(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0014560
(43) 공개일자 2015년02월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61K 9/28 (2006.01) *A61K 47/36* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0089551
(22) 출원일자 2013년07월29일
심사청구일자 2013년07월29일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
정봉근
경기 과천시 관문로 143, 1110동 1104호 (중앙동, 래미안에코팰리스아파트)
굴팜 무하매드
서울 마포구 백범로 35, TE관 606호 (신수동, 서강대학교)
이종민
경기 안산시 상록구 구룡체육관로 24, 301호 (이동)
(74) 대리인
양부현

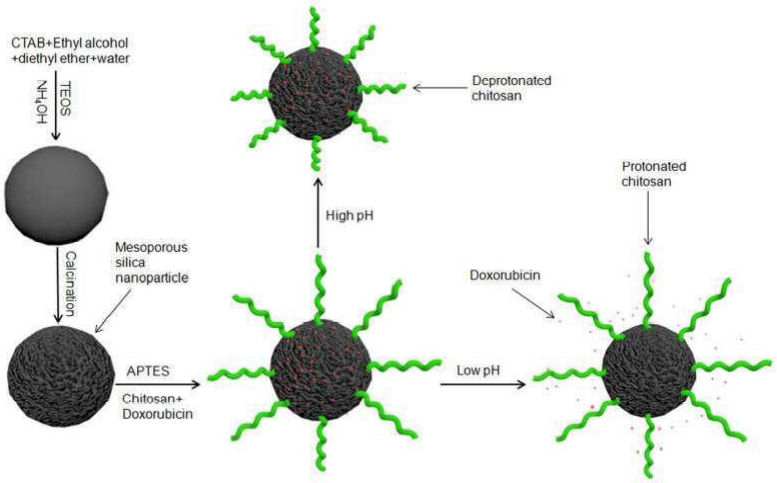
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **pH-반응성 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 다공성 실리카 나노입자; 및 (b) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산(chitosan)을 포함하는 pH-반응성 약물 전달용 나노입자를 제공한다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 pH에 따라 나노입자로부터 용이하게 약물 방출 속도를 제어할 수 있으며, 진핵세포에 의해 흡수 될 수 있는 적합한 크기를 제공한다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013K1A4A3055268
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 해외우수연구기관유치사업
연구과제명 서강-하버드 질병 바이오물리 연구 센터
기 여 율 1/3
주관기관 서강대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014M3A6B2060503
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 글로벌프론티어연구개발사업(바이오나노헬스가드 연구단)
연구과제명 디지털 진단을 위한 마이크로플루이딕칩 개발
기 여 율 1/3
주관기관 서강대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31 이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C3347
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 첨단의료기술개발사업
연구과제명 3차원 기술을 이용한 근위축성측상경화증 모델 개발 및 치료제 효능검증 표준화 시스템 확립
기 여 율 1/3
주관기관 서강대학교
연구기간 2014.12.01 ~ 2018.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 다공성 실리카 나노입자; 및 (b) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산(chitosan)을 포함하는 pH-반응성 약물 전달용 나노입자.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 나노입자는 220 ㎚ 내지 240 ㎚의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 나노입자는 중성 pH 반응 조건에서의 약물 방출 속도와 비교하여 산성 pH 반응 조건에서 약 1.5 내지 2배의 약물 방출 속도를 갖는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 나노입자는 +2.5 내지 +3.0의 제타 전위(Zeta potential)를 갖는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 약물은 항암제인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 싸이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 메토트렉세이트(methotrexate), 파클리탁셀(paclitaxel), 치오테파(thiotepa), 미톡산트론(mitoxantrone), 빈크리스틴(vincristine), 캄토테신(camptothecin) 또는 Daunorubicin(다우노루비신)인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 pH-반응성 약물 전달용 나노입자를 제조 방법:

(a) 수산화암모늄, 에틸알코올 및 디에틸에테르를 포함하는 수용액에 양이온성 계면활성제를 첨가하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 결과물에 실리카 원료를 첨가하는 단계;

(c) 상기 단계 (b)의 결과물을 원심분리하여 침전물을 수득하는 단계;

(d) 상기 침전물을 염산 및 에틸알코올의 혼합액에 침지하여 양이온성 계면활성제를 제거하는 단계;

(e) 상기 단계 (d)의 결과물을 가소(calcination)하여 다공성 실리카 나노입자를 제조하는 단계;

(f) 상기 다공성 실리카 나노입자의 분산물에 아미노실란(aminosilane)을 첨가하여 상기 다공성 실리카 나노입자의 표면에 아미노기를 생성하는 단계;

(g) 상기 단계 (f)의 결과물에 키토산 용액을 첨가하여 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자를 제조하는 단계; 및

(h) 상기 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자에 약물을 내장(loading)하는 단계.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 양이온성 계면활성제는 CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide), CPC(Cetylpyridinium chloride), BAC(Benzalkonium chloride), BZT(Benzethonium chloride), 5-브로모-5-니트로-1,3-다이옥산(5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane), 디메틸디옥타데실암모늄 클로라이드(Dimethyldioctadecylammonium chloride), 세트리모늄 브로마이드(Cetrimonium bromide) 또는 DODAB(Dioctadecyldimethylammonium bromide)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 실리카 원료는 TEOS(Tetraethyl orthosilicate), TOMCATS(tetramethylcyclotetrasiloxane), 퓸드 실리카(fumed silica) 또는 규산나트륨(sodium silicate)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 단계 (e)의 가소는 6시간 내지 18시간동안 400℃ 내지 800℃에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 7 항에 있어서, 상기 단계 (f)의 아미노실란은 APTES [(3-aminopropyl)-triethoxysilane], APDEMS[(3-aminopropyl)-diethoxy-methylsilane], APDMES[(3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane] 또는 APTMS[(3-aminopropyl)-trimethoxysilane]인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 p H-반응성 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자극-반응성 고분자(stimuli response polymers)는 극적이고 가역적인 상(phase) 변화를 나타낸다.[1-3] 자극-반응성 스마트 고분자는 약물 전달, 조직 공학용 스캐폴드(scaffold) 및 바이오센서로 적용가능한 많은 잠재력을 갖는다.[2] 특히, 다공성 표면을 갖는 실리카 나노입자는 생체적합성, 넓은 표면적 및 조절가능한 구멍 크기와 같은 장점으로 약물 전달에 적용하는데 많은 관심을 받고 있다.[4-6] 이러한 장점을 갖는 다공성 실리카 나노입자는 약물 및 유전자 전달, 세포 이미징 및 암 치료에 적용되어왔다.[7-12] 이러한 항암제-로딩 다공성 실리카 나노입자의 치료 효과에도 불구하고, 나노수송체가 용혈 및 세포 독성을 유도할 가능성이 있다고 알려져 왔다.[4,13] 일례로, 인간 폐암 세포에서 실리카 나노입자의 인비트로(*in virto*) 독성을 조사한 결과, 나노입자 처리량 및 노출 시간에 따라 세포 생존능이 감소하였다.[14] 또한, 실리카 나노입자는 총 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)의 농도를 증가시키고 글루타치온(glutathione)의 농도를 감소시킨다.[15] 나노입자에 의해 유도된 산화 스트레스는 미토콘드리아의 막 손상 및 아폽토시스(apoptosis)를 조절하는데 중요한 역할을 한다. 이는 실리카 나노입자에 의해 미토콘드리아 경로를 통한 아폽토시스가 유도되는 것을 의미한다. 더욱이, 인간

내피 세포에서의 실리카 나노입자의 세포독성이 보고되었다.[16] 다양한 사이즈를 갖는 단순분산 무정형의 실리카 나노입자를 합성하고 이의 내피세포 생존능에 대한 영향을 조사한 결과, 실리카 나노입자는 세포 독성 손상을 야기하였고 내피 세포의 생존능을 감소시켰다. 작은 다공성 실리카 나노입자(직경 14 내지 16 ㎚)는 세포 독성을 야기하고, 큰 다공성 실리카 나노입자(직경 104 내지 335 ㎚)은 작은 다공성 실리카 나노입자와 비교하여 낮은 세포 독성 반응을 나타내는 것은 나노입자의 표면적이 독성을 결정하는데 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

[0003] 실리카 나노입자에 의한 세포독성 및 용혈을 해결하기 위해, 자극-반응성 조절 방출 시스템이 개발되었다. 다공성 실리카 나노입자의 표면을 기능화하는 다양한 전략이 사용되었다. 예컨대, siRNA 및 DNA 구조체를 세포내 흡수 및 전달하기 위해 폴리에틸렌이민-코팅 다공성 실리카 나노입자가 개발되었다.[17] 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine) 고분자의 비공유 결합은 DNA 및 siRNA 구조체가 결합할 수 있는 양이온성 표면으로 인해 다공성 실리카 나노입자의 세포내 흡수를 증가시켰다. 폴리비닐피리딘[poly(vinyl pyriding); PVP]을 이용한 다공성 실리카 나노입자의 분자 조절 방출도 보고되었다.[18] 브로모(bromo)-기능화된 다공성 실리카를 합성하기 위해 다공성 실리카를 BMDMCS(bromomethyldimethylchlorosilane)과 반응하였다. 그 후, 실리카의 표면에 4기(quaternized) 피리딘기를 통해 PVP를 결합하여 다공성 실리카 나노입자의 표면 상에 속박된(tethered) 고분자층을 형성하였다. 이는 높은 pH에서 고분자의 탈양성화작용(deprotonation)이 소수성 상태를 만들어 분자의 방출을 억제하는 것을 보여준다. 반면에, 양성화된 PVP의 팽윤(swollen) 상태는 낮은 pH에서 분자 내로 침투할 수 있다. 또한, 다공성 실리카 나노입자-기반 지질 이중층은 암 세포에 대한 다중성분 카고(cargo)의 표적 전달에 이용되었다.[10] 원세포는 독소루비신, siRNA 및 진단 제재(예컨대, 양자점)와 함께 로딩되었다. 선별된 카고의 탈엔도좀(endosomal escape) 및 핵 축적을 개선하기 위해 변형하였다. 상부 표면적 나노기공 코어의 높은 수용력을 항암제와 조합하여 표적 효율을 높였다. 다공성 실리카 나노입자의 잠재력에도 불구하고, 항암제를 전달하기 위한 pH-반응성 고분자-코팅된 실리카 나노입자는 아직 개발되지 않았다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 생체 내 효과적인 약물 전달을 위한 나노입자를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 다공성 실리카 나노입자의 표면을 키토산으로 코팅하는 경우에 pH에 따라 약물 방출이 제어됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 pH-반응성 약물 전달용 나노입자를 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 pH-반응성 약물 전달용 나노입자를 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 다공성 실리카 나노입자; 및 (b) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산(chitosan)을 포함하는 pH-반응성 약물 전달용 나노입자를 제공한다.

[0010] 본 발명자들은 생체 내 효과적인 약물 전달을 위한 나노입자를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 다공성 실리

카 나노입자의 표면을 키토산으로 코팅하는 경우에 pH에 따라 약물 방출이 제어됨을 확인하였다.

[0011] 본 발명의 pH-반응성 약물 전달용 나노입자는 키토산으로 코팅된 다공성 실리카 나노입자이다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 220 ㎚ 내지 240 ㎚의 직경을 갖는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 225 ㎚ 내지 235 ㎚ 직경을 갖고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 228 ㎚내지 232 ㎚ 직경을 갖는다.

[0013] 본 발명의 나노입자는 식세포가 아닌 진핵세포에 의해 흡수될 수 있는 적합한 크기를 갖는다.

[0014] 본 발명의 pH-반응성 약물 전달용 나노입자는 pH 반응조건에 따라 약물 방출을 제어할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 중성 pH 반응 조건에서의 약물 방출 속도와 비교하여 산성 pH 반응 조건에서 약 1.5 내지 2배의 약물 방출 속도를 갖는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 나노입자는 48시간동안 중성 pH 반응 조건에서 약 50%의 약물을 방출하는데 반해, 산성 pH 반응 조건에서 약 90%의 약물을 방출한다.

[0016] 본 발명의 이러한 pH 반응성 약물 방출 효과는 키토산-코팅에 의한 것으로, 키토산을 코팅하지 않은 다공성 실리카 나노입자의 약물 방출 효과와 구별된다.

[0017] 상기 키토산을 코팅하지 않은 다공성 실리카 나노입자는 중성 pH 반응 조건 및 산성 pH 반응 조건에서 48시간 동안 약 90%의 약물을 방출하는 동일한 효과를 나타낸다.

[0018] 본 명세서에서, 상기 “중성 pH”는 pH 6.0 내지 pH 8.0을 의미한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 중성 pH는 pH 7.0 내지 pH 7.5를 의미한다.

[0019] 본 명세서에서, 상기 “산성 pH”는 pH 3.0 내지 pH 5.0을 의미한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 중성 pH는 pH 4.0 내지 pH 4.5를 의미한다.

[0020] 본 발명의 pH-반응성 약물 전달용 나노입자는 +2.5 내지 +3.0의 제타 전위(Zeta potential)를 갖는다.

[0021] 상기 제타 전위는 콜로이드계의 동전지적(electrokinetic) 전위를 의미한다(Definition of electrokinetic potential in "IUPAC. Compendium of Chemical Terminology", 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997)).

[0022] 본 발명의 pH-반응성 약물 전달용 나노입자는 약물을 내장하며 pH에 따라 약물을 제어할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 약물은 항암제이고, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 싸이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 메토트렉세이트(methotrexate), 파클리탁셀(paclitaxel), 치오테파(thiotepa), 미톡산트론(mitoxantrone), 빈크리스틴(vincristine), 캄토테신(camptothecin) 또는 Daunorubicin(다우노루비신)이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 약물은 독소루비신이다.

[0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 pH-반응성 약물 전달용 나노입자 제조방법을 제공한다.

[0025] (a) 수산화암모늄, 에틸알코올 및 디에틸에테르를 포함하는 수용액에 양이온성 계면활성제를 첨가하는 단계;

[0026] (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 실리카 원료를 첨가하는 단계;

[0027] (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 원심분리하여 침전물을 수득하는 단계;

[0028] (d) 상기 침전물을 염산 및 에틸알코올의 혼합액에 침지하여 양이온성 계면활성제를 제거하는 단계;

[0029] (e) 상기 단계 (d)의 결과물을 가소(calcination)하여 다공성 실리카 나노입자를 제조하는 단계;

[0030] (f) 상기 다공성 실리카 나노입자의 분산물에 아미노실란(aminosilane)을 첨가하여 상기 다공성 실리카 나노입자의 표면에 아미노기를 생성하는 단계;

[0031] (g) 상기 단계 (f)의 결과물에 키토산 용액을 첨가하여 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자를 제조하는 단계; 및

[0032] (h) 상기 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자에 약물을 내장(loading)하는 단계.

[0033] 본 발명의 pH-반응성 약물 전달용 나노입자 제조방법을 통해 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자를 제조한다.

[0034] 먼저, 수산화암모늄, 에틸알코올 및 디에틸에테르를 포함하는 수용액에 양이온성 계면활성제를 첨가한다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 양이온성 계면활성제는 CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide), CPC(Cetylpyridinium chloride), BAC(Benzalkonium chloride), BZT(Benzethonium chloride), 5-브로모-5-니트로-1,3-다이옥산(5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane), 디메틸디옥타데실암모늄 클로라이드(Dimethyldioctadecylammonium chloride), 세트리모늄 브로마이드(Cetrimonium bromide) 또는 DODAB(Dioctadecyldimethylammonium bromide)이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 양이온성 계면활성제는 CTAB이다.

[0036] 상기 양이온성 계면활성제를 첨가한 수산화암모늄, 에틸알코올 및 디에틸에테르를 포함하는 수용액에 실리카 원료를 첨가한다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 실리카 원료는 TEOS(Tetraethyl orthosilicate), TOMCATS(tetramethylcyclotetrasiloxane), 퓸드 실리카(fumed silica) 또는 규산나트륨(sodium silicate)이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 실리카 원료는 TEOS이다.

[0038] 다음, 상기 단계 (b)의 결과물을 원심분리하여 침전물을 수득한다. 상기 침전물은 다공성 실리카 나노입자이다. 수득한 침전물을 염산 및 에틸알코올 혼합액에 침지하여 양이온성 계면활성제를 제거한다.

[0039] 상기 양이온성 계면활성제의 제거를 완전한 제거 및 상기 다공성 실리카 나노입자의 다공성 형태를 유지하기 위해 가소(calcination)한다.

[0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (e)의 가소는 6시간 내지 18시간동안 400℃ 내지 800℃에서 실시한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 가소는 9시간 내지 15시간 동안 500℃ 내지 700℃에서 실시한다.

[0041] 다음, 상기 다공성 실리카 나노입자의 표면에 아미노기를 생성하기 위해, 다공성 실리카 나노입자의 분산물에 아미노실란(aminosilane)을 첨가한다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아미노실란은 APTES [(3-aminopropyl)-triethoxysilane], APDEMS[(3-aminopropyl)-diethoxy-methylsilane], APDMES[(3-aminopropyl)-dimethyl-ethoxysilane] 또는 APTMS[(3-aminopropyl)-trimethoxysilane]이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아미노실란은 APTES이다.

[0043] 다음, 상기 단계 (f)의 결과물에 키토산 용액을 첨가하여 교반하고, 원심분리를 실시하여 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자를 수득한다.

[0044] 마지막으로, 상기 키토산 코팅 다공성 실리카 나노입자에 약물을 내장한다.

[0045] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 약물은 항암제이고, 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 싸이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 메토트렉세이트(methotrexate), 파클리탁셀(paclitaxel), 치오테파(thiotepa), 미톡산트론(mitoxantrone), 빈크리스틴(vincristine), 캄토테신(camptothecin) 또는 Daunorubicin(다우노루비신)이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 약물은 독소루비신이다.

[0046] 본 발명의 pH-반응성 약물 전달용 나노입자 제조방법을 통해 제조된 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자는 중성 pH 반응 조건에서의 약물 방출 속도와 비교하여 산성 pH 반응 조건에서 약 1.5 내지 2배의 약물 방출 속도를 갖는다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0048] (a) 본 발명은 pH-반응성 약물 전달용 나노입자 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0049] (b) 본 발명은 pH에 따라 나노입자로부터 용이하게 약물 방출 속도를 제어할 수 있다.

[0050] (c) 본 발명의 pH-반응성 약물 전달용 나노입자는 진핵세포에 의해 흡수 될 수 있는 적합한 크기를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 pH-반응성 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자로부터 약물 방출이 pH에 의해 조절되는 것을 도식화하여 보여준다.

도 2a 내지 도 2d는 다공성 실리카 나노입자의 형태적 특징을 보여준다. 도 2a는 다공성 실리카 나노입자의 FE-SEM 이미지를 보여주고, 도 2b는 원소적 특징을 나타낸다. 도 2c 및 도 2d는 다공성 실리카 나노입자의 TEM 이미지를 나타낸다.

도 3a 내지 도 3d는 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 형태적 특징을 보여준다. 도 3a는 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 FE-SEM 이미지를 보여주고, 도 3b는 원소적 특징을 나타낸다. 도 3c 및 도 3d는 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 TEM 이미지를 나타낸다.

도 4a 및 도 4b는 다공성 실리카 나노입자의 크기 분포 및 제타전위 측정 결과를 보여준다. 상기 다공성 실리카 나노입자의 평균 직경은 225 ㎚이고, 평균 제타전위는 -2.67이다.

도 5a 및 도 5b는 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 크기 분포 및 제타전위 측정 결과를 보여준다. 상기 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 평균 직경은 230 ㎚이고, 평균 제타전위는 +2.79이다.

도 6a 내지 도 6c는 다공성 실리카 나노입자 표면의 아미노기에 FITC와 결합하여 관찰한 결과를 보여준다. 도 6a는 명시야(bright field) 이미지, 도 6b는 형광 이미지 및 도 6c는 명시야 이미지와 형광 이미지를 병합한 이미지를 나타낸다.

도 7은 다공성 실리카 나노입자의 pH 범위에 따른 제타전위를 나타낸다.

도 8a 내지 도 8c는 다공성 실리카 나노입자 및 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 독소루비신 방출을 비교한 결과를 보여준다. 도 8a는 각 나노입자의 독소루비신 내장 효율을 나타낸다. 도 8b는 pH 7.4 조건에서의 독소루비신 방출 결과를 보여주고, 도 8c는 pH 4.4 조건에서의 독소루비신 방출 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0053] **실시예**

[0054] **실험재료 및 실험방법**

[0055] *실험재료*

[0056] CTAB(Cetyltrimethylammonium bromide), 액상 암모니아(NH_4OH, 25-28%), 염산(HCl, 36-38%), FITC(Fluorescein isothiocyanate), TEOS(Tetraethylorthosilicate), APTES[(3-Aminopropyl) triethoxysilane], 키토산(MW=60,000 내지 120,000) 및 염산 독소루비신을 시그마 사(Sima aldrich, 미국)로부터 구매하였다. 아세트산(CH_3COOH, 99.5% 순도), 톨루엔(99.8% 순도), 에틸 알코올(99.9% 순도) 및 디에틸에테르(99.5% 순도)는 삼전순약공업사(Samchun Chemicals, 대한민국)로부터 구매하였다.

[0057] *다공성 실리카 나노입자의 합성*

[0058] 낮은 계면활성제 조건 하에 암모니아-기반 촉매 방법으로 계층적(hierarchical) 다공성 실리카 나노입자를 제조하였다(도 1). 실리카 재료로 TEOS를 사용하였다. 물, 에틸알코올 및 디에틸에테르를 공동용액으로 사용하여 상온에서 반응을 실시하였다. CTAB를 기질 및 계면활성제로 사용하였다. 암모니아 농도, TEOS 부피 및 반응 온도를 조절하여 입자 크기를 조절하였다. 일반적으로, 0.8 ㎖ 수산화암모늄, 10 ㎖ 에틸알코올 및 20 ㎖ 디에틸에테르를 70㎖ 증류수에 용해한다. 500 ㎎ CTAB를 혼합액에 첨가하고 600 rpm으로 30분 동안 교반하였다. 다음, 2.5 ㎖ TEOS를 신속하게 첨가하고, 600 rpm으로 4시간 동안 교반하였다. 여과를 통해 침전물을 수확하고 증류수로 세척하여 60℃에서 24시간동안 건조하였다. 15 ㎖ HCl 및 120 ㎖ 에틸알코올로 구성된 용

액에서 70℃로 24시간동안 교반하여 CTAB 기질을 제거하였다. 기질을 제거하고 실리카 나노입자의 계층적 다공성 형태를 유지하기 위해, 나노입자를 600℃에서 12시간동안 하소(calcination)하였다. 마지막으로, 다공성 실리카 나노입자를 증류수 및 에틸알코올로 수차례 세척하고 80℃에서 건조하였다.

[0059] *키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 합성*

[0060] 1 g 키토산을 200 ㎖ 3% 아세트산에 용해하고 600 rpm로 24시간 동안 교반하여 키토산 용액(0.5 % w/v)을 제조하였다(도 1). 10 mg 다공성 실리카 나노입자를 5 ㎖ 에틸알코올에서 10분 동안 초음파파쇄하고 아세트산을 첨가하여 pH 3.5 내지 4.5로 조정하였다. 다음, 다공성 실리카 나노입자 분산물에 200 ㎕ APTES를 첨가하고 4시간동안 상온에서 교반하였다. 마지막으로, 분산물에 5 ㎖ 키토산 용액을 첨가하고 24시간 동안 상온에서 교반하였다. 10,000 rpm으로 원심분리를 실시하여 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자를 수득하고 증류수 및 에틸알코올로 세척한 후 동결건조 하였다.

[0061] *독소루비신-로딩된 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자*

[0062] 독소루비신을 다공성 실리카 나노입자 및 키토산-코팅 실리카 나노입자에 로딩하였다. 10 mg 다공성 실리카 나노입자를 5 ㎖ PBS(Phosphate Buffered Saline) 용액에 10분 동안 초음파 처리하였다. 다음, 500 ㎍ 독소루비신을 첨가하고 600 rpm으로 24시간동안 교반하였다. 10,000 rpm으로 원심분리를 실시하여 독소루비신-로딩 다공성 실리카 나노입자를 수확하고 상층액을 약물 로딩 효율을 측정하는데 사용하였다. 최종산물을 증류수로 세척하고 동결건조 하였다. 독소루비신-로딩 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자를 합성하기 위해, 10 mg 키토산-코팅된 다공성 실리카 나노입자를 초음파파쇄기를 이용하여 500 ㎍ 독소루비신을 포함하는 5 ㎖ PBS 용액에 용해하고 혼합물을 600 rpm으로 24시간동안 교반하였다. 다음, 0.2 M NaOH를 첨가하여 pH 9로 조정하고 10,000 rpm으로 원심분리하여 최종산물을 수확하였다. 내장 효율을 측정하기 위해 상층액을 분석하였다. 독소루비신-로딩 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자를 PBS 용액으로 수차례 세척한 후, 원심분리하고 동결건조 하였다. 약물의 내장 효율은 다음의 수학식으로 산출하였다:

[0063] 약물 내장 효율(%)=(상층액 내 약물의 양/약물 전체의 양)×100

[0064] *약물 방출 분석*

[0065] 다공성 실리카 나노입자 및 키토산-코팅 실리카 나노입자로부터 방출된 독소루비신을 분석하기 위해, 나노입자를 pH 4.4 및 pH 7.4의 10 ㎖ PBS 용액에 각각 분산하였다. 혼합물을 진탕배양기에서 100 rpm으로 37℃ 조건에서 교반하였다. 1 ㎖ 샘플을 다른 시간 간격(1 내지 48시간)에 수집하고 1 ㎖ PBS 용액으로 대체하여 10 ㎖ 부피를 유지하였다. 샘플을 1,000 rpm으로 원심분리를 실시하여 독소루비신의 조절성 방출을 측정하기 위해 상층액을 분석하였다. 표준곡선에 대입하여 UV-가시 분광광도계를 이용하여 465 ㎚ 파장에서 다공성 실리카 나노입자 및 키토산-코팅 실리카 나노입자로부터 방출된 독소루비신의 양을 산출하였다.

[0066] **실험 결과 및 토론**

[0067] *다공성 실리카 나노입자의 합성 및 특징*

[0068] 액상 조건하에 양이온성 CTAB-기질 및 암모니아수 촉매제를 이용하여 다공성 실리카 나노입자를 제조하였다(도 1). CTAB는 HCl 추출 및 실리카 나노구의 표면 구멍을 생성하기 위한 가소(calcination)에 의해 제거되었다. 나노입자의 형태를 주사형 전자현미경(Field Emission-Scanning Electron Microscope; FE-SEM) 및 투과형 전자 현미경(Transmission electron Microscope; TEM) 분석한 결과, 구형-형태의 나노입자는 표면에 계급적 구멍을 보여주었다(도 2a, 2c 및 2d). 다공성 실리카의 합성은 오르토규산(orthosilicic acid)의 인 시츄(*in situ*) 중합을 위해 기질로서 역할을 하는 양쪽친매성 계면활성제 분자의 액상-크리스탈의 중간상 형성을 기반으로 한다. 상기 합성은 산성 또는 염기성 하에 수행될 수 있고, 규산나트륨, 규산염 나노입자 및 실란(silane)의 테트라-알킬 산화물을 실리카의 원료로 사용할 수 있다. 다공성 실리카의 합성은 주형제, 중성적이거나 대전된 수용액 계면활성제를 필요로 한다. 공지된 바와 같이, 기질은 전구체(예컨대, 오르토규산의 이스터)로부터 규산염의 중합 반응을 지시한다.[19] 다공성 실리카의 입자 크기 및 형태는 가수분해율, pH, 실리카 원료의

축합 및 실리카 고분자 및 결집된 기질 간의 상호작용의 규모에 의해 조절된다.

[0069] *키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 합성 및 특성*

[0070] 자극-반응성 천연 생체고분자물질인 키토산은 β-(1-4)-결합 글루코사민 단위체와 N-아세틸-D-글루코사민으로 구성된 양이온성 다당류이다.[3,20,21] pH-반응성 고분자 전해질 층을 생성하기 위해, 키토산을 사용하여 SiO_2의 표면을 코팅하였다(도 1). SiO_2 나노입자를 변형하고, Si-O-Si 결합을 형성하기 위한 SiO_2 표면 상에 실라놀(silanol) 기와 반응하기 위해 APTES를 사용하였다. SiO_2 나노입자의 표면 상에 교차결합을 형성하기 위해 키토산 용액에 첨가하였다.[22] 키토산 층을 함유하는 SiO_2 나노입자의 형태를 주사형 전자현미경 및 투과형 전자현미경 분석으로 조사하였다(도 3). 원소적 특징은 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자 내 Si, N, O 및 C를 보여준다(도 3b). 동적 광산란법(Dynamic Light Scattering; DLS) 및 제타 전위를 적용하여 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 크기 및 전하를 분석하였다(도 4 및 도 5). 단순분산된 키토산-코팅 실리카 나노입자(직경 230 ㎚)의 사이즈가 실리카 나노입자(직경 225 ㎚)와 비교하여 큰 것(도 4 및 도 5)은 키토산이 5 ㎚의 두께로 실리카 나노입자의 표면에 코팅된 것을 의미한다. 제타 전위를 측정한 결과, 실리카 나노입자는 음성 전위(-2.67 ㎷)를 나타내고, 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자는 양이온성 다당류 키토산에 의해 2.79 ㎷로 증가된 것을 나타낸다(도 4 및 도 5). 결과적으로, 키토산이 실리카 나노입자 상에 코팅된 것을 확인하였다.

[0071] FITC(Fluorescein isothiocyanate)는 아민과의 반응을 통해 안정적인 티오우레아를 형성하는 대표적인 아민 표지 시약이다. FITC 표지 전에는 어떠한 스펙트롬더 나타나지 않은 것과 비교하여, FITC 표지 후 FITC-아민-다공성 실리카 나노입자 현탁액의 최대 흡수 흡수 스펙트럼을 나타내어 FITC가 결합된 것을 확인하였다(도 6).

[0072] *항암제의 조절성 방출*

[0073] 다공성 실리카를 전달체로 사용하여 약물 전달에 적용하였다. 약물과 나노입자 간의 상호작용을 향상시키기 위해 실리카의 표면 기능화를 적용하였다. 표면-기능화된 실리카의 방출율(release rate)은 기능화하지 않은 실리카의 방출율과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한, 비-자가포식성 진핵세포는 500 ㎚ 보다 크기가 큰 입자를 흡수할 수 있고, 200 ㎚보다 크기가 작은 입자의 경우에 흡수 효율이 증가하는 것이 보고되었다. 이는 본 발명의 나노입자를 약물 전달에 적용하는데 유용할 것임을 뒷받침한다.[23] 생체적합성 고분자-코팅 나노입자는 약물의 전달 및 조절 방출을 조절하는데 많은 관심을 받고 있다.[24] 본 발명에서 항암제인 독소루비신은 다공성 실리카 나노입자 및 키토산-코팅 실리카 나노입자로부터 pH-의존 조절 방출되는지 분석하기 위해 사용하였다. 다양한 변수(예컨대, 입자 크기, 분해속도, 분자량, 습윤 및 고분자와 약물간의 결합 친화성)은 약물 방출을 조절하는데 중요한 역할을 한다.[25] 다공성 실리카 나노입자 및 키토산-코팅 실리카 나노입자로부터 방출된 독소루비신의 농도를 정량화하였다. 1시간 동안 pH 7.4에서 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자(15%)와 비교하여 다공성 실리카 나노입자로부터 독소루비신이 빠르게 방출(28%)되었다(도 8b). pH 7.4에, 48시간 동안 다공성 실리카 나노입자로부터 85% 독소루비신이 방출되었다. 반면에, 동일한 조건에서 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자는 53%의 느린 약물 방출을 나타내었다. 이러한 느린 약물 방출은 다공성 실리카 나노입자의 표면에 코팅된 키토산에 기인한다. 이는 키토산 사슬이 pH 7.4에서 탈이온화되어 나노운반체의 다공성 표면 상에 보호막 층이 무너지기 때문이다. 반면에, pH 4.4에서 48시간 동안 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자는 많은 양(90%)의 독소루비신을 방출한다(도 8c). 이는 독소루비신 분자가 빈 나노구 안으로 캡슐화되고 표면 상에 양성 전하 및 아미노 기능화 기로 인해 키토산 층에 흡착되기 때문이다.[26] 다른 pH에서의 독소루비신 방출의 특징은 실리카 나노입자의 표면 상의 키토산 층의 붕괴(collapse) 및 팽윤(swelling)에 기인한다. 산성 pH에서, 양이온성 키토산 사슬은 이온화되고 팽윤하여 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자의 구멍이 열린다.[3,27] 결과적으로, pH-반응성 키토산은 약물 방출을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것이다.

[0074] **결론**

[0075] 본 발명은 표면에 계층적 다공성을 갖는 실리카 나노입자를 합성하였다. 다공성 실리카 나노입자의 표면을 아

미노기로 기능화하고 키토산을 표면에 코팅하였다. 다공성 실리카 나노입자 및 키토산-코팅 실리카 나노입자 내로 항암제(예컨대, 독소루비신)을 로딩하였다. 본 발명은 pH 7.4 조건에서 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자로부터 독소루비신이 느리게 방출됨을 보여준다. 반면에, 키토산의 pH 민감성으로 인해 pH 4.4에서 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자로부터 빠르게 방출됨을 보여준다. 따라서, 본 발명의 pH-반응 조절성 키토산-코팅 다공성 실리카 나노입자는 항암제 전달에 유용한 전달체가 될 것이다.

[0076] **참고문헌**

[0077] 1. Stayton PS, Shimoboji T, Long C, Chilkoti A, Ghen G, Harris JM, Hoffman AS. Control of protein-ligand recognition using a stimuli-responsive polymer. *Nature* 1995;378:472-474.

[0078] 2. Roy D, Cambre JN, Sumerlin BS. Future perspectives and recent advances in stimuliresponsive materials. *Prog. Polym. Sci.* 2010;35:278-301.

[0079] 3. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010;62:83-99.

[0080] 4. Lin YS, Haynes CL. Impacts of Mesoporous Silica Nanoparticle Size, Pore Ordering, and Pore Integrity on Hemolytic Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2010;132:4834-4842.

[0081] 5. Slowing II, Trewyn BG, Lin VSY. Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2007;129:8845-8849.

[0082] 6. Warren SC, DiSalvo FJ, Wiesner U. Nanoparticle-tuned assembly and disassembly of mesostructured silica hybrids. *Nat. Mater.* 2007;6:156-161.

[0083] 7. Zhu Y, Shi J, Shen W, Dong X, Feng J, Ruan M, Li Y. Stimuli-Responsive Controlled Drug Release from a Hollow Mesoporous Silica Sphere/Polyelectrolyte Multilayer Core-Shell Structure. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005;44:5083-5087.

[0084] 8. Jiang X, Ward TL, Cheng YS, Liu J, Brinker CJ. Aerosol fabrication of hollow mesoporous silica nanoparticles and encapsulation of l-methionine as a candidate drug cargo. *Chem. Commun.* 2010;46:3019-3021.

[0085] 9. Zhu J, Tang J, Zhao L, Zhou X, Wang Y, Yu C. Ultrasmall, Well-Dispersed, Hollow Siliceous Spheres with Enhanced Endocytosis Properties. *Small* 2010;6:276-282.

[0086] 10. Ashley CE, Carnes EC, Phillips GK, Padilla D, Durfee PN, Brown PA, Hanna TN, Liu J, Phillips B, Carter MB, Carroll NJ, Jiang X, Dunphy DR, Willman CL, Petsev DN, Evans DG, Parikh AN, Chackerian B, Wharton W, Peabody DS, Brinker CJ. The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers. *Nat. Mater.* 2011;10:389-397.

[0087] 11. Gary-Bobo M, Hocine O, Brevet D, Maynadier M, Raehm L, Richeter S, Charasson V, Loock B, MorA, Maillard P, Garcia M, Durand JO. Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT. *Int. J. Pharm.* 2012;423:509-515.

[0088] 12. Cheng SH, Lee CH, Yang CS, Tseng FG, Mou CY, Lo LW. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with an oxygen-sensing probe for cell photodynamic therapy: potential cancer theranostics. *J. Mater. Chem.* 2009;19:1252-1257.

[0089] 13. Di Pasqua AJ, Sharma KK, Shi YL, Toms BB, Ouellette W, Dabrowiak JC, Asefa T. Cytotoxicity of mesoporous silica nanomaterials. *J. Inorg. Biochem.* 2008;102:1416-1423.

[0090] 14. Lin W, Huang YW, Zhou XD, Ma Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006;217:252-259.

[0091] 15. Sun L, Li Y, Liu X, Jin M, Zhang L, Du Z, Guo C, Huang P, Sun Z. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicol. In Vitro* 2011;25:1619-1629.

[0092] 16. Napierska D, Thomassen LCJ, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, irsch-Volders M, Martens JA, Hoet PH. Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. *Small* 2009;5:846-853.

[0093] 17. Xia T, Kovochich M, Liong M, Meng H, Kabehie S, George S, Zink JI, Nel AE. Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs. *ACS Nano* 2009;3:3273-3286.

[0094] 18. Liu R, Liao P, Liu J, Feng P. Responsive Polymer-Coated Mesoporous Silica as a pHSensitive Nanocarrier for Controlled Release. *Langmuir* 2011;27:3095-3099.

[0095] 19. Wan Y, Zhao. On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates. *Chem. Rev.* 2007;107:2821-2860.

[0096] 20. Wu J, Su ZG, Ma GH. A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. *Int. J. Pharm.* 2006;315:1-11.

[0097] 21. Jang JH, Choi YM, Choi YY, Joo MK, Park MH, Choi BG, Kang EY, Jeong B. pH/temperature sensitive chitosan-g-(PA-PEG) aqueous solutions as new thermogelling systems. *J. Mater. Chem.* 2011;21:5484-5491.

[0098] 22. Wu J, Sailor MJ. Chitosan Hydrogel-Capped Porous SiO2 as a pH Responsive Nano-Valve for Triggered Release of Insulin. *Adv. Funct. Mater.* 2009;19:733-741.

[0099] 23. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 2004;377:159-169.

[0100] 24. Gulfam M, Kim J, Lee JM, Ku B, Chung BH, Chung BG. Anticancer Drug-Loaded Gliadin Nanoparticles Induce Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Langmuir* 2012;28:8216-8223.

[0101] 25. Ge H, Hu Y, Jiang X, Cheng D, Yuan Y, Bi H, Yang C. Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(ε-caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ε-caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles. *J. Pharm. Sci.* 2002;91:1463-1473.

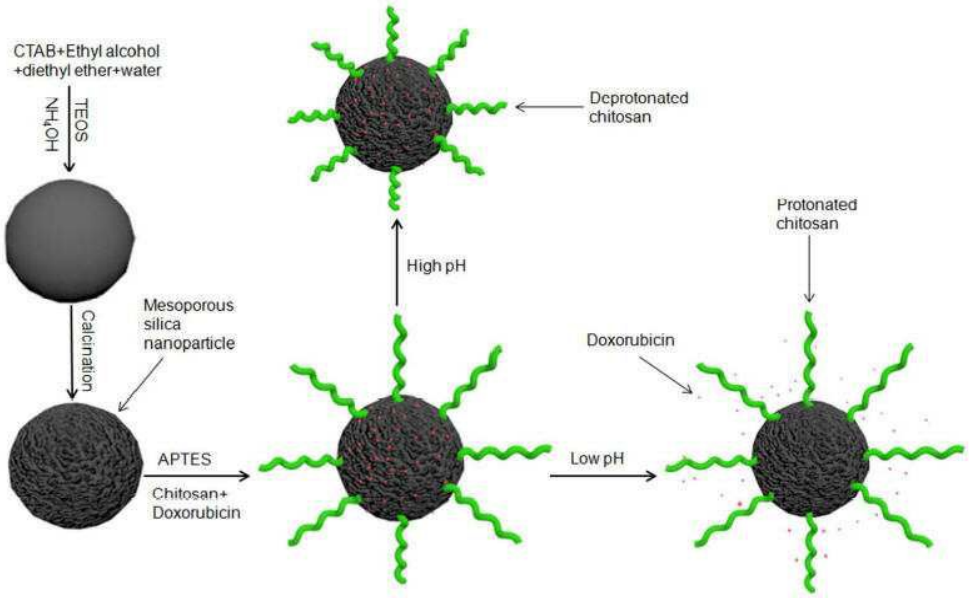
[0102] 26. Song SW, Hidajat K, Kawi S. pH-Controllable drug release using hydrogel encapsulated mesoporous silica. *Chem. Commun.* 2007;4396-4398.

[0103] 27. Deng Z, Zhen Z, Hu X, Wu S, Xu Z, Chu PK. Hollow chitosanilica nanospheres as pHsensitive targeted delivery carriers in breast cancer therapy. *Biomaterials* 2011;32:4976-4986.

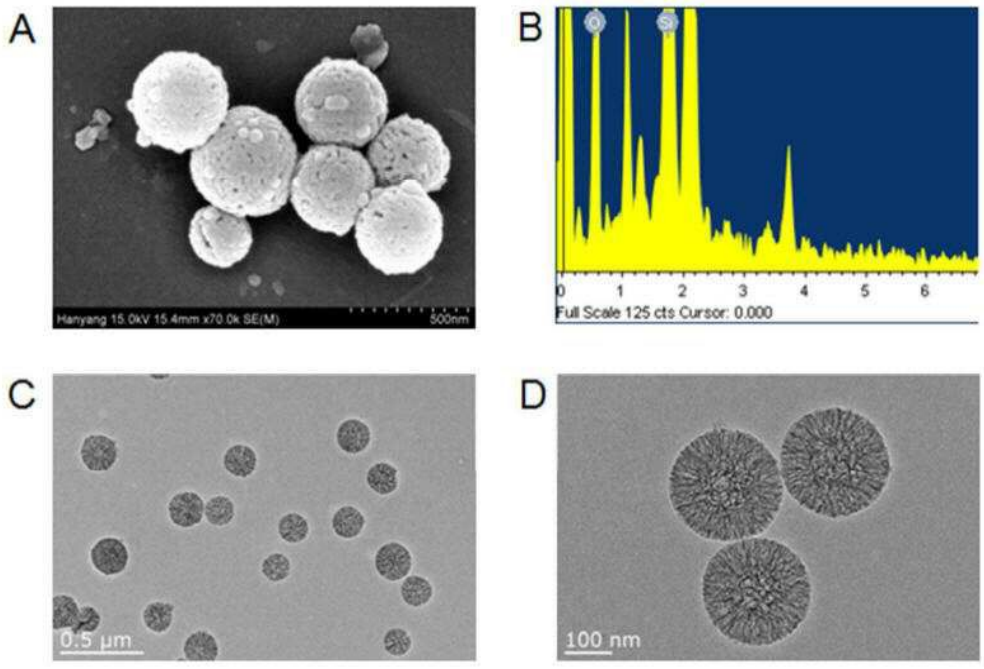
[0104] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

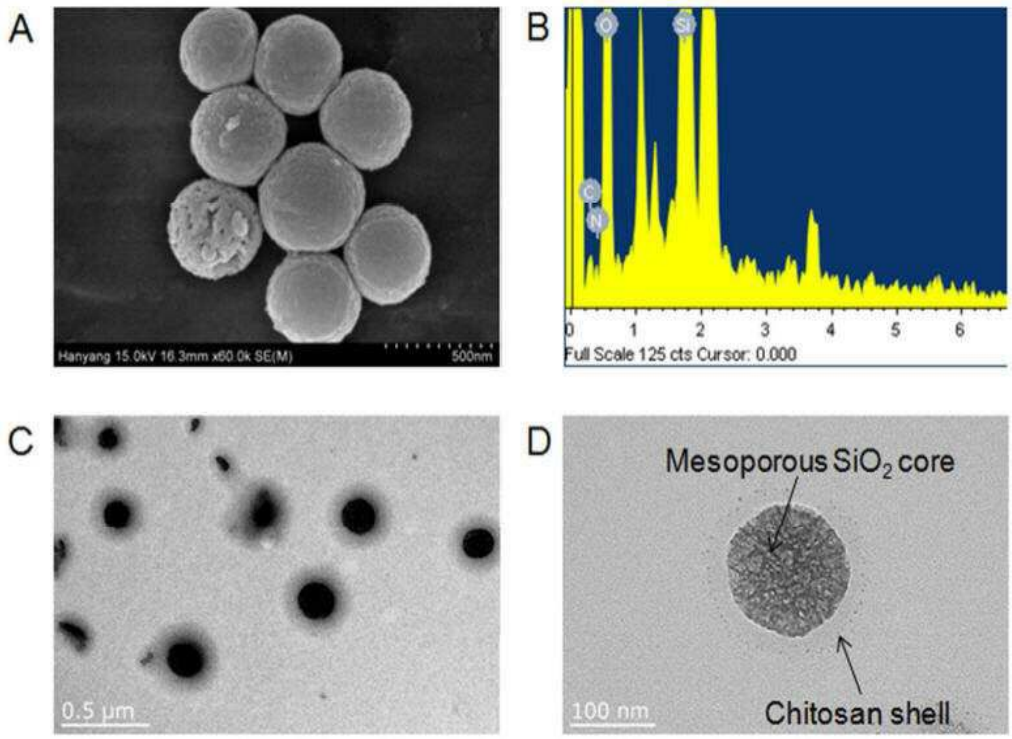
도면1


CTAB+Ethyl alcohol
+diethyl ether+water
NH4OH
TEOS
Calcination
Mesoporous
silica
nanoparticle
APTES
Chitosan+
Doxorubicin
High pH
Deprotonated
chitosan
Protonated
chitosan
Doxorubicin
Low pH

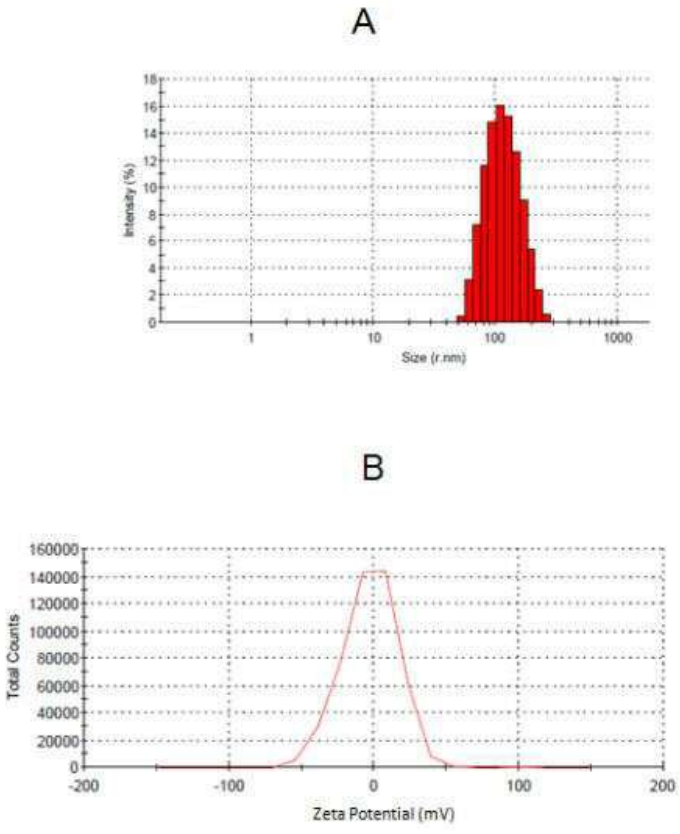
도면2


A
B
C
D
Hanyang 15.0kV 15.4mm x70.0k SE(M)
500nm
Full Scale 125 cts Cursor: 0.000
0.5 μm
100 nm

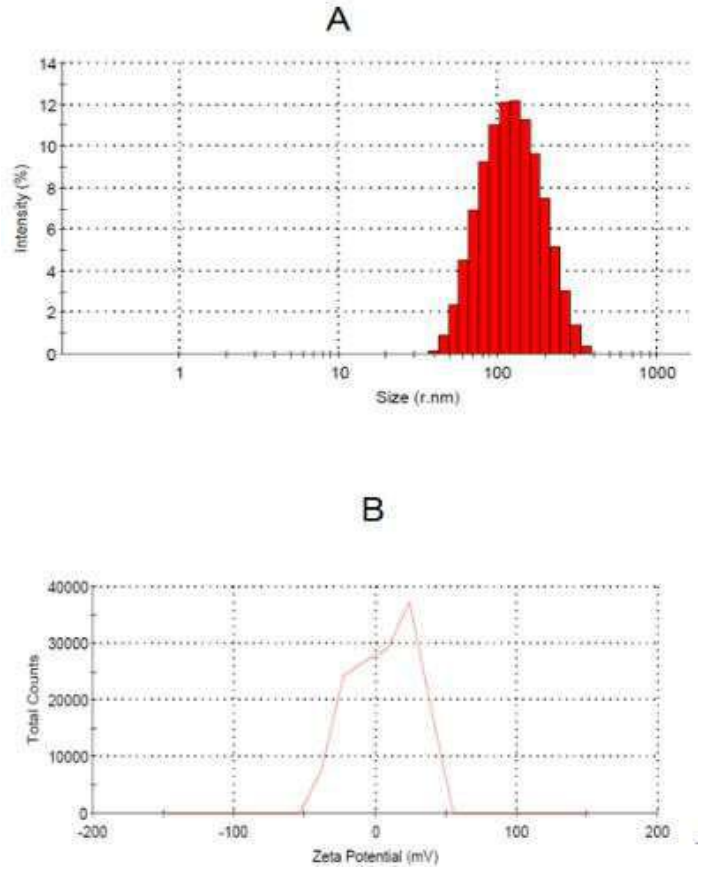
도면3


A
B
O
Si
C
N
0 1 2 3 4 5 6
Full Scale 125 cts Cursor: 0.000
Hanyang 15.0kV 16.3mm x60.0k SE(M)
500nm
C
D
0.5 μm
Mesoporous SiO_2 core
100 nm
Chitosan shell

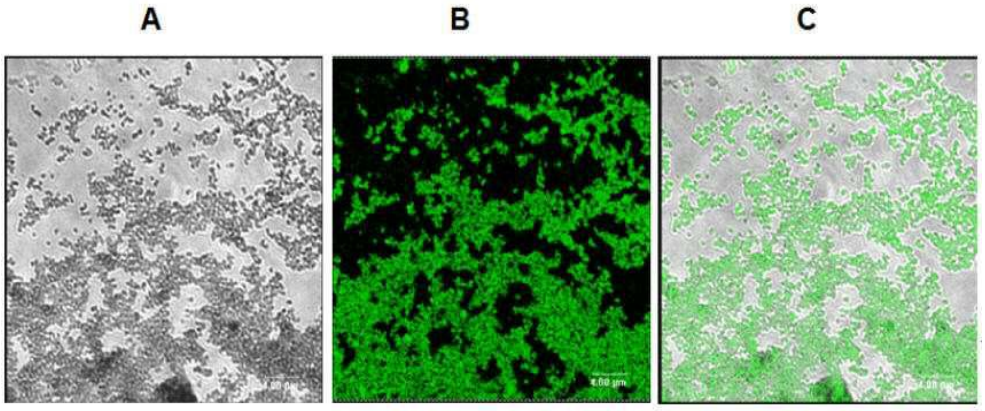
도면4


A
Intensity (%)
Size (r.nm)
B
Total Counts
Zeta Potential (mV)

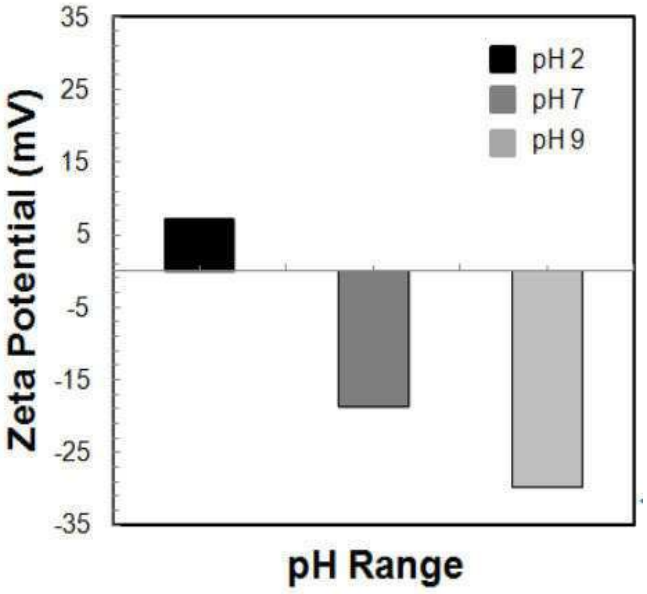
도면5



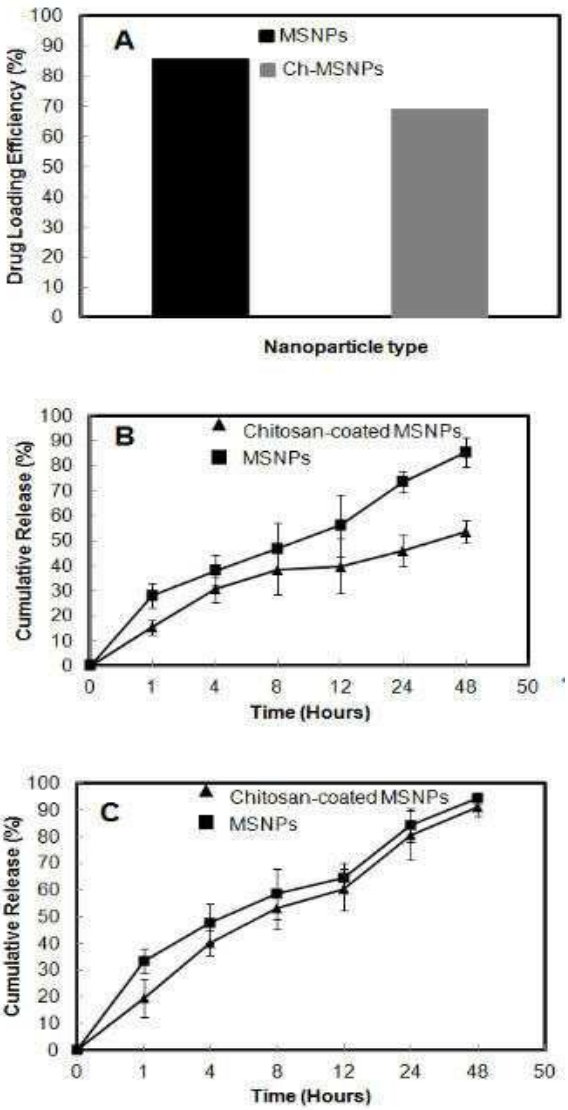
도면6



도면7



도면8


A
MSNPs
Ch-MSNPs
Drug Loading Efficiency (%)
Nanoparticle type
B
Chitosan-coated MSNPs
MSNPs
Cumulative Release (%)
Time (Hours)
C
Chitosan-coated MSNPs
MSNPs
Cumulative Release (%)
Time (Hours)