(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0090317
(43) 공개일자 2012년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 9/16* (2006.01) *A61K 9/14* (2006.01)
*A61K 47/02* (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0010683
(22) 출원일자 2011년02월07일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울 성북구 안암동5가 1
**연세대학교 산학협력단**
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)
(72) 발명자
**오민규**
서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 104-605
**이혜진**
경기도 안산시 상록구 삼리로 24, 숲속마을요진 1차아파트 107동 603호 (사동)
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인주원**

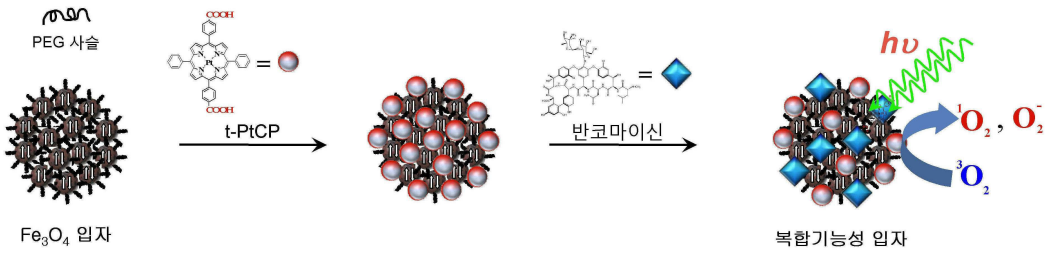
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **미생물 광사멸입자 및 미생물 광사멸방법**

## (57) 요 약

본 발명은 미립자 표면에 광에 의해 살미생물제를 생성하는 광감응제 및 표적 미생물에 선택적으로 결합하는 표적화제를 구비한 미생물 광사멸입자, 및 상기 미생물 광사멸입자를 이용해서 박테리아나 암세포와 같은 미생물을 사멸시키는 미생물 광사멸방법에 관한 것이다. 본 발명의 미생물 광사멸입자는 낮은 광감응제 농도 (0.35 μM), 적은 광 조사량 (6.1 mW/cm$^2$), 및 매우 짧은 처리시간에서도 박테리아의 사멸을 가능하게 하며, 항생제 내성 박테리아도 동일한 수준으로 사멸시킬 수 있다. 본 발명의 다기능 미생물 광사멸입자는 또한 자석에 의한 분리가 가능한데, 이를 통해 광역학적 치료 도중 및 그 이후에 숙주세포에 대한 2 차적인 광독성을 최소화시킬 수 있다. 또한, 본 발명은 상기와 같은 장점으로 인해 환경 분야에서도 적은 운전비로 높은 살균 효율을 달성할 수 있는 유망한 처리수단이 될 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(72) 발명자

**김용록**

서울특별시 광진구 아차산로 552, 5동 504호 (광장동, 극동아파트)

**최경훈**

경기도 안양시 동안구 관악대로 121, 삼성레미안 아파트 106동 2204호 (비산동)

**왕강균**

서울특별시 서대문구 연세로4길 66-3 (창천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 20100002191 |
| 부처명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | (원천)미래유망파이오니아사업 |
| 연구과제명 | 자성천이제어와 영속발광이 가능한 복합기능 마그네틱-포토닉 나노결정 개발 |
| 주관기관 | 고려대학교 |
| 연구기간 | 2010.03.01 ~ 2011.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업 |
| 과제고유번호 | A085136 |
| 부처명 | 보건복지부(한국보건산업진흥원) |
| 연구사업명 | 선도형연구중심병원사업 |
| 연구과제명 | 광기능성 자가세정 스텐트 개발 |
| 주관기관 | 연세대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2010.12.01 ~ 2011.11.30 |

## *특허청구의 범위*

**청구항 1**

평균입경 5 nm 내지 100 ㎛의 미립자;

상기 미립자의 표면에 결합되고, 광에 의해 살미생물제를 생성하는 광감응제; 및

상기 미립자의 표면에 결합되고, 표적 미생물과 선택적으로 결합하는 표적화제

를 포함하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 2**

청구항 1에 있어서,

상기 미립자는 자성입자인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 3**

청구항 2에 있어서,

상기 자성입자는 $MFe_2O_4$, $M^1M^2FeO_4$, M 단일입자, 및 M 합금으로 이루어진 군에서 선택되고, 식 중 M, $M^1$ 및 $M^2$는 Ba, 전이금속 또는 란탄족 금속인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 4**

청구항 3에 있어서,

상기 M, $M^1$ 또는 $M^2$는 Fe, Ni, Co, Mn, Zn 및 Pt로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 5**

청구항 2에 있어서,

상기 자성입자는 $Fe_3O_4$인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 6**

청구항 5에 있어서,

상기 자성입자는 $FeCl_3$ 수화물 및 폴리에틸렌글리콜을 에틸렌글리콜에 용해시킨 용액에 나트륨 아세테이트를 첨가, 혼합한 후 160 내지 230 ℃에서 6 내지 16 시간 동안 반응시킨 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 7**

청구항 2에 있어서,

상기 자성입자는 평균입경 5 내지 20 nm의 나노입자의 집적체인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 8**

청구항 1에 있어서,

상기 광은 200 내지 1000 nm의 파장을 갖는 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 9**

청구항 1에 있어서,

상기 광은 레이저인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 10**

청구항 1에 있어서,

상기 살미생물제는 활성 산소종인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 11**

청구항 10에 있어서,

상기 활성 산소종은 일중항산소 또는 산소 자유라디칼인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 12**

상기 광감응제는 포르피린(porphyrin) 또는 프탈로시아닌(phthalocyanine)인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 13**

청구항 1에 있어서,

상기 광감응제와 미립자는 서로 착물을 형성하여 배위결합하는 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 14**

청구항 1에 있어서,

상기 광감응제는 카르복시기, 티올기 또는 아민기를 갖는 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 15**

청구항 1에 있어서,

상기 광감응제는 [5,15-비스페닐-10,20-비스(4-메톡시카르보닐페닐)-포르피린] 플래티늄 ([5,15-bisphenyl-10,20-bis(4-methoxycarbonylphenyl)-porphyrin] platinum. t-PtCP)인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 16**

청구항 1에 있어서,

상기 표적화제와 미립자는 서로 착물을 형성하여 배위결합하는 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 17**

청구항 1에 있어서,

상기 표적화제는 카르복시기, 티올기 또는 아민기를 갖는 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 18**

청구항 1에 있어서,

상기 표적화제는 항생제, 항체, 단백질, 또는 당단백질인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸입자.

**청구항 19**

(A) 청구항 1 내지 청구항 18 중 어느 한 청구항의 미생물 광사멸입자를 표적 미생물과 혼합하는 단계;

(B) 상기 미생물 광사멸입자를 표적 미생물과 결합시키는 단계; 및

(C) 상기 표적 미생물과 결합한 미생물 광사멸입자에 광 또는 고주파를 조사하는 단계

를 포함하는 미생물 광사멸방법.

**청구항 20**

청구항 19에 있어서,

상기 단계 (C) 이후에

(D) 상기 표적 미생물과 결합한 미생물 광사멸입자를 자력으로 분리하는 단계

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸방법.

**청구항 21**

청구항 19에 있어서,

상기 단계 (B) 이후 단계 (C) 이전에

(E) 상기 표적 미생물과 결합한 미생물 광사멸입자를 자력으로 모으는 단계

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸방법.

**청구항 22**

청구항 19에 있어서,

상기 단계 (C)의 광 조사량은 5 내지 20 $mW/cm^2$인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸방법.

**청구항 23**

청구항 19에 있어서,

상기 단계 (C)에서 조사하는 고주파의 주파수는 1 Hz 내지 1 GHz인 것을 특징으로 하는 미생물 광사멸방법.

# *명 세 서*

## *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 미립자 표면에 광에 의해 살미생물제를 생성하는 광감응제 및 표적 미생물에 선택적으로 결합하는 표적화제를 구비한 미생물 광사멸입자, 및 상기 미생물 광사멸입자를 이용해서 미생물을 사멸시키는 미생물 광사멸방법에 관한 것이다. 본 발명의 미생물 광사멸입자를 이용해 의학 분야에서는 병원성 미생물 및 암세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있고, 환경오염방지 분야에서는 독성 미생물에 의한 생태계 교란을 예방할 수 있다.

## *배 경 기 술*

[0002] 박테리아에 의한 감염은 인류의 건강을 위협하는 주요한 원인이다. 이러한 박테리아는 일반적으로 항생제에 의해 사멸시킬 수 있으나, 상기 항생제의 오남용으로 인해 항생제 자체에 내성을 가진 박테리아가 발생하고 있다. 메티실린-내성 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 및 반코마이신-내성 *Enterococcus* (VRE)와 같은 항생제 내성 박테리아는 병원감염 질환에 의한 사망원인 중 주요한 요인으로 매년 수천명의 목숨을 앗아간다. 그러나, 이들 박테리아에 대한 치료법은 아직 확립되지 않고 있으며, 따라서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 항생제를 사용하지 않고 박테리아를 사멸시키는 대체방법이 의학 바이오기술에서 가장 시급한 도전 중 하나이다. 광동역학 치료 (photodynamic therapy. PDT)는 항생제에 내성을 가진 병원성 미생물을 퇴치하는 대체 살균법으로서 제안되어 왔다. 광동역학 치료의 살균작용은 광감응제(photosensitizer)로 알려진 비독성 염료가 박테리아에 산화 스트레스를 가한다는 이론에 기초한다. 구체적으로, 박테리아에 부착된 광감응제는 적당한 파장의 광 조사에 의해 활성화되어 일중항산소 및 산소 자유라디칼을 생성하고, 이들 생성물은 세포막 및 기타 세포 구조에 산화 스트레스를 가함으로써 표적 미생물을 죽이게 된다. 아진, 시아닌, 포르피린 및 무기 나노입자를 포함하는 다양한 광감응제가 이러한 목적을 위해 제안 및 시험되어 왔다.

[0004] 그러나, 대부분의 광감응제는 박테리아 괴사 작용에 한계점을 가지고 있으며, 그램-음성 박테리아에 비해 그램-양성 박테리아에 대해 더 효율적인 항미생물 활성을 나타낸다. 그램-음성 박테리아의 내성은, 포르피린과

의 상호작용을 제한하고 $^1O_2$를 가로채는, 이들 박테리아 외막의 리포폴리사카라이드와 관련이 있다. 이러한 제한을 극복하기 위해, 폴리믹신 노나펩타이드 (polymixin nonapeptide) 및 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)와 같은 막투과제와 조합한 음이온성 광감응제를 사용하여 많은 신규 기술이 그램-음성 박테리아를 효율적으로 살균하기 위해 개발되어 왔다. 하지만, 많은 광감응제가 박테리아의 광역학적 불활성화에 효과적임이 밝혀졌음에도 불구하고, 숙주세포에 대한 광독성이 병변의 치료에 새로운 문제점으로 대두되었다.

[0005] 구체적으로, 광감응제가 박테리아에 선택적으로 부착되지 않으면 박테리아의 완전한 불활성화를 위해 고농도의 광감응제와 고출력밀도의 광이 요구되는데, 이는 숙주세포의 손상을 야기할 수 있다. 덧붙여, 광치료 후 감염부위에 잔존하는 광감응제는 숙주세포에 2 차 손상을 야기할 수 있다. 이처럼 숙주세포에 대한 광독성은 박테리아에 대한 광역학적 불활성화 (photodynamic inactivation. PDI)의 실제 적용에 있어서 주요한 장애물 중 하나로 작용해 왔다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 미립자와 그 표면에 결합된 광감응제 및 표적화제로 구성되고, 상기 표적화제에 의해 표적 미생물에 결합되며, 광에 의해 상기 광감응제로부터 생성된 살미생물제가 상기 표적 미생물을 사멸시키는 미생물 광사멸입자를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 또한, 상기 미생물 광사멸입자을 이용하여 미생물을 사멸시키는 미생물 광사멸방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

### *과제의 해결 수단*

[0008] 본 발명의 미생물 광사멸입자는 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여,

[0009] 평균입경 5 nm 내지 100 ㎛의 미립자;

[0010] 상기 미립자의 표면에 결합되고, 광에 의해 살미생물제를 생성하는 광감응제; 및

[0011] 상기 미립자의 표면에 결합되고, 표적 미생물과 선택적으로 결합하는 표적화제

[0012] 를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 또한, 상기 미립자는 자성입자일 수 있다.

[0014] 또한, 상기 자성입자는 $MFe_2O_4$, $M^1M^2FeO_4$, M 단일입자, 및 M 합금으로 이루어진 군에서 선택되고, 식 중 M, $M^1$ 및 $M^2$는 Ba, 전이금속 또는 란탄족 금속일 수 있다.

[0015] 또한, 상기 M, $M^1$ 또는 $M^2$는 Fe, Ni, Co, Mn, Zn 및 Pt로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0016] 또한, 상기 자성입자는 $Fe_3O_4$일 수 있다.

[0017] 또한, 상기 자성입자는 $FeCl_3$ 수화물 및 폴리에틸렌글리콜을 에틸렌글리콜에 용해시킨 용액에 나트륨 아세테이트를 첨가, 혼합한 후 160 내지 230 ℃에서 6 내지 16 시간 동안 반응시킨 것일 수 있다.

[0018] 또한, 상기 자성입자는 평균입경 5 내지 20 nm의 나노입자의 집적체일 수 있다.

[0019] 또한, 상기 미립자는 고주파에 의해 가열될 수 있다.

[0020] 또한, 상기 고주파는 1 Hz 내지 1 GHz의 주파수를 가질 수 있다.

[0021] 또한, 상기 광은 200 내지 1000 nm의 파장을 가질 수 있다.

[0022] 또한, 상기 광은 태양광 또는 레이저일 수 있다.

[0023] 또한, 상기 살미생물제는 활성 산소종일 수 있다.

[0024] 또한, 상기 활성 산소종은 일중항산소 또는 산소 자유라디칼일 수 있다.

[0025] 또한, 상기 광감응제와 자성입자는 서로 착물을 형성하여 배위결합할 수 있다.

[0026] 또한, 상기 광감응제는 카르복시기, 티올기 또는 아민기를 가질 수 있다.

[0027] 또한, 상기 광감응제는 포르피린(porphyrin) 또는 프탈로시아닌(phthalocyanine)일 수 있다.

[0028] 또한, 상기 광감응제는 [5,15-비스페닐-10,20-비스(4-메톡시카르보닐페닐)-포르피린] 플래티늄 ([5,15-bisphenyl-10,20-bis(4-methoxycarbonylphenyl)-porphyrin] platinum. t-PtCP)일 수 있다.

[0029] 또한, 상기 표적화제와 자성입자는 서로 착물을 형성하여 배위결합할 수 있다.

[0030] 또한, 상기 표적화제는 카르복시기, 티올기 또는 아민기를 가질 수 있다.

[0031] 또한, 상기 표적화제는 항생제, 항체, 단백질, 또는 당단백질일 수 있다.

[0032] 한편, 본 발명의 미생물 광사멸방법은

[0033] (A) 상기 미생물 광사멸입자를 표적 미생물과 혼합하는 단계;

[0034] (B) 상기 미생물 광사멸입자를 표적 미생물과 결합시키는 단계; 및

[0035] (C) 상기 표적 미생물과 결합한 미생물 광사멸입자에 광 또는 고주파를 조사하는 단계

[0036] 를 포함하는 것이 바람직하다.

[0037] 또한, 본 발명의 미생물 광사멸방법은

[0038] 상기 단계 (C) 이후에

[0039] (D) 상기 표적 미생물과 결합한 미생물 광사멸입자를 자력으로 분리하는 단계

[0040] 를 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 미생물 광사멸방법은

[0042] 상기 단계 (B) 이후 단계 (C) 이전에

[0043] (E) 상기 표적 미생물과 결합한 미생물 광사멸입자를 자력으로 모으는 단계

[0044] 를 추가로 포함할 수 있다.

[0045] 또한, 상기 단계 (C)의 광 조사량은 5 내지 20 mW/$cm^2$일 수 있다.

[0046] 또한, 상기 단계 (C)에서 조사하는 고주파의 주파수는 1 Hz 내지 1 GHz일 수 있다.

## *발명의 효과*

[0047] 본 발명의 미생물 광사멸입자는 광 또는 고주파의 조사 하에서 박테리아나 암세포를 비롯한 미생물을 표적화(targeting), 포획 및 불활성화하는 데 효과적이다. 예컨대, $Fe_3O_4$@t-PtCP&van 입자는 박테리아에 대한 높은 결합능력을 통해 개선된 광역학적 불활성화 효율을 나타내며, 결과적으로 포획된 박테리아의 완전한 사멸이 가능하다. 이처럼 탁월한 결합능력은 낮은 광감응제 농도 (0.35 μM), 적은 광 조사량 (6.1 mW/$cm^2$), 및 매우 짧은 처리시간 (그램-양성 박테리아에 대해 6 분)에서도 박테리아의 사멸을 가능하게 한다.

[0048] 본 발명의 다기능 미생물 광사멸입자는 또한 자석에 의한 분리가 가능한데, 이를 통해 광역학적 치료 도중 및 그 이후에 숙주세포에 대한 2 차적인 광독성을 최소화시킬 수 있다. 이는 본 발명의 미생물 광사멸입자를 구성하는 자성입자가 나노입자의 집적체이어서 일반 나노입자에 비해 훨씬 큰 포화자화값을 가지고 그 결과 외부자기장에 의해 쉽게 포집될 수 있기 때문이다. 뿐만 아니라, 초상자성을 가진 나노입자의 집적체로 구성됨으로써 비교적 큰 입자 크기에 비해 초상자성을 그대로 유지할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 초상자성 특징은 고주파에 의한 온열치료(hyperthermia)를 가능케 하여 이에 의한 치료효과도 거둘 수 있다.

[0049] 본 발명은 그램-양성 및 그램-음성 박테리아 뿐만 아니라, 병원내 및 항생제-내성 박테리아 균주에 대해서도 효과적이다. 이러한 결과는 심각한 박테리아 감염을 앓는 환자에 대해 본 발명의 물질이 대단히 유망한 보조치료법으로서의 적용가능성을 나타낸다. 나아가, 본 발명의 다기능 미생물 광사멸입자는 자기공명영상(MRI) 진단, 생분리(bioseparation), 표적 전달, 광동역학 치료와 같은 다양한 임상적 용도 뿐만 아니라, 환경에 유

해한 미생물을 사멸시킴으로써 생태계 피해를 방지하는 환경분야에서도 그 효과가 기대된다.

## 도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 본 발명의 다기능 미생물 광사멸입자를 제조하는 과정을 나타낸 개략도이다.

도 2는 $Fe_3O_4$ 입자의 형태구조 및 결정구조에 대한 FE-SEM 이미지이다 (개별 나노입자에 대한 고해상도 삽도 포함).

도 3은 $Fe_3O_4$ 입자의 형태구조 및 결정구조에 대한 TEM 이미지이다 (개별 나노입자에 대한 고해상도 삽도 포함).

도 4는 순수한 $Fe_3O_4$ 나노입자의 입자크기 분포에 대한 히스토그램이다.

도 5는 $Fe_3O_4$ 입자의 XRD 패턴이다.

도 6은 순수한 t-PtCP 및 $Fe_3O_4$에 결합된 t-PtCP의 FT-IR 스펙트럼이다.

도 7은 순수한 반코마이신 및 $Fe_3O_4$에 결합된 반코마이신의 FT-IR 스펙트럼이다.

도 8은 본 발명의 다기능 미생물 광사멸입자에 대한 단계별 제조과정에 있어서 실온 자성 히스터리시스 루프를 나타낸다.

도 9는 확산반사 스펙트럼에 대한 Kubelka-Munk 식을 적용하여 수득한, THF 중 t-PtCP 및 다기능 미생물 광사멸입자의 흡수 스펙트럼이다.

도 10은 여기파장 510 nm에서 THF 중 t-PtCP 및 다기능 미생물 광사멸입자의 방출 스펙트럼이다.

도 11은 시간 및 파장에 대한, THF 중 다기능 나노입자로부터의 일중항산소 인광 붕괴신호를 나타내며, 삽도는 THF 중 다기능 나노입자에 의해 생성된 일중항산소의 방출 스펙트럼을 나타낸다.

도 12는 다기능 나노입자를 이용한 박테리아의 포획 및 사멸, 그리고 레이저 조사 후 생존율 확인에 대한 개략도이다.

도 13은 (b) *E. coli* O157:H7:K-, (c) *S. typhimurium*, (d) *S. aureus*, (e) *E. faecalis*, (f) MSSA, (g) MRSA, 및 (h) VRE를 다기능 나노입자와 배양한 후 자석으로 분리한 후의 TEM 이미지이며, 삽도는 각 박테리아의 단일 세포의 TEM 이미지를 나타낸다.

도 14 내지 도 16은 다기능 미생물 광사멸입자에 의해 포획된 그램-양성 박테리아 (도 14), 그램-음성 박테리아 (도 15), 및 슈퍼박테리아 (도 16)의 광역학적 사멸을 나타내며, Y-축은 포획 분획에 대한 레이저 조사 후의 생존 박테리아 백분율을 나타내고, 오차 막대는 2 번의 독립적 시험으로부터 수득되었다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 또한, 하기의 설명에서는 구체적인 구성요소 등과 같은 많은 특정사항들이 설명되어 있는데, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐 이러한 특정 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0052] 본 명세서에서 사용된 용어 '미생물'은 의학 분야 또는 환경 분야에서 포획 또는 사멸의 대상이 되는 세균, 진균, 바이러스 또는 암세포 등 작은 생명체를 가리킨다.

[0053] 본 명세서에서 사용된 용어 '광(光)'이란, 본 발명의 미생물 광사멸입자를 구성하는 광감응제 분자를 여기시켜 살미생물제를 생성시킬 수 있는 정도의 에너지를 가진 입자선 및 전자기파를 함께 지칭하며, 근적외선, 가시광선, 자외선, 태양광, 레이저 등을 포함한다. 본 발명에서는 특히 파장 200 내지 1000 nm의 광이 바람직하다.

[0054] 본 명세서에서 사용된 용어 '고주파'는 본 발명의 미생물 광사멸입자를 구성하는 '미립자'를 가열시킬 수 있는 높은 주파수를 가진 전자파를 가리키며, 1 Hz 내지 1 GHz의 주파수를 갖는 것이 더욱 바람직하다.

[0055] 본 명세서에서 사용된 용어 '표적화제' 및 '포획분자'는 표적이 되는 세균, 진균, 바이러스 또는 암세포와 같은 사멸시킬 미생물과 결합하여 포획이 가능한 분자를 가리킨다.

[0056] 본 발명에서, 새롭게 디자인된 다기능 미생물 광사멸입자는 박테리아 등 미생물의 선택적 표적화 및 불활성화를 위한 광치료제 또는 환경분야에서의 친환경 살균제로서 개발되었다. 이러한 다기능 미생물 광사멸입자는 광감응제와 공유결합된 미립자에 기초하며, 이 입자는 숙주 조직으로부터 포획된 미생물을 분리하고, 광동역학 치료 후 광감응제의 완전한 제거를 가능하게 한다. 상기 미립자는 또한 표적화제로서 사용되는 반코마이신(vancomycin)으로 기능이 추가되며, 이 분자는 미생물의 세포벽에 선택적으로 상기 다기능 미생물 광사멸입자를 전달한다. 세포벽에 대한 반코마이신의 높은 결합 친화도로 인해 표적 미생물을 사멸시키는 데 필요한 광감응제의 농도를 매우 낮은 수준으로 낮출 수 있고, 저 출력밀도의 광으로도 아주 짧은 시간 내에 표적 미생물을 사멸시킬 수 있다. 박테리아와 같은 미생물을 표적화, 포획 및 사멸시키기 위한 다기능 미생물 광사멸입자는 대단히 효과적이어서, 6 분 내에 그램-양성 박테리아 100 %를 완전히 불활성화시킬 수 있다. 상기 입자는 항생제-내성 병원성 박테리아에 대해서도 효과적인 살균제이다.

[0057] 구체적으로, 본 발명의 미생물 광사멸입자는 평균입경 5 nm 내지 100 ㎛의 미립자, 상기 미립자의 표면에 결합되고, 광에 의해 살미생물제를 생성하는 광감응제; 및 상기 미립자의 표면에 결합되고, 표적 미생물과 선택적으로 결합하는 표적화제를 포함한다.

[0058] 상기 미립자는 탄소나노튜브와 같은 나노입자 등도 가능하나, 자성을 띤 자성입자인 것이 더욱 바람직하다. 여기서 상기 자성입자는 핵자기공명에서 조영제로 사용할 수 있는 성분이라면 제한 없이 사용 가능하며, 특히 초상자성을 가지는 입자가 바람직하다. 그 중에서도, $MFe_2O_4$, $M^1M^2FeO_4$, M 단일입자, 및 M 합금으로 이루어진 군에서 선택되고, 식 중 M, $M^1$ 및 $M^2$는 Ba, 전이금속 또는 란탄족 금속인 것이 바람직하며, 특히 Fe, Ni, Co, Mn, Zn 및 Pt로 이루어진 군에서 선택되는 것이 더욱 바람직하다.

[0059] 또한, 상기 자성입자는 평균입경 5 내지 20 nm의 나노입자의 집적체일 수 있다. 일반적으로, 20 nm 이하의 입경을 갖는 나노입자는 초상자성을 가지는데, 이들 나노입자의 집적체는 크기가 커져도 초상자성을 유지할 수 있어 MRI나 온열치료에 활용할 수 있으므로 바람직하다. 또한, 이처럼 집적체를 구성하는 경우 포화자화값을 대폭 상승시킬 수 있는데, 이렇게 포화자화값이 높아지면 외부자기장에 의한 포집이 가능해지는 장점이 있다. 이는 종래 초상자성을 갖는 나노입자가 외부자기장으로 포집하기 어려웠던 한계를 극복하게 해 주며, 실제 임상에서는 숙주 조직으로부터 완전히 제거되지 않은 광사멸입자로 인한 2 차 독성을 방지할 수 있는 장점으로 작용한다.

[0060] 나노입자의 집적체로서의 본 발명 자성입자는 평균입경이 5 nm 내지 100 ㎛인 것이 바람직한데, 5 nm 미만인 경우 제조하기가 곤란한 문제점이 있고, 반대로 100 ㎛를 초과하는 경우에는 표적 미생물의 세포를 감싸기에는 지나치게 커져 버리는 문제점이 있다. 특히 10 내지 1000 nm 범위의 자성입자가 치료 목적에 적합하며, 그 이상 크기의 입자는 의학용이 아닌 환경오염물질 제거용과 같은 생체외 처리에 적합하다.

[0061] 나아가, 상기 자성입자는 $Fe_3O_4$인 것이 바람직하고, 예컨대 $FeCl_3$ 수화물 및 폴리에틸렌글리콜을 에틸렌글리콜에 용해시킨 용액에 나트륨 아세테이트를 첨가, 혼합한 후 160 내지 230 ℃에서 6 내지 16 시간 동안 반응시켜 제조하는 것이 바람직하다.

[0062] 한편, 본 발명의 광사멸을 유도하는 상기 광은 본 발명의 광사멸입자 구성성분 중 광감응제를 여기시켜 이로부터 살미생물제를 생성시킬 수 있는 것이라면 제한 없이 사용 가능하다. 따라서, 태양광, 형광등, 할로겐 램프, Xe 램프, LED 등의 각종 다이오드처럼 다양한 광원으로부터 생성되는 자외선, 가시광선 또는 근적외선 등의 광선이 가능하며, 구체적으로 200 내지 1000 nm의 파장을 갖는 것이 바람직하고, 이들의 레이저도 가능하다.

[0063] 그리고, 본 발명의 온열 치료를 유도하는 고주파는 본 발명의 미생물 광사멸입자를 구성하는 미립자를 가열시킬 수 있는 높은 주파수를 가진 전자파라면 제한 없이 사용 가능하며, 1 Hz 내지 1 GHz의 주파수를 갖는 것이 더욱 바람직하다.

[0064] 또한, 상기 살미생물제는 미생물의 생장을 저해할 수 있는 물질이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 숙주세포에 영향을 미치지 않고 인접한 표적 미생물만 선택적으로 사멸시킬 수 있는 물질이 바람직하다. 특히 상기 살미생물제는 활성 산소종인 것이 더욱 바람직하고, 그 중에서도 일중항산소 또는 산소 자유라디칼인 것이 특히 바람직하다.

[0065] 한편, 상기 광감응제는 본 발명에서의 광에 의해 여기되어 살미생물제를 생성시킬 수 있는 물질이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 특히 분자 내에 카르복시기, 티올기 또는 아민기를 갖는 경우 상기 자성입자와 같은 미립자와 서로 착물을 형성하여 배위결합할 수 있어 안정적인 광사멸입자를 구성할 수 있다. 구체적으로 포르피린 또는 프탈로시아닌이 이러한 용도에 적합하며, 특히 [5,15-비스페닐-10,20-비스(4-메톡시카르보닐페닐)-포르피린] 플래티늄 ([5,15-bisphenyl-10,20-bis(4-methoxycarbonylphenyl)-porphyrin] platinum. t-PtCP)이 바람직하다.

[0066] 그리고, 표적화제란 전술한 용어 설명에서와 같이 미생물과 선택적으로 결합할 수 있는 물질이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 특히 상기 광감응제와 마찬가지 취지로 분자 내에 카르복시기, 티올기 또는 아민기를 가짐으로써 상기 자성입자와 같은 미립자와 서로 착물을 형성하여 배위결합할 수 있는 것이 바람직하고, 구체적으로 항생제, 항체, 단백질, 또는 당단백질 분자일 수 있다.

[0067] 한편, 본 발명의 미생물 광사멸방법은 상기 미생물 광사멸입자를 표적 미생물과 혼합하여 서로 결합시키고, 상기 표적 미생물과 결합한 미생물 광사멸입자에 광 또는 고주파를 조사하여 미생물을 사멸시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명은 미립자에 광감응제와 표적화제를 동시에 구비시킴으로써 미생물에 대한 선택성이 높아지고 광감응제에서 생성된 살미생물제가 효과적으로 표적 미생물에 전달되는 장점이 있다. 이는 표적화제가 미생물을 붙들고 있어서, 광감응제는 살미생물제를 바로 곁의 미생물에 효과적으로 전달할 수 있기 때문이다. 이러한 효과는 고주파에 의해 가열된 미립자로부터 발생되는 열도 마찬가지여서, 인접한 표적 미생물을 대상으로 효율적인 온열 치료를 가능하게 한다.

[0068] 본 발명의 광사멸방법은 또한, 상기 표적 미생물과 결합한 미생물 광사멸입자를 자력으로 분리하여 2 차 광독성을 예방하는 단계를 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

[0069] 나아가, 상기 광 또는 고주파 조사 전에 상기 표적 미생물과 결합한 미생물 광사멸입자를 자력으로 모으면 좁은 범위에만 광 또는 고주파를 조사하는 것이 가능하여 전력소비를 최소화할 수도 있다. 이는 환경 분야와 같이 대규모 처리가 필요한 분야에서 특히 장점으로 작용한다.

[0070] 상기 광 조사 단계에서의 광 조사량은 5 내지 20 $mW/cm^2$인 것이 바람직하며, 5 $mW/cm^2$ 미만인 경우 에너지량이 너무 적어 미생물이 사멸하지 않을 수 있고, 반대로 20 $mW/cm^2$를 초과하는 경우 숙주세포가 감당할 수 없는 독성을 나타낼 수 있어 바람직하지 않다.

[0071] 이하, 본 발명의 실시예에 대하여 설명한다.

[0072] **실시예**

[0073] 실시예 1: 다기능 미생물 광사멸입자의 제조

[0074] - 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자의 제조

[0075] 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자는 열용매 환원법 (solvothermal reduction method)을 사용하여 제조되었다. $FeCl_3?6H_2O$ (1.35 g, 5 mmol) 및 폴리에틸렌 글리콜 (1.0 g)을 에틸렌 글리콜 (40 mL)에 용해시켜 맑은 용액을 형성시키고 나서, NaAc (3.6 g)를 상기 혼합물에 첨가하고 30 분 동안 강하게 교반했다. 상기 형성된 점성 슬러리를 테프론이 구비된 용량 80 mL의 스텐레스 오토클레이브로 옮겼다. 상기 오토클레이브를 가열하여 200 ℃에서 8 시간 동안 유지했고, 실온까지 자연냉각시켰다. 증류수 및 무수 알콜로 수차례 세척하고 60 ℃에서 6 시간 동안 건조시켜 흑색의 침전물을 수득하였다.

[0076] - 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자에 광감응제 및 반코마이신 접합

[0077] 다음과 같이 [5,15-비스페닐-10,20-비스(4-메톡시카르보닐페닐)-포르피린] 플래티늄 ([5,15-bisphenyl-10,20-bis(4-methoxycarbonylphenyl)-porphyrin] platinum. t-PtCP)과의 습식 화학공정에 의해 $Fe_3O_4$@t-PtCP 입자를 제조하였다. t-PtCP 분자는 문헌 (Guo, S. J., Li, D., Zhang, L. M., Li, J. & Wang, E. K. Monodisperse mesoporous superparamagnetic single-crystal magnetite nanoparticles for drug delivery. Biomaterials 30, 1881-1889, 2009)에 개시된 바대로 합성하였다. THF 중 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자 (30 mg / mL, 5 mL THF)를 t-PtCP ($5\times10^{-2}$ mM, 5 mL THF) 용액과 혼합하였다. 혼합액을 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후, 생성물을 THF 용매로 수차례 세척하였다. 최종 세척 후, 잔여 THF 용매를 추가로 제거하고 나서

60 ℃에서 6 시간 동안 건조시켰다. 수득된 $Fe_3O_4$@t-PtCP 입자 1 mg을 이어서 PBS 용액 (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.4 mM Na2HPO4, 1.8 mM KH2PO4, pH 7.4) 1 mL가 담긴 바이알로 옮겼다. 세척을 위해 PBS 용액을 교반시켰다. 세척 후 잔여 PBS 용액을 제거하고 나서, $Fe_3O_4$@t-PtCP 입자를 새로운 PBS 용액 1 mL에 재현탁시켜 농도 1 mg/mL (약 $2.37 \times 10^{10}$ 입자/mL)을 달성하였다. $Fe_3O_4$@t-PtCP 입자 용액 (1 mg/mL, 1 mL)을 반코마이신 용액 (1 mg/mL, 1 mL) 및 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드 (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride. EDAC) 수용액 (1 mg/mL, 1 mL)과 혼합하였다. 혼합 용액을 4 ℃의 약한 혼합 조건 (50 rpm)에서 24 시간 배양 동안 교반시켰다. 반응 후 용액을 1 분 동안 자석 위에 놓아, 상청액 중의 미결합 반코마이신을 다른 바이알로 제거하였다. $Fe_3O_4$@t-PtCP 입자에 접합된 반코마이신을 PBS 용액으로 3 회 세척하고, 혼합조건 200 rpm에서 30 분 동안 Tris?HCl 완충액 (50 mM, pH 7.4) 1 mL로 배양했다.

[0078] 시험예 1: 다기능 미생물 광사멸입자의 성질

[0079] 투과전자현미경 (TEM, JEOL, JEM-2100F, Japan) 및 전계방사형 주사전자현미경 (FE-SEM, Hitachi, SU-70, Japan)을 사용하여 다기능 미생물 광사멸입자의 형태구조를 연구하였다. 복합 입자의 결정구조는 Cu Kα 복사에서 작동하는 X-선 회절계 (XRD, PANalytical, X` Pert Pro MPD, Netherlands)로 조사하였다. 실온에서 H = 10 kOe 까지 자기장 루프에 대한 자성화를 수득하기 위해 진동 샘플 자기 측정계 (vibrating sample magnetometry, VSM, Lakeshore 7300, USA)를 사용하였다. PerkinElmer FT-IR (spectrum 100 spectrometer, USA)을 이용하여 적외선 스펙트럼을 수득하였다. IR 측정을 위해, 샘플은 마노유발 (agate mortar)로 분쇄하고 나서 압축 웨이퍼 (KBr 중 샘플 약 1 중량%)로 제조되었다. 적분구 (Jasco ISV-469, Japan) 및 분광형광계 (Hitachi, F-4500, Japan) 각각을 구비한 확산반사 UV-Vis 분광광도계 (Jasco V-550, Japan)를 사용하여 흡수 및 방출 스펙트럼을 수득하였다.

[0080] 도 1에 도시된 바와 같이, 제조된 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자를 광감응제 및 표적화제로 표면개질함으로써 다기능 미생물 광사멸입자를 제조하였다. 광감응제 및 표적화제의 반코마이신이 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자 표면의 철 이온에 결합되었다. 글리코펩타이드 항생제인 반코마이신은 박테리아의 세포벽 중 펩티도글리칸의 D-Ala-D-Ala 부위에 수소결합함으로써 박테리아의 성장을 방해한다. 반코마이신이 결합된 나노입자는 박테리아를 선택적으로 포획할 수 있어, 박테리아를 표적화하는 데 바람직하다.

[0081] 본 발명에서 합성된 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자의 형태구조 및 결정구조는 FE-SEM, TEM, 및 XRD를 사용하여 조사되었다. 도 2는 미크론 이하의 입자가 훌륭한 크기 균일성을 보유하고 있음을 나타낸다. 고배율 이미지 (도 2의 삽도)는 각 입자가 다수의 작은 직경 12 내지 17 nm의 나노입자로 이루어져 있음을 나타낸다. 보다 상세한 결정구조는 미크론 이하의 구형 입자의 가장자리에서 촬영된 HR-TEM 이미지로 수득되었다. 도 3의 삽도는 집적된 작은 나노입자들이 규칙적인 평행격자 띠를 가지고 있음을 나타낸다. 격자 띠의 층간 거리는 약 2.97 Å으로 측정되었는데, 이는 자성 나노입자의 역 스피넬 구조 내부의 (220) 평면들 사이의 거리와 일치한다.

[0082] 도 4는 FE-SEM 이미지의 상이한 영역에서 300 입자를 샘플링하여 측정한, 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자의 크기 히스토그램으로서, 본 발명의 입자가 훌륭한 크기 균일성을 가지고, 평균 입자크기는 400 nm이며 분포는 ± 19 nm임을 나타낸다.

[0083] 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자에 대한 분말 XRD 패턴은 도 5에 도시된 바와 같이 보다 자세한 구조 정보를 제공한다. 강한 브라그(Bragg) 반사피크 ($2\Theta$ = 30.0, 35.6, 43.3, 53.7, 57.0, 62.8° )가 표준 $Fe_3O_4$ 분말 회절데이터 (JCPDS, card 19-0629)로부터 수득된 밀러(Miller) 지수 ((220), (311), (400), (422), (511), 및 (440))에 의해 표지된다. 모든 회절피크의 위치 및 상대강도는 입방 역스피넬 구조의 자철석 결정의 특성피크와 잘 대응된다. Debye-Scherrer 식으로부터 계산된 평균 입경은 약 13 nm인데, 이는 작은 나노입자에 대한 FE-SEM 결과와 아주 일치하고, 그 집적 형은 400 nm의 큰 미크론 이하 입자가 된다.

[0084] t-PtCP의 카르복실기 및 반코마이신, 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자 중 철 이온 사이의 결합 특성을 이해하기 위해, t-PtCP, 반코마이신, $Fe_3O_4$와 결합한 t-PtCP, 및 $Fe_3O_4$와 결합한 반코마이신의 FT-IR 스펙트럼이 비교되었다 (도 6, 도 7). 순수 t-PtCP의 IR 스펙트럼은 1689 cm-1, 1421 cm-1, 및 1290 cm-1에서 흡수피크를 나타

내는데, 이는 자유 카르보닐 이중결합($\upsilon_{C=O}$)의 신축모드, 탄소-산소 단일결합 ($\upsilon_{C-O}$)의 신축모드, 및 O-H 변형 ($\upsilon_{C-OH}$)에 각각 대응된다 (도 6). 이들 특성 흡수피크는 순수한 t-PtCP가 예상대로 양성자화 카르복실기(COOH)를 보유함을 나타낸다. 카르복실기 및 철 이온 사이에서 접합반응 (conjugation reaction)이 일어난 후, $Fe_3O_4$에 결합된 t-PtCP의 IR 스펙트럼은 양성자화 카르복실기에 대응되는 피크, 및 나아가 카르복실레이트기의 각각 비대칭($\upsilon_{as}$) 및 대칭($\upsilon_s$) 신축진동에 기인하는, 1549 $cm^{-1}$ 및 1411 $cm^{-1}$에서의 새로운 밴드가 나타난다. 이는 t-PtCP의 카르복실 말단기가 철 이온 및 카르복실레이트 사이의 화학적 배위결합의 결과 철-카르복실레이트 착물을 형성하고, 일부는 또한 양성자화 카르복실 상태로 존재함을 의미한다. $Fe_3O_4$에 결합한 반코마이신의 IR 스펙트럼은 계면 결합반응 후 비슷한 결과를 또한 나타낸다. 도 6의 스펙트럼은 양성자화 카르복실기가 실질적으로 사라지고, 1560 $cm^{-1}$ 및 1417 $cm^{-1}$에서 새로운 밴드가 나타남을 보여준다. 이러한 패턴의 스펙트럼 변화는 또한 화학 배위에 의한 철-카르복실레이트 착물의 형성에 기인한다.

[0085] 이처럼 자성입자와 유기물이 배위결합에 의해 직접 결합하는 것은 본 발명의 또 다른 주요 특징을 이룬다. 종래 자성입자는 유기 계면활성제 중에서 소수성으로 제조되므로, 친수성의 유기물 도입을 위해서는 복잡한 표면처리를 거쳐야 하는 번거로움이 있었다. 이에 더하여, 소수성 유기 계면활성제 뿐만 아니라 표면처리에 사용되는 물질들은 향후 임상 적용시 독성을 발휘하므로 사용 전에 완전히 제거해야만 하는 문제점 또한 지니고 있다.

[0086] 그러나, 본 발명의 미생물 광사멸입자를 구성하는 자성입자는 친수성 PEG 사슬로 제조되고 이러한 PEG 역시 세척으로 제거되어, 자성입자의 철 원자가 노출된 형태로 제조될 수 있다. 이처럼 노출된 철 원자는 광감응제나 표적화제의 각종 기능기와 착물 형성을 통한 배위결합을 이루어 화학적 안정성이 뛰어나고, 그 결과 장기간 강한 결합을 유지할 수 있다.

[0087] 미크론 이하의 입자에 대한 자석 성질은 실온에서 VSM을 사용하여 조사되었다. 도 8은 미크론 이하의 다기능 미생물 광사멸입자의 단계별 표면 개질공정 도중 수득된 여러 샘플에 대해 포화 자성화에서의 변화를 나타낸다. 모든 샘플의 자성화 곡선은 심지어 높은 자기장에서도 아무런 히스터리시스(hysteresis) 및 보자력(coercivity)을 나타내지 않으며, 이는 모든 미크론 이하의 입자가 초상자성(superparamagnetic)임을 가리킨다. FE-SEM 이미지 및 X-선 회절 패턴에서 관찰된 바와 같이, 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자는 직경 15 내지 20 nm의 많은 작은 나노입자로 이루어져 있다. 일반적으로, $Fe_3O_4$ 나노입자는 나노결정 크기가 20 nm 이하일 때 초상자성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 미생물 광사멸입자가 약 400 nm의 큰 입경에도 불구하고 이러한 초상자성 거동을 나타내는 이유는 초상자성을 갖는 직경 20 nm 이하의 작은 나노입자가 집적된 형태의 구조를 갖고 있기 때문이다.

[0088] 도 8은 순수한 $Fe_3O_4$가 $Fe_3O_4$@t-PtCP 및 $Fe_3O_4$@t-PtCP&van을 거쳐 $Fe_3O_4$@t-PtCP&van@박테리아까지 표면 개질됨에 따라 10,000 G 자기장에서의 자성화가 감소하는 것을 나타내며, 이는 미크론 이하의 $Fe_3O_4$ 입자 표면에 결합된 다양한 유기 화합물의 반자기성 기여 때문이다. 특히, $Fe_3O_4$@t-PtCP&van@박테리아의 박테리아 결합 샘플이 표적화 및 분리 치료제로서 적용하기에 매우 충분한 자성화를 여전히 가지고 있음은 주목할 만하다.

[0089] 이는 본 발명의 미생물 광사멸입자 입경이 약 400 nm에 달해 일반 나노입자에서 도달할 수 없는 큰 포화자화값을 가지기 때문이다. 종래 초상자성 나노입자는 외부자기장에 의해 포집이 매우 어려웠던 점을 감안하면, 그 집적체로서 포화자화값을 획기적으로 증대시킴에 따라 외부자기장에 의한 포집을 용이하게 한 본 발명의 미생물 광사멸입자는 임상적으로 대단히 탁월한 장점을 가지게 되는 것이다.

[0090] 도 9는 THF 용액 중 t-PtCP의 흡수 스펙트럼과 THF 용액에 현탁된 미크론 이하의 다기능 미생물 광사멸입자의 확산반사 흡수 스펙트럼 사이의 차이를 나타낸다. 400 nm에서의 소레(Soret) 밴드 및 510 nm와 538 nm에 위치한 Q 밴드가 2 샘플에서 일관되게 나타난다. 도 10에 도시된 바와 같이 408 nm의 여기에서, t-PtCP 용액은 660 및 725 nm에 위치한 2 개의 강한 방출 피크를 생성하는 데 반해, 미크론 이하의 광기능성 자성 입자는 628 및 680 nm에서의 청색 변위된 피크를 보여준다. 이러한 청색 변위는 또한 t-PtCP 및 미크론 이하의 자성 입자 표면 사이에 강한 커플링이 존재함을 나타낸다.

[0091] 시험예 2: 일중항산소의 검출

[0092] 1270 nm에서 특성 인광 방출피크에 의해 일중항산소($^1O_2$)의 생성 및 그 이완수명을 검출하였다. Nd-YAG (BMI

series, 7 ns FWHM pulse)에 의해 펌핑되는 광파라메트릭발진기 (Optical parametric oscillator, OPO. B.M. Industries OP901-355, 5 ns FWHM pulse, France) 레이저를 여기원 (excitation source)으로서 사용하였다. 인광신호가 여기 광선에 수직으로 수집되고, 분광기 (Optometrics LLC, mini-chrom04, USA) 및 NIR-PMT (Hamamatsu, H9170-45, Japan)로 검출되었다. 신호는 500 MHz 디지털 오실로스코프 (Hewlett Packard, 54520A, USA)로 수득되어 자료분석을 위해 컴퓨터로 전송되었다.

[0093] 도 11은 THF 용액 중 $Fe_3O_4$@t-PtCP&van로부터 일중항산소의 생성을 증명한다. 여기된 일중항산소의 이완에 의해 생성되는 인광 밴드는 일반적으로 1190 내지 1350 nm에 위치한다. 일중항산소의 수명은 THF 용액 중 $Fe_3O_4$@t-PtCP&van의 단일 지수 피팅으로부터 ~20 μs로 추산되는데, 이는 THF 용액 중 기타 광감응제로부터 일중항산소의 수명과 일치한다. 따라서, 이렇게 제조된 $Fe_3O_4$@t-PtCP&van은 일중항산소를 포함한 활성 산소종을 사용하는 다양한 광역학적 적용을 위한 다기능 매체로서 적합하다.

[0094] 실시예 2: 병원성 박테리아의 광역학적 사멸

[0095] *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (KCCM 40253), *Escherichia coli* O157:H7:K$^-$ (ATCC 700927), *Salmonella typhimurium* (IFO 14193), 메티실린-민감성 *Staphylococcus aureus* (MSSA, ATCC 29213)가 균주은행으로부터 수득되었다. MRSA 및 VRE의 임상분리주는 고려대학교병원(한국)으로부터 기증받았다. 이들 균주는 뇌-심장 침출 (BHI) 배지에서 배양되었다. 박테리아는 37 ℃에서 15 시간 동안 배양되었다. 이어서, 배양 배지를 원심분리하고 박테리아를 PBS 용액으로 세척하였다. 박테리아 농도는 UV-Vis 분광광도계로 측정하고, 이와 별도로 BHI 우무판 또는 혈액우무판 (Blood Agar plate, BAP)에 박테리아를 도말하고 37 ℃에서 15 시간 동안 배양한 후 콜로니를 계수하여 확인하였다. PBS 용액의 부피는 세포의 목표농도 $10^6$ CFU/mL를 달성하도록 조절되었다. 박테리아의 포획을 위해, 본 발명의 다기능 미생물 광사멸입자 (Fe3O4@t-PtCP&van. 1 mg/mL, 1mL)를 박테리아 1 mL와 혼합하였다. 혼합물을 실온의 혼합조건 (150 rpm) 하에서 2 시간 동안 배양하였다. 이어서 다기능 미생물 광사멸입자에 의해 포획된 박테리아를 자석으로 수집하고, 포획 효율을 계산하기 위하여 상청액을 새로운 바이알로 옮겼다. 박테리아 및 다기능 미생물 광사멸입자 복합체는 PBS 용액으로 5 회 세척하고, PBS 용액 1 mL에 재현탁시키고 나서, 포획 분획에서 박테리아의 계수를 위해 BHI 우무판 또는 BAP에 도말하였다.

[0096] 다음, 박테리아의 사멸을 시험하기 위해, 다기능 미생물 광사멸입자 복합체에 포획된 박테리아를 상이한 시간 간격에서 레이저로 조사하였다. Nd-YAG로 펌핑되는 파장 λ=510 nm 및 펄스 폭 7 ns의 OPO 레이저가 약 1.23 $cm^2$의 스팟면적에 조사되었다. 레이저 에너지 밀도는 10 Hz의 반복속도로 6.1 $mWcm^{-2}$이었다. 조사 후, 박테리아의 생존 백분율을 평가하기 위해 다기능 미생물 광사멸입자에 의해 포획된 박테리아의 복합체를 BHI 우무판 또는 BAP에 도말하고 37 ℃에서 15 시간 동안 배양하였다. 각 실험은 3 회 반복하였다.

[0097] 도 12는 다기능 미생물 광사멸입자를 사용하여 박테리아를 포획하고, 광 조사에 이어 박테리아 사멸을 확인하는 과정에 대한 개략도이다. 다기능 미생물 광사멸입자가 박테리아 용액 ($10^6$ CFU/mL)에 첨가되면, 박테리아는 그 세포벽에 대한 반코마이신의 결합능 때문에 다기능 미생물 광사멸입자에 의해 포획된다. 박테리아를 포획한 다기능 미생물 광사멸입자 복합체는 자석을 이용하여 포획되지 않은 박테리아로부터 분리하고, FWHM (full width half maximum)에서 7 ns 및 파장 λ=510 nm인 레이저 광을 사용하여 약 1.23 $cm^2$의 면적에 조사하였다. 이어서 샘플을 BHI 우무판에 도말하고 박테리아를 계수하였다.

[0098] 반코마이신의 박테리아 포획 용량을 측정하기 위해, $10^6$ CFU/mL의 4 박테리아, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7:K$^-$, 및 *S. typhimurium*를 $Fe_3O_4$@t-PtCP 및 $Fe_3O_4$@t-PtCP&van의 기능성 입자와 2 시간 동안 혼합하였다. 혼합 용액으로부터, 자석을 이용하여 각각의 박테리아 포획 입자 복합체가 분리되고, 포획된 박테리아의 수가 계산되었다.

[0099] 포획률 및 박테리아 사멸효과를 측정하기 위해, 수집된 입자 복합체를 PBS 용액에 재현탁시키고 나서 BHI 우무판에 도말하였다 (포획된 분획). 표 1에 나타낸 바와 같이, $Fe_3O_4$@t-PtCP 입자의 박테리아 포획률은 최초 박테리아 수의 0.42 ± 0.02 %였다. 이처럼 포획률이 저조한 것은 반코마이신을 구비하지 않은 입자와 박테리아 사이의 비특이적 결합 때문이다 (표 1의 제 1 열). 그러나, $Fe_3O_4$@t-PtCP&van 입자의 경우, 박테리아 포획률이 그램-양성 박테리아에 대해 85.68 ± 3.08 %, 그램-음성 박테리아에 대해 48.48 ± 1.81 %이었다 (표

1의 제 2 열). 이러한 포획 효율은 자석 분리 후 상청액 중 잔여 박테리아 조사에서도 확인되었다. 상청액에서는 그램-양성 박테리아가 전혀 검출되지 않았으며, 이는 그램-양성 박테리아가 다기능 미생물 광사멸입자에 의해 100 % 포획되었음을 나타낸다. 이들 결과는 반코마이신이 다기능 미생물 광사멸입자를 박테리아에 결합시키는 데 매우 효율적인 분자임을 확인시켜 준다.

표 1

[0100]

| 생존율 $N/N_I$ (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 박테리아 균주 | $Fe_3O_4$@t-PtCP | $Fe_3O_4$@t-PtCP&van | | $Fe_3O_4$@van | |
| | 포획률 | 포획률 | 12시간 배양 후 포획률 | 포획률 | 레이저 조사 후 포획률 |
| *E. faecalis* | 0.38±0.01 | 88.29±2.96 | 86.01±1.28 | 88.37±4.13 | 87.31±1.44 |
| *S. aureus* | 0.39±0.06 | 83.06±5.48 | 84.29±4.25 | 84.80±4.17 | 85.18±1.03 |
| *E. coli* 0157:H7:$K^-$ | 0.38±0.03 | 47.90±0.53 | 47.41±1.02 | 49.39±9.62 | 50.24±0.74 |
| *S. typhimurium* | 0.53±0.03 | 49.05±3.57 | 48.73±3.88 | 47.75±0.50 | 46.92±2.03 |
| MSSA | 0.36±0.02 | 83.85±4.94 | 83.01±3.92 | 85.39±0.55 | 85.46±0.03 |
| MRSA | 0.38±0.02 | 84.11±2.79 | 85.64±1.88 | 84.90±1.68 | 85.34±3.26 |
| VRE | 0.38±0.01 | 84.87±0.41 | 84.84±2.04 | 86.18±0.27 | 86.26±0.56 |

[0101] N = 생존 박테리아 세포수; $N_I$ = 투입 박테리아 세포수

[0102] 반코마이신, 광감응제(t-PtCP), 및 레이저 조사의 박테리아 사멸효과를 다음과 같이 조사하였다. 반코마이신의 독성시험을 위해, 다기능 미생물 광사멸입자를 4 유형의 박테리아와 혼합하였다. 광여기된 광감응제로부터 생성된 $^1O_2$로부터 야기되는 박테리아 사멸효과를 예방하기 위해, 샘플은 제조 후 완전함 암흑 조건에서 12 시간 동안 실온 배양하였다. 배양 12 시간 후 박테리아 수는 감소하지 않았는데, 이는 박테리아에 결합한 반코마이신이 12 시간 이내에는 생존율에 영향을 미치지 않음을 나타낸다 (표 1의 제 3 열). t-PtCP의 독성을 시험하기 위해, t-PtCP가 없는 $Fe_3O_4$@van 입자에 포획된 박테리아를 BHI 우무판으로 분리하였다. t-PtCP가 있는 샘플과 그렇지 않은 샘플 사이에 생존율 차이가 없다는 점에서, 광 조사가 없다면 t-PtCP 자체는 세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다 (표 1의 제 4 열). 레이저 조사가 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 $Fe_3O_4$@van 입자의 포획 분획을 510 nm 및 6.1 mW/$cm^2$의 레이저로 그램-양성 박테리아에 대해서는 6 분, 그램-음성 박테리아에 대해서는 60 분 동안 조사하였다. 박테리아 숫자는 변하지 않는데, 이는 t-PtCP가 없으면 레이저 조사 자체는 박테리아를 사멸시키지 않음을 의미한다 (표 1의 제 5 열). 다음으로, 다기능 미생물 광사멸입자와 다양한 박테리아 사이의 결합을 살펴보기 위해, 박테리아와 다기능 미생물 광사멸입자의 포획 분획에 대한 TEM 이미지를 촬영하였다 (도 13의 b 내지 e). 박테리아의 세포벽은 다기능 미생물 광사멸입자에 의해 완전히 덮여진 것으로 나타났다. 이는 다기능 미생물 광사멸입자가 그램-양성 박테리아 및 그램-음성 박테리아의 세포벽에 대해 인식 및 결합할 수 있음을 분명히 나타낸다.

[0103] 레이저를 조사하여 박테리아 불활성화 속도를 관찰하였다. 박테리아를 포획한 다기능 미생물 광사멸입자 복합체에 510 nm 및 6.1 mW/$cm^2$의 레이저를 조사하여, 4 가지 상이한 박테리아에 대한 생존율을 조사하였다 (도 14 및 도 15). 포획 분획 중 그램-양성 박테리아 및 그램-음성 박테리아 모두 레이저 조사 하에서 다기능 미생물 광사멸입자의 광활성화에 의해 완전히 사멸되었다. 이는 다기능 미생물 광사멸입자가 박테리아에 대해 광에 의한 매우 효율적인 불활성화제임을 나타낸다. 흥미롭게도, 그램-양성 박테리아의 사멸은 대단히 신속하게 이루어져 채 6 분이 걸리지 않아 완전한 사멸이 이루어졌음에 반해, 그램-음성 박테리아는 완전히 사멸시키는 데 거의 1 시간이 소요되었다. 그램-양성 박테리아에 대해 이처럼 짧은 시간 안에 완전한 불활성화가 이루어진 예는 아직까지 보고된 바 없다. 나아가, 본 발명에서는 사용한 광감응제의 농도가 매우 낮고 (0.35 μM), 광 조사량도 매우 적었다 (6.1 mW/$cm^2$). 본 발명에서 제조된 다기능 미생물 광사멸입자의 이러한 높은 박테리아 불활성화 효율은, 반코마이신의 강력한 결합으로 인해 광감응제가 박테리아의 세포벽에 효과적으로 편재하기 때문이다. 광감응제에 의해 생성되는 ROS (reactive oxygen species, 활성 산소종)는 대단히 불안정하며, 특히 ROS 중에서 가장 파괴적인 성분으로 알려진 일중항산소는 수용액 중에서 약 219 nm만 침투할 수 있어, 박테리아에서 먼 광감응제는 사멸에 효과적이지 않다. 세포벽에 대한 광감응제의 편재효과를 확인하기

위해, 상기와 동일한 실험이 결합된 반코마이신 없이 $Fe_3O_4$@t-PtCP 입자를 사용하여 수행되었다. 6 분 동안의 레이저 조사 후 그램-양성 박테리아의 47.40 ± 2.16 %가 사멸되었고, 60 분 동안의 레이저 조사 후 그램-음성 박테리아의 21.70 ± 1.33 %가 사멸된 것으로 나타났다. 이는 자석 분리 없이 $Fe_3O_4$@t-PtCP&van 입자를 사용한 경우의 그램-양성 박테리아의 100 % (완전 사멸) 및 그램-음성 박테리아의 63.75 ± 3.77 %와 비교하면, 박테리아 사멸 효율 측면에서 상당한 차이를 나타낸다. 따라서, 본 발명은 박테리아 표면에 광감응제를 가깝게 그리고 선택적으로 편재시키는 것이 박테리아의 완전한 사멸에 필수적이며, 이러한 밀접한 접촉은 반코마이신을 포획 분자로서 사용함으로써 달성될 수 있음을 보여준다.

[0104] 나아가, 다기능 미생물 광사멸입자는 또한 항생제-내성 박테리아 (MSSA, MRSA, 및 VRE)를 사멸시키는 데도 적용할 수 있다. MSSA, MRSA, 및 VRE는 그램-양성 박테리아이므로, 예상대로 100 %의 효율로 포획된다. 도 13의 f 내지 h의 TEM 이미지는 항생제-내성 박테리아와 다기능 미생물 광사멸입자 사이의 강력한 결합을 보여주며, 이는 다기능 미생물 광사멸입자가 항생제-내성 박테리아의 세포벽을 인식 및 결합할 수 있음을 나타낸다.

[0105] 항생제-내성 박테리아를 포획한 입자 복합체는 자석으로 분리 후, 510 nm 및 6.1 $mW/cm^2$의 레이저로 6 분 동안 조사되었다. 도 16의 결과는 항생제-내성 박테리아가 6 분 동안의 레이저 조사 후에 완전히 사멸되었음을 보여준다. 따라서, 본 발명의 다기능 미생물 광사멸입자는 다른 항생제-내성 박테리아의 사멸에도 적용될 수 있음을 또한 알 수 있다.

[0106] 이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대해서 설명하였으나, 본 발명은 상술한 특정의 실시예에 한정되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형 실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 범위는 위의 실시예에 국한해서 해석되어서는 안되며, 후술하는 특허청구범위 뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 할 것이다.

## *부호의 설명*

[0107] van : 반코마이신

t-PtCP : [5,15-비스페닐-10,20-비스(4-메톡시카르보닐페닐)-포르피린] 플래티늄

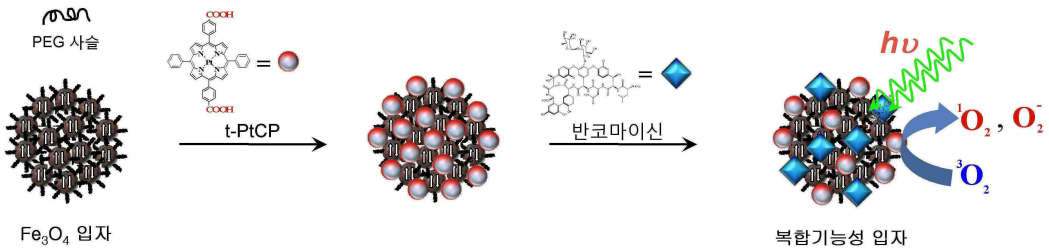
MSSA : 메티실린-민감성 *Staphylococcus aureus*

MRSA : 메티실린-내성 *Staphylococcus aureus*

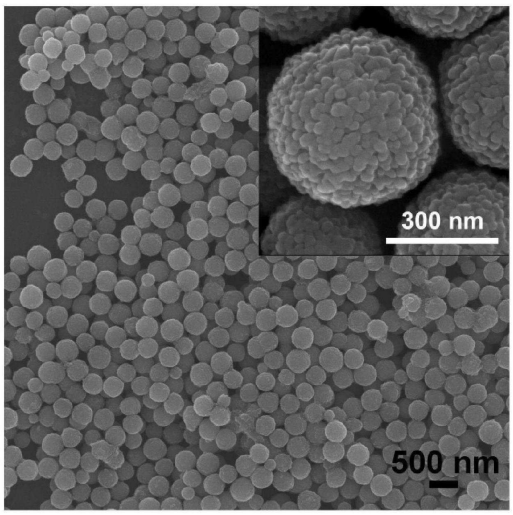
VRE : 반코마이신-내성 *Enterococcus*

## *도면*

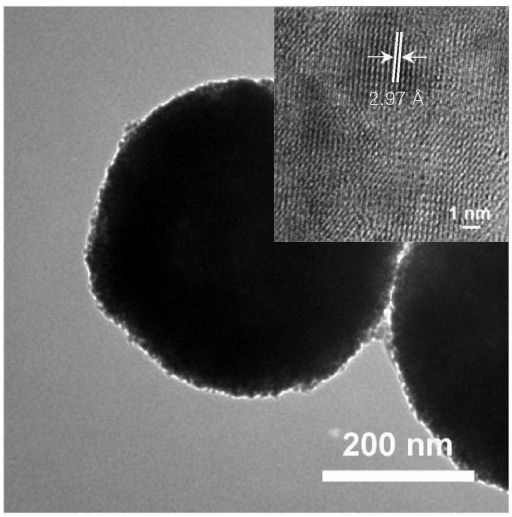
### *도면1*



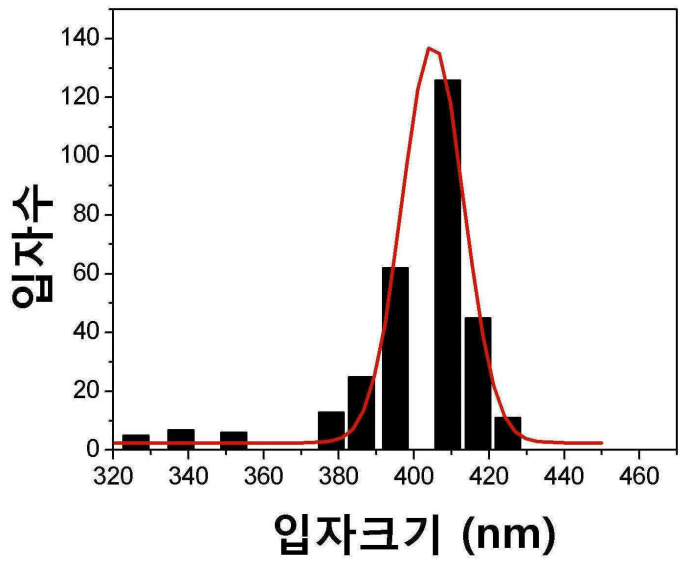
도면2


300 nm
500 nm

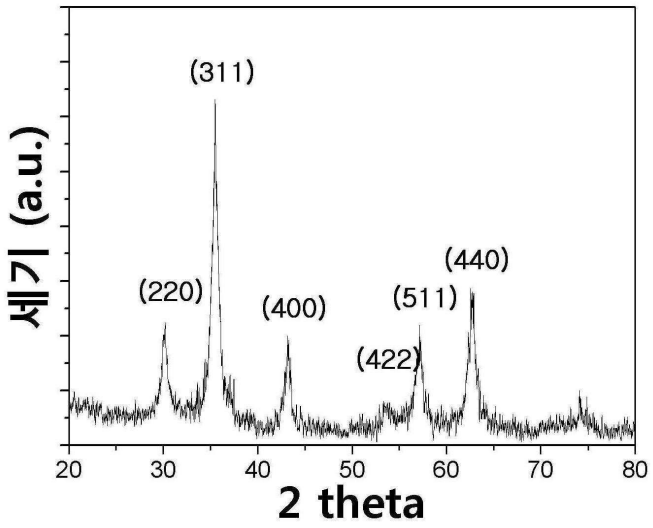
도면3


2.97 Å
1 nm
200 nm

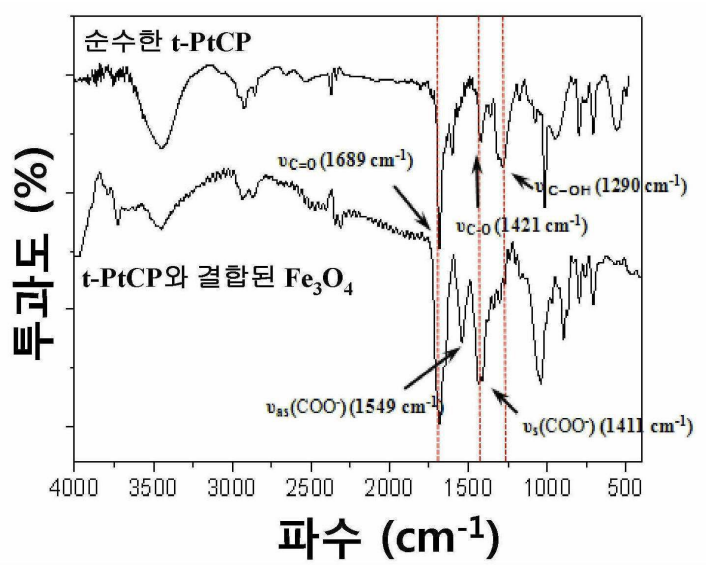
도면4


입자수
입자크기 (nm)
0
20
40
60
80
100
120
140
320
340
360
380
400
420
440
460

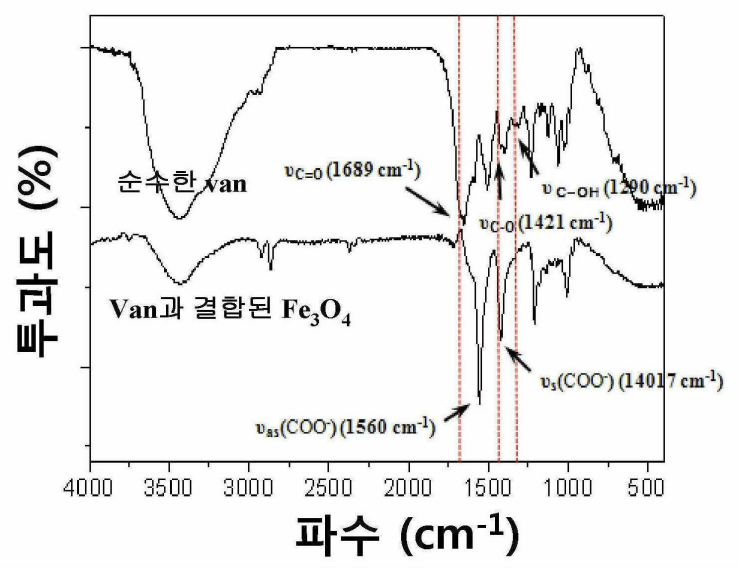
도면5


(311)
(220)
(400)
(422)
(511)
(440)
세기 (a.u.)
20
30
40
50
60
70
80
2 theta

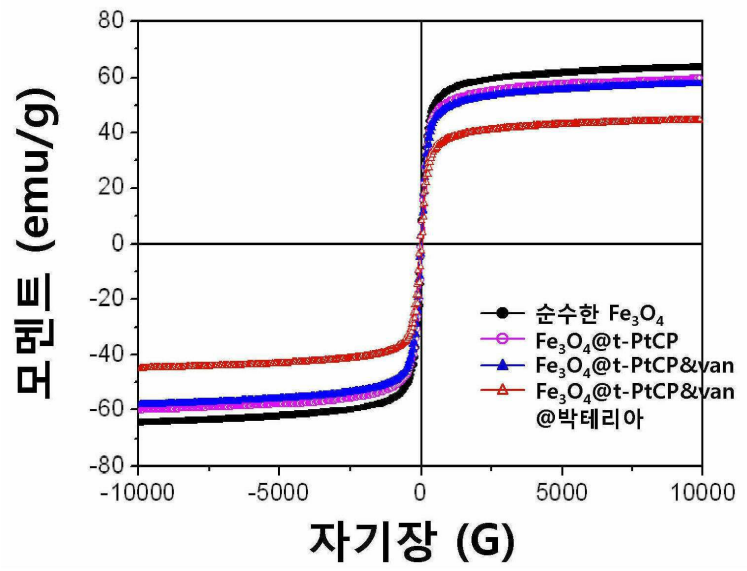
도면6


순수한 t-PtCP
t-PtCP와 결합된 Fe3O4
υC=O (1689 cm-1)
υC-O (1421 cm-1)
υC-OH (1290 cm-1)
υas(COO-) (1549 cm-1)
υs(COO-) (1411 cm-1)
투과도 (%)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
파수 (cm-1)

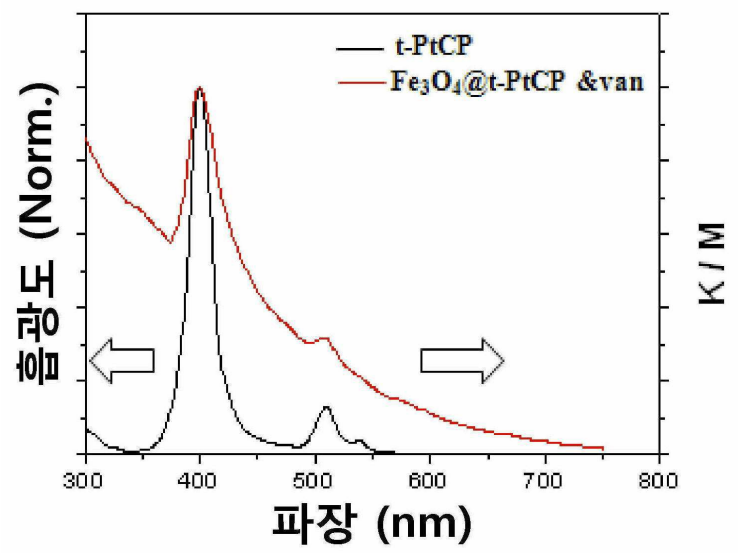
도면7


투과도 (%)
순수한 van
Van과 결합된 $Fe_3O_4$
$\upsilon_{C=O}$ (1689 $cm^{-1}$)
$\upsilon_{C-O}$ (1421 $cm^{-1}$)
$\upsilon_{C-OH}$ (1290 $cm^{-1}$)
$\upsilon_s(COO^-)$ (14017 $cm^{-1}$)
$\upsilon_{as}(COO^-)$ (1560 $cm^{-1}$)
4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000 500
파수 ($cm^{-1}$)

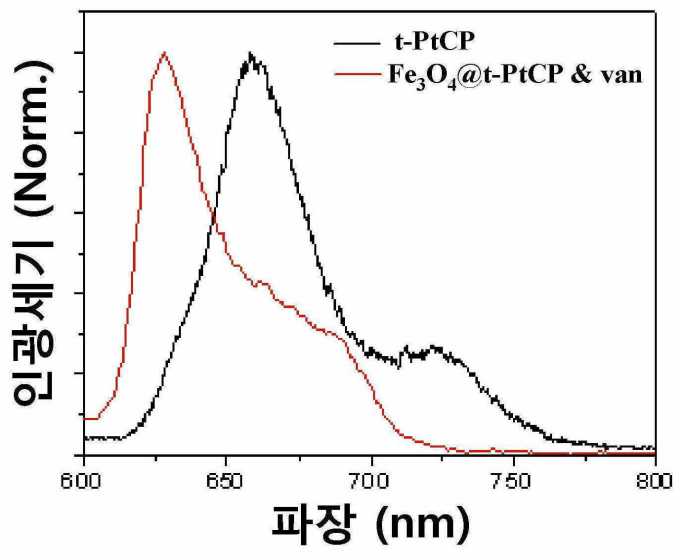
도면8


모멘트 (emu/g)
80 60 40 20 0 -20 -40 -60 -80
-10000 -5000 0 5000 10000
자기장 (G)
순수한 $Fe_3O_4$
$Fe_3O_4$@t-PtCP
$Fe_3O_4$@t-PtCP&van
$Fe_3O_4$@t-PtCP&van
@박테리아

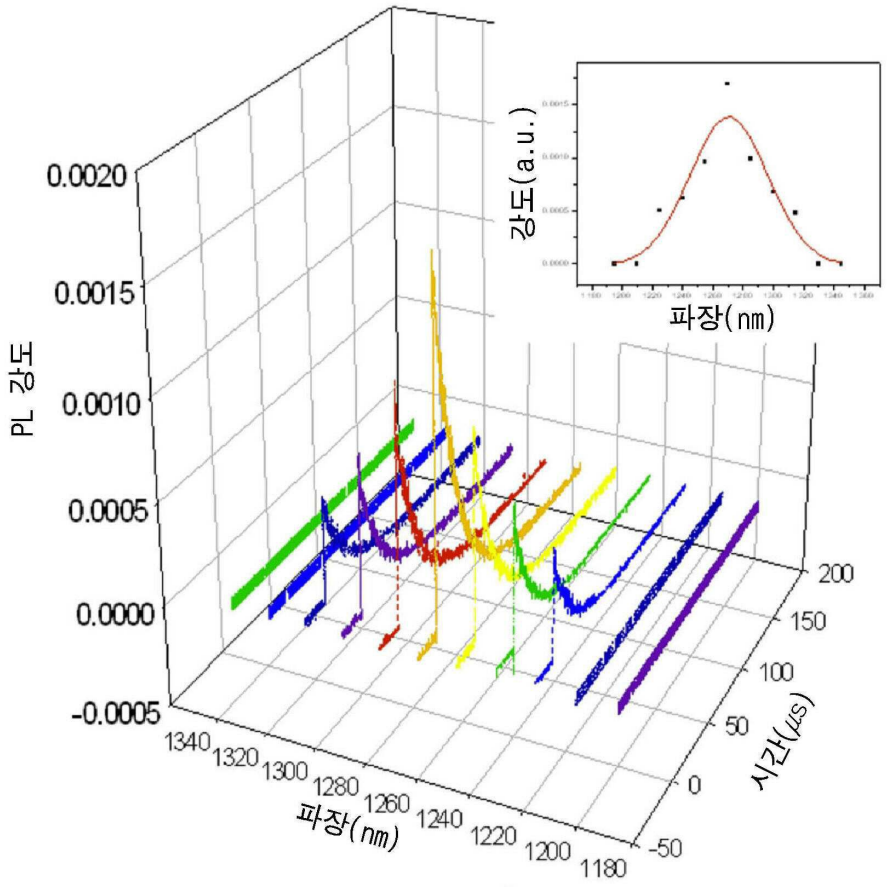
도면9


t-PtCP
Fe3O4@t-PtCP &van
흡광도 (Norm.)
K / M
300
400
500
600
700
800
파장 (nm)

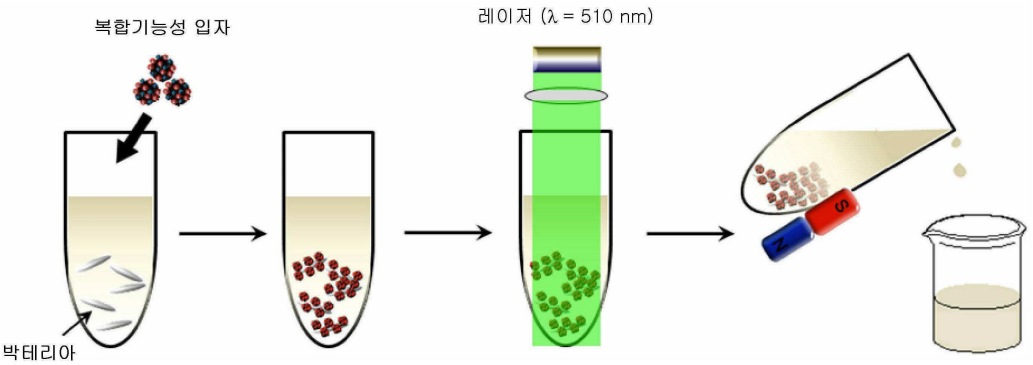
도면10


t-PtCP
Fe3O4@t-PtCP & van
인광세기 (Norm.)
600
650
700
750
800
파장 (nm)

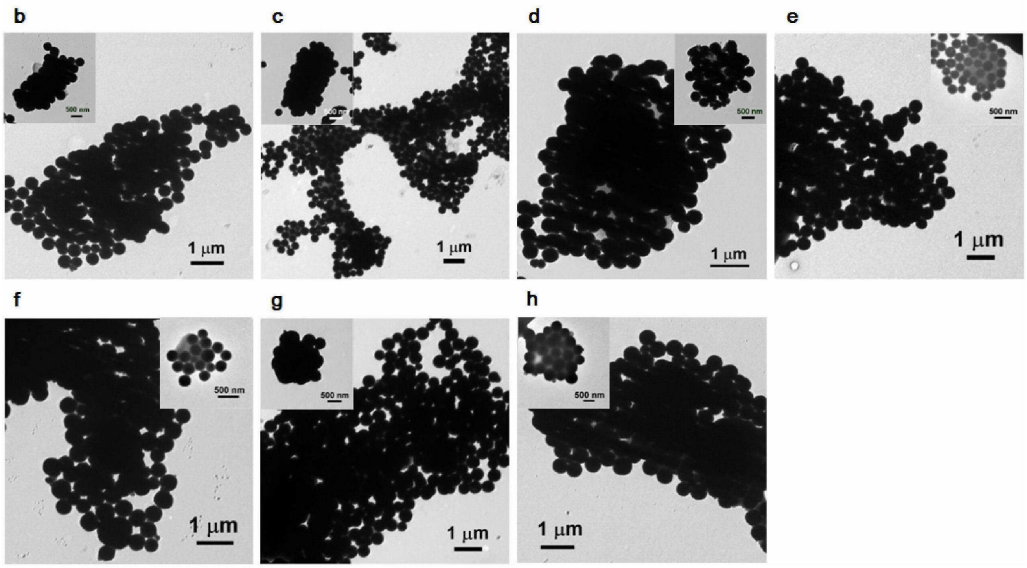
도면11


강도(a.u.)
파장(nm)
PL 강도
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
-0.0005
1340
1320
1300
1280
1260
1240
1220
1200
1180
파장(nm)
200
150
100
50
0
-50
시간(μs)

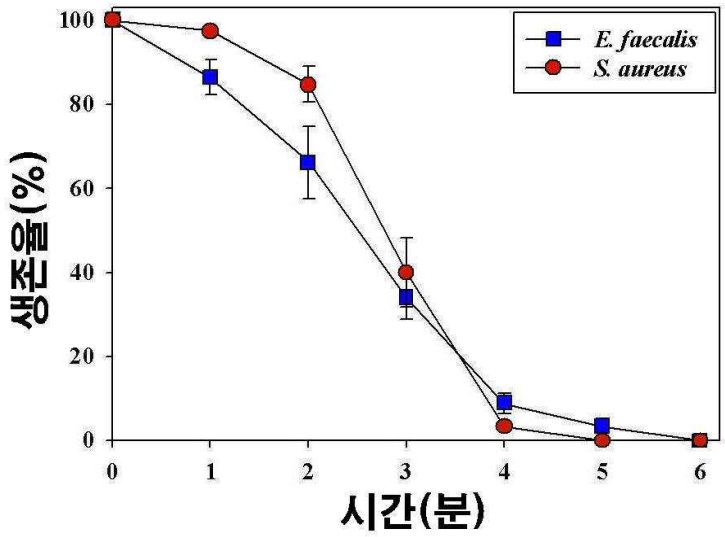
도면12


복합기능성 입자
레이저 (λ = 510 nm)
박테리아
S
N

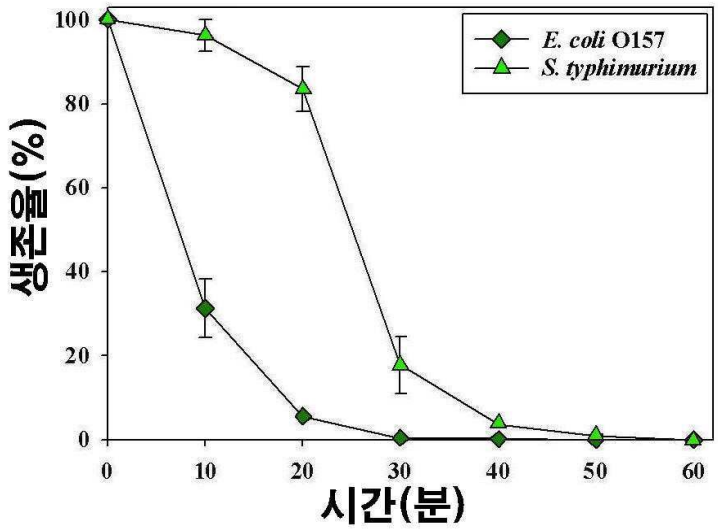
도면13


b
c
d
e
f
g
h
1 μm
500 nm

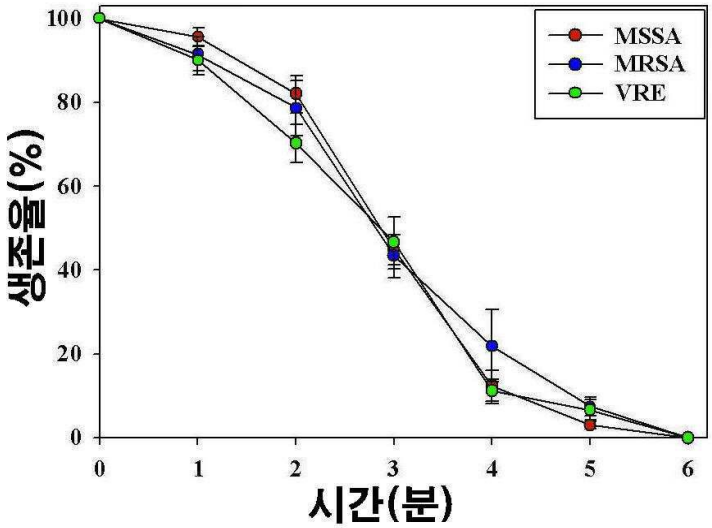
도면14


E. faecalis
S. aureus
생존율(%)
시간(분)
0
20
40
60
80
100
0
1
2
3
4
5
6

도면15


E. coli O157
S. typhimurium
생존율(%)
시간(분)
0
20
40
60
80
100
0
10
20
30
40
50
60

도면16


MSSA
MRSA
VRE
생존율(%)
시간(분)
0
20
40
60
80
100
0
1
2
3
4
5
6