

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2020/231105 A1

2020 년 11 월 19 일 (19.11.2020) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/006109

(22) 국제출원일:

2020 년 5 월 8 일 (08.05.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0054778 2019 년 5 월 10 일 (10.05.2019) KR

(71) 출원인: 서강대학교 산학협력단 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) [KR/KR];
04107 서울시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교),
Seoul (KR).

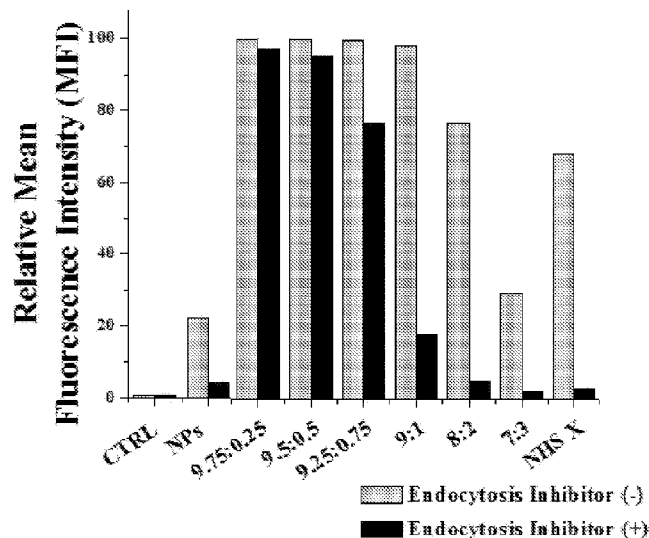
(72) 발명자: 김현철 (KIM, Hyun Cheol); 07344 서울시 영등포구 63로 7, B동 501호, Seoul (KR). 김도연 (KIM, Do Yeon); 02831 서울시 성북구 성북로4길 52, 110-705, Seoul (KR). 김지원 (KIM, Jee Won); 10371 경기도 고양시 일산서구 후곡로9, 804동 701, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 김현진 (KIM, Hyun Jin); 06142 서울시 강남구 테헤란로37길 7, 조이타워 301호(대신국제특허법률사무소), 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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: NANOPARTICLE COMPLEX FOR TREATING DISEASE, AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 발명의 명칭: 질병 치료용 나노입자 복합체 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present invention pertains to a nanoparticle complex for treating disease, and a method for producing same. More specifically, the present invention pertains to: a nanoparticle complex, wherein a tubular lipid structure is bonded to a portion of the surfaces of nanoparticles, thus enabling endocytosis as well as direct penetration through cell membranes, the nanoparticles can be effectively ingested into spheroid-type tumor cells due to the improved tissue penetration ability thereof, and a lipid structure of a sufficient length can be formed on the surfaces of the nanoparticles by controlling the ratio between a phospholipid bonded to a second reaction group that is used in the formation of the lipid structure and a phospholipid that is not bonded to the second reaction group; and a method for producing same.

(57) 요약서: 본 발명은 질병 치료용 나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체가 결합하여 엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있으며, 향상된 조직 투과 능력으로 인해 스페로이드 형태의 종양 세포 내에 나노입자를 효과적으로 섭취시킬 수 있고, 지질체 형성시 사용되는 제2반응기가 결합한 인지질과 제2반응기가 결합하지 않은 인지질의 비율을 조절하여 나노입자의 표면에 충분한 길이를 가지는 지질구조체를 형성할 수 있는 나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/231105 A1

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 역
내 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), 유
럽 (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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 질병 치료용 나노입자 복합체 및 이의 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은 질병 치료용 나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체가 결합하여 엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있으며, 향상된 조직 투과 능력으로 인해 스펙로이드 형태의 종양 세포 내에 나노입자를 효과적으로 섭취시킬 수 있고, 지질체 형성시 사용되는 제2반응기가 결합한 인지질과 제2반응기가 결합하지 않은 인지질의 비율을 조절하여 나노입자의 표면에 충분한 길이를 가지는 지질구조체를 형성할 수 있는 나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 약물전달 분야에서 세포 내 섭취 효율은 약물전달 효능을 달성하기 위한 중요한 척도가 된다. 따라서, 세포 내 섭취 효율을 향상시키기 위한 기술이 널리 개발되고 있다. 일 예로 하기 특허문헌에 기재된 것처럼 나노입자에 세포투과성 펩타이드 등을 화학적으로 결합시켜 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키고자 하고 있다.

- [3] <특허문헌>

- [4] 공개특허공보 제10-2017-0040748호(2017. 04. 13. 공개) "다중 블럭 폴리펩타이드를 포함하는 약물전달체 및 자가조립 나노구조체"

- [5] 하지만, 종래의 세포 내 섭취 효율을 향상시키기 위한 기술은 충분한 효과를 얻을 수 없으며, 결합된 물질이 쉽게 분해되어 안정성이 떨어지는 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,
[7] 본 발명은 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 리피드 기반 물질로 나노입자 표면을 개질함으로써 세포 내 섭취 효율을 비약적으로 향상시킨 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
[8] 또한, 본 발명은 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체를 형성하여, 엔도시토시스(100 내지 200nm 사이즈의 입자가 세포 내에 섭취되는 기작임)뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있는 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
[9] 또한, 본 발명은 향상된 조직 투과(tissue penetration) 능력으로 인해 스펙로이드 형태의 종양 세포 내에 나노입자를 효과적으로 섭취시킬 수 있는 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
[10] 또한, 본 발명은 유전체 약물을 담지하거나 유전체 약물 자체로 이루어진

나노입자의 세포 및 조직에의 전달 효과를 향상시켜, 유전자 치료 효율을 높일 수 있는 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[11] 또한, 본 발명은 지질구조체를 나노입자에 직접 부착하지 않고 지질 기반의 지질체(버블, 리포솜 등)와 나노입자를 결합시킨 후 물질적인 힘을 가해 지질체가 파쇄되어 나노입자 표면에 지질구조체가 형성되도록 하는 Top-down 방식을 이용하므로 용이하게 대량 생산이 가능한 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[12] 또한, 본 발명은 지질체 형성시 사용되는 제2반응기가 결합한 인지질과 제2반응기가 결합하지 않은 인지질의 비율을 조절하여 상기 나노입자의 표면에 충분한 길이를 가지는 지질구조체를 형성할 수 있는 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결 수단

[13] 본 발명은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.

[14] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체는 세포 내에 섭취되는 나노입자와, 상기 나노입자의 외표면 일부분에 복수 개가 자기조립되어 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 지질 기반의 지질구조체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[15] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자는 제1반응기를 포함하고, 상기 지질구조체를 구성하는 지질 중에 일부 지질이 상기 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하는 제2반응기를 가지고 있으며, 우선적으로 상기 제1반응기와 제2반응기가 화학 결합하고 일부 지질이 나노입자에 결합하고 이를 시작점으로 하여 나머지 지질들이 자기조립으로 지질구조체를 형성하는 것을 특징으로 한다.

[16] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 지질구조체는 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합물로 이루어진 지질체의 자기조립에 의해 형성되며, 상기 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합 비율을 조절하여 나노입자에 결합한 지질구조체의 생성 및 형태를 제어할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[17] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질은 1:2.33 ~ 99의 몰비로 혼합되는 것을 특징으로 한다.

[18] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 지질구조체는 친수성을 띄는 지질 헤드가 외측면에 위치하고 내부에 소수성을 띄는 지질 꼬리가 위치하여 전체적으로 길이가 긴 튜브 형태를 가지는 것을 특징으로 한다.

- [19] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자는 50 내지 500nm의 직경을 가지며, 상기 지질구조체는 50 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [20] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체는 기존 나노입자의 세포 내에 들어가는 기작인 엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통하여 세포 내에 섭취될 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [21] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 지질구조체는 상기 나노입자의 암 세포 스피로이드 세포 내 섭취 효율을 향상시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [22] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자는 항암제를 포함하며, 항암 저항성을 가진 종양 세포의 사멸 효율을 향상시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [23] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자는 유전체 약물이 담지된 나노입자 또는 유전체 약물 자체로 이루어진 나노입자가 사용되어, 유전자 치료 효율을 향상시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [24] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체의 제조방법은 제1반응기가 존재하는 나노입자를 형성하는 나노입자형성단계와; 상기 제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질체를 형성하는 지질체형성단계와; 상기 나노입자와 지질체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록 하여 지질체의 외면에 나노입자가 결합한 지질체-나노입자 복합체를 형성하는 지질복합체형성단계와; 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘을 가해 지질체를 파쇄하여 나노입자의 외표면 일부분에 결합한 지질구조체를 형성하여 나노입자 복합체를 제조하는 파쇄형성단계;를 포함하며, 상기 지질체형성단계는 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합물을 이용하여 지질체를 형성하고, 상기 나노입자는 세포 내에 섭취되며, 상기 지질구조체는 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 것을 특징으로 한다.
- [25] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체의 제조방법에 있어서 상기 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합 비율을 조절하여 나노입자에 결합한 지질구조체의 생성 및 형태를 제어할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [26] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 파쇄형성단계에서는 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘을 가하고 일정 시간 유지하여, 지질체가 파쇄되며 지질체를 이루는 인지질은 재조합이 일어나 나노입자에 결합한 튜브 형태의 지질구조체가 형성되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [27] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.
- [28] 본 발명은 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 리피드 기반 물질로 나노입자 표면을 개질함으로써 세포 내 섭취 효율을 비약적으로 향상시킬 수 있는 효과가 있다.
- [29] 또한, 본 발명은 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체가 형성되어, 엔도시토시스(100 내지 200nm 사이즈의 입자가 세포 내에 섭취되는 기작임)뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있도록 할 수 있는 효과가 있다.
- [30] 또한, 본 발명은 향상된 조직 투과(tissue penetration) 능력으로 인해 스펜로이드 형태의 종양 세포 내에 나노입자를 효과적으로 섭취시킬 수 있는 효과가 있다.
- [31] 또한, 본 발명은 지질구조체를 나노입자에 직접 부착하지 않고 지질 기반의 지질체(버블, 리포솜 등)와 나노입자를 결합시킨 후 물질적인 힘을 가해 지질체가 파쇄되어 나노입자 표면에 지질구조체가 형성되도록 하는 Top-down 방식을 이용하므로 용이하게 대량 생산이 가능한 효과가 있다.
- [32] 또한, 본 발명은 지질체 형성시 사용되는 제2반응기가 결합한 인지질과 제2반응기가 결합하지 않은 인지질의 비율을 조절하여 상기 나노입자의 표면에 충분한 길이를 가지는 지질구조체를 형성할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [33] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 모식도.
- [34] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 TEM 이미지.
- [35] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 Cryo-TEM 이미지.
- [36] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체에 결합하는 지질구조체의 Cryo-TEM 이미지.
- [37] 도 5는 인지질 비율을 달리하여 제조된 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 Cryo-TEM 이미지.
- [38] 도 6은 본 발명의 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체에 사용되는 바이러스 나노입자의 TEM 이미지.
- [39] 도 7은 본 발명의 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 Cryo-TEM 이미지.
- [40] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 분석결과를 나타내는 도표.
- [41] 도 9 및 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 confocal microscope 이미지.
- [42] 도 11은 본 발명의 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 confocal microscope 이미지.
- [43] 도 12는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 confocal microscope 이미지.

- [44] 도 13 및 14는 다양한 지질 및 작용기를 이용하여 제조된 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 분석결과를 나타내는 도표.
- [45] 도 15는 Endocytosis Inhibitor를 처리한 후의 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 분석결과를 나타내는 도표.
- [46] 도 16은 Endocytosis Inhibitor를 처리한 후, 인지질 비율을 달리하여 제조된 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 분석결과를 나타내는 도표.
- [47] 도 17은 HA를 과량 처리한 후의 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 confocal microscope 이미지.
- [48] 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 항암제 전달체로의 효능 확인하기 위한 cell viability assay 결과를 나타내는 도표.
- [49] 도 19 및 20은 본 발명에 또 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 유전체 약물 전달체로의 효능을 확인하기 위한 gene silencing 결과를 나타내는 도면.
- [50] 도 21 내지 22는 본 발명에 또 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 유전체 약물 전달체로의 효능을 확인하기 위한 gene silencing 결과를 나타내는 도면.
- [51] 도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 스피로이드 종양 세포 모델에서의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 confocal microscope 이미지.
- [52] 도 24는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 스피로이드 종양 세포 모델에서의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 confocal microscope 이미지.
- [53] 도 25 및 26은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 스피로이드 종양 세포 모델에서 유전체 약물 전달체로의 효능을 확인하기 위한 gene silencing 결과를 나타내는 도면.
- [54] 도 27은 동물모델에서 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율 평가하기 위한 confocal microscope 이미지.
- [55] *도면에 사용되는 부호의 설명
- [56] 1: 나노입자 2: 지질구조체 21: 지질 헤드 22: 지질 꼬리

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [57] 이하에서는 본 발명에 따른 질병치료용 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라

다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [58] 본 발명의 일 실시예에 따른 질병치료용 나노입자 복합체를 도 1 내지 24를 참조하여 설명하면, 상기 나노입자 복합체는 세포 내에 섭취되는 나노입자(1)와, 상기 나노입자(1)의 외표면 일부분에 결합하여 나노입자(1)의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 지질 기반의 지질구조체(2) 등을 포함한다.
- [59] 상기 나노입자(1)는 세포 내에 섭취되는 구성으로, 질병의 치료 등에 이용될 수 있다. 상기 나노입자(1)는 예컨대 약물을 담지하거나 질병을 치료할 수 있는 물질로 이루어지는데, 세포 내에 섭취되어 질병의 치료에 이용되는 종래의 다양한 나노입자가 사용될 수 있으며, 예컨대, 질병의 치료에 이용되는, 알부민 나노입자, 핵산과 알부민으로 이루어진 나노입자, 생분해성 고분자 나노입자, 핵산 나노입자, 바이러스 입자 등을 예로 들 수 있다. 상기 나노입자는 예컨대 50 내지 500nm의 직경 및 구형의 형태 등을 가질 수 있다. 상기 나노입자는 지질구조체와 결합하는 화학 반응기(이하, '제1반응기'라 함)를 포함할 수 있다. 예컨대, 제1반응기로는 싸이올기, 아민기, 아미노기, 카르복시기 등을 포함하는 화합물일 수 있다.
- [60] 상기 지질구조체(2)는 나노입자(1)의 외표면 일부분에 결합하여 나노입자(1)의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 지질 기반의 구조체로, 상기 지질구조체는 예컨대 50 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가질 수 있으며, 상기 나노입자의 외표면에 하나 이상이 결합될 수 있다. 또한, 상기 지질구조체는 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하는 화학 반응기(이하, '제2반응기'라 함)를 포함할 수 있다. 예컨대, 제2반응기로는 싸이올기, 아민기, 아미노기, 카르복시기 등을 포함하는 화합물일 수 있다. 상기 지질구조체는 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질이 혼합된 혼합물로 이루어진 지질체의 재조합에 의해 형성되는데, 상기 지질구조체는 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합 비율을 조절하여 지질구조체의 생성 및 형태(모양 및 길이 등) 제어할 수 있으며, 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합하지 않은 지질은 1:2.33 ~ 99의 몰비로 혼합되는 것이 바람직하다.
- [61] 상기 지질구조체는 예컨대 친수성을 띄는 지질 헤드(21)가 외측면에 위치하고 내부에 소수성을 띄는 지질 꼬리(22)가 위치하여 전체적으로 길이가 긴 튜브 형태를 가질 수 있으며, 튜브 형태의 지질구조체 일단에 위치하는 제2반응기기가 상기 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하여 튜브 형태의 지질구조체가 상기 나노입자(1)의 외표면에 결합하게 된다. 예를 들어, 나노입자를 알부민 나노입자이고, 상기 지질구조체에 NHS(N-hydroxysuccinimide) 반응기를 형성하는 경우, NHS-amine 반응을 통해 상기 나노입자(1)와 지질구조체(2)를 결합시킬 수 있다. 본 발명은 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 리피드 기반 물질로 나노입자 표면을 개질함으로써 세포 내 섭취 효율을 비약적으로 향상시킬 수 있으며, 100 내지 200nm 사이즈의

나노입자가 세포 내에 섭취되는 기작은 엔도시토시스인데, 상기 나노입자 복합체는 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체가 결합하여, 엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있으며, 스피어로이드 형태의 종양 세포를 효과적으로 섭취되어 생체 모델에도 적용할 수 있다.

- [62] 본 발명의 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 제조방법을 설명하면, 상기 나노입자 복합체의 제조방법은 제1반응기가 존재하는 나노입자를 형성하는 나노입자형성단계와, 상기 제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질체(버블, 리포솜 등)를 형성하는 지질체형성단계와, 상기 나노입자와 지질체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록 하여 지질체의 외면에 나노입자가 결합한 지질체-나노입자 복합체를 형성하는 지질복합체형성단계와, 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘(mechanical force)을 가해 지질체를 파쇄하여 나노입자의 외표면 일부분에 결합한 지질구조체를 형성하는 파쇄형성단계 등을 포함한다.
- [63] 상기 나노입자형성단계는 세포 내에 섭취되어 질병에 치료에 이용되는 나노입자가 제1반응기를 포함하도록 상기 나노입자를 형성하는 단계로, 종래의 다양한 나노입자를 제조하는 방법이 사용될 수 있으며, 예컨대 약물을 담지한 알부민 나노입자의 경우 알부민에 아민기가 존재하여 제1반응기로 이용될 수 있으며, 특정 단백질의 발현을 억제하는 siRNA 나노입자의 경우 siRNA 나노입자에 아민이 붙어 있는 히알루론산을 코팅하여 siRNA 나노입자에 제1반응기를 형성할 수 있다.
- [64] 상기 지질체형성단계는 상기 제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질체(버블, 리포솜 등)를 형성하는 단계로, 예컨대 버블은 지질(예컨대, 인지질)로 형성되고 내부에 가스가 충전되어 있으며 상기 버블에 제2반응기가 위치하게 된다. 내부에 가스를 가지고 지질로 이루어진 리포솜 형태의 마이크로 사이즈의 버블은 종래의 제조방법에 의해 제조될 수 있으며, 예컨대 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합하지 않은 지질을 유기용매에 일정 비율로 혼합하여 지질필름을 형성하고, 상기 지질필름을 용매에 녹이고 가스를 주입하여 형성할 수 있다. 상기 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합하지 않은 지질의 혼합 비율을 조절하여 지질구조체의 생성 및 형태(모양 및 길이 등)를 제어할 수 있으며, 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합하지 않은 지질은 1:2.33 ~ 99의 몰비로 혼합되는 것이 바람직하다.
- [65] 상기 지질복합체형성단계는 상기 나노입자와 지질체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록 하여 지질의 외면에 나노입자가 결합한 지질체-나노입자 복합체를 형성하는 단계이다.
- [66] 상기 파쇄형성단계는 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘(mechanical force)을 가해 지질체를 파쇄하여 나노입자의

외표면 일부분에 결합한 지질구조체를 형성하는 단계이다. 지질체-나노입자 복합체에 초음파 기기 등을 이용하여 기계적인 힘을 가하고 일정 시간 유지하는 경우, 지질체가 파쇄되며 지질체를 이루는 지질은 재조합이 일어나 나노입자에 결합한 튜브 형태의 지질구조체가 형성되게 된다. 구체적으로, 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘을 가하면 지질체가 파쇄되며, 제2반응기를 가지고 있는 일부 지질이 우선적으로 나노입자에 결합하고(제1반응기와 제2반응기가 화학 결합함), 이를 시적점으로 하여 나머지 지질들이 자기조립으로 지질구조체를 형성하게 된다.

[67] 본 발명은 지질구조체를 나노입자에 직접 부착하지 않고 지질 기반의 지질체와 나노입자를 결합시킨 후 기계적인 힘을 가해 지질체가 파쇄되어 나노입자 표면에 지질구조체가 형성되도록 하는 Top-down 방식을 이용하므로 용이하게 대량 생산이 가능하도록 할 수 있다.

[68] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[69] <실시예 1> 알부민 나노입자 복합체의 제조

[70] 1. 알부민 나노입자(NPs)의 준비

[71] 알부민(Human serum albumin)을 증류수에 20mg/mL의 농도로 녹여 준 후, 0.2M NaOH를 이용하여 pH를 8로 조절하여 알부민 용액을 준비하고, 100% 에탄올을 1mL/min의 속도로 상기 알부민 용액에 적정하였다. 이후, 4%의 glutaraldehyde 10μL를 첨가하고 차광 하에 에탄올을 하룻밤 동안 날려주고, 13200rpm, 10min 조건으로 원심분리를 진행한 후 입자화되지 않은 알부민을 피펫을 이용해 제거해주고 PBS로 재분산하여 3000rpm, 5min 조건으로 원심분리를 진행한 후 micropellet을 제외한 상층액(나노입자(NPs))를 피펫으로 얻었다(한편, 형광 실험을 진행할 시에는, 필요에 따른 형광 dye와 나노입자를 하룻밤 동안 상온에서 반응시킨 후, 13200rpm, 10min 조건으로 원심분리를 진행한 후 반응하지 않은 형광 dye를 피펫을 이용하여 제거한 후 PBS로 재분산하여 사용함).

[72] 2. 지질체(리포솜)의 준비

[73] 지질 DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)와 DSPE-PEG-NHS2000(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-polyethylene glycol succinimidyl ester)을 9.25:0.75의 몰비로 혼합하여 Chloroform에 10mg/ml의 농도로 녹인 후 1mg/ml이 되도록 1c vial에 100ul씩 넣어준 후, 질소가스를 이용하여 chloroform을 날려준 후, desiccator를 이용하여 진공을 잡아 1시간 이상 말려 지질박막(lipid film)을 형성하였다. lipid film vial에 auto PBS를 1ml 넣어 지질 용액을 형성하고, 55°C 이상의 온도를 가지는 물에 지질 용액이 들어 있는 HPLC vial을 넣어 지질 용액의 온도가 55°C 이상이 되도록 하고 bath sonic에서 15초 정도 sonication을 실시하여(이때, 뜨거운 물에 담그는 과정과

sonication 실시 과정을 3번 정도 반복함), 리포솜을 형성하였다.

[74] 3. 지질체(지질을 이용한 버블)의 준비

[75] 실시예 1의 2의 과정을 거쳐 얻은 결과물에, C_3F_8 gas를 30초간 vial에 채워, Vial Mixer를 이용하여 45초간 mixing 시켜 NHS 반응기를 포함하는 지질 기반의 마이크로 버블을 형성하였다.

[76] 4. 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)의 형성

[77] (1) 실시예 1의 1에서 형성된 나노입자를 리포솜 용액(실시예 1의 2에서 형성된 리포솜이 PBS에 1mg/ml의 농도로 혼합되어 형성)에 넣어준 후, NHS-amine 반응을 유도하기 위해 RT에서 2시간 이상 반응시킨 후(이때, 리포솜-나노입자 복합체(Liposome-NPs)가 형성됨), 초음파 기기를 이용하여 2W, 1MHZ, duty cycle 100% 조건으로 5분 이상 mechanical force를 가하였다. 이후, 파쇄된 리포솜이 지질구조체를 충분히 형성할 수 있도록, 1시간 이상 RT에서 incubation하여 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)를 형성하였다.

[78] (2) 리포솜 대신에 실시예 1의 3에서 형성된 마이크로 버블을 사용한 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 4의 (1)과 동일하게 하여 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)를 형성하였다.

[79] (3) DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000의 혼합 비율을 달리하거나, DSPE-PEG-NHS2000 대신에 DSPE-PEG를 사용한 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 4의 (2)와 동일하게 하여 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)를 형성하였다. DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000의 혼합 비율은 각각 9.75:0.25, 9.5:0.5, 9:1, 8:2, 7:3로 하였고, DSPE-PEG-NHS2000 대신에 DSPE-PEG를 사용하여 제조된 나노입자 복합체는 하기의 도면들에서 NHS X로 표기하였다.

[80] <실시예 2> 바이러스 나노입자 복합체의 제조

[81] 1. 바이러스 나노입자의 준비

[82] 바이러스 나노입자로 AAV2-GFP(vector Biolabs, 1×10^{13} GC/ml, 20ul) 입자(AAV)를 이용하였다.

[83] 2. 지질체(지질을 이용한 버블)의 준비

[84] 지질 DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)와 DSPE-PEG2k(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[succinyl(polyethylene glycol)-2000])를 9.5:0.5의 몰비로 혼합한 후, 1mg/vial이 되도록 Chloroform에 녹이고, 질소가스를 이용하여 chloroform을 증발시켰다. 이후, 건조된 phospholipid의 농도가 1mg/ml이 되게 PBS를 넣고, 55°C 이상의 D.W에 5초간 담근 후, bath sonicator를 이용하여 30초 동안 건조된 phospholipid를 수용액 상으로 분산시켰다. 위 과정을 3회정도 반복하여 phospholipid를 수용액 상으로 완전히 분산시킨 후, C_3F_8 가스를 vial에 가득 채우고 vial mixer를 이용하여

45초간 흔들어 지질 기반의 마이크로 버블을 형성하였다.

[85] 3. 나노입자 복합체(Directional LT-AAV)의 형성

[86] 실시예 2의 1에서 준비된 바이러스 나노입자와 실시예 2의 2에서 준비된 마이크로 버블을 혼합하고 3시간 이상 상온에서 반응시킨 후, 초음파($2.0\text{W}/\text{cm}^2$)를 이용하여 30초 동안 mechanical force를 가하였다. 이후, 파쇄된 마이크로 버블이 지질구조체를 충분히 형성될 수 있도록 1시간 이상 상온에서 반응시켜, 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 나노입자 복합체(Directional LT-AAV)를 형성하였다.

[87] <실시예 3> 알부민과 RNA로 이루어진 나노입자 복합체의 제조

[88] 1. 알부민과 RNA로 이루어진 나노입자(siRNA NPs)의 준비

[89] 알부민(Human serum albumin)을 0.1mM HEPES with 0.01mM EDTA에 $40\text{mg}/\text{mL}$ 의 농도로 녹여 준 후, thiol-modify VEGF siRNA duplex(5' modified)를 넣고, 알부민과 siRNA가 혼합된 용액이 탁해질 때까지 100% 에탄올을 $1\text{mL}/\text{min}$ 의 속도로 적정 후, 차광 하에 에탄올을 하룻밤 동안 날려주고, 13200rpm , 10min 조건으로 원심분리를 진행한 후 입자화되지 않은 물질을 피펫을 이용해 제거해주고 PBS로 재분산하여 3000rpm , 5min 조건으로 원심분리를 진행한 후 micropellet을 제외한 상층액(siRNA와 알부민으로 이루어진 나노입자(siRNA NPs))를 피펫으로 얻었다. 상기 thiol-modify VEGF siRNA duplex의 sense는

5'-AUGUGAAUGCAGACCAAAGAATT-3'(서열번호:1)이고 antisense는

5'-thiol-UUCUUUGGUCUGCAUUCACAUTT-3'(서열번호:2)이다.

[90] 2. 나노입자 복합체(Directional siRNA LT-NPs)의 형성

[91] 실시예 3의 1에서 형성된 RNA와 알부민으로 이루어진 나노입자를 버블 용액(실시예 1의 3에서 형성된 버블이 PBS에 $1\text{mg}/\text{mL}$ 의 농도로 혼합되어 형성)에 넣어준 후, RT에서 2시간 이상 반응시킨 후, 초음파 기기를 이용하여 2W , 1MHz , duty cycle 100% 조건으로 5분 이상 mechanical force를 가하였다. 이후, 파쇄된 버블이 지질구조체를 충분히 형성할 수 있도록, 1시간 이상 RT에서 incubation하여 siRNA와 알부민으로 이루어진 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 나노입자 복합체(Directional siRNA LT-NPs)를 형성하였다.

[92] <실시예 4> 양이온성 고분자와 히알루론산이 차례로 코팅된 RNA 나노입자 복합체의 제조

[93] 1. 양이온성 고분자와 히알루론산이 차례로 코팅된 RNA 나노입자(siRNA NPs)의 준비

[94] 쥐의 혈관내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor A (VEGF-A))의 센스는 5'-AUGUGAAUGCAGACCAAAGAATT-3'(서열번호:1)이고, 안티센스는 5'-UUCUUUGGUCUGCAUUCACAUTT-3'(서열번호:2)이다. 상기 센스 및 안티센스를 인코딩한 긴 선형 단일가닥 DNA를 제조하였다. Ligase된 원형 DNA 템플릿을 T7 RNA 폴리머레이즈와 같이 37°C 에서 20 시간 동안 반응시켜(8mM

Tris-HCl, 0.4mM spermidine, 1.2mM MgCl₂, and 2mM dithiothreitol)에서 배양하였다. 생성된 용액을 여러 번 피펫하고 5분 동안 초음파처리해서 입자를 분해하였다. 용액을 4°C 조건하 13,200rpm에서 20분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 그 후 RNase-free water를 첨가해 입자를 세척하였다. 용액을 1분 동안 다시 초음파처리하고 원심 분리하였다. 세척단계를 세 번 더 반복해서 RCT 시약을 제거하여 RNA-microsponge(anti-VEGF siRNA hydrogel)를 수득하였다. 상기 siRNA hydrogel을 bath sonicator에 1분 이상 넣고 뭉친 것이 없게 잘 풀어준 후 mini centrifuge로 벽면에 튕겨나온 것이 down될 정도로 몇 초만 돌려준 후, siRNA hydrogel 3μl와 nuclease free water 12μl을 혼합하여 제1용액을 형성하고, 1mg/ml bPEI 1μl과 nuclease free water 9μl를 혼합하여 제2용액을 형성한 후, 제1용액과 제2용액을 10분간 상온에서 반응시키고, 1mg/ml hyaluronic acid-amine을 5μl를 천천히 넣은 후, 10분 동안 상온에서 반응시킨 후, sonication으로 뭉친 입자를 풀어주어 양이온성 고분자와 히알루론산이 차례로 코팅된 RNA 나노입자(siRNA NPs)를 얻었다. 상기 양이온성 고분자와 히알루론산이 차례로 코팅된 RNA 나노입자의 제조는 본 발명자의 선행 특허(KR10-1880790)를 참조하였다.

[95] 2. 나노입자 복합체(Lipid-siRNA NPs(siRNA LT-NPs))의 형성

[96] 실시예 4의 1에서 형성된 양이온성 고분자와 히알루론산이 차례로 코팅된 RNA 나노입자를 버블 용액(실시예 1의 3에서 형성된 버블이 PBS에 1mg/ml의 농도로 혼합되어 형성)에 넣어준 후, RT에서 2시간 이상 반응시킨 후, 초음파 기기를 이용하여 2W, 1MHZ, duty cycle 100% 조건으로 5분 이상 mechanical force를 가하였다. 이후, 파쇄된 버블이 지질구조체를 충분히 형성할 수 있도록, 1시간 이상 RT에서 incubation하여 양이온성 고분자와 히알루론산이 차례로 코팅된 RNA 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 나노입자 복합체(Lipid-siRNA NPs(siRNA LT-NPs))를 형성하였다.

[97] <실시예 5> 여러 종류의 지질과 작용기를 이용하여 나노입자 복합체의 제조

[98] 1. DSPC 대신에 DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DOPE(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), cis-PC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)를 사용하고, 제2반응기가 결합되지 않은 지질(DSPC, DPPC, DOPE, cis-PC)와 제2반응기가 결합된 지질(DSPE-PEG-NHS2000)의 혼합 비율을 9.5:0.5의 몰비로 한 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 4의 (2)와 동일하게 하여 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 나노입자 복합체를 형성하였다.

[99] 2. DSPE-PEG-NHS2000 대신에 DSPE-PEG2000-SH, DSPE-PEG2000-Amine을 사용하고, 제2반응기가 결합되지 않은 지질(DSPC)와 제2반응기가 결합된 지질(DSPE-PEG-NHS2000, DSPE-PEG2000-SH, DSPE-PEG2000-Amine)의 혼합 비율을 9.5:0.5의 몰비로 한 것을 제외하고는, 다른 조건을 실시예 1의 4의 (2)와 동일하게 하여 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 나노입자

복합체를 형성하였다.

[100] <실시예 6> 나노입자 복합체의 특성 확인

[101] 1. 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (2)에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)를 TEM으로 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었고, 실시예 1의 4의 (2)에서 형성한 나노입자 복합체 및 지질구조체를 Cryo-TEM으로 측정하여 그 결과를 각각 도 3 및 4에 나타내었으며, 실시예 1의 4의 (3)에서 형성한 나노입자 복합체를 Cryo-TEM으로 측정하여 그 결과를 각각 도 5에 나타내었고(단, DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000의 혼합 비율은 각각 9.75:0.25, 9.5:0.5, 9:1, 8:2인 나노입자 복합체에 대해서만 측정함), 실시예 2의 1에서 준비한 바이러스 나노입자를 TEM으로 측정하여 그 결과를 도 6에 나타내었으며, 실시예 2의 3에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-AAV)를 Cryo-TEM으로 측정하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[102] 2. 도 2를 보면, 알부민 나노입자의 경우 표면이 매끈한 것을 확인할 수 있는데 반해, 알부민 나노입자 복합체는 지질구조체가 나노입자의 표면에 붙어 있어 표면이 매끈하지 않은 것을 알 수 있다. 또한, 도 3을 보면 나노입자의 표면에 튜브 형태의 지질구조체가 붙어 있음을 알 수 있고, 도 4를 보면 상기 지질구조체는 튜브 형태를 가짐을 더욱 명확히 할 수 있다. 또한, 도 3 및 4를 보면, 상기 지질구조체는 50 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가짐을 알 수 있고, 상기 지질구조체는 상기 나노입자의 외표면에 하나 이상이 결합될 수 있음을 알 수 있다. 또한, 도 3 및 5를 보면, DSPC와 DSPE-PEG-NHS의 비율에 따라 지질구조체 형성 양상이 달라지는 것을 확인할 수 있고, DSPE-PEG-NHS의 비율이 증가할수록 지질구조체의 길이가 짧아지고 나노입자에도 지질구조체가 덜 형성되는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 6을 보면 바이러스 나노입자의 경우 표면이 매끈한 것을 확인할 수 있는데 반해, 도 7을 보면 바이러스 나노입자의 표면에 튜브 형태의 지질구조체가 붙어 있음을 알 수 있다.

[103] <실시예 7> 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율 평가

[104] 1. 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (2) 및 (3)에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)에 대한 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 분석 결과를 도 8에 나타내었고 이를 정량화한 결과를 표 1에 나타내었으며, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 9에 나타내었다. 유세포 측정기를 이용한 분석은 A549 세포(1×10^4)에 Alexa 488 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리하여 수행하였고, 공초점 현미경을 이용한 분석은 DAPI를 이용하여 핵이 염색되고 Phalloidin을 이용하여 세포 골격(cytoskeleton)이 염색된 A549 세포(1×10^5)에 Cy5.5 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리하여 수행하였다.

[105] [표1]

	CTRL	NPs	9.75:0.2 5	9.5:0.5	9.25:0.7 5	9:1	8:2	7:3	NHS X
Alexa 488+	0.43	18.30	95.91	92.51	77.23	78.17	20.90	10.9 7	22.27
STD	0.19	0.24	0.24	0.11	0.26	0.37	0.36	0.05	0.17

- [106] 2. 또한, 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (1)에서 형성한 리포좀-나노입자 복합체(Liposome-NPs), 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)에 대한 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 10에 나타내었다. 공초점 현미경을 이용한 분석은 DAPI를 이용하여 핵이 염색된 A549 세포(1×10^5)에 Alexa 555 형광 dye가 표지된 나노입자, 리포좀-나노입자 복합체 및 나노입자 복합체를 처리하여 수행하였다.
- [107] 3. 또한, 실시예 2의 1에서 준비한 나노입자(AAV)와 실시예 2의 3에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-AAV)에 대한 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 11에 나타내었다. 공초점 현미경을 이용한 분석은 DAPI를 이용하여 핵이 염색된 ARPE19 세포(1×10^5)에 바이러스 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리하여 수행하였다.
- [108] 4. 또한, 실시예 4의 1에서 준비한 나노입자(siRNA NPs)와 실시예 4의 2에서 형성한 나노입자 복합체(siRNA LT-NPs)에 대한 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 12에 나타내었다. 공초점 현미경을 이용한 분석은 DAPI를 이용하여 핵이 염색되고 FITC를 이용하여 세포골격이 염색된 MCF-7 세포(1×10^5)에 Cy3 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리하여 수행하였다.
- [109] 5. 또한, A549 세포(1×10^5)에 Alexa 647 형광 dye가 표지된 실시예 5의 1 및 2에서 형성한 나노입자 복합체를 도입한 후, 형광 세기를 측정하여 그 결과를 도 13 및 14에 나타내었다. 도 13에서 DSPC로 표기된 것은 DSPC가 사용되어 제조된 나노입자 복합체의 결과를 의미하며, 도 14에서 Thiol로 표기된 것은 DSPE-PEG2000-SH가 사용되어 제조된 나노입자 복합체의 결과를 의미한다.
- [110] 6. 도 8 및 표 1을 보면, 나노입자 복합체가 나노입자에 비해서 세포 섭취 효율이 월등히 뛰어난 것을 알 수 있고, DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000의 비율이 9:1 이상일 때, Alexa 488 positive 세포(염색된 나노입자를 uptake한 세포)의 비율이 control 대비 78% 이상임을 확인할 수 있고, DSPE-PEG-NHS2000의 비율이 이보다 많아지는 경우 세포 내 uptake 효율이 현저하게 떨어짐을 확인할 수 있어, 지질구조체가 나노입자 표면에 충분한 길이 및 모양으로 형성되는 않는 경우 나노입자의 세포 섭취 효율이 떨어지는 것을 알 수 있다. 또한, 도 9를 보면 형광

이미지를 이용한 실험에서도 도 8 및 표 1와 같은 결과를 확인할 수 있다. 또한, 도 10을 보면, 나노입자 복합체가 나노입자나 리포좀-나노입자 복합체에 비해서 세포 섭취 효능이 월등히 뛰어남을 확인할 수 있어, 나노입자에 지질구조체가 형성된 경우 나노입자에 리포좀이 단순히 결합한 것에 비해 섭취 효율이 뛰어남을 알 수 있고, 지질로 이루어진 버블 뿐만 아니라 리포좀 혹은 다른 지질 구형체로도 나노입자 복합체가 형성될 수 있음을 알 수 있다.

- [111] 7. 또한, AAV(Adeno associate Virus)는 망막조직 내로 치료용 유전자 또는 약물을 전달하는 벡터로 이용되며 다른 벡터에 비해 좋은 효율을 보이나, RPE(retinal pigment epithelium)까지는 전달되지 않는데, 도 11을 보면 나노입자 복합체가 나노입자에 비해 섭취 효율이 현저하게 뛰어난 것을 알 수 있어, 지질구조체가 바이러스와 세포수용체 간의 특이적 반응을 감소시켜 바이러스 transfection률이 증가되고 RPE층으로의 전달율이 증가될 수 있음을 알 수 있다. 또한, 도 12를 보면 고분자와 히알루론산이 코팅된 RNA 나노입자에서도 나노입자 복합체가 나노입자에 비해서 세포 섭취 효능이 월등히 뛰어남을 알 수 있고, 도 13 및 도 14를 보면 다양한 종류의 지질과 다양한 작용기를 이용하여 나노입자 복합체를 제조하여도 나노입자 복합체가 나노입자에 비해서 세포 섭취 효능이 월등히 뛰어남을 알 수 있다.

- [112] <실시예 8> 나노입자 복합체가 direct penetration으로 세포 내에 uptake 되는 것의 확인

- [113] 1. Endocytosis Inhibitor를 처리한 후의 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율 평가

- [114] (1) Endocytosis Inhibitor를 처리한 세포에 대하여, 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (2)에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)의 세포 섭취 효율을 평가하였다. 200nm 사이즈의 나노입자는 크게 macropinocytosis, clathrin-independent endocytosis, clathrin-dependent endocytosis의 총 세 가지 기작에 세포 내 섭취가 이루어진다고 알려져 있으므로, 이를 inhibition하는 inhibitor를 선정하여 먼저 A549 세포(1×10^4)를 각각 또는 동시에 1시간 처리한 후, Alexa 488 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 3시간 처리하고 유세포 측정기를 이용하여 측정하였다. 측정 결과에 대해 나노입자를 기준으로 normalize하여 도 15에 나타내었다. Macropinocytosis inhibitor로는 EIPA(5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride)를 선정(25ug/ml의 농도)하여 Na^+/H^+ exchange 기작을 방해하고, Clathrin-dependent endocytosis inhibitor로는 CPZ(chlorpromazine) 선정(20ug/ml의 농도)하여 inhibits clathrin-coated pit formation을 방해하고, Clathrin-independent endocytosis inhibitor로는 M β CD(methyl- β -cyclodextrin)을 선정(3mg/ml의 농도)하여 cholesterol-dependent endocytic process를 방해하였다. 또한, 위와 같이, Macropinocytosis inhibitor, Clathrin-dependent endocytosis inhibitor, Clathrin-independent endocytosis inhibitor를 모두 처리한 A549 세포(1×10^4)에 Alexa 488 형광 dye가 표지된 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (2) 및 (3)에서 형성한

나노입자 복합체(Directional LT-NPs)를 도입한 후, 형광 세기를 측정하여 그 결과를 도 16에 나타내었다.

- [115] (2) 도 15를 보면, 나노입자의 경우(NPs), CPZ, EIPA inhibitor로 인해 세포 섭취 효능이 크게 감소함을 확인할 수 있고, 세 가지 종류의 inhibitor를 모두 처리하여 endocytosis 기작을 모두 방해하였을 때 나노입자의 세포 섭취가 거의 이루어지지 않음을 알 수 있으며, 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)의 경우 세포 섭취 효능이 나노입자와 비교했을 때 350% 정도 더 뛰어난 것을 확인할 수 있고, 세 가지 종류의 inhibitor로 endocytosis 기작을 모두 방해하였을 때도 나노입자보다 세포 섭취 효능이 뛰어난 것을 관찰할 수 있다. 이를 통해, 나노입자 복합체는 endocytosis뿐만 아니라, 세포막을 direct penetration을 통해 직접적으로 통과한다는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 16을 보면, DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000을 8:2, 7:3의 비율로 혼합하여 제조된 나노입자 복합체의 경우 세 가지의 inhibitor들을 모두 처리하게 되면 세포 uptake 효능이 현저하게 떨어짐을 알 수 있는데 반해, DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000을 9:1 이상의 비율로 혼합하여 제조된 나노입자 복합체의 경우 세 개의 inhibitor들을 모두 처리하여 endocytosis 기작을 모두 방해하였음에도 세포 uptake 효능이 뛰어난 것을 확인할 수 있어, 지질구조체가 나노입자에 충분한 길이와 개수로 형성된 경우 나노입자가 endocytosis 기작이 아닌 translocation 등의 direct penetration으로 세포 내에 uptake 되는 것을 알 수 있다.

- [116] 2. HA blocking 후의 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율 평가

- [117] (1) 실시예 4의 1에서 형성된 나노입자(siRNA NPs)는 최 외각이 HA로 코팅되어 있어 CD44 receptor를 이용하여 세포 내에 들어가므로, 미리 MCF-7 세포에 HA를 과량으로 처리하여 CD44 receptor를 모두 block 한 뒤, 실시예 4의 1에서 형성한 나노입자(siRNA NPs)와 실시예 4의 2에서 형성한 나노입자 복합체(siRNA LT-NPs)를 처리한 후, 공초점 현미경을 이용하여 분석하여 그 결과를 17에 나타내었다. 공초점 현미경을 이용한 분석은 DAPI를 이용하여 핵이 염색되고 FITC를 이용하여 세포골격이 염색된 MCF-7 세포(1×10^5)에 대하여 HA를 과량 처리한 후, Cy3 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리하여 수행하였다.

- [118] (2) 도 17을 보면, 세포를 HA로 block을 하였기에, 나노입자의 경우 낮은 효율로 섭취되었으나, 나노입자 복합체의 경우 CD44 receptor가 block 되었음에도 세포 내의 섭취 효율이 뛰어난 것을 알 수 있어, 나노입자 복합체가 endocytosis나 receptor binding 외에도 direct penetration을 통해 세포 내로 섭취되는 것을 알 수 있다.

- [119] <실시예 9> 나노입자 복합체의 항암제 전달체로의 효능 평가

- [120] 1. 알부민 용액에 독소루비신(doxorubicin)이 혼합된 용액을 첨가하여 반응시킨 후 혼합 용액이 탁해질 때까지 에탄올 적정을 수행한 것을 제외하고는 실시예 1의 1 및 실시예 1의 4의 (2)와 동일하게 하여, 독소루비신 함유 나노입자,

독소루비신 함유 나노입자 복합체를 형성하고, 항암 저항성을 가진 유방암 세포주인 MCF-7/ADR을 well plates에 시드하고, 각각 독소루비신(100mM, DOX), 독소루비신 함유 나노입자(100mM의 독소루비신 포함)와 독소루비신 함유 나노입자 복합체(100mM의 독소루비신 포함)를 포함하는 배지를 가지고 37°C에서 6시간 배양한 후, 상기 세포주를 노멀 배지(normal media)를 가지고 48시간 동안 배양하여 Cell viability를 수행하여 그 결과를 도 18에 나타내었다. Cell viability는 MTT assay와 trypan blue dye exclusion method를 이용하는데, Cell viability는 0.4% trypan blue dye를 가진 세포를 배양하고 Neubauer hemocytometer로 카운팅하는 것에 의해 결정된다. MTT assay에서 96-well plates와 1.5mg/ml MTT reagent(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 사용되며, 15ul의 MTT reagent를 가지고 2시간 배양한 후 200ul의 DMSO가 각 well에 추가되고, Resulting culture plates는 plate reader(Bio Tek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA)로 570nm에서 측정하였다

- [121] 2. 도 18을 보면, 같은 농도의 독소루비신을 유방암 세포에 처리했을 때, 나노입자 복합체를 이용할 경우 일반 암세포뿐만 아니라, 항암제 대한 항암저항성을 가진 세포에서도 항암제에 의한 세포사멸효과를 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [122] <실시예 10> 나노입자 복합체의 유전체 약물 전달체로의 평가
- [123] 1. 실시예 3의 1 및 2에서 형성된 나노입자(siRNA NPs) 및 나노입자 복합체(Directional siRNA LT-NPs)에 대한 Gene silencing을 확인하여 도 19 및 20에 나타내었다. 또한, 실시예 4의 1 및 2에서 형성된 나노입자(siRNA NPs) 및 나노입자 복합체(siRNA LT-NPs)에 대한 Gene silencing을 확인하여 도 21 및 22에 나타내었다. Gene silencing의 확인은 MCF-7 세포(1×10^5)에 나노입자, 나노입자 복합체를 각각 3시간 동안 처리한 후, 24시간 배양한 후에 mRNA를 추출하였으며, 같은 방법으로 세포에 대한 PCR을 수행하였다. PCR gel retardation assay에서 유전자 밴드(gene bands)는 GelRed Nucleic Acid stain으로 염색되고, Gel Doc imaging device에 의해 시각화된다. 도 20 및 22의 경우, gene band의 intensity를 ImagePro를 이용하여 상대적으로 정량화한 값을 나타내었다.
- [124] 2. 도 19 및 20을 보면, 알부민과 RNA로 이루어진 나노입자 보다 나노입자 복합체를 사용하였을 때 gene silencing 효율이 훨씬 우수한 것을 확인할 수 있어, 나노입자 복합체가 유전체 약물 전달체로 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있다. 또한, 도 21 및 22를 보면, 고분자 및 히알루론산이 차례로 코팅된 RNA 나노입자에 있어도 위와 같은 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.
- [125] <실시예 11> Tumor cell spheroid에서의 효능 평가
- [126] 1. Tumor cell spheroid는 일반적인 adherent 암세포와 달리 3D culture를 이용하여 증식하며, 이러한 spheroid는 암세포가 배지상에서 floating되서 자라기 때문에 암 세포들이 뭉쳐서 자라게 된다. 뭉쳐서 자라는 형태가 암 조직의 Extracellular matrix(ECM)을 mimic한다는 연구 결과가 있기 때문에 지질 표면

개질에 따른 tissue penetration 여부를 in vitro에서 확인하기 위해 이 모델에서 실험을 진행하였다.

[127] 2. Spheroid 세포 형성

[128] Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) 10g을 100% pure ethanol 1L에 첨가하여 60°C에서 녹인 후, 녹인 Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)를 100phi 기준 3.3ml을 plate 전체에 골고루 분산시켜서 24시간 동안 건조시켜서 coating을 수행하고, 위에서 준비된 plate에 MCF7 세포를 시드하고 5일 동안 유지하여 spheroid를 형성한 세포를 얻었다.

[129] 3. Spheroid 세포에 나노입자 복합체의 처리

[130] (1) 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (2)에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)에 대한 Spheroid 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 23에 나타내었다. DAPI를 이용하여 핵이 염색된 실시예 11의 2에서 형성된 Spheroid 형태 MCF-7 세포(1×10^5)에 Alexa 555 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리한 후 3시간이 지난 시점에 공초점 현미경을 이용하여 측정하였다.

[131] (2) 또한, 실시예 4의 1에서 형성한 나노입자(siRNA NPs)와 실시예 4의 2에서 형성한 나노입자 복합체(Lipid siRNA NPs)에 대한 Spheroid 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 24에 나타내었다. DAPI를 이용하여 핵이 염색되고 Alexa 488을 이용하여 세포골격이 염색된 실시예 11의 2에서 형성된 Spheroid 형태 MCF-7 세포(1×10^5)에 Cy3 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리하고 3, 6시간이 지난 시점에 공초점 현미경을 이용하여 측정하였다.

[132] (3) 또한, 실시예 4의 1에서 형성한 나노입자(siRNA NPs)와 실시예 4의 2에서 형성한 나노입자 복합체(Lipid-siRNA NP)에 대한 Spheroid 세포 Gene silencing을 확인하여, 도 25 및 도 26에 나타내었다. Gene silencing의 확인은 Spheroid 형태 MCF-7 세포(1×10^5)에 나노입자, 나노입자 복합체를 각각 3시간 동안 처리한 후, 24시간 배양한 후에 mRNA를 추출하였으며, 같은 방법으로 세포에 대한 PCR을 수행하였다. PCR gel retardation assay에서 유전자 밴드(gene bands)는 GelRed Nucleic Acid stain으로 염색되고, Gel Doc imaging device에 의해 시각화된다. 도 26의 경우, gene band의 intensity를 ImagePro를 이용하여 상대적으로 정량화한 값을 나타내었다.

[133] (4) 도 23내지 26을 보면, 나노입자 복합체가 나노입자에 비해 세포 섭취 효율이 뛰어난 것을 확인할 수 있어, 이를 통해, 단순 in vitro 환경에서 뿐 아니라, in vivo를 mimic한 환경에서도 나노입자 복합체의 섭취 효율이 우수함을 확인할 수 있어, 나노입자 복합체는 조직에서 뛰어난 페네트레이션 효율을 가짐을 알 수 있다.

[134] <실시예 12> 동물모델에서 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율 평가

[135] 1. 실시예 4의 1에서 형성한 나노입자(siRNA NPs)와 실시예 4의 2에서 형성한

나노입자 복합체(Lipid siRNA NPs)에 대한 동물 모델에서 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 27에 나타내었다. 상기 동물 모델 실험은 Cy5 형광 dye가 표지된 나노입자와 나노입자 복합체를 각각 포함하는 안약제제 5ul 준비하고, 상기 안약제제를 Brown Norway Rat의 안구에 유리체강내 주사로 전달하였다. 약물을 주입하고 30일이 지난 후 안구를 적출하고 4%PFA로 고정한 후 20% 수크로오스에 30분 동안 담근 후, 안구를 수크로오스에서 꺼내어 O.C.T compound에 버무려 주고 cryomolld에 O.C.T compound를 부어 얼린 후, 안구 조직을 cryomolld에서 떼어 내고 cryosection기로 썰어 구김이 없게 잘 펴주고 DAPI solution을 5분동안 반응시켜 조직의 핵을 염색한 후, 공초점 현미경을 이용하여 측정하였다.

- [136] 2. 도 27을 보면, 나노입자 복합체가 나노입자보다 오랫동안 안구 조직에 체류하는 것을 알수 있어, 나노입자 복합체는 세포섭취 효율이 뛰어난 것을 알 수 있다.
- [137] 이상에서, 출원인은 본 발명의 다양한 실시예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며, 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경예 또는 수정예도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

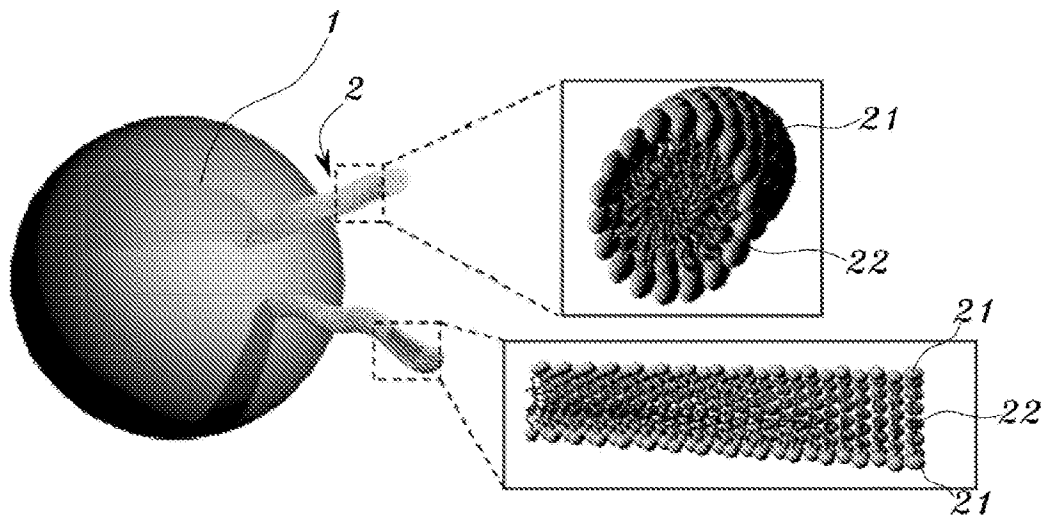
청구범위

- [청구항 1] 세포 내에 섭취되는 나노입자와, 상기 나노입자의 외표면 일부분에 결합하여 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 지질 기반의 지질구조체를 포함하며,
상기 나노입자는 제1반응기를 포함하고, 상기 지질구조체는 상기 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하는 제2반응기를 포함하여, 상기 제1반응기와 제2반응기가 화학 결합함으로써 지질구조체가 나노입자에 결합하는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 지질구조체는 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합물로 이루어진 지질체의 재조합에 의해 형성되며,
상기 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합 비율을 조절하여 나노입자에 결합한 지질구조체의 생성 및 형태를 제어할 수 있는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질은 1:2.33 ~ 99의 물비로 사용되는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 지질구조체는
친수성을 띄는 지질 헤드가 외측면에 위치하고 내부에 소수성을 띄는 지질 꼬리가 위치하여 전체적으로 길이가 긴 튜브 형태를 가지는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 나노입자는 50 내지 500nm의 직경을 가지며, 상기 지질구조체는 50 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가지는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 나노입자 복합체는
엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통하여 세포 내에 섭취될 수 있는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 지질구조체는
상기 나노입자의 스피로이드 세포 내 섭취 효율을 향상시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 나노입자는 항암제를 포함하며, 항암 저항성을 가진 종양 세포의 사멸 효율을 향상시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 나노입자는 유전체를 포함하거나 유전체로 이루어져, 상기 나노입자 복합체는 유전자 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는

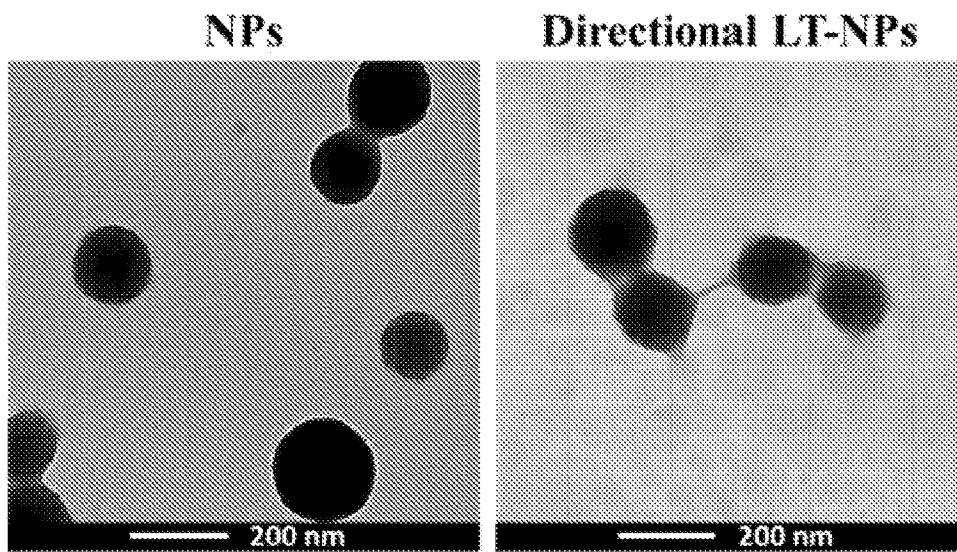
나노입자 복합체.

- [청구항 10] 제1반응기가 존재하는 나노입자를 형성하는 나노입자형성단계와; 상기 제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질체를 형성하는 지질체형성단계와; 상기 나노입자와 지질체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록 하여 지질체의 외면에 나노입자가 결합한 지질체-나노입자 복합체를 형성하는 지질복합체형성단계와; 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘을 가해 지질체를 파쇄하여 나노입자의 외표면 일부분에 결합한 지질구조체를 형성하여 나노입자 복합체를 제조하는 파쇄형성단계;를 포함하며,
상기 지질체형성단계는 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합물을 이용하여 지질체를 형성하고,
상기 나노입자는 세포 내에 섭취되며, 상기 지질구조체는 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체의 제조방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합 비율을 조절하여 나노입자에 결합한 지질구조체의 생성 및 형태를 제어할 수 있는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체의 제조방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 파쇄형성단계에서는 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘을 가하고 일정 시간 유지하여, 지질체가 파쇄되며 지질체를 이루는 인지질은 재조합이 일어나 나노입자에 결합한 튜브 형태의 지질구조체가 형성되는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체의 제조방법.

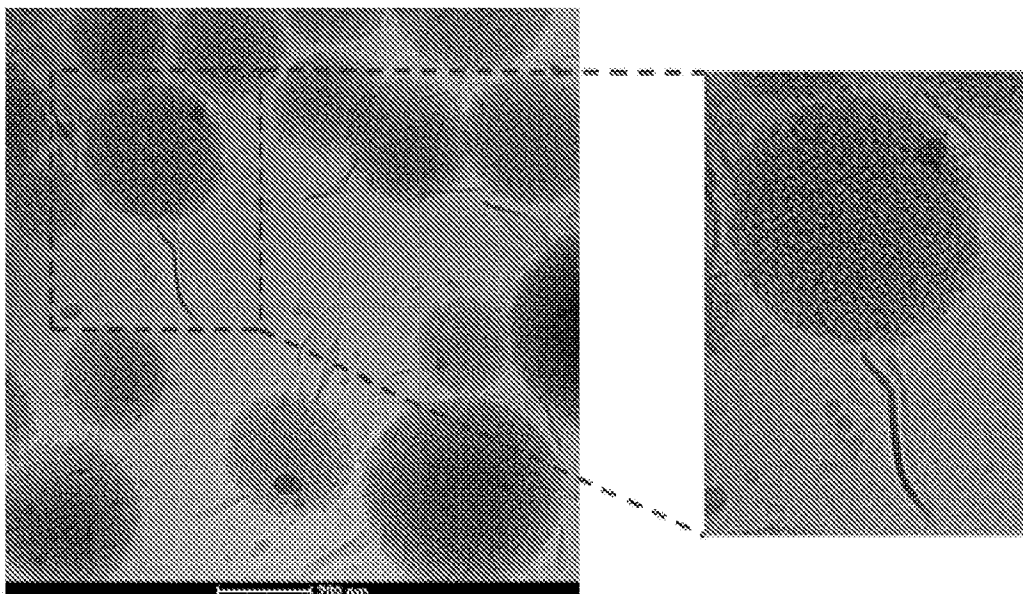
[도1]



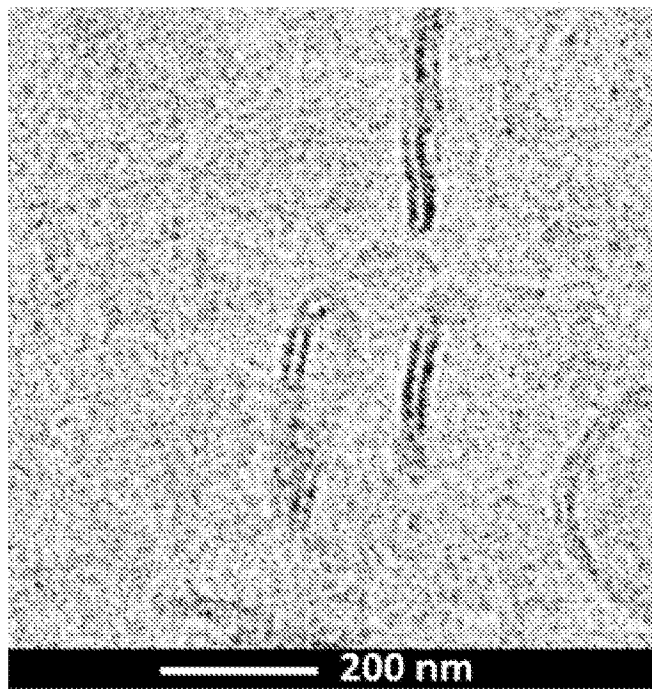
[도2]



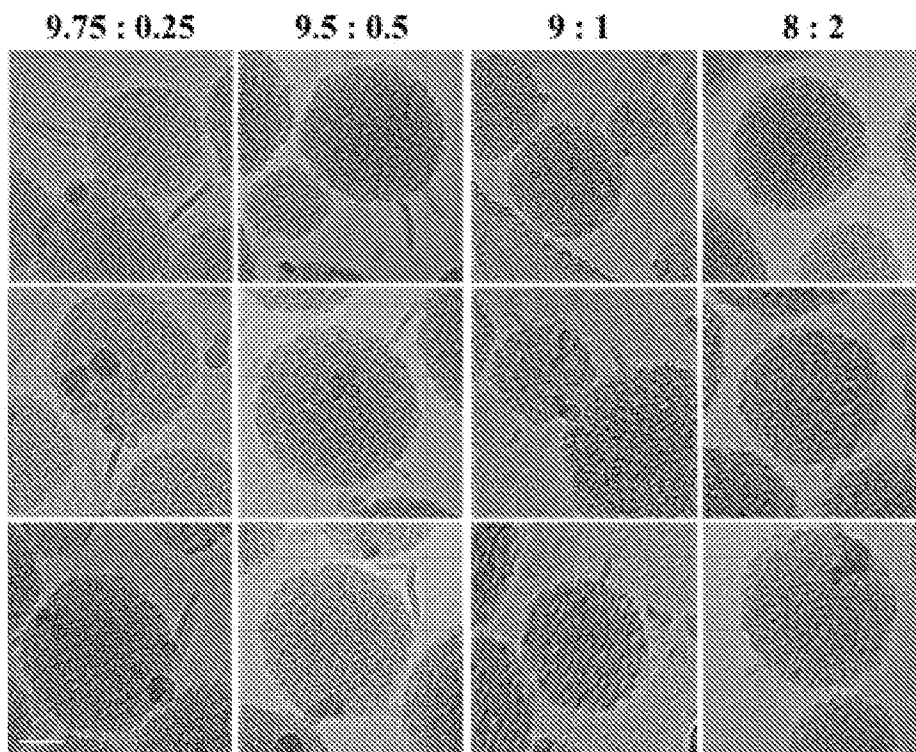
[도3]



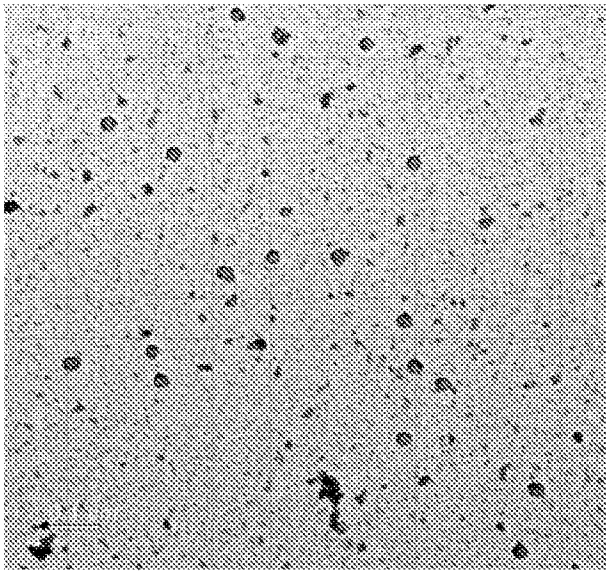
[도4]



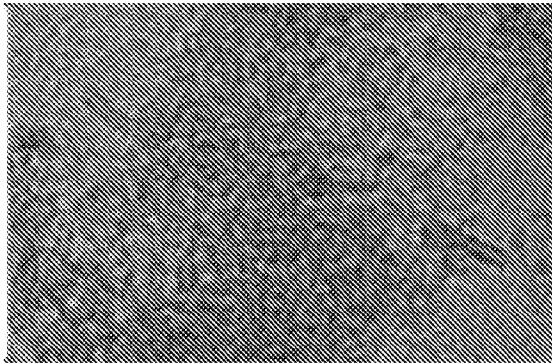
[도5]



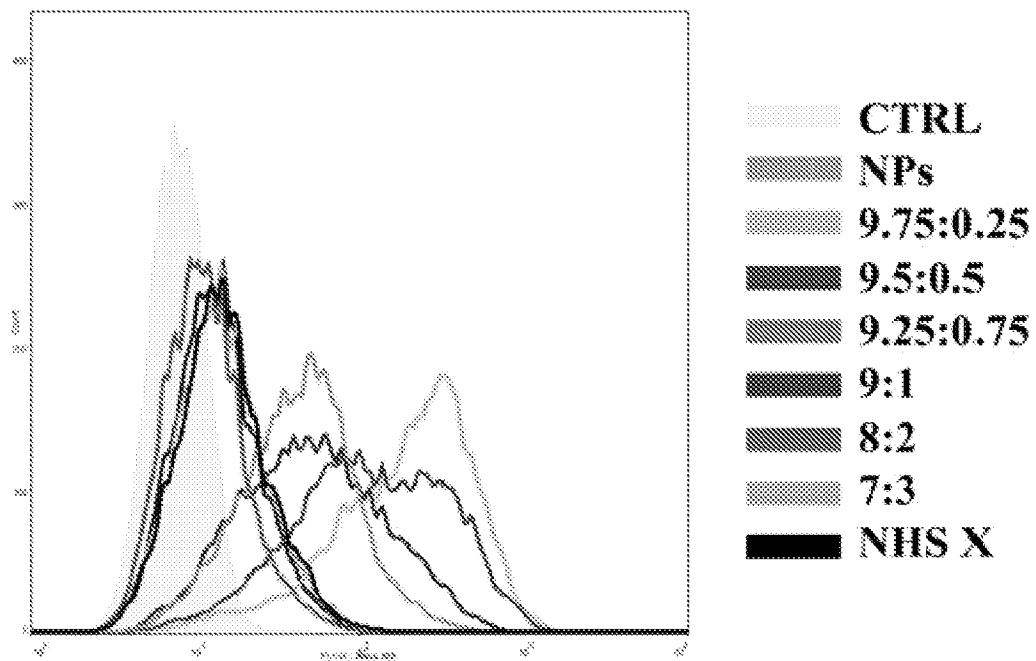
[도6]



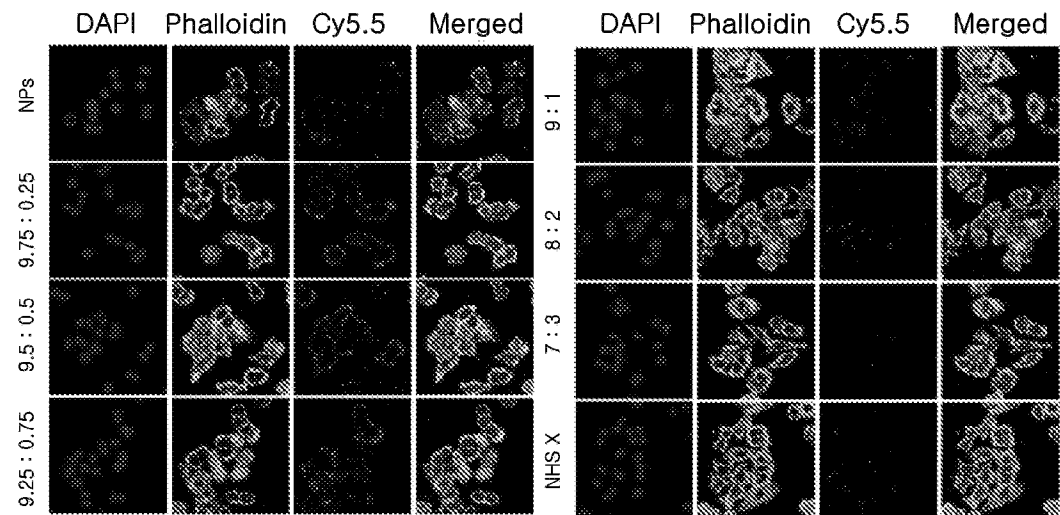
[도7]



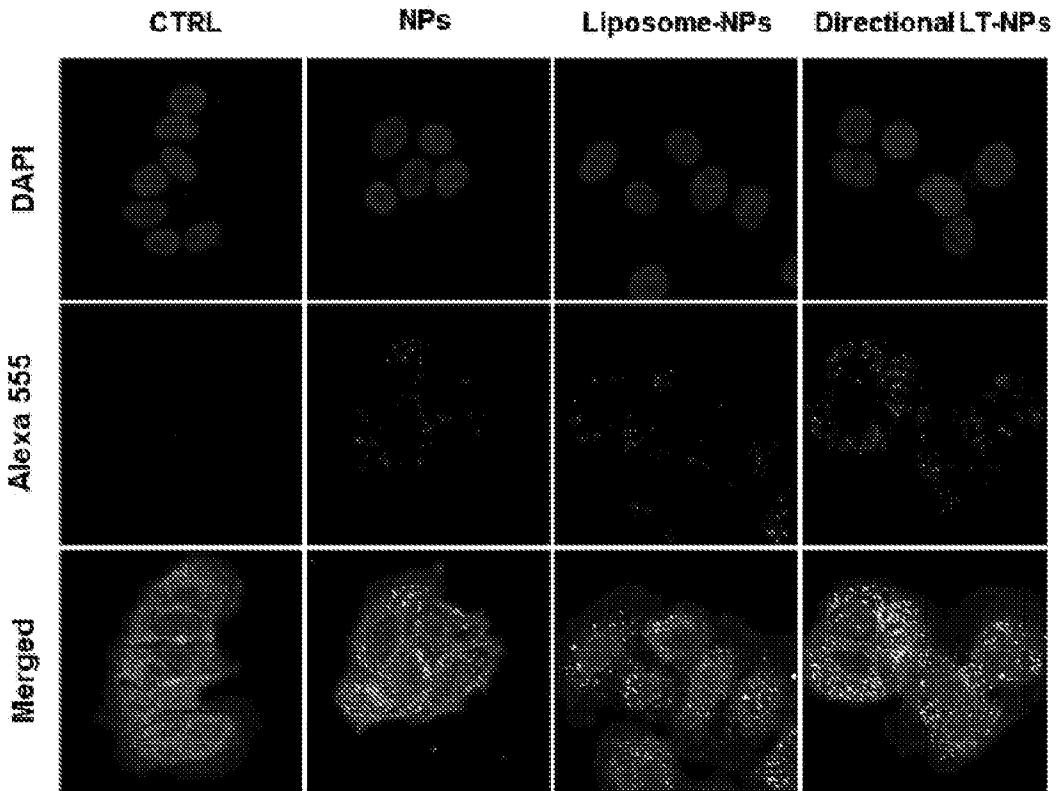
[도8]



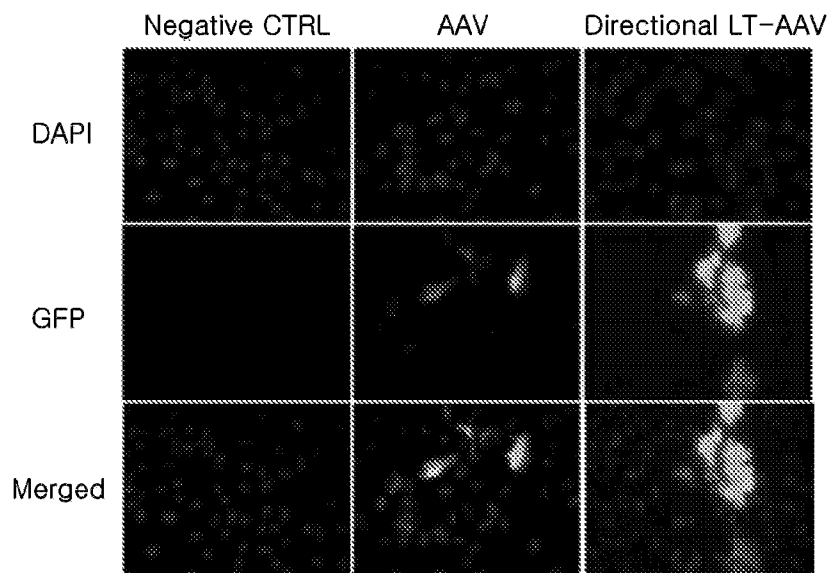
[도9]



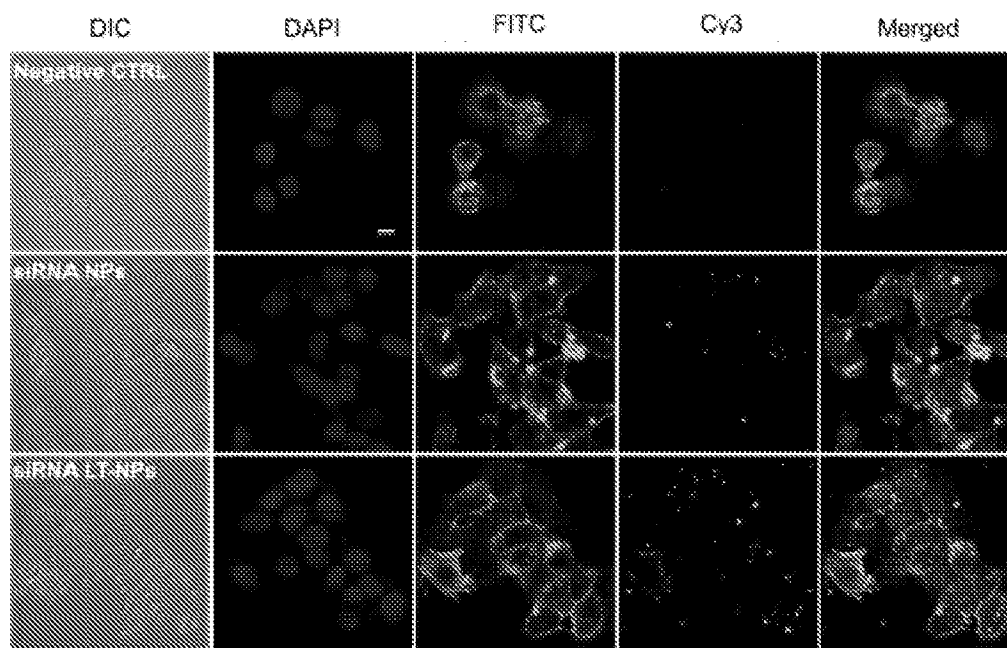
[도10]



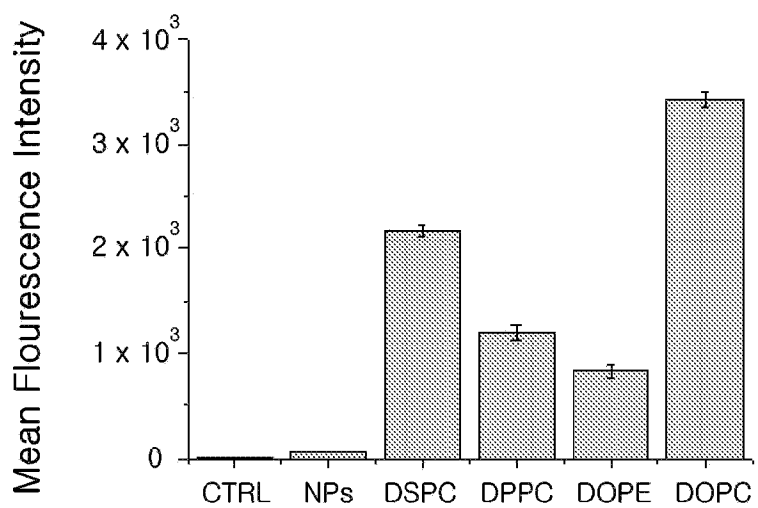
[도11]



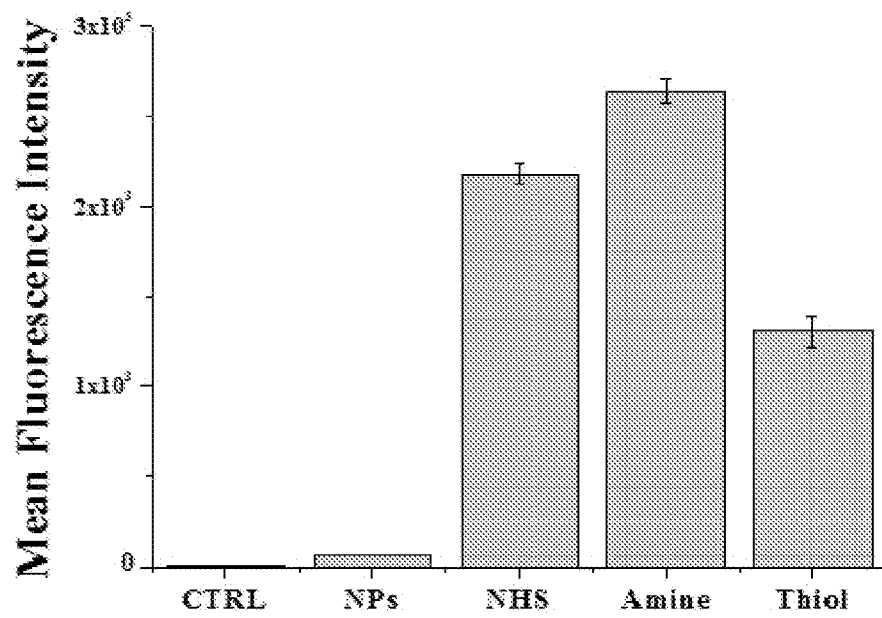
[도12]



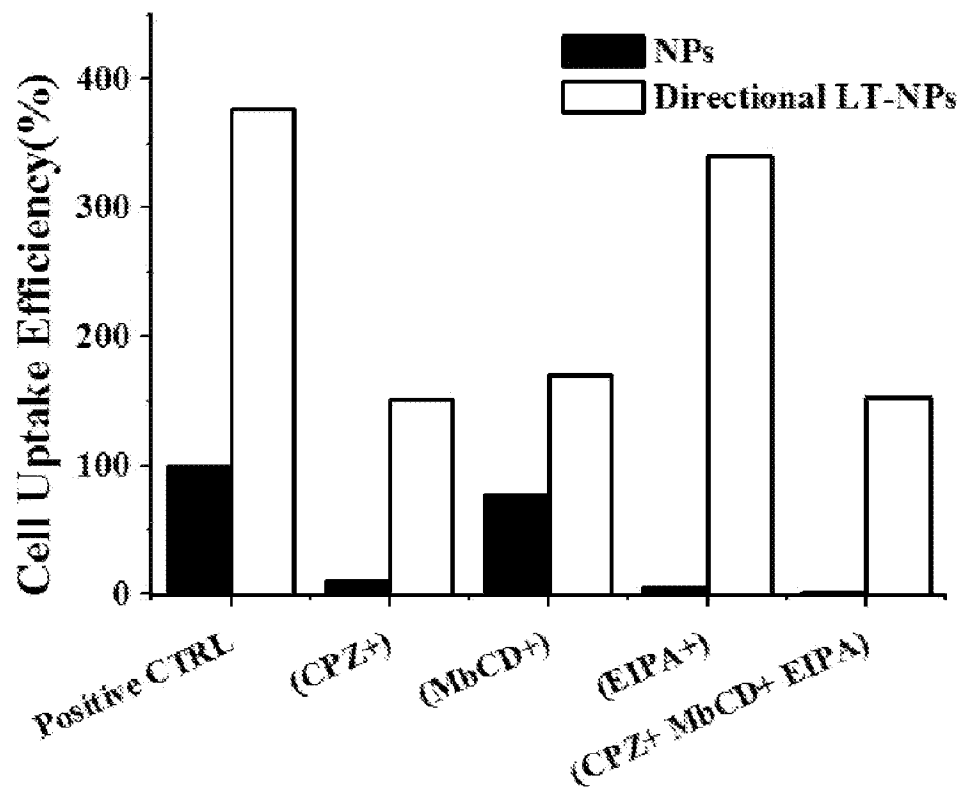
[도13]



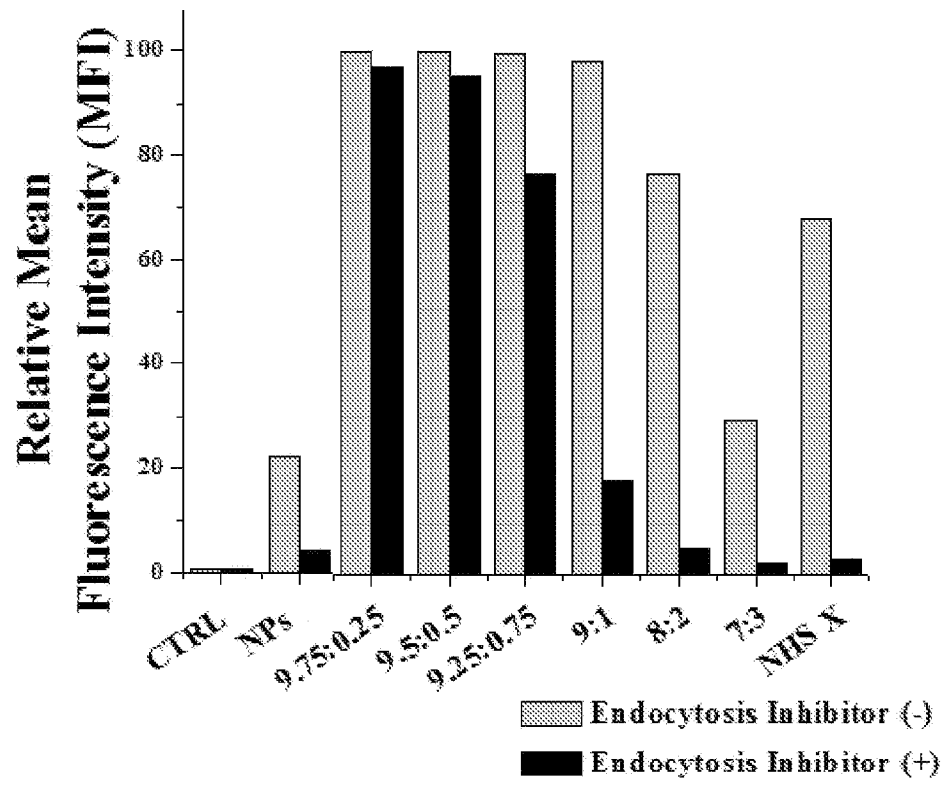
[도14]



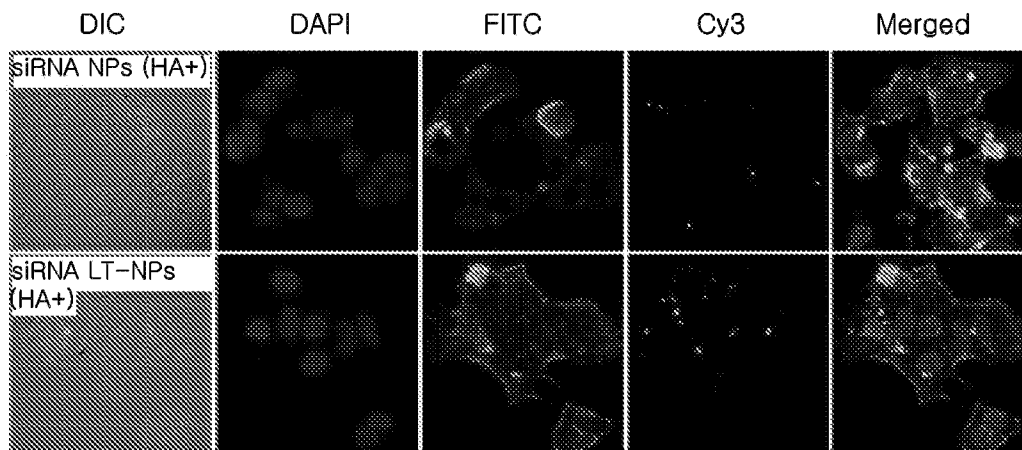
[도15]



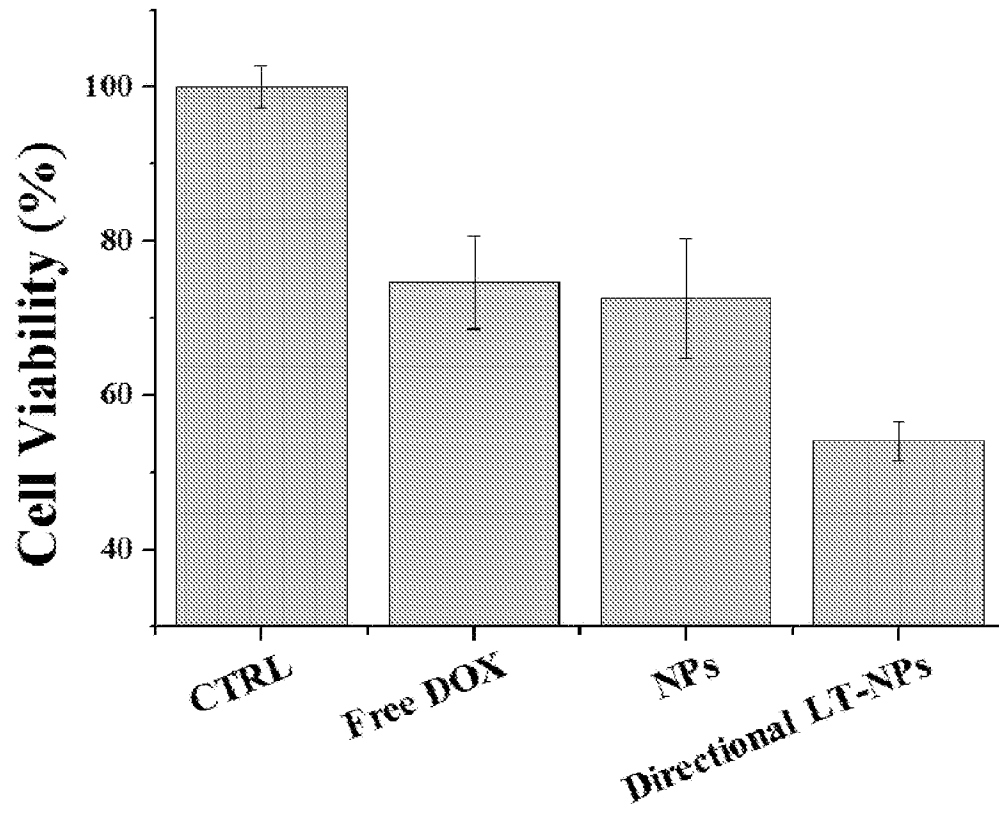
[도16]



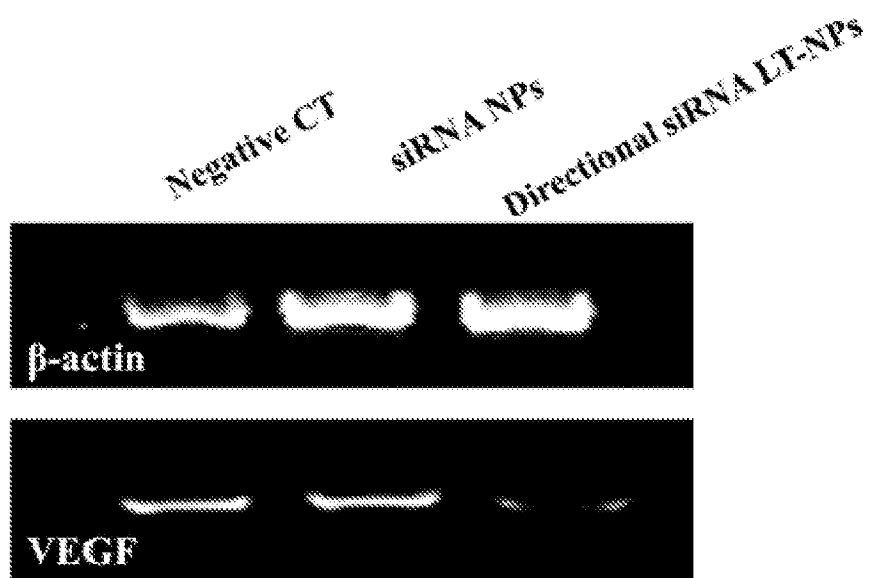
[도17]



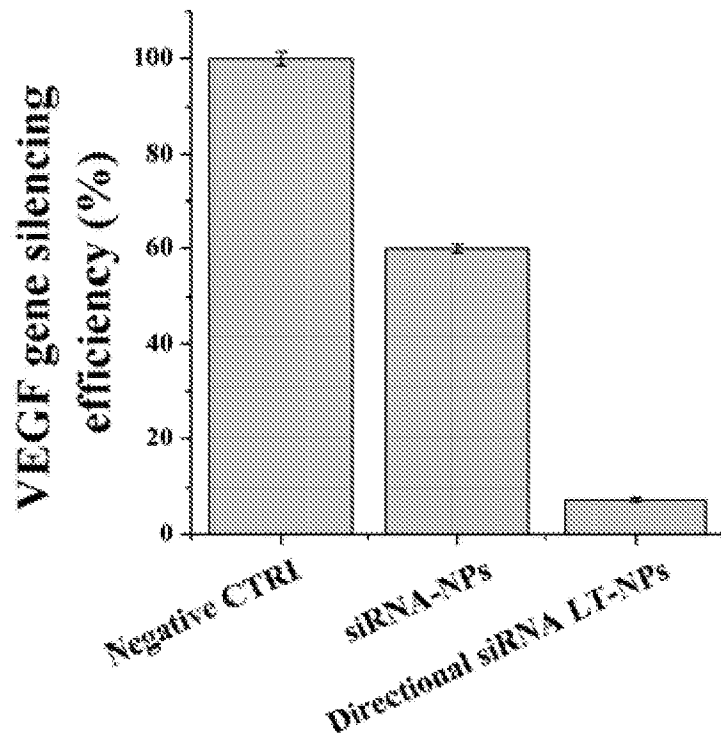
[도18]



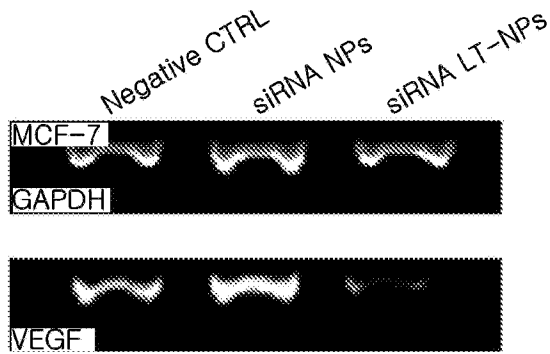
[도19]



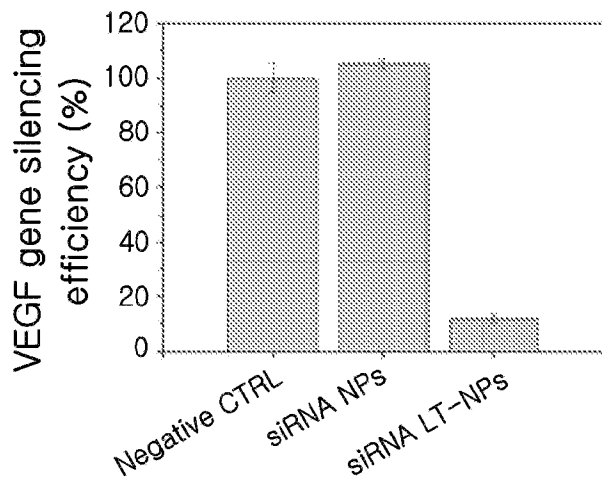
[도20]



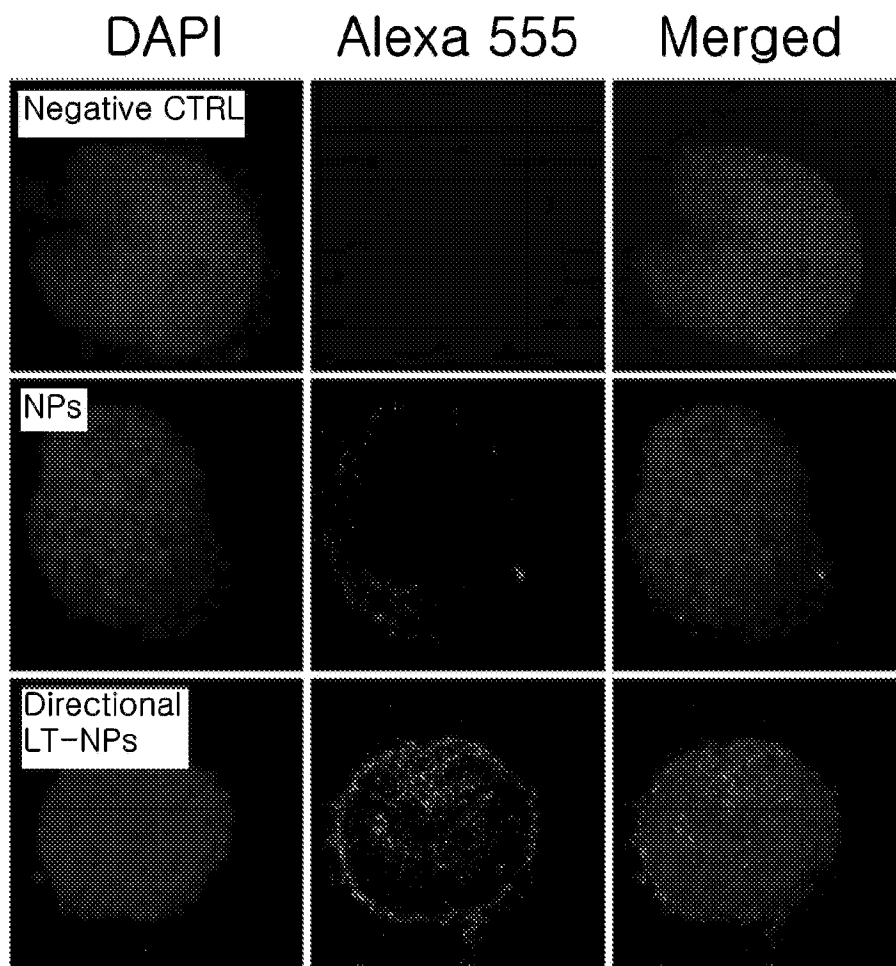
[도21]



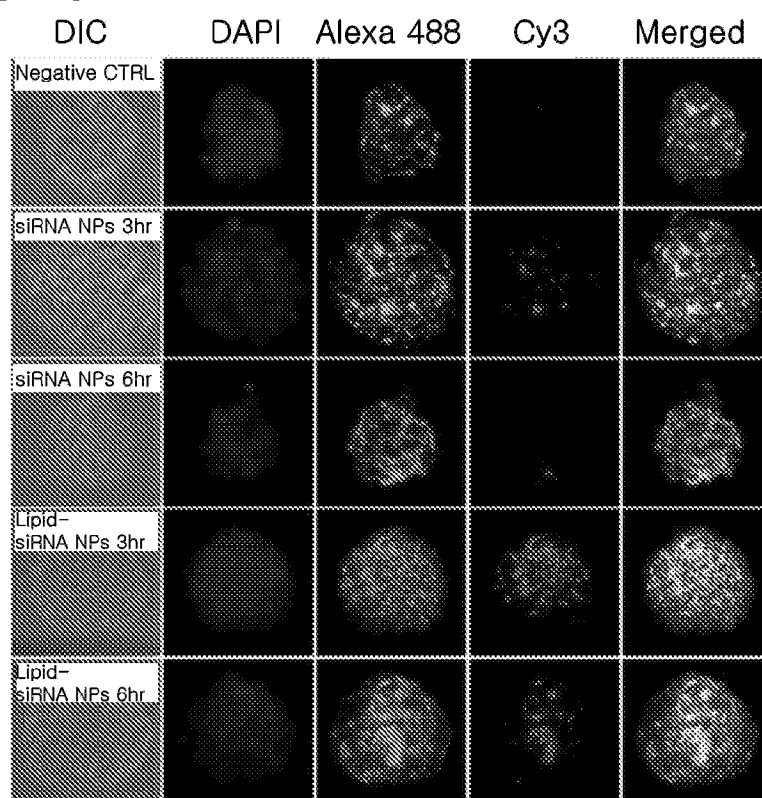
[도22]



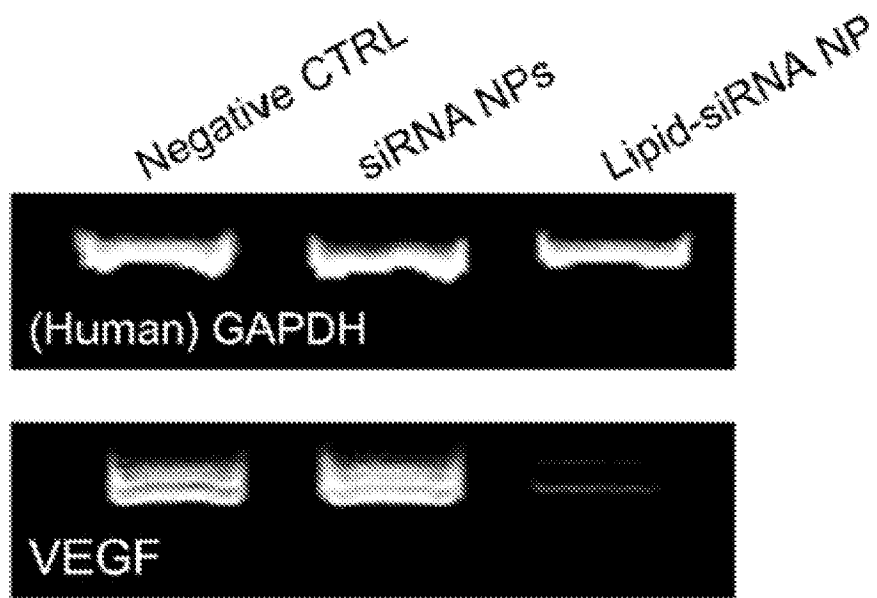
[도23]



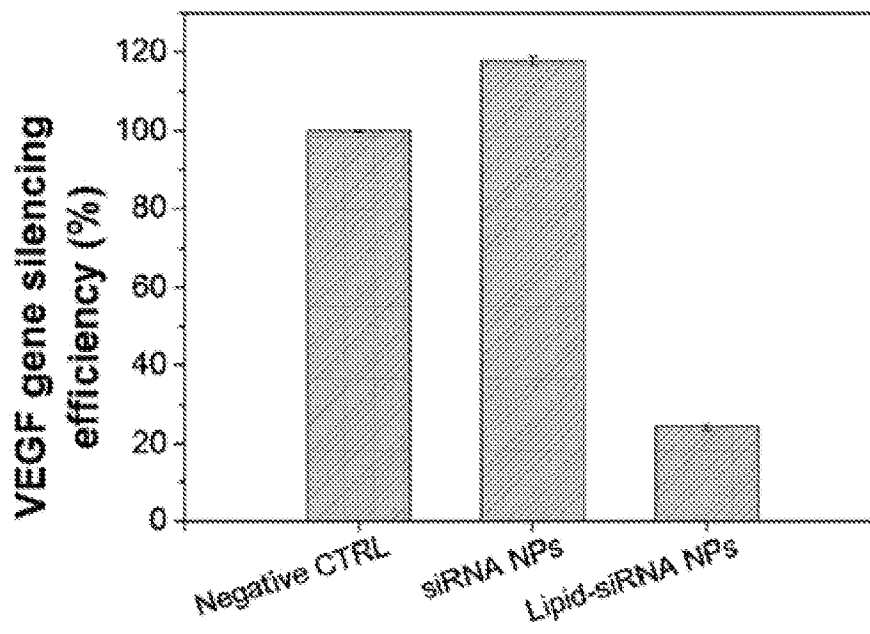
[도24]



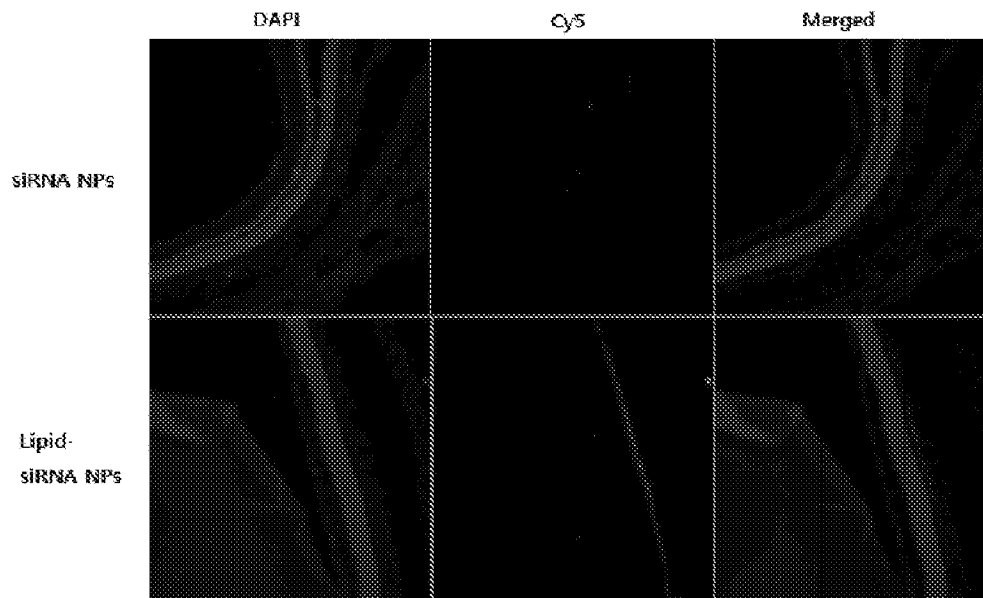
[도25]



[도26]



[도27]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/006109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/51(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(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; A61K 31/685; A61K 49/04; A61K 49/08; A61K 9/127; A61K 9/14; A61K 9/16; A61K 9/19; A61K 9/56; A61K 48/00; A61K 45/06; A61P 35/00

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: nanoparticles, tissue penetration, lipid, functional group, mechanical force

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2014-0052812 A (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION) 07 May 2014 See paragraphs [0005]-[0060].	1,6-9
A		2-5, 10-12
A	KR 10-1085203 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 21 November 2011 See the entire document.	1-12
A	KR 10-2008-0094473 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 23 October 2008 See the entire document.	1-12
A	JP 2017-512840 A (CHILDREN'S HOSPITAL LOS ANGELES) 25 May 2017 See the entire document.	1-12
A	US 2019-0046446 A1 (ERIOCHEM USA, LLC.) 14 February 2019 See the entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“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

08 SEPTEMBER 2020 (08.09.2020)

Date of mailing of the international search report

08 SEPTEMBER 2020 (08.09.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/006109

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0052812 A	07/05/2014	CN 104755108 A	01/07/2015
		CN 104755108 B	27/04/2018
		EP 2913065 A1	02/09/2015
		KR 10-1390631 B1	29/04/2014
		KR 10-1487088 B1	27/01/2015
		KR 10-2014-0023469 A	27/02/2014
		KR 10-2014-0023853 A	27/02/2014
		US 2015-0343079 A1	03/12/2015
		WO 2014-027812 A1	20/02/2014
		WO 2014-065513 A1	01/05/2014
KR 10-1085203 B1	21/11/2011	None	
KR 10-2008-0094473 A	23/10/2008	WO 2008-130137 A1	30/10/2008
JP 2017-512840 A	25/05/2017	AU 2015-240766 A1	06/10/2016
		AU 2015-240766 A1	08/10/2015
		AU 2015-240766 B2	14/05/2020
		AU 2015-240766 B2	14/05/2020
		CA 2943365 A1	08/10/2015
		EP 3129062 A2	15/02/2017
		US 10369104 B2	06/08/2019
		US 2017-0020816 A1	26/01/2017
		US 2017-143630 A1	25/05/2017
		US 2019-365650 A1	05/12/2019
		US 9956176 B2	01/05/2018
		WO 2015-153805 A2	08/10/2015
		WO 2015-153805 A3	03/12/2015
US 2019-0046446 A1	14/02/2019	AR 109757 A1	23/01/2019
		EP 3518901 A1	07/08/2019
		WO 2018-064350 A1	05/04/2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/51(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/51; A61K 31/685; A61K 49/04; A61K 49/08; A61K 9/127; A61K 9/14; A61K 9/16; A61K 9/19; A61K 9/56;
A61K 48/00; A61K 45/06; A61P 35/00

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: 나노입자(nanoparticles), 조직 투과(tissue penetration), 지질(lipid), 반응기(functional group), 기계적인 힘(mechanical force)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2014-0052812 A (서강대학교산학협력단) 2014.05.07 단락 [0005]-[0060]	1,6-9
A		2-5,10-12
A	KR 10-1085203 B1 (서울대학교산학협력단) 2011.11.21 전체 문헌	1-12
A	KR 10-2008-0094473 A (한국화학연구원) 2008.10.23 전체 문헌	1-12
A	JP 2017-512840 A (CHILDREN'S HOSPITAL LOS ANGELES) 2017.05.25 전체 문헌	1-12
A	US 2019-0046446 A1 (ERIOCHEM USA, LLC) 2019.02.14 전체 문헌	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

- “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
- “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
- “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
- “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
- 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 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 09월 08일 (08.09.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 09월 08일 (08.09.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0052812 A	2014/05/07	CN 104755108 A CN 104755108 B EP 2913065 A1 KR 10-1390631 B1 KR 10-1487088 B1 KR 10-2014-0023469 A KR 10-2014-0023853 A US 2015-0343079 A1 WO 2014-027812 A1 WO 2014-065513 A1	2015/07/01 2018/04/27 2015/09/02 2014/04/29 2015/01/27 2014/02/27 2014/02/27 2015/12/03 2014/02/20 2014/05/01
KR 10-1085203 B1	2011/11/21	없음	
KR 10-2008-0094473 A	2008/10/23	WO 2008-130137 A1	2008/10/30
JP 2017-512840 A	2017/05/25	AU 2015-240766 A1 AU 2015-240766 A1 AU 2015-240766 B2 AU 2015-240766 B2 CA 2943365 A1 EP 3129062 A2 US 10369104 B2 US 2017-0020816 A1 US 2017-143630 A1 US 2019-365650 A1 US 9956176 B2 WO 2015-153805 A2 WO 2015-153805 A3	2016/10/06 2015/10/08 2020/05/14 2020/05/14 2015/10/08 2017/02/15 2019/08/06 2017/01/26 2017/05/25 2019/12/05 2018/05/01 2015/10/08 2015/12/03
US 2019-0046446 A1	2019/02/14	AR 109757 A1 EP 3518901 A1 WO 2018-064350 A1	2019/01/23 2019/08/07 2018/04/05