명세서

발명의 명칭: 약물전달용 나노입자 조성물 제조용 키트

기술분야

[1] 본 발명은 약물전달용 나노입자 조성물을 제조하기 위한 키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 폴리락트산염을 포함하지 않으며, 키트 구성성분인 양친성 블록 공중합체, 양이온성 화합물 및 약물을 단순 혼합하는 것만으로 약물이 그 내부에 봉입되어 있는 나노입자를 쉽게 형성할 수 있도록 설계된 약물전달용 나노입자 조성물 제조용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[2] 핵산을 비롯한 음이온성 약물을 이용한 치료에 있어서, 안전하고 효율적인 약물 전달기술은 오랫동안 연구되어 왔으며, 다양한 전달체 및 전달기술이 개발되어 왔다. 전달체는 크게 아데노바이러스나 레트로바이러스 등을 이용한 바이러스성 전달체와 양이온성 지질 및 양이온성 고분자 등을 이용한 비바이러스성 전달체로 나뉜다. 바이러스성 전달체의 경우 비특이적 면역 반응 등의 위험성에 노출되어 있으며 생산 공정이 복잡하여 상용화하는 데 많은 문제점이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 최근 연구 방향은 비바이러스성 전달체를 이용하여 그 단점을 개선하는 방향으로 진행되고 있다. 비바이러스성 전달체는, 바이러스성 전달체에 비하여 생체 내 안전성의 측면에서 부작용이 적고, 경제성 측면에서 생산 가격이 저렴하다는 장점을 가지고 있다.

[3] 핵산 물질의 전달에 이용되는 비바이러스성 전달체로서 대표적인 것은 양이온성 지질을 이용한 양이온성 지질과 핵산의 복합체(lipoplex) 및 폴리양이온성(polycation) 고분자와 핵산의 복합체(polyplex)이다. 이러한 양이온성 지질 혹은 폴리양이온성 고분자는, 음이온성 약물과 정전기적 상호작용을 통해 복합체를 형성함으로써 음이온성 약물을 안정화시키고, 세포 내 전달을 증가시킨다는 점에서 많은 연구가 진행되어 왔다(De Paula D, Bentley MV, Mahato RI, Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting, RNA 13 (2007) 431-56; Gary DJ, Puri N, Won YY, Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery, J Control release 121 (2007) 64-73).

[4] 그러나 이러한 복합체가 형성하는 나노입자는 보관 환경에 따라 쉽게 안정성을 잃게 되는 경우가 잦으므로, 장기 보관에 취약하고 운송 중에 품질이 손상될 우려가 있다. 또한, 충분한 안정성을 확보하기 위해 복잡한 제조 공정을 필요로 하여 제조하기에 매우 까다로운 특징을 갖는다.

[5] 따라서, 보관 환경에 크게 영향을 받지 않고, 최종 소비자가 사용하기에 용이한 약물전달용 나노입자 조성물 제조용 키트의 개발이 요청되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 목적은 키트 구성성분들을 단순 혼합하는 것만으로 약물이 함유된 나노입자를 쉽게 형성할 수 있어 최종 소비자가 사용하기에 용이하고, 약물-함유 나노입자를 사용 직전에 쉽게 형성할 수 있으므로 그 보관 또는 운송 환경에 따른 영향 없이 약물을 체내에 효과적으로 전달할 수 있는, 약물전달용 나노입자 조성물 제조용 키트를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[7] 상기 과제를 해결하고자 본 발명은, 양친성 블록 공중합체 및 양이온성 화합물을 포함하는 제1 챔버; 및 핵산, 폴리펩티드, 바이러스 또는 이들의 조합으로부터 선택된 유효성분을 포함하는 제2 챔버;를 포함하고, 키트 구성성분으로서 폴리락트산 및 폴리락트산염 중 어느 것도 포함하지 않는, 나노입자 조성물 제조용 키트를 제공한다.

[8] 일 구체예에서, 상기 키트는 세포 내 유효성분을 전달하는 나노입자를 형성하기 위한 것이다.

[9] 일 구체예에서, 상기 제1 챔버 및 제2 챔버로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상은 추가의 용매를 더 포함한다.

[10] 일 구체예에서, 상기 용매는 수성 용매, 수혼화성 용매 또는 이의 혼합물이다.

[11] 일 구체예에서, 상기 제2 챔버는 pH 조절제, 무기염, 당류, 계면활성제, 킬레이트제 또는 이들의 조합을 더 포함한다.

발명의 효과

[12] 본 발명에 따른 나노입자 조성물 제조용 키트는, 약물-함유 나노입자를 형성하기 위한 구성성분들을 별도의 챔버들 내에 분리시켜 포함하므로, 이미 형성된 나노입자와 달리 보관 또는 운송 환경에 영향받지 않으며, 이를 사용하면 최종 사용자가 챔버의 성분들을 단순 혼합하는 것 만으로도 유효한 약물 전달 효과를 갖는 나노입자를 성공적으로 형성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[13] 도 1은 본 발명의 실험예 2에서 수행된 나노입자의 세포 내 전달 효율 실험 결과를 보여주는 그래프이다.

[14] 도 2는 본 발명의 실험예 3에 수행된 나노입자의 세포 내 전달 효율 실험 결과를 보여주는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[15] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[16] 본 발명에 따른 나노입자 조성물 제조용 키트는, 양친성 블록 공중합체 및 양이온성 화합물을 포함하는 제1 챔버; 및 핵산, 폴리펩티드, 바이러스 또는 이들의 조합으로부터 선택된 유효성분을 포함하는 제2 챔버;를 포함하고, 키트 구성성분으로서 폴리락트산 및 폴리락트산염 중 어느 것도 포함하지 않는다.

[17] 본 발명의 키트는, 투여 직전에 혼합하여 나노입자를 제조하기 위한 것일 수

있다. 본 발명의 키트는, 두 개 이상의 챔버로 구성되어 있고, 최종 사용자는 상기 챔버들을 단순 혼합함으로써 나노입자를 쉽게 형성할 수 있다. 용어 "단순 혼합"은 "혼합"하는 행위를 모두 포함할 수 있고, 나노입자를 형성하기 위해 혼합하는 행위에 특정한 조건이 부여되지 않는 것을 의미한다. 상기 혼합은, 점적, 교반(vortexing), 디켄팅 등 다양한 방식에 의해 이루어질 수 있고, 이에 제한되지 않는다. 일 구체예에 따르면, 본 발명의 키트 사용시, 이론적으로 형성 가능한 양의 90% 이상, 95 % 이상, 또는 99% 이상의 나노입자가 신속히, 예를 들어, 1분 이내, 30초 이내, 또는 15 초 이내에 형성될 수 있다.

[18] 본 발명의 키트는, 폴리락트산 및 폴리락트산염 중 어느 것도 포함하지 않는 것을 특징으로 한다. 폴리락트산 또는 그의 염은 세포 내 유효성분의 전달 효과를 일정 부분 유도하기 위해 사용될 수 있지만, 혼합하는 과정에서 쉽게 침전이 발생하는 단점을 갖는다. 따라서, 최종 사용자가 단순 혼합하여 나노입자를 형성하여야 하는 본 발명의 키트에는 포함되지 않는다.

[19] 최종 사용자가 단순 혼합하여 형성하는 나노입자 내의 유효성분은 양이온성 화합물과 정전기적 상호작용을 통해 복합체를 형성할 수 있고, 상기 복합체는 양친성 블록 공중합체에 의해 형성된 나노입자 구조 내부에 봉입될 수 있다.

[20] 상기 나노입자에서, 수성 환경에서는 양친성 블록 공중합체의 친수성 부분이 나노입자의 외벽을 형성하고, 양친성 블록 공중합체의 소수성 부분이 나노입자의 내벽을 형성하며, 그 형성된 나노입자의 내부에 유효성분과 양이온성 화합물의 복합체가 봉입될 수 있다. 이러한 나노입자 구조는, 혈중 또는 체액 내에서 유효성분의 안정성을 향상시킨다.

[21] 상기 "핵산"은, 예를 들어, DNA, RNA, siRNA, shRNA, miRNA, mRNA, 앱타머, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 핵산은 체내에서 일련의 과정을 통해 항원을 발현하는 것으로서, 항원을 코딩하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산은 항원의 염기서열을 포함하거나 그러한 폴리펩타이드 서열을 코딩하는 DNA, RNA, 또는 mRNA일 수 있다.

[22] 상기 "폴리펩티드"는 항원으로 인식될 수 있는 것일 수 있다. 상기 폴리펩티드는 항원, 이의 유사체 또는 전구체의 폴리펩티드 서열을 포함하여, 체내에서 일련의 과정을 통해 항원으로 인식될 수 있는 단백질을 의미할 수 있다.

[23] 상기 "바이러스"는 암살상 바이러스(oncolytic virus)일 수 있고, 예를 들어, 아데노바이러스, 백시니아바이러스, 단순헤르페스바이러스(HSV) 및 수포성구내염바이러스(VSV)로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 일 구체예에서, 암살상 바이러스는 아데노바이러스이다. 본 발명의 구체예에서 사용된 아데노바이러스는 루시퍼라아제 유전자를 포함하고, 이것은 이미징을 통해 확인할 수 있다.

[24] 상기 바이러스는 개체의 체내에 여러 종류의 치료 유전자를 발현할 수 있으며,

특정 분자량, 단백질, 생활성 또는 치료 분야에 제한되지 않는다. 예방용 바이러스는 표적 질병에 대해 개체의 체내에 면역을 유발할 수 있다. 질병 예방용 바이러스를 포함하는 조성물은 바이러스 자체에 의한 면역 유발을 감소시키고, 표적 세포를 지정 또는 확장 가능하며, 재투여시 바이러스에 대한 과면역 반응을 감소시켜 수 회 접종하여 유효한 효과를 얻을 수 있는 장점을 갖는다.

[25] 일 예에서, 상기 나노입자의 입자 크기는 Z-평균 값으로 정의될 수 있고, 예컨대, 800 nm 이하, 600 nm 이하, 500 nm 이하, 400 nm 이하, 300 nm 이하, 200 nm 이하 또는 150 nm 이하일 수 있으며, 또한 10 nm 이상일 수 있다. 일 구체예에서, Z-평균 값으로 정의된 상기 나노입자의 입자 크기는, 예를 들어, 10 내지 800 nm, 10 내지 600 nm, 10 내지 500 nm, 10 내지 400 nm, 10 내지 300 nm, 10 내지 200 nm 또는 10 내지 150 nm일 수 있다.

[26] 상기 "Z-평균"은 동적빛산란(Dynamic light scattering, DSL)을 이용하여 측정한 입자 분포의 유체학적 지름(hydrodynamic diameter)의 평균을 의미할 수 있다. 상기 나노입자는 단순분산 입자 분포(monodisperse particle distribution)를 갖는 것으로서, 그 다분산도 지수(polydispersity index)는, 예컨대, 0.01 내지 0.30, 0.05 내지 0.25, 또는 0.1 내지 0.2일 수 있다.

[27] 또한, 일 예에서, 상기 나노입자의 표면 전하는, 예컨대, -40 mV 이상, -30 mV 이상, -20 mV 이상 또는 -10 mV 이상일 수 있고, 또한 40 mV 이하, 30 mV 이하, 20 mV 이하 또는 10 mV 이하일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 나노입자의 표면 전하는, 예를 들어, -40 내지 40 mV, -30 내지 30 mV, -20 내지 20 mV 또는 -10 내지 1 mV일 수 있다. 상기 표면 전하는 생물학적 환경에 가까운 환경에서 측정된 것일 수 있고, 예를 들어, 10 mM HEPES 완충액(pH 7.2)에서 측정될 수 있다.

[28] 나노입자의 입자 크기 및 표면 전하가 상기 수준을 유지할 경우, 나노입자 구조의 안정성 및 구성성분들의 함량과 체내에서 흡수도 및 약제학적 조성물로서 멸균의 편의성 측면에서 바람직하다. 예를 들어, 상기 유효성분이 핵산인 경우, 상기 핵산의 하나 이상의 말단은 콜레스테롤, 토코페롤 및 탄소수 10 내지 24개의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상으로 수식될 수 있다. 상기 콜레스테롤, 토코페롤 및 탄소수 10 내지 24개의 지방산에는 콜레스테롤, 토코페롤 및 지방산의 각 유사체, 유도체, 및 대사체가 포함된다.

[29] 상기 유효성분은, 본 발명의 키트에 의하여 형성되는 전체 조성물 중량을 기준으로, 예컨대, 30 중량% 이하, 25 중량% 이하, 20 중량% 이하, 15 중량% 이하, 10 중량% 이하, 또는 5 중량% 이하일 수 있고, 또한 0.001 중량% 이상, 0.01 중량% 이상, 0.05 중량% 이상, 0.1 중량% 이상, 0.25 중량% 이상, 0.5 중량% 이상 또는 1 중량% 이상일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 유효성분은 전체 조성물 중량을 기준으로, 예를 들어, 0.05 내지 30 중량%, 0.1 내지 25 중량%, 0.25 내지 20 중량%, 0.5 내지 15 중량%, 1 내지 10 중량%, 또는 1 내지 5 중량%일 수 있다.

유효성분의 함량이 전체 조성물의 중량을 기준으로 상기 범위보다 적으면 약물에 비하여 사용되는 전달체의 양이 너무 많아서 오히려 전달체에 의한 부작용이 있을 수 있고, 상기 범위를 초과하면, 나노입자의 크기가 너무 커져 나노입자의 안정성이 저하되고 필터 멸균시 손실율이 커질 우려가 있다.

[30] 일 구체예에서, 상기 유효성분이 바이러스인 경우, 상기 나노입자는 바이러스 $1x10^6$ 내지 $1x10^{14}$VP(Virus particle), $1x10^7$ 내지 $1x10^{13}$VP, $1x10^8$ 내지 $1x10^{12}$VP, 또는 $1x10^9$ 내지 $1x10^{11}$VP를 포함할 수 있다.

[31] 일 구체예에서, 상기 유효 성분이 핵산 또는 폴리펩티드인 경우, 상기 나노입자 내에 포함되는 핵산 또는 폴리펩티드의 양은, 예컨대, 5 ng 내지 150 μg, 10 ng 내지 100 μg, 10 ng 내지 50 μg, 10 ng 내지 10 μg, 10 ng 내지 500 ng, 또는 50 ng 내지 500 ng일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[32] 구체적인 일 태양에서, 상기 양이온성 화합물은 양이온성 지질 또는 양이온성 고분자 종류일 수 있으며, 보다 구체적으로는 양이온성 지질일 수 있다.

[33] 일 구체예에서, 상기 양이온성 지질은
N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄클로라이드(DODAC),
N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄브로마이드(DDAB),
N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTAP),
N,N-디메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DODMA),
N,N,N-트리메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DOTMA),
1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(TAP),
1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판(DAP),
3베타-[N-(N',N',N'-트리메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(TC-콜레스테롤),
3베타-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤),
3베타-[N-(N'-모노메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(MC-콜레스테롤),
3베타-[N-(아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(AC-콜레스테롤),
콜레스테릴옥시프로판-1-아민(COPA), N-(N'-아미노에탄)카바모일프로파노익 토코페롤(AC-토코페롤) 및 N-(N'-메틸아미노에탄)카바모일프로파노익 토코페롤(MC-토코페롤)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 조합일 수 있다.

[34] 이러한 양이온성 지질을 사용하는 경우, 양이온성 지질로부터 유발되는 독성을 감소시키기 위하여 분자 내의 양이온 밀도가 높은 폴리양이온성 지질을 적게 사용하는 것이 바람직하고, 보다 구체적으로는 분자당 수용액 상에서 양이온을 나타낼 수 있는 작용기가 하나인 양이온성 지질을 사용하는 것이 바람직하다.

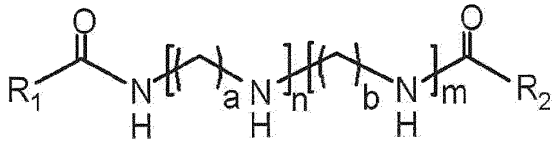
[35] 이에 따라, 보다 바람직한 일 태양에서, 상기 양이온성 지질은
3베타-[N-(N',N',N'-트리메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(TC-콜레스테롤),
3베타[N-(N',N'- 디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤),
3베타[N-(N'- 모노메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(MC-콜레스테롤),
3베타[N-(아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(AC-콜레스테롤),

N-(1-(2,3-디올레오일옥시) 프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTAP), N,N-디메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DODMA), 및 N,N,N-트리메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DOTMA)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있다.

[36] 한편, 일 구체예에서, 상기 양이온성 고분자는 키토산(chitosan), 글라이콜 키토산(glycol chitosan), 프로타민(protamine), 폴리라이신(polylysine), 폴리아르기닌(polyarginine), 폴리아미도아민(PAMAM), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), 덱스트란(dextran), 히알루론산(hyaluronic acid), 알부민(albumin), 고분자폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아민 및 폴리비닐아민(PVAm)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 보다 구체적으로는 폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아민 및 폴리비닐아민(PVAm)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 것일 수 있다.

[37] 구체적인 일 태양에서, 상기 양이온성 지질은 하기 화학식 1의 양이온성 지질일 수 있다:

[38] [화학식 1]

[39] 

[40] 상기 식에서,

[41] n 및 m은 각각 독립적으로 0 내지 12이되, $2 \leq n + m \leq 12$이고,

[42] a 및 b는 각각 독립적으로 1 내지 6이며,

[43] R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 탄소수 11 내지 25개의 포화 및 불포화 탄화수소기로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

[44] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서, n 및 m은 각각 독립적으로 1 내지 9이며, $2 \leq n+m \leq 10$일 수 있다.

[45] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서, a 및 b는 각각 독립적으로 2 내지 4일 수 있다.

[46] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로, 라우릴(lauryl), 미리스틸(myristyl), 팔미틸(palmityl), 스테아릴(stearyl), 아라키딜(arachidyl), 베헤닐(behenyl), 리그노세릴(lignoceryl), 세로틸(cerotyl), 미리스트올레일(myristoleyl), 팔미트올레일(palmitoleyl), 사피에닐(sapienyl), 올레일(oleyl), 리놀레일(linoleyl), 아라키도닐(arachidonyl), 에이코사펜타에닐(eicosapentaenyl), 에루실(erucyl), 도코사헥사에닐(docosahexaenyl), 및 세로틸(cerotyl)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[47] 일 구체예에서, 상기 양이온성 지질은 1,6-디올레오일트리에틸렌테트라마이드(N,N'-((ethane-1,2-diylbis(azanediyl))bis(e

thane-2,1-diyl))dioleamide),
1,8-디리놀레오일테트라에틸렌펜타마이드((9Z,9'Z,12Z,12'Z)-N,N'-(((azanediylbis(ethane-2,1-diyl))bis(azanediyl))bis(ethane-2,1-diyl))bis(octadeca-9,12-dienamide)),
1,4-디미리스톨레오일디에틸렌트리아마이드((9Z,9'Z)-N,N'-(azanediylbis(ethane-2,1-diyl))bis(tetradec-9-enamide)),
1,10-디스테아로일펜타에틸렌헥사마이드(N,N'-(3,6,9,12-tetraazatetradecane-1,14-diyl)distearamide) 및
1,10-디올레오일펜타에틸렌헥사마이드(N,N'-(3,6,9,12-tetraazatetradecane-1,14-diyl)dioleamide)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[48] 본 발명의 키트에 의하여 형성되는 조성물 내의 상기 양이온성 화합물의 함량은, 유효성분 1 중량부를 기준으로, 예컨대, 100 중량부 이하, 90 중량부 이하, 80 중량부 이하, 70 중량부 이하, 60 중량부 이하, 50 중량부 이하, 40 중량부 이하, 30 중량부 이하, 29 중량부 이하, 28 중량부 이하, 27 중량부 이하, 26 중량부 이하, 25 중량부 이하, 24 중량부 이하, 23 중량부 이하, 22 중량부 이하, 21 중량부 이하, 20 중량부 이하, 19 중량부 이하, 18 중량부 이하, 17 중량부 이하, 16 중량부 이하, 15 중량부 이하, 14 중량부 이하, 13 중량부 이하, 12 중량부 이하, 11 중량부 이하, 10 중량부 이하, 9 중량부 이하, 8 중량부 이하, 7 중량부 이하, 6 중량부 이하, 또는 5 중량부 이하일 수 있고, 또한 0.1 중량부 이상, 0.2 중량부 이상, 0.3 중량부 이상, 0.4 중량부 이상, 0.5 중량부 이상, 0.6 중량부 이상, 0.7 중량부 이상, 0.8 중량부 이상, 0.9 중량부 이상, 1 중량부 이상, 1.1 중량부 이상, 1.2 중량부 이상, 1.3 중량부 이상, 1.4 중량부 이상, 1.5 중량부 이상, 1.6 중량부 이상, 1.7 중량부 이상, 1.8 중량부 이상, 1.9 중량부 이상, 2 중량부 이상, 2.1 중량부 이상, 2.2 중량부 이상, 2.3 중량부 이상, 2.4 중량부 이상, 2.5 중량부 이상, 2.6 중량부 이상, 2.7 중량부 이상, 2.8 중량부 이상, 2.9 중량부 이상, 3 중량부 이상, 3.1 중량부 이상, 3.2 중량부 이상, 3.3 중량부 이상, 3.4 중량부 이상, 3.5 중량부 이상, 3.6 중량부 이상, 3.7 중량부 이상, 3.8 중량부 이상, 3.9 중량부 이상, 또는 4 중량부 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[49] 일 구체예에서, 조성물 내의 상기 양이온성 화합물의 함량은, 유효성분 1 중량부를 기준으로, 0.1 내지 100 중량부, 0.5 내지 50 중량부, 1 내지 25 중량부, 1.5 내지 10 중량부, 2 내지 15 중량부, 2.5 내지 10 중량부, 또는 3 내지 8 중량부일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 조성물 내의 상기 양이온성 화합물의 함량이 상기 수준보다 지나치게 적으면 유효성분과 안정한 복합체를 형성하지 못할 수 있고, 반대로 상기 수준보다 지나치게 많으면 나노입자의 크기가 너무 커져 안정성이 저하되고 필터 멸균시 손실율이 커질 우려가 있다.

[50] 상기 유효성분이 핵산인 경우, 상기 양이온성 화합물과 핵산은 정전기적 상호작용을 통해 결합하여 복합체를 형성한다. 일 구체예에서, 상기 핵산(P)과 양이온성 화합물(N)의 전하량의 비율(N/P; 핵산의 음이온 전하에 대한 양이온성 화합물의 양이온 전하 비율)은, 0.5 이상, 1 이상 또는 2 이상일 수 있고, 또한 100

이하, 50 이하, 20 이하일 수 있으며, 예를 들어, 0.5 내지 100, 1 내지 50, 또는 2 내지 20일 수 있다. 상기 비율(N/P)이 0.5 미만인 경우에는 충분한 양의 핵산을 포함하는 복합체를 형성하기 어려울 수 있는 반면, 상기 비율(N/P)이 100을 초과할 시에는 독성을 유발할 우려가 있다. 또한, N/P 값은 유효성분이 비장에서 특이적으로 발현하는데 중요하게 작용할 수 있다.

[51] 구체적인 일 태양에서, 상기 양친성 블록 공중합체는, 친수성 A 블록 및 소수성 B 블록을 포함하는 A-B 형 블록 공중합체일 수 있다. 상기 A-B 형 블록 공중합체는, 수용액 상에서, 소수성 B 블록이 코어(내벽)를 형성하고 친수성 A 블록이 쉘(외벽)을 형성하는 코어-쉘 타입의 고분자 나노입자를 형성한다.

[52] 일 구체예에서, 상기 친수성 A 블록은 폴리알킬렌글리콜, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아미드 및 그 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[53] 보다 구체적으로, 상기 친수성 A 블록은 모노메톡시폴리에틸렌클리콜, 모노아세톡시폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌과 프로필렌글리콜의 공중합체 및 폴리비닐피롤리돈으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[54] 일 구체예에서, 상기 친수성 A 블록은 수평균분자량이 200 내지 50,000달톤인 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 1,000 내지 20,000달톤, 보다 더 구체적으로는 1,000 내지 5,000달톤인 것일 수 있다.

[55] 또한, 필요에 따라, 상기 친수성 A 블록의 말단에 특정 조직이나 세포에 도달할 수 있는 작용기, 리간드, 또는 세포내 전달을 촉진할 수 있는 작용기를 화학적으로 결합시켜 양친성 블록 공중합체와 폴리락트산염으로 형성된 고분자 나노입자 전달체의 체내 분포를 조절하거나 상기 나노입자 전달체가 세포 내로 전달되는 효율을 높일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 작용기나 리간드는 단당류, 다당류, 비타민, 펩타이드, 단백질 및 세포 표면 수용체에 대한 항체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 작용기나 리간드는 아니사마이드(anisamide), 비타민 B9(엽산), 비타민 B12, 비타민A, 갈락토오스, 락토오스, 만노오스, 히알루론산, RGD 펩타이드, NGR 펩타이드, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체에 대한 항체 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[56] 상기 소수성 B 블록은 생체적합성 생분해성 고분자로서, 일 구체예에서, 이는 폴리에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리아미노산, 폴리오르소에스테르 및 폴리포스파진으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[57] 보다 구체적으로, 상기 소수성 B 블록은 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리디옥산-2-온, 폴리락타이드와 글리콜라이드의 공중합체, 폴리락타이드와 폴리디옥산-2-온의 공중합체, 폴리락타이드와 폴리카프로락톤의 공중합체 및 폴리글리콜라이드와 폴리카프로락톤의 공중합체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[58] 일 구체예에서, 상기 소수성 B 블록은 수평균분자량이 50 내지 50,000달톤인 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 200 내지 20,000달톤, 보다 더 구체적으로는 1,000 내지 5,000달톤인 것일 수 있다.

[59] 또한, 일 구체예에서, 상기 소수성 B 블록은, 소수성 B 블록의 소수성을 증가시켜 나노입자의 안정성을 향상시키기 위하여, 소수성 B 블록 말단의 히드록시기에 토코페롤, 콜레스테롤, 또는 탄소수 10 내지 24개의 지방산을 화학적으로 결합시키는 것에 의하여 수식된 것일 수 있다.

[60] 일 구체예에서, 본 발명의 키트에 의하여 형성되는 조성물 내의 상기 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)을 포함하는 양친성 블록 공중합체의 함량은, 유효성분 1 중량부를 기준으로, 예컨대, 200 중량부 이하, 190 중량부 이하, 180 중량부 이하, 170 중량부 이하, 160 중량부 이하, 150 중량부 이하, 140 중량부 이하, 130 중량부 이하, 120 중량부 이하, 110 중량부 이하, 100 중량부 이하, 90 중량부 이하, 80 중량부 이하, 70 중량부 이하, 60 중량부 이하, 50 중량부 이하, 40 중량부 이하, 또는 30 중량부 이하일 수 있고, 또한 0.1 중량부 이상, 0.5 중량부 이상, 1 중량부 이상, 1.5 중량부 이상, 2 중량부 이상, 2.5 중량부 이상, 3 중량부 이상, 3.5 중량부 이상, 4 중량부 이상, 4.5 중량부 이상, 5 중량부 이상, 5.5 중량부 이상, 5 중량부 이상, 6.5 중량부 이상, 7 중량부 이상, 7.5 중량부 이상, 8 중량부 이상, 8.5 중량부 이상, 9 중량부 이상, 9.5 중량부 이상, 10 중량부 이상, 10.5 중량부 이상, 11 중량부 이상, 11.5 중량부 이상, 12 중량부 이상, 12.5 중량부 이상, 13 중량부 이상, 13.5 중량부 이상, 14 중량부 이상, 14.5 중량부 이상, 15 중량부 이상, 15.5 중량부 이상, 16 중량부 이상, 16.5 중량부 이상, 17 중량부 이상, 17.5 중량부 이상, 18 중량부 이상, 18.5 중량부 이상, 19 중량부 이상, 19.5 중량부 이상, 또는 20 중량부 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[61] 예를 들어, 조성물 내의 상기 양친성 블록 공중합체 함량은, 유효성분 1 중량부에 대하여, 0.1 내지 200 중량부, 0.5 내지 180 중량부, 1 내지 150 중량부, 10 내지 100 중량부, 10 내지 70 중량부, 15 내지 50 중량부, 또는 15 내지 30 중량부일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 조성물 내의 상기 양친성 블록 공중합체 함량이 상기 수준보다 지나치게 적으면 나노입자의 크기가 너무 커져 나노입자의 안정성이 저하되고 필터 멸균시 손실율이 커질 우려가 있고, 반대로 상기 수준보다 지나치게 많으면 함입할 수 있는 유효성분의 함량이 너무 적어지게 된다.

[62] 일 구체예에서, 상기 양친성 블록 공중합체에 있어서, 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)의 조성비는, 공중합체 총중량을 기준으로, 친수성 블록(A)이 40 내지 70중량% 범위일 수 있고, 보다 구체적으로는 50 내지 60중량% 범위일 수 있다. 친수성 블록(A)의 비율이 공중합체 총중량을 기준으로 40중량% 미만이면 고분자의 물에 대한 용해도가 낮아서 나노입자를 형성하기 어렵기 때문에, 공중합체가 나노입자를 형성하기에 충분한 물에 대한 용해도를 갖기 위하여 친수성 블록(A)의 비율이 40중량% 이상인 것이 좋다. 한편, 친수성 블록(A)의

비율이 공중합체 총중량을 기준으로 70중량%를 초과하면 친수성이 너무 높아 고분자 나노입자의 안정성이 낮아져서 유효성분/양이온성 화합물 복합체의 가용화 조성물로 사용하기 어려우므로, 나노입자 안정성을 고려하여 친수성 블록(A)의 비율이 70중량% 이하인 것이 좋다.

[63] 일 구체예에서, 상기 양친성 블록 공중합체는 수용액 상에서 유효성분과 양이온성 화합물 복합체를 나노입자 구조 내부에 봉입시키는데, 이 때 양친성 블록 공중합체의 중량(b) 대비 유효성분 및 양이온성 화합물 복합체의 중량(a) 비율[a/b X 100; (유효성분 중량+양이온성 화합물 중량)/양친성 블록 공중합체 중량 X 100]은, 1 내지 60%일 수 있고, 보다 구체적으로는 1.5 내지 50%, 보다 더 구체적으로는 2 내지 40%일 수 있다. 상기 중량 비율(a/b X 100)이, 1% 미만인 경우에는 유효성분 및 양이온성 화합물 복합체의 함량이 지나치게 낮아져서 유효성분이 효과적으로 작용할 수 있는 유효 함량을 충족시키기 어려우며, 반대로 60% 초과시에는 양친성 블록 공중합체의 분자량과 유효성분 및 양이온성 화합물 복합체의 양을 고려할 때 적절한 크기의 나노입자 구조를 형성하지 못할 수 있다.

[64] 일 구체예에서, 상기 키트에서 상기 양이온성 화합물은 1㎍ 이상, 5㎍ 이상, 10㎍ 이상, 15㎍ 이상 또는 18㎍ 이상이면서, 200㎍ 이하, 150㎍ 이하, 120㎍ 이하, 100㎍ 이하, 80㎍ 이하, 50㎍ 이하, 30㎍ 이하, 또는 25 ㎍ 이하로서, 예를 들어, 1㎍ 내지 200㎍, 5㎍ 내지 100㎍, 5㎍ 내지 80㎍, 또는 15 ㎍ 내지 25 ㎍일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[65] 일 구체예에서, 상기 키트에서 상기 양친성 블록 공중합체는 10 ㎍ 이상, 20㎍ 이상, 25㎍ 이상, 50 ㎍ 이상, 80 ㎍ 이상, 100 ㎍ 이상, 또는 120 ㎍ 이상이면서, 500㎍ 이하, 400㎍ 이하, 350㎍ 이하, 300㎍ 이하, 또는 250㎍ 이하로서, 예를 들어, 10㎍ 내지 500㎍, 20㎍ 내지 300㎍, 25㎍ 내지 250㎍, 또는 120 ㎍ 내지 250 ㎍일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[66] 또한, 일 구체예에서, 상기 양친성 블록 공중합체는 양이온성 화합물 1 중량부 대비 40 중량부 미만, 예를 들어, 1 내지 35 중량부, 1 내지 30 중량부, 1 내지 25 중량부, 1 내지 20 중량부, 1 내지 15 중량부, 1 내지 10 중량부, 1 내지 5 중량부, 5 내지 40 중량부, 5 내지 35 중량부, 5 내지 30 중량부, 5 내지 25 중량부, 5 내지 20 중량부, 또는 5 내지 15 중량부 등으로 상기 키트에 포함된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[67] 일 구체예에서, 상기 제1 챔버 및/또는 제2 챔버는 수성 용액, 수혼화성 유기용매 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 상기 "수성 용액"은 수용액과 같은 의미로 사용될 수 있고, 예를 들어, 물, 멸균정제수, 완충액, 주사액 등을 의미할 수 있으며, 유기산을 더 포함한 완충액일 수도 있다. 상기 수성 용액은 예를 들어, 시트르산 완충액, PBS 완충액 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "수혼화성 유기용매"는 C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 아세토니트릴, 이의 수혼합물 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에

제한되지 않는다.

[68] 일 구체예에서, 제1 챔버에서 양친성 블록 공중합체와 양이온성 화합물이 에멀젼 상태로 포함된 것일 수 있다. 이 경우 용매는 수혼화성 유기용매 및 수성 용액의 혼합물로서, 예를 들어 아세트산나트륨과 같은 아세트산염이나 에탄올에 에탄올의 20 배 내지 30 배의 물이 혼합된 것일 수 있다.

[69] 일 구체예에서, 상기 제2 챔버는 유효성분의 안정성을 향상시키는데 적절한 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 안정화제는, pH 조절제, 무기염, 당류, 계면활성제, 킬레이트제 등을 더 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 "당류"는 단당류, 이당류, 이들의 환원당인 당알코올, 단일 또는 혼합된 다수 당의 폴리머 등을 의미할 수 있고, 상기 다당류는 3당류 이상 당류를 의미할 수 있다. 상기 단당류는, 예를 들어, 만노스, 글루코스, 아라비노스, 프럭토스, 갈락토스 등이 있고; 상기 이당류로는, 수크로스, 트레할로스, 말토스, 락토스, 셀로비오스, 겐티오비오스, 이소말토스, 멜리보우스 등이 있고; 상기 당알코올은 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨 등이 있고; 상기 다당류로는, 라피노스, 덱스트란, 전분, 히드록시에틸 전분, 시클로덱스트린, 셀룰로스, 헤타스타치, 올리고당이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "pH 조절제"는 트리스(Tris), 글라이신, 히스티딘, 글루타메이트, 숙시네이트, 포스페이트, 아세테이트, 아스파르테이트 또는 이들의 조합일 수 있고, 상기 "계면활성제"는 나트륨 라우릴 술페이트, 디옥틸 나트륨 술포숙시네이트, 디옥틸나트륨 술포네이트, 케노데옥시콜산, N-라우로일사르코신 나트륨염, 리튬 도데실 술페이트, 1-옥탄술폰산 나트륨염, 나트륨 콜레이트 수화물, 나트륨 데옥시콜레이트, 글리코데옥시콜산 나트륨염, 벤즈알코늄 클로라이드, 트리톤(Triton) X-100, 트리톤 X-114, 라우로마크로골 (lauromacrogol) 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리소르베이트 20, 40, 60, 65 및 80 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "킬레이트제"는 구연산, 폴리페놀릭산, EDTA, DTPA, EDDHA 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "무기염"은 1가 또는 2가 금속의 염을 의미하는 것으로서, NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, MgSO4, $CaSO_4$, $CaCO_3$, $MgCO_3$ 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[70] 예를 들어, 유효성분이 바이러스인 경우, 상기 제2 챔버는 5 내지 15 mM Tris, 5 내지 15 mM 히스티딘, 50 내지 90 mM NaCl, 2 내지 8% 수크로오스 (w/v), 0.5 내지 1.5 mM $MgCl_2$, 0.005 내지 0.05% (w/v) PS-80, 0.05 내지 0.15 mM EDTA, 및 0.1 내지 1.0% 에탄올 (v/v)를 더 포함할 수 있고, pH는 7.0 내지 8.0일 수 있다.

[71] 상기 "챔버"는 나노입자의 재료 또는 이를 함유하는 용매를 담기에 적절한 것으로서, 유리, 플라스틱, 종이, 팩 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

[72] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 자세하게 설명하나, 이들은 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 이들에 의하여 본 발명의 범위가 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[73] [실시예]

[74] **제조예 1: 바이러스를 함유하는 나노입자의 형성**

[75] (1) 제1 챔버 조성물의 제조

[76] 1,6-디올레오일 트리에틸렌테트라미드(dioTETA) 20mg 및 mPEG-PLA-토코페롤 50mg를 각각 90% 에탄올 1ml 에 녹여주었다. dioTETA, mPEG-PLA-토코페롤을 하기의 표 1의 비율로 섞어준 뒤, 30배의 PBS를 섞어주어 복합 유상액을 제조하였다. 제조된 조성물은 0.22 ㎛ 친수성 필터로 여과시켰다. (표 1 참조)

[77] [표 1]

[78]

제1 챔버 조성물	조성비	dioTETA	mPEG-PLA-토코페롤
실시예 1	5/50	5μg	50μg
실시예 2	10/50	10μg	50μg
실시예 3	20/50	20μg	50μg
실시예 4	40/50	40μg	50μg
실시예 5	80/50	80μg	50μg
실시예 6	5/100	5μg	100g
실시예 7	10/100	10μg	100μg
실시예 8	20/100	20μg	100μg
실시예 9	40/100	40μg	100μg
실시예 10	80/100	80μg	100μg
실시예 11	5/200	5μg	200μg
실시예 12	10/200	10μg	200μg
실시예 13	20/200	20μg	200μg
실시예 14	40/200	40μg	200μg
실시예 15	80/200	80μg	200μg
실시예 16	10/400	10μg	400μg
실시예 17	20/400	20μg	400μg
실시예 18	40/400	40μg	400μg
실시예 19	80/400	80μg	400μg

[79] (2) 종양용해성 바이러스를 함유하는 제2 챔버 조성물의 제조

[80] A195 완충액(10 mM Tris, 10 mM 히스티딘, 75 mM NaCl, 5% 수크로오스 (w/v), 1 mM $MgCl_2$, 0.02% (w/v) PS-80, 0.1 mM EDTA, 0.5% 에탄올 (v/v), pH 7.4)에 분주된 형태의 VQAd CMV Luc 바이러스(ViraQuest, Lot #: 33088)를 $1x10^{10}$ VP 가 되도록 계수하여 준비하였다.

[81] (3) 나노입자의 제조

[82] 상기 제1 챔버 조성물 및 제2 챔버 조성물을 사용 직전에 10 내지 15 초 동안 교반(vortexing)하여 혼합함으로써 나노입자를 형성하였다.

[83] **실험예 1: 나노입자의 형성 확인**

[84] 제1 챔버 조성물 및 제2 챔버 조성물을 사용 직전에 혼합함으로써 실시예 1 내지 19의 나노입자가 정상적으로 형성되는지 확인하였다.

[85] 그 결과, 실시예 1 내지 19 모두 단순 혼합으로도 침전물이 관찰되지 않아, 정상적으로 나노입자가 형성되는 것으로 확인되었다.

[86] **실험예 2: 종양용해성 바이러스를 함유하는 나노입자의 세포 내 전달 효율 확인**

[87] 나노입자의 세포 내 전달 효율을 평가하기 위해, 바이러스 전달효율을 평가하기에 적합한 CAR 발현이 낮은 MDA-MB435 세포를 준비하였다. 제1 챔버 조성물 및 제2 챔버 조성물을 세포 내 주입 직전에 혼합함으로써 실시예 1 내지 3, 6 내지 8, 및 11 내지 13의 나노입자를 형성하고, 바이러스 기준 500moi에 해당하는 양으로 세포에 분주하였다. 15 내지 24시간 동안 추가로 인큐베이션한 후, 세포에 루시페린(luciferin)을 첨가하여 발현하는 루시퍼라아제 양을 측정하였다. 대조군으로는 나노입자가 아닌 바이러스(naked Ad; Ad)를 사용하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[88] **제조예 2: mRNA를 함유하는 나노입자의 형성**

[89] (1) 제1 챔버 조성물의 제조

[90] dioTETA 20mg을 20mM 아세트산나트륨에 녹이고, mPEG-PLA-토코페롤 50mg를 정제수에 녹여주었다. 폴리락트산염을 사용하는 경우, mPEG-PLA-토코페롤과 함께 정제수에 녹여 주었다. dioTETA, mPEG-PLA-토코페롤, 및 폴리락트산염을 하기의 표 2의 비율로 섞어준 뒤, PBS를 섞어주어 복합 유상액을 제조하고, 0.22 ㎛ 친수성 필터로 여과시켰다.

[91] [표 2]

[92]

제1 챔버 조성물	dioTETA	mPEG-PLA-토코페롤	폴리락트산염
실시예 20	15μg	24.7μg	0
비교예 1	15μg	24.7μg	76.4μg
비교예 2	15μg	24.7μg	152.8μg
비교예 3	15μg	24.7μg	305.6μg

[93] (2) mRNA를 함유하는 제2 챔버 조성물의 제조

[94] 루시퍼라아제 mRNA를 정제수에 혼합하여 섞어주었다. mRNA는 나노입자 제조시 5 ㎍이 되도록 하여 사용하였다.

[95] (3) 나노입자의 제조

[96] 상기 제1 챔버 조성물 및 제2 챔버 조성물을 사용 직전에 10 내지 15 초 동안 교반(vortexing)하여 혼합함으로써 나노입자를 형성하였다.

[97] **실험예 3: mRNA를 함유하는 나노입자의 세포 내 전달 효율 확인**

[98] 나노입자의 세포 내 전달 효율을 폴리락트산염이 있는 경우와 비교하여 평가하기 위해, HepG2 세포를 준비하였다. 제1 챔버 조성물 및 제2 챔버

조성물을 세포 내 주입 직전에 혼합함으로써 실시예 20 및 비교예 1 내지 3의 나노입자를 형성하고, mRNA가 250 ng에 해당하는 양으로 세포에 분주하였다. 15 내지 24시간 동안 추가로 인큐베이션한 후, 세포에 루시페린(luciferin)을 첨가하여 발현하는 루시퍼라아제 양을 측정하였다. 대조군으로는 통상적으로 사용되는 형질주입 시약인 TransIT(Takara)를 사용하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.