

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2023년 1월 12일 (12.01.2023)



(10) 국제공개번호  
WO 2023/282652 A2

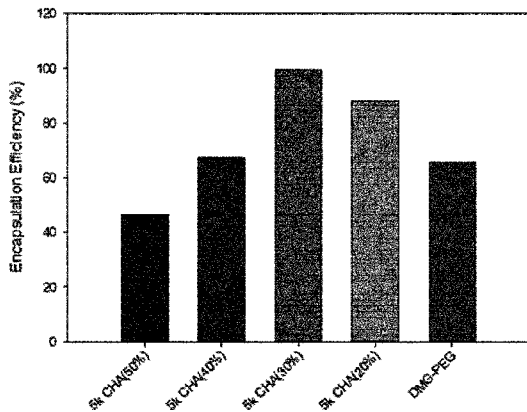
- (51) 국제특허분류:  
A61K 39/215 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/009827
- (22) 국제출원일: 2022년 7월 7일 (07.07.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2021-0088956 2021년 7월 7일 (07.07.2021) KR  
10-2021-0090563 2021년 7월 9일 (09.07.2021) KR  
10-2021-0090679 2021년 7월 12일 (12.07.2021) KR
- (71) 출원인: 주식회사 제넥신 (GENEXINE, INC.) [KR/KR]; 07789 서울특별시 강서구 마곡중앙로 172, Seoul (KR). (주)화이바이오메드 (PHI BIOMED INC.) [KR/KR]; 06248 서울특별시 강남구 역삼로 168, 6층, Seoul (KR). 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH RESEARCH AND BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 한세광 (HAHN, Sei Kwang); 37837 경상북도 포항시 남구 새천년대로 306, 107동 1201호, Gyeongsangbuk-do (KR). 성영철 (SUNG, Young Chul); 04419 서울특별시 용산구 독서당로 111, 105동 102호, Seoul (KR). 정다함 (JEONG, Daham); 02784 서울특별시 성북구 한천로73길 38-4, Seoul (KR). 김문구 (KIM, Mun Gu); 37666 경상북도 포항시 남구 지곡로 77, 19동 319호, Gyeongsangbuk-do (KR). 김환희 (KIM, Hwan Hee); 02784 서울특별시 성북구 한천로73길 38-4, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울특별시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:  
— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: HYALURONIC ACID-LIPID DERIVATIVE, LIPID NANOPARTICLE COMPRISING SAME, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 히알루론산-지질 유도체, 이를 포함하는 지질나노입자 및 그 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a hyaluronic acid-lipid derivative, lipid nanoparticles comprising same, and a use thereof. The lipid nanoparticles comprising the hyaluronic acid-lipid derivative according to the present invention can be utilized as a vaccine or a drug delivery carrier for effectively carrying mRNA, proteins, and other drugs and stably delivering same into the body, and such a vaccine or drug delivery carrier has excellent mucoadhesive properties and mucosal permeability and thus has the advantage of enabling vaccine or drug delivery via the nasal cavity and lungs.

(57) 요약서: 본 발명은 히알루론산-지질 유도체, 이를 포함하는 지질나노입자 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 히알루론산-지질 유도체를 포함하는 지질나노입자는 mRNA, 단백질, 기타 약물을 효과적으로 담지하고 체내에 안정적으로 전달하는 백신 또는 약물 전달체로 활용될 수 있으며, 이와 같은 백신 또는 약물 전달체는 점막 접착성 및 점막 투과성이 우수하여 비강 및 폐를 통한 백신 또는 약물의 전달이 가능한 장점이 있다.

WO 2023/282652 A2

## 명세서

### 발명의 명칭: 히알루론산-지질 유도체, 이를 포함하는 지질나노입자 및 그 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 히알루론산-지질 유도체, 이를 포함하는 지질나노입자 및 그 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 저분자 히알루론산에 소수성 알킬 체인을 가지는 지질이 결합된 히알루론산-지질 유도체, 이를 포함하는 지질나노입자 및 그 용도에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] Messenger RNA는 분자생물학의 중심원리 (central dogma)에 따라 각각 고유의 단백질을 발현하는 핵산물질로써, 현재 정식 FDA 승인받은 화이자와 모더나의 COVID-19 백신(코미나티주, RNA-1273)은 mRNA 백신 플랫폼을 사용한 것이다. 해당 백신은 mRNA에 저장된 유전정보로부터 SARS-CoV-2 바이러스의 일부분인 스파이크 단백질을 발현하고, 이를 체내의 면역세포가 인식하여 면역 반응을 유도한다. 단백질을 발현함에 있어 모더나와 화이자의 백신은 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 mRNA 서열을 그대로 사용하지 않고, 단백질 구조 안정화 및 항원으로써의 인식을 용이하게 하기 위한 목적으로 mRNA의 서열을 적절하게 변화시켜 주었다는 특징을 갖고 있다 (예컨대, proline substitution (K986P, V987P) 변이)(Dai, L., Gao, G.F., Viral targets for vaccines against COVID-19, Nat Rev Immunol, 2021).
- [3] 그러나, mRNA 백신은 과도하게 높은 면역원성, 낮은 체내 안정성, 그리고 낮은 단백질 발현량등의 고질적인 문제점이 있다. 예컨대, mRNA는 DNA기반의 백신과 달리 안정성이 매우 낮으며, 제형에 물이 많이 함유되어 있거나 상온의 환경에서 쉽게 변형되어 운반과 저장에 어려움이 있다.
- [4] 한편, mRNA-지질나노입자(mRNA-LNP)는 표적하는 항원을 암호화하는 mRNA를 세포 내로 효과적으로 전달하기 위한 복합체로, 바이러스 벡터 기반 백신과 달리 보균자에 대한 면역원을 형성하지 않고, DNA 백신과 달리 계놈에 통합될 가능성이 없으며, 높은 면역원 발현율을 나타내는 장점이 있다.
- [5] mRNA를 효과적으로 담지 및 세포 내로 전달하기 위해 사용되는 LNP는 4개의 주요 지질들로 구성되어 있는데, 구체적으로 1) mRNA와 정전기 복합체 형성이 가능한 양이온성 지질, 2) 지질 이중층의 세포 흡수를 도우며 흡수 후 불안정화를 촉진시키는 포스파티딜콜린, 3) LNP의 융합과 응집을 방해하기 위해 PEG화 된 지질, 4) LNP의 구조 및 융합성에 기여하는 콜레스테롤이 있다. 이러한 주요 지질의 종류에 따라 LNP의 mRNA 담지 효능 및 세포 내 전달 효능이 달라지므로 효과적인 mRNA 백신 전달시스템 개발을 위해서는 LNP 개발이 필수적이다.
- [6] mRNA를 세포내로 효과적으로 전달하기 위한 복합체로, 모더나의 경우,

융합생성 지질(fusogenic lipid), 콜레스테롤 및 PEG 지질을 포함하는 mRNA 제형을 개시하고 있으며, 구체적으로 상기 제형은 몰비 50:10:38.5:1.5-3.0(양이온성 지질:융합생성 지질:콜레스테롤:PEG 지질)을 포함할 수 있음을 개시하고 있으며 (대한민국 공개특허 10-2014-0102759), 예컨대, 일반적으로 핵산 전달을 위해 사용되고 있는 SM-102와 DMG-PEG, 콜레스테롤, DSPC를 사용하고 있다.

- [7] 한편, 화이자와 BioNTech의 경우 mRNA를 세포내로 효과적으로 전달하기 위한 복합체로, 직접 개발한 ALC-0315, ALC-0159를 콜레스테롤, DSPC와 함께 사용하고 있다(유럽 공개특허 3,901,261).
- [8] 그러나, PEG화 지질의 경우, 환자에서 항 PEG 항체가 생성될 수 있고, 이로 인해 PEG 부분에 특이적으로 결합하여 투여된 LNP의 제제의 제거를 가속화시키는 accelerated blood clearance (ABC)에 의해 백신 효능을 감소시키는 문제점이 있어, PEG 분자의 면역원성을 낮추거나 다른 투여경로를 고려해야 한다. 또한 PEG화 지질의 경우 LNP의 응집 및 혈류의 응집을 방지하는 효과를 가지고 있지만 세포 흡수율이 낮기 때문에 새로운 헬퍼 지질 개발이 필요한 실정이다.
- [9] 이와 같은 문제점을 개선하고자, 본 발명자들은 PEG화 지질의 한계성을 극복할 수 있는 새로운 mRNA 백신 전달용 LNP 플랫폼 기술을 개발하고자 예의 노력한 결과, 히알루론산-지질 유도체를 포함하는 지질나노입자를 사용하는 경우 mRNA를 백신을 효과적으로 담지하여 체내에 전달할 수 있으며, 체내 안정성을 유지하면서도 점막 점착성(mucoadhesion)과 폐전달 성능이 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [10] 본 발명은 점막 점착성 및 점막 투과성이 개선된 히알루론산-지질 유도체, 상기 히알루론산-지질 유도체를 포함하는 지질나노입자, 및 상기 지질나노입자를 포함하는 백신 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

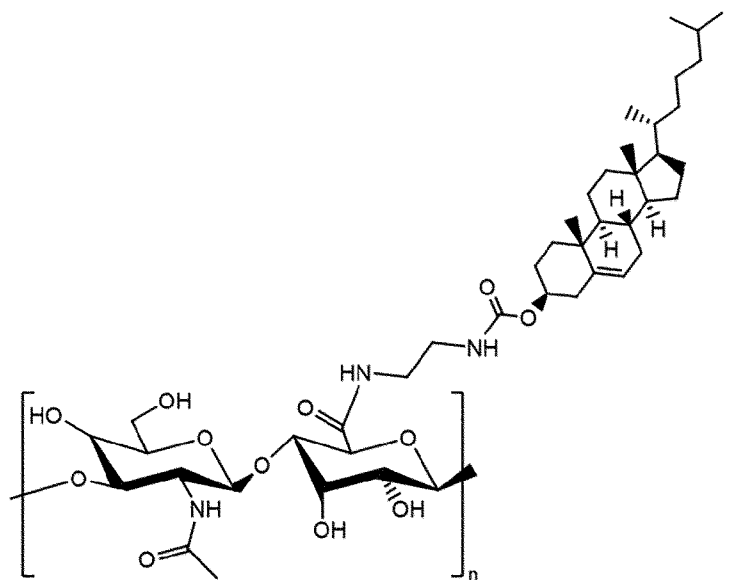
### 과제 해결 수단

- [11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 히알루론산-지질 유도체를 포함하는 지질나노입자를 제공한다.
- [12] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 이온성 지질, 콜레스테롤 및 포스파티딜콜린을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [13] 본 발명에 있어서, 상기 이온성 지질은 양이온성 지질인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [14] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 히알루론산 당 골격의 -COOH 그룹 또는 -OH 그룹 또는 히알루론산 말단의 환원당에 지질이 도입되어 형성되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [15] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체에서 지질은 소수성 알킬 체인을 가지는 지질인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [16] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 히알루론산-콜레스테롤 유도체 또는 히알루론산-1,2-다이미리스토일-락-글리세롤(Hyaluronic acid-1,2-Dimyristoyl-rac-glycerol)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [17] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 지질화 PEG를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [18] 예컨대, 상기 지질화 PEG는 DMG-PEG일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [19] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 핵산, 단백질 또는 약물 전달용인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [20] 본 발명에 있어서, 상기 핵산은 mRNA인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [21] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산의 분자량은 3,000 내지 6,000 Da인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [22] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질 : 콜레스테롤 : 포스파티딜콜린 : 히알루론산-지질 유도체의 몰비(molar ratio)는 30-60 : 30-60 : 8-12 : 1-10인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [23] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 정맥내, 근육내, 유리체내, 척수강내, 종양내, 비강내, 폐 및 피하로 구성되는 군에서 선택되는 경로로 투여되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [24] 본 발명은 또한, mRNA 백신 및 상기 지질나노입자를 포함하는, 백신 조성물을 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, 하기 화학식 1 내지 5 중 어느 하나로 표시되는, 히알루론산-지질 유도체에 관한 것이다:

[26] [화학식 1]

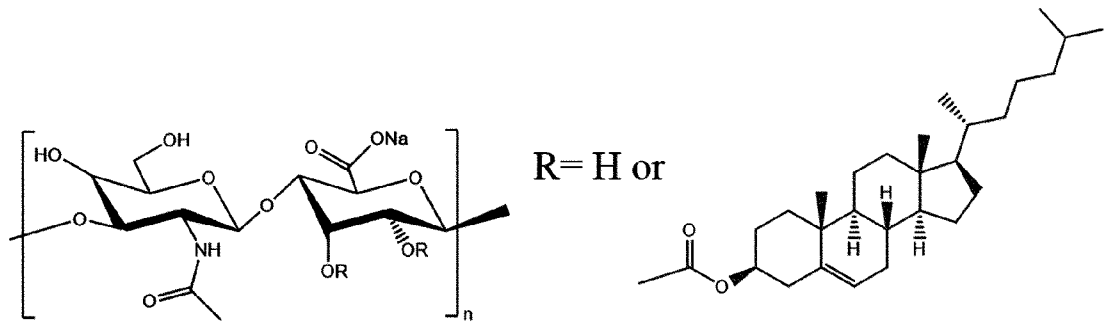
[27]



[28]

[29] [화학식 2]

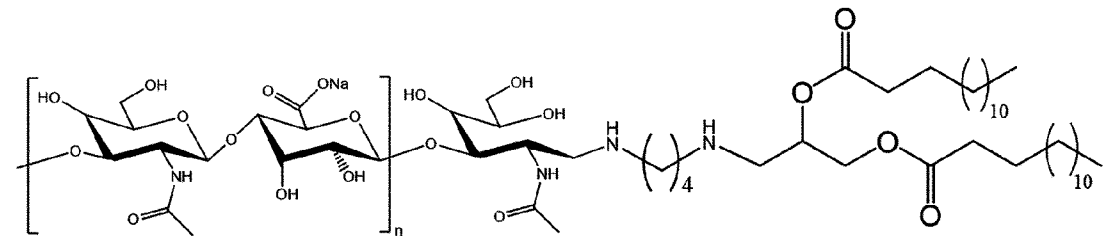
[30]



[31]

[32] [화학식 3]

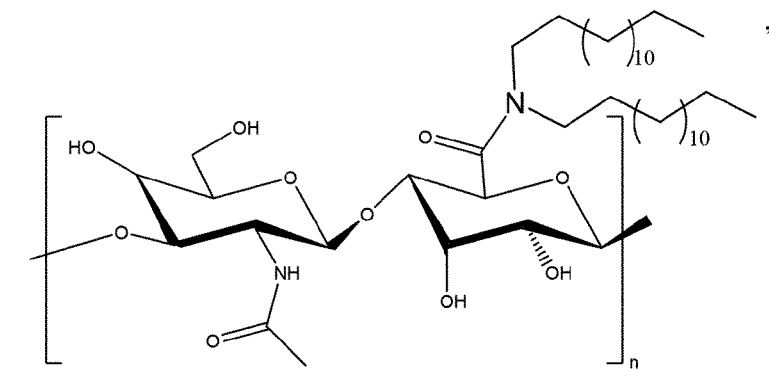
[33]



[34]

[35] [화학식 4]

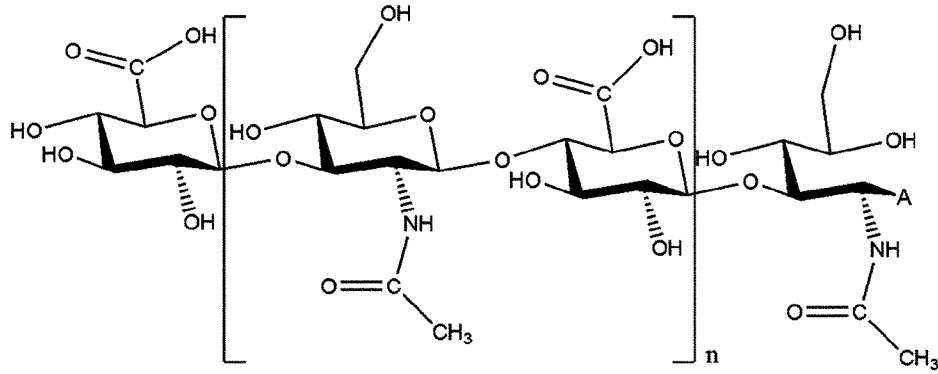
[36]



[37]

[38] [화학식 5]

[39]



[40] 화학식 1 내지 5에서 n은 1 내지 50의 정수, 화학식 5에서 A는 알데하이드 그룹임.

[41] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은 히알루론산의 -OH 그룹을 화학적 변형 없이 콜레스테릴 클로로포르메이트로 치환하여 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[42] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 콜레스테릴 클로로포르메이트, 4-다이메틸아미노피리딘 (4-Dimethylaminopyridine, DMAP) 및 트리에틸아민(Triethylamine, TEA)의 양을 조절하여 히알루론산-콜레스테롤 유도체의 콜레스테롤 치환도를 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[43] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 3의 화합물은 히알루론산 환원당 말단을 1,2-다이미리스토일-락-글리세롤(1,2-Dimyristoyl-rac-glycerol)로 치환하여 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[44] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산 환원당 말단은 개환반응에 의해 아민 그룹이 치환되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[45] 본 발명에 있어서, 상기 아민 그룹은 에틸렌디아민, 부틸렌디아민, 헥사메틸렌디아민, 펜타에틸렌헥사아민, 1,4-뷰테인디아민 및 1,5-다이아미노-2-메틸펜탄으로 구성된 군에서 선택되는 다이아민을 사용하여 아민 그룹이 치환되는 것을 특징으로 할 수 있다.

**발명의 효과**

[46] 본 발명에 따른 히알루론산-지질 유도체를 포함하는 지질나노입자는 mRNA, 단백질, 기타 약물을 효과적으로 담지하고 체내에 안정적으로 전달하는 백신 또는 약물 전달체로 활용될 수 있으며, 이와 같은 백신 또는 약물 전달체는 점막 접착성 및 점막 투과성이 우수하여 비강 및 폐를 통한 백신 또는 약물의 전달이 가능한 장점이 있다.

**도면의 간단한 설명**

[47] 도 1은 히알루론산 콜레스테롤 유도체 1 (HA-CHOL)의 합성 과정을 보여주는 합성도이다.

[48] 도 2는 히알루론산 콜레스테롤 유도체 2 (CHA)의 합성 과정을 보여주는

합성도이다.

- [49] 도 3a는 히알루론산-콜레스테롤 유도체 1의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 분석 결과이다.
- [50] 도 3b는 다양한 히알루론산-콜레스테롤 유도체 2의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 분석 결과이다.
- [51] 도 4는 히알루론산-1,2-Dimyristoyl-rac-glycerol 유도체 (DMG-HA)의 합성 과정을 보여주는 합성도이다.
- [52] 도 5는 HA-b-damb의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 분석 결과이다.
- [53] 도 6은 HA-b-damb-TBA의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 분석 결과이다.
- [54] 도 7은 Tosyl-DMG의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 분석 결과이다.
- [55] 도 8은 DMG-HA의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼 분석 결과이다. (a) NMR 용매 D<sub>2</sub>O, (b)NMR 용매 DMSO-d<sub>6</sub>.
- [56] 도 9는 히알루론산-지질 유도체가 포함된 LNP 제조 공정도를 나타낸다.
- [57] 도 10은 미세유체혼합장치 및 시험관내에서 제조된 LNP의 크기를 비교한 것이다. (a) DMG-PEG/SM-102/DSPC/cholesterol로 제조된 LNP의 크기 분산도로 몰비(molar ratio)는 1 : 50 : 10 : 39로 구성이 되어 있다. (b) 5K CHA/SM-102/DSPC/cholesterol로 제조된 LNP의 크기 분산도(m=미세유체혼합장치로 제조, p=시험관내 혼합으로 제조)로 몰비(molar ratio)는 1 : 50 : 10 : 39 으로 구성이 되어 있다.
- [58] 도 11은 5K CHA의 함량에 따른 LNP 크기 분산도를 나타낸다.
- [59] 도 12는 DMG-HA의 함량에 따른 LNP 크기 분산도를 나타낸다.
- [60] 도 13은 각각 DMG-PEG, DMG-PEG/4K CHA, 4K CHA를 포함하는 LNP의 크기 분포도를 나타낸다.
- [61] 도 14는 각각 DMG-PEG/4K CHA, 4K CHA, DMG-HA, DMG-PEG를 포함하는 LNP의 제타 전위를 나타낸다.
- [62] 도 15는 PEG 유도체와 히알루론산-지질 유도체를 함께 포함하는 LNP의 크기 분포도를 나타낸다.
- [63] 도 16은 PEG 유도체와 히알루론산-지질 유도체를 함께 포함하는 LNP의 제타전위를 나타낸다.
- [64] 도 17은 각각 DMG-PEG/4K CHA, DMG-HA, DMG-PEG를 포함하는 LNP에 GFP mRNA를 담지하고 A549 세포 내 전달하여, GFP 발현을 확인한 결과이다.
- [65] 도 18은 PEG 유도체와 히알루론산-지질 유도체를 함께 포함하는 LNP에 GFP mRNA를 담지하고 A549 세포 내 전달하여, GFP 발현을 정량적으로 분석한 결과이다. (a) DMG-PEG/4K CHA, (b) DMG-PEG/DMG-HA, (c) DMG-PEG, (d) Lipofectamine
- [66] 도 19는 5k CHA의 함량을 달리하거나 DMG-PEG를 포함하는 LNP에 mRNA를 담지하고 담지 효율을 Ribogreen assay로 확인한 결과이다.
- [67] 도 20은 PEG 유도체와 히알루론산-지질 유도체를 함께 포함하는 LNP에 mRNA를 담지하고 담지 효율을 Ribogreen assay로 확인한 결과이다.

## 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [68] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [69]
- [70] 본 발명에서는 생체 고분자로서 생분해성 및 생체친화성이 우수한 히알루론산에 소수성 알킬 체인을 가지는 지질을 결합하는 히알루론산-지질 유도체를 개발하고, 이를 지질나노입자로 제조하는 경우, mRNA를 비롯한 핵산, 단백질, 기타 화합물을 포함하는 약물의 전달체로 활용할 수 있음을 확인하였다.
- [71] 히알루론산은 D-글루쿠론산과 N-아세틸-D-글루코사민이 반복되는 선형 생체고분자이다. 히알루론산은 우수한 생체 적합성을 갖기 때문에 안과용 수술보조제, 관절기능 개선제, 약물전달 물질, 점안제, 하이드로젤 필러, 주름 개선제, 화장품 등에 이미 널리 사용되고 있어, 안전성이 입증되어 있다.
- [72] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 히알루론산-지질 유도체를 포함하는 지질나노입자에 관한 것이다.
- [73] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 이온성 지질, 콜레스테롤 및 포스파티딜콜린을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [74] 본 발명에 있어서, 상기 이온성 지질은 양이온성 지질인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [75] 본 발명에 있어서, 상기 양이온성 지질은 중성의 pH에서 양이온을 띄는 성질을 띄는 지질을 의미하며, 바람직하게는 SM-102를 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명에 있어서 양이온성 지질은 이에 한정되지는 않으나, 국제 특허 공개 제WO2012040184호, 제WO2011153120호, 제WO2011149733호, 제WO2011090965호, 제WO2011043913, WO2011022460호, 제WO2012061259호, 제WO2012054365호, 제WO2012044638호, 제WO2010080724호, 제WO201021865호 및 제WO2008103276호, 미국 특허 제7,893,302호, 제7,404,969호 및 제8,283,333호 및 미국 특허 공개 제US20100036115호 및 제US20120202871호에 기재된 양이온성 지질로부터 선택될 수 있으며, 상기 문헌의 각각은 그들의 전문이 참조로 본 명세서에 포함된다. 다른 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은, 국제 특허 공개 제WO2012040184호, 제WO2011153120호, 제WO2011149733호, 제WO2011090965호, 제WO2011043913호, 제WO2011022460호, 제WO2012061259호, 제WO2012054365호 및 제WO2012044638호에 기재된 화학식 A(이것으로 제한되지 않음)로부터 선택될 수 있으며, 이들 문헌의 각각은 그들의 전문이

참조로 본 명세서에 포함된다. 또 다른 실시형태에 있어서, 양이온성 지질은, 국제 특허 공개 제 WO2008103276호의 화학식 CLI-CLXXIX, 미국 특허 제7,893,302호의 화학식 CLI-CLXXIX, 미국 특허 제7,404,969호의 화학식 CLI-CLXXXII 및 미국 특허 공개 제US20100036115호의 화학식 I-VI으로부터 선택될 수 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니며; 이들의 각각은 그들의 전문이 참조로 본 명세서에 포함된다. 비제한적인 예로서, 양이온성 지질은

(20Z,23Z)-N,N-다이메틸노나코사-20,23-다이엔-10-아민,  
 (17Z,20Z)-N,N-다이메틸헥사코사-17,20-다이엔-9-아민,  
 (1Z,19Z)-N,N-다이메틸펜타코사-16,19-다이엔-8-아민,  
 (13Z,16Z)-N,N-다이메틸도코사-13,16-다이엔-5-아민,  
 (12Z,15Z)-N,N-다이메틸헨아이코사-12,15-다이엔-4-아민,  
 (14Z,17Z)-N,N-다이메틸트라이코사-14,17-다이엔-6-아민,  
 (15Z,18Z)-N,N-다이메틸테트라코사-15,18-다이엔-7-아민,  
 (18Z,21Z)-N,N-다이메틸헵타코사-18,21-다이엔-10-아민,  
 (15Z,18X)-N,N-다이메틸테트라코사-15,18-다이엔-5-아민,  
 (14Z,17Z)-N,N-다이메틸트라이코사-14,17-다이엔-4-아민,  
 (19Z,22Z)-N,N-다이메틸옥타코사옥타코사-19,22-다이엔-9-아민,  
 (18Z,21Z)-N,N-다이메틸헵타코사-18,21-다이엔-8-아민,  
 (17Z,20Z)-N,N-다이메틸헥사코사-17,20-다이엔-7-아민,  
 (16Z,19Z)-N,N-다이메틸펜타코사-16,19-다이엔-6-아민,  
 (22Z,25Z)-N,N-다이메틸헨트라이아콘타-22,25-다이엔-10-아민,  
 (21Z,24Z)-N,N-다이메틸트라이아콘타-21,24-다이엔-9-아민,  
 (18Z)-N,N-다이메틸헵타코스-18-엔-10-아민,  
 (17Z)-N,N-다이메틸헥사코스-17-엔-9-아민,  
 (19Z,22Z)-N,N-다이메틸옥타코사-19,22-다이엔-7-아민,  
 N,N-다이메틸헵타코산-10-아민,  
 (20Z,23Z)-N-에틸-N-메틸노나코사-20,23-다이엔-10-아민,  
 1-[(11Z,14Z)-1-노닐아이코사-11,14-다이엔-1-일] 피롤리딘,  
 (20Z)-N,N-다이메틸헵타코스-20-엔-10-아민, (15Z)-N,N-다이메틸  
 헵타코스-15-엔-10-아민, (14Z)-N,N-다이메틸노나코스-14-엔-10-아민,  
 (17Z)-N,N-다이메틸노나코스-17-엔-10-아민,  
 (24Z)-N,N-다이메틸트라이트라이아콘트-24-엔-10-아민,  
 (20Z)-N,N-다이메틸노나코스-20-엔-10-아민,  
 (22Z)-N,N-다이메틸헨트라이아콘트-22-엔-10-아민,  
 (16Z)-N,N-다이메틸펜타코스-16-엔-8-아민,  
 (12Z,15Z)-N,N-다이메틸-2-노닐헨아이코사-12,15-다이엔-1-아민,  
 (13Z,16Z)-N,N-다이메틸-3-노닐도코사-13,16-다이엔-1-아민,  
 N,N-다이메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헵타데칸-8-아민,

1-[(1S,2R)-2-헥실사이클로프로필]-N,N-다이메틸노나데칸-10-아민,  
 N,N-다이메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]노나데칸-10-아민,  
 N,N-다이메틸-21-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헨아이코산-10-아민,  
 N,N-다이메틸-1-[(1S,2S)-2-[[1R,2R)-2-사이클로프로필]메틸]사이클로프로필  
 노나데칸-10-아민,N,N-다이메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헥사데칸-8-  
 아민, N,N-다이메틸-[(1R,2S)-2-운데실사이클로프로필]테트라데칸-5-아민,  
 N,N-다이메틸-3-{7-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]헵틸}도데칸-1-아민,  
 1-[(1R,2S)-2-헵틸사이클로프로필]-N,N-다이메틸옥타데칸-9-아민,  
 1-[(1S,2R)-2-데실사이클로프로필]-N,N-다이메틸펜타데칸-6-아민,  
 N,N-다이메틸-1-[(1S,2R)-2-옥틸사이클로프로필]펜타데칸-8-아민,  
 R-N,N-다이메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로  
 판-2-아민,  
 S-N,N-다이메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로  
 판-2-아민,  
 1-{2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]-1-[(옥틸옥시)메틸]에틸}피롤리  
 딘,  
 (2S)-N,N-다이메틸-1-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]-3-[(5Z)-옥트-5-  
 엔-1-일옥시]프로판-2-아민,  
 1-{2-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]-1-[(옥틸옥시)메틸]에틸}아제티  
 딘,  
 (2S)-1-(헥실옥시)-N,N-다이메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프  
 로판-2-아민,  
 (2S)-1-(헵틸옥시)-N,N-다이메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프  
 로판-2-아민,  
 N,N-다이메틸-1-(노닐옥시)-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프로판-  
 2-아민,  
 N,N-다이메틸-1-[(9Z)-옥타데카-9-엔-1-일옥시]-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민;  
 (2S)-N,N-다이메틸-1-[(6Z,9Z,12Z)-옥타데카-6,9,12-트라이엔-1-일옥시]-3-(옥틸  
 옥시)프로판-2-아민,  
 (2S)-1-[(11Z,14Z)-아이코사-11,14-다이엔-1-일옥시]-N,N-다이메틸-3-(헵틸옥시)  
 프로판-2-아민,  
 (2S)-1-(헥실옥시)-3-[(11Z,14Z)-아이코사-11,14-다이엔-1-일옥시]-N,N-다이메틸  
 프로판-2-아민,  
 1-[(11Z,14Z)-아이코사-11,14-다이엔-1-일옥시]-N,N-다이메틸-3-(옥틸옥시)프로  
 판-2-아민,  
 1-[(13Z,16Z)-도코사-13,16-다이엔-1-일옥시]-N,N-다이메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-  
 아민,  
 (2S)-1-[(13Z,16Z)-도코사-13,16-다이엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-다이메틸프

로판-2-아민,

(2S)-1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-3-(헥실옥시)-N,N-다이메틸프로판-2-아민,

1-[(13Z)-도코스-13-엔-1-일옥시]-N,N-다이메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민,

1-[(9Z)-헥사데크-9-엔-1-일옥시]-N,N-다이메틸-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민,

(2R)-N,N-다이메틸-H(1-메토일옥틸메토일옥틸)옥시]-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프로판-2-아민,

(2R)-1-[(3,7-다이메틸옥틸)옥시]-N,N-다이메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-다이엔-1-일옥시]프로판-2-아민,

N,N-다이메틸-1-(옥틸옥시)-3-({8-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-펜틸사이클로프로필]메틸}사이클로프로필)옥틸}옥시)프로판-2-아민,

N,N-다이메틸-1-{{8-(2-옥틸사이클로프로필)옥틸}옥시}-3-(옥틸옥시)프로판-2-아민 및 (11E,20Z,23Z)-N,N-다이메틸노나코사-11,20,2-트라이엔-10-아민 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 혹은 입체이성질체로부터 선택될 수 있다.

[76] 일 양태로서, 상기 양이온성 지질은, 당업계에서 공지된 및/또는 국제 특허 공개 제 WO2012040184호, 제 WO2011153120호, 제 WO2011149733호, 제 WO2011090965호, 제 WO2011043913호, 제 WO2011022460호, 제 WO2012061259호, 제 WO2012054365호, 제 WO2012044638호, 제 WO2010080724호 및 제 WO201021865호에 기재된 바와 같은 방법에 의해 합성될 수 있으며; 이들의 각각은 그들의 전문이 참조로 본 명세서에 포함된다.

[77] 본 발명에 있어서, 상기 콜레스테롤은 콜레스테롤 구조를 가지는 콜레스테롤 유도체를 모두 포함하며, 나노입자를 구성하는 분자의 총 몰수에 대하여 30-60 몰%로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[78] 본 발명에 있어서, 포스파티딜콜린은 포스파티딜콜린 구조를 가지는 지질을 모두 포함하며, 예컨대, DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)를 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 포스파티딜콜린은 나노입자를 구성하는 분자의 총 몰수에 대하여 8-12 몰%로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[79] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 히알루론산에 지질이 결합되어 있는 화합물을 총칭하며, 상기 히알루론산-지질 유도체에서 상기 지질은 바람직하게는 소수성 알킬 체인을 가지는 지질인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 지질은 지질은, 예컨대, 콜레스테롤, Dimyristoyl glycerol, N, N Ditetradecylacetamide과 알킬 체인을 갖는 지질일 수 있다.

[80] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 나노입자를 구성하는 분자의 총 몰수에 대하여 1-10 몰%로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[81] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 히알루론산 당 골격의 -COOH 그룹 또는 -OH 그룹 또는 히알루론산 말단의 환원당에 지질이 도입되어

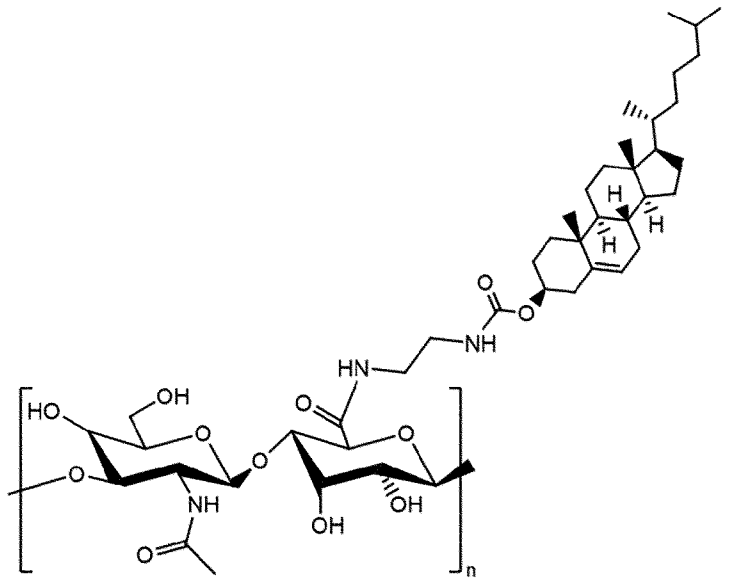
형성되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[82] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 히알루론산-콜레스테롤 유도체 또는 히알루론산-1,2-다이미리스토일-락-글리세롤(Hyaluronic acid-1,2-Dimyristoyl-rac-glycerol)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[83] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 하기 화학식 1 내지 화학식 5 중 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[84] [화학식 1]

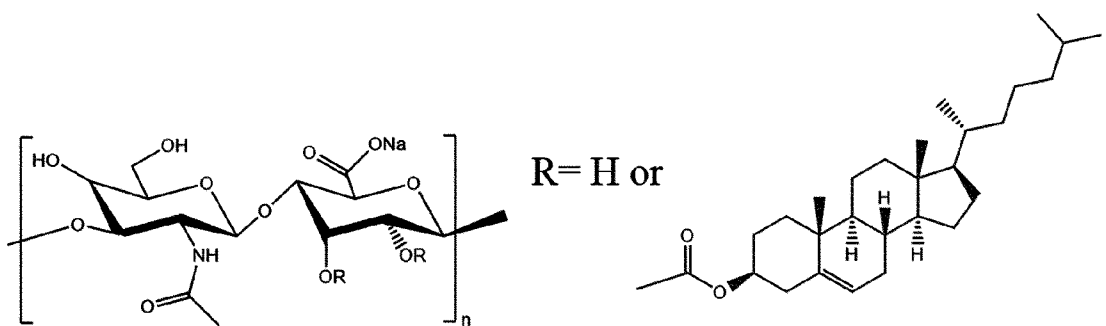
[85]



[86]

[87] [화학식 2]

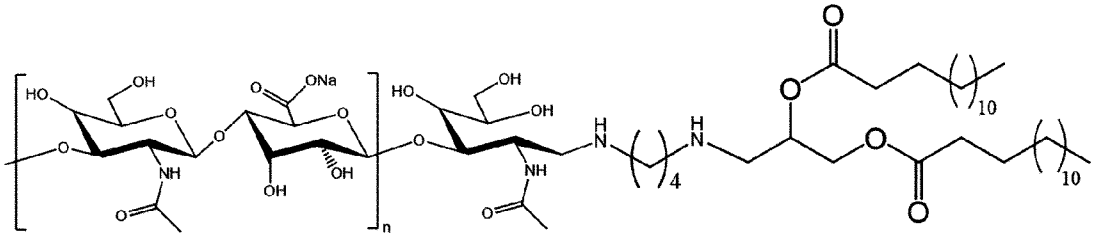
[88]



[89]

[90] [화학식 3]

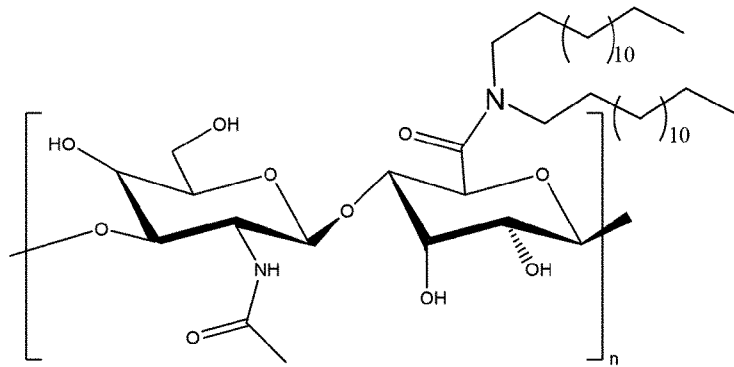
[91]



[92]

[93] [화학식 4]

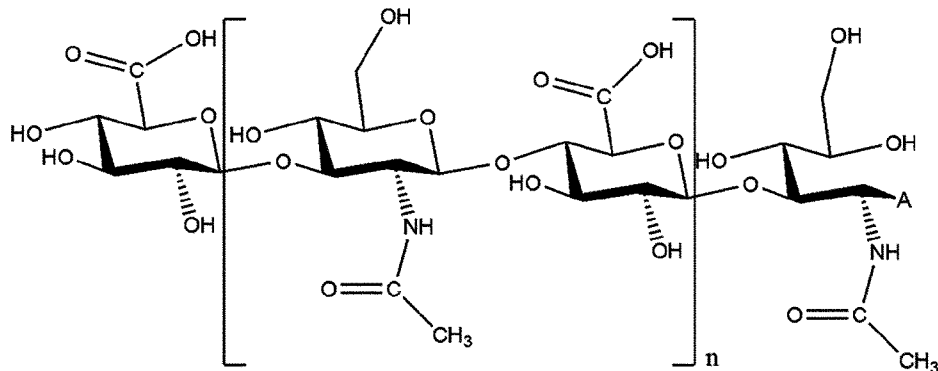
[94]



[95]

[96] [화학식 5]

[97]



[98] 화학식 1 내지 화학식 5에서 n은 1 내지 50의 정수, 화학식 5에서 A는 알데하이드 그룹임.

[99] 예컨대, 상기 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 정수일 수 있다.

[100] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 지질화 PEG를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 예컨대, 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 PEG 유도체를 추가로 포함할 수 있다.

[101] 본 발명에 있어서, 지질화 PEG 또는 PEG 유도체, 예컨대, DMG-PEG는 나노입자를 구성하는 분자의 총 몰수에 대하여 0.5-2 몰%로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[102] 이 경우, 지질나노입자 내 히알루론산-지질 유도체는 그 몰%가 감소될 수 있다.

- 예컨대, 상기 지질나노입자 내 히알루론산-지질 유도체는 0.01 내지 10몰%, 구체적으로, 0.1 내지 10몰%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [103] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 핵산, 단백질 또는 약물 전달용인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [104] 본 발명에 있어서, 상기 핵산은 DNA, RNA 또는 PNA일 수 있으며, 바람직하게는 mRNA일 수 있다.
- [105] 본 발명에 있어서, 상기 단백질은 일 양태로서 항체일 수 있으며, 다른 양태로서 펩타이드일 수 있다.
- [106] 본 발명에 있어서, 상기 약물은 화합물일 수 있다.
- [107] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 질병에 따라 표적 특이적 항체, 단백질, 형광 염료 등을 탑재할 수 있다.
- [108] 즉, 본 발명은 다른 관점에서, 핵산, 단백질 또는 약물 전달을 위한 지질나노입자의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 핵산, 단백질 또는 약물 전달을 위한 의약품의 제조에 있어, 상기 지질나노입자의 용도를 제공할 수 있다.
- [109] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산의 분자량은 1,000 내지 10,000 Da인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 3,000 내지 6,000 Da인 것을 특징으로 할 수 있다. 예컨대, 상기 히알루론산의 분자량은 약 4,000 Da 또는 약 5,000 Da인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [110]
- [111] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질 : 콜레스테롤 : 포스파티딜콜린 : 히알루론산-지질 유도체의 몰비(molar ratio)는 30-60 : 30-60 : 8-12 : 1-10인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [112] 바람직하게는, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질 : 콜레스테롤 : 포스파티딜콜린 : 히알루론산-지질 유도체의 몰비(molar ratio)는 40-50 : 40-50 : 8-12 : 1-10인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [113] 또 다른 바람직한 양태로는, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질 : 콜레스테롤 : 포스파티딜콜린 : 히알루론산-지질 유도체의 몰비(molar ratio)는 40-50 : 40-50 : 10 : 1-10인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [114] 또 다른 바람직한 양태로는, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질 : 콜레스테롤 : 포스파티딜콜린 : 히알루론산-지질 유도체의 몰비(molar ratio)는 50 : 40 : 10 : 0.1인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [115] 일 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 2로 표시되는 화합물(4k CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : 4k CHA : DMG-PEG는 49: 39: 10 : 1 : 1의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [116] 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식

2로 표시되는 화합물(4k CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : 4k CHA는 50 : 39 : 10 : 1 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [117] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 3으로 표시되는 화합물 (DMG-HA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : DMG-HA는 48 : 38 : 9 : 5 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [118] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 3으로 표시되는 화합물 (DMG-HA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : DMG-HA는 50 : 39 : 10 : 1 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [119] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 3으로 표시되는 화합물 (DMG-HA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : DMG-HA는 48 : 37 : 10 : 5 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [120] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 3으로 표시되는 화합물 (DMG-HA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : DMG-HA는 46 : 35 : 9 : 10 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [121] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 2으로 표시되는 화합물 (5k CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : 5k CHA는 46 : 35 : 9 : 10 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [122] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 2으로 표시되는 화합물 (5k CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : 5k CHA는 47 : 37 : 9 : 7 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [123] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 2로 표시되는 화합물 (5k CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : 5k CHA는 48 : 38 : 10 : 4 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [124] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 2으로 표시되는 화합물 (5k CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : 5k CHA는 49 : 38 : 10 : 3 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [125] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 3으로 표시되는 화합물 (DMG-HA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : DMG-HA는 50 : 39 : 10 : 1 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [126] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 3으로 표시되는 화합물 (DMG-HA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : DMG-HA는 48 : 37 : 10 : 5 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [127] 또 다른 양태로서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 3으로 표시되는 화합물 (DMG-HA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : DMG-HA는 46 : 35 : 9 : 10 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [128] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 2으로 표시되는 화합물 (CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : CHA는 48 - 49 : 37 - 39 : 10 : 2-5 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [129] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 2으로 표시되는 화합물 (CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : CHA는 48 - 49 : 38 : 10 : 3-4 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [130] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 2으로 표시되는 화합물 (CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : CHA는 47.5 - 48.5 : 38 : 10 : 3.5-4.5 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [131] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질 : 콜레스테롤 : 포스파티딜콜린 : PEG 유도체 : 히알루론산-지질 유도체의 몰비(molar ratio)는 49-51 : 38-40 : 9 - 11 : 0.5-1.5 : 0.05-0.15인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [132] 바람직한 양태로서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질 : 콜레스테롤 : 포스파티딜콜린 : DMG-PEG : 히알루론산-지질 유도체의 몰비(molar ratio)는 49-51 : 38-40 : 9 - 11 : 0.5-1.5 : 0.05-0.15인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [133] 다른 바람직한 양태로는, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질 : 콜레스테롤 : 포스파티딜콜린 : DMG-PEG : 히알루론산-지질 유도체의 몰비(molar ratio)는 50 : 40 : 10 : 1 : 0.1 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [134] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 2으로 표시되는 화합물 (CHA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 : DSPC : DMG-PEG : CHA는 49-50 : 39-40 : 10 : 0.1-1 : 0.1-1 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [135] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자에서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질은 SM-102이고, 포스파티딜콜린은 DSPC이며, 히알루론산-지질 유도체는 화학식 3으로 표시되는 화합물 (DMG-HA)이고, 상기 SM-102 : 콜레스테롤 :

DSPC : DMG-PEG: DMG-HA는 49-50 : 39-40 : 10 : 0.1-1 : 0.1-1 의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[136] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 정맥내, 근육내, 유리체내, 척수강내, 종양내, 비강내, 폐 및 피하로 구성되는 군에서 선택되는 경로로 투여되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[137] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 완충액과 1:1-5, 바람직하게는 1:2-4, 더욱 바람직하게는 약 1:3의 부피비로 혼합되어 제조되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[138] 이 경우, 상기 완충제는, 식염수, 인산염 완충 식염수 및 락트산 링거(Ringers lactate)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[139] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 핵산(예컨대, mRNA), 단백질 또는 기타 약물을 포함하는 완충액으로 상기 이온성 지질, 콜레스테롤, 포스파티딜콜린, 히알루론산-지질 유도체를 수화하여 제조될 수 있다.

[140] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 수화가 가능한 유기용매에 상기 이온성 지질, 콜레스테롤, 포스파티딜콜린, 히알루론산-지질 유도체를 녹이고, 이후 핵산(예컨대, mRNA), 단백질 또는 기타 약물을 포함하는 완충액을 준비하여 이 용액을 여과막, 필터, 믹서 혹은 교반기를 이용하여 혼합시킨 후, 상기 에탄올을 제거하여 제조될 수 있다.

[141] 필요에 따라, 상기 지질나노입자 제조시 멸균 또는 보관을 위한 단계가 추가될 수 있다.

[142] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 미세유체혼합장치 또는 시험관내 파이펫팅으로 혼합될 수 있다.

[143] 본 발명에 있어서, 상기 지질나노입자는 비강내 투여 가능하도록 제형화될 수 있으며, 이 경우 물 함유를 최소화하기 위하여 분말 형태로 제형화할 수 있다.

[144] 예컨대, 분말 제형의 경우 스프레이 드라이어를 통해 고체상 지질나노입자를 제조하여 코 점막에서 체류 시간을 연장시켜 잠재적인 국소 및 전신 면역반응을 증가시킬 수 있다.

[145]

[146] 본 발명에서는 특히 mRNA를 담지하는데 있어서, 기존의 지질나노입자에 비해 담지 효율이 개선되는 장점을 가진다.

[147] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, mRNA 백신 및 상기 지질나노입자를 포함하는, 백신 조성물에 관한 것이다.

[148] 본 발명에 있어서, 상기 백신 조성물은 정맥내, 근육내, 유리체내, 척수강내, 종양내, 비강내, 폐 및 피하로 구성되는 군에서 선택되는 경로로 투여되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[149] 본 발명에 따른 백신 조성물은, 기타 국소, 비강내, 기관내, 또는 주사가능형(예컨대, 정맥내, 안구내, 유리체내, 근육내, 심장내, 복강내, 피하)

등과 같은 본 명세서에 기재된 투약 형태로 제형화될 수 있다.

- [150] 비경구 투여용의 액체 투약 형태는 약제학적으로 허용가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및/또는 엘릭시르를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 활성 성분에 부가해서, 액체 투약 형태는, 물 또는 기타 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대, 에틸 알코올, 아이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글라이콜, 1,3-부틸렌 글라이콜, 다이메틸폼아마이드, 오일류(특히 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글라이세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글라이콜 및 솔비타의 지방산 에스터솔비탄, 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아닌 당업계에 통상적으로 이용되는 비활성 희석제를 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 소정의 실시형태에 있어서, 조성물은, 크레모포, 알코올, 오일, 변형된 오일, 글라이콜, 폴리솔베이트, 사이클로덱스트린, 중합체, 및/또는 이들의 조합 등과 같은 가용화제와 혼합될 수 있다.
- [151] 주사가 가능한 제형은, 예를 들어, 세균 보유 여과기를 통한 여과에 의해, 및/또는 사용 전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사가 가능한 매질 속에 용해되거나 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 멸균화제를 혼입시킴으로써 멸균될 수 있다.
- [152] 활성 성분의 효과를 연장시키기 위하여, 피하 또는 근육내 주사로부터 활성 성분의 흡수를 늦추는 것이 바람직한 경우, 이는 난수용성을 가진 결정성 혹은 비정질 물질의 액체 현탁액의 이용에 의해 달성될 수 있다.
- [153] 일 양태로서, 본 발명의 백신 조성물은 폐 전달에 바람직하다.
- [154] 폐 전달을 위해 유용한 본 발명에 따른 백신 조성물은 비강내 전달에 이용될 수도 있다. 비강내 투여용으로 적합한 다른 제형은 활성 성분을 포함하고 평균 입자 크기가 약  $0.2\mu\text{m}$  내지  $500\mu\text{m}$ 인 분말이다. 이러한 제형은, 코가 취하는 방식, 즉, 코에 근접하게 유지된 분말의 용기로부터 비강 통로를 통한 신속한 흡입에 의해 투여된다.
- [155] 비강 투여용으로 적합한 제형은 예를 들어, 약 0.1%(w/w) 내지 약 100%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있으며, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 추가의 성분을 포함할 수 있다.
- [156] 본 발명에 있어서, 상기 백신 조성물은 다양한 보조제가 추가로 함유될 수 있다. 상기 보조제는 pH 환경을 조성하는 염류, 면역반응을 유도 가능한 사이토카인과 같은 면역증강제일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [157] 한편, 본 발명에 따른 백신 조성물에 있어서, 상기 히알루론산 자체가 면역적 보조제가 될 수 있다. 저분자량 히알루론산은 면역반응을 자극하여 수지상 세포의 성숙과 사이토카인 분비를 유도하여 백신의 효과를 극대화할 수 있다.
- [158] 특히, 본 발명에 따른 지질나노입자는 100 내지 1000 nm, 바람직하게는 100 내지 300 nm의 크기를 가지고, 크기 분산도가 종래 지질나노입자에 비해 개선된 것을 특징으로 할 수 있다.

[159] 이와 같이, 본 발명에 따른 작고 균일한 지질나노입자는 백신 전달에 유리한 특성으로 작용한다.

[160] 본 발명은 또 다른 관점에서, mRNA 백신 및 상기 지질나노입자를 포함하는 조성물의 감염병 예방 또는 치료를 위한 용도에 관한 것이다.

[161] 본 발명은 또 다른 관점에서, 감염병 예방 또는 치료용 의약품(또는 약물)의 제조를 위한 mRNA 백신 및 상기 지질나노입자를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[162] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 mRNA 백신 및 상기 지질나노입자를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 감염병 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

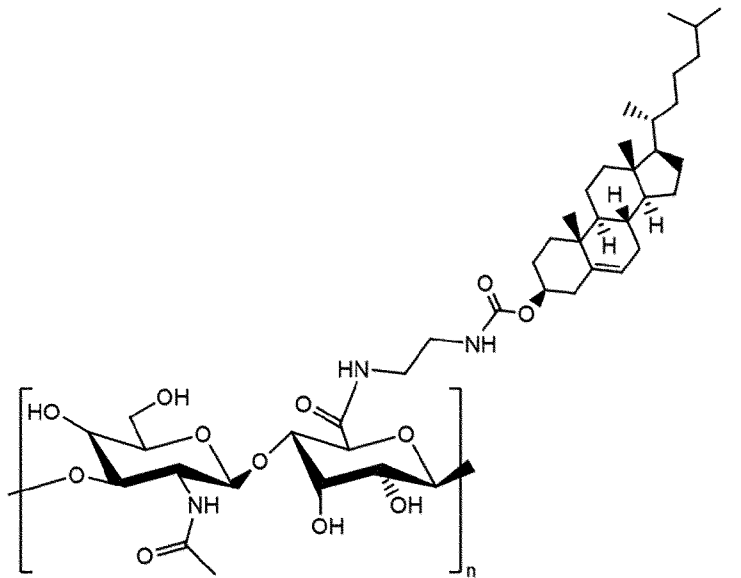
[163]

[164] 본 발명에서는 또한, 생분해성 및 생체친화성이 우수한 히알루론산을 지질과 결합시켜 기존 지질나노입자에 비해 생체적합성이 개선되고 점막 접착성 및 점막 투과성이 개선된 히알루론산-지질 유도체를 제조하였다.

[165] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 하기 화학식 1 내지 5 중 어느 하나로 표시되는, 히알루론산-지질 유도체에 관한 것이다:

[166] [화학식 1]

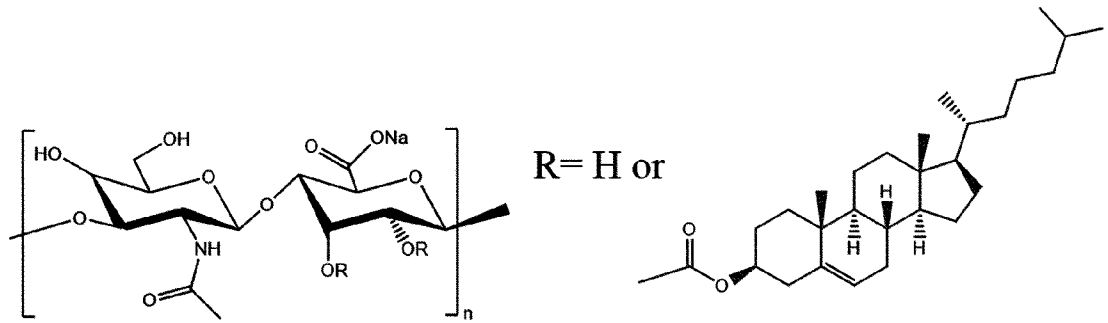
[167]



[168]

[169] [화학식 2]

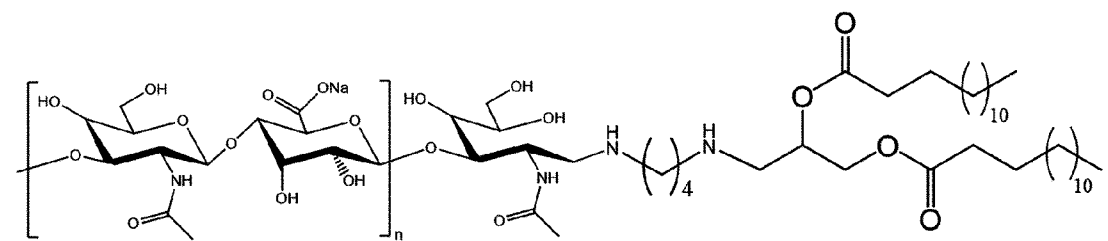
[170]



[171]

[172] [화학식 3]

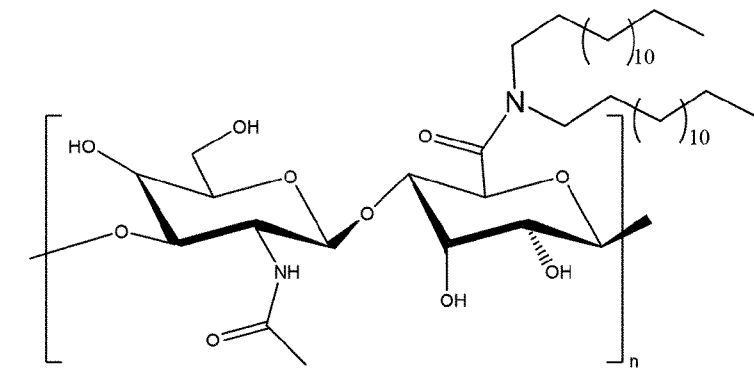
[173]



[174]

[175] [화학식 4]

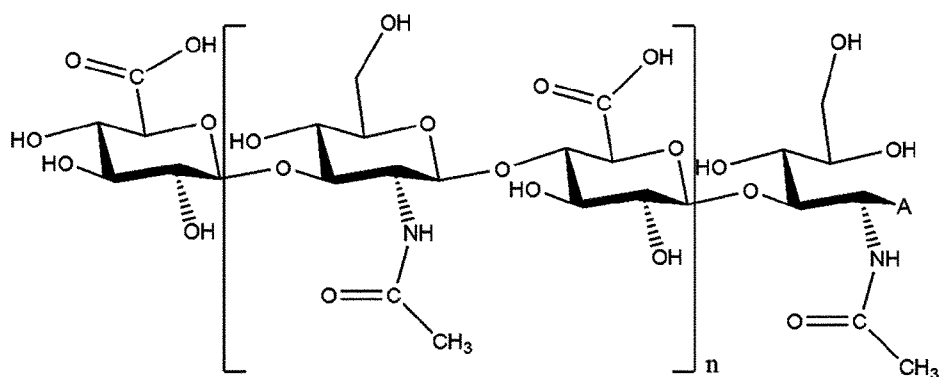
[176]



[177]

[178] [화학식 5]

[179]



- [180] 화학식 1 내지 5에서 n은 1 내지 50의 정수, 화학식 5에서 A는 알데하이드 그룹임.
- [181] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은 히알루론산의 -OH 그룹을 화학적 변형 없이 콜레스테릴 클로로포르메이트로 치환하여 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [182] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산-콜레스테롤 유도체는 콜레스테릴 클로로포르메이트, 4-다이메틸아미노피리딘 (4-Dimethylaminopyridine, DMAP) 및 트리에틸아민(Triethylamine, TEA)의 당량을 조절하여 히알루론산-콜레스테롤 유도체의 콜레스테롤 치환도를 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [183] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 3의 화합물은 히알루론산 환원당 말단을 1,2-다이미리스토일-락-글리세롤(1,2-Dimyristoyl-rac-glycerol)로 치환하여 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [184] 본 발명에 있어서, 상기 히알루론산 환원당 말단은 개환반응에 의해 아민 그룹이 치환되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [185] 본 발명에 있어서, 상기 아민 그룹은 에틸렌디아민, 부틸렌디아민, 헥사메틸렌디아민, 펜타에틸렌헥사아민, 1,4-뷰테인디아민 및 1,5-다이아미노-2-메틸펜탄으로 구성된 군에서 선택되는 다이아민을 사용하여 아민 그룹이 치환되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [186] 본 발명에 따른 히알루론산-지질 유도체를 제조함에 있어서, 가교제로 DMTMM를 사용하였으나, 가교제로 DMTMM만을 한정하고 있지 않으며, 유사한 길이 가교제인 Sulfo-NHS/EDC, NHS/EDC, 2-chloro4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine로 대체하여 사용할 수 있다.
- [187] 본 발명에 따른 히알루론산 유도체를 제조함에 있어서, 용매로 DMSO를 사용하였으나, 용매를 DMSO로 한정하고 있지 않으며, 유사한 dipolar aprotic solvents인 N,NDimethylmethanamide(디메틸포름아마이드, DMF), 1,3-Dimethyl-2-imidazolidinone (1,3-다이메틸-2-이미다졸리돈, DMI)로 대체하여 사용할 수 있다.
- [188]
- [189] 본 발명은 본 발명의 방법을 편리하게 및/또는 효율적으로 수행하는 다양한 키트를 제공한다. 전형적으로 키트는 사용자가 대상체(들)의 다중 접종 또는 치료를 가능하게 하고/하거나 다수의 실험을 수행할 수 있게 하도록 충분한 양 및/또는 개수의 성분을 포함할 것이다.
- [190] 일 양태로서, 본 발명은, 핵산, 단백질, 화합물, 기타 물질이나 약물 등의 페이로드와 지질나노입자를 포함하는, 핵산, 단백질, 화합물, 기타 물질이나 약물 등의 페이로드 전달용 키트를 제공한다. 상기 키트는 포장 및 설명서를 더 포함할 수 있다.
- [191] 본 발명에 있어서, 전달이란 핵산, 단백질, 화합물, 기타 물질이나 약물 등의

페이로드를 전달하는 작용 또는 방식을 지칭하며, 본 발명에 있어서 전달체란 표적화된 세포로 핵산, 단백질, 화합물, 기타 물질이나 약물 등의 페이로드의 생체내 전달을 적어도 부분적으로 촉진하는 임의의 물질을 지칭한다.

[192]

[193] 실시예

[194] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[195]

[196] **실시예 1. 히알루론산-지질 유도체 합성**

[197]

[198] 본 발명에서는 소수성 알킬 체인을 갖는 지질을 히알루론산에 도입하여 다양한 히알루론산-지질 유도체를 합성하였다. 이하에서 달리 명시되지 않은 화합물 및 시약은 Sigma-Aldrich 제품을 사용하였다.

[199]

[200] 1-1. 히알루론산-콜레스테롤 유도체 1 (HA-CHOL, 화학식 1)

[201] 콜레스테릴 클로로포르메이트(Cholesteryl chloroformate, TCI)를 플라스크에 넣고 진공상태를 만든 후, 에틸렌디아민을 첨가하고, 무수 상태의 다이클로로메테인 (dichloromethane, DCM, TCI)을 위 플라스크에 첨가하여, 1시간동안  $< 0^{\circ}\text{C}$  환경에서 교반하였다. 반응용액에 물을 넣어 씻어주고 회전 농축 증발기를 이용하여 유기용매를 모두 제거하여 콜레스테릴-2-아미노에틸카바메이트 (cholesteryl-2-aminoethylcarbamate, CAEC, 1')를 획득하였다.

[202] 테트라부틸암모늄(Tetrabutylammonium, Sigma-Aldrich) 염으로 치환된 히알루론산 (HA-TBA)을 DMSO에 용해시켰다. CAEC를 DCM/methanol (1:1) 용액에 녹이고 이를 테트라부틸암모늄(Tetrabutylammonium) 염으로 치환된 히알루론산 용액에 넣어 30분 교반하였다. 반응 용액에 디메틸 설펝사이드 (Dimethyl sulfoxide, DMSO, Alfa Aesar)에 위에서 획득한 CAEC와 동일한 몰수로 녹인 DMTMM (4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl), TCI)을 넣고 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 제조된 히알루론산-콜레스테롤 유도체 1 (HA-CHOL, 2')을 투석을 통해 정제하고, 동결건조를 통해 획득하였다 (도 1).

[203] 히알루론산 콜레스테롤 유도체 1의 콜레스테롤 치환도는  $^1\text{H NMR}$  분석을 통해 확인되었다 (도 3a). 제조된 히알루론산-콜레스테롤 유도체의 히알루론산 아세틸 그룹의 수소 적분값과 콜레스테롤의 메틸그룹 적분값이 3:6으로 나타나고, 이를 이용하여 아세틸 그룹의 적분값을 3으로 고정하였을 때, 메틸그룹의 적분값을 계산하여 치환도를 계산이 가능하다.

[204]

- [205] 1-2. 히알루론산-콜레스테롤 유도체 2 (CHA, 화학식 2)
- [206] 테트라부틸암모늄 (Tetrabutylammonium) 염으로 치환된 히알루론산 (HA-TBA)을 다이메틸포름아마이드 (Dimethylformamide, DMF, Alfa Aesar)에 용해시킨 후 콜레스테릴 클로로포르메이트 (Cholesteryl chloroformate, TCI)와 4-다이메틸아미노피리딘 (4-Dimethylaminopyridine, DMAP, TCI)을 넣어주고 트리에틸아민(Triethylamine, TEA, DAEJUNG)을 넣어 교반하였다. 교반 후에 에르를 이용하여 생성물을 침전시켜 반응하지 않은 지질을 제거하였다. 이후 NaCl 용액과 증류수에 각각 24시간 투석하였다 (도 2).
- [207] 히알루론산 콜레스테롤 유도체 2의 콜레스테롤 치환도는 <sup>1</sup>H NMR 분석을 통해 확인되었다.
- [208] 한편, 히알루론산 콜레스테롤 유도체 2의 경우 반응 조성물에 따라 콜레스테롤의 치환도를 조절 가능하다(표 1). 즉, 제조된 히알루론산-콜레스테롤 유도체의 히알루론산 아세틸 그룹의 수소 적분값과 콜레스테롤의 메틸그룹 적분값이 3:6으로 나타나고, 이를 이용하여 아세틸 그룹의 적분값을 3으로 고정하였을 때, 메틸그룹의 적분값을 계산하여 치환도를 계산이 가능하다. 콜레스테롤의 치환도가 높을수록 히알루론산 아세틸 그룹의 수소 적분값이 콜레스테롤의 수소 적분값과 겹쳐져 히알루론산의 글라이시딕코딕 결합을 하고 있는 1'탄소에 있는 수소의 적분값을 2로 기준하여 콜레스테롤의 치환도를 계산할 수 있다 (도 3b). 상기 콜레스테롤이 치환된 히알루론산 유도체는 CHA라고 명명하였다.

[209]

[210] [표1]

히알루론산-콜레스테롤 유도체 2 조성물 정보

Entry	HA	Cholesterol	DMAP	TEA
a)	450mg	98mg	67mg	111mg
b)	450mg	197mg	134mg	111mg
c)	450mg	296mg	134mg	111mg
d)	450mg	296mg	134mg	111mg

[211]

[212] 1-3. 히알루론산-1,2-Dimyristoyl-rac-glycerol 유도체 (DMG-HA, 화학식 3)

[213] 히알루론산은 본 발명자들이 제조한 4K 저분자 히알루론산을 사용하였다.

[214] 4K 저분자 히알루론산은 고분자 히알루론산(Sodium hylauronate(1.0~1.5mDA), Biogenics)을 염을 5% 이하의 물을 함유하고 있는 아세톤에 분산시키고 고온 (60-70°C)에서 염산(Hydrochloric acid, SAMCHUN) 수용액(3M)을 추가로 첨가하여 24시간 교반한 후 히알루론산을 침전시켜 여과하였다. 이후 여과한 히알루론산을 회수하여 에탄올 용액(Ethanol, 95%, SAMCHUN)에 세척을

수행하여 획득하였다.

- [215] 히알루론산 1g을 100ml의 sodium borate buffer (pH 8.5)에 용해시켰다. pH 미터를 이용하여 pH가 8.4 이하로 낮아지지 않은 것을 확인하였다. pH가 8.4 이하인 경우, 1M NaOH 용액을 이용하여 pH 8.4로 적정하였다. 이후 다이아민 (diamine) 화합물, 여기서는 다이아민부테인 (diaminobutane, Sigma Aldrich)을 히알루론산의 글루코스 2 당량 대비 15배 위 용액에 첨가하였다. 충분히 교반시킨 후, 소듐 시아노보로하이드라이드 (sodium cyanoborohydride, Sigma Aldrich)를 히알루론산의 글루코스 2 당량 대비 5 배의 당량을 추가로 용액에 첨가하고, 3 일간 40 °C에서 교반하였다. 위 반응용액을 감압 농축 증류기를 통해 부피를 20ml로 농축하고, MWCO 3500을 갖는 투석막에 넣어 증류수로 1 일간 투석하였다. 0.1M HCl 용액으로 1 일간 추가로 투석한 후, 마지막으로 1 일간 3차 증류수를 이용해 투석하였다. 이를 통해 얻어진 생성물은 히알루론산-b-다이아미노부테인 (hyaluronic-b-diaminobutane) 유도체로 히알루론산의 나트륨(sodium)이 제거된 형태이다. 이를 HA-b-damb 라고 명명하였다. 얻어지는 생성물 용액에 40% 테트라부틸암모늄 하이드록사이드 (tetrabutylammonium hydroxide, TBA-OH, Sigma Aldrich)를 첨가하여 pH를 7.0으로 적정하였다. TBA-OH로 인해 HA-b-damb는 TBA 염으로 치환되며, 이를 HA-damb-TBA라고 명명하였다. 이후 동결건조를 통해 생성물을 획득하였다. HA-b-damb와 HA-b-damb-TBA의 합성은 <sup>1</sup>H NMR 분석을 통해 확인되었다. 히알루론산의 당 단위체와 다이아미노부테인 (diaminobutane)의 특유의 메틸렌의 수소 및 TBA 염의 알킬체인이 모두 나타난 것이 확인되었다. 다이아미노부테인 (diaminobutane)의 적분값을 히알루론산의 아세틸(acetyl) 그룹의 적분값과 대조하여볼 때 약 10개의 히알루론산 당단위체당 1개의 다이아미노부테인 (diaminobutane)이 치환된 것으로 확인되어 모든 4k 히알루론산 말단에 다이아미노부테인 (diaminobutane)이 치환되었음을 알 수 있었다 (도 5, 도 6).

- [216] 0.25 mmol에 해당하는 1,2-다이미기스토일-락-글리세롤 (1,2-Dimyrystoyl-rac-glycerol, DMG, GOLDBIO)와 0.3 mmol에 해당하는 P-톨루엔설포닐 클로라이드 (P-Toluenesulfonyl chloride, TsCl, SAMCHUN), 0.125mmol의 4-다이메틸아미노피리딘(4-Dimethylamionpyridine, DMAP)와 함께 1.2ml의 다이클로로메탄 (Dichloromethane, DCM, TCI)에 용해시키고, 질소가스를 통해 무수 상태를 유지하였다. 이후 주사기를 이용하여 0.3mmol의 트리에틸아민(Triethylamine, TEA, DAEJUNG)을 첨가하고 실온에서 4시간동안 충분히 교반하였다. 생성물은 TLC를 통해 확인하였다. (TLC 조건: 이동용매 DCM; RF 값 0.52) 반응물을 회수하고 이를 실리카겔 크로마토그래피 (silica gel chromatography)를 이용하여 생성물만 회수하였다. 회수된 생성물은 감압 농축 증류수를 통해 회수하였다. 이를 Tosyl-DMG라 명명하였다. Tosyl-DMG의 합성은 <sup>1</sup>H NMR 분석을 통해 확인되었다. DMG의 특유의 알킬 체인과 tosyl

관능기에 있는 수소의 적분값이 화학식과 일치되는바, 합성이 잘 되었음을 알 수 있었다(도 7).

[217] 앞서 제조한 HA-damb-TBA를 Tosyl-DMG를 무수 DMF에 용해시켰다. 질소가스를 이용하여 무수화상태를 유지한 상태로 50 °C내지 60 °C에서 72시간 동안 자석교반기를 이용하여 교반하였다. 반응 종료 후 반응용액을 회수하여, 반응용액 부피의 10배에 해당하는 에테르(ether)를 첨가하여 생성물을 침전시켜 원심분리를 통해 회수하였다. 이는 필터를 이용해 회수도 가능하다. 다시 한번 생성물 부피의 10배에 해당하는 에테르(ether, SAMCHUN)를 침전물에 추가하여 풀어 주고, 원심분리하여 미반응된 Tosyl-DMG를 모두 제거하였다. 침전된 생성물을 물에 용해하고, 이를 0.2 M NaCl 용액을 이용하여 24시간 동안 투석한 후, 추가로 24시간 동안 증류수를 이용하여 투석을 진행하였다. 이후 생성물을 동결건조를 통해 획득하였다. 이렇게 얻은 히알루론산-지질 유도체를 DMG-HA라 명명하였다.

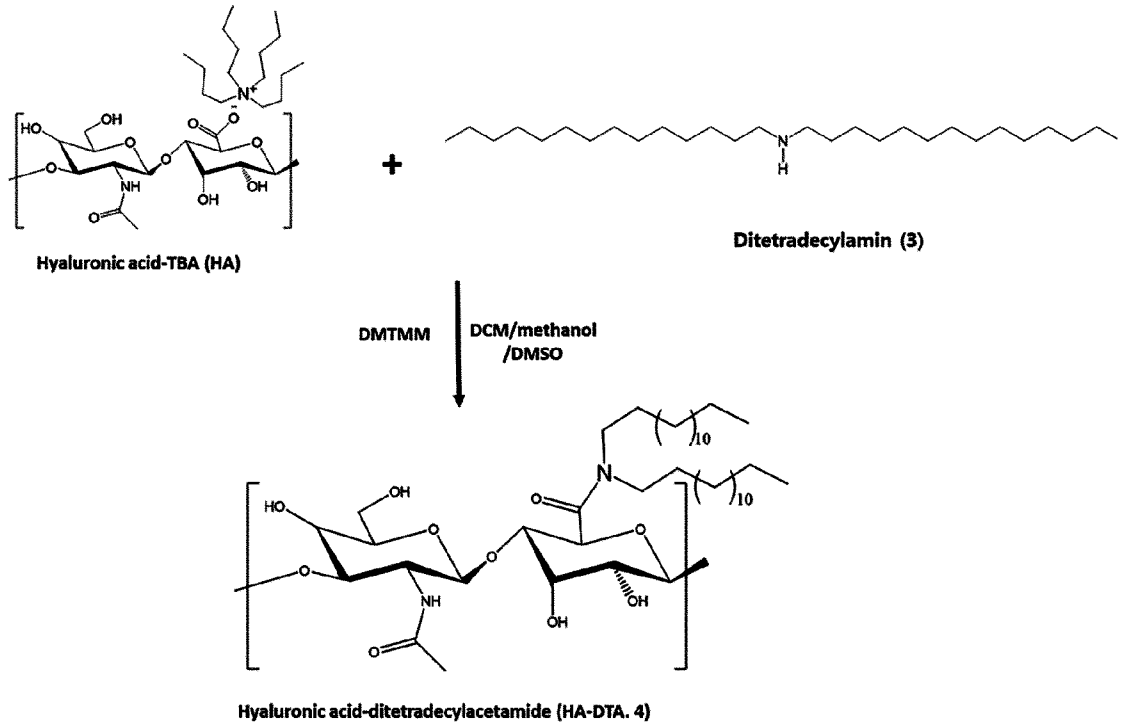
[218] DMG-HA의 합성은 <sup>1</sup>H NMR 분석을 통해 확인되었다. DMG-HA를 D<sub>2</sub>O에 녹여 측정한 결과, 히알루론산 특유의 당 단위체에서 나타나는 수소들과 DMG의 알킬체인에 있는 수소 피크가 확인되었다. DMSO-d<sub>6</sub>에 녹여 측정한 결과에서는 DMG-HA에 있는 DMG의 알킬체인의 수소 적분값이 치환전의 DMG의 수소 적분값과 일치함에 따라 DMG가 분해되지 않고 히알루론산 말단에 치환됐음을 알 수 있었으며, 히알루론산의 아세틸(acetyl) 그룹을 기준으로 비교하여 볼 때 모든 히알루론산 말단에 DMG가 치환되었음을 확인할 수 있었다(도 8).

[219]

[220] 1-4. 히알루론산-ditetradecylacetamide (화학식 4)의 합성

[221] 실시예 1-1의 합성방법과 유사하게, 히알루론산-Ditetradecylacetamide도 제조할 수 있다. 이때 콜레스테릴 클로로포르메이트(Cholesteryl chloroformate, TCI) 대신 Ditetradecylamine(디메틸테트라데실아민, Sigma-Aldrich)을 이용한다. Tetrabutylammonium(테트라부틸암모늄, Sigma-Aldrich)염으로 치환된 히알루론산 (HA-TBA)을 DMSO에 용해시킨다. ditetradecylamine를 DCM/methanol (1:1) 용액에 녹이고 이를 히알루론산 용액에 넣어 30분 교반한다. 반응 용액에 Dimethyl sulfoxide (다이메틸 설펍사이드, DMSO, Alfa Aesar)에 위에서 획득한 CAEC와 동일한 몰수로 녹인 녹인 DMTMM을 넣고 상온에서 24시간 동안 교반 한다. 제조된 히알루론산-ditetradecylacetamide 유도체 (4', HA-DAT)는 투석을 통해 정제하고, 동결건조를 통해 획득한다.

[222]



[223]

[224] 1-5. 히알루론산 알데하이드를 이용한 히알루론산-지질 유도체 (화학식 5) 합성

[225] 히알루론산 알데하이드의 A는 알데하이드 그룹을 포함하고 있으며 A는 알데하이드 그룹이다. 알데하이드 그룹을 이용하여 실시예 와 유사한 방법으로 히알루론산-지질 유도체 합성이 가능하다.

[226] 구체적으로, 히알루론산을 pH8.5 Sodium borate buffer(보레이트염 완충용액)에 녹여 히알루론산의 농도가 10mg/ml인 히알루론산 용액을 제조하고, 상기 용액에 히알루론산 중의 알데하이드 그룹의 5몰 배로 환원제인 소듐시아노보로하이드라이드를 첨가하였다. 그 후, 상기 알데하이드 그룹의 10몰 배로 디아미노부테인(1,4-diaminobutane, Sigma Aldrich)을 첨가하고 37°C에서 3일간 반응시켜 히알루론산-디아미노부탄 유도체를 제조하였다. 상기 제조된 히알루론산-디아미노부탄 유도체를 투석막(Dialysis tubing, 7000K MWCO, Snakeskin)을 이용하여 증류수에서 3일간 투석하고 동결건조한 후 다시 pH8.5 보레이트염 완충용액에 녹여 상기 유도체의 농도가 10mg/ml인 용액을 제조하였다. 이 용액에 아민그룹의 10몰배로 환원제인 소듐시아노보로하이드라이드를 첨가하였다. 그 후 아민 그룹의 10몰 배로 글루타알데하이드(glutaraldehyde solution, Sigma Aldrich)를 첨가하고 상온에서 1일동안 반응시켰다. 상기 제조된 히알루론산-글루타알데하이드 유도체를 투석막(Dialysis tubing, 7000K MWCO, Snakeskin)을 이용하여 3일간 증류수에 대해 투석하고 3일간 동결건조한 하였다. 제조된 히알루론산-글루타알데하이드 유도체를 pH5.5 소듐 아세테이트 완충용액에 녹여 용액을 제조하였다. 상기 용액에 넣어준 유도체의 알데하이드 그룹의 10몰배로 환원제인



교환 과정을 거쳤다. 여과막을 사용할 경우 인산염 완충액 상에 여과막을 24시간 이상 노출시켜 알코올이 완전히 제거되도록 하고, 원심분리 필터를 사용할 경우에는 1000g에서 3분 이상, 인산염 완충액으로 2회 이상 교환을 실시하여 알코올을 완전히 제거하였다 (도 10).

[238] 미세유체혼합장치 및 시험관내에서 제조된 LNP의 크기를 비교한 결과를 도 10에 나타내었다. LNP의 크기는 제조된 LNP를 인산염 완충액에 분산시킨 후 동적광산란 분광기(ZEN3600, Malvern Instruments)로 측정하였다.

[239] 미세유체 혼합장치를 이용하거나 피펫팅을 이용하는 경우 모두, 지질나노입자가 합성되는 것을 확인하였다.

[240]

[241] 본 발명에서 사용된 일부 양태로서, 히알루론산-지질이 포함된 LNP는 표 2 또는 표 3과 같은 조성물로 제조하였다. 표 3에서 다량의 히알루론산-지질 유도체를 첨가할수록 나노입자가 응집되는 것을 억제할 수 있다 (도 11).

[242]

[243] [표2]

히알루론산의-지질이 포함된 LNP 조성물

LNPs	Lipid	Mw	Lipid composition molar ratio	Lipid concentration: buffer
DMG-PEG/4k CHA	SM-102	710.2	49	1:3
	DSPC	790.2	10	
	Cholesterol	386.654	39	
	DMG-PEG	2509.2	1	
	4k CHA	4386.65	1	
4k CHA	SM-102	710.2	50	
	DSPC	790.2	10	
	Cholesterol	386.654	39	
	4k CHA	4386.65	1	
DMG-HA x5	SM-102	710.2	48	
	DSPC	790.2	9	
	Cholesterol	386.654	38	
	DMG-HA	5000	5	
DMG-PEG (Control)	SM-102	710.2	50	
	DSPC	790.2	10	
	Cholesterol	386.654	39	
	DMG-PEG	2509.2	1	

[244] \*여기서 4K는 히알루론산의 분자량 정보이다. 4K 히알루론산은 실시예 1-3에 기재된 방식으로 제조하였다.

[245]

[246] [표3]  
 히알루론산-지질이 포함된 LNP 조성물

LNPs	Lipid	Mw	Lipid composition molar ratio	Lipid concentration: buffer
5k CHA 50%	SM-102	710.2	46	1:3
	DSPC	790.2	9	
	Cholesterol	386.654	35	
	5k CHA	5386.65	10	
5k CHA 40%	SM-102	710.2	47	
	DSPC	790.2	9	
	Cholesterol	386.654	37	
	5k CHA	5386.65	7	
5k CHA 30%	SM-102	710.2	48	
	DSPC	790.2	10	
	Cholesterol	386.654	38	
	5k CHA	5386.65	4	
5k CHA 20%	SM-102	710.2	49	
	DSPC	790.2	10	
	Cholesterol	386.654	38	
	5k CHA	5386.65	3	

[247] \*여기서 5K는 히알루론산 (Sodium Hyaluronate, Research Grade, HA5K, Lifecore Biomedical)의 분자량 정보이다.

[248]

[249] 실시예 3. DMG-HA의 양에 따른 LNP 크기 비교

[250]

[251] 표 4와 같은 조성으로 DMG-HA가 포함된 LNP를 제조하였다.

[252]

[253] [표4]  
 히알루론산-지질이 포함된 LNP 조성물

Lipids	DMG-HA x1 (molar ratio)	DMG-HA x5 (molar ratio)	DMG-HA x10 (molar ratio)
SM-102	50	48	46
DSPC	10	10	9
Cholesterol	39	37	35
DMG-HA	1	5	10

[254]  
 [255] 그 결과, DMG-HA x1 일 때 가장 균일하게 나노입자가 형성되는 것을 확인하였다. (도 12).

[256]  
 [257] 실시예 4. CHA와 DMG-PEG가 포함된 LNP 크기 비교  
 [258] 표 5와 같은 조성으로 CHA와 DMG-PEG가 포함된 LNP를 제조하였다.

[259]  
 [260] [표5]  
 CHA와 DMG-PEG가 포함된 LNP 조성물

Lipids	DMG-PEG (molar ratio)	DMG-PEG/4K CHA (molar ratio)	4K CHA (molar ratio)
SM-102	50	49	50
DSPC	10	10	10
Cholesterol	39	39	39
DMG-PEG	1	1	-
4K CHA	-	1	1

[261]  
 [262] 그 결과, CHA만 단독으로 첨가되어 LNP가 제조된 경우 크기가 크나 그 분산도가 작아 균일한 크기를 나타내는 것으로 확인된 반면, CHA가 DMG-PEG와 함께 첨가되어 LNP 제조시 크기는 작아지나 그 분산도가 커서 나노입자가 다소 균일하지 않게 생성됨을 알 수 있었다 (도 13).

[263]  
 [264] 실시예 6. 히알루론산-지질 유도체가 포함된 LNP의 제타 전위 분석  
 [265] 표 2에 따른 조성물로 히알루론산-지질 유도체가 포함된 LNP를 제조하고 제타전위를 분석하였다. 제타전위는 제조된 LNP를 인산염 완충액에 분산시킨 후 동적광산란 분광기(ZEN3600, Malvern Instruments)로 측정하였다.

[266]

[267] 그 결과, CHA, DMG-HA를 첨가하는 경우, DMG-PEG 또는 DMG-PEG와 CHA를 혼합하여 첨가하는 경우에 비해 LNP의 제타전위의 음의 값이 크게 나타나, 본 발명에 따른 히알루론산 지질이 LNP에 더욱 효과적으로 포함된다는 것을 확인하였다 (도 14).

[268]

[269] 실시예 7. CHA와 DMG-PEG 또는 DMG-HA와 DMG-PEG 조합이 포함된 LNP 크기 및 제타 전위 비교

[270] PEG 유도체와 히알루론산 유도체를 함께 첨가하여 지질나노입자를 제조하는 경우, 이들의 적절한 조성비를 확인하고자, 표 6과 같은 조성으로 CHA와 DMG-PEG 또는 DMG-HA와 DMG-PEG 조합이 포함된 LNP 조성물을 제조하였다.

[271]

[272] [표6]

CHA와 DMG-PEG 또는 DMG-HA와 DMG-PEG 조합이 포함된 LNP 조성물

Lipids	DMG-PEG (molar ratio)	DMG-PEG/4K CHA (molar ratio)	DMG-PEG/DMG-HA (molar ratio)
SM-102	50	50	50
DSPC	10	10	10
Cholesterol	39	39	39
DMG-PEG	1	1	1
4K CHA	-	0.1	-
DMG-HA	-	-	0.1

[273]

[274] 그 결과, DMG-PEG만을 포함하는 LNP, DMG-PEG/4K CHA, DMG-PEG/DMG-HA LNP가 낮은 분산도로 균일한 크기를 보임이 확인되었다(도 15).

[275]

[276] 한편, 표 6에 따른 조성물로 LNP를 제조하고 제타전위를 분석한 결과, DMG-PEG/4K CHA, DMG-PEG/DMG-HA LNP가 DMG-PEG만을 포함하는 LNP에 비해 LNP의 제타전위의 음의 값이 크게 나타나, PEG 유도체와 히알루론산 유도체를 적절한 비율로 함께 첨가하는 경우, 히알루론산 지질이 LNP에 효과적으로 포함된다는 것을 확인하였다(도 16).

[277]

[278] 실시예 8. 히알루론산-지질 유도체가 포함된 LNP의 mRNA 세포 내 전달 효율

## 평가

- [279] 표 2에서 DMG-PEG/4K CHA, DMG-HA, DMG-PEG를 포함하는 LNP를 각각 제조하고, 이에 GFP mRNA (Clean Cap®EGFP mRNA, TriLink)를 담지하였다.
- [280] LNP 제조는 각 지질 조성물을 유기용매에 분산시키고 mRNA와 히알루론산 지질은 시트레이트(citrate buffer)에 녹여 1:3의 비율로 피펫팅을 통하여 섞어 제조하였다. mRNA와 히알루론산 지질은 시트레이트 버퍼에 질량기준 DMG-PEG/4K CHA는 1:1.6, DMG-HA는 1:9.3, DMG-PEG는 1:0.9의 비율로 섞어 제조하였다.
- [281] A549 세포 (한국세포주은행)를 96웰 플레이트에  $1 \times 10^3$  cells/well로 분주한 후, 배양액(RPMI medium 1640 (1X), gibco)을 이용하여 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 밤새 배양하였다. GFP mRNA가 담지 된 각각의 LNP를 5% FBS가 함유된 배양액(RPMI medium 1640 (1X), gibco)에 희석하여, 각 웰에 mRNA 기준 100ng씩 처리하였다. LNP가 처리된 세포는 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 추가 배양 후 형광현미경을 통해 GFP 발현을 확인하였다.
- [282] 그 결과, DMG-PEG 단독 또는 DMG-PEG와 CHA를 혼합하여 포함된 LNP에 의한 것보다 DMG-HA를 단독으로 포함하는 LNP에 의해 GFP mRNA가 세포 내로 가장 효과적으로 전달되어 GFP 발현량이 가장 높게 나타나는 것을 확인하였다 (도 17).
- [283]
- [284] 한편, 표 6에 따른 조성물로 LNP를 제조한 후, 상기와 동일한 방법으로 GFP mRNA를 담지하고 세포에 처리하여, 세포 내 전달 효율을 평가하였다. mRNA와 히알루론산 지질은 시트레이트 버퍼에 질량기준 DMG-PEG/4K CHA는 1:0.16, DMG-PEG/DMG-HA는 1:0.15, DMG-PEG는 1:0.9의 비율로 섞어 제조하였다. Lipofectamine은 mRNA기준 well 당 100ng과 lipofectamine 시약 0.15ul가 되도록 제조사의 매뉴얼대로 제조하였다. 이 때, IVIS(In vivo imaging system, Perkin Elmer)를 활용하여 이미징하고, 형광을 정량 분석하였다.
- [285] 그 결과, PEG 유도체와 히알루론산 유도체를 적절한 비율로 함께 첨가하는 경우, mRNA가 LNP에 효과적으로 담지된다는 것을 확인하였다(도 18).
- [286]
- [287] 실시예 9. 히알루론산-지질 유도체가 포함된 LNP의 mRNA 담지 효율 평가
- [288] 표 3에 따른 조성물로 5K CHA의 양을 변화시켜 mRNA 담지효율을 평가하였다. 이를 위하여, LNP 내부와 외부 완충액에 있는 mRNA를 측정하기 위하여 각각 TritonX-100 (Sigma-Aldrich)가 있는 Ribogreen dye 용액과 없는 용액을 처리하고 Ribogreen assay의 들뜸파장 480nm, 방출파장 520nm 대에서 플레이트 형광판독기를 통해 확인하였다. 구체적으로는 Ribogreen assay Kit (Quant-it™ Ribogreen RNA Assay Kit, Invitrogen™)를 이용하여, 제조자 방식에 따라 실험을 진행하였다.
- [289] 그 결과, 20 내지 30% CHA를 포함하는 LNP의 mRNA 담지 효율이

DMG-PEG를 사용하는 것보다 20% 이상 향상되었고, 특히 30% CHA를 포함하는 LNP의 경우 mRNA 담지 효율이 100%에 가까운 것으로 확인되었다 (도 19).

[290]

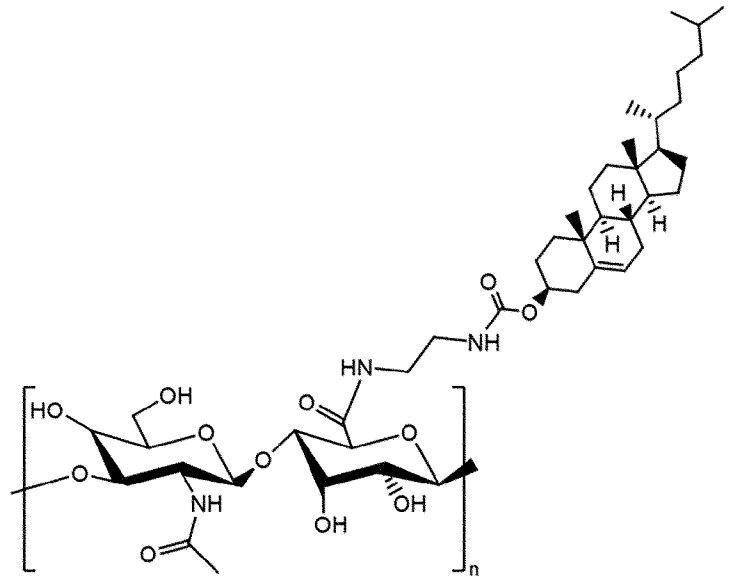
[291] 한편, 표 6에 따른 조성물에 대해서도 담지효율을 평가해 본 결과, DMG-HA, 4k CHA를 DMG-PEG와 적절한 비율로 혼합하여 제조된 LNP는 히알루론산 유도체 없이 DMG-PEG를 포함하는 LNP와 비교하여 mRNA 담지 효율이 약 10% 이상 향상되었다 (도 20).

[292]

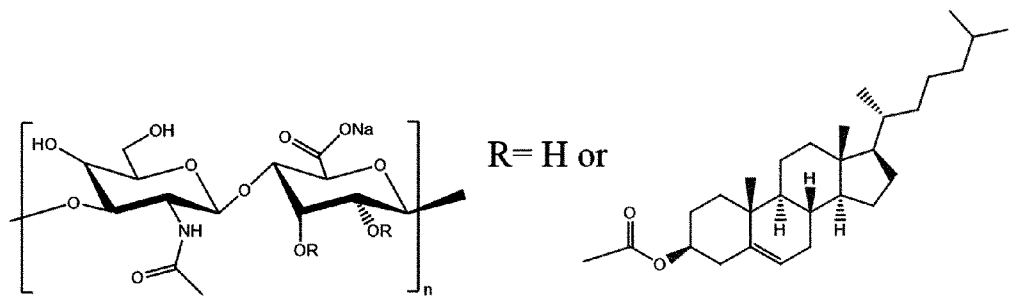
[293] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 청구범위

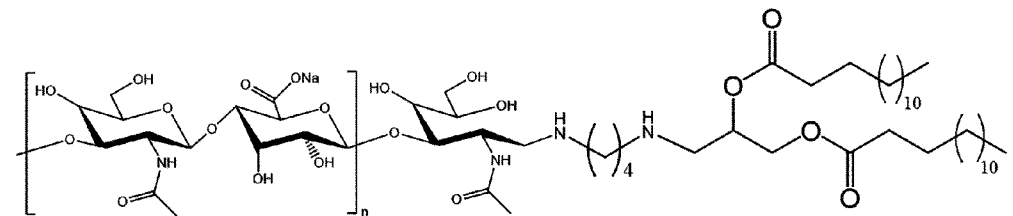
- [청구항 1] 히알루론산-지질 유도체를 포함하는 지질나노입자.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 이온성 지질, 콜레스테롤 및 포스파티딜콜린을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 이온성 지질은 양이온성 지질인 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 히알루론산 당 골격의 -COOH 그룹 또는 -OH 그룹 또는 히알루론산 말단의 환원당에 지질이 도입되어 형성되는 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체에서 지질은 소수성 알킬 체인을 가지는 지질인 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 히알루론산-콜레스테롤 유도체 또는 히알루론산-1,2-다이미리스토일-락-글리세롤(Hyaluronic acid-1,2-Dimyristoyl-rac-glycerol)인 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 지질화 PEG를 추가로 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 지질나노입자는 핵산, 단백질 또는 약물 전달용인 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 핵산은 mRNA인 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 히알루론산의 분자량은 3,000 내지 6,000 Da인 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 지질나노입자 내 이온성 지질 : 콜레스테롤 : 포스파티딜콜린 : 히알루론산-지질 유도체의 몰비(molar ratio)는 30-60 : 30-60 : 8-12 : 1-10인 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 지질나노입자는 정맥내, 근육내, 유리체내, 척수강내, 종양내, 비강내, 폐 및 피하로 구성되는 군에서 선택되는 경로로 투여되는 것을 특징으로 하는, 지질나노입자.
- [청구항 13] mRNA 백신 및 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 지질나노입자를 포함하는, 백신 조성물.
- [청구항 14] 하기 화학식 1 내지 5 중 어느 하나로 표시되는, 히알루론산-지질 유도체:  
[화학식 1]



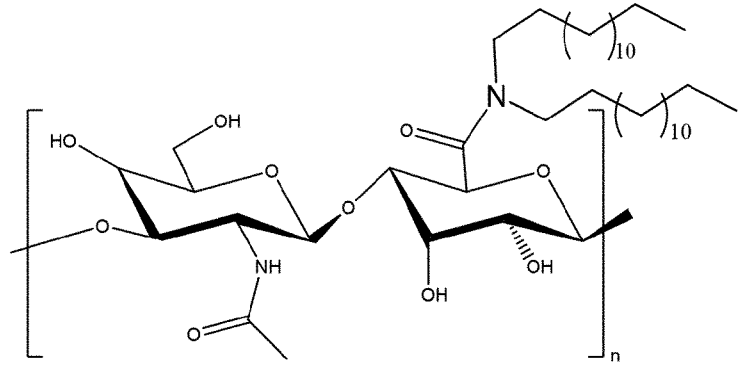
[화학식 2]



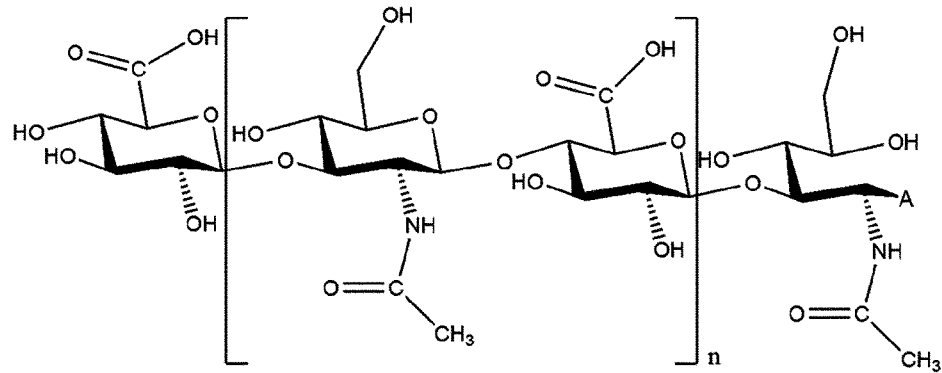
[화학식 3]



[화학식 4]



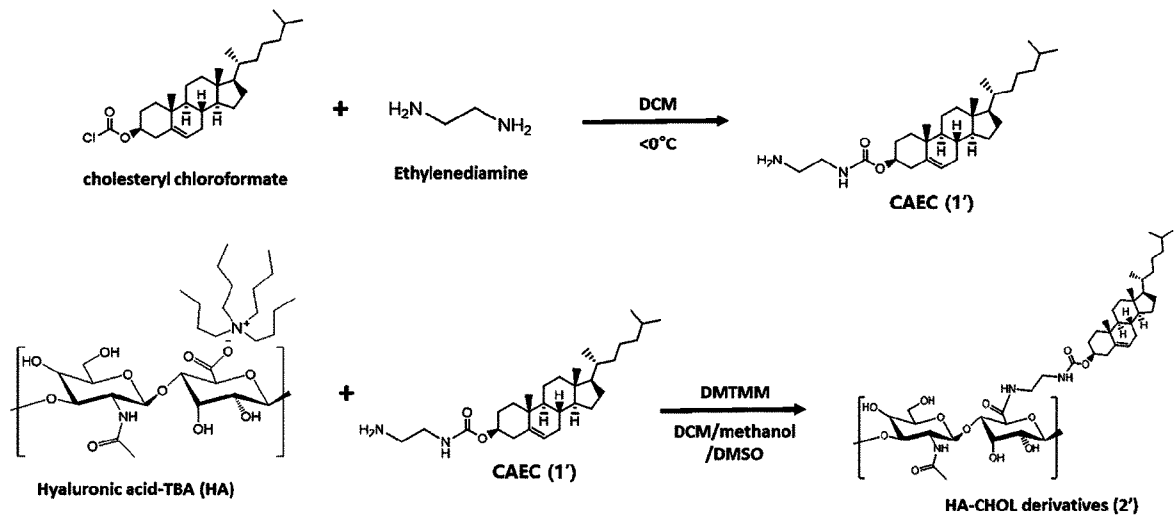
[화학식 5]



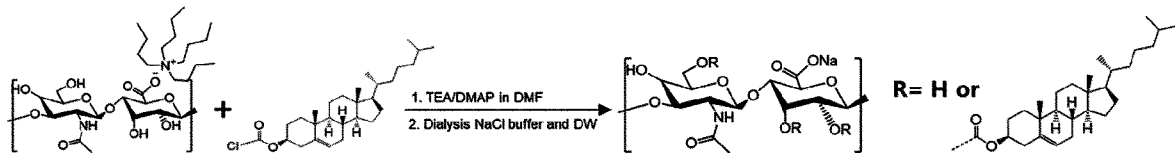
화학식 1 내지 5에서 n은 1 내지 50의 정수, 화학식 5에서 A는 알데하이드 그룹임.

- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은 히알루론산의 -OH 그룹을 화학적 변형 없이 콜레스테릴 클로로포르메이트로 치환하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 히알루론산-지질 유도체.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 히알루론산-지질 유도체는 콜레스테릴 클로로포르메이트, 4-다이메틸아미노피리딘 (4-Dimethylaminopyridine, DMAP) 및 트리에틸아민(Triethylamine, TEA)의 당량을 조절하여 히알루론산-콜레스테롤 유도체의 콜레스테롤 치환도를 조절하는 것을 특징으로 하는, 히알루론산-지질 유도체.
- [청구항 17] 제14항에 있어서, 상기 화학식 3의 화합물은 히알루론산 환원당 말단을 1,2-다이미리스토일-락-글리세롤(1,2-Dimyristoyl-rac-glycerol)로 치환하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 히알루론산-지질 유도체.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 히알루론산 환원당 말단은 개환반응에 의해 아민 그룹이 치환되는 것을 특징으로 하는, 히알루론산-지질 유도체.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 아민 그룹은 에틸렌디아민, 부틸렌디아민, 헥사메틸렌다이아민, 펜타에틸렌헥사아민, 1,4-뷰테인다이아민 및 1,5-다이아미노-2-메틸펜탄으로 구성된 군에서 선택되는 다이아민을 사용하여 아민 그룹이 치환되는 것을 특징으로 하는, 히알루론산-지질 유도체.

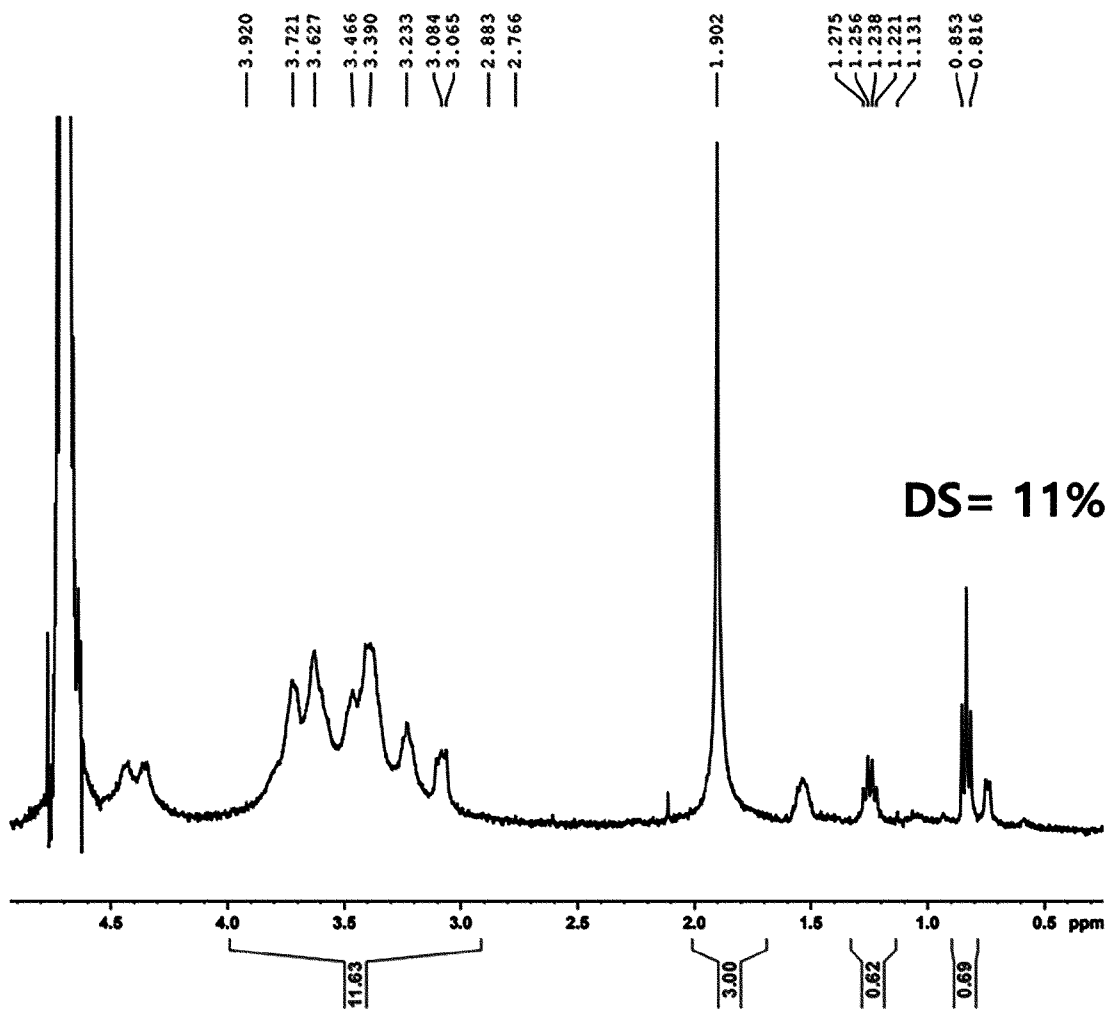
[도1]



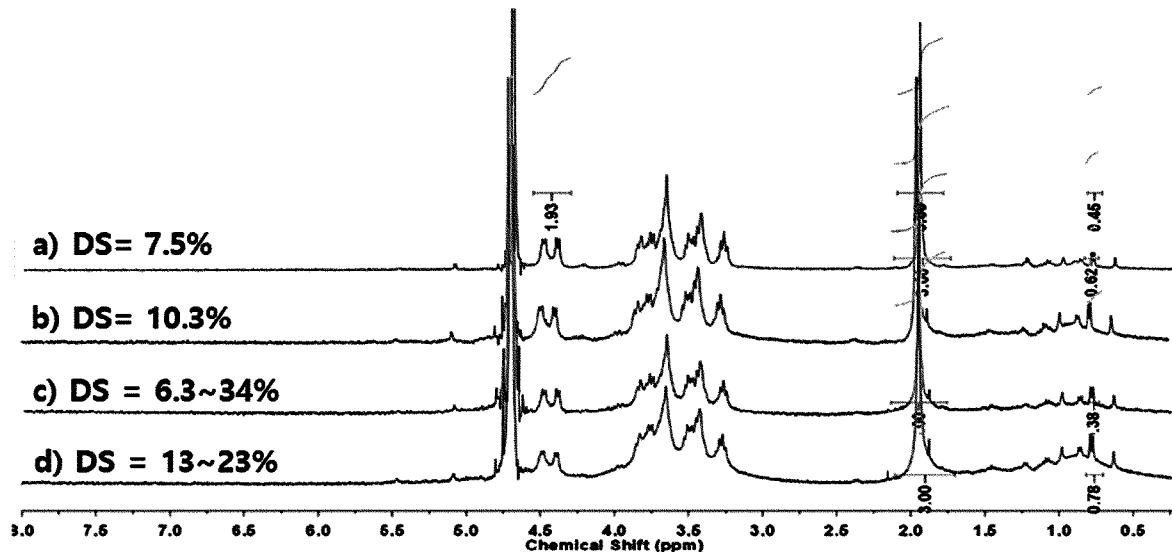
[도2]



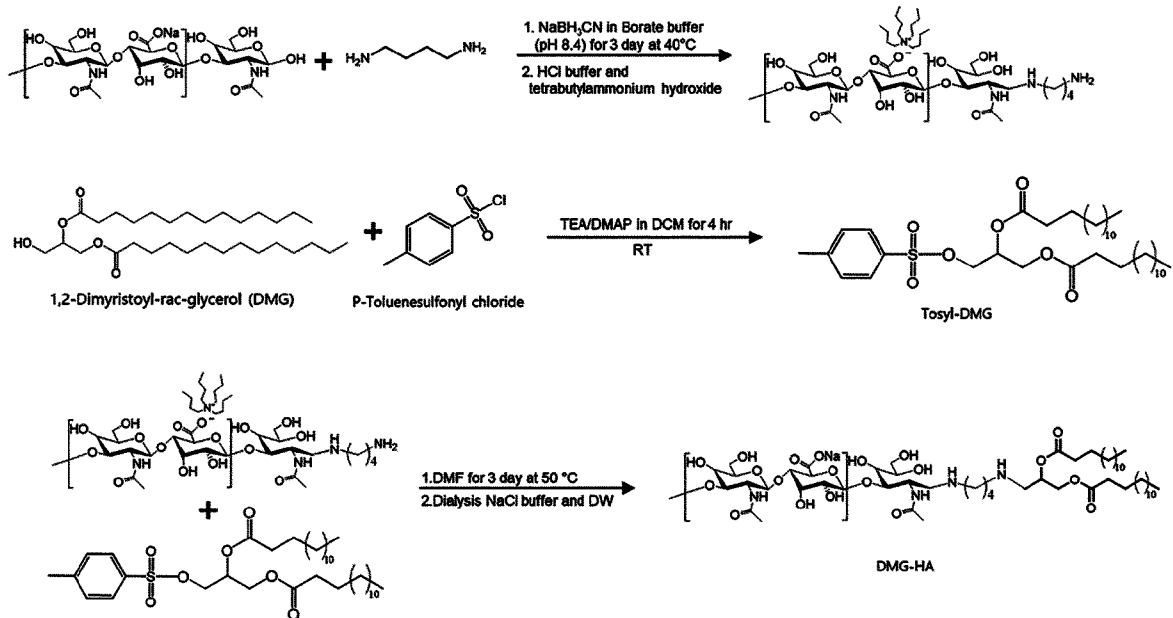
[도3a]



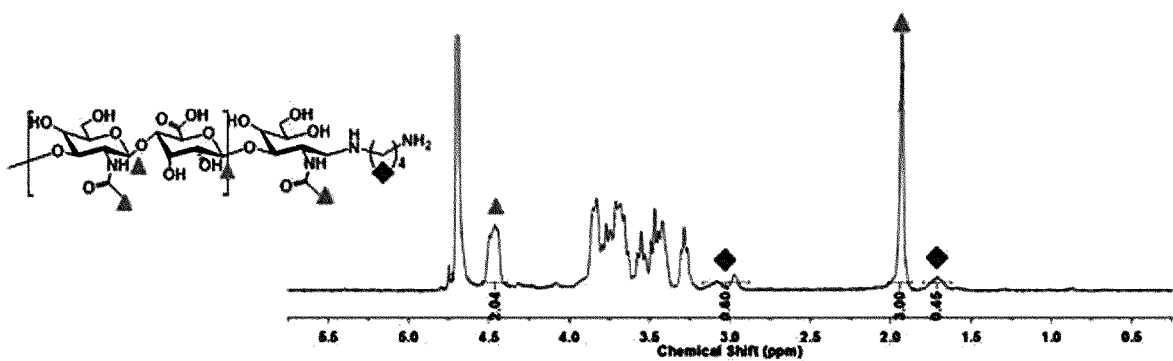
[도3b]



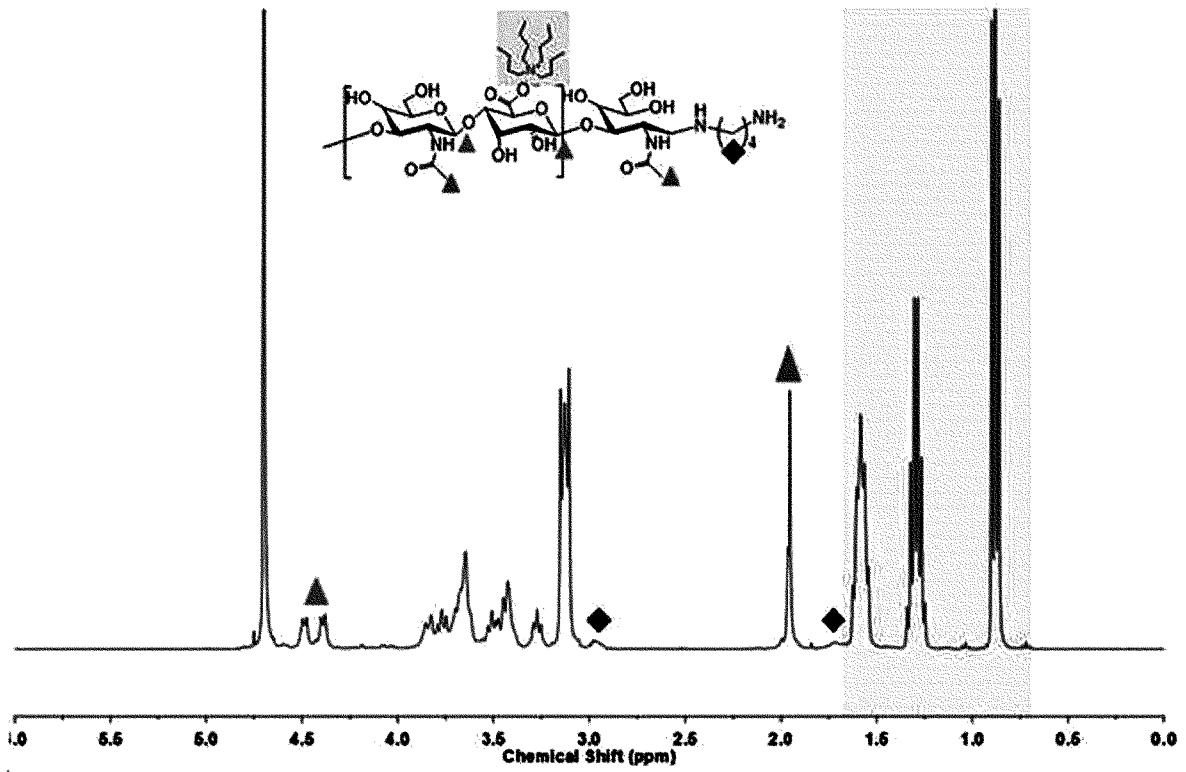
[도4]



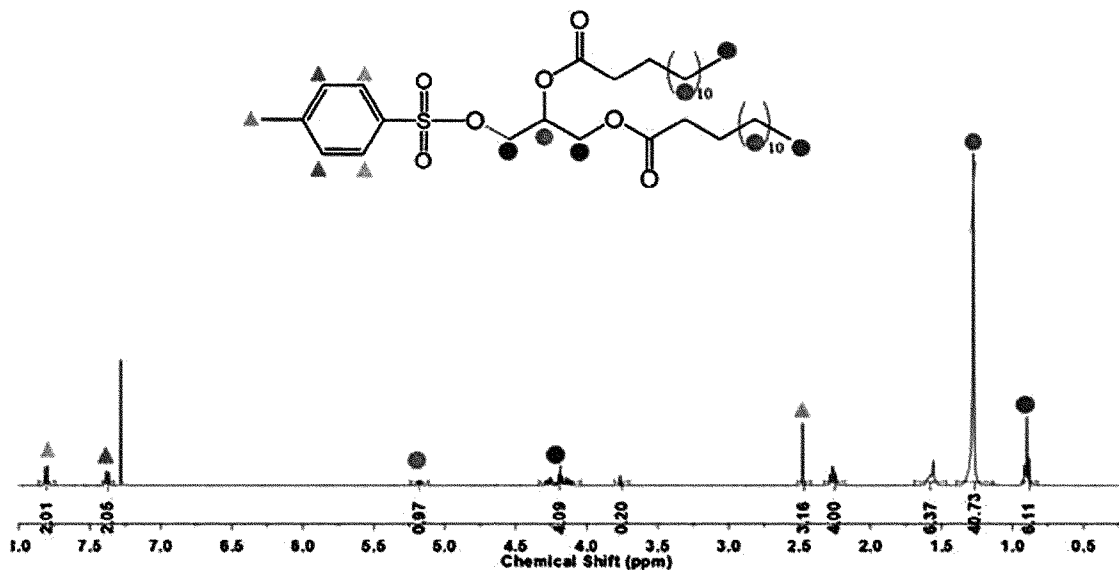
[도5]



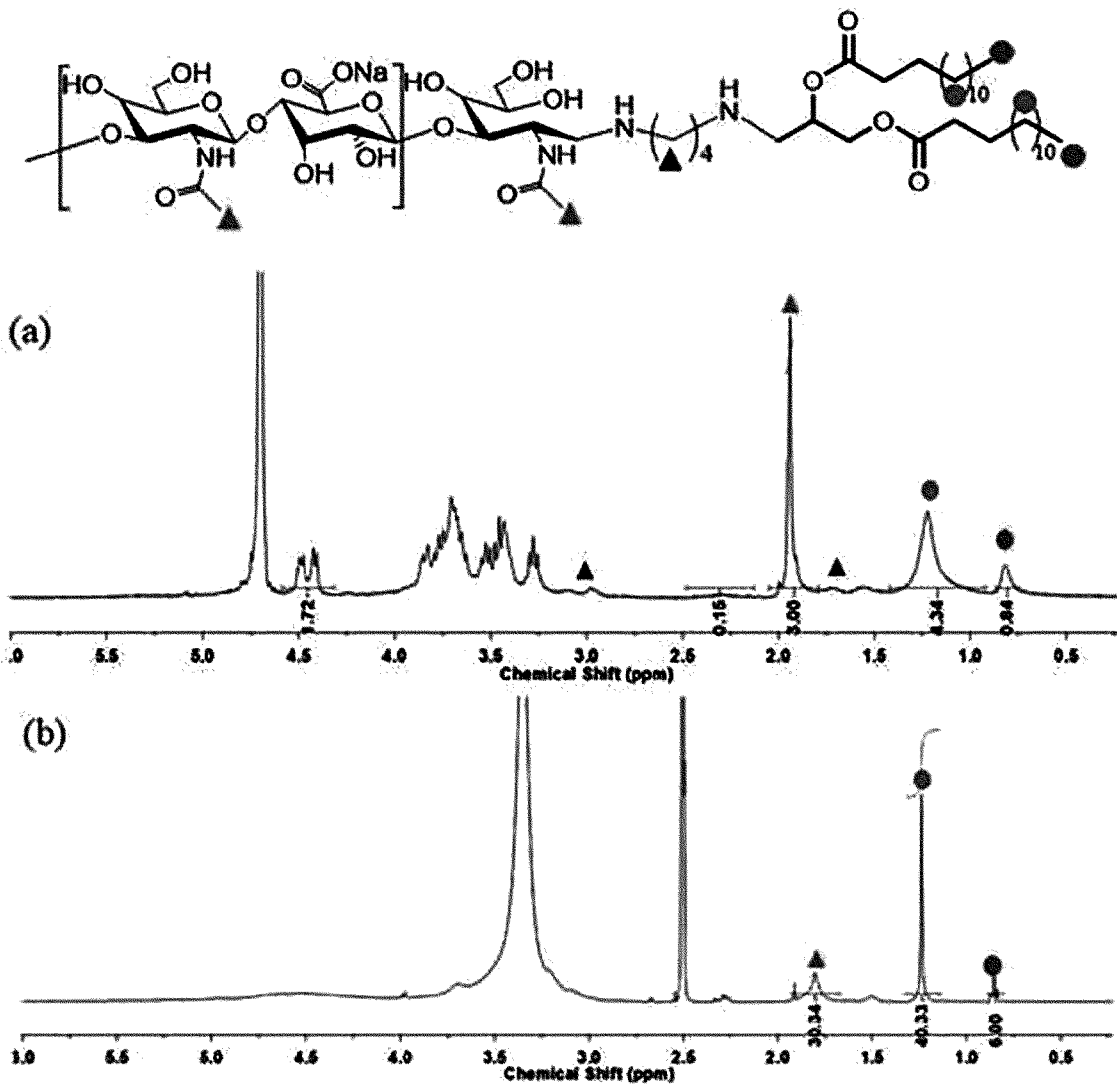
[도6]



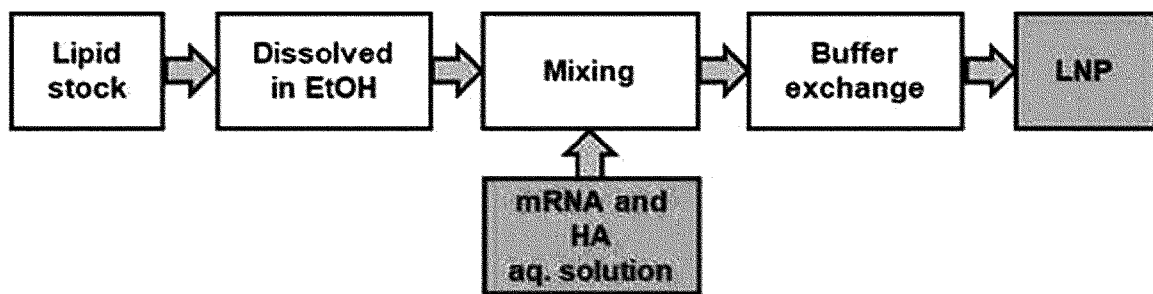
[도7]



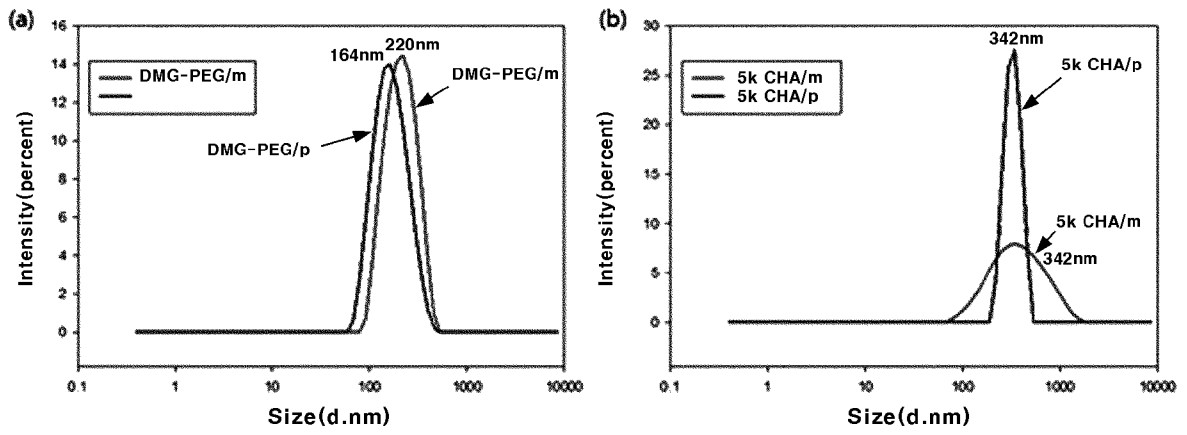
[도8]



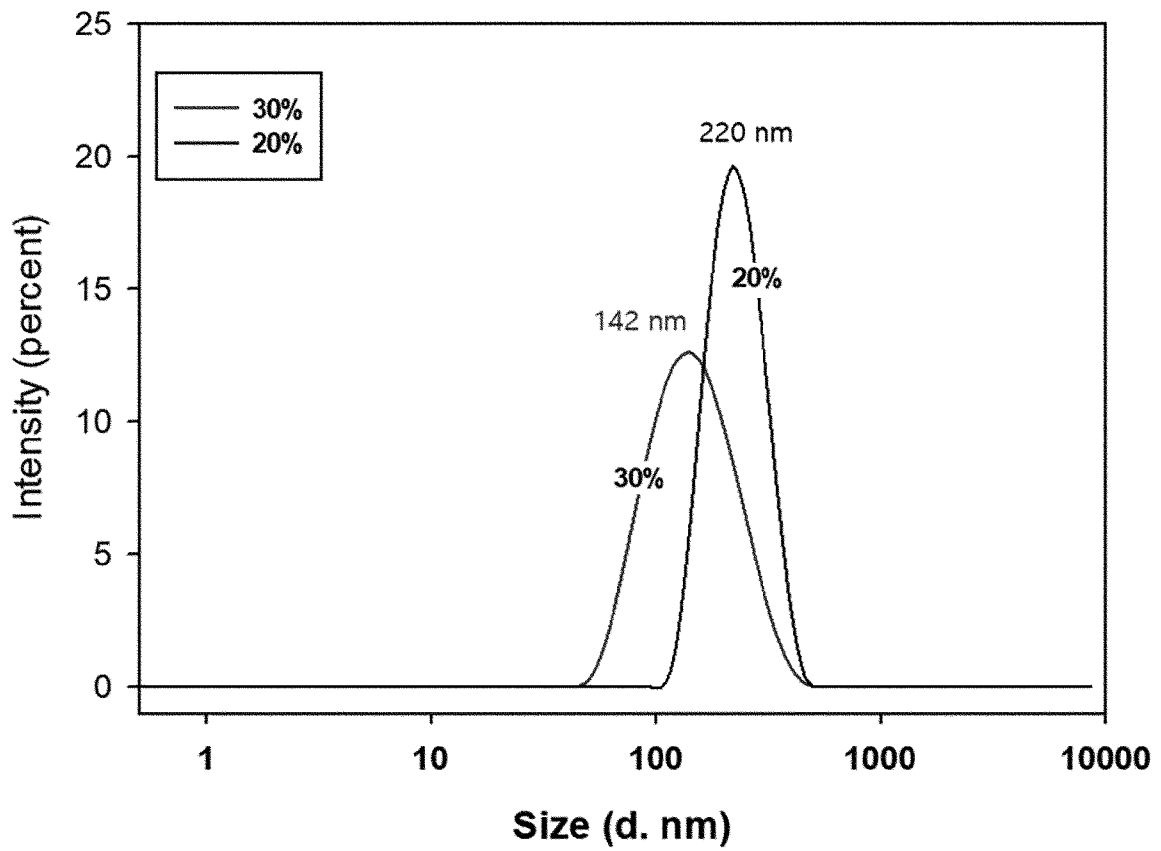
[도9]



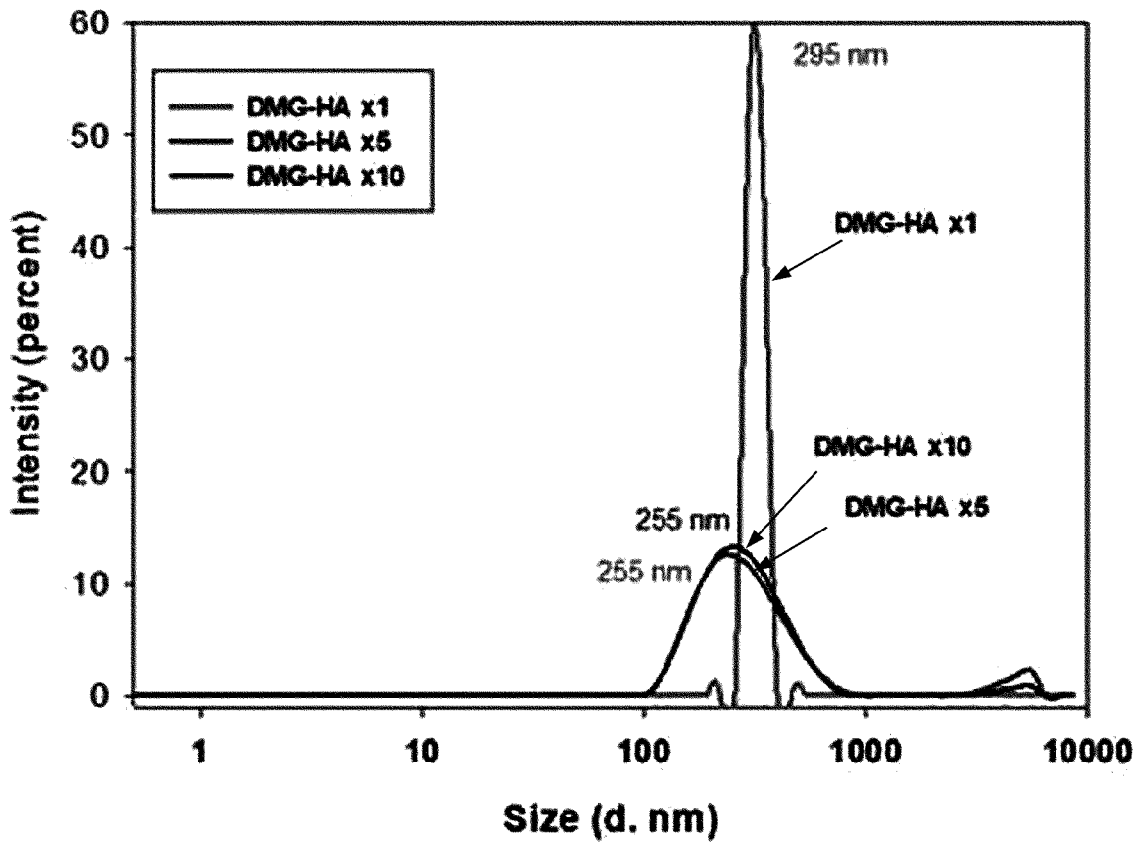
[도 10]



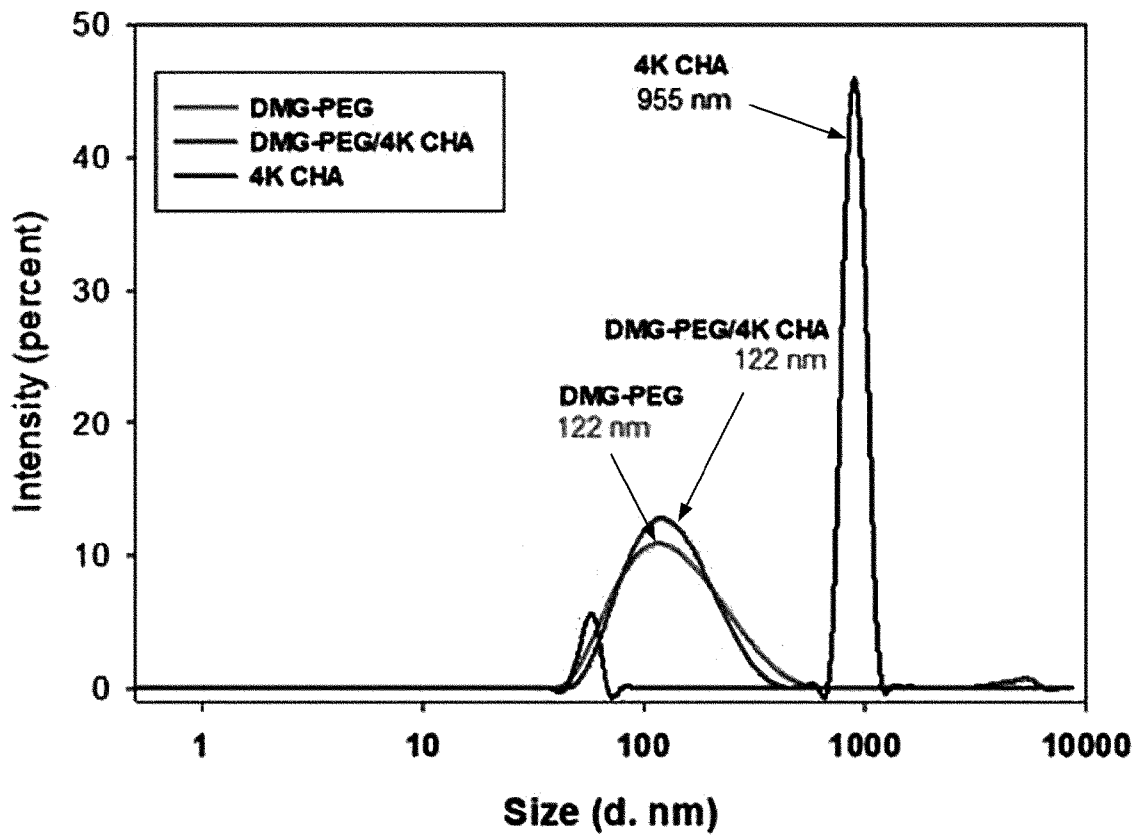
[도 11]



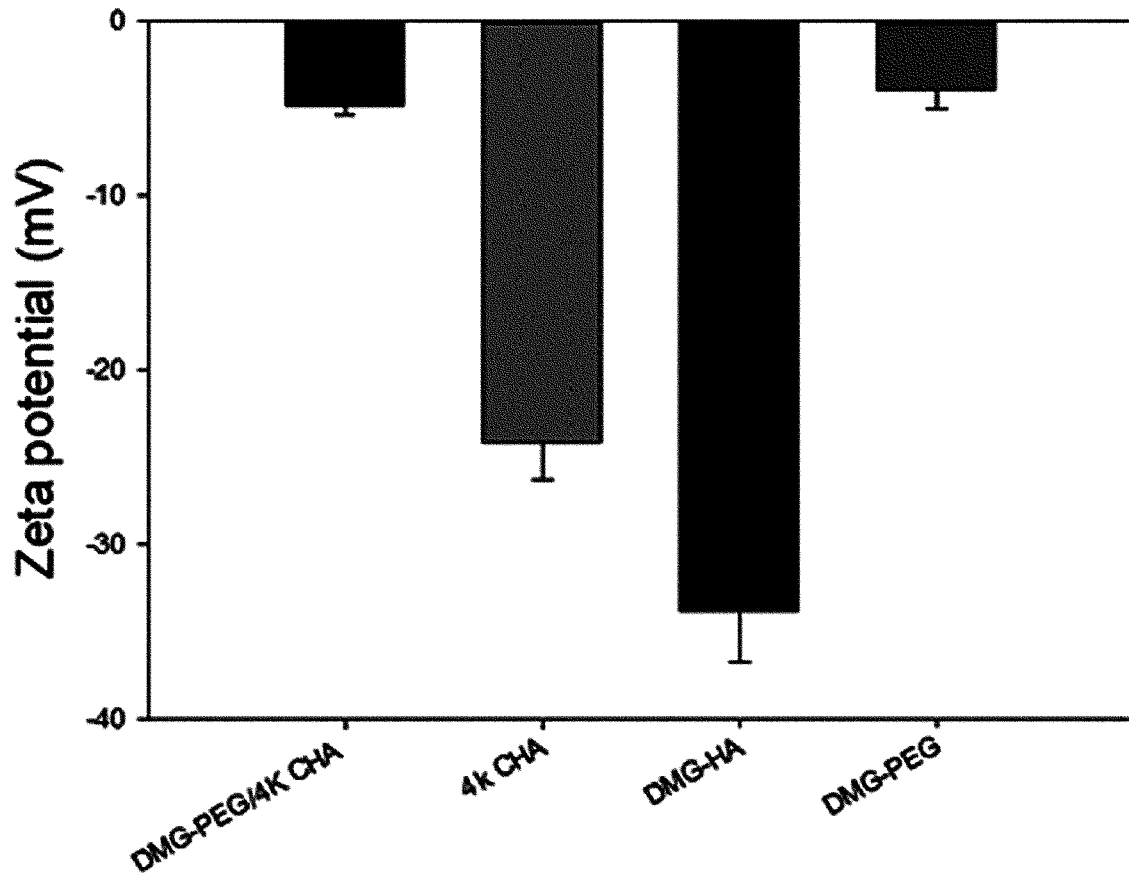
[도12]



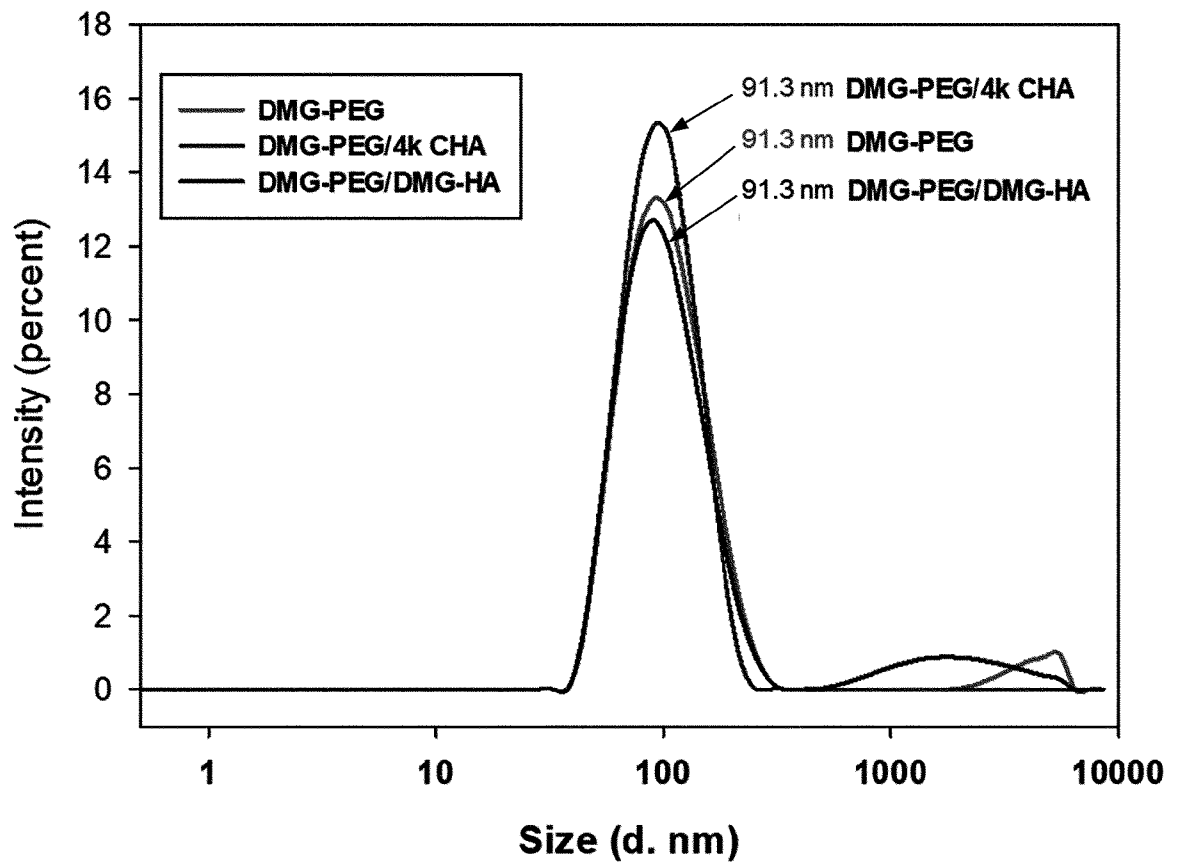
[도13]



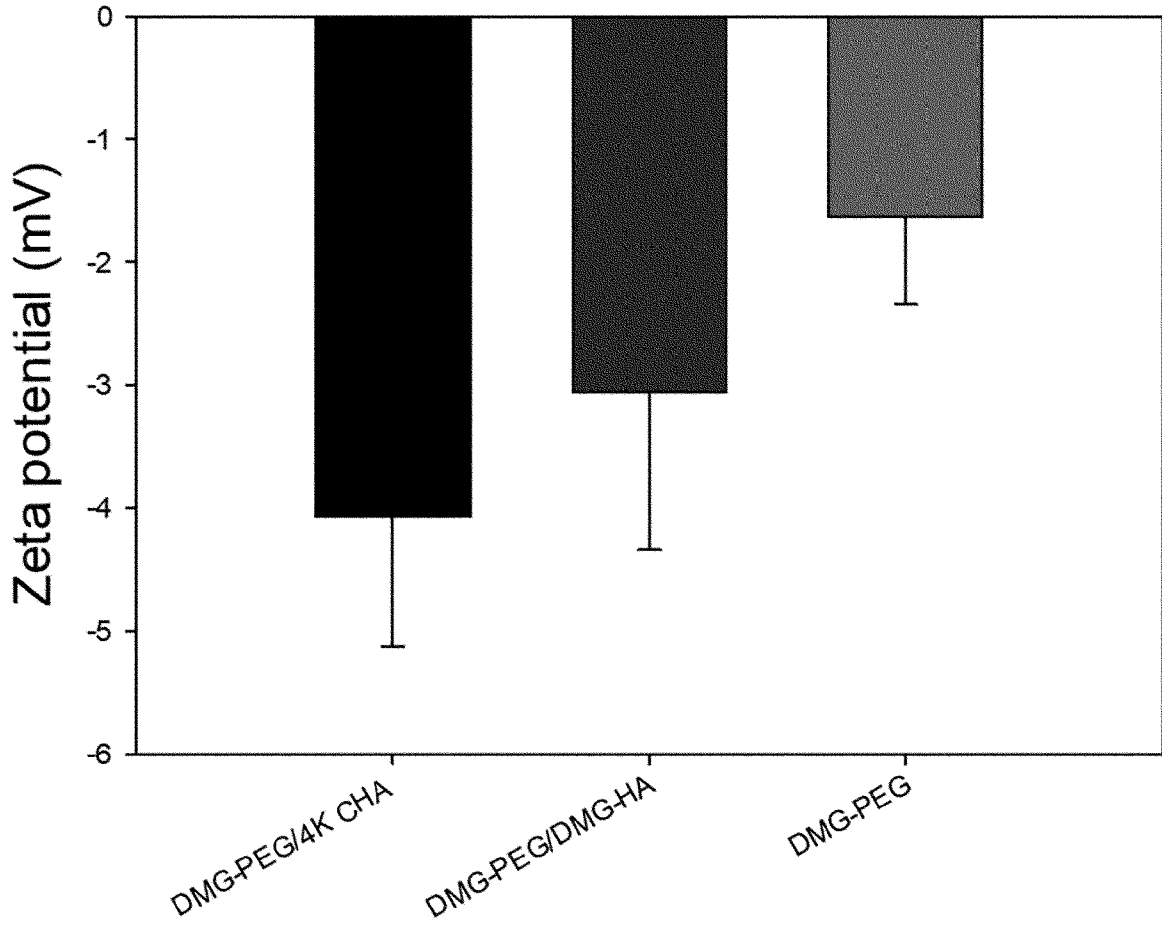
[도14]



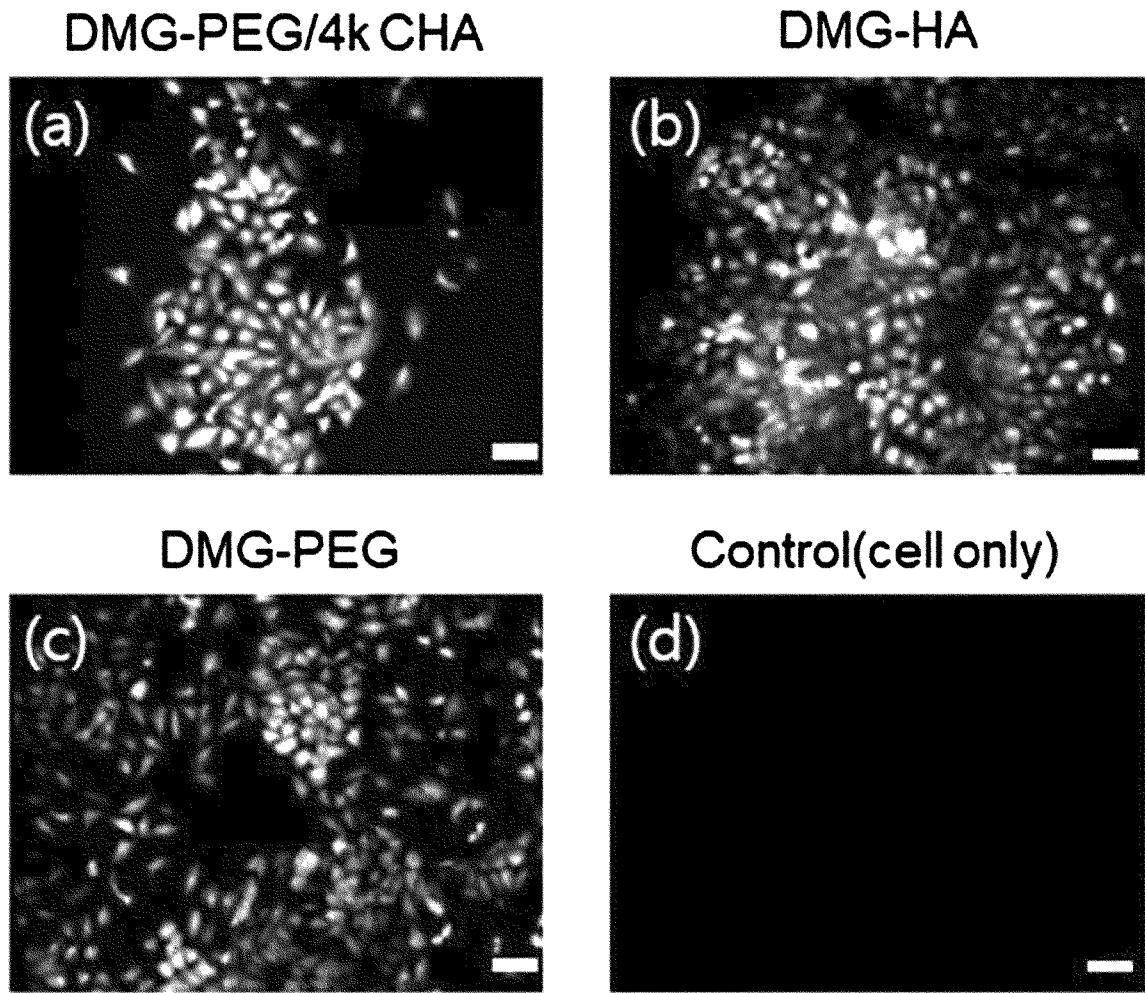
[도15]



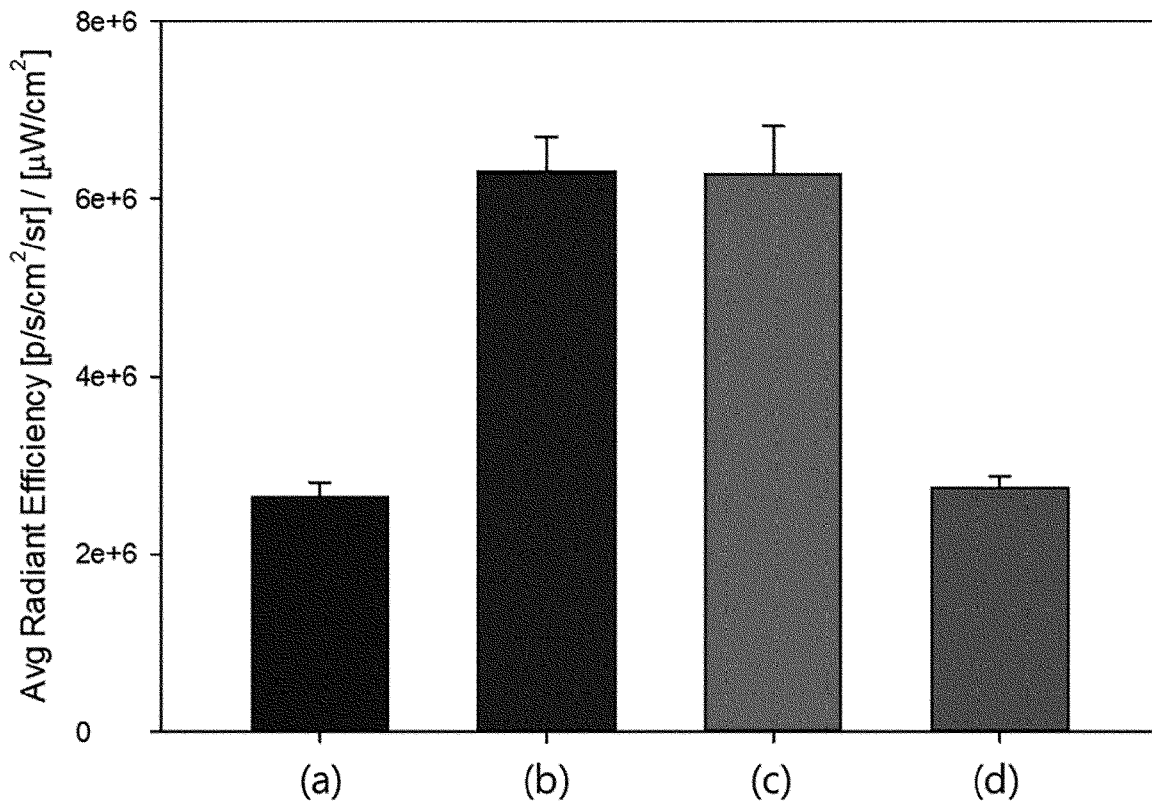
[도16]



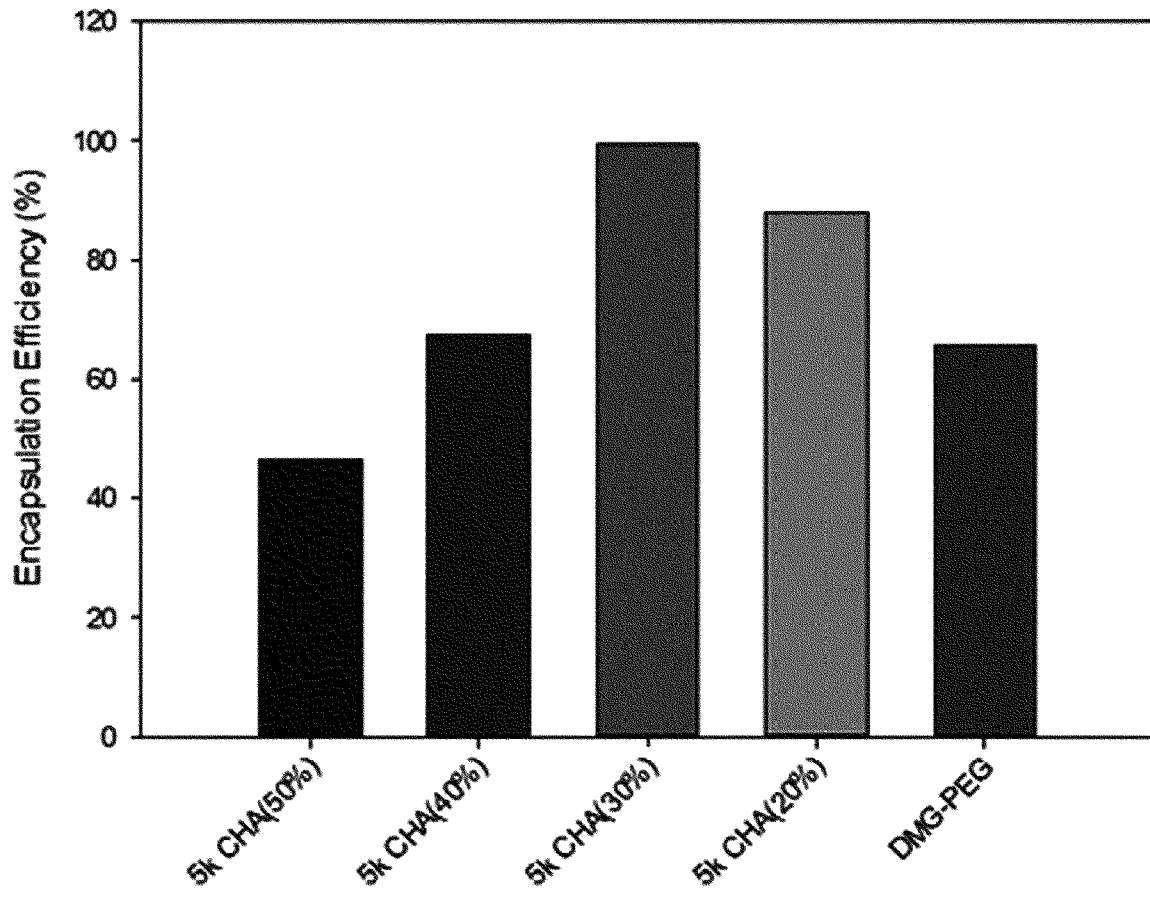
[도17]



[도18]



[도 19]



[도20]

