(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0098865
(43) 공개일자 2020년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08F 20/38 (2006.01) *C08F 220/38* (2006.01)
C08G 81/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08F 20/38 (2013.01)
C08F 220/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0016510
(22) 출원일자 2019년02월13일
심사청구일자 2019년02월13일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
라오 징이
서울특별시 성북구 안암로 145, 창의관 811B호
쥬 지유안
서울특별시 성북구 안암로 145, 창의관 811B호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

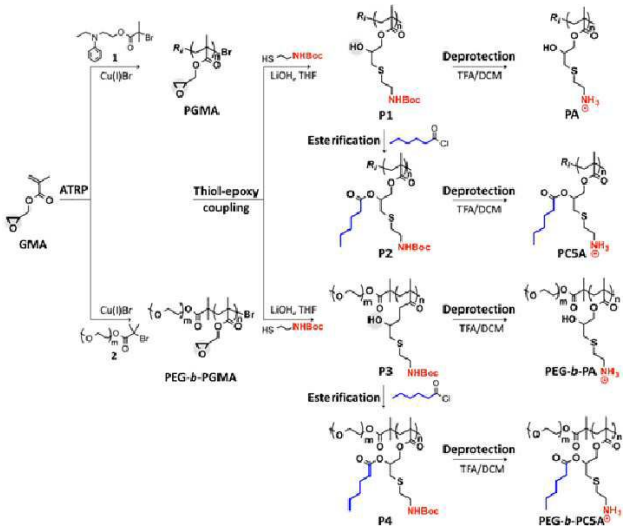
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **높은 생체 적합성을 갖는 항균성 고분자**

(57) 요 약

본 발명은 높은 생체 적합성과 특정 박테리아에 대한 선택성, 두 가지 특성을 지닌 메타크릴레이트 기반의 항균성 고분자에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 생체 적합성 항균성 고분자는 메타크릴레이트 기반의 양친성 고분자에 폴리에틸렌글리콜 (PEG)을 도입하여 높은 생체적합성과 특정 박테리아에 대한 선택성, 두 가지 특성을 동시에 발현할 수 있는 소재로서, 의료 분야 등의 미생물의 생장을 억제해야하는 분야에서 유용하게 활용 가능하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C08G 81/025 (2013.01)
C08L 33/14 (2013.01)
C08L 2203/02 (2013.01)
(72) 발명자
칸 안자르
서울특별시 성북구 안암로 145, 창의관 810C호
방준하
서울특별시 서초구 방배로37길 26-9, 102동 507호
오민규
경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 1601호
정구경
경기도 고양시 덕양구 화신로 311, 915동 401호

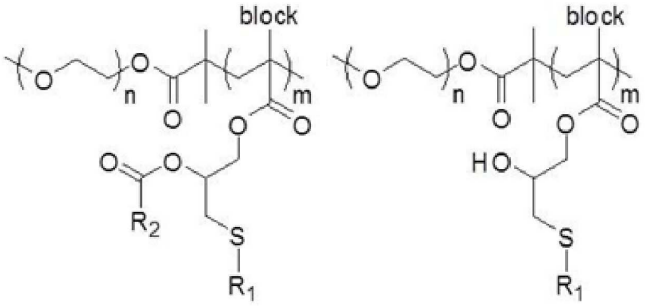
명 세 서

청구범위

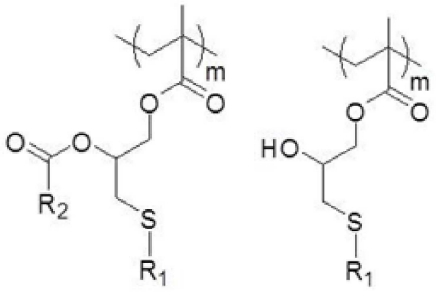
청구항 1

하기 [화학식 1] 내지 [화학식 4]로 표시되는 항균성 고분자 화합물:

[화학식 1] [화학식 2]



[화학식 3] [화학식 4]



상기 [화학식 1] 내지 [화학식 4]에서, R_1은 친수성 작용기이고, R_2는 소수성 작용기이며, n과 m은 서로 동일하거나 상이하고 각각 양의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R_1은 암모늄 이온, 설포늄 이온, 구아니디늄 이온 또는 포스포늄 이온으로 치환된 탄소수 1 내지 20의 알킬기이고, 상기 R_2는 탄소수 1 내지 20의 알킬기인 것을 특징으로 하는 고분자 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 n과 m은 서로 동일하거나 상이하고 각각 독립적으로 30 내지 60인 것을 특징으로 하는 고분자 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 고분자 화합물은 그람 음성균에 대해서 선택적으로 항균 성능을 갖는 것을 특징으로 하는 고분자 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 고분자 화합물은 적혈구 세포 (red blood cells, RBCs)의 50% 용혈을 초래하는 농도 (HC_{50})가 1% 미만인 것을 특징으로 하여 생체적합성이 높은 것을 특징으로 하는 고분자 화합물.

청구항 6

제1항에 따른 고분자 화합물을 포함하는 항균성 소재.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 항균성 소재에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 높은 생체 적합성과 특정 박테리아에 대한 선택성, 두 가지 특성을 지닌 메타크릴레이트 기반의 항균성 고분자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 새롭고 효율적인 항균성 물질의 개발은 항생제 내성 세균 감염이 세계적 수준에서 계속 증가함에 따라 주요한 연구 목표가 되고 있으며, 이를 해결하기 위한 전략 중의 하나로 항균성 고분자 (antimicrobial peptides, AMPs)를 모방하는 것으로서, 확산되고 있는 항생제 내성 박테리아들을 효과적으로 제거하는 것과 관련하여 현재 이러한 합성 고분자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 합성 고분자는 천연 항균성 펩티드에 비해 생산 비용이 저렴하며 개질이나 변형 (post-modification)이 용이하다. 항균성 작용기를 고분자 사슬에 직접 결합시킴으로서 반영구적 항균성을 갖는 고분자를 합성할 수 있으며, 이렇게 합성된 항균성 고분자는 그람양성균, 그람음성균, 곰팡이류 등의 유기 미생물을 효과적으로 사멸시킬 수 있어 의료 분야, 가정용 플라스틱 제품 등 다양한 분야에 응용될 수 있다.

[0003] 항균성 고분자와 관련하여 알려진 기작 중에서 양친매성 구조는 펩타이드 사슬이 박테리아 세포막과 상호 작용하여 항균성 고분자들이 박테리아의 세포막을 파괴하여 박테리아들을 제거하는 것으로 알려져 있으며, 이 과정에서 친수성/소수성의 균형이 박테리아 제거 및 낮은 세포 독성을 달성함에 있어서 중요한 역할을 한다. 따라서 반복 단위로 친수성인 부분과 소수성인 부분을 모두 갖고 있는 표면 양친매성 (facially amphiphilic) 고분자가 유망한 후보 물질로 고려되고 있으며, 이러한 친수성/소수성 균형을 단량체 레벨에서 조절할 수 있어서 랜덤 공중합체보다 특성 조절이 더욱 용이하다.

[0004] 그러나 기존의 항균성 고분자들은 높은 항균 성능에도 불구하고 낮은 생체 적합성을 지녀 실질적으로 활용되기 어려운 문제점이 있었으며 또한, 이전의 라이신 모방 메타크릴레이트 고분자는 특정 박테리아에 대한 선택성을 지니고 있지 않아 원하는 박테리아만 취사선택하여 죽일 수 없다. 특히, 그람음성균은 그람양성균에 비해 두꺼운 외부 세포막 층을 한 겹 더 가지고 있어 그람음성균만을 선택해서 죽이는 항균성 고분자에 대해서는 현재까지 그 연구가 미비한 수준이다.

발명의 내용

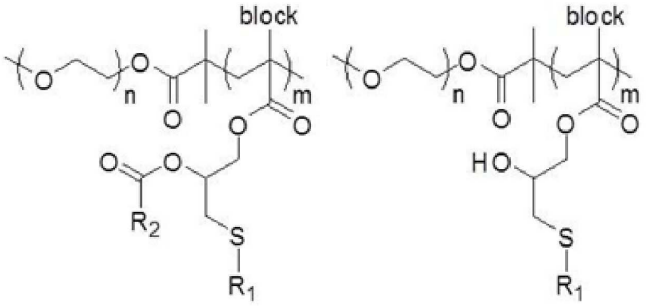
해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명에서는 메타크릴레이트(methacrylate) 기반의 양친매성 고분자에 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 달아 생체 적합 성능을 크게 향상시키고, 또한 특정 박테리아에 대한 선택성을 지닌 항균성 고분자 및 이를 이용한 생체적합 항균성 소재를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

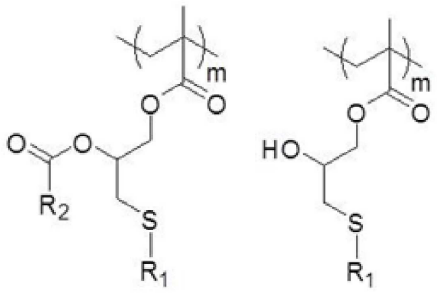
[0006] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 하기 [화학식 1] 내지 [화학식 4]로 표시되는 높은 생체 적합성을 항균성 고분자 및 이를 포함하는 항균성 소재를 제공한다.

[0007] [화학식 1] [화학식 2]



[0008]

[0009] [화학식 3] [화학식 4]



[0010]

[0011] 상기 [화학식 1] 내지 [화학식 4]의 구체적인 구조 및 그 특성에 대해서는 후술하기로 한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 생체 적합성 항균성 고분자는 메타크릴레이트 기반의 양친성 고분자에 폴리에틸렌글리콜 (PEG)을 도입하여 높은 생체적합성과 특정 박테리아에 대한 선택성, 두 가지 특성을 동시에 발현할 수 있는 소재로서, 의료 분야 등의 미생물의 생장을 억제해야하는 분야에서 유용하게 활용 가능하다.

[0013] 구체적으로 본 발명에 따른 항균성 고분자는 그람음성균인 에스체리치아 콜라이(Escherichia coli, E. coli)에 대한 선택성이 적혈구 (Red Blood Cells, RBC), 스타필로코쿠스 아우레우스 (Staphylococcus aureus, S. aureus)에 비해 최대 670 배 이상 높아, 그람음성균을 특정적으로 사멸시킬수 없는 기존의 항균성 고분자와는 차별화되는 장점을 가지고 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명에 따른 높은 생체 적합성을 갖는 항균성 고분자에 대한 구체적인 전체 합성 루트를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 PGMA 동종중합체의 ^{1}H NMR 스펙트럼 ($CDCl_3$)이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 PEG-b-PGMA 블록 공중합체의 ^{1}H NMR 스펙트럼 ($CDCl_3$)이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 P4 블록 공중합체의 ^{1}H NMR 스펙트럼 ($CDCl_3$)이다.

도 5는 (A) PEG-b-PGMA, (B) P3, (C) P4, (D) PEG-b-PA 및 (E) PEG-b-PC5A 공중합체의 ^{1}H NMR 스펙트럼이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 PEG-매크로개시제, PEG-b-PGMA, PEG-b-PA 및 PEG-b-PC5A 블록 공중합체의 GPC 프로파일이다.

도 7은 (a) 대조구 (control), (b) PC5A 동종중합체 및 (c) PEG-b-PGMA 블록 공중합체 각각 존재하에서 4시간 배양 후의 E. coli 세포의 CLSM 이미지이며, CLSM 이미지는 녹색 (SYTO, 살아있는 세포) 및 빨간색 (propidium iodide, 죽은 세포)의 병합 이미지고, 중합체가 없는 박테리아 현탁액을 대조군으로 사용하였다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 PC5A, PEG-b-PC5A 중합체, 그리고 대조구에서 24 시간 배양한 후 E. coli 및 S. aureus cell에 대한 (A) CLSM 이미지 및 (B) SEM 이미지이다.

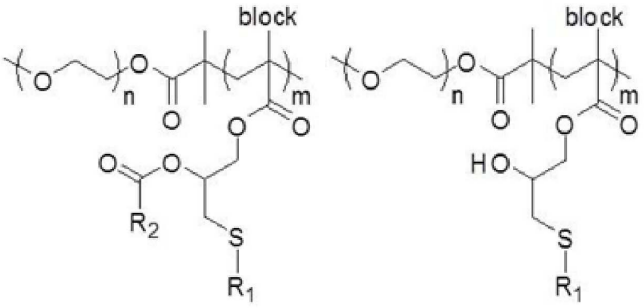
도 9는 본 발명의 실험예에 따른 용혈 테스트 결과이고, 항균성 농도의 함수로서 RBC의 용혈 비율이 모든 합성된 중합체에 대해 나타나는 것을 확인할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

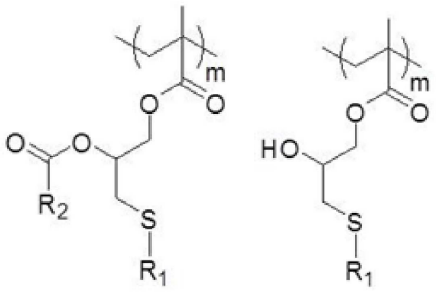
[0015] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 하기 [화학식 1] 내지 [화학식 4]로 표시되는 높은 생체 적합성을 항균성 고분자에 관한 것이다.

[0017] [화학식 1] [화학식 2]

[0018] 

[0019] [화학식 3] [화학식 4]

[0020] 

[0021] 상기 [화학식 1] 내지 [화학식 4]에서,

[0022] R_1은 암모늄 이온, 설포늄 이온, 구아니디늄 이온 또는 포스포늄 이온 등과 같은 친수성 작용기로서, 바람직하게는 친수서 작용기를 포함하는 탄소수 1 내지 7의 알킬기일 수 있다.

[0023] R_2는 소수성 작용기로서, 바람직하게 탄소수 1 내지 7의 알킬기일 수 있다.

[0024] n과 m은 각각 양의 정수로서, n, m이 작은 수인 경우에는 실질적인 고분자의 물성을 나타내기에 한계점이 존재하고, 상기 고분자의 평균 분자량은 합성할 때 이용하는 단량체의 함량을 이용하여 제어할 수 있으며, 이를 통해 원하는 물성을 용이하게 제어할 수 있다.

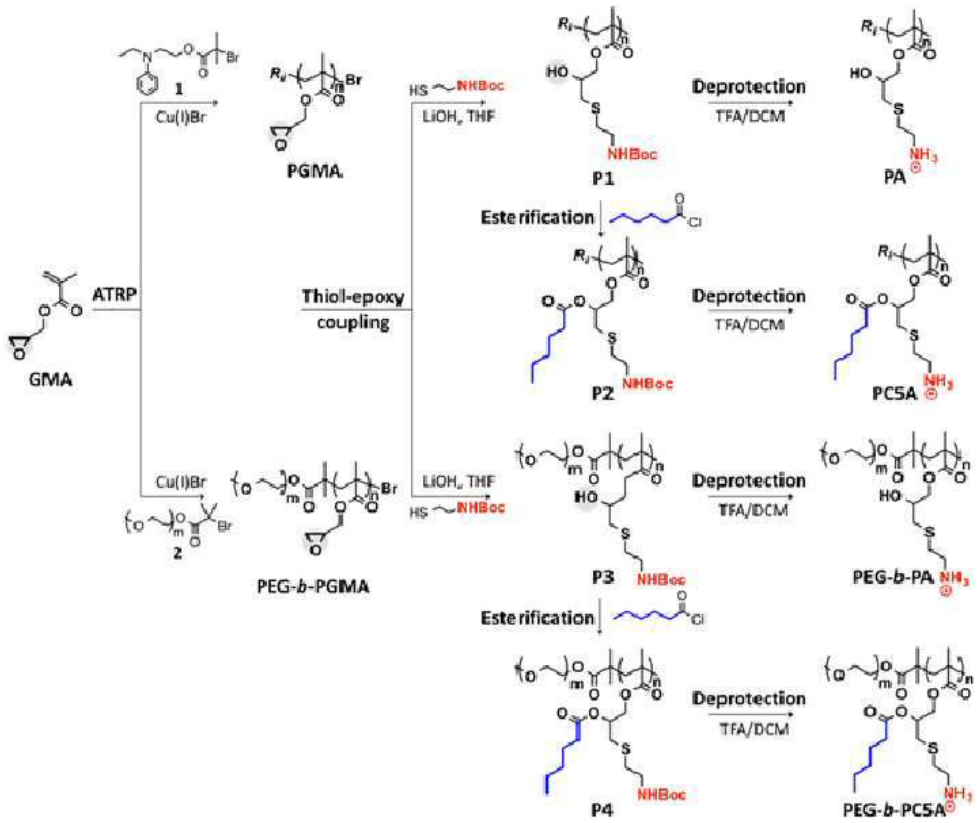
[0025] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1] 내지 [화학식 4]의 고분자는 그람음성균인 E. coli 박테리아 성장에 대한 억제 활성 (MIC_{90} : 박테리아 성장의 90%를 방지하는 최소 억제 농도)이 0.59 μM, 적혈구에 대한 용혈 활성 (HC_{50} : 혈구의 50%를 용해하는 농도)이 >355 μM로, 항균성 고분자로서 요구되는 높은 항균 성능을 가지면서 이와 동시에 우수한 생체적합성을 만족한다.

[0026] 본 발명에 따른 항균성 고분자는 높은 생체적합성 및 단일 박테리아에 대한 선택성을 동시에 발현할 수 있는 물질로서 의료분야 등에 유용하게 활용될 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명에 따른 고분자는 별모양 (star-shape)이거나, 병솔형 모양 (bottle brush shape)의 성형 구조체일 수 있으며, 상기 응용 소재가 요구하는 항균 성능 및 생체적합성을 최적으로 발현하기 위하여 적합한 구조가 사용될 수 있다.

[0029] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이러한 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에 따른 높은 생체 적합성을 갖는 항균성 고분자에 대한 구체적인 전체 합성 루트는 하기와 같다.

[0032] 

[0033] 먼저, 원자 이동 라디칼 중합 (atom transfer radical polymerization) 후중합 개질 공정을 통하여 양친매성 동종중합체를 제조할 수 있으며, 이는 중합체 반복 단위 기준으로 알킬사슬과 양이온 부분의 관능기가 1:1로 구성되어 표면 양친매성 (facially amphiphilic) 고분자 구조를 가지게 되어서 우수한 항균 성능을 가진다. 여기서 항균 성능과 함께 혈액적합성, 즉 생체적합성을 동시에 구현하기 위하여 폴리에틸렌글리콜 (PEG)를 도입하고, 티올-에폭시 커플링과 에스테르화 반응을 통하여 이중 관능화된 동종중합체를 합성한다.

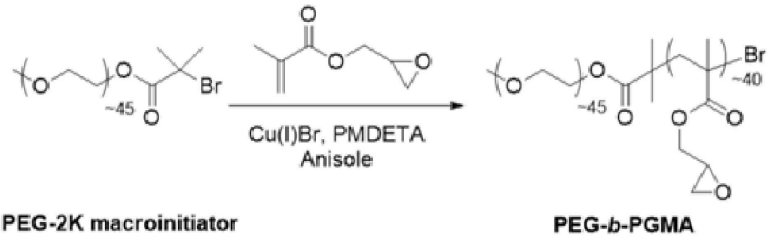
[0034] 상기 합성루트에서 확인할 수 있는 바와 같이, PGMA는 [1]로 표시되는 방향족 개시제를 통하여 합성하고, 중합체 사슬은 약 40 반복 단위를 포함한다. 이어서, PGMA 사슬의 에폭시 단위를 2-(boc-아미노)에탄티올로 오픈시켜 두 번째 작용기를 위한 히드록실기를 갖는 중합체 P1을 수득한다. 히드록실기와 헥사노일 클로라이드와의 에스테르화 반응을 통하여 중합체 P2를 수득한다. P1 및 P2의 t-boc 그룹을 제거하여 PA 및 PC5A 폴리메타크릴레이트 동종중합체를 수득한다. 구체적으로 PA 중합체는 항균 라이신 아미노산 잔기를 모방한 1차 아민만을 함유하고, PC5A 중합체는 각각의 반복 단위에 펜틸 측쇄 및 암모늄 양이온을 1:1 작용기로 갖추고 있다.

[0035] PEG 블록은 상기 개시제 [1]을 PEG 기반의 PEG-2K macroinitiator [2]로 대체하여 폴리메타크릴레이트에 도입할 수 있고, 이를 통하여 PEG-b-PGMA 블록 공중합체를 형성하고, PGMA 블록의 중합도는 PA 및 PC5A 동종중합체의 중합도 (n=40)와 유사하다. PEG-b-PA와 PEG-b-PC5A 블록 공중합체는 P3와 P4의 t-boc 그룹을 제거하여 수득한다.

[0036] 하기 도 2 내지 도 5의 NMR 데이터에 기초하면, 모든 후중합 개질 반응이 양적 전환으로 진행되고, 양친매성 작용기의 1:1 비율을 갖는 중합체가 얻어짐을 알 수 있다. 이를 통하여 본 발명에 따른 합성된 중합체의 구조적 재현성이 우수함을 알 수 있고, 하기 도 6의 GPC에서도 대칭적으로 좁게 단일 모드 분자량 분포 곡선을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0038] 합성예 1 : PEG-b-PA와 PEG-b-PC5A 블록 공중합체 합성

[0039] (1) PEG-b-PGMA 블록 공중합체 합성



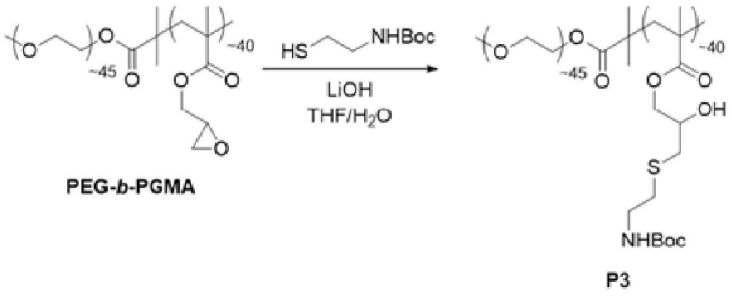
PEG-2K macroinitiator PEG-*b*-PGMA

[0040]

[0041] 8 mL anisole이 담긴 schlenk flask 안에 PEG-2K macroinitiator (2.0 g, 1.0 mmol), glycidyl methacrylate (5.69 g, 40 mmol), PMDETA (173 mg, 1.0 mmol)을 넣는다. 30분 동안 Argon으로 산소를 제거한 후, Cu(Ⅰ)Br (71 mg, 0.5 mmol)을 첨가하였다. 상온에서 5시간 동안 stirring 시킨 후, 200 mL의 hexane에 침전시키고 필터로 걸러내었다. 이 고체를 적은 양의 DCM에 녹인 후, 작은 silica plug를 통해 여과시켰다. 건조시킨 후 7.0 g의 흰색 PEG-b-PGMA 블록 공중합체를 얻었다.

[0042] ^{1}H-NMR (δ, ppm, 500 MHz, $CDCl_3$): 4.31 (br s, 1H, $COOCH_2$), 3.83 (br s, 1H, $COOCH_2$), 3.64 (br s, 4H, CH_2CH_2O), 3.23 (br s, 1H, OCH_2CHCH_2O), 2.84 (br s, 1H, $COOCH_2CHCH_2O$), 2.63 (br s, 1H, $COOCH_2CHCH_2O$), 2.11-1.75 (br s, 2H, CH_2CCH_3), 1.20-0.75 (br s, 3H, CH_2CCH_3). GPC (DMF): M_n=9800, M_w=11370, PDI (M_w/M_n)=1.16, M_n, (NMR)=7680, DP_{GMA} (NMR) ≈ 40

[0044] (2) P3 합성



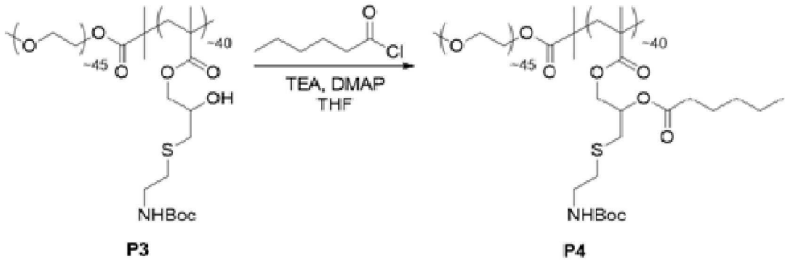
PEG-*b*-PGMA P3

[0045]

[0046] PEG-b-PGMA 블록 공중합체 (500 mg)을 2-(Boc-amino)ethanethiol (910 mg, 2 eq. per r.u.)가 담긴 5 mL THF에 녹인 후, ice bath로 냉각시켰다. LiOH (25 mg, 0.25 eq. per-SH)가 담긴 0.5 mL 물을 천천히 첨가하였다. ice bath를 제거하고, 반응물을 상온에서 12시간 동안 stirring 시켰다. 이후 Evaporator로 THF를 제거하고, 30 mL의 DCM에 희석시켜 물로 washing 한다. 유기물층을 sodium sulfate로 dry 시키고, evaporator로 DCM을 제거하고, diethyl ether에 침전을 시켜 550 mg의 블록 공중합체 P3를 얻었다.

[0047] ^{1}H-NMR (δ, ppm, 500 MHz, $CDCl_3$): 5.43 (br s, 1H, NH), 4.35-3.79 (br m, 3H, $OCH_2CH(OH)CH_2S$), 3.64 (s, 4H, CH_2CH_2O), 3.34 (br s, 2H, $NHCH_2CH_2S$), 2.72 (br s, 4H, $CH(OH)\ CH_2S$ + $NHCH_2CH_2S$), 1.87-1.85 (br s, 2H, CH_2CCH_3), 1.45 (br s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.08-0.95 (br s, 3H, CCH_3). GPC (DMF): M_n=18900; M_w=23250; PDI (M_w/M_n)=1.23.

[0049] (3) P4 합성



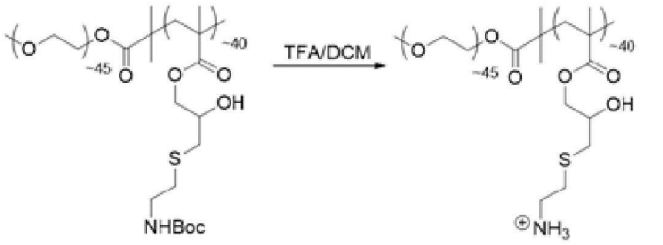
P3 P4

[0050]

[0051] P3 (300 mg)을 dry THF에 녹인 후 argon 기압 상태로 ice bath에서 5분간 stirring 시킨다. 그 후, TEA (2 eq. per r.u.)를 한 방울씩 첨가하고 반응물을 10분간 stirring 시킨다. Hexanoyl chloride (2 eq. per r.u.)와 촉매 DMAP가 담긴 1 mL의 dry THF를 첨가하여 50 ℃에서 밤새 stirring 시킨다. 반응물을 차가운 acidic water (20 mL)에 붓고, DCM으로 extraction 시킨 후, sodium sulfate로 dry시킨다. Evaporator로 용매의 양을 줄인 후, 작은 silica gel plug를 통해 DCM으로 여과시킨다. 이후 hexane으로 침전시킨 후 dry 시켜서 350 mg의 P4를 얻었다.

[0052] ^{1}H-NMR (δ, ppm, 500 MHz, $CDCl_3$): 5.30 (br s, 1H, NH), 5.15 (br s, 1H, $OCH_2CH(OR)CH_2S$), 4.33-3.91 (br s, 2H, $OCH_2CH(OR)CH_2S$), 3.64 (s, 4H, CH_2CH_2O), 3.32 (br s, 2H, $RNHCH_2CH_2S$), 2.72 (br s, 4H, $CH(OR)\ CH_2S$, $NHCH_2CH_2S$), 2.34 (br s, 2H, $RCOOCH_2CH_2CH_3$), 1.87-1.83 (br s, 2H, CH_2CCH_3), 1.68 (br s, 2H, $RCOOCH_2CH_2CH_3$), 1.44 (br s, 9H, $C(CCH_3)_3$), 1.07-0.78 (br s, 6H, $RCOOCH_2CH_2CH_3$, CH_2CCH_3). GPC (DMF): M_n=24360, M_w=29480, PDI (M_w/M_n)=1.21.

[0054] (4) PEG-b-PA와 PEG-b-PC5A의 합성



P3: R = H
P4: R = COC_5H_{11}

PEG-*b*-PA: R = H
PEG-*b*-PC5A: R = COC_5H_{11}

[0055]

[0056] 200 mg의 P3 혹은 P4가 담긴 2.0 mL의 DCM 용액에, 1.0 mL의 TFA를 0 ℃에서 한 방울씩 첨가하였다. 반응물을 밤새 stirring 시키고, 50 mL의 diethyl ether에 침전시켰다. 이 침전물을 filter로 걸러내고, washing 한 후에, 물에 녹인 후 동결 건조를 통하여 양이온성 블록 공중합체 PEG-b-PA와 PEG-b-PC5A를 얻었다.

[0057] PEG-b-PA block copolymer (precursor polymer P3), 160 mg.

[0058] ^{1}H-NMR (δ, ppm, 500 MHz, DMSO-d_6): 8.02 (br s, 3H, NH_3^+), 5.31 (br, 1H, OCH_2CHOH), 3.85 (br s, 3H, $OCH_2CH(OH)CH_2S$), 3.51 (s, 4H, CH_2CH_2O), 2.78-2.69 (br s, 4H, $NHCH_2CH_2S$, $CH(OH)CH_2S$), 2.64 (br s, 2H, $NH_3CH_2CH_2S$), 1.8 (br s, 2H, CH_2CCH_3), 1.1-0.88 (br s, 3H, CH_2CCH_3). GPC (DMF): M_n=14500, M_w=18420, PDI (M_w/M_n)= 1.27.

[0060] PEG-b-PC5A block copolymer (precursor polymer P4), 170 mg.

[0061] ^{1}H-NMR (δ, ppm, 300 MHz, DMSO-d_6): 8.21 (br s, 3H, NH_3^+), 5.19 (br s, 1H, $OCH_2CH(OR)CH_2S$), 4.39-3.81 (br, 2H, $OCH_2CH(OR)CH_2S$), 3.51 (s, 4H, CH_2CH_2O), 3.40 (br s, 2H, $NH_3CH_2CH_2S$), 3.0 (br s, 4H, $CH(OR)CH_2S$, $NH_3CH_2CH_2S$), 2.76 (br s, 2H, $ROOCCH_2(CH_2)_3CH_3$), 1.99-0.55 (br m, 14H, backbone + aliphatic chain). GPC (DMF): M_n=19890, M_w=25460, PDI (M_w/M_n)=1.28.

[0063] 실험예 1 : Broth dilution method (최소 억제 농도(MIC_{90}) 측정)

[0064] 기존 문헌의 방법에서 조금 변형하여 항균 성능 테스트를 진행하였다. Escherichia coli, Staphylococcus aureus를 37℃ Muller-Hinton broth에서 밤새 배양하였다. E. coli는 optical density가 600 nm에서 0.01이 되도록 희석시켰고, S. aureus는 0.05가 되도록 희석시켰다.

[0065] 고분자들을 DMSO에 50 mg/mL의 농도로 용해시키고, PBS (pH 7.4) buffer로 희석시켜 다른 농도의 고분자 용액을 준비하였다. 15분 동안 UV light을 통해 살균시키고, 이후 96 well microplate 내에서 bacteria cell suspension에 1:1로 섞어준다. 고분자 용액 없이 박테리아 용액만 첨가한 MHB medium을 positive control로, 박테리아 용액도 넣지 않은 MHB medium을 negative control로 설정하였다. 모든 실험의 샘플들은 세 번씩 실행되었으며, 각각의 샘플과 control들은 37 ℃에서 24 시간 동안 배양되었다. MIC는 박테리아 생장 속도를 억제하는 최소 고분자 농도를 의미하며 (inhibition% < 10%, MIC_{90}), 다음과 같이 계산된다.

[0066] $$Inhibition\% = \frac{OD_{600}(t) - OD_{600}(negative\ control)}{OD_{600}(positive\ control) - OD_{600}(negative\ control)} \times 100\%$$

[0067] $OD_{600}(t)$는 t 시간 동안 고분자와 함께 박테리아를 배양했을 때의 OD_{600}값을 의미한다.

[0069] 실험예 2 : LIVE/DEAD bacterial viability assays (박테리아 생존활성 분석)

[0070] E. coli에 대해서는 1.0 mL의 bacterial suspension (OD_{600}=1.0)에 각각 30 μg의 PC5A와 PEG-b-PC5A 블록 공중합체가 투여되었고, S. aureus에 대해서는 1.0 mL의 bacterial suspension (OD_{600}=1.0)에 5000 μg의 PC5A와 PEG-b-PC5A 블록 공중합체가 투여되었다. 고분자를 넣지 않은 Cell suspension은 control로 사용되었다. 4 시간 혹은 24 시간 동안 37 ℃에서 배양하고 나서, 1.0 mL of LIVE/DEAD BacLight (Kit L7012)를 용액에 첨가하였다. 어두운 곳에서 15분간 배양하고 난 후, Carl Zesis LSM700 confocal laser scanning microscopy (CLSM)을 통해 세포의 이미지를 얻을 수 있었다. 정상적인 박테리아들은 초록색을 띄며 (E_m=500 nm), 죽은 박테리아들은 빨간 색을 띄었다 (E_m=635 nm).

[0072] 실험예 3 : 미생물 형태학

[0073] 폴리머가 있거나 없는 E. coli와 S. aureus의 형태에 대해서 전계방출 주사 전자현미경 (FE-SEM, Hitachi S-4800, 15 kV에서 작동)을 사용하여 확인하였다. 일반적으로 S. aureus와 E. coli는 MH broth 배지에서 37 ℃에서 하룻밤 동안 성장시켰다. 세포 현탁액을 OD_{600} = 1.0으로 희석시켰다. 그런 다음 30 μg의 PC5A 및 PEG-b-PC5A 중합체를 E. coli 1 mL 세포 저장 용액에 첨가하고 5000 μg의 PC5A 및 PEG-b-PC5A 중합체를 각각 S.aureus에 첨가 하였다. 중합체가 없는 세포 현탁액을 대조군으로 사용 하였다. 37 ℃에서 24 시간 동안 배양한 후 모든 샘플을 실온에서 2 시간 동안 cacodylate buffered glutaraldehyde 용액 (pH 7.2, 2.5 %)에 고정시켰다. 박테리아 세포를 단계적 에탄올 용액 (30, 50, 70, 90, 95 및 100 % v / v 물)을 사용하여 탈수시키고 임계점에서 건조시킨 후 Denton Dest II Sputter Coater를 사용하여 45 초 동안 금으로 코팅하고 FE-SEM에 의해 관찰하였다.

[0075] 실험예 4 : Hemolysis Assay (용혈반응 분석)

[0076] 용혈반응 분석 (Hemolysis assay)에서는 살균된 defibrinated sheep's blood를 사용하였다. 1 mL의 적혈구를 원심분리기를 통해 pelletize시킨 후 얻은 pellet을 0.9% saline으로 4번 세정해준다. 이렇게 얻은 pellet은 1 mL의 Tris buffered saline (TBS)에 넣어 red blood cell suspension을 형성시킨다. 고분자를 750 μL의 TBS에 희석시켜 제일 높은 농도의 용액을 만들고, 이를 2배씩 희석시킨다. 원하는 양의 고분자와 25 μL의 RBS suspension을 TBS에 넣어, 총 1000 μL가 되도록 맞춘다. negative control은 고분자 없이 25 μL의 RBC suspension과 975 μL TBS를 사용하였고, positive control은 25 μL의 RBC suspension에 975 μL DI water를 첨가하였다. 샘플들은 상온에서 2시간 동안 배양되었고, 그 후 다시 원심분리기를 사용하여 repelletize시켰다. 샘플과 control에 대해 200 μL의 supernatant를 96-well plate에 담고 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이 때 hemolysis percent는 다음과 같이 결정된다.

[0077]
$$Percent\ Hemolysis = \frac{A_{sample} - A_{negative\ control}}{A_{positive\ control} - A_{negative\ control}} \times 100\%$$

[0079] 본 발명의 일 실시예에 따른 고분자의 특성과 생물학적 활성에 대한 실험 결과는 하기 [표 1]과 같다.

[0080] 표 1

구분	M_n (g/mol)	PDI	DP	MIC_{90}				HC_{50}		선택도 HC_{50}/MIC_{90} (E.coli)
				E.coli		S.aureus				
				μg/mℓ	μM	μg/mℓ	μM	μg/mℓ	μM	
PA	8800	1.20	≈ 40	50	5.68	>5000	>568	>5000	>568	>100
PC5A	12,700	1.23	≈ 40	7.5	0.59	>5000	>393	10	0.79	1.3
PEG-b-PA	10,400	1.27	≈ 40	2500	241	>5000	>483	>5000	>483	>20
PEG-b-PC5A	14,100	1.28	≈ 40	7.5	0.53	>5000	>355	>5000	>355	>670

[0081] M_n : ^{1}H NMR 분광학에 의해 결정된 중합체의 수평균 분자량. PDI : GPC 측정에 의해 계산 된 중합체의 다분산도.

[0082] DP : ^{1}H NMR 분광학으로부터 계산된 PA 또는 PC5A의 중합도.

[0083] MIC_{90} : 세균 증식(10 % 미만)을 억제하는 최소 저해 농도.

[0084] HC : 적혈구 50 % 용혈을 위한 고분자 농도.

[0086] (1) 대표적인 그람 음성균 (Escherichia coli, ATCC25922) 및 그람 양성균 (Staphylococcus aureus, ATCC6538) 박테리아 성장에 대한 억제 활성 (MIC_{90} : 박테리아 성장의 90%를 방지하는 최소 억제 농도)을 확인하기 위하여 상기 실험예 1과 같이 broth microdilution 방법으로 항균 활성을 확인한 결과, 상기 [표 1]에서 확인할 수 있는 바와 같이 E. coli에 대한 가장 높은 항균 활성은 1:1 작용기 비를 함유한 중합체였으며, PC5A 동종중합체 및 PEG-b-PC5A 블록 공중합체는 모두 7.5 μg/mL 또는 0.53-0.59 μM의 다소 낮은 MIC_{90} 값을 나타내었다. 대조적으로, 1 차 아민 그룹만으로, 양이온성 동종중합체 PA는 E.coli에 대해 적당한 항균 활성을 나타내었으며, MIC_{90} 값은 50 μg/mL 또는 5.68 μM이었다. PEG가 결합된 후, 가장 친수성이 큰 PEG-b-PA (2500 μg/mL 또는 241 μM의 MIC_{90})에서 항균 활성이 현저히 감소되었다. PC5A와 PEG-b-PC5A의 우수한 성능은 박테리아 세포막의 소수성 영역으로의 폴리머 투과성을 촉진하여 항균력을 높일 수 있는 양친매성 성질이 그 원인이다.

[0087] 그러나, 모든 중합체는 그람 양성균인 S.aureus에 대해서는 최대 5000 μg/mL까지 비활성을 나타내었으며, 이는 가장 활성이 높은 PC5A 및 PEG-b-PC5A 중합체가 갖는 현저한 선택성 (>670)으로 인하여 S.aureus보다 E. coli를 우선적으로 표적함을 의미한다. 즉, 본 발명에 따른 고분자는 그람 양성균인 S. aureus에 대해서는 높은 농도에서도 박테리아를 사멸시키지 않는 것에 반하여, 그람 음성균인 E. coli에 대해서는 상대적으로 매우 낮은 농도에서도 박테리아를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 것으로서, 그람 음성균에 대해서 높은 선택성을 갖는 것이

라 할 수 있다.

[0088] 또한, PEG-b-PC5A는 PC5A와 비교하여 HC_{50} 값이 현저하게 감소하여, PEG가 생체 적합성을 높여준다는 것을 확인할 수 있다. 결과적으로, 그람 음성균에 대한 선택성이 최대 670배라는 높은 수치를 갖는 것이 확인된다.

[0090] (2) E.coli 및 S.aureus에 대한 PC5A 및 PEG-b-PC5A 중합체의 항균 효과를 LIVE/DEAD bacterial viability assays (박테리아 생존활성 분석)을 사용하여 추가로 확인하고, confocal laser scanning microscopy (CLSM)을 통항려 적색 형광의 죽은 세포와 녹색 형광의 생체를 구별하기 위해 SYTO 및 propidium iodide을 사용하여 세균 세포를 염색하였다.

[0091] 하기 도 7 내지 8에서 확인할 수 있는 바와 같이 24 시간 동안 배양 후 E. coli에 고분자를 넣은 두 시료에서 붉은 빛이 검출되었으며, 이는 세포의 사멸이 일어났음을 의미한다. 이와는 대조적으로, 고분자들을 투여한 S. aureus 시료에 대해서는 초록색 신호만 나타나, 즉 대조군과 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다.

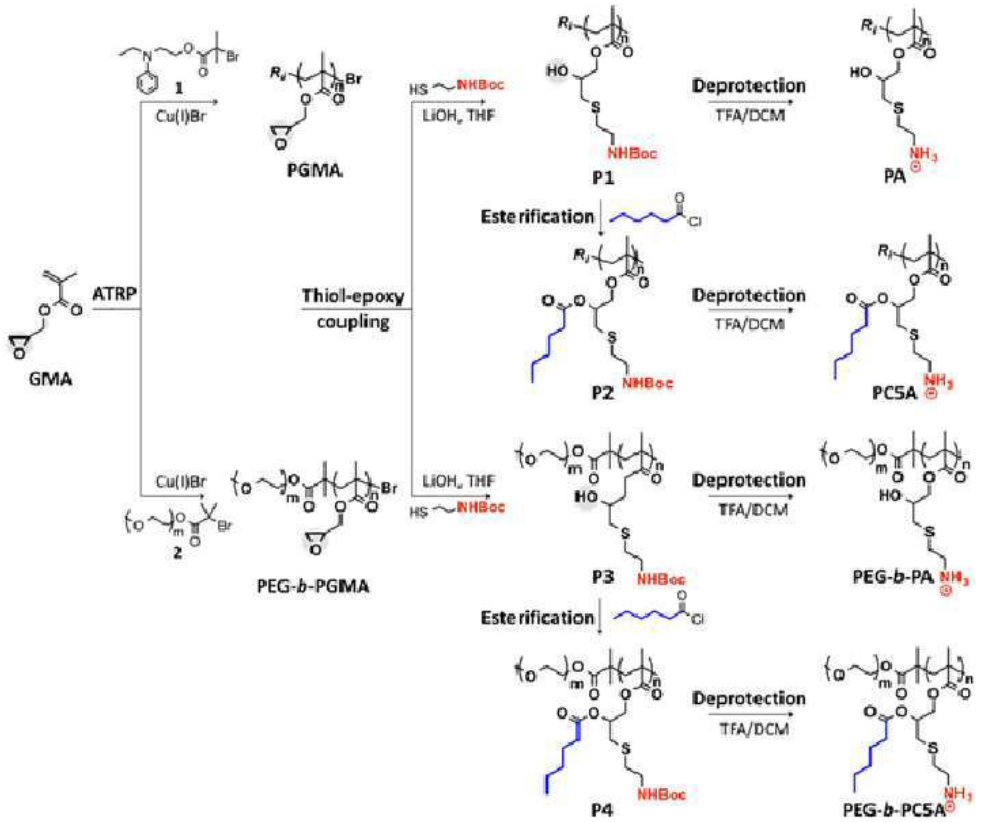
[0092] 또한, 고분자들을 투입하기 전과 후에 대한 세포 형태의 차이를 비교하기 위하여, 주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscopy, SEM)을 사용하여 분석한 결과, E. coli 대조군에서는 본래의 손상되지 않은 막대 모양을 유지한 반면, PC5A와 PEG-b-PC5A와 함께 24시간동안 배양한 시료에서는 손상된 박테리아 세포막이 관측되었다. 그러나 S. aureus에 대해서는 모든 시료에 대해 S. aureus가 모두 온전한 구 형태를 유지하고 있는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 고분자는 E. coli에 대해 선택성을 갖는 것을 알 수 있다.

[0094] (3) 상기 실험예 4는 본 발명에 따른 고분자의 생체적합성을 측정하기 위한 것으로서, sheep red blood cell(RBCs)을 사용한 hemolysis 분석법을 통해 합성된 고분자들의 세포 용해성을 조사하였다.

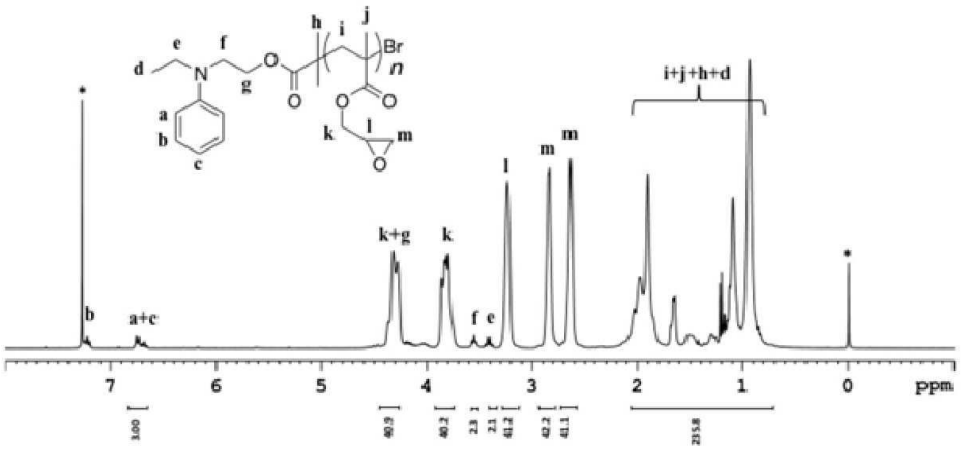
[0095] 하기 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 5000 μg/mL의 고분자 농도에서도 PA와 PEG-b-PA 고분자의 RBC 용해도는 1% 이하이며, 이는 포유류 세포에 대한 독성이 매우 낮다는 것을 의미한다. 따라서 PA와 PEG-b-PA 고분자 모두 각각 100 이상, 20 이상의 E. coli/RBC 선택성을 갖는다는 것을 확인할 수 있다. 이와는 대조적으로, PC5A homopolymer의 경우에는 높은 hemolytic activity를 가져, 포유류 세포에 대해 높은 독성을 갖고 있다(HC_{90} : 10 μg/mL, 0.79 μM).하지만 PEG를 결합하여 합성된 블록 공중합체인 PEG-b-PC5A에 대해서는 상당히 낮은 hemolysis level을 갖는 것을 확인할 수 있다 (HC_{90} : 5000 μg/mL). PEG-b-PC5A는 매우 높은 E. coli/RBC 선택성을 갖는 결과를 보였다 (>670).

도면

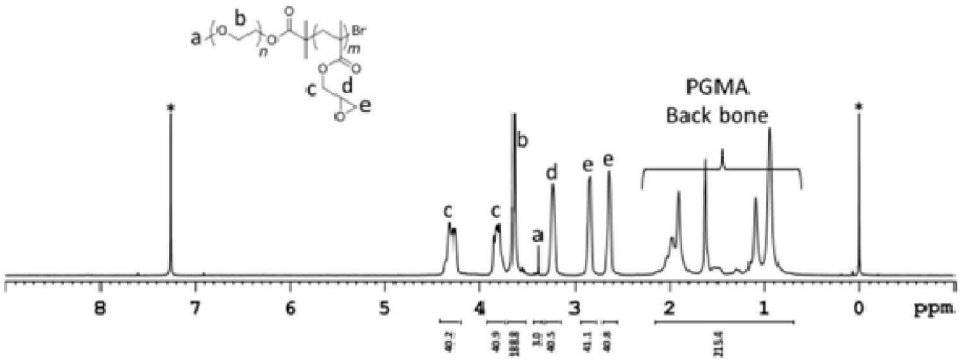
도면1


GMA
ATRP
Cu(I)Br
1
PGMA
Cu(I)Br
2
PEG-b-PGMA
Thiol-epoxy coupling
HS NHBoc
LiOH, THF
P1
P2
P3
P4
Esterification
Deprotection
TFA/DCM
PA
PC5A
PEG-b-PA
PEG-b-PC5A

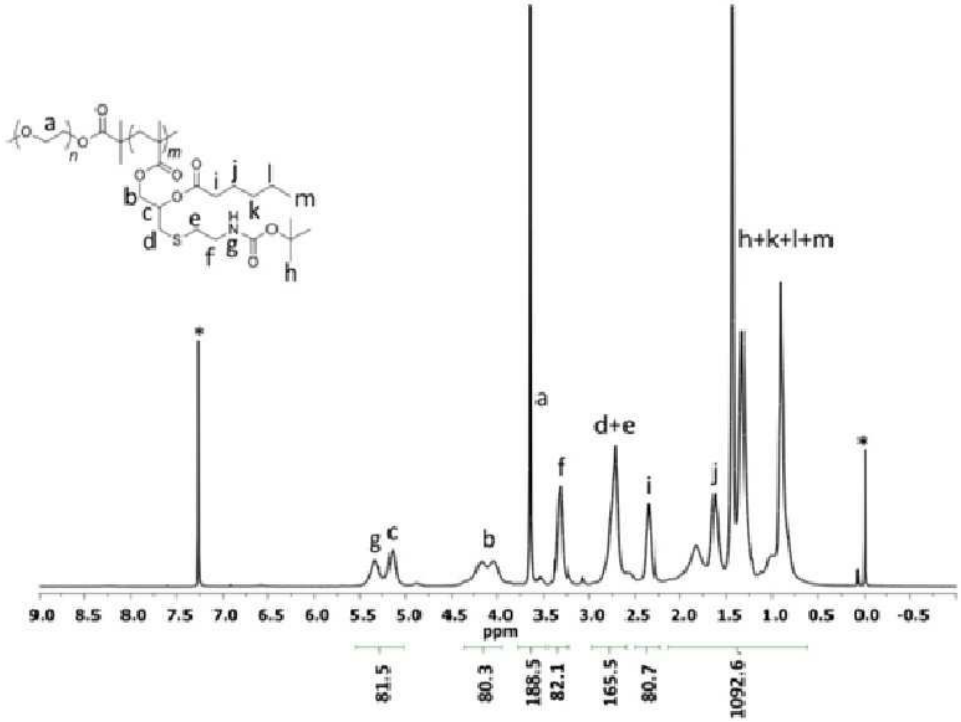
도면2


i+j+h+d
k+g
k
f e
l
m m
b
a+c
ppm

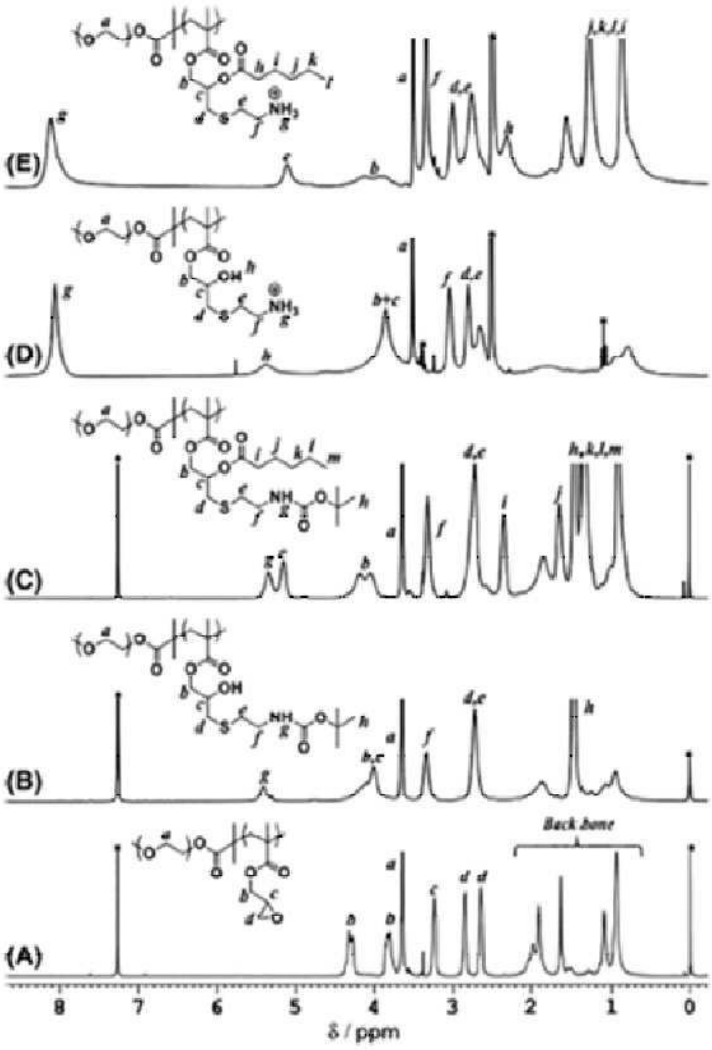
도면3



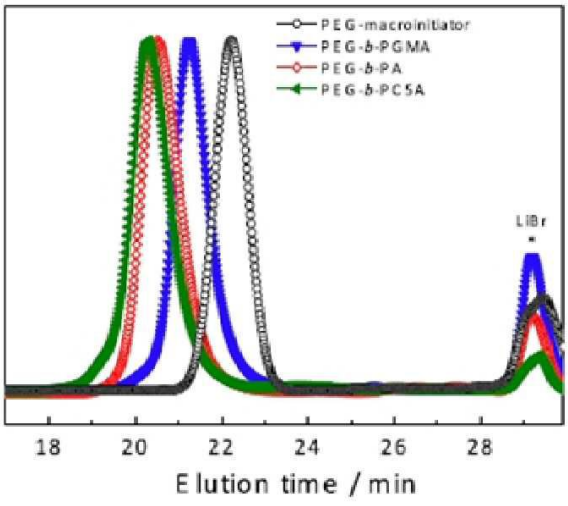
도면4



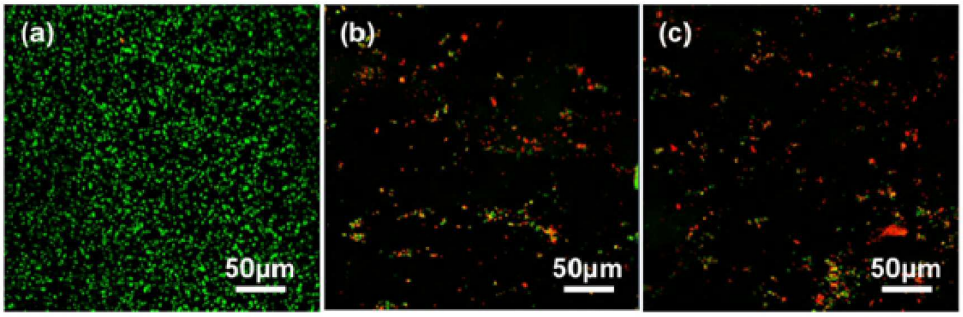
도면5


(E)
(D)
(C)
(B)
(A)
Back bone
8
7
6
5
4
3
2
1
0
δ / ppm

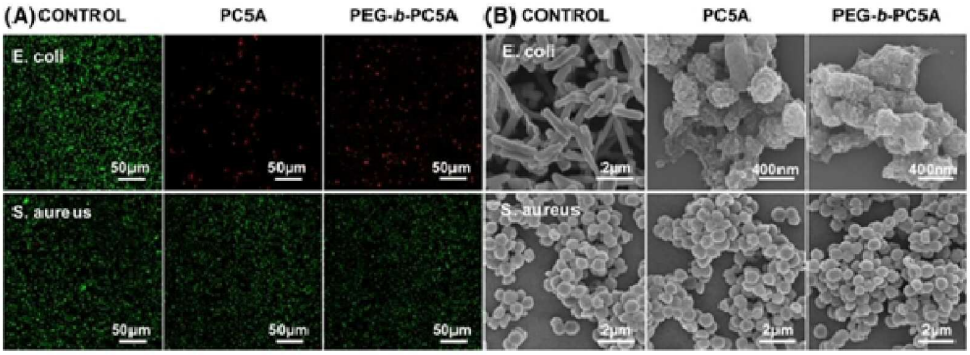
도면6


PEG-macroinitiator
PEG-b-PGMA
PEG-b-PA
PEG-b-PC5A
LiBr
18
20
22
24
26
28
Elution time / min

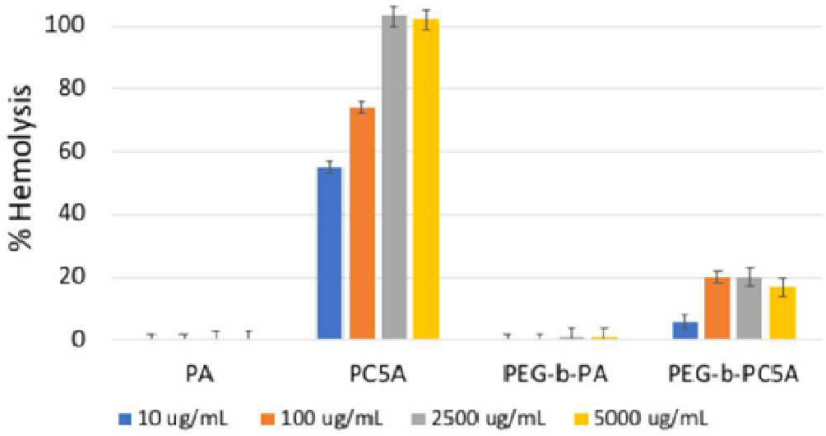
도면7


(a)
50μm
(b)
50μm
(c)
50μm

도면8


(A) CONTROL
PC5A
PEG-b-PC5A
(B) CONTROL
PC5A
PEG-b-PC5A
E. coli
S. aureus
50μm
2μm
400nm

도면9


% Hemolysis
100
80
60
40
20
0
PA
PC5A
PEG-b-PA
PEG-b-PC5A
10 ug/mL
100 ug/mL
2500 ug/mL
5000 ug/mL