

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0030400 (43) 공개일자 2014년03월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A01N 43/74</i> (2006.01) <i>A01N 33/02</i> (2006.01) <i>A01N 25/10</i> (2006.01) <i>A01P 13/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0094290 (22) 출원일자 2012년08월28일 심사청구일자 2012년08월28일	(71) 출원인 경성대학교 산학협력단 부산광역시 남구 수영로 309 (대연동, 경성대학교) 한양대학교 산학협력단 서울 성동구 왕십리로 222, 내 (행당동, 한양대학교) 조선대학교 산학협력단 광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동) (72) 발명자 나동희 부산 남구 분포로 111, 114동 603호 (용호동, 엘지메트로시티아파트) 박은지 부산 남구 분포로 111, 114동 603호 (용호동, 엘지메트로시티아파트) (뒷면에 계속) (74) 대리인 김중효

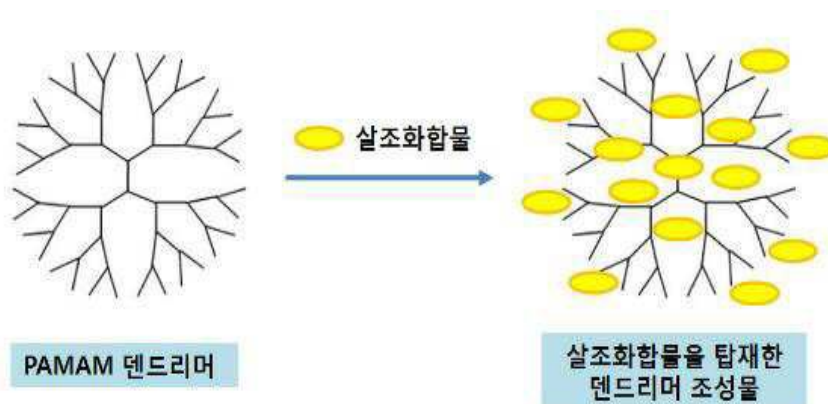
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 덴드리머를 포함하는 유해조류 제어용 조성물

(57) 요약

본 발명은 가지형 화합물인 덴드리머 및 난용성인 살조화합물이 탑재된 덴드리머를 이용하여 친환경적으로 적조 및 녹조 피해가 예방되고 수질오염이 방지되도록 하기 위한 유해조류 제어용 조성물로서, 친수성 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머(polyamidoamine dendrimer)를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 가용성 유해 조류 제어용 조성물과 친수성 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머(polyamidoamine dendrimer) 및 티아졸리딘돈 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 가용성 유해 조류 제어용 조성물을 제공한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

진언선

서울특별시 종로구 숭인동 센트레빌아파트 104동
1203호

정슬기

경기 화성시 동탄숲속로 19, 891동 601호 (능동,
숲속마을풍성신미주아파트)

조훈

광주 남구 서문대로663번안길 12, 104동 601호 (진
월동, 금광하늘연가)

김시욱

광주 남구 제석로80번안길 11, 101동 1403호 (봉선
동, 한국아텔리움1차)

특허청구의 범위

청구항 1

친수성 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머(polyamidoamine dendrimer)를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 가용성 유해 조류 제어용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 친수성 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머는 폴리아미도아민 덴드리머 G2, 폴리아미도아민 덴드리머 G3, 및 폴리아미도아민 덴드리머 G4로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 가용성 유해 조류 제어용 조성물.

청구항 3

친수성 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머(polyamidoamine dendrimer) 및 티아졸리딘디온 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 가용성 유해 조류 제어용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머는 폴리아미도아민 덴드리머 G0, 폴리아미도아민 덴드리머 G1, 폴리아미도아민 덴드리머 G2, 폴리아미도아민 덴드리머 G3, 폴리아미도아민 덴드리머 G4, 및 폴리아미도아민 덴드리머 G5로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 가용성 유해 조류 제어용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

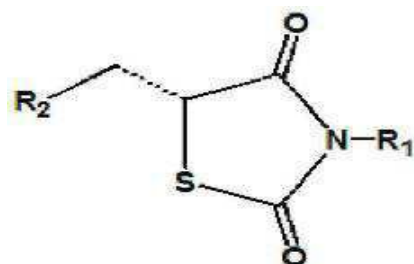
상기 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머는 폴리아미도아민 덴드리머 G4인 것을 특징으로 하는 가용성 유해 조류 제어용 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 티아졸리딘디온 유도체 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염인 것을 특징으로 하는 가용성 유해 조류 제어용 조성물:

<화학식 1>



상기 식에서, R₁은 수소(H), 메틸(CH₃), 또는 알킬이고, R₂는 치환 또는 비치환 (헤테로)사이클로알킬, (헤테로)사이클로알케닐 또는 (헤테로)아틸이며, 점선은 단일 결합 또는 이중 결합이다.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 덴드리머(dendrimer)를 포함하는 유해조류 제어용 조성물에 관한 것으로, 특히, 가지형 화합물인 덴드리머를 이용하여 살조능이 우수하나 난용성인 살조화합물을 환경에 유해한 유기용매를 사용하지 않는 조건에서 가용화하고, 또한 이 살조화합물을 덴드리머에 탑재시켜 적조(red tide) 및 녹조의 원인이 되는 유해조류에만 선택적으로 살조작용을 하도록 함으로써 친환경적으로 적조 및 녹조 피해를 예방하고 수질오염을 방지하도록 하기 위한 덴드리머(dendrimer)를 포함하는 유해조류 제어용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 잘 알려진 바와 같이, 적조는 바닷물 속에서 부유생활을 하는 플랑크톤의 대량번식이나 집적으로 인해 바닷물의 색깔이 적색, 적갈색, 황갈색, 녹색, 황녹색 또는 황색 등으로 변하는 현상을 말한다. 적조를 일으키는 플랑크톤은 규조류, 편모조류와 같은 식물성 플랑크톤이 가장 일반적이며, 이외에도 남조류나 섬모충류, 적색세균 등에 의해서 적조가 일어나기도 한다. 적조가 일어나는 주요 요인은 산업발전에 따른 해양오염물의 증가와 지구 온난화로 인한 수온 상승 등으로 인한 물의 부영양화이며, 적조가 일어나면 물속에 녹아 있는 산소 농도가 낮아지기 때문에, 어패류가 질식사하여 폐사하는 일이 많이 발생한다. 대량 증식된 플랑크톤은 물고기의 아가미에 끼여 물고기를 물리적으로 질식사시키기도 하며, 적조를 일으키는 플랑크톤 중 편모조류의 경우 유해독소를 발생시켜 어류를 폐사시키기도 한다. 이 때문에 적조 발생은 어업에 큰 타격을 줄 뿐만 아니라 해양생태계 파괴로 인해 심각한 환경문제를 일으킨다.

[0003] 적조 방제를 위한 방법으로 화학약품 살포법, 초음파 및 오존 처리법, 해변 회수 및 침강법, 황토 살포법 등이 알려져 있다.

[0004] 화학약품 살포법중 비용이 가장 저렴하여 널리 이용되는 것은 황산구리(CuSO_4)인데, 황산구리는 적조원인 생물 외에 다른 해양생물에까지 영향을 끼쳐 수중의 다른 생물에 대한 독성 측면에서 문제를 일으킬 수 있으며, 적조 발생 시 수반되는 높은 알칼리성 환경 조건하에서는 황산구리가 불안정해지기 때문에 많은 양을 반복적으로 처리해야 하므로 비경제적이라는 단점이 있다.

[0005] 현재 가장 많이 사용되는 방법은 황토를 해수 중에 살포하여 적조원인 생물을 흡착하여 침강시켜 제거하는 황토 살포법이다. 그러나 해수 중에 황토를 살포하면 부유물질이 증가되어 어류 양식장과 저층에 정착생물이 살고 있는 어장에서는 어류가 아가미 폐쇄로 인해 호흡장애로 폐사되는 등의 부작용을 일으킬 수 있는 문제점을 가지고 있다.

[0006] 최근 연구에서 티아졸리딘디온(thiazolidinedione) 유도체들(이하, TD화합물)이 적조 및 녹조의 원인 생물에 대해 우수한 살조능을 보임이 증명되었다(Kim et al., Environ Toxicol Chem. 2011;30(12):2810; Han et al., Int J Pharm. 2011;405:137; Kim et al., Appl Biochem Biotechnol. 2010;162:2273). 폴리사이클릭 구조(polycyclic structure)를 가지는 물질들은 강력한 생리활성을 가지는 반면 구조적 특이성으로 인해 물이나 수용액에 대한 용해도가 낮은 경우가 많은데, TD 화합물도 유해조류에 대한 우수한 살조 활성을 가지나, 물과 수용액에 대한 용해도가 낮은 문제점을 가지고 있다. 물이나 수용액에 대한 낮은 용해도는 현장에서 적용시 조류와의 결합능을 저하시켜 기대하는 효과를 거두기 힘들게 하는 원인이 될 수 있다. 따라서 살조 화합물의 활성 증가를 위해 용해도를 증가시킬 필요가 있다.

[0007] 난용성 물질의 가용화 기술로는 분쇄, 나노입자 형성, 마이크로 에멀전 형성, 가용성 고분자를 이용한 고체 분산체 형성, 수용성 고분자를 결합시킨 접합체, 리포솜 등의 다양한 방법들이 응용되어 왔다. 최근에는 고분자를

이용한 캐리어 개발 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 그중에 나노크기의 덴드리머 화합물이 신소재로 크게 주목받고 있다. 덴드리머는 중심(core)에서부터 나뭇가지 모양의 일정한 단위구조가 반복적으로 뻗어 나오는 나뭇가지꼴 거대분자다. 덴드리머는 저분자 또는 초분자(supramolecule)가 가지는 분자성(molecularity)과 고분자가 가지는 물질성을 동시에 가질 수 있어 고분자와 초분자 사이에 있는 이중성(분자성과 물질성)을 가지는 거대분자 화합물로 정의된다. 최근 덴드리머가 새로운 약물송달 수송체(carrier)로 각광을 받고 있는데, 그 이유는 (1) 빈 내부 공간과 열린 구조로 인해 소수성 또는 난용성 약물의 봉입이 쉽고, (2) 표면의 작용기가 많아 다량의 약물을 접합시킬 수 있으며, (3) 이를 통해 난용성 또는 소수성 약물의 용해도를 증가시켜줄 수 있고, (4) 표면의 작용기에 기능성 물질을 접합하면 약물타게팅(drug targeting)이 가능하다는 등의 장점을 가지고 있기 때문이다. 이중 난용성 물질의 가용화를 위한 방법으로는 난용성 화합물을 덴드리머 내부 공간으로 봉입하여 용해시키는 방법이 주로 사용된다. 덴드리머는 의약연구 분야에서 새로운 약물송달 캐리어로 주목받으며 여러 약물에 적용되어 다양한 투여경로에서 캐리어로서의 역할이 검증되고 있다. 하지만 유해조류 제어 분야에서는 아직까지 적용되고 있는 예를 찾아볼 수 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 전술한 과제를 해결하기 위하여 안출한 것으로, 살조능이 우수하면서도 적조 및 녹조의 원인이 되는 유해조류에만 선택적으로 살조작용을 하는 가지형 화합물인 덴드리머를 포함하는 유해 조류 제어용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

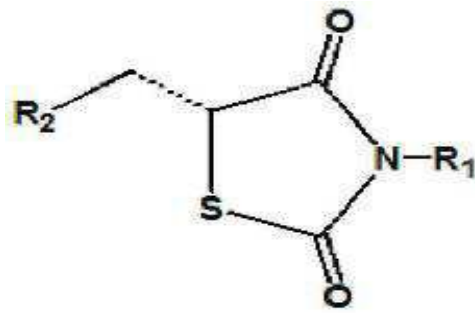
[0009] 또한, 본 발명은 난용성인 살조화합물을 덴드리머에 탑재시켜 환경에 유해한 유기용매를 사용하지 않으면서 살조화합물을 가용화하여 친환경적으로 적조 및 녹조 피해가 예방되고 수질오염이 방지되도록 하기 위한 유해조류 제어용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 이와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 가용성 유해 조류 제어용 조성물은 친수성 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머(polyamidoamine dendrimer)를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 친수성 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머는 폴리아미도아민 덴드리머 G2 (표면아민기 16개, 분자량 3,256 Da), 폴리아미도아민 덴드리머 G3 (표면아민기 32개, 분자량 6,909 Da), 및 폴리아미도아민 덴드리머 G4 (표면아민기 64개, 분자량 14,215 Da)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상인 것으로 할 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 가용성 유해 조류 제어용 조성물은 친수성 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머(polyamidoamine dendrimer) 및 티아졸리딘디온 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 아민기 표면을 가지는 폴리아미도아민 덴드리머는 폴리아미도아민 덴드리머 G0 (표면아민기 4개, 분자량 517 Da), 폴리아미도아민 덴드리머 G1 (표면아민기 8개, 분자량 1,430 Da), 폴리아미도아민 덴드리머 G2 (표면아민기 16개, 분자량 3,256 Da), 폴리아미도아민 덴드리머 G3 (표면아민기 32개, 분자량 6,909 Da), 폴리아미도아민 덴드리머 G4 (표면아민기 64개, 분자량 14,215 Da), 및 폴리아미도아민 덴드리머 G5 (표면아민기 128개, 분자량 28,826 Da)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것으로 할 수 있다. 그리고, 상기 티아졸리딘디온 유도체 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염인 것을 특징으로 할 수 있다:

화학식 1



[0012]

[0013]

[0014] (상기 식에서, R₁은 수소(H), 메틸(CH₃), 또는 알킬이고, R₂는 치환 또는 비치환 (헤테로)사이클로알킬, (헤테로)사이클로알케닐 또는 (헤테로)아릴이며, 점선은 단일 결합 또는 이중 결합이다.

발명의 효과

[0015] 위의 해결수단에 의하여 본 발명은 살조능이 우수하면서도 적조 및 녹조의 원인이 되는 유해조류에만 선택적으로 살조작용을 하는 가지형 화합물인 덴드리머를 포함하는 유해 조류 제어용 조성물을 제공하고, 난용성인 살조 화합물을 덴드리머에 탑재시켜 환경에 유해한 유기용매를 사용하지 않으면서 살조화합물을 가용화하여 친환경적으로 적조 및 녹조 피해가 예방되고 수질오염이 방지되도록 하기 위한 유해조류 제어용 조성물을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 PAMAM 덴드리머 G4의 구조를 나타낸 도면이다.

도 2는 PAMAM 덴드리머 G4 또는 fluorescein isothiocyanate (FITC)로 형광 표지한 PAMAM 덴드리머 G4를 유해조류 *Alexandrium tamarense*와 *Cochlodinium polykrikoides*에 처리한 후 형태 변화를 광학현미경과 형광 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 3은 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머를 이용한 난용성 TD 화합물의 가용화 및 탑재 개념을 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머에 의해 TD화합물이 용해됨을 나타낸 사진이다.

도 5는 본 발명에 있어서 TD49 에탄올 표준액 (A), TD49의 수용액 (B), TD49의 수용액에 PAMAM 덴드리머를 첨가한 샘플 (C)의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머에 의한 TD49 화합물의 용해도 개선 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머 크기에 따른 TD49 화합물의 봉입 효과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머 크기별 TD49 화합물의 봉입에 요구되는 몰농도를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머 농도에 따른 TD49 화합물의 봉입률을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 발명에 따른 실시예 및 첨부된 도면에 따라 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

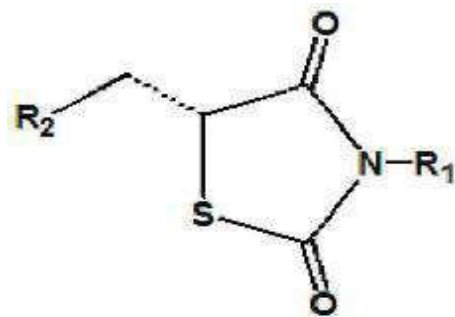
[0018] 폴리아미도아민 덴드리머(이하, PAMAM 덴드리머)는 'ethylene diamine'을 코어로 하는 구형 나노 입자로서 제10

세대까지의 지름이 1 nm에서 13 nm의 크기를 가지며 세대당 약 1 nm씩 지름이 증가한다. 최외곽의 표면 말단기는 일차 아민과 카르복실산을 선택적으로 도입할 수 있는 강한 친수성 화합물이다. 본 발명에 있어서는 표면에 아민기(-NH₂)를 가지는 것을 특징으로 하며(도 1의 전형적인 PAMAM덴드리머의 구조 참조), 표면아민기가 4개이고 분자량이 517 Da인 PAMAM 덴드리머 0세대를 PAMAM 덴드리머 G0라고 정의하고, 표면아민기가 8개이고 분자량이 1,430 Da인 PAMAM 덴드리머 1세대를 PAMAM 덴드리머 G1라고 정의하고, 표면아민기가 16개이고 분자량이 3,256 Da인 PAMAM 덴드리머 2세대를 PAMAM 덴드리머 G2라고 정의하고, 표면아민기가 32개이고 분자량이 6,909 Da인 PAMAM 덴드리머 3세대를 PAMAM 덴드리머 G3라고 정의하고, 표면아민기가 64개이고 분자량이 14,215 Da인 PAMAM 덴드리머 4세대를 PAMAM 덴드리머 G4라고 정의하고, 표면아민기가 128개이고 분자량이 28,826 Da인 PAMAM 덴드리머 5세대를 PAMAM 덴드리머 G5라고 정의한다.

[0019] 상기 PAMAM 덴드리머는 그 내부에 약물을 봉입하여 환자의 신체내부로 전달하는 약물전달체로의 응용되거나, PAMAM덴드리머 말단 아민기의 양이온성을 이용하여 유전자 전달체로서의 응용되고 있음이 알려져 있다. 한편, 본 발명에서는 표면에 아민기(-NH₂)가 있는 PAMAM 덴드리머, 바람직하게는 표면에 아민기(-NH₂)가 있는PAMAM 덴드리머 G2 내지 PAMAM 덴드리머 G4가 유해조류에 대한 선택적 살조효과가 있음이 확인되고 있으며, 이에 대하여는 아래 실시예 1에서 구체적으로 설명한다.

[0020] 본 발명에서 유해조류를 제어하기 위한 살조화합물로서 티아졸리딘디온(thiazolidinedione)화합물(이하, TD화합물)은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염인 것을 특징으로 한다:

[0021] <화학식 1>



[0022]

[0023]

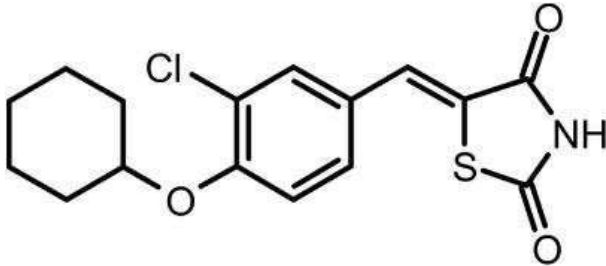
[0024] 상기 식에서, R₁은 수소(H), 메틸(CH₃), 또는 알킬이고, R₂는 치환 또는 비치환 (헤테로)사이클로알킬, (헤테로)사이클로알케닐 또는 (헤테로)아틸이며, 점선은 단일 결합 또는 이중 결합이다.

[0025] 상기 TD화합물들은 최근 연구에서 적조 및 녹조의 원인 생물에 대해 우수한 살조능을 보임이 증명되었다(Kim et al., Environ Toxicol Chem. 2011;30(12):2810; Han et al., Int J Pharm. 2011;405:137; Kim et al., Appl Biochem Biotechnol. 2010;162:2273). 그러나, 상기 TD화합물은 폴리사이클릭 구조(polycyclic structure)라는 구조적 특이성으로 인해 물이나 수용액에 대한 용해도가 낮은 특징을 가지고 있다. 이처럼 물이나 수용액에 대한 낮은 용해도는 현장에서 적용시 조류와의 결합능력을 저하시켜 적조 및 녹조의 원인생물에 대한 살조 효과를 거두기 어렵게 하는 원인이 된다.

[0026] 따라서, 본 발명에서는 그 자체로서도 살조효과가 있는 PAMAM 덴드리머를 이용하여 난용성 TD 화합물의 가용화하고, 또한 상기 PAMAM 덴드리머와 살조화합물인 TD 화합물이 서로 상가적으로 작용하여 유해조류에 대해 우수한 살조능을 보이는 살조화합물 함유 덴드리머 조성물을 제시하고 있다. 도 3은 PAMAM 덴드리머를 이용하여 TD 화합물을 가용화하는 가용화 및 탑재 개념을 나타낸 도면으로, PAMAM덴드리머가 난용성의 TD 화합물과 반응시 TD화합물이 소수성인 PAMAM 덴드리머의 내부에 녹아들어가거나 표면의 아민기와 정전기적 인력 또는 물리적인 인력으로 친수성의 PAMAM 덴드리머와 결합하여 가용화되는 과정을 보여주고 있다.

[0027] 도 4는 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머에 의해 TD 화합물이 용해됨을 나타낸 사진으로, TD49 제어 샘플(왼쪽)과 TD49와 PAMAM 덴드리머가 혼합된 용액 샘플(오른쪽)의 사진 관찰 결과를 보여준다. TD49는 위의 화학식 1로 표현되는 티아졸리딘온 유도체 중의 하나로서 하기 화학식 2로 표시되는 화합물이다.

화학식 2



[0028]

[0029]

[0030] 즉, 왼쪽 용기에서 보이는 것처럼 물에서 녹지 않아 분말상태로 존재하던 TD49 화합물이 오른쪽 용기에서 보이는 것처럼 PAMAM 덴드리머에 의해 완전히 용해되어 있음을 보여주고 있다. PAMAM 덴드리머에 의해 TD 화합물이 가용화되며, 이에 따라 PAMAM 덴드리머와 TD 화합물이 서로 상가적으로 작용하여 유해조류에 대해 우수한 살조능을 보이고 있음에 대하여는 아래 실시예 2 및 실시예 3에서 구체적으로 설명한다.

[0031] 위의 본 발명의 특징 및 기타의 장점은 후술되는 실시예로부터 보다 명백하게 될 것이다. 단, 본 발명이 하기 실시예로 제한되는 것은 아니다.

실시예 1

[0032] 본 발명자들은 PAMAM 덴드리머 자체가 유해조류에 대한 살조효과가 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 PAMAM 덴드리머를 유해조류인 *Heterosigma akashiwo* (CCMP 452), *Chattonella marina* (*C. marina*), *Alexandrium tamarense* (*A. tamarense*), *Cochlodinium polykrikoides* (*C. polykrikoides*), *Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*)와 비유해조류인 *Amphidium* sp., *Navicula pelliculosa*, *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum* EPV에 각각 처리한 후, 하루 당 세포 분열의 수를 나타내는 감소율(%)을 측정하고, 각 감소율이 50 %가 되는 농도를 의미하는 IC₅₀ 값(the half maximal inhibitory concentration)을 계산하여 PAMAM 덴드리머의 살조 활성을 측정하였다.

[0033] 먼저, 표면기능기가 서로 다른 PAMAM 덴드리머들의 유해조류와 비유해조류에 대한 살조능 비교 연구를 실시하였다(표 1 참조). 표면이 중성인 acetyl기를 가지는 PAMAM 덴드리머 G4-acetyl과 산성인 카르복시기(CO₂H)를 가지는 PAMAM 덴드리머 G3.5-CO₂H는 시험한 모든 조류에서 활성을 나타내지 않았다. 반면에, 아민기 표면을 가지는 PAMAM 덴드리머 G4-NH₂는 세 개 유해조류 중 *H. akashiwo*와 *C. polykrikoides*에 대해서 IC₅₀가 각각 0.65와 0.27 μM로 비교적 강한 활성을 나타내었다. 한편 비유해조류에 대해서는 2.8 μM을 처리해도 유의미한 살조효과가 나타나지 않았다. 즉, 표면이 염기성인 아민기를 가진 PAMAM 덴드리머 G4-NH₂는 유해조류에만 선택적인 살조능을 보이고 있음을 확인하였다.

표 1

[0034] PAMAM 덴드리머의 표면 기능기에 따른 유해조류와 비유해조류에 대한 살조능 (IC₅₀, 단위: μ M) 비교

표본(Sample)	유해조류(Harmful algal species)			비유해조류(Non-harmful algal species)	
	<i>A. tarmarens</i>	<i>H. akashiwo</i>	<i>C. polykrikoides</i>	<i>A. sp</i>	<i>N. WT</i>
PAMAM 덴드리머 G4-NH ₂	2.34 $\pm$ 0.10	0.65 $\pm$ 0.52	0.27 $\pm$ 0.03	> 2.8	> 2.8
PAMAM 덴드리머 G3.5-CO ₂ H	> 2.8	> 2.8	2.60 $\pm$ 0.85	> 2.8	> 2.8
PAMAM 덴드리머 G4-acetyl	> 2.8	> 2.8	> 2.8	> 2.8	> 2.8
Blank	> 2.8	> 2.8	> 2.8	> 2.8	> 2.8

[0035] 크기가 서로 다른 PAMAM 덴드리머들의 유해조류와 비유해조류에 대한 살조능 비교연구를 실시하였다(표 2 참조). 아민기를 가지고 있으나 크기가 다른 PAMAM 덴드리머 G0 ~ G5를 대상으로 한 실험에서는 크기가 커짐에 따라 유해조류에 대한 살조능이 강해짐을 확인할 수 있었다. 즉, PAMAM 덴드리머 G2 내지 PAMAM 덴드리머 G4는 비유해조류에 비하여 유해조류에 대해서 선택적인 살조능을 보이고 있음을 확인하였으며, PAMAM 덴드리머 G5는 유해조류뿐만 아니라 비유해조류인 *Amphidinium. sp*에 대해서도 강한 살조능을 나타내었음을 확인하였다.

표 2

[0036] 양이온성 PAMAM 덴드리머의 유해조류와 비유해조류에 대한 살조능(IC₅₀)비교

Sample	유해조류(Harmful algal species)			비유해조류(Non-harmful algal species)	
	<i>A. tarmarens</i>	<i>H. akashiwo</i>	<i>C. polykrikoides</i>	<i>A. sp</i>	<i>N. WT</i>
PAMAM 덴드리머 G0	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
PAMAM 덴드리머 G1	> 10	> 10	> 10	> 9	> 10
PAMAM 덴드리머 G2	> 10	3.61 $\pm$ 0.66	5.92 $\pm$ 0.79	> 8	> 10
PAMAM 덴드리머 G3	> 10	1.66 $\pm$ 0.35	1.06 $\pm$ 0.38	> 8	> 10
PAMAM 덴드리머 G4	6.52 $\pm$ 2.52	1.49 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.28	6.92 $\pm$ 4.68	> 10
PAMAM 덴드리머 G5	1.33 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.27	0.67 $\pm$ 0.15	> 10

[0037] 따라서, 표면이 염기성인 아민기를 가진 PAMAM 덴드리머 G2 내지 PAMAM 덴드리머 G4, 바람직하게는 염기성인 아민기를 가진 PAMAM 덴드리머 G4-NH₂가 유해조류에 대한 선택적 살조능력이라는 측면에서 가장 바람직한 덴드리머임을 확인할 수 있었다.

실시예 2

[0038] 살조활성을 가지고 있는 표면이 염기성인 아민기를 가진 PAMAM 덴드리머 G4가 유해조류에 선택적으로 작용하는지 여부를 확인하기 위하여 Fluorescein isothiocyanate (FITC)로 형광 표지한 PAMAM 덴드리머 G4를 유해조류 *Alexandrium tamarens*와 *Cochlodinium polykrikoides*에 처리한 후 형태 변화를 형광 현미경으로 관찰하였다. 형광현미경 사진(도 2)에서 붉은색은 엽록소를 나타내는 것이며, 녹색은 FITC를 나타내는 것이다. 또한 PAMAM 덴드리머 G4와 FITC가 표지된 PAMAM 덴드리머 G4 (FITC-PAMAM G4)의 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 것, PAMAM 덴드리머 G4만 처리한 것 그리고 FITC만 처리한 것 이렇게 3가지를 설정하여 비교하였으며, 처리 후 5분 간 반응시킨 뒤 세척 과정을 2번 반복하여 배지의 불순물들을 제거한 뒤 각각 광학현미경과 형광현미경으로 관찰하였다.

- [0039] 먼저 광학현미경으로 관찰한 결과, 유해 조류 *A. tamarense*와 *C. polykrikoides*에 FITC를 처리한 경우, 아무것도 처리하지 않은 세포 상태와 같은 정상적인 세포의 형태를 가지고 있었다. 하지만 PAMAM 덴드리머 G4를 처리한 경우에는 세포가 커지면서 세포파괴가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 PAMAM G4-FITC 복합체를 처리하였을 경우에도 세포파괴를 관찰할 수 있었으며, 터지는 과정 및 형태가 유사함을 확인하였다.
- [0040] 다음으로 형광현미경으로 관찰한 결과, 아무것도 처리하지 않은 세포, PAMAM 덴드리머 G4 그리고 FITC로만 처리한 경우에는 엽록소만 관찰 되었다. 하지만 PAMAM G4-FITC 복합체를 처리한 경우, FITC를 나타내는 형광 녹색이 세포를 둘러싸고 있는 형태로 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.
- [0041] 따라서 PAMAM 덴드리머 G4는 유해조류의 세포 표면에 결합하여 선택적으로 살조작용을 함을 확인할 수 있었다.

실시예 3

[0042] TD49 에탄올 표준액 (A), TD49의 수용액 (B), TD49의 수용액에 PAMAM 덴드리머를 첨가한 샘플 (C)의 HPLC 크로마토그램

[0043] 도 5는 본 발명에 있어서 TD49 에탄올 표준액 (A), TD49의 수용액 (B), TD49의 수용액에 PAMAM 덴드리머를 첨가한 샘플 (C)의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 도면으로, 물에 녹지 않아 상등액 샘플에서 전혀 관찰되지 않던 TD49 피크 (B)가 PAMAM 덴드리머에서 완전히 용해되어 표준액에 해당하는 크기의 TD49 피크 (C)가 나타났다. 이때 HPLC 분석은 'Dionex Ultimate 3000 HPLC system'과 'Hypersil GOLD column(4.6 x 250 mm, 5 micron particle size, Thermo Scientific)'을 사용하여 수행하였고, 이동상은 '0.1% trifluoroacetic acid in water and acetonitrile'이었으며, 유속은 '1 mL/min'이었고, 용출된 물질은 'UV 320nm'에서 검출하였다.

[0044] PAMAM 덴드리머에 의한 TD49 화합물의 용해도 개선 결과

[0045] 도 6은 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머에 의한 TD49 화합물의 용해도 개선 결과를 나타낸 그래프로, 표면이 아민기인 PAMAM 덴드리머 G0 ~ G5 이용 시 물에서의 용해도는 2.54~3.09 mmol/L(G0: 2.6, G1: 2.5, G2: 3.1, G3: 3.0, G4: 2.9, G5: 2.6 mmol/L)인 반면에, 표면이 카르복실기인 PAMAM 덴드리머 G3.5 이용 시 용해도는 0.05 mmol/L이었다. TD49를 물에 녹였을 때는 HPLC에서 피크가 관찰되지 않아 용해도 측정이 불가능하였다.

[0046] 유해조류에 대한 TD49의 IC₅₀이 0.5~5 μM인 점을 감안하면 PAMAM 덴드리머 G0 ~ G5가 보여준 2.54~3.09 μM의 용해도는 TD49를 이용하기에 충분한 수준이라고 볼 수 있다. 즉, 표면이 양이온성인 PAMAM 덴드리머 G0~G5는 모두 TD49를 충분히 가용화시킨 것에 반해, 표면이 음이온성인 G3.5는 가용화 효과가 매우 미약했던 점을 보면 PAMAM 덴드리머가 TD49를 가용화하는 기전에는 TD49와 덴드리머의 양이온성 표면간의 정전기적 인력이 중요한 요소가 됨을 확인할 수 있었다.

[0047] PAMAM 덴드리머 크기에 따른 TD49 화합물의 봉입 효과

[0048] 도 7은 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머 크기에 따른 TD49 화합물의 봉입 효과를 나타낸 그래프로, PAMAM 덴드리머 G0에서 G5로 덴드리머의 크기가 증가함에 따라 봉입되는 TD49화합물의 수도 증가한다. 반면, 표면이 카르복실기인 PAMAM 덴드리머 G3.5는 비슷한 크기의 PAMAM 덴드리머 G4와 비교하여 매우 낮은 봉입률을 나타낸다. PAMAM 덴드리머 분자당 봉입된 TD49 화합물의 분자수(mol of TD49/mol of PAMAM)는 G3.5: 0.2, G0: 0.3, G1: 0.9, G2: 2.5, G3: 5.2, G4: 10.1, G5: 18.8이다. 도 6에서와 같이 표면에 아민기를 가진 PAMAM 덴드리머 G0~G5는 TD49에 대한 우수한 봉입률을 나타낸 반면, 표면에 카르복실기를 가진 PAMAM 덴드리머 G3.5는 매우 낮은 봉입률을 보였다.

[0049] 따라서 용해도 결과에서와 마찬가지로 TD49를 봉입하는 데 덴드리머의 양이온성 표면이 중요한 요소로 확인된다. 또한 덴드리머의 크기가 커짐에 따라 봉입되는 TD49의 수가 늘어나는 결과로부터 덴드리머의 크기에 따라 형성되는 내부 캐비티(cavity)의 크기의 영향에 따른 것임을 알 수 있다.

[0050] PAMAM 덴드리머 크기별 TD49 화합물의 봉입에 요구되는 몰농도

[0051] 도 8은 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머 크기별 TD49 화합물의 봉입에 요구되는 물농도를 나타낸 그래프로, TD49 용액(1 mg/mL)을 가지고 85%이상 봉입률을 보이는 데 요구되는 PAMAM 덴드리머의 물농도(μ M)는 G0: 7.7, G1: 2.8, G2: 1.2, G3: 0.6, G4: 0.3, G5: 0.1이다. 즉, TD49 화합물을 봉입하는 데는 PAMAM 덴드리머의 크기가 클수록 효율적이다.

[0052] **PAMAM 덴드리머 농도에 따른 TD49 화합물의 봉입률**

[0053] 도 9는 본 발명에 있어서 PAMAM 덴드리머 농도에 따른 TD49 화합물의 봉입률을 나타낸 그래프로, TD49 화합물 1 mg을 봉입하는 데 요구되는 PAMAM 덴드리머의 양은 4 mg으로 PAMAM 덴드리머 G0~G5 모두 85%이상의 봉입률을 보였다. 즉, TD49를 함유한 PAMAM 덴드리머의 최적의 조성은 'TD49 화합물 1 mg + PAMAM 덴드리머 4 mg + 물(H_2O) 1 mL'이다.

실시예 4

[0054] 본 발명자들은 PAMAM 덴드리머와 TD화합물이 유해조류에 대한 살조효과가 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 TD 화합물 함유 PAMAM 덴드리머 조성물을 유해조류인 *Heterosigma akashiwo* (CCMP 452), *Chattonella marina* (*C. marina*), *Alexandrium tamarense* (*A. tamarense*), *Cochlodinium polykrikoides* (*C. polykrikoides*), *Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*)와 비유해조류인 *Amphidium* sp., *Navicula pelliculosa*, *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum* EPV에 각각 처리한 후, 하루 당 세포 분열의 수를 나타내는 감소율(%)을 측정하고, 각 감소율이 50 %가 되는 농도를 의미하는 IC_{50} 값(the half maximal inhibitory concentration)을 계산하여 PAMAM 덴드리머의 살조 활성을 측정하였다.

[0055] TD화합물을 탑재한 PAMAM 덴드리머 조성물의 유해조류와 비유해조류에 대한 살조능 결과는 표 3에서와 같다. PAMAM 덴드리머 G4에 TD49를 봉입하여 제조한 PAMAM 덴드리머 G4-TD49 조성물의 유해조류와 비유해조류에 대한 살조능을 실험한 결과, TD49의 살조능이 PAMAM 덴드리머 G4와 상가적으로 작용하여 유해조류에 대해 우수한 살조능을 보임을 확인하였다. TD49를 탑재한 PAMAM 덴드리머G4-TD49 조성물은 유해조류 4종에 대해서는 IC_{50} 가 0.5~2.4 μ M을 보였으며, 비유해조류 4종에 대해서는 모두 20 μ M을 처리해도 무해한 것으로 나타났다. 특히, 유해조류 중 *Microcystis*에 대해서는 TD49 자체는 거의 활성을 보이지 않은 반면에 PAMAM 덴드리머 G4-TD49 조성물은 1.98 μ M을 보여 의미있는 결과를 나타내었다.

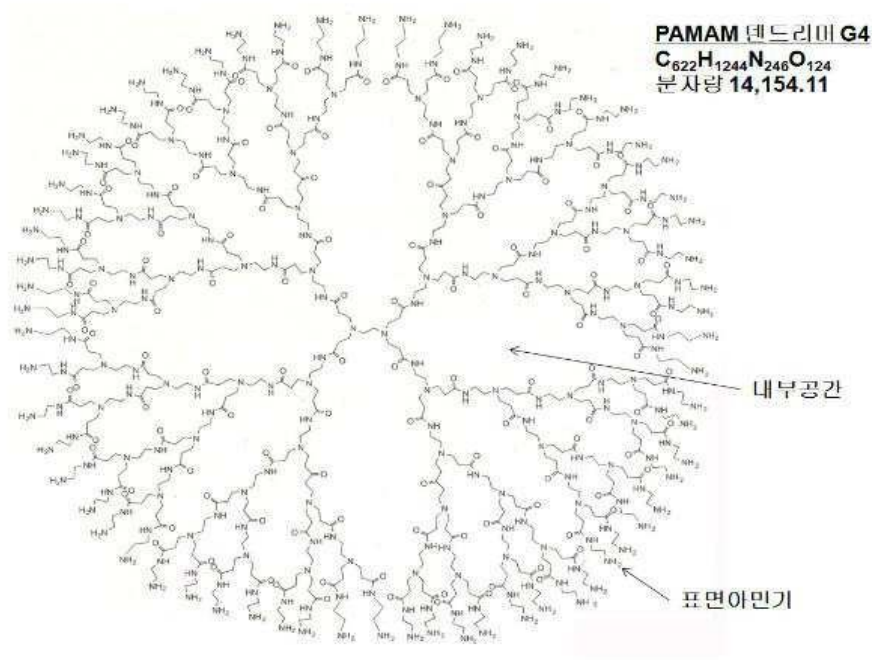
표 3

[0056] TD49를 탑재한 PAMAM 덴드리머 조성물의 유해조류와 비유해조류에 대한 살조능 (IC_{50}) 결과

Sample	유해조류(Harmful algal species)				비유해조류(Non-harmful algal species)			
	<i>A. marina</i>	<i>H. akashiwo</i>	<i>C. polykrikoides</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Amphidinium</i> sp	<i>Navicula pelliculosa</i>	<i>Phaeodactylum</i> EPV	<i>Nannochloropsis oculata</i>
TD49	1.17 $\pm$ 0.33	4.89 $\pm$ 2.39	0.86 $\pm$ 0.09	>20	> 20	> 20	> 20	> 20
PAMAM 덴드리머G4-TD49조성물	1.00 $\pm$ 0.05	2.39 $\pm$ 0.16	0.540 $\pm$ 0.001	1.98 $\pm$ 0.23	> 20	> 20	> 20	> 20
Blank	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

도면

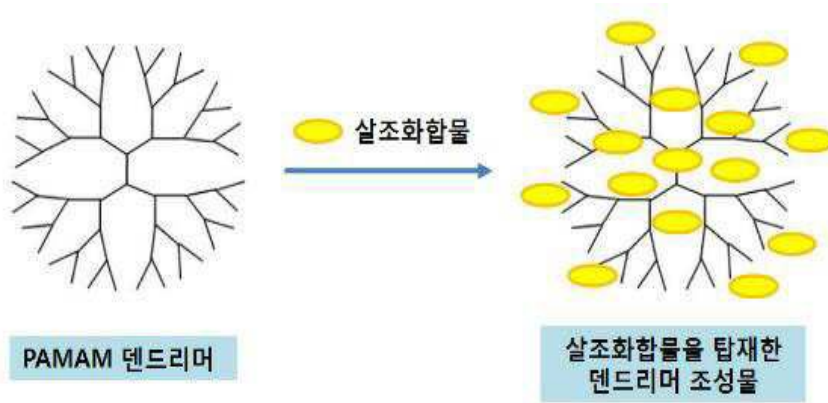
도면1



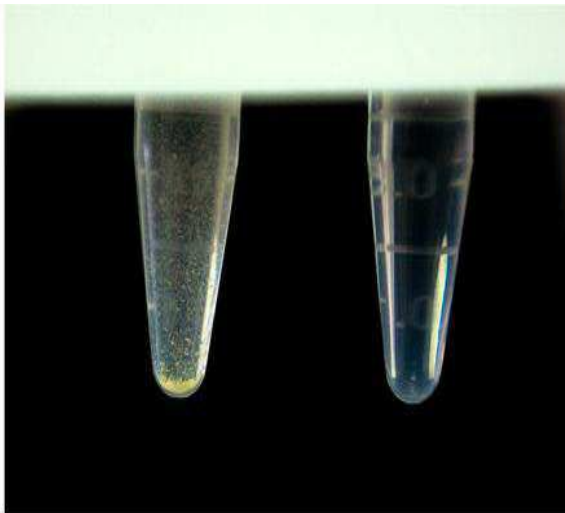
도면2

	<i>Alexandrium tamarense</i>		<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	
	광학 관찰	형광 관찰	광학 관찰	형광 관찰
Control				
PAMAM G4				
FITC				
PAMAM G4-FITC complex				

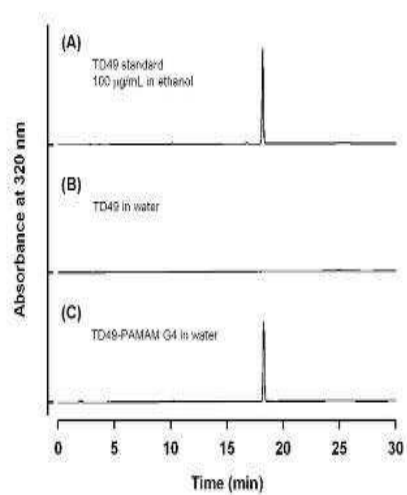
도면3



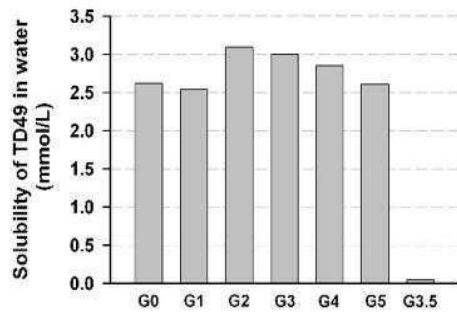
도면4



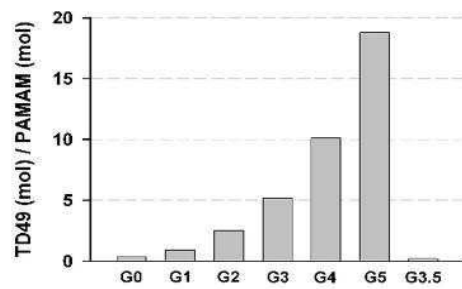
도면5



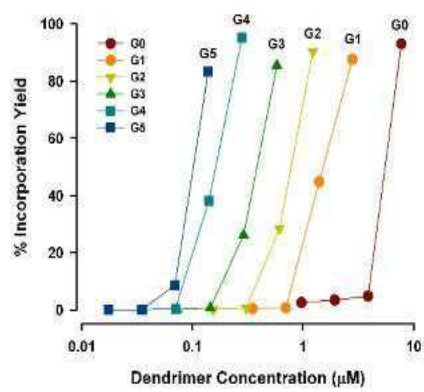
도면6



도면7



도면8



도면9

