(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월15일
(11) 등록번호 10-2796922
(24) 등록일자 2025년04월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61K 47/24* (2017.01)
A61K 47/28 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 39/00 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2022-0044633
(22) 출원일자 2022년04월11일
심사청구일자 2022년04월11일
(65) 공개번호 10-2023-0145791
(43) 공개일자 2023년10월18일
(56) 선행기술조사문헌
JP2004508423 A*
Keun-Sik Kim et al., Bulletin of the Korean Chemical Society, 2012, vol. 33, no. 2, pp.651-656
KR1020180122128 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
박용석
강원도 원주시 시청로 264
최강찬
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(74) 대리인
김보정

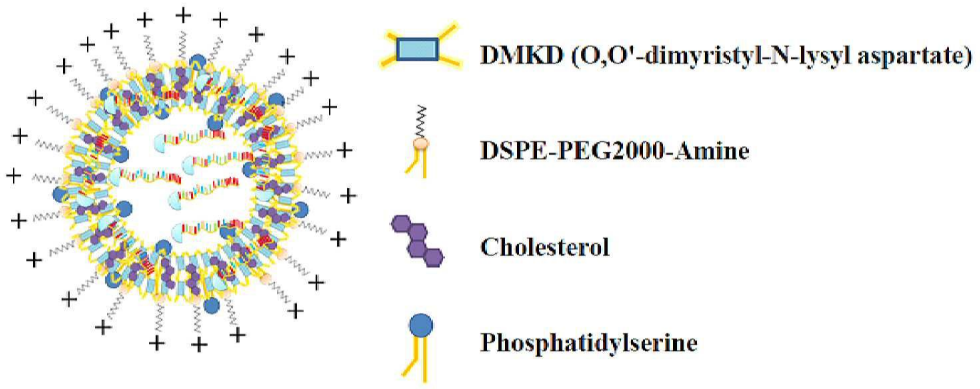
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 **mRNA 백신을 위한 양이온성 지질 나노입자**

(57) 요 약

본 발명은 a) DMKD(O,O′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate); b) 인지질; c) 스테롤계 지질; 및 d) 세포사멸 유도 물질을 포함하는 지질 나노입자; 또는 e) 핵산을 더 포함하는 지질 나노입자 복합체에 관한 것으로, 전달체로 사용이 가능하고, 비면역세포와 면역세포의 전달에 차별성을 나타내어 효율적으로 면역 획득이 가능한 발명에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/183 (2013.01)
A61K 47/24 (2013.01)
A61K 47/28 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/6018 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) DMKD(O,O′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate); b) 인지질; c) 스테롤계 지질; 및 d) 세포사멸 유도 물질을 포함하는 지질 나노입자:

상기 DMKD는 나노입자 대비 몰백분율 45 내지 60 mol%이고,

상기 인지질은 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)-2000] (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG2000-amine) 또는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌 글리콜)-2000] (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG2000-maleimide)이며 나노입자 대비 몰백분율 14 내지 24 mol%이고,

상기 스테롤계 지질은 콜레스테롤(cholesterol)이며 나노입자 대비 몰백분율 18 내지 30 mol%이고,

상기 세포사멸 유도 물질은 포스파티딜 세린(phosphatidylserine)이며 나노입자 대비 몰백분율 1 내지 4 mol%이다.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 지질 나노입자는 크기가 1 내지 500 nm인, 지질 나노입자.

청구항 12

a) DMKD(0,0′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate); b) 인지질; c) 스테롤계 지질; d) 세포사멸 유도 물질; 및 e) 핵산을 포함하는 지질 나노입자 복합체:

상기 DMKD는 나노입자 대비 몰백분율 45 내지 60 mol%이고,

상기 인지질은 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)-2000] (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG2000-amine) 또는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌 글리콜)-2000] (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG2000-maleimide)이며 나노입자 대비 몰백분율 14 내지 24 mol%이고,

상기 스테롤계 지질은 콜레스테롤(cholesterol)이며 나노입자 대비 몰백분율 18 내지 30 mol%이고,

상기 세포사멸 유도 물질은 포스파티딜 세린(phosphatidylserine)이며 나노입자 대비 몰백분율 1 내지 4 mol%이고,

상기 핵산은 mRNA이다.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제12항에 따른 지질 나노입자 복합체를 포함하는 mRNA 전달체.

청구항 16

제12항에 따른 지질 나노입자 복합체를 포함하는 mRNA 백신용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 mRNA 백신을 위한 양이온성 지질 나노입자, 상세하게는 a) DMKD(0,0′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate); b) 인지질; c) 스테롤계 지질; 및 d) 세포사멸 유도 물질을 포함하는 지질 나노입자; 또는 e) 핵산을 더 포함하는 지질 나노입자 복합체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 지질 나노입자(lipid nanoparticle)는 난용성 물질을 봉입할 수 있는 지질로 이루어진 입자성 약물전달체를 의미한다. 지질 나노입자는 일반적으로 인지질, 콜레스테롤, 음이온성 지질, PEG 함유 지질을 사용하여 제조되고, 크기가 약 60 내지 150 나노미터(nm)에 해당한다. 지질 나노입자는 내부 구조에 따라 분류될 수 있고, 그 분류에 따라 입자 안정성, 전달 효과 등이 다르게 나타난다.

[0004] 종래는 약물의 전달을 위하여 사용되는 지질의 종류, 사용량, 약물의 종류 등을 변화시켜가며 제조하려는 시도가 있어 왔고, 이와 관련하여, 지질의 특성에 따라 물리적 특성이 달라질 수 있고, 이온성 지질이 포함되지 않

은 중성 나노입자의 경우 마이크로 크기의 거대 입자가 형성되거나 소수성 결합에 의해 침전이 발생하며, 음이온성 지질의 경우에도 표면전하 등에 따라 봉입 효율이 달라진다는 것이 알려진 바 있다(비특허문헌 1). 또한, 약물로써 RNA분자를 사용하고, 지질 나노입자를 약물전달체로 하는 복합체로 약물 전달효율을 높이려는 시도가 있어왔으나, RNA의 불투과성, 취약성, 면역원성, 큰 크기 등에 의한 문제가 있다. 다만, 지질 나노입자를 통한 siRNA 전달방법이 2018년 FDA 허가를 받으면서 가능하게 되었고, 이를 바탕으로 mRNA 백신 전달체로 지질 나노입자를 사용하는 많은 연구가 진행되었다.

[0005] 이와 관련하여, 대한민국공개특허 제10-2021-0105889호에 특정 양이온성 지질을 사용함과 동시에 핵산 분자, 콜레스테롤, 인지질, PEG 포함 지질이 특정 비율로 인해 제조된 지질 나노입자가 개시되어 있고, 대한민국공개특허 제10-2021-0135494호에는 핵산과 결합된 지질 나노입자의 제조방법이 개시되어 있으며, 대한민국공개특허 제10-2021-0091120호에 특정 농도로 캡슐화하여 mRNA 로딩 지질 나노입자의 제조방법이 개시되어 있다.

[0006] 다만, 지질 나노입자는 종류에 따라 mRNA, 약물 등의 전달 효율, 안정성 등 특성에 많은 차이를 나타낸다. 이에, 본 발명자는 지질 나노입자 전달 특성의 개선을 위해 많은 연구를 거쳐 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2021-0105889호

(특허문헌 0002) 대한민국공개특허 제10-2021-0135494호

(특허문헌 0003) 대한민국공개특허 제10-2021-0091120호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 음이온성 지질을 포함한 지질나노입자의 제조 및 물리적 특성, 이정은 외, Journal of the Korean Chemical Society, 2008, Vol. 52, No.3

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 종래 지질 나노입자가 체내 오래 순환할 수 있다는 면역회피성 입자와 달리, 면역세포의 포식작용을 유발하는 방식에 의해 mRNA 백신을 전달하고자 한다. 또한, 종래 mRNA 백신 전달체는 면역세포와 비면역세포를 구분하지 않고 전달하여 항원의 과발현에 따른 부작용 가능성을 내포하나, 본 발명은 비면역세포에 핵산을 전달하면서도 면역세포에 효과적으로 전달하여 면역세포가 직접 항원을 생산하여 효율적으로 면역 획득이 가능할 수 있는 전달체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a) DMKD(O,O′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate); b) 인지질; c) 스테롤계 지질; 및 d) 세포사멸 유도 물질을 포함하는 지질 나노입자를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은

[0014] 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE),

[0015] 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethyleneglycol)-2000, DSPE-PEG2000-amine),

[0016] 디스테아로일포스파티딜에탄올말레이미드-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000, DSPE-PEG2000-maleimide),

[0017] 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC),

[0018] 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC),

[0019] 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroylsn-glycero-3-phosphocholine, DLPC),

[0020] 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-snglycero-3-phosphocholine, DMPC),

[0021] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC),

[0022] 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DMPE), 및

[0023] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다.

[0024] 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은

[0025] 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE),

[0026] 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethyleneglycol)-2000, DSPE-PEG2000-amine) 및

[0027] 디스테아로일포스파티딜에탄올말레이미드-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000, DSPE-PEG2000-maleimide)

[0028] 로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다.

[0029] 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethyleneglycol)-2000, DSPE-PEG2000-amine)이다.

[0030] 본 발명의 일 양태에서, 상기 스테롤계 지질은 콜레스테롤(cholesterol), 시토스테롤(sitosterol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 캄페스테롤(campesterol), 및 에르고스테롤(ergosterol)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다.

[0031] 본 발명의 일 양태에서, 상기 스테롤계 지질은 콜레스테롤(cholesterol)이다.

[0032] 본 발명의 일 양태에서, 상기 세포사멸 유도 물질은 포스파티딜 세린(phosphatidylserine)이다.

[0033] 본 발명의 일 양태에서, 상기 DMKD(0,0′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate)는 나노입자 대비 몰백분율 45 내지 65 mol% 이다.

[0034] 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은 나노입자 대비 몰백분율 14 내지 24 mol%이다..

[0035] 본 발명의 일 양태에서, 상기 스테롤계 지질은 나노입자 대비 몰백분율 18 내지 30 mol% 이다.

[0036] 본 발명의 일 양태에서, 상기 세포사멸 유도 물질은 나노입자 대비 몰백분율 1 내지 4 mol%이다.

[0037] 본 발명의 일 양태에서, 상기 지질 나노입자는 크기가 1 내지 500 nm이다.

[0039] 또한, 본 발명은 a) DMKD(0,0′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate); b) 인지질; c) 스테롤계 지질; d) 세포사멸 유도 물질; 및 e) 핵산을 포함하는 지질 나노입자 복합체를 제공한다.

[0040] 본 발명의 일 양태에서, 상기 핵산은 DNA, siRNA, mRNA, 안티센스 RNA, 단일가닥 RNA, 또는 마이크로 RNA이다.

[0041] 본 발명의 일 양태에서, 상기 핵산은 mRNA이다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 지질 나노입자 복합체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0044] 또한, 본 발명은 상기 지질 나노입자 복합체를 포함하는 백신을 제공한다.

발명의 효과

[0046] 본 발명은 mRNA 백신 전달체로 사용이 가능하고, 비면역세포와 면역세포의 전달에 차별성을 나타내어 효율적으

로 면역 획득이 가능하다는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 본 발명 지질 나노입자의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시형태에 따른 지질 나노입자의 안정성을 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시형태에 따른 지질 나노입자와 비교군의 단백질 발현을 공초점 현미경으로 확인한 도이다.

도 4 및 5는 본 발명의 일 실시형태에 따른 지질 나노입자와 비교군의 비면역세포에서 단백질 발현을 유세포 분석으로 확인한 도이다.

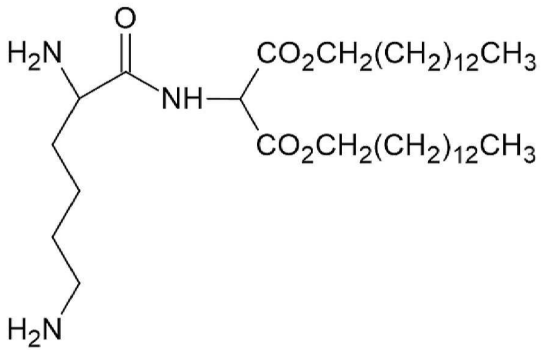
도 6 및 7는 본 발명의 일 실시형태에 따른 지질 나노입자와 비교군의 면역세포에서 단백질 발현을 유세포 분석으로 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0050] 본 발명은 a) DMKD(0,0′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate); b) 인지질; c) 스테롤계 지질; 및 d) 세포사멸 유도 물질을 포함하는 지질 나노입자에 관한 것이다.

[0052] 본 발명에서 DMKD는 0,0′ -디미리스틸-N-라이실 아스파테이트로, 하기 화학식의 화합물을 의미한다.



[0053]

[0054] 본 발명에서, 상기 DMKD는 자기조립을 통해 나노크기의 입자 형성을 촉진할 수 있고, 그 구조에 의해 세포질로 mRNA 등의 방출, 특히 엔도솜 방출이 가능하다.

[0056] 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은

[0057] 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE),

[0058] 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethyleneglycol)-2000, DSPE-PEG2000-amine),

[0059] 디스테아로일포스파티딜에탄올말레이미드-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000, DSPE-PEG2000-maleimide),

[0060] 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC),

[0061] 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC),

[0062] 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroylsn-glycero-3-phosphocholine, DLPC),

[0063] 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-snglycero-3-phosphocholine, DMPC),

[0064] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC),

[0065] 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine,

DMPE), 및

[0066] 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다.

[0067] 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethyleneglycol)-2000, DSPE-PEG2000-amine) 및 디스테아로일포스파티딜에탄올말레이미드-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000, DSPE-PEG2000-maleimide)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다.

[0068] 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethyleneglycol)-2000, DSPE-PEG2000-amine)이다.

[0069] 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은 폴리에틸렌글리콜 변형을 포함할 수 있다. 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은 폴리에틸렌글리콜 변형을 포함할 수 있고, 인지질에 1 kDa 이상의 폴리에틸렌글리콜이 공유 결합될 수 있다. 구체적으로, 폴리에틸렌글리콜은 1 kDa 이상, 1.5 kDa 이상, 2 kDa 이상, 2.5 kDa 이상일 수 있다.

[0070] 본 발명에서, 인지질은 지질 나노입자의 반감기와 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0072] 본 발명의 일 양태에서, 상기 스테롤계 지질은 콜레스테롤(cholesterol), 시토스테롤(sitosterol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 캄페스테롤(campesterol), 및 에르고스테롤(ergosterol)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다.

[0073] 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 스테롤계 지질은 콜레스테롤(cholesterol)이다.

[0074] 본 발명에서, 스테롤계 지질은 이중층 구조를 지지할 수 있고, 안정성을 부여할 수 있다.

[0076] 본 발명의 일 양태에서, 상기 세포사멸 유도 물질은 포스파티딜 세린(phosphatidylserine)이다.

[0077] 본 발명에서, 세포사멸 유도 물질이 세포막 표면에 노출되는 경우, 세포사멸 신호(apoptosis signal)를 모방하여 식작용(phagocytosis)을 촉진할 수 있다. 따라서, 면역세포에서의 식작용을 촉진하여 전달체로써 유용하다.

[0079] 본 발명의 일 양태에서, 상기 DMKD(O,O′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate)는 나노입자 대비 몰백분율 45 내지 65 mol% 이다.

[0080] 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 DMKD는 나노입자 대비 몰백분율 47 내지 65 mol %, 구체적으로, 48 내지 65 mol%, 49 내지 65 mol%, 50 내지 65 mol%, 50 내지 63 mol%, 50 내지 62 mol%, 50 내지 61 mol%, 더 구체적으로, 50 내지 60 mol%이다.

[0081] 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은 나노입자 대비 몰백분율 14 내지 24 mol%이다.

[0082] 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 인지질은 나노입자 대비 몰백분율 14.5 내지 24 mol%, 15 내지 24 mol%, 15.5 내지 24 mol%, 16 내지 24 mol%, 16 내지 22 mol%, 16 내지 21.5 mol%, 16 내지 21 mol%, 16 내지 20.5 mol%, 더 구체적으로, 16 내지 20 mol%이다.

[0083] 본 발명의 일 양태에서, 상기 스테롤계 지질은 나노입자 대비 몰백분율 18 내지 30 mol%이다.

[0084] 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 스테롤계 지질은 나노입자 대비 몰백분율 19 내지 30 mol%, 20 내지 30 mol%, 20.5 내지 30 mol%, 21 내지 30 mol%, 21 내지 29 mol%, 21 내지 28.5 mol%, 21 내지 28 mol%, 21 내지 27.5 mol%, 더 구체적으로, 21 내지 27 mol%이다.

[0085] 본 발명의 일 양태에서, 상기 세포사멸 유도 물질은 나노입자 대비 몰백분율 1 내지 4 mol%이다.

[0086] 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 세포사멸 유도 물질은 나노입자 대비 몰백분율 1.5 내지 4 mol%, 1.6 내지 4 mol%, 1.7 내지 4 mol%, 1.75 내지 4 mol%, 1.8 내지 4 mol%, 1.85 내지 4 mol%, 1.9 내지 4 mol%, 2 내지 4 mol%, 2 내지 3.8 mol%, 2 내지 3.6 mol%, 2 내지 3.5 mol%, 2 내지 3.4 mol%, 2 내지 3.3 mol%, 2 내지 3.25 mol%, 2 내지 3.2 mol%, 2 내지 3.15 mol%, 2 내지 3.1 mol%, 2 내지 3.1 mol%, 2 내지 3.05 mol%, 더 구

체적으로, 2 내지 3 mol%이다.

[0087] 본 발명의 일 양태에서, 상기 지질 나노입자는 크기가 1 내지 500 nm이다. 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 지질 나노입자는 크기가 2 내지 500 nm, 더 구체적으로 5 내지 500 nm, 5 내지 450 nm, 5 내지 400 nm, 5 내지 350 nm, 5 내지 300 nm, 5 내지 250 nm, 5 내지 240 nm, 5 내지 230 nm, 5 내지 220 nm, 5 내지 210 nm, 5 내지 200 nm, 10 내지 200 nm이다.

[0089] 본 발명 지질 나노입자는 양이온성 지질, 보조지질, 세포 사멸 유도 물질 등을 유기 용매에 각 몰백분율로 용해 후 혼합시켜 제조할 수 있다. 유기 용매는 특별히 제한되지 않으나, 클로로포름, 메탄올, 에탄올, 펜탄, 헥산, 벤젠 등을 사용할 수 있다. 또한, 지질 나노입자의 형성을 위하여, 가열, 증발, 나노입자 형성 용액 등을 사용하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0090] 본 발명에서, 지질 나노입자는 A) a) 양이온성 지질 DMKD(O,O′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate), b) 인지질; c) 스테롤계 지질; 및 d) 세포사멸 유도 물질을 유기용매에 용해시키는 단계; B) 유기용매를 제거하는 단계; 및 C) 초음파 처리 및 압출하는 단계를 포함하여 제조할 수 있다.

[0091] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 A)의 양이온성 지질, 인지질, 스테롤계 지질, 세포사멸 유도 물질은 각 몰백분율에 따를 수 있다.

[0093] 또한, 본 발명은 a) DMKD(O,O′ -dimyristyl-N-lysyl aspartate); b) 인지질; c) 스테롤계 지질; d) 세포사멸 유도 물질; 및 e) 핵산을 포함하는 지질 나노입자 복합체에 관한 것이다.

[0094] 본 발명에서 지질 나노입자 복합체는 핵산이 지질 내부에 캡슐화된 상태로, 핵산이 뉴클레아제 등으로부터의 분해, 세포막 투과 등이 가능하다.

[0095] 본 발명 지질 나노입자 복합체는 면역세포와 비면역세포의 구분없이 핵산을 전달 할 수 있다. 또한, 본 발명 지질 나노입자 복합체는 비면역세포와 비교하여 면역세포에서 효과적으로 핵산을 전달할 수 있어, 면역세포가 직접 항원을 만들어낼 수 있도록 하여 정상세포에서의 항원 과발현에 따른 부작용을 현저히 감소시킬 수 있다.

[0096] 본 발명에서, a) 내지 d)를 포함하는 지질 나노입자 및 e) 핵산을 교반하여 지질 나노 입자 복합체를 제조할 수 있다. 교반 시간, 교반 속도, 온도 등의 조건은 제조된 나노입자의 특성, mRNA의 특성 등에 따라 달리할 수 있다.

[0097] 본 발명에서, 지질 나노입자 또는 지질 나노입자 복합체를 통해 제조하는 경우, a) 양이온성 지질, b) 인지질, c) 스테롤계 지질, d) 세포사멸 유도 물질, 및 e) 핵산의 농도는 각각 0.1 내지 100 mg/mL의 임의의 농도를 사용할 수 있다.

[0098] 본 발명에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이들의 중합체를 의미한다. 핵산의 예로 데옥시리보 핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 포스포르아미데이트, 메틸 포스포네이트 등을 포함한다.

[0100] 본 발명의 일 양태에서, 상기 핵산은 DNA, siRNA, mRNA, 안티센스 RNA, 단일가닥 RNA, 또는 마이크로 RNA이다.

[0101] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 핵산은 DNA, siRNA, 또는 mRNA이다.

[0102] 또한, 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 핵산은 mRNA이다.

[0103] 본 발명의 일 양태에서, 상기 a) 내지 d)의 지질 나노입자 및 e) 핵산은 N:P 비율을 1 : 2 내지 4, 구체적으로 1 : 2.2 내지 3.8, 1 : 2.3 내지 3.7, 1 : 2.4 내지 3.6, 1 : 2.5 내지 3.5일 수 있다.

[0104] 본 발명의 일 양태에서, 상기 지질 나노입자 또는 지질 나노입자 복합체는 DMKD를 사용하지 않는 경우와 비교하여, 더 높은 핵산 발현을 나타낸다.

[0105] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 지질 나노입자 또는 지질 나노입자 복합체는 DMKD를 사용하지 않는 경우와 비교하여, 핵산 발현이 5% 이상, 구체적으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 100% 이상 더 높은 핵산 발현을 나타낸다.

[0106] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 지질 나노입자 또는 지질 나노입자 복합체는 포스파티딜세린(phosphatidylserine)을 사용하지 않는 경우와 비교하여, 핵산 발현이 5% 이상, 구체적으로 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상 더 높은 핵산 발현을

나타낸다.

[0107] 본 발명의 일 양태에서, 상기 지질 나노입자 복합체는 5일 이상 입자의 크기를 유지할 수 있다. 구체적인 본 발명의 일 양태에서, 상기 지질 나노입자 복합체는 10일 이상, 더 구체적으로, 20일 이상, 30일 이상, 40일 이상, 50일 이상, 60일 이상, 70일 이상, 80일 이상, 90일 이상, 100일 이상, 110일 이상, 120일 이상 크기를 유지할 수 있다.

[0109] 또한, 본 발명은 상기 지질 나노입자 복합체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0110] 또한, 본 발명은 지질 나노입자 복합체를 포함하는 백신에 관한 것이다.

[0111] 본 발명의 일 양태에서, 상기 지질 나노입자 복합체는 약학적으로 허용가능한 염, 또는 보조제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다.

[0112] 또한, 본 발명은 상기 지질 나노입자 복합체를 투여하는 방법을 제공한다.

[0113] 또한, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0114] 본 발명의 화합물 투여 경로는 예를 들면, 경구 또는 비경구 경로로 투여될 수 있다. 여기서, 비경구는 광의의 투여 경로를 의미하며, 예를 들면, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 비내, 설하, 척추강내(초내, intrathecal), 흡입, 눈, 직장, 질, 뇌실 투여 등을 포함한다.

[0115] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0116] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명에 따른 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0117] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.

[0118] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0119] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0120] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.01 mg 내지 100 mg, 보다 구체적으로 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 15 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0122] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0123] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0125] **<실시예 1> 양이온성 지질 나노입자(cationic lipid nanoparticle, LNP) 제조**

[0126] **<실시예 1-1> 시료의 준비**

[0127] DSPE-PEG2000-amine(1,2-distearoyl-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] 및 콜레스테롤(cholesterol) 및 포스파티딜세린(phosphatidylserine)은 Avanti Polar Lipid, Inc., (Alabaster, USC)로부터 구입하였다. 양이온성 지질 DMKD(O,O-dimyristyl-N-lysyl glutamate)는 대한민국공개특허 10-2002-0062479호에 따라 합성하였다.

[0129] **<실시예 1-2> 양이온성 지질 나노입자 제조**

[0130] 도 1의 모식도와 같이 양이온성 지질 나노입자(cationic lipid nanoparticle, LNP)를 초음파 처리 및 압출에 의해 제조하였다. 구체적으로, 양이온성 지질인 DMKD, 보조지질인 포스파티딜세린, DSPE-PEG2000-amine, 콜레스테롤(Cholesterol)을 클로로포름 및 메탄올 혼합 용액(2:1, v/v)에 용해시켰다. 이 때, DMKD-PS는 DMKD, 포스파티딜세린, DSPE-PEG200-amine, 콜레스테롤을 각각 48 : 2.5 : 18 : 24.5 몰비로 하여 제조하였다. 이후, 유기용매를 N_2 가스 스트림 하에 증발시켜 양이온성 지질 박막을 형성시키고, 이후 1시간 동안 진공 건조하여 잔류 유기용매를 제거하고 1 mL 식염수로 수화하였다. 이후, 실온에서 20분 간격으로 10분씩 3회 초음파 처리 및 압출을 통해 나노입자의 크기를 균일화하였다.

[0132] **<실시예 2> mRNA-양이온성 지질 나노입자 제조**

[0133] 양이온성 지질 나노입자로 mRNA를 캡슐화하기 위하여, mRNA와 양이온성 지질을 1:3 N:P ratio로 첨가한 후, 상온에서 30분 간 교반하여 mRNA와 복합체를 형성한 지질 나노입자를 제조하였다.

[0135] 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 나노입자의 크기 및 표면전하는 Zetasizer Nano-ZS90(Malvern Instrument Ltd., Malvern, UK)을 사용하여 DLS(dynamic light scattering)으로 3회 측정하였고 GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., Ca, USA)로 통계적으로 분석하였으며, 그 결과는 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

[0136]

	크기[a] (d.nm)	다분산지수[a]	제타전위(mV)
DMKD-PS	135.77 ± 1.51[b]	0.192 ± 0.004[b]	41.57 ± 4.06[b]
DMKD-PS with mRNA	271.90 ± 46.95	0.055 ± 0.060	36.3 ± 1.18

[0137] [a: 크기(지름), 다분산지수, 제타전위는 입자 분석기로 3회 측정]

[0138] [b: 크기(지름), 다분산지수, 제타전위 평균 ± 표준편차(S.D)]

[0140] **<실험예 1> GFP mRNA-양이온성 지질 나노입자의 특성 확인**

[0141] 상시 실시예 2에서 GFP mRNA를 사용하여 GFP mRNA-양이온성 지질 나노입자를 제조하였으며, 생리식염수 용액 100 μL에 넣고 37 ℃에서 배양하여 이의 안정성을 확인하였다. 실험결과는 도 2에 나타난 바와 같으며, GFP mRNA-양이온성 지질 나노입자는 4일까지는 입자의 크기가 커지나 5일째에는 감소하였다. 또한, GFP mRNA-양이온성 지질 나노입자가 4개월 후에도 크기 변화가 거의 없는 것을 확인하여, 안정성이 우수한 것을 확인하였다.

[0143] **<실험예 2> mRNA *in vitro* 형질감염**

[0144] **<실험예 2-1> GFP mRNA로 형질감염된 비면역세포 및 면역세포의 공초점 현미경(Confocal Microscopy) 분석**

[0145] 비면역세포 CT 26 및 면역세포 RAW 264.7의 녹색형광단백질 발현여부를 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM 710, Zeiss)로 분석하였다.

[0146] 구체적으로, 상기 실시예에서 제조된 mRNA-양이온성 지질 나노입자의 세포 내 흡수를 확인하기 위하여, 상기 실시예에서 제조된 양이온성 지질 나노입자 30 μg을 세포에 처리한 후, 37 ℃에서, 24 시간 동안 배양하였다. 처리 후, 모든 세포를 PBS(pH 7.4)로 2회 세척하고 2% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 4 ℃, 어두운 곳에서 10분간 고정시켰다. 이후, 비면역세포 CT 26 및 면역세포 RAW 264.7를 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 용액(Vector lab, Burlingame, USA)으로 어두운 곳에서 10분간 염색하고, 슬라이드에 고정시킨 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 사용하여 관찰하였다. 또한, 대조군, 리포펙타민(Lipofectamine) 사용군, DMKD-chol(포스파티딜 미포함) 군, DMKD-PS(실시예에 따라 제조)으로 나누어 실험을 진행하였다.

[0147] 실험결과는 도 3에 나타난 바와 같으며, 비면역세포 및 면역세포 모두에서 DMKD-PS 군이 다른 군에 비해 신호가

높게 나타나 단백질 발현이 가장 많은 것을 확인하였다.

[0149] **<실험예 2-2> GFP mRNA로 형질감염된 비면역세포 및 면역세포의 유세포 분석(flow cytometry analysis)**

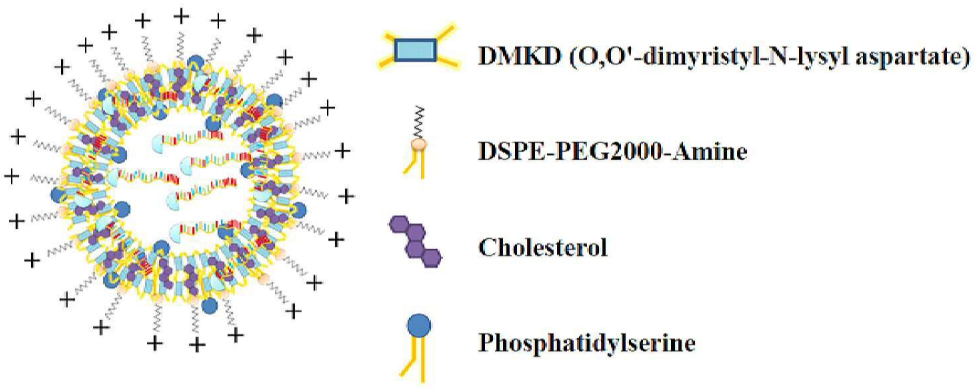
[0150] 비면역세포 CT 26 및 면역세포 RAW 264.7의 녹색형광단백질 발현 여부를 유세포 분석기(BD biosciences, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

[0151] 구체적으로, 비면역세포 CT 26 세포 및 면역세포 Raw 264.7을 6-웰 플레이트에 웰당 2 × 10^5 세포 밀도로 접종하고 상기 실시예에서 제조된 양이온성 지질 나노입자를 30 μg을 처리한 후 24, 48시간 동안 배양하였다. 이후, 모든 세포를 PBS(pH 7.4)로 2회 세척하고 2% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 4 ℃ 어두운 곳에서 10분간 고정시킨 후 FACS Calibur 유세포 분석기(Becton Dickinson)로 분석하였다. 또한, 대조군, 리포펙타민(Lipofectamine) 사용군, DMKD-chol(포스파티딜세린 미포함) 군, DMKD-PS(실시예에 따라 제조)으로 나누어 실험을 진행하였다.

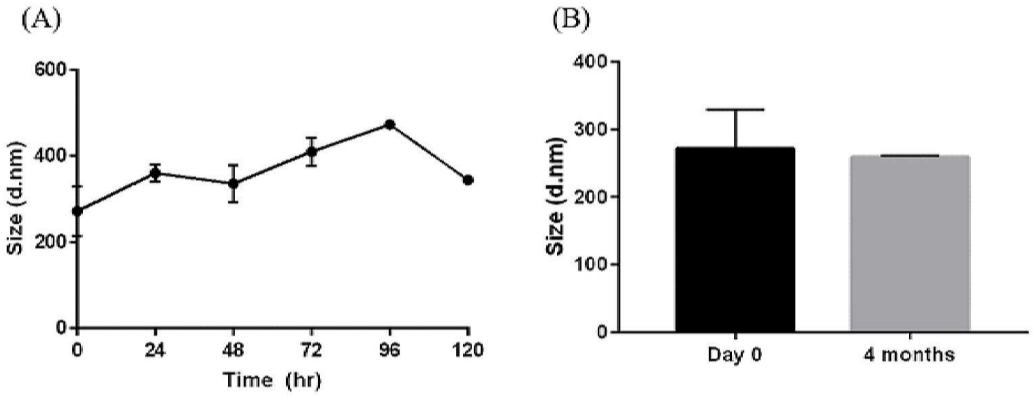
[0152] 실험결과는 도 4 내지 7에 나타난 바와 같으며, 비면역세포 및 면역세포 모두에서 DMKS-PS 군이 다른 군에 비해 현저하게 많은 양의 단백질 발현이 일어나는 것을 확인하였다. 또한, 도 7에 나타난 바와 같이, 면역세포에서 DMKS-PS군이 다른 군에 비해 48시간 후 압도적으로 많은 양의 단백질 발현이 일어나는 것을 확인하였다.

도면

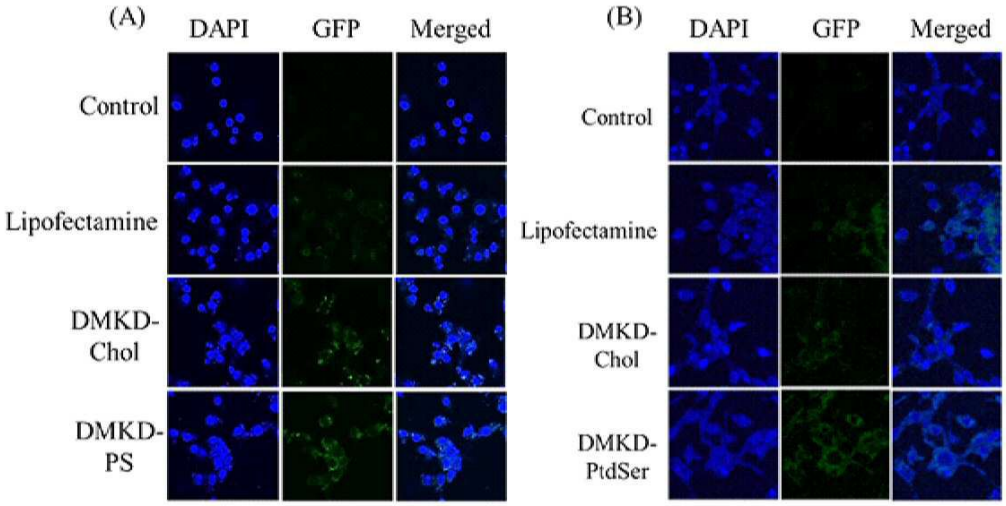
도면1



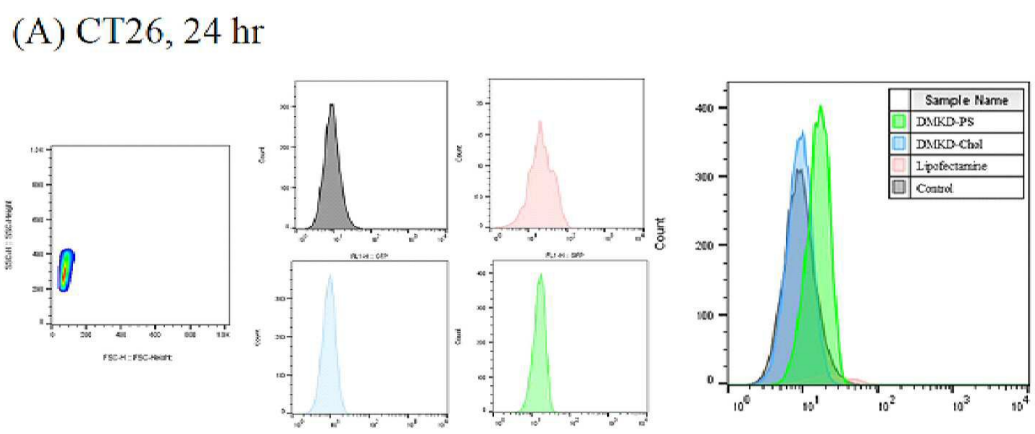
도면2



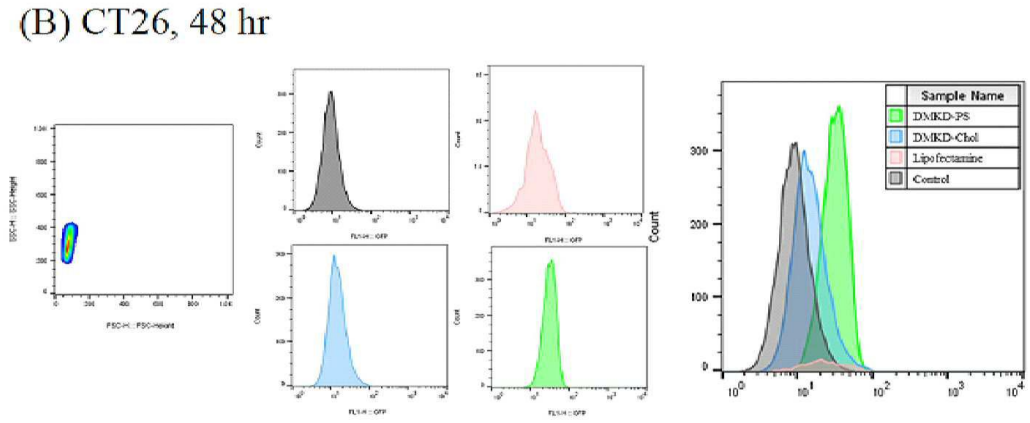
도면3


(A)
DAPI
GFP
Merged
Control
Lipofectamine
DMKD-Chol
DMKD-PS
(B)
DAPI
GFP
Merged
Control
Lipofectamine
DMKD-Chol
DMKD-PtdSer

도면4

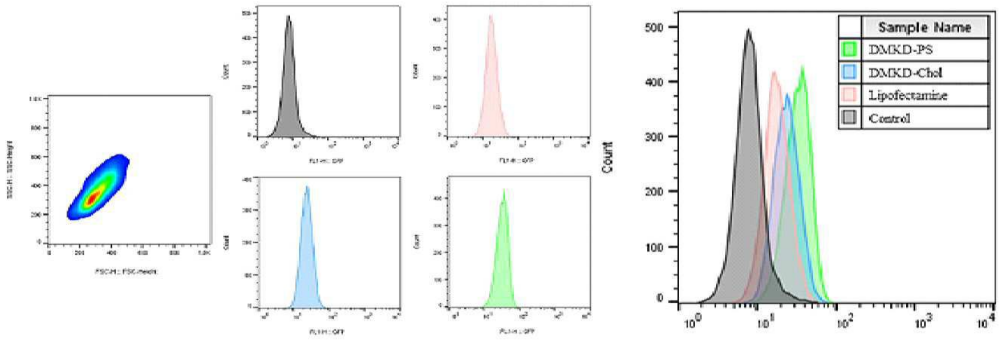

(A) CT26, 24 hr
Sample Name
DMKD-PS
DMKD-Chol
Lipofectamine
Control
Count

도면5


(B) CT26, 48 hr
Sample Name
DMKD-PS
DMKD-Chol
Lipofectamine
Control
Count

도면6

(A) RAW 264.7 , 24 hr



도면7

