(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 11 월 10 일 (10.11.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/235125 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/006518

(22) 국제출원일: 2022 년 5 월 6 일 (06.05.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0058377 2021 년 5 월 6 일 (06.05.2021) KR
10-2022-0056180 2022 년 5 월 6 일 (06.05.2022) KR

(71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R & DB FOUNDATION**) [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: **오유경 (OH, Yu-Kyoung)**; 06084 서울특별시 강남구 학동로88길5, 1동 201호, Seoul (KR). **박진원 (PARK, Jinwon)**; 08800 서울특별시 관악구 인헌16다길 14, 102동 601호, Seoul (KR). **르쿠옥 비엣 (LE, Quoc Viet)**; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1, 904동 420B호, Seoul (KR).

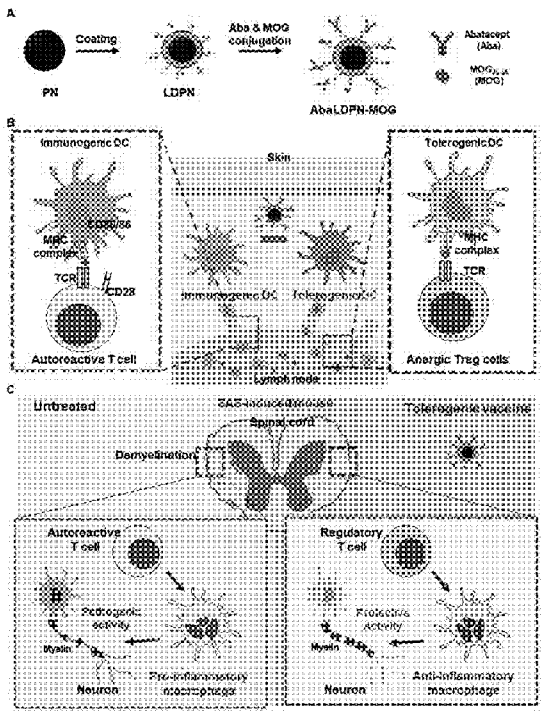
(74) 대리인: **이명진 (LEE, Myoung-Jin)**; 06158 서울특별시 강남구 테헤란로 445, 13층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) **Title:** LIPID-BIOPOLYMER NANOPARTICLES HAVING ANTIBODY AND AUTOANTIGEN BOUND TO SURFACE THEREOF, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-생체고분자 나노입자 및 이의 용도



(57) **Abstract:** Lipid-antioxidizing nanoparticles according to the present invention have an autoantigen and an antigen-presenting cell-specific antibody modified on the surface thereof, and thus are able to deliver autoantigens specifically to antigen-presenting cells, and are coated on the surface with a lipid membrane encapsulating an immunomodulator, and thus can induce immunotolerance to autoantigens. Particularly, it was confirmed that the nanoparticles according to the present invention, when administered to animal models of autoimmune diseases, can effectively target the lymph nodes and spleen, which are immune organs, to effectively inhibit excessive immune activation by antigen-presenting cells and thereby prevent, delay, and treat the autoimmune diseases. Therefore, the nanoparticles according to the present invention are expected to be effectively utilized for preventing or treating various autoimmune diseases including encephalomyelitis.

(57) **요약서:** 본 발명에 따른 지질-항산화 나노입자는 자가항원 및 항원제시세포 특이적 항체가 표면에 수식되어 있어 항원제시세포 특이적으로 자가항원을 전달할 수 있고, 표면은 면역조절제가 봉입된 지질막으로 코팅되어 있어 자가항원에 대한 면역관용을 유도할 수 있다. 특히 본 발명에 따른 나노입자는 자가면역질환 동물모델에 투여하였을 때 면역기관인 림프절 및 비장을 효과적으로 타겟팅하여 항원제시세포들에 의한 과잉의 면역 활성화를 효과적으로 억제함으로써, 자가면역질환을 예방, 지연, 및 치료할 수 있음이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 나노입자는 뇌척수염 등을 포함한 다양한 자가면역질환의 예방 내지 치료를 위해 유용히 활용될 것으로 기대된다.

WO 2022/235125 A1

[다음 쪽 계속]

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-생체고분자 나노입자 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-생체고분자 나노입자, 이의 제조방법, 및 이의 용도 등에 관한 것이다. 본 발명은 2021년 5월 6일 출원된 한국특허출원 제10-2021-0058377호 및 2022년 5월 6일 출원된 한국특허출원 제10-2022-0056180호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원들의 명세서 및 도면에 개시된 내용은 본 출원에 원용된다.

배경기술

[2] 자가면역질환 (Autoimmune diseases)은 정상적인 신체 조직이나 세포에 대해 비정상적인 면역반응이 일어나는 질환으로 대표적으로 류마티스성 관절염 (Rheumatoid arthritis), 염증성 장질환 (Inflammatory bowel disease), 제1형 당뇨병 (Diabetes Mellitus type 1), 및 다발성 경화증 (Multiple sclerosis) 등을 포함하며 이는 환자의 삶의 질과 생명을 위협할 뿐만이 아니라 환자의 가족은 물론, 사회적으로도 큰 경제적, 정서적 손실을 야기한다.

[3] 이러한 자가면역질환의 대부분은 병인이 불분명한데, 다양한 유전적 및 환경적 요인이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있으며 환자 개개인 마다 다른 병인을 가진다. 따라서 자가면역질환의 치료는 환자의 기저 요인을 배제하여 완치를 달성하는 것 보다는 환자의 상태 및 증상에 따라 적절한 수술 및 약물치료를 수행하여, 증상을 완화하고 질환의 진행을 지연시켜 환자의 삶의 질을 개선하려는 방향을 주요 목적으로 하고 있다.

[4] 자가면역질환의 병인은 불명확하나, 결과적으로 환자의 면역계가 비정상적인 조직 및 세포에 대하여 과잉 면역반응을 보이는 것을 특징으로 하므로, 주로 소염진통제 및 스테로이드를 포함하여 다양한 면역억제제를 사용해 우리 몸의 전신적인 면역반응을 저해함으로써 환자의 증상을 개선하는 시도들이 이루어지고 있다.

[5] 하지만, 약물치료요법은 다양한 문제점을 갖고 있는데, 그 중 하나는 환자가 장기간, 혹은 거의 평생 동안 약물치료를 받아야 한다는 점이다. 특히 젊은 나이의 환자에게 자가면역질환이 발생한 경우, 이와 같은 문제가 더욱 대두될 수밖에 없다. 자가면역질환의 약물치료요법은 대증요법에 맞춰져 있으며 근본적인 치료는 아니므로 증상을 완화시키기 위해서는 지속적으로 약물을 복용하여야 한다. 그러나 장기적인 약물 복용은 환자의 심리적 부담감을 줄 뿐만이 아니라 약물상호작용 및 부작용 등에 의해 삶의 질을 저해할 수 있다. 또한 현재 사용되는 약물요법은 전신적인 면역기능을 저하시키므로, 환자를 기타 감염질환에 취약하게 만들며 조혈작용에도 악영향을 미친다.

[6] 따라서 자가면역질환을 치료하는데 있어 자가항원 (self-antigen)에 대한 선택적인 면역반응만을 억제하여 약물요법의 효율을 극대화하고, 약물요법이 갖는 한계점을 극복하려는 시도가 이루어지고 있다. 관련 선행 기술로는 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)와 같은 생체적합성이 높은 고분자 내에 자가항원과 Rapamycin과 같은 면역억제제를 봉입하여 백신 제형의 나노입자를 이용하여 항원 특이적 면역 관용을 유발한 연구가 있다 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112(2) (2015) E156-E165). 또한, 임상에서도 제1형 당뇨의 경우 프로인슐린 (Proinsulin) 또는 다발성 경화증의 경우 미엘린 염기성 단백질 (Myelin basic protein)과 같은 자가면역질환을 유발 할 수 있는 자가항원을 투여하여, 자가항원에 대한 면역관용을 유도하는 전략들이 시도되고 있다.

[7] 한편, 우리 몸의 면역체계는 크게 선천성 면역체계 (Innate immune system)와 적응 면역 (Adaptive immune system)으로 나눌 수 있는데, 이 둘의 가장 큰 차이점은 항원에 대한 특이성이다. 전자는 비특이적이지만 신속한 면역반응을 유도하며 후자는 특이적이지만 지연된 면역반응을 보인다. 이 2가지 면역반응의 원활한 매개로 효과적이고 장기적인 면역반응이 유지된다. 이때 선천성 면역반응과 적응 면역반응의 매개자 역할을 하는 세포가 항원제시세포 (Antigen-presenting cells) 이며, 대표적으로 수지상세포 (Dendritic cells), 대식세포 (Macrophages) 및 B 세포 (B cells) 등이 있다. 따라서, 효과적인 항원 특이적 면역관용을 유도하기 위해서는 항원제시세포를 선택적으로 조절하는 것이 효율적이다.

[8] 한편, 체내에서 항원제시세포의 기능을 조절하고 자가항원에 대한 과잉의 면역반응을 억제하기 위한 수단으로 나노입자를 사용하려는 시도들이 이루어지고 있다. 그러나, 많은 생체 유래 또는 합성 나노물질들이 발견 및 개발되고 있음에도 불구하고, 체내에서 부작용을 일으키지 않으면서 위와 같은 기능을 효과적으로 수행할 수 있는 나노입자는 아직까지 발굴되지 않고 있다. 그 예로 프러렌 나노입자, 백금 나노입자, 망간 나노입자 등이 연구되고 있으나, 이들은 생체내 독성을 나타내며 생체적합성이 좋지 않은 문제가 있다.

[9] 따라서, 생체적합성이 높으면서도 항원제시세포에 특이적으로 면역조절제를 전달하여 자가항원에 대한 면역관용을 유도할 수 있는 나노전달체의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 면역조절제 등이 봉입된 지질막으로 표면이 코팅되고, 상기 표면에 자가항원 및 항원제시세포-특이적 항체가 결합된 생체고분자 나노입자 (항산화 나노입자)가 과잉의 면역반응을 저해하고 자가항원에 대한 면역관용을 유도함으로써

자가면역질환 등을 예방, 개선, 및 치료할 수 있음을 확인하여 완성된 것이다.

[11] 따라서, 본 발명의 목적은 생체고분자 나노입자; 상기 나노입자 표면을 코팅하는 지질막; 상기 지질막 표면에 결합된 자가항원; 및 상기 지질막 표면에 결합된 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-생체고분자 나노입자를 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-생체고분자 나노입자를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-생체고분자 나노입자를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-생체고분자 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.

[15] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[16] 본 발명은 항산화 나노입자; 상기 나노입자 표면을 코팅하는 지질막; 상기 지질막 표면에 결합된 자가항원; 및 상기 지질막 표면에 결합된 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 제공한다.

[17] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 항산화 나노입자는 폴리도파민 나노입자, 탄닌 나노입자, 및 세륨 산화물 나노입자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[18] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 지질막은 폐길화된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[19] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 지질막은 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), phosphorylglycerol (PG), phosphocholine (PC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG2000-maleimide), 콜레스테롤 (cholesterol), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 및 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[20] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 DPPC : DPPG의 몰비율은 1 내지 10 : 1 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[21] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 DPPC : DPPG : DSPE-PEG2000-maleimide의 몰비율은 100 내지 1000 : 10 내지 500 : 1 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[22] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 수지상세포 또는 대식세포에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[23] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 CD80, CD86, CD123, CD303, CD304, CD68, CD11b, CD11c, BDCA-1, DC-SIGN, MHCII, F4/80, CD206, 및 CSF1-R로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질에 결합하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[24] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 IgG, Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv, 재조합 IgG (rIgG), 단일쇄 Fv (scFv), 및 디아바디 (diabody)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[25] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 자가항원은 개체에서 자가면역질환을 유도할 수 있는 단백질, 이의 단편, 또는 이의 변이체일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[26] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 자가항원은 콜라겐, 인슐린, 인슐린 B 사슬, 프로인슐린, 미엘린 단백질, 미엘린 염기성 단백질 (myelin basic protein), 미엘린 프로테오리피드 단백질 (myelin proteolipid protein), 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질 (myelin oligodendrocyte glycoprotein), Hsp60, 및 Hsp65로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로부터 유래된 단백질, 이의 단편, 또는 이의 변이체일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[27] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 자가항원; 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 티올기를 갖는 것이거나, 티올기를 갖도록 변형된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[28] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 지질막은 말레이미드기를 갖는 지질을 포함하고, 상기 자가항원; 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 티올기 및 말레이미드기의 결합을 통해 지질막에 결합되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[29] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 나노입자는 면역억제제를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[30] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 면역억제제는 상기 지질막에 봉입되어 있을 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[31]

[32] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 면역억제제는 부신피질호르몬

(Glucocorticoids), 칼시뉴린 (Calcineurine) 억제제, 항대사제, mTOR 억제제, 및 비타민 D3로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[33] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 나노입자는 직경이 50 내지 200 nm일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[34] 또한, 본 발명은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[35] 또한, 본 발명은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자의 자가면역질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자의 자가항원에 대한 면역관용 유도 용도를 제공한다.

[36] 또한, 본 발명은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자가항원에 대한 면역관용 유도 방법을 제공한다.

[37] 또한, 본 발명은 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자의 용도를 제공한다. 또한, 본 발명은 자가항원에 대한 면역관용 유도제의 제조를 위한 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자의 용도를 제공한다.

[38] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[39] 또한, 본 발명은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물을 포함한다.

[40] 또한, 본 발명은 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[41] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자는 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:

[42] (a) 항원제시세포 및 T 세포의 상호작용을 억제함;

[43] (b) 면역세포의 조직 침습을 억제함;

[44] (c) 보조 T 세포, 세포독성 T 세포, 수지상세포, 및 대식세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수준 또는 활성을 감소시킴;

[45] (d) 조절 T 세포의 수준 또는 활성을 증가시킴;

[46] (e) 염증성 사이토카인의 수준 또는 활성을 억제함; 및

[47] (f) 자가항체의 생성을 억제함.

[48] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자는 림프절 또는 비장을 표적화 (targeting)할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[49] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 전신성 경피증, 성인 스틸씨병, 전신 홍반성 루푸스, 아토피 피부염, 베체트병 (Behcet's disease), 다발성 경화증, 전신성 경화증, 쇼그렌 증후군, 원발성 담즙성 경변증, 셀리악병, 염증성 장질환, 제1형 당뇨병, 자가면역성 용혈성 빈혈증, 굿파스쳐 증후군, 그레이브스 병, 하시모토 갑상선염, 감상선 항진증, 중증근무력증, 천포창, 혈관염, 뇌척수염, 뇌하수체염, 백반증, 천식, 원발성 담즙성 간경변, 시신경 척수염, 심상성 천포창 (pemphigus vulgaris), 과민성 장질환, 크론병, 대장염, 궤양성 대장염, 건선, 심근병증, 중증 근무력증 (myasthenia gravis), 결절성 다발동맥염, 길랑바레 증후군, 및 강직성 척추염 (ankylosing spondylitis)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[50] 또한, 본 발명은 (S1) 염기성 환경에서 생체고분자의 자가조립을 유도하여 항산화 나노입자를 제조하는 단계;

[51] (S2) 상기 항산화 나노입자의 현탁액으로 지질막을 수화시켜 지질막으로 표면이 코팅된 항산화 나노입자를 제조하는 단계; 및

[52] (S3) 상기 지질막으로 표면이 코팅된 항산화 나노입자를 자가항원, 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편과 반응시키는 단계를 포함하는, 제1항의 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[53] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 생체고분자는 폴리도파민, 탄닌, 및 세륨 산화물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[54] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 지질막은 면역억제제가 봉입되어 있는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

발명의 효과

[55] 본 발명에 따른 지질-항산화 나노입자는 자가항원 및 항원제시세포 특이적 항체가 표면에 수식되어 있어 항원제시세포 특이적으로 자가항원을 전달할 수 있고, 표면은 면역조절제가 봉입된 지질막으로 코팅되어 있어 자가항원에 대해 면역관용을 유도할 수 있다. 특히 본 발명에 따른 나노입자는 자가면역질환 동물모델에 투여하였을 때 면역기관인 림프절 및 비장을 효과적으로 타겟팅하여 항원제시세포들에 의한 과잉의 면역 활성화를 효과적으로 억제함으로써, 자가면역질환을 예방, 지연, 및 치료할 수 있음이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 나노입자는 뇌척수염 등을 포함한 다양한

자가면역질환의 예방 내지 치료를 위해 유용히 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[56] 도 1은 본 발명에 따른, 항체 및 자가항원으로 수식된 지질-항산화 나노입자의 모식도이다. 항산화 나노입자 (PN)의 표면을 약물을 함유한 지질막으로 코팅하여 지질-항산화 나노입자 (LDPN)를 형성하고, 페길화된 지질층 표면에 자가항원만 수식시키거나 (LDPN-MOG), 자가항원 및 항체를 모두 수식시켜 (AbaLDPN-MOG) 제조하였다.

[57] 도 2는 항산화 나노입자 (PN); 지질-항산화 나노입자 (LDPN); 자가항원 수식 지질-항산화 나노입자 (LDPN-MOG); 및 항체 및 자가항원 수식된 지질-항산화 나노입자 (AbaLDPN-MOG)의 혈청 내에서의 입자의 크기와 제타전위 (ξ-potential)를 측정한 것이다. 입자 크기는 동적광산란법 (dynamic light scattering)을 이용하여 측정했으며 제타전위는 레이저 도플러 전기영동법 (laser doppler electrophoresis)을 이용하여 측정했다. 입자 간에 크기 및 제타전위의 유의미한 차이가 없는 것으로 나타났다.

[58] 도 3은 각 나노입자에 봉입된 면역조절 약물의 양과 나노입자의 표면에 수식된 자가항원의 양을 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)를 통해 확인한 결과이다.

[59] 도 4는 분광학적 분석을 통해 각 나노입자들의 지질 코팅 여부 및 화학적 작용기의 성질을 확인한 결과이다.

[60] 도 5는 투과전자현미경으로 각 나노입자의 형태 (morphology)를 관찰하고, 에너지 분산형 X-선 분광법을 통해 원소분석을 수행한 결과이다. 원소분석 결과, 폴리도파민 나노입자의 주요 원소인 탄소 (C), 질소 (N), 산소 (O)가 검출됐고, 인지질 유래의 인 (P), 단백질 유래의 황 (S)이 검출됐다.

[61] 도 6은 CD80/86을 발현하는 수지상세포 (dendritic cell)에 CD80/86-특이적 재조합 항체로 수식된 나노입자 또는 상기 항체로 수식되지 않은 나노입자를 각각 처리한 후 나노입자의 세포 결합능을 유세포분석으로 비교한 결과이다. 각 나노입자는 형광 (Cy5)으로 표지하였으며, 세포의 형광 강도를 통해 나노입자의 세포 결합 정도를 확인했다.

[62] 도 7은 수지상세포에 CD80/86-특이적 재조합 항체로 수식된 나노입자 또는 상기 항체로 수식되지 않은 나노입자를 각각 처리한 후 나노입자의 세포 결합능을 공초점현미경으로 확인한 결과이다.

[63] 도 8은 수지상세포에 CD80/86-특이적 재조합 항체로 수식된 나노입자 또는 항체로 수식되지 않은 나노입자를 각각 처리한 후 나노입자의 세포 결합 정도를 투과전자현미경으로 확인한 결과이다.

[64] 도 9는 CD80/86-특이적 재조합 항체로 수식된 나노입자가 내포작용을 통해 수지상세포 내부로 도입되어 리소좀으로 이동하는 것을 공초점현미경으로 관찰한 결과이다.

[65] 도 10은 본 발명에 따른 나노입자의 수지상세포 및 T 세포간 상호작용

저해효과를 확인하기 위한 *in vitro* 실험을 나타낸 그림이다. 웰 플레이트에는 수지상세포 표면단백질을 코팅하고, 본 발명의 나노입자 및 T 세포를 함께 처리하였다.

[66] 도 11은 도 10의 실험 조건에서 본 발명에 따른 나노입자를 T 세포와 함께 처리하였을 때 수지상세포 및 T 세포의 상호작용 억제 정도를 배양액 내 IL-2 수준을 통해 확인한 결과이다. 본 발명에 따른, 항체로 표면이 수식된 지질-항산화 나노입자가 수지상세포 및 T 세포간 상호작용을 차단하여 T 세포의 IL-2 분비를 억제하는 것을 확인하였다.

[67] 도 12 및 도 13은 도 10의 실험 조건에서 본 발명에 따른 나노입자를 T 세포와 함께 처리하였을 때 비장세포에 의한 보조 T 세포 (CD3 및 CD4 이중 양성; $CD4^+$ T cells) 및 세포독성 T 세포 (CD3 및 CD8 이중 양성; $CD8^+$ T cells) 확장 (expansion)이 억제된 것을 확인한 결과이다.

[68] 도 14는 본 발명에 따른 나노입자에 의한 수지상세포 세포막 단백질 CD80, CD86, 및 MHCII의 수준 감소; 및 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, 및 IL-6의 분비 억제 효과를 확인한 결과이다.

[69] 도 15는 본 발명에 따른 나노입자에 의한 면역관용 수지상세포의 유도 기작을 나타낸 그림이다.

[70] 도 16 및 17은 본 발명에 따른 나노입자를 마우스에 피하투여한 후, 시간별로 표적기관인 림프절에서의 나노입자의 분포를 확인한 결과이다. 재조합 항체가 표면에 수식된 나노입자는 항체가 수식되지 않은 나노입자에 비해 림프절 분포가 증가하고, 더 지속적으로 축적되는 것을 확인하였다.

[71] 도 18은 본 발명에 따른 나노입자 (Cy5 표지됨)를 마우스에 피하투여한 후, 림프절 세포집단 중 Cy5 양성인 수지상세포의 비율을 확인한 결과이다. 재조합 항체가 표면에 수식된 나노입자는 항체가 수식되지 않은 나노입자에 비해 림프절 내의 수지상세포에 더 효과적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[72] 도 19는 본 발명에 따른 나노입자 (Cy5 표지됨)를 마우스에 피하투여한 후, 면역형광조직법으로 마우스의 림프절 조직을 분석하여 나노입자의 분포 (Cy5 형광신호)를 확인한 이미지이다.

[73] 도 20a은 본 발명에 따른 나노입자의 체액성 면역 억제 효과를 확인하기 위한 자가면역질환 동물모델 실험 스케쥴을 나타낸 것이다.

[74] 도 20b는 오브알부민 (Ovalbumin)을 이용한 자가면역질환 모델에서 본 발명에 따른 나노입자가 상기 동물모델의 혈청 내 자가항체 (anti-OVA IgG)의 생성을 효과적으로 저해한 것을 확인한 결과이다. 이로부터 본 발명의 나노입자가 오브알부민 특이적 체액성 면역반응을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[75] 도 21a 내지 21c는 본 발명에 따른 나노입자의 자가면역질환 (뇌척수염)의 예방 (도 21a), 진행 억제 (도 21b), 및 치료 효과 (도 21c)를 확인하기 위한 실험 스케쥴이다.

[76] 도 22a 내지 22c는 본 발명에 따른 나노입자를 자가면역질환의 예방 (도 22a),

진행 억제 (도 22b), 또는 치료 (도 22c) 목적으로 뇌척수염 마우스에 투여한 후 시간에 따른 체중 변화 및 임상적 증상을 추적관찰한 결과이다. 모든 동물모델에서, 본 발명에 따른 나노입자가 개체의 임상적 증상을 개선하고 체중을 정상 수준으로 조절하는 것으로 나타났다.

[77] 도 23a 내지 23c는 본 발명에 따른 나노입자를 자가면역질환의 예방 (도 23a), 진행 억제 (도 23b), 또는 치료 (도 23c) 목적으로 뇌척수염 마우스에 투여한 후, 수지상세포 ($CD11c^+$ $MHCII^+$), 대식세포 ($CD11b^+$ $F4/80^+$), 보조 T 세포 ($CD4^+$ T 세포 또는 조력 T 세포; $CD3^+$ $CD4^+$), 및 세포독성 T 세포 ($CD8^+$ T 세포 또는 cytotoxic T cells; $CD3^+$ $CD8^+$)의 중추신경계 침습 정도를 확인한 결과이다. 조절 T 세포의 경우 조력 T 세포 내에서 $CD25^+$ $FoxP3^+$를 마커로 하여 분석하였다.

[78] 도 24a 내지 24c는 본 발명에 따른 나노입자를 자가면역질환의 예방 (도 24a), 진행 억제 (도 24b), 또는 치료 (도 24c) 목적으로 뇌척수염 마우스에 투여하였을 때, 조절 T 세포의 비율이 증가하는 것을 확인한 결과이다. 특히, 상기 나노입자는 조직을 손상시킬 수 있는 IFN-γ 또는 IL-17A를 발현하는 보조 T세포의 비율을 억제할 수 있다는 것도 확인되었다 (도 24a).

[79] 도 25a 내지 25c는 본 발명에 따른 나노입자를 자가면역질환의 예방 (도 25a), 진행 억제 (도 25b), 또는 치료 (도 25c) 목적으로 뇌척수염 마우스에 투여한 후, 나노입자에 의한 세포성 면역반응 조절 능력을 확인한 결과이다. 본 발명에 따른 나노입자를 투여 받은 마우스에서, 자가항원 (MOG peptide)에 의해 활성화된 IFN-γ 비장세포의 수가 감소한 것을 확인하였다.

[80] 도 26은 본 발명에 따른 나노입자를 뇌척수염 동물모델에 질병 진행 억제 목적으로 투여한 후, 면역형광조직법으로 면역세포의 중추신경계 (미엘린 수초) 침습을 확인한 결과이다.

[81] 도 27은 본 발명에 따른 나노입자의 구조 및 이의 자가항체에 대한 면역관용 유도 효과를 나타낸 대표도이다.

발명의 실시를 위한 형태

[82] 본 발명에 따른 항산화 나노입자는 표면이 면역조절제가 봉입된 지질막으로 코팅되고, 상기 지질막을 통해 자가항원 및 항원제시세포 특이적 항체로 표면이 수식된 것으로서, 생체 내 투여시 비장 및 림프절 내에 존재하는 항원제시세포에 특이적으로 결합하고, 자가항원에 대한 면역관용을 유도하여, 자가항원에 대한 과잉의 면역반응으로 일어나는 자가면역질환을 예방, 개선, 지연, 및 치료할 수 있다.

[83] 따라서, 본 발명은 항산화 나노입자; 상기 나노입자 표면을 코팅하는 지질막; 상기 지질막 표면에 결합된 자가항원; 및 상기 지질막 표면에 결합된 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[84] 본 발명에 있어서, “항산화 나노입자 (antioxidant nanoparticles)”는 항산화

기능을 갖는 나노입자로서 더 바람직하게는 활성산소를 포촉할 수 있는 나노입자를 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 항산화 나노입자는 생체고분자-기반의 생체고분자 나노입자 (biopolymer nanoparticles)로서, 생체고분자를 포함하거나, 생체고분자로 이루어진 나노입자일 수 있다. 생체고분자란 살아있는 유기체의 세포로부터 생성되는 천연 고분자 내지 이를 모방하여 인공적으로 합성된 고분자로서, 우수한 생체적합성, 생분해성, 및/또는 지속성 (sustainability) 등을 갖는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 나노입자는 생체고분자로 구성되어 있어, 생체 내 투여하더라도 생체적합성이 우수하고, 독성 등의 부작용을 일으키지 않을 수 있다. 본 발명에 따른 항산화 나노입자는, 바람직하게는 폴리도파민 나노입자, 탄닌 나노입자, 및 세륨 산화물 나노입자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하며, 가장 바람직하게는 폴리도파민 (polydopamine) 나노입자일 수 있다.

[85] 본 발명에 있어서, "자가면역질환 (autoimmune diseases)"은 면역계가 외부 항원이 아닌 내부의 정상 세포 내지 정상 조직을 공격하여 발생하는 질환을 의미한다. 즉, 자가면역질환은 자가항원에 대한 과도한 면역반응의 활성화로 인해 발생하는 질환을 의미한다. 따라서, 본 발명에 있어서 자가면역질환은, 과잉 면역반응으로 인한 질환뿐만 아니라 자가항원에 대한 면역반응을 억제함으로써 개선/치료될 수 있는 질환을 제한 없이 포함한다. 즉, 본 발명에 따른 자가면역질환은 본 발명에 따른 나노입자의 표면에 수식된 자가항원에 대한 자가항체의 생성으로 유도될 수 있는 질환을 의미하고, 구체적인 질환으로 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 전신성 경피증, 성인 스틸씨병, 전신 홍반성 루푸스, 아토피 피부염, 베체트병 (Behcet's disease), 다발성 경화증, 전신성 경화증, 쇼그렌 증후군, 원발성 담즙성 경변증, 셀리악병, 염증성 장질환, 제1형 당뇨병, 자가면역성 용혈성 빈혈증, 굿파스쳐 증후군, 그레이브스 병, 하시모토 갑상선염, 감상선 항진증, 중증근무력증, 천포창, 혈관염, 뇌척수염, 뇌하수체염, 백반증, 천식, 원발성 담즙성 간경변, 시신경 척수염, 심상성 천포창 (pemphigus vulgaris), 과민성 장질환, 크론병, 대장염, 궤양성 대장염, 건선, 심근병증, 중증 근무력증 (myasthenia gravis), 결절성 다발동맥염, 길랑바레 증후군, 및 강직성 척추염 (ankylosing spondylitis) 등으로부터 선택될 수 있다.

[86] 본 발명에 따른 항산화 나노입자는 바람직하게는 생체고분자가 염기성 조건하에서 자가중합 (self-polymerization)되어 제조된 것을 특징으로 하며, 구체적인 형태나 크기에 제한 없다. 바람직하게는, 상기 항산화 나노입자는 직경이 50 내지 200 nm, 50 내지 150 nm, 50 내지 100 nm, 100 내지 200 nm, 또는 150 내지 200 nm 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[87] 본 발명에 따른 나노입자는 표면이 지질막으로 코팅된 것을 특징으로 한다. 본 발명자들은 상기 나노입자를 특정 조성비의 지질을 포함하는 지질막으로 코팅하였을 때 나노입자의 안정성이 향상되고, 상기 나노입자가 항체 및

자가항원과 안정적으로 결합할 수 있음을 확인하였다. 바람직하게는, 상기 지질막은 페길화된 것일 수 있다. 또한, 상기 지질막은 말레이미드기 (maleimide group)을 갖는 지질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 지질막은 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), phosphorylglycerol (PG), phosphocholine (PC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG2000-maleimide), 콜레스테롤 (cholesterol), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 및 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG)는 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

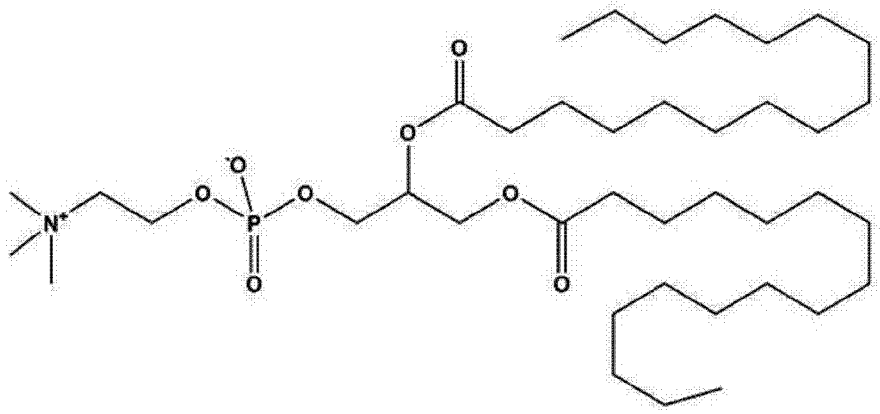
[88] 바람직하게는, 상기 지질막은 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) 및 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG)를 포함할 수 있다. 상기 DPPC : DPPG의 몰비율은 1 내지 10 : 1, 1 내지 8 : 1, 1 내지 5 : 1, 1 내지 3 : 1, 1.5 내지 10 : 1, 1.5 내지 8 : 1, 1.5 내지 5 : 1, 1.5 내지 3 : 1, 2 내지 10 : 1, 2 내지 8 : 1, 2 내지 6 : 1, 2 내지 4 : 1, 또는 2 내지 3 : 1 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[89] 더욱 바람직하게는, 상기 지질막은 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), 및 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG2000-maleimide)를 포함할 수 있다. 상기 DPPC : DPPG : DSPE-PEG2000-maleimide의 몰비율은 100 내지 1000 : 10 내지 500 : 1, 100 내지 1000 : 50 내지 500 : 1, 200 내지 1000 : 100 내지 500 : 1, 300 내지 1000 : 100 내지 500 : 1, 500 내지 1000 : 200 내지 500 : 1, 600 내지 1000 : 200 내지 500 : 1, 300 내지 900 : 100 내지 500 : 1, 300 내지 900 : 200 내지 500 : 1, 300 내지 800 : 200 내지 500 : 1, 400 내지 800 : 200 내지 400 : 1, 500 내지 800 : 200 내지 400 : 1, 또는 600 내지 800 : 250 내지 350 : 1 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[90] 바람직하게는, 상기 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)는 하기 화학식 1로 표시되고, 상기 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG)는 하기 화학식 2로 표시되고, 상기 phosphoglycerol (PG)는 화학식 3으로 표시되고, 상기 phosphocholine (PC)는 화학식 4로 표시되고, 상기 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG2000-maleimide)는 하기 화학식 5로 표시될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

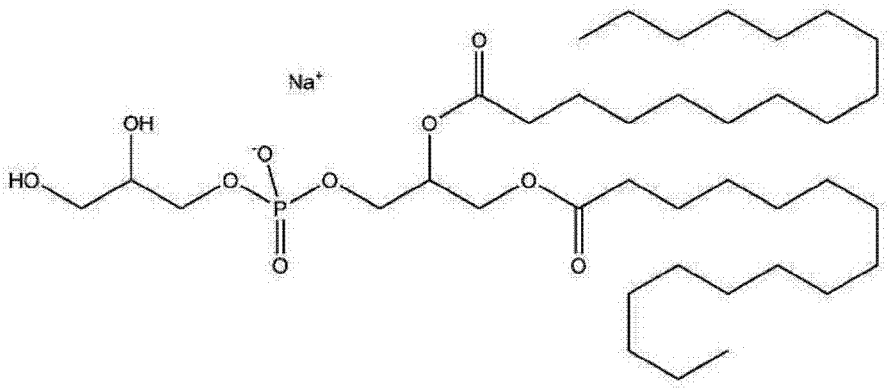
[91] [화학식 1]

[92]



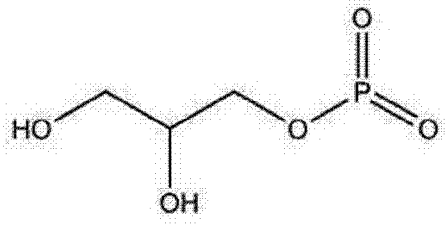
[93] [화학식 2]

[94]



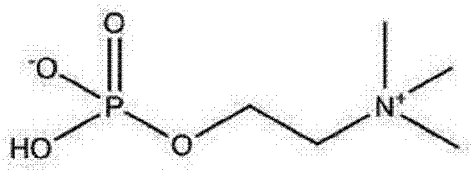
[95] [화학식 3]

[96]



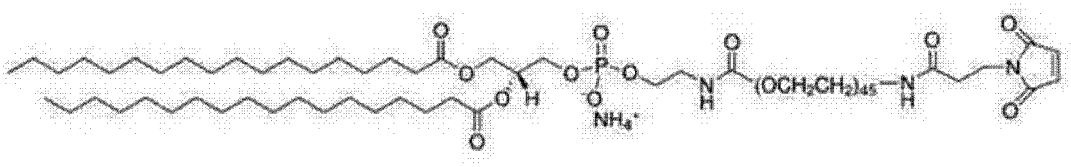
[97] [화학식 4]

[98]



[99] [화학식 5]

[100]



[101] 본 발명에 따른 나노입자는 표면이 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편으로 수식 (결합, 접합, 담지, 또는 부착)된 것을 특징으로 한다.

[102] 본 발명에 있어서, "항체 (antibodies)"란 특정 항원 또는 그의 에피토프 부위와 특이적으로 반응하여 결합할 수 있는 특이적인 단백질 분자를 의미하며, 항원과 결합능력을 가지는 면역글로불린 분자 (예를 들어, 단일클론 항체, 다클론 항체 등), 상기 면역글로불린 분자의 단편 (예를 들어, IgG, Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv, 재조합 IgG (rIgG), 단일쇄 Fv (scFv), 또는 디아바디(diabody) 등) 등이 이에 포함된다. 특히, 상기 면역글로불린 분자는 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변영역(부위) 및 가변영역을 포함하고, 상기 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 항원의 에피토프에 결합할 수 있는, 3개의 다변가능한 영역인 "상보성 결정영역(complementarity determining region, CDR)"; 및 4개의 "구조 영역(framework region, FR)"을 포함한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리우고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다. 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 상기 항체는 동물 유래 항체, 마우스-인간 키메릭 항체(chimeric antibody), 인간화 항체(humanized antibody), 또는 인간 항체일 수 있다. 본 발명에 있어서 "항체의 단편"이란 상기 항체의 기능을 발휘할 수 있는 상기 항체의 기능성 단편을 의미한다.

[103] 본 발명에 따른 항체는 항원제시세포에 특이적으로 결합하는 항체이다. 다만, 본 발명에서 상기 항체는 항체와 유사한 기능을 수행하는 재조합 단백질을 포함하는 개념이다. 즉, 본 발명에 따른 항원제시세포 특이적 항체는, 항원제시세포 특이적 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 재조합 단백질이면

충분하고, 반드시 항체의 구조를 가져야 하는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 본 발명에 따른 항원제시세포 특이적 항체는 항원제시세포에서 특이적으로 발현되는 단백질에 결합할 수 있는 항체이다. 본 명세서에서 사용되는 용어, "항원제시세포 (antigen presenting cells, APCs)"란 T 세포 등과 같은 특정 림프구 (lymphocytes)가 인식할 수 있도록 항원 (antigen)을 가공 및 제시 (presenting)하는 세포 그룹을 지칭한다. 자연적인 APC의 종류로는 수지상세포, 대식세포, 랑게르한스세포, B 세포 등이 있다. 바람직하게는, 상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 수지상세포 또는 대식세포에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이다. 즉, 상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 수지상세포 또는 대식세포에서 특이적으로 발현되는 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 단편이다. 따라서, 상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 수지상세포 또는 대식세포에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편이면 충분하고 구체적인 종류에 한정되는 것은 아니며, 천연 항체는 물론 인공적으로 합성된 항체 (재조합 항체)가 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 항체 또는 이의 단편은 CD80, CD86, CD123, CD303, CD304, CD68, CD11b, CD11c, BDCA-1, DC-SIGN, MHCII, F4/80, CD206, 및 CSF1-R로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질에 결합할 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 따른 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 CD80 및/또는 CD86에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명에 따른 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 CD80 및/또는 CD86에 특이적으로 결합하는 재조합 단백질 (예컨대, 항체) 또는 이의 단편으로서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나, 더욱 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 상기 아미노산 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 즉, 본 발명에 따른 세포 투과성 펩타이드는 이를 구성하는 폴리펩타이드의 작용성 등가물, 예를 들어, 폴리펩타이드의 일부 아미노산 서열이 결실 (deletion), 치환 (substitution) 또는 삽입 (insertion)에 의해 변형되었지만, 상기 폴리펩타이드와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체 (variants)를 포함하는 개념이다. 예를 들어, 상기 CD80 및/또는 CD86에 특이적으로 결합하는 재조합 단백질 (예컨대, 항체) 또는 이의 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 폴리펩타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리펩타이드의 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를

포함할 수 있다.

[104] 본 발명에 있어서, "자가항원 (self-antigens 또는 autoantigens)"은 개체의 면역계가 자가항체 (autoantibodies)를 생성하도록 자극하는, 해당 개체 자체의 항원을 의미한다. 즉, 자가항원은 자가면역질환의 유도원으로서, 자가항원에 대해 적응 면역 반응이 일어날 때 자가면역질환이 유발된다. 자가항원은 정상적인 상태에서는 면역체계의 표적이 되지 않지만, 면역적인 요인이나 환경적 요인에 의해 면역적 내성이 결여되면서 항원으로 작용할 수 있다. 자가항원의 구체적인 종류에는 제한이 없고, 단백질, 펩타이드, 효소 복합체, 리보핵단백질 (ribonucleoprotein), DNA, 인지질 등이 모두 자가항원으로 기능할 수 있다. 자가항원의 구체적인 종류는 자가면역질환의 종류에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 자가면역질환 중 하나인 뇌척수염은 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질 (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, MOG)이 자가항원으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 각 자가면역질환을 유발할 수 있는 자가항원의 종류는 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 대한민국 공개특허공보 제10-2020-0079507호 참조).

[105] 즉, 본 발명에 따른 자가항원은 면역계가 자가항체를 생성하도록 자극하는 것으로서, 자가면역질환을 유도할 수 있는 것이라면 충분하고, 구체적인 종류로 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, 본 발명에 따른 나노입자에 결합된 자가항원은, 자가항체의 생성을 유도함으로써 상기 나노입자가 목적 (예방, 개선, 또는 치료)으로 하는 자가면역질환을 유도할 수 있는 것이다. 당업자는 목적하는 자가면역질환의 종류에 따라, 혹은 상기 나노입자를 투여 받을 개체에 따라 당업계의 공지된 지식을 참고하여 적절한 자가항원을 선택할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 자가항원은 개체에서 자가면역질환을 유도할 수 있는 단백질, 이의 단편, 또는 이의 변이체일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 상기 자가항원은 콜라겐, 인슐린, 인슐린 B 사슬, 프로인슐린, 미엘린 단백질, 미엘린 염기성 단백질 (myelin basic protein), 미엘린 프로테오리피드 단백질 (myelin proteolipid protein), 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질 (myelin oligodendrocyte glycoprotein), Hsp60, 및 Hsp65로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로부터 유래된 단백질, 이의 단편, 또는 이의 변이체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[106] 바람직하게는, 상기 자가항원; 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 티올기 (thiol group)를 갖는 것이거나, 티올기를 갖도록 변형된 것일 수 있다. 상기 티올기는 자유 티올기를 포함한다. 상기 티올기는 자가항원; 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편의 amine group에 결합되어 있을 수 있다. 즉, 상기 티올기는 자가항원; 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편을 구성하는 아미노산 중에서도 Lysine (Lys) 또는 Arigine (Arg) 등과 같이 1차 amine group을 갖는 아미노산에 결합되어 있을 수 있다. 일 구현예에서, 상기 티올기는 상기 항체 또는 이의 단편의 경쇄의 불변영역에 존재하는 것일 수

있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 자가항원; 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 상기 티올기를 통해 나노입자의 지질막에 결합할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 상기 결합은 상기 티올기 및 지질막의 말레이미드기의 결합을 통해 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[107] 바람직하게는, 본 발명에 따른 나노입자는 면역조절제, 바람직하게는 면역억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 한다. 더욱 바람직하게는, 상기 면역조절제는 나노입자의 표면을 코팅하는 지질막 상에 혹은 지질막 내부에 봉입 (결합, 포집, 또는 담지)된 것일 수 있다. 면역억제제 (Immunosuppressants)는 면역체계가 건강한 세포나 조직을 손상시키는 것을 방지하기 위해 면역 기능을 억제하는 약물을 의미한다. 주로 장기 이식 또는 줄기세포 이식을 받은 환자에서 이식거부반응을 예방하기 위해 투여되며, 자가면역질환을 치료하기 위해서도 사용된다. 즉, 상기 면역억제제는 자가항원에 대한 면역계의 면역관용을 유도할 수 있다. 본 발명에 있어서, 면역억제제는 면역기능을 억제할 수 있는 것이면 충분하고, 구체적인 종류에 한정되는 것은 아니나, 구체적인 예시로는 부신피질호르몬 (Glucocorticoids), 칼시뉴린 (Calcineurine) 억제제, 항대사제, 및 mTOR 억제제 등을 들 수 있다.

[108] 더욱 바람직하게는, 상기 면역억제제는 덱사메타손 (Dexamethasone), 베타메타손 (Betamethasone), 프레드니손 (Prednisone), 프레드니솔론 (Prednisolone), 메틸프레드니솔론 (Methylprednisolone), 트리암시놀론 (Triamcinolone), 데플라자코트 (Deflazacort), 사이클로스포린 A (Cyclosporine A), 타크로리무스 (Tacrolimus), MPA (Mycophenolic acid), MMF (Mycophenolate mofetil), 아자티오프린 (Azathioprine), 미조리빈 (Mizoribine), 에베로리무스 (Everolimus), 라파마이신 (Rapamycin), 레티노산 (Retinoic acid), 및 비타민 D3 등으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[109] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방, 개선, 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 치료는 자가면역질환의 질병 진행 억제를 포함한다.

[110] 상기 나노입자의 자가면역질환의 예방, 개선, 또는 치료 효과는 상기 나노입자의 자가항원에 의한 면역 억제 효과, 혹은 자가항원에 대한 면역관용 유도 효과에 의해 달성되는 것이다.

[111] 보다 구체적으로는, 상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자는 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족할 수 있다:

[112] (a) 항원제시세포 및 T 세포의 상호작용을 억제함;

[113] (b) 면역세포의 조직 침습을 억제함;

[114] (c) 보조 T 세포, 세포독성 T 세포, 수지상세포, 및 대식세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수준 또는 활성을 감소시킴;

[115] (d) 조절 T 세포의 수준 또는 활성을 증가시킴;

[116] (e) 염증성 사이토카인의 수준 또는 활성을 억제함; 및

[117] (f) 자가항체의 생성을 억제함.

[118] 특히, 상기 나노입자는 개체에 투여시 림프절 또는 비장을 표적화 (targeting)하여, 즉, 림프절 또는 비장으로 이동하여 상기 효과를 발휘할 수 있다.

[119] 상기 (a) 항원제시세포 및 T 세포의 상호작용을 억제한다는 것은, 항원제시세포에 의한 T 세포의 활성화, 바람직하게는, 세포독성 T 세포의 활성화를 억제한다는 것을 의미한다. 나아가, 이는 본 발명에 따른 나노입자에 의한 면역관용 수지상세포 (tolerogenic dendritic cells)의 유도도 포함한다.

[120] 상기 (b) 면역세포의 조직 침습을 억제한다는 것은, 바람직하게는 수지상세포, 대식세포, 및 세포독성 T 세포의 조직 침습을 억제하는 것을 의미한다. 특히, 상기 나노입자가 뇌척수염의 예방, 개선, 또는 치료를 목적으로 하는 경우, 상기 면역세포들의 중추신경계 침습을 억제하는 것을 의미한다.

[121] 상기 (e) 염증성 사이토카인은 TNF-α, IL-1β, 및 IL-6로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 염증을 유발할 수 있는 사이토카인이라면 제한 없이 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 나노입자는 활성화된 면역세포에 의한 상기 염증성 사이토카인들의 생성 및 분비를 억제할 수 있다.

[122] 상기 (f)의 자가항체는 바람직하게는 상기 나노입자에 담지된 자가항원에 대한 자가항체일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 나노입자는 항원제시세포 특이적으로 자가항원을 전달하여 이에 대한 면역관용을 유도함으로써, 상기 자가항원에 대한 자가항체가 생성되는 것을 억제하는 기능을 수행한다.

[123] 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역조절용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 면역조절은 자가항원에 대한 면역억제 용도 및 자가항원에 대한 면역관용 유도 용도를 포함한다.

[124] 본 발명의 조성물 내의 상기 나노입자의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[125] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[126] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제,

건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[127] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[128] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[129] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제쉘락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지,

살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[130] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[131] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[132] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[133] 본 발명에 따른 현탁제에는 증류수, 포도당 수용액, 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[134] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 포도당 수용액, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩 톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨($NaHSO_3$) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($Na_2S_2O_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당,

글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[135] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[136] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[137] 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[138] 바람직하게는, 본 발명에 따른 나노입자는 증류수 또는 등장액 (isotonic solution)에 분산되어 투여되는 것을 특징으로 한다. 상기 등장액은 구체적인 종류에 제한되지 않고, 투여 대상이 되는 개체의 체액과 등장성 (isotonic)을 보이는 용액이라면 제한 없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 포도당 수용액 및 생리식염수 (NaCl 용액) 등으로부터 선택될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 포도당 수용액의 농도 (w/w%)는 4 내지 6% 일 수 있고, 가장 바람직하게는 상기 농도가 5% 일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 생리식염수 농도 (w/w%)는 0.5 내지 1% 일 수 있고, 가장 바람직하게는 상기 농도가 0.9% 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[139] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본

발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 나노입자는, 항산화 나노입자의 중량을 기준으로, 개체 중량 대비 1 내지 100 mg/kg, 1 내지 90 mg/kg, 1 내지 80 mg/kg, 1 내지 70 mg/kg, 1 내지 60 mg/kg, 1 내지 50 mg/kg, 1 내지 40 mg/kg, 1 내지 30 mg/kg, 1 내지 20 mg/kg, 1 내지 10 mg/kg, 1 내지 5 mg/kg, 10 내지 100 mg/kg, 20 내지 100 mg/kg, 30 내지 100 mg/kg, 40 내지 100 mg/kg, 10 내지 80 mg/kg, 10 내지 60 mg/kg, 20 내지 60 mg/kg, 30 내지 60 mg/kg, 또는 40 내지 60 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 나노입자는 단일 투여는 물론, 목적하는 효과를 달성할 때까지 다회 투여될 수 있다.

[140] 또한, 본 발명에 따른 나노입자는 목적에 따라 투여방법이 달라질 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 나노입자를 자가면역질환의 예방 목적으로 투여하는 경우, 질환의 증상이 없는 상태에서 상기 나노입자를 미리 투여할 수 있고, 본 발명에 따른 나노입자를 자가면역질환의 진행 억제 목적으로 투여하는 경우, 질환이 확인된 직후에 상기 나노입자를 투여할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 나노입자를 자가면역질환의 치료 목적으로 투여하는 경우, 자가면역질환의 증상이 나타난 직후부터 상기 나노입자를 투여할 수 있다.

[141] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[142] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[143] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[144] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[145] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의

조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[146] 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 특히, 상기 "개선"은 "질병의 진행 억제"를 포함한다.

[147] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물을 포함한다. 즉, 본 발명은 상기 나노입자를 유효성분으로 포함하는 기능성 식이 및 약학 조성물을 제공하는 것을 주요 목적으로 한다.

[148] 본 발명의 나노입자를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 생체고분자 나노입자를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 나노입자는 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[149] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[150] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 덱스트린 및 시클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10g 이다.

[151] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로

또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[152] 본 명세서에 있어서, "건강기능식품"이란 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 자가면역질환의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[153] 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.

[154] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 나노입자를 포함하는, 자가면역질환의 예방, 개선, 또는 치료용 키트를 제공한다.

[155] 본 발명에 있어서, "키트 (kit)"는 구체적인 형태나 종류에 제한이 없으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형태의 키트를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 키트는 상기 나노입자 외에도 상기 나노입자의 보관 용액, 투여 도구, 투여용 현탁액 등을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 나노입자의 특징, 제조방법 등에 관한 지시서를 추가로 포함할 수 있다.

[156] 또한, 본 발명은 (S1) 염기성 환경에서 생체고분자의 자가조립을 유도하여 항산화 나노입자를 제조하는 단계;

[157] (S2) 상기 항산화 나노입자의 현탁액으로 지질막을 수화시켜 지질막으로 표면이 코팅된 항산화 나노입자를 제조하는 단계; 및

[158] (S3) 상기 지질막으로 표면이 코팅된 항산화 나노입자를 자가항원, 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편과 반응시키는 단계를 포함하는, 제1항의 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[159] 상기 단계 (S1)의 생체고분자의 구체적인 설명은 위에서 서술한 바와 같다. 상기 생체고분자는 폴리도파민, 탄닌, 및 세륨 산화물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[160] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (S1)은 구체적으로 하기 단계를 포함할 수 있다:

[161] (S1-1) 생체고분자 용액을 염기성 용액으로 적정하는 단계; 및

[162] (S1-2) 생체고분자의 자가조립을 유도하는 단계.

[163] 상기 생체고분자 용액은, 바람직하게는 폴리도파민 용액, 탄닌 용액, 및 세륨 산화물 용액으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리도파민 수용액일 수 있고, 더욱 바람직하게는 도파민 하이드로클로라이드 (dopamine hydrochloride) 용액일 수 있다. 상기 생체고분자 용액의 용매는 증류수일 수

있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[164] 상기 염기성 용액은 염기성 환경에서 상기 생체고분자의 자가조립을 유도하기 위한 목적으로 사용된다. 상기 염기성 용액의 구체적인 종류에는 제한이 없으나, 바람직하게는 수산화나트륨 용액, 수산화칼륨 용액, 및 수산화칼슘 용액 등으로부터 선택될 수 있다.

[165] 상기 단계 (S1-1)에서, 상기 생체고분자 용액은 염기성 용액에 의해 pH 5 내지 10, pH 6 내지 10, pH 7 내지 10, pH 8 내지 10, pH 9 내지 10, 또는 pH 9.5 내지 10으로 적정될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[166] 상기 단계 (S1-2)의 자가조립은 생체고분자 용액을 자기교반함으로써 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 상기 자기교반은 10 내지 35 ℃, 10 내지 30 ℃, 10 내지 27 ℃, 15 내지 30 ℃, 20 내지 30 ℃, 20 내지 27 ℃, 또는 23 내지 27 ℃에서 수행될 수 있고, 1 내지 40 시간, 1 내지 35 시간, 1 내지 30 시간, 1 내지 25 시간, 5 내지 35 시간, 10 내지 35 시간, 15 내지 35 시간, 15 내지 30 시간, 20 내지 30 시간, 또는 20 내지 25시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[167] 또한, 상기 제조방법의 단계 (S1)은 상기 단계 (S1-2) 이후에 하기 단계들을 선택적으로 더 포함할 수 있다:

[168] (S1-3) 상기 단계 (S1-2)로부터 제조된 항산화 나노입자를 세척하는 단계; 및

[169] (S1-4) 상기 항산화 나노입자를 여과하는 단계.

[170] 바람직하게는, 상기 단계 (S1-3)의 세척은 증류수에 생체고분자 나노입자를 현탁한 후 원심분리함으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 당업계에 공지된 나노입자 세척 방법을 제한 없이 사용할 수 있다.

[171] 바람직하게는, 상기 단계 (S1-4)의 여과는 폴리카보네이트 필터를 이용하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[172] 바람직하게는, 상기 생체고분자 나노입자는 증류수에 현탁된 상태로 보관될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[173] 상기 제조방법에 있어서, 상기 지질막은 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), phosphorylglycerol (PG), phosphocholine (PC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG2000-maleimide), 콜레스테롤 (cholesterol), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 및 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 이외에, 지질막에 대한 성분은 위에서 서술한 바와 같다.

[174] 바람직하게는, 상기 지질막은 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), 및

1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG2000-maleimide)를 위에서 서술한 몰비율로 혼합한 후, 유기용매에 용해시키고 감압 농축함으로써 제조되는 것일 수 있다.

[175] 바람직하게는, 상기 유기용매는 클로로포름, 헥산, 에틸아세테이트, 메탄올, 디클로로메탄, 사염화탄소, 벤젠, DMSO 및 DMF로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 클로로포름 및 메탄올 용액일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 더욱 바람직하게는, 상기 클로로포름 및 메탄올 용액은 클로로포름 : 메탄올 (v/v)이 1 내지 10 : 1, 1 내지 8 : 1, 1 내지 6 : 1, 1 내지 5 : 1, 2 내지 10 : 1, 3 내지 10 : 1, 2 내지 8 : 1, 3 내지 7 : 1, 또는 3 내지 6 : 1의 비율로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[176] 상기 단계 (S2)에서 상기 지질막 및 항산화 나노입자는 지질막 : 항산화 나노입자의 중량비 (w/w)가 1 내지 20 : 27, 1 내지 18 : 27, 1 내지 16 : 27, 1 내지 14 : 27, 1 내지 12 : 27, 1 내지 10 : 27, 1 내지 8 : 27, 1 내지 6 : 27, 또는 1 내지 4 : 27일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 나노입자가 상기 지질로 코팅될 수 있는 정도면 충분하다.

[177] 바람직하게는, 상기 지질막은 면역조절제, 더욱 바람직하게는 면역억제제가 봉입된 것일 수 있다.

[178] 상기 면역억제제는 상기 지질막 제조과정에서 각 지질성분을 유기용매에 용해시켜 혼합할 때 함께 첨가함으로써 지질막에 봉입될 수 있다. 이 때, 상기 면역억제제는 면역억제제 : 항산화 나노입자 (바람직하게는, 폴리도파민 나노입자)의 중량비 (w/w)가 0.0001 내지 0.01 : 1, 0.0001 내지 0.01 : 1, 0.001 내지 0.01 : 1, 또는 0.001 내지 0.005 : 1가 되도록 첨가될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[179] 상기 단계 (S3)의 자가항원; 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편을 상기 나노입자와 반응시키는 것은 상기 단계 (S2)로부터 수득한 나노입자의 현탁액에 자가항원; 또는 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편의 용액을 첨가하여 교반하여 이루어지는 것일 수 있다.

[180] 상기 교반은 10 내지 35 ℃, 10 내지 30 ℃, 10 내지 27 ℃, 15 내지 30 ℃, 20 내지 30 ℃, 20 내지 27 ℃, 또는 23 내지 27 ℃에서 수행될 수 있고, 1 내지 30 시간, 1 내지 25 시간, 1 내지 20 시간, 1 내지 15 시간, 5 내지 30 시간, 10 내지 25 시간, 10 내지 20 시간, 또는 10 내지 15 시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[181] 일 구현예에서, 상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은, 상기 항체 또는 이의 단편 : 항산화 나노입자 (바람직하게는, 폴리도파민 나노입자)의 중량비 (w/w)가 0.01 내지 1 : 1, 0.01 내지 0.9 : 1, 0.01 내지 0.8 : 1, 0.01 내지 0.7 : 1, 0.01 내지 0.6 : 1, 0.05 내지 1 : 1, 0.07 내지 1 : 1, 0.09 내지 1 : 1, 0.1 내지 1 : 1, 0.2 내지 1 : 1, 0.3 내지 1 : 1, 0.2 내지 0.8 : 1, 0.2 내지 0.6 : 1, 또는 0.4 내지 0.6 : 1가 되도록 첨가될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[182] 일 구현예에서, 상기 자가항원은, 상기 자가항원 : 항산화 나노입자 (바람직하게는, 폴리도파민 나노입자)의 중량비 (w/w)가 0.01 내지 1 : 1, 0.02 내지 1 : 1, 0.05 내지 1 : 1, 0.07 내지 1 : 1, 0.09 내지 1 : 1, 0.01 내지 0.8 : 1, 0.01 내지 0.6 : 1, 0.01 내지 0.5 : 1, 0.01 내지 0.3 : 1, 0.05 내지 0.3 : 1, 또는 0.09 내지 0.2 : 1가 되도록 첨가될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[183] 상기 단계 (S3)에서, 상기 자가항원; 또는 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편이 티올기를 갖지 않은 것인 경우, 상기 제조방법은 상기 (S3) 단계 전에 상기 자가항원; 또는 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편이 티올기를 갖도록 변형하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 티올기를 첨가하는 방법은 당업계에 공지되어 있으나, 바람직하게는 traut reagent를 상기 자가항원 또는 항체의 용액에 첨가하고 반응시켜 수행될 수 있다.

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

[185]

[186] **[실시예]**

[187] **<실시예 1> 자가항원과 재조합 항체가 결합되어 있는 지질-항산화 나노입자 (AbaLDPN-MOG)의 제조**

[188] 표면이 면역관용 유도 약물을 함유한 지질층으로 코팅되어 있으며, 상기 지질층의 표면에는 자가항원 및 재조합 항체가 결합되어 있는 항산화 나노입자 (이하, “AbaLDPN-MOG”)를 제조하였다. 전체적인 제조 과정은 도 1에 나타냈다.

[189]

[190]

[191] **<1-1> 항산화 나노입자 (폴리도파민 나노입자, PN)의 제조**

[192] 알칼리 조건하에서 도파민의 자가 중합을 통해 폴리도파민 나노입자를 합성하였다.

[193] 구체적으로, 도파민 하이드로클로라이드 (dopamine hydrochloride)를 25 mL의 삼중 증류수 (TDW)에 녹여 최종 농도 2 mg/mL이 되도록 준비한 후, 1N 수산화 나트륨 용액을 이용하여 도파민 하이드로클로라이드 수용액을 pH 9.68로 적정한 후, 상온 (25 ℃)에서 24시간 동안 자기 교반 하였다. 반응이 종료되면, 13,500g에서 20분 동안 원심분리하여 흑색의 폴리도파민 나노입자 침전물을 수집하고, 상층액이 투명해질 때까지 삼중 증류수로 세척하였다. 세척을 마친 폴리도파민 나노입자는 450 nm 폴리카보네이트 필터에 여과를 하여 증류수에 현탁된 현탁액 상태로 4 ℃에 보관하였다. 이하 폴리도파민 나노입자는 PN 또는 항산화 나노입자 등으로 지칭한다.

[194]

[195] **<1-2> 약물이 봉입되지 않은 지질막으로 코팅된 항산화 나노입자 (LPN)의 제조**

[196] 상기 실시예 1-1에서 제조한 폴리도파민 나노입자를 함유한 현탁액으로, 약물을 함유하지 않은 지질층을 수화시켜, DPPC: DPPG=7:3의 지질 조성을 가진, 지질-항산화 나노입자를 제조하였다.

[197] 구체적으로, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG2000-maleimide)를 7 : 3 : 0.1의 몰비율로 혼합하여 클로로포름-메탄올 (4:1, v/v)에 용해시킨 후, 감압 농축하여 지질 박막을 제조하였다. 제조한 지질 박막에 상기 실시예 1-1에서 제조한 폴리도파민 수용액을 가하여 수화시켰다. 약물이 봉입 되지 않은 상태의 지질-항산화 나노입자 (LPN)는 4 ℃에 보관하였다.

[198]

[199] **<1-3> 약물이 봉입된 지질막으로 코팅된 항산화 나노입자 (LDPN)의 제조**

[200] 상기 실시예 1-1에서 제조한 폴리도파민 나노입자를 함유한 현탁액으로, 약물을 함유한 지질층 (DPPC: DPPG=7:3의 지질 조성)을 수화시켜, 지질-항산화 나노입자를 제조하였다.

[201] 구체적으로, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG2000-maleimide)를 7 : 3 : 0.1의 몰비율로 혼합하여 클로로포름-메탄올 (4:1, v/v)에 용해시키고, 덱사메타손 (dexamethasone, Dexa)은 폴리도파민에 대하여 0.003 : 1 의 중량비 (w/w)로 첨가한 후 감압 농축하여 지질 박막을 제조하였다. 제조한 지질 박막은 상기 실시예 1-1에서 제조한 폴리도파민 수용액 또는 등장액인 5 % glucose 수용액을 가하여 수화시켰다. 약물이 봉입된 지질-항산화 나노입자 (LDPN)는 4 ℃에 보관하였다.

[202]

[203] **<1-4> 자가항원이 결합된 지질-항산화 나노입자 (LDPN-MOG)의 제조**

[204] 상기 실시예 1-3에서 제조한 나노입자에 자가항원 (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)을 가하여 격렬하게 교반 하였다. 먼저, thiol기를 포함하지 않은 자가항원 10 mg/mL에 traut reagent가 최종 농도 2 mg/mL가 되도록 첨가하여 25 ℃ 에서 1시간 정도 반응하여 thiolation 한 후 정제하였다. 이미 thiol기를 갖고 있는 자가항원의 경우 바로 사용이 가능하다. 정제된 자가항원은 지질-항산화 나노입자 현탁액에 처리하여 25 ℃ 에서 12 시간 동안 나노입자와의 반응을 진행하였으며, 20 분 동안 13,500g에서 원심분리하여 자가항원이 결합된 지질-항산화 나노입자 (LDPN-MOG)를 수집하고, 이를 증류수 또는 등장액인 5 % glucose 수용액에 재현탁 하여 4 ℃에 보관하였다.

[205]

[206] **<1-5> 재조합 항체 및 자가항원이 결합된 지질-항산화 나노입자**

(AbaLDPN-MOG)의 제조

[207] 상기 실시예 1-3에서 제조한 나노입자에 재조합 항체 및 자가항원을 가하여 격렬하게 교반하였다. 재조합 항체 (10 mg/mL; CD80/86 특이적 항체) 및 자가항원 (10 mg/mL)을 traut reagent 2mg/mL 조건하에서 반응을 시켜 thiolation 한 후 정제하였다. 본 실시예에서는 상기 CD80/86 특이적 항체로서, 재조합 단백질인 Abatacept (Orencia, Bristol-Myers Squibb; BMS)를 사용하였다. Abatacept는 human cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)을 human IgG1 의 Fc portion과 융합한 단백질로, CD80 및 CD86에 특이적으로 결합할 수 있다. Abatacept는 homodimer의 형태를 가지며, monomer는 357개의 amino acid sequence (서열번호 1)를 가지는 것으로 알려져 있다. 상기 Abatacept 대신, 또다른 상용화 약물인 Belatacept (Nulojix, BMS)를 사용할 수 있다. 이미 thiol기를 갖고 있는 자가항원 또는 항체의 경우 바로 사용이 가능하다. 정제된 자가항원 및 항체를 지질-항산화 나노입자 현탁액에 처리하여 25 ℃ 에서 12 시간 동안 나노입자와의 반응을 진행하였으며, 20 분 동안 13,500g에서 원심분리하여 자가항원 및 재조합 항체가 결합된 지질-항산화 나노입자 (AbaLDPN-MOG)를 수집하고, 이를 증류수 또는 등장액인 5 % glucose 수용액에 재현탁 하여 4 ℃에 보관하였다.

[208]

[209] **[실험예]**

[210] **<실험예 1> AbaLDPN-MOG의 물리화학적 특성 분석**

[211] **<1-1> AbaLDPN-MOG의 입자 크기 및 제타전위 평가**

[212] 상기 실시예 1에서 제조한 AbaLDPN-MOG의 물리화학적 특성을 파악하기 위해, 입자 크기 및 제타전위를 평가하였다.

[213] 구체적으로, 실시예 1-1의 방법으로 제조한 폴리도파민 나노입자 (대조군) 및 실시예 1-3, 1-4, 또는 1-5의 방법으로 제조한 나노입자를 준비하였으며, 10% 소태아혈청 (fetal bovine serum), 및 100 units/㎖ 페니실린를 함유한 혈청에서 24시간 동안 보관한 후, AbaLDPN-MOG의 크기를 동적 광산란법 (ELS8000 instrument, Photal, Osaka, Japan)을 이용하여 측정하였다. 그 결과 도 2와 같이 PN, LDPN, 및 AbaLDPN-MOG간의 입자 크기에는 유의미한 차이가 없는 것을 확인하였다. 또한 수용액 상에서의 제타전위는 레이저 도플러 전기영동법을 이용하여 측정하였으며 각 조성간의 유의미한 차이가 없음을 확인하였다.

[214]

[215] **<1-2> AbaLDPN-MOG의 약물 봉입량 및 결합된 자가항원의 정량**

[216] 상기 실시예 1에서 제조한 AbaLDPN-MOG에 봉입된 면역조절 약물 (덱사메타손) 및 상기 나노입자에 결합한 자가항원을 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC, Agilent)를 이용하여 정량했다.

[217] 면역조절 약물의 정량을 위하여, 나노입자를 methanol에 분산 시키고, 30 분간 초음파분산법 (ultrasonication)을 이용하여 지질층에 봉입된 약물이 모두

석출되도록 한 후, 27,000 xg에서 20분간 원심분리하여 약물이 녹아있는 상층액만을 분석하였다. 이동상은 삼차 증류수 : acetonitrile을 부피비 70:30의 조성으로 준비하였으며, 검출 파장은 254 nm이었다. 컬럼은 C18 역상 크로마토그래피 컬럼 (C18 reverse-phase HPLC column, Phenomenex)을 사용하였으며 25 ℃ 하에서 진행하였다.

[218] Thiol을 가진 자가항원 (MOG-Cys)의 경우, 나노입자와 반응시킨 후 남은 자유 항원들을 HPLC로 정량 하여 계산하였다. 이동상의 경우 gradient mobile phase를 이용하였으며, 용매 A를 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA)/water, 용매 B를 0.1 % TFA/acetonitrile이라 할 때, 용매 B를 3%에서 시작하여 2 분간 20 %로, 10 분간 20 %에서 50 %로, 4분간 50 %에서 70 %로, 1 분간 70%에서 3%로 조성을 바꾸면서 진행하였으며 검출 파장은 562 nm에서 진행 하였다. 컬럼은 C18 역상 크로마토그래피 컬럼 (C18 reverse-phase HPLC column, Phenomenex)을 사용하였으며 25 ℃ 하에서 진행하였다.

[219] 분석 결과는 도 3에 나타냈다. 약물이 함유된 지질박막으로 코팅되지 않은 대조군 (PN 나노입자)의 경우 약물이 검출되지 않았으나, 본 발명의 나노입자 (LDPN, LDPN-MOG, 및 AbaLDPN-MOG)는 모두 약물의 존재가 확인되었으며, 그 양은 나노입자간 유의미한 차이가 없는 것으로 나타났다. 자가항원의 경우, 자가항원이 수식되지 않은 대조군 (PN 나노입자) 및 LDPN 나노입자는 자가항원이 검출되지 않았으나, 자가항원으로 표면이 수식된 LDPN-MOG 나노입자 및 AbaLDPN-MOG 나노입자는 모두 자가항원이 높은 수준으로 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

[220]

[221] **<1-3> AbaLDPN-MOG의 분광학적 성질 평가**

[222] 상기 실시예 1에서 제조한 AbaLDPN-MOG의 분광학적 성질을 이용하여 화학적 작용기들을 분석하였다.

[223] 구체적으로, 실시예 1에서 제조한 나노입자들을 동결건조하고, 푸리에 변환 적외선분광법 (Fourier transformation-infrared spectroscopy, FT-IR) (FT/IR-400, JASCO)을 수행해 나노입자들의 지질 박막 코팅을 확인하였다. 적외선분광법은 attenuated total reflection (ATR)을 이용하여 측정하였다. 그 결과 2900 내지 3000 cm^{-1} 에서 강한 피크가 나타남을 확인하였다. 이는 인지질의 지방산이 많이 갖고 있는 C-H 신축진동에 기인한 것이다. 라만 분광법 (LabRAM HR. Evolution, HORIBA)의 경우 위와 유사하게 동결건조한 나노입자들을 사용하였으며, 532 nm의 laser를 사용하여 분석하였다. 그 결과, 방향족고리들을 가진 고분자화합물의 특징인 D band와 G band가 모든 조성에서 공통적으로 나타난 것을 확인하였다 (도 4).

[224]

[225] **<1-4> AbaLDPN-MOG의 형태 및 원소 분석**

[226] 상기 실시예 1에서 제조한 AbaLDPN의 입자 크기 및 형태를 평가하였으며

원소분석의 경우 투과전자현미경에 탑재된 에너지 분산형 X-선 분광법 (EDS)를 통하여 분석하였다.

[227] 분석 결과는 도 5에 나타냈다. 구체적으로, 투과전자현미경 관찰 결과, 입자의 형태는 동적 광산란법을 이용한 나노입자의 크기 분석 결과와 유사함을 확인할 수 있었다. 또한, EDS를 이용하여 원소분석을 수행한 결과, 항산화 나노입자의 주요 구성 원소인 탄소, 질소, 산소의 검출이 가장 지배적임을 확인하였다. 인의 검출은 인지질 층을 의미하며, 황의 검출은 표면에 결합한 단백질에 의한 것이다.

[228]

[229] **<실험예 2> 재조합 항체의 수식에 따른 항원제시세포 특이적 결합능 확인**

[230] 실시예 1에서 제조한 LDPN 나노입자 및 AbaLDPN-MOG 나노입자의 CD80/86를 발현하고 있는 항원제시세포에 대한 결합능을 유세포 분석법, 공초점 현미경, 및 투과전자현미경을 통해서 확인하였으며, *ex vivo* 조건하에서 타겟 세포에 대한 선택성을 평가하였다.

[231]

[232] **<2-1> 형광표지를 이용한 나노입자의 항원제시세포 결합능 평가**

[233] 실시예 1에서 제조한 LDPN 및 AbaLDPN-MOG의 CD80/86-발현 수지상세포에 대한 결합능을 유세포분석법 및 공초점 현미경으로 확인 하였다. 나노입자는 실시예 1에 따라 CD80/86에 특이적으로 결합할 수 있는 재조합 항체로 표면을 수식했다.

[234] 구체적으로, C57BL/6 (8주령)으로부터 비장 유래 수지상세포를 유세포분석기를 이용하여 얻었다 (FACS Aria Sorting). 먼저 비장세포에 존재하는 세포들 중 CD11c 및 MHCII를 동시에 발현하는 세포만을 선별하여 진행하였다. 수지상세포의 경우, 대퇴골 및 경골을 적출하여 미성숙 수지상세포를 수득하고, 이를 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 및 interleukin-4 (IL-4)를 각각 20 ng/mL이 되도록 첨가한 배지 (10% 소태아혈청, 100 units/㎖ 페니실린, 및 100 mg/㎖ 스트렙토마이신이 보충된 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM))에서 7일 간 분화 시킨 후 사용했다. 분화가 완료 되면 24 well plate에 well당 1×10^6 세포의 밀도로 파종 (seeding)한 후, 1 μg/mL의 LPS 조건하에서 24 시간 활성화 시켰다.

[235] 이어서, 수지상세포에 Cy5로 표지된 나노입자들을 폴리도파민으로서 400 μg/mL이 되도록 처리하였다. 1시간 뒤, 나노입자들을 제거하고, 상기 수지상세포들의 Cy5 형광 세기를 유세포분석법으로 확인한다.

[236] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 표면에 항체가 수식된 AbaLDPN-MOG 나노입자가 처리된 실험군은, LDPN-MOG가 처리된 실험군 보다 더 높은 형광 세기를 나타냈다. 상기 결과는 재조합 항체의 나노입자 수식이 수지상세포에 대한 상기 나노입자의 결합능을 높인다는 것을 보여주는 것이다.

[237] 이어서, 공초점 현미경으로 나노입자의 세포 결합능을 확인하기 위해, 위와

동일한 방법으로 수지상세포 및 나노입자를 배양한 후, 나노입자들를 제거한 세포들을 10% formalin/PBS (v/v) 상에서 1시간 고정한 후에 2 μg/mL의 Hoechst로 15 분간 핵을 염색하여 현미경으로 관찰했다.

[238] 그 결과, AbaLDPN-MOG가 처리된 실험군은 LDPN-MOG가 처리된 실험군 보다 더 높은 형광 세기를 나타내는 것을 확인했다 (도 7). 상기 결과는, 위의 실험결과와 마찬가지로, 본 발명에 따른 지질-항산화 나노입자의 표면을 재조합 항체로 수식하면 상기 나노입자의 항원제시세포에 대한 특이적 결합능이 증가한다는 것을 보여준다.

[239]

[240] **<2-2> 투과전자현미경을 이용한 항원제시세포에 대한 세포 결합능 평가**

[241] 실시예 1에서 제조한 LDPN 및 AbaLDPN-MOG의 CD80/86-발현 수지상세포에 대한 결합능을 투과전자현미경으로 확인 하였다. 나노입자는 실시예 1에 따라 CD80/86에 특이적으로 결합할 수 있는 재조합 항체로 표면을 수식했다.

[242] 구체적으로, 활성화된 비장 유래 수지상세포에 대해 나노입자를 폴리도파민으로서 400 μg/mL이 되도록 처리하였다. 1 시간 후, 각 세포를 수집하여 Karnovsky 용액으로 2시간 동안 고정한 다음, 차가운 0.05 M 소듐 카코딜레이트 (sodium carcodylate) 완충액으로 3번 세척하고, 펠렛을 4 ℃에서 2시간 동안 1% 오스뮴 테트록시드 (osmium tetroxide)로 사후 고정시켰다. 고정시킨 펠렛을 차가운 삼중 증류수로 3회 세척한 후, 4℃에서 밤새 0.5% 우라닐 아세테이트 (uranyl acetate)로 염색하고, 에탄올 (30%, 50%, 70%, 80%, 90% 및 100% 3회)에서 탈수 시켰다. 탈수된 세포 펠렛에 50:50 프로필렌 옥사이드(propylene oxide)/스퍼(Spurr) 수지를 2시간 동안 침투시킨 후, 100% 스퍼 수지로 교체하여 이를 70 ℃ 오븐에서 24시간 동안 고체화 시켰다. 펠렛은 극미세단면 (60nm)으로 절단하여 TEM으로 관찰하였다.

[243] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, LDPN-MOG 나노입자와 비교하여 훨씬 많은 수의 AbaLDPN-MOG 나노입자가 수지상세포에 결합한 것을 관찰할 수 있다. 즉, 상기 결과는 재조합 항체로 나노입자의 표면을 수식하는 것이 수지상세포에 대한 나노입자의 결합능을 높인다는 것을 입증하는 것이다.

[244]

[245] **<실험예 3> AbaLDPN-MOG의 수지상세포 내 내포작용 (endocytosis) 확인**

[246] 실시예 1에 따라 제조한, 재조합 항체 및 자가항원이 표면에 수식된 지질-항산화 나노입자가 수지상 세포 내로 효과적으로 내포작용을 일으키는 것을 공초점 현미경 및 투과전자현미경을 통하여 확인하였다. 특히, 상기 나노입자는 내포작용을 통해 수지상 세포의 리소좀 (lysosome) 내로 함입되는 것이 확인됐다.

[247] 구체적으로는, 실험예 2-1과 같은 조건으로, 수지상세포에 Cy5-표지된 나노입자들을 폴리도파민으로서 400 μg/mL에 해당하도록 처리하여 시간대별로 Cy5 형광의 움직임을 추적하였다. 또한 세포 내의 lysosome을 표지하기 위해서

Lysotracker (Invitrogen)을 사용했다.

[248] 그 결과, 수지상세포에 나노입자를 처리하고 1시간이 경과했을 때에는 대부분의 형광이 세포의 표면에서 검출됐으나, 4시간 뒤에는 세포 내부에서 Cy5 형광이 검출되기 시작했으며, 24시간 후에는 세포 내부의 lysotracker와 같은 위치에서 형광신호가 분산되어 존재하는 것을 확인하였다 (도 9). 상기 결과는 본 발명에 따른 나노입자가 내포작용을 통해 항원제시세포 내부로 도입될 수 있으며, 특히 리소좀 내로 이동한다는 것을 보여준다.

[249]

[250] **<실험예 4> AbaLDPN-MOG의 수지상세포 및 T 세포간의 상호작용 억제 능력 확인**

[251] 실시예 1에 따라 제조한, 재조합 항체 및 자가항원이 표면에 수식된 지질-항산화 나노입자가항원제시세포 및 T 세포간 상호작용을 저해하는 것을 *in vitro*에서 확인하였다. 이를 위해, T 세포 활성화에 관여하는 수지상세포의 표면 단백질을 이용해 수지세상세포 및 T 세포간 상호작용을 *in vitro*로 구현했다.

[252]

[253] **<4-1> T 세포의 활성화 저해 작용 확인**

[254] 본 발명에 따른 나노입자에 의한 수지상세포 및 T 세포간 상호작용 억제 효과를 도 10에 나타낸 *in vitro* 환경에서 T 세포의 IL-2 분비량을 통해 평가하였다.

[255] 구체적으로, 도 10의 시험관 조건은 수지상세포 및 T 세포 간의 상호작용을 모방한 것으로, 96 well plate에 anti-CD3 antibody (aCD3Ab) 및 CD80 Fc fusion protein (CD80 Fc)을 코팅하여 구현한 것이다. aCD3Ab 및 CD80 Fc를 각각 10 μg/mL이 되도록 PBS에 준비하여 well plate를 덮어준 후 4 ℃에서 12 시간 동안 보관했다. 12 시간 후, well plate의 코팅이 완료 되면 PBS로 1회 세척한 후 C57BL/6 (8주령)으로부터 준비한 비장 세포를 well 당 3×10^6 세포의 밀도로 파종하고, 나노입자는 폴리도파민으로서 400 μg/mL이 되도록 처리했다. 48 시간 후, 세포를 배양하던 배지를 수득하고, 이에 대해 제조사 protocol에 따라 ELISA (R&D systems, DY402-05)를 수행하여 IL-2를 검출했다.

[256] 그 결과, 면역조절약물인 덱사메타손을 포함하는 나노입자 (LDPN-MOG 또는 AbaLDPN-MOG)가 처리된 그룹은 덱사메타손 및 항원을 직접 처리한 그룹 (Dexa+MOG)에 비해 T 세포에 의한 IL-2 분비가 현저하게 억제된 것을 확인할 수 있었다 (도 11). 특히, 표면이 수지상세포 특이적 항체로 수식된 AbaLDPN-MOG 나노입자는, 항체가 수식되지 않은 LDPN-MOG보다 더 효과적으로 T 세포의 IL-2 분비를 억제하는 것으로 나타났다. 상기 결과는 본 발명에 따른, 항체로 표면이 수식된 지질-항산화 나노입자가 well plate에 코팅된 수지상세포 표면 단백질과 T 세포의 상호작용을 효과적으로 차단하여, T 세포의 활성화를 억제한다는 것을 보여주는 것이다. 특히, 본 발명에 따른 나노입자는 양성대조군으로 사용한 CTLA-4 Fc와 비교하여서도 더욱 효과적으로 T 세포의

IL-2 분비를 억제하는 것으로 확인됐다.

[257]

[258] **<4-2> T 세포의 증식 및 분열 억제 작용 확인**

[259] 본 발명에 따른 나노입자에 의한 수지상세포 및 T 세포간 상호작용 억제 효과를 도 10에 나타낸 *in vitro* 환경에서 T 세포의 증식 및 분열 수준을 통해 평가했다.

[260] 구체적으로, 도 10과 동일한 조건에서 실험을 진행하였으며, 마찬가지로 96 well plate에 aCD3Ab 및 CD80 Fc를 코팅하여 구현하였다. 세포를 파종하기 전에 PBS로 1회 세척했다.

[261] 비장세포는 carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)로 염색하여 준비했다. CFSE (BioLegend, 423801)는 제조사의 protocol에 따라 준비되었으며, 형광 염색된 비장세포는 well 당 1×10^7 세포의 밀도로 파종하고, 나노입자는 폴리도파민으로서 400 μg/mL이 되도록 처리하였다. 72 시간 후 비장세포에 대해 유세포분석을 수행했다.

[262] 결과는 도 12 및 도 13에 나타냈다. 도면에서 확인 가능한 바와 같이, 본 발명에 따른 나노입자는 대조군들 (미처리대조군, MOG 처리군, 덱사메타손 및 MOG 처리군)과 비교하여 T 세포의 분열 및 증식을 현저하게 억제했다. 특히, 표면이 수지상세포 특이적 항체로 수식된 AbaLDPN-MOG 나노입자는, 항체가 수식되지 않은 LDPN-MOG보다 더 효과적으로 T 세포의 분열 및 증식을 억제한 것으로 나타났다. 형광 세기를 통한 T 세포의 확장 인덱스 (expansion index) 분석은 flowJo v10 프로그램으로 수행했다. 보조 T 세포를 의미하는 CD3 및 CD4 이중 양성 세포; 및 세포독성 T 세포를 의미하는 CD3 및 CD8 이중 양성 세포 각각에 대해서 분석했으며, 표면이 수지상세포 특이적 항체로 수식된 AbaLDPN-MOG 나노입자가 두 종류의 T 세포 모두 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[263]

[264] **<실험예 5> AbaLDPN-MOG의 면역관용 수지상세포 유도 능력 평가**

[265] **<5-1> 면역관용 수지상세포 유도 능력 확인**

[266] 실시예 1의 방법으로 제조한, 재조합 항체 및 자가항원이 표면에 수식된 지질-항산화 나노입자가 효과적으로 면역관용 수지상세포를 유도할 수 있음을 유세포분석법을 통해 확인 하였다.

[267] 구체적으로, 비장세포에 폴리도파민으로서 400 μg/mL에 해당하는 나노입자를 1시간 동안 처리하고, 나노입자를 제거한 상태로 세포를 72 시간 동안 배양 했다. 배양을 마친 비장세포에 1 μg/mL LPS를 처리하여 세포를 활성화 시킨 후 6 시간 뒤에 유세포분석법으로 세포를 확인했다. 세포질에 존재하는 단백질을 분석하기 위해서는 LPS와 함께 brefeldin A를 5 μg/mL이 되도록 처리하여 세포질 내 단백질의 유출을 막았다. 세포의 형광 항체 염색은 해당 제품 (BioLegend 424401)의 protocol을 따라서 진행하였다. 비장 세포 내에서 CD11c 및 MHCII의 이중 양성 세포만을 선택하여, 이들의 타겟 단백질에 대한 형광의 mean

fluorescence intensity를 분석 하였으며, 세포막 단백질 CD86, CD80, MHCII; 및 염증성 사이토카인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 수준을 확인했다.

[268] 그 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 항산화-나노입자를 처리한 세포는 수지상세포의 활성화와 관련된 세포막 단백질인 CD80, CD86, 및 MHCII의 수준이 감소하고, 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, 및 IL-6의 분비도 억제된 것을 확인할 수 있었다. 특히, 상기 효과는 재조합 항체로 표면이 수식된 지질-항산화 나노입자 (AbaLDPN-MOG)를 처리한 세포에서 더욱 현저하게 나타났다. 상기 결과는 본 발명에 따른 나노입자가 수지상세포에서 CD80, CD86, 및 MHCII에 의한 T 세포 활성화를 효과적으로 차단함으로써, 면역관용 수지상세포를 유도할 수 있음을 보여준다 (도 15).

[269]

[270] **<실험예 6> 동물모델에서의 AbaLDPN-MOG의 면역조절 효과 확인**

[271] 2차 면역기관인 림프절과 비장은 수지상세포를 비롯한 항원제시세포가 많이 분포하는 곳으로, 본 발명에 따른 면역조절을 위한 나노입자의 주요 타겟 장기이다. 본 발명자들은 동물모델에 상기 나노입자를 피하주사하였을 때, 상기 나노입자가 동물모델의 2차 면역기관을 표적화하는 것을 전임상 단층광학 이미징, 유세포분석법 및 면역형광조직법을 통하여 확인하였다.

[272]

[273] **<6-1> 단층광학 이미징을 이용한 AbaLDPN-MOG의 림프절 표적화 능력 평가**

[274] 실시예 1에 따라 제조한, 재조합 항체 (CD80/86-특이적 재조합 항체) 및 자가항원이 표면에 수식된 지질-항산화 나노입자의 림프절 표적화 능력을 전임상 단층광학 이미징을 통하여 확인하였다.

[275] 구체적으로는, C57BL/6 (8주령)의 요추에 해당하는 부분의 피하에 Cy5로 표지된 나노입자를 주사했다. 나노입자는 폴리도파민으로서 50 mg/kg으로 투여하였으며, 투여 후 6, 24, 48, 및 72시간이 경과했을 때 림프절에서의 Cy5의 형광 세기를 측정했다.

[276] 그 결과, 도 16 및 도 17에 나타낸 바와 같이, 재조합 항체가 표면에 수식된 나노입자는 항체가 수식되지 않은 나노입자에 비해 림프절에 더 많은 양이 축적되었으며, 더 오랜 시간 동안 축적되어 있는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 양쪽 림프절 모두에서 유사하게 나타났다.

[277]

[278] **<6-2> AbaLDPN-MOG의 림프절 내 수지상세포의 표적화 능력 평가**

[279] 실시예 1에 따라 제조한, 재조합 항체 (CD80/86-특이적 재조합 항체) 및 자가항원이 표면에 수식된 지질-항산화 나노입자의 비장 표적화 능력을 림프절 내 수지상세포를 분석하여 확인하였다.

[280] 이를 위해, 실험예 6-2와 동일한 방법으로 본 발명에 따른 나노입자를 마우스에 투여한 후, 마우스의 림프절을 분리하여 유세포분석법으로 확인하였다.

[281] 림프절에 존재하는 세포집단 중 수지상세포 ($CD11c^{+}MHCII^{+}$)에 대하여

Cy5형광을 나타내는 세포의 분포를 분석한 결과, 재조합 항체로 표면이 수식된 지질-항산화 나노입자를 처리한 그룹에서 Cy5 양성인 수지상세포의 비율이 대조군 (재조합 항체로 수식되지 않은 지질-항산화 나노입자를 처리한 그룹)에 비해 현저하게 증가한 것으로 나타났다 (도 18). 상기 결과는 재조합 항체로 표면이 수식된 지질-항산화 나노입자는 항체로 수식되지 않은 나노입자와 비교해 더욱 효과적으로 수지상세포에 결합하며, 림프절 타겟화 능력 역시 증가한다는 것을 보여준다.

[282]

[283] **<6-3> 면역형광조직법을 이용한 나노입자의 림프절 분포 능력 평가**

[284] 재조합 항체 (CD80/86-특이적 재조합 항체) 및 자가항원이 표면에 수식된 지질-항산화 나노입자의 림프절 표적화 능력을 면역형광조직법을 이용하여 확인하였다.

[285] 실험예 6-1과 동일한 방법으로 마우스에 Cy5로 표지된 나노입자를 투여한 후, 마우스의 림프절을 분리하여 공초점현미경 및 Automated Multimodal Tissue Analysis System (PerkinElmer, Vectra)을 이용하여 조직학적 분석을 실시하였다. 분리된 림프절은 10 % formalin/PBS (v/v)에서 24시간 고정한 후, 30 % sucrose 용액에서 cryoprotection process를 24시간 진행 하였다. 조직의 embedding medium은 OCT compound tissue-TEK을 이용했으며, 액화 질소를 이용하여 진행 후 -80 ℃에 보관하였다. Cryosection slide는 동결절편기 (Leica)를 이용하여 준비하였으며 조직 절편의 두께는 5 μm로 하였다. 형광 항체로 염색하기 전에, 10 % FBS/PBS로 2 시간 동안 blocking을 진행 하였고, PBS로 washing 후, 항체를 4 ℃에서 12시간 이상 처리하였다. 그 후, 샘플을 PBST를 이용하여 washing 하였으며, 2 μg/mL의 Hoechst로 1시간 동안 염색을 진행 하였다. 염색이 완료된 샘플은 washing한 후 fluoromount (Sigma-aldrich)를 처리하고 slide를 완성했다. Slide는 공초점 현미경과 Automated Multimodal Tissue Analysis System을 이용하여 분석하였다.

[286] 관찰 결과는 도 19에 나타냈다. 이미지에서 명확히 확인할 수 있듯이, 재조합 항체로 표면이 수식된 지질-항산화 나노입자를 처리한 마우스의 림프절에서는 대조군 (항체로 표면이 수식되지 않은 나노입자)에 비해 매우 높은 수준의 Cy5 형광이 관측됐다. 즉, 이는 항체로 표면이 수식된 지질-항산화 나노입자가 림프절에 높은 수준으로 축적되었음을 의미한다. 상기 결과는 본 발명에 따른 재조합 항체로 표면이 수식된 지질-항산화 나노입자의 림프절 표적화 기능이 우수하며, 따라서 림프절 내에 효과적으로 분포될 수 있음을 보여준다.

[287]

[288] **<실험예 7> 자가면역질환 모델에서의 AbaLDPN-MOG 효능 평가**

[289] 본 발명에 따른 나노입자의 효능을 오브알부민 (Ovalbumin, OVA)을 이용한 자가면역질환 동물모델에서 확인하였다. 나노입자의 체액성 면역반응 조절 효과는 혈청 내 자가항체의 농도 분석을 통해 평가하였고, 세포성 면역반응의

조절 효과는 ELISPOT을 통해 평가하였다.

[290]

[291] **<7-1> Ovalbumin을 이용한 자가면역질환 모델의 구축**

[292] 병원성 항원이 아닌 자가항원 (오브알부민, OVA)에 대하여 면역반응이 일어나도록 C57BL/6를 이용한 (12 주령) 자가면역질환 동물 모델을 구축하였다.

[293] 구체적으로는, 2 mg/mL의 OVA와 동일한 부피에 해당하는 complete freund's adjuvant (CFA; invivogen)을 균일한 유제 (emulsion)가 될 때까지 교반하였으며, 제조된 자가항원 용액 200 μL를 마우스에 피하주사하여 자가면역질환을 유도했다. 2 주 후, OVA 만을 추가로 100 μL 피하 주사하여 재활성화 시켰다. 실험의 전체적인 계획표는 도 20a과 같다.

[294]

[295] **<7-2> 나노입자의 체액성 면역 반응 조절 능력 평가**

[296] 재조합 항체 및 자가항원이 표면에 수식된 지질-항산화 나노입자의 체액성 면역 반응 조절 능력 확인하기 위해, 동물모델의 체내 자가항체 농도를 측정했다.

[297] 구체적으로는, 자가항원으로 OVA가 담지된 본 발명의 나노입자 (AbaLDPN-OVA)를 7일 간격으로 3회 피하 주사하였으며, 자가면역질환 모델 유도시작일로부터 14일이 경과한 시점부터 매주 개체의 꼬리 정맥으로부터 혈액을 10 μL 수득했다. 혈액을 10% FBS를 함유한 5 mM EDTA/PBS 수용액에 잘 희석한 후, 2,000g 에서 10분간 원심 분리를 하여 적혈구를 분리해냈다. 분리된 혈청 샘플은 ELISA의 감도에 맞게 희석을 하여 OVA가 coating 된 well plate를 이용하여 ELISA를 진행했다.

[298] 그 결과, 도 20b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 나노입자가 투여된 마우스의 체내 자가항체 (anti-OVA IgG) 수준은 기타 대조군들에 비해 유의하게 감소하였으며, 특히 재조합 항체가 표면에 수식된 지질-항산화 나노입자를 투여 받은 마우스는 항체가 수식되지 않은 나노입자를 투여 받은 마우스보다도 더욱 현저하게 자가항체의 수준이 감소한 것을 확인하였다. 상기 결과는 본 발명에 따른 나노입자가 지속적인 항원 노출에도 불구하고 체액성 면역반응을 장기간 효과적으로 억제할 수 있으며, 항체 및 자가항원으로 표면이 수식된 나노입자의 체액성 면역 억제 효과가 특히 우수하다는 것을 뒷받침 한다.

[299]

[300] **<실험예 8> 자가면역 뇌척수염 모델에서의 AbaLDPN-MOG 효능 평가**

[301] 본 발명에 따른 나노입자의 효능을 실험적 자가면역 뇌척수염 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) 모델을 이용하여 평가하였다. 효능 평가는 개체의 임상적 증상 (clinical score) 및 체중 변화를 비롯하여, 면역세포의 중추신경계 침습 정도 및 탈수초화 정도를 확인하여 이루어졌다.

[302]

[303] **<8-1> 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE) 동물 모델의 구축 및 나노입자 투여에**

따른 임상증상 평가

[304] 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE) 모델은 인간의 다발성 경화증 (multiple sclerosis) 연구에 널리 사용되는 실험적 동물 모델로, 건강한 개체의 신경계에 존재하는 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)의 35에서 55번까지의 fragment peptide (MOG_{35-55})에 대한 자가 면역반응을 유도하여 구축한 모델이다.

[305] 구체적으로는, MOG_{35-55} (MOG peptide) (Prospec Bio, PRO-371) 2 mg/mL과 complete freund's adjuvant (CFA; Heat inactivated M. tuberculosis, 4 mg/mL) (Chondrex)를 동일한 부피로 혼합하여 유제 (emulsion) 형태로 준비했다. 균일한 유제를 C57BL/6 (12주령, female)에 200 μL씩, 피하투여한 후 2 시간 이내로 pertussis toxin (PTX) (List Biological Lab) 400 ng을 복강투여 하였다. 유제 피하 주사 48 시간 뒤에 PTX를 추가로 400 ng 복강투여 하였다.

[306] 이후 개체의 임상적 증상 (임상 스코어 (clinical score))과 체중을 추적관찰했다. 임상적 증상 (clinical score)에 대한 criteria는 선행 문헌 Nature Protocols 1 (2006) 1810-1819를 기반으로 평가하였으며 매일 체중과 함께 평가하였다.

[307] 투여 스케쥴은 실험 목적 (자가면역질환의 예방, 진행 억제, 및 치료)에 따라 다르게 진행했다. 자가면역질환의 예방을 목적으로 할 경우, 질환모델을 유도하기 2주 전부터 1주일 간격으로 2회 나노입자 투여를 진행하였으며 (도 21a), 자가면역질환의 진행 억제를 목적으로 할 경우, 자가면역질환 유도 직후 1주일 간격으로 2회 나노입자 투여를 진행하였고 (도 21b), 자가면역질환의 치료가 목적인 경우 증상이 나타나기 시작하였을 때, clinical score가 0.5인 개체들을 무작위적으로 선별하여 대조군 및 실험군으로 나누고, 나노입자를 폴리도파민으로서 50 mg/kg이 되도록 3일 마다 4회 피하 주사로 투여했다 (도 21c).

[308] 총 28일동안 개체들의 임상 스코어와 체중 변화를 추적관찰 하였다. 그 결과, 미처리 대조군에 비해 본 발명의 지질-항산화 나노입자가 처리된 마우스는 효과적으로 임상 증상을 개선하고 체중을 정상적으로 조절하며, 특히 재조합 항체가 표면에 수식된 AbaLDPN-MOG가 그렇지 않은 LDPN-MOG에 비해서 더 고무적인 결과를 보여주는 것을 확인했다 (도 22a 내지 22c).

[309]

[310] **<8-2> 나노입자의 면역세포의 중추신경계 침습 개선 및 조절 T 세포 증가 효과 확인**

[311] 본 발명에 따른 항산화-나노입자에 의한 면역세포의 중추신경계 침습 개선 능력을 유세포분석법으로 평가하였다.

[312] 구체적으로는, 실험예 8-1과 동일한 방법으로 자가면역질환 모델에 나노입자를 투여하였으며, 실험 개시일로부터 28일이 경과한 후 각 개체로부터 척수를 적출하였다. 척수는 1mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich) 및 cell strainer (40 μm) (SPL)을 이용하여 single cell로 분리 되었으며, hypotonic buffer내에서 적혈구를 용혈한 후 사용하였다. 각 면역세포는 기본적으로 CD45를 발현하는

것을 선별하였고, 수지상세포의 경우 $CD11c^+$ $MHCII^+$를, 대식세포의 경우 $CD11b^+$ $F4/80^+$를, 조력 T 세포의 경우 $CD3^+$ $CD4^+$를, 세포독성 T 세포의 경우 $CD3^+$ $CD8^+$를, 조절 T 세포의 경우 조력 T 세포 내에서 $CD25^+$ $FoxP3^+$를 마커로 하여 분석하였다. 병인성 보조 T 세포의 경우, $CD3^+$ $CD4^+$를 공통으로 표지하며, IFN-γ 또는 IL-17A를 발현하는 것으로 분석하였다. 표지 방법은 상기 유세포분석법과 동일하게 진행하였다.

[313] 결과는 도 23a 내지 23c에 나타냈다. 본 발명에 따른 항산화 나노입자를 자가면역질환의 예방, 진행 억제, 또는 치료 목적으로 투여한 경우 모두 미처리 대조군에 비해 면역세포들의 중추신경계로의 침습이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히, 상기 효과는 보다 LDPN-MOG 투여군보다는 AbaLDPN-MOG 투여군에서 더욱 확연하게 나타났다. 보다 자세하게는, 수지상세포, 대식세포, 및 세포독성 T 세포 모두 AbaLDPN-MOG가 가장 효과적으로 중추신경계로의 침습을 억제하였으며, 조력 T 세포에 대해서는 LDPN-MOG 및 AbaLDPN-MOG가 유사한 정도의 효과를 보였으나, 면역관용 효과가 있는 조절 T 세포의 경우, 후술하는 바와 같이 AbaLDPN-MOG를 투여한 실험군에서 가장 높은 수준을 나타내는 것을 확인하였다 (도 24a 내지 24c). 즉, 이는 본 발명에 따른 항산화 나노입자가 과잉의 면역반응을 조절할 수 있는 조절 T 세포의 비율을 증가시키는 효과가 있음을 보여주는 것이다. 뿐만 아니라, 조직을 손상시킬 수 있는 IFN-γ 또는 IL-17A를 발현하는 보조 T 세포의 비율은 AbaLDPN-MOG를 투여한 실험군에서 가장 확연하게 감소했다.

[314]

[315] **<8-3> 나노입자의 자가항원 특이적 세포성 면역반응 조절 능력 평가**

[316] 본 발명에 따른 항산화-나노입자의 면역세포의 항원특이적 세포성 면역 반응 조절 능력을 ELISPOT을 이용하여 평가하였다.

[317] 구체적으로는, 실험예 8-1과 동일한 방법으로 자가면역질환 모델에 나노입자를 투여하였으며, 실험 개시일로부터 28일이 지난 뒤 개체들로부터 비장세포를 적출하여, 5 μg/mL의 MOG peptide 처리 하에서 ELISPOT (BD, Mouse IFN-γ ELISPOT Set, 551083)을 진행 하였다. 구체적인 실험은 제품의 protocol을 따라 진행 하였다

[318] 결과는 도 25a 내지 25c에 나타냈다. 본 발명에 따른 항산화 나노입자를 자가면역질환의 예방, 진행 억제, 또는 치료 목적으로 투여한 경우, 상기 나노입자가 각 동물모델의 비장세포가 자가항원 (MOG peptide)에 의해 활성화되어 IFN-γ를 분비하는 것을 감소시키는 것을 확인했다. 즉, 상기 나노입자는 MOG peptide에 의해 활성화 되는 면역세포들의 세포성 면역반응을 효과적으로 억제할 수 있으며 특히, 재조합 항체로 수식된 지질-항산화 나노입자의 경우 재조합 항체가 수식 되지 않은 지질-항산화 나노입자보다 효과적으로 면역반응을 조절하는 것으로 나타났다.

[319]

[320]

[321] **<8-4> 나노입자의 면역세포의 중추신경계 침습 개선 능력 및 탈수초화 억제 효과 평가**

[322] 본 발명에 따른 항산화-나노입자의 면역세포의 중추신경계 침습 개선 능력 탈수초화 억제 효과를 면역형광조직법을 이용하여 분석하였다.

[323] 구체적으로는, 실험예 8-1과 동일한 방법으로 자가면역질환 모델에 나노입자를 투여하였으며, 실험 개시일로부터 28일이 지난 뒤, 각 개체로부터 척수를 적출하였다. 적출한 척수는 실험예 6-3과 동일한 방법으로 처리하여 면역형광조직법을 수행하였다. CD45는 중추신경계를 침습한 면역세포의 마커이며, myelin basic protein (MBP)은 수초의 마커로서, 탈수초화 정도를 확인할 수 있다.

[324] 결과는 도 26에 나타냈다. 본 발명에 따른 항산화 나노입자를 투여 받은 마우스는 미처리 대조군과 비교하여 면역세포들의 중추신경계 침습이 두드러지게 감소한 것으로 나타났으며, 특히 면역세포 침습 억제 효과는 AbaLDPN-MOG를 투여한 실험군에서 가장 뛰어난 것으로 나타났다. 상기 결과는 본 발명에 따른 항산화 나노입자가 뇌척수염 동물모델에서 마이엘린 수초 (myelin sheath)를 보호하며, 면역세포의 중추신경계 침습을 차단하여 면역반응을 조절할 수 있음을 보여준다.

[325]

[326] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자는 개체에 투여되었을 때 비장 또는 림프절을 효과적으로 타겟팅하고, 항원제시세포에 특이적으로 결합하여 지질막 내에 봉입된 면역억제제를 효과적으로 전달할 뿐만 아니라, 자가항원에 대한 면역관용을 유도하는 것이 확인되었다 (도 27). 즉, 본 발명에 따른 나노입자는 자가항원에 대한 자가항체 생성을 억제하고, 면역세포들의 과활성화를 억제하며, 면역세포에 의한 정상조직 침습을 억제할 수 있으므로, 다양한 자가면역질환의 예방 및 치료 목적으로 활용될 것으로 기대된다.

[327]

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

산업상 이용가능성

[329] 본 발명에 따른 지질-항산화 나노입자는 자가항원 및 항원제시세포 특이적 항체가 표면에 수식되어 있어 항원제시세포 특이적으로 자가항원을 전달할 수 있고, 표면은 면역조절제가 봉입된 지질막으로 코팅되어 있어 자가항원에 대해

면역관용을 유도할 수 있다. 특히 본 발명에 따른 나노입자는 자가면역질환 동물모델에 투여하였을 때 면역기관인 림프절 및 비장을 효과적으로 타겟팅하여 항원제시세포들에 의한 과잉의 면역 활성화를 효과적으로 억제함으로써, 자가면역질환을 예방, 지연, 및 치료할 수 있음이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 나노입자는 뇌척수염 등을 포함한 다양한 자가면역질환의 예방 내지 치료를 위해 유용히 활용될 것으로 기대된다.

청구범위

[청구항 1] 항산화 나노입자; 상기 나노입자 표면을 코팅하는 지질막; 상기 지질막 표면에 결합된 자가항원; 및 상기 지질막 표면에 결합된 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 항산화 나노입자는 폴리도파민 나노입자, 탄닌 나노입자, 및 세륨 산화물 나노입자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 지질막은 페길화된 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 지질막은 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), phosphorylglycerol (PG), phosphocholine (PC),
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG2000-maleimide), 콜레스테롤 (cholesterol),
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC),
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 및
1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 5] 제4항에 있어서
상기 DPPC : DPPG의 몰비율은 1 내지 10 : 1인 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 6] 제4항에 있어서
상기 DPPC : DPPG : DSPE-PEG2000-maleimide의 몰비율은 100 내지 1000 : 10 내지 500 : 1인 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 수지상세포 또는 대식세포에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편인 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 CD80, CD86, CD123, CD303, CD304, CD68, CD11b, CD11c, BDCA-1, DC-SIGN, MHCII, F4/80,

CD206, 및 CSF1-R로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질에 결합하는 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 IgG, Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv, 재조합 IgG (rIgG), 단일쇄 Fv (scFv), 및 디아바디 (diabody)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 자가항원은 개체에서 자가면역질환을 유도할 수 있는 단백질, 이의 단편, 또는 이의 변이체인, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 자가항원은 콜라겐, 인슐린, 인슐린 B 사슬, 프로인슐린, 미엘린 단백질, 미엘린 염기성 단백질 (myelin basic protein), 미엘린 프로테오리피드 단백질 (myelin proteolipid protein), 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질 (myelin oligodendrocyte glycoprotein), Hsp60, 및 Hsp65로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로부터 유래된 단백질, 이의 단편, 또는 이의 변이체인 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 자가항원; 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 티올기를 갖는 것이거나, 티올기를 갖도록 변형된 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 지질막은 말레이미드기를 갖는 지질을 포함하고, 상기 자가항원; 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편은 티올기 및 말레이미드기의 결합을 통해 지질막에 결합되는 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 14] 제1항에 있어서,
상기 나노입자는 면역억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 면역억제제는 상기 지질막에 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 면역억제제는 부신피질호르몬 (Glucocorticoids), 칼시뉴린 (Calcineurine) 억제제, 항대사제, mTOR 억제제, 및 비타민 D3로 이루어진

군에서 선택된 하나 이상인, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 나노입자는 직경이 50 내지 200 nm인, 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자.

[청구항 18] 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자는 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족하는 것인, 약학적 조성물:
(a) 항원제시세포 및 T 세포의 상호작용을 억제함;
(b) 면역세포의 조직 침습을 억제함;
(c) 보조 T 세포, 세포독성 T 세포, 수지상세포, 및 대식세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수준 또는 활성을 감소시킴;
(d) 조절 T 세포의 수준 또는 활성을 증가시킴;
(e) 염증성 사이토카인의 수준 또는 활성을 억제함; 및
(f) 자가항체의 생성을 억제함.

[청구항 20] 제18항에 있어서,
상기 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자는 림프절 또는 비장을 표적화 (targeting)하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 21] 제18항에 있어서,
상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 전신성 경피증, 성인 스틸씨병, 전신 홍반성 루푸스, 아토피 피부염, 베체트병 (Behcet's disease), 다발성 경화증, 전신성 경화증, 쇼그렌 증후군, 원발성 담즙성 경변증, 셀리악병, 염증성 장질환, 제1형 당뇨병, 자가면역성 용혈성 빈혈증, 굿파스쳐 증후군, 그레이브스 병, 하시모토 갑상선염, 감상선 항진증, 중증근무력증, 천포창, 혈관염, 뇌척수염, 뇌하수체염, 백반증, 천식, 원발성 담즙성 간경변, 시신경 척수염, 심상성 천포창 (pemphigus vulgaris), 과민성 장질환, 크론병, 대장염, 궤양성 대장염, 건선, 심근병증, 중증 근무력증 (myasthenia gravis), 결절성 다발동맥염, 길랑바레 증후군, 및 강직성 척추염 (ankylosing spondylitis)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 22] 제18항의 약학적 조성물을 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 키트.

[청구항 23] 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 항체 및 자가항원이 표면에 결합된

지질-항산화 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 24] (S1) 염기성 환경에서 생체고분자의 자가조립을 유도하여 항산화 나노입자를 제조하는 단계;
(S2) 상기 항산화 나노입자의 현탁액으로 지질막을 수화시켜 지질막으로 표면이 코팅된 항산화 나노입자를 제조하는 단계; 및
(S3) 상기 지질막으로 표면이 코팅된 항산화 나노입자를 자가항원, 및 항원제시세포 특이적 항체 또는 이의 단편과 반응시키는 단계를 포함하는, 제1항의 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자의 제조방법.

[청구항 25] 제24항에 있어서,
상기 생체고분자는 폴리도파민, 탄닌, 및 세륨 산화물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 제조방법.

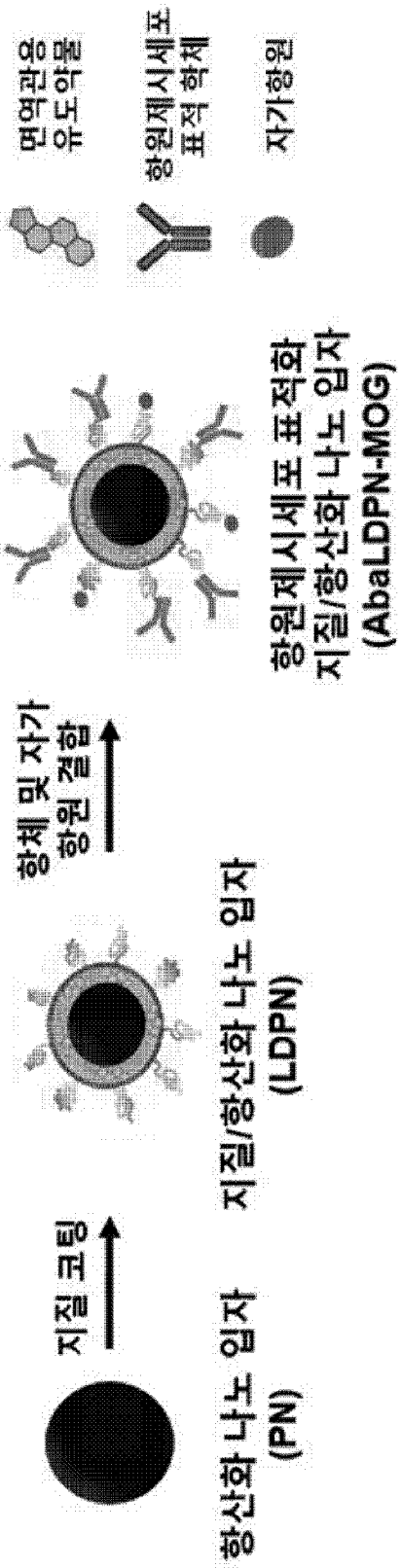
[청구항 26] 제24항에 있어서,
상기 지질막은 면역억제제가 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

[청구항 27] 제1항의 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료방법.

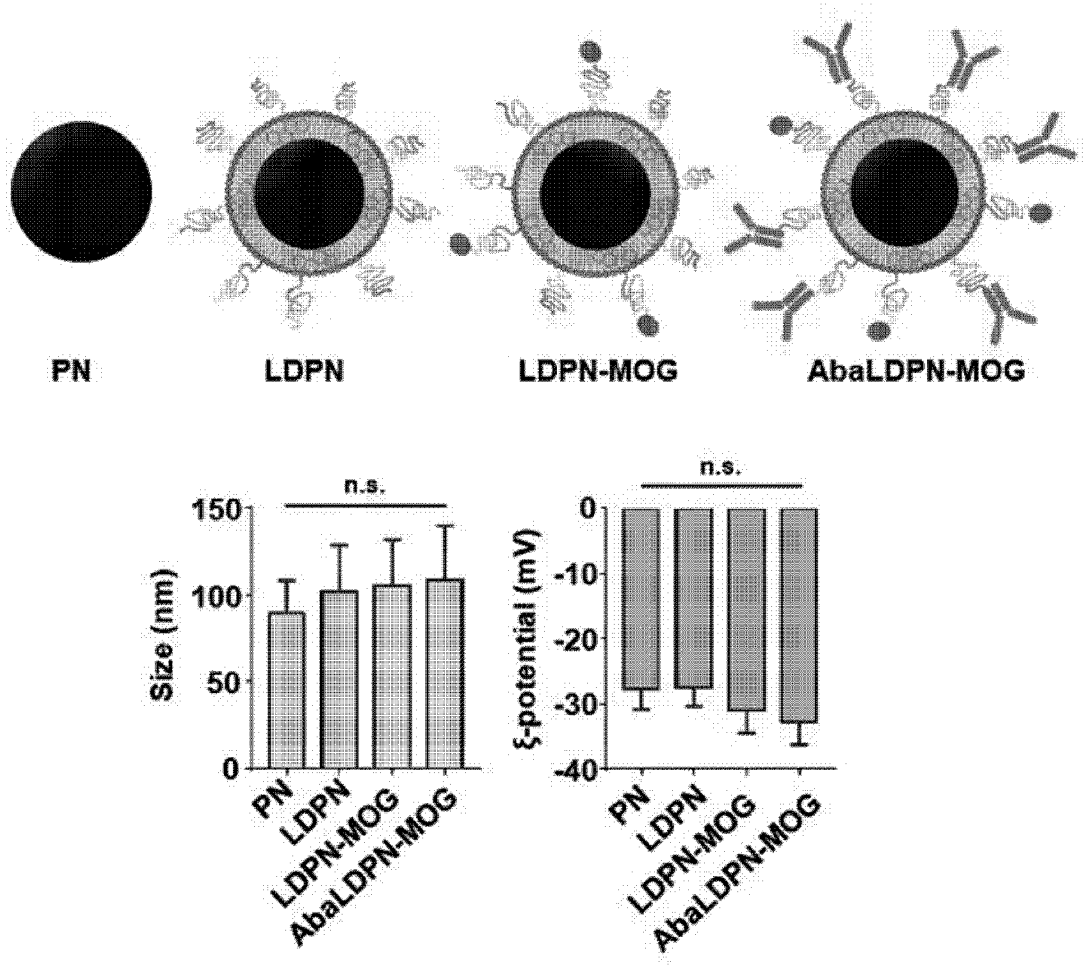
[청구항 28] 자가면역질환의 치료용 약제의 제조를 위한 제1항의 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자의 용도.

[청구항 29] 제1항의 항체 및 자가항원이 표면에 결합된 지질-항산화 나노입자의 자가면역질환의 예방 또는 치료 용도.

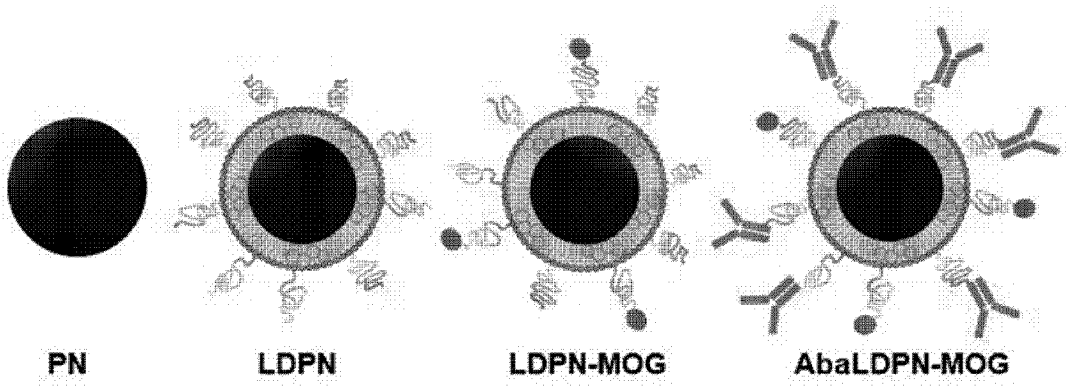
[도1]

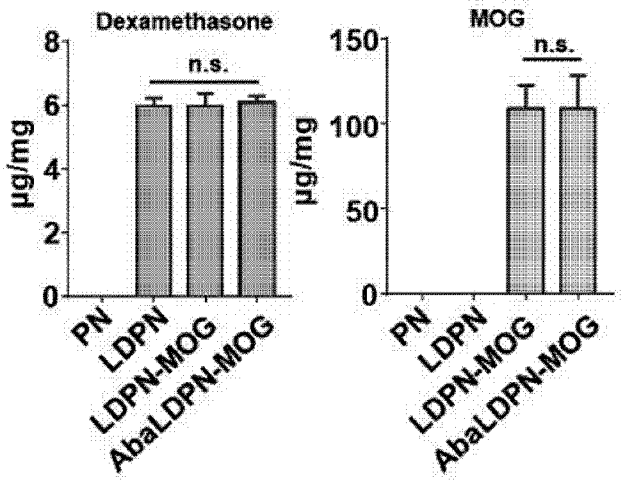

면역관용 유도약물
항원제시세포 표적 항체
자가항원
항원제시세포 표적화 지질/항산화 나노 입자 (AbaLDPN-MOG)
항체 및 자가 항원 결합
지질/항산화 나노 입자 (LDPN)
지질 코팅
항산화 나노 입자 (PN)

[도2]

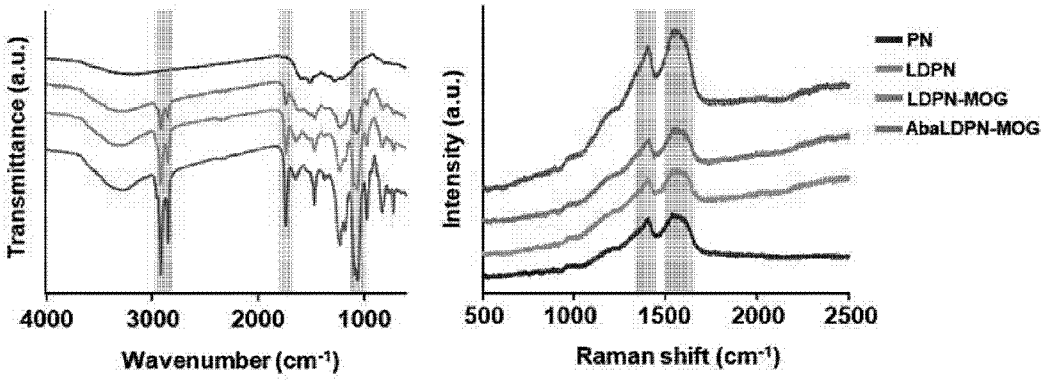

PN
LDPN
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
n.s.
Size (nm)
150
100
50
0
PN
LDPN
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
n.s.
ξ-potential (mV)
0
-10
-20
-30
-40
PN
LDPN
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

[도3]

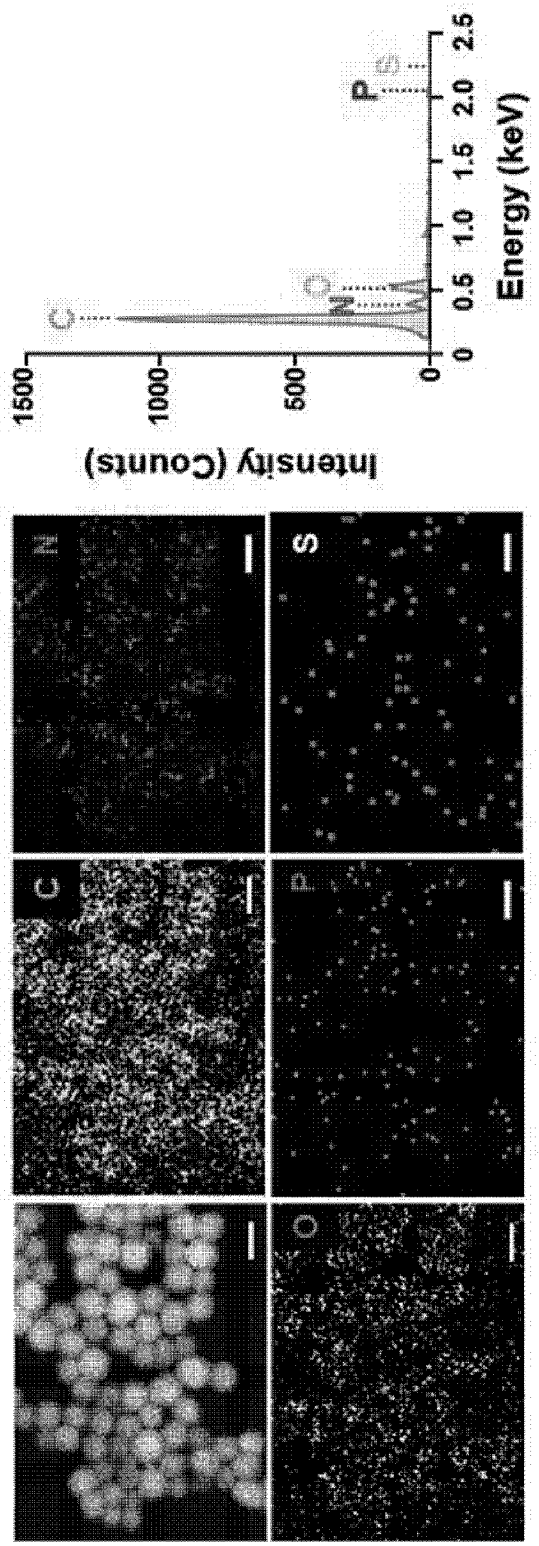

PN
LDPN
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG


Dexamethasone
n.s.
μg/mg
8
6
4
2
0
PN
LDPN
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
MOG
n.s.
μg/mg
150
100
50
0
PN
LDPN
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

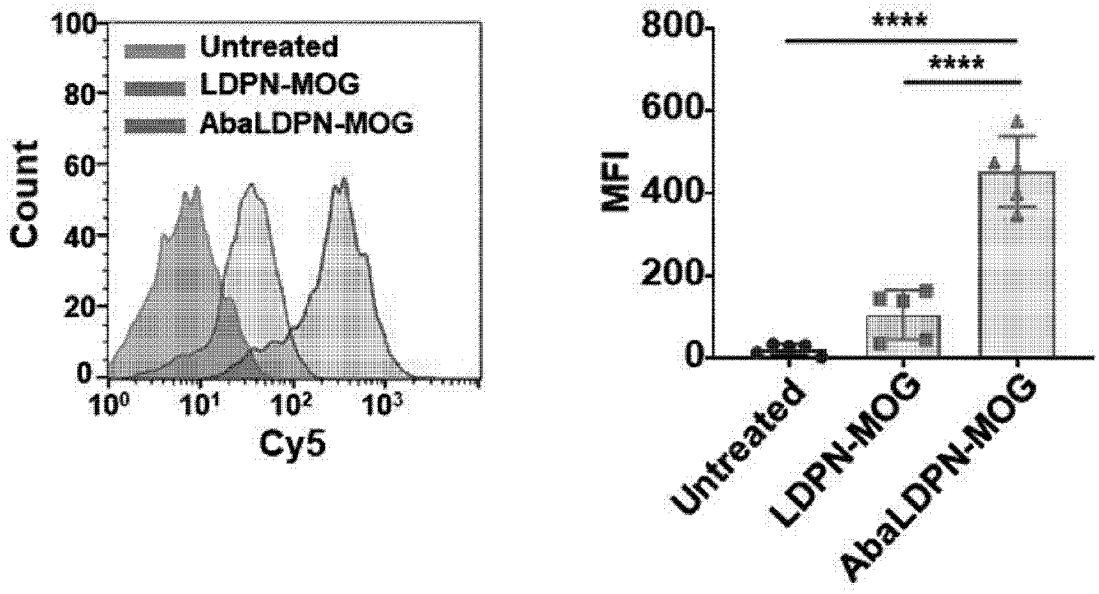
[도4]


Transmittance (a.u.)
4000
3000
2000
1000
Wavenumber (cm-1)
Intensity (a.u.)
500
1000
1500
2000
2500
Raman shift (cm-1)
PN
LDPN
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

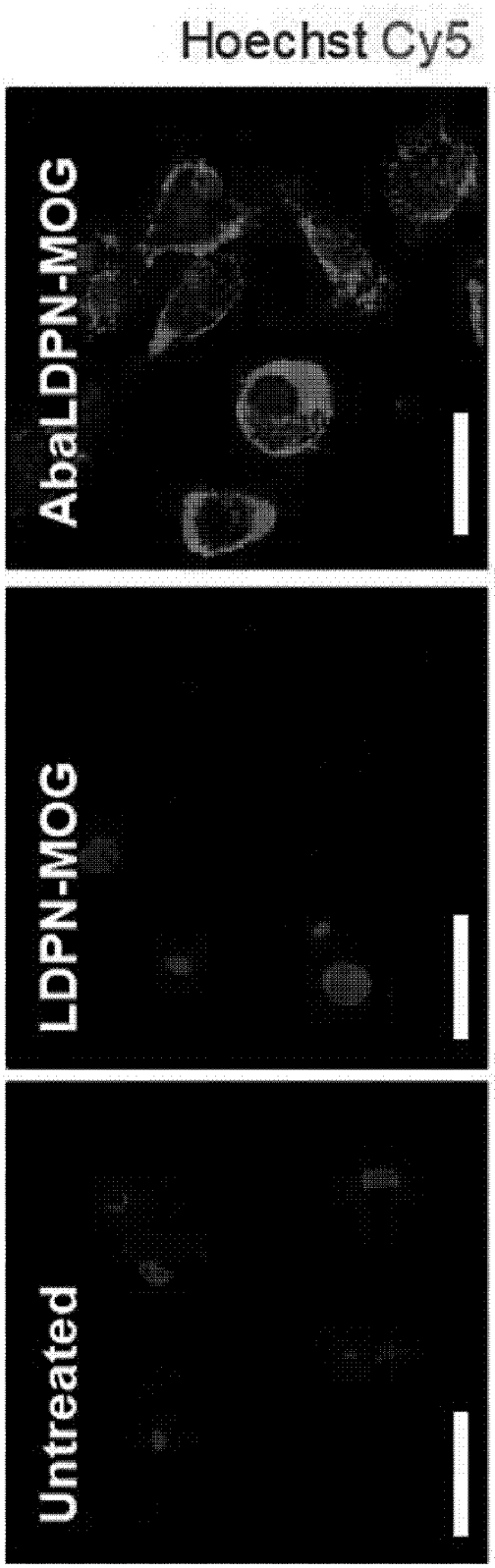
[도5]


Intensity (Counts)
1500
1000
500
0
C
N
O
P
Si
0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Energy (keV)
N
S
C
P
O

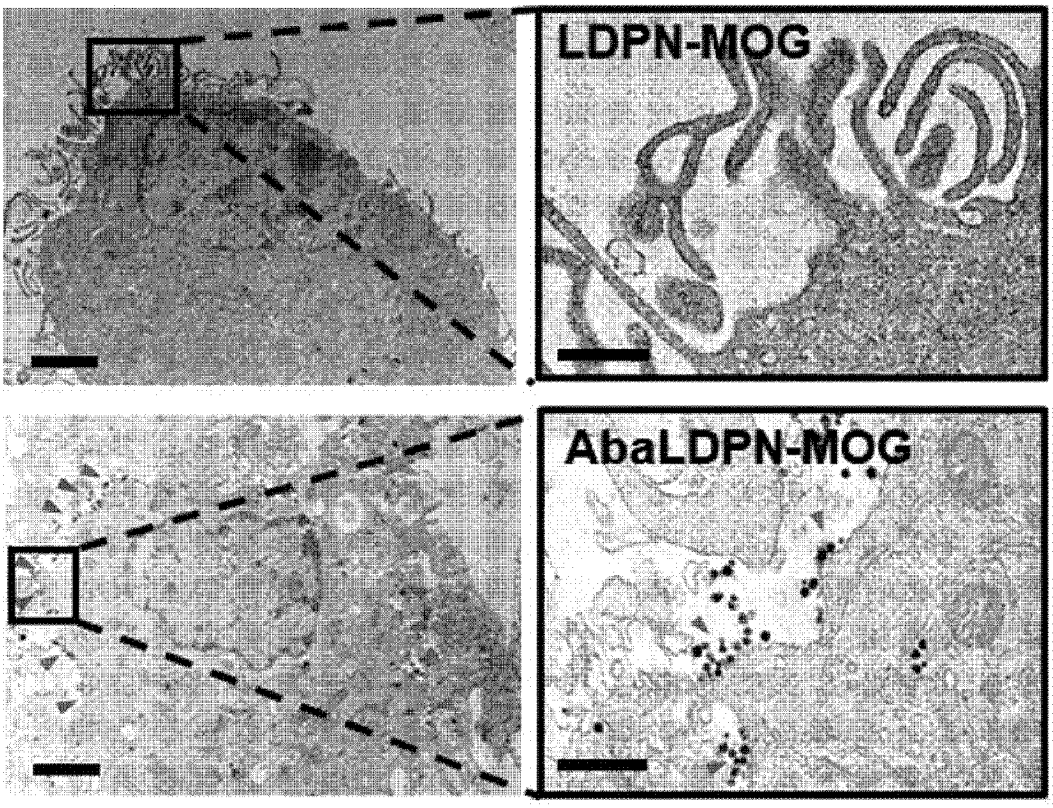
[도6]


Untreated
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
Count
Cy5
MFI
****
****
Untreated
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

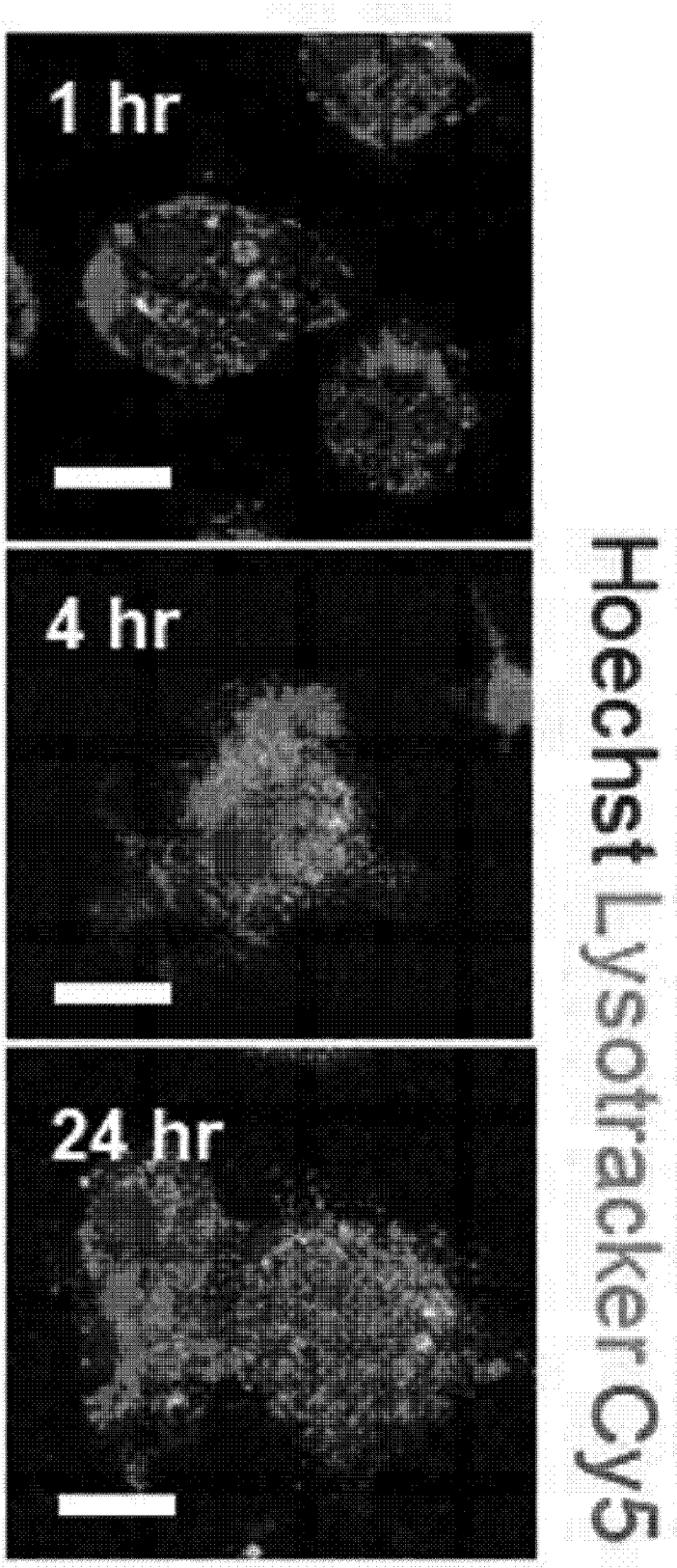
[도7]



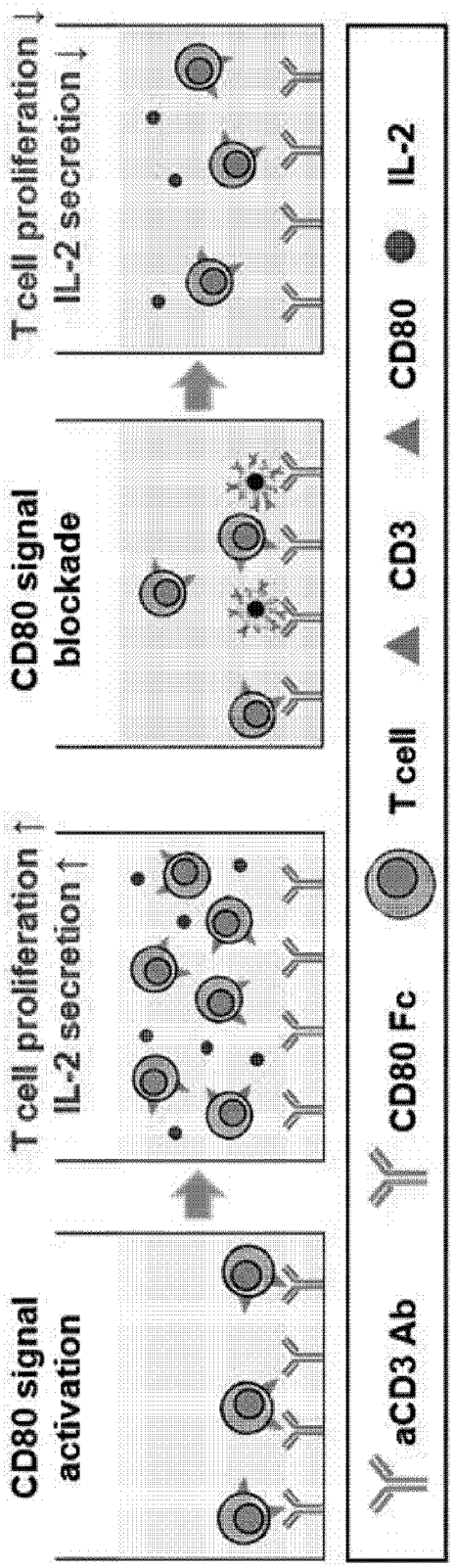
[도8]



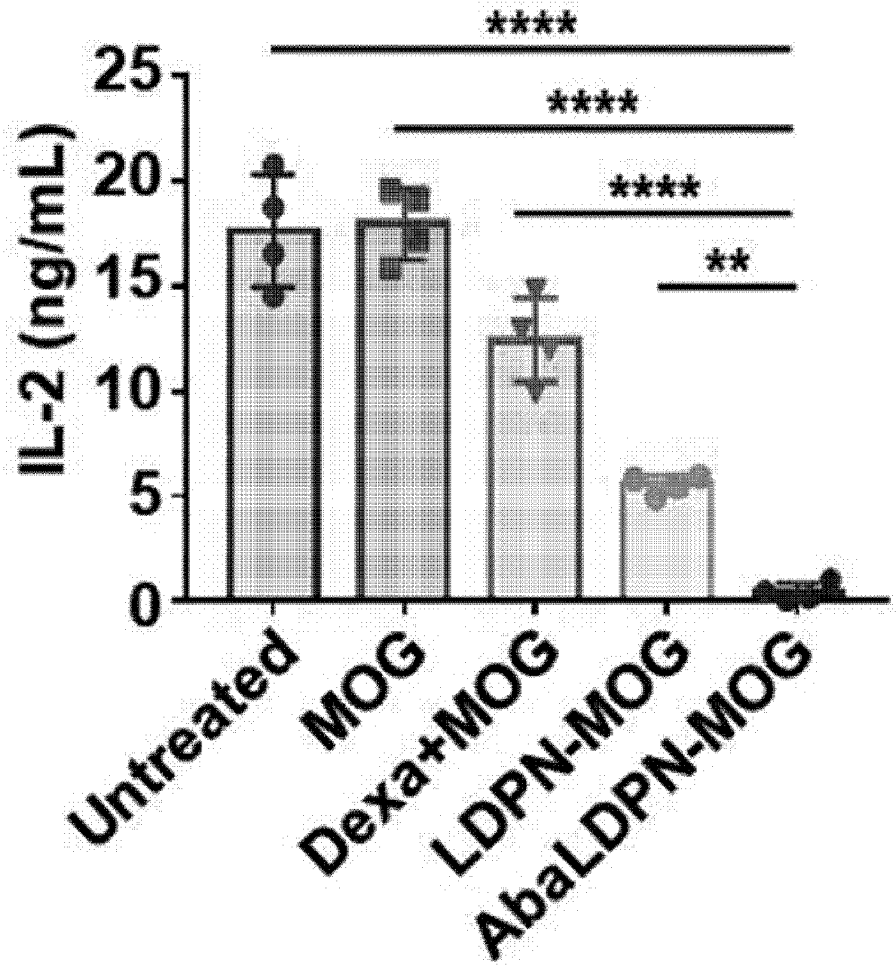
[도9]



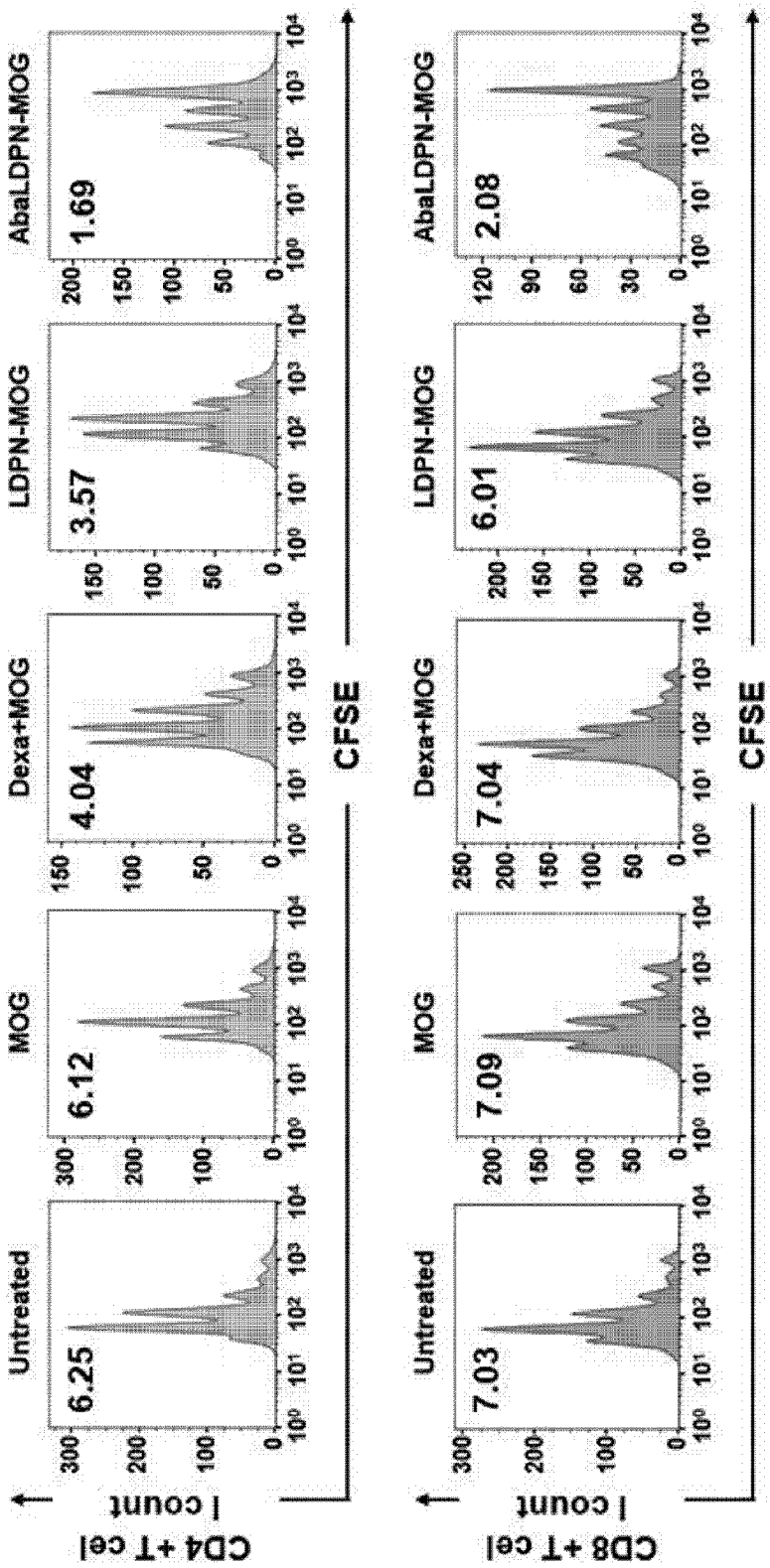
[도10]


CD80 signal activation
T cell proliferation ↑
IL-2 secretion ↑
CD80 signal blockade
T cell proliferation ↓
IL-2 secretion ↓
aCD3 Ab
CD80 Fc
T cell
CD3
CD80
IL-2

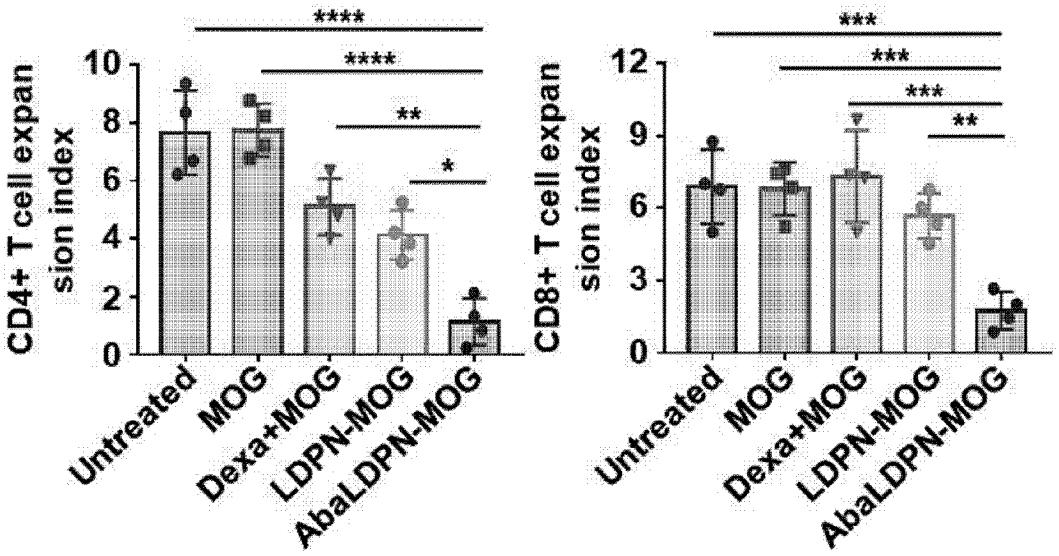
[도11]


****
****
****
**
IL-2 (ng/mL)
25
20
15
10
5
0
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

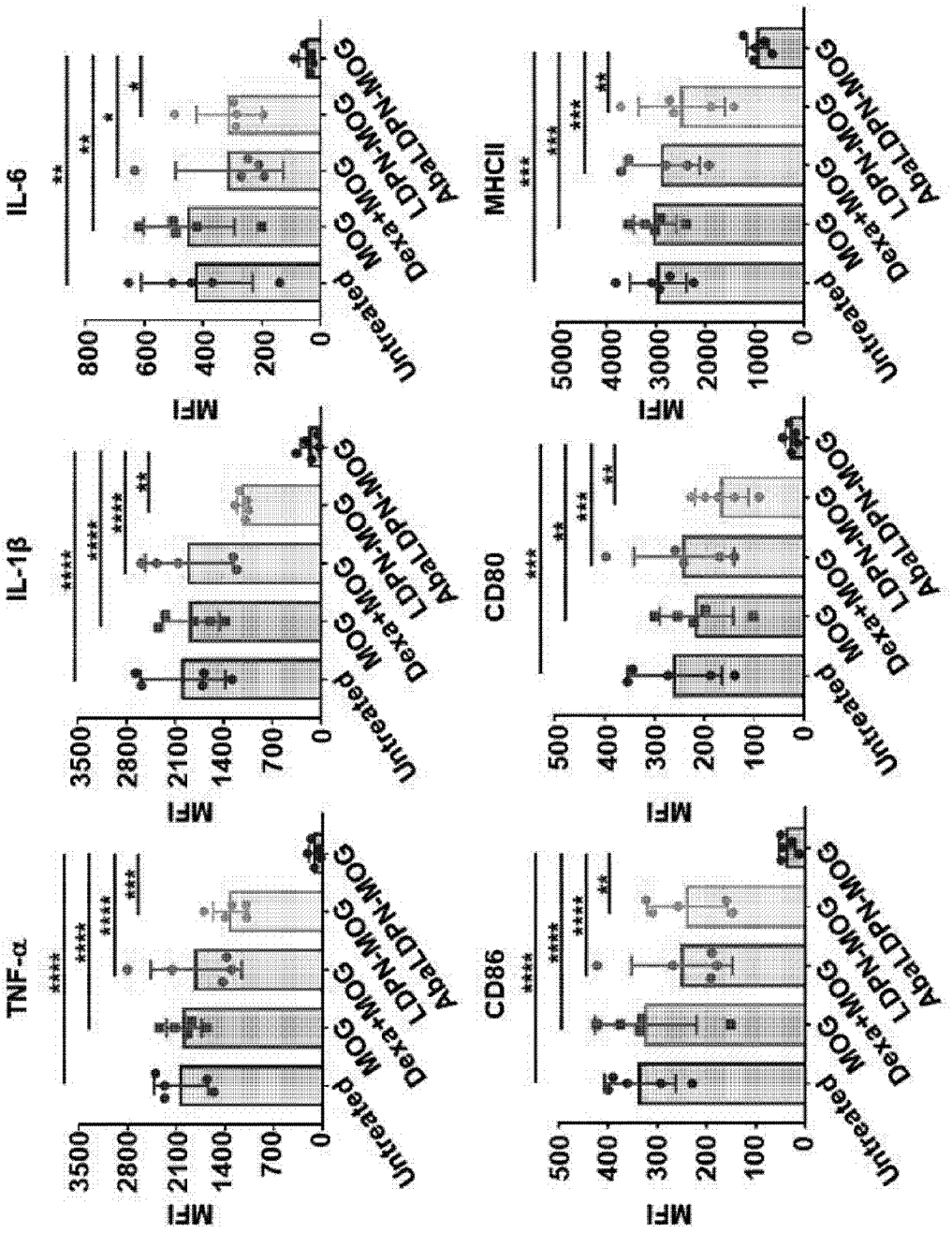
[도12]


Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
6.25
6.12
4.04
3.57
1.69
7.03
7.09
7.04
6.01
2.08
CD4 +T cell
CD8 +T cell
count
CFSE

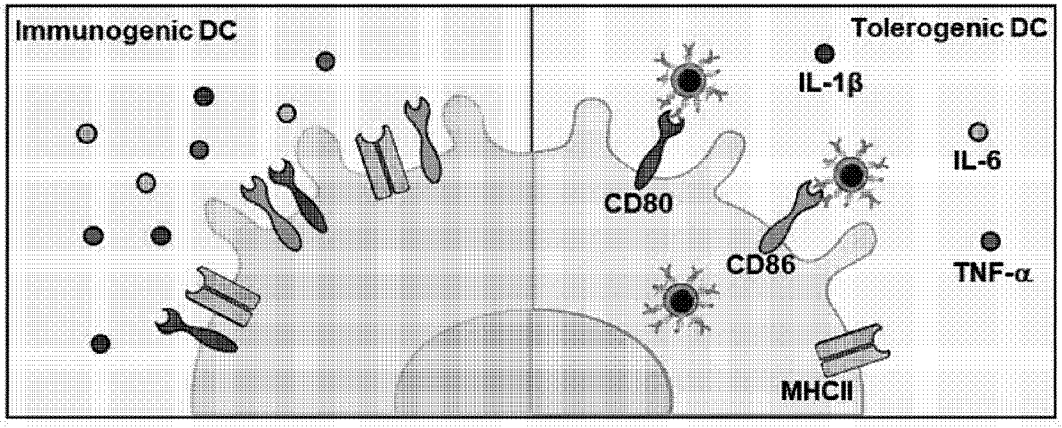
[도13]


CD4+ T cell expansion index
10
8
6
4
2
0
****
****
**
*
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
CD8+ T cell expansion index
12
9
6
3
0
***
***
***
**
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

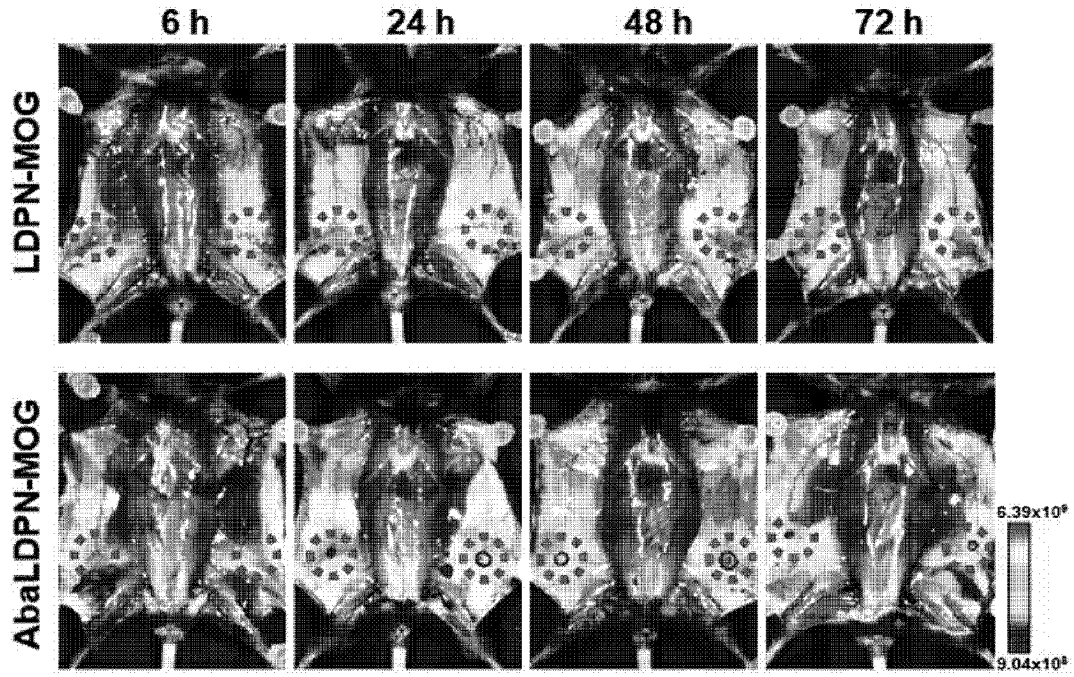
[도14]


IL-6
IL-1β
TNF-α
MHCII
CD80
CD86
MFI
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

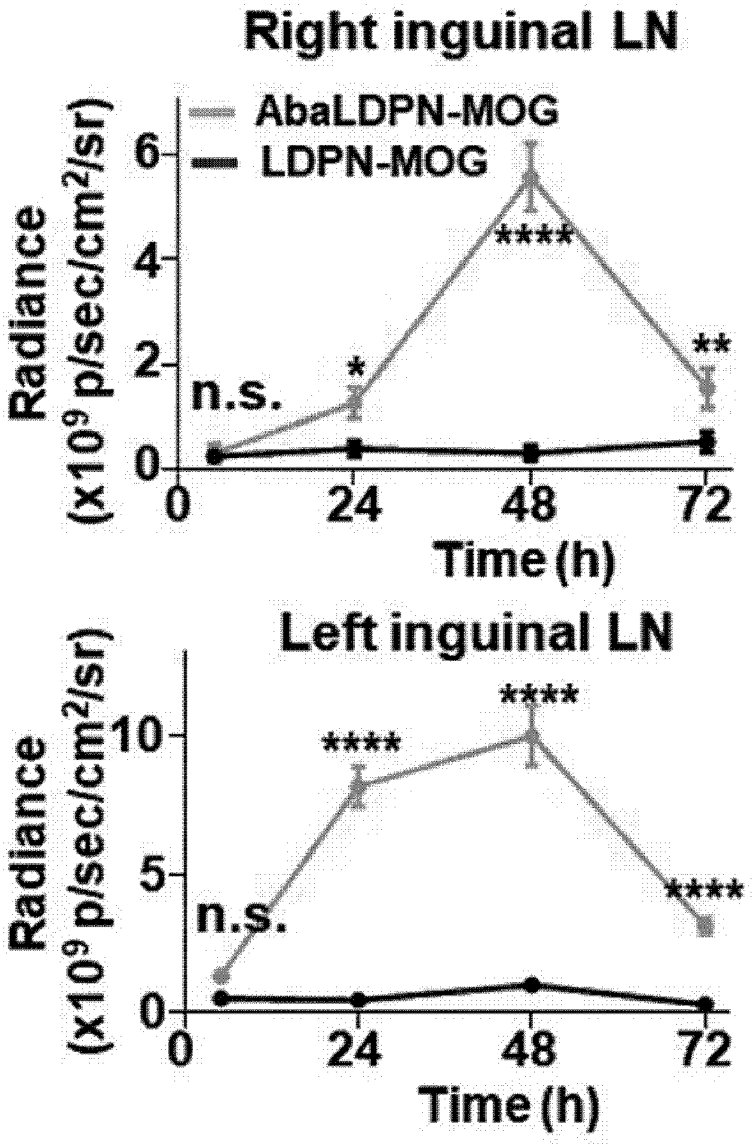
[도15]


Immunogenic DC
Tolerogenic DC
IL-1β
IL-6
CD80
CD86
TNF-α
MHCII

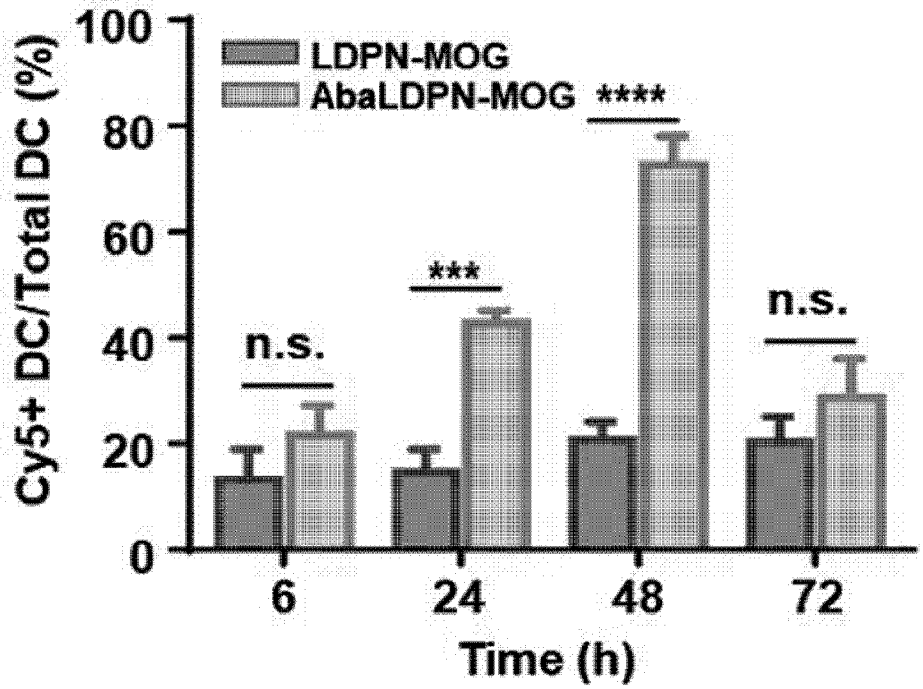
[도16]



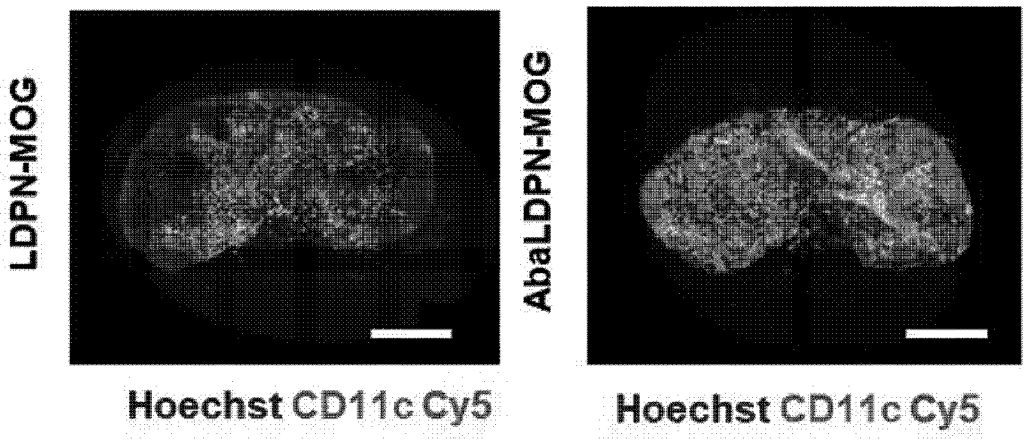
[도17]


Right inguinal LN
AbaLDPN-MOG
LDPN-MOG
Radiance
(x10⁹ p/sec/cm²/sr)
6
4
2
0
n.s.
*
****
**
0
24
48
72
Time (h)
Left inguinal LN
Radiance
(x10⁹ p/sec/cm²/sr)
10
5
0
n.s.
****
****
****
0
24
48
72
Time (h)

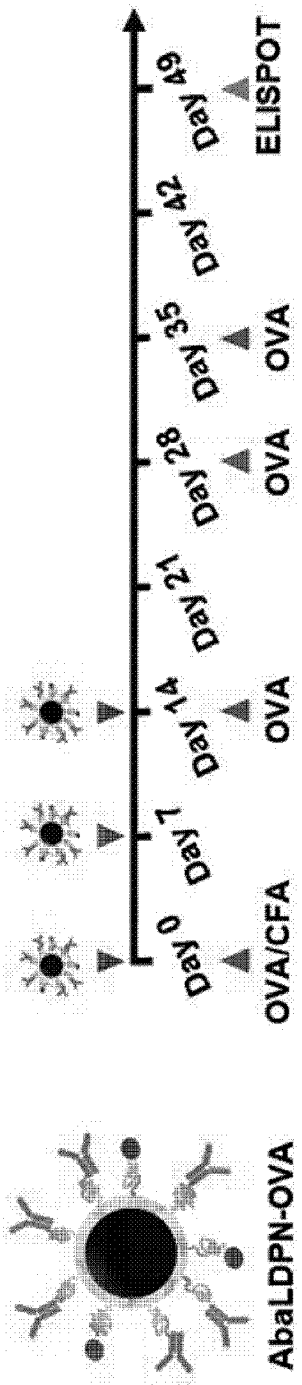
[도18]


Cy5+ DC/Total DC (%)
100
80
60
40
20
0
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
n.s.
***
****
n.s.
6
24
48
72
Time (h)

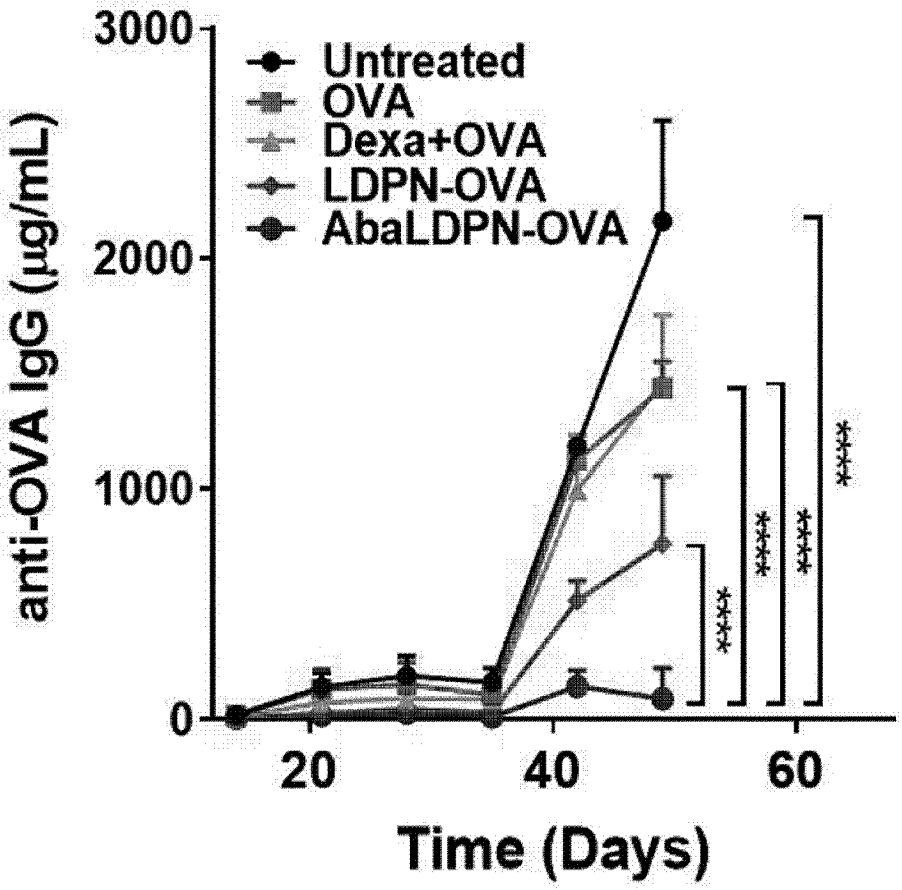
[도19]



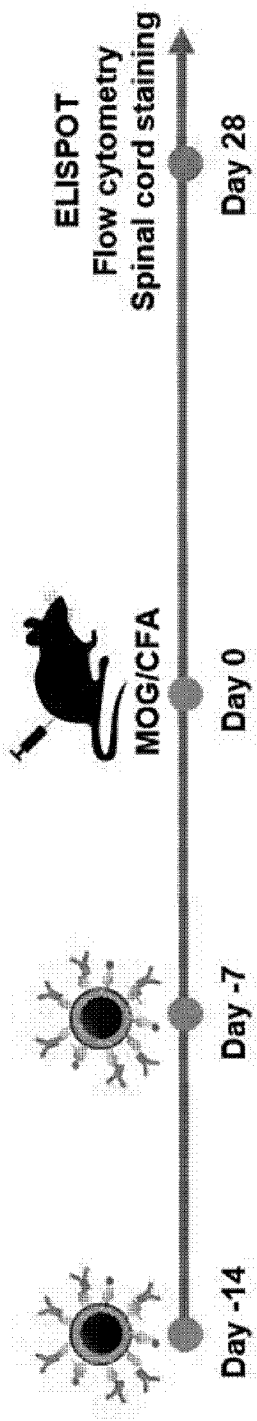
[도20a]


Day 0
Day 7
Day 14
Day 21
Day 28
Day 35
Day 42
Day 49
OVA/CFA
OVA
OVA
OVA
ELISPOT
AbaLDPN-OVA

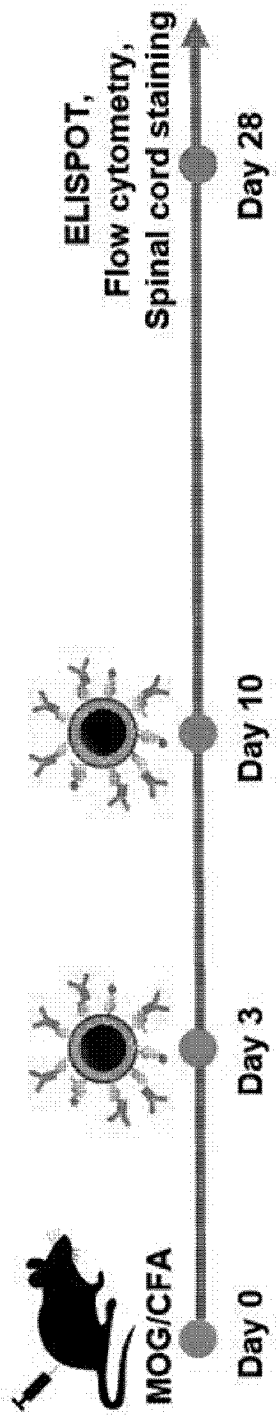
[도20b]


3000
2000
1000
0
anti-OVA IgG (μg/mL)
Untreated
OVA
Dexa+OVA
LDPN-OVA
AbaLDPN-OVA
****
****
****
****
20
40
60
Time (Days)

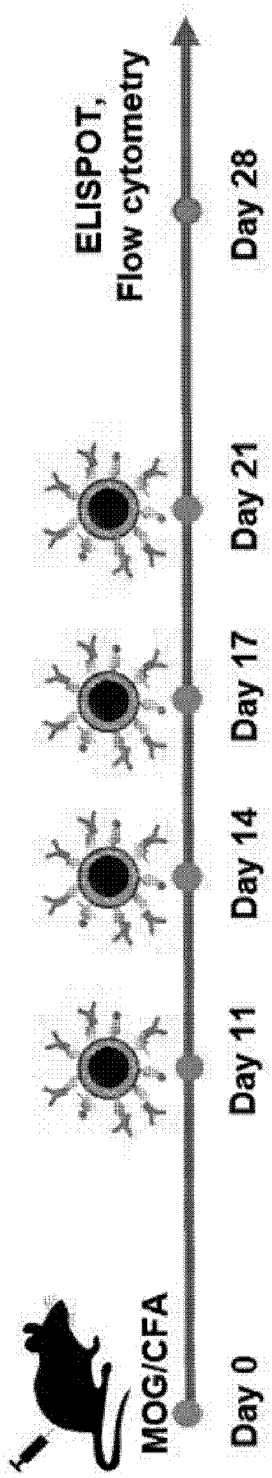
[도21a]


ELISPOT
Flow cytometry
Spinal cord staining
Day 28
MOG/CFA
Day 0
Day -7
Day -14

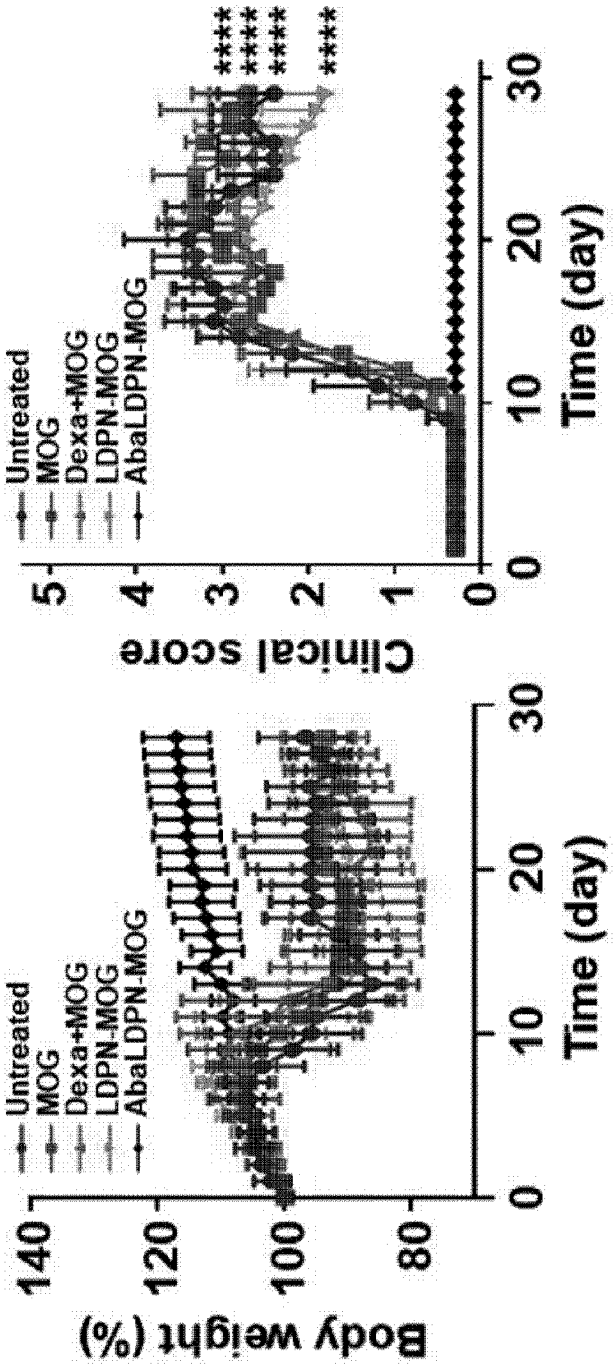
[도21b]


MOG/CFA
Day 0
Day 3
Day 10
Day 28
ELISPOT,
Flow cytometry,
Spinal cord staining

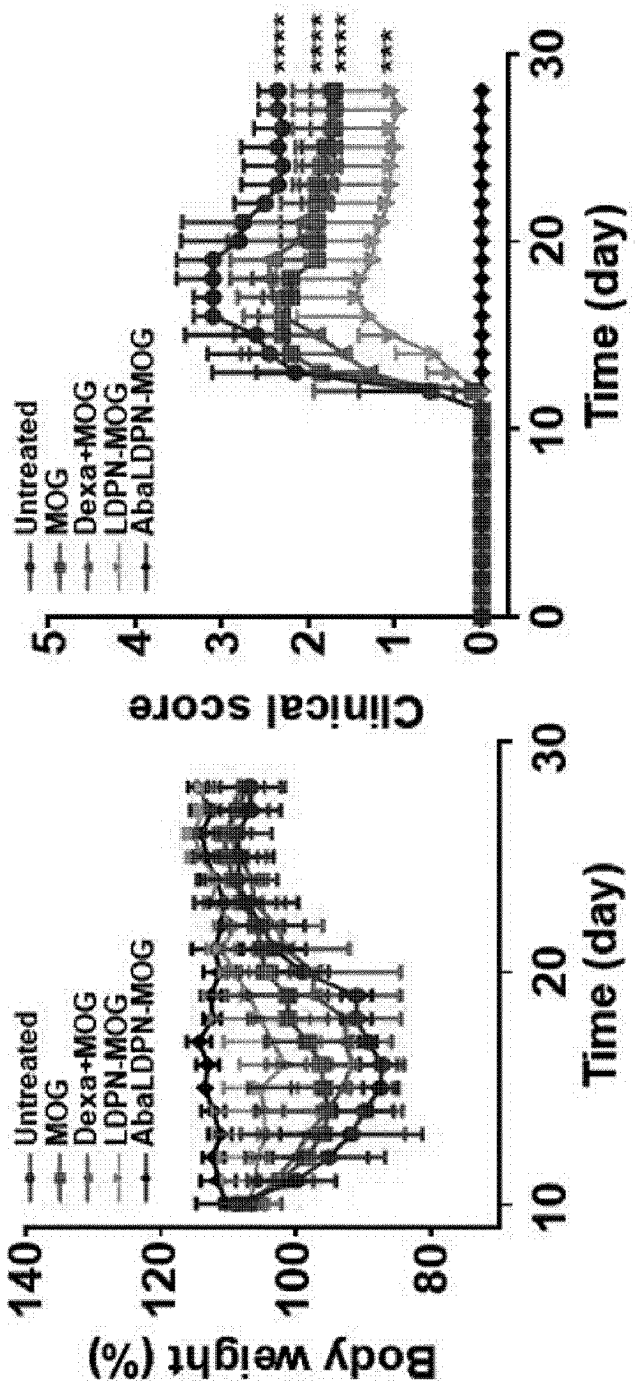
[도21c]


ELISPOT,
Flow cytometry
Day 28
Day 21
Day 17
Day 14
Day 11
Day 0
MOG/CFA

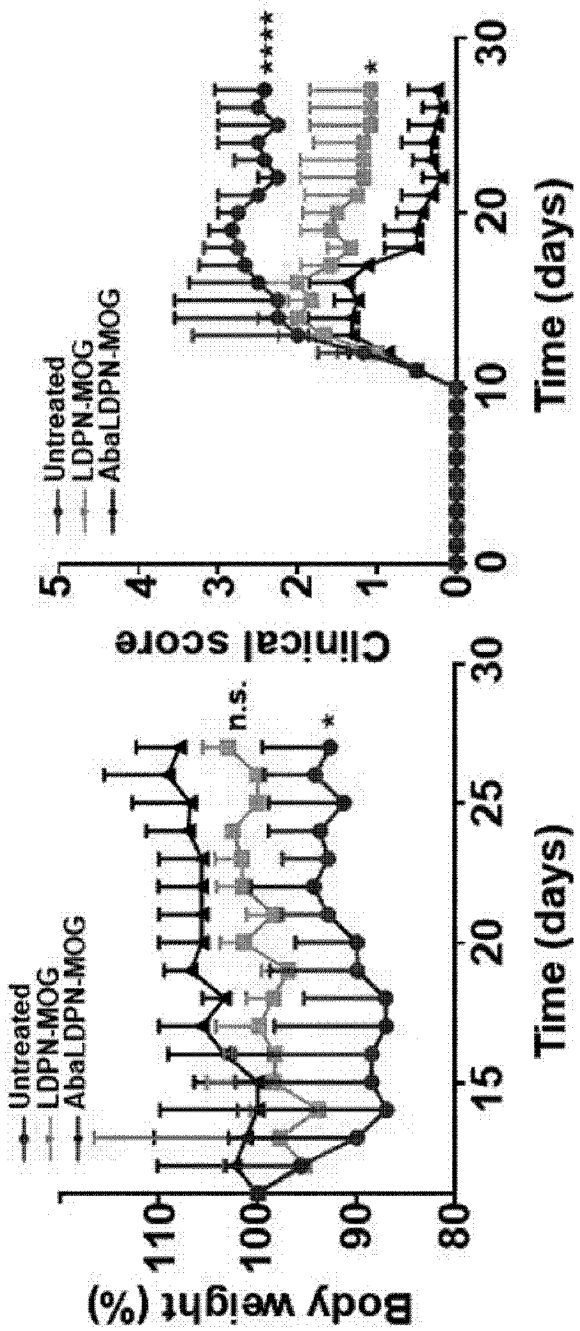
[도22a]


Clinical score
Time (day)
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
****
Body weight (%)
Time (day)
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

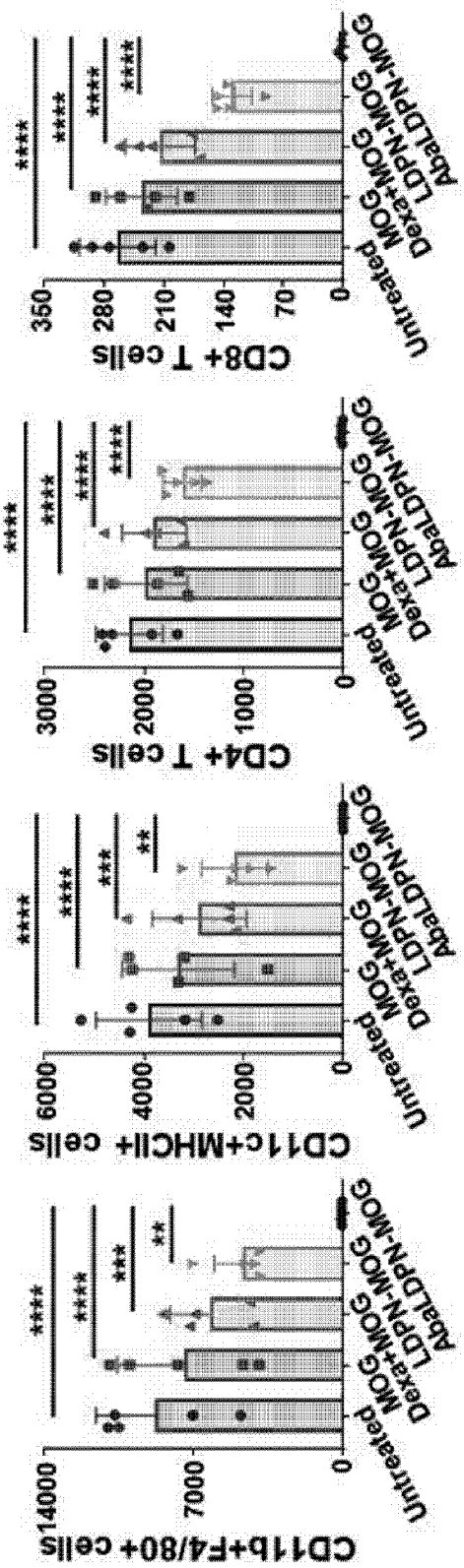
[도22b]


Clinical score
Time (day)
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
****
****
***
Body weight (%)
Time (day)
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

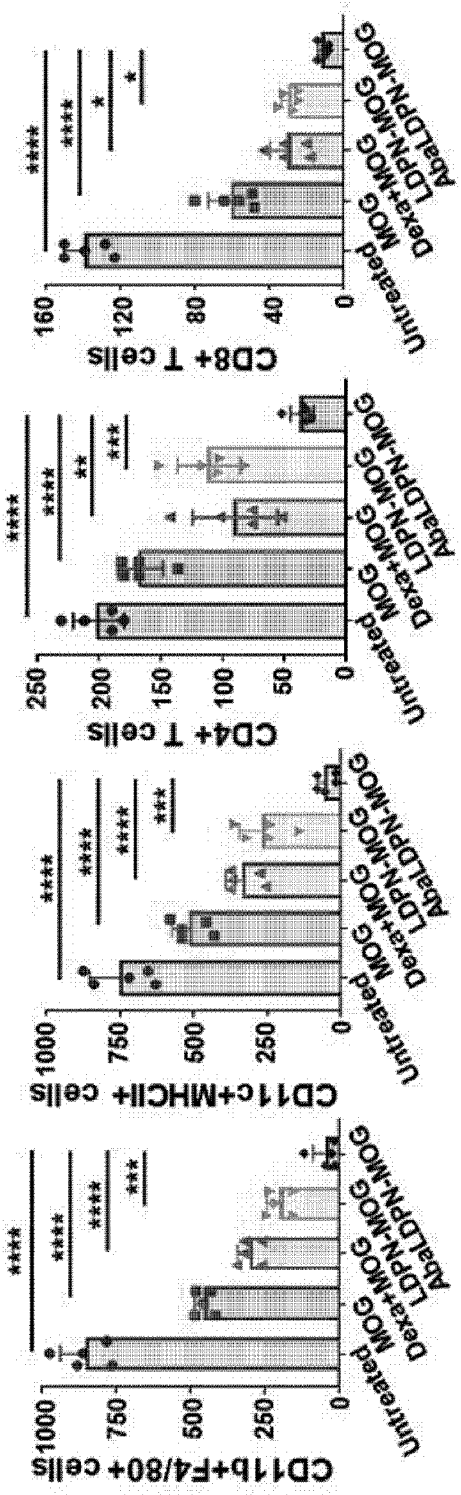
[도22c]


Clinical score
Untreated
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
****
*
Time (days)
Body weight (%)
n.s.
*
Time (days)

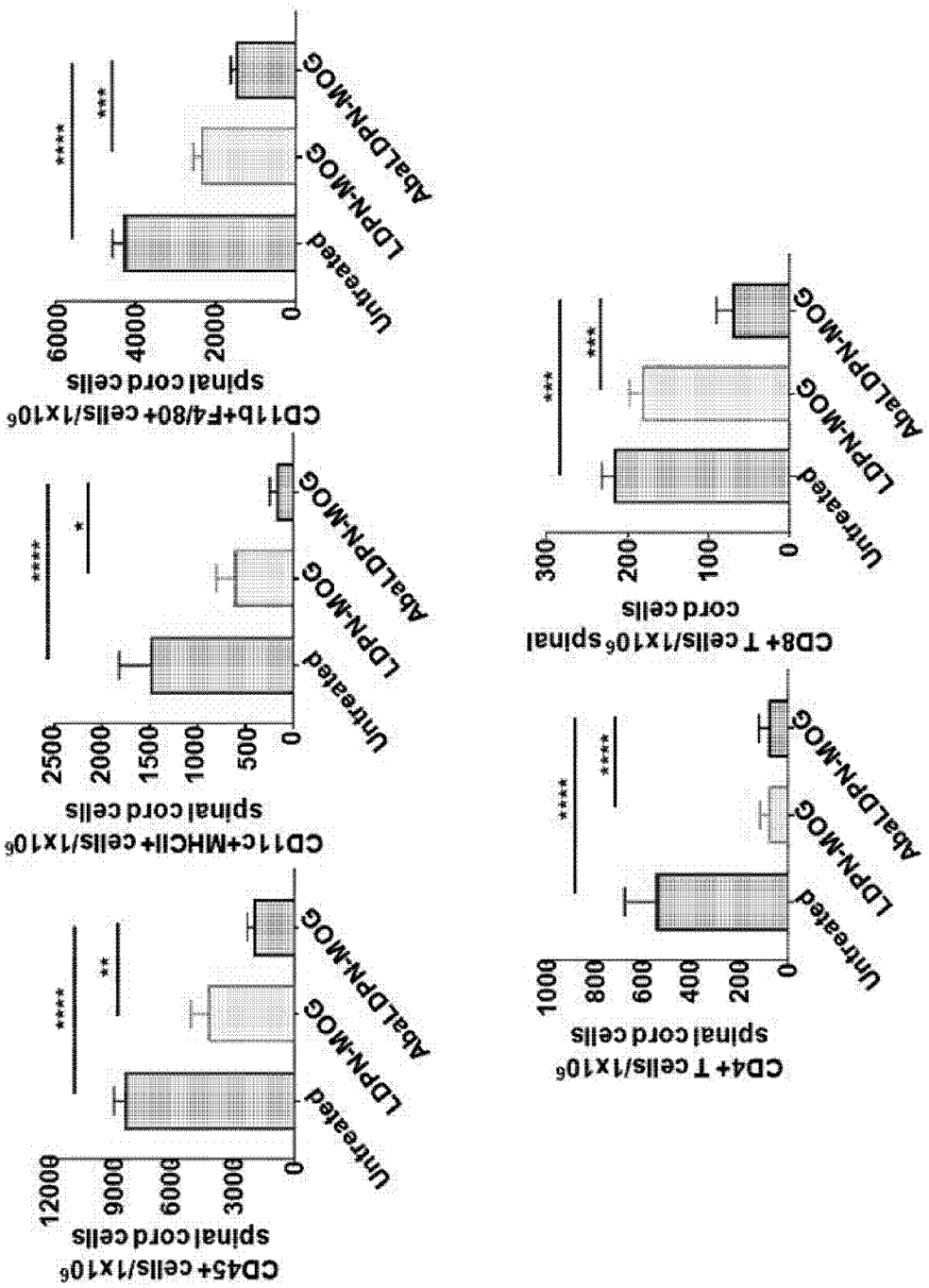
[도23a]


CD11b+F4/80+ cells
CD11c+MHCII+ cells
CD4+ T cells
CD8+ T cells
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
****
***
**

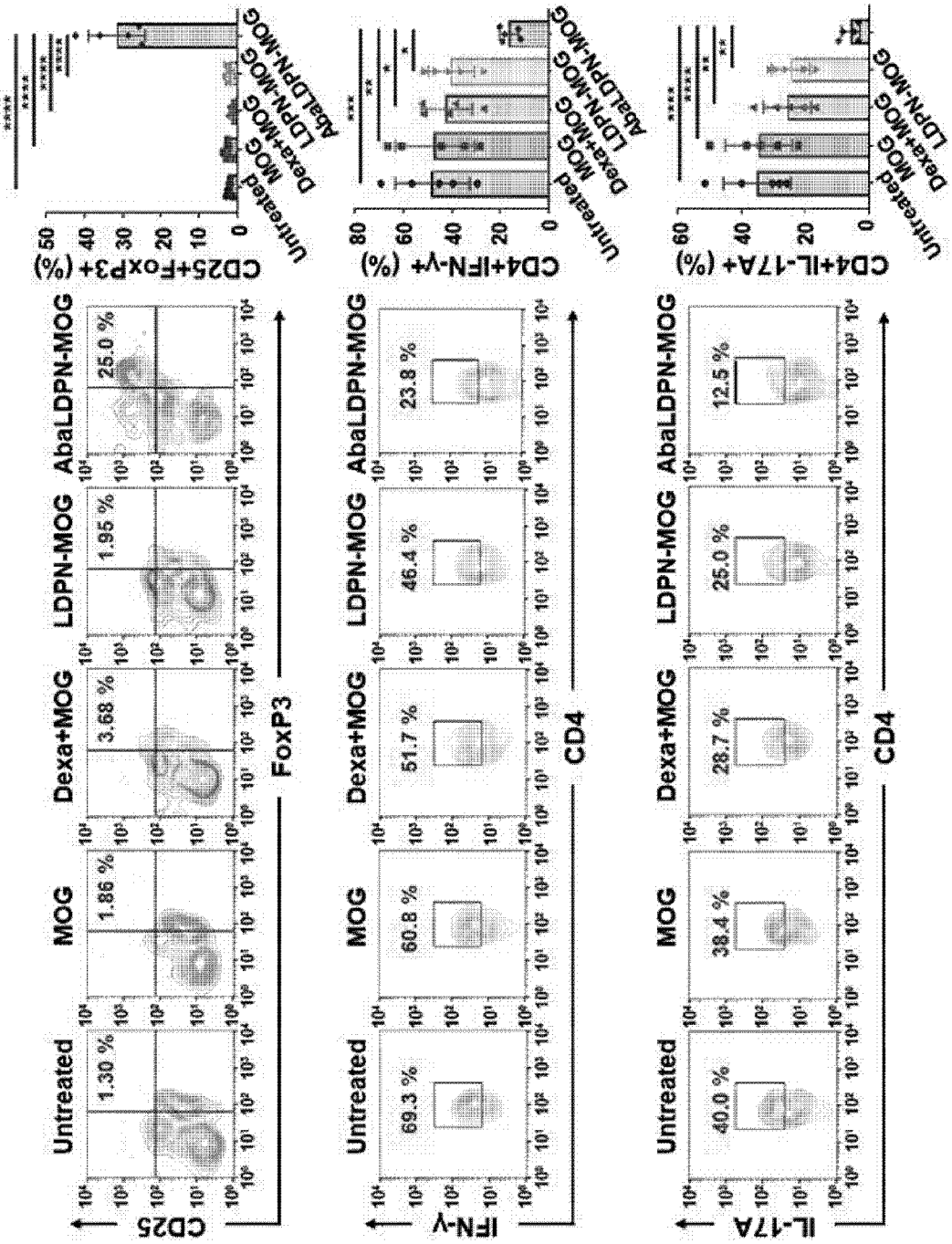
[도23b]


CD11b+F4/80+ cells
CD11c+MHCII+ cells
CD4+ T cells
CD8+ T cells
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
0
250
500
750
1000
50
100
150
200
120
160
40
80
****
***
**
*

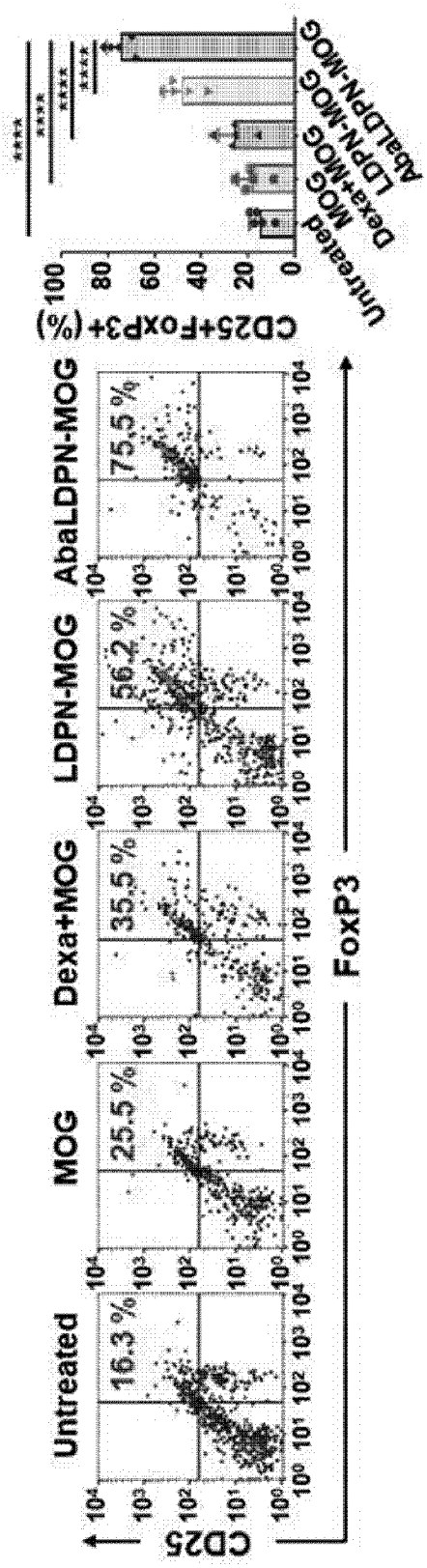
[도23c]


CD45+ cells/1x10^6 spinal cord cells
12000
9000
6000
3000
0
**
****
Untreated
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
CD11c+MHCII+ cells/1x10^6 spinal cord cells
2500
2000
1500
1000
500
0
*
****
CD11b+F4/80+ cells/1x10^6 spinal cord cells
6000
4000
2000
0
***
****
CD4+ T cells/1x10^6 spinal cord cells
1000
800
600
400
200
0
****
****
CD8+ T cells/1x10^6 spinal cord cells
300
200
100
0
***
***

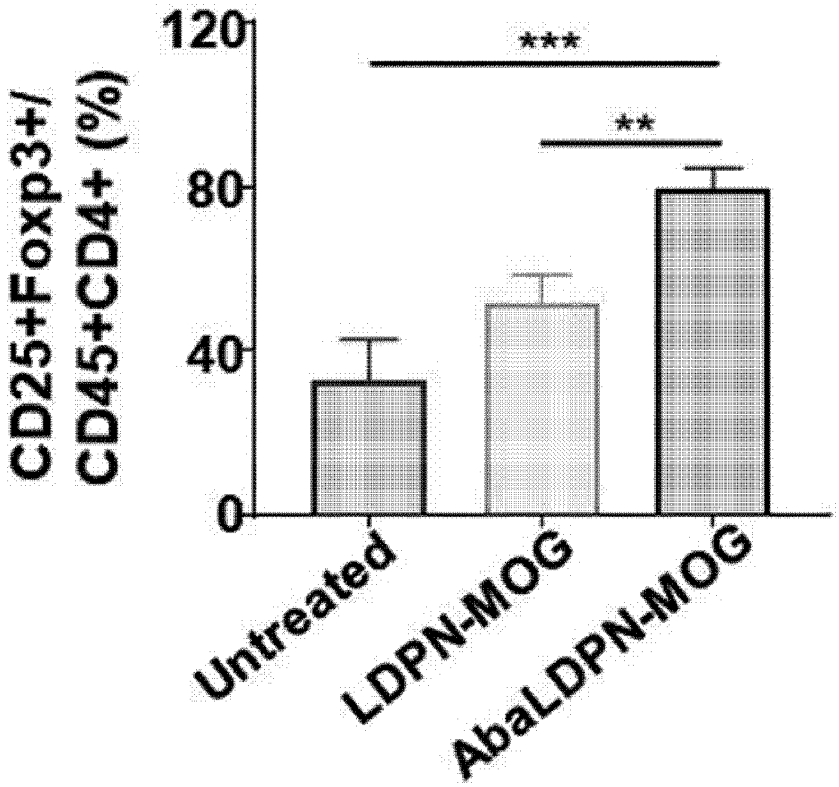
[도24a]


Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
CD25
FoxP3
1.30 %
1.86 %
3.68 %
1.95 %
25.0 %
IFN-γ
CD4
69.3 %
60.8 %
51.7 %
46.4 %
23.8 %
IL-17A
40.0 %
38.4 %
28.7 %
25.0 %
12.5 %
CD25+FoxP3+ (%)
CD4+IFN-γ+ (%)
CD4+IL-17A+ (%)

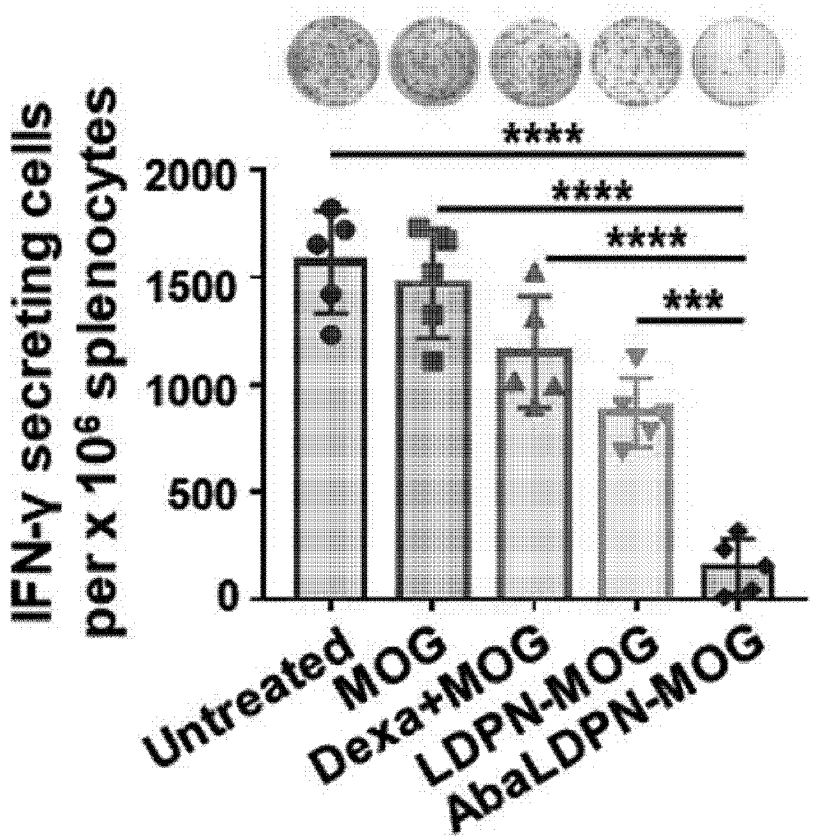
[도24b]


CD25+FoxP3+(%)
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG
****
CD25
FoxP3
16.3 %
25.5 %
35.5 %
56.2 %
75.5 %

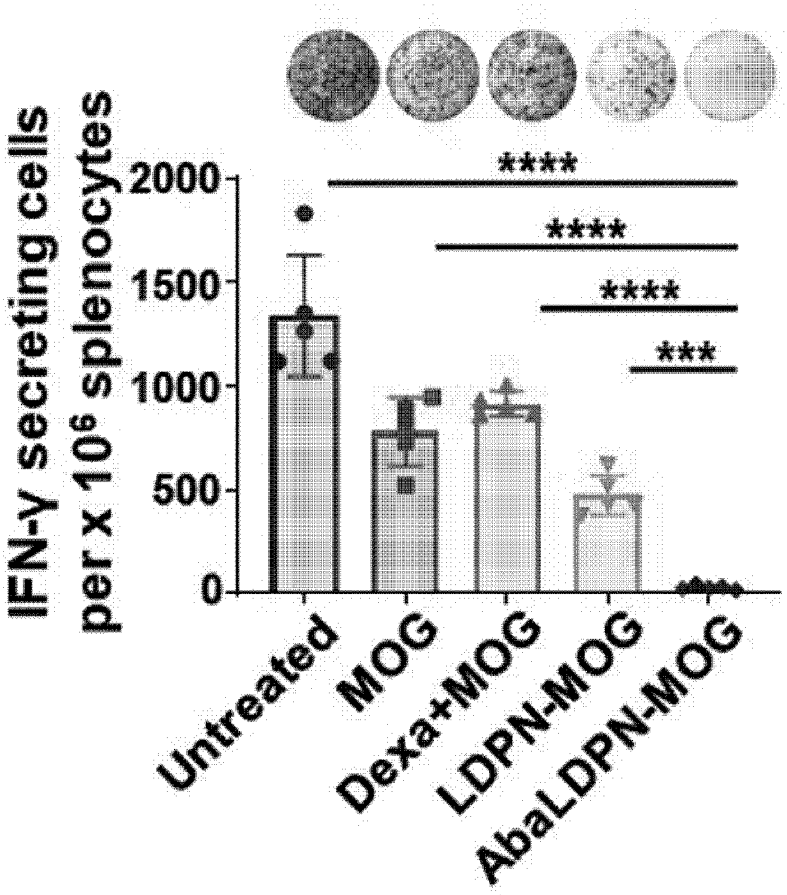
[도24c]


CD25+Foxp3+/
CD45+CD4+ (%)
120
80
40
0
***
**
Untreated
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

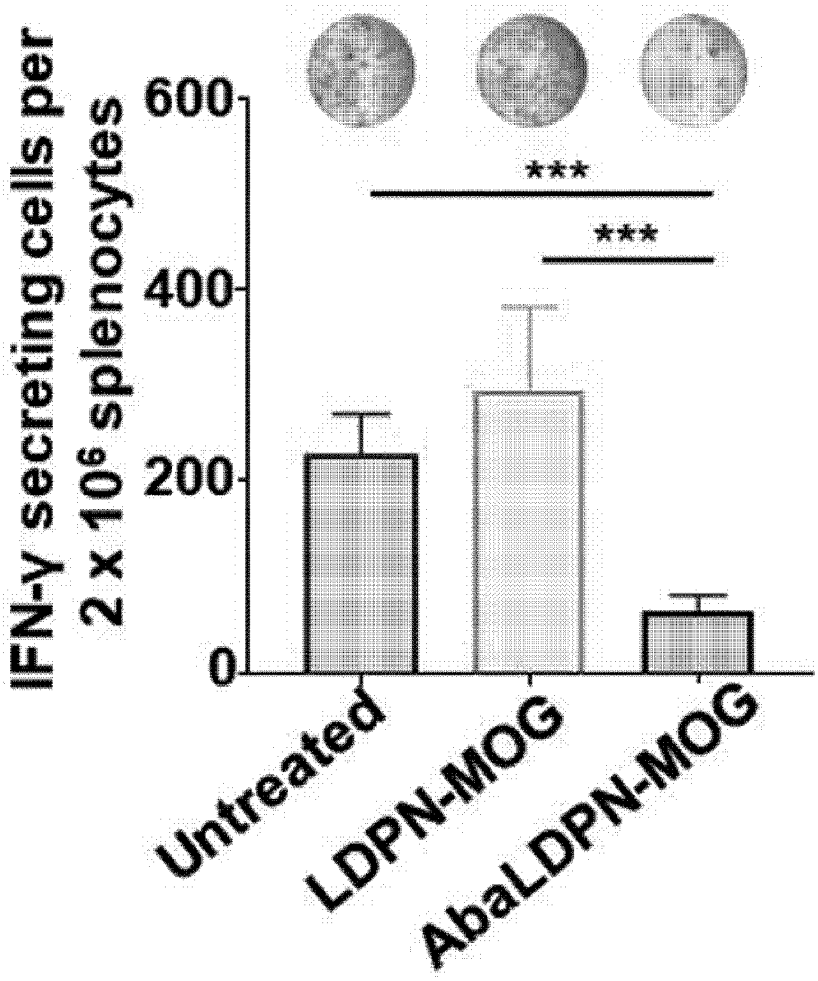
[도25a]


IFN-γ secreting cells
per x 10⁶ splenocytes
2000
1500
1000
500
0
****
****
****
***
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

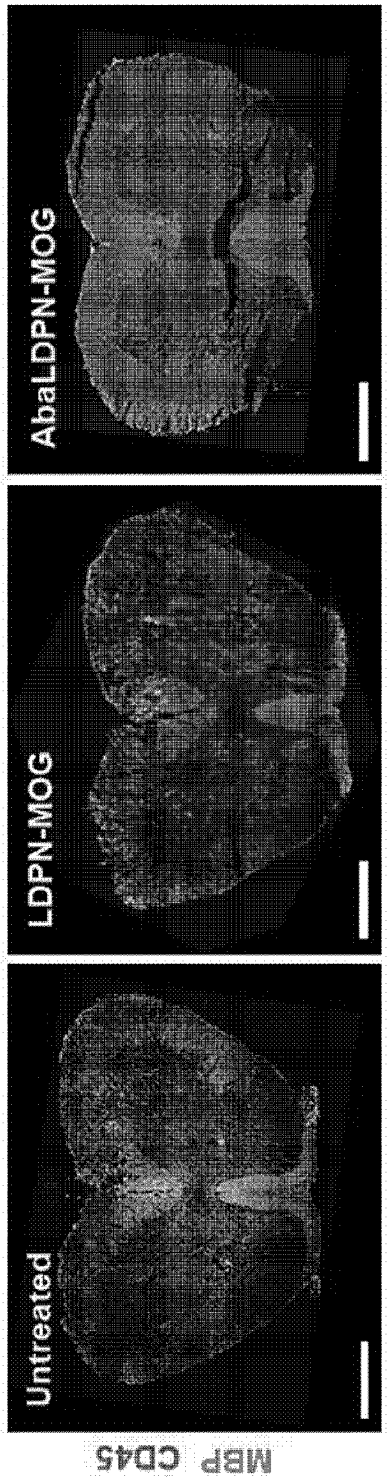
[도25b]


IFN-γ secreting cells
per x 10⁶ splenocytes
2000
1500
1000
500
0
****
****
****
***
Untreated
MOG
Dexa+MOG
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

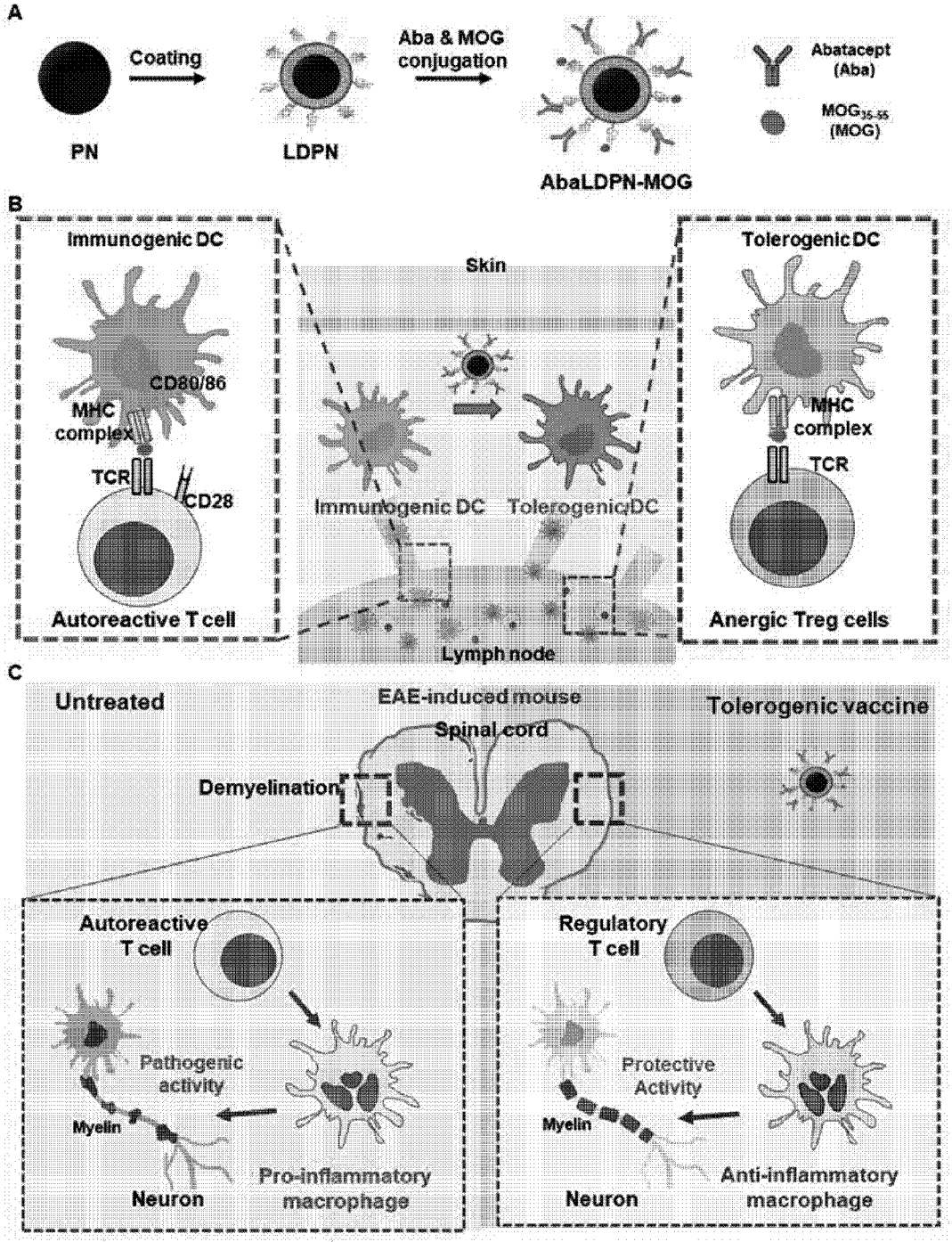
[도25c]


IFN-γ secreting cells per
2 x 10⁶ splenocytes
600
400
200
0
***
***
Untreated
LDPN-MOG
AbaLDPN-MOG

[도26]



[도27]


A
Coating
PN
LDPN
Aba & MOG conjugation
AbaLDPN-MOG
Abatacept (Aba)
MOG35-55 (MOG)
B
Immunogenic DC
CD80/86
MHC complex
TCR
CD28
Autoreactive T cell
Skin
Immunogenic DC
Tolerogenic DC
Lymph node
Tolerogenic DC
MHC complex
TCR
Anergic Treg cells
C
Untreated
EAE-induced mouse
Spinal cord
Demyelination
Tolerogenic vaccine
Autoreactive T cell
Pathogenic activity
Myelin
Neuron
Pro-inflammatory macrophage
Regulatory T cell
Protective Activity
Myelin
Neuron
Anti-inflammatory macrophage

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/006518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/51(2006.01)i; **A61K 47/69**(2017.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i; **A61P 37/00**(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/51(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 37/02(2006.01)

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 자가항원(auto-antigen), 항원제시세포(antigen presenting cell), 항체(antibody), 항산화 나노입자(antioxidant nanoparticle), 자가면역질환(autoimmune disease), 치료(treatment)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1732744 B1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 04 May 2017 (2017-05-04) See paragraphs [0015], [0019], [0033], [0062], [0075], [0082], [0089], [0104], [0116], [0125], [0188], [0230], [0255]-[0256], [0362]-[0363], [0398] and [0400]; and claims 1, 4-5, 7 and 11.	1-26,28-29
Y	YANG, Hobin et al. Molecular engineering of antibodies for site-specific conjugation to lipid polydopamine hybrid nanoparticles. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2020, vol. 10, no. 11, pp. 2212-2226. See abstract; and pages 2214 and 2220-2221.	1-26,28-29
A	US 2012-0076831 A1 (STEPHEN, Miller et al.) 29 March 2012 (2012-03-29) See entire document.	1-26,28-29
A	LI, Peter Y. et al. PEGylation enables subcutaneously administered nanoparticles to induce antigen-specific immune tolerance. Journal of Controlled Release. 12 January 2021 (online publication date), vol. 331, pp. 164-175. See entire document.	1-26,28-29

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 August 2022	**18 August 2022**

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DUL, M. et al. Conjugation of a peptide autoantigen to gold nanoparticles for intradermally administered antigen specific immunotherapy. International Journal of Pharmaceutics. 2019, vol. 562, pp. 303-312. See entire document.	1-26,28-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/006518

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **27**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 27 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/006518

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-1732744 B1	04 May 2017	CN 101861165 A	13 October 2010
		CN 102245199 A	16 November 2011
		CN 102245200 A	16 November 2011
		CN 102245201 A	16 November 2011
		CN 105770878 A	20 July 2016
		EP 2217269 A2	18 August 2010
		EP 2217269 B1	12 April 2017
		EP 2344185 A1	20 July 2011
		EP 2344186 A1	20 July 2011
		EP 2344186 B1	05 April 2017
		EP 2344187 A1	20 July 2011
		EP 2344187 B1	05 July 2017
		EP 2346528 A1	27 July 2011
		EP 2346528 B1	06 April 2016
		EP 2394657 A1	14 December 2011
		EP 2620157 A2	31 July 2013
		EP 2630966 A1	28 August 2013
		EP 2630966 B1	19 April 2017
		EP 2630967 A1	28 August 2013
		EP 3424525 A1	09 January 2019
		JP 2011-500569 A	06 January 2011
		JP 2012-505245 A	01 March 2012
		JP 2012-505246 A	01 March 2012
		JP 2012-505248 A	01 March 2012
		JP 2012-505249 A	01 March 2012
		JP 2013-216691 A	24 October 2013
		JP 2013-234186 A	21 November 2013
		JP 2014-221838 A	27 November 2014
		JP 2015-025019 A	05 February 2015
		JP 2015-091892 A	14 May 2015
		JP 2015-091893 A	14 May 2015
		JP 2015-110645 A	18 June 2015
		JP 2017-125034 A	20 July 2017
		JP 2018-090592 A	14 June 2018
		JP 2020-011981 A	23 January 2020
		JP 5854837 B2	09 February 2016
		JP 5905259 B2	20 April 2016
		JP 5937354 B2	22 June 2016
		JP 6133539 B2	24 May 2017
		JP 6140127 B2	31 May 2017
		JP 6196479 B2	13 September 2017
		JP 6250851 B2	20 December 2017
		JP 6285374 B2	28 February 2018
		JP 7029128 B2	03 March 2022
		KR 10-1756995 B1	26 July 2017
		KR 10-2011-0074902 A	04 July 2011
		KR 10-2011-0074903 A	04 July 2011
		KR 10-2011-0091855 A	16 August 2011
		US 10736848 B2	11 August 2020
		US 2010-0092425 A1	15 April 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/006518

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		US	2010-0129392	A1	27 May 2010
		US	2010-0129439	A1	27 May 2010
		US	2010-0183727	A1	22 July 2010
		US	2010-0233251	A1	16 September 2010
		US	2011-0268804	A1	03 November 2011
		US	2011-0268805	A1	03 November 2011
		US	2012-0027808	A1	02 February 2012
		US	2012-0087890	A1	12 April 2012
		US	2013-0129790	A1	23 May 2013
		US	2013-0236533	A1	12 September 2013
		US	2013-0287857	A1	31 October 2013
		US	2014-0037736	A1	06 February 2014
		US	2014-0127301	A1	08 May 2014
		US	2014-0314865	A1	23 October 2014
		US	2020-0054559	A1	20 February 2020
		US	8277812	B2	02 October 2012
		US	8343497	B2	01 January 2013
		US	8343498	B2	01 January 2013
		US	8562998	B2	22 October 2013
		US	8591905	B2	26 November 2013
		US	8637028	B2	28 January 2014
		US	8906381	B2	09 December 2014
		US	8932595	B2	13 January 2015
		US	9233072	B2	12 January 2016
		US	9308280	B2	12 April 2016
		US	9439859	B2	13 September 2016
		US	9474717	B2	25 October 2016
		US	9526702	B2	27 December 2016
		US	9539210	B2	10 January 2017
		WO	2009-051837	A2	23 April 2009
		WO	2010-042863	A1	15 April 2010
		WO	2010-042866	A1	15 April 2010
		WO	2010-042870	A1	15 April 2010
		WO	2010-042876	A1	15 April 2010
US 2012-0076831 A1	29 March 2012	CN	102325546	A	18 January 2012
		EP	2389193	A1	30 November 2011
		JP	2012-515722	A	12 July 2012
		KR	10-2011-0117684	A	27 October 2011
		US	2016-0166664	A1	16 June 2016
		US	2019-0365877	A1	05 December 2019
		WO	2010-085509	A1	29 July 2010

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/006518

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/51(2006.01)i; **A61K 47/69**(2017.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i; **A61P 37/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/51(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 37/02(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

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

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 자가항원(auto-antigen), 항원제시세포(antigen presenting cell), 항체(antibody), 항산화 나노입자(antioxidant nanoparticle), 자가면역질환(autoimmune disease), 치료(treatment)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1732744 B1 (메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지 등) 2017.05.04 단락 [0015], [0019], [0033], [0062], [0075], [0082], [0089], [0104], [0116], [0125], [0188], [0230], [0255]-[0256], [0362]-[0363], [0398], [0400]; 청구항 1, 4-5, 7, 11 참조.	1-26,28-29
Y	YANG, HOBIN 등, 'Molecular engineering of antibodies for site-specific conjugation to lipid polydopamine hybrid nanoparticles', Acta Pharmaceutica Sinica B, 2020, 10권, 11호, 페이지 2212-2226 요약; 페이지 2214, 2220-2221 참조.	1-26,28-29
A	US 2012-0076831 A1 (MILLER STEPHEN 등) 2012.03.29 전체 문헌 참조.	1-26,28-29
A	LI, PETER Y. 등, 'PEGylation enables subcutaneously administered nanoparticles to induce antigen-specific immune tolerance', Journal of Controlled Release, 2021.01.12(온라인 공개일), 331권, 페이지 164-175 전체 문헌 참조.	1-26,28-29
A	DUL, M. 등, 'Conjugation of a peptide autoantigen to gold nanoparticles for intradermally administered antigen specific immunotherapy', International Journal of Pharmaceutics, 2019, 562권, 페이지 303-312 전체 문헌 참조.	1-26,28-29

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2022년08월18일(18.08.2022)	**2022년08월18일(18.08.2022)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/006518

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

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

1. ☑ 청구항: **27**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 27은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

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

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

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/006518

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1732744 B1	2017/05/04	CN 101861165 A	2010/10/13
		CN 102245199 A	2011/11/16
		CN 102245200 A	2011/11/16
		CN 102245201 A	2011/11/16
		CN 105770878 A	2016/07/20
		EP 2217269 A2	2010/08/18
		EP 2217269 B1	2017/04/12
		EP 2344185 A1	2011/07/20
		EP 2344186 A1	2011/07/20
		EP 2344186 B1	2017/04/05
		EP 2344187 A1	2011/07/20
		EP 2344187 B1	2017/07/05
		EP 2346528 A1	2011/07/27
		EP 2346528 B1	2016/04/06
		EP 2394657 A1	2011/12/14
		EP 2620157 A2	2013/07/31
		EP 2630966 A1	2013/08/28
		EP 2630966 B1	2017/04/19
		EP 2630967 A1	2013/08/28
		EP 3424525 A1	2019/01/09
		JP 2011-500569 A	2011/01/06
		JP 2012-505245 A	2012/03/01
		JP 2012-505246 A	2012/03/01
		JP 2012-505248 A	2012/03/01
		JP 2012-505249 A	2012/03/01
		JP 2013-216691 A	2013/10/24
		JP 2013-234186 A	2013/11/21
		JP 2014-221838 A	2014/11/27
		JP 2015-025019 A	2015/02/05
		JP 2015-091892 A	2015/05/14
		JP 2015-091893 A	2015/05/14
		JP 2015-110645 A	2015/06/18
		JP 2017-125034 A	2017/07/20
		JP 2018-090592 A	2018/06/14
		JP 2020-011981 A	2020/01/23
		JP 5854837 B2	2016/02/09
		JP 5905259 B2	2016/04/20
		JP 5937354 B2	2016/06/22
		JP 6133539 B2	2017/05/24
		JP 6140127 B2	2017/05/31
		JP 6196479 B2	2017/09/13
		JP 6250851 B2	2017/12/20
		JP 6285374 B2	2018/02/28
		JP 7029128 B2	2022/03/03
		KR 10-1756995 B1	2017/07/26
		KR 10-2011-0074902 A	2011/07/04
		KR 10-2011-0074903 A	2011/07/04
		KR 10-2011-0091855 A	2011/08/16
		US 10736848 B2	2020/08/11
		US 2010-0092425 A1	2010/04/15

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/006518

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2010-0129392 A1	2010/05/27
		US 2010-0129439 A1	2010/05/27
		US 2010-0183727 A1	2010/07/22
		US 2010-0233251 A1	2010/09/16
		US 2011-0268804 A1	2011/11/03
		US 2011-0268805 A1	2011/11/03
		US 2012-0027808 A1	2012/02/02
		US 2012-0087890 A1	2012/04/12
		US 2013-0129790 A1	2013/05/23
		US 2013-0236533 A1	2013/09/12
		US 2013-0287857 A1	2013/10/31
		US 2014-0037736 A1	2014/02/06
		US 2014-0127301 A1	2014/05/08
		US 2014-0314865 A1	2014/10/23
		US 2020-0054559 A1	2020/02/20
		US 8277812 B2	2012/10/02
		US 8343497 B2	2013/01/01
		US 8343498 B2	2013/01/01
		US 8562998 B2	2013/10/22
		US 8591905 B2	2013/11/26
		US 8637028 B2	2014/01/28
		US 8906381 B2	2014/12/09
		US 8932595 B2	2015/01/13
		US 9233072 B2	2016/01/12
		US 9308280 B2	2016/04/12
		US 9439859 B2	2016/09/13
		US 9474717 B2	2016/10/25
		US 9526702 B2	2016/12/27
		US 9539210 B2	2017/01/10
		WO 2009-051837 A2	2009/04/23
		WO 2010-042863 A1	2010/04/15
		WO 2010-042866 A1	2010/04/15
		WO 2010-042870 A1	2010/04/15
		WO 2010-042876 A1	2010/04/15
US 2012-0076831 A1	2012/03/29	CN 102325546 A	2012/01/18
		EP 2389193 A1	2011/11/30
		JP 2012-515722 A	2012/07/12
		KR 10-2011-0117684 A	2011/10/27
		US 2016-0166664 A1	2016/06/16
		US 2019-0365877 A1	2019/12/05
		WO 2010-085509 A1	2010/07/29