

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 10월 27일 (27.10.2022) WIPO | PCT



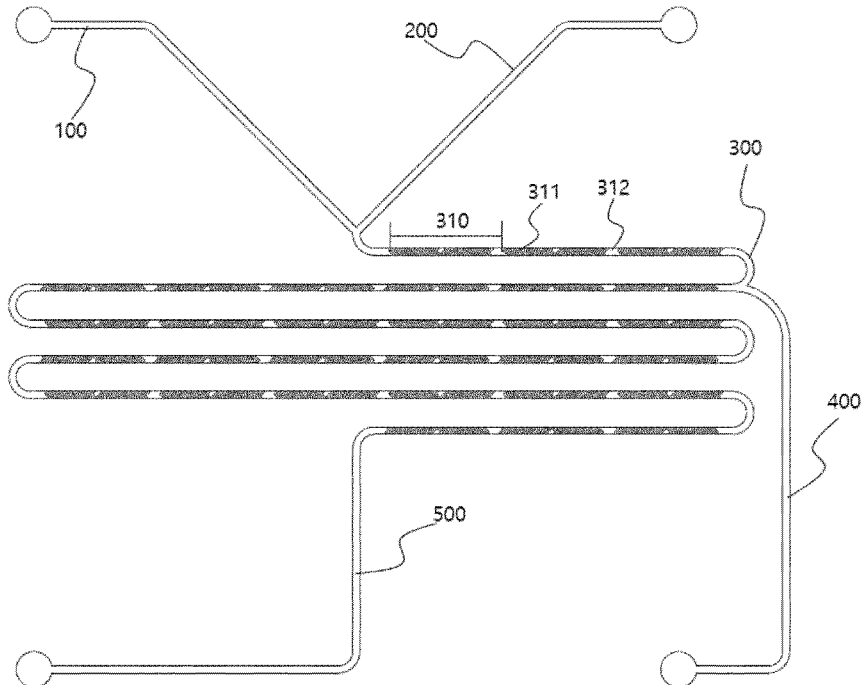
(10) 국제공개번호

WO 2022/225368 A1

- (51) 국제특허분류: *B82B 3/00* (2006.01) *C12N 15/88* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *B82Y 40/00* (2011.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/005796
- (22) 국제출원일: 2022년 4월 22일 (22.04.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2021-0052233 2021년 4월 22일 (22.04.2021) KR
10-2022-0050159 2022년 4월 22일 (22.04.2022) KR
- (71) 출원인: (주)인벤티지랩 (INVENTAGE LAB INC.)
[KR/KR]; 13403 경기도 성남시 중원구 둔촌대로388번길 24, 101호, 601호, 612호, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 정진양 (CHUNG, Jinyang); 13501 경기도 성남시 분당구 양현로 507, 302동 404호, Gyeonggi-do (KR).
박효찬 (PARK, Hyochan); 01455 서울특별시 도봉구 도봉로110나길 9, 901호, Seoul (KR). 전찬희 (CHON, Chan Hee); 13165 경기도 성남시 중원구 황송로 77, 109동 1002호, Gyeonggi-do (KR). 김동훈 (KIM, Donghoon); 13530 경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 1801호, Gyeonggi-do (KR). 김주희 (KIM, Ju Hee); 13622 경기도 성남시 분당구 구미로174번길 26, 203호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 원대규 (WON, Dae Gyu); 08505 서울특별시 금천구 디지털로 121, 509호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,

(54) Title: LIPID NANOPARTICLE PREPARATION METHOD AND PREPARATION APPARATUS THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 지질 나노입자의 제조 방법 및 이의 제조 장치



(57) Abstract: The present invention relates to a lipid nanoparticle preparation method and a preparation apparatus therefor. Since a separate process for selecting prepared lipid nanoparticles is not required, production yield can be increased in a sterilization and filtration process and the like of a downstream stage. In addition, the present invention can prepare lipid nanoparticles which have a uniform size and have, by deviating from a conventional optimum drug and lipid ratio, the reduced amount of ionized lipid of which toxicity is problematic when administered into the body.



WO 2022/225368 A1

SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 지질 나노입자의 제조 방법 및 이의 제조 장치에 관한 것으로, 제조된 지질 나노입자를 선별하기 위한 별도의 공정을 필요로 하지 않아, 후단의 제균 여과 공정 등에서의 생산 수율을 높일 수 있다. 또한, 종래 최적의 약물 및 지질 비율을 벗어나, 체내 주입 시 독성이 문제되는 이온화 지질의 함량을 낮추고, 균일한 크기의 지질 나노입자의 제조할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 지질 나노입자의 제조 방법 및 이의 제조 장치 기술분야

[1] 본 발명은 지질 나노입자(LNP)의 제조 방법 및 이의 제조 장치에 관한 것이다.

배경기술

[2] 지질 나노입자(LNP)는 세포 불투과성인 치료용 핵산, 단백질, 및 펩타이드와 같은 생물학적 활성 화합물에 대한 효과적인 약물 전달 시스템이다.

[3] 보통, 백신은 "1세대", "2세대" 및 "3세대" 백신으로 세분되며, 유전자 백신, 즉, 유전자 백신 접종을 위한 백신은 보통 "3세대" 백신으로 이해된다. 유전자 백신은 전형적으로, 생체 내에서 병원체 또는 종양 항원에 대해 특징적인 펩티드 또는 단백질(항원) 단편의 발현을 가능하게 하는 유전자 조작 핵산 분자로 이루어진다. 유전자 백신은 환자에 투여 시, 표적 세포에 의한 흡수 후에 발현된다. 투여된 핵산의 발현은 암호화된 단백질의 생산을 가져온다. 이러한 단백질이 환자의 면역계에 의해 이물질로 인식되는 경우, 면역 반응이 촉발된다.

[4] 유전자 백신 접종의 맥락에서, DNA 뿐만 아니라 RNA도 투여를 위한 핵산 분자로서 이용될 수 있다. DNA는 상대적으로 안정적이고 다루기 용이하다고 알려져 있다.

[5] 그러나 DNA 이용은 손상된 유전자의 기능 상실에서와 같은 돌연변이 유발성 사건을 잠재적으로 초래하는 투여된 DNA 단편의 환자의 게놈 내로의 원치 않는 삽입 위험을 안고 있다.

[6] 유전자 백신 접종을 위해 DNA 대신 RNA를 이용함으로써, 원치 않는 게놈 통합 및 항-DNA 항체의 생성 위험은 최소화되거나 방지된다. 그러나 RNA는 편제하는 RN아제에 의해 용이하게 분해될 수 있는 상당히 불안정하여, 불투과성, 취약성 및 면역원성의 문제를 갖는다.

[7] 지난 수년간 많은 발전이 이루어졌음에도 적응 면역 반응을 유발할 수 있는 mRNA 백신 접종을 위한 효율적인 방법으로, 지질 나노입자 제제를 이용하였다.

[8] 상기 지질 나노입자 제제는 생체내 핵산 전달을 개선할 수 있다.

[9] 상기 지질 나노입자를 이용한 약물 전달 시스템은 이온화 지질, 비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 포함하는 다성분 제제이다. 양이온성의 이온화 지질은 음이온성 핵산에 결합하는 반면, 다른 성분은 지질 나노입자의 안정한 자가 조립을 지원한다.

[10] 상기 지질 나노입자는 최적의 약물:지질 비율로 제조되어, 혈청에서 분해 및 제거로부터 핵산을 보호하고, 전신 또는 국소 전달에 적합하며, 핵산의 세포 내 전달을 제공할 수 있다.

[11] 상기 지질 나노입자는 종래 제조 방법으로 제조 시, 제조된 입자의 크기가 균일하지 못해, 별도의 분류 공정을 필요로 하는 등의 생산 효율이 저하되는

문제가 있다.

[12] 이러한 문제를 해결하고, 생산 효율을 높이기 위해, 직경이 균일한 지질 나노입자의 제조 공정의 개발이 필요하다.

[13] [선행기술문헌]

[14] [특허문헌]

[15] KR 10-2019-0093816 A1

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[16] 본 발명의 목적은 지질 나노입자의 제조 방법 및 이의 제조 장치를 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 다른 목적은 제조된 지질 나노입자를 선별하기 위한 별도의 공정을 필요로 하지 않아, 후단의 제균 여과 공정 등에서의 생산 수율을 높일 수 있는 지질 나노입자의 제조 장치를 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 다른 목적은 종래 최적의 약물 및 지질 비율을 벗어나, 체내 주입 시 독성이 문제되는 이온화 지질의 함량을 낮추고, 균일한 크기의 지질 나노입자의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지질 나노입자의 제조 방법에 관한 것으로, 핵산을 포함하는 수상 용액을 제조하는 단계; 이온화 지질(Ionizable lipid)을 유기 용액에 용해하여 제1 유상 용액을 제조하는 단계; 비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 유기 용액에 용해하여 제2 유상 용액을 제조하는 단계; 상기 수상 용액을 제1 채널로 주입하여 흐르게 하는 단계; 상기 제1 유상 용액을 제2 채널로 주입하여 흐르게 하는 단계; 상기 수상 용액 및 제1 유상 용액이 교차하여 제1 혼합 용액으로 교반 채널을 흐르는 단계; 상기 교반 채널에 연결된 제3 채널로 제2 유상 용액을 흐르게 하여 상기 제1 혼합 용액과 교차하여 제2 혼합 용액으로 혼합하는 단계; 및 상기 제2 혼합 용액이 교반 채널 내 교반부를 통과하여 핵산을 포함하는 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[20] 상기 교반 채널은 교반부 및 비교반부의 혼합 모듈을 포함할 수 있다.

[21] 상기 혼합 모듈은 교반 채널 내 복수로 형성되며, 상기 교반 채널의 유체 흐름 방향을 기준으로 순서대로 제n 혼합 모듈이 형성되며, 상기 제n 혼합 모듈은 교반 채널 내 반복적으로 형성된 혼합 모듈의 순서를 의미할 수 있다.

[22] 상기 제3 채널은 제1 혼합 모듈 내지 제5 혼합 모듈 사이에 교차점을 형성하여 교반 채널과 결합하여, 제1 혼합 용액과 제2 유상 용액이 교차하여 층류(Laminar flow)를 형성하게 할 수 있다.

[23] 상기 지질 나노입자는 균일한 구 형상으로, 다분산 지수(Polydispersity index)가 0.2 이하일 수 있다.

- [24] 상기 이온화 지질은 지질 나노입자 내 지질의 총 중량 대비 10 내지 30 mol%로 포함할 수 있다.
- [25] 상기 이온화 지질 및 핵산의 중량 비율이 3:1 내지 50:1일 수 있다.
- [26] 상기 핵산은 RNA, DNA, siRNA(short interfering RNA), mRNA(messenger RNA) aptamer(aptamer), 안티센스 ODN(antisense oligodeoxynucleotide), 안티센스 RNA(antisense RNA), 리보자임(ribozyme), 디엔에이자임(DNAzyme) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [27] 상기 비이온화 지질은 DSPC(distearoylphosphatidylcholine), DOPE(dioleolphosphatidyl ethanolamine), DPPE(bis(diphenylphosphino)ethane), 디아실포스파티딜콜린(diacyl phosphatidylcholine), 디아실포스파티딜에탄올아민(diacylphosphatidylethanolamine), 디아실포스파티딜세린(diacylphosphatidylserine) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [28] 상기 중성지질은 폴리에틸렌글리콜 2000 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(PEG(2000) DSPE), DMG-PEG, PEG-DMPE, DPPE-PEG, DPG-PEG, PEG-DOPE 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [29] 상기 융합성 지질은 인지질, 콜레스테롤, 토크페롤 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [30] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 저농도의 이온화 지질을 포함하는 지질 나노입자는 상기 제조 방법으로 제조된 것 일 수 있다.
- [31] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 저농도의 이온화 지질을 포함하는 지질 나노입자의 제조 장치는 핵산을 포함하는 수상 용액을 흐르게 하는 제1 채널; 이온화 지질(Ionizable lipid)을 포함하는 제1 유상 용액을 흐르게 하는 제2 채널; 비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 포함하는 제2 유상 용액을 흐르게 하는 제3 채널; 및 교반 채널을 포함하며, 상기 제1 채널 및 제2 채널은 제1 교차점을 형성하며, 상기 교차점은 교반 채널과 연결되며, 상기 교반 채널은 교반부 및 비교반부의 혼합 모듈을 포함할 수 있다.
- [32] 상기 혼합 모듈은 교반 채널 내 복수로 형성되며, 상기 교반 채널의 유체 흐름 방향을 기준으로 순서대로 제n 혼합 모듈이 형성되며, 상기 제n 혼합 모듈은 교반 채널 내 반복적으로 형성된 혼합 모듈의 순서를 의미할 수 있다.
- [33] 상기 교반 채널 내에 혼합 모듈을 3개 내지 70개로 포함할 수 있다.
- [34] 상기 제3 채널은 제1 혼합 모듈 내지 제5 혼합 모듈 사이에 교차점을 형성하여 교반 채널과 결합될 수 있다.
- [35] 상기 혼합 모듈의 길이는 교반 채널 내 유체의 흐름 방향을 기준으로 1 내지 5mm일 수 있다.
- [36] 상기 교반부 및 비교반부의 길이 비율은 교반 채널 내 유체의 흐름 방향을 기준으로 45:1 내지 5:0.3일 수 있다.

[37] 상기 교반부는 유입되는 유체를 혼합하기 위해 그루브(groove)가 형성될 수 있다.

[38] 상기 교반부의 그루브는 교반 채널 내 층류(Laminar flow)의 혼합 효율을 높이기 위해, 카오스 혼합을 발생하게 할 수 있다.

[39] 상기 그루브의 형상이 사각형, 반원 또는 삼각형일 수 있다.

발명의 효과

[40] 본 발명은 제조된 지질 나노입자를 선별하기 위한 별도의 공정을 필요로 하지 않아, 후단의 제균 여과 공정 등에서의 생산 수율을 높일 수 있다.

[41] 또한, 종래 최적의 약물 및 지질 비율을 벗어나, 체내 주입 시 독성이 문제되는 이온화 지질의 함량을 낮추고, 균일한 크기의 지질 나노입자를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[42] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 제조 장치에 대한 도면이다.

[43] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 종래 지질 나노입자를 제조하기 위한 제조 장치에 대한 도면이다.

[44] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 제조 장치에 대한 사진이다.

[45] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 의해 제조된 지질 나노입자의 PDI 측정 결과이다.

[46] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 지질 나노입자에 대한 Cryo-EM 사진이다.

[47] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 수상용액과 제1 유상 용액의 유량비에 따른 혼합 비율 지수(mixing index rate, %)의 측정 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[48] 본 발명은 핵산을 포함하는 수상 용액을 제조하는 단계; 이온화 지질(Ionizable lipid)을 유기 용액에 용해하여 제1 유상 용액을 제조하는 단계; 비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 유기 용액에 용해하여 제2 유상 용액을 제조하는 단계; 상기 수상 용액을 제1 채널로 주입하여 흐르게 하는 단계; 상기 제1 유상 용액을 제2 채널로 주입하여 흐르게 하는 단계; 상기 수상 용액 및 제1 유상 용액이 교차하여 제1 혼합 용액으로 교반 채널을 흐르는 단계; 상기 교반 채널에 연결된 제3 채널로 제2 유상 용액을 흐르게 하여 상기 제1 혼합 용액과 교차하여 제2 혼합 용액으로 혼합하는 단계; 및 상기 제2 혼합 용액이 교반 채널 내 교반부를 통과하여 핵산을 포함하는 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함하는 지질 나노입자의 제조 방법에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[49] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[50] mRNA는 전령 리보핵산(messenger RiboNucleic Acid)의 줄임말로 유전정보를

가진 DNA가 mRNA가 되고 이를 이용하여 단백질이 합성되는 과정에서 DNA와 단백질을 연결해주는 중간체이다.

- [51] 코로나 19에 의해 mRNA 백신의 관심 및 개발이 집중되고 있다. mRNA 백신은 다른 유형의 백신에 비해 몇 가지 이점이 있다. mRNA 백신의 가장 큰 장점은 mRNA를 포함하는 지질 나노입자(LNP)가 플랫폼 기술에 해당되어, 코로나 19와 같이 변이가 많이 발생하는 바이러스에 대하여, 빠른 기술 개발이 가능하다는 것이다.
- [52] 구체적으로, 보호 단백질 항원(protective protein antigen)을 식별하고 상기 항원에 대한 유전자를 시퀀싱하여, mRNA를 제조할 수 있다. 이러한 방식을 이용하여 신규 mRNA를 제조하고, 종래 mRNA 백신의 제형 설계 및 제조 공정을 이용할 경우, 신속한 mRNA 백신의 제조가 가능하다. 이는 서로 다른 항원을 코딩하는 mRNA가 화학적, 물리적으로 매우 유사하기 때문에 새로운 mRNA 백신의 제형 설계 및 제조 공정은 종래 mRNA 백신의 제형 및 제조 공정과 동일한 단계로 진행될 수 있음을 의미한다.
- [53] 인산염 그룹의 음전하 때문에 mRNA는 일반적으로 비경구용으로 사용되는 pH 범위에서 다가 음이온성 거대분자이다. 상기와 같이, 음전하를 띠는 mRNA의 전기적인 성질을 이용해, 양전하를 띠는 이온화 지질(ionisable lipid 또는 cationic lipid)를 이용하여 지질 나노입자를 제조할 수 있다. 구체적으로, 이온화 지질은 양전하를 띠는 지질로, 음전하를 띠는 mRNA와 전기적인 인력을 통해 서로 강하게 결합하게 된다. 상기 이온화 지질 이외에, 추가로 비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 포함하여 지질 나노입자를 형성하게 된다.
- [54] US 9364435 B2의 핵산-지질 입자는 (a) 핵산, (b) 양이온성 지질, (c) 비양이온성 지질 및 (d) 융합성 지질을 포함하며, 입자 내 지질의 총 함량을 기준으로, 상기 양이온성 지질을 50 mol% 내지 85 mol%로 포함하고, 상기 비양이온성 지질을 13 mol% 내지 49.5 mol%로 포함하고, 융합성 지질을 0.5 mol% 내지 2 mol%로 포함하는 것으로 개시하고 있다.
- [55] 또한, EP 2279254 B1의 핵산-지질 입자는 입자 내 지질의 총 함량을 기준으로, 상기 양이온성 지질을 50 mol% 내지 65 mol%로 포함하고, 상기 비양이온성 지질을 49.5 mol% 이하로 포함하고, 콜레스테롤 또는 이의 유도체를 30 mol% 내지 40 mol%로 포함하며, 융합성 지질을 0.5 mol% 내지 2 mol%로 포함하는 것으로 개시하고 있다.
- [56] 상기와 같이 mRNA를 포함하는 나노 지질입자는 이온화 지질(양이온성 지질)을 입자 내 다량 포함하는 것으로 확인되고 있다.
- [57] 다만, 상기와 같이 mRNA를 포함하는 지질 나노입자(LNP)는 체외 및 체내 독성으로 인하여 치료용 안전성에 대한 일부 우려는 여전히 남아 있다. 이러한 독성은 주로 비특이적인 전하 상호작용에 기초하여 발생한다. 즉 양전하를 띠는 이온화 지질의 독성 문제가 이슈화되고 있으며, 이를 보완하기 위한 연구가

지속되고 있다.

- [58] 양이온성의 이온화 지질의 사용량을 줄이는 시도가 가장 직관적이거나, 한계점 이하의 저농도의 이온화 지질을 사용할 경우 제조된 지질 나노입자(LNP)의 크기가 균일하지 않은 문제가 있다. 균일하지 않은 크기의 지질 나노입자(LNP)를 제조하는 경우, 원치 않는 크기의 지질 나노입자(LNP)를 제거하기 위한 공정이 추가로 필요하게 되며, 후단에서 진행하는 제균 여과 공정 등에서도 큰 손실로 연결된다. 이는 mRNA를 포함하는 지질 나노입자의 생산 수율을 크게 저하시키는 원인이 된다.
- [59] 본 발명은 핵산을 포함하는 지질 나노입자의 제조 방법에 관한 것으로, 입자의 크기가 균일한 지질 나노입자를 제조할 수 있는 제조 방법을 제공하고자 한다.
- [60] 또한, 앞서 설명한 바와 같이, 독성이 문제되는 이온화 지질의 함량을 낮추면서도, 균일한 직경을 갖는 지질 나노입자를 제조하는 것을 특징으로 한다. 종래 지질 나노입자를 제조하기 위한 지질들의 함량 범위 내이거나, 이온화 지질의 함량 범위를 낮추는 경우에도, 종래 제조 방법과 상이한 방법을 이용함에 따라, 직경이 균일한 입자로의 제조가 가능한 것을 특징으로 한다.
- [61] 구체적으로, 핵산을 포함하는 수상 용액을 제조하는 단계; 이온화 지질(Ionizable lipid)을 유기 용액에 용해하여 제1 유상 용액을 제조하는 단계; 비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 유기 용액에 용해하여 제2 유상 용액을 제조하는 단계; 상기 수상 용액을 제1 채널로 주입하여 흐르게 하는 단계; 상기 제1 유상 용액을 제2 채널로 주입하여 흐르게 하는 단계; 상기 수상 용액 및 제1 유상 용액이 교차하여 제1 혼합 용액으로 교반 채널을 흐르는 단계; 상기 교반 채널에 연결된 제3 채널로 제2 유상 용액을 흐르게 하여 상기 제1 혼합 용액과 교차하여 제2 혼합 용액으로 혼합하는 단계; 및 상기 제2 혼합 용액이 교반 채널 내 교반부를 통과하여 핵산을 포함하는 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [62] 구체적으로, 핵산을 용매에 혼합하여, 수상 용액을 제조한다. 상기 용매는 시트르산 용액으로, pH 3.0인 것이나, 상기 예시에 제한되지 않고, 핵산을 혼합하여, 지질 나노입자를 제조할 수 있는 용매는 제한 없이 모두 사용 가능하다.
- [63] 상기 핵산은 RNA, DNA, siRNA(short interfering RNA), mRNA(messenger RNA) aptamer, 안티센스 ODN(antisense oligodeoxynucleotide), 안티센스 RNA(antisense RNA), 리보자임(ribozyme), 디엔에이자임(DNAzyme) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 mRNA이나, 상기 예시에 국한되지 않는다.
- [64] 상기 핵산은 질병을 예방 또는 치료하기 위한 용도이며, 일 예시로, 코로나 19 백신과 같이 코로나 19 바이러스에 대항하기 위한 스파이크 단백질을 합성하게 한다. 상기 예시에 국한되지 않고, 질병의 예방 또는 치료를 위한 핵산은 모두 사용이 가능하다.

- [65] 이후, 이온화 지질을 유기 용액에 용해하여 제1 유상 용액을 제조한다. 상기 이온화 지질은 ALC-0315(제네반트), ALC-0159(제네반트), DlinDAP, Dlin-MC3-DMA 또는 SM102(알부투스) 등을 이용할 수 있다. 상기 이온화 지질은 예시에 국한되지 않고 지질 나노입자의 제조에 이용될 수 있는 이온화 지질은 제한 없이 모두 사용 가능하다.
- [66] 상기 유기 용액은 알코올이며, 구체적으로 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, n-프로판올 등 일 수 있으나, 바람직하게는 에탄올이지만, 상기 예시에 국한되지 않고 이온화 지질을 균일하게 용해시킬 수 있는 유기 용매는 제한 없이 모두 사용 가능하다.
- [67] 비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 유기 용액에 용해하여 제2 유상 용액을 제조한다.
- [68] 상기 비이온화 지질은 융합성 지질과 함께 지질 나노입자의 안정성을 높이기 위해 포함될 수 있다. 지질 나노입자는 목적하는 조직이나 기관에 핵산을 도달하게 하기 위한 것이나, 체내 주입 후, 목적하는 조직이나 기관에 도달하기 전에 파괴되는 문제가 있다. 이러한 문제를 방지하고자, 비이온화 지질 및 융합성 지질을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 비이온화 지질은 DSPC(distearoylphosphatidylcholine), DOPE(dioleolphosphatidyl ethanolamine), DPPE(bis(diphenylphosphino)ethane), 디아실포스파티딜콜린(diacyl phosphatidylcholine), 디아실포스파티딜에탄올아민(diacylphosphatidylethanolamine), 디아실포스파티딜세린(diacylphosphatidylserine) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 바람직하게는 DSPC이지만, 상기 예시에 국한되지 않는다.
- [69] 상기 융합성 지질은 콜레스테롤, 토크페롤 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 콜레스테롤이나 상기 예시에 국한되지 않는다.
- [70] 상기 중성지질은 입자의 크기를 조절하고, 보관 중 응집을 방지하는 입체 장벽 역할을 하기 위해 포함되는 것으로, 구체적으로 폴리에틸렌글리콜 2000 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(PEG(2000) DSPE), DMG-PEG, PEG-DMPE, DPPE-PEG, DPG-PEG, PEG-DOPE 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 DMG-PEG이지만, 상기 예시에 국한되지 않는다.
- [71] 상기 제2 유상 용액을 제조하기 위해 사용되는 유기 용액은 알코올이며, 구체적으로 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, n-프로판올 등 일 수 있으나, 바람직하게는 에탄올이지만, 상기 예시에 국한되지 않고 이온화 지질을 균일하게 용해시킬 수 있는 유기 용매는 제한 없이 모두 사용 가능하다.
- [72] 상기 제조된 수상 용액 및 제1 유상 용액은 제1 채널 및 제2 채널로 주입하여 흐르게 한다. 상기 제1 채널 및 제2 채널은 후술하는 바와 같이 교차점을

형성하고, 교반 채널과 연결된다.

- [73] 상기 제1 채널 및 제2 채널로 각 주입된 수상 용액 및 제1 유상 용액은 교차점에서 층류(laminar flow)를 형성하여 교반 채널을 흐르게 된다.
- [74] 일반적으로 지질 나노입자를 제조하는 공정은 핵산이 용해된 수상 용액과 4종의 지질이 모두 용해된 유상 용액을 각 채널로 주입하고, 채널 내로 주입된 수상 용액과 유상 용액이 교차점에서 층류를 형성하여 교반 채널을 흐르게 된다. 상기 교반 채널로 주입된 수상 용액과 유상 용액이 혼합되고, 수상 용액 내 핵산, 유상 용액 내 이온화 지질, 비이온화 지질, 중성지질 및 융합성 지질이 정전기적 인력에 의해 결합되어 지질 나노입자를 형성하게 된다.
- [75] 즉, 수상 용액과 유상 용액을 혼합하여 지질 나노입자를 제조하며, 상기 유상 용액에는 4종의 지질이 모두 혼합된 상태를 이용한다.
- [76] 반면 본 발명의 저농도의 이온화 지질을 포함하는 지질 나노입자의 제조 방법은 유상 용액을 제1 유상 용액 및 제2 유상 용액으로 분류하고, 상기 제1 유상 용액에는 이온화 지질만 포함하고, 제2 유상 용액에 나머지 지질을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [77] 상기와 같이 제1 채널에서는 수상 용액이 흐르게 되고, 제2 채널에서는 제1 유상 용액이 흐르게 되어, 상기 수상 용액 내 핵산과 제1 유상 용액 내 이온화 지질이 정전기적 인력에 의해 우선 결합하게 된다.
- [78] 상기 수상 용액 내 핵산과 제1 유상 용액 내 이온화 지질이 정전기적 인력에 의해 보다 쉽게 결합하게 하기 위해, 교반 채널 내 교반부를 통과하게 된다.
- [79] 상기 교반 채널은 구체적으로 교반부 및 비교반부를 포함하는 혼합 모듈을 복수로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [80] 상기 혼합 모듈은 상기 교반 채널의 유체 흐름 방향을 기준으로 순서대로 제 n 혼합 모듈이 형성되며, 상기 제 n 혼합 모듈은 교반 채널 내 반복적으로 형성된 혼합 모듈의 순서를 의미한다.
- [81] 구체적으로, 제1 혼합 모듈은 교반 채널의 유체 흐름 방향을 기준으로 가장 앞에 형성된 것이며, 그 이후 제2 혼합 모듈, 제3 혼합 모듈 등으로 형성될 수 있다.
- [82] 상기 혼합 모듈은 교반부 및 비교반부를 포함하는 것을 특징으로 한다. 후술하는 바와 같이 교반부는 수상 용액 및 제1 유상 용액이 잘 혼합되도록 하기 위해, 그루부(groove)가 형성된 것을 특징으로 한다. 상기 수상 용액 및 제1 유상 용액이 층류를 형성하여 흐르다가, 교반부에서 카오스 혼합(chaotic mix)되고, 상기 혼합 과정에 의해 핵산과 이온화 지질이 결합하게 된다.
- [83] 상기 핵산은 구체적으로 mRNA이며, mRNA는 앞서 설명한 바와 같이 음이온성이며, 이온화 지질은 양이온성으로 상호간 정전기적 인력에 의해 결합되게 된다.
- [84] 상기 수상 용액 및 제1 유상 용액이 교반 채널을 통과하며 혼합 공정이 진행되어 제1 혼합 용액으로 교반 채널을 흐르게 되면, 순차적으로 제2 혼합

- 용액이 제3 채널로 주입되어 교반 채널 내 제1 혼합 용액과 혼합하게 된다.
- [85] 상기 제3 채널은 제1 혼합 모듈 내지 제5 혼합 모듈 사이에 교반 채널과 교차점을 형성하여 결합하게 된다. 구체적으로, 상기 제3 채널은 제2 혼합 모듈 내지 제4 혼합 모듈 사이에서 교반 채널과 교차점을 형성하여 결합하게 되며, 보다 바람직하게는 제3 혼합 모듈 내 비교반부에서 교반 채널과 교차점을 형성하여 결합하게 된다.
- [86] 상기와 같이, 제3 채널의 결합 부분은 제2 유상 채널이 제1 혼합 용액과 층류를 형성하여 혼합되기에 앞서, 상기 제1 혼합 용액 내에서 핵산과 이온화 지질이 완전히 결합시킨 이후, 제2 유상 채널의 비이온화 지질, 중성지질 및 융합성 지질과 결합하게 하기 위해, 핵산과 이온화 지질의 결합 정도를 고려하여 결정하였다.
- [87] 구체적으로, 제1 채널 및 제2 채널을 이용하여 수상 용액과 제1 유상 용액을 교차시켜 층류를 형성시킨 후, 교반 채널을 흐르게 한 후, 혼합 모듈을 통과하도록 하는 경우, 제3 혼합 모듈 내 교반부를 통과하면 수상 용액 내 핵산과 제1 유상 용액 내 이온화 지질이 혼합되어 80% 이상의 혼합율(mixing rate)를 나타냄을 확인하였다.
- [88] 구체적으로 제1 채널로 주입되는 수상 용액 및 제2 채널로 주입되는 제1 유상 용액의 유량비가 1:1 내지 10:1이며, 3:1 내지 9:1일 수 있다. 상기 범위 내에서 혼합하여 사용 시, 입자의 크기가 균일한 지질 나노입자로의 제조가 가능하다. 보다 구체적으로 상기 범위 미만으로 포함하는 경우, 후 공정의 진행 시 에탄올의 함량이 많아 지질 나노입자의 형태 유지가 어려운 문제가 있으며, 상기 범위를 초과하여 포함하는 경우, 수상 용액이 다량 포함됨에 따라, 수상 용액 내 지질 입자의 움직임이 제한되어 직경이 너무 작은 입자를 형성하는 문제가 있다.
- [89] 이에, 본 발명에서는 제3 채널의 교반 채널과의 결합 위치를 핵산과 이온화 지질의 결합 정도를 고려하여 결정한 것으로, 상기 제1 혼합 모듈 내 비교반부, 제2 혼합 모듈 내 비교반부, 제3 혼합 모듈 내 비교반부, 제4 혼합 모듈 내 비교반부 또는 제5 혼합 모듈 내 비교반부에 결합시켜, 제2 유상 용액이 제1 혼합 용액과 층류를 형성하고, 이후 교반 모듈을 통과하여 제2 유상 용액과 제1 혼합 용액이 혼합되어, 제2 혼합 용액을 형성하고, 상기 제2 혼합 용액 내에서 핵산 및 이온화 지질이 결합된 입자와 비이온화 지질, 중성지질 및 융합성 지질이 결합하여 핵산을 포함하는 지질 나노입자를 형성하도록 한다.
- [90] 종래와 달리 지질 나노입자를 제조하기 위해, 핵산, 이온화 지질, 비이온화 지질, 중성지질 및 융합성 지질을 한번에 혼합하는 경우와 비교하여 본 발명에서와 같이 단계적으로 결합을 유도하여 지질 나노입자를 형성하는 경우, 보다 균일한 지질 나노입자로 제조할 수 있다.
- [91] 상기 본 발명에서 제조된 지질 나노입자는 균일한 구 형상으로, 다분산 지수(Polydispersity index)가 0.2 이하이며, 0.01 내지 0.2이며, 0.05 내지 0.2이며, 0.1 내지 0.2일 수 있다. 상기 범위 내에서 다분산 지수를 만족하는 지질

나노입자는 매우 균일한 크기를 갖는 지질 나노입자로 제공됨을 의미한다. 상기와 같이 균일한 크기를 갖는 지질 나노입자를 제조하는 경우, 특정 크기를 갖는 지질 나노입자를 분류하기 위한 별도의 작업을 필요로 하지 않기 때문에, 지질 나노입자를 백신 또는 치료제로 제공하기 위한 혼합 공정 이후의 후단의 공정에서 생산 수율을 극대화할 수 있다.

- [92] 또한, 상기 본 발명의 핵산을 포함하는 지질 나노입자는 상기 이온화 지질을 지질 나노입자 내 지질의 총 중량 대비 10 내지 30mol%일 수 있다. 또한, 상기 이온화 지질을 지질 나노입자 내 지질의 총 중량 대비 15 내지 19.9 mol%로 포함할 수 있다. 상기와 같이 이온화 지질을 20 mol% 이상으로 포함하는 경우에도 종래 지질 나노입자의 제조 방법과 비교하여 균일한 직경을 갖는 지질 나노입자로 제조가 가능하며, 상기 이온화 지질의 함량 범위는 앞서 검토한 선행특허 뿐 아니라, 상품화되어 있는 mRNA 백신과 비교하여 저농도로 포함되는 경우에도, 제조한 지질 나노입자는 균일한 크기를 갖도록 제조할 수 있다. 즉, 독성의 이슈가 있는 이온화 지질의 함량은 낮춰, 독성의 문제를 해소함과 동시에 제조 공정 상 이온화 지질과 다른 지질들을 분리시켜 핵산과 결합하게 하여 균일한 크기를 갖는 지질 나노입자를 제조하여, 생산 수율을 높일 수 있다.
- [93] 상기 이온화 지질 및 핵산의 중량 비율이 3:1 내지 50:1이며, 3.3:1 내지 50:1이며, 3.3:1 내지 16.7:1일 수 있다. 또한, 이온화 지질, 비이온화 지질, 융합성 지질 및 중성 지질의 mol 비율은 10 내지 50 : 10 내지 50 : 30 내지 65 : 1 내지 2.5의 범위 내 일 수 있다. 종래 기술과 비교하여 융합성 지질의 함량 범위를 높이고, 이온화 지질의 함량을 낮춘 것을 확인할 수 있다.
- [94] 앞서 설명한 바와 같이 종래의 제조 방법은 이온화 지질의 함량을 낮출 경우, 제조된 지질 나노입자의 크기가 균일하지 않아, 사실 상 지질들의 함량 범위를 조정하기 불가하다고 알려지고 있다.
- [95] 다만, 본 발명에서는 종래 제조 방법과 달리, 지질을 이온화 지질과 나머지 지질로 분류하고, 이를 각 유기 용매에 용해시킨 후, 핵산과 단계적으로 결합시킴으로 인해 이온화 지질의 함량을 낮추면서도 균일한 크기를 갖는 지질 나노입자를 제조할 수 있다.
- [96] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 저농도의 이온화 지질을 포함하는 지질 나노입자는 상기 제조 방법에 의해 제조된 것일 수 있다.
- [97] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명의 제조 방법으로 제조된 지질 나노입자는 이온화 지질을 적은 함량으로 포함하고 있어, 이온화 지질을 다량 포함함에 따른 독성 문제도 해소할 수 있을 뿐 아니라, 제조된 입자의 크기 또한 균일하여 생산 수율을 높일 수 있다.
- [98] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 저농도의 이온화 지질을 포함하는 지질 나노입자의 제조 장치는 핵산을 포함하는 수상 용액을 흐르게 하는 제1 채널; 이온화 지질(Ionizable lipid)을 포함하는 제1 유상 용액을 흐르게 하는 제2 채널;

비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 포함하는 제2 유상 용액을 흐르게 하는 제3 채널; 및 교반 채널을 포함하며, 상기 제1 채널 및 제2 채널은 제1 교차점을 형성하며, 상기 교차점은 교반 채널과 연결되며, 상기 교반 채널은 교반부 및 비교반부의 혼합 모듈을 포함할 수 있다.

- [99] 상기 혼합 모듈은 교반 채널 내 복수로 형성되며, 상기 교반 채널의 유체 흐름 방향을 기준으로 순서대로 제 n 혼합 모듈이 형성되며, 상기 제 n 혼합 모듈은 교반 채널 내 반복적으로 형성된 혼합 모듈의 순서를 의미한다.
- [100] 상기 교반 채널 내에 혼합 모듈을 3개 내지 70개로 포함할 수 있다. 혼합 모듈은 앞서 설명한 바와 같이 교반부 및 비교반부를 포함하는 것으로, 층류로 흐르는 수상 용액 및 유상 용액이 교반부에서 혼합될 수 있도록 하는 것으로, 교반 채널 내에서 교반부 및 비교반부가 복수로 반복되도록 하여, 혼합 효율을 높일 수 있다.
- [101] 상기 교반 채널 내 혼합 모듈은 3개 내지 70개로 포함되며, 3개 내지 50개로 포함되며, 3개 내지 40개로 포함되며, 3개 내지 35개로 포함되며, 바람직하게는 30개로 포함될 수 있다. 상기 범위 내에서 혼합 모듈을 포함하는 경우, 앞서 설명한 바와 같이 수상 용액 내 핵산과 제1 유상 용액 내 이온화 지질이 완전히 결합된 후, 제2 유상 용액 내의 비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질과 단계적으로 결합하여 균일한 크기를 갖는 지질 나노입자로 제조가 가능하다.
- [102] 상기 제3 채널은 제1 혼합 모듈 내지 제5 혼합 모듈 사이에 교차점을 형성하여 교반 채널과 결합될 수 있다.
- [103] 상기 제3 채널은 제2 유상 용액을 흐르게 하여 교반 채널을 흐르고 있는 제1 혼합 용액과 층류를 형성하게 하기 위한 것으로, 앞서 설명한 바와 같이, 제3 채널을 흐르는 제2 유상 용액 내 지질들은 핵산과 이온화 지질이 충분히 혼합되어 입자를 형성한 후, 상기 입자와 결합하게 하기 위해, 제1 채널 및 제2 채널의 교차점과 일정 간격을 두고 교반 채널에 결합하게 한다.
- [104] 상기 제3 채널의 결합 위치는 제1 혼합 모듈 내지 제5 혼합 모듈 사이이며, 구체적으로 상기 제1 혼합 모듈 내 비교반부, 제2 혼합 모듈 내 비교반부, 제3 혼합 모듈 내 비교반부, 제4 혼합 모듈 내 비교반부 또는 제5 혼합 모듈 내 비교반부에 결합시킬 수 있고, 바람직하게는 제2 혼합 모듈 내 비교반부, 제3 혼합 모듈 내 비교반부, 제4 혼합 모듈 내 비교반부 또는 제5 혼합 모듈 내 비교반부에 결합시킬 수 있고, 보다 바람직하게는 제3 혼합 모듈 내 비교반부에 결합시킬 수 있다.
- [105] 상기와 같이 결합 위치를 조정시킴에 따라, 제3 채널 내 제2 유상 용액이 제1 혼합 용액과 교차되기 전에, 제1 혼합 용액이 제1 혼합 모듈의 교반부, 제2 혼합 모듈의 교반부 및 제3 혼합 모듈의 교반부를 통해, 혼합되어 수상 용액 내 핵산과 제1 유상 용액 내 이온화 지질 간의 결합에 충분한 시간이 제공될 수 있다.
- [106] 상기 혼합 모듈의 길이는 교반 채널 내 유체의 흐름 방향을 기준으로 1 내지

5mm일 수 있다. 또한, 상기 교반부 및 비교반부의 길이 비율은 교반 채널 내 유체의 흐름 방향을 기준으로 45:1 내지 5:0.3일 수 있다. 구체적으로 교반부의 길이는 2 내지 4mm이며, 비교반부는 0.1 내지 0.25mm이며, 교반부의 길이는 2 내지 3.5mm이며, 비교반부는 0.1 내지 0.20mm이며, 교반부의 길이는 2 내지 3mm이며, 비교반부는 0.12 내지 0.20mm일 수 있다. 상기 범위 내에서 교반부 및 비교반부가 혼합 모듈을 구성함에 따라, 교반부 및 비교반부를 통과하는 제1 혼합 용액 및 제2 혼합 용액 내에서 핵산과 지질들 간에 결합이 용이하게 발생할 수 있게 한다.

- [107] 상기 교반부는 유입되는 유체를 혼합하기 위해 그루브(groove)가 형성되고, 상기 교반부의 그루브는 교반 채널 내 층류(Laminar flow)의 혼합 효율을 높이기 위해, 카오스 혼합을 발생하게 할 수 있다.
- [108] 상기 그루브의 형상이 사각형, 반원 또는 삼각형일 수 있다. 상기 그루브의 형태는 교반 채널을 통과하는 유체의 혼합 효율을 높이기 위한 것으로, 상기 예시에 국한되지 않고, 교반 효율을 높일 수 있는 그루브 형태는 모두 사용 가능하다.
- [109] 구체적으로, 도 1은 본 발명의 지질 나노입자를 제조하기 위한 제조 장치에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명의 지질 나노입자를 제조하기 위한 제조 장치는 제1 채널(100), 제2 채널(200), 교반 채널(300) 및 제3 채널(400)을 포함하고, 상기 교반 채널(300) 내 혼합 모듈(310)이 반복하여 형성되어 있다.
- [110] 또한, 상기 혼합 모듈(310)은 교반부(311) 및 비교반부(312)가 형성되어 있다.
- [111] 도 2는 종래 지질 나노입자의 제조 장치에 관한 것으로, 도 1과 달리 교반 채널(300)에 제3 채널(400)을 별도로 포함하고 있지 않다.
- [112] 상기 제조장치는 유리 기관, 실리콘 웨이퍼 또는 고분자 필름으로 이루어진 균으로부터 선택된 소재에 형성될 수 있으나, 상기 소재의 예시는 상기 예시에 국한되지 않고, 마이크로 채널의 형성이 가능한 소재는 모두 사용 가능하다.
- [113] 상기 고분자 필름은 폴리이미드(Polyimide), 폴리에틸렌(Polyethylene), 플루오르화에틸렌프로필렌(Fluorinated ethylene propylene), 폴리프로필렌(Polypropylene), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate), 폴리에틸렌 나프탈레이트(Polyethylene naphthalate), 폴리술폰(Polysulfone) 및 이들의 혼합으로 이루어진 균으로부터 선택될 수 있으나, 상기 예시에 국한되지 않는다.
- [114] 일 예시로, 실리콘 웨이퍼에 e-beam evaporator를 이용하여 알루미늄을 증착하며, 포토리소그래피(photolithography) 기법을 이용하여 포토레지스트(photoresist)를 알루미늄 위에 패터닝한다. 이후, 포토레지스트를 마스크로 이용하여 알루미늄 식각(etching)하고, 포토레지스트를 제거한 후 알루미늄을 마스크로 하여 실리콘을 DRIE(deep ion reactive etching)로 에칭하고, 알루미늄 제거 후 웨이퍼 위에 유리를 양극 접합하여 밀봉하여, 제조한다.
- [115] 상기의 제조 장치 내 제1 채널, 제2 채널, 제3 채널 및 교반 채널의 평균 직경이

180 내지 220 μm 이며, 바람직하게는 200 μm 이며, 높이는 60 내지 100 μm 이며, 바람직하게는 80 μm 이며, 그루브의 높이는 10 내지 50 μm 이며, 바람직하게는 30 μm 이지만, 용액의 흐름에 의해 지질 나노입자를 제조할 수 있는 채널의 직경, 높이 및 그루브 높이는 제한 없이 모두 사용이 가능하다.

[116] 상기 채널 내로 주입되는 수상 용액, 제1 유상 용액 및 제2 유상 용액의 유량은, 각 0.3 내지 0.9 ml/min, 0.05 ml/min 내지 0.3 ml/min 및 0.05 ml/min 내지 0.3 ml/min로 주입하였다. 상기 범위 내에서 수상 용액, 제1 유상 용액 및 제2 유상 용액을 주입하는 경우, 균일한 크기를 갖는 지질 나노입자로 제조할 수 있다.

[117] 또한, 앞서 설명한 바와 같이 제2 유상 용액이 교차하여 제1 혼합 용액과 혼합되기 전에 제1 혼합 용액에서 핵산과 이온화 지질이 충분히 결합되어야 한다, 핵산과 이온화 지질의 결합율(mixing index rate)을 높이기 위해선, 채널 내로 주입되는 수상 용액 및 제1 유상 용액의 유량을 조절해야 되며, 이때 유량 비는 1:1 내지 10:1이며, 바람직하게는 2:1 내지 10:1이며, 보다 바람직하게는 3:1 내지 9:1일 수 있다. 상기 유량 비 범위 내에서, 제3 혼합 모듈 내 교반부를 통과한 제1 혼합 용액에서의 핵산과 이온화 지질의 혼합 비율 지수(mixing index rate)이 80% 이상이며, 85% 이상일 수 있다. 상기와 같이 혼합 비율 지수 값을 충족하는 경우, 핵산과 이온화 지질이 충분히 결합함을 의미하며, 이후 제3 채널을 통해 다른 지질과 결합하여 지질 나노입자로 제조될 수 있다.

[118] 제조예 1

[119] 지질 나노입자의 제조 장치의 제조

[120] 실리콘 웨이퍼(Silicon wafer)의 표면에 네거티브 포토레지스트(negative photoresist)를 회전하여 도포한 후, 65°C에서 0 내지 3분 및 95°C에서 6 내지 9분 가열하여 용매를 증발시킨 후 그루브(Groove) 구조를 제외하고 자외선을 조사하였다. 이후 65°C에서 1 내지 2분 및 95°C에서 6 내지 7분 가열을 통해 포토레지스트(photoresist) 중 자외선에 노광된 부분을 고형화 하였다.

[121] 교반 채널 내의 그루브(Groove)를 형성하기 위해 네거티브 포토레지스트를 한 번 더 회전하여 도포한 후, 65°C에서 0 내지 3분 및 95°C에서 6 내지 9분 가열하여 용매를 증발시킨 후 칩의 그루브에 대한 부분에 자외선을 조사하였다. 이후 65°C에서 1 내지 2분 및 95°C에서 6 내지 7분 가열을 통해 포토레지스트 중 자외선에 노광된 부분을 고형화 하였다. 이후 디벨로퍼(Developer)를 이용하여 자외선이 노광되지 않은 부분을 제거하였다.

[122] 제조된 제조 장치는 도 3과 같다.

[123]

[124] 제조예 2

[125] 지질 나노입자의 제조

[126] mRNA (CleanCap® Firefly Luciferase mRNA, ~1,929 nucleotides)를 10mM Citrate solution(pH 3)에 혼합하여 수상 용액을 제조하였다.

[127] 이온화 지질로 ALC-0315를 에탄올에 용해시켜 제1 유상 용액을 제조하였다.

이후, DSPC, 콜레스테롤 및 DMG-PEG2000을 에탄올에 용해시켜 제2 유상 용액을 제조하였다.

[128] 상기 제조예 1에서 제조한 제조 장치의 제1 채널에 수상 용액을 주입하고, 제2 채널에 제1 유상 용액을 주입하고, 제3 채널에 제2 유상 용액을 주입하였다.

[129] 상기 수상 용액은 0.6mL /min으로, 제1 유상 용액은 0.1mL/min으로, 제2 유상 용액은 0.1mL의 유량으로 주입하였다.

[130] 혼합이 완료되어 장치 외부로 방출된 용액은 Dialysis(PES membrane dialysis cassette (MWCO=10,000 dalton))를 통해 완충 용액을 PBS로 교환하여, 지질 나노입자를 제조하였다.

[131] 지질 나노입자에 대한 구성 성분의 함량은 하기와 표 1과 같다.

[132] [표1]

	지질 간의 혼합 비율 (mol%)				ALC-0315:mRNA (중량%)
	ALC-031 5	DSPC	콜레스테롤	DMG-PEG 2000	
실시예 1	16.5	16.7	64.3	2.5	3.3:1
비교예 1	16.5	16.7	64.3	2.5	3.3:1
실시예 2	37.4	12.5	48.2	1.9	10:1
실시예 3	30	30	38.5	1.5	16.7:1
비교예 2	30	30	38.5	1.5	16.7:1

[133] 상기 비교예는 제조 장치로도 2와 같이 제3 채널이 없는 제조 장치를 이용하였으며, ALC-0315, DSPC, 콜레스테롤 및 DMG-PEG2000을 에탄올에 용해시켜 유상 용액으로 제2 채널로 주입한 것을 제외하고 제조예와 동일하게 제조하였다.

[134] 상기 실시예 3 및 비교예 2는 mRNA를 CleanCap®Enhanced Green Fluorescent Protein mRNA (996 nucleotides)를 이용한 것을 제외하고, 제조예 2와 동일하게 제조하였다.

[135]

[136] 실험예 1

[137] 입자의 입도 분포도 평가

[138] 상기 제조예 2 및 비교예 1에서 제조한 지질 나노입자에 대해 Dynamic laser scattering 장치(Malvern Zetasizer)로 입자의 입도분포도 (Polydispersity index)를 측정하였다.

[139] 실험 결과는 도 4와 같다.

[140] 구체적으로, 16.5 mol%의 이온화 지질을 포함하는 경우, 비교예의 제조 장치로 제조한 지질 나노입자의 PDI는 0.25±0.08이나, 제조예의 제조 장치로 제조한

지질 나노입자는 PDI가 0.15±0.01로 도 5와 같이, 균일한 크기의 지질 나노입자를 제조함을 확인하였다.

[141] 또한, 실시예 2는 이온화 지질의 함량을 높여 본 발명의 제조 장치를 이용하여 제조한 것으로, PDI 값이 0.08±0.03으로 0.2 이하로 확인하였다.

[142] 실시예 3 및 비교예 2는 mRNA를 달리하여 동일하게 제조한 것으로, 실시예 3은 PDI가 0.15이고, 비교예 2는 0.24로 확인되어, 제조된 입자의 직경의 균일함에서 차이가 나타남을 확인하였다.

[143]

[144] 실험예 2

[145] SHM Mixing Evaluation

[146] 수상용액과 제1 유상 용액의 교반 정도를 확인하기 위해, 대체 실험을 진행하였다. 상기 실험을 통해, 수상용액 내 mRNA 및 제1 유상 용액 내 이온화 지질 간의 결합을 확인하였다.

[147] 구체적으로, 수상 용액을 대신하여, DI Water에 로다민 B(Rhodamine B)를 0.015 w/w%로 혼합하여 수상 용액을 제조하고, 제1 유상 용액을 대신하여 에탄올에 로다민 B(Rhodamine B)를 0.015 w/w%로 혼합하여 유상 용액으로 제조하였다.

[148] 상기 수상 용액 및 유상 용액을 각각 제1 채널 및 제2 채널로 주입하였다. 상기 각 채널로 주입 시 유량 및 유량비는 하기와 같다.

[149] [표2]

TFR (μL/min)	용액	유량 (μL/min)		
300	DI Water	150	225	270
	에탄올	150	75	30
	FRR	1:1	3:1	9:1

[150] 상기 혼합 용액을 제1 채널 및 제2 채널로 주입한 후, 유량비의 차이에 의한 혼합 비율 지수(mixing index rate, %)를 측정하였다.

[151] 하기와 같은 지수(Index) 이미지 분석 방법을 이용하였다.

[152] ① 촬영된 이미지 파일을 Image J를 이용하여 Grey Scale로 변환

[153] ② Grey Scale로 변환된 이미지 8 Bit로 전환

[154] ③ 배경 Intensity 필터링 작업

[155] ④ 하기 식을 이용하여 픽셀 별 Intensity 분석 및 Index 계산

[156]

$$MI = 1 - \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{c_i - \bar{c}}{\bar{c}} \right)^2}$$

- [157] 여기서,
 [158] N은 전체 pixel의 개수이며,
 [159] C_i 는 i의 pixel 값이며,
 [160] \bar{c} 는 complete pixel의 평균 값이며,
 [161] \bar{c}' 는 unmixed pixel의 평균 값이다.
 [162] 실험 결과는 도 6과 같다.
 [163] 수상용액과 유상용액을 1:1의 유량비로 혼합한 경우, 3회 혼합 모듈을 통과하고, 82%의 혼합 비율 지수로 나타났으나, 1:1의 비율로 혼합한 경우, 혼합 정도가 상대적으로 낮아, 이를 실제 지질 나노입자를 제조하기 위한 수상 용액과 유상 용액을 이용하는 경우, 수상 용액 내 mRNA와 제1 유상 용액의 이온화 지질이 충분히 결합하지 않을 수 있음을 의미한다.
 [164] 이에, 실험에 의해서는 3:1 내지 9:1의 유량비로 수상 용액과 유상 용액을 혼합하여 제조하는 경우, 제3 혼합 모듈을 통과하여, 상기 용액의 혼합 정도가 각 87% 및 95%로 높은 수준으로 혼합되는 것을 확인하였다. 상기 실험을 통해, 수상 용액과 제1 유상 용액을 혼합하기 위한, 바람직한 유량비는 3:1 내지 9:1임을 확인할 수 있다.
 [165] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.
 [166] 100: 제1 채널 100': 제1 채널
 [167] 200: 제2 채널 200': 제2 채널
 [168] 300: 교반 채널 300': 교반 채널
 [169] 310: 혼합 모듈 310': 혼합 모듈
 [170] 311: 교반부 311': 교반부
 [171] 312: 비교반부 312': 비교반부
 [172] 400: 제3 채널
 [173] 500: 유출채널 500': 유출채널
- 산업상 이용가능성**
- [174] 본 발명은 지질 나노입자(LNP)의 제조 방법 및 이의 제조 장치에 관한 것이다.

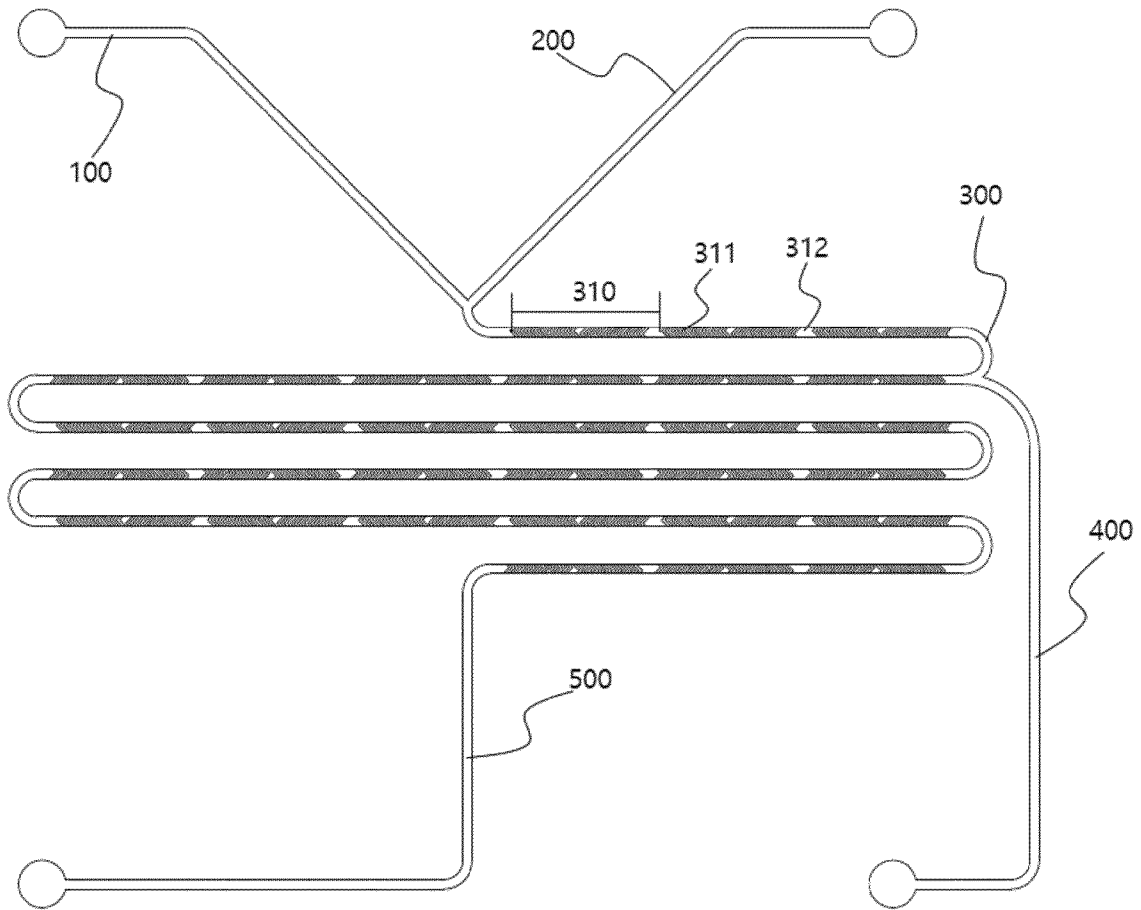
청구범위

- [청구항 1] 핵산을 포함하는 수상 용액을 제조하는 단계;
 이온화 지질(Ionizable lipid)을 유기 용액에 용해하여 제1 유상 용액을 제조하는 단계;
 비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 유기 용액에 용해하여 제2 유상 용액을 제조하는 단계;
 상기 수상 용액을 제1 채널로 주입하여 흐르게 하는 단계;
 상기 제1 유상 용액을 제2 채널로 주입하여 흐르게 하는 단계;
 상기 수상 용액 및 제1 유상 용액이 교차하여 제1 혼합 용액으로 교반 채널을 흐르는 단계;
 상기 교반 채널에 연결된 제3 채널로 제2 유상 용액을 흐르게 하여 상기 제1 혼합 용액과 교차하여 제2 혼합 용액으로 혼합하는 단계; 및
 상기 제2 혼합 용액이 교반 채널 내 교반부를 통과하여 핵산을 포함하는 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함하는 지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 교반 채널은 교반부 및 비교반부의 혼합 모듈을 포함하는 지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
 상기 혼합 모듈은 교반 채널 내 복수로 형성되며,
 상기 교반 채널의 유체 흐름 방향을 기준으로 순서대로 제n 혼합 모듈이 형성되며,
 상기 제n 혼합 모듈은 교반 채널 내 반복적으로 형성된 혼합 모듈의 순서를 의미하는 지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
 상기 제3 채널은 제1 혼합 모듈 내지 제5 혼합 모듈 사이에 교차점을 형성하여 교반 채널과 결합하여, 제1 혼합 용액과 제2 유상 용액이 교차하여 층류(Laminar flow)를 형성하게 하는 지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
 상기 지질 나노입자는 균일한 구 형상으로, 다분산 지수(Polydispersity index)가 0.2 이하인 지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 이온화 지질은 지질 나노입자 내 지질의 총 중량 대비 10 내지 30 mol%로 포함하는

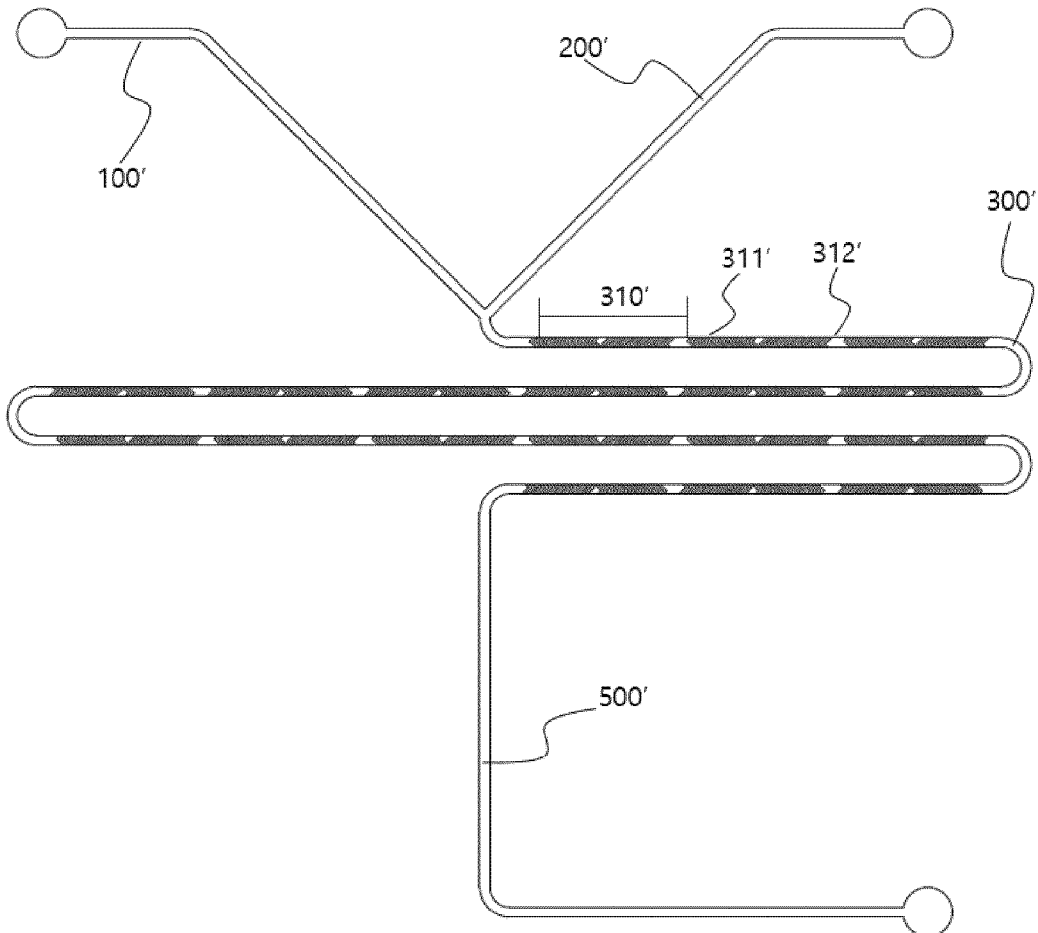
- 지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 이온화 지질 및 핵산의 중량 비율이 3:1 내지 50:1인
지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 핵산은 RNA, DNA, siRNA(short interfering RNA), mRNA(messenger RNA), aptamer(아пта머), antisense ODN(antisense oligodeoxynucleotide), antisense RNA(antisense RNA), 리보자임(ribozyme), 디엔에이자임(DNAzyme) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는
지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 비이온화 지질은 DSPC(distearoylphosphatidylcholine), DOPE(dioleoylphosphatidyl ethanolamine), DPPE(bis(diphenylphosphino)ethane), 디아실포스파티딜콜린(diacyl phosphatidylcholine), 디아실포스파티딜에탄올아민(diacylphosphatidylethanolamine), 디아실포스파티딜세린(diacylphosphatidylserine) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는
지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 중성지질은 폴리에틸렌글리콜 2000 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(PEG(2000) DSPE), DMG-PEG, PEG-DMPE, DPPE-PEG, DPG-PEG, PEG-DOPE 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는
지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 융합성 지질은 인지질, 콜레스테롤, 토크페롤 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는
지질 나노입자의 제조 방법.
- [청구항 12] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 제조 방법으로 제조된 지질 나노입자.
- [청구항 13] 핵산을 포함하는 수상 용액을 흐르게 하는 제1 채널;
이온화 지질(Ionizable lipid)을 포함하는 제1 유상 용액을 흐르게 하는 제2 채널;
비이온화 지질(non-Ionizable lipid), 중성지질 및 융합성 지질을 포함하는 제2 유상 용액을 흐르게 하는 제3 채널; 및
교반 채널을 포함하며,

- 상기 제1 채널 및 제2 채널은 제1 교차점을 형성하며, 상기 교차점은 교반 채널과 연결되며,
상기 교반 채널은 교반부 및 비교반부의 혼합 모듈을 포함하는 지질 나노입자의 제조 장치.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 혼합 모듈은 교반 채널 내 복수로 형성되며,
상기 교반 채널의 유체 흐름 방향을 기준으로 순서대로 제 n 혼합 모듈이 형성되며,
상기 제 n 혼합 모듈은 교반 채널 내 반복적으로 형성된 혼합 모듈의 순서를 의미하는 지질 나노입자의 제조 장치.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 교반 채널 내에 혼합 모듈을 3개 내지 70개로 포함하는 지질 나노입자의 제조 장치.
- [청구항 16] 제14항에 있어서,
상기 제3 채널은 제1 혼합 모듈 내지 제5 혼합 모듈 사이에 교차점을 형성하여 교반 채널과 결합되는 지질 나노입자의 제조 장치.
- [청구항 17] 제13항에 있어서,
상기 혼합 모듈의 길이는 교반 채널 내 유체의 흐름 방향을 기준으로 1 내지 5mm인 지질 나노입자의 제조 장치.
- [청구항 18] 제13항에 있어서,
상기 교반부 및 비교반부의 길이 비율은 교반 채널 내 유체의 흐름 방향을 기준으로 45:1 내지 5:0.3인 지질 나노입자의 제조 장치.
- [청구항 19] 제13항에 있어서,
상기 교반부는 유입되는 유체를 혼합하기 위해 그루브(groove)가 형성되는 지질 나노입자의 제조 장치.
- [청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 교반부의 그루브는 교반 채널 내 층류(Laminar flow)의 혼합 효율을 높이기 위해, 카오스 혼합을 발생하게 하는 지질 나노입자의 제조 장치.
- [청구항 21] 제19항에 있어서,
상기 그루브의 형상이 사각형, 반원 또는 삼각형인 지질 나노입자의 제조 장치.

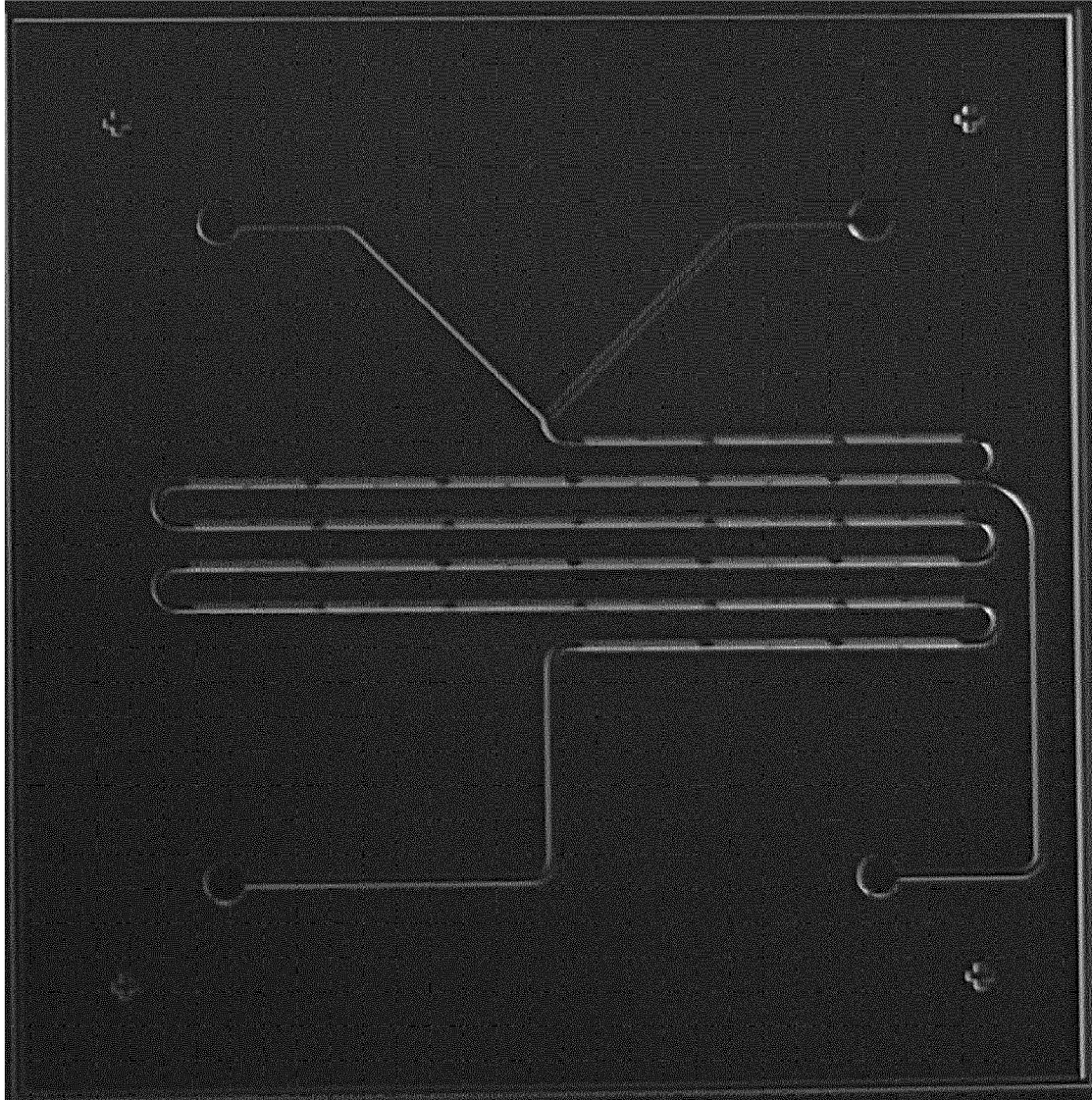
[도1]



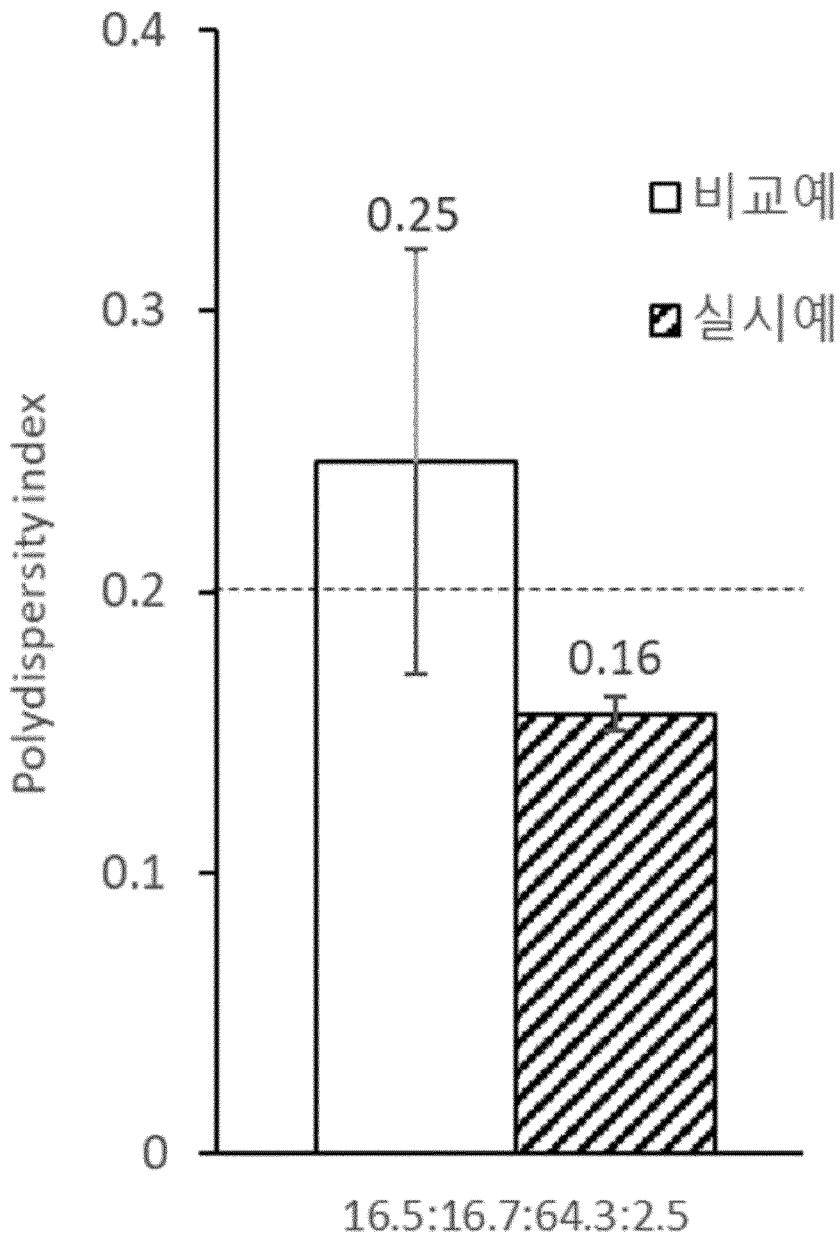
[도2]



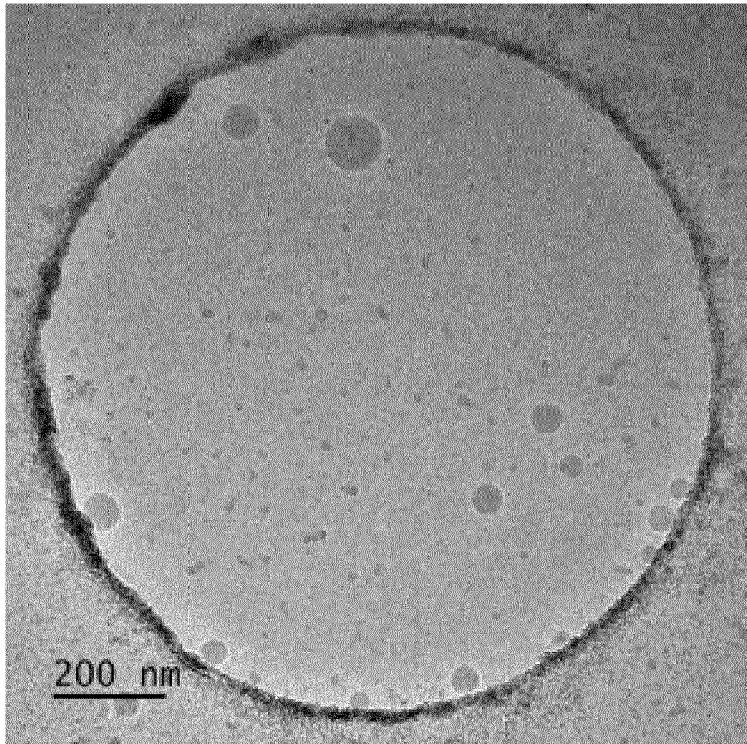
[도3]



[도4]



[도5]



[도6]

Flowrate Ratio	Unmixed	SHM 1 cycle	SHM 2 cycles	SHM 3 cycles
1:1	27%	67%	76%	82%
3:1	40%	74%	82%	87%
9:1	49%	81%	81%	95%

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/005796

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
B82B 3/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/88(2006.01)i; B82Y 40/00(2011.01)n		
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) B82B 3/00(2006.01); A61K 31/713(2006.01); A61K 47/24(2006.01); A61K 47/36(2006.01); A61K 9/127(2006.01); B01F 13/00(2006.01); B01J 13/04(2006.01); B01J 19/00(2006.01); C12N 15/113(2010.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 지질 나노 입자(lipid nanoparticle, LNP), 핵산(nucleic acid), 이온화 지질(ionized lipid), 비이온화 지질(non-ionizable lipid), 중성지질(neutral lipid), 융합성 지질(fused lipid), 제1 채널(first channel), 제2 채널(second channel), 제3 채널(third channel), 교반 채널(mixing channel)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUSCHMANN, M. D. et al. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. Vaccines. 2021, vol. 9, 65, inner pp. 1-30 (thesis publication date: 19 January 2021). See figure 1.	12
A	JP 2016-028031 A (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA) 25 February 2016 (2016-02-25) See abstract; paragraphs [0012], [0035], [0107], [0111]-[0113] and [0175]-[0177]; and figures 10 and 29.	1-21
A	KIMURA, N. et al. Development of a Microfluidic-Based Post-Treatment Process for Size-Controlled Lipid Nanoparticles and Application to siRNA Delivery. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2020, vol. 12, no. 30, pp. 34011-34020. See entire document.	1-21
A	KR 10-2017-0126944 A (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA) 20 November 2017 (2017-11-20) See entire document.	1-21
<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 August 2022		Date of mailing of the international search report 02 August 2022
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/KR2022/005796

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018-190423 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) 18 October 2018 (2018-10-18) See entire document.	1-21
A	KR 10-2015-0127580 A (CUREPORT, INC.) 17 November 2015 (2015-11-17) See entire document.	1-21
A	KR 10-2014-0097276 A (NITTO DENKO CORPORATION) 06 August 2014 (2014-08-06) See entire document.	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/005796

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
JP	2016-028031	A	25 February 2016	CA	2816925	A1	17 November 2011				
				CN	102712935	A	03 October 2012				
				CN	102712935	B	26 April 2017				
				CN	107028886	A	11 August 2017				
				EP	2496700	A1	12 September 2012				
				EP	2496700	B1	01 March 2017				
				JP	2013-510096	A	21 March 2013				
				JP	5823405	B2	25 November 2015				
				JP	6234971	B2	22 November 2017				
				RU	2012122776	A	10 December 2013				
				RU	2573409	C2	20 January 2016				
				US	10041091	B2	07 August 2018				
				US	2012-0276209	A1	01 November 2012				
				US	2017-0121712	A1	04 May 2017				
				US	2018-0044699	A1	15 February 2018				
				US	2019-0032087	A1	31 January 2019				
				US	9758795	B2	12 September 2017				
				WO	2011-140627	A1	17 November 2011				
				KR	10-2017-0126944	A	20 November 2017	AU	2016-222746	A1	07 September 2017
								AU	2016-385135	A1	26 July 2018
AU	2016-385135	B2	17 February 2022								
CA	2977768	A1	01 September 2016								
CA	2983804	A1	03 November 2016								
CA	2983804	C	17 August 2021								
CA	3009691	A1	13 July 2017								
CA	3009691	C	07 December 2021								
CN	107533076	A	02 January 2018								
CN	107921381	A	17 April 2018								
CN	107921381	B	09 November 2021								
CN	108778477	A	09 November 2018								
EP	3262424	A1	03 January 2018								
EP	3288671	A1	07 March 2018								
EP	3400097	A1	14 November 2018								
EP	3400097	B1	27 January 2021								
EP	3797860	A1	31 March 2021								
JP	2018-515324	A	14 June 2018								
JP	2018-525209	A	06 September 2018								
JP	2019-503271	A	07 February 2019								
JP	6764870	B2	07 October 2020								
KR	10-2018-0103088	A	18 September 2018								
KR	10-2361123	B1	09 February 2022								
US	10076730	B2	18 September 2018								
US	10597291	B2	24 March 2020								
US	10688456	B2	23 June 2020								
US	10835878	B2	17 November 2020								
US	2018-0043320	A1	15 February 2018								
US	2018-0093232	A1	05 April 2018								
US	2018-0111830	A1	26 April 2018								
US	2018-0345232	A1	06 December 2018								
US	2020-0269201	A1	27 August 2020								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/005796

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				US	2021-0023514	A1	28 January 2021
				US	2021-0113974	A1	22 April 2021
				WO	2016-138175	A1	01 September 2016
				WO	2016-176505	A1	03 November 2016
				WO	2017-117647	A1	13 July 2017
WO	2018-190423	A1	18 October 2018	CA	3059714	A1	18 October 2018
				CN	110520214	A	29 November 2019
				EP	3610943	A1	19 February 2020
				JP	2022-008314	A	13 January 2022
				JP	6942376	B2	29 September 2021
				TW	201902447	A	16 January 2019
				US	2021-0129103	A1	06 May 2021
KR	10-2015-0127580	A	17 November 2015	AU	2014-240013	A1	13 August 2015
				AU	2014-240013	B2	12 July 2018
				CA	2898047	A1	25 September 2014
				CN	105188685	A	23 December 2015
				CN	105188685	B	15 June 2021
				EP	2968193	A1	20 January 2016
				EP	2968193	B1	01 September 2021
				JP	2016-517423	A	16 June 2016
				JP	6450742	B2	09 January 2019
				MX	2015011072	A	22 October 2015
				US	2014-0348900	A1	27 November 2014
				US	2018-0000735	A1	04 January 2018
				US	9693958	B2	04 July 2017
				WO	2014-152200	A1	25 September 2014
				WO	2014-152200	A4	13 November 2014
KR	10-2014-0097276	A	06 August 2014	AU	2012-330819	A1	15 May 2014
				AU	2012-330819	B2	31 August 2017
				AU	2012-356239	A1	29 May 2014
				AU	2012-356239	B2	22 September 2016
				CA	2853685	A1	10 May 2013
				CA	2853685	C	03 September 2019
				CA	2853689	A1	27 June 2013
				CA	2853689	C	30 June 2020
				CN	103906503	A	02 July 2014
				CN	103906503	B	14 December 2016
				CN	103906504	A	02 July 2014
				CN	103906504	B	17 November 2017
				EP	2773326	A2	10 September 2014
				EP	2773326	B1	20 February 2019
				EP	2773328	A2	10 September 2014
				EP	3485875	A1	22 May 2019
				EP	3673898	A1	01 July 2020
				JP	2014-534232	A	18 December 2014
				JP	2015-502345	A	22 January 2015
				JP	2017-165748	A	21 September 2017
				JP	6133883	B2	24 May 2017
				JP	6149041	B2	14 June 2017
				JP	6442551	B2	19 December 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/005796

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		KR 10-2014-0101748 A	20 August 2014
		KR 10-2046968 B1	02 December 2019
		KR 10-2056702 B1	17 December 2019
		RU 2014122432 A	10 December 2015
		RU 2014122433 A	10 December 2015
		RU 2642640 C2	25 January 2018
		RU 2647476 C2	15 March 2018
		US 10155945 B2	18 December 2018
		US 2013-0115274 A1	09 May 2013
		US 2013-0164400 A1	27 June 2013
		US 2017-0152516 A1	01 June 2017
		US 8956572 B2	17 February 2015
		US 9579338 B2	28 February 2017
		WO 2013-064911 A2	10 May 2013
		WO 2013-064911 A3	24 October 2013
		WO 2013-093648 A2	27 June 2013
		WO 2013-093648 A3	24 October 2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) B82B 3/00(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12N 15/88(2006.01); B82Y 40/00(2011.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) B82B 3/00(2006.01); A61K 31/713(2006.01); A61K 47/24(2006.01); A61K 47/36(2006.01); A61K 9/127(2006.01); B01F 13/00(2006.01); B01J 13/04(2006.01); B01J 19/00(2006.01); C12N 15/113(2010.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 지질 나노 입자(lipid nanoparticle, LNP), 핵산(nucleic acid), 이온화 지질(ionized lipid), 비이온화 지질(non-ionizable lipid), 중성지질(neutral lipid), 융합성 지질(fused lipid), 제1 채널(first channel), 제2 채널(second channel), 제3 채널(third channel), 교반 채널(mixing channel)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	M. D. BUSCHMANN 등, "Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines", Vaccines 2021, 제9권, 65, 내부페이지 1-30(논문 공개일: 2021년 1월 19일) 도면 1	12
A	JP 2016-028031 A (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA) 2016.02.25 요약; 단락 [0012], [0035], [0107], [0111]-[0113], [0175]-[0177]; 도면 10, 29	1-21
A	KIMURA, N. 등, "Development of a Microfluidic-Based Post-Treatment Process for Size-Controlled Lipid Nanoparticles and Application to siRNA Delivery", ACS Appl. Mater. Interfaces, 2020, 제12권, 제30호, 페이지 34011-34020 전문	1-21
A	KR 10-2017-0126944 A (더 유니버시티 오브 브리티시 콜롬비아) 2017.11.20 전문	1-21
A	WO 2018-190423 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) 2018.10.18 전문	1-21
<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	
2022년08월01일(01.08.2022)	2022년08월02일(02.08.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	한인호	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-3362	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2015-0127580 A (큐어포트, 인크.) 2015.11.17 전문	1-21
A	KR 10-2014-0097276 A (넛토텐코 가부시카가이샤) 2014.08.06 전문	1-21

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2016-028031 A	2016/02/25	CA 2816925 A1	2011/11/17
		CN 102712935 A	2012/10/03
		CN 102712935 B	2017/04/26
		CN 107028886 A	2017/08/11
		EP 2496700 A1	2012/09/12
		EP 2496700 B1	2017/03/01
		JP 2013-510096 A	2013/03/21
		JP 5823405 B2	2015/11/25
		JP 6234971 B2	2017/11/22
		RU 2012122776 A	2013/12/10
		RU 2573409 C2	2016/01/20
		US 10041091 B2	2018/08/07
		US 2012-0276209 A1	2012/11/01
		US 2017-0121712 A1	2017/05/04
		US 2018-0044699 A1	2018/02/15
		US 2019-0032087 A1	2019/01/31
		US 9758795 B2	2017/09/12
		WO 2011-140627 A1	2011/11/17
		KR 10-2017-0126944 A	2017/11/20
AU 2016-385135 A1	2018/07/26		
AU 2016-385135 B2	2022/02/17		
CA 2977768 A1	2016/09/01		
CA 2983804 A1	2016/11/03		
CA 2983804 C	2021/08/17		
CA 3009691 A1	2017/07/13		
CA 3009691 C	2021/12/07		
CN 107533076 A	2018/01/02		
CN 107921381 A	2018/04/17		
CN 107921381 B	2021/11/09		
CN 108778477 A	2018/11/09		
EP 3262424 A1	2018/01/03		
EP 3288671 A1	2018/03/07		
EP 3400097 A1	2018/11/14		
EP 3400097 B1	2021/01/27		
EP 3797860 A1	2021/03/31		
JP 2018-515324 A	2018/06/14		
JP 2018-525209 A	2018/09/06		
JP 2019-503271 A	2019/02/07		
JP 6764870 B2	2020/10/07		
KR 10-2018-0103088 A	2018/09/18		
KR 10-2361123 B1	2022/02/09		
US 10076730 B2	2018/09/18		
US 10597291 B2	2020/03/24		
US 10688456 B2	2020/06/23		
US 10835878 B2	2020/11/17		
US 2018-0043320 A1	2018/02/15		
US 2018-0093232 A1	2018/04/05		
US 2018-0111830 A1	2018/04/26		
US 2018-0345232 A1	2018/12/06		
US 2020-0269201 A1	2020/08/27		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2021-0023514 A1	2021/01/28
		US 2021-0113974 A1	2021/04/22
		WO 2016-138175 A1	2016/09/01
		WO 2016-176505 A1	2016/11/03
		WO 2017-117647 A1	2017/07/13
WO 2018-190423 A1	2018/10/18	CA 3059714 A1	2018/10/18
		CN 110520214 A	2019/11/29
		EP 3610943 A1	2020/02/19
		JP 2022-008314 A	2022/01/13
		JP 6942376 B2	2021/09/29
		TW 201902447 A	2019/01/16
		US 2021-0129103 A1	2021/05/06
KR 10-2015-0127580 A	2015/11/17	AU 2014-240013 A1	2015/08/13
		AU 2014-240013 B2	2018/07/12
		CA 2898047 A1	2014/09/25
		CN 105188685 A	2015/12/23
		CN 105188685 B	2021/06/15
		EP 2968193 A1	2016/01/20
		EP 2968193 B1	2021/09/01
		JP 2016-517423 A	2016/06/16
		JP 6450742 B2	2019/01/09
		MX 2015011072 A	2015/10/22
		US 2014-0348900 A1	2014/11/27
		US 2018-0000735 A1	2018/01/04
		US 9693958 B2	2017/07/04
		WO 2014-152200 A1	2014/09/25
		WO 2014-152200 A4	2014/11/13
KR 10-2014-0097276 A	2014/08/06	AU 2012-330819 A1	2014/05/15
		AU 2012-330819 B2	2017/08/31
		AU 2012-356239 A1	2014/05/29
		AU 2012-356239 B2	2016/09/22
		CA 2853685 A1	2013/05/10
		CA 2853685 C	2019/09/03
		CA 2853689 A1	2013/06/27
		CA 2853689 C	2020/06/30
		CN 103906503 A	2014/07/02
		CN 103906503 B	2016/12/14
		CN 103906504 A	2014/07/02
		CN 103906504 B	2017/11/17
		EP 2773326 A2	2014/09/10
		EP 2773326 B1	2019/02/20
		EP 2773328 A2	2014/09/10
		EP 3485875 A1	2019/05/22
		EP 3673898 A1	2020/07/01
		JP 2014-534232 A	2014/12/18
		JP 2015-502345 A	2015/01/22
		JP 2017-165748 A	2017/09/21
		JP 6133883 B2	2017/05/24
		JP 6149041 B2	2017/06/14
		JP 6442551 B2	2018/12/19

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-2014-0101748 A	2014/08/20
		KR 10-2046968 B1	2019/12/02
		KR 10-2056702 B1	2019/12/17
		RU 2014122432 A	2015/12/10
		RU 2014122433 A	2015/12/10
		RU 2642640 C2	2018/01/25
		RU 2647476 C2	2018/03/15
		US 10155945 B2	2018/12/18
		US 2013-0115274 A1	2013/05/09
		US 2013-0164400 A1	2013/06/27
		US 2017-0152516 A1	2017/06/01
		US 8956572 B2	2015/02/17
		US 9579338 B2	2017/02/28
		WO 2013-064911 A2	2013/05/10
		WO 2013-064911 A3	2013/10/24
		WO 2013-093648 A2	2013/06/27
		WO 2013-093648 A3	2013/10/24