



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0118612
(43) 공개일자 2015년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08F 290/06 (2006.01) A01N 43/48 (2006.01)
C08F 2/46 (2006.01) C08F 279/00 (2006.01)
C08F 281/00 (2006.01) C08G 69/00 (2006.01)
C08G 73/06 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0044123

(22) 출원일자 2014년04월14일

심사청구일자 2015년04월10일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

윤주영

서울 서초구 잠원로14길 3, 207동 1703호 (잠원동, 롯데캐슬)

박성수

서울 영등포구 여의동로3길 10, 401동 304호 (여의도동, 여의도자이)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

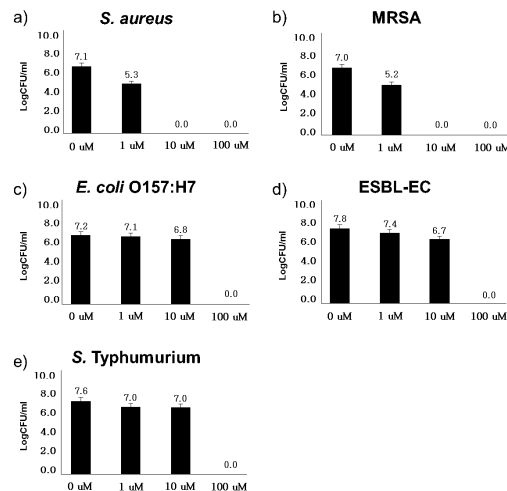
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물을 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물 및 박테리아 검출용 화학센서

(57) 요약

본 발명은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물을 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물 및 박테리아 검출용 화학센서에 관한 것으로, 비색, 흡광 및 형광 변화를 통한 박테리아의 검출 능력뿐만 아니라, 그람양성세균성박테리아(Gram-positive pathogenic bacteria), 그람음성세균성박테리아(Gram-negative pathogenic bacteria) 및 항생제 내성을 가지는 박테리아(antibiotic resistant bacteria)의 활성을 억제하는 효과가 우수하므로, 이에 따른 박테리아 감염에 대한 치료가 효과적일 것으로 예상되어 박테리아의 검출 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이송이

인천 계양구 계산로 48, 4동 201호 (계산동, 청우맨션)

성 화

서울 서대문구 이화여대길 52, 화학 나노과학과 (대현동, 이화여자대학교)

슈 켈링

서울 서대문구 이화여대길 52, 종합과학관 D동 501호 (대현동, 이화여자대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711001732
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구
연구과제명	다차원 유기소재 연구
기 여 율	50/100
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2012.09.01 ~ 2021.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	1711000056
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	공공복지안전연구사업
연구과제명	식중독균 다중검출 센서 집적화 미세유체칩 개발
기 여 율	50/100
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2012.10.01 ~ 2017.07.31

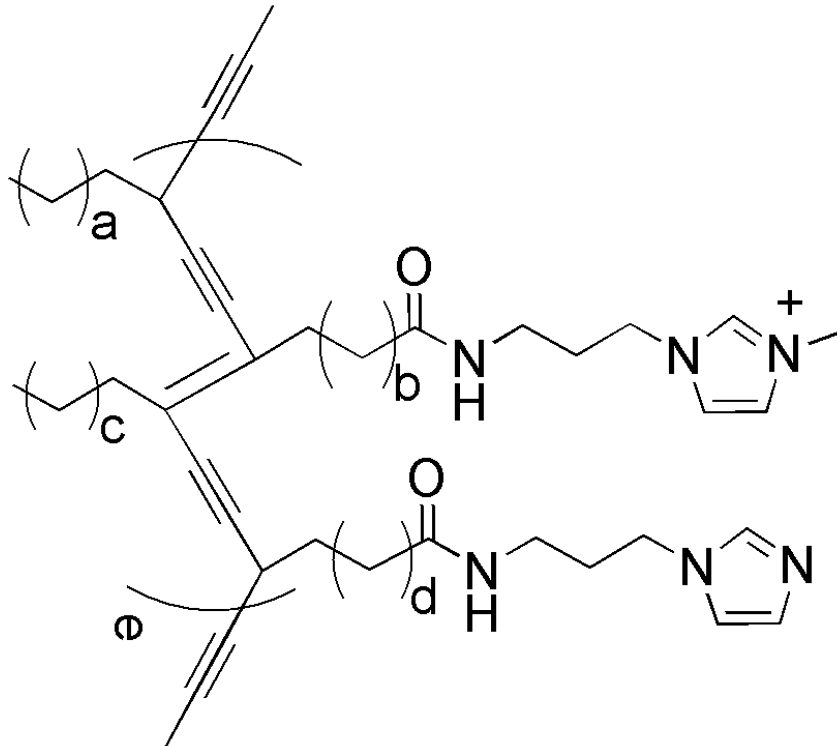
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

a, b, c, 및 d는 0-20의 정수이고;

e는 1 이상의 정수이다).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 a, b, c, 및 d는 0-10의 정수이고;

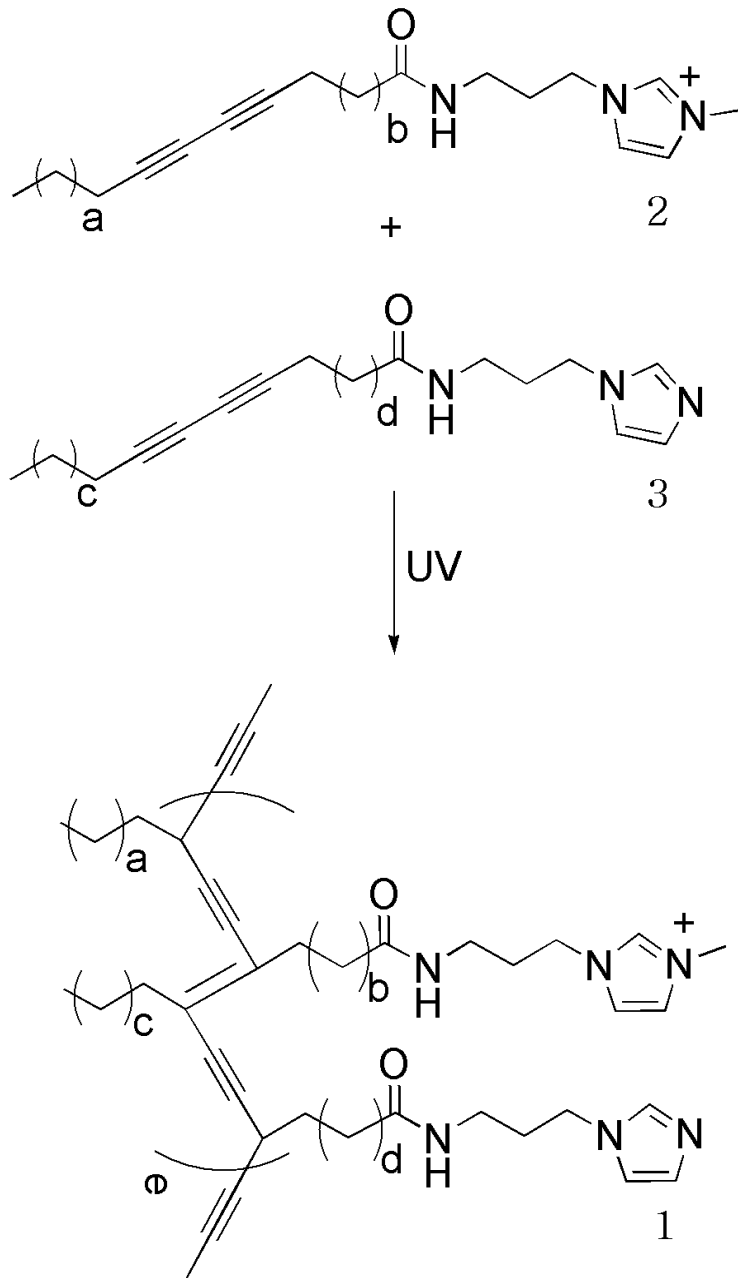
e는 0-100의 정수인 것을 특징으로 하는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물.

청구항 3

하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

화학식 2 및 3으로 표시되는 화합물을 광중합반응(photopolymerization)시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제1항의 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서, a, b, c, d 및 e는 제1항에 정의한 바와 같다).

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 광중합반응은 100 내지 380 nm의 빛을 조사하는 것을 특징으로 하는 제1항의 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물의 제조방법.

청구항 5

제1항의 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물을 포함하는 박테리아 검출용 화학센서.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 박테리아는 그람양성세균성박테리아(Gram-positive pathogenic bacteria), 그람음성세균성박테리아(Gram-negative pathogenic bacteria) 및 항생제 내성을 가지는 박테리아(antibiotic resistant bacteria)인 것을 특징으로 하는 박테리아 검출용 화학센서.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 그람양성세균성박테리아는 *S. aureus*(*Staphylococcus aureus*)이고,

상기 그람음성세균성박테리아는 *E. coli* O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7) 및 *S. Typhumurium*(*Salmonella Typhumurium*)이고,

상기 항생제 내성을 가지는 박테리아는 MRSA(Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*) 및 ESBL-EC(Extended Spectrum β -Lactamase-producing *E. coli*)인 것을 특징으로 하는 박테리아 검출용 화학센서.

청구항 8

제5항의 박테리아 검출용 화학센서를 이용한 박테리아 검출방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 검출방법은 비색변화, 흡광 및 형광 세기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 검출방법을 사용하는 것을 특징으로 하는 박테리아 검출용 화학센서를 이용한 박테리아 검출방법.

청구항 10

제1항의 화학식 1의 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 박테리아 감염으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 박테리아는 그람양성세균성박테리아(Gram-positive pathogenic bacteria), 그람음성세균성박테리아(Gram-negative pathogenic bacteria) 및 항생제 내성을 가지는 박테리아(antibiotic resistant bacteria)인 것을 특징으로 하는 박테리아 감염으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 그람양성세균성박테리아는 *S. aureus*(*Staphylococcus aureus*)이고,

상기 그람음성세균성박테리아는 E. coli O157:H7(Escherichia coli O157:H7) 및 S. Typhumurium(Salmonella Typhumurium)이고,

상기 항생제 내성을 가지는 박테리아는 MRSA(Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus) 및 ESBL-EC(Extended Spectrum β -Lactamase-producing E. coli)인 것을 특징으로 하는 박테리아 감염으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물을 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물 및 박테리아 검출용 화학센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2백만 이상의 아이들이 해마다 박테리아 감염에 의하여 사망한다고 보고되고 있다. 특히, 항생제 내성을 가진 박테리아는 전 세계적으로 건강에 위협이 되고 있는 실정이다. 이에, 항생제 내성을 가진 박테리아를 치료하기 위해서는 새로운 종류의 화합물이 개발되어야 하며, 박테리아가 새로운 화합물에 대한 내성을 가지지 못하도록 하는 것이 중요하다.

[0003] 국제미생물학회는, 현재 사용가능한 항박테리아제들의 군주에 대한 효능이 이들 군주의 항생제 내성의 발달로 인해 무력화될 수 있다는 것에 대해 중대한 관심을 표명하고 있다.

[0004] 일반적으로, 박테리아 병원체는 그램-양성 세균성 박테리아(Gram-positive bacterial pathogen) 또는 그램-음성 세균성 박테리아(Gram-negative bacterial pathogen)으로 분류될 수 있다. 그램-양성 세균성 박테리아 및 그램-음성 세균성 박테리아에 대하여 유효한 활성을 갖는 항생제 화합물은 일반적으로 광범위한 활성을 갖는 것으로 여겨진다.

[0005] 그램-양성 세균성 박테리아, 예를 들어 스태필로코쿠스 (Staphylococcus), 엔테로코쿠스 (Enterococcus), 스트렙토코쿠스(Streptococcus) 및 마이코박테리아 (mycobacterium)는, 치료하기 어렵고 병원 환경이 한 번 조성되면 박멸하기가 어려워지는 내성 군주로 발달하기 때문에 특히 중요하다. 이러한 군주의 예로는 메티실린-내성 스태필로코쿠스 (MRSA), 메티실린-내성 옹고효소-음성 스태필로코쿠스 (MRCNS), 페니실린-내성 스트렙토코쿠스 뉴모니아 (Streptococcus pneumoniae) 및 다중 내성 엔테로코쿠스 패시움 (Enterococcus faecium)이 있다.

[0006] 또한, 에이치. 인플루엔자 (H.influenzae) 및 엠. 카타랄리스 (M. catarrhalis)를 비롯한 특정 그램-음성 군주에 의해 유발되는 감염의 치료에 사용되는 β -락탐, 퀴놀론 및 마크롤라이드 (macrolide)와 같은 치료제에 대한 내성 또한 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다.

[0007] 특허문헌 1에서는 항생제에 내성을 가지는 박테리아로 인한 감염의 치료가 점점 어려워지고 있음을 개시하고 있다.

[0008] 따라서, 신규한 메커니즘의 작용을 갖고/갖거나 신규한 약물분자구조 기 (pharmacophoric group)를 함유하고 상기 병원성 군주를 다루는 신규 항박테리아제가 필요한 시점이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 병원성 군주의 활성억제 효과를 나타내는 화합물을 개발하기 위해 노력하던 중, 이미

다줄리움을 가진 고분자 화합물이 상기 병원성 균주의 활성 억제제로 작용함과 동시에 비색, 흡광 및 형광의 변화를 통해 병원성 균주의 검출능력까지 가지고 있음을 밝히고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-2013-0012072

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 이미다줄리움을 가진 고분자 화합물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 이미다줄리움을 가진 고분자 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이미다줄리움을 가진 고분자 화합물을 포함하는 박테리아 검출용 화학센서를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 박테리아 검출용 화학센서를 이용한 박테리아 검출방법을 제공하는 것이다.

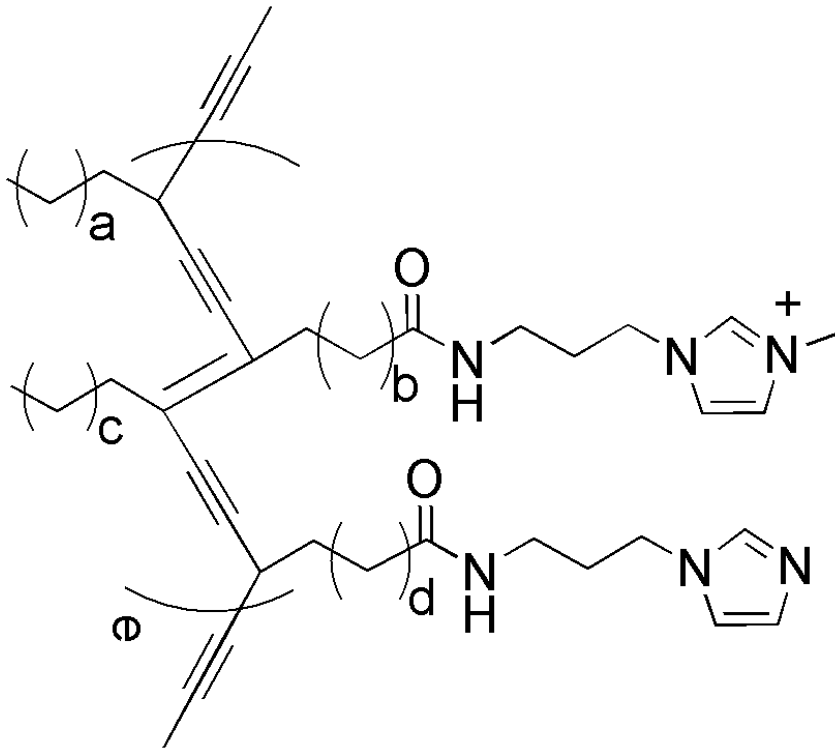
[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이미다줄리움을 가진 고분자 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 박테리아 감염으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이미다줄리움을 가진 고분자 화합물을 제공한다.

[0017]

[화학식 1]



[0018]

[0019]

상기 화학식 1에서,

[0020]

a, b, c, 및 d는 0-20의 정수이고;

[0021]

e는 1 이상의 정수이다.

[0022]

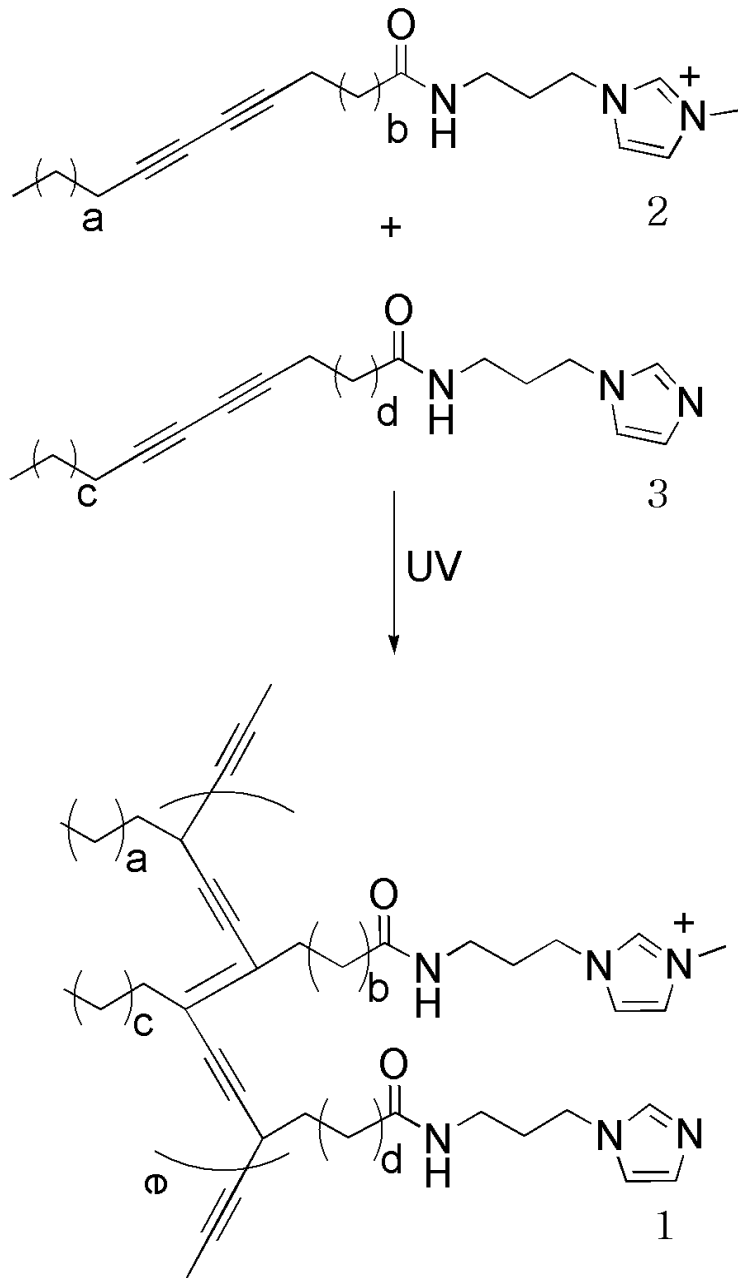
또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0023]

화학식 2 및 3으로 표시되는 화합물을 광중합반응(photopolymerization)시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0024]

[반응식 1]



[0025]

[0026]

상기 반응식 1에서, a, b, c, d 및 e는 본 명세서에서 정의한 바와 같다.

[0027]

나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물을 포함하는 박테리아 검출용 화학센서를 제공한다.

[0028]

또한, 본 발명은 상기 박테리아 검출용 화학센서를 이용한 박테리아 검출방법을 제공한다.

[0029]

나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 박테리아 감염으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0030]

본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물은 비색, 흡광 및 형광 변화를 통한 박테리아의 검출 능력뿐 아니라, 그람양성세균성박테리아(Gram-positive pathogenic bacteria), 그람음성세균성박테리아(Gram-negative pathogenic bacteria) 및 항생제 내성을 가지는 박테리아(antibiotic resistant bacteria)의 활성을 억제하는 효과가 우수하므로, 이에 따른 박테리아 감염에 대한 치료가 효과적일 것으로 예상되어 박테리아의 검출 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 농도에 따른 그람 양성 세균성 박테리아, 그람 음성 세균성 박테리아 및 항생제 내성을 가지는 박테리아에 대한 항균 활성도를 나타내는 그래프이고;

도 2는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 농도에 따른 인간 세포주(caco-2)에 대한 독성을(caco-2 세포 생존률) 나타낸 그래프이고;

도 3은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 혼합한 세균성 박테리아(S. aureus, MRSA 및 ESBL-EC)의 TEM 이미지이고;

도 4는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)를 혼합하지 않은 세균성 박테리아(S. aureus)의 TEM 이미지이고;

도 5는 세균성 박테리아(1×10^7 CFU/ml)가 들어있는 시험관에 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 첨가하였을 때 색 변화를 나타내는 사진이고;

도 6은 물에 용해되어 있는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I) 100 μ M를, 세균성 박테리아가 각각 0, 1×10^5 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml 및 1×10^7 CFU/ml 들어있는 시험관에 첨가하여 UV 스펙트럼을 분석한 그래프이고;

도 7은 물에 용해되어 있는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I) 100 μ M를, 세균성 박테리아가 각각 0, 1×10^5 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml 및 1×10^7 CFU/ml 들어있는 시험관에 첨가하여 형광 스펙트럼을 분석한 그래프이고;

도 8은 공초점 레이저 현미경(CLSM, Confocal laser scanning microscopy)을 통한 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 S. Typhimurium 박테리아에 대한 항균 여부를 관찰한 이미지이고;

도 9는 숙주세포(caco-2)와 S. Typhimurium 박테리아를 함께 배양할 때, 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 첨가 또는 첨가하지 않았을 때, 각 숙주세포당 침입한 박테리아의 세포수를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

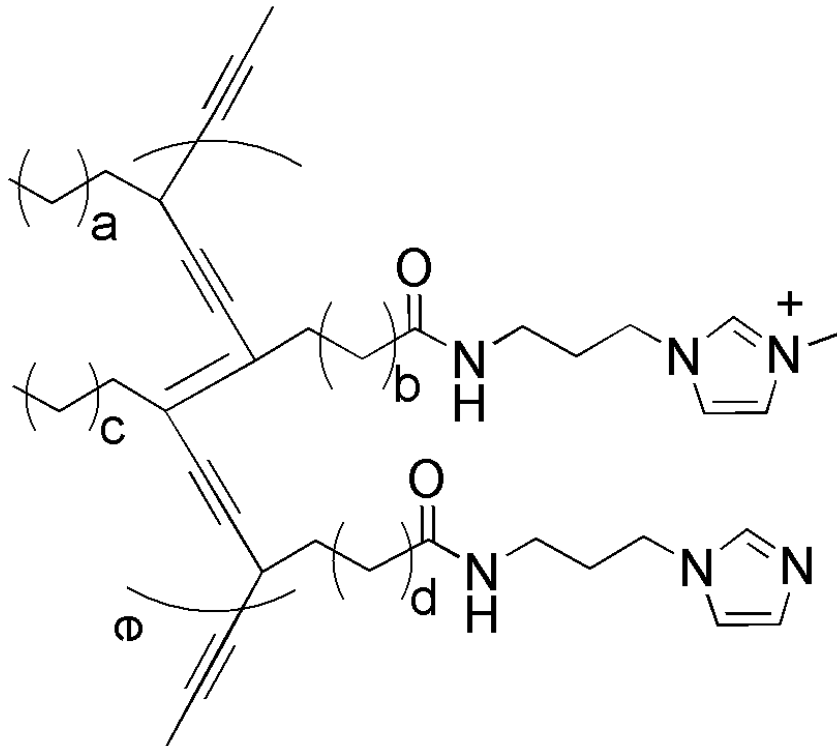
[0032]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0033]

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물을 제공한다.

[0034] [화학식 1]



[0035]

[0036] 상기 화학식 1에서,

[0037] a, b, c, 및 d는 0-20의 정수이고;

[0038] e는 1 이상의 정수이다.

[0039] 바람직하게는,

[0040] 상기 a, b, c, 및 d는 0-10의 정수이고;

[0041] e는 0-100의 정수이다.

[0042] 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물은 양전하를 띄는 이미다졸리움의 활성이 높아, 음전하를 띄는 박테리아의 표면과 정전기적인 상호작용을 통해 p-오비탈의 배향이 변화하면서 변색, 흡광 및 발광성 특징의 변화를 유도한다.

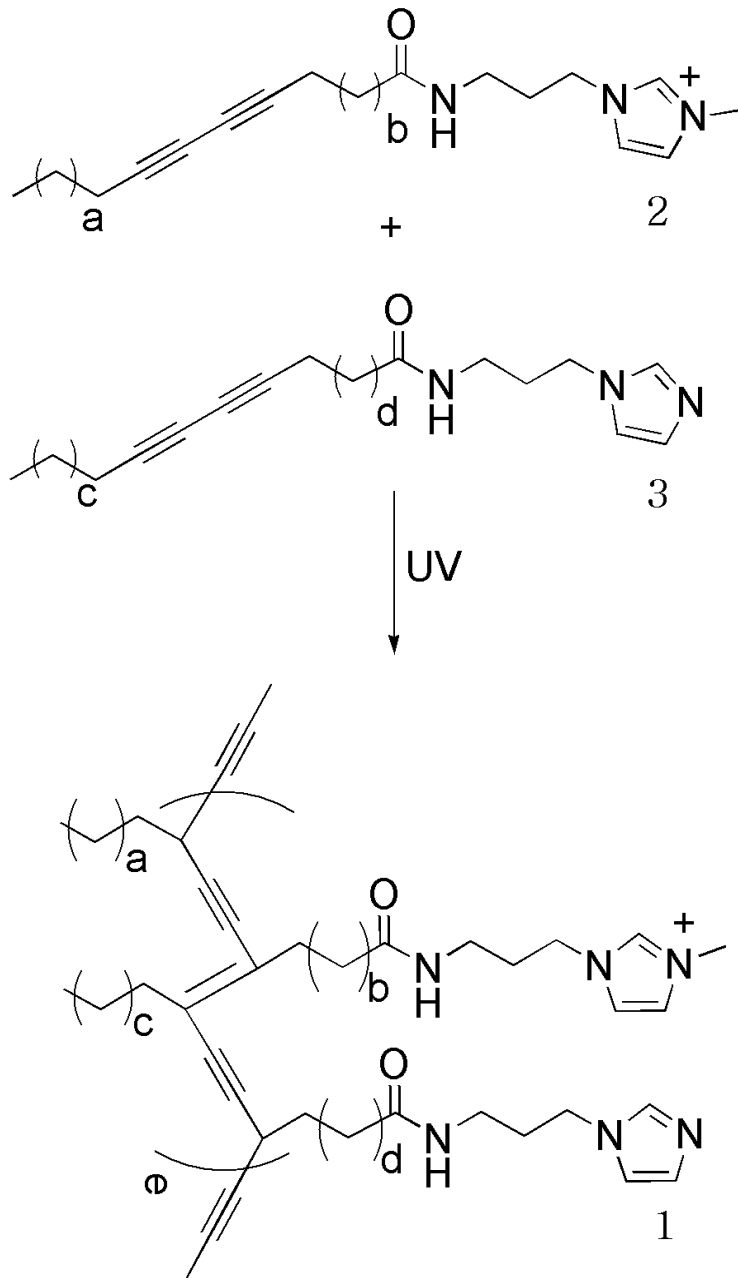
[0043] 구체적으로, 상기 변화 특징을 이용하여 비색분석(colormetric analysis), 흡광분석(absorption analysis), 형광분석(fluorescence analysis) 등의 방법을 단독으로 또는 병행하여 검출하고자 하는 물질을 정성 및/또는 정량 분석할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0045] 화학식 2 및 3으로 표시되는 화합물을 광중합반응(photopolymerization)시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 얻는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0046]

[반응식 1]



[0047]

[0048]

상기 반응식 1에서, a, b, c, d 및 e는 본 명세서에서 정의한 바와 같다.

[0049]

구체적으로, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 광중합반응은 화학식 2 및 화학식 3으로 표시되는 화합물의 아세틸렌기를 광중합반응시킬 수 있는 빛의 세기라면 특별한 제한없이 사용가능하나, 100 내지 380 nm의 빛을 조사하는 것이 바람직하고, 200 내지 300 nm의 빛을 조사하는 것이 보다 바람직하다.

[0050]

나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물을 포함하는 박테리아 검출용 화학센서를 제공한다.

- [0051] 이때, 상기 화학센서는 종이, 필름 또는 입자 형태의 기재에 적용될 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.
- [0052] 또한, 상기 박테리아는 그람양성세균성박테리아(Gram-positive pathogenic bacteria), 그람음성세균성박테리아(Gram-negative pathogenic bacteria) 및 항생제 내성을 가지는 박테리아(antibiotic resistant bacteria)이며, 예를 들면, S. aureus(*Staphylococcus aureus*), MRSA(Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*), E. coli 0157:H7(*Escherichia coli* 0157:H7), ESBL-EC(Extended Spectrum β -Lactamase-producing E. coli), S. Typhumurium(*Salmonella Typhumurium*) 등을 포함하며, 이에 제한하지 않는다.
- [0053] 나아가, 본 발명은 상기 박테리아 검출용 화학센서를 이용한 박테리아 검출방법을 제공한다.
- [0054] 이때, 상기 박테리아를 검출하는 방법은 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물의 양전하를 띄는 이미다졸리움과 음전하를 띄는 박테리아 표면의 정전기적인 상호작용으로 p-오비탈의 배향이 변함에 따라 기인하는 변색, 흡광 또는 발광 특징의 변화를 단독으로 또는 병행하여 검출하는 것을 특징으로 한다.
- [0055] 이에, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 비색 분석(colormetric analysis)을 통한 세균성 박테리아의 검출능력을 평가하기 위하여, 상기 PDA-I-I의 농도를 각각 1, 10, 100 μ M씩 박테리아(1×10^7 CFU/ml)이 들어있는 시험관에 첨가하여 색 변화를 관찰하였다. 이에, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물은 박테리아가 없는 경우 파란색을 띄지만, 박테리아가 존재하는 경우 파란색에서 보라색 또는 빨간색으로 색 변화를 나타내는 것을 알 수 있었다(실험예4, 도5 참조).
- [0056] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 흡광 분석(absorption analysis)을 통한 세균성 박테리아의 검출능력을 평가하기 위하여, 물에 용해되어 있는 PDA-I-I 100 μ M를, 박테리아가 각각 0, 1×10^5 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml 및 1×10^7 CFU/ml 들어있는 시험관에 첨가하여 흡광(UV 스펙트럼)분석을 수행하였다. 이에, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물은 박테리아의 농도가 증가함에 따라 UV 스펙트럼의 625 nm피크는 감소하고, 540 nm피크는 증가하는 것을 알 수 있었다(실험예5, 도6 참조).
- [0057] 나아가, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 형광 분석(fluorescence analysis)을 통한 세균성 박테리아의 검출능력을 평가하기 위하여, 물에 용해되어 있는 PDA-I-I 100 μ M를, 박테리아가 각각 0, 1×10^5 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml 및 1×10^7 CFU/ml 들어있는 시험관에 첨가하여 형광 분석을 수행하였다. 이에, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물은 박테리아의 농도가 증가함에 따라 형광 스펙트럼의 최대 방사 피크(maximum emission wavelength)가 560 nm에서 증가하여 형광을 나타내는 것을 알 수 있었다(실험예6, 도7 참조).
- [0058] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 박테리아감염 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0059] 이때, 상기 박테리아는 그람양성세균성박테리아(Gram-positive pathogenic bacteria), 그람음성세균성박테리아(Gram-negative pathogenic bacteria) 및 항생제 내성을 가지는 박테리아(antibiotic resistant bacteria)이며, 예를 들면, S. aureus(*Staphylococcus aureus*), MRSA(Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*), E. coli 0157:H7(*Escherichia coli* 0157:H7), ESBL-EC(Extended Spectrum β -Lactamase-producing E. coli), S. Typhumurium(*Salmonella Typhumurium*) 등을 포함하며, 이에 제한하지 않는다.
- [0060] 이에, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 항균 활성을

평가하기 위해, PDA-I-I를 0, 1, 10 및 100 μM 농도로 세균성 박테리아(1×10^7 CFU/ml)와 혼합한 후, 생존한 세균성 박테리아의 농도를 측정하였다. 100 μM 의 PDA-I-I를 세균성 박테리아와 혼합하였을 때, 모든 박테리아에 대하여 100%의 항균 활성도를 나타냈으며, 특히 그람 양성 세균성 박테리아(*S. aureus*)에 낮은농도(10 μM)의 PDA-I-I를 혼합하였을 때 100%의 항균 활성도를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, PDA-I-I는 항생제 내성을 가지는 박테리아(MRSA, ESBL-EC)에 대해서도 좋은 항균 활성을 나타냈으며, 특히 항생제 내성을 가지는 그람 양성 세균성 박테리아인 MRSA에 낮은농도(10 μM)의 PDA-I-I를 혼합하였을 때 100%의 항균 활성도를 나타내는 것으로 확인되었다. 여기서, 상기 PDA-I-I는 그람 음성 세균성 박테리아보다 그람 양성 세균성 박테리아에 대하여 더 좋은 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다(실험예 1, 도1 참조).

[0061]

나아가, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 세포독성을 평가하기 위해, PDA-I-I를 0, 0.1, 1 및 10 μM 농도로 인간의 결장암세포주(colon carcinoma cell)인 caco-2와 혼합하여 caco-2 세포의 생존율을 측정한 결과, PDA-I-I를 10 μM 농도로 caco-2 세포와 혼합하였을 때, 약 20% 세포 생존율을 감소시키는 것을 알 수 있었다(실험예2, 도2 참조).

[0062]

또한, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 항균 메커니즘을 측정하기 위하여, *S. aureus*, MRSA 및 ESBL-EC의 박테리아를 10 μM 농도의 PDA-I-I와 30분 동안 혼합한 TEM 이미지와 PDA-I-I를 혼합하지 않은 박테리아의 TEM 이미지를 관찰하였다. PDA-I-I를 혼합하지 않은 박테리아(*S. aureus*)는 온전한 세포벽 및 세포막이 관찰되었으며, 특히 잘 보존된 펩티도글라이칸 층(peptidoglycan layer) 및 세포질막(cytoplasmic membrane)이 확인되었다(실험예3, 도4참조).

[0063]

반대로, PDA-I-I를 혼합한 박테리아(*S. aureus*, MRSA 및 ESBL-EC)는 세포벽이 손상되어, 세포 형태의 변화가 관찰되었다(실험예3, 도3 참조). 구체적으로, 도 3(a)에서는 세포벽(cell wall, CW)이 세포질막(cytoplasmic membrane, CM)과 분리되어 있음을 알 수 있었다. 도 3(c)에서는 PDA-I-I가 박테리아의 외벽을 공격하여 세포벽이 손상되어 세포 내용물(cellular contents)이 방출되고 있음을 확인하였다. 이러한 현상으로부터 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물 내 양전하를 띠는 이미다졸리움과 음전하를 띠는 박테리아의 세포벽이 정전기적인 상호작용으로 인하여 박테리아 세포가 손상됨을 알 수 있었다.

[0064]

나아가, 공초점 레이저 현미경(CLSM, Confocal laser scanning microscopy)을 통한 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 *S. Typhimurium* 박테리아에 대한 항균 효과를 관찰하기 위하여, *S. Typhimurium*(1×10^7 CFU/ml)에 녹색형광단백질(GFP, green fluorescence protein)을 표지하고, PDA-I-I를 첨가하지 않은 상태로 CLSM을 통해 상기 박테리아의 생존 여부를 확인하였다. 이에, 473nm에서의 여기(excitation)로 인한 녹색 형광이 관찰되어 상기 *S. Typhimurium*가 온전한 형태로 생존해 있음을 알 수 있었다(실험예7, 도8(a) 참조).

[0065]

반대로, *S. Typhimurium*(1×10^7 CFU/ml)에 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 혼합한 후, GFP가 표지된 *S. Typhimurium* 박테리아를 CLSM으로 관찰하였을 때, 녹색 형광이 관찰되지 않아 *S. Typhimurium* 박테리아에 대한 PDA-I-I의 항균 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 559nm에서의 여기로 인한 적색 형광이 관찰되었으며 이를 통해 상기 박테리아가 PDA-I-I로 인하여 형태가 손상되었음을 알 수 있었다(실험예7, 도8(b) 참조).

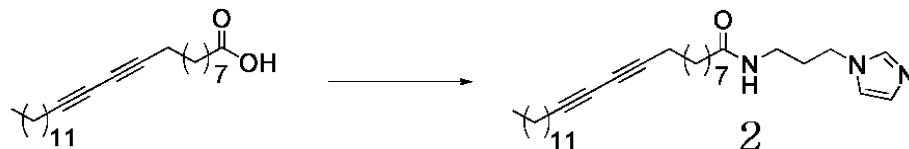
[0066]

또한, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 숙주세포(host cell)에 대한 *S. Typhimurium* 박테리아의 감염 저해효과를 평가하였다. PDA-I-I를 첨가하지 않고, 숙주세포(caco-2) 및 *S. Typhimurium* 박테리아를 배양하였을 때, 숙주세포당 세포에 침입하여 감염시킨 박테리아의 세포 수가 1 이상인 것으로 나타났다. 반면에, PDA-I-I를 첨가하여 숙주세포(caco-2) 및 *S. Typhimurium* 박테리아와 함께 배양하였을 때, 숙주세포당 세포에 침입하여 감염시킨 박테리아의 세포 수가 현저하게 감소한 것으로 확인되었다(실험예 8, 도9 참조).

[0067] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0068] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것을 아니다.

[0069] <제조예 1> N-(3-(1H-이미다졸-1-일)프로필)펜타코사-10,12-다인아마이드(PCDA-Im) 단량체의 제조



[0070]

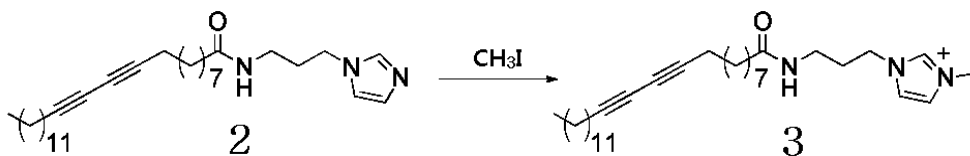
[0071] 20 mL의 CH_2Cl_2 에 용해된 0.750 g (2.01mmol)의 10,12-펜타코사다이노익 산 (PDA)에 300 mg (2.61 mmol)의 N-히드록시석신이미드 (NHS) 및 600 mg (2.91mmol)의 N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드 (DCC)를 첨가한 후, 질소 내 상온에서 하루 동안 혼합하였다. 감압을 통해 용매를 증발시킨 후, 생성된 흰색 침전물을 필터하여 제거하고, 플래시 컬럼 크로마토그래피(실리카겔 / 용리액 : CH_2Cl_2)를 통해 NHS를 포함하는 PDA(PDA-NHS, PDA modified with NHS)를 얻었다. 상기 PDA-NHS를 10 mL의 CH_2Cl_2 에 용해된 1-(3-아미노프로필)이미다졸 (500 mg, 4.0 mmol) 용액에 첨가한 후, 24시간 동안 혼합하였다. 용매를 증발시킨 후, 실리카겔 칼럼 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 97:3)을 통해 정제하여 상기 화학식 2로 표시되는 N-(3-(1H-이미다졸-1-일)프로필)펜타코사-10,12-다인아마이드 (560 mg, 58%)를 흰색 고체로 얻었다.

[0072] ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ (ppm): 7.40 (d, 1H, $J = 1\text{Hz}$), 6.98 (d, 1H, $J = 1\text{Hz}$), 6.89 (s, 1H), 5.95 (br, 1H), 3.93(t, 2H, $J = 6.7\text{ Hz}$), 3.18 (q, 2H, $J = 6.7\text{ Hz}$), 2.19-2.05 (m, 6H), 1.96-1.91 (m, 2H), 1.53-1.18 (m, 32 H), 0.81 (t, 3H, $J = 6.25\text{ Hz}$).

[0073] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ (ppm): 173.58, 137.04, 129.58, 118.86, 65.28, 65.18, 44.66, 36.63, 31.89, 29.61, 29.46, 29.32, 29.20, 29.12, 29.08, 28.88, 28.84, 28.72, 28.33, 28.25, 22.67, 19.18, 19.16.

[0074] FAB MS $m/z = 482.4112$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, calc. for $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O} = 482.4110$.

[0075] <제조예 2> 3-메틸-1-(3-(펜타코사-10,12-다인아미도)프로필)-1H-이미다졸-3-이움 아이오다이드 (PCDA-Methyl-Im) 단량체의 제조



[0076]

[0077] 상기 제조예 1에서 얻은 화학식 2로 표시되는 N-(3-(1H-이미다졸-1-일)프로필)펜타코사-10,12-다인아마이드 0.250 g (0.52 mmol)가 용해된 20 mL의 CH_3CN 에 400 mg (2.81 mmol)의 CH_3I 를 첨가한 후, 하루 동안 환류하였다. 용매를 증발시킨 후, 화학식 3으로 표시되는 3-메틸-1-(3-(펜타코사-10,12-다인아미도)프로필)-1H-이미다졸-3-이움 아이오다이드를 고순도, 91 %수율(233 mg)로 얻었다.

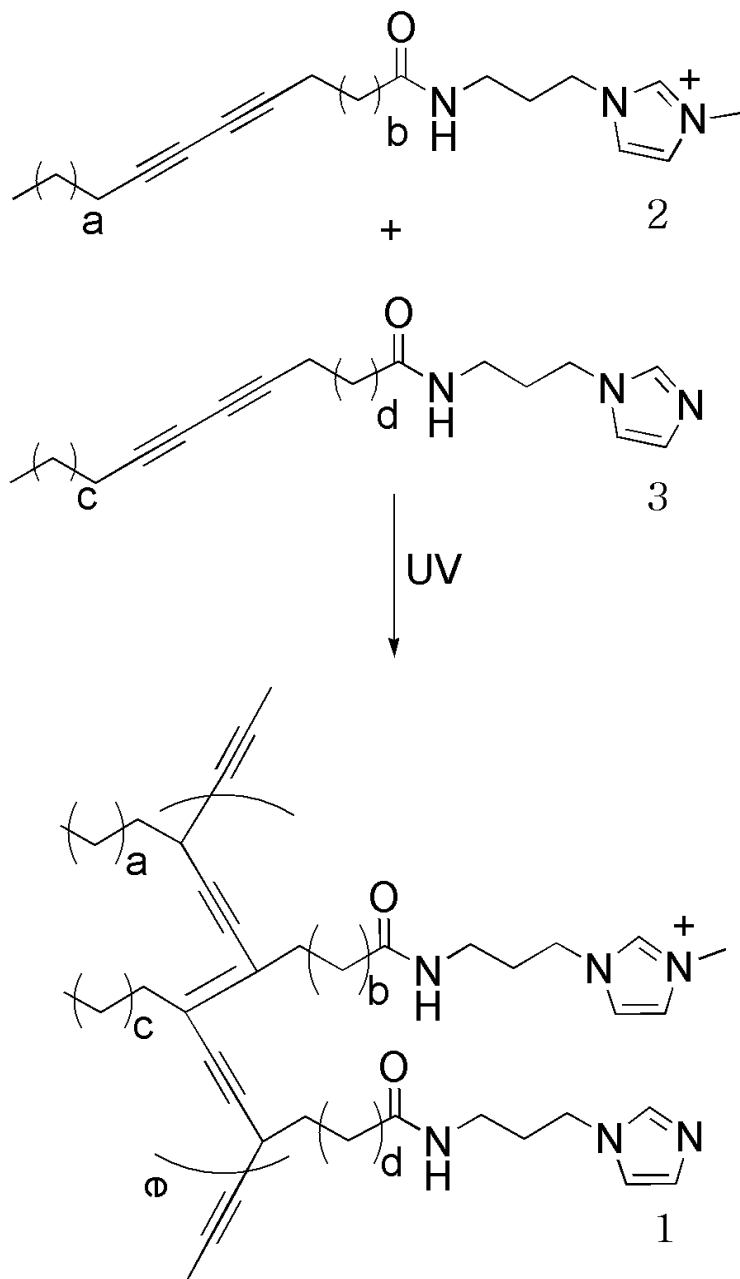
[0078] ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ (ppm) 9.93 (s, 1H), 7.72 (d, 1H, $J = 1.5\text{ Hz}$), 7.29 (d, 1H, $J = 1.5\text{ Hz}$), 4.37 (t, 2H, $J = 6.25\text{Hz}$), 4.00 (s, 3H), 3.24 (q, 2H, $J = 5.5\text{ Hz}$), 2.27-2.14(m, 8H), 1.55-1.18 (m, 32H), 0.81 (t, 3 H, $J = 6.25\text{Hz}$).

[0079] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ b(ppm):174.86, 137.14, 123.13, 123.04, 65.19, 47.52, 36.93, 31.90, 29.62,

29.47, 29.34, 29.26, 29.09, 28.95, 28.86, 28.82, 28.34, 25.82, 22.68, 19.20, 14.14.

[0080] FAB MS m/z = 496.4271 $[M + H]^+$, calc. for $C_{32}H_{54}N_3O$ = 496.4267.

[0081] <실시예 1> 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 제조



[0082]

[0083] 상기 제조예 1에서 얻은 화학식 2로 표시되는 PCDA-Im 단량체 (1.6 mg, 0.003 mmol) 및 상기 제조예 2에서 얻은 화학식 3으로 표시되는 PCDA-Methyl-Im 단량체 (4.2 mg, 0.007 mmol)를 $CHCl_3$ 10 mL에 용해한 후, N_2 스트림 (stream)을 통해 용매를 증발시키고, 10 mL 물을 첨가한 후, 80℃에서 30분 동안 소니케이팅(sonicate) 하고, 4℃에서 하루 동안 저장하였다. 두 단량체의 농도는 1.0 mM이었으며, 상기 용액을 30초 동안 254 nm의 자외선등 (UV lamp)으로 조사하여 화학식 1로 표시되는 목적생성물(PDA-I-I)을 얻었다.

- [0084] <실험예 1> 농도에 따른 항균 활성 평가
- [0085] 본 발명에 따른 실시예 1에서 제조한 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 농도에 따른 항균 활성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다.
- [0086] 그람 양성 세균성 박테리아인 *S. aureus*(ARCC 25923), 그람 음성 세균성 박테리아인 *E. coli* 0157:H7(ATCC 43894) 및 *S. Typhumurium*(ATCC 3339) 및 항생제 내성을 가지는 박테리아 MRSA(CCRAM 3696) 및 ESBL-EC(ATCC BAA-198)를 실험에 사용하였다. 하기 사용한 Difco™ LB (Luria-Bertani Broth) 및 BBL™ MHB (Mueller-Hinton Broth; not cation-adjusted)는 BD사에서 제조된 배지를 사용하였다.
- [0087] 그람 양성 세균성 박테리아, *S. aureus*를 MHB(Mueller-Hinton Broth)가 들어있는 둥근 유리 튜브에 첨가하여 37℃에서 220rpm으로 하루 동안 배양한 후, 순수한 MHB(Mueller-Hinton Broth)로 100배 희석하고, 600nm에서 광밀도(optical density)가 1에 도달할 때까지 37℃로 에어레이션(aeration)하며 배양하였다. 상기 배양액을 10분 동안 5000rpm으로 원심분리한 후, 박테리아의 밀도를 조절하기 위하여 박테리아가 들어있는 펠렛(pellet)에 물을 첨가하여 재현탁 하였다.
- [0088] 그람 음성 세균성 박테리아, *E. coli* 0157:H7 및 *S. Typhumurium*를 LB(Luria-Bertani Broth)가 들어있는 둥근 유리 튜브에 첨가하여 37℃에서 220rpm으로 하루 동안 배양한 후, 순수한 LB(Luria-Bertani Broth)로 100배 희석하고, 600nm에서 광밀도(optical density)가 1에 도달할 때까지 37℃로 배양하였다. 상기 배양액을 10분 동안 5000rpm으로 원심분리한 후, 박테리아의 밀도를 조절하기 위하여 박테리아가 들어있는 펠렛(pellet)에 물을 첨가하여 재현탁 하였다.
- [0089] 항생제 내성을 가지는 박테리아 MRSA 및 ESBL-EC 또한, 상기 방법과 같은 방법으로 준비하였다.
- [0090] 항균 활성 평가를 위하여 상기 방법으로 준비된 박테리아(1×10^7 CFU/ml)를 상기 실시예 1에서 얻은 1-100 μ M의 PDA-I-I과 혼합한 후, 상온에서 배양하였다. 생존 가능한 세포(Viable cells)는 일반적인 한천평판배양법(conventional plate counting method)을 사용하여 열거하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0091] 도 1은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 농도에 따른 그람 양성 세균성 박테리아, 그람 음성 세균성 박테리아 및 항생제 내성을 가지는 박테리아에 대한 항균 활성도를 나타내는 그래프이다.
- [0092] 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 항균 활성은 농도-의존적이란 것을 확인할 수 있었다. 100 μ M의 PDA-I-I를 상기 박테리아들과 혼합하였을 때, 모든 박테리아에 대하여 100%의 항균 활성도를 나타냈으며, 특히 그람 양성 세균성 박테리아(*S. aureus*)에 낮은농도(10 μ M)의 PDA-I-I를 혼합하였을 때 100%의 항균 활성도를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, PDA-I-I는 항생제 내성을 가지는 박테리아(MRSA, ESBL-EC)에 대해서도 좋은 항균 활성을 나타냈으며, 특히 항생제 내성을 가지는 그람 양성 세균성 박테리아인 MRSA에 낮은농도(10 μ M)의 PDA-I-I를 혼합하였을 때 100%의 항균 활성도를 나타내는 것으로 확인되었다. 여기서, 상기 PDA-I-I는 그람 음성 세균성 박테리아보다 그람 양성 세균성 박테리아에 대하여 더 좋은 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0093] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 다양한 박테리아에 대한 항균을 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0094]

<실험예 2> PDA-I-I의 독성평가

[0095]

상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 인간 세포주(caco-2)에 대한 독성을 평가하기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다.

[0096]

인간의 결장암세포주(colon carcinoma cell)인 caco-2 (KCLB 30037, 계대 30-35)를 10 %의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1 %의 페니실린을 함유하는 로우 글루코스 DMEM 배지(low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium)가 들어있는 96-웰 세포 배양 플레이트에 첨가하여, 가습 인큐베이터(humidified incubator) 내에서 37 °C로 2일 동안 배양하였다. 탈이온수 내 0.1-10 μ M의 농도로 용해되어 있는 PDA-I-I를 상기 Caco-2 세포가 들어있는 각 웰에 첨가하여 37 °C에서 1시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 독성평가는 제조사(M. C. Alley, C. B. Uhl, M. M. Lieber, *Life Sci.* **1982**, *31*, 3071)가 제안한 대로, Cyto/XTM 및 독성검사키트(LPS solution, Daejeon, Korea)를 사용하여 수행하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0097]

도 2는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 농도에 따른 인간 세포주(caco-2)에 대한 독성(caco-2 세포 생존률) 나타낸 그래프이다.

[0098]

도 2에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 농도에 의존하여 인간의 결장암세포주(colon carcinoma cell)인 caco-2의 생존률을 낮추는 것으로 나타났다. 특히, 상기 PDA-I-I를 10 μ M로 caco-2 세포와 혼합하였을 때, 약 20% 세포 생존률을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

[0099]

따라서, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 농도에 따른 세포 독성을 어느 정도 가지고 있지만, 항균 효과에 비하여 그 독성이 미미하므로 다양한 박테리아에 의하여 감염된 세포의 항균을 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0100]

<실험예 3> Transmission electron microscopy(TEM)을 통한 PDA-I-I의 항균 메커니즘 측정

[0101]

상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 항균 메커니즘을 측정하기 위하여, S. aureus, MRSA 및 ESBL-EC 박테리아를 10 μ M 농도의 PDA-I-I와 30분 동안 혼합한 TEM 이미지와 PDA-I-I를 혼합하지 않은 박테리아의 TEM 이미지를 얻었으며, 이를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0102]

(S. aureus : 도 3(a) / MRSA : 도 3(b) / ESBL-EC : 도 3(c))

[0103]

도 3은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 혼합한 박테리아(S. aureus, MRSA 및 ESBL-EC)의 TEM 이미지이다.

[0104]

도 4는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 혼합하지 않은 박테리아(S. aureus)의 TEM 이미지이다.

[0105]

도 4에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 혼합하지 않은 박테리아(S. aureus)는 온전한 세포벽 및 세포막이 관찰되었으며, 특히 잘 보존된 펩티도글라이칸 층(peptidoglycan layer) 및 세포질막(cytoplasmic membrane)이 확인되었다.

[0106]

반대로, 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 혼합한 박테리아(S. aureus, MRSA 및 ESBL-EC)는 세포벽이 손상되어, 세포 형태의 변화가 관찰되었다. 구체적으로, 도 3(a)에서는 세포벽(cell wall, CW)이 세포질막(cytoplasmic membrane, CM)과 분리되어 있음을

알 수 있다. 또한, 도 3(c)에서는 PDA-I-I이 박테리아의 외벽을 공격하여 세포벽이 손상되어 세포 내용물(cellular contents)이 방출되고 있음을 확인하였다. 이러한 현상으로부터 PDA-I-I 내 양전하를 띠는 이미다졸리움과 음전하를 띠는 박테리아의 세포벽이 정전기적인 상호작용으로 인하여 박테리아 세포가 손상됨을 알 수 있었다.

[0107] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 다양한 박테리아에 대한 항균을 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0108] <실험예 4> 비색 분석(colormetric analysis)을 통한 박테리아 검출능력 평가

[0109] 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 비색 분석을 통한 박테리아 검출능력을 평가하기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다.

[0110] 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 농도를 각각 1, 10, 100 μM 씩 박테리아(1×10^7 CFU/ml)이 들어있는 시험관에 첨가하여 색 변화를 관찰하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0111] 도 5는 박테리아(1×10^7 CFU/ml)가 들어있는 시험관에 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)를 첨가하였을 때 색 변화를 나타내는 사진이다.

[0112] 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 박테리아가 없는 경우 파란색을 띄지만(도5 a 참조), 박테리아가 존재하는 경우 파란색에서 보라색 또는 빨간색으로 색 변화를 나타내는 것을 알 수 있었다.

[0113] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 다양한 박테리아 검출을 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0114] <실험예 5> 흡광 분석(absorption analysis)을 통한 박테리아 검출능력 평가

[0115] 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 흡광 분석(UV 스펙트럼)을 통한 박테리아 검출능력을 평가하기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다.

[0116] 물에 용해되어 있는 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I) 100 μM 를, 박테리아가 각각 0, 1×10^5 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml 및 1×10^7 CFU/ml 들어있는 시험관에 첨가하여 흡광 분석(UV 스펙트럼) 분석을 실시하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0117] 도 6은 물에 용해되어 있는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I) 100 μM 를, 박테리아가 각각 0, 1×10^5 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml 및 1×10^7 CFU/ml 들어있는 시험관에 첨가하여 UV 스펙트럼을 분석한 그래프이다.

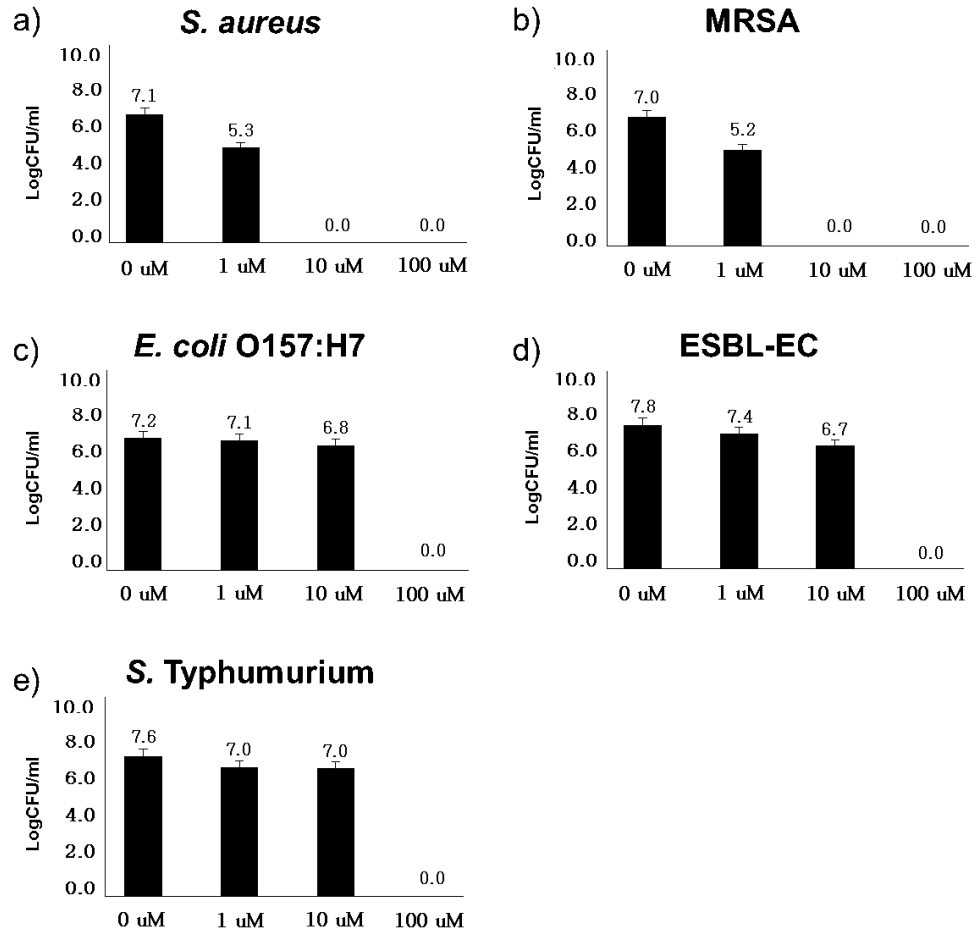
[0118] 도 6에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 박테리아의 농도가 증가함에 따라 UV 스펙트럼의 625 nm피크는 감소하고, 540 nm피크는 증가하는 것을 알 수 있었으며, 상기 실험예 5의 색 변화 결과와 연관됨을 알 수 있었다.

- [0119] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 다양한 박테리아 검출을 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0120] **<실험예 6> 형광 분석(Fluorescence analysis)을 통한 박테리아 검출능력 평가**
- [0121] 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 형광 스펙트럼 분석을 통한 박테리아 검출능력을 평가하기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다.
- [0122] 물에 용해되어 있는 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I) 100 μ M를, 박테리아가 각각 0, 1×10^5 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml 및 1×10^7 CFU/ml 들어있는 시험관에 첨가하여 형광 스펙트럼 분석을 실시하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0123] 도 7은 물에 용해되어 있는 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I) 100 μ M를, 박테리아가 각각 0, 1×10^5 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml 및 1×10^7 CFU/ml 들어있는 시험관에 첨가하여 형광 스펙트럼을 분석한 그래프이다.
- [0124] 도 7에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 박테리아의 농도가 증가함에 따라 형광 스펙트럼의 최대 방사 피크(maximum emission wavelength)가 560 nm에서 증가하여 형광을 나타내는 것을 알 수 있었다.
- [0125] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 다양한 박테리아 검출을 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0126] **<실험예 7> 공초점 레이저 현미경(CLSM, Confocal laser scanning microscopy)을 통한 PDA-I-I의 S. Typhimurium 박테리아에 대한 항균 효과 관찰**
- [0127] 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 공초점 레이저 현미경을 통한 S. Typhimurium 박테리아에 대한 항균 능력을 관찰하기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다.
- [0128] 박테리아(S. Typhimurium) 1×10^7 CFU/ml에 녹색형광단백질(GFP, green fluorescence protein)을 표지하고, PDA-I-I를 첨가하지 않은 상태로 CLSM을 통해 상기 박테리아의 생존 여부를 관찰하였다. 또한, PDA-I-I 50 μ M를 첨가하여 30분 동안 혼합한 후 CLSM을 통해 상기 박테리아의 생존 여부를 관찰하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0129] 도 8은 공초점 레이저 현미경(CLSM, Confocal laser scanning microscopy)을 통한 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 S. Typhimurium 박테리아에 대한 항균 여부를 관찰한 이미지이다.
- [0130] 도 8(a)에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 혼합하지 않고, GFP가 표지된 S. Typhimurium 박테리아를 CLSM으로 관찰하였을 때, 473nm에서의 여기(excitation)로 인한 녹색 형광이 관찰되었으며 이를 통해 상기 박테리아가 온전한 형태로 생존해 있음을 알 수 있었다.

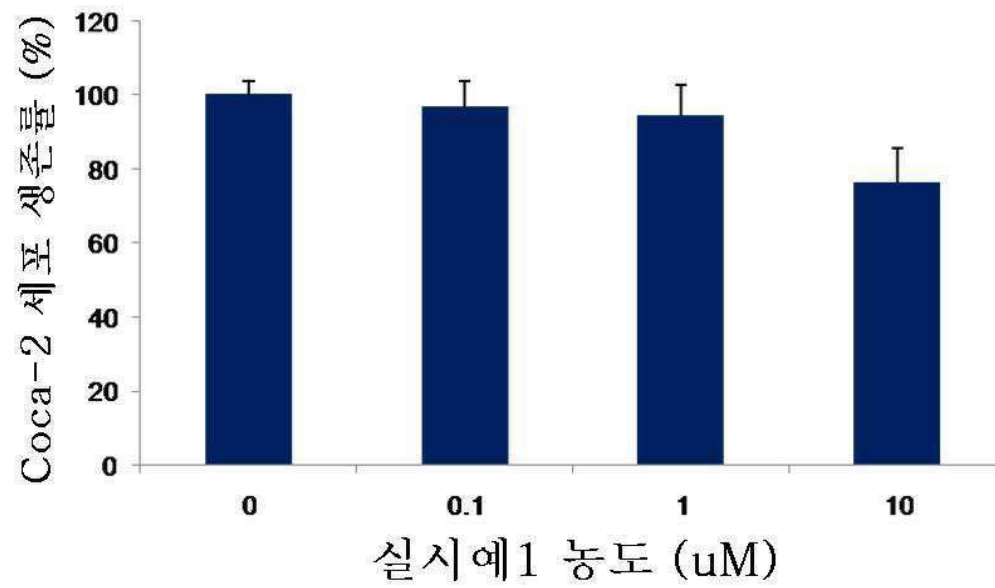
- [0131] 반대로, 도 8(b)에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 혼합한 후, GFP가 표지된 *S. Typhimurium* 박테리아를 CLSM으로 관찰하였을 때, 녹색 형광이 관찰되지 않았으며 이를 통해 PDA-I-I의 항균 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 559nm에서의 여기로 인한 적색 형광이 관찰되었으며 이를 통해 상기 박테리아가 PDA-I-I로 인하여 형태가 손상되었음을 알 수 있었다.
- [0132] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 *S. Typhimurium* 박테리아에 대한 항균을 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0133] <실험예 8> PDA-I-I의 숙주세포(host cell)에 대한 *S. Typhimurium* 박테리아의 감염 저해효과 평가
- [0134] 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)의 숙주세포(host cell)에 대한 *S. Typhimurium* 박테리아의 감염 저해효과를 평가하기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다.
- [0135] 인간의 결장암세포주(colon carcinoma cell)인 caco-2 세포를 10 %의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1 %의 페니실린을 함유하는 로우 글루코스 DMEM 배지(low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium)가 들어있는 96-웰 세포 배양 플레이트에 첨가하여, 가습 인큐베이터(humidified incubator) 내에서 각 웰에 단일층(monolayer)이 형성될 때까지 37 °C로 7일 동안 배양하였다. 상기 숙주세포는 세포계산기(제조사: Paul Marienfeld GmbH & Co. KG / 모델명 : KCLB Number : 30037.1)를 사용하여 나열하였다. 상기 숙주세포는 페니실린을 제거하기 위하여 인산완충식염수(PBS, phosphate buffer saline)를 사용하여 세척하였다. 세척한 숙주세포(10^5 세포/웰)는 페니실린이 첨가되지 않은 로우 글루코스 DMEM 배지에 들어있는 *S. Typhimurium* 박테리아(10^6 CFU/웰)과 함께 37°C에서 1시간 동안 CO₂ 인큐베이터 내에서 함께 배양하였다. 숙주세포에 결합하지 않은 박테리아 세포는 PBS를 사용하여 3회에 걸쳐 세척하여 제거하였다. 상기 숙주세포에 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 1μM 농도로 첨가 또는 첨가하지 않은 상태로 37°C에서 1시간 동안 CO₂ 인큐베이터 내 배양하였다.
- [0136] 숙주세포에 침입한 박테리아 세포는 숙주세포를 트립신(Trypsin)/EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)에 용해하여 일반적인 콜로니계수기법(colony counting method)을 사용하여 나열하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0137] 도 9는 숙주세포(caco-2)와 *S. Typhimurium* 박테리아를 함께 배양할 때, 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 첨가 또는 첨가하지 않았을 때, 각 숙주세포당 침입한 박테리아의 세포수를 나타낸 그래프이다.
- [0138] 도 9에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 얻은 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)을 첨가하지 않고, 숙주세포(caco-2) 및 *S. Typhimurium* 박테리아를 배양하였을 때, 숙주세포당 세포에 침입하여 감염시킨 박테리아의 세포 수가 1 이상인 것으로 나타났다. 반면에, PDA-I-I를 첨가하여 숙주세포(caco-2) 및 *S. Typhimurium* 박테리아와 함께 배양하였을 때, 숙주세포당 세포에 침입하여 감염시킨 박테리아의 세포 수가 현저하게 감소한 것으로 확인되었다.
- [0139] 따라서, 본 발명에 따른 이미다졸리움을 가진 고분자 화합물(PDA-I-I)은 숙주세포에 대한 *S. Typhimurium* 박테리아의 감염을 저해하는 효과가 있으므로, *S. Typhimurium* 박테리아에 대한 항균을 목적으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면

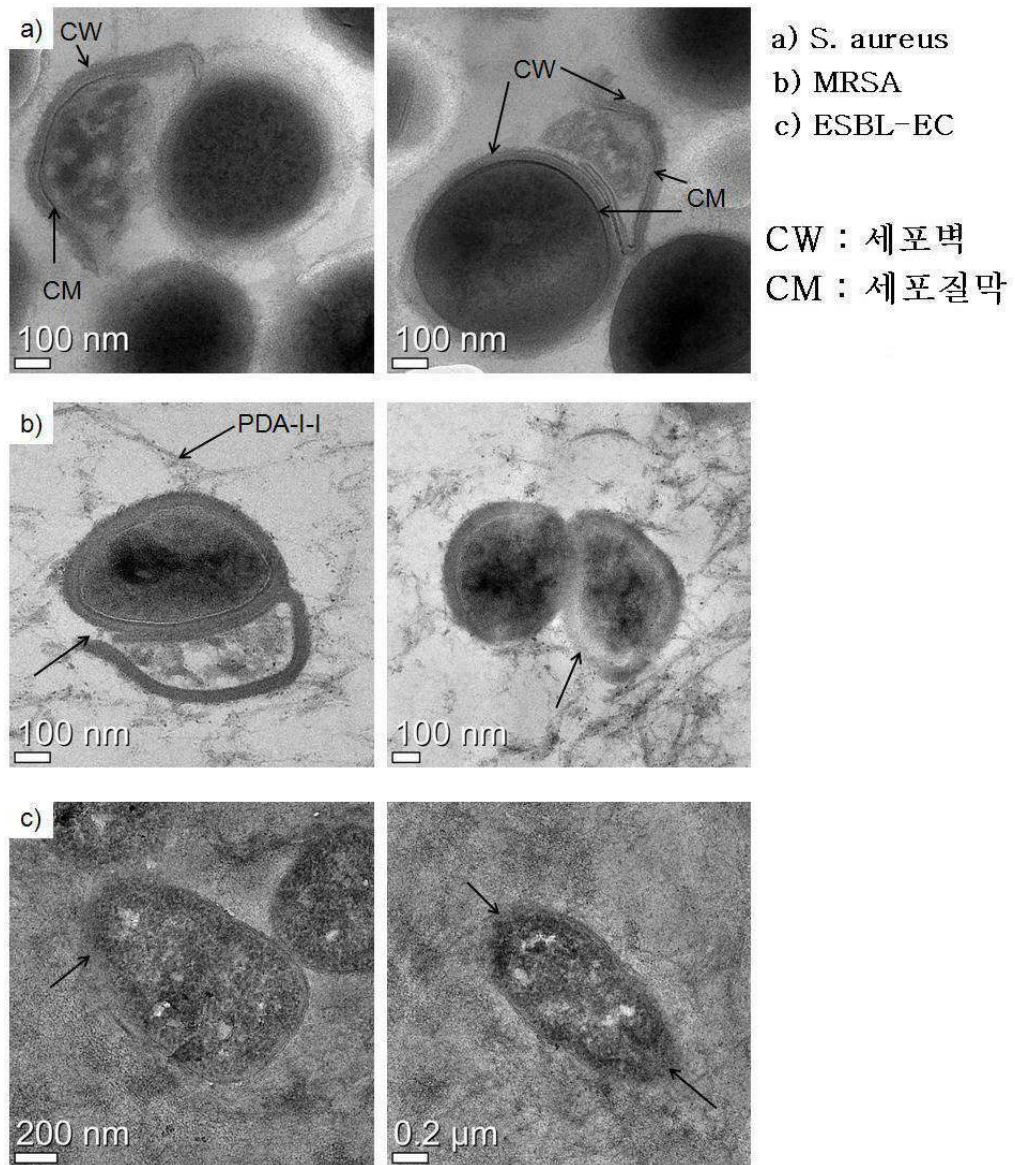
도면1



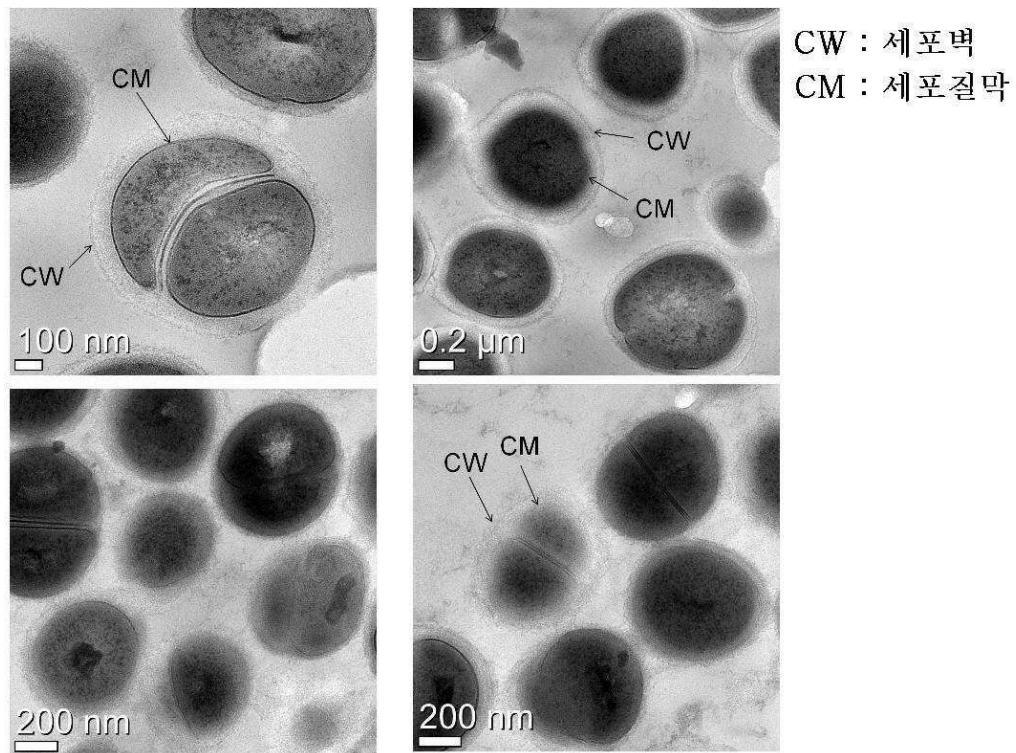
도면2



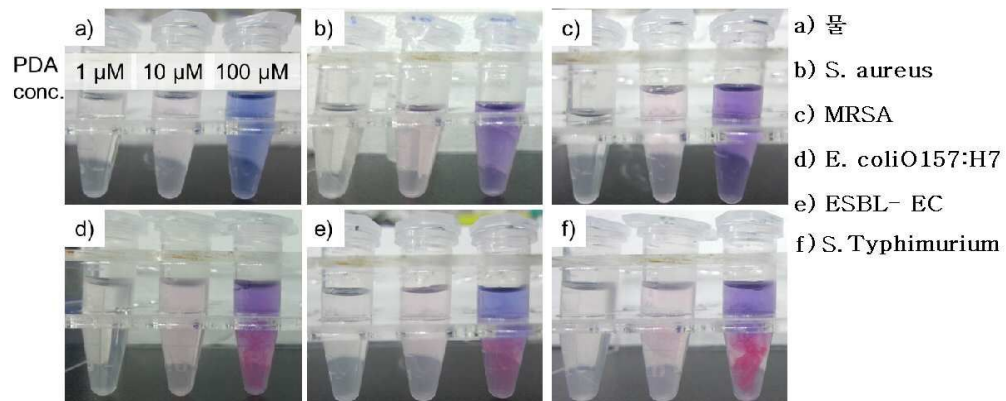
도면3



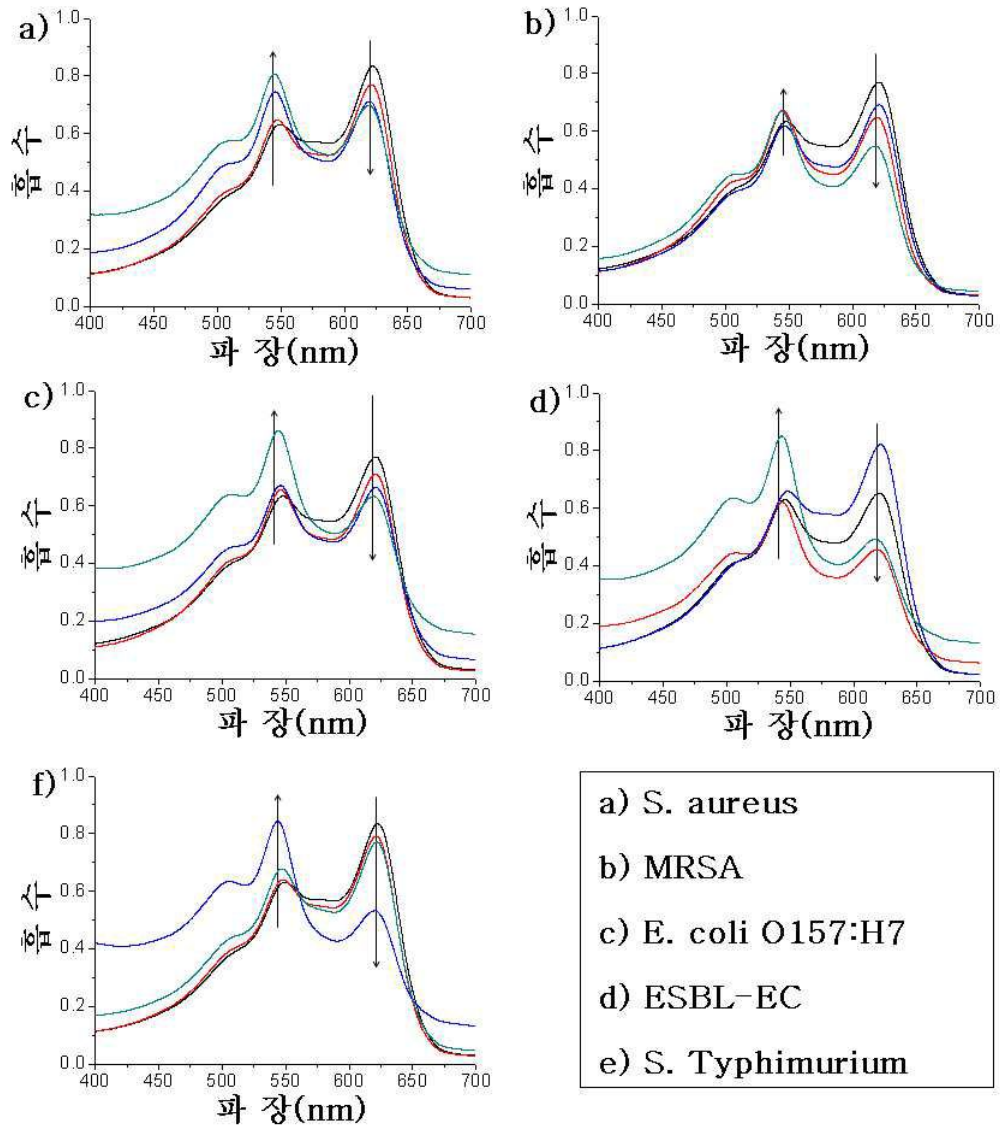
도면4



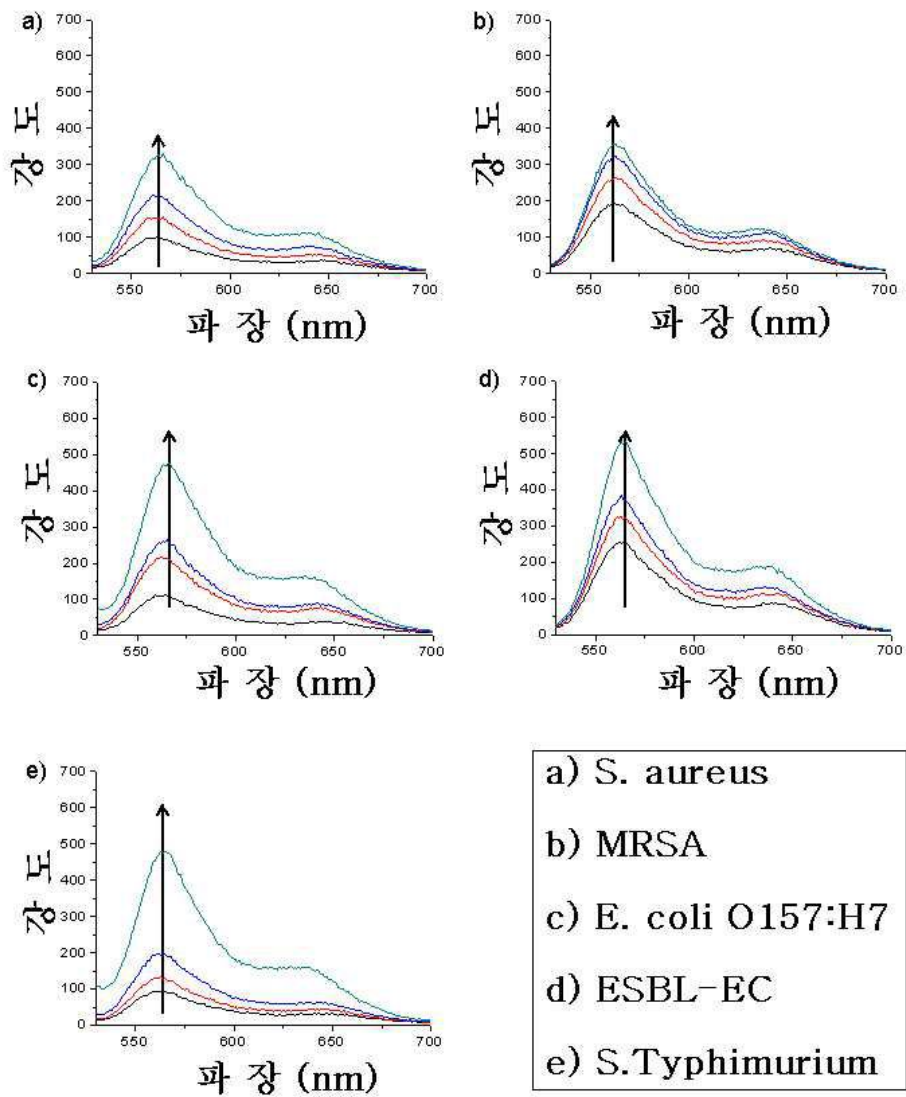
도면5



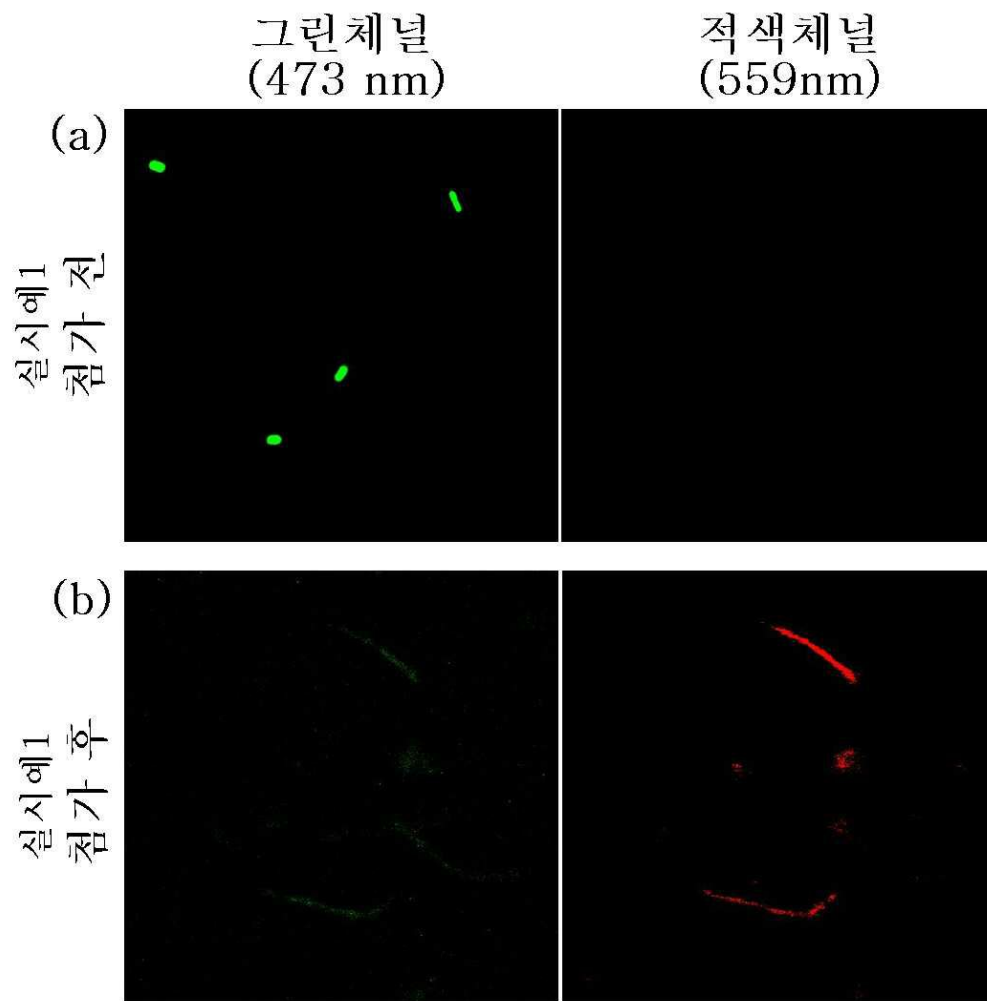
도면6



도면7



도면8



도면9

