



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0021882
(43) 공개일자 2022년02월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/14 (2006.01) A61K 47/69 (2017.01)
A61P 31/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/145 (2013.01)
A61K 47/6929 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2021-0107440
(22) 출원일자 2021년08월13일
심사청구일자 없음
- (30) 우선권주장
1020200102124 2020년08월14일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
- (72) 발명자
김현철
서울특별시 영등포구 63로 7, B동 501호 (여의도동, 은하아파트)
- 이규호
서울특별시 송파구 올림픽로4길 42 17동, 303호(잠실동, 우성아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김현진

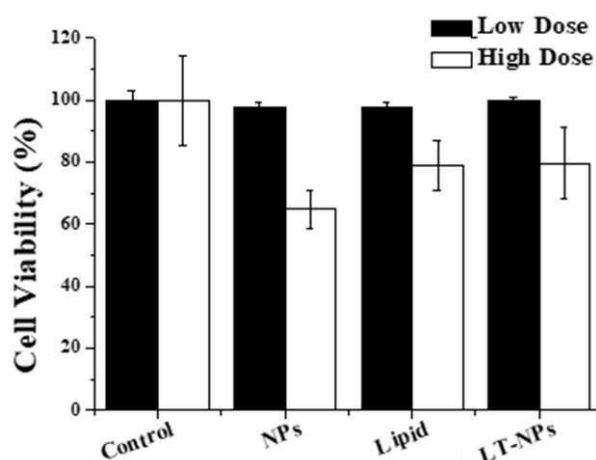
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물

(57) 요약

본 발명은 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물에 대한 것으로, 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 지질 기반 물질로 나노입자의 표면을 개질함으로써 미생물의 세포막 교란을 유도하여 미생물을 사멸시킬 수 있는 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 47/6931 (2017.08)

A61P 31/00 (2018.01)

(72) 발명자

조영훈

서울특별시 마포구 백범로 35

장보람

서울특별시 마포구 백범로 35

정유철

서울특별시 마포구 백범로 35

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	201970090
과제번호	SRFC-IT1902-02
부처명	삼성전자
과제관리(전문)기관명	삼성전자미래기술육성센터
연구사업명	삼성미래기술육성사업
연구과제명	막교란과 장력을 유도하는 차세대 항생제 나노 지질 드릴 구조 설계
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2019.12.01 ~ 2021.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

나노구조체를 포함하며,

상기 나노구조체는 알부민 나노입자와, 상기 알부민 나노입자의 외면에 결합된 지질 기반의 지질체를 포함하는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알부민 나노입자는 알부민 분자가 서로 결합하여 형성되며, 상기 알부민 나노입자 내에서 알부민 분자는 서로 결속되어 있는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 지질체는 친수성을 띠는 지질 머리가 외측면에 위치하고 내부에 소수성을 띠는 지질 꼬리가 위치하여, 튜브 형태를 가지는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 나노입자는 50 내지 300nm의 직경을 가지며, 상기 지질체는 10 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가지는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항생제 조성물은

패혈증비브리�균, 녹농균 및 황색포도상구균에 대하여 항생 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 지질체는 DSPC 및 DSPE를 포함하는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물에 대한 것으로, 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 지질 기반 물질로 나노입자의 표면을 개질함으로써 미생물의 세포막 교란을 유도하여 미생물을 사멸시킬 수 있는 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 항생제(antibiotics)는 감염된 사람에게는 해가 없지만 감염원인 세균을 죽이거나 세균 성장을 억제하여 세균 감염을 치료하거나 예방하는 화학물질이다.

[0003] 현재 항생제는 하기 특허문헌에 기재된 바와 같은 세포벽 성분 생합성 억제 계열과, RNA 중합 효소를 이용한 단백질 합성 억제 계열로 크게 분류할 수 있다.

[0004] <특허문헌>

[0005] 특허 제10-1492720호(2015. 02. 05. 등록) "2-브로모알칸산을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물"

[0006] 하지만, 병원성 미생물은 환경 변화에 적응이 뛰어나고 빠른 번식으로 인해 유전자 변이가 빈번하여 항생제에 대한 내성이 생기며, 따라서 병원성 미생물에 대한 충분한 항생 효과를 위해서는 약물 복용량을 늘려야 하여, 이에 따른 부작용과 약물의 오남용이라는 한계를 가지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로,

[0008] 본 발명은 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 지질 기반 물질로 나노입자의 표면을 개질함으로써, 미생물의 세포막 교란을 유도하여 미생물을 사멸시킬 수 있는 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 생명 중심원리(Central Dogma)를 건드리지 않는 방식으로 작용하며, 내성 발생 가능성을 저감시킬 수 있고, 세포 독성이 없는 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 항생제 조성물은 나노구조체를 포함하며, 상기 나노구조체는 알부민 나노입자와, 상기 알부민 나노입자의 외면에 결합된 지질 기반의 지질체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 항생제 조성물에 있어서, 상기 알부민 나노입자는 알부민 분자가 서로 결합하여 형성되며, 상기 알부민 나노입자 내에서 알부민 분자는 서로 결속되어 있는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 항생제 조성물에 있어서 상기 지질체는 친수성을 띠는 지질 머리가 외측면에 위치하고 내부에 소수성을 띠는 지질 꼬리가 위치하여, 튜브 형태를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 항생제 조성물에 있어서, 상기 나노입자는 50 내지 300nm의 직경을 가지며, 상기 지질체는 10 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 항생제 조성물은 패혈증비브리오균, 녹농균 및 황색포도상구균에 대하여 항생 효과를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 항생제 조성물에 있어서 상기 지질체는 DSPC 및 DSPE를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.

[0018] 본 발명은 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 지질 기반 물질로 나노입자의 표면을 개질함으로써, 미생물의 세포막 교란을 유도하여 미생물을 사멸시킬 수 있는 효과가 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 생명 중심원리(Central Dogma)를 건드리지 않는 방식으로 작용하며, 내성 발생 가능성을 저감시킬 수 있고, 세포 독성이 없는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체의 모식도.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체의 TEM 이미지.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체의 표면 전하값 측정결과를 나타내는 그래프.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체의 Cryo-TEM 이미지.

도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 나노구조체의 TEM 이미지.

도 6은 본 발명의 다른 실시예에 따른 나노구조체의 Cryo-TEM 이미지

도 7은 본 발명의 다른 실시예에 따른 나노구조체에 결합하는 지질체의 Cryo-TEM 이미지.

도 8은 인지질 비율을 비율을 달리하여 제조된 본 발명의 다른 실시예에 따른 나노구조체의 Cryo-TEM 이미지.

도 9는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 나노구조체의 TEM 이미지.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체의 독성 검사 결과를 나타내는 도표

도 11은 PBS를 처리한 패혈증비브리오균의 TEM 이미지.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체를 처리한 패혈증비브리오균의 TEM 이미지.

도 13은 나노입자를 패혈증비브리오균에 처리하여 수행한 survivability test의 결과를 나타내는 디지털 이미지.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체를 패혈증비브리오균에 처리하여 수행한 survivability test의 결과를 나타내는 디지털 이미지.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체, 나노입자, 지질을 각각 패혈증비브리오균에 처리하여 수행한 survivability test의 결과를 나타내는 디지털 이미지.

도 16는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 나노구조체를 패혈증비브리오균에 처리하여 수행한 survivability test의 결과를 나타내는 디지털 이미지.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체를 녹농균에 처리하여 수행한 survivability test의 결과를 나타내는 디지털 이미지.

도 18은 나노입자, 지질을 각각 녹농균에 처리하여 수행한 survivability test의 결과를 나타내는 디지털 이미지.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체를 황색포도상구균에 처리하여 수행한 survivability test의 결과를 나타내는 디지털 이미지.

도 20은 나노입자, 지질을 각각 황색포도상구균에 처리하여 수행한 survivability test의 결과를 나타내는 디지털 이미지.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

이하에서는 본 발명에 따른 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물을 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0023]

본 발명의 일 실시예에 따른 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물을 도 1 내지 20을 참조하여 설명하면, 상기 항생제 조성물은 나노구조체를 유효 성분으로 포함하며, 상기 나노구조체는 나노입자(1)와, 상기 나노입자(1)의 외표면 일부분에 복수 개가 결합하는 지질 기반의 지질체(2)를 포함하여, 미생물의 세포막 교란을 유도하여 미생물을 사멸시켜 항생 효과를 발휘한다.

[0025]

상기 나노입자(1)는 세포 내에 섭취되어도 독성을 발휘하지 않는 종래의 다양한 나노입자가 사용될 수 있으며, 예컨대 알부민, 고분자 나노입자가 사용될 수 있다. 상기 나노입자(1)는, 예컨대 50 내지 300nm의 직경 및 구형

의 형태를 가질 수 있다. 상기 나노입자는 지질체와 결합하는 화학 반응기(이하, '제1반응기'라 함)를 포함할 수 있다. 예컨대, 제1반응기로는 싸이올기, 아민기, 아미노기, 카르복시기 등을 포함하는 화합물일 수 있다. 상기 나노입자(1)의 일 예인 알부민 나노입자는 알부민 분자가 결합(예컨대, 디설파이드 결합 등)에 의해 형성되어, 알부민 나노입자에서는 알부민 분자가 결속되어 있는 것을 특징으로 한다.

[0027] 상기 지질체(2)는 지질로 이루어지며 상기 나노입자(1)의 외표면 일부분에 복수 개가 결합하는 구성으로, 상기 지질체는 예컨대 10 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가질 수 있으며, 상기 나노입자의 외표면에 하나 이상이 결합될 수 있다. 또한, 상기 지질체는 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하는 화학 반응기(이하, '제2반응기'라 함)를 포함할 수 있다. 예컨대, 제2반응기로는 싸이올기, 아민기, 아미노기, 카르복시기 등을 포함하는 화합물일 수 있다. 상기 지질체는 제2반응기가 결합된 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질이 혼합된 혼합물로 이루어진 지질구조체(예컨대, 리포솜, 마이크로버블 등)의 제조함에 의해 형성되는데, 상기 지질체는 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합되지 않은 지질의 혼합 비율을 조절하여 지질체의 생성 및 형태(모양 및 길이 등) 제어할 수 있으며, 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합하지 않은 지질은 1:9 ~ 99의 몰비로 혼합되는 것이 바람직하다.

[0028] 상기 지질체는 예컨대 친수성을 띠는 지질 머리(21)가 외측면에 위치하고 내부에 소수성을 띠는 지질 꼬리(22)가 위치하여 전체적으로 길이가 긴 튜브 형태를 가질 수 있으며, 튜브 형태의 지질체 일단에 위치하는 제2반응기기가 상기 나노입자의 제1반응기와 화학 결합하여 튜브 형태의 지질체가 상기 나노입자(1)의 외표면에 결합하게 된다. 예를 들어, 나노입자를 알부민 나노입자이고, 상기 지질체에 NHS(N-hydroxysuccinimide) 반응기를 형성하는 경우, NHS-amine 반응을 통해 상기 나노입자(1)와 지질체(2)를 결합시킬 수 있다. 본 발명은 안정성이 높고 생체적합성이 뛰어난 지질 기반 물질로 나노입자의 표면을 개질함으로써, 미생물의 세포막 교란을 유도하여 미생물을 사멸시킬 수 있다. 상기 지질체는 지질 중에서도 가장 안전(안전하다는 의미는 정상 세포에 영향이 적음을 의미함)하다고 알려진 DSPC와 DSPE를 이용하여 형성된다. 또한, 인지질 DSPC와 DSPE의 경우 그 자체로, 패혈증비브리�균, 녹농균, 황색포도상구균에 대하여 항생 효과를 가지지 않으나, 상기 인지질을 이용하여 나노구조체로 형성하는 경우 패혈증비브리�균, 녹농균, 황색포도상구균에 항생 효과가 발생하게 된다.

[0030] 상기 나노구조체를 함유하는 항생제 조성물은 항생제 조성물에 사용되는 공지의 물질(예컨대, 희석제, 부형제, 수용액, 프로필렌글리콜 등)이 추가로 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 나노구조체의 제조방법을 설명하면, 상기 나노구조체의 제조방법은 제1반응기가 존재하는 나노입자를 형성하는 나노입자형성단계와, 상기 제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질구조체(버블, 리포솜 등)를 형성하는 지질구조체형성단계와, 상기 나노입자와 지질구조체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록 하여 지질구조체의 외면에 나노입자가 결합한 지질구조체-나노입자 복합체를 형성하는 지질복합체형성단계와, 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질구조체-나노입자 복합체에 기계적인 힘(mechanical force)을 가해 지질구조체를 파쇄하여 나노입자의 외표면 일부분에 결합한 지질체를 형성하는 파쇄형성단계 등을 포함한다.

[0033] 상기 나노입자형성단계는 세포 내에 섭취되어도 독성을 발휘하지 않는 나노입자를 형성하는 단계로, 종래의 다양한 나노입자를 제조하는 방법이 사용될 수 있으며, 예컨대 알부민 나노입자의 경우 알부민에 아민기가 존재하여 제1반응기로 이용될 수 있다.

[0034] 상기 지질구조체형성단계는 상기 제1반응기와 화학적으로 결합하는 제2반응기가 존재하는 지질 기반의 마이크로 사이즈의 지질구조체(버블, 리포솜 등)를 형성하는 단계로, 예컨대 버블은 지질(예컨대, 인지질)로 형성되고 내부에 가스가 충전되어 있으며 상기 버블에 제2반응기가 위치하게 된다. 내부에 가스를 가지고 지질로 이루어진 리포솜 형태의 마이크로 사이즈의 버블은 종래의 제조방법에 의해 제조될 수 있으며, 예컨대 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합하지 않은 지질을 유기용매에 일정 비율로 혼합하여 지질필름을 형성하고, 상기 지질필름을 용매에 녹이고 가스를 주입하여 형성할 수 있다. 상기 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합하지 않은 지질의 혼합 비율을 조절하여 지질체의 생성 및 형태(모양 및 길이 등)를 제어할 수 있으며, 제2반응기가 결합한 지질과 제2반응기가 결합하지 않은 지질은 1:9 ~ 99의 몰비로 혼합되는 것이 바람직하다.

[0035] 상기 지질복합체형성단계는 상기 나노입자와 지질구조체를 혼합하여 제1반응기와 제2반응기가 서로 결합하도록

하여 지질의 외면에 나노입자가 결합한 지질구조체-나노입자 복합체를 형성하는 단계이다.

[0036] 상기 파쇄형성단계는 상기 지질복합체형성단계에서 형성된 지질구조체-나노입자 복합체에 기계적인 힘 (mechanical force)을 가해 지질구조체를 파쇄하여 나노입자의 외표면 일부분에 결합한 지질체를 형성하는 단계이다. 지질구조체-나노입자 복합체에 초음파 기기 등을 이용하여 기계적인 힘을 가하고 일정 시간 유지하는 경우, 지질구조체가 파쇄되며 지질구조체를 이루는 지질은 재조합이 일어나 나노입자에 결합한 튜브 형태의 지질체가 형성되게 된다. 본 발명은 지질체를 나노입자에 직접 부착하지 않고 지질 기반의 지질구조체와 나노입자를 결합시킨 후 기계적인 힘을 가해 지질구조체가 파쇄되어 나노입자 표면에 지질체가 형성되도록 하는 Top-down 방식을 이용하므로 용이하게 대량 생산이 가능하도록 할 수 있다.

[0038] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] <실시예 1> 리포솜을 이용한 알부민 나노구조체의 제조

[0041] 1. 알부민 나노입자(NPs)의 준비

[0042] 알부민(Human serum albumin)을 증류수(DW)에 320mg/10mL의 농도로 녹여 준 후, 2-Iminothiolane hydrochloride 16mg/2ml(DW)를 첨가하였다. 이후, 0.2M NaOH를 이용하여 pH를 8로 조절하여 알부민 용액을 준비하고, 30kDa amicon tube 4000rpm 10min 조건으로 원심분리를 진행하여 미반응 물질을 제거한 후, 0.2M NaOH를 이용하여 pH를 7.7로 조절하고 100% 에탄올을 1mL/min의 속도로 상기 알부민 용액에 50ml를 적정하였다. 이후, 차광 하에 에탄올을 이틀 동안 날려주고, 100kDa amicon tube 4000rpm, 5min 3회 조건으로 원심분리를 진행한 후 입자화되지 않은 알부민을 피펫을 이용해 제거해주고 PBS로 재분산하여 상층액(나노입자(NPs))을 피펫으로 얻어 PBS로 최종부피를 6ml로 맞춰주었다.

[0043] 2. 지질을 이용한 리포솜의 준비

[0044] 지질 DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)와 DSPE-PEG-NHS2000(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-polyethylene glycol succinimidyl ester)을 9.5:0.5의 몰비로 혼합하여 Chloroform에 10mg/ml의 농도로 녹인 후, vial에 넣어 질소가스를 이용하여 chloroform을 날려준 후, desiccator를 이용하여 진공을 잡아 1시간 이상 말려 지질박막(lipid film)을 형성하였다. lipid film vial에 auto PBS를 9ml 넣어 지질 용액을 형성하고, 55℃ 이상의 온도를 가지는 물에 지질 용액이 들어 있는 vial을 넣어 지질 용액의 온도가 55℃ 이상이 되도록 하고 bath sonic에서 15초 정도 sonication을 실시하여 리포솜용액을 얻었다(이때, 뜨거운 물에 담그는 과정과 sonication 실시 과정을 3번 정도 반복함).

[0045] 3. 나노구조체(LT-NPs)의 형성

[0046] 실시예 1의 1에서 형성된 나노입자를 실시예 1의 2에서 준비된 리포솜용액에 넣어준 후, NHS-amine 반응을 유도하기 위해 상온에서 2시간 이상 반응시킨 후(이때, 리포솜-나노입자 복합체가 형성됨), 초음파 기기를 이용하여 200W, cycle:1 Amplitude 20% 조건으로 30초동안 mechanical force를 가하였다. 이후, 파쇄된 리포솜이 지질체를 충분히 형성할 수 있도록, 12시간 이상 4℃에서 incubation하여 나노입자의 외표면 일부분에 지질체가 결합한 나노구조체(LT-NPs)를 형성하였다.

[0048] <실시예 2> 버블을 이용한 알부민 나노구조체의 제조

[0049] 1. 알부민 나노입자(NPs)의 준비

[0050] 알부민(Human serum albumin)을 증류수에 20mg/mL의 농도로 녹여 준 후, 0.2M NaOH를 이용하여 pH를 8로 조절하여 알부민 용액을 준비하고, 100% 에탄올을 1mL/min의 속도로 상기 알부민 용액에 적정하였다. 이후, 4%의 glutaraldehyde 10 μL를 첨가하고 차광 하에 에탄올을 하룻밤 동안 날려주고, 13200rpm, 10min 조건으로 원심분리를 진행한 후 입자화되지 않은 알부민을 피펫을 이용해 제거해주고 PBS로 재분산하여 3000rpm, 5min 조건으로 원심분리를 진행한 후 micropellet을 제외한 상층액(나노입자(NPs))을 피펫으로 얻었다.

[0051] 2. 지질을 이용한 버블의 준비

- [0052] (1) 지질 DSPC(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)와 DSPE-PEG-NHS2000(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-polyethylene glycol succinimidyl ester)을 9.25:0.75의 몰비로 혼합하여 Chloroform에 10mg/ml의 농도로 녹인 후 1mg/ml이 되도록 1c vial에 100ul씩 넣어준 후, 질소가스를 이용하여 chloroform을 날려준 후, desiccator를 이용하여 진공을 잡아 1시간 이상 말려 지질박막(lipid film)을 형성하였다. lipid film vial에 auto PBS를 1ml 넣어 지질 용액을 형성하고, 55℃ 이상의 온도를 가지는 물에 지질 용액이 들어 있는 HPLC vial을 넣어 지질 용액의 온도가 55℃ 이상이 되도록 하고 bath sonic에서 15초 정도 sonication을 실시하였다(이때, 뜨거운 물에 담그는 과정과 sonication 실시 과정을 3번 정도 반복함).
- [0053] (2) 실시예 2의 2의 (1)의 과정을 거쳐 얻은 결과물에, C₃F₈ gas를 30초간 vial에 채워, Vial Mixer를 이용하여 45초간 mixing시켜 NHS 반응기를 포함하는 지질 기반의 마이크로 버블을 형성하였다.
- [0054] 3. 나노구조체(LT-NPs)의 형성
- [0055] (1) 실시예 2의 1에서 형성된 나노입자를 마이크로 버블 용액(실시예 2의 2에서 형성된 마이크로 버블이 PBS에 1mg/ml의 농도로 혼합되어 형성)에 넣어준 후, NHS-amine 반응을 유도하기 위해 RT에서 2시간 이상 반응시킨 후(이때, 마이크로 버블-나노입자 복합체가 형성됨), 초음파 기기를 이용하여 2W, 1MHZ, duty cycle 100% 조건으로 5분 이상 mechanical force를 가하였다. 이후, 과쇄된 마이크로 버블이 지질체를 충분히 형성할 수 있도록, 1시간 이상 RT에서 incubation하여 나노입자의 외표면 일부분에 지질체가 결합한 나노구조체(LT-NPs)를 형성하였다.
- [0056] (2) DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000의 혼합 비율을 달리한 것을 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 2의 3의 (1)과 동일하게 하여 나노입자의 외표면 일부분에 지질체가 결합한 나노구조체(LT-NPs)를 형성하였다. DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000의 혼합 비율은 각각 9.75:0.25, 9.5:0.5, 9:1, 8:2로 하였다.
- [0058] <실시예 3> 고분자 나노구조체의 제조
- [0059] 1. 고분자 나노입자(NPs)의 준비
- [0060] 0.25 μmol(MW:20000, 5mg)의 PLA-NHS를 DMSO 1mL에 녹이고, 0.5 μmol(MW:10000, 5mg)의 HA-NH₂를 DW 200ul에 녹인 뒤, 양 용액을 합쳐 건조 시켜 PLA-b-HA diblock copolymers를 얻었다. PLA-b-HA diblock copolymers를 CHCl₃ 1mL에 녹인 후, 주사기에 옮겨 담아 3ml의 Magnetic stirrer bar 상의 물에 일정하게 떨어트린 후, Tip sonication을 1분간 수행하였다. Amicon tube를 통해 4000G, 5min 조건으로 원심분리 진행을 통해 상층액 PLA-b-HA 이중 공중합체(diblock copolymer) 나노입자((NPs)를 얻은 후, 최종부피가 1ml이 되도록 DW를 첨가하였다.
- [0061] 2. 나노구조체(LT-NPs)의 형성
- [0062] (1) 지질 DSPC(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)와 DSPE-PEG-NHS2000(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-polyethylene glycol succinimidyl ester)을 9.5:0.5의 몰비로 혼합하여 Chloroform에 10mg/ml의 농도로 녹인 후 1mg/ml이 되도록 1c vial에 100ul씩 넣어준 후, 질소가스를 이용하여 chloroform을 날려준 후, desiccator를 이용하여 진공을 잡아 1시간 이상 말려 지질박막(lipid film)을 형성하였다. lipid film vial에 auto PBS를 800ul 넣어 지질 용액을 형성하고, 55℃ 이상의 온도를 가지는 물에 지질 용액이 들어 있는 HPLC vial을 넣어 지질 용액의 온도가 55℃ 이상이 되도록 하고 bath sonic에서 15초 정도 sonication을 실시하였다.
- [0063] (2) 이후, HPLC vial에 실시예 3의 1에서 형성한 나노입자 200ul 넣어 최종 부피 1ml가 되도록 한 후, 12시간 반응 시킨 후 Tip sonication을 10초간 처리하고, Amicon tube 4000G, 5min 조건으로 원심분리 진행하여, 고분자 나노입자의 외표면 일부분에 지질체가 결합한 나노구조체(LT-NPs)를 얻었다.
- [0065] <실시예 4> 나노구조체의 특성 확인
- [0066] 1. 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 1의 3에서 형성한 나노구조체(LT-NPs)를, TEM으로 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었고, 표면 전하를 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었고, 실시예 1의 3에서 형성한 나노구조체를 Cryo-TEM으로 측정하여 그 결과를 각각 도 4에 나타내었다. 또한, 실시예 2의 1에서 형성한 나

노입자(NPs)와 실시예 2의 3의 (1)에서 형성한 나노구조체(LT-NPs)를, TEM으로 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었고, 실시예 2의 3의 (1)에서 형성한 나노구조체 및 지질체를 Cryo-TEM으로 측정하여 그 결과를 각각 도 6 및 7에 나타내었고, 실시예 2의 3의 (2)에서 형성한 나노구조체를 Cryo-TEM으로 측정하여 그 결과를 각각 도 8에 나타내었다. 또한, 실시예 3의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와 실시예 3의 2에서 형성한 나노구조체(LT-NPs)를, TEM으로 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0067] 2. 도 2를 보면, 알부민 나노입자의 경우 표면이 매끈한 것을 확인할 수 있는데 반해, 나노구조체는 지질체가 나노입자의 표면에 붙어 있어 표면이 매끈하지 않은 것을 알 수 있으며, 도 3을 보면, 알부민 나노입자는 강한 음전하(-24mV)를 띠고 있으나, 중성 전하를 가지고 있는 지질 기반의 지질체가 나노입자의 표면에 유도됨으로서 나노구조체는 나노입자에 비해 감소된 음전하(-12mV)를 띠고 있음을 확인할 수 있어, 나노입자 표면에 지질체가 유도되었음을 알 수 있다. 또한, 도 2 및 4를 보면, 나노입자의 표면에 튜브 형태의 지질체가 붙어 있음을 알 수 있고, 상기 지질체는 튜브 형태를 가짐을 더욱 명확히 알 수 있으며, 나노입자는 100 내지 300nm의 직경을 가지며, 상기 지질체는 50 내지 300nm의 길이를 가지고 3 내지 20nm의 폭을 가짐을 알 수 있고, 상기 지질체는 상기 나노입자의 외표면에 하나 이상이 결합될 수 있음을 알 수 있다. 또한, 도 5 내지 8을 보면, 버블을 이용한 경우에도 리포솜을 이용한 경우와 마찬가지로 나노구조체가 형성됨을 알 수 있고, DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000의 비율에 따라 지질체 형성 양상이 달라지는 것을 확인할 수 있고, DSPE-PEG-NHS2000의 비율이 증가할수록 지질체의 길이가 짧아지고 나노입자에도 지질체가 덜 형성되는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 9를 보면, PLA-b-HA 이중 공중합체(diblock copolymer) 나노입자 표면에도 지질체가 형성됨을 확인할 수 있다.

[0069] <실시예 5> 나노구조체의 독성 확인

[0070] 1. 총 1×10^4 개의 A549 cell을 96-well plate에 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 Control(PBS), 실시예 1의 1에서 형성된 나노입자(NPs), 지질(Lipid), 실시예 1의 3에서 형성된 나노구조체(LT-NPs)를 두 가지 농도(High Dose: 0.5mg/ml, Low Dose: 0.002mg/ml)로 처리하고 3시간 동안 인큐베이션 후, 모든 그룹에 새로운 배지를 갈아주고 추가로 24시간 동안 배양하고, MTT용액(0.5mg/ml)을 각 well에 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 이어서, 100ul의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가한 후, microplate reader를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하고, cell viability를 계산하여 그 결과를 도 10에 나타내었다. 상기 지질은 DSPC를 사용하였다.

[0071] 2. 도 10을 보면, 알부민 나노입자(NPs) 뿐만 아니라, 지질 중에서 인체에 가장 안전하다고 알려진 지질인 DSPC 보다, 나노구조체(LT-NPs)가 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있어, 상기 나노구조체의 안전성이 뛰어난을 알 수 있다.

[0073] <실시예 6> 패혈증비브리오균(*Vibrio vulnificus*)에 나노구조체 처리하여 항생 효과 확인

[0074] 1. 그람 음성균(Gram-negative Bacteria)인 패혈증비브리오균(*Vibrio vulnificus*)에 나노구조체를 처리한 후, 세균 사멸을 확인하여 상기 나노구조체의 항생 효과를 확인하였다.

[0075] 2. LBS medium, 30℃, 혼탁배양의 조건에서 12시간 배양한 패혈증비브리오균을 새로운 배지에 fresh culture한 후, 지수 성장기에 도달한(~ 0.4 OD_{595nm}) 패혈증비브리오균을 phosphate buffered saline(PBS: 100mM NaCl, 20mM sodium phosphate, pH 7.5)을 이용하여 2회 세척을 하고, 0.1 OD_{595nm}/ml 농도로 준비하였다.

[0076] 3. 실시예 6의 2에서 준비된 패혈증비브리오균 100 μ l에 최종농도 100 μ g/ml이 되도록, 실시예 1의 3에서 형성한 나노구조체(LT-NPs)를 처리하고, 3시간 후 TEM으로 측정하여 그 결과를 도 12에 나타내었다. 도 11은 PBS(control)를 처리한 결과를 나타낸다. 또한, 실시예 6의 2에서 준비된 패혈증비브리오균 100 μ l에 최종농도 50 μ g/ml 및 100 μ g/ml이 되도록, 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs)를 처리하고 10^{-0} 부터 10^{-6} 까지 희석하여 survivability test를 수행하여 그 결과를 도 13에 나타내었다. 또한, 실시예 6의 2에서 준비된 패혈증비브리오균 100 μ l에 최종농도 100, 200, 400 μ g/ml가 되도록, 실시예 1의 3에서 형성한 나노구조체(LT-NPs)를 6시간 처리하고 survivability test를 수행하여 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0077] 4. 또한, 실시예 6의 2에서 준비된 패혈증비브리오균 100 μ l에 최종농도 0.2, 0.4mg/ml가 되도록, 실시예 1의 3에서 형성한 나노구조체(LT-NPs)를 3시간 처리하고, 10^{-2} 부터 10^{-3} 까지 희석하여 survivability test를 수행하여

그 결과를 도 15의 (a)에 나타내었고, 실시예 6의 2에서 준비된 패혈증비브리오균 100 μ l에 최종농도 0.4mg/ml가 되도록, 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs), 지질(Lipid)을 각각 3시간 처리하고, survivability test를 수행하여 그 결과를 도 15의 (b)에 나타내었다. 상기 지질은 DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000를 9.5:0.5의 몰비로 혼합하여 사용하였다.

[0078] 5. 실시예 6의 2에서 준비된 패혈증비브리오균 100 μ l에 최종농도 100 μ g/ml가 되도록, 실시예 3의 1에서 형성한 나노입자(NPs)와, 실시예 3의 2에서 형성한 나노구조체(LT-NPs)를 각각 처리하고, survivability test를 수행하여 그 결과를 도 16에 나타내었다.

[0079] 6. 도 11을 보면, PBS를 처리한 경우 패혈증비브리오균에 특별한 변화가 관찰되지 않았으나, 도 12를 보면, 나노구조체를 처리한 경우 패혈증비브리오균의 막이 교란이 일어나며, 패혈증비브리오균이 사멸됨을 확인할 수 있었다. 또한, 도 13 및 14를 보면, survivability test 결과 나노입자를 처리한 경우 패혈증비브리오균의 감소를 확인할 수 없으나, 나노구조체를 처리한 경우 패혈증비브리오균의 감소를 관찰할 수 있다. 한편, 알부민 용액과 달리 알부민 나노입자에서 항생 효과를 가지지 않는 것은, 알부민 분자가 자유로운 알부민 용액과 달리, 알부민 분자가 결합(예컨대, 디설파이드 결합)에 의해 알부민 나노입자가 형성되므로, 알부민 나노입자에서는 알부민 분자가 견고하게 결속되어 있어 박테리아 내에서 알부민 분자를 이용하기 어렵기 때문인 것으로 보인다. 또한, 도 15를 보면, survivability test 결과 나노구조체를 처리한 경우 패혈증비브리오균의 감소를 확인할 수 있으나, 나노입자, 지질을 처리한 경우 패혈증비브리오균의 감소를 확인할 수 없었다. 이는, 일부 인지질의 경우 특정 박테리아에 항생 효과를 가진다고 알려져 있으나, DSPC와 DSPE의 경우 패혈증비브리오균에 대하여 항생 효과를 가지지 않음을 명확히 알 수 있다. 또한, 도 16을 보면, PLA-b-HA 이중 공중합체(diblock copolymer) 나노입자를 처리한 경우 패혈증비브리오균의 감소를 확인할 수 없으나, PLA-b-HA 이중 공중합체(diblock copolymer) 나노입자를 이용한 나노구조체를 처리한 경우 패혈증비브리오균의 감소를 관찰할 수 있다.

[0080] 7. 실시예 3의 1에서 형성한 나노입자 대신에 실시예 2의 1에서 형성한 나노입자를 사용하고, 실시예 3의 2에서 형성한 나노구조체 대신에 실시예 2의 3의 (1)에서 형성한 나노구조체를 사용하여, 실시예 6의 5와 동일하게 survivability test를 수행한 결과, 나노입자를 처리한 경우 패혈증비브리오균의 감소를 확인할 수 없으나, 나노구조체를 처리한 경우 패혈증비브리오균의 감소를 관찰할 수 있었다.

[0082] <실시예 7> 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 나노구조체를 처리하여 항생 효과 확인

[0083] 1. 그람 음성균인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 나노구조체를 처리한 후, 세균 사멸을 확인하여 상기 나노구조체의 항생 효과를 확인하였다.

[0084] 2. LBS medium, 30 $^{\circ}$ C, 혼탁배양의 조건에서 12시간 배양한 녹농균을 새로운 배지에 fresh culture한 후, 지수 성장기에 도달한(~ 0.4 OD_{595nm}) 녹농균을 0.025 OD_{595nm}/ml이 되도록 borosilicate vial에 접종하고, 30 $^{\circ}$ C, static culture 조건에서 6시간 배양 후, 배지성분을 제거하였다.

[0085] 3. 실시예 7의 2에서 준비된 녹농균 100 μ l에 최종농도 0.2, 0.4, 0.8mg/ml이 되도록, 실시예 1의 3에서 형성한 나노구조체(LT-NPs)를 3시간 처리하고 survivability test를 수행하여 그 결과를 도 17에 나타내었다.

[0086] 4. 실시예 7의 2에서 준비된 녹농균 100 μ l에 최종농도 0.4mg/ml가 되도록, 실시예 1의 1에서 형성한 나노입자(NPs), 지질(Lipid)을 각각 3시간 처리하고, survivability test를 수행하여 그 결과를 도 18에 나타내었다. 상기 지질은 DSPC와 DSPE-PEG-NHS2000를 9.5:0.5의 몰비로 혼합하여 사용하였다..

[0087] 5. 도 17 및 18을 보면, 상기 나노구조체가 녹농균에 대하여 항생효과가 있음을 확인할 수 있으나, 나노입자, 지질을 처리한 경우 녹농균의 감소를 확인할 수 없었다. 이는, 인지질 DSPC와 DSPE의 경우 녹농균에 대하여 항생 효과를 가지지 않으나, 상기 인지질을 이용하여 나노구조체로 형성하는 경우 녹농균에 항생 효과가 발생함을 알 수 있다.

[0088] 6. 또한, 실시예 1의 3에서 형성한 나노구조체 대신에 실시예 2의 3의 (1)에서 형성한 나노구조체를 사용하여, 실시예 7의 3과 동일하게 survivability test를 수행한 결과, 상기 나노구조체가 녹농균에 대하여 항생효과가 있음을 확인하였고, 실시예 1의 3에서 형성한 나노구조체 대신에 실시예 3의 2에서 형성한 나노구조체를 사용하여, 실시예 7의 3과 동일하게 survivability test를 수행한 결과, 상기 나노구조체가 녹농균에 대하여 항생효과가 있음을 확인하였다.

[0091]

[0092]

[0093]

[0094]

[0095]

[0096]

[0098]

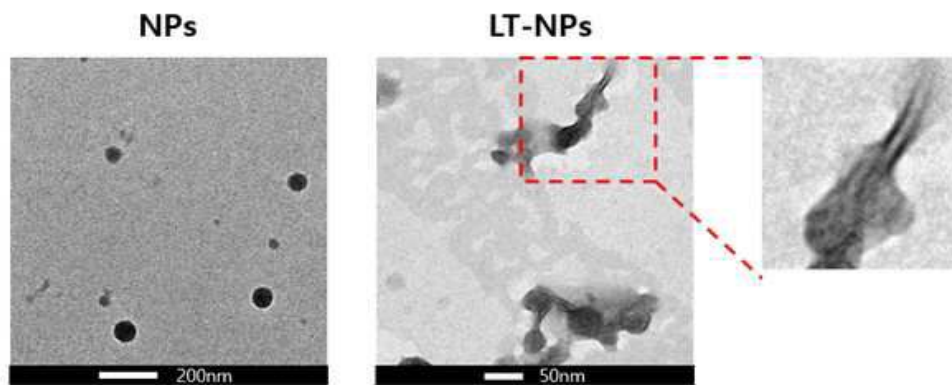
[0099]

2: 지질체

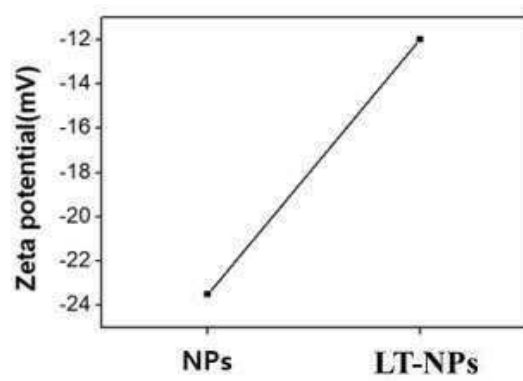
22: 지질 꼬리

- 11 -

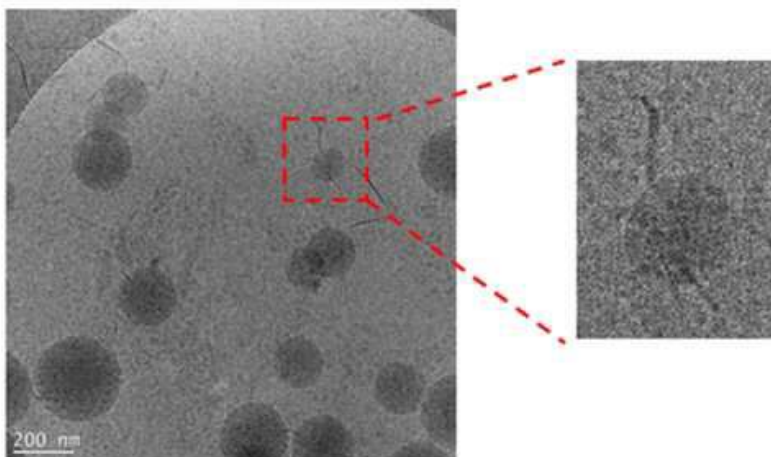
도면2



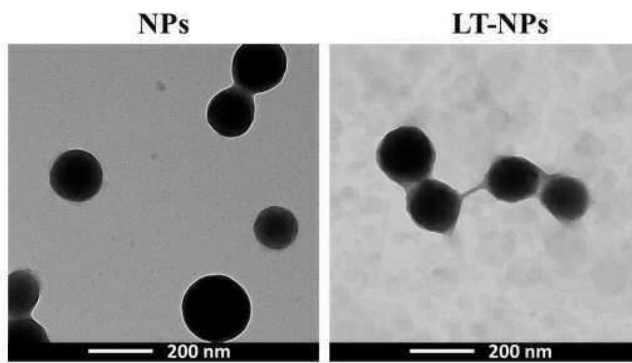
도면3



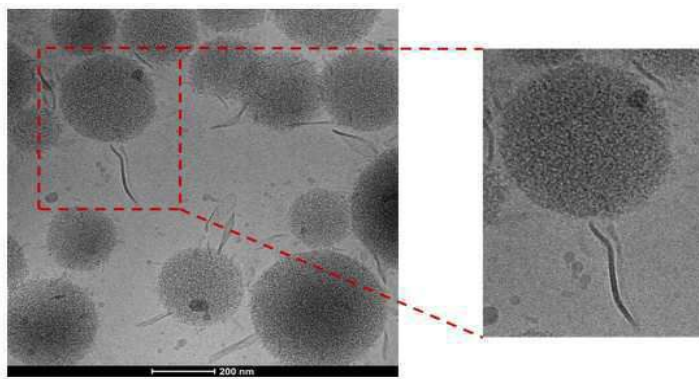
도면4



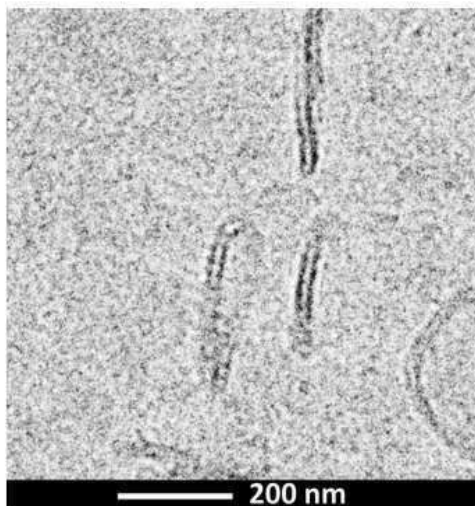
도면5



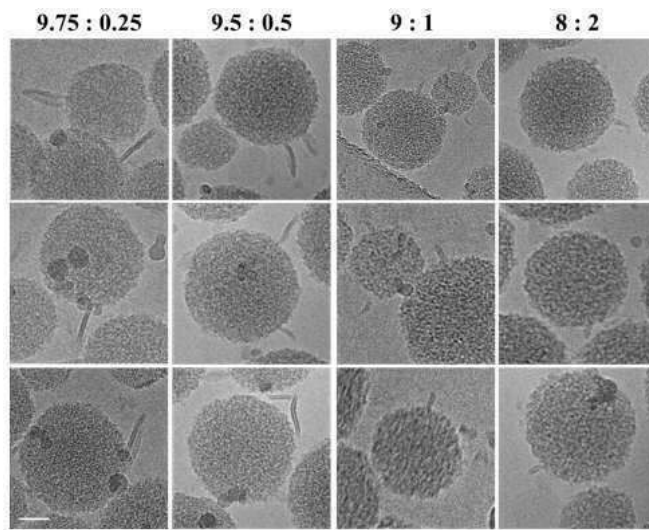
도면6



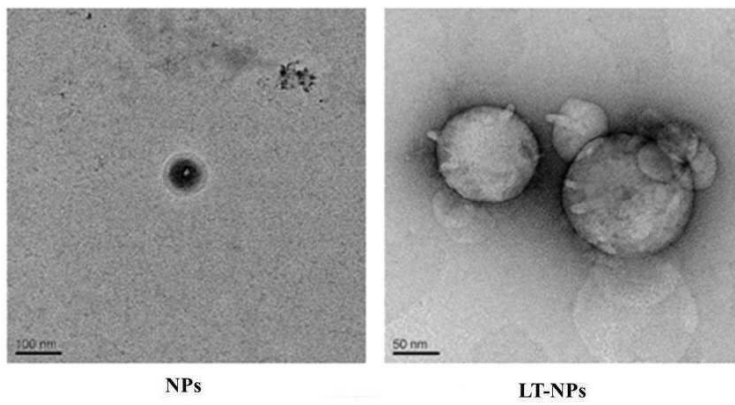
도면7



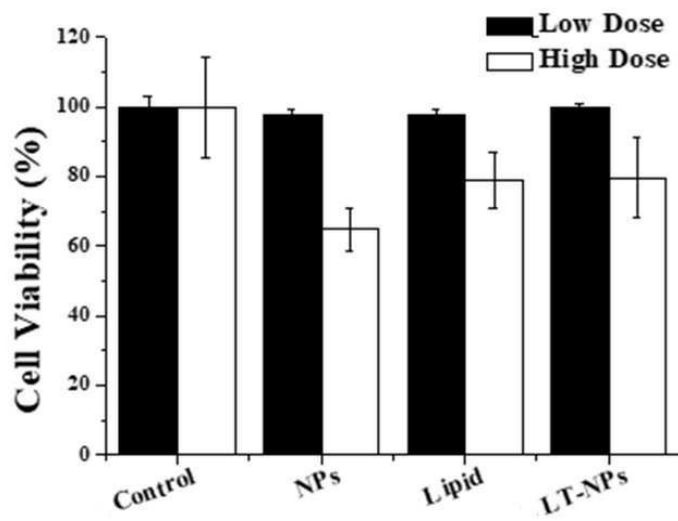
도면8



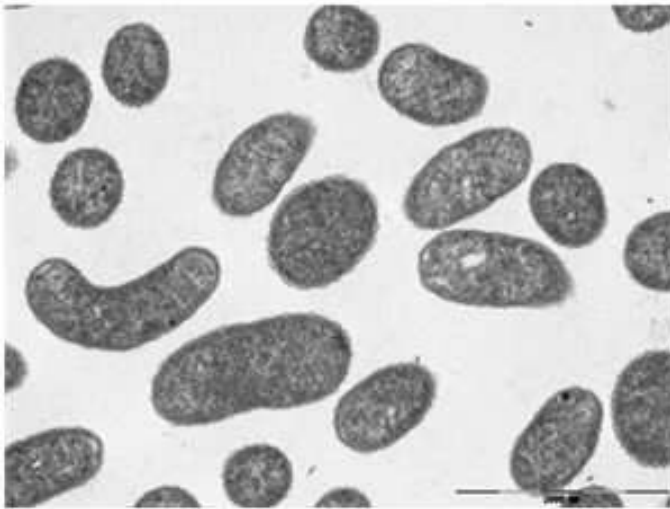
도면9



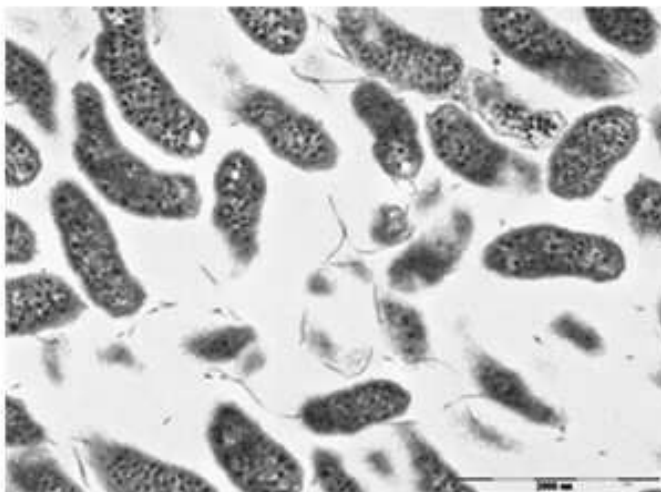
도면10



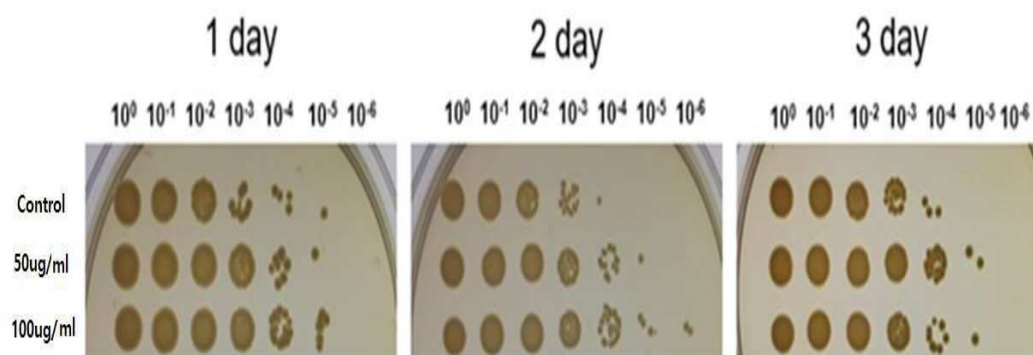
도면11



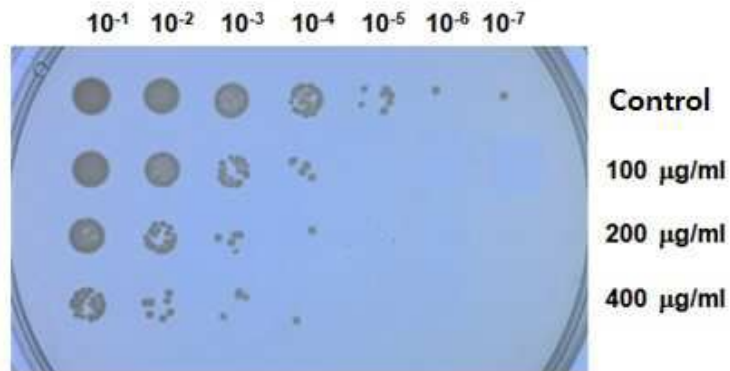
도면12



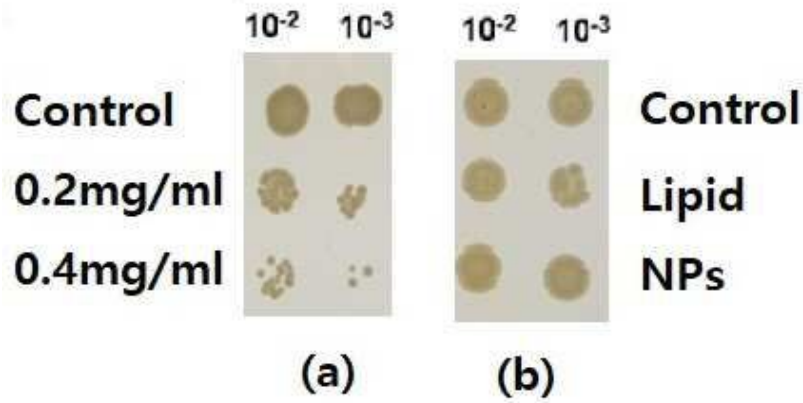
도면13



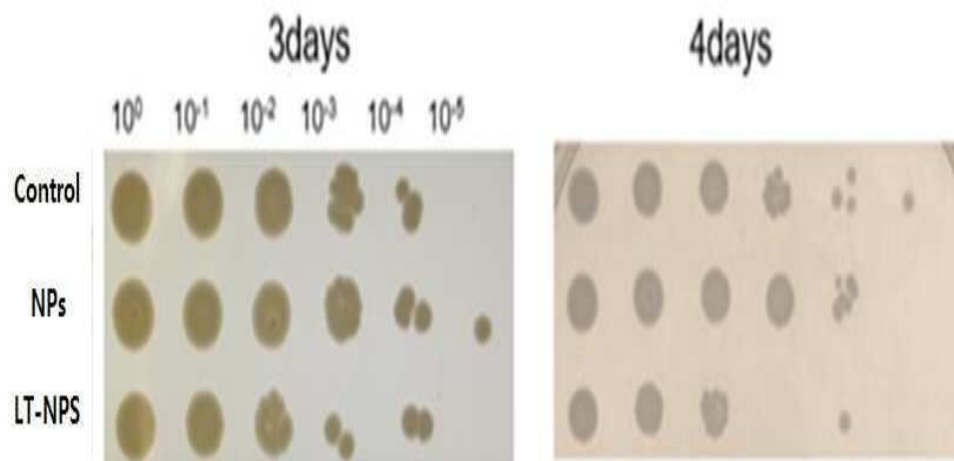
도면14



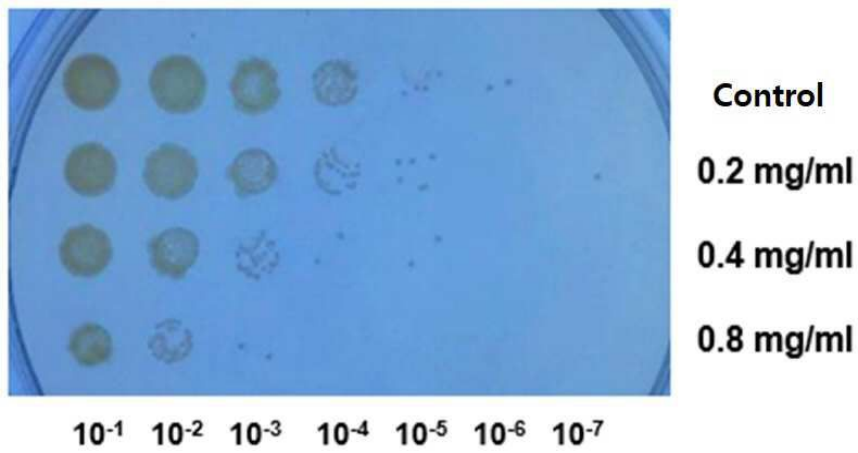
도면15



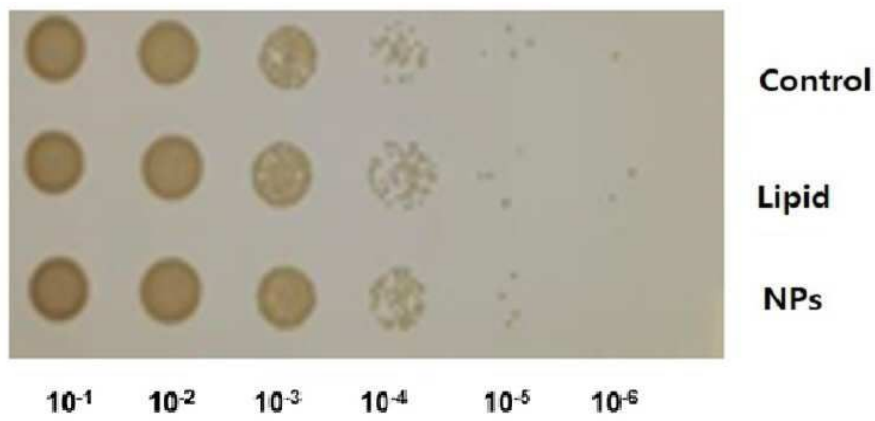
도면16



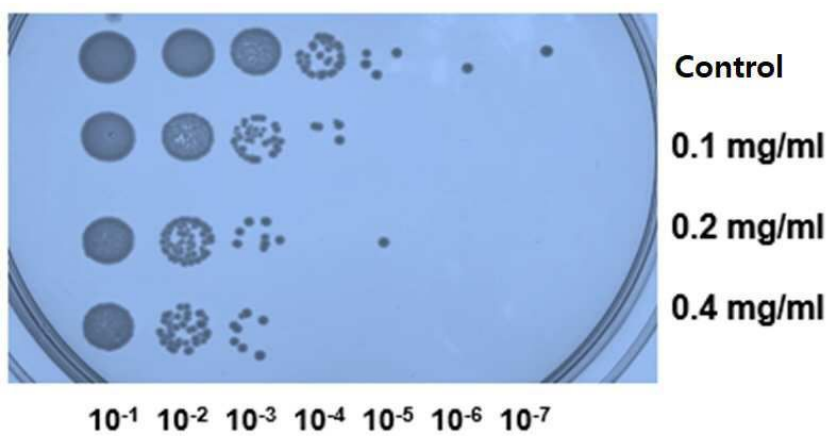
도면17



도면18



도면19



도면20

