(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월16일
(11) 등록번호 10-2032277
(24) 등록일자 2019년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01) *A61K 47/36* (2017.01)
A61K 47/42 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5115 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0041254
(22) 출원일자 2018년04월09일
심사청구일자 2018년04월09일
(56) 선행기술조사문헌
Biomaterials. 2014. Vol.35, Issue36, pp.9678-9688.*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 13 항

(73) 특허권자
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
정봉근
경기도 과천시 관문로 143, 1110동 1004호
서주리
대전광역시 동구 동대전로248번길 87, 3층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최우성

심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 **화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자 및 그 제조 방법**

(57) 요 약

화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자로서, 도파민 및 히알루론산이 결합되어 있으며, 약물 특히 표적 치료 약물이 로딩된 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자 및 그 제조 방법을 제공한다. 이 제조 방법은 중공 실리카 나노 입자의 몰폴로지 콘트롤과 금 나노 점의 형성을 하나의 단계로 인시츄로 진행할 수 있어서 제조 과정이 용이하고, 계면 활성제를 사용하지 않는 장점이 있다. 또한, 도파민 및 히알루론산 결합에 의하여 광열 효과를 향상시킬 수 있고, 세포 독성을 낮추고 생체 적합성을 증가시킬 수 있으며, 의도하지 않은 약물 방출을 방지할 수 있을 뿐만 아니라, 종양 표적능을 부여하고 병용 치료 효과를 높일 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 41/0052 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)
A61K 47/42 (2013.01)
A61K 9/5146 (2013.01)
A61K 9/5192 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자
김다은
서울특별시 금천구 독산로8길 23, 3층
박다연
부산광역시 사상구 백양대로 372-22, 111동 202호
임재현
인천광역시 부평구 부흥로293번길 24, 1002호
최형우
서울특별시 중랑구 면목로38길 16, 402호

(56) 선행기술조사문헌
Chemical Journal of Chinese Universities. 2016. Vol.37, No.2, pp.224-231.*
Nanoscale. 2017. Vol.9, pp.6509-6520.*
KR1020140070848 A
KR1020150014560 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016M3A7B4910652
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 나노소재원천기술개발
연구과제명 곰팡이 검출을 위한 미세유체칩 개발
기 여 율 40/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017M3A7B4039937
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 나노소재원천기술개발
연구과제명 미세패터닝 기반 모듈칩 원터치 본딩 기술 개발
기 여 율 30/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2017.07.01 ~ 2018.03.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711066487
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구지원사업
연구과제명 다기능 스마트 나노 전달체를 이용한 신경 줄기세포 분화유도
기 여 율 30/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자이고,

상기 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자에는 도파민 및 히알루론산이 결합되어 있으며, 약물이 로딩된 것이고,

복수의 금 나노 점들이 중공 실리카 나노 입자 표면에 분산되어 있는 것을 특징으로 하는 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점을 함유 중공 실리카 나노입자.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 금 나노 점은 폴리에틸렌이민과 정전기적으로 결합되어 있으며, 상기 폴리에틸렌이민이 실리카 나노 입자에 수소 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 히알루론산은 EDC-NHS 커플링을 통해 도파민에 접합되고, 히알루론산이 접합된 도파민은 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자에 정전기적 상호 작용을 통해 결합되는 것을 특징으로 하는 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 약물은 독소루비신을 포함하는 것을 특징으로 하는 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 약물은 표적 치료 약물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자.

청구항 7

제 1 항, 제 2 항, 제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자의 제조 방법으로서,

실리카 전구체 용액으로부터 실리카 나노 입자를 합성하고,

상기 실리카 나노 입자에 폴리에틸렌이민 및 금 전구체를 함께 제공하여 실리카 나노 입자를 에칭하는 것이며,

계면 활성제를 사용하지 않는 것을 특징으로 하는 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자 제조 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 방법은 실리카 전구체 용액으로부터 실리카 나노 입자를 합성하는 단계;

상기 실리카 나노 입자를 함유하는 용액에 폴리에틸렌이민 및 금 전구체를 제공하여, 금 나노 점 및 폴리에틸렌이민을 실리카 나노 입자에 결합시키면서 실리카 나노 입자를 에칭하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자 제조 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 실리카 나노 입자 함유 용액에 폴리에틸렌이민 및 금 전구체를 제공하고 pH를 조절하여 금 나노 점을 함유하는 폴리에틸렌이민 얽힘(entanglement)을 유도하는 단계; 및

상기 얽혀진(entangled) 금 나노 점 및 폴리에틸렌이민을 실리카 나노 입자에 결합시키면서 실리카 나노 입자를 에칭하는 것을 특징으로 하는 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자 제조 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 pH는 9~12로 조절하는 것을 특징으로 하는 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자 제조 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서,

상기 실리카 전구체 용액은 TEOS(Tetraethyl orthosilicate) 및 NH_4OH이고,

상기 금 전구체는 $HAuCl_4$인 것을 특징으로 하는 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자 제조 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

실리카 나노 입자에 폴리에틸렌이민 및 금 전구체를 제공하고 NaOH를 더 제공하는 것을 특징으로 하는 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자 제조 방법.

청구항 13

제 7 항에 있어서,

상기 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자를 제조한 후, 도파민 및 히알루론산을 제공하여 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자에 도파민 및 히알루론산을 결합시키는 것을 특징으로 하는 금 나노 점을 함

유하는 중공 실리카 나노 입자 제조 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 도파민 및 히알루론산 제공 전 또는 제공 후 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자에 약물을 로딩하는 것을 특징으로 하는 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 명세서는 화학 요법(chemotherapy) 및 광열 치료(photothermal therapy)의 이중 치료를 위한 나노 캐리어인 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 약물 전달 시스템(Drug Delivery System; DDS)의 목적은 암을 포함하는 질병 치료를 위한 치료 타겟에 약물을 전달하기 위한 것이다. 약물 손실과 부작용 없이 신속하고 정확하게 약물을 전달하기 위하여, 나노 캐리어(nanocarriers)가 주목받고 있다. 나노 캐리어는 생체적합성이 양호하고, 기능화가 용이하며, 세포로의 흡수가 빠르고, 약물 로딩 용량이 크며, 상대적으로 제조가 용이하다. 이에 금 나노 입자, 실리카 나노 입자, 리포좀, 폴리머 등에 기초한 약물 전달을 위한 다양한 나노 캐리어가 연구되었다. 그러나, 나노 캐리어에 약물이 완전히 보유되지 않는 문제나 약물이 의도하지 않게 방출되어 정상 조직을 손상하고 이에 따라 부작용을 일으키는 등의 가능성이 있다.

[0004] 최근의 약물 전달을 위한 나노 캐리어 개발은 약물 방출 조절 시스템에 초점을 두고 있으며, 치료 효과의 민감도를 더욱 향상시킬 수 있는 자극 촉발 약물 전달 시스템(stimuli-triggered DDS)에 적용되고 있다.

[0005] 한편, 다양한 외부 자극 중 근적외선(near-infrared; NIR)을 사용한 광열 효과는 암 치료를 위한 강력한 툴이다. 근적외선(NIR)은 조직에 깊이 침투할 수 있는 이점이 있고 세포 독성이 낮다. 근적외선(NIR) 조사된 나노 캐리어는 열을 생성하고 엔도좀 막(endosomal membrane)을 불안정하게 하여, 앤도좀으로부터 암세포로의 나노 캐리어 및 약물 방출을 촉진할 수 있다. 특히, 금 기반의 코아-쉘 구조의 나노 입자는 근적외선 흡수 플라즈모닉 특성에 의해 종양 형성 세포를 사멸시키도록 제조되었다.

[0006] 플라즈모닉 나노 물질 및 화학 약물의 조합에 의한 이러한 시너지 효과 또는 병용 치료 효과는 종양 세포 치료 효과를 향상하는데 더욱 효과적이다.

[0007] 이러한 화학-광열 치료의 병용 치료 효과를 사용하기 위하여, 나노 캐리어는 소수성 작용(hydrophobic interaction)과 정전 작용(electrostatic interaction)을 통해 기재와 상호 작용하는 약물 로딩을 위한 특정 영역을 가져야 한다.

[0008] 예를 들어, 화학-광열 치료를 위한 실리카 코팅된 금 나노로드가 보고된 바 있다(S. Shen et al. Biomaterials 2013). 또한, pH 및 NIR 조사로 방출을 조절하기 위해 5-fluorouracil을 금 나노로드/하이드로젤 복합체에 로딩시킨 것도 제안된 바 있다(H. Jin et al. Colloids and surfaces B, 2015). 또한, 이중 치료 효과를 위해 실리카 나노 로틀(nanorottle) 상에 다기능 금 나노 쉘을 제조한 것도 보고된 바 있다(Angew et al. Nanomedicine 2011).

[0009] 그러나, 대부분의 연구는 두 단계의 합성을 통해 나노 캐리어를 제조하는 것에 초점을 맞추고 있다. 즉, 우선 나노 입자 제조 후 여러 공정을 통해 약물 로딩을 위한 중심 중공이나 메조 다공성 등 공간을 확보한 다음, 금, 그라펜, 몰리브데늄 등의 광열 에이전트와 결합시키는 방식이다. 이러한 나노 캐리어의 분리된 제조 방식은 번거롭고 시간이 많이 소요되며 경제적이지 못하다.

[0010] 또한, 통상적인 Au 또는 실리카 나노 입자(silica nanoparticle) 코어의 제조 방법은 세포 독성이 큰 계면 활성제의 사용을 필요로 하는데, 생체 적용 시에는 계면 활성제를 완전히 제거하기 어렵다. 따라서, 계면 활성제의 사용 없이 병용 치료 요법에 사용될 수 있는 나노 캐리어를 제조하는 신규한 방법이 필요하다. 또한, 실리카 나노 입자도 다공성 표면을 가지게 되면 양전하로 인해 높은 세포 독성을 가지게 되어 암세포뿐만 아니라 정상 세

포에 손상을 야기할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 일측면에서, 나노 캐리어 제조 후 약물 로딩을 위한 나노 캐리어 공간을 확보하고 광열 에이전트와 결합시키는 복잡한 단계를 거치는 것이 아니라, 중공 실리카 나노 입자의 몰폴로지 콘트롤과 광열 에이전트인 금 나노 점의 형성을 인 시츄로 동시에 진행할 수 있으며, CTAB와 같은 계면 활성제의 도입이 배제되므로 제조 과정이 단순해지고 계면활성제로 인한 독성을 없앨 수 있는, 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0013] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 다른 일측면에서, 광열 효과를 증폭시킬 수 있고 세포 독성을 낮추어 생체적합성을 증가시킬 수 있으며, 의도하지 않은 약물 방출을 방지할 수 있는 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 또 다른 일측면에서, 표적화된 화학 및 광열의 병용 치료가 가능하고 병용 치료 효과를 높일 수 있는 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자이고, 상기 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자에는 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)이 결합되어 있으며, 약물이 로딩된 것을 특징으로 하는 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노입자를 제공한다.

[0016] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금 나노 점은 폴리에틸렌이민과 정전기적으로 결합되어 있으며, 상기 폴리에틸렌이민이 실리카 나노 입자에 수소 결합되어 있다.

[0017] 삭제

[0018] 예시적인 일 구현예에서, 상기 히알루론산은 EDC-NHS 커플링을 통해 도파민(DA)에 접합되고, 히알루론산(HA)이 접합된 도파민(DA)은 정전기적 상호 작용을 통해 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자에 결합되어 있다.

[0019] 예시적인 일 구현예에서, 상기 약물은 독소루비신을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는 또한, 상기 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자의 제조 방법으로서, 실리카 전구체 용액으로부터 실리카 나노 입자를 합성하고, 폴리에틸렌이민 및 금 전구체를 제공하여 실리카 나노 입자를 에칭하여, 실리카 나노 입자에 중공 및/또는 다공성 몰폴로지를 형성하면서 금 나노 점이 중공 실리카 입자에 결합되도록 하며, 계면활성제를 사용하지 않는, 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자 제조 방법을 제공한다.

[0021] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 실리카 전구체 용액으로부터 실리카 나노 입자를 합성하는 단계; 및 상기 실리카 나노 입자 함유 용액에 폴리에틸렌이민 및 금 전구체를 제공하여 금 나노 점 및 폴리에틸렌이민을 실리카 나노 입자에 결합시키면서 실리카 나노 입자를 에칭하는 단계;를 포함한다.

[0022] 예시적인 일 구현예에서, 상기 실리카 나노 입자 함유 용액에 폴리에틸렌이민 및 금 전구체를 제공한 후 pH를 조절하여 금 나노 점을 함유하는 폴리에틸렌이민(entanglement)을 유도한 후 금 나노 점 및 폴리에틸렌이민을 실리카 나노 입자에 결합시키면서 실리카 나노 입자를 에칭한다.

[0023] 예시적인 일 구현예에서, 상기 pH는 염기성 조건이고, 예컨대 9~12이다.

[0024] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자를 제조한 후, 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)을 제공하여 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자에 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)을 결합시키는 단계;를 포함한다.

[0025] 예시적인 일 구현예에서, 상기 도파민(DA) 및 히알루론산(HA) 제공 전 또는 제공 후 약물을 로딩할 수 있다.

[0026] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 상기 금 나노 점이 함유된 중공 실리카 나노 입자에 독소루비신을 로딩하는 단계; 및 상기 독소루비신 로딩 후, 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)을 제공하여 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자에 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)을 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 예시적인 구현예들의 제조 방법에 의하면, 중공 실리카 나노 입자의 몰폴로지 콘트롤과 금 나노 점의 형성을 하나의 단계로 인 시츄로 진행할 수 있어서 제조 과정이 용이하다. 또한, CTAB와 같은 계면 활성제의 사용이 없기 때문에 계면 활성제를 제조하는 번거로움이 없고, 불가피하게 잔류하는 계면 활성제로 인한 세포 독성이 없다.

[0028] 또한, 도파민 및 히알루론산 결합에 의하여 광열 효과를 향상시킬 수 있고, 세포 독성을 낮추고 생체 적합성을 증가시킬 수 있으며, 의도하지 않은 약물 방출을 방지할 수 있다. 특히 도파민 코팅에 의하여 pH 감응성과 기존 금 나노 구조체로는 부족한 광열 효과를 증폭할 수 있고, 히알루론산에 의하여 생체 적합성 및 종양 표적능을 부여하고 병용 치료 효과를 높일 수 있다. 따라서, 본 발명의 예시적인 구현예들에 따른 나노 캐리어는 표적 화학-광열 치료가 가능한 약물 전달 체계로 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 예시적인 일 구현예에서, 종양 표적 치료 및 화학-광열 치료가 가능한 금 나노 점이 함유된 중공 실리카 나노 입자를 제조하는 과정을 나타내는 개략도이다.

도 2는 본 발명 실시예에서 제조된 나노 입자의 TEM 이미지 및 원소 분석 결과이다. 구체적으로, 도 2a는 SiO_2, 도 2b는 HSN, 도 2c는 Au-HSN, 도 2d는 Au-HSN/DA-HA의 각 TEM 이미지이고, 도 2e는 Au-HSN/DA-HA의 원소 분석 결과이다.

도 3은 본 발명 실시예에서, SiO_2, Au-HSN, Au-HSN/DA-HA의 분석 결과로서, 푸리에변환 적외선 분광법에 의한 분석(도 3a), 자외선-가시광선 분광법에 의한 분석 결과 (도 3b), 합성된 나노입자의 탈이온수에서의 제타전위 분석 결과(도 3c)이다.

도 4는 본 발명 실시예에서, 광열효과 평가 결과로서, 농도에 따른 광열효과 평가 결과(도 4a), 에너지에 따른 광열효과 평가 결과(도 4b), 각 샘플 별 광열효과 평가 결과(도 4c), 근적외선(NIR) 인가 유무에 따른 나노입자의 광열효과의 재현성 분석 결과(도 4d)이다.

도 5는 본 발명 실시예에서, pH 감응성 약물 방출 평가로서, 정상 세포 내의 환경(도 5a pH 7.4) 및 암 세포내의 환경(도 5b pH 5.0)에 대한 평가 결과이다.

도 6은 본 발명 실시예에서, 다양한 농도에 따른 Au-HSN/DA-HA 의 세포 독성 평가 결과이다.

도 7은 본 발명 실시예에서, LCSM을 이용한 세포이입율 평가결과로서, 섬유아세포 NIH3T3 경우(도 7a) 및 자궁경부암의 HeLa 세포 경우(도 7b) 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 용어 정의

[0032] 본 명세서에서 나노란 100nm 이하를 의미한다.

[0033] 본 명세서에서 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자를 하나의 단계 또는 인 시츄로 합성한다는 것은, 실리카 나노 입자의 중공 및 몰폴로지 콘트롤과 금 나노 점의 형성이 하나의 제조 과정에서 이루어지는 것을 의미한다.

[0035] 예시적인 구현예들의 설명

[0036] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들을 상세히 설명한다.

[0037] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는 화학 및 광열 치료의 병용 치료를 위하여, 도파민-히알루론산 (DA-HA) 표면 코팅되고 약물이 로딩된 금 나노 점 함유 중공 실리카 나노 입자 (Au-HSN)을 제조하였다.

[0038] 구체적으로, 상기 화학 및 광열 치료를 위한 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자의 제조 방법은, 실

리카 전구체 용액으로부터 실리카 나노 입자를 합성 하고, 폴리에틸렌이민 및 금 전구체를 제공하여 실리카 나노 입자를 에칭하여 중공 실리카 나노 입자를 형성하면서 이에 금 나노 점이 결합되도록 한다.

[0039] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 실리카 전구체 용액으로부터 실리카 나노 입자를 합성하는 단계; 상기 실리카 나노 입자 함유 용액에 폴리에틸렌이민 및 금 전구체를 제공하고 금 나노 점 및 폴리에틸렌이민을 실리카 나노 입자에 결합시키면서 실리카 나노 입자를 에칭하는 단계;를 포함한다.

[0040] 도 1은 본 발명의 예시적인 일 구현예에서, 종양 표적 치료 및 화학-광열 치료가 가능한 금 나노 점이 함유된 중공 실리카 나노 입자를 제조하는 과정을 나타내는 개략도이다.

[0041] 도 1에 도시된 바와 같이, SiO_2 표면은 Au 전구체와 결합된 PEI(PEI@Au)로 천천히 에칭된다. Au에 정전기적으로 결합된 PEI는 실리카 나노 입자에 수소 결합된다.

[0042] 비제한적인 예시에서, 실리카 나노입자는 전구체인 예컨대 TEOS(Tetraethyl orthosilicate)와 NH_4OH를 반응시켜 형성할 수 있다.

[0043] 예시적인 일 구현예에서, pH를 조절하여 금 나노 점을 함유하는 폴리에틸렌이민 얽힘(entanglement)을 유도한 후, 금 나노 점 및 폴리에틸렌이민을 실리카 나노 입자에 결합시키면서 실리카 나노 입자를 에칭하여 중공 다공성 몰폴로지를 형성할 수 있다.

[0044] 비제한적인 예시에서, pH는 염기성 조건 예컨대 9~12로 조절하면 상기 폴리에틸렌이민 얽힘을 유도할 수 있다.

[0045] 비제한적인 예시에서, 실리카 나노 입자 형성 후, 금 전구체인 예컨대 $HAuCl_4$와 PEI를 첨가하여 초음파 처리한 뒤, 예컨대 NaOH 수용액을 적가하여 초음파 처리한다. 이때 NaOH 등의 염기는 pH를 전술한 바와 같이 염기성 조건으로 변화시킴으로써 Au를 함유하는 폴리에틸렌이민(PEI) 얽힘(entanglement)를 일으키고, 이와 같이 얽혀있는(entanglemented) PEI @ Au가 실리카에 결합되며 실리카가 에칭되면서 중공 몰폴로지를 형성하게 된다.

[0046] 기존에는 큰 계층적 공극(hierarchical pores)을 가진 나노 입자를 합성한 다음 금 나노 입자를 로딩하는 두 가지 단계를 거쳐야 하였지만, 본 발명의 예시적인 구현예들의 제조 방법에서는, 전술한 바와 같이, 하나의 단계로 인시츄 방식으로 실리카 입자의 몰폴로지를 콘트롤하면서 나노 점이 중공 실리카 나노 입자의 내부와 표면에 분포되도록 할 수 있다. 또한, 이와 같이 간단하고 용이한 단일 단계 합성에 의하여 합성되면서도 금 나노 점들이 중공 실리카 나노 입자에 잘 분산되게 된다. 금 나노 점이 중공 실리카 나노 입자 표면에 잘 분산되어 분포한다는 측면에서 금 나노 점이 중공 실리카 나노 입자를 감싸는 또는 캡슐화하는(encapsulation) 것으로 표현할 수도 있다.

[0047] 예시적인 일 구현예에서, 상기 중공 실리카 나노 입자는 메조 다공성(mesoporous)을 가질 수 있다.

[0048] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자를 제조한 후, 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)을 제공하여 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자에 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)을 결합시킨다.

[0049] 히알루론산은 EDC-NHS 커플링(EDC-NHS coupling)을 사용하여 도파민에 접합할 수 있다. 참고로, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)는 N-hydroxysuccinimide (NHS) 또는 술포-NHS와 결합하여 고정화 등에 이용되는 커플링 반응이다.

[0050] 이 후, DA-HA는 정전기적 상호 작용(electrostatic interaction)으로 금 나노 입자를 함유하는 중공 실리카 나노 입자에 결합된다.

[0051] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금 나노 입자를 함유하는 중공 실리카 나노 입자를 제조한 후, 약물을 로딩하고, 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)을 제공하여 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자 표면에 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)을 결합시킬 수 있다.

[0052] 비제한적인 예시에서, 상기 로딩되는 약물은 예컨대 독소루비신일 수 있다.

[0053] 예시적인 일 구현예에서, 상기 도파민(DA) 및 히알루론산(HA)이 결합된 금 나노 점이 함유된 중공 실리카 나노 입자에 추가적으로 표적화 약물을 로딩할 수 있다. 이러한 표적화 약물은 금 나노 점이 함유된 중공 실리카 나노 입자에 그래프트 결합될 수 있다.

[0054] 비제한적인 예시에서, 상기 표적화 약물은 엽산(foate)이나 트랜스페린(transferrin), 각종 펩타이드 등의 표적

화 리간드일 수 있다. 예컨대, 표적화 리간드는 인테그린 수용체에 결합하는 RGD (arginine-glycine-asparatic acid) 펩타이드일 수 있다. 특히, RGD로서 선형 RGD보다 선택성과 안정성이 높은 cyclic RGD(cRGD)를 사용할 수 있다.

[0056] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들에 따른 구체적인 실시예를 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며 첨부된 특허청구범위 내에서 다양한 형태의 실시예들이 구현될 수 있고, 단지 하기 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 함과 동시에 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 실시를 용이하게 하고자 하는 것임이 이해될 것이다.

[0058] **[실시예]**

[0059] **<제조 방법>**

[0060] **재료**

[0061] 테트라에틸오소실리케이트(Tetraethyl orthosilicate; TEOS), 폴리에틸렌이민[poly(ethylenimine) (PEI), Mw = 25kDa], 에틸알코올(ethyl alcohol), 암모늄 하이드록사이드 용액(Ammonium hydroxide solution)(NH_4OH), 수산화나트륨(NaOH), 디메틸 술폭사이드(DMSO), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)] 카르보디이미드(carbodiimide, EDC), N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS), 염화 금 삼수화물[gold chloride trihydrate ($HAuCl_4$) 99.99%], 도파민 하이드로클로라이드(dopamine hydrochloride), 및 독소루비신 하이드로클로라이드(doxorubicin hydrochloride, DOX)를 시그마-알드리치 사(St. Louis, MO)에서 구입하였다.

[0062] 염산 (Hydrochloric acid, 35%)는 대정화학(DAEJUNG, KOREA)에서 입수하였고, 히알루론산 나트륨(Sodium hyaluronate, Mw:51 kDa)은 라이프코어 바이오메디칼 사(Lifecore Biomedical LLC, MN, USA)에서 입수하였다.

[0063] 둘베코스 변형된 이글 배지(Dulbecco's modified eagle's medium, 이하 DMEM), 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린스트렙토마이신(penicillinstreptomycin), 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS), 팔로이딘(phalloidin) 488, 4',6-디아미디노-2-페닐린돌 (DAPI), 및 칼세인 (calcein) AM은 서모 피셔 사이언티픽 사(Thermo Fisher Scientific Inc. USA)로부터 구입했다.

[0064] 트리스-(하이드록시메틸)아미노메탄 버퍼[Tris-(hydroxymethyl)aminomethane buffer]는 Alfa Aesar (MA, USA)에서 입수하였다. 모든 화합들은 추가적인 정제 없이 사용하였다.

[0066] **금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자(Au-HSN)의 용이한 합성**

[0067] 금 나노 점을 함유하는 중공 실리카 나노 입자(Au nano-dot decorated hollow silica nanoparticle; Au-HSN 또는 Au-HSN@Au)를 합성하였다.

[0068] 먼저 0.8 mL의 TEOS(Tetraethyl orthosilicate)를 0.2 mL 수산화 암모늄(NH_4OH) 용액을 포함하는 2 mL의 탈 이온수 및 8 mL 에탄올에 용해하였다. 이 혼합물을 실온에서 6 시간 교반하여 실리카(SiO_2) 나노 입자를 형성하였다.

[0069] $HAuCl_4$ (1mg) 및 PEI (Mw = 25kDa, 1mg / 1mL)를 준비한 다음, SiO_2 용액 (Si / Au-PEI = 1 : 2)에 적하하였다. 그 후, 0.3M NaOH 용액을 반응 혼합물에 천천히 넣고, 3 시간 동안 초음파 처리하였다. 얻어진 백색 생성물을 원심 분리, 탈 이온수로 여러 번 세척하여 정제하였고, 최종 생성물을 실온에서 건조시킴으로써, 금 나노 점이 함유된 중공(hollow) 실리카 나노입자(Au-HSN)를 수득하였다.

[0071] **암 치료 약물이 로딩되고 도파민(DA)-히알루론산(HA)이 코팅된 Au-HSN 제조**

[0072] 독소루비신(DOX)을 로딩한 실시예의 경우에는, Au-HSN (10mg)을 독소루비신 용액 (DW 중 0.2 mg / mL)에 분산시키고 24시간 동안 어두운 곳에서 교반시켰다. 이 혼합물을 원심 분리하고 PBS로 3 회 세정하여 흡착된 독소루비신을 제거하여 Au-HSN/DOX를 제조하였다. 독소루비신을 로딩하지 않는 경우에는 이 과정을 생략한다.

[0073] 그 후 40mg의 도파민(DA)과, 히알루론산(HA)[DA-HA mixture (중량비 1:1)]을 물에 분산한뒤, 10mM EDC, 0.4mM NHS를 첨가하여, 격렬히 반응하여 Au-HSN의 표면을 코팅해준 뒤 cellulose membrane을 통해 3일간 투석하여, 정제한 뒤 동결-건조하였다.

[0075] **<특성 평가>**

[0076] SiO_2, Au-HSN, Au-HSN/DA-HA의 형성을 평가하기 위해 FETEM(Field-Emission Transmission Electron Microscope, 200Kv)을 이용하였다.

[0077] 도 2는 본 발명 실시예에서 제조된 나노 입자의 TEM 이미지 및 원소 분석 결과이다. 구체적으로, 도 2a는 SiO_2, 도 2b는 HSN, 도 2c는 Au-HSN, 도 2d는 Au-HSN/DA-HA의 각 TEM 이미지이고, 도 2e는 Au-HSN/DA-HA의 원소 분석 결과이다.

[0078] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 검은색 원형구를 통해 SiO_2가 형성됨을 확인하였으며(도 2a), Au-HSN, Au-HSN/DA-HA의 표면의 동공이 형성되어 PEI의 얽힘으로 SiO2의 에칭을 확인하였다(도 2b 내지 2d). 또한, 도 2e에 도시된 바와 같이, C, O, Si 및 Au의 원소가 확인되었다. 아울러, SiO_2, Au-HSN, Au-HSN/DA-HA의 평균 사이즈는 각각 110 ± 5.1 nm, 105 ± 5.6 nm, 130 ± 5.2 nm로 측정되었으며, Au-HSN/DA-HA가 다른 입자보다 큰 것을 확인하여 DA-HA의 코팅되었음을 확인하였다(도 2a 내지 2d).

[0079] 한편, UV-VIS 분광광도법, 푸리에변환 분광광도법(FT-IR), 그리고 제타전위 측정을 통해 나노입자의 형성되었음 확인하였다.

[0080] 도 3은 본 발명 실시예에서, SiO_2, Au-HSN, Au-HSN/DA-HA의 분석 결과로서, 푸리에변환 적외선 분광법에 의한 분석(도 3a), 자외선-가시광선 분광법에 의한 분석 결과 (도 3b), 합성된 나노입자의 탈이온수에서의 제타전위 분석 결과(도 3c)이다.

[0081] 도 3으로부터 알 수 있듯이, Au-HSN이 550nm에서 흡수를 보이면서 금나노구조체가 HSN 안에서 형성된 것을 확인하였다. 하지만 Au-HSN/DA-HA에서 550nm 파장대의 빛이 코팅으로 인해 감소하며 280nm에서 흡수 피크를 보였다.

[0082] DA와 HA 코팅을 확인하기 위해 FT-IR 분광법으로 확인하였다. Au-HSN의 스펙트럼에서 Si-O-Si, Si-O 진동을 785cm-1과 1058cm-1에서 확인하며, Si-OH와 PEI의 반응을 통해 Si-O-Si 결합이 형성되어서 Si-OH 흡수 피크가 감소하였다.

[0083] Au-HSN/DA-HA의 스펙트럼에서 도파민의 catechol-OH의 방향족 링의 진동으로 1614cm-1 및 3400cm-1, 히얄루론산의 NH와 OH 신축으로 1410과 1654cm-1가 보일 것이다.

[0084] 제타 전위는 SiO_2, Au-HSN, Au-HSN/DA-HA가 -45mV, +36mV 그리고 -4.9mV 측정되었다. SiO_2는 OH기로 인해, 강하게 음으로 하전되어 있다. Au-HSN은 PEI로 인해 음전하에 강하게 양으로 하전시켰다. Au-HSN/DA-HA의 HSN에 도파민과 히얄루론산의 코팅으로 인해 약하게 음으로 하전되어 있다.

[0085] 한편, 나노 입자의 광열 치료 (PTT) 효과는 808nm 레이저에서 15 분간 검사하였다.

[0086] 도 4는 본 발명 실시예에서, 광열효과 평가 결과로서, 농도에 따른 광열효과 평가 결과(도 4a), 에너지에 따른 광열효과 평가 결과(도 4b), 각 샘플 별 광열효과 평가 결과(도 4c), 근적외선(NIR) 인가 유무에 따른 나노입자의 광열효과의 재현성 분석 결과(도 4d)이다.

[0087] 도 4a에서는 다양한 농도에서의 온도 상승을 측정하여 광열 치료에 필요한 조건을 설정하였다. 광열 효과를 분석한 결과, 각 농도(10, 20, 30, 40 ㎍ / mL)에 따라 온도는 42, 49, 52, 55 ℃까지 올라감을 확인하였고(도 4a), 광열 치료에 적용하기 위하여, 적합한 농도로서 20㎍ / mL의 농도가 선택되었다.

[0088] 도 4b에서, 808 nm NIR 레이저의 다양한 전력 밀도(power density) 하에서 Au-HSAN /PDA-HA의 온도 증가를 분석하였다. 온도는 조사(irradiation) 전력 밀도에 따라 증가했다. 2.5W/cm^2로 조사한 경우 10 분 안에 49 ℃로 상승한 반면 1.5W/cm^2조사한 경우는 33 ℃로 상승하였다. 2.5W/cm^2의 전력 밀도에서는 NIR을 흡수하여 종양 세포를 죽이는 데 적합했다.

[0089] 또한, 대조군인 DMEM (Dulbecco’s modified eagle’s medium, 이하 DMEM), Au-HSAN, HSN-DA, Au-HSAN/DA-HA의 광열 효과를 분석한 결과, Au-HSAN/DA-HA가 제일 두드러진 효과를 보였다(도 4c). 이는 DA-HA 코팅이 Au-HSAN의 광열 효과를 향상시켰음을 증명한다.

[0090] 도 4d에 도시 된 바와 같이, Au-HSAN / DA-HA 용액에 NIR 레이저를 5 회 온/오프하며 온도 변화를 반복적으로 모니터링하였고, 그 결과 경향성이 있게 온도가 상승함을 확인하였다.

[0091] Au-HSN/DA-HA는 광열효과 증폭뿐 아니라 pH 감응성 물질로 약물방출을 제어할 수 있다.

[0092] 도 5는 본 발명 실시예에서, pH 감응성 약물 방출 평가로서, 정상 세포 내의 환경(pH 7.4) 및 암 세포내의 환경(pH 5.0)에 대한 평가 결과이다.

[0093] 독소루비신(DOX)이 담지된 Au-HSN/DA-HA를 PBS(pH 7.4, pH 5.0)에 분산시켜 정상세포의 환경과 암세포의 환경을 조성한 뒤 DOX 방출량을 정량분석하였다. pH 7.4의 환경에서 72 시간 동안 방출을 평가한 결과, DOX가 Au-HSN으로부터 50.6% 방출된 반면, Au-HSN/DA-HA는 29.1% 방출된 것을 확인했다.

[0094] 반면 pH 5.0에서는 DOX 담지된 Au-HSN/DA-HA에서 86.8% 방출된 것을 확인하였으나, DOX 담지된 Au-HSN의 경우 60% 방출된 것을 확인하였다. 이는 PEI의 양성자화된 아민기가 산성환경에서 DOX방출을 가속하기 때문이다. 이와 같이 암 치료 약물이 로딩된 Au-HSN/DA-HA는 향상된 광열효과와 pH 감응성 약물 방출와 같이 암치료에 유용할 것이다.

[0095] 도 6은 본 발명 실시예에서, 다양한 농도에 따른 Au-HSN/DA-HA 의 세포 독성 평가 결과이다. NIH3T3은 히알루론산(HA) 수용체(receptor) negative cell이고, Hela 세포는 히알루론산(HA) 수용체(receptor) positive cell이다.

[0096] 도 6에 도시된 바와 같이, Hela와 NIH3T3 세포를 MTT assay를 통해 항암약물이 없이 Au-HSN/DA-HA의 독성을 평가하였다. 두 가지 세포에 다양한 농도의 Au-HSN/DA-HA를 처리한 뒤 2시간동안 배양하여, Microplate reader를 이용하여 595nm에서 분석하였다.

[0097] 100ug/mL의 Au-HSN/DA-HA 처리한 Hela와 NIH3T3 세포에서 80%이상의 낮은 세포독성을 통해 보였다. DA와 HA는 잘 알려진 생체적합성 고분자으로, 독성을 낮출수 있다.

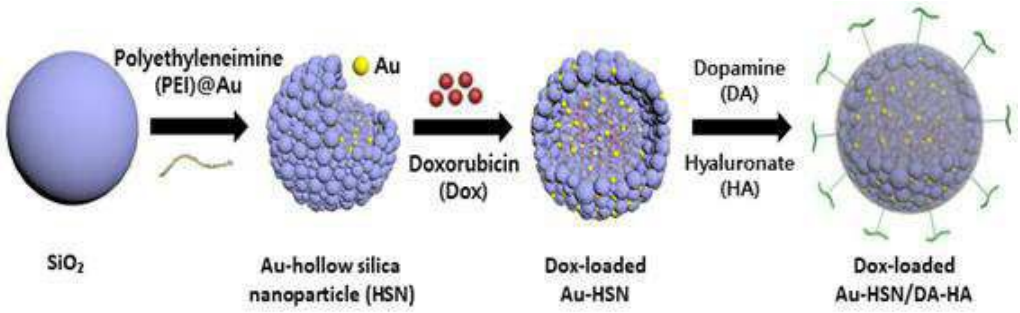
[0098] 한편, 두 가지 세포의 선택적 endocytosis를 확인하기 위해 다양한 형광 dye로 핵과 세포질을 염색한 뒤 공초점 레이저 현미경을 형광이미지를 획득하였다.

[0099] 도 7은 본 발명 실시예에서, LCSM을 이용한 세포이입율 평가결과로서, 섬유아세포 NIH3T3 경우(도 7a) 및 자궁경부암의 HeLa 세포 경우(도 7b) 이다.

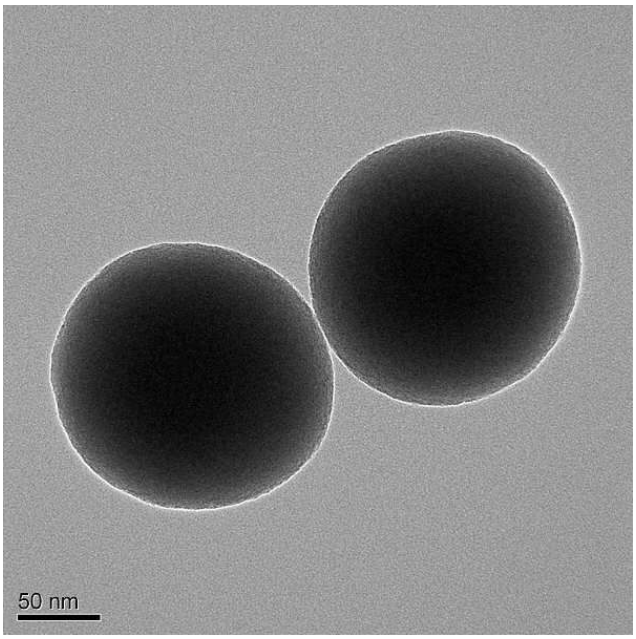
[0100] Au-HSN/DA-HA는 HA-receptor positive cell인 Hela와 negative cell인 NIH3T3를 이용하여 평가하였다. 그 결과 Au-HSN/DA-HA를 처리한 Hela 세포는 적색형광을 띄는 것을 확인하였다. 그 반면 DOX만 처리한 두 가지 세포에서 강한 적색형광을 띄는 것을 확인하였다. Au-HSN/DA-HA의 DOX는 천천히 방출되어 항암효과를 보이게 된다. 공초점 현미경 이미지를 통해서 Au-HSN/DA에 HA가 잘 코팅되어 HA 과발현된 암세포에 receptor mediated endocytosis에 적합함을 알 수 있다.

도면

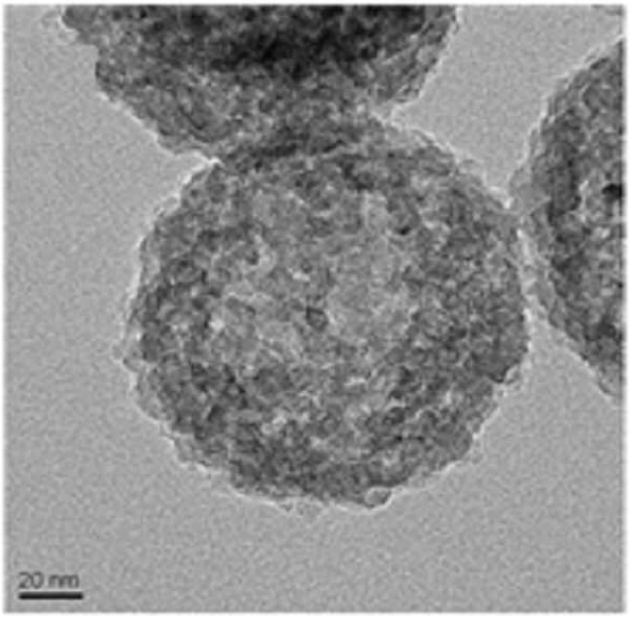
도면1



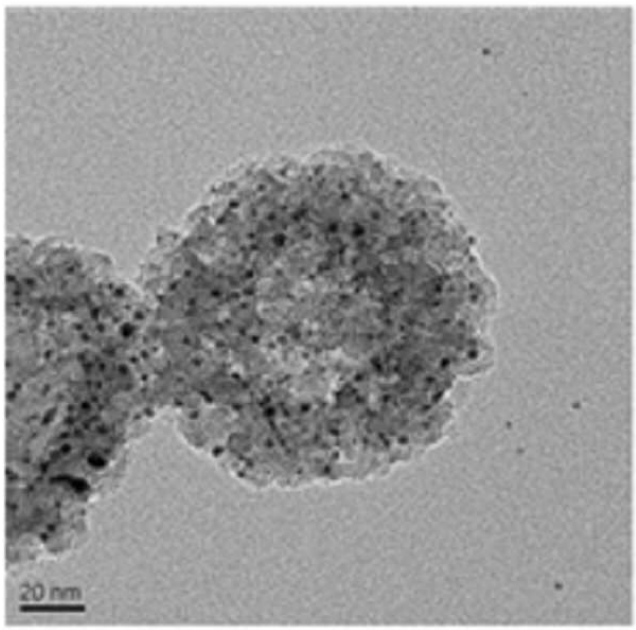
도면2a



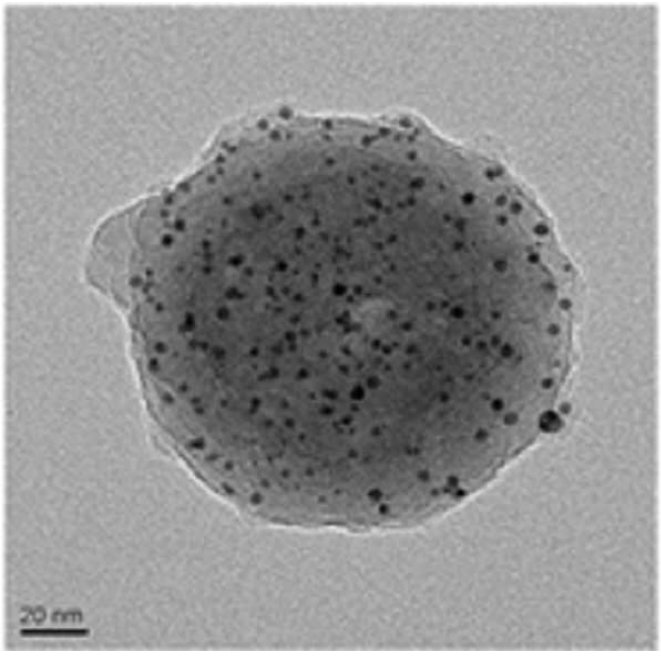
도면2b



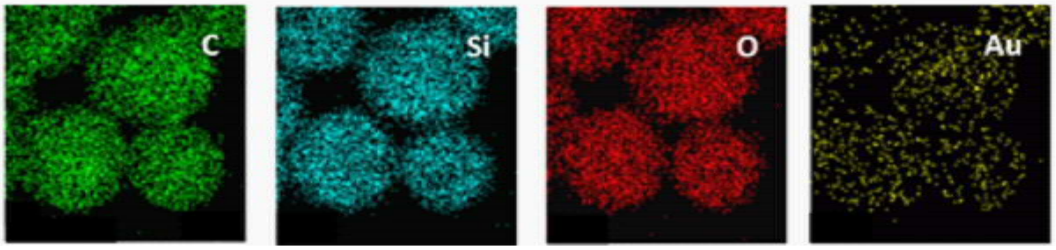
도면2c



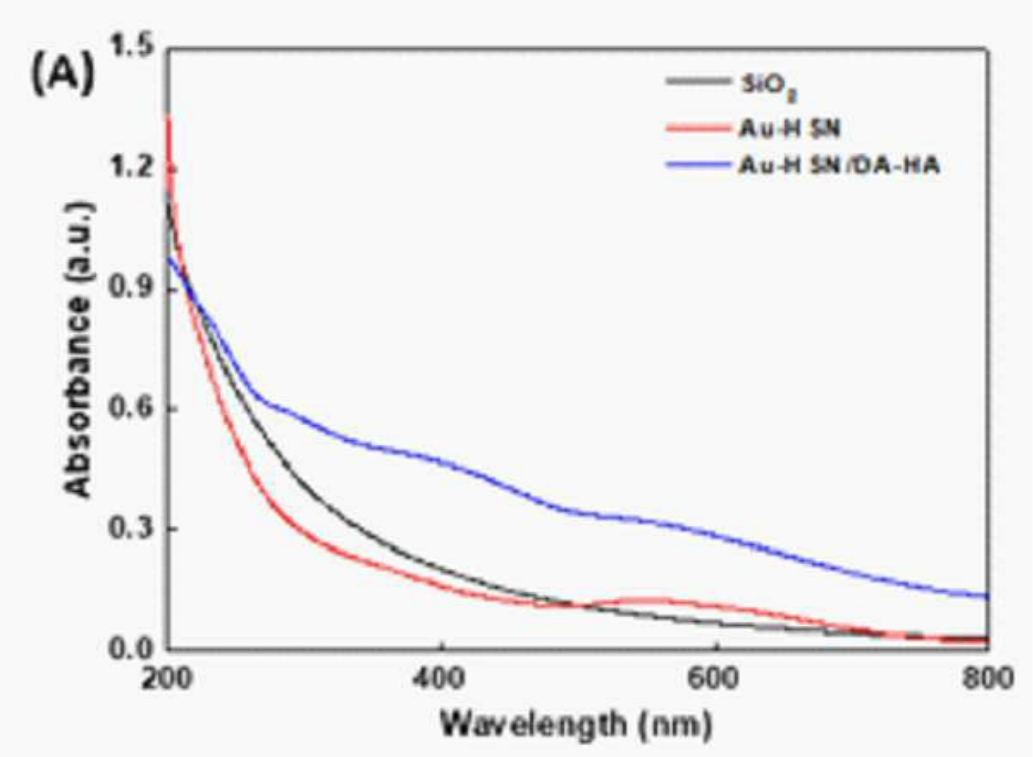
도면2d



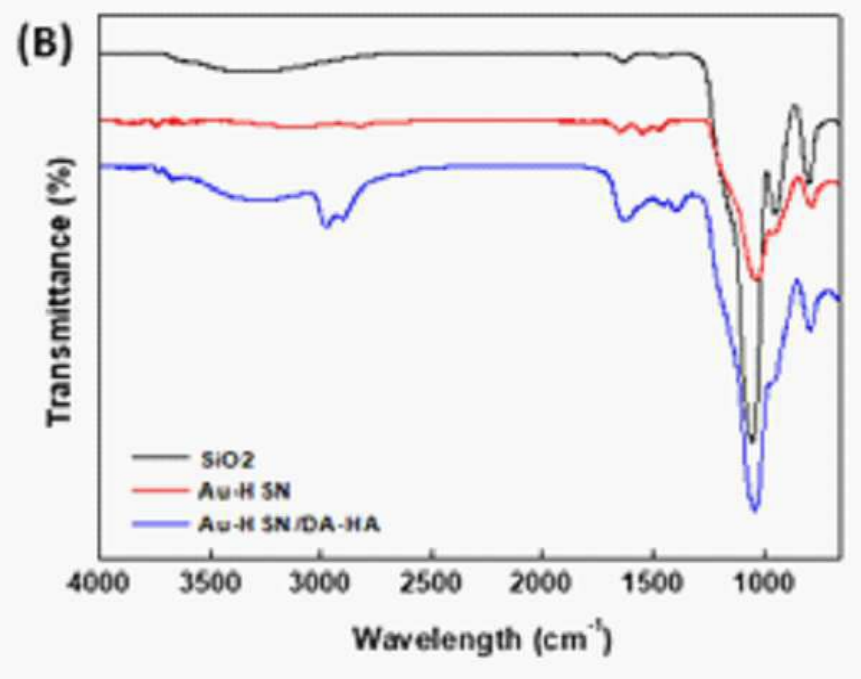
도면2e



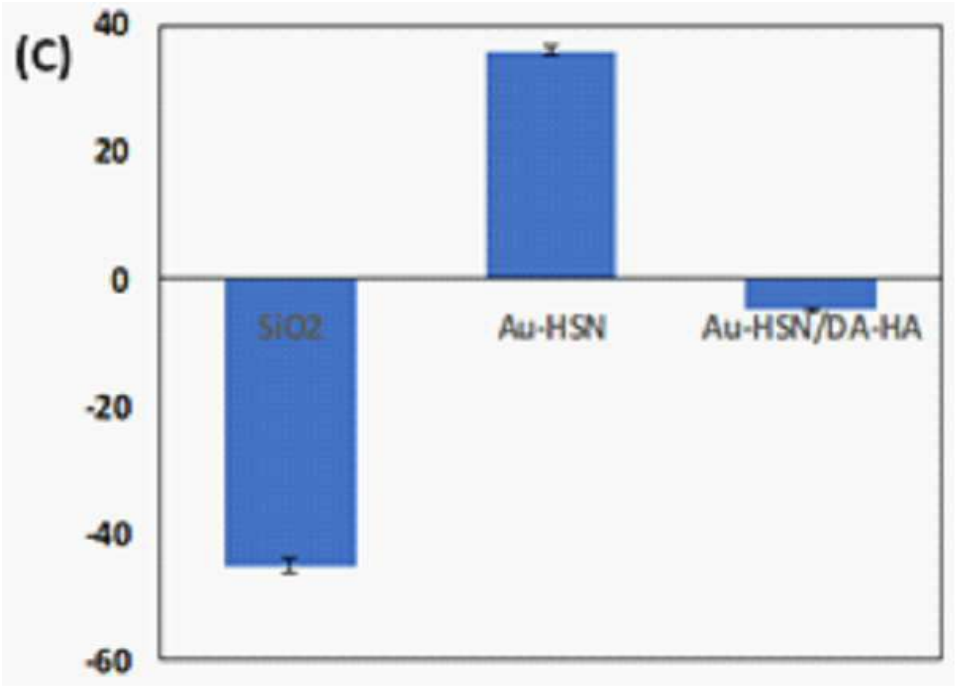
도면3a


(A)
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
Absorbance (a.u.)
200
400
600
800
Wavelength (nm)
SiO2
Au-H SN
Au-H SN/DA-HA

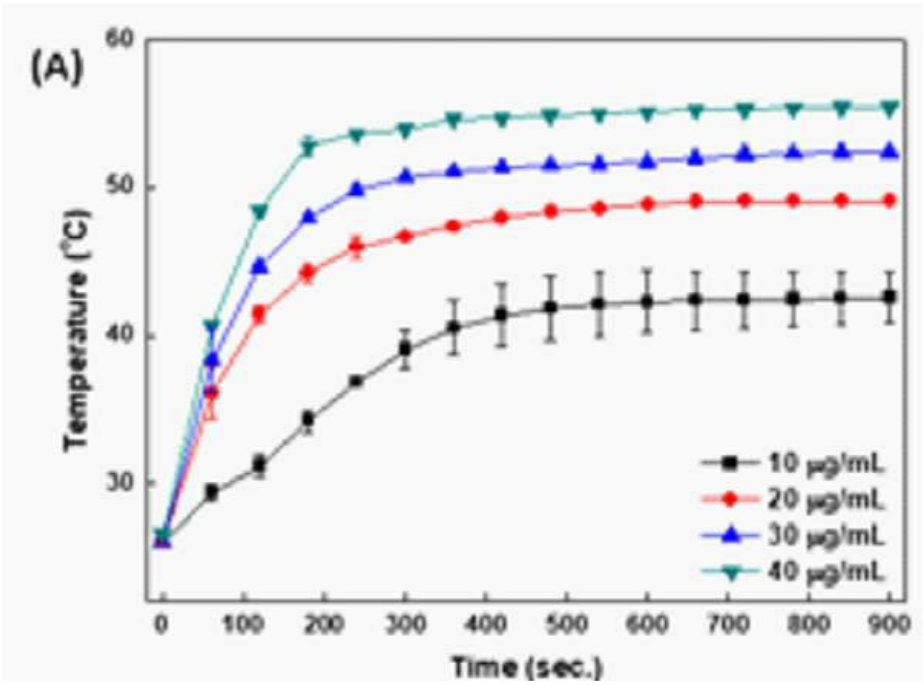
도면3b


(B)
Transmittance (%)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wavelength (cm-1)
SiO2
Au-H SN
Au-H SN/DA-HA

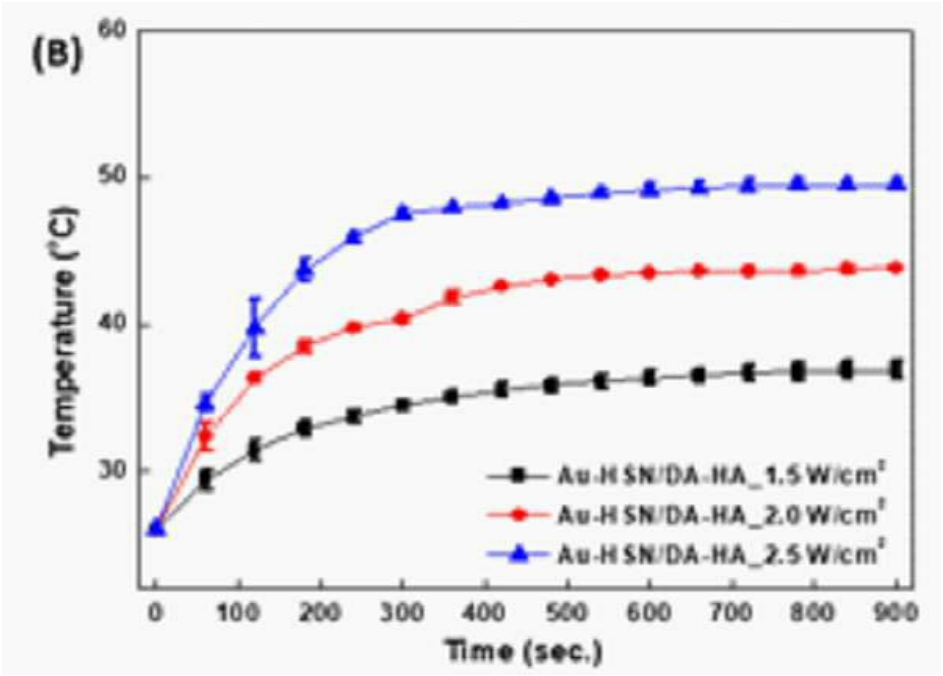
도면3c


(C)
40
20
0
-20
-40
-60
SiO2
Au-HSN
Au-HSN/DA-HA

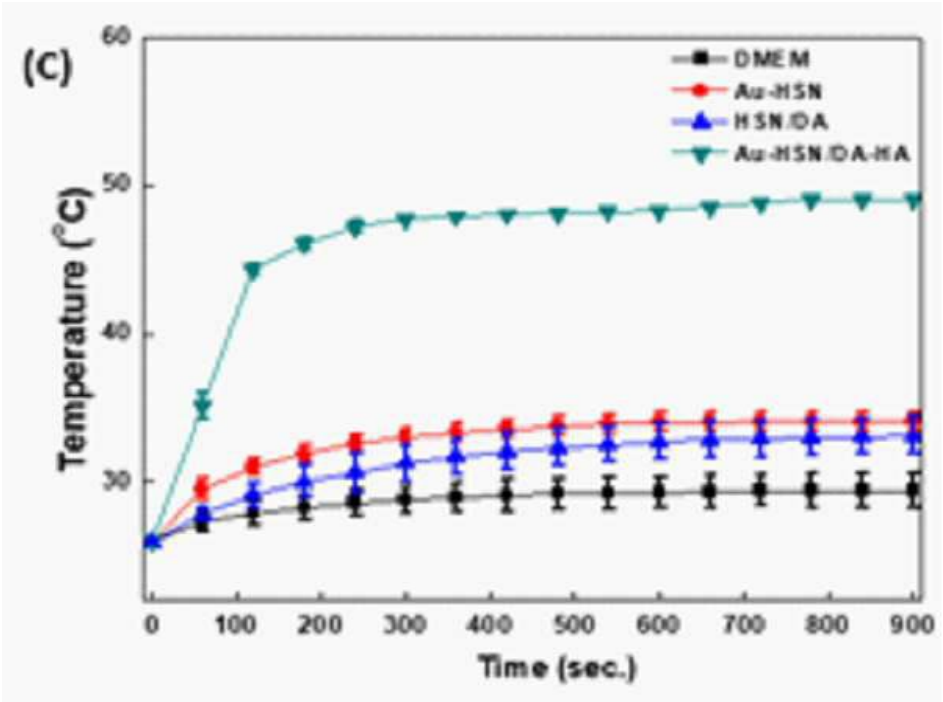
도면4a


(A)
Temperature (°C)
60
50
40
30
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
Time (sec.)
10 μg/mL
20 μg/mL
30 μg/mL
40 μg/mL

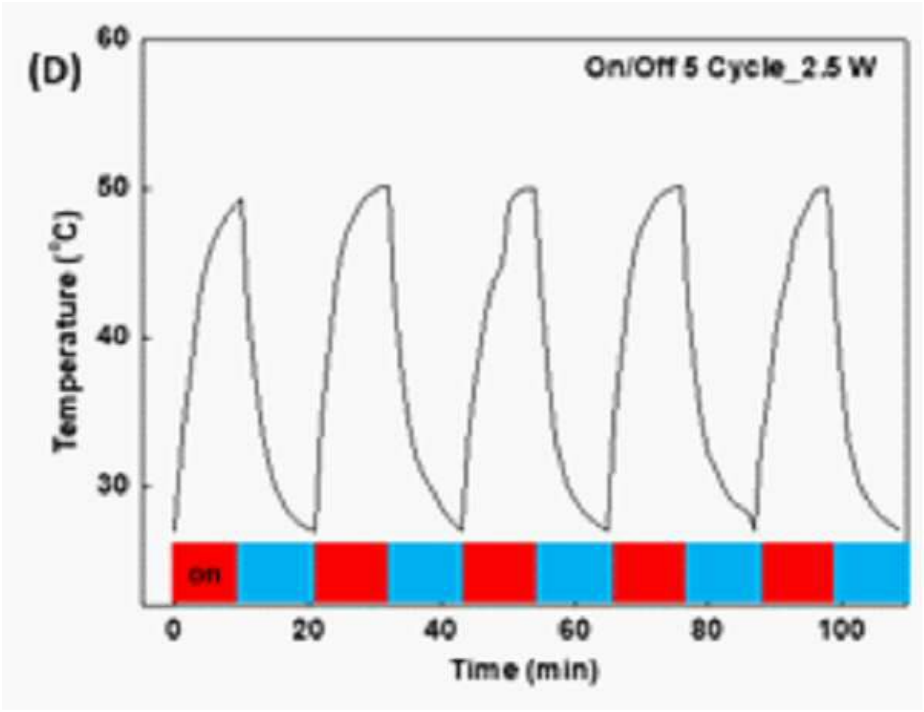
도면4b


(B)
Temperature (°C)
Time (sec.)
Au-HSN/DA-HA_1.5 W/cm²
Au-HSN/DA-HA_2.0 W/cm²
Au-HSN/DA-HA_2.5 W/cm²

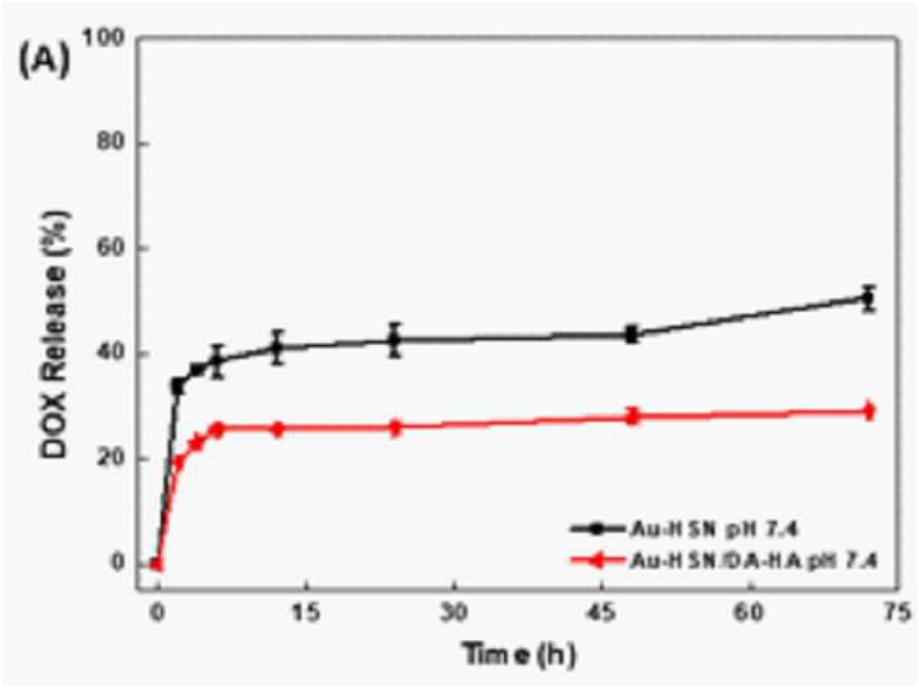
도면4c


(C)
Temperature (°C)
Time (sec.)
DMEM
Au-HSN
HSN/DA
Au-HSN/DA-HA

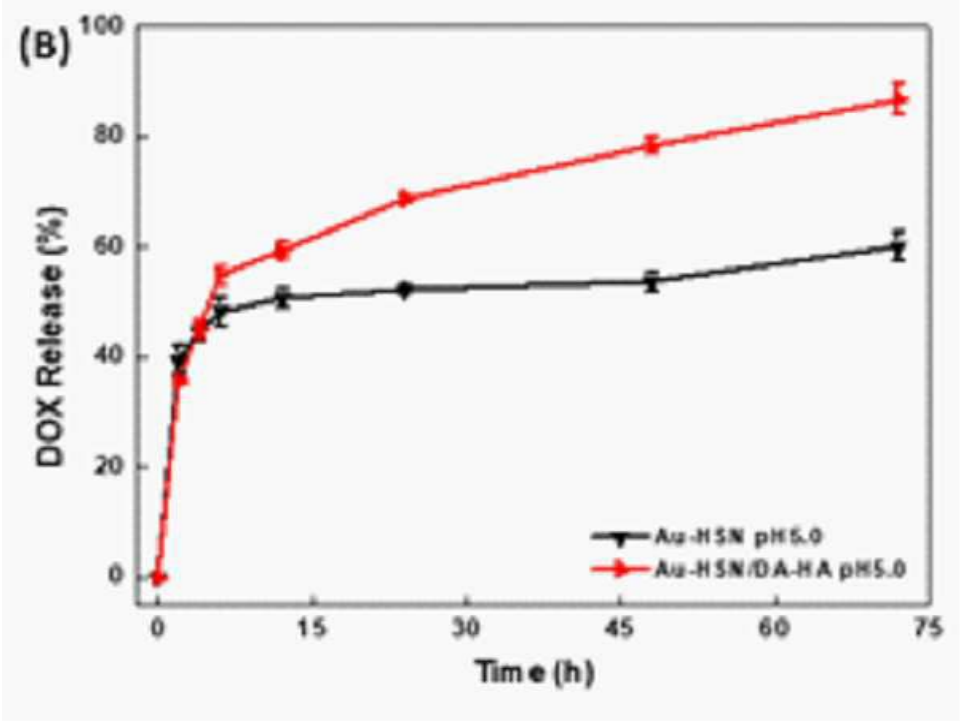
도면4d


(D)
On/Off 5 Cycle_2.5 W
Temperature (°C)
60
50
40
30
on
0
20
40
60
80
100
Time (min)

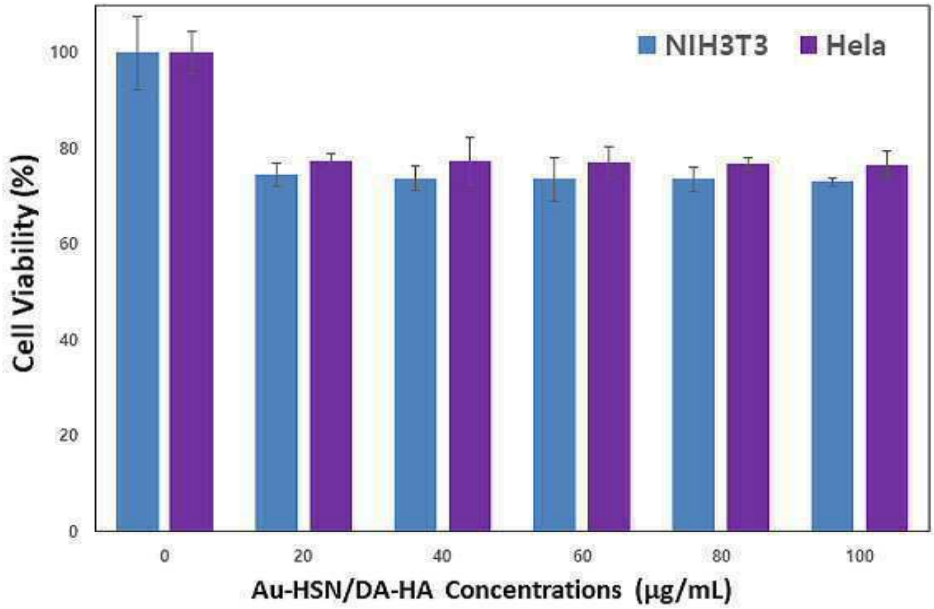
도면5a


(A)
DOX Release (%)
100
80
60
40
20
0
Au-HSN pH 7.4
Au-HSN/DA-HA pH 7.4
0
15
30
45
60
75
Time (h)

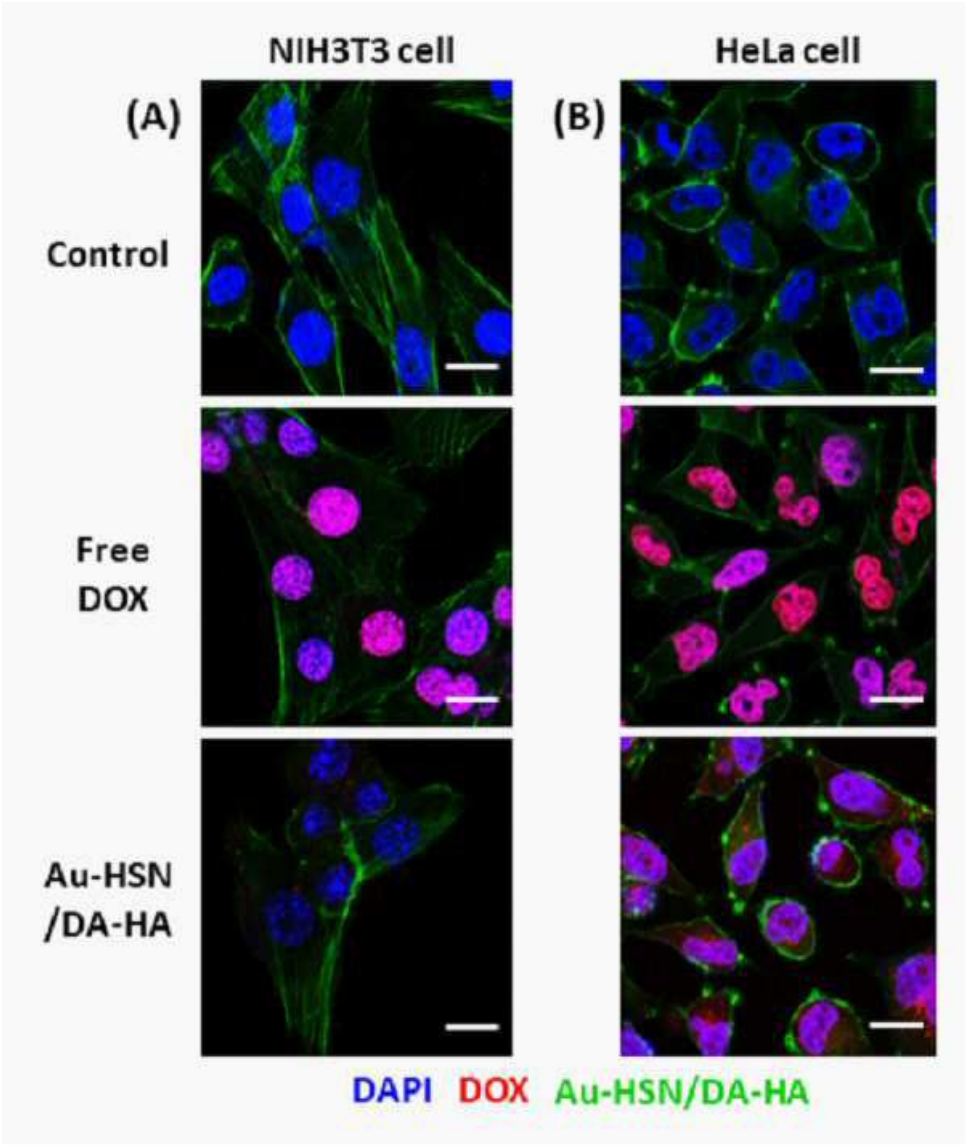
도면5b


(B)
DOX Release (%)
Time (h)
Au-HSN pH5.0
Au-HSN/DA-HA pH5.0
0
20
40
60
80
100
0
15
30
45
60
75

도면6


NIH3T3
Hela
Cell Viability (%)
Au-HSN/DA-HA Concentrations (μg/mL)
0
20
40
60
80
100

도면7


NIH3T3 cell
HeLa cell
(A)
(B)
Control
Free
DOX
Au-HSN
/DA-HA
DAPI DOX Au-HSN/DA-HA