

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 7월 20일 (20.07.2023)



(10) 국제공개번호
WO 2023/136689 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 9/51 (2006.01) A61K 47/22 (2006.01)
C07D 295/04 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
C07C 219/20 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/000742

(22) 국제출원일: 2023년 1월 16일 (16.01.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0006692 2022년 1월 17일 (17.01.2022) KR

(71) 출원인: 에스티팜 주식회사 (ST PHARM CO., LTD.)
[KR/KR]; 15086 경기도 시흥시 협력로 231, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김경진 (KIM, Kyung Jin); 06170 서울특별시 강남구 영동대로 520, 7층, Seoul (KR). 양주성 (YANG, Joo Sung); 15610 경기도 안산시 단원구 해안로 171, Gyeonggi-do (KR). 최강현 (CHOI, Kang Hyun); 15610 경기도 안산시 단원구 해안로 171, Gyeonggi-do (KR). 김옥일 (KIM, Uk-II); 15610 경기도 안산시 단원구 해안로 171, Gyeonggi-do (KR). 이주영 (LEE, Joo Young); 15610 경기도 안산시 단원구 해안로 171, Gyeonggi-do (KR). 이혁진 (LEE, Hyuk Jin); 06557 서울특별시 서초구 방배로 37길 26-9, Seoul (KR). 김민정 (KIM, Min Jeong); 05119 서울특별시 광진구 광나루로56길 29, 1동 2007호, Seoul (KR). 정예희 (JEONG, Yea Hee); 02531 서울특별시 동대문구 사가정로 122, Seoul (KR). 이예지 (LEE, Ye Ji); 13643 경기도 성남시 수정구 위례순환로 211, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 김경교 등 (KIM, Kyeongkyo et al.); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로70길 13, 2층, 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, CV, 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, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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.

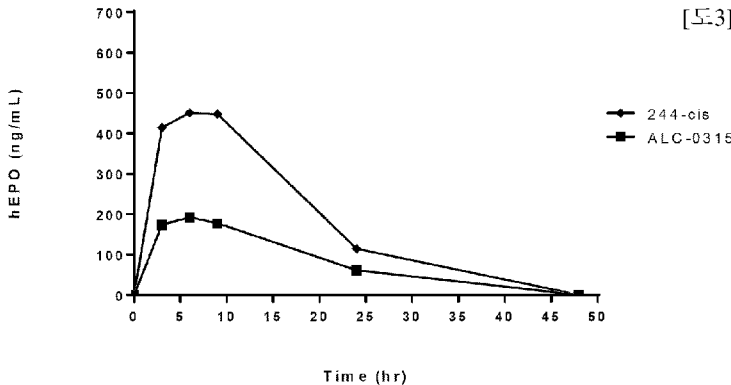
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: IONIZABLE LIPID CONTAINING BIODEGRADABLE ESTER BOND AND LIPID NANOPARTICLES COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 생분해성 에스터 결합을 포함하는 이온화 가능한 지질 및 이를 포함하는 지질나노입자



(57) Abstract: The present invention relates to a novel ionizable lipid containing a biodegradable ester bond. The ionizable lipid containing an ester bond, according to the present invention, stably delivers an anionic drug when prepared into lipid nanoparticles, and exhibits an excellent effect, in particular, in delivering nucleic acids, and thus can be effectively used in related technical fields such as lipid nanoparticle-mediated gene therapy.

(57) 요약서: 본 발명은 생분해성 에스터 결합을 포함하는 신규한 이온화 가능한 지질에 관한 것이다. 본 발명의 에스터 결합을 포함한 이온화 가능한 지질은 지질나노입자 제조 시 음이온성 약물을 안정적으로 전달하고, 특히 핵산 전달 시 우수한 효과를 보여 지질나노입자 매개 유전자치료 등 관련 기술분야에 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2023/136689 A1

명세서

발명의 명칭: 생분해성 에스터 결합을 포함하는 이온화 가능한 지질 및 이를 포함하는 지질나노입자

기술분야

- [1] 본 발명은 생분해성 에스터 결합을 포함하는 신규한 이온화 가능한 지질에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 생분해성 에스터 결합을 포함하는 이온화 가능한 지질, 이를 이용해 제조된 지질나노입자 및 그 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 약물전달시스템 (DDS; Drug Delivery System)은 약물의 부작용을 줄이고 효능 및 효과를 극대화시켜 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 설계한 기술이다. 특히, 유전자 치료에 있어서 약물 전달체로는 종래 바이러스 전달체가 효과적임이 입증되었으나, 면역원성 (immunogenicity), 주입된 DNA 크기의 한계 및 대량생산의 어려움과 같은 여러 결점으로 인해 유전자전달 시스템으로서 바이러스의 이용이 제한되고 있다.

- [4] 이에, 바이러스성 시스템의 대체 수단으로서 핵산을 세포 내로 운반하는 방법으로는 현재까지 양전하 지질 또는 중합체와 섞어 운반하는 방법 (각각 지질-DNA 접합체(lipoplex) 및 폴리머-DNA 접합체(polyplex)라 명명됨)이 주로 사용되고 있다 (Hirko et al., *Curr. Med. Chem.*, 10, 1185-1193, 2003; Merdan et al., *Adv. Drug. Deliv.Rev.*, 54, 715-758, 2002; Spagnou et al., *Biochemistry*, 43, 13348-13386, 2004). 특히, 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 and Phillips, *Biochim. Biophys/Acta*, 1329, 345-356, 1997), 혈관 내 주사 시 주로 1 차 통과기관들인 폐, 간, 비장 등과 같은 조직에 축적되는 단점이 있다 (Ren et al., *Gene Therapy*. 7, 764-768, 2000).

[5]

- [6] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 약물의 봉입률이 우수하며 목적하는 기관 또는 세포에 핵산 등 음이온성 약물을 효율적으로 전달할 수 있는 신규 물질을 개발하고자 예의 노력한 결과, 본 발명의 생분해성 에스터 결합을 포함하는 신규 이온화 가능한 지질의 우수한 약물 전달 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 하나의 목적은 신규한 구조의 생분해성 에스터 결합을 포함하는

이온화 가능한 지질, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 것이다.

- [9] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 이온화 가능한 지질, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 지질나노입자를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 지질나노입자 및 음이온성 약물을 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공하는 것이다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[13]

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들이 연구 노력한 결과, 하기 화학식 1로 표시되는 에스터 결합을 포함하는 이온화 가능한 지질이 지질나노입자 제조 시 약물을 안정적이고 효과적으로 전달하고, 간 독성 등 부작용이 적음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

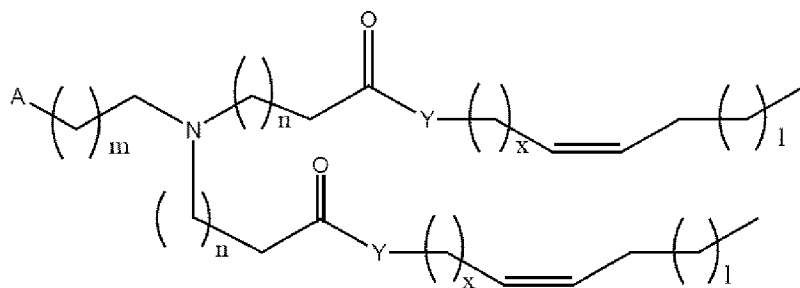
[15]

에스터 결합을 포함하는 이온화 가능한 지질

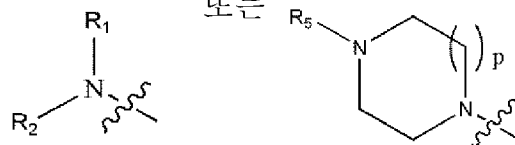
- [16] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 하기 화학식 1로 표시되는 이온화 가능한 지질, 이의 입체 이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[17] [화학식 1]

[18]



- [19] 여기서, A는

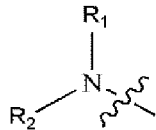


- [20] R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 -H, -C₁₋₆알킬, -C₁₋₆알킬-NR₃R₄, 또는 -C₂₋₁₂알킬-(C=O)-Y-(CH₂)_xCH=CH-C₄₋₁₂알킬로부터 선택된 어느 하나이고,

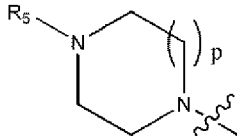
[21]

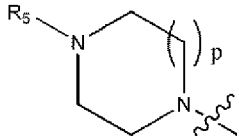
- [22] R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 -H, - C_{1-6} 알킬, 또는 - C_{2-12} 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-12} 알킬로부터 선택된 어느 하나이고,
 [23] R_5 는 - C_{1-6} 알킬- NR_3R_4 또는 - C_{2-12} 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-12} 알킬이고,
 [24] Y는 -O- 또는 NR_6 이고,
 [25] R_6 는 -H 또는 C_{1-3} 알킬이고,
 [26] m은 0 내지 5의 정수이고,
 [27] n은 1 내지 11의 정수이고,
 [28] x는 1 내지 5의 정수이고,
 [29] l은 2 내지 10의 정수이고, 및
 [30] p는 0 내지 2의 정수이다.
 [31] 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 화학식 1로 표시되는 화합은 구체적으로, 상기 화학식 1에서,

- [32] A는  이고,



- [33] R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 -H, - C_{1-3} 알킬, - C_{1-4} 알킬- NR_3R_4 , 또는 - C_{4-8} 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-8} 알킬로부터 선택된 어느 하나이고,
 [34] R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 -H, - C_{1-3} 알킬, 또는 - C_{4-8} 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-8} 알킬로부터 선택된 어느 하나이고,
 [35] Y는 -O-이고,
 [36] m은 0 내지 3의 정수이고,
 [37] n은 3 내지 7의 정수이고,
 [38] x는 1 내지 3의 정수이고,
 [39] l은 2 내지 6의 정수이고, 및
 [40] p는 1일 수 있다.
 [41] 또한, 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 상기 화학식 1에서,

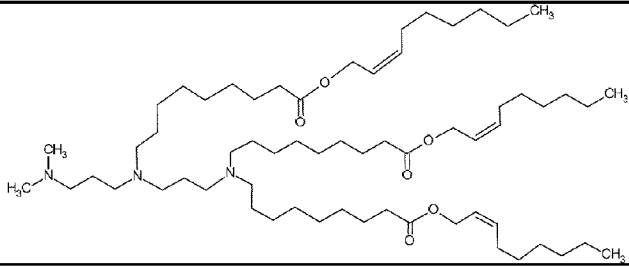
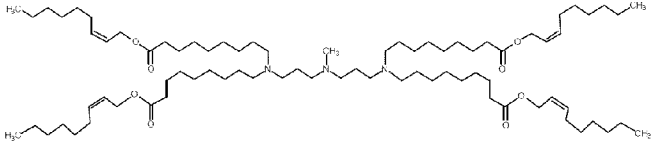
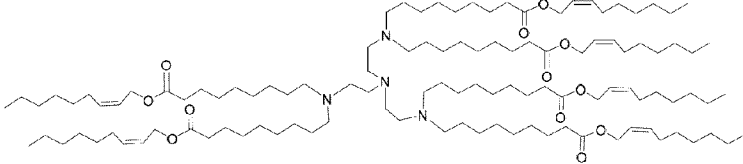
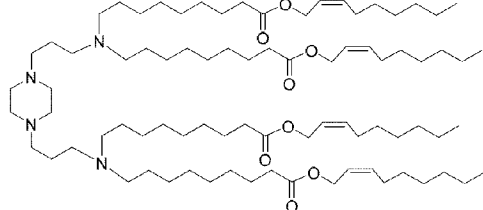
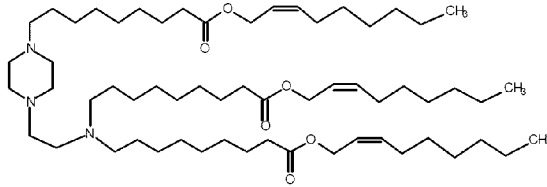
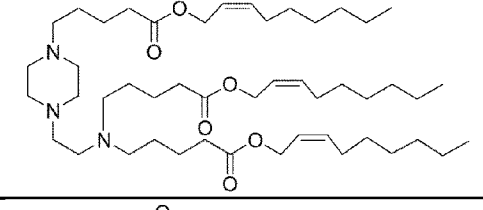
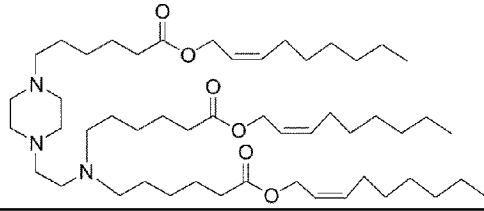
- [42] A는  이고,



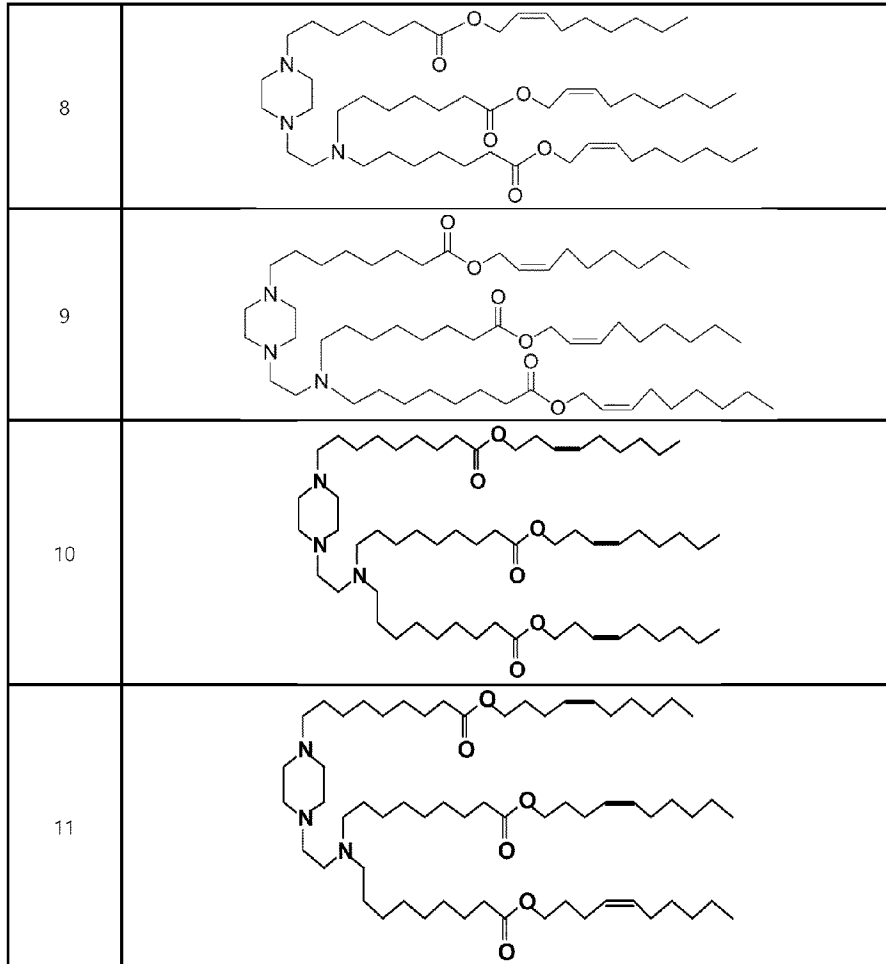
- [43] R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 -H, - C_{1-3} 알킬, 또는 - C_{4-8} 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-8} 알킬로부터 선택된 어느 하나이고,
 [44] R_5 는 - C_{1-4} 알킬- NR_3R_4 또는 - C_{4-8} 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-8} 알킬이고,
 [45] Y는 -O-이고,
 [46] m은 0 내지 3의 정수이고,
 [47] n은 3 내지 7의 정수이고,

- [48] x 는 1 내지 3의 정수이고,
[49] 1은 2 내지 6의 정수이고, 및
[50] p 는 1일 수 있다.
[51] 또한 본 발명의 구체예에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 표 1에 기재된 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
[52]

[53] [표 1]

화합물	구조
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	

[54]



[55]

[56]

본 발명에 있어서, 용어 "알킬"은 다른 기재가 없는 한, 직쇄 또는 분지쇄의 비고리형 포화 탄화수소를 의미한다. 예를 들어, "C₁₆알킬"은 탄소원자를 1 내지 6 개 포함하는 알킬을 의미할 수 있다. 본 발명의 알킬 구조에서 단순한 치환기의 부가 등을 한 경우라도, 본 발명의 이온화 가능한 지질과 동등한 효과를 가지는 한 모두 균등 범위로 본 발명의 범주에 포함된다.

[57]

본 발명에 있어서, 용어 "이온화 가능한 지질 (ionizable lipid)"은 용이하게 양성자화 될 수 있는 아민-함유 지질을 의미하고, 지질 유사체 (lipidoid)로도 명명된다. 상기 이온화 가능한 지질은, 주변 pH에 따라 전하상태가 변할 수 있으므로, 음이온성 약물과 정전기적 상호작용을 통하여 상기 약물이 지질나노입자 내에 높은 효율로 봉입되도록 하는 역할을 수행하며, 지질나노입자의 구조를 형성하는데 기여한다. 본 발명의 이온화 가능한 지질은 적어도 하나 이상의 일차 아민을 포함하는 아민 헤드에 에스터 결합 및 이중 결합을 포함하는 알킬 사슬이 결합된 형태를 갖는 것을 특징으로 하며, 핵산 전달 시 기준에 알려진 다른 이온화 가능한 지질에 비하여 생체 내에서 조직 특이성, 유전자 발현율과 같은 효능이 우수하고 약물 전달 이후 생체 내에서 쉽게 분해되어 간독성과 같은 부작용이 크지 않다는 장점을 갖는다.

- [58] 본 발명에 있어서, 용어 "입체이성질체"는 동일한 화학식 또는 분자식을 가지지만 입체적으로 다른 본 발명의 화합물을 의미한다. 이러한 각각의 입체이성질체 및 그것의 혼합물들 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 다른 설명이 없는 한, 비대칭 탄소 원자와 연결되는 실선 결합 (-)은 입체 중심의 절대적 배열을 나타내는 쉼표형 실선 결합 (⌣) 또는 쉼표형 점선 결합 (⌣)을 포함할 수 있다.
- [59] 본 발명의 화학식 1의 화합물은 "약학적으로 허용가능한 염"의 형태로 존재할 수 있다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산 (free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1로 표시되는 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기산 또는 무기산 부가염, 또는 염기부가염을 의미한다.
- [60] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세트나이트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.
- [61] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 또는 질산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메테인설폰산, p-톨루엔설폰산, 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 말레인산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산, 구연산, 젖산, 글리콜산, 글루콘산, 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산, 글루쿠론산, 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 또는 아이오딘화수소산 등을 사용할 수 있으나, 이들에 제한되지 않는다.
- [62] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이때, 금속염으로는 예컨대 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조할 수 있으나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [63]
- [64] 에스터 결합을 포함하는 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질나노입자
- [65] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상술한 화학식 1로 표시되는 이온화 가능한 지질 (ionizable lipid), 이의 입체이성질체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 지질나노입자이다. 본 발명의 지질나노입자는 화학식 1로 표시되는 이온화 가능한 지질을 1 종 포함하거나, 또는 2 종 이상 포함하는 것일 수 있다.

또한, 목적에 따라 본 발명 외의 이온화 가능한 지질을 추가적으로 더 포함할 수 있다.

[66] 상기 지질나노입자는 인지질, 콜레스테롤, 및 PEG-지질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[67] 상기 인지질은 지질나노입자 내에서 이온화 가능한 지질 및 약물이 상호 작용하여 형성된 코어를 감싸서 보호하는 역할을 수행하며, 타겟 세포의 인지질 이중층과 결합하여 약물의 세포 내 전달 시 세포막 통과 및 엔도솜 탈출 (endosomal escape)을 용이하게 한다. 상기 인지질은 지질나노입자의 용합을 촉진할 수 있는 인지질을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예컨대, 디올레일포스파티딜에탄올아민 (dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE), 디스테아로일포스파티딜콜린 (distearoylphosphatidylcholine, DSPC), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린 (palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine, POPC), 에그 포스파티딜콜린 (egg phosphatidylcholine, EPC), 디올레오일포스파티딜콜린 (dioleoylphosphatidylcholine, DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린 (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤 (dioleoylphosphatidylglycerol, DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 (dipalmitoylphosphatidylglycerol, DPPG), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (distearoylphosphatidylethanolamine, DSPE), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP), 포스파티딜에탄올아민 (Phosphatidylethanolamine, PE), 디팔미토일포스파티딜에탄올아민 (dipalmitoylphosphatidylethanolamine), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스페이트 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate, 18-PA), 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, ME 16:0 PE), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, POPE), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린] (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DOPS), 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-포스포콜린

(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC),
 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린
 (1,2-diundecanoyl-sn-glycero-phosphocholine, DUPC),
 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린
 (1,2-di-O-octadecenyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 18:0 디에테르 PC),
 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린
 (1-oleoyl-2-cholesterylhemisuccinoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, OChemsPC),
 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1-hexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine, C16 Lyso PC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민
 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine),
 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민
 (1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine),
 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민
 (1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine),
 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민
 (1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine),
 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민
 (1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 스펡고미엘린, 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

- [68] 상기 구조적 지질은 지질나노입자 내에서 지질 충전에 형태적 측면에서 견고성을 부여하며, 나노입자의 코어 및 표면에 분산되어 나노입자의 안정성을 향상시키는 역할을 한다. 상기 구조적 지질은 예컨대, 콜레스테롤, 콜레스테놀, 스피나스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤, 에르고스테놀, 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤, 토마티딘, 우르솔산, 알파-토코페롤 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69] 본 발명에서 PEG-지질은 지질과 PEG가 컨쥬게이트된 형태를 지칭하는 것으로, 일측 단부에 친수성 중합체인 폴리에틸렌글리콜 중합체가 결합된 지질을 의미한다. 상기 PEG-지질은 지질나노입자 내에서 나노입자의 혈청 내 입자 안정성에 기여하며, 나노입자 간 응집을 막는 역할을 수행한다. 또한, PEG-지질은 핵산의 생체 내 전달 시 분해효소로부터 핵산을 보호하여 핵산의 체내 안정성을 강화시키며, 나노입자 내 봉입된 약물의 반감기를 증가시킬 수 있다. 상기 PEG-지질은 예컨대, PEG-세라마이드, PEG-DMG, PEG-c-DOMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC, PEG-DSPE 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [70] 구체예로서, 본 발명의 이온화 가능한 지질과 인지질, 구조적 지질 및 PEG 지질을 혼합하여 지질나노입자를 제조할 경우, 이온화 가능한 지질 : 인지질 : 구조적 지질 : PEG-지질의 몰비는 10 내지 40 : 10 내지 30 : 40 내지 70 : 1 내지 5일 수 있다. 또한, 상기 몰비는 20 내지 30 : 15 내지 25 : 45 내지 55 : 1 내지 5일

수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [71] 본 발명의 지질나노입자는 6.0 내지 7.0, 구체적으로 6.0 내지 6.5의 pKa를 나타냄으로써 산성 pH 조건에서 양전하를 나타내어 음전하를 나타내는 핵산 및 음이온성 약물 등의 치료제와 정전기적 상호작용을 통해 용이하게 약물과의 복합체를 형성하여 높은 효율로 음이온성 약물을 봉입할 수 있으며, 약물의 세포 내 또는 생체 내 약물 전달 조성물로서 사용될 수 있다. 따라서 본 발명의 지질나노입자는 핵산뿐만 아니라 음이온을 띄는 모든 형태의 약물의 전달에 유용하게 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 지질나노입자는 최종적으로 음이온성 약물을 추가로 포함하는 형태 (봉입된 형태)로 제조될 수 있다.
- [72] 본 명세서에서, "봉입 (encapsulation)"은 전달물질을 둘러싸서 효율적으로 생체 내로 함입 시키기 위해 캡슐화하는 것을 말하고, 약물 봉입률 (캡슐화 효율, Encapsulation efficiency)은 제조에 사용된 전체 약물 함량에 대하여 지질나노입자 내에 봉입된 약물의 함량을 의미한다.
- [73] 상기 음이온성 약물은 핵산, 저분자 화합물, 펩타이드, 단백질, 단백질-핵산 구조체 또는 음이온성 생체고분자-약물 접합체 등일 수 있으나, 본 발명의 이온화 가능한 지질과 함께 지질나노입자를 형성하여 안정적이고 효율적으로 전달될 수 있는 한 이에 제한되는 것은 아니다.
- [74] 본 발명에서 상기 핵산은 siRNA, rRNA, DNA, 앵타머 (aptamer), mRNA, tRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, shRNA, miRNA, sgRNA, tracrRNA, gRNA, 리보자임 (ribozyme), PNA, DNAzyme 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [75] 상기 지질나노입자에서 이온화 가능한 지질/핵산의 중량비는 1 내지 20일 수 있으며, 예컨대 5 내지 15, 더 구체적으로 8 내지 12일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [76] 본 발명에서 상기 지질나노입자는 예컨대 50 내지 90 nm의 지름 크기를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77]

[78] 지질나노입자를 포함하는 약물 전달용 및 약학적 조성물

[79] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 본 발명에 따른 음이온성 약물 함유 지질나노입자를 포함하는, 약물 전달용 조성물이다.

[80] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 본 발명에 따른 음이온성 약물 함유 지질나노입자를 유효성분으로 포함하는, 약학적 조성물이다.

[81] 지질나노입자 및 음이온성 약물에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[82] 본 발명의 지질나노입자는 핵산 등의 음이온성 약물과 안정된 복합체를 형성하고 낮은 세포독성 및 효과적인 세포 흡수성을 나타내므로, 음이온성 약물을 전달하는데 효과적이다. 따라서, 상기 지질나노입자는 사용되는 음이온성 약물의 종류, 핵산의 종류에 따라 관련 질환에 예방 또는 치료 효과를 가지며, 약물 전달용 조성물로서 제한 없는 활용 가능성이 있다.

- [83] 본 발명에서 용어, "치료"는 질병을 갖는 개개인 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 개입하는 것을 지칭하고, 이는 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행될 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차도시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 특히, 본 발명에서는 에스터 결합을 포함한 이온화 가능한 지질, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 음이온성 약물을 유효성분으로 포함하는 지질나노입자의 투여로 질병의 경과를 호전시키는 모든 행위를 포함한다. 또한, 용어 "예방"은 상기 지질나노입자의 투여로 질병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명의 지질나노입자가 치료 또는 예방 목적으로 사용될 경우, 개체에 치료학적으로 유효한 양으로 투여된다.
- [84] 본 발명에서 사용되는 "치료학적으로 유효한 양"이라는 용어는 음이온성 약물 함유 지질나노입자의 유효한 양을 나타낸다. 구체적으로, "치료학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 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. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 시판되는 치료제와는 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 성별 및 합병증 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분은 안전성이 우수하므로, 결정된 투여 용량 이상으로도 사용될 수 있다.
- [85] 상기 지질나노입자를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 근육, 정맥, 동맥, 피하, 복강, 폐, 및 비강 주사 등으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [86] 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1 종 이상 더 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 패치제, 액제, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 좌제 등일 수 있다. 이들 제제는 당 분야에서 제제화에 사용되는 통상의 방법 또는 문헌 [Remington's

Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA]에 개시되어 있는 방법으로 제조될 수 있으며 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 다양한 제제로 제제화될 수 있다.

[87]

[88] 본 발명의 실시 형태는 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 실시 형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[89]

발명의 효과

[90] 본 발명의 에스터 결합을 포함한 이온화 가능한 지질은 지질나노입자 제조 시 음이온성 약물을 안정적으로 전달하고, 특히 핵산 전달 시 우수한 효과를 보여 지질나노입자 매개 유전자치료 등 관련 기술분야에 유용하게 사용될 수 있다.

[91]

도면의 간단한 설명

[92] 도 1은 244-9-cis 지질나노입자의 TNS 실험을 통한 pKa 측정 결과이다.

[93] 도 2는 생체 내 효능 실험으로, 본 발명의 이온화 가능한 지질을 포함한 siRNA 봉입 지질나노입자의 간세포 타겟 가능성을 실험하기 위하여 siFVII (Factor VII) 녹아웃 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

[94] 도 3은 hEPO mRNA 봉입 244-9-cis 지질나노입자의 생체 내 전달을 확인하기 위하여 마우스에 정맥주사한 후 채혈하여 hEPO 수준을 분석한 결과이다.

[95] 도 4는 mFLuc 봉입 244-9-cis 지질나노입자의 생체 내 전달을 확인하기 위하여 마우스에 근육주사한 후 생체발광을 확인한 사진이다.

[96] 도 5는 244-9-cis 지질나노입자의 세포독성을 확인하기 위하여 핵산 약물이 봉입되지 않은 지질나노입자를 제조해 HepG2, MEF, Hela, KB-GFP 4가지 세포주에 지질나노입자를 농도별로 처리한 후 세포독성을 확인한 결과이다.

[97] 도 6은 244-9-cis 지질나노입자의 간 독성을 확인하기 위하여 mRNA가 봉입된 지질나노입자를 제조해 마우스에 투여한 후 AST, ALT의 수준을 확인하고 ALC-0315 지질과 비교한 결과이다.

[98] 도 7은 244-9-cis 지질나노입자의 간 독성을 확인하기 위하여 mRNA가 봉입된 지질나노입자를 제조해 투여한 후 ALP, ALB 수준을 확인하고 ALC-0315 지질과 비교한 결과이다.

[99] 도 8은 244-9-cis 지질나노입자의 간 독성을 확인하기 위하여 mFLuc가 봉입된

지질나노입자를 제조하여 마우스에 투여한 후 24 시간 뒤 ALC-0315와 간 독성을 상태를 비교한 간 조직사진이다.

[100]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[101]

이하, 본 발명을 제조예, 실시예 및 실험예를 통하여 상세히 설명한다. 단, 하기 제조예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[102]

[103] 실시예 1. 에스터 결합 포함 이온화 가능한 지질 (ionizable lipid)의 제조

[104] 실시예 1-1. 에스터 결합 포함 이온화 가능한 지질의 합성

[105] 여러 종류의 아민 헤드그룹에 에스터 결합과 이중결합을 포함하는 알킬 사슬을 결합시켜 본 발명의 에스터 결합 포함 이온화 가능한 지질을 제조하였다.

[106]

화합물 1 내지 화합물 4는 구체적으로, DCM (Dichloromethane) 용매에 *cis*-2-노넨-1-올 당 9-브로모노난산 (9-Bromo nonanoic acid), DIC (N,N-Diisopropyl carbodiimide)를 각각 1.5 당량, DMAP (4-dimethylaminopyridine)를 0.2 당량 넣고 25 °C에서 밤새 반응시켰고, CombiFlash 컬럼을 이용하여 헥산/에틸 아세테이트 (5 : 1 v/v ratio)에서 정제하였다. 용매를 다 날린 후, 생성물을 에탄올에 녹이고 DIPEA (N, N-Diisopropylethylamine) 1 당량, 1 차 아민을 갖는 물질 (아민 헤드)의 경우 화합물 1은 0.3 당량, 화합물 2, 화합물 4는 0.2 당량, 화합물 3은 0.15 당량을 넣고 3 일 동안 반응시켰다. CombiFlash 컬럼을 이용하여 DCM/MeOH (9 : 1 v/v ratio)에서 정제를 진행하여 이온화 가능한 지질을 합성하였다.

[107]

[108] 화합물 5 내지 화합물 9는 구체적으로, DCM (Dichloromethane) 용매에 *cis*-2-노넨-1-올 당 화합물 5의 경우 9-브로모노난산 (9-Bromo nonanoic acid), 화합물 6의 경우 5-브로모펜타노익산 (5-Bromo pentanoic acid), 화합물 7의 경우 6-브로모 헥사노익산 (6-Bromo hexanoic acid), 화합물 8의 경우 7-브로모헵타노익산 (7-Bromo heptanoic acid), 화합물 9의 경우 8-브로모 옥타오익산 (8-Bromo octanoic acid)과 DIC (N,N-Diisopropyl carbodiimide)를 각각 1.5 당량, DMAP (4-dimethylaminopyridine)를 0.2 당량 넣고 25 °C에서 밤새 반응시켰고, CombiFlash 컬럼을 이용하여 헥산/에틸 아세테이트 (5 : 1 v/v ratio)에서 정제하였다. 용매를 다 날린 후, 생성물을 에탄올에 녹이고 DIPEA (N, N-Diisopropylethylamine) 1 당량, 1 차 아민을 갖는 물질 (아민 헤드) 0.3 당량을 넣고 3 일 동안 반응시켰다. CombiFlash 컬럼을 이용하여 DCM/MeOH (9 : 1 v/v ratio)에서 정제를 진행하여 이온화 가능한 지질을 합성하였다.

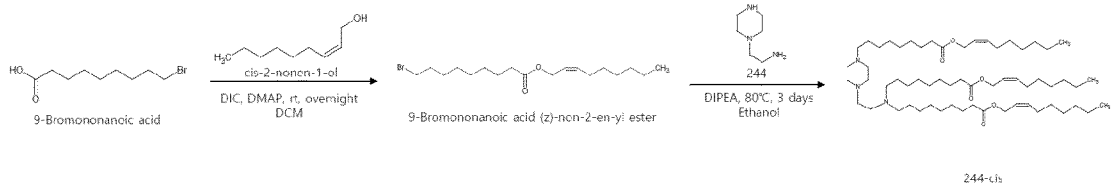
[109]

일례로, 244-9-*cis*의 구체적인 반응식은 하기 반응식 1과 같다.

[110]

[111] [반응식 1]

[112]

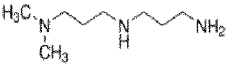
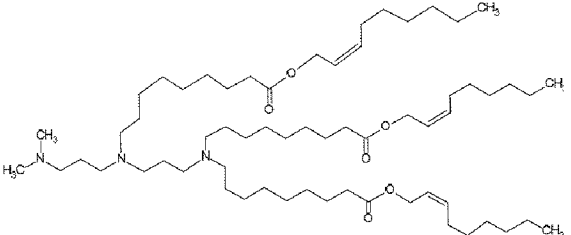
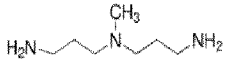
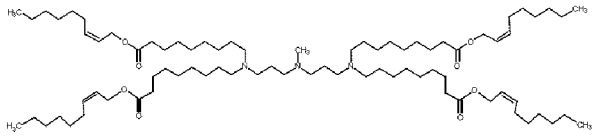
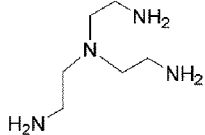
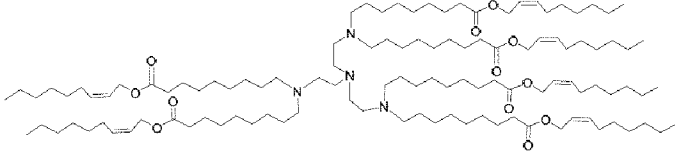
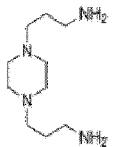
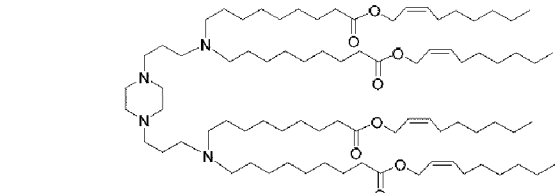
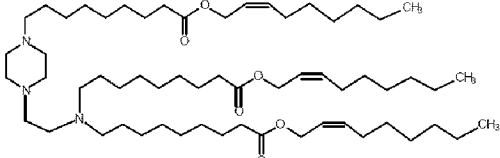
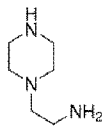
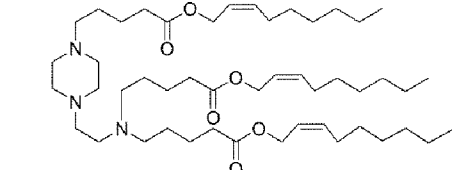
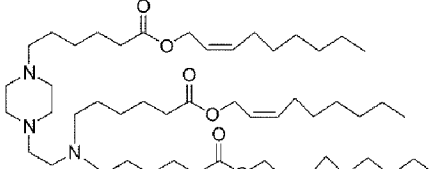


[113] 화합물 10 및 화합물 11은 구체적으로, DCM (Dichloromethane) 용매에 화합물 10의 경우 cis-3-노넨-1-올, 화합물 11의 경우 cis-4-데켄-1-올 당 9-브로모노난산 (9-Bromo nonanoic acid), DIC (N,N-Diisopropyl carbodiimide)를 각각 1.5 당량, DMAP (4-dimethylaminopyridine)를 0.2 당량 넣고 25 °C에서 밤새 반응시켰고, CombiFlash 컬럼을 이용하여 헥산/에틸 아세테이트 (5 : 1 v/v ratio)에서 정제하였다. 용매를 다 날린 후, 생성물을 에탄올에 녹이고 DIPEA (N, N-Diisopropylethylamine) 1 당량, 1 차 아민을 갖는 물질 (아민 헤드) 0.3 당량을 넣고 3 일 동안 반응시켰다. CombiFlash 컬럼을 이용하여 DCM/MeOH (9 : 1 v/v ratio)에서 정제를 진행하여 이온화 가능한 지질을 합성하였다.

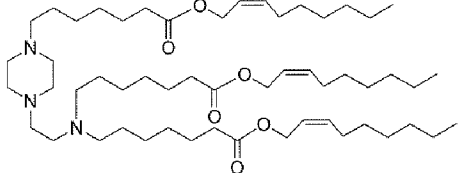
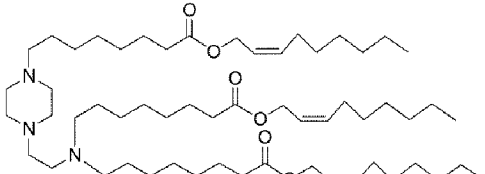
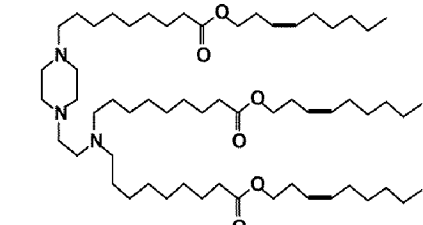
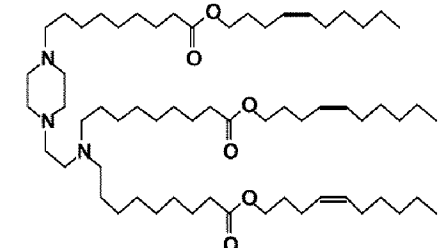
[114] 본 발명의 에스터 결합 포함 이온화 가능한 지질의 구체적인 실시예 화합물들을 하기 표 2에 나타내었다.

[115]

[116] [표2]

번호	아민 헤드	최종생성물 (이온화 가능한 지질)
화합물 1 (211-cis)		
화합물 2 (221-cis)		
화합물 3 (222-cis)		
화합물 4 (246-cis)		
화합물 5 (244-9-cis)		
화합물 6 (244-5-cis)		
화합물 7 (244-6-cis)		

[117]

화합물 8 (244-7-cis) s)		
화합물 9 (244-8-cis) s)		
화합물 10 (244-cis-3-nonen)		
화합물 11 (244-cis-4-decan)		

[118]

[119] 실시예 1-2. 에스터 결합 포함 이온화 가능한 지질의 합성 확인

[120] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질의 합성을 확인하기 위하여, MS 분석을 수행하였다. 구체적으로, 이온화 가능한 지질은 0.5 ppm 이하 농도로 에탄올에 희석하여 MS 분석을 수행하였고, 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 사용하였다. 상기 MS 분석 내용을 표 3에 나타내었다.

[121]

[122] [표3]

	화학식	계산된 m/z 비율	관찰된 m/z 비율
244-5-cis	$C_{48}H_{87}N_3O_6$	802.2209	802.6668
244-6-cis	$C_{51}H_{93}N_3O_6$	844.3006	844.7140
244-7-cis	$C_{54}H_{99}N_3O_6$	886.3804	886.7616
244-8-cis	$C_{57}H_{105}N_3O_6$	928.4601	928.8082
244-9-cis	$C_{60}H_{111}N_3O_6$	970.5398	970.8539
221-cis	$C_{79}H_{147}N_3O_8$	1267.0278	1267.1263
246-cis	$C_{82}H_{152}N_4O_8$	1322.1063	1322.1683

[123]

[124] 상기 결과로부터 실시예 1-1에서 에스터 결합을 포함한 이온화 가능한 지질이 잘 만들어진 것을 확인할 수 있었다.

[125]

[126] 실시예 2. 지질나노입자의 제조

[127] 실시예 2-1. 제제 파라미터

[128] 본 발명의 이온화 가능 지질을 포함하는 지질나노입자는 하기 표 4 및 표 5의 중량비로 제조되었다.

[129]

[130] [표4]

	중량 비
이온화 가능한 지질/mRNA	10
이온화 가능한 지질/siRNA	10

[131]

[132] [표5]

	siRNA 봉입 LNP (몰비, %)	mRNA 봉입 LNP (몰비, %)
이온화 가능한 지질	26.5	26.5
헬퍼 지질	20 (DOPE)	20 (DOPE)
콜레스테롤	52	52
PEG-지질	1.5 (세라마이드 C16 PEG)	1.5 (세라마이드 C16 PEG)

[133]

- [134] 실시예 2-2. siRNA가 봉입된 지질나노입자의 제조
- [135] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤 (Cholesterol powder, BioReagent, suitable for cell culture, $\geq 99\%$, sigma, 한국), 인지질 (DSPC)(Avanti, 미국), 및 C16-PEG2000 세라마이드 (Avanti, 미국)를 에탄올에 26.5 : 20 : 52 : 1.5의 몰 비로 용해시켰다.
- [136] 그 후 siRNA를 50 mM 아세트산나트륨 (sigma, 한국) 완충액에 용해시켰고, 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및 지질-PEG가 용해된 에탄올 및 아세트이트 완충액을 각각 1 : 3의 부피비와 12 ml/min의 유속으로 미세 유체 혼합 장치 (Benchtop Nanoassemblr; PNI, Canada)를 통해 혼합하여, 지질나노입자를 제조하였다.
- [137]
- [138] 실시예 2-3. mRNA가 봉입된 지질나노입자의 제조
- [139] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤 (Cholesterol powder, BioReagent, suitable for cell culture, $\geq 99\%$, sigma, 한국), 인지질 (DOPE)(Avanti, 미국), 및 C16-PEG2000 세라마이드 (Avanti, 미국)를 에탄올에 26.5 : 20 : 52 : 1.5의 몰 비로 용해시켰다.
- [140] 그 후 mRNA를 10 mM 시트르산 나트륨 (sigma, 한국) 완충액에 용해하였고, 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및 지질-PEG가 용해된 에탄올 및 시트르산 완충액을 각각 1 : 3의 부피비로 12 ml/min의 유속으로 미세 유체 혼합 장치 (Benchtop Nanoassemblr; PNI, Canada)를 통해 혼합하여, 지질나노입자를 제조하였다.
- [141]
- [142] 실험예 1: 지질나노입자의 물리화학적 특성 확인
- [143] 실험예 1-1. 입자 크기, 다분산도 (PDI, polydispersity index), 표면 전하 (zeta potential) 및 약물 봉입률 측정
- [144] 본 실험예에서는 상기 실시예 2-3에서 제조된 파이어플라이 루시퍼라아제 mRNA (서열번호 1) 또는 FVII siRNA (서열번호 2 및 서열번호 3)가 봉입된 지질나노입자의 물리화학적 특성을 확인하고자 하였다. 구체적으로, mRNA 또는 siRNA가 봉입된 244-9-cis 지질나노입자를 제조한 후, 각 지질나노입자에 포함된 RNA의 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 PBS를 사용하여 희석하였다. 그 후, Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments, UK)에서 동적 광산란 (DLS)을 사용하여 지질나노입자의 지름, 다분산도 (PDI; polydispersity index), 표면 전하 (zeta potential)를 측정하였다.
- [145] 다음으로, Ribogreen 분석 (Quant-iT™ RiboGreen® RNA, Invitrogen)을 통해 상기 mRNA 또는 siRNA를 봉입한 지질나노입자의 캡슐화 효율 (약물 봉입률, %)을 측정하였다. mRNA를 봉입한 지질나노입자를 96-웰 플레이트에서 mRNA의 최종 농도가 4 ~ 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 1xTE 완충액 50 μl 로 희석하였다. Triton-X를 처리하지 않은 그룹 (Triton-x LNP(-))은 1xTE 완충액 50 μl 를

첨가하고, Triton-X를 처리한 그룹 (Triton-X LNP(+))은 2% Triton-X 완충액 50 μ l를 첨가하였다. 37 °C에서 10 분간 인큐베이션하여, Triton-X로 지질나노입자를 분해하여 캡슐화된 핵산을 방출시켰다. 그 후 Ribogreen 시약 100 μ l를 각 웰에 첨가하였다. Triton LNP(-)와 Triton LNP(+))의 형광 강도 (FL)는 Infinite® 200 PRO NanoQuant (Tecan)에서 파장 대역폭 (excitation: 485 nm, emission: 528 nm)으로 측정하였으며, 약물 봉입률(캡슐화 효율, %)은 하기 수학적 식 1과 같이 계산하였다.

[146]

[147] [수학적 식 1]

[148] $\text{약물 봉입률 (\%)} = (\text{Triton LNP(+)} \text{의 형광도} - \text{Triton LNP(-)} \text{의 형광도}) / (\text{Triton LNP(+)} \text{의 형광도}) \times 100$

[149]

[150] 각각의 결과값은 다음과 같다 (표 6).

[151]

[152] [표6]

	244-9-cis mRNA LNP	244-9-cis siRNA LNP
크기 (nm)	70.94	74.87
다분산도	0.170	0.051
표면 전하 (mV)	-3.05	-3.87
약물 봉입률 (%)	90.0	94.7

[153]

[154] 실험예 1-2. pKa 측정

[155] 본 실험예에서는 인비트로 TNS (2-(p-toluidino)naphthalene-6-sulfonic acid) 분석을 통해 상기 실시예 2-3에서 제형화된 파이어플라이 루시퍼라아제 mRNA (서열번호 1) 지질나노입자의 pKa를 계산하였다.

[156] 구체적으로, 20 mM 인산나트륨, 25 mM 시트르산, 20 mM 암모늄 아세테이트, 및 150 mM 염화나트륨을 포함하는 용액의 pH를 0.1 N 수산화나트륨 및/또는 0.1 N 염산을 이용하여 pH 3.5에서 pH 11까지 0.5의 간격으로 조정하여 다양한 pH 단위의 용액을 제조하였다. 각각의 pH를 갖는 용액을 100 μ l씩 블랙 96-웰 플레이트에 첨가하고, 300 μ M의 TNS 스톡 용액을 이용하여 6 μ M의 최종 농도가 되도록 상기 용액에 각각 첨가하였다. 제형화 된 지질나노입자를 최종 농도가 20 μ M이 되도록 혼합용액에 첨가하였고, Tecan 기기를 통해 형광강도를 측정 (excitation: 325 nm, emission: 435 nm)하였다. 여기서, 지질나노입자에 대한 pKa는 최대형광의 절반에 도달하는 pH 값으로 계산하였다.

[157] 그 결과, 본 발명의 지질나노입자는 pKa 값이 약 6.2 정도이며, 그래프 상 s-형 곡선의 형태를 나타내는 것으로 확인되었다 (도 1). 음이온성 TNS는 양으로

하전된 이온화 가능한 지질과 상호 작용하여 친유성이 되고, pH 값이 각각의 LNP의 pKa 값에 근접함에 따라 TNS의 친유성이 낮아지고 더 많은 물분자가 TNS 형광을 퀀칭시키므로, 6.0 내지 7.0의 pKa를 갖는 지질나노입자는 생체 내 약물전달 효율이 우수하다. 또한, pH에 따른 형광을 나타내는 그래프에서 "s-형 곡선"을 나타내는 지질나노입자는 엔도솜 막과 상호작용이 용이하고, 산성화시에 용이하게 엔도솜을 탈출할 수 있는 것을 의미한다.

[158]

[159] 실험예 1-3. Cryo-TEM 측정

[160] Cryo-TEM으로 지질나노입자의 내부 구조 이미지를 측정하였다.

[161] 구체적으로, 파이어플라이 루시퍼라아제 mRNA (서열번호 1)를 봉입한 지질나노입자를 총 지질의 최종 농도가 15 ~ 25 mg/ml 되도록 농축하여, 2 ~ 4 μ l의 LNP 솔루션을 구리 그리드에 올린 후 블로팅 시켰다. 그 후, KIST 특성분석센터의 cryo-TEM (FEI Tecnai F20 G2) 장비를 통해 지질나노입자의 내부 이미지를 측정하였다.

[162]

[163] 실험예 2: mRNA 봉입 지질나노입자의 시험관 내 효능 확인

[164] 시험관 내에서 mRNA를 봉입한 지질나노입자의 효능을 확인하기 위하여 여러 아민 헤드 그룹으로 합성한 지질나노입자를 이용하여 스크리닝을 수행하였다.

[165] 시험은 여러 아민 헤드 그룹을 이용하여 합성한 각각의 지질나노입자 (실시에 1, 2, 4 및 5)를 이용하여 Hela 세포에 mFLuc (서열번호 1)이 봉입된 지질나노입자를 20 ng 처리 후, 24 시간 췌에 발광 정도를 측정하였다.

[166] 그 결과, 하기 표 7에서 확인되는 바와 같이, 시험된 대부분의 지질나노입자에서 발광 강도가 현저히 증가된 것을 확인하였으며, 특히 화합물 5 (244-9-cis) 지질나노입자가 가장 높은 발현 효과를 보임을 알 수 있었다.

[167]

[168] [표7]

샘플	상대적 발광 평균값	p 값
음성 대조군	2823.25	-
221-cis	229976.5	< 0.0001
244-9-cis	1022327.75	< 0.0001
221-cis	129255	< 0.0001
246-cis	39970.75	0.2634
리포펙타민	1953.5	> 0.9999

[169]

[170] 실험예 3: 지질나노입자의 생체 내 효과 확인

[171] 실험예 3-1. siRNA 봉입 지질나노입자의 전달 효과

[172] FVII은 간세포에서 특이적으로 발현되므로 지질나노입자의 간세포 타겟 가능성을 siFVII를 이용한 FVII (Factor VII) 녹아웃 효과를 통하여 확인하고자 하였다.

[173] 구체적으로, FVII 표적 siRNA (서열번호 2 및 서열번호 3)가 봉입된 244-9-cis 지질나노입자를 상기 실시예 2-2의 방법으로 제조하였다. 지질나노입자에 포함된 siRNA의 농도를 기준으로 0.03, 0.1, 또는 0.3 mg/kg 농도로 제조한 siRNA가 봉입된 244-9-cis 지질나노입자를 C57BL/6 암컷 7 주령 마우스에 정맥주사 하였다. 3 일 후, 혈액을 수집하였고, coaset FVII 어세이 키트의 프로토콜에 따라 혈액을 분석하였다. PBS가 투여된 마우스의 혈액으로 표준 곡선을 도시하여 FVII 발현량을 측정하였다.

[174] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 이온화 가능한 지질을 이용하여 제조된 지질나노입자는 봉입된 siRNA 농도에 의존적으로 생체 내에서 FVII 발현을 억제하였으므로, 본 발명의 지질나노입자가 간세포를 타겟으로 효과적으로 핵산을 전달할 수 있는 것을 확인하였다. 특히, 본 발명의 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질나노입자는 모든 용량에서 FDA 승인을 받은 ALC-0315로 제조된 지질나노입자보다 우수한 FVII 발현 억제 효과를 보여주었다.

[175]

[176] 실험예 3-2. 정맥주사를 통한 mRNA 봉입 지질나노입자의 전달 효능 확인

[177] 244-9-cis 지질나노입자의 mRNA 전달을 알아보기 위하여, 루시페라아제 mRNA를 마우스에 전달한 후, 생체발광을 확인하여 유전자 발현을 확인하였다.

[178] 구체적으로, 상기 실시예 2-3의 방법으로 mFluc (서열번호 1)이 봉입된 244-9-cis 지질나노입자를 제조하였다. 그 후, 제조된 지질나노입자 (mRNA 기준 2 µg)를 7 주령 C57BL/6 마우스에 정맥주사 하고, 3 시간 후 루시페린 0.25 mg/kg을 복강 투여하여 IVIS (PerkinElmer, USA) 장비를 통해 생체발광을 확인하였다. 그 결과, 대부분의 지질나노입자가 간으로 전달됨을 확인하였다 (표 8).

[179]

[180] [표8]

샘플	244-9-cis LNP	SM-102
히트	1.75 x 10 ⁷	2.3 x 10 ⁷
바디	2.52 x 10 ⁴	2.91 x 10 ⁵
히트/바디	4160	79
크기(nm)	53.04	76.42
다분산도(PDI)	0.147	0.163
약물 봉입률(%)	89.6	91.9

[181]

[182] 다음으로, 위와 동일한 방식으로 hEPO mRNA (서열번호 4)가 봉입된 지질나노입자를 제조하였다. mRNA 기준 0.1 mg/kg 용량으로 제조한 지질나노입자를 7 주령 C57BL/6 마우스에 정맥주사한 후, 각각 3, 6, 9, 24, 48 시간 뒤에 채혈하여 hEPO ELISA kit를 통해 hEPO 정량분석을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질나노입자는 핵산을 생체 내로 효과적으로 전달하여 혈액 내에서 hEPO가 상당 수준 검출되었으며, 이러한 효과는 대조군인 ALC-0315로 제조된 지질나노입자에 비해 곡선 하면적이 무려 약 1.7 배 높은 것으로 확인되었다 (표 9 및 도 3).

[183]

[184] [표9]

	AUC	폴드 증가
244-9-cis LNP	8022.5	1.72
ALC-0315 LNP	4660.0	

[185]

[186] 실험예 3-3. 근육주사를 통한 mRNA 봉입 지질나노입자의 전달 효과

[187] 루시페라아제 mRNA (서열번호 1)를 마우스에 근육주사로 전달한 후, 생체발광을 확인하여 유전자 발현을 확인하였다.

[188] 구체적으로, 상술한 바와 같이 mFluc이 봉입된 지질나노입자 (244-9-cis)를 제조한 후, 2 µg (mRNA 기준)을 7 주령 C57BL/6 마우스에 근육 주사하였다. 3 시간 후, 루시페린 0.25 mg/kg을 복강 투여하여 IVIS (PerkinElmer, USA) 장비를 통해 생체발광을 확인하였다.

[189] 그 결과, 대부분의 지질나노입자가 주사 부위에 잘 전달되는 것을 확인할 수 있었다 (표 10 및 도 4).

[190]

[191] [표10]

샘플	244-cis LNP
히트	1.9 x 10 ⁶
바디	5.7 x 10 ⁴
히트/바디	333
크기 (nm)	53.04
다분산도 (PDI)	0.147
약물 봉입률 (%)	89.6

[192]

[193] 실험예 4: 지질나노입자의 세포독성 확인

[194] CCK-8 (tetrazolium salt) 물질은 살아있는 세포의 미토콘드리아 내 탈수소 효소에 의한 환원을 통해 주황색 포르마잔을 형성하므로, 흡광도 분석을 통해 세포 생존능력 확인이 가능하다.

[195] 구체적으로, 다양한 종류의 세포 (HeLa, HepG2, MEF, KB-GFP)를 투명한 96-웰 플레이트 (SPL, 30096)에 시딩 (0.4 x 10⁵ 개)하였다. 그 후, mRNA를 제외한 지질나노입자 구성성분들을 미세 유체 혼합 장치 (Benchtop Nanoassemblr; PNI, Canada)를 통해 혼합하여 mRNA를 봉입하지 않은 244-9-cis 지질나노입자를 제조하였다. 세포 시딩 24 시간 후, 1 웰 당 0.5 µg, 5 µg, 50 µg 또는 100 µg의 양에 해당하는 지질나노입자 (이온화 가능한 지질 기준)를 처리하였다. 지질나노입자 처리 24 시간 후, Cell Counting Kit - 8(Sigma-Aldrich, 96992)를 1 웰 당 10 µl씩 추가하였다. 4 시간 동안 인큐베이션 한 후, Infinite® 200 PRO NanoQuant(Tecan)를 통해 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[196] 그 결과, 각 암세포주에서 5 µg까지 세포독성을 보이지 않음을 확인하였다 (도 5).

[197]

[198] 실험예 5: 지질나노입자의 간 독성 확인

[199] AST (Aspartate transaminase), ALT (Alanine transaminase)는 간세포성 질환이나 간염과 같은 질환의 유무를 측정할 수 있는 수치이며, 평소 낮은 농도로 혈액 중에 존재하다가 간세포가 손상 받으면 흘러나와서 농도가 높아진다. ALP (Alkaline phosphatase)는 간의 담관 안을 싸고 있는 세포 내부의 효소로, 담관의 폐색, 간 내부의 담즙분비 중지 등 질병과 함께 상승한다. ALB (Albumin)는 간에서 생성되며, 알부민 수치는 간경변과 같은 급성 간염에서는 줄어드는 특징이 있다.

[200] 간 독성의 확인을 위하여, 파이어플라이 루시페라아제 mRNA (서열번호 1)가 봉입된 244-9-cis 지질나노입자를 제조한 후 7 주령 C57BL/6 마우스에 mRNA

기준 2 mg/kg의 용량으로 단 회 투여하였다. 대조군으로는 ALC-0315를 사용하였다. 투여 24 시간 후, 채혈하여 AST, ALT, ALP, ALB의 수준을 확인하였다 (도 6 및 도 7). 또한, 각 실험군의 간 조직 분석 사진을 도 8에 나타내었다.

[201] 그 결과, 전반적으로 FDA 승인받은 ALC-0315 지질 대비 간 독성이 나타나지 않음을 알 수 있었다.

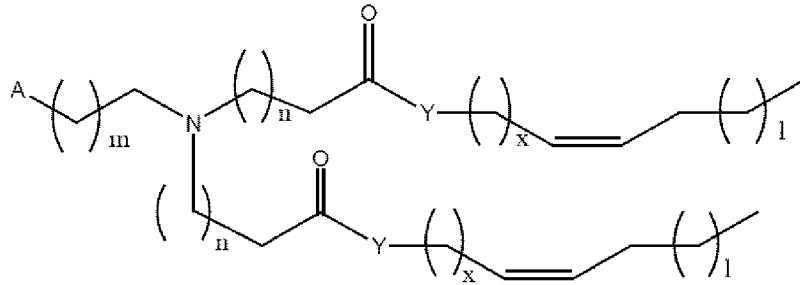
[202]

[203] 이상의 설명으로부터, 본 발명의 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

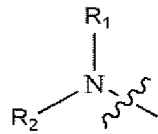
청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 이온화 가능한 지질 (ionizable lipid), 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

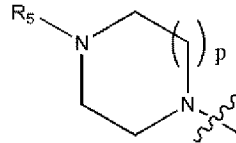
[화학식 1]



여기서, A는



또는



이고,

R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 -H, $-C_{1-6}$ 알킬, $-C_{1-6}$ 알킬- NR_3R_4 , 또는 $-C_{2-12}$ 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-12} 알킬로부터 선택된 어느 하나이고,

R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 -H, $-C_{1-6}$ 알킬, 또는 $-C_{2-12}$ 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-12} 알킬로부터 선택된 어느 하나이고,

R_5 는 $-C_{1-6}$ 알킬- NR_3R_4 또는 $-C_{2-12}$ 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-12} 알킬이고,

Y는 -O- 또는 NR_6 이고,

R_6 는 -H 또는 C_{1-3} 알킬이고,

m은 0 내지 5의 정수이고,

n은 1 내지 11의 정수이고,

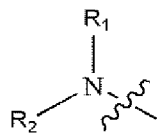
x는 1 내지 5의 정수이고,

l은 2 내지 10의 정수이고, 및

p는 0 내지 2의 정수이다.

[청구항 2] 제1항에 있어서,

A는



이고,

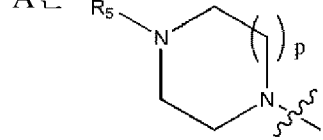
R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 -H, $-C_{1-3}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 알킬- NR_3R_4 , 또는 $-C_{4-8}$ 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-8} 알킬로부터 선택된 어느 하나이고,

R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 -H, $-C_{1-3}$ 알킬, 또는 $-C_{4-8}$ 알킬-(C=O)-Y-(CH_2) $_x$ CH=CH- C_{4-8} 알킬로부터 선택된 어느 하나이고,

Y는 -O-이고,
 m은 0 내지 3의 정수이고,
 n은 3 내지 7의 정수이고,
 x는 1 내지 3의 정수이고,
 l은 2 내지 6의 정수이고, 및
 p는 1인, 이온화 가능한 지질, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 3] 제1항에 있어서,

A는  이고,



R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 -H, $-C_{1-3}$ 알킬, 또는 $-C_{4-8}$ 알킬- $(C=O)-Y-(CH_2)_x$ $CH=CH-C_{4-8}$ 알킬로부터 선택된 어느 하나이고,

R_5 는 $-C_{1-4}$ 알킬- NR_3R_4 또는 $-C_{4-8}$ 알킬- $(C=O)-Y-(CH_2)_xCH=CH-C_{4-8}$ 알킬이고,
 Y는 -O-이고,

m은 0 내지 3의 정수이고,

n은 3 내지 7의 정수이고,

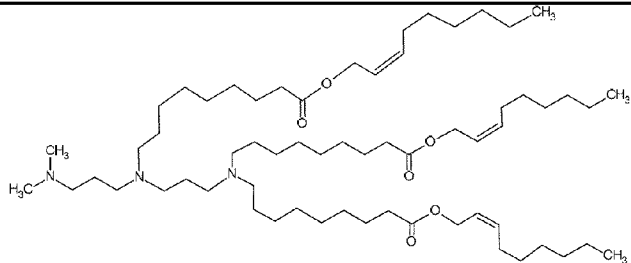
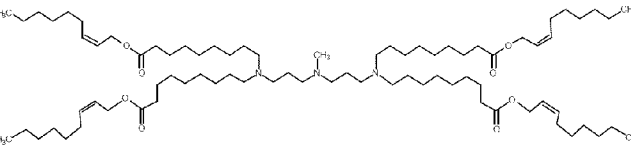
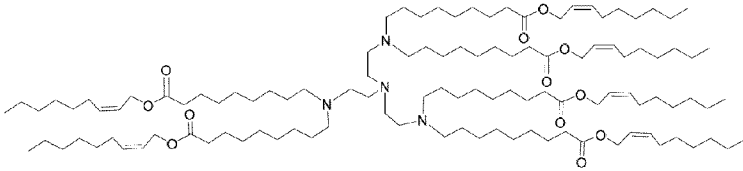
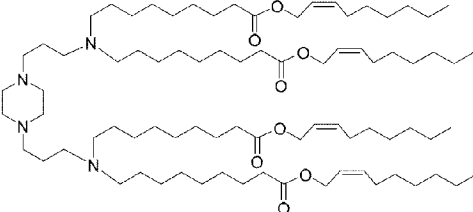
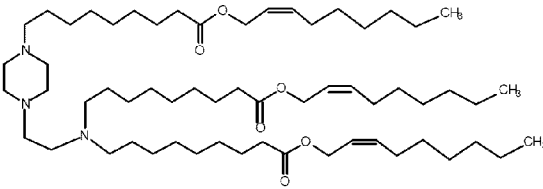
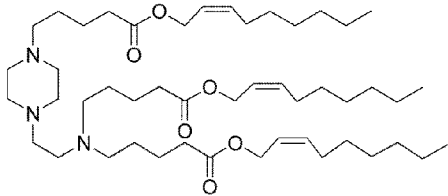
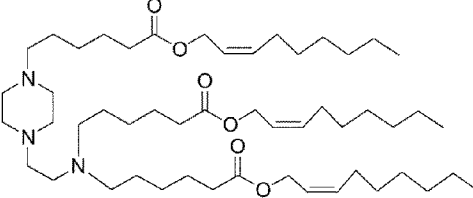
x는 1 내지 3의 정수이고,

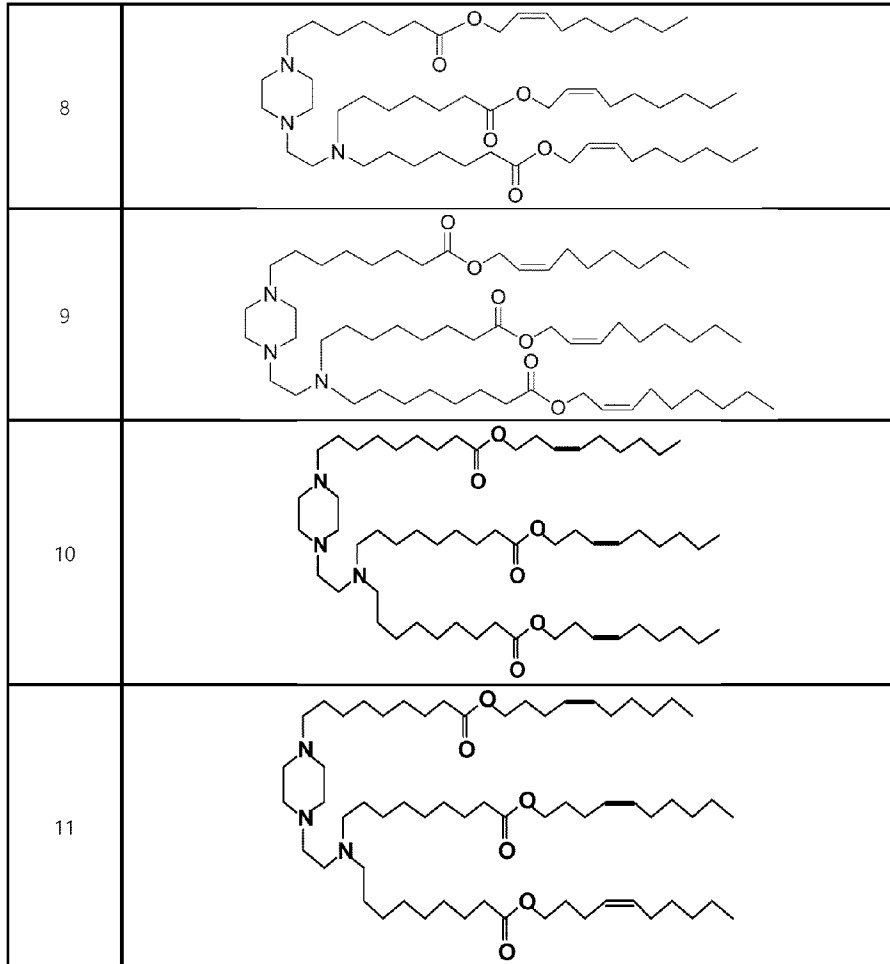
l은 2 내지 6의 정수이고, 및

p는 1인, 이온화 가능한 지질, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 4] 제1항에 있어서,

상기 이온화 가능한 지질은 하기 표에 기재된 화합물 1 내지 화합물 11로 이루어진 군에서 선택되는, 이온화 가능한 지질, 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

화합물	구조
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	



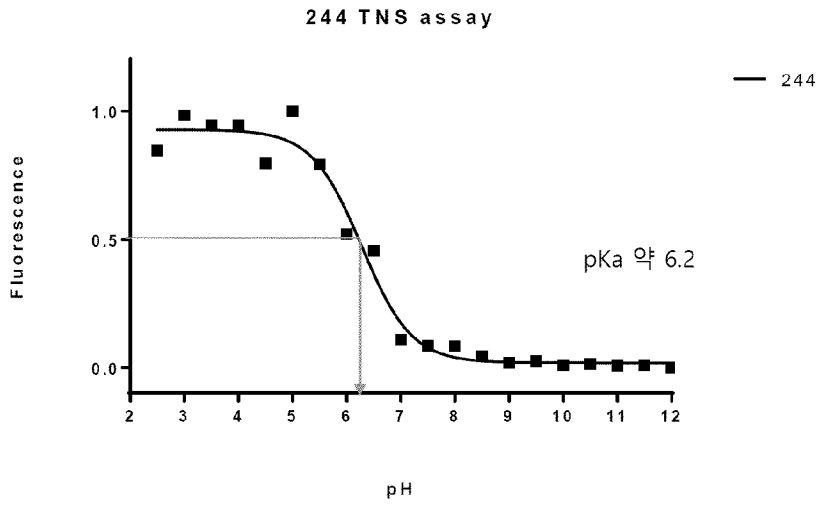
[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 이온화 가능한 지질 (ionizable lipid), 이의 입체 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 지질나노입자.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 지질나노입자는 인지질, 구조적 지질, 및 PEG-지질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 더 포함하는, 지질나노입자.

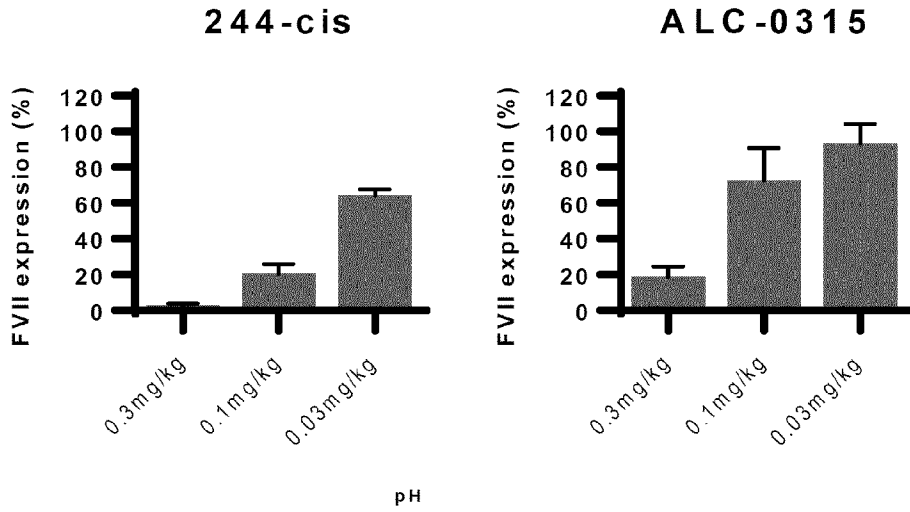
[청구항 7] 제6항에 있어서, 인지질은 DOPE, DSPC, POPC, EPC, DOPC, DPPC, DOPG, DPPG, DSPE, DOTAP, 포스파티딜에탄올아민, 디팔미토일포스파티딜에탄올아민, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, POPE, DOPS, DLPC, DMPC, DUPC, 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미숙시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린,

- 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 및
 스펅고미엘린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인,
 지질나노입자.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 PEG-지질은 PEG-세라마이드, PEG-DMG, PEG-c-DOMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC 및 PEG-DSPE로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 지질나노입자.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 구조적 지질은 콜레스테롤, 콜레스테놀, 스피나스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤, 에르고스테놀, 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤, 토마티딘, 우르솔산 및 알파-토코페롤로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 지질나노입자.
- [청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 지질나노입자는 이온화 가능한 지질 : 인지질 : 콜레스테롤 : 지질-PEG 접합체를 10 내지 40 : 10 내지 30 : 40 내지 70 : 1 내지 5의 몰 비로 포함하는, 지질나노입자.
- [청구항 11] 제6항에 있어서, 상기 지질나노입자는 음이온성 약물을 추가로 포함하는 지질나노입자.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 음이온성 약물은 핵산, 저분자 화합물, 펩타이드, 단백질, 단백질-핵산 구조체, 및 음이온성 생체고분자-약물 접합체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 지질나노입자.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
 상기 핵산은 siRNA, rRNA, DNA, 앵타머 (aptamer), mRNA, tRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, shRNA, miRNA, sgRNA, tracrRNA, gRNA, 리보자임 (ribozyme), PNA, 및 DNAzyme로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 지질나노입자.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 지질나노입자에서 이온화 가능한 지질/핵산의 중량비는 1 내지 20인, 지질나노입자.
- [청구항 15] 제11항에 따른 지질나노입자를 포함하는, 약물 전달용 조성물.

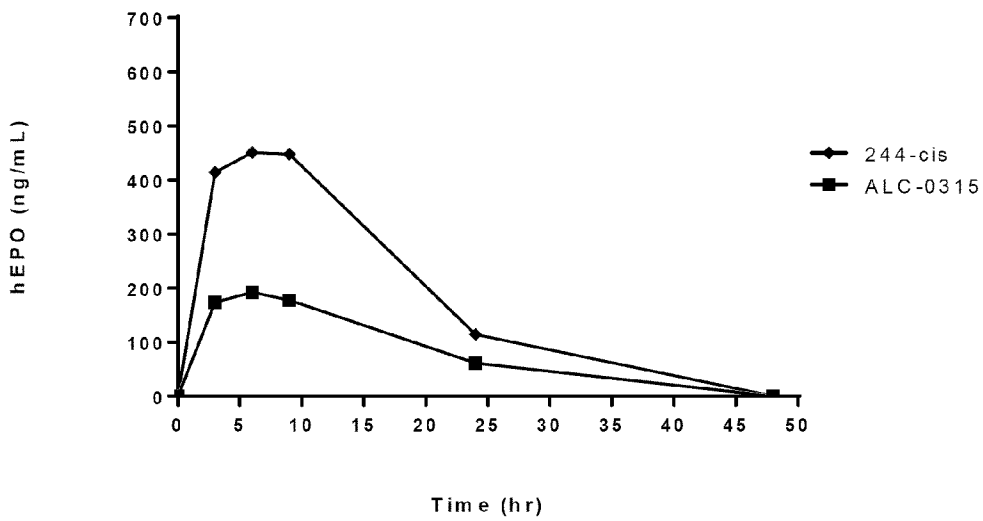
[도1]



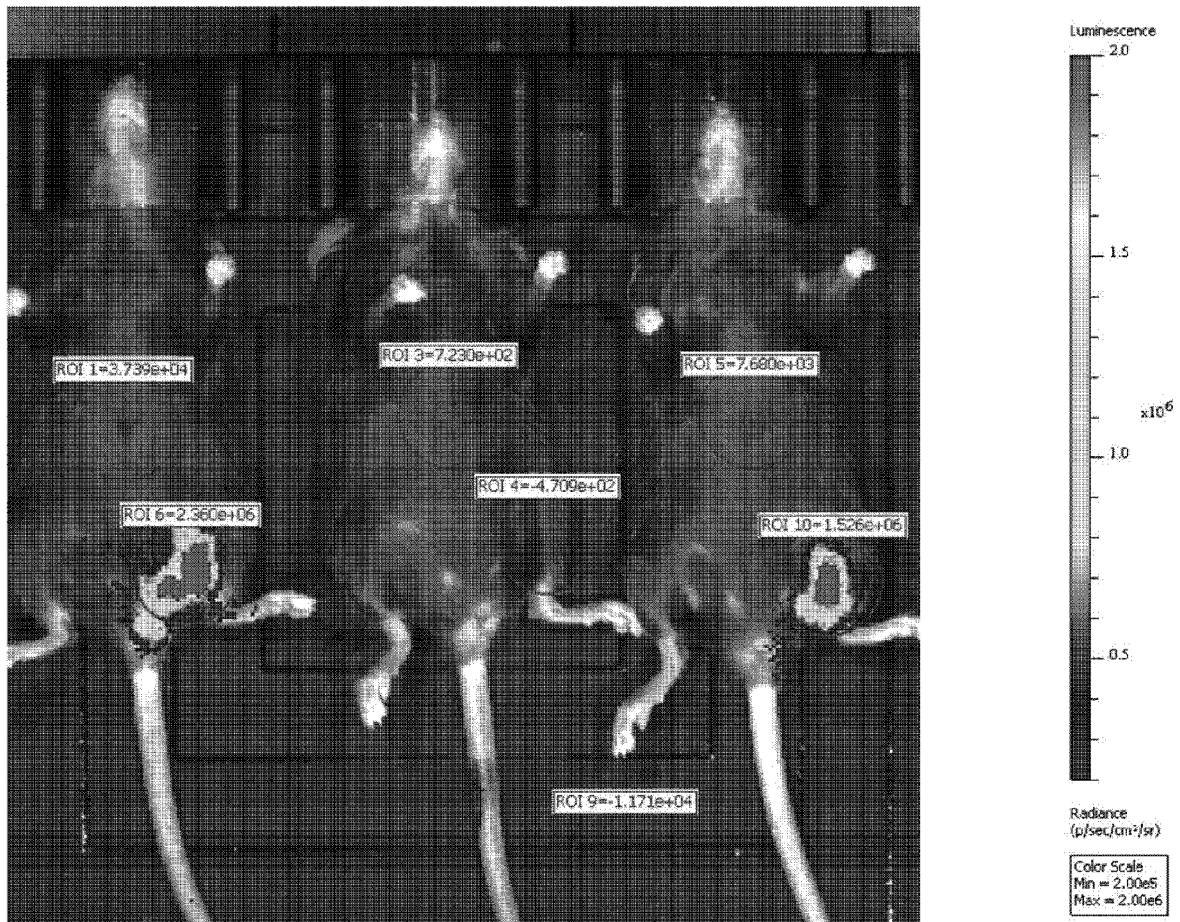
[도2]



[도3]

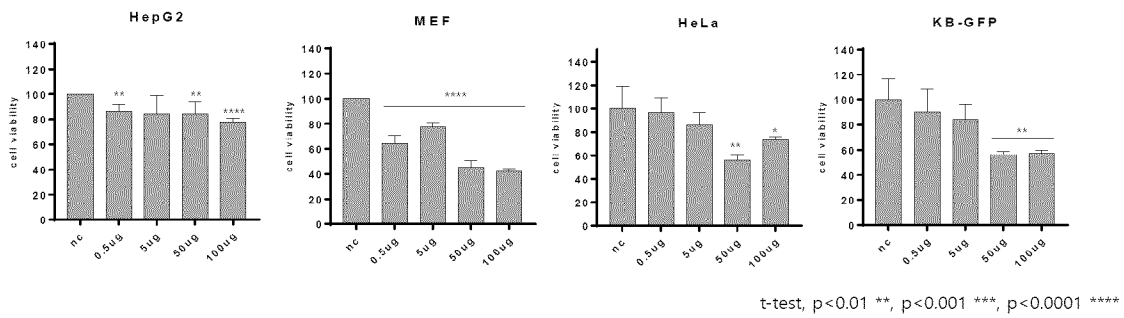


[도4]

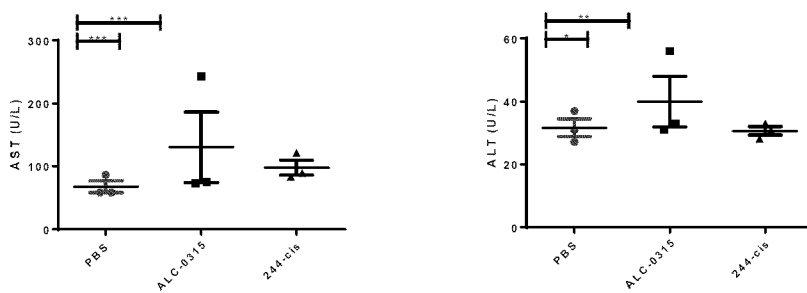


244-cis

[도5]



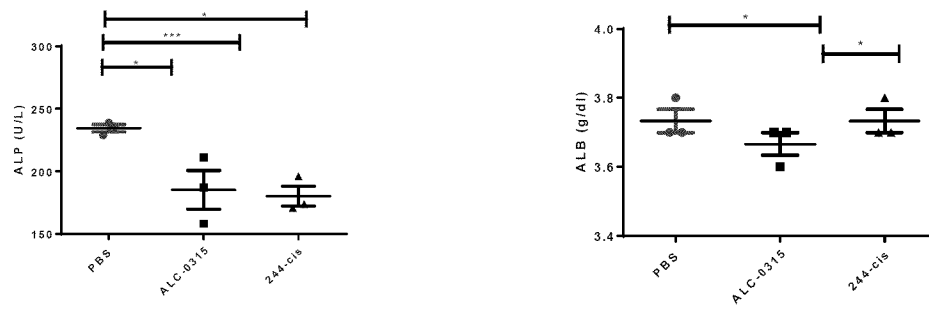
[도6]



Injection (2 mg/kg)	AST (mean ± SD, U/L)
PBS	67.33 ± 16.17
ALC-0315	130.33 ± 97.58
244-cis	97.67 ± 20.43

Injection (2 mg/kg)	ALT (mean ± SD, U/L)
PBS	31.67 ± 5.03
ALC-0315	40.00 ± 13.89
244-cis	30.67 ± 2.52

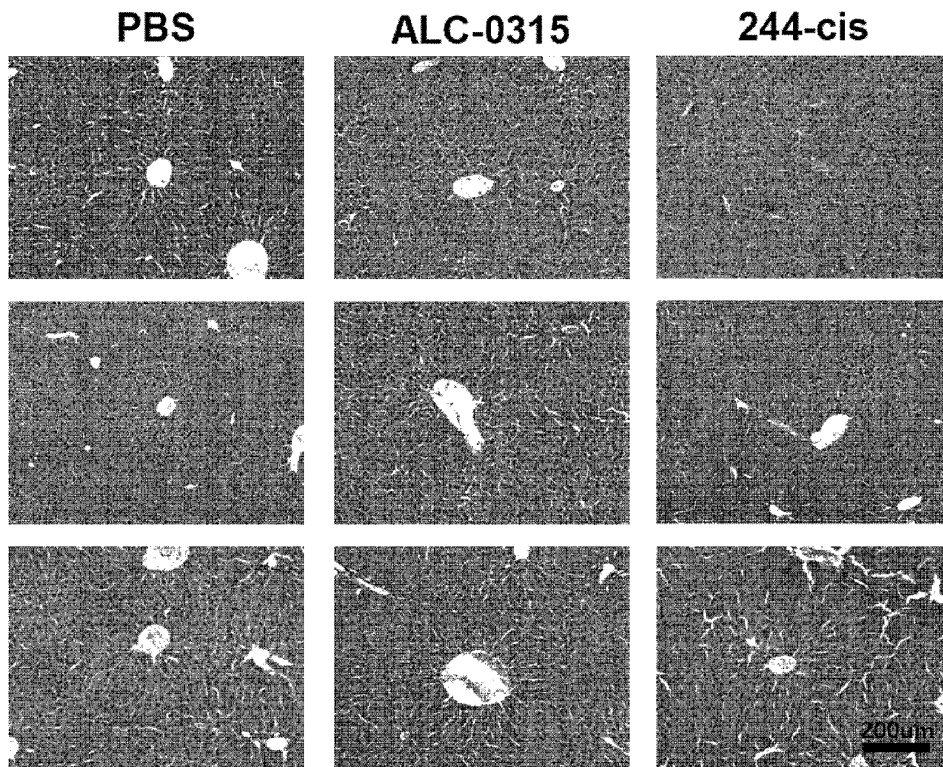
[도7]



Injection (2 mg/kg)	ALP (mean \pm SD, U/L)
PBS	234.67 \pm 5.13
ALC-0315	185.33 \pm 26.54
244-cis	180.33 \pm 13.65

Injection (2 mg/kg)	ALB (mean \pm SD, g/dL)
PBS	3.73 \pm 0.06
ALC-0315	3.63 \pm 0.06
244-cis	3.73 \pm 0.06

[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/000742

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 9/51(2006.01)i; C07D 295/04(2006.01)i; C07C 219/20(2006.01)i; A61K 47/18(2006.01)i; A61K 47/22(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 48/00(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 39/39(2006.01); A61K 47/18(2006.01); A61K 9/127(2006.01); A61K 9/14(2006.01); C07C 229/24(2006.01); C07C 69/013(2006.01); C07D 487/08(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), STN (Registry, Caplus) & keywords: 이온화 가능한 지질(ionizable lipid), 에스터 결합(ester bond), 지질나노입자(lipid nano particle), 약물 전달(drug delivery)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014-0308304 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 16 October 2014 (2014-10-16) See claims 114 and 127; and paragraphs [0005], [0552]-[0555], [0573], [0574], [0577], [0748], [0749], [0755], [0761], [0768], [0812] and [0818].	1,2,5-15
A		3,4
X	US 2021-0107861 A1 (ACUITAS THERAPEUTICS, INC.) 15 April 2021 (2021-04-15) See paragraphs [0002]-[0004], [0006], [0007], [0022], [0043], [0046], [0047], [0053], [0140], [0141], [0291], [0295] and [0297]; and table 1 (compound 19).	1,2,5-15
X	US 2020-0163878 A1 (CUREVAC AG et al.) 28 May 2020 (2020-05-28) See claim 1; and paragraphs [0010], [0045], [0064], [0080], [0641], [0644], [0645], [0657], [0805], [0812] and [1314].	1,2,5-15
A	WO 2018-232120 A1 (MODERNATX, INC.) 20 December 2018 (2018-12-20) See entire document.	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 01 May 2023		Date of mailing of the international search report 01 May 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/000742

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WHITEHEAD, K. A. et al. Degradable lipid nanoparticles with predictable in vivo siRNA delivery activity. Nature communications. 2014, vol. 5, article no. 4277, pp. 1-10. See entire document.	1-15
<hr/>		

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/000742

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2014-0308304	A1	16 October 2014	WO	2013-086373	A1	13 June 2013
US	2021-0107861	A1	15 April 2021	AU	2015-280499	A1	09 February 2017
				AU	2015-280499	B2	19 March 2020
				AU	2020-204111	A1	09 July 2020
				AU	2020-204111	B2	11 November 2021
				AU	2022-200794	A1	24 February 2022
				CA	2953341	A1	30 December 2015
				CN	106795096	A	31 May 2017
				CN	106795096	B	29 May 2020
				CN	111454165	A	28 July 2020
				EP	3160938	A1	03 May 2017
				EP	3160938	B1	16 September 2020
				EP	3766916	A1	20 January 2021
				EP	3766916	B1	28 September 2022
				ES	2834556	T3	17 June 2021
				JP	2017-522376	A	10 August 2017
				JP	2019-218403	A	26 December 2019
				JP	2022-008909	A	14 January 2022
				JP	6594421	B2	23 October 2019
				JP	6957573	B2	02 November 2021
				US	10106490	B2	23 October 2018
				US	10723692	B2	28 July 2020
				US	2015-0376115	A1	31 December 2015
				US	2017-0157268	A1	08 June 2017
				US	2017-0283367	A1	05 October 2017
				US	2019-0270697	A1	05 September 2019
				US	9737619	B2	22 August 2017
				US	9738593	B2	22 August 2017
				WO	2015-199952	A1	30 December 2015
US	2020-0163878	A1	28 May 2020	AU	2017-350488	A1	02 May 2019
				AU	2017-350488	B2	23 June 2022
				BR	112019008481	A2	03 March 2020
				CA	3040337	A1	03 May 2018
				CN	110352071	A	18 October 2019
				EA	201990670	A1	29 November 2019
				EP	3532094	A1	04 September 2019
				IL	266194	A	30 June 2019
				JP	2020-504764	A	13 February 2020
				KR	10-2019-0093816	A	26 August 2019
				MX	2019004913	A	16 September 2019
				SG	11201903460	A	30 May 2019
				US	2021-0251898	A1	19 August 2021
				WO	2018-078053	A1	03 May 2018
WO	2018-232120	A1	20 December 2018	EP	3638678	A1	22 April 2020
				US	2021-0198200	A1	01 July 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 9/51(2006.01)i; C07D 295/04(2006.01)i; C07C 219/20(2006.01)i; A61K 47/18(2006.01)i; A61K 47/22(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 9/51(2006.01); A61K 39/39(2006.01); A61K 47/18(2006.01); A61K 9/127(2006.01); A61K 9/14(2006.01); C07C 229/24(2006.01); C07C 69/013(2006.01); C07D 487/08(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), STN(Registry, Caplus) & 키워드: 이온화 가능한 지질(ionizable lipid), 에스터 결합(ester bond), 지질나노입자(lipid nano particle), 약물 전달(drug delivery)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2014-0308304 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 2014.10.16 청구항 114, 127; 단락 [0005], [0552]-[0555], [0573], [0574], [0577], [0748], [0749], [0755], [0761], [0768], [0812], [0818]	1,2,5-15
A		3,4
X	US 2021-0107861 A1 (ACUITAS THERAPEUTICS, INC.) 2021.04.15 단락 [0002]-[0004], [0006], [0007], [0022], [0043], [0046], [0047], [0053], [0140], [0141], [0291], [0295], [0297]; 표 1 (화합물 19)	1,2,5-15
X	US 2020-0163878 A1 (CUREVAC AG 등) 2020.05.28 청구항 1; 단락 [0010], [0045], [0064], [0080], [0641], [0644], [0645], [0657], [0805], [0812], [1314]	1,2,5-15
A	WO 2018-232120 A1 (MODERNATX, INC.) 2018.12.20 전체 문헌	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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	
2023년05월01일(01.05.2023)	2023년05월01일(01.05.2023)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WHITEHEAD, K. A. 등, "Degradable lipid nanoparticles with predictable in vivo siRNA delivery activity", Nature communications, 2014, 제5권, 아티클 넘버 4277, 페이지 1-10 전체 문헌	1-15

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0308304 A1	2014/10/16	WO 2013-086373 A1	2013/06/13
US 2021-0107861 A1	2021/04/15	AU 2015-280499 A1	2017/02/09
		AU 2015-280499 B2	2020/03/19
		AU 2020-204111 A1	2020/07/09
		AU 2020-204111 B2	2021/11/11
		AU 2022-200794 A1	2022/02/24
		CA 2953341 A1	2015/12/30
		CN 106795096 A	2017/05/31
		CN 106795096 B	2020/05/29
		CN 111454165 A	2020/07/28
		EP 3160938 A1	2017/05/03
		EP 3160938 B1	2020/09/16
		EP 3766916 A1	2021/01/20
		EP 3766916 B1	2022/09/28
		ES 2834556 T3	2021/06/17
		JP 2017-522376 A	2017/08/10
		JP 2019-218403 A	2019/12/26
		JP 2022-008909 A	2022/01/14
		JP 6594421 B2	2019/10/23
		JP 6957573 B2	2021/11/02
		US 10106490 B2	2018/10/23
		US 10723692 B2	2020/07/28
		US 2015-0376115 A1	2015/12/31
		US 2017-0157268 A1	2017/06/08
		US 2017-0283367 A1	2017/10/05
		US 2019-0270697 A1	2019/09/05
		US 9737619 B2	2017/08/22
		US 9738593 B2	2017/08/22
		WO 2015-199952 A1	2015/12/30
US 2020-0163878 A1	2020/05/28	AU 2017-350488 A1	2019/05/02
		AU 2017-350488 B2	2022/06/23
		BR 112019008481 A2	2020/03/03
		CA 3040337 A1	2018/05/03
		CN 110352071 A	2019/10/18
		EA 201990670 A1	2019/11/29
		EP 3532094 A1	2019/09/04
		IL 266194 A	2019/06/30
		JP 2020-504764 A	2020/02/13
		KR 10-2019-0093816 A	2019/08/26
		MX 2019004913 A	2019/09/16
		SG 11201903460 A	2019/05/30
		US 2021-0251898 A1	2021/08/19
		WO 2018-078053 A1	2018/05/03
WO 2018-232120 A1	2018/12/20	EP 3638678 A1	2020/04/22
		US 2021-0198200 A1	2021/07/01