



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0068047
(43) 공개일자 2023년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/22 (2017.01) A61K 47/26 (2017.01)
A61K 47/28 (2017.01) A61K 48/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0153940
(22) 출원일자 2021년11월10일
심사청구일자 2021년11월10일

(71) 출원인
주식회사 에스엠엘바이오팜
경기도 광명시 덕안로104번길 17, 1406호, 1407호
(일직동, 광명역 앰플러스터)

(72) 발명자
방은경
서울특별시 성북구 화랑로14길 5
금교창
서울특별시 성북구 화랑로14길 5
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
네이트특허법인

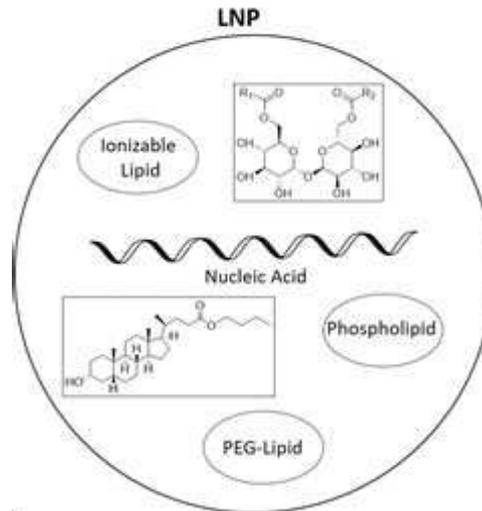
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **트레할로즈 유도체 및 신규 구조 유지 화합물을 포함하는 핵산 의약품 전달용 지질나노입자의 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 핵산 약물의 안정화 및 체내 전달력 증진을 위한 지질나노입자의 신규 조성물에 관한 것이다. 지질나노입자는 핵산 의약품과 지질로 구성되어 있으며, 핵산은 mRNA 기반 백신, 면역증강제 RNA, miRNA, siRNA, pDNA, antisense ODN, pDNA 등을 모두 포함한다. 지질나노입자의 지질은 트레할로즈 기반 지질, 이온화 지질, 인지질, PEG-지질 및 구조 유지 지질을 포함한다. 이중 구조 유지 지질은 통상적으로 사용되는 콜레스테롤을 리토콜산 유도체, 글리시레틴산 유도체 또는 디오스게니 유도체 화합물로 대체 가능한 조성을 제공한다. 본 발명의 지질나노입자는 사용하는 핵산의약품의 종류에 따라 백신 또는 치료제로 활용될 수 있다.

대표도 - 도7



- (52) CPC특허분류
A61K 47/12 (2013.01)
A61K 47/22 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 47/28 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)

남재환

경기도 부천시 옥길로 55, 704동 1502호(옥길동, 옥길센트리뷰)

배서현

경상남도 김해시 삼계로 239, 205동 503호(삼계동, 화정마을2단지부영아파트)

(72) 발명자

강택

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

전병선

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

이안수

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711141402
과제번호	2021M3E5E3080563
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신·변종감염병대응플랫폼핵심기술개발사업(R&D)
연구과제명	차세대 mRNA 전달용 나노제형 플랫폼 개발
기여율	1/1
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

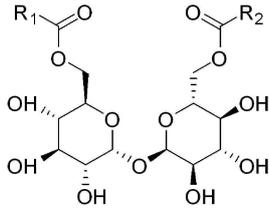
명세서

청구범위

청구항 1

지질 성분을 포함하는 지질 나노 입자 조성물에 있어서, 상기 조성물은 하기 화학식 1의 트레할로스 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물 :

[화학식 1]



상기 화학식 1 에서 R1과 R2는 각각 독립적으로 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 탄소수 2 내지 20의 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 불포화 결합을 1 내지 3개 포함하는 탄소수 6 내지 20의 알케닐인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 불포화 결합을 1 내지 2개 포함하는 탄소수 10 내지 20의 알케닐인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

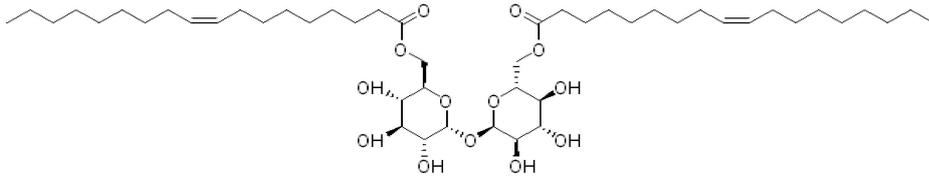
상기 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 불포화 결합을 1 개 포함하는 탄소수 14 내지 20의 알케닐인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 트레할로스 유도체 화합물은 하기 화학식 2의 화합물인, 지질 나노 입자 조성물.

[화학식 2]



청구항 7

제 1항에 있어서,

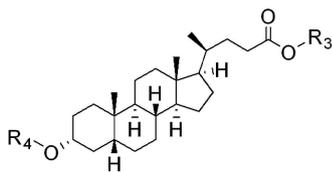
상기 지질 나노 입자 조성물은 구조 지질로서 콜레스테롤 지질을 포함하지 않는, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 3의 리토콜산 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물 :

[화학식 3]



상기 화학식 3에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 R3 및 R4 중 적어도 어느 하나 이상은 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

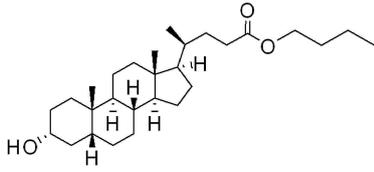
상기 화학식 3의 리토콜산 유도체 화합물은 R3가 수소이고, R4가 탄소수 3 내지 7의 알킬기인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 11

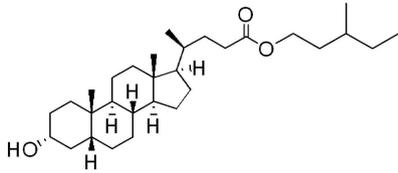
제 10항에 있어서,

상기 리토콜산 유도체 화합물은 하기 화학식 4 내지 6 중 어느 하나 이상인, 지질 나노 입자 조성물:

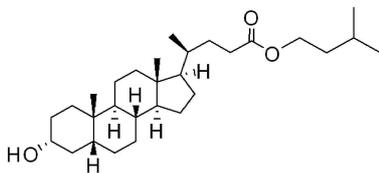
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



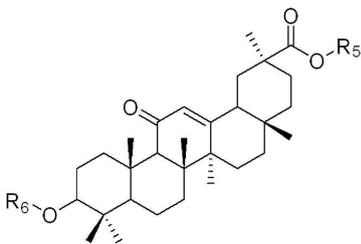
청구항 12

제 7항에 있어서,

상기 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 7의 글리시레틴산 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물

:

[화학식 7]



상기 화학식 7에서 R5 및 R6 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 R5 및 R6 중 적어도 어느 하나 이상은 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 화학식 7의 글리시레틴산 유도체 화합물은 R6가 수소이고, R5가 탄소수 3 내지 8의 알킬기 또는 탄소수 3

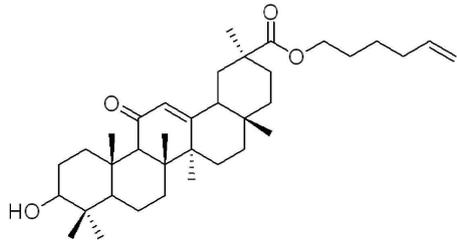
내지 8의 알케닐기인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 15

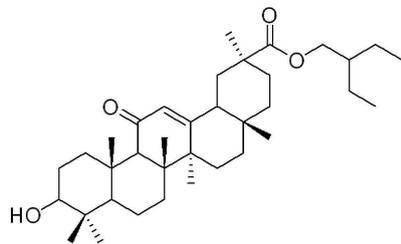
제 12항에 있어서,

상기 글리시레틴산 유도체 화합물은 하기 화학식 8 내지 10 중 어느 하나 이상인, 지질 나노 입자 조성물:

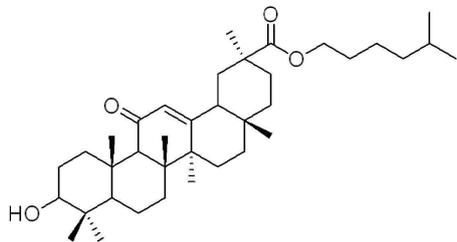
[화학식 8]



[화학식 9]



[화학식 10]

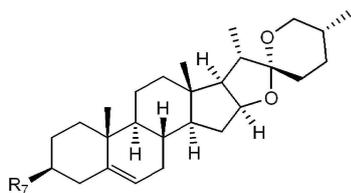


청구항 16

제 7항에 있어서,

상기 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 11의 디오스게닌 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물 :

[화학식 11]



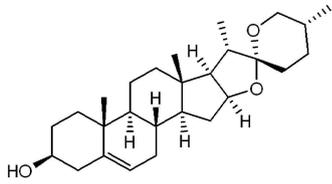
상기 화학식 11에서 R7은 -OH, -OMe, -NH2, -NHMe, -NMe2, -NMe3, -SH, -Glucose, 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

청구항 17

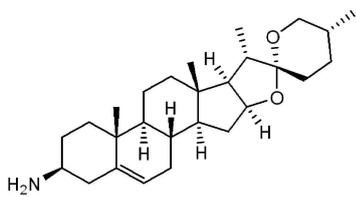
제 16항에 있어서,

상기 디오스게닌 그 유도체 화합물은 하기 화학식 12 내지 14 중 어느 하나 이상인, 지질 나노 입자 조성물:

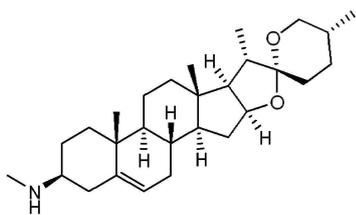
[화학식 12]



[화학식 13]



[화학식 14]



청구항 18

제 1항에 있어서,

상기 지질 나노 입자 조성물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 이온성 지질을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물:

3-(디도데실아미노)-N1,N1,4-트리도데실-1-피페라진에탄아민 (KL10);

N1-[2-(디도데실아미노)에틸]-N1,N4,N4-트리도데실-1,4-피페라진디에탄아민 (KL22);

14,25-디트리데실-15,18,21,24-테트라아자-옥타트리아콘탄 (KL25);

1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLin-DMA);

2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-K-DMA);

헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA);

2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-KC2-DMA);

1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DODMA);

2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA);

(2R)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥

시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA (2R)); 및

(2S)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA (2S)).

청구항 19

제 1항에 있어서,

상기 지질 나노 입자 조성물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 인지질을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물:

- 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DLPC),
- 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DMPC),
- 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC),
- 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC),
- 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC),
- 1,2-di 옥테카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DUPC),
- 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (POPC),
- 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:0 디에테르 PC),
- 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미석시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (OChemPC),
- 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 Lyso PC),
- 1,2-딜리노레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린,
- 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE),
- 1,2-디파이타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (ME 16.0 PE),
- 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-딜리노레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민,
- 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨 염 (DOPG),
- 디팔미토일포스파티딜글리세롤 (DPPG),
- 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민 (POPE),
- 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민 (DSPE),
- 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민 (DPPE),
- 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE),
- 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE),
- 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜콜린 (SOPC),
- 스핑고미엘린,
- 포스파티딜콜린,

포스파티딜에탄올아민,
 포스파티딜세린,
 포스파티딜이노시톨,
 포스파티드산,
 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린,
 라이소포스파티딜콜린, 및
 라이소포스파티딜에탄올아민 (LPE).

청구항 20

제 1항에 있어서,
 상기 지질 나노 입자 조성물은 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-변형된 세라미드, PEG-변형된 디알킬아민, PEG-변형된 디아실글리세롤, PEG-변형된 디알킬글리세롤, 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 PEG 지질을 더 포함하는, 지질 나노 입자 조성물.

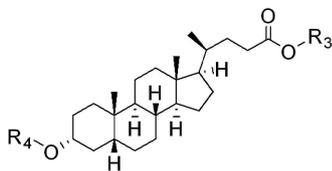
청구항 21

제 1항에 있어서,
 상기 지질 나노 입자 조성물은 이온성 지질을 더 포함하고,
 상기 이온성 지질 및 트레할로즈 유도체 화합물의 몰 비율은 1 : 0.7 내지 1.3인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 22

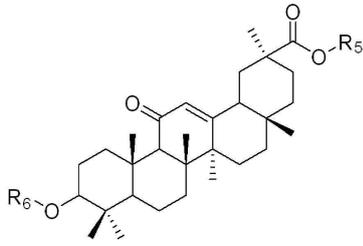
제 21항에 있어서,
 상기 지질 나노 입자 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 3의 리토콜산 유도체 화합물, 하기 화학식 7의 글리시레틴산 유도체 화합물 또는 화학식 11의 디오스게닌 유도체 화합물을 더 포함하며,
 상기 이온성 지질, 트레할로즈 유도체 화합물 및 구조 지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30 내지 1.80인, 지질 나노 입자 조성물:

[화학식 3]

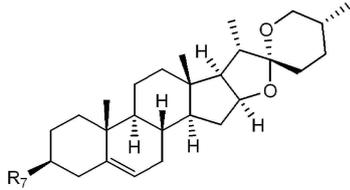


상기 화학식 3에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이며,

[화학식 7]



상기 화학식 7에서 R5 및 R6 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이며,
[화학식 11]



상기 화학식 11에서 R7은 -OH, -OMe, -NH2, -NHMe, -NMe2, -NMe3, -SH, -SMe, -Glucose, -CH3 또는 C2-C20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

청구항 23

제 22항에 있어서,

상기 지질 나노 입자 조성물은 인지질을 더 포함하며,

상기 이온성 지질; 트레할로즈 유도체 화합물; 구조 지질; 및 인지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30 내지 1.80 : 0.35 내지 0.45 인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 24

제 23항에 있어서,

상기 지질 나노 입자 조성물은 PEG 지질을 더 포함하며,

상기 이온성 지질; 트레할로즈 유도체 화합물; 구조 지질; 인지질; 및 PEG 지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30 내지 1.80 : 0.35 내지 0.45 : 0.03 내지 0.09인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 25

제 1항 에 있어서,

상기 지질 나노 입자 조성물은 이온성 지질, 구조 지질, 인지질 및 PEG지질을 더 포함하고,

상기 이온성 지질은 1 mol% 내지 59 mol%, 상기 트레할로즈 유도체 화합물은 1 mol% 내지 59 mol%, 상기 구조 지질은 30 mol% 내지 60 mol%, 상기 인지질은 5 mol% 내지 20 mol%, 상기 PEG 지질은 0.5 mol% 내지 5 mol%을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 26

제 1항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서,

치료적 및/또는 예방적 제제를 추가로 포함하는, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 27

제 26항에 있어서,

상기 치료적 및/또는 예방적 제제는 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 또는 화합물인, 지질 나노 입자 조성물.

청구항 28

제 26항에 있어서,

상기 치료적 및/또는 예방적 제제는 간섭 RNA (siRNA), 비대칭 간섭 RNA (aiRNA), microRNA (miRNA), 다이서-기질 RNA (dsRNA), 작은 헤어핀 RNA (shRNA), 메신저 RNA (mRNA), 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택 되는 핵산인, 지질 나노 입자 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서는 핵산 약물의 안정화 및 전달을 위한 지질나노입자 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 트레할 로즈를 포함하는 지질과 콜레스테롤 대체제로서 리토콜산 유도체, 글리시레틴산 유도체 또는 디오스게닌 및 그 유도체를 포함하는 지질나노입자 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 특정 질병의 항원을 주입하여 인체의 면역작용을 이용하여 질병을 예방하는 백신은 오랫동안 인류를 다양한 전염병으로부터 보호해 왔다. 항원을 주입하는 형태에 따라 다양한 백신의 플랫폼이 존재하는데, 병원체를 약독화 하여 주입하는 생백신과 단백질 항원을 주입하는 제조합 단백질 백신, 바이러스 유사입자 등이 있고 항원을 코딩하는 유전자를 주입하는 방식으로 DNA 백신, RNA 백신, 바이러스 벡터 백신 등이 있다.

[0004] 이중 RNA 백신은 항원을 코딩하는 mRNA를 인체에 주입하는 형식으로 감염이나 유전자 변이 등에 대한 잠재적인 위험이 없고, 신속개발이 가능하다는 장점을 가지고 있으나, 체내 가수분해 효소에 의해 쉽게 분해되어 안정성이 낮고 세포 전달력이 약하여 mRNA 자체만으로는 면역 반응을 유도하기 어렵다. 이를 극복하기 위하여 지질나노입자를 이용을 하는데, 현재의 지질 나노입자는 이온화지질, 인지질, 콜레스테롤, PEG-지질이 일정한 비율로 혼합된 형태가 일반적으로 쓰인다.

[0005] 그러나, 현재까지 나온 지질나노입자는 목적하는 항원의 발현을 증대시키기 위한 핵산의 안정화 및 전달력 증진이 시장의 요구에 미치지 못하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 국제공개특허 W02010/144740 호
- (특허문헌 0002) 국제공개특허 W02012/000104 호
- (특허문헌 0003) 국제공개특허 W02010/129709 호
- (특허문헌 0004) 국제공개특허 W02010/054401 호

- (특허문헌 0005) 국제공개특허 W02009/127060 호
- (특허문헌 0006) 미국특허 US 9364435 호
- (특허문헌 0007) 한국등록특허 제 10-1967417 호
- (특허문헌 0008) 한국공개특허 제 10-2019-0132405 호

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Direct Synthesis of Maradolipids and Other Trehalose 6-monoesters and 6,6'-diesters, N. J. Paul et al. J. Org. Chem. 2013, 78: 363:
- (비특허문헌 0002) Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA, S. Patel et al. Nat. Commun. 2020, 11: 983:

발명의 내용

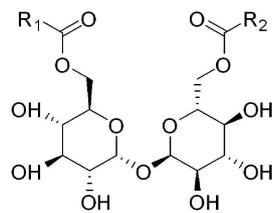
해결하려는 과제

- [0009] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 연구를 한 결과, 항원의 발현효율을 증대시키기 위하여 핵산의 안정화 및 전달력 증진을 위해 사용되는 지질나노입자의 신규 조성물을 발명하여 이를 제공하고자 한다.
- [0010] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않는다. 본 발명의 목적은 이하의 설명으로 보다 분명해질 것이며, 특허청구범위에 기재된 수단 및 그 조합으로 실현될 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기와 같은 과제의 해결 수단을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일측면은, 지질 성분을 포함하는 지질 나노 입자 조성물에 있어서, 상기 조성물은 하기 화학식 1의 트레할로스 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

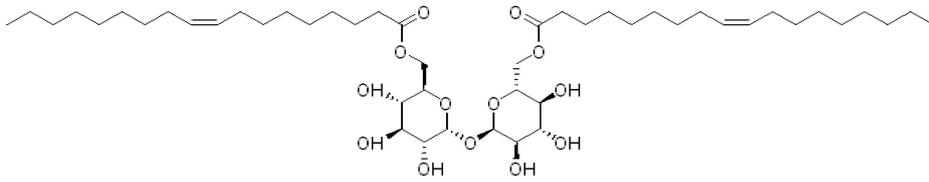
[0014] [화학식 1]



- [0015] 상기 화학식 1 에서 R1과 R2는 각각 독립적으로 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.
- [0017] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 탄소수 2 내지 20의 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 불포화 결합을 1 내지 3개 포함하는 탄소수 6 내지 20의 알케닐인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 불포화 결합을 1 내지 2개 포함하는 탄소수 10 내지 20의 알케닐인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 불포화 결합을 1 개 포함하는 탄소수 14 내지 20의 알케닐인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 트레할로스 유도체 화합물은 하기 화학식 2의 화합물인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0022] [화학식 2]

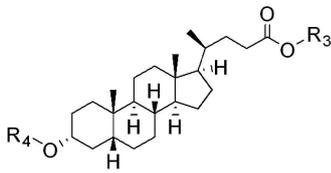


[0023]

[0024] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 구조 지질로서 콜레스테롤 지질을 포함하지 않는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 3의 리토콜산 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다 :

[0026] [화학식 3]



[0027]

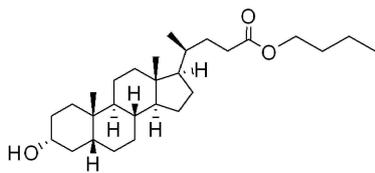
[0028] 상기 화학식 3에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

[0029] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 R3 및 R4 중 적어도 어느 하나 이상은 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 화학식 3의 리토콜산 유도체 화합물은 R3가 수소이고, R4가 탄소수 3 내지 7의 알킬기인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

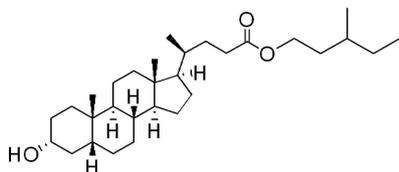
[0031] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 리토콜산 유도체 화합물은 하기 화학식 4 내지 6 중 어느 하나 이상인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0032] [화학식 4]



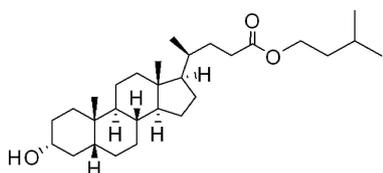
[0033]

[0034] [화학식 5]



[0035]

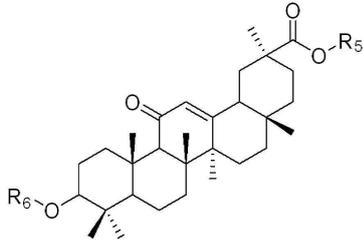
[0036] [화학식 6]



[0037]

[0038] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 7의 글리시레틴산 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0039] [화학식 7]



[0040]

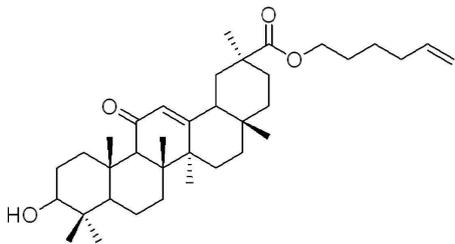
[0041] 상기 화학식 7에서 R5 및 R6 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

[0042] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 R5 및 R6 중 적어도 어느 하나 이상은 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 화학식 7의 글리시레틴산 유도체 화합물은 R6가 수소이고, R5가 탄소수 3 내지 8의 알킬기 또는 탄소수 3 내지 8의 알케닐기인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

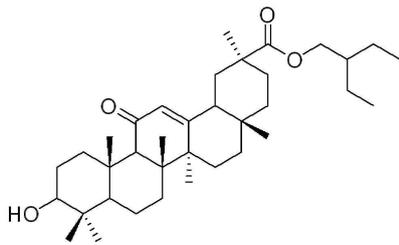
[0044] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 글리시레틴산 유도체 화합물은 하기 화학식 8 내지 10 중 어느 하나 이상인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0045] [화학식 8]



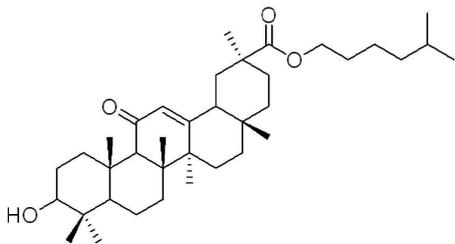
[0046]

[0047] [화학식 9]



[0048]

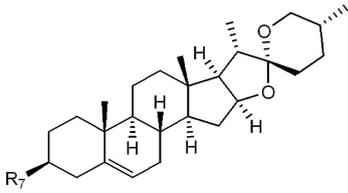
[0049] [화학식 10]



[0050]

[0052] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 11의 디오스게닌 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0053] [화학식 11]



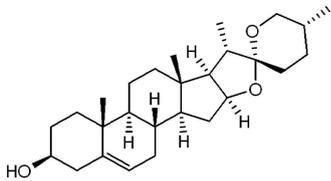
[0054]

[0055] 상기 화학식 11에서 R7은 -OH, -OMe, -NH2, -NHMe, -NMe2, -NMe3, -SH, -Glucose, 메틸 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물을 포함하는 구조이다.

[0056] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 화학식 11의 디오스게닌 및 그 유도체 화합물은 R7가 산화수소기 또는 아미노기 또는 메틸 아미노기인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

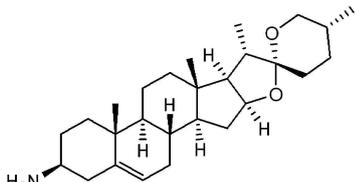
[0057] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 디오스게닌 및 그 유도체 화합물은 하기 화학식 12 내지 14 중 어느 하나 이상인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0058] [화학식 12]



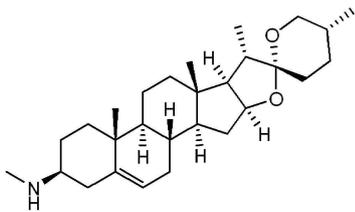
[0059]

[0060] [화학식 13]



[0061]

[0062] [화학식 14]



[0063]

[0065] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 이온성 지질을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0066] 3-(디도데실아미노)-N1,N1,4-트리도데실-1-피페라진에탄아민 (KL10); N1-[2-(디도데실아미노)에틸]-N1,N4,N4-트리도데실-1,4-피페라진디에탄아민 (KL22); 14,25-디트리테실-15,18,21,24-테트라아자-옥타트리아콘탄 (KL25); 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DLin-DMA); 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란 (DLin-K-DMA); 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA); 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-KC2-DMA); 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판 (DODMA); 2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA); (2R)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA (2R)); 및 (2S)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA (2S)).

[0067] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 인지질을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

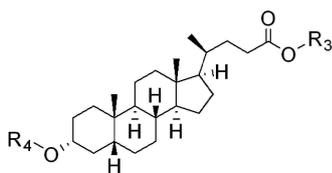
[0068] 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-포스포콜린(DMPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DOPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 1,2-di운데카노일-sn-글리세로-포스포콜린(DUPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC), 1,2-di-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린(18:0 디에테르 PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미석시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(OChemsPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 Lyso PC), 1,2-딜리노레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE), 1,2-디파이타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(ME 16.0 PE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-딜리노레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨 염(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민(POPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE), 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜콜린(SOPC), 스펅고미엘린, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티드산, 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린, 라이소포스파티딜콜린, 및 라이소포스파티딜에탄올아민(LPE).

[0069] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-변형된 세라미드, PEG-변형된 디알킬아민, PEG-변형된 디알킬글리세롤, PEG-변형된 디알킬글리세롤, 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 PEG 지질을 더 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0070] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 이온성 지질을 더 포함하고, 상기 이온성 지질 및 트레할로즈 유도체 화합물의 몰 비율은 1 : 0.7 내지 1.3인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0071] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 3의 리토콜산 유도체 화합물, 하기 화학식 7의 글리시레틴산 유도체 화합물 또는 하기 화학식 11의 디오스케닌 유도체 화합물을 더 포함하며, 상기 이온성 지질, 트레할로즈 유도체 화합물 및 구조 지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30 내지 1.80 인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

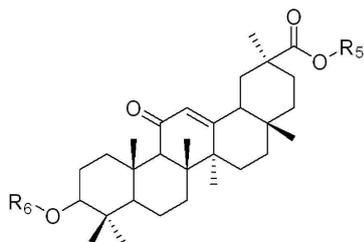
[0072] [화학식 3]



[0073]

[0074] 상기 화학식 3에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이며,

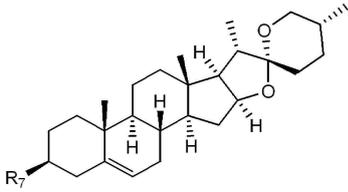
[0075] [화학식 7]



[0076]

[0077] 상기 화학식 7에서 R5 및 R6 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

[0078] [화학식 11]



- [0079]
- [0080] 상기 화학식 11에서 R7은 -OH, -OMe, -NH₂, -NHMe, -NME₂, -NME₃, -SH, -Glucose 혹은 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소를 포함하는 구조이다
- [0081] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 인지질을 더 포함하며, 상기 이온성 지질; 트레할로즈 유도체 화합물; 구조 지질; 및 인지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30 내지 1.80 : 0.35 내지 0.45 인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0082] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 PEG 지질을 더 포함하며, 상기 이온성 지질; 트레할로즈 유도체 화합물; 구조 지질; 인지질; 및 PEG 지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30 내지 1.80 : 0.35 내지 0.45 : 0.03 내지 0.09인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0083] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 이온성 지질, 구조 지질, 인지질 및 PEG 지질을 더 포함하고, 상기 이온성 지질은 1 mol% 내지 59 mol%, 상기 트레할로즈 유도체 화합물은 1 mol% 내지 59 mol%, 상기 구조 지질은 30 mol% 내지 60 mol%, 상기 인지질은 5 mol% 내지 20 mol%, 상기 PEG 지질은 0.5 mol% 내지 5 mol%를 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0084] 본 발명의 일측면에 있어서, 치료적 및/또는 예방적 제제를 추가로 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0085] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 치료적 및/또는 예방적 제제는 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 또는 화합물인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0086] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 치료적 및/또는 예방적 제제는 간섭 RNA (siRNA), 비대칭 간섭 RNA (aiRNA), microRNA (miRNA), 다이스-기질 RNA (dsRNA), 작은 헤어핀 RNA (shRNA), 메신저 RNA (mRNA), 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 핵산인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0088] 본 발명의 일측면에 따른 지질 나노 입자는 기존 지질 나노입자에 비하여 핵산 약물을 안정화 시키고 생체 내 전달력을 향상시킬 수 있다.
- [0089] 본 발명에 따라 구성한 지질나노입자를 이용하여 in vivo에서 mRNA가 코딩하는 단백질의 발현 효율을 살펴보면 트레할로즈 기반 지질이 적절히 포함되었을 때, 트레할로즈 기반 지질을 포함하지 않은 지질나노입자를 사용한 경우에 비하여 단백질의 발현 효율이 증가하였다.
- [0090] 본 발명의 일측면에 따르면 최적의 트레할로즈 기반 지질의 비율은 이온화지질과 동일한 몰비율을 사용하였을 때이고 최적의 RNA:지질의 비율은 질량비로 1:24 이었으며 이 때의 N/P 비율은 3 이다. (N/P 비율: 이온화 지질의 이온화가 가능한 질소의 개수를 핵산분자의 인산기의 개수로 나누어 준 값)
- [0091] 또한 본 발명의 일측면에 따른 지질나노입자는 콜레스테롤 대체제를 사용하여 통상적인 콜레스테롤을 사용하였을 때 보다 우수한 효과를 보였다.
- [0092] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 효과로 한정되지 않는다. 본 발명의 효과는 이하의 설명에서 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0094] 도 1은 Renilla Luciferase (R/L) mRNA를 포함하는 신규 조성의 지질나노입자 (LNP 87, 93, 98, 100)의 단백질 발현 효율을 쥐의 귀에 주사한 후 6시간 및 24시간 뒤 발현된 R/L의 양을 분석한 도면이다.

도 2는 LNP98번을 1 μg의 R/L mRNA 대비 3.6, 7.2, 12, 24, 48 μg의 지질의 양을 사용하여 R/L의 발현량으로부터 최적의 RNA/지질 비율을 분석한 도면이다.

도 3은 트레할로즈 함량에 따른 R/L mRNA의 전달효율을 R/L의 발현량으로부터 분석한 도면이다.

도 4 내지 도 6은 콜레스테롤을 대체한 화합물의 종류에 따른 R/L mRNA의 전달효율을 R/L 발현량으로부터 분석한 도면이다.

도 7은 본원발명 일 구현예의 지질 나노 입자 조성물의 성분을 표현한 개념도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0095] 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 성분, 반응 조건, 성분의 함량을 표현하는 모든 숫자, 값 및/또는 표현은, 이러한 숫자들이 본질적으로 다른 것들 중에서 이러한 값을 얻는 데 발생하는 측정의 다양한 불확실성이 반영된 근사치들이므로, 모든 경우 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 기재에서 수치범위가 개시되는 경우, 이러한 범위는 연속적이며, 달리 지적되지 않는 한 이러한 범위의 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지의 모든 값을 포함한다. 더 나아가, 이러한 범위가 정수를 지칭하는 경우, 달리 지적되지 않는 한 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지를 포함하는 모든 정수가 포함된다.

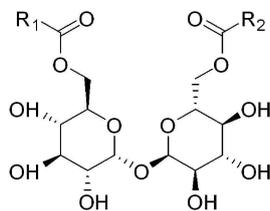
[0096] 본 명세서에 있어서, 범위가 변수에 대해 기재되는 경우, 상기 변수는 상기 범위의 기재된 종료점들을 포함하는 기재된 범위 내의 모든 값들을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "5 내지 10"의 범위는 5, 6, 7, 8, 9, 및 10의 값들뿐만 아니라 6 내지 10, 7 내지 10, 6 내지 9, 7 내지 9 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 5.5, 6.5, 7.5, 5.5 내지 8.5 및 6.5 내지 9 등과 같은 기재된 범위의 범주에 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다. 또한 예를 들면, "10% 내지 30%"의 범위는 10%, 11%, 12%, 13% 등의 값들과 30%까지를 포함하는 모든 정수들뿐만 아니라 10% 내지 15%, 12% 내지 18%, 20% 내지 30% 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 10.5%, 15.5%, 25.5% 등과 같이 기재된 범위의 범주 내의 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0098] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0099] 본 발명의 일측면에 따르면, 핵산 약물을 안정화 시키고 생체 내 전달력을 향상시킬 수 있는 지질나노입자의 신규 조성물로서 트레할로즈 기반 지질과 통상적인 지질나노입자에 사용되는 콜레스테롤 대체 용도의 신규 조성물로서 리토콜산 유도체 또는 글리시레틴산 유도체 또는 디오스게닌 유도체를 제안한다.

[0100] 본 발명은 핵산 분자를 안정화시키며 아래 화학식 1의 구조를 가지는 트레할로즈 기반의 지질을 포함하는 지질 나노입자 조성물을 제공한다.

[0101] [화학식 1]

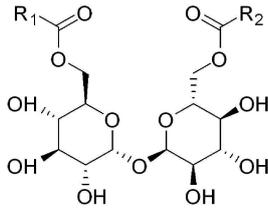


[0102]

[0104] 트레할로즈는 이당류의 화합물로서 높은 보습력으로 인해 화장품, 식품, 의약품 등에 사용되고 있다. 또한 단일 가당 핵산과 수소결합을 통하여 안정성을 증가시키는 물질로서 단일가당 핵산을 포함하는 시약의 보존제로도 쓰이는 물질이다.

[0105] 본 발명의 일측면은 친수성의 트레할로즈에 두 가당의 올레산을 결합시켜 화학식 1을 합성하여 이를 수소결합을 기반으로하여 핵산 분자를 안정화시키는 지질나노입자의 구성물질로 이용하였다.

[0106] [화학식 1]

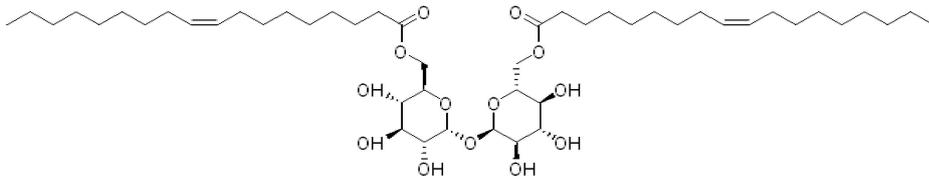


[0107]

[0108] 화학식 1에서 R1과 R2는 C2~C20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

[0109] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 트레할로즈 기반 지질 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다.

[0110] [화학식 2]



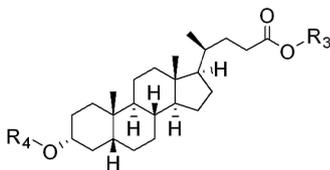
[0111]

[0112] 본 발명의 일구현예에 있어서, 트레할로즈 기반 지질 화합물은 몰비율로 전체의 10~50%를 차지할 수 있다.

[0113] 본 발명의 일측면은 기존 통상적인 지질나노입자의 구성물질인 콜레스테롤의 대체화합물로서 하기 지질나노입자 조성물을 제공한다.

[0114] 일 구현예에서, 콜레스테롤 대체 용도의 지질나노입자 조성물의 첫 번째 예로서 화학식 3으로 대표되는 리토콜산 유도체를 제공한다. 리토콜산은 체내 존재하는 담즙산의 일종으로 스테로이드 구조를 가지고 있어 지질나노입자의 콜레스테롤을 대체하기에 적절하며 지방산의 대사를 돕기 때문에 지질나노입자의 핵산 약물 전달 이후 분해 및 대사에 긍정적인 효과를 줄 수 있다.

[0115] [화학식 3]

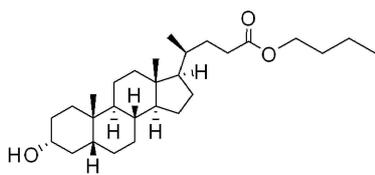


[0116]

[0117] 일 구현예에서, 화학식 3에서 R3과 R4는 H 또는 C2~C20의 선형 또는 가지형의 포화 또는 불포화 탄화수소를 포함하는 구조이며, R3과 R4 중 적어도 하나는 C2~C20의 선형 또는 가지형의 포화 또는 불포화 탄화수소를 포함하여야 한다.

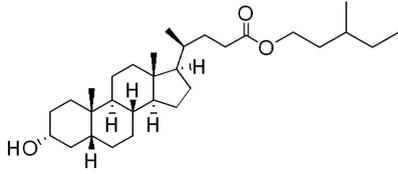
[0118] 일 구현예에서, 상기 리토콜산 기반 지질 화합물은 하기 화학식 4내지 6으로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다.

[0119] [화학식 4]



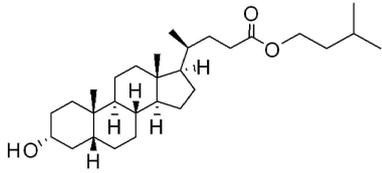
[0120]

[0121] [화학식 5]



[0122]

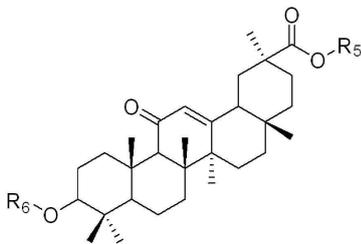
[0123] [화학식 6]



[0124]

[0125] 일 구현예에 있어서, 콜레스테롤 대체 용도의 지질나노입자 조성물의 두 번째 예로서 화학식 7로 대표되는 글리시레틴산 유도체를 제공한다. 글리시레틴산은 감초 추출물의 대사물질로서 코르티코스테로이드의 대사과정에 관여하여 코르티코스테로이드 생성을 억제하기도 하는데, 이러한 작용으로 인하여 항염효과를 나타내기도 한다.

[0126] [화학식 7]

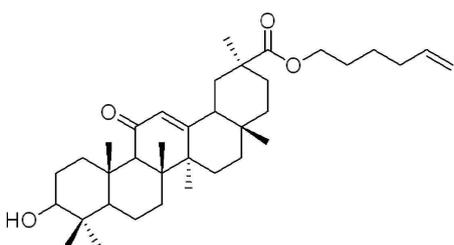


[0127]

[0128] 일 구현예에서, 화학식 7에서 R5와 R6는 H 또는 C2-C20의 선형 또는 가지형의 포화 또는 불포화 탄화수소를 가지는 구조를 포함하며, R5와 R6 중 적어도 하나 이상은 C2-C20의 선형 또는 가지형의 포화 또는 불포화 탄화수소를 포함하여야 한다.

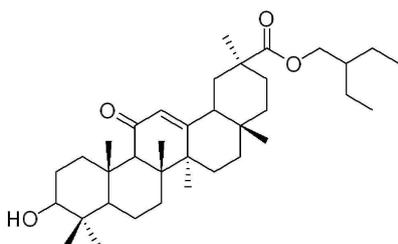
[0129] 일 구현예에서, 상기 글리시레틴산 기반 화합물은 하기 화학식 8~10으로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다.

[0130] [화학식 8]



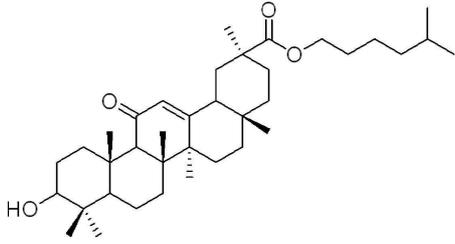
[0131]

[0132] [화학식 9]



[0133]

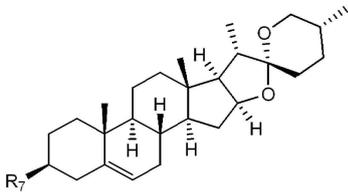
[0134] [화학식 10]



[0135]

[0137] 일 구현예에 있어서, 콜레스테롤 대체 용도의 지질나노입자 조성물의 세 번째 예로서 화학식 11로 대표되는 디오스케닌 유도체를 제공한다. 디오스케닌은 참마 추출물로서 성호르몬의 전구체이다. 체내에서 DHEA를 거쳐 성호르몬이 만들어지며 DHEA는 기억력 회복, 면역기능 회복, 항암능력 강화, 심장병 예방, 활력 증진 등의 다양한 효과가 검증되어 있다.

[0138] [화학식 11]

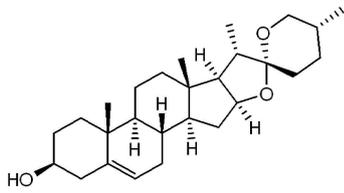


[0139]

[0140] 상기 화학식 11에서 R7은 -OH, -OMe, -NH2, -NHMe, -NME2, -NME3, -SH, -SMe, -Glucose, 메틸 혹은 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소를 포함하는 구조이다.

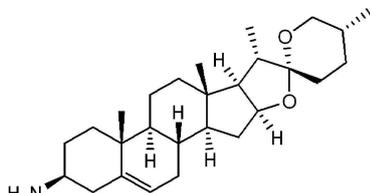
[0141] 일 구현예에서, 상기 디오스케닌 유도체 화합물은 하기 화학식 12 내지 14 중 어느 하나 이상인, 지질 나노입자 조성물을 제공한다:

[0142] [화학식 12]



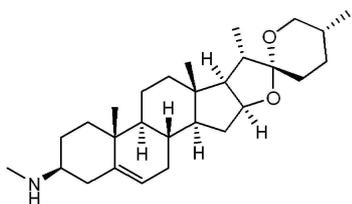
[0143]

[0144] [화학식 13]



[0145]

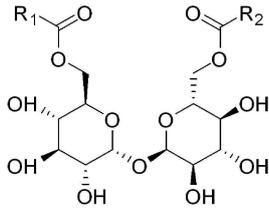
[0146] [화학식 14]



[0147]

- [0149] 일구현예에서, 구조 지질로서 콜레스테롤 대체 용도의 상기 구조 지질은 몰비율로 전체 나노입자 조성물의 20~50%를 차지한다.
- [0150] 일구현예에서, 본 발명의 지질나노입자 조성물은 이온성 지질 혹은 이온화 지질을 포함할 수 있다. 상기 이온성 지질은 TNS pKa 값이 6~7 사이의 질소를 포함하는 친수성 머리 구조와 소수성 꼬리 구조를 가지는 통상적인 이온화 지질을 사용하며 그 구조에 제한을 두지 않는다. 상기 이온화 지질은 1세대 LNP용 이온화 지질은 DLin-MC3-DMA를 사용할 수 있다.
- [0151] 일 구현예에서, 화학식 1의 화합물은 통상적인 이온화 지질과 함께 사용되며 화학식 1과 통상적인 이온화 지질의 총량은 몰비율로 전체의 30~60%를 차지한다.
- [0152] 일 구현예에서, 본 발명의 지질나노입자 조성물은 헬퍼지질로서 인지질을 포함할 수 있다. 상기 인지질로는 DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)을 사용할 수 있다.
- [0153] 일 구현예에서, 본 발명의 지질나노입자 조성물은 PEG 지질을 포함할 수 있다. PEG-지질은 통상적으로 나노입자의 응집을 저해하기 위하여 사용되는 PEG-conjugated 지질을 포함하며 그 구조에 제한을 두지 않는다. 상기 PEG 지질은 DMG-PEG 지질을 사용할 수 있다.
- [0154] 일 구현예에서, 본 발명의 지질 나노입자는 핵산, 화학식 1, 이온화 지질, 인지질, 구조유지 지질, PEG-지질의 5개의 구성성분으로 이루어지며 그 비율은 화학식 1을 20~40%, 이온화 지질을 20~40%, 인지질을 5~20%, 구조유지 지질을 30~60%, PEG-지질을 0.5~5% 조성으로 포함할 수 있다.
- [0155] 일구현예에서, 신규 조성의 지질나노입자(LNP)의 함량 및 조성은 실시예 5의 하기 표 1과 같을 수 있다.
- [0156] 일 구현예에서, 이온화 지질: 트레할로즈 기반 지질 : DOPE: 콜레스테롤 (또는 대체 화합물) DMG-PEG 의 비율을 25:25:10:38.5:1.5 의 비율의 조성으로 지질나노입자를 제조하였을 때, 화학식 4, 화학식 5의 리토콜산 유도체와 레티노산, 이 적절한 콜레스테롤 대체제로 활용 가능함을 보였다.
- [0157] 본 발명은 핵산 약물을 안정화하고 체내 전달력을 향상시키기 위한 지질나노입자의 신규 조성물에 관한 것으로서 트레할로즈 기반 지질 및 콜레스테롤 대체 용도의 화합물을 포함한다.
- [0158] 통상적인 지질나노입자는 이온화지질, 인지질, 콜레스테롤, PEG-지질의 네 가지 화합물로 조성이 되나 본 발명에서는 단일가닥 핵산과 수소결합으로 상호작용이 가능한 이당류 화합물인 트레할로즈를 이용하여 합성한 지질 화합물 (화학식 2)을 첨가하였을 때, 트레할로즈를 포함하지 않는 지질나노입자 대비 이온화 지질의 양이 절반으로 감소하였음에도 불구하고 전달효율이 크게 떨어지지 않거나 (표 1의 LNP 93과 LNP87) 증가함을 (표 1의 LNP 98과 LNP101) 확인하였다.
- [0159] 일 구현예에서, 트레할로즈 기반 지질의 함량을 몰비율로 0% (표 1의 LNP101), 12.5% (표 1의 LNP103), 25% (표 1의 LNP98), 37.5% (표 1의 LNP102) 로 변화시켰을 때, 전달효율의 변화를 보였으며 이온화 지질과 트레할로즈 기반 지질의 몰비율을 각각 25%로 사용하였을 때 최적의 전달 효율을 보였다.
- [0160] 여기에 콜레스테롤을 리토콜산 유도체 (화합물 4 및 화합물 5)로 대체하였을 때 (표 1의 LNP98), 전달효율이 크게 증가하였음을 확인하였다.
- [0161] 이로써 본 발명에서는 이온성 지질; 트레할로즈 유도체 화합물; 구조 지질; 인지질; 및 PEG 지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30 내지 1.80 : 0.35 내지 0.45 : 0.03 내지 0.09로 사용하는 신규 조성의 핵산 약물 전달용 지질나노입자를 제공한다.
- [0162] 일 구현예에서, 지질나노입자는 핵산 의약품을 포함하며, 이는 백신용 mRNA, 면역증강제용 RNA, siRNA, miRNA, pDNA, 유전자 가위 등 핵산을 기반으로 하는 약물을 포함하며 길이와 이차구조 형성 여부에 제한을 두지 않는다.
- [0164] 이하, 본 발명의 다양한 측면에 대하여 설명한다.
- [0165] 본 발명의 일측면은, 지질 성분을 포함하는 지질 나노 입자 조성물에 있어서, 상기 조성물은 하기 화학식 1의 트레할로즈 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0166] [화학식 1]



[0167]

[0168] 상기 화학식 1 에서 R1과 R2는 각각 독립적으로 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

[0169] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 탄소수 2 내지 20의 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

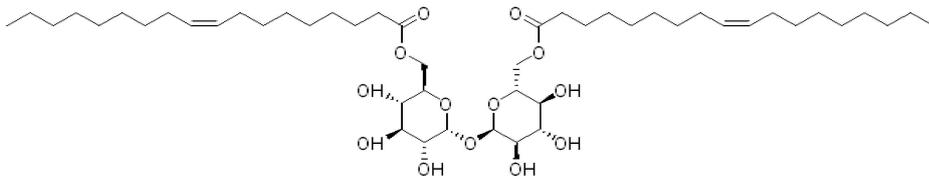
[0170] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 불포화 결합을 1 내지 3개 포함하는 탄소수 6 내지 20의 알케닐인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0171] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 불포화 결합을 1 내지 2개 포함하는 탄소수 10 내지 20의 알케닐인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0172] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 R1과 R2는 각각 독립적으로 불포화 결합을 1 개 포함하는 탄소수 14 내지 20의 알케닐인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0173] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 트레할로스 유도체 화합물은 하기 화학식 2의 화합물인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0174] [화학식 2]

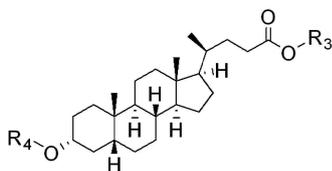


[0175]

[0176] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 구조 지질로서 콜레스테롤 지질을 포함하지 않는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0177] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 3의 리토콜산 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다 :

[0178] [화학식 3]



[0179]

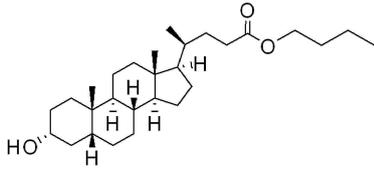
[0180] 상기 화학식 3에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

[0181] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 R3 및 R4 중 적어도 어느 하나는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0182] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 화학식 3의 리토콜산 유도체 화합물은 R3가 수소이고, R4가 탄소수 3 내지 7의 알킬기인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

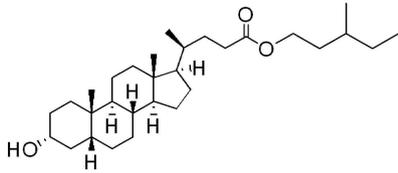
[0183] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 리토콜산 유도체 화합물은 하기 화학식 4 내지 6 중 어느 하나 이상인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0184] [화학식 4]



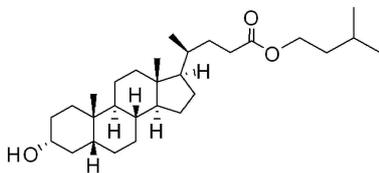
[0185]

[0186] [화학식 5]



[0187]

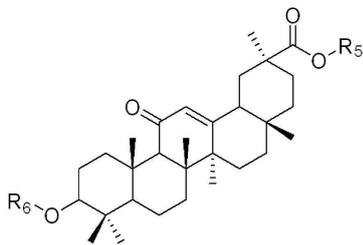
[0188] [화학식 6]



[0189]

[0190] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 7의 글리시레틴산 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0191] [화학식 7]



[0192]

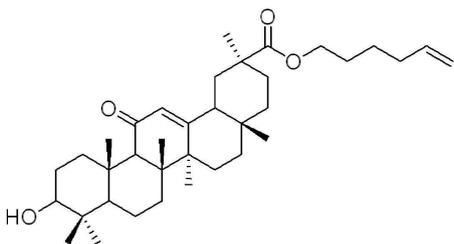
[0193] 상기 화학식 7에서 R5 및 R6 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

[0194] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 R5 및 R6 중 적어도 어느 하나 이상은 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0195] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 화학식 7의 글리시레틴산 유도체 화합물은 R6가 수소이고, R5가 탄소수 3 내지 8의 알킬기 또는 탄소수 3 내지 8의 알케닐기인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

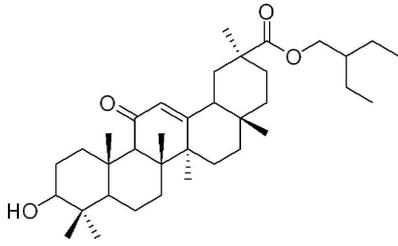
[0196] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 글리시레틴산 유도체 화합물은 하기 화학식 8 내지 10 중 어느 하나 이상인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0197] [화학식 8]



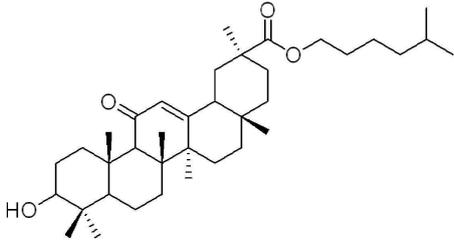
[0198]

[0199] [화학식 9]



[0200]

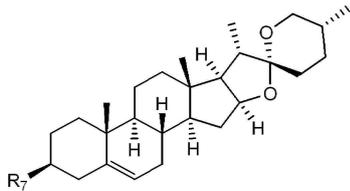
[0201] [화학식 10]



[0202]

[0203] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 11의 디오스게닌 유도체 화합물을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0204] [화학식 11]



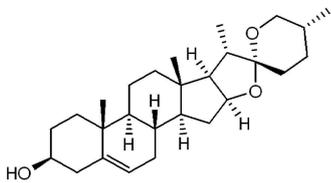
[0205]

[0206] 상기 화학식 11에서 R7은 -OH, -OMe, -NH2, -NHMe, -NMe2, -NMe3, -SH, -Glucose 혹은 메틸 대신 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소를 포함하는 구조이다.

[0207] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 화학식 7의 디오스게닌 및 그 유도체 화합물은 R6가 산화수소기 또는 아미노기 또는 메틸 아미노기인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

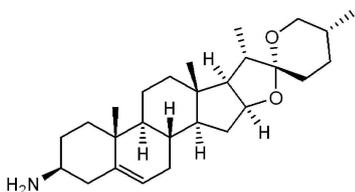
[0208] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 디오스게닌 및 그 유도체 화합물은 하기 화학식 12 내지 14 중 어느 하나 이상인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0209] [화학식 12]



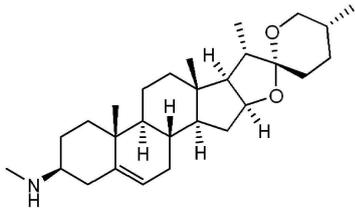
[0210]

[0211] [화학식 13]



[0212]

[0213] [화학식 14]



[0214]

[0216] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 이온성 지질을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0217] 3-(디도데실아미노)-N1,N1,4-트리도데실-1-피페라진에탄아민 (KL10); N1-[2-(디도데실아미노)에틸]-N1,N4,N4-트리도데실-1,4-피페라진디에탄아민 (KL22); 14,25-디트리데실-15,18,21,24-테트라아자-옥타트리아콘탄 (KL25); 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLin-DMA); 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-K-DMA); 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트 (DLin-MC3-DMA); 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란 (DLin-KC2-DMA); 1,2-디올레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DODMA); 2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA); (2R)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민(옥틸-CLinDMA (2R)); 및 (2S)-2-({8-[(3β)-콜레스트-5-엔-3-일옥시]옥틸}옥시)-N,N-디메틸-3-[(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디엔-1-일옥시]프로판-1-아민 (옥틸-CLinDMA (2S)).

[0218] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 인지질을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

[0219] 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DLPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-포스포콜린(DMPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DOPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 1,2-di운데카노일-sn-글리세로-포스포콜린(DUPC), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC), 1,2-디-O-옥타데세닐-sn-글리세로-3-포스포콜린(18:0 디에테르 PC), 1-올레오일-2-콜레스테릴헤미석시노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(OChemsPC), 1-헥사데실-sn-글리세로-3-포스포콜린(C16 Lyso PC), 1,2-딜리노레노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE), 1,2-디파이타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(ME 16.0 PE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-딜리노레노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-rac-(1-글리세롤) 나트륨 염(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민(POPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE), 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜콜린(SOPC), 스펅고미엘린, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티드산, 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린, 라이소포스파티딜콜린, 및 라이소포스파티딜에탄올아민(LPE).

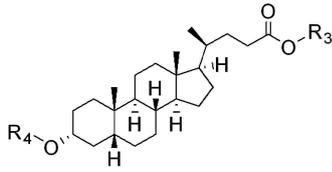
[0220] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 PEG-변형된 포스파티딜에탄올아민, PEG-변형된 포스파티드산, PEG-변형된 세라미드, PEG-변형된 디알킬아민, PEG-변형된 디알킬글리세롤, PEG-변형된 디알킬글리세롤, 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 PEG 지질을 더 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0221] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 이온성 지질을 더 포함하고, 상기 이온성 지질 및 트레할로즈 유도체 화합물의 몰 비율은 1 : 0.7 내지 1.3인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0222] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 구조 지질로서 하기 화학식 3의 리토콜산 유도체 화합물, 하기 화학식 7의 글리시레틴산 유도체 화합물 또는 화학식 11의 디오스게닌 유도체 화합물을 더 포함하며, 상기 이온성 지질, 트레할로즈 유도체 화합물 및 구조 지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30

내지 1.80 인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다:

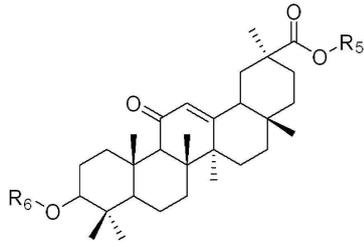
[0223] [화학식 3]



[0224]

[0225] 상기 화학식 3에서 R3 및 R4는 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이며,

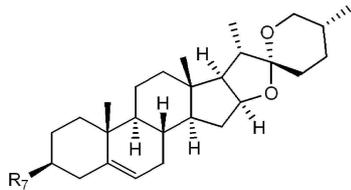
[0226] [화학식 7]



[0227]

[0228] 상기 화학식 7에서 R5 및 R6 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소이다.

[0229] [화학식 11]



[0230]

[0231] 상기 화학식 11에서 R7은 -OH, -OMe, -NH2, -NHMe, -NMe2, -NMe3, -SH, -Glucose 혹은 탄소수 2 내지 20의 포화 또는 불포화 탄화수소를 포함하는 구조이다.

[0233] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 인지질을 더 포함하며, 상기 이온성 지질; 트레할로즈 유도체 화합물; 구조 지질; 및 인지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30 내지 1.80 : 0.35 내지 0.45 인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0234] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 PEG 지질을 더 포함하며, 상기 이온성 지질; 트레할로즈 유도체 화합물; 구조 지질; 인지질; 및 PEG 지질의 몰비율은 1 : 0.70 내지 1.30 : 1.30 내지 1.80 : 0.35 내지 0.45 : 0.03 내지 0.09인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0235] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 나노 입자 조성물은 이온성 지질, 구조 지질, 인지질 및 PEG 지질을 더 포함하고, 상기 이온성 지질은 1 mol% 내지 59 mol%, 바람직하게는 20 mol% 내지 40 mol%, 상기 트레할로즈 유도체 화합물은 1 mol% 내지 59 mol%, 바람직하게 20 mol% 내지 40 mol%, 상기 구조 지질은 30 mol% 내지 60 mol%, 상기 인지질은 5 mol% 내지 20 mol%, 상기 PEG 지질은 0.5 mol% 내지 5 mol%을 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0236] 본 발명의 일측면에 있어서, 치료적 및/또는 예방적 제제를 추가로 포함하는, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0237] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 치료적 및/또는 예방적 제제는 면역 반응을 유도할 수 있는 백신 또는 화합물인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

[0238] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 치료적 및/또는 예방적 제제는 간섭 RNA (siRNA), 비대칭 간섭 RNA (aiRNA), microRNA (miRNA), 다이서-기질 RNA (dsRNA), 작은 헤어핀 RNA (shRNA), 메신저 RNA (mRNA), 및 이들의 혼합물

로 구성된 군으로부터 선택되는 핵산인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.

- [0239] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 치료적 및/또는 예방적 제제의 캡슐화 효율은 적어도 50% 이상인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0240] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 지질 성분 대 상기 치료적 및/또는 예방적 제제의 wt/wt 비는 약 10:1 내지 약 60:1인, 지질 나노 입자 조성물을 제공한다.
- [0241] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 N:P 비는 약 2:1 내지 약 30:1인, 나노입자 조성물을 제공한다. N/P 비율은 이온화 지질의 이온화가 가능한 질소의 개수를 핵산분자의 인산기의 개수로 나누어 준 값이다.
- [0242] 본 발명의 다른 측면은 상기 본 발명의 일측면에 따른 지질 나노 입자 조성물 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0243] 본 발명의 또 다른 측면은 치료적 및/또는 예방적 제제를 포유동물 세포에 전달하는 방법으로서, 대상체에게 상기 본 발명의 일측면의 지질 나노입자 조성물을 투여하는 것을 포함하되, 상기 투여는 상기 세포를 상기 나노입자 조성물과 접촉시켜서, 상기 치료적 및/또는 예방적 제제가 세포에 전달되는 것을 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0244] 일 구현예에서, 상기 포유동물 세포는 포유동물의 것이다.
- [0245] 일 구현예에서, 상기 포유동물은 인간이다.
- [0246] 일 구현예에서, 상기 나노입자 조성물은 정맥내로, 근육내로, 진피내로, 피하로, 비강내로, 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다.
- [0247] 일 구현예에서, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 치료적 및/또는 예방적 제제의용량이 포유동물에게 투여되는 방법을 제공한다.
- [0248] 본 발명의 또 다른 측면은 포유동물 세포에서 관심 폴리펩타이드를 생산하는 방법, 상기 세포를 상기 본 발명의 일측면 중 어느 하나의 지질 나노 입자 조성물을 접촉시키는 것을 포함하되, 상기 치료적 및/또는 예방적 제제는 mRNA이고, 상기 mRNA는 관심 폴리펩타이드를 인코딩함으로써, 상기 mRNA는 관심 폴리펩타이드를 생산하기 위해 세포에서 번역될 수 있는, 방법을 제공한다.
- [0250] 이하, 구체적인 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 예시에 불과하며, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0252] **실시예 1: 트레할로즈 기반 지질의 합성**

- [0253] Trehalose dihydrate (200 mg, 0.53 mmol)를 pyridine (5mL)에 녹인 후, TBTU(421 mg, 1.3 mmol), DIPEA (320 μ L, 1.2 mmol), Oleic acid (370 μ L, 1.2 mmol)을 차례로 넣고 아르곤 기체 충전 후, 상온에서 20시간 동안 교반한다. 용매는 회전감압증류기를 이용하여 제거한 후, 관크로마토그래피 (SiO₂, 2:98 -> 10:90 MeOH/EtOAc)로 1차 정제 후 건조한다.
- [0254] 건조된 고체를 EtOAc로 수차례 씻은 후, 완전히 건조하여 화학식 2의 화합물을 287 mg (62 %)를 얻었다.
- [0255] ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 5.38 (t, 4H, *J* = 4.5 Hz), 5.08 (d, 2H, *J* = 3.8 Hz), 4.39 (dd, 2H, *J* = 11.9, 2.2 Hz), 4.23 (dd, 2H, *J* = 11.9, 5.1 Hz), 4.04 (ddd, 2H, *J* = 10.2, 5.3, 2.1 Hz), 3.81 (dd, 2H, *J* = 9.6, 9.4 Hz), 3.50 (dd, 2H, *J* = 9.6, 3.6 Hz), 3.35 (dd, 2H, *J* = 10.0, 8.8 Hz), 2.042.09 (m, 8H), 2.37 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 1.611.67 (m, 4H), 1.291.41 (m, 40H), 0.93 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz)
- [0256] ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 174.0, 129.5, 129.4, 93.8, 73.2, 71.8, 70.5, 70.1, 63.0, 33.7, 31.7, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.8, 28.8, 26.8, 24.7, 22.4, 13.1

[0258] **실시예 2: 리토콜산 유도체의 합성**

[0259] 리토콜산과 해당 알코올을 반응용기에 넣고, HCl 용액 (35~37% 수용액, 1 당량)을 주입한 뒤 상온에서 24시간 교반한다. 회전감압증류기를 이용하여 알코올을 증류한 뒤, DCM에 다시 녹여 NaHCO₃ 포화수용액과 포화 소금물로 분순물을 추출해 낸다. 이 후, DCM 층을 무수 Na₂SO₄를 이용하여 수분을 제거한 뒤 필터해 내고, 걸러진 용액을 회전감압증류기를 이용하여 건조한 다음 판크로마토그래피 (SiO₂, 19:1~49:1 DCM/MeOH)로 정제한다.

[0260] 이에 따라, 화학식 4(92%), 화학식 5 (87%), 화학식 6 (79%)의 리토콜산 유도체 화합물을 얻었다.

[0261] 화학식 4: MS (FAB-MS) calcd. for C₂₈H₄₉O₃ [M-H]⁻ 431.4, found 431.2; calcd. for C₂₈H₄₇O₂ [M-OH]⁺ 415.4, found 415.2.

[0262] 화학식 5: MS (ESI-MS) calcd. for C₃₀H₅₁O₃ [M-H]⁻ 459.4, found 459.3; ; calcd. for C₃₀H₅₁O₂ [M-OH]⁺ 443.4, found 443.3.

[0263] 화학식 6: MS (ESI-MS) calcd. for C₂₉H₄₉O₃ [M-H]⁻ 445.4, found 445.2; calcd. for C₂₉H₄₉O₂ [M-OH]⁺ 429.4, found 429.

[0265] **실시예 3: 글리시레틴산 유도체의 합성**

[0266] 글리시레틴산을 DMF에 녹이고, K₂CO₃ (1.5 당량)을 가하여 상온에서 30분간 교반한 후, 해당 alkyl bromide (1.2 당량)를 가하여 아르곤 기체 하에서 24 시간 상온에서 교반한다. 회전감압증류기를 이용하여 DMF를 제거한 뒤, DCM에 다시 녹여 분별깔대기에 넣고 0.5 N HCl 수용액과 포화 소금물로 불순물을 추출해 낸 후, DCM 층을 무수 Na₂SO₄를 이용하여 수분을 제거하여 걸러낸다. 걸러진 용액을 회전감압증류기를 이용하여 건조한 다음 판크로마토그래피 (SiO₂, 4:1 ~ 9:1 Hexane/EtOAc)로 정제한다.

[0267] 이에 따라, 화학식 8 (97%), 화학식 9 (96%), 화학식 10 (99%)의 글리시레틴산 유도체 화합물을 얻었다.

[0268] 화학식 8: MS (FAB-HRMS) calcd. for C₃₆H₅₇O₄ [M+H]⁺ 553.4257, found 553.4259.

[0269] 화학식 9: MS (FAB-HRMS) calcd. for C₃₆H₅₉O₄ [M+H]⁺ 555.4413, found 555.4410.

[0270] 화학식 10: MS (FAB-HRMS) calcd. for C₃₇H₆₁O₄ [M+H]⁺ 569.4570, found 569.4573.

[0272] **실시예 4: 디오스게닌 유도체의 합성**

[0273] [1단계] 반응 용기에 화학식 12 (디오스게닌, 0.50g, 1.2 mmol), TsOCl (1.1g, 5.5 mmol), 무수 피리딘 (0.95 mL, 11 mmol)과 소량의 DMAP를 무수 DCM에 녹인 후, 0 °C에서 24시간 교반한다. 반응 종료 후, 반응유기용액을 5%의 HCl 수용액와 Na₂HCO₃ 포화수용액을 이용하여 순차적으로 씻어낸 후, DCM 층을 무수 MgSO₄로 건조하여 추가 정제없이 농축하였다.

[0274] [2단계] 상기 1단계 농축물을 NaN₃ (0.95 g, 15 mmol)와 함께 아르곤 기체 환경에서 무수 DMF에 녹인 후, 60 °C에서 22시간 교반하였다. 반응 종료 후, EtOAc로 반응 용액을 희석한 후, 포화 소금물로 씻어낸다. 유기층을 무수 MgSO₄로 건조, 여과, 농축한 후, 판크로마토그래피 (SiO₂, 석유에테르/EtOAc, 150:1 부피비)로 분리하여 중간산물을 36%의 수율로 얻었다.

[0275] [3단계] 상기 2단계 중간산물과 PPh₃ (0.99 g, 3.8 mmol)를 아르곤 기체 환경에서 THF/증류수 (10:1 부피비) 혼합용매에 녹인 후, 60 °C에서 7시간 교반한다. 반응 종료 후, 반응 혼합액을 농축하여 판크로마토그래피 (SiO₂, DCM/MeOH, 50:1 부피비)로 분리하여 화학식 13 (85%)을 흰색 고상형태로 얻었다.

[0276] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.34 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.44 - 4.34 (m, 1H), 3.87 - 3.80 (m, 1H), 3.45 (ddd, J = 11.0, 4.5, 2.0 Hz, 1H), 3.35 (t, J = 10.9 Hz, 1H), 2.54 (d, J =

14.7 Hz, 1H), 1.42 (s, 9H).

[0277] ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155.18, 139.05, 123.12, 109.37, 80.89, 79.06, 66.94, 62.21, 56.64, 50.36, 46.72, 41.71, 40.34, 39.88, 37.53, 37.43, 34.00, 32.16, 31.92, 31.49, 31.44, 30.40, 28.91, 28.57, 26.49, 20.65, 18.99, 17.25, 16.37, 14.63.

[0279] 화학식 13 (261 mg, 0.61 mmol)과 Et₃N (94 μL, 0.67 mmol), BOC₂O (147 mg, 0.67 mmol)를 아르곤 기체 하에서 무수 DCM에 녹인 후, 상온에서 20시간 교반한다. 반응 종료 후, DCM을 추가로 희어 희석하고 후, 증류수 및 포화 소금물을 이용하여 순차적으로 씻어준다. 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시킨 후 여과하여 얻은 농축액을 관크로마토그래피 (SiO₂, 16:1 헥산/EtOAc)로 분리하여 화학식 14 (정량적)을 흰색 고상형태로 얻었다.

[0280] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.34 (dd, J = 4.4, 2.6 Hz, 1H), 4.39 (td, J = 7.9, 6.4 Hz, 1H), 3.46 (ddd, J = 10.9, 4.4, 2.0 Hz, 1H), 3.36 (t, J = 10.9 Hz, 1H), 2.78 (t, J = 3.3 Hz, 1H), 2.47 (dq, J = 14.4, 3.0 Hz, 1H), 2.36 (s, 3H).

[0281] ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 139.30, 122.75, 109.38, 80.95, 66.96, 62.22, 56.63, 54.89, 50.23, 41.74, 40.37, 39.90, 37.55, 36.70, 33.49, 33.22, 32.15, 31.95, 31.53, 30.44, 29.83, 28.95, 25.19, 20.69, 19.26, 17.27, 16.40, 14.65.

[0282] MS (ESI-MS) calcd. for C₂₈H₄₆NO₂ [M+H]⁺ 428.3523, found 428.3525.

[0284] **실시예 5: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작**

[0285] 뇌심근염 바이러스(encephalomyocarditis virus(EMCV))유래의 IRES 요소를 가지며, reporter gene 중 하나로 알려진 Renilla Luciferase(R/L) 을 암호화하는 핵산 서열을 표적 서열로 삽입된 RNA 플랫폼을 제작하였다. 주형 DNA를 설계하고, IVT 과정을 이용해서, 단일 가닥의 RNA 플랫폼의 핵산 분자를 제작하였다.

[0287] **실시예 6: 지질나노입자의 제조**

[0288] 0.625 mg/mL 농도의 RNA 용액 (50 mM sodium citrate buffer, 110 mM NaCl, pH=4.0)과 지질혼합용액 (Ethanol)을 실험실용 혼합기 및 유헤기 (Nanoprep Spark, Precision Nanosystems, Inc.)를 이용하여 지질나노입자를 제조한 후, 원심분리용 필터 튜브 (UFC5010, Amicon)를 이용하여 생리식염수로 용매변환을 하여 제공한다.

[0289] 구체적으로 하기 표 1과 같이 함량으로 제조하였다.

표 1

[0291]

이름	이온화지질 (몰비율)	추가 조성 (몰비율)	구조 지질 (몰비율)	인지질 (몰비율)	PEG-지질 (몰비율)
LNP87	DLin-MC3-DMA(50)	-	콜레스테롤 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP93	DLin-MC3-DMA(25)	화학식 2 (25)	콜레스테롤 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP98	DLin-MC3-DMA(25)	화학식 2 (25)	화학식 4 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP100	-	화학식 2(50)	화학식 4 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP101	DLin-MC3-DMA(50)	-	화학식 4 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)

LNP102	DLin-MC3-DMA(12.5)	화학식 2 (37.5)	화학식 4 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP103	DLin-MC3-DMA(37.5)	화학식 2 (12.5)	화학식 4 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP105	DLin-MC3-DMA(25)	화학식 2 (25)	화학식 8 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP106	DLin-MC3-DMA(25)	화학식 2 (25)	화학식 9 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP107	DLin-MC3-DMA(25)	화학식 2 (25)	화학식 10 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP112	DLin-MC3-DMA(25)	화학식 2 (25)	화학식 5 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP113	DLin-MC3-DMA(25)	화학식 2 (25)	화학식 6 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP154	DLin-MC3-DMA (25)	화학식 12 (25)	화학식 6 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP156	DLin-MC3-DMA(25)	화학식 13 (25)	화학식 6 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)
LNP158	DLin-MC3-DMA(25)	화학식 14 (25)	화학식 6 (38.5)	DOPE (10)	DMG-PEG (1.5)

[0293] 일 구현예에서, 이온화 지질: 트레할로즈 기반 지질 : DOPE: 콜레스테롤 (또는 대체 화합물) DMG-PEG 의 비율을 25:25:10:38.5:1.5 의 비율의 조성으로 지질나노입자를 제조하였을 때, 화학식 4, 화학식 5의 리토콜산 유도체와 레티노산, 이 적절한 콜레스테롤 대체제로 활용 가능함을 보였다.

[0295] **실험예 1: 단백질 발현량 확인을 통한 전달 효율의 평가**

[0296] ICR 마우스의 귀에 I.D.로 mRNA-LNP를 RNA 기준 5ug/20ul로 주사하여 발현 여부를 확인하였다.

[0297] 실험과정은 다음과 같다. 각 실험군을 RNA 기준 5ug/20ul의 용량에 맞추어 준비한 후 마우스의 양쪽 귀에 각각 I.D로 주사한다. 이후, 표적 단백질의 최대 발현 시간대에 맞춰 발현을 확인하게 된다. 실제로 실험을 진행한 R/L 의 경우, 6시간, 24시간의 2가지 시간대에 맞춰 발현과 유지 여부를 확인하였다.

[0298] 구체적인 실험과정은 다음과 같다.

[0299] 개별 호흡마취기를 이용하여 마취 후, 실험조건에 맞은 투여약물을 인슐린 주사기를 통해 주사한다. 이후, 각 해당하는 시간에 CO2를 이용하여 안락사한 후 귀를 자른다. 자른 귀를 300μl의 1X Renilla Lysis buffer에 담겨진 채로 가위와 homogenizer 기구를 이용하여 완전히 분쇄시킨다. 이후 혼합액에서 20μl를 취해 하얀색 96well plate에 옮긴 후 Promega社의 Renilla luciferase assay substrate를 100μl 넣은 후 luminescence를 측정하여 발현여부를 비교하였다.

[0300] 실험 결과는 다음과 같다.

[0301] 도 1은 Renilla Luciferase (R/L) mRNA를 포함하는 신규 조성의 지질나노입자 (LNP 87, 93, 98, 100)의 단백질 발현 효율을 쥐의 귀에 주사한 후 6시간 및 24시간 뒤 발현된 R/L의 양을 분석한 결과이다.

[0302] 도 2는 LNP98번을 1μg의 R/L mRNA 대비 3.6, 7.2, 12, 24, 48 μg 의 지질의 양을 사용하여 R/L의 발현량으로부터 최적의 RNA/지질 비율을 분석한 결과이다.

[0303] 도 3은 트레할로즈 함량에 따른 R/L mRNA의 전달효율을 R/L의 발현량으로부터 분석한 결과이다.

[0304] 도 4 내지 도 6은 콜레스테롤을 대체한 화합물의 종류에 따른 R/L mRNA 의 전달효율을 R/L 발현량으로부터 분석한 결과이다.

[0306] 통상적인 지질나노입자는 이온화지질, 인지질, 콜레스테롤, PEG-지질의 네 가지 화합물로 조성이 되나 본 발명에서는 단일가닥 핵산과 수소결합으로 상호작용이 가능한 이당류 화합물인 트레할로즈를 이용하여 합성한 지질 화합물 (화학식 2)을 첨가하였을 때, 트레할로즈를 포함하지 않는 지질나노입자 대비 이온화 지질의 양이 절반으로 감소하였음에도 불구하고 전달효율이 크게 떨어지지 않거나 (표 1의 LNP 93과 LNP87) 증가함을 (표 1의 LNP 98과 LNP101) 확인하였다.

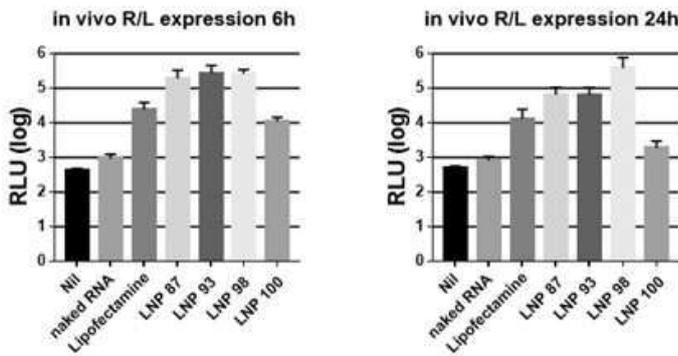
[0307] 일 구현예에서, 트레할로즈 기반 지질의 함량을 몰비율로 0% (표 1의 LNP101), 12.5% (표 1의 LNP103), 25% (표 1의 LNP98), 37.5% (표 1의 LNP102) 로 변화시켰을 때, 전달효율의 변화를 보였으며 이온화 지질과 트레할로즈 기반 지질의 몰비율을 각각 25%로 사용하였을 때 최적의 전달 효율을 보였다.

[0308] 여기에 콜레스테롤을 리토콜산 유도체 (화합물 4 및 화합물 5)로 대체하였을 때 (표 1의 LNP98), 전달효율이 크게 증가하였음을 확인하였다.

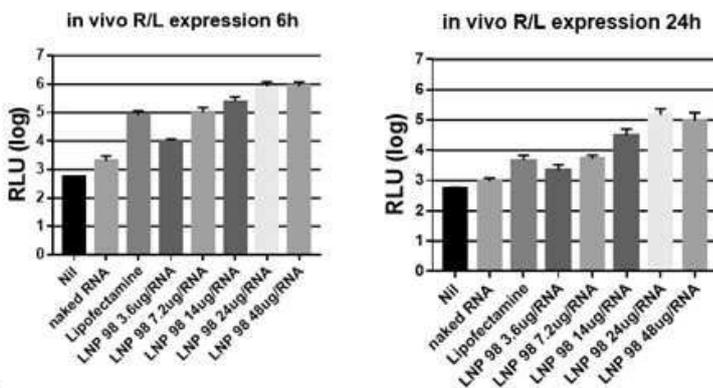
[0310] 이상, 본 발명의 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징으로 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예는 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

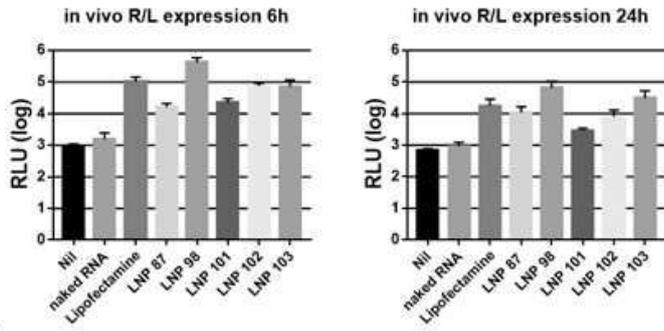
도면1



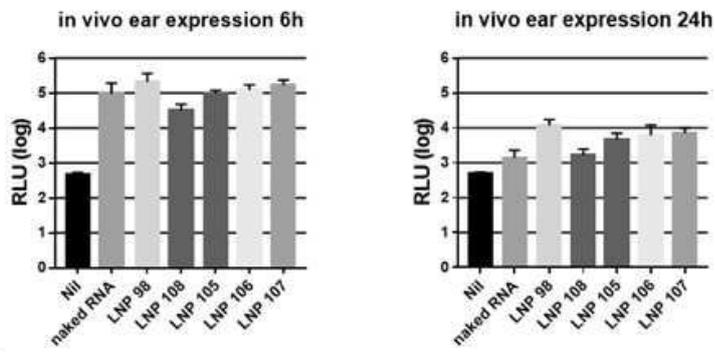
도면2



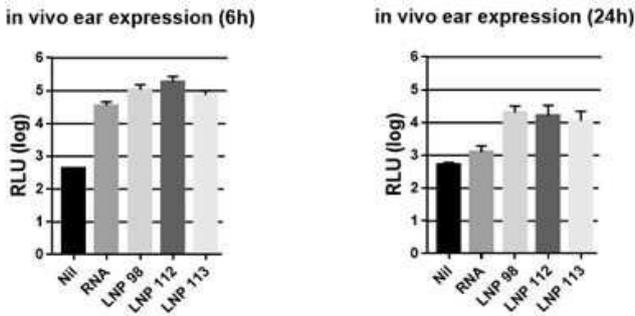
도면3



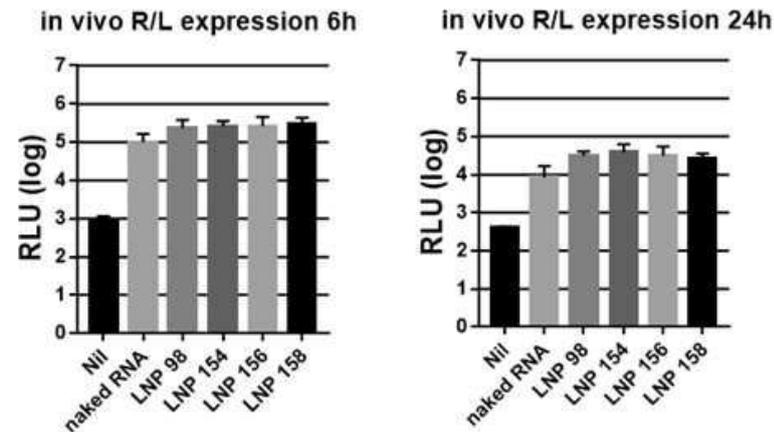
도면4



도면5



도면6



도면7

