

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 12월 5일 (05.12.2019)



(10) 국제공개번호

WO 2019/231051 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 45/06 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/010309

(22) 국제출원일:

2018년 9월 4일 (04.09.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0063163 2018년 6월 1일 (01.06.2018) KR

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

(72) 발명자: 김현철 (KIM, Hyun Cheol); 07344 서울시 영등포구 63로 7, B동 501호, Seoul (KR). 김도연 (KIM, Do Yeon); 02831 서울시 성북구 성북로4길 52, 110동 705호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김현진 (KIM, Hyun Jin); 06142 서울시 강남구 테헤란로37길 7, 조이타워 301호 (대신국제특허법률사무소), Seoul (KR).

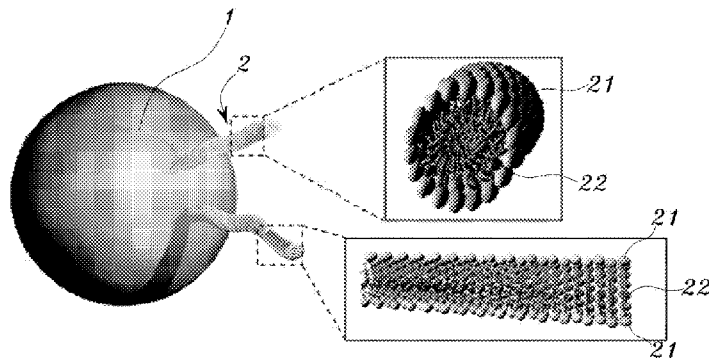
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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

(54) Title: NANOPARTICLE COMPOSITE SHOWING IMPROVED ENDOCYTOSIS EFFICIENCY THROUGH SURFACE MODIFICATION USING LIPID AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 지질을 이용한 표면 개질을 통해 세포 내 섭취 효율을 향상시킨 나노입자 복합체 및 이의 제조방법

[도1]



(57) Abstract: The present invention relates to a nanoparticle composite, which is endocytosed into cells and used to treat a disease, and to a manufacturing method therefor. More specifically, the present invention relates to a nanoparticle composite and a manufacturing method therefor, wherein the nanoparticle composite shows improved endocytosis efficiency by modifying the nanoparticle surface with a lipid-based material having high stability and excellent biocompatibility; the nanoparticle composite can attain direct passage through the cellular membrane as well as endocytosis, and can be effectively endocytosed into spheroid-shaped tumor cells, by having a tube-shaped lipid structure combined with a portion of the nanoparticle surface; and the nanoparticle composite can be easily mass-produced by using a top-down manner, in which, the lipid structure is not attached directly to the nanoparticle, but the binding of the nanoparticle and the lipid-based lipidome (bubble, liposome, etc.) is induced, and then the physical force is applied thereto to disrupt the lipidome, thereby forming the lipid structure on the nanoparticle surface.

[다음 쪽 계속]

WO 2019/231051 A1

(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))

(57) 요약서: 본 발명은 세포 내에 섭취되어 질병의 치료에 이용되는 나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 리피드 기반 물질로 나노입자 표면을 개질함으로써 세포 내 섭취 효율이 향상되고, 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체가 결합하여 엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있으며, 스피어로이드 형태의 중앙 세포에 효과적으로 섭취될 수 있고, 지질구조체를 나노입자에 직접 부착하지 않고 지질 기반의 지질체(버블, 리포솜 등)와 나노입자를 결합시킨 후 물질적인 힘을 가해 지질체가 파쇄되어 나노입자 표면에 지질구조체가 형성되도록 하는 Top-down 방식을 이용하므로 용이하게 대량 생산이 가능한 나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 지질을 이용한 표면 개질을 통해 세포 내 섭취 효율을 향상시킨 나노입자 복합체 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 세포 내에 섭취되어 질병의 치료에 이용되는 나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 리피드 기반 물질로 나노입자 표면을 개질함으로써 세포 내 섭취 효율이 향상되고, 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체가 결합하여 엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있으며, 스피어로이드 형태의 종양 세포에 효과적으로 섭취될 수 있고, 지질구조체를 나노입자에 직접 부착하지 않고 지질 기반의 지질체(버블, 리포솜 등)와 나노입자를 결합시킨 후 물질적인 힘을 가해 지질체가 파쇄되어 나노입자 표면에 지질구조체가 형성되도록 하는 Top-down 방식을 이용하므로 용이하게 대량 생산이 가능한 나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 약물전달 분야에서 세포 내 섭취 효율은 약물전달 효능을 달성하기 위한 중요한 척도가 된다. 따라서, 세포 내 섭취 효율 향상을 달성하기 위한 기술이 널리 개발되고 있다. 일 예로 하기 특허문헌에 기재된 것처럼 나노입자에 세포투과성 펩타이드 등을 화학적으로 결합시켜 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키고자 하고 있다.
- [3] <특허문헌>
- [4] 공개특허공보 제10-2017-0040748호(2017. 04. 13. 공개) "다중 블럭 폴리펩타이드를 포함하는 약물전달체 및 자가조립 나노구조체"
- [5] 하지만, 종래의 세포 내 섭취 효율 향상을 달성하기 위한 기술은 충분한 효과를 얻을 수 없으며, 결합된 물질이 쉽게 분해되어 안정성이 떨어지는 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,
- [7] 본 발명은 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 리피드 기반 물질로 나노입자 표면을 개질함으로써 세포 내 섭취 효율을 비약적으로 향상시킨 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [8] 또한, 본 발명은 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체가 결합하여, 엔도시토시스(100 내지 200nm 사이즈의 입자가 세포 내에 섭취되는 기작임)뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있는 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [9] 또한, 본 발명은 조직 페네トレー션(tissue penetration) 능력으로 인해

스피어로이드 형태의 종양 세포 내에 나노입자를 효과적으로 섭취시킬 수 있는 나노입자 복합체 제공하는데 그 목적이 있다.

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

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.
- [12] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체는 세포 내에 섭취되어 질병의 치료에 이용되는 나노입자와, 상기 나노입자의 외표면 일부분에 결합하여 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 지질 기반의 지질구조체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [13] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자는 100 내지 300nm의 직경을 가지며, 상기 지질구조체는 50 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [14] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 지질구조체는 친수성을 띄는 지질 헤드가 외측면에 위치하고 내부에 소수성을 띄는 지질 꼬리가 위치하여 전체적으로 길이가 긴 튜브 형태를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [15] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자는 제1반응기를 포함하고, 상기 지질구조체는 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하는 제2반응기를 포함하여, 제1반응기와 제2반응기가 화학 결합함으로써 지질구조체가 나노입자에 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [16] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자는 외표면에 제1반응기가 위치하고, 상기 튜브 형태의 지질구조체는 일단에 제2반응기가 위치하여, 상기 제1반응기와 제2반응기가 화학 결합함으로써 튜브 형태의 지질구조체가 상기 나노입자의 외표면에 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [17] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자는 약물을 담지하거나 질병을 치료할 수 있는 물질로 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자 복합체는 엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통하여 세포 내에 섭취될 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서

상기 지질구조체는 스피어로이드 형태 종양 세포의 조직 내까지 상기 나노입자의 조직 페네트레이션을 향상시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.

[20] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체에 있어서 상기 나노입자는 항암제를 포함하며, 종양 세포의 사멸 효율을 향상시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.

[21] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체의 제조방법은 제1반응기가 존재하는 나노입자를 형성하는 나노입자형성단계와, 상기 제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 인지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질체를 형성하는 지질체형성단계와, 상기 나노입자와 지질체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록 하여 지질체의 외면에 나노입자가 결합한 지질체-나노입자 복합체를 형성하는 지질복합체형성단계와, 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘을 가해 지질체를 파쇄하여 나노입자의 외표면 일부분에 결합한 지질구조체를 형성하여 나노입자 복합체를 제조하는 파쇄형성단계를 포함하며, 상기 지질체는 버블 또는 리포솜이고, 상기 나노입자는 세포 내에 섭취되어 질병의 치료에 이용되며, 상기 지질구조체는 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 것을 특징으로 한다.

[22] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 나노입자 복합체의 제조방법에 있어서 상기 파쇄형성단계에서는 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘을 가하고 일정 시간 유지하여, 지질체가 파쇄되며 지질체를 이루는 인지질은 재조합이 일어나 나노입자에 결합한 튜브 형태의 지질구조체가 형성되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[23] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.

[24] 본 발명은 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 리피드 기반 물질로 나노입자 표면을 개질함으로써 세포 내 섭취 효율을 비약적으로 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

[25] 또한, 본 발명은 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체가 결합하여, 엔도시토시스(100 내지 200nm 사이즈의 입자가 세포 내에 섭취되는 기작임)뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있는 효과가 있다.

[26] 또한, 본 발명은 조직 페네트레이션(tissue penetration) 능력으로 인해 스피어로이드 형태의 종양 세포 내에 나노입자를 효과적으로 섭취시킬 수 있는 효과가 있다.

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

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 모식도.
- [29] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 TEM 이미지.
- [30] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 Cryo-TEM 이미지.
- [31] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체에 결합하는 지질구조체의 Cryo-TEM 이미지.
- [32] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 분석결과를 나타내는 도표.
- [33] 도 6 및 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 confocal microscope 이미지.
- [34] 도 8은 Endocytosis Inhibitor를 처리한 후의 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 분석결과를 나타내는 도표.
- [35] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 항암제 전달체로의 효능 확인하기 위한 cell viability assay 결과를 나타내는 도표.
- [36] 도 10 및 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 유전체 약물 전달체로의 효능을 확인하기 위한 gene silencing 결과를 나타내는 도면.
- [37] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노입자 복합체의 스피로이드 종양 세포 모델에서의 세포 섭취 효율을 확인하기 위한 confocal microscope 이미지.
- [38]
- [39] *도면에 사용되는 부호의 설명
- [40] 1: 나노입자 2: 지질구조체
- [41] 21: 지질 헤드 22: 지질 꼬리

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [42] 이하에서는 본 발명에 따른 지질을 이용한 표면 개질을 통해 세포 내 섭취 효율을 향상시킨 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적인 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [43]
- [44] 본 발명의 일 실시예에 따른 지질을 이용한 표면 개질을 통해 세포 내 섭취

효율을 향상시킨 나노입자 복합체를 도 1 내지 12를 참조하여 설명하면, 상기 나노입자 복합체는 세포 내에 섭취되어 질병의 치료에 이용되는 나노입자(1)와, 상기 나노입자(1)의 외표면 일부분에 결합하여 나노입자(1)의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 지질 기반의 지질구조체(2) 등을 포함한다.

[45]

[46] 상기 나노입자(1)는 세포 내에 섭취되어 질병의 치료에 이용되는 구성으로, 약물을 담지하거나 질병을 치료할 수 있는 물질로 이루어지게 되는데, 세포 내에 섭취되어 질병에 치료에 이용되는 종래의 다양한 나노입자가 사용될 수 있으며, 예컨대 약물(siRNA를 포함하는 개념)을 담지한 알부민 나노입자, 약물을 담지한 생분해성 고분자 나노입자, 특정 단백질의 발현을 억제하는 siRNA 나노입자 등을 예로 들 수 있다. 상기 나노입자는 예컨대 100 내지 300nm의 직경 및 구형의 형태를 가질 수 있다. 상기 나노입자는 지질구조체와 결합하는 화학 반응기(이하, '제1반응기'라 함)를 포함할 수 있다. 예컨대, 제1반응기로는 싸이올기, 아민기, 아미노기, 카르복시기 등을 포함하는 화합물일 수 있다.

[47]

[48] 상기 지질구조체(2)는 나노입자(1)의 외표면 일부분에 결합하여 나노입자(1)의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 지질 기반의 구조체로, 상기 지질구조체는 예컨대 50 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가질 수 있으며, 상기 나노입자의 외표면에 하나 이상이 결합될 수 있다. 또한, 상기 지질구조체는 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하는 화학 반응기(이하, '제2반응기'라 함)를 포함할 수 있다. 예컨대, 제2반응기로는 싸이올기, 아민기, 아미노기, 카르복시기 등을 포함하는 화합물일 수 있다.

[49]

상기 지질구조체는 예컨대 친수성을 띄는 지질 헤드(21)가 외측면에 위치하고 내부에 소수성을 띄는 지질 꼬리(22)가 위치하여 전체적으로 길이가 긴 튜브 형태를 가질 수 있으며, 튜브 형태의 지질구조체 일단에 위치하는 제2반응기기가 상기 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하여 튜브 형태의 지질구조체가 상기 나노입자(1)의 외표면에 결합하게 된다. 예를 들어, 나노입자를 알부민 나노입자이고, 상기 지질구조체에 NHS(N-hydroxysuccinimide) 반응기를 형성하는 경우, NHS-amine 반응을 통해 상기 나노입자(1)와 지질구조체(2)를 결합시킬 수 있다. 본 발명은 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 리피드 기반 물질로 나노입자 표면을 개질함으로써 세포 내 섭취 효율을 비약적으로 향상시킬 수 있으며, 100 내지 200nm 사이즈의 나노입자가 세포 내에 섭취되는 기작은 엔도시토시스인데, 상기 나노입자 복합체는 나노입자 표면의 일 부분에 튜브 형태의 지질구조체가 결합하여, 엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통할 수 있으며, 스피어로이드 형태의 종양 세포를 효과적으로 섭취되어 생체 모델에도 적용할 수 있다.

[50]

[51] 본 발명의 다른 실시예에 따른 나노입자 복합체의 제조방법을 설명하면, 상기

나노입자 복합체의 제조방법은 제1반응기가 존재하는 나노입자를 형성하는 나노입자형성단계와, 상기 제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질체(버블, 리포솜 등)을 형성하는 지질체형성단계와, 상기 나노입자와 지질체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록 하여 지질체의 외면에 나노입자가 결합한 지질체-나노입자 복합체를 형성하는 지질복합체형성단계와, 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘(mechanical force)을 가해 지질체를 파쇄하여 나노입자의 외표면 일부분에 결합한 지질구조체를 형성하는 파쇄형성단계 등을 포함한다.

- [52] 상기 나노입자형성단계는 세포 내에 섭취되어 질병에 치료에 이용되는 나노입자가 제1반응기를 포함하도록 상기 나노입자를 형성하는 단계로, 종래의 다양한 나노입자를 제조하는 방법이 사용될 수 있으며, 예컨대 약물을 담지한 알부민 나노입자의 경우 알부민에 아민기가 존재하여 제1반응기로 이용될 수 있으며, 특정 단백질의 발현을 억제하는 siRNA 나노입자의 경우 siRNA 나노입자에 아민이 붙어 있는 히알루론산을 코팅하여 siRNA 나노입자에 제1반응기를 형성할 수 있다.
- [53] 상기 지질체형성단계는 상기 제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질체(버블, 리포솜 등)를 형성하는 단계로, 예컨대 버블은 지질(예컨대, 인지질)로 형성되고 내부에 가스가 충전되어 있으며 상기 버블의 외면에 제2반응기가 위치하게 된다. 내부에 가스를 가지고 인지질로 이루어진 리포솜 형태의 마이크로 사이즈의 버블은 종래의 제조방법에 의해 제조될 수 있으며, 예컨대 제2반응기가 결합한 인지질과 제2반응기가 결합하지 않은 인지질을 유기용매에 일정 비율로 혼합하여 지질필름을 형성하고, 상기 지질필름을 용매에 녹이고 가스를 주입하여 형성할 수 있다.
- [54] 상기 지질복합체형성단계는 상기 나노입자와 지질체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록 하여 지질의 외면에 나노입자가 결합한 지질체-나노입자 복합체를 형성하는 단계이다.
- [55] 상기 파쇄형성단계는 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘(mechanical force)을 가해 지질체를 파쇄하여 나노입자의 외표면 일부분에 결합한 지질구조체를 형성하는 단계이다. 지질체-나노입자 복합체에 초음파 기기 등을 이용하여 기계적인 힘을 가하고 일정 시간 유지하는 경우, 지질체가 파쇄되며 지질체를 이루는 인지질은 재조합이 일어나 나노입자에 결합한 튜브 형태의 지질구조체가 형성되게 된다. 본 발명은 지질구조체를 나노입자에 직접 부착하지 않고 지질 기반의 지질체와 나노입자를 결합시킨 후 기계적인 힘을 가해 지질체가 파쇄되어 나노입자 표면에 지질구조체가 형성되도록 하는 Top-down 방식을 이용하므로 용이하게 대량 생산이 가능하도록 할 수 있다.

[56]

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

[58]

[59] <실시예 1> 나노입자 복합체의 제조

[60] 1. 나노입자(NPs)의 형성

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

[62] 2. 리포솜의 형성

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

[64] 3. 지질을 이용한 버블의 형성

[65] 실시예 1의 2의 과정을 거쳐 얻은 결과물에, C₃F₈ gas를 30초간 vial에 채워, Vial Mixer를 이용하여 45초간 mixing 시켜 NHS 반응기를 포함하는 지질 기반의 버블을 형성하였다.

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

[67] (1) 실시예 1의 1에서 형성된 나노입자를 리포솜 용액(실시예 1의 2에서 형성된 리포솜이 PBS에 1mg/ml의 농도로 혼합되어 형성)에 넣어준 후, NHS-amine 반응을 유도하기 위해 RT에서 2시간 이상 반응시킨 후(이때, 리포솜-나노입자 복합체(Liposome-NPs)가 형성됨), 초음파 기기를 이용하여 2W, 1MHZ, duty cycle

100% 조건으로 5분 이상 mechanical force를 가하였다. 이후, 파쇄된 리포솜이 지질구조체를 충분히 형성할 수 있도록, 1시간 이상 RT에서 incubation하여 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)를 형성하였다.

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

[69]

[70] <실시예 2> 나노입자 복합체의 특성 확인

- [71] 1. 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (2)에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)를 TEM으로 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었고, 상기 나노입자 복합체 및 지질구조체를 Cryo-TEM으로 측정하여 그 결과를 각각 도 3 및 4에 나타내었다.

- [72] 2. 도 2를 보면, 나노입자의 경우 표면이 매끈한 것을 확인할 수 있는데 반해, 나노입자 복합체는 지질구조체가 나노입자의 표면에 붙어 있어 표면이 매끈하지 않은 것을 알 수 있다. 또한, 도 3을 보면 나노입자의 표면에 튜브 형태의 지질구조체가 붙어 있음을 알 수 있고, 도 4를 보면 상기 지질구조체는 튜브 형태를 가짐을 더욱 명확히 할 수 있다. 또한, 도 3 및 4를 보면, 나노입자는 100 내지 300nm의 직경을 가지며, 상기 지질구조체는 50 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가짐을 알 수 있고, 상기 지질구조체는 상기 나노입자의 외표면에 하나 이상이 결합될 수 있음을 알 수 있다.

[73]

[74] <실시예 3> 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율 평가

- [75] 1. 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (2)에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)에 대한 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용하여 분석하여 그 결과를 도 5에 나타내었으며, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 6에 나타내었다. 유세포 측정기를 이용한 분석은 A549 세포(1×10^4)에 Alexa 488 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리하여 수행하였고, 공초점 현미경을 이용한 분석은 DAPI를 이용하여 핵이 염색되고 Phalloidin을 이용하여 세포 골격(cytoskeleton)이 염색된 A549 세포(1×10^5)에 Cy5.5 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리하여 수행하였다.

- [76] 2. 또한, 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (1)에서 형성한 리포솜-나노입자 복합체(Liposome-NPs), 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)에 대한 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 7에 나타내었다. 공초점 현미경을 이용한 분석은 DAPI를 이용하여 핵이 염색된 A549 세포(1×10^5)에 Alexa 555 형광 dye가 표지된 나노입자, 리포솜-나노입자 복합체 및 나노입자 복합체를 처리하여 수행하였다.

- [77] 2. 도 5를 보면 나노입자 복합체가 나노입자에 비해서 세포 섭취 효능이 월등히 뛰어남을 알 수 있고, 도 6을 보면 나노입자 대신에 나노입자 복합체의 사용 시 세포 내에서 더 많은 붉은색을 띄는 것을 알 수 있어 형광 이미지를 이용한 실험에서도 도 5와 같은 결과를 확인할 수 있다. 또한, 도 7을 보면, 나노입자 복합체가 나노입자나 리포좀-나노입자 복합체에 비해서 세포 섭취 효능이 월등히 뛰어남을 확인할 수 있어, 지질로 이루어진 버블 뿐만 아니라 리포좀 혹은 다른 지질 구형체로도 나노입자 복합체가 형성될 수 있음을 알 수 있다.
- [78]
- [79] <실시예 4> Endocytosis Inhibitor를 처리한 후의 나노입자 복합체의 세포 섭취 효율 평가
- [80] 1. Endocytosis Inhibitor를 처리한 세포에 대하여, 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (2)에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)의 세포 섭취 효율을 평가하였다. 200nm 사이즈의 나노입자는 크게 macropinocytosis, clathrin-independent endocytosis, clathrin-dependent endocytosis의 총 세 가지 기작에 세포 내 섭취가 이루어진다고 알려져 있으므로, 이를 inhibition하는 inhibitor를 선정하여 먼저 A549 세포(1×10^4)를 각각 또는 동시에 1시간 처리한 후, Alexa 488 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 3시간 처리하고 유세포 측정기를 이용하여 측정하였다. 측정 결과에 대해 나노입자를 기준으로 normalize하여 도 8에 나타내었다. Macropinocytosis inhibitor로는 EIPA(5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride)를 선정(25ug/ml의 농도)하여 Na^+/H^+ exchange 기작을 방해하고, Clathrin-dependent endocytosis inhibitor로는 CPZ(chlorpromazine) 선정(20ug/ml의 농도)하여 inhibits clathrin-coated pit formation을 방해하고, Clathrin-independent endocytosis inhibitor로는 M β CD(methyl- β -cyclodextrin)을 선정(3mg/ml의 농도)하여 cholesterol-dependent endocytic process를 방해하였다.
- [81] 2. 도 8을 보면, 나노입자의 경우(NPs), CPZ, EIPA inhibitor로 인해 세포 섭취 효능이 크게 감소함을 확인할 수 있고, 세 가지 종류의 inhibitor를 모두 처리하여 endocytosis 기작을 모두 방해하였을 때 나노입자의 세포 섭취가 거의 이루어지지 않음을 알 수 있으며, 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)의 경우 세포 섭취 효능이 나노입자와 비교했을 때 350% 정도 더 뛰어난 것을 확인할 수 있고, 세 가지 종류의 inhibitor로 endocytosis 기작을 모두 방해하였을 때도 나노입자보다 세포 섭취 효능이 뛰어난 것을 관찰할 수 있다. 이를 통해, 나노입자 복합체는 endocytosis뿐만 아니라, 세포막을 direct penetration을 통해 직접적으로 통과한다는 것을 확인할 수 있다.
- [82]
- [83] <실시예 5> 나노입자 복합체의 항암제 전달체로의 효능 평가
- [84] 1. 알부민 용액에 독소루비신(doxorubicin)이 혼합된 용액을 첨가하여 반응시킨 후 혼합 용액이 탁해질 때까지 에탄올 적정을 수행한 것을 제외하고는 실시예

1의 1 및 실시예 1의 4의 (2)와 동일하게 하여, 독소루비신 함유 나노입자, 독소루비신 함유 나노입자 복합체를 형성하고, 항암 저항성을 가진 유방암 세포주인 MCF-7/ADR을 well plates에 시드하고, 각각 독소루비신(100mM, DOX), 독소루비신 함유 나노입자(100mM의 독소루비신 포함)와 독소루비신 함유 나노입자 복합체(100mM의 독소루비신 포함)을 포함하는 배지를 가지고 37°C에서 6시간 배양한 후, 상기 세포주를 노멀 배지(normal media)를 가지고 48시간 동안 배양하여 Cell viability를 수행하여 그 결과를 도 9에 나타내었다. Cell viability는 MTT assay와 trypan blue dye exclusion method를 이용하는데, Cell viability는 0.4% trypan blue dye를 가진 세포를 배양하고 Neubauer hemocytometer로 카운팅하는 것에 의해 결정된다. MTT assay에서 96-well plates와 1.5mg/ml MTT reagent(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 사용되며, 15ul의 MTT reagent를 가지고 2시간 배양한 후 200ul의 DMSO가 각 well에 추가되고, Resulting culture plates는 plate reader(Bio Tek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA)로 570nm에서 측정하였다

- [85] 2. 도 9를 보면, 같은 농도의 독소루비신을 유방암 세포에 처리하였을 때, 나노입자 복합체를 이용할 경우 일반 암세포뿐만 아니라, 항암제 대한 항암저항성을 가진 세포에서도 항암제에 의한 세포 사멸 효과를 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

[86]

- [87] <실시예 6> 나노입자 복합체의 유전체 약물 전달체로의 평가

- [88] 1. 알부민(Human serum albumin)을 0.1mM HEPES with 0.01mM EDTA에 40mg/mL의 농도로 녹여 준 후, thiol-modify VEGF siRNA duplex(5' modified)를 넣고, 알부민과 siRNA가 혼합된 용액이 탁해질 때까지 100% 에탄올을 1mL/min의 속도로 적정 후, 차광 하에 에탄올을 하룻밤 동안 날려주고, 13200rpm, 10min 조건으로 원심분리를 진행한 후 입자화되지 않은 알부민 혹은 미반응 약물을 피펫을 이용해 제거해주고 PBS로 재분산하여 3000rpm, 5min 조건으로 원심분리를 진행한 후 micropellet을 제외한 상층액(siRNA가 담지된 나노입자(siRNA NPs))를 피펫으로 얻었다. 상기 thiol-modify VEGF siRNA duplex의 sense는 5'-AUGUGAAUGCAGACCAAAGAA-3'(서열번호:1)이고 antisense는 5'-thiol-UUCUUUGGUCUGCAUUCACAU-3'(서열번호:2)이다.

- [89] 2. 실시예 6의 1에서 형성된 siRNA가 담지된 나노입자를 버블 용액(실시예 1의 3에서 형성된 버블이 PBS에 1mg/ml의 농도로 혼합되어 형성)에 넣어준 후, RT에서 2시간 이상 반응시킨 후, 초음파 기기를 이용하여 2W, 1MHZ, duty cycle 100% 조건으로 5분 이상 mechanical force를 가하였다. 이후, 파쇄된 버블이 지질구조체를 충분히 형성할 수 있도록, 1시간 이상 RT에서 incubation하여 siRNA가 담지된 나노입자의 외표면 일부분에 지질구조체가 결합한 siRNA가 담지된 나노입자 복합체(Directional siRNA LT-NPs)를 형성하였다.

- [90] 3. 실시예 6의 1 및 2에서 siRNA NPs, Directional siRNA LT-NPs에 대한 Gene

silencing을 확인하여 도 9 및 10에 나타내었다. Gene silencing의 확인은 MCF-7 세포(1×10^5)에 siRNA NPs, Directional siRNA LT-NPs를 각각 3시간 동안 처리한 후, 24시간 배양한 후에 mRNA를 추출하였으며, 같은 방법으로 세포에 대한 PCR을 수행하였다. PCR gel retardation assay에서 유전자 밴드(gene bands)는 GelRed Nucleic Acid stain으로 염색되고, Gel Doc imaging device에 의해 시각화된다. 도 10의 경우, gene band의 intensity를 ImagePro를 이용하여 상대적으로 정량화한 값을 나타내었다.

- [91] 4. 도 9 및 10을 보면, siRNA NPs보다 Directional siRNA LT-NPs를 사용하였을 때 gene silencing 효율이 훨씬 우수한 것을 확인할 수 있어, 나노입자 복합체가 유전체 약물 전달체로 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[92]

- [93] <실시예 7> Tumor cell spheroid에서의 효능 평가

- [94] 1. Tumor cell spheroid는 일반적인 adherent 암세포와 달리 3D culture를 이용하여 증식하며, 이러한 spheroid는 암세포가 배지상에서 floating되서 자라기 때문에 암 세포들이 뭉쳐서 자라게 된다. 뭉쳐서 자라는 형태가 암 조직의 Extracellular matrix(ECM)을 mimic한다는 연구 결과가 있기 때문에 지질 표면 개질에 따른 tissue penetration 여부를 in vitro에서 확인하기 위해 이 모델에서 실험을 진행하였다.

- [95] 2. Spheroid 세포 형성

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

- [97] 3. Spheroid 세포에 나노입자 복합체의 처리

- [98] (1) 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 4의 (2)에서 형성한 나노입자 복합체(Directional LT-NPs)에 대한 Spheroid 세포 섭취 효율을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 12에 나타내었다. DAPI를 이용하여 핵이 염색된 실시예 7의 2에서 형성된 Spheroid 형태 MCF-7 세포(1×10^5)에 Alexa 555 형광 dye가 표지된 나노입자 및 나노입자 복합체를 처리한 후 3시간이 지난 시점에 공초점 현미경을 이용하여 측정하였다.

- [99] (2) 도 11을 보면 나노입자 복합체가 나노입자에 비해 세포 섭취 효율이 뛰어난 것을 확인할 수 있어, 이를 통해, 단순 in vitro 환경에서 뿐만 아니라, in vivo를 mimic한 환경에서도 나노입자 복합체의 섭취 효율이 우수함을 확인할 수 있어, 나노입자 복합체는 조직에서의 뛰어난 페네트레이션 효율을 가짐을 알 수 있다.

[100]

[101] 이상에서, 출원인은 본 발명의 다양한 실시예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며, 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경예 또는 수정예도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

[102]

청구범위

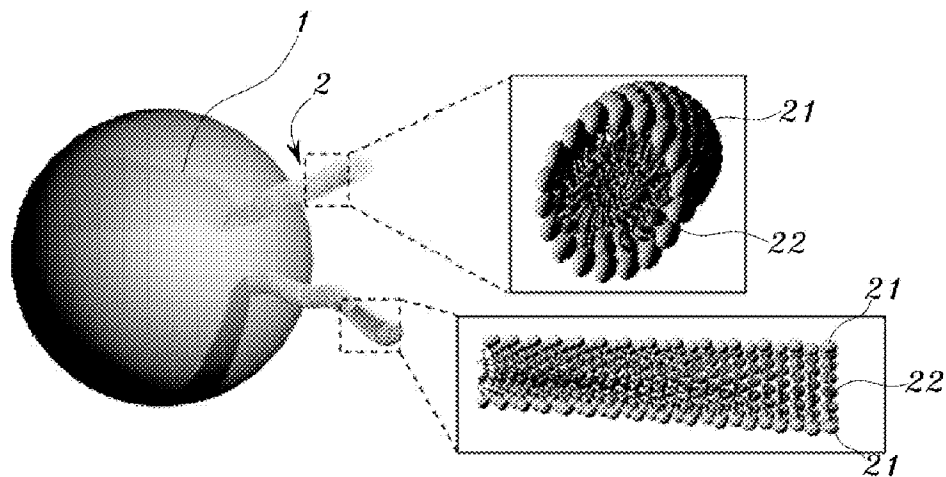
- [청구항 1] 세포 내에 섭취되어 질병의 치료에 이용되는 나노입자와, 상기 나노입자의 외표면 일부분에 결합하여 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 지질 기반의 지질구조체를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 나노입자는 100 내지 300nm의 직경을 가지며, 상기 지질구조체는 50 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가지는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 지질구조체는
친수성을 띄는 지질 헤드가 외측면에 위치하고 내부에 소수성을 띄는 지질 꼬리가 위치하여 전체적으로 길이가 긴 튜브 형태를 가지는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 나노입자는 제1반응기를 포함하고, 상기 지질구조체는 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하는 제2반응기를 포함하여, 제1반응기와 제2반응기가 화학 결합함으로써 지질구조체가 나노입자에 결합하는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,
상기 나노입자는 외표면에 제1반응기가 위치하고, 상기 튜브 형태의 지질구조체는 일단에 제2반응기가 위치하여, 상기 제1반응기와 제2반응기가 화학 결합함으로써 튜브 형태의 지질구조체가 상기 나노입자의 외표면에 결합하는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 나노입자는
약물을 담지하거나 질병을 치료할 수 있는 물질로 이루어지는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 7] 제3항에 있어서, 상기 나노입자 복합체는
엔도시토시스뿐만 아니라 세포막을 직접 관통하여 세포 내에 섭취될 수 있는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 8] 제3항에 있어서, 상기 지질구조체는
상기 나노입자의 스피로이드 세포 내 섭취 효율을 향상시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 9] 제3항에 있어서,
상기 나노입자는 항암제나 유전 치료제를 포함하며, 항암 저항성을 가진 종양 세포의 사멸 효율이나 세포의 유전자 치료 효율을 향상시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.
- [청구항 10] 제1반응기가 존재하는 나노입자를 형성하는 나노입자형성단계와, 상기

제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 인지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질체를 형성하는 지질체형성단계와, 상기 나노입자와 지질체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록 하여 지질체의 외면에 나노입자가 결합한 지질체-나노입자 복합체를 형성하는 지질복합체형성단계와, 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘을 가해 지질체를 파쇄하여 나노입자의 외표면 일부분에 결합한 지질구조체를 형성하여 나노입자 복합체를 제조하는 파쇄형성단계를 포함하며,
 상기 지질체는 버블 또는 리포솜이고,
 상기 나노입자는 세포 내에 섭취되어 질병의 치료에 이용되며, 상기 지질구조체는 나노입자의 세포 내 섭취 효율을 향상시키는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체의 제조방법.

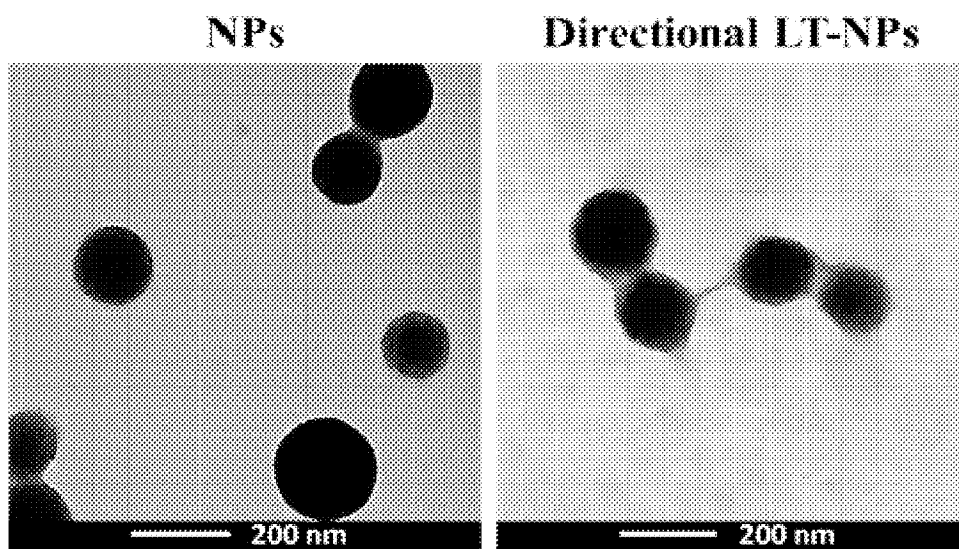
[청구항 11]

제10항에 있어서,
 상기 파쇄형성단계에서는 지질체-나노입자 복합체에 기계적인 힘을 가하고 일정 시간 유지하여, 지질체가 파쇄되며 지질체를 이루는 인지질은 재조합이 일어나 나노입자에 결합한 튜브 형태의 지질구조체가 형성되는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체의 제조방법.

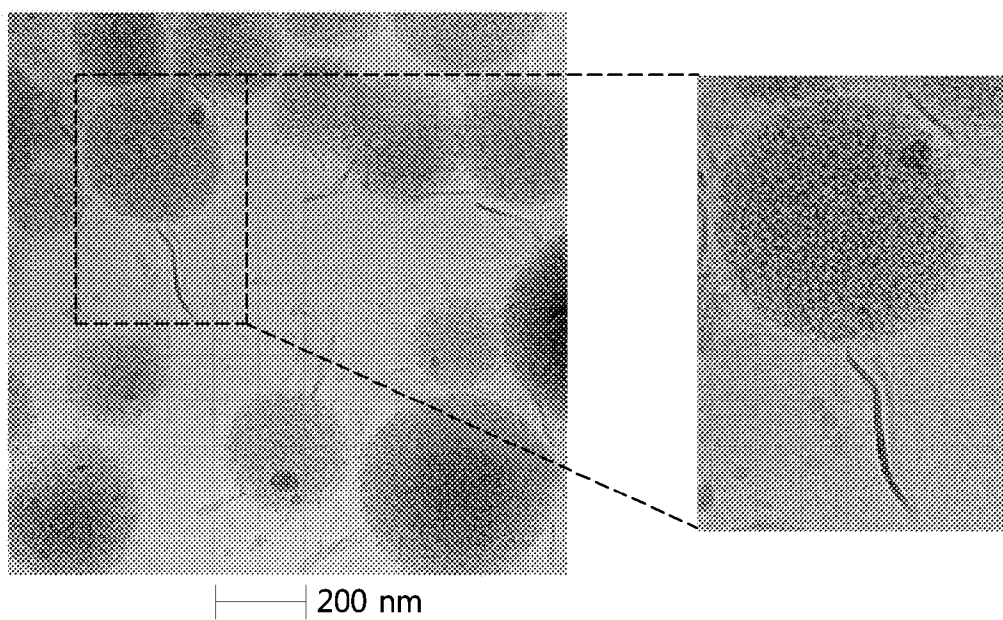
[도1]



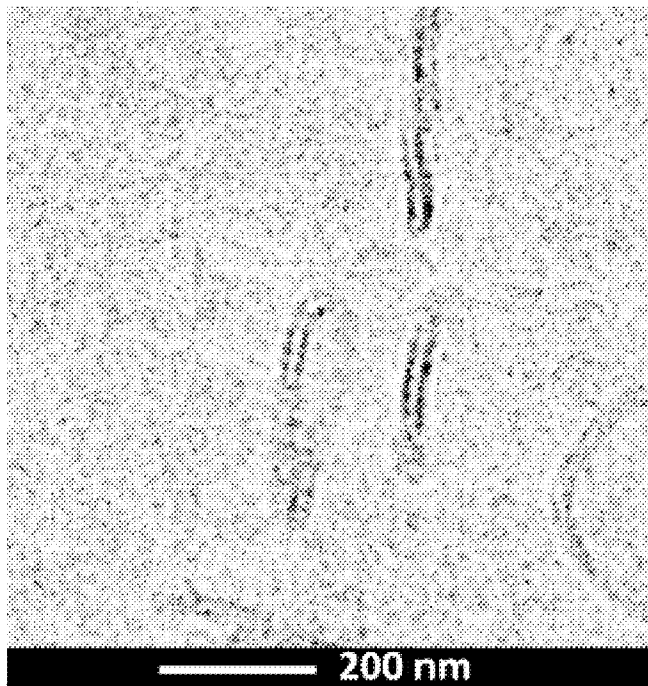
[도2]



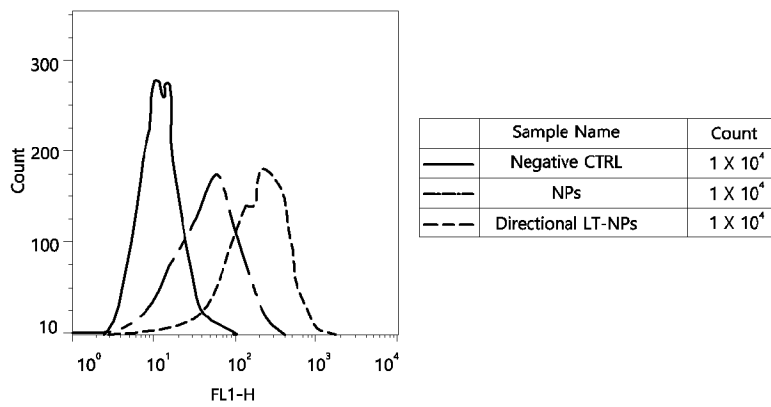
[도3]



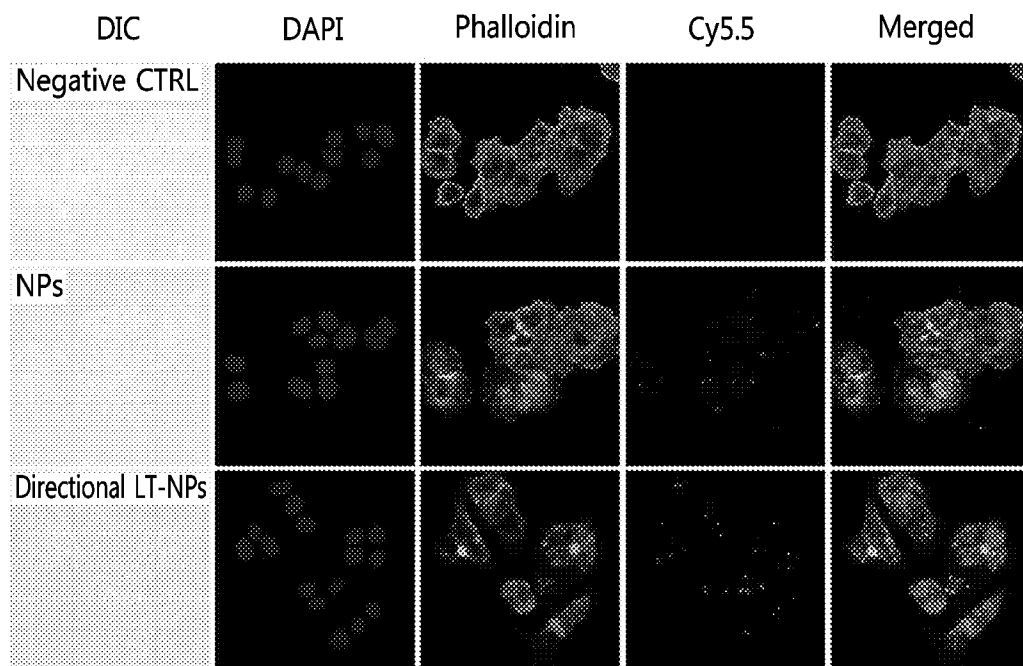
[도4]



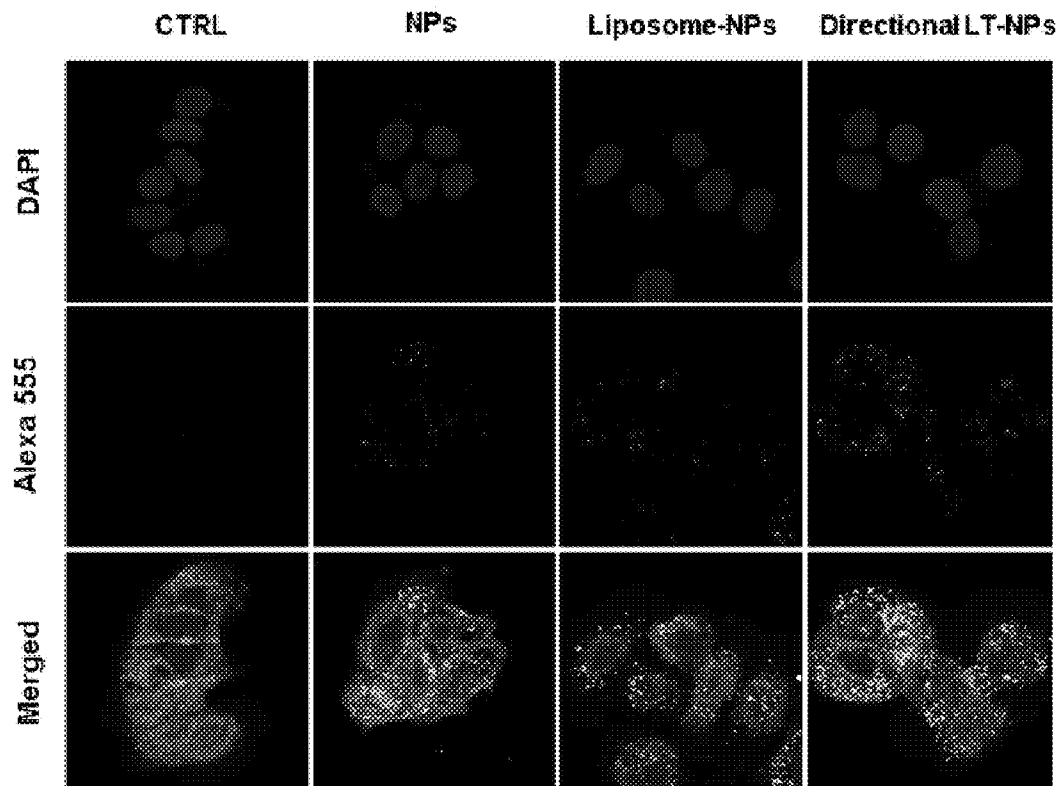
[도5]



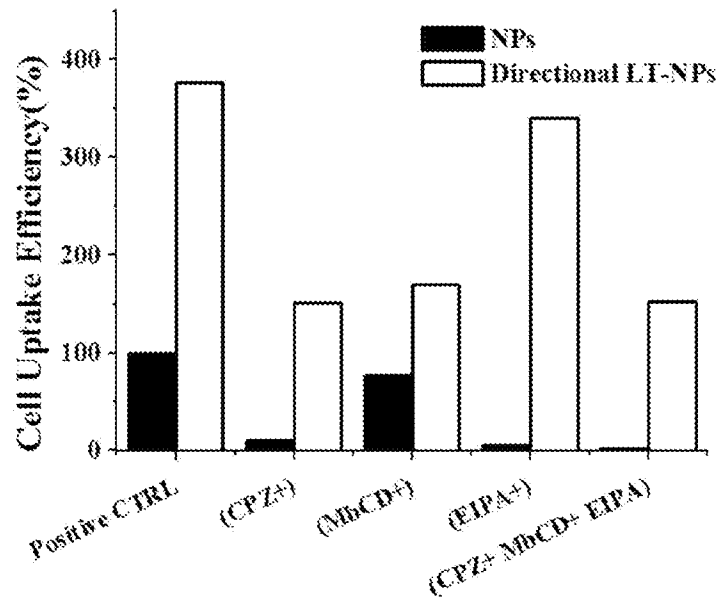
[도6]



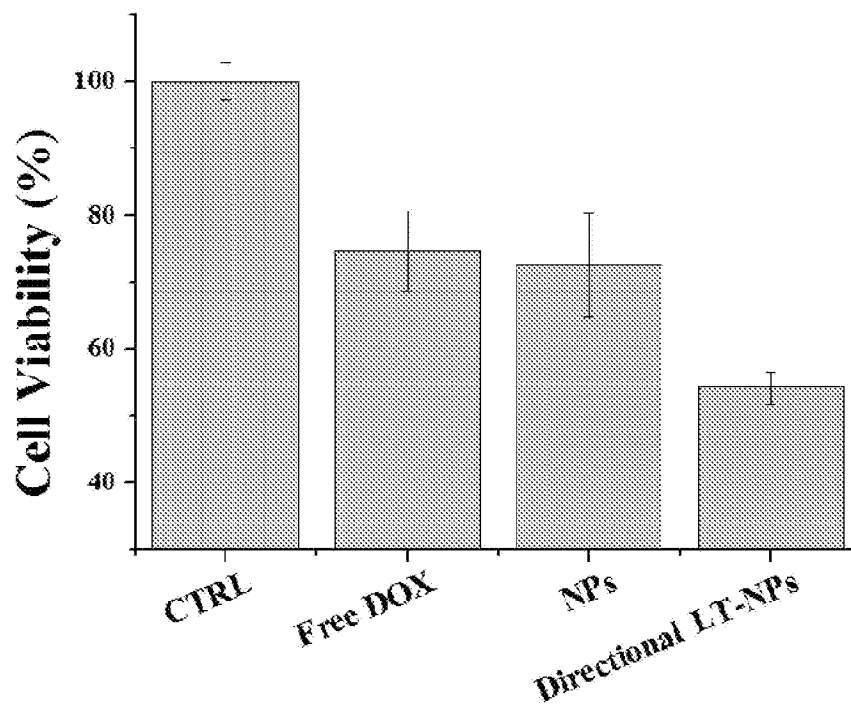
[도7]



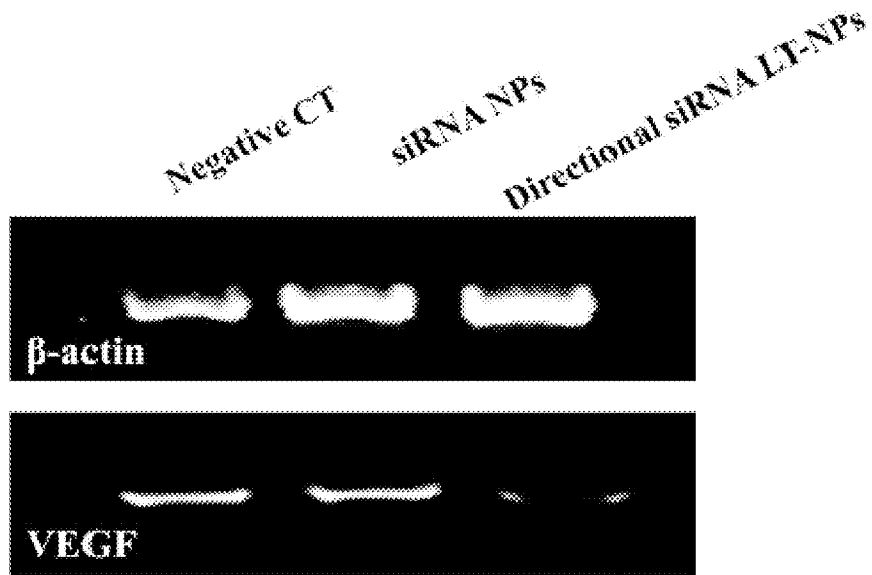
[도8]



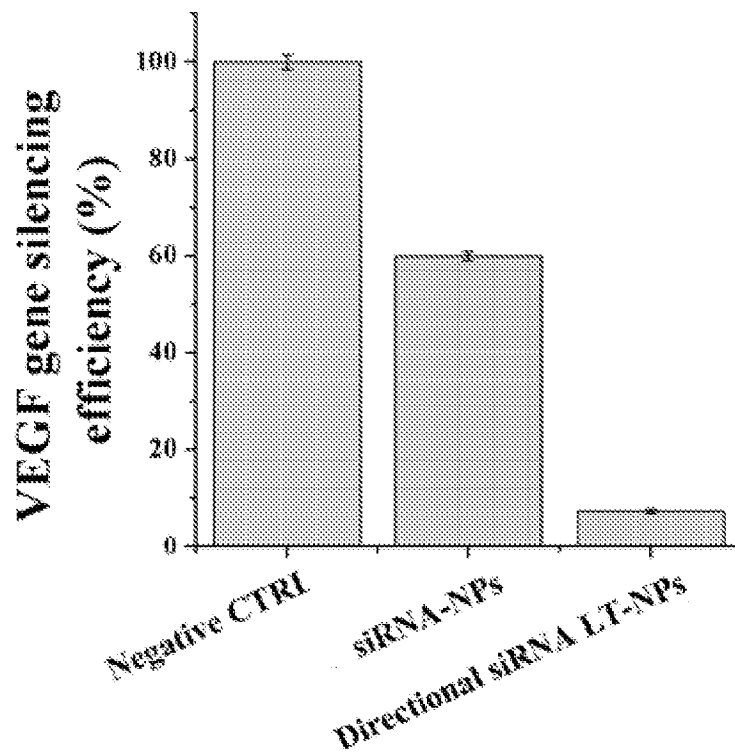
[도9]



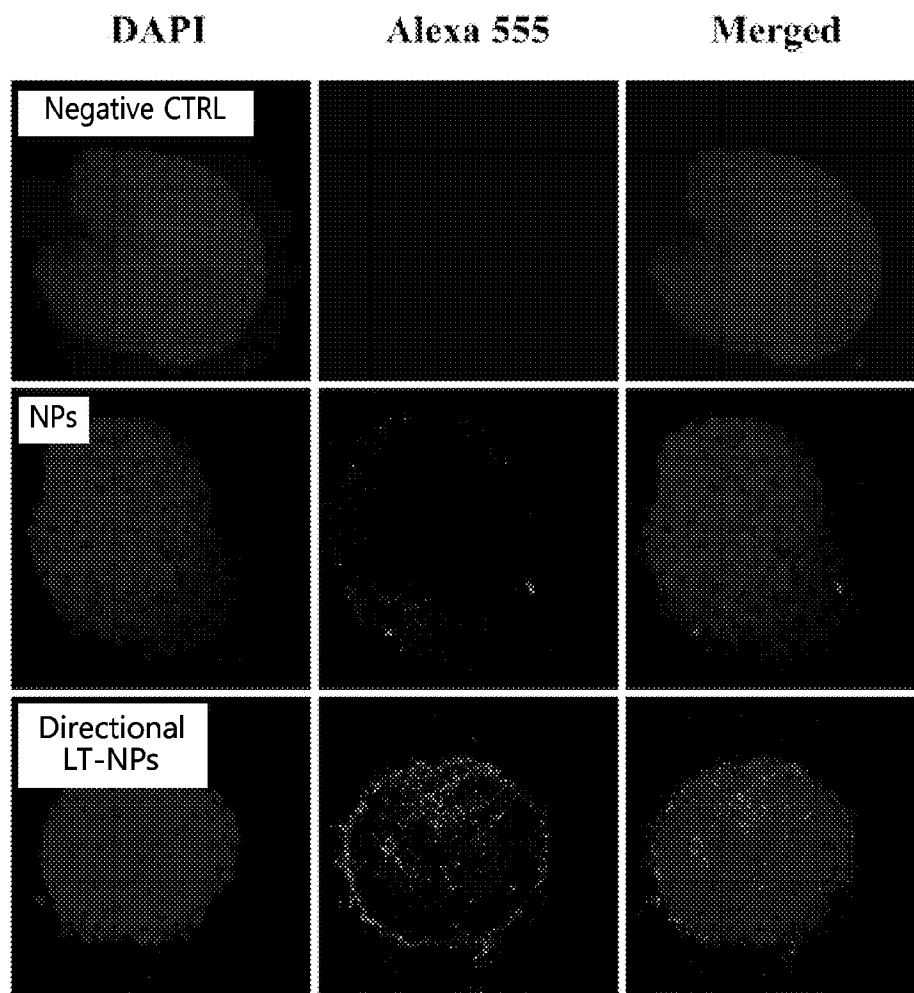
[도10]



[도11]



[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/50(2006.01)i, A61K 9/51(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61K 47/69(2017.01)i, A61K 45/06(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/50; A61K 31/685; A61K 9/127; A61K 9/19; A61K 9/51; A61K 47/69; A61K 45/06

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: drug delivery, surface modification, lipid body, nanoparticles, Top-down method

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015-153805 A2 (CHILDREN'S HOSPITAL LOS ANGELES et al.) 08 October 2015 See abstract and claims 1, 8, 34, 45.	1-3,7
A		4,5,6,8-11
X	WO 2018-064350 A1 (ERIOCHEM USA, LLC.) 05 April 2018 See abstract, claims 1, 7-9, 26.	1-3,6,9
A		4,5,7,8,10,11
X	KR 10-1085203 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 21 November 2011 See abstract, claims 1, 8, 11 and paragraph [0024].	1-3,6,9
A		4,5,7,8,10,11
X	SAHAY, G. et al. Endocytosis of nanomedicines. J. Control Release. 03 August 2010, vol. 145, no. 3, pages 182-195, [electronic publication] doi: 10.1016/j.jconrel.2010.01.036 See the entire document.	1
A		2-11
X	KOU, L. et al. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 14 February 2013, vol. 8, no. 1, pages 1-10 See the entire document.	1



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 22 MAY 2019 (22.05.2019)	Date of mailing of the international search report 22 MAY 2019 (22.05.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010309

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A		2-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/010309

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2015-153805 A2	08/10/2015	AU 2015-240766 A1	06/10/2016
		CA 2943365 A1	08/10/2015
		EP 3129062 A2	15/02/2017
		JP 2017-512840 A	25/05/2017
		US 2017-0020816 A1	26/01/2017
		US 2017-0143630 A1	25/05/2017
		US 9956176 B2	01/05/2018
		WO 2015-153805 A3	03/12/2015
WO 2018-064350 A1	05/04/2018	AR 109757 A1	23/01/2019
		US 2019-046446 A1	14/02/2019
KR 10-1085203 B1	21/11/2011	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/50(2006.01)i, A61K 9/51(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61K 47/69(2017.01)i, A61K 45/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/50; A61K 31/685; A61K 9/127; A61K 9/19; A61K 9/51; A61K 47/69; A61K 45/06

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: 약물 전달, 표면 개질, 지질체, 나노입자, Top-down 방식

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2015-153805 A2 (CHILDREN'S HOSPITAL LOS ANGELES 등) 2015.10.08 요약 및 청구항 1, 8, 34, 45 참조.	1-3,7
A		4,5,6,8-11
X	WO 2018-064350 A1 (ERIOCHEM USA, LLC) 2018.04.05 요약, 청구항 1, 7-9, 26 참조.	1-3,6,9
A		4,5,7,8,10,11
X	KR 10-1085203 B1 (서울대학교산학협력단) 2011.11.21 요약, 청구항 1, 8, 11 및 단락 [0024] 참조.	1-3,6,9
A		4,5,7,8,10,11
X	SAHAY, G. 등, 'Endocytosis of nanomedicines.', J. Control Release., 2010.08.03., 제145권, 제3호, 페이지 182-195, [전자공개] doi: 10.1016/j.jconrel.2010.01.036. 전체 문헌 참조.	1
A		2-11
X	KOU, L. 등, 'The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Impli- cation for rational design', Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013.02.14., 제8권, 제1호, 페이지 1-10 전체 문헌 참조.	1

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 05월 22일 (22.05.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 05월 22일 (22.05.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



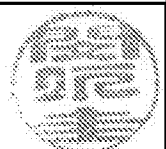
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

민인규

전화번호 +82-42-481-3326



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A		2-11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2015-153805 A2	2015/10/08	AU 2015-240766 A1 CA 2943365 A1 EP 3129062 A2 JP 2017-512840 A US 2017-0020816 A1 US 2017-0143630 A1 US 9956176 B2 WO 2015-153805 A3	2016/10/06 2015/10/08 2017/02/15 2017/05/25 2017/01/26 2017/05/25 2018/05/01 2015/12/03
WO 2018-064350 A1	2018/04/05	AR 109757 A1 US 2019-046446 A1	2019/01/23 2019/02/14
KR 10-1085203 B1	2011/11/21	없음	