



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0080451
(43) 공개일자 2023년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/88 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7014747
(22) 출원일자(국제) 2021년10월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월28일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/036449
(87) 국제공개번호 WO 2022/071582
국제공개일자 2022년04월07일
(30) 우선권주장
JP-P-2020-167928 2020년10월02일 일본(JP)

(71) 출원인
내셔널 유니버시티 코포레이션 홋카이도 유니버시티
일본 060-0808 홋카이도 삿포로시 기타쿠 기타 8
쵸 니시 5쵸메 8반짜
넛토덴코 가부시키가이샤
일본국 오사카후 이바라키시 시모호즈미 1-1-2
(72) 발명자
사토, 유스케
일본 0600808 홋카이도 삿포로시 기타쿠 기타 8쵸
니시 5쵸메 내셔널 유니버시티 코포레이션 홋카이
도 유니버시티 씨/오
하라시마, 히데요시
일본 0600808 홋카이도 삿포로시 기타쿠 기타 8쵸
니시 5쵸메 내셔널 유니버시티 코포레이션 홋카이
도 유니버시티 씨/오
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

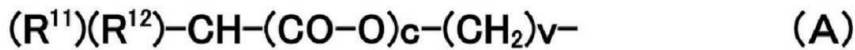
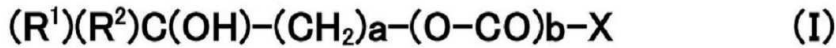
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 지질 나노 입자

(57) 요약

본 발명은 간 또는 비장으로 선택적 전달이 가능한 유전자 전달 담체로서 기능하는 지질 나노 입자를 제공하는 것을 목적으로 한다. 지질 나노입자는 화학식 (I)로 표시되는 pH-감수성 양이온성 지질을 포함한다. [a는 3-5의 정수를 나타내고, b는 0 또는 1을 나타내고; R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 일반 식 (A) (R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로 선형 또는 가지형의 C₂₋₁₅ 알킬기를 나타내고, c는 0 또는 1을 나타내고, v는 4-12의 정수를 나타냄)로 표시되는 기를 나타내고, X는 일반식 (B)(d는 0-3의 정수를 나타내고, R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기를 나타내고, R³ 및 R⁴는 서로 결합하여 5- 내지 7-원자(membered) 비방향족 헤테로환기를 형성할 수 있음)로 표시되는 기 또는 5- 내지 7-원자(membered) 비방향족 헤테로환기를 나타낸다.] (I) (R¹)(R²)C(OH)-(CH₂)_a-(O-CO)b-X. (A): (R¹¹)(R¹²)-CH-(CO-O)_c-(CH₂)_v-. (B): -(CH₂)_d-N(R³)(R⁴).

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 48/0033 (2013.01)

A61K 9/1272 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/88 (2013.01)

(72) 발명자

하시바, 카츠키

일본 5678680 오사카 이바라키시 시모호즈미 1-1-2

니토텐코 씨/오

타쿠치, 마사미츠

일본 5678680 오사카 이바라키시 시모호즈미 1-1-2

니토텐코 씨/오

사카모토, 좌치코

일본 5678680 오사카 이바라키시 시모호즈미 1-1-2

니토텐코 씨/오

시시도 타쿠야

일본 5678680 오사카 이바라키시 시모호즈미 1-1-2

니토텐코 씨/오

오츠 아야카

일본 5678680 오사카 이바라키시 시모호즈미 1-1-2

니토텐코 씨/오

마에다, 요시키

일본 5678680 오사카 이바라키시 시모호즈미 1-1-2

니토텐코 씨/오

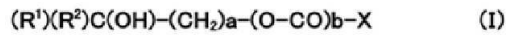
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I로 표시되는 pH-감수성 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노 입자로서:

[화학식. 1]



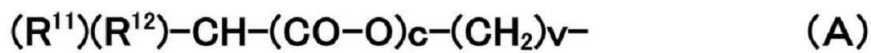
상기:

a는 3-5의 정수를 나타내고;

b는 0 또는 1을 나타내고;

R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 일반식(A)으로 표시되는 기를 나타내고:

[화학식. 2]



상기 R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로 직쇄형 또는 가지형-체인의 C5-15 알킬기를 나타내고;

c는 0 또는 1을 나타내고;

v는 4-12의 정수를 나타내고; 및

X는 일반식(B)으로 표시되는 기를 나타내고:

[화학식. 3]



상기 d는 0-3의 정수를 나타내고; 및

R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기(상기 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기에서, 1개 또는 2개의 수소 원자가 페닐기로 치환될 수 있음)를 나타내고, R³ 및 R⁴는 서로 결합하여 5- 내지 7-원자(membered) 비방향족 헤테로환(상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기로 치환될 수 있음)을 형성하거나 5- 내지 7-원자(membered) 비방향족 헤테로환기(여기서, 상기 기는 탄소원자에 의해 (O-CO)_b-에 결합되고 상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기로 치환될 수 있음)를 나타낼 수 있는 것을 특징으로 하는, 지질 나노 입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 스테롤 및 폴리알킬렌 글리콜-수정된 지질을 추가로 포함 하는, 지질 나노 입자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 핵산을 함유하는, 지질 나노 입자.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 핵산이 siRNA인, 지질 나노 입자.

청구항 5

제3항에 있어서, 핵산이 mRNA 또는 플라스미드 DNA인, 지질 나노 입자.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산이 간세포에서 발현되는 유전자인, 지질 나노 입자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 지질 나노 입자를 유효성분으로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 유전자 치료에 사용되는, 약제학적 조성물.

청구항 9

간세포에서 발현하고자 하는 외래 유전자를 발현시키는 방법으로, 다음을 포함하는 방법:

상기 외래 유전자가 봉입된 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 지질 나노 입자를 실험동물(인간 제외)에 투여하고, 상기 외래 유전자를 상기 실험동물의 간에서 발현시키는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간 또는 비장으로 선택적으로 전달하기 위한 유전자 전달 담체로서 유용한 지질 나노 입자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지용성 약물이나 siRNA(short interfering RNA), mRNA 등의 핵산을 봉입하여 표적세포로 전달하기 위한 담체로서 지질 나노 입자(Lipid nanoparticles, LNP)가 이용되고 있다. 예를 들면, 지질구성분으로서 생리적 pH에서는 전기적으로 중성이며, 엔도솜 등의 약산성 pH 환경에서는 양이온성으로 변화하는, pH 감수성 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노입자가 siRNA와 같은 핵산을 효율적으로 표적 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 담체로서 역할을 하는 지질 나노입자가 보고되고 있다(특허문헌 1 및 비특허문헌 1).

[0003] pH-감수성 양이온성 지질로서는, 예를 들어, Jayaraman 등은 DLin-MC3-DMA를 개발하였고, 마우스 간에서의 제7 인자(F7) 녹다운에 있어서 ED50에서 0.005mg siRNA/kg을 달성하였다(비특허문헌 2). 본 발명자들도 지금까지 독자적인 pH 감수성 양이온성 지질 YSK05 및 YSK13-C3를 개발하였으며 F7 녹다운에 있어서의 ED50으로서 각각 0.06, 0.015mg siRNA/kg을 달성하였다(비특허문헌 3~5). 또한 Maier 등은 MC3-DMA에 생분해성을 부여한 L319를 개발하여 ED50에서 0.01 mg siRNA/kg로, 높은 안전성 및 생분해성 둘 다를 달성한 보고하였다(비특허문헌 6~8). 그러나 이들 상기 pH 감수성 양이온성 지질을 포함한 지질 나노입자의 엔도솜 탈출 효율은 아직 수% 정도에 불과하다는 것이 밝혀졌으며(비특허 문헌9), 따라서 생체이용률을 더욱 향상시킬 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0004] 또한, Dong 등은 고처리량 스크리닝을 통해 독자적인 지질 유사 물질 cKK-E12를 발견하였으며, F7녹다운에 있어서 ED₅₀에서 0.002mg siRNA/kg를 달성하였다(비특허 문헌10). 해당 기술은 활성면에서 문헌상 가장 우수하지만, 고용량 투여시 독성 또는 지질의 생분해성과 같은 안전성에 대해서는 밝혀진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) [PL1] WO 2018/230710
 (특허문헌 0002) [PL2] WO 2018/190423

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) [NPL1] Sato et al., Journal of controlled Release, 2019, vol.295, p.140-152
 (비특허문헌 0002) [NPL2] Jayaraman et al., Angewandte Chemie International Edition, 2012, vol.51, p.8529-8533
 (비특허문헌 0003) [NPL3] Watanabe et al., Scientific Reports, 2014, 4:4750, DOI: 10.1038/srep04750
 (비특허문헌 0004) [NPL4] Yamamoto et al., Journal of Hepatology, 2016, vol.64, p.547-555
 (비특허문헌 0005) [NPL5] Sato et al., Molecular Therapy, 2016, vol.24, p.788-795
 (비특허문헌 0006) [NPL6] Maier et al., Molecular Therapy, 2013, vol.21(8), p.1570-1578
 (비특허문헌 0007) [NPL7] Wittrup et al., Nature Biotechnology, 2015, vol.33(8), p.870-876
 (비특허문헌 0008) [NPL8] Xu et al., Molecular Pharmaceutics, 2014, vol.11, p.1424-1434
 (비특허문헌 0009) [NPL9] Gilleron et al., Nature Biotechnology, 2013, vol.31(7), p.638-646
 (비특허문헌 0010) [NPL10] Dong, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, vol.111(11), p.3955-3960
 (비특허문헌 0011) [NPL11] Leung et al., Journal of Physical Chemistry C Nanomater Interfaces, 2012, vol.116(34), p.18440-18450

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 간 또는 비장에 선택적으로 전달 가능한 유전자 전달 담체가 되는 지질 나노 입자를 제공하고, 안정성이 우수한 지질 나노입자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

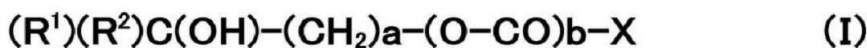
과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명자들은, 가지형-사슬 탄화수소 사슬 (branched-chain hydrocarbon chains)을 가진 pH-감수성 양이온성 지질을 구성지질로서 포함하는 지질 나노 입자가, 간 또는 비장에 대한 선택성이 높고, 및 간 또는 비장에 특이적으로 고발현하는 유전자 전달 담체로서 유용하다는 것을 발견하였다.

- [0009] 즉, 본 발명은 하기의 지질 나노 입자를 제공하는 것이다.

- [0010] 화학식 (I)로 표시되는 pH-감수성 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노 입자이되:

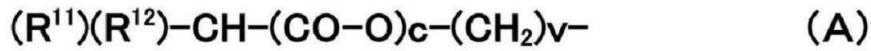
- [0011] [화학식. 1]



- [0012]

- [0013] 상기 화학식 (I) 중, a는 3-5의 정수를 나타내고; b는 0 또는 1을 나타내고; R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 하기 일반식(A)으로 표시되는 기를 나타내고;

[0014] [화학식. 2]



[0015]

[0016] 상기 화학식 (A) 중, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로, 선형 또는 가지형의 C_{5-15} 알킬기를 나타내고; c 는 0 또는 1을 나타내고; v 는 4~12의 정수를 나타내며;

[0017] 및 X 는 하기 일반식 (B)로 표시되는 기를 나타낸다:

[0018] [화학식. 3]



[0019]

[0020] 상기 화학식 (B) 중, d 는 0-3의 정수를 나타내고; R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기(상기 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기에서, 1개 또는 2개의 수소 원자가 페닐기로 치환될 수 있음)를 나타내고, R^3 및 R^4 는 서로 결합하여 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환(상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기로 치환될 수 있음)을 형성하거나, 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환기 (여기서, 상기 기는 탄소 원자에 의해 (O-CO) b-에 결합되고 상기 고리의 1 개 또는 2 개의 수소 원자는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기로 치환 될 수 있음)을 나타낼 수 있다.

[0021] [1-2] 추가로 스테롤 수식 지질과 폴리알킬렌글리콜 수식 지질을 함유하는 상기 [1-1]의 지질 나노입자.

[0022] [1-3] 핵산을 함유하는 상기 [1-1] 또는 [1-2]의 지질 나노 입자.

[0023] [1-4] 핵산이 siRNA인 상기 [1-3]의 지질 나노 입자.

[0024] [1-5] 핵산이 mRNA 또는 플라스미드 DNA인 상기 [1-3]의 지질 나노 입자.

[0025] [1-6] 핵산이 간세포에서 발견되는 유전자인 상기 [1-3] 내지 [1-5] 중 어느 하나의 지질 나노 입자.

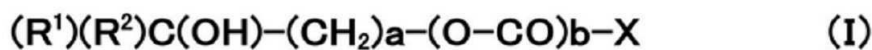
[0026] [1-7] 상기 [1-1] 내지 [1-6] 중 어느 하나의 지질 나노 입자를 유효 성분으로하는 의약품 조성물.

[0027] [1-8] 유전자 치료에 사용되는 상기 [1-7]의 의약품 조성물.

[0028] [1-9] 상기 [1-1] 내지 [1-6] 중 어느 하나의 지질 나노입자로서, 간세포 내에서 발현시키는 목적의 외래 유전자를 봉입한 지질 나노입자를 실험동물(인간 제외)에 투여하여 상기 시험 동물의 간에서 외래 유전자를 발현시키는 외래 유전자의 발현 방법.

[0029] [2-1] 화학식 (I)로 표시되는 pH-감수성 양이온성 지질, 그 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물, mRNA 이거나 플라스미드 DNA인 핵산을 포함하는 지질 나노입자:

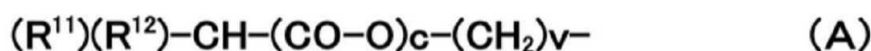
[0030] [화학식. 4]



[0031]

[0032] 상기 화학식 (I) 중, a 는 3~5의 정수를 나타내고, b 는 0 또는 1을 나타내고; R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 하기 일반식 (A)을 나타낸다:

[0033] [화학식. 5]



[0034]

[0035] 상기 화학식 (A) 중, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로, 선형 또는 가지형의 C_{2-15} 알킬기를 나타내고; c 는 0 또는 1을 나타내고; v 는 4~12의 정수를 나타내며; 및 X 는 하기 일반식 (B)로 표시되는 기를 나타낸다:

[0036] [화학식. 6]

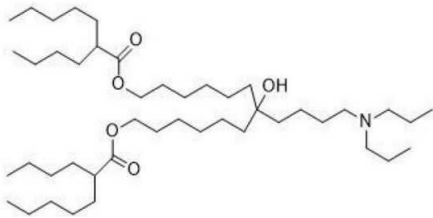


[0037]

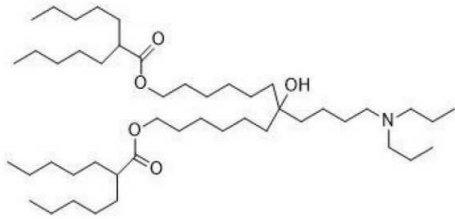
[0038] 상기 화학식 (B) 중, d 는 0-3의 정수를 나타내고; R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기(상기 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기에서, 1개 또는 2개의 수소 원자가 페닐기로 치환될 수 있음)를 나타내고, R^3 및 R^4 는 서로 결합하여 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환(상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기로 치환될 수 있음)을 형성하거나, 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환기 (여기서, 상기 기는 탄소 원자에 의해 (O-CO) b-에 결합되고 상기 고리의 1 개 또는 2 개의 수소 원자는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기로 치환 될 수 있음)을 나타낼 수 있다.

[0039] [2-2] 상기 pH-감수성 양이온성 지질은 하기 식으로 표시되는 [2-1]의 지질 나노 입자이다:

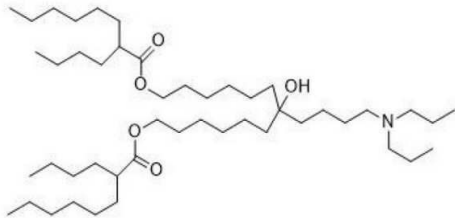
[0040] [화학식. 7-1]



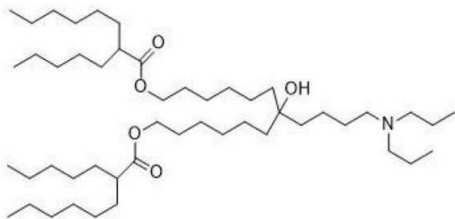
CL 4 F 7-4、



CL 4 F 7-5、



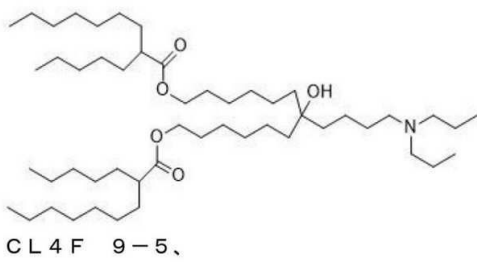
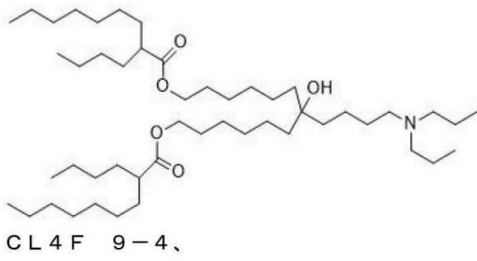
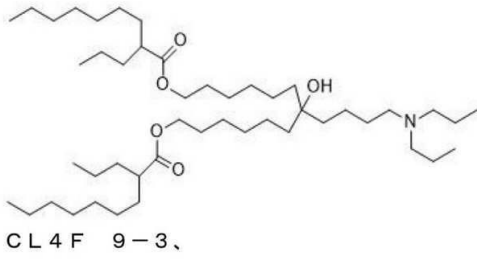
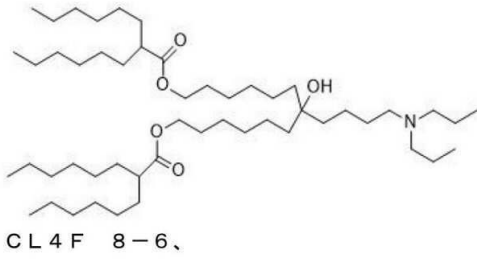
CL 4 F 8-4、



CL 4 F 8-5、

[0041]

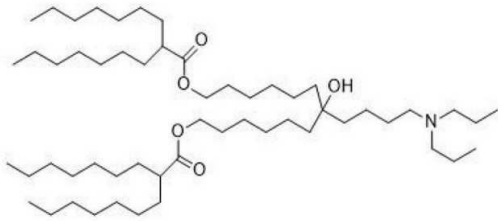
[0042] [화학식. 7-2]



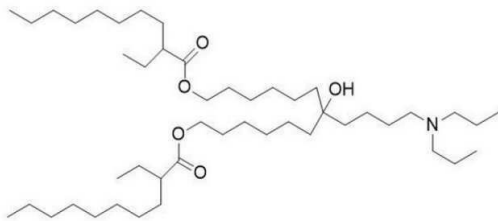
[0043]

[0044]

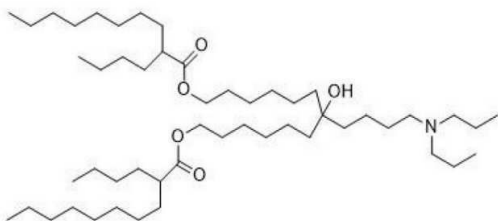
[화학식. 7-3]



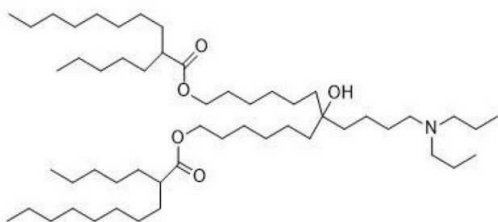
CL 4 F 9-7,



CL 4 F 10-2,



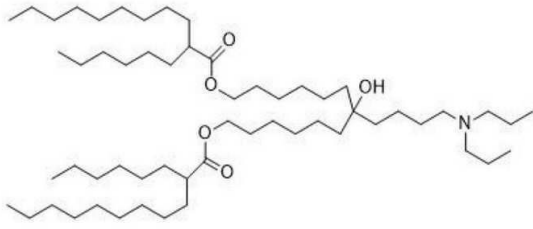
CL 4 F 10-4,



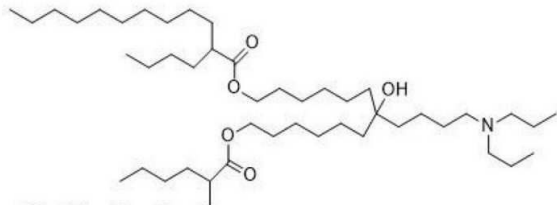
CL 4 F 10-5,

[0045]

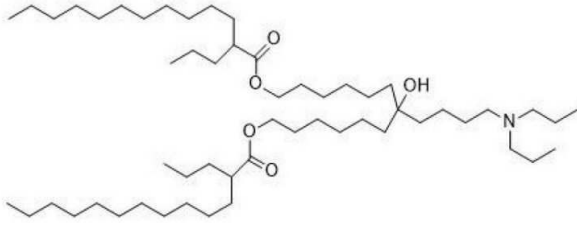
[0046] [화학식. 7-4]



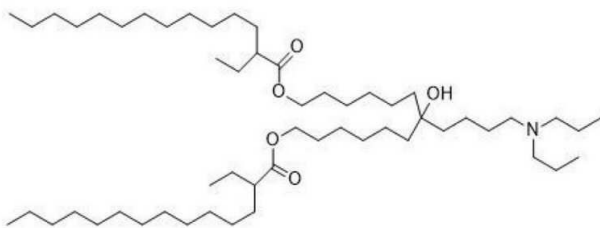
CL4F 11-6.



CL4F 12-4.



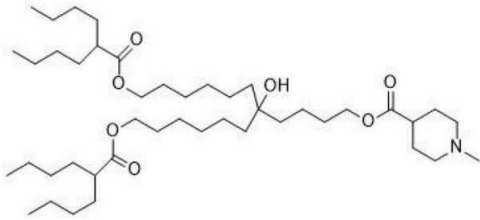
CL4F 13-3.



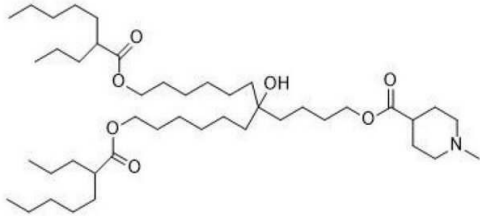
CL4F 14-2.

[0047]

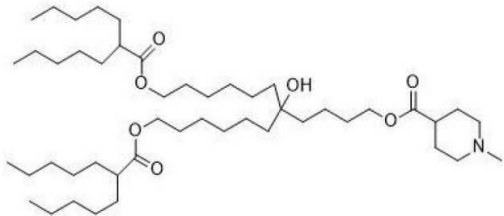
[0048] [화학식. 7-5]



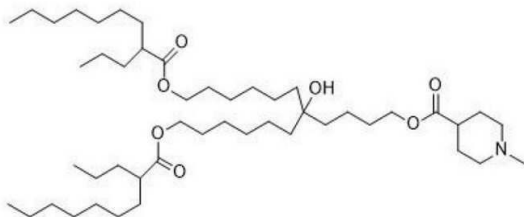
CL 15 F 6-4,



CL 15 F 7-3,



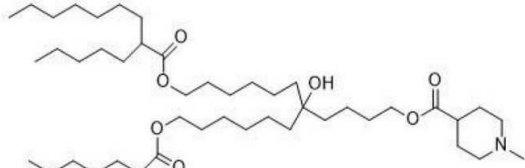
CL 15 F 7-5,



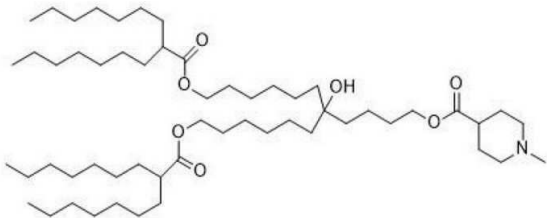
CL 15 F 9-3,

[0049]

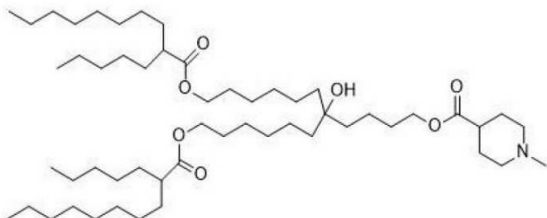
[0050] [화학식. 7-6]



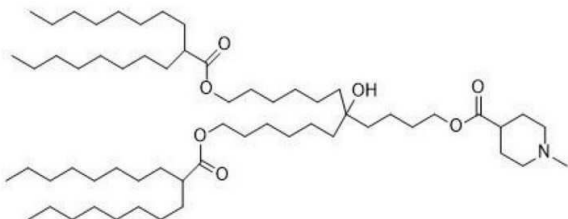
CL 15 F 9-5、



CL 15 F 9-7、



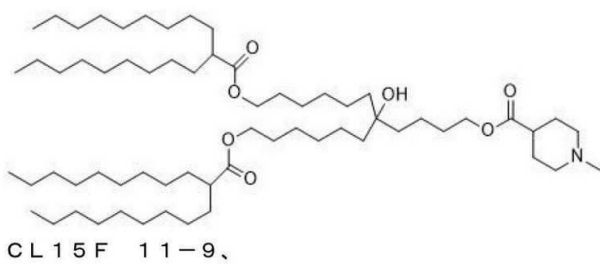
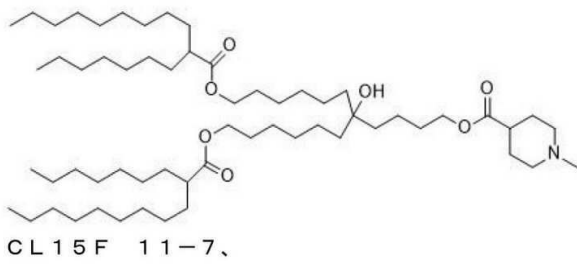
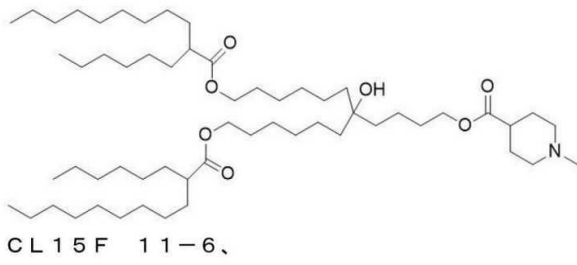
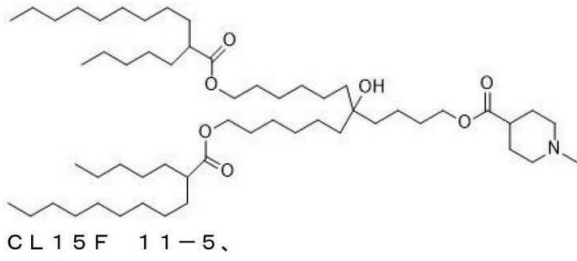
CL 15 F 10-5、



CL 15 F 10-8、

[0051]

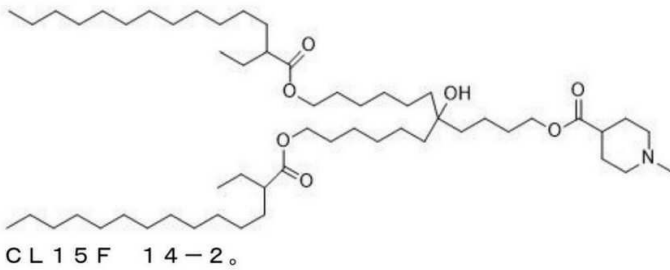
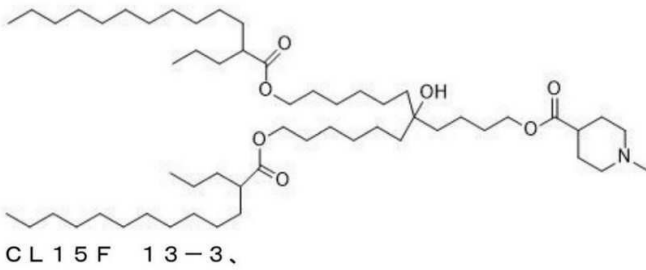
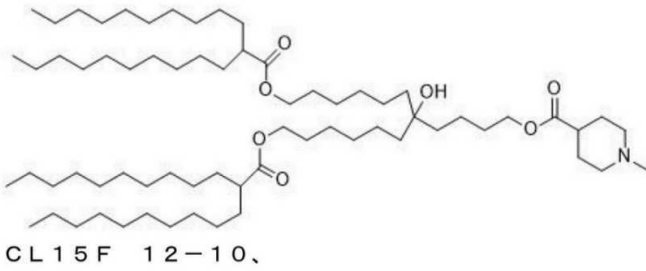
[0052] [화학식. 7-7]



[0053]

[0054] [화학식. 7-8]

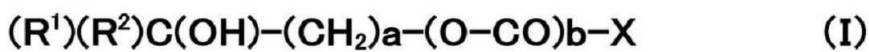
[0055]



[0056]

[0057] [3-1] 비장 전달용 약학 조성물이되, (I)의 화학식으로 표시되는 pH감수성 양이온성 지질, 그 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물을 포함하는 비장 전달용 약학 조성물:

[0058] [화학식. 8]



[0059]

[0060] 상기 화학식 (I) 중, a는 3~5의 정수를 나타내고, b는 0 또는 1을 나타내고; R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 하기 일반식 (A)을 나타낸다:

[0061] [화학식. 9]



[0062]

[0063] 상기 화학식 (A) 중, R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로, 선형 또는 가지형의 C₂₋₁₅알킬기를 나타내고; c는 0 또는 1을 나타내고; v는 4~12의 정수를 나타내며; 및 X는 하기 일반식 (B)로 표시되는 기를 나타낸다:

[0064] [화학식. 10]

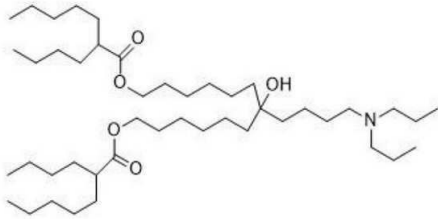


[0065]

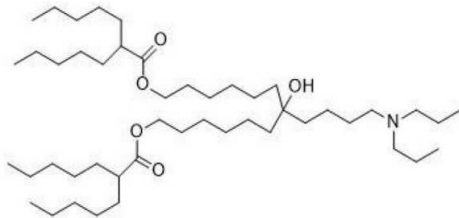
[0066] 상기 화학식 (B) 중, d는 0-3의 정수를 나타내고; R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기(상기 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기에서, 1개 또는 2개의 수소 원자가 페닐기로 치환될 수 있음)를 나타내고, R³ 및 R⁴는 서로 결합하여 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환(상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기로 치환될 수 있음)을 형성하거나, 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환기(여기서, 상기 기는 탄소 원자에 의해 (O-CO) b-에 결합되고 상기 고리의 1 개 또는 2 개의 수소 원자는 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기로 치환 될 수 있음)을 나타낼 수 있다.

[0067] [3-2] 상기 pH-감수성 양이온성 지질이, 하기 화학식으로 표시되는, [3-1]의 약제학적 조성물:

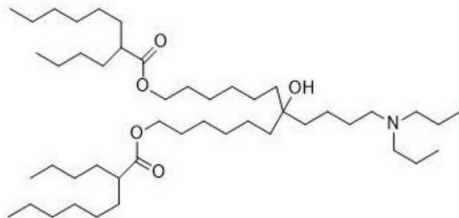
[0068] [화학식. 11-1]



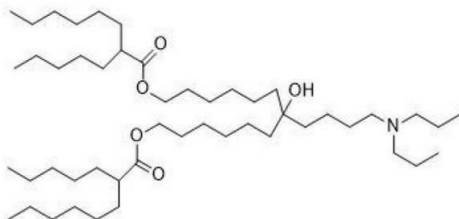
CL 4 F 7-4、



CL 4 F 7-5、



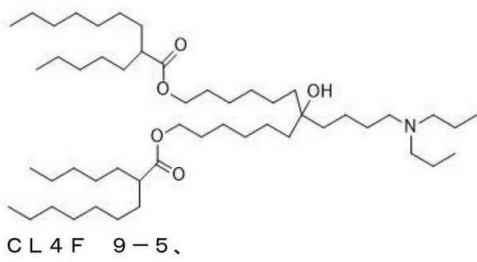
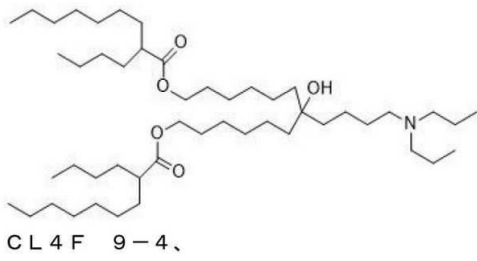
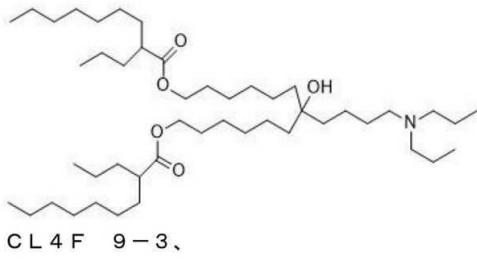
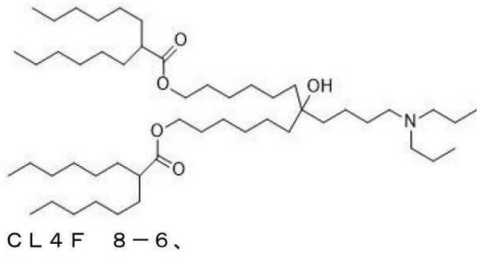
CL 4 F 8-4、



CL 4 F 8-5、

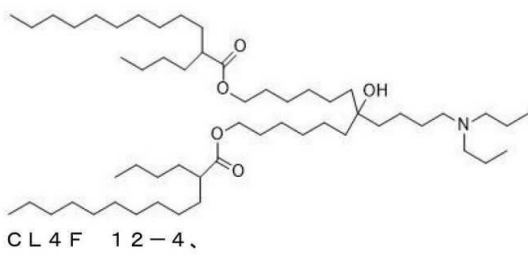
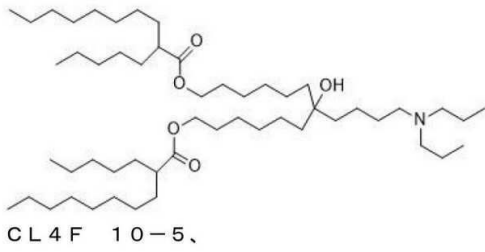
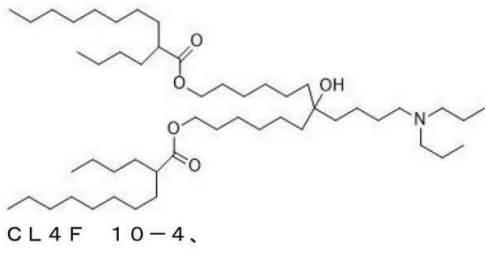
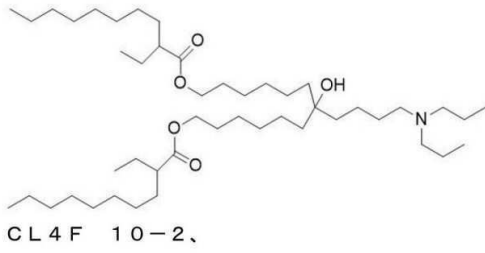
[0069]

[0070] [화학식. 11-2]



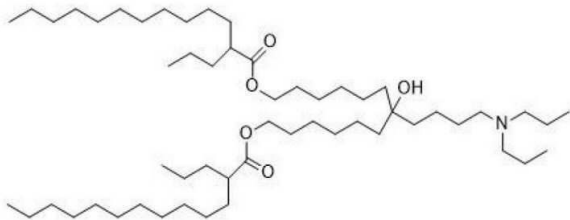
[0071]

[0072] [화학식. 11-3]

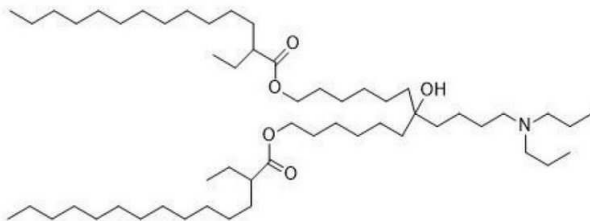


[0073]

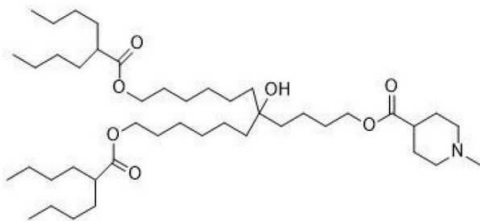
[0074] [화학식. 11-4]



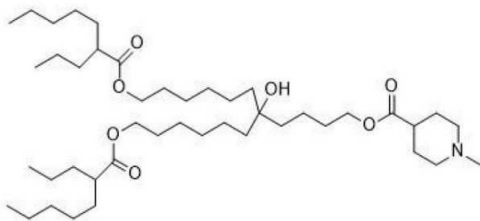
CL 4 F 13-3、



CL 4 F 14-2、



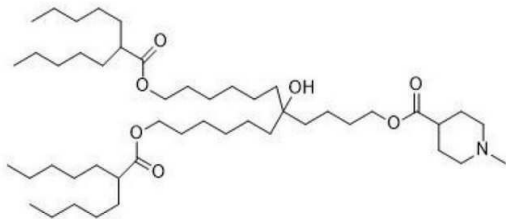
CL 15 F 6-4、



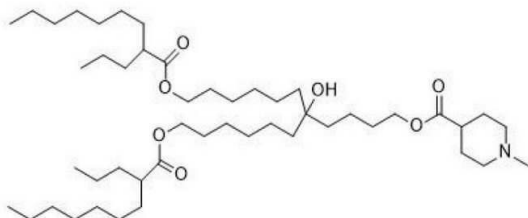
CL 15 F 7-3、

[0075]

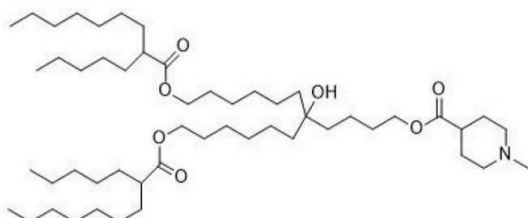
[0076] [화학식. 11-5]



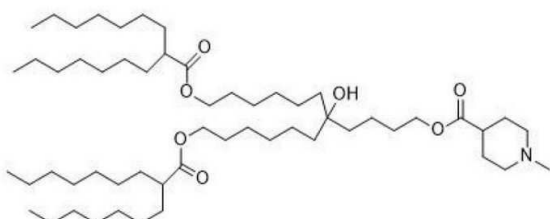
CL 15 F 7-5、



CL 15 F 9-3、



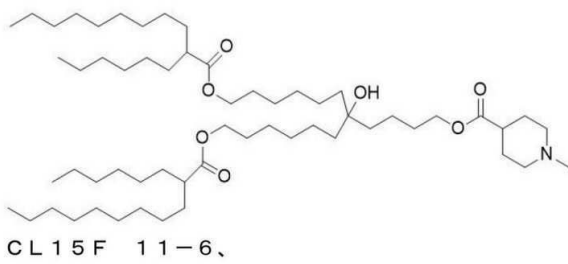
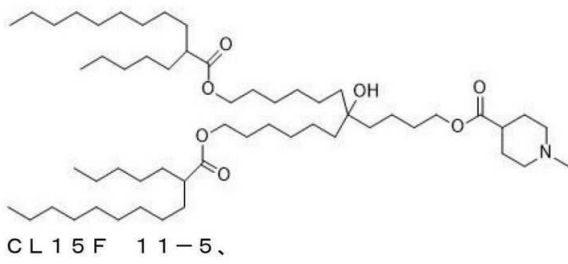
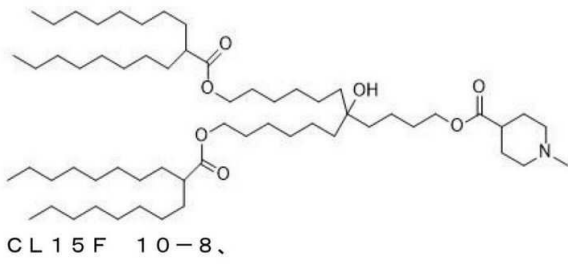
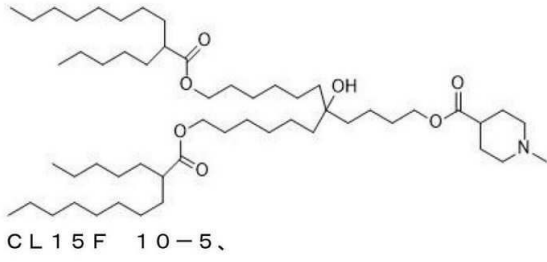
CL 15 F 9-5、



CL 15 F 9-7、

[0077]

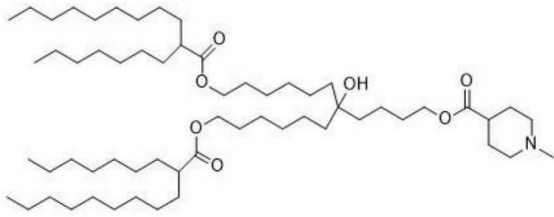
[0078] [화학식. 11-6]



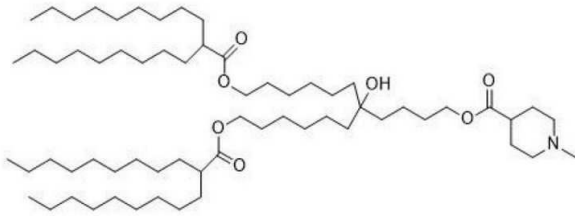
[0079]

[0080]

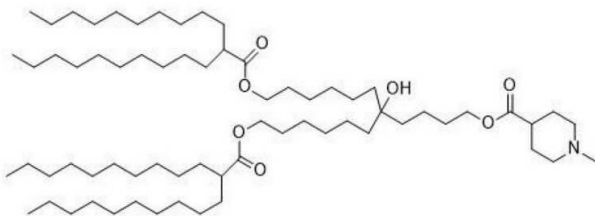
[화학식. 11-7]



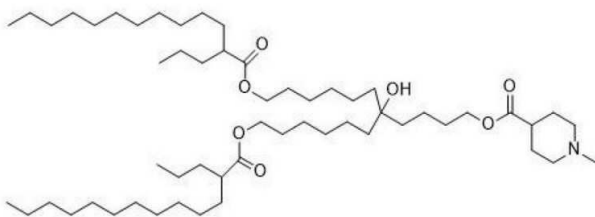
CL 15 F 11-7,



CL 15 F 11-9,



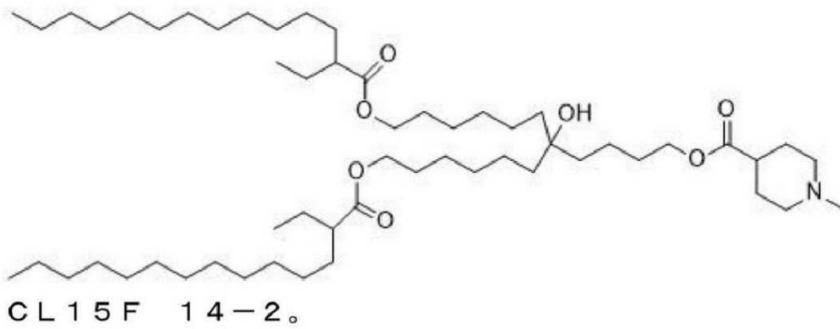
CL 15 F 12-10,



CL 15 F 13-3,

[0081]

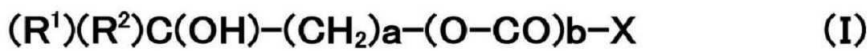
[0082] [화학식. 11-8]



[0083]

[0084] [4-1] 화학식 (I)로 표기되는 pH-감수성 양이온성 지질, 그 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물:

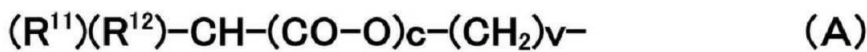
[0085] [화학식. 12]



[0086]

[0087] 화학식 (I) 중, a는 3~5의 정수를 나타내고; b는 0 또는 1을 나타내고; R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 하기 일반식 (A)으로 표시되는 기를 나타낸다:

[0088] [화학식. 13]



[0089]

[0090] 상기 화학식 (A) 중, R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로, 선형 또는 가지형의 C₂₋₁₅알킬기를 나타내고; c는 0 또는 1을 나타내고; v는 4~12의 정수를 나타내며; 및 X는 하기 일반식 (B)로 표시되는 기를 나타낸다:

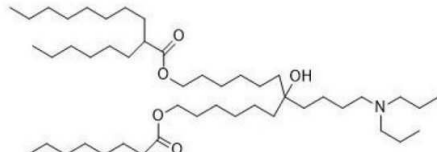
[0091] [화학식. 14]



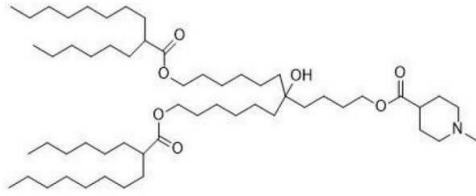
[0092]

[0093] 상기 화학식 (B) 중, d는 0-3의 정수를 나타내고; R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기(상기 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기에서, 1개 또는 2개의 수소 원자가 페닐기로 치환될 수 있음)를 나타내고, R³ 및 R⁴는 서로 결합하여 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환(상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기로 치환될 수 있음)을 형성하거나, 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환기(여기서, 상기 기는 탄소 원자에 의해 (O-CO) b-에 결합되고 상기 고리의 1 개 또는 2 개의 수소 원자는 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기로 치환 될 수 있음)을 나타낼 수 있고; 여기서 하기 식의 pH-감수성 양이온성 지질은 제외된다:

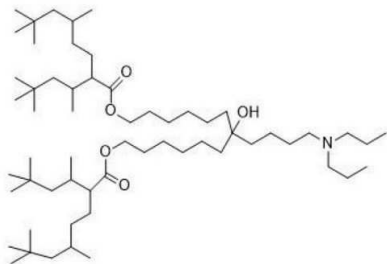
[0094] [화학식. 15]



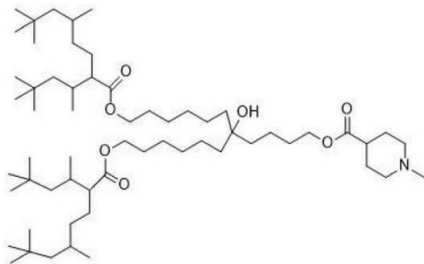
CL 4 F 6,



CL 15 F 6,



CL 4 G 6,



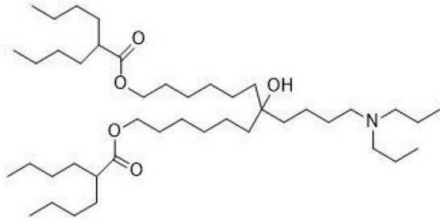
CL 15 G 6

[0095]

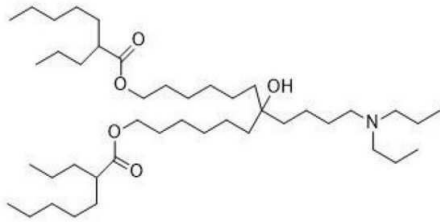
[0096]

[4-2] [4-1]의 pH-감수성 양이온성 지질, 그리고 그들의 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물이되, pH-감수성 양이온성 지질은 하기 화학식으로 표시된다:

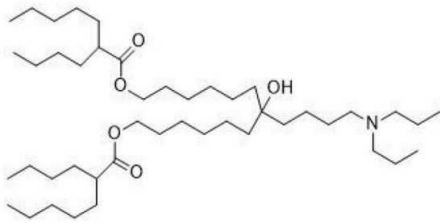
[0097] [화학식. 16-1]



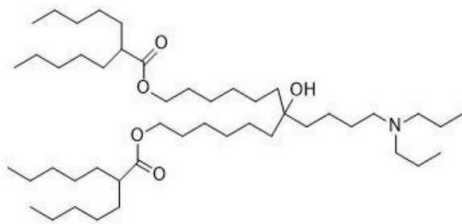
CL 4 F 6-4、



CL 4 F 7-3、



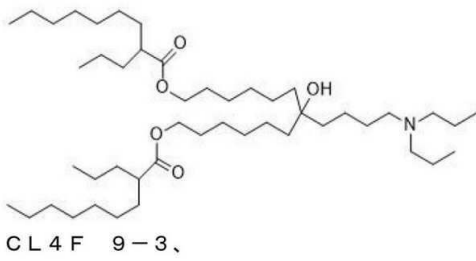
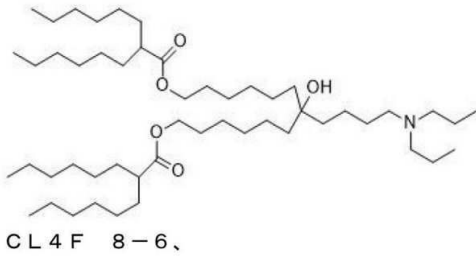
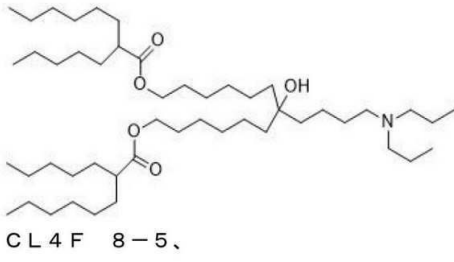
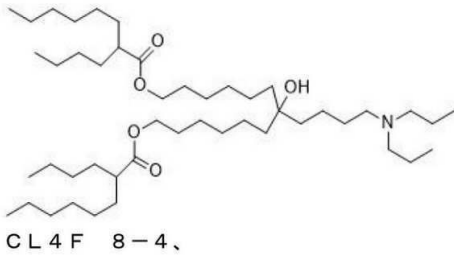
CL 4 F 7-4、



CL 4 F 7-5、

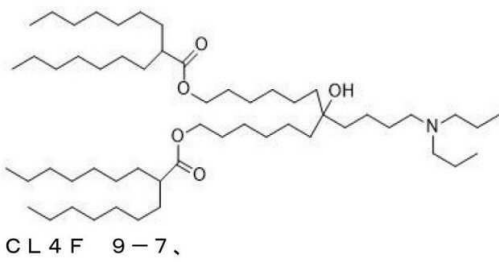
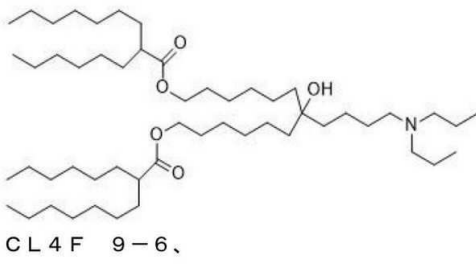
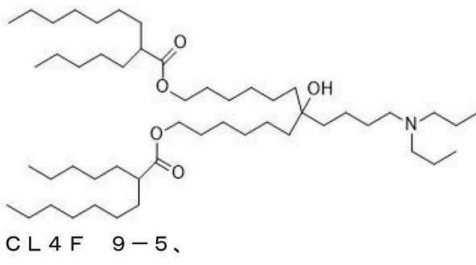
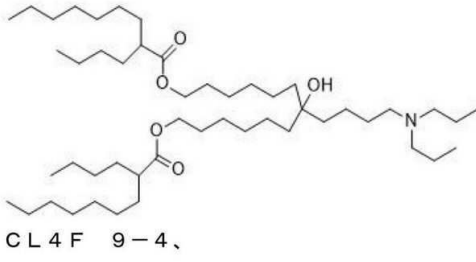
[0098]

[0099] [화학식. 16-2]



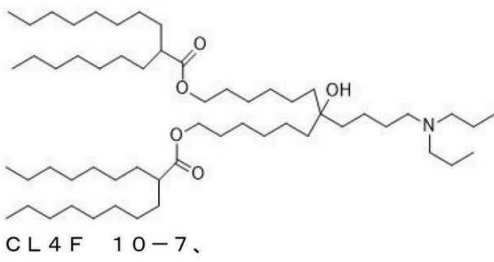
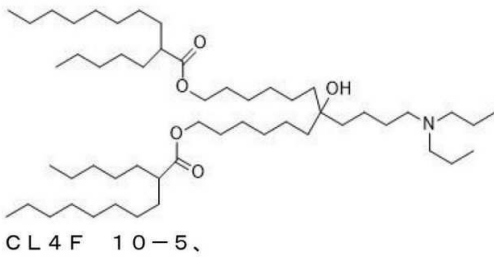
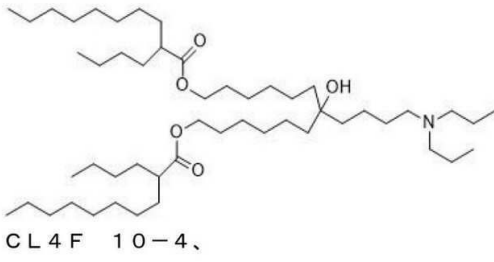
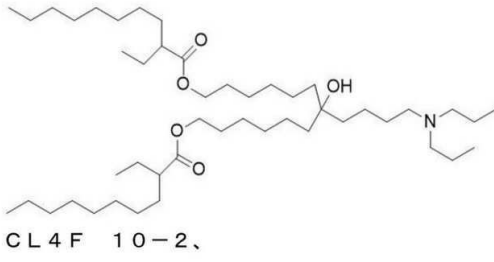
[0100]

[0101] [화학식. 16-3]



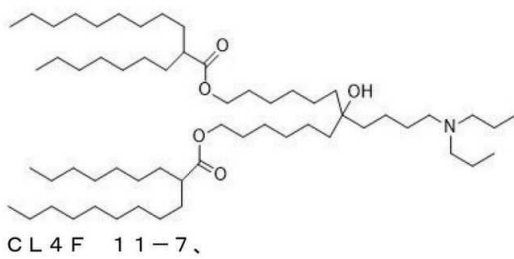
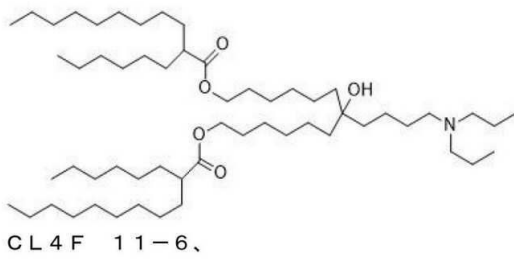
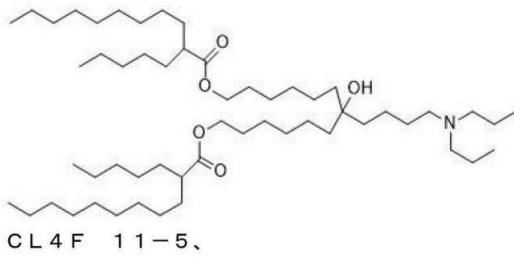
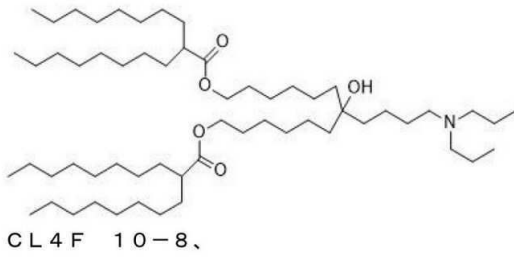
[0102]

[0103] [화학식. 16-4]



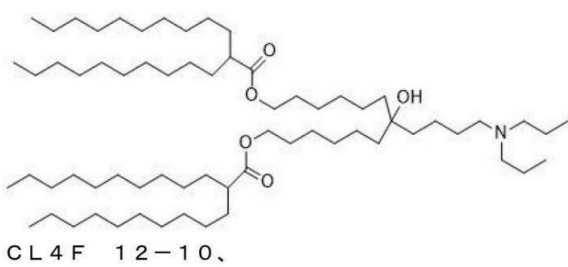
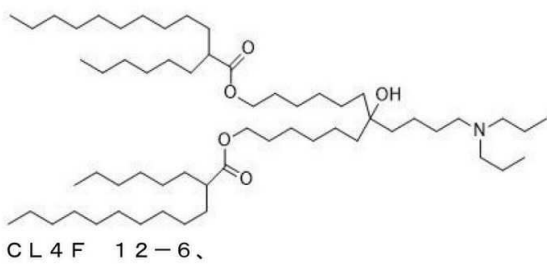
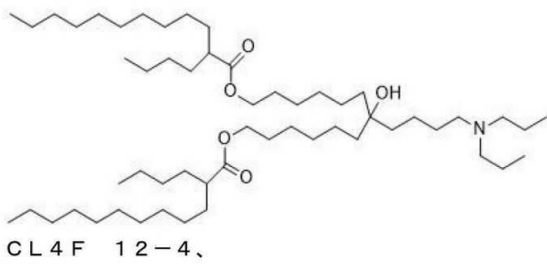
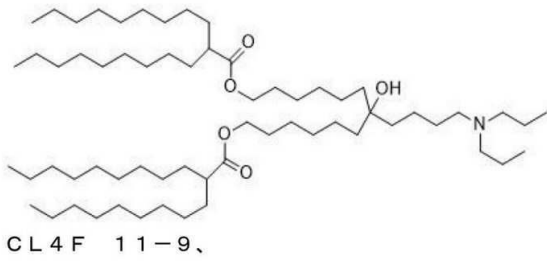
[0104]

[0105] [화학식. 16-5]



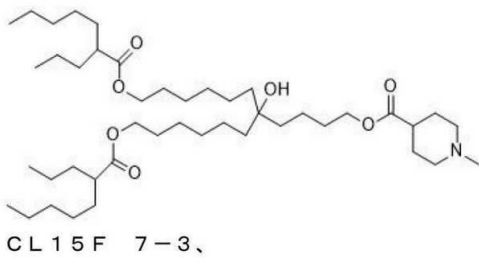
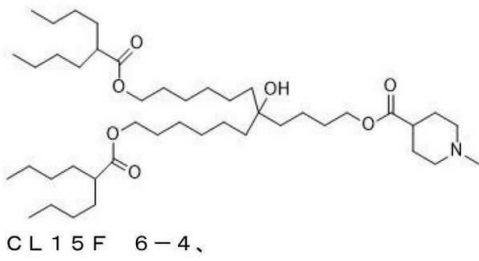
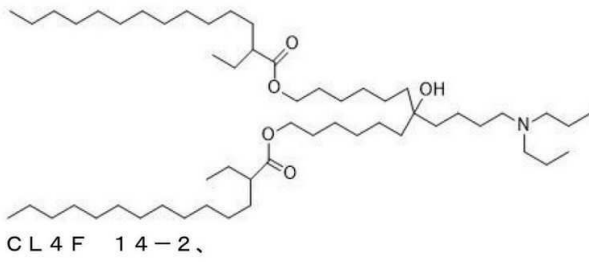
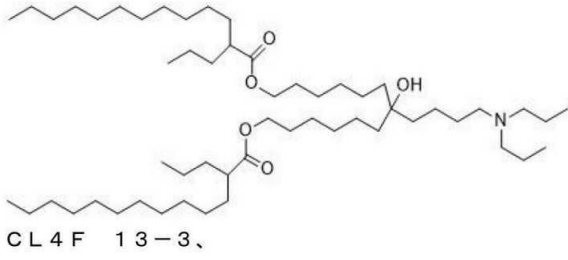
[0106]

[0107] [화학식. 16-6]



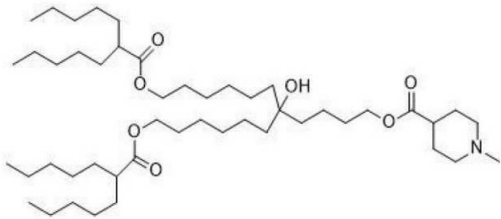
[0108]

[0109] [화학식. 16-7]

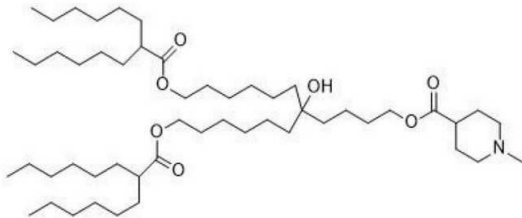


[0110]

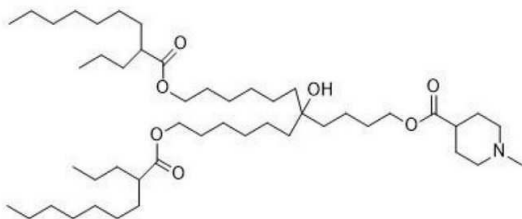
[0111] [화학식. 16-8]



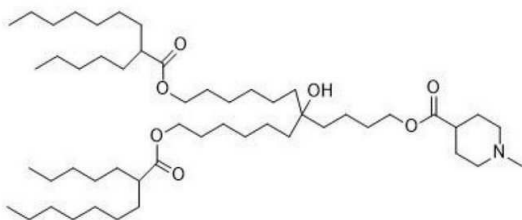
CL 15 F 7-5.



CL 15 F 8-6.



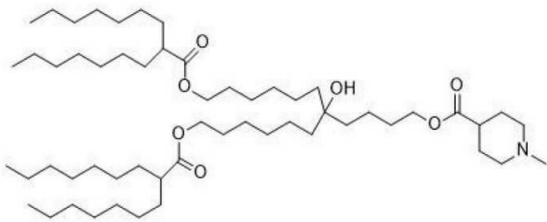
CL 15 F 9-3.



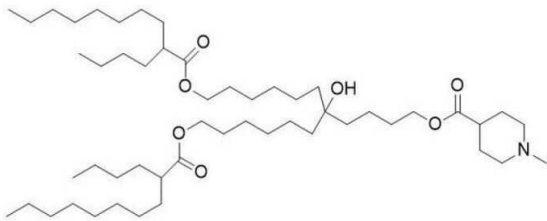
CL 15 F 9-5.

[0112]

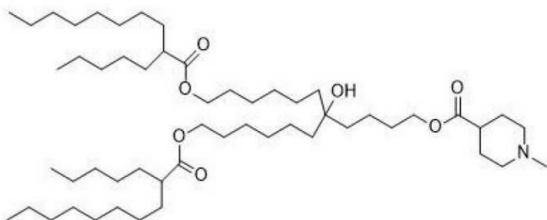
[0113] [화학식. 16-9]



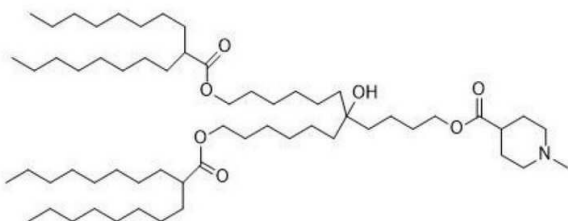
CL 15 F 9-7,



CL 15 F 10-4,



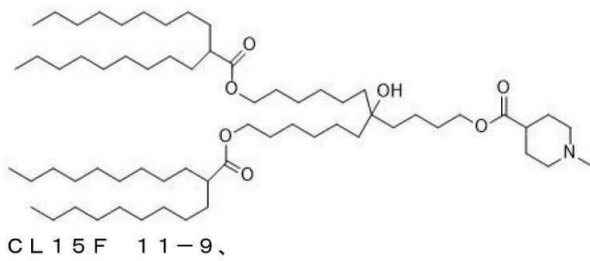
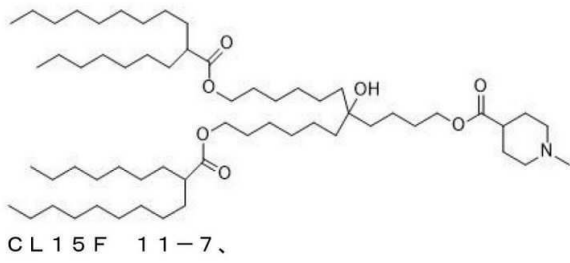
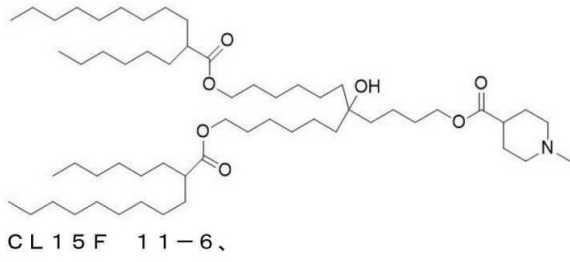
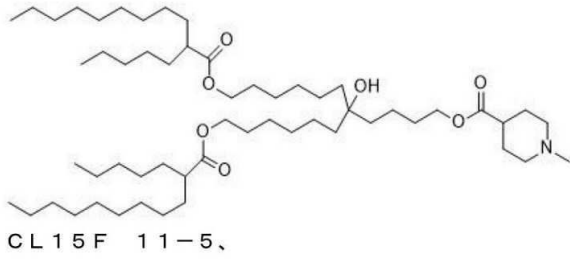
CL 15 F 10-5,



CL 15 F 10-8,

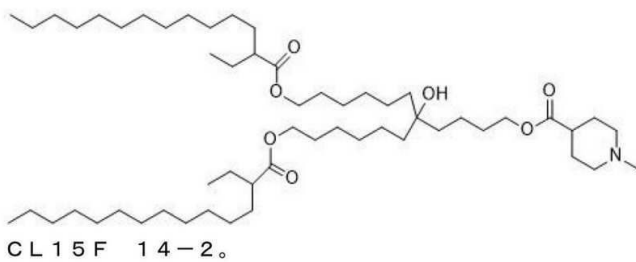
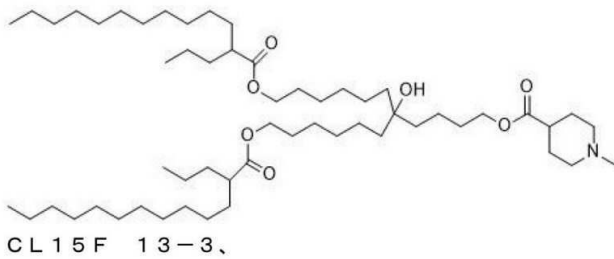
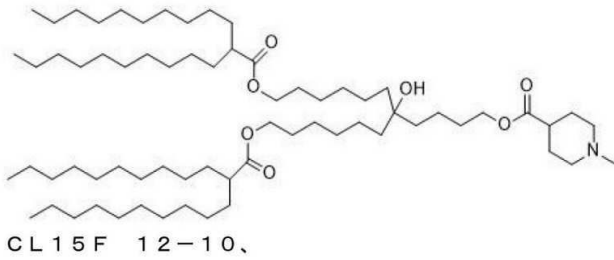
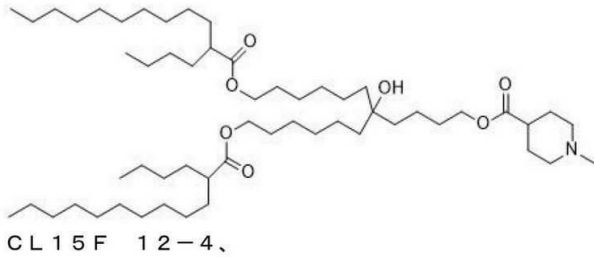
[0114]

[0115] [화학식. 16-10]



[0116]

[0117] [화학식. 16-11]



[0118]

[0119] [5-1] 지질 나노 입자 제제는 다음을 포함한다:

[0120] (i) 스테롤 또는 스테롤 유도체;

[0121] (ii) 폴리알킬렌 글리콜 수정된 지질(polyalkylene glycol-modified lipids);

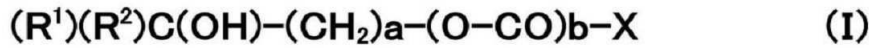
[0122] (iii) 핵산;

[0123] (iv) 완충제

[0124] (v) 이당류; 및

[0125] (vi) 화학식(I)에 표기된 pH-감수성 양이온성 지질과 그것의 입체 이성질체 또는 입체이성질체 혼합물;

[0126] [화학식. 17]



[0127]

[0128] 화학식 (I) 중, a는 3~5의 정수를 나타내고; b는 0 또는 1을 나타내고; R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 하기 일반식 (A)으로 표시되는 기를 나타낸다:

[0129] [화학식. 18]



[0130]

[0131] 상기 화학식 (A) 중, R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로, 선형 또는 가지형의 C₂₋₁₅알킬기를 나타내고; c는 0 또는 1을 나타내고; v는 4~12의 정수를 나타내며; 및 X는 하기 일반식 (B)로 표시되는 기를 나타낸다:

[0132] [화학식. 19]

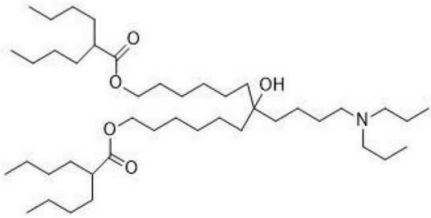


[0133]

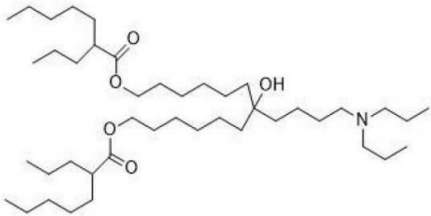
[0134] 상기 화학식 (B) 중, d는 0~3의 정수를 나타내고; R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기(상기 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기에서, 1개 또는 2개의 수소 원자가 페닐기로 치환될 수 있음)를 나타내고, R³ 및 R⁴는 서로 결합하여 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환(상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기로 치환될 수 있음)을 형성하거나, 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환기(여기서, 상기 기는 탄소 원자에 의해 (O-CO) b-에 결합되고 상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기로 치환될 수 있음)을 나타낼 수 있다.

[0135] [5-2] 상기 pH-감수성 양이온성 지질이 하기 화학식으로 표시되는 [5-1]의 지질 나노 입자 제제:

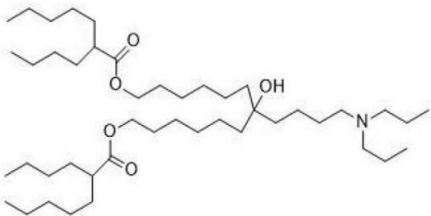
[0136] [화학식. 20-1]



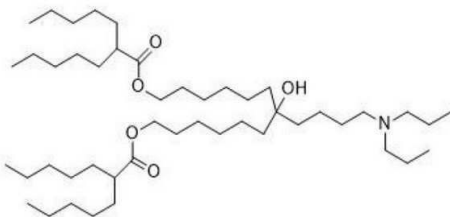
CL 4 F 6-4、



CL 4 F 7-3、



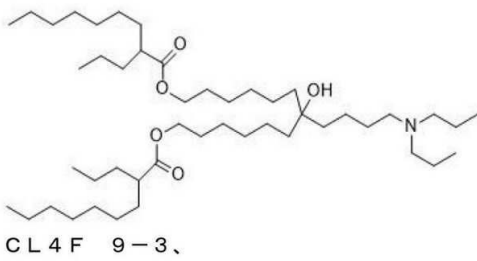
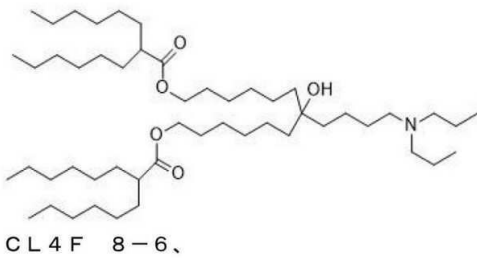
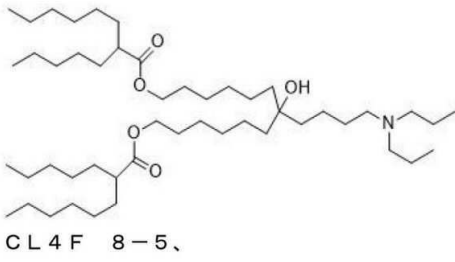
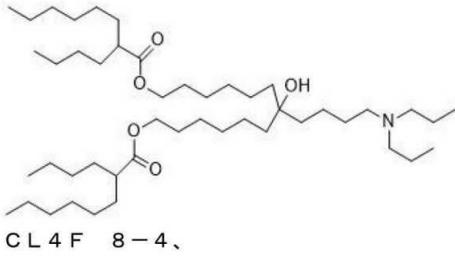
CL 4 F 7-4、



CL 4 F 7-5、

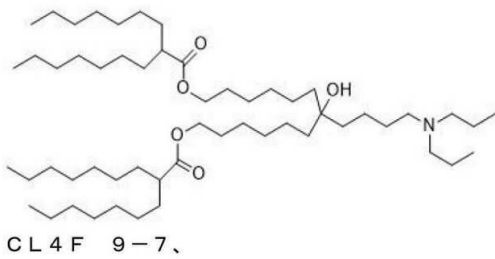
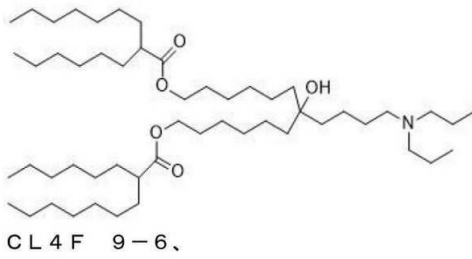
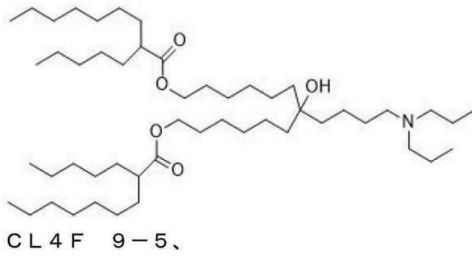
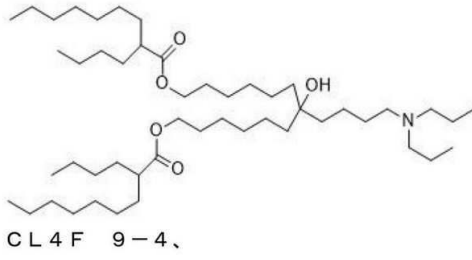
[0137]

[0138] [화학식. 20-2]



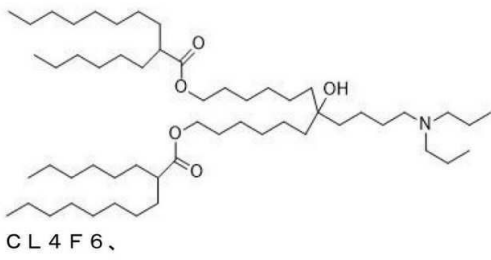
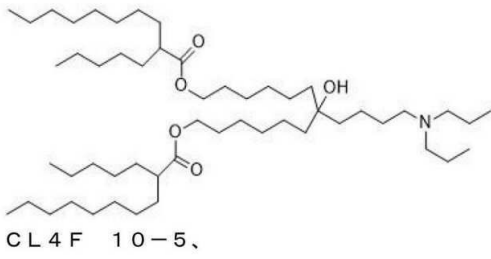
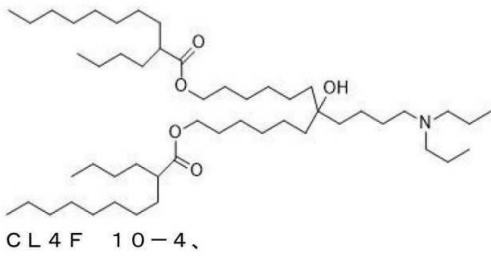
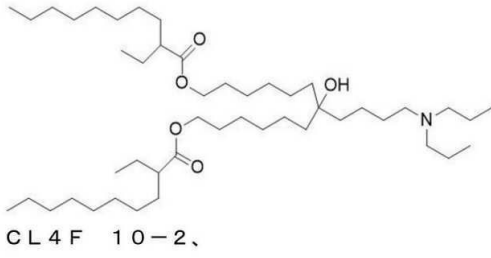
[0139]

[0140] [화학식. 20-3]



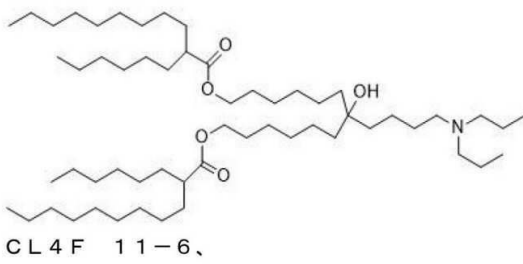
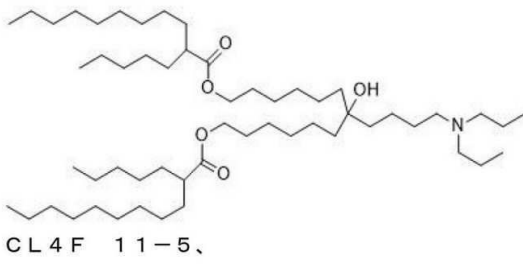
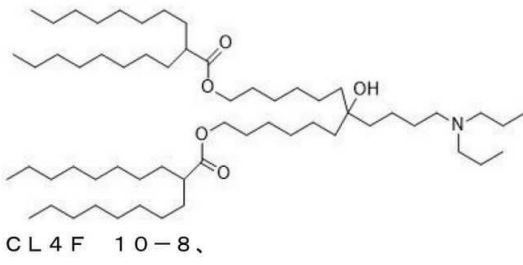
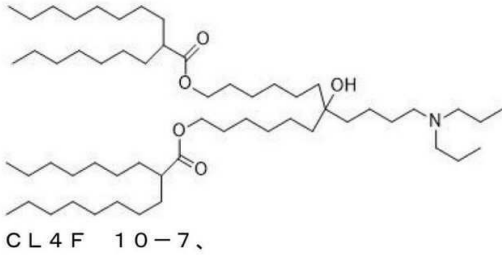
[0141]

[0142] [화학식. 20-4]



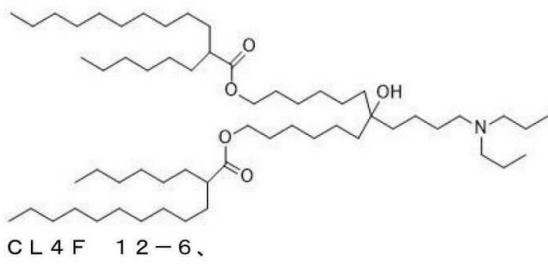
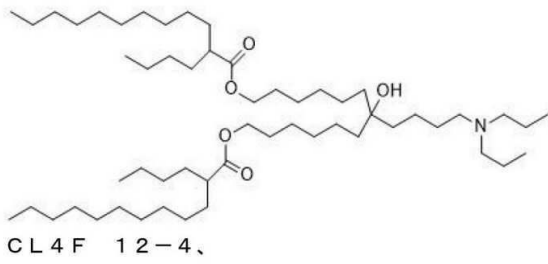
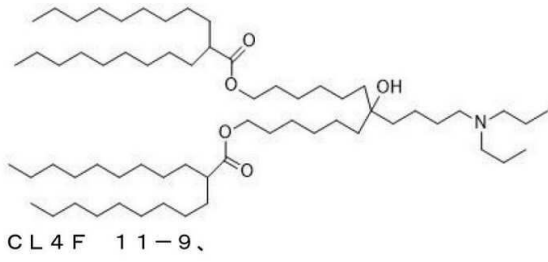
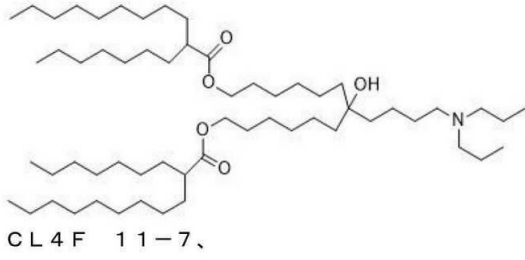
[0143]

[0144] [화학식. 20-5]



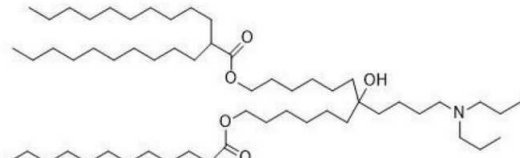
[0145]

[0146] [화학식. 20-6]

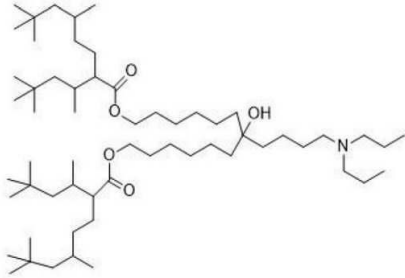


[0147]

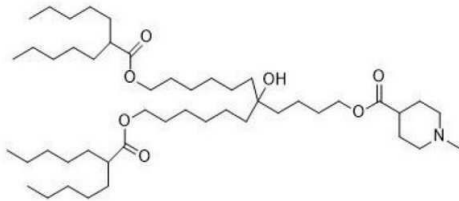
[0148] [화학식. 20-7]



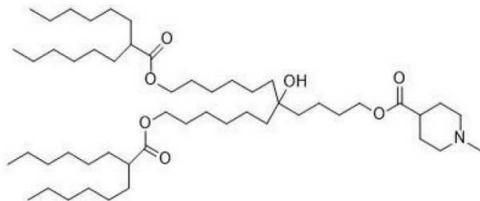
CL 4 F 12-10、



CL 4 G 6、



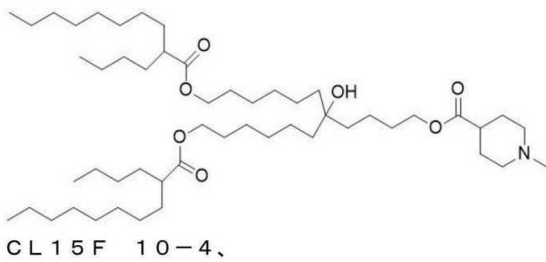
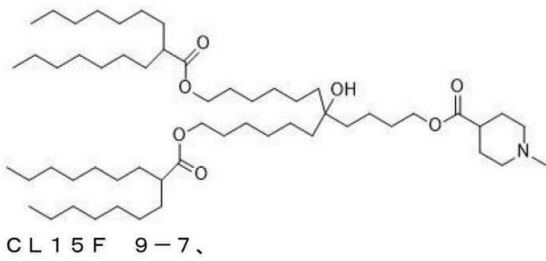
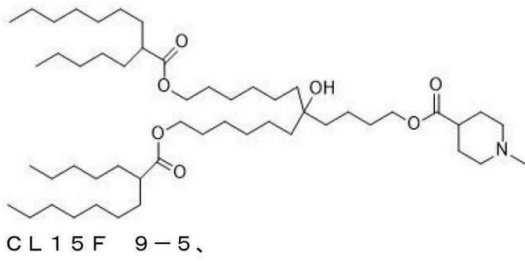
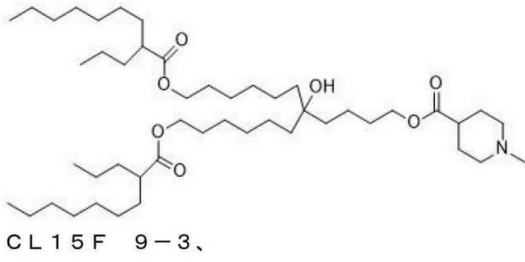
CL 15 F 7-5、



CL 15 F 8-6、

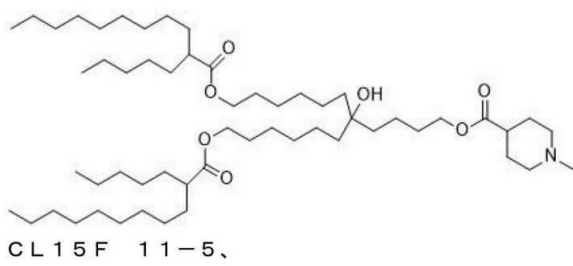
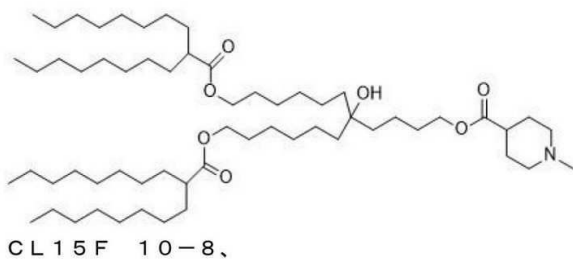
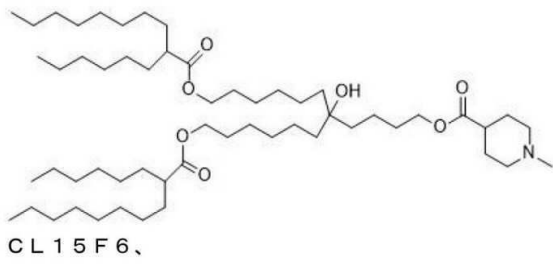
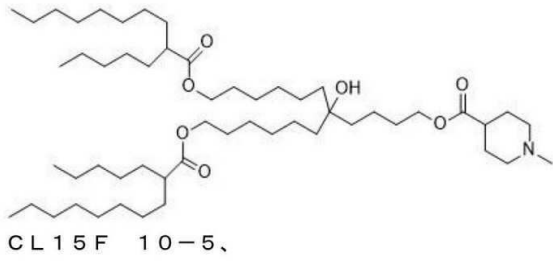
[0149]

[0150] [화학식. 20-8]



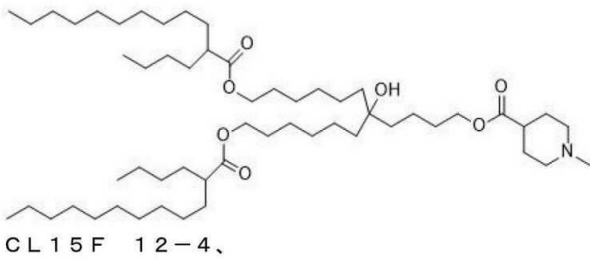
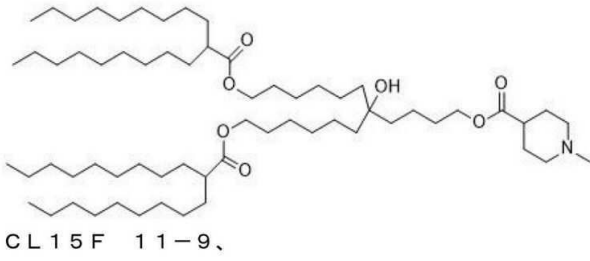
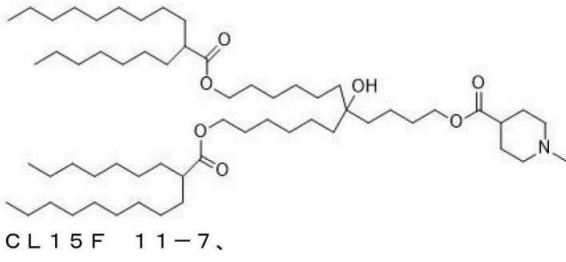
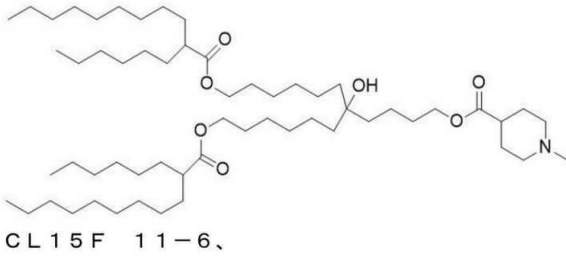
[0151]

[0152] [화학식. 20-9]



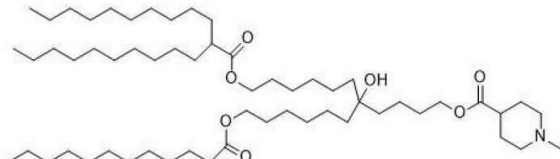
[0153]

[0154] [화학식. 20-10]

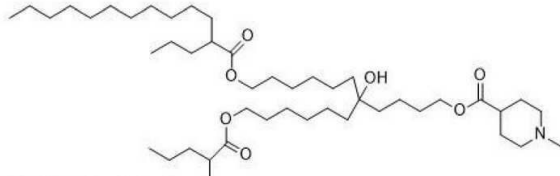


[0155]

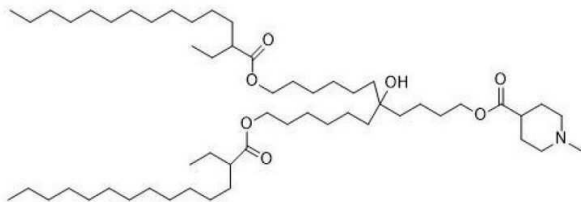
[0156] [화학식. 20-11]



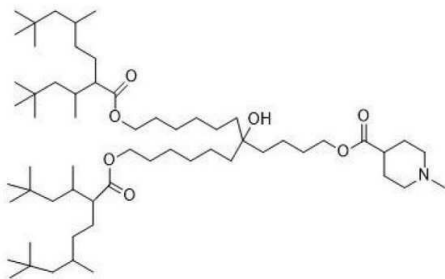
CL 15 F 12-10,



CL 15 F 13-3,



CL 15 F 14-2,



CL 15 G 6.

[0157]

[0158] [5-3] 상기 핵산이 mRNA 인 [5-1] 또는 [5-2]의 지질 나노 입자 제제.

[0159] [5-4] 지질 나노 입자가 수용액에 현탁된 [5-1] 내지 [5-3] 중 어느 하나의 지질 나노 입자 제제.

[0160] [5-5] 상기 이당류의 농도가 1중량% 내지 20중량%인 [5-4]의 지질 나노입자 제제.

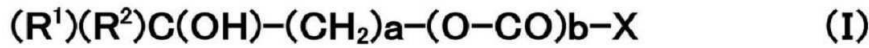
[0161] [5-6] 25℃에서 pH 6.8 내지 pH 8.0인 [5-4] 또는 [5-5] 중 어느 하나의 지질 나노입자 제제.

[0162] [5-7] 동결 건조된 [5-1] 내지 [5-3] 중 어느 하나의 지질 나노입자 제제.

[0163] [5-8] [5-7]의 지질 나노 입자 제제에, 물 또는 수용액이 첨가된 재현탁 제제.

[0164] [6-1] (I)의 화학식으로 표시되는 pH-감수성 양이온성 지질, 그리고 그 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물의 제조 방법:

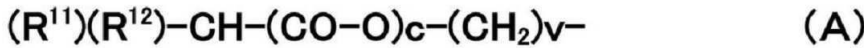
[0165] [화학식. 21]



[0166]

[0167] 화학식 (I) 중, a는 3~5의 정수를 나타내고; b는 0 또는 1을 나타내고; R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 하기 일반식 (A)으로 표시되는 기를 나타낸다:

[0168] [화학식. 22]



[0169]

[0170] 상기 화학식 (A) 중, R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로, 선형 또는 가지형의 C₂₋₁₅알킬기를 나타내고; c는 0 또는 1을 나타내고; v는 4~12의 정수를 나타내며; 및 X는 하기 일반식 (B)로 표시되는 기를 나타낸다:

[0171] [화학식. 23]

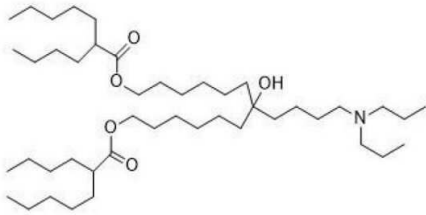


[0172]

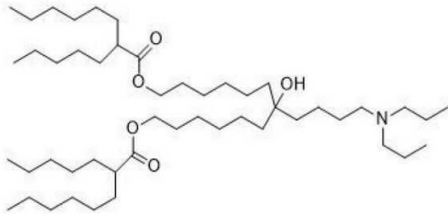
[0173] 상기 화학식 (B) 중, d는 0~3의 정수를 나타내고; R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기(상기 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기에서, 1개 또는 2개의 수소 원자가 페닐기로 치환될 수 있음)를 나타내고, R³ 및 R⁴는 서로 결합하여 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환(상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기로 치환될 수 있음)을 형성하거나, 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환기(여기서, 상기 작용기는 탄소 원자에 의해 (O-CO) b-에 결합되고 상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기로 치환될 수 있음)을 나타낼 수 있다.

[0174] 여기서 pH-감수성 양이온성 지질의 화학식은 하기 식으로 나타낸다.

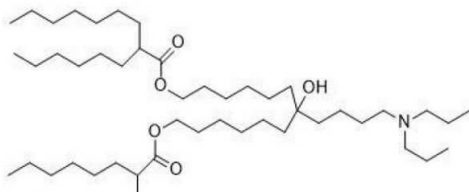
[0175] [화학식. 24]



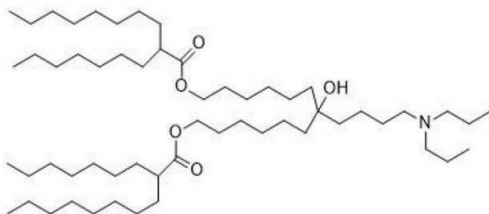
CL 4 F 7-4、



CL 4 F 8-5、



CL 4 F 9-6、



CL 4 F 10-7、

[0176]

[0177] 및 상기 제조 방법은 유기리튬 (organolithium), 디메틸프로필렌우레아(dimethylpropylene urea, DMPU) 및 테트라히드로푸란(tetrahydrofuran, THF)의 존재하에 적어도 알킬카르복실산과 알킬할라이드를 반응시켜 가지형 지방산을 얻는 공정을 포함한다.

[0178] [6-2] 상기 공정에 있어서의 상기 테트라히드로푸란(THF)과 상기 디메틸프로필렌우레아(DMPU)의 용적비가 10:1~1:1(v/v) 인 [6-1]의 제조 방법.

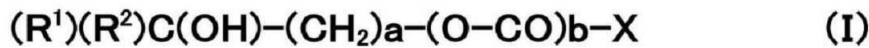
[0179] [6-3] 상기 유기리튬이 리튬 디이소프로필아미드(lithium diisopropylamide, LDA)인, [6-1] 또는 [6-2]의 제조 방법.

[0180] [6-4] 상기 알킬 할라이드가 아이오도알킬(iodoalkyl) 인 [6-1] 내지 [6-3] 중 어느 하나의 제조 방법.

[0181] [6-5] 역상 크로마토그래피 (reversed phase chromatography) 에 의해 가지형 지방산을 정제하는 공정을 더 포함하는, [6-1] 내지 [6-4] 중 어느 하나의 제조 방법.

[0182] [6-6] 화학식 (I)로 표시되는 pH-감수성 양이온성 지질, 그리고 그 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물의 제조 방법:

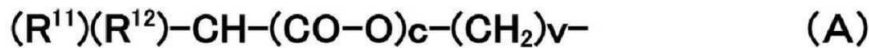
[0183] [화학식. 25]



[0184]

[0185] 화학식 (I) 중, a는 3~5의 정수를 나타내고; b는 0 또는 1을 나타내고; R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 하기 일반식 (A)으로 표시되는 기를 나타낸다:

[0186] [화학식. 26]



[0187]

[0188] 상기 화학식 (A) 중, R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로, 선형 또는 가지형의 C₂₋₁₅알킬기를 나타내고; c는 0 또는 1을 나타내고; v는 4~12의 정수를 나타내며;

[0189] 및 X는 하기 일반식 (B)로 표시되는 기를 나타낸다:

[0190] [화학식. 27]

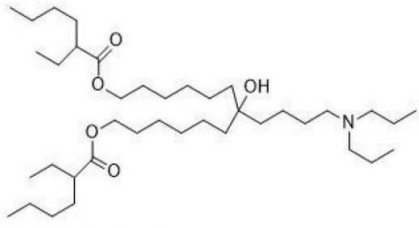


[0191]

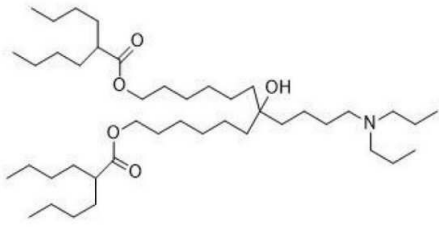
[0192] 상기 화학식 (B) 중, d는 0-3의 정수를 나타내고; R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기(상기 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기에서, 1개 또는 2개의 수소 원자가 페닐기로 치환될 수 있음)를 나타내고, R³ 및 R⁴는 서로 결합하여 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환(상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기로 치환될 수 있음)을 형성하거나, 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환기(여기서, 상기 작용기는 탄소 원자에 의해 (O-CO) b-에 결합되고 상기 고리의 1개 또는 2개의 수소 원자는 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기로 치환될 수 있음)을 나타낼 수 있다.

[0193] 여기서 상기 pH-감수성 양이온성 지질의 화학식은 하기의 식으로 나타낸다:

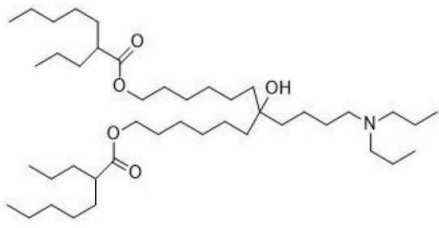
[0194] [화학식. 28-1]



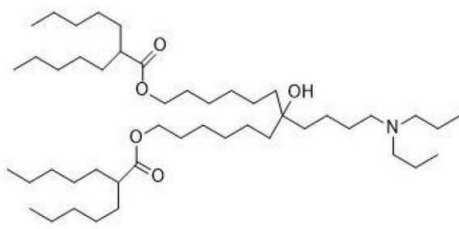
CL 4 F 6-2、



CL 4 F 6-4、



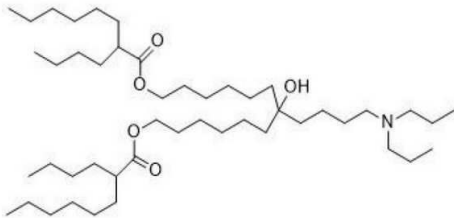
CL 4 F 7-3、



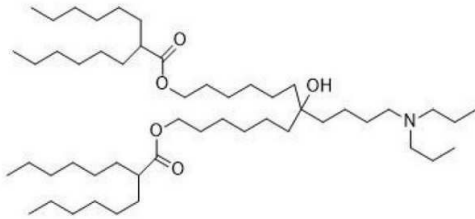
CL 4 F 7-5、

[0195]

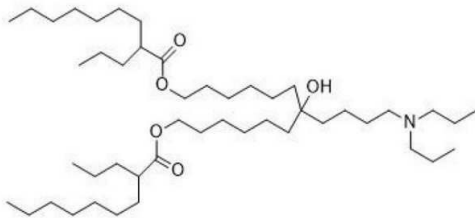
[0196] [화학식. 28-2]



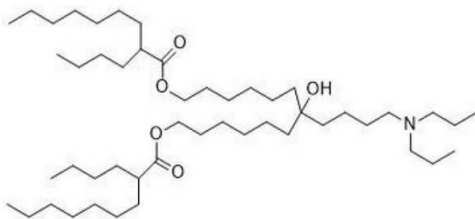
CL 4 F 8-4、



CL 4 F 8-6、



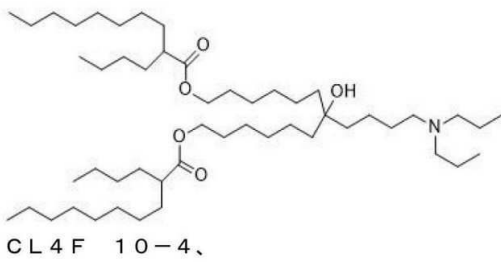
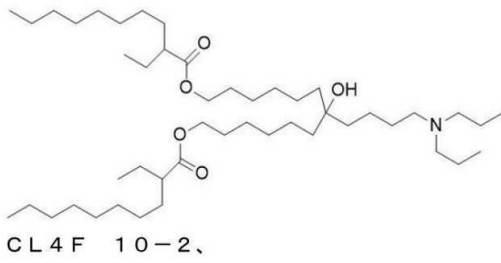
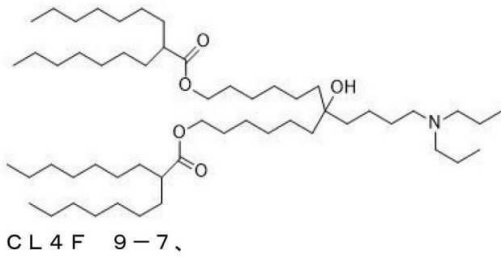
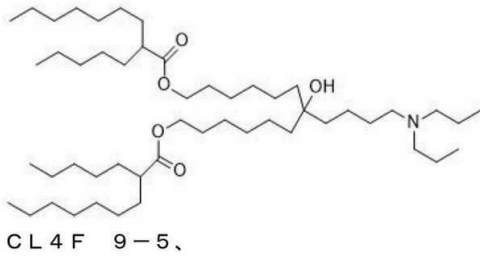
CL 4 F 9-3、



CL 4 F 9-4、

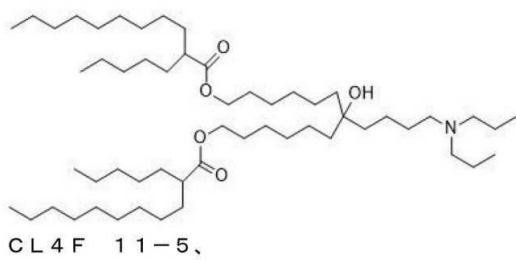
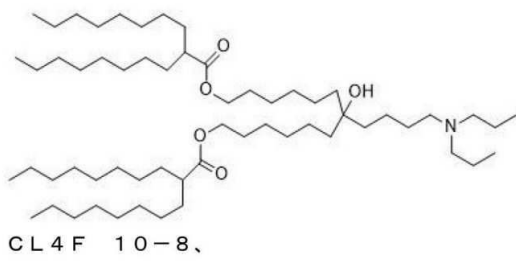
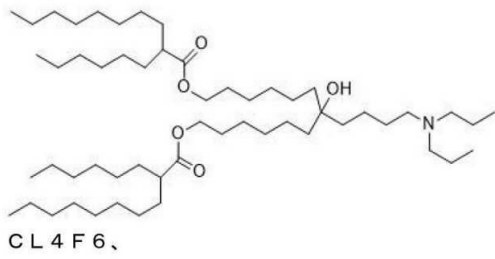
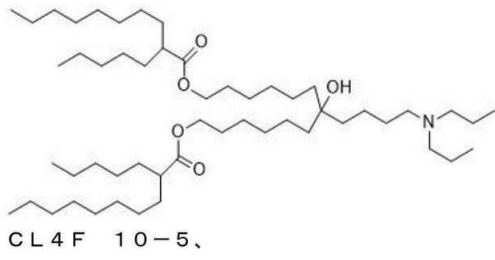
[0197]

[0198] [화학식. 28-3]



[0199]

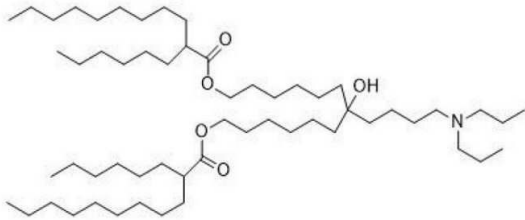
[0200] [화학식. 28-4]



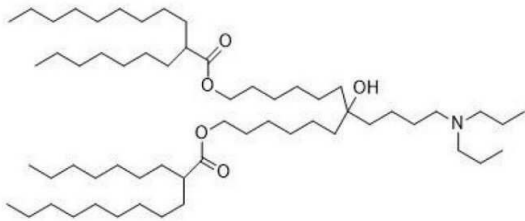
[0201]

[0202]

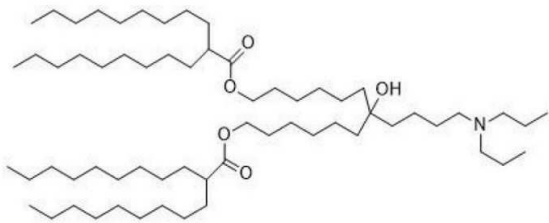
[화학식. 28-5]



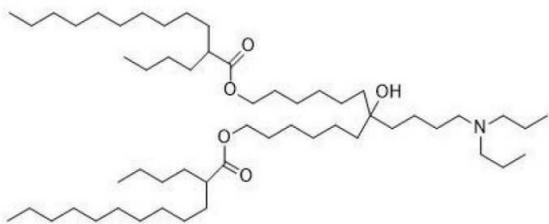
CL4F 11-6、



CL4F 11-7、



CL4F 11-9、

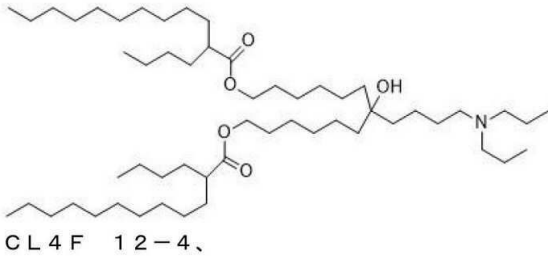
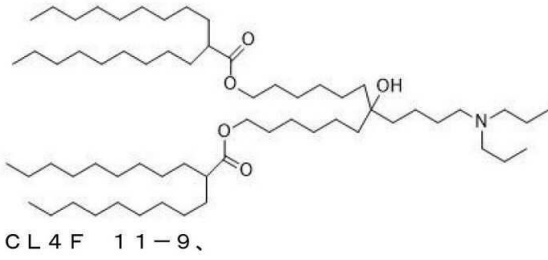
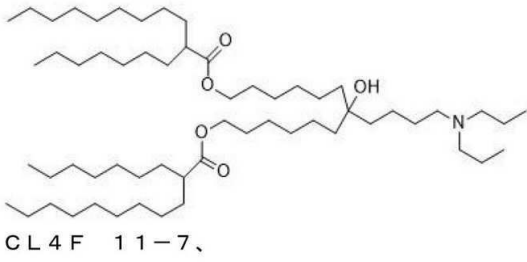
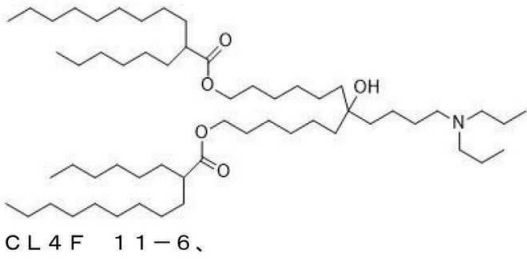


CL4F 12-4、

[0203]

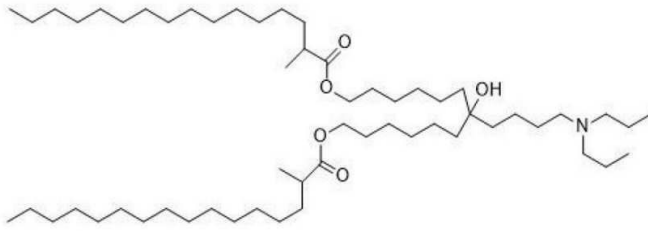
[0204]

[화학식. 28-6]

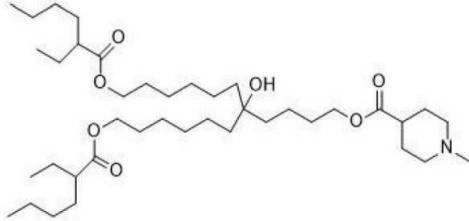


[0205]

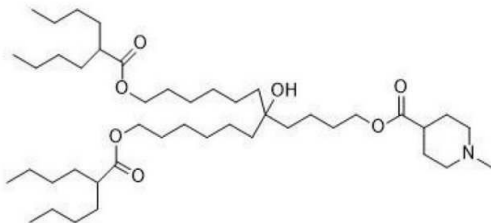
[0206] [화학식. 28-7]



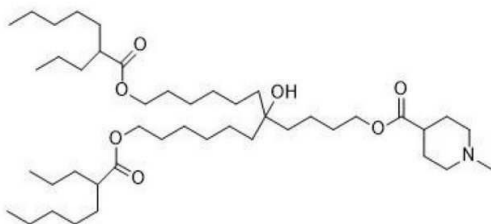
CL 4 F 16-1、



CL 15 F 6-2、



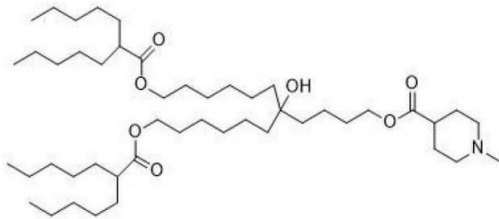
CL 15 F 6-4、



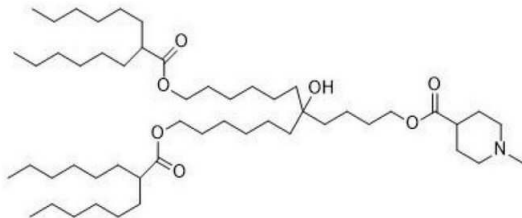
CL 15 F 7-3、

[0207]

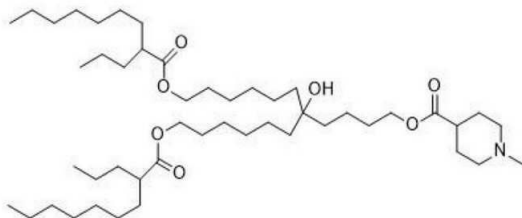
[0208] [화학식. 28-8]



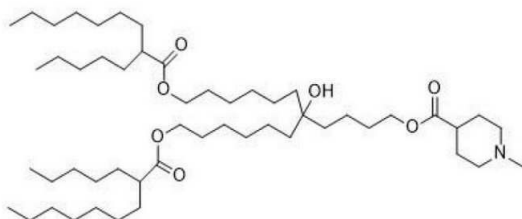
CL 15 F 7-5.



CL 15 F 8-6.



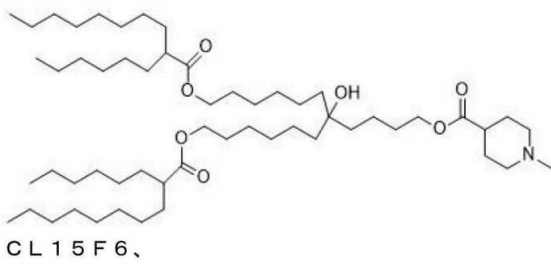
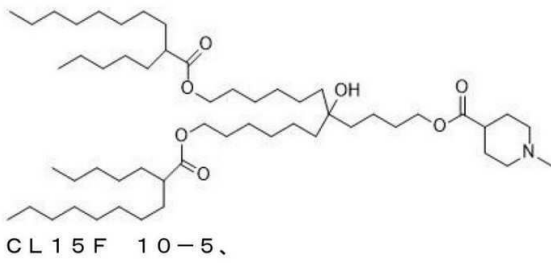
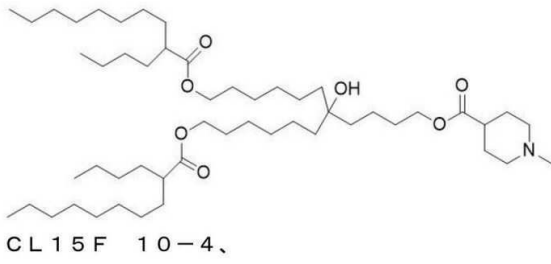
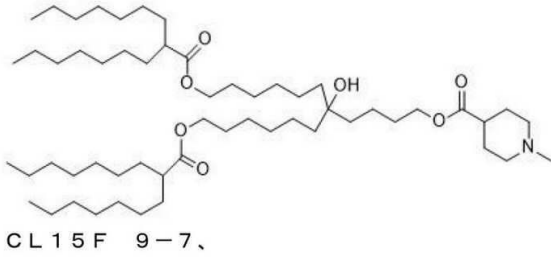
CL 15 F 9-3.



CL 15 F 9-5.

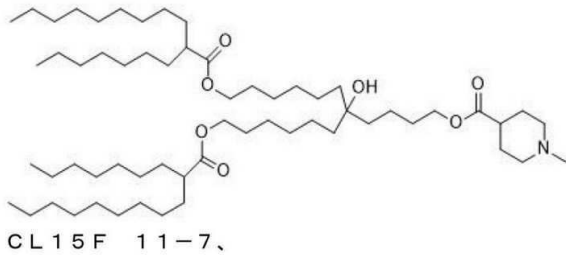
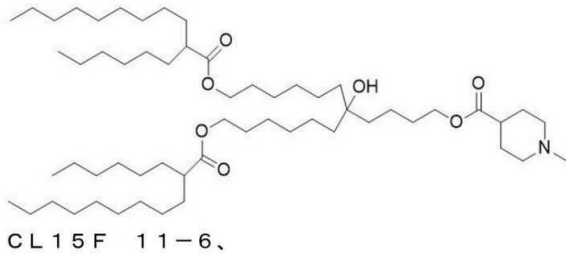
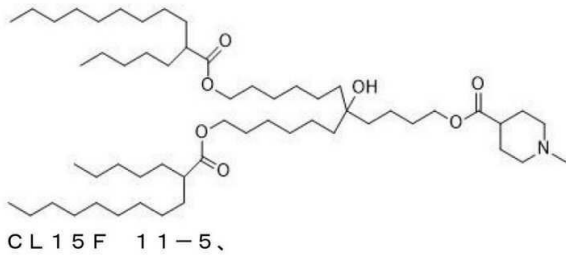
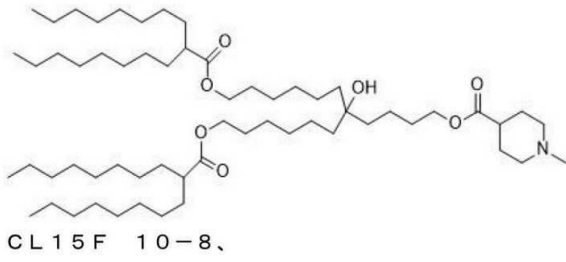
[0209]

[0210] [화학식. 28-9]



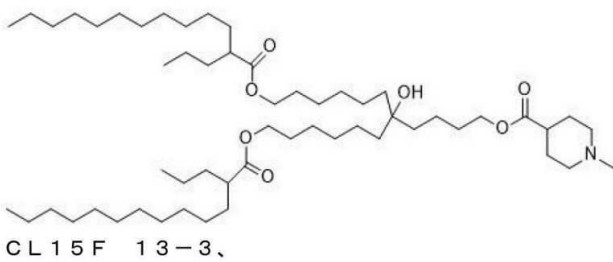
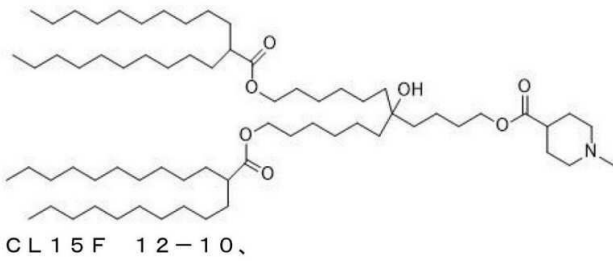
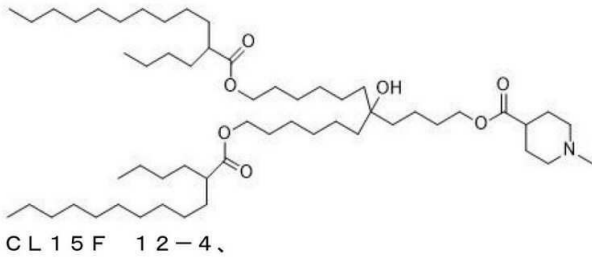
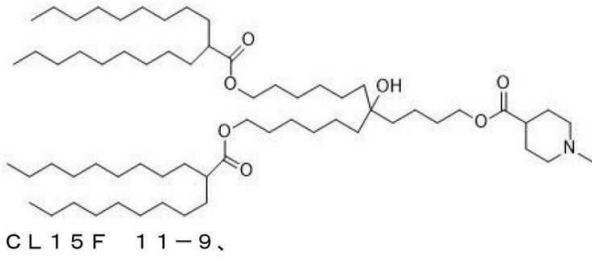
[0211]

[0212] [화학식. 28-10]



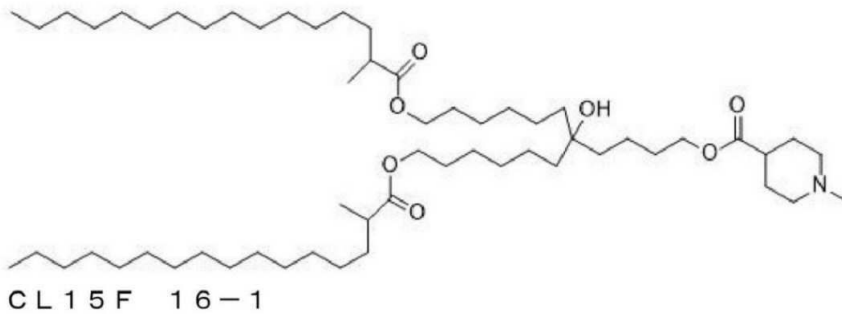
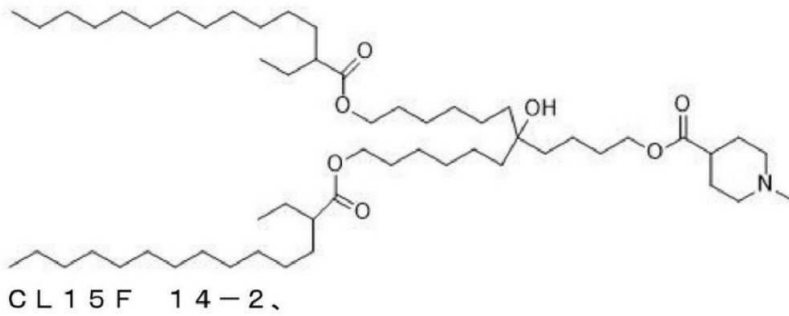
[0213]

[0214] [화학식. 28-11]



[0215]

[0216] [화학식. 28-12]



[0217]

[0218] 및 상기 제조 방법은 말론산 에스테르와 알킬 할라이드를 염기의 존재하에서 반응시켜 얻은 가지형 지방산을 얻은 반응액을 적어도 가수분해 처리 및 열처리하는 공정을 포함한다.

[0219] [6-7] 상기 말론산 에스테르가 디메틸 말로네이트인 것인 [6-6]의 제조 방법.

[0220] [6-8] 상기의 알킬 할라이드가 아이오도알킬(iodoalkyl)인 [6-6] 또는 [6-7]의 제조 방법.

[0221] [6-8] 상기 염기가 수소화나트륨소듐 (sodium hydride), 수소화 칼슘 (calcium hydride), 나트륨 소듐 에톡사이드 (sodium ethoxide) 및 비스(트리스메틸실릴)아미드리튬 ((bis(trimethylsilyl)amido lithium)) 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, [6-6] 내지 [6-8] 중 어느 하나의 제조 방법.

[0222] [6-10] 상기 가수분해 처리에서, 수산화나트륨 (sodium hydroxide), 수산화칼슘 (calcium hydroxide) 및 수산화리튬 (lithium hydroxide) 중 어느 하나가 사용되는, [6-6] 내지 [6-9] 중 어느 하나의 제조 방법.

[0223] [6-11] 상기 가열 처리를, 상기 가수분해 처리와 동시 및/또는 후에 120°C~170°C에서 행하는, [6-6]~[6-10] 중 어느 하나의 제조 방법.

[0224] [6-12] 역상 크로마토그래피에 의해 가지형 지방산을 정제하는 공정을 추가로 포함하는, [6-6] 내지 [6-11] 중 어느 하나의 제조 방법.

발명의 효과

[0225] 본 발명에 따른 지질 나노입자는 봉입된 유전자를 간 또는 비장 내에서 고발현시킬 수 있다. 따라서 지질 나노입자는 유전자 치료에 사용되는 간 특이적 유전자 전달 담체 또는 비장 특이적 유전자 전달 담체로서 유용하다. 또한, 본 발명에 따른 지질 나노입자는 안정성이 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0226] [도. 1] 도 1은 실시예1에 있어서, 각 R7 siRNA 탑재된 지질 나노입자의 pKa를 측정된 결과를 나타낸 도면이다. 도 1 (A)는 CL4F6, CL4G6 또는 CL4H6을 사용하여 제조된 지질 나노 입자의 결과이고, 도 1 (B)는 CL15F6, CL15G6 또는 CL15H6을 사용하여 제조된 지질 나노 입자의 결과를 보여준다.

[도. 2] 도 2는 실시예1에 있어서, 각 F7siRNA가 탑재된 지질 나노입자를 투여한 마우스의 상대적인 혈장 농도 중 F7 효소 활성(%)을 산출한 결과를 나타낸 도면이다. 도 2(A)는 CL4F6, CL4G6 또는 CL4H6을 사용하여 제조된 지질 나노입자를 투여한 마우스의 결과이고, 도 2(B)는 CL15F6, CL15G6 또는 CL15H6을 사용하여 제조된 지질 나노입자를 투여한 마우스의 결과를 보여준다.

[도. 3] 도 3은 실시예 2에 있어서, 각 NlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 간과 비장에 있어서의 Nluc 활성(RLU/mg protein)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

[도. 4] 도 4는 실시예 3에 있어서, 각 pFluc 탑재 지질 나노입자를 도입한 HeLa-GFP 세포의 Fluc 활성의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

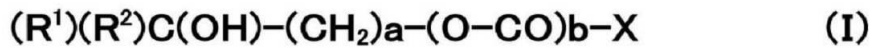
[도. 5] 도 5는 실시예 3에 있어서, 각 pFluc 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 간과 비장에 있어서의 Fluc 활성(RLU/mg protein)의 측정 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0227] 하기에 본 발명의 실시 예를 구체적으로 설명한다. 본원 명세서에 있어서, “X1~X2(X1과 X2는, X1<X2를 만족하는 실수)” 는, “X1 또는 그 이상 및 X2 또는 그 이하” 를 의미한다.

[0228] 본 발명에 따른 지질 나노입자는, 하기 일반식 (I)로 표시되는 pH-감수성 양이온성 지질(이하, “본 발명의 pH 감수성 양이온성 지질” 이라고 하는 경우가 있다)을 포함하는, 지질 나노 입자 이다. 지질 나노입자의 구성 지질로서, 일반식 (I)로 표시되는 pH 감수성 양이온성 지질을 구비함으로써, 본 발명에 따른 지질 나노입자는 간 또는 비장에 대한 선택성이 높다.

[0229] [화학식. 29]

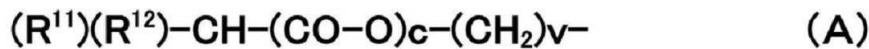


[0230] 일반식 (I)에 있어서, a는 3-5의 정수를 나타내지만, 바람직하게는 4이다.

[0232] b는 0 또는 1을 나타낸다. b가 0인 경우에는 -O-CO-기가 존재하지 않고, 단일결합임을 의미한다.

[0233] 일반식 (I)에 있어서, R¹ 및 R²는 각각 독립적으로 하기 일반식 (A)로 표시되는 기를 나타낸다. 일반식(A)에 있어서, R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로, 선형 또는 가지형의 C₂₋₁₅ 알킬기(탄소수 2-15의 알킬기)를 나타내고; c는 0 또는 1을 나타내고; v는 4 내지 12의 정수를 나타낸다.

[0234] [화학식. 30]



[0235] 선형 또는 가지형의 C₂₋₁₅알킬기로서는 다음을 포함한다:

[0237] n-에틸기;

[0238] n-프로필기, 1-메틸에틸기;

[0239] n-부틸기, 1-메틸프로필기, 2-메틸프로필기, 1,1-디메틸에틸기;

[0240] n-펜틸기, 1-메틸부틸기, 2-메틸부틸기, 3-메틸부틸기, 1-에틸프로필기, 1,1-디메틸프로필기, 2,2-디메틸프로필기;

[0241] n-헥실기, 1-메틸펜틸기, 2-메틸펜틸기, 3-메틸펜틸기, 4-메틸펜틸기, 1-에틸부틸기, 1,1-디메틸부틸기, 2,2-디메틸부틸기, 3,3-디메틸부틸기, 1,2-디메틸부틸기, 1-메틸-2,2-디메틸부틸기;

[0242] n-헵틸기, 1-메틸헥실기, 2-메틸헥실기, 3-메틸헥실기, 4-메틸헥실기, 5-메틸헥실기, 1-에틸펜틸기, 1,1-디메틸펜틸기, 2,2-디메틸펜틸기, 3,3-디메틸펜틸기, 4,4-디메틸펜틸기, 1-메틸-3,3-디메틸부틸기, 2-메틸-3,3-디메틸부틸기;

- [0243] n-옥틸기, 1-메틸헵틸기, 2-메틸헵틸기, 3-메틸헵틸기, 4-메틸헵틸기, 5-메틸헵틸기, 6-메틸헵틸기, 1-에틸헥실기, 1,1-디메틸헥실기, 2,2-디메틸헥실기, 3,3-디메틸헥실기, 4,4-디메틸헥실기, 5,5-디메틸헥실기, 1-메틸-4,4-디메틸펜틸기, 2-메틸-4,4-디메틸펜틸기, 3-메틸-4,4-디메틸펜틸기;
- [0244] n-노닐기, 1-메틸옥틸기, 2-메틸옥틸기, 3-메틸옥틸기, 4-메틸옥틸기, 5-메틸옥틸기, 6-메틸옥틸기, 7-메틸옥틸기, 1-에틸헵틸기; 1,1-디메틸헵틸기, 2,2-디메틸헵틸기, 3,3-디메틸헵틸기, 4,4-디메틸헵틸기, 5,5-디메틸헵틸기, 6,6-디메틸헵틸기, 1-메틸-5,5-디메틸헥실기, 2-메틸-5,5-디메틸헥실기, 3-메틸-5,5-디메틸헥실기, 4-메틸-5,5-디메틸헥실기;
- [0245] n-데실기, 1-메틸노닐기, 2-메틸노닐기, 3-메틸노닐기, 4-메틸노닐기, 5-메틸노닐기, 6-메틸노닐기, 7-메틸노닐기, 8-메틸노닐기, 1-에틸옥틸기, 1,1-디메틸옥틸기, 2,2-디메틸옥틸기, 3,3-디메틸옥틸기, 4,4-디메틸옥틸기, 5,5-디메틸옥틸기, 6,6-디메틸옥틸기, 7,7-디메틸옥틸기, 1-메틸-6,6-디메틸헵틸기, 2-메틸-6,6-디메틸헵틸기, 3-메틸-6,6-디메틸헵틸기, 4-메틸-6,6-디메틸헵틸기, 5-메틸-6,6-디메틸헵틸 그룹;
- [0246] n-운데실기, 1-메틸데실기, 2-메틸데실기, 3-메틸데실기, 4-메틸데실기, 5-메틸데실기, 6-메틸데실기, 7-메틸데실기, 8-메틸데실기, 9-메틸데실기, 1-에틸노닐기, 1,1-디메틸노닐기, 2,2-디메틸노닐기, 3,3-디메틸노닐기, 4,4-디메틸노닐기, 5,5-디메틸노닐기, 6,6-디메틸노닐기, 7,7-디메틸노닐기, 8,8-디메틸노닐기, 1-메틸-7,7-디메틸옥틸기, 2-메틸-7,7-디메틸옥틸기, 3-메틸-7,7-디메틸옥틸기, 4-메틸-7,7-디메틸옥틸기, 5-메틸-7,7-디메틸옥틸기, 6-메틸-7,7-디메틸옥틸기;
- [0247] n-도데실기, 1-메틸운데실기, 2-메틸운데실기, 3-메틸운데실기, 4-메틸운데실기, 5-메틸운데실기, 6-메틸운데실기, 7-메틸운데실기, 8-메틸운데실기, 9-메틸운데실기, 10-메틸운데실기, 1-에틸데실기, 1,1-디메틸데실기, 2,2-디메틸데실기, 3,3-디메틸데실기, 4,4-디메틸데실기, 5,5-디메틸데실기, 6,6-디메틸데실기, 7,7-디메틸데실기, 8,8-디메틸데실기, 9,9-디메틸데실기, 1-메틸-8,8-디메틸노닐기, 2-메틸-8,8-디메틸노닐기, 3-메틸-8,8-디메틸노닐기, 4-메틸-8,8-디메틸노닐기, 5-메틸-8,8-디메틸노닐기, 6-메틸-8,8-디메틸노닐기, 7-메틸-8,8-디메틸노닐기;
- [0248] n-트리데실기, 1-메틸도데실기, 2-메틸도데실기, 3-메틸도데실기, 4-메틸도데실기, 5-메틸도데실기, 6-메틸도데실기, 7-메틸도데실기, 8-메틸도데실기, 9-메틸도데실기, 10-메틸도데실기, 11-메틸도데실기, 1-에틸운데실기, 1,1-디메틸운데실기, 2,2-디메틸운데실기, 3,3-디메틸운데실기, 4,4-디메틸운데실기, 5,5-디메틸운데실기, 6,6-디메틸운데실기, 7,7-디메틸운데실기, 8,8-디메틸운데실기, 9,9-디메틸운데실기, 10,10-디메틸운데실기, 1-메틸-9,9-디메틸데실기, 2-메틸-9,9-디메틸데실기, 3-메틸-9,9-디메틸데실기, 4-메틸-9,9-디메틸데실기, 5-메틸-9,9-디메틸데실기, 6-메틸-9,9-디메틸데실기, 7-메틸-9,9-디메틸데실기, 8-메틸-9,9-디메틸데실기;
- [0249] n-테트라데실기, 1-메틸트리데실기, 2-메틸트리데실기, 3-메틸트리데실기, 4-메틸트리데실기, 5-메틸트리데실기, 6-메틸트리데실기, 7-메틸트리데실기, 8-메틸트리데실기, 9-메틸트리데실기, 10-메틸트리데실기, 11-메틸트리데실기, 12-메틸트리데실기, 1-에틸도데실기, 1,1-디메틸도데실기, 2,2-디메틸도데실기, 3,3-디메틸도데실기, 4,4-디메틸도데실기, 5,5-디메틸도데실기, 6,6-디메틸도데실기, 7,7-디메틸도데실기, 8,8-디메틸도데실기, 9,9-디메틸도데실기, 10,10-디메틸도데실기, 11,11-디메틸도데실기, 1-메틸-10,10-디메틸운데실기, 2-메틸-10,10-디메틸운데실기, 3-메틸-10,10-디메틸운데실기, 4-메틸-10,10-디메틸운데실기, 5-메틸-10,10-디메틸운데실기, 6-메틸-10,10-디메틸운데실기, 7-메틸-10,10-디메틸운데실기, 8-메틸-10,10-디메틸운데실기, 9-메틸-10,10-디메틸운데실기;
- [0250] n-펜타데실기, 1-메틸테트라데실기, 2-메틸테트라데실기, 3-메틸테트라데실기, 4-메틸테트라데실기, 5-메틸테트라데실기, 6-메틸테트라데실기, 7-메틸테트라데실기, 8-메틸테트라데실기, 9-메틸테트라데실기, 10-메틸테트라데실기, 11-메틸테트라데실기, 12-메틸테트라데실기, 13-메틸테트라데실기, 1-에틸트리데실기, 1,1-디메틸트리데실기, 2,2-디메틸트리데실기, 3,3-디메틸트리데실기, 4,4-디메틸트리데실기, 5,5-디메틸트리데실기, 6,6-디메틸트리데실기, 7,7-디메틸트리데실기, 8,8-디메틸트리데실기, 9,9-디메틸트리데실기, 10,10-디메틸트리데실기, 11,11-디메틸트리데실기, 12,12-디메틸트리데실기, 1-메틸-11,11-디메틸도데실기, 2-메틸-11,11-디메틸도데실기, 3-메틸-11,11-디메틸도데실기, 4-메틸-11,11-디메틸도데실기, 5-메틸-11,11-디메틸도데실기, 6-메틸-11,11-디메틸도데실기, 7-메틸-11,11-디메틸도데실기, 8-메틸-11,11-디메틸도데실기, 9-메틸-11,11-디메틸도데실기, 10-메틸-11,11-디메틸도데실기 등
- [0251] 일반식 (A)에 있어서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로, 선형 또는 가지형의 C_{2-12} 알킬기(탄소수 2~12의 알킬기)인

것이 바람직하고, 선형 또는 가지형의 C₂₋₁₅알킬기(탄소수 5~12의 알킬기)인 것이 보다 바람직하고, 선형 또는 가지형의 C₅₋₁₀알킬기(탄소수 5~10의 알킬기)로 존재하는 것이 더욱 바람직하고, 선형 또는 가지형의 C₆₋₉ 알킬기(탄소수 6 내지 9의 알킬기)인 것이 가장 바람직하다. 또한, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질에 있어서, R¹ 및 R²는, 일반식(A)으로 표시되는 기이면 되고, 서로 동일한 기여도 되고, 다른 기여도 된다.

[0252] 일반식 (I)에 있어서, X는 하기 일반식 (B)로 표시되는 기 또는 5- 내지 7-원 비방향족 헤테로환기를 나타낸다. X가 나타내는 5- 내지 7-원 비방향족 헤테로환기는 탄소 원자에 의해 (O-CO)_b-에 결합한다.

[0253] [화학식. 31]



[0254]

[0255] 일반식 (B) 중, d는 0-3의 정수를 나타낸다. d가 0인 경우에는 -(CH₂)-기가 존재하지 않고, 단일결합임을 의미한다.

[0256] 일반식(B) 중, R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄알킬기(탄소수 1~4의 알킬기) 또는 C₂₋₄알케닐기(탄소수 1~4의 알케닐기)를 나타낸다. R³ 및 R⁴가 나타내는 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기는, 1개 또는 2개의 수소 원자가 페닐기로 치환되어 있어도 된다. R³ 및 R⁴는 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기일 수 있고, 및 서로 동일한 기일 수 있고, 또는 상이한 기일 수 있다.

[0257] C₁₋₄알킬기는, 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기를 포함한다. C₂₋₄알케닐기로서는, 비닐기, 1-프로페닐기, 2-프로페닐기, 1-메틸비닐기, 2-메틸-1-프로페닐기, 1-부테닐기, 2-부테닐기, 3-부테닐기를 포함한다.

[0258] 일반식(B) 중, R³ 및 R⁴는 서로 결합하여 5- 내지 7-원 비방향족 헤테로환을 형성하고 있어도 된다. R³ 및 R⁴가 서로 결합하여 형성되는 5- 내지 7-원 비방향족 헤테로환으로서, 예를 들면 1-피롤리디닐기, 1-피페리디닐기, 1-모르폴리닐기 및 1-피페라지닐기가 포함된다. R³ 및 R⁴가 서로 결합하여 형성되는 5- 내지 7-원 비방향족 헤테로환은, 환 중의 1개 또는 2개의 수소 원자가 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기로 치환될 수 있다. 상기 고리 중의 2개의 수소 원자가 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기로 치환되어 있는 경우, 서로 같은 기로 치환되거나 또는 서로 다른 기로 치환될 수 있다.

[0259] 일반식(I)에 있어서, X가 5- 내지 7-원 비방향족 헤테로환기인 경우, 상기 헤테로환기에 포함되는 헤테로 원자로서는, 질소 원자, 산소 원자, 또는 황 원자 등을 포함한다. 상기 헤테로환기 중의 헤테로환을 구성하는 헤테로원자는 1개 일 수도 있고, 동일 또는 상이한 헤테로원자가 2개 이상일 수도 있다. 헤테로환기의 헤테로 고리는 포화된 헤테로 고리 일 수 있고, 1개 또는 2개 이상의 이중 결합을 포함 할 수 있지만, 헤테로 고리는 방향족 고리가 되지 않는다.

[0260] 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질은 하기의 화합물이 바람직하다:

[0261] 일반식(I)에서, R¹ 및 R² 는 각각 독립적으로 다음과 같은 기이다:

[0262] 일반식(A) 중, R¹¹ 및 R¹² 가 각각 독립적으로 선형 또는 가지 형태의 C₂₋₁₂알킬기이고, c가 1이고, v가 6-10의 정수인 기이고,

[0263] a는 3-5의 정수이고, b가 1이고, 및 X는 5- 내지 7-원자(membered) 비방향족 헤테로환기(헤테로환기에서 탄소원자에 의해 (O-CO)_b-에 결합됨)이 되, 바람직하게는 1-피롤리디닐기, 1-피페리디닐기, 1-모르폴리닐기 또는 1-피페라지닐기(고리의 탄소원자에 의해 (O-CO)_b-에 결합되고, 및 하나의 수소 원자는 C₁₋₄알킬기 또는 C₂₋₄알케닐기로 치환될 수 있음)이다;

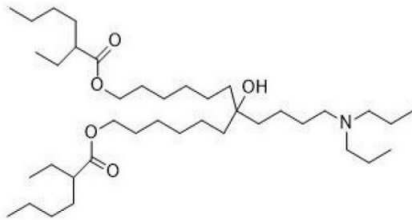
- [0264] 또는 다음과 같은 화합물로:
- [0265] 일반식(I)에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적인 기이고 여기서:
- [0266] 일반식(A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 선형 또는 가지형 C_{2-12} 알킬기이고, c 는 1, v 는 6-10의 정수이고;
- [0267] a 는 3-5의 정수이고, b 는 0, 및 X 는 다음과 같은 기이다:
- [0268] 일반식(B)에 있어서, d 는 0, R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기(R^3 및 R^4 가 나타내는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기 중, 1개 또는 2개의 수소 원자는 페닐기(들)로 치환될수 있음). 추가로, 그들은 바람직하게는 다음과 같은 화합물이다:
- [0269] 일반식(I)에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적인 기이고 여기서:
- [0270] 일반식(A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 선형 또는 가지형 C_{5-12} 알킬기이고, c 는 1, v 는 6-10의 정수이고;
- [0271] a 는 3-5의 정수이고, b 는 1이고, 및 X 는 5- 내지 7-원자 비방향족 헤테로환기(헤테로환기에서 탄소 원자에 의해 (O-CO) b -에 결합됨), 바람직하게는 1-피롤리디닐기, 1-피페리디닐기, 1-모르폴리닐기 또는 1-피페라지닐기(고리의 탄소 원자에 의해 (O-CO) b -에 결합되고, 및 하나의 수소 원자는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기로 치환될 수 있음)이다;
- [0272] 또는 다음과 같은 화합물로:
- [0273] 일반식 (I)에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 다음과 같은 기이다:
- [0274] 일반식 (A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 선형 또는 가지형 C_{5-12} 알킬기이고, c 는 1이고, v 는 6-10의 정수이고;
- [0275] a 는 3-5의 정수이고, b 는 0이고, X 는 다음과 같은 기이다:
- [0276] 일반식(B)에 있어서, d 는 0이고, R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기(R^3 및 R^4 가 나타내는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기 중, 1개 또는 2개의 수소 원자는 페닐기로 치환될 수 있음). 특히, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질은 바람직하게는 다음과 같은 화합물이다:
- [0277] 일반식 (I)에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 다음과 같은 기이다:
- [0278] 일반식 (A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 선형 또는 가지형 C_{6-9} 알킬기이고, c 는 1이고, v 는 6-10의 정수이고; 그리고
- [0279] a 는 3-5의 정수이고, b 는 1이며, 및 X 는 1-피롤리디닐기, 1-피페리디닐기, 1-모르폴리닐기 또는 1-피페라지닐기(고리에서 탄소 원자에 의해 (O-CO) b -에 결합되어 있고 1개의 수소 원자는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기로 치환될 수 있음)이다;
- [0280] 또는 다음과 같은 화합물로:
- [0281] 일반식 (I)에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 다음과 같은 기이다:
- [0282] 일반식 (A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 선형 또는 가지형 C_{6-9} 알킬기이고, c 는 1이고, v 는 6-10의 정수이고; 그리고
- [0283] a 는 3-5의 정수이고, b 는 0이고, 및 X 는 다음과 같은 기이다:
- [0284] 일반식(B)에서 d 는 0이고, R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬기이다.
- [0285] 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질은 보다 바람직하게는 다음과 같은 화합물이다:

- [0286] 일반식 (I)에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 다음과 같은 기이다:
- [0287] 일반식 (A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 직쇄 C_{6-9} 알킬기이고, c 는 1이고, v 는 6-10의 정수이고; 및
- [0288] a 는 3-5의 정수이고, b 는 1이고, X 는 1-피롤리디닐기, 1-피페리디닐기, 1-모르폴리닐기 또는 1-피페라지닐기(고리의 탄소 원자에 의해 (O-CO) b -에 결합되고, 하나의 수소 원자는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기로 치환될 수 있음)이다; 및
- [0289] 화합물은 여기서:
- [0290] 일반식 (I)에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 다음과 같은 기이다:
- [0291] 일반식 (A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 가지형 체인 C_{6-9} 알킬기이고, c 는 1이고, v 는 6-10의 정수이고;
- [0292] a 는 3-5의 정수이고, b 는 1이고, 및 X 는 1-피롤리디닐기, 1-피페리디닐기, 1-모르폴리닐기 또는 1-피페라지닐기(고리의 탄소 원자에 의해 (O-CO) b -에 결합되고, 하나의 수소 원자는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기로 치환될 수 있음)이다;
- [0293] 화합물은 여기서:
- [0294] 일반식 (I)에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 다음과 같은 기이다:
- [0295] 일반식 (A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 직쇄 C_{6-9} 알킬기이고, c 는 1이고, v 는 6-10의 정수이고; 및
- [0296] a 는 3-5의 정수이고, b 는 0이고, 및 X 는 다음과 같은 기이다:
- [0297] 일반식 (B)에서, d 는 0이고, R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬기이다;
- [0298] 화합물은 여기서:
- [0299] 일반식(I)에서, R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 다음과 같은 기이다:
- [0300] 일반식(A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 가지형 체인 C_{6-9} 알킬기이고, c 는 1이고, v 는 6-10의 정수이고, 및
- [0301] a 는 3-5의 정수, b 는 0, 및 X 는 다음과 같은 기이다:
- [0302] 일반식(B)에서, d 는 0이고, R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬기이다.
- [0303] 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질은 특히 바람직하게는, 하기의 화합물이다:
- [0304] 일반식 (I)에서, R^1 및 R^2 는 동일한 기이며 다음의 기이다:
- [0305] 일반식 (A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 직쇄 C_{6-9} 알킬기이고, c 는 1이고, v 는 6-10의 정수이고; 및
- [0306] a 는 3-5의 정수이고, b 는 1이며, 및 X 는 1-피롤리디닐기, 1-피페리디닐기, 1-모르폴리닐기 또는 1-피페라지닐기(탄소 원자에 의해 (O-CO) b -에 결합되어 있고, 고리에서 1개의 수소 원자는 C_{1-4} 알킬기 또는 C_{2-4} 알케닐기로 치환될 수 있음)이다;
- [0307] 또는 하기의 화합물이다:
- [0308] 일반식 (I)에서, R^1 및 R^2 는 동일한 기이며 하기의 기이다:
- [0309] 일반식 (A)에서, R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 가지형-체인 C_{6-9} 알킬기이고, c 는 1이고, v 는 6-10의 정수이고; 및
- [0310] a 는 3-5의 정수이고, b 는 1이며, 및 X 는 1-피롤리디닐기, 1-피페리디닐기, 1-모르폴리닐기 또는 1-피페라지닐기

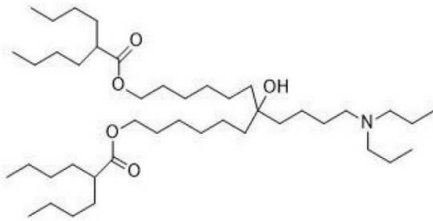
(탄소 원자에 의해 (O-CO)b-에 결합되어 있고, 고리에서 1개의 수소 원자는 C₁₋₄ 알킬기 또는 C₂₋₄ 알케닐기로 치환될 수 있음)이고;

- [0311] 또는 하기의 화합물이다:
- [0312] 일반식 (I)에서, R¹ 및 R²는 동일한 기 및 하기의 기이다:
- [0313] 일반식 (A)에서, R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로 직쇄 C₆₋₉알킬기이고, c는 1이고, v는 6-10의 정수이고; 그리고
및
- [0314] a는 3-5의 정수이고, b는 0이고, 및 X는 다음과 같은 그룹이다:
- [0315] 일반식(B)에서 d는 0이고, R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄ 알킬기이라고;
- [0316] 또는 하기의 화합물이다:
- [0317] 일반식 (I)에서, R¹ 및 R²는 동일한 기 및 기이고 여기서 기는:
- [0318] 일반식 (A)에서, R¹¹ 및 R¹²는 각각 독립적으로 가지형-체인 C₆₋₉ 알킬기이고, c는 1이고, v는 6-10의 정수이고;
그리고 및
- [0319] a는 3-5의 정수이고, b는 0이고, 및 X는 다음과 같은 그룹이다:
- [0320] 일반식(B)에서 d는 0이고, R³ 및 R⁴는 각각 독립적으로 C₁₋₄ 알킬기이다.
- [0321] 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질은, 예를 들어, 하기의 구조, 그들의 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물을 갖는 pH-감수성 양이온성 지질이다.

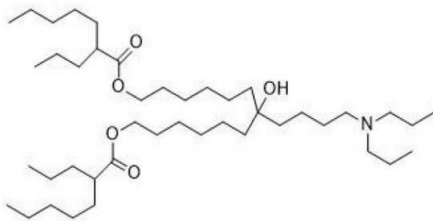
[0322] [화학식. 32-1]



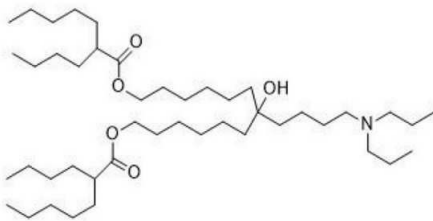
CL 4 F 6-2、



CL 4 F 6-4、



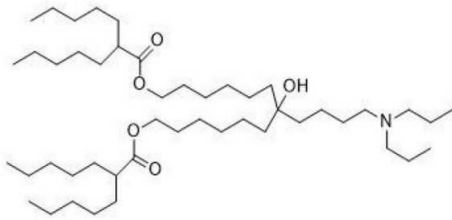
CL 4 F 7-3、



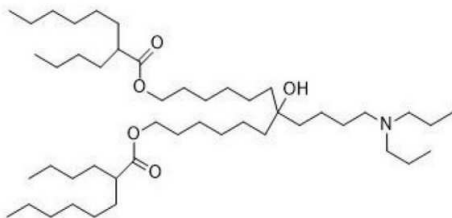
CL 4 F 7-4、

[0323]

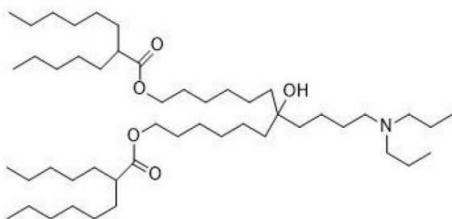
[0324] [화학식. 32-2]



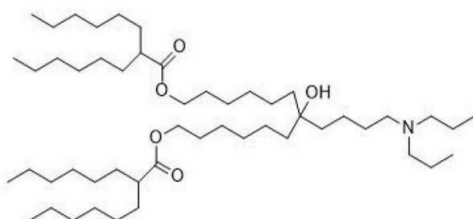
CL 4 F 7-5,



CL 4 F 8-4,



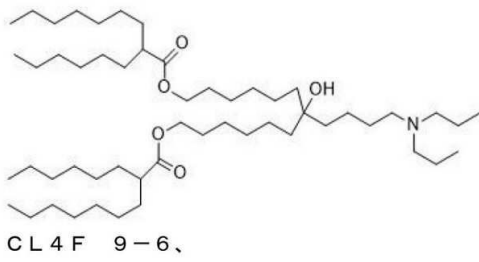
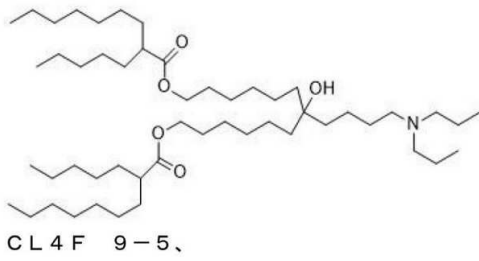
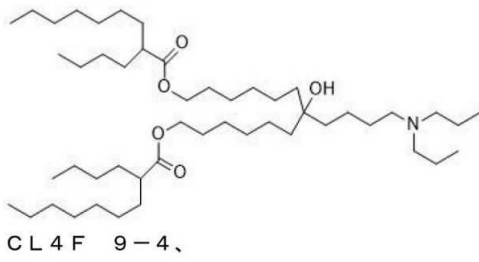
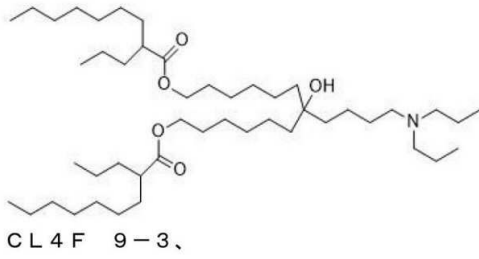
CL 4 F 8-5,



CL 4 F 8-6,

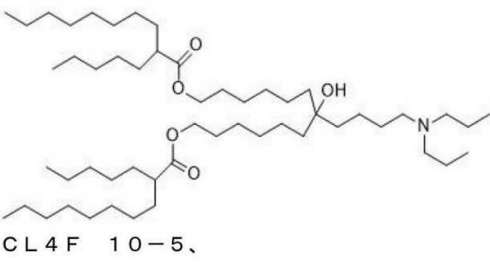
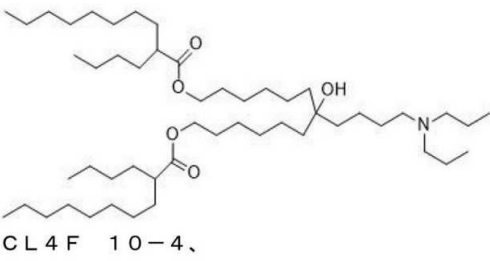
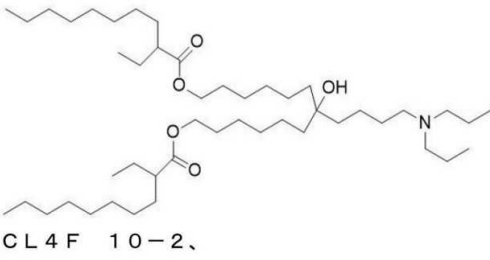
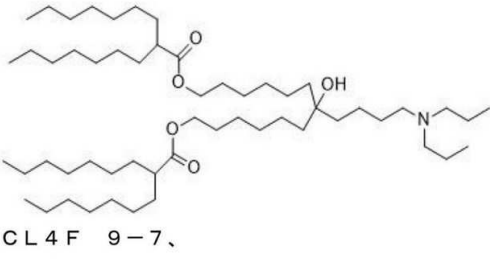
[0325]

[0326] [화학식. 32-3]



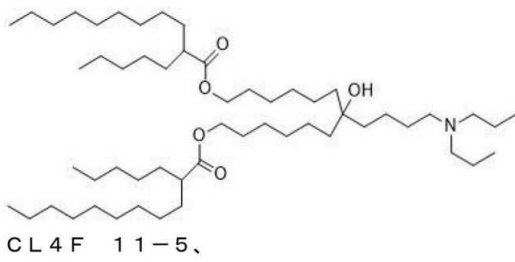
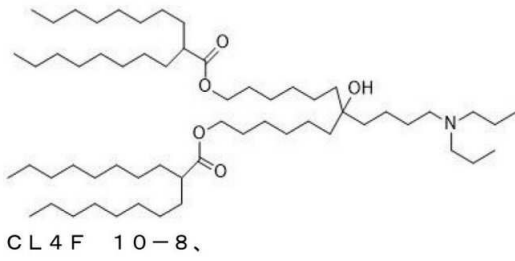
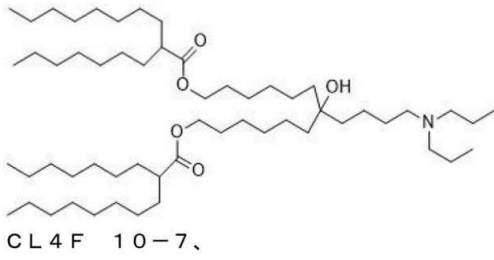
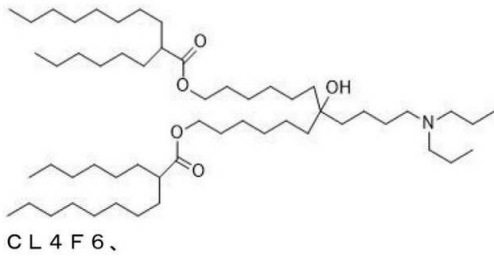
[0327]

[0328] [화학식. 32-4]



[0329]

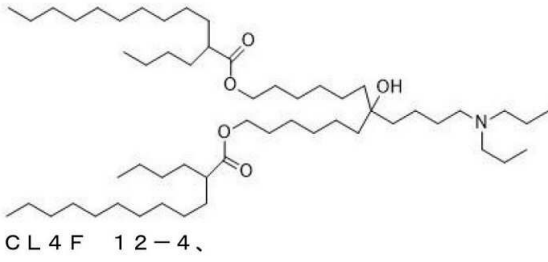
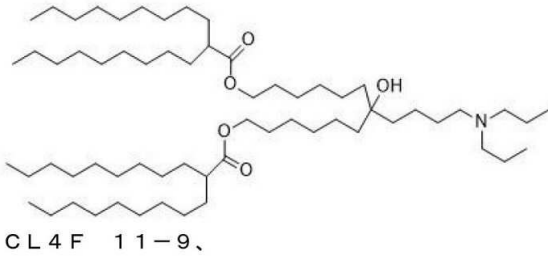
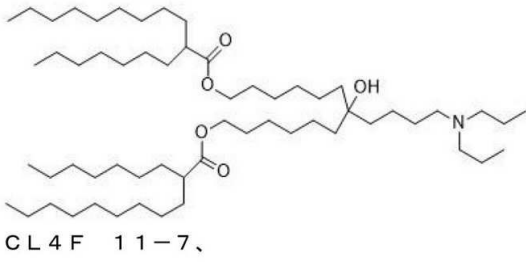
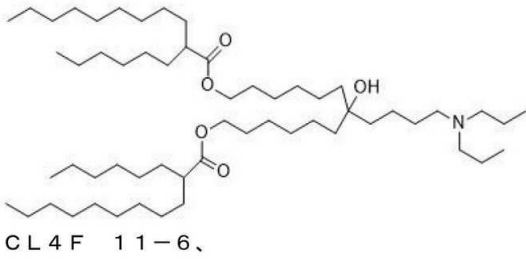
[0330] [화학식. 32-5]



[0331]

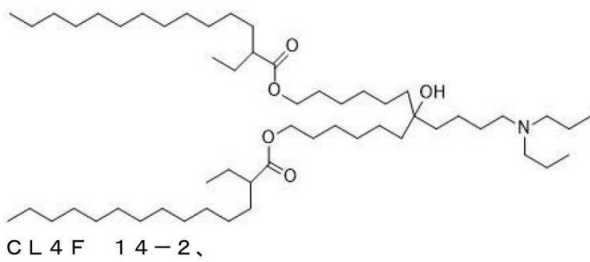
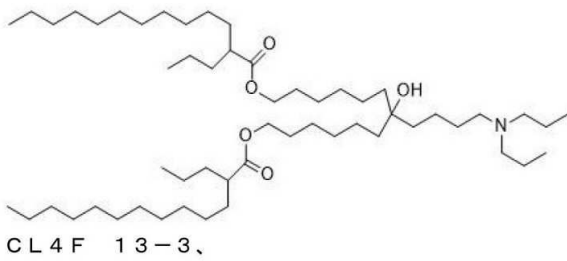
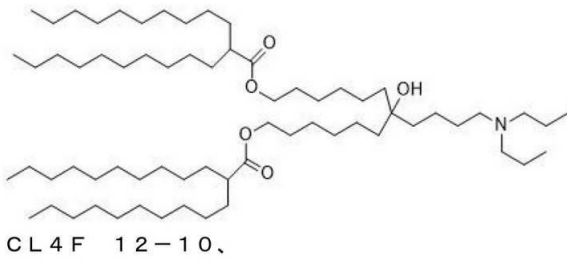
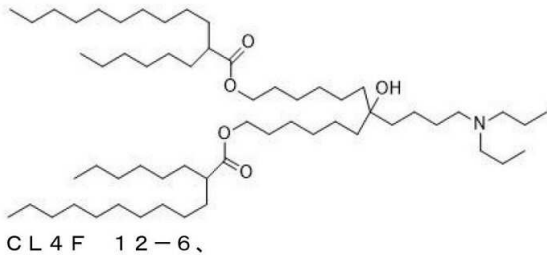
[0332]

[화학식. 32-6]



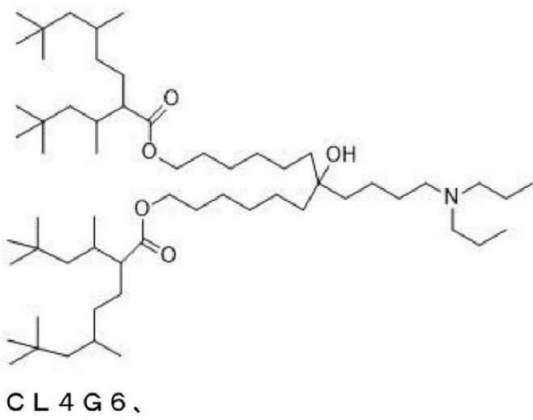
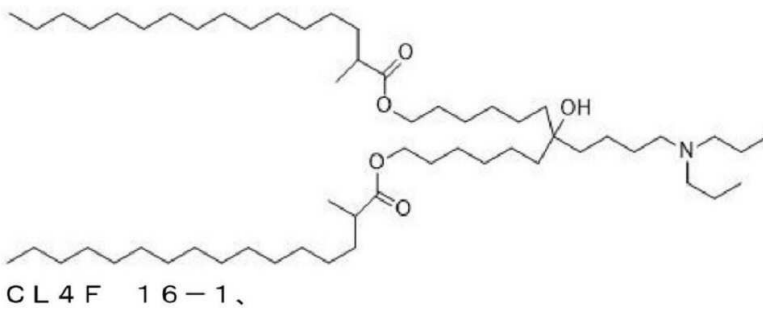
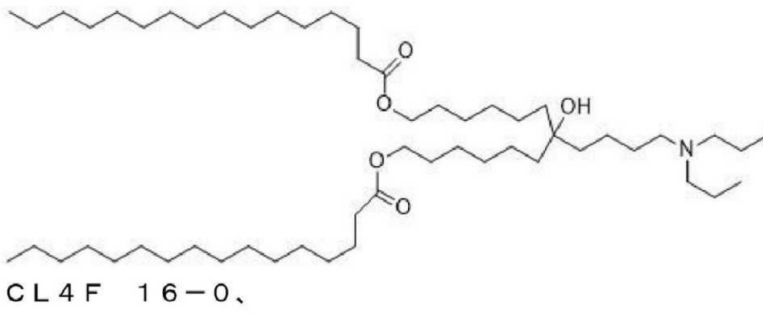
[0333]

[0334] [화학식. 32-7]



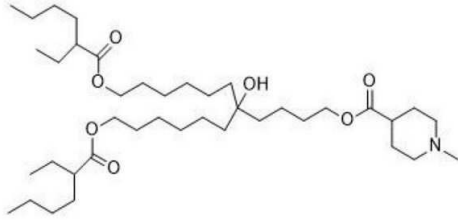
[0335]

[0336] [화학식. 32-8]

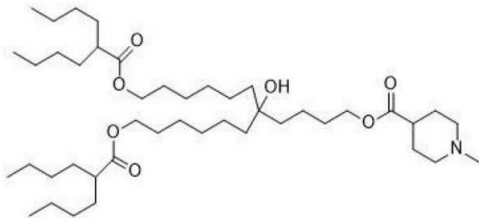


[0337]

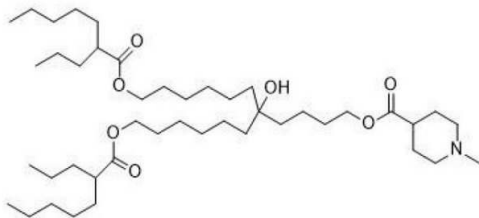
[0338] [화학식. 32-9]



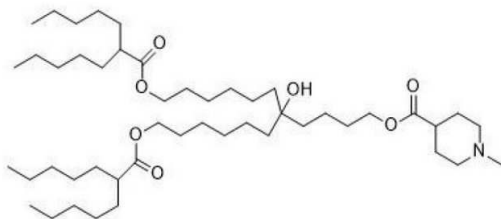
CL 15 F 6-2、



CL 15 F 6-4、



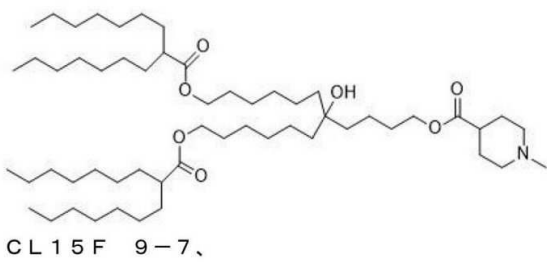
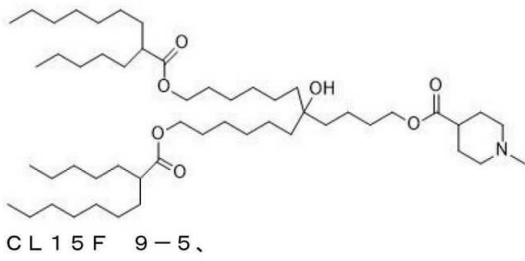
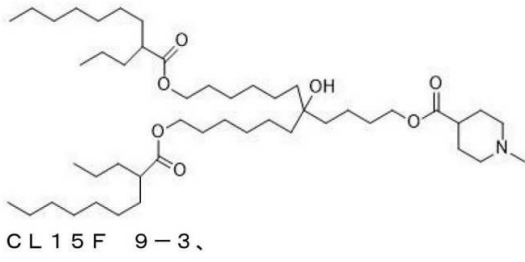
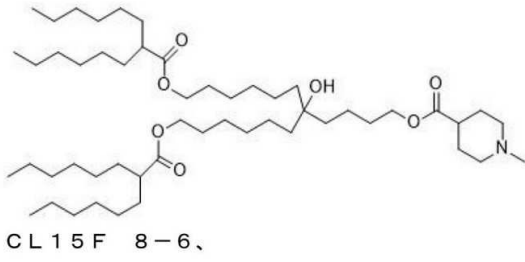
CL 15 F 7-3、



CL 15 F 7-5、

[0339]

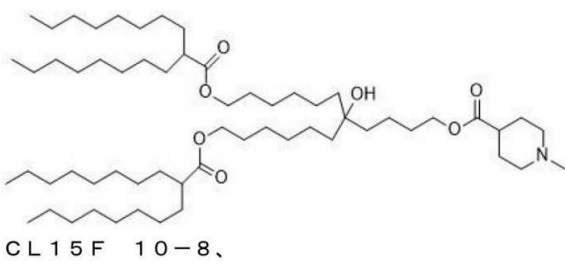
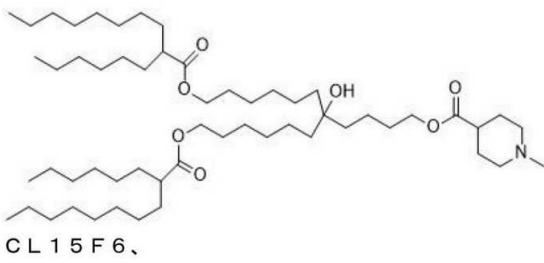
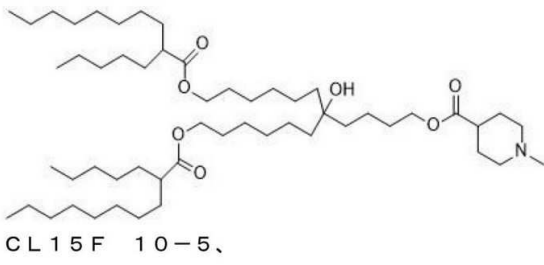
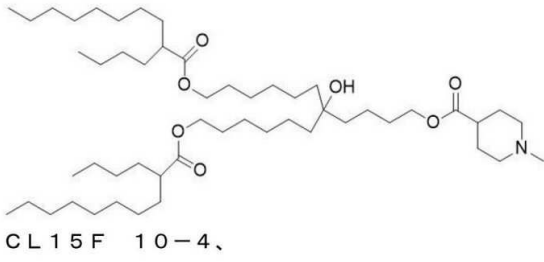
[0340] [화학식. 32-10]



[0341]

[0342]

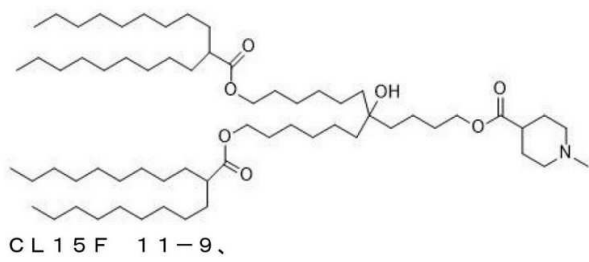
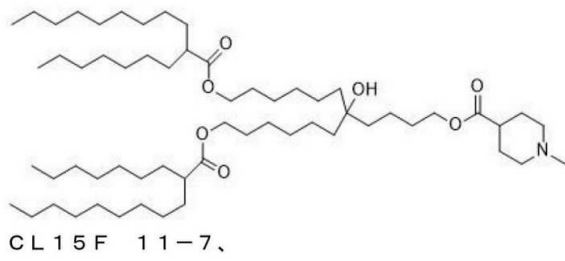
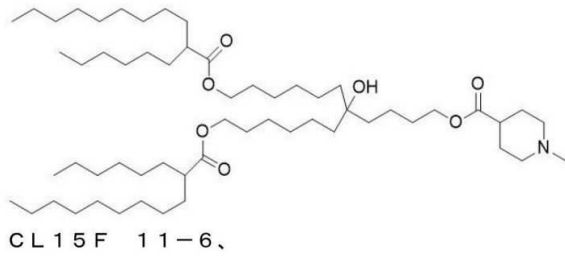
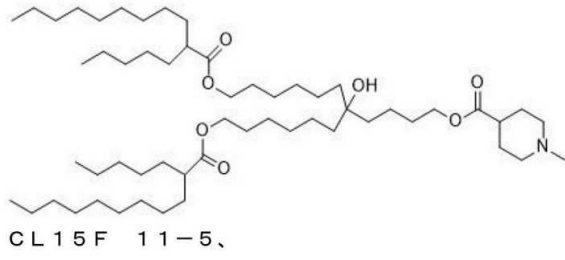
[화학식. 32-11]



[0343]

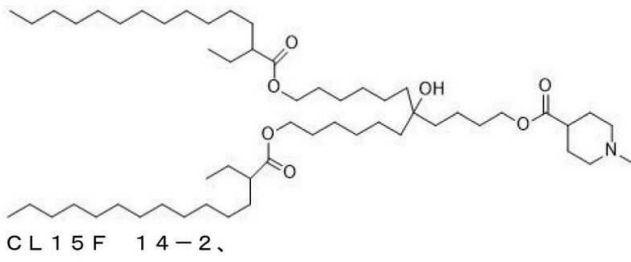
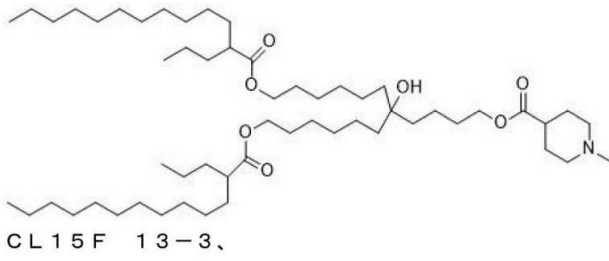
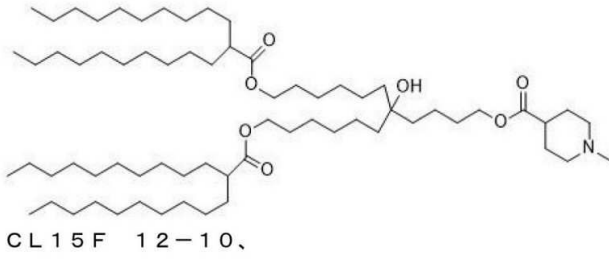
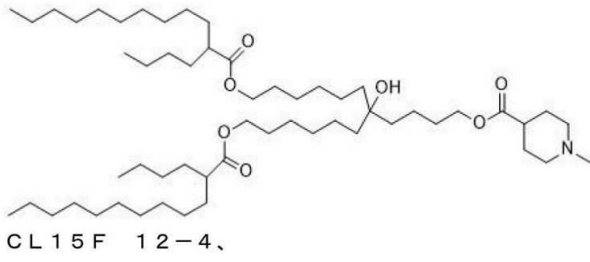
[0344]

[화학식. 32-12]



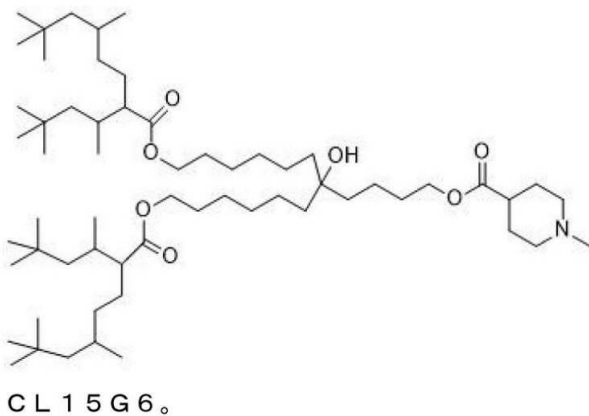
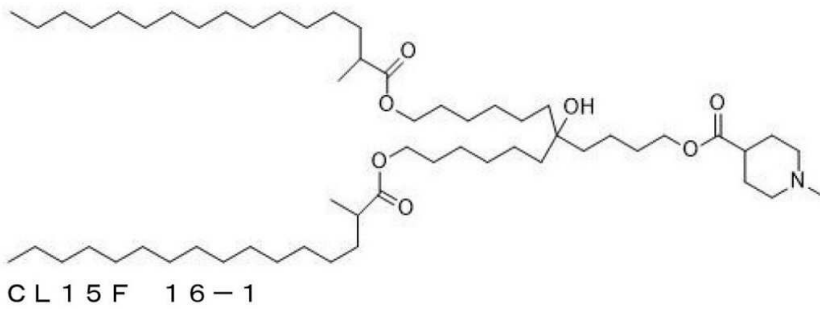
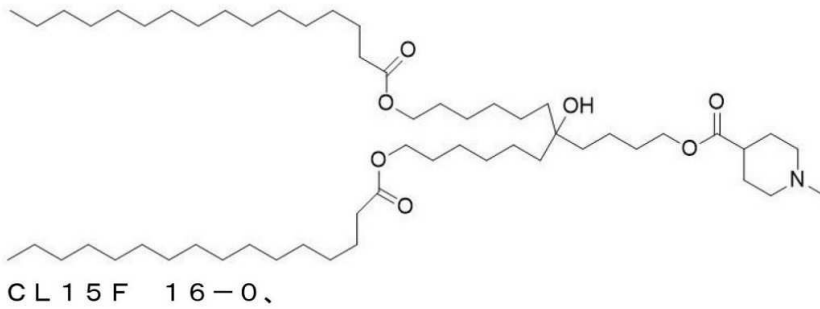
[0345]

[0346] [화학식. 32-13]



[0347]

[0348] [화학식. 32-14]



[0349]
 [0350] 본 발명은, 한 관점에서, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질에 관련된다.

[0351] 일반식(I)로 표시되는 pH-감수성 양이온성 지질의 pKa는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 4.0 내지 9.0 정도, 바람직하게는 대략 4.5 내지 8.5 범위로 선택할 수 있고, 이 범위의 pKa를 제공하도록 각 치환기의 종류를 선택하는 것이 바람직하다.

[0352] 일반식(I)로 표시되는 pH-감수성 양이온성 지질은, 예를 들면, 본 명세서의 실시예에 구체적으로 나타낸 방법에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 이 제조 방법을 참조하여, 원료 화합물, 시약, 반응 조건 등을 적절히 선택함으로써, 당업자는 일반식 (I)의 범위에 포함되는 임의의 지질을 용이하게 제조할 수 있다.

[0353] 일반식 (A)로 표시되는 기는 -CO-O-기에 2 개의 탄화수소쇄(R11 및 R12)가 연결된 가지형 구조를 갖는 기이다. 즉, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질에서는, 2개의 가지형의 탄화수소쇄(R1 및 R2)를 구비하고 있고, 이들 탄화수소쇄는, 지질 나노 입자의 지질막 안에 매립되는 소수성 스캐폴드가 된다. 본 발명에 따른 지질 나노입자는, 지질의 구성 성분으로써, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질을 가지형 체인 구조로 구성된 소수성 스캐폴드

드를 형성함으로써, 간 또는 비장에의 선택성이 높다는 특징이 있다.

- [0354] 본 발명에 따른 지질 나노입자를 구성하는 본 발명의 pH 감수성 양이온성 지질은, 1종류만 일수도 있고, 또는 2종류 이상 일수도 있다. 본 발명에 따른 지질 나노입자를 구성하는 pH-감수성 양이온성 지질이 2종류 이상인 경우, pH-감수성 양이온성 지질의 양은, 지질 나노입자를 구성하는 지질 분자 중, pH-감수성 양이온성 지질에 해당하는 지질 분자의 함계량을 의미한다.
- [0355] 지질 나노 입자를 구성하는 지질 분자에서 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질의 비율이 많을수록, 표적 세포로의 지질 나노입자의 흡수 효율이 높아진다. 그러므로, 본 발명에 따른 지질 나노 입자에 있어서, 지질 나노 입자를 구성하는 전체 지질 질량에 대한 pH-감수성 양이온성 지질의 양의 비율($[\text{본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질의 양(mol)}] / ([\text{지질 나노입자를 구성하는 전체 지질의 양(mol)}]) \times 100\%$)은 20몰% 또는 그 이상인 것이 바람직하다. 한편, 지질 나노입자를 구성하는 지질 분자에 차지하는 pH-감수성 양이온성 지질의 비율이 지나치게 크면, 입자 직경을 충분히 작게 하는 것이 곤란한 경우가 있다. 표적 세포로의 지질 나노 입자의 흡수 효율이 충분하고, 및 입자 직경이 충분히 작은 지질 나노 입자를 얻을 수 있기 때문에, 본 발명에 따른 지질 나노 입자에 있어서, 지질 나노 입자를 구성하는 총 지질 질량에 대한 pH-감수성 양이온성 지질의 양의 비율은 30몰% 또는 그 이상인 것이 보다 바람직하고, 추가로 바람직하게 30~70몰% 및 더욱 추가로 바람직하게는, 40~60몰%이다.
- [0356] 본 발명에 따른 지질 나노입자의 구성 지질 중에서, 리포솜을 형성할 때에 일반적으로 사용되는 지질이 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질 이외의 지질로서, 일반적으로 사용될 수 있다. 이러한 지질의 예는 인지질, 스테롤 또는 스테롤 유도체, 당지질, 포화 또는 불포화 지방산 등을 포함한다. 이들은 1종 또는 2종 이상을 조합하여 사용될 수 있다.
- [0357] 인지질로서는 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜에탄올아민, 포스포틸콜린, 카르디옉린, 플라스말로젠, 세라미드 포스포틸글리세롤 포스페이트, 포스파티딘산과 같은 글리세로포스포리피드 ; 스펅고마이엘린, 세라미드 포스포틸글리세롤, 세라미드 포스포틸 에탄올아민 스펅고인지질; 등이 포함될 수 있다. 또한, 난황 레시틴 및 대두 레시틴 등과 같은 천연물 유래의 인지질을 사용할 수도 있다. 글리세로 인지질 및 스펅고인지질의 지방산 잔기는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 탄소수 12~24의 포화 또는 불포화 지방산 잔기를 들 수 있고, 탄소수 14~20의 포화 또는 불포화 지방산 잔기가 바람직하다. 구체적으로는, 라우르산, 미리스트산, 팔미틴산, 팔미트레인산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 아라키딘산, 아라키돈산, 베헨산, 리그노세린산 등의 지방산 유래의 아실기를 들 수 있다. 이들 글리세로지질 또는 스펅고지질이 2 또는 그 이상의 지방산 잔기를 갖는 경우, 모든 지방산 잔기가 동일한 기일 수도 있고 또는 서로 다른 기일수도 있다.
- [0358] 스테롤 또는 스테롤 유도체로는, 예를 들면, 콜레스테롤, 콜레스테롤 숙신산, 라노스테롤, 디하이드로라노스테롤, 테스모스테롤, 및 디하이드로콜레스테롤과 같은 동물-유래의 스테롤; 스티그마스테롤, 시토스테롤, β -시토스테롤, 캠펜스테롤, 브라시캐스테롤과 같은 식물-유래의 스테롤(피토스테롤); 자이모스테롤 및 에르고스테롤과 같은 미생물 유래의 스테롤 등을 포함한다. 당지질로서는, 예를 들면, 설펅시리보실글리세리드, 디글리코실 디글리세라이드, 디갈락토실 디글리세라이드, 갈락토실 디글리세라이드, 글리코실 디글리세라이드와 같은 글리세로당지질; 갈락토실셀레브로시드, 락토실셀레브로시드, 갱글리오사이드 등과 같은 스펅고글리코리피드를 포함한다. 포화 또는 불포화 지방산으로서, 예를 들면, 팔미틴산, 올레산, 스테아르산, 아라키돈산, 및 미리스틴산과 같은 탄소수 12 내지 20을 가진 포화 또는 불포화 지방산을 포함한다.
- [0359] 본 발명에 따른 지질 나노입자의 구성 지질로서는, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질 이외에, 중성 지질을 포함하는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게 인지질 또는 스테롤을 포함하고, 더욱 바람직하게 스테롤을 포함하고, 및 좀 더 바람직하게는 콜레스테롤을 포함하는 것이다.
- [0360] 본 발명에 따른 지질 나노입자는, 지질 성분으로서 폴리알킬렌 글리콜-수정된 지질을 포함하는 것이 바람직하다. 폴리알킬렌 글리콜은 친수성 폴리머이며, 폴리알킬렌 글리콜-수정된 지질을 지질막 구성 지질로서 사용하여 지질 나노입자를 구축함으로써, 지질 나노입자의 표면을 폴리알킬렌 글리콜로 수정 할 수 있다. 폴리알킬렌 글리콜로 표면을 수정함으로써, 지질 나노입자의 혈중 체류성과 같은 안정성을 높일 수 있다.
- [0361] 폴리알킬렌 글리콜로서는, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리테트라메틸렌 글리콜, 폴리헥사메틸렌 글리콜 등을 사용할 수 있다. 폴리알킬렌 글리콜의 분자량은, 예를 들면 300~10,000, 바람직하게는 대략 500~10,000 정도, 더욱 바람직하게는 대략 1,000~5,000이다.
- [0362] 예를 들어, 지질의 폴리에틸렌 글리콜에 의한 수정에는 스테아릴화 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, PEG45 스테아

르산 (STR-PEG45) 등)을 사용할 수 있다. 그 외에, N-[카르보닐-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000]-1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, n-[카르보닐-메톡시폴리에틸렌 글리콜-5000]-1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, N-[카르보닐-메톡시폴리에틸렌 글리콜-750]-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, N-[카르보닐-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000]-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, N-[카르보닐-메톡시폴리에틸렌 글리콜-5000]-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(PEG-DMG) 등의 폴리에틸렌글리콜 유도체 등을 사용할 수 있으며, 그러나 폴리알킬렌 글리콜화 지질은 이것에만 한정되지 않는다.

[0363] 본 발명에 따른 지질 나노입자를 구성하는 전체 지질 질량에 대한 폴리알킬렌 글리콜-수정된 지질(polyalkylene glycol-modified lipids)의 비율은 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질에 의한 간 선택성 또는 비장 선택성, 구체적으로는 본 발명에 따른 지질 나노 입자를 유전자 담체로서 사용하는 경우의 간 특이적 유전자 발현 활성 또는 비장 특이적 유전자 발현 활성을 손상시키지 않는 양이면 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 지질 나노 입자를 구성하는 전체 지질 질량에 대한 폴리알킬렌 글리콜-수정된 지질의 비율은 0.5-3 몰 %로 하는 것이 바람직하다.

[0364] 본 발명에 지질 나노입자에는 필요에 따라 적절한 표면 수정(surface modification) 등을 실시할 수 있다.

[0365] 본 발명에 따른 지질 나노입자는 표면을 친수성 폴리머 등으로 수정함으로써 혈중 체류성을 높일 수 있다. 이들 수식기(modifying groups)로 수정된 지질을 지질 나노입자의 구성 지질로서 사용함으로써, 표면 수정을 달성할 수도 있다.

[0366] 본 발명에 따른 지질 나노입자의 제조에 있어서, 혈중 체류성을 높이기 위한 지질 유도체로서, 예를 들면, 글리코포린, 강글리오사이드 GM1, 포스파티딜이노시톨, 강글리오사이드 GM3, 글루쿠론산 유도체, 글루탐산 유도체, 및 폴리글리세린 인지질 유도체 등을 이용할 수도 있다. 또한, 혈중 체류성을 높이기 위한 친수성 폴리머로서, 폴리알킬렌글리콜 외에 텍스트란, 폴루란, 피콜, 폴리비닐 알코올, 스티렌-무수 말레산 교호 공중합체(styrene-maleic anhydride alternating copolymer), 디비닐 에테르-무수 말레산 교호 공중합체, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 키토산, 만난, 사이클로덱스트린, 펙틴 및 카라기난(carrageenan) 등을 표면 수정에 사용할 수도 있다.

[0367] 본 발명에 따른 지질 나노입자의 제조에 있어서, 혈중 체류성을 높이기 위한 지질 유도체로서, 예를 들면, 글리코포린, 강글리오사이드 GM1, 포스파티딜이노시톨, 강글리오사이드 GM3, 글루쿠론산 유도체, 글루탐산 유도체, 및 폴리글리세린 인지질 유도체 등을 이용할 수도 있다. 또한, 혈중 체류성을 높이기 위한 친수성 폴리머로서, 폴리알킬렌글리콜 외에 텍스트란, 폴루란, 피콜, 폴리비닐 알코올, 스티렌-무수 말레산 교호 공중합체(styrene-maleic anhydride alternating copolymer), 디비닐 에테르-무수 말레산 교호 공중합체, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 키토산, 만난, 사이클로덱스트린, 펙틴 및 카라기난(carrageenan) 등을 표면 수정에 사용할 수도 있다.

[0368] 올리고당 화합물로 지질 나노 입자를 표면 수식하는 방법은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 지질 나노 입자를 갈락토오즈나 만노즈 등의 단당으로 표면을 수정한 리포솜(국제 공개 공보 제2007/102481호)이 알려져 있다. 따라서, 이 간행물에 기재된 표면 수식 방법을 채용할 수 있다. 상기 공보의 모든 개시는 본 명세서의 개시로서 참고로 포함되어야 한다.

[0369] 또한, 본 발명에 따른 지질 나노입자에는, 예를 들어 온도 변화 감수성 기능, 막 투과 기능, 유전자 발현 기능, 및 pH-감수성 기능 등의 어느 하나 또는 2개 이상의 기능을 부여할 수 있다. 이들 기능을 적절히 부가함으로써, 지질 나노입자의 혈액 중의 체류성을 향상시키고 및 표적 세포에서의 엔도시토시스(endocytosis) 후에 엔도솜으로부터 효율적으로 지질 나노입자가 방출되게 함으로써, 봉입된 핵산은 간세포 또는 비장세포에서 보다 효율적으로 발현 되게 할 수 있다.

[0370] 본 발명에 따른 지질 나노입자는, 토코페롤, 몰식자산 프로필, 팔미트산 아스코르빌, 또는 부틸화 히드록시톨루엔 등의 항산화제, 전하 물질(charged substances) 및 막 폴리펩티드 등으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질을 포함할 수 있다. 양성 전하를 부여하는 전하 물질로서는, 예를 들면, 스테아릴아민 및 올레일아민과 같은 포화 또는 불포화 지방족 아민 등을 들 수 있고, 및 음전하를 부여하는 전하 물질로서는, 예를 들면, 디세틸 포스페이트, 콜레스테릴 헤미석시네이트, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딘산 등을 포함할 수 있다. 막 폴리펩티드로는, 예를 들면 막 표재성 폴리펩티드, 또는 막 내재성 폴리펩티드 등을 들 수 있다. 이들 물질의 배합량은 특별히 한정되지 않고 및 목적에 따라 적절히 선택될 수 있다.

- [0371] 본 발명에 따른 지질 나노입자의 크기는, 생체 내의 간세포 또는 비장세포에 높은 전달 효율이 얻어지기 쉽기 때문에, 평균 직경이 400nm 이하인 것이 바람직하고, 평균 직경이 300nm 이하인 것이 보다 바람직하고, 평균 직경이 200nm 이하인 것이 더욱 바람직하고, 150nm 이하인 것이 보다 더 바람직하다. 또한, 지질 나노입자의 평균 직경이란, 동적 광산란법(Dynamic light scattering: DLS)에 의해 측정된 개수 평균 직경을 의미한다. 동적 광산란법에 의한 측정은 시판되는 DLS 장치 등을 이용하여 통상의 방법에 의해 행할 수 있다.
- [0372] 본 발명에 따른 지질 나노입자의 다분산도 지수(polydispersity index, PDI)는 0.01~0.7 정도, 바람직하게는 0.01~0.6 정도, 더욱 바람직하게는 0.03~0.3 정도이다. pH 7.4에서의 제타 전위 (zeta potential) 는 -50mV 내지 5mV의 범위, 바람직하게는 -45mV 내지 5mV의 범위일 수 있다.
- [0373] 본 발명에 따른 지질 나노입자의 형태는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 수용성 용매에 분산된 형태로서 단층 리포솜, 다중층 리포솜, 구형 미셀, 또는 부정형의 층상 구조 등을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 지질 나노입자로서는, 단층 리포솜, 다중층 리포솜인 것이 바람직하다.
- [0374] 본 발명에 따른 지질 나노입자는, 지질막으로 덮인 입자 내부에, 표적의 세포 내에 전달할 목적의 성분을 내포하고 있는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 지질 나노입자가 입자 내부에 내포하는 성분으로서, 내포 가능한 크기라면 특별히 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 따른 지질 나노입자에는 핵산, 당류, 펩티드류, 저분자 화합물, 금속 화합물 등 임의의 물질을 봉입할 수 있다.
- [0375] 본 발명에 따른 지질 나노 입자에 내포시키는 성분으로서 핵산이 바람직하다. 핵산은 DNA일 수도 있고, RNA일 수도 있고, 또한 그의 유사체 또는 유도체(예를 들어, 펩티드 핵산(PNA), 포스포로티오에이트 DNA 등)일 수 있다. 본 발명에 따른 지질 나노입자에 봉입되는 핵산은, 단일가닥 핵산이어도 되고, 이중 가닥 핵산이어도 되고, 선형이어도 되고, 고리형이어도 된다.
- [0376] 본 발명의 한 실시 예에서, 본 발명에 따른 지질 나노입자는 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질, 이의 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물 및 핵산을 포함한다.
- [0377] 본 발명에 따른 지질 나노입자에 내포시키는 핵산은, 표적 세포 내에서 발현시키기 위한 외래 유전자를 포함하는 것이 바람직하고, 세포 내에 흡수됨으로써 세포 내에서 외래 유전자가 발현 되도록 기능하는 핵산이 더 바람직하다. 상기 외래 유전자는 표적 세포(바람직하게는 간 세포 및 비장 세포)의 게놈 DNA 중에 본래 포함되어 있는 유전자 일 수도 있고, 게놈 DNA 중에 포함되어 있지 않은 유전자 일 수도 있다. 이러한 핵산으로서, 발현시킬 목적의 유전자를 코딩하는 염기 서열로 이루어지는 핵산을 포함하는 유전자 발현 벡터를 들 수 있다. 유전자 발현 벡터는 도입된 세포 내에서 염색체 외 유전자로서 존재할 수 있고, 상동 재조합 (homologous recombination)에 의해 게놈 DNA에 도입 될 수 있다.
- [0378] 본 발명에 따른 지질 나노 입자에 내포하는 유전자 발현 벡터로서는, 특별히 한정되는 것은 아니고, 일반적으로 유전자 치료 등에서 사용되는 벡터를 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 나노 입자에 내포시키는 유전자 발현 벡터로서는, 플라스미드 벡터 등의 핵산 벡터인 것이 바람직하다. 플라스미드 벡터는 환상으로 유지될 수 있고, 선형으로 절단된 상태로 상기 지질 나노 입자에 봉입될 수 있다. 유전자 발현 벡터는, 발현시킬 대상의 유전자의 염기 서열에 기반하여, 일반적으로 사용되는 분자 생물학적 기법을 이용하여 통상의 방법에 의해 설계될 수 있고, 알려진 각종 방법으로 제조될 수 있다.
- [0379] 본 발명에 따른 지질 나노입자에 포함되는 핵산은 또한 표적 세포 내에 존재하는 표적 유전자의 발현을 조절하는 기능성 핵산인 것이 바람직하다. 해당 기능성 핵산으로서, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 안티센스 DNA, 안티센스 RNA, siRNA, 마이크로RNA, mRNA 등을 들 수 있다. 또한, 세포 내에서 siRNA를 발현시키는 siRNA 발현 벡터가 되는 플라스미드 DNA(pDNA)여도 된다. siRNA 발현 벡터는, 상업적으로 이용 가능한 siRNA 발현 벡터로부터 제조할 수 있고, 또한 이것을 적절히 수정하여 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 지질 나노 입자에 봉입되는 핵산은, 특히 간 또는 비장에 대한 선택성이 높기 때문에, mRNA 또는 pDNA인 것이 바람직하다.
- [0380] 본 발명의 한 실시예에서, 본 발명에 따른 지질 나노입자는 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질, 이의 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물 및 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 mRNA 또는 플라스미드 DNA이다.
- [0381] 본 발명과 관련된 지질 나노입자의 제조 방법은 특별히 한정되지 않고, 당업자에게 이용가능한 임의의 방법을 채용할 수 있다. 예를 들면, 모든 지질성분을 클로로포름 등의 유기용매에 용해하여 증발기에 의한 감압건조나 분무건조기에 의한 분무건조를 수행함으로써 지질막을 형성하게 한 후, 해당 지질나노입자에 봉입시키는 성분(예를 들어 핵산 등을 포함하는 수용성 용매 등)을 건조한 상기 혼합물에 첨가하고, 그 후 균질화기 등의 유화

기, 초음파 유회기, 또는 고압분사유회기 등에 의해 유회함으로써 제조할 수 있다. 또한, 리포솜을 제조하는 방법으로 잘 알려진 방법, 예컨대 역상 증발법 등에 의해서도 제조될 수 있다. 지질 나노입자의 크기를 제어하고자 하는 경우에는, 균일한 구멍 크기를 가진 멤브레인 필터등을 이용하여 고압하에서 익스트루전 (extrusion) (압출 여과)을 수행할 수 있다.

[0382] 수용성 용매(분산매)의 조성은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 인산 완충액, 구연산완충액, 인산완충된 생리식염수액 등의 완충액, 생리식염수, 세포배양용 배지 등을 들 수 있다. 이들 수용성 용매(분산매)는 지질 나노입자를 안정적으로 분산시킬 수 있지만, 또한 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스, 플라토오스, 이노시톨, 리보스, 자일로스의 단당류, 유당, 자당, 셀로비오스, 트레할로오스, 말토오스오스 등의 이당류, 라피노오스, 메레지디노오스 (meredinose) 등의 삼당류, 사이클로덱스트린 등의 다당류, 에리스리톨, 자일리톨, 소르비톨, 만니톨, 멀티톨 등의 당 알코올 등의 당(수용액)이나, 글리세린, 디글리세린, 폴리글리세린, 프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 디에틸렌 글리콜, 트리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜 모노알킬 에테르, 디에틸렌 글리콜 모노알킬에테르, 1,3-부틸렌 글리콜 등의 다가 알코올(수용액)등을 첨가해도 된다. 이 수용성 용매에 분산된 지질 나노입자를 안정적으로 장기간 보존하기 위해서는, 응집 억제 등의 물리적 안정성 측면에서 수용성 용매 중의 전해질을 최대한 배제하는 것이 바람직하다. 또한, 지질의 화학적 안정성의 측면에서는 수용성 용매의 pH를 약산성에서 중성 부근(pH 3.0~8.0 정도)으로 설정하고, 밧/또는 질소 버블링 (nitrogen bubbling) 등으로 용존 산소를 제거하는 것이 바람직하다.

[0383] 본 발명에 따른 지질 나노입자는 유로(flow channel)를 이용한 알코올 희석법에 의해 제조될 수도 있다. 해당 방법은 알코올 용매에 지질 성분을 용해시킨 용액과 지질 나노입자를 포함시키는 수용성 성분이 수용성 용매에 용해된 용액을 별도의 유로에서 도입하여 이를 합류시킴으로써 지질 나노 입자를 제조하는 방법이다. 두 용액의 순간적인 혼합을 달성하게 해주는 3차원 마이크로 믹서가 내장된 마이크로 유로를 사용함으로써, 직경 30nm 정도의 지질 나노 입자를 재현성있게 제조할 수 있다(비특허 문헌11). 제조에 사용하는 유로로서, 원료 용액이 흐르는 마이크로 사이즈의 유로에서는, 특허문헌2에 기재되어 있는 바와 같이, 유로 폭에 대하여 일정한 폭을 가지는 배플(방해판)이 양쪽에 교대로 배열되어 있는 단순한 2차원적 구조의 유로 구조를 이용하는 것이 바람직하다. 입자 직경 제어성이 높은 나노 사이즈의 지질 입자 형성 시스템을 형성하는 것이 가능하기 때문이다. 상기 기재한 용매들은 알코올 희석법에서 사용되는 수용성 용매로는 사용될 수 있다.

[0384] 얻어진 지질 나노 입자의 수성 분산물을 동결 건조 또는 분무 건조하는 경우에는, 예를 들면 클루코오스, 갈락토오스, 만노오스, 플라토오스, 이노시톨, 리보오스, 자일로스의 단당류; 유당, 자당, 셀로비오스, 트레할로오스, 말토오스 등의 이당류; 라피노오스, 메레지노오스 등의 삼당류; 사이클로덱스트린 등의 다당류; 에리스리톨, 자일리톨, 소르비톨, 만니톨, 멀티톨 등의 당알코올 등의 당(수용액)을 사용하면 안정성을 개선할 수 있는 경우가 있다. 또한, 상기 수성 분산액을 동결하는 경우에는, 예를 들면, 상기의 당류나 글리세린, 디글리세린, 폴리글리세린, 프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 디에틸렌 글리콜, 트리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜 모노알킬 에테르, 디에틸렌 글리콜 모노알킬 에테르, 1,3-부틸렌 글리콜 등의 다가 알코올(수용액)을 사용하면 안정성을 개선할 수 있는 경우가 있다.

[0385] 본 발명의 한 실시 예에 있어서, 본 발명에 따른 지질 나노 입자는 동결건조 되어 있다.

[0386] 본 발명은, 한 측면에서, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질, 이의 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물을 포함하는 지질 나노입자 제제(formulations)에 관한 것이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 스테롤 또는 스테롤 유도체, (ii) 폴리알킬렌 글리콜 수정된 지질, (iii) 핵산, (iv) 완충제, (v) 이당류 및 (vi) 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질, 이의 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물을 포함하는 지질 나노입자 제제에 관한 것이다.

[0387] 스테롤 또는 스테롤 유도체의 예는 콜레스테롤, 시토스테롤 등을 포함하며, 바람직하게는 콜레스테롤이다.

[0388] 폴리알킬렌 글리콜-수정된 지질(Polyalkylene glycol-modified lipids)의 예는 폴리에틸렌 글리콜-수정된 지질, 폴리프로필렌 글리콜-수정된 지질 등을 포함하며, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜-수정된 지질이다.

[0389] 핵산의 예는 siRNA, pDNA, mRNA 등을 포함하며, 바람직하게는 mRNA이다.

[0390] 완충제의 예는 HEPES 완충제, 인산염 완충제, 트리스 완충제 등을 포함한다.

[0391] 이당류로서는, 예를 들면, 유당, 슈크로오스, 셀로비오스, 트레할로오스, 말토오스 등을 들 수 있고, 바람직하게는 슈크로오스이다. 지질 나노 입자 제제 중의 이당류의 농도는, 예를 들면 1 중량 % 내지 20 중량 %, 바람직하게는 5 중량 % 내지 15 중량 %이다. 스테롤 또는 스테롤 유도체와 pH-감수성 양이온성 지질, 그 입체이성질체

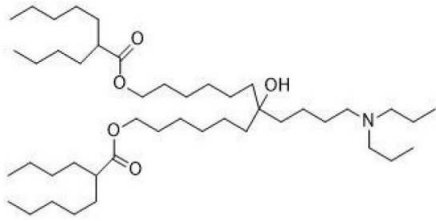
또는 입체이성질체의 혼합물의 몰비는, 예를 들면 68.5:20 내지 28.5:60이다.

- [0392] 본 발명에서, 지질 나노 입자 제제는 지질 나노입자가 수용액에 현탁됨으로써 제조될 수 있다.
- [0393] 본 발명의 지질 나노 입자 제제의 pH는, 예를 들어, 25℃에서 5.5 내지 8.5, 바람직하게는 6.8 내지 8.0이다.
- [0394] 본 발명은 한 측면에서, 지질 나노입자 제제가 물 또는 수용액의 첨가에 의해 재현탁된 재현탁 제제에 관한 것이다.
- [0395] 본 발명의 지질 나노입자는 안정성이 우수하다. 본 발명의 지질 나노입자는 예를 들어 -80 ℃에서 보관할 경우, 1주일 또는 1주일 이상 안정하고, 및/또는 5℃에서 보관한 경우 1주간, 2주간, 3주간, 4주간, 5주간 또는 5주 이상 안정하고, 및/또는 25℃에서 보관한 경우 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 5주 이상 안정하고, 및/또는 40℃에서 보관한 경우 3일, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주 또는 5 주 이상 안정하다.
- [0396] 지질 나노입자의 품질에 대해서는, 예를 들면, 지질 나노입자를 미리 정해진 온도에서 놓아두고, 미리 정해진 기간 보관 후의 평균 입자 직경, PDI 및 핵산 봉입율을 제조 직후의 값과 비교하여, 평균 입자 직경이 지질 나노입자 제조일을 기준으로 $\pm 20\text{nm}$ 이내를 유지하고, PDI가 0.2 이하로 높은 균일성을 유지하고, 핵산 봉입율도 80% 이상을 유지하고 있다는 세가지 조건 모두 만족한 지질 나노 입자는 품질이 양호하게 유지되는 지질 나노입자로 정의될 수 있다.
- [0397] 예를 들어, 다음 기준에 따라 평가할 수 있다.
- [0398] 양호: 입자경은 제조 직후의 입자경 $\pm 20\text{nm}$ 이내, 또한, PDI가 0.2 이하, 또한, 봉입율 80% 이상;
- [0399] 양호하지 않음 : 입자 직경은 생성 직후의 입자 직경 $\pm 20 \text{ nm}$ 초과, 또는 봉입율 80 % 미만.
- [0400] 예를 들면, 5℃에서 놓아두었을 때 1주일 이상 품질이 양호하게 유지되고 있는 지질 나노 입자나 이거나 또는 40℃에서 놓아두었을 때 1주일 이상 품질이 양호하게 유지되고 있는 지질 나노 입자는, 안정성이 우수한 지질 나노입자로 평가할 수 있다.
- [0401] 본 발명에 따른 유전자 발현 백터가 봉입된 지질 나노입자를 개별 동물에 투여하면, 지질 나노입자에 봉입된 유전자 발현 백터는 다른 기관보다 간이나 비장에서 선택적으로 발현된다. 유사하게, siRNA 발현 백터가 봉입된 본 발명에 따른 지질 나노입자를 개별 동물에 투여하면, 해당 지질 나노입자에 봉입된 siRNA 발현 백터는 다른 장기보다 간 또는 비장에서 선택적으로 발현하고, 상기 발현 백터가 표적으로 하는 유전자의 발현이 억제된다. 예를 들면, 간세포 내 또는 비장세포 내에서 발현시킬 목적의 외래 유전자를 봉입한 본 발명에 따른 지질 나노입자를, 실험 동물에 투여하면, 해당 실험 동물의 간 또는 비장 내에서 해당 외래 유전자를 발현시킬 수 있다.
- [0402] 간 또는 비장에 대한 선택적 유전자 고발현 활성에 의해, 본 발명과 관련된 지질 나노입자는 간 또는 비장을 표적으로 하는 유전자 발현 담체로서 기능한다. 본 발명과 관련된 지질 나노입자에 간세포 내 또는 비장세포 내에서 발현시키는 목적의 외래유전자를 봉입한 후, 실험동물에게 투여함으로써 해당 실험동물의 간 내 또는 비장 내에서 해당 외래유전자가 발현한다. 따라서, 본 발명과 관련된 지질 나노 입자는 유전자 치료에 이용되는 약제학적 조성물의 유효성분으로서 유용하며, 특히 간 또는 비장을 표적 장기로 하는 유전자 치료에 이용되는 약제학적 조성물의 유효성분으로서 유용하다.
- [0403] 본 발명은 한 측면에서 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질, 그 입체 이성질체 또는 입체 이성질체 혼합물을 함유하는 간 전달용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0404] 본 발명은 다른 측면에서, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질, 그 입체 이성질체 또는 입체 이성질체 혼합물을 함유하는 비장 전달용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0405] 본 발명과 관련된 지질 나노입자가 투여되는 동물은 특별히 한정되지 않고, 사람일 수도 있고, 사람 이외의 동물일 수도 있다. 비인간 동물로는 소, 돼지, 말, 양, 염소, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 마우스, 생쥐, 햄스터, 기니피그 등 포유동물과 닭, 메추라기, 오리 등 조류 등을 들 수 있다.
- [0406] 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질, 이의 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물은 예를 들어 기본 골격인 7-(4-(디프로필아미노)부틸)트리데칸-1,7,13-트리올 또는 5,11-디히드록시 5-(6-히드록시헥실)운데실1-메틸피페리딘-4-카르복실레이트와 가지형 지방산을 축합함으로써 합성된다.
- [0407] 본 발명은, 한 측면에서, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질, 그 입체이성질체 또는 입체이성질체의 혼합물의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 pH에 민감한 양이온성 지질의 제조 방법은 적어도

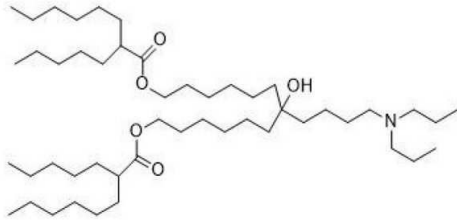
알킬 카르복실산과 할로젠화 알킬을 유기 리튬, 디메틸프로필렌우레아(DMPU) 및 테트라하이드로푸란(THF)의 존재하에서 반응시켜 가지형 지방산을 얻는 단계 (단계 A)를 포함한다.

- [0408] 상기 방법에 있어서, 알킬카르복실산은, 예를 들면, 옥탄산, 데칸산, 트리데칸산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 운데칸산, 도데칸산, 트리데칸산, 테트라데칸산, 펜타데칸산, 헥사데센산이다.
- [0409] 상기 방법에 있어서, 알킬 할라이드는, 예를 들면 1-요오도헥산, 1-요오도부탄, 2-요오도헥산, 1-브로모헥산, 요오도메탄, 요오도에탄, 1-요오도프로판, 1-요오도부탄, 1-요오도펜탄, 1-요오도헥산, 1-요오도헵탄, 1-요오도옥탄, 1-요오도노난, 1-요오도데칸, 1-요오도운데칸, 1-요오도데칸, 1-요오도트리데칸, 1-요오도테트라데칸, 1-요오도펜타데칸, 1-요오드헥사데칸이다.
- [0410] 상기 방법에 있어서, 유기 리튬은, 예를 들면, 리튬 디소프로필아미도리튬(LDA), t-부틸리튬, 및 n-부틸리튬이다.
- [0411] 본 발명의 한 형태에 있어서, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질의 제조 방법은, 적어도 말론산 에스테르와 알킬 할라이드를 염기 존재하에서 반응시켜 얻어지는 반응액을 가수분해 처리 및 가열 처리를 하여 가지형 지방산을 얻는 단계(단계 B)를 포함한다.
- [0412] 상기 방법에서, 말론산 에스테르는 예를 들어, 디메틸 말로네이트, 디에틸 말로네이트, 디소프로필 말로네이트이며, 및 바람직하게는 디메틸 말로네이트이다.
- [0413] 상기 방법에서, 알킬 할라이드는 예를 들어 아이오도알킬(iodoalkyl)이고, 및 아이오도알킬(iodoalkyl)은, 예를 들어, 1-요오도헥산, 1-요오도프로판, 2-요오도헥산이다.
- [0414] 상기 방법에서, 염기는, 예를 들어, 수소화나트륨, 수소화칼슘, 소듐에톡사이드 및 비스(트리스메틸실릴)아미도리튬이고, 바람직하게는 수소화나트륨이다.
- [0415] 상기 방법에 있어서, 가수분해 처리는, 예를 들면, 수산화나트륨, 수산화칼슘 및 수산화리튬 중 어느 하나를 사용하여 수행된다.
- [0416] 상기 방법에 있어서, 가열 처리는 가수분해 처리와 동시 및/또는 후에, 바람직하게는 120°C~170°C, 보다 바람직하게는 150°C~170°C에서 수행된다.
- [0417] 상기 방법은 역상 크로마토 그래피에 의해 가지형 지방산을 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0418] 다음 화합물의 합성에 사용되는 가지형 지방산은 다음과 같다:

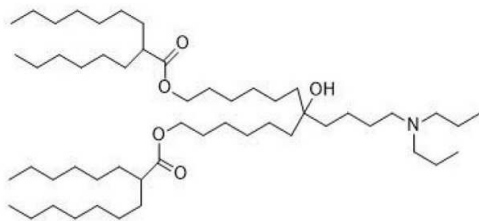
[0419] [화학식. 33]



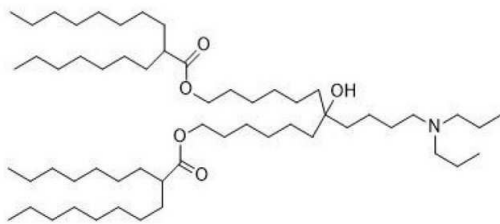
CL 4 F 7-4、



CL 4 F 8-5、



CL 4 F 9-6、



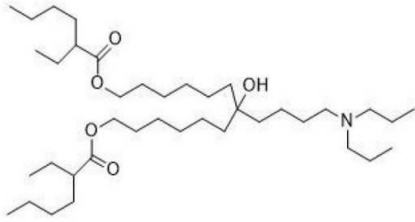
CL 4 F 10-7、

[0420]

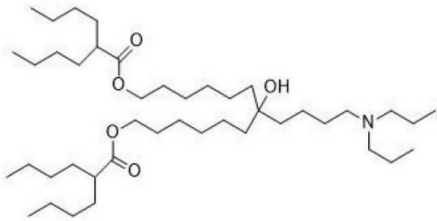
[0421] 가지형 지방산은 공정A에 의해 공정B보다 더 높은 수율로 얻어진다.

[0422] 다음 화합물의 합성에 사용되는 가지형 지방산은 다음과 같다:

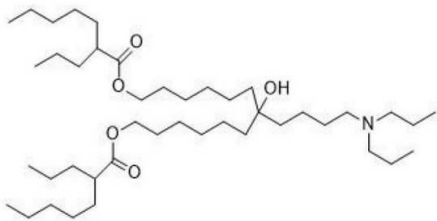
[0423] [화합물. 34-1]



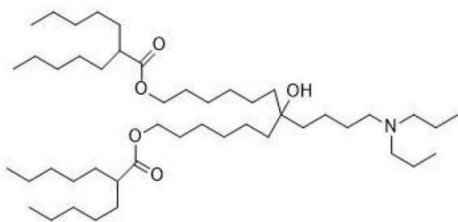
CL 4 F 6-2、



CL 4 F 6-4、



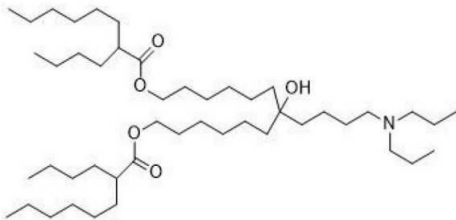
CL 4 F 7-3、



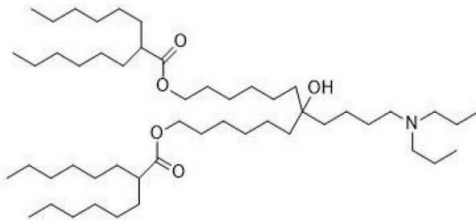
CL 4 F 7-5、

[0424]

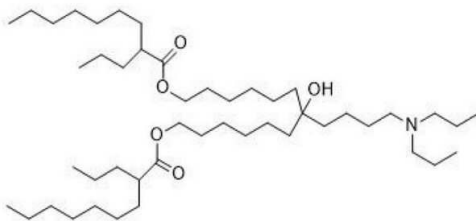
[0425] [화합물. 34-2]



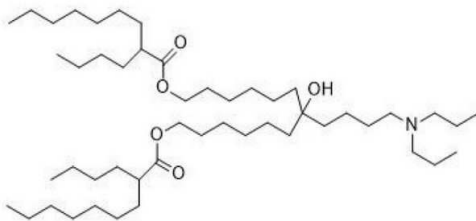
CL 4 F 8-4、



CL 4 F 8-6、



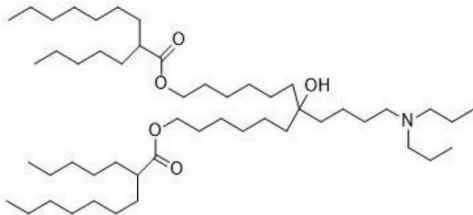
CL 4 F 9-3、



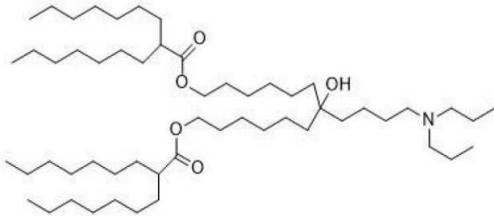
CL 4 F 9-4、

[0426]

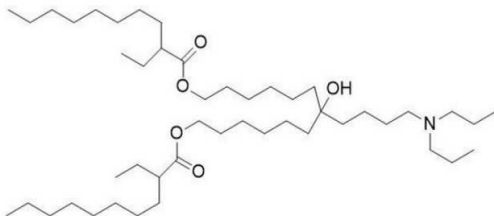
[0427] [화합물. 34-3]



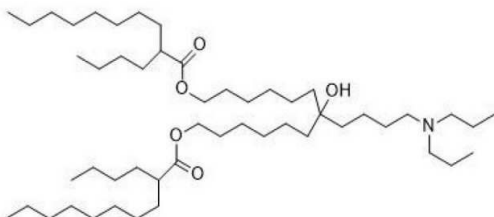
CL 4 F 9-5、



CL 4 F 9-7、



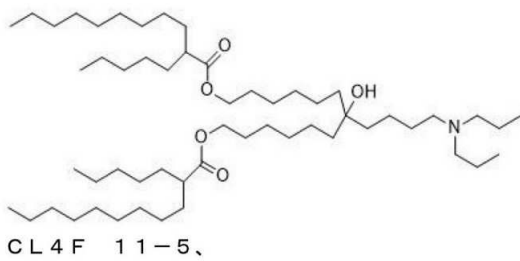
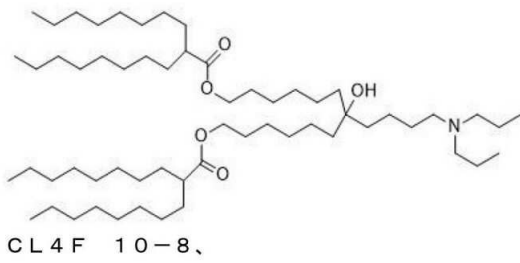
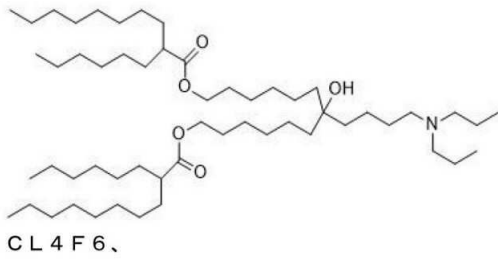
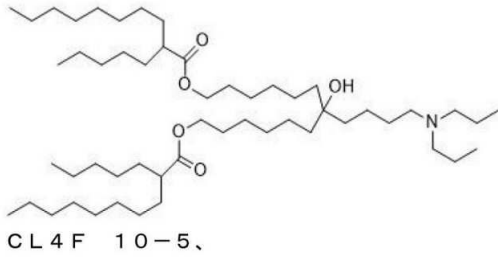
CL 4 F 10-2、



CL 4 F 10-4、

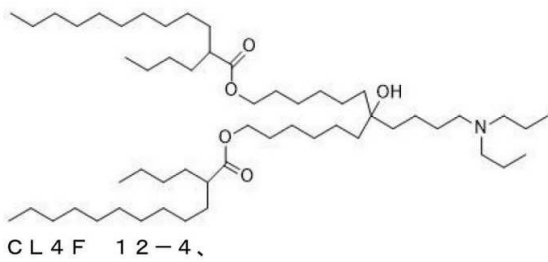
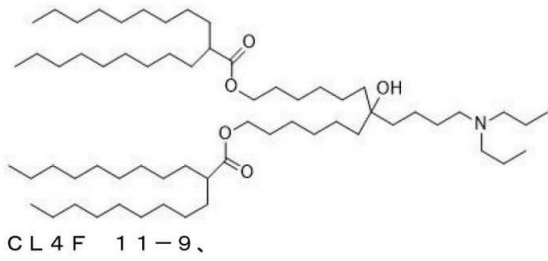
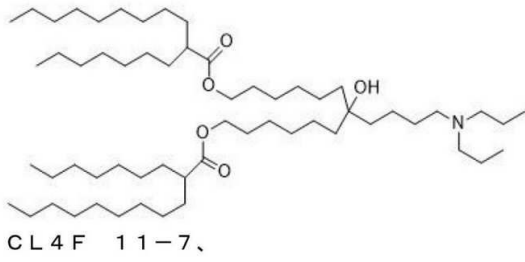
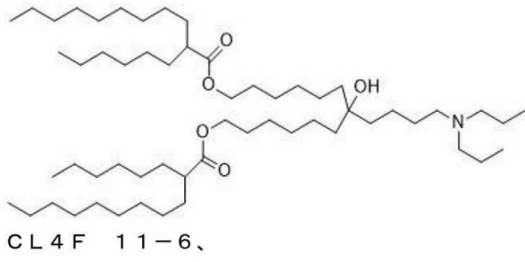
[0428]

[0429] [화합물. 34-4]



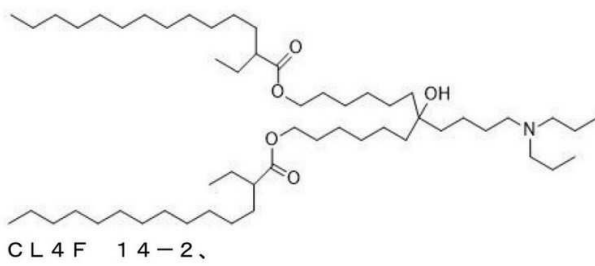
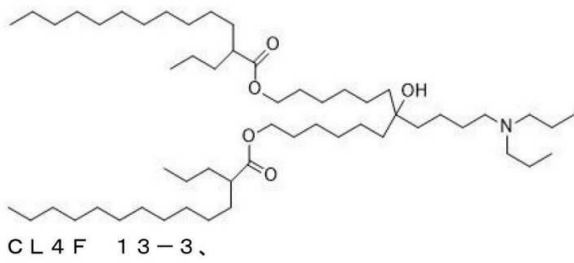
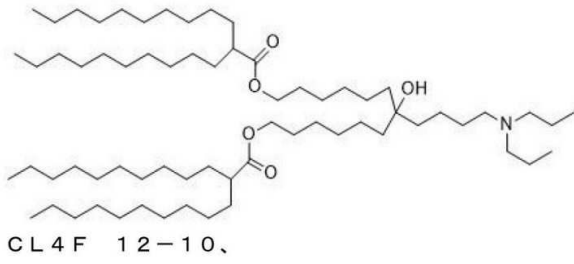
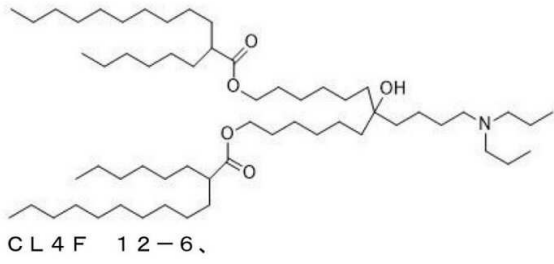
[0430]

[0431] [화합물. 34-5]



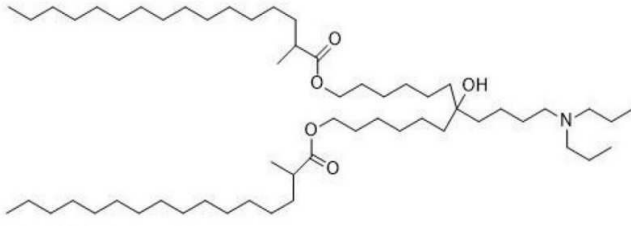
[0432]

[0433] [화합물. 34-6]

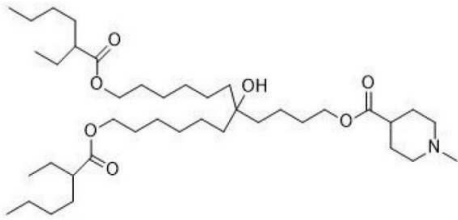


[0434]

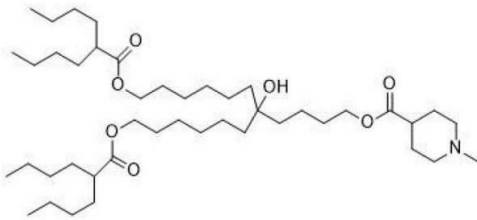
[0435] [화합물. 34-7]



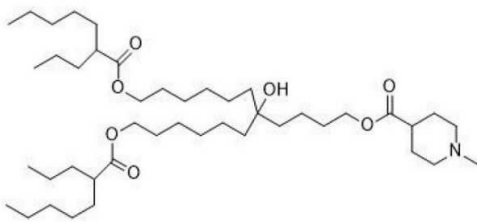
CL 4 F 16-1、



CL 15 F 6-2、



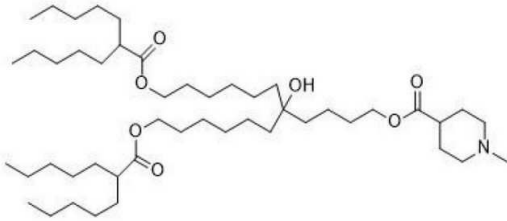
CL 15 F 6-4、



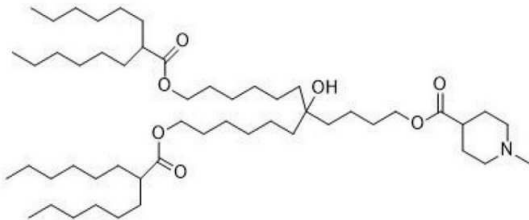
CL 15 F 7-3、

[0436]

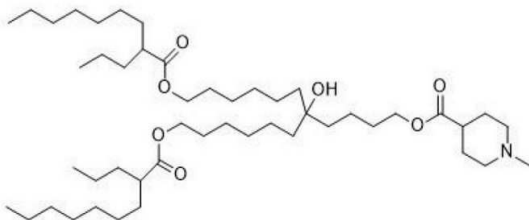
[0437] [화합물. 34-8]



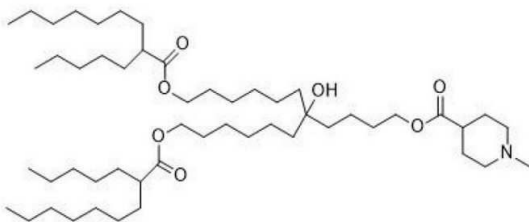
CL 15 F 7-5.



CL 15 F 8-6.



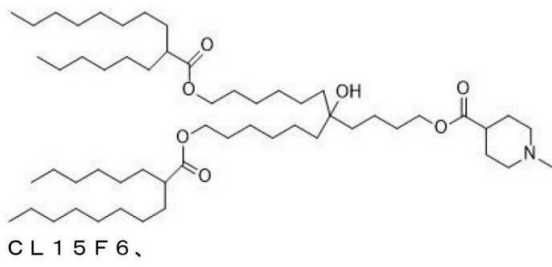
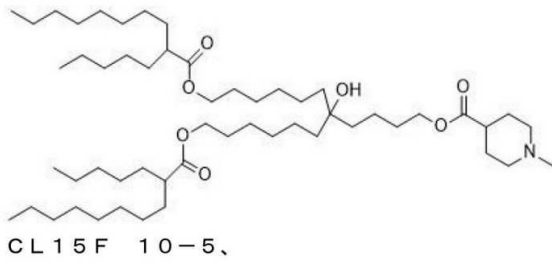
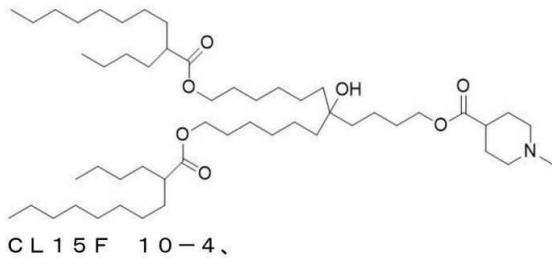
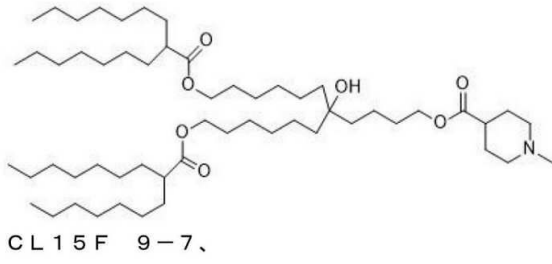
CL 15 F 9-3.



CL 15 F 9-5.

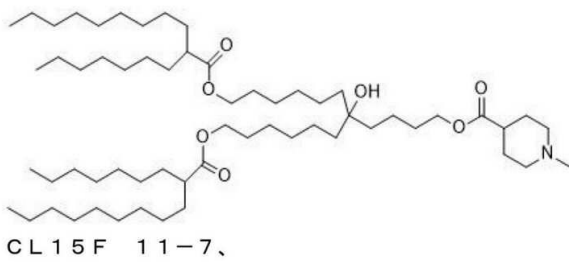
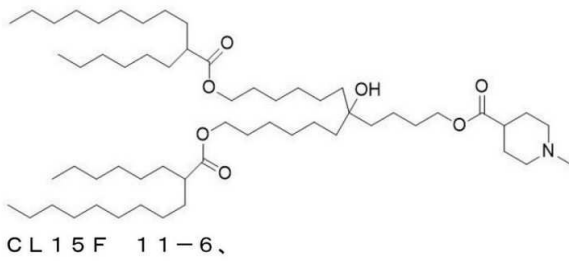
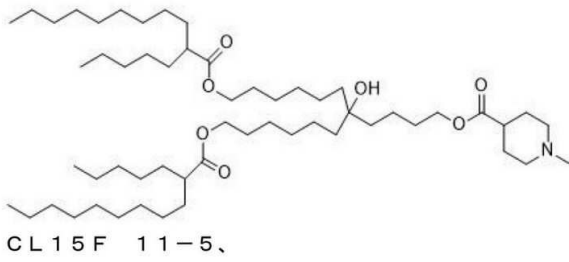
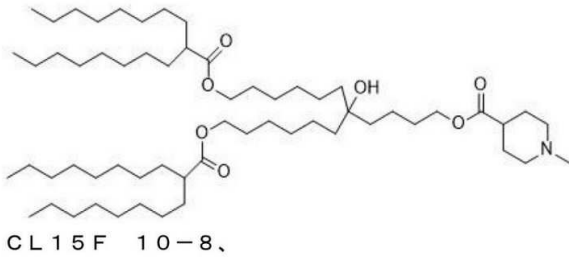
[0438]

[0439] [화합물. 34-9]



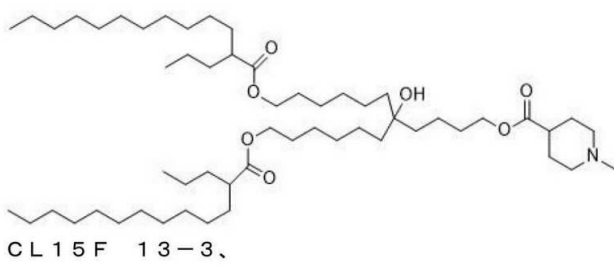
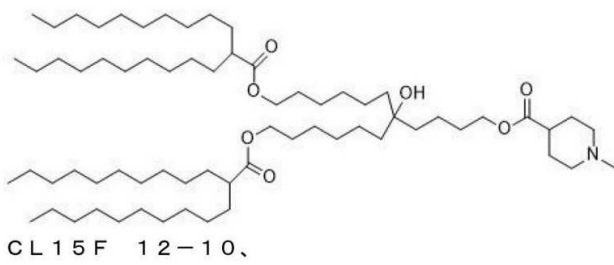
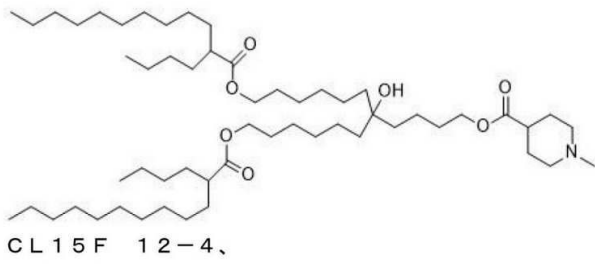
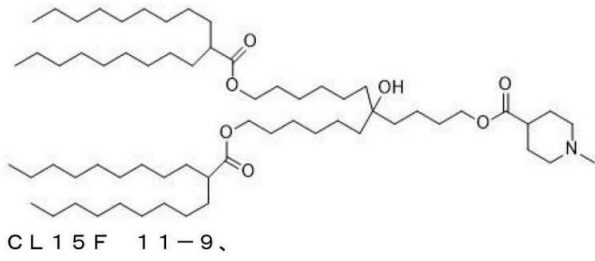
[0440]

[0441] [화합물. 34-10]



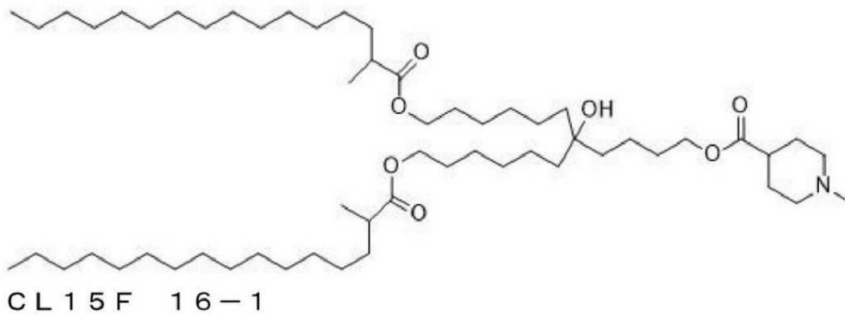
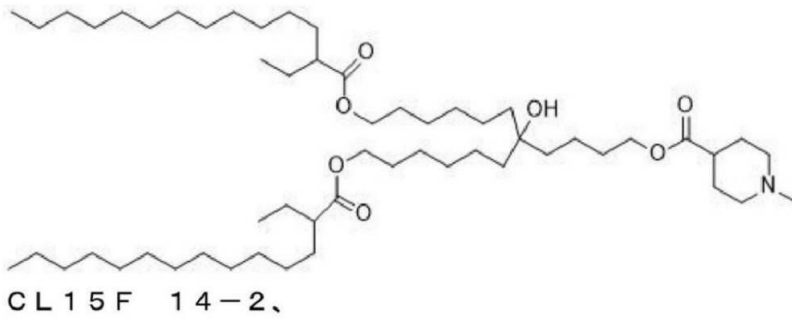
[0442]

[0443] [화합물. 34-11]



[0444]

[0445] [화합물. 34-12]



[0446]

[0447] 가지형 지방산은 공정 B에 의해 공정 A보다 더 높은 수율로 얻어진다.

[0448] 본 발명의 한 형태에서, 본 발명의 pH-감수성 양이온성 지질 합성에 이용되는 가지형 지방산은 예를 들어 특허 제2756756호에 기재된 방법으로 얻을 수 있다.

[0449] <실시예>

[0450] 다음은 실시예를 제시하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하되, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0451] I. CL4F6, CL4G6, CL15F6 및 CL15G6의 합성

[0452] <합성예 1> CL4F6의 합성

[0453] 특허문헌 1에 기재된 방법으로 합성된 7-(4-(디프로필아미노)부틸)트리데칸-1,7,13-트리올(1.0mmol)을 5mL의 디클로로메탄에 용해시킨 후, 2-헥실데카노산(2.20mmol), DMAP(N,N-디메틸-4-아미노피리딘)(0.20mmol) 및 EDCI(1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드)(3.0mmol)를 첨가하고 실온에서 하룻밤 반응시켰다. 로터리 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거한 후, 에틸 아세테이트로 헹타시키고, 여과에 의해 불용물을 제거하였다. 여액을 0.5N 산화 나트륨 수용액 및 포화 식염수로 씻어 분리하였다. 유기층에 무수 황산나트륨을 첨가하여 탈수하였다. 이것을 여과한 후, 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거하여 거친 생산물을 얻었다. 거친 생산물을 실리카겔 크로마토그래피[용출 용매; 디클로로메탄:메탄올(연속 구배)]로 정제하여, 7-(4-(디프로필아미노)부틸)-7-히드록시트리데칸-1,13-디일 비스 (2-헥실 데카노 에이트) (CL4F6)를 얻었다.

[0454] <합성예 2> CL4G6의 합성

[0455] 2-헥실데카노인산 대신 2-(4,4-디메틸펜탄-2-일)-5,7,7-트리메틸옥타노인산을 이용한 것 이외에는 합성예 1과 동일하게 하여, 7-(4-(디프로필아미노)부틸)-7-히드록시트리데칸-1,13-디일비스(2-(4,4-디메틸펜탄-2-일)-5,7,7-트리메틸옥타노에이트)(CL4G6)를 얻었다.

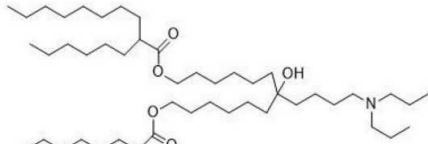
[0456] <합성예 3> CL15F6의 합성

[0457] 특허문헌 1에 기재된 방법으로 합성된 5,11-디히드록시 5-(6-히드록시헥실)운데실 1-메틸피페리딘-4-카르복실레

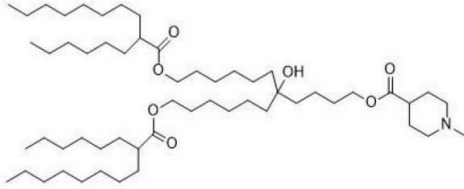
이트(1.00 mmol)를 10 mL의 디클로로메탄에 용해하였다. 이어서, 2-헥실테카노산(2.20mmol), DMAP(0.20mmol) 및 EDCI(3.0mmol)를 첨가하고, 실온에서 하룻밤 반응시켰다. 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거한 후, 에틸 아세테이트로 현탁시키고, 여과에 의해 불용물을 제거하였다. 여액을 0.5N 수산화 나트륨 수용액 및 포화 식염수로 씻었다. 유기층에 무수 황산나트륨을 첨가하여 탈수하였다. 이것을 여과한 후, 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거하여 거친 생산물을 얻었다. 거친 생산물을 실리카겔 크로마토그래피 [용출 용매; 디클로로메탄:메탄올(연속 구배)]로 정제하여, 7-히드록시-7-(4-((1-메틸피페리딘)-4-카르보닐)옥시) 부틸)트리데칸-1,13-디일비스(2-헥실테카노에이트)(CL15F6)를 얻었다.

- [0458] <합성에 4> CL15G6의 합성
- [0459] 2-헥실테카노산 대신에, 2-(4,4-디메틸펜탄-2-일)-5,7,7-트리메틸옥타노산을 사용한 것 이외는 합성에 3과 동일하게 하여, 히드록시-7-(4-((1-메틸피페리딘)-4-카르보닐)옥시)부틸)트리데칸-1,13-디일비스(2-(4,4-디메틸펜탄-2-일)-5,7, 7-트리메틸옥타노에이트(CL15G6)를 얻었다.
- [0460] II. CL4F6, CL4G6, CL15F6, 및 CL15G6를 이용한 지질 나노입자의 생산 및 평가
- [0461] <지질 나노 입자의 제조>
- [0462] 이후의 실험에서 특별한 기재가 없는 한 지질 나노입자는 유로 (flow channel) 를 이용한 알코올 희석법으로 제조했다. 유로로서는 믹서 내장 마이크로 유체 디바이스 (microfluidic device) ” iLiNP” (라일락 파마사 제조) 를 이용했다.
- [0463] 구체적으로는 우선 지질농도 8mM로 조절한 에탄올 용액 및 siRNA 농도 71.1 μg/mL로 조절한 아세트산 완충액 (25mM, pH 4.0)을 각각 0.375mL/분 및 1.125mL/분으로 마이크로유로 내에 흘려 보내어 유로에서 배출된 지질 나노 입자 용액을 수집하였다. 해당 지질 나노입자 용액을 투석막(MWCO 12,000-14,000)에 넣고 외부 수용액 상 (outer aqueous phase) 으로 20mMES 완충액(pH 6.0)을 사용하여 4℃, 2시간 이상 투석하였다. 그 후 외부 수용액 상을PBS(-)(pH7.4)로 치환하고 4℃, 2시간 이상 투석한 후 투석막에서 지질 나노입자 용액을 회수했다.
- [0464] <지질 나노 입자의 구성 지질>
- [0465] CL4F6, CL4G6, CL15F6 및 CL15G6은 합성에 1 내지 4에서 합성한 것을 사용하였다.
- [0466] 7-(4-(디프로필아미노)부틸)-7-히드록시트리데칸-1,13-디일디올레이트(CL4H6) 및 7-히드록시-7-(4-((1-메틸피페리딘)-4-카르보닐)옥시)) 부틸) 트리 데칸 -1,13- 디일 디올 레아트 (CL15H6)는 특허 문헌 1에 기재된 방법으로 합성된 것을 사용하였다.

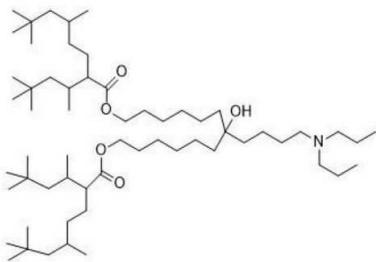
[0467] [화학식. 35-1]



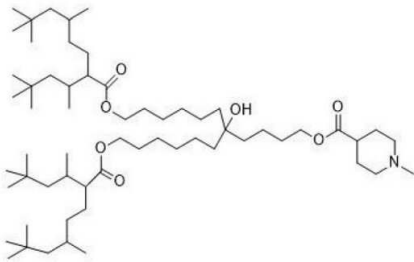
CL 4 F 6



CL 1 5 F 6



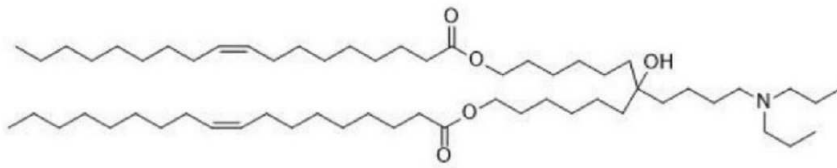
CL 4 G 6



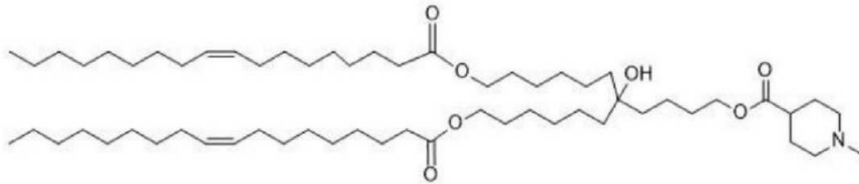
CL 1 5 G 6

[0468]

[0469] [화학식. 35-2]



CL4H6



CL15H6

[0470]

[0471] 또한, 중성지질로서 콜레스테롤(chol) 및 폴리에틸렌 글리콜 2000 수정된 디미리스토일글리세롤 (PEG-DMG)을 사용하였다.

[0472] <지질 나노 입자의 평균 직경, PDI(다분산 지수) 및 제타 전위(zeta potential)의 측정>

[0473] PBS(-) 중에서의 지질 나노입자의 평균 입자 직경(개수 평균값) 및 PDI와 10 mM HEPES 완충액(pH 7.4) 중에서의 제타 전위를 동적 광산란법을 이용한 분석 장치 「Zetasizer Nano ZS ZEN3600」(Malvern사 제조)을 사용하여 측정하였다.

[0474] <지질 나노 입자의 pKa 측정>

[0475] 지질 나노 입자의 pKa는 p-톨루이디노-2-나프탈렌술폰산(TNS)을 사용하여 측정하였다. 먼저, TNS(최종 농도: 0.75 μM)와 지질 나노입자(최종 농도: 30 mM)를 각 pH로 조정된 완충액 중에서 혼합하였다. 제조된 혼합 용액의 형광 강도를 마이크로 플레이트 리더로 측정 하였다. 측정값 중, 가장 높은 값 및 낮은 값을 각각 100% 및 0% 전하율로 하고, 50% 전하율을 나타내는 pH를 pKa로서 산출하였다.

[0476] <지질 나노 입자의 핵산 봉입율>

[0477] 지질 나노 입자의 siRNA, mRNA 및 pDNA의 봉입율은 Ribogreen (life technologies 사 제조)을 사용하여 측정 하였다.

[0478] <실시에 1>

[0479] pH-감수성 양이온성 지질, 콜레스테롤 및 PEG-DMG를 몰비 50:50:1의 조성으로 사용하여, 알코올 회석법에 의해, F7에 대한 siRNA를 탑재시킨 지질 나노 입자(F7siRNA 탑재 지질 나노 입자)를 제작 했다. pH-감수성 양이온성 지질로서 CL4F6, CL4G6, CL4H6, CL15F6, CL15G6 또는 CL15H6을 사용하였다. 이하 pH-감수성 양이온성 지질 X를 사용하여 제조된 지질 나노입자를 X-LNP라고 한다. 예를 들어, pH-감수성 양이온성 지질 CL4F6, CL4G6, CL4H6, CL15F6, CL15G6 또는 CL15H6을 사용하여 제조된 지질 나노입자를 각각 CL4F-LNP, CL4G6-LNP, CL4H6-LNPCL, LNP 또는 CL15H6-LNP라고 한다. 또한, F7에 대한 siRNA의 염기 서열을 표 1에 나타낸다.

[0480] 표 중, 대문자는 천연형 RNA(T만 천연형 DNA), 소문자는 2'-fluoro 수정체, 및 *는 포스포로티오에이트 결합을 각각 나타낸다.

표 1

[0481]

| F7에 대한 siRNA | 염기서열 | 서열 번호 |
|--------------|------------------------|-------|
| 센스 가닥 | GGAucAucucAAGucuuAC*T | 1 |
| 안티센스 가닥 | GuAAGAcuuGAGAuGAuccT*T | 2 |

[0482] 제조된 지질 나노입자는 평균 입자 직경이 80 내지 120nm이고 및 siRNA 봉입율은 90% 이상이었다. 각 지질 나노입자의 pKa를 측정된 결과를 도1(A) 및 도1(B)에 나타낸다. 도1에 도시된 바와 같이, 스캐폴드 구조가 가지형-체인인 CL4F6, CL4G6, CL15F6 또는 CL15G6을 사용하여 제조된 지질 나노입자는 스캐폴드 구조가 직쇄형인 CL4H6 또는 CL15H6을 사용하여 제조된 지질 나노입자와 비교하여 낮은 pKa를 나타낸다.

[0483] 이어서, 제조한 각 F7siRNA 탑재 지질 나노입자를 ICR 마우스(4주령, 암컷)에 투여하고, 생체 내 (in vivo) F7 녹다운 활성을 조사하였다. 구체적으로는, ICR 마우스에, 각 F7siRNA 탑재 지질 나노입자를 0.003~0.1mg siRNA/kg으로 정맥 내 투여하고, 24시간 후에 혈장 중 F7 효소 활성을 측정하였다. 미처리한 마우스의 혈장 중 F7 효소 활성을 100%로 하여, 각 F7siRNA 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 상대 혈장 중 F7 효소 활성(%)을 산출하였다. 결과를 도 2 (A) 및 도 2 (B)에 나타낸다. 도 2(B)는 각 F7siRNA 탑재 지질 나노입자를 0.1mg siRNA/kg으로 정맥 내 투여한 결과이다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 스캐폴드 구조가 가지형-체인인 CL4F6, CL4G6, CL15F6 또는 CL15G6을 사용하여 제조한 지질 나노입자는 스캐폴드 구조가 직쇄형인 CL4H6 또는 CL15H6을 사용하여 생성한 지질 나노입자와 동등한 생체 내 F7 녹다운 활성을 나타내었다. 이러한 결과로부터, CL4F6, CL4G6, CL15F6 및 CL15G6을 구성 지질로 하는 지질 나노입자가 siRNA 전달 담체로서 유용함을 알 수 있다.

[0484] <실시예 2>

[0485] siRNA 대신에 mRNA를 탑재시킨 지질 나노입자를 제조하고, 및 생체 내(in vivo) 유전자 발현 활성을 조사하였다. NanoLuc (등록상표) 루시페라제(Nluc) (Promega 제조)를 암호화하는 pDNA에 대해 시험관 내 (in vitro) 전사 반응을 수행하여 제조한 mRNA(NlucmRNA)을 사용하였다.

[0486] 우선, pH-감수성 양이온성 지질, DSPC(1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린), 콜레스테롤 및 PEG-DMG를 몰비 60:10:40:1의 조성으로 사용하여, 알코올 희석법에 의해, NlucmRNA를 탑재시킨 지질 나노입자(NlucmRNA 탑재 지질 나노입자)를 제조하였다. pH-감수성 양이온성 지질로서 CL4F6, CL4G6, CL4H6, CL15F6, CL15G6 또는 CL15H6을 사용하였다.

표 2

| CL | ζ-평균(nm) | PDI | ζ-전위(mV) | %mRNA 봉입율 |
|--------|----------|-------|----------|-----------|
| CL4F6 | 127.2 | 0.157 | -3.72 | 90 |
| CL4G6 | 109.6 | 0.13 | -1.76 | 91.7 |
| CL4H6 | 113.4 | 0.139 | -1.23 | 77.6 |
| CL15F6 | 92.52 | 0.162 | -2.16 | 90.3 |
| CL15G6 | 71.65 | 0.201 | 0.419 | 91.8 |
| CL15H6 | 94.34 | 0.495 | 0.123 | 90.5 |

[0488] 제조된 지질 나노입자의 평균 입자 크기, PDI, 제타 전위 및 mRNA 봉입율을 조사하였다. 측정 결과를 표 2에 나타낸다. 표 2에서, "CL"은 양이온성 지질을 의미한다. 동적 광산란법에 의해 산출된 평균 입자 직경은 모두 70~130nm였다(표 2). 제조된 지질 나노입자 중 CL15H6-LNP만이 PDI가 크고 균일성이 낮은 입자가 형성되었다(표 2). mRNA 봉입률은 CL4H6-LNP가 80% 미만인 반면, 다른 양이온성 지질을 포함하는 LNP는 모두 90% 이상을 나타냈다.

[0489] 이어서, 제조한 각 NlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 ICR 마우스(4주령, 암컷)에 투여하고, 생체 내 (in vivo) 유전자 발현 활성을 조사하였다. 구체적으로는, ICR 마우스에, 각 NlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 0.04 mg mRNA/kg으로 정맥 내 투여하고, 24시간 후의 간 및 비장에서의 Nluc 활성을 측정하였다. Nluc 활성은 루미노미터(RLU)에 의해 측정하고, BCA법에 의해 정량된 단백질량으로 보정하였다.

[0490] 각 NlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 간과 비장에서의 Nluc 활성(RLU/mg protein)의 측정 결과를 도 3에 나타낸다. 도 3(A)는 간에서의 Nluc 활성의 측정 결과이고, 도 3(B)는 비장에서의 Nluc 활성의 측정 결과이다. 또한, 간에서의 유전자 발현 활성을 비장에서의 유전자 발현 활성으로 나누어 유전자 발현의 간 선택성을 산출하였다. 도 3(C)는 각 NlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 [간에서의 Nluc 활성]/[비장에서의 Nluc 활성]의 산출 결과를 나타낸 도면이다. 도 3(A)에 나타낸 바와 같이, 간에서 CL4F6-LNP, CL15F6-LNP 및 CL15G6-LNP를 투여한 마우스에서는 CL4H6-LNP를 투여한 마우스와 동등한 Nluc 활성을 나타내었다. 또한, 도

3 (C)에 나타낸 바와 같이, CL4F6-LNP 및 CL4G6-LNP를 투여 한 마우스는 CL4H6-LNP를 투여 한 마우스와 비교하여 높은 간 선택성을 나타냈다. 유사하게, CL15F6-LNP 및 CL15G6-LNP를 투여한 마우스는 CL15H6-LNP를 투여한 마우스와 비교하여 높은 간 선택성을 나타냈다. 이러한 결과로부터, 스캐폴드 구조가 가지형-체인인 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노 입자는, mRNA를 봉입한 경우에, 스캐폴드 구조가 직쇄형인 pH-감수성 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노입자보다, 간으로의 선택성이 높아, 간에 특이적으로 전달하는 전달 담체로서 유용한 것을 알 수 있었다.

[0491] <실시예 3>

[0492] siRNA 대신에 pDNA를 탑재시킨 지질 나노 입자를 제조하고, 생체 내 (in vivo) 유전자 발현 활성을 조사했다. pDNA는 CMV 프로모터 하에서 반딧불이 루시페라제 (Fluc)를 발현하는 플라스미드 (pFluc)를 사용하였다.

[0493] <시험관 내 (In vitro) 유전자 발현 활성>

[0494] 우선, pH-감수성 양이온성 지질, DSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DMG를 몰비 50:10:40:1.5의 조성으로 사용하여, 알코올 희석법에 의해 pFluc를 탑재시킨 지질 나노입자(pFluc 탑재 지질 나노입자)를 제조하였다. pH-감수성 양이온성 지질로서 CL4F6, CL4G6, CL4H6, CL15F6, CL15G6 또는 CL15H6을 사용하였다. 또한, 마이크로 유로에서의 N / P 비를 9로 하였다.

표 3

| CL | ζ -평균(nm) | PDI | ζ -전위(mV) | %mRNA 봉입율 |
|--------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| CL4F6 | 91.3±11.2 | 0.19±0.03 | -1.7±0.5 | 94.8±3.3 |
| CL4G6 | 90.6±7 | 0.19±0.05 | -1.3±0.7 | 94.5±3.6 |
| CL4H6 | 113.9±4.2 | 0.2±0.03 | -0.4±0.4 | 70±5.2 |
| CL15F6 | 105.7±8.6 | 0.13±0.02 | -1.2±0.4 | 93.1±3.3 |
| CL15G6 | 100.9±10.7 | 0.12±0.08 | -1.9±0.6 | 91.1±2.1 |
| CL15H6 | 149.9±9.8 | 0.11±0.01 | 0.9±0.9 | 81.9±3 |

[0496] 제조된 지질 나노 입자의 평균 입자 크기, PDI, 제타 전위 및 mRNA 봉입율을 조사하였다. 측정 결과를 표 3에 나타낸다. 표 3에서, "CL"은 양이온성 지질을 의미한다. 동적 광산란법에 의해 산출된 평균 입자 직경은 모두 90~150nm였다(표 3). pDNA 봉입율의 경우, CL4H6-LNP 및 CL15H6-LNP는 각각 70% 및 82%였다. 한편, 다른 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노입자는 pDNA 봉입율이 90% 이상의 양호한 값을 나타냈다.

[0497] 배양 세포에 pFluc 탑재 지질 나노 입자를 도입하고, 시험관 내 (in vitro) 유전자 발현 활성을 조사하였다. 구체적으로는, 96웰 플레이트에 배양한 HeLa-GFP 세포에 pFluc 탑재 지질 나노입자를 0.0625 μ g pDNA/웰로 형질감염시키고, 24시간 후에 Fluc 활성을 측정하였다. 양성 대조군으로서, pFluc를 도입 시약 "리포펙타민 3000(Lipofectamine 3000)"(Thermo Fisher Scientific사 제조)을 사용하여 HeLa-GFP 세포에 도입 하였다. Fluc 활성은 루미노미터(RLU)로 측정하고, BCA 방법에 의해 정량된 단백질량으로 보정하였다.

[0498] 각 pFluc 탑재 지질 나노 입자를 도입한 HeLa-GFP 세포의 Fluc 활성의 측정 결과를 도 4에 나타낸다. 도면에서, "Lipo3K"는 리포펙타민3000(Lipofectamine 3000)을 사용하여 유전자 도입된 양성 대조군을 의미한다. 도 4에 나타낸 바와 같이, CL15F6-LNP를 도입한 세포는 CL4H6-LNP, CL15H6-LNP 및 양성 대조군을 도입한 세포보다 더 높은 활성을 보였다.

[0499] <시험관 내(In vitro) 유전자 발현 활성>

[0500] 마이크로 유로에서의 N/P 비를 6으로 한 것 이외에는, 상기와 동일하게 하여 pFluc 탑재 지질 나노 입자를 제조했다.

표 4

| CL | ζ -평균(nm) | PDI | ζ -전위(mV) | %mRNA 봉입율 |
|--------|-----------------|------|-----------------|-----------|
| CL4F6 | 79.91 | 0.08 | -5.17 | 97.1 |
| CL4G6 | 74.48 | 0.11 | -2.46 | 97.6 |
| CL4H6 | 105.6 | 0.14 | -0.57 | 41.5 |
| CL15F6 | 109.4 | 0.07 | -2.02 | 95.4 |
| CL15G6 | 86.39 | 0.03 | -5.84 | 94.7 |

| | | | | |
|--------|-------|------|-------|------|
| CL15H6 | 121.7 | 0.08 | 0.367 | 72.4 |
|--------|-------|------|-------|------|

- [0502] 제조된 지질 나노 입자의 평균 입자 크기, PDI, 제타 전위 및 mRNA 봉입율을 조사하였다. 측정 결과를 표 4에 나타낸다. 표 4에서, "CL"은 양이온성 지질을 의미한다. 동적 광산란법에 의해 산출된 평균 입자 직경은 모두 70~125nm였다(표 4). pDNA 봉입률에 대해서는, CL4F6-LNP, CL4G6-LNP, CL15F6-LNP 및 CL15G6-LNP는 모두 90% 이상의 양호한 값을 나타냈다.
- [0503] 이어서, 제조한 각 pFluc 탑재 지질 나노입자를 ICR 마우스(4주령, 암컷)에 투여하고, 생체 내 (in vivo) 유전자 발현 활성을 조사하였다. 구체적으로는, ICR 마우스에, 각 pFluc 탑재 지질 나노 입자를 0.5 mg mRNA/kg으로 정맥 내 투여하고, 6 시간 후의 간 및 비장에서의 Fluc 활성을 측정하였다. Fluc 활성은 루미노미터(RLU)로 측정하고, BCA 방법에 의해 정량된 단백질량으로 보정하였다.
- [0504] 각 pFluc 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 간과 비장에서의 Fluc 활성(RLU/mg protein)의 측정 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5(A)는 간에서의 Fluc 활성의 측정 결과이고, 도 5(B)는 비장에서의 Fluc 활성의 측정 결과이다. 또한, 간에서의 유전자 발현 활성을 비장에서의 유전자 발현 활성으로 나누어 유전자 발현의 간 선택성을 산출하였다. 도 5(C)는 각 pFluc 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 [간에서의 Fluc 활성]/[비장에서의 Fluc 활성]의 산출 결과를 나타낸 도면이다. 도 5(A)에 나타낸 바와 같이, 간에서의 Fluc 활성은 CL4F6-LNP 및 CL15F6-LNP를 투여한 마우스는 CL4H6-LNP 및 CL15H6-LNP를 투여한 마우스보다 우수하였다. 또한, 도 5 (C)에 나타낸 바와 같이, CL4F6-LNP 및 CL4G6-LNP를 투여 한 마우스는 CL4H6-LNP를 투여 한 마우스와 비교하여 높은 간 선택성을 나타냈다. 유사하게, CL15F6-LNP 및 CL15G6-LNP를 투여한 마우스는 CL15H6-LNP를 투여한 마우스와 비교하여 높은 간 선택성을 나타냈다. 이러한 결과로부터, 동일한 친수성 부위를 갖는 지질 사이에서 비교하면, pDNA를 봉입한 경우에도, 스캐폴드 구조가 가지형 체인인 pH-감수성 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노 입자는, 스캐폴드 구조가 직쇄형인 pH-감수성 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노입자보다 간에의 선택성이 높고, 간에 특이적으로 전달하는 전달 캐리어로서 유용한 것을 알 수 있었다.
- [0505] III. CL4F6 유도체 및 CL15F6 유도체의 합성
- [0506] <CL4F6 및 CL4F6 유도체의 합성>
- [0507] CL4F6 및 CL4F6 유도체인 CL4F 6-2, CL4F 6-4, CL4F 7-3, CL4F 7-4, CL4F 7-5, CL4F 8-4, CL4F 8-5, 44 3, CL4F 9-4, CL4F 9-5, CL4F 9-6, CL4F 9-7, CL4F 10-2, CL4F 10-4, CL4F 10-5, CL4F 10-7, CL4 5, CL4F 11-6, CL4F 11-7, CL4F 11-9, CL4F 12-4, CL4F 12-6, CL4F 12-10, CL4F 13-3, CL4F 16-4 -1의 합성이 하기와 같이 수행되었다.
- [0508] 특허문헌 1에 기재된 방법으로 합성된 7-(4-(디프로필아미노)부틸)트리데칸-1,7,13-트리올(1.0mmol)을 5mL의 디클로로메탄에 용해시킨 후, 가지형 지방산 (2.40mmol), DMAP(N,N-디메틸-4-아미노피리딘)(0.10mmol) 및 EDCI(1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드)(3.0mmol)를 첨가하고, 실온에서 하룻밤 반응시켰다. 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거한 후, 아세트산 에틸로 현탁 한 후, 0.5N 수산화 나트륨 수용액 및 포화 식염수로 씻어 분리했다. 유기층에 무수 황산나트륨을 첨가하여 탈수하였다. 이것을 여과한 후, 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거하여 거친 생산물을 얻었다. 거친 생산물을 ODS 실리카겔 크로마토그래피[용출 용매; 아세토니트릴/이소프로판올(50:50): 물(0.1% TFA)(연속 구배)]와 실리카겔 크로마토그래피[용출 용매; 디클로로메탄:메탄올(연속 구배)]로 정제하여 CL4F6 또는 CL4F6 유도체를 얻었다.
- [0509] <CL15F6 및 CL15F6 유도체의 합성>
- [0510] CL15F6 및 CL15F6 유도체인 CL15F 6-2, CL15F 6-4, CL15F 7-3, CL15F 7-5, CL15F 8-6, CL15F 9-9, CL15F, CL15F 4, CL15F 10-5, CL15F 10-8, CL15F 11-5, CL15F 11-6, CL15F 11-7, CL15F 11-9, CL15F 1-4, CL15F 12-4, CL15F 2, CL15F 16-0 및 CL15F 16-1의 합성이 하기와 같이 수행되었다.
- [0511] 특허문헌 1에 기재된 방법으로 합성된 5,11-디히드록시 5-(6-히드록시헥실)운데실 1-메틸피페리딘-4-카르복실레이트(1.00 mmol)를 10 mL의 디클로로메탄에 용해시켰다. 이어서, 2-헥실데카노산(2.40mmol), DMAP(0.10mmol) 및 EDCI(3.0mmol)를 첨가하고, 실온에서 하룻밤 반응시켰다. 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거한 후, 아세트산 에틸로 현탁 한 후, 0.5N 수산화 나트륨 수용액 및 포화 식염수로 씻어 분리했다. 유기층에 무수 황산 나트륨을 첨가하여 탈수하였다. 이것을 여과한 후, 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거하여 거친 생산물을 얻었다. 거친 생산물을 ODS 실리카겔 크로마토그래피[용출 용매; 아세토니트릴/이소프로판올(50:50): 물

(0.1% TFA)(연속 구배)]와 실리카겔 크로마토그래피[용출 용매; 디클로로메탄:메탄올(연속 구배)]로 정제하여 CL15F6 또는 CL15F6 유도체를 얻었다.

[0512] 상기 가지형 지방산은 직쇄 지방산 또는 디메틸 말로네이트를 원료로서 하기와 같이 합성하였다.

[0513] <직쇄 지방산을 원료로 한 가지형 지방산의 합성>

[0514] 직쇄 지방산(10.28mmol)을 36mL의 THF에 용해시킨 후, -20℃ 이하에서 리튬 디이소프로필아미드(24mmol)를 적하하고, 0℃에서 30분 교반시켰다. 이어서, DMPU(18 mL)를 첨가하고, 0℃에서 60분 동안 교반하였다. 이어서, 요오드알칸(23.2mmol)을 첨가하고, 10℃에서 하룻밤 반응시켰다. 2N 염산으로 반응을 중지시킨 후 (quenching), 디에틸 에테르로 희석하고, 포화 식염수로 씻어 분리했다. 유기층에 무수 황산나트륨을 첨가하여 탈수하였다. 이것을 여과한 후, 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거하여 거친 생산물을 얻었다. 거친 생산물을 ODS 실리카겔 크로마토그래피[용출 용매; 아세트니트릴/이소프로판올(50:50): 물(10mM 아세트산암모늄)(연속 구배)]로 정제하여 가지형 지방산을 얻었다.

[0515] <디메틸 말로네이트를 원료로 한 분지가지형 지방산의 합성>

[0516] NaH (7.56 mmol)를 18 mL의 THF에 용해시키고 0℃에서 10분 동안 교반시켰다. 이어서, 디메틸 말로네이트 (7.56mmol)를 첨가하고, 0℃에서 10분 교반시켰다. 이어서, 임의의 요오드알칸(7.56 mmol)을 첨가하고, 실온에서 하룻밤 반응시켰다. NaH(11.34 mmol)를 첨가하고, 0℃에서 10분 교반하였다. 이어서, 임의의 요오드알칸 (11.34 mmol)을 첨가하고, 실온에서 하룻밤 반응시켰다. 아세트산으로 반응을 중지시킨 후 (quenching), 아세트산 에틸로 희석하고, 포화 식염수로 씻어 분리했다. 유기층에 무수 황산나트륨을 첨가하여 탈수하였다. 이것을 여과한 후, 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거하였다. 용매 제거의 성분을 16 mL의 에탄올로 용해시키고, 8N 수산화나트륨 수용액 5 mL를 첨가하고, 60℃에서 하룻밤 반응시켰다. 6N 염산으로 중화한 후, 아세트산 에틸로 희석하고, 포화 식염수로 씻어 분리하였다. 유기층에 무수 황산나트륨을 첨가하여 탈수하였다. 이것을 여과한 후, 회전식 증발기를 사용하여 용매를 증류 제거한 후, 160℃에서 2시간 가열하여 거친 생산물을 얻었다. 거친 생산물을 ODS실리카겔 크로마토그래피[용출 용매; 아세트니트릴/이소프로판올(50:50): 물(10mM 아세트산암모늄)(연속 구배)]로 정제하여 가지형 지방산을 얻었다.

[0517] CL4F 7-4, CL4F 8-5, CL4F 9-6 및 CL4F 10-7의 합성에 이용되는 가지형 지방산에서는 디메틸 말로네이트를 원료로 이용하는 방법보다 직쇄 지방산을 원료로 이용하는 방법으로 더 높은 수율로 가지형 지방산을 얻을 수 있었다.

[0518] CL4F 6-2, CL4F 6-4, CL4F 7-3, CL4F 7-5, CL4F 8-4, CL4F 8-6, CL4F 9-3, CL4F 9-4, CL4F 9-9 CL4F 10-2, CL4F 10-4, CL4F 10-5, CL4F6, CL4F 10-8, CL4F 11-5, CL4F 11-6, CL4F 11-7, CL4F 2 6, CL4F 12-10, CL4F 13-3, CL4F 14-2, CL4F 16-1, CL15F 6-2, CL15F 6-4, CL15F 7-3, CL15F 5 -3, CL15F 9-5, CL15F 9-7, CL15F 10-4, CL15F 10-5, CL15F6, CL15F 10-8, CL15F 11-5, CL15F 1-11-11-5, CL15F 1-11 CL15F 12-4, CL15F 12-10, CL15F 13-3, CL15F 14-2 및 CL15F 16-1의 합성에 사용되는 가지형 지방산에 있어서, 디메틸 말로네이트를 원료로 사용하는 방법이 직쇄 지방산을 원료로 사용하는 방법보다 더 높은 수율로 가지형 지방산을 얻을 수 있었다.

[0519] IV. CL4F6 유도체 및 CL15F6 유도체를 이용한 지질 나노입자의 생산 및 평가

[0520] 1. mRNA 탑재 지질 나노 입자의 제조 및 평가

[0521] <mRNA 탑재 지질 나노 입자(mRNA-LNP)의 제조>

[0522] 지질 나노입자는 유로(flow-channel)를 이용한 알코올 희석법에 의해 제조하였다. 유로로서는, 믹서 내장 마이크로 유체 디바이스 (Microfluidic device with built-in mixer) 「NanoAssemblr」(Precision NanoSystems사 제조)를 사용하였다.

[0523] 구체적으로는, 우선, 지질 농도 8mM로 조정된 에탄올 용액 및 mRNA 농도 46.1µg/mL로 조절된 시트르산 완충액 (50mM, pH 3.5)을 각각 3mL/분 및 9mL/분으로 마이크로 유로 내부로 송액하고, 유로로부터 배출된 지질 나노입자 용액을 회수하였다. 상기 지질 나노입자 용액을, 20 mM HEPES 완충액(9% 수크로스, pH 7.45)로 10배 희석한 후, 초여과 유닛 (ultrafiltration unit) 으로 농축하여, 지질 나노입자 용액을 회수하였다.

[0524]

[0525] <지질 나노 입자의 구성 지질>

[0526] pH-감수성 양이온성 지질, DSPC(1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 유화 산업), 콜레스테롤(나카라이 테스크), 및 DMG-PEG2K(유화 산업)을 몰비 50:10: 38.5:1.5의 조성으로 사용하여, 알코올 회석법에 의해 FlucmRNA를 탑재시킨 지질 나노입자(FlucmRNA 탑재 지질 나노입자)를 제작하였다. FlucmRNA는 트리링크 바이오 테크놀로지 (TriLink Biotechnologies) 사의 CleanCap® FLuc mRNA (5 moU)를 사용했다.

[0527] <지질 나노 입자의 평균 입자 직경 및 PDI의 측정>

[0528] 지질 나노입자의 PBS(-)중에 있어서의 평균 입자 직경(ζ -Average) 및 PDI를, 동적 광산란법을 이용한 분석 장치 「Zetasizer Nano ZSP」(Malvern사 제조)를 이용하여 측정하였다.

[0529] <지질 나노 입자의 pKa의 측정>

[0530] 지질 나노입자의 pKa는 p-톨루이지노-2-나프탈렌술폰산(TNS)을 사용하여 측정하였다. 우선, TNS(최종 농도: 0.75 μ M)와 지질 나노입자(최종 농도: 60 μ M)를 각 pH로 조절한 완충액 중에서 혼합하였다. 제조된 혼합 용액의 형광 강도를 마이크로 플레이트 리더로 측정 하였다. 여기 파장은 측정값 중 pH 3.5에서의 측정값을 100%로 전하율, pH 9.5에서의 측정값을 0% 전하율로 하고, 50% 전하율을 나타내는 pH를 pKa로서 산출하였다.

[0531] <지질 나노입자의 핵산 봉입률>

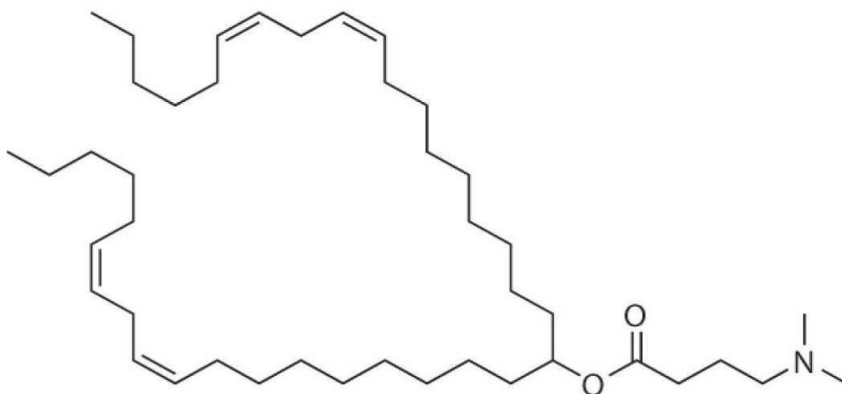
[0532] 지질 나노 입자의 siRNA 및 mRNA의 봉입율은 Ribogreen 시약으로 측정 하였다. 지질 나노 입자의 농도를 핵산 농도로서 8 μ g/ml가 되도록 TE 완충액으로 희석한 용액을 나노 입자 표면 핵산 농도 측정용 용액으로서 준비하였다. 또한, 지질 나노입자의 농도를 핵산 농도로서 1.2 μ g/ml X-triton100이 1%(w/w)가 되도록 첨가하여 총 핵산 농도 측정용 용액을 준비하였다. 각각의 용액 100 μ L에 대해 Ribogreen® 시약(Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent, ThermoFisher Scientific사 제조) 100 μ L를 96웰 마이크로 플레이트(흑색, 폴리스티렌제, 플랫 보텀, Corning사제)의 웰 내에서 잘 혼합하여, 여기 파장 485nm, 측정 파장 528nm에서의 형광 강도를 마이크로 플레이트 리더로 측정하였다. 핵산 농도의 산출은, 1% X-triton100 함유의 핵산 용액(핵산 농도: 0~2.5 μ g/ml)을 상기와 동일하게 하여 형광 강도를 측정함으로써 제조한 검량선에 의해 행하였다. 다음의 계산식에 의해 각 지질 나노입자의 핵산 봉입률을 산출하였다.

[0533] 봉입률 %=(총 핵산 농도 측정용 용액의 핵산 농도(μ g/ml)-나노 입자 표면 핵산 농도 측정용 용액의 핵산 농도(μ g/ml))÷총 핵산 농도 측정용 용액의 핵산 농도(μ g/ml)×100

[0534] <결과>

[0535] 제조된 지질 나노입자의 평균 입자 직경, PDI 및 mRNA 봉입률, pKa를 조사하였다. CL4F6 유도체 나노 입자의 측정 결과를 표 5 및 6에, CL15F6 유도체 나노 입자의 측정 결과를 표 7에 나타낸다. 대조군으로서, 다음과 같은 구조를 갖는 D-Lin-MC3-DMA (MC3) (MedChemExpress사 제조)를 사용하였다.

[0536] [화학식. 36]



[0537]

[0538] 동적광산란법에 의해 산출된 표5의 CL4F6 유도체 나노입자의 평균 입자 직경은 모두 60-220nm이며, CL4F 16-0-LNP 이외는 PDI가 작고 균일성이 높은 입자가 형성되었다. mRNA 봉입률은 CL4F 6-2-LNP와 CL4F 16-1-LNP는 80%

미만인 반면, 다른 양이온성 지질을 포함하는 LNP는 모두 80% 이상을 나타냈다.

[0539] 표 7의 CL15F6 유도체 나노입자의 평균 입자 직경은 CL15F 6-4-LNP, CL15F 7-3-LNP는 300nm를 초과한 반면, 다른 양이온성 지질을 포함하는 LNP는 모두 90~200nm이었다. PDI는 CL15F 6-4-LNP, CL15F 7-3-LNP, CL15F 16-0-LNP, CL15H6-LNP 이외에는 작고 균일성이 높은 입자가 형성되었다. mRNA 봉입률은 CL15F 6-4-LNP, CL15F 7-3-LNP는 80% 미만인 반면, 다른 양이온성 지질을 포함하는 LNP는 모두 80% 이상을 나타냈다.

[0540] 이어서, 제조한 각 FlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 Balb/c 마우스(Charles River Laboratories Japan, Inc., 7주령, 암컷)에 투여하고, 생체 내 (in vivo) 유전자 발현 활성을 조사하였다. 구체적으로는, Balb/c 마우스에, 각 FlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 0.1mg mRNA/kg으로 정맥 내 투여하고, 6시간 후 간 및 비장에 있어서의 Fluc 활성을 측정하였다. Fluc 활성은 PBS로 15mg/mL에 녹인 비보글로 루시페린 (VivoGlo Luciferin, In Vivo Grade)(Promega, P1041)을 마우스 1마리당 1.5mg이 되도록 꼬리 정맥을 통해 투여한 후, 생체 내 (in vivo) 이미징 시스템(Perkin Elmer, IVIS200)에 의해 측정하였다. Fluc 활성의 단위는 최대 방출 파장 약 560 nm에서의 단위 면적당 방출 강도(Avg Radiance[p/s/cm²/sr])이다.

[0541] 각 FlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 간과 비장에 있어서의 Fluc 활성(Avg Radiance [p/s/cm²/sr])의 측정 결과를 표 5-7에 나타낸다.

[0542] 표 5 및 6의 CL4F6 유도체 나노입자의 간에서의 Fluc 활성은 CL4F 8-6, CL4F 9-7 또는 CL4F 11-6 함유 FlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스에서 CL4F6 함유 FlucmRNA 지질 입자를 투여한 마우스보다 더 높은 Fluc 활성을 나타내었다. 한편, 비장에서의 CL4F6 유도체 나노 입자의 Fluc 활성은 CL4F 7-5, CL4F 8-4, CL4F 9-3, CL4F 10-2, CL4F 8-6, CL4F 10-4, CL4F 10-5, CL4F 12-4, CL4F 13-3, CL4F 14-2, CL4F 7-4, CL4F 8-5, CL4F 9-4, 또는 CL4F 9-5를 포함하는 FlucmRNA 지질 나노 입자를 투여한 마우스에 있어서, CL4F6 함유 나노입자를 투여한 마우스보다 더 높은 Fluc 활성을 보였다.

[0543] 표 7의 CL15F6 유도체 나노입자의 간에서의 Fluc 활성은 CL15F 9-7, CL15F 11-5, CL15F 11-6, CL15F 10-8, CL15F 11-7, CL15F 1 CL15F 14-2를 포함하는 FlucmRNA 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스에 있어서, CL15F6를 포함하는 FlucmRNA 지질 나노입자를 투여한 마우스보다 높은 Fluc 활성을 나타냈다. 표 7의 CL15F6의 비장에서의 Fluc 활성은 CL15F 6-4, CL15F 7-3, CL15F 7-5, CL15F 9-3, CL15F 19-5, CL15F 10-5, CL15F 10-5, CL15F 10-8, CL15F 11-7, CL15F 11-9, 또는 CL15F 14-2를 포함하는 FlucmRNA 지질 나노입자를 투여한 마우스에 있어서, CL15F6 함유 FlucmRNA 지질 나노입자를 투여한 마우스보다 높은 Fluc 활성을 보였다.

표 5

[0544]

| 지질 명칭 | ζ-평균 (nm) | PDI | %mRNA 봉입률 | pKa | 간에서 Fluc 활성 | 비장에서 Fluc 활성 |
|-----------|-----------|-------|-----------|------|-------------|--------------|
| CL4F 6-2 | 218.20 | 0.069 | 41.4 | 6.40 | 1.34E+03 | 1.24E+05 |
| CL4F 7-5 | 109.80 | 0.057 | 99.9 | 6.27 | 4.56E+07 | 1.47E+07 |
| CL4F 8-4 | 101.60 | 0.020 | 99.7 | 6.27 | 6.09E+07 | 1.41E+07 |
| CL4F 9-3 | 102.80 | 0.030 | 99.6 | 6.34 | 2.96E+07 | 8.17E+06 |
| CL4F 10-2 | 93.60 | 0.068 | 98.6 | 6.35 | 3.02E+07 | 6.40E+06 |
| CL4F 8-6 | 88.78 | 0.022 | 99.4 | 6.14 | 1.80E+08 | 9.58E+06 |
| CL4F 10-4 | 84.92 | 0.041 | 99.8 | 6.19 | 1.20E+08 | 6.70E+06 |
| CL4F 10-5 | 84.62 | 0.021 | 99.7 | 6.07 | 1.06E+08 | 4.64E+06 |
| CL4F 9-7 | 81.30 | 0.004 | 99.2 | 6.05 | 1.55E+08 | 2.43E+06 |
| CL4F 11-5 | 81.81 | 0.019 | 99.6 | 6.19 | 4.50E+07 | 1.03E+06 |

| | | | | | | |
|------------|--------|-------|------|------|----------|----------|
| CL4F 12-4 | 84.57 | 0.015 | 99.0 | 6.16 | 7.70E+07 | 3.19E+06 |
| CL4F 13-3 | 83.05 | 0.044 | 96.3 | 6.22 | 7.34E+07 | 7.30E+06 |
| CL4F 14-2 | 74.02 | 0.078 | 94.0 | 6.29 | 4.08E+07 | 3.66E+06 |
| CL4F 10-7 | 79.68 | 0.039 | 99.8 | 5.99 | 1.19E+08 | 2.03E+06 |
| CL4F 11-6 | 84.50 | 0.020 | 99.8 | 6.02 | 1.38E+08 | 2.54E+06 |
| CL4F 16-0 | 158.30 | 0.225 | 86.2 | 7.46 | 2.32E+04 | 2.83E+05 |
| CL4F 16-1 | 69.08 | 0.045 | 65.9 | 6.40 | 8.52E+06 | 1.93E+06 |
| CL4F 10-8 | 81.99 | 0.021 | 99.8 | 5.99 | 5.14E+07 | 8.04E+05 |
| CL4F 11-7 | 79.45 | 0.021 | 99.7 | 5.98 | 1.23E+08 | 2.03E+06 |
| CL4F 11-9 | 81.13 | 0.014 | 99.8 | 5.92 | 6.86E+07 | 1.19E+06 |
| CL4F 12-10 | 75.85 | 0.019 | 99.6 | 5.85 | 3.09E+07 | 2.77E+05 |
| CL4F6 | 82.66 | 0.006 | 99.6 | 6.05 | 1.26E+08 | 2.81E+06 |
| CL4G6 | 81.21 | 0.030 | 99.8 | 6.02 | 4.58E+07 | 2.08E+06 |
| CL4H6 | 71.28 | 0.072 | 80.1 | 6.53 | 1.06E+07 | 2.10E+06 |
| MC3 | 68.60 | 0.042 | 99.0 | 6.31 | 7.60E+06 | 6.48E+05 |

표 6

[0545]

| 지질 명칭 | ζ -평균 (nm) | PDI | %mRNA 봉입율 | pKa | 간에서 Fluc 활성 | 비장에서 Fluc 활성 |
|-----------|------------------|-------|-----------|------|----------------|-----------------|
| CL4F 6-4 | 141.10 | 0.023 | 97.2 | 6.38 | 2.17E+05 | 2.95E+05 |
| CL4F 7-3 | 133.90 | 0.025 | 98.1 | 6.39 | 3.43E+05 | 6.64E+05 |
| CL4F 7-4 | 113.50 | 0.032 | 98.8 | 6.33 | 5.05E+06 | 7.43E+06 |
| CL4F 8-5 | 94.65 | 0.043 | 99.1 | 6.23 | 4.80E+07 | 1.45E+07 |
| CL4F 9-4 | 95.29 | 0.002 | 99.1 | 6.26 | 2.55E+07 | 8.69E+06 |
| CL4F 9-5 | 89.41 | 0.048 | 99.0 | 6.16 | 6.84E+07 | 9.53E+06 |
| CL4F 9-6 | 89.18 | 0.021 | 99.1 | 6.10 | 9.61E+07 | 3.89E+06 |
| CL4F 12-6 | 82.84 | 0.017 | 99.7 | 6.03 | 5.86E+07 | 1.72E+06 |
| CL4F6 | 88.07 | 0.020 | 99.4 | 6.05 | 1.25E+08 | 4.01E+06 |

표 7

| 지질 명칭 | ζ -평균(nm) | PDI | %mRNA 봉입율 | pKa | 간에서 Fluc 활성 | 비장에서 Fluc 활성 |
|-------------|-----------------|-------|-----------|------|-------------|--------------|
| CL15F 6-4 | 312.10 | 0.316 | 66.7 | 6.90 | 1.84E+06 | 3.39E+07 |
| CL15F 7-3 | 370.30 | 0.369 | 64.2 | 6.85 | 5.34E+06 | 1.48E+07 |
| CL15F 7-5 | 196.00 | 0.007 | 97.6 | 6.33 | 2.15E+06 | 1.37E+07 |
| CL15F 9-3 | 196.80 | 0.044 | 95.5 | 6.62 | 1.16E+06 | 7.47E+06 |
| CL15F 8-6 | 132.00 | 0.011 | 99.2 | 6.57 | 1.92E+06 | 5.02E+06 |
| CL15F 9-5 | 135.00 | 0.037 | 99.1 | 6.57 | 1.86E+06 | 5.77E+06 |
| CL15F 10-4 | 146.10 | 0.030 | 98.7 | 6.48 | 2.07E+06 | 3.97E+06 |
| CL15F 10-5 | 113.90 | 0.047 | 99.4 | 6.59 | 2.70E+06 | 7.55E+06 |
| CL15F 9-7 | 107.60 | 0.010 | 99.5 | 6.64 | 6.76E+06 | 4.23E+06 |
| CL15F 11-5 | 108.90 | 0.010 | 99.8 | 6.71 | 9.38E+06 | 5.01E+06 |
| CL15F 12-4 | 116.60 | 0.009 | 99.7 | 6.62 | 2.87E+06 | 5.10E+06 |
| CL15F 16-0 | 195.90 | 0.234 | 100.1 | 7.15 | 1.97E+05 | 4.59E+05 |
| CL15F 13-3 | 142.90 | 0.048 | 98.62 | 6.73 | 3.51E+06 | 6.11E+06 |
| CL15F 11-6 | 106.50 | 0.007 | 99.75 | 6.48 | 9.09E+06 | 8.19E+06 |
| CL15F 16-1 | 187.70 | 0.182 | 94.0 | 7.13 | 2.18E+05 | 1.27E+06 |
| CL15F 10-8 | 99.84 | 0.026 | 99.78 | 6.24 | 1.35E+07 | 8.42E+06 |
| CL15F 11-7 | 102.50 | 0.002 | 99.86 | 6.29 | 1.10E+07 | 7.13E+06 |
| CL15F 11-9 | 99.31 | 0.023 | 99.78 | 6.60 | 3.66E+07 | 7.55E+06 |
| CL15F 12-10 | 97.59 | 0.030 | 99.78 | 6.60 | 4.33E+07 | 5.58E+06 |
| CL15F 14-2 | 158.90 | 0.117 | 95.70 | 7.00 | 1.03E+07 | 7.58E+06 |
| CL15F6 | 115.50 | 0.002 | 99.69 | 6.39 | 6.28E+06 | 5.76E+06 |
| CL15G 6 | 102.40 | 0.012 | 100.24 | 6.15 | 6.52E+06 | 2.77E+06 |
| CL15H 6 | 180.90 | 0.238 | 83.8 | 7.14 | 1.17E+05 | 6.17E+05 |
| MC3 | 71.49 | 0.072 | 99.04 | 6.31 | 5.69E+06 | 2.02E+05 |

[0547] 2. siRNA 탑재 지질 나노 입자의 제조 및 평가

[0548] <siRNA 탑재 지질 나노 입자의 제조>

[0549] mRNA 대신에 siRNA를 탑재시킨 지질 나노 입자를 제조하고, 생체 내(in vivo) F7 녹다운 활성을 조사하였다. siRNA 탑재 지질 나노 입자는, 마이크로 유로에 있어서의 N/P비를 6으로 한 것 이외에는, 상기와 동일하게 하여 제조했다. F7에 대한 siRNA의 염기 서열을 표 8에 나타내었다. 표 중, 대문자는 천연형 RNA(T만 천연형 DNA), 소문자는 2'-fluoro 수정체, *는 포스포로티오에이트 결합을 각각 나타낸다.

표 8

[0550]

| F7에 대한 siRNA | 염기서열 | 서열 번호: |
|--------------|------------------------|--------|
| 센스 가닥 | GGAucAucucAAGucuuAC*T | 1 |
| 안티센스 가닥 | GuAAGAcuuGAGAuGAuccT*T | 2 |

[0551] 우선, pH-감수성 양이온성 지질, DSPC(1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린), 콜레스테롤 및 PEG-DMG를 몰비 50:10:38.5:1.5의 조성으로 사용하여, 알코올 희석법으로, F7에 대한 siRNA를 탑재시킨 지질 나노 입자(F7siRNA 탑재 지질 나노 입자)를 제작하였다.

[0552] <결과>

[0553] 제조된 지질 나노 입자의 평균 입자 직경, PDI, siRNA 봉입율 및 pKa를 조사하였다. CL4F6 유도체 나노입자의 측정 결과를 표 9 및 10에, CL15F6 유도체 나노입자의 측정 결과를 표 11에 나타낸다. CL4F6 유도체 나노입자의 평균 입자 직경이 60~280nm이며, siRNA 봉입율은 CL4F 6-2-LNP는 90% 미만인 반면, 다른 양이온성 지질을 포함하는 LNP는 모두 90% 이상을 나타냈다. CL4F 16-2-LNP를 제외하고는 PDI가 작고 균일성이 높은 입자가 형성되었다.

[0554] CL15F6 유도체 나노 입자의 평균 입자 직경이 CL15F 6-2-LNP는 300nm를 초과하고 있었지만, 다른 양이온성 지질을 포함하는 LNP는 모두 85-290nm였다. siRNA 봉입율은 모든 LNP에서 90% 이상을 나타냈다. CL15F 6-2-LNP, CL15F 6-4-LNP, CL15F 7-3-LNP, CL15F 16-0-LNP 이외는 PDI가 작고 균일성이 높은 입자가 형성되었다.

[0555] 이어서, 제조한 각 F7siRNA 탑재 지질 나노입자를 Balb/c 마우스(Charles River Laboratories Japan, Inc., 5 주령, 암컷)에 투여하고, 생체 내(in vivo) F7 녹다운 활성을 조사하였다. 구체적으로는, BALB/c 마우스에, 표 9에 기재된 지질을 함유하는 F7siRNA 탑재 지질 나노 입자는 0.025mg siRNA/kg으로, 표 10 및 11에 기재된 지질을 함유하는 F7siRNA 탑재 지질 나노 입자는 0.025mg siRNA/kg으로 정맥내 투여하고, 24시간 후의 혈장 중 F7 효소 활성을 BIOPHEN FVII(Biophen, A221304)를 사용하여 측정하였다. 미처리군 마우스의 혈장 중 F7 효소 활성을 100%로 하여, 각 F7siRNA 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 상대 혈장 중 F7 효소 활성(%)을 산출하였다. 또한 MC3 함유 F7siRNA 탑재 지질 나노입자를 투여한 마우스의 상대 혈장 중 F7 효소 활성(%)을 1로 하여 비율을 산출하였다. CL4F6 유도체 나노입자의 측정 결과를 표 9 및 10에, CL15F6 유도체 나노입자의 측정 결과를 표 11에 나타낸다.

[0556] 표 9 및 10의 CL4F 10-4, CL4F 8-5, CL4F 9-5 또는 CL4F 12-6 를 포함하는 F7siRNA-탑재 지질 나노 입자는 MC3 를 포함하는 F7siRNA-탑재 지질 나노 입자보다 높은 녹다운 활성을 나타낸다.

[0557] 표 11의 CL15F 9-7, CL15F 11-5, CL15F 12-4, CL15F 11-6, CL15F 10-8, CL15F 11-7, CL15F 11-9, 또는 CL15F 12-10f를 포함하는 F7siRNA-탑재 지질 나노 입자는 MCS를 포함하는 F7siRNA-탑재 지질 나노 입자보다 높은 녹다운 활성을 보였다.

표 9

[0558]

| 지질 명칭 | ζ-평균 (nm) | PDI | % siRNA 봉입율 | pKa | F7 효소 활성 (%) |
|----------|-----------|-------|-------------|------|--------------|
| CL4F 6-2 | 274.50 | 0.298 | 56.9 | 6.34 | 54.8 |
| CL4F 7-5 | 120.20 | 0.021 | 100.1 | 6.45 | 35.7 |
| CL4F 8-4 | 110.00 | 0.006 | 100.0 | 6.43 | 5.6 |
| CL4F 9-3 | 114.40 | 0.022 | 99.9 | 6.33 | 11.7 |

| | | | | | |
|------------|--------|-------|-------|------|-------|
| CL4F 10-2 | 115.60 | 0.024 | 99.6 | 6.46 | 11.4 |
| CL4F 8-6 | 99.72 | 0.010 | 100.0 | 6.31 | 3 |
| CL4F 10-4 | 95.37 | 0.021 | 100.1 | 6.36 | 1.7 |
| CL4F 10-5 | 98.70 | 0.006 | 100.1 | 6.27 | 3 |
| CL4F 9-7 | 97.03 | 0.020 | 99.9 | 6.31 | 4.3 |
| CL4F 11-5 | 89.72 | 0.012 | 100.1 | 6.38 | 4.3 |
| CL4F 12-4 | 94.55 | 0.011 | 100.1 | 6.40 | 5 |
| CL4F 13-3 | 92.25 | 0.023 | 99.7 | 6.41 | 8.4 |
| CL4F 14-2 | 80.87 | 0.076 | 98.0 | 6.38 | 7.9 |
| CL4F 10-7 | 89.34 | 0.013 | 100.1 | 6.27 | 4.1 |
| CL4F 11-6 | 92.98 | 0.034 | 99.9 | 6.29 | 6 |
| CL4F 16-1 | 64.81 | 0.092 | 94.9 | 6.33 | 103.6 |
| CL4F 10-8 | 91.44 | 0.007 | 99.9 | 6.14 | 8.1 |
| CL4F 11-7 | 94.76 | 0.019 | 99.8 | 6.13 | 14.1 |
| CL4F 12-6 | 92.28 | 0.012 | 99.3 | 6.21 | 6 |
| CL4F 11-9 | 90.93 | 0.009 | 100.1 | 5.98 | 47.7 |
| CL4F 12-10 | 85.62 | 0.015 | 99.2 | 5.87 | 80.6 |
| CL4F6 | 92.27 | 0.014 | 99.9 | 6.22 | 6.8 |
| CL4G6 | 85.14 | 0.048 | 100.1 | 6.14 | 7.6 |
| CL4H6 | 68.86 | 0.102 | 96.1 | 6.53 | 47.2 |
| MC3 | 81.68 | 0.048 | 99.1 | 6.28 | 2.5 |

표 10

[0559]

| 지질 명칭 | ζ -평균(nm) | PDI | % siRNA 봉입율 | pKa | F7 효소 활성 (MC3가 1일때의 비율) |
|-----------|-----------------|-------|-------------|------|----------------------------|
| CL4F 8-5 | 103.40 | 0.034 | 99.7 | 6.43 | 0.38 |
| CL4F 9-5 | 99.72 | 0.032 | 99.9 | 6.40 | 0.43 |
| CL4F 12-6 | 94.26 | 0.008 | 99.6 | 6.21 | 0.18 |
| MC3 | 85.73 | 0.013 | 99.1 | 6.28 | 1 |

표 11

[0560]

| 지질 명칭 | ζ -평균 (nm) | PDI | % siRNA 봉입율 | pKa | F7 효소 활성 (MC3가 1일때의 비율) |
|-------------|---------------------|-------|-------------|------|----------------------------|
| CL15F 6-2 | 390.7 | 0.534 | 100.4 | 7.35 | 1.87 |
| CL15F 6-4 | 230.7 | 0.255 | 91.5 | 6.75 | 2.28 |
| CL15F 7-3 | 287.9 | 0.398 | 95.7 | 6.93 | 2.08 |
| CL15F 7-5 | 180.6 | 0.039 | 98.8 | 6.41 | 1.74 |
| CL15F 9-3 | 200.4 | 0.172 | 98.3 | 6.73 | 1.50 |
| CL15F 8-6 | 121.2 | 0.056 | 100.2 | 6.19 | 1.60 |
| CL15F 9-5 | 129.5 | 0.035 | 100.1 | 6.29 | 1.11 |
| CL15F 10-4 | 126.8 | 0.021 | 100.3 | 6.31 | 2.00 |
| CL15F 10-5 | 111.7 | 0.003 | 100.5 | 6.23 | 1.33 |
| CL15F 9-7 | 103.1 | 0.023 | 100.3 | 6.42 | 0.60 |
| CL15F 11-5 | 109.6 | 0.017 | 100.3 | 6.48 | 0.78 |
| CL15F 12-4 | 113.2 | 0.065 | 100.2 | 6.48 | 0.81 |
| CL15F 16-0 | 109.6 | 0.238 | 101.0 | 7.60 | 1.48 |
| CL15F 13-3 | 126.0 | 0.081 | 100.3 | 6.65 | 1.11 |
| CL15F 11-6 | 101.2 | 0.025 | 100.3 | 6.36 | 0.81 |
| CL15F 16-1 | 122.5 | 0.088 | 99.0 | 7.39 | 1.37 |
| CL15F 10-8 | 99.44 | 0.041 | 100.6 | 6.41 | 0.52 |
| CL15F 11-7 | 102.5 | 0.049 | 100.6 | 6.48 | 0.85 |
| CL15F 11-9 | 104.9 | 0.029 | 101.1 | 6.14 | 0.50 |
| CL15F 12-10 | 100.2 | 0.014 | 100.5 | 6.36 | 0.51 |
| CL15F 14-2 | 143.9 | 0.13 | 100.2 | 7.14 | 1.82 |
| CL15F6 | 105.9 | 0.044 | 100.5 | 6.23 | 1.52 |
| CL15G6 | 97.73 | 0.021 | 100.7 | 5.76 | 2.69 |
| CL15H6 | 123.50 | 0.142 | 100.2 | 7.57 | 1.99 |

| | | | | | |
|-----|-------|-------|------|------|------|
| MC3 | 87.69 | 0.048 | 97.6 | 6.28 | 1.00 |
|-----|-------|-------|------|------|------|

- [0561] 3. DNA-탑재 지질 나노 입자의 제조 및 평가
- [0562] <pDNA-탑재 지질 나노 입자의 제조 및 평가>
- [0563] mRNA 대신에 eGFP를 코딩한 pDNA를 탑재시킨 지질 나노 입자를 제조하고, 시험관 내(in vitro)에서의 eGFP의 방출을 조사하였다. eGFP를 코딩한 pDNA는 랙스위치 II 포유류 발현 시스템(LacSwitch II Mammalian Expression System)(Agilent사)으로 부터의 pCMV-LacI에 eGFP를 암호화한 유전자를 삽입함으로써 제작하였다.
- [0564] pDNA-탑재 지질 나노 입자는 mRNA-탑재 지질 나노 입자와 동일한 방법으로 제조되었다.
- [0565] <지질 나노 입자의 구성 지질>
- [0566] pH-감수성 양이온성 지질, DSPC(1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, YUKA SANGYO CO., LTD), 콜레스테롤(nacalai tesque), 및 DMG-PEG2K(YUKA SANGYO CO., LTD)을 몰비 50:10: 38.5:1.5의 조성으로 사용되었다.
- [0567] <지질 나노 입자의 평균 입자 직경 및 PDI의 측정>
- [0568] 지질 나노 입자의 평균 입자 직경 및 PDI의 측정은 mRNA-LNP의 평균 입자 직경의 측정과 동일한 방법으로 수행되었다.
- [0569] <지질 나노 입자의 핵산 봉입율>
- [0570] 지질 나노 입자의 pDNA의 봉입율은 Picogreen (등록 상표) 시약 (Quant-iT™ dsDNA Assay Kit, broad range, ThermoFisher Scientific 사 제조)을 사용하여 측정 하였다. pDNA의 봉입율 측정에서는 나노입자 표면 핵산 농도 측정용 용액의 핵산 농도는 1.6µg/mL, 총 핵산 농도 측정용 용액의 핵산 농도는 24ng/mL, 검량선에 사용한 핵산 농도는 0~0.5µg/mL로 하고, 측정 시약으로서 Picogreen(등록상표) 시약(Quant-iT™ dsDNA Assay Kit, broad range, ThermoFisher Scientific사 제조)을 사용하는 것 이외는 siRNA 및 mRNA의 봉입율 측정방법과 동일한 방법으로 수행되었다.
- [0571] 봉입율 %=(총 핵산 농도 측정용 용액의 핵산 농도(µg/mL)-나노 입자 표면 핵산 농도 측정용 용액의 핵산 농도(µg/mL))÷(총 핵산 농도 측정용 용액의 핵산 농도(µg/mL))×100
- [0572] <결과>
- [0573] 결과는 아래 표에 나타난다. 제조한 지질 나노 입자를 40° C 에 놓아두고, 각각의 기간동안 보관 후에, 하기의 기준에 따라, 품질이 양호하게 유지되었는지 여부를 평가하였다:
- [0574] 양호(O): 입자 직경은 제조 직후의 입자 직경이 ±20nm 이내이고, PDI가 0.2 이하, 봉입율은 80% 이상임;
- [0575] 양포하지 않음(X): 입자 직경은 제조 직후의 입자 직경이 ±20nm 초과하거나 봉입율은 80% 미만임.
- [0576] 40°C에서 1주일 또는 그 이상 놓아 두었을 때 품질이 양호하게 유지되고 있는 지질 나노 입자에 대해서는, 안정성이 우수하다고 평가할 수 있다.

표 12

| 지질 이름 | 제조 직후 | | 40° C 1W | | 40° C 1M | | 품질 | |
|-----------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|----------|----------|
| | 입자 크기 (nm) | 봉입율(%) | 입자 크기 (nm) | 봉입율(%) | 입자 크기 (nm) | 봉입율(%) | 40° C 1W | 40° C 1M |
| CL4F 10-5 | 101.6 | 98.2 | 101.0 | 98.3 | 104.2 | 98.5 | 0 | 0 |
| CL4F 9-7 | 98.2 | 98.1 | 97.1 | 98.0 | 101.4 | 98.1 | 0 | 0 |
| CL4F 8-4 | 104.7 | 98.0 | 109.1 | 97.8 | 116.4 | 98.1 | 0 | 0 |

- [0578] 4. 지질 나노 입자의 저장 안정성 평가
- [0579] <지질 나노 입자의 저장>
- [0580] 지질 나노 입자는 유로를 이용한 알코올 회석법에 의해 제조하였다. 유로로서는, 믹서 내장 마이크로 유체 디바이스 "NanoAssemblr" (Precision NanoSystems사 제조)를 사용하였다.
- [0581] 구체적으로는, 우선 지질 농도 8mM로 조절한 에탄올 용액 및 mRNA 농도 46.1 μ g/mL로 조절한 시트르산 완충액 (50mM, pH 3.5)을 각각 3mL/분 및 9mL/분으로 마이크로 유로 내부로 송액하고, 유로로부터 배출된 지질 나노입자 용액을 회수하였다. 상기 지질 나노입자 용액을, 20 mM HEPES 완충액(9% 수크로스, pH 7.45)로 10배 희석한 후, 초여과-유닛으로 농축하여, 지질 나노입자 용액을 회수하였다.
- [0582] <지질 나노 입자의 구성 지질>
- [0583] pH-감수성 양이온성 지질, DSPC(1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린), 콜레스테롤, 및 PEG-DMG를 몰비 50:10:38.5:1.5의 조성으로 사용하여, 알코올 회석법에 의해, FlucmRNA를 탑재시킨 지질 나노 입자(FlucmRNA-loaded lipid nanoparticles)는 제조되었다. FlucmRNA는 트리링크 바이오텍크놀로지(TriLink Biotechnologies)사의 CleanCap® FLuc mRNA (5 moU)를 사용했다.
- [0584] <지질 나노 입자의 평균 입자 직경 및 PDI의 측정>
- [0585] PBS(-)에서의 지질 나노 입자의 평균 입자 크기 및 PDI는 동적 광산란을 이용하는 분석기인 "Zetasizer Nano ZSP"(Malvern사 제조)를 사용하여 측정되었다.
- [0586] <지질 나노 입자의 핵산 봉입율>
- [0587] 지질 나노 입자의 mRNA 봉입율은 Ribogreen(life technologies사 제조)을 사용하여 측정되었다.
- [0588] <보존 안정성 평가>
- [0589] 지질 나노 입자를 -80 $^{\circ}$ C, 5 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C의 각 온도에서 놓아두고, 각 기간 보관 후에 평균 입자 직경, PDI 및 핵산 봉입률을 측정하였다. 평균 입자 직경이 LNP 제조일을 기준으로 \pm 20nm 이내를 유지하고, PDI가 0.2 이하로 높은 균일성을 유지하고, 핵산 봉입율도 80% 이상을 유지하고 있다는 3조건 모두 만족한 지질 나노 입자에 대해서는, 품질이 양호하게 유지되고 있다고 판단했다.
- [0590] <결과>
- [0591] 각 FlucmRNA-탑재 지질 나노 입자를 -80 $^{\circ}$ C, 5 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C에서 각각 놓아두고, 각 기간 보관 후에 평균 입자 직경, PDI 및 핵산 봉입율을 측정한 결과, 지질 나노입자의 품질이 양호하게 유지되었다고 판단된 기간을 표 13 및 14에 나타낸다. 5 $^{\circ}$ C에 놓아두었을 때 1주일 이상 품질이 양호하게 유지되고 있는 지질 나노입자에 대해서는, 안정성이 우수하다고 평가할 수 있다.

표 13

[0592]

| 지질명칭 | -80 $^{\circ}$ C | 5 $^{\circ}$ C | 25 $^{\circ}$ C | 40 $^{\circ}$ C |
|---------------|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| (): 최대 보관 기간 | (1 주) | (5 주) | (5 주) | (5 주) |
| CL4F 6-2 | 제조 단계에서 “양호” 기준을 충족시키지 못함 | | | |
| CL4F 6-4 | 0주 | 5주 | 5주 | 3일 |
| CL4F 7-3 | 0주 | 5주 | 5주 | 0일 |
| CL4F 7-4 | 0주 | 5주 | 5주 | 1주 |
| CL4F 7-5 | 1주 | 2주 | 5주 | 1주 |

| | | | | |
|------------|---------------------------|----|-----|----|
| CL4F 8-4 | 1주 | 5주 | 5주 | 1주 |
| CL4F 8-5 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 8-6 | 1주 | 5주 | 5주 | 1주 |
| CL4F 9-3 | 1주 | 5주 | 5주 | 0일 |
| CL4F 9-4 | 1주 | 5주 | 5주 | 1주 |
| CL4F 9-5 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 9-6 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 9-7 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 10-2 | 0주 | 5주 | 1주 | 0일 |
| CL4F 10-4 | 1주 | 5주 | 5 주 | 0일 |
| CL4F 10-5 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 10-7 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 10-8 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 11-5 | 1주 | 5주 | 5주 | 1주 |
| CL4F 11-6 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 11-7 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 11-9 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 12-4 | 1주 | 5주 | 5주 | 1주 |
| CL4F 12-6 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 12-10 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4F 13-3 | 0주 | 0주 | 0주 | 0일 |
| CL4F 14-2 | 0주 | 0주 | 0주 | 0일 |
| CL4F 16-0 | 제조 단계에서 “양호” 기준을 충족시키지 못함 | | | |
| CL4F 16-1 | 제조 단계에서 “양호” 기준을 충족시키지 못함 | | | |
| CL4F6 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4G6 | 1주 | 5주 | 5주 | 5주 |
| CL4H6 | 0주 | 0주 | 1주 | 0일 |

표 14

[0593]

| 지질 명칭 | -80° C | 5° C | 25° C | 40° C |
|----------------|---------------------------|-------|-------|-------|
| () : 최대 보관 기간 | (1 주) | (5 주) | (5 주) | (5 주) |
| CL15F 6-2 | 제조 단계에서 “양호” 기준을 충족시키지 못함 | | | |
| CL15F 6-4 | 제조 단계에서 “양호” 기준을 충족시키지 못함 | | | |
| CL15F 7-3 | 제조 단계에서 “양호” 기준을 충족시키지 못함 | | | |
| CL15F 7-5 | 0 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 8-6 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 9-3 | 0 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 9-5 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 9-7 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 10-4 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 10-5 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 10-8 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 11-5 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 11-6 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 11-7 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 11-9 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 12-4 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 12-10 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 13-3 | 0 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 14-2 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15F 16-0 | 제조 단계에서 “양호” 기준을 충족시키지 못함 | | | |
| CL15F 16-1 | 0 주 | 0 주 | 0 주 | 0 주 |
| CL15F6 | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15G | 1 주 | 5 주 | 5 주 | 5 주 |
| CL15H | 제조 단계에서 “양호” 기준을 충족시키지 못함 | | | |
| MC3 | 0 주 | 0 주 | 1 주 | 0 주 |

- [0594] 5. 다양한 조성을 갖는 지질 나노 입자의 제작 및 평가
- [0595] <지질 나노 입자의 제조>
- [0596] 지질 나노 입자는 유로를 이용한 알코올 희석법에 의해 제조하였다. 유로로서는, 믹서 내장 마이크로 유체 디바이스 “NanoAssemblr” (Precision NanoSystems사 제조)를 사용하였다.
- [0597] 구체적으로는, 우선, 지질 농도 8mM로 조절된 에탄올 용액 및 핵산 농도 46.1 μ g/mL로 조절된 시트르산 완충액 (50mM, pH 3.5)을 각각 3mL/분 및 9mL/분으로 마이크로 유로 내부로 송액하고, 유로로부터 배출된 지질 나노입자 용액을 회수하였다. 상기 지질 나노입자 용액을, 20 mM HEPES 완충액(9% 수크로스, pH 7.45)로 10배 희석한 후, 초여과 유닛으로 농축하여, 지질 나노입자 용액을 회수하였다.
- [0598] <지질 나노 입자의 구성 지질>
- [0599] 표 15~18에 기재된 조성으로 지질을 제조했다. pH-감수성 양이온성 지질로서, CL4F 10-5, CL4F 9-7, CL4F 8-4, CL4F6, CL15 10-5 및 CL15F6을 사용하였다. 다른 지질로는 콜레스테롤(나칼레이테스크), β -시토스테롤(22,23-다이하이드로스티그마스테롤, 베타-시토스테롤, 5-스티그마스텐-3 β -올, α -디하이드로푸코스테롤, 24 α -에틸콜레스테롤, Sigma-Aldrich), DSPC(1,2-디스테롤, COAT-SN-G-3-280, LTD, 선브라이트 GM-020, YUKA SANGYO 주식회사), DOPC(1,2-다이올로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, COATOM MC-8181, YUKA SANGYO 주식회사), DOP(1,2-다이올로일-SN-글리세로-3-포스포에탄올아민, COATOME-181, COATOME-1, COPALYUKA). mRNA로는 Fluc 발현 mRNA(CleanCap Fluc mRNA(5moU)), TriLink Biotechnologies), mCherry 발현 mRNA(CleanCap Cherry mRNA(5moU)), TriLink Biotechnologies)가 사용되었다.
- [0600] <보존 안정성 평가>
- [0601] 제조한 지질 나노 입자를 40 $^{\circ}$ C에 놓아두고, 각 기간 보관 후에 평균 입자경, PDI 및 핵산 봉입률을 측정하였다. 다음 기준에 따라 품질이 양호하게 유지되는지 평가했다.
- [0602] 양호(O): 입자 직경은 제조 직후의 입자 직경 ± 20 nm 이내, 또한, PDI가 0.2 이하, 또한, 봉입률 80% 이상;
- [0603] 양호하지 않음(\times): 입자 직경은 제조 직후의 입자 직경 ± 20 nm 초과, 또는 봉입률 80% 미만.
- [0604] 40 $^{\circ}$ C에 놓아두었을 때 1주일 이상 품질이 양호하게 유지되고 있는 지질 나노 입자에 대해서, 안정성이 우수하다고 평가할 수 있다.
- [0605] <시험관 내(in vitro)에서의 루시페라제 발현 활성의 측정>
- [0606] 세포 배양용 배지로서 E-MEM 배지(L-글루타민, 페놀 레드, 피루브산나트륨, 비필수 아미노산, 1,500 mg/L 탄산수소나트륨 함유)(제품 코드 055-08975, 와코 준야쿠사)에 소 태아 혈청(Fetal Bovine Serum Characterized, 코닝사)을 10% 및 항생제(Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), Thermo Fisher사)를 1% 첨가한 것을 사용하였다. 인간 태아 신장세포 293(HEK293 세포)을 2.0×10^4 세포/웰로 96웰 백색 플레이트(SIGMA사)에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건 하에서 하룻밤 배양한 후, 지질 나노입자를 mRNA 함량 환산으로 100 ng/웰 첨가하였다. 같은 조건으로 24시간 배양한 후, 300 μ g/mL 루시페린 용액(Beetle luciferin, Promega사)을 100 μ g/웰 첨가하고, 멀티 플레이트 리더(EnSight multimode plate reader, Perkin Elmer사)로 방출 강도를 측정하였다. 그 때, 배지만 첨가한 웰과 지질 나노입자 미첨가한 세포 웰에 상기 루시페린 용액을 첨가하여 동일한 측정을 했으며, 배지 웰의 방출 강도를 배경값(background)으로서 뺀 값을 채택하였다. 또한 지질 나노 입자 미첨가한 세포 웰의 방출 강도는 배경값(background)보다 낮았다.
- [0607] <시험관 내(in vitro)에서의 mCherry 발현 활성의 측정>
- [0608] 세포 배양용 배지로서 E-MEM 배지(L-글루타민, 페놀 레드, 피루브산나트륨, 비필수 아미노산, 1,500 mg/L 탄산수소나트륨 함유)(제품 코드 055-08975, 와코 준야쿠사)에 소 태아 혈청(Fetal Bovine Serum Characterized, 코닝사)을 10% 및 항생제(Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), Thermo Fisher사)를 1% 첨가한 것을 사용하였다. 인간 태아 신장세포 293(HEK293 세포)을 2.0×10^4 세포/웰로 96웰 흑색 플레이트(SIGMA사)에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건 하에서 하룻밤 배양한 후, 지질 나노입자를 mRNA 함량 환산으로 1000 ng/웰 첨가하였다. 동일한 조건에서 24시간 배양한 후, 멀티 플레이트 리더(EnSight multimode plate reader, Perkin Elmer사)로 형광 강도(여기 파장 587nm/형광 파장 610nm)를 측정하였다. 그 때, 배지만 첨가한 웰, 및 지질 나노입자 미첨가

의 세포 웰도 준비하고, 마찬가지로 측정을 행하고, 배지 웰의 방출 강도를 배경 값(background)으로서 뺀 값을 채택하였다. 또한, 지질 나노 입자 미첨가 세포 웰의 형광 강도는 배경값(background) 이하였다.

표 15

[0609]

| 지질 | 지질 구성 (몰비율) | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 5-1 | 5-2 | 5-3 | 5-4 | 5-5 | 5-6 | 5-7 | 5-8 | 5-9 | 5-10 | 5-11 | 5-12 | 5-13 |
| CL4F 10-5 | 50 | - | - | - | 50 | - | - | - | 50 | - | - | - | - |
| CL4F 9-7 | - | 50 | - | - | - | 50 | - | - | - | 50 | - | - | - |
| CL4F 8-4 | - | - | 50 | - | - | - | 50 | - | - | - | 50 | - | - |
| CL4F6 | - | - | - | 50 | - | - | - | 50 | - | - | - | 50 | 50 |
| DOPC | 10 | 10 | 10 | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| DPPC | - | - | - | - | 10 | 10 | 10 | 10 | - | - | - | - | - |
| DOPE | - | - | - | - | - | - | - | - | 10 | 10 | 10 | 10 | - |
| DSPC | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 10 |
| 콜레스테롤 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 |
| DMG-PEG2K | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 총 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 핵산 | Fluc-발현 mRNA | | | | | | | | | | | | |

표 16

[0610]

| 지질 | 지질 구성 (몰비율) | | | | |
|----------------|-------------|------|------|------|------|
| | 5-14 | 5-15 | 5-16 | 5-17 | 5-18 |
| CL4F 10-5 | 50 | - | - | - | - |
| CL4F 9-7 | - | 50 | - | - | - |
| CL4F 8-4 | - | - | 50 | - | - |
| CL4F6 | - | - | - | 50 | 50 |
| DSPC | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 콜레스테롤 | - | - | - | - | 38.5 |
| β -시토스테롤 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | - |
| DMG-PEG2K | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |

| | | | | | |
|----|--------------|-----|-----|-----|-----|
| 총 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 핵산 | Fluc-발현 mRNA | | | | |

표 17

[0611]

| 지질 | 지질 구성 (몰비율) | | | | |
|-----------|--------------|------|------|------|------|
| | 5-19 | 5-20 | 5-21 | 5-22 | 5-23 |
| CL4F 9-7 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| CL4F6 | - | - | - | - | - |
| DSPC | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 콜레스테롤 | 68.5 | 58.5 | 48.5 | 38.5 | 28.5 |
| DMG-PEG2K | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 총 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 핵산 | Fluc-발현 mRNA | | | | |

표 18

[0612]

| 지질 | 지질 구성 (몰비율) | | | |
|--------------|----------------------|------|------|------|
| | 5-24 | 5-25 | 5-26 | 5-27 |
| CL4F 10-5 | 50 | - | - | - |
| CL4F 9-7 | - | 50 | - | - |
| CL15F 10-5 | - | - | 50 | - |
| CL15F6 | - | - | - | 50 |
| DSPC | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 콜레스테롤 | 38.5 | 38.5 | 38.5 | 38.5 |
| DMG-PEG2K | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 총 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Nucleic acid | mRNA mCherry-발현 mRNA | | | |

표 19

| 예 | 이온성 지질 | 인지질 | 핵산 | 제조 직후 | | 40° C 1W | | 40° C 1M | | 품질 | 품질 | Fluc 방출 강도 |
|------|-----------|------|--------------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|----|----|------------|
| | | | | 입자 크기 [nm] | 봉입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 봉입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 봉입율 [%] | | | |
| 5-1 | CL4F 10-5 | DOPC | Fluc-발현 mRNA | 92.9 | 99.1 | 100.5 | 98.7 | 102.8 | 99.1 | 0 | 0 | 4.2E+05 |
| 5-2 | CL4F 9-7 | | | 94.9 | 99.2 | 101.7 | 99.0 | 100.9 | 99.5 | 0 | 0 | 4.1E+05 |
| 5-3 | CL4F 8-4 | | | 113.9 | 98.3 | 126.4 | 97.3 | 154.8 | 95.0 | 0 | × | 1.9E+06 |
| 5-4 | CL4F6 | | | 94.8 | 98.9 | 99.9 | 98.7 | 102.4 | 97.8 | 0 | 0 | 9.3E+05 |
| 5-5 | CL4F 10-5 | DPPC | | 117.1 | 98.4 | 121.1 | 98.1 | 124.1 | 96.1 | 0 | 0 | 4.9E+05 |
| 5-6 | CL4F 9-7 | | | 103.4 | 99.3 | 105.2 | 99.6 | 103.0 | 99.4 | 0 | 0 | 3.2E+05 |
| 5-7 | CL4F 8-4 | | | 163.0 | 96.6 | 175.2 | 84.6 | 184.8 | 77.1 | 0 | × | 1.7E+06 |
| 5-8 | CL4F6 | | | 97.9 | 99.4 | 112.3 | 94.1 | 251.8 | 56.3 | 0 | × | 8.1E+05 |
| 5-9 | CL4F 10-5 | DOPE | | 90.9 | 99.2 | 94.3 | 99.2 | 93.8 | 99.2 | 0 | 0 | 1.4E+05 |
| 5-10 | CL4F 9-7 | | | 89.7 | 99.2 | 92.7 | 99.2 | 91.4 | 99.4 | 0 | 0 | 1.9E+05 |
| 5-11 | CL4F 8-4 | | | 98.8 | 98.6 | 104.0 | 98.9 | 108.6 | 98.9 | 0 | 0 | 2.3E+05 |
| 5-12 | CL4F6 | | | 89.3 | 98.5 | 91.6 | 99.1 | 92.7 | 99.0 | 0 | 0 | 4.8E+05 |
| 5-13 | CL4F6 | DSPC | | 112.1 | 99.8 | 121.1 | 99.2 | 120.9 | 87.4 | 0 | 0 | 4.0E+05 |

표 20

| 예 | 이온성 지질 | 콜레스테롤 | 핵산 | 제조 직후 | | 40° C 1W | | 40° C 1M | | 품질 | 품질 | Fluc 방출 강도 |
|---|--------|-------|----|------------|---------|------------|---------|------------|---------|----|----|------------|
| | | | | 입자 크기 [nm] | 봉입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 봉입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 봉입율 [%] | | | |

[0613]

[0614]

| | | | | | | | | | | | | |
|------|-----------|----------------|--------------|-------|------|-------|------|--------|------|---|---|---------|
| 5-14 | CL4F 10-5 | β -시토스테롤 | Fluc-발현 mRNA | 214.4 | 99.9 | 337.4 | 75.1 | 492.4 | 47.7 | × | × | 8.1E+05 |
| 5-15 | CL4F 9-7 | β -시토스테롤 | | 228.1 | 99.9 | 275.2 | 79.0 | 327.0 | 58.8 | × | × | 8.5E+05 |
| 5-16 | CL4F 8-4 | β -시토스테롤 | | 224.5 | 98.4 | 409.4 | 74.7 | 1040.0 | 54.5 | × | × | 7.3E+05 |
| 5-17 | CL4F6 | β -시토스테롤 | | 312.1 | 99.0 | 392.8 | 77.8 | 501.9 | 58.8 | × | × | 9.2E+05 |
| 5-18 | CL4F6 | 콜레스테롤 | | 112.1 | 99.8 | 121.1 | 99.2 | 120.9 | 87.4 | 0 | 0 | 3.3E+05 |

표 21

[0615]

| 예 | 이온성 지질 | 이온성 지질 비율 | 핵산 | 제조 직후 | | 40° C 1W | | 40° C 1M | | 품질 | | Fluc 방출 강도 |
|------|----------|-----------|------------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|----------|----------|------------|
| | | | | 입자 크기 [nm] | 붕입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 붕입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 붕입율 [%] | 40° C 1W | 40° C 1M | |
| 5-19 | CL4F 9-7 | 20 | Fluc 방출 강도 | 78.13 | 100.4 | 80.81 | 99.9 | 77.6 | 99.5 | 0 | 0 | 2.3E+05 |
| 5-20 | | 30 | | 73.36 | 100.2 | 71.91 | 99.8 | 73.1 | 99.8 | 0 | 0 | 3.2E+05 |
| 5-21 | | 40 | | 79.28 | 100.0 | 77.55 | 99.8 | 78.0 | 99.8 | 0 | 0 | 3.9E+05 |
| 5-22 | | 50 | | 104.3 | 100.2 | 101.4 | 99.9 | 104.6 | 100.2 | 0 | 0 | 9.3E+04 |
| 5-23 | | 60 | | 94.26 | 100.0 | 95.64 | 99.5 | 95.4 | 99.6 | 0 | 0 | 1.4E+04 |

표 22

[0616]

| 예 | 이온성 지질 | 콜레스테롤/인지질 | 핵산 | 제조 직후 | | 40° C 1W | | 40° C 1M | | 품질 | |
|------|-----------|-----------|-----------------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|----------|----------|
| | | | | 입자 크기 [nm] | 붕입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 붕입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 붕입율 [%] | 40° C 1W | 40° C 1M |
| 5-24 | CL4F 10-5 | Chol/DSPC | mCherry-발현 mRNA | 100.2 | 99.5 | 103.2 | 98.3 | 111.6 | 85.4 | 0 | 0 |
| 5-25 | CL4F 9-7 | | | 98.9 | 99.7 | 100.9 | 99.6 | 99.8 | 99.7 | 0 | 0 |

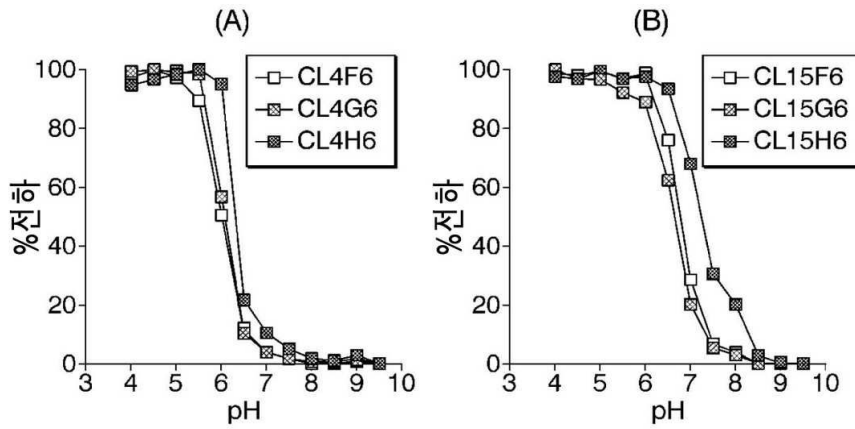
표 23

[0617]

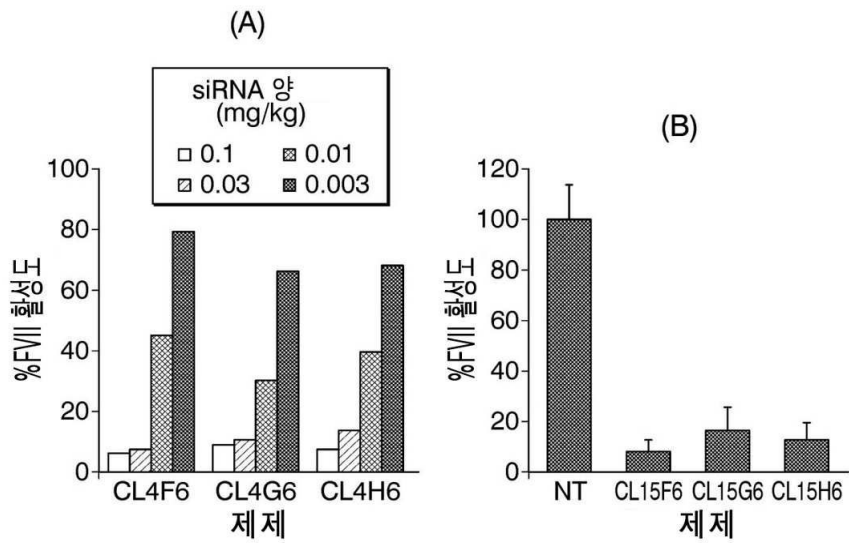
| 예 | 이온성 지질 | 콜레스테롤 / 인지질 | 핵산 | 제조 직후 | | 40° C 1W | | 40° C 1M | | 품질 40° C 1W | 품질 40° C 1M | mCherry-방출 강도 |
|--------------|------------|-------------|-----------------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|-------------|-------------|---------------|
| | | | | 입자 크기 [nm] | 봉입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 봉입율 [%] | 입자 크기 [nm] | 봉입율 [%] | | | |
| 5-26 | CL15F 10-5 | Chol/DSPC | mCherry-발현 mRNA | 107.9 | 99.3 | 108.3 | 99.6 | 114.3 | 99.4 | 0 | 0 | 1351 |
| 5-27 | CL15F6 | | | 99.0 | 99.4 | 100.3 | 99.7 | 106.7 | 99.3 | 0 | 0 | 1092 |
| HEPES Buffer | | | | | | | | | | | | 753 |

도면

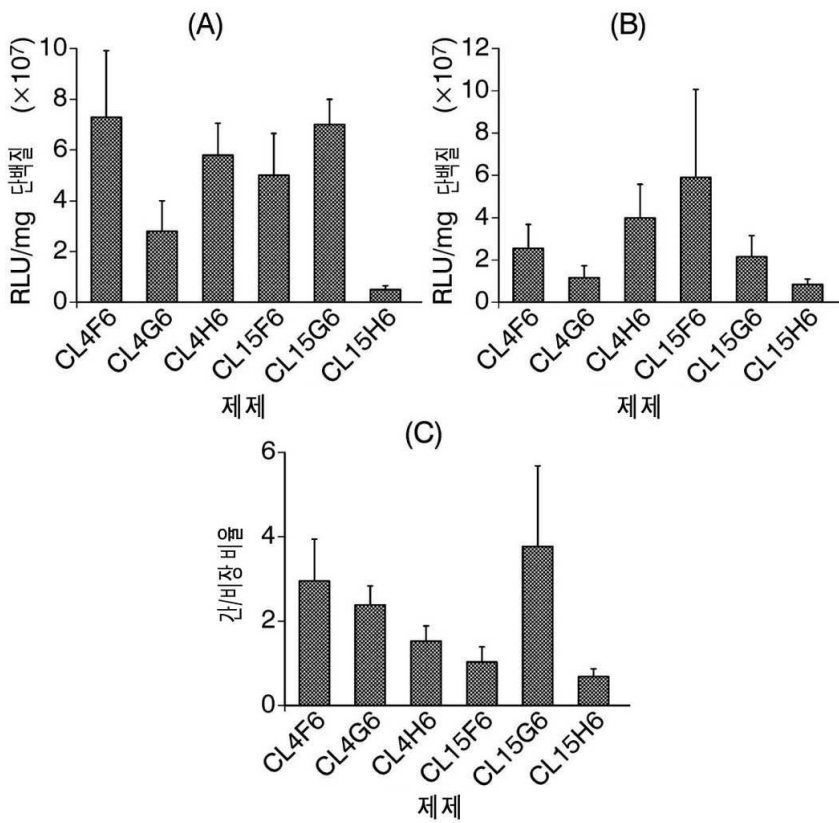
도면1



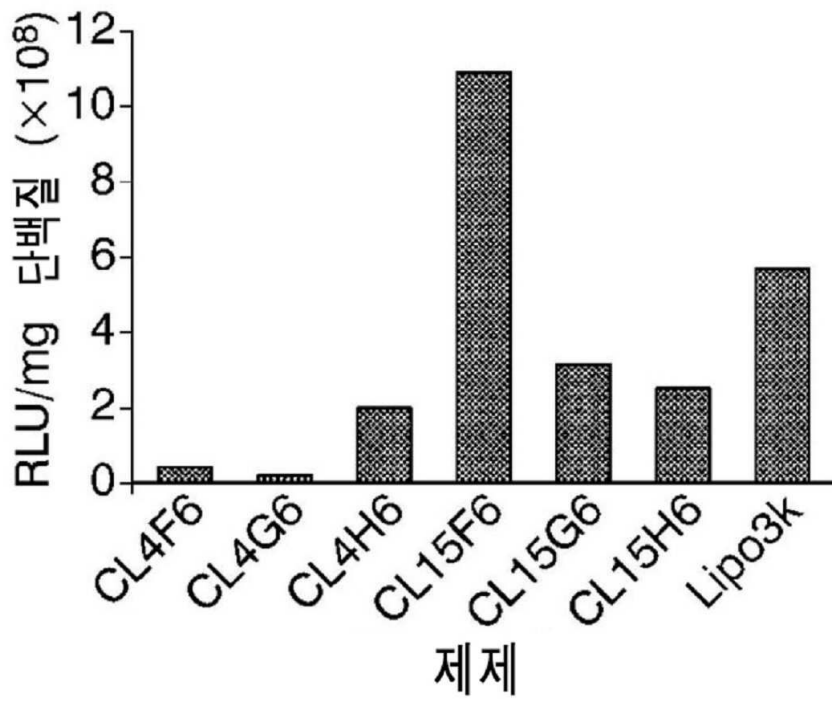
도면2



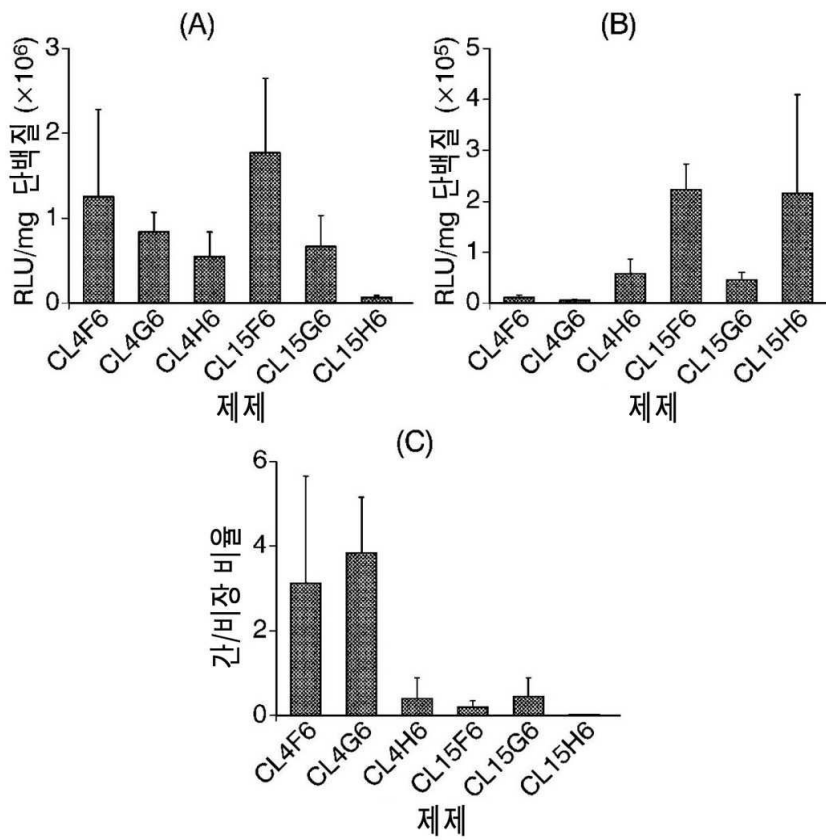
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Hokkaido University
Nitto Denko Corporation
- <120> Lipid nanoparticle
- <130> 2023FPI-03-007/JP
- <150> PCT/JP
- <151> 2021-10-01
- <150> JP 2020-167928
- <151> 2020-10-02
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Sense siRNA for F7, a chimera of DNA and RNA.

<400> 1

ggaucaucuc aagucuuact 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA_RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Antisense siRNA for F7, a chimera of DNA and RNA.

<220><223> Description of Artificial Sequence: Antisense siRNA for F7, a chimera of DNA and RNA.

<400> 2

guaagacuug agaugaucct t 21