(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023 년 8 월 3 일 (03.08.2023)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2023/146356 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 47/69* (2017.01)
C07K 14/775 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/001298

(22) 국제출원일: 2023 년 1 월 27 일 (27.01.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0013592 2022 년 1 월 28 일 (28.01.2022) KR
10-2023-0010355 2023 년 1 월 26 일 (26.01.2023) KR

(71) 출원인: 성균관대학교산학협력단 (**RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY**) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR). 엠브릭스 주식회사 (**MVRIX CO.,LTD.**) [KR/KR]; 18469 경기도 화성시 동탄첨단산업1로 27, B동 29층 2944호, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 권대혁 (**KWEON, Dae Hyuk**); 04129 서울특별시 마포구 마포대로 195, 303동 1903호, Seoul (KR). 박원범 (**PARK, Won Beom**); 16418 경기도 수원시 장안구 화산로 133, 405호, Gyeonggi-do (KR). 김수현 (**KIM, Su Hyun**); 16357 경기도 수원시 장안구 서부로2167번길 4, 205호, Gyeonggi-do (KR).

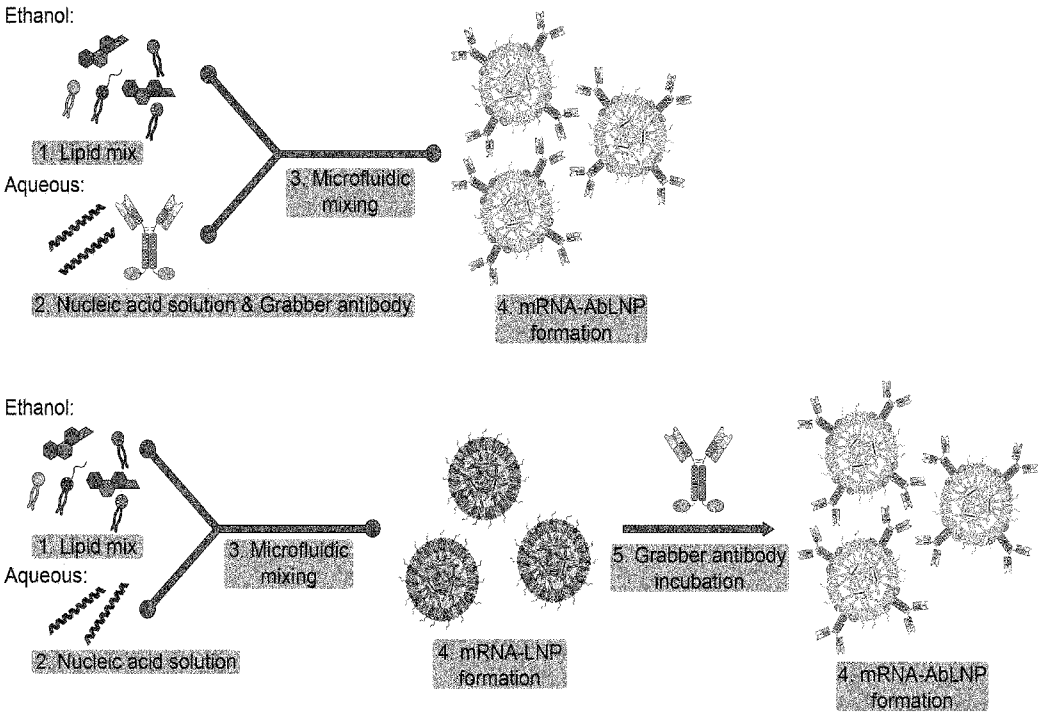
(74) 대리인: 특허법인태동 (**TAEDONG PATENT & LAW FIRM**); 08302 서울특별시 구로구 가마산로 282, 302호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,

WO 2023/146356 A1

(54) **Title:** ANTIBODY-BOUND LIPID NANOPARTICLE COMPRISING ANTIBODY BOUND TO MEMBRANE SCAFFOLD PROTEIN

(54) **발명의 명칭:** 막구조화 단백질이 결합된 항체를 포함하는 항체 결합 지질나노입자



(57) **Abstract:** The present invention relates to an antibody-bound lipid nanoparticle comprising an antibody bound to a membrane scaffold protein, and more specifically relates to an antibody-bound lipid nanoparticle which comprises a lipid, and an antibody bound to a membrane scaffold protein, and which can be easily produced and has an excellent specific targeting ability.

(57) **요약서:** 본 발명은 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein) 이 결합된 항체를 포함하는 항체 결합 지질나노입자에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 지질 및 막구조화 단백질이 결합된 항체를 포함하여, 쉽게 제조할 수 있으면서도, 특이적인 표적능이 우수한 항체 결합 지질나노입자에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 막구조화 단백질이 결합된 항체를 포함하는 항체 결합 지질나노입자

기술분야

[1] 본 발명은 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein)이 결합된 항체를 포함하는 항체 결합 지질나노입자에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 지질 및 막구조화 단백질이 결합된 항체를 포함하여, 쉽게 제조할 수 있으면서도, 특이적인 표적능이 우수한 항체 결합 지질나노입자에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] mRNA는 DNA의 유전정보를 세포질 속에서 단백질을 합성하는 기관으로 전달하는 역할을 한다. 이러한 mRNA가 세포 안으로 들어가게 되면, 세포 안에서 단백질을 합성하게 되고, 면역반응이 일어나게 된다.

[4] 상기와 같은 특징을 가진 mRNA 이용하여 mRNA 백신이 개발되고 있다. 하지만, mRNA는 면역반응에 의한 간섭현상으로 유전자 발현이 억제되는 문제점이 있으며, 크기가 크기 때문에 mRNA를 세포질로 들어가게 하기 어렵다는 문제점이 있다.

[5] 상기와 같은 문제점을 해결하고자 mRNA를 세포질로 들어가게 도와주는 지질나노입자(lipid nanoparticle, LNP) 기술이 개발되었으며, 최근 mRNA 백신 등의 전달체로 활용되면서 그 가치가 상승하고 있다. 다만, 지질나노입자(lipid nanoparticle, LNP)를 선택적으로 세포에 표적전달하는 기술은 아직까지 미진한 부분이 있다.

[6] 이에 항체의 뛰어난 표적전달능과 지질나노입자(lipid nanoparticle)기술을 결합하여 표적전달능이 우수한 지질나노입자가 개발되고 있는데, 기존 방법들은 화학적 접합(chemical conjugation)을 이용하기 때문에 공정이 복잡하고 수율이 떨어지는 문제가 있다. 또한, 화학적 정체성이 불명확하며, 친화성 태그로 항체가 붙어있음으로 인해서 생체 내 주입 시 그 결합에 대한 확증이 어렵다는 단점이 있다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명에서는 지질나노입자(lipid nanoparticle, LNP)와 결합할 수 있는 항체를 이용하여, 간단하게 제조할 수 있으면서도, 표적전달능이 우수한 항체 결합 지질나노입자 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

[9]

과제 해결 수단

[10] 본 발명은 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein)이 결합된 '항체 또는 항체 절편'이, 막구조화 단백질을 매개로, 지질나노입자(lipid nanoparticle)의 형태를 구성하는 지질의 소수성 부분에, 소수성 결합을 통해 결합된 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자를 제공한다.

[11] 본 발명의 항체 결합 지질나노입자에 있어서, 상기 막구조화 단백질은 바람직하게 헬릭스(helix) 구조를 갖는 양친매성 단백질인 것이 좋다. 이때, 상기 막구조화 단백질은 헬릭스 구조 및 양친매성 특성이 유지된 막구조화 단백질의 절편을 사용할 수도 있다.

[12] 본 발명의 항체 결합 지질나노입자에 있어서, 상기 항체 절편은 바람직하게 scFv 또는 'scFv 및 Fc가 결합된 scFV-Fc'인 것이 좋다.

[13] 본 발명의 항체 결합 지질나노입자에 있어서, 상기 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein)이 결합된 '항체 또는 항체 절편'은 바람직하게 막구조화 단백질을 암호화하는 유전자에 '항체 또는 항체 절편'을 암호화하는 유전자를 결합시킨 후, 이를 발현시켜 제조한 것이 좋다.

[14] 본 발명의 항체 결합 지질나노입자에 있어서, 상기 지질나노입자는 바람직하게 내부에 봉입대상물질이 봉입되어 있는 것이 좋다. 이때, 상기 봉입대상물질은 바람직하게 핵산인 것이 좋다.

[15] 또한, 본 발명은 막구조화 단백질이 결합된 항체 및 지질을 혼합하는 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자의 제조방법을 제공한다.

[16] 본 발명의 항체 결합 지질나노입자의 제조방법에 있어서, 상기 항체 결합 지질나노입자는 바람직하게 봉입대상물질을 더욱 포함하여 혼합시킨 것이 좋다.

[17]

발명의 효과

[18] 본 발명의 항체 결합 지질나노입자는 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein)이 결합된 항체를 포함하여, 목적 세포로의 특이적인 전달능이 우수하면서도, 간단하게 제조할 수 있다.

[19]

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 종래의 항체 결합 지질나노입자 제조방법을 개략적으로 보여준다.

[21] 도 2는 본 발명의 항체 (Grabber antibody)를 이용한 항체 결합 지질나노입자의 제조방법을 개략적으로 보여준다. 한편, 도 2에서 (a)는 지질나노입자 제조과정에서 본 발명의 항체 (Grabber antibody)를 같이 혼합시켜 제조하는 경우, 도 2에서 (b)는 제조된 지질나노입자에 본 발명의 항체 (Grabber antibody)를 첨가하여 제조하는 과정을 보여준다.

[22] 도 3은 본 발명 항체 (Grabber antibody)의 구조를 개략적으로 보여준다.

[23] 도 4는 본 발명의 단일사슬항체조각 (Graber Single chain variable fragment,

Gr-scFv)을 대장균 단백질 발현 시스템을 이용하여 생산한 후, 온전하게 생산된 것인지 확인하기 위해, SDS 젤 전기영동으로 확인한 결과를 보여준다. 도 4에서 10B4 및 NLDC 145는 사용한 항체를 나타내고, ApoA1, MSP1E3D1, ApoeE3는 사용한 막구조화 단백질을 나타낸다.

[24] 도 5는 본 발명의 단일사슬항체조각 (Graber Single chain variable fragment, Gr-scFv)을 포유류 세포 단백질 발현 시스템을 이용하여 생산한 후, 온전하게 생산된 것인지 확인하기 위해, SDS 젤 전기영동으로 확인한 결과를 보여준다.

[25] 도 6은 본 발명의 단일사슬항체 (Graber Single chain variable fragment-Fc, Gr-scFv-Fc)를 포유류 세포 단백질 발현 시스템을 이용하여 생산한 후, 온전하게 생산된 것인지 확인하기 위해, SDS 젤 전기영동으로 확인한 결과를 보여준다.

[26] 도 7은 본 발명의 항체 (Graber Antibody, Gr-Antibody)를 포유류 세포 단백질 발현 시스템을 이용하여 생산한 후, 온전하게 생산된 것인지 확인하기 위해, SDS 젤 전기영동으로 확인한 결과를 보여준다.

[27] 도 8은 지질나노입자에 본 발명의 항체가 결합될 수 있는지 확인하기 위해, size exclusion chromatography를 통해 막구조화 단백질(MSP), 지질나노입자(LNP), 지질나노입자 및 막구조화 단백질의 혼합액 (MSP LNP)의 A_{280}을 확인한 결과이다.

[28] 도 9는 지질나노입자에 본 발명의 항체가 결합될 수 있는지 확인하기 위해, 동적 광산란법을 통해 지질나노입자(LNP), 지질나노입자 및 막구조화 단백질의 혼합액 (MSP LNP)의 입자 크기를 확인한 결과이다.

[29] 도 10은 지질나노입자와 본 발명 항체의 혼합 시기를 최적화 하기 위해, 지질나노입자가 형성되는 도중에 본 발명의 항체를 혼합시키며, 혼합 시기 별로 항체 결합 지질나노입자의 mRNA 캡슐화 효율 (Encapsulation %)을 계산한 결과이다.

[30] 도 11은 지질나노입자와 본 발명 항체의 혼합 비율을 최적화 하기 위해, 다양한 지질:단백질 몰 비율 (LP ratio)로 혼합하여 항체 결합 지질나노입자를 제조한 후, mRNA 캡슐화 효율 (Encapsulation %)을 계산한 결과이다.

[31] 도 12는 지질나노입자와 본 발명 항체의 혼합 비율을 최적화 하기 위해, 다양한 지질:단백질 몰 비율 (LP ratio)로 혼합하여 항체 결합 지질나노입자를 제조한 후, 동적 광산란법을 실시하여 형성된 항체 결합 지질나노입자의 입자 크기를 확인한 결과이다.

[32] 도 13은 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 보관 안정성을 확인하기 위해, 7일간 4℃에서 보관하고 캡슐화 효율 변화를 관찰한 결과이다.

[33] 도 14는 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 보관 안정성을 확인하기 위해, 7일간 4℃에서 보관하며, 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 크기를 확인한 결과이다.

[34] 도 15는 본 발명 항체 결합 지질나노입자가 목적 세포에 특이적으로 결합하는지 확인하기 위해, 목적 리간드가 발현된 MutuDC1940 세포, 목적

리간드가 발현되지 않는 A549 세포에, DiD 염색약을 포함하는 항체 결합 지질나노입자를 처리한 후, 형광(Fluorescence)을 측정하여 상대적인 결합능을 확인한 결과이다.

[35] 도 16은 본 발명 항체 결합 지질나노입자가 목적 세포에 특이적으로 mRNA를 전달하는지 확인하기 위해, 목적 리간드가 발현된 MutuDC1940 세포, 목적 리간드가 발현되지 않는 A549 세포에, 항체 결합 지질나노입자를 처리한 후, 세포의 상대적인 유전자 발현량을 확인한 결과이다.

[36] 도 17은 본 발명 항체 결합 지질나노입자가 혈청(Serum)에 의해 방해받는 상황에서도 목적 세포에 특이적으로 mRNA를 전달하는지 확인하기 위해, 목적 리간드가 발현된 MutuDC1940 세포, 목적 리간드가 발현되지 않는 A549 세포에, 항체 결합 지질나노입자를 혈청(Serum)이 존재하는 조건에서 항체 결합 지질나노입자를 처리한 후, 세포의 상대적인 유전자 발현량을 확인한 결과이다.

[37]

발명의 실시를 위한 형태

[38] 본 발명은 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein)이 결합된 '항체 또는 항체 절편'이, 막구조화 단백질을 매개로, 지질나노입자(lipid nanoparticle)의 형태를 구성하는 지질의 소수성 부분에, 소수성 결합을 통해 결합된 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자를 제공한다.

[39] 기존 알려진 항체 결합 지질나노입자(지질나노입자 표면에 항체가 결합된 형태)의 제조방법은 1) 지질나노입자 구성 지질 혼합액을 봉입대상물질과 혼합하여 지질나노입자를 제조하는 단계; 2) 상기 지질나노입자 및 항체와 결합할 수 있는 화합물을 결합하는 단계; 3) 상기 화합물에 항체를 결합하는 단계;를 포함하기 때문에 최소 3 단계의 제조과정으로 이루어진다 (도 1 참조).

[40] 하지만, 본 발명에서는 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein)이 결합된 항체 (도 3 참조)를 사용하여 별도의 항체 결합 공정 없이도 항체 결합 지질나노입자를 제조할 수 있었다. 즉, 봉입대상물질, 지질 혼합액과 본 발명의 항체 (소위 "grabber antibody")를 혼합하였더니, 막구조화 단백질이 결합된 항체가 지질나노입자의 형성과 동시에 지질입자의 표면에 배열되어 항체 결합 지질나노입자로 제조되는 것을 확인할 수 있었다 (도 2의 (a) 참조). 이는 막구조화 단백질이 결합된 항체를 사용하는 경우, 기존 3 단계로 이루어진 제조과정을 단 1 단계의 제조과정으로 단순화할 수 있는 것을 의미한다.

[41] 또한, 만들어진 지질나노입자에 본 발명의 항체 (소위 "grabber antibody")를 첨가시키는 것으로 항체 결합 지질나노입자가 형성되는 것을 확인할 수 있었다 (도 2의 (b) 참조). 이는 이미 개발된 지질나노입자 제조 공정을 변화시키도 않고도 단순 첨가만으로도 지질나노입자에 항체를 수식해 지질나노입자에 특이성을 부여시킬 수 있음을 의미한다.

[42] 한편, 본 발명에 있어서 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein, MSP)은

헬릭스(helix) 구조를 갖으며, 양친매성 특징을 보이는 단백질로, 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 지질과 항체를 매개하는 역할을 한다. 이때, 막구조화 단백질은 지질나노입자의 형태를 구성하는 지질의 소수성 부분에, 소수성 결합을 이용하여 결합한다.

[43] 막구조화 단백질의 대표적인 예로는 아포리포단백질(apolipoprotein)이 있다. 아포리포단백질(apolipoprotein)은 혈장지방단백질에 특이적으로 존재하는 단백질로, 지방단백질의 구조를 안정시키고, 지방단백질대사에 관여하는 효소를 활성화하며, 세포표면에 존재하는 지방단백질 수용체에 대한 배위자로서 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 상기 아포리포단백질(apolipoprotein)은 일 예로서, 아포리포단백질 A1(ApoA-I), 아포리포단백질 A2(ApoA-2), 아포리포단백질 B(ApoB), 아포리포단백질 C(ApoC) 및 아포리포단백질 E(ApoE), MSP1(Membrane scaffold protein1), MSP1D1, MSP1D2, MSP1E1, MSP1E2, MSP1E3, MSP1E3D1, MSP2, MSP2N1, MSP2N2, MSP2N3, 등이 있다.

[44] 상기에서 일 예로 언급한 Apo-A1은 분자량 28kDa의 243개의 아미노산으로 이루어진 단일 폴리펩타이드로 구성되고, 11개의 아미노산 혹은 22개의 아미노산으로 이루어진 8개의 반복 단위 도메인을 가지며, HDL을 이루는 2차 구조의 알파-헬릭스의 비율이 60 내지 75%인 단백질을 의미한다. 상기 ApoA-I은 주로 주변조직으로부터 콜레스테롤을 제거하여 간 또는 다른 리포단백질로 운반하는 역할을 수행하는 고밀도 리포단백질(HDL)의 구성요소로서 사용된다고 알려져 있다. 또한, ApoE는 33kDa의 299개의 아미노산으로 이루어진 단일 폴리펩타이드로 구성된 단백질이며 ApoA1과 마찬가지로 콜레스테롤의 운반에 관여하는 단백질이다

[45] 또한, 본 발명에서는 상기 막구조화 단백질로 헬릭스 구조 및 양친매성 특성'이 유지된 막구조화 단백질의 절편을 사용할 수도 있다. 즉, 상기 막구조화 단백질의 '헬릭스 구조 및 양친매성 특성'을 소실하지 않는 범위 내에서, 막구조화 단백질 전체가 아닌 그 일부(절편)를 사용할 수도 있는 것이다.

[46] 한편, 본 발명에 있어서 '항체 또는 항체 절편'은 지질나노입자와 결합되어 상기 '항체 또는 항체 절편'이 결합될 수 있는 목적 세포에 특이적인 표적능을 부여하는 역할을 한다. 본 발명의 항체 결합 지질나노입자는 목적 세포의 특징에 맞추어 다양한 '항체 또는 항체 절편'를 사용할 수 있다. 이때, 상기 항체 절편은 특이적인 표적능을 부여할 수 있도록 scFv 또는 'scFv 및 Fc가 결합된 scFv-Fc'인 것이 좋다.

[47] 한편, 본 발명에 있어서 상기 '막구조화 단백질 (membrane scaffold protein)이 결합된 항체'는 막구조화 단백질을 암호화하는 유전자에 항체를 암호화하는 유전자를 결합시킨 후, 이를 발현시켜 제조한 것일 수 있다.

[48] 한편, 본 발명의 항체 결합 지질나노입자는, 바람직하게 내부에 봉입대상물질이 봉입되어 있는 것이 좋으며, 이때 상기 봉입대상물질은,

바람직하게 핵산인 것이 좋다. 핵산의 일 예로는 mRNA일 수 있다.

[49] 지질나노입자는 주로 봉입대상물질을 안전하게 표적으로 전달하기 위해 사용한다. 외래의 mRNA는 인체 면역반응에 의한 간섭현상으로 유전자 발현이 억제되는 문제점이 있으며, 크기가 크기 때문에 세포로 유도하기가 어렵다는 문제점이 있다. mRNA 백신은 지질나노입자를 이용하여 이와 같은 문제점을 해결하였는데, 본 발명에서 개발된 항체 결합 지질나노입자 또한 mRNA 백신을 수송하기 위한 캐리어(carrier)로 사용될 수 있다.

[50] 지질나노입자는 이온화 지질 (ionizable lipid), 구조적 헬퍼 지질 (Structural helper lipid), 콜레스테롤(cholesterol), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)을 혼합하여 제조한 것이 좋다. 이렇게 제조한 지질나노입자는 핵산과 같은 약물의 봉입이 용이하고, 세포막을 쉽게 통과할 수 있으며, 체내 유지성이 우수하다.

[51]

[52] 또한, 본 발명은 막구조화 단백질이 결합된 항체 및 지질을 혼합하는 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자의 제조방법을 제공한다.

[53] 상기 기재한 것과 같이, 본 발명은 막구조화 단백질이 결합된 항체를 이용하여, 기존 3 단계로 이루어진 제조과정을 단 1 단계의 제조과정으로 단순화할 수 있었다.

[54] 한편, 본 발명의 항체 결합 지질나노입자의 제조방법에 있어서, 상기 항체 결합 지질나노입자는 바람직하게 봉입대상물질을 더욱 포함하여 혼합시킨 것이 좋다. 봉입대상 물질로 바람직하게 mRNA 백신을 봉입시킬 수 있는데, 상기와 같이 제조하는 경우 mRNA 백신을 수송하기 위한 캐리어(carrier)로 사용할 수 있다.

[55]

[56] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[57]

[58] **[실시예 1: 지질나노입자를 형성하는 항체 생산용 플라스미드 제조]**

[59] 본 실시예에서는 본 발명의 '지질나노입자를 형성하는 항체'를 생산할 수 있는 플라스미드를 제조하고자 했다.

[60]

[61] <u>1-1. 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체조각 (Graber single chain variable fragment, Gr-scFv) 생산용 플라스미드 제조</u>

[62] 중사슬 가변 영역 (Variable region of heavy chain, VH) 및 경사슬 가변 영역 (Variable region of light chain, VL), 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein, MSP)로 이루어진 '지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체조각 (Gr-scFv, 도 3의 (a) 참조)'을 생산하기 위한 플라스미드를 제조하기 위해 pET-22b(+) 또는 pcDNA3.1(+)을 벡터로 사용하고, T4 DNA 중합효소 (T4 DNA polymerase)를

사용하여 클로닝하였다.

[63] 구체적으로, pET-22b(+) 또는 pcDNA3.1(+) 벡터와 VH-linker-VL-linker-Apolipoprotein 인서트(Insert)의 양 말단 15 bp가 상호간 상보적이게 디자인된 프라이머들을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 후, PCR을 위한 메틸화(Methylation) 된 backbone plasmid를 제거하기 위해 37℃에서 2시간 동안 DpnI 효소를 처리하였다. T4 DNA 중합효소를 넣고 25℃에서 150초, 얼음에서 10분 간 반응시켜 벡터와 인서트 간의 수소결합을 유도하였다. 반응물 1 μL를 *Escherichia coli* Top10 수용성 세포 (Competent cell) 100 μL와 혼합한 후 얼음에서 30분간 배양하고, 유전자의 형질 도입을 위하여 42℃ 온도에서 45초간 열충격 (Heat shock)을 주었다. 이후, SOC(Super Optimal broth with Catabolite repression) 액체 배지 900 μL를 더욱 첨가한 후 37℃에서 1시간 배양하고, 원심분리(13,000 rpm, 1분)를 통해 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 SOC 액체 배지 100 μL로 재부유(Resuspension)하고 카베니실린(Carbenicillin) LB(Luria-Bertani) 고체배지에 도말 후 37℃에서 16시간 배양하여 콜로니를 형성시켰다. 콜로니를 카베니실린 100 μg/mL 농도의 LB 액체배지에 접종하여 37℃에서 16시간 배양한 후, 플라스미드 정제 키트를 사용하여 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체조각 생산용 플라스미드를 정제하였다.

[64]

[65] <u>1-2. 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체 (Graber single chain variable fragment-Fc, Gr-scFv-Fc) 생산용 플라스미드 제조</u>

[66] 사슬 가변 영역 (Variable region of heavy chain, VH) 및 경사슬 가변 영역 (Variable region of light chain, VL), 단편 결정화 영역 (Fragment crystallizable region, Fc region), 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein, MSP)로 이루어진 '지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체 (Gr-scFv-Fc, 도 3의 (b) 참조)'를 생산하기 위한 플라스미드를 제조하기 위해 pcDNA3.1(+) 벡터 및 VH-linker-VL-hinge-Fc-linker-Apolipoprotein 인서트를 사용하여 상기 실시예 1-1과 동일하게 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체 생산용 플라스미드를 제조하였다.

[67]

[68] <u>1-3. 지질나노입자를 형성하는 항체 (Gr-Antibody) 생산용 플라스미드 제조</u>

[69] '지질나노입자를 형성하는 항체 (Gr-Antibody, 도 3의 (c) 참조)' 생산용 플라스미드인, 중사슬 가변 영역 (Variable region of heavy chain, VH), 중사슬 불변 영역 (Constant region of heavy chain, CH) 및 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein, MSP)로 이루어진 플라스미드와 경사슬 가변 영역 (Variable region of light chain, VL), 경사슬 불변 영역 (Constant region of light chain, CL)으로 이루어진 플라스미드를 제조하기 위해 pMAZ 벡터, VH-CH-linker-Apolipoprotein 또는 VL-CL 인서트를 사용하여 상기 실시예 1-1과 동일하게 지질나노입자를 형성하는 항체 생산용 플라스미드를 제조하였다.

[70]

[71] **[실시예 2: 지질나노입자를 형성하는 항체 생산]**

[72] 본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 제조한 플라스미드를 사용하여 본 발명의 '지질나노입자를 형성하는 항체'를 생산하였다.

[73]

[74] 2-1. 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체조각 (Graber Single chain variable fragment, Gr-scFv)의 생산

[75] 서열번호 1 내지 9의 단백질 서열을 가지는 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체조각 (Graber Single chain variable fragment, Gr-scFv) 생산을 위해, 상기 실시예 1-1에서 제조한 pET-22b(+) 벡터를 이용한 플라스미드를 대장균 단백질 발현 시스템 (*E. coli* expression system)을 이용하여 발현시켰다.

[76] 구체적으로, 발현 숙주인 *E.coli* BL21 (DE3)에 플라스미드를 42℃에서 도입하고, 이를 100 μg/mL 농도의 카베니실린(Carbenicillin) LB(Luria-Bertani) 고체배지에 도말 후 37℃에서 16시간 배양하여 콜로니를 형성하여 형질 전환된 *E. coli* 균주를 선별하였다. 각각의 형질 전환 균주를 카베니실린 100 μg/mL 농도의 LB 액체배지에 접종하여 37℃에서 16시간 배양한 후, 이를 계대 배양하였다. 계대 배양액을 600 nm 파장으로 측정한 광학 밀도 (OD_{600})가 1.5가 될 때까지 배양한 후, 0.5 mM의 IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 첨가하고, 25℃에서 6시간 동안 배양하여 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체조각을 발현시켰다. 이후, 배양액을 원심분리(4,000 rpm, 10분)하여 세포를 수득하였다. 수득한 세포는 초음파파쇄기(Sonicator)를 이용하여 분쇄한 후, 원심분리(15,000 rpm, 10분)를 통해 수용성 분획과 불용성 분획으로 분리하였다.

[77] 한편, 각 분획 내 단백질을 SDS 젤 전기영동으로 확인한 결과, 본 발명의 '지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체조각'이 온전하게 생산된 것을 확인할 수 있었다 (도 4). 한편, 도 4에서 10B4 및 NLDC 145는 사용한 항체를 나타내고, ApoA1, MSP1E3D1, ApoeE3는 사용한 막구조화 단백질을 나타낸다.

[78] 또한, 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체조각 생산을 위해, 상기 실시예 1-1에서 제조한 pcDNA3.1(+) 벡터를 이용한 플라스미드는 포유류 세포 단백질 발현 시스템 (Mammalian cell expression system)을 이용하여 발현시켰다.

[79] 구체적으로, 발현 숙주로 HEK-293F (Human embryonic kidney 293F)을 사용하여 수용성 부유 세포 상태에서 37℃, 120 rpm, 8% CO_2의 조건 하에 배양하여 세포액(1.1×10^6 cells/mL) 180 mL를 준비하였다. 형질주입 (Transfection)을 위해 플라스미드 250 μg과 PEI (Polyethylenimine) 750 μg을 배지 20 mL에 혼합한 후, 상기 준비한 세포액과 혼합하였다. 이후 37℃, 120 rpm, 8% CO_2의 조건 하에 세포를 96시간 배양한 후 원심분리 (8,000 g, 10분)하여 세포를 제거하고 상층액을 얻어내었다. 상층액을 pH 7.0의 인산 완충액과 1:1 비율로 혼합 후 proL 아가로스 비드를 이용해 정제하였다. pH 7.0의 인산 완충액을

처리하여 비드에 결합하지 못한 물질들을 제거하였다. pH 2.5의 0.1 M 글라이신(Glycine)이 포함된 용액을 처리하여 단일사슬항체조각과 아가로스 비드 간의 결합을 제거시켜 단일사슬항체조각을 정제하였고, 이후 pH 8.0의 1 M Tris 완충액을 사용하여 중성 pH로 회복시켰다.

[80] 한편, 정제된 단일사슬항체조각을 SDS 젤 전기영동으로 확인한 결과, 본 발명의 '지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체조각'이 온전하게 생산된 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[81]

[82] 2-2. 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체 (Graber Single chain variable fragment-Fc, Gr-scFv-Fc)의 생산

[83] 서열번호 10 내지 18의 단백질 서열을 가지는 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체 (Graber Single chain variable fragment-Fc, Gr-scFv-Fc) 생산을 위해, 상기 실시예 1-2에서 제조한 pcDNA3.1(+) 벡터를 이용한 플라스미드를 포유류 세포 단백질 발현 시스템 (Mammalian cell expression system)을 이용하여 발현시켰다.

[84] 구체적으로, 발현 숙주로 HEK-293F (Human embryonic kidney 293F)을 사용하여 수용성 부유 세포 상태에서 37℃, 120 rpm, 8% CO_2의 조건 하에 배양하여 세포액(1.1×10^6 cells/mL) 180 mL를 준비하였다. 형질주입 (Transfection)을 위해 플라스미드 250 μg과 PEI (Polyethylenimine) 750 μg을 배지 20 mL에 혼합한 후, 상기 준비한 세포액과 혼합하였다. 이후 37℃, 120 rpm, 8% CO_2의 조건 하에 세포를 96시간 배양한 후 원심분리(8,000 g, 10분)하여 세포를 제거하고 상층액을 얻어내었다. 상층액을 pH 7.0의 인산 완충액과 1:1 비율로 혼합 후 proL 아가로스 비드를 이용해 정제하였다. pH 7.0의 인산 완충액을 처리하여 비드에 결합하지 못한 물질들을 제거하였다. pH 2.8의 0.1 M 글라이신(Glycine)이 포함된 용액을 처리하여 단일사슬항체와 아가로스 비드 간의 결합을 제거시켜 단일사슬항체를 정제하였고, 이후 pH 8.0의 1 M Tris 완충액을 사용하여 중성 pH로 회복시켰다.

[85] 한편, 생산된 단일사슬항체를 SDS 젤 전기영동으로 확인한 결과, 본 발명의 '지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체'가 온전하게 생산된 것을 확인할 수 있었다 (도 6).

[86]

[87] 2-3. 지질나노입자를 형성하는 항체 (Gr-Antibody)의 생산

[88] 서열번호 19 내지 21의 IgL 서열 및 서열번호 22 내지 30의 IgH 서열을 가지는 가지는 지질나노입자를 형성하는 항체 (Gr-Antibody) 생산을 위해, 상기 실시예 1-3에서 제조한 pcDNA3.1(+) 벡터를 이용한 플라스미드를 포유류 세포 단백질 발현 시스템 (Mammalian cell expression system)을 이용하여 발현시켰다.

[89] 구체적으로, 발현 숙주로 HEK-293F(Human embryonic kidney 293F)을 사용하여 수용성 부유 세포 상태에서 37℃, 120 rpm, 8% CO_2의 조건 하에 배양하여

세포액(1.1×10^6 cells/mL) 180 mL를 준비하였다. 형질주입(Transfection)을 위해 플라스미드 250 μg과 PEI(Polyethylenimine) 750 μg을 배지 20 mL에 혼합한 후, 상기 준비한 세포액과 혼합하였다. 이후 37℃, 120 rpm, 8% CO_2의 조건 하에 세포를 144시간 배양한 후 원심분리(8,000 g, 10분)하여 세포를 제거하고 상층액을 얻어내었다. 상층액을 pH 7.0의 인산 완충액과 1:1 비율로 혼합 후 proL 아가로스 비드를 이용해 정제하였다. pH 7.0의 인산 완충액을 처리하여 비드에 결합하지 못한 물질들을 제거하였다. pH 2.8의 0.1 M 글라이신(Glycine)이 포함된 용액을 처리하여 항체와 아가로스 비드 간의 결합을 제거시켜 항체를 정제하였고, pH 8.0의 1 M Tris 완충액을 사용하여 중성 pH로 회복시켰다.

[90] 한편, 생산된 항체를 SDS 젤 전기영동으로 확인한 결과, 본 발명의 '지질나노입자를 형성하는 항체'가 온전하게 생산된 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

[91] 한편, 도 7에서 83.6 kDa는 중사슬 가변 영역 (Variable region of heavy chain, VH) 및 중사슬 불변 영역 (Constant region of heavy chain, CH), 아포리포단백질(Apolipoprotein)로 이루어진 단백질을 나타내고, 23.4 kDa는 경사슬 가변 영역 (Variable region of light chain, VL), 경사슬 불변 영역 (Constant region of light chain, CL)로 이루어진 단백질을 나타낸다.

[92]

[93] **[실시예 3: 막구조화 단백질의 지질나노입자 부착성 확인]**

[94] 본 실시예에서는 막구조화 단백질의 지질나노입자에 대한 부착성을 확인하여, 본 발명의 '지질나노입자를 형성하는 항체'를 지질나노입자에 혼합시켜 주는 것으로 항체 결합 지질나노입자에 부착될 수 있는지 확인하고자 했다.

[95]

[96] 3-1. 지질나노입자의 제조

[97] SM102(CAS No. 2089251-47-6), DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 콜레스테롤(Cholesterol), DMG-PEG-2000(1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000)를 에탄올에 용해시켜 지질 용액을 준비하였다. 한편, 수용상(Aqueous phase) mRNA 완충액 (10.25 mM citric acid, 2.25 mM tri-sodium citrate, pH 3.0)에 메신저 리보핵산 (messenger RNA, mRNA) 75 μL를 혼합하여 RNA 용액을 준비하였다. 상기 준비한 지질 용액 및 RNA 용액을 Microfluidic device를 사용하여, SM102:DSPC:콜레스테롤:DMG-PEG-2000의 몰 비율이 50:10:38.5:1.5이고, 이온화지질인 SM102의 아미노기와 mRNA 인산기의 몰 비율 (N/P ratio)이 6이 되도록 혼합하였다. 이후, 혼합액에 PBS를 첨가하여 4배의 부피 비율로 희석하여 지질나노입자 용액을 제조하였다.

[98]

[99] 3-2. 막구조화 단백질의 지질나노입자에 대한 부착성 확인

[100] 상기 3-1에서 제조한 지질나노입자 용액에 막구조화 단백질로서

아포리포단백질 AI 유래의 MSP1E3D1를 지질:단백질 몰 비율 (LP ratio)이 240:1가 되도록 혼합하고, 4℃에서 16시간 동안 배양하여 지질나노입자에 막구조화 단백질을 부착시켰다.

[101] 이후, size exclusion chromatography를 통해 지질나노입자(LNP), 막구조화 단백질(MSP), 막구조화 단백질이 부착된 지질나노입자 (MSP-LNP)의 A_{280}을 확인하였다 (도 8).

[102] 도 8을 보면, 지질나노입자(LNP)에 막구조화 단백질(MSP)을 혼합시킨 경우 A_{280} 픽이 이동하는 것을 확인할 수 있는데, 지질나노입자(LNP)에 막구조화 단백질(MSP)이 온전하게 부착됐음을 의미한다.

[103] 또한, 동적 광산란법을 실시하여 지질나노입자(LNP) 및 막구조화 단백질이 부착된 지질나노입자 (MSP-LNP)의 입자 크기를 측정하였다 (도 9),

[104] 도 9를 보면, 막구조화 단백질이 부착된 지질나노입자 (MSP-LNP)의 경우 입자 크기가 더욱 큰 것을 확인할 수 있는데, 지질나노입자(LNP)에 막구조화 단백질(MSP)이 온전하게 부착됐음을 의미한다.

[105] 상기와 같은 결과는, 막구조화 단백질을 포함하는 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 항체가 지질나노입차에 우수한 부착성이 있음을 의미한다.

[106]

[107] **[실시예 4: 지질나노입자를 형성하는 항체를 사용한 본 발명의 항체 결합 지질나노입자 제작]**

[108] 본 실시예에서는 상기 실시예 2-2에서 제조한 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체를 사용하여 항체가 부착된 지질나노입자 (항체 결합 지질나노입자)를 제조하고자 했다.

[109] 또한, 지질나노입자와 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체의 혼합시기 및 혼합 비율을 달리하여 제조하며, 최적화된 혼합 시기 및 비율을 선정하고자 했다.

[110]

[111] <u>4-1. 지질나노입자 및 본 발명 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체의 혼합 시기 선정</u>

[112] SM102(CAS No. 2089251-47-6), DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 콜레스테롤(Cholesterol), DMG-PEG-2000(1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000)를 에탄올에 각각 용해시켜 지질 용액을 준비하였다. 한편, 수용상(Aqueous phase) mRNA 완충액 (10.25 mM citric acid, 2.25 mM tri-sodium citrate, pH 3.0)에 메신저 리보핵산 (messenger RNA, mRNA) 75 μL를 혼합하여 RNA 용액을 준비하였다. 상기 준비한 지질 용액 및 RNA 용액을 Microfluidic device를 사용하여, SM102:DSPC:콜레스테롤:DMG-PEG-2000의 몰 비율이 50:10:38.5:1.5이고, 이온화지질인 SM102의 아미노기와 mRNA 인산기의 몰 비율 (N/P ratio)이 6이 되도록 혼합하였다. 이후, 혼합액에 PBS를 사용하여 4배 부피 비율로 희석하여

지질나노입자를 형성시키되, 희석을 3회로 나누어 진행하며, 지질:단백질 몰 비율 (LP ratio)이 240:1가 되도록 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 반응시켜 항체 결합 지질나노입자를 형성시켰다.

[113] 이때, 첫 번째 희석에 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체를 첨가한 실험군의 경우 early, 두 번째 희석에 첨가한 실험군의 경우 middle, 세 번째 희석에 첨가한 실험군의 경우 late, 총 3번의 희석에 균일하게 나누어 첨가한 실험군의 경우 total이라 명명하였다.

[114] 이후, 본 발명의 항체 결합 지질나노입자가 성공적으로 형성됐는지 확인하기 위해 리보그린 어세이 (RiboGreen assay)를 수행하였다.

[115] 구체적으로, 지질나노입자와 항체 결합 지질나노입자 20 μL를 각각 dPBS 180 μL에 희석하였다. dPBS 또는 '1% Triton X-100 in dPBS' 200 μL를 더욱 혼합하고 10분간 반응시켜 지질나노입자 희석 용액 및 항체 결합 지질나노입자 희석 용액을 준비하였다. 96 well plate에 표준 농도 범위의 RNA 용액 (dPBS 표준과 0.5 % Triton X-100 in dPBS 표준)및 상기 제조한 지질나노입자 희석 용액과 항체 결합 지질나노입자 희석 용액을 각각 100 μL 씩 넣고, RiboGreen 용액 100 μL씩 더욱 첨가한 후 25℃에서 5분간 반응시켰다. 이후, 형광 분광 광도계 (Fluorospectrophotometer)를 사용하여 excitation/emission = 485/530 nm를 측정하는 것으로, mRNA 농도를 측정하였다 (도 10).

[116] 한편, 도 10에서, dPBS를 사용하여 희석한 실험군의 값을 캡슐화 되지 않은 free mRNA 농도로 나타냈고, '1% Triton X-100 in dPBS'를 사용하여 희석한 실험군의 값을 total mRNA 농도로 나타냈다. 캡슐화 효율 (Encapsulation)은 (1-(Free mRNA/Total mRNA)) × 100%로 계산하였다.

[117] 이를 통해, 지질나노입자가 형성되는 중에, 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체를 혼합시켜도 항체 결합 지질나노입자가 온전하게 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체를 늦게 넣어줄수록 mRNA의 캡슐화 효율이 올라가는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 이하 실험에서는 지질나노입자가 온전하게 형성된 후, 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체를 첨가하는 방식으로 본 발명의 항체 결합 지질나노입자를 제조하였다.

[118]

[119] 4-2. 지질나노입자 및 본 발명 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체의 혼합 비율 선정

[120] SM102(CAS No. 2089251-47-6), DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 콜레스테롤(Cholesterol), DMG-PEG-2000(1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000)를 에탄올에 각각 용해시켜 지질 용액을 준비하였다. 한편, 수용상(Aqueous phase) mRNA 완충액 (10.25 mM citric acid, 2.25 mM tri-sodium citrate, pH 3.0)에 메신저

리보핵산 (messenger RNA, mRNA) 75 μL를 혼합하여 RNA 용액을 준비하였다. 상기 준비한 지질 용액 및 RNA 용액을 Microfluidic device를 사용하여, SM102:DSPC:콜레스테롤:DMG-PEG-2000의 몰 비율이 50:10:38.5:1.5이고, 이온화지질인 SM102의 아미노기와 mRNA 인산기의 몰 비율 (N/P ratio)이 6이 되도록 혼합하였다. 혼합액에 PBS를 사용하여 4배 부피 비율로 희석하여 지질나노입자를 형성시켰다. 지질나노입자에 다양한 지질:단백질 몰 비율 (LP ratio)로 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체를 첨가하고, 4℃에서 16시간 반응시켜 항체 결합 지질나노입자를 형성시켰다.

[121] 이후, 상기 실시예 4-1와 같은 방법으로 리보그린 어세이를 실시하여 캡슐화 효율을 계산하였고 (도 11), 상기 실시예 3-2와 같은 방법으로 동적 광산란법을 실시하여 형성된 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 크기를 확인하였다 (도 12).

[122] 이를 통해, LP ratio 5,000:1~100,000:1에서 캡슐화 효율이 약 95% 정도로 높은 것을 확인할 수 있었고, 지질나노입자에 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 단일사슬항체가 부착되어 크기가 커진 것을 확인할 수 있었다.

[123]

[124] **[실시예 5: 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 보관 안정성 확인]**

[125] 본 실시예에서는 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 보관 안정성을 확인하고자 했다.

[126]

[127] <u>5-1. 보관 시간에 따른 항체 결합 지질나노입자의 mRNA 캡슐화 효율 변화</u>

[128] 실시예 4-2의 방법으로 Firefly luciferase mRNA를 포함하고, MutuDC1940의 리간드에 결합하는 NLDC145 항체의 부분 및 막구조화 단백질 (MSP1E3D1, ApoA1 또는 ApoE3)를 포함하는 본 발명의 항체 결합 지질나노입자를 제작한 후, 4℃에서 보관하며 mRNA 캡슐화 효율 변화를 확인하였다. 항체 결합 지질나노입자를 만든 당일과 7일 후에, 상기 실시예 4-1와 같은 방법으로 리보그린 어세이를 실시하여 캡슐화 효율을 계산하였다 (도 13).

[129] 도 13을 보면, 본 발명의 항체 결합 지질나노입자는 제작 후 7일이 지나더라도 mRNA 캡슐화 효율이 떨어지지 않은 것을 확인할 수 있다. 상기와 같은 결과는 지질나노입자에 본 발명의 지질나노입자를 형성하는 항체를 부착시키더라도 지질나노입자로부터 mRNA가 누출되지 않았다는 것을 의미한다.

[130]

[131] <u>5-2. 보관 시간에 따른 항체 결합 지질나노입자의 크기 변화</u>

[132] 상기 실시예 5-1에서 제조한 본 발명의 항체 결합 지질나노입자를 4℃에서 보관하며, 실시예 3-2와 같은 방법으로 동적 광산란법을 실시하여 7일 동안 항체 결합 지질나노입자의 크기 변화를 확인하였다 (도 14). 한편, 도 14에서 (a)와 (b)는 동일한 실험 결과를 나타내는데, (a)는 LP ratio가 500:1인 실험군을 포함한 결과이고, (b)는 LP ratio가 500:1인 실험군을 제외하고 나타낸 결과이다.

[133] 도 14를 보면, 본 발명의 항체 결합 지질나노입자는 LP ratio가 5,000:1 보다 큰

경우에는 시간이 지나더라도 일정한 크기를 유지하나 500:1 ~ 1,000:1의 경우 크기가 비약적으로 커지는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, LP ratio가 5,000:1를 넘어야 안정적인 항체 결합 지질나노입자를 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

[134]

[135] **[실시예 6: 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 목적 세포로의 결합능 확인]**

[136] 본 실시예에서는 본 발명의 항체 결합 지질나노입자가 목적 세포에 특이적으로 잘 결합되는지 확인하고자 했다.

[137] 실시예 5-1의 방법으로 본 발명의 항체 결합 지질나노입자를 제작하되, 지질의 1 % 몰 비율로 DiD(DiIC18(5); 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate salt) 염색약을 추가하여 DID-항체 결합 지질나노입자를 제작하였다.

[138] RPMI-1640를 배지를 사용하여 키운 A549 세포와 IMDM 배지에 10 mM HEPES, 50μM β-mercaptoethanol를 첨가한 배지로 키운 MutuDC1940 세포를 준비하였다. 한편, A549 세포는 목적 리간드를 발현하지 않는 실험군, MutuDC1940 세포는 목적 리간드를 상시 발현하고 있는 실험군으로 사용하였다.

[139] 96 well black 플레이트에 A549 세포는 well 당 1.5×10^5 cells/mL 농도로 100 μL를 시딩하였다. MutuDC1940 세포는 플레이트에 잘 부착되도록 collagen I을 50 μg/mL 농도로 코팅한 후, well 당 3.5×10^5 cells/mL의 농도로 100 μL를 시딩하였다. 세포들이 플레이트에 잘 부착되도록 하루 동안 배양한 후, well 최종 지질 농도가 10 μg/mL가 되도록 본 발명의 항체 결합 지질나노입자를 처리하였다. 37℃, 5% CO_2 조건에서 30분 동안 배양 후 상층액을 제거하였다. PBS(Phosphate buffered saline)를 사용하여 2회 워싱을 진한 후, 세포 파쇄 용액 (Cell lysis buffer) 100 μL를 넣고 37℃에서 5분간 처리하여 세포를 용해시켰다. 이후, plate reader를 통해 형광(Fluorescence)를 Ex/Em = 644/663 nm에서 측정하여, 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 상대적 결합능을 확인하였다 (도 15).

[140] 도 15를 보면, 목적 리간드를 발현하고 있지 않는 A549 세포에 처리한 실험군에서는 본 발명의 항체 결합 지질나노입자와 일반적인 지질나노입자가 차이를 보이지 않지만, 목적 리간드를 발현하고 있는 MutuDC1940 세포에 처리한 실험군에서는 본 발명의 항체 결합 지질나노입자가 더 높은 형광값을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 상기와 같은 결과는 본 발명의 항체 결합 지질나노입자가 목적 리간드를 발현하고 있는 목적 세포에 특이적으로 더욱 잘 결합된다는 것을 의미한다.

[141]

[142] **[실시예 7: 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 mRNA 전달능 확인]**

[143] 본 실시예에서는 본 발명의 항체 결합 지질나노입자가 포집하고 있는 mRNA를 목적 세포에 특이적으로 잘 전달하는지 확인하고자 했다.

[144]

[145] 7-1. 혈청이 존재하지 않는 조건에서의 mRNA 전달 확인

[146] 상기 실시예 5-1에서 제조한 본 발명의 항체 결합 지질나노입자가 mRNA를 목적 세포로 성공적으로 전달하는지 확인하기 위해 luciferase assay를 수행하였다.

[147] RPMI-1640를 배지를 사용하여 키운 A549 세포와 IMDM 배지에 10 mM HEPES, 50μM β-mercaptoethanol를 첨가한 배지로 키운 MutuDC1940 세포를 준비하였다. 한편, A549 세포는 혈청이 존재하지 않으며, 목적 리간드를 발현하지 않는 실험군, MutuDC1940 세포는 혈청이 존재하지 않으며, 목적 리간드를 상시 발현하고 있는 실험군으로 사용하였다.

[148] 96 well black 플레이트에 A549 세포는 well 당 2×10^5 cells/mL 농도로 500 μL를 시딩하였다. MutuDC1940 세포는 플레이트에 잘 부착되도록 collagen I을 50 μg/mL 농도로 코팅한 후, well 당 4×10^5 cells/mL의 농도로 500 μL를 시딩하였다. 세포들이 플레이트에 잘 부착되도록 하루 동안 배양한 후, well 당 총 mRNA가 125 ng이 처리되도록 본 발명의 항체 결합 지질나노입자를 처리하였다. 37℃, 5% CO_2 조건에서 12시간 배양 후 상층액을 제거하였다. 세포 파쇄 용액 (Cell lysis buffer) 200 μL를 넣고 37℃에서 5분간 처리하여 세포를 용해시킨 후, 상층액 100 μL를 white 96 well plate에 옮긴다. 이후, luciferase의 기질(substrate) 50 μL를 첨가한 후, plate reader를 통해 발광(luminescence)를 측정하고, 일반적인 지질나노입자를 처리한 실험군을 기준으로 상대적인 Firefly luciferase 유전자 발현량을 확인하였다 (도 16).

[149] 도 16을 보면, 목적 리간드가 발현되지 않은 A549 세포에 처리한 실험군에서 본 발명의 항체 결합 지질나노입자는 일반적인 지질나노입자보다 대부분의 경우 유전자 발현량이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 발명의 항체가 적게 포함될수록 목적 리간드가 발현되지 않은 세포에서의 발현양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[150] 반면, 목적 리간드가 발현된 MutuDC1940 세포에 처리한 실험군에서는 MSP1E3D1의 경우 LP ratio 5,000:1 ~ 10,000:1, ApoA1의 경우 500:1 ~ 10,000:1, ApoE3의 경우 500:1 ~ 1,000:1에서 유전자 발현량이 약 5 ~ 20배 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[151] 상기와 같은 결과는, 일반적인 지질나노입자의 경우 내포하고 있는 mRNA를 무작위로 전달하지만, 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 경우 막구조화 단백질을 포함하여 무작위적인 세포로의 mRNA 전달이 억제되고, 항체를 포함하여 항체가 결합이 가능한 세포로의 mRNA 전달이 향상되어, 일반적인 항체 결합 지질나노입자 보다 더욱 우수한 특이적인 전달능을 가지고 있음을 의미한다.

[152]

[153] 7-2. 혈청이 존재하는 조건에서 mRNA 전달 확인

[154] 혈청(serum)이 존재하는 조건에서도 방해받지 않고 상기 실시예 7-1과 같이

mRNA를 특이적으로 전달할 수 있는지 확인하고자 했다.

[155] 이를 위해, 상기 5-1과 동일한 방법으로 luciferase assay를 수행하여 유전자 발현량을 확인하되, RPMI-1640에 10% FBS를 첨가한 배지로 키운 A549 세포와 IMDM 배지에 10% FBS, 10 mM HEPES, 50μM β-mercaptoethanol를 첨가한 배지로 키운 MutuDC1940 세포를 사용하여 실험을 진행하였다 (도 17).

[156] 도 17을 보면, 목적 리간드가 발현되지 않은 A549 세포에 처리한 실험군에서 본 발명의 항체 결합 지질나노입자는 일반적인 지질나노입자보다 대부분의 경우 유전자 발현량이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[157] 반면, 목적 리간드가 발현되는 MutuDC1940 세포에 처리한 경우, 지질나노입자가 항체의 scFv (NLDC145)를 포함한 군에서 MSP1E3D1의 경우 5,000:1 ~ 100,000:1, ApoA1은 1,000:1~100,000:1, ApoE3의 경우 500:1 ~ 100,000:1의 비율에서 발현양이 약 5 ~ 20 배 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[158] 상기와 같은 결과는, 체액과 같이 혈청이 존재하는 조건에서도, 일반적인 지질나노입자의 경우 내포하고 있는 mRNA를 아무런 세포에나 무작위로 전달하지만, 본 발명 항체 결합 지질나노입자의 경우 막구조화 단백질을 포함하여 무작위적인 세포로의 mRNA 전달이 억제되고, 항체를 포함하여 항체가 결합이 가능한 세포로의 mRNA 전달이 향상되어, 일반적인 항체 결합 지질나노입자 보다 더욱 특이적인 전달능을 가지고 있음을 의미한다.

청구범위

[청구항 1] 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein)이 결합된 '항체 또는 항체 절편'이, 막구조화 단백질을 매개로, 지질나노입자(lipid nanoparticle)의 형태를 구성하는 지질의 소수성 부분에, 소수성 결합을 통해 결합된 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 막구조화 단백질은,
헬릭스(helix) 구조를 갖는 양친매성 단백질인 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 막구조화 단백질은,
헬릭스 구조 및 양친매성 특성이 유지된 막구조화 단백질의 절편인 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 항체 절편은,
scFv 또는 'scFv 및 Fc가 결합된 scFV-Fc'인 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 막구조화 단백질 (membrane scaffold protein)이 결합된 '항체 또는 항체 절편'은,
막구조화 단백질을 암호화하는 유전자에 '항체 또는 항체 절편'을 암호화하는 유전자를 결합시킨 후, 이를 발현시켜 제조한 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자.

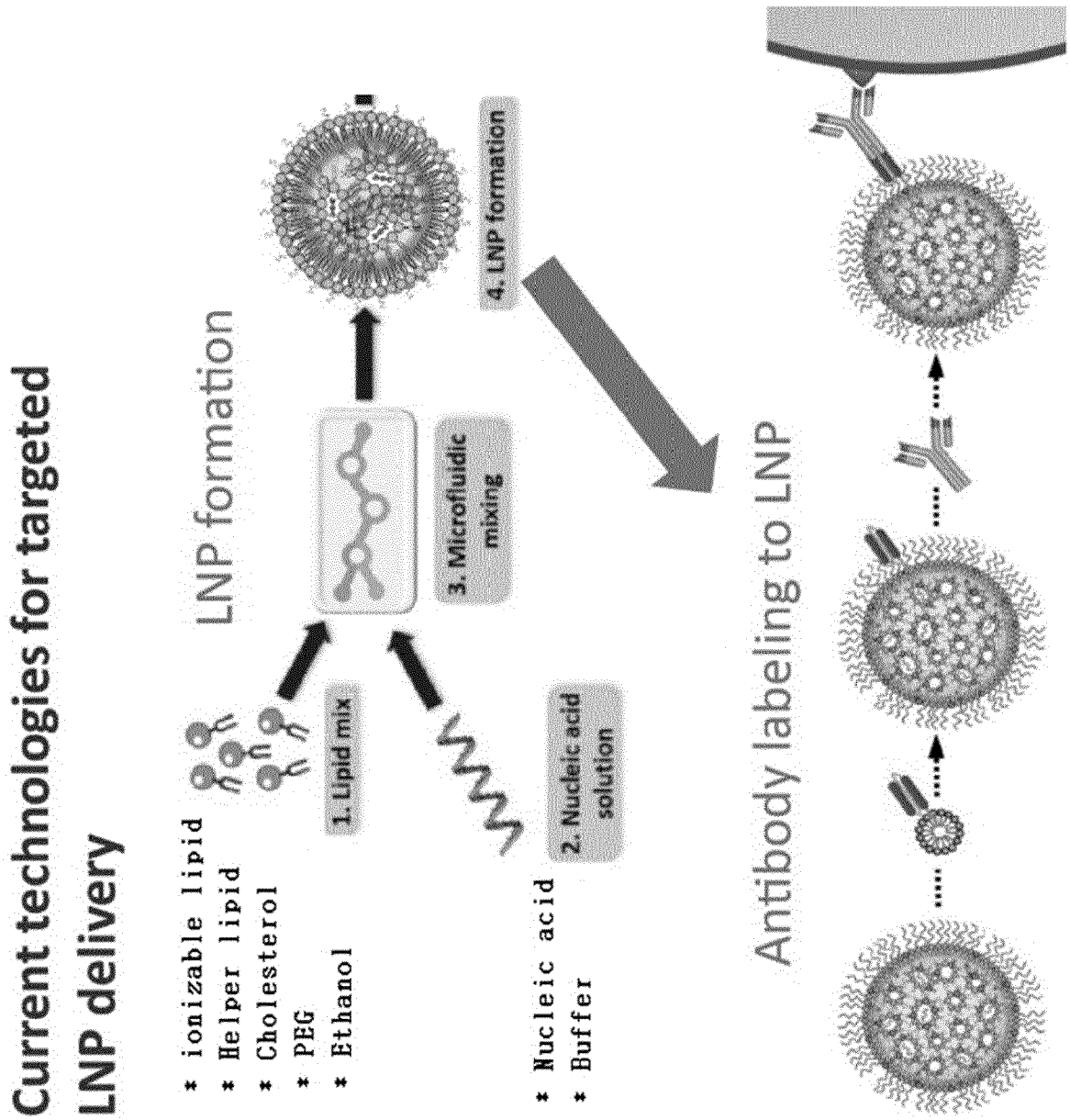
[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 지질나노입자는,
내부에 봉입대상물질이 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 봉입대상물질은,
핵산인 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자.

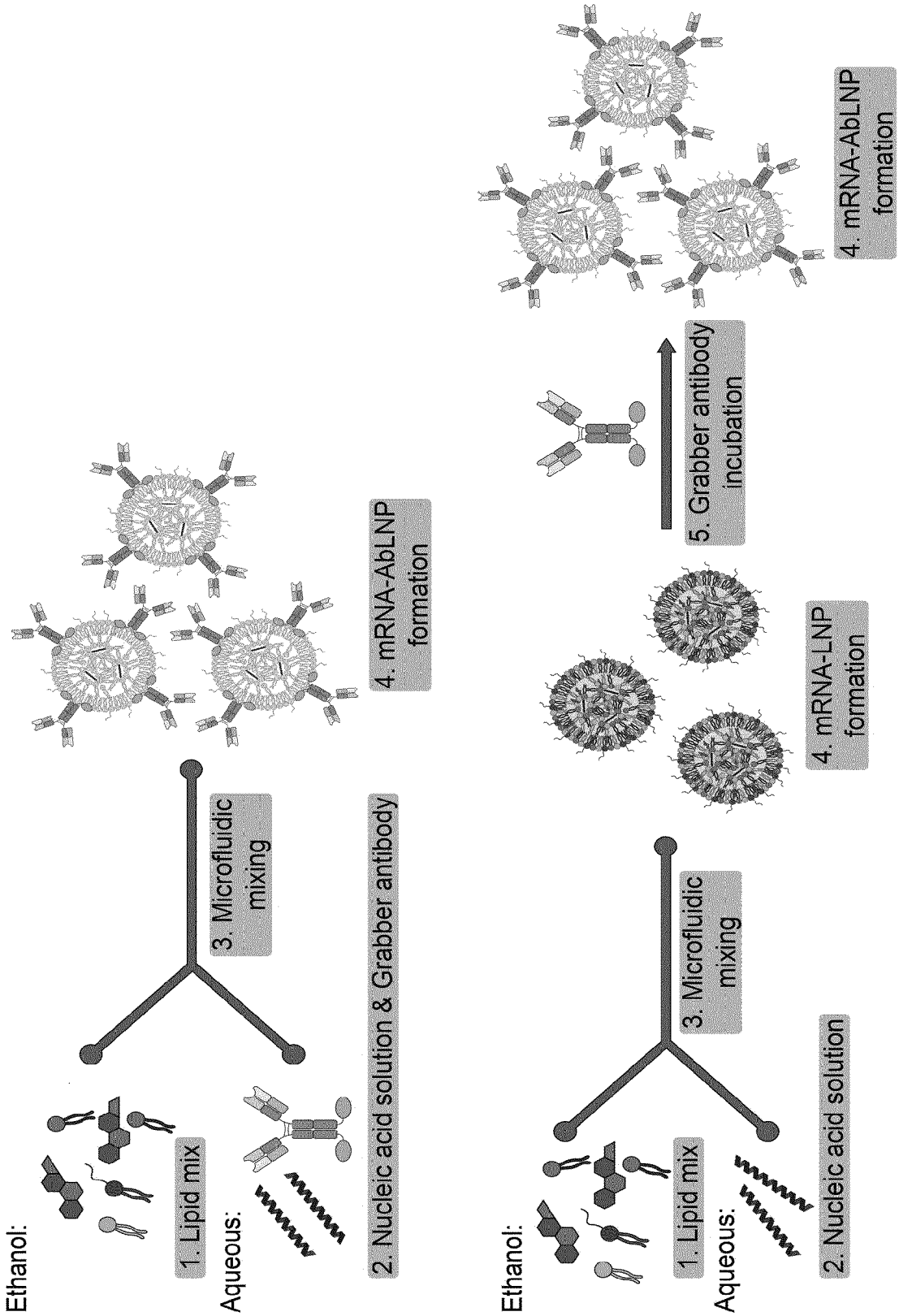
[청구항 8] 막구조화 단백질이 결합된 항체 및 지질을 혼합하는 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자의 제조방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 항체 결합 지질나노입자는,
봉입대상물질을 더욱 포함하여 혼합시킨 것을 특징으로 하는 항체 결합 지질나노입자의 제조방법.

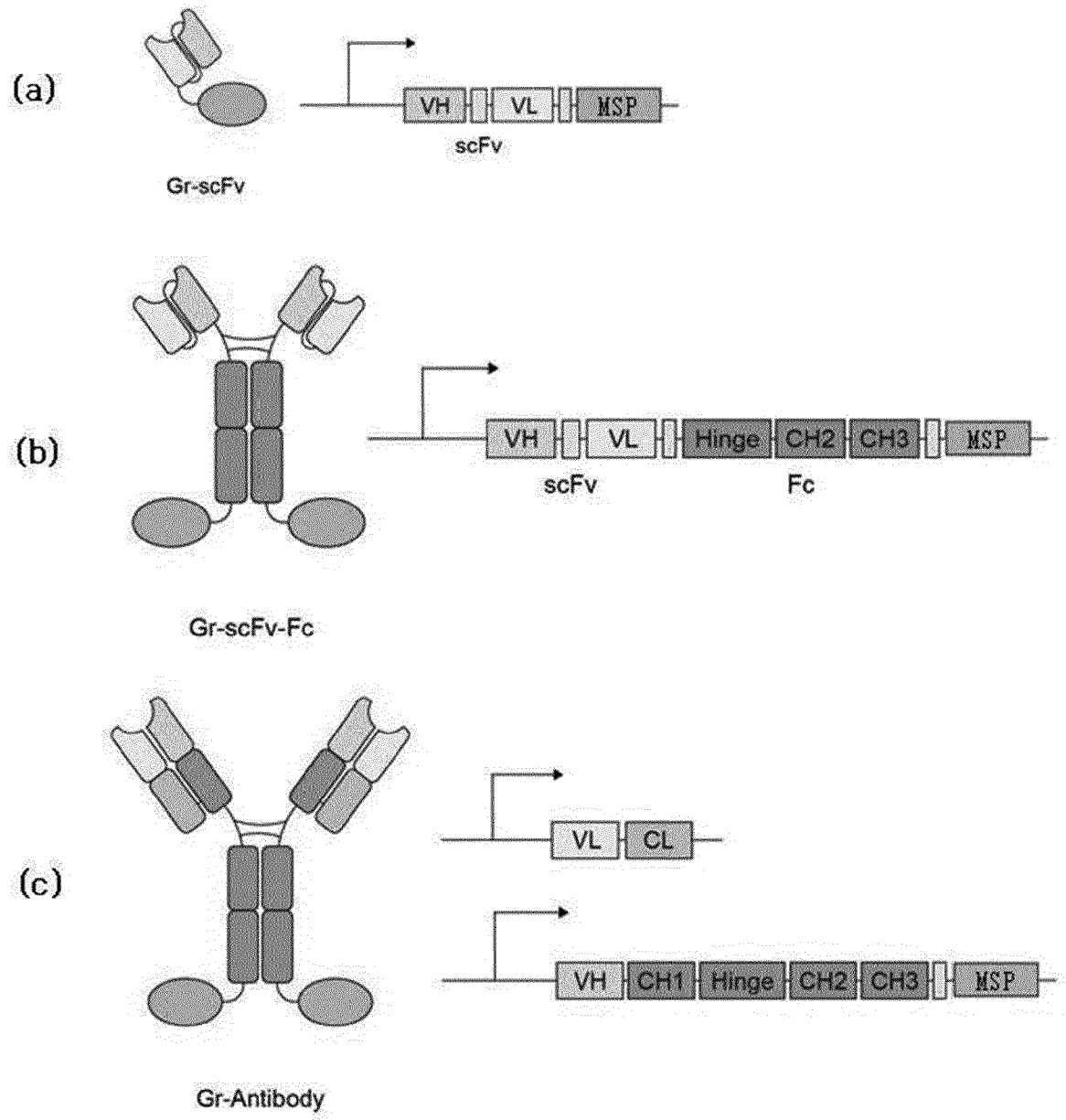
[도1]


Current technologies for targeted LNP delivery
LNP formation
* ionizable lipid
* Helper lipid
* Cholesterol
* PEG
* Ethanol
1. Lipid mix
* Nucleic acid
* Buffer
2. Nucleic acid solution
3. Microfluidic mixing
4. LNP formation
Antibody labeling to LNP

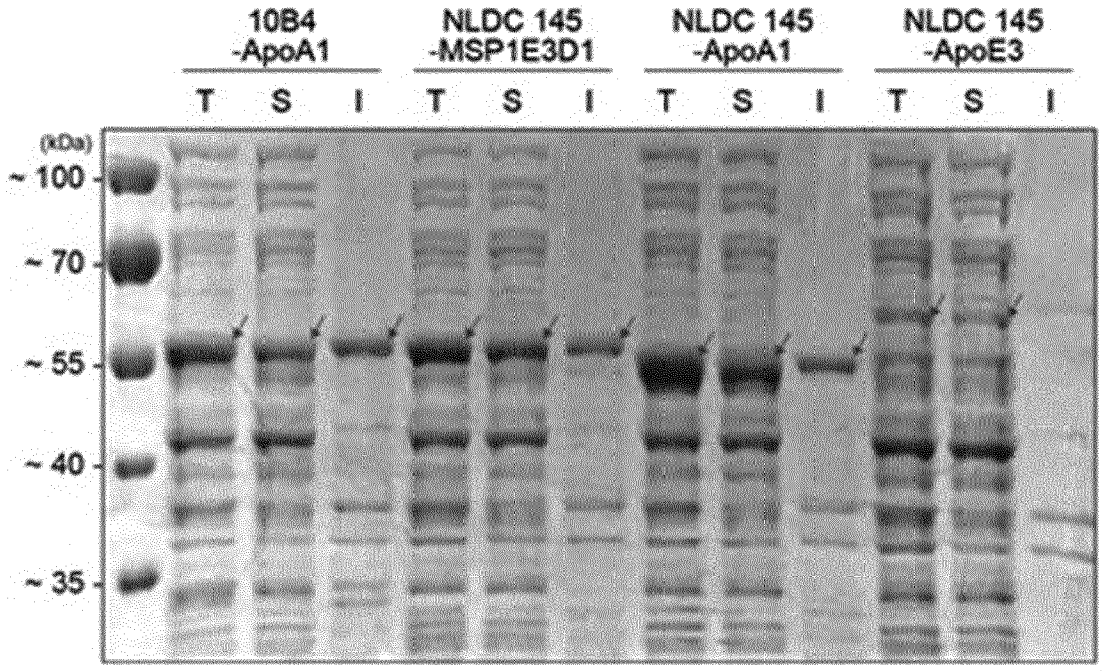
[도2]


Ethanol:
Aqueous:
1. Lipid mix
2. Nucleic acid solution & Grabber antibody
3. Microfluidic mixing
4. mRNA-AbLNP formation
Ethanol:
Aqueous:
1. Lipid mix
2. Nucleic acid solution
3. Microfluidic mixing
4. mRNA-LNP formation
5. Grabber antibody incubation
4. mRNA-AbLNP formation

[도3]

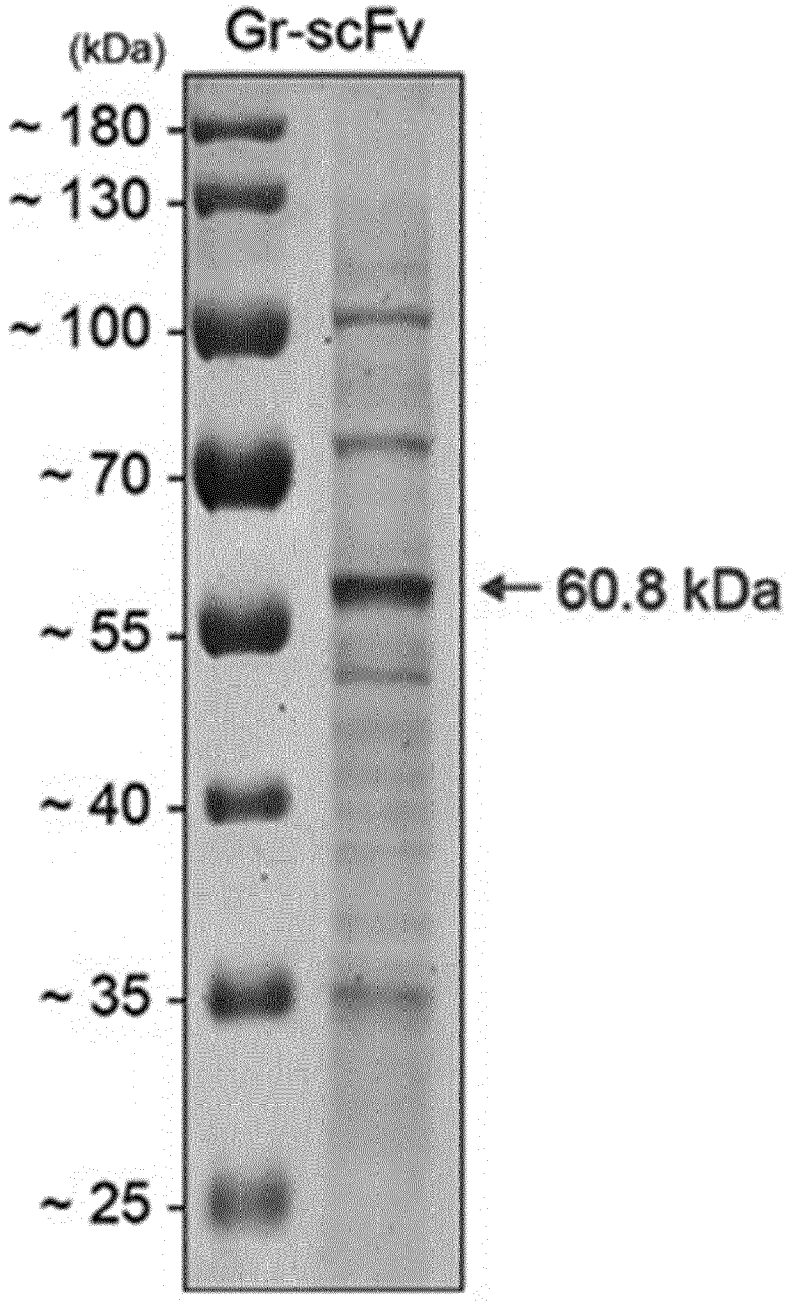

(a)
VH
VL
MSP
scFv
Gr-scFv
(b)
VH
VL
Hinge
CH2
CH3
MSP
scFv
Fc
Gr-scFv-Fc
(c)
VL
CL
VH
CH1
Hinge
CH2
CH3
MSP
Gr-Antibody

[도4]

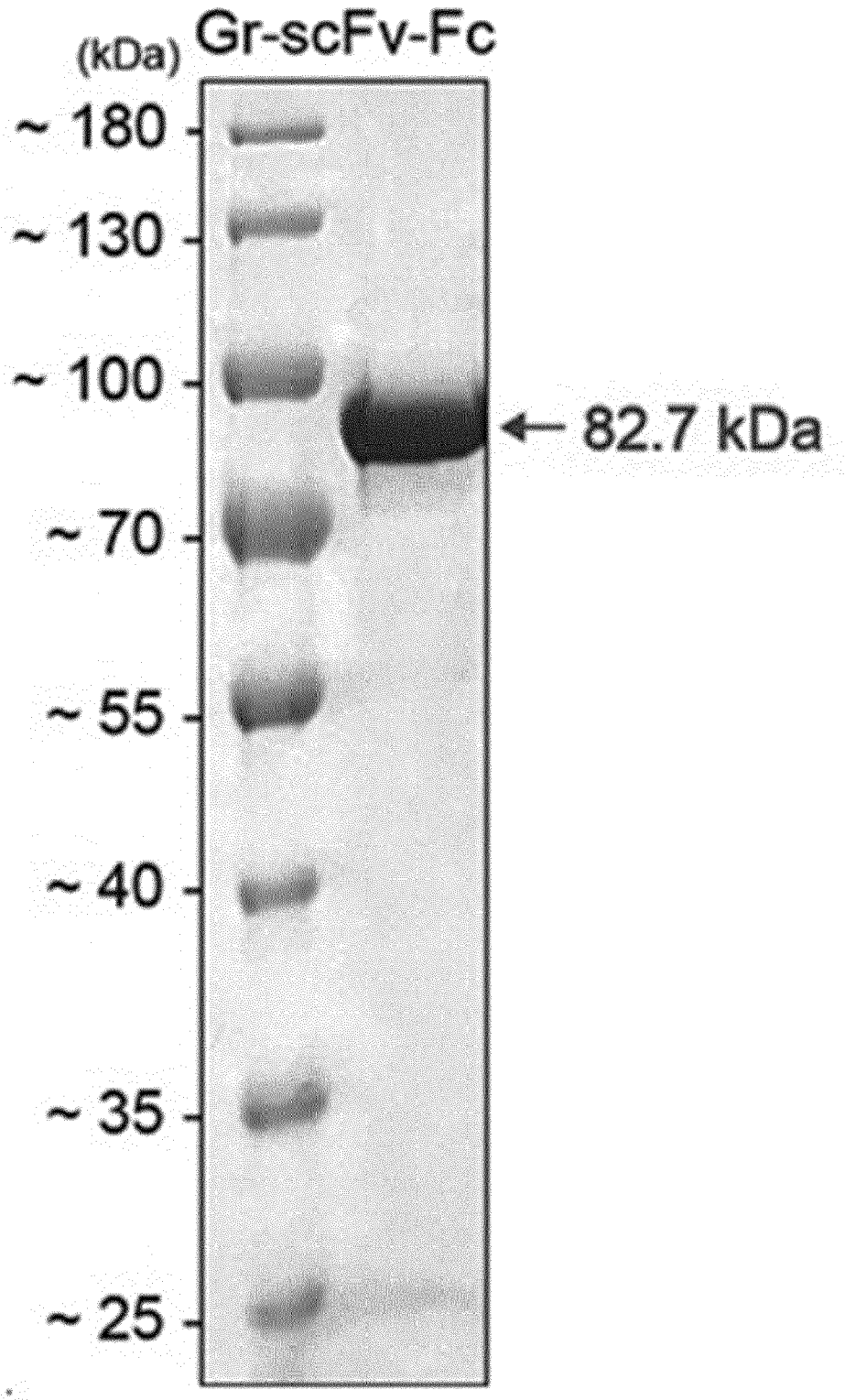


Protein	Size (kDa)
10B4-ApoA1	58.9
NLDC 145-MSP1E3D1	60.2
NLDC 145-ApoA1	58.5
NLDC 145-ApoE3	64.6

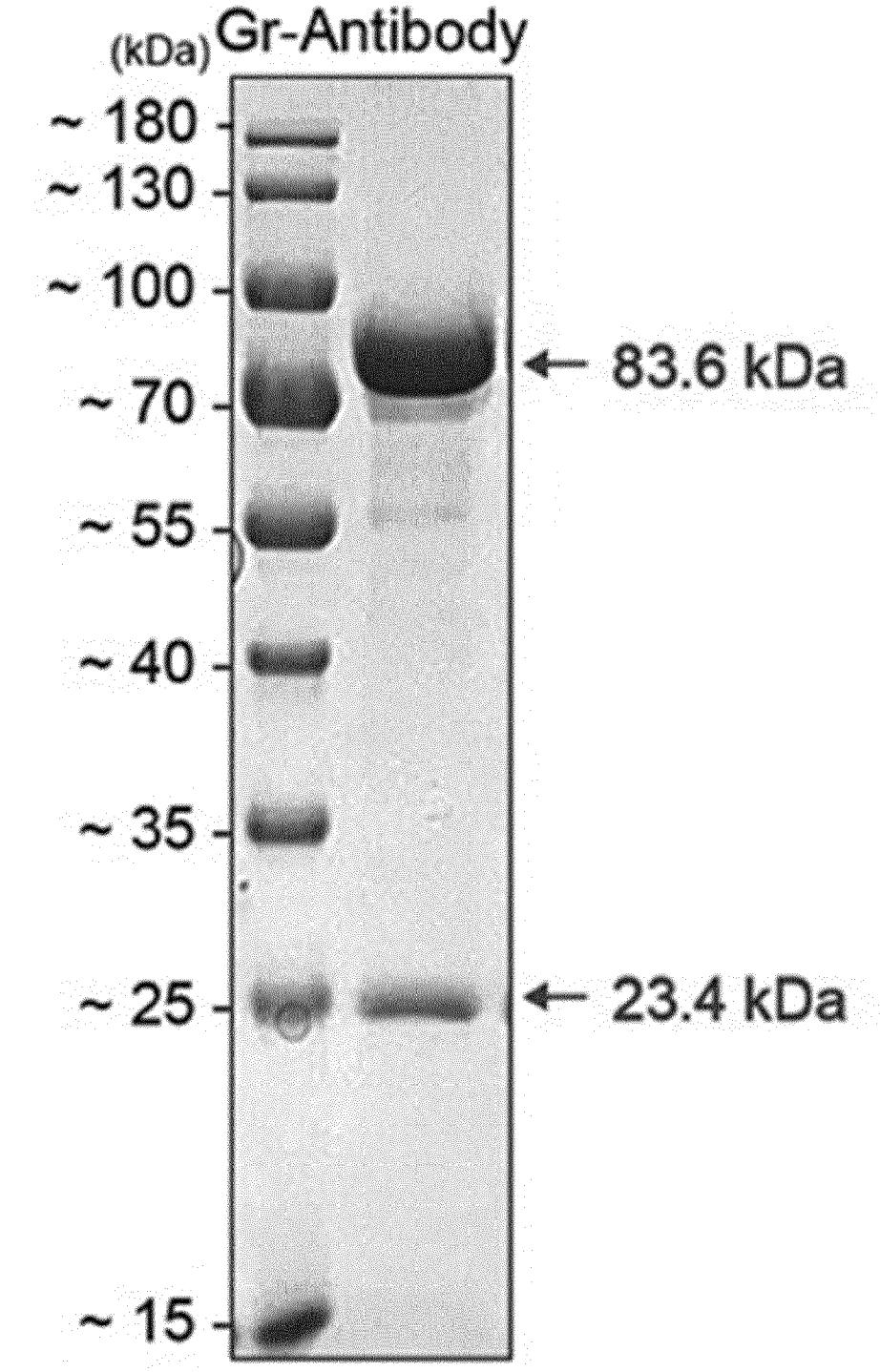
[도5]



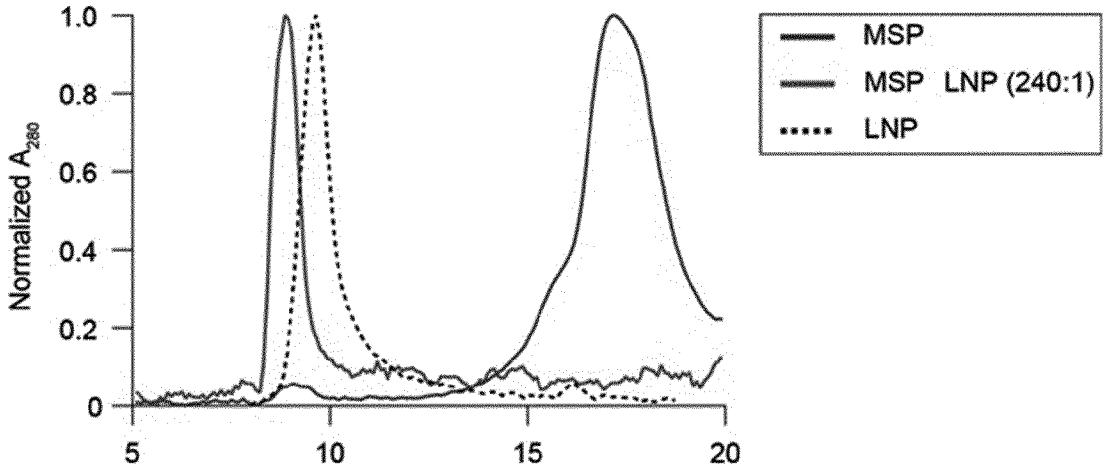
[도6]



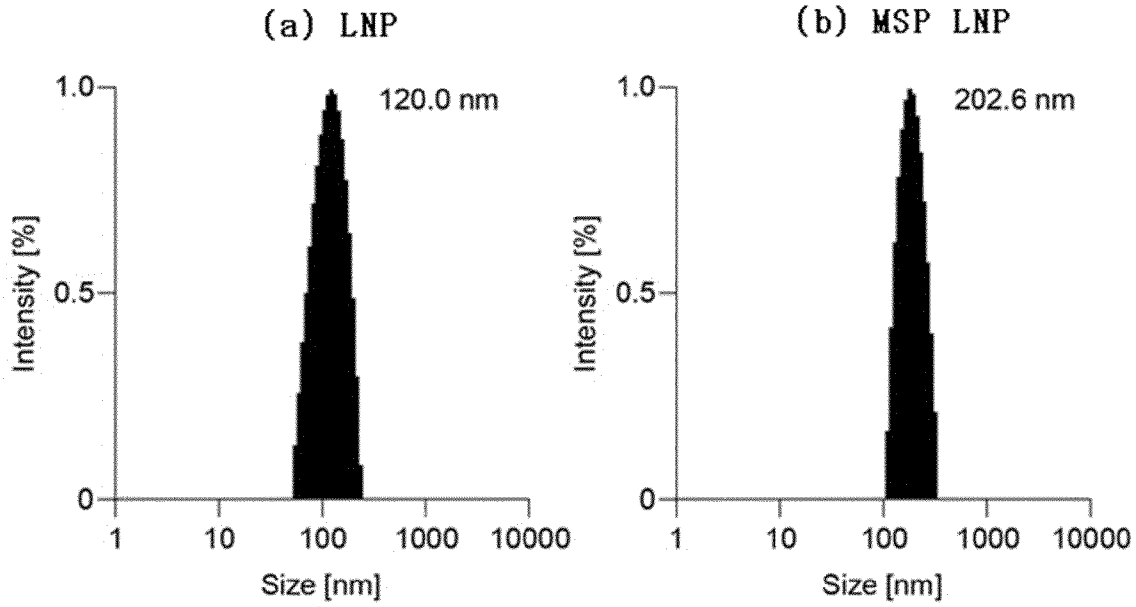
[도7]



[도8]



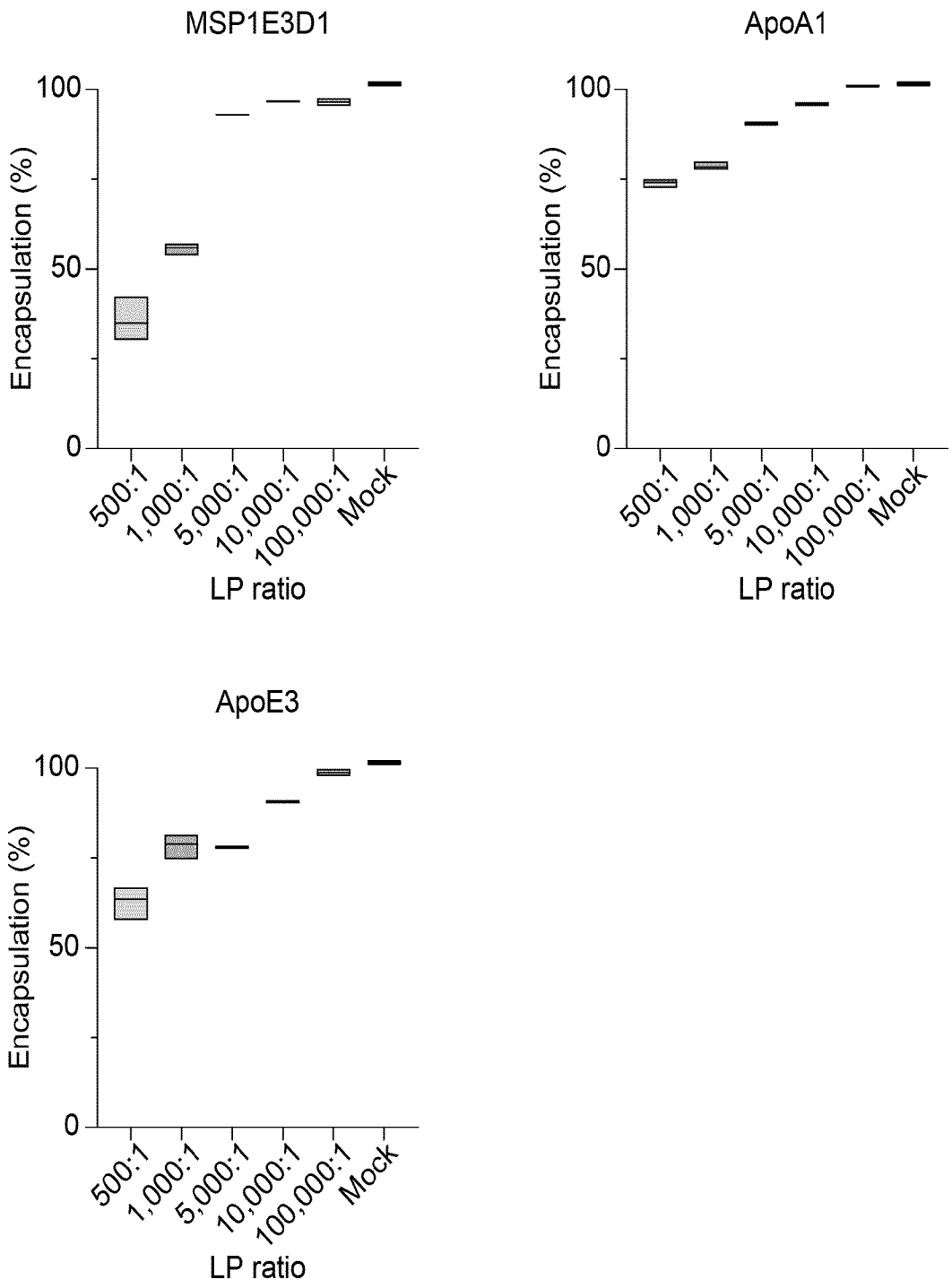
[도9]



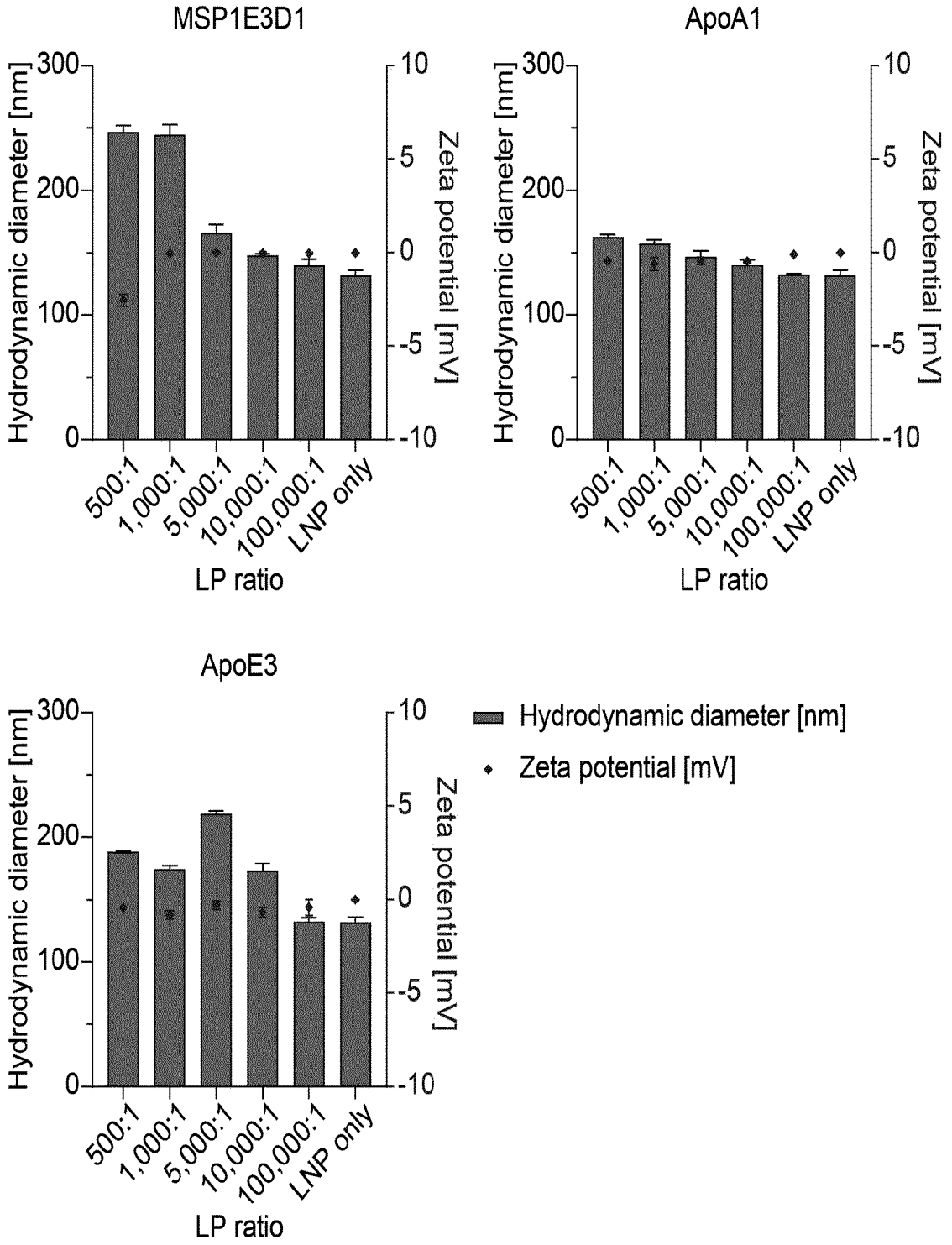
[도10]

Sample	Free mRNA (μg/mL)	Total mRNA (μg/mL)	Encapsulation (%)
LNP only	0.5	11.5	95.9
Early	5.8	11.1	47.5
Middle	5.3	10.6	49.9
Late	3.9	10.3	62.7
Total	3.3	11.4	70.6

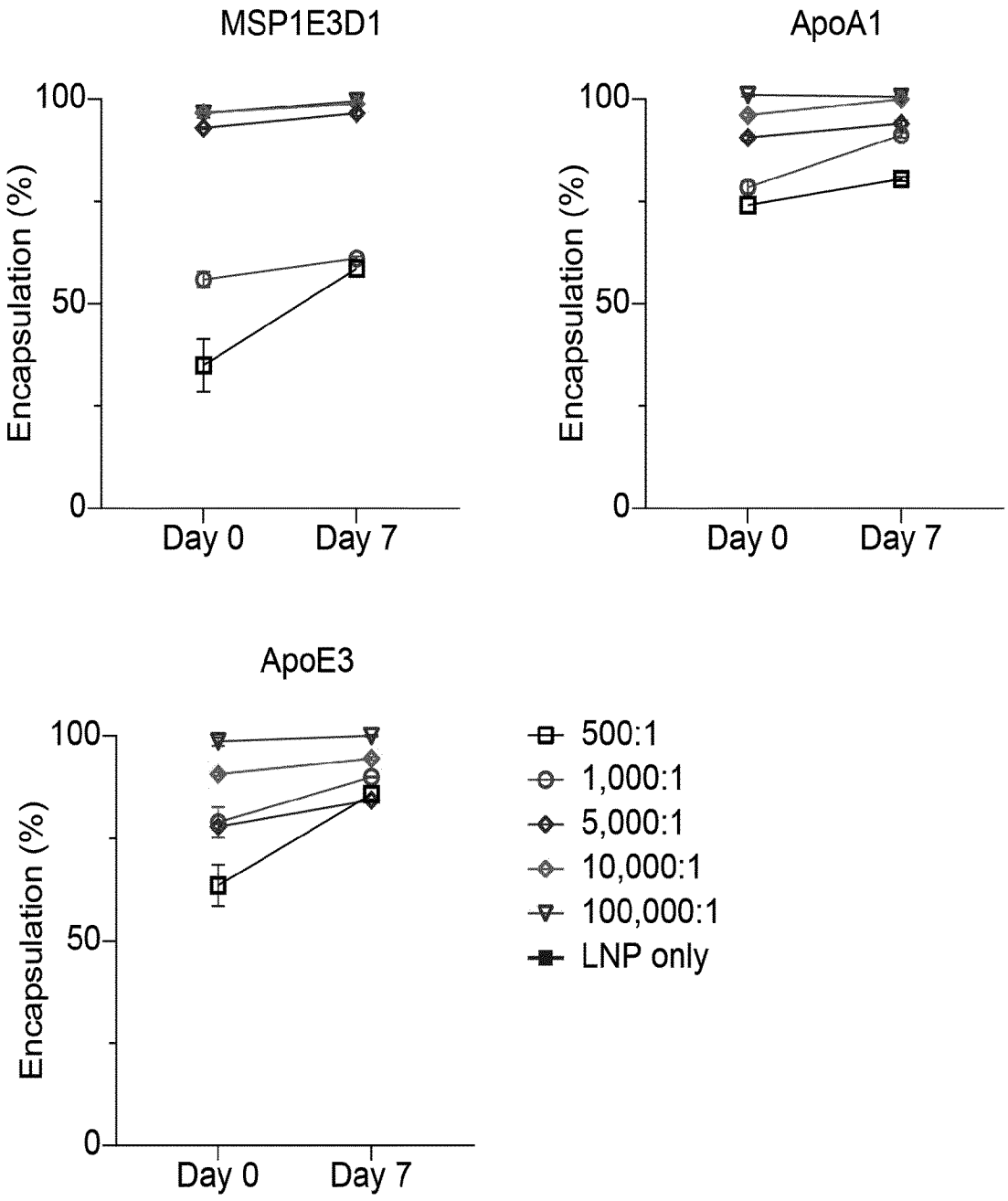
[도11]


MSP1E3D1
ApoA1
ApoE3
Encapsulation (%)
100
50
0
500:1
1,000:1
5,000:1
10,000:1
100,000:1
Mock
LP ratio

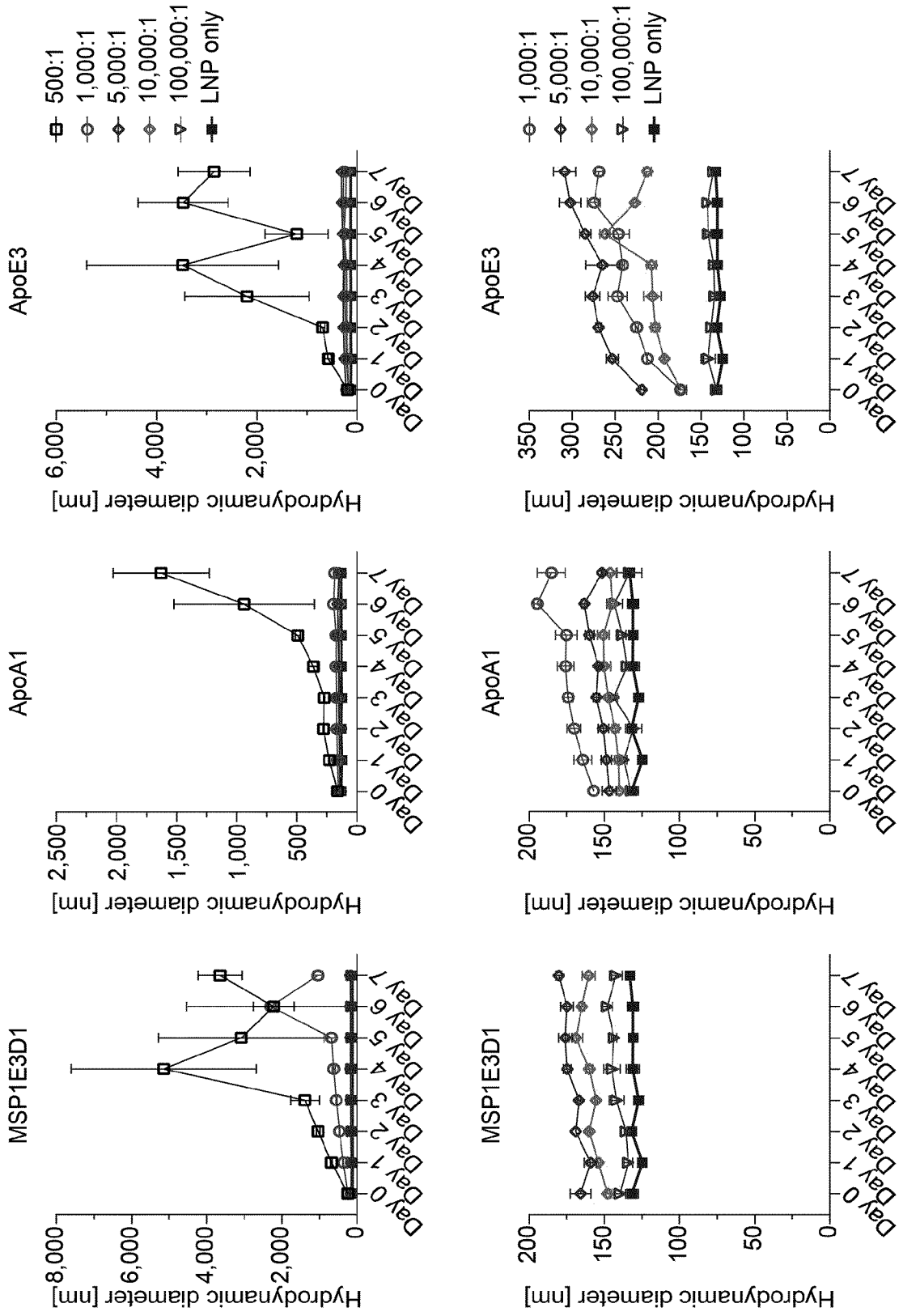
[도12]


MSP1E3D1
ApoA1
ApoE3
Hydrodynamic diameter [nm]
Zeta potential [mV]
300
200
100
0
10
5
0
-5
-10
500:1
1,000:1
5,000:1
10,000:1
100,000:1
LNP only
LP ratio
Hydrodynamic diameter [nm]
Zeta potential [mV]

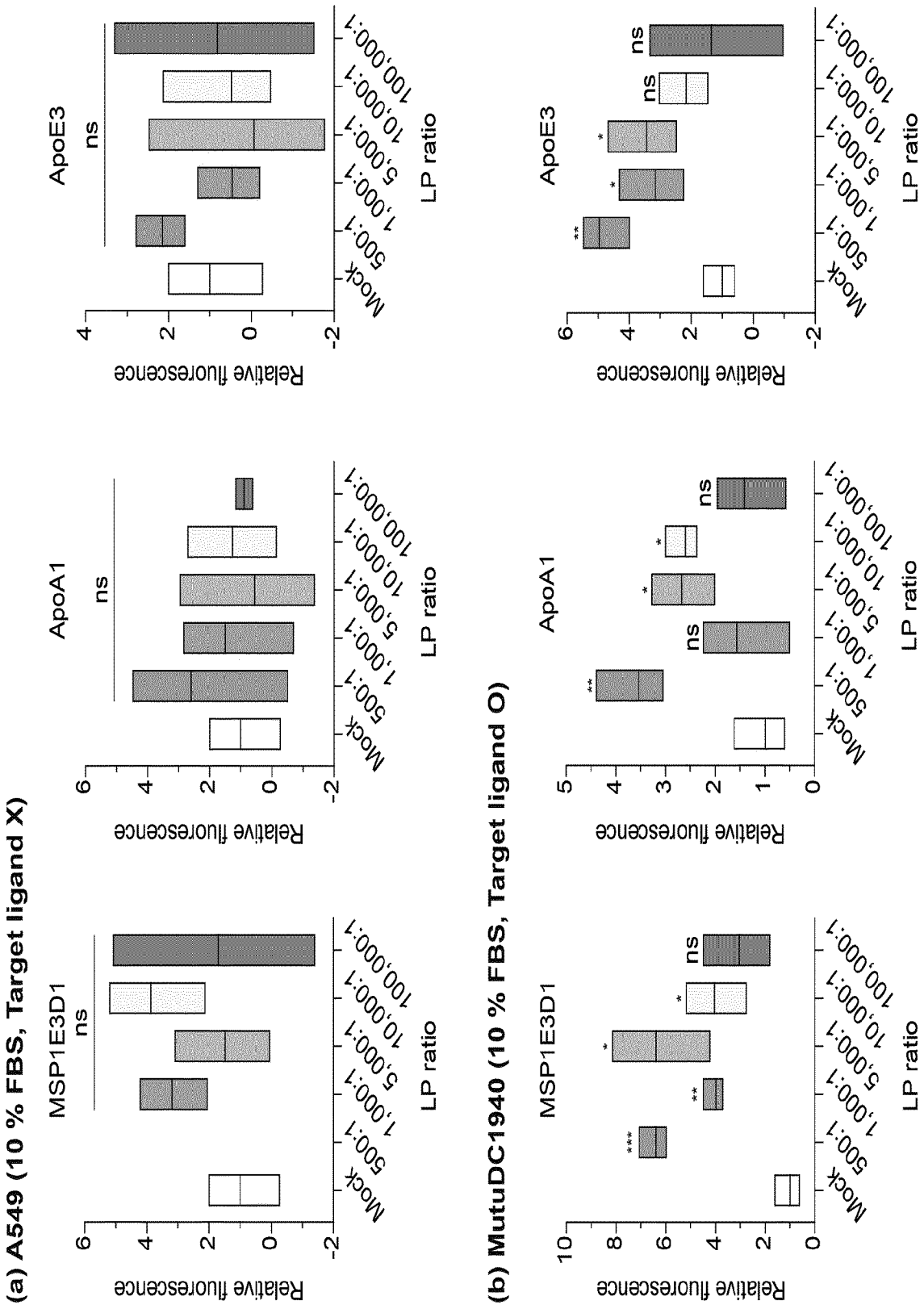
[도13]


MSP1E3D1
ApoA1
ApoE3
Encapsulation (%)
100
50
0
Day 0
Day 7
500:1
1,000:1
5,000:1
10,000:1
100,000:1
LNP only

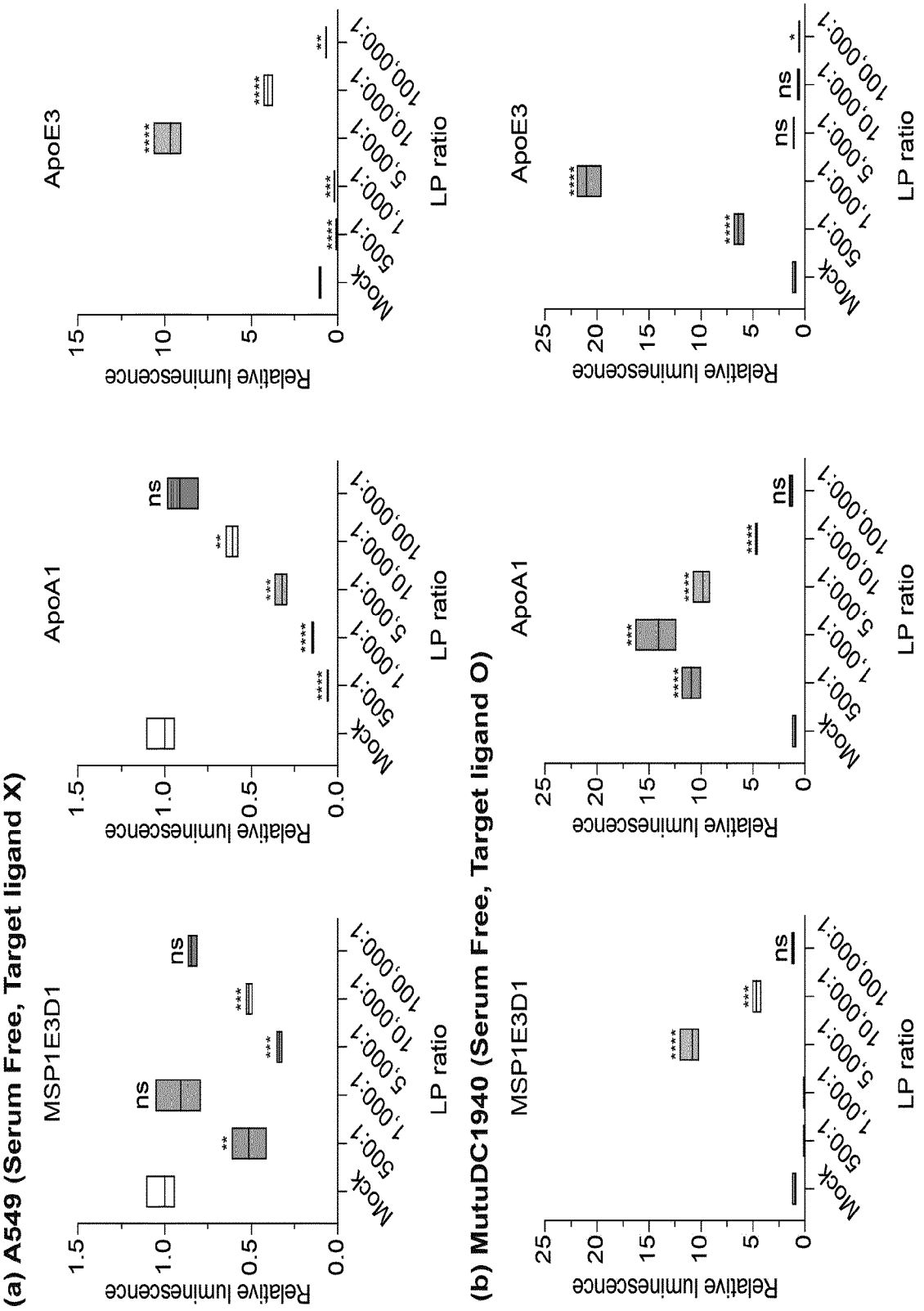
[도14]


ApoE3
ApoA1
MSP1E3D1
Hydrodynamic diameter [nm]
500:1
1,000:1
5,000:1
10,000:1
100,000:1
LNP only
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7

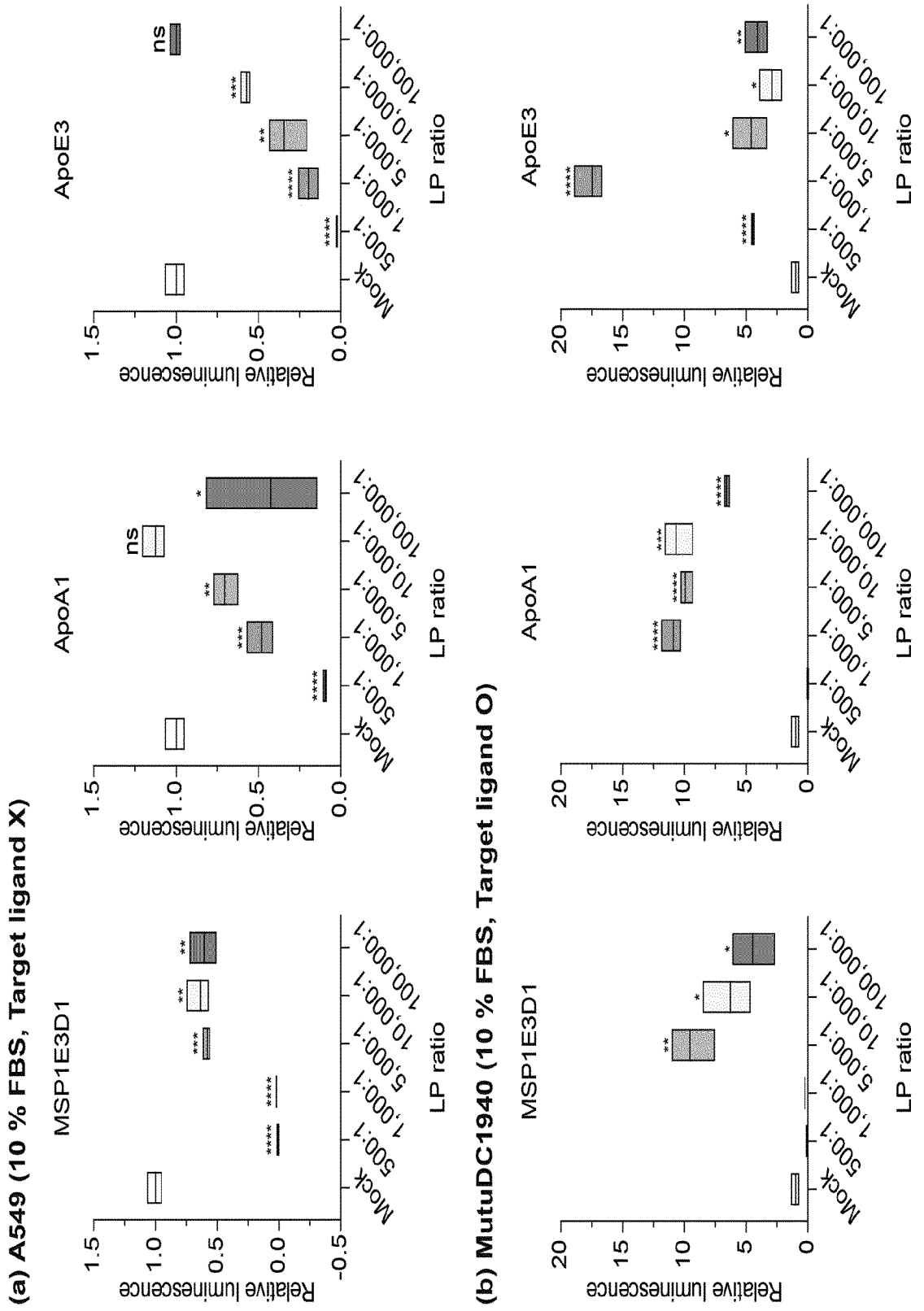
[도15]


(a) A549 (10 % FBS, Target ligand X)
(b) MutuDC1940 (10 % FBS, Target ligand O)
MSP1E3D1
ApoA1
ApoE3
Relative fluorescence
LP ratio
Mock
500:1
1,000:1
5,000:1
10,000:1
100,000:1
ns
*
**
***

[도16]


(a) A549 (Serum Free, Target ligand X)
MSP1E3D1
ApoA1
ApoE3
(b) MutuDC1940 (Serum Free, Target ligand O)
MSP1E3D1
ApoA1
ApoE3
Relative luminescence
LP ratio
Mock
500:1
1,000:1
5,000:1
10,000:1
100,000:1
ns

[도17]


(a) A549 (10 % FBS, Target ligand X)
(b) MutuDC1940 (10 % FBS, Target ligand O)
MSP1E3D1
ApoA1
ApoE3
Relative luminescence
LP ratio
Mock
500:1
1,000:1
5,000:1
10,000:1
100,000:1
ns

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/001298

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/00(2006.01)i; **C07K 14/775**(2006.01)i; **C12N 15/113**(2010.01)i; **A61K 9/51**(2006.01)i; **A61K 47/69**(2017.01)i; **A61K 31/7088**(2006.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/00(2006.01); A61K 38/17(2006.01); B82B 3/00(2006.01); B82Y 5/00(2011.01); C07K 14/705(2006.01); G01N 33/569(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 막구조화 단백질(membrane scaffold protein, MSP), 헬릭스(helix), 양친매성(amphiphilicity), 항체(antibody), 절편(fragment), 지질나노입자(lipid nanoparticle), 소수성 결합(hydrophobic bond), 봉입(inclusion), 핵산(nucleic acid), 혼합(mixing)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2021-0035753 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 01 April 2021 (2021-04-01) See abstract, claims 15-16, paragraphs [0052], [0056], [0065], [0085] and [0090], and figure 28.	1-4,6-9
A		5
Y	KR 10-2018-0008338 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 24 January 2018 (2018-01-24) See abstract, claim 1, and paragraphs [0029] and [0038]-[0041].	1-4,6-9
Y	VEIGA, N. et al. Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes. Nature Communications. 2018, vol. 9, thesis no. : 4493 (pp. 1-9). See abstract, pages 2 and 7-8 and figures 1 and 4.	1-4,6-9

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 April 2023	**26 April 2023**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0050586 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 13 May 2019 (2019-05-13) See entire document.	1-9
A	SWINGLE, K. L. et al. Lipid nanoparticle-mediated delivery of mRNA therapeutics and vaccines. Trends in Molecular Medicine. 2021, vol. 27, no. 6, pp. 616-617. See entire document.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/001298

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/001298

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2021-0035753 A	01 April 2021	CN 114667293 A	24 June 2022
		EP 4019537 A1	29 June 2022
		KR 10-2021-0035752 A	01 April 2021
		KR 10-2023-0006784 A	11 January 2023
		KR 10-2023-0006785 A	11 January 2023
		US 2022-0372496 A1	24 November 2022
		WO 2021-060791 A1	01 April 2021
KR 10-2018-0008338 A	24 January 2018	KR 10-2181991 B1	23 November 2020
		US 11541100 B2	03 January 2023
		US 2019-0255145 A1	22 August 2019
		WO 2018-012936 A1	18 January 2018
KR 10-2019-0050586 A	13 May 2019	KR 10-1994279 B1	28 June 2019
		US 2021-0214401 A1	15 July 2021

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/001298

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/00(2006.01)i; **C07K 14/775**(2006.01)i; **C12N 15/113**(2010.01)i; **A61K 9/51**(2006.01)i; **A61K 47/69**(2017.01)i; **A61K 31/7088**(2006.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/00(2006.01); A61K 38/17(2006.01); B82B 3/00(2006.01); B82Y 5/00(2011.01); C07K 14/705(2006.01); G01N 33/569(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 막구조화 단백질(membrane scaffold protein, MSP), 헬릭스(helix), 양친매성(amphiphilicity), 항체(antibody), 절편(fragment), 지질나노입자(lipid nanoparticle), 소수성 결합(hydrophobic bond), 봉입(inclusion), 핵산(nucleic acid), 혼합(mixing)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2021-0035753 A (성균관대학교 산학협력단) 2021.04.01 요약, 청구항 15-16, 단락 [0052], [0056], [0065], [0085], [0090], 도면 28	1-4,6-9
A		5
Y	KR 10-2018-0008338 A (성균관대학교 산학협력단) 2018.01.24 요약, 청구항 1, 단락 [0029], [0038]-[0041]	1-4,6-9
Y	VEIGA, N. 등, "Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes", Nature Communications, 2018, 제9권, 논문번호 : 4493(페이지 1-9) 초록, 페이지 2, 7-8, 도면 1, 4	1-4,6-9
A	KR 10-2019-0050586 A (서울대학교 산학협력단) 2019.05.13 전체 문헌	1-9

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2023년04월25일(25.04.2023)	**2023년04월26일(26.04.2023)**
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 **대한민국 특허청** **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)** 팩스 번호 **+82-42-481-8578**	심사관 **허주형** 전화번호 **+82-42-481-5373**

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/001298

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SWINGLE, K. L. 등, “Lipid nanoparticle-mediated delivery of mRNA therapeutics and vaccines”, Trends in Molecular Medicine, 2021, 제27권, 제6호, 페이지 616-617 전체 문헌	1-9

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/001298

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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

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

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/001298

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2021-0035753 A	2021/04/01	CN 114667293 A	2022/06/24
		EP 4019537 A1	2022/06/29
		KR 10-2021-0035752 A	2021/04/01
		KR 10-2023-0006784 A	2023/01/11
		KR 10-2023-0006785 A	2023/01/11
		US 2022-0372496 A1	2022/11/24
		WO 2021-060791 A1	2021/04/01
KR 10-2018-0008338 A	2018/01/24	KR 10-2181991 B1	2020/11/23
		US 11541100 B2	2023/01/03
		US 2019-0255145 A1	2019/08/22
		WO 2018-012936 A1	2018/01/18
KR 10-2019-0050586 A	2019/05/13	KR 10-1994279 B1	2019/06/28
		US 2021-0214401 A1	2021/07/15