



등록특허 10-2316722



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월26일

(11) 등록번호 10-2316722

(24) 등록일자 2021년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/14 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/143 (2013.01)
A61K 38/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0065620

(22) 출원일자 2019년06월03일

심사청구일자 2019년06월03일

(65) 공개번호 10-2020-0016783

(43) 공개일자 2020년02월17일

(30) 우선권주장

62/714,874 2018년08월06일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

ZHOU, Y. 등, Acta Pharmaceutica Sinica B,
2018.03, 8권, 2호, 페이지 165-177

(73) 특허권자

주식회사 레모넥스

서울특별시 서초구 방배로 103 (방배동,
디엠타워)

(72) 발명자

원철희

서울특별시 서초구 방배로1길 15, 1동 401호(방
배동, 대우 로얄 빌라트)

민달희

서울특별시 관악구 관악로 1 C동 501호 (봉천
동, 서울대학교수아파트122)

(74) 대리인

특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 13 항

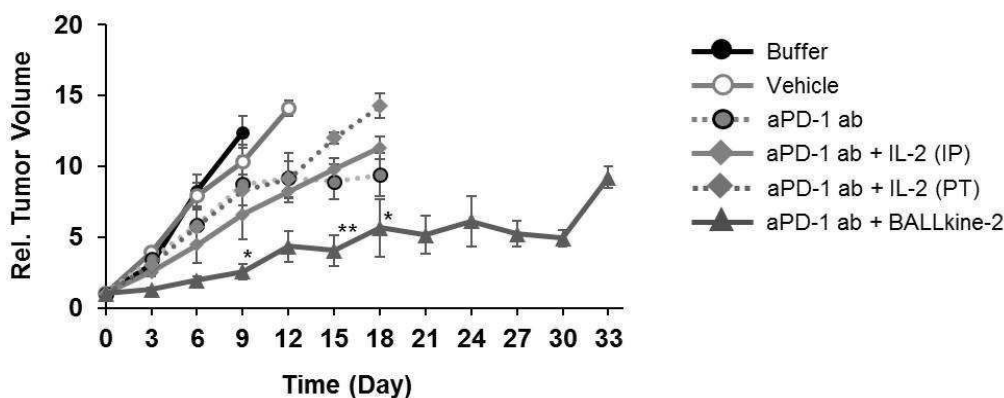
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 면역반응 물질 전달체

(57) 요약

본 발명의 면역반응 물질 전달체는 항체와 사이토카인을 포함하는 다양한 면역반응 물질을 안정적으로, 표적부위에 전달하여, 우수한 면역치료 효과를 갖는다.

대표도 - 도59



(52) CPC특허분류

A61K 38/21 (2013.01)

A61K 39/3955 (2013.01)

A61K 9/1611 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/02 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 담지한 다공성 실리카 입자를 포함하고,

상기 다공성 실리카 입자는 직경 5nm 미만의 기공을 갖는 실리카 입자를 120℃ 내지 180℃에서 24시간 내지 96시간 동안 팽창제와 반응시켜 상기 직경 5nm 미만의 기공을 팽창시키는 단계; 및 상기 기공이 팽창된 실리카 입자를 400℃ 이상의 온도에서 3시간 이상 하소하는 단계를 포함하여 제조되며,

상기 다공성 실리카 입자의 평균 직경은 150 nm 내지 1000nm이고, 그 BET 표면적은 $200\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $700\text{m}^2/\text{g}$ 이고, 그 g당 부피는 0.7ml 내지 2.2ml이며,

상기 다공성 실리카 입자는 직경 5 nm 내지 100 nm의 복수개의 기공을 가지며,

상기 다공성 실리카 입자는 하기 수학식 1의 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상인 것인 면역반응 물질 전달체:

[수학식 1]

$$A_t/A_0$$

(식 중, A_0 는 상기 다공성 실리카 입자 1mg/ml 현탁액 5ml를 직경 50kDa의 기공을 갖는 원통형 투과막에 넣고 측정된 다공성 실리카 입자의 $\lambda=640\text{nm}$ 에서의 흡광도이고,

상기 투과막 외부에는 상기 투과막과 접하며, 상기 현탁액과 동일한 용매 15ml가 위치하고, 상기 투과막 내외부는 37℃에서 60rpm 수평 교반되며,

상기 현탁액 및 상기 용매의 pH는 7.4이고,

A_t 는 상기 A_0 의 측정시로부터 t시간 경과 후에 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도임).

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 인터류킨(interleukins) 또는 인터페론(interferons) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 전달체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 IgG 이거나; PD-1, CTLA-4, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD28, CD27, CD137, HVEM, GITR, VEGFR, VEGF, EGFR, EGF, IL-1, IL-6, IL-23, TGF-beta, CTGF, TSLP, TNF-alpha, Notch 및 OX40으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 전달체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 PD-1, PD-L1 및 CTLA-4로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 전달체.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 사이토카인은 인터류킨(interleukins) 또는 인터페론(interferons)인 전달체.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-23, IL-24, IL-27, G-CSF, GM-CSF, HGF, EGF, VEGF, LTF, TGF- β 및 IL-2로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 전달체.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IL-24 및 IL-13으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 전달체.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 다공성 실리카 입자는 외부 표면 또는 기공 내부가 중성의 pH에서 전하를 띠는 것인 전달체.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 다공성 실리카 입자는 외부 표면 또는 기공 내부에 친수성 또는 소수성 작용기를 갖는 것인 전달체.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 항체(antibody)를 담지한 다공성 실리카 입자; 및 사이토카인(cytokine)을 담지한 다공성 실리카 입자를 포함하는 전달체.

청구항 11

항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 담지한 다공성 실리카 입자를 포함하고,

상기 다공성 실리카 입자의 평균 직경은 150 nm 내지 1000nm이고, 그 BET 표면적은 200m²/g 내지 700m²/g이고, 그 g당 부피는 0.7ml 내지 2.2ml이며,

상기 다공성 실리카 입자는 직경 5 nm 내지 100 nm의 복수개의 기공을 가지며,

상기 다공성 실리카 입자는 하기 수학식 1의 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상인 것인 면역반응 물질 전달체:

[수학식 1]

$$A_t/A_0$$

(식 중, A₀는 상기 다공성 실리카 입자 1mg/ml 현탁액 5ml를 직경 50kDa의 기공을 갖는 원통형 투과막에 넣고 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도이고,

상기 투과막 외부에는 상기 투과막과 접하며, 상기 현탁액과 동일한 용매 15ml가 위치하고, 상기 투과막 내외부는 37℃에서 60rpm 수평 교반되며,

상기 현탁액의 pH는 7.4이고,

A_t 는 상기 A_0 의 측정시로부터 t 시간 경과 후에 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도임).

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 전달체를 포함하는 면역요법(immunotherapy)용 조성물.

청구항 13

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 전달체를 포함하는 암 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역반응 물질을 안정적으로, 표적부위에 전달하여 우수한 면역치료 효과를 갖는 면역반응 물질 전달체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 약물전달 시스템은 기존 의약품의 부작용을 최소화하고 효능 및 효과를 극대화시켜 필요한 양의 약물, 예를 들어, 단백질, 핵산, 또는 기타 저분자 등을 효율적으로 전달할 수 있도록 하는 의학 기술을 의미한다. 신약개발에 필요한 비용과 시간을 절감해 주는 상기 기술은 최근 나노기술과 결합하면서 의학계에서 새로운 부가가치를 창출하는 첨단기술의 한 분야로 자리 잡고 있으며, 미국과 일본 등 기술선진국들은 지난 80년대 후반부터 제약회사 등 기업을 중심으로 신약개발과 함께 약물전달시스템의 개발에 전력을 쏟아 왔다.

[0004] 지금까지는, 바이러스 유전자, 재조합 단백질, 리포솜(liposome), 양이온성 고분자, 그리고 다양한 형태의 나노입자와 나노물질들이 동물 세포 내로의 약물전달을 위해 이용되었다. 그러나 많은 양이온성 리포솜들과 양이온성 고분자들은 임상에 적용하기에는 세포에 독성이 강하여 부적합한 것으로 밝혀졌다. 또한, 안정적인 핵산의 세포막 투과를 위하여 핵산의 주 사슬을 화학적으로 변형시키는 방법도 시도되었다. 그러나, 이러한 방법은 비용이 비싸고 오랜 시간이 걸리며 노동 집약적인 공정이 요구되므로 임상 적용에는 적합하지 않다. 의미 있는 시도로서, 양자점, 자성 입자, 또는 금 나노입자를 포함한 다양한 형태의 나노입자를 이용한 약물전달 시스템(drug delivery system, DDS)이 개발된 바 있다. 그러나, 이러한 입자들은 세포에 독성을 가지며 핵산 등의 생체 고분자의 도입에 용이하지 않은 구조를 가지며, 세포 내로의 도입 효율도 낮다는 단점이 있었다.

[0005] 세포 내에서의 생리활성물질의 기능의 연구 또는 세포내 전달을 위해서는 효율적인 전달 시스템이 필요하다. 그러나, 광범위한 생리활성물질을 전달할 수 있는 범용적인 전달 시스템, 다량의 약물을 수용 및 전달할 수 있는 시스템, 약물을 서방적으로 방출하는 시스템에 대한 개발은 아직 미진한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2017-0138861호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 항체와 사이토카인을 포함하는 다양한 면역반응 물질을 안정적으로, 표적부위에 전달하여, 우수한 면역치료 효과를 갖는 면역반응 물질 전달체를 제공함에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 1. 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 담지한 다공성 실리카 입자를 포함하고,
- [0011] 상기 다공성 실리카 입자는 직경 5nm 미만의 기공을 갖는 실리카 입자를 120℃ 내지 180℃에서 24시간 내지 96시간 동안 팽창제와 반응시켜 상기 직경 5nm 미만의 기공을 팽창시키는 단계; 및 상기 기공이 팽창된 실리카 입자를 400℃ 이상의 온도에서 3시간 이상 하소하는 단계를 포함하여 제조되며,
- [0012] 상기 다공성 실리카 입자의 평균 직경은 150 nm 내지 1000nm이고, 그 BET 표면적은 200m²/g 내지 700m²/g이고, 그 g당 부피는 0.7ml 내지 2.2ml이며,
- [0013] 상기 다공성 실리카 입자는 하기 수학적 식 1의 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상인 것인 면역반응 물질 전달체:
- [0014] [수학적 식 1]
- [0015] A_t/A_0
- [0016] (식 중, A_0 는 상기 다공성 실리카 입자 1mg/ml 현탁액 5ml를 직경 50kDa의 기공을 갖는 원통형 투과막에 넣고 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도이고,
- [0017] 상기 투과막 외부에는 상기 투과막과 접하며, 상기 현탁액과 동일한 용매 15ml가 위치하고, 상기 투과막 내외부는 37℃에서 60rpm 수평 교반되며,
- [0018] 상기 현탁액의 pH는 7.4이고,
- [0019] A_t 는 상기 A_0 의 측정시로부터 t시간 경과 후에 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도임).
- [0020] 2. 위 1에 있어서, 상기 항체는 인터류킨(interleukins) 또는 인터페론(interferons) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 전달체.
- [0021] 3. 위 1에 있어서, 상기 항체는 IgG 이거나; PD-1, CTLA-4, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD28, CD27, CD137, HVEM, GITR, VEGFR, VEGF, EGFR, EGF, IL-1, IL-6, IL-23, TGF-beta, CTGF, TSLP, TNF-alpha, Notch 및 OX40으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 전달체.
- [0022] 4. 위 1에 있어서, 상기 항체는 PD-1, PD-L1 및 CTLA-4로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 전달체.
- [0023] 5. 위 1에 있어서, 상기 사이토카인은 인터류킨(interleukins) 또는 인터페론(interferons)인 전달체.
- [0024] 6. 위 1에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-23, IL-24, IL-27, G-CSF, GM-CSF, HGF, EGF, VEGF, LTF, TGF-β 및 IL-2로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 전달체.
- [0025] 7. 위 1에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IL-24 및 IL-13으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 전달체.
- [0026] 8. 위 1에 있어서, 상기 다공성 실리카 입자는 외부 표면 또는 기공 내부가 중성의 pH에서 전하를 띠는 것인 전달체.
- [0027] 9. 위 1에 있어서, 상기 다공성 실리카 입자는 외부 표면 또는 기공 내부에 친수성 또는 소수성 작용기를 갖는 것인 전달체.
- [0028] 10. 위 1에 있어서, 항체(antibody)를 담지한 다공성 실리카 입자; 및 사이토카인(cytokine)을 담지한 다공성 실리카 입자를 포함하는 전달체.
- [0029] 11. 위 1 내지 10 중 어느 한 항의 전달체를 포함하는 면역요법(immunotherapy)용 조성물.
- [0030] 12. 위 1 내지 10 중 어느 한 항의 전달체를 포함하는 암 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 효과

- [0032] 본 발명의 면역반응 물질 전달체는 항체와 사이토카인을 포함하는 다양한 면역반응 물질을 안정적으로, 표적부위에 전달하여, 우수한 면역치료 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0034]

- 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 현미경 사진이다.
- 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 현미경 사진이다.
- 도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 제조 공정 중의 소기공 입자의 현미경 사진이다.
- 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 소기공 입자의 현미경 사진이다.
- 도 5는 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 기공 직경별 현미경 사진이다. DDV(Degradable Delivery Vehicle)는 실시예의 입자로서 괄호안의 숫자는 입자의 직경, 아래첨자의 숫자는 기공 직경을 의미한다. 예를 들어, DDV(200)₁₀은 입자 직경은 200 nm, 기공 직경은 10 nm인 실시예의 입자를 의미한다.
- 도 6은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 생분해성을 확인할 수 있는 현미경 사진이다.
- 도 7은 일 예시에 따른 원통형 투과막을 구비한 튜브이다.
- 도 8은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 흡광도 감소 결과이다.
- 도 9는 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 입경별 흡광도 감소 결과이다.
- 도 10은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 기공 직경별 흡광도 감소 결과이다.
- 도 11은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 환경의 pH별 흡광도 감소 결과이다.
- 도 12는 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 흡광도 감소 결과이다.
- 도 13 내지 15는 각각 IgG, PD-1, PD-L1 항체를 다공성 실리카 입자에 담지한 후 방출한 누적량을 나타낸 것이다.
- 도 16은 IL-2 사이토카인을 담지하는 데에 사용된 다공성 실리카 입자의 TEM 이미지를 나타낸 것이다.
- 도 17 내지 21은 IL-10, IL-15, HGF, EGF, IL-2를 다공성 실리카 입자에 담지한 후 방출한 누적량을 나타낸 것이다.
- 도 22 내지 43은 본 발명 다공성 실리카 입자의 독성여부를 확인한 결과이다.
- 도 44, 45는 다공성 실리카 입자에 담지된 면역반응 물질의 생물학적 활성 보존여부를 확인한 결과이다.
- 도 46은 본 발명 전달체에 의한 과민반응 여부를 확인한 결과이다.
- 도 47 내지 55는 본 발명 전달체의 담지된 항체 또는 사이토카인의 안정적인 전달성 및 표적성을 확인한 것이다.
- 도 56 내지 82는 본 발명 전달체의 암 면역치료 효능을 확인한 결과이다.
- 도 83 내지 92는 본 발명 전달체의 부작용(VLS 또는 CLS) 감소 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035]

이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0037]

항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 담지한 다공성 실리카 입자;를 포함하는 면역반응 물질 전달체를 제공한다.

[0038]

상기 사이토카인은 구체적으로 인터류킨(interleukins) 또는 인터페론(interferons)일 수 있다.

[0039]

상기 사이토카인은 IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-23, IL-24, IL-27, G-CSF, GM-CSF, HGF, EGF, VEGF, LTF, TGF- β , IL-2, A2M, ABI3BP, acidic fibroblast growth factor, ACVR1B, ADAM17, ADAMTS6, ADMLX, aFGF, AGPAT1, AGPAT2, AIF1, AIMP1, AKR1C1, AKT1S1, allograft-inflammatory factor-1, amac-1, AMH, ANGPTL2, ANGPTL3, ANKFN1, ANKRD1, ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 3 isoform a variant, ankyrin repeat domain-containing SOCS box protein ASB11, ankyrin repeat domain-containing

SOCS box protein Asb-13, ankyrin repeat domain-containing SOCS box protein Asb-14, ankyrin repeat domain-containing SOCS box protein Asb-15, ankyrin repeat-containing protein ASB-2, ankyrin repeat-containing SOCS box protein 7, ANOS1, Apo-2 ligand, APOC1, ARHGAP10, ASB1, ASB-1 protein, ASB10, ASB-10, ASB11, ASB12, ASB13, ASB14, ASB15, ASB16, ASB17, ASB18, ASB2, ASB-2, ASB3, ASB-3 protein, ASB4, ASB-4 protein, ASB5, ASB6, ASB7, ASB8, ASB9, ASTN2, ATP10A, ATP1A1, ATP8A1, AXL, B219/OB receptor isoform HuB219.1 precursor, B219/OB receptor isoform HuB219.2 precursor, B219/OB receptor isoform HuB219.3 precursor, BATF, BCL2A1, BCL3, BCO2, BIG-2, BMP6, BOC, BTNL2, byk, C10orf99, C11orf40, C17, C17orf99, C19orf66, C1GALT1C1, C1QTNF4, C22orf39, C2orf83, C3orf39, C6 beta-chemokine, C6orf120, C8orf44-SGK3, CALL, CAMKMT, CARD14, cardiotrophin-like cytokine CLC, CASP1, cathepsin X, CBLB, CBLN4, CCDC134, CCDC86, CCL1, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L1, CCL3L3, CCL4, CCL4L, CCL4L1, CCL4L2, CCL5, CCL7, CCL8, CCR4, CCR8, CD200R1, CD274, CD28, CD300LB, CD34, CD36, CD3D, CD40LG, CD53, CD70, CD74, CD74-ROS1_C6,R32, CD80, CD83, CD84, CD86, CDO, CDON, CEBPD, CER1, CFC1, chemokine (C-C motif) ligand 13, chemokine (C-C motif) ligand 3, CHL1, CHUK, CIAPIN1, ciliary neurotrophic factor receptor, CIP29, CIS2, CIS3, CIS4, CISH, CISH6, CITED2, CKId, CKIe, CKLF, CKLF1, CKLFSF1, CLC, CLCF1, CLEC11A, CLEC1B, CLEC2D, CLF-1, CLNK, c-mer, c-mpl-K, c-mpl-P, CMYA5, CNAIP, CNTF, CNTFR, CNTN1, CNTN2, CNTN3, CNTN4, CNTN5, CNTN6, CNTNAP4, CNTRL, Col VII, COL12A1, COL14A1, COL20A1, COL28A1, COL7A1, collagen VII, colony stimulating factor 2 receptor alpha subunit splice variant, colony stimulating factor 3 receptor isoform c precursor variant, CPEB 4 variant, CPEB4, CR6, CREME9, CRF2/12, CRIP2, CRL1, CRL2, CRL3, CRLF1, CRLF2, CRLF3, CRNDE, CRP, CRTAM, CS box-containing WD protein, CSA2, CSBP1, CSBP2, CSF1, CSF1R, CSF2, CSF2RA, CSF2RB, CSF3, CSF3R, CSN1S1, CTF1, CTLA4, CTLA8, CTSG, CUA001, CX3CL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL9, CXCR2, CXCR3, CXCR5, CXXC5, cyclon, CYP4F3, CYTIP, CYTL1, cytokine CX2 precursor, cytokine receptor CRL2 precursor, cytokine receptor-like factor 2 variant, cytokine SDF-1-beta, cytokine type 1 receptor CRLP-1 precursor, cytokine-inducible inhibitor of signalling type 1b, cytokine-inducible SH2-containing protein, cytokine-like nuclear factor n-pac, cytokine-like nuclear factor n-pac-like protein, cytokine-like protein 2-21, cytokine-like protein EF-7, CYTOR4, cytotoxic lymphocyte maturation factor 40 kDa subunit, DAGLA, DCC, DCSTAMP, DDT, DEFB103B, delta 4-delta 7/11 truncated prolactin receptor, delta 4-SF1b truncated prolactin receptor, dendritic cell associated lectin 2, density enhanced phosphatase-1, DHX58, DIP2C, DNAH3, DNAH9, Down syndrome cell adhesion molecule isoform CHD2-42 precursor variant, DRT, DSCAM, DSCAM2, DSCAML1, DTK, DTL, DUB3, DVL2, EBI3, ECK, EDIL3, eEF1A2 binding protein, EFNA5, EGFLAM, EGR4, ELAC1, ELAVL1, ELAVL3, ELP2, endothelial-monocyte activating polypeptide II, EOMES, eotaxin precursor, EPGN, EPHA1, EPHA10, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHB1, EPHB2, EPHB2 variant protein, EPHB3, EPHB4, EPHB6, EphB6 variant protein, ephrin receptor EphA5 isoform a variant, ephrin receptor EphA7 variant, ephrin receptor EphB4 precursor variant, EPO, EPOR, ERK, ESOP1, FABP5, factor for adipocyte differentiation 104 variant, fad104, FAM19A4, FAM213A, FAM3A, FAM3B, FAM3C, FAM3D, FANK1, FBRS, FCAR, FCER1A, FCER1G, FCGR2C, FCN3, FES, FGF19, FGF9, FGF-9, fibronectin, Fibronectin 1 variant, FIL1-theta, FILIP1L, FLJ00133, FLJ00148, FLJ00154, FLJ00236, FLJ00376, FLT3, FLT3LG, FN1, FNDC1, FNDC3A, FNDC3B, FNDC4, FNDC5, FNDC7, FNDC8, FOSB, FOSL1, FOXP3, FRMD1, FSD1, FSD1L, FSD2, FSTL3, FUCA2, GOS3, G18, G-26, GAB2, GAB3, gamma.1, GBP4, G-CSFR-1, G-CSFR-2, GDF15, GDF2, GHR, GJA1, GLEPP1, GLYR1, GM-CSF receptor beta chain, gp130, gp130-like monocyte receptor, gp250 precursor, GPI, GPR15, GPR75-ASB3, GPSM1, GRAIL, granulocyte colony-stimulating factor receptor, granulocyte macrophage-colony stimulating factor, granulocyte-macrophage colony stimulating factor 2, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor precursor, GRAP2, GRO-beta, GRO-gamma, growth-inhibiting protein 45, GZMK, HAVCR2, HAX1, HBD, HCF-2, HCFC1, HCFC2, HCV NS5A-binding protein NS5ABP37, HDAC11, hDDM36, HEK, HEK11, HEK5, HEK7, HEK8, hematopoietic stem/progenitor cell induced protein 1, hematopoietic stem/progenitor cell induced protein 2, hematopoietic stem/progenitor cell induced protein 3, HES4, HGF, HGS, HIBDL, hIL-2Rg, HILPDA, HIN-1 putative cytokine, HMGB1, hmmp-2a, hmmp-2b, hNB-2, hNB-2s, hNB-3, host cell factor C2 variant, HOXB5, hp40, HSD13, hSHIP, HSP90B1, HSSOCS-2, HTK, HTPZP2, hTroy, Humig, HXB, hypothetical protein, ICOSLG, IFI16, IFI30, IFNA1, IFNA10, IFNA17, IFNA2, IFNA4, IFNA8, IFNAR1, IFNAR2, IFNB1, IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IFNK, IFNL1, IFNL2, IFNL3,

IFNLR1, IFNW1, IGANRP, IGDC3, IGDC4, IGF1R, IGFN1, IGSF22, IGSF9, IGSF9B, IK, IKBKB, IKK alpha, Interleukins, IL10, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12 receptor beta2, IL12 receptor component, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL-13Ra, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL-17, IL-17 receptor, IL17A, IL17B, IL17BR, IL17C, IL17D, IL-17D, IL17D precursor, IL17E, IL17F, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE, IL18, IL-18 receptor beta splice variant, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, IL1A, IL1B, IL1BCE, IL1F10, IL1F7, IL1L1, IL1R1, IL1R2, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RL1, IL1RL2, IL1RN, IL2, IL15, IL20, IL20RA, IL20RB, IL21, IL-21, IL21R, IL22, IL22BP, IL22R, IL22RA1, IL22RA2, IL23A, IL23R, IL-23R, IL-24 splice variant delE3, IL-24 splice variant delE5, IL25, IL26, IL27, IL27RA, IL28A, IL28B, IL28C, IL28RA, IL29, IL30, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL31, IL31RA, IL32, IL33, IL34, IL36A, IL36B, IL36G, IL36RN, IL37, IL3RA, IL4, IL4I1, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL7R, IL9, IL9R, il-xr, ING3, INPP5D, INSR, INSR, insulin receptor variant, insulin responsive sequence DNA binding protein-1, integrin beta 4 isoform 3 precursor variant, interferon alpha 2b, interferon gamma, interferon-lambda1, interferon-lambda2, interferon-lambda3, interleukin 10 receptor, beta, interleukin 11 receptor, alpha, interleukin 12, P40, interleukin 13, interleukin 13 receptor, alpha 1 precursor variant, interleukin 17A, interleukin 17B, interleukin 17C, interleukin 18 precursor, interleukin 23 p19 subunit, interleukin 23 receptor isoform 1, interleukin 32 variant, interleukin 34 isoform 1 precursor, interleukin 34 isoform 2 precursor, interleukin 4 receptor alpha chain isoform a precursor variant, interleukin 6 receptor isoform 1 precursor variant, interleukin-1 homolog 1, interleukin-1 homolog 2, interleukin-1 homolog 4, interleukin-11 receptor alpha chain, interleukin-13 receptor, interleukin-17 beta, interleukin-1-related protein long isoform, interleukin-1-related protein long isoform a, interleukin-1-related protein short isoform, interleukin-2, interleukin-32 small, interleukin-32 theta, interleukin-33, intermediate prolactin receptor isoform, IRAK1, IRAK3, IREB2 variant, IRF9, IRS2, ISG15, ITGA1, ITGAL, ITGB2, ITGB4, ITPK1, JAB, JAK2, JAK3, JAKMIP1, JOSD2, KAL, KAL1, KALIG-1, KALRN, KAT6B, KCNA3, KCNJ12, KIAA0273, KIAA0282, KIAA0283, KIAA0318, KIAA0343, KIAA0671, KIAA0756, KIAA0970, KIAA1030, KIAA1132, KIAA1146, KIAA1297, KIAA1355, KIAA1397, KIAA1459, KIAA1496, KIAA1497, KIAA1510, KIAA1514, KIAA1568, KIAA1628, KIAA1666, KIAA1866, KLF8, KLRF1, L1CAM, LAR, LBP, LD78 alpha beta, LEPR, leptin receptor, LGI3, LICR2, LIF, LIFR, LILRA2, LIMK2, LOC57019, LOC728835, long myosin light chain kinase, LRG1, LRRC20, LRRC70, LRRFIP2, LRRN1, LRRN4, LTA, LTB, LTBP1, LTBP2, lymphokine, lymphotoxin beta isoform variant, lysophosphatidic acid acyltransferase-alpha, lysophosphatidic acid acyltransferase-beta, macrophage colony-stimulating factor 1, MAF, magic roundabout, MAPK14, MCP3, MCP-3, MCP4, MCP-4, MDK, MEP1B, MERTK, MEX3C, MGDF, MIC-1, microtubule-associated protein GLFND, MIP-1 delta, MIP1a, MIP2a, mitochondria associated granulocyte macrophage CSF signaling molecule Magmas, ML1, MLCK, MMP9, MNAT1, MON1B, MOV10, MPIF-1, MPL, MRPL17, MSLN, MTHFD2L, MTUS1, MUSK, MYBPC1, MYBPC2, MYBPC3, MYBPH, MYBPHL, MYDGF, myeloproliferative leukemia virus oncogene, MYLK, MYOM1, MYOM2, MYOM3, NAA35, NAMPT, NC28, NCAM, N-CAM, NCAM1, NCAM2, NCAM21, Nck, Ash and phospholipase C gamma-binding protein NAP4, NCR1, NCR3, NCR3LG1, NCSTN, NDFIP1, NDUFA2, NDUFB6, NE01, neogenin, neogenin homolog 1 variant, neshbp, NET PTK, Neural cell adhesion molecule 1, 120 kDa isoform precursor variant, neural cell adhesion molecule CD56, Neural cell adhesion molecule variant, neurotrophin-1/B-cell stimulating factor-3, NFAM1, NFASC, NFAT1, NFATC1, NFATC4, NHLH1, NILR, NIPSNAP1, NIPSNAP2, NKSF1, NKSF2, NLRC5, NLRP11, NLRP12, NLRP13, NLRP2, NLRP4, NLRP6, NLRP7, NLR-1, NOX5, N-PAC, NR2C2, NR4A1, NRCAM, OBSCN, OC-116KDa, OCLN, OPTC, OR2H1, OSM, OSMR, OSMRB, osteoprotegerin ligand, OTUB1, OTUD6B, OTUD7B, P2RY8/CRLF2 fusion, p48, PANX2, PARC, PDCD1LG2, PGLYRP1, PHF11, PHYHIP, PHYHIP, PI9, PIAS1, PIBF1, PIK3R3, PLA2G2D, PLAC8, pLD78 peptide, PLK3, PLTP, PLXNC1, POMGNT2, PP14212, PPBP, PPIA, PPM1F, PPM1H, PPP2R5A, PPP3CC, PPP5C, PPY, PREX1, prk, PRLR, PRO0915, prolactin receptor, prolactin receptor delta 7/11, prolactin receptor isoform delta S1 precursor, proliferation associated cytokine-inducible protein CIP29, protein tyrosine phosphatase delta, protein tyrosine phosphatase sigma, protein tyrosine phosphatase, receptor type, D isoform 4 precursor variant, protein tyrosine phosphatase, receptor type, F isoform 2 precursor variant, protein tyrosine phosphatase, receptor type, G precursor variant, protein tyrosine phosphatase, receptor type, K precursor variant, protein tyrosine phosphatase, receptor type, sigma isoform 3 precursor variant, protein-tyrosine phosphatase, PRR16, PRSS27, PRTG, PSMA4, PTCHD1, PTGDR, PTGES, PTN, PTPRB, PTPRC,

PTPRD, PTPRE, PTPRF, PTPRG, PTPRH, PTPRJ, PTPRK, PTPRM, PTPRO, PTPRQ, PTPRS, PTPRT, PTPRU, PTPRZ, PTPRZ1, PTPsigma, PTX4, PUS7L, putative cytokine receptor CRL4 precursor, PYPAF6, PYRIN-containing Apaf1-like protein 2, PYRIN-containing Apaf1-like protein 3, PYRIN-containing APAF1-like protein 4, PYRIN-containing APAF1-like protein 5, PYRIN-containing APAF1-like protein 7, PYY, RAB40A, RAB40AL, RAB40B, RAB40B, member RAS oncogene family variant, RAB40C, RAB6B, RANTES precursor, Rar protein, Rar-2 protein, RBM15, RBM5 variant, RCAN3, receptor protein tyrosine phosphatase hPTP-J precursor, Receptor protein tyrosine phosphatase hPTP-J precursor variant, receptor tyrosine kinase, receptor-type protein tyrosine phosphatase 0 isoform a precursor variant, RGS2, RIMBP2, RIMBP3, RIMBP3B, RIMBP3C, RIPK4, RMC1, RNASE10, RNASE7, RNASE9, RNASET2, RNF113A, RNF128, RNF41, ROBO1, ROBO2, ROBO2 isoform a, ROBO2 isoform b, ROBO3, ROBO4, RORC, ROS1, RPL27, RPL36, RPS21, R-PTP-kappa, RPTP-rho, rse, RSL24D1, S100A12, S100A8, S100A9, S1PR4, SAC3D1, SAP/SH2D1A, SAP-1, SARNP, SASH1, SCAMP5, SCGB3A1, SCGB3A2, SCM-1, SCYA13, SCYA16, SCYA26, SCYE1, SDC4, SDC4-ROS1_S2,R32, SDC4-ROS1_S4,R32, SDK1, SDK2, secreted osteoclastogenic factor of activated T cells, SELE, SEMA7A, SENP3, SERPINB9, serum/glucocorticoid regulated kinase-like isoform 1 variant, SETD1B, SGK3, SGK-like protein SGKL, SH2 domain containing SOCS box protein SOCS4, SH2B1, SH2B3, shen-dan, SIGIRR, SIGLEC14, Similar to RIKEN cDNA 3930401K13 gene, SKIP1, SKIP3, sky, SLAMF9, SLC2A5, SLC2A9, SLC34A2/ROS fusion, SLC34A2-ROS1, SLC39A13, SLC39A3, SLC4A3, SLC9A8, SLC9B2, SLURP1, small cytokine B subfamily member 11 SCYB11 precursor, SMIM27, SMPD2, SNED1, SNX10, SOCS box containing protein RAR2A, SOCS box protein ASB-5, SOCS1, SOCS-1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7, SORL1, SPATA2, SPOCK3, SPP1, SPPL2B, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-1, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-1 variant, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-2, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-3, SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-4, SPSB1, SPSB2, SPSB3, SPSB4, STAM, STAM2, STAMBP, STAT induced STAT inhibitor-1, STAT induced STAT inhibitor-2, STAT induced STAT inhibitor-3, STAT1, STAT5A, STAT5B, STAT-induced STAT inhibitor-2, stem cell factor, STIMATE, STK35, STK40, striated muscle preferentially expressed protein, suppressor of cytokine signaling 3, surface glycoprotein, Ig superfamily member variant, SUSD2, SWIP1, SYNJ2BP, synleurin, TACC2, TAIF, TARM1, TBX21, TBX5, TCEB1, TCIRG1, TEC, TEK, TEK tyrosine kinase variant, tenascin XB isoform 1 variant, tenascin-C isoform 14/AD1/16, testicular tissue protein Li 126, testicular tissue protein Li 64, testis tissue sperm-binding protein Li 57p, TEX12, TFPI, THEMIS2, THNSL2, THPO, thymic stromal lymphopoietin protein receptor TSLPR, thymic stromal lymphopoietin protein TSLP, TIE, tie receptor tyrosine kinase, TIE1, Tie-2, TIGIT, TIMP1, tip3, TIRAP, Titin, TLR1, TLR3, TLR6, TM7SF3, TMEM102, TMEM110-MUSTN1, TMSB4X, TMX2, TNC, TNC variant protein, TNF, TNFAIP3, TNFAIP8L2, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF13C, TNFRSF21, TNFRSF25, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFSF10, TNFSF11, TNFSF12, TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF15, TNFSF18, TNFSF4, TNFSF8, TNFSF9, TNL, TNN, TNF, TNXB, TOPORS, Trad, TRAF6, TRIM21, TRIM3, TRIM42, TRIM46, TRIM67, TRIM8, TRIM9, TRPM4, TSLP, TTN, TULP4, tumor necrosis factor receptor, TUSP, TUT4, TUT7, TWIST2, TYK2, type VII collagen, type XII collagen, type-I T cell cytokine receptor, TYRO3, tyrosyl-tRNA synthetase, tyrosyl-tRNA synthetase variant, U2AF1L4, UBA6, UBAP1, ubiquitin ligase E3 alpha-I, ubiquitin ligase E3 alpha-II, UBR2, UFO, undulin 1, undulin 2, UNQ1942, UNQ2421, UNQ288, UNQ296, UNQ3121, UNQ421, UNQ5793, UNQ604, UNQ6309, UNQ6368, UNQ6389, UNQ6504, UNQ693, UQCRH, USH2A, USMG5, USP15, USP17L10, USP17L11, USP17L12, USP17L13, USP17L15, USP17L17, USP17L18, USP17L19, USP17L2, USP17L20, USP17L21, USP17L22, USP17L24, USP17L25, USP17L26, USP17L27, USP17L28, USP17L29, USP17L3, USP17L30, USP17L4, USP17L5, USP17L7, USP17L8, USP18, USP36, UTY, V alpha 1, V alpha 13, VCAM1, VESPR, VNN2, VSIG2, VWA1, WARS, WD SOCS-box protein 1 isoform 1 variant, WDR26, WSB1, WSB-1, WSB-1 isoform, WSB-1 protein, WSB2, WSB-2, WSX1, WWOX, XA, XB, XBP1, XCL1, XCL2, XKR4, YARS, ZBED3, ZBP1, ZC3H12D, ZC3H15, ZCYTO10, zcytor5, ZCYTOR7, ZFP36, ZNF366, ZNF580 및 ZNF827으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지 않는다.

[0040] 상기 항체는 구체적으로, 인터류킨(interleukins) 또는 인터페론(interferons) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[0041] 상기 항체는 IgG; 또는 PD-1, CTLA-4, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD28, CD27, CD137, HVEM, GITR, VEGFR, VEGF, EGFR, EGF, IL-1, IL-6, IL-23, TGF-beta, CTGF, TSLP, TNF-alpha, Notch 및 OX40으로 이루어진 군에서 선택된 하나의 적어도 하나의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나,

생물학적 관점에서 통상의 항체로 인식되는 것이라면 반드시 이에 제한되지 않는다.

- [0042] 상기 다공성 실리카 입자는 실리카(SiO_2) 소재의 입자이며, 나노 사이즈의 입경을 갖는다.
- [0043] 본 발명의 다공성 실리카 나노입자는 다공성 입자로서, 나노사이즈의 기공을 갖고, 그 표면 및/또는 기공 내부에 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 담지할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 생분해성 입자로서, 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 담지하여 체내에 투여되었을 때 체내에서 생분해되면서 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 방출할 수 있는데, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 체내에서 서서히 분해되어 담지된 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)이 서방적으로 방출되도록 할 수 있다. 예를 들면, 하기 수학적 1의 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상이다:
- [0045] [수학적 1]
- [0046] A_t/A_0
- [0047] (식 중, A_0 는 상기 다공성 실리카 입자 1mg/ml 현탁액 5ml를 직경 50kDa의 기공을 갖는 원통형 투과막에 넣고 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도이고,
- [0048] 상기 투과막 외부에는 상기 투과막과 접하며, 상기 현탁액과 동일한 용매 15ml가 위치하고, 상기 투과막 내외부는 37℃에서 60rpm 수평 교반되며,
- [0049] 상기 현탁액의 pH는 7.4이고,
- [0050] A_t 는 상기 A_0 의 측정시로부터 t시간 경과 후에 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도임).
- [0051] 상기 수학적 1은 다공성 실리카 입자가 체내와 유사한 환경에서 어느 정도의 속도로 분해되는지를 의미하는 것이다.
- [0052] 상기 수학적 1에서의 흡광도 A_0 , A_t 는 예를 들면 도 34에 예시된 바와 같이, 원통형 투과막에 다공성 실리카 입자 및 현탁액을 넣고, 투과막 외부에도 동일한 현탁액을 넣고 측정된 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 생분해성으로서, 현탁액 내에서 서서히 분해될 수 있고, 직경 50kDa는 약 5nm에 해당하는 것으로서 생분해된 다공성 실리카 입자는 직경 50kDa의 투과막을 통과할 수 있고, 원통형 투과막은 60rpm 수평 교반 하에 있으므로 현탁액이 고루 섞일 수 있으며 분해된 다공성 실리카 입자는 투과막 외부로 나올 수 있다.
- [0054] 상기 수학적 1에서의 흡광도는 예를 들어 투과막 외부의 현탁액이 새로운 현탁액으로 교체되는 환경 하에 측정된 것일 수 있다. 현탁액은 지속적으로 교체되는 것일 수 있고, 일정 기간마다 교체되는 것일 수 있으며, 상기 일정 기간은 정기 또는 비정기적인 기간일 수 있다. 예를 들어 1시간 내지 1주일의 범위 내에서, 1시간 간격, 2시간 간격, 3시간 간격, 6시간 간격, 12시간 간격, 24시간 간격, 2일 간격, 3일 간격, 4일 간격, 7일 간격 등으로 교체될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 상기 흡광도의 비가 1/2가 된다는 것은 t시간 후에 흡광도가 초기 흡광도의 절반이 된다는 것인 바, 이는 다공성 실리카 입자의 대략 절반이 분해되었다는 의미이다.
- [0056] 상기 현탁액은 완충용액일 수 있고, 구체적인 예를 들면, PBS(phosphate buffered saline) 및 SBF(simulated body fluid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 보다 구체적으로는 PBS일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 상기 수학적 1의 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상으로, 예를 들면 t는 24 내지 120일 수 있고, 예를 들어 상기 범위 내에서 24 내지 96, 24 내지 72, 30 내지 70, 40 내지 70, 50 내지 65 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 상기 수학적 1의 흡광도의 비가 1/5가 되는 t가 예를 들면 70 내지 140일 수 있고, 예를 들어 상기 범위 내에서 80 내지 140, 80 내지 120, 80 내지 110, 70 내지 140, 70 내지 120, 70 내지 110 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 상기 수학적 1의 흡광도의 비가 1/20가 되는 t가 예를 들면 130 내지 220일 수 있고, 예를 들어 상기 범위 내에서 130 내지 200, 140 내지 200, 140 내지 180, 150 내지 180 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0060] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 측정되는 흡광도가 0.01 이하가 되는 t가 예를 들면 250 이상, 예를 들어, 300 이상, 350 이상, 400 이상, 500 이상, 1000 이상 등일 수 있으며, 그 상한은 2000일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 다공성 실리카 입자에서 상기 수학식 1의 흡광도의 비와 t는 높은 양의 상관 관계를 갖는 것으로서, 예를 들면 피어슨 상관 계수가 0.8 이상일 수 있고, 예를 들어, 0.9 이상, 0.95 이상일 수 있다.
- [0062] 상기 수학식 1의 t는 다공성 실리카 입자가 체내와 유사한 환경에서 어느 정도의 속도로 분해되는지를 의미하는 것으로서, 이는 예를 들면 다공성 실리카 입자의 표면적, 입경, 기공 직경, 표면 및/또는 기공 내부의 치환기, 표면의 치밀함 정도 등을 조절함으로써 조절될 수 있다.
- [0063] 예를 들면, 입자의 표면적을 증가시켜 t를 감소시키거나, 표면적을 감소시켜 t를 증가시킬 수 있다. 표면적은 입자의 직경, 기공의 직경을 조절함으로써 조절될 수 있다. 또한, 표면 및/또는 기공 내부에 치환기를 위치시켜 다공성 실리카 입자가 환경(용매 등)에 직접 노출되는 것을 줄여 t를 증가시킬 수 있다. 또한, 다공성 실리카 입자에 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 담지시키고 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)과 다공성 실리카 입자 간의 친화도를 증가시켜, 다공성 실리카 실리카 입자가 환경에 직접 노출되는 것을 줄여 t를 증가시킬 수 있다. 또한, 입자의 제조시에 표면을 보다 치밀하게 제조하여 t를 증가시킬 수도 있다. 상기에는 수학식 1의 t를 조절할 수 있는 다양한 예시를 서술하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 예를 들면 구형 입자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 평균 직경이 예를 들면 150nm 내지 1000nm일 수 있고, 예를 들어 상기 범위 내에서 예를 들면 150nm 내지 800nm, 150nm 내지 500nm, 150nm 내지 400nm, 150nm 내지 300nm, 150nm 내지 200nm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경이 예를 들면 1nm 내지 100nm일 수 있고, 예를 들어 상기 범위 내에서 예를 들면 5nm 내지 100nm, 7nm 내지 100nm, 7nm 내지 50nm, 10nm 내지 50nm, 10nm 내지 30nm, 7nm 내지 30nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기와 같은 큰 직경을 가져 다량의 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 담지할 수 있고, 크기가 큰 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 담지도 가능하다.
- [0067] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 BET 표면적이 예를 들면 $200\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $700\text{m}^2/\text{g}$ 일 수 있다. 예를 들어 상기 범위 내에서 $200\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $700\text{m}^2/\text{g}$, $200\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $650\text{m}^2/\text{g}$, $250\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $650\text{m}^2/\text{g}$, $300\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $700\text{m}^2/\text{g}$, $300\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $650\text{m}^2/\text{g}$, $300\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $600\text{m}^2/\text{g}$, $300\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $550\text{m}^2/\text{g}$, $300\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $500\text{m}^2/\text{g}$, $300\text{m}^2/\text{g}$ 내지 $450\text{m}^2/\text{g}$ 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명의 다공성 실리카 나노입자는 g당 부피가 예를 들면 0.7ml 내지 2.2ml일 수 있다. 예를 들어 상기 범위 내에서 0.7ml 내지 2.0ml, 0.8ml 내지 2.2ml, 0.8 ml 내지 2.0ml, 0.9 ml 내지 2.0ml, 1.0 ml 내지 2.0ml 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. g당 부피가 과도하게 작아지면 분해 속도가 너무 빨라질 수 있고, 과도하게 큰 입자는 제조가 어렵거나, 온전한 형상을 가질 수 없을 수 있다.
- [0069] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 외부 표면 및/또는 기공 내부에 친수성 치환기 및/또는 소수성 치환기가 존재할 수 있다. 예를 들면 표면 및 기공 내부 모두 친수성 치환기만 존재하거나, 소수성 치환기만 존재할 수도 있고, 표면 또는 기공 내부에만 친수성 치환기가 존재하거나, 소수성 치환기가 존재할 수도 있고, 표면에는 친수성 치환기, 기공 내부에는 소수성 치환기가 존재할 수도 있고, 그 반대의 경우도 가능하다.
- [0070] 본 발명의 다공성 실리카 입자에 담지된 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 방출은 주로 나노입자의 분해에 의해 수행되는 것인 바, 상기 치환기의 조절로 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 방출 환경에 대한 다공성 실리카 입자의 상호 작용이 조절되어 나노입자 자체의 분해 속도가 조절되어 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 방출 속도가 조절될 수 있고, 또한, 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)은 나노입자로부터 확산되어 방출될 수도 있는데, 상기 치환기의 조절로 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 나노입자에 대한 결합력이 조절되어 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 방출이 조절될 수 있다.
- [0071] 또한, 난용성(소수성) 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질과의 결합력 증진을 위해 기공 내부에는 소수성 치환기가 존재하고, 사용, 제형화의 용이성 등의 측면에서 입자의 표면은 친수성 치환기가 존재하도록

하는 등의 처리도 가능하다.

- [0072] 친수성 치환기는 예를 들면 히드록시기, 카르복시기, 아미노기, 카르보닐기, 설프히드릴기, 포스페이트기, 티올기, 암모늄기, 에스테르기, 이미드기, 티오이미드기, 케토기, 에터기, 인텐기, 설포닐기, 폴리에틸렌글리콜기 등을 들 수 있고, 소수성 치환기는 예를 들면 치환 또는 비치환된 C1 내지 C30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C3 내지 C30의 사이클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C30의 헤테로아릴기, 할로젠기, C1 내지 C30의 에스테르기, 및 할로젠 함유기 등을 들 수 있다.
- [0073] 또한, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 외부 표면 및/또는 기공 내부가 양전하 및/또는 음전하로 대전된 것일 수 있다. 예를 들면 표면 및 기공 내부 모두 양전하로 대전되거나, 음전하로 대전될 수 있고, 표면 또는 기공 내부만 양전하로 대전되거나, 음전하로 대전될 수 있고, 표면은 양전하, 기공 내부는 음전하로 대전될 수 있고, 그 반대의 경우도 가능하다.
- [0074] 상기 대전은 예를 들면 양이온성 치환기 또는 음이온성 치환기가 존재함으로써 된 것일 수 있다.
- [0075] 상기 양이온성 치환기는 예를 들면 염기성기로서 아미노기, 그 외 질소함유기 등일 수 있고, 상기 음이온성 치환기는 예를 들면 산성기로서 카르복시기($-COOH$), 술폰산기($-SO_3H$), 티올기($-SH$) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0076] 마찬가지로 상기 대전에 의해 상기 치환기의 조절로 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 방출 환경에 대한 다공성 실리카 입자의 상호 작용이 조절되어 나노입자 자체의 분해 속도가 조절되어 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 방출 속도가 조절될 수 있고, 또한, 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)은 나노입자로부터 확산되어 방출될 수도 있는데, 상기 치환기의 조절로 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 나노입자에 대한 결합력이 조절되어 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 방출이 조절될 수 있다.
- [0077] 또한, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 그 표면 및/또는 기공 내부에 상기 외에 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 담지, 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 표적 세포로의 이동, 그외 기타 목적을 위한 물질의 담지 또는 그외 추가 치환기의 결합 등을 위한 치환기가 존재할 수 있으며, 이에 결합된 항체, 리간드, 세포투과성 펩타이드 또는 앵커 등을 더 포함할 수 있다.
- [0078] 전술한 표면 및/또는 기공 내부의 치환기, 전하, 결합물질 등은 예를 들면 표면 개질에 의해 부가될 수 있다.
- [0079] 표면 개질은 예를 들면 도입하고자 하는 치환기를 갖는 화합물을 입자와 반응시켜 수행할 수 있고, 상기 화합물은 예를 들면 C1 내지 C10 알콕시기를 갖는 알콕시실란일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 알콕시실란은 상기 알콕시기를 1개 이상 갖는 것으로서, 예를 들면 1 내지 3개 가질 수 있고, 알콕시기가 결합되지 않은 부위에 도입하고자 하는 치환기가 있거나 이로 치환된 치환기가 있을 수 있다.
- [0081] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 예를 들면 소기공의 입자 제조 및 기공 확장 공정을 거쳐 제조된 것일 수 있고, 필요에 따라 하소(calcination) 공정, 표면 개질 공정 등을 더 거쳐 제조된 것일 수 있다. 하소 및 표면 개질 공정을 모두 거친 경우는 하소 이후에 표면 개질 된 것일 수 있다.
- [0082] 상기 소기공의 입자는 예를 들면 평균 기공 직경이 1nm 내지 5nm인 입자일 수 있다.
- [0083] 상기 소기공의 입자는 용매에 계면활성제와 실리카 전구물질을 넣고 교반 및 균질화시켜 얻어질 수 있다.
- [0084] 상기 용매는 물 및/또는 유기용매일 수 있고, 유기용매는 예를 들면 1,4-디옥산 등의 에테르류(특히 고리형상 에테르류); 클로로포름, 염화메틸렌, 4염화탄소, 1,2-디클로로에탄, 디클로로에틸렌, 트리클로로에틸렌, 퍼클로로에틸렌, 디클로로프로판, 염화아밀, 1,2-디브로모에탄 등의 할로젠화 탄화수소류; 아세톤, 메틸이소부틸케톤, γ -부티로락톤, 1,3-디메틸-이미다졸리디논, 메틸에틸케톤, 시클로헥사논, 시클로펜타논, 4-하이드록시-4-메틸-2-펜타논 등의 케톤류; 벤젠, 톨루엔, 크실렌, 테트라메틸벤젠 등의 탄소계 방향족류; N,N-디메틸포름아미드, N,N-디부틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈 등의 알킬아미드류; 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 알코올류; 에틸렌글리콜모노에틸에테르, 에틸렌글리콜모노메틸에테르, 에틸렌글리콜모노부틸에테르, 디에틸렌글리콜모노에틸에테르, 디에틸렌글리콜모노메틸에테르, 디에틸렌글리콜모노부틸에테르, 프로필렌글리콜모노메틸에테르, 프로필렌글리콜모노에틸에테르, 디프로필렌글리콜디에틸에테르, 트리에틸렌글리콜모노에틸에테르 등의 글리콜에테르류(셀로솔브); 그외 디메틸아세트아미드(DMAc), N,N-디에틸아세트아미드, 디메틸포름아미드(DMF), 디에틸포름아미드(DEF), N,N-디메틸아세트아미드(DMAc), N-메틸피롤리돈(NMP), N-에틸피롤리돈(NEP), 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논, N,N-디메틸메톡시아세트아미드, 디메틸술폰사이드, 피리딘, 디메틸

술폰, 헥사메틸포스포아미드, 테트라메틸우레아, N-메틸카로락탐, 테트라히드로퓨란, m-디옥산, p-디옥산, 1,2-디메톡시에탄 등을 사용할 수 있고, 구체적으로는 알코올, 보다 구체적으로 메탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0085] 상기 물과 유기 용매의 혼합 용매 사용시 그 비율은 예를 들면 물과 유기용매를 1: 0.7 내지 1.5의 부피비, 예를 들어, 1: 0.8 내지 1.3의 부피비로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0086] 상기 계면활성제는 예를 들면 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide), TMABr(hexadecyltrimethylammonium bromide), TMAPrCl(hexadecyltrimethylpyridinium chloride), TMACl(tetramethylammonium chloride) 등일 수 있고, 구체적으로는 CTAB를 사용할 수 있다.
- [0087] 상기 계면활성제는 예를 들면 용매 1리터당 1g 내지 10g, 예를 들어 상기 범위 내에서 1g 내지 8g, 2g 내지 8g, 3g 내지 8g 등의 양으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0088] 상기 실리카 전구 물질은 용매에 계면활성제를 첨가하여 교반한 후에 첨가될 수 있다. 실리카 전구물질은 예를 들면 TMOS(Tetramethyl orthosilicate)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0089] 상기 교반은 예를 들면 10분 내지 30분간 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0090] 상기 실리카 전구물질은 예를 들면 용매 1리터당 0.5ml 내지 5ml, 예를 들어 상기 범위 내에서 0.5ml 내지 4ml, 0.5ml 내지 3ml, 0.5ml 내지 2ml, 1ml 내지 2ml 등으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0091] 필요에 따라 촉매로서 수산화나트륨을 더 사용할 수 있으며, 이는 용매에 계면활성제를 첨가한 후 실리카 전구 물질의 첨가 전에 교반하면서 첨가될 수 있다.
- [0092] 상기 수산화나트륨은 예를 들면 1M 수산화나트륨 수용액 기준으로 용매 1리터당 0.5ml 내지 8ml, 예를 들어 상기 범위 내에서 0.5ml 내지 5ml, 0.5ml 내지 4ml, 1ml 내지 4ml, 1ml 내지 3ml 2ml 내지 3ml 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0093] 상기 실리카 전구 물질의 첨가 후에 용액을 교반하며 반응시킬 수 있다. 교반은 예를 들면 2시간 내지 15시간 할 수 있고, 예를 들어 상기 범위 내에서 3시간 내지 15시간, 4시간 내지 15시간, 4시간 내지 13시간, 5시간 내지 12시간, 6 시간 내지 12시간, 6시간 내지 10시간 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 교반 시간(반응 시간)이 너무 짧은 경우에는 결정핵 생성(nucleation)이 부족할 수 있다.
- [0094] 상기 교반 이후에는 용액을 숙성(aging)시킬 수 있다. 숙성은 예를 들면 8시간 내지 24시간 할 수 있고, 예를 들어 상기 범위 내에서 8시간 내지 20시간, 8시간 내지 18시간, 8시간 내지 16시간, 8시간 내지 14시간, 10시간 내지 16시간, 10시간 내지 14시간 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 이후, 반응산물을 세척 및 건조시켜 다공성 실리카 입자를 얻을 수 있고, 필요에 따라 세척 전에 미반응 물질의 분리가 선행될 수 있다.
- [0096] 상기 미반응 물질의 분리는 예를 들면 원심분리로 상등액을 분리하여 수행될 수 있고, 원심분리는 예를 들면 6,000 내지 10,000rpm으로 수행될 수 있으며, 그 시간은 예를 들면 3분 내지 60분, 예를 들어 상기 범위 내에서 3분 내지 30분, 3분 내지 30분, 5분 내지 30분 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0097] 상기 세척은 물 및/또는 유기용매로 할 수 있고, 구체적으로는 용매별로 녹일 수 있는 물질이 상이하므로 물과 유기용매를 1회 또는 수회 번갈아 사용할 수 있으며, 물 또는 유기용매 단독으로도 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 상기 수회는 예를 들면 2회 이상, 10회 이하, 예를 들어, 3회 이상 10회 이하, 4회 이상 8회 이하, 4회 이상 6회 이하 등일 수 있다.
- [0098] 상기 유기용매는 예를 들면 1,4-디옥산 등의 에테르류(특히 고리형상 에테르류); 클로로포름, 염화메틸렌, 4염화탄소, 1,2-디클로로에탄, 디클로로에틸렌, 트리클로로에틸렌, 퍼클로로에틸렌, 디클로로프로판, 염화아미, 1,2-디브로모에탄 등의 할로젠화 탄화수소류; 아세톤, 메틸이소부틸케톤, γ-부티로락톤, 1,3-디메틸-이미다졸리디논, 메틸에틸케톤, 시클로헥산, 시클로펜타논, 4-하이드록시-4-메틸-2-펜타논 등의 케톤류; 벤젠, 톨루엔, 크실렌, 테트라메틸벤젠 등의 탄소계 방향족류; N,N-디메틸포름아미드, N,N-디부틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈 등의 알킬아미드류; 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 알코올류; 에틸렌글리콜모노에틸에테르, 에틸렌글리콜모노메틸에테르, 에틸렌글리콜모노부틸에테르, 디에틸렌글리콜모노에틸에테르, 디에틸렌글리콜모노메틸에테르, 디에틸렌글리콜모노부틸에테르, 프로필렌글리콜모노메틸에테르, 프로필렌글리콜모노에틸에테르, 디프로필렌글리콜디에틸에테르, 트리에틸렌글리콜모노에틸에테르 등의 글리콜에테르류(셀

로솔브); 그외 디메틸아세트아미드(DMAc), N,N-디에틸아세트아미드, 디메틸포름아미드(DMF), 디에틸포름아미드(DEF), N,N-디메틸아세트아미드(DMAc), N-메틸피롤리돈(NMP), N-에틸피롤리돈(NEP), 1,3-디메틸-2-이미다졸리딘, N,N-디메틸메톡시아세트아미드, 디메틸술폰, 피리딘, 디메틸술폰, 헥사메틸포스포아미드, 테트라메틸우레아, N-메틸카르복사이드, 테트라히드로퓨란, m-디옥산, P-디옥산, 1,2-디메톡시에탄 등을 사용할 수 있고, 구체적으로는 알코올, 보다 구체적으로 에탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0099] 상기 세척은 원심분리 하에 수행될 수 있으며, 예를 들면 6,000 내지 10,000rpm으로 수행될 수 있으며, 그 시간은 예를 들면 3분 내지 60분, 예를 들어 상기 범위 내에서 3분 내지 30분, 3분 내지 30분, 5분 내지 30분 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0100] 상기 세척은 원심분리를 하지 않고, 필터로 입자를 걸러내어 수행될 수도 있다. 필터는 다공성 실리카 입자의 직경 이하의 기공을 가지는 것일 수 있다. 반응액을 그러한 필터로 걸러내면 입자만이 필터 위에 남고, 그 필터 위에 물 및/또는 유기용매를 부어 세척할 수 있다.
- [0101] 상기 세척 시에 물과 유기용매를 1회 또는 수회 번갈아 사용할 수 있으며, 물 또는 유기용매 단독으로도 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 상기 수회는 예를 들면 2회 이상, 10회 이하, 예를 들어, 3회 이상 10회 이하, 4회 이상 8회 이하, 4회 이상 6회 이하 등일 수 있다.
- [0102] 상기 건조는 예를 들면 20℃ 내지 100℃로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 진공 상태에서 수행될 수도 있다.
- [0103] 이후, 상기 얻어진 다공성 실리카 입자의 기공을 확장하고, 기공 확장은 기공 팽창제를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0104] 상기 기공 팽창제는 예를 들면 트리메틸벤젠, 트리에틸벤젠, 트리프로필벤젠, 트리부틸벤젠, 트리펜틸벤젠, 트리헥실벤젠, 톨루엔, 벤젠 등을 사용할 수 있고, 구체적으로, 트리메틸벤젠을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0105] 또한, 상기 기공 팽창제는 예를 들면 N,N-디메틸헥사데실아민(N,N-dimethylhexadecylamine, DMHA)를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0106] 상기 기공 확장은 예를 들면 용매 중의 다공성 실리카 입자를 기공 팽창제와 혼합하고, 가열하여 반응시켜 수행될 수 있다.
- [0107] 상기 용매는 예를 들면 물 및/또는 유기용매일 수 있고, 유기용매는 예를 들면 1,4-디옥산 등의 에테르류(특히 고리형상 에테르류); 클로로포름, 염화메틸렌, 4염화탄소, 1,2-디클로로에탄, 디클로로에틸렌, 트리클로로에틸렌, 퍼클로로에틸렌, 디클로로프로판, 염화아미드, 1,2-디브로모에탄 등의 할로겐화 탄화수소류; 아세톤, 메틸이소부틸케톤, 시클로헥산온 등의 케톤류; 벤젠, 톨루엔, 크실렌 등의 탄소계 방향족류; N,N-디메틸포름아미드, N,N-디부틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈 등의 알킬아미드류; 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 알코올류; 등을 사용할 수 있고, 구체적으로는 알코올, 보다 구체적으로 에탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0108] 상기 다공성 실리카 입자는 예를 들면 용매 1리터당 10g 내지 200g, 예를 들어 상기 범위 내에서 10g 내지 150g, 10g 내지 100g, 30g 내지 100g, 40g 내지 100g, 50g 내지 100g, 50g 내지 80g, 60g 내지 80g 등의 비율로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0109] 상기 다공성 실리카 입자는 용매 중에 고르게 분산되어 있는 것일 수 있고, 예를 들면 용매에 다공성 실리카 입자를 첨가하고 초음파 분산시킨 것일 수 있다. 혼합용매를 사용하는 경우에는 제1 용매에 다공성 실리카 입자를 분산시킨 후에 제2 용매를 첨가한 것일 수 있다.
- [0110] 상기 기공 팽창제는 예를 들면 용매 100부피부에 대하여 10 내지 200부피부, 상기 범위 내에서, 10 내지 150부피부, 10 내지 100부피부, 10 내지 80부피부, 30 내지 80부피부, 30 내지 70부피부 등의 비율로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0111] 상기 반응은 예를 들면 120℃ 내지 190℃로 수행될 수 있다. 예를 들어 상기 범위 내에서 120℃ 내지 190℃, 120℃ 내지 180℃, 120℃ 내지 170℃, 130℃ 내지 170℃, 130℃ 내지 160℃, 130℃ 내지 150℃, 130℃ 내지 140℃ 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0112] 상기 반응은 예를 들면 6시간 내지 96시간 수행될 수 있다. 예를 들어 상기 범위 내에서 30시간 내지 96시

간, 30시간 내지 96시간, 30시간 내지 80시간, 30시간 내지 72시간, 24시간 내지 80시간, 24시간 내지 72시간, 36시간 내지 96시간, 36시간 내지 80시간, 36시간 내지 72시간, 36시간 내지 66시간, 36시간 내지 60시간, 48시간 내지 96시간, 48시간 내지 88시간, 48시간 내지 80시간, 48시간 내지 72시간, 6시간 내지 96시간, 7시간 내지 96시간, 8시간 내지 80시간, 9시간 내지 72시간, 9시간 내지 80시간, 6시간 내지 72시간, 9시간 내지 96시간, 10시간 내지 80시간, 10시간 내지 72시간, 12시간 내지 66시간, 13시간 내지 60시간, 14시간 내지 96시간, 15시간 내지 88시간, 16시간 내지 80시간, 17시간 내지 72시간 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0113] 상기 예시한 범위 내에서 시간 및 온도를 조절하여 반응이 과다하지 않으면서 충분히 수행될 수 있도록 할 수 있다. 예를 들면 반응 온도가 낮아지면 반응 시간을 늘리거나, 반응 온도가 낮아지면 반응 시간을 짧게하는 등에 의할 수 있다. 반응이 충분하지 않으면 기공의 확장이 충분하지 못할 수 있고, 반응이 과다하게 진행되면 기공의 과다 확장에 의해 입자가 붕괴될 수 있다.
- [0114] 상기 반응은 예를 들면 단계적으로 승온시켜 수행될 수 있다. 구체적으로, 상온에서 상기 온도까지 0.5℃/분 내지 15℃/분의 속도로 단계적으로 승온시켜 수행될 수 있으며, 예를 들어 상기 범위 내에서 1℃/분 내지 15℃/분, 3℃/분 내지 15℃/분, 3℃/분 내지 12℃/분, 3℃/분 내지 10℃/분 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0115] 상기 반응은 교반 하에 수행될 수 있다. 예를 들면 100rpm 이상의 속도로 교반될 수 있고, 구체적으로 100rpm 내지 1000rpm의 속도로 수행도리 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0116] 상기 반응 이후에는 반응액을 서서히 냉각시킬 수 있으며, 예를 들면 단계적으로 감온하여 냉각시킬 수 있다. 구체적으로 상기 온도에서 상온까지 0.5℃/분 내지 20℃/분의 속도로 단계적으로 감온시켜 수행될 수 있으며, 예를 들어 상기 범위 내에서 1℃/분 내지 20℃/분, 3℃/분 내지 20℃/분, 3℃/분 내지 12℃/분, 3℃/분 내지 10℃/분 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0117] 상기 냉각 이후에 반응 산물을 세척 및 건조시켜 기공이 확장된 다공성 실리카 입자를 얻을 수 있고, 필요에 따라 세척 전에 미반응 물질의 분리가 선행될 수 있다.
- [0118] 상기 미반응 물질의 분리는 예를 들면 원심분리로 상등액을 분리하여 수행될 수 있고, 원심분리는 예를 들면 6,000 내지 10,000rpm으로 수행될 수 있으며, 그 시간은 예를 들면 3분 내지 60분, 예를 들어 상기 범위 내에서 3분 내지 30분, 3분 내지 30분, 5분 내지 30분 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0119] 상기 세척은 물 및/또는 유기용매로 할 수 있고, 구체적으로는 용매별로 녹일 수 있는 물질이 상이하므로 물과 유기용매를 1회 또는 수회 번갈아 사용할 수 있으며, 물 또는 유기용매 단독으로도 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 상기 수회는 예를 들면 2회 이상, 10회 이하, 예를 들어, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회 등일 수 있다.
- [0120] 상기 유기용매는 예를 들면 1,4-디옥산 등의 에테르류(특히 고리형상 에테르류); 클로로포름, 염화메틸렌, 4염화탄소, 1,2-디클로로에탄, 디클로로에틸렌, 트리클로로에틸렌, 퍼클로로에틸렌, 디클로로프로판, 염화아밀, 1,2-디브로모에탄 등의 할로젠화 탄화수소류; 아세톤, 메틸이소부틸케톤, 시클로헥산온 등의 케톤류; 벤젠, 톨루엔, 크실렌 등의 탄소계 방향족류; N,N-디메틸포름아미드, N,N-디부틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈 등의 알킬아미드류; 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 알코올류; 등을 사용할 수 있고, 구체적으로는 알코올, 보다 구체적으로 에탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0121] 상기 세척은 원심분리 하에 수행될 수 있으며, 예를 들면 6,000 내지 10,000rpm으로 수행될 수 있으며, 그 시간은 예를 들면 3분 내지 60분, 예를 들어 상기 범위 내에서 3분 내지 30분, 3분 내지 30분, 5분 내지 30분 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0122] 상기 세척은 원심분리를 하지 않고, 필터로 입자를 걸러내어 수행될 수도 있다. 필터는 다공성 실리카 입자의 직경 이하의 기공을 가지는 것일 수 있다. 반응액을 그러한 필터로 걸러내면 입자만이 필터 위에 남고, 그 필터 위에 물 및/또는 유기용매를 부어 세척할 수 있다.
- [0123] 상기 세척 시에 물과 유기용매를 1회 또는 수회 번갈아 사용할 수 있으며, 물 또는 유기용매 단독으로도 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 상기 수회는 예를 들면 2회 이상, 10회 이하, 예를 들어, 3회 이상 10회 이하, 4회 이상 8회 이하, 4회 이상 6회 이하 등일 수 있다.
- [0124] 상기 건조는 예를 들면 20℃ 내지 100℃로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 진공 상태에서 수행

될 수도 있다.

- [0125] 이후, 얻어진 입자는 하소될 수 있는데, 하소는 입자를 가열하여 그 표면 및 내부의 실라놀기를 제거하여 입자의 반응성을 낮추고, 좀 더 치밀한 구조를 갖게 하고, 기공을 채우는 유기물들을 제거하는 공정으로, 예를 들면 400℃ 이상의 온도로 가열될 수 있다. 그 상한은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면 1000℃, 900℃, 800℃, 700℃ 등일 수 있다. 가열은 예를 들면 3시간 이상 수행될 수 있다. 그 상한은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 24시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간 등일 수 있다. 보다 구체적으로는 400℃ 내지 700℃에서 3시간 내지 8시간, 구체적으로 500℃ 내지 600℃에서 4시간 내지 5시간 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0126] 기공을 채우는 유기물을 제거함으로써, 잔존 유기물에 의해 나타나는 세포 독성, 거품 발생 등의 문제를 방지할 수 있다.
- [0127] 이후, 얻어진 다공성 실리카 입자는 표면개질 될 수 있고, 표면 개질은 표면 및/또는 기공 내부에 수행될 수 있다. 입자 표면과 기공 내부는 동일하게 표면개질될 수도 있고, 서로 다르게 표면개질될 수도 있다.
- [0128] 상기 표면 개질을 통해 입자가 대전되도록 하거나, 친수성 및/또는 소수성 성질을 갖도록 할 수 있다.
- [0129] 보다 구체적으로, 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 효과적인 담지를 위하여, 아미노기, 아미노알킬기, 알킬아미노기, 질소원자를 포함하는 헤테로고리 방향족화합물기, 시안기 및 구아니딘기로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 치환기를 갖도록 하여, 상기 다공성 실리카 입자의 표면개질을 수행할 수 있다.
- [0130] 표면 개질은 예를 들면 도입하고자 하는 친수성, 소수성, 양이온성, 음이온성 등의 치환기를 갖는 화합물을 입자와 반응시켜 수행할 수 있고, 상기 화합물은 예를 들면 C1 내지 C10 알콕시기를 갖는 알콕시실란일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0131] 상기 알콕시실란은 상기 알콕시기를 1개 이상 갖는 것으로서, 예를 들면 1 내지 3개 가질 수 있고, 알콕시기가 결합되지 않은 부위에 도입하고자 하는 치환기가 있거나 이로 치환된 치환기가 있을 수 있다.
- [0132] 상기 알콕시실란을 다공성 실리콘 입자와 반응시키면 실리콘 원자와 산소 원자간 공유 결합이 형성되어 알콕시실란이 다공성 실리콘 입자의 표면 및/또는 기공 내부와 결합될 수 있고, 상기 알콕시실란은 도입하고자 하는 치환기를 가지고 있는 바, 해당 치환기가 다공성 실리콘 입자의 표면 및/또는 기공 내부에 도입될 수 있다.
- [0133] 상기 반응은 용매에 분산시킨 다공성 실리카 입자를 알콕시실란과 반응시켜 수행할 수 있다.
- [0134] 상기 용매는 물 및/또는 유기용매일 수 있고, 유기용매는 예를 들면 1,4-디옥산 등의 에테르류(특히 고리형상 에테르류); 클로로포름, 염화메틸렌, 4염화탄소, 1,2-디클로로에탄, 디클로로에틸렌, 트리클로로에틸렌, 퍼클로로에틸렌, 디클로로프로판, 염화아밀, 1,2-디브로모에탄 등의 할로젠화 탄화수소류; 아세톤, 메틸이소부틸케톤, γ-부티로락톤, 1,3-디메틸-이미다졸리디논, 메틸에틸케톤, 시클로헥산논, 시클로펜타논, 4-하이드록시-4-메틸-2-펜타논 등의 케톤류; 벤젠, 톨루엔, 크실렌, 테트라메틸벤젠 등의 탄소계 방향족류; N,N-디메틸포름아미드, N,N-디부틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈 등의 알킬아미드류; 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 알코올류; 에틸렌글리콜모노에틸에테르, 에틸렌글리콜모노메틸에테르, 에틸렌글리콜모노부틸에테르, 디에틸렌글리콜모노에틸에테르, 디에틸렌글리콜모노메틸에테르, 디에틸렌글리콜모노부틸에테르, 프로필렌글리콜모노메틸에테르, 프로필렌글리콜모노에틸에테르, 디프로필렌글리콜디에틸에테르, 트리에틸렌글리콜모노에틸에테르 등의 글리콜에테르류(셀로솔브); 그외 디메틸아세트아미드(DMAc), N,N-디에틸아세트아미드, 디메틸포름아미드(DMF), 디에틸포름아미드(DEF), N,N-디메틸아세트아미드(DMAc), N-메틸피롤리돈(NMP), N-에틸피롤리돈(NEP), 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논, N,N-디메틸메톡시아세트아미드, 디메틸술폰사이드, 피리딘, 디메틸술폰, 헥사메틸포스포아미드, 테트라메틸우레아, N-메틸카프로락탐, 테트라히드로퓨란, m-디옥산, p-디옥산, 1,2-디메톡시에탄 등을 사용할 수 있고, 구체적으로는 톨루엔을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0135] 상기 양전하로 대전은 예를 들면 아미노기, 아미노알킬기 등 질소함유기 등의 염기성기를 갖는 알콕시실란과 반응시켜 수행할 수 있다. 구체적으로는 N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine, N1-(3-Trimethoxysilylpropyl)diethylenetriamine, (3-Aminopropyl)trimethoxysilane, N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]aniline, Trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silane, 3-(2-Aminoethylamino)propyldimethoxymethylsilane 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0136] 상기 음전하로 대전은 예를 들면 카르복시기, 술폰산기, 티올기 등의 산성기를 갖는 알콕시실란과 반응시켜 수행할 수 있다. 구체적으로는 (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는

것은 아니다.

- [0137] 상기 친수성 성질은 친수성기, 예를 들면 히드록시기, 카르복시기, 아미노기, 카르보닐기, 설프히드릴기, 포스페이트기, 티올기, 암모늄기, 에스테르기, 이미드기, 티오이미드기, 케토기, 에터기, 인텐기, 설포닐기, 폴리에틸렌글리콜기 등을 갖는 알콕시실란과 반응시켜 갖도록 할 수 있다. 구체적으로는, N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine, N1-(3-Trimethoxysilylpropyl)diethylenetriamine, (3-Aminopropyl)trimethoxysilane, (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane, Trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silane, 3-(2-Aminoethylamino)propyldimethoxymethylsilane 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0138] 상기 소수성 성질은 소수성 치환기, 예를 들면 치환 또는 비치환된 C1 내지 C30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C3 내지 C30의 사이클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C6 내지 C30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C2 내지 C30의 헤테로아릴기, 할로젠기, C1 내지 C30의 에스테르기, 할로젠 함유기 등을 갖는 알콕시실란과 반응시켜 갖도록 할 수 있다. 구체적으로는, Trimethoxy(octadecyl)silane, Trimethoxy-n-octylsilane, Trimethoxy(propyl)silane, Isobutyl(trimethoxy)silane, Trimethoxy(7-octen-1-yl)silane, Trimethoxy(3,3,3-trifluoropropyl)silane, Trimethoxy(2-phenylethyl)silane, Vinyltrimethoxysilane, Cyanomethyl, 3-(trimethoxysilyl)propyl] trithiocarbonate, (3-Bromopropyl)trimethoxysilane 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0139] 그 외에 상기 표면 개질을 통해 난용성(소수성) 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질과의 결합력 증진을 위해 기공 내부에는 소수성 치환기가 존재하고, 사용, 제형화의 용이성 등의 측면에서 입자의 표면은 친수성 치환기가 존재하도록 하는 등의 처리도 가능하고, 표면에 다른 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질을 결합시키기 위한 치환기가 존재할 수도 있다.
- [0140] 또한, 상기 표면 개질은 복합적으로 수행될 수도 있다. 예를 들어, 외부 표면 또는 기공 내부에 2회 이상의 표면 개질이 수행될 수도 있다. 구체적인 예를 들자면, 아미노기가 도입된 실리카 입자에 카르복실기를 포함하는 화합물을 아미드 결합으로 결합시켜 양전하로 대전된 입자를 다른 표면특성을 가지게 변화시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0141] 상기 다공성 실리카 입자의 알콕시실란과의 반응은 예를 들면 가열 하에 수행될 수 있고, 가열은 예를 들면 80℃ 내지 180℃, 예를 들어 상기 범위 내에서 80℃ 내지 160℃, 80℃ 내지 150℃, 100℃ 내지 160℃, 100℃ 내지 150℃, 110℃ 내지 150℃ 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0142] 상기 다공성 실리카 입자의 알콕시실란과의 반응은 예를 들면 4시간 내지 20시간, 예를 들어 상기 범위 내에서 4시간 내지 18시간, 4시간 내지 16시간, 6시간 내지 18시간, 6시간 내지 16시간, 8시간 내지 18시간, 8시간 내지 16시간, 8시간 내지 14시간, 10시간 내지 14시간 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0143] 상기 반응 온도, 시간, 그리고 표면개질에 사용되는 화합물의 양 등은 표면개질하고자 하는 정도에 따라 선택될 수 있는 것으로서, 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질들의 친수성, 소수성, 전하 정도에 따라 반응 조건을 달리하여 다공성 실리카 입자의 친수성, 소수성, 전하 정도를 조절함으로써, 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질들의 방출 속도를 조절할 수 있다. 예를 들면, 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질들이 중성의 pH에서 강한 음전하를 띠는 경우에는 다공성 실리카 입자가 강한 양전하를 띠도록 하기 위해, 반응 온도를 높이거나 반응 시간을 길게 할 수 있으며, 화합물 처리량을 늘릴 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0144] 또한, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 예를 들면 소기공의 입자 제조, 기공 확장, 표면 개질, 기공 내부 개질 공정을 거쳐 제조된 것일 수도 있다.
- [0145] 상기 소기공의 입자 제조 및 기공 확장 공정은 전술한 바의 공정에 의할 수 있으며, 소기공의 입자 제조 이후, 그리고 기공 확장 공정 이후에 세척 및 건조 공정을 수행할 수 있다.
- [0146] 필요에 따라 세척 전에 미반응 물질의 분리가 선행될 수 있고, 미반응 물질의 분리는 예를 들면 원심분리로 상등액을 분리하여 수행될 수 있다.
- [0147] 상기 원심분리는 예를 들면 6,000 내지 10,000rpm으로 수행될 수 있으며, 그 시간은 예를 들면 3분 내지 60분, 구체적으로, 상기 범위 내에서 3분 내지 30분, 3분 내지 30분, 5분 내지 30분 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0148] 상기 소기공의 입자 제조 이후의 세척은 앞서 예시한 범위 내의 방법/조건으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0149] 상기 기공 확장 이후의 세척은 앞서 예시보다는 보다 완화된 조건으로 수행할 수 있다. 예를 들면, 세척을 3회 이내 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0150] 상기 표면 개질과 기공 내부 개질은 각각 전술한 바의 공정에 의할 수 있으며, 표면 개질과 기공 내부 개질의 순서로 공정이 수행될 수 있고, 상기 두 공정 사이에 입자의 세척 공정이 추가로 수행될 수 있다.
- [0151] 상기 소기공의 입자 제조 및 기공 확장 이후에 세척을 보다 완화된 조건으로 수행하는 경우 기공 내부에 입자 제조, 기공 확장에 사용된 계면활성제 등의 반응액이 채워져 있어 표면 개질시에 기공 내부는 개질되지 않고 표면만 개질될 수 있다. 그리고 나서 입자를 세척하면 기공 내부의 반응액이 제거될 수 있다.
- [0152] 상기 표면 개질과 기공 내부 개질 공정 사이의 입자 세척은 물 및/또는 유기용매로 할 수 있고, 구체적으로는 용매별로 녹일 수 있는 물질이 상이하므로 물과 유기용매를 1회 또는 수회 번갈아 사용할 수 있으며, 물 또는 유기용매 단독으로도 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 상기 수회는 예를 들면 2회 이상, 10회 이하, 구체적으로, 3회 이상 10회 이하, 4회 이상 8회 이하, 4회 이상 6회 이하 등일 수 있다.
- [0153] 상기 세척은 원심분리 하에 수행될 수 있으며, 예를 들면 6,000 내지 10,000rpm으로 수행될 수 있으며, 그 시간은 예를 들면 3분 내지 60분, 구체적으로, 상기 범위 내에서 3분 내지 30분, 3분 내지 30분, 5분 내지 30분 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0154] 상기 세척은 원심분리를 하지 않고, 필터로 입자를 걸러내어 수행될 수도 있다. 필터는 다공성 실리카 입자의 직경 이하의 기공을 가지는 것일 수 있다. 반응액을 그러한 필터로 걸러내면 입자만이 필터 위에 남고, 그 필터 위에 물 및/또는 유기용매를 부어 세척할 수 있다.
- [0155] 상기 세척 시에 물과 유기용매를 1회 또는 수회 번갈아 사용할 수 있으며, 물 또는 유기용매 단독으로도 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 상기 수회는 예를 들면 2회 이상, 10회 이하, 구체적으로, 3회 이상 10회 이하, 4회 이상 8회 이하, 4회 이상 6회 이하 등일 수 있다.
- [0156] 상기 건조는 예를 들면 20℃ 내지 100℃로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 진공 상태에서 수행될 수도 있다.
- [0158] 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)은 다공성 실리카 입자의 표면 및/또는 기공 내부에 담지될 수 있고, 담지는 예를 들면 용매 중의 다공성 실리카 입자와 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)을 혼합하여 수행될 수 있다.
- [0159] 상기 용매는 물 및/또는 유기용매일 수 있으며, 유기용매는 예를 들면 1,4-디옥산 등의 에테르류(특히 고리형상 에테르류); 클로로포름, 염화메틸렌, 4염화탄소, 1,2-디클로로에탄, 디클로로에틸렌, 트리클로로에틸렌, 퍼클로로에틸렌, 디클로로프로판, 염화아밀, 1,2-디브로모에탄 등의 할로젠화 탄화수소류; 아세톤, 메틸이소부틸케톤, 시클로헥산온 등의 케톤류; 벤젠, 톨루엔, 크실렌 등의 탄소계 방향족류; N,N-디메틸포름아미드, N,N-디부틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈 등의 알킬아미드류; 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 알코올류; 등을 사용할 수 있다.
- [0160] 또한, 상기 용매로 PBS(phosphate buffered saline solution), SBF(Simulated Body Fluid), Borate-buffered saline, Tris-buffered saline 등을 사용할 수도 있다.
- [0161] 상기 다공성 실리카 입자와 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 비율은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 중량비가 1: 0.05 내지 0.8, 예를 들어 상기 범위 내에서 1: 0.05 내지 0.7, 1:0.05 내지 0.6, 1: 0.1 내지 0.8, 1: 0.1 내지 0.6, 1: 0.2 내지 0.8, 1: 0.2 내지 0.6 등일 수 있다.
- [0163] 상기 다공성 실리카 입자에 담지된 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)은 연장된 시간에 걸쳐 점진적으로 방출될 수 있다. 이와 같이 느린 방출은 연속성 또는 비연속성, 선형 또는 비선형일 수 있으며, 다공성 실리카 입자의 특징 및/또는 그와 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)과의 상호작용에 기인하여 달라질 수 있다.
- [0164] 상기 다공성 실리카 입자에 담지된 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)은 다공성 실리카 입자가 생분해되면서 방출되는데, 본 발명에 따른 다공성 실리카 입자는 서서히 분해되어 담지된 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)이 서방적으로 방출되도록 할 수 있다. 이는 예를 들면 다공성 실리카 입자의 표면적, 입경, 기

공 직경, 표면 및/또는 기공 내부의 치환기, 표면의 치밀함 정도 등을 조절함으로써 조절될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0165] 또한, 상기 다공성 실리카 입자에 담지된 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)은 다공성 실리카 입자로부터 이탈되어 확산되면서도 방출될 수 있고, 이는 다공성 실리카 입자와 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine), 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 방출 환경과의 관계에 영향을 받는 것인 바, 이를 조절하여 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)의 방출을 조절할 수 있다. 예를 들면 표면개질에 의해 다공성 실리카 입자의 항체(antibody) 또는 사이토카인(cytokine)과의 결합력을 강화 또는 약화시킴으로써 조절할 수 있다.
- [0166] 보다 구체적인 예를 들자면, 담지된 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 난용성(소수성)인 경우에는 입자의 표면 및/또는 기공 내부가 소수성 치환기를 가져 다공성 실리카 입자와 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질과의 결합력이 증가된 것일 수 있고, 이에 의해 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 서방적으로 방출될 수 있다. 이는 예를 들면 다공성 실리카 입자가 소수성 치환기를 갖는 알콕시실란으로 표면개질된 것일 수 있다.
- [0167] 본 명세서에서 "난용성"은 (물에 대해) 불용성(insoluble), 실질적으로 불용성(practically insoluble) 또는 극히 약간의 가용성(only slightly soluble)인 것을 포함하는 의미로서 이는 "Pharmaceutical Science" 18th Edition(U.S.P., Remington, Mack Publishing Company 발행)에 정의되어 있는 용어이다.
- [0168] 상기 난용성 물질은 예를 들면 1기압, 25℃에서 수용해도가 10g/L 미만, 구체적으로 5g/L 미만, 보다 구체적으로 1g/L 미만일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0169] 담지된 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 수용성(친수성)인 경우에는 입자의 표면 및/또는 기공 내부가 친수성 치환기를 가져 다공성 실리카 입자와 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질과의 결합력이 증가된 것일 수 있고, 이에 의해 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 서방적으로 방출될 수 있다. 이는 예를 들면 다공성 실리카 입자가 친수성 치환기를 갖는 알콕시실란으로 표면개질된 것일 수 있다.
- [0170] 수용성 물질은 예를 들면 1기압, 25℃에서 수용해도가 10g/L 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0171] 담지된 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 전하를 띠는 경우에는 입자의 표면 및/또는 기공 내부가 그와 반대 전하로 대전되어 다공성 실리카 입자와 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질과의 결합력이 증가된 것일 수 있고, 이에 의해 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 서방적으로 방출될 수 있다. 이는 예를 들면 다공성 실리카 입자가 산성기 또는 염기성기를 갖는 알콕시실란으로 표면개질된 것일 수 있다.
- [0172] 구체적으로, 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 중성의 pH에서 양전하를 띠는 것이라면 입자의 표면 및/또는 기공 내부가 중성의 pH에서 음전하로 대전되는 것일 수 있고, 이에 의해 다공성 실리카 입자와 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질과의 결합력이 증가되어 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 서방적으로 방출될 수 있다. 이는 예를 들면 다공성 실리카 입자가 카르복시기(-COOH), 술폰산기(-SO₃H) 등의 산성기를 갖는 알콕시실란으로 표면개질된 것일 수 있다.
- [0173] 또한, 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 중성의 pH에서 음전하를 띠는 것이라면 입자의 표면 및/또는 기공 내부가 양전하로 대전되는 것일 수 있고, 이에 의해 다공성 실리카 입자와 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질과의 결합력이 증가되어 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질이 서방적으로 방출될 수 있다. 이는 예를 들면 다공성 실리카 입자가 아미노기, 그 외 질소함유기 등의 염기성기를 갖는 알콕시실란으로 표면개질된 것일 수 있다.
- [0174] 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질은 필요한 치료 유형, 방출 환경, 사용되는 다공성 실리카 입자에 의존하여 예를 들면 7일 내지 1년 또는 그 이상의 기간 동안 방출될 수 있다.
- [0175] 또한, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 생분해성으로서 100% 분해될 수 있으므로, 이에 담지된 항체(antibody), 사이토카인(cytokine) 또는 물질은 100% 방출될 수 있다.
- [0177] 본 발명은 상술한 전달체를 포함하는 면역요법용 조성물을 제공한다.
- [0178] 면역요법(immunotherapy)이란 면역학적 방법으로 환자치료를 기획하는 것을 말하는 것으로서, 특정항원에 대한

면역 응답에만 관여하는 특이적 면역요법과 특정항원에 한정하지 않고 면역계 전체에 효과를 미치는 비특이적 면역요법이 있다. 상기 특이적 요법으로서 항체를 투여하는 방법이, 상기 비특이적 방법으로서 사이토카인을 투여하는 방법이 대표적인 예라고 할 수 있다.

- [0179] 본 발명의 면역요법용 조성물은 상술한 항체 또는 사이토카인을 포함하는 면역반응 물질을 담지한 다공성 실리카 입자를 포함하고 있어, 담지한 면역반응 물질을 체내에 안정적이고 서방적으로 전달하며, 면역반응 물질 본래의 부작용을 감소시키는 효과적 우수성을 가짐에 따라, 면역요법에 사용되어 각종 암 또는 면역질환 등의 예방 또는 치료에 탁월한 효과를 발휘할 수 있다.
- [0180] 상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 위암, 경부암, 갑상선암 및 편평세포암종을 포함하는 피부암을 포함하는 암종; 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨스 림프종, 비-호지킨스 림프종, 모발상 세포 림프종 및 버켓 림프종을 포함하는 림프계 조혈모 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수구 백혈병을 포함하는 골수형의 조혈 종양; 섬유 육종 및 횡문 근육종을 포함하는 간엽 유래 종양; 흑색종, 정상피종, 기형암종, 신경모세포종 및 신경교종을 포함하는 다른 종양; 성상세포종, 신경아세포종, 신경교종 및 신경초종을 포함하는 중추 및 말초 신경 시스템의 종양; 섬유육종, 횡문근육종 및 골육종을 포함하는 중간엽 유래 종양; 및 흑색종, 색소성 건피증, 각화극 세포종, 정상피종, 갑상선 여포상암 및 기형 암종을 포함하는 기타 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0181] 상기 면역질환은 포유류 면역계의 구성성분들이 포유류의 병리상태를 야기하거나, 매개하거나 또는 기타 공헌하는 질환을 의미하는 것으로서, 면역 반응의 자극 또는 중단이 그 질병의 진행에 보상적인 효과를 갖는 질환을 모두 포함할 수 있으며, 자가면역질환, 감염질환, 염증성질환 또는 세포, 조직 또는 기관의 이식거부(transplantation rejection)질환 등을 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는, 베체트병, 다발성 근육염/피부 근육염, 자가면역 혈구감소증, 자가면역 심근염, 아토피피부염, 천식, 일차성간경변, 피부근염, 굿파이처 증후군, 자가면역 뇌수막염, 비만, 쇼그렌 증후군, 강직성 척추염, 전신 홍반성 루프스, 애디슨병, 원형 탈모증, 자가면역성 간염, 자가면역성 이하선염, 크론병, 인슐린 의존성 당뇨병, 이영양성 수포성 표피박리증, 부고환염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑바레 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상 천포창, 건선, 류마티스열, 류마티스 관절염, 유육종증, 피부 경화증, 척추관절증, 갑상선염, 혈관염, 백반증, 점액수종, 악성빈혈, 궤양성 대장염 등을 포함할 수 있다.
- [0182] 상기 면역질환의 일 종류로서 자가면역질환은 그 종류에 제한이 없으나, 크론병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 애디슨병, 제1형 당뇨, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 전신성 경피증, 천식 또는 궤양성 대장염일 수 있다.
- [0183] 상기 면역질환의 일 종류로서 감염 질환은 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온에 의해 초래되는 감염 질환일 수 있다.
- [0184] 상기 바이러스는 장내바이러스, 로터바이러스, 아데노바이러스 및 간염 바이러스일 수 있고, 상기 바이러스 외에도 레트로바이러스(예를 들어, HIV-I(또한 HTLV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV, 또는 HIV-III)로서도 언급됨)와 같은 인간 면역 결핍 바이러스; 및 HIV-LP와 같은 다른 분리물); 피코나바이러스과(Picornaviridae)(예를 들어, 폴리오 바이러스(polio virus), A형 간염 바이러스, 엔테로바이러스, 인간 콕사키바이러스(human Cocksackie virus), 리노바이러스(rhinovirus), 에코바이러스(echovirus)); 칼시바이러스과(Calciviridae)(예를 들어, 위장염의 원인이 되는 중); 토가바이러스과(Togaviridae)(예를 들어, 말 뇌염 바이러스(equine encephalitis virus), 풍진 바이러스(rubella virus)); 플라비바이러스과(Flaviviridae)(예를 들어, 뎅기 바이러스(dengue virus), 뇌염 바이러스(encephalitis virus), 황열 바이러스(yellow fever virus)); 코로나바이러스과(Coronaviridae)(예를 들어, 코로나바이러스(coronavirus)); 람도바이러스과(Rhabdoviridae)(예를 들어, 수포성구내염바이러스(vesicular stomatitis virus), 광견병 바이러스(rabies virus)); 필로바이러스과(예를 들어, 에볼라 바이러스(ebolavirus)); 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae)(예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 볼거리 바이러스(mumps virus), 홍역 바이러스(measles virus), 호흡기세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus)); 오소믹소바이러스과(Orthomyxoviridae)(예를 들어, 인플루엔자 바이러스(influenza virus)); 부니아바이러스(Bunyaviridae)(예를 들어, 한탄 바이러스(Hantaan virus), 부니아 바이러스(bunya virus), 플레보바이러스(phlebovirus) 및 나이로 바이러스(Nairo virus)); 아레나바이러스과(출

혈열 바이러스(hemorrhagic fever virus)); 레오바이러스과(Reoviridae)(예를 들어, 레오바이러스(reovirus), 오르비바이러스(orbivirus) 및 로타바이러스(rotavirus)); 보르나바이러스과(Bornaviridae); 헤파드나바이러스과(Hepadnaviridae)(B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus)); 파보바이러스과(Parvoviridae)(파보바이러스(Parvoviridae)); 파포바바이러스과(Papovaviridae)(유두종 바이러스(papilloma virus), 폴리오마 바이러스(polyoma virus)); 아데노바이러스과(Adenoviridae)(대부분의 아데노바이러스(Adenovirus)); 헤르페스바이러스과(Herpesviridae)(단순 포진 바이러스(herpes simplex virus, HSV) 1 및 2, 수두 대상 포진 바이러스(varicella zoster virus), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV), 헤르페스 바이러스(herpes virus); 폭스바이러스과(Poxviridae)(바리올라 바이러스(variola virus), 우두 바이러스(vaccinia virus), 폭스 바이러스(pox virus)); 및 이리도바이러스과(Iridoviridae)(예를 들어, 아프리카 돼지 콜레라 바이러스(African swine fever virus)); 및 미분류 바이러스들(예를 들어 델타 간염(delta hepatitis)(B형 간염의 결핍된 부수체(satellite)인 것으로 생각됨), C형 간염(Hepatitis C); 노워크(Norwalk) 및 관련 바이러스, 및 아스트로 바이러스(astro virus)의 제제)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0186] 본 발명은 또한, 상술한 전달체를 포함하는 암 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0187] 본 발명의 조성물은 암 또는 면역질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 것으로서, 이는 담지된 항체 또는 사이토카인을 체내에 안정적으로 전달하고, 타겟에 서방적으로 방출하여, 암(또는 종양)의 성장을 억제하고, 전이를 억제함으로써 달성되는 효과일 수 있다.
- [0188] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로오스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0189] 본 발명의 조성물은 본 발명의 전달체를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.
- [0190] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 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. 본 발명의 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.
- [0191] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양하며, 적절한 투여량은 예를 들면 환자의 체내에 축적된 약물의 양 및 /또는 사용되는 본 발명의 전달체의 구체적 효능정도에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로 인비보 동물모델 및 인비트로에서 효과적인 것으로 측정된 EC50을 기초로 계산될 수 있으며, 예를 들면 체중 1kg당 0.01 μ g 내지 1 g 일 수 있으며, 일별, 주별, 월별 또는 연별의 단위 기간으로, 단위 기간 당 일회 내지 수회 나누어 투여될 수 있으며, 또는 인퓨전 펌프를 이용하여 장기간 연속적으로 투여될 수 있다. 반복투여 횟수는 약물이 체내 머무는 시간, 체내 약물 농도 등을 고려하여 결정된다. 질환 치료 경과에 따라 치료가 된 후라도, 재발을 위해 조성물이 투여될 수 있다.
- [0192] 본 발명의 조성물은 암의 치료와 관련하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 또한 선택적으로, 화학치료제, 항염증제, 항바이러스제 및/또는 면역조절제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0193] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질

또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0194] 상기 예방 또는 치료의 대상으로서 암과 면역질환에 관련된 구체적 설명은 상술한 바와 같다.

[0196] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0198] 이하, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 'DegradaBALL 또는 DDV'로, IL-2가 담지된 DegradaBALL은 'BALLkine-2'로 각각 약칭될 수 있다.

[0200] 이하, 종괴주위주사(peritumoral injection)는 p.t로, 복강주사(intra-peritoneal injection)는 i.p로, 피하주사(subcutaneous injection)는 s.c로, 정맥주사(intravenous injection)는 i.v로 약칭될 수 있다.

[0202] 실시예 1. 다공성 실리카 입자(DDV 또는 DegradaBALL)

[0203] 1. 다공성 실리카 입자의 제조

[0204] (1) 다공성 실리카 입자의 제조

[0205] 1) 소기공 입자의 제조

[0206] 2 L 둥근바닥플라스크에 증류수 (DW) 960 mL 과 MeOH 810 mL을 넣었다. 상기 플라스크에 CTAB 7.88 g을 넣은 후 교반하면서 1M NaOH 4.52 mL를 빠르게 넣었다. 10분 동안 교반시켜 균일한 혼합액을 넣은 후 TMOS 2.6 mL를 넣었다. 6시간 동안 교반하여 균일하게 혼합한 후, 24시간 동안 숙성시켰다.

[0207] 이후 상기 반응액을 25℃에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하고, 25℃에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하며 에탄올 및 증류수로 번갈아가며 5회 세척하였다.

[0208] 이후 70℃ 오븐에서 건조시켜 1.5g의 분말형의 소기공 다공성 실리카 입자(기공 평균 직경 2nm, 입경 200nm)를 얻었다.

[0210] 2) 기공 확장

[0211] 1.5g의 소기공 다공성 실리카 입자 분말을 에탄올 10ml에 첨가하여 초음파 분산시키고, 물 10ml, TMB (trimethyl benzene) 10ml를 첨가하여 초음파 분산시켰다.

[0212] 이후 상기 분산액을 오토클레이브에 넣고 160℃, 48시간 반응시켰다.

[0213] 반응은 25℃에서 시작하여 10℃/분의 속도로 승온시켜 수행하였고, 이후 오토클레이브 내에서 1~10℃/분의 속도로 서서히 냉각시켰다.

[0214] 냉각된 반응액을 25℃에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하고, 25℃에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하며 에탄올 및 증류수로 번갈아가며 5회 세척하였다.

[0215] 이후 70℃ 오븐에서 건조시켜 분말형의 다공성 실리카 입자(기공 직경 10~15nm, 입경 200nm)를 얻었다.

[0217] 3) 하소

[0218] 상기 2)에서 제조된 다공성 실리카 입자를 유리 vial에 담아 550℃에서 5시간 동안 가열하고, 반응 종료 후 상온으로 서서히 식혀 입자를 제조하였다.

[0220] (2) 다공성 실리카 입자의 제조

[0221] 기공 확장시의 반응 조건을 140℃, 72시간으로 변경한 것을 제외하고는 상기 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[0223] (3) 다공성 실리카 입자의 제조 (10L 스케일)

[0224] 5배 큰 용기를 사용하고, 각 물질을 모두 5배 용량으로 사용한 것을 제외하고는 실시예 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[0226] (4) 다공성 실리카 입자의 제조 (입경 300nm)

[0227] 소기공 입자의 제조시에 증류수 920ml, 메탄올 850ml를 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[0229] (5) 다공성 실리카 입자의 제조 (입경 500nm)

- [0230] 소기공 입자의 제조시에 증류수 800ml, 메탄올 1010 ml, CTAB 10.6g을 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.
- [0232] (6) 다공성 실리카 입자의 제조 (입경 1000nm)
- [0233] 소기공 입자의 제조시에 증류수 620ml, 메탄올 1380ml, CTAB 7.88g을 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.
- [0235] (7) 다공성 실리카 입자의 제조 (기공 직경 4nm)
- [0236] 기공 확장시에 TMB를 2.5mL를 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.
- [0238] (8) 다공성 실리카 입자의 제조 (기공 직경 7nm)
- [0239] 기공 확장시에 TMB를 4.5mL를 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.
- [0241] (9) 다공성 실리카 입자의 제조 (기공 직경 17nm)
- [0242] 기공 확장시에 TMB를 11mL를 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.
- [0244] (10) 다공성 실리카 입자의 제조 (기공 직경 23nm)
- [0245] 기공 확장시에 TMB를 12.5mL를 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.
- [0247] (11) 다공성 실리카 입자의 제조 (이중개질)
- [0248] 1) 소기공 입자의 제조
- [0249] 실시예 1-1-(1)-1)과 동일한 방법으로 소기공 입자를 제조하였다.
- [0251] 2) 기공 확장
- [0252] 실시예 1-1-(1)-2)와 동일한 방법으로 소기공 입자를 TMB와 반응시키고 냉각시키고 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이후 실시예 1-1-(1)-2)와 동일 조건으로 원심분리하며 에탄올 및 증류수로 번갈아가며 3회 세척하고, 이후 실시예 1-1-(1)-2)와 동일 조건으로 건조하여 분말형의 다공성 실리카 입자(기공 직경 10~15nm, 입경 200nm)를 얻었다.
- [0254] 3) 표면 개질
- [0255] 기공이 확장된 다공성 실리카 입자 0.8g 내지 1g을 50mL의 톨루엔에 분산시킨 후, (3-aminopropyl)triethoxysilane를 5mL 넣어주어 120℃로 환류한 채로 12시간 가열하였다. 해당 과정은 상기 서술된 세척과정 및 건조 과정을 거친 뒤 1mL의 트레에틸렌글리콜 (PEG3, 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetic acid)와 100mg의 EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) 및 200mg의 N-Hydroxysuccinimide (NHS)를 30mL의 PBS에 분산시켜서 상온에서 교반한 채로 12시간 동안 반응을 보낸다. 이후 생성물은 상기의 세척 및 건조과정을 거친다.
- [0256] 기공 내부에 이전 단계의 반응액이 남아 있어, 기공 내부는 개질 되지 않는다.
- [0258] 4) 기공 내부 세척
- [0259] 표면개질된 입자 분말 800mg을 2M HCl/에탄올 40ml에 녹이고, 12시간 강하게 교반 하에 환류시켰다.
- [0260] 이후 냉각된 반응액을 10분간 8000rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하고, 25℃에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하며 에탄올 및 증류수로 번갈아가며 5회 세척하였다.
- [0261] 이후 70℃ 오븐에서 건조시켜 분말형의 다공성 실리카 입자를 얻었다.
- [0263] 5) 기공 내부 개질
- [0264] ① 후술하는 실시예 1-2-(2)-1)의 방법과 동일한 방법으로 기공 내부에 프로필기를 도입하였다.

- [0265] ② 후술하는 실시예 1-2-(2)-2)의 방법과 동일한 방법으로 기공 내부에 옥틸기를 도입하였다.
- [0267] **2. 다공성 실리카 입자의 표면 개질**
- [0268] (1) 양전하로의 대전
- [0269] 1) 입경 300nm의 입자
- [0270] 실시예 1-1-(4)의 다공성 실리카 입자를 (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)와 반응시켜 양전하로 대전시켰다.
- [0271] 구체적으로, 100 mL 둥근바닥플라스크에 100 mg의 다공성 실리카 입자를 10 mL의 톨루엔에 bath sonicator로 분산시켰다. 이후 1 mL의 APTES를 첨가하고 400 rpm으로 교반하며 130℃에서 교반하며 12시간 동안 반응시켰다.
- [0272] 반응 후에 상온까지 서서히 식히고, 10분간 8000rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하고, 25℃에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하며 에탄올 및 증류수로 번갈아가며 5회 세척하였다.
- [0273] 이후 70℃ 오븐에서 건조시켜 표면 및 기공 내부에 아미노기를 갖는 분말형의 다공성 실리카 입자를 얻었다.
- [0275] 2) 입경 200nm의 입자
- [0276] ① 실시예 1-1-(1)의 다공성 실리카 입자를 (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)와 반응시켜 양전하로 대전시켰으며, APTES를 0.4ml 첨가하고, 반응 시간을 3시간으로 한 것을 제외하고는 상기 9-2-(1)-1)의 방법과 동일하게 개질하였다.
- [0277] ② 실시예 1-1-(9)의 다공성 실리카 입자를 (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)와 반응시켜 양전하로 대전시켰으며, 그 외 방법은 상기 9-2-(1)-1)의 방법과 동일하게 개질하였다.
- [0278] ③ 실시예 1-1-(10)의 다공성 실리카 입자를 (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)와 반응시켜 양전하로 대전시켰으며, 상기 9-2-(1)-1)의 방법과 동일하게 개질하였다.
- [0280] (2) 소수성기의 도입
- [0281] 1) 프로필기
- [0282] 상기 실시예 1-1-(1)의 다공성 실리카 입자를 Trimethoxy(propyl)silane와 반응시켜 표면 및 기공 내부에 프로필기를 도입하였으며, APTES 대신에 Trimethoxy(propyl)silane를 0.35ml 첨가하고, 12시간 반응시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1-2-(1)과 동일한 방법으로 개질을 수행하였다.
- [0284] 2) 옥틸기
- [0285] 상기 실시예 1-1-(1)의 다공성 실리카 입자를 Trimethoxy-n-octylsilane와 반응시켜 표면 및 기공 내부에 프로필기를 도입하였으며, APTES 대신에 Trimethoxy-n-octylsilane를 0.5ml 첨가하고, 12시간 반응시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1-2-(1)과 동일한 방법으로 개질을 수행하였다.
- [0287] (3) 음전하로의 대전
- [0288] 1) 카르복실기
- [0289] 상기 실시예 1-1-(1)의 다공성 실리카 입자를 succinic anhydride와 반응시켜 음전하로 대전시켰으며,
- [0290] 톨루엔 대신에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 사용하고, APTES 대신에 80 mg의 succinic anhydride를 첨가하여 24시간 동안 상온에서 교반하며 반응시키고, 세척 시에 증류수 대신에 DMSO를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1-2-(1)-1)의 방법과 동일하게 개질하였다.
- [0292] 2) 티올기
- [0293] APTES 대신에 MPTES 1.1 mL를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1-2-(1)-1)의 방법과 동일하게 개질하였다.
- [0295] 3) 술폰산기
- [0296] 상기 실시예 1-2-(3)-2)의 다공성 실리카 나노입자 100 mg를 1 M 황산수용액을 1 mL와 30% 과산화수소수 20 mL에 분산하여 상온에서 교반하여 산화반응을 유도하여 티올기를 술폰산기로 산화시켰다. 이후 상기 실시예 1-2-(1)-1)의 방법과 동일하게 세척 및 건조시켰다.

[0298] **3. 입자의 형성 및 기공의 확장 확인**

[0299] 실험방법 실시예 1-1-(1) 내지 (3)의 입자의 소기공 입자, 제조된 다공성 실리카 입자를 현미경으로 관찰하여, 소기공 입자가 균일하게 생성되었는지, 기공이 충분히 확장되어 다공성 실리카 입자가 균일하게 형성되었는지를 확인하였다(도 1 내지 4).

[0300] 도 1은 실시예 1-1-(1)의 다공성 실리카 입자의 사진, 도 2는 실시예 1-1-(2)의 다공성 실리카 입자의 사진으로 기공이 충분히 확장된 구형의 다공성 실리카 입자가 고르게 생성된 것을 확인할 수 있고,

[0301] 도 3은 실시예 1-1-(1)의 소기공 입자의 사진이고, 도 4는 실시예 1-1-(1)과 1-1-(3)의 소기공 입자의 비교 사진으로, 구형의 소기공 입자가 고르게 생성된 것을 확인할 수 있다.

[0303] **4. BET 표면적 및 기공의 부피 계산**

[0304] 실시예 1-1-(1)의 소기공 입자, 실시예 1-1-(1),(7),(8),(10)의 다공성 실리카 입자의 표면적과 기공 부피를 계산하였다. 표면적은 Brunauer-Emmett-Teller(BET) 방법에 의해 계산되었으며, 기공 크기의 분포는 Barrett-Joyner-Halenda(BJH) 방법에 의하여 계산되었다.

[0305] 상기 각 입자들의 현미경 사진은 도 5에 나타내었고, 계산 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	기공 직경(nm)	BET 표면적(m^2/g)	기공 부피(mL/g)
실시예 1-1-(1)의 소기공 입자	2.1	1337	0.69
실시예 1-1-(7)	4.3	630	0.72
실시예 1-1-(8)	6.9	521	0.79
실시예 1-1-(1)	10.4	486	0.82
실시예 1-1-(10)	23	395	0.97

[0308] **5. 생분해성 확인**

[0309] 실시예 1-1-(1)의 다공성 실리카 입자의 생분해성 확인을 위해 37℃, SBF(pH 7.4)에서의 생분해 정도를 0시간, 120시간, 360시간에 현미경으로 관찰하였고, 이는 도 6에 나타내었다.

[0310] 이를 참조하면 다공성 실리카 입자가 생분해되어 360시간 경과 후에는 거의 다 분해된 것을 확인할 수 있다.

[0312] **6. 흡광도비 측정**

[0313] 시간별 하기 수학적 식 1에 따른 흡광도비를 측정하였다.

[0314] [수학적 식 1]

[0315] A_t/A_0

[0316] (식 중, A_0 는 상기 다공성 실리카 입자 1mg/ml 현탁액 5ml를 직경 50 kDa의 기공을 갖는 원통형 투과막에 넣고 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도이고,

[0317] 상기 투과막 외부에는 상기 투과막과 접하며, 상기 현탁액과 동일한 용매 15ml가 위치하고, 상기 투과막 내외부는 37℃에서 60rpm 수평 교반되며,

[0318] A_t 는 상기 A_0 의 측정시로부터 t시간 경과 후에 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도임).

[0319] 구체적으로, 다공성 실리카 입자 분말 5mg을 SBF (pH 7.4) 5ml에 녹였다. 이후 5ml의 다공성 실리카 입자 용액을 도 7에 도시된 직경 50 kDa의 기공을 갖는 투과막에 넣었다. 외부막에 15ml의 SBF를 첨가하고, 외부막의 SBF는 12시간마다 교체하였다. 다공성 실리카 입자의 분해는 37℃에서 60rpm 수평 교반하며 수행되었다.

[0320] 이후 UV-vis spectroscopy에 의해 흡광도를 측정하였고, $\lambda = 640 \text{ nm}$ 에서 분석되었다.

[0322] (1) 흡광도 비 측정

- [0323] 실시예 1-1-(1)의 다공성 실리카 입자의 흡광도비를 상기 방법에 따라 측정하였고, 그 결과는 도 8에 나타내었다.
- [0324] 이를 참조하면 흡광도비가 1/2가 되는 t가 약 58시간으로 굉장히 천천히 분해되는 것을 확인할 수 있다.
- [0326] (2) 입경별
- [0327] 실시예 1-1-(1), (5), (6)의 다공성 실리카 입자의 흡광도를 상기 수학적 식 1에 따라 측정하였고, 그 결과는 도 9에 나타내었다(현탁액과 용매로는 SBF를 사용).
- [0328] 이를 참조하면, 입경의 증가에 따라 t가 감소함을 알 수 있다.
- [0330] (3) 기공 평균 직경별
- [0331] 실시예 1-1-(1), (9)의 다공성 실리카 입자, 그리고 컨트롤로서 실시예 1-1-(1)의 소기공 다공성 실리카 입자의 흡광도를 상기 수학적 식 1에 따라 측정하였고, 그 결과는 도 10에 나타내었다(현탁액과 용매로는 SBF를 사용).
- [0332] 이를 참조하면, 실시예의 다공성 실리카 입자는 컨트롤에 비해 t가 상당히 큰 것을 확인할 수 있다.
- [0334] (4) pH별
- [0335] 실시예 1-1-(4)의 다공성 실리카 입자의 pH별 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 SBF에서, 그리고 pH 2, 5, 및 7.4의 Tris에서 측정하였고, 그 결과는 도 11에 나타내었다.
- [0336] 이를 참조하면, pH 별 t의 차이는 있으나, 모두 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상이었다.
- [0338] (5) 대전
- [0339] 실시예 1-2-(1)-1)의 다공성 실리카 입자의 흡광도를 측정하였고, 그 결과는 도 12에 나타내었다(현탁액과 용매로는 Tris(pH 7.4)를 사용).
- [0340] 이를 참조하면, 양전하로 대전된 입자도 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상이었다.
- [0342] **7. 항체 또는 사이토카인의 담지**
- [0343] (1) 항체의 담지
- [0344] 1 x PBS 200 μ L 내에 실시예 1-2-(1)-2)-②의 다공성 실리카 입자 분말 100 μ g과 anti-twist IgG(Santacruz, sc-81417) 10 μ g을 혼합한 후, 실온에서 1시간 인큐베이션하여 IgG를 담지하였다. 상기와 동일한 조건 하에 타 항체들도 담지하였다.
- [0346] (2) 사이토카인의 담지
- [0347] PBS 또는 증류수 100 μ L 내에 실시예 1-2-(1)-2)-②의 다공성 실리카 입자 분말 25 μ g과 IL-2 10 μ g을 혼합한 후, 1시간 인큐베이션 하여 IL-2를 담지하였다. 상기와 동일한 조건 하에 타 사이토카인들도 담지하였다.
- [0349] **8. 항체 또는 사이토카인의 방출**
- [0350] (1) 항체의 방출
- [0351] Fluorescein 형광이 표지된 IgG를 로딩한 다공성 실리카 입자 100 μ g을 SBF(pH 7.4) 또는 PBS(pH 7.4) 200 μ L에 재부유시켰다.
- [0352] IgG, PD-1, PD-L1의 방출은 37°C에서 60rpm 수평 교반하며 수행되었고, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 96 시간, 144 시간, 240 시간 지점에서 200 μ L의 방출 용매를 형광 측정을 위해 회수하고 등량의 SBF 또는 PBS를 첨가하였다. Fluorescein 형광이 표지된 IgG의 형광 강도는 517 nm 파장(λ_{ex} =492 nm)에서 측정하여 BSA의 방출 정도를 측정하였다.
- [0353] 도 13 내지 15를 참조하면, IgG는 SBF와 PBS에서 모두 서방적으로 방출되며, IgG, PD-1, PD-L1 모두 250시간 이상에 걸쳐 거의 100%까지 방출되는 것을 확인할 수 있다.
- [0355] (2) 사이토카인의 방출
- [0356] FITC가 결합된 사이토카인을 담지한 다공성 실리카 입자를 37°C에서 SBF(pH 7.4)에 재부유시킨 후, 기설정된 기간(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일) 동안 관찰하였다. 용액은 10분 동안 8,000 rpm 원심분리하였고, 사이토카인의 방출

량은 FITC의 형광 세기 스펙트럼을 통해 확인하였다.

[0357] 도 17 내지 21을 참조하면, IL-10, IL-15, HGF, EGF, IL-2는 모두 서방적으로 방출되며, 7시간 이상에 걸쳐 거의 100%까지 방출되는 것을 확인할 수 있다.

[0359] **실시예 2. 다공성 실리카 입자의 독성여부 확인**

[0360] **1. 실험방법**

[0361] 본 발명 다공성 실리카 입자의 단위 투여 독성을 확인하기 위해, 모든 마우스(군 당 4마리)에 각각 31.25, 62.5, 125, 250 mg/kg의 다공성 실리카 입자(DegradaBALL)를 투여하고, 투여 후 5일째에 마우스를 희생하여 주요 장기(간, 비장, 폐, 심장 및 신장)를 분리하였다.

[0362] 본 발명 다공성 실리카 입자의 반복 투여 독성을 확인하기 위해, 모든 마우스(군 당 8마리)에 0.5, 5, 50 mg/kg의 다공성 실리카 입자(DegradaBALL)를 매 3일 또는 4일 간격으로 최대 9회 피하로 투여하였고, 마지막 투여 48시간 후 모든 마우스를 희생하여 주요 장기(간, 비장, 폐, 심장 및 신장)를 분리하였다.

[0364] **2. 실험결과**

[0365] 도 22 내지 43을 참조하면, 모든 군에서 명백한 병리학적 또는 임상적 독성 징후는 관찰되지 않음을 확인할 수 있는데, 보다 구체적으로, 본 발명 다공성 실리카 입자는 기관(간, 비장, 신장, 흉선, 심장, 폐 및 림프절)의 유의한 체중 감소를 유발하지 않았고(데이터는 평균±표준 편차로 나타냄. 정상군과 유의한 차이 값(* $p<0.05$)), 전혈 분석 및 혈청 생화학 분석으로 얻은 다양한 매개 변수에 있어서, 적혈구(RBC), 백혈구(WBC) 및 혈액 세포 부피(즉, 평균 미립자 부피(MCV)), 평균 혈소판 부피(MPV), 평균 미립자 헤모글로빈 농도(MCHC), 헤모글로빈, 헤마토크리트 및 적혈구 분포 폭(RDW) 수준은 정상 범위를 나타내었으며, ALT(Alanine transaminase), AST(aspartate transaminase), ALP(alkaline phosphatase) 및 GGT(gamma-glutamyltransferase) 수치에 있어서도 간 손상의 징후를 보이지 않았다. 신장 기능(혈액 우레아 질소(BUN), 크레아티닌)의 지표 및 전체 단백질과 빌리루빈도 역시 모든 군에서 정상범위였으며, 모든 군의 심장, 간, 폐, 신장 및 비장의 H&E 염색(x200)의 조직학적 관찰에 있어서도 출혈은 관찰되지 않아 군 간 차이가 없었다(막대는 100 μ m를 나타냄).

[0367] **실시예 3. 담지된 면역반응 물질의 생물학적 활성 보존 확인**

[0368] **1. 실험방법**

[0369] 다공성 실리카 입자에 담지된 항체 또는 사이토카인의 생물학적 활성이, 담지되지 아니한 경우와 마찬가지로 생물학적 활성이 보존되는지 확인하기 위하여, IL-2를 담지한 다공성 실리카 입자(BALLkine-2)를 처리한 마우스 T세포의 세포 증식(cell proliferation) 정도를 CCK assay로 확인하였고, IL-2를 담지한 다공성 실리카 입자(BALLkine-2)를 처리한 IL-HEK 세포에서의 STAT5 활성 정도를 HEK-Blue™ IL-2 assay (InvivoGen, CA, USA)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분석하였다.

[0371] **2. 실험결과**

[0372] 도 44, 45를 참조하면, IL-2가 담지되지 않은 경우 대비, IL-2가 다공성 실리카 입자에 담지된 경우, 마우스의 T세포의 증식과 STAT5 활성 정도가 처리 농도에 무관하게 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 이는, 항체나 사이토카인을 본 발명 다공성 실리카 입자에 담지하여 처리하여도 생물학적 활성이 잘 보존됨을 보여주는 결과이다.

[0374] **실시예 4. 본 발명 전달체에 의한 과민반응 여부 확인**

[0375] **1. 실험방법**

[0376] DegradaBALL, IL-2 및 IL-2를 담지한 DegradaBALL(BALLkine-2)의 잠재 면역원성, 특히 지연형 과민반응(type 4 hypersensitivity)을 평가하기 위해 시험관 내 MUSST(골수성 U937 피부 민감성 시험) 분석을 수행하였다. Stimulation index가 3 이하이면 반응이 없다는 것을 의미한다(NC: 음성대조군(negative control), PC: 양성대조군(positive control), 자극 지수 = 시험 샘플의 양성 세포의 평균% / NC의 양성 세포의 평균%, NC 군과 유의한 차이(### $p<0.05$)). NC와 PC 군에서 3회, 다른 군에서 2회 반복시험하였다.

[0378] **2. 실험결과**

[0379] 도 46을 참조하면, 모든 군의 모든 자극 지수(이론적 혈장 농도의 10배에서 1/25배까지)는 3.0보다 낮아 양성 반응이 없음으로 나타났는데, 이는 본 발명 전달체에 의한 과민반응, 특히 지연형 과민반응이 없다는 것을 입증

하는 결과이다.

[0381] 실시예 5. 본 발명 전달체의 안정적인 전달성 및 표적성 확인

[0382] 1. 항체의 전달

[0383] 도 47, 48을 참조하면, anti-PD-L1 항체와 DDV에 각각 FITC, Cy5를 표지하고, anti-PD-L1 항체를 담지한 DDV를 종양내투여(intratatumoral injection)한 후, 각 시간 별로 anti-PD-L1 항체와 DDV의 형광세기를 측정된 결과를 확인할 수 있는데, DDV와 anti-PD-L1 항체가 오랫동안 투여부위에 남아있는 것을 확인할 수 있고, 이는 본 발명 전달체가 담지된 anti-PD-L1 항체를 안정적으로 전달할 수 있고, 종양 내 및 투여부위에 오래 머물게 하여, 오랫동안 약효를 가질수 있음을 입증하는 것이다.

[0385] 2. 사이토카인의 전달

[0386] 도 49를 참조하면, IL-2와 DDV에 각각 Cy7, Cy5를 표지하고, IL-2를 담지한 DDV(BALLkine-2)를 피하투여(SC injection)한 후, 각 시간 별로 IL-2와 DDV의 형광세기를 측정된 결과를 확인할 수 있는데, DDV와 BALLkine-2가 오랫동안 투여부위에 남아있는 것을 확인할 수 있고, 이는 본 발명 전달체가 담지된 IL-2를 안정적으로 전달할 수 있음을 입증하는 것이다.

[0387] 도 50, 51을 참조하면, IL-2에 FITC형광을 달고, DDV에 TAMRA형광을 달아 피하로 투여하고, 24시간 후에 꼬리정맥으로 Cy5형광으로 라벨링(labeling) 되어있는 렉틴(lectin)을 주사하여 혈관을 염색한 뒤, 종양을 적출하여 형광이미지를 확인한 결과를 확인할 수 있는데, DDV와 BALLkine-2가 종양조직에 특이적으로 분포함을 확인할 수 있고, 이는 본 발명 전달체가 담지된 IL-2를 종양특이적으로 표적하여 전달할 수 있음을 입증하는 것이다.

[0388] 도 52는 종양 세포(DAPI), vehicle(TAMRA), IL-2(FITC) 및 혈관염색(dylight 649 접합 lectin)을 나타내는 종양 조직의 조직학적 단면 이미지를 나타내는 것이고, 도 53은 BALLkine-2(p.t) 및 IL-2(i.p 또는 p.t)의 종양 내 약물동태(그래프는 측정시간당 3마리 마우스의 평균±표준편차를 나타냄)를 나타낸 것으로서, 피하주사후, 종양 내에서의 IL-2의 양을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 것인데, 이들을 참조하면, 본 발명 다공성 실리카 입자가 IL-2를 종양 및 투여부위에 오랫동안 머무르게 하고, IL-2를 안정적으로 전달할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0390] 3. 면역반응 물질의 면역기관으로의 전달능 확인

[0391] 도 54, 55는 마우스에 1xPBS buffer (100 μ L) 및 Cy5 접합 DegradaBALL (2.5 mg/kg)를 피하 주입하고, 투여 후 1, 3, 5일에 마우스를 희생하여 장기(피부, 흉선, 비장 및 림프절)를 분리한 후, FOBI 이미징 시스템으로 장기의 형광 이미지를 촬영한 결과를 확인할 수 있는데, 1, 3, 5일에 면역기관으로 분포되는 것을 형광이미지를 통해 확인할 수 있는 바, 본 발명의 다공성 실리카 입자가 담지된 다양한 면역반응 물질을 면역기관으로 안정적으로 전달할 수 있음을 입증하는 것이다.

[0393] 실시예 6. 본 발명 전달체의 암 면역치료 효능 확인

[0394] 1. 흑색종(melanoma) 모델

[0395] 도 56을 참조하면, 정상 마우스와 흑색종 종양 마우스에 DegradaBALL을 각각 피하 또는 종양주변으로 주사하였다. 도 57을 참조하면, 모든 마우스에 TAMRA가 달린 DegradaBALL을 각각 2.5, 10, 50 mg/kg의 용량으로 피하로 주입하고, 1, 3, 5, 7일 뒤 마우스를 희생하여 피부조직을 적출하여 형광 이미지를 확보한 결과를 확인할 수 있는데, 주입 후 7일째가 되어도 형광이 잔존하는 것으로 보아, 본 발명 다공성 실리카 입자의 생체 내 안정성이 매우 높아 담지된 면역반응 물질을 안정적으로 오랜기간 서방적으로 전달할 수 있음을 암시케 한다.

[0396] 본 발명 전달체의 흑색종 치료효과 우수성을 입증하기 위해, 도 58 및 하기 표 2의 프로토콜에 따라 흑색종 마우스 모델을 이용하여 실험을 진행하였다. 각 그룹별로 종양의 성장속도를 측정하고, 마우스 개체별 종양의 성장속도를 측정된 결과를 도 59에 나타내었는데, aPD-1 항체와 IL-2의 병용투여는 aPD-1 항체 단독투여군 대비 그 성장속도가 낮았는데, IL-2를 다공성 실리카 입자에 담지하여 병용투여한 경우(BALLkine-2) 그 성장속도가 현저하게 낮음을 확인할 수 있다. 또한, 각 군별 생존율 역시 IL-2를 다공성 실리카 입자에 담지하여 병용투여한 경우(BALLkine-2), 그러하지 않은 경우 대비 현저히 높음을 도 60에서 확인할 수 있다.

표 2

[0397]

투여 군(Group)	투여 프로토콜	총 용량
Buffer(i.p)	3일 간격으로 7회 복강주사(0,3,6,9,12,15,18일)	
DegradaBALL(s.c)	6일 간격으로 4회 종괴주위주사(0,6,12,18일)	
aPD-1 항체(i.p)	3일 간격으로 7회 복강주사(0,3,6,9,12,15,18일)	70 mg/kg
aPD-1 항체(i.p) + IL-2(i.p)	aPD-1 항체: 3일 간격으로 7회 복강주사(0,3,6,9,12,15,18일)IL-2: 매 5일간 2사이클 복강주사(0,1,2,3,4,10,11,12,13,14일)	aPD-1 항체: 70 mg/kg IL-2: 10 mg/kg
aPD-1 항체(i.p) + IL-2(s.c)	aPD-1 항체: 3일 간격으로 7회 복강주사(0,3,6,9,12,15,18일)IL-2: 6일 간격으로 4회 종괴주위주사(0,6,12,18일)	aPD-1 항체: 70 mg/kg IL-2: 4 mg/kg
aPD-1 항체(i.p) + BALLkine-2(s.c)(1 또는 0.25 mg/kg)	aPD-1 항체: 3일 간격으로 7회 복강주사(0,3,6,9,12,15,18일)BALLkine-2: 6일 간격으로 4회 종괴주위주사(0,6,12,18일)	aPD-1 항체: 70 mg/kg BALLkine-2: 4 mg/kg 또는 1 mg/kg

[0398]

또한, 본 발명 전달체의 전이성 흑색종(metastatic melanoma) 치료효과 우수성을 입증하기 위해, 도 61의 프로토콜에 따라 전이성 흑색종의 폐전이 동물모델에서 실험을 진행하였는데, 상기 도 58 내지 60에서의 결과와 유사하게, aPD-1 항체와 IL-2의 병용투여는 aPD-1 항체 단독투여군 대비 그 성장속도가 낮았는데, IL-2를 다공성 실리카 입자에 담지하여 병용투여한 경우(BALLkine-2) 그 성장속도가 현저하게 낮음을 확인하였다. 구체적으로, 도 61에서 IL-2를 다공성 실리카 입자에 담지하여 aPD-1 항체와 병용투여한 경우(BALLkine-2), 그러하지 않은 경우 대비 검은색의 암 조직 부위가 현저히 적은 면적으로 퍼져있어, 폐 전이가 낮고, 폐종양 결절의 형성과 폐의 부피 증대를 현저히 억제함을 확인할 수 있고, 도 62에서 폐 전이가 진행된 각 폐의 무게 역시 IL-2를 다공성 실리카 입자에 담지하여 aPD-1 항체와 병용투여한 경우(BALLkine-2), 그러하지 않은 경우 대비 현저히 낮음을 확인할 수 있으며(데이터는 3마리의 마우스의 평균±표준편차로 나타냄), 도 63에서 생존율 역시 IL-2를 다공성 실리카 입자에 담지하여 aPD-1 항체와 병용투여한 경우(BALLkine-2), 그러하지 않은 경우 대비 현저히 높음을 확인할 수 있다(군 당 10마리의 마우스).본 발명 전달체의 흑색종 치료에 있어서 면역반응 기전을 탐구하기 위해, 도 64의 프로토콜에 따라 중앙침윤림프구(TILs) 분석을 진행하였다. TIL 분석은 목표일(BALLkine-2 투여 후 1,3,5,7일)에 마우스로부터 분리하여, 면역 세포 집단((b) $CD8^+$ T 세포, (c) $CD4^+$ T 세포, (d) 활성화 NK 세포, (e) Treg 세포, (f) $CD8^+$ /Treg 세포)을 유세포분석법으로 분석하였고(점은 개별 종양 조직을, 선은 8마리 마우스의 종양 조직의 평균을 나타냄), 3, 5일 시점의 $CD8^+$ T 세포의 면역 조직을 염색하여 분석하였는데, BALLkine-2 투여군의 대표이미지(도 70)를 참조하면, $CD8^+$ T세포의 수가 극적으로 증가해 광범위한 종양세포 사이에 분포하고 있음을 확인할 수 있다. 또한, BALLkine-2를 B16F10 흑색종 종양을 가진 마우스의 오른쪽 옆구리에 주입(종괴주위주사; peritumoral injection) 후 1,3,5일에 비장과 배수 림프절(장골과 사타구니 림프절)을 분리하고, 림프구($CD8^+$ T 세포와 NK 세포)를 분리해 면역 세포 집단을 평가하였는데(데이터는 3마리 마우스의 평균±표준편차로 나타냄), 대조군 대비 면역세포의 수가 BALLkine-2 투여군에서 현저히 증가함을 확인할 수 있다.

[0400]

2. 신장암(renal cell carcinoma) 모델

[0401]

본 발명 전달체의 신장암 치료 우수성을 확인하기 위해, 도 75의 프로토콜에 따라 신장 세포 암종(RCC) 이종 이식 마우스 모델에서, 다공성 실리카 입자에 담지하지 않은 IL-2 대비, 다공성 실리카 입자에 담지한 IL-2(BALLkine-2)의 종양 성장 억제 정도를 확인하고자 하였다. 도 76에서 확인할 수 있듯, BALLkine-2는 IL-2 대비 유의한 종양 성장 억제 우수성을 보여, 신장암 치료 우수성을 입증하였다(데이터는 평균±SEM, 군당 7마리의 마우스, ***p< 0.001: 다른 군과 유의하게 다름).

[0402]

또한, RCC의 전이성(metastatic) 및 정위(orthotopic) 마우스 모델에서, 다공성 실리카 입자에 담지하지 않은 IL-2 대비, 다공성 실리카 입자에 담지한 IL-2(BALLkine-2)의 종양 성장 억제 정도를 확인하고자 도 77의 프로토콜에 따라 실험을 진행하였다. 투여 후 10일째에 마우스를 희생시키고, 신장을 적출하여 그 무게를 재었는데(신장무게/체중(%))을 계산함, 데이터는 평균±SD, 그룹당 3마리의 마우스, #p< 0.05, ###p< 0.001: 대조군(Buffer 투여군) 대비 유의하게 다름, *p<0.05: IL-2 투여군 대비 유의하게 다름), IL-2 투여군 대비,

BALLkine-2 투여군에서의 신장 무게가 유의하게 낮음을 도 78에서 확인할 수 있다. 도 79의 적출한 신장의 실측 이미지에서도 BALLkine-2의 신장 크기가 타 군 대비 현저히 작음을 확인할 수 있고, 도 80의 신장 조직의 H&E 염색 사진에서도 타 군 대비, BALLkine-2 처리군에서 조직염색의 정도가 현저히 높음을 확인할 수 있다. 또한, 폐부종을 평가하기 위해, 젖은 폐를 수확하고 무게를 측정 후, 60℃ 오븐에서 3일 동안 건조시킨 후 무게를 측정한 결과(도 81, 데이터는 평균±SD, 그룹당 3마리 마우스, ##p<0.01: 대조군(Buffer 투여군) 대비 유의하게 다름, **p<0.01: IL-2 투여군 대비 유의하게 다름), BALLkine-2 처리군에서 젖은 폐와 건조한 폐의 무게비가 IL-2 투여군 대비 유의하게 낮음을 확인하였다.

[0403] 또한, 마우스의 혈액 내 백혈구, 호중구 및 림프구를 분석한 결과(도 82, 데이터는 평균±SD, 그룹당 3마리 마우스, #p<0.05: 대조군(Buffer 투여군) 대비 유의하게 다름, *p<0.05: IL-2 투여군 대비 유의하게 다름), 그 수에 있어서, BALLkine-2 처리군에서 타 군 대비 유의하게 높은 수준을 보임에 따라, 면역반응 촉진 효과에 있어서 현저한 우수성을 확인하였다.

[0404]

[0405] 3. 기타 암 모델

[0406] 흑색종과 신장암을 포함한 다른 암종에 대한 본 발명 조성물의 효과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0407]

암종	세포주	측정변수	대조군(vehicle)	실험군 1	실험군 2	실험군 3
흑색종	B16F10	상대적 종양 크기(12일)	14.1	IL-2/aPD-1항체	IL-2+DegradaBALL/aPD-1항체	
				9.1	4.3	
		상대적 종양 크기(10일)	12.5	IL-15	IL-15+DegradaBALL	
				8.2	3.9	
신장암	Renca	체중량 대비 신장무게(w/w%; 10일)	1.05	IL-2	IL-2+DegradaBALL	
				0.86	0.78	
간암	BNL-h1	간 전이의 수	85	IL-12	IL-12+DegradaBALL	
				9	2	
대장암	CT26(s.c)	종양크기(mm ³ ; 19일)	452	aPD-L1항체	aPD-L1항체+DegradaBALL	
				220	187	
	CT26(i.v)	생체발광, 광자량/s	38	IL-2	IL-2+DegradaBALL	
				11	1.4	
폐암	LLC	생체발광, 광자량/s	3.9	IL-12	IL-12+DegradaBALL	
				1.1	0.4	
				PTX/CDDP	IL-2/PTX/CDDP	
				3.8	0.2	IL-12+DegradaBALL/PTX/CDDP 0.01
유방암	4T1	종양크기(mm ³ ; 20일)	411	IL-12	IL-12+DegradaBALL	
				32.4	8.3	
	EMT-6	종양크기(mm ³ ; 28일)	953	IL-21	IL-21+DegradaBALL	
				521	120	
				aCTLA-4항체	aCTLA-4항체+DegradaBALL	
				320	89	IL-21/aCTLA-4항체+DegradaBALL 21
위암	SGC-7901	종양크기(mm ³ ; 28일)	1285	IL-24	IL-24+DegradaBALL	
				423	121	
췌장암	HS766T	종양크기(mm ² ; 28일)	81	IL-13	IL-13+DegradaBALL	
				14	3.2	

두경 부압	KCCT873	종양크기(mm ² ; 30일)	138	IL-13	IL-13+DegradaBALL	
				29	11	
				IL-13/CpG	IL-13+DegradaBALL/CpG	IL-13+DegradaBALL/CpG+DegradaBALL
				19	4.2	1.7

[0409] 실시예 7. 본 발명 전달체의 부작용 감소효과 확인

[0410] 사이토카인의 투여로 인한 다양한 부작용이 존재하는데, 그 중, IL-2 투여로 인한 부작용으로 혈관 누출 증후군(capillary leak syndrome (CLS) 또는 vascular leak syndrome (VLS))이 잘 알려져 있다. 이에, 본 발명 전달체가 담지하는 물질의 부작용을 감소시키는 효과가 존재하는지 확인하고자 하였고, IL-2 사이토카인을 담지한 다공성 실리카 입자인 BALLkine-2를 이용하여 실험을 진행하였다.

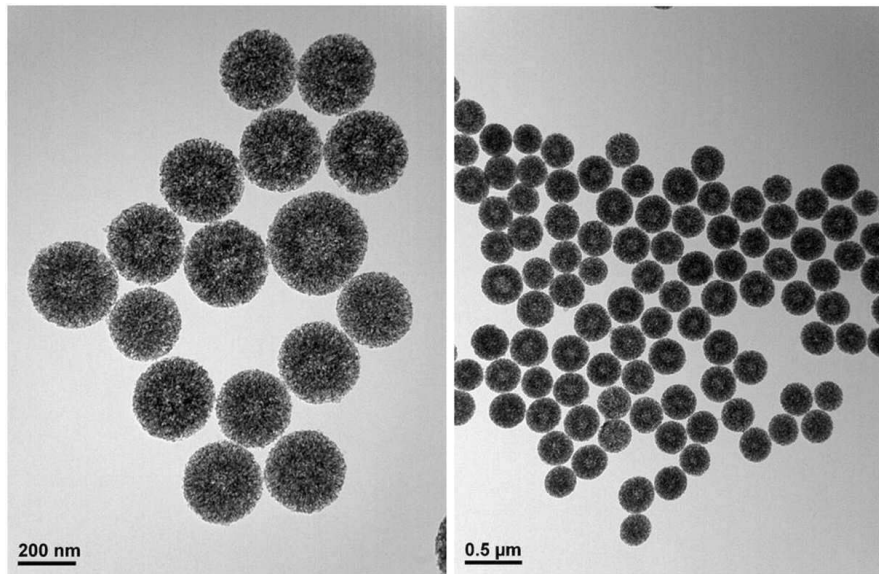
[0411] 도 83의 투여일정과 CLS분석 프로토콜에 따라 실험을 진행하였는데, 구체적으로, 3일간 IL-2(15 µg)와 BALLkine-2(15 µg)을 C57BL/6 마우스에 투여한 후, 4일째 분석하였다. 완충액(i.v 또는 s.c), DegradaBALL(i.v 또는 s.c), IL-2(i.v 또는 s.c) 또는 BALLkine-2(i.v 또는 s.c)를 투여한 마우스 폐 조직의 H&E 염색 대표 이미지(도 84)를 참조하면, BALLkine-2 투여군에서 IL-2(i.v 또는 s.c) 투여군 대비 혈관 내부와 주변의 염증 세포 수를 감소시킴을 확인할 수 있다(막대는 200 µm을 나타냄). 또한, 폐부종을 평가하기 위해 젖은 폐를 분리해 무게를 측정하고, 폐를 60 °C 오븐에서 3일 동안 건조하고 무게를 측정하였는데(도 85), BALLkine-2 투여군에서 IL-2(i.v 또는 s.c) 젖은 폐 대비 건조한 폐의 무게비(젖은 폐 무게/건조한폐 무게)가 유의미하게 낮음을 확인하였다. 또한, 상기 VLS 모델에서 꼬리 정맥을 통해 에반스 블루 염료를 희생하기 2시간 전 마우스에 주입하고, 희생 후 간(도 86)과 폐(도 87)를 분리하고 VLS의 심화정도를 에반스 블루의 혈관 외 유출을 통해 측정하여 분석하였는데, BALLkine-2 투여군에서 IL-2(i.v 또는 s.c) 투여군 대비 그 유출의 정도가 현저히 낮음을 확인하였다. 또한, 3일째에 마우스의 혈액학적 분석을 위해 혈액을 채취하여 백혈구, 호중구 및 림프구를 분석하였는데, 모두 BALLkine-2 투여군에서 IL-2(i.v 또는 s.c) 투여군 대비 그 수가 유의하게 높음을 확인하였다(도 88, 데이터는 완충액 및 DegradaBALL 처리군 당 3~4마리, BALLkine-2 군 당 4~7마리 마우스의 평균±표준 편차로 나타냄; 완충액(i.v 또는 s.c) 군과 유의한 차이(*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), IL-2(i.v 또는 s.c) 군과 유의한 차이(*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

[0412] 실제 암의 면역치료에 있어서도 혈관 누출 증후군을 감소시킬 수 있는지 확인하기 위해, 도 89의 프로토콜에 따라 종양 보유 마우스 모델에서 혈관 누출 증후군(VLS) 분석을 진행하였다. 폐부종을 평가하기 위해 젖은 폐를 분리해 무게를 측정하고, 폐를 60 °C 오븐에서 3일 동안 건조하고 무게를 측정하였는데(도 90), BALLkine-2 투여군에서 IL-2(i.v 또는 s.c) 투여군 대비 그 무게비가 유의하게 낮았고, 정상군과 유사한 수치를 나타내었다. 또한, VLS 모델에서 꼬리 정맥을 통해 에반스 블루 염료를 희생하기 2시간 전 마우스에 주사한 후, 간(도 91)과 폐(도 92)를 분리하고, 에반스 블루의 혈관 외 유출을 통해 측정한 VLS를 분석하였는데, BALLkine-2 투여군에서 IL-2(i.v 또는 s.c) 투여군 대비 그 유출의 정도가 현저히 낮음을 확인하였다.

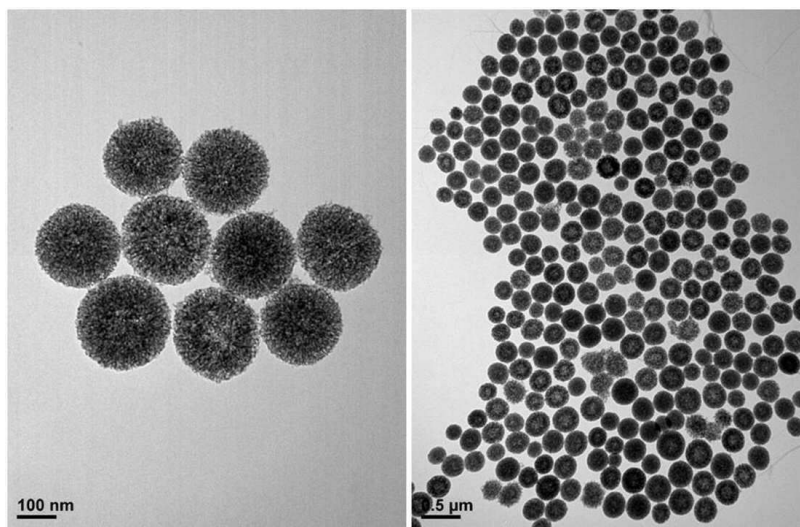
[0413] 상기의 결과는, 본 발명 다공성 실리카 입자에 항체 또는 사이토카인과 같은 면역반응 물질을 담지하여 생체 내 전달하는 경우, 각 항체 또는 사이토카인이 갖는 본래의 부작용을 현저히 감소시키는 결과를 낳음으로써, 본래의 약리적 치료효과를 증대시킬 수 있음을 입증하는 유의미한 결과로 판단된다.

도면

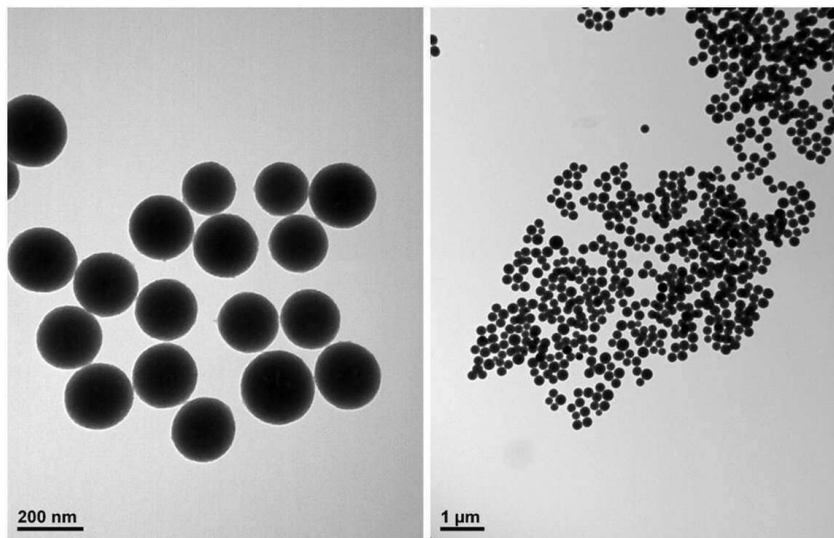
도면1



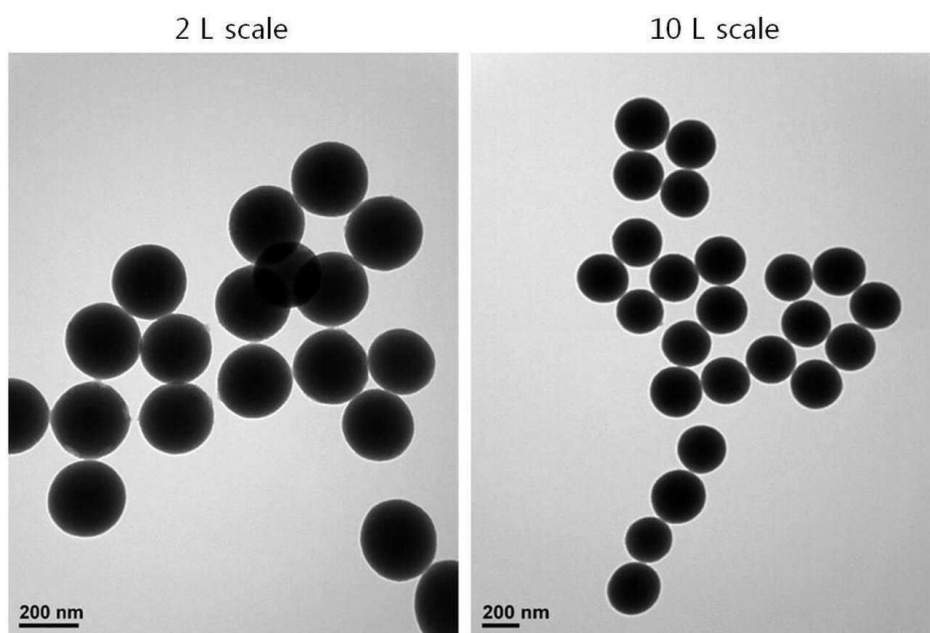
도면2



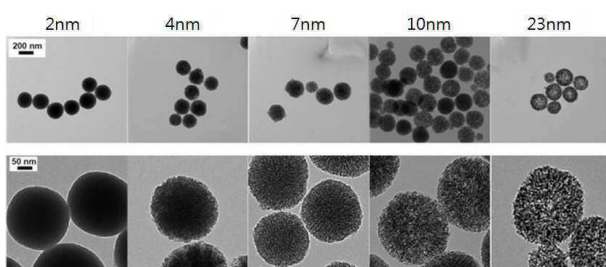
도면3



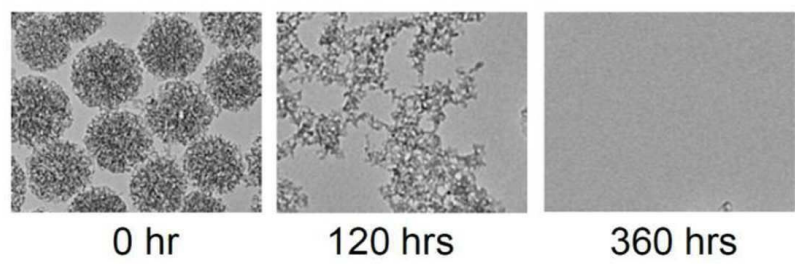
도면4



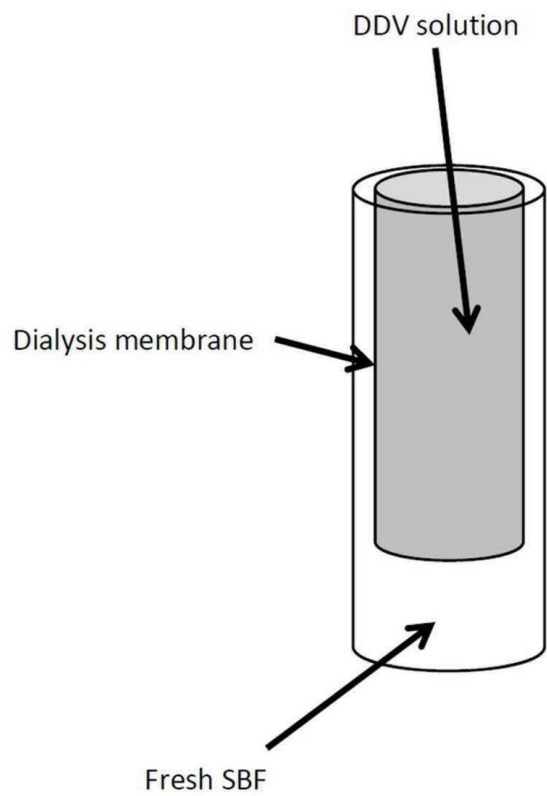
도면5



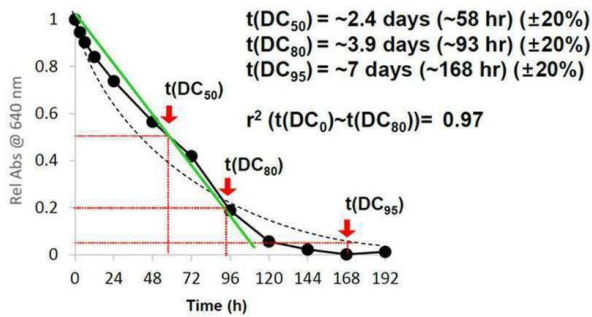
도면6



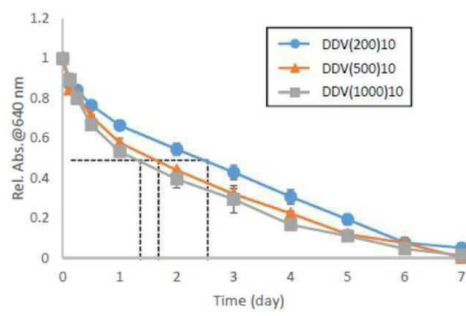
도면7



도면8

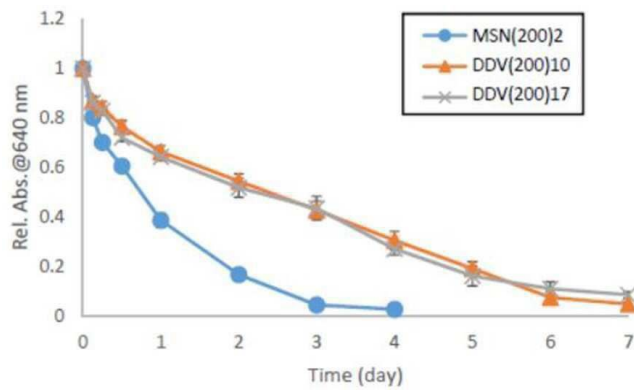


도면9



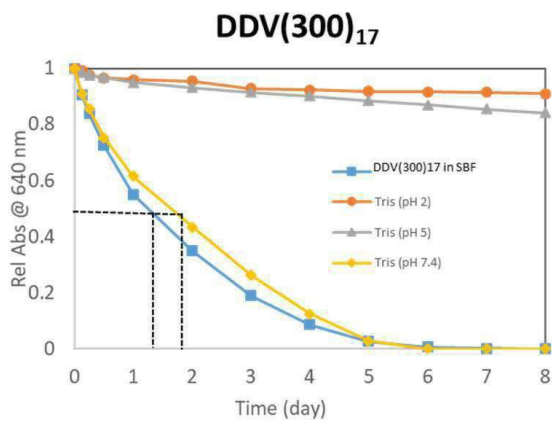
Sample	$t_{50\%}$
DDV(200) ₁₀	57.4 h
DDV(500) ₁₀	37.5 h
DDV(1000) ₁₀	30.0 h

도면10

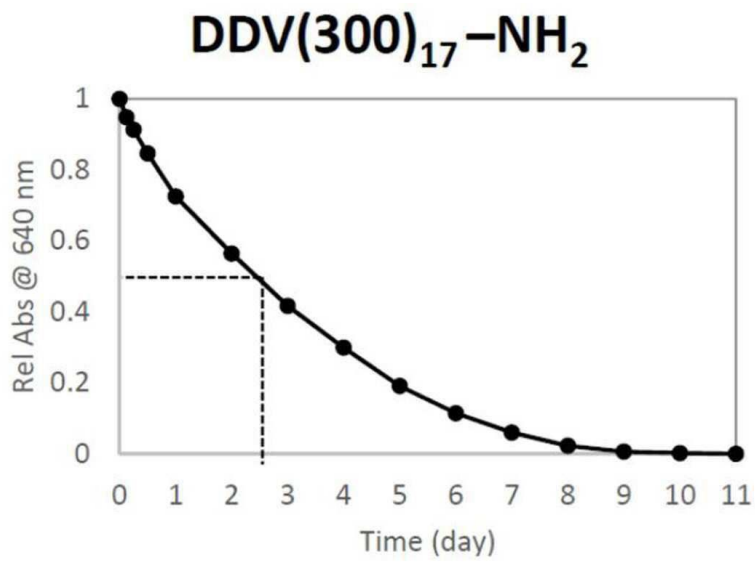


Samples	$t_{50\%}$
MSN(200) ₂	17.9 h
DDV(200) ₁₀	57.4 h
DDV(200) ₁₇	53.6 h

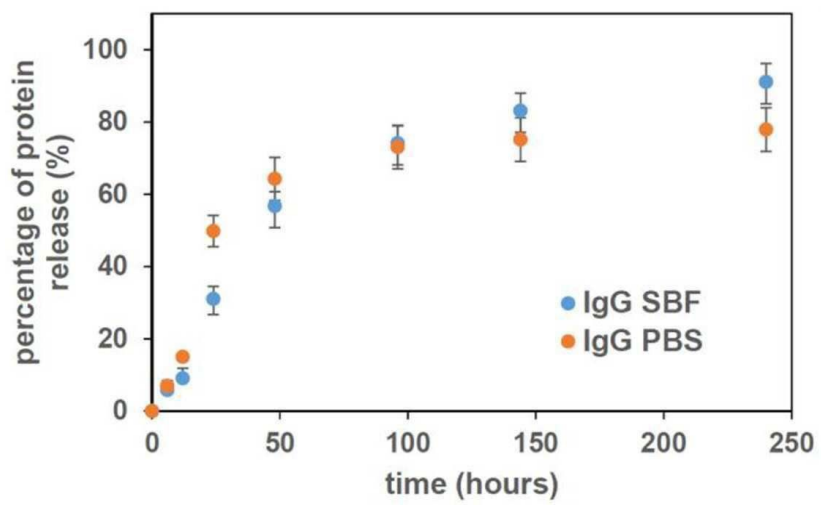
도면11



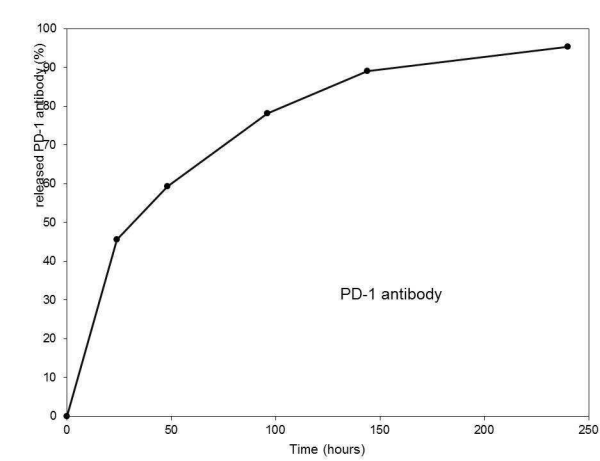
도면12



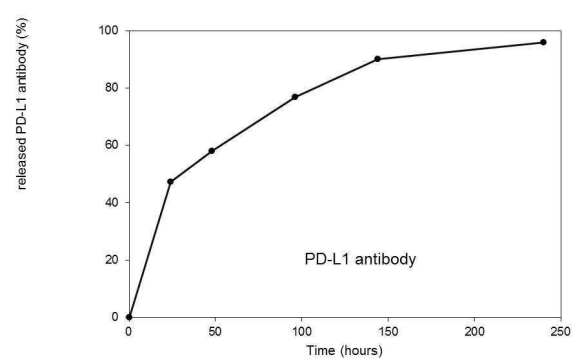
도면13



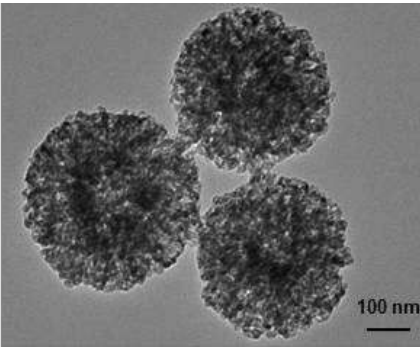
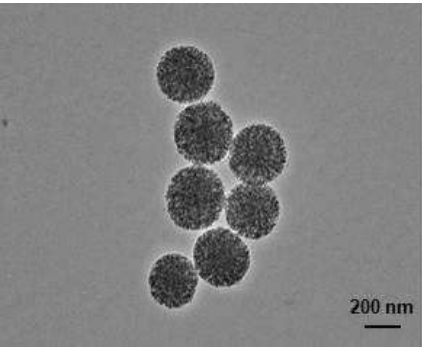
도면14



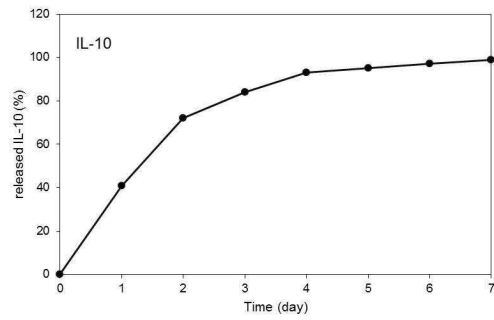
도면15



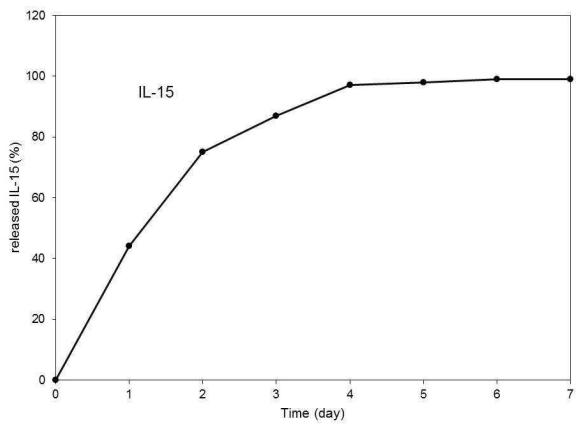
도면16



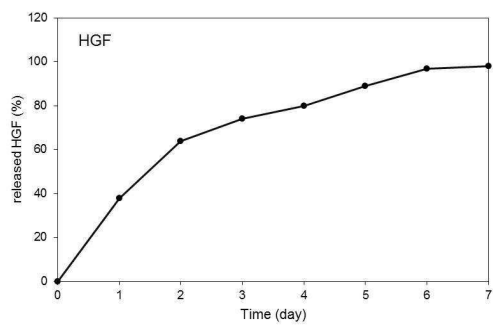
도면17



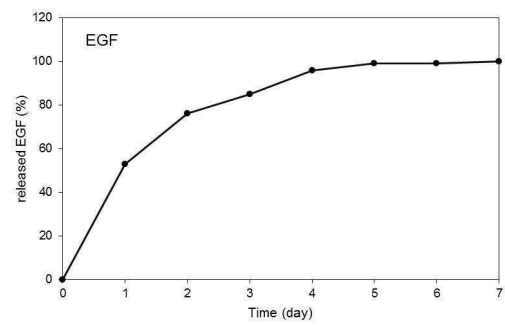
도면18



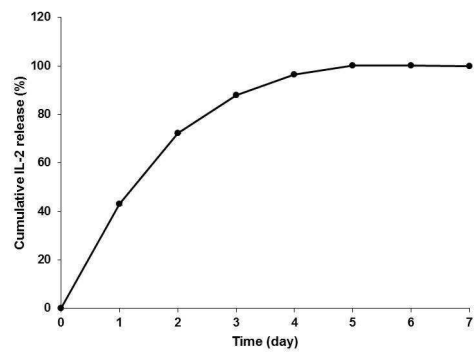
도면19



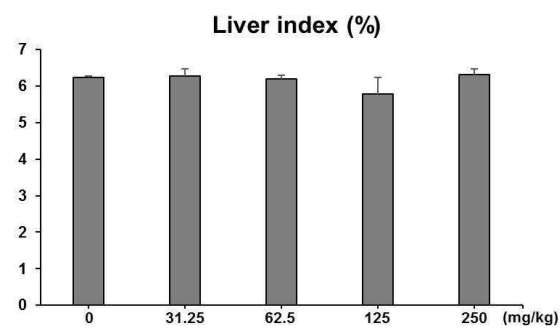
도면20



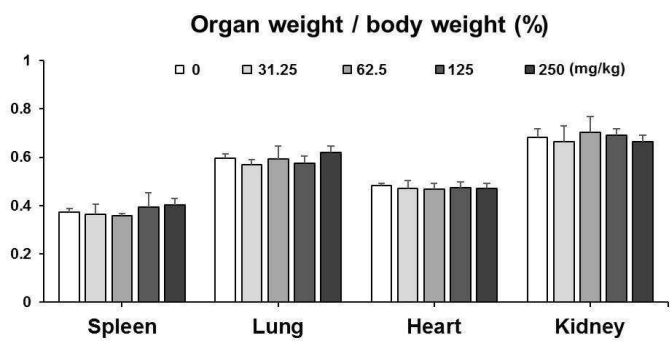
도면21



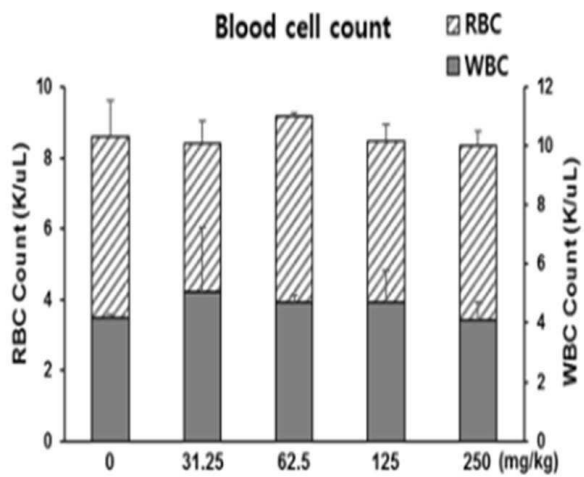
도면22



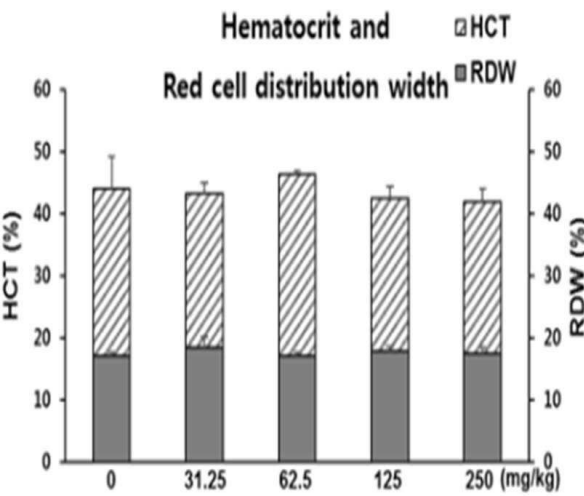
도면23



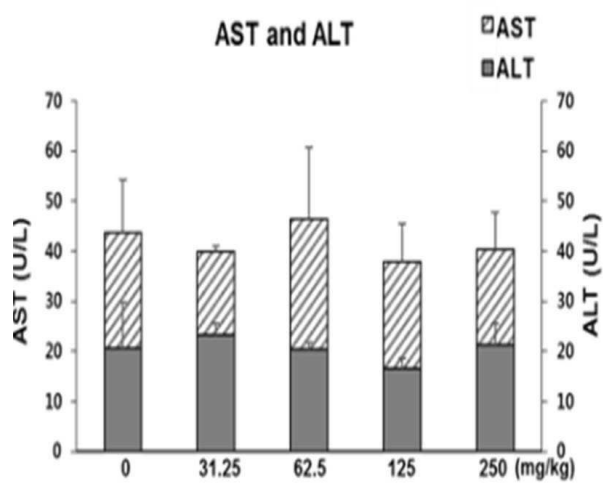
도면24



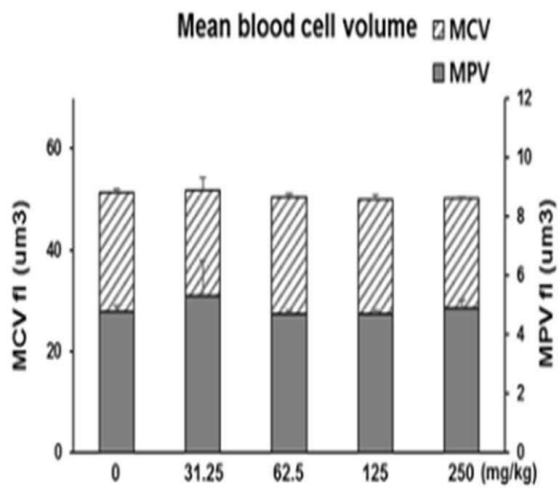
도면25



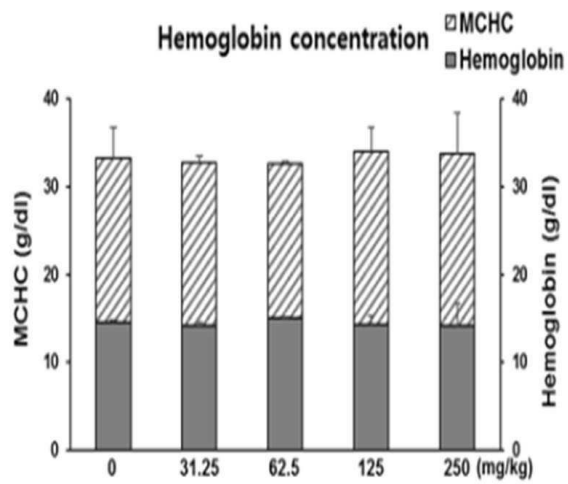
도면26



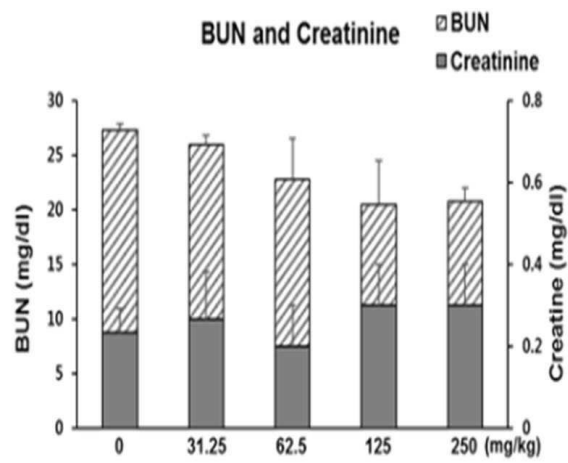
도면27



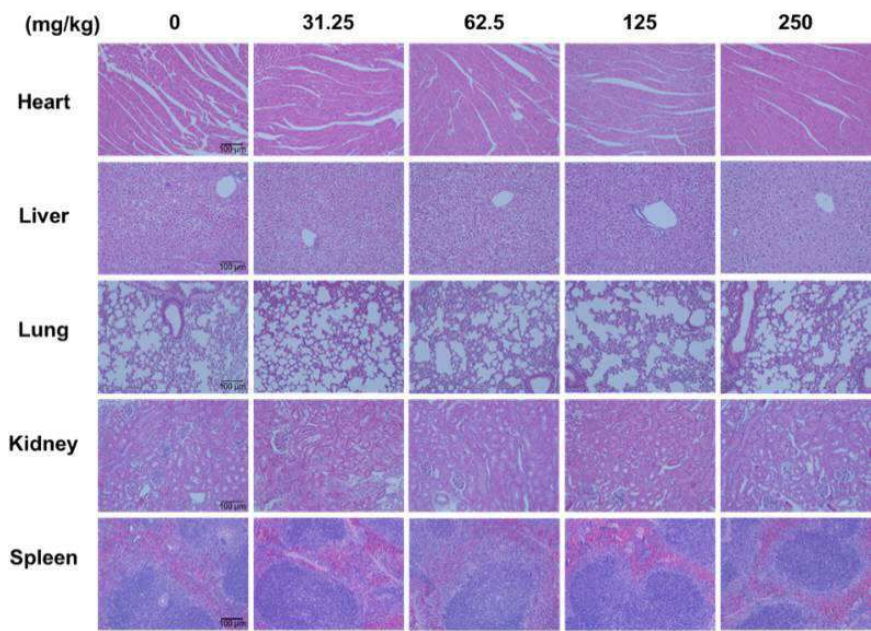
도면28



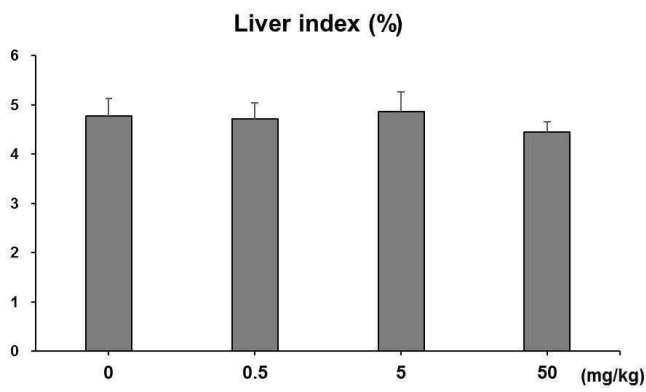
도면29



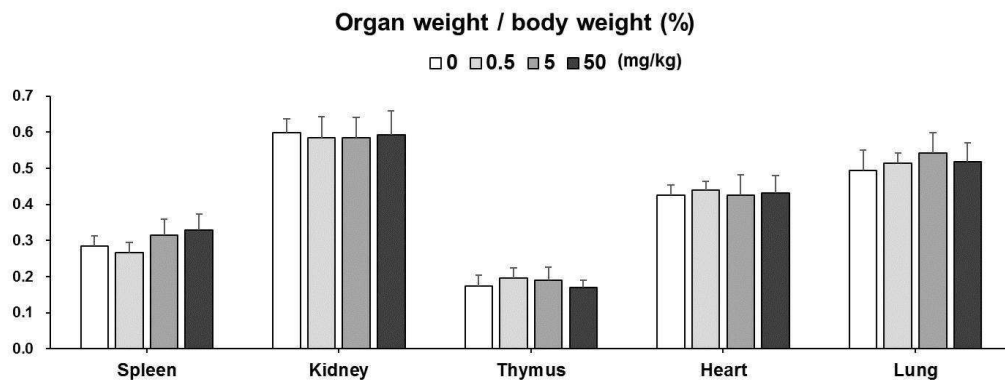
도면30



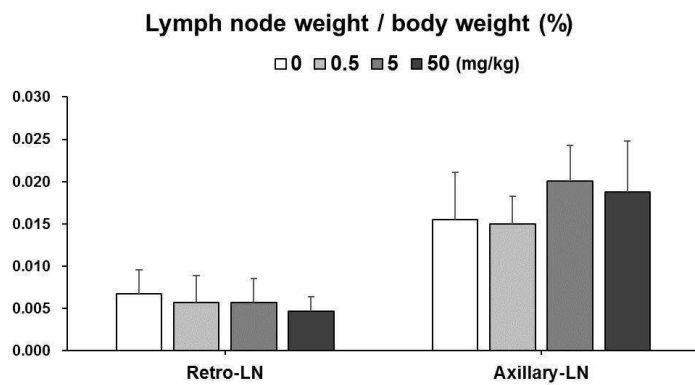
도면31



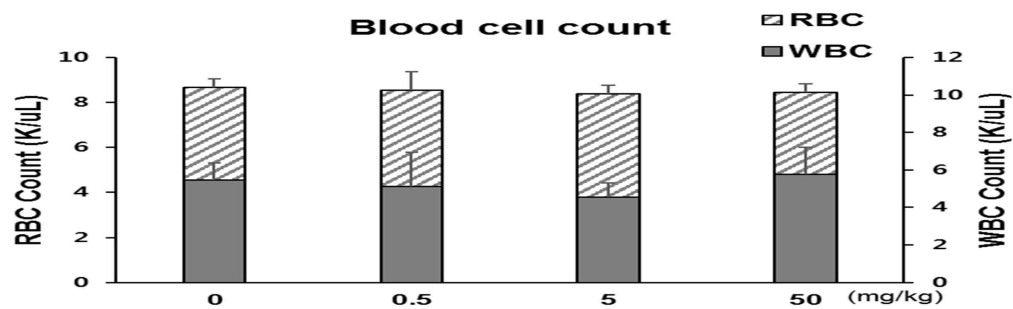
도면32



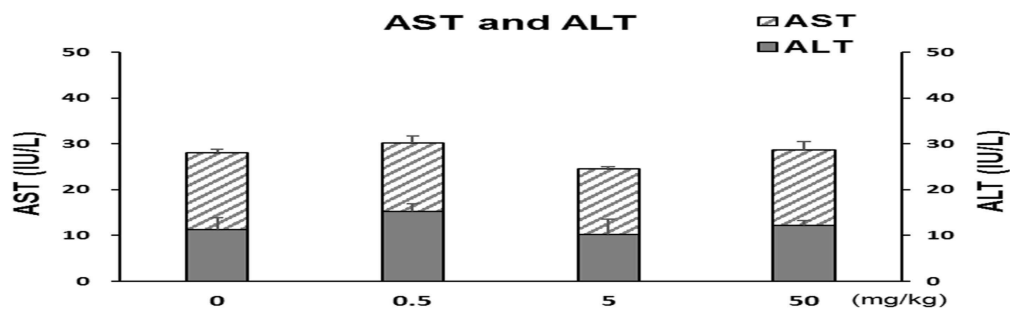
도면33



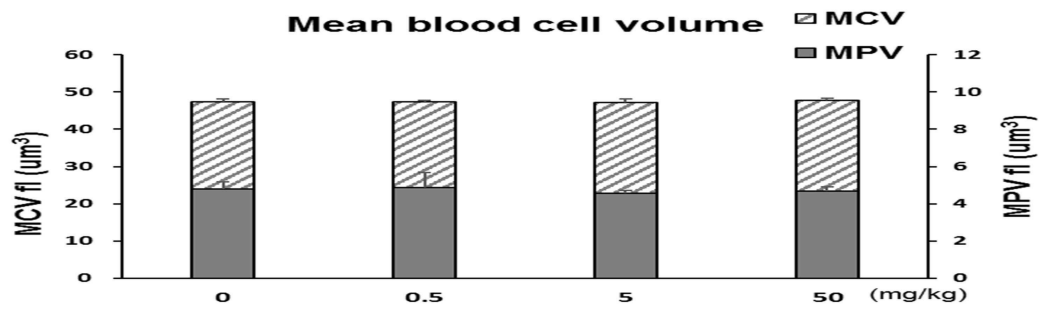
도면34



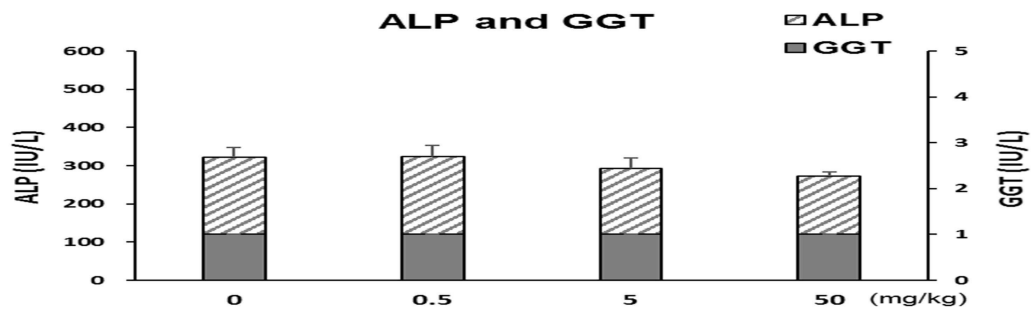
도면35



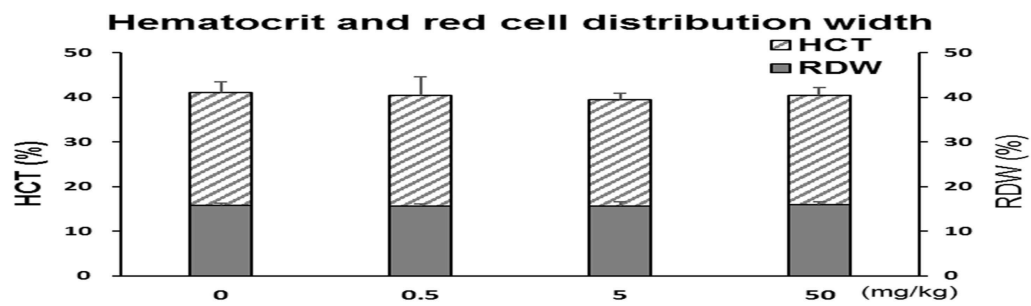
도면36



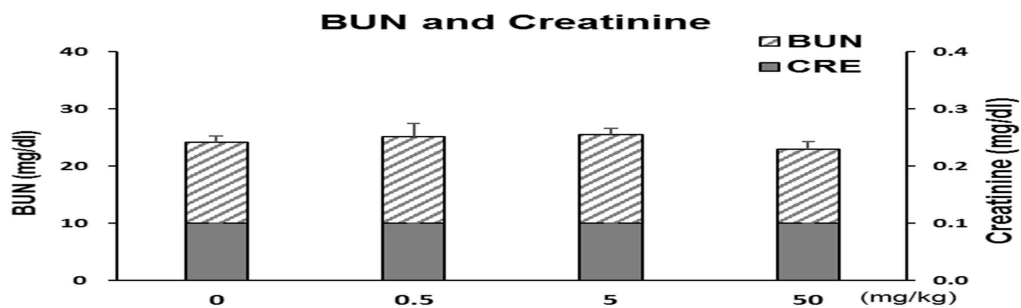
도면37



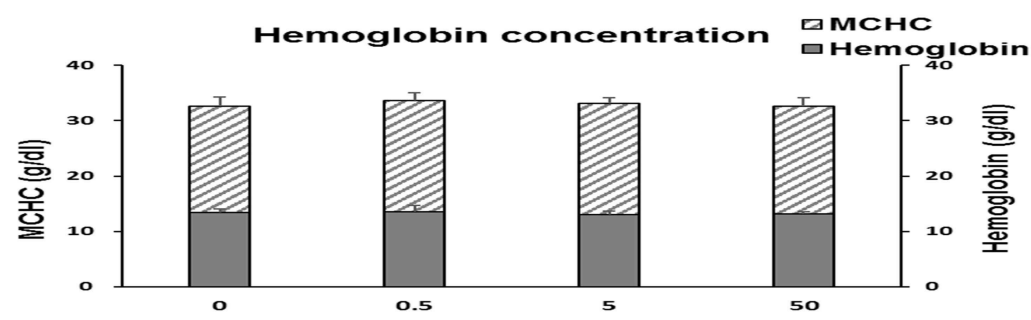
도면38



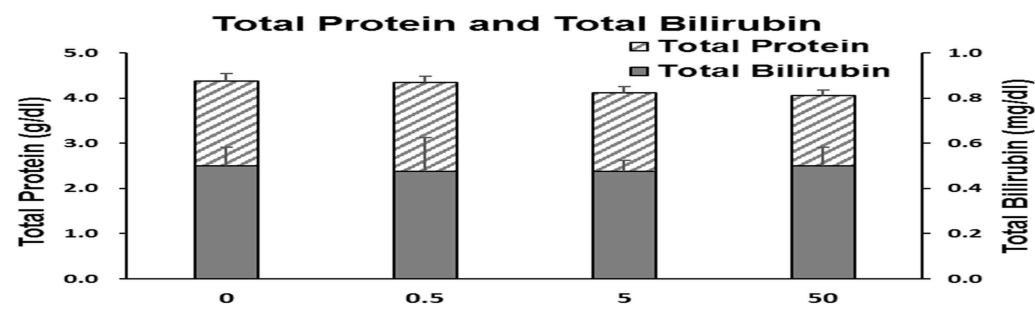
도면39



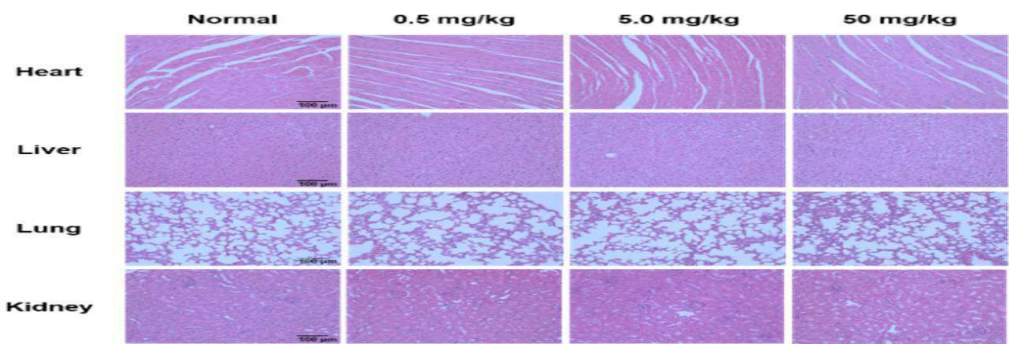
도면40



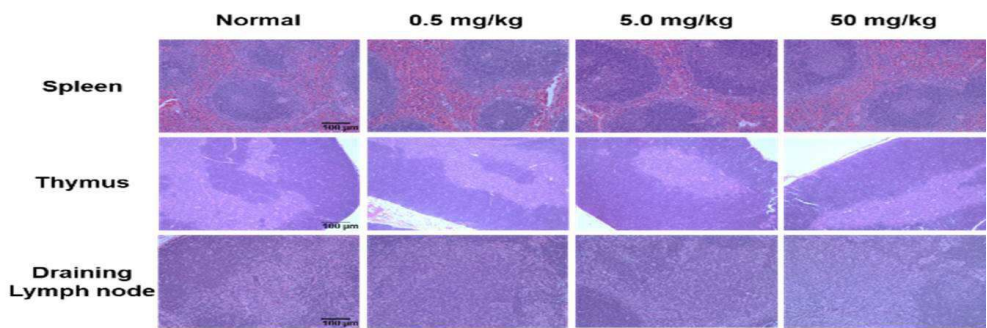
도면41



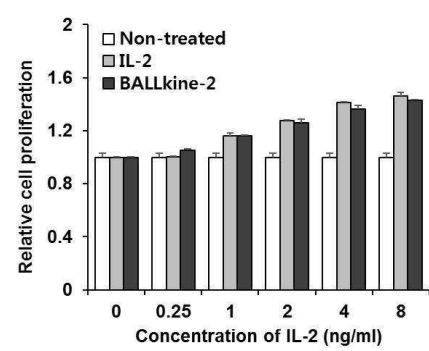
도면42



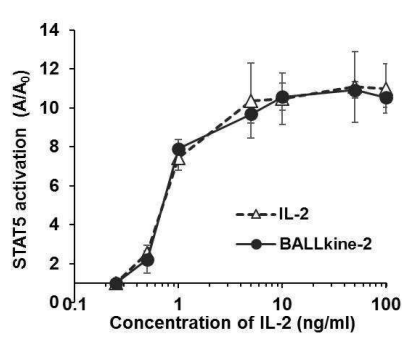
도면43



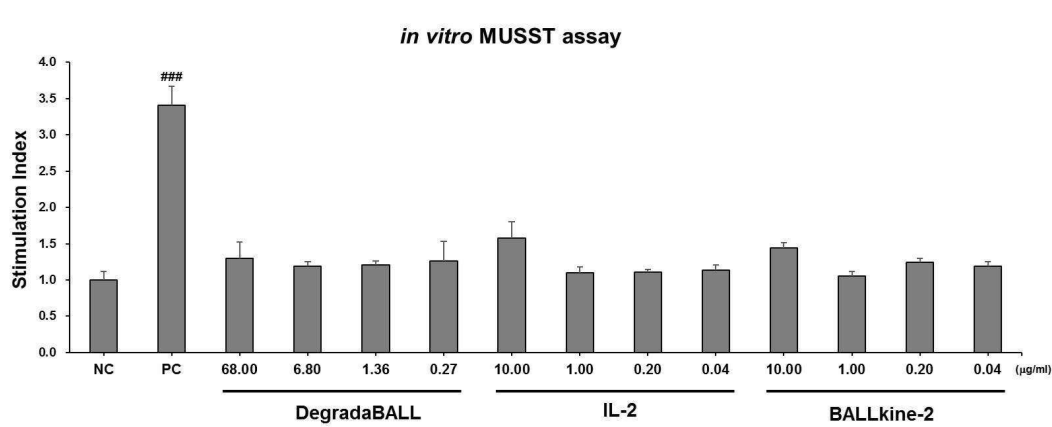
도면44



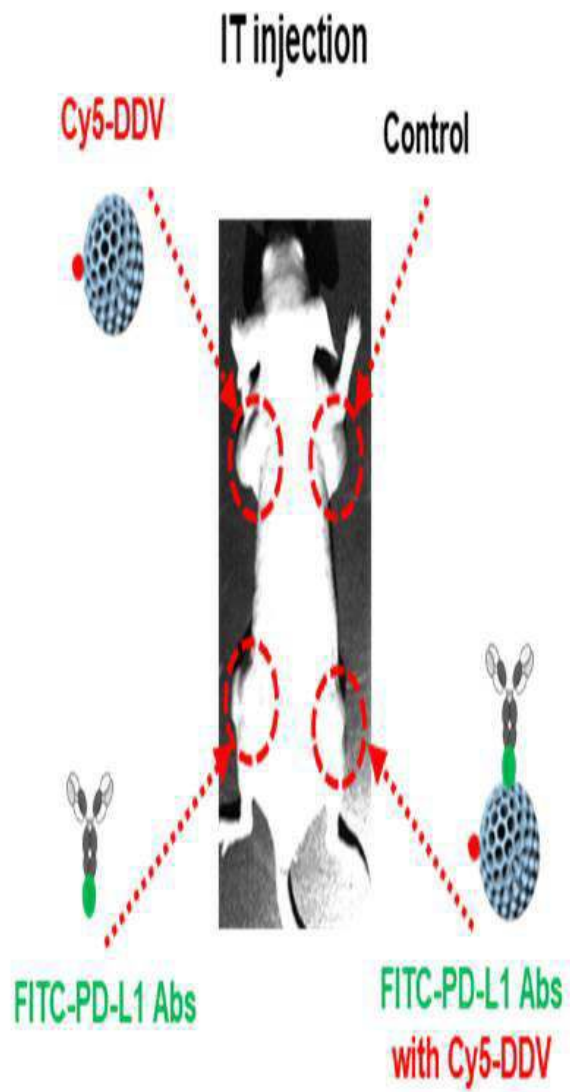
도면45



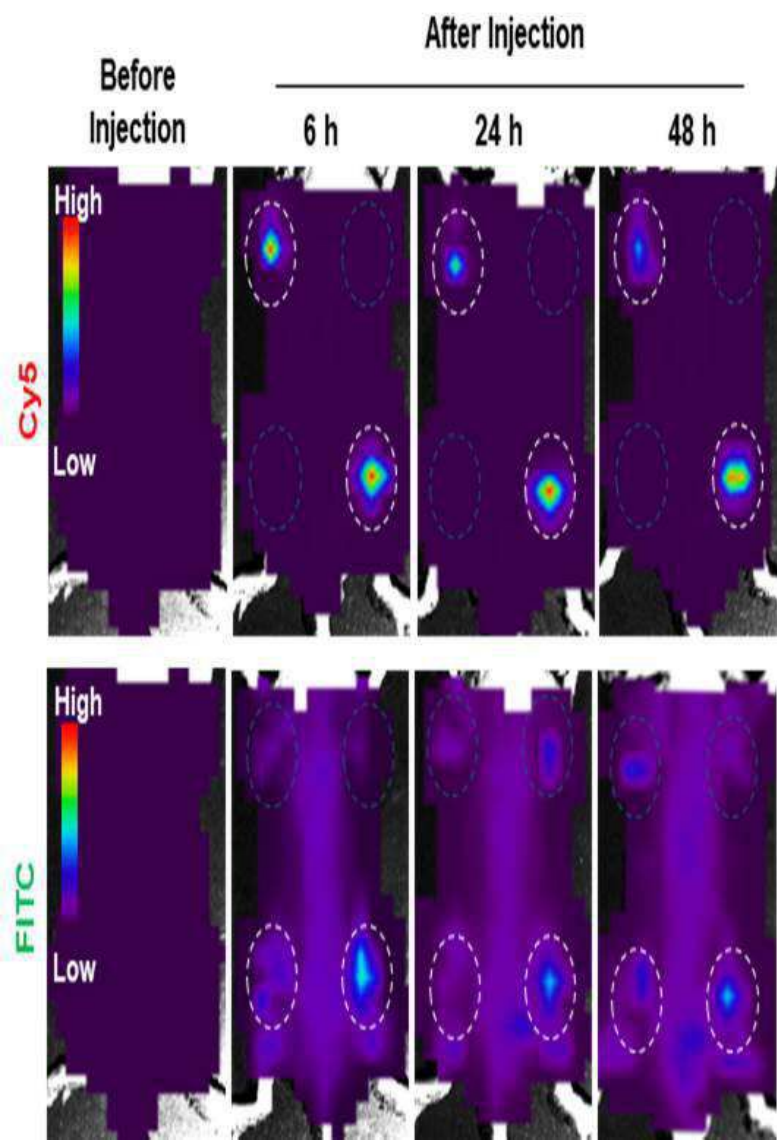
도면46



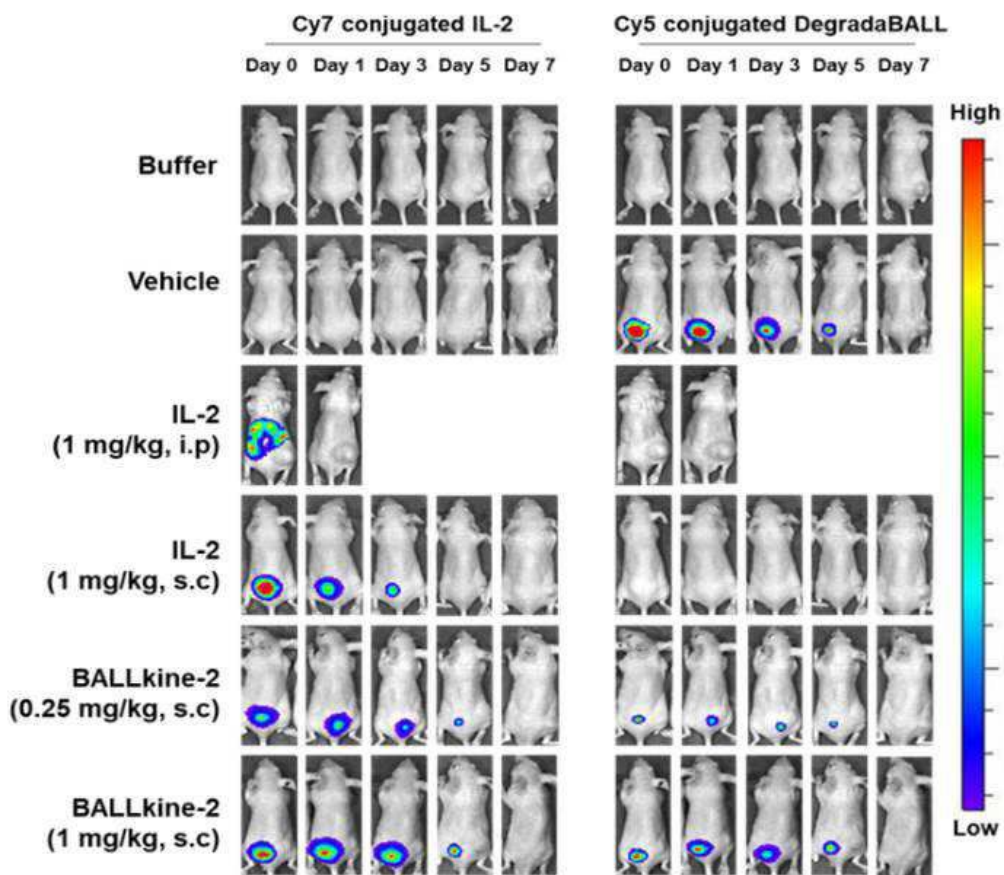
도면47



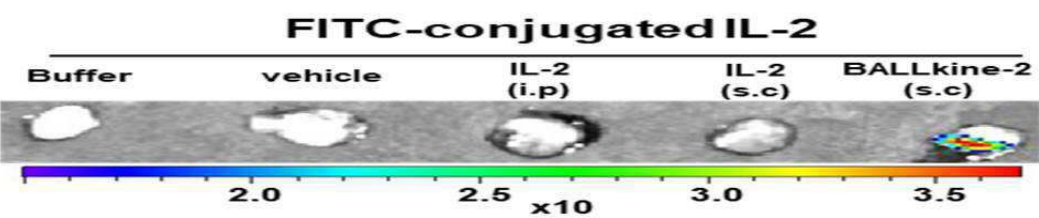
도면48



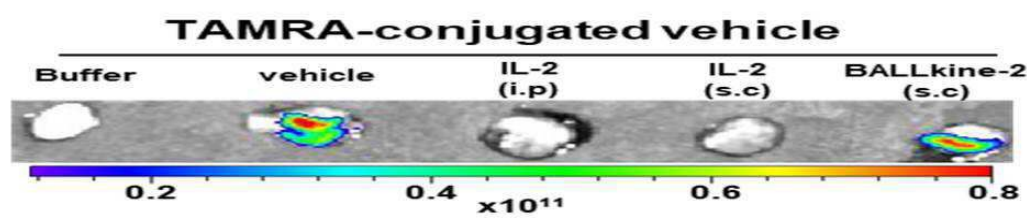
도면49



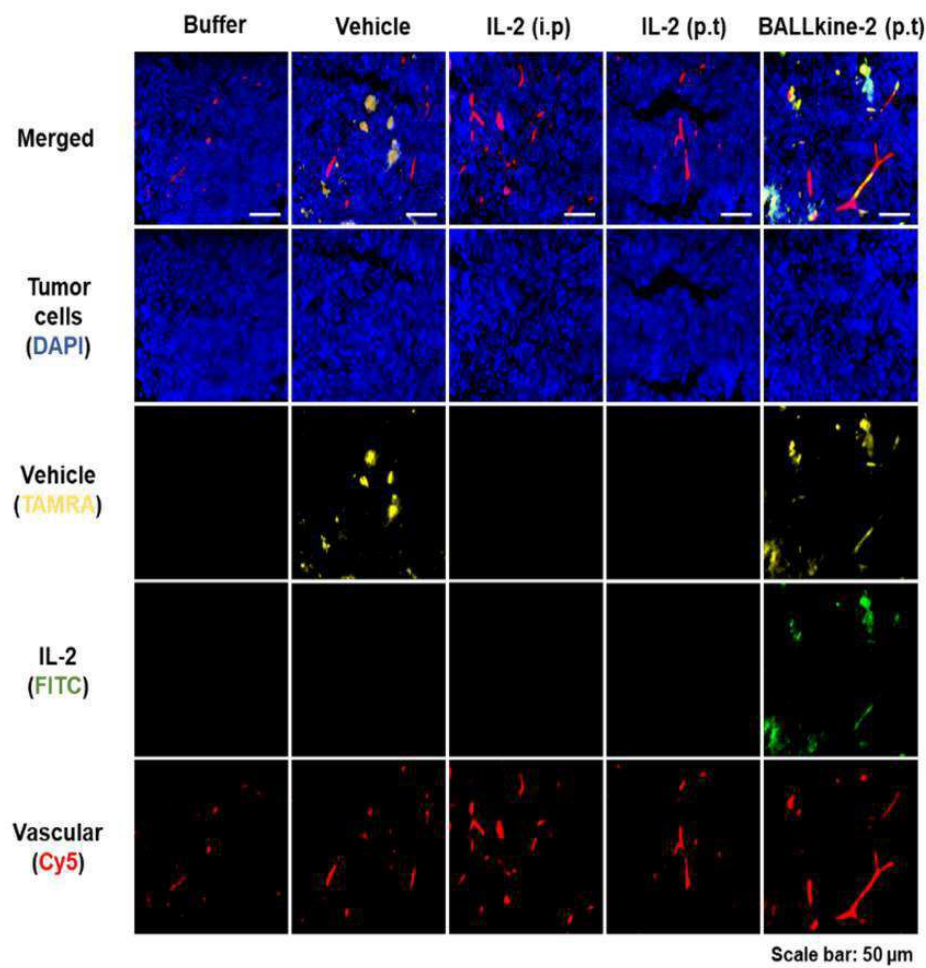
도면50



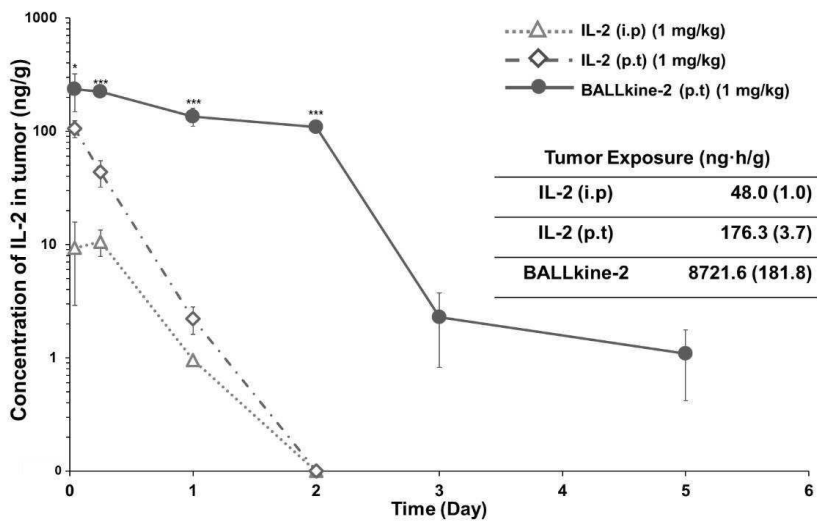
도면51



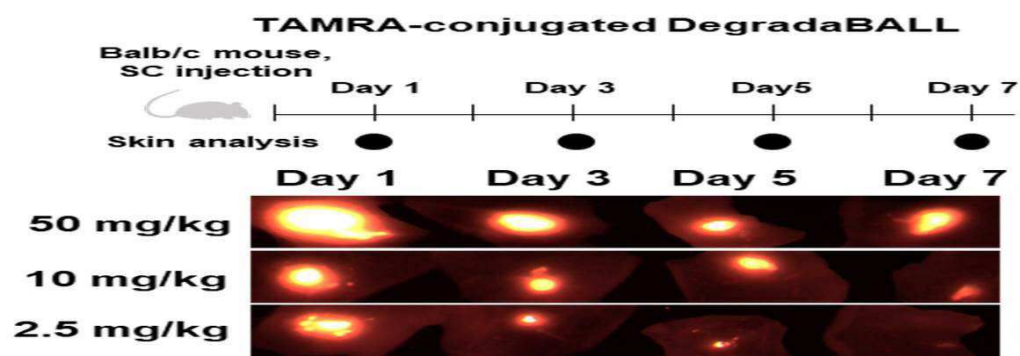
도면52



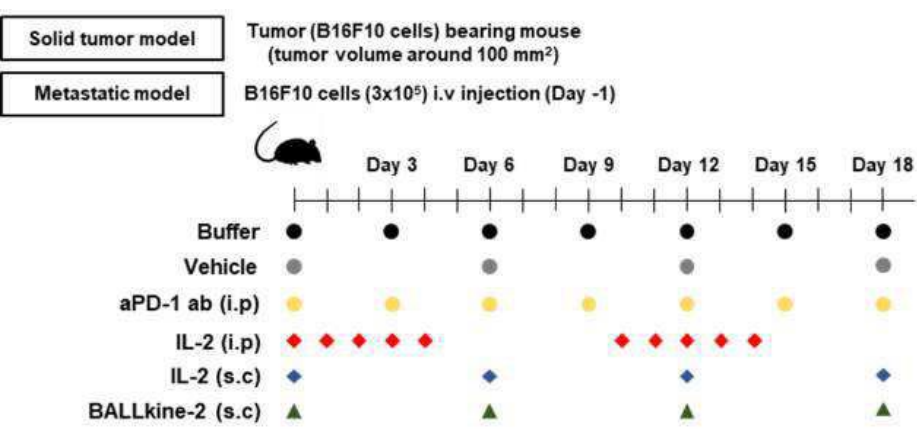
도면53



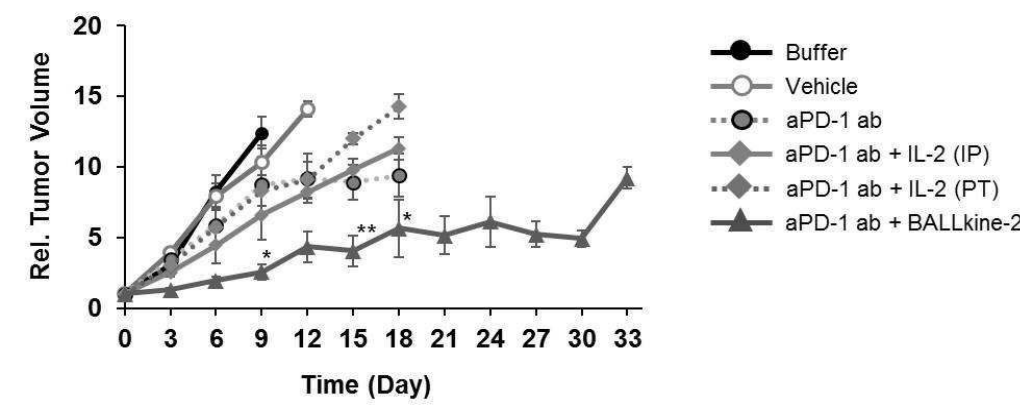
도면57



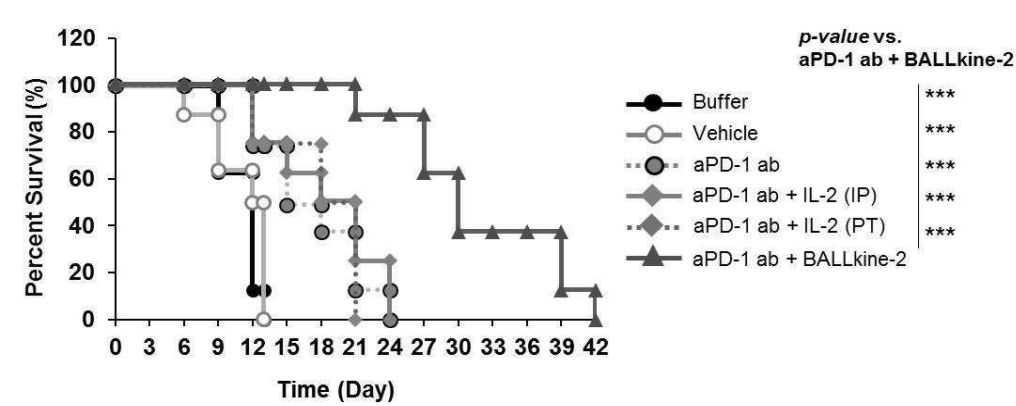
도면58



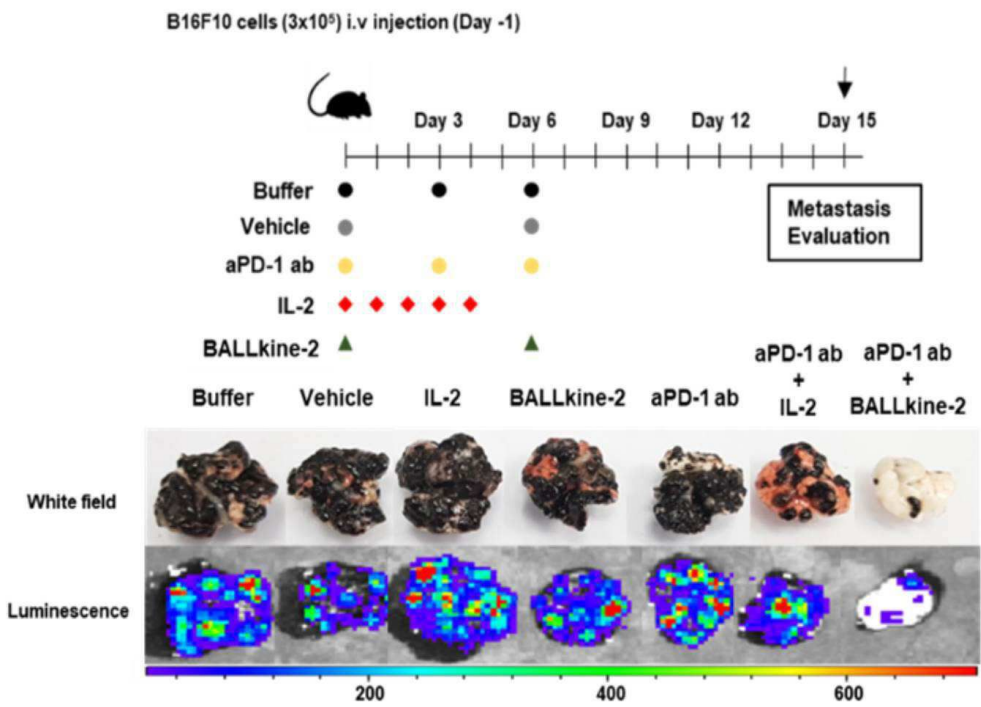
도면59



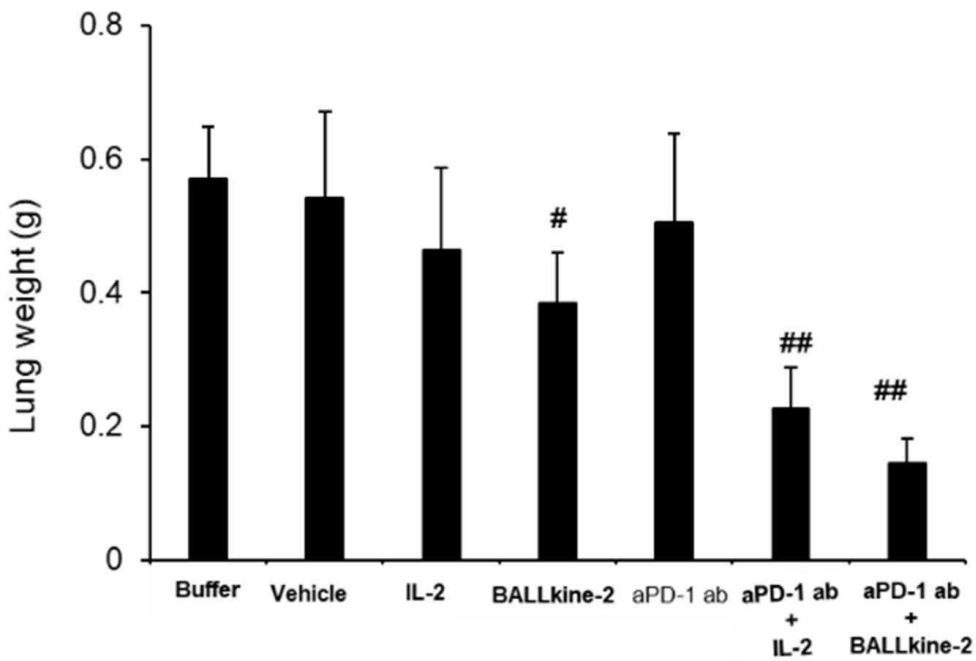
도면60



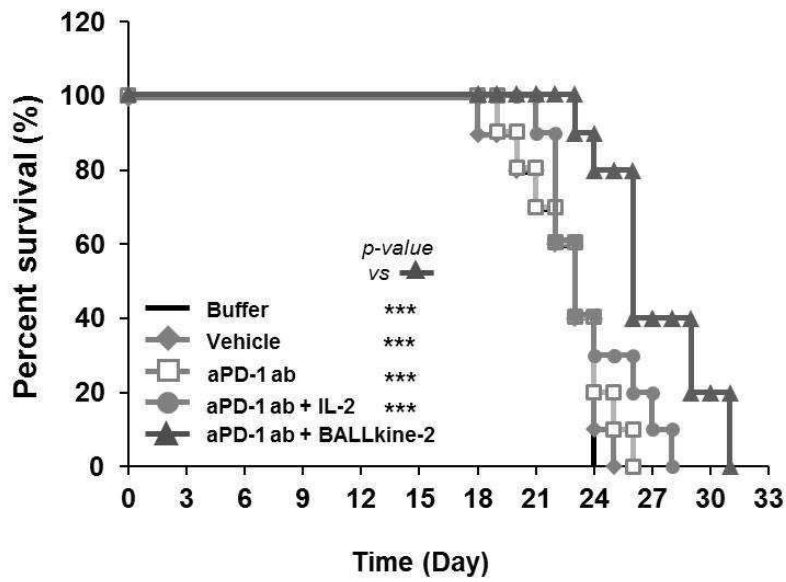
도면61



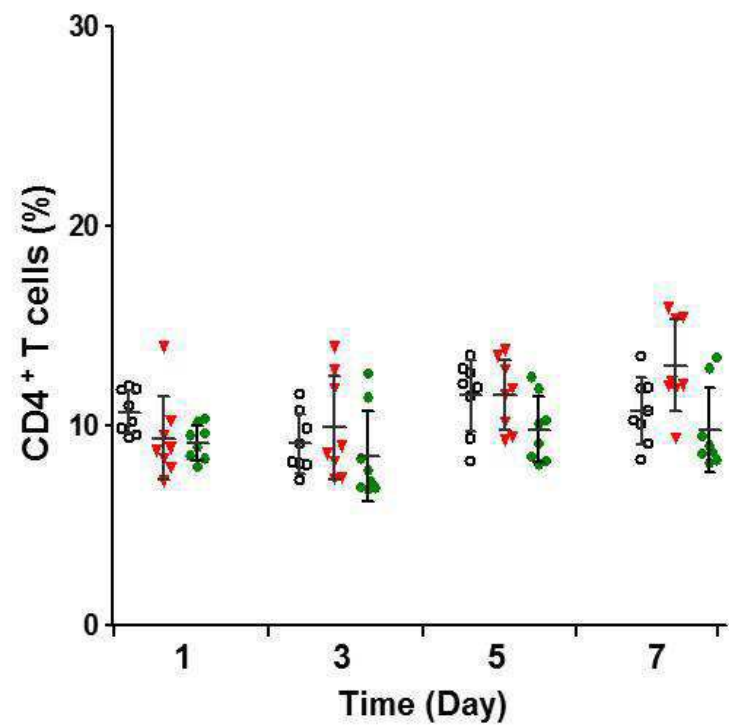
도면62



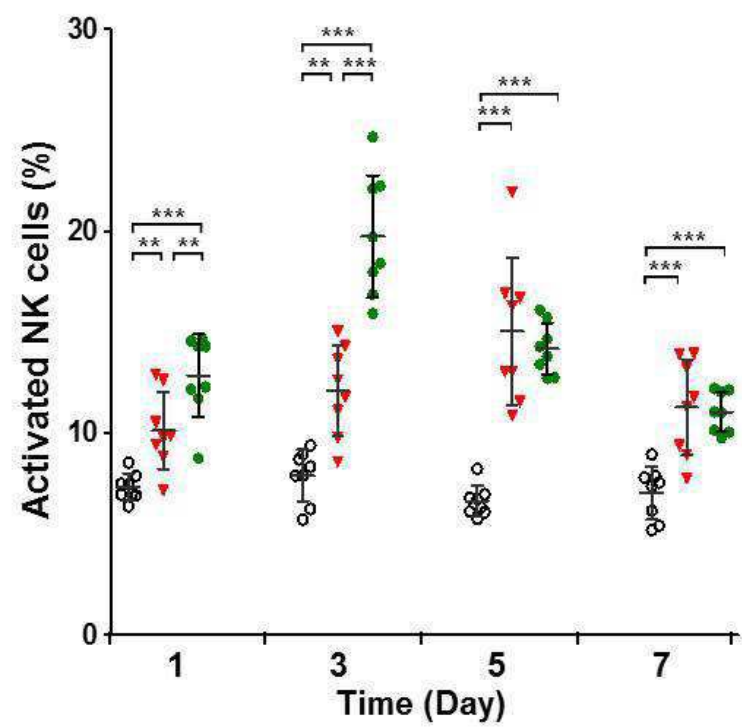
도면63



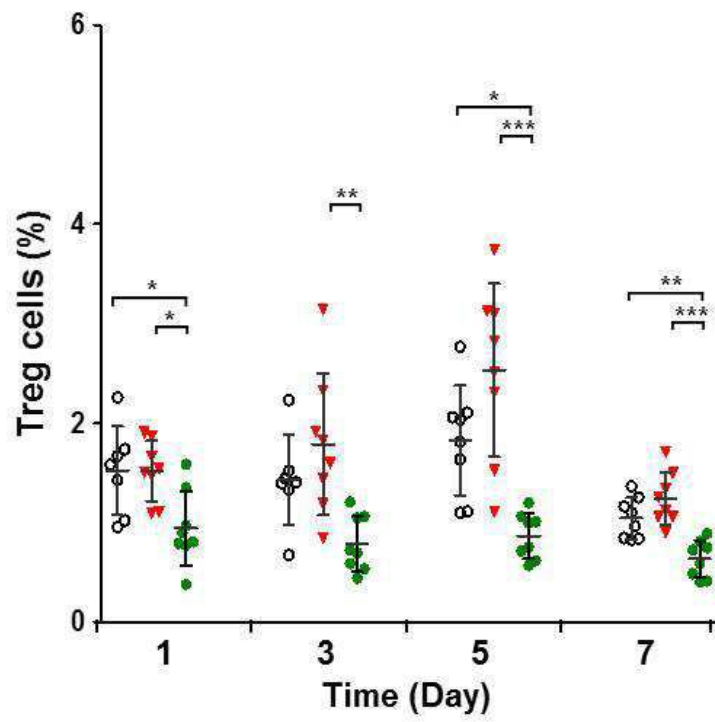
도면66



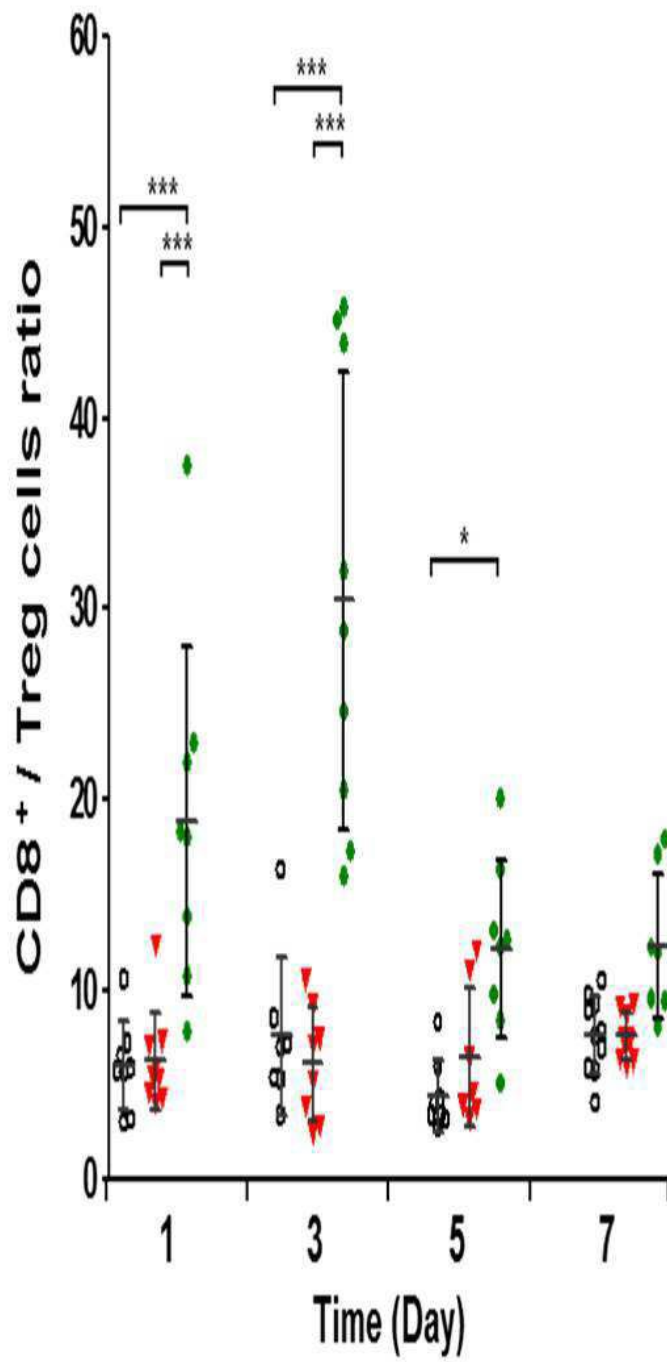
도면67



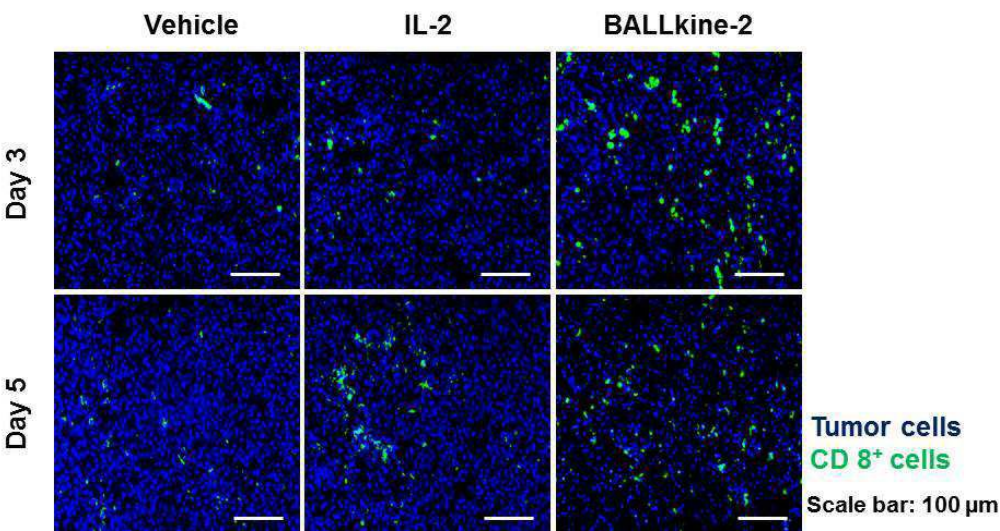
도면68



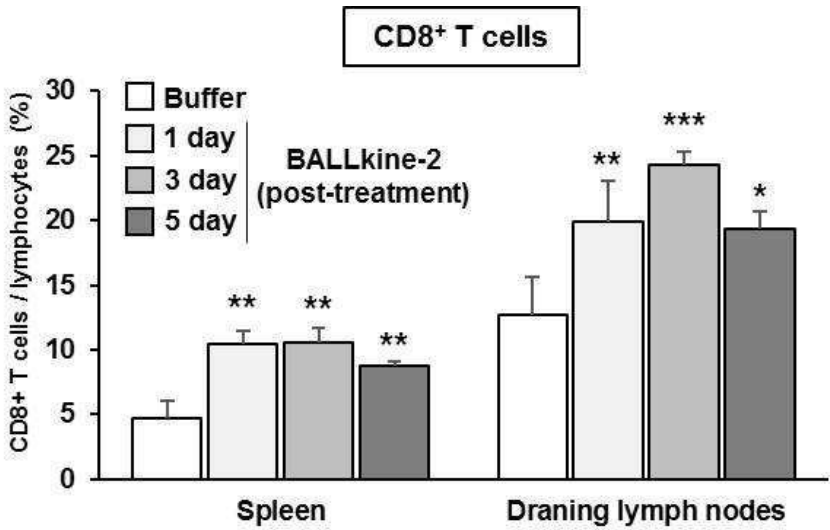
도면69



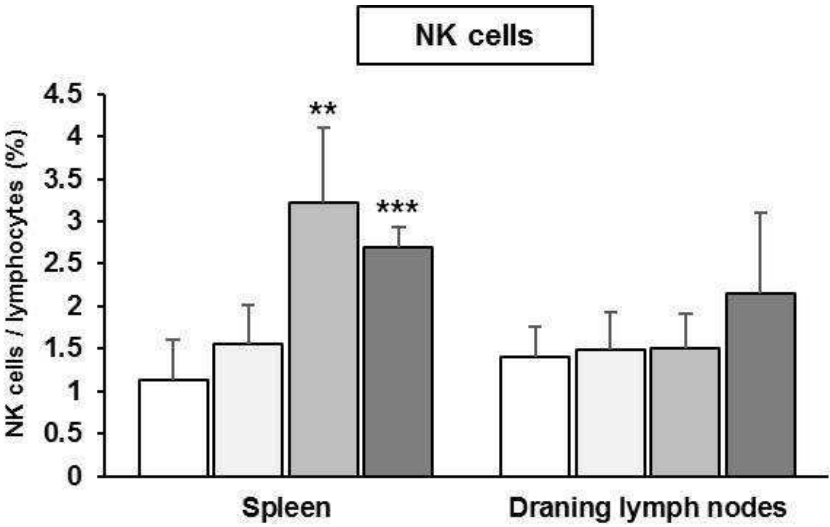
도면70



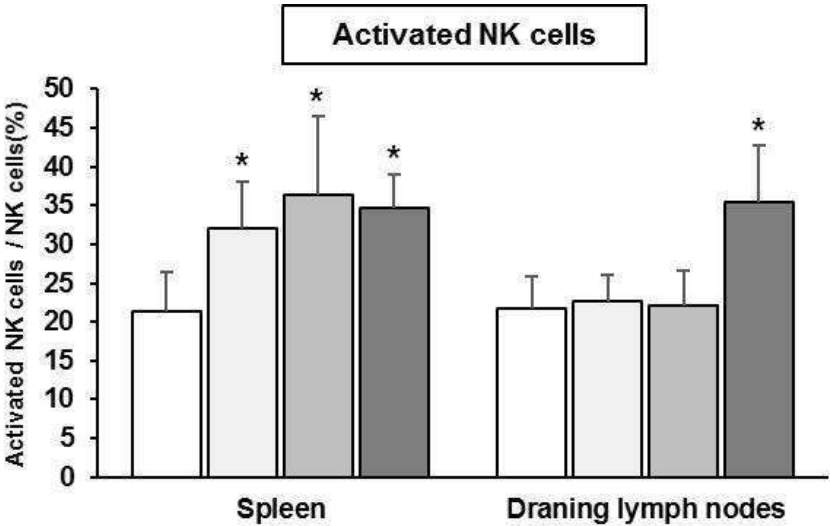
도면71



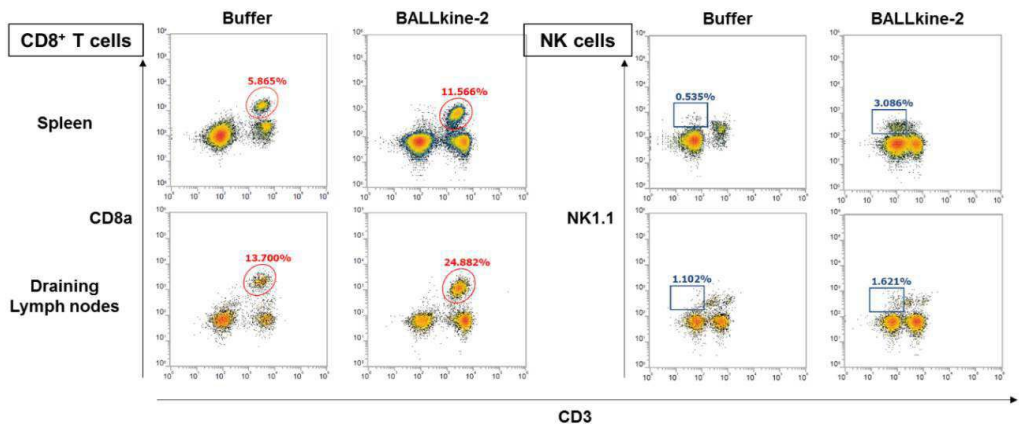
도면72



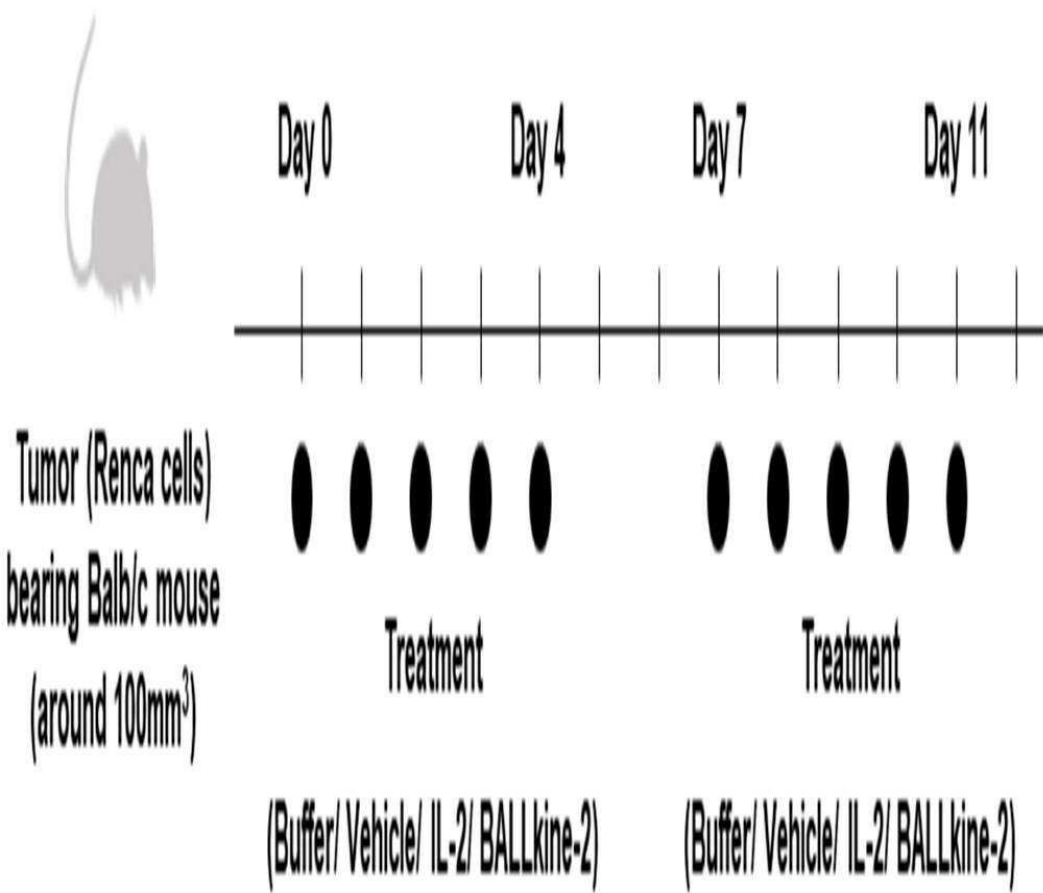
도면73



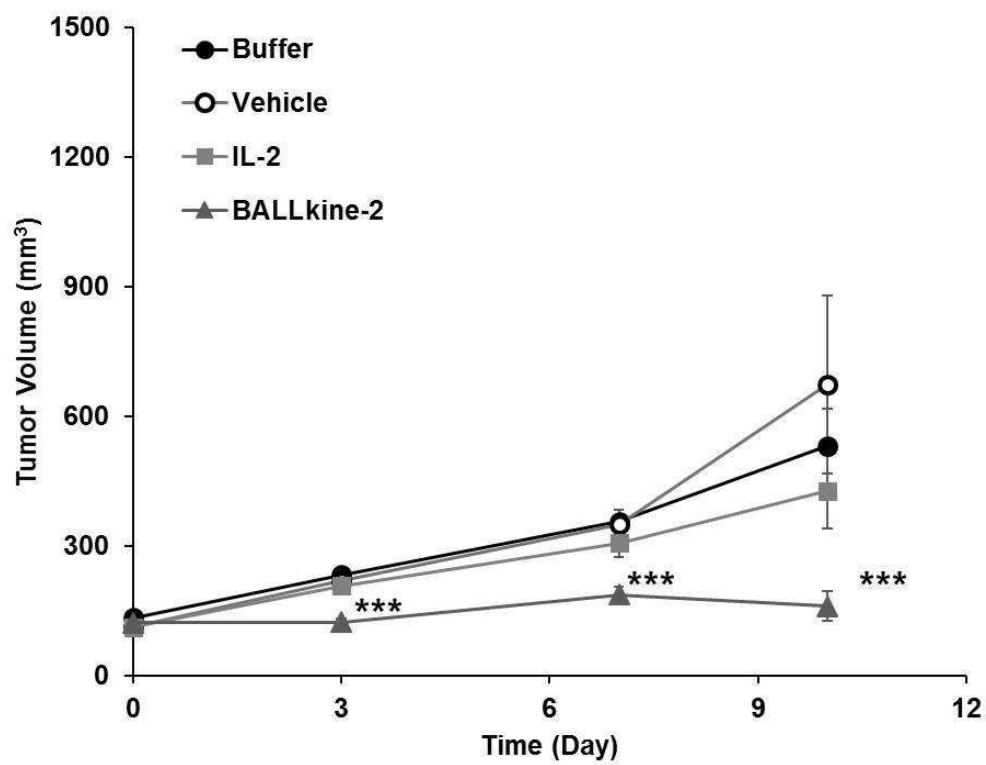
도면74



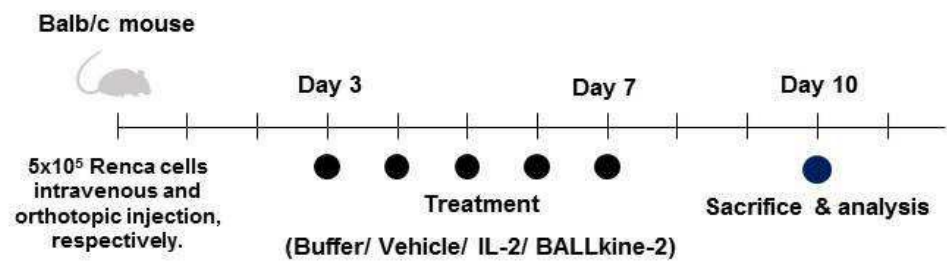
도면75



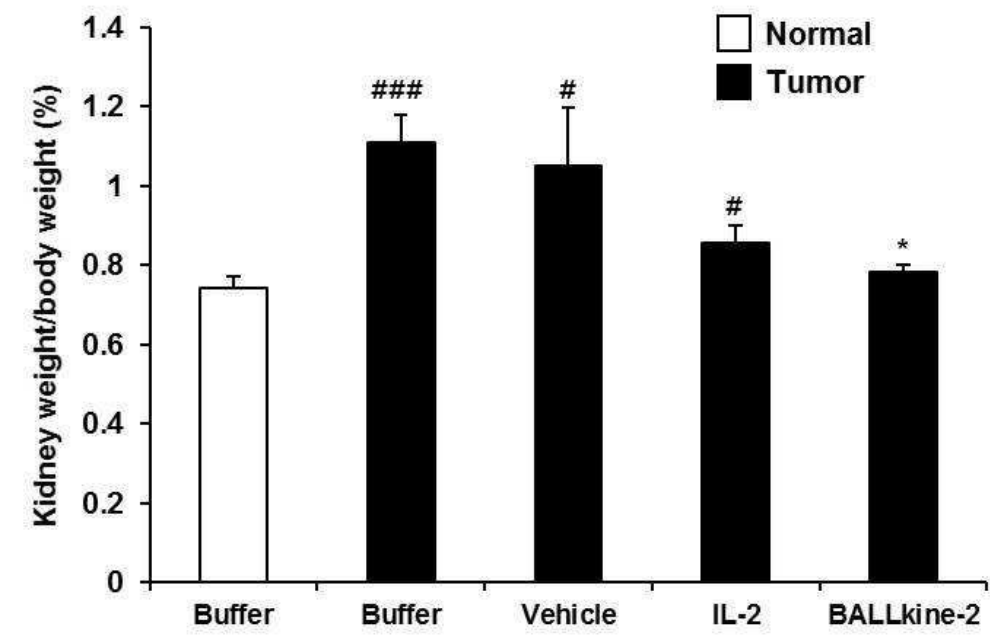
도면76



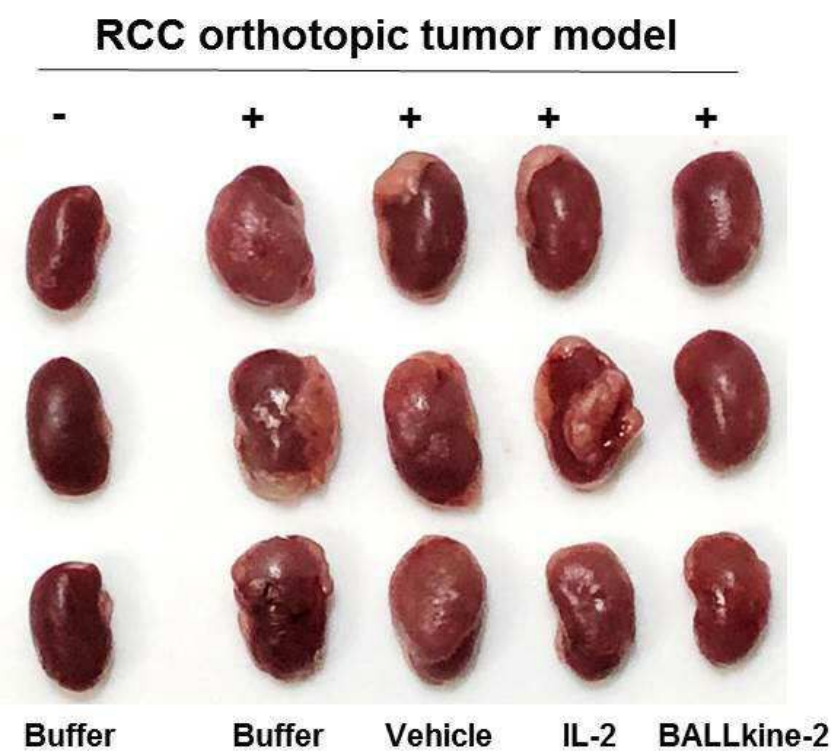
도면77



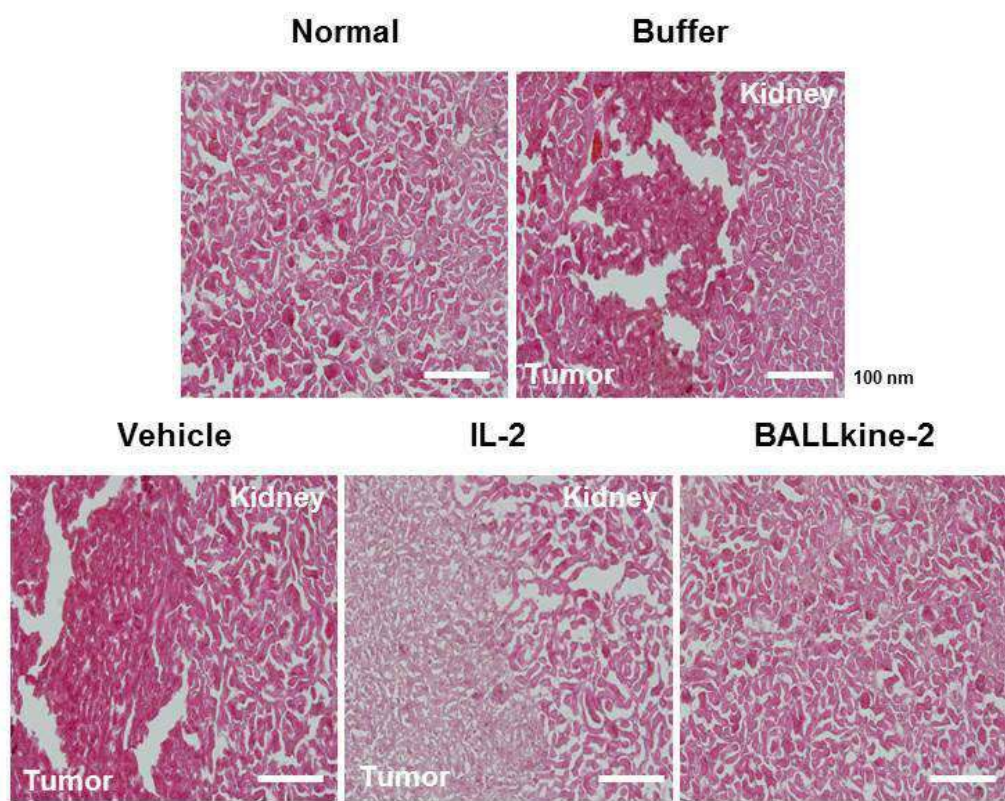
도면78



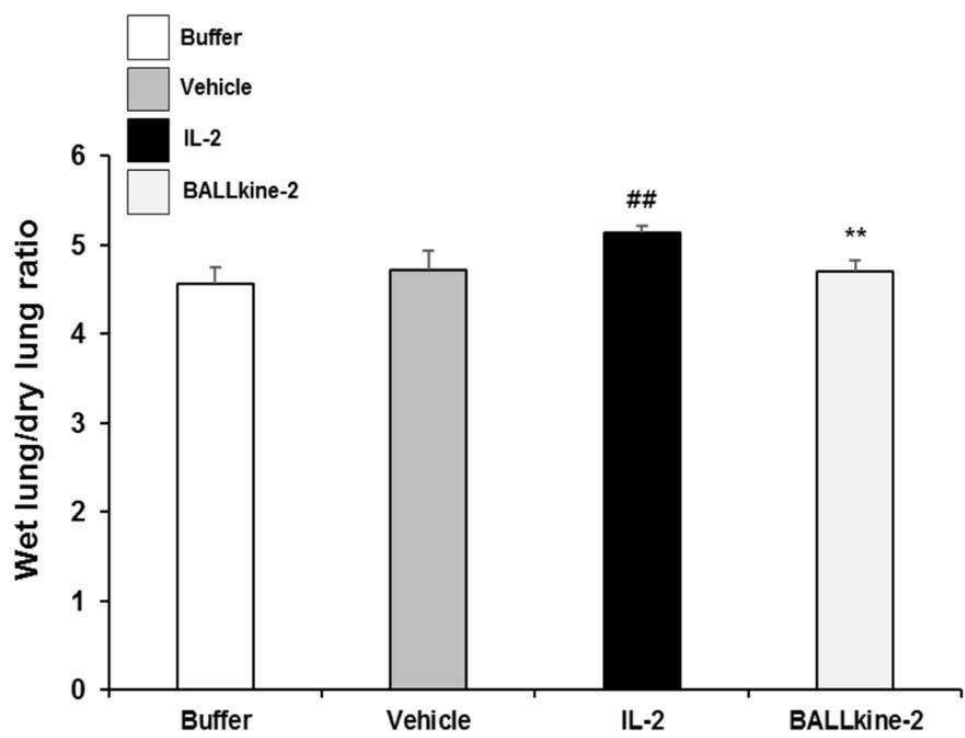
도면79



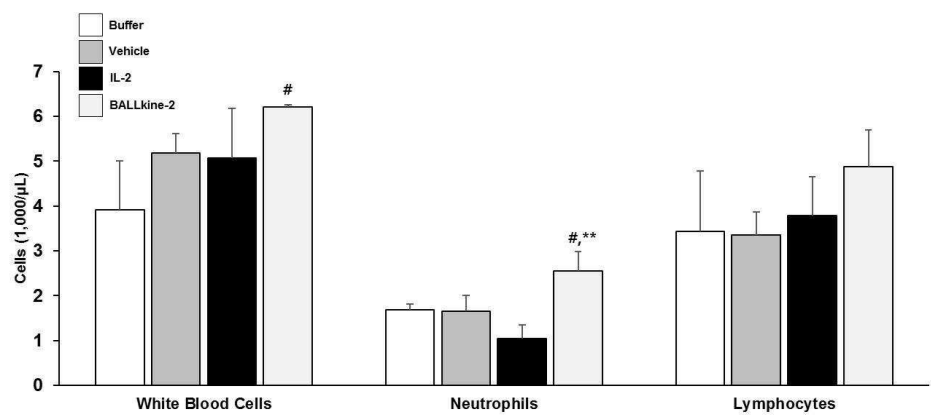
도면80



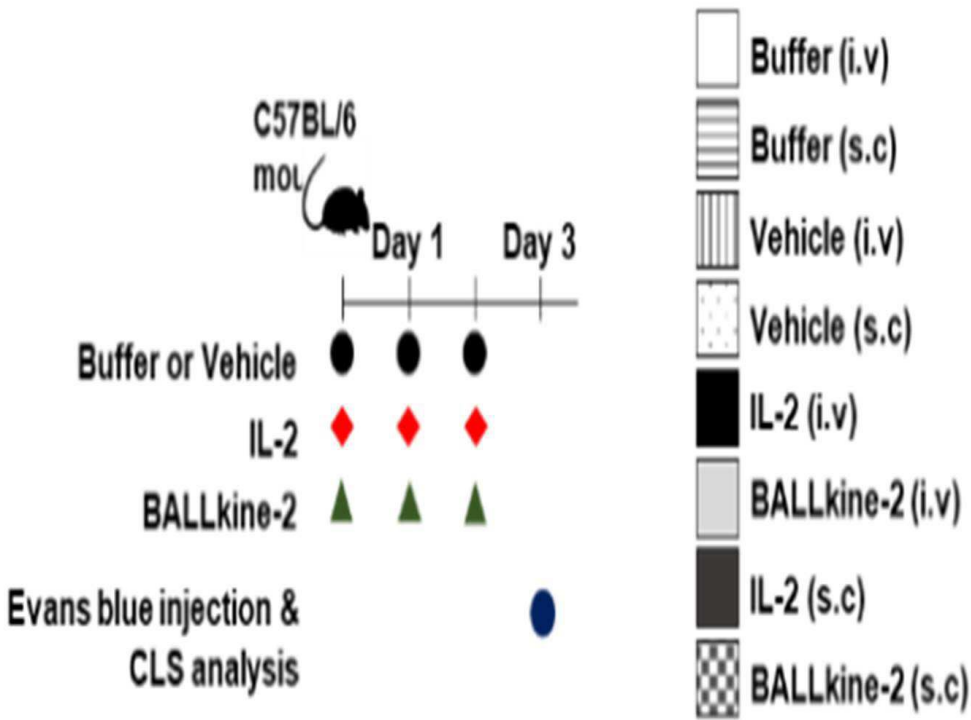
도면81



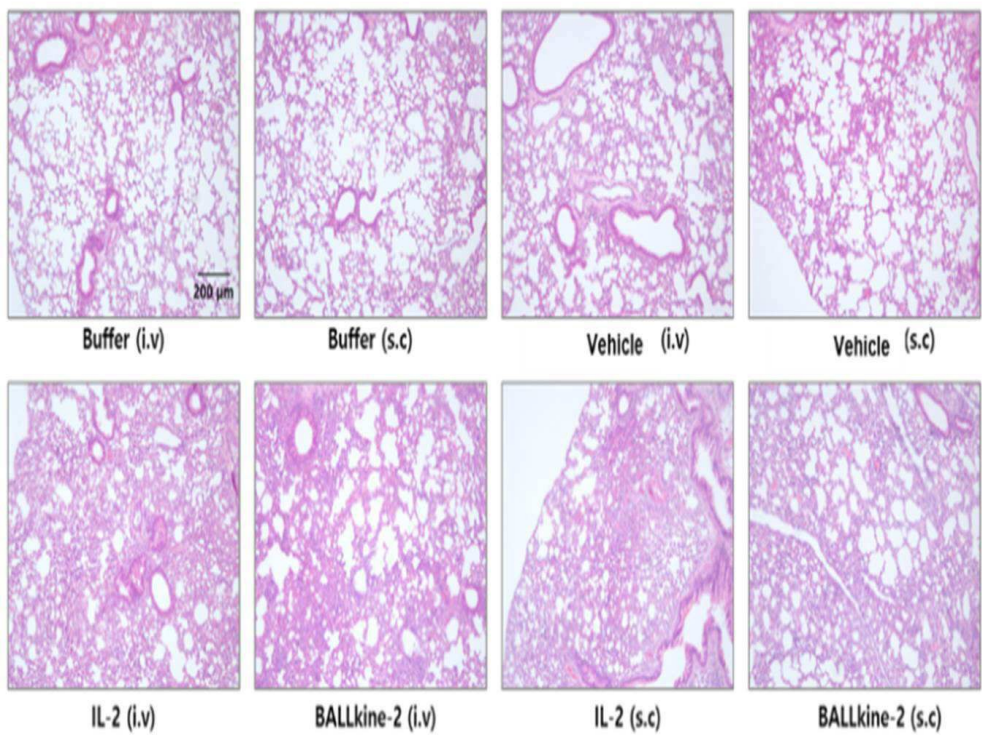
도면82



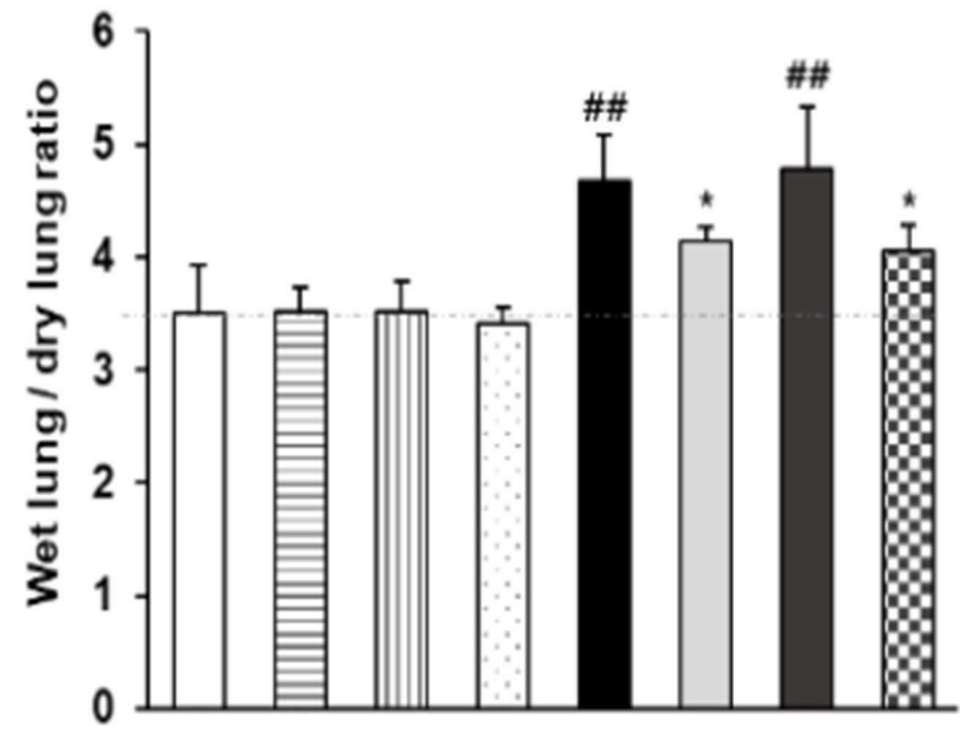
도면83



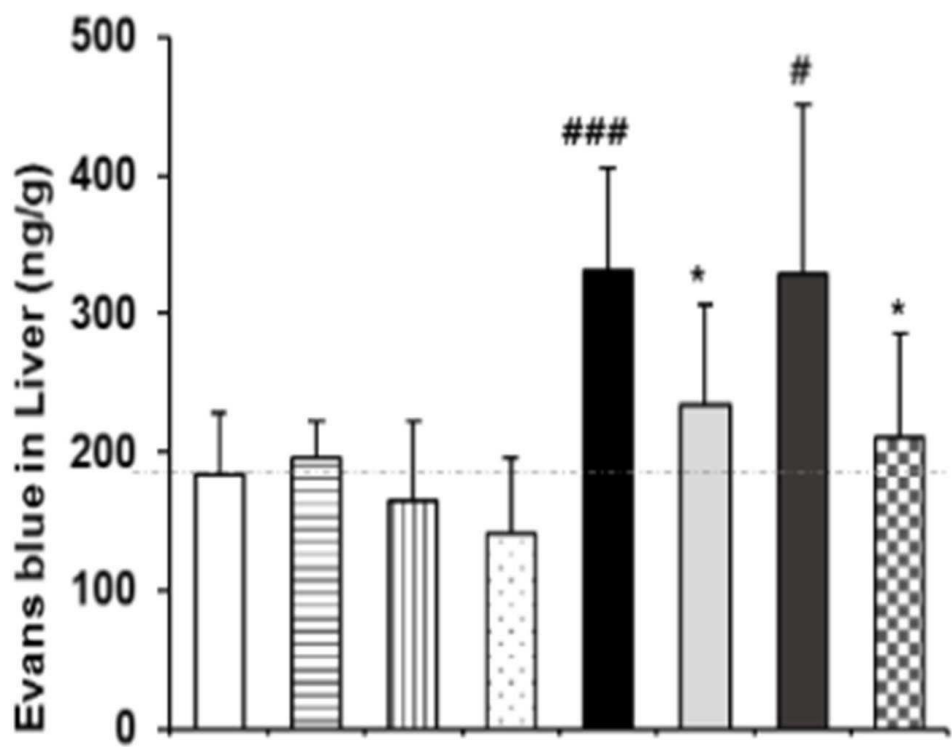
도면84



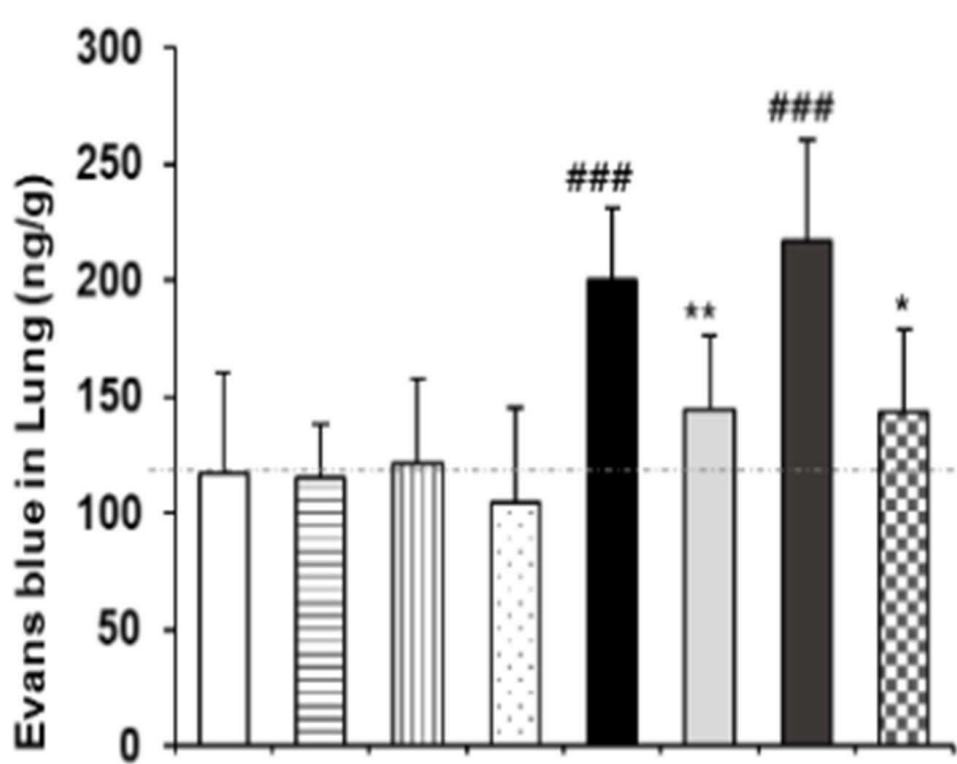
도면85



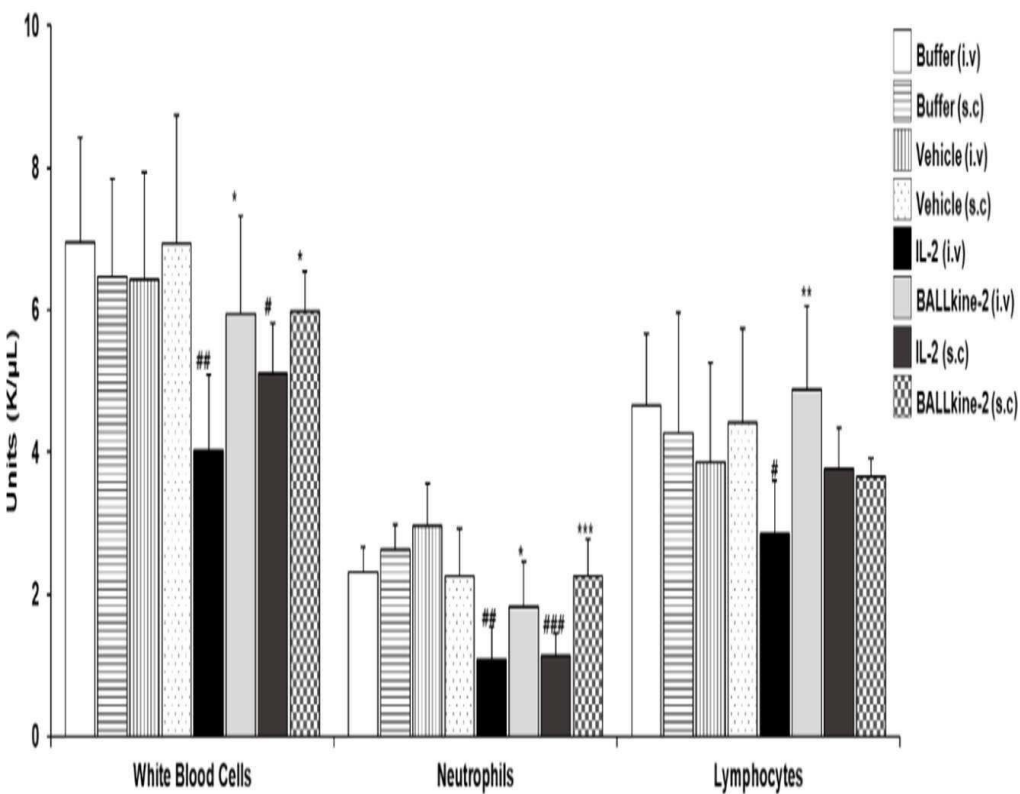
도면86



도면87

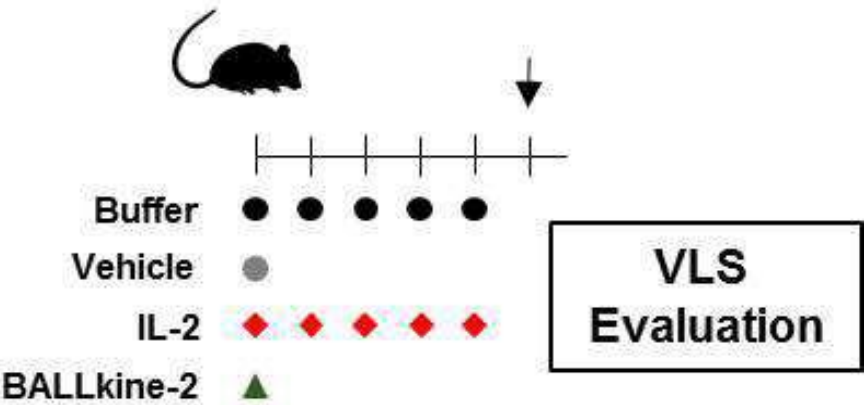


도면88

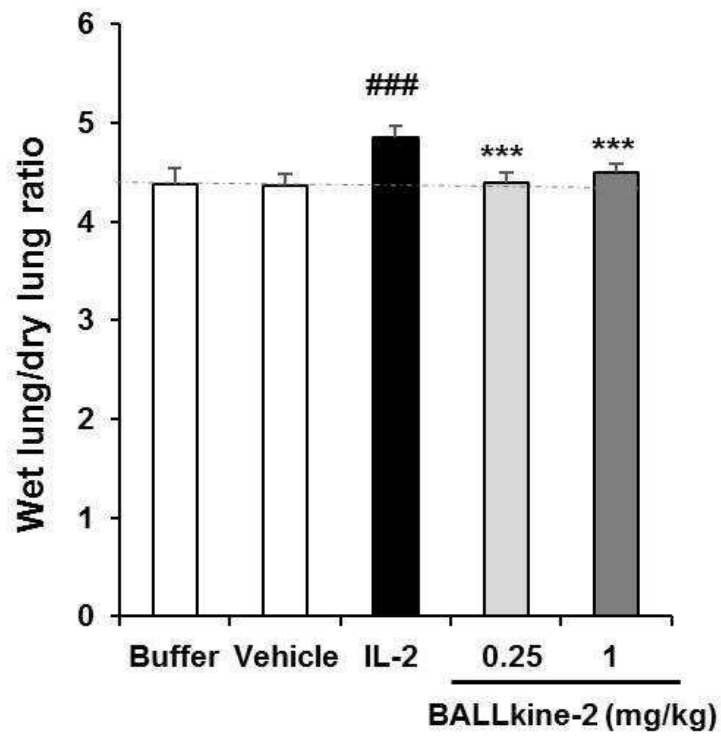


도면89

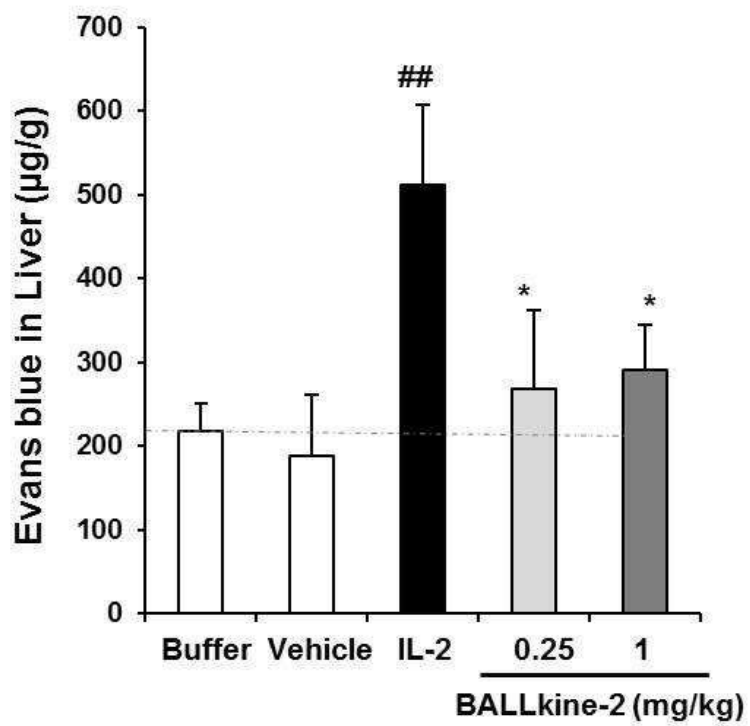
Tumor (B16F10 cells) bearing mouse
(tumor volume around 100 mm²)



도면90



도면91



도면92

