

명세서

발명의 명칭: 생체 내 약물 전달을 위한 지질 나노입자 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 생체 내 약물 전달을 위한 지질 나노입자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 의약 제제 산업에 있어 약물의 부작용을 줄이고 효능 및 효과를 극대화시켜 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 설계한 약물전달시스템(DDS; Drug Delivery System)은 신약개발과 맞먹는 경제적 이익을 창출할 수 있으면서 성공 가능성이 큰 고부가가치 핵심기술로서 약물투여를 효율화함으로써 환자 치료의 질을 높이는데 그 목적이 있다.
- [3] 약물전달시스템의 핵심기술 중의 하나인 약물흡수 촉진 기술에 속하는 난용성 약물의 가용화 기술은 신약 물질의 개발비용을 줄일 수 있는 동시에 현재 출시되어 있는 의약품의 부가가치를 높일 수 있는 가장 합리적인 방법으로 여겨지고 있다. 특히, 우리나라와 같이 신약개발 여건이 열악한 상황에서 약물의 가용화 기술의 개발을 통한 개량 신약의 개발은 적은 비용으로 막대한 부가가치를 창출할 수 있는 분야이다.
- [4] 유전자 약물전달시스템을 이용한 유전자 치료법은 유전적 결함을 수정하고 수많은 질병을 치료하는데 있어 커다란 희망으로 자리 잡고 있다. 이러한 유전자 치료법을 성공적이고 안전하게 수행함에 있어서, 효과적인 유전자 전달이 주요한 과제 중 하나이며, 바이러스 전달체가 유전자 전달에 있어 효과적임이 입증되었다. 그러나 면역원성(immunogenicity), 주입된 DNA 크기의 한계 및 대량 생산의 어려움과 같은 몇 가지 결점으로 인해 유전자 전달 시스템으로서 바이러스의 이용이 제한되고 있다. 양이온성 리포솜 및 중합체와 같은 비-바이러스성 유전자 담체가 바이러스성 시스템의 대체 수단으로서 주목을 받기 시작했다.
- [5] 개선된 안정성 프로파일 및 중합체 전달체의 제조와 조작의 용이성이 효과적이고 안전한 유전자 전달용 비독성 및 생분해성 중합체 담체의 디자인 및 합성에 대한 연구를 촉발시켰다. 폴리(L-라이신), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), 스타버스트(starburst), 폴리아미도아민(polyamidoamine) 텐드리머, 및 양이온성 리포솜 등이 자발적으로 자가 조립가능하고 플라스미드 DNA(pDNA)를 엔도사이토시스를 통해 세포로 진입시키기에 충분히 작은 구조로 압축할 수 있기 때문에 비-바이러스성 유전자 전달체로서 널리 연구되어 왔다.
- [6] Antisense RNA, siRNA 등의 핵산은 생체 내에서 특정 단백질의 발현을 억제할 수 있는 물질로, 암, 유전병, 감염질환, 자가면역 질환 등의 치료에 중요한 도구로

각광받고 있다(Novina and Sharp, Nature, 430, 161-164, 2004). 그러나 siRNA와 같은 핵산은 세포 내로 직접 전달이 어렵고, 혈액 내에서 효소에 의해 쉽게 분해되므로 이를 극복하기 위한 연구들이 많이 진행되고 있다. 현재까지 핵산을 세포 내로 운반하는 방법으로 양전하 지질 또는 중합체와 섞어 운반하는 방법(각각 지질-DNA 접합체(lipoplex) 및 폴리머-DNA 접합체(polyplex)라 명명함)이 주로 사용되고 있다(Hirko 등, Curr. Med. Chem., 10, 1185-93, 2003; Merdan 등, Adv. Drug. Deliv. Rev., 54, 715-58, 2002). 지질-DNA 접합체는 핵산과 결합하여 세포 내로 핵산을 잘 전달시켜 세포수준에서 많이 사용되고 있으나, 생체 내에서는 국부적으로 주사 시 많은 경우 체내에서 염증을 유발시키는(Filonand 및 Phillips, Biochim. Biophys. Acta, 1329, 345-56, 1997) 등의 단점이 있다.

- [7] 또한 이러한 비-바이러스성 전달체는 트랜스펙션 효율이 낮은 문제점이 있다. 트랜스펙션 효율을 높이기 위해 많은 노력이 기울여져 왔으나, 이는 여전히 안정하다고 여겨지는 시스템과는 거리가 멀다. 또한, 비-바이러스성 유전자 전달체 담체는 열악한 생체적합성 및 비-생분해성으로 인해 현저하게 높은 세포독성을 나타낸다.
- [8] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 약물의 봉입률이 우수하며 목적하는 기관 또는 세포에 음이온성 약물, 핵산 등을 효율적으로 전달할 수 있는 신규 입자를 개발하고자 예의 노력한 결과, 이온화 가능한 지질; 인지질; 콜레스테롤; 및 지질-PEG(polyethyleneglycol) 접합체를 포함하는 지질 나노입자를 제조하고, 상기 지질 나노입자가 간 조직에 특이적으로 전달되며 음이온성 화합물 또는 핵산 등의 약물이 높은 효율로 봉입될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[9]

발명의 상세한 설명

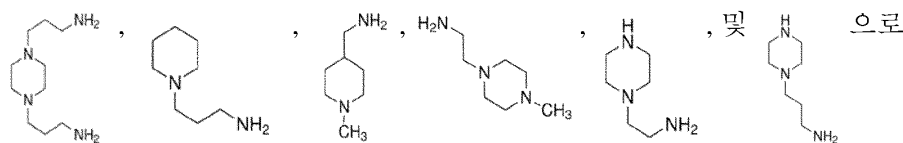
기술적 과제

- [10] 본 발명의 목적은 6원의 헥테로고리 아민 및 알킬-에폭시드가 결합된 이온화 가능한 지질, 인지질, 콜레스테롤, 및 지질-PEG(polyethyleneglycol) 접합체를 포함하는 지질 나노입자를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합) 전달용 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물 핵산, 또는 이의 조합을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[13]

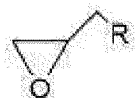
과제 해결 수단

- [14] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [15] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태는, 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드가 결합된 이온화 가능한 지질(ionizable lipid); 인지질; 콜레스테롤; 및 지질-PEG(polyethyleneglycol) 접합체를 포함하는 지질 나노입자를 제공한다.
- [16] 일 예에 따른 지질 나노입자는 간 조직 특이적이고 생체 친화도가 우수하며, 고효율로 유전자 치료제 등을 전달할 수 있어 지질 나노입자 매개 유전자 치료 및 영상 진단 기술 등 관련 기술분야에 유용하게 사용할 수 있다.
- [17] 본 명세서에서, '이온화 가능한 지질(ionizable lipid)' 또는 '지질 유사체(lipidoid)'는 용이하게 양성자화될 수 있는 아민-함유 지질을 의미하고, 예를 들면, 주변 pH에 따라 전하상태가 변하는 지질일 수 있다. 상기 이온화 가능한 지질은 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드가 결합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 이온화 가능한 지질은 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드가 반응하여 생성되는 지질과 유사한 특성을 갖는 화합물일 수 있으며, 보다 구체적으로, 6원의 헤테로고리 아민을 알킬-에폭시드와 반응시켜 에폭시드의 고리열림반응(ring opening reaction)에 의해 생성되는 화합물일 수 있다.
- [18] 일 예에서, 상기 이온화 가능한 지질은 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드는 1:n ($n = 6$ 원의 헤테로고리 아민에 포함된 1차 아민의 갯수 $\times 2 + 2$ 차 아민의 갯수 $\times 1$)의 몰비로 반응시켜 결합된 것일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 246 아민 및 1,2-에폭시도데칸을 1: 4의 몰비로 혼합하여 700 내지 800rpm, 85 내지 95의 조건에서 2 내지 4일 동안 반응시켜 제조한 것일 수 있다.
- [19] 상기 이온화 가능한 지질은 양이온성 지질의 pKa 미만의 pH에서 양성자화(양으로 하전)될 수 있고, pKa 초과 pH에서는 실질적으로 중성일 수 있다. 일 예에서, 상기 지질 나노입자는 양성자화된 이온화 가능한 지질 및/또는 중성을 나타내는 이온화 가능한 지질을 포함할 수 있다.
- [20] 상기 이온화 가능한 지질은 지질과 유사한 특성을 갖는 이온화 가능한 화합물로서 약물(예를 들면, 음이온성 약물 및/또는 핵산)과의 정전기적 상호작용을 통하여 상기 약물이 지질 나노입자 내에 높은 효율로 봉입되도록 하는 역할을 수행할 수 있다.
- [21] 상기 6원의 헤테로고리 아민은 피페라진(piperazine) 또는 피페리딘(piperidine) 구조를 포함하는 것일 수 있다.
- [22] 상기 6원의 헤테로고리 아민은 3차 아민을 포함하는 사슬형 또는 비사슬형의



이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

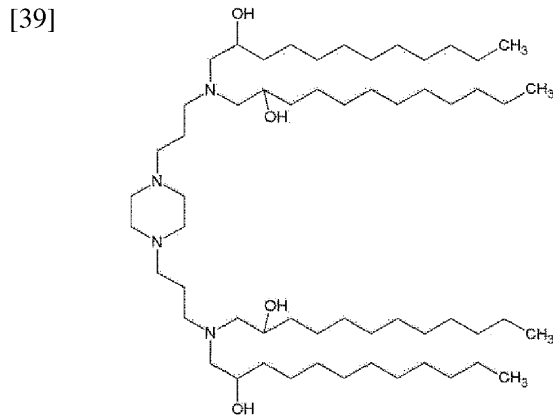
- [23] 일 예에서, 상기 6원의 헤테로고리 아민은 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine, N-(3-Aminopropyl)piperidine, (1-Methyl-4-piperidinyl)methanamine, 2-(4-Methyl-piperazin-1-yl)-ethylamine, 1-(2-Aminoethyl)piperazine, 및 1-(3-aminopropyl)piperazine으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [24] 상기 이온화 가능한 지질에 포함되는 아민의 종류에 따라, 지질 나노입자의 (i) 약물 봉입률, (ii) PDI(polydispersity index). 및/또는 (iii) 간 조직, 및/또는 간을 구성하는 세포(예를 들면, 간세포(hepatocyte) 및/또는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cell; 간 혈관 내피세포))로의 약물 전달 효율이 상이할 수 있다.
- [25] 상기 아민을 포함하는 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자는 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:
- [26] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;
- [27] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며); 및/또는
- [28] (3) 간 조직, 및/또는 간을 구성하는 세포 (예를 들면, 간세포 및/또는 LSEC)로의 약물 전달 효율이 우수.
- [29] 일 예에 따르면, 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine(예를 들면, Cas Nos. 7209-38-3)을 포함하는 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자는 다른 종류의 아민을 포함하는 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자 보다 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:
- [30] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;
- [31] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며); 및/또는
- [32] (3) 간 조직, 및/또는 간을 구성하는 세포 (예를 들면, 간세포 및/또는 LSEC)로의 약물 전달 효율이 우수.
- [33] 상기 알킬-에폭시드는 하기 화학식 1과 같은 구조를 가질 수 있다.
- [34] [화학식 1]
- [35]



- [36] 상기 알킬-에폭시드는 C6 내지 C14, C6 내지 C12, C6 내지 C10, C8 내지 C14, C8 내지 C12, C8 내지 C10, C10 내지 C14, C10 내지 C12, 또는 C10의 탄소 길이를 갖는 것일 수 있고, 예를 들면, C10의 1,2-에폭시도데칸(1,2-epoxydodecane)일 수 있다. 이온화 가능한 지질에 포함되는 알킬-에폭시드의 탄소수를 상기 범위로 함으로써 지질 나노입자 내에 봉입되는 약물에 대한 높은 봉입률을 나타낼 수 있다.

[37] 일 예에서, 상기 이온화 가능한 지질은 하기 화학식 2의 일반식을 가질 수 있다.

[38] [화학식 2]



[40] 상기 화학식 2의 구조는 일 예에 따른 이온화 가능한 지질이 갖는 구조의 일례로서, 이온화 가능한 지질의 구조는 6원의 헤테로고리 아민 및 알킬-에폭시드의 종류에 따라 상이할 수 있다.

[41] 일 예에 따르면, 화학식 2의 구조를 갖는 이온화 가능한 지질을 포함하는 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자는 다른 종류의 이온화 가능한 지질을 포함하는 지질 나노입자 보다 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:

[42] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;

[43] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며); 및/또는

[44] (3) 간 조직, 및/또는 간을 구성하는 세포 (예를 들면, 간세포 및/또는 LSEC)로의 약물 전달 효율이 우수.

[45] 일 예에 따르면, 상기 지질 나노 입자는 pKa가 5 내지 8, 5.5 내지 7.5, 6 내지 7, 또는 6.5 내지 7일 수 있다. pKa는 산 해리 상수로, 대상 물질의 산 강도를 나타내는 지표로서 일반적으로 사용되고 있는 것을 가리킨다. 상기 지질 나노입자가 갖는 pKa 값은 지질 나노입자의 생체 내 안정성 및 지질 나노입자의 약물 방출 측면에서 중요하다. 일 예에서 상기 범위의 pKa 값을 나타내는 지질 나노입자는 생체 내에서 안전하게 타겟 장기(예를 들면, 간) 및/또는 타겟 세포(간세포, 및/또는 LSEC)로 전달될 수 있고, 타겟 장기 및/또는 타겟 세포에 도달하여 엔도시토시스(endocytosis) 후에 양전하를 나타내어 엔도솜(endosome) 막의 음이온성 단백질과 정전기적 상호작용을 통해 봉입된 약물이 방출되도록 할 수 있다.

[46] 일 예에 따른 지질 나노입자의 구성요소 중 인지질은 지질 나노입자 내에서 이온화 가능한 지질 및 약물이 상호작용하여 형성된 코어를 감싸서 보호하는 역할을 수행하며, 타겟 세포의 인지질 이중층과 결합하여 약물의 세포 내 전달시 세포막 통과 및 엔도솜 탈출(endosomal escape)을 용이하게 할 수 있다.

[47] 상기 인지질은 일 예에 따른 지질 나노입자의 용합을 촉진할 수 있는 인지질을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들면,

디올레일포스파티딜에탄올아민(dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE),
 디스테아로일포스파티딜콜린(distearoylphosphatidylcholine, DSPC),
 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine, POPC),
 에그 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine, EPC),
 디올레오일포스파티딜콜린(dioleoylphosphatidylcholine, DOPC),
 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC),
 디올레오일포스파티딜글리세롤(dioleoylphosphatidylglycerol, DOPG),
 디팔미토일포스파티딜글리세롤(dipalmitoylphosphatidylglycerol, DPPG),
 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(distearoylphosphatidylethanolamine, DSPE),
 포스파티딜에탄올아민(Phosphatidylethanolamine, PE),
 디팔미토일포스파티딜에탄올아민(dipalmitoylphosphatidylethanolamine),
 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine,
 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(POPE),
 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC),
 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine](DOPS),
 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine] 등으로 이루어진 군으로부터 선택된
 1종 이상일 수 있다. 일 예에서 DOPE를 포함하는 지질 나노입자는 mRNA
 전달에 효과적(mRNA에 대한 약물 전달 효율이 우수)일 수 있고, 다른 예에서,
 DSPE를 포함하는 지질 나노입자는 siRNA 전달에 효과적(siRNA에 대한 약물
 전달 효율이 우수)일 수 있다.

- [48] 일 예에 따른 지질 나노입자의 구성요소 중 콜레스테롤은 지질 나노입자
 내에서 지질 층전에 형태적 측면에서 견고성을 부여하며, 나노입자의 코어 및
 표면에 분산되어 나노입자의 안정성을 향상시키는 역할을 할 수 있다.
- [49] 본 명세서에서 "지질-PEG(polyethyleneglycol) 접합체", "지질-PEG",
 "PEG-지질", "PEG-lipid", 또는 "lipid-PEG"는 지질과 PEG가 컨쥬게이트된
 형태를 지칭하는 것으로, 일측 단부에 친수성 중합체인 폴리에틸렌글리콜(PEG)
 중합체가 결합된 지질을 의미한다. 상기 지질-PEG 접합체는 지질 나노입자
 내에서 나노입자의 혈청 내 입자 안정성에 기여하며, 나노입자 간 응집을 막는
 역할을 수행한다. 또한, 지질-PEG 접합체는 핵산의 생체 내 전달시
 분해효소로부터 핵산을 보호하여 핵산의 체내 안정성을 강화시키며, 나노입자
 내 봉입된 약물의 반감기를 증가시킬 수 있다.
- [50] 상기 지질-PEG 접합체에서 PEG는 지질에 직접 접합될 수 있거나 또는 링커
 모이어티를 통해 지질에 연결될 수 있다. PEG를 지질에 결합시키기에 적합한
 임의의 링커 모이어티가 사용될 수 있으며, 예를 들면, 에스테르-비함유 링커
 모이어티 및 에스테르-함유 링커 모이어티가 포함된다. 상기 에스테르-비함유
 링커 모이어티는 아미도(-C(O)NH-), 아미노(-NR-), 카르보닐(-C(O)-),
 카르바메이트(-NHC(O)O-), 우레아(-NHC(O)NH-), 다이설파이드(-S-S-),
 에테르(-O-), 석시닐(-(O)CCH₂CH₂C(O)-),

석신아미딜(-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), 에테르, 다이설파이드뿐만 아니라 이들의 조합(예컨대, 카르바메이트 링커 모이어티 및아미도 링커 모이어티 둘 모두를 함유하는 링커)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 에스테르-함유 링커 모이어티는, 예를 들면 카르보네이트(-OC(O)O-), 석시노일, 포스페이트 에스테르(-O-(O)POH-O-), 설포네이트 에스테르, 및 이들의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

- [51] 일 예에서, 상기 지질-PEG 접합체의 평균 분자량은 100 달톤 내지 10,000달톤, 200 달톤 내지 8,000달톤, 500 달톤 내지 5,000달톤, 1,000 달톤 내지 3,000달톤, 1,000 달톤 내지 2,600달톤, 1,500 달톤 내지 2,600달톤, 1,500 달톤 내지 2,500달톤, 2,000 달톤 내지 2,600달톤, 2,000 달톤 내지 2,500달톤, 또는 2,000달톤일 수 있다.
- [52] 상기 지질-PEG 접합체 내 지질은 폴리에틸렌글리콜과 결합할 수 있는 지질이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 상기 지질 나노입자의 다른 구성요소인 인지질 및/또는 콜레스테롤 또한 사용할 수 있다. 구체적으로, 지질-PEG 접합체 내 지질은 세라마이드(ceramide), 디미리스톨글리세롤(dimyristoylglycerol, DMG), 석시노일 디아글리세롤(succinoyl-diacylglycerol, s-DAG), 디스테아로일포스파티딜콜린(distearoylphosphatidylcholine, DSPC), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(distearoylphosphatidylethanolamine, DSPE), 또는 콜레스테롤일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [53] 일 예에서, 상기 지질-PEG 접합체는 다이알킬옥시프로필에 결합된 PEG(PEG-DAA), 다이아실글리세롤에 결합된 PEG(PEG-DAG), 포스파티딜에탄올아민과 같은 인지질에 결합된 PEG(PEG-PE), 세라마이드에 접합된 PEG(PEG-CER, 세라마이드-PEG 접합체, 세라마이드-PEG, PEG-세라마이드 접합체, 또는 PEG-세라마이드), 콜레스테롤 또는 이의 유도체에 접합된 PEG, PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC, PEG-DSPE(DSPE-PEG), 및 이들의 혼합물일 수 있고 예를 들면, C16-PEG2000 세라마이드(N-palmitoyl-sphingosine-1-{succinyl[methoxy(polyethylene glycol)2000]}), DMG-PEG 2000, 14:0 PEG2000 PE 일 수 있다.
- [54] 일 예에 따르면, 세라마이드-PEG 접합체를 포함하는 지질 나노입자를 포함하는 경우 다른 종류의 지질-PEG 접합체를 포함하는 지질 나노입자를 포함하는 경우 보다 하기 특징 중 1종 이상을 가질 수 있다:
- [55] (1) 높은 효율로 약물을 봉입;
- [56] (2) 제조된 입자의 크기가 균일(또는 낮은 PDI 수치를 가지며); 및/또는
- [57] (3) 간 조직, 및/또는 간을 구성하는 세포 (예를 들면, 간세포 및/또는 LSEC)로의 약물 전달 효율이 우수.
- [58] 상기 지질-PEG 접합체 내 PEG는 친수성 고분자로 혈장 단백질들의 흡착을 억제하는 능력을 가지고 있어서 지질 나노입자의 체내 순환시간을 증가시키며,

나노입자 간의 응집현상을 막는 역할을 할 수 있다. 또한, 지질-PEG 접합체는 생체 내에서 스텔스(stealth) 기능을 나타내어 나노입자의 분해를 방지할 수 있다.

- [59] 상기 PEG는 지질과 결합하지 않은 쪽에 관능기가 결합된 것(functionalized PEG)일 수 있다. 이 때 사용 가능한 관능기는 숙시닐기(succinyl), 카르복시산(carboxylic acid), 말레이미드(maleimide), 아민기, 바이오틴, 시아누르기(cyanur), 및 폴레이트(folate) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [60] 일 예에 따르면, 상기 지질-PEG 접합체는 0.1 내지 15몰%, 0.25 내지 15몰%, 0.5 내지 15몰%, 1 내지 15몰%, 1.5 내지 15몰%, 2 내지 15몰%, 2.5 내지 15몰%, 0.1 내지 12.5몰%, 0.25 내지 12.5몰%, 0.5 내지 12.5몰%, 1 내지 12.5몰%, 1.5 내지 12.5몰%, 2 내지 12.5몰%, 2.5 내지 12.5몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 2.5 내지 10몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 2.5 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 2.5 내지 5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 2.5 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 1 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 2 내지 2.5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 2.5 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 2.5 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 1 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 2 내지 3.5몰%, 2.5 내지 3.5몰%, 0.1 내지 2.0몰%, 0.1 내지 1.5몰%, 0.1 내지 1.0몰%, 0.5 내지 2.0몰%, 0.5 내지 1.5몰%, 0.5 내지 1.0몰%, 1.0 내지 2.0몰%, 1.0 내지 1.5몰%, 1.5 내지 2.0몰%, 1.0몰%, 또는 1.5몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.
- [61] 일 예에서, 상기 지질 나노입자의 간조직, 간세포, 및/또는 LSEC 타겟팅 효과(약물 전달 효과)는 지질 나노입자에 포함되는 지질-PEG 접합체의 함량에 의존적일 수 있다.
- [62] 예를 들면, 지질-PEG 접합체를 0.1 내지 15몰%, 0.25 내지 15몰%, 0.5 내지 15몰%, 1 내지 15몰%, 1.5 내지 15몰%, 2 내지 15몰%, 2.5 내지 15몰%, 0.1 내지 12.5몰%, 0.25 내지 12.5몰%, 0.5 내지 12.5몰%, 1 내지 12.5몰%, 1.5 내지 12.5몰%, 2 내지 12.5몰%, 2.5 내지 12.5몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 2.5 내지 10몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 2.5 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 2.5 내지 5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 2.5 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 1 내지 2.5몰%, 1.5 내지

2.5몰%, 2 내지 2.5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 2.5 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 2.5 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 1 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 2 내지 3.5몰%, 2.5 내지 3.5몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.1 내지 5.0몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4.0몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.1 내지 3.0몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.1 내지 2.0몰%, 0.1 내지 1.5몰%, 0.1 내지 1.0몰%, 0.5 내지 10몰%, 0.5 내지 5.0몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.0몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.0몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.0몰%, 0.5 내지 1.5몰%, 0.5 내지 1.0몰%, 1.0 내지 10몰%, 1.0 내지 5.0몰%, 1.0 내지 4.5몰%, 1.0 내지 4.0몰%, 1.0 내지 3.5몰%, 1.0 내지 3.0몰%, 1.0 내지 2.5몰%, 1.0 내지 2.0몰%, 1.0 내지 1.5몰%, 1.5 내지 10몰%, 1.5 내지 5.0몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.0몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.0몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.0몰%, 1.0몰%, 또는 1.5몰%로 포함하는 지질 나노입자는 (상기 범위 외의 함량으로 지질-PEG 접합체를 포함하는 지질 나노입자 보다) 간세포로의 타겟팅 효과가 우수한 것일 수 있다.

- [63] 또 다른 예를 들면, 지질-PEG 접합체를 0.1 내지 15몰%, 0.25 내지 15몰%, 0.5 내지 15몰%, 1 내지 15몰%, 1.5 내지 15몰%, 2 내지 15몰%, 2.5 내지 15몰%, 0.1 내지 12.5몰%, 0.25 내지 12.5몰%, 0.5 내지 12.5몰%, 1 내지 12.5몰%, 1.5 내지 12.5몰%, 2 내지 12.5몰%, 2.5 내지 12.5몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 2.5 내지 10몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 2.5 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 2.5 내지 5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 2.5 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 1 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 2 내지 2.5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 2.5 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 2.5 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 1 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 2 내지 3.5몰%, 2.5 내지 3.5몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.1 내지 5.0몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4.0몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.1 내지 3.0몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.1 내지 2.0몰%, 0.1 내지 1.5몰%, 0.1 내지 1.0몰%, 0.5 내지 10몰%, 0.5 내지 5.0몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.0몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.0몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.0몰%, 0.5 내지 1.5몰%, 0.5 내지 1.0몰%, 1.0 내지 10몰%, 1.0 내지 5.0몰%, 1.0 내지 4.5몰%, 1.0 내지 4.0몰%, 1.0 내지 3.5몰%, 1.0 내지 3.0몰%, 1.0 내지 2.5몰%, 1.0 내지 2.0몰%, 1.0 내지 1.5몰%, 1.5 내지 10몰%, 1.5 내지 5.0몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.0몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.0몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.0몰%, 1.0몰%, 또는 1.5몰%로 포함하는

지질 나노입자는 (상기 범위 외의 함량으로 지질-PEG 접합체를 포함하는 지질 나노입자 보다) LSEC으로의 타겟팅 효과가 우수한 것일 수 있다.

- [64] 일 예에 따르면, 상기 콜레스테롤은 10 내지 60몰%, 20 내지 60몰%, 30 내지 60몰%, 30 내지 55몰%, 30 내지 52.5몰%, 30 내지 52몰%, 30 내지 51몰%, 30 내지 50몰%, 30 내지 47.5몰%, 30 내지 45몰%, 30 내지 44몰%, 30 내지 43.5몰%, 30 내지 43몰%, 30 내지 41.5몰%, 30 내지 40몰%, 30 내지 39.5몰%, 35 내지 60몰%, 35 내지 55몰%, 35 내지 52.5몰%, 35 내지 52몰%, 35 내지 51몰%, 35 내지 50몰%, 35 내지 47.5몰%, 35 내지 45몰%, 35 내지 44몰%, 35 내지 43.5몰%, 35 내지 43몰%, 35 내지 41.5몰%, 35 내지 40몰%, 35 내지 39.5몰%, 37 내지 60몰%, 37 내지 55몰%, 37 내지 52.5몰%, 37 내지 52몰%, 37 내지 51몰%, 37.5 내지 50몰%, 37.5 내지 47.5몰%, 37.5 내지 45몰%, 37.5 내지 44몰%, 37.5 내지 43.5몰%, 37.5 내지 43몰%, 37.5 내지 41.5몰%, 37.5 내지 40몰%, 37.5 내지 39.5몰%, 39.5 내지 60몰%, 39.5 내지 55몰%, 39.5 내지 52.5몰%, 39.5 내지 52몰%, 39.5 내지 51몰%, 39.5 내지 50몰%, 39.5 내지 47.5몰%, 39.5 내지 45몰%, 39.5 내지 44몰%, 39.5 내지 43.5몰%, 39.5 내지 43몰%, 39.5 내지 41.5몰%, 39.5 내지 40몰%, 40 내지 60몰%, 40 내지 55몰%, 40 내지 52.5몰%, 40 내지 52몰%, 40 내지 51몰%, 40 내지 50몰%, 40 내지 47.5몰%, 40 내지 45몰%, 40 내지 44몰%, 40 내지 43.5몰%, 40 내지 43몰%, 40 내지 41.5몰%, 41.5 내지 60몰%, 41.5 내지 55몰%, 41.5 내지 52.5몰%, 41.5 내지 52몰%, 41.5 내지 51몰%, 41.5 내지 50몰%, 41.5 내지 47.5몰%, 41.5 내지 45몰%, 41.5 내지 44몰%, 41.5 내지 43.5몰%, 41.5 내지 43몰%, 43 내지 60몰%, 43 내지 55몰%, 43 내지 52.5몰%, 43 내지 52몰%, 43 내지 51몰%, 43 내지 50몰%, 43 내지 47.5몰%, 43 내지 45몰%, 43 내지 44몰%, 43 내지 43.5몰%, 43.5 내지 60몰%, 43.5 내지 55몰%, 43.5 내지 52.5몰%, 43.5 내지 52몰%, 43.5 내지 51몰%, 43.5 내지 50몰%, 43.5 내지 47.5몰%, 43.5 내지 45몰%, 43.5 내지 44몰%, 45 내지 60몰%, 45 내지 55몰%, 45 내지 52.5몰%, 45 내지 52몰%, 45 내지 51몰%, 45 내지 50몰%, 45 내지 47.5몰%, 47.5 내지 60몰%, 47.5 내지 55몰%, 47.5 내지 52.5몰%, 47.5 내지 52몰%, 47.5 내지 51몰%, 47.5 내지 50몰%, 50 내지 60몰%, 50 내지 55몰%, 50 내지 52.5몰%, 50 내지 52몰%, 50 내지 51.5몰%, 51 내지 60몰%, 51 내지 55몰%, 51 내지 52.5몰%, 또는 51 내지 52몰%, %, 51 내지 60몰%, 51 내지 55몰%, 51 내지 52.5몰%, 또는 51 내지 52몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.
- [65] 일 예에 따르면, 상기 지질-PEG접합체와 콜레스테롤의 합은 30 내지 70몰%, 40 내지 70몰%, 40 내지 60몰%, 40 내지 55몰%, 40 내지 53.5몰%, 40 내지 50몰%, 40 내지 47.5몰%, 40 내지 45몰%, 40 내지 44.5몰%, 42 내지 60몰%, 42 내지 55몰%, 42 내지 53.5몰%, 42 내지 50몰%, 42 내지 47.5몰%, 42 내지 45몰%, 42 내지 44.5몰%, 44 내지 60몰%, 44 내지 55몰%, 44 내지 53.5몰%, 44 내지 50몰%, 44 내지 47.5몰%, 44 내지 45몰%, 44 내지 44.5몰%, 44.5 내지 60몰%, 44.5 내지 55몰%, 44.5 내지 53.5몰%, 44.5 내지 50몰%, 44.5 내지 47.5몰%, 또는 44.5 내지

45몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.

- [66] 일 예에 따르면, 상기 이온화 가능한 지질은 10 내지 70몰%, 10 내지 60몰%, 10 내지 55몰%, 10 내지 50몰%, 10 내지 45몰%, 10 내지 42.5몰%, 10 내지 40몰%, 10 내지 35몰%, 10 내지 30몰%, 10 내지 26.5몰%, 10 내지 25몰%, 10 내지 20몰%, 15 내지 60몰%, 15 내지 55몰%, 15 내지 50몰%, 15 내지 45몰%, 15 내지 42.5몰%, 15 내지 40몰%, 15 내지 35몰%, 15 내지 30몰%, 15 내지 26.5몰%, 15 내지 25몰%, 15 내지 20몰%, 20 내지 60몰%, 20 내지 55몰%, 20 내지 50몰%, 20 내지 45몰%, 20 내지 42.5몰%, 20 내지 40몰%, 20 내지 35몰%, 20 내지 30몰%, 20 내지 26.5몰%, 20 내지 25몰%, 25 내지 60몰%, 25 내지 55몰%, 25 내지 50몰%, 25 내지 45몰%, 25 내지 42.5몰%, 25 내지 40몰%, 25 내지 35몰%, 25 내지 30몰%, 25 내지 26.5몰%, 26.5 내지 60몰%, 26.5 내지 55몰%, 26.5 내지 50몰%, 26.5 내지 45몰%, 26.5 내지 42.5몰%, 26.5 내지 40몰%, 26.5 내지 35몰%, 26.5 내지 30몰%, 30 내지 60몰%, 30 내지 55몰%, 30 내지 50몰%, 30 내지 45몰%, 30 내지 42.5몰%, 30 내지 40몰%, 30 내지 35몰%, 35 내지 60몰%, 35 내지 55몰%, 35 내지 50몰%, 35 내지 45몰%, 35 내지 42.5몰%, 35 내지 40몰%, 40 내지 60몰%, 40 내지 55몰%, 40 내지 50몰%, 40 내지 45몰%, 40 내지 42.5몰%, 42.5 내지 60몰%, 42.5 내지 55몰%, 42.5 내지 50몰%, 또는 42.5 내지 45몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.

- [67] 일 예에 따르면, 상기 인지질은 1 내지 50몰%, 5 내지 50몰%, 5 내지 40몰%, 5 내지 30몰%, 5 내지 25몰%, 5 내지 20몰%, 5 내지 15몰%, 5 내지 13몰%, 5 내지 10몰%, 10 내지 30몰%, 10 내지 25몰%, 10 내지 20몰%, 10 내지 15몰%, 10 내지 13몰%, 15 내지 30몰%, 15 내지 25몰%, 15 내지 20몰%, 20 내지 30몰%, 또는 20 내지 25몰%로 상기 지질 나노입자에 포함되는 것일 수 있다.

- [68] 본 명세서에서 "몰%(mol%, 몰퍼센트)"는 특정 구성성분의 몰수를 전체 구성성분의 몰수의 합으로 나눈 후 100을 곱하여 퍼센트로 나타낸 것이고, 수식으로 표현하여 예를 들면, 하기 수학적 식 1과 같을 수 있다.

- [69] (수학적 식 1)

- [70]
$$\text{몰\%} = (\text{특정 구성성분의 몰수}) / (\text{전체 구성성분의 몰수의 합}) \times 100$$

- [71] 상기 지질 나노입자는 이온화 가능한 지질 : 인지질 : 콜레스테롤 : 지질-PEG 접합체를 20 내지 50 : 10 내지 30 : 20 내지 60 : 0.1 내지 10의 몰비, 20 내지 50 : 10 내지 30 : 20 내지 60 : 0.25 내지 10의 몰비, 20 내지 50 : 10 내지 30 : 30 내지 60 : 0.25 내지 10의 몰비, 20 내지 50 : 10 내지 30 : 30 내지 60 : 0.1 내지 5의 몰비, 20 내지 50 : 10 내지 30 : 30 내지 60 : 0.5 내지 5의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 25 : 40 내지 50 : 0.5 내지 3의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 20 : 40 내지 55 : 0.5 내지 3의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 20 : 40 내지 55 : 1.0 내지 1.5의 몰비, 40 내지 45 : 10 내지 15 : 40 내지 45 : 0.5 내지 3.0의 몰비, 40 내지 45 : 10 내지 15 : 40 내지 45 : 0.5 내지 3의 몰비, 40 내지 45 : 10 내지 15 : 40 내지 45 : 1 내지 1.5의 몰비, 25 내지 30 : 17 내지 22 : 50 내지 55 : 0.5 내지 3.0의 몰비, 25 내지 30 : 17 내지 22 : 50

내지 55 : 1.0 내지 2.5의 몰비, 또는 25 내지 30: 17 내지 22; 50 내지 55 : 1.5 내지 2.5의 몰비로 포함하는 것일 수 있다. 일 예에 따르면, 상기 지질 나노입자에 포함되는 구성성분 중 지질-PEG 접합체 및 콜레스테롤의 몰수의 합을 일정하게 유지하면서 지질-PEG 접합체의 몰수를 증가시킨 만큼 콜레스테롤의 몰수를 감소시켜, 상기 구성성분의 몰비를 유지시킬 수 있다.

- [72] 본 명세서에서, 몰비는 몰수 비를 의미하고, "중량부"는 각 성분이 포함된 중량 비율을 의미한다.
- [73] 일 예에서, 상기 지질 나노입자는 이온화 가능한 지질 20 내지 50 중량부, 인지질 10 내지 30 중량부, 콜레스테롤 20 내지 60 중량부(또는 20 내지 60 중량부), 및 지질-PEG 접합체 0.1 내지 10 중량부(또는 0.25 내지 10 중량부, 0.5 내지 5 중량부)를 포함할 수 있다. 상기 지질 나노입자는 전체 나노입자 중량을 기준으로 이온화 가능한 지질 20 내지 50 중량%, 인지질 10 내지 30 중량%, 콜레스테롤 20 내지 60 중량%(또는 30 내지 60 중량%), 및 지질-PEG 접합체를 0.1 내지 10 중량%(또는 0.25 내지 10 중량%, 0.5 내지 5 중량%)를 포함할 수 있다. 다른 예에서 상기 지질 나노입자는 전체 나노입자 중량을 기준으로 이온화 가능한 지질 25 내지 50 중량%, 인지질 10 내지 20 중량%, 콜레스테롤 35 내지 55 중량%, 및 지질-PEG 접합체를 0.1 내지 10 중량%(또는 0.25 내지 10 중량%, 0.5 내지 5 중량%)로 포함할 수 있다.
- [74] 상기 범위(몰비, 중량부, 및/또는 중량%)로 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및/또는 지질-PEG 접합체를 포함하는 지질 나노입자는 상기 범위 외로 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및/또는 지질-PEG 접합체를 포함하는 지질 나노입자 보다 (i) 지질 나노입자의 안정도 (ii) 약물의 봉입률, 및/또는 (iii) 간 조직, 및/또는 세포(예를 들면, 간세포 및/또는 LSEC)를 타겟하는 약물 전달 효율이 우수할 수 있다.
- [75] 일 예에 따른 지질 나노입자는 간조직, 간세포(hepatocyte), 및/또는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cells) 내 도입이 용이하도록 평균 지름이 20nm 내지 200nm, 20 내지 180nm, 20nm 내지 170nm, 20nm 내지 150nm, 20nm 내지 120nm, 20nm 내지 100nm, 20nm 내지 90nm, 30nm 내지 200nm, 30 내지 180nm, 30nm 내지 170nm, 30nm 내지 150nm, 30nm 내지 120nm, 30nm 내지 100nm, 30nm 내지 90nm, 40nm 내지 200nm, 40 내지 180nm, 40nm 내지 170nm, 40nm 내지 150nm, 40nm 내지 120nm, 40nm 내지 100nm, 40nm 내지 90nm, 50nm 내지 200nm, 50 내지 180nm, 50nm 내지 170nm, 50nm 내지 150nm, 50nm 내지 120nm, 50nm 내지 100nm, 50nm 내지 90nm, 60nm 내지 200nm, 60 내지 180nm, 60nm 내지 170nm, 60nm 내지 150nm, 60nm 내지 120nm, 60nm 내지 100nm, 60nm 내지 90nm, 70nm 내지 200nm, 70 내지 180nm, 70nm 내지 170nm, 70nm 내지 150nm, 70nm 내지 120nm, 70nm 내지 100nm, 70nm 내지 90nm, 80nm 내지 200nm, 80 내지 180nm, 80nm 내지 170nm, 80nm 내지 150nm, 80nm 내지 120nm, 80nm 내지 100nm, 80nm 내지 90nm, 90nm 내지 200nm, 90 내지 180nm, 90nm 내지 170nm, 90nm 내지

150nm, 90nm 내지 120nm, 또는 90nm 내지 100nm일 수 있다. 지질 나노입자 크기가 상기 범위 보다 작은 경우, 지질 나노입자의 표면적이 과대하게 증가됨으로서 안정성 유지가 어렵고, 이에 따라 표적 조직으로의 전달 및/또는 약물 효과가 감소될 수 있다.

- [76] 일 예에 따른 지질 나노입자의 간조직, 간세포, 및/또는 LSEC 타겟팅 효과(약물 전달 효과)는 지질 나노입자의 크기에 의존적일 수 있다. 예를 들면, 40 내지 120nm, 30 내지 100nm, 35 내지 95 nm, 40 내지 90nm, 45 내지 90nm, 50 내지 90nm, 55 내지 85nm, 60 내지 80nm, 70 내지 90nm, 70 내지 80nm, 50 내지 70nm, 또는 60 내지 70nm의 지름을 갖는 지질 나노입자의 경우 간세포로의 타겟팅 효과가 (상기 범위 외의 지름을 갖는 나노입자 보다) 우수한 것일 수 있다. 다른 예를 들면, 20 내지 200nm, 20내지 180 nm, 40 내지 180nm, 40 내지 170nm, 50 내지 160nm, 70 내지 180nm, 70 내지 170nm, 75 내지 170nm, 75 내지 165nm, 70 내지 150nm, 70 내지 130nm, 75 내지 130nm, 80 내지 120nm, 85 내지 120nm, 약 90 내지 120nm, 90 내지 110nm, 90 내지 100nm, 80 내지 110nm, 80 내지 100nm, 85 내지 95nm, 약 90nm, 또는 90nm 의 지름을 갖는 지질 나노입자의 경우 LSEC으로의 타겟팅 효과가 (상기 범위 외의 지름을 갖는 나노입자 보다) 우수한 것일 수 있다.
- [77] 상기 지질 나노입자는 간 조직을 특이적으로 표적화하는 것일 수 있다. 일 예에 따른 지질 나노입자는 천연 지단백질의 대사 거동을 매우 유사하게 모방할 수 있으며, 간에 의한 지질 대사 과정 및 이를 통한 치료 메커니즘에 유용하게 적용될 수 있다.
- [78] 상기 지질 나노입자는 간세포(hepatocyte)를 표적화하는 것일 수 있다. 상기 지질 나노 입자에 포함된 지질-PEG 접합체의 함량이 0.1 내지 15몰%, 0.25 내지 15몰%, 0.5 내지 15몰%, 1 내지 15몰%, 1.5 내지 15몰%, 2 내지 15몰%, 2.5 내지 15몰%, 0.1 내지 12.5몰%, 0.25 내지 12.5몰%, 0.5 내지 12.5몰%, 1 내지 12.5몰%, 1.5 내지 12.5몰%, 2 내지 12.5몰%, 2.5 내지 12.5몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 2.5 내지 10몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 2.5 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 2.5 내지 5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 2.5 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 1 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 2 내지 2.5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 2.5 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 2.5 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 1 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 2 내지 3.5몰%, 2.5 내지 3.5몰%, 0.1 내지 2.0몰%, 0.1 내지 1.5몰%, 0.1 내지 1.0몰%, 0.5 내지 2.0몰%, 0.5 내지 1.5몰%, 0.5 내지 1.0몰%,

1.0 내지 2.0몰%, 1.0 내지 1.5몰%, 1.5 내지 2.0몰%, 1.0몰%, 또는 1.5몰%인 경우 상기 지질 나노입자의 간세포로의 약물 전달 효율(간세포 타겟 효율)이 우수해질 수 있다.

- [79] 상기 지질 나노입자는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cell)을 표적화하는 것일 수 있다. 상기 지질 나노입자에 포함된 지질-PEG 접합체의 함량이 0.1 내지 15몰%, 0.25 내지 15몰%, 0.5 내지 15몰%, 1 내지 15몰%, 1.5 내지 15몰%, 2 내지 15몰%, 2.5 내지 15몰%, 0.1 내지 12.5몰%, 0.25 내지 12.5몰%, 0.5 내지 12.5몰%, 1 내지 12.5몰%, 1.5 내지 12.5몰%, 2 내지 12.5몰%, 2.5 내지 12.5몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 2.5 내지 10몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 2.5 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 2.5 내지 5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 2.5 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 1 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 2 내지 2.5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 2.5 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 2.5 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 1 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 2 내지 3.5몰%, 2.5 내지 3.5몰%, 0.1 내지 2.0몰%, 0.1 내지 1.5몰%, 0.1 내지 1.0몰%, 0.5 내지 2.0몰%, 0.5 내지 1.5몰%, 0.5 내지 1.0몰%, 1.0 내지 2.0몰%, 1.0 내지 1.5몰%, 1.5 내지 2.0몰%, 1.0몰%, 또는 1.5몰%인 경우 상기 지질 나노입자의 LSEC 로의 약물 전달 효율(LSEC 타겟 효율) 이 우수해질 수 있다.
- [80] 본 명세서에서, 상기 지질 나노입자가 간조직, 간세포, 및/또는 LSEC으로 "표적화(targeting)", 위치화(localization)"한다는 것은 조직 내 또는 세포 내에 내재화(internalization)하는 것일 수 있고, 핵막도 투과할 수 있어 핵 내부에 내재화하는 것을 의미할 수 있다.
- [81]
- [82] 다른 양태로서, (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합(음이온성 약물 및 핵산의 조합)을 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다. 상기 약물은 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합(음이온성 약물 및 핵산)일 수 있다.
- [83] 상기 약물 전달용 조성물은 상기 지질 나노입자 내부에 음이온성 약물 및/또는 핵산 등의 생리활성물질이 봉입되어 있는 것일 수 있으며, 음이온성 약물 및/또는 핵산 등의 생리활성물질이 안정적이고 높은 효율로 봉입되어 상기 전달용 조성물에 의해 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있다. 또한, 상기 지질 나노입자 내부에 봉입되는 약물의 종류를 치료 목적에 따라 다양하게 조절할 수 있는 장점이 있다.

- [84] 상기 지질 나노입자는 음이온성 약물 및/또는 핵산이 (지질 나노입자의) 내부에 봉입된 것일 수 있다. 음이온성 약물 및/또는 핵산이 (지질 나노입자의 내부에) 봉입된 지질 나노입자에 대한 것은 전술한 지질 나노입자에 대한 것과 동일하다.
- [85] 일 예에서, 상기 지질 나노입자에 포함된 이온화 가능한 지질 및 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합)의 중량비는 1 내지 20 : 1, 1 내지 15 : 1, 1 내지 10 : 1, 5 내지 20 : 1, 5 내지 15 : 1, 5 내지 10 : 1, 7.5 내지 20 : 1, 7.5 내지 15 : 1, 또는 7.5 내지 10 : 1 일 수 있다.
- [86] 일 예에서, 상기 범위 내의 중량비로 (1) 이온화 가능한 지질; 및 (2) 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합)을 포함하면, 지질 나노입자 내부에 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합)의 봉입률 및/또는 약물 전달 효율이 상기 범위 밖의 중량비로 (1) 이온화 가능한 지질; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는 지질 나노입자 보다 높을 수 있다.
- [87] 상기 음이온성 약물 및/또는 핵산이 봉입된 지질 나노입자는 간조직, 간세포(hepatocyte), 및/또는 LSEC(liver sinusoidal endothelial cells) 내 도입이 용이하도록 평균 지름이 20nm 내지 200nm, 20 내지 180nm, 20nm 내지 170nm, 20nm 내지 150nm, 20nm 내지 120nm, 20nm 내지 100nm, 20nm 내지 90nm, 30nm 내지 200nm, 30 내지 180nm, 30nm 내지 170nm, 30nm 내지 150nm, 30nm 내지 120nm, 30nm 내지 100nm, 30nm 내지 90nm, 40nm 내지 200nm, 40 내지 180nm, 40nm 내지 170nm, 40nm 내지 150nm, 40nm 내지 120nm, 40nm 내지 100nm, 40nm 내지 90nm, 50nm 내지 200nm, 50 내지 180nm, 50nm 내지 170nm, 50nm 내지 150nm, 50nm 내지 120nm, 50nm 내지 100nm, 50nm 내지 90nm, 60nm 내지 200nm, 60 내지 180nm, 60nm 내지 170nm, 60nm 내지 150nm, 60nm 내지 120nm, 60nm 내지 100nm, 60nm 내지 90nm, 70nm 내지 200nm, 70 내지 180nm, 70nm 내지 170nm, 70nm 내지 150nm, 70nm 내지 120nm, 70nm 내지 100nm, 70nm 내지 90nm, 80nm 내지 200nm, 80 내지 180nm, 80nm 내지 170nm, 80nm 내지 150nm, 80nm 내지 120nm, 80nm 내지 100nm, 80nm 내지 90nm, 90nm 내지 200nm, 90 내지 180nm, 90nm 내지 170nm, 90nm 내지 150nm, 90nm 내지 120nm, 또는 90nm 내지 100nm 일 수 있다.
- [88] 상기 범위의 하한 값 보다 지질 나노입자의 크기가 작은 경우, (i) 지질 나노입자가 체순환(systemic circulation)시 혈액 내에 존재하는 아포지단백(apolipoprotein)(예를 들면, ApoE(예를 들면, ApoE3))의 결합이 감소되어 세포 안으로 들어가는 지질 나노입자의 수가 감소될 수 있고/있거나 (ii) 지질 나노입자의 표면적이 과대하게 증가됨으로서 안정성 유지가 어려워, 이에 따라 표적 조직(또는 표적 세포)으로의 약물 전달 효율 및/또는 지질 나노입자가 운반하는 약물의 치료 효과가 감소될 수 있다.
- [89] 상기 범위 내의 지름을 갖는 지질 나노입자는 상기 범위의 상한 값을 초과하는 지름을 갖는 지질 나노입자 보다 타겟 장기 및/또는 세포로의 약물 전달 효율이 우수하다.

- [90] 일 예에서, (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는 약물 전달용 조성물은 간세포(hepatocyte)로의 약물 전달용 조성물일 수 있다.
- [91] 일 예에 따르면, 상기 간세포로의 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합) 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자의 지름은 40 내지 120nm, 30 내지 100nm, 35 내지 95 nm, 40 내지 90nm, 45 내지 90nm, 50 내지 90nm, 55 내지 85nm, 60 내지 80nm, 70 내지 90nm, 70 내지 80nm, 50 내지 70nm, 또는 60 내지 70nm 일 수 있다. 간세포로의 약물 전달시 sinusoidal lumen에서 간세포로 이어지는 천공(fenestrae)의 지름은 포유동물의 경우 약 140 nm, 사람의 경우 약 100nm 이므로, 상기 범위의 지름을 갖는 약물 전달용 조성물은 간세포(hepatocyte)로의 약물 전달 효율이 상기 범위 외의 지름을 갖는 지질 나노입자보다 우수할 수 있다.
- [92] 일 예에 따르면, 상기 간세포로의 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자는 지질-PEG 접합체를 0.1 내지 15몰%, 0.25 내지 15몰%, 0.5 내지 15몰%, 1 내지 15몰%, 1.5 내지 15몰%, 2 내지 15몰%, 2.5 내지 15몰%, 0.1 내지 12.5몰%, 0.25 내지 12.5몰%, 0.5 내지 12.5몰%, 1 내지 12.5몰%, 1.5 내지 12.5몰%, 2 내지 12.5몰%, 2.5 내지 12.5몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 2.5 내지 10몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 2.5 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 2.5 내지 5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 2.5 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 1 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 2 내지 2.5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 2.5 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 2.5 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 1 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 2 내지 3.5몰%, 2.5 내지 3.5몰%, 0.1 내지 2.0몰%, 0.1 내지 1.5몰%, 0.1 내지 1.0몰%, 0.5 내지 2.0몰%, 0.5 내지 1.5몰%, 0.5 내지 1.0몰%, 1.0 내지 2.0몰%, 1.0 내지 1.5몰%, 1.5 내지 2.0몰%, 1.0몰%, 또는 1.5몰%로 포함할 수 있고, 상기 범위로 지질-PEG 접합체를 포함하는 지질 나노입자는 간세포 특이적인(또는 간세포를 타겟하는) 약물 전달 효율이 우수한 것일 수 있다.
- [93] 일 예에 따르면, 상기 간세포로의 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자는 이온화 가능한 지질: 인지질 : 콜레스테롤 : 지질-PEG 접합체를 상기에서 전술한 범위 또는 20 내지 50 : 10 내지 30 : 30 내지 60 : 0.5 내지 5의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 25 : 40 내지 50 : 0.5 내지 3의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 20 : 40 내지 55 : 0.5 내지 3의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 20 : 40 내지 55 : 1.0 내지 1.5의 몰비로 포함할 수 있다. 상기 범위의 몰비로 구성성분을 포함하는 지질

나노입자는 간세포 특이적인(또는 간세포를 타겟하는) 약물 전달 효율이 우수한 것일 수 있다.

- [94] 일 예에서, (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는 약물 전달용 조성물은 LSEC으로의 약물 전달용 조성물일 수 있다.
- [95] 상기 LSEC으로의 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자의 지름은 상기 천공(fenestrae)의 지름과 유사하거나 약간 작은 경우에 LSEC으로의 약물 전달 효과가 우수할 수 있다. 일 예에서, 상기 LSEC로 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자의 지름은 20 내지 200nm, 20 내지 180 nm, 40 내지 180nm, 40 내지 170nm, 50 내지 160nm, 70 내지 180nm, 70 내지 170nm, 75 내지 170nm, 75 내지 165nm, 70 내지 150nm, 70 내지 130nm, 75 내지 130nm, 80 내지 120nm, 85 내지 120nm, 약 90 내지 120nm, 90 내지 110nm, 80 내지 110nm, 80 내지 100nm, 85 내지 95nm, 약 90nm, 또는 90nm일 수 있다.
- [96] 일 예에 따르면, 상기 LSEC으로의 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자는 지질-PEG 접합체를 0.1 내지 15몰%, 0.25 내지 15몰%, 0.5 내지 15몰%, 1 내지 15몰%, 1.5 내지 15몰%, 2 내지 15몰%, 2.5 내지 15몰%, 0.1 내지 12.5몰%, 0.25 내지 12.5몰%, 0.5 내지 12.5몰%, 1 내지 12.5몰%, 1.5 내지 12.5몰%, 2 내지 12.5몰%, 2.5 내지 12.5몰%, 0.1 내지 10몰%, 0.25 내지 10몰%, 0.5 내지 10몰%, 1 내지 10몰%, 1.5 내지 10몰%, 2 내지 10몰%, 2.5 내지 10몰%, 0.1 내지 7.5몰%, 0.25 내지 7.5몰%, 0.5 내지 7.5몰%, 1 내지 7.5몰%, 1.5 내지 7.5몰%, 2 내지 7.5몰%, 2.5 내지 7.5몰%, 0.1 내지 5몰%, 0.25 내지 5몰%, 0.5 내지 5몰%, 1 내지 5몰%, 1.5 내지 5몰%, 2 내지 5몰%, 2.5 내지 5몰%, 0.1 내지 3몰%, 0.25 내지 3몰%, 0.5 내지 3몰%, 1 내지 3몰%, 1.5 내지 3몰%, 2 내지 3몰%, 2.5 내지 3몰%, 0.1 내지 2.5몰%, 0.25 내지 2.5몰%, 0.5 내지 2.5몰%, 1 내지 2.5몰%, 1.5 내지 2.5몰%, 2 내지 2.5몰%, 0.1 내지 4.5몰%, 0.25 내지 4.5몰%, 0.5 내지 4.5몰%, 1 내지 4.5몰%, 1.5 내지 4.5몰%, 2 내지 4.5몰%, 2.5 내지 4.5몰%, 0.1 내지 4몰%, 0.25 내지 4몰%, 0.5 내지 4몰%, 1 내지 4몰%, 1.5 내지 4몰%, 2 내지 4몰%, 2.5 내지 4몰%, 0.1 내지 3.5몰%, 0.25 내지 3.5몰%, 0.5 내지 3.5몰%, 1 내지 3.5몰%, 1.5 내지 3.5몰%, 2 내지 3.5몰%, 2.5 내지 3.5몰%, 0.1 내지 2.0몰%, 0.1 내지 1.5몰%, 0.1 내지 1.0몰%, 0.5 내지 2.0몰%, 0.5 내지 1.5몰%, 0.5 내지 1.0몰%, 1.0 내지 2.0몰%, 1.0 내지 1.5몰%, 1.5 내지 2.0몰%, 1.0몰%, 또는 1.5몰%로 포함할 수 있고, 상기 범위로 지질-PEG 접합체를 포함하는 지질 나노입자는 LSEC 특이적인(또는 LSEC을 타겟하는) 약물 전달 효율이 우수한 것일 수 있다.
- [97] 일 예에 따르면, 상기 LSEC으로의 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자는 이온화 가능한 지질 : 인지질 : 콜레스테롤 : 지질-PEG 접합체를 상기에서 전술한 범위 또는 20 내지 50 : 10 내지 30 : 30 내지 60 : 0.5 내지 5의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 25 : 40 내지 50 : 0.5 내지 3의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 20 : 40 내지 55 : 0.5 내지 3의 몰비, 25 내지 45 : 10 내지 20 : 40 내지 55 : 1.0 내지

1.5의 물비로 포함할 수 있다. 상기 범위의 물비로 구성성분을 포함하는 지질 나노입자는 LSEC 특이적인(또는 LSEC을 타겟하는) 약물 전달 효율이 우수한 것일 수 있다.

- [98] 일 예에 따른 지질 나노입자는 간 조직 특이적인 특성을 통해 고효율적으로 치료제를 간 조직 내부, 간세포, 및/또는 LSEC으로 전달할 수 있으며, 이러한 고효율의 간 조직, 간세포, 및/또는 LSEC 특이적 지질 나노입자를 매개한 간질환 치료용 약물, 치료용 유전자 등의 전달 방법 및 간을 통해 매개되는 치료제 등에 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 일 예에 따른 지질 나노입자는 핵산 등의 유전자 약물과 안정된 복합체를 형성하고 낮은 세포독성 및 효과적인 세포 흡수성을 나타내므로, 핵산 등의 유전자 약물을 전달하는데 효과적이다.
- [99] 상기 지질 나노입자는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [100] 일 예에 따른 지질 나노입자는 5 내지 8, 5.5 내지 7.5, 6 내지 7, 또는 6.5 내지 7의 pKa를 나타냄으로써 산성 pH 조건에서 양전하를 나타내어 음전하를 나타내는 핵산 및 음이온성 약물(예를 들면, 단백질) 등의 치료제와 정전기적 상호작용을 통해 용이하게 약물과의 복합체를 형성하여 높은 효율로 약물을 봉입할 수 있으며, 약물(예를 들면, 핵산)의 세포 내 또는 생체 내 약물 전달용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [101] 본 명세서에서, "봉입(encapsulation)"은 전달물질을 둘러싸서 효율적으로 생체 내로 함입시키기 위해 캡슐화하는 것을 말하고, 약물 봉입률(캡슐화 효율, Encapsulation efficiency)은 제조에 사용된 전체 약물 함량에 대하여 지질 나노입자 내에 봉입된 약물의 함량을 의미한다.
- [102] 상기 전달용 조성물의 음이온성 또는 핵산 약물의 봉입률은 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 80% 초과 내지 99% 이하, 80% 초과 내지 97% 이하, 80% 초과 내지 95% 이하, 85% 이상 내지 95% 이하, 87% 이상 내지 95% 이하, 90% 이상 내지 95% 이하, 91% 이상 내지 95% 이하, 91% 이상 내지 94% 이하, 91% 초과 내지 95% 이하, 92% 이상 내지 99% 이하, 92% 이상 내지 97% 이하, 또는 92% 이상 내지 95% 이하일 수 있다.
- [103] 일 예에 따르면, 상기 봉입률은 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 계산될 수 있으며, 예를 들면, 상기 약물 봉입률은 일 예에 따른 지질 나노입자에 Triton-X를 처리하고, Triton-X가 처리되고, Triton-X가 처리되지 않은 지질 나노입자의 형광강도를 특정 파장 대역폭(예를 들면, excitation : 480 ~ 490nm, emission : 520 ~ 530nm)를 측정하고, 하기 수학적 식 2에 의해 계산된 것일 수 있다.
- [104] (수학적 식 2)
- [105]
$$\text{약물 봉입률(\%)} = \frac{(\text{Triton-X가 처리된 지질 나노입자의 형광강도(형광도)} - \text{Triton-X가 처리되지 않은 지질 나노입자의 형광강도(형광도)})}{(\text{Triton-X가 처리된 지질 나노입자의 형광강도(형광도)})} \times 100$$
- [106] 일 예에 따른 약물 전달용 조성물은 Cas9 mRNA를 높은 봉입률로 포함할 수

있다. 기존에 알려진 Cas9 mRNA 전달용 조성물은 낮은 비율로 Cas9 mRNA를 포함하여 Cas9 mRNA 전달용 조성물로 활용하는데 한계가 있었다. 이와 달리, 일예에 따른 지질 나노입자는 높은 봉입률로, 구체적으로 70% 이상의 봉입률로 Cas9 mRNA를 포함할 수 있으며, 이에 따라 유전자 교정치료에 유용하게 활용될 수 있다.

- [107] 상기 음이온성 약물은 음이온을 띠는 각종 펩타이드, 단백질 약물, 단백질-핵산 구조체 또는 히알루로닉산-펩타이드 접합체, 히알루로닉산-단백질 접합체 등의 음이온성 생체고분자-약물 접합체 등일 수 있다. 상기 단백질 약물의 비제한적인 예로는, 유전자 교정가위인 Cas 9, cpf1 등의 유전자 교정 단백질을 비롯하여 세포사멸 유도인자(예컨대, cytochrome C, caspase 3/7/8/9 등) 및 다양한 세포내 단백질(예컨대, 전사인자) 등일 수 있다.
- [108] 상기 핵산은 소간섭리보핵산(siRNA), 리보솜 리보핵산(rRNA), 리보핵산(RNA), 디옥시리보핵산(DNA), 상보성 디옥시리보핵산(cDNA), 앵타머(aptamer), 전령 리보핵산(mRNA), 운반 리보핵산(tRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA, DNAzyme, 및 유전자교정을 위한 sgRNA 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [109] 본 명세서에서 용어 "siRNA"란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 이중 가닥 RNA(duplex RNA), 혹은 단일 가닥 RNA 내부에서 이중 가닥의 형태를 띠는 단일 가닥 RNA를 지칭한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹-다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다. 이중 가닥 사이의 결합은 뉴클레오티드 간의 수소 결합을 통해 이루어지고, 이중 가닥 내부의 모든 뉴클레오티드가 상보적으로 완전 결합해야 하는 것은 아니다.
- [110] siRNA의 길이는 약 15 내지 60개, 구체적으로 약 15 내지 50개, 약 15 내지 40개, 약 15 내지 30개, 약 15 내지 25개, 약 16 내지 25개, 약 19 내지 25개, 약 20 내지 25개, 또는 약 20 내지 23개 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 siRNA 길이는 이중 가닥 RNA의 한쪽 뉴클레오티드의 갯수, 즉, 염기쌍의 갯수를 의미하며, 단일 가닥 RNA인 경우에는 단일 가닥 RNA 내부의 이중 가닥의 길이를 의미한다. 또한 siRNA는 혈중 안정성을 증가시키거나 면역 반응을 약화시키는 등의 목적을 위해 다양한 작용기를 도입한 뉴클레오티드로 이루어질 수 있다.
- [111] 본 명세서에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오티드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수

있다. 또한, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히, 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-테아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

- [112] 본 명세서에서, "단일가닥 디옥시리보핵산(ssDNA)"은 특정 타겟 DNA에 선택적으로 결합하여 안티진(antigene) 효과를 유도하는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [113] 본 명세서에서, "앱타머(aptamer)"는 특정 타겟에 결합하는 올리고뉴클레오티드(일반적으로, 20 ~ 80 nt DNA 혹은 RNA)를 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에서 "앱타머"는 올리고뉴클레오티드 앱타머(예컨대, DNA 혹은 RNA aptamer)를 의미한다.
- [114] 본 명세서에서, "mRNA"는 유전자를 발현 가능한 합성 mRNA(in vitro transcribed mRNA)를 의미한다.
- [115] 본 명세서에서, "shRNA"는 단일 가닥으로 50 내지 70개로 구성된 뉴클레오티드를 의미하며, in vivo 상에서 스템-루프(stemloop) 구조를 이루고 있다. 5 내지 10개의 뉴클레오티드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19 내지 29개의 뉴클레오티드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.
- [116] 본 명세서에서, "miRNA(microRNA)"는 유전자 발현을 조절하며, 전장 21 내지 23개의 뉴클레오티드로 구성된 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다. miRNA는 세포 내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오티드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2 이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.
- [117] 본 명세서에서, "리보자임(ribozyme)"은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA이다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.
- [118] 본 명세서에서, "DNAzyme"은 효소 활성을 가지는 단일 가닥 DNA 분자로, 10 내지 23개의 뉴클레오티드로 구성된 DNAzyme(10-23 DNAzyme)은 생리적으로 유사한 조건 하에서 RNA가닥을 특정위치에서 절단한다. 10-23 DNAzyme은 염기쌍을 이루지 않고 노출된 어떠한 퓨린 및 피리미딘 사이를 절단한다. 10-23 DNA효소(DNAzyme)는 15개의 보존된 염기 서열(예를 들면, 5'-GGCTAGCTACAACGA-3')로 이루어진 효소의 활성부위(catalytic domain) 및 상술한 효소의 활성부위 좌우로 RNA 기질을 인식하는 7 ~ 8개의 DNA

염기서열로 이루어진 기질인식 자리(RNA substrate binding domain)로 구성된다.

- [119] 본 명세서에서, "PNA(Peptide nucleic acid)"는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.
- [120] 본 명세서에서, "sgRNA"는 특정 DNA 타겟에 결합하는 올리고뉴클레오티드(일반적으로, RNA 분자)로 crispr RNA(crRNA)와 tracer(tracrRNA)의 복합 단일 RNA 분자를 의미한다. CRISPR system에서 Cas9 nuclease와 함께 특정 DNA 서열을 인식하는데 이용이 되며 선택적인 유전자 절단을 가능케 하는 RNA분자로서, 대략 DNA와 상보적으로 결합이 가능한 20-nt 서열을 포함하며, 총 길이는 100 nt이다.
- [121] 본 명세서에서, "유전자 교정 단백질"은 Cas9, spCas9, cjCas9, casX, CasY 및 Cpf1 등을 일컬으며, sgRNA와 함께 타겟 DNA 염기 배열을 인식하여 DNA 절단을 일으키는 단백질을 말한다.
- [122] 일 예에 따른 지질 나노입자에 의하여 약물 및/또는 핵산이 전달되는 표적 세포는 생체 내의 또는 생체에서 분리된 간세포(hepatocyte), 및/또는 LSEC일 수 있다. 일 예에 따른 약물 전달용 조성물 및/또는 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합) 및 지질 나노입자와의 복합체는 간세포, 및/또는 LSEC를 타겟팅하거나 특이적으로 표적화하는 것일 수 있다. 따라서, 일 예에 따른 지질 나노입자 또는 상기 지질 나노입자를 포함하는 약물 핵산 전달용 조성물은 간 섬유화, 간경변, 간염(예컨대, A형 간염, B형 간염, C 간염 등) 등의 급성 또는 만성 간질환 치료를 위한 것일 수 있으며, 또한 간을 통해 흡수되는 치료제(약물)의 전달용 조성물로서 활용될 수 있다.
- [123]
- [124] 또 다른 양태는 (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의

조합을 포함하는, 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [125] 상기 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 포함되는 지질 나노입자에 대해서는 전술한 약물 전달용 조성물에 포함되는 지질 나노입자에 대한 것과 동일하다.
- [126] 상기 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 포함되는 음이온성 약물 및 핵산에 대해서는 전술한 약물 전달용 조성물에 포함되는 음이온성 약물 및 핵산에 대한 것과 동일하다.
- [127] 일 예에 따른 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 내부에 음이온성 약물 및/또는 핵산이 봉입된 지질 나노입자를 포함할 수 있다.
- [128] 상기 간질환은 ATTR 아밀로이드증(ATTR amyloidosis), 이상지질혈증(Hypercholesterolemia), B형 간염(Hepatitis B virus infection), 급성 간부전(Acute liver failure), 간경변(Cirrhosis), 및 간섬유화(liver fibrosis)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [129] 상기 음이온성 약물은 간질환 예방 또는 치료 효과를 갖는 것일 수 있다.
- [130] 상기 핵산은 간질환 예방 또는 치료 효과를 갖는 것일 수 있으며, 예를 들면, (1) TTR(Transthyretin)((e.g., 인간 TTR(단백질: GenBank Accession Nos. NP_000362.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_000371.4 등), 마우스 TTR(단백질: GenBank Accession No.; NP_038725.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_013697.5 등)), (2) PCSK9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)((e.g., 인간 PCSK9 (단백질: GenBank Accession Nos. NP_777596.2; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_174936.4 등), 마우스 PCSK9(단백질: GenBank Accession No. NP_705793.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_153565.2 등)), (3) HBV(Hepatitis B Virus)(예를 들면, HBV genotype A (e.g., GenBank Accession No.: X02763, X51970, 또는 AF090842); HBV genotype B(e.g., GenBank Accession No.: D00329, AF100309, 또는 AB033554); HBV genotype C(e.g., GenBank Accession No.: X04615, M12906, AB014381, AB042285, AB042284, AB042283, AB042282, AB026815, AB026814, AB026813, AB026812, 또는 AB026811); HBV genotype D(e.g., GenBank Accession No.: X65259, M32138, 또는 X85254); HBV genotype E(e.g., GenBank Accession No.: X75657 또는 AB032431); HBV genotype F(e.g., GenBank Accession No.: X69798, AB036910, 또는 AF223965); HBV genotype G(e.g., GenBank Accession No.: AF160501, AB064310, 또는 AF405706) HBV genotype H(e.g., AY090454, AY090457, 또는 AY090460) (4) Bax(BCL2 associated X))((e.g., 인간 Bax (단백질: GenBank Accession Nos. NP_001278357.1, NP_001278358.1, NP_001278359.1, NP_001278360.1, NP_004315.1 ; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_001291428.2, NM_001291429.2, NM_001291430.1, NM_001291431.2, NM_004324.4 등), 마우스 Bax (단백질: GenBank Accession No. NP_031553.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_007527.3 등), (5) VEGF(Vascular endothelial growth factor) (예를 들면, VEGFA((e.g., 인간 VEGFA

(단백질: GenBank Accession Nos. NP_001020537.2, NP_001020538.2, NP_001020539.2, NP_001020540.2, NP_001020541.2; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_003376.6, NM_001025366.3, NM_001025367.3, NM_001025368.3, NM_001025369.3 등), 마우스 VEGFA(단백질: GenBank Accession No. NP_001020421.2, NP_001020428.2, NP_001103736.1, NP_001103737.1, NP_001103738.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_001025250.3, NM_001025257.3, NM_001110266.1, NM_001110267.1, NM_001110268.1 등); VEGFB((e.g., 인간 VEGFB(단백질: GenBank Accession Nos. NP_001230662.1, NP_003368.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_003377.5, NM_001243733.2 등), 마우스 VEGFB(단백질: GenBank Accession No. NP_001172093.1, NP_035827.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_001185164.1, NM_011697.3 등); VEGFC(e.g., 인간 VEGFC(단백질: GenBank Accession Nos. NP_005420.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_005429.5 등), 마우스 VEGFC(단백질: GenBank Accession No.; NP_033532.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_009506.2 등)), 및/또는 (6) PDGF(Platelet-derived growth factor)(예를 들면, PDGFA((e.g., 인간 PDGFA (단백질: GenBank Accession Nos. NP_002598.4, NP_148983.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_002607.5, NM_033023.4 등), 마우스 PDGFA(단백질: GenBank Accession No. NP_032834.1, NP_001350200.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_008808.4, NM_001363271.1 등)); PDGFB((e.g., 인간 PDGFB(단백질: GenBank Accession Nos. NP_002599.1, NP_148937.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_033016.3, NM_002608.4 등), 마우스 PDGFB(단백질: GenBank Accession No. NP_035187.2; 유전자: GenBank Accession No. NM_011057.4 등)); PDGFC((e.g., 인간 PDGFC (단백질: GenBank Accession Nos. NP_057289.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_016205.3 등), 마우스 PDGFC(단백질: GenBank Accession No. NP_064355.1, NP_001344675.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_019971.3, NM_001357746.1 등)); PDGFD(e.g., 인간 PDGFD(단백질: GenBank Accession Nos. NP_079484.1, NP_149126.1; 유전자: GenBank Accession Nos. NM_033135.4, NM_025208.5 등), 마우스 PDGFD(단백질: GenBank Accession No. NP_082200.1, NP_001344326.1, NP_001344327.1; 유전자: GenBank Accession No. NM_027924.3, NM_001357397.1, NM_001357398.1 등))의 발현을 억제할 수 있는 siRNA 및/또는 miRNA일 수 있다.

- [131] 상기 약학적 조성물은 사람을 포함하는 포유동물에 비경구 투여를 포함한 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 비경구 투여는 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [132] 일 예에 따른 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를

사용하여 제조된다.

- [133] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.
- [134] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [135] 일 예에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적인 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일 예에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [136] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [137] 일 구체예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물에 포함된 약물(음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합)의 농도를 기준으로 0.1 내지 100mg/kg, 0.1 내지 50mg/kg, 1 내지 10mg/kg, 또는 1 내지 5mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다.
- [138]
- [139] 또 다른 양태는 (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는, 조성물 (예를 들면, 상기 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물)을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 간질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다. 지질 나노입자, 음이온성 약물, 핵산, 약학적 조성물, 및 간질환에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [140] 일 예에 따르면, 상기 간질환의 예방 또는 치료방법은 상기 조성물을 투여하는 단계 이전에, 상기 간질환의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인(선별)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [141] 상기 치료방법이 적용되는 대상 개체는 간질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나 이에 한정되지

않는다. 일 예에 따른 지질 나노입자를 포함하는 상기 약학적 조성물은 간으로 음이온성 약물 및/또는 핵산을 효율적으로 전달할 수 있어, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다.

- [142] 일 예에 따르면, (1) 상기 지질 나노입자; 및 (2) 음이온성 약물, 핵산, 또는 이의 조합을 포함하는, 조성물 (예를 들면, 상기 간질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물)의 약학적 유효량을 환자에 투여하는 단계를 포함하는, 간질환의 예방 또는 치료방법을 제공할 수 있다. 약학적 유효량에 대해서는 전술한 바와 같고 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용할 수 있다.

발명의 효과

- [143] 일 예에 따른, 지질 나노입자는 간 조직 특이적이고 생체 친화도가 우수하며, 고효율로 유전자 치료제 등을 전달할 수 있어 지질 나노입자 매개 유전자 치료 등 관련 기술분야에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [144] 도 1a는 일 예에 따른 지질 나노입자의 예시적인 구조를 나타낸 것이고, 도 1b는 일 예에 따른 나노입자를 Cryo-TEM으로 관찰한 이미지를 나타낸다.
- [145] 도 2는 CDCl_3 에서 246-C10의 ^1H NMR (실온, 400MHz) 결과를 나타낸다.
- [146] 도 3a(241-C10 LNP 내지 243-C10 LNP) 및 도 3b(244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP)는 각 지질 나노입자가 pH 4.1 내지 pH 9.6 범위를 갖는 용액에서 나타나는 형광 강도를 측정한 결과를 나타낸다.
- [147] 도 4a 및 도 4b는 각 나노입자의 세포 내 유전자 전달 효율을 나타내는 결과이다. 구체적으로, 도 4a는 루시페라제를 코딩하는 mRNA(luc mRNA)를 봉입한 LNP를 HeLa cell에 형질전환 시킨 후 세포를 용해시켜 측정한 발광 강도를 나타내고, 도 4b는 luc mRNA를 봉입한 LNP를 간세포(Hepatocyte)에 형질전환 시킨 후 세포를 용해시켜 측정한 발광 강도를 나타낸다. 도 4b에서 +ApoE는 ApoE3을 처리한 군을 의미하고, -ApoE는 ApoE3을 처리하지 않은 군을 의미한다.
- [148] 도 5a는 Luc mRNA가 봉입된 244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP가 투여된 마우스에서 생체 내 약물전달 분포를 나타내고, 도 5b는 Luc mRNA가 봉입된 246-C10 LNP가 투여된 마우스에서 적출된 마우스의 각 기관에 대한 약물전달 분포를 나타낸다.
- [149] 도 6은 1.0 내지 2.5몰%로 지질-PEG를 포함하는 246-C10 LNP가 투여된

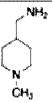
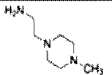
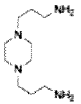
마우스에서 지질 나노입자에 포함된 지질-PEG 함량에 따른, 지질 나노입자의 약물전달 효율 및 나노입자의 크기를 나타낸다.

- [150] 도 7은 지질 나노입자에 봉입되어 투여된 siFVII의 농도에 따른 간세포(hepatocyte) 타겟 가능성을 FVII의 발현양을 통해 확인한 결과를 나타낸다.
- [151] 도 8은 지질 나노입자에 포함된 지질-PEG 함량에 따른 지질 나노입자의 지질 나노입자의 크기와 PDI 수치를 나타내고(좌측 표), 생체 내 간세포(hepatocyte)로의 약물 전달 효율을 FVII의 발현양을 통해 확인한 결과(우측 그래프)를 나타낸다.
- [152] 도 9는 지질 나노입자에 포함된 지질-PEG 함량에 따른 지질 나노입자의 크기와 PDI 수치를 나타내고(좌측 표), 생체 내 LSEC으로의 약물 전달 효율을 FVIII의 발현양을 통해 확인한 결과(우측 그래프)를 나타낸다.
- [153] 도 10은 세라마이드-PEG 또는 DSPE-PEG를 포함하는 지질 나노입자의 세포 내 siRNA 전달 효율을 측정한 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [154] 본 발명은 하기 실시예를 들어 더욱 자세히 설명할 것이나, 하기 실시예로 권리범위가 한정되는 의도는 아니다.
- [155] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [156]
- [157] 실시예 1. 이온화 가능한 지질(ionizable lipid)의 제조
- [158]
- [159] 실시예 1-1. 이온화 가능한 지질의 제조
- [160] 6원의 헤테로고리 3차 아민을 포함하는 하기 표 1의 아민계 화합물 및 1,2-epoxidodecane(이하, C10)(Sigma-Aldrich, USA)을 1:n (n = 1차 아민 x 2 + 2차 아민 x 1)의 몰비로 반응시켜 이온화 가능한 지질을 합성하였다.

[161] [Table 1]

Name	화학식
241	
242	
243	
244	
245	
246	

[162]

[163] 구체적으로, 5ml 바이알에 상기 표 1의 241 내지 246 아민 각각과 에폭시드(C10)를 1:n (n = 1차 아민 x 2 + 2차 아민 x 1)의 몰비로 마그네틱바와 함께 첨가하여 교반기에서 750rpm, 90°C로 3일 동안 반응시켰다. 이후 WELUX fine silica column(Intertec, 한국)으로 정제 후 상기 반응에 의해 생성된 각 이온화 가능한 지질의 분자량을 계산하고 에탄올을 사용하여 100mg/ml의 농도로 맞춰 보관하였다. 241 아민과 C10을 이용하여 제조한 이온화 가능한 지질을 '241-C10'으로 명명하고, 다른 종류의 아민을 사용하여 제조한 이온화 가능한 지질도 마찬가지로 '사용된 아민 이름(241 내지 246)-C10'으로 명명하였다.

[164]

[165] 실시예 1-2. 생성된 이온화 가능한 지질의 확인

[166] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질을 확인하기 위하여, ¹H NMR을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 1-1에서 합성된 이온화 가능한 지질(246-C10) 5μg을 CDCl₃(sigma, USA) 0.5ml에 희석하여 100mmole 농도가 되도록 준비하였다. 이후 400MHz NMR 전용 튜브에 0.5ml씩 넣고 상부를 막은 후 파라필름으로 실링하여 Agilent 400MHZ FT-NMR(Agilent, USA)을 이용하여 NMR spectra를 얻었고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 246-C10의 각 작용기를 나타내는 신호가 포화된 것을 알 수 있었다.

[167]

[168] 또한, 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질(241-C10 내지 246-C10)을

확인하기 위하여, MS분석을 수행하였다. 구체적으로, 이온화 가능한 지질은 0.5ppm 이하 농도로 에탄올에 희석하여 MS 분석을 수행하였다. 분석에 사용된 기기는 Agilent Technologies사 (Palo Alto, USA)의 6230 LC/MS로 분리관은 Agilent Technologies사 Zorbax SB-C18(100 mmX2.1 mm i.d., 3.5 μ m)를 사용하였고, 이동상으로 0.1% 개미산이 포함된 증류수(A)와 아세트오니트릴(B)의 두 가지 용매를 기울기 용리하였다. 이동상의 용매 기울기는 처음 유기용매 아세트오니트릴(B)의 비율을 30% 에서 시작하여 2분까지 80%까지 올린 후 다시 유기용매의 비율이 30%까지 낮추고 안정화될 때까지 4분간 유지하였다. 이동상의 유속은 300 μ l/min이며, 이때 분석기기 주입량은 2 μ l였다. MS분석을 수행한 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 표 2에 나타난 바와 같이 이온화 가능한 지질의 측정된 m/z ratio와 계산된 m/z ratio가 거의 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

[169] [Table 2]

	Chemical formula	Calculated m/z ratio	Observed m/z ratio
241-C10	C ₃₂ H ₆₆ N ₂ O ₂	510.87864	511.5201
242-C10	C ₃₁ H ₆₄ N ₂ O ₂	496.85206	497.5043
243-C10	C ₃₁ H ₆₅ N ₃ O ₂	511.8667	513.5186
244-C10	C ₄₂ H ₈₇ N ₃ O ₃	682.15848	682.6821
245-C10	C ₄₃ H ₈₉ N ₃ O ₃	696.18506	696.7045
246-C10	C ₅₈ H ₁₂₀ N ₄ O ₄	937.5978	937.9383

[170] 상기 결과로부터 실시예 1-1에서 이온화 가능한 지질이 잘 만들어진 것을 확인할 수 있었다.

[171]

[172] 실시예 2. 지질 나노입자의 제조

[173]

[174] 실시예 2-1. 지질 나노입자 제조

[175] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질(241-C10 내지 246-C10), 콜레스테롤(Cholesterol powder, BioReagent, suitable for cell culture, $\geq$ 99%, sigma, 한국), 인지질(DSPC)(Avanti, 미국), 및 지질-PEG 접합체(세라마이드-PEG 접합체; C16 PEG2000 Ceramide, Avanti, 미국)를 에탄올에 42.5:13:43:1.5의 물비로 용해시켰다.

[176] 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및 지질-PEG가 용해된 에탄올 및 아세트이트 버퍼를 1:3의 부피비로 12ml/min의 유속으로 미세 유체 혼합 장치(Benchtop Nanoassemblr; PNI, Canada)를 통해 혼합하여, 지질

나노입자(LNP)를 제조하였다.

[177]

[178] 실시예 2-2. 핵산이 봉입된 지질 나노입자의 제조

[179] 상기 실시예 1-1에서 제조한 이온화 가능한 지질(241-C10 내지 246-C10), 콜레스테롤(Cholesterol powder, BioReagent, suitable for cell culture, ≥99%, sigma, 한국), 인지질(DSPC 또는 DOPE) (18:0 PC (DSPC), 18:1 (Δ9-Cis) PE (DOPE), Avanti, 미국), 및 지질-PEG 접합체(세라마이드-PEG 접합체; C16 PEG2000 Ceramid, Avanti, 미국)를 에탄올에 용해시켰다. RNA 치료제인 mRNA(luciferase mRNA; 서열번호 1) 30μg을 시트르산 나트륨 0.75mℓ에 희석시키거나, siRNA(siFVII; 서열번호 2 및 3를 동일 몰비로 혼합, 또는 siFVIII; 서열번호 4 내지 11를 동일 몰비로 혼합, 또는 siLuc; 서열번호 12 및 13를 동일 몰비로 혼합) 30μg을 50mM의 아세트산 나트륨 0.75mℓ에 희석시켜 수성상을 제조하였다.

[180] 사용된 siRNA 서열은 다음과 같다: 서열번호 2 (FVII target siRNA_sense; 5'-GGAUCAUCUCAAGUCUUACdtdt-3'), 서열번호 3 (FVII target siRNA_antisense; 5'-GUAAGACUUGAGAUGAUCCdtdt-3'), 서열번호 4 (FVIII target siRNA_sense_1; 5'-CUUAUAUCGUGGAGAAUUAAdtdt-3') 서열번호 5 (FVIII target siRNA_antisense_1; 5'-UAAUUCUCCACGAUAUAAGdtdt-3'), 서열번호 6 (FVIII target siRNA_sense_2; 5'-UCAAAGGAUUCGAUGGUAUdtdt-3'), 서열번호 7 (FVIII target siRNA_antisense_2; 5'-AUACCAUCGAAUCCUUUGAdtdt-3'), 서열번호 8(FVIII target siRNA_sense_3; 5'-CAAGAGCACUAGUGAUUAUdtdt-3'), 서열번호 9(FVIII target siRNA_antisense_3; 5'-AUAAUCACUAGUGCUCUUGdtdt-3'), 서열번호 10(FVIII target siRNA_sense_4; 5'-GGGCACCACUCCUGAAAUAdtdt-3'), 서열번호 11(FVIII target siRNA_antisense_4; 5'-UAUUUCAGGAGUGGUGCCdtdt-3'), 서열번호 12(siLuc_sense; 5'-AACGCUGGGCGUAAUCAAdtdt-3'), 서열번호 13(siLuc_antisense; 5'-UUGAUUAACGCCAGCGUAdtdt-3').

[181] 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, 인지질, 및 지질-PEG 접합체(이하, 지질-PEG)가 용해된 유기상(에탄올) 및 RNA 치료제(핵산)이 용해된 수성상(아세트산 나트륨 또는 시트르산 나트륨)을 12mℓ/min의 유속으로 미세 유체 혼합 장치(Benchtop Nanoassembler; PNI, Canada)를 통해 혼합하여, 핵산이 봉입된 지질 나노입자(LNP)를 제조하였다. (i) mRNA 가 봉입된 지질 나노입자를 제조하기 위하여, 이온화 가능한 지질 : 인지질(DOPE) : 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드)를 26.5 : 20 : 52.5 내지 51 : 1.0 내지 2.5 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)의 몰비로 에탄올에 용해시켰고, mRNA(luciferase mRNA; 서열번호 1) : 이온화 가능한 지질이 1:10의 중량비가 되도록 유기상 및 수성상을 혼합하여 지질 나노입자를 제조하였다. (ii) siRNA 가 봉입된 지질 나노입자를 제조하기 위하여 이온화 가능한 지질 : 인지질(DSPC) : 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000

세라마이드)를 42.5 : 13 : 44 내지 39.5 : 0.5 내지 5.0 (물비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)의 물비로 에탄올에 용해시켰고, siRNA(siFVII; 서열번호 2 및 3를 동일 물비로 혼합, 또는 siFVIII; 서열번호 4 내지 11를 동일 물비로 혼합, 또는 siLuc; 서열번호 12 및 13를 동일 물비로 혼합); 이온화 가능한 지질이 1 : 7.5의 중량비가 되도록 유기상 및 수성상을 혼합하여 지질 나노입자(lipid nanoparticle; LNP)를 제조하였다.

[182] 제조된 LNP를 에탄올 제거 및 체내의 pH와 지질 나노입자의 pH를 맞추기 위해서, 3500 MWCO 투석 카세트를 사용하여 16 시간 동안 PBS에 대해 투석하였다.

[183]

[184] 이온화 가능한 지질 '241-C10'를 포함하는 지질 나노입자를 '241-C10 LNP'로 명명하고, 다른 종류의 아민을 포함하는 이온화 가능한 지질을 사용하여 제조한 지질 나노입자(핵산이 봉입된 지질 나노입자 포함)를 '포함된 아민 이름(241 내지 246)-C10 LNP'로 명명하였다.

[185]

[186] 실시예 2-3. 핵산이 봉입된 지질 나노입자의 관찰

[187] siLuc (서열번호 12 및 13)가 봉입된 지질 나노입자를 세라마이드-PEG 접합체(C16-PEG2000 세라마이드)를 사용하여 실시예 2-2 와 같이 제조하였다. 제조된 지질 나노입자(세라마이드-PEG 접합체를 1.5몰% 포함)를 200 mesh carbon lacey film Cu-grid에 siRNA 농도 기준으로 60ug 로딩하여 vitrobot으로 액화된 (약 -170도 이하) Ethane 에 담구어 plunge freeze 시켜 준비한 후 Cryo-TEM (Tecnai F20, FEI)으로 관찰하고, 그 결과를 도 1b에 나타내었다. 도 1b에 나타난 바와 같이, 속이 짙은 형태의 구모양의 입자가 관찰되었다.

[188]

[189] 실시예 3. 지질 나노입자의 pKa

[190] 본 실시예에서 인비트로 TNS 분석(In vitro TNS assay)을 통하여 상기 실시예 2-1에서 제형화된 각 지질 나노입자(LNP)의 pKa를 계산하였다. 음이온성 TNS는 양으로 하전된 이온화 가능한 지질과 상호 작용하여 친유성이 되고, pH값이 각각의 LNP의 pKa값에 근접함에 따라 TNS의 친유성이 낮아지고 더 많은 물분자가 TNS 형광을 퀀칭(quenching)시키므로, 6.0 내지 7.0의 pKa를 갖는 지질 나노입자는 생체 내 약물전달 효율이 우수하고, pH에 따른 형광(fluorescence)를 나타내는 그래프에서"s형 곡선"을 나타내는 지질 나노입자는 엔도솜 막과 상호작용이 용이하고, 산성화시에 용이하게 엔도솜을 탈출할 수 있는 것을 의미한다.

[191] 구체적으로, 20mM sodium phosphate, 25mM citrate, 20mM ammonium acetate, 및 150mM NaCl를 포함하는 용액의 pH를 0.1N NaOH 및/또는 0.1N HCl를 이용하여 pH 4.1에서 pH 9.6까지 0.5의 간격으로 조정하여 다양한 pH단위의 용액을 제조하였다. 각각의 pH(pH 4.1에서 pH 9.6까지 0.5의 간격의 pH)를 갖는 용액을

100 μ l씩 black 96well plate에 첨가하고, 300uM의 TNS 스톡(stock) 용액을 이용하여 6uM의 최종 농도가 되도록 상기 범위의 pH를 갖는 용액에 각각 첨가하였다. 241-C10 LNP 내지 246-C10 LNP를 최종 농도가 20uM가 되도록 혼합용액에 첨가하였다. 형광강도는 Tecan 기기를 통해 325nm의 excitation, 435nm의 emission으로 측정하여, 각 지질 나노입자에 대한 형광강도를 도 3a 및 도 3b에 나타내었고, 각 지질 나노입자에 대한 pKa는 최대형광의 절반에 도달하는 pH값으로 계산하여 하기 표 3에 기재하였다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP는 비선형 회귀분석(nonlinear regression)을 통해 형광적정 s형 곡선을 나타내는 것을 알 수 있었다.

[192] [Table 3]

지질 나노입자	pKa
241-C10 LNP	7.7
242-C10 LNP	8.7
243-C10 LNP	8.2
244-C10 LNP	6.8
245-C10 LNP	6.9
246-C10 LNP	7

[193] 상기 표 3에서 확인되는 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노 입자는 생체 내 안전성 및 약물 방출이 우수한 pKa 6.0 내지 7.0범위를 나타내는 것을 확인하였다.

[194] 실시예 2-2의 방법과 같이 제조한, 핵산이 봉입된 LNP의 경우에도 포함된 이온화 가능한 지질의 종류(이온화 가능한 지질에 포함된 아민의 종류)에 따라 동일한 양상을 보였다.

[195]

[196] 실시예 4. 지질 나노입자의 특성 확인

[197]

[198] 실시예 4-1. 입자크기 측정

[199] 본 실시예에서 상기 실시예 2-2에서 제조된 mRNA가 봉입된 지질 나노입자(LNP; 지질-PEG를 1.5몰% 포함)의 크기를 측정하고자 하였다. 상기 실시예 2-2에서 제조한 각 지질 나노입자에 포함된 RNA(luciferase mRNA; 서열번호 1)의 농도가 1 μ g/ml가 되도록 PBS를 사용하여 희석하고, Malvern Zetasizer Nano(Malvern Instruments, UK)에서 동적 광산란(DLS)을 사용하여 LNP의 지름 및 다분산도(PDI; polydispersity index)를 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 4에 기재하였다.

[200] [Table 4]

지질 나노입자	지름(nm)	PDI
241-C10 LNP	128	0.259
242-C10 LNP	77	0.210
243-C10 LNP	56	0.225
244-C10 LNP	66	0.149
245-C10 LNP	70	0.210
246-C10 LNP	68	0.143

[201] 상기 표 4에서 확인되는 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노 입자는 간세포 내 도입이 용이하고 약물 방출이 우수한 입자크기를 나타내었고, 241-C10 LNP > 243-C10 LNP > 242-C10 LNP = 245-C10 LNP > 244-C10 LNP > 246-C10 LNP 순서대로 PDI 수치가 작고, 입자가 균일한 것을 알 수 있었다.

[202]

[203] 실시예 4-2. 약물 봉입률 측정

[204] 핵산 약물로서 siRNA(siFVII siRNA)를 봉입한 각 LNP(지질-PEG를 1.5몰% 포함)의 캡슐화 효율(약물 봉입률, %)을 Ribogreen 분석 (Quant-iT™ RiboGreen® RNA, Invitrogen)을 통해 측정하였다. 상기 실시예 2-2에서 제조한 핵산 약물을 봉입한 LNP를 96 웰 플레이트에서 siRNA의 최종 농도가 4 ~ 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 1xTE 완충액 50 μl 로 희석하였다. Triton-X를 처리하지 않은 그룹(Triton-x LNP(-))은 1xTE 버퍼 50 μl 를 첨가하고, Triton-X를 처리한 그룹(Triton-X LNP(+))은 2% Triton-X 버퍼 50 μl 를 첨가하였다. 37°C에서 10분간 인큐베이션하여, Triton-X로 LNP를 분해하여 캡슐화된 핵산을 방출시켰다. 그 후 Ribogreen 시약 100 μl 를 각 웰에 첨가하였다. Triton LNP(-)와 Triton LNP(+))의 형광 강도(FL)는 Infinite® 200 PRO NanoQuant(Tecan)에서 파장 대역폭(excitation : 485nm, emission : 528nm)으로 측정하였으며, 약물 봉입률(캡슐화 효율, %)은 하기 수학적 식 3과 같이 계산하였다. 각 LNP에 대한 약물 봉입률(%)은 2회 반복하여 측정된 결과값의 평균값으로 하기 표 5에 나타내었다.

[205] (수학적 식 3)

[206] $\text{약물 봉입률}(\%) = (\text{Triton LNP}(+) \text{의 형광도} - \text{Triton LNP}(-) \text{의 형광도}) / (\text{Triton LNP}(+) \text{의 형광도}) \times 100$

[207] [Table 5]

지질 나노입자	봉입률 (Encapsulation efficiency, %)
241-C10 LNP	84
242-C10 LNP	83
243-C10 LNP	91
244-C10 LNP	87
245-C10 LNP	91
246-C10 LNP	94

[208] 상기 표 5에서 확인되는 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자는 높은 효율로 약물을 봉입할 수 있음을 확인하였다.

[209]

[210] 실시예 5. 지질 나노입자를 이용한 세포 내 핵산 전달 확인

[211]

[212] 실시예 5-1. LNP에 포함되는 이온화 가능한 지질의 종류에 따른 핵산 전달 효과

[213] 일 예에 따른 LNP를 세포에 형질 전환(transfection)시키기 하루 전에 HeLa 세포를(한국 세포주 은행)을 white plate(96well)에 0.01x10⁶ cells/well 로 분주하여 DMEM media(SH30022, Hyclone, USA)에서 37°C, 0.5~3% CO₂ 조건으로 배양하였다. 실시예 2-2에서 제조된, 루시페라제(luciferase) 유전자를 코딩하는 mRNA(luc mRNA; 서열번호 1)가 봉입된 LNP(지질-PEG를 1.5몰% 포함하는 241-C10 LNP 내지 246-C10 LNP)를 ApoE3 0.1µg/ml와 파이팻팅으로 교반 후 상온에서 10분 동안 인큐베이션 후 HeLa cell에 처리(지질 나노입자에 포함된 mRNA 기준으로 100ng/well) 하였다. ApoE3는 LNP 표면에 결합하여 세포 표면에 발현된 LDL 수용체를 통해 LNP가 세포 안으로 엔도시토시스(endocytosis)를 통해 들어갈 수 있도록 하는 역할을 한다.

[214] 24시간 후 Bright-Glo™ Luciferase Assay 용액(promega, USA)을 100µl/well씩 처리하여 10분간 상온에 둔 후 용해된 세포를 Infinite M200 발광 측정기기(Tecan, USA)를 이용하여 발광 강도(luminescence intensity)를 측정하고, 그 결과를 도 4a에 나타내었다. 도 4a에 나타난 바와 같이, pKa 범위가 6.0 내지 7.0인 244-C10 LNP, 245-C10 LNP, 및 246-C10 LNP의 경우, 강한 발광 강도를 나타내었고, 그 중에서도 246-C10 LNP의 경우 발광 강도가 가장 높아, 246-C10 LNP가 세포 내 약물 전달 효율이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

[215]

[216] 실시예 5-2. 간세포 내 핵산 전달 확인

- [217] 실시예 2-2에서 제조한 246-C10 지질 나노입자를 이용하여 간세포(Hepatocyte)에 luc mRNA를 전달하여 발광 강도를 측정하여 상기 유전자의 발현을 확인하였다.
- [218] 구체적으로, luc mRNA(서열번호 1)가 봉입된 246-C10 LNP(지질-PEG를 1.5몰% 포함)를 ApoE3 5 μ g/ml와 결합시킨 뒤, 나노입자에 포함된 mRNA 농도를 기준으로 0.2 μ g/well, 0.5 μ g/well, 또는 1 μ g/well로 1x10⁵cells/well로 분주된 간세포(Hepatocyte) 세포주(Nexel, Korea)에 LNP를 처리하였다. 6시간 후 Bright-Glo™ Luciferase Assay 용액(promega, USA)을 100 μ l/well 처리하여 10분간 상온에 둔 후 용해된 세포를 Infinite M200 발광 측정기(Tecan, US)을 이용하여 발광 강도(luminescence intensity)를 측정하여 그 결과를 도 4b에 나타내었다.
- [219] 도 4b에서 확인되는 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자는 지질 나노입자는 ApoE3과의 결합을 통해 세포 안으로 도입이 용이하고, 농도 의존적으로 약물(핵산) 전달량이 증가하였으며, 간세포(hepatocyte)에 약물을 높은 효율로 전달할 수 있는 것을 확인하였다.
- [220]
- [221] 실시예 6. 지질 나노입자를 이용한 생체 내 발현 확인
- [222] 상기 실시예 5-1에서 확인한 바와 같이, 인비트로에서 우수한 유전자 발현 효과(유전자 전달 효과)를 나타내는 244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP의 생체 내 약물전달 효율 및 생체 분포(biodistribution)를 본 실시예에서 확인하고자 하였다.
- [223] 상기 실시예 2-2의 방법대로 luc mRNA(서열 번호 1)가 봉입된 244-C10 내지 246-C10 LNP(지질-PEG를 1.5몰% 포함)를 제조하고, 각 나노입자를 PBS에서 16시간 동안 투석하여 에탄올을 제거하였다. 지질 나노입자에 포함된 mRNA를 기준으로 0.1mg/kg 용량으로 C57BL/6 Female 7주령 마우스(오리엔트 바이오)에 mRNA가 봉입된 지질 나노입자를 정맥(i.v) 주사 후 3시간 뒤에 루시페린(luciferin) 0.25 mg/kg을 복강 투여하여 IVIS(PerkinElmer, USA) 장비를 통해 생체발광(bioluminescence)을 확인하여, 그 결과를 도 5a에 나타내었다.
- [224] luc mRNA가 봉입된 246-C10 LNP가 투여된 마우스를 희생시키고 장기를 적출하여 각 장기에서 지질입자의 생체 분포(biodistribution)를 IVIS 장비를 통해 확인하고 그 결과를 도 5b에 나타내었다.
- [225] 도 5a에 나타난 바와 같이, luc mRNA가 봉입된 244-C10 LNP 내지 246-C10 LNP가 투여된 마우스의 생체 내에서 높은 발광 강도를 나타내며, 이는 상기 실시예 5-1의 결과와도 일치한다. 특히, 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, 전신 이미징과 탈체 기관 이미징(ex vivo organ imaging)을 통해 luc mRNA가 봉입된 246-C10 LNP의 경우 간 특이적으로 높은 발광 강도를 나타내는 것을 확인하여 일 예에 따른 지질 나노입자는 간으로의 높은 생체 분포를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [226]
- [227] 실시예 7. 핵산 전달에 최적인 지질 나노입자의 조성비 확인

- [228] 본 실시예에서, 생체 내에서 간 특이적으로 약물 전달 효율이 가장 우수한 지질 나노입자의 조성비를 확인하고자 하였다.
- [229] 지질 나노입자 제조에 있어, 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드)를 1.0 내지 2.5 몰%로 혼합하여 상기 실시예 2-2의 방법과 같이 luc mRNA(서열 번호 1)가 봉입된 지질 나노입자(246-C10 LNP)를 제조하였다. 지질 나노입자에 포함된 이온화 가능한 지질(Ionizable lipid): mRNA의 중량비는 10 : 1 였고, LNP에 포함되는 이온화 가능한 지질(246-C10): 인지질(DOPE) : 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드)의 몰비는 26.5 : 20 : 52.5 내지 51 : 1.0 내지 2.5(몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)이었다.
- [230] 지질-PEG를 1.0몰%, 1.5몰%, 또는 2.5 몰%로 함유하고, luc mRNA가 봉입된 246-C10 LNP를 상기 실시예 6의 방법과 유사하게, 지질 나노입자에 포함된 luc mRNA를 기준으로 0.1mg/kg 용량으로 C57BL/6 Female 7주령 마우스(오리엔트 바이오)에 mRNA가 봉입된 지질 나노입자를 정맥(i.v) 주사 후 3시간 뒤에 루시페린(luciferin) 0.25 mg/kg을 복강 투여하여 IVIS(PerkinElmer, USA) 장비를 통해 생체발광(bioluminescence)을 확인하여, 그 결과를 도 6에 나타내었고, 지질-PEG 함량에 따른 지질 나노입자의 크기를 실시예 4-1의 방법과 동일하게 측정하여 하기 표 6 및 도 6에 기재하였다.

[231] [Table 6]

LNP에 포함된 지질-PEG 함량	지름(nm)
1.0 몰%	90
1.5 몰%	67
2.5 몰%	55

- [232] 도 6에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자를 투여한 군에서 간으로의 약물전달 효율이 우수한 것을 확인할 수 있었고, 지질-PEG를 1.5몰%로 포함하는 LNP 크기는 약 70nm 정도였다.

[233]

[234] 실시예 8. 간세포(hepatocyte) 특이적인 약물전달 효과 확인

[235]

[236] 실시예 8-1. 지질 나노입자를 이용한 FVII의 녹아웃(knockout) 효과 확인

[237] FVII은 간세포(hepatocyte)에서 특이적으로 발현되므로 본 실시예에서 일 예에 따른 지질 나노입자의 간세포 타겟 가능성을 siFVII를 이용한 FVII(Factor VII) 녹아웃 효과를 통하여 확인하고자 하였다.

[238] 지질 나노입자에 포함된 siRNA의 농도를 기준으로 0.03mg/kg, 0.1mg/kg, 또는 0.3mg/kg 농도로, 상기 실시예 2-2에서 제조한 FVII target siRNA(서열번호 2 및 3)가 봉입된 246-C10 지질 나노입자(지질-PEG를 1.5몰% 포함)를 C57BL/6 암컷 7주령 20g 마우스에 정맥주사 후 3일 후 꼬리 정맥을 통해 혈액을 수집하고,

coaset FVII assay kit의 프로토콜에 따라 혈액 분석하고, PBS가 투여된 마우스의 혈액으로 표준 곡선(standard curve)를 도시하여 FVII 발현양을 측정하고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 246-C10 지질 나노입자에 봉입된 siRNA 농도 의존적으로 생체 내에서 FVII 발현을 억제하였으므로, 일 예에 따른 지질 나노입자가 간세포를 타겟으로 핵산을 전달할 수 있는 것을 확인하였다.

[239]

[240] 실시예 8-2. 지질-PEG 함량에 따른 간세포로의 약물전달 효과

[241] 지질 나노입자에 포함되는 지질-PEG의 함량을 0.5 내지 5.0몰%로 변경하여 상기 실시예 2-2의 방법대로 siFVII(서열 번호 2 및 3)가 봉입된 지질 나노입자(246-C10 LNP)를 제조하였다. 지질 나노입자에 포함된 이온화 가능한 지질: siRNA의 중량비는 7.5 : 1 이었고, LNP에 포함되는 이온화 가능한 지질(246-C10): 인지질(DSPC): 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드)의 몰비는 42.5 : 13 : 44 내지 39.5 : 0.5 내지 5.0 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)이었다.

[242] 상기에서 제조한 지질 나노입자의 지름 및 다분산도(PDI; polydispersity index)를 상기 실시예 4-1의 방법과 동일하게 측정하여 하기 표 7 및 도 8(좌측 표)에 나타내었다.

[243] [Table 7]

지질-PEG (%)	평균 지름(nm)	PDI
0.5	120	0.018
1	78	0.106
1.5	52	0.159
3	42	0.152
5	37	0.226

[244] 지질 나노입자에 포함된 siRNA를 기준으로 0.2mg/kg 용량이 되도록, siFVII가 봉입된 지질 나노입자(0.5 내지 5몰%로 지질-PEG를 포함)를 C57BL/6 female 7주령 20g 마우스에 정맥주사 후 3일 뒤 꼬리 정맥을 통해 혈액을 수집하여, 상기 실시예 8-1의 방법과 유사하게 coaset FVII assay kit를 이용하여, FVII의 발현양을 측정하고, 그 결과를 도 8(우측 그래프)에 나타내었다. 도 8에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자를 투여시 생체 내의 FVII의 발현이 감소하였고, 일 예에 따라 0.5 내지 5.0몰%의 지질-PEG 함량을 갖는 지질 나노입자를 투여한 경우, 우수하게 FVII 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

[245]

[246] 실시예 9. LSEC 특이적인 약물전달 효과

[247] FVIII은 LSEC(liver sinusoidal endothelial cells)에서 특이적으로 발현되므로 본

실시예에서 일 예에 따른 지질 나노입자의 LSEC 타겟 가능성을 siFVIII를 이용한 FVIII(Factor VIII)의 녹아웃 효과를 통하여 확인하고자 하였고, 지질-PEG 함량에 따른 약물전달 효과를 살펴보았다.

[248]

[249] 지질 나노입자에 포함되는 지질-PEG의 함량을 0.5 내지 5.0 몰%로 변경하여 상기 실시예 2의 방법대로 siFVIII(서열 번호 4 내지 11)가 봉입된 나노입자(246-C10 LNP)를 제조하였다. 지질 나노입자에 포함된 이온화 가능한 지질: siRNA의 중량비는 7.5 : 1 이었고, LNP에 포함되는 이온화 가능한 지질(246-C10): 인지질(DSPC) : 콜레스테롤 : 지질-PEG(C16-PEG2000 세라마이드) = 42.5 : 13 : 44 내지 39.5 : 0.5 내지 5.0 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)이었다.

[250] 상기에서 제조한 지질 나노입자의 지름 및 PDI를 상기 실시예 4-1의 방법과 동일하게 측정하여 하기 표 8 및 도 9(좌측 표)에 나타내었다.

[251] [Table 8]

지질-PEG (%)	평균 지름(nm)	PDI
0.5	166	0.018
1	87	0.106
1.5	78	0.159
3	42	0.152
5	35.6	0.226

[252] 지질 나노입자에 포함된 siRNA를 기준으로 0.5mg/kg 의 용량이 되도록, siFVIII가 봉입된 지질 나노입자(0.5 내지 5몰%로 지질-PEG를 포함)를 C57BL/6 암컷 7주령 20g 마우스에 정맥주사 후 2일뒤 꼬리 정맥을 통해 혈액을 수집하여, 상기 실시예 8-1의 방법과 유사하게 coaset FVIII assay kit를 이용하여, FVIII의 발현양을 측정하여 그 결과를 도 9(우측 그래프)에 나타내었다. 도 9에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자를 투여시 생체 내의 FVIII의 발현이 감소하였고, 일 예에 따른 지질 나노입자가 LSEC을 타겟할 수 있는 것을 확인하였고, 일 예에 따라 0.5 내지 5.0몰%의 지질-PEG 함량을 갖는 지질 나노입자를 투여한 경우, 우수하게 FVIII 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

[253]

[254] 실시예 10. 지질-PEG 접합체의 종류에 따른 약물전달 효과

[255] 지질-PEG 접합체로서, 세라마이드-PEG 접합체(C16-PEG 2000 세라마이드; Avanti, 미국) 또는 PEG-DSPE(Avanti, 미국)를 포함하는 지질 나노입자 (지질-PEG 접합체를 0.25 내지 10.0 몰%로 포함)를 상기 실시예 2-2의 방법과 유사하게 지질 나노입자를 제조하였다.

[256] 지질 나노입자에 포함된 이온화 가능한 지질: siRNA(siLuc)의 중량비는 7.5 : 1

이었고, LNP에 포함되는 이온화 가능한 지질(246-C10): 인지질(DSPC): 콜레스테롤: 지질-PEG(세라마이드-PEG 또는 PEG-DSPE)의 몰비는 42.5 : 13 : 44.25 내지 34.5 : 0.25 내지 10 (몰비의 총 합이 100이 되도록 콜레스테롤과 지질-PEG 함량을 조절)이었다. 사용된 siLuc (루시페라제 (luciferase) 유전자를 타겟하는 siRNA; 서열번호 12 및 13)의 서열은 상기 실시예 2-2에 기재하였다.

[257] 일 예에 따른 LNP를 세포에 형질 전환(transfection)시키기 하루 전에 HeLa 세포를(한국 세포주 은행)을 white plate(96well)에 0.01×10^6 cells/well 로 분주하여 DMEM media(SH30022, Hyclone, USA)에서 37°C, 0.5~3% CO₂ 조건으로 배양하였다. siLuc가 봉입된 지질 나노입자를 siRNA 농도를 기준으로 10 nM 로 HeLa-Luc 세포주에 처리 24시간 후 Bright-Glo™ Luciferase Assay 용액(promega, USA)을 100 μ l/well씩 처리하여 10분간 상온에 둔 후 용해된 세포를 Infinite M200 발광 측정기기(Tecan, USA)를 이용하여 발광 강도(luminescence intensity)를 측정하여 그 결과를 도 10에 나타내었다. 측정된 결과는 평균 $\pm$ SD로 표현되었다. 결과값은 T-test를 통한 방법으로 통계 검증하였고, $p < 0.05$ 이상일 경우를 통계적으로 유의하다고 정의하였다.

[258] 도 10에 나타난 바와 같이, 일 예에 따른 지질 나노입자는 세포로의 핵산 전달 효과가 우수하였고, 특히 지질-PEG 접합체로서 세라마이드-PEG 접합체를 포함하는 경우 핵산 전달 효과가 우수하였다.