



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월26일
(11) 등록번호 10-2537540
(24) 등록일자 2023년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 47/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0183885
(22) 출원일자 2020년12월24일
심사청구일자 2020년12월24일
(65) 공개번호 10-2022-0092273
(43) 공개일자 2022년07월01일
(56) 선행기술조사문헌
KR101685304 B1*
W02019110067 A1*
Yan Zhao et al., International Journal of
Nanomedicine, 2020, vol. 15,
pp.9571-9586(2020.12.01. 인터넷 공개)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)인핸드바이오
서울특별시 성동구 상원길 19, 3층 (성수동1가,
신한아이티타워)
(72) 발명자
이혁진
서울특별시 서초구 방배로37길 26-9, 102동 207
호(방배동, 쌍용예가클래식)
정예희
서울특별시 동대문구 사가정로 122, 705호(
전농동, 하우스토리)
김민정
서울특별시 서초구 신반포로 270, 111동 703호 (
반포동, 반포자이아파트)
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

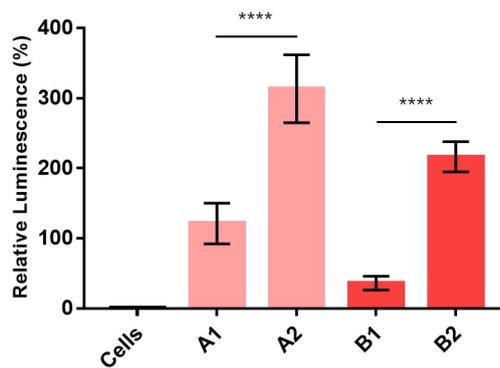
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 만노스를 포함하는 지질 나노입자 또는 이의 용도

(57) 요약

본 출원은 만노스를 포함하는 지질 나노입자 또는 이의 용도에 관한 것으로, 일 예에 따른, 지질 나노입자는 간 조직 및/또는 LSEC 특이적이고 생체 친화도가 우수하며, 고효율로 유전자 치료제 등을 전달할 수 있어 지질 나노입자 매개 유전자 치료 등 관련 기술분야에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

- A61K 47/26 (2013.01)
- A61K 48/0033 (2013.01)
- A61P 1/16 (2018.01)
- A61P 31/20 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113839
과제번호	2020R1A2C2004364
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	기질 리보핵산 구조 연구를 통한 혁신적 유전자치료제 개발
기 여 율	40/100
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01~2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114860
과제번호	2018R1A5A2025286
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	섬유화질환 제어 연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01~2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711116223
과제번호	2019M3A9H1103786
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	세포 표면 나노코팅 및 세포 내 소기관 강화 기술을 기반으로 한 차세대 베타세포 치료제 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.04.01~2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

1,4-비스(3-아미노프로필)피페라진(1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine) 및 알킬-에폭시드가 결합된 이온화 가능한 지질 (ionizable lipid); 인지질; 콜레스테롤; 지질-PEG(polyethyleneglycol) 접합체의 혼합물을 포함하고,

상기 이온화 가능한 지질 : 인지질 : 콜레스테롤 : 지질-PEG 접합체를 20 내지 50 : 10 내지 30 : 30 내지 60 : 0.5 내지 5의 몰비로 포함하고,

상기 지질-PEG 접합체의 혼합물은 세라마이드-PEG 접합체 및 만노스-PEG(polyethyleneglycol)-지질 접합체를 포함하며,

상기 지질-PEG 접합체의 혼합물은 0.5 내지 5 몰%로 포함되는 것인, 지질 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 알킬-에폭시드는 1,2-에폭시도데칸(1,2-epoxydodecane)인, 지질 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인지질은 DOPE, DSPC, POPC, EPC, DOPC, DPPC, DOPG, DPPG, DSPE, Phosphatidylethanolamine, dipalmitoylphosphatidylethanolamine, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, POPE, POPC, DOPS, 및 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine]으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 지질 나노입자.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 만노스-PEG-지질 접합체를 0.5 내지 4.5 몰%로 포함하는, 지질 나노입자.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 만노스-PEG-지질 접합체 외의 지질-PEG 접합체를 0.5 내지 4.5 몰%로 포함하는, 지질 나노입자.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 pKa가 6.0 내지 7.0인, 지질 나노입자.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 간 조직을 특이적으로 표적화하는 것인, 지질 나노입자.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cell)을 특이적으로 표적화하는 것인, 지질 나노입자.

청구항 12

(1) 제1항 내지 제3항, 제6항 내지 제7항, 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는, 약물 전달용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합은 상기 지질 나노입자 내부에 봉입되어 있는, 약물 전달용 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 조성물은 CD206 양성 세포 특이적으로 약물을 전달하는, 약물 전달용 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 조성물은 LSEC(liver sinusoidal endothelial cell) 특이적으로 약물을 전달하는, 약물 전달용 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 평균 지름이 70 내지 150nm, 약물 전달용 조성물.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 음이온성 약물은 펩타이드, 단백질 약물, 단백질-핵산 구조체, 및 음이온성 생체고분자-약물 접합체로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인, 약물 전달용 조성물.

청구항 18

제12항에 있어서, 상기 핵산은 소간섭리보핵산(siRNA), 리보솜 리보핵산(rRNA), 리보핵산(RNA), 디옥시리보핵산(DNA), 상보성 디옥시리보핵산(cDNA), 앵타머(aptamer), 전령 리보핵산(mRNA), 운반 리보핵산(tRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA, 및 DNAzyme로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인, 약물 전달용 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 만노스를 포함하는 지질 나노입자 또는 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 의약 제제 산업에 있어 약물의 부작용을 줄이고 효능 및 효과를 극대화시켜 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 설계한 약물전달시스템(DDS; Drug Delivery System)은 신약개발과 맞먹는 경제적 이익을 창출할 수 있으면서 성공 가능성이 큰 고부가가치 핵심기술로서 약물투여를 효율화함으로써 환자 치료의 질을 높이는데

그 목적이 있다.

- [0003] 약물전달시스템의 핵심기술 중의 하나인 약물흡수 촉진 기술에 속하는 난용성 약물의 가용화 기술은 신약 물질의 개발비용을 줄일 수 있는 동시에 현재 출시되어 있는 의약품의 부가가치를 높일 수 있는 가장 합리적인 방법으로 여겨지고 있다. 특히, 우리나라와 같이 신약개발 여건이 열악한 상황에서 약물의 가용화 기술의 개발을 통한 개량 신약의 개발은 적은 비용으로 막대한 부가가치를 창출할 수 있는 분야이다.
- [0004] 유전자 약물전달시스템을 이용한 유전자 치료법은 유전적 결함을 수정하고 수많은 질병을 치료하는데 있어 커다란 희망으로 자리 잡고 있다. 이러한 유전자 치료법을 성공적이고 안전하게 수행함에 있어서, 효과적인 유전자 전달이 주요한 과제 중 하나이며, 바이러스 전달체가 유전자 전달에 있어 효과적임이 입증되었다. 그러나 면역원성(immunogenicity), 주입된 DNA 크기의 한계 및 대량 생산의 어려움과 같은 몇 가지 결점으로 인해 유전자 전달 시스템으로서 바이러스의 이용이 제한되고 있다. 양이온성 리포솜 및 중합체와 같은 비-바이러스성 유전자 담체가 바이러스성 시스템의 대체 수단으로서 주목을 받기 시작했다.
- [0005] 개선된 안정성 프로파일 및 중합체 전달체의 제조와 조작용이성이 효과적이고 안전한 유전자 전달용 비독성 및 생분해성 중합체 담체의 디자인 및 합성에 대한 연구를 촉발시켰다. 폴리(L-라이신), 폴리에틸렌아민(polyethylenimine), 스타버스트(starburst), 폴리아미도아민(polyamidoamine) 덴드리머, 및 양이온성 리포솜 등이 자발적으로 자가 조립가능하고 플라스미드 DNA(pDNA)를 엔도사이토시스를 통해 세포로 진입시키기에 충분히 작은 구조로 압축할 수 있기 때문에 비-바이러스성 유전자 전달체로서 널리 연구되어 왔다.
- [0006] Antisense RNA, siRNA 등의 핵산은 생체 내에서 특정 단백질의 발현을 억제할 수 있는 물질로, 암, 유전병, 감염질환, 자가면역 질환 등의 치료에 중요한 도구로 각광받고 있다(Novina and Sharp, Nature, 430, 161-164, 2004). 그러나 siRNA와 같은 핵산은 세포 내로 직접 전달이 어렵고, 혈액 내에서 효소에 의해 쉽게 분해되므로 이를 극복하기 위한 연구들이 많이 진행되고 있다. 현재까지 핵산을 세포 내로 운반하는 방법으로 양전하 지질 또는 중합체와 섞어 운반하는 방법(각각 지질-DNA 접합체(lipoplex) 및 폴리머-DNA 접합체(polyplex)라 명명함)이 주로 사용되고 있다(Hirko 등, Curr. Med. Chem., 10, 1185-1193, 2003; Merdan 등, Adv. Drug. Deliv. Rev., 54, 715-758, 2002; Spagnou 등, Biochemistry, 43, 13348-13356, 2004). 지질-DNA 접합체는 핵산과 결합하여 세포 내로 핵산을 잘 전달시켜 세포수준에서 많이 사용되고 있으나, 생체 내에서는 국부적으로 주사 시 많은 경우 체내에서 염증을 유발시키며(Filonand 및 Phillips, Biochim. Biophys. Acta, 1329, 345-356, 1997), 혈관 내 주사 시 주로 1차 통과기관들인 폐, 간, 비장 등과 같은 조직에 축적되는 단점이 있다(Ren 등, Gene Therapy, 7, 764-768, 2000).
- [0007] 또한 이러한 비-바이러스성 전달체는 트랜스펙션 효율이 낮은 문제점이 있다. 트랜스펙션 효율을 높이기 위해 많은 노력이 기울여져 왔으나, 이는 여전히 안정하다고 여겨지는 시스템과는 거리가 멀다. 또한, 비-바이러스성 유전자 전달체 담체는 열악한 생체적합성 및 비-생분해성으로 인해 현저하게 높은 세포독성을 나타낸다.
- [0008] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 간 조직, 특히 LSEC에 특이적으로 전달되어 음이온성 약물, 핵산 등을 효율적으로 전달할 수 있는 신규한 나노입자를 개발하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1000358호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 일 예는 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드가 결합된 이온화 가능한 지질, 인지질, 콜레스테롤 및 지질-PEG(polyethyleneglycol) 접합체 혼합물을 포함하는 지질 나노입자를 제공하는 것이다. 상기 지질-PEG 접합체 혼합물은 만노스-PEG-지질 접합체를 포함할 수 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는 약물(음이온성 약물, 및/또는 핵산) 전달용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물 핵산, 또는 이의 조합을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태는, 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드가 결합된 이온화 가능한 지질(ionizable lipid); 인지질; 콜레스테롤; 및 지질-PEG(polyethyleneglycol) 접합체의 혼합물을 포함하고,

[0014] 상기 지질-PEG 접합체의 혼합물은 만노스-PEG(polyethyleneglycol)-지질 접합체를 포함하는, 지질 나노입자를 제공한다.

[0015] 일 예에 따른 지질 나노입자는 간 조직 및/또는 LSEC (liver sinusoidal endothelial cell; 간 혈관 내피세포) 특이적이고 생체 친화도가 우수하며, 고효율로 유전자 치료제 등을 전달할 수 있어 지질 나노입자 매개 유전자 치료 및 영상 진단 기술 등 관련 기술분야에 유용하게 사용할 수 있다.

[0016] 본 명세서에서, '이온화 가능한 지질(ionizable lipid)' 또는 '지질 유사체(lipidoid)'는 용이하게 양성자화될 수 있는 아민-함유 지질을 의미하고, 예를 들면, 주변 pH에 따라 전하상태가 변하는 지질일 수 있다. 상기 이온화 가능한 지질은 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드가 결합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 이온화 가능한 지질은 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드가 반응하여 생성되는 지질과 유사한 특성을 갖는 화합물일 수 있으며, 보다 구체적으로, 6원의 헤테로고리 아민을 알킬-에폭시드와 반응시켜 에폭시드의 고리열림반응(ring opening reaction)에 의해 생성되는 화합물일 수 있다.

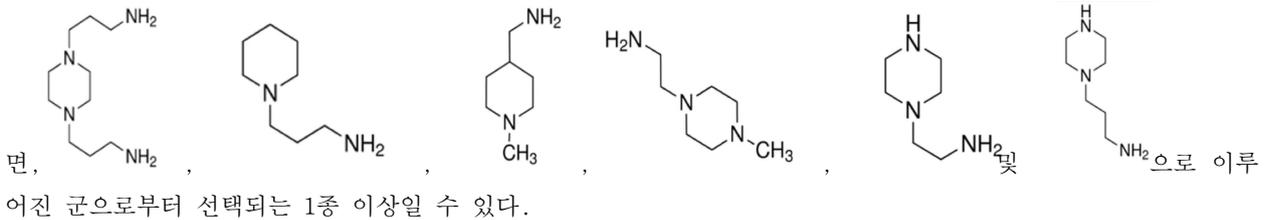
[0017] 일 예에서, 상기 이온화 가능한 지질은 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드를 1:n (n = 6원의 헤테로고리 아민에 포함된 1차 아민의 갯수 x 2 + 2차 아민의 갯수 x 1)의 몰비로 반응시켜 결합된 것일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 246 아민 및 1,2-에폭시도데칸을 1: 4의 몰비로 혼합하여 700 내지 800rpm, 85 내지 95°C 의 조건에서 2 내지 4일 동안 반응시켜 제조한 것일 수 있다.

[0018] 상기 이온화 가능한 지질은 양이온성 지질의 pKa 미만의 pH에서 양성자화(양으로 하전)될 수 있고, pKa 초과인 pH에서는 실질적으로 중성일 수 있다. 일 예에서, 상기 지질 나노입자는 양성자화된 이온화 가능한 지질 및/또는 중성을 나타내는 이온화 가능한 지질을 포함할 수 있다.

[0019] 상기 이온화 가능한 지질은 지질과 유사한 특성을 갖는 이온화 가능한 화합물로서 약물(예를 들면, 음이온성 약물 및/또는 핵산)과의 정전기적 상호작용을 통하여 상기 약물이 지질 나노입자 내에 높은 효율로 봉입되도록 하는 역할을 수행할 수 있다.

[0020] 상기 6원의 헤테로고리 아민은 피페라진(piperazine) 또는 피페리딘(piperidine) 구조를 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 상기 6원의 헤테로고리 아민은 3차 아민을 포함하는 사슬형 또는 비사슬형의 아민일 수 있고, 일 예에 따르



[0022] 일 예에서, 상기 6원의 헤테로고리 아민은 1,4-비스(3-아미노프로필)피페라진(1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine), N-(3-아미노프로필)피페리딘 (N-(3-Aminopropyl)piperidine), (1-메틸-4-피페리딘)메탄아민((1-Methyl-4-piperidinyl)methanamine), 2-(4-메틸-피페라진-1-일)-에틸아민 (2-(4-Methyl-piperazin-1-yl)-ethylamine), 1-(2-아미노에틸)피페라진(1-(2-Aminoethyl)piperazine), 및 1-(3-아미노프로필)피페라진(1-(3-aminopropyl)piperazine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0023] 상기 이온화 가능한 지질에 포함되는 아민의 종류에 따라, 지질 나노입자의 (i) 약물 봉입률, (ii) PDI(polydispersity index). 및/또는 (iii) 간 조직, 및/또는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cell; 간 혈관 내피세포)로의 약물 전달 효율이 상이할 수 있다.

[0024] 상기 아민을 포함하는 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자는 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:

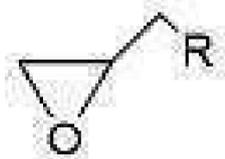
- [0025] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;
- [0026] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며);
- [0027] (3) 간 조직, 및/또는 LSEC으로의 약물 전달 효율이 우수; 및/또는
- [0028] (4) LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수 (예를 들면, 간세포(hepatocyte) 보다 LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수함).

[0029] 일 예에 따르면, 1,4-비스(3-아미노프로필)피페라진(1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine; Cas Nos. 7209-38-3)을 포함하는 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자는 다른 종류의 아민을 포함하는 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자 보다 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:

- [0030] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;
- [0031] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며);
- [0032] (3) 간 조직, 및/또는 LSEC으로의 약물 전달 효율이 우수; 및/또는
- [0033] (4) LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수 (예를 들면, 간세포(hepatocyte) 보다 LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수함).

[0034] 상기 알킬-에폭시드는 하기 화학식 1과 같은 구조를 가질 수 있다.

[0035] [화학식 1]



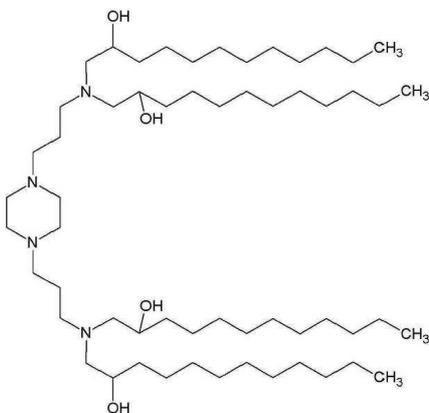
[0036]

[0037] 상기 알킬-에폭시드는 C6 내지 C14, C6 내지 C12, C6 내지 C10, C8 내지 C14, C8 내지 C12, C8 내지 C10, C10 내지 C14, C10 내지 C12, 또는 C10의 탄소 길이를 갖는 것일 수 있고, 예를 들면, C10의 1,2-에폭시도데칸(1,2-epoxydodecane)일 수 있다. 일 예에서, 이온화 가능한 지질에 포함되는 알킬-에폭시드의 탄소수를 상기 범위로 함으로써 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:

- [0038] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;
- [0039] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며);
- [0040] (3) 간 조직, 및/또는 LSEC으로의 약물 전달 효율이 우수; 및/또는
- [0041] (4) LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수 (예를 들면, 간세포(hepatocyte) 보다 LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수함).

[0042] 일 예에서, 상기 이온화 가능한 지질은 하기 화학식 2의 일반식을 가질 수 있다.

[0043] [화학식 2]



[0044]

[0045] 상기 화학식 2의 구조는 일 예에 따른 이온화 가능한 지질이 갖는 구조의 일례로서, 이온화 가능한 지질의 구조는 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드의 종류에 따라 상이할 수 있다.

- [0046] 일 예에 따르면, 화학식 2의 구조를 갖는 이온화 가능한 지질을 포함하는 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자는 다른 종류의 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자 보다 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:
- [0047] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;
- [0048] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며);
- [0049] (3) 간 조직, 및/또는 LSEC으로의 약물 전달 효율이 우수; 및/또는
- [0050] (4) LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수 (예를 들면, 간세포(hepatocyte) 보다 LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수함).
- [0051] 일 예에 따르면, 상기 지질 나노 입자는 pKa가 5 내지 8, 5.5 내지 7.5, 6 내지 7, 또는 6.5 내지 7일 수 있다. pKa는 산 해리 상수로, 대상 물질의 산 강도를 나타내는 지표로서 일반적으로 사용되고 있는 것을 가리킨다. 상기 지질 나노입자가 갖는 pKa 값은 지질 나노입자의 생체 내 안정성 및 지질 나노입자의 약물 방출 측면에서 중요하다. 일 예에서 상기 범위의 pKa 값을 나타내는 지질 나노입자는 생체 내에서 안전하게 타겟 장기(예를 들면, 간) 및/또는 타겟 세포(예를 들면, LSEC)로 전달될 수 있고, 타겟 장기 및/또는 타겟 세포에 도달하여 엔도시토시스(endocytosis) 후에 양전하를 나타내어 엔도솜(endosome) 막의 음이온성 단백질과 정전기적 상호작용을 통해 봉입된 약물이 방출되도록 할 수 있다.
- [0052] 일 예에 따른 지질 나노입자의 구성요소 중 인지질은 지질 나노입자 내에서 이온화 가능한 지질 및 약물이 상호 작용하여 형성된 코어를 감싸서 보호하는 역할을 수행하며, 타겟 세포의 인지질 이중층과 결합하여 약물의 세포 내 전달시 세포막 통과 및 엔도솜 탈출(endosomal escape)을 용이하게 할 수 있다.
- [0053] 상기 인지질은 일 예에 따른 지질 나노입자의 융합을 촉진할 수 있는 인지질을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들면, 디올레일포스파티딜에탄올아민(dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE), 디스테아로일포스파티딜콜린(distearoylphosphatidylcholine, DSPC), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(palmitoyloleoylphosphatidylcholine, POPC), 에그 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine, EPC), 디올레오일포스파티딜콜린(dioleoylphosphatidylcholine, DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(dioleoylphosphatidylglycerol, DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(dipalmitoylphosphatidylglycerol, DPPG), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(distearoylphosphatidylethanolamine, DSPE), 포스파티딜에탄올아민(Phosphatidylethanolamine, PE), 디팔미토일포스파티딜에탄올아민(dipalmitoylphosphatidylethanolamine), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(POPE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine](DOPS), 및 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine] 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다. 일 예에서 DOPE를 포함하는 지질 나노입자는 mRNA 전달에 효과적(mRNA에 대한 약물 전달 효율이 우수)일 수 있고, 다른 예에서, DSPE를 포함하는 지질 나노입자는 siRNA 전달에 효과적(siRNA에 대한 약물 전달 효율이 우수)일 수 있다.
- [0054] 일 예에 따른 지질 나노입자의 구성요소 중 콜레스테롤은 지질 나노입자 내에서 지질 층전에 형태적 측면에서 견고성을 부여하며, 나노입자의 코어 및 표면에 분산되어 나노입자의 안정성을 향상시키는 역할을 할 수 있다.
- [0055] 본 명세서에서, "지질-PEG(polyethyleneglycol) 접합체", "지질-PEG", "PEG-지질", "PEG-lipid", 또는 "lipid-PEG"는 지질과 PEG가 컨쥬게이트된 형태를 지칭하는 것으로, 일측 단부에 친수성 중합체인 폴리에틸렌글리콜(PEG) 중합체가 결합된 지질을 의미할 수 있다.
- [0056] 본 명세서에서, "지질-PEG-접합체의 혼합물"은 다양한 종류의 지질-PEG 접합체를 포함하는 혼합물을 의미할 수 있다. 일 예에서, 지질-PEG 접합체의 혼합물은 만노스-PEG-지질 접합체(또는 만노스-지질-PEG 접합체) (예를 들면, 만노스-PEG-DSPE 접합체)를 포함할 수 있다. 일 예에서 상기 만노스-PEG-지질 접합체는 상기 지질 나노입자의 외층(out layer)에 존재할 수 있다.
- [0057] 상기 지질-PEG 접합체 혼합물은 지질 나노입자 내에서 나노입자의 혈청 내 입자 안정성에 기여하며, 나노입자 간 응집을 방지하고, 간조직 및/또는 LSEC으로의 타겟팅 효과를 증가시키는 역할을 수행할 수 있다. 또한, 지질-PEG 접합체 혼합물은 핵산의 생체 내 전달시 분해효소로부터 핵산을 보호하여 핵산의 체내 안정성을 강화시키며, 나노입자 내 봉입된 약물의 반감기를 증가시킬 수 있다. 또한, 지질-PEG 접합체 혼합물은 나노입자에 생체 내에서 스텔스(stealth) 기능을 부여하여 나노입자의 분해를 방지할 수 있다.

- [0058] 상기 지질-PEG 접합체에서 PEG는 지질에 직접 접합될 수 있거나 또는 링커 모이어티를 통해 지질에 연결될 수 있다. PEG를 지질에 결합시키기에 적합한 임의의 링커 모이어티가 사용될 수 있으며, 예를 들면, 에스테르-비함유 링커 모이어티 및 에스테르-함유 링커 모이어티가 포함된다. 상기 에스테르-비함유 링커 모이어티는 아미도(-C(O)NH-), 아미노(-NR-), 카르보닐(-C(O)-), 카르바메이트(-NHC(O)O-), 우레아(-NHC(O)NH-), 다이설파이드(-S-S-), 에테르(-O-), 석시닐(-O)CCH₂CH₂C(O)-, 석신아미딜(-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), 에테르, 다이설파이드뿐만 아니라 이들의 조합(예컨대, 카르바메이트 링커 모이어티 및아미도 링커 모이어티 둘 모두를 함유하는 링커)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 에스테르-함유 링커 모이어티는, 예를 들면 카르보네이트(-OC(O)O-), 석시노일, 포스페이트 에스테르(-O-(O)POH-O-), 설포네이트 에스테르, 및 이들의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 일 예에서, 상기 지질-PEG 접합체 혼합물 (또는 상기 만노스-PEG 지질 접합체, 또는 세라마이드-PEG 접합체)의 평균 분자량은 100 내지 10000달톤, 200 내지 10000달톤, 500 내지 10000달톤, 1000 내지 10000달톤, 1500 내지 10000달톤, 2000 내지 10000달톤, 100 내지 7500달톤, 200 내지 7500달톤, 500 내지 7500달톤, 1000 내지 7500달톤, 1500 내지 7500달톤, 2000 내지 7500달톤, 100 내지 5000달톤, 200 내지 5000달톤, 500 내지 5000달톤, 1000 내지 5000달톤, 1500 내지 5000달톤, 2000 내지 5000달톤, 100 내지 3000달톤, 200 내지 3000달톤, 500 내지 3000달톤, 1000 내지 3000달톤, 1500 내지 3000달톤, 2000 내지 3000달톤, 100 내지 2600달톤, 200 내지 2600 달톤, 500 내지 2600달톤, 1000 내지 2600달톤, 1500 내지 2600달톤, 2000 내지 2600달톤, 100 내지 2500달톤, 200 내지 2500달톤, 500 내지 2500달톤, 1000 내지 2500달톤, 1500 내지 2500달톤, 또는 2000 내지 2500달톤일 수 있다.
- [0060] 상기 지질-PEG 접합체 내 지질은 폴리에틸렌글리콜과 결합할 수 있는 지질이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 상기 지질 나노입자의 다른 구성요소인 인지질 및/또는 콜레스테롤 또한 사용할 수 있다. 구체적으로, 지질-PEG 접합체 내 지질은 세라마이드(세라미드, ceramide), 디미리스톨글리세롤(dimyristoylglycerol, DMG), 석시노일 디아글리세롤(succinoyl-diacylglycerol, s-DAG), 디스테아로일포스파티딜콜린(distearoylphosphatidylcholine, DSPC), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(distearoylphosphatidylethanolamine, DSPE), 또는 콜레스테롤일 수 있다.
- [0061] 일 예에서, 상기 지질-PEG 접합체 혼합물은 상기 만노스-PEG-지질 접합체 외에 다이알킬옥시프로필에 결합된 PEG(PEG-DAA), 디아실글리세롤에 결합된 PEG(PEG-DAG), 포스파티딜에탄올아민과 같은 인지질에 결합된 PEG(PEG-PE), 세라마이드에 접합된 PEG(PEG-CER, 또는 세라마이드-PEG 접합체), 콜레스테롤 또는 이의 유도체에 접합된 PEG, PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC, PEG-DSPE, 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있고 예를 들면, C16-PEG2000 세라마이드, DMG-PEG 2000, 14:0 PEG2000 PE 일 수 있다.
- [0062] 일 예에서, 상기 지질-PEG 접합체 혼합물은 세라마이드-PEG 접합체 및/또는 만노스-PEG-지질 접합체 (예를 들면, 만노스-PEG-DSPE 접합체)를 포함할 수 있다.
- [0063] 일 예에서, 세라마이드-PEG 접합체 및/또는 만노스-PEG-지질 접합체 (예를 들면, 만노스-PEG-DSPE 접합체)를 포함하는 지질-PEG 접합체 혼합물을 포함하는 경우 다른 종류의 지질-접합체를 포함하는 경우 보다 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:
- [0064] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;
- [0065] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며);
- [0066] (3) 간 조직, 및/또는 LSEC으로의 약물 전달 효율이 우수; 및/또는
- [0067] (4) LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수 (예를 들면, 간세포(hepatocyte) 보다 LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수함).
- [0068] 상기 지질-PEG 접합체 내 PEG는 친수성 고분자로 혈장 단백질들의 흡착을 억제하는 능력을 가지고 있어서 지질 나노입자의 체내 순환시간을 증가시키게 할 수 있다.
- [0069] 상기 PEG는 지질과 결합하지 않은 쪽에 관능기가 결합된 것(functionalized PEG)일 수 있다. 이 때 사용 가능한 관능기는 숙시닐기(succinyl), 카르복시산(carboxylic acid), 말레이미드(maleimide), 아민기, 바이오틴, 시아누르기(cyanur), 및 폴레이트(folate) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0070] 상기 지질-PEG 접합체 혼합물은 0.1 내지 15몰%, 0.25 내지 15몰%, 0.5 내지 15몰%, 1 내지 15몰%, 1.5 내지 15몰%, 2 내지 15몰%, 2.5 내지 15몰%, 3 내지 15몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 2.5 내지 10몰%, 3 내지 10몰%, 0.1 내지 9몰%, 0.25 내지 9몰%,

0.5 내지 9몰%, 1 내지 9몰%, 1.5 내지 9몰%, 2 내지 9몰%, 2.5 내지 9몰%, 3 내지 9몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 2.5 내지 7.5몰%, 3 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 2.5 내지 5몰%, 3 내지 5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 2.5 내지 4.5몰%, 3 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 2.5 내지 4몰%, 3 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 1 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 2 내지 3.5몰%, 2.5 내지 3.5몰%, 3 내지 3.5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 또는 2.5 내지 3몰%로 상기 지질 나노입자에 포함될 수 있다.

[0071] 상기 만노스-PEG-지질 접합체는 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 1 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 2 내지 2.5몰%, 0.1 내지 2몰%, 0.25 내지 2몰%, 0.5 내지 2몰%, 1 내지 2몰%, 또는 1.5 내지 2몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.

[0072] 일 예에서 지질-PEG 접합체의 혼합물은 상기 지질 만노스-PEG-지질 접합체 외의 다른 종류의 지질-PEG 접합체를 포함할 수 있고,

[0073] 상기 만노스-PEG-지질 접합체 외의 지질-PEG 접합체(예를 들면, 세라마이드-PEG 접합체)를 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 1 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 2 내지 2.5몰%, 0.1 내지 2몰%, 0.25 내지 2몰%, 0.5 내지 2몰%, 1 내지 2몰%, 1.5 내지 2몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.3 내지 5몰%, 0.4 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.3 내지 4몰%, 0.4 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.3 내지 3.5몰%, 0.4 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.3 내지 3몰%, 0.4 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.3 내지 2.5몰%, 0.4 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 0.1 내지 2몰%, 0.25 내지 2몰%, 0.3 내지 2몰%, 0.4 내지 2몰%, 0.5 내지 2몰%, 0.1 내지 1.5몰%, 0.25 내지 1.5몰%, 0.3 내지 1.5몰%, 0.4 내지 1.5몰%, 0.5 내지 1.5몰%, 0.1 이상 내지 1몰%, 0.25 이상 내지 1몰%, 0.3 이상 내지 1몰%, 0.4 이상 내지 1몰%, 0.5 이상 내지 1몰%, 0.1 이상 내지 1미만 몰%, 0.25 이상 내지 1미만 몰%, 0.3 이상 내지 1미만 몰%, 0.4 이상 내지 1미만 몰%, 0.5 이상 내지 1미만 몰%, 0.1 내지 0.75몰%, 0.25 내지 0.75몰%, 0.3 내지 0.75몰%, 0.4 내지 0.75몰%, 0.5 내지 0.75몰%, 0.1 내지 0.5몰%, 0.25 내지 0.5몰%, 0.3 내지 0.5몰%, 0.4 내지 0.5몰%, 또는 0.5 내지 0.5몰% 상기 지질 나노입자에 포함될 수 있다.

[0074] 상기 범위로 상기 지질-PEG 접합체의 혼합물, 상기 만노스-PEG-지질 접합체, 및/또는 만노스-PEG-지질 접합체 외의 지질-PEG 접합체 (예를 들면, 세라마이드-PEG 접합체)를 포함하는 지질 나노입자는 (상기 범위 외의 함량으로 지질-PEG 접합체의 혼합물, 만노스-PEG-지질 접합체, 및/또는 만노스-PEG-지질 접합체 외의 지질-PEG 접합체를 포함하는 지질 나노입자 보다) 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:

- [0075] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;
- [0076] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며);
- [0077] (3) 간 조직, 및/또는 LSEC으로의 약물 전달 효율이 우수; 및/또는
- [0078] (4) LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수 (예를 들면, 간세포(hepatocyte) 보다 LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수함).

[0079] 일 예에 따르면, 상기 콜레스테롤은 10 내지 60몰%, 20 내지 60몰%, 30 내지 60몰%, 34.5 내지 60몰%, 35 내지 60몰%, 39.5 내지 60몰%, 40 내지 60몰%, 43 내지 60몰%, 44 내지 60몰%, 10 내지 55몰%, 20 내지 55몰%, 30

내지 55몰%, 34.5 내지 55몰%, 35 내지 55몰%, 39.5 내지 55몰%, 40 내지 55몰%, 43 내지 55몰%, 44 내지 55몰%, 10 내지 52.5몰%, 20 내지 52.5몰%, 30 내지 52.5몰%, 34.5 내지 52.5몰%, 35 내지 52.5몰%, 39.5 내지 52.5몰%, 40 내지 52.5몰%, 43 내지 52.5몰%, 44 내지 52.5몰%, 10 내지 51몰%, 20 내지 51몰%, 30 내지 51몰%, 34.5 내지 51몰%, 35 내지 51몰%, 39.5 내지 51몰%, 40 내지 51몰%, 43 내지 51몰%, 44 내지 51몰%, 10 내지 50몰%, 20 내지 50몰%, 30 내지 50몰%, 34.5 내지 50몰%, 35 내지 50몰%, 39.5 내지 50몰%, 40 내지 50몰%, 43 내지 50몰%, 44 내지 50몰%, 10 내지 45몰%, 20 내지 45몰%, 30 내지 45몰%, 34.5 내지 45몰%, 35 내지 45몰%, 39.5 내지 45몰%, 40 내지 45몰%, 43 내지 45몰%, 44 내지 45몰%, 10 내지 44.25몰%, 20 내지 44.25몰%, 30 내지 44.25몰%, 34.5 내지 44.25몰%, 35 내지 44.25몰%, 39.5 내지 44.25몰%, 40 내지 44.25몰%, 43 내지 44.25몰%, 44 내지 44.25몰%, 10 내지 44몰%, 20 내지 44몰%, 30 내지 44몰%, 34.5 내지 44몰%, 35 내지 44몰%, 39.5 내지 44몰%, 40 내지 44몰%, 43 내지 44몰%, 44 내지 44몰%, 10 내지 43몰%, 20 내지 43몰%, 30 내지 43몰%, 34.5 내지 43몰%, 35 내지 43몰%, 39.5 내지 43몰%, 40 내지 43몰%, 30 내지 60몰%, 30 내지 55몰%, 30 내지 52.5몰%, 30 내지 52몰%, 30 내지 51몰%, 30 내지 50몰%, 30 내지 47.5몰%, 30 내지 45몰%, 30 내지 44몰%, 30 내지 43.5몰%, 30 내지 43몰%, 30 내지 41.5몰%, 30 내지 40몰%, 30 내지 39.5몰%, 35 내지 60몰%, 35 내지 55몰%, 35 내지 52.5몰%, 35 내지 52몰%, 35 내지 51몰%, 35 내지 50몰%, 35 내지 47.5몰%, 35 내지 45몰%, 35 내지 44몰%, 35 내지 43.5몰%, 35 내지 43몰%, 35 내지 41.5몰%, 35 내지 40몰%, 35 내지 39.5몰%, 37 내지 60몰%, 37 내지 55몰%, 37 내지 52.5몰%, 37 내지 52몰%, 37 내지 51몰%, 37.5 내지 50몰%, 37.5 내지 47.5몰%, 37.5 내지 45몰%, 37.5 내지 44몰%, 37.5 내지 43.5몰%, 37.5 내지 43몰%, 37.5 내지 41.5몰%, 37.5 내지 40몰%, 37.5 내지 39.5몰%, 39.5 내지 60몰%, 39.5 내지 55몰%, 39.5 내지 52.5몰%, 39.5 내지 52몰%, 39.5 내지 51몰%, 39.5 내지 50몰%, 39.5 내지 47.5몰%, 39.5 내지 45몰%, 39.5 내지 44몰%, 39.5 내지 43.5몰%, 39.5 내지 43몰%, 39.5 내지 41.5몰%, 39.5 내지 40몰%, 40 내지 60몰%, 40 내지 55몰%, 40 내지 52.5몰%, 40 내지 52몰%, 40 내지 51몰%, 40 내지 50몰%, 40 내지 47.5몰%, 40 내지 45몰%, 40 내지 44몰%, 40 내지 43.5몰%, 40 내지 43몰%, 40 내지 41.5몰%, 41.5 내지 60몰%, 41.5 내지 55몰%, 41.5 내지 52.5몰%, 41.5 내지 52몰%, 41.5 내지 51몰%, 41.5 내지 50몰%, 41.5 내지 47.5몰%, 41.5 내지 45몰%, 41.5 내지 44몰%, 41.5 내지 43.5몰%, 41.5 내지 43몰%, 43 내지 60몰%, 43 내지 55몰%, 43 내지 52.5몰%, 43 내지 52몰%, 43 내지 51몰%, 43 내지 50몰%, 43 내지 47.5몰%, 43 내지 45몰%, 43 내지 44몰%, 43 내지 43.5몰%, 43.5 내지 60몰%, 43.5 내지 55몰%, 43.5 내지 52.5몰%, 43.5 내지 52몰%, 43.5 내지 51몰%, 43.5 내지 50몰%, 43.5 내지 47.5몰%, 43.5 내지 45몰%, 43.5 내지 44몰%, 45 내지 60몰%, 45 내지 55몰%, 45 내지 52.5몰%, 45 내지 52몰%, 45 내지 51몰%, 45 내지 50몰%, 45 내지 47.5몰%, 47.5 내지 60몰%, 47.5 내지 55몰%, 47.5 내지 52.5몰%, 47.5 내지 52몰%, 47.5 내지 51몰%, 47.5 내지 50몰%, 50 내지 60몰%, 50 내지 55몰%, 50 내지 52.5몰%, 50 내지 52몰%, 50 내지 52.5몰%, 50 내지 51.5몰%, 51 내지 60몰%, 51 내지 55몰%, 51 내지 52.5몰%, 또는 51 내지 52몰%, 51 내지 60몰%, 51 내지 55몰%, 51 내지 52.5몰%, 또는 51 내지 52몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.

[0080] 일 예에 따르면, 상기 지질-PEG접합체와 콜레스테롤의 함은 40 내지 60몰%, 40 내지 55몰%, 40 내지 53.5몰%, 40 내지 50몰%, 40 내지 47.5몰%, 40 내지 45몰%, 40 내지 44.5몰%, 42 내지 60몰%, 42 내지 55몰%, 42 내지 53.5몰%, 42 내지 50몰%, 42 내지 47.5몰%, 42 내지 45몰%, 42 내지 44.5몰%, 44 내지 60몰%, 44 내지 55몰%, 44 내지 53.5몰%, 44 내지 50몰%, 44 내지 47.5몰%, 44 내지 45몰%, 44 내지 44.5몰%, 44.5 내지 60몰%, 44.5 내지 55몰%, 44.5 내지 53.5몰%, 44.5 내지 50몰%, 44.5 내지 47.5몰%, 또는 44.5 내지 45몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.

[0081] 일 예에 따르면, 상기 이온화 가능한 지질은 10 내지 60몰%, 10 내지 55몰%, 10 내지 50몰%, 10 내지 45몰%, 10 내지 42.5몰%, 10 내지 40몰%, 10 내지 35몰%, 10 내지 30몰%, 10 내지 26.5몰%, 10 내지 25몰%, 10 내지 20몰%, 15 내지 60몰%, 15 내지 55몰%, 15 내지 50몰%, 15 내지 45몰%, 15 내지 42.5몰%, 15 내지 40몰%, 15 내지 35몰%, 15 내지 30몰%, 15 내지 26.5몰%, 15 내지 25몰%, 15 내지 20몰%, 20 내지 60몰%, 20 내지 55몰%, 20 내지 50몰%, 20 내지 45몰%, 20 내지 42.5몰%, 20 내지 40몰%, 20 내지 35몰%, 20 내지 30몰%, 20 내지 26.5몰%, 20 내지 25몰%, 25 내지 60몰%, 25 내지 55몰%, 25 내지 50몰%, 25 내지 45몰%, 25 내지 42.5몰%, 25 내지 40몰%, 25 내지 35몰%, 25 내지 30몰%, 25 내지 26.5몰%, 26.5 내지 60몰%, 26.5 내지 55몰%, 26.5 내지 50몰%, 26.5 내지 45몰%, 26.5 내지 42.5몰%, 26.5 내지 40몰%, 26.5 내지 35몰%, 26.5 내지 30몰%, 30 내지 60몰%, 30 내지 55몰%, 30 내지 50몰%, 30 내지 45몰%, 30 내지 42.5몰%, 30 내지 40몰%, 30 내지 35몰%, 35 내지 60몰%, 35 내지 55몰%, 35 내지 50몰%, 35 내지 45몰%, 35 내지 42.5몰%, 35 내지 40몰%, 40 내지 60몰%, 40 내지 55몰%, 40 내지 50몰%, 40 내지 45몰%, 40 내지 42.5몰%, 42.5 내지 60몰%, 42.5 내지 55몰%, 42.5 내지 50몰%, 또는 42.5 내지 45몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.

- [0082] 일 예에 따르면, 상기 인지질은 5 내지 30몰%, 5 내지 25몰%, 5 내지 20몰%, 5 내지 15몰%, 5 내지 13몰%, 5 내지 10몰%, 10 내지 30몰%, 10 내지 25몰%, 10 내지 20몰%, 10 내지 15몰%, 10 내지 13몰%, 15 내지 30몰%, 15 내지 25몰%, 15 내지 20몰%, 20 내지 30몰%, 또는 20 내지 25몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.
- [0083] 본 명세서에서 "몰%(mol%, 몰퍼센트)"는 특정 구성성분의 몰수를 전체 구성성분의 몰수의 합으로 나눈 후 100을 곱하여 퍼센트로 나타낸 것이고, 수식으로 표현하면 하기 수학적 식 1과 같다.
- [0084] (수학적 식 1)
- [0085]
$$\text{몰\%} = (\text{특정 구성성분의 몰수}) / (\text{전체 구성성분의 몰수의 합}) \times 100$$
- [0086] 상기 지질 나노입자는 이온화 가능한 지질 : 인지질 : 콜레스테롤 : 지질-PEG 접합체 혼합물을 20 내지 50 : 10 내지 30 : 30 내지 60 : 0.1 내지 5 의 몰비, 20 내지 50 : 10 내지 30 : 30 내지 60 : 0.5 내지 5 의 몰비, 20 내지 50 : 10 내지 30 : 30 내지 60 : 1.5 내지 3 의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 25 : 40 내지 50 : 0.5 내지 3의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 20 : 40 내지 55 : 0.5 내지 3 의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 20 : 40 내지 55 : 1.0 내지 1.5 의 몰비, 40 내지 45 : 10 내지 15 : 40 내지 45 : 0.5 내지 3.0의 몰비, 40 내지 45 : 10 내지 15 : 40 내지 45 : 0.5 내지 3의 몰비, 40 내지 45 : 10 내지 15 : 40 내지 45 : 1 내지 1.5의 몰비, 25 내지 30 : 17 내지 22; 50 내지 55 : 0.5 내지 3.0의 몰비, 25 내지 30 : 17 내지 22; 50 내지 55 : 1.0 내지 2.5의 몰비, 25 내지 30 : 17 내지 22; 50 내지 55 : 1.5 내지 2.5의 몰비로 포함하는 것일 수 있다. 상기 지질 나노입자에 포함되는 구성성분 중 지질-PEG 접합체 혼합물 및 콜레스테롤의 몰수의 합을 일정하게 유지하면서 지질-PEG 접합체 혼합물의 몰수를 증가시킨 만큼 콜레스테롤의 몰수를 감소시켜, 상기 구성성분의 몰비를 유지시킬 수 있다.
- [0087] 본 명세서에서, 몰비는 몰수 비를 의미한다.
- [0088] 상기 지질 나노입자는 이온화 가능한 지질 20 내지 50 중량부, 인지질 10 내지 30 중량부, 콜레스테롤 30 내지 60 중량부, 및 지질-PEG 접합체 혼합물 0.1 내지 5 중량부(또는 0.5 내지 5 중량부)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0089] 본 명세서에서, "중량부"는 각 성분이 포함된 중량 비율을 의미한다.
- [0090] 상기 지질 나노입자는 전체 나노입자 중량을 기준으로 이온화 가능한 지질 20 내지 50 중량%, 인지질 10 내지 30 중량%, 콜레스테롤 40 내지 60 중량%, 및 지질-PEG 접합체 혼합물 1.5 내지 3 중량%를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 지질 나노입자는 전체 나노입자 중량을 기준으로 이온화 가능한 지질 25 내지 50 중량%, 인지질 10 내지 20 중량%, 콜레스테롤 35 내지 55 중량%, 및 지질-PEG 접합체 혼합물 0.5 내지 5.0 중량%로 포함할 수 있다.
- [0091] 상기 범위(몰비, 중량부, 및/또는 중량%)로 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및/또는 지질-PEG 접합체 혼합물을 포함하는 지질 나노입자는 상기 범위 외로 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및/또는 지질-PEG 접합체 혼합물을 포함하는 지질 나노입자 보다 (i) 지질 나노입자의 안정도 (ii) 약물의 봉입률, 및/또는 (iii) 간 조직, 및/또는 LSEC을 타겟하는 약물 전달 효율이 우수할 수 있다.
- [0092] 일 예에 따른 지질 나노입자는 간조직, 및/또는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cells) 내 도입이 용이하도록 평균 지름이 20nm 내지 200nm, 20 내지 180nm, 20nm 내지 170nm, 20nm 내지 150nm, 20nm 내지 120nm, 20nm 내지 100nm, 20nm 내지 90nm, 30nm 내지 200nm, 30 내지 180nm, 30nm 내지 170nm, 30nm 내지 150nm, 30nm 내지 120nm, 30nm 내지 100nm, 30nm 내지 90nm, 40nm 내지 200nm, 40 내지 180nm, 40nm 내지 170nm, 40nm 내지 150nm, 40nm 내지 120nm, 40nm 내지 100nm, 40nm 내지 90nm, 50nm 내지 200nm, 50 내지 180nm, 50nm 내지 170nm, 50nm 내지 150nm, 50nm 내지 120nm, 50nm 내지 100nm, 50nm 내지 90nm, 60nm 내지 200nm, 60 내지 180nm, 60nm 내지 170nm, 60nm 내지 150nm, 60nm 내지 120nm, 60nm 내지 100nm, 60nm 내지 90nm, 70nm 내지 200nm, 70 내지 180nm, 70nm 내지 170nm, 70nm 내지 150nm, 70nm 내지 120nm, 70nm 내지 100nm, 70nm 내지 90nm, 80nm 내지 200nm, 80 내지 180nm, 80nm 내지 170nm, 80nm 내지 150nm, 80nm 내지 120nm, 80nm 내지 100nm, 80nm 내지 90nm, 90nm 내지 200nm, 90 내지 180nm, 90nm 내지 170nm, 90nm 내지 150nm, 90nm 내지 120nm, 또는 90nm 내지 100nm일 수 있다. 지질 나노입자 크기가 상기 범위 보다 작은 경우, 지질 나노입자의 표면적이 과대하게 증가됨으로서 안정성 유지가 어렵고, 이에 따라 표적 조직으로의 전달 및/또는 약물 효과가 감소될 수 있다.
- [0093] 일 예에서, 20 내지 200nm, 20내지 180 nm, 40 내지 180nm, 40 내지 170nm, 50 내지 160nm, 70 내지 180nm, 70

내지 170nm, 75 내지 170nm, 75 내지 165nm, 70 내지 150nm, 70 내지 130nm, 75 내지 130nm, 80 내지 120nm, 85 내지 120nm, 약 90 내지 120nm, 90 내지 110nm, 90 내지 100nm, 80 내지 110nm, 80 내지 100nm, 85 내지 95nm, 약 90nm, 또는 90nm 의 지름을 갖는 지질 나노입자의 경우 LSEC으로의 타겟팅 효과가 (상기 범위 외의 지름을 갖는 나노입자 보다) 우수한 것일 수 있다.

- [0094] 상기 지질 나노입자는 간 조직을 특이적으로 표적화하는 것일 수 있다. 일 예에 따른 지질 나노입자는 천연 지단백질의 대사 거동을 매우 유사하게 모방할 수 있으며, 간에 의한 지질 대사 과정 및 이를 통한 치료 메커니즘에 유용하게 적용될 수 있다.
- [0095] 상기 지질 나노입자는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cell)을 표적화하는 것일 수 있다. 상기 지질 나노입자에 포함된 지질-PEG 접합체 혼합물의 함량이 0.1 내지 15몰%, 0.25 내지 15몰%, 0.5 내지 15몰%, 1 내지 15몰%, 1.5 내지 15몰%, 2 내지 15몰%, 2.5 내지 15몰%, 3 내지 15몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 2.5 내지 10몰%, 3 내지 10몰%, 0.1 내지 9몰%, 0.25 내지 9몰%, 0.5 내지 9몰%, 1 내지 9몰%, 1.5 내지 9몰%, 2 내지 9몰%, 2.5 내지 9몰%, 3 내지 9몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 2.5 내지 7.5몰%, 3 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 2.5 내지 5몰%, 3 내지 5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 2.5 내지 4.5몰%, 3 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 2.5 내지 4몰%, 3 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 1 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 2 내지 3.5몰%, 2.5 내지 3.5몰%, 3 내지 3.5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 또는 2.5 내지 3몰%인 경우 상기 지질 나노입자의 LSEC 로의 약물 전달 효율(LSEC 타겟 효율) 이 우수해질 수 있다.
- [0096] 본 명세서에서, 상기 지질 나노입자가 간조직, 및/또는 LSEC으로 "표적화(targeting)", 또는 위치화(localization)"한다는 것은 조직 내 또는 세포 내에 내재화(internalization)하는 것일 수 있고, 핵막도 투과할 수 있어 핵 내부에 내재화하는 것을 의미할 수 있다.
- [0098] 다른 양태로서, (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합(음이온성 약물 및 핵산의 조합)을 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다. 상기 약물은 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합(음이온성 약물 및 핵산)일 수 있다.
- [0099] 상기 약물 전달용 조성물은 상기 지질 나노입자 내부에 음이온성 약물 및/또는 핵산 등의 생리활성물질이 봉입되어 있는 것일 수 있으며, 음이온성 약물 및/또는 핵산 등의 생리활성물질이 안정적이고 높은 효율로 봉입되어 상기 전달용 조성물에 의해 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있다. 또한, 상기 지질 나노입자 내부에 봉입되는 약물의 종류를 치료 목적에 따라 다양하게 조절할 수 있는 장점이 있다.
- [0100] 상기 지질 나노입자는 음이온성 약물 및/또는 핵산이 (지질 나노입자의) 내부에 봉입된 것일 수 있다. 음이온성 약물 및/또는 핵산이 (지질 나노입자의 내부에) 봉입된 지질 나노입자에 대한 것은 전술한 지질 나노입자에 대한 것과 동일하다.
- [0101] 일 예에서, 상기 지질 나노입자에 포함된 이온화 가능한 지질 및 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합)의 중량비는 1 내지 20 : 1, 1 내지 15 : 1, 1 내지 10 : 1, 5 내지 20 : 1, 5 내지 15 : 1, 5 내지 10 : 1, 7.5 내지 20 : 1, 7.5 내지 15 : 1, 또는 7.5 내지 10 : 1 일 수 있다.
- [0102] 일 예에서, 상기 범위 내의 중량비로 (1) 이온화 가능한 지질; 및 (2) 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합)을 포함하면, 지질 나노입자 내부에 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합)의 봉입률 및/또는 약물 전달 효율이 상기 범위 밖의 중량비로 (1) 이온화 가능한 지질; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는 지질 나노입자 보다 높을 수 있다.
- [0103] 일 예에서, 상기 조성물은 CD206 양성 세포 및/또는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cell) 특이적으로 약물을 전달할 수 있다.
- [0104] 상기 음이온성 약물 및/또는 핵산이 봉입된 지질 나노입자는 간조직, CD206 양성 세포, 및/또는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cells) 내 도입이 용이하도록 평균 지름이 20nm 내지 200nm, 20 내지 180nm, 20nm 내지 170nm, 20nm 내지 150nm, 20nm 내지 120nm, 20nm 내지 100nm, 20nm 내지 90nm, 30nm 내지 200nm, 30 내지 180nm, 30nm 내지 170nm, 30nm 내지 150nm, 30nm 내지 120nm, 30nm 내지 100nm, 30nm 내지 90nm, 40nm 내지 200nm, 40 내지 180nm, 40nm 내지 170nm, 40nm 내지 150nm, 40nm 내지 120nm, 40nm 내지 100nm, 40nm 내지

90nm, 50nm 내지 200nm, 50 내지 180nm, 50nm 내지 170nm, 50nm 내지 150nm, 50nm 내지 120nm, 50nm 내지 100nm, 50nm 내지 90nm, 60nm 내지 200nm, 60 내지 180nm, 60nm 내지 170nm, 60nm 내지 150nm, 60nm 내지 120nm, 60nm 내지 100nm, 60nm 내지 90nm, 70nm 내지 200nm, 70 내지 180nm, 70nm 내지 170nm, 70nm 내지 150nm, 70nm 내지 120nm, 70nm 내지 100nm, 70nm 내지 90nm, 80nm 내지 200nm, 80 내지 180nm, 80nm 내지 170nm, 80nm 내지 150nm, 80nm 내지 120nm, 80nm 내지 100nm, 80nm 내지 90nm, 90nm 내지 200nm, 90 내지 180nm, 90nm 내지 170nm, 90nm 내지 150nm, 90nm 내지 120nm, 또는 90nm 내지 100nm 일 수 있다.

[0105] 상기 범위의 하한 값 보다 지질 나노입자의 크기가 작은 경우, (i) 지질 나노입자가 체순환(systemic circulation)시 혈액 내에 존재하는 아포지단백(apolipoprotein)(예를 들면, ApoE(예를 들면, ApoE3))의 결합이 감소되어 세포 안으로 들어가는 지질 나노입자의 수가 감소될 수 있고/있거나 (ii) 지질 나노입자의 표면적이 과대하게 증가됨으로서 안정성 유지가 어려워, 이에 따라 표적 조직(또는 표적 세포)으로의 약물 전달 효율 및/또는 지질 나노입자가 운반하는 약물의 치료 효과가 감소될 수 있다.

[0106] 일 예에서, 상기 범위 내의 지름을 갖는 지질 나노입자는 상기 범위의 상한 값을 초과하는 지름을 갖는 지질 나노입자 보다 타겟 장기 및/또는 세포로의 약물 전달 효율이 우수할 수 있다.

[0107] 일 예에 따르면, 상기 LSEC으로의 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자는 전술한 범위로 지질-PEG 접합체 혼합물, 만노스-PEG 지질 접합체, 및/또는 만노스-PEG 지질 접합체 외의 지질-PEG 접합체 (예를 들면, 세라마이드-PEG 접합체)를 포함할 수 있고, 상기 지질-PEG 접합체 혼합물, 만노스-PEG 지질 접합체, 및/또는 만노스-PEG 지질 접합체 외의 지질-PEG 접합체 (예를 들면, 세라마이드-PEG 접합체)를 포함하는 지질 나노입자는 LSEC 특이적인(또는 LSEC을 타겟하는) 약물 전달 효율이 우수한 것일 수 있다.

[0108] 일 예에 따르면, 상기 LSEC으로의 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자는 전술한 범위(몰비, 중량부, 및/또는 중량%)로 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및/또는 지질-PEG 접합체 혼합물을 포함하는 지질 나노입자는 상기 범위 외로 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및/또는 지질-PEG 접합체 혼합물을 포함하는 지질 나노입자 보다 LSEC 특이적인(또는 LSEC을 타겟하는) 약물 전달 효율이 우수한 것일 수 있다.

[0109] 일 예에 따른 지질 나노입자는 간 조직 특이적인 특성을 통해 고효율적으로 치료제를 간 조직 내부, 및/또는 LSEC으로 전달할 수 있으며, 이러한 고효율의 간 조직, 및/또는 LSEC특이적 지질 나노입자를 매개한 간질환 치료용 약물, 치료용 유전자 등의 전달 방법 및 간을 통해 매개되는 치료제 등에 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 일 예에 따른 지질 나노입자는 핵산 등의 유전자 약물과 안정된 복합체를 형성하고 낮은 세포독성 및 효과적인 세포 흡수성을 나타내므로, 핵산 등의 유전자 약물을 전달하는데 효과적일 수 있다.

[0110] 상기 지질 나노입자는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0111] 일 예에 따른 지질 나노입자는 5 내지 8, 5.5 내지 7.5, 6 내지 7, 또는 6.5 내지 7의 pKa를 나타냄으로써 산성 pH 조건에서 양전하를 나타내어 음전하를 나타내는 핵산 및 음이온성 약물(예를 들면, 단백질) 등의 치료제와 정전기적 상호작용을 통해 용이하게 약물과의 복합체를 형성하여 높은 효율로 약물을 봉입할 수 있으며, 약물(예를 들면, 핵산)의 세포 내 또는 생체 내 약물 전달용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0112] 본 명세서에서, "봉입(encapsulation)"은 전달물질을 둘러싸서 효율적으로 생체 내로 함입시키기 위해 캡슐화하는 것을 말하고, 약물 봉입률(캡슐화 효율, Encapsulation efficiency)은 제조에 사용된 전체 약물 함량에 대하여 지질 나노입자 내에 봉입된 약물의 함량을 의미한다.

[0113] 상기 전달용 조성물의 음이온성 또는 핵산 약물의 봉입률은 70% 이상, 75%이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 80% 초과 내지 99% 이하, 80% 초과 내지 97% 이하, 80% 초과 내지 95% 이하, 85% 이상 내지 95% 이하, 87% 이상 내지 95% 이하, 90% 이상 내지 95% 이하, 91% 이상 내지 95% 이하, 91% 이상 내지 94% 이하, 91% 초과 내지 95% 이하, 92% 이상 내지 99% 이하, 92% 이상 내지 97% 이하, 또는 92% 이상 내지 95% 이하일 수 있다.

[0114] 일 예에 따르면, 상기 봉입률은 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 계산될 수 있으며, 예를 들면, 상기 약물 봉입률은 일 예에 따른 지질 나노입자에 Triton-X를 처리하고, Triton-X가 처리되고, Triton-X가 처리되지 않은 지질 나노입자의 형광강도를 특정 파장 대역폭(예를 들면, excitation : 480 ~ 490nm, emission : 520 ~ 530nm)를 측정하고, 하기 수학적 식 2에 의해 계산된 것일 수 있다.

[0115] (수학적 식 2)

[0116] 약물 봉입률(%)=(Triton-X가 처리된 지질 나노입자의 형광강도(형광도)- Triton-X가 처리되지 않은 지질 나노입

자의 형광강도(형광도))/(Triton-X가 처리된 지질 나노입자의 형광강도(형광도)) X 100

- [0117] 일 예에 따른 약물 전달용 조성물은 Cas9 mRNA를 높은 봉입률로 포함할 수 있다. 기존에 알려진 Cas9 mRNA 전달용 조성물은 낮은 비율로 Cas9 mRNA를 포함하여 Cas9 mRNA 전달용 조성물로 활용하는데 한계가 있었다. 이와 달리, 일 예에 따른 지질 나노입자는 높은 봉입률로, 구체적으로 70% 이상의 봉입률로 Cas9 mRNA를 포함할 수 있으며, 이에 따라 유전자 교정치료에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0118] 상기 음이온성 약물은 음이온을 띠는 각종 펩타이드, 단백질 약물, 단백질-핵산 구조체 또는 히알루로닉산-펩타이드 접합체, 히알루로닉산-단백질 접합체 등의 음이온성 생체고분자-약물 접합체 등일 수 있다. 상기 단백질 약물의 비제한적인 예로는, 유전자 교정가위인 Cas 9, cpf1 등의 유전자 교정 단백질을 비롯하여 세포사멸 유도인자(예컨대, cytochrome C, caspase 3/7/8/9 등) 및 다양한 세포내 단백질(예컨대, 전사인자) 등일 수 있다.
- [0119] 상기 핵산은 소간섭리보핵산(siRNA), 리보솜 리보핵산(rRNA), 리보핵산(RNA), 디옥시리보핵산(DNA), 상보성 디옥시리보핵산(cDNA), 앵타머(aptamer), 전령 리보핵산(mRNA), 운반 리보핵산(tRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA, DNAzyme, 및 유전자교정을 위한 sgRNA 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0120] 본 명세서에서 용어 "siRNA"란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 이중 가닥 RNA(duplex RNA), 혹은 단일 가닥 RNA 내부에서 이중 가닥의 형태를 띠는 단일 가닥 RNA를 지칭한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹-다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다. 이중 가닥 사이의 결합은 뉴클레오티드 간의 수소결합을 통해 이루어지고, 이중 가닥 내부의 모든 뉴클레오티드가 상보적으로 완전 결합해야 하는 것은 아니다.
- [0121] siRNA의 길이는 약 15 내지 60개, 구체적으로 약 15 내지 50개, 약 15 내지 40개, 약 15 내지 30개, 약 15 내지 25개, 약 16 내지 25개, 약 19 내지 25개, 약 20 내지 25개, 또는 약 20 내지 23개 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 siRNA 길이는 이중 가닥 RNA의 한쪽 뉴클레오티드의 갯수, 즉, 염기쌍의 갯수를 의미하며, 단일 가닥 RNA인 경우에는 단일 가닥 RNA 내부의 이중 가닥의 길이를 의미한다. 또한 siRNA는 혈중 안정성을 증가시키거나 면역 반응을 약화시키는 등의 목적을 위해 다양한 작용기를 도입한 뉴클레오티드로 이루어질 수 있다.
- [0122] 본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오티드 골격은 포스포포티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄헤테로아톰릭, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히, 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-테아자구아닌, N6(6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.
- [0123] 본 명세서에서, "단일가닥 디옥시리보핵산(ssDNA)"은 특정 타겟 DNA에 선택적으로 결합하여 안티진(antigene) 효과를 유도하는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0124] 본 명세서에서, "앵타머(aptamer)"는 특정 타겟에 결합하는 올리고뉴클레오티드(일반적으로, 20 ~ 80 nt DNA 혹은 RNA)를 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에서 "앵타머"는 올리고뉴클레오티드 앵타머(예컨대, DNA 혹은 RNA aptamer)를 의미한다.
- [0125] 본 명세서에서, "mRNA"는 유전자를 발현 가능한 합성 mRNA(in vitro transcribed mRNA)를 의미한다.
- [0126] 본 명세서에서, "shRNA"는 단일 가닥으로 50 내지 70개로 구성된 뉴클레오티드를 의미하며, in vivo 상에서 스템-루프(stemloop) 구조를 이루고 있다. 5 내지 10개의 뉴클레오티드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19 내지 29개의 뉴클레오티드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.
- [0127] 본 명세서에서, "miRNA(microRNA)"는 유전자 발현을 조절하며, 전장 21 내지 23개의 뉴클레오티드로 구성된 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다. miRNA는 세포 내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오티드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2 이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.

- [0128] 본 명세서에서, "리보자임(ribozyme)"은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA이다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.
- [0129] 본 명세서에서, "DNAzyme"은 효소 활성을 가지는 단일 가닥 DNA 분자로, 10 내지 23개의 뉴클레오티드로 구성된 DNAzyme(10-23 DNAzyme)은 생리적으로 유사한 조건 하에서 RNA가닥을 특정위치에서 절단한다. 10-23 DNAzyme은 염기쌍을 이루지 않고 노출된 어떠한 퓨린 및 피리미딘 사이를 절단한다. 10-23 DNA효소(DNAzyme)는 15개의 보존된 염기 서열(예를 들면, 5'-GGCTAGCTACAACGA-3')로 이루어진 효소의 활성부위(catalytic domain) 및 상술한 효소의 활성부위 좌우로 RNA 기질을 인식하는 7 ~ 8개의 DNA 염기서열로 이루어진 기질인식 자리(RNA substrate binding domain)로 구성된다.
- [0130] 본 명세서에서, "PNA(Peptide nucleic acid)"는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.
- [0131] 본 명세서에서, "sgRNA"는 특정 DNA 타겟에 결합하는 올리고뉴클레오티드(일반적으로, RNA 분자)로 crispr RNA(crRNA)와 tracer(tracrRNA)의 복합 단일 RNA 분자를 의미한다. CRISPR system에서 Cas9 nuclease와 함께 특정 DNA 서열을 인식하는데 이용이 되며 선택적인 유전자 절단을 가능케 하는 RNA분자로서, 대략 DNA와 상보적으로 결합이 가능한 20-nt 서열을 포함하며, 총 길이는 100 nt이다.
- [0132] 본 명세서에서, "유전자 교정 단백질"은 Cas9, spCas9, cjCas9, casX, CasY 및 Cpf1 등을 일컬으며, sgRNA와 함께 타겟 DNA 염기 배열을 인식하여 DNA 절단을 일으키는 단백질을 말한다.
- [0133] 일 예에 따른 지질 나노입자에 의하여 약물 및/또는 핵산이 전달되는 표적 세포는 생체 내의 또는 생체에서 분리된 LSEC일 수 있다. 일 예에 따른 약물 전달용 조성물 및/또는 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합) 및 지질 나노입자와의 복합체는 LSEC를 타겟팅하거나 특이적으로 표적화하는 것일 수 있다. 따라서, 일 예에 따른 지질 나노입자 또는 상기 지질 나노입자를 포함하는 약물 핵산 전달용 조성물은 간 섬유화, 간경변, 간염(예컨대, A형 간염, B형 간염, C 간염 등) 등의 급성 또는 만성 간질환 치료를 위한 것일 수 있으며, 또한 간을 통해 흡수되는 치료제(약물)의 전달용 조성물로서 활용될 수 있다.
- [0135] 또 다른 양태는 (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는, 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0136] 상기 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 포함되는 지질 나노입자에 대해서는 전술한 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자에 대한 것과 동일하다.
- [0137] 상기 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 포함되는 음이온성 약물 및 핵산에 대해서는 전술한 약물 전달용 조성물에 포함되는 음이온성 약물 및 핵산에 대한 것과 동일하다.
- [0138] 일 예에 따른 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 내부에 음이온성 약물 및/또는 핵산이 봉입된 지질 나노입자를 포함할 수 있다.
- [0139] 상기 간질환은 B형 간염(Hepatitis B virus infection), 급성 간부전(Acute liver failure), 간경변(Cirrhosis), 간 섬유화(liver fibrosis), 혈우병 A, 출혈성 괴사(hemorrhagic necrosis), 급성 간부전(acute liver failure), 및 간 재생(liver regeneration)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0140] 상기 음이온성 약물은 간질환 예방 또는 치료 효과를 갖는 것일 수 있다.
- [0141] 상기 핵산은 간질환 예방 또는 치료 효과를 갖는 것일 수 있으며, 예를 들면, (1) TTR(Transthyretin)((e.g.,

인간 TTR(단백질: GenBank Accession Nos. NP_000362.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_000371.4등), 마우스 TTR(단백질: GenBank Accession No.: NP_038725.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_013697.5 등)), (2) PCSK9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)((e.g., 인간 PCSK9 (단백질: GenBank Accession Nos. NP_777596.2; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_174936.4등), 마우스 PCSK9(단백질: GenBank Accession No. NP_705793.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_153565.2 등)), (3) HBV(Hepatitis B Virus) (예를 들면, HBV genotype A (e.g., GenBank Accession No.: X02763, X51970, 또는 AF090842); HBV genotype B(e.g., GenBank Accession No.: D00329, AF100309, 또는AB033554); HBV genotype C(e.g., GenBank Accession No.: X04615, M12906, AB014381, AB042285, AB042284, AB042283, AB042282, AB026815, AB026814, AB026813, AB026812, 또는 AB026811); HBV genotype D(e.g., GenBank Accession No.: X65259, M32138, 또는 X85254); HBV genotype E(e.g., GenBank Accession No.: X75657 또는 AB032431); HBV genotype F(e.g., GenBank Accession No.: X69798, AB036910, 또는 AF223965); HBV genotype G(e.g., GenBank Accession No.: AF160501, AB064310, 또는AF405706) HBV genotype H(e.g., AY090454, AY090457, 또는 AY090460) (4) Bax(BCL2 associated X))((e.g., 인간 Bax (단백질: GenBank Accession Nos. NP_001278357.1, NP_001278358.1, NP_001278359.1, NP_001278360.1, NP_004315.1 ; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_001291428.2, NM_001291429.2, NM_001291430.1, NM_001291431.2, NM_004324.4 등), 마우스 Bax (단백질: GenBank Accession No. NP_031553.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_007527.3 등), (5) VEGF(Vascular endothelial growth factor) (예를 들면, VEGFA((e.g., 인간 VEGFA (단백질: GenBank Accession Nos. NP_001020537.2, NP_001020538.2, NP_001020539.2, NP_001020540.2, NP_001020541.2; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_003376.6, NM_001025366.3, NM_001025367.3, NM_001025368.3, NM_001025369.3 등), 마우스 VEGFA(단백질: GenBank Accession No. NP_001020421.2, NP_001020428.2, NP_001103736.1, NP_001103737.1, NP_001103738.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_001025250.3, NM_001025257.3, NM_001110266.1, NM_001110267.1, NM_001110268.1 등); VEGFB((e.g., 인간 VEGFB(단백질: GenBank Accession Nos. NP_001230662.1, NP_003368.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_003377.5, NM_001243733.2 등), 마우스 VEGFB(단백질: GenBank Accession No. NP_001172093.1, NP_035827.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_001185164.1, NM_011697.3 등); VEGFC(e.g., 인간 VEGFC(단백질: GenBank Accession Nos. NP_005420.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_005429.5 등), 마우스 VEGFC(단백질: GenBank Accession No.: NP_033532.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_009506.2 등)), 및/또는 (6) PDGF(Platelet-derived growth factor)(예를 들면, PDGFA((e.g., 인간 PDGFA (단백질: GenBank Accession Nos. NP_002598.4, NP_148983.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_002607.5, NM_033023.4 등), 마우스 PDGFA(단백질: GenBank Accession No. NP_032834.1, NP_001350200.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_008808.4, NM_001363271.1 등)); PDGFB((e.g., 인간 PDGFB(단백질: GenBank Accession Nos. NP_002599.1, NP_148937.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_033016.3, NM_002608.4 등), 마우스 PDGFB(단백질: GenBank Accession No. NP_035187.2; 유전자: GenBank Accession No. NM_011057.4 등)); PDGFC((e.g., 인간 PDGFC (단백질: GenBank Accession Nos. NP_057289.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_016205.3 등), 마우스 PDGFC(단백질: GenBank Accession No. NP_064355.1, NP_001344675.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_019971.3, NM_001357746.1 등)); PDGFD(e.g., 인간 PDGFD(단백질: GenBank Accession Nos. NP_079484.1, NP_149126.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_033135.4, NM_025208.5 등), 마우스 PDGFD(단백질: GenBank Accession No. NP_082200.1, NP_001344326.1, NP_001344327.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_027924.3, NM_001357397.1, NM_001357398.1 등))의 발현을 억제할 수 있는 siRNA 및/또는 miRNA일 수 있다.

- [0142] 상기 약학적 조성물은 사람을 포함하는 포유동물에 비경구 투여를 포함한 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 비경구 투여는 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0143] 일 예에 따른 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0144] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0145] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0146] 일 예에 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 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일 예에 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 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0147] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0148] 일 구체예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물에 포함된 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합)의 농도를 기준으로 0.1 내지 100mg/kg, 0.1 내지 50mg/kg, 1 내지 10mg/kg, 또는 1 내지 5mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0149] 일 예에 따른, 지질 나노입자는 간 조직 및/또는 LSEC 특이적이고 생체 친화도가 우수하며, 고효율로 유전자 치료제 등을 전달할 수 있어 지질 나노입자 매개 유전자 치료 등 관련 기술분야에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0150] 도 1은 일 예에 따른 만노스를 포함하는 지질 나노입자의 예시적인 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 CDC₁₃에서 246-C10의 ¹H NMR (실온, 400MHz) 결과를 나타낸다.

도 3a(241-C10 LNP 내지 243-C10 LNP) 및 도 3b(244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP)는 각 지질 나노입자가 pH 4.1 내지 pH 9.6 범위를 갖는 용액에서 나타나는 형광 강도를 측정된 결과를 나타낸다.

도 4a 및 도 4b는 각 나노입자의 세포 내 유전자 전달 효율을 나타내는 결과이다. 구체적으로, 도 4a는 루시페라제를 코딩하는 mRNA(luc mRNA)를 봉입한 LNP를 HeLa cell에 형질전환 시킨 후 세포를 용해시켜 측정된 발광 강도를 나타내고, 도 4b는 luc mRNA를 봉입한 LNP를 간세포(Hepatocyte)에 형질전환 시킨 후 세포를 용해시켜 측정된 발광 강도를 나타낸다. 도 4b에서 +ApoE는 ApoE3을 처리한 군을 의미하고, -ApoE는 ApoE3을 처리하지 않은 군을 의미한다.

도 5a는 Luc mRNA가 봉입된 244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP가 투여된 마우스에서 생체 내 약물전달 분포를 나타내고, 도 5b는 Luc mRNA가 봉입된 246-C10 LNP가 투여된 마우스에서 적출된 마우스의 각 기관에 대한 약물전달 분포를 나타낸다.

도 6a는 1.0 내지 2.5몰%로 지질-PEG를 포함하는 246-C10 LNP가 투여된 마우스에서 생체 내 약물전달 분포를 나타내고, 도 6b는 지질 나노입자에 포함된 지질-PEG함량에 따른, 지질 나노입자의 약물전달 효율 및 나노입자의 크기를 나타낸다.

도 7은 지질 나노입자에 봉입되어 투여된 siFVII의 농도에 따른 간세포(hepatocyte) 타겟 가능성을 FVII의 발현양을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 8은 지질 나노입자에 포함된 지질-PEG 함량에 따른 지질 나노입자의 지질 나노입자의 크기와 PDI 수치를 나타내고(좌측 표), 생체 내 간세포(hepatocyte)로의 약물 전달 효율을 FVII의 발현양을 통해 확인한 결과(우측 그래프)를 나타낸다.

도 9는 지질 나노입자에 포함된 지질-PEG 함량에 따른 지질 나노입자의 크기와 PDI 수치를 나타내고(좌측 표), 생체 내 LSEC으로의 약물 전달 효율을 FVIII의 발현양을 통해 확인한 결과(우측 그래프)를 나타낸다.

도 10은 지질-PEG 함량에 따른 각 나노입자의 세포 내 유전자 전달 효율을 나타내는 결과이다. 1.5 내지 5.0몰%로 지질-PEG를 포함하는 siFLuc이 봉입된 246-C10 LNP를 Luciferase을 발현하는 HeLa-Luc에 처리 후 약물 전달 효율을 감소된 luminescence을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 11은 만노스-PEG-지질 접합체가 포함된 나노입자의 우수한 약물 전달 효율을 PEG-지질 접합체만 포함한 지질

나노입자 대비 luc mRNA 발현야을 통해 나타내는 결과이다. 를 나타낸다.

도 12는 만노스 의존적인 HepG2 세포로의 나노입자를 luc mRNA 발현을 통해 나타내는 결과이다. 도 12a는 CD206 리셉터 항체 처리가 된 HepG2 세포에서 만노스 PEG 가 포함된 LNP의 감소된 세포 내로의 이행을 나타낸다.

도 12b는 CD206 리셉터 항체 처리가 된 HepG2 세포에서 갈락토오스 (만노스 이성질체) PEG 가 포함된 LNP의 감소되지 않은 세포 내로의 이행을 나타낸다.

도 13a는 만노스-PEG-지질 접합체가 포함된 cre mRNA가 봉입된 나노입자의 LSL-tdTomato 마우스 모델에서 간의로의 선택적 이행을 Tomato 형광 발현을 통해 나타낸다.

도 13b는 만노스-PEG-지질 접합체가 포함된 cre mRNA가 봉입된 나노입자의 LSL-tdTomato 마우스 모델에서 LSEC 특이적 전달을 간혈관을 따라 발현한 Tomato 형광을 통해 나타낸다.

도 13c는 cre mRNA가 봉입된 지질-PEG 접합체만 포함한 LNP 대비 우수한 만노스-PEG-지질 접합체가 포함된 나노입자의 LSEC에서의 transfection efficiency을 나타낸다.

도 14는 만노스-PEG-지질 접합체가 포함된 지질 나노입자에 봉입되어 투여된 siFVIII의 LSEC 타겟 가능성을 FVIII의 발현양을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 15은 만노스-PEG-지질 접합체가 포함된 지질 나노입자에 봉입되어 투여된 siFVII의 간세포 (hepatocyte)로의 비이행을 FVII의 발현양을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 16은 만노스-PEG-지질 접합체를 포함하는 지질 나노입자에 봉입되어 투여된 siFIII의 농도에 따른 LSEC 타겟 가능성을 지질-PEG 접합체만 포함하는 지질 나노입자 대비 FVIII의 발현양을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0151] 본 발명은 하기 실시예를 들어 더욱 자세히 설명할 것이나, 하기 실시예로 권리범위가 한정되는 의도는 아니다.

[0153] **실시예 1. 이온화 가능한 지질(ionizable lipid)의 제조**

[0154] **실시예 1-1. 이온화 가능한 지질의 제조**

[0155] 6원의 헥테로고리 3차 아민을 포함하는 하기 표 1의 아민계 화합물 및 1,2-epoxidodecane(이하, C10)(Sigma-Aldrich, USA)을 1:n (n = 1차 아민 x 2 + 2차 아민 x 1)의 몰비로 반응시켜 이온화 가능한 지질을 합성하였다.

표 1

Name	화학식
241	
242	
243	
244	
245	
246	

[0156]

[0157] 구체적으로, 5ml 바이알에 상기 표 1의 241 내지 246 아민 각각과 에폭시드(C10)를 1:n (n = 1차 아민 x 2 + 2차 아민 x 1)의 몰비로 마그네틱바와 함께 첨가하여 교반기에서 750rpm, 90℃로 3일 동안 반응시켰다. 이후

WELUX fine silica column(Intertec, 한국)으로 정제 후 상기 반응에 의해 생성된 각 이온화 가능한 지질의 분자량을 계산하고 에탄올을 사용하여 100mg/ml의 농도로 맞춰 보관하였다. 241 아민과 C10을 이용하여 제조한 이온화 가능한 지질을 ‘241-C10’ 으로 명명하고, 다른 종류의 아민을 사용하여 제조한 이온화 가능한 지질도 마찬가지로 ‘사용된 아민 이름(241 내지 246)-C10’ 으로 명명하였다.

[0159] 실시예 1-2. 생성된 이온화 가능한 지질의 확인

[0160] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질을 확인하기 위하여, ¹H NMR을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 1-1에서 합성된 이온화 가능한 지질(246-C10) 5µg을 CDCl₃(sigma, USA) 0.5ml에 희석하여 100mmole 농도가 되도록 준비하였다. 이후 400MHz NMR 전용 튜브에 0.5ml씩 넣고 상부를 막은 후 파라필름으로 실링하여 Agilent 400MHZ FT-NMR(Agilent, USA)을 이용하여 NMR spectra를 얻었고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 246-C10의 각 작용기를 나타내는 신호가 포화된 것을 알 수 있었다.

[0162] 또한, 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질(241-C10 내지 246-C10)을 확인하기 위하여, MS분석을 수행하였다. 구체적으로, 이온화 가능한 지질은 0.5ppm 이하 농도로 에탄올에 희석하여 MS 분석을 수행하였다. 분석에 사용된 기기는 Agilent Technologies사 (Palo Alto, USA)의 6230 LC/MS로 분리관은 Agilent Technologies사 Zorbax SB-C18(100 mm×2.1 mm i.d., 3.5 µm)를 사용하였고, 이동상으로 0.1% 개미산이 포함된 증류수(A)와 아세트오닐트릴(B)의 두 가지 용매를 기울기 용리하였다. 이동상의 용매 기울기는 처음 유기용매 아세트오닐트릴(B)의 비율을 30% 에서 시작하여 2분까지 80%까지 올린 후 다시 유기용매의 비율이 30%까지 낮추고 안정화될 때까지 4분간 유지하였다. 이동상의 유속은 300µl/min이며, 이때 분석기기 주입량은 2µl였다. MS분석을 수행한 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 표 2에 나타난 바와 같이 이온화 가능한 지질의 측정된 m/z ratio와 계산된 m/z ratio가 거의 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

표 2

[0163]

	Chemical formula	Calculated m/z ratio	Observed m/z ratio
241-C10	C ₃₂ H ₆₆ N ₂ O ₂	510.87864	511.5201
242-C10	C ₃₁ H ₆₄ N ₂ O ₂	496.85206	497.5043
243-C10	C ₃₁ H ₆₅ N ₃ O ₂	511.8667	513.5186
244-C10	C ₄₂ H ₈₇ N ₃ O ₃	682.15848	682.6821
245-C10	C ₄₃ H ₈₉ N ₃ O ₃	696.18506	696.7045
246-C10	C ₅₈ H ₁₂₀ N ₄ O ₄	937.5978	937.9383

[0164] 상기 결과로부터 실시예 1-1에서 이온화 가능한 지질이 잘 만들어진 것을 확인할 수 있었다.

[0166] 실시예 2. 지질 나노입자의 제조

[0168] 실시예 2-1. 지질 나노입자 제조

[0169] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질(241-C10 내지 246-C10), 인지질(DSPC)(Avanti, 미국), 콜레스테롤(Cholesterol powder, BioReagent, suitable for cell culture, ≥99%, sigma, 한국), 및 지질-PEG 접합체(C16-PEG2000 세라마이드)(C16 PEG2000 Ceramide, Avanti, 미국)를 에탄올에 42.5:13:43:1.5의 몰비로 용해시켰다.

[0170] 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및 지질-PEG가 용해된 에탄올 및 아세트에이트 버퍼를 1:3의 부피비로 12ml/min의 유속으로 미세 유체 혼합 장치(Benchtop Nanoassembler; PNI, Canada)를 통해 혼합하여, 지질 나노입자(LNP)를 제조하였다.

[0172] 실시예 2-2. 핵산이 봉입된 지질 나노입자의 제조

[0173] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질(241-C10 내지 246-C10), 콜레스테롤(Cholesterol powder, BioReagent, suitable for cell culture, ≥99%, sigma, 한국), 인지질(DSPC 또는 DOPE) (18:0 PC (DSPC), 18:1 (Δ9-Cis) PE (DOPE), Avanti, 미국), 및 지질-PEG 접합체(C16-PEG2000 세라마이드)(C16 PEG2000

Ceramid, Avanti, 미국)를 에탄올에 용해시켰다. mRNA(luciferase mRNA; 서열번호 1) 30 μ g을 시트르산 나트륨 0.75mL에 희석시키거나, siRNA(siFVII; 서열번호 2 및 3, 또는 siFVIII; 서열번호 4 내지 11) 30 μ g을 50mM의 아세트산 나트륨 0.75mL에 희석시켜 수성상을 제조하였다.

[0174] 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및 지질-PEG 접합체(이하, 지질-PEG)가 용해된 유기상(에탄올) 및 핵산이 용해된 수성상(아세트산 나트륨 또는 시트르산 나트륨)을 12mL/min의 유속으로 미세 유체 혼합 장치(Benchtop Nanoassembler; PNI, Canada)를 통해 혼합하여, 핵산이 봉입된 지질 나노입자(LNP)를 제조하였다. (i) mRNA가 봉입된 지질 나노입자를 제조하기 위하여, 이온화 가능한 지질 : 인지질(DOPE) : 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드)를 26.5 : 20 : 52.5 내지 51 : 1.0 내지 2.5 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)의 몰비로 에탄올에 용해시켰고, mRNA(luciferase mRNA; 서열번호 1) : 이온화 가능한 지질이 1:10의 중량비가 되도록 유기상 및 수성상을 혼합하여 지질 나노입자를 제조하였다. (ii) siRNA가 봉입된 지질 나노입자를 제조하기 위하여 이온화 가능한 지질 : 인지질(DSPC) : 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드)를 42.5 : 13 : 44 내지 39.5 : 0.5 내지 5.0 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)의 몰비로 에탄올에 용해시켰고, siRNA(siFVII; 서열번호 2 및 3, 또는 siFVIII; 서열번호 4 내지 11, 또는 siFluc; 서열번호 13 및 14) : 이온화 가능한 지질이 1 : 7.5의 중량비가 되도록 유기상 및 수성상을 혼합하여 지질 나노입자(lipid nanoparticle; LNP)를 제조하였다.

[0175] 사용된 siRNA 서열은 다음과 같다:

[0176] 서열번호 2 (FVII target siRNA_sense; 5'-GGAUCAUCUCAAGUCUACdtdt-3'), 서열번호 3 (FVII target siRNA_antisense; 5'-GUAAGACUUGAGAUGAUCCdtdt-3'), 서열번호 4 (FVIII target siRNA_sense_1; 5'-CUUUAUUCUGGAGAAUUAdtdt-3') 서열번호 5 (FVIII target siRNA_antisense_1; 5'-UAAUUCUCCACGAUUAAGdtdt-3'), 서열번호 6 (FVIII target siRNA_sense_2; 5'-UCAAGGAUUCGAUGGUAdtdt-3'), 서열번호 7 (FVIII target siRNA_antisense_2; 5'-AUACCAUCGAAUCCUUGAdtdt-3'), 서열번호 8(FVIII target siRNA_sense_3; 5'-CAAGAGCACUAGUGAUUAUdtdt-3'), 서열번호 9(FVIII target siRNA_antisense_3; 5'-AUAUACUAGUGUCUCUUGdtdt-3'), 서열번호 10(FVIII target siRNA_sense_4; 5'-GGGCACCACUCCUGAAAUAdtdt-3'), 서열번호 11(FVIII target siRNA_antisense_4; 5'-UAUUUCAGGAGUGGCCdtdt-3'), 서열번호 13(siFluc_sense; 5'-AACGUCGGCGUUAUCAAdtdt-3'), 서열번호 14(siFluc_antisense; 5'-UUGAUUAACGCCAGCGUdtdt-3').

[0177] 제조된 LNP를 에탄올 제거 및 체내의 pH와 지질 나노입자의 pH를 맞추기 위해서, 3500 MWCO 투석 카세트를 사용하여 16 시간 동안 PBS에 대해 투석하였다.

[0179] 이온화 가능한 지질 '241-C10'를 포함하는 지질 나노입자를 '241-C10 LNP'로 명명하고, 다른 종류의 아민을 포함하는 이온화 가능한 지질을 사용하여 제조한 지질 나노입자(핵산이 봉입된 지질 나노입자 포함)를 '포함된 아민 이름(241 내지 246)-C10 LNP'로 명명하였다.

[0181] **실시예 3. 지질 나노입자의 pKa**

[0182] 본 실시예에서 인비트로 TNS 분석(In vitro TNS assay)을 통하여 상기 실시예 2-1에서 제형화된 각 지질 나노입자(LNP)의 pKa를 계산하였다. 음이온성 TNS는 양으로 하전된 이온화 가능한 지질과 상호 작용하여 친유성이 되고, pH값이 각각의 LNP의 pKa값에 근접함에 따라 TNS의 친유성이 낮아지고 더 많은 물분자가 TNS 형광을 퀀칭(quenching)시키므로, 6.0 내지 7.0의 pKa를 갖는 지질 나노입자는 생체 내 약물전달 효율이 우수하고, pH에 따른 형광(fluorescence)을 나타내는 그래프에서 “s형 곡선”을 나타내는 지질 나노입자는 엔도솜 막과 상호작용이 용이하고, 산성화시에 용이하게 엔도솜을 탈출할 수 있는 것을 의미한다.

[0183] 구체적으로, 20mM sodium phosphate, 25mM citrate, 20mM ammonium acetate, 및 150mM NaCl를 포함하는 용액의 pH를 0.1N NaOH 및/또는 0.1N HCl를 이용하여 pH 4.1에서 pH 9.6까지 0.5의 간격으로 조정하여 다양한 pH단위의 용액을 제조하였다. 각각의 pH(pH 4.1에서 pH 9.6까지 0.5의 간격의 pH)를 갖는 용액을 100 μ l씩 black 96well plate에 첨가하고, 300 μ M의 TNS 스톡(stock) 용액을 이용하여 6 μ M의 최종 농도가 되도록 상기 범위의 pH를 갖는 용액에 각각 첨가하였다. 241-C10 LNP 내지 246-C10 LNP를 최종 농도가 20 μ M가 되도록 혼합용액에 첨가하였다. 형광강도는 Tecan 기기를 통해 325nm의 excitation, 435nm의 emission으로 측정하여, 각 지질 나노입자에 대한 형광강도를 도 3a 및 도 3b에 나타내었고, 각 지질 나노입자에 대한 pKa는 최대형광의 절반에 도달하는 pH값으로 계산하여 하기 표 3에 기재하였다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP는 비선형 회귀분석(nonlinear regression)을 통해 형광적정 s형 곡선을 나타내는 것을 알 수 있었다.

표 3

[0184]

지질 나노입자	pKa
241-C10 LNP	7.7
242-C10 LNP	8.7
243-C10 LNP	8.2
244-C10 LNP	6.8
245-C10 LNP	6.9
246-C10 LNP	7

[0185]

상기 표 3에서 확인되는 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노 입자는 생체 내 안전성 및 약물 방출이 우수한 pKa 6.0 내지 7.0범위를 나타내는 것을 확인하였다.

[0186]

실시예 2-2의 방법과 같이 제조한, 핵산이 봉입된 LNP의 경우에도 포함된 이온화 가능한 지질의 종류(이온화 가능한 지질에 포함된 아민의 종류)에 따라 동일한 양상을 보였다.

[0188]

실시예 4. 지질 나노입자의 특성 확인

[0190]

실시예 4-1. 입자크기 측정

[0191]

본 실시예에서 상기 실시예 2-2에서 제조된 mRNA가 봉입된 지질 나노입자(LNP; 지질-PEG를 1.5몰% 포함)의 크기를 측정하고자 하였다. 상기 실시예 2-2에서 제조한 각 지질 나노입자에 포함된 RNA(luciferase mRNA; 서열번호 1)의 농도가 1µg/ml가 되도록 PBS를 사용하여 희석하고, Malvern Zetasizer Nano(Malvern Instruments, UK)에서 동적 광산란(DLS)을 사용하여 LNP의 지름 및 다분산도(PDI; polydispersity index)를 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 4에 기재하였다.

표 4

[0192]

지질 나노입자	지름(nm)	PDI
241-C10 LNP	128	0.259
242-C10 LNP	77	0.210
243-C10 LNP	56	0.225
244-C10 LNP	66	0.149
245-C10 LNP	70	0.210
246-C10 LNP	68	0.143

[0193]

상기 표 4에서 확인되는 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노 입자는 간세포 내 도입이 용이하고 약물 방출이 우수한 입자크기를 나타내었고, 241-C10 LNP > 243-C10 LNP > 242-C10 LNP = 245-C10 LNP > 244-C10 LNP > 246-C10 LNP 순서대로 PDI 수치가 작고, 입자가 균일한 것을 알 수 있었다.

[0195]

실시예 4-2. 약물 봉입률 측정

[0196]

핵산 약물로서 siRNA(siFVII siRNA)를 봉입한 각 LNP(지질-PEG를 1.5몰% 포함)의 캡슐화 효율(약물 봉입률, %)을 Ribogreen 분석 (Quant-iT™ RiboGreen® RNA, Invitrogen)을 통해 측정하였다. 상기 실시예 2-2에서 제조한 핵산 약물을 봉입한 LNP를 96 웰 플레이트에서 siRNA의 최종 농도가 4 ~ 7 µg/ml이 되도록 1xTE 완충액 50µl로 희석하였다. Triton-X를 처리하지 않은 그룹(Triton-x LNP(-))은 1xTE 버퍼 50µl를 첨가하고, Triton-X를 처리한 그룹(Triton-X LNP(+))은 2% Triton-X 버퍼 50 µl를 첨가하였다. 37℃에서 10분간 인큐베이션하여, Triton-X로 LNP를 분해하여 캡슐화된 핵산을 방출시켰다. 그 후 Ribogreen 시약 100µl를 각 웰에 첨가하였다. Triton LNP(-)와 Triton LNP(+))의 형광 강도(FL)는 Infinite® 200 PRO NanoQuant(Tecan)에서 파장 대역폭(excitation : 485nm, emission : 528nm)으로 측정하였으며, 약물 봉입률(캡슐화 효율, %)은 하기 수학적 식 3과 같이 계산하였다. 각 LNP에 대한 약물 봉입률(%)은 2회 반복하여 측정된 결과값의 평균값으로 하기 표 5에 나타내었다.

[0197]

(수학적 식 3)

[0198]

약물 봉입률(%)=(Triton LNP(+))의 형광도 - Triton LNP(-)의 형광도)/(Triton LNP(+))의 형광도) X 100

표 5

지질 나노입자	봉입률 (Encapsulation efficiency, %)
241-C10 LNP	84
242-C10 LNP	83
243-C10 LNP	91
244-C10 LNP	87
245-C10 LNP	91
246-C10 LNP	94

[0199]

상기 표 5에서 확인되는 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자는 높은 효율로 약물을 봉입할 수 있음을 확인하였다.

[0200]

실시예 5. 지질 나노입자를 이용한 세포 내 핵산 전달 확인

[0202]

실시예 5-1. LNP에 포함되는 이온화 가능한 지질의 종류에 따른 핵산 전달 효과

[0204]

일 예에 따른 LNP를 세포에 형질 전환(transfection)시키기 하루 전에 HeLa 세포를(한국 세포주 은행)을 white plate(96well)에 0.01×10^6 cells/well 로 분주하여 DMEM media(SH30022, Hyclone, USA)에서 37°C, 0.5~3% CO₂ 조건으로 배양하였다. 실시예 2-2에서 제조된, 루시퍼라제(luciferase) 유전자를 코딩하는 mRNA(luc mRNA; 서열 번호 1)가 봉입된 LNP(지질-PEG를 1.5몰% 포함하는 241-C10 LNP 내지 246-C10 LNP)를 ApoE3 0.1µg/ml와 파이펫팅으로 교반 후 상온에서 10분 동안 인큐베이션 후 HeLa cell에 처리(지질 나노입자에 포함된 mRNA 기준으로 100ng/well) 하였다. ApoE3는 LNP 표면에 결합하여 세포 표면에 발현된 LDL 수용체를 통해 LNP가 세포 안으로 엔도시토시스(endocytosis)를 통해 들어갈 수 있도록 하는 역할을 한다.

[0205]

24시간 후 Bright-Glo™ Luciferase Assay 용액(promega, USA)을 100µl/well씩 처리하여 10분간 상온에 둔 후 용해된 세포를 Infinite M200 발광 측정기기(Tecan, USA)를 이용하여 발광 강도(luminescence intensity)를 측정하고, 그 결과를 도 4a에 나타내었다. 도 4a에 나타난 바와 같이, pKa 범위가 6.0 내지 7.0인 244-C10 LNP, 245-C10 LNP, 및 246-C10 LNP의 경우, 강한 발광 강도를 나타내었고, 그 중에서도 246-C10 LNP의 경우 발광 강도가 가장 높아, 246-C10 LNP가 세포 내 약물 전달 효율이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

[0206]

실시예 5-2. 간세포 내 핵산 전달 확인

[0208]

실시예 2-2에서 제조한 246-C10 지질 나노입자를 이용하여 간세포(Hepatocyte)에 luc mRNA를 전달하여 발광 강도를 측정하여 상기 유전자의 발현을 확인하였다.

[0209]

구체적으로, luc mRNA(서열번호 1)가 봉입된 246-C10 LNP(지질-PEG를 1.5몰% 포함)를 ApoE3 5µg/ml와 결합시킨 뒤, 나노입자에 포함된 mRNA 농도를 기준으로 0.2µg/well, 0.5µg/well, 또는 1µg/well로 1×10^5 cells/well로 분주된 간세포(Hepatocyte) 세포주(Nexel, Korea)에 LNP를 처리하였다. 6시간 후 Bright-Glo™ Luciferase Assay 용액(promega, USA)을 100µl/well 처리하여 10분간 상온에 둔 후 용해된 세포를 Infinite M200 발광 측정기(Tecan, US)을 이용하여 발광 강도(luminescence intensity)를 측정하여 그 결과를 도 4b에 나타내었다.

[0210]

도 4b에서 확인되는 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자는 지질 나노입자는 ApoE3과의 결합을 통해 세포 안으로 도입이 용이하고, 농도 의존적으로 약물(핵산) 전달량이 증가하였으며, 간세포(hepatocyte)에 약물을 높은 효율로 전달할 수 있는 것을 확인하였다.

[0211]

실시예 6. 지질 나노입자를 이용한 생체 내 발현 확인

[0213]

상기 실시예 5-1에서 확인한 바와 같이, 인비트로에서 우수한 유전자 발현 효과(유전자 전달 효과)를 나타내는 244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP의 생체 내 약물전달 효율 및 생체 분포(biodistribution)를 본 실시예에서 확인하고자 하였다.

[0214]

상기 실시예 2-2의 방법대로 luc mRNA(서열 번호 1)가 봉입된 244-C10 내지 246-C10 LNP(지질-PEG를 1.5몰% 포함)를 제조하고, 각 나노입자를 PBS에서 16시간 동안 투석하여 에탄올을 제거하였다. 지질 나노입자에 포함된 mRNA를 기준으로 0.1mg/kg 용량으로 C57BL/6 Female 7주령 마우스(오리엔트 바이오)에 mRNA가 봉입된 지질 나노입자를 정맥(i.v) 주사 후 3시간 뒤에 루시페린(luciferin) 0.25 mg/kg을 복강 투여하여 IVIS(PerkinElmer,

[0215]

USA) 장비를 통해 생체발광(bioluminescence)을 확인하여, 그 결과를 도 5a에 나타내었다.

[0216] luc mRNA가 봉입된 246-C10 LNP가 투여된 마우스를 희생시키고 장기를 적출하여 각 장기에서 지질입자의 생체 분포(biodistribution)를 IVIS 장비를 통해 확인하고 그 결과를 도 5b에 나타내었다.

[0217] 도 5a에 나타난 바와 같이, luc mRNA가 봉입된 244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP가 투여된 마우스의 생체 내에서 높은 발광 강도를 나타내며, 이는 상기 실시예 5-1의 결과와도 일치한다. 특히, 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, 전신 이미징과 탈체 기관 이미징(ex vivo organ imaging)을 통해 luc mRNA가 봉입된 246-C10 LNP의 경우 간 특이적으로 높은 발광 강도를 나타내는 것을 확인하여 일 예에 따른 지질 나노입자는 간으로의 높은 생체 분포를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0219] **실시예 7. 핵산 전달에 최적인 지질 나노입자의 조성비 확인**

[0220] 본 실시예에서, 생체 내에서 간 특이적으로 약물 전달 효율이 가장 우수한 지질 나노입자의 조성비를 확인하고자 하였다.

[0221] 지질 나노입자 제조에 있어, 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드)를 1.0 내지 2.5 몰%로 혼합하여 상기 실시예 2-2의 방법과 같이 luc mRNA(서열 번호 1)가 봉입된 지질 나노입자(246-C10 LNP)를 제조하였다. 지질 나노입자에 포함된 이온화 가능한 지질(Ionizable lipid): mRNA의 중량비는 10 : 1 였고, LNP에 포함되는 이온화 가능한 지질(246-C10): 인지질(DOPE) : 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드)의 몰비는 26.5 : 20 : 52.5 내지 51 : 1.0 내지 2.5(몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)이었다.

[0222] 지질-PEG를 1.0몰%, 1.5몰%, 또는 2.5 몰%로 함유하고, luc mRNA가 봉입된 246-C10 LNP를 상기 실시예 6의 방법과 유사하게, 지질 나노입자에 포함된 luc mRNA를 기준으로 0.1mg/kg 용량으로 C57BL/6 Female 7주령 마우스(오리엔트 바이오)에 mRNA가 봉입된 지질 나노입자를 정맥(i.v) 주사 후 3시간 뒤에 루시페린(luciferin) 0.25 mg/kg을 복강 투여하여 IVIS(PerkinElmer, USA) 장비를 통해 생체발광(bioluminescence)을 확인하여, 그 결과를 도 6a 및 도 6b에 나타내었고, 지질-PEG 함량에 따른 지질 나노입자의 크기를 실시예 4-1의 방법과 동일하게 측정하여 하기 표 6 및 도 6b에 기재하였다.

표 6

[0223]

LNP에 포함된 지질-PEG 함량	지름(nm)
1.0 몰%	90
1.5 몰%	67
2.5 몰%	55

[0224] 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이, 지질-PEG를 1.5몰%로 포함하는 LNP에서 발광 강도가 가장 높아, 간으로의 약물전달 효율이 제일 우수한 것을 확인할 수 있었고, 지질-PEG를 1.5몰%로 포함하는 LNP 크기는 약 70nm 정도였다.

[0226] **실시예 8. 간세포(hepatocyte) 특이적인 약물전달 효과 확인**

[0228] **실시예 8-1. 지질 나노입자를 이용한 FVII의 녹아웃(knockout) 효과 확인**

[0229] FVII은 간세포(hepatocyte)에서 특이적으로 발현되므로 본 실시예에서 일 예에 따른 지질 나노입자의 간세포 타겟 가능성을 siFVII를 이용한 FVII(Factor VII) 녹아웃 효과를 통하여 확인하고자 하였다.

[0230] 지질 나노입자에 포함된 siRNA의 농도를 기준으로 0.03mg/kg, 0.1mg/kg, 또는 0.3mg/kg 농도로, 상기 실시예 2-2에서 제조한 FVII target siRNA(서열번호 2 및 3)가 봉입된 246-C10 지질 나노입자(지질-PEG를 1.5몰% 포함)를 C57BL/6 암컷 7주령 20g 마우스에 정맥주사 후 3일 후 꼬리 정맥을 통해 혈액을 수집하고, coaset FVII assay kit의 프로토콜에 따라 혈액 분석하고, PBS가 투여된 마우스의 혈액으로 표준 곡선(standard curve)를 도시하여 FVII 발현양을 측정하고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 246-C10 지질 나노입자에 봉입된 siRNA 농도 의존적으로 생체 내에서 FVII 발현을 억제하였으므로, 일 예에 따른 지질 나노입자가 간세포를 타겟으로 핵산을 전달할 수 있는 것을 확인하였다.

[0232] **실시예 8-2. 지질-PEG 함량에 따른 간세포로의 약물전달 효과**

[0233] 지질 나노입자에 포함되는 지질-PEG의 함량을 0.5 내지 5.0몰%로 변경하여 상기 실시예 2-2의 방법대로 siFVII

(서열 번호 2 및 3)가 봉입된 지질 나노입자(246-C10 LNP)를 제조하였다. 지질 나노입자에 포함된 이온화 가능한 지질: siRNA의 중량비는 7.5 : 1 이었고, LNP에 포함되는 이온화 가능한 지질(246-C10): 인지질(DSPC): 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드)의 몰비는 42.5 :13 : 44 내지 39.5 : 0.5 내지 5.0 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)이었다.

[0234] 상기에서 제조한 지질 나노입자의 지름 및 다분산도(PDI; polydispersity index)를 상기 실시예 4-1의 방법과 동일하게 측정하여 하기 표 7 및 도 8(좌측 표)에 나타내었다.

표 7

[0235]

지질-PEG (%)	평균 지름(nm)	PDI
0.5	120	0.018
1	78	0.106
1.5	52	0.159
3	42	0.152
5	37	0.226

[0236] 지질 나노입자에 포함된 siRNA를 기준으로 0.2mg/kg 용량이 되도록, siFVII가 봉입된 지질 나노입자(0.5 내지 5 몰%로 지질-PEG를 포함)를 C57BL/6 female 7주령 20g 마우스에 정맥주사 후 3일 뒤 꼬리 정맥을 통해 혈액을 수집하여, 상기 실시예 8-1의 방법과 유사하게 coaset FVII assay kit를 이용하여, FVII의 발현양을 측정하고, 그 결과를 도 8(우측 그래프)에 나타내었다. 도 8에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자를 투여시 생체 내의 FVII의 발현이 감소하였고, 0.5 내지 5.0몰%, 또는 0.5 내지 3.0몰%의 지질-PEG 함량을 갖는 지질 나노입자를 투여한 경우, 우수하게 FVII 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

[0238] **실시예 9. LSEC 특이적인 약물전달 효과**

[0239] FVIII은 LSEC(liver sinusoidal endothelial cells)에서 특이적으로 발현되므로 본 실시예에서 일 예에 따른 지질 나노입자의 LSEC 타겟 가능성을 siFVIII를 이용한 FVIII(Factor VIII)의 녹아웃 효과를 통하여 확인하고자 하였고, 지질-PEG 함량에 따른 약물전달 효과를 살펴보았다.

[0241] 지질 나노입자에 포함되는 지질-PEG의 함량을 0.5 내지 5.0 몰%로 변경하여 상기 실시예 2의 방법대로 siFVIII(서열 번호 4 내지 11)가 봉입된 나노입자(246-C10 LNP)를 제조하였다. 지질 나노입자에 포함된 이온화 가능한 지질: siRNA의 중량비는 7.5 : 1 이었고, LNP에 포함되는 이온화 가능한 지질(246-C10): 인지질(DSPC) : 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드) = 42.5 : 13 : 44 내지 39.5 : 0.5 내지 5.0 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)이었다.

[0242] 상기에서 제조한 지질 나노입자의 지름 및 PDI를 상기 실시예 4-1의 방법과 동일하게 측정하여 하기 표 8 및 도 9(좌측 표)에 나타내었다.

표 8

[0243]

지질-PEG (%)	평균 지름(nm)	PDI
0.5	166	0.018
1	87	0.106
1.5	78	0.159
3	42	0.152
5	35.6	0.226

[0244] 지질 나노입자에 포함된 siRNA를 기준으로 0.5mg/kg 의 용량이 되도록, siFVIII가 봉입된 지질 나노입자(0.5 내지 5몰%로 지질-PEG를 포함)를 C57BL/6 암컷 7주령 20g 마우스에 정맥주사 후 2일뒤 꼬리 정맥을 통해 혈액을 수집하여, 상기 실시예 8-1의 방법과 유사하게 coaset FVIII assay kit를 이용하여, FVIII의 발현양을 측정하여 그 결과를 도 9(우측 그래프)에 나타내었다. 도 9에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자를 투여시 생체 내의 FVIII의 발현이 감소하였고, 일 예에 따른 지질 나노입자가 LSEC을 타겟할 수 있는 것을 확인하였고, 0.5 내지 5.0몰%, 또는 0.5 내지 3.0몰%의 지질-PEG 함량을 갖는 지질 나노입자를 투여한 경우, 우수하게 FVIII 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

[0246] 실시예 10. 만노스를 포함하는 지질 나노 입자의 제조

[0247] 실시예 10-1. 만노스를 포함하는 지질 나노입자 제조

[0248] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질(246-C10), 인지질(DSPC)(Avanti, 미국), 콜레스테롤(Cholesterol powder, BioReagent, suitable for cell culture, ≥99%, sigma, 한국), 지질-PEG 접합체(C16-PEG2000 세라마이드, 또는 세라마이드-PEG 접합체; C16 PEG2000 Ceramide, Avanti, 미국) 및 만노스-PEG-지질 접합체(만노스-PEG-DSPE 접합체; Biochempeg, 미국)를 에탄올에 42.5 : 13 : 43 내지 41.5 : 0.5 : 1.0 내지 2.5 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 총 지질-PEG 함량 (= 세라마이드-PEG 접합체 함량 + 만노스-PEG-DSPE 접합체 함량)의 조절)의 몰비로 용해시켰다. 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 세라마이드-PEG 접합체 및 만노스-PEG-지질 접합체(만노스-PEG-DSPE)이 용해된 에탄올 및 아세트이트 버퍼를 1:3의 부피비로 12ml/min의 유속으로 미세 유체 혼합 장치(Benchtop Nanoassembler; PNI, Canada)를 통해 혼합하여, 만노스-PEG-지질 접합체를 포함하는 지질 나노입자 (이하, 만노스-LNP)를 제조하였다.

[0250] 실시예 10-2. 핵산이 봉입된, 만노스를 포함하는 지질 나노입자의 제조

[0251] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질 (246-C10), 콜레스테롤(Cholesterol powder, BioReagent, suitable for cell culture, ≥99%, sigma, 한국), 인지질(DSPC 또는 DOPE) (18:0 PC (DSPC), 18:1 (Δ9-Cis) PE (DOPE), Avanti, 미국), 지질-PEG 접합체(C16-PEG2000 세라마이드)(C16 PEG2000 Ceramid, Avanti, 미국), 및 만노스-PEG-지질 접합체(만노스-PEG-DSPE 접합체, Biochempeg, 미국)를 에탄올에 용해시켰다. mRNA (luciferase mRNA; 서열번호 1 또는 Cre; 서열번호 12) 30μg을 시트르산 나트륨 0.75ml에 희석시키거나, siRNA (siFVII; 서열번호 2 및 3, 또는 siFVIII; 서열번호 4 내지 11, 또는 siFluc; 서열번호 13 및 14) 30μg을 50mM의 아세트산 나트륨 0.75ml에 희석시켜 수성상을 제조하였다.

[0252] 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 지질-PEG 접합체 (C16-PEG2000 세라마이드), 및 만노스-PEG-지질 접합체 (만노스-PEG-DSPE 접합체)가 용해된 유기상 (에탄올) 및 핵산 (상기 mRNA 또는 siRNA)이 용해된 수성상 (아세트산 나트륨 또는 시트르산 나트륨)을 12ml/min의 유속으로 미세 유체 혼합 장치 (Benchtop Nanoassembler; PNI, Canada)를 통해 혼합하여, 핵산이 봉입되고, 만노스를 포함하는 지질 나노입자 (만노스-LNP)를 제조하였다. (i) mRNA 가 봉입된 지질 나노입자를 제조하기 위하여, 이온화 가능한 지질(246-C10) : 인지질(DOPE) : 콜레스테롤 : C16-PEG2000 세라마이드(세라마이드-PEG 접합체) : 만노스-PEG-지질 접합체(만노스-PEG-DSPE 접합체)를 26.5 : 20 : 50.5 내지 52 : 0.5 : 1.0 내지 2.5(몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 총 지질-PEG 함량 (= 세라마이드-PEG 접합체 함량 + 만노스-PEG-DSPE 접합체 함량)을 조절)의 몰비로 에탄올에 용해시켰고, mRNA (luciferase mRNA; 서열번호 1 또는 Cre; 서열번호 12) : 이온화 가능한 지질이 1:10의 중량비가 되도록 유기상 및 수성상을 혼합하여 지질 나노입자를 제조하였다. (ii) siRNA 가 봉입된 지질 나노입자를 제조하기 위하여 이온화 가능한 지질 : 인지질(DSPC) : 콜레스테롤 : C16-PEG2000 세라마이드 : 만노스-PEG-DSPE 접합체를 42.5 : 13 : 43 내지 41.5 : 0.5 : 1.0 내지 2.5 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 총 지질-PEG 함량 (= 세라마이드-PEG 접합체 함량 + 만노스-PEG-DSPE 접합체 함량)의 조절)의 몰비로 에탄올에 용해시켰고, siRNA(siFVII; 서열번호 2 및 3, siFVIII; 서열번호 4 내지 11, 또는 siFluc; 서열번호 13 및 14) : 이온화 가능한 지질이 1 : 7.5의 중량비가 되도록 유기상 및 수성상을 혼합하여 지질 나노입자를 제조하였다. 도 1에 일 예에 따라 핵산이 봉입된, 만노스를 포함하는 지질 나노입자의 예시적인 구조를 나타내었다.

[0253] 제조된 LNP를 에탄올 제거 및 체내의 pH와 지질 나노입자의 pH를 맞추기 위해서, 3500 MWCO 투석 카세트를 사용하여 16 시간 동안 PBS에 대해 투석하였다.

[0255] 이하, 만노스-PEG-지질 접합체를 포함하는 지질 나노입자를 ‘만노스-LNP’ 로 명명하였다.

[0257] 실시예 11. 지질-PEG 접합체 함량에 따른 ApoE 흡착률 및 세포 내 이동

[0258] 실시예 11-1. ApoE 흡착률 측정

[0259] 상기 실시예 2의 방법과 같이, mRNA (서열번호 1)가 봉입된 지질 나노입자를 제조하기 위하여, 이온화 가능한 지질(246-C10) : 인지질(DOPE) : 콜레스테롤 : C16-PEG2000 세라마이드(세라마이드-PEG 접합체)를 26.5 : 20 : 48.5 내지 52.5 : 1.0 내지 5.0 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량 을 조절)의 몰비로 에탄올에 용해시켰고, mRNA : 이온화 가능한 지질을 1:10의 중량비가 되도록 유기상 및 수성상을 혼합하여 지질 나노입자를 제조하였다. Malvern Zetasizer Nano(Malvern Instruments, UK)에서 동적 광산란(DLS)을 사용하여 제조된 나노입자의 크기를 측정된 후 $4\pi r^2$ 으로 표면적을 계산하였다 (하기 표 9의 S). 이후 합

성에 사용된 총 지질양 (20ug) 으로 S을 나눠 준 후 PEG 1.0%을 포함하는 LNP 값 기준으로 상대 비율을 표시하였다. (하기 표 9의 N)

[0260] 이후 RNA 중량비: ApoE 중량비=10:1로 ApoE3 2 μ g/ml와 결합시킨 뒤 Triton-X을 처리 후 나노입자에 포함된 mRNA 농도를 기준으로 0.2 μ g/ml의 LNP에 흡착된 ApoE 단백질 양을 ELISA Kit (Abcam, USA) 의 프로토콜을 이용하여 측정하였다. 간단히, ELISA kit에 포함된 ApoE protein을 농도 1ug/ml 부터 2배씩 계열희석하여 준비 후 흡광도를 측정하여 standard curve을 확인하였다. Infinite® 200 PRO NanoQuant(Tecan, USA)을 이용하여 450nm에서 측정된 ApoE 흡광도를 standard curve 에 대입하여 농도를 확인하였다. 측정된 ApoE 농도는 PEG 1.0%을 포함하는 LNP를 기준으로 상대적 비율로 표시하였다. (하기 표 9에서 n) 이후 나노입자 개당 결합한 ApoE을 계산하기 위해 n을 N으로 나눈 후 PEG-지질에 따른 ApoE 흡착률을 계산하였다.

표 9

[0261]

PEG (%)	Diameter (nm)	PDI	Particle surface area (nm ²) = S	Relative ratio of LNPs = N	Relative ApoE concentration	ApoE concentration/N
1.0	104±10	0.057	135917.8363	1	1	1
1.5	60±10	0.148	45238.9248	3	3.3	1.1
3.0	42±8	0.154	22167.07315	6	2.8	0.47
5.0	40±5	0.128	20106.1888	7	4	0.57

[0262] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 3.0% 이상의 지질-PEG 접합체를 포함하는 LNP의 경우, 상대적으로 ApoE 흡착이 감소하였다.

[0264] 실시예 11-2. 세포 내 핵산 전달 측정

[0265] 상기 실시예 2-2의 방법과 같이, 1.5 내지 5몰%로 지질-PEG 접합체를 포함하고, siFLuc가 봉입된 246-C10 LNP를 제작하였다. LNP를 세포에 형질 전환 (transfection)시키기 전에 루시페라제(Luciferase)를 발현하는 HeLa-Luc 세포주 (MIT, USA) 를 0.01*10⁶ cells/well 로 분주하여 DMEM media(SH30022, Hyclone, USA)에서 37°C, 0.5~3% CO2 조건으로 배양하였다. siFLuc 가 봉입된 246-C10 LNP(PEG-지질은 1.5 내지 5.0몰% 포함)을 10nM 농도 (지질 나노입자에 포함된 siRNA 농도 기준)로 HeLa-Luc cell에 하루 동안 처리하였다. Bright-Glo™ Luciferase Assay 용액(promega, USA)을 100 μ l/well 처리하여 10분간 상온에 둔 후 용해된 세포를 Infinite M200 발광 측정기(Tecan, US)을 이용하여 발광 강도(luminescence intensity)를 측정하여 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0266] 도 10에 나타난 바와 같이, 지질 나노입자에 포함된 지질-PEG 접합체의 함량이 증가함에 따라 지질 나노입자에 의한 세포 내 핵산전달이 감소되었다.

[0268] 실시예 12. 만노스를 포함하는 지질 나노입자의 세포 내 이동

[0270] 실시예 12-1. 만노스-LNP의 지름 측정

[0271] 상기 실시예 10-2의 방법과 같이, C16-PEG2000 세라마이드 및 만노스-PEG-DSPE를 합하여 총 지질-PEG 접합체를 1.5 내지 3.0몰%로 포함하고, 만노스-PEG-DSPE 접합체를 1.0 내지 2.5 몰%로 포함하며, 표 10과 같이 mFluc(서열번호 1)이 봉입된 만노스 LNP를 제조하였다.

표 10

[0272]

Name	총 지질-PEG 접합체	만노스-PEG-DSPE 접합체	세라마이드-PEG 접합체
A1	1.5	-	1.5
A2		1.0	0.5
B1	3	-	3.0
B2		2.5	0.5

[0273] 실시예 12-2. 만노스 LNP의 세포 내 핵산 전달 측정

[0274] 상기 실시예 12-1에서 제조한 만노스-LNP (A1 내지 B2) 를 지질 나노입자에 포함된 mRNA 기준으로 100ng/well

의 농도로 HepG2 세포에 37°C, 0.5~3% CO₂ 의 조건에서 6시간 동안 처리하였다. HepG2 세포는 만노스 특이적 리셉터인 CD206을 발현하는 세포이다. 그 후 Bright-Glo™ Luciferase Assay 용액(promega, USA)을 100μl/well 처리하여 10분간 상온에 둔 후 용해된 세포를 Infinite M200 발광 측정기(Tecan, US)을 이용하여 발광 강도 (luminescence intensity)를 측정하여 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0275] 도 11에 나타난 바와 같이 만노스-PEG-DSPE를 포함하는 LNP는 만노스-PEG-DSPE를 포함하지 않는 LNP 대비 우수한 세포 내 핵산 전달 효과를 나타내었다.

[0277] **실시예 12-3. 항 CD206 항체 처리에 따른 효과 확인**

[0278] 상기 실시예 12-2의 방법과 유사하게 mFluc(서열번호 1)을 포함하는 만노스-LNP를 항 CD206 항체 (Abcam, USA) 0.5μg/well의 존재 또는 부존재 하에서, 37°C, 0.5~3% CO₂ 의 조건에서 3시간 동안 HepG2 세포에 처리하고, 발광(luminescence)을 측정하여 그 결과를 도 12a에 나타내었다.

[0279] 대조군으로서, 만노스-PEG-DSPE 접합체 대신 갈락토스-PEG-DSPE 접합체를 포함하는 지질 나노입자 (이하, 갈락토스-LNP)를 제조하여 상기와 유사한 방법으로 항 CD206 항체의 존재 또는 부존재 하에서 HepG2 세포에 처리하고 발광을 측정하여 그 결과를 도 12b에 나타내었다.

[0280] 도 12a 및 도 12b에 나타난 바와 같이, 갈락토스-LNP 대비 만노스-LNP의 핵산의 세포 내 전달 효과가 대조군 대비 현저히 우수하였다. 또한, 일 예에 따른 만노스-LNP는 항 CD206 항체 처리시 세포 내 이동 효과가 감소하였으나, 갈락토스-LNP는 항체 처리 유무에 따라 세포 내 핵산 전달 효과는 유의미하게 차이하지 않았다.

[0281] 따라서 이로부터 일 예에 따른 만노스-LNP의 우수한 세포 내 핵산 전달 효과는 만노스 리간드를 포함함에 따른 효과임을 확인할 수 있었다.

[0283] **실시예 13. 만노스-LNP의 LSEC 타겟 효과 확인**

[0285] **실시예 13-1. 탈체 기관 이미징 (Ex vivo organ imaging)**

[0286] 상기 실시예 10-2 방법과 같이, 지질-PEG 접합체를 총 3.0% 포함하고, 만노스-PEG-DSPE를 2.5몰%로 포함하며, mCre이 봉입된 만노스-LNP를 제조하고, 이를 이용하여 생체 분포를 확인하고자 하였다.

[0287] 상기 만노스-LNP (총 지질-PEG 3.0몰% 포함 (= 만노스-PEG-DSPE 2.5몰% 및 세라마이드-PEG 0.5몰% 포함)를 PBS에서 16 시간동안 투석하여 에탄올을 제거하였다. 지질 나노입자에 포함된 mRNA (mCre)를 기준으로 0.5 mg/kg 용량으로 LSL-tdTomato Female 과 male 마우스 (Jackson Laboratory, USA) 8주령에 만노스-LNP를 꼬리 정맥으로 투여하고, 이틀후에 마우스를 희생시키고 장기를 적출하여, 각 장기에서 IVIS 장비를 이용하여 tdTomato 형광 단백질 발현을 확인하고, 그 결과를 도 13a에 나타내었다.

[0288] 도 13a에 나타난 바와 같이, 탈체 기관 이미징(ex vivo organ imaging)을 통해 만노스-LNP는 간 특이적으로 높은 발광 강도를 나타내는 것을 확인하여 일 예에 따른 만노스-LNP는 간으로의 높은 생체 분포를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0290] **실시예 13-2. 간 histology 이미지**

[0291] 상기 실시예 13-1과 유사하게 만노스-LNP (총 지질-PEG 3.0몰% 포함 (= 만노스-PEG-DSPE 2.5몰% 및 세라마이드-PEG 0.5몰% 포함)를 제조하였다. 이후 간을 4% 파라포름알데히드(PFA) (Sigma, USA)로 고정했다. 파라핀을 내장한 뒤 마이크로톰을 이용해 조직을 5μm 크기로 분할했다. 그런 다음 열 유도 에피토프 검색(HIER)을 위해 pH 6.0 버퍼(Dako, S1699)에 하룻 동안 상온에서 인큐베이션하였다. HIER 이후, 조직섹션을 4,6-다이아미디노-2-페닐린톨레(DAPI), α-SMA(Abcam, ab5694), Hnf4α (R&D, PP-H1415-00), F4/80(Abcam, Ab6640)으로 염색하였다. 이후 형광을 현미경 (EVOS® FL)을 통하여 검출하고 그 결과를 도 13b에 나타내었다.

[0292] 도 13b에 나타난 바와 같이, 만노스-LNP는 LSEC (혈관 벽)을 따라 토마토 형광 발현이 나타나는 것을 확인하여, 일 예에 따른 만노스-LNP는 LSEC을 효과적으로 타겟팅 하는 것을 확인할 수 있었다.

[0294] **실시예 13-3. FACS**

[0295] 상기 실시예 13-1과 유사하게 mCre(서열번호 12)이 봉입된 만노스-LNP를 제조하고, 이를 LSL-tdTomato 마우스에 꼬리정맥으로 투여 후 2일 뒤 마우스를 희생시키고, 간을 적출 후 FACS를 통해 간세포별 (Hepatocyte, LSEC, Kupffer cell) tomato 형광 발현율을 확인하고 그 결과를 도 13c에 나타내었다. 대조군으로서 만노스-PEG-DSPE를 포함하지 않고, 지질-PEG 접합체로서 C16 PEG2000 Ceramide를 3몰% 포함하는 246C10-LNP를 사용하였다.

[0296] 구체적으로, 50mL tube 에 모아 상온에서 45분간 리베라제 TM(Sigma-Aldrich)으로 소화했다. 소화된 세포들은 40 μm 그물망을 통해 여과되었다. 그 후, 세포는 특정 항체로 염색하고 그 결과를 도 13c에 나타내었다. 특정 간세포 유형 검출에 사용된 항체는 APC 라벨 안티CD31(biolegend, USA), FITC 라벨 안티CD45(biolegend, USA), PE/cy7 라벨 안티CD68(biolegend, USA), PE 라벨 안티CD47(biolegend, USA) 이었다. 마지막으로, 간세포와 비실질 세포는 Novocyte 2060R(ACEA)에 의해 분석되었다.

[0297] 도 13c에 나타난 바와 같이, 간세포(Hepatocyte)로의 타겟팅 효과는 대조군 대비 만노스-LNP의 경우 28%>10%로 tomato 형광 발현을 감소하였고, LSEC으로의 타겟팅 효과는 대조군 대비 만노스-LNP의 경우 25%<35%로 tomato 형광 발현을 증가하였으며, 쿠퍼세포 (Kupffer cell)로의 타겟팅 효과는 : 4%<9%로 tomato 형광 발현율이 거의 변화 없었다.

[0299] **실시예 13-4. siRNA 전달 효과**

[0300] FVII(Factor VII)은 간세포(hepatocyte)에서 특이적으로 발현되고, FVIII(Factor VIII)은 LSEC(liver sinusoidal endothelial cells)에서 특이적으로 발현되므로 만노스-LNP의 LSEC 타겟 효과를 siFVII 및 siFVIII를 이용한 녹아웃 효과를 통하여 확인하고자 하였다.

[0301] 상기 실시예 10-2와 유사한 방법으로 siRNA (siFVII 또는 siFVIII)가 봉입된 만노스-LNP를 제조하고, 이의 지름을 측정하여, 그 결과를 각각 표 11 및 표 12에 나타내었다.

표 11

[0302]

siFVIII-LNPs		
PEG (%)	Mean particle diameter(nm)	
	w/o mannose PEG	w/ mannose PEG
1.5	65±6	128±8
3.0	42±8	101±10

표 12

[0303]

siFVII-LNPs		
PEG (%)	Mean particle diameter(nm)	
	w/o mannose PEG	w/ mannose PEG
1.5	59±7	115±10
3.0	44±8	109±10

[0304] 표 11 및 표 12에 나타난 바와 같이, 만노스-LNP의 경우 나노입자의 지름이 증가하였다.

[0306] 지질 나노입자에 포함된 siRNA 농도를 기준으로 siFVII 0.2mg/kg, siFVIII 0.5mg/kg 농도로, siRNA가 봉입된 만노스-LNP를 57BL/6 암컷 7주령 20g 마우스에 정맥주사 후 3일 후 꼬리 정맥을 통해 혈액을 수집하고, coaset FVII assay kit 또는 coaset FVIII assay kit의 프로토콜에 따라 혈액 분석하고, PBS가 투여된 마우스의 혈액으로 표준 곡선 (standard curve)를 도시하여 FVIII 또는 FVII 발현양을 측정하고, 그 결과를 각각 도 14 및 도 15에 나타내었다.

[0307] 도 14 및 도 15에 나타난 바와 같이, 간세포 특이적으로 발현되는 FVII의 발현은 만노스-PEG-DSPE를 포함하지 않는 LNP 보다 핵산 전달 효과가 저하되었으나, 만노스-LNP의 경우 LSEC 특이적으로 발현하는 FVIII의 발현이 현저히 저해된 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 일 예에 따른 만노스-LNP는 LSEC 특이적 핵산 전달 효능이 현저히 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0309] **실시예 16. 용량에 따른 만노스-LNP 의 효과**

[0310] 상기 실시예 10-2와 유사한 방법으로 siFVIII가 봉입된 만노스-LNP를 세라미드-PEG 접합체 3.0몰%만 포함하거나 세라미드 PEG 접합체 0.5몰%와 만노스 PEG-지질 접합체 2.5% (총 PEG-접합체 3.0%)를 포함하도록 제조하고, 지질 나노입자에 포함된 siRNA 농도를 기준으로 0.5mg/kg 농도로, siRNA가 봉입된 만노스-LNP를 57BL/6 암컷 7주령 20g 마우스에 정맥주사 후 2일 후 꼬리 정맥을 통해 혈액을 수집하고, coaset FVIII assay kit의 프로토콜에 따라 혈액 분석하고, PBS가 투여된 마우스의 혈액으로 표준 곡선 (standard curve)를 도시하여 FVIII 발현양을 측

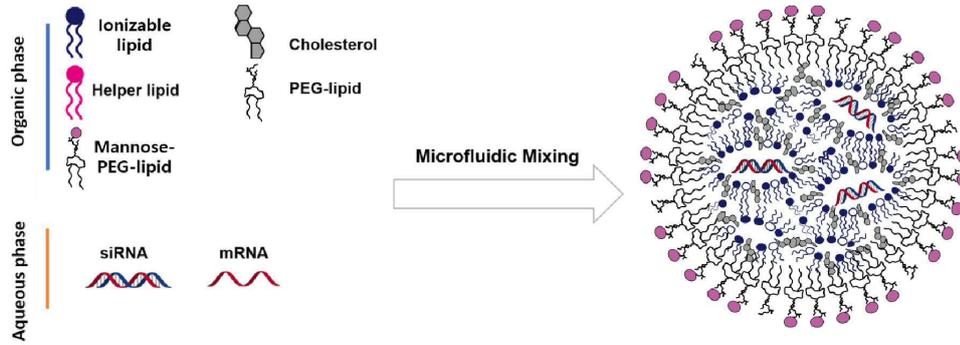
정하고, 그 도 16 에 나타내었다.

[0312]

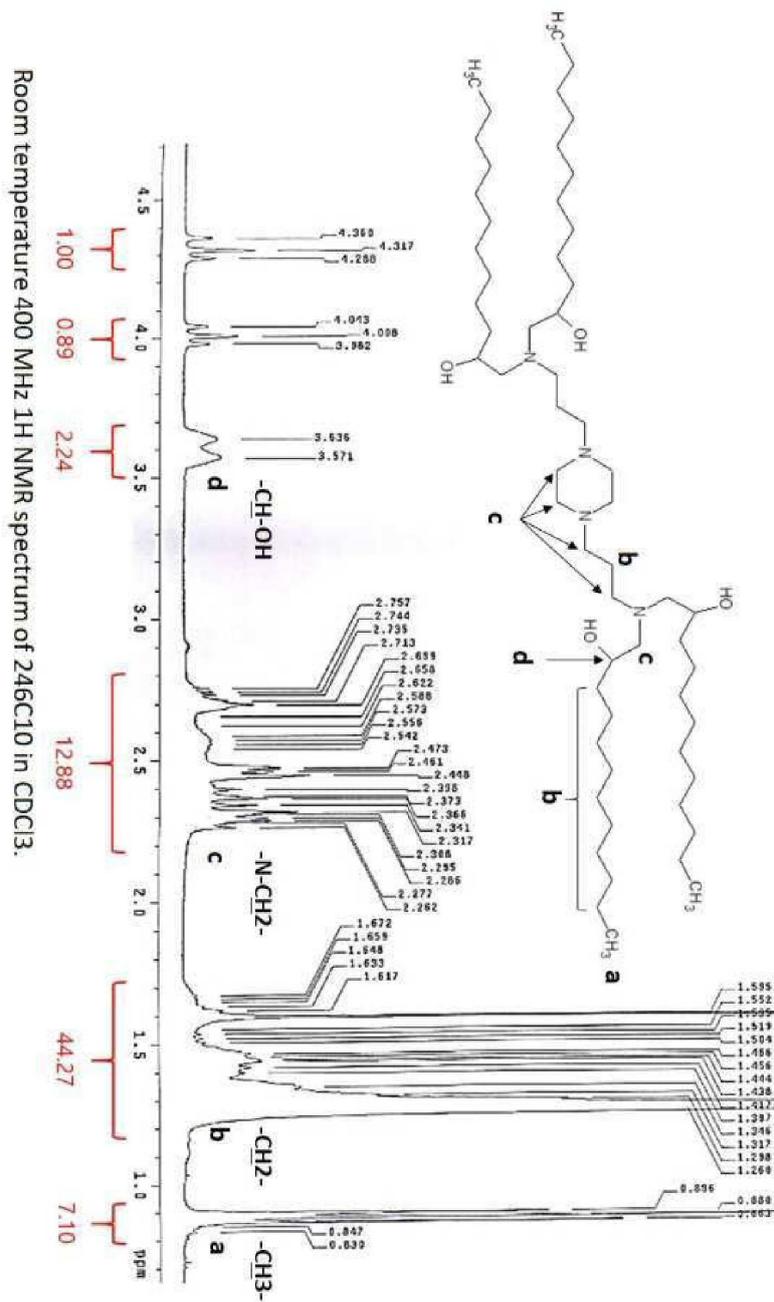
도 16에 나타난 바와 같이, 만노스-LNP는 만노스- PEG-DSPE 접합체를 포함하지 않는 LNP 보다 LSEC 특이적 전달 효과가 우수한 것을 알 수 있었다.

도면

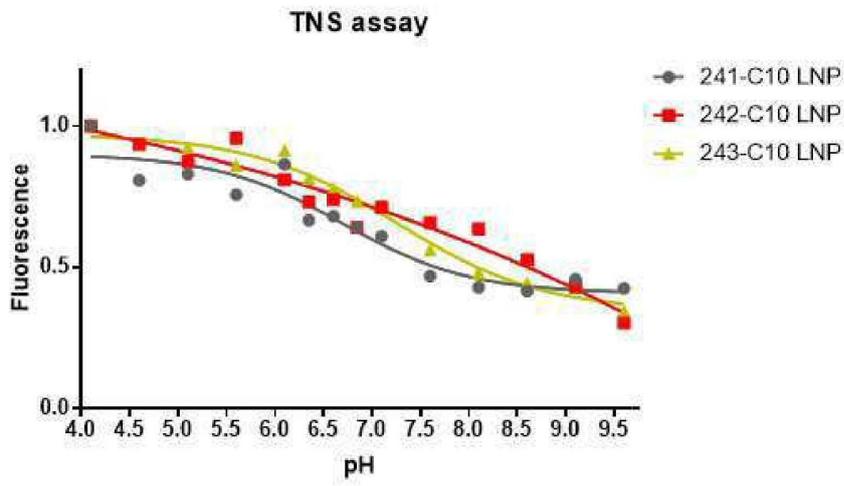
도면1



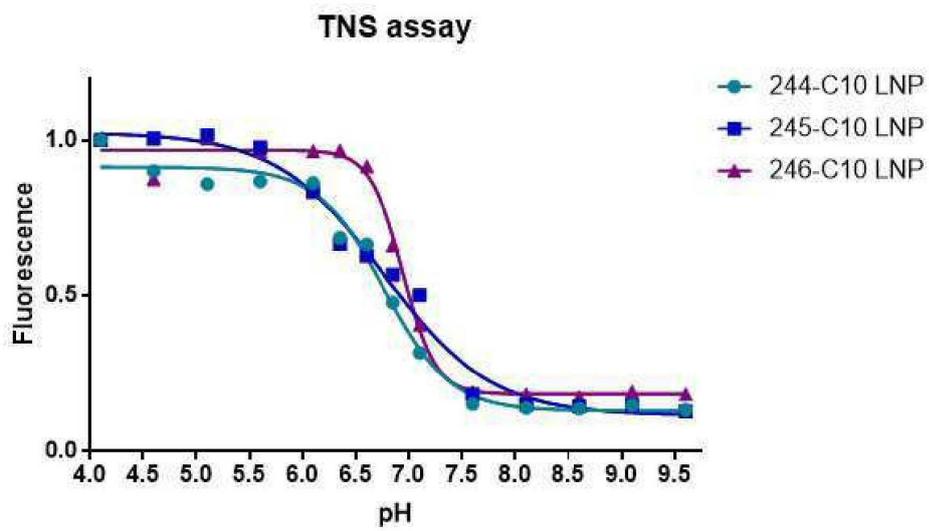
도면2



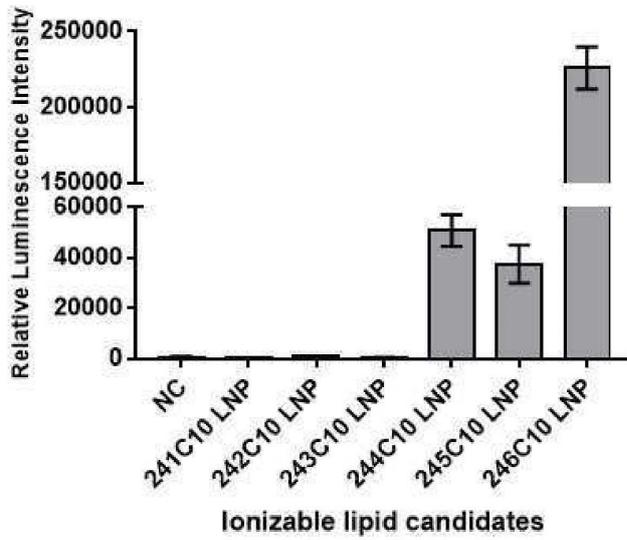
도면3a



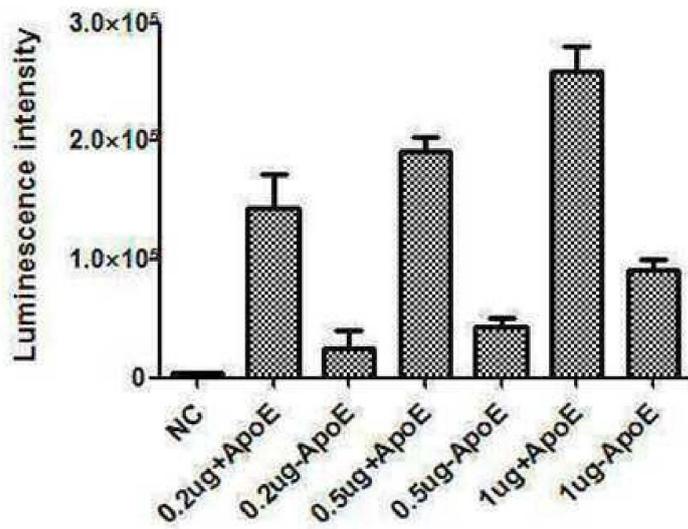
도면3b



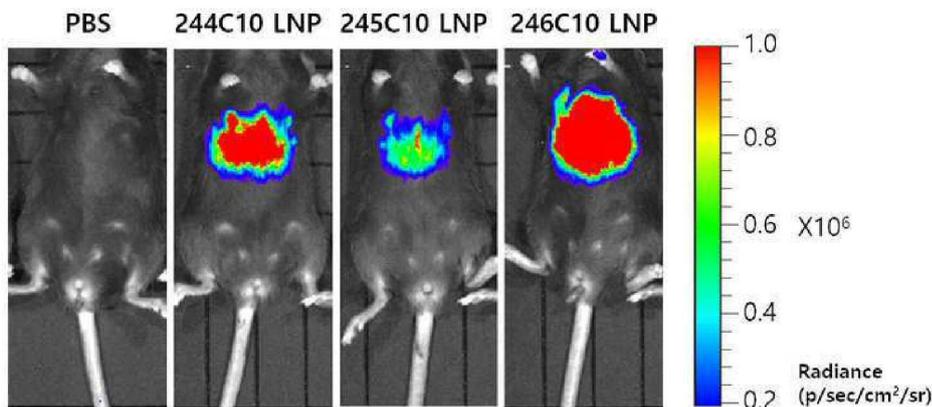
도면4a



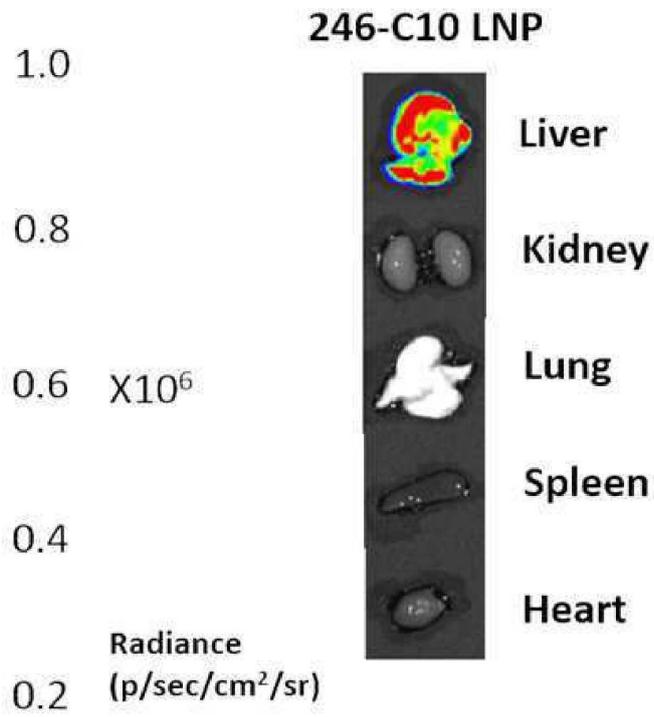
도면4b



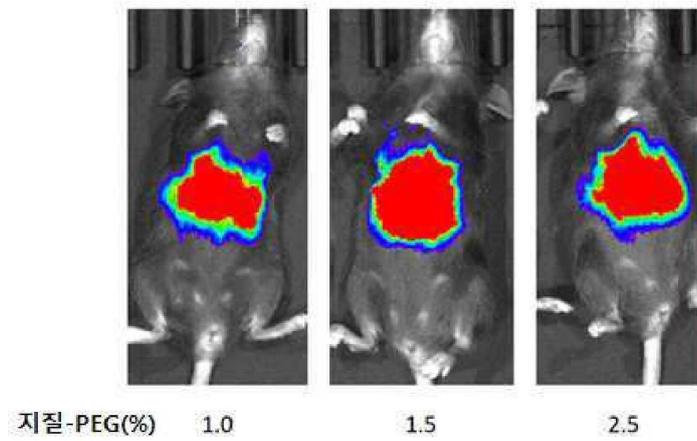
도면5a



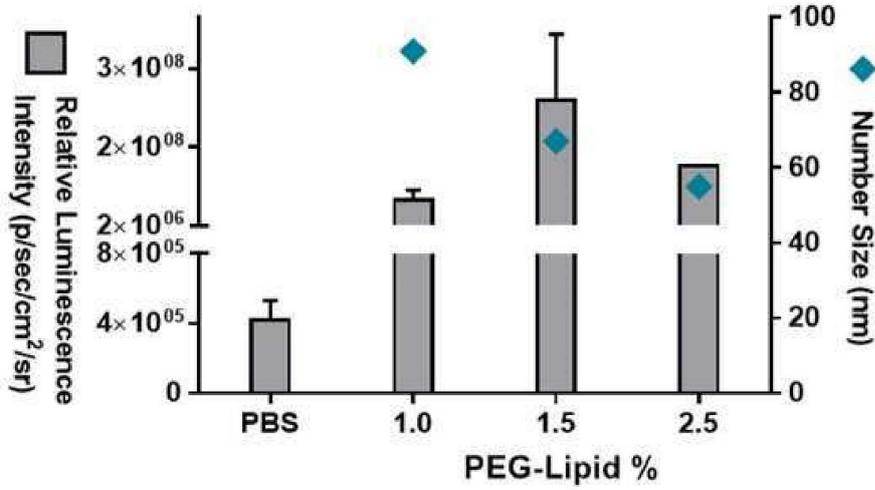
도면5b



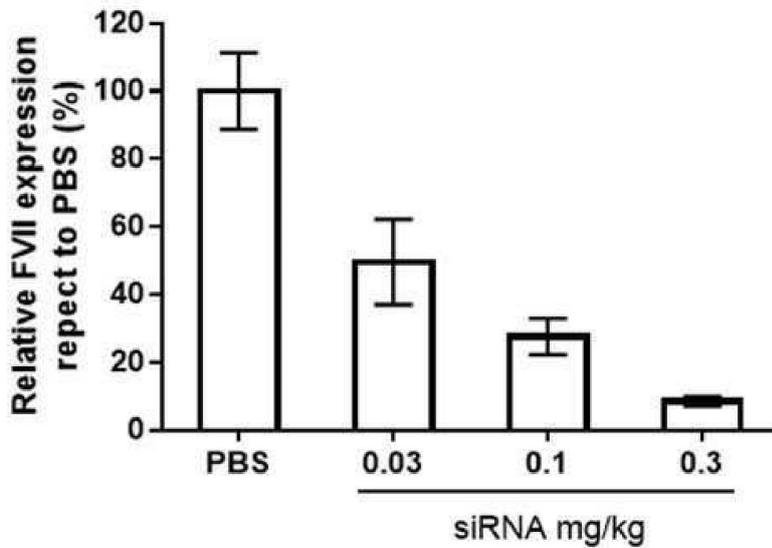
도면6a



도면6b

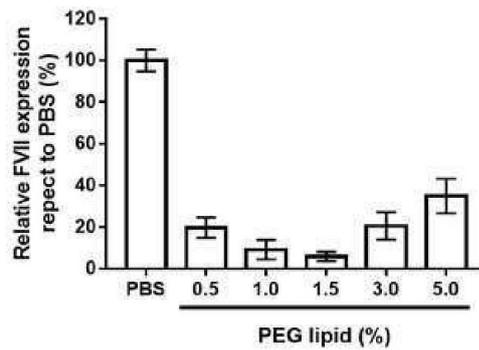


도면7

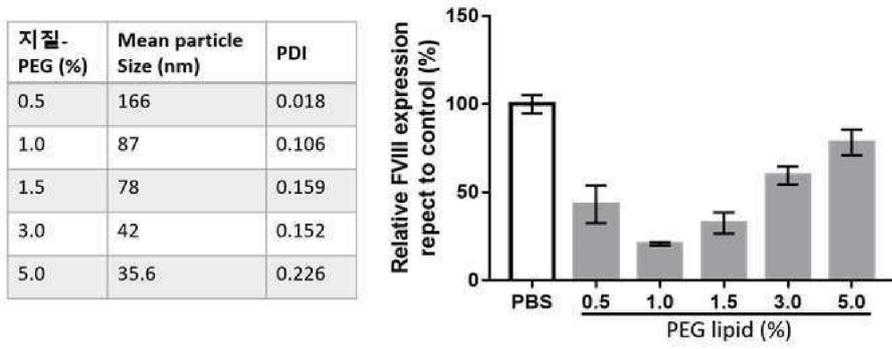


도면8

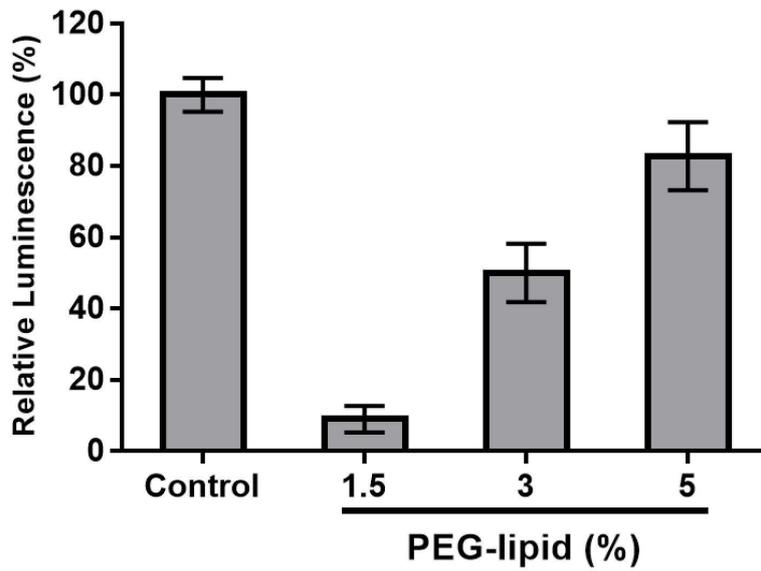
지질-PEG (%)	Mean particle Size (nm)	PDI
0.5	120	0.018
1.0	78	0.106
1.5	52	0.159
3.0	42	0.152
5.0	37	0.226



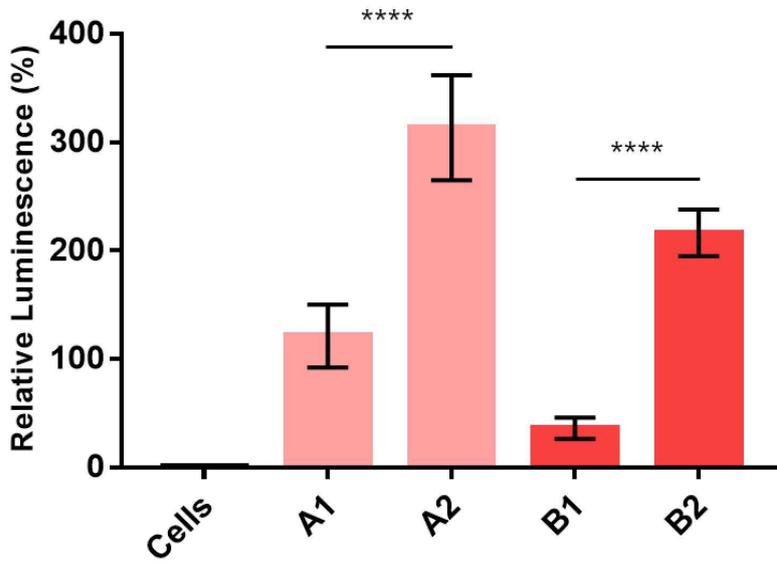
도면9



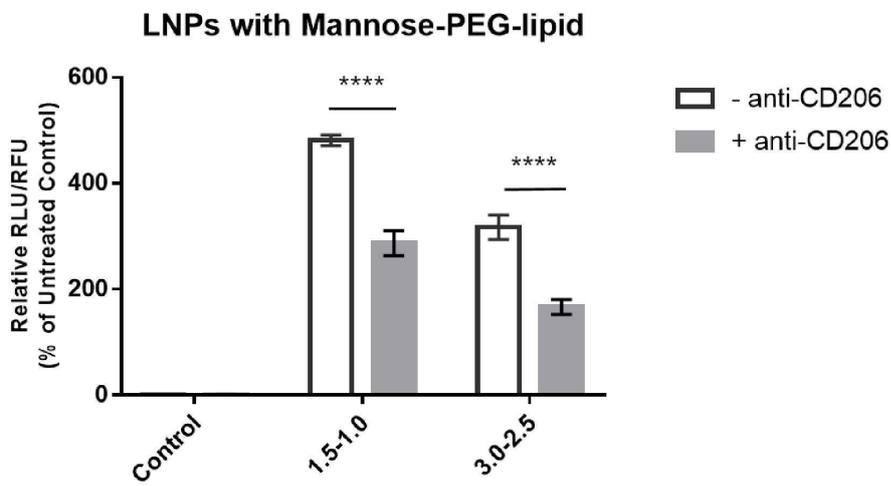
도면10



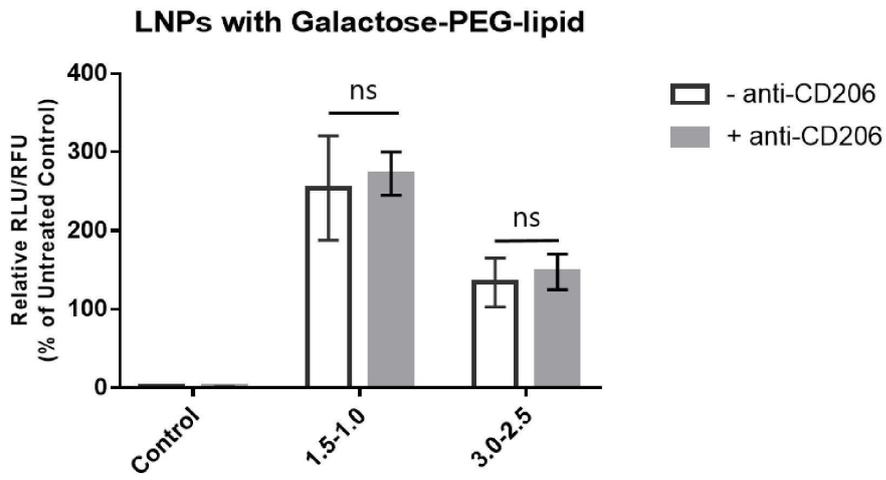
도면11



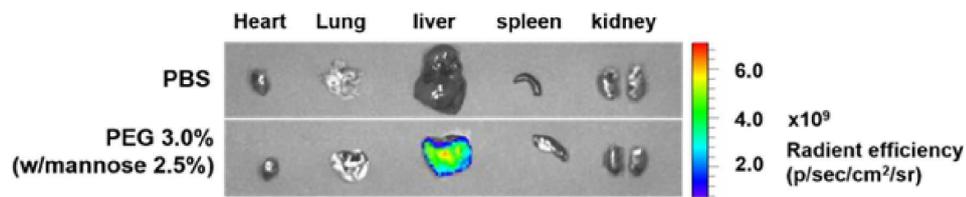
도면12a



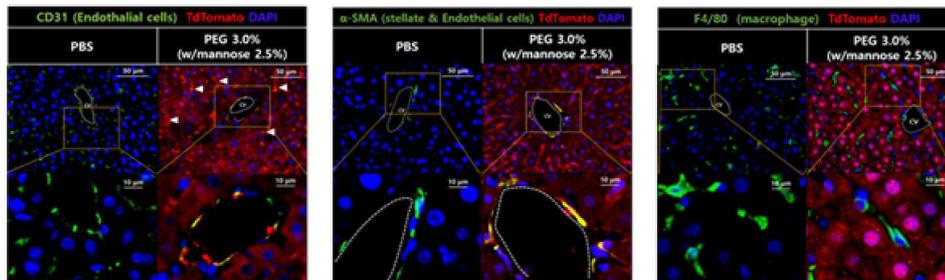
도면12b



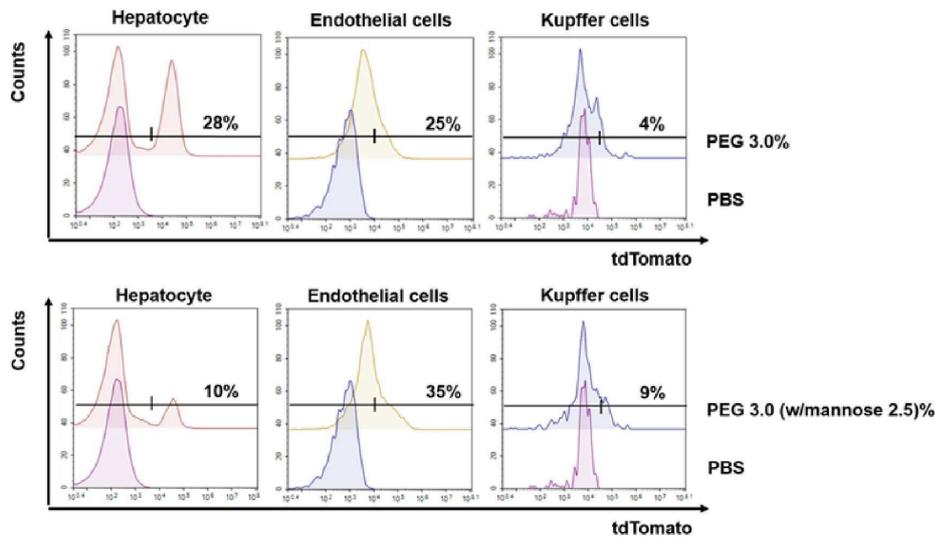
도면13a



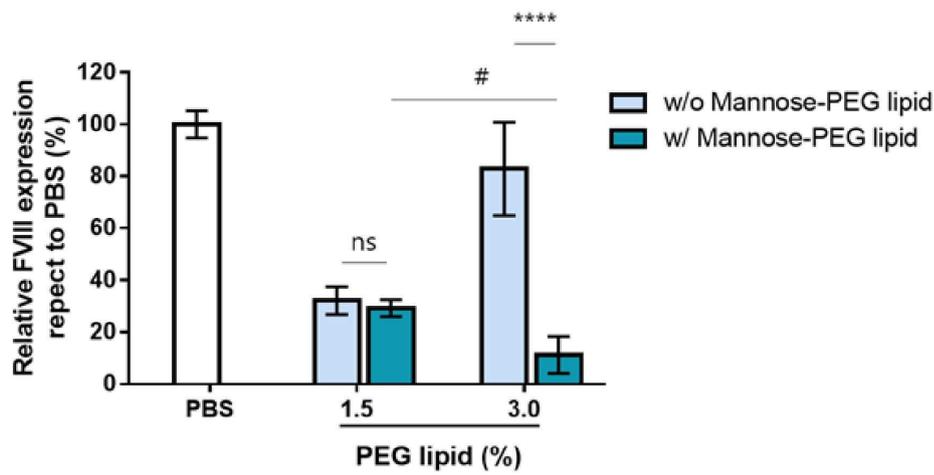
도면13b



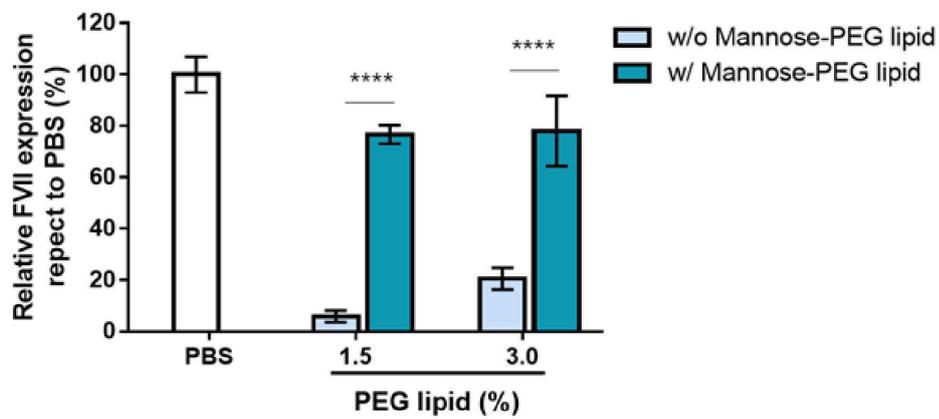
도면13c



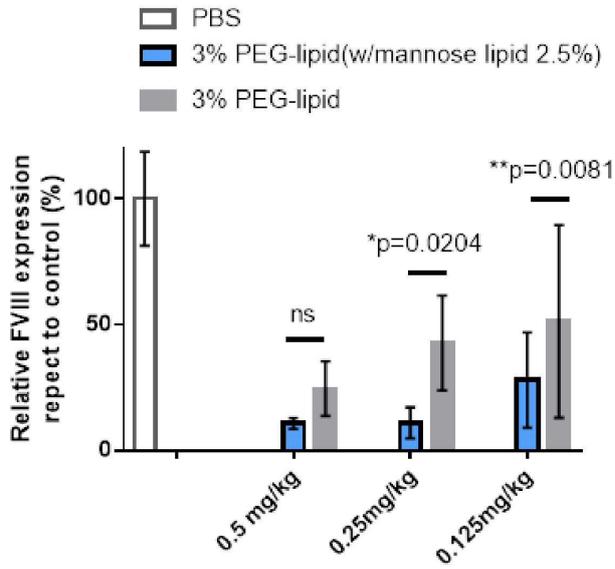
도면14



도면15



도면16



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Lipid nanoparticles comprising mannose or uses thereof

<130> DPP20204548KR

<160> 14

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1653

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> luciferase mRNA

<400> 1

```

auggaagacg ccaaaaacau aaagaaaggc cggcgcccau ucuaucgcu ggaagaugga      60
accgcuggag agcaacugca uaaggcuaug aagagauacg cccugguucc uggaacaauu      120
gcuuuuacag augcacauau cgagguggac aucacuuacg cugaguacuu cgaaaugucc      180

guucgguugg cagaagcuau gaaacgauau gggcugaaua caaaucacag aaucgucgua      240
ugcagugaaa acucucuua auucuuuauug ccgguguugg ggcgguuuuu uaucggaguu      300
gcaguugcgc ccgcgaacga cauuuuuuuu gaacgugaau ugcucaacag uaugggcauu      360
ucgcagccua ccgugguugu cguuuccaaa aaggguugc aaaaauuuuu gaacgugcaa      420
aaaaagcucc caucaucca aaaaauuuuu aucauggauu cuaaaacgga uuaccagga      480
    
```

uuucagucga uguacacguu cgucacaucau caucuaccuc ccgguuuuaa ugaauacgau 540
uuugugccag aguccuucga uagggacaag acaauugcac ugaucaugaa cuccucugga 600

ucuacugguc ugccuaaagg ugucgcucug ccucauagaa cugccugcgu gagauucug 660
caugccagag auccuauuuu uggcaaucau aucauuccgg auacugcgau uuaaaguguu 720
guuccauucc aucacgguuu uggaauguuu acuacacucg gauauuugau auguggauuu 780
cgagucgucu uaauguauag auuugaagaa gacguguuuc ugaggagccu ucaggauuac 840
aagauucaa gucgcugcu ggugccaacc cuauucuccu ucuucgcaa aagcacucug 900
auugacaaa acgauuuuac uauuuuacac gaaauugcuu cugguggcgc uccccucucu 960
aaggaagucg gggaagcggg ugccaagagg uuccaucugc cagguaucag gcaaggauau 1020

gggcucacug agacuacauc agcuauucug auuacaccg agggggauga uaaaccgggc 1080
gcgugcggua aaguuguucc auuuuuugaa gcgaagguug uggaucugga uaccgggaaa 1140
acgcugggcg uuaaucaaag aggcgaacug ugugugagag guccuaugau uauguccggu 1200
uauuaaaca auccggaagc gaccaacgcc uugauugaca aggauggaug gcuacauucu 1260
ggagacauag cuuacuggga cgaagacgaa cacuucuca ucguugaccg ccugaagucu 1320
cugauuaagu acaaggcua ucagguggcu cccgcugaau uggaauccau cuugcuccaa 1380
cacccaaca ucuucgacgc aggugucgca ggucuucccg acgaugacgc cggugaacuu 1440

cccgccccg uuguuuuuu ggagcacgga aagacgauga cggaaaaaga gaucguggau 1500
uacgucgcca gucaaguac aaccgcgaaa aaguugcgcg gaggaguugu guuuguggac 1560
gaaguaccga aaggucuac cggaaaacuc gacgcaagaa aaucagaga gauccucaua 1620
aaggccaaga agggcggaaa gaucgccgug uaa 1653

<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FVII target siRNA_sense
<220><221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> deoxyribonucleotides

<
400> 2
ggaucaucuc aagucuuact t 21
<210> 3

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FVII target siRNA_antisense
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 3
 guaagacuug agaugaucct t 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FVIII target siRNA_sense_1
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 4
 cuuauaucgu ggagaauuat t 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FVIII target siRNA_antisense_1
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 5
 uaaauuccca cgauauaagt t 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> FVIII target siRNA_sense_2
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 6
 ucaaaggauu cgaugguaut t 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FVIII target siRNA_antisense_2
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 7
 auaccaucga auccuuugat t 21

 <210> 8
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FVIII target siRNA_sense_3
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 8
 caagagcacu aguguuaut t 21
 <210> 9
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FVIII target siRNA_antisense_3
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides

<400> 9
aauaucacua gugcucuugt t 21

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FVIII target siRNA_sense_4
<220><221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> deoxyribonucleotides

<400> 10
gggcaccacu ccugaaauat t 21

<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FVIII target siRNA_antisense_4
<220><221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> deoxyribonucleotides

<400> 11
uauuucagga guggugccct t 21

<210> 12
<211> 1074
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Cre
<400> 12

augggcaccc ccaagaagaa gcggaaggug cggaccgacc ugaacagcaa ccugcugacc 60
gugcaccaga accugcccgc ccugcccgug gacgccacca gcgacgaggu gcggaagaac 120
cugauggaca uguuccggga ccggcaggcc uucagcgagc acaccuggaa gaugcugcug 180
agcgugugcc ggagcugggc cgccuggugc aagcugaaca accggaagug guuccccgcc 240
gagcccgagg acgugcggga cuaccugcug uaccugcagg cccggggccu ggccgugaag 300

accauccagc agcaccuggg ccagcugaac augcugcacc ggcggagcgg ccugccccgg 360

 cccagcgaca gcaacgccgu gagccuggug augcggcggga uccggaagga gaacugggac 420
 gccggcgagc gggccaagca ggcccuggcc uucgagcggga ccgacuucga ccaggugcgg 480
 agccugaugg agaacagcga ccggugccag gacaucggga accuggccuu ccugggcauc 540
 gccuacaaca cccugcugcg gaucgccgag aucgcccggga uccgggugaa ggacaucagc 600
 cggaccgacg gggccggau gcugaaccac aucggccggga ccaagaccu ggugagcacc 660
 gccggcgugg agaaggcccu gagccugggc gugaccaagc ugguggagcg guggaucagc 720
 gugagcggcg uggccgacga cccaacaac uaccuguucu gccgggugcg gaagaacggc 780

 guggccgcc ccagcgccac cagccagcug agcaccggg cccuggaggg caucuucgag 840
 gccaccacc ggcugaucua cggcgccaag gacgacagcg gccagcggua ccuggccugg 900
 agcggccaca gcgcccgggu gggcgccgcc cgggacaugg cccgggcccgg cgugagcauc 960
 cccgagauc ugcaggccgg cggcuggacc aacgugaaca ucgugaugaa cuacaucgg 1020
 aaccuggaca gcgagaccgg cgccauggug cggcugcugg aggacggcga cuga 1074

 <210> 13
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siFluc_sense
 <220><221> misc_feature

 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 13
 aacgcugggc guaaaucaat t 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siFluc_antisense
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> deoxyribonucleotides
 <400> 14

uugauuaacg cccagcguut t

21