유도하는 질병 치료 또는 예방용 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 핵산을 비롯한 음이온성 약물을 이용한 치료에 있어서, 안전하고 효율적인 약물 전달기술은 오랫동안 연구되어 왔으며, 다양한 전달체 및 전달기술이 개발되어 왔다. 전달체는 크게 아데노바이러스나 레트로바이러스 등을 이용한 바이러스성 전달체와 양이온성 지질 및 양이온성 고분자 등을 이용한 비바이러스성 전달체로 나뉜다. 바이러스성 전달체의 경우 비특이적 면역 반응 등의 위험성에 노출되어 있으며 생산 공정이 복잡하여 상용화하는 데 많은 문제점이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 최근 연구 방향은 비바이러스성 전달체를 이용하여 그 단점을 개선하는 방향으로 진행되고 있다. 비바이러스성 전달체는, 바이러스성 전달체에 비하여 생체 내 안전성의 측면에서 부작용이 적고, 경제성 측면에서 생산 가격이 저렴하다는 장점을 가지고 있다.

[3] 한편, 항암 치료제로서 항원 특이 T 세포 반응을 유도하는 암 항원 백신 개발이 활발히 진행되고 있다(npj Vaccines vol 4, Article number: 7 (2019)). 효과적인 항암 면역 반응을 유도하기 위해서는 암 항원을 항원제시세포(antigen-presenting cell)에 전달하고, 종양 특이적 항원 유래 epitope의 제시율을 높여 세포독성 T 세포를 효과적으로 자극해야 한다. 효율적인 항원 전달을 위해 종양 세포 자체를 항원으로 사용하기도 하거나, 항원을 펩타이드, 핵산, 바이러스, 또는 수지상 세포 등을 이용하여 항원에 특이적인 면역 반응을 유도하는 방법들이 사용되고 있다(Advances in Cancer Research Vol 119, 2013, 421-475). 특히, 핵산 중 mRNA의 경우 비감염성, 비삽입성 플랫폼으로 돌연변이 유전자와 같은 위험이 상대적으로 적으며, 시험관 내 전사 반응으로 신속하고 경제적으로 대용량의 제조가 가능하다는 장점이 있어, 감염성 질병을 비롯한 여러 종류의 암에 대한 개인별 맞춤형 항암 백신용 platform으로 두각을 나타내고 있다(Nat Rev Drug Discov. 2018 Apr;17(4):261-279).

[4] 한국공개특허 제10-2017-0032858호는 유효성분으로서 음이온성 약물; 양이온성 화합물; 양친성 블록 공중합체; 및 폴리락트산염을 포함하며, 상기 음이온성 약물은 상기 양이온성 화합물과 정전기적 상호작용에 의해 복합체를 형성하고, 이와 같이 형성된 복합체가 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염에 의하여 형성된 나노입자 구조 내부에 봉입되는 것을 특징으로 하는 음이온성 약물 전달용 조성물 및 그의 제조방법을 개시하고 있다. 그러나, 여기에는

음이온성 약물의 전달체로서의 용도만 개시되어 있을 뿐, 개체의 면역에 대한 영향은 개시되지 않았다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명은 유효성분으로서 핵산, 폴리펩티드 또는 이들의 조합; 양이온성 화합물; 양친성 블록 공중합체; 및 폴리락트산염;을 포함하며, 상기 유효성분은 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염에 의하여 형성된 나노입자 구조 내부에 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는, 상기 유효성분에 대한 면역유도용 조성물 및 그 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[6] 본 발명의 일 태양은, 유효성분으로 핵산, 폴리펩티드 또는 이들의 조합; 양이온성 화합물; 양친성 블록 공중합체; 및 폴리락트산염;을 포함하며, 상기 유효성분은 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염에 의하여 형성된 나노입자 구조 내부에 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는, 상기 유효성분에 대한 면역유도용 조성물을 제공한다.

[7] 본 발명의 다른 태양은, (a) 핵산, 폴리펩티드 또는 이들의 조합인 유효성분을 포함하는 수성 용액과 양이온성 화합물이 수혼화성 유기용매에 용해되어 있는 용액을 혼합하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 혼합물에, 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염의 수용액을 혼합하는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 혼합물에 수성 용매를 가하여 혼합하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)의 혼합물로부터 용매를 제거하는 단계;를 포함하는, 상기 유효성분에 대한 면역유도용 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[8] 본 발명에 따른 면역유도용 조성물은, 핵산, 폴리펩티드 또는 이들의 조합과 같은 유효성분에 대해 개체의 면역을 유발할 수 있고, 상기 유효성분이 항원으로 인식되기 어려운 것이라고 하더라도 효과적으로 면역 유발이 가능한 이점을 갖는다. 이를 이용하여, 상기 면역유도용 조성물은 자가 암 백신으로서 사용될 수 있고, 궁극적으로 암 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다.

[9] 일 구체예에서, 본 발명에 따른 면역유도용 조성물은, 상기와 같은 유효성분을 비장에 효과적으로 전달하여 상기 유효성분에 의한 면역을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[10] 도 1은 본 발명의 일 태양에 따른 면역유도용 조성물의 개략적인 구조를 나타낸 도면이다.

[11] 도 2는 실시예 2의 동물실험 방법을 도식화한 것이다.

[12] 도 3은 본 발명의 일 태양에 따른 면역유도용 조성물에 의한 비장세포에서의 IFN-γ 발현양을 보여주는 이미지이다.

[13] 도 4는 본 발명의 일 태양에 따른 면역유도용 조성물에 의한 비장세포에서의

IFN-γ 발현양을 ELISPOT 그래프로 나타낸 것이다.

[14] 도 5는 본 발명의 일 태양에 따른 면역유도용 조성물의 기관 특이적 발현을 보여주는 이미지이다.

[15] 도 6은 본 발명의 일 태양에 따른 면역유도용 조성물에 의한 암 치료 효과를 보여주는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[16] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[17] 본 발명에 따른 조성물의 구성성분 중, 유효성분인 핵산, 폴리펩티드 또는 이들의 조합은 면역반응을 유발할 수 있는 항원과 관련된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산은 항원을 발현하는 것일 수 있고, 다른 예에서, 상기 폴리펩티드는 항원으로 인식될 수 있는 것일 수 있다.

[18] 상기 유효성분은 양이온성 화합물과 정전기적 상호작용을 통해 복합체를 형성할 수 있고, 상기 복합체는 양친성 블록 공중합체와 폴리락트산염에 의해 형성된 나노입자 구조 내부에 봉입될 수 있다. 그 예시적인 구조를 도 1에 개략적으로 나타내었다.

[19] 상기 나노입자에서, 수성 환경에서는 양친성 블록 공중합체의 친수성 부분이 나노입자의 외벽을 형성하고, 양친성 블록 공중합체의 소수성 부분과 상기 양친성 블록 공중합체와의 별도의 성분으로 함유된 폴리락트산염이 나노입자의 내벽을 형성하며, 그 형성된 나노입자의 내부에 유효성분과 양이온성 화합물의 복합체가 봉입될 수 있다. 이러한 나노입자 구조는, 혈중 또는 체액 내에서 유효성분의 안정성을 향상시킨다.

[20] 상기 “핵산”은, 예를 들어, DNA, RNA, siRNA, shRNA, miRNA, mRNA, 앱타머, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 핵산은 체내에서 일련의 과정을 통해 항원을 발현하는 것으로서, 항원을 코딩하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산은 항원의 염기서열을 포함하거나 그러한 폴리펩타이드 서열을 코딩하는 DNA, RNA, 또는 mRNA일 수 있다.

[21] 상기 “폴리펩티드”는 항원으로 인식될 수 있는 것일 수 있다. 상기 폴리펩티드는 항원, 이의 유사체 또는 전구체의 폴리펩티드 서열을 포함하여, 체내에서 일련의 과정을 통해 항원으로 인식될 수 있는 단백질을 의미할 수 있다.

[22] 일 구체예에 따른 면역유도용 조성물은 항원을 체내에 효과적으로 전달하여, 상기 항원과 관련된 질병을 치료 또는 예방하는 효과를 갖는다. 예를 들어, 상기 질병이 종양인 경우, 핵산은 종양항원을 발현하는 것이거나, 폴리펩티드가 종양항원일 수 있다. 종양항원의 예로는 Trp2(tyrosinase-related protein 2), gp100(Glycoprotein 100), 티로시나아제(tyrosinase), PSA(Prostate-specific antigen), WT1(Wilms' tumor 1), MAGE-1(Melanoma-associated antigen 1),

NY-ESO-1(cancer-testis antigen), MUC-1(Mucin 1) 등이 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[23] 본 발명의 면역유도용 조성물은 일반적인 투여 방식이나 담체를 이용하는 경우 면역유도를 일으키기 어려운 항원들도 성공적으로 면역유도를 일으킬 수 있도록 함으로써, 효율적이고 우수한 백신 효과를 가지고, 결과적으로 면역유도에 따른 질병 치료 효과를 가질 수 있다.

[24] 다른 구체예에서, 상기 폴리펩티드는 바이러스 외피, 당단백질, 박테리아, 암세포 또는 이의 절편일 수 있다. 이 경우, 본 발명의 면역유도용 조성물은 바이러스, 박테리아, 또는 암세포에 의한 질병을 치료 또는 예방하기 위한 것일 수 있다.

[25] 상기 질병은, 암, 바이러스 감염, 세포성 감염, 알러지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 면역유도용 조성물은 질병의 예방을 위한 백신으로 사용될 수 있다.

[26] 상기 유효성분인 핵산 또는 폴리펩티드는 혈중 안정성을 증가시키거나 면역유도 효과를 증진시키기 위해 그 백본(backbone), 아미노산, 당 또는 염기가 화학적으로 변형되거나 말단이 수식될 수 있다.

[27] 일 예에서, 상기 나노입자의 입자 크기는 Z-평균 값으로 정의될 수 있고, 예컨대, 800 nm 이하, 600 nm 이하, 500 nm 이하, 400 nm 이하, 300 nm 이하, 200 nm 이하 또는 150 nm 이하일 수 있으며, 또한 10 nm 이상일 수 있다. 일 구체예에서, Z-평균 값으로 정의된 상기 나노입자의 입자 크기는, 예를 들어, 10 내지 800 nm, 10 내지 600 nm, 10 내지 500 nm, 10 내지 400 nm, 10 내지 300 nm, 10 내지 200 nm 또는 10 내지 150 nm일 수 있다.

[28] 상기 "Z-평균"은 동적빛산란(Dynamic light scattering, DSL)을 이용하여 측정한 입자 분포의 유체학적 지름(hydrodynamic diameter)의 평균을 의미할 수 있다. 상기 나노입자는 단순분산 입자 분포(monodisperse particle distribution)를 갖는 것으로서, 그 다분산도 지수(polydispersity index)는, 예컨대, 0.01 내지 0.30, 0.05 내지 0.25, 또는 0.1 내지 0.2일 수 있다.

[29] 또한, 일 예에서, 상기 나노입자의 표면 전하는, 예컨대, -40 mV 이상, -30 mV 이상, -20 mV 이상 또는 -10 mV 이상일 수 있고, 또한 40 mV 이하, 30 mV 이하, 20 mV 이하 또는 10 mV 이하일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 나노입자의 표면 전하는, 예를 들어, -40 내지 40 mV, -30 내지 30 mV, -20 내지 20 mV 또는 -10 내지 10 mV일 수 있다. 상기 표면 전하는 생물학적 환경에 가까운 환경에서 측정된 것일 수 있고, 예를 들어, 10 mM HEPES 완충액(pH 7.2)에서 측정될 수 있다.

[30] 나노입자의 입자 크기 및 표면 전하가 상기 수준을 유지할 경우, 나노입자 구조의 안정성 및 구성성분들의 함량과 체내에서 흡수도 및 약제학적 조성물로서 멸균의 현의성 측면에서 바람직하다. 예를 들어, 상기 유효성분이 핵산인 경우, 상기 핵산의 하나 이상의 말단은 콜레스테롤, 토코페롤 및 탄소수

10 내지 24개의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상으로 수식될 수 있다. 상기 콜레스테롤, 토코페롤 및 탄소수 10 내지 24개의 지방산에는 콜레스테롤, 토코페롤 및 지방산의 각 유사체, 유도체, 및 대사체가 포함된다.

[31] 상기 유효성분은 전체 조성물 중량을 기준으로, 예컨대, 30 중량% 이하, 25 중량% 이하, 20 중량% 이하, 15 중량% 이하, 10 중량% 이하, 또는 5 중량% 이하일 수 있고, 또한 0.05 중량% 이상, 0.1 중량% 이상, 0.25 중량% 이상, 0.5 중량% 이상 또는 1 중량% 이상일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 유효성분은 전체 조성물 중량을 기준으로, 예를 들어, 0.05 내지 30 중량%, 0.1 내지 25 중량%, 0.25 내지 20 중량%, 0.5 내지 15 중량%, 1 내지 10 중량%, 또는 1 내지 5 중량%일 수 있다. 유효성분의 함량이 전체 조성물의 중량을 기준으로 상기 범위보다 적으면 약물에 비하여 사용되는 전달체의 양이 너무 많아서 오히려 전달체에 의한 부작용이 있을 수 있고, 상기 범위를 초과하면, 나노입자의 크기가 너무 커져 나노입자의 안정성이 저하되고 필터 멸균시 손실율이 커질 우려가 있다.

[32] 구체적인 일 태양에서, 상기 양이온성 화합물은 양이온성 지질 또는 양이온성 고분자 종류일 수 있으며, 보다 구체적으로는 양이온성 지질일 수 있다.

[33] 일 구체예에서, 상기 양이온성 지질은
N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄클로라이드(DODAC),
N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄브로마이드(DDAB),
N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTAP),
N,N-디메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DODMA),
N,N,N-트리메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DOTMA),
1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(TAP),
1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판(DAP),
3베타-[N-(N',N',N'-트리메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(TC-콜레스테롤),
3베타-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤),
3베타-[N-(N'-모노메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(MC-콜레스테롤),
3베타-[N-(아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(AC-콜레스테롤),
콜레스테릴옥시프로판-1-아민(COPA), N-(N'-아미노에탄)카바모일프로파노익 토코페롤(AC-토코페롤) 및 N-(N'-메틸아미노에탄)카바모일프로파노익 토코페롤(MC-토코페롤)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 조합일 수 있다.

[34] 이러한 양이온성 지질을 사용하는 경우, 양이온성 지질로부터 유발되는 독성을 감소시키기 위하여 분자 내의 양이온 밀도가 높은 폴리양이온성 지질을 적게 사용하는 것이 바람직하고, 보다 구체적으로는 분자당 수용액 상에서 양이온을 나타낼 수 있는 작용기가 하나인 양이온성 지질을 사용하는 것이 바람직하다.

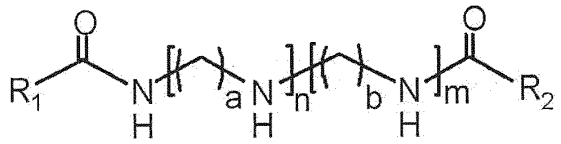
[35] 이에 따라, 보다 바람직한 일 태양에서, 상기 양이온성 지질은
3베타-[N-(N',N',N'-트리메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(TC-콜레스테롤),
3베타[N-(N',N'- 디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤),

3베타[N-(N'- 모노메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(MC-콜레스테롤), 3베타[N-(아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(AC-콜레스테롤), N-(1-(2,3-디올레오일옥시) 프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTAP), N,N-디메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DODMA), 및 N,N,N-트리메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DOTMA)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있다.

[36] 한편, 일 구체예에서, 상기 양이온성 고분자는 키토산(chitosan), 글라이콜 키토산(glycol chitosan), 프로타민(protamine), 폴리라이신(polylysine), 폴리아르기닌(polyarginine), 폴리아미도아민(PAMAM), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), 덱스트란(dextran), 히알루론산(hyaluronic acid), 알부민(albumin), 고분자폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아민 및 폴리비닐아민(PVAm)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 보다 구체적으로는 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아민 및 폴리비닐아민(PVAm)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 것일 수 있다.

[37] 구체적인 일 태양에서, 상기 양이온성 지질은 하기 화학식 1의 양이온성 지질일 수 있다:

[38] [화학식 1]

[39] 

[40] 상기 식에서,

[41] n 및 m은 각각 독립적으로 0 내지 12이되, $2 \leq n + m \leq 12$이고,

[42] a 및 b는 각각 독립적으로 1 내지 6이며,

[43] R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 탄소수 11 내지 25개의 포화 및 불포화 탄화수소기로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

[44] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서, n 및 m은 각각 독립적으로 1 내지 9이며, $2 \leq n+m \leq 10$일 수 있다.

[45] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서, a 및 b는 각각 독립적으로 2 내지 4일 수 있다.

[46] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로, 라우릴(lauryl), 미리스틸(myristyl), 팔미틸(palmityl), 스테아릴(stearyl), 아라키딜(arachidyl), 베헤닐(behenyl), 리그노세릴(lignoceryl), 세로틸(cerotyl), 미리스트올레일(myristoleyl), 팔미트올레일(palmitoleyl), 사피에닐(sapienyl), 올레일(oleyl), 리놀레일(linoleyl), 아라키도닐(arachidonyl), 에이코사펜타에닐(eicosapentaenyl), 에루실(erucyl), 도코사헥사에닐(docosahexaenyl), 및 세로틸(cerotyl)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[47] 일 구체예에서, 상기 양이온성 지질은
1,6-디올레오일트리에틸렌테트라마이드(N,N'-((ethane-1,2-diylbis(azanediyl))bis(ethane-2,1-diyl))dioleamide),
1,8-디리놀레오일테트라에틸렌펜타마이드((9Z,9'Z,12Z,12'Z)-N,N'-(((azanediylbis(ethane-2,1-diyl))bis(azanediyl))bis(ethane-2,1-diyl))bis(octadeca-9,12-dienamide)),
1,4-디미리스톨레오일디에틸렌트리아마이드((9Z,9'Z)-N,N'-(azanediylbis(ethane-2,1-diyl))bis(tetradec-9-enamide)),
1,10-디스테아로일펜타에틸렌헥사마이드(N,N'-(3,6,9,12-tetraazatetradecane-1,14-diyl)distearamide) 및
1,10-디올레오일펜타에틸렌헥사마이드(N,N'-(3,6,9,12-tetraazatetradecane-1,14-diyl)dioleamide)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[48] 본 발명의 면역유도용 조성물 내의 상기 양이온성 화합물의 함량은, 유효성분 1 중량부를 기준으로, 예컨대, 25 중량부 이하, 20 중량부 이하, 18 중량부 이하, 15 중량부 이하, 12 중량부 이하, 10 중량부 이하, 또는 8 중량부 이하일 수 있고, 또한 1 중량부 이상, 1.5 중량부 이상, 2 중량부 이상, 2.5 중량부 이상, 또는 3 중량부 이상일 수 있다. 일 구체예에서, 조성물 내의 상기 양이온성 화합물의 함량은, 유효성분 1 중량부를 기준으로, 1 내지 25 중량부, 1.5 내지 10 중량부, 2 내지 15 중량부, 2.5 내지 10 중량부, 또는 3 내지 8 중량부일 수 있다. 조성물 내의 상기 양이온성 화합물의 함량이 상기 범위 미만이면 유효성분과 안정한 복합체를 형성하지 못할 수 있고, 상기 범위를 초과하면 나노입자의 크기가 너무 커져 안정성이 저하되고 필터 멸균시 손실율이 커질 우려가 있다.

[49] 상기 유효성분이 핵산인 경우, 상기 양이온성 화합물과 핵산은 정전기적 상호작용을 통해 결합하여 복합체를 형성한다. 일 구체예에서, 상기 핵산(P)과 양이온성 화합물(N)의 전하량의 비율(N/P; 핵산의 음이온 전하에 대한 양이온성 화합물의 양이온 전하 비율)은, 0.5 이상, 1 이상, 2 이상, 또는 3 이상일 수 있고, 또한 100 이하, 50 이하, 20 이하, 또는 10 이하일 수 있으며, 예를 들어, 0.5 내지 100, 1 내지 50, 2 내지 20, 2 내지 15, 또는 3 내지 10일 수 있다. 상기 비율(N/P)이 0.5 미만인 경우에는 충분한 양의 핵산을 포함하는 복합체를 형성하기 어려울 수 있는 반면, 상기 비율(N/P)이 100을 초과할 시에는 독성을 유발할 우려가 있다. 또한, N/P 값은 유효성분이 비장에서 특이적으로 발현하는데 중요하게 작용할 수 있다.

[50] 구체적인 일 태양에서, 상기 양친성 블록 공중합체는, 친수성 A 블록 및 소수성 B 블록을 포함하는 A-B 형 블록 공중합체일 수 있다. 상기 A-B 형 블록 공중합체는, 수용액 상에서, 소수성 B 블록이 코어(내벽)를 형성하고 친수성 A 블록이 쉘(외벽)을 형성하는 코어-쉘 타입의 고분자 나노입자를 형성한다.

[51] 일 구체예에서, 상기 친수성 A 블록은 폴리알킬렌글리콜, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아미드 및 그 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[52] 보다 구체적으로, 상기 친수성 A 블록은 모노메톡시폴리에틸렌클리콜, 모노아세톡시폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌과 프로필렌글리콜의 공중합체 및 폴리비닐피롤리돈으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[53] 일 구체예에서, 상기 친수성 A 블록은 수평균분자량이 200 내지 50,000달톤인 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 1,000 내지 20,000달톤, 보다 더 구체적으로는 1,000 내지 5,000달톤인 것일 수 있다.

[54] 또한, 필요에 따라, 상기 친수성 A 블록의 말단에 특정 조직이나 세포에 도달할 수 있는 작용기, 리간드, 또는 세포내 전달을 촉진할 수 있는 작용기를 화학적으로 결합시켜 양친성 블록 공중합체와 폴리락트산염으로 형성된 고분자 나노입자 전달체의 체내 분포를 조절하거나 상기 나노입자 전달체가 세포 내로 전달되는 효율을 높일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 작용기나 리간드는 단당류, 다당류, 비타민, 펩타이드, 단백질 및 세포 표면 수용체에 대한 항체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 작용기나 리간드는 아니사마이드(anisamide), 비타민 B9(엽산), 비타민 B12, 비타민A, 갈락토오스, 락토오스, 만노오스, 히알루론산, RGD 펩타이드, NGR 펩타이드, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체에 대한 항체 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[55] 상기 소수성 B 블록은 생체적합성 생분해성 고분자로서, 일 구체예에서, 이는 폴리에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리아미노산, 폴리오르소에스테르 및 폴리포스파진으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[56] 보다 구체적으로, 상기 소수성 B 블록은 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리디옥산-2-온, 폴리락타이드와 글리콜라이드의 공중합체, 폴리락타이드와 폴리디옥산-2-온의 공중합체, 폴리락타이드와 폴리카프로락톤의 공중합체 및 폴리글리콜라이드와 폴리카프로락톤의 공중합체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[57] 일 구체예에서, 상기 소수성 B 블록은 수평균분자량이 50 내지 50,000달톤인 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 200 내지 20,000달톤, 보다 더 구체적으로는 1,000 내지 5,000달톤인 것일 수 있다.

[58] 또한, 일 구체예에서, 상기 소수성 B 블록은, 소수성 B 블록의 소수성을 증가시켜 나노입자의 안정성을 향상시키기 위하여, 소수성 B 블록 말단의 히드록시기에 토코페롤, 콜레스테롤, 또는 탄소수 10 내지 24개의 지방산을 화학적으로 결합시키는 것에 의하여 수식된 것일 수 있다.

[59] 일 구체예에서, 조성물 내의 상기 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)을 포함하는 양친성 블록 공중합체의 함량은, 유효성분 1 중량부를 기준으로, 예컨대, 150 중량부 이하, 100 중량부 이하, 70 중량부 이하, 50 중량부 이하, 또는 30 중량부 이하일 수 있고, 또한 1 중량부 이상, 10 중량부 이상 또는 15 중량부 이상일 수 있다. 예를 들어, 조성물 내의 상기 양친성 블록 공중합체 함량은, 유효성분 1

중량부에 대하여, 1 내지 150 중량부, 10 내지 100 중량부, 10 내지 70 중량부, 15 내지 50 중량부, 또는 15 내지 30 중량부일 수 있다. 조성물 내의 상기 양친성 블록 공중합체 함량이 상기 범위 미만이면 나노입자의 크기가 너무 커져 나노입자의 안정성이 저하되고 필터 멸균시 손실율이 커질 우려가 있고, 상기 범위를 초과하면 함입할 수 있는 유효성분의 함량이 너무 적어지게 된다.

[60] 일 구체예에서, 상기 양친성 블록 공중합체에 있어서, 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)의 조성비는, 공중합체 총중량을 기준으로, 친수성 블록(A)이 40 내지 70중량% 범위일 수 있고, 보다 구체적으로는 50 내지 60중량% 범위일 수 있다. 친수성 블록(A)의 비율이 공중합체 총중량을 기준으로 40중량% 미만이면 고분자의 물에 대한 용해도가 낮아서 나노입자를 형성하기 어렵기 때문에, 공중합체가 나노입자를 형성하기에 충분한 물에 대한 용해도를 갖기 위하여 친수성 블록(A)의 비율이 40중량% 이상인 것이 좋다. 한편, 친수성 블록(A)의 비율이 공중합체 총중량을 기준으로 70중량%를 초과하면 친수성이 너무 높아 고분자 나노입자의 안정성이 낮아져서 유효성분/양이온성 화합물 복합체의 가용화 조성물로 사용하기 어려우므로, 나노입자 안정성을 고려하여 친수성 블록(A)의 비율이 70중량% 이하인 것이 좋다.

[61] 일 구체예에서, 상기 양친성 블록 공중합체는 수용액 상에서 유효성분과 양이온성 화합물 복합체를 나노입자 구조 내부에 봉입시키는데, 이 때 양친성 블록 공중합체의 중량(b) 대비 유효성분 및 양이온성 화합물 복합체의 중량(a) 비율[a/b X 100; (유효성분 중량+양이온성 화합물 중량)/양친성 블록 공중합체 중량 X 100]은, 90% 이하, 80% 이하, 60% 이하, 50% 이하 또는 45% 이하일 수 있고, 1% 이상, 2% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 21% 이상, 또는 25% 이상일 수 있고, 예를 들어, 1 내지 90%, 2 내지 50%, 10 내지 50%, 15 내지 50%, 또는 21% 내지 45%일 수 있다. 상기 중량 비율(a/b X 100)이, 1% 미만인 경우에는 유효성분 및 양이온성 화합물 복합체의 함량이 지나치게 낮아져서 유효성분이 효과적으로 작용할 수 있는 유효 함량을 충족시키기 어려우며, 반대로 60% 초과시에는 양친성 블록 공중합체의 분자량과 유효성분 및 양이온성 화합물 복합체의 양을 고려할 때 적절한 크기의 나노입자 구조를 형성하지 못할 수 있다.

[62] 본 발명에 따른 조성물 내의 상기 나노입자 구조는 폴리락트산염(예컨대, 폴리락트산나트륨염(PLANa))을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 폴리락트산염은 나노입자의 코어(내벽)에 분포하여 코어의 소수성을 강화시켜 나노입자를 안정시킴과 동시에 체내에서 세망내피계(RES)를 효과적으로 회피하는 역할을 한다. 즉, 폴리락트산염의 카르복실산 음이온이 폴리락트산보다 효과적으로 양이온성 복합체와 결합하여 고분자 나노입자의 표면전위를 감소시켜 폴리락트산염을 포함하지 않는 고분자 나노입자에 비해 표면전위의 양성 전하가 감소하여 세망내피계에 의해 덜 포획되고, 이로 인하여 목적하는 부위(예컨대, 암세포, 염증세포 등)로의 전달 효율이 우수하다는

장점이 있다.

[63] 일 구체예에서, 상기 양친성 블록 공중합체와 별도의 성분으로 나노입자 내벽 성분으로 포함되는 폴리락트산염은 수평균분자량이 500 내지 50,000달톤인 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 1,000 내지 10,000달톤인 것일 수 있다. 폴리락트산염의 수평균분자량이 500달톤 미만이면 소수성이 너무 낮아 나노입자의 코어(내벽)에 존재하기 어려울 수 있고, 50,000달톤을 초과하면 고분자 나노입자의 입자가 커지는 문제가 있을 수 있다.

[64] 일 구체예에서, 조성물 내의 상기 폴리락트산 염의 함량은, 유효성분 1 중량부에 대해, 80 중량부 이하, 60 중량부 이하, 50 중량부 이하, 40 중량부 이하, 또는 30 중량부 이하일 수 있고, 또한 1 중량부 이상, 5 중량부 이상, 10 중량부 이상, 15 중량부 이상, 또는 20 중량부 이상일 수 있다. 예를 들어, 조성물 내의 상기 폴리락트산 염의 함량은, 유효성분 1 중량부에 대해, 1 내지 80 중량부, 1 내지 50 중량부, 1 내지 40 중량부, 5 내지 30 중량부, 또는 20 내지 60 중량부일 수 있다. 조성물 내의 상기 폴리락트산 염의 함량이 상기 범위 미만인 경우, 유효성분의 전달 효율이 감소할 수 있고, 반면 상기 범위 초과인 경우 나노입자가 너무 커져서 멸균막을 사용한 여과가 어렵거나 안정성이 감소될 수 있다.

[65] 일 구체예에서, 상기 폴리락트산염(예컨대, 폴리락트산나트륨염)의 말단 중 카르복실산금속(예컨대, 카르복실산나트륨)의 반대편의 말단은, 히드록시, 아세톡시, 벤조일옥시, 데카노일옥시, 팔미토일옥시 및 탄소수 1 내지 2개의 알콕시로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나로 치환될 수 있다.

[66] 일 구체예에서, 상기 폴리락트산염은 하기 화학식 2 내지 7의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다:

[67] [화학식 2]

[68] $RO-CHZ-[A]_n-[B]_m-COOM$

[69] 상기 식 2에서, A는 -COO-CHZ-이고; B는 -COO-CHY-, $-COO-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 또는 $-COO-CH_2CH_2OCH_2$이며; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸, 또는 에틸기이고; Z와 Y는 각각 수소원자, 또는 메틸 또는 페닐기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; n은 1 내지 30의 정수이며; m은 0 내지 20의 정수이다;

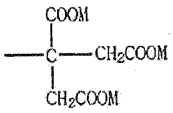
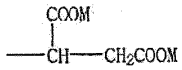
[70] [화학식 3]

[71] $RO-CHZ-[COO-CHX]_p-[COO-CHY']_q-COO-CHZ-COOM$

[72] 상기 식 3에서, X는 메틸기이고; Y'는 수소원자 또는 페닐기이며; p는 0 내지 25의 정수이고, q는 0 내지 25의 정수이되, 단 p+q는 5 내지 25의 정수이고; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; Z 는 수소 원자, 메틸 또는 페닐기이다;

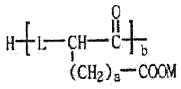
[73] [화학식 4]

[74] RO-PAD-COO-W-M'

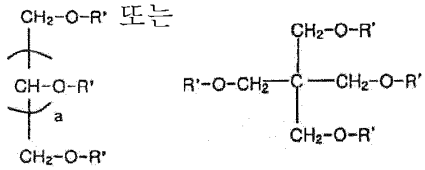
[75] 상기 식 4에서, W-M'는  또는  이고; PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이며; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이고; M은 독립적으로 Na, K, 또는 Li이다;

[76] [화학식 5]

[77] S-O-PAD-COO-Q

[78] 상기 식 5에서, S는  이고; L은 -NR_1- 또는 -0-이며, 여기서 R_1은 수소원자 또는 C_{1-10}알킬이고; Q는 CH_3, CH_2CH_3, $CH_2CH_2CH_3$, $CH_2CH_2CH_2CH_3$, 또는 $CH_2C_6H_5$이고; a는 0 내지 4의 정수이며; b는 1 내지 10의 정수이고; M은 Na, K, 또는 Li이며; PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이다;

[79] [화학식 6]

[80] 

[81] 상기 식 6에서, R'는 -PAD-O-C(O)-CH_2CH_2-C(O)-OM이고, 여기서 PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이고, M은 Na, K, 또는 Li이며; a는 1 내지 4의 정수이다;

[82] [화학식 7]

[83] YO-[-C(O)-$(CHX)_a$-O-]$_m$-C(O)-R-C(O)-[-O-$(CHX')_b$-C(O)-]$_n$-OZ

[84] 상기 식 7에서, X 및 X'은 독립적으로 수소, 탄소수가 1~10인 알킬 또는 탄소수가 6~20인 아릴이고; Y 및 Z는 독립적으로 Na, K, 또는 Li이며; m 및 n은 독립적으로 0 내지 95의 정수이되, $5 < m + n < 100$이고; a 및 b는 독립적으로 1 내지 6의 정수이며; R은 -$(CH_2)_k$-, 탄소수가 2~10인 2가 알케닐(divalent alkenyl), 탄소수가 6~20인 2가 아릴(divalent aryl) 또는 이들의 조합이고, 여기서 k는 0

내지 10의 정수이다.

[85] 일 구체예에서, 상기 폴리락트산염은 상기 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물일 수 있다.

[86] 일 구체예에서, 본 발명의 조성물은 mRNA의 세포 내 전달 효율을 증가시키기 위하여 전체 조성물의 총중량을 기준으로 0.01 내지 50중량%의, 보다 구체적으로는 0.1 내지 10중량%의 융합성 지질을 추가로 포함할 수 있다.

[87] 상기 융합성 지질은 mRNA와 양이온성 지질의 복합체에 혼합시, 소수성 상호작용으로 결합하여 mRNA, 양이온성 지질 및 융합성 지질의 복합체를 형성하고, 상기 융합성 지질을 포함하는 복합체는 양친성 블록 공중합체의 나노입자 구조 내부에 봉입된다.

[88] 일 구체예에서, 상기 융합성 지질은 인지질, 콜레스테롤, 및 토코페롤로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 조합일 수 있다.

[89] 보다 구체적으로, 상기 인지질은
포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamin, PE),
포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC) 및 포스파티딘산(phosphatidic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기
포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamin, PE),
포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC) 및 포스파티딘산은 하나 또는 2 개의 C10-24 지방산과 결합된 형태일 수 있다. 상기 콜레스테롤 및 토코페롤에는 콜레스테롤 및 토코페롤의 각 유사체, 유도체, 및 대사체가 포함된다.

[90] 보다 더 구체적으로, 상기 융합성 지질은 디라우로일
포스파티딜에탄올아민(dilauroyl phosphatidylethanolamine), 디미리스토일
포스파티딜에탄올아민(dimyristoyl phosphatidylethanolamine), 디팔미토일
포스파티딜에탄올아민(dipalmitoyl phosphatidylethanolamine), 디스테아로일
포스파티딜에탄올아민(distearoyl phosphatidylethanolamine), 디올레오일
포스파티딜에탄올아민(dioleoyl phosphatidylethanolamine), 디리놀레오일
포스파티딜에탄올아민(dilinoleoyl phosphatidylethanolamine),
1-팔미토일-2-올레오일 포스파티딜에탄올아민(1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylethanolamine),
1,2-디피타노일-3-sn-포스파티딜에탄올아민(1,2-diphytanoyl-3-sn-phosphatidylethanolamine), 디라우로일 포스파티딜콜린(dilauroyl phosphatidylcholine),
디미리스토일 포스파티딜콜린(dimyristoyl phosphatidylcholine), 디팔미토일
포스파티딜콜린(dipalmitoyl phosphatidylcholine), 디스테아로일
포스파티딜콜린(distearoyl phosphatidylcholine), 디올레오일
포스파티딜콜린(dioleoyl phosphatidylcholine), 디리놀레오일
포스파티딜콜린(dilinoleoyl phosphatidylcholine), 1-팔미토일-2-올레오일
포스파티딜콜린(1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine),
1,2-디피타노일-3-sn-포스파티딜콜린(1,2-diphytanoyl-3-sn-phosphatidylcholine),

디라우로일 포스파티딘산(dilauroyl phosphatidic acid), 디미리스토일 포스파티딘산(dimyristoyl phosphatidic acid), 디팔미토일 포스파티딘산(dipalmitoyl phosphatidic acid), 디스테아로일 포스파티딘산(distearoyl phosphatidic acid), 디올레오일 포스파티딘산(dioleoyl phosphatidic acid), 디리놀레오일 포스파티딘산(dilinoleoyl phosphatidic acid), 1-팔미토일-2-올레오일 포스파티딘산(1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidic acid), 1,2-디피타노일-3-sn-포스파티딘산(1,2-diphytanoyl-3-sn-phosphatidic acid), 콜레스테롤 및 토코페롤로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 조합일 수 있다.

[91] 보다 더 구체적으로, 상기 융합성 지질은 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(dioleoyl phosphatidylethanolamine, DOPE), 디팔미토올레오일포스포콜린(1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 디올레오일포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC) 및 디팔미토올레오일포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[92] 일 구체예에서, 본 발명의 조성물은 2가 또는 3가 금속이온을 더 포함할 수 있다.

[93] 상기 2가 또는 3가의 금속이온은, 바람직하게는 칼슘(Ca^{2+}), 마그네슘(Mg^{2+}), 바륨(Ba^{2+}), 크롬(Cr^{3+}), 철(Fe^{3+}), 망간(Mn^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 구리(Cu^{2+}), 아연(Zn^{2+}) 또는 알루미늄(Al^{3+}) 등에서 선택될 수 있다.

[94] 상기 금속이온은 황산염, 염산염, 탄산염, 인산염 및 수산화물의 형태로 고분자 나노입자 조성물에 첨가될 수 있으며, 바람직하게는 염화칼슘($CaCl_2$), 염화마그네슘($MgCl_2$), 염화아연($ZnCl_2$), 염화알루미늄($AlCl_3$), 염화철($FeCl_3$), 탄산칼슘($CaCO_3$), 탄산마그네슘($MgCO_3$), 인산칼슘($Ca_3(PO_4)_2$), 인산마그네슘($Mg_3(PO_4)_2$), 인산알루미늄($AlPO_4$), 황산마그네슘($MgSO_4$), 수산화칼슘($Ca(OH)_2$), 수산화마그네슘($Mg(OH)_2$), 수산화알루미늄($Al(OH)_3$), 수산화아연($Zn(OH)_2$) 또는 이들의 혼합물이 첨가될 수 있다.

[95] 상기 2가 또는 3가의 금속이온은 당량을 조절하여 고분자 나노입자 내부에 봉입되어 있는 약물의 방출 속도를 조절할 수 있다. 구체적으로, 2가 또는 3가의 금속이온이 폴리락트산염의 카르복시기의 당량에 대하여 고분자 나노입자 조성물에 1 당량 이하 포함되면, 폴리락트산염의 카르복시 말단기와 결합되는 수가 적어 약물의 방출 속도가 증가하게 되며, 1 당량 이상 포함되면, 폴리락트산염의 카르복시 말단기와 결합되는 수가 많아 약물의 방출 속도가 지연된다. 이에, 혈액 내 약물의 방출속도를 증가시키기 위해 적은 당량의 금속이온을 사용하며, 약물의 방출 속도를 지연시키기 위해서는 많은 당량의 금속이온을 사용할 수 있다.

[96] 또한, 2가 또는 3가 금속이온은 상기 폴리락트산염의 카르복시 말단기의

당량에 대하여 0.01~10 당량, 0.1~5 당량, 0.2~2 당량으로 포함될 수 있다.

[97] 구체적인 일 태양으로서, 본 발명에 따른 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염 나노입자 구조에 봉입된 유효성분-양이온성 화합물 복합체 함유 조성물은, 혈관, 근육, 피하, 경구, 뼈, 경피 또는 국소 조직 등의 투여 경로를 통하여 투여될 수 있고, 이러한 투여 경로에 적합하게, 다양한 경구 또는 비경구 투여 제제로 제형화될 수 있다. 상기 경구 투여 제제로는 정제, 캡슐, 분체 제제, 액제 등, 비경구 투여 제제로는 점안제, 주사제 등 다양한 제제를 예시할 수 있는데, 바람직한 일 태양으로서, 상기 조성물은 주사용 제제일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조성물을 동결건조하는 경우, 이를 주사용 증류수, 0.9% 생리식염수 및 5% 덱스트로스 수용액 등으로 재건하여 주사용 제제 형태로 제조할 수 있다.

[98] 일 구체예에서, 상기 면역유도용 조성물은 암 치료 또는 암 예방용으로 사용될 수 있다. 상기 면역유도용 조성물은 유효성분을 비장에 효율적으로 전달할 수 있다. 이 과정에서, 단순 투여 시 항원으로 인식되기 어려운 자가항원과 같은 것이라도 그 항원에 대한 면역을 유도하여 백신과 같은 효과를 기대할 수 있도록 한다. 따라서, 일 구체예에서, 상기 면역유도용 조성물은 비장을 표적으로 하는 것일 수 있다. 이러한 효과는, 국소 투여뿐 아니라, 전신 투여에 의해서도 얻을 수 있다.

[99] 본 발명의 다른 태양은, (a) 핵산, 폴리펩티드 또는 이들의 조합인 유효성분, 양이온성 화합물, 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염을 수성 용액, 수혼화성 유기용매 또는 이들의 조합인 용매에 혼합하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 혼합물에 수성 용매를 가하여 혼합하는 단계를 포함하는, 상기 유효성분에 대한 면역유도용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[100] 상기 단계 (a)는 (a-1) 핵산, 폴리펩티드 또는 이들의 조합인 유효성분을 포함하는 수성 용액과 양이온성 화합물이 수혼화성 유기용매에 용해되어 있는 용액을 혼합하는 단계; 및 (a-2) 상기 단계 (a-1) 혼합물에, 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염의 수용액을 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

[101] 또는 상기 단계 (a)는 (a-1) 핵산, 폴리펩티드 또는 이들의 조합인 유효성분을 포함하는 수성 용액과 폴리락트산염을 포함하는 수성 용액을 혼합하는 단계; 및 (a-2) 상기 단계 (a-1) 혼합물에 양이온성 화합물을 포함하는 수혼화성 유기용매와 양친성 블록 공중합체를 포함하는 수성 용액을 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[102] 상기 제조 방법은 상기 단계 (b)의 혼합물로부터 용매를 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[103] 상기 "수성 용액"은 수용액과 같은 의미로 사용될 수 있고, 예를 들어, 물, 멸균정제수, 완충액, 주사액 등을 의미할 수 있으며, 유기산을 더 포함한 완충액일 수도 있다. 상기 수성 용액은 예를 들어, 시트르산 완충액, PBS 완충액 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[104] 상기 "수혼화성 유기용매"는 알코올, 아세톤, 아세토니트릴, 이의 수혼합물 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[105] 또 다른 일 구체예에 따르면, 상기 제조방법은, 상기 용매를 제거하는 단계 이후에, 동결건조 보조제를 가하여 동결건조하는 공정을 더 포함할 수 있다.

[106] 또 다른 일 구체예에 따르면, 상기 제조방법은, 상기 동결 건조 전에 고분자 나노입자 수용액을 멸균 필터로 멸균하는 공정을 추가로 포함할 수 있다.

[107] 본 발명에서 사용가능한 동결건조 보조제는, 동결건조된 조성물이 케이크 형태를 유지할 수 있도록 하거나, 양친성 블록 공중합체 조성물을 동결건조 후, 재건(reconstitution)하는 과정에서 빠른 시간 내에 균일하게 녹는 것을 도와주기 위해 첨가하는 것으로, 구체적으로, 락토스, 만니톨, 솔비톨 및 슈크로스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 상기 동결건조 보조제의 함량은, 동결건조 조성물 전체 건조중량을 기준으로, 1 내지 90 중량%일 수 있고, 더 구체적으로는 10 내지 60 중량%일 수 있다.

[108] 이러한 본 발명에 따른 제조방법을 통해 제조된, 유효성분과 양이온성 화합물 복합체가 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염 나노입자 구조체에 봉입된 형태의 조성물 내의 나노입자는 혈중에서 안정하며, 그 크기는 구체적으로 10 내지 200 nm일수 있고, 더욱 구체적으로는 10 내지 150 nm일 수 있다.

[109] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 자세하게 설명하나, 이들은 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 이들에 의하여 본 발명의 범위가 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[110] **[실시예 1 및 2] 종양항원 발현 mRNA를 유효성분으로 포함하는 면역유도용 조성물의 제조**

[111] Trp2 mRNA(TriLink, cat # L7008, 10mM citrate buffer, 1mg/ml) 100㎕와 PLANa 수용액 (10mg/ml) 76.4㎕ 를 혼합하여 준비하였다. 그런 다음, 양이온성 지질인 2OT(N,N'-((ethane-1,2-diylbis(azanediyl))bis(ethane-2,1-diyl))dioleamide) 용액 (20mM sodium acetate buffer, 20mg/ml) 30㎕와 mPEG-PLA 166㎕ 수용액 (10mg/ml)을 혼합하고 준비해 둔 Trp2 mRNA와 PLANa 혼합 용액에 넣어 복합체를 형성하였다. 그 후, mRNA 10㎍/200㎕ 농도가 되도록 PBS를 채워주고, 0.22 ㎛ PVDF 필터로 여과시켜 입자가 큰 제형은 배제하였다.

[112] [표 1]

[113]

	비교예 1	실시예 1	실시예 2	비교예 2
mRNA (㎍)	10	10	10	10
2OT (㎍)	10	40	60	250
mPEG-PLA (㎍)	100	200	166	1500
PLANa (㎍)	10	150	72	500

[114] mPEG-PLA: 모노메톡시폴리에틸렌클리콜-폴리락타이드 블록 공중합체

[115] PLANa: 폴리락트산나트륨염

[116] **[실험예 2] 면역유도용 조성물의 마우스의 정맥 주사 후 단백질 발현 여부 확인**

[117] 실시예 1 및 2의 면역유도용 조성물을 PBS완충액을 담체로 하여 마우스 뒷다리에 투여하였다. 투여는, 0일, 7일, 및 14일 째에 3회 투여한 후, 20일 째에 마우스를 희생시키고, 비장을 채취하여, 비장 세포를 단리하였다. 비장세포는 비장을 적출하고, 그 조직을 40 ㎛ 세포 여과기(strainer)에 넣은 후 실린지 플런저(syringe plunger) 끝을 이용하여 균질화(homogenization) 하였다. 5 ㎖ 무혈청 배지를 추가하여 원심분리하였다 (1,200 rpm, 5 min, 4℃). 상등액을 제거한 후, 1 ㎖의 적혈구 분해(lysis) 용액을 추가하였다. 상온에서 3분 정도 반응시킨 후, 1 ㎖의 PBS를 추가하여 중화시켰다. 원심분리 (1,200 rpm, 5 min, 4℃) 후 1 ㎖ 배양 배지로 현탁시키고, 얼음에 보관하였다. 0.4% trypan blue용액으로 염색 후, 혈구계측기(hemocytometer)를 이용하여 살아있는 비장세포를 계수하였다.

[118] 각 시험군 및 대조군에 대해 IFN-γ가 발현되었는지 여부를 관찰하기 위해 ELISPOT 으로 하여 그래프로 도시하였다. 구체적으로, $5x10^5$ 내지 $1x10^6$ 개의 비장 세포를 ELISPOT 플레이트에 넣고, 자극제로서 OVA 펩티드 (10 ㎍/㎖)를 추가하였다. 37℃ 습식 인큐베이터에 5% CO_2조건에서 36시간 동안 반응시킨 후, IFN-γ에 대한 검출 항체와 streptavidin-ALP를 사용하여 IFN-γ발현을 측정하고 그래프로 도시하였다. 비장세포 중 IFN-γ 분비는 대부분 항원의 에피토프(epitope)를 인지하는 T세포가 활성화됨에 따른 결과라 여겨진다.

[119] 대조군에는 PBS 담체, 나노입자로 가공되지 않은 free mRNA를 각각 투여하였고, 비교군으로 시판 중인 형질주입 시약인 TransIT®을 이용하고 양성 대조군으로 Trp2 펩티드 및 I:C (Polyinosinic:polycytidylic acid)를 피하 투여하였다. 'I:C'는 B세포, 대식세포, 수지상 세포 등에 세포 표면에 발현되어 있는 TLR3 (toll-like receptor)를 자극하여 면역 증강제(adjuvant) 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서, 항원 물질인 Trp2와 함께 사용하면 면역 활성을 일으키므로, 양성 대조군으로서 적합하다. 시험군 및 각 시험군에 대한 항원 물질(mRNA) 투여량을 요약하면 하기의 표 2와 같다.

[120] [표 2]

[121]

시험군	개체수	투여량
PBS	2	N/A
Free mRNA	5	10 μg
실시예 2(mSENS) I	9	10 μg
실시예 2(mSENS) II	9	20 μg
TransIT®	9	10 μg
Trp2 peptide + poly (I:C)	6	100 + 50 μg

[122] 그 결과를 도 3 및 4에 나타내었다. IFN-γ 발현 관찰 결과, 실시예 1 및 2의 면역유도용 조성물을 투여한 군 및 양성 대조군에서 강한 IFN-γ이 검출되었다.

[123] **[실험예 3] 면역유도용 조성물의 마우스 비장세포 발현율 확인**

[124] 상기 실시예 2의 면역유도용 조성물과 같이 제조하되, mRNA로 Trp2 발현 mRNA 대신 루시퍼라아제 (luc: Trilink, cat #L7202)를 발현할 수 있는 mRNA를 도입하였다(실시예 3). 상기 실시예 3 및 N/P(nitrogen-to-phosphate) 비율이 더 작은 비교예 1 및 더 큰 비교예 2를, 마우스(BALB/cAnNCrlOri, n=3)의 꼬리 정맥에 mRNA 10 ㎍을 투여하고, 루시퍼라아제 발현 양상을 투여 후 6 시간 째에, 마우스를 희생시키고 각 장기를 적출하여 형광(luminescence) 발현 양상을 측정하였다. (L = 간, S = 비장, H = 심장, Lu = 폐, 및 K = 신장)

[125] 그 결과 도 5에 나타낸 바와 같이, 다른 장기에 비해 비장에서 현저하게 높은 수준으로 발현하는 것이 확인되었다.

[126] **[실험예 4] 면역유도용 조성물의 암 치료 효과 확인**

[127] 상기 실시예 2의 면역유도용 조성물을 이용하였다. 마우스(BALB/cAnNCrlOri, n=3)에 흑색종 세포 B16F10 세포를 $2.5x10^5$세포로 정맥 투여하고, 3일 째에 꼬리 정맥에 PBS를 담체로 하여 mRNA 기준 10 ㎍씩 3일, 5일, 7일, 및 9일 째에 투여하여 면역화 하였다. 19일 째 희생시킨 후, 폐의 절(nodule)에 전이 여부를 관찰하였다. 대조군으로는 담체인 PBS만 투여한 것과, mRNA만 투여한 것을 사용하였다. 폐의 절 수에 대해 One-way ANOVA post-hoc Tukey's 다중 비교로 통계적 수치를 도 6과 같이 나타내었다 (***p<0.001, ****p<0.0001 vs. mRNA).

[128] 그 결과, 대조군에 비해 본 발명의 면역유도용 조성물이 폐 전이가 현저히 낮은 것으로 관찰되어, 면역유도에 따른 암 치료 효과를 확인하였다.

[129] 상기 모든 동물실험은 실험동물보호협회 및 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)에서 승인된 프로토콜에 따라 실험되었다.