



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월16일

(11) 등록번호 10-1577951

(24) 등록일자 2015년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/14 (2006.01) A61K 33/00 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/143 (2013.01)

A61K 33/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0134269

(22) 출원일자 2015년09월23일

심사청구일자 2015년09월23일

(56) 선행기술조사문헌

논문1: J. MATER. CHEM. B.

논문2: ANGEW. CHEM. INT. ED.

(73) 특허권자

기초과학연구원

대전광역시 유성구 유성대로1689번길 70 (전민동, KT대덕2연구센터)

포항공과대학교 산학협력단

경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)

(72) 발명자

김원중

경상북도 포항시 남구 지곡로 155 (지곡동, 교수아파트) 4-403

김지훈

경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동) 포항공과대학교 화학관 311호

최형우

경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동) 포항공과대학교 화학관 316호

(74) 대리인

특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 이수형

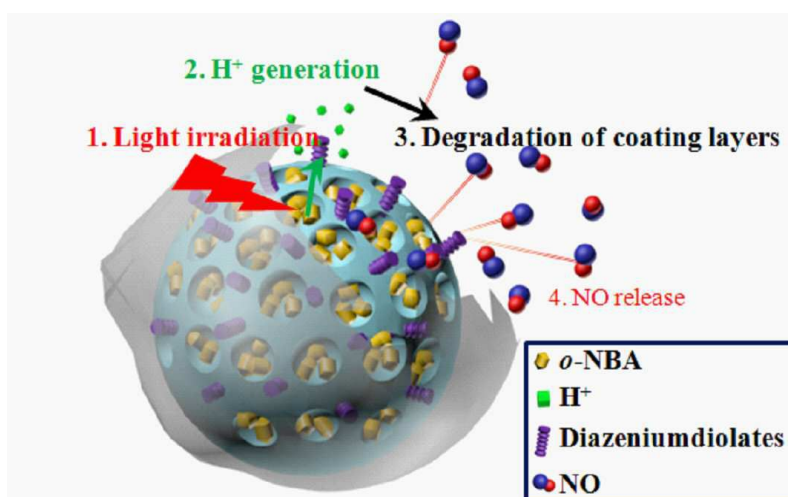
(54) 발명의 명칭 다공성 코어-셸 나노입자와 인산칼슘을 이용한 선택적 일산화질소 방출 방법

(57) 요약

본 발명은 일산화질소의 방출을 제어하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 광조사에 의해 양성자를 방출할 수 있는 물질을 포함한 다공성 실리카 나노입자와 인산칼슘을 이용해 일산화질소를 선택적으로 방출하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 광조사에 의해 일산화질소의 방출을 제어하는 기술은 원하는 부분까지 안정적으로 일산화질소를 전달할 수 있으며, 광에 노출되었을 경우에만 일산화질소의 방출을 유도해 치료 효과를 극대화시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 41/0057 (2013.01)

A61K 47/02 (2013.01)

A61K 47/08 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

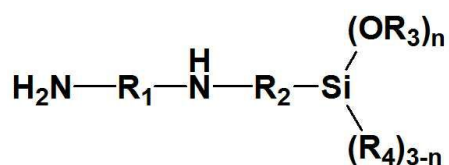
이차아민기를 포함하는 실란커플링제로 화학적 개질된 다공성 코어부;
및 인산칼슘을 포함하는 셸부;로 이루어진 다공성 나노입자로서,
상기 다공성 코어부는 광반응성 pH 조절제를 포함하는 것을 특징으로 하는 다공성 코어-셸 나노입자.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 다공성 코어부는 실리카(SiO_2), 알루미나(Al_2O_3), 티타니아(TiO_2), 지르코니아(ZrO_2), 삼산화안티몬(Sb_2O_3), 산화몰리브덴(MoO_3), 산화주석(SnO_2), 산화아연(ZnO) 및 이들의 혼합물 중에 선택되는 어느 하나를 포함하는 다공성 코어-셸 나노입자.

청구항 3

제 1항에 있어서,
상기 실란커플링제는 하기 화학식 1로 표현되는 다공성 코어-셸 나노입자.
[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,
 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 ($\text{C}_1\sim\text{C}_{12}$)알킬렌기이고, R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 ($\text{C}_1\sim\text{C}_4$)알킬기이고, n 은 1~3이다.)

청구항 4

제 1항에 있어서,
상기 실란커플링제는 이차아민기가 일산화질소와 반응하여 형성된 디아제늄디올레이트 작용기를 포함하는 다공성 코어-셸 나노입자.

청구항 5

제 1항에 있어서,
상기 광반응성 pH 조절제는 o-니트로벤즈알데히드(o-nitrobenzaldehyde), m-니트로벤즈알데히드(m-nitrobenzaldehyde), p-니트로벤즈알데히드(p-nitrobenzaldehyde) 및 이들의 혼합물 중에 선택되는 어느 하나를 포함하는 다공성 코어-셸 나노입자.

청구항 6

제 1항에 있어서,
상기 인산칼슘은 수산화아파타이트($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)인 다공성 코어-셸 나노입자.

청구항 7

- a) 다공성 나노입자를 실란커플링제로 처리하는 단계;
 - b) 상기 a)단계에서 제조된 다공성 나노입자에 광반응성 pH 조절제를 첨가하는 단계;
 - c) 상기 b)단계에서 제조된 다공성 나노입자에 인산칼슘으로 표면을 코팅하는 단계; 및
 - d) 상기 c)단계에서 제조된 다공성 나노입자에 일산화질소 가스를 투입하여 디아제늄디올레이트 작용기를 형성하는 단계;
- 를 포함하는 다공성 코어-셸 나노입자의 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 a)단계에서 다공성 나노입자는 금속전구체에 계면활성제를 첨가하여 형성되는 것인 다공성 코어-셸 나노입자의 제조방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 금속전구체는 $\text{Si}-(\text{OR})_4$ (R은 각각 독립적으로 수소 또는 (C1~C4)알킬기이다.)를 포함하는 다공성 코어-셸 나노입자의 제조방법.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 계면활성제는 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 양쪽성이온계면활성제 및 비이온성 계면활성제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 다공성 코어-셸 나노입자의 제조방법.

청구항 11

제 7항에 있어서,

상기 c)단계에서 pH를 7 내지 11로 조절하는 것인 다공성 코어-셸 나노입자의 제조방법.

청구항 12

제 1항 내지 6항에서 선택되는 어느 한 항의 다공성 코어-셸 나노입자에 광조사하여 일산화질소가 방출되는 것을 특징으로 하는 선택적 일산화질소 방출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일산화질소의 방출을 제어하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 광조사에 의해 양성자를 방출할 수 있는 물질을 포함한 다공성 코어-셸 나노입자와 인산칼슘을 이용해 일산화질소를 선택적으로 방출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일산화질소는 세포 내에 일산화질소 생성 효소에 의해 합성되는 기체로 생체 내 생리 활성 물질로서 중요한 기능을 가지고 있다. 특히, 신경전달 시스템, 심혈관계 및 면역시스템 등 다양한 생리현상 및 질병에 관련이 있는 것으로 알려지고 있다.

[0003] 예를 들면, 일산화질소는 농도와 방출 시간에 비례하여 상반되는 치료 효과를 나타낸다. 예를 들어 고농도의 일산화질소가 단시간 방출이 되면 항암효과 및 항박테리아 효과가 나타나며 적은 양의 일산화질소가 장시간 방출되면 상처 치료, 세포 성장, 혈관 생성등과 관련이 있다고 알려져 있다. 하지만 일산화질소는 가스 형태로 존재

하므로 효과적인 전달에 많은 제약이 있다.

[0004] 대표적으로 일산화질소를 방출하는 작용기인 디아제늄디올레이트 (diazoniumdiolate)는 노노에이트(NONOate)로도 불리는데, 그 일반식은 $RR'N-N(O)=NOR''$ 으로 나타낼 수 있다. 디아제늄디올레이트는 고체 형태로 안정 하게 보관할 수 있으며, 물에 대한 용해도가 높고, 생체 온도와 pH 조건에서 분해될 뿐만 아니라, pH에 따라 다양한 방출 형태를 가진다. 디아제늄디올레이트는 쉽게 일산화질소를 생성하고 상대적으로 다량의 일산화질소 방출을 할 수 있지만, 물과 접촉과 동시에 방출되는 문제점을 가지고 있다.

[0005] 이를 극복하기 위해 외부 자극에 의한 일산화질소 방출 기술이 개발되고 있지만 외부 자극과 생체 적합성 물질을 응용한 사례는 매우 드물다. 외부 자극(빛, pH, 엔자임, 온도, 자기장 등)에 의한 약물 전달 시스템은 국한된 약물의 선택성을 가지기 때문에, 체내에서 일산화질소를 안정적으로 방출하는 방법을 개발하는 것이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 공개특허공보 제 2008-0037677호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 과량의 일산화질소를 원하는 부분까지 안정적으로 전달할 수 있는 다공성 코어-셸 나노입자를 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명의 다공성 코어-셸 나노입자는 물과 접촉하는 동시에 일산화질소를 방출하는 디아제늄디올레이트 작용기의 문제점을 해결하기 위하여, 외부에서 광 조사된 경우에만 일산화질소의 방출을 유도하여 치료 효과를 높일 수 있는 선택적인 일산화질소 방출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 이차아민기를 포함하는 실란커플링제로 화학적 개질된 다공성 코어부; 및 인산칼슘을 포함하는 셸부;로 이루어진 다공성 나노입자로서, 상기 다공성 코어부는 광반응성 pH 조절제를 포함하는 것을 특징으로 하는 다공성 코어-셸 나노입자 및 그 제조방법에 관한 것이다.

[0010] 본 발명은 상기 다공성 코어-셸 나노입자에 광조사하여 일산화질소가 방출되는 것을 특징으로 하는 선택적 일산화질소 방출 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 다공성 코어-셸 나노입자를 도입한 일산화질소의 선택적인 방출 방법은 원하는 부분까지 안정적으로 일산화질소를 전달할 수 있으며, 광에 노출된 경우에만 일산화질소의 방출을 유도해 치료 효과를 극대화시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다.

[0012] 또한 본 발명에 따른 다공성 코어-셸 나노입자는 다른 약물을 추가적으로 첨가할 수 있으며, 듀얼 딜리버리를 통해 약물의 치료 효과와 더불어 일산화질소의 치료 효과를 볼 수 있을 것이라 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 다공성 코어-셸 나노입자를 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 다공성 코어-셸 나노입자를 제조하는 과정을 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 다공성 코어-셸 나노입자를 Transmission Electron Microscopy로 측정한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 다공성 코어-셸 나노입자를 Powder XRD를 통해 측정한 결정구조 분석 그래프

이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 다공성 코어-셸 나노입자를 광조사에 전후의 pH를 측정한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 다공성 코어-셸 나노입자를 적외선 분광기(FT-IR)로 측정한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 다공성 코어-셸 나노입자를 자외-가시광 분광기(UV-vis spectroscopy)로 측정한 결과이다.

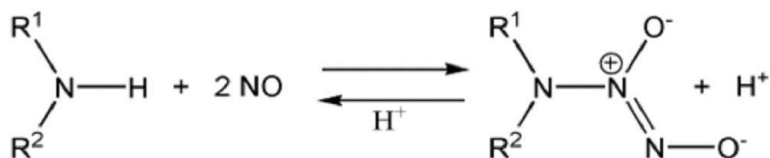
도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 다공성 코어-셸 나노입자를 칼슘이온 검출 방법을 통해 측정한 결과이다.

도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 다공성 코어-셸 나노입자를 일산화질소 검출기를 통해 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 첨부한 도면들을 참조하여 본 발명을 상세히 설명한다. 이때 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.
- [0016] 본 발명은 이차아민기를 포함하는 실란커플링제로 화학적 개질된 다공성 코어부;
- [0017] 및 인산칼슘을 포함하는 셸부;로 이루어진 다공성 나노입자로서,
- [0018] 상기 다공성 코어부는 광반응성 pH 조절제를 포함하는 것을 특징으로 하는 다공성 코어-셸 나노입자에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 용어에 있어, 다공성 코어-셸 나노입자(Mesoporous core-shell nanoparticles)는 구조 내에 균일한 크기의 기공 및 배열을 가지는 다공성 코어-셸 나노입자를 의미하는 것이다. 또한 광반응성이란 광조사에 화학적 결합상태가 변화하는 것을 의미하며, 본 발명의 광원은 자외선(Ultraviolet Ray)일 수 있으며, 바람직하게는 200 내지 400nm 파장의 자외선일 수 있다. 또한 광반응성 pH 조절제는 광조사에 의해 양성자를 생성하여 pH를 조절할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0022] 이하, 본 발명의 다공성 코어-셸 나노입자를 보다 상세히 설명한다.
- [0023] 상기 다공성 코어부는 실리카(SiO_2), 알루미늄(Al_2O_3), 티타니아(TiO_2), 지르코니아(ZrO_2), 삼산화안티몬(Sb_2O_3), 산화몰리브덴(MoO_3), 산화주석(SnO_2), 산화아연(ZnO) 및 이들의 혼합물 중에 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 실리카(SiO_2)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 상기 다공성 코어-셸 나노입자의 평균직경은 30~200nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 다공성 코어-셸 나노입자는 다양한 크기, 모양 및 기능을 가진 물질을 포획할 수 있으며, 구조 내의 생체적합한 기공은 외부 물질을 우수한 안정성으로 포획할 수 있다. 따라서, 상기 다공성 코어-셸 나노입자는 약물 및 유전자 전달, 세포 이미징 및 암 치료에 적용될 수 있다.
- [0026] 특히, 본 발명의 다공성 코어-셸 나노입자는 표면 기능화가 용이하기 때문에 자극-제어 방출에 적용할 수 있도록 표면을 기능화 시킨 다공성 코어-셸 나노입자를 도입하였다.
- [0028] 본 발명에서는 다공성 코어-셸 나노입자에 일산화질소를 방출할 수 있는 작용기를 도입하였으며, 상기 작용기는 “디아제늄디올레이트(diazoniumdiolate)” 일 수 있다.
- [0029] 상기 디아제늄디올레이트 작용기는 하기 반응식 1에 나타난 것처럼 이차아민에 일산화질소를 반응시켜 얻을 수 있다. 또한 상기 디아제늄디올레이트 작용기는 $\text{RR}'\text{N}(\text{O})=\text{NOR}$ 의 일반식으로 나타낼 수 있다.

[0030] [반응식 1]



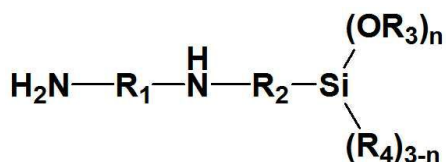
[0031]

[0032] 상기 디아제퓨디올레이트 작용기는 작용기당 2분자의 일산화질소를 방출하므로 전달체에 포함시켰을 때 상대적으로 높은 농도의 일산화질소를 발생할 수 있다. 그러나 물과 접촉하는 동시에 일산화질소의 방출이 일어나므로 효율적인 일산화질소 전달을 위해 외부 자극을 통해 일산화질소의 방출을 제어하는 게이트키퍼 시스템이 필요하다. 따라서 본 발명은 생체 내 특정 조건에 노출되었을 때, 디아제퓨디올레이트 작용기가 반응하여 일산화질소를 방출할 수 있다.

[0034] 본 발명에서는 디아제늄디올레이트 작용기를 형성할 수 있는 이차아민기를 포함하는 실란커플링제를 사용할 수 있다. 실란커플링제의 알콕시실릴(Si-OR) 관능기는, 가수분해되면 실라놀기가 되어 무기물과 결합하며, 유기물과 무기물을 서로 연결시키는 역할을 할 수 있다.

[0035] 상기 실란커플링제는 하기 화학식 1로 표현될 수 있다.

[0036] [화학식 1]



[0037]

[0038] (상기 화학식 1에서,

[0039] R1 및 R2는 각각 독립적으로 (C1~C12)알킬렌기이고, R3 및 R4는 각각 독립적으로 (C1~C4)알킬기이고, n은 1~3이다.)

[0040] 본 발명에서는 더욱 바람직하게, N-(2-아미노에틸)-3-아미노프로필트리메톡시실란(AEATS)를 사용하여 본 발명의 목적하는 효과를 얻을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

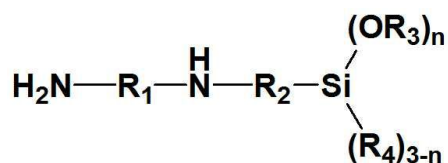
[0042] 본 발명에서는 일산화질소의 방출을 제어하는 게이트키퍼 시스템으로 광반응성 pH조절제 및 인산칼슘을 사용하여 pH변화에 의한 일산화질소 방출을 제어할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 인산칼슘은 다공성 코어-셸 나노입자의 셸(shell)에 코팅되며, pH가 낮아지면 인산칼슘 코팅층이 분해되므로 일산화질소가 선택적으로 방출될 수 있다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 광반응성 pH 조절제는 광조사에 의해 양성자를 생성하는 물질로서, o-니트로벤즈알데히드(o-nitrobenzaldehyde, o-NBA), m-니트로벤즈알데히드(m-nitrobenzaldehyde, m-NBA), p-니트로벤즈알데히드(p-nitrobenzaldehyde, p-NBA) 및 이들의 혼합물 중에 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다. 바람직하게는 o-NBA를 사용할 수 있으며, o-NBA는 특정 파장의 UV에 노출되었을 경우 양성자를 방출하는 화합물로, o-NBA는 여기 상태(excited state)에서 분자내 양성자 이동반응을 통해 nitrosobenzoic anion으로 변화되고 최종적으로 proton을 방출할 수 있다. 따라서 광반응에 의해 pH는 급격히 변화되고, 이러한 pH의 변화는 인산칼슘 코팅층을 분해시킬 수 있다.

[0046] 본 발명에서 사용되는 인산칼슘은 칼슘의 인산염을 지칭하는 말로써, 바람직하게는 수산화아파타이트를 사용할 수 있다.

[0047] 상기 수산화아파타이트($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)는 생체 무기화합물로 인체 뼈와 가장 유사한 구조를 가지고 있어 고분자와 결합하여 경조직 대체 물질로 우수한 골 재생능력, 생체활성, 생체적합성 및 생분해성의 특징을 가지고 있어 조직공학에 주로 활용될 수 있다. 본 발명에서는 pH가 낮아지면 분해되는 특성을 이용하여 효과적인 일산화질소의 방출을 제어하는 게이트키퍼 시스템으로 사용될 수 있다.

- [0049] 본 발명은 a) 다공성 나노입자를 실란커플링제로 처리하는 단계;
- [0050] b) 상기 a)단계에서 제조된 다공성 나노입자에 광반응성 pH 조절제를 첨가하는 단계;
- [0051] c) 상기 b)단계에서 제조된 다공성 나노입자에 인산칼슘으로 표면을 코팅하는 단계; 및
- [0052] d) 상기 c)단계에서 제조된 다공성 나노입자에 일산화질소 가스를 투입하여 디아제늄디올레이트 작용기를 형성하는 단계;
- [0053] 를 포함하는 다공성 코어-셸 나노입자의 제조방법을 제공 할 수 있다.
- [0055] a) 다공성 나노입자를 실란커플링제로 처리하는 단계;는 다음과 같다.
- [0056] 본 발명의 다공성 나노 입자의 제조방법은 당업자가 제조할 수 있는 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 본 발명에서는 금속전구체에 계면활성제를 첨가하여 형성되는 것일 수 있다. 상기 금속 전구체는 바람직하게 실리카 전구체로 $\text{Si}-(\text{OR})_4$ (R은 각각 독립적으로 수소 또는 (C1~C4)알킬기이다.)일 수 있으며, 예를 들면, 테트라에틸 오소실리케이트(TEOS), 테트라메틸 오소실리케이트(TMOS), 테트라프로필 오소실리케이트(TPOS) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 상기 계면활성제는 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 양쪽성이온계면활성제 및 비이온성 계면활성제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0058] 양이온성 계면활성제로는 알킬트리메틸암모늄염, 알킬피리디늄염, 알킬4급암모늄염, 알킬디메틸벤질암모늄염 등을 사용할 수 있고, 음이온성 계면활성제로는 알킬설페이트염, 알킬설포네이트염, 알킬포스페이트염, 알킬카르복실산염 등을 사용할 수 있다.
- [0059] 양쪽성이온 계면활성제로는 코코아미도 프로필 베타인, 코코암포아세테이트, 코코암포 카르복시글리시네이트, 알킬 암포아세테이트, 나트륨 라우로암포아세테이트 등을 사용할 수 있다.
- [0060] 비이온성 계면활성제로는 솔비탄계 계면활성제, 당류계 계면활성제 또는 폴리(알킬렌 옥사이드)계 계면활성제일 수 있다. 당류계 계면활성제로는 알킬 폴리글루코사이드일 수 있고, 당으로는 1당 또는 2당류가 사용할 수 있으며, 슈크로즈 디스테아레이트, 슈크로즈 모노스테아레이트 등을 사용할 수 있다. 폴리(알킬렌 옥사이드)계 계면활성제로는 알킬 또는 아릴 치환 폴리(알킬렌 옥사이드), 친수성 폴리(알킬렌 옥사이드)-소수성 폴리(알킬렌 옥사이드) 형태의 블록 공중합체일 수 있으며, 구체적으로 폴리(에틸렌 옥사이드)-스테아레이트, 노닐페놀 폴리(에틸렌옥사이드), 에틸렌 옥사이드가 부가된 솔비탄 지방산 에스테르, 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드) 블록 공중합체, 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 옥사이드) 블록 공중합체 등을 사용할 수 있다.
- [0062] 본 발명에서는 바람직하게 소수성 알킬체인과 친수성 아민으로 이루어진 양이온성 계면활성제를 사용할 수 있으며, 헥사데실트리메틸암모늄 브롬화물(CTAB), 헥사데실트리메틸암모늄 클로라이드(CTACl) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 상기 계면활성제, 실리카 전구체 및 용매의 혼합물을 원심분리하여 다공성 나노입자를 제조할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 상기 용매는 알콜류, 물, 에테르계 단독 또는 혼합한 용매를 사용할 수 있으며, 알콜류 용매로는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 프로판올, 부탄올, 펜탄올 등을 사용할 수 있고, 에테르계 용매로는 테트라하이드로퓨란, 메틸테트라하이드로퓨란, 디메틸에테르, 디부틸에테르 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 상기 제조된 다공성 나노입자에 하기 화학식 1의 실란커플링제를 혼합할 수 있다.
- [0068] [화학식 1]



- [0069]
- [0070] (상기 화학식 1에서,

[0071] R1 및 R2는 각각 독립적으로 (C1~C12)알킬렌기이고, R3 및 R4는 각각 독립적으로 (C1~C4)알킬기이고, n은 1~3이다.)

[0073] 또한 상기 a)단계에서, 제조된 다공성 나노 입자는 계면활성제를 제거 할 수 있다. 계면활성제를 제거하기 위해 염산 및 메탄올 혼합액에 침지할 수 있다.

[0075] b) 상기 a)단계에서 제조된 다공성 나노입자에 광반응성 pH 조절제를 첨가하는 단계;는 다음과 같다.

[0076] 상기 a) 단계에서 제조된 다공성 나노입자 파우더와 액체상의 광반응성 pH 조절제를 혼합하며, 건조할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 광반응성 pH 조절제는 o-니트로벤즈알데히드(o-nitrobenzaldehyde), m-니트로벤즈알데히드(m-nitrobenzaldehyde), p-니트로벤즈알데히드(p-nitrobenzaldehyde) 및 이들의 혼합물 중에 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다.

[0078] c) 상기 b) 단계에서 제조된 다공성 나노입자에 인산칼슘으로 표면을 코팅하는 단계;는 다음과 같다.

[0079] 본 발명에서 사용되는 인산칼슘은 수산화아파타이트($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)로서, 수산화아파타이트의 제조방법은 수용성의 칼슘염과 인산염을 액상 매질을 이용하여 제조하는 습식법을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] 본 발명의 수산화아파타이트는 반응시, pH에 민감하여 pH 12 부근에서 침전물이 생성되지만 반응이 진행할수록 pH가 감소되어 반응중반부에서는 7 내지 11 영역에서 침전물이 생성될 수 있다.

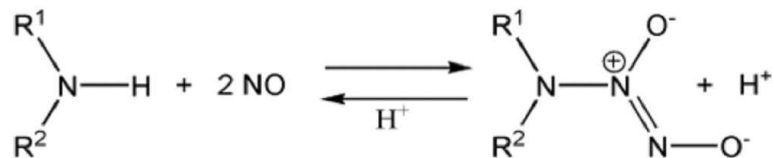
[0081] 수산화아파타이트 침전물은 pH가 7 이하의 낮은 영역에서의 그들의 결정구조내에 충분한 칼슘을 확보하지 못하게 되어 칼슘이 결핍된 수산화아파타이트, 즉 구조가 붕괴된 수산화아파타이트가 생성될 수 있다.

[0082] 본 발명에서는 pH를 7 내지 11 로 조절하는 단계를 수행할 수 있다.

[0086] d) 상기 c) 단계에서 제조된 다공성 나노입자에 일산화질소 가스를 투입하여 디아제늄디올레이트 작용기를 형성하는 단계;는 다음과 같다.

[0088] 상기 디아제퓨디올레이트 작용기는 하기 반응식 1에 나타난 것처럼 이차아민에 일산화질소 가스를 반응시켜 얻을 수 있다.

[0089] [반응식 1]



[0090]

[0091] 본 발명에서 일산화질소 가스의 투입은 40 psi 내지 200 psi의 압력 하에 수행할 수 있고, 바람직하게는 80 psi 내지 150 psi의 압력 하에 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0093] 본 발명의 상기 제조된 다공성 코어-셸 나노입자는 광조사하여 선택적으로 일산화질소가 방출될 수 있으며, 광조사는 바람직하게 200 내지 400nm의 자외선(Ultraviolet Ray)을 조사할 수 있다.

[0095] 또한 본 발명의 다공성 코어-셸 나노 입자는 내부 또는 표면에 약리 효과 물질을 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 일산화질소 효과와 더불어 추가적인 약리 효과를 목적으로 사용할 수도 있다. 상기 약리 효과 물질은 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 혈전 형성이나 혈액 응고를 방지하는 물질, 항산화제, 소염제, 상처 치유 촉진 물질, 항박테리아제 등을 포함할 수 있으며, 약물의 치료 효과와 더불어 일산화질소의 치료 효과를 볼 수 있다.

[0097] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예는 본 발명을 상세히 설명하기 위한 하나의 참조일 뿐이며, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0099] [실시예 1]

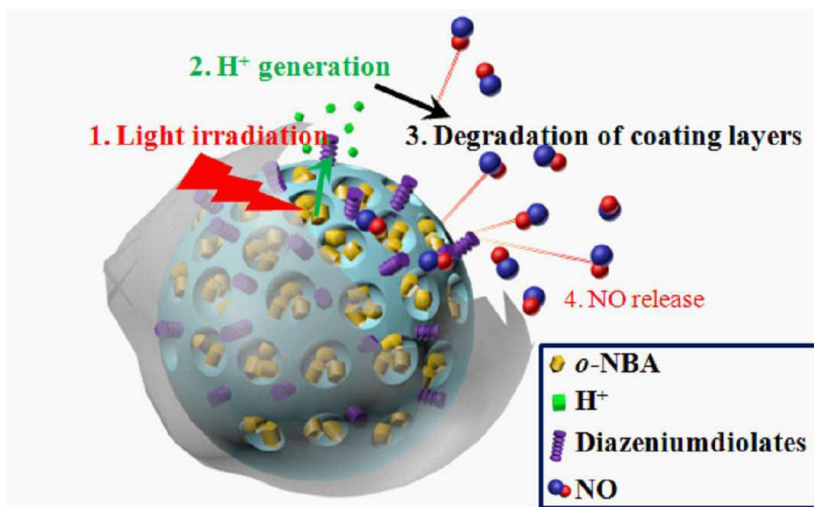
[0100] 1. 다공성 실리카 나노입자와 실란커플링제의 반응(MSN-AEATS)

- [0101] 500ml 증류수에 1g 의 CTAB(Cetyltrimethylammonium bromide)을 녹인 용액에 3.5ml 2M의 NaOH 솔루션을 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 5ml TEOS(tetraethyl orthosilicate)를 첨가하였다. 80℃에서 3시간동안 교반한 후, 여과하여 MeOH로 3번 세척하고 건조시켰다. 상기 건조된 파우더 0.5g과 100ml EtOH 과 0.5ml의 AEATS(N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl trimethoxysilane)을 첨가하여 현탁반응으로 3시간동안 환류(reflux)시켰다. 원심분리기(centrifugation, 7000 rpm, 10 min)에서 분리한 후, MeOH로 3번 세척하였다. 16ml MeOH과 1ml의 농염산(concentrated hydrochloric acid)을 혼합한 용액에 60℃ 24시간 용해시켜 건조하였다. 상기 과정을 통해 CTAB가 녹아 AEATS가 혼합 된 다공성 실리카 나노입자(MSN-AEATS)를 수득하였다.
- [0103] 2. 광반응성 pH 조절제의 반응(pH@MSN-AEATS)
- [0104] 상기 수득한 MSN-AEATS 100mg에 10ml o-NBA(2-nitrobenzaldehyde)을 혼합하여 24시간 동안 상온에서 방치하였다. 48시간동안 동결건조(freeze-drying)하여 pH@MSN-AEATS를 수득하였다.
- [0106] 3. 인산칼슘과의 반응(pH@MSN-CaP)
- [0107] 상기 수득한 pH@MSN-AEATS 100mg에 0.1M의 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10ml용액에 용해시킨 후, 암모니아수를 첨가하여 pH 10으로 조절하였다. 0.1M의 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20ml를 드롭방식(dropwise)으로 첨가하여 60℃에서 1시간 동안 반응하였다. 원심분리기(centrifugation, 7000 rpm, 10 min)에서 분리한 후, 탈이온수(deionized water)로 3번 세척하였다. 48시간동안 동결건조(freeze-drying)하여 pH@MSN-CaP를 수득하였다.
- [0108] 4. 디아제늄디올레이트 작용기의 반응(pH@MSN-CaP-NO)
- [0109] 상기 수득한 pH@MSN-CaP 10mg을 0.5M NaOMe/MeOH 3ml에 용해시킨 후 고압반응기에 넣는다. 상기 반응기는 20psi의 Ar 가스로 두 번 배기(purging)시킨 후, 80 psi의 NO가스로 3일간 반응시켰다. 상기 일산화질소를 방출할 수 있는 디아제늄디올레이트기를 가진 pH@MSN-CaP-NO는 원심분리기(centrifugation, 7000 rpm, 10 min)에서 분리한 후, 남아있는 용매를 진공건조하여 제거하였다.
- [0111] [특성 평가]
- [0112] 광조사는 $365\text{nm}(300\text{ }\mu\text{W}/\text{cm}^2)$ UV로 조사 전 후의 다공성 실리카 나노 입자와 일산화질소 방출 거동을 관찰하였다.
- [0114] (1) 다공성 실리카 나노입자 확인
- [0115] 다공성 실리카 나노입자의 확인을 위해 Transmission Electron Microscopy (JEOL JEM-1011 Japan) 으로 관찰하였다. 도 3을 통해 크기 및 분포도를 확인한 결과 약 4~50nm의 크기로 균일하게 형성 된 것을 확인하였으며, 자외선에 노출된 경우 표면 인산칼슘 층이 붕괴되어 있는 것을 확인하였다.
- [0117] (2) 결정구조 분석
- [0118] Powder XRD(using $\text{Cu } K\alpha_1$ radiation ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) from Rigaku SmartLab at 40 kV and 30 mA.)를 통해 다공성 실리카 나노입자의 표면을 관찰하였다. powder XRD를 통해 확인한 결과 다공성 실리카 나노 입자에서만 나타나는 특이적인 peak와 인산칼슘으로 인한 표면적의 감소가 나타났으며, 표면 개질을 통한 결정구조의 변화는 나타나지 않았다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0120] (3) UV에 의한 pH 조절제의 작동 여부 확인
- [0121] UV에 의해 pH가 변하는 것을 확인하기 위해 o-NBA를 UV로 조사한 결과, pH가 8에서 5로 변하는 것을 확인하였으며, 실제 다공성 실리카 입자에 pH 조절제를 넣어 동일한 방법으로 실시한 결과, o-NBA와 유사하게 pH가 감소하는 것을 확인하였다. 인산칼슘으로 코팅한 경우 pH가 낮아지면서 인산칼슘의 층을 붕괴하여 이로 생기는 phosphate이온 ($\text{pKb} \sim 10^{-2}$)으로 인해 pH가 증가하는 것을 확인하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0123] (4) 적외선 분광기(FT-IR), 자외-가시광 분광기(UV-vis spectroscopy)를 통한 일산화질소 확인
- [0124] 표면 개질 단계별로 다공성 실리카 나노입자를 적외선 분광기, 자외-가시광 분광기를 통해 관찰한 결과, 일산화질소로 인해 특정 peak형성 확인을 하여 일산화질소의 방출을 확인할 수 있었다. UV-vis spectroscopy 관찰 결과, 디아제늄디올레이트의 흡수 밴드는 250~260nm로 기록되었다. 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.
- [0126] (5) UV에 의한 칼슘이온 검출 (Arsenazo assay)

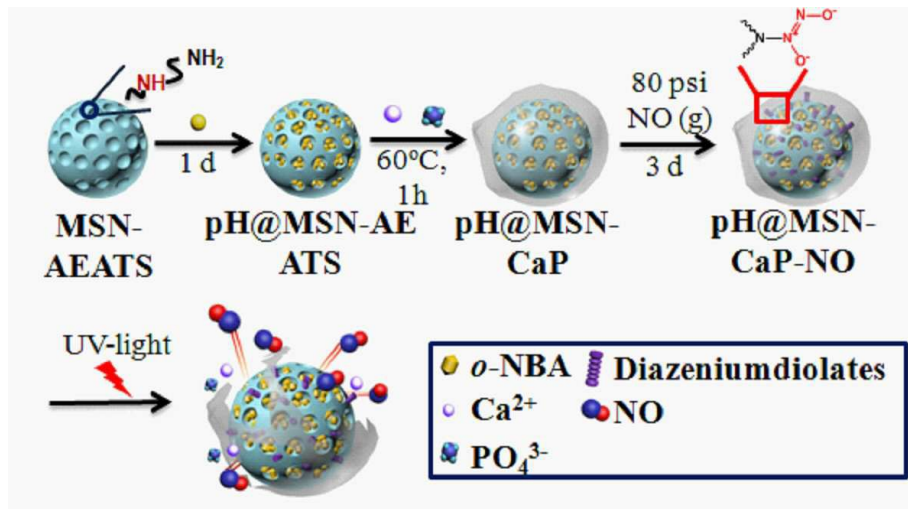
- [0127] (Arsenazo III complexon method)[Micaylova V. Et al., Anal. Chim. Acta, 53(194), 1971]
- [0128] UV에 의해 pH 조절제가 작동하여 표면 인산칼슘층의 붕괴가 일어남을 확인하기 위해 UV에 1시간 방치하여 검출되는 칼슘이온의 양을 측정하였다. UV에 노출되지 않은 경우 6.4% 칼슘이온이 검출되었으나 광조사한 경우 56% 칼슘이온이 검출되어 pH 조절제의 작동을 확인하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0130] (6) 일산화질소 검출기 (SieversNOA)
- [0131] 일산화질소 검출기 (SieversNOA, GE analytical instruments, USA)를 이용하여 광조사에 의한 일산화질소 방출 제어를 확인한 결과 UV를 조사하지 않은 경우, 일산화질소의 방출이 거의 일어나지 않았으나 UV를 조사한 경우 일산화질소 최고 방출점이 25배 증가하였고 총 방출양도 10배이상 증가한 것을 확인하였다. 또한, UV의 on/off에 따른 실험을 실시한 결과 UV가 on일 경우에만 일산화질소의 방출이 일어나는 것을 확인하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0133] 이상과 같이 본 발명에서는 특정된 사항들과 한정된 실시예 및 도면에 의해 설명되었으나 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다.
- [0134] 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

도면

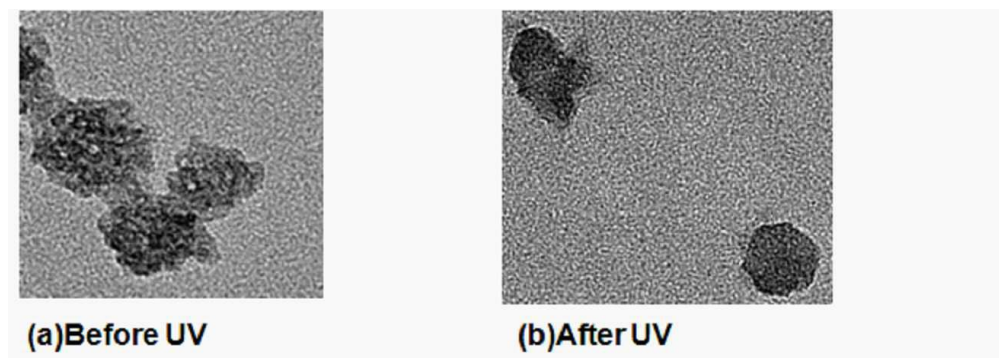
도면1



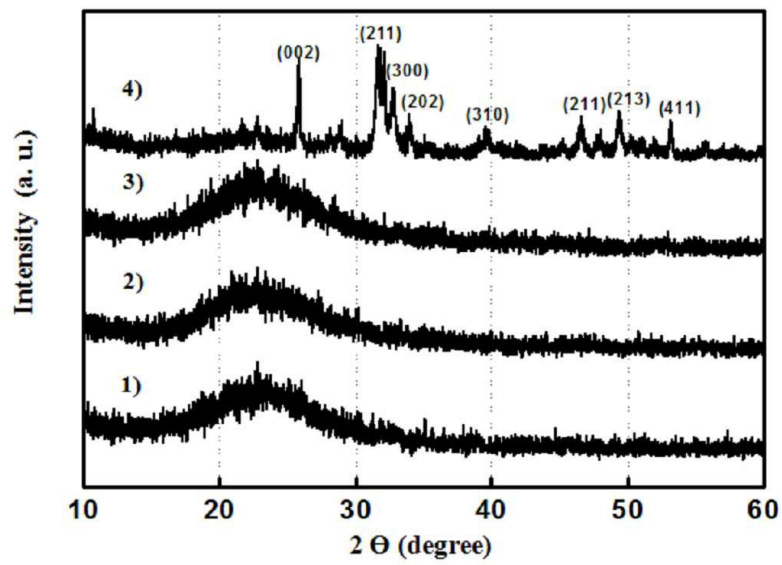
도면2



도면3

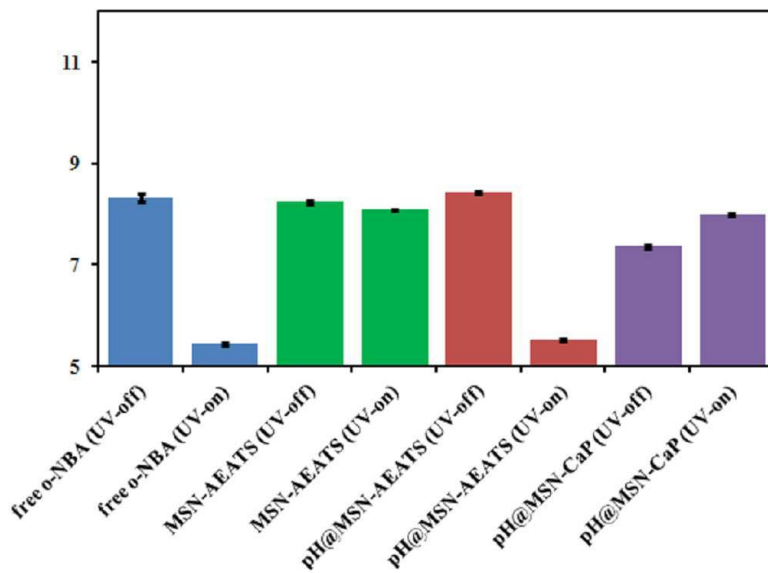


도면4

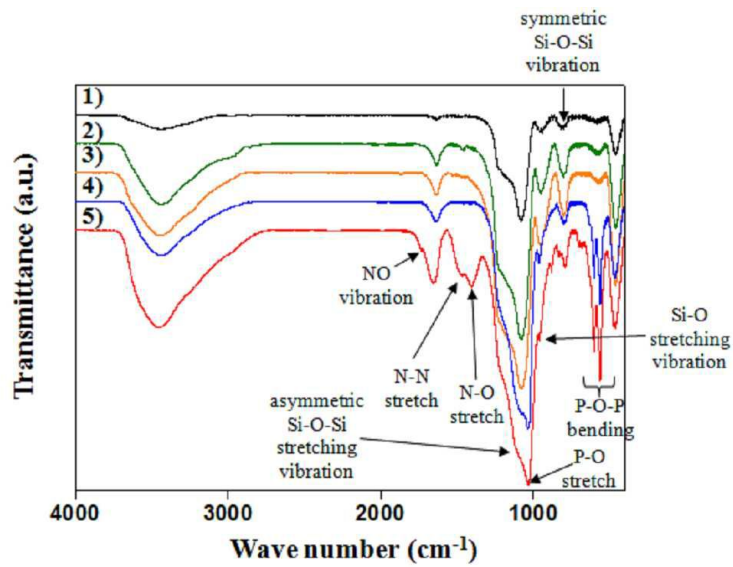


(1) Pure MSN, 2) MSN-AEATS, 3) pH@MSN-AEATS, 4) pH@MSN-CaP,

도면5

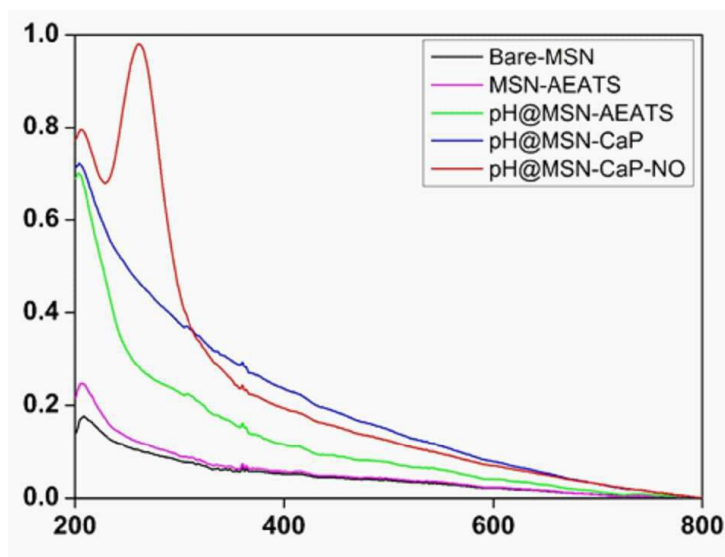


도면6

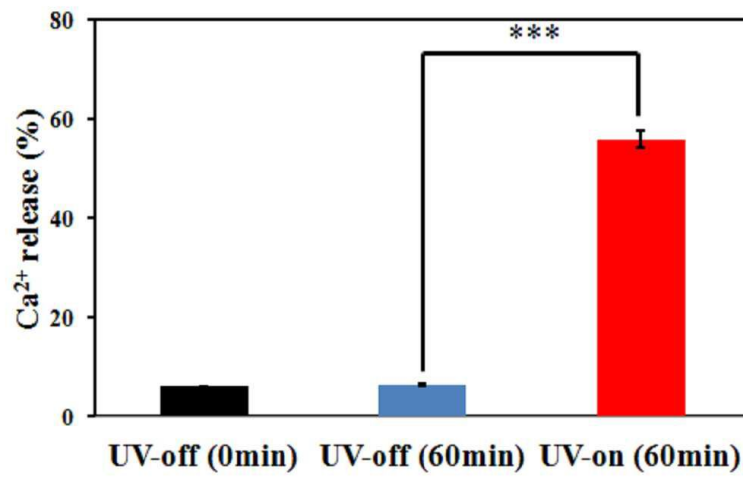


1) Pure MSN, 2) MSN-AEATS, 3) pH@MSN-AEATS 4) pH@MSN-CaP, 5) pH@MSN-CaP-NO

도면7



도면8



도면9

