



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0089774
(43) 공개일자 2016년07월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/48 (2013.01)

A61K 47/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0009402

(22) 출원일자 2015년01월20일

심사청구일자 2015년01월20일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

유자형

울산광역시 울주군 범서읍 구영로 75-26, 105동
2006호 (제일풍경채아파트)

로가나탄, 팔라니쿠마르

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(74) 대리인

제일특허법인

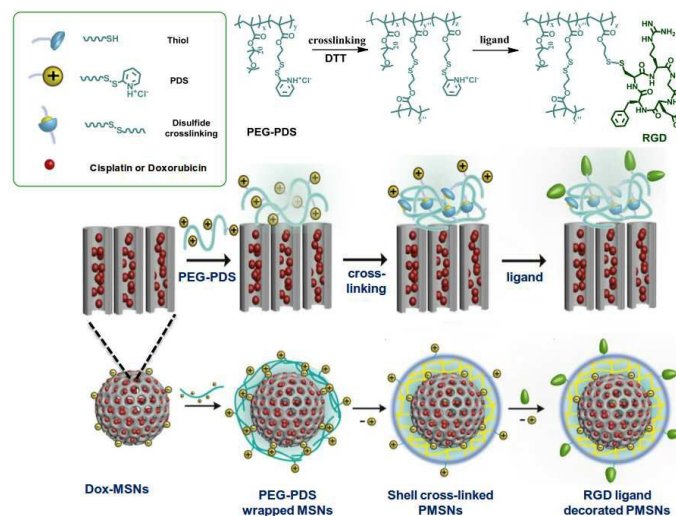
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 메조포러스 실리카 나노입자 및 생분해성 공중합체를 포함하는 표적 지향 약물 전달체

(57) 요약

본 발명에 따른 약물 전달체는 메조포러스 나노입자의 화학적 수식 없이도 매우 높은 약물 담지 효율을 나타낸다. 또한, 메조포러스 나노입자의 표면이 비공유 결합으로 연결된 생분해성 공중합체와 결합되어 있어, 상기 생분해성 공중합체에 티올기를 함유하는 리간드 분자를 부착시킴으로써 표적화된 약물 전달이 가능하므로 선택적 약물 또는 생체기능물질의 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/16 (2013.01)

A61K 9/1629 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

메조포러스 실리카 나노입자, 및 상기 메조포러스 실리카 나노입자의 표면에 결합된, 폴리에틸렌글리콜 및 피리딘 디설파이드 염산염으로 이루어진 생분해성 공중합체를 포함하는, 약물 전달체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 메조포러스 실리카 나노입자가 그 내부에 약물 또는 생체기능 조절물질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 약물이 독소루비신, 시스플라틴, 플루오로우라실 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 친수성 약물; 파클리탁셀, 캄토테신 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 소수성 약물; 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 소분자 약물인 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 생체기능 조절물질이 DNA, RNA, 폴리펩타이드, 비타민 및 이의 유도체, 아미노산 및 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 생분해성 공중합체의 표면이 티올기를 갖는 펩타이드 리간드로 수식화되는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 펩타이드 리간드가, 사이클릭 Arg-Gly-Asp-Asp-Phe-Cys (cRGDfC), 시스테인을 함유하는 세포 침투 펩타이드(cell penetration peptides) 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 메조포러스 실리카 나노입자가 0.5 내지 4 nm의 기공 크기를 갖는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 약물 전달용 나노입자가 상기 메조포러스 실리카 나노입자 및 상기 생분해성 공중합체를 1:1 내지 1:4의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 9

그 내부에 약물 또는 생체기능 조절물질을 포함하는 메조포러스 실리카 나노입자, 및 상기 메조포러스 실리카 나노입자의 표면에 결합된, 폴리에틸렌글리콜 및 피리딘 디설파이드 염산염으로 이루어진 생분해성 공중합체를 포함하는 약물 전달체를 이용하여, 약물을 타겟 부위에 전달하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 생분해성 공중합체가 상기 메조포러스 실리카 나노입자의 중량 대비 2배 이상의 중량으로 상기 메조포러스 실리카 나노입자에 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생분해성 공중합체간의 가교결합을 이용하여 메조 포러스 실리카 나노입자(mesoporous silica nanoparticle, MSN)의 표면을 비공유결합으로 감싸는 표적 지향 약물 전달체 및 상기 약물 전달체를 이용하여 약물을 타겟 부위에 전달하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이상적인 나노 운반체는 혈액 순환 동안 표적 세포에 도달하기 전까지 약물을 보유하기 위해 매우 안정적인 캡슐화 능력을 보여 주고, 중앙 조직 또는 중앙 세포 내에서 효율적으로 방출될 수 있어야 한다(Q. Zhang, et al., *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 2450). 약물의 부정확한 방출을 방지하고 타겟 부위에서 정확히 방출되도록 하기 위하여, 약물을 담지한 전달 비히클(delivery vehicle)은 특정 자극에 반응하여 방출을 제어하는 특성을 가져야 한다. 고분자 마이셀, 폴리머솜, 리포솜, 덴드리머, 금속나노입자 및 나노겔을 포함하는 다양한 전달 비히클 중에서도 메조포러스 실리카 나노입자는 생물 의학 응용 프로그램에서 높은 관심을 끌고 있는데, 이는 MSN이 많은 기공을 갖고 있기 때문이다. 그 기공은 내부에 약물 분자를 잡아둘 수 있고, 특정 촉발제에 의해 약물을 방출할 수 있다.

[0003] MSN의 표면에 자극에 민감한 관능기를 도입함으로써 기공 입구를 막을 수 있고, 기공 내에 안정적으로 약물 분자를 보유할 수 있으며, pH, 온도, 빛, 경쟁적 결합 및 효소와 같은 외부 자극에 의해 방출될 수 있다(Y. Cui, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2012**, *4*, 3177). 그러나 MSN의 표면에 이러한 관능기를 도입하는 것은 MSN의 표면 수식(modification) 때문에 복잡한 합성 단계를 필요로 하여, 이는 약물 담지 전 MSN의 표면 수식이 담지할 물질의 캡슐화를 위한 기공 부피를 감소시키고, 약물 담지 후 MSN의 몇 가지 후관능화 단계가 약물의 누출을 야기하기 때문에 담지 효율을 제한한다(B. Chang, et al., *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 574). 또한, MSN 상에 표적 리간드의 설치하는 화학적 수식을 필요로 한다.

[0004] 중앙 세포의 선택적 표적화 및 약물분자의 중앙 미세환경 내에서의 방출은 복용량을 감소시킴으로써 전통적인 화학요법의 부작용을 줄일 수 있다. 이러한 목표는 특정 자극에 반응하여 약물을 방출하는 표적화 약물 전달 시

시스템을 사용함으로써 달성될 수 있다.

- [0005] 이에 본 발명자들은, 간단한 합성법을 통하여 화학적 수식 없이 매우 높은 약물 담지율로 약물을 담지할 수 있고, 특정 자극에 반응하여 약물을 방출하는 리간드-수식된 MSN을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 따라서, 본 발명의 목적은 메조포러스 실리카 나노입자 및 생분해성 공중합체를 포함하고, 상기 메조포러스 실리카 나노입자에 약물 또는 생체기능 조절물질을 담지시킬 수 있는 약물 전달체를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 약물 전달체를 이용하여 약물을 타겟 부위에 전달하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 메조포러스 실리카 나노입자, 및 상기 메조포러스 실리카 나노입자의 표면에 결합된, 폴리에틸렌글리콜 및 피리딘 디설파이드 염산염으로 이루어진 생분해성 공중합체를 포함하는, 약물 전달체를 제공한다.
- [0009] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 그 내부에 약물 또는 생체기능 조절물질을 포함하는 메조포러스 실리카 나노입자, 및 상기 메조포러스 실리카 나노입자의 표면에 결합된, 폴리에틸렌글리콜 및 피리딘 디설파이드 염산염으로 이루어진 생분해성 공중합체를 포함하는 약물 전달체를 이용하여, 약물을 타겟 부위에 전달하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명에 따른 약물 전달체는 메조포러스 실리카 나노입자의 화학적 수식 없이 매우 높은 약물 담지 효율을 나타낸다. 또한, 메조포러스 실리카 나노입자의 표면이 비공유 결합으로 생분해성 공중합체와 결합되어 있어 여기에 티올기를 함유하는 리간드 분자를 부착시키면 특정 암세포로의 선택적인 약물 전달이 가능하므로, 약물 또는 생체기능물질의 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 폴리에틸렌글리콜 및 피리딘 디설파이드 염산염(PEG-PDS) 공중합체와 결합된 MSN, 그리고 이의 표면을 표적화 리간드(RGD)로 수식하는 것을 포함하는 본 발명의 약물 전달체의 원-팟(one-pot) 합성 절차를 도식화한 것이다.
- 도 2에서 (a)는 MSN의 XRD 패턴을 나타낸 것이고; (b)는 MSN의 기공 크기별 분포도를 나타낸 것이고; (c)는 MSN의 질소 흡착/탈착 등온선 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3에서 (a)는 라즈베리형 MSN(rMSN)의 XRD 패턴을 나타낸 것이고; (b)는 rMSN의 TEM 사진을 나타낸 것이고; (c)는 rMSN의 질소 흡착/탈착 등온선 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4에서 (a)는 PEG-PDS 공중합체 제조시 디티오테리톨(DTT) 첨가량에 따라 생성된 피리도티올 부산물의 UV-가시 스펙트럼이고; (b) 및 (c)는 MSN 및 생분해성 공중합체와 결합된 MSN(PMSN)의 입자 직경별 부피 및 제타 전위 분석 결과를 각각 나타낸 것이고; (d) 및 (e)는 각각 MSN 및 PMSN의 TEM 이미지를 각각 나타낸 것이다.
- 도 5에서 (a)는 PEG-PDS 공중합체로 MSN의 표면을 결합시키기 전후의 MSN 상층액의 UV-가시 스펙트럼을 나타낸 것이고; (b)는 다양한 농도의 PEG-PDS 공중합체 및 교차결합된 PEG-PDS로 코팅시킨 PMSN의 약물 방출 프로파일을 나타낸 것이다.
- 도 6에서 (a)는 PMSN-1에 0 mM, 1 mM, 5 mM 및 10 mM의 글루타치온(GSH)을 첨가한 후의 약물 방출 프로파일을

나타낸 것이고; (b)는 19몰%, 36몰% 및 83몰%의 교차결합 밀도를 갖는 PMSN-1, PMSN-2 및 PMSN-3에 5 mM의 GSH 처리 후 약물 방출 프로파일을 나타낸 것이다.

도 7에서 (a) 및 (b)는 rMSN 및 생분해성 공중합체와 결합된 rMSN (PrMSN)의 입자 직경별 부피 및 제타 전위 분석 결과를 각각 나타낸 것이고; (c)는 PrMSN의 TEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 8에서 (a)는 0몰%, 19몰%, 36몰% 및 83몰%의 교차결합 밀도를 갖는 PrMSN, PrMSN-2, PrMSN-3 및 PrMSN-4의 약물 방출 프로파일을 나타낸 것이고; (b)는 PrMSN-4(83몰%)에 처리된 GSH의 농도별(1 mM, 5 mM 및 10 mM) 약물 방출 프로파일을 나타낸 것이다.

도 9는 MSN 및 PMSN의 농도별에 대한 시험관내 세포 독성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 10에서 (a)는 시스플라틴이 담지된 PMSN(cis-PMSN), 및 0몰%, 19몰%, 36몰% 및 83몰%의 교차결합 밀도를 갖는 cis-PMSN-1(19몰%), cis-PMSN-2(36몰%) 및 cis-PMSN-3(83몰%)의 약물 방출 프로파일을 나타낸 것이고; (b)는 cis-PMSN-1 내지 cis-PMSN-3의 5mM GSH 처리에 따른 약물 방출 프로파일을 나타낸 것이고; (c)는 시스플라틴 약물 농도별 PMSN의 세포 독성 분석 결과를 나타낸 것이고; (d)는 이중 약물로서 시스플라틴 및 독소루비신을 포함하는 PMSN(Cis-Dox-PMSN)의 약물 농도별 세포 독성 분석 결과이다.

도 11에서 (a)는 리간드 부착된 PMSN(RGD-PMSN) 및 RGD의 UV-가시 스펙트럼이고; (b)는 PMSN 및 RGD-PMSN의 독소루비신 농도별 세포 생존율 분석 결과를 나타낸 것이고(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$ 제어 비교, 학생 t-테스트로 분석); (c)는 RGD-PMSN(i) 및 비-리간드 PMSN-1(ii)의 30분 흡착 후 공초점 형광 현미경 (CLSM) 이미지를 나타낸 것이고; (d)는 비-리간드 PMSN-1 및 RGD-PMSN의 유동 세포 계측법 분석 결과를 나타낸 것이다(왼쪽: 비 리간드-PMSN-1; 오른쪽: RGD-PMSN).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0013] 본 발명은 메조포러스 실리카 나노입자, 및 상기 메조포러스 실리카 나노입자의 표면에 결합된, 폴리에틸렌글리콜 및 피리딘 디설파이드 염산염으로 이루어진 생분해성 공중합체를 포함하는, 약물 전달체를 제공한다.
- [0014] 본 발명에서 상기 메조포러스 실리카 나노입자는 나노 크기의 기공을 갖는 다공성 실리카 입자라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 바람직한 예로, 질소 흡착/탈착 등온선 측정 시 총 기공 부피가 0.4 내지 1.2 cm^3/g , 바람직하게는 0.4 내지 0.8 cm^3/g ; 기공 크기가 0.5 내지 4 nm, 바람직하게는 2 내지 3 nm; 및 브루나우어-에메트-텔러(BET) 표면적이 400 내지 1,500 m^2/g , 바람직하게는 450 내지 1,200 m^2/g 인 것을 사용할 수 있다.
- [0015] 예컨대, 상기 메조포러스 실리카 나노입자는 MCM-41형, MCM-48형, 라즈베리형 등의 형태일 수 있다. 상기 MCM-41형 MSN은 1992년 Mobil사의 연구진에 의해 합성된 것으로서, 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 질소 흡착/탈착 등온선 측정 시 총 기공 부피가 0.79 cm^3/g 이고, 기공 크기가 2.4 nm이며, BET 표면적이 789 m^2/g 일 수 있다. 또한, 상기 라즈베리형 MSN은 질소 흡착/탈착 등온선 측정 시 총 기공 부피가 0.47 cm^3/g , 기공 크기가 2 내지 3 nm, 및 BET 표면적이 487 m^2/g 일 수 있다.
- [0016] 상기 메조포러스 실리카 나노입자는 그 내부에 약물 또는 생체기능 조절물질을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 상기 약물은 상기 메조포러스 실리카 나노입자의 기공 내에 포함시킬 수 있는 소분자 약물이면 모두 가능하며, 예를 들어 독소루비신, 시스플라틴, 플루오로우라실 및 이의 약학적으로 허용가능한 염과 같은 친수성 약물; 및 파클리탁셀(paclitaxel), 캄토테신(camptothecine) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염과 같은 소수성 약물; 및 이의 혼합물 등을 들 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 상기 생체기능 조절물질은 DNA, RNA, 폴리펩타이드, 비타민 및 이의 유도체, 아미노산 및 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에 따르면, 상기 약물 또는 생체기능 조절물질을 본 발명의 MSN을 포함하는 용액에 첨가하여 단순히 혼합함으로써 상기 약물 또는 생체기능 조절물질들을 MSN 내부에 담지할 수 있다. 따라서, 본 발명은 화학적 결합 반응 및 복잡한 정제 분리 과정을 필요로 하지 않으므로 간단하고 비용 효율적인 방법으로 약물 전달체를 제조할 수 있다.

- [0020] 상기 메조포러스 실리카 나노입자는 표면을 폴리에틸렌글리콜 및 피리딘 디설파이드 염산염으로 이루어진 생분해성 공중합체와 결합시킬 수 있으며, 이를 통해 메조포러스 나노입자의 기공을 매울 수 있다.
- [0021] 상기 생분해성 공중합체(이하, PEG-PDS 공중합체로도 지칭함)는 결사슬로써 피리딘 디설파이드 염산염(PDS) 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 함유하는 생분해성 공중합체를 의미한다.
- [0022] 상기 생분해성 공중합체에서 피리딘 디설파이드 염산염은 여러 가지 역할을 수행할 수 있다. 먼저, 음전하를 띤 MSN을 감싸기 위한 일시적인 양전하로 작용하고, 생분해성 공중합체와 결합된 MSN의 셀을 안정화시키기 위한 교차결합제로서 사용될 수 있으며, 목표 리간드를 수식하기 위해 표면을 관능화시키는 데에 이용될 수 있다. 즉, 생분해성 공중합체 셀 내에서의 자기 교차 결합에 의해 생분해성 공중합체가 약한 정전기적 상호작용으로 MSN의 표면에 결합될 수 있으며, 생분해성 공중합체 셀 내의 디설파이드 교환 반응에 의한 교차 결합을 용이하게 한다.
- [0023] 한편, 상기 메조포러스 실리카 나노 입자의 표면에 결합되는 PEG는 수용액에서 MSN의 분산성에 중요한 역할을 할 수 있다.
- [0024] 또한, 티올에 특이적으로 반응하는 PDS 관능성은 여러가지 역할을 할 수 있다. i) PDS의 양전하가 공중합체의 정전기적 상호작용을 통해 MSN 표면을 감싸게 할 수 있고, ii) DTT를 첨가함으로써 후속 디설파이드 교차결합 반응을 통해 매우 안정한 공중합체 셀이 제조될 수 있도록 하며, iii) 이러한 역할에 사용되지 않은 나머지 PDS 유닛들은 리간드 분자를 함유하는 티올의 첨가에 의해 표적 리간드 수식에 이용될 수 있다.
- [0025] 한편, 본 발명의 약물 전달체는 생분해성 공중합체가 MSN의 표면에 결합하는 교차 결합 밀도에 의해 약물 방출 프로파일이 조절될 수 있다.
- [0026] 구체적으로, 본 발명에서는 생분해성 공중합체의 제조 시 DTT의 첨가량(즉, PDS 기에 대한 몰%)을 변화시킴으로써, 교차 결합 밀도를 조절하고 이를 통해 약물 방출 프로파일을 조절할 수 있다. 본 발명에서는 생분해성 공중합체 내의 교차 결합 밀도를 10 내지 90몰%, 예를 들어, 10 내지 60몰%, 15 내지 85몰%, 또는 20 내지 40몰%로 조절할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약물 전달체는 MSN 및 생분해성 공중합체를 1: 1 내지 1: 4, 바람직하게는 1: 2의 중량비로 포함할 수 있다.
- [0028] 만일 MSN 및 생분해성 공중합체의 중량비가 1:1 미만이면, MSN 표면에 결합되는 생분해성 공중합체의 양이 너무 적어 MSN 내부에 담지된 약물이 급격하게 방출될 수 있으므로 원하는 약물 누출 작용이 일어날 수 있다. 반대로 1:4를 초과하면 MSN 표면에 결합하는 생분해성 공중합체양이 너무 많아 약물대비 약물 담지체의 질량이 커지는 단점이 있다.
- [0029] 본 발명의 약물 전달체는 약물 또는 생체기능 조절물질을 메조포러스 실리카 나노입자 내에 20 내지 50중량%, 바람직하게는 30 내지 50중량%의 담지 효율(loading efficiency)로 담지할 수 있다. 담지 효율은 하기 계산식 1에 따라 계산할 수 있다.
- [0030] [계산식 1]
- [0031] $\text{약물 담지효율(중량\%)} = (\text{MSN 내 약물 질량}) / (\text{약물 담지된 MSN의 질량})$
- [0032] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, MSN의 표면을 생분해성 공중합체와 비공유결합으로 연결시켜 제조한 PMSN-1 내지 PMSN-3은 30 내지 40중량%의 담지 효율을 나타낸다.
- [0033] 결론적으로, 본 발명에 따른 약물 전달체는 MSN이 최대 기공 부피를 제공할 수 있도록 화학적 수식하지 않았으며, 친수성 약물이 MSN의 내부에 고농도로 담지될 수 있는 등 매우 높은 담지 효율을 나타낸다. 또한, 본 발명

의 약물 전달체는 약물 또는 생체기능 조절물질이 담지된 메조포러스 실리카 나노입자의 표면을, 생체에 적용가능한 자기 교차결합 가능한 랜덤 공중합체, 즉 PDS 및 PEG를 함유하는 생분해성 공중합체를 이용하여 비공유결합을 통해 말단을 결합시킴으로써, 상기 약물 또는 생체 기능 조절물질의 포획 효율 및 이의 담지 효율을 향상시킬 수 있다.

[0034] 이러한 본 발명에 따른 약물 전달체는 외부 자극에 의하여 기공의 개폐를 조절함으로써 약물 방출을 조절할 수 있다. 구체적으로, 생분해성 공중합체가 MSN의 표면에 결합되어 MSN의 표면을 감싸서 MSN의 기공을 매우는데, 만일 글루타치온(GSH)과 같은 환원 환경에 노출되게 되면, 기공을 매우고 있던 생분해성 공중합체가 분해된다. 생분해성 공중합체가 분해되면 노출된 기공을 통해 약물을 방출시키고 이로써 생체 내로 약물을 전달할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약물 전달체는 나노 크기의 약물을 표적화하여 원하는 부위에만 이동시킬 수 있으며, 이를 통해 생체의 다른 부위에 대한 부작용을 최소화하고 그 효율성을 극대화할 수 있다. 이를 위해서는 원하는 부위에만 세포가 발현하는 특이적인 단백질을 인식하는 항체나 앵타머와 같은 리간드를 이용하여 생분해성 공중합체의 표면을 수식화할 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 생분해성 공중합체의 표면을 티올기를 갖는 펩타이드 리간드로 수식화할 수 있다.

[0036] 도 1에 PEG-PDS 공중합체와 결합된 MSN, 그리고 이의 표면을 표적화 리간드로 수식하는 것을 포함하는 본 발명의 약물 전달체의 원-팟 합성 절차를 도식화하여 나타내었다. 도 1에서 보는 바와 같이 비-공유결합된 리간드를 포함하는 나노입자가 교차 결합된 셀을 제조하는데 있어, 희생 양전하 상호작용 교차결합 반응(sacrificial positive charge interaction)이 이용된다.

[0037] 상기 티올기를 갖는 펩타이드 리간드는 시스테인을 함유하는 펩타이드로서, 예컨대, 사이클릭 Arg-Gly-Asp-Asp-Phe(D form)-Cys (cRGDfC), 시스테인을 함유하는 세포 침투 펩타이드(cell penetration peptides) 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 펩타이드 리간드를 사용할 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 따라서, 본 발명은 그 내부에 약물 또는 생체기능 조절물질을 포함하는 메조포러스 실리카 나노입자, 및 상기 메조포러스 실리카 나노입자의 표면에 결합된, 폴리에틸렌글리콜 및 피리딘 디설파이드 염산염으로 이루어진 생분해성 공중합체를 포함하는 약물 전달체를 이용하여, 약물을 타겟 부위에 전달하는 방법을 제공한다.

[0039] 상기 약물 전달체는 MSN 및 생분해성 공중합체를 1:1 내지 1:4, 바람직하게는 1:2의 중량비로 포함할 수 있다. 또한, 상기 생분해성 공중합체는 상기 메조포러스 실리카 나노입자의 중량 대비 2배 이상의 중량으로 상기 메조포러스 실리카 나노입자에 결합되는 것을 특징으로 한다.

[0040] 이와 같이, 본 발명의 약물 전달체는 생체적합성이 뛰어나고, 세포 독성을 나타내지 않으므로 질병 치료를 위하여 임상적으로 사용될 수 있다. 또한, 세포 내 생물학적 자극에 대한 응답으로 선택적으로 약물 또는 생체기능 조절물질을 방출할 수 있다. 예컨대, GSH와 같은 세포 내 환원 환경에 본 발명의 약물 전달체가 노출되면, 원하는 표적 부위에서 약물이 효과적으로 방출되어 암세포를 죽일 수 있다. 따라서, 표적 약물 전달 시스템으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0041] [실시예]

[0042] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0043] 제조예 1: MCM-41형 메조포러스 나노입자(MSN)의 제조

[0044] 실리케이트의 염기 촉매된 축합을 통해 주형으로서 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB)를 이용하는 Stober 공정을 통해 MCM-41형 MSN을 제조하였다(K. Zhang, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2427).

[0045] 구체적으로, 2M NaOH 용액(3.5 mL)을 정제수(480 mL)와 혼합하였다. CTAB(1.02 g)를 상기 혼합물에 교반하면서

첨가한 후 80℃로 가열하였다. 상기 CTAB가 완전히 용해되면 테트라에틸 오르쏘실리케이트(TEOS)(4.67 g)를 천천히 적가한 후 2시간 동안 80℃에서 교반하였다. 생성된 침전물을 여과하고 정제수로 2회 세척한 후 60℃에서 밤새 건조시켰다. 수득한 건조된 시료를 550℃에서 5시간 동안 공기 중에서 하소(calcine)시켜 MCM-41형 메조포러스 나노입자를 제조하였다. 제조된 MCM-41형 메조포러스 나노입자를 "MSN"으로 지칭하였다.

[0046] MCM-41형 MSN의 X선 회절(XRD) 패턴을 X-ray 회절분석기(Rigaku D/Max 2500V/PC, Cu K α (λ = 1.5418 Å, 40 kV 및 200 mA)를 이용하여 분석하여 도 2의 (a)에 나타내었다. 또한, 상기 MSN의 구조를 200 kV의 가속 전압에서 투과전자현미경(TEM)(JEOL-2100, JEOL)을 이용하여 분석한 후 기공의 입자 크기별 분포도를 작성하여 도 2의 (b)에 나타내었으며, 질소 흡착 분석기(BEL BELSORP-Max system)를 이용하여 -196℃에서 측정한 브루나우어-에메트-텔러(Bruaner-Emmette-Teller, BET) 표면적 분석 결과를 도 2의 (c)에 나타내었다.

[0047] XRD 패턴으로부터 관찰된 바와 같이, 잘 정의된 메조 구조체를 얻었다. 질소 흡착/탈착 등온선 측정 결과에서는 MSN이 총 0.79 cm³/g의 기공 부피 및 2.4 nm의 기공 크기와 789 m²/g의 큰 BET 표면적을 갖는 것을 보여준다.

[0048] 제조예 2: 라즈베리형 MSN 메조포러스 나노입자(rMSN)의 제조

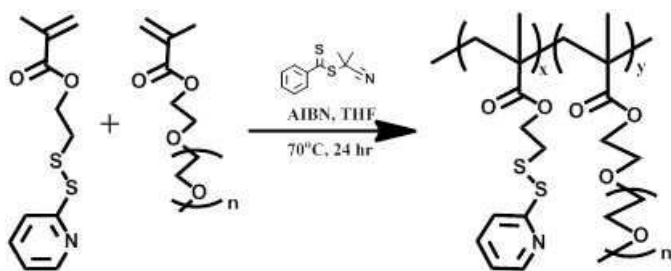
[0049] 불균일한 다공성 구조체에서도 본 발명의 약물 전달체의 제조가 가능한지 확인하기 위해서, 라즈베리형 MSN에 대해 동일한 전략을 적용했다.

[0050] 라즈베리형 MSN은 소프트-템플링법으로 제조하였다(K. Zhang, 등, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 2427). 먼저, CTAB 192 g, 트리에탄올아민 34.7 g 및 정제수 10 L를 80℃에서 1시간 동안 교반하였다. 상기 혼합물에 TEOS 1458.0 g을 빠르게 첨가하였다. 상기에서 수득한 겔 혼합물은 1.0 SiO₂: 0.06 CTAB : 0.026 SOA (트리에탄올아민) : 80.0 H₂O의 물조성으로 구성되어 있었다. 제조된 라즈베리형 MSN을 "rMSN"으로 지칭하였다.

[0051] rMSN의 XRD 패턴, TEM 사진, 동적광산란(DLS) 및 질소 흡착/탈착 등온선 측정 결과를 분석하여 rMSN의 XRD 패턴은 도 3의 (a)에, TEM 사진은 (b)에, 질소 흡착/탈착 등온선 측정 결과는 (c)에 나타내었다.

[0052] BET 표면적 분석 기술에서는 rMSN의 BET 표면적 및 기공 크기가 각각 487 m²/g 및 0.47 cm³/g으로 나타나 기존 보고된 내용(*J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 2427)과 유사하게 측정되었다.

[0053] 제조예 3: PEG-PDS 생분해성 공중합체의 제조



[0054]

[0055] 상기 식에서,

[0056] x 및 y는 7:3의 몰(mole)비를 갖고, n은 22 내지 44의 정수이다.

[0057] RAFT(reversible addition-fragmentation chain-transfer) 중합체로서 2-시아노-2-프로필 벤조디티오에이트 (9.44 μ L, 0.05 mmol), 피리딜 디설파이드 에틸메타크릴레이트(PDSEMA)(1 g, 3.92 mmol), 폴리(에틸렌글리콜)메타크릴레이트(931 mg, 0.98 mmol) 및 아조비스이소부티로니트릴 (AIBN)(2.4 mg, 0.0146 mmol)의 혼합물을 테트라히드로푸란(THF) 5 ml에 용해시키고 아르곤 퍼지(argon purge)로 가스를 제거하였다. 상기 반응 용기(reaction vessel)를 봉인한 후 오일욕(oil bath)에 두고 70℃에서 24시간 동안 가열하였다. 미반응 모노머를 제거하고 중합체를 정제하기 위하여, 상기 반응 혼합물을 디에틸에테르에서 석출하여 랜덤 공중합체를 제조하였다.

[0058] ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 8.46, 7.68, 7.11, 4.50-4.01, 3.72-3.58, 3.38, 3.03, 2.15-1.71, 1.13-0.79.

[0059] GPC (PMMA standard): Mn 9.8 kD, Mw 14.4 KD 및 PDI 1.47.

[0060] 상기 랜덤 공중합체의 양성 표면 전하를 증가시키기 위하여, 공중합체 내의 PDS기에 상응하는 1당량의 HCl을 정제수 중에서 약정된 질량(stipulated mass)의 중합체에 첨가한 후 초음파 처리하여 분산액을 제조하였다. 이렇게 제조된 HCl 중성화된 생분해성 중합체를 MSN의 표면을 감싸는(capping) 게이트키퍼로 이용하였으며, 이하에서는 "PEG-PDS 공중합체"로 지칭하였다.

[0061] 실시예 1: 약물 전달체의 제조(PMSN)의 제조

[0062] 1-1) MSN에 약물 담지

[0063] 본 발명에서는 메조포러스 나노입자 내부에 최대 용량으로 약물을 담지하기 위하여 MSN의 표면을 수식하지 않고 사용하였다. 담지 효율 및 포획 효율은 나노 입자에 대한 약물의 비율을 변화시킴으로써 규정되어 진다. 본 발명자들은 약물 분자의 공급 양을 늘리면 선적량이 증가할 것으로 기대하였다.

[0064] 먼저, 상기 제조예 1에서 제조한 5 mg의 MSN을 정제수 1mL에 첨가하고 초음파 처리하여 균일한 콜로이달 용액이 수득될 때까지 상기 입자를 분산시켰다. 상기 용액에 독소루비신(Dox) 0.9 mg, 2.1 mg, 2.9 mg, 4.4 mg 또는 5.4 mg을 각각 첨가한 후 용해시키고 상온에서 3시간 동안 교반하여 MSN에 독소루비신이 담지되도록 하였다. 이후, 상기 시료를 원심분리하고, 세척하여 미적재 독소루비신을 제거하였다. 이렇게 제조된 시료를 각각 MSN-1, MSN-2, MSN-3, MSN-4 및 MSN-5로 명명하였다.

[0065] UV-Vis 스펙트럼을 이용하여 하기 계산식 1 및 2에 따라 상기 시료의 독소루비신 약물 담지 효율(drug loading efficiency, 이하, "DL"로 지칭함) 및 포획 효율(entrapment efficiency, 이하, "EE"로 지칭함)을 계산하여 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0066] [계산식 1]

[0067] 약물 담지효율 (%): (MSN 내 약물 질량)/(약물 담지된 MSN의 질량)

[0068] [계산식 2]

[0069] 포획 효율 (%): (MSN 내 약물 질량)/(약물의 처음 질량)

표 1

시료명	Dox (mg)	MSN (mg)	약물 담지 효율	포획 효율(%)
MSN-1	0.9 mg	5.0 mg	10중량% ($0.172 \mu\text{mol mg}^{-1}$)	62%
MSN-2	2.1 mg	5.0 mg	19중량% ($0.328 \mu\text{mol mg}^{-1}$)	56%
MSN-3	2.9 mg	5.0 mg	24중량% ($0.414 \mu\text{mol mg}^{-1}$)	54%
MSN-4	4.4 mg	5.0 mg	39중량% ($0.672 \mu\text{mol mg}^{-1}$)	73%
MSN-5	5.4 mg	5.0 mg	44중량% ($0.759 \mu\text{mol mg}^{-1}$)	73%

[0071] 표 1에서 보는 바와 같이, MSN은 독소루비신의 함량을 증가시킴에 따라 최대 73%의 포획 효율 및 44%의 높은 약물 담지 효율을 나타내었다. 본 발명에서는 MSN의 표면을 수식시키지 않아 큰 기공 부피로 인하여 담지 효율이 상당히 높게 난 것으로 판단된다.

[0072] 1-2: MSN 표면을 생분해성 공중합체로 감싸기한 PMSN의 제조

[0073] MSN의 기공 내부에 약물을 안정적으로 보유하기 위해서, 본 발명자들은 전하를 띤 MSN과 양전하를 띤 공중합체

간의 간단한 정전기적 상호 작용을 이용하여, 상기 1-1에서 수득한 독소루비신을 담지한 MSN (MSN-1 내지 MSN-5)의 표면에 생분해성 공중합체 게이트 키퍼를 설치한 후 중합체 셀에서 교차 결합시켰다.

[0074] 구체적으로, 1 ml의 정제수에 5mg의 MSN을 분산시킨 후, 상기 제조예 3에서 제조한 PEG-PDS 공중합체 10 mg(정제수 내 100 μ l)를 첨가한 후 상온에서 3시간 동안 지속적으로 교반하면서 감싸기 반응이 일어나도록 하였다. 이렇게 얻어진, 생분해성 공중합체로 감싸기한 MSN 입자를 "PMSN"으로 지칭하였다.

[0075] 실시예 2 : 약물 전달체(PMSN)의 제조-(2)

[0076] 1 ml의 정제수에 5mg의 MSN을 분산시킨 후, 상기 제조예 3에서 제조한 PEG-PDS 공중합체 10 mg(정제수 내 100 μ l)를 첨가한 후 상온에서 3시간 동안 지속적으로 교반하면서 감싸기 반응이 일어나도록 하였다.

[0077] 이어, 중합체 셀을 교차결합하기 위하여, 하기 표 2에 기재된 바와 같이 DTT(PDS 기에 대하여 12몰%, 24몰% 및 60몰%)를 첨가하였다. 이어, 상기 혼합물을 상온에서 3시간 동안 교반하여 *in-situ* 교차결합이 되도록 하였다. 중합체가 교차결합된 MSN을 원심분리를 통해 수집하였다. 흡수되지 않고 미반응된 DTT는 원심분리 및 재분산 과정을 통해 정제수에서 세척함으로써 제거하였다. 티올-피리딜 디설파이드 교환반응 때문에 부산물 피리디오티온의 방출을 포함하는 상층액을 UV-Vis 스펙트럼을 이용하여 관찰하였다. 제조된 시료들을 각각 PMSN-1, PMSN-2 및 PMSN-3으로 명명하였다.

[0078] 제조된 PEG-PDS 공중합체의 소모된 PDS 몰%로서 교차 결합 밀도를 측정하고 약물 담지 효율 및 포획 효율을 측정하여 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0079]	시료명	DTT 첨가 농도 (PDS 기에 대한 몰%)	교차결합 밀도 (소모된 PDS의 몰%)	약물 담지 효율	포획 효율
	PMSN-1	12 mol%	19 mol%	32 wt% (0.552 μ mol mg ⁻¹)	53%
	PMSN-2	24 mol%	36 mol%	33 wt% (0.569 μ mol mg ⁻¹)	56%
	PMSN-3	60 mol%	83 mol%	39 wt% (0.672 μ mol mg ⁻¹)	73%

[0080] 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 효율적인 약물 전달 시스템을 위해 PEG-PDS 공중합체 제조 시 PDS기에 대해 12 몰% 내지 60 몰%의 DTT를 첨가하는 경우, 교차결합 밀도(즉, 소모된 PDS의 몰%)가 19몰% 내지 83몰% 범위인 것으로 나타났으며, 이들의 약물 담지 효율은 약 32중량% 내지 39 중량%인 것으로 확인되었다.

[0081] 실시예 3: 라즈베리형 MSN을 포함하는 약물 전달체(PrMSN)의 제조

[0082] 3-1: rMSN에 약물 담지

[0083] 상기 실시예 1-1에 개시된 것과 동일한 방식으로, 상기 제조예 2에서 수득한 rMSN 5.0 mg에 독소루비신 약물을 각각 0.9 mg, 2.1 mg, 2.9 mg, 4.4 mg 및 5.4 mg을 각각 담지시켜 rMSN-1, rMSN-2, rMSN-3, rMSN-4 및 rMSN-5를 제조하였다.

[0084] 3-2: rMSN 표면을 생분해성 공중합체로 감싸기한 PrMSN의 제조

[0085] 상기 3-1에서 제조한 rMSN을 이용하여 실시예 1-2와 동일한 방식으로 rMSN과 PEG-PDS 공중합체를 결합시켰다. 이때 독소루비신은 4.4 mg으로 담지시켰으며, rMSN 5mg과 rMSN의 2중량배의 PEG-PDS 공중합체 10 mg을 첨가하였다. 이렇게 얻어진, 약물이 담지된 MSN 입자의 표면이 생분해성 공중합체와 결합된 나노입자를 "PrMSN"으로 지칭하였다.

[0086] 실시예 4: rMSN을 포함하는 약물 전달체(PrMSN)의 제조-(2)

[0087] 4-1: rMSN에 약물 담지

[0088] 상기 실시예 1-1에 개시된 것과 동일한 방식으로, 상기 제조예 2에서 수득한 rMSN 5.0 mg에 독소루비신 약물을 각각 4.4 mg을 담지시켰다.

[0089] 4-2: rMSN의 표면에 생분해성 공중합체의 결합

[0090] 상기 4-1에서 제조한 rMSN을 PEG-PDS 공중합체와 결합시켰다. 이때 실시예 2와 동일한 방식으로 하기 표 3에 기재된 다양한 농도(12몰%, 24몰% 또는 60몰%)의 DTT를 첨가하여, 다양한 교차 결합 밀도를 갖는 PrMSN-2, PrMSN-3 및 PrMSN-4를 제조하였다. PEG-PDS 공중합체 내 PDS기에 대하여 환원제 DTT로 중합함으로써 약물 담지 효율이 최대 28 중량%까지 도달할 수 있도록 최적화했다.

[0091] 실시예 3 및 4에서 제조된 rMSN-1 내지 rMSN-5, PrMSN 및 PrMSN-2 내지 PrMSN-4의 약물 담지 효율 및 포획 효율을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

Sample	rMSNs	Dox	PEG-PDS (mg)	DTT 첨가 농도 (PDS 기에 대한 몰%)	약물담지 효율	포획 효율
rMSNs-1	5.0 mg	0.9 mg	No polymer	-	8 wt%	48%
rMSNs-2	5.0 mg	2.1 mg	No polymer	-	15 wt%	42%
rMSNs-3	5.0 mg	2.9 mg	No polymer	-	16 wt%	32%
rMSNs-4	5.0 mg	4.4 mg	No polymer	-	28 wt%	45%
rMSNs-5	5.0 mg	5.4 mg	No polymer	-	33 wt%	46%
PrMSNs	5.0 mg	4.4 mg	10.0 mg	No-crosslinking	25 wt%	39%
PrMSNs-2	5.0 mg	4.4 mg	10.0 mg	12 몰%	25 wt%	39%
PrMSNs-3	5.0 mg	4.4 mg	10.0 mg	24 몰%	27 wt%	43%
PrMSNs-4	5.0 mg	4.4 mg	10.0 mg	60 몰%	28 wt%	45%

[0093]

[0094] 실시예 5: 시스플라틴이 담지된 PMSN(Cis-PMSN)의 제조 및 분석

[0095] 본 발명자들은 MCM-41형 MSN을 적용할 또 다른 친수성 약물 모델로서 시스플라틴을 사용하였다.

[0096] 구체적으로, 실시예 1에서 약물로 독소루비신 대신 시스플라틴을 담지시키고, MSN 대비 2중량배의 PEG-PDS 공중합체와 MSN의 표면을 결합시켰다. 시스플라틴의 약물 담지 효율은 33%였다. 또한, PEG-PDS의 셀 교차 결합 밀도를 19몰%, 36몰% 및 83몰%로 변화시켜 다양한 PMSN을 제조하였다. 이렇게 제조된 시스플라틴이 담지된 PMSN을 각각 "Cis-PMSN-1", "Cis-PMSN-2", 및 "Cis-PMSN-3"으로 지칭하였다.

[0097] 실시예 6: 이중 약물을 담지한 PMSN(Cis-Dox-PMSN)의 제조

[0098] 조합 치료의 주된 과제 중 하나는 이중 약물 요법의 요구이며, 이중 약물 전달 시스템은 최근에 강력한 기술 중 하나가 되었다. 본 발명의 약물 전달체의 높은 약물 담지의 이점을 고려할 때, 시간 척도를 변화시킴으로써 MSN에 시스플라틴과 독소루비신을 순차적으로 담지하였고, 본 고분자 게이트 키퍼 기술은 이중 약물을 캡슐화할 수 있었다.

[0099] 구체적으로, 하기 표 4에서 보는 바와 같이, 시스플라틴 4.4 mg을 5 mg/mL의 MSN 수용액에 첨가한 후 정제수 하에서 잘 분산시키고 초음파 처리하여 균일한 콜로이드 용액이 될 때까지 상기 입자를 분산시켰다. 이어, 상온에서 1.5시간 동안 700 rpm으로 교반하였다. 계획한 시간이 경과하면, 시스플라틴이 담지된 나노입자 현탁액을 원심분리한 후, 원심분리 및 재분산 과정을 거쳐 정제수로 2회 세척하였다. 이어, 상기 반응물에 4.4 mg의 독소루비신 수용액을 첨가한 후 마그네틱 교반기를 이용하여 상온에서 1.5시간 동안 700 rpm으로 교반하였다.

[0100] 시스플라틴 및 독소루비신의 이중 약물이 담지된 MSN의 표면을 PEG-PDS 공중합체로 감싸기 위하여, 상기 결과물에 10 mg의 PEG-PDS 공중합체를 첨가한 후 마그네틱 교반기를 이용하여 상온에서 3시간 동안 700 rpm으로 교반하였다. 중합체 셀을 교차결합하기 위하여 특정 함량의 DTT (12몰%, 24몰% 또는 60몰%)를 첨가하고, 3시간 동안

상온에서 추가로 교반하였다. 이렇게 제조된 다양한 농도의 시스플라틴 및 독소루비신을 담지한 19몰% 내지 83 몰%의 교차 밀도를 갖는 Cis-Dox-PMSN-1 내지 Cis-Dox-PMSN-3을 제조하였다.

[0101] 한편, 시스플라틴 및 독소루비신의 이중 약물을 담지하되 공중합체로 감싸지 않은 MSN을 제조하여 Cis-Dox-MSN으로 명명하였으며, 시스플라틴 및 독소루비신을 담지하고 공중합체로 감싸기 처리하되, 교차 결합시키지 않은 MSN을 제조하여 Cis-Dox-PMSN으로 명명하였다.

표 4

Sample	시스플라틴	DL (EE)	독소루비신	교차 밀도	DL (EE)
Cis-Dox-MSNs	4.4 mg	14 wt% (20%)	4.4 mg	No polymer	18 wt% (30%)
Cis-Dox-PMSNs			4.4 mg	No-crosslinking	13 wt% (19%)
Cis-Dox-PMSNs-1			4.4 mg	19몰%	20 wt% (34%)
Cis-Dox-PMSNs-2			4.4 mg	36몰%	24 wt% (44%)
Cis-Dox-PMSNs-3			4.4 mg	83몰%	25 wt% (44%)

[0103]

[0104] 실시예 7: PMSN에 리간드 장식(RGD-PMSN) 및 표적 전달

[0105] 디설파이드 관능성의 존재는 간단하고 빠르고 효율적인 합성에 의해 시스테인 함유 리간드의 후속 첨가를 용이하게 할 수 있다(J.H. Ryu et al., *Biomacromolecules*. 2012, 13, 1515).

[0106] 이를 위하여, 먼저, Dox를 포함하고 공중합체가 캐핑된 나노입자 PMSN (DTT 첨가농도 20몰%) 1mg를 정제수 1 mL에 잘 분산시킨 후, 여기에 시스테인을 함유하는 펩타이드 리간드로서, 사이클릭 Arg-Gly-Asp-Asp-Phe(D form)-Cys (cRGDFC, 이하 "RGD"로도 지칭함) 1 mg을 첨가하여 상온에서 200rpm으로 24시간 동안 교반하였다. 상기 과정을 거쳐 펩타이드 리간드가 도입된 나노입자를 만들고, 과량의 펩타이드 리간드 원심분리를 통해 나노입자와 용액을 분리함으로써 제거하였다. 이렇게 제조된 리간드 장식된 PMSN를 "RGD-PMSN"이라고 지칭하였다.

[0107] 상기에서 제조한 RGD-PMSN에서 펩타이드 리간드가 부착되었는지 여부를, 343 nm에서 반응 후에 생성되는 부산물인 피리도티올 흡수도를 이용하여 계산하였다(도 8(a)). 이를 통해 펩타이드 리간드의 PMSN 나노 입자(1 mg/mL) 표면에 3.62×10^{-8} 몰의 리간드가 부착되었음을 계산하였고, 이를 통해 중합체-게이트 키퍼 셀 내 ~ 4 %의 PDS 단위를 추가로 표적 리간드를 컨쥬게이션하는데 추가 사용하였다.

[0108] 시험예 1: MSN 및 PMSN의 분석

[0109] 반응 부산물 관찰

[0110] 상기 실시예 1에서 PMSN의 제조 시, 반응 부산물인 피리도티올을 UV-Vis 스펙트럼에 의해 관찰한 결과를 도 4의 (a)에 나타내었고, 이를 통해 교차 결합 밀도를 계산할 수 있었다. PEG-PDS 공중합체로 MSN의 표면을 결합시키는 감싸기와 교차 결합은 다른 금속 촉매나 화학물질 없이 실온 물 내에서의 마일드(mild)한 조건에서 발생하므로 포획물은 PEG-PDS 공중합체로 MSN의 표면을 결합시키는 과정 동안 기공에 안전하게 담지될 수 있다.

[0111] PEG-PDS 중합체와 결합된 MSN은 약물이 어떤 자극 없이 지속적으로 방출되도록 하는 약물 방출 시스템에 유용한데, 이는 공중합체 및 MSN 간의 정전 상호 작용이 혈청 단백질과 적혈구와 같은 전하를 띤 많은 성분을 함유하는 생리 환경에서 약화될 것이기 때문이다. 그러나, 표적 약물 전달 시스템에서 초기에 약물 또는 생체기능 조절물질이 방출됨에 따른 심각한 부작용을 피하기 위해서는, 약물 또는 생체기능 조절물질이 표적하는 세포, 예컨대, 치료하고자 하는 세포에 도달하기 전에 기공 내부에 안정적으로 위치해야 한다. 이를 위해, 본 발명에서는 MSN 표면에 공중합체 셀을 중합체 사슬 간 디설파이드 형성을 통해 교차 결합시켰다.

[0112] 디티오테리톨(DDT)을 첨가하는 것은, PDS의 일부 티올기를 분해하여 자유 티올기를 만들어 내고, 자유 티올은 남아있는 PDS 작용기와 반응하여 디설파이드 결합을 형성할 수 있다. 이러한 디설파이드 교환 반응은 공중합체 층에서 발생하며 교차 결합된 중합체 셀이 매우 안정적으로 약물을 보유하게 한다. 또한, 이러한 반응은 간단하며, 독성을 유발할 수 있는 촉매 및 용매를 함유하는 금속의 사용을 필요로 하지 않는다.

[0113] 직경, 제타 전위 및 TEM 사진 분석

[0114] 상기 실시예 1에서 제조한 MSN 및 PMSN의 특징을 동적 광산란(DLS), 제타 전위 측정 및 TEM 사진 촬영을 통해 분석하였다.

[0115] 도 4의 (b)에서 보는 바와 같이, MSN의 직경은 약 124 nm였고, PMSN는 160 nm까지 크기가 증가하였다. 또한, MSN의 표면 전하는 매우 음성(-54 mV)인 반면, PMSN의 경우 거의 중성(-1 mV)이 되었다(도 4의 (c)). 나노 입자의 표면 전하가 세포 내재화에 상당한 영향을 미친다는 것을 고려할 때, PMSN의 중성 PEG 외층은 단백질 내성에 바람직할 수 있으며, 순환 시간을 증가시킬 수 있다.

[0116] 한편, MSN 및 PMSN의 TEM 이미지를 각각 도 4의 (d) 및 (e)에 나타내었는데, 이는 MSN의 표면이 생분해성 공중합체와 결합됨으로 인한 다공성 특성의 가시적인 대표적 변화를 보여준다. 즉, MSN은 명백히 다공성 특성을 보인 반면, PMSN의 기공 이미지는 공중합체와 결합됨으로써 가시적으로 보이지 않게 되었다.

[0117] 시험예 2: 생분해성 공중합체의 최적량 확인

[0118] MSN의 표면을 안정적으로 결합시키는 생분해성 중합체의 최적량을 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-2에 기재된 것과 동일한 방식으로 다양한 농도(2.5mg/ml, 5.0mg/ml 및 10mg/ml)의 PEG-PDS 공중합체를 각각 MSN 5mg과 함께 25℃에서 물에서 배양하고 10,000 rpm 조건에서 원심 분리한 후, 상층액에서 중합체의 잔류량을 측정하였다. 그리고 10 mg/ml의 PEG-PDS 공중합체로 MSN의 표면을 결합시키기 전과 후의 반응액 상층액의 UV-가시 스펙트럼을 측정한 결과를 도 5의 (a)에 나타내었다. 중합체 감싸기, 즉 PEG-PDS 공중합체로 MSN의 표면을 결합시키는 것이 안정화된 것을 확인하였다.

[0119] 또한, PEG-PDS 공중합체로 나노입자의 표면을 결합시키는 것이 약물의 누출을 효율적으로 차단하는지 여부를 확인하기 위하여, PEG-PDS 공중합체의 농도별 약물 방출 프로파일을 조사하였다.

[0120] 도 5의 (b)에 나타난 바와 같이, MSN에 대한 저농도의 중합체(2.5mg/ml 및 5.0mg/ml)는 1시간 이내에 약물 분자의 급격한 방출을 보였으며, 이는 이러한 중합체의 양이 MSN의 기공으로부터 약물 분자의 누출을 방지하기에 충분하지 않다는 것을 나타낸다. 반면, 중합체 농도 10 mg/ml, 및 10몰%로 교차 결합된 중합체 농도 10 mg/ml는 약물 분자의 느린 방출을 보여 주었다. 중합체 셀이 교차결합(10몰%)될 때, 이 상태는 효율적으로 기공을 차단하여 약물 분자의 누출을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 관찰을 바탕으로, 추가 실험에 대해서는 중합체의 충분한 양을 제공하기 위해 MSN에 비해 두 배 많은 양의 중합체를 사용하였다.

[0121] 시험예 3: PMSN, PMSN-1 내지 PMSN-3의 촉발된 약물 방출 프로파일

[0122] PMSN는 24시간에 걸쳐 약물 분자의 누출 없이 매우 안정적인 캡슐화를 나타낸다. 중합체의 교차 결합은 디설파이드 결합에 의해 형성되기 때문에, 중합체 셀은 환원제에 의해 분해될 수 있고, 약물은 외부 자극에 반응하여 생분해성 공중합체가 분해됨으로 인해 기공이 노출되는, 이른 바 중합체 게이트 키퍼를 개방함으로써 방출될 수 있다.

[0123] 본 발명에서는 촉발된 약물 방출을 보이기 위해, 형광 분석기를 사용하여 PMSN로부터 방출된 독소루비신의 배출 증가에 의해서 인산염 완충 생리 식염수(pH 7.4) 내 PMSN으로부터 독소루비신의 방출 프로파일을 조사하였다.

[0124] 3-1: 환원제 처리 농도에 따른 약물 방출 프로파일

[0125] 상기 실시예 1에서 제조한 PMSN의 수성 현탁액에 5시간째에 다양한 농도(1 mM, 5 mM 및 10 mM)의 글루타치온(GSH)을 각각 처리하였다. 도 6의 (a)에서 볼 수 있듯이, 환원제로서 GSH 농도의 증가는 디설파이드 잔기 일부 분의 환원에 의해 게스트 분자의 방출을 가속화함을 나타내었다. 암 세포는 디설파이드 결합을 절단하여 세포 내부 약물 방출을 유발할 수 있는 GSH가 풍부하다. 따라서 본 발명에 따른 PMSN은 암 세포의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0126] 3-2: 공중합체 쉼의 교차 결합 밀도에 따른 약물 방출 프로파일

[0127] 또한, PMSN-1 내지 PMSN-3의 수성 현탁액에 4시간째에 5 mM의 GSH를 처리한 후 약물 방출 프로파일을 확인해 본 결과, 약물 방출 프로파일은 MSN의 표면에 결합된 공중합체 쉼의 교차 결합 밀도에 따라 조절될 수 있음을 알 수 있었다.

[0128] 도 6의 (b)에서 볼 수 있듯이, 아무 처리를 하지 않은 최초 4시간 동안에는 방출이 없다가, 4시간째에 5 mM의 GSH 첨가 시 19몰% 교차 결합된 MSN(PMSN-1)은 빠른 방출을 보여 주었고, 83몰% 교차 결합된 MSN(PMSN-3)은 느린 방출을 보였고, 36몰% 교차 결합된 MSN(PMSN-2)은 중간 수준이었다. 이것은 본 발명의 PMSN이 특정 약물 전달 시스템에 대해 제어된 방식으로 방출 속도를 조절할 수 있음을 나타낸다.

[0129] **시험예 4: rMSN 및 PrMSN의 분석**

[0130] 상기 실시예 3 및 4에서 제조한 rMSN 및 PrMSN의 직경, 제타 전위 측정 및 TEM 이미지를 분석하였다.

[0131] 도 7의 (a)에서 보는 바와 같이, rMSN 및 PrMSN의 직경은 각각 80 nm 및 100 nm 이었으며, 고분자를 도입한 경우에 직경이 증가하는 양상을 나타내었다. 또한, rMSN의 표면 전위는 매우 음성이었으나(-44 mV), MSN의 표면에 PEG-PDS 공중합체를 도입하여 제조한 PrMSN의 경우 거의 중성(-2 mV)이 되었다(도 7의 (b)).

[0132] 한편, PrMSN의 TEM 이미지를 도 7의 (c)에 나타내었다. 고분자를 이용하여 감싼 경우인 PrMSN에는 고분자에 의해 구멍이 막히면서 구멍이 정확히 보여지 않고 흐려짐을 볼 수 있다. 이를 통해 PrMSN의 경우 나노입자 표면에 고분자가 잘 감싸고 있다는 것을 확인할 수 있다.

[0133] **시험예 5: PrMSN, PrMSN-2 내지 PrMSN-4의 약물 방출 프로파일 및 세포 독성 시험**

[0134] 5-1: 공중합체 쉼의 교차 결합 밀도에 따른 약물 방출 프로파일

[0135] 본 발명자들은 MSN과 생분해성 공중합체가 낮은 교차 결합 밀도에서 방출 프로파일에 영향을 준다는 것에 주목하였다. 이에, 인산염 완충 생리 식염수 내 쉼 교차결합의 밀도를 변화시켜 제조한 PrMSN(교차결합 없음), PrMSN-2(19몰% 교차결합), PrMSN-3(36몰% 교차결합) 및 PrMSN-4(83몰% 교차결합)를 대상으로 약물의 방출 프로파일을 조사하였다.

[0136] 도 8의 (a)에 나타난 바와 같이, 83몰% 쉼 교차 결합 밀도를 갖는 PrMSN-4가 약물 분자의 안정된 캡슐화를 보여주었다.

[0137] 5-2: 환원제 처리 농도에 따른 약물 방출 프로파일

[0138] 상기 4-1에서 확인된 안정된 캡슐화를 보이는 PrMSN-4의 수용액에 시험예 2-1과 동일한 방식으로 다양한 농도(1 mM, 5 mM 및 10 mM)의 GSH를 처리한 후, 촉발된 약물 방출 프로파일을 확인하였다.

[0139] 도 8의 (b)에서 볼 수 있듯이, 환원제의 농도가 증가할수록 방출 프로파일에 영향을 미쳤다. 이것은 쉼 교차결합 밀도가 약물 전달 시스템의 특성에 영향을 미칠 수 있는 경우, 중합체 게이트 키퍼 전략이 다양한 다공성 특성에 적용될 수 있음을 나타낸다.

[0140] **시험예 6: 약물 운반체의 세포 독성 시험**

[0141] 나노 운반체의 생체 적합성을 보여주기 위해 KB 세포에서, 약물을 담지하지 않은 MSN 및 PMSN에 대한 시험관내 (*in vitro*) 세포 독성 시험을 수행하였다.

[0142] 구체적으로, KB 세포를 RPM 1640 배지를 이용하여 멸균 96-웰 Nunc (Thermo Fisher Scientific Inc.) 다공편판 (microtitre plate) 중에서 5×10^3 세포/웰의 씨딩 밀도로 배양하고, 37°C에서 5% CO₂ 하에서 24시간 동안 방치하였다. 세포 생존율을 확인하기 위하여, 상기 세포들에 다양한 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 및 2 mg/mL)의 MSN 및 PMSN을 처리하고, 알라마 블루 분석법(Alamar Blue assay)에 의해 세포 생존율을 분석하였다. 예상대로, 약물이 담지되지 않은 MSN과 PMSN은 2mg/ml의 비교적 높은 농도까지 어떤 독성도 보이지 않았으며,

이는 PMSN이 약물 전달 시스템을 위해 비독성이며, 생체에 적합하다는 것을 제시한다(도 9).

[0143] 또한, MSN 및 PMSN의 생체 적합성을 확인하기 위하여, HeLa 세포 및 SCC-7 암 세포에서의 세포 생존율을 상기와 동일한 방식으로 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 나노 입자는 어떤 세포 독성도 나타내지 않았다.

[0144] 시험예 7: 시스플라틴을 함유하는 PMSN의 약물 프로파일

[0145] 안정적인 캡슐화를 확인하기 위해서, Cis-PMSN(교차결합 없음), Cis-PMSN-1(19몰%), Cis-PMSN-2(36몰%) 및 Cis-PMSN-3(83몰%)을 Agilent Eclipse XDB C18 컬럼을 사용하여 비-구배 이동상 고성능 액체 크로마토 그래피(H₂O 93% 및 MeOH 7%, UV-Vis 스펙트럼을 통해 305 nm에서 검출)에 의해서 인산염 완충 식염수에서 시스플라틴 방출 프로파일을 분석하였다(도 10의 (a)). 예상대로 그리고 이전 결과와 유사하게도, 쉘을 가교한 것은 약물을 방출시키지 않고 안정하게 포함시키는 유망한 결과를 보여 주었다.

[0146] 또한, 상기 시험예 3-1에 기재된 것과 동일한 방식으로, Cis-PMSN-1 내지 Cis-PMSN-3에 5 mM의 GSH를 첨가함으로써 촉발된 방출 동역학을 조사하여 도 10의 (b)에 나타내었다. 본 발명자들은 다양한 교차결합 밀도가 상이한 방출 프로파일을 보여주는 것에 주목하였다. 이러한 결과는 본 발명의 약물 전달체가 다목적 약물 시스템으로 작용할 수 있다는 것과 일치한다.

[0147] 시험예 8: 시스플라틴을 함유하는 PMSN의 시험관내 세포 독성 시험

[0148] KB 세포에 다양한 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 및 2 µg/ml)의 시스플라틴이 담지된 PMSN(Cis-PMSN)을 첨가하고, 48시간이 되는 시점에 알라마 블루 분석법으로 세포 생존율을 분석하였으며, 각 데이터는 3회 측정하였다. 형광 분석(Fluorescence measurement)은 플레이트 리더(Tecan Infinite Series, Germany)를 이용하여 여기 파장(excitation wavelength) 565 nm 및 모니터링 방출 파장 590 nm에서 측정하였다.

[0149] 그 결과, 세포 독성 시험 결과(도 10의 (c))에서도, 대량의 시스플라틴을 나노입자에 담지시킨 체로 세포내로 전달시켜 세포 안에서만 쉘 가교 결합이 분해되면서 KB 세포에서 다양한 세포 독성 반응을 보여 주었다.

[0150] 또한, 다양한 농도의 시스플라틴 및 독소루비신 이중 약물(Cis 및 Dox: 0.007 및 0.01 µg/ml, 0.035 및 0.05 µg/ml, 0.07 및 0.10 µg/ml, 0.175 및 0.25 µg/ml, 0.35 및 0.50 µg/ml, 0.70 및 1 µg/ml, 및 1.40 및 2.0 µg/ml)을 담지한 PMSN(Cis-Dox-PMSN)을 대상으로, 상기와 동일한 방식으로 세포 독성 시험을 수행하고 그 결과를 도 10의 (d)에 나타내었다.

[0151] 도 10의 (d)에서 보는 바와 같이, Cis-Dox-PMSN은 쉘 교차 결합된 중합체 게이트 키퍼의 존재로 인한 상이한 세포 독성 반응을 보였다. 독소루비신이 DNA에 삽입됨으로써 세포 독성 반응을 유도하므로, 시스플라틴은 DNA와 교차 결합하여 세포 사멸을 유도하고, 이 중합체 게이트 키퍼는 다중약물 저항 시스템 및 조합 치료법에 사용될 수 있다.

[0152] 실험예 9: RGD-PMSN의 내재화 확인

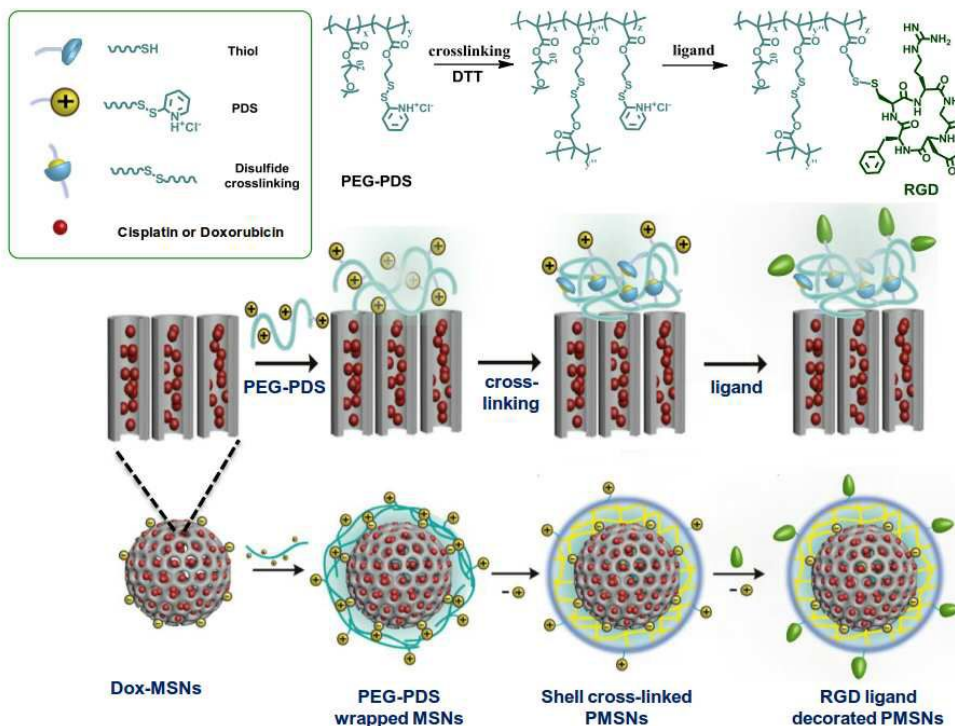
[0153] 잔여 표면 PDS기를 디설파이드 교환 반응을 통해 PMSN의 표면을 시스테인 함유 펩타이드 리간드(cRGDFc)로 장식화한 RGD-PMSN을 대상으로, 343 nm에서 피리도틴은 흡수를 관찰함으로써 상기 리간드가 부착되었는지 여부를 확인하였다(도 11의 (a)). 그 결과 약 3.62×10^{-8} mole의 리간드가 PMSN의 나노캐리어의 표면에 장식화된 것을 확인할 수 있었다.

[0154] 한편, MSN 및 PMSN은 2 mg/mL의 고농도까지 세포 독성을 나타내지 않는데, 이는 PMSN이 비독성이고 생체적합성이 우수하여 약물전달체로서 유용함을 보여준다(시험예 6). 이에, 상기 실험예 8에 기재된 것과 동일한 방식으로 RGD-PMSN의 세포 독성을 확인 해 본 결과, RGD-PMSN은 0.25 내지 2 µg/mL의 농도의 독소루비신에 대하여, 펩타이드 리간드로 수식되지 않은 PMSN에 비해 독성이 더 높은 것으로 나타났다(도 11의 (b)). 이것은 RGD-PMSN이 빠르게 내재화되고 약물을 방출하여 리간드 매개 세포내포작용에 의해 암 세포를 죽일 수 있다는 것을 나타낸다(K. Chen, X. Chen. *Theranostics* 2011, 1, 189).

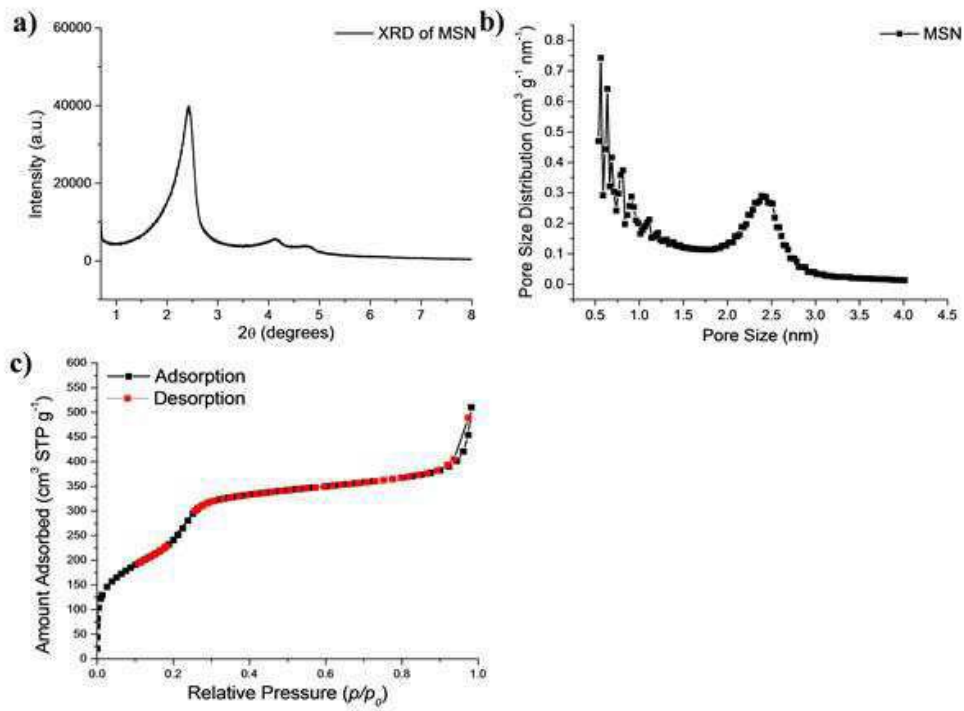
- [0155] 또한, 독소루비신이 담지된 PMSN 및 RGD-PMSN의 내재화를 공초점 형광 현미경 검사(CLSM)에 의해 분석하여 도 11의 (c)에 나타내었다. 먼저 KB 세포를 웰 글라스 커버 슬립 위에서 2×10^5 세포/웰의 농도로 씨딩하였다. 24 시간 후, 상기 세포들을 최종 농도 독소루비신 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 RGD-PMSN 나노입자로 처리하였다. 세포내 흡수 (cellular uptake)를 커버글라스(Lab Tek II glass chamber coverglass, Thermo Fisher Scientific Inc) 상에서 조사하고, CO₂ 배양기가 연결된 Carl Zeiss LSM 700 microscope으로 정기적으로 조사하였다.
- [0156] 도 11의 (c)의 (i)에서 보는 바와 같이 독소루비신(붉은색)은 세포에 분포하였고, 이는 리간드로 수식된 나노입자인 RGD-PMSN는 담지된 약물의 대부분이 30분 내에 세포 내로 내재화되었음을 나타낸다. 그러나, 비-리간드 RGD-RMSN(비 리간드-PMSN-1)은 높은 내재화를 나타내지 않았다(도 11의 (c)의 (ii)). 이것은 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 매개된 내포작용에 의해 발생하고, 약물이 세포 내 자극 상태에 대한 반응으로 표면에 결합된 공중합체의 분해로 인해 방출된다는 것을 제시한다.
- [0157] 마지막으로, KB 세포 내 리간드의 존재 또는 부재 하에 독소루비신이 담지된 PMSN의 흡수를 정량적으로 측정하기 위해 유동 세포 계측법 실험으로 분석하였다.
- [0158] 비-리간드 및 리간드 장식된 나노입자의 세포내 흡수를 분석하기 위하여, KB 세포를 24웰 플레이트 상에서 5×10^3 세포로 씨딩하였다. 24시간 후에, 상기 세포를 비-리간드 PMSN-1, 및 리간드 장식되고 Dox 담지된 PMSN(RGD-PMSN)로 3시간 동안 처리하였다. 이어, 상기 독소루비신의 세포내 흡수를 FACS(FACS caliber, BD Bioscience)를 이용하여 분석하였다.
- [0159] 도 11의 (d)에서 나타낸 바와 같이, 리간드와 비-리간드 PMSN의 세포흡수 사이에 유의한 차이가 관찰되었다(왼쪽: 비-리간드 PMSN-1; 오른쪽: RGD-PMSN). 이 결과는 RGD-PMSN가 세포 표면 인테그린이 과발현되는 암세포에 대해 선택적임을 확인시켜준다. 또한, 비-리간드 PMSN-1은 처리된 중앙 세포의 세포 생존율에 대한 명백한 억제 효과를 나타내지 않았는데, 이는 리간드 장식에 의한 세포 내재화가 다양한 GSH 농도로 인한 독소루비신의 세포 내 방출을 촉진한다는 것을 제시한다. 이 결과는 표면상의 cRGDfC 펩타이드 리간드의 존재가 세포 흡수를 향상 시킴을 보여준다.

도면

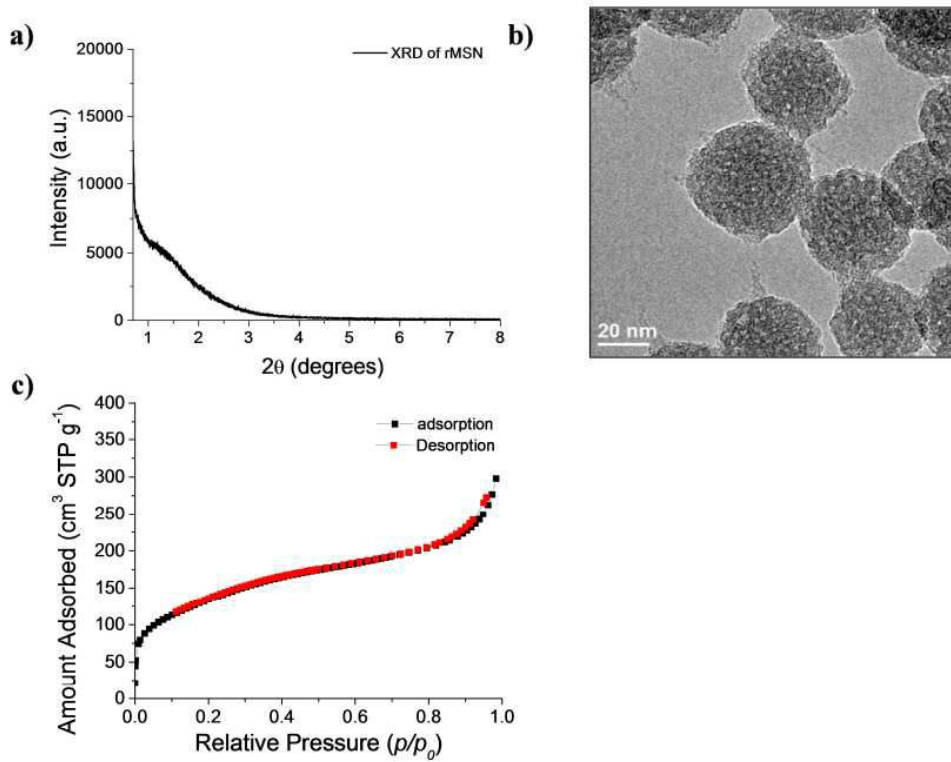
도면1



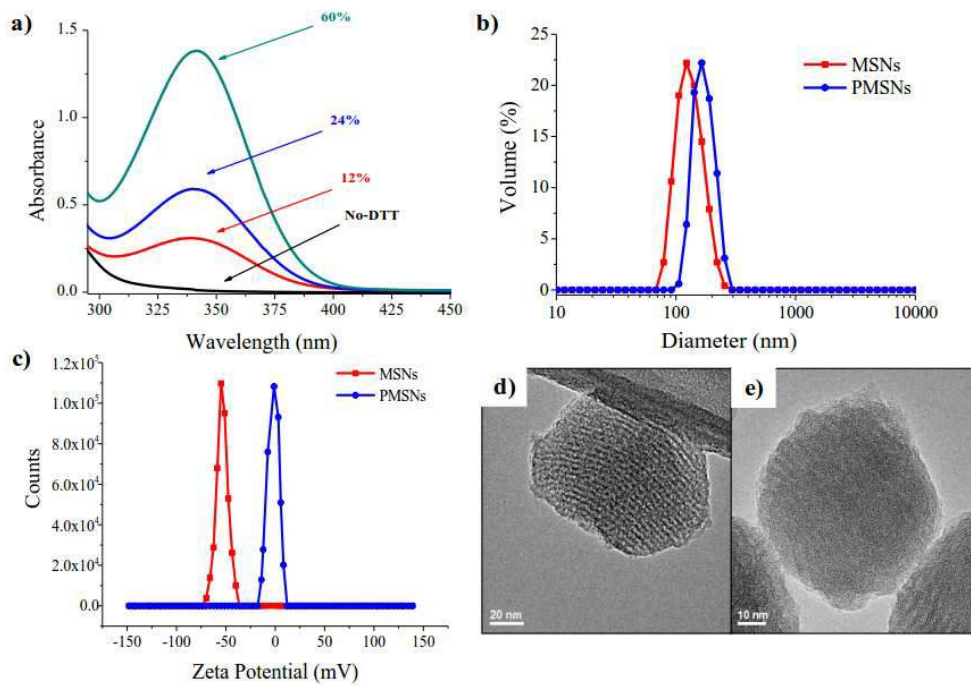
도면2



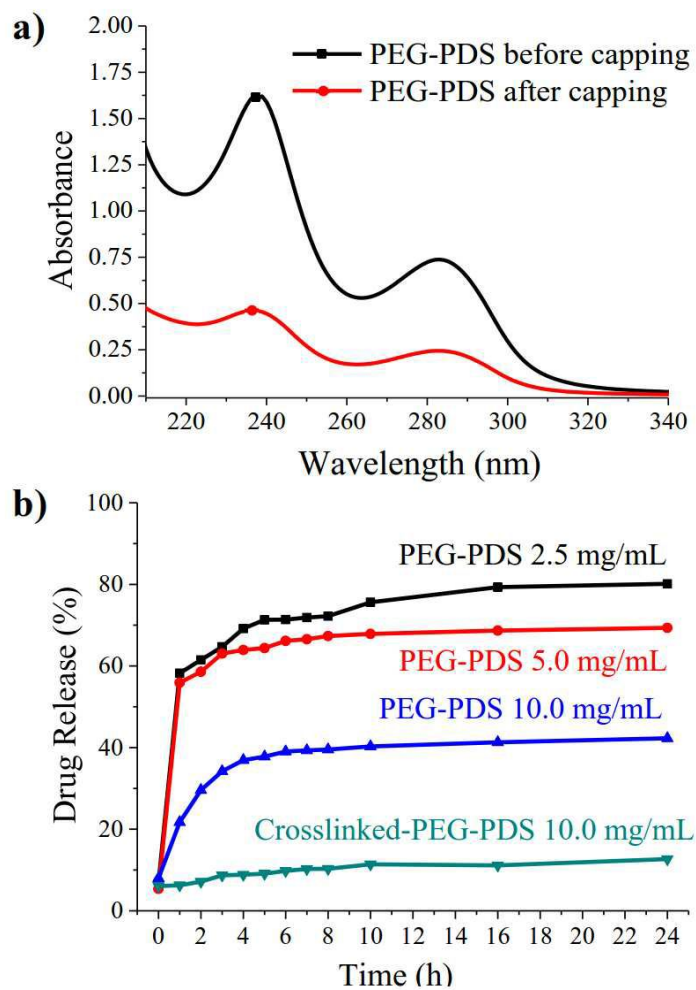
도면3



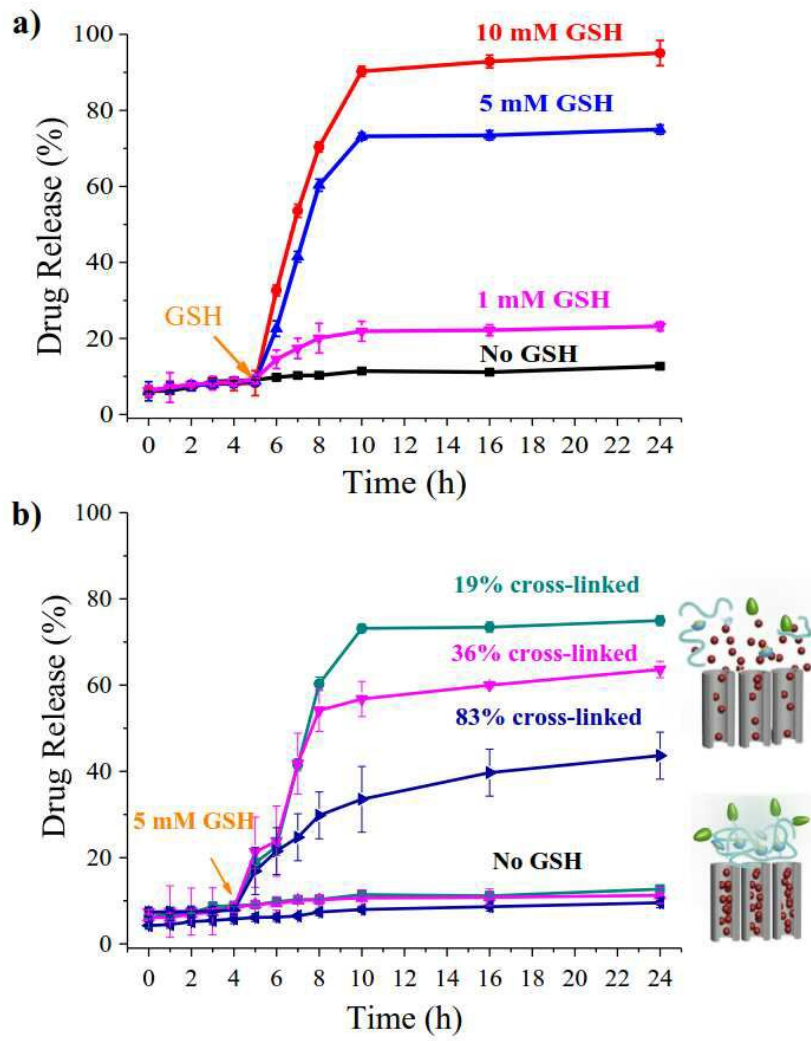
도면4



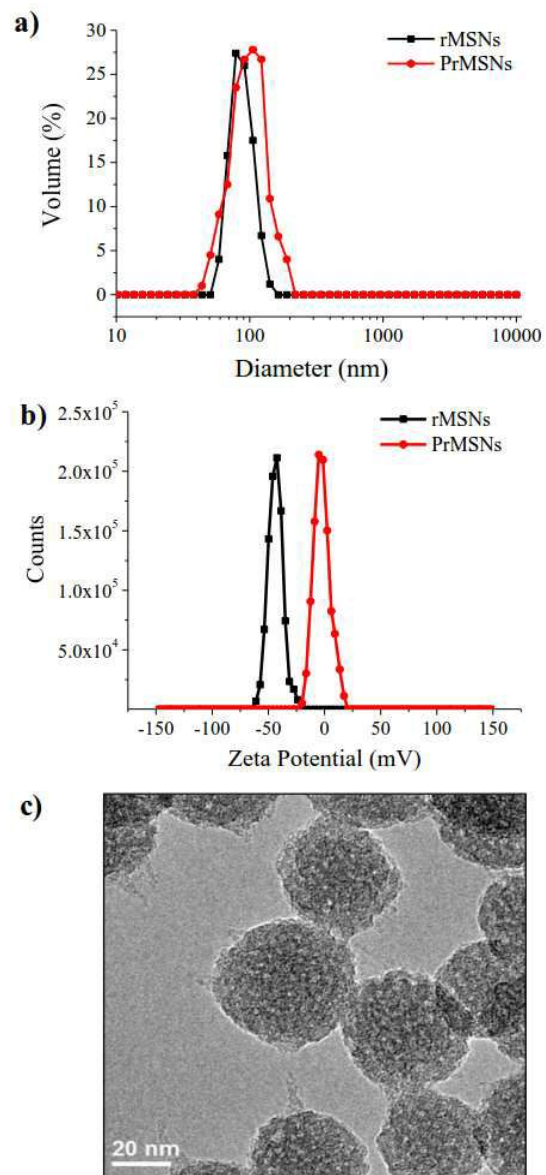
도면5



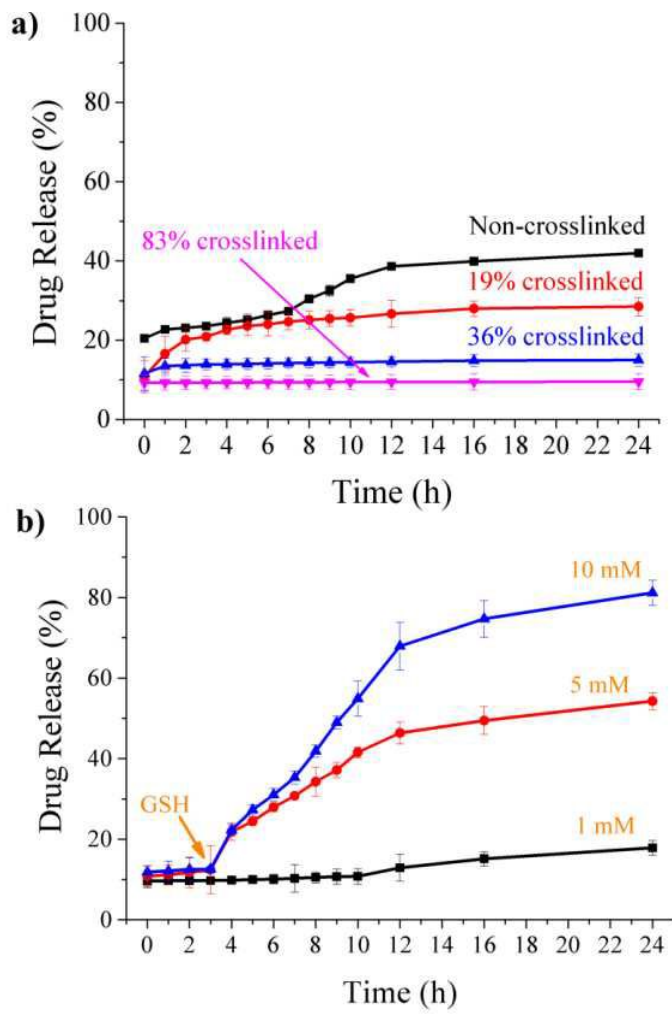
도면6



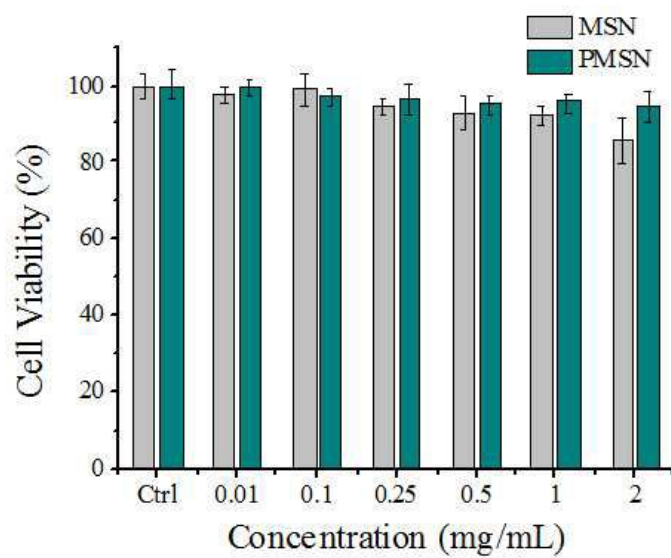
도면7



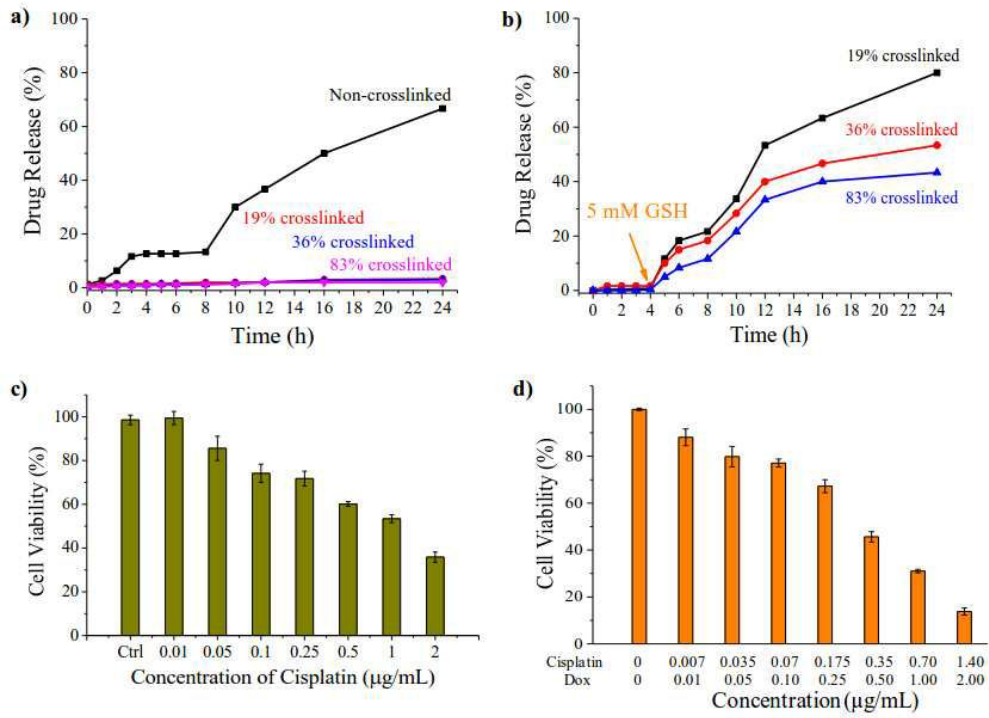
도면8



도면9



도면10



도면11

