



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월18일
(11) 등록번호 10-1604899
(24) 등록일자 2016년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

B82B 3/00 (2006.01) *A61K 47/04* (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01) *C09K 11/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0025716

(22) 출원일자 2014년03월04일

심사청구일자 2014년03월04일

(65) 공개번호 10-2015-0103971

(43) 공개일자 2015년09월14일

(56) 선행기술조사문헌

Facile preparation in synthesizing nano-size hollow silicate particles by encapsulating colloidal-hydroxyapatite nanoparticles, *J. Mater. Chem.*, 2011, Vol. 21, pp. 18205-18207.*

Hydroxyapatite Nano- and Microcrystals with Multifiform Morphologies: Controllable Synthesis and Luminescence Properties, *Crystal Growth & Design*, 2009, Vol. 9, pp. 2725-2733.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교 천안캠퍼스내(안서동)

(72) 발명자

김해원

충남 천안시 서북구 광장로 260, 106동 101호 (불당동, 불당한화꿈에그린아파트)

성, 라젠드라 쿠마르

충남 천안시 동남구 안서1길 5-5, 203호 (안서동, 선주빌딩)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 7 항

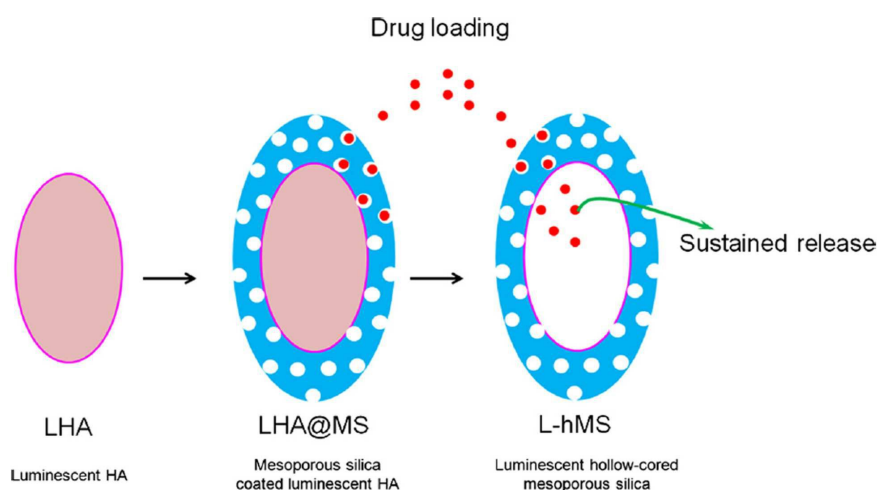
심사관 : 이정희

(54) 발명의 명칭 **속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 발광 하이드록시아파타이트 나노입자를 준비하는 단계; 실리카 전구체 테트라에틸 오르쏘규산염(TEOS)을 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자에 코팅하여 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 제조하는 단계; 상기 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트의 메조포러스 실리카 코팅 부(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



분만 남기고 내부의 하이드록시아파타이트를 용해시켜 내부 핵을 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 제조방법에 의해서 제조된 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체(L-hMS)는 항암약물 독소루비신을 효과적으로 담지 및 수주에 걸쳐서 pH-의존적 방식으로 약물의 방출을 유도할 수 있다. 또한, 본 발명의 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체는 매우 효과적으로 세포 내로 투과되었으며 이를 통해서 전달되는 독소루비신(DOX)에 의해서 종양세포 안에서 세포괴사가 효과적으로 일어났다. 또한, 자기-활성 형광 성질 및 뛰어난 생체 안정성을 갖고 있어 세포의 수리 및 질병 치료에 있어서 치료학적 및 영상학적으로 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093829

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 조직재생공학을 위한 소재-세포-인자 융합연구

기여율 1/1

주관기관 단국대학교

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

발광 하이드록시아파타이트 나노입자를 준비하는 단계;

실리카 전구체 테트라에틸 오르쏘규산염(TEOS)을 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자에 코팅하여 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 제조하는 단계; 및

상기 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 탈이온수에 분산시키고, 이에 질산 암모늄을 첨가하여 메조포러스 실리카 코팅 부분만 남기고 내부의 하이드록시아파타이트를 용해시켜 내부 핵을 제거하는 단계를 포함하며,

속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체가 내부의 CO₂⁻ 라디칼 이온에 의해서 발광하는 것을 특징으로 하는, 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자는 헥사데실트리메틸 암모늄 브로마이드 및 테트라하이드레이트 질산 칼슘의 혼합용액과 암모늄 하이드로젠 포스페이트 및 시트르산삼나트륨의 혼합용액을 혼합하여 과포화된 용액의 침전 반응에 의해서 제조되는 것을 특징으로 하는, 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자의 크기는 10 nm 내지 100 nm인 것을 특징으로 하는, 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 제조하는 단계는 헥사데실트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB)를 포함하는 암모늄 하이드록사이드 및 탈이온수를 발광 하이드록시아파타이트 용액에 추가한 후 고-압 초음파 하에서 혼합하여 혼합용액을 제조하는 단계 및 상기 제조된 혼합용액에 테트라에틸 오르쏘규산염을 추가하여 응집을 방지하기 위해서 추가적으로 초음파를 가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 테트라에틸 오르쏘규산염은 50 μl 내지 400 μl로 추가되는 것을 특징으로 하는, 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의해서 제조된 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 메조포러스 실리카 담지체는 독소루비신 약물을 전달하기 위한 용도로 사용되는 것을 특징으로 하는 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 발광 하이드록시아파타이트 나노입자를 준비하는 단계; 실리카 전구체 테트라에틸 오르쏘규산염 (TEOS)을 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자에 코팅하여 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 제조하는 단계; 상기 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트의 메조포러스 실리카 코팅 부분만 남기고 내부의 하이드록시아파타이트를 용해시켜 내부 핵을 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

나노입자는 진단 및 치료학적 적용을 위해서 사용될 수 있는 유망주로 여겨지고 있다 ([1] Cho K, Wang X, Nie SM, Chen Z, Shin MD. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. Clin Cancer Res 2008;14:1310-6. [2] Kim J, Piao YZ, Hyeon T. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. Chem Soc Rev 2009;38:372-90. [3] Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. Adv Drug Deliv Rev 2008;60:1627-37.). 무기 나노입자는 상대적으로 낮은 독성, 및 이들 성질의 미세조절 및 표면 기능화를 허용하는 잘-조절된 합성방법이 있다. 따라서, 무기 나노입자는 약물의 넓은 범위의 전달을 위한 강력한 생물학적으로 적합한 중요물질로 여겨지고 있다 ([4] Guo Y, Shi DL, Cho H, Dong ZY, Kulkarni A, Pauletti GM, et al. In vivo imaging and drug storage by quantum-dot-conjugated carbon nanotubes. Adv Funct Mater 2008;18:2489-97. [5] You J, Zhang GD, Li C. Exceptionally high payload of doxorubicin in hollow gold nanospheres for near-infrared light-triggered drug release. ACS Nano 2010;4:1033-41. [6] Tang S, Huang XQ, Chen XL, Zheng NF. Hollow mesoporous zirconia nanocapsules for drug delivery. Adv Funct Mater 2010;20:2442-7. [7] Lin MM, Kim HH, Kim H, Dobson J, Kim DK. Surface activation and targeting strategies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer-oriented diagnosis and therapy. Nanomedicine 2010;5:109-33.). 최근에는, 약물 전달 시스템은 높은 정확성 및 낮은 복용량을 갖는 더 잘 조절된 방법으로 궁극적으로는 목표 조직으로 만의 약물의 상호작용을 목표로 하는 약물 분자의 전달을 위해서 디자인되어 왔다. 특히 메조포러스(mesoporous) 실리카 나노물질은 약물 전달에 있어서 최고의 후보자로서 출현하고 있다([8] Manzanoab M, Vallet-Regi M. New developments in ordered mesoporous materials for drug delivery. J Mater Chem 2010;20:5593-604. [9] Yang P, Gaib S, Lin J. Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. Chem Soc Rev 2012;41:3679-98.). 이들은 약물의 많은 양의 섭취를 위한 큰 표면적 및 큰 부피와 같은 분명한 장점이 있으며, 그리고 구체적 형태의 약물 분자에 적용될 수 있도록 표면의 성질을 쉽게 조절할 수 있는 분명한 장점이 있다([10] Li Z, Barnes JC, Bosoy A, Stoddart JF, Zink JJ. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. Chem Soc Rev 2012;41:2590-605. [11] Ariga K, Vinu A, Yamauchi Y, Ji Q, Hill JP. Nanoarchitectonics for mesoporous materials. Bull Chem Soc Jpn 2012;85:1-32. [12] Coll C, Bernardos A, Martinez-Manez R, Sancenon F. Gated silica mesoporous supports for controlled release and signaling applications. Acc Chem Res 2013;46:339-49. [13] Tang F, Li L, Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. Adv Mater 2012;24:1504-34.). 게다가, 약물의 방출은 다공성 구조 및 표면 화학을 변경하는 것에 의해서 조절될 수

있다. 부차적인 노력은 약물 분자의 저장용량의 증가 및/또는 속주특이성 상호결합을 촉진하는 것을 목표로 하여, 기공부피의 강화 또는 기공 크기의 강화와 같은 이들의 기공 수치의 최적화를 위해서 계속적으로 이루어지고 있다([14] Chen Y, Chen HR, Zhang SJ, Chen F, Zhang LX, Zhang JM, et al. Multifunctional mesoporous nanoellipsoids for biological bimodal imaging and magnetically targeted delivery of anticancer drugs. *Adv Funct Mater* 2011;21:270-8. [15] Yang J, Lee J, Kang JY, Lee K, Suh JS, Yoon HG, et al. Hollow silica nanocontainers as drug delivery vehicles. *Langmuir* 2008;24:3417-21. [16] Li LL, Tang FQ, Liu HY, Liu TL, Hao NJ, Chen D, et al. In vivo delivery of silica nanorattle encapsulated docetaxel for liver cancer therapy with low toxicity and high efficacy. *ACS Nano* 2010;4:6874-82. [17] Singh RK, Kim TH, Kim JJ, Lee EJ, Kim J, Knowles JC, et al. Mesoporous silica tubular nanocarriers for the delivery of therapeutic molecules. *RSC Adv* 2013;3:8692-704.)

[0003]

메조포러스 실리카를 포함하는, 또 다른 나노입자의 중요한 특징은, 예를 들어, 발광, 광역학, 전기적 및 전자적 성질과 같은 다기능의 제공할 수 있는 이의 능력에 관한 것이다([18] Kim J, Lee JE, Lee J, Yu JH, Kim BC, An K, Shin CH, Park JG, et al. Magnetic fluorescent delivery vehicle using uniform mesoporous silica spheres embedded with monodisperse magnetic and semiconductor nanocrystals. *J Am Chem Soc* 2006;128:688-9. [19] Chen H, Colvin DC, Qi B, Moore T, He J, Mefford OT, et al. Magnetic and optical properties of multifunctional coreshell radioluminescence nanoparticles. *J Mater Chem* 2012;22:12802-9.). 이것은 주로 진단목표를 위해서 사용되는 치료학적 시스템 능력과 관련이 있다. 유기 염료 및 양자점(QDs)은 이들의 뛰어난 발광 성질 때문에 주로 생물학적 라벨링 및 진단을 위해서 적용되었다 ([20] Burns A, Ow H, Wiesner U. Fluorescent coreshell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology. *Chem Soc Rev* 2006;35:1028-42. [21] Bruchez MJ, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998;281:2013-5.). 그러나, 상기 유기 염료의 발광 성질은 쉽게 분해되거나 소광되고, 양자점으로부터 유발되는 Cd²⁺ 및 Pb²⁺와 같은 중금속은 심각한 세포독성이 있어, 생물학적 적용에 한계가 있다([22] Wang F, Liu X. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped up conversion nanocrystals. *Chem Soc Rev* 2009;38:976-89. [23] Bouziques C, Gacoin T, Alexandrou A. Biological applications of rare-earth based nanoparticles. *ACS Nano* 2011;5:8488-505.). 따라서, 적당한 영상 현상을 유지하면서 생물학적으로 안정한 영상을 위한 다양한 물질원을 개발하는 것이 중요한 실정이다.

[0004]

이에 본 발명자들은 영상을 목적으로 하는 발광뿐만 아니라 잘-조절된 약물 담지/방출 능력을 소유하는 진정한 다기능성의 신규한 메조포러스 실리카(MS)-기반 나노전달 시스템을 개발하고자 노력하였다. 또한, 발광 하이드록시 아파타이트 (LHA: luminescent hydroxyapatite)를 이용하고자 노력하였다. 하이드록시 아파타이트는 생물학적 물질로서 뼈 및 치아를 포함하는 단단한 조직의 일반적 구성물질이고, 따라서 생체적합성이 있다고 밝혀져 있다([24] Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, Yamaguchi S, Kusunose T, Toyonaga T, et al. Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein. *Biomaterials* 2004;25:3807-12. [25] Rauschmann MA, Wichelhaus TA, Stirnal V, Dingeldein E, Zichner L, Schnettler R, et al. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials* 2005;26:2677-84.). 특히, 상기 하이드록시 아파타이트의 결정 형태는 모체에 존재하는 결정 또는 불순물에 의존하며, 자기-활성화된 발광을 방출한다([26] Zhang C, Li C, Huang S, Hou Z, Cheng Z, Yang P, et al. Self-activated luminescent and mesoporous strontium hydroxyapatite nanorods for drug delivery. *Biomaterials* 2010;31:3374-83. [27] Green WH, Le KP, Grey J, Au TT, Sailor MJ. White phosphors from a silicate-carboxylate sol-gel precursor that lack metal activator ions. *Science* 1997;276:1826-8. [28] Jakob AM, Schmedake TA. A novel approach to monodisperse, luminescent silica spheres. *Chem Mater* 2006;18:3173-5. [29] Angelov S, Stoyanova R, Dafinova R, Kabasnov K. Luminescence and EPR studies on strontium carbonate obtained by thermal decomposition of strontium oxalate. *J Phys Chem Solids* 1986;47:409-12. [30] He Q, Shi J, Cui X, Wei C, Zhang L, Wu W, et al. Synthesis of oxygen-deficient luminescent mesoporous silicananoparticles for synchronous drug delivery and imaging. *Chem Commun* 2011;47:7947-9.). 발광 하이드록시 아파타이트는 이것의 우수한 광학 성질 및 생체 적합성 때문에 발광원으로서 유망주로 여겨진다.

[0005]

본 발명자들은 발광 하이드록시 아파타이트 상에 메조포러스 실리카 층을 코팅하여 발광 하이드록시 아파타이트-메조포러스 실리카(LHA-MS) 핵-겹질 구조를 얻었다. 발광 하이드록시 아파타이트-메조포러스 실리카(LHA-MS)의

외부 다공성 구조는 약물 담지 및 약물 방출을 조절하도록 하였다. 더 나아가서, 본 발명자들은 핵 부분의 발광 하이드록시 아파타이트 부분을 제거하여 추가적인 약물 담지 영역을 확보하는 구조(hollow-core MS (hMS))를 제조할 수 있다는 것을 확인하였다.

- [0006] 상기와 같은 구조는 다른 실리카 기반 시스템과 비교하여 약물 담지를 위한 능력을 상당히 향상시켰으며 흥미롭 게도, 속이 빈 구조(hMS)가 또한 발광 하이드록시 아파타이트의 발광 성질을 보전할 수 있다는 것을 관찰하였고, 결과적으로 신규한 발광 메조포러스 실리카 담지체(L-hMS)를 제조하였다.
- [0007] 지금까지 주형 복제 접근에 사용되는 속이 빈 메조포러스 실리카 형태에 대해서 보고된 바가 있었으나 ([31] Hu J, Chen M, Fang X, Wu L. Fabrication and application of inorganic hollow spheres. Chem Soc Rev 2011;40:5472-91. [32] Lou XWD, Archer LA, Yang Z. Hollow micro-/nanostructures: synthesis and applications. Adv Mater 2008;20:3987-4019.). 본 발명에서와 같이 발광을 띠는 속이 빈 메조포러스 실리카 형태에 대해서는 보고된 바가 없었다.
- [0008] 또한, 본 발명자들은 세포내 약물 전달 시스템에서 발광 메조포러스 실리카 담지체(L-hMS)를 적용하기 위해서 약물로서 독소루비신(DOX)을 사용하여 독소루비신의 담지능력 및 발광 메조포러스 실리카 담지체로부터의 독소 루비신의 방출 프로파일을 조사한 결과 세포내 전달 시스템의 생물학적 효과는 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 발광 하이드록시아파타이트 나노입자를 준비하는 단계; 실리카 전구체 테트라에틸 오르쏘규산 염(TEOS)을 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자에 코팅하여 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아 파타이트를 제조하는 단계; 상기 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트의 메조포러스 실리카 코팅 부분만 남기고 내부의 하이드록시아파타이트를 용해시켜 내부 핵을 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으 로 하는, 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 기재된 방법에 의해서 제조된 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 발광 하이드록시아파타이트 나노입자를 준비하는 단계; 실리카 전구체 테트라에틸 오르쏘규산염(TEOS)을 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자에 코팅하여 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 제조하는 단계; 상기 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이 트의 메조포러스 실리카 코팅 부분만 남기고 내부의 하이드록시아파타이트를 용해시켜 내부 핵을 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자를 준비하는 단계는 기존에 알려져 있는 방법에 의 해서 제조된 것을 사용할 수도 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 헥사데실트리메틸 암모늄 브로마이드 및 테 트라하이드레이트 질산 칼슘의 혼합용액과 암모늄 하이드로젠 포스페이트 및 시트르산삼나트륨의 혼합용액을 혼 합하여 과포화된 용액의 침전 반응에 의하여 발광 하이드록시아파타이트 나노입자를 준비하였다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 의해서 제조된 발광 하이드록시아파타이트는 탄소-관련 불순물의 존재로 인하여 발광현 상이 관찰되는 것으로서 순수한 발광 하이드록시아파타이트(LHA:luminescence hydroxyapatite)의 주요 발광 원 인은 CO₂⁻ 라디칼 이온이다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자의 크기는 10 nm 내지 100 nm인 것이 바람직하며, 본 발명의 일 실시예에서는 탈이온수에 녹인 3% 아연 나이트레이트 헥사하이드레이트를 헥사데실트리메틸 암모 늄 브로마이드 및 테트라하이드레이트 질산 칼슘의 혼합용액에 추가하는 것에 의해서 발광 하이드록시 아파타이 트 입자 크기를 수십 나노미터로 감소시켰다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 따른 발광 하이드록시아파타이트를 제조하는 방법에 의할 경우 헥사데실트리메틸 암모늄 브로마이드 및 테트라하이드레이트 질산 칼슘의 혼합용액의 pH를 9 내지 10으로 조절하기 위해서 암모늄 하이드

록사이드 용액을 추가할 수 있다.

- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 제조하는 단계는 헥사테실트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB)를 포함하는 암모늄 하이드록사이드 및 탈이온수를 발광 하이드록시아파타이트 용액에 추가한 후 고-압 초음파 하에서 혼합하여 혼합용액을 제조하는 단계 및 상기 제조된 혼합용액에 테트라에틸 오르쏘규산염을 추가하여 응집을 방지하기 위해서 추가적으로 초음파를 가하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 테트라에틸 오르쏘규산염은 50 μ l 내지 400 μ l로 추가되는 것이 바람직하다. 테트라에틸 오르쏘규산염을 50 μ l 미만 사용할 경우 실리카 코팅이 완전하게 일어나지 않는 문제점이 있으며, 테트라에틸 오르쏘규산염을 400 μ l 초과하여 사용할 경우 실리카 코팅이 더 이상 두껍게 형성되지 않으므로 바람직하지 않다. 또한 상기 껍질의 두께는 테트라에틸 오르쏘규산염(TEOS)의 농도를 (30 mg LHA 당 TEOS 50 μ l에서 400 μ l로) 다양화하는 것에 의해서 조절될 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 메조포러스 실리카의 코팅은 부분적으로 가수분해된 TEOS 분자를 LHA 나노입자의 표면상에 흡착하고 이종으로 핵을 형성하며, 이것은 LHA 나노입자상에 실리카층의 안정한 증착을 할 수 있는, 실란올 기를 형성하기 위해서 알칼라인 조건(여기에서는 pH 9 내지 10)하에서의 농축반응에 의해서 이루어질 수 있다.
- [0019] 실리카 전구체 테트라에틸오르쏘규산염(TEOS)을 상기 발광 하이드록시아파타이트 나노입자에 코팅하여 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 제조하기 위해서는 본 발명의 일 실시예에서는 암모늄 하이드록사이드에서 헥사테실트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB) 및 탈이온수를 발광 하이드록시아파타이트 용액에 추가하였고 음향반응기(Sonoreactor, Ulssso Hitech)를 사용하여 고-압 초음파 하에서 혼합하였다. 테트라에틸 오르쏘규산염(50, 100, 200, 300 및 400 μ l)을 다양한 양으로 혼합물에 추가하였고, 응집을 방지하기 위해서 추가적으로 초음파를 가하였다. 상기 혼합물을 그 후 1200 rpm으로 분산시켰다. 상기 용액은 그 후에 초음파처리하였고 헥사테실트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB) 제거를 위해서 무수에탄올 및 탈이온수로 완전히 세척하였고 진공하에서 하룻밤 동안 건조시켜서 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트(LHA@MS)를 수득하였다. 테트라에틸 오르쏘규산염의 양이 증가함에 따라서 메조포러스 실리카의 두께도 6 nm 에서 62 nm로 다소 직선적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 내부의 하이드록시아파타이트를 용해시켜 내부 핵을 제거하는 단계는 상기 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 탈이온수에 분산시키고 이에 질산 암모늄을 첨가하는 것에 의해서 이루어질 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에서는 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체를 얻기 위해서, 상기 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트에서 핵 부분의 발광 하이드록시아파타이트를 에칭과정에 의해서 용해시켰다. 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 탈이온수에 분산시켰고 그 후 HCl 용액과 혼합하였다. 상기 혼합물에 초음파를 가하고 응집 방지 및 혼합을 위해서 재교반하였다. 그 후 상기 혼합물은 탈이온수에 용해된 질산 암모늄으로 처리하였다. 상기 용액은 에탄올 및 탈이온수로 초음파화하고 세척하였고, 그 후 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체를 얻기 위해서 진공하에서 건조시켰다. 그 결과 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체를 수득할 수 있었다.
- [0022] 본 발명에 있어서 상기 제조방법에 의해서 제조된 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체는 내부 핵으로서 발광 하이드록시아파타이트가 제거된 후에도 여전히 발광을 띄는 특징을 나타낸다. 이러한 현상은 발광 하이드록시아파타이트의 CO₂⁻ 라디칼 이온이 메조포러스 실리카 내부에 남아있기 때문일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 의해서 제조된 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체를 제공한다. 상기 메조포러스 실리카 담지체는 약물을 전달하기 위한 용도로 사용될 수 있으며, 본 발명의 일 실험예에서는 항암약물인 독소루비신(DOX)을 이용하여 약물의 담지능력을 확인하였다. 특히, 약물 분자는 점진적 분산에 의해서 실리카 껍질의 메조포어 상 및 핵의 빈 공간 안에 담지되었고, 그리고 나서 생체 내에서 적당한 전달 시스템을 형성하였다.
- [0024] 특히, 독소루비신을 이용한 항암치료에 있어서 조직 괴사 및 심장독성과 같은 일반적인 부작용은 비조절된 방출로 인한 약물의 높은 복용량 및 약물의 정확성의 결여와 관계가 있다. 본 발명의 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담체를 이용할 경우 독소루비신을 포함하는 약물 분자의 조절되고 지속적인 방출 능력과 함께, 고 담지 능력으로 특징적으로 갖는다. 상기 독소루비신을 담지한 나노입자의 세포 내 삼입은 약물 담지체의 자기 발광 능력 때문에 그 자리에서 영상화 할 수 있는 특징을 추가적으로 갖는다. 본 발명의 일 실험예에서는 본 발명의 제조

방법에 의해서 제조한 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 다공성도 및 광학 활성을 포함하는 주요 물리 화학적 성질의 분석을 나타내었다. 또한, 독소루비신과 같은 약물의 담지 능력 및 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체의 방출 프로파일을 조사하였고 in vitro 세포 내 전달 시스템의 생물학적 효과를 확인하였다.

발명의 효과

[0025]

본 발명의 제조방법에 의해서 제조된 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체(L-hMS)는 항암약물 독소루비신을 효과적으로 담지 및 수주에 걸쳐서 pH-의존적 방식으로 약물의 방출을 유도할 수 있다. 또한, 본 발명의 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체는 매우 효과적으로 세포 내로 투과되었으며 이를 통해서 전달되는 독소루비신(DOX)에 의해서 종양세포 안에서 세포괴사가 효과적으로 일어났다. 또한, 자기-활성 형광 성질 및 뛰어난 생체 안정성을 갖고 있어 세포의 수리 및 질병 치료에 있어서 치료학적 및 영상학적으로 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0026]

도 1은 본 발명의 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체를 제조하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명에 의해서 제조된 약물 담지체의 TEM 영상을 나타낸 것이다. (a) LHA (b) MS50 (c) MS100 (d) MS200 (e) MS400 및 (f) L-hMS, (g) 다양한 TEOS 농도로 제조된 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트(LHA@MS) 나노전달체의 TEOS 농도 조건에 따른 실리카 껍질의 두께를 나타낸 것이다.

도 3은 (a) XRD 패턴 (b) 약물 담지체 샘플의 FTIR 스펙트럼 (c) 각각의 샘플의 원자조성을 나타내는 EDS 피크 (LHA 내부의 Ca 및 P vs. LHA@MS 내부의 Ca, P 및 Si vs. L-hMS 내부의 Si) (d) 껍질의 두께가 두꺼워짐에 따라서 음전하 값에 있어서의 점진적인 증가를 나타내는 pH 7.0에서 측정된 나노입자의 ζ-전위를 나타낸 것이다.

도 4는 BET 방법에 의해서 분석한 메조포어 구조를 나타낸 것이다: (a) 약물 전달체 샘플의 질소 가스 흡착/탈착 등온선 (b) 구체적인 표면 면적 (c) 구체적인 기공 부피 및 (d) 각각의 약물 담지체의 메조포어 크기.

도 5는 본 발명의 약물 담지체의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 것이다: (a) 전형적인 형광 방출 스펙트럼 (b) 본 발명의 약물 담지체의 형광 방출 스펙트럼 (c) 본 발명의 약물 담지체의 형광 영상 (d) 본 발명의 약물 담지체의 EPR 스펙트럼.

도 6은 본 발명의 대표적인 실시예로서 LHA@MS200 및 L-hMS 약물 담지체를 사용하여 DOX 약물 담지 및 방출에 대한 값을 나타낸 것이다: (a)최초 DOX 농도에 따른 DOX의 담지량을 나타낸 그래프 (b) 최초 48 시간 동안 두 가지 다른 약물 담지체의 DOX 방출을 나타낸 그래프 (c) 300시간까지 L-hMS로부터 DOX의 장기 방출을 나타낸 그래프.

도 7은 (a) DOX 복용-의존 방식에 따른 HeLa 세포의 생존도를 나타낸 것이고, (b) 4시간 동안 1 μgm⁻¹ DOX-담지된 L-hMS 또는 1 μgm⁻¹ DOX 용액으로 배양한 HeLa 세포의 공초점 레이저 주사현미경의 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 DOX-담지된 L-hMS의 처리에 의한 HeLa 세포에 있어서 세포괴사의 유도를 나타낸 것이다: (a) DOX 복용-의존 방식에 따른 HeLa 세포의 아넥신 V/PI 염색의 대표 점 플롯 (b) DOX 복용-의존 방식에 따른 caspase-3의 발현을 나타내는 FACS 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위해서 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다. 하기에서 사용되는 화합물 중 출발물질과 반응시약은 Aldrich사의 시약을 사용하였으며, 모든 용매는 순수하여 건조나 정제 없이 사용하였다.

[0028]

실시예 1: 발광 메조포러스 실리카 담지체 제조

- [0029] **실시예 1-1. 발광 하이드록시아파타이트 나노입자의 제조**
- [0030] 발광 하이드록시 아파타이트는 하기의 A 용액 및 B 용액을 혼합하여 과포화된 용액의 침전 반응에 의해서 제조되었다. 용액 A는 0.6 g 헥사데실트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB)와 1.3743 g의 테트라하이드레이트 질산 칼슘 및 60 ml 탈이온수에 녹인 3% 아연 나이트레이트 헥사하이드레이트를 혼합하여 제조하였다. 상기 아연 이온은 발광 하이드록시 아파타이트 입자 크기를 수십 나노미터로 감소시키기 위해서 추가하였다. 암모늄 하이드록사이드 용액(28%) 적은 양(~3 ml)을 pH를 9 내지 10으로 조절하기 위해서 용액 A에 추가하였다.
- [0031] 용액 B는 탈이온수 15 ml에 용해된 0.4752 g의 암모늄 하이드로젠 포스페이트 및 1.7646 g의 시트르산삼나트륨을 혼합하는 것에 의해서 제조하였다. 10분 동안의 격렬한 혼합 후에, 용액 B는 용액 A에 도입되었다. 1:1의 A 비율이 시트르산삼나트륨/질산칼슘 몰비로부터 선택되었다. 60분 동안 추가적인 교반 후에, 상기 용액을 스테인리스 강철 오토클레이브에 정지된 병에 이동시키고, 포장 후 24시간 동안 185°C에서 반응시켰다.
- [0032] 오토클레이브를 실온으로 냉각시킨 후, 발광 하이드록시아파타이트는 8000 rpm에서 원심분리에 의해서 용액 밖으로 침전되었다. 그 후, 침전된 하이드록시아파타이트 나노입자는 탈이온수 및 에탄올로 세척하고, 그리고 나서 24 시간 동안 공기중 80°C에서 건조시켜 발광 하이드록시아파타이트 나노입자를 수득하였다.
- [0033] **실시예 1-2. 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트의 제조**
- [0034] 발광 하이드록시아파타이트 형광상의 다공성 실리카 코팅은 실리카 전구체 테트라에틸 오르쏘규산염(TEOS)과 발광 하이드록시아파타이트를 혼합하는 것에 의해서 얻었다. 테트라에틸 오르쏘규산염 추가 전에, 200 ml의 에탄올에 상기에서 합성한 발광 하이드록시아파타이트 30 mg을 넣고 초음파 욕조에서 30분 동안 초음파를 가하였고 모든 발광 하이드록시아파타이트 입자가 일정한 형태의 실리카 코팅으로 잘 분산될 수 있게 만들기 위해서 500rpm에서 교반시켰다.
- [0035] 그 다음, 8 ml 암모늄 하이드록사이드에서 헥사데실트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB) 5 g 및 22 ml의 탈이온수를 발광 하이드록시아파타이트 용액에 추가하였고 30분 동안 20kHz 및 700W에서 작동하는 음향반응기(Sonoreactor, Ulssco Hitech)를 사용하여 고-압 초음파 하에서 30분 동안 혼합하였다. 테트라에틸 오르쏘규산염(50, 100, 200, 300 및 400 μ l)을 다양한 양으로 혼합물에 추가하였고, 응집을 방지하기 위해서 2시간 동안 추가적으로 초음파를 가하였다. 상기 혼합물을 그 후 1200 rpm으로 하룻밤 동안 잘-분산된 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트를 얻기 위해서 분산시켰다. 상기 용액은 그 후에 초음파처리하였고 헥사데실트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB) 제거를 위해서 무수에탄올 및 탈이온수로 완전히 세척하였고 진공하에서 하룻밤 동안 건조시켜서 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트(LHA@MS)를 수득하였다.
- [0036] **실시예 1-3. 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체 제조**
- [0037] 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체를 얻기 위해서, 상기 실시예 1-2에서 수득한 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트에서 핵 부분의 발광 하이드록시아파타이트를 에칭과정에 의해서 용해시켰다. 특히 상기 테트라에틸 오르쏘규산염 200 μ l를 사용하여 제조한 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트(LHA@MS200)를 대표예로서 선택하였다. 그 후, 0.15 g의 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트(LHA@MS200)를 30 ml 탈이온수에 분산시켰고 그리고 나서 20 ml 1 N HCl 용액과 혼합하였다.
- [0038] 상기 혼합물을 2시간 동안 초음파화하고 응집 방지 및 철저한 혼합을 위해서 1200 rpm에서 교반하였다. 상기 혼합물은 그 다음에 60°C에서 하룻밤동안 40 ml 탈이온수에 용해된 20 mg 질산 암모늄으로 처리하였다. 상기 나노입자 용액은 에탄올 및 탈이온수로 초음파화하고 세척하였고, 그 후 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체를 얻기 위해서 진공하에서 하룻밤 동안 건조시켰다. 그 결과 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체를 수득하였다(도 1).
- [0039] **실험예 1: 발광 메조포러스 실리카 담지체의 성질 분석**
- [0040] **실험예 1-1. 실험방법**
- [0041] 제조된 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체 나노입자의 결정 구조를 측정하기 위해서, 40 kV 및 40 mA에서,

Cu K_α복사(k = 1.5418 Å)에 의해 작동되는 회절계(Rigaku)를 사용하여 X-선회절분석(XRD)을 적용하였다. 스캐닝은 2θ=10° 내지 60° 의 회절각, 2° min⁻¹의 스캐닝 속도 및 0.02° 의 스텝 크기를 갖도록 제조되었다. 변환적외분광법 (FTIR; Varian 640-IR)은 기능기 및 샘플의 화학결합을 특징화하기 위해서 사용되었다. 각각의 스펙트럼에 대해서, 400-1800 cm⁻¹ 주파수 범위의 20 스캔은 KBr 펠렛 방법을 사용하여, 투과모드에서 기록되었다. 나노입자 크기 및 형태는 투과전자현미경을 사용하여 측정하였다(TEM; JEOL-7100). 상기 TEM에 대한 샘플은 에탄올 상에서 나노입자 분산에 의해서 제조되었고 탄소-코팅된 구리 격자판상에 현탁액 방울로 적가하였다. 나노입자상에 형성된 실리카 껍질의 두께는 TEM 영상 (>50 나노입자)에서 무작위로 선택하여 측정하였다. 상기 샘플의 원자 조성은 에너지-분산 분광계(EDS; Bruker)에 의해서 분석하였다. 상기 샘플의 제타(ζ) 전위는 말번 제타사이저(ZEN3600; Malvern)를 사용하여 측정하였다. 상기 ζ-전위는 탈이온수, 25°C에서 3배로 측정되었다. 구체적인 표면 면적, 기공 부피 및 기공 크기는 77 K에서 Quadrasorb SI 자동화된 표면 면적 및 기공 크기 분석계(2SI-MP-9 Quanta-chrome)를 사용하여 질소 기체 흡착/탈착 등온식에 의해서 결정되었다. 분석에 앞서서 진공하에서, 100°C의 탈기 온도 그리고 4 시간의 외부기체로, 샘플의 가스를 제거하였다. 상기 나노입자 크기는, 동적광산란(DLS) 측정계에 기반하여 입자 크기 분석계(Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK)로 분석하였다. 상기 나노입자 샘플의 발광 성질은 Jasco FP-6500 스펙트로-발광계를 사용하여 광발광(PL)에 의해서 측정되었다. 상기 샘플의 발광 영상은 또한 기준용액으로서 탈이온수를 사용하여 UV 트랜스일루미네이터(Vilber Lourmat)를 사용하여 얻었다. 상기 나노입자의 전자 상자성 공명 (EPR)의 성질은 100 kHz 자기장 변조로 9.4 GHz의 X-band 진동수 (m)에서 작동하는 JEOL 분광기 (model JES-FA200)를 사용하여 특징화하였다.

[0042] **실험예 1-2. 결과**

[0043] 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 핵 형판으로 사용되는 발광 하이드록시아파타이트(LHA)는 TEOS를 사용하여 솔-겔 반응에 의해서 메조포러스 실리카(LHA@MS)로 코팅하였다. 상기 껍질의 두께는 TEOS의 농도를 (30 mg LHA 당 TEOS 50 μl에서 400 μl로) 다양화하는 것에 의해서 조절되었다.

[0044] TEOS를 추가하기 이전에, 상기 LHA 용액을 솔-겔 반응, 코팅 과정뿐만 아니라 분산을 위하여 초음파 분해하였다. 보다 구체적으로, 부분적으로 가수분해된 TEOS 분자는 LHA 나노입자의 표면에 흡착하였고 이중으로 핵을 형성하였으며, 이것은 LHA 나노입자상에 실리카층의 안정한 증착을 할 수 있는, 실란올 기를 형성하기 위해서 알칼라인 조건(여기에서는 pH 9 내지 10)하에서 농축반응이 수반되었다.

[0045] 그 후, 상기 핵 LHA는 속이 빈 메조포러스 실리카 나노입자를 형성하기 위해서 제거되었고, 이것은 또한 발광을 나타내었다(L-hMS). 약물 분자는 점진적 분산에 의해서 실리카 껍질의 메조포어 상 및 빈 공간 안에 담지되었고, 그리고 나서 적당한 전달 시스템을 형성하였다.

[0046] 약물 담지체의 형태는 도 2에 나타낸 것과 같이 TEM에 의해서 조사되었다. LHA는 핵 형판(core template, 도 2a)으로서 사용되었고 30 nm 내지 40 nm 길이 × 10 nm 너비 (평균 37 nm × 11 nm)를 갖는 면적의 막대-모양 형태를 나타내었다. 도 2b-e는 다양한 TEOS 농도로 제조된 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트(LHA@MS) 나노전달체의 TEM 영상을 나타내었다. 상기 실리카 껍질은 메조포러스형태이고 일정한 두께를 갖도록 발광 하이드록시아파타이트에 도포되어 있다. 상기 껍질의 두께는 예를 들어 TEOS 농도(도 2g)등의 제조 조건에 의해서 조절될 수 있다.

[0047] TEOS 양이 50 μl에서 400 μl로 증가함에 따라서 껍질의 두께는 7 nm 내지 62 nm로 증가하였다. 두께 및 TEOS 양 (R² = 0.99) 사이의 일정한 직선 관계가 있었다. 이것은 껍질의 두께는 TEOS 농도를 조절하는 것에 의해서 쉽게 조절할 수 있다는 것을 의미한다.

[0048] 껍질 부분은 약물 분자의 섭취에 있어서 중요한 역할을 담당하기 때문에, 껍질 두께의 정확한 조절은 나노전달체의 작용에 있어서 중요한 역할을 담당한다. 산처리에 의해서 LHA 핵 부분을 점차적으로 제거하였으며 결과적으로 속이 빈 발광 메조포러스 실리카 담지체 형태를 얻었다(도 2f). 상기 실리카 껍질의 메조포러스 구조는 제거 과정 후에 손상되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 속이 빈 메조포러스 담지체 껍질에서의 핵 및 기공 모두에 있어서 허용가능한 부피 때문에 높은 약물 담지 능력을 나타냈다. 상기 껍질 부분은 약물 분자의 확산에 대한 장벽으로서 행동하는 것으로 여겨졌고, 예를 들어, 껍질의 두께가 증가함에 따라서 약물 분자는 속이 빈 공

간에 담지되면서 메조포어 채널을 통해서 약물 분자의 방출을 지연시켰다.

- [0049] TEOS 양에 대한 겹질의 두께는 TEM 영상으로부터 측정되었다(도 2g). 상기 실리카 겹질의 두께는 TEOS의 양이 증가함에 따라서, TEOS를 50 μ l 에서 400 μ l로 다양화함에 따라서 6 nm 에서 62 nm로 다소 직선적으로 증가하였다. 동일한 방법으로, 상기 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트(LHA@MS) 나노전달체의 크기는 49 nm \times 23 nm 에서 161 nm \times 135 nm로 서로 일치하게 증가하였다. 상기 유체역학적 입자 크기는 또한 DLS 측정의 방법에 의해서 검출되었다.
- [0050] 테트라에틸 오르소규산염 200 μ l를 사용하여 제조한 메조포러스 실리카가 코팅된 발광 하이드록시아파타이트(LHA@MS200) 및 속이 빈 메조포러스 실리카 담지체(L-hMS)를 대표적인 샘플로 사용하였다. 상기 DLS 분석은 각각 LHA@MS-200 및 L-hMS에 대해서 120 nm 및 102 nm의 입자 크기를 나타내었다. TEM 영상부터 LHA@MS200(93 nm \times 67 nm)의 크기를 고려하여, 상기 DLS로 측정된 크기는 다소 증가하는 값으로 나타났고, 용액에 있어서 나노입자의 유체역학적 효과를 반영하였다.
- [0051] 이러한 작은 증가는 일반적으로 나노입자는 다소 잘 분산되고 심각하게 응집되지 않는다는 것을 의미한다. 상기 제조과정에 중의 형태의 상 및 결정 구조는 XRD를 사용하여 분석하였다. 발광 하이드록시아파타이트는 결정형 하이드록시아파타이트에 대한 전형적인 피크(도 3a)를 나타내었다. 메조포러스 실리카 겹질이 형성될 때, $2\theta = 23^\circ$ 에서 하나의 지배적인 넓은 피크, 이것은 실리카의 전형적인 무정형 상과 관련된 것이 관측되었다.
- [0052] 상기 관련된 실리카 피크의 강도는 겹질의 두께가 증가함에 따라서 증가하였다. 하이드록시아파타이트 및 실리카와 관련된 것으로 기대되는 어떠한 피크도 LHA@MS 샘플의 어떠한 것에 있어서도 관측되지 않았다. 발광 하이드록시아파타이트 핵을 제거시(L-hMS 샘플), 오직 더 넓은 무정형 실리카 피크가 관찰되었다. 이러한 발견은 발광 하이드록시아파타이트 핵의 완전한 제거를 확실하게 하였다. 상기 약물 담지체의 화학 구조는 FTIR 분광계에 의해서 분석되었다(도 3b). 상기 발광 하이드록시아파타이트 핵은 1096, 1020, 960, 600 및 565 cm^{-1} 에서 특징적인 밴드를 나타내었고, 이것은 PO_4^{3-} 이온에서 P-O의 특징적인 진동과 관련되어 있다.
- [0053] 추가적인 밴드는 1577 $^{-1}$ 및 1375 cm^{-1} 에서 관찰되었으며, 이것은 CO_2^- 에 대응되었다. 상기 OH^- 의 스트레칭 진동은 630 cm^{-1} 에서 나타났다. LHA@MS 샘플에서, 실리카-관련된 밴드가 또한 나타났다. Si-O-Si(1220 cm^{-1} 및 1095 cm^{-1} 에서 대칭적인 스트레칭, 및 801 cm^{-1} 에서 비대칭적인 스트레칭), Si-OH (954 cm^{-1} 에서 대칭적인 스트레칭) 및 Si-O (465 cm^{-1} 에서 밴딩)은 주요한 밴드였으며, 강도는 실리카 두께가 두꺼워짐에 따라서 증가하였다.
- [0054] L-hMS에 대해서, 오직 실리카-관련 밴드가 관찰되었다. 상기 FTIR 결과는 XRD 패턴과 일치하였다. 흥미롭게도, 상기 1300 cm^{-1} 내지 1600 cm^{-1} 범위에서의 밴드는 모든 샘플(LHA, LHA@MS 및 특히 L-hMS)에 있어서 발견되었고, 모든 약물 담지체의 일반 화학결합을 증명하였다.
- [0055] 이것은 탄소-관련 불순물의 존재와 관련되어 있다. 사실상, 순수한 LHA의 주요 발광 요소는 CO_2^- 라디칼 이온이고, 상기 밴드는 또한 이것으로 할당된다. 중요하게, 이것은 또한 발광 하이드록시아파타이트가 제거된 속이 빈 메조포러스실리카 샘플에 존재하고 발광 하이드록시아파타이트 제거 과정 후에 속이 빈 공간 안에 라디칼 이온의 보유를 제안한다.
- [0056] 상기 담지체의 EDS 분석은 각각의 나노전달 시스템을 추가적으로 확인하였다 (도 3c). Ca 및 P가 명백하게 발광 하이드록시아파타이트에 나타나는 반면에, 추가적인 Si 피크는 LHA@MS 샘플에 있어서 주요 시그널로 보이고, L-hMS 나노저장소에 있어서 오직 하나의 Si 피크 (Ca 및 P이 아닌)만이 있었다.
- [0057] 이러한 기본적인 조성물 결과는 핵으로서 하이드록시아파타이트 결정체의 완전한 제거를 확실하게 하며, FTIR

결과와 일치하였다. 상기 나노전달체는 ζ -전위 측정을 통한 표면 전하 성질을 측정하기 위해서 증류수에 분산시켰다(도 3d). 음성 ζ -전위는 모든 샘플에서 관찰되었다. 특히, 상기 LHA의 ζ -전위는 메조포러스 실리카 겔질의 도포로 더욱 음전하를 띠게 되었으며, 그리고 겔질 두께 증가와 함께 증가하였다(LHA -18.1 mV 에서 LHA@MS400 -26 mV). 상기 L-hMS의 ζ -전위(-21.8 mV)는 실리카 조성물의 효과를 반영하는 LHA@MS400(-22.4 mV)의 값과 서로 상응한다. LHA의 결정 구조에 OH^- 및 PO_3^{4-} 이온이 존재하기 때문에 LHA는 음성의 전하를 갖을 수 있는 반면에, 메조포러스 실리카 겔질은 수용성 배지에서 가수분해 되기 쉽고, 표면상에서 풍부한 음성 Si-OH 기를 형성한다.

[0058] 상기 실리카 겔질 성질은 표면 면적, 기공 부피 및 기공 크기를 포함하는 이들의 메조포어 구조를 관찰하는 것에 의해서 더 큰 깊이에서 분석되었고, 이것은 약물 분자를 담지하기 위한 수용력을 결정하는데 있어서 중요한 파라미터로서 작용한다.

[0059] 첫째, 상기 약물 전달체 샘플의 질소 가스 흡착/탈착 등온선을 플롯화 하였다(도 4a). 모든 LHA@MS 샘플은 좁은 히스테리시스 루프 면적을 나타내는 전형적인 IV 등온선 타입을 나타내었다.

[0060] 주어진 압력 영역에서 메조포러스 실리카 겔질 두께가 증가함에 따라서 흡착되는 부피는 증가하였다. 속이 빈 메조포러스 실리카는 가장 높은 흡착 부피를 나타내었다. 특히, 상기 등온선 커브는 $0.45 < p/p_0 < 0.9$ 의 상대적인 압력 영역에 있어서 히스테리시스 루프를 나타내었고, 이것은 공동 네트워크된 나노구조의 특징이고, 다른 곳에서도 유사하게 관찰되었다(Tang JT, Liu J, Wang PY, Zhong H, Yang QH. Evolution from hollow nanospheres to highly ordered FDU-12 induced by inorganic salts under weak acidic conditions. *Microporous Mesoporous Mater* 2010;127:119-25. 및 Fan J, Yu CZ, Gao F, Lei J, Tian BZ, Wang LM, et al. Cubic mesoporous silica with large controllable entrance sizes and advanced adsorption properties. *Angew Chem Int Ed* 2003;42:3146-50.). 등온선에 기반하여, 상기 구체적인 표면 면적 및 기공 부피를 측정하였다.

[0061] 샘플의 표면 면적은 MS 겔질 두께가 $110 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 에서 $510 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 으로 증가됨에 따라서 증가하였다(도 4b). 그리고 상기 기공 부피는 또한 증가하였다($0.15 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 부터 $0.450.818 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 으로 도 4c). 게다가, 상기 속이 빈 메조포러스 실리카는 표면 면적 및 기공 부피(각각 $1012 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 및 $0.818 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$)에서 실질적으로 증가하는 것을 관찰하였다. 이러한 발견은 겔질의 메조포어를 따라서 속이 빈 핵은 약물 분자를 더 많은 양으로 저장하는 것을 제시한다(도 4d). LHA@MS 샘플에 있어서, 상기 메조포어는 크기에 있어서 $\sim 3.6 \text{ nm}$ 였다. 반면에, 속이 빈 메조포러스 실리카, 평균 메조포어 크기는 $\sim 4.3 \text{ nm}$ 였다. 이러한 크기에 있어서 작은 변화는 핵으로부터 LHA의 제거 과정과 관련이 있을 수 있다. 반면에, 이들의 기공 크기 측정을 위해서 사용되는 BJH 모델은 속이 빈 내부 공간으로부터 정확하게 메조포어를 식별하지 못할 수 있다. 그러나, 전형적인 기공 크기 분배 커브(도 4d 내부)에 근거하여, 이것은 평균 값($\sim 4.3 \text{ nm}$)에서 날카로운 피크를 갖는 기공 크기의 좁은 분배를 나타냈고, 상기 기공 확장 효과는 더욱 합리적으로 여겨졌다.

[0062] L-hMS에 있어서 속이 빈 공간의 넓은 수용력뿐만 아니라 매우 메조포러스한 구조를 생산하는데 있어서 발광 하이드록시아파타이트의 실리카 겔질의 효율을 확인한 후에, 그 다음으로 나노전달체의 발광 성질을 측정하였다. 이전에 보고된 바에 따르면, 시트르산이 하이드록시아파타이트의 줄-겔 제조를 위한 킬레이팅제로서 사용될 때, R-C-COO⁻(Cit³⁻)기는 Ca-사이트레이트 킬레이팅 복합체를 형성하기 위해서 하이드록시아파타이트 표면에 점차적으로 흡착하였다. 추가적인 제조과정 동안, 상기 Cit³⁻ 기는 R-C 및 CO₂⁻에 달라붙을 수 있고, 몇몇의 CO₂⁻ 라디칼은 하이드록시아파타이트 격자 또는 조직 사이의 위치에 붙잡히고 결과적으로 발광 센터의 형성에 기여하였다.

[0063] 넓은 여기 범위에 대한 발광 HA의 전형적인 형광 방출 스펙트럼을 도 5a에 나타내었다. 300 nm 내지 400 nm에서 넓은 스펙트럼은, 340 nm에서 최대값을 갖는 것으로 보고되었고, 대응하는 방출 스펙트럼은 427 nm에서 관찰되

었다. 상기 약물 담지체 샘플의 모든 방출 스펙트럼 밴드는 도 5b에 나타내었다.

[0064]

427 nm 및 466 nm에서 증심화되는 두 개의 밴드로 구성되는 스펙트럼은 메조포러스실리카 껍질 발광 하이드록시 아파타이트 및 속이 빈 메조포러스실리카 담지체를 포함하는 모든 나노전달체에 대해서 유사하게 관찰되었다. 상기 LHA@MS 샘플의 PL 방출 스펙트라는 이것이 핵 LHA로부터 기원되었기 때문에 이해될 수 있고, 존재하는 메조포러스 실리카 껍질의 방출 효과를 반영하는 방출 밴드에 있어서 강도를 낮게 하였다.

[0065]

그러나, 상기 속이 빈 메조포러스 실리카 샘플에 있어서 상응하는 방출 스펙트럼은 LHA 핵이 제거되기 때문에 다소 놀라운 결과를 나타낸다. 이것은 LHA의 발광 행동에 있어서 주요 역할을 하는 것으로 믿어지는 $\text{CO}_2^{\cdot-}$ 라디칼이 제거과정 후에도 여전히 빈 공간 안에 남아있기 때문인 것으로 여겨진다. 제거 과정 동안 $\text{CO}_2^{\cdot-}$ 라디칼의 몇몇 부분을 잃을 수도 있는 반면에, 대부분은 남아있다고 여겨지고, 오직 LHA@MS200(속이 비도록 하는 제조 전 샘플)의 그것과 비교하여 속이 빈 메조포러스 실리카의 발광에 있어서 무시해도 될 정도의 감소가 관찰되었다.

[0066]

이전 영역에 있어서 FTIR 결과는, 1300 내지 1600 cm^{-1} 주변의 공통 밴드는 LHA, LHA@MS 및 L-hMS를 포함하는 모든 샘플에 대해서 관찰되었고, 이것은 또한 무수한 $\text{CO}_2^{\cdot-}$ 라디칼의 존재를 뒷받침한다. PL측정으로부터 관찰되는 상기 결과는 UV 트랜스일루미네이터에 의해서 발생하는 영상에 있어서 일치하는 것과 같아 보인다 (도 5c). 상기 L-hMS의 PL 성질은 또한 다소 안정적이고, 나노입자의 PL 강도 때문에 모호한 조건에서 한 달 동안 저장 후에 보전되는 것으로 관찰되었다.

[0067]

발광 메커니즘을 확정하기 위해서, 약물담지체 샘플에 대해서 EPR 분광을 수행하였다(도 5d). 상기 LHA 샘플은 전형적으로 $g = 2.1177$ 및 $g = 1.9805$ (여기에서 g 는 Lande g -요소이다)에서 EPR 밴드를 나타내었으며, 진실로 LHA 나노입자에 있어서 상자성 결점이 존재한다는 것을 의미하였다. EPR 신호는 P^{5+} , Ca^{2+} 또는 O^{2-} 에 의해서 유발될 수 없기 때문에 이것은(이러한 이온에 있어서 단일 전자는 없다) 몇몇의 퍼옥실 라이칼 또는 카본 다이옥사이드 라디칼 이온 ($\text{CO}_2^{\cdot-}$)과 같은 라디칼-관련된 결점으로부터 나타난다. 유사하게, EPR 신호는 다른 나노전달체의 샘플(LHA@MS 및 L-hMS)에 있어서 보여지고, 반면에 신호 강도는 MS 껍질 두께가 증가할시 감소되고 그리고 또한 약물 담지체는 속이 비어있을 때 (L-hMS) 신호 강도가 감소된다. 상기 EPR 결과는 PL 측정이 모든 나노전달체는 효과적인 상자성 결점을 갖는다는 것, 이것은 주로 $\text{CO}_2^{\cdot-}$ 라디칼 이온과 같다는 것을 증명한다는 것에 동의하게 한다.

[0068]

실험예 2: 발광 메조포러스 실리카 담지체의 독소루비신 담지 및 방출 연구

[0069]

실험예 2-1. 실험방법

[0070]

120 μml^{-1} 의 농도에서 재고 용액을 생산하기 위해서 독소루비신(DOX)을 pH 7.4에서 PBS상에 용해시켰다. 483 nm의 흡광에서 UV-vis 분광광도계를 사용하여 재고 용액 (20, 30, 40, 60, 80, 100 및 120 μml^{-1})의 순서로 광학 강도를 측정하는 것에 의해서 표준 커브를 얻었다. DOX 담지 테스트를 위해서, 1 mg의 나노입자 샘플(LHA@MS 및 L-hMS)을 5분 동안 각각의 DOX 용액에 초음파적으로 분산시켰고 4시간 동안 37°C 수조에서 보관하였다. 약물 담지량을 정량화하기 위해서, 상기 나노입자는 5분 동안 10,000rpm에서 원심분리하였고, 상청액은 UV-vis 분광광도계 (A483 nm)를 사용하여 분석을 위해서 수집하였다. 나노전달체 샘플로부터 DOX 방출 프로파일을 측정하기 위해서, 최초 DOX 농도 120 μml^{-1} 에서 제조되는 상기 DOX-담지된 나노전달체(LHA@MS 및 L-hMS)를 사용하였다. DOX 방출 역학을 측정하기 위해서, 각기 샘플 2mg을 다른 pH값 (5.5 및 7.4)으로 제조된 2 ml PBS에 분산하였고 그 후 37°C에서 배양하였다. 다른 시간점 (최대 2주)에서, 배지로 방출되는 약물의 양을 측정하였다. 10,000 rpm에서 5분 동안 나노입자-약물 복합체의 원심분리 후에, 상기 상청액을 모으고, 그리고

나서 UV-vis 분광광도계(A483 nm)를 사용하여 측정하였다. 상기 배지는 각각의 테스트에서 재환기되었다.

[0071] **실험예 2-2. 결과**

[0072] 치료 약물(분자)의 담지 및 전달을 위한 발달된 약물 담지체의 수용력을 측정하기 위해서, 독소루비신(DOX) 항암 약물이 선택되었다. 독소루비신은 8.3의 pKa를 갖고, 이것은 pH 7.4에서 양전하를 띠면서, 추가적인 기능화 없이도 음전하를 나타내는 약물 담지체에 달라붙을 수 있다. 게다가, 독소루비신은 작은분자이고 심지어 속이 빈 공간인 메조포어 채널(3 nm 내지 4 nm)안에 삽입될 수 있다. 상기 DOX 담지 연구는 두 개의 대표적인 약물 담지체를 사용하여 수행하였다(LHA@MS200 및 속이 빈 L-hMS). 상기 DOX 담지는 20 μg 에서 120 μg 으로 DOX 농도를 다양화함으로써 주어진 약물 담지체 농도(1 mg)에서 기록되었다. LHA@MS200의 경우, 상기 DOX이 담지된 양은 점차적으로 사용하는 DOX의 양이 증가함에 따라서 증가되었고, LHA@MS200 샘플 60 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ 에 대해서 최대 30 μg 의 담지가 기록되었다. L-hMS의 경우, 상기 DOX 담지 양은 또한 DOX 양이 증가함에 따라서 직선적으로 최대 담지량의 수준은 70 μg 만큼 높게 최대 80 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ 까지 증가하였다.

[0073] 약물 담지체의 담지 능력은 따라서 상당히 다양화되었고, 예를 들어, L-hMS (70 μg) 상에 담지된 DOX의 양은 LHA@MS200(30 μg) 상에 담지된 것과 비교하여 두배가 되었다. 이러한 결과는 분명하게 DOX 분자의 담지에 있어서 속이 빈 핵의 효과를 나타낸다. DOX은 실리카 메조포러스 표면과 상반된 전하를 띠고 크기가 작기 때문에, 이의 메조포어 채널로의 삽입은 쉽게 일어날 수 있고 심지어 속이 빈 공간 채널을 통해서 침투가 가능하다. 담지된 DOX는 다양한 pH 값으로 PBS에 잇따라 방출되었다. pH 7.4는 정상 생리학적 조건을 나타내는 반면, 산성 pH 5.3은 종양 세포의 세포 밖의 조직을 나타낸다. 상기 LHA@MS200 또는 L-hMS 둘 중 하나로부터 방출 패턴의 최초 48 시간을 먼저 나타내었다(도 6b). 상기 방출 패턴은 예를 들어 부차적으로 지속되는 방출에 의한 10 시간까지의 최초의 빠른 방출을 나타내며 분명하게 두-단계 행동을 보여준다. 최초의 빠른 방출은 주로 외부 표면에서 나타나는 DOX 분자 또는 메조포어 채널의 최외각 부분으로부터 기인하는 것으로 여겨지며, 여기에 있어서 물 분자는 DOX 분자를 분해하기 위해서 빠르게 침투하고, 따라서 이들이 방출될 수 있다. 산성 pH를 갖는 것과 관련된 DOX 분자의 강화된 양성자화는 따라서 쉽고 빠르게 이 부분에서 발생하고, 중요한 pH-의존적 방출의 결과를 나타낸다. 반면에, 두번째로, 속이 빈 프로파일 단계는 메조포어 채널(LHA@MS200의 경우)의 내부 및/또는 빈 공간의 내부(L-hMS의 경우)에 추가적으로 존재하는 DOX의 방출을 반영하는 것으로 여겨지고, 주로 확산 메커니즘에 의해서 지배된다. LHA@MS200로부터 보다 L-hMS로부터 DOX의 더 높은 최초 방출(10 시간까지)은 L-hMS안에 담지된 더 많은 DOX의 양 때문인 것으로 추측된다. pH 효과와 관련하여, pH -의존적 방출 패턴을 나타내는 DOX는 두 종류의 약물 전달체에서 중성 조건일 때보다 산성 조건일 때 보다 더 빠르게 방출하는 것으로 나타났다.

[0074] 이러한 pH-민감성 현상에 대한 가능한 설명은 DOX의 친수성 및 용해성으로 인한 DOX 분자의 NH_2 그룹의 강한 양성자화 때문에 산성 환경에서 증가하는 것으로 나타날 수 있다. 또한, L-hMS 약물 담지체는 pH 7.4 보다 pH 5.3에서 더 빠른 방출 속도를 나타내며, pH에 민감하다. L-hMS로부터 DOX 방출 결과는 10 시간에 약 38%, 24 시간에 약 42% 및 48 시간에 약 53% 였고, 이것은 거의 pH 7.4에서 방출되는 퍼센트에 두배였다(10시간에 약 19%, 24시간에 약 23%, 및 48시간에 약 34%). pH-의존적 DOX 방출 행동을 확인한 후에, 우리는 추가적으로 긴 시간에 걸쳐서 속이 빈 약물 담지체로부터 DOX의 방출 프로파일을 조사하였다(도 6c). 증명한 바와 같이, 전체 방출 패턴은 두 단계로 구성된다, 예를 들어, 최초의 빠른 방출 단계는 최대 10 시간까지 지속되고, 이후 방출 영역은 끝까지(약 300 시간까지) 유지되며, 두 개의 pH 값에서 점차적인 곡선 패턴을 갖는다. 흥미롭게도, 최초에 발생한 pH-의존적 차이는 pH 7.4 및 5.3 사이의 어떠한 좁은 차이도 없이 두번째 단계에서도 그대로 보존되는 것으로 보였다. 증명한 바와 같이, 그 이후에 유지되는 프로파일은 메조포어 채널을 통한 DOX 확산으로부터 기인한다. 비록 물 분자 (산성 pH에서는 양성자)가 DOX 분자를 분해 및 이온 교환(DOX와 메조포러스 실리카 표면 사이)으로 붙잡을 수 있도록 자유롭게 분산되고, DOX 확산의 과정은 시간이 걸리고 오랜시간에 걸쳐서 방출이 유지되는 결과를 초래한다.

[0075] 또한, 이러한 두-단계 행동에 대한 DOX의 방출 메커니즘을 발견하고자 노력하였다. 0차 모델은 10 시간 ($M_t/M_\infty = K_0t$)까지 일차 직선 단계에 대해서 적용되는 반면에, Ritger-Peppasempirical 방정식은 그 이후의 단계에 대

해서 적용되었으며, 이것은 $M_t/M_\infty = Kt^n$ 법칙(Patel KD, El-Fiqi A, Lee HY, Singh RK, Kim DA, Lee HH, et al. Chitosan- nanobioactive glass electrophoretic coatings with bone regenerative and drug delivering potential. J Mater Chem 2012;22(47):24945-56)을 따랐으며, 여기에서 M_t 및 M_∞ 은 시간 t 및 무한대 시간 (∞)에 있어서 약물 방출의 절대량을 의미하고, K_0 및 K 는 각각의 평균에 대해서 방출 속도 상수이며, 약물 담지체의 구조적 및 기하학적 성질을 포함하며, n 은 방출 지수이고, 약물 방출 메커니즘을 나타낸다.

[0076]

상기 모델에 기반하여, 피팅은 또한 그래프로서 나타내었고, 이것은 실제 데이터에서 평균적으로 좋은 피팅을 보여주었다. 표 2는 약물 방출 역학 방정식을 결정하는 파라미터(K_0 , K 및 n)의 획득 값을 요약하여 나타낸 것이다. 첫번째 단계에서, 상기 속도상수는 산성 조건에서 더 높았으며, 산성 pH와 관련된 DOX 분자의 더 높은 양성자화를 제시하고 따라서 더 빠른 분해 및 방출을 제시한다. 게다가, 이차 단계에서 속도 상수는 산성 조건에서 부차적으로 더 높았고, 행동 커브에 있어서 더 빠른 최소 상수를 반영하였다. 두번째 단계에서 얻은 전력 상수는 0.32 (pH 5.3) 및 0.46 (pH 7.4)였고, 이러한 방출 역학은 더 높은 단계로의 방출에 의해서 조절된다. 게다가, 산성배지에서 다소 낮은 전력상수는 약물 분자의 더욱 빠른 고갈 때문인 것으로 판단된다. DOX 담지 및 방출 연구에 근거하여, 상기 속이 빈 메조포러스 실리카 약물 담지체는 약물 전달을 위한 효과적인 전달체로서 여겨진다.

[0077]

속이 빈 공간에 담지된 DOX 분자의 많은 양 및 방출-조절 메커니즘에 의해서 12일 넘게 장-기간 유지되는 전달은 중요시된다. 실리카 나노입자는 약물 전달의 목적을 위해서 이전에 계속적으로 연구되어 왔으나, 나노구로조부터의 약물의 급작스런 방출 및 약물의 빠른 고갈은 공통의 문제로 보고되어 왔다[18,46,47]. 이러한 한계 중 몇몇은 나노입자에서의 폴리(에틸렌글라이콜)의 형성을 포함하는 복잡한 여러단계에 의해서 유발되었고, 이것은 기공을 좁히는 것을 통해서 약물 방출의 속도를 느리게 하였다. 여기에서 나타낸 속이 빈 핵의 제조는 전달체의 구조(화학적 및 기하학적인)를 변경하는 것에 의해서 약물 방출 프로파일의 조절 가능성을 증명한다. 그러나, 여기에서 DOX에 대해서 증명된 것과 같은 상기 속이 빈 메조포러스의 효과는 메조포어 구조(포어 사이즈 및 다공성도) 및 표면 기능화 적용을 위해서 구체적인 약물에 대해서 적절하게 조절되어야 하기 때문에 모든 다양한 종류의 약물에 반드시 적용되는 것은 아니다.

[0078]

실험예 3: 발광 메조포러스 실리카 담지체의 세포 독성 실험

[0079]

실험예 3-1. 실험방법

[0080]

제조된 약물 전달체의 in vitro 세포학적 독성은 인간 자궁 암 세포 주 헬라 세포(HeLa cells, American Type Culture Collection, Rockville)를 사용하여 측정하였다. 세포는 10% 소태아혈청 (Gibco) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 최소필수배양액 배지 (α-MEM; Gibco)에서 5% CO₂의 기상에서 37°C에서 유지하였다. 상기 배지는 일주일 동안 두배 또는 세배로 대체되었고, 상기 세포는 포화상태로 통과하였다. MTS 분석을 위해서, HeLa 세포를 웰당 10⁴ 세포의 밀도로 96-well 플레이트에 분주하였고 24시간 동안 접촉하였다. 상기 접촉한 세포는 그리고 나서 24시간 동안 배양 배지에서 다양한 복용량으로 L-hMS, DOX, 또는 DOX-담지된 L-hMS로 처리하였다. 각각의 처리 후에, 상기 세포는 37°C 어둠 속에서 4시간 동안 α-MEM 100 μl 및 MTS 용액 20 μl(CellTiter 96 Aqueous One Solution; Promega)의 혼합액으로 배양하였다. MTS 처리 끝에, 상기 490 nm에서 OD 값은 iMark microplate reader (BioRad)를 사용하여 읽혔다. 세포 생존도는 대조군의 값을 넘어서는 실험군의 OD값의 퍼센트를 근거로 하여 측정하였다.

[0081]

실험예 3-2. 결과

[0082]

대표적인 종양 세포로서 헬라 세포주(HeLa cell line)를 사용하여 세포 생존에 있어서 DOX-담지된 속이 빈 메조포러스 실리카 약물 담지체의 효과를 조사하였다. 양성 대조군에 대해서, 효과적인 복용범위로 일반적으로 알려져 있는 일반적인 DOX 분자의 다양한 복용량으로 헬라 세포(HeLa cells)에 처리하였다. 24시간 동안 DOX로 처리된 HeLa 세포의 생존도는 DOX 복용-의존 방식에 따라서 점차적으로 감소하였고, DOX의 세포독성의 효과를 분명하게 나타내었다(도 7a). 다음으로, DOX-담지한 L-hMS 약물 담지체를 이용하였다. 이 경우, 상기 DOX 담지 양은

대표군 (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 및 60 μgml^{-1})에서 사용한 DOX의 양과 일치하였다. 결과적으로, 상기 L-hMS 나노저장소의 대응 농도는 각각 0, 1.43, 7.15, 14.28, 71.4, 142.8, 285.6, 571.2 및 856.8 μgml^{-1} 로서 측정되었다.

[0083] 헬라 세포를 DOX 담지된 L-hMS로 처리시, 또한 세포 생존도에 있어서 점차적인 감소가 있었고, 이것은 일정하게 복용량-의존적 방식 및 직접적인 DOX의 처리에 대해 관찰한 것과 유사한 패턴 및 단계로 발생하였다. 이러한 효과가 L-hMS 약물 전달체로부터 또는 DOX로부터 나오는게 아닌지를 확인하기 위해서, 단지 L-hMS (DOX이 없는)로 헬라세포를 DOX-담지된 L-hMS에 대해서 사용하는 동일한 농도로 처리하였다.

[0084] 이 경우, 상기 세포 생존도는 잘 보존되었다. 285.6 μgml^{-1} 의 L-hMS 약물 담지체의 농도에서도, 상기 헬라 세포의 생존률은 L-hMS가 생체적합성을 갖는 것을 지시하는 90.4%였다. 이러한 L-hMS 약물 담지체의 우수한 세포 생존도는 세포 내 섭취 단계를 통해서 치료약물의 전달을 위해서 매우 유효하게 작용하는 것으로 여겨진다.

[0085] 이러한 결과는 또한 DOX-담지된 L-hMS에서 발휘되는 세포독성의 효과는 약물 담지체에 담지된 DOX 분자로부터 오는 것이지 L-hMS 약물 담지체로부터 오는 것이 아니라는 것을 의미하였다. 보다 구체적으로, 최초 24시간 동안에 L-hMS 약물 담지체로부터 DOX가 모두 방출되지 않음에도 불구하고, DOX-담지된 L-hMS 약물 담지체에 의해서 유발되는 세포 생존 레벨은 단지 DOX 만의 치료에 의한 것보다 다소 더 낮아진다.

[0086] 또한, 이러한 결과는 네이키드(naked) DOX와 약물 담지체에 의해서 도움이 되는 DOX사이의 다른 세포 섭취 메커니즘 때문인 것으로 판단된다. 상기 DOX-담지된 L-hMS 약물 담지체는 가능한 세포 내 섭취 메커니즘을 포함하고, 이것은 네이키드(naked) DOX 보다 세포에 들어갈 때보다 효과적이다. 상기와 같은 결과에 근거하여, 상기 L-hMS 약물 담지체는 잠재적으로 항암제, 특히 DOX을 포함하고 전달하기 위한 암세포를 목표로 하는, pH 민감성 때문에 항암 약물 전달의 효과를 강화하기 위한 운반체로서 잠재적으로 사용될 수 있다.

[0087] **실험예 4: HeLa 세포에 있어서 독소루비신-담지된 발광 메조포러스 실리카 담지체에 대한 발광 영상**

[0088] **실험예 4-1. 실험방법**

[0089] 4시간 동안 L-hMS, DOX 또는 DOX-담지된 L-hMS로 처리된 6-웰 배양 플레이트의 각각의 웰에 10^5 세포를 분주한 헬라 세포를 수확하고 30분 동안 4% 파라포름알데하이드 용액으로 고정시켰다. 상기 고정된 세포를 차가운 PBS (4 °C)로 세척하였고 그리고 나서 유리 슬라이드에 위치시켰다. 상기 광학 영상을 Zeiss LSM 510 laser-scanning confocal microscope (Zeiss)로 관측하였고 분석하였다. 세포는 핵의 관찰을 위해서 40,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI; Invitrogen, USA)로 착색하였다.

[0090] **실험예 4-2. 결과**

[0091] 상기 DOX-담지된 L-hMS의 세포 섭취는 이어서 조사하였다. HeLa 세포는 1 μg 의 DOX로 처리하거나 4시간 동안 DOX-담지된 L-hMS의 농도에 대응하여 처리하였고, HeLa 세포에 있어서 DOX 담지된 L-hMS의 위치는 공초점 레이저 주사현미경 (도 7b)에 의해서 확인되었다. 상기 빨간색 부분은 DOX 만의 형광 시그널을 나타내고 상기 파란색 시그널은 DAPI-염색된 핵으로부터 기인한다.

[0092] 상기 DOX의 빨간색 형광 시그널은 사이토플라즈마(파란색 시그널 근처)에서 또는 HeLa 세포의 핵 안에서(파란색 시그널과 일치하는) 관찰될 수 있다. 세포를 4 시간 동안 네이키드(naked) DOX로 처리시, 대부분의 빨간색 시그널은 확산된 패턴으로 세포질에서 관찰되었다. 마찬가지로, DOX-담지된 L-hMS로 4시간 처리시, 유사한 빨간색 신호가 세포에서 분명하게 관찰되었다. 특히, 더욱 강한 빨간색 신호가 L-hMS 약물 담지체에서의 DOX 분자의 응집 때문에 더욱 확실하게 눈에 띄었다.

[0093] 따라서, 단지 4시간의 처리는 세포에 의해서 DOX-담지된 L-hMS 나노저장소의 빠른 섭취를 초래했다는 것이 분명하였다. 게다가, 세포질에서 몇몇의 확산된 빨간색 신호는 L-hMS 나노저장소로부터 방출될 수 있는 DOX 분자에 의해서 묘사되었다. pH-민감성 DOX 분자는 몇몇의 범위에서 방출되었고 약한 산성 환경을 갖는 종양세포로서 세포질에서 주로 국부화되었다.

[0094] DOX 방출 프로파일에 기반하여(도 6에 나타난 것과 같이), 최초 몇 시간 안에 담지된 DOX의 약 10%-20%가 방출되었다. L-hMS-기여 DOX 처리에 의해서 영향을 받는 세포 생존 결과를 상기하면(도 7a), 상당한 효과가 최초 24 시간 동안에 세포 분획 내부로 방출되는 DOX 분자로부터 야기되는 것으로 여겨진다. pH 5.3에서 최초 24시간 동

안에 DOX 방출 프로파일이 대략 50%의 담지량으로 방출되는 것을 나타내기 때문에, 이러한 생물학적 결과를 확인할 수 있었다.

[0095] 비록 이러한 사실은 살아있는 세포 환경에 기초하여 직접적으로 추론할 수는 없지만, 상당히 유사한 범위에서의 DOX 농도, 결과적으로 생물학적 효과를 나타내는, 세포내 영역에 있어서 방출되는 것으로 여겨진다. 담지된 DOX는 계속적으로 방출되고 세포내 분획안에서 L-hMS 시스템으로부터 유지되고, 가능한 장기간 효과가 예상된다. DOX의 반복적인 복용처리 없이 약물을 전달할 수 있다는 것이 L-hMS 약물 담지체 전달 시스템의 가장 큰 장점 중의 하나일 수 있다.

[0096] 공초점 형광 현미경 영상 및 세포 생존결과는 DOX-담지된 L-hMS 약물 담지체가 빠르게 내면화되고, 상기 DOX 분자가 고 함량으로 방출되고, 세포질 안에서 주로 구속화되는 결과를 나타내었다.

[0097] **실험예 5: 세포사멸세포사멸위한 플루오레세인이소티오시안산염(FITC)-아넥신 V 및 프로피디움 아이오다이드(PI) 이중 염색**

[0098] **실험예 5-1. 실험방법**

[0099] FITC-아넥신 V(Annexin V) 및 PI 이중 염색은 DOX-담지된 L-hMS에 의해서 유도된 세포괴사를 검출하기 위해서 사용되었다. 24 시간 동안 L-hMS, DOX 또는 DOX-담지된 L-hMS로 처리된 헬라 세포를 수확하고 차가운 PBS로 세척하였다. 상기 세척된 세포는 FITC-아넥신 V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen)를 사용하여 염색되었다. 요약하면, 상기 세포는 1×10^6 세포 ml^{-1} 의 농도에서 1×10^6 의 1 ml 결합 완충액에서 재부유하였다. 다음으로, FITC 아넥신 V의 5 μl 및 PI의 5 μl 를 세포 현탁액(1×10^5 cells) 100 μl 에 추가하였다. 부드럽게 섞은 후에, 상기 세포는 어두운 곳에서 실온에서 15분 동안 배양하였다. 따라서, 1×10^6 결합 완충액의 400 μl 를 FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences)를 사용하여 분석 전에 각각의 튜브에 첨가하였다. 각각의 샘플에서 10,000 세포에 대해서 얻어진 데이터는 CellQuest Pro software (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

[0100] **실험예 5-2. 결과**

[0101] 추가적으로 플로우 사이토메트리(flow cytometry)를 사용하는 것에 의해서 DOX-담지된 L-hMS 약물 담지체의 세포-접취 성질을 조사하였다.

[0102] 첫째, 상기 DOX-담지된 L-hMS의 세포 접취 단계는 DOX-담지된 L-hMS로부터 유래되는 DOX의 세포 신호를 측정하는 것에 의해서 플로우 사이토메트리(flow cytometry)로 정량화되었다. L-hMS 기여 DOX에 의해서 유도되는 세포괴사를 측정하기 위해서, 처리된 세포는 FITC-Annexin V 및 PI로 이중-염색되었고, 그리고 나서 플로우 사이토메트리(flow cytometry)에 의해서 분석되었다. 세포막 외부에서 내부로의 포스파티딜세린(PS)의 외부화는 세포괴사의 최초 지시제이다.

[0103] 따라서, Annexin V, PS에 대한 높은 친화도를 갖는 포스포리피드-결합 단백질은 세포괴사를 위한 효과적인 마커로서 사용될 수 있다. PI, 비특이적 DNA 끼어들기 약물은 괴저성 또는 손상된 세포에 들어갈 수 있으나, 살아있는 세포 또는 이른 세포사멸 세포의 막에 의해서 배제된다. 도 8a에 나타낸 바와 같이, 비처리된 대조군 또는 L-hMS(w/o DOX) 처리된 HeLa cells에서 세포사멸 세포는 거의 검출되지 않았다. 그러나, 세포사멸은 DOX로 처리된 군 및 DOX-담지된 L-hMS에서 상당히 유도되었고, 각각에 대해서 약 19.6% 및 57.4% 레벨에 이르렀다. 흥미롭게도, 우수한 세포사멸이 DOX-만의 처리에 대해서 DOX-담지된 L-hMS의 처리로부터 유발되었다.

[0104] 다른 표현으로, DOX 만으로 처리된 군에서는 세포사멸 세포로 나타나는 최소 19.6%의 비율이 나타났고, 반면에 DOX-담지된 L-hMS 군에서는, 최대 57.4%로 세포사멸이 일어났다. 비-세포사멸 세포분율은 괴저성으로 여겨지고, 세포사멸을 제외한 원인에 의해서 사멸하였다. 이러한 관점에서, DOX로 처리된 HeLa cells의 세포 자살 메커니즘은 DOX-담지된 L-hMS로 처리된 세포의 그것과는 다르게 여겨진다: 이것은 DOX가 L-hMS 약물 담지 시스템에 의해서 전달될 때 더욱 더 세포사멸적이다.

[0105] **실험예 6: 카스파스-3 (caspase-3) 발현의 분석**

[0106]

실험예 6-1. 실험방법

[0107]

카스파스 3 (활성) FITC 염색 키트 (BD Pharmingen)는 DOX-담지된 L-hMS에 의해서 유도된 세포괴사를 검증하기 위해서 사용되었다. L-hMS, DOX 또는 DOX-담지된 L-hMS로 처리된 헬라 세포는 24시간 동안 배양되었고 그리고 나서 수확하였다. 상기 수집된 세포는 냉각 PBS로 세척하였고 그리고 나서 30분 동안 얼음에서 BD Cytofix/Cytoperm™ 용액으로 고정하였다. 고정된 세포는 BD Perm/Wash™ 완충액으로 두 번 세척하였고 그리고 나서 30분 동안 어둠속, 실온에서 FITC-Caspase 3 항원에 추가하여 BD Perm/Wash™ 완충액에 재부유시켰다. 상기 염색된 세포는 그리고 나서 BD Perm/Wash™ 완충액으로 세척하였고 FACSCalibur flow cytometer를 사용하여 분석하였다. 각각의 샘플에서 10,000 세포에 대해서 얻어진 상기 데이터는 CellQuest Pro software를 사용하여 분석하였다.

[0108]

실험예 6-2. 결과

[0109]

세포의 세포사멸 행동을 확인하기 위해서, 세포의 caspase-3 발현을 추가적을 조사하였다. Caspase-3는 이른 세포사멸 단계 동안에 활성화되는 주요 단백질 분해효소이고, caspase 군의 다른 종류들과 마찬가지로, 세포사멸 및 염증에 있어서 중요한 역할을 담당한다. 도 8b에 나타낸 바와 같이, 사실상 비처리 군 및 L-hMS(w/o DOX) 처리 헬라 세포(HeLa cells)에 있어서 검증되는 caspase-3-양성 세포는 없었다. 상기 DOX-처리된 HeLa cells는 caspase-3 양성 세포의 약 7.1%를 나타내었다. 그러나, L-hMS-기여 DOX-처리 HeLa cells에서 caspase-3 양성 세포는 약 58.6%로 상당히 증가하였다.

[0110]

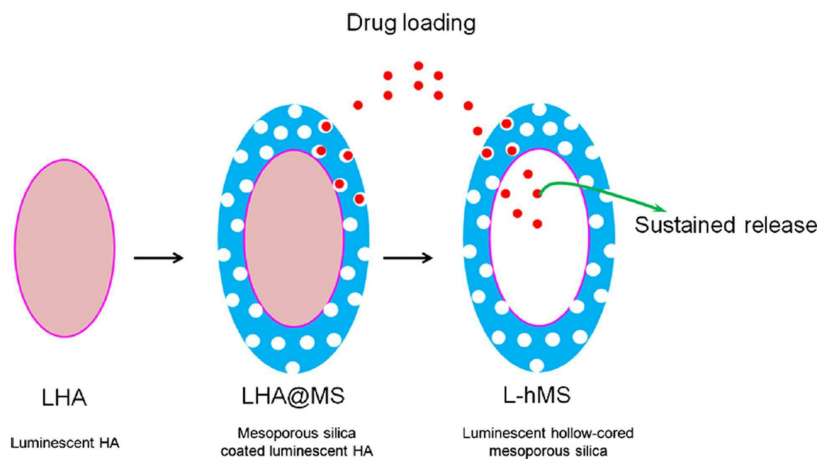
caspase-3 발현에 대한 이러한 결과는 DOX의 L-hMS-전달 때문에 DOX만 있을 때보다 더 큰 세포사멸 활동을 나타내었고, 이것은 FACS 분석과 일치하였다. DOX만을 처리하는 것과 간접적으로 비교하여 L-hMS 약물 전달체를 통한 DOX 전달 시스템의 구체적 세포사멸과 관련하여 어떠한 명백한 메커니즘이 아직 결정되지는 않았다.

[0111]

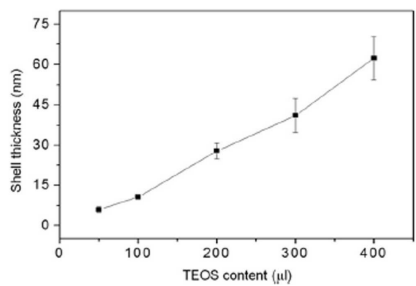
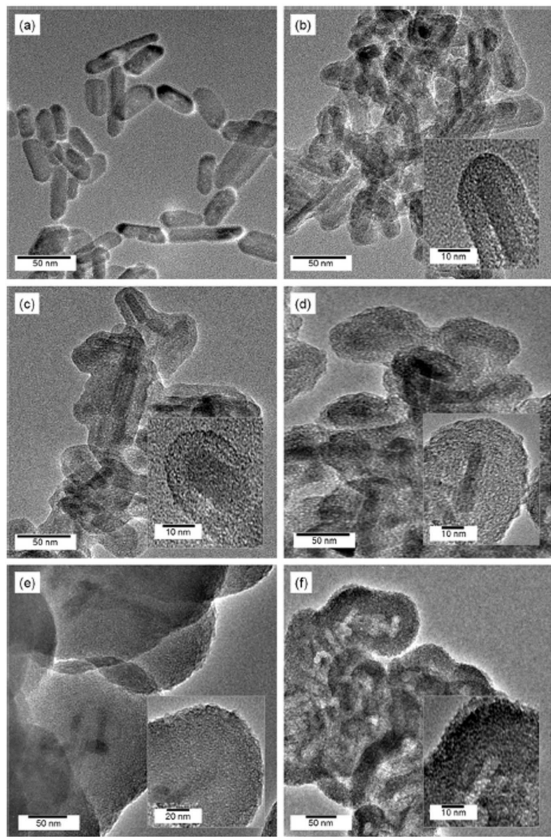
엔도솜(endosomes)을 탈피하기 위한 메조포러스 표면 구조를 갖는 실리카 나노입자의 능력뿐만 아니라 HeLa 세포주를 포함하는, 암 세포 속으로 매우 효과적인 세포내 섭취 과정은 세포내 분배 및 DOX 분자의 세포사멸 신호 운명에 중요한 역할을 담당한다.

도면

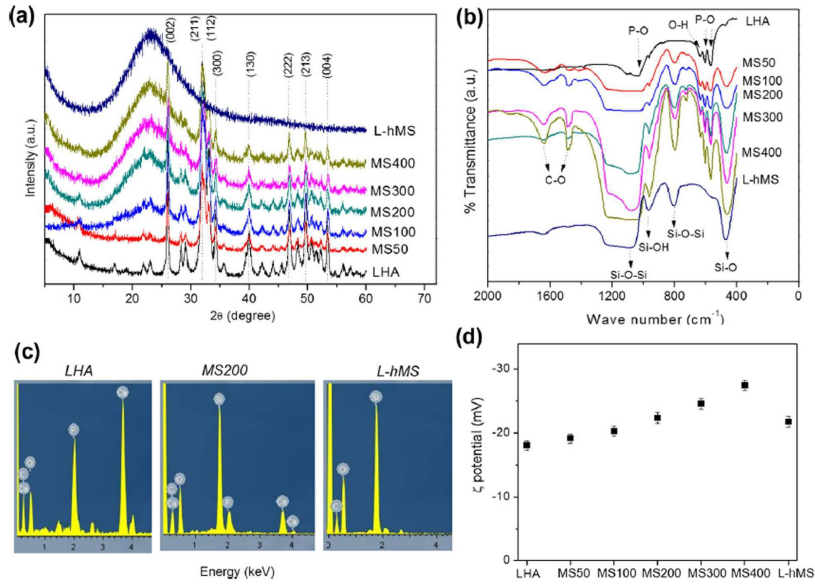
도면1



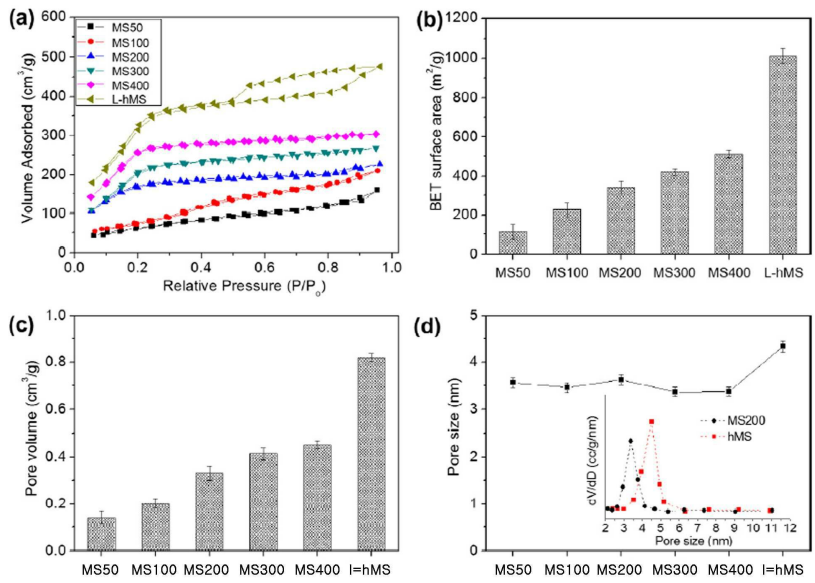
도면2



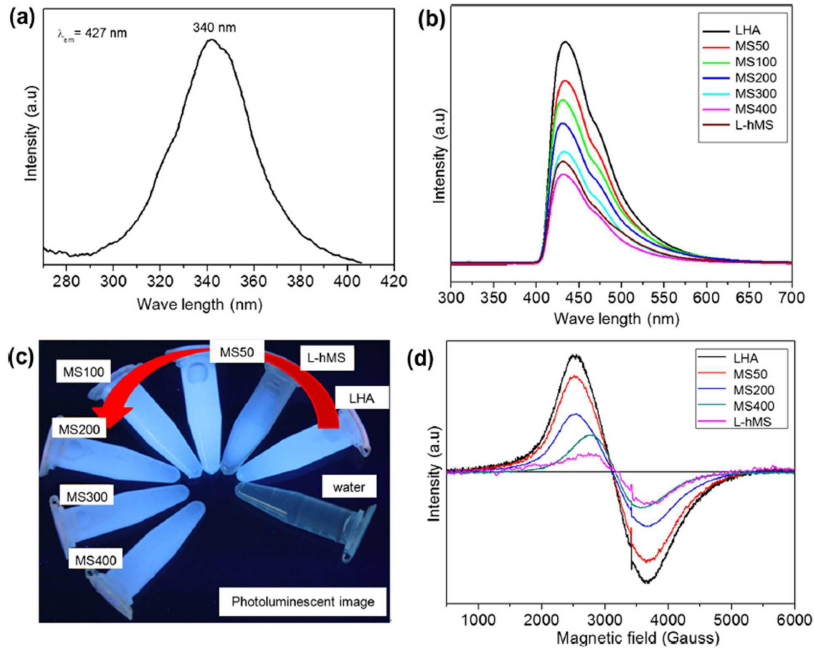
도면3



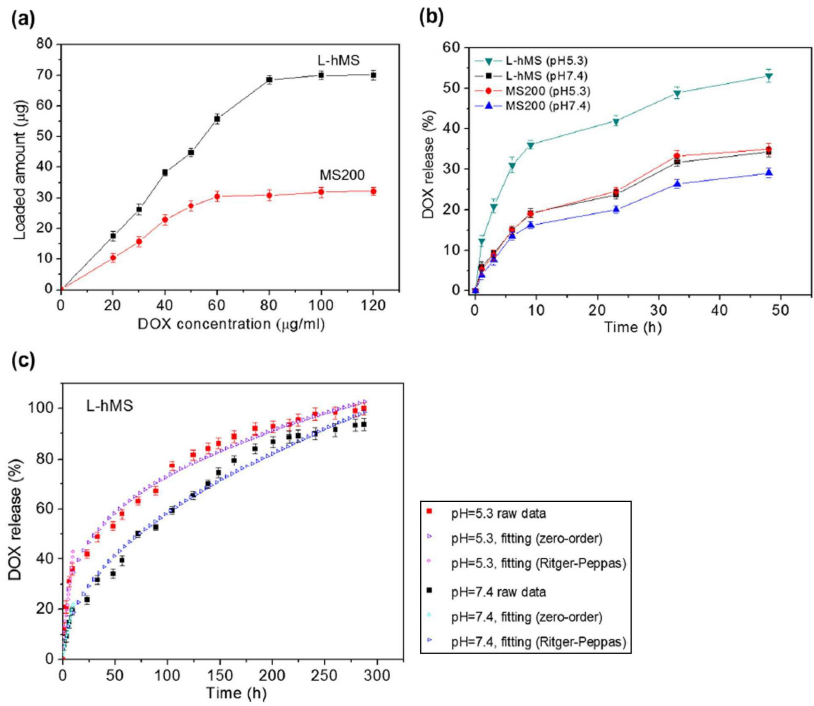
도면4



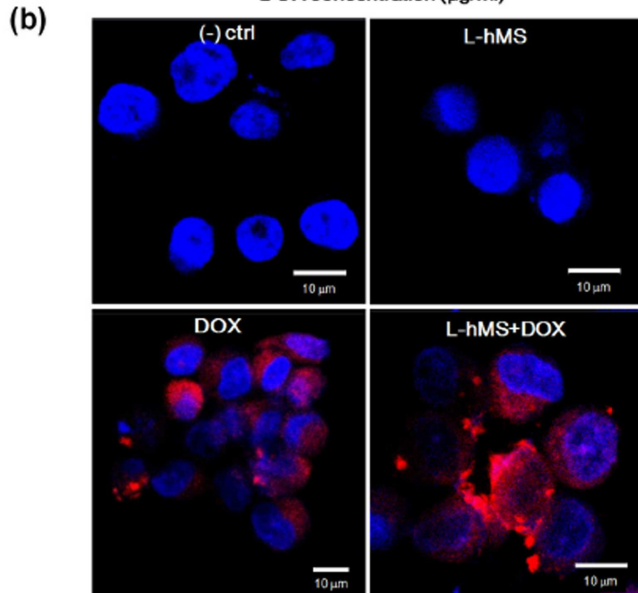
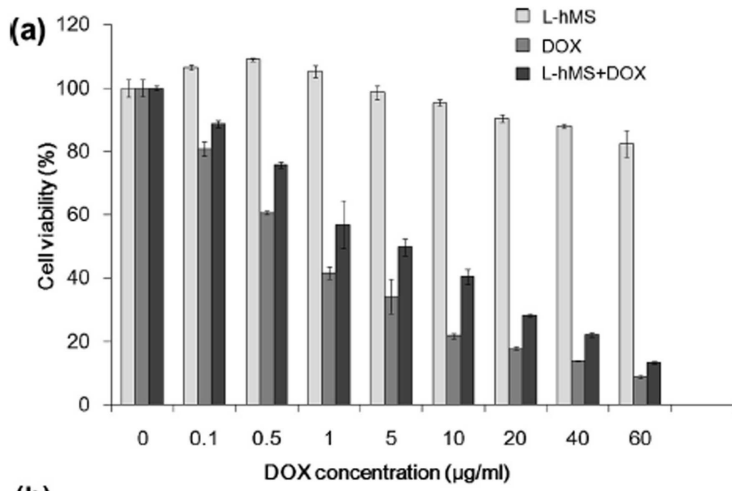
도면5



도면6



도면7



도면8

