

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 8월 27일 (27.08.2020)

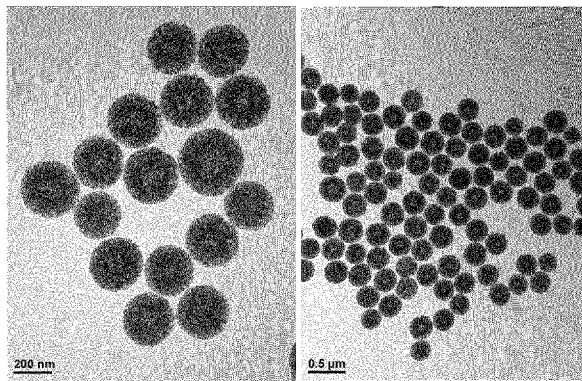


(10) 국제공개번호
WO 2020/171680 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 9/14 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/002648
- (22) 국제출원일: 2020년 2월 24일 (24.02.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
62/808,974 2019년 2월 22일 (22.02.2019) US
10-2020-0022598 2020년 2월 24일 (24.02.2020) KR
- (71) 출원인: 주식회사 레모넥스 (LEMONEX INC.) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, 서울대학교 (신림동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 원철희 (WON, Cheol Hee); 08741 서울시 관악구 솔밭로7길 16, 301동 803호 (봉천동,낙성대현대홈타운), Seoul (KR). 민달희 (MIN, Dal Hee); 08741 서울시 관악구 솔밭로7길 16, 301동 803호 (봉천동,낙성대현대홈타운), Seoul (KR). 김정호 (KIM, Jung Ho); 02595 서울시 동대문구 답십리로38길 14, 103동 302호, Seoul (KR). 김준 (KIM, Jun); 08799 서울시 관악구 낙성대역 8길 50-4, 101호(봉천동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인리채 (LEECHAE INTELLECTUAL PROPERTY); 06236 서울시 강남구 테헤란로26길12, 3층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR IMMUNE ACTIVITY OR FOR PREVENTING OR TREATING CANCER

(54) 발명의 명칭: 면역활성 또는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for enhancing immune activity and a pharmaceutical composition for preventing or treating a cancer, the pharmaceutical composition comprising: particular blunt-ended hairpin RNAs; and porous silica particles supporting the RNAs inside the pores, wherein the porous silica particles have an average pore diameter of 7 to 25nm, have the inside of the pores positively charged and thus sufficiently support the RNAs and stably deliver same into the body.

(57) 요약서: 본 발명은 특정의 평활 말단의 헤어핀 RNA; 및 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자;를 포함하고, 상기 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경이 7 내지 25nm 이고, 그 기공 내부가 양전하로 대전됨으로써, 상기 RNA를 충분히 담지하고 체내에 안정적으로 전달할 수 있는 면역 활성 개선용 약학 조성물 및 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.



WO 2020/171680 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 면역활성 또는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물 기술분야

[1] 본 발명은 면역활성 또는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 항체-기반 면역반응의 유도에 기반하는 표준 백신 전략은 천연두, 소아마비 및 파상풍과 같은 이전의 치명적인 다수의 감염성 질환을 근절시키거나 거의 근절시켰다. 그러나, 이러한 고전적인 인간 백신은 HIV 및 간염과 같은 다른 감염성 질환 및 암과 같은 비감염성 질병에 사용하기에 비효율적이거나 안전하지 않았다.

[3] 세포 면역반응의 유도를 목표로 하는 차세대 면역치료 제품은 병원체 자체 대신에 암 세포 및 감염된 세포를 인식하고 사멸시킴으로써 전통적인 백신의 한계를 극복할 수 있다. 핵산 백신 및 특히 바이러스 벡터는 진료소로 번역될 수 있는 큰 잠재력을 보여주었다.

[4] 암 세포 및 많은 감염 인자는 면역계를 피하는 방법이 갖고 있고 이로 인해 효과적인 백신을 창출하기가 어렵다. 고전적인 백신은 종종 최적의 효과를 위해 보조제(adjuvant), 예를 들어 알루미늄 염을 필요로 하지만, 통상적인 보조제는 전형적으로 세포 면역반응의 불량한 향상제이다. 바이러스 벡터에 의해 유발되는 세포 면역반응의 질과 정도를 개선시키기 위한 몇 가지 전략이 제안되었다. 벡터-기반 면역요법에 의해 유도되는 세포 면역반응을 개선시키는 새로운 종류의 유전자 보조제가 개발되었다. 유전자 보조제는 면역 조절 분자를 코딩하는 DNA 서열로 이루어진다.

[5] 스톤 등(WO 2014/039961)은 인터페론 알파 및 베타의 분비를 유도하여 인터페론 자극된 유전자의 발현을 유도하는 유전자 보조제의 용도를 개시하고 있다. 상기 접근법에서, 핵산 백신은, 임의로 마커 단백질 또는 항원을 코딩하는 전이유전자(transgene)에 추가하여, 세포질내 도메인이 면역 이펙터 또는 어댑터 단백질, 예컨대 IPS1 단백질로 대체된 LMP1 단백질의 막관통(transmembrane) 부분을 포함하는 융합 단백질을 코딩한다. IFN- β 프로모터 자극인자(IPS1; MAVS, VISA 또는 카디프(Cardif)로서도 지칭됨)의 활성화는 STING(인터페론 유전자의 자극인자) 경로를 통해 강력한 T 세포 반응을 생성한다. 세포에서 발현될 때, LMP1의 막관통 도메인은 IPS1가 세포질내 클러스터(cluster)로 응집될 수 있게 하는 클러스터를 자발적으로 형성하여 STING 경로를 활성화한다. 전장 뮤린(murine) IPS1과 융합된 LMP1의 막관통 도메인은 IFN- α , IFN- β 및 IL-6의 분비를 유도하고 또한 마우스 대식세포에서 성숙 마커(CD40 및 CCR7) 및 활성화 마커(CD80 및 CD86)의 발현을 유도하는 것으로 나타났다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 면역 활성 개선용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
 [8] 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
 [9]

과제 해결 수단

- [10] 1. 하기 화학식 1로 표시되는 평활 말단의 헤어핀 RNA; 및 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자;를 포함하고,
 [11] 상기 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경이 7 내지 25nm이고, 그 기공 내부가 양전하로 대전된 것인 면역 활성 개선용 약학 조성물:
 [12] [화학식 1]
 [13] $5'-P_a-((N1-X1)_b-N2)-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'$
 [14] (식 중, P는 인산기이고,
 [15] a는 2 내지 5의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고,
 [16] UUCG는 헤어핀의 루프를 형성하는 염기이고,
 [17] N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 1 내지 5개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고,
 [18] N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고,
 [19] b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).
 [20] 2. 위 1에 있어서, 상기 RNA는 하기 화학식 2로 표시되는 것인, 조성물:
 [21] [화학식 2]
 [22] $5'-P_a-((N1-X1)_b-N2)-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'$
 [23] (식 중, P는 인산기이고,
 [24] a 및 b는 2 내지 4의 정수이고,
 [25] N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고,
 [26] N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고,
 [27] b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).
 [28] 3. 위 1에 있어서, 상기 RNA는 그 길이가 14 내지 100 nt인, 조성물.
 [29] 4. 위 1에 있어서, 상기 RNA는 서열번호 1 내지 25 중 어느 하나의 서열 및 그 5' 말단에 결합된 2 내지 4개의 인산기로 이루어진 것인, 조성물.
 [30] 5. 위 1에 있어서, 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자의 제타 전위는 5 내지 65 mV인, 조성물.
 [31] 6. 위 1에 있어서, 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자의 제타 전위는 35 mV 이하인 조성물.

- [32] 7. 위 1에 있어서, 상기 입자의 RNA를 담지하지 않은 상태의 제타 전위는 10 내지 70 mV인, 조성물.
- [33] 8. 위 1에 있어서, 상기 입자와 상기 RNA의 무게비는 1: 5 내지 20인 조성물.
- [34] 9. 위 1에 있어서, 상기 입자는 복수개의 기공을 가지고, 상기 기공은 입자 표면에서 내부까지 이어진 것인, 조성물.
- [35] 10. 위 1에 있어서, 상기 입자의 BET 표면적은 280 내지 680m²/g이고, 입경은 50 내지 500nm인, 조성물.
- [36] 11. 위 1에 있어서, 상기 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경 5nm 미만의 소기공 입자의 기공이 평균 직경 7 내지 25nm로 확장된 것인, 조성물.
- [37] 12. 하기 화학식 1로 표시되는 평활 말단의 헤어핀 RNA; 및 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자;를 포함하고,
- [38] 상기 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경이 7 내지 25nm이고, 그 기공 내부가 양전하로 대전된 것인 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물:
- [39] [화학식 1]
- [40] 5'-P_a-((N1-X1)_b-N2)-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'
- [41] (식 중, P는 인산기이고,
- [42] a는 2 내지 5의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고,
- [43] UUCG는 헤어핀의 루프를 형성하는 염기이고,
- [44] N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 1 내지 5개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고,
- [45] N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고,
- [46] b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).
- [47] 13. 위 12에 있어서, 상기 RNA는 하기 화학식 2로 표시되는 것인, 조성물:
- [48] [화학식 2]
- [49] 5'-P_a-((N1-X1)_b-N2)-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'
- [50] (식 중, P는 인산기이고,
- [51] a 및 b는 2 내지 4의 정수이고,
- [52] N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고,
- [53] N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고,
- [54] b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).
- [55] 14. 위 12에 있어서, 상기 RNA는 그 길이가 14 내지 100 nt인, 조성물.
- [56] 15. 위 12에 있어서, 상기 RNA는 서열번호 1 내지 25 중 어느 하나의 서열 및 그 5' 말단에 결합된 2 내지 4개의 인산기로 이루어진 것인, 조성물.
- [57] 16. 위 12에 있어서, 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자의 제타 전위는 5 내지 65 mV인, 조성물.

- [58] 17. 위 12에 있어서, 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자의 제타 전위는 35 mV 이하인 조성물.
- [59] 18. 위 12에 있어서, 상기 입자의 RNA를 담지하지 않은 상태의 제타 전위는 10 내지 70 mV인, 조성물.
- [60] 19. 위 12에 있어서, 상기 입자와 상기 RNA의 무게비는 1: 5 내지 20인, 조성물.
- [61] 20. 위 12에 있어서, 상기 입자는 복수개의 기공을 가지고, 상기 기공은 입자 표면에서 내부까지 이어진 것인, 조성물.
- [62] 21. 위 12에 있어서, 상기 입자의 BET 표면적은 280 내지 680m²/g이고, 입경은 50 내지 500nm인, 조성물.
- [63] 22. 위 12에 있어서, 상기 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경 5nm 미만의 소기공 입자의 기공이 평균 직경 7 내지 25nm로 확장된 것인, 조성물.
- [64] 23. 위 12에 있어서, 상기 암은 유방암, 난소암, 자궁 경부암, 전립선암, 고환암, 음경암, 비뇨생식관 암, 고환종, 식도암, 후두암, 위암, 위장관암, 피부암, 각질극 세포종, 난포 암종, 흑색종, 폐암, 소세포 폐암종, 비-소세포 폐암종(NSCLC), 폐 선암, 폐의 편평 세포 암종, 결장암, 췌장암, 갑상선암, 유두암, 방광암, 간암, 담관암, 신장, 골암, 골수 장애, 림프 장애, 모발 세포암, 구강 및 인두(경구)암, 구순암, 설암, 구강암, 침샘암, 인두암, 소장암, 결장암, 직장암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 대장암, 자궁내막암, 자궁암, 뇌암, 중추신경계암, 복막암, 간세포 암, 두부 암, 경부 암, 호지킨 또는 백혈병인, 조성물.

[65]

발명의 효과

- [66] 본 발명의 조성물은 담지된 RNA를 체내에 안정적으로 전달하고, 타겟에 방출하여, RIG-I 신호 전달 경로가 활성화되고, IFN- α , β , Viperin 등 인자의 발현을 촉진함으로써 면역 활성화 효과를 나타낼 수 있다.
- [67] 본 발명의 조성물은 인터페론 신호 경로 및/또는 인터페론 무관 세포사 경로가 활성화시켜 우수한 항암 활성을 나타낼 수 있다.
- [68] 본 발명의 조성물은 세포 내로 전달시에의 세포질 내 공포(액포, vacuole) 형성 등의 현상을 줄일 수 있다.

[69]

도면의 간단한 설명

- [70] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 현미경 사진이다.
- [71] 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 현미경 사진이다.
- [72] 도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 제조 공정 중의 소기공 입자의 현미경 사진이다.
- [73] 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 소기공 입자의 현미경 사진이다.
- [74] 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.

- [75] 도 6은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 생분해성을 확인할 수 있는 현미경 사진이다.
- [76] 도 7은 일 예시에 따른 원통형 투과막을 구비한 튜브이다.
- [77] 도 8은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 흡광도 감소 결과이다.
- [78] 도 9는 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 입경별 흡광도 감소 결과이다.
- [79] 도 10은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 기공 직경별 흡광도 감소 결과이다.
- [80] 도 11은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 환경의 pH별 흡광도 감소 결과이다.
- [81] 도 12는 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 시간 경과에 따른 흡광도 감소 결과이다.
- [82] 도 13 내지 17은 본 발명의 일 구현예에 따른 RNA를 담지한 다공성 실리카 입자(LEM-S403)의 특성 분석 결과이다. A, DegradaBALL의 전자현미경 이미지와 물리적 특성 (표면적, 미세공 크기, 표면 전하, 평균 입자 크기). B, 합성 RIG-I 리간드 (5'-triphosphate hairpin RNA, ppp-RNA)와 대조 hairpin RNA (OH-RNA)의 서열 및 구조. C, DegradaBALL과 ppp-RNA를 다양한 무게비로 혼합한 후, 원심분리하여 얻어진 상층액을 SDS-PAGE로 분석한 이미지. D, 형광 표지한 OH-RNA를 담지한 DegradaBALL을 A549 세포에 처리하였을 때, 세포 내부에서 OH-RNA가 방출되는 실시간 고 해상도 형광 이미지. E, pearson correlation coefficient를 이용한 세포 내에서 DegradaBALL에 담지된 OH-RNA가 방출되는 정도를 정량분석.
- [83] 도 18은 본 발명의 일 구현예에 따른 RNA를 담지한 다공성 실리카 입자(LEM-S403)의 인터페론 베타 발현 유도 결과이다.
- [84] 도 19는 본 발명의 일 구현예에 따른 RNA를 담지한 다공성 실리카 입자(LEM-S403)의 바이페린 발현 유도 결과이다.
- [85] 도 20은 본 발명의 일 구현예에 따른 RNA를 담지한 다공성 실리카 입자(LEM-S403)의 인터페론 알파 발현 유도 결과이다.
- [86] 도 21 내지 26은 본 발명의 일 구현예에 따른 RNA를 담지한 다공성 실리카 입자(LEM-S403)의 인터페론 의존적 또는 비의존적 종양 세포 사멸 유도 결과이다. A, 종양내 주사를 통해 LEM-S403의 전달을 표현한 모식도. B, FITC로 표지된 OH-RNA와 TAMRA로 표지한 DegradaBALL을 이용하여, DegradaBALL 혼합 유무에 따른 OH-RNA의 서방형 방출 경향을 확인한 형광 이미지. 종양이 심어진 C57BL/6 마우스에 투여한 후 1, 3, 5일 뒤에 종양을 분리하여 분석. C,

흑색종 종양에서 LEM-S403 주사를 통한 항종양 치료과정을 보여주는 모식도. LEM-S403의 치료 전략. 1) 인터페론 의존성 면역 반응, 2) 인터페론 비의존성 종양 세포 사멸 반응. D, 종양 (B16F10)이 형성된 C57B6 마우스를 이용한 LEM-S403 기전 연구의 투여 일정. 마우스에 종양 접종 후 3일 (day 0) 및 5일 (day 2)에 buffer, vehicle (70 µg), ppp-RNA (7 µg) 또는 LEM-S403 (7 µg)를 투여함 (각 군당 5마리). 6일 (day 3)에 모든 마우스를 희생하여 종양을 분리한 후 추가 분석을 진행. E, 종양에서 phosphor-STAT1의 면역 형광 염색 분석. F, 헤마톡실린 (hematoxylin) 및 에오신 (eosin) 염색과 TUNNEL 염색을 통한 대표적인 종양 조직 절편 이미지.

- [87] 도 27 내지 31은 본 발명의 일 구현예에 따른 RNA를 담지한 다공성 실리카 입자(LEM-S403)의 인터페론 비의존적 종양 세포 사멸 유도 결과이다. 흑색종 마우스 모델에 Buffer, Vehicle, ppp-RNA 또는 LEM-S403을 2회간 종양내 주사한 후(day 0 및 day 2), 3일 째 (day 3)에 분리한 종양세포를 Annexin V-PI 염색. A, 각 실험군의 종양세포를 유세포 분석 한 대표적인 이미지. B, 각 실험군의 종양 세포에서 생존, 세포사멸과정 또는 사멸 된 세포의 비율. C, Western-blot으로 측정된 종양 내 Capase-3 절단 확인. D, B16F10 세포를 이용하여, LEM-S403 처리 후 Noxa의 유전자 발현을 RT-PCR로 분석. 세포에 Buffer, ppp-RNA, Vehicle, LEM-S403 또는 Lipofectamine 2000+ppp RNA을 처리하고 24시간 후, mRNA 발현을 RT-PCR로 측정. E, RT-PCR로 측정된 마우스 종양에서의 Noxa의 유전자 발현. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs other groups (ANOVA).
- [88] 도 32 내지 35는 본 발명의 일 구현예에 따른 RNA를 담지한 다공성 실리카 입자(LEM-S403)의 종양 침윤 NK 세포와 CD8+ T 세포의 수 및 활성 증가 평가 결과이다. 마우스에 흑색종을 접종한 후, 3일 (day 0) 및 5일 (day 2)에 buffer, vehicle (70 µg), ppp-RNA (7 µg) 또는 LEM-S403 (7 µg)를 투여함 (그룹당 5마리). 6일 (day 3)에 모든 마우스는 희생하여 종양을 분리한 후 추가 분석을 진행. A, NK세포와 CD69가 발현된 NK 세포의 분포를 종양 침윤 림프구의 유세포 분석법을 통하여 확인. B, NK 1.1 (녹색) 및 CD69 (적색) 발현 세포를 나타내는 B16F10 종양의 대표적인 면역형광 이미지. C, CD8+ T 세포와 CD69가 발현된 CD8+ T 세포의 분포를 종양 침윤 림프구의 유세포 분석법을 통하여 확인. D, CD8a (녹색) 및 CD69 (적색) 발현 세포를 나타내는 B16F10 종양의 대표적인 면역 형광 이미지. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs other groups (ANOVA).
- [89] 도 36 내지 39는 본 발명의 일 구현예에 따른 RNA를 담지한 다공성 실리카 입자(LEM-S403)의 단독 또는 항체와의 병용 투여에서의 항 종양 평가 결과이다. A, 마우스의 흑색종 (B16F10) 모델에서 LEM-S403의 단독 투여 및 anti-PD-1과의 병용 투여 실험 계획 모식도. C57B/6 마우스에 종양을 접종 후, 종양 부피가 약 100 mm³ 가 되는 시점을 0일로 함. 0, 3, 7 및 10일에 buffer (1xPBS, 50 µL, 종양내 투여), vehicle (70 µg, 종양내 투여), ppp-RNA (7 µg, 종양내 투여), LEM-S403 (7 µg, 종양내 투여) 또는 LEM-S403 (7 µg, 종양내 투여) 및 anti-PD-1 항체 (10 mg/kg,

복강 투여)을 투여함. B, 2일 및 3일 간격으로 측정된 종양 부피의 변화. C, 관측된 모든 그룹의 시간에 따른 생존율 변화. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs Buffer, # $p < 0.05$ vs LEM-S403 by log-rank Mantel-Cox test. D, 모든 그룹에서 각 개체의 종양 부피를 나타낸 그래프.

[90] 도 40은 입자가 세포 내로 전달되는 일 구현예의 개략도이다.

[91] 도 41은 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자와 RNA의 함량비를 다양하게 조절했을 때의 세포(B16F10) 내로의 원활한 유입 여부를 확인한 것이다.

[92] 도 42는 본 발명의 일 구현예에 따른 다공성 실리카 입자의 개략도이다.

[93]

발명의 실시를 위한 형태

[94] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[95]

[96] 본 발명은 면역 활성화 개선용 약학 조성물에 관한 것이다.

[97] 본 발명의 면역 활성화 개선용 약학 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 평활 말단의 헤어핀 RNA; 및 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자;를 포함한다.

[98] [화학식 1]

[99] $5'-P_a-((N1-X1)_b-N2)-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'$

[100] (식 중, P는 인산기이고,

[101] a는 2 내지 5의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고,

[102] UUCG는 헤어핀의 루프를 형성하는 염기이고,

[103] N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 1 내지 5개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고,

[104] N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고,

[105] b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).

[106] 상기 화학식 1로 표시되는 RNA는 2가닥의 폴리뉴클레오티드가 서로 상보적으로 결합되고, 가운데 링커 부분의 염기 UUCG가 루프를 형성하는 평활 말단(blunt ended)의 헤어핀 구조의 RNA로서, blunt 5'-triphosphate ends를 가지고 있어 RIG-I 작용제(agonist)로 작용할 수 있다.

[107] 본 발명의 조성물은 면역 활성화, 면역 반응 자극 또는 촉진 효능을 갖는 것으로서, 이는 담지된 RNA를 체내에 안정적으로 전달하고, 타겟에 방출하여, RIG-I 신호 전달 경로가 활성화되고, IFN- α , β , Viperin 등 인자의 발현을 촉진함으로써 달성되는 효과일 수 있다. 이에 의해 면역이 활성화됨으로써, 감염 질환, 암, 그외 면역 관련 질환 등에 대한 우수한 약효를 나타낼 수 있다.

[108] 구체적으로, "면역반응"은 항원 또는 항원들 또는 알레르겐(들) 또는 약물 또는

생물학적 제제에 대한 특이적인 항체 및/또는 면역 세포-매개성 반응의 유도 의미를 의미한다. 면역반응의 유도는 챌린지된(challenged) 유기체의 면역원성 구성, 항원 또는 알레르겐 또는 약물 또는 생물학적 제제의 화학적 조성 및 입체배치, 및 항원 또는 알레르겐 또는 약물 또는 생물학적 제제의 투여 방식 및 기간을 포함하는 많은 요인들에 의존한다. 면역반응은 많은 측면을 가지고 있는데, 이 중 일부는 면역계의 세포(예: B-림프구, T-림프구, 대식세포 및 형질세포)에 의해 나타난다. 면역계 세포는 항원 또는 알레르겐 또는 면역계의 다른 세포와의 상호작용, 사이토카인의 방출 및 이들 사이토카인에 대한 반응성을 통해 면역반응에 참여할 수 있다. 면역반응은 일반적으로 2가지 주요 범주-체액성 및 세포-매개성으로 나뉜다. 면역반응의 체액성 성분은 항원 또는 알레르겐 또는 약물 또는 생물학적 제제에 특이적인 항체의 생성을 포함한다. 세포-매개성 성분은 항원 또는 알레르겐에 대한 지연형 과민성 및 세포 독성 이펙터 세포의 생성을 포함한다.

[109] 면역계의 활성화 또는 자극은 림프구, 대식세포, 수지상 세포, 자연 살해 세포(NK 세포) 및 세포독성 T 림프구(CTL)와 같은 면역 이펙터 세포의 활성화에 의해 매개될 수 있다. 이것은 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포의 활성화 및 성숙에 의해 매개될 수 있다. 이것은 면역 체크포인트 억제제를 억제하는 것과 같은 억제 경로의 차단에 의해 매개될 수 있다.

[110] 상기 감염 질환은 병원성 항원의 감염으로 유발되는 질환으로, 병원성 항원은 예를 들면 박테리아, 바이러스 등으로서, 구체적으로는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 아나플라즈마 속(*Anaplasma* genus), 아나플라즈마 파고사이토펠리움(*Anaplasma phagocytophilum*), 브라질구충(*Ancylostoma braziliense*), 십이지장충(*Ancylostoma duodenale*), 용혈성 아카노박테리아균(*Arcanobacterium haemolyticum*), 회충(*Ascaris lumbricoides*), 아스페르길루스 속(*Aspergillus* genus), 아스트로비리다에(*Astroviridae*), 바베시아 속(*Babesia* genus), 탄저균(*Bacillus anthracis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바르토넬라 헨셀라에(*Bartonella henselae*), BK 바이러스, 블라스토시스티스 호미니스(*Blastocystis hominis*), 블라스토미세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 백일해균(*Bordetella pertussis*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 보렐리아 속(*Borrelia* genus), 보렐리아 종(*Borrelia* spp), 브루셀라 속(*Brucella* genus), 말레이사상충(*Brugia malayi*), 부니아바이러스 과(*Bunyaviridae* 패밀리), 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*) 및 다른 부르크홀데리아 종, 부르크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*), 부르크홀데리아 슈도말레이, 칼리시비리다에 과(*Caliciviridae* 패밀리), 캄필로박터 속(*Campylobacter* genus), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 종(*Candida* spp), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클라미도필라 뉴모니아(*Chlamydophila pneumoniae*), 클라미도필라 프시타시(*Chlamydophila psittaci*), CJD 프리온, 간흡충(*Clonorchis sinensis*), 클로스트리디움

보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*), 클로스트리듐 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 페르프린젠스, 클로스트리듐 종(*Clostridium spp*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 콕시디오이데스 종(*Coccidioides spp*), 코로나바이러스(*coronaviruses*), 디프테리아균(*Corynebacterium diphtheria*), 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*), 크리민 콩고 출혈열 바이러스(*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*), 크립토콕쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 크립토스포리디움 속(*Cryptosporidium genus*), 사이토메갈로바이러스(*Cytomegalovirus, CMV*), 뎡기 바이러스(*Dengue viruses*) (DEN-1, DEN-2, DEN-3 및 DEN-4), 이핵아메바(*Dientamoeba fragilis*), 에볼라바이러스(*Ebolavirus, EBOV*), 에키노코쿠스 종(*Echinococcus genus*), 에를리히아 샤펜시스(*Ehrlichia chaffeensis*), 엘리키아 에윙기(*Ehrlichia ewingii*), 엘리키아 속(*Ehrlichia genus*), 이질 아메바(*Entamoeba histolytica*), 장구균 속(*Enterococcus genus*), 장내 바이러스 속(*Enterovirus genus*), 장내 바이러스(*Enteroviruses*), 주로 콕사키 A 바이러스(*Coxsackie A virus*) 및 장내 바이러스 71 (EV71), 표피사상균 종(*Epidermophyton spp*), 엡스테인-바 바이러스(*Epstein-Barr Virus, EBV*), 대장균(*Escherichia coli*) O157:H7, O111 및 O104:H4, 간질(*Fasciola hepatica*) 및 거대 간질(*Fasciola gigantica*), FFI 프리온, 필라리오이데아 상과(*Filarioidea super패밀리*), 플라비바이러스(*Flaviviruses*), 야토병균(*Francisella tularensis*), 푸소박테리움 속(*Fusobacterium genus*), 게오트리쿰 칸디둠(*Geotrichum candidum*), 지알디아편모충(*Giardia intestinalis*), 악구충속 종(*Gnathostoma spp*), GSS 프리온, 구아나리토 바이러스(*Guanarito virus*), 헤모필루스 듀크레이(*Haemophilus ducreyi*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 헤니파바이러스(*Henipavirus*) (Hendra virus Nipah virus), 간염 A 바이러스, 간염 B 바이러스(*HBV*), 간염 C 바이러스(*HCV*), 간염 D 바이러스, 간염 E 바이러스, 단순포진 바이러스 1 및 2 (HSV-1 및 HSV-2), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), HIV (인간 면역결핍 바이러스, *Human immunodeficiency virus*), 호르테아 웨넥키(*Hortaea werneckii*), 인간 보카바이러스(*Human bocavirus*) (HBoV), 인간 헤르페스 바이러스 6(*Human herpesvirus 6, HHV-6*) 및 인간 헤르페스 바이러스 7 (HHV-7), 인간 메타뉴모바이러스(*Human metapneumovirus, hMPV*), 인간 파필로마바이러스(*Human papillomavirus, HPV*), 인간 파라인플루엔자 바이러스(*Human parainfluenza viruses, HPIV*), 일본 뇌염 바이러스(*Japanese encephalitis virus*), JC 바이러스, 주닌(*Junin*) 바이러스, 킨젤라 킨가에(*Kingella kingae*), 클레브시엘라 클라눌로마티스(*Klebsiella granulomatis*), 쿠루 프리온(*Kuru prion*), 라싸 바이러스(*Lassa virus*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 레슈마니아 속(*Leishmania genus*), 렙토스피라 속(*Leptospira genus*),

리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 림프구성
 맥락수막염바이러스(*Lymphocytic choriomeningitis virus*) (LCMV), 마추포
 바이러스(*Machupo virus*), 말라세지아 종(*Malassezia spp*), 마르부르그
 바이러스(*Marburg virus*), 홍역 바이러스(*Measles virus*), 메타고니무스
 요카가와이(*Metagonimus yokagawai*), 마이크로스포리디아 필름(*Microsporidia*
phylum), 전염성 연속종 바이러스(*Molluscum contagiosum virus*) (MCV), 귀밑샘염
 바이러스(*Mumps virus*), 나균(*Mycobacterium leprae*) 및 마이코박테리아
 레프로마토시스(*Mycobacterium lepromatosis*), 마이코박테리움
 투베쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움
 우르세란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코플라즈마 폐렴(*Mycoplasma*
pneumoniae), 파울러 자유아메바(*Naegleria fowleri*), 아메리카 구충(*Necator*
americanus), 임균(*Neisseria gonorrhoeae*), 수막염균(*Neisseria meningitidis*),
 노카디아 아스테로이드(*Nocardia asteroides*), 노카디아 종(*Nocardia spp*),
 온코세르카 볼부루스(*Onchocerca volvulus*), 오리엔티아 쓰쓰가무시(*Orientia*
tsutsugamushi), 오르토믹소 바이러스과(*Orthomyxoviridae* 패밀리, 인플루엔자),
 브라질 파라콕시디오이디즈(*Paracoccidioides brasiliensis*), 폐흡충 종(*Paragonimus*
spp), 페디스토마(*Paragonimus westermani*), 파보바이러스(*Parvovirus*) B19,
 파스퇴렐라 속(*Pasteurella* genus), 플라스모디움 속(*Plasmodium* genus),
 폐포자충(*Pneumocystis jirovecii*), 폴리오바이러스(*Poliovirus*), 라비
 바이러스(*Rabies virus*), 호흡기 합포체 바이러스(*Respiratory syncytial virus*, RSV),
 리노바이러스(*Rhinovirus*), 리노바이러스, 리케치아 아카리(*Rickettsia akari*),
 리케치아 속(*Rickettsia* genus), 발진티푸스 리케치아(*Rickettsia prowazekii*),
 로키산 홍반열 리케치아(*Rickettsia rickettsia*), 발진열 리케치아(*Rickettsia typhi*),
 리프트벨리얼 바이러스(*Rift Valley fever virus*), 로타바이러스(*Rotavirus*), 풍진
 바이러스(*Rubella virus*), 사비아 바이러스(*Sabia virus*), 살모넬라 속(*Salmonella*
genus), 천공 개선충(*Sarcoptes scabiei*), SARS 코로나바이러스, 주혈흡충
 속(*Schistosoma* genus), 시겔라 속(*Shigella* genus), 신 نوم브레 바이러스(*Sin Nombre*
virus), 한타바이러스(*Hantavirus*), 스포로트릭스 셴키(*Sporothrix schenckii*),
 스타필로코커스 속(*Staphylococcus* genus), 스타필로코커스 속, 스트렙토코커스
 아갈락티아(*Streptococcus agalactiae*), 폐렴연쇄구균(*Streptococcus pneumoniae*),
 화농성연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*), 분선충(*Strongyloides stercoralis*), 테니아
 속(*Taenia* genus), 유구조충(*Taenia solium*), 진드기매개뇌염(*Tick-borne*
encephalitis virus, TBEV), 견회충(*Toxocara canis*) 또는 고양이 회충(*Toxocara cati*),
 독소플라즈마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*),
 선모충(*Trichinella spiralis*), 질트리코모나스(*Trichomonas vaginalis*), 백선균
 종(*Trichophyton spp*), 편충(*Trichuris trichiura*), 트리파노소마
 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*),
 우레아플라즈마 우레알리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*), 수두 대상 포진

바이러스(Varicella zoster virus) (VZV), 수두 대상 포진 바이러스 (VZV), 천연두 메이저(Variola major) 또는 천연두 마이너(Variola minor), vCJD 프리온, 베네스 웰라형 마뇌염 바이러스(Venezuelan equine encephalitis virus), 비브리오 콜레라(Vibrio cholera), 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus), 서부형 마뇌염 바이러스(Western equine encephalitis virus), 반크로프트 사상충(Wuchereria bancrofti), 황열병 바이러스(Yellow fever virus), 여시니아 엔테로콜리티카(Yersinia enterocolitica), 여시니아 페스티스(Yersinia pestis), 및 여시니아 슈도투베르쿨로시스(Yersinia pseudotuberculosis) 병원체로부터 유도된 항원으로부터 선택된 감염성 질병과 관련된 병원체로부터 유도된 펩타이드 또는 단백질 항원이다.

- [111] 상기 면역 관련 질환은 예를 들면 폐혈증, 욕창, 족부궤양, 당뇨, 당뇨병성 신경병증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 치매 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [112] 상기 RNA는 예를 들면 그 길이가 14 내지 100nt 일 수 있다. 상기 범위 내에서 예를 들면 14 내지 100nt, 14 내지 90nt, 14 내지 80nt, 14 내지 70nt, 14 내지 60nt, 20 내지 80nt, 20nt 내지 60nt, 20 내지 50nt, 20 내지 40nt, 20 내지 35nt, 25 내지 50nt, 25 내지 45nt, 25 내지 35nt 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 길이가 상기 범위 내인 경우 우수한 면역 활성화능, 그리고 후술할 항암 활성을 나타낼 수 있으며, 적정의 전하를 가져 입자에 담지되었을 때 입자가 적정 전하를 나타낼 수 있다.
- [113] 구체적으로, 상기 RNA는 하기 화학식 2로 표시될 수 있고, 보다 구체적으로는 서열번호 1 내지 25로 이루어진 군에서 선택된 서열 및 그 5'말단에 결합된 2 내지 4개의 인산기를 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로는 서열번호 1 내지 25로 이루어진 군에서 선택된 서열 및 그 5'말단에 결합된 2 내지 4개의 인산기로 이루어진 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 1의 서열 및 그 5'말단에 결합된 3개의 인산기로 이루어진 것일 수 있다.
- [114] [화학식 2]
- [115] 5'-P_a-(N1-X1)_b-N2-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'
- [116] (식 중, P는 인산기이고,
- [117] a 및 b는 2 내지 4의 정수이고,
- [118] N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고,
- [119] N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고,
- [120] b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).
- [121] 다공성 실리카 입자는 상기 RNA를 기공 내에 담지한 것이다.
- [122] 본 발명에 따른 다공성 실리카 입자는 실리카(SiO₂) 소재의 입자이며, 나노 사이즈의 입경을 갖는다.

- [123] 본 발명의 다공성 실리카 나노입자는 다공성 입자로서, 나노사이즈의 기공을 갖고, 그 표면 및/또는 기공 내부에 RNA를 담지할 수 있다.
- [124] 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경이 7 내지 25nm이고, 그 기공 내부가 양전하로 대전된 것일 수 있다.
- [125] 평균 기공 직경은 상기 범위 내에서 예를 들면 7 내지 25nm, 상기 범위 내에서 예를 들면 7 내지 25nm, 7 내지 23nm, 10 내지 25nm, 13 내지 25nm, 7 내지 20nm, 7 내지 18nm, 10 내지 20nm, 10 내지 18nm 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [126] 상기 RNA는 5' 말단에 인산기를 갖는 것으로서, 이에 해당하는 pppRNA는 통상 리포솜 등의 전달체에 담지하여 사용되지만, 그 전달 효율이 굉장히 낮은 것으로 알려져 있다. 그러나, 본 발명에 따른 다공성 실리카 입자는 상기 평균 기공 직경을 가지고, 그 기공 내부가 양전하로 대전됨으로써, 그 기공 내부에 상기 RNA를 충분히 담지하고 전달할 수 있다.
- [127] 다공성 실리카 입자는 기공 내부가 양전하로 대전된 것으로서, 예를 들면 제타 전위는 10 내지 70 mV일 수 있다. 상기 범위 내에서 예를 들면 10 내지 70 mV, 10 내지 60 mV, 10 내지 50 mV, 10 내지 40 mV, 10 내지 30 mV, 20 내지 70 mV, 20 내지 60 mV, 20 내지 50 mV, 30 내지 60 mV, 15 내지 35 mV 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [128] 상기 RNA는 음전하를 갖는 것으로서, 이를 용이하게 담지할 수 있는 입자는 양전하로 대전된 것이어야 하는데, 그러한 전하를 띠는 입자가 타겟 세포 내로 흡수(예를 들어, 도 40에 예시된 Endocytosis 등의 과정을 통해)될 때 세포내로 들어간 입자는 엔도솜내에서의 낮은 pH 때문에 강한 양전하를 띄게 되고, 이는 엔도솜의 막을 가로지르는 물의 확산에 의한 삼투압을 유발하게 되어 액포(vacuole, 공포)의 형성으로 이어질 수 있다. 그리고 입자의 양전하가 강한 경우에, 세포막이 입자를 감쌀 때 보다 크게 벌어져서 입자 외의 세포외액(extracellular fluid), 또는 그에 포함된 여러 단백질 등의 이물질이 타겟 세포 내로 함께 유입될 수 있고, 그러한 경우에는 이물 유입에 따른 예상치 못한 효과가 발생하거나, 이물이 유입되지 않는 경우에 비해 입자는 상대적으로 적게 유입되는 것으로서 입자의 충분한 전달에 의한 약효 발생이 어려울 수 있다. 그러나 본 발명은 RNA를 담지한 입자의 전하를 최적화함으로써 이러한 문제를 방지할 수 있다.
- [129] 다공성 실리카 입자는 RNA를 담지한 상태에서의 전하가 예를 들면 5 내지 65 mV 일 수 있다. 상기 범위 내에서 예를 들면 5 내지 65 mV, 5 내지 60 mV, 5 내지 55 mV, 5 내지 50 mV, 5 내지 45 mV, 5 내지 40 mV, 5 내지 35 mV, 5 내지 30 mV, 10 내지 60 mV, 10 내지 55 mV, 10 내지 50 mV, 10 내지 45 mV, 10 내지 40 mV, 10 내지 35 mV, 10 내지 30mV, 20 내지 50 mV, 20 내지 45 mV, 20 내지 40 mV, 20 내지 35 mV, 20 내지 30mV, 25 내지 40 mV, 25 내지 35 mV 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는 상한이 40 mV, 보다 구체적으로 35 mV,

더욱 구체적으로는 30 mV일 수 있고, 하한은 10 mV, 보다 구체적으로 15mV, 더욱 구체적으로 20 mV 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [130] 상기 RNA를 담지한 상태에서의 입자의 전하는 예를 들면 RNA를 담지하지 않은 입자의 전하(예를 들면 표면 개질 정도로 조절), RNA의 입자에의 담지 비율 등으로 조절할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [131] RNA의 입자에의 담지 비율은 예를 들면 다공성 실리카 입자와 RNA의 무게비가 1: 5 내지 20일 수 있다. 함량비가 상기 범위 내인 경우에 RNA가 충분히 담지되면서, RNA가 담지되지 않은 빈 다공성 실리카 입자가 발생하는 것을 방지할 수 있으며, 이에 의해 강한 양전하를 가진 입자가 세포로 전달되는 것을 방지할 수 있다. 상기 범위 내에서 예를 들면 1: 5 내지 20, 1: 5 내지 18, 1: 7 내지 20, 1: 7 내지 18, 1: 7 내지 15, 1: 8 내지 12, 1: 9 내지 11 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [132] 구체적으로, 본 발명의 조성물을 개체에 투여하기 위해 RNA를 담지한 다공성 실리카 입자는 분산매에 분산되어 있는 것일 수 있고, 이는 다공성 실리카 입자와 RNA를 분산매에 넣고 교반하여 얻어진 것일 수 있다. 이와 관련하여, RNA 대비 입자의 양이 너무 많으면 RNA를 충분히 담지하지 못한 빈 입자가 발생할 수 있고, RNA 대비 입자의 양이 너무 적으면 입자에 담지되지 못하는 잔여 RNA가 발생하게 될 수 있다.
- [133]
- [134] 본 발명의 일 구현예에서, 전술한 세포 내 유입 시의 액포 형성, 이물 유입 등의 문제를 방지한다는 측면에서 다공성 실리카 입자는 하기 스펙을 갖는 것일 수 있다. 예를 들어 기공 크기 7 내지 25 nm, 구체적으로 7 내지 20nm, 더욱 구체적으로 7 내지 15nm일 수 있다. 입경은 50 내지 500 nm, 구체적으로, 200 내지 500nm, 더욱 구체적으로, 250 내지 350 nm일 수 있다. 표면적은 280 내지 680 m²/g, 구체적으로, 280 내지 480 m²/g일 수 있다. 제타 전위는 RNA 담지 전 상태에서 40 mV 초과, 구체적으로 40 mV 내지 70mV일 수 있다. 입자는 RNA를 무게비 1: 5 내지 20, 구체적으로 1: 5 내지 15가 되도록 담지할 수 있다. RNA 담지 후 입자의 제타 전위는 상한이 40 mV, 구체적으로 35 mV, 더욱 구체적으로 30 mV일 수 있고, 하한은
- [135] 다공성 실리카 입자는 도 42에 예시된 바와 같이, 복수개의 기공을 가지고, 상기 기공은 입자 표면에서 내부까지 이어진 것일 수 있다. 이에, RNA가 기공 내부에 충분히 담지될 수 있다.
- [136] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 생분해성 입자로서, RNA를 담지하여 체내에 투여되었을 때 체내에서 생분해되면서 RNA를 방출할 수 있는데, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 체내에서 서서히 분해되어 담지된 RNA가 서방적으로 방출되도록 할 수 있다. 예를 들면, 하기 수학적 식 1의 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상이다:
- [137] [수학적 식 1]

- [138] A_t/A_0
- [139] (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,
- [140] 상기 투과막 외부에는 상기 투과막과 접하며, 상기 현탁액과 동일한 용매 15ml가 위치하고, 상기 투과막 내외부는 37°C에서 60rpm 수평 교반되며,
- [141] 상기 현탁액의 pH는 7.4이고,
- [142] A_t 는 상기 A_0 의 측정시로부터 t시간 경과 후에 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도임).
- [143] 상기 수학식 1은 다공성 실리카 입자가 체내와 유사한 환경에서 어느 정도의 속도로 분해되는지를 의미하는 것이다.
- [144] 상기 수학식 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.
- [145] 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.
- [146] 상기 수학식 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
- [147] 상기 흡광도의 비가 1/2가 된다는 것은 t시간 후에 흡광도가 초기 흡광도의 절반이 된다는 것인 바, 이는 다공성 실리카 입자의 대략 절반이 분해되었다는 의미이다.
- [148] 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.
- [149] 본 발명의 상기 수학식 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.
- [150] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 상기 수학식 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.

- [151] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 상기 수학식 1의 흡광도의 비가 1/20가 되는 t 가 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.
- [152] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 측정되는 흡광도가 0.01 이하가 되는 t 가 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.
- [153] 본 발명의 다공성 실리카 입자에서 상기 수학식 1의 흡광도의 비와 t 는 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.
- [154] 상기 수학식 1의 t 는 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.
- [155] 예를 들면, 입자의 표면적을 증가시켜 t 를 감소시키거나, 표면적을 감소시켜 t 를 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 t 를 증가시킬 수 있다. 또한, 다공성 실리카 입자에 RNA를 담지시키고 RNA과 다공성 실리카 입자 간의 친화도를 증가시켜, 다공성 실리카 실리카 입자가 환경에 직접 노출되는 것을 줄여 t 를 증가시킬 수 있다. 또한, 입자의 제조시에 표면을 보다 치밀하게 제조하여 t 를 증가시킬 수도 있다. 상기에는 수학식 1의 t 를 조절할 수 있는 다양한 예시를 서술하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [156] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 예를 들면 구형 입자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [157] 다공성 실리카 입자는 예를 들면 입경은 50 내지 500nm일 수 있다. 상기 범위 내에서 예를 들면 50 내지 500nm, 50 내지 400nm, 50 내지 300nm, 100 내지 450nm, 100 내지 400nm, 100 내지 350nm, 100 내지 300nm, 150 내지 400nm, 150 내지 350nm, 200 내지 400nm, 200 내지 350nm, 250 내지 400nm, 180 내지 300nm, 150 내지 250nm 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [158] 다공성 실리카 입자는 예를 들면 BET 표면적은 280 내지 680m²/g일 수 있다. 예를 들어 상기 범위 내에서 280m²/g 내지 680m²/g, 280m²/g 내지 600m²/g, 280m²/g 내지 500m²/g, 280m²/g 내지 400m²/g, 300m²/g 내지 650m²/g, 300m²/g 내지 600m²/g, 300m²/g 내지 550m²/g, 300m²/g 내지 500m²/g, 300m²/g 내지 450m²/g, 350m²/g 내지 450m²/g 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [159] 본 발명의 다공성 실리카 나노입자는 기공의 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 동일 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.

[160] 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경 5nm 미만의 소기공 입자의 기공이 평균 직경 7 내지 25nm로 확장된 것일 수 있다. 이에 의해 기공 직경이 커서 큰 RNA를 기공 내부에 담지할 수 있으며, 기공 직경에 비해 입경 자체는 크지 않아 세포 내로의 전달 및 흡수가 용이하다.

[161] 본 발명의 다공성 실리카 입자는 외부 표면 및/또는 기공 내부가 양전하로 대전된 것일 수 있다. 예를 들면 표면 및 기공 내부 모두 양전하로 대전되거나, 표면 또는 기공 내부만 양전하로 대전될 수 있다. 상기 대전은 예를 들면 양이온성 치환기가 존재함으로써 된 것일 수 있다.

[162] 상기 양이온성 치환기는 예를 들면 염기성기로서 아미노기, 그 외 질소함유기 동일 수 있고, 상기 음이온성 치환기는 예를 들면 산성기로서 카르복시기(-COOH), 술폰산기(-SO₃H), 티올기(-SH) 동일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[163] 상기 대전에 의해 상기 치환기의 조절로 RNA의 방출 환경에 대한 다공성 실리카 입자의 상호 작용이 조절되어 나노입자 자체의 분해 속도가 조절되어 RNA의 방출 속도가 조절될 수 있고, 또한, RNA는 나노입자로부터 확산되어 방출될 수도 있는데, 상기 치환기의 조절로 RNA의 나노입자에 대한 결합력이 조절되어 RNA의 방출이 조절될 수 있다.

[164] 또한, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 그 표면 및/또는 기공 내부에 상기 외에 RNA의 담지, RNA의 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 엡타머 등을 더 포함할 수 있다.

[165] 전술한 표면 및/또는 기공 내부의 치환기, 전하, 결합물질 등은 예를 들면 표면 개질에 의해 부가될 수 있다.

[166] 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.

[167]

[168] 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.

- [169] 상기 소기공의 입자는 예를 들면 평균 기공 직경이 1nm 내지 5nm인 입자일 수 있다.
- [170] 상기 소기공의 입자는 용매에 계면활성제와 실리카 전구물질을 넣고 교반 및 균질화시켜 얻어질 수 있다.
- [171] 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, 디메틸술폰, 피리딘, 디메틸술폰, 헥사메틸포스포아미드, 테트라메틸우레아, N-메틸카르보락탐, 테트라히드로퓨란, m-디옥산, P-디옥산, 1,2-디메톡시에탄 등을 사용할 수 있고, 구체적으로는 알코올, 보다 구체적으로 메탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [172] 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.
- [173] 상기 계면활성제는 예를 들면 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide), TMABr(hexadecyltrimethylammonium bromide), TMAPrCl(hexadecyltrimethylpyridinium chloride), TMAcI(tetramethylammonium chloride) 등일 수 있고, 구체적으로는 CTAB를 사용할 수 있다.
- [174] 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.
- [175] 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.
- [176] 상기 교반은 예를 들면 10분 내지 30분간 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [177] 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.
- [178] 필요에 따라 촉매로서 수산화나트륨을 더 사용할 수 있으며, 이는 용매에 계면활성제를 첨가한 후 실리카 전구물질의 첨가 전에 교반하면서 첨가될 수 있다.
- [179] 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.
- [180] 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.
- [181] 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.
- [182] 이후, 반응산물을 세척 및 건조시켜 다공성 실리카 입자를 얻을 수 있고, 필요에 따라 세척 전에 미반응 물질의 분리가 선행될 수 있다.
- [183] 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.
- [184] 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.
- [185] 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, 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, 디메틸술폰, 피리딘, 디메틸술폰, 헥사메틸포스포아미드, 테트라메틸우레아, N-메틸카르보락탐, 테트라히드로퓨란, m-디옥산, p-디옥산, 1,2-디메톡시에탄 등을 사용할 수 있고, 구체적으로는 알코올, 보다 구체적으로 에탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [186] 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.
- [187] 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.
- [188] 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.
- [189] 앞서 예시한 방법으로 제조되는 입자는 그 표면 및 기공 내부에 반응에 사용된 잔여 유기물질(계면활성제 등)이 남아 있을 수 있는 바, 이를 제거하기 위해 세척이 수행되는 것일 수 있다. 통상 이러한 유기물질의 제거를 위해 산 처리(또는 산성의 유기용매 처리)가 수행될 수 있으나, 본 발명은 이러한 산 처리를 수행하지 않아 세척 이후에도 기공 내부에 잔여 유기물질이 남아 있는 것일 수 있다.

- [190] 상기 건조는 예를 들면 20°C 내지 100°C로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 진공 상태에서 수행될 수도 있다.
- [191] 이후, 상기 얻어진 다공성 실리카 입자의 기공을 확장하고, 기공 확장은 기공 팽창제를 사용하여 수행될 수 있다.
- [192] 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.
- [193] 또한, 상기 기공 팽창제는 예를 들면 N,N-디메틸헥사데실아민(N,N-dimethylhexadecylamine, DMHA)를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [194] 상기 기공 확장은 예를 들면 용매 중의 다공성 실리카 입자를 기공 팽창제와 혼합하고, 가열하여 반응시켜 수행될 수 있다.
- [195] 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, 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.
- [196] 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.
- [197] 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.
- [198] 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.
- [199] 상기 반응은 예를 들면 120°C 내지 190°C로 수행될 수 있다. 예를 들어 상기 범위 내에서 120°C 내지 190°C, 120°C 내지 180°C, 120°C 내지 170°C, 130°C 내지 170°C, 130°C 내지 160°C, 130°C 내지 150°C, 130°C 내지 140°C 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [200] 상기 반응은 예를 들면 6시간 내지 96시간 수행 수행될 수 있다. 예를 들어 상기 범위 내에서 30시간 내지 96시간, 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 동일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [201] 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.
- [202] 상기 반응은 예를 들면 단계적으로 승온시켜 수행될 수 있다. 구체적으로, 상온에서 상기 온도까지 0.5°C/분 내지 15°C/분의 속도로 단계적으로 승온시켜 수행될 수 있으며, 예를 들어 상기 범위 내에서 1°C/분 내지 15°C/분, 3°C/분 내지 15°C/분, 3°C/분 내지 12°C/분, 3°C/분 내지 10°C/분 동일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [203] 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.
- [204] 상기 반응 이후에는 반응액을 서서히 냉각시킬 수 있으며, 예를 들면 단계적으로 감온하여 냉각시킬 수 있다. 구체적으로 상기 온도에서 상온까지 0.5°C/분 내지 20°C/분의 속도로 단계적으로 감온시켜 수행될 수 있으며, 예를 들어 상기 범위 내에서 1°C/분 내지 20°C/분, 3°C/분 내지 20°C/분, 3°C/분 내지 12°C/분, 3°C/분 내지 10°C/분 동일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [205] 입자 제조 이후에 산처리로 세척하지 않은 경우 기공 내부의 잔여 물질이 상기 기공 확장에도 관여하여, 보다 충분히 고르게 기공이 확장될 수 있다.
- [206] 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.
- [207] 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.
- [208] 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 동일 수 있다.

- [209] 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.
- [210] 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.
- [211] 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.
- [212] 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 동일 수 있다.
- [213] 입자 제조 이후에 산처리로 세척하지 않은 경우 기공 확장 이후에도 기공 내부의 잔여 물질이 남아 있을 수 있어, 기공 확장 이후의 세척시에도 산처리가 수행될 수 있으나, 본 발명은 산처리를 수행하지 않고 후술할 하소를 통해 잔여 물질을 제거할 수 있다.
- [214] 상기 건조는 예를 들면 20°C 내지 100°C로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 진공 상태에서 수행될 수도 있다.
- [215] 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°C 이상의 온도로 가열될 수 있다. 그 상한은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면 1000°C, 900°C, 800°C, 700°C 동일 수 있다. 가열은 예를 들면 3시간 이상, 4시간 이상 등으로 수행될 수 있다. 그 상한은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 24시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 5시간 동일 수 있다. 보다 구체적으로는 400°C 내지

700°C에서 3시간 내지 8시간, 구체적으로 500°C 내지 600°C에서 4시간 내지 5시간 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [216] 기공을 채우는 유기물을 제거함으로써, 잔존 유기물에 의해 나타나는 세포 독성, 거품 발생 등의 문제를 방지할 수 있다.
- [217] 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.
- [218] 상기 표면 개질을 통해 입자가 대전되도록 할 수 있다.
- [219] 표면 개질은 예를 들면 도입하고자 하는 양이온성 치환기를 갖는 화합물을 입자와 반응시켜 수행할 수 있고, 상기 화합물은 예를 들면 C1 내지 C10 알콕시기를 갖는 알콕시실란일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [220] 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.
- [221] 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.
- [222] 상기 반응은 용매에 분산시킨 다공성 실리카 입자를 알콕시실란과 반응시켜 수행할 수 있다.
- [223] 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, 디메틸술폰, 피리딘, 디메틸술폰,
헥사메틸포스포아미드, 테트라메틸우레아, N-메틸카르보락탐,
테트라히드로퓨란, m-디옥산, P-디옥산, 1,2-디메톡시에탄 등을 사용할 수 있고,
구체적으로는 톨루엔을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [224] 상기 양전하로의 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.

- [225] 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.

- [226] 상기 다공성 실리카 입자의 알콕시실란과의 반응은 예를 들면 가열 하에 수행될 수 있고, 가열은 예를 들면 80°C 내지 180°C, 예를 들어 상기 범위 내에서 80°C 내지 160°C, 80°C 내지 150°C, 100°C 내지 160°C, 100°C 내지 150°C, 110°C 내지 150°C 등으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [227] 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.

- [228] 상기 반응 온도, 시간, 그리고 표면개질에 사용되는 화합물의 양 등은 표면개질하고자 하는 정도에 따라 선택될 수 있는 것으로서, RNA들의 전하 정도에 따라 반응 조건을 달리하여 다공성 실리카 입자의 전하 정도를 조절함으로써, RNA의 방출 속도를 조절할 수 있다. 예를 들면, RNA가 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.

- [229] 또한, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 예를 들면 소기공의 입자 제조, 기공 확장, 표면 개질, 기공 내부 개질 공정을 거쳐 제조된 것일 수도 있다.

- [230] 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.

- [231] 필요에 따라 세척 전에 미반응 물질의 분리가 선행될 수 있고, 미반응 물질의 분리는 예를 들면 원심분리로 상등액을 분리하여 수행될 수 있다.
- [232] 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.
- [233] 상기 소기공의 입자 제조 이후의 세척은 앞서 예시한 범위 내의 방법/조건으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [234] 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.
- [235]
- [236] 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.
- [237] 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.
- [238] 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.
- [239] 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.
- [240] 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.
- [241] 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.
- [242] 상기 건조는 예를 들면 20°C 내지 100°C로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는

것은 아니고, 진공 상태에서 수행될 수도 있다.

[243]

[244] RNA는 다공성 실리카 입자의 표면 및/또는 기공 내부에 담지될 수 있고, 담지는 예를 들면 용매 중의 다공성 실리카 입자와 RNA를 혼합하여 수행될 수 있다.

[245]

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.

[246]

또한, 상기 용매로 PBS(phosphate buffered saline solution), SBF(Simulated Body Fluid), Borate-buffered saline, Tris-buffered saline 등을 사용할 수도 있다.

[247]

[248]

상기 다공성 실리카 입자에 담지된 RNA는 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 RNA과의 상호작용에 기인하여 달라질 수 있다.

[249]

상기 다공성 실리카 입자에 담지된 RNA는 다공성 실리카 입자가 생분해되면서 방출되는데, 본 발명에 따른 다공성 실리카 입자는 서서히 분해되어 담지된 RNA가 서방적으로 방출되도록 할 수 있다. 이는 예를 들면 다공성 실리카 입자의 표면적, 입경, 기공 직경, 표면 및/또는 기공 내부의 치환기, 표면의 치밀함 정도 등을 조절함으로써 조절될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[250]

또한, 상기 다공성 실리카 입자에 담지된 RNA는 다공성 실리카 입자로부터 이탈되어 확산되면서도 방출될 수 있고, 이는 다공성 실리카 입자와 RNA, RNA의 방출 환경과의 관계에 영향을 받는 것인 바, 이를 조절하여 RNA의 방출을 조절할 수 있다. 예를 들면 표면개질에 의해 다공성 실리카 입자의 RNA과의 결합력을 강화 또는 약화시킴으로써 조절할 수 있다.

[251]

RNA는 필요한 치료 유형, 방출 환경, 사용되는 다공성 실리카 입자에 의존하여 예를 들면 7일 내지 1년 또는 그 이상의 기간 동안 방출될 수 있다.

[252]

또한, 본 발명의 다공성 실리카 입자는 생분해성으로서 100% 분해될 수 있으므로, 이에 담지된 RNA는 100% 방출될 수 있다.

[253]

[254]

또한, 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

- [255] 본 발명의 의약 조성물은 화학식 1로 표시되는 평활 말단의 헤어핀 RNA; 및 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자;를 포함한다.
- [256] 헤어핀 RNA 및 다공성 실리카 입자는 전술한 범위 내의 것일 수 있다.
- [257] 본 발명의 조성물은 항암 효능을 갖는 것으로서, 이는 담지된 RNA를 체내에 안정적으로 전달하고, 타겟에 방출하여, 인터페론 신호 경로 및/또는 인터페론 무관 세포사 경로가 활성화됨에 의한 것일 수 있다(도 23).
- [258] 본 발명의 조성물의 예방 또는 치료 대상인 암은 상기 경로에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 모든 암으로서, 예를 들면, 유방암, 난소암, 자궁 경부암, 전립선암, 고환암, 음경암, 비뇨생식관 암, 고환종, 식도암, 후두암, 위암, 위장관암, 피부암, 각질극 세포종, 난포 암종, 흑색종, 폐암, 소세포 폐암종, 비-소세포 폐암종(NSCLC), 폐 선암, 폐의 편평 세포 암종, 결장암, 췌장암, 갑상선암, 유두암, 방광암, 간암, 담관암, 신장, 골암, 골수 장애, 림프 장애, 모발 세포암, 구강 및 인두(경구)암, 구순암, 설암, 구강암, 침샘암, 인두암, 소장암, 결장암, 직장암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 대장암, 자궁내막암, 자궁암, 뇌암, 중추신경계암, 복막암, 간세포 암, 두부 암, 경부 암, 호지킨, 백혈병 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [259] 상기 암은 항암제 내성암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [260]
- [261] 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, 덱스트로오스 용액, 말토 덱스트린 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.
- [262] 본 발명의 조성물은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 붙 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.
- [263] 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.

- [264] 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. 예를 들면 체중 1kg당 0.01 μg 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.
- [265] 본 발명의 조성물은 상처의 치료와 관련하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다.
- [266] 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.

[267]

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

[269]

[270] 실시예

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

[272] 1. 다공성 실리카 입자의 제조

[273] (1) 다공성 실리카 입자의 제조

[274] 1) 소기공 입자의 제조

[275] 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.

[276] 이후 상기 반응액을 25°C에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하고, 25°C에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하며 에탄올 및 증류수로 번갈아가며 5회 세척하였다.

[277] 이후 70°C 오븐에서 건조시켜 1.5g의 분말형의 소기공 다공성 실리카

입자(기공 평균 직경 2nm, 입경 200nm)를 얻었다.

[278]

[279] **2) 기공 확장**

[280] 1.5g의 소기공 다공성 실리카 입자 분말을 에탄올 10ml에 첨가하여 초음파 분산시키고, 물 10ml, TMB (trimethyl benzene) 10ml를 첨가하여 초음파 분산시켰다.

[281] 이후 상기 분산액을 오토클레이브에 넣고 160°C, 48시간 반응시켰다.

[282] 반응은 25°C에서 시작하여 10°C/분의 속도로 승온시켜 수행하였고, 이후 오토클레이브 내에서 1~10°C/분의 속도로 서서히 냉각시켰다.

[283] 냉각된 반응액을 25°C에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하고, 25°C에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하며 에탄올 및 증류수로 번갈아가며 5회 세척하였다.

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

[285]

[286] **3) 하소**

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

[288]

[289] **(2) 다공성 실리카 입자의 제조**

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

[291]

[292] **(3) 다공성 실리카 입자의 제조 (10L 스케일)**

[293] 5배 큰 용기를 사용하고, 각 물질을 모두 5배 용량으로 사용한 것을 제외하고는 실시예 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[294]

[295] **(4) 다공성 실리카 입자의 제조 (입경 300nm)**

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

[297]

[298] **(5) 다공성 실리카 입자의 제조 (입경 500nm)**

[299] 소기공 입자의 제조시에 증류수 800ml, 메탄올 1010 ml, CTAB 10.6g을 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[300]

[301] **(6) 다공성 실리카 입자의 제조 (입경 1000nm)**

[302] 소기공 입자의 제조시에 증류수 620ml, 메탄올 1380ml, CTAB 7.88g을 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[303]

[304] (7) 다공성 실리카 입자의 제조 (기공 직경 4nm)

[305] 기공 확장시에 TMB를 2.5mL를 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[306]

[307] (8) 다공성 실리카 입자의 제조 (기공 직경 7nm)

[308] 기공 확장시에 TMB를 4.5mL를 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[309]

[310] (9) 다공성 실리카 입자의 제조 (기공 직경 17nm)

[311] 기공 확장시에 TMB를 11mL를 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[312]

[313] (10) 다공성 실리카 입자의 제조 (기공 직경 23nm)

[314] 기공 확장시에 TMB를 12.5mL를 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[315]

[316] (11) 다공성 실리카 입자의 제조

[317] 소기공 입자의 제조시에 증류수 900ml, 메탄올 850 ml, CTAB 8g을 사용한 것을 제외하고는 1-1-(1)과 동일한 방법으로 다공성 실리카 입자를 제조하였다.

[318]

[319] 2. 다공성 실리카 입자의 표면 개질

[320] (1) 실시예 1-1-(1)의 다공성 실리카 입자를 (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)와 반응시켜 양전하로 대전시켰다.

[321] 구체적으로, 100 mL 둥근바닥플라스크에 100 mg의 다공성 실리카 입자를 10 mL의 톨루엔에 bath sonicator로 분산시켰다. 이후 1 mL의 APTES를 첨가하고 400 rpm으로 교반하며 130°C에서 교반하며 12시간 동안 반응시켰다.

[322] 반응 후에 상온까지 서서히 식히고, 10분간 8000rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하고, 25°C에서 10분간 8000rpm에서 원심분리하며 에탄올 및 증류수로 번갈아가며 5회 세척하였다.

[323] 이후 70°C 오븐에서 건조시켜 표면 및 기공 내부에 아미노기를 갖는 분말형의 다공성 실리카 입자를 얻었다.

[324] (2) 1.8 mL의 APTES를 사용한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 실시예 1-1-(11)을 표면 개질하여, 표면 및 기공 내부에 아미노기를 갖는 분말형의 다공성 실리카 입자를 얻었다.

[325]

[326] 3. 입자의 형성 및 기공의 확장 확인

[327] 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).

[328] 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,

[329] 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.

[330]

[331] **4. 기공 직경 및 BET 표면적 계산**

[332] 실시예 1-1-(1)의 소기공 입자, 실시예 1-1-(1), (7), (8), (10), (11)의 다공성 실리카 입자의 표면적을 계산하였다. 표면적은 Brunauer-Emmett-Teller(BET) 방법에 의해 계산되었으며, 기공 직경의 분포는 Barrett-Joyner-Halenda(BJH) 방법에 의하여 계산되었다.

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

[334]

[335] [표1]

구분	기공 직경(nm)	BET 표면적(m ² /g)
실시예 1-1-(1)의 소기공 입자	2.1	1337
실시예 1-1-(7)	4.3	630
실시예 1-1-(8)	6.9	521
실시예 1-1-(1)	10.4	486
실시예 1-1-(10)	23	395
실시예 1-1-(11)	12.3	379

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

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

[338]

[339] **6. 흡광도비 측정**

[340] 시간별 하기 수학적 식 1에 따른 흡광도비를 측정하였다.

- [341] [수학식 1]
- [342] A/A_0
- [343] (식 중, A_0 는 상기 다공성 실리카 입자 1mg/ml 현탁액 5ml를 직경 50 kDa의
- [344] 기공을 갖는 원통형 투과막에 넣고 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도이고,
- [345] 상기 투과막 외부에는 상기 투과막과 접하며, 상기 현탁액과 동일한 용매 15ml가 위치하고, 상기 투과막 내외부는 37°C에서 60rpm 수평 교반되며,
- [346] A_t 는 상기 A_0 의 측정시로부터 t시간 경과 후에 측정된 다공성 실리카 입자의 흡광도임).
- [347] 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°C에서 60rpm 수평 교반하며 수행되었다.
- [348] 이후 UV-vis spectroscopy에 의해 흡광도를 측정하였고, $\lambda = 640 \text{ nm}$ 에서 분석되었다.
- [349] **(1) 흡광도 비 측정**
- [350] 실시예 1-1-(1)의 다공성 실리카 입자의 흡광도비를 상기 방법에 따라 측정하였고, 그 결과는 도 8에 나타내었다.
- [351] 이를 참조하면 흡광도비가 1/2가 되는 t가 약 58시간으로 굉장히 천천히 분해되는 것을 확인할 수 있다.
- [352]
- [353] **(2) 입경별**
- [354] 실시예 1-1-(1), (5), (6)의 다공성 실리카 입자의 흡광도를 상기 수학식 1에 따라 측정하였고, 그 결과는 도 9에 나타내었다(현탁액과 용매로는 SBF를 사용).
- [355] 이를 참조하면, 입경의 증가에 따라 t가 감소함을 알 수 있다.
- [356]
- [357] **(3) 기공 평균 직경별**
- [358] 실시예 1-1-(1), (9)의 다공성 실리카 입자, 그리고 컨트롤로서 실시예 1-1-(1)의 소기공 다공성 실리카 입자의 흡광도를 상기 수학식 1에 따라 측정하였고, 그 결과는 도 10에 나타내었다(현탁액과 용매로는 SBF를 사용).
- [359] 이를 참조하면, 실시예의 다공성 실리카 입자는 컨트롤에 비해 t가 상당히 큰 것을 확인할 수 있다.
- [360]
- [361] **(4) pH별**
- [362] 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.

[363] 이를 참조하면, pH 별 t의 차이는 있으나, 모두 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상이었다.

[364]

[365] (5) 대전

[366] 실시예 1-2-(1)-1)의 다공성 실리카 입자의 흡광도를 측정하였고, 그 결과는 도 12에 나타내었다(현탁액과 용매로는 Tris(pH 7.4)를 사용).

[367] 이를 참조하면, 양전하로 대전된 입자도 흡광도의 비가 1/2이 되는 t가 24 이상이었다.

[368]

[369] 7. RNA의 담지 및 방출

[370] 합성 RIG-I 리간드(5'-triphosphate hairpin RNA, ppp-RNA, 서열번호 1)와 대조 hairpin RNA (OH-RNA)를 합성하였다(도 14 B). 1µg의 ppp-RNA에 실시예 1-1-(11)의 다공성 실리카 입자(DegradaBALL)을 40, 30, 20, 10, 5 µg 혼합하여 실온에 10분간 방치한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액의 ppp-RNA를 SDS-PAGE로 검출한 결과, 무게비 1:10 (ppp-RNA:DegradaBALL)까지 ppp-RNA가 검출되지 않음을 확인하였다(도 15C). 이를 기반으로 이후 실험에서 DegradaBALL의 담지 용량을 10%로 설정하였다. FITC로 표지한 DegradaBALL에 Cy5로 표지한 OH-RNA를 담지한 후 OH-RNA 농도 5nM로 A549 세포에 2시간 동안 처리하였다. 배지를 교체한 뒤 정해진 시점(처리 후 6, 12, 24 시간)까지 배양하여 고해상도 현미경으로 확인하였고, 이를 정량 분석하였다 (도 16, 17 D, E). 이를 통해 DegradaBALL에 담지된 OH-RNA가 세포 내로 이동한 후, 24시간에 걸쳐 서서히 DegradaBALL에서 방출되는 것을 확인하였다.

[371]

[372] 8. 면역 활성화 효과

[373] 24웰 플레이트 한 웰 당 세포(A549세포, 배지 RPMI1640, 10% FBS, 1% P/S) 25000 개를 분주하여 하룻밤 동안 CO₂ 5%, 37°C 인큐베이터에 배양한다. 다음날 표와 같이 각각의 시료들을 정리된 조건에 맞추어 배합한 뒤 30분간 두어 유전자 도입을 위한 혼합물을 준비한다. 준비한 혼합물을 혈청이 들어가지 않은 배양액(RPMI1640, 1%P/S)에 섞어 유전자 도입을 준비한다.

[374]

[375] [표2]

	Control	Group1	Group2	Group3	Group4	Group5
ppp-RNA				850 ng	850 ng	850 ng
DegradaBALL			15 µg			15 µg
LNP		0.5 µl			0.5 µl	

- [376] 세포가 배양되어 있는 24웰 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내 배양액을 제거하고 1xPBS로 잔여 배양액이 제거될 수 있도록 세척한다. 1xPBS까지 제거하고 난 뒤 유전자 도입 배양액을 각 웰에 분주하고 유전자 도입 혼합물이 세포에 잘 들어가도록 인큐베이터 넣어 6시간동안 배양한다. 6시간 이후, 인큐베이터에서 꺼내 유전자 도입 혼합물이 들어간 배양액을 제거하고 혈청이 들어간 배양액 (RPMI1640, 10% FBS, 1% P/S)을 첨가하여 추가적으로 배양(6시간/18시간/42시간)한다. 유전자 도입 및 배양이 완료된 24웰 플레이트를 인큐베이터에 꺼낸 다음 배양액을 제거한다. 플레이트 바닥에 붙어 있는 세포로부터 RNA를 추출하기 위하여 TRIzol 시약을 처리하고, 판매처에서 권장한 방법에 따라 RNA를 추출한다.
- [377] 추출된 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위하여 M-MLV RT 5xmaster mix (elpisbiotech, #EBT-1511) 시약을 사용하였으며, 판매처에서 권장한 방법에 따라 RNA로부터 cDNA를 합성하였다.
- [378] cDNA로부터 타겟 유전자의 발현을 정량적으로 분석하기 위하여 real-time PCR 분석을 수행하였다. Power SYBR Green PCR Master Mix (#4367659) 시약을 사용하였으며, 판매처에서 권장한 방법에 따라 cDNA로부터 타겟 유전자의 발현량을 확인하였다.
- [379]
- [380] (1) 인터페론 베타
- [381] ppp-RNA가 첨가되지 않은, control, group1, group2에서 IFN- β 의 변화는 거의 없었다. 이는 ppp-RNA가 없이, 전달체인 LNP와 DegradaBALL 만으로는 IFN- β 의 발현에 영향을 미치지 않기 때문이다(도 18).
- [382] ppp-RNA가 첨가되었지만 전달체가 없는 실험군의 경우도 배양시간과는 상관없이 IFN- β 의 발현에는 변화가 없었다. 이는 ppp-RNA가 존재하더라도 세포 내로 들어가지 못하였기 때문에 IFN- β 의 발현에는 영향을 주지 못한 것으로 해석할 수 있다.
- [383] ppp-RNA가 첨가되고 LNP를 전달체로 사용한 실험군의 경우도 배양시간과 상관없이 IFN- β 발현 큰 변화가 없었다. 이는 LNP만으로는 ppp-RNA가 세포 내로 전달되지 못하였거나, LNP로 ppp-RNA가 세포 내로 전달되더라도 ppp-RNA가 RIG-I와 상호작용하기 이전에 세포 내 환경으로부터 활성을 잃어버렸을 것으로 해석할 수 있다.
- [384] ppp-RNA가 첨가되고 DegradaBALL을 전달체로 사용한 실험군의 경우 배양시간에 따른 IFN- β 발현이 크게 변화함을 볼 수 있다. 특히 배양시간이 24시간 되는 시점에서 IFN- β 의 발현이 최고가 되었다. 따라서, DegradaBALL이 ppp-RNA를 세포 내로 효과적으로 전달시키면서, 그 생물학적 활성을 효과적으로 잘 보여주는 결과이다.
- [385]
- [386] (2) 바이페린

- [387] ppp-RNA가 첨가되지 않은, Control, Group1에서 Viperin 의 변화는 거의 없었다. 이는 ppp-RNA 가 존재하지 않기 때문에 RIG-I와의 상호작용이 일어나지 않고, 전달체인 LNP 만으로도 Viperin의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 해석할 수 있다(도 19).
- [388] ppp-RNA가 첨가되지 않고, DegradaBALL 만 첨가된 Group2의 Viperin 의 변화는 크지 않았다.
- [389] ppp-RNA가 첨가되었지만 전달체가 없는 Group3의 경우도 배양시간과는 상관없이 Viperin의 발현에는 변화가 없었다. 이는 ppp-RNA가 존재하더라도 세포 내로 들어가지 못하였기 때문에 Viperin의 발현에는 영향을 주지 못한 것으로 해석할 수 있다.
- [390] ppp-RNA가 첨가되고 LNP를 전달체로 사용한 Group4의 경우, 짧은 배양시간인 12시간에서만 Viperin 발현에 약간의 증가가 있었다. 이는 LNP에 의한 ppp-RNA의 생물학적 효과가 크지 않고 한정적인 것으로 해석할 수 있다.
- [391] ppp-RNA가 첨가되고 DegradaBALL을 전달체로 사용한 Group5의 경우 배양시간에 따른 Viperin 발현이 매우 크게 증가되는 것을 관찰하였다. 특히 배양시간이 24시간 되는 시점에서 Viperin의 발현이 최고가 되었다. 따라서, DegradaBALL이 ppp-RNA를 세포 내로 효과적으로 전달시키면서, 그 생물학적 활성을 효과적으로 잘 보여준다고 해석할 수 있다.

[392]

[393] (3) 인터페론 알파

[394] C57BL/6 8주령 마우스를 표와 같이 정리된 실험군으로 나누었다.

[395]

[396] [표3]

	Control	Group1	Group2	Group3
ppp-RNA	-	10 µg	-	10 µg
DegradaBALL	-	-	200 µg	200 µg

- [397] 각각의 시료들을 1xPBS에 섞어 복합체를 만들고 30분간 두어 주사액을 준비하였고 주사액의 최종 부피는 100 µl 가 되도록 맞추었다. 각 그룹의 마우스에 각각의 주사액을 정맥 내로 주사하였으며, 주사 이후 6시간 12시간 24시간이 지난 시점에 마우스의 비장을 적출하였다. TRIzol 을 이용하여 적출된 비장으로부터 RNA를 추출하였다.추출된 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위하여 M-MLV RT 5x master mix (elpisbiotech, #EBT-1511)시약을 사용하였으며, 판매처에서 권장한 방법에 따라 RNA로부터 cDNA를 합성하였다.
- [398] cDNA로부터 타겟 유전자의 발현을 정량적으로 분석하기 위하여 real-time PCR 분석을 수행하였다. Power SYBR Green PCR Master Mix (#4367659)시약을 사용하였으며, 판매처에서 권장한 방법에 따라 cDNA로부터 타겟 유전자의

발현량을 확인하였다.

[399]

[400] Control, Group1, Group2 은 IFN- α 발현에서 어떠한 변화도 관찰할 수 없었다. 특히 ppp-RNA 만을 주입하거나, DegradaBALL만 주입하여도 IFN- α 의 발현에는 영향을 주지 않음을 확인할 수 있다(도 20). 정맥주사로 ppp-RNA 만을 주입하더라도 세포 내로 침입할 수 없으며, 혈류 내에서 활성을 빠르게 잃어버렸기 때문에 해석할 수 있다.

[401] Group3의 경우 IFN- α 발현이 굉장히 크게 유도가 되며, 이는 시간에 따라서 24시간까지 지속되어 유지되는 것을 확인할 수 있다. 정맥주사를 통해 투여한 DegradaBALL에 적제된 ppp-RNA는 혈류 내에 안정하게 유지가 되며, 세포 내부로 ppp-RNA가 전달될 수 있기 때문에 해석할 수 있다.

[402]

[403] **9. 항종양 효과**

[404] **(1) 종양내 LEM-S403 주사로 인한 인터페론 의존적 또는 비의존적 종양 세포 사멸 유도 (도 21 내지 26)**

[405] LEM-S403이 종양 내로 주사 될 경우 어느 정도의 기간 동안 잔류하게 될지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. LEM-S403을 종양내 주사로 투여하였을 경우 OH-RNA가 DegradaBALL (vehicle)에 의해 보호되어 종양 내에서 서방 방출되는 것을 기대 할 수 있다. OH-RNA에 FITC 형광을 표지하고 DegradaBALL에 TRAMRA 형광을 표지한 후 OH-RNA를 담지하여 종양내 주사로 투여할 경우, 1, 3, 5일차 중 1일차에서 가장 세기가 강한 OH-RNA 형광을 확인할 수 있었고, 이는 시간이 지날수록 점차 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 반면 OH-RNA 단독 투여군에서는 1일차에서도 OH-RNA의 형광을 확인할 수 없었다. LEM-S403이 종양 세포 내로 섭취되게 된다면 ppp-RNA를 서방형 방출하게 된다. 이후 ppp-RNA는 RIG-I에 매개된 신호를 통해 1형 인터페론 분비를 증가시키게 되고, 이는 CD 8 T 세포 및 NK 세포를 활성화시키며 면역을 증진시킨다. 또한 RIG-I에 매개된 신호 중, 인터페론과 독립적으로 종양의 세포 사멸 인자를 증가시켜 종양세포의 사멸을 유도한다. 마우스에 B16F10 흑색종 종양 세포 (B16F10) 약 1×10^6 개를 피하에 주입한 뒤, 3일 (day 0) 및 5일 (day 2)에 buffer, vehicle (70 μ g), ppp-RNA (7 μ g) 또는 LEM-S403 (7 μ g)를 종양 내 주사로 투여하고 6일 (day 3)에 종양을 분리하여 치료 기전을 확인하고자 한다. 면역 형광 염색 분석을 통해 분리한 종양에서 LEM-S403 투여군에서 독보적으로 phospho-STAT1이 발현이 증가되어 있는 것을 확인하였으며, 이는 LEM-S403에 의해 분비된 1형 인터페론이 주변 혹은 자기 세포에 수용체에 반응하여 STAT1을 인산화 시킨 것으로 판단된다. Hematoxylin 및 eosin 염색을 통해 조직 병리학적으로 LEM-S403 투여군의 종양 조직이 다른 투여군에 비해 세포의 수가 적고 조직이 영성한 것을 확인하였고, 면역 형광 염색을 통한 TUNNEL 분석에서도 다른 군에 비해 다수의 형광이 관찰되었다. 이를 통해 LEM-S403이 종양세포의

사멸(apoptosis)을 일으켰다는 것을 확인할 수 있다.

[406]

[407] (2) 종양내 LEM-S403 주사로 인한 인터페론 비의존적 종양 세포 사멸 유도 (도 27 내지 31)

[408]

C57BL/6 마우스에 B16F10 세포를 1×10^6 개 피하주사하여 흑색종 마우스 모델을 준비하였다. 종양이 약 100 mm^3 크기에 도달한 시점에 각 군별로 6마리의 마우스에 $50 \mu\text{l}$ 1xPBS (buffer), $70 \mu\text{g}$ DegradaBALL (vehicle), $7 \mu\text{g}$ ppp-RNA, $70 \mu\text{g}$ DegradaBALL + $7 \mu\text{g}$ ppp-RNA (LEM-S403)을 2일 간격으로 총 2회 종양 내 주사하였다. 마지막 투여 후 24시간 후, 마우스를 희생하여 적출한 종양을 Annexin V-propidium iodide (PI) 염색한 뒤, 유세포분석을 진행하였다. LEM-S403 처리군은 버퍼, vehicle, ppp-RNA 처리군에 비해 종양 내 세포사멸 중인(Annexin V+, PI-) 세포와 사멸한 (Annexin V+, PI+) 세포의 비율이 모두 유의하게 증가한 것을 확인하였고, 살아 있는 (Annexin V-, PI-) 세포의 비율이 유의하게 감소된 것을 확인하였다. 분자적인 수준에서 LEM-S403 처리 시 procaspase-3의 절단과 pro-apoptotic 유전자인 Noxa의 발현이 증가한 것을 각각 western blot과 RT-PCR을 통해 확인하였다 해당 현상은 in vitro 실험에서도 재현되었는데, B16F10 세포에 buffer, $0.85 \mu\text{g}$ ppp-RNA, $8.5 \mu\text{g}$ DegradaBALL (vehicle), ppp-RNA $0.85 \mu\text{g}$ + DegradaBALL $8.5 \mu\text{g}$ (LEM-S403), ppp-RNA $0.85 \mu\text{g}$ + Lipofectamine 2000 처리 후 24시간 시점에서 수거한 세포를 RT-PCR 분석한 결과, LEM-S403 처리 시 Noxa의 발현이 증가한 것을 확인하였다. 이를 통해 종양 내로 주사 시, LEM-S403이 종양 세포의 Noxa 발현을 증가시키고, caspase-3의 절단을 유도하는 기전으로 종양 세포의 세포사멸을 유도함을 검증하였다.

[409]

[410] (3) 종양내 LEM-S403 주사로 인한 종양 침윤 NK 세포와 CD8+ T 세포의 수 및 활성 증가 평가 (도 32 내지 35)

[411]

종양내 LEM-S403 주사로 인해 종양 내로 활성화된 면역세포 혹은 면역세포의 침윤이 증가하는 지를 확인하기 위해 유세포 분석과 면역 형광 염색 분석을 진행하였다. 유세포 분석을 토대로, LEM-S403 투여군에서 종양 내의 침윤된 면역세포 중 NK 세포의 분포 10.51%로 vehicle 군 대비 67% 증가하였으며, 이 중에 CD 69가 발현된 NK 세포는 종양 내의 침윤된 면역세포 중 약 3.59%이며 vehicle군 대비 약 152% 증가함을 확인하였다. CD 8 T cell 분포 또한 LEM-S403 투여군에서 종양 내의 침윤된 면역세포 중 8.57%로 다른 vehicle 군 대비 128% 증가하였고, 이 중에 CD 69가 발현된 CD 8 T 세포는 종양 내의 침윤된 면역세포 중 6.54%로 다른 vehicle 군 대비 141% 증가함을 확인하였다. 면역 형광 염색 분석에서도 다른 투여군에 비해 LEM-S403 투여군에서 NK 세포 및 CD 8 T 세포가 종양 내로 많이 침윤해 있는 것을 확인할 수 있었고, CD 69 양성인 세포 비율도 높음을 확인하였다.

[412]

[413] (4) 흑색종 마우스 모델을 이용한 LEM-S403의 단독 투여 및 병용 투여 (+ anti-PD-1 항체)의 항 종양 효과 (도 36 내지 39)

[414] 마우스 흑색종 모델에서 LEM-S403 단독 및 anti-PD-1 항체와 병용 투여를 통한 종양 성장 저해 효과를 확인하기 위한 실험을 진행 하였다. 마우스에 흑색종 세포인 B16F10을 접종한 후 부피가 약 100 mm³이 되었을 때 0, 3, 7 및 10일에 buffer (1xPBS, 50 µL, 종양내 투여), vehicle (70 µg, 종양내 투여), ppp-RNA (7 µg, 종양내 투여), LEM-S403 (7 µg, 종양내 투여) 또는 LEM-S403 (7 µg, 종양내 투여) 및 anti-PD-1 항체 (10 mg/kg, 복강 투여)을 투여하고, 2일 및 3일 간격으로 종양 부피를 측정하였다. Buffer, vehicle 및 ppp-RNA투여군에서는 종양이 빠르게 성장한 반면 LEM-S403 단독 및 anti-PD-1 항체 병용 투여군에서는 2일차부터 종양 성장이 더디게 증가하였고, 7일차부터 vehicle군과 비교 시 유의적으로 종양 부피가 작은 것을 확인하였다. 투여가 종료된 후, 11일에도 종양 성장은 vehicle 군에 비해 유의적으로 억제된 것을 확인할 수 있었다. 모든 마우스의 생존율은 추적 관찰하였고, Buffer, vehicle 및 ppp-RNA 군에 속한 마우스는 모두 15일 이전으로 사망하였다. 하지만, LEM-S403 단독 투여 혹은 anti-PD-1 항체와의 병용투여 군에서는 평균 생존기간이 유의적으로 증가된 것을 확인할 수 있었고, anti-PD-1과의 병용 투여 시, LEM-S403단독투여에 비해 유의적으로 종양 부피 차이를 보이진 않았으나, 평균 생존기간은 유의적으로 증가시킨 것을 확인하였다.

[415]

[416] **10. RNA를 담지한 입자의 전하에 따른 세포 내 전달 확인**

[417] 실시예 7에서 사용한 서열번호 1의 합성 RIG-I 리간드(5'-triphosphate hairpin RNA, ppp-RNA)와 실시예 1-1-(11)의 다공성 실리카 입자를 농도별로 혼합하여 B16F10 세포에 전달하였다.

[418] 각 웰에 5 x 10⁴개의 세포가 접종되었고, 입자의 전달은 4 h Transfection (Serum free) + 2 h (10% FBS)의 조건으로 수행되었다.

[419] 각 입자의 전하는 하기 표 4와 같다.

[420]

[421] [표4]

입자(µg/ml)	pppRNA(µg/ml)	담지 입자 전하
10	1	28.8
10	0.1	39.8
10	0	41.5

[422] 도 41을 참조하면, 입자와 ppp-RNA를 10:0.1의 비율로 사용하여 세포에 처리한 경우, 세포 내에 일시적 공포(액포, vacuoles) 형성이 관찰되는 것을 확인할 수 있다. 그러나 10:1(입자:ppp-RNA)에서는 이러한 공포(액포, vacuoles)형성이

관찰되지 않았다.

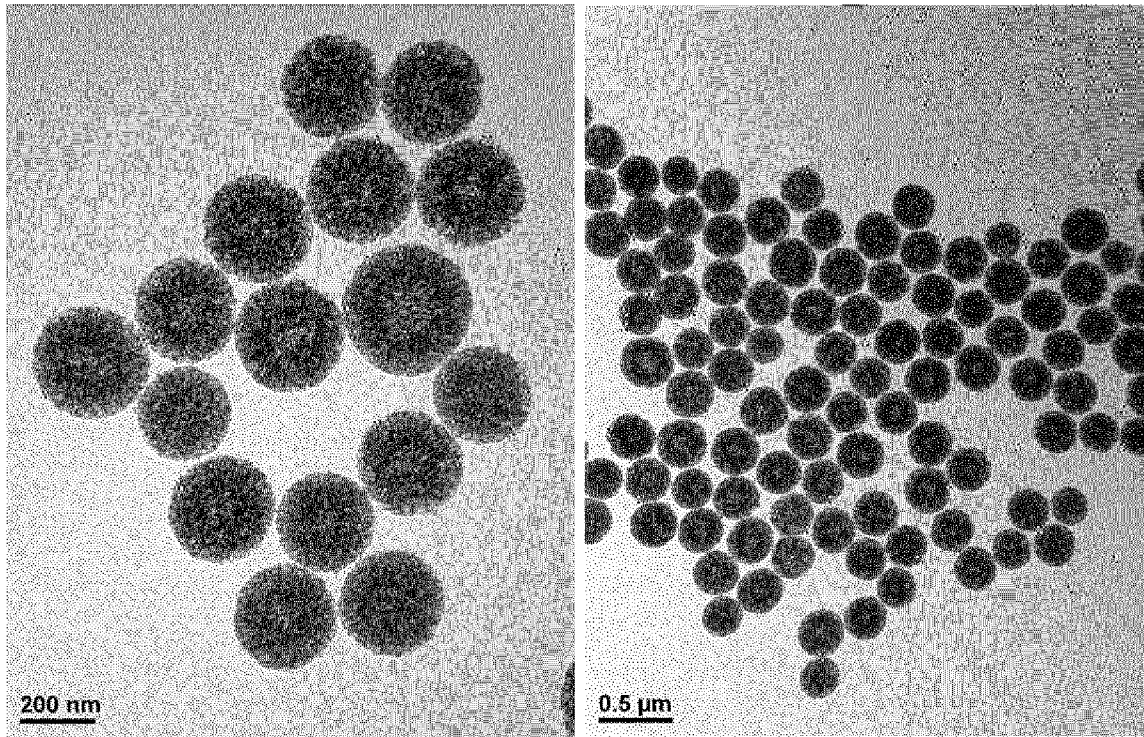
청구범위

- [청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 평활 말단의 헤어핀 RNA; 및 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자;를 포함하고, 상기 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경이 7 내지 25nm이고, 그 기공 내부가 양전하로 대전된 것인 면역 활성 개선용 약학 조성물:
[화학식 1]
5'-P_a-((N1-X1)_b-N2)-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'
(식 중, P는 인산기이고,
a는 2 내지 5의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고,
UUCG는 헤어핀의 루프를 형성하는 염기이고,
N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 1 내지 5개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고,
N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고,
b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 RNA는 하기 화학식 2로 표시되는 것인, 조성물:
[화학식 2]
5'-P_a-((N1-X1)_b-N2)-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'
(식 중, P는 인산기이고,
a 및 b는 2 내지 4의 정수이고,
N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고,
N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고,
b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 RNA는 그 길이가 14 내지 100 nt 인, 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 RNA는 서열번호 1 내지 25 중 어느 하나의 서열 및 그 5' 말단에 결합된 2 내지 4개의 인산기로 이루어진 것인, 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자의 제타 전위는 5 내지 65 mV인, 조성물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자의 제타 전위는 35 mV 이하인 조성물.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 입자의 RNA를 담지하지 않은 상태의 제타 전위는 10 내지 70 mV인, 조성물.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 입자와 상기 RNA의 무게비는 1: 5 내지 20인, 조성물.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 입자는 복수개의 기공을 가지고, 상기 기공은

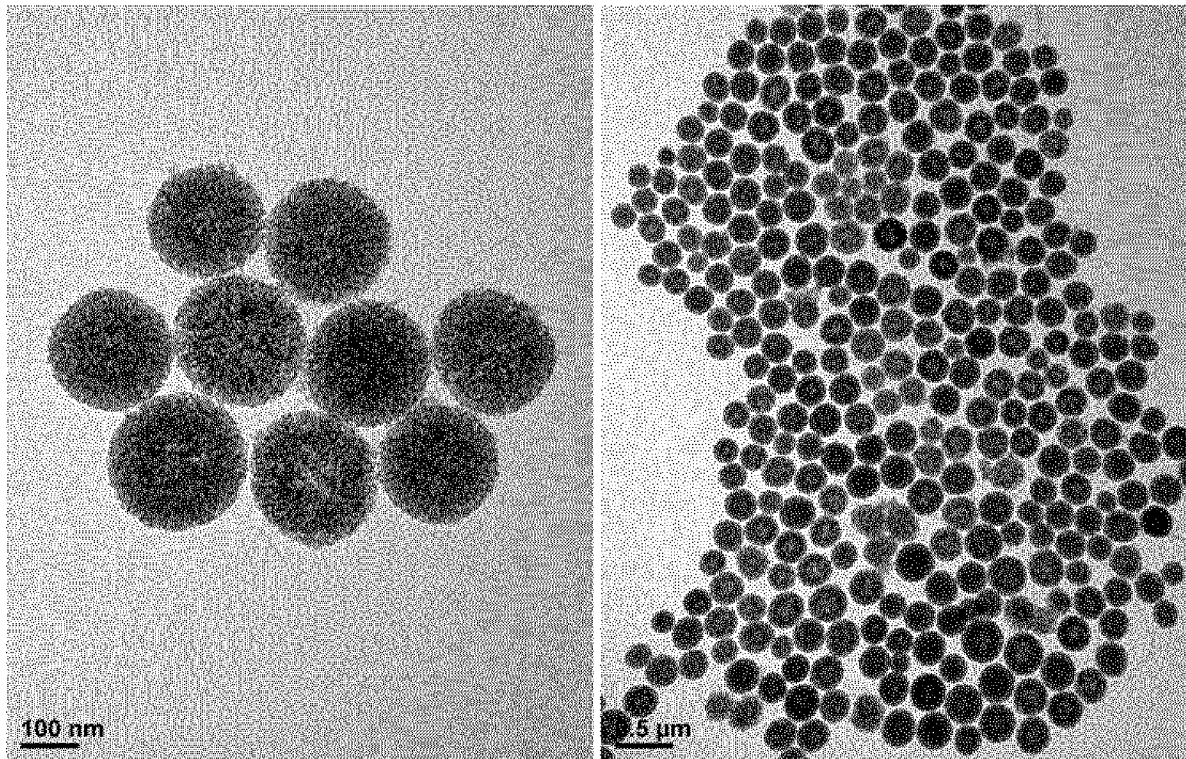
- 입자 표면에서 내부까지 이어진 것인, 조성물.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서, 상기 입자의 BET 표면적은 280 내지 680m²/g이고, 입경은 50 내지 500nm인, 조성물.
- [청구항 11] 청구항 1에 있어서, 상기 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경 5nm 미만의 소기공 입자의 기공이 평균 직경 7 내지 25nm로 확장된 것인, 조성물.
- [청구항 12] 하기 화학식 1로 표시되는 평활 말단의 헤어핀 RNA; 및 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자;를 포함하고, 상기 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경이 7 내지 25nm이고, 그 기공 내부가 양전하로 대전된 것인 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물:
 [화학식 1]
 5'-P_a-((N1-X1)_b-N2)-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'
 (식 중, P는 인산기이고, a는 2 내지 5의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고, UUCG는 헤어핀의 루프를 형성하는 염기이고, N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 1 내지 5개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고, N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고, b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).
- [청구항 13] 청구항 12에 있어서, 상기 RNA는 하기 화학식 2로 표시되는 것인, 조성물:
 [화학식 2]
 5'-P_a-((N1-X1)_b-N2)-UUCG-(N3-(X2-N4)_b)-3'
 (식 중, P는 인산기이고, a 및 b는 2 내지 4의 정수이고, N1 및 N2는 G 또는 C 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, X1 및 X2는 A 또는 U 중 선택된 2 내지 4개의 염기이고, 선택된 복수개의 염기는 서로 동일하거나 상이하고, N3는 N2와, X2는 X1과, N4는 N1과 상보적으로 연결되고, b회 반복되는 각 염기는 서로 동일하거나 상이한 염기임).
- [청구항 14] 청구항 12에 있어서, 상기 RNA는 그 길이가 15 내지 100 nt 인, 조성물.
- [청구항 15] 청구항 12에 있어서, 상기 RNA는 서열번호 1 내지 25 중 어느 하나의 서열 및 그 5' 말단에 결합된 2 내지 4개의 인산기로 이루어진 것인, 조성물.
- [청구항 16] 청구항 12에 있어서, 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자의 제타 전위는 5 내지 65 mV인, 조성물.
- [청구항 17] 청구항 12에 있어서, 상기 RNA를 기공 내에 담지한 다공성 실리카 입자의 제타 전위는 35 mV 이하인 조성물.
- [청구항 18] 청구항 12에 있어서, 상기 입자의 RNA를 담지하지 않은 상태의 제타

- 전위는 10 내지 70 mV인, 조성물.
- [청구항 19] 청구항 12에 있어서, 상기 입자와 상기 RNA의 무게비는 1: 5 내지 20인, 조성물.
- [청구항 20] 청구항 12에 있어서, 상기 입자는 복수개의 기공을 가지고, 상기 기공은 입자 표면에서 내부까지 이어진 것인, 조성물.
- [청구항 21] 청구항 12에 있어서, 상기 입자의 BET 표면적은 280 내지 680m²/g이고, 입경은 50 내지 500nm인, 조성물.
- [청구항 22] 청구항 12에 있어서, 상기 다공성 실리카 입자는 평균 기공 직경 5nm 미만의 소기공 입자의 기공이 평균 직경 7 내지 25nm로 확장된 것인, 조성물.
- [청구항 23] 청구항 12에 있어서, 상기 암은 유방암, 난소암, 자궁 경부암, 전립선암, 고환암, 음경암, 비뇨생식관 암, 고환종, 식도암, 후두암, 위암, 위장관암, 피부암, 각질극 세포종, 난포 암종, 흑색종, 폐암, 소세포 폐암종, 비-소세포 폐암종(NSCLC), 폐 선암, 폐의 편평 세포 암종, 결장암, 췌장암, 갑상선암, 유두암, 방광암, 간암, 담관암, 신장, 골암, 골수 장애, 림프 장애, 모발 세포암, 구강 및 인두(경구)암, 구순암, 설암, 구강암, 침샘암, 인두암, 소장암, 결장암, 직장암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 대장암, 자궁내막암, 자궁암, 뇌암, 중추신경계암, 복막암, 간세포 암, 두부 암, 경부 암, 호지킨 또는 백혈병인, 조성물.

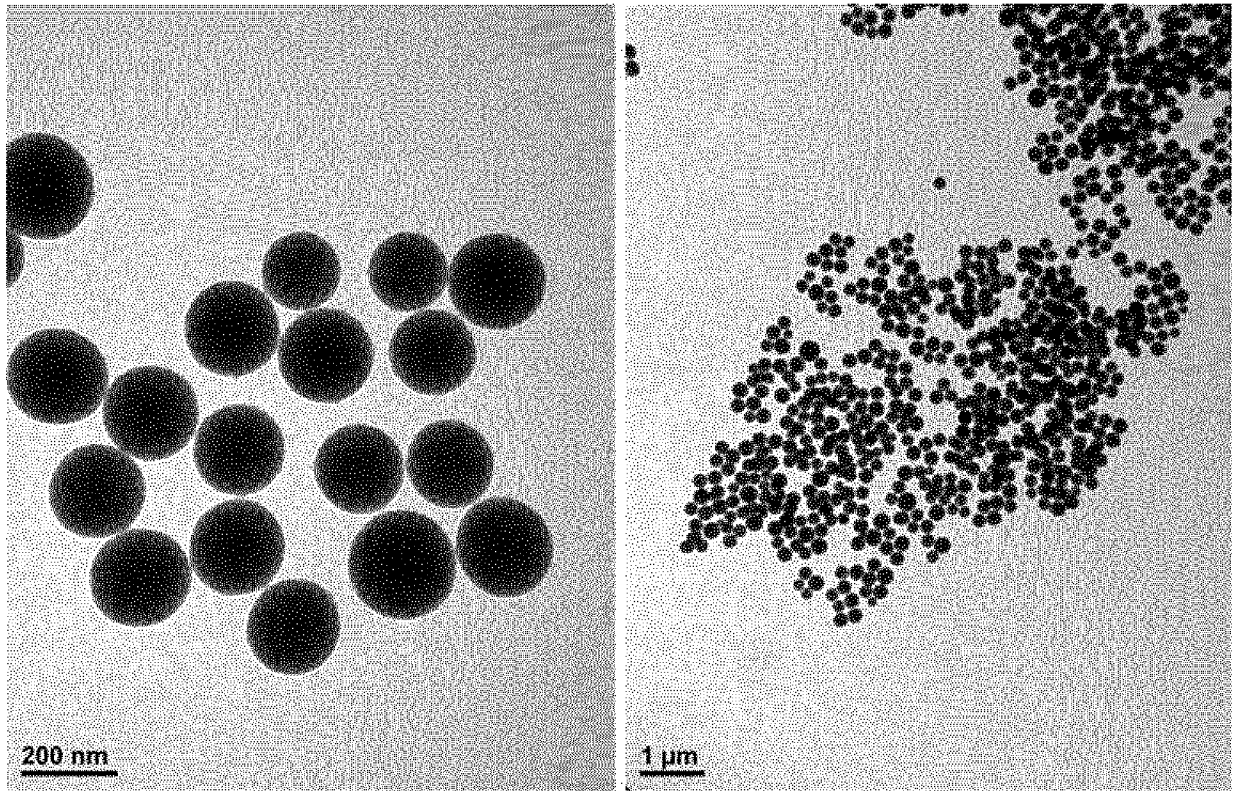
[도1]



[도2]



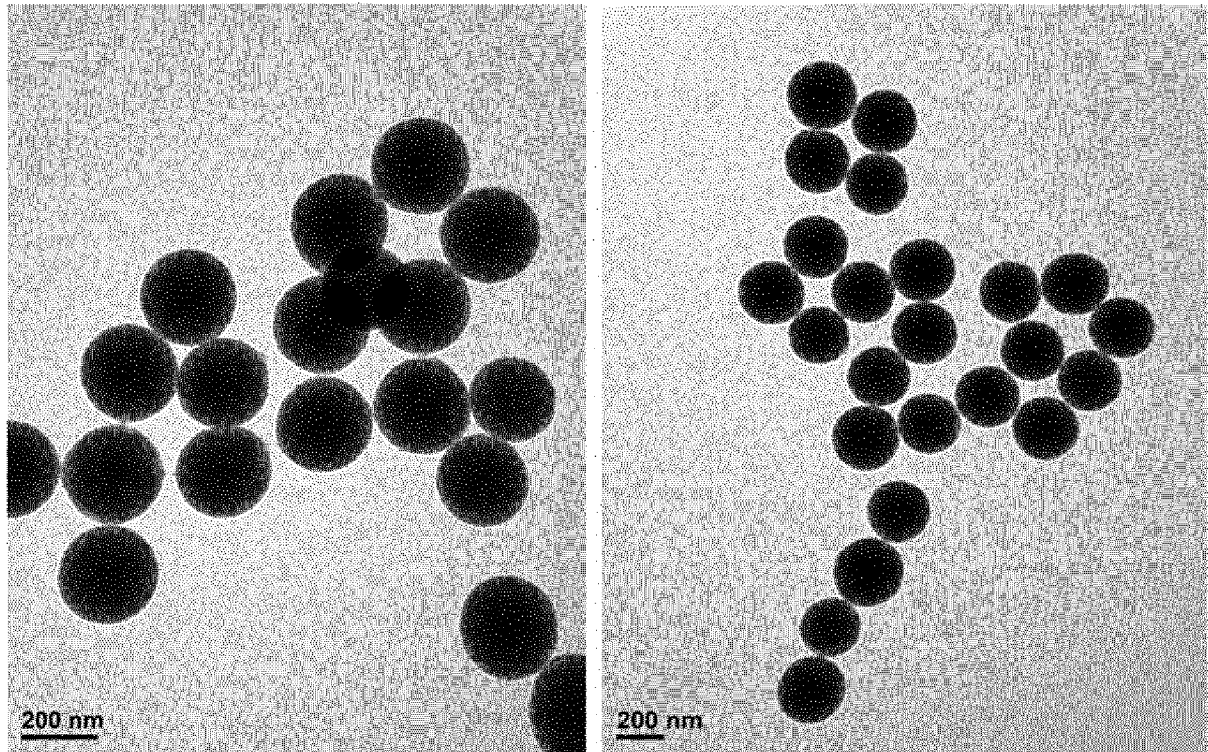
[도3]



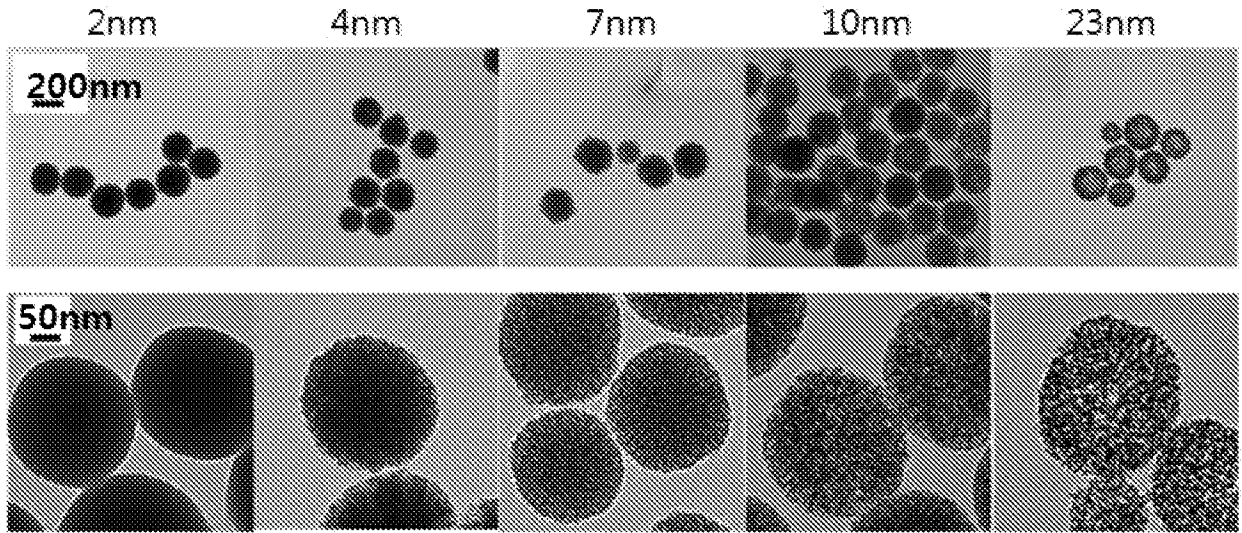
[도4]

2 L scale

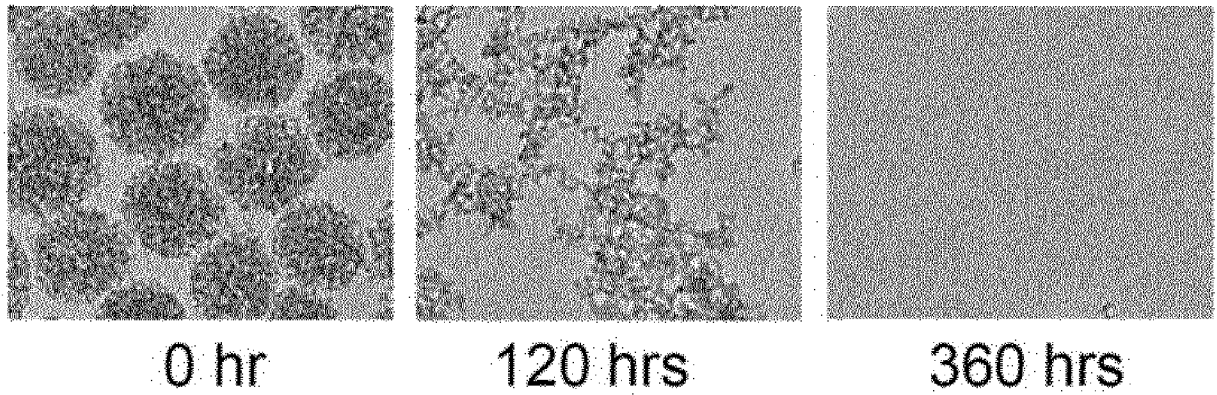
10 L scale



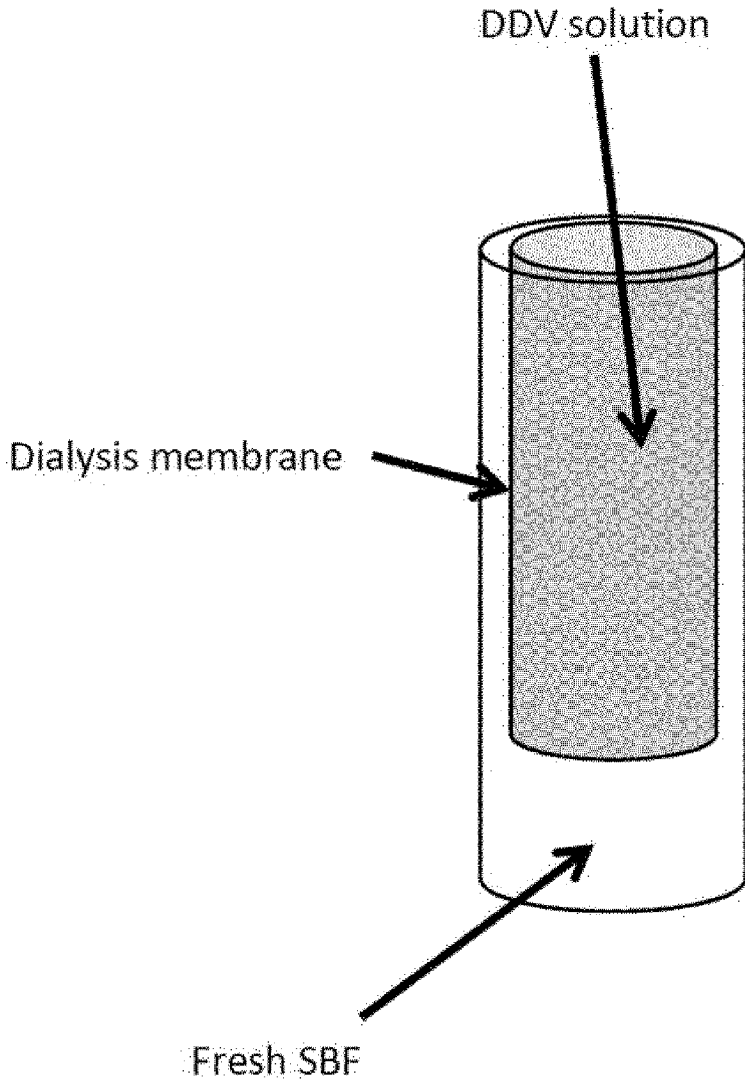
[도5]



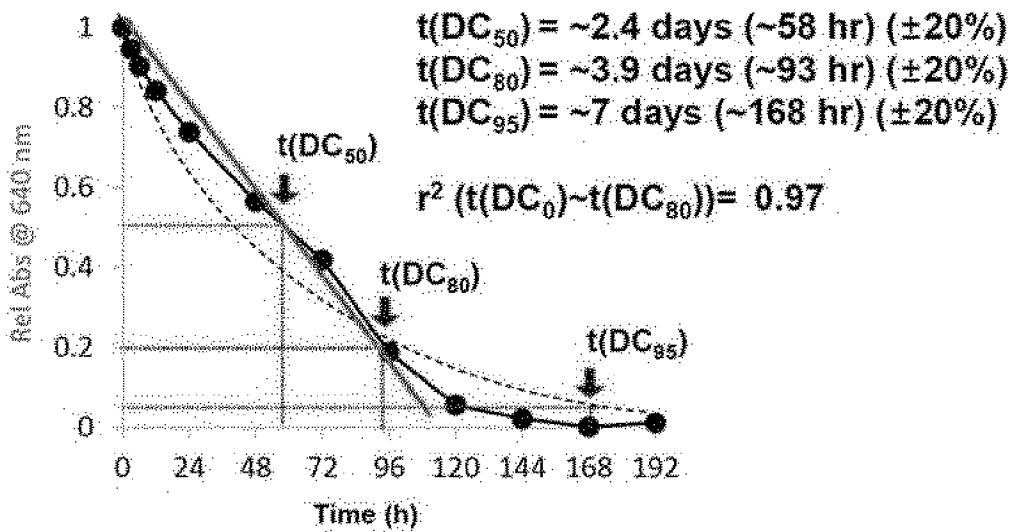
[도6]



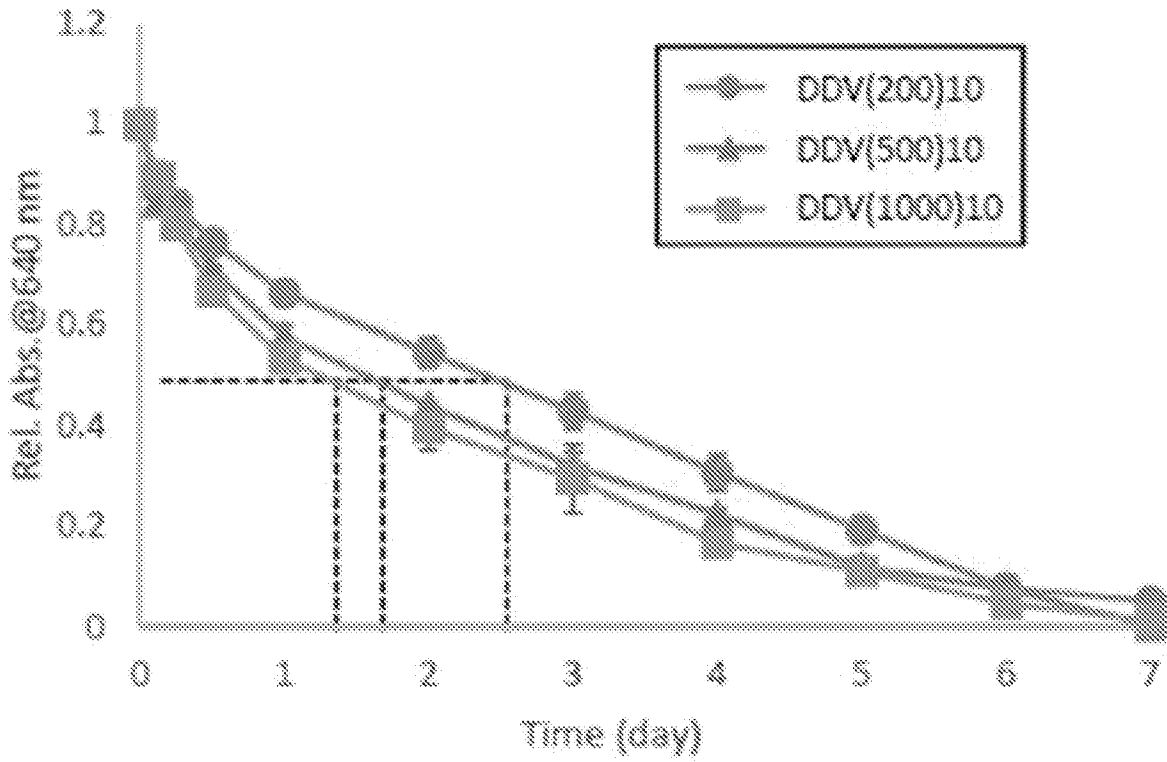
[도7]



[도8]

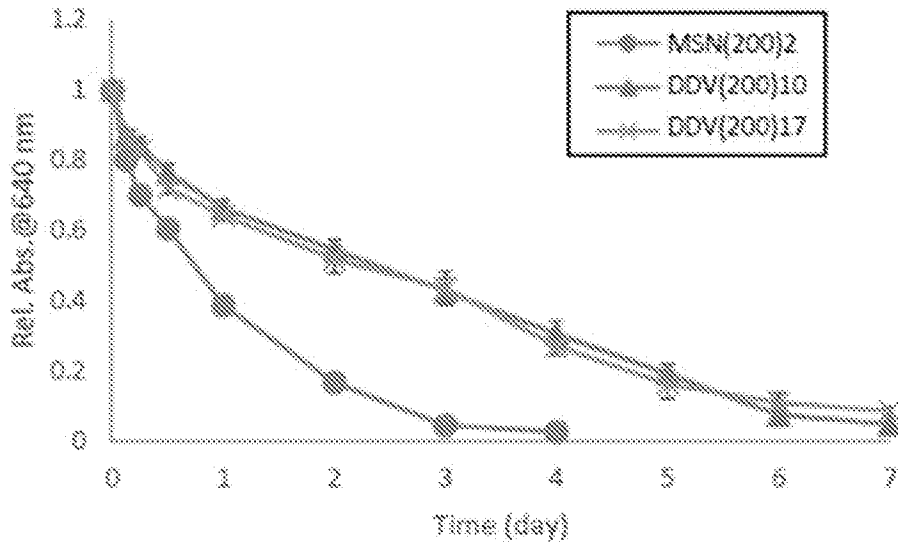


[도9]



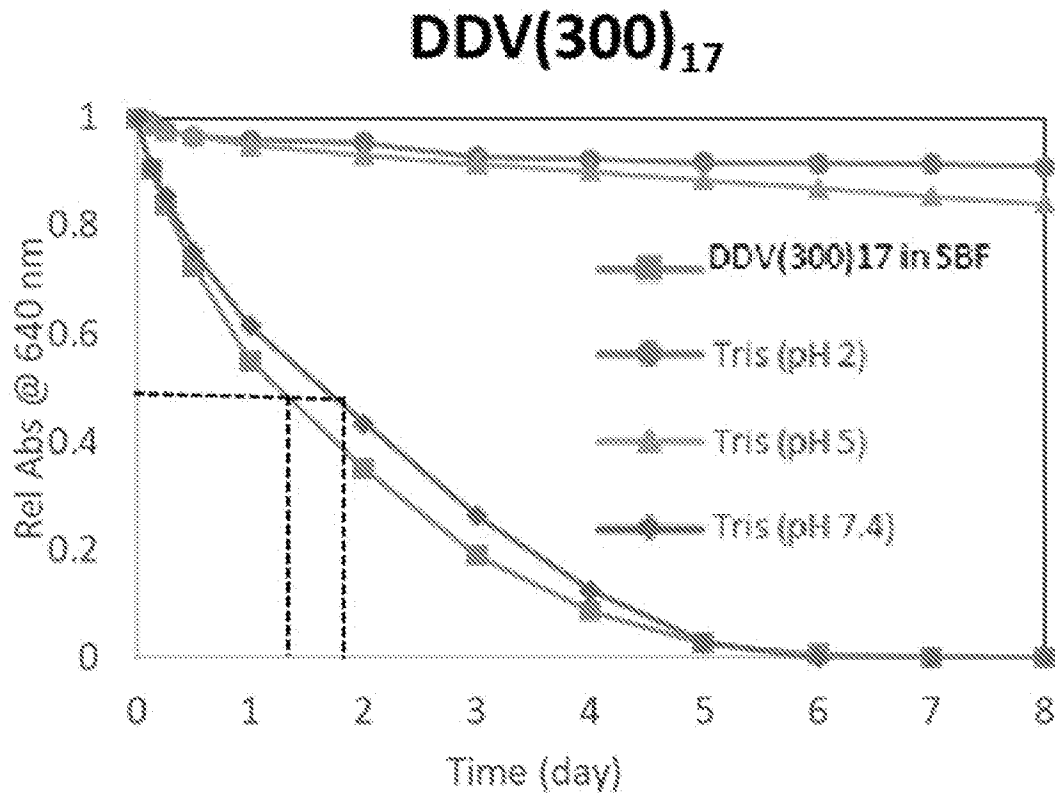
Sample	t _{50%}
DDV(200) ₁₀	57.4 h
DDV(500) ₁₀	37.5 h
DDV(1000) ₁₀	30.0 h

[도 10]

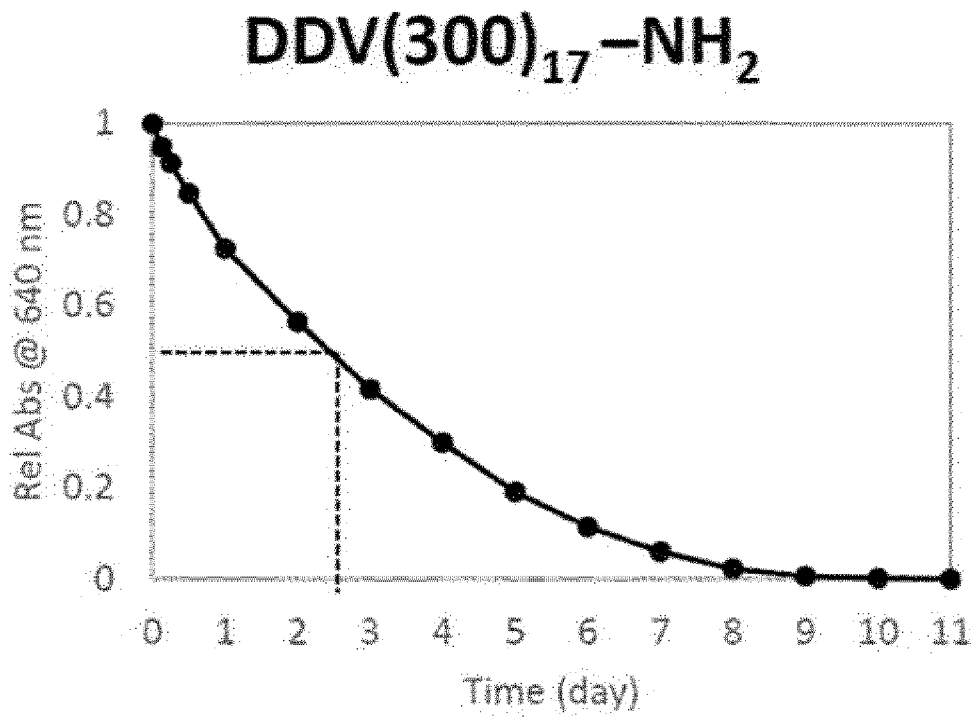


Samples	t _{50%}
MSN(200) ₂	17.9 h
DDV(200) ₁₀	57.4 h
DDV(200) ₁₇	53.6 h

[도 11]

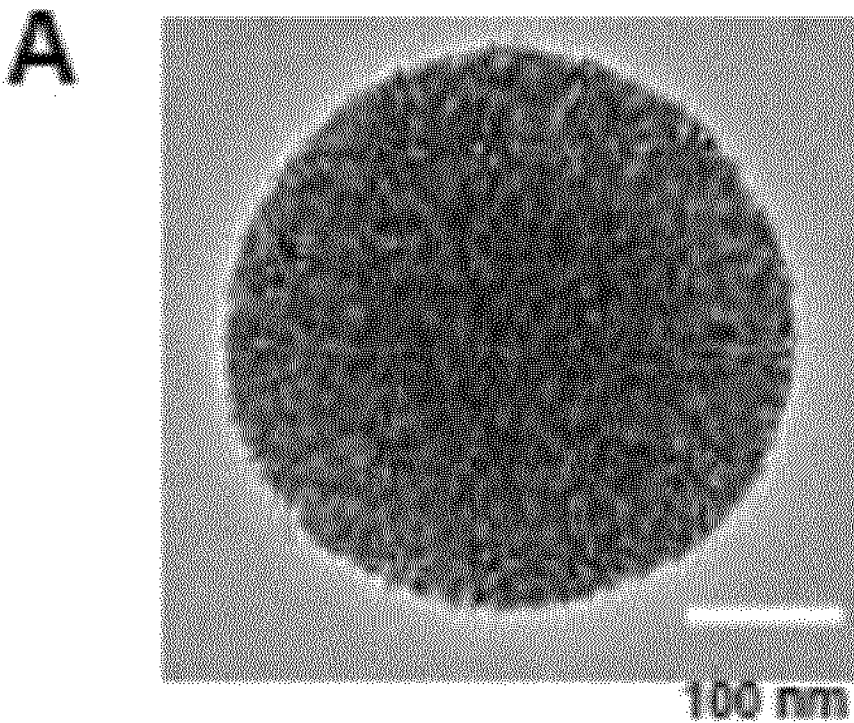


[도12]



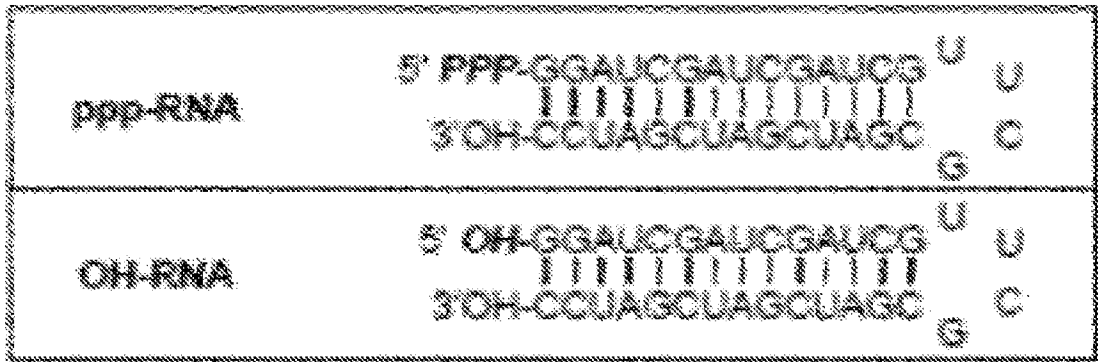
$t_{50\%} = \text{약 } 2.5 \text{ days}$

[도13]



[도 14]

B



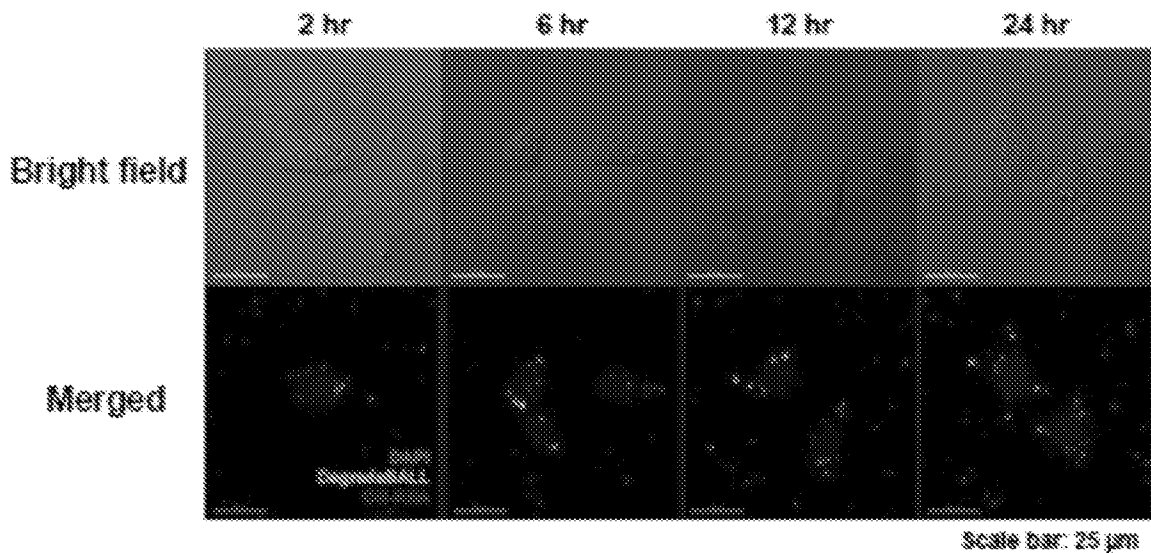
[도 15]

C

ratio	Ctrl	1:40	1:30	1:20	1:10	1:5
ppp-RNA	1	1	1	1	1	1
DeradaBALL	0	40	30	20	10	5

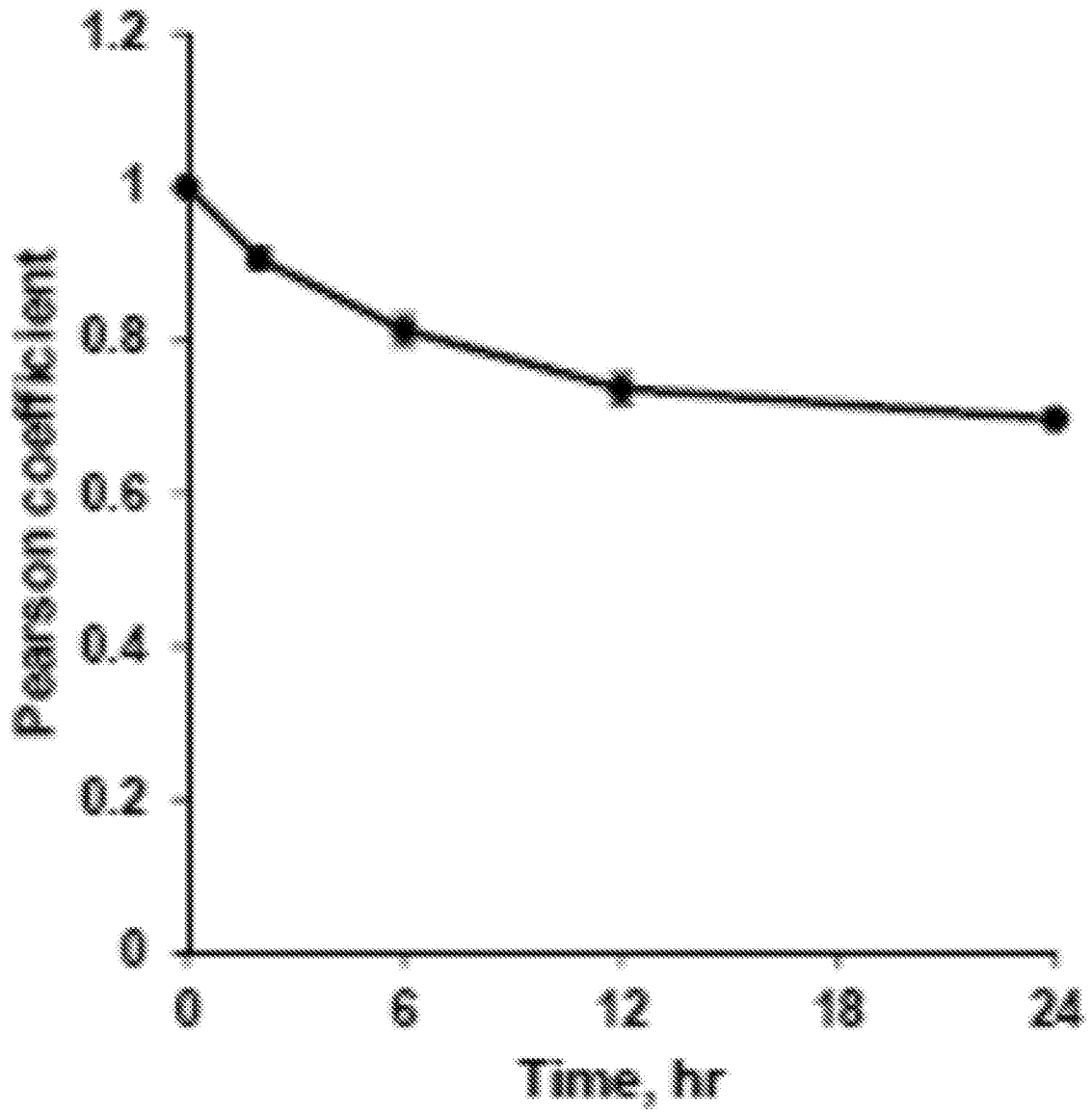
[도 16]

D



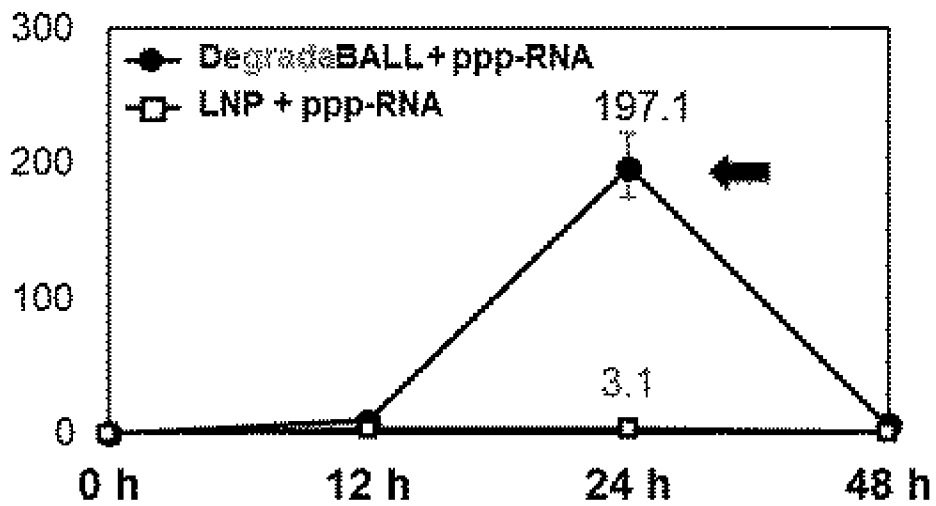
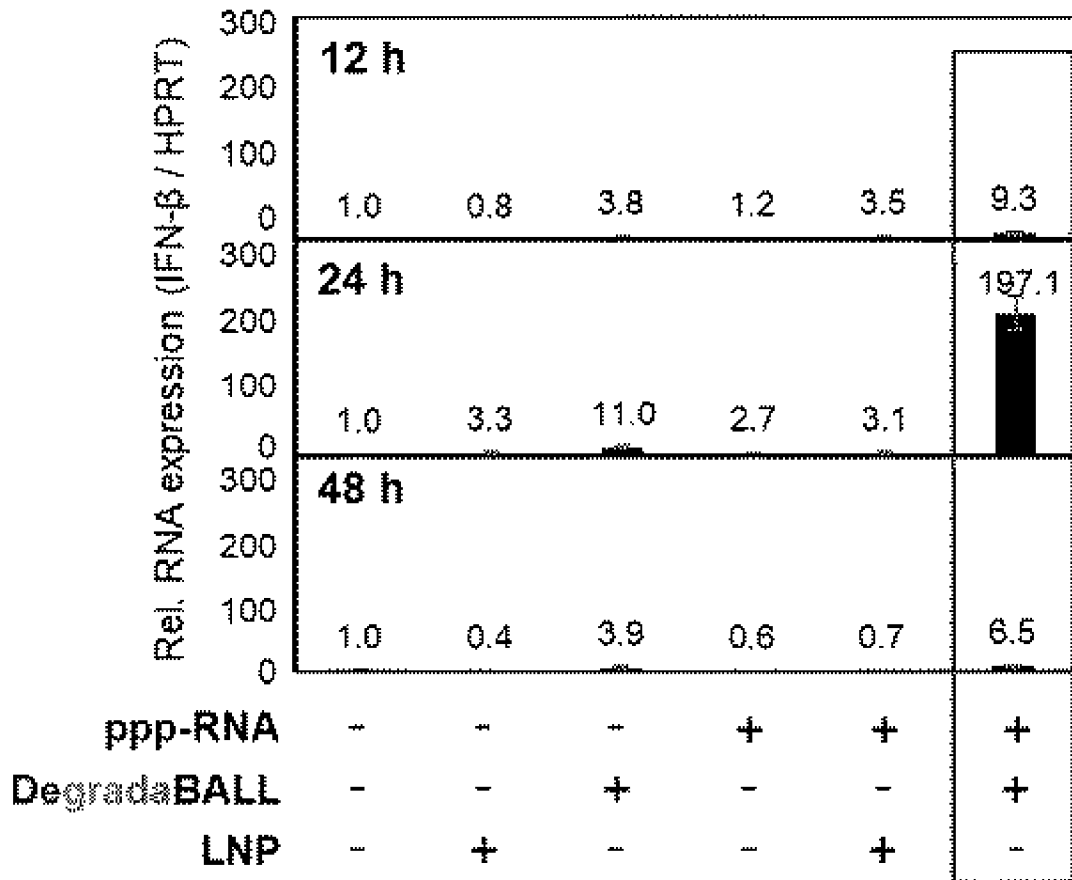
[도17]

E

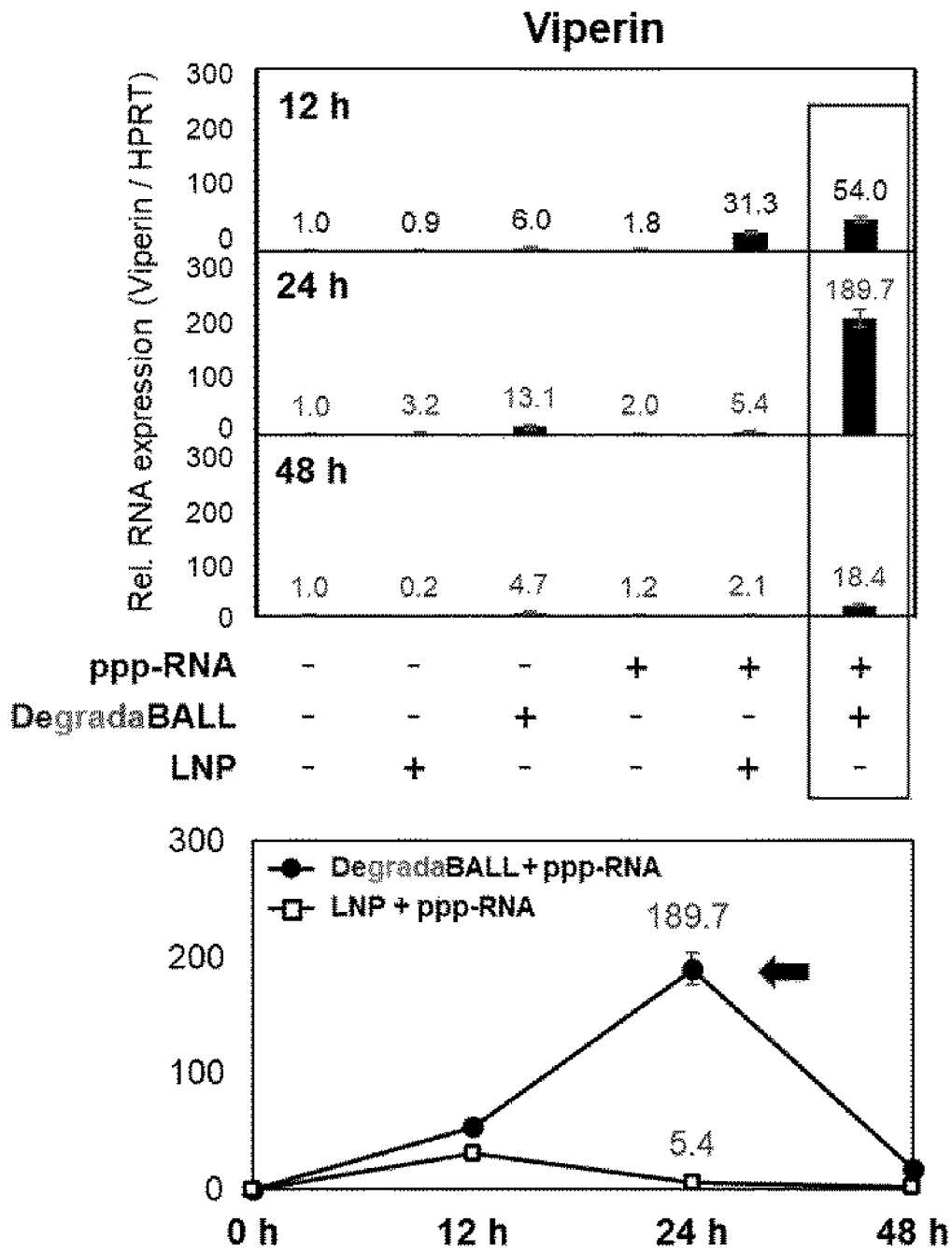


[도18]

IFN-β

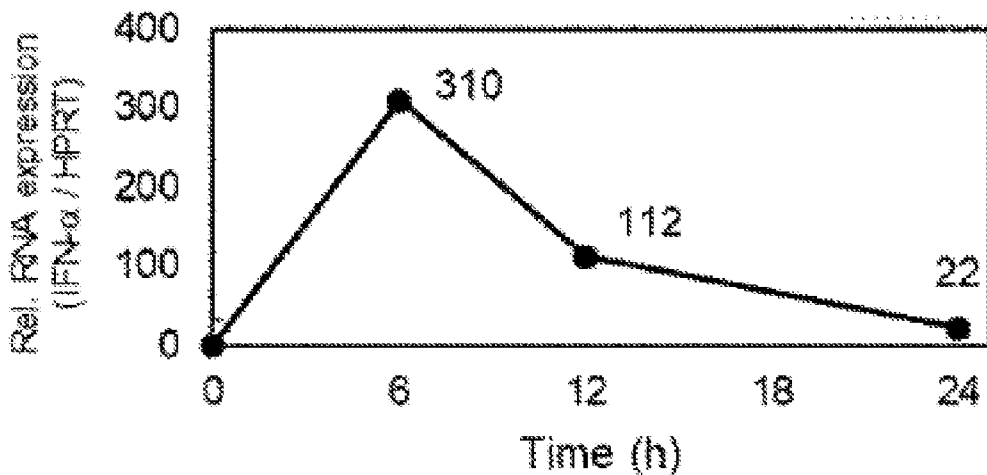
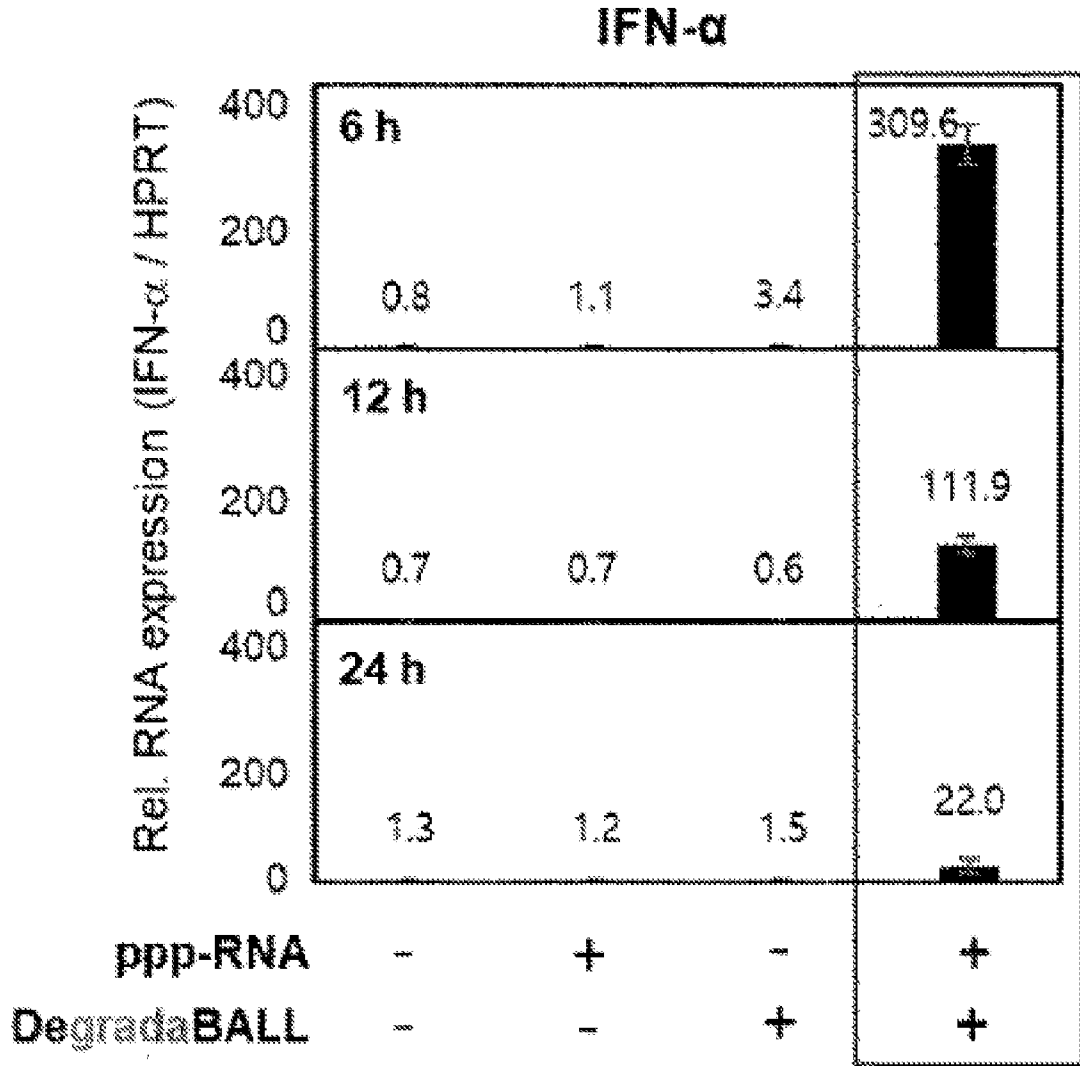


[도19]

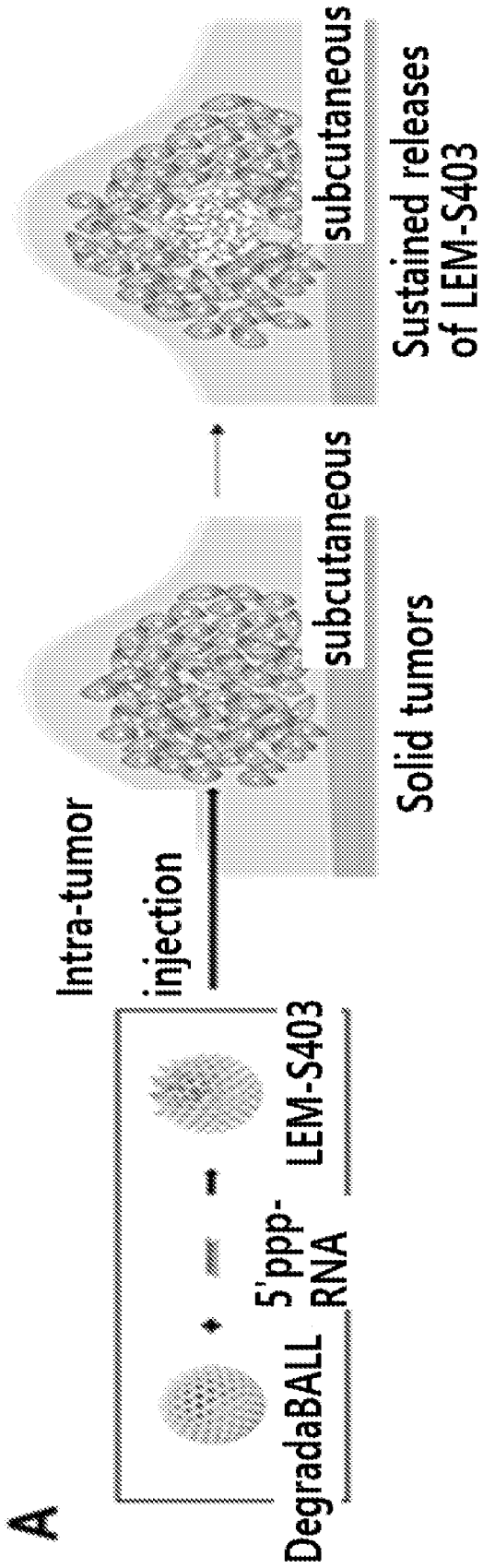


[도20]

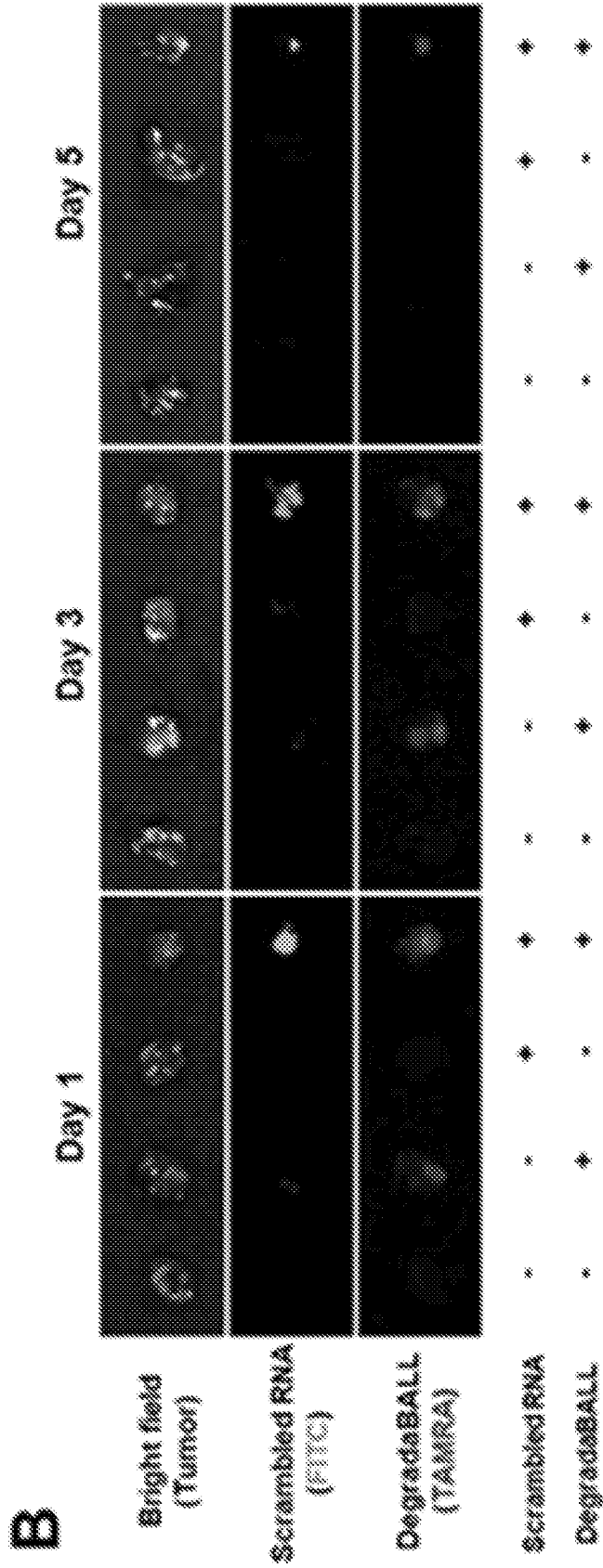
Efficient induction of IFN- α *in vivo*



[도21]

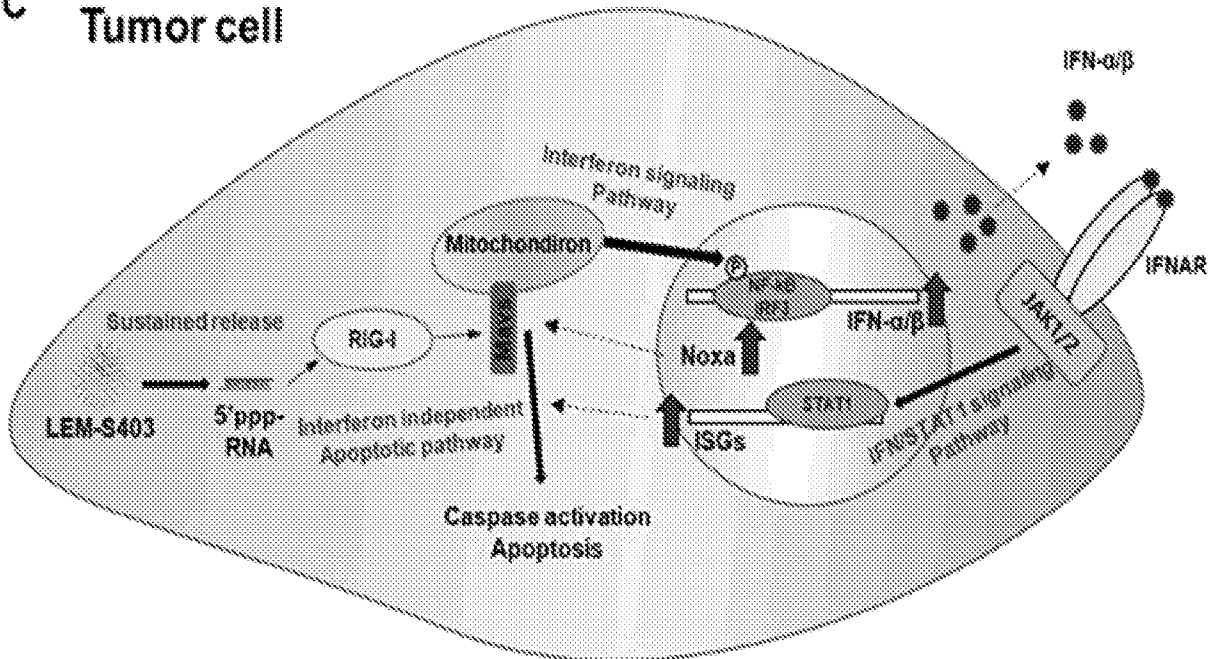


[도22]



[도23]

C Tumor cell

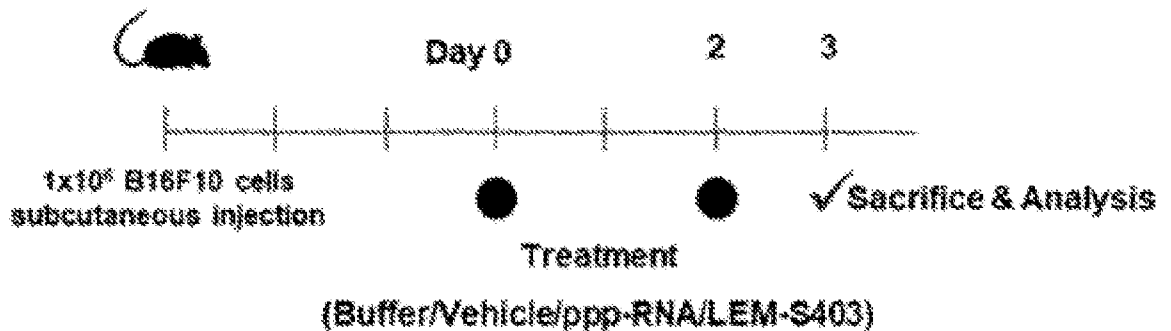


- Type 1 IFNs**
- Increased cytotoxicity of NK cells and CD8 T cells
 - Increased T cell cross priming by Dendritic cells
 - Pro-inflammatory cytokine modulation
- RIG-I induced apoptosis**
- RIG-I induces apoptotic cell death in tumor cells
 - Increased apoptotic gene expression and caspase cleavage

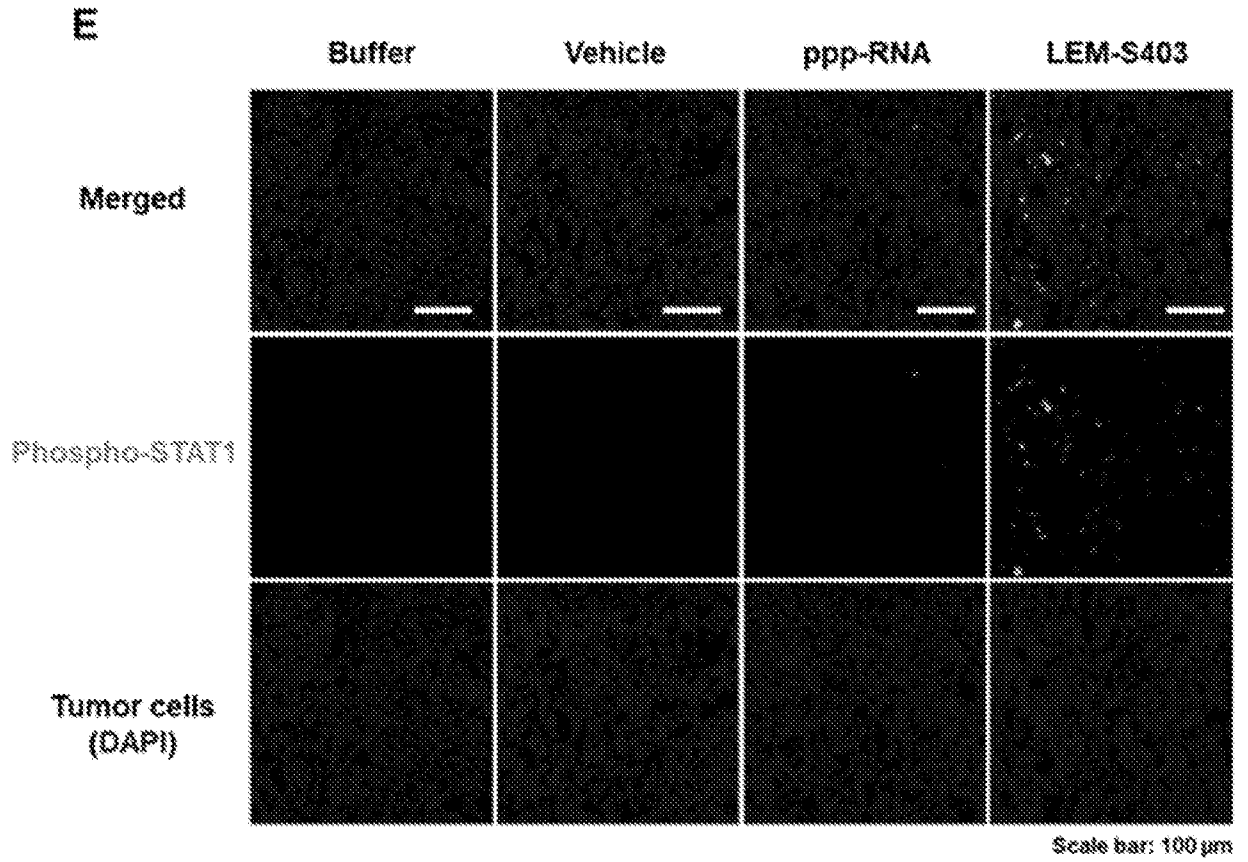
[도24]

D

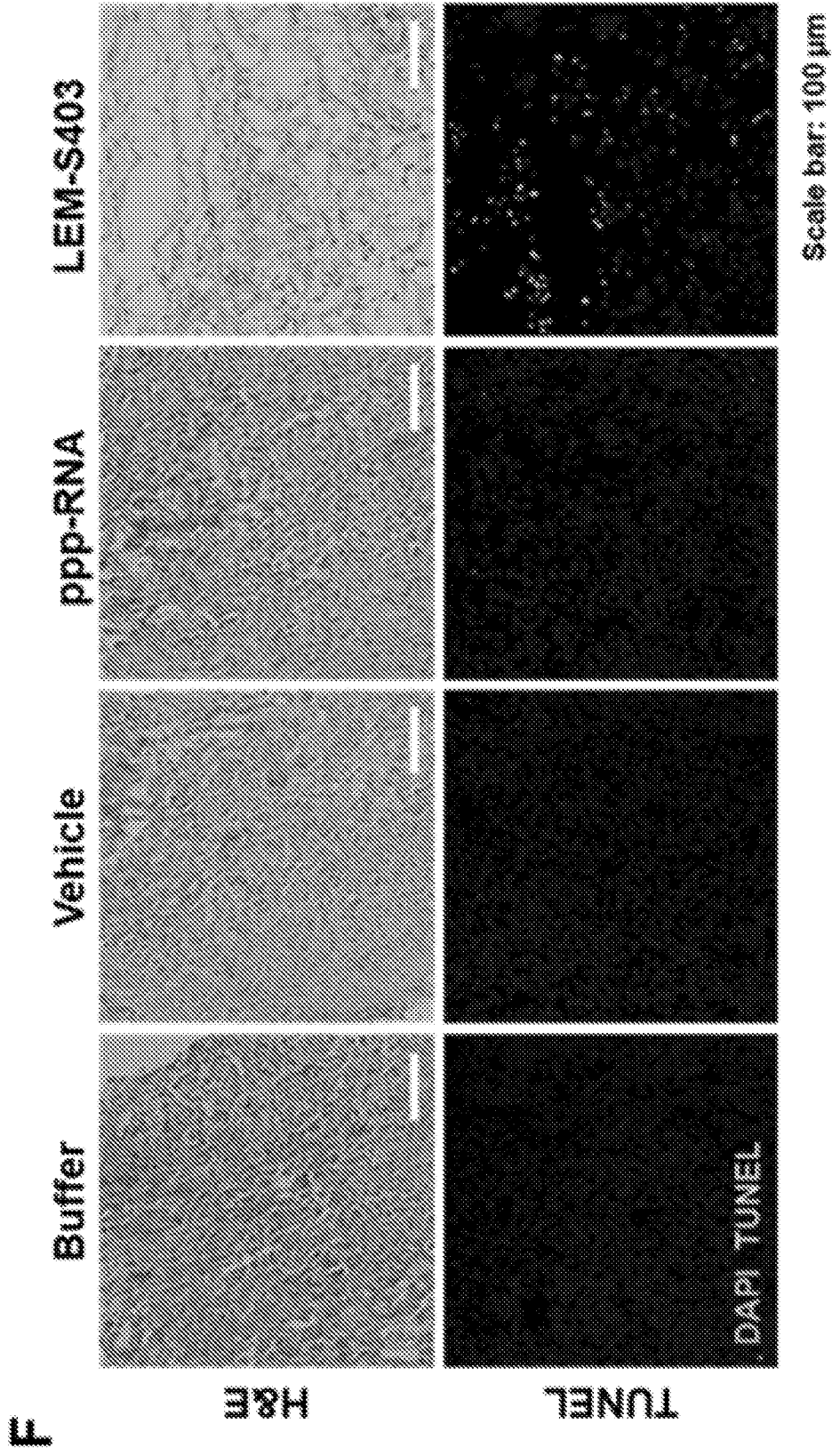
C57/B6 mouse (5w, male)



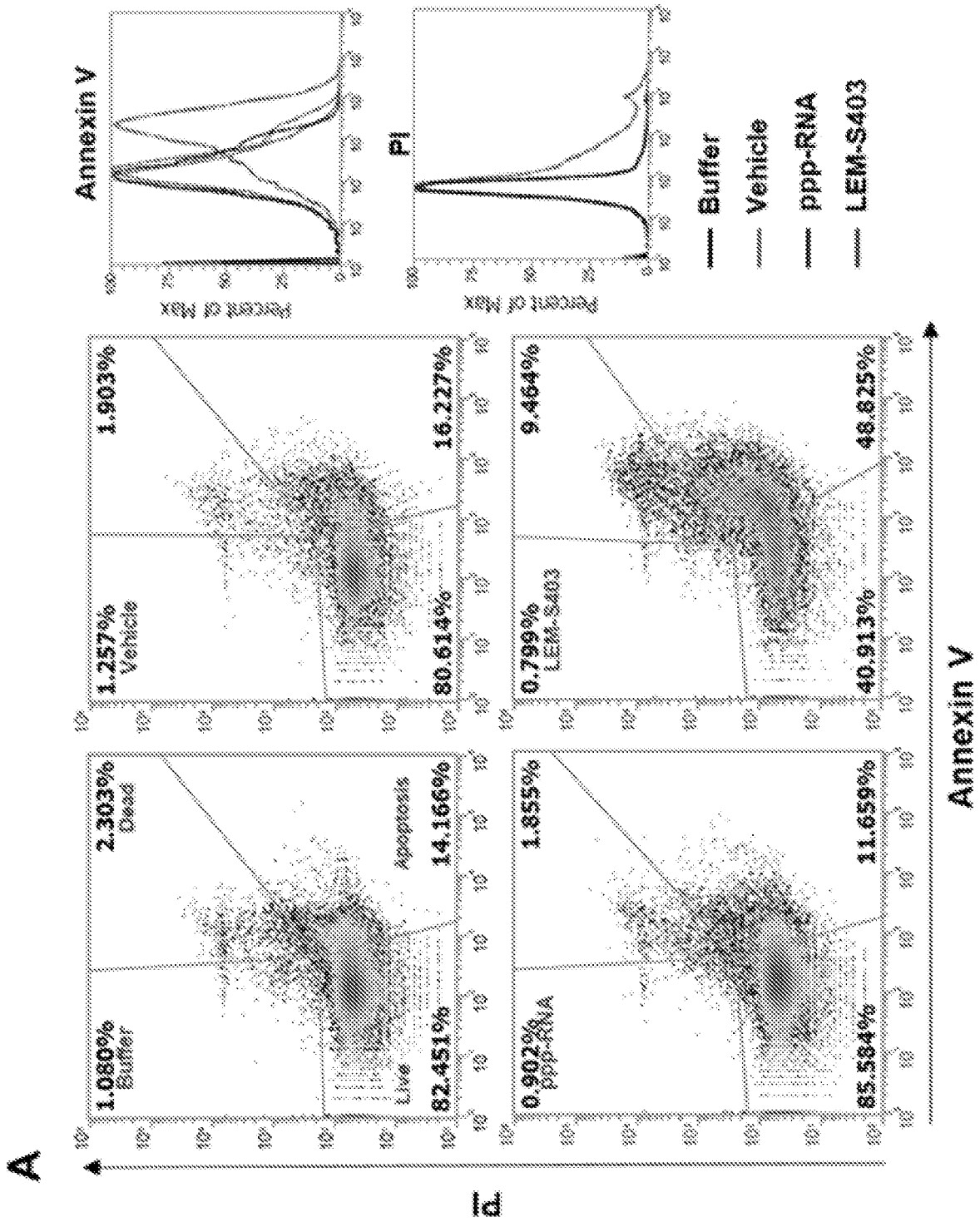
[도25]



[도26]

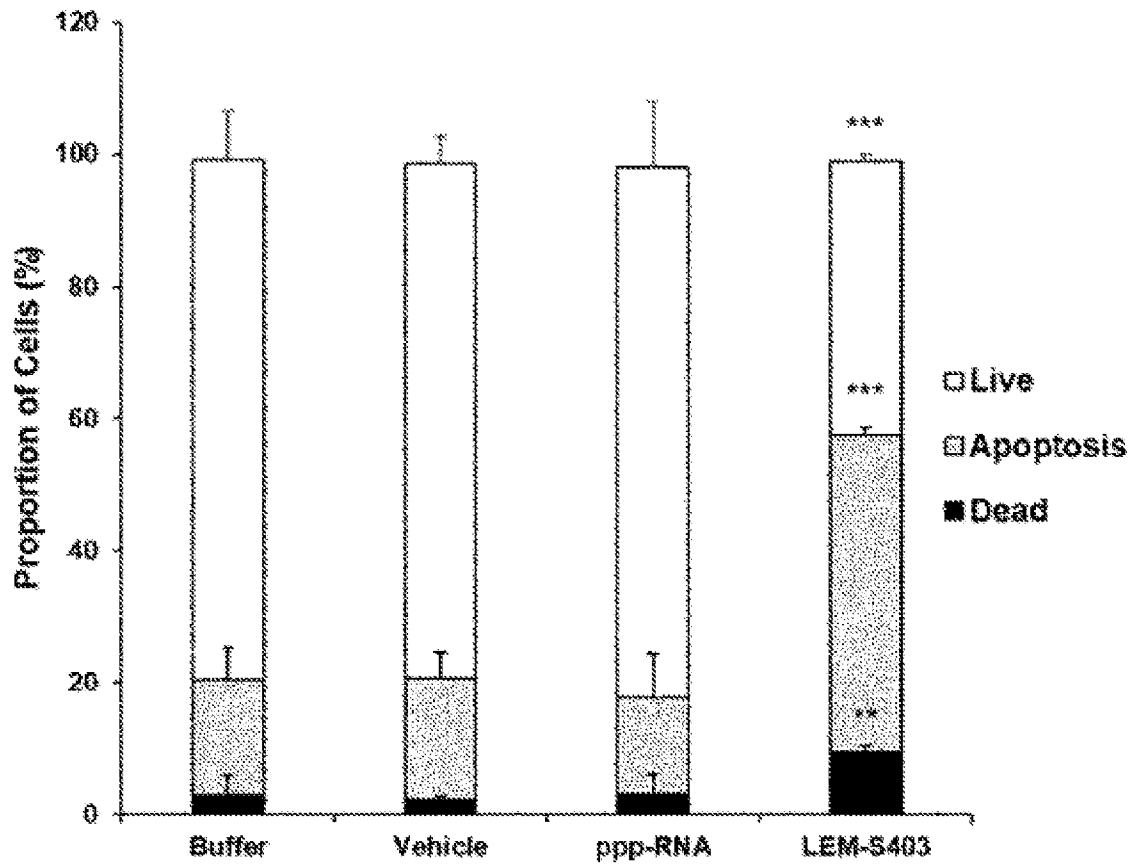


[도27]



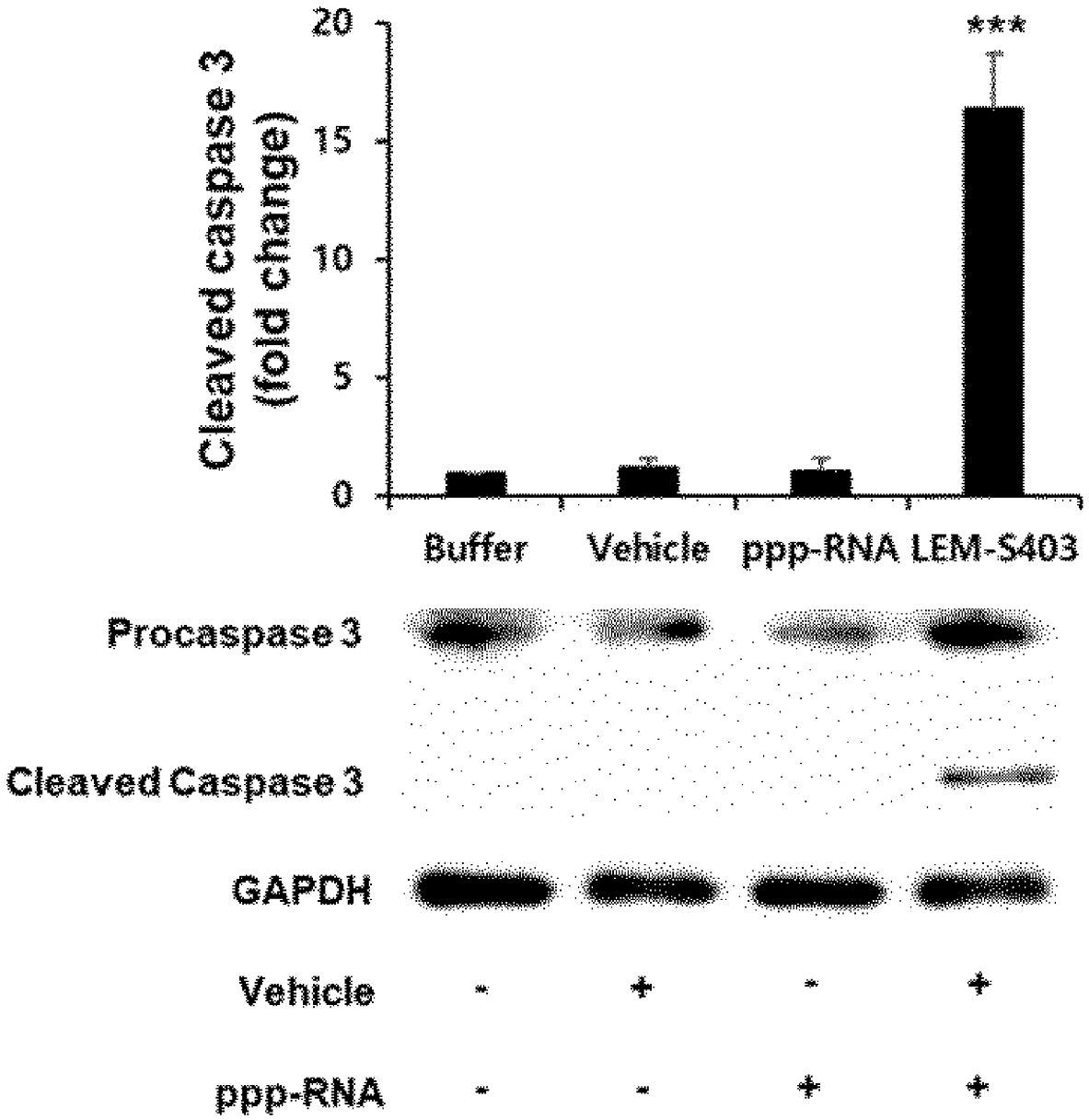
[도28]

B



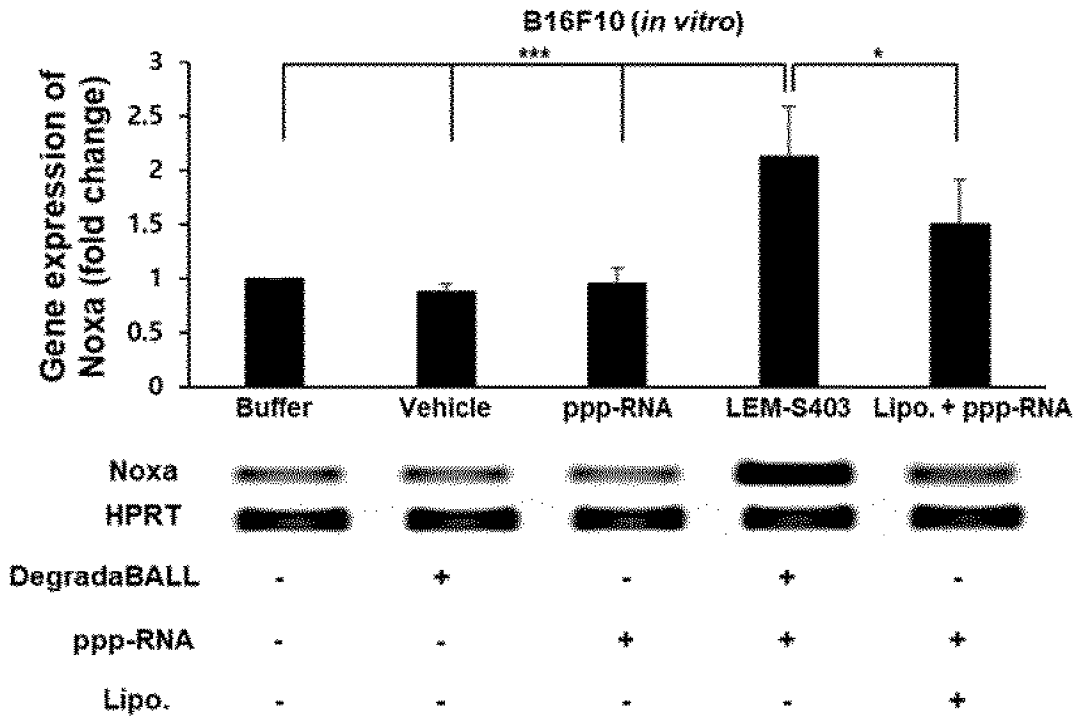
[도29]

C



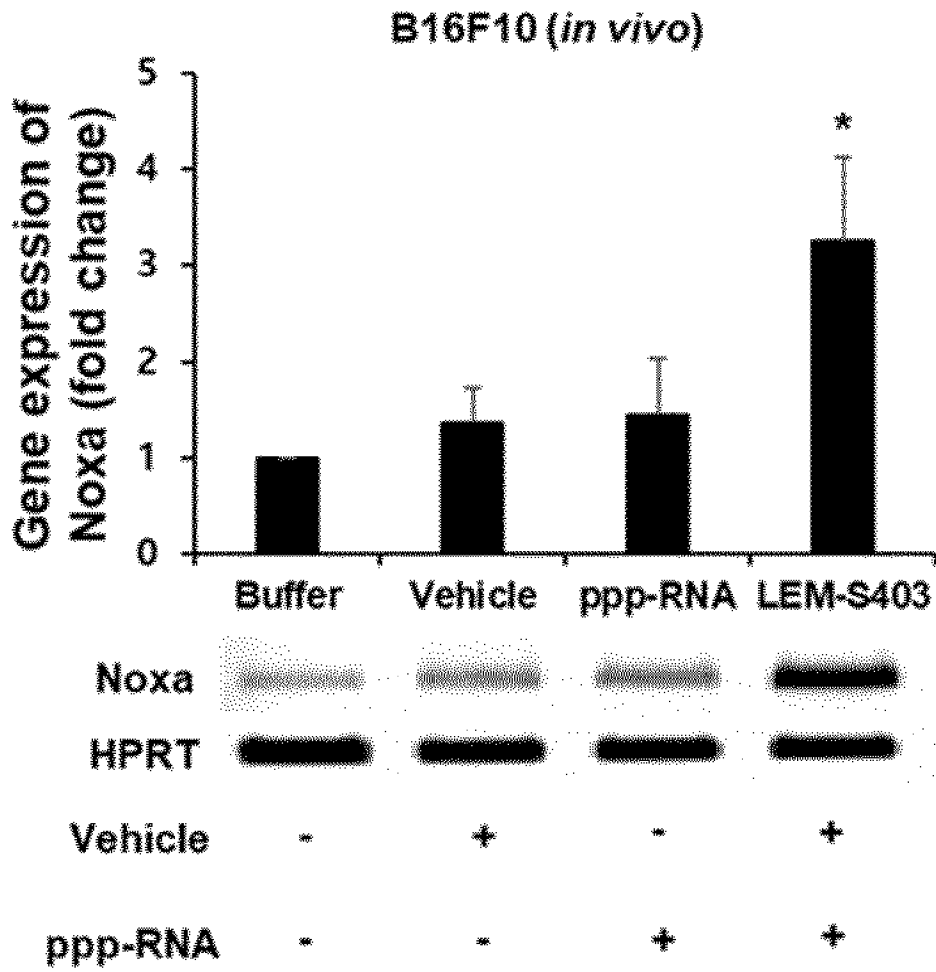
[도30]

D

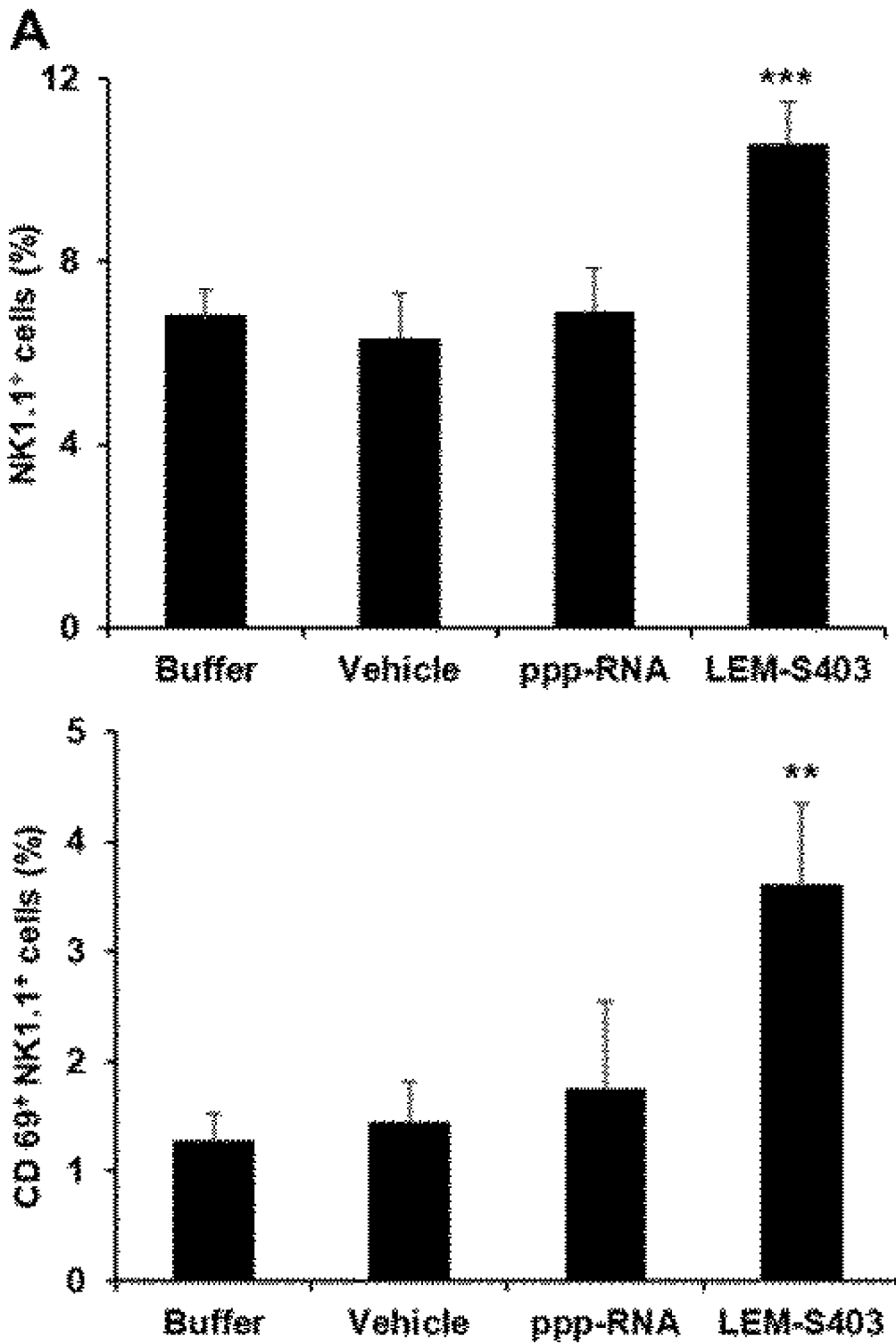


[도31]

III

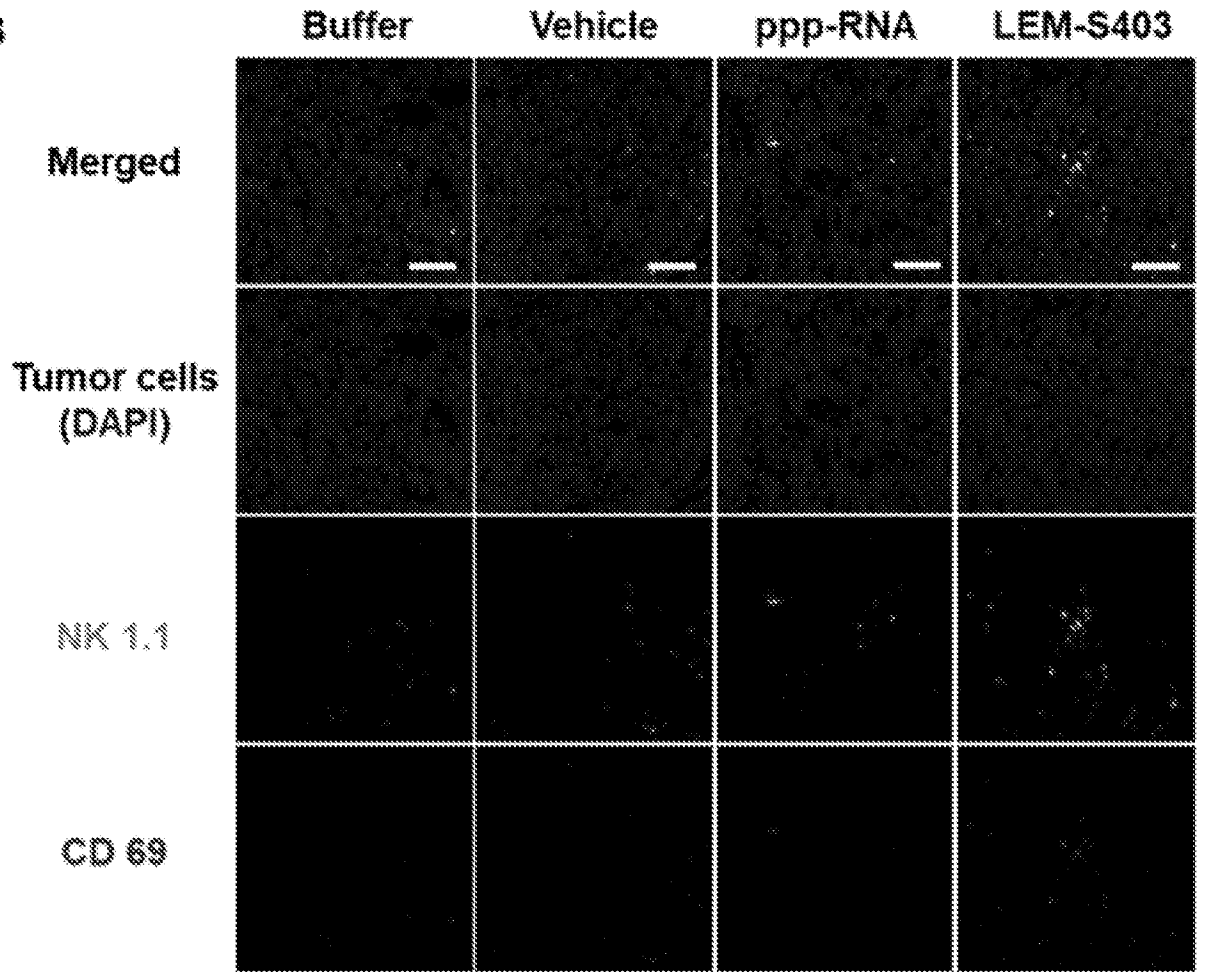


[도32]



[도33]

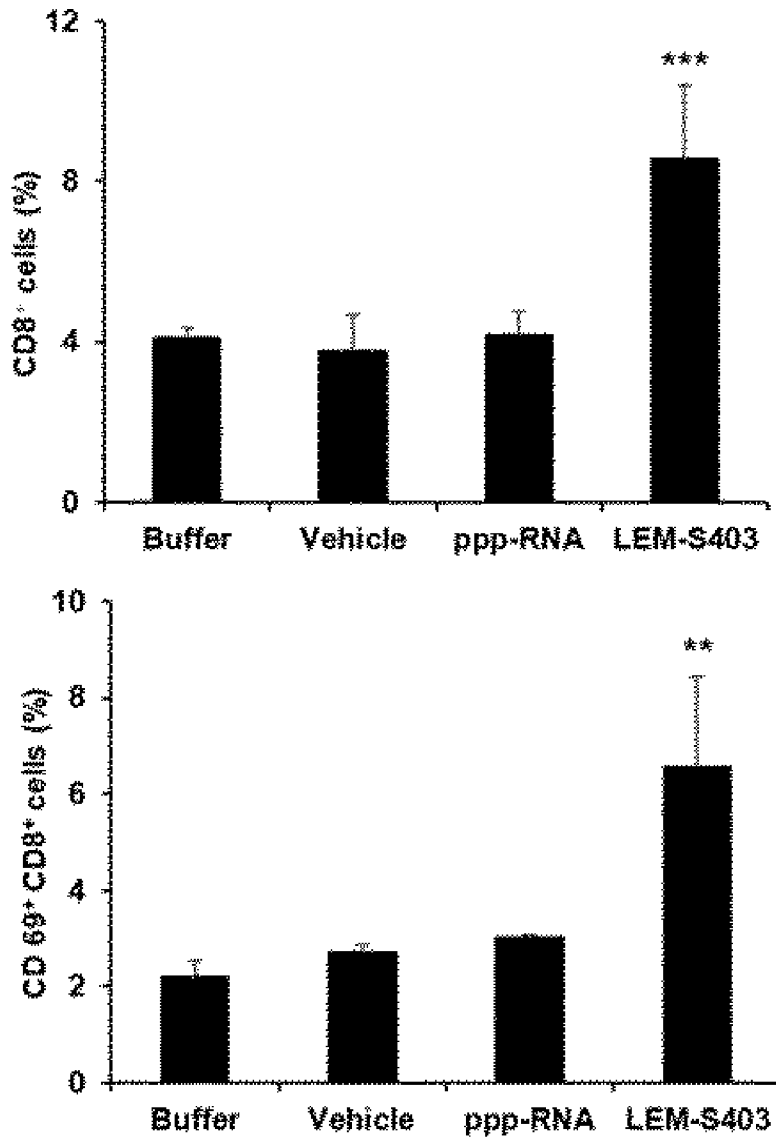
B



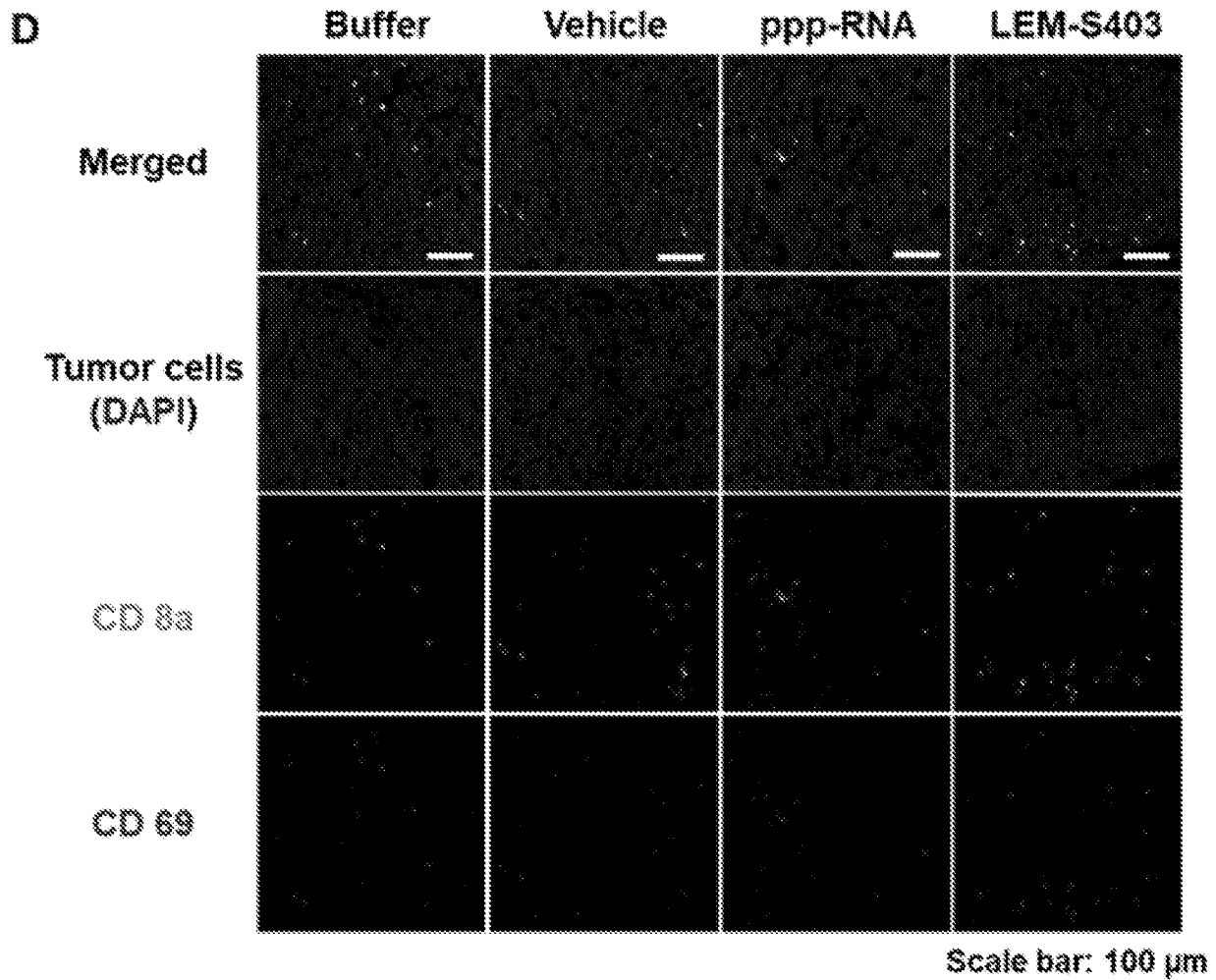
Scale bar: 100 μ m

[도34]

C

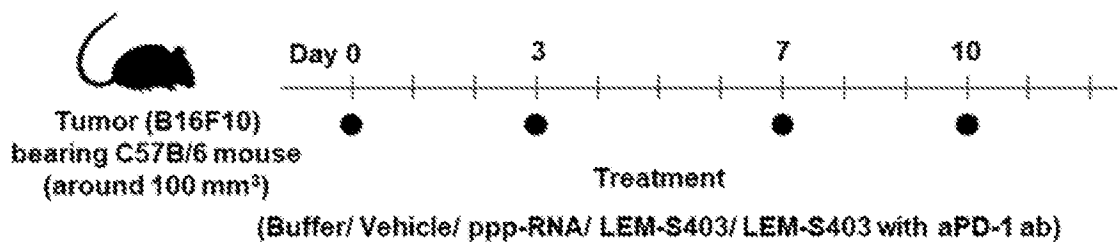


[도35]



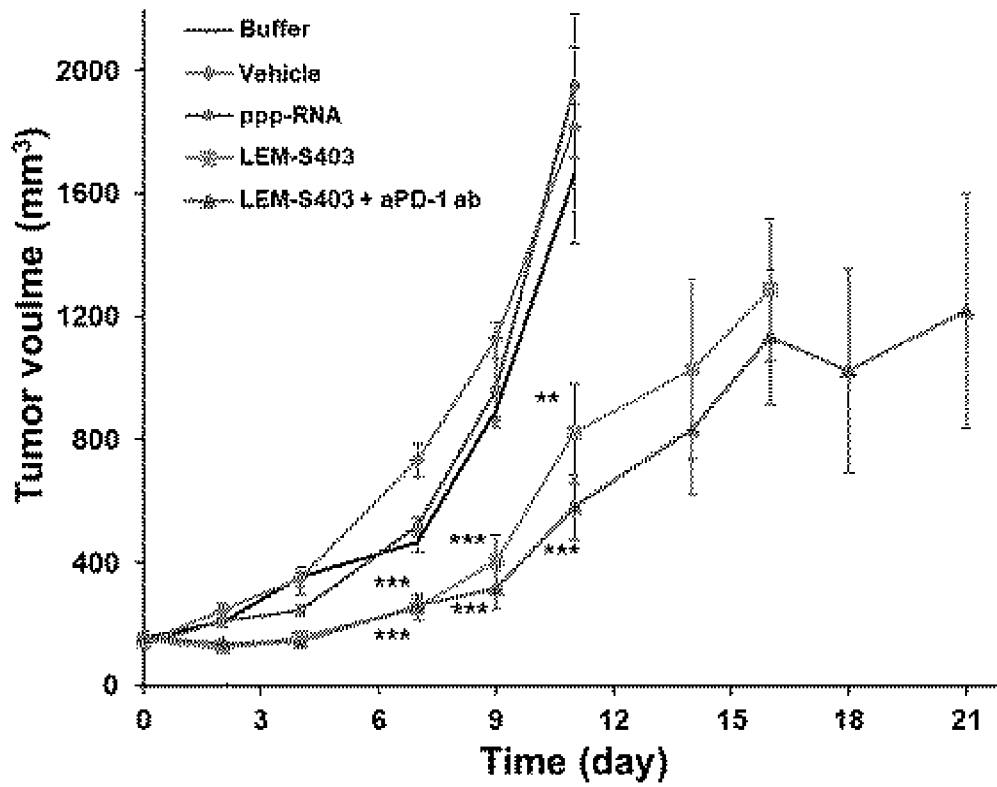
[도36]

A



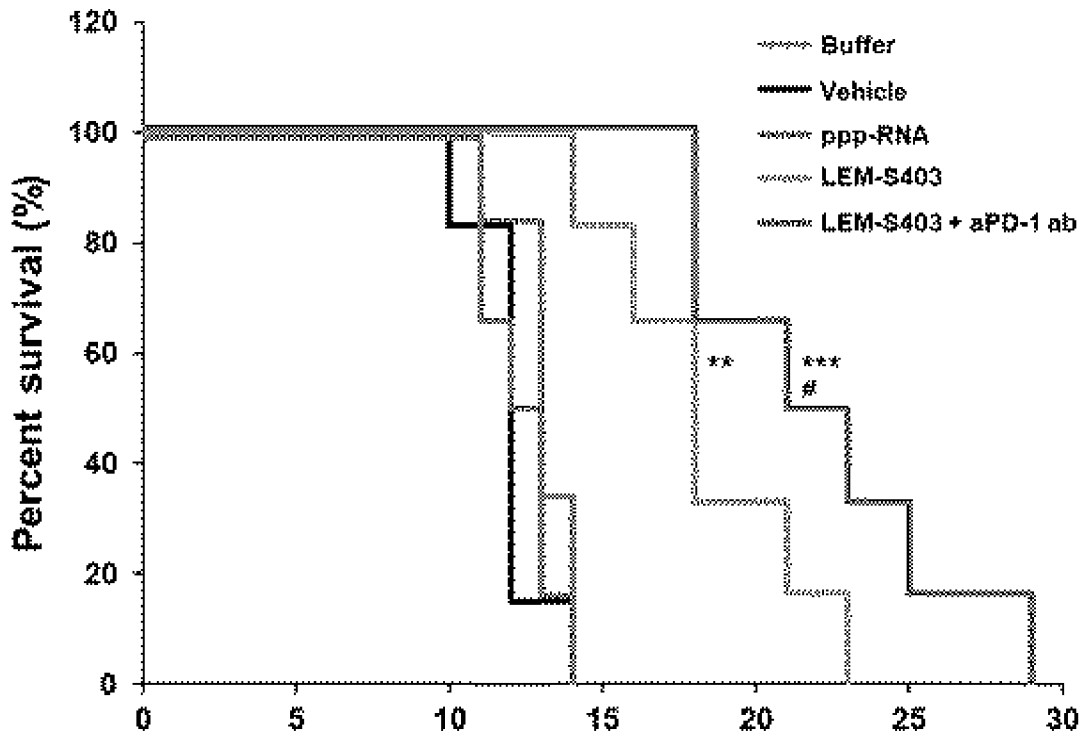
[도37]

B



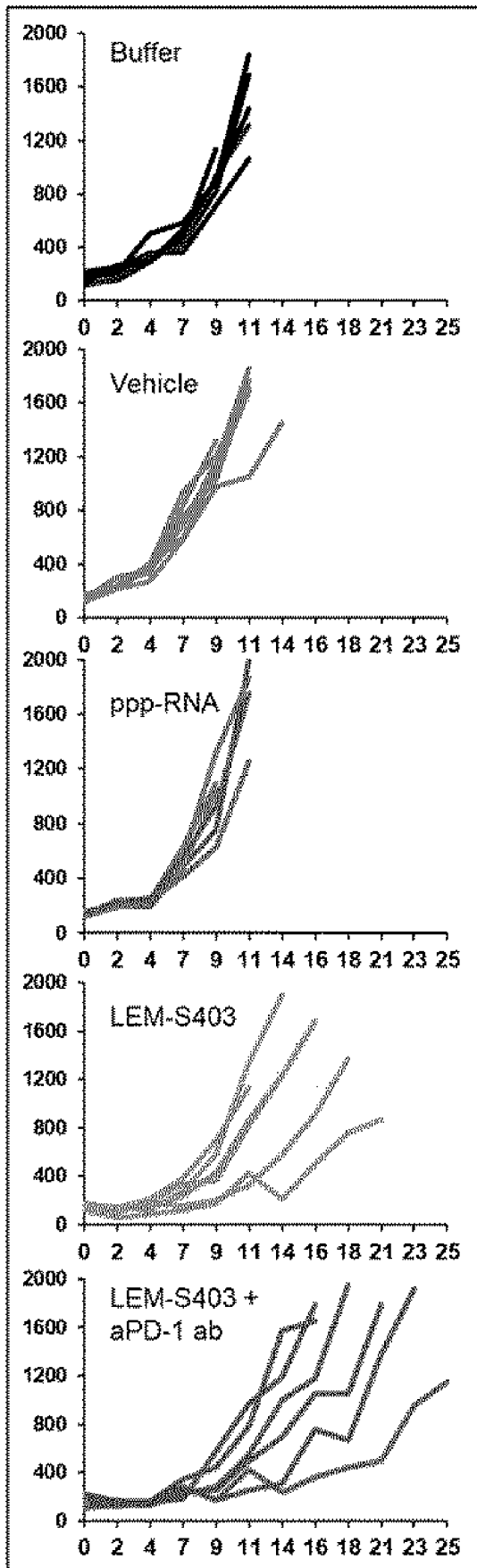
[도38]

C

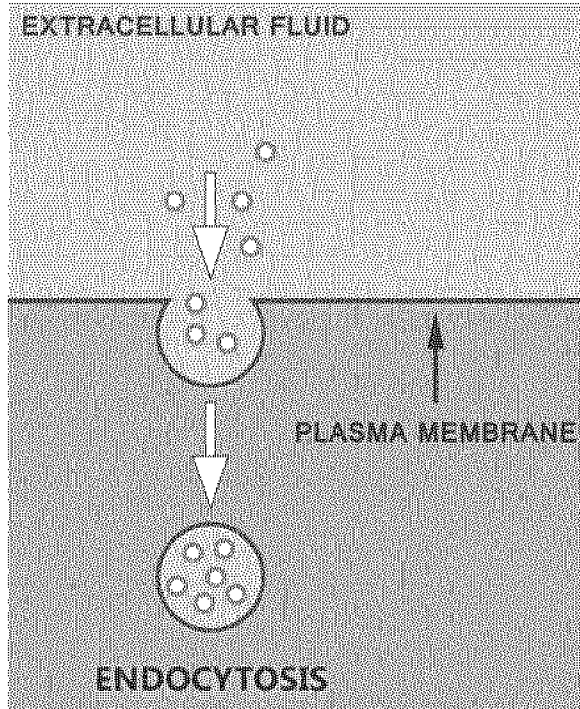


[도39]

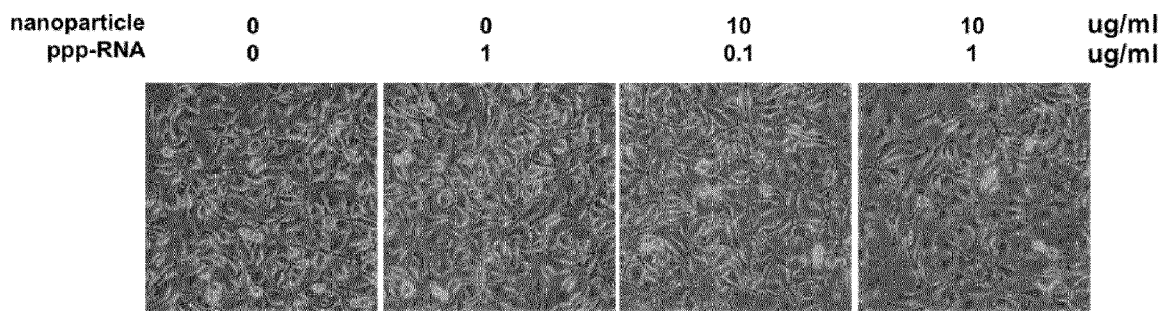
D



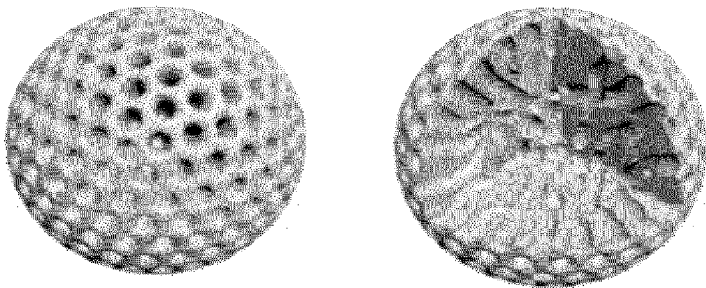
[도40]



[도41]



[도42]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/002648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/14(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/14; A61K 31/695; A61K 47/42; A61K 47/48; A61K 9/127; A61K 9/24; A61K 9/51; A61P 31/00; C12N 9/22; A61K 9/16; A61K 31/7105; A61P 37/00; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: immune, antibody, RNA, porous silica, carrier

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0103914 A (STC.UNM et al.) 27 August 2014 See claims 1-38; figure 2.	1-23
A	KR 10-2014-0030420 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 12 March 2014 See the entire document.	1-23
A	WO 2017-181115 A1 (SPINNAKER BIOSCIENCES, INC. et al.) 19 October 2017 See the entire document.	1-23
A	US 2018-0049984 A1 (BRINKER, C. J. et al.) 22 February 2018 See the entire document.	1-23
A	WO 2017-041033 A1 (BRINKER, C. J. et al.) 09 March 2017 See the entire document.	1-23

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

11 JUNE 2020 (11.06.2020)

Date of mailing of the international search report

11 JUNE 2020 (11.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
 Daejeon, 35208, Republic of Korea
 Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer


Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/002648

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
KR 10-2014-0103914 A	27/08/2014	AU 2014-323937 A1	05/06/2014		
		CA 2852064 A1	18/04/2013		
		CN 103396164 A	20/11/2013		
		CN 103396164 B	08/10/2014		
		CN 104023711 A	03/09/2014		
		EP 2765997 A2	20/08/2014		
		JP 2014-532071 A	04/12/2014		
		MX 2014004415 A	05/06/2015		
		US 2015-0272885 A1	01/10/2015		
		US 2017-0232115 A1	17/08/2017		
		WO 2013-056132 A2	18/04/2013		
		WO 2013-056132 A3	13/06/2013		
		KR 10-2014-0030420 A	12/03/2014	KR 10-1975754 B1	09/05/2019
		WO 2017-181115 A1	19/10/2017	AU 2018-250300 A1	01/11/2018
CA 3021001 A1	19/10/2017				
CN 109843301 A	04/06/2019				
EP 3442540 A1	20/02/2019				
JP 2019-511582 A	25/04/2019				
US 2018-0049984 A1	22/02/2018	US 2016-0090603 A1	31/03/2016		
		US 2018-0028686 A1	01/02/2018		
		WO 2016-054225 A1	07/04/2016		
WO 2017-041033 A1	09/03/2017	US 2018-0344641 A1	06/12/2018		

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 9/14(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 9/14; A61K 31/695; A61K 47/42; A61K 47/48; A61K 9/127; A61K 9/24; A61K 9/51; A61P 31/00; C12N 9/22; A61K 9/16; A61K 31/7105; A61P 37/00; A61P 35/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 면역(immune), 항체(antibody), RNA, 다공성 실리카(porous silica), 담체(carrier)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2014-0103914 A (에스티씨, 유엔엠 등) 2014.08.27 청구항 1-38; 도면 2	1-23
A	KR 10-2014-0030420 A (고려대학교 산학협력단) 2014.03.12 전문	1-23
A	WO 2017-181115 A1 (SPINNAKER BIOSCIENCES, INC. 등) 2017.10.19 전문	1-23
A	US 2018-0049984 A1 (BRINKER, C. J. 등) 2018.02.22 전문	1-23
A	WO 2017-041033 A1 (BRINKER, C. J. 등) 2017.03.09 전문	1-23
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2020년 06월 11일 (11.06.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 06월 11일 (11.06.2020)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0103914 A	2014/08/27	AU 2014-323937 A1 CA 2852064 A1 CN 103396164 A CN 103396164 B CN 104023711 A EP 2765997 A2 JP 2014-532071 A MX 2014004415 A US 2015-0272885 A1 US 2017-0232115 A1 WO 2013-056132 A2 WO 2013-056132 A3	2014/06/05 2013/04/18 2013/11/20 2014/10/08 2014/09/03 2014/08/20 2014/12/04 2015/06/05 2015/10/01 2017/08/17 2013/04/18 2013/06/13
KR 10-2014-0030420 A	2014/03/12	KR 10-1975754 B1	2019/05/09
WO 2017-181115 A1	2017/10/19	AU 2018-250300 A1 CA 3021001 A1 CN 109843301 A EP 3442540 A1 JP 2019-511582 A	2018/11/01 2017/10/19 2019/06/04 2019/02/20 2019/04/25
US 2018-0049984 A1	2018/02/22	US 2016-0090603 A1 US 2018-0028686 A1 WO 2016-054225 A1	2016/03/31 2018/02/01 2016/04/07
WO 2017-041033 A1	2017/03/09	US 2018-0344641 A1	2018/12/06