



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0004814
(43) 공개일자 2015년01월13일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/19 (2006.01) A61K 33/42 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7029790</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2013년03월27일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2014년10월23일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/056598</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/144247
국제공개일자 2013년10월03일</p> <p>(30) 우선권주장
12161802.9 2012년03월28일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
아틀라 푸즈 에이엠비에이
덴마크, 디케이-8260 비비 제이, 쉐데르웨즈 14</p> <p>(72) 발명자
비르케달, 헨릭
덴마크, 디케이-8520 리스트루프, 블라베르하벤 24</p> <p>울센, 자코브
덴마크, 디케이-8200 아르후스 엔, 2. 티브이, 스티븐 빌레스 게이트 6
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
허용록</p> |
|---|---|

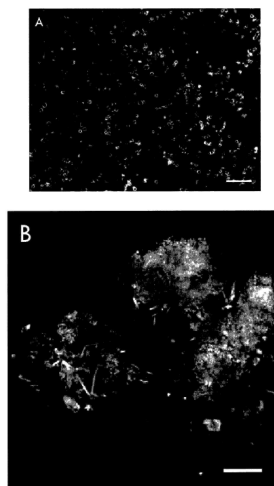
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 오스테오폰틴 및 칼슘- 및/또는 스트론튬-함유 입자를 함유하는 나노입자 응집체

(57) 요약

본 발명은 오스테오폰틴(OPN) 및 칼슘 및/또는 스트론튬을 함유하는 하나 이상의 입자들을 포함하는 나노입자 응집체 및 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위하거나 생물막을 제거하기 위한 이의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 생물막-관련 질병의 치료, 완화 또는 방지를 위한 나노입자 응집체의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

스코브갈드, 조나스

덴마크, 디케이-8000 아르후스 씨, 4. 티에이치,
스칸데르보르그베지 29

셀아페르, 세바스티안

덴마크, 디케이-8000 아르후스 씨, 2. 티에이치,
히에그호-골드베르그스게이트 123

메이어, 리케 루이스

덴마크, 디케이-8230 아비회지, 제페 아크제르스
베지 50

니바드, 벤데

덴마크, 디케이-8240 리스코브, 스트란드마르크스
베지 27 에이

수털란드, 둔칸 스테와르트

덴마크, 디케이-8210 아후스 브이, 클로케르팔데트
62

웨지세, 피터 랑보르그

덴마크, 디케이-8200 아르후스 엔, 프리드트조프
난센스 베지 25

특허청구의 범위

청구항 1

약제로서의 사용을 위한 a) 오스테오폰틴(OPN) 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체.

청구항 2

생물막-관련 질병을 치유, 완화 및/또는 방지하기 위한 a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 생물막-관련 질병은 세균 감염을 포함하는 것인 나노입자 응집체.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 생물막-관련 질병은 구강 질병인 것인 나노입자 응집체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 생물막-관련 질병은 충치인 것인 나노입자 응집체.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 생물막-관련 질병은 치은염인 것인 나노입자 응집체.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 하나에 있어서,

상기 생물막-관련 질병은 치주염인 것인 나노입자 응집체.

청구항 8

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 생물막-관련 질병은 세균성심내막염, 만성 상처 감염, 임플란트 감염, 중이염, 및 낭포성 섬유증 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 질병인 것인 나노입자 응집체.

청구항 9

제2항에 있어서,

세균 감염, 예컨대, 세균 상처 감염을 치유, 완화 및/또는 방지하기 위한 것인 나노입자 응집체.

청구항 10

미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위하거나 미생물 생물막을 제거하기 위한 a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생물막은 치태인 것인 나노입자 응집체.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 생물막은 세포당 적어도 50 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유하는 것인 나노입자 응집체.

청구항 13

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 생물막은 스트렙토코커스 종(*Streptococcus spp.*), 스테필로코커스 종(*Staphylococcus spp.*), 슈도모나스 종(*Pseudomonas spp.*), 악티노마이세스 종(*Actinomyces spp.*), 락토바실러스 종(*Lactobacillus spp.*), 아그레가티박터 종(*Aggregatibacter spp.*), 박테로이데스 종(*Bacteroides spp.*), 리스테리아 종(*Listeria spp.*), 캄필로박터 종(*Campylobacter spp.*), 아이케넬라 종(*Eikenella spp.*), 포르피로모나스 종(*Porphyromonas spp.*), 프레보텔라 종(*Prevotella spp.*), 트레포네마 종(*Treponema spp.*) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세균을 함유하거나 심지어 이로 이루어진 것인 나노입자 응집체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 입자는 칼슘을 포함하는 것인 나노입자 응집체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 입자는 스트론튬을 포함하는 것인 나노입자 응집체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 입자는 칼슘 및 스트론튬을 포함하는 것인 나노입자 응집체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 입자는 칼슘 및/또는 스트론튬의 무기염을 포함하는 것인 나노입자 응집체.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 무기염은 인산염 중, 황산염 및/또는 탄산염을 포함하는 것인 나노입자 응집체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 입자는 적어도 50%(w/w) 인산 칼슘을 포함하는 것인 나노입자 응집체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 입자는 칼슘 및/또는 스트론튬을 방출할 수 있는 것인 나노입자 응집체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1 입자는 나노입자인 나노입자 응집체.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1 입자와 동일한 유형의 제2 입자를 포함하는 것인 나노입자 응집체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,
5 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 갖는 것인 나노입자 응집체.

청구항 24

a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체의 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위하거나 미생물 생물막을 제거하기 위한 용도.

청구항 25

제24항에 있어서,
상기 생물막은 스트렙토코커스 종, 스테필로코커스 종, 슈도모나스 종, 악티노마이세스 종, 락토바실러스 종, 아그레가티박터 종, 박테로이데스 종, 리스테리아 종, 캄필로박터 종, 아이케렐라 종, 포르피로모나스 종, 프레보텔라 종, 트레포네마 종 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세균을 함유하거나 심지어 이로 이루어진 것인 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 오스테오폰틴(OPN) 및 칼슘 및/또는 스트론튬을 함유하는 하나 이상의 입자들을 포함하는 나노입자 응집체 및 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위하거나 미생물 생물막을 제거하기 위한 이의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 생물막-관련 질병의 치료, 완화 또는 방지를 위한 나노입자 응집체의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미생물 생물막으로 인하여 엄청난 손해가 유발된다. 세균 및 진균 생물막은 세균성심내막염, 만성 상처 감염, 임플란트 감염, 중이염, 카리에스(caries), 치주염 및 낭포성 섬유증을 포함하는 수많은 인간 질병들에 관련된다. 또한, 생물막은 식품 부패 및 생물오손에서 중요한 역할을 하는데, 양쪽 모두는 전세계적으로 엄청난 경제적 손실을 유발한다. 종래 항생물막 접근법은 생물막의 기계적 제거 및/또는 생물막에서 살균을 목표로 하는 반면에, 대안적인 전략은 미생물 생물막 형성에 관련된 메커니즘을 목표로 한다. 미생물 생물막의 해로운 효과는 중요한 글로벌 문제로 여전히 남아 있다. 예를 들면, 충치는 여전히 가장 만연한 인간 질병이다.

[0003] WO2005053628는 치아 에나멜 상에 플라크 세균 성장을 감소시키기 위한 OPN 및 오스테오폰틴을 포함하는 치아 제형의 용도를 개시한다.

[0004] Jensen 등(Journal of Biomedical Material Research A, 2011년 10월, Vol 99A, Issue 1)은 OPN으로 코팅된 히드록시아파타이트 나노입자들 및 임플란트 코팅을 위한 이의 용도를 개시한다.

[0005] Holt 등(FEBS Journal 276 (2009), 2308 내지 2323 페이지)은 인간 칼슘 중심의 성장을 제어하기 위하여 OPN 또는 OPN 절편을 이용한 인간 칼슘 나노클러스터들의 제조를 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 발명자들은 OPN 및 칼슘을 포함하는 입자를 포함하는 나노입자 응집체가 시험관 내 및 생체 내 양쪽 모두에서 대단히 감소된 구강 생물막 성장을 제공한다는 것을 놀랍게도 알게 되었다(예컨대, 실시예 6 및 8 및 도 3 및 6 참조). 나노입자 응집체는 생물막 형성을 감소하는데 있어서 매우 효율적이고, OPN 단독, 또는 OPN이 없는 칼슘-함유 입자 또는 다른 모델 입자보다 훨씬 더 효율적이다. 따라서, 뚜렷한 상승효과가 OPN 및 칼슘-함유 입자를 조합함으로써 얻게 되어, 항-생물막 효과가 개선되게 되었다. 또한, 발명자들은 칼슘이 스트론튬에 의하여 대체될 수 있다는 것을 보였다.

과제의 해결 수단

[0007] 따라서, 본 발명의 일 양태는 약제로서의 사용을 위한 a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 양태는 생물막-관련 질병을 치유, 완화 및/또는 방지하기 위한 a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 일 양태는 a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체의 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위하거나 미생물 생물막을 제거하기 위한 용도에 관한 것이다. 본 발명의 일부 실시형태들에 있어서, 이 용도는 요법에 의한 인간 또는 동물 신체의 치료가 아니다. 생물막은 예를 들면, 살아있는 인간 또는 동물과 접촉되지 않는 생물막일 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 양태는 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체로서; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H_2O , 공격자점(vacancy) 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO_3) , (SO_4) , (HSO_4) , (HPO_4) , (H_2PO_4) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO_3) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO_4) 및 (HPO_4) 사이의 몰비는 2.5를 초과하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 양태는 a) OPN 및 b) 인산 스트론튬, 인산 칼슘 및 이의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체의 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 양태는 a) OPN 및 b) 인산 스트론튬, 인산 칼슘 및 이의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체를 포함하는 코팅 조성물에 관한 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 양태는 약제로서의 사용을 위한 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체로서; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO_3) , (SO_4) , (HSO_4) , (HPO_4) , (H_2PO_4) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO_3) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO_4) 및 (HPO_4) 사이의 몰비는 2.5를 초과하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 양태는 세균 감염을 치유, 완화 또는 방지 하기 위한 약제로서의 사용을 위한 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체로서; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO_3) , (SO_4) , (HSO_4) , (HPO_4) , (H_2PO_4) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO_3) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO_4) 및 (HPO_4) 사이의 몰비는 2.5를 초과하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양태는 나노입자 응집체를 포함하는 치아 제형으로서, 상기 나노입자 응집체는 화학양론식

$A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 가지며; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H₂O, 공격자점(vacancy) 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO₃), (SO₄), (HSO₄), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 2.5초과하는 치아 제형에 관한 것이다.

[0016]

일 양태는

[0017]

a) PO₄³⁻로서 인산염을 포함하는 제1 수용액으로서; pH는 6 내지 14의 범위 내에 있는 제1 수용액을 제공하는 단계;

[0018]

b) Ca²⁺ 및/또는 Sr²⁺를 포함하는 제2 수용액으로서; pH는 6 내지 14의 범위 내 있는 제2 수용액을 제공하는 단계로서; 제1 수용액, 제2 수용액 중 어느 하나 또는 양 수용액들은 OPN을 포함하는 단계;

[0019]

c) 상기 제1 및 제2 수용액들을 혼합하여, 1) OPN, 2) 인산 스트론튬, 인산 칼슘 또는 이의 혼합물, 및 3) 수용성 전해질을 포함하는 나노입자 응집체를 포함하는 현탁액을 형성하는 단계;

[0020]

d) 선택적으로, 상기 수용성 전해질의 실질적인 양을 현탁액으로부터 제거하는 단계; 및

[0021]

e) 선택적으로, 상기 나노입자 응집체를 수상으로부터 분리하는 단계를 포함하는, OPN 및 인산 칼슘에 의하여 형성된 나노입자 응집체의 제조방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022]

도 1a는 카리에스 모델 생물막에서 OPN의 세균과의 결합을 도시한다. 성장상 이후에, 생물막은 형광적으로 라벨링된 OPN과 함께 35°C에서 45 분 동안 배양되었다. 세균 염색이 이용되지 않았다고 하더라도, 세균, 특히 일련의 스트렙토코커스가 제조될 수 있다. OPN의 세균 표면에 대한 강한 친화도는 생물막을 향한 나노입자 응집체를 표적한다. 바(Bar) = 10 μm. 도 1b는 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체의 생체 내 성장한 치아 생물막과의 결합을 도시한다. 생물막은 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 중합체와 함께 35°C에서 30 분 동안 배양되고 C-SNARF-4로 염색되었다. OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체는 세균 생물막 주위로 빈틈없이 덩어리진다. 바 = 20 μm;

도 2는 세균 성장은 OPN에 의하여 영향 받지 않는다는 것을 도시한다. 스트렙토코커스 미티스(*S. mitis*) 및 악티노마이세스 나이슬룬디(*A. naeslundii*)는 THB 및 0.9 g/l OPN을 함유하는 THB에서 성장되었다. 세균 성장은 분광광도법에 의하여 모니터링되었다. 에리 바는 표준 편차를 나타낸다. OPN은 살균 또는 정균 효과를 갖지 않는 것으로 나타나 있다;

도 3은 크리스탈 바이올렛 염색에 의하여 측정된, 카리에스 모델에서 생물막 형성에 미치는 상이한 작용제들의 효과를 도시한다. OPN(HAP-OPN)을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체는 1000 nm 폴리스티렌 입자, 실리카 입자(150 nm, 500 nm 및 2000 nm), OPN이 없는 인산 칼슘 입자 응집체 및 0.9 g/l OPN과 비교하여 유동 세포 내에서 형성된 생물막의 양을 강하게 감소시킨다. 에리 바는 표준 편차를 나타낸다.

도 4는 OPN(HAP-OPN)을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체가 실리카 입자, 폴리스티렌 입자, 용액 내의 OPN 및 OPN이 없는 인산 칼슘 나노입자 응집체(HAP)보다 현저히 많은 크리스탈 바이올렛에 결합하는 것을 도시한다. OPN을 함유하는 나노입자 응집체의 부재 시에 형성된 생물막의 양의 크리스탈 바이올렛 정량화(도 3에 도시)는 유동 세포 내에서 형성된 생물막의 실제 양을 과대평가한다. 에리 바는 표준 편차를 나타낸다.

도 5는 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체는 카리에스 생물막 유동 세포 모델에서 성장한 생물막의 양을 감소시키는 것을 도시한다. 생물막은 C-SNARF-4로 염색되고, 공초점 현미경으로 영상되었다. A: 나노입자 응집체 없이 성장한 생물막. B: 성장하는 동안에 나노입자 중합체에 노출된 생물막. 바 = 20 μm;

도 6은 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체가 생체 내 구강 생물막의 성장을 강하게 감소시키는 것을 도시한다. A: 유리 슬랩 상에 성장한 생물막은 72 시간 동안 구강 내에서 유지되었다. 매일 5 내지 6 회 NaCl 적심(dip)(30 내지 60 분)이 수행되었다. B: 유리 슬랩 상에 성장한 생물막은 72 시간 동안 구강 내에서 유지되었다. 매일 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체로 5 내지 6 회 적심(30 내지 60 분)이 수행되었다. 양쪽

유리 슬랩들은 동시에 동일한 연구 피검자에 의하여 착용되었다. 바 = 20 μm ;

도 7a 내지 7e는 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체가 플랑크톤 배양물 내에서 성장하는 경우 카리에스 모델의 중에 의하여 생성된 산을 완충하는 것을 도시한다;

도 8a 내지 8e는 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체가 5 개 중 카리에스 모델에서 생물막에 의하여 생성된 산을 완충하는 것을 도시한다. 생물막은 글루코오스를 함유하는 THB 상에서의 성장이 완료된 이후에 나노입자 응집체와 함께 유일하게 배양되었다. 나노입자 응집체에 노출된 생물막에서, pH는 에나멜 용해에 대한 임계치인 5.5 미만으로 하강하지 않았다;

도 9는 CuK α 방사선을 이용하여 기록된 X-선 회절 패턴들을 도시한다. 개별 물질에 대한 회절 패턴들은 명료함을 위해 수직으로 이동되었다. 나노결정질 인회석 물질은 15 mg/ml의 첨가된 OPN의 양에 대하여 얻어진다. 이 농도를 초과하면, 다량의 무정형 물질이 관찰된다; 30 및 34 mg/ml에서 나노결정질 인회석에 해당하는 매우 작은 회절 피크들이 큰 무정형 배경 산란의 상단에서 관찰된다;

도 10은 도 9에서 X-선 회절 데이터의 리트벨트 정제(Rietveld refinement)로부터 추출된 평균 미소 결정 크기들을 도시한다. 나노결정의 형상은 인회석의 결정학적 c-축과 일치하는 긴 형태학적인 축이 있는 대략 바늘 형상인 것을 알게 되었다. 상단 패널은 모든 데이터에 대한 결과를 도시하는 반면에, 하단 패널은 매우 낮은 농도에서 관찰되는 미소 결정 크기에 미치는 현저한 효과를 보여준다; 12.5 및 15 mg/ml에 대하여 관찰된 미소 결정 크기의 증가는 아마도 혼합된 나노결정질/무정형 물질의 형성으로 인한 것이다;

도 11은 OPN의 첨가량의 함수로서 나노입자 응집체의 열중량 분석(TGA)을 도시한다. 데이터는 명료함을 위하여 세로좌표 축을 따라 이동되었다. 25 내지 200 $^{\circ}\text{C}$ 로부터 질량 손실은 물의 손실에 기인하는 반면에, 200 내지 550 $^{\circ}\text{C}$ 로부터의 손실은 유기 물질에 해당하며, 550 내지 1200 $^{\circ}\text{C}$ 로부터의 손실은 탄산염의 손실에 기인한다;

도 12는 도 11에서 TGA 데이터로부터 추출된 물, 유기물 및 탄산염의 질량 분율을 도시한다. 유기물 및 탄산염 질량은 건조 물질 질량(200 $^{\circ}\text{C}$ 에서 잔류 질량)으로 정규화되었다;

도 13은 OPN의 첨가량의 함수로서 나노입자 응집체의 FTIR 데이터를 도시한다. 데이터는 명료함을 위하여 세로좌표 축을 따라 이동되었다. OPN 농도가 증가함에 따라, 1300, 1550 및 1650 cm^{-1} 주위의 아미드 피크들의 세기가 증가하는데, 이는 더 많은 단백질이 고농도 합성에서 입자들과 연관된다는 것을 시사하는 것이다. 인산염(900 내지 1200 cm^{-1}), 탄산염(840 내지 890 cm^{-1}) 및 아미드(1595 내지 1720 cm^{-1})에 대한 특이적인 피크들이 관찰되며; 및

도 14는 인산염(900 내지 1200 cm^{-1}), 탄산염(840 내지 890 cm^{-1}) 및 아미드(1595 내지 1720 cm^{-1})에 대한 피크면적들의 비율로서 얻어진 IR 데이터로부터 유기물 및 탄산염 함량을 추정하는 것을 도시한다. 도 12에서 TGA에 의하여 얻어진 결과들과 양호하게 일치하는 것에 주목한다.

이제, 본 발명은 하기에서 더 상세히 설명될 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 상기에 언급된 바와 같이, 본 발명의 일 양태는 약제로서의 사용을 위한 a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.
- [0024] 따라서, 나노입자 응집체의 각각은 바람직하게는 OPN 및 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자 양쪽 모두를 함유한다.
- [0025] 칼슘은 바람직하게는 칼슘의 +2 산화 상태(Ca^{2+})로 존재한다. 유사하게도, 스트론튬은 바람직하게는 스트론튬의 +2 산화 상태(Sr^{2+})로 이용된다.
- [0026] 본 발명의 맥락에서, "Y 및/또는 X"라는 어구는 "Y" 또는 "X" 또는 "Y 및 X"를 의미한다. 동일한 논리 선상에서, " $n_1, n_2, \dots, n_{i-1}$, 및/또는 n_i "는 " n_1 " 또는 " n_2 " 또는 ... 또는 " n_{i-1} " 또는 " n_i " 또는 성분 $n_1, n_2, \dots, n_{i-1}$, 및 n_i 의 임의의 조합을 의미한다.
- [0027] 본원에 사용된 "오스테오폰틴" 또는 "OPN"이라는 용어는 자연적으로 발생하는 절편 또는 유절 내에서 단백질 분해적 절단(proteolytic cleavage)에 의하여 OPN으로부터 유도된 펩티드를 포함하는 유절으로부터 얻어진 오스테

오폴틴, 또는 WO 01/49741에서 제안된 방법으로부터 얻을 수 있는 바와 같은 유전자스플라이스(genesplice)-, 인산화- 또는 글리코실화 변이체를 의미한다. 유젓은 소, 인간, 쌍봉 낙타, 염소, 양, 단봉 낙타 및 라마와 같은 임의의 유젓 생산 동물로부터 나온 유젓일 수 있다. 그러나, 우유로부터 나온 OPN이 현재 이용 가능성으로 인하여 바람직하다. 전장 오스테오폴틴(fOPN)은 산성이고, 고도로 인산화되고, 시알산이 풍부한 칼슘 결합 단백질이다. fOPN는 물당 인산염 28 몰 및 Ca 약 50 몰과 결합한다. fOPN의 등전점은 약 3.0이다. 상기 단백질은 신체의 많은 조직에 존재하며 신호 및 조절 단백질로서 역할을 한다. 이는 생체석회화 과정에서 활성 단백질이다. OPN은 골 세포, 평활근 세포 및 상피 세포를 포함하는 수많은 세포 유형에 의하여 발현된다.

[0028] 모든 수량은 천연 우유 OPN에 기초하지만, 이의 활성 분을 또는 다른 소스로부터 나온 OPN의 해당 양으로 용이하게 보정될 수 있다. OPN 또는 이의 유도체도 재조합으로 제조될 수 있다.

[0029] OPN은 전장 소 OPN(예컨대, 스위스-생물정보학 연구소 승인번호(Swiss-Prot Accession No.) P31096의 17 내지 278 위치 또는 스위스-생물정보학 연구소 승인번호P31096의 17 내지 278 위치와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 펩티드)의 형태 및 전장 소 OPN(예컨대, 스위스-생물정보학 연구소 승인번호 P31096의 17 내지 163 위치 또는 스위스-생물정보학 연구소 승인번호P31096의 17 내지 163 위치와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 펩티드)의 긴 N-터미널 절편의 형태의 양쪽 모두의 형태로서, 우유 내에 존재한다, 예컨대, Bissonnette 등, Journal of Dairy Science Vol. 95 No. 2, 2012 참조.

[0030] 본 발명의 맥락에서, “서열 동일성”이라는 용어는 바람직하게는 동일한 길이의 두 개의 아미노산 서열들 사이 또는 동일한 길이의 두 개의 핵산 서열들 사이에 동일성의 정도의 정량적 척도에 관한 것이다.

[0031] 비교 대상인 두 개의 서열들이 동일한 길이가 아니면, 이들은 가능한 최선의 맞춤(fit)이 되도록 정렬되어야 한다. 서열 동일성은 하기와 같이 계산될 수 있다

[0032] $(N_{ref}-N_{dif})*100)/(N_{ref})$,

[0033] 여기서, N_{dif} 는 두 개의 서열들이 정렬되는 경우 두 개의 서열 내에 동일하지 않은 잔기들의 총 개수이고, N_{ref} 는 기준 서열들의 잔기들의 개수이다. 그러므로, DNA 서열 AGTCAGTC는 서열 AATCAATC와 75%의 서열 동일성을 가질 것이다($N_{dif}=2$ 및 $N_{ref}=8$). 겹은 특정 잔기(들)의 비-동일성으로 계산되는데, 즉, DNA 서열 AGTGTC는 DNA 서열 AGTCAGTC와 75%의 서열 동일성을 가질 것이다($N_{dif}=2$ 및 $N_{ref}=8$). 서열 동일성은 예를 들면, 미국 국립생물공학 정보센터(NCBI)에 의하여 제공된 BLASTp-알고리즘과 같은 적절한 BLAST-프로그램들을 이용하여 계산될 수 있다.

[0034] 예를 들면, 본 발명에서 이용된 OPN은 실질적으로 순수한 전장 OPN일 수 있고, 전장 OPN의 실질적으로 순수한 절편일 수 있으며, 전장 OPN 및 OPN의 하나 이상의 절편들을 포함하는 혼합물일 수 있다.

[0035] 본 발명에서 이용된 OPN은 실질적으로 순수한 전장 소 OPN일 수 있고, 전장 소 OPN의 실질적으로 순수한, 긴 N-터미널 절편일 수 있으며, 전장 소 OPN 및 전장 소 OPN의 긴 N-터미널 절편을 포함하는 혼합물일 수 있다. 그러한 혼합물은 예를 들면, OPN의 총량에 대하여 5 내지 40%(w/w)의 양으로 전장 소 OPN을 함유할 수 있고, OPN의 총량에 대하여 60 내지 95%(w/w)의 양으로 전장 소 OPN의 긴 n-터미널 절편을 함유할 수 있다.

[0036] 소 OPN은 통상적으로 우유 1 리터당 20 mg OPN의 농도로 이용 가능하다.

[0037] 소 OPN은 예컨대, 특허 출원 WO 01/497741 A2, WO 02/28413, WO 2012/117,119 또는 WO 2012/117,120에 의하여 기재된 바와 같이 pH 4.5에서 산성 유청으로부터 음이온 교환 크로마토그래피에 의하여 분리될 수 있다. 최대 90 내지 95%의 OPN 순도가 얻어질 수 있다.

[0038] 나노입자 응집체는 OPN에 더하여 다른 칼슘 결합 펩티드들을 함유할 수도 있다.

[0039] 나노입자 응집체는 OPN에 더하여, 페투인 A (FETUA)(스위스-생물정보학 연구소 승인번호 P02765), 프롤린-풍부 염기성 인단백질 4(PRB4)(스위스-생물정보학 연구소 승인번호 P1 0163), 매트릭스 Gla 단백질(MGP)(스위스-생물정보학 연구소 승인번호 P08493), 분비된 인단백질 24 (SPP-24)(스위스-생물정보학 연구소 승인번호 Q13103), 리보플라빈 결합 단백질(스위스-생물정보학 연구소 승인번호 P02752), 인테그린 결합 시알로인단백질 II(IBSP-II) (스위스-생물정보학 연구소 승인번호 P21815), 매트릭스 세포의 뼈 인당단백질(matrix extracellular bone phosphoglycoprotein; MEPE)(스위스-생물정보학 연구소 승인번호 Q9NQ76), 상아질 매트릭스 산성 인단백질 1(dentin matrix acidic phosphoprotein 1; OMP1)(스위스-생물정보학 연구소 승인번호 Q13316), 인간 베타-카제인, 소 베타-카제인, 및 이들의 동형 또는 포스포펩티드 절편으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 포스포펩티드들을 함유할 수 있다.

- [0040] 본 발명의 다른 양태는 생물막-관련 질병을 치유, 완화 및/또는 방지하기 위한 a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.
- [0041] 나노입자 응집체는 인간 피검자 또는 동물 피검자를 치료하기 위해 이용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 맥락에서, “생물막-관련 질병”이라는 용어는 인간 또는 동물 신체와 접촉하는 생물막에 의하여 적어도 부분적으로 유발된 질병에 관한 것이다. 생물막-관련 질병은 예를 들면, 세균 감염을 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 생물막-관련 질병은 구강 질병이다.
- [0044] 생물막-관련 질병은 예를 들면, 충치, 치은염 및/또는 치주염일 수 있다.
- [0045] 생물막-관련 질병은 치은염일 수 있다. 대안적으로, 생물막-관련 질병은 치주염이다. 생물막-관련 질병은 충치일 수도 있다.
- [0046] 본 발명의 일부 실시형태들에 있어서, 생물막-관련 질병은 세균성심내막염, 만성 상처 감염, 임플란트 감염, 중이염, 및 낭포성 섬유증 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 질병이다.
- [0047] 나노입자 응집체는 예컨대, 세균 감염, 예컨대, 세균 상처 감염을 치유, 완화 및/또는 방지하기 위한 것일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 양태는 예를 들면, 세균 감염을 치유, 완화 및/또는 방지하기 위한 나노입자 응집체에 관한 것일 수 있다.
- [0049] 세균 감염은 예를 들면, 치은염과 같은 구강 세균 감염일 수 있다. 따라서, 나노입자 응집체는 치은염을 치유, 완화 및/또는 방지하기 위한 것일 수 있다.
- [0050] 나노입자 응집체는 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 것일 수 있다.
- [0051] 예를 들면, 나노입자 응집체는 치태(dental plaque)의 형성을 감소시키거나 방지하기 위한 것일 수 있다.
- [0052] 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하는 것에 더하여, 또는 대안적으로, 나노입자 응집체는 예컨대, 치태와 같은 미생물 생물막을 제거하기 위한 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일 양태는 OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체의 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0054] 생물막은 세포들이 표면 상에서 서로 부착하는 미생물들의 군집이다. 이 부착성 세포들은 세포의 중합체 물질의 자가-생성된 매트릭스 내에 종종 박혀 있다.
- [0055] 본 발명의 다른 양태는 OPN 및 스트론튬/인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체의 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0056] 또 다른 양태는 OPN 및 인산 스트론튬을 포함하는 나노입자 응집체의 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0057] 또 다른 양태는 OPN 및 인산 스트론튬과 인산 칼슘의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체의 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0058] 다른 양태는 a) OPN 및 b) 인산 스트론튬, 인산 칼슘 및 이의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체의 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명의 맥락에서, 나노입자 응집체는 나노입자들의 집합들을 의미하는 것으로 해석되며, 상기 나노입자들은 교반 또는 저출력 초음파처리와 같은 기계적 자극 시에 서로 용이하게 분리되지 않는다. 일례로, OPN 나노입자들 및 인산 칼슘 나노입자들이 조합되어 나노입자 응집체를 형성한다.
- [0060] 다양한 크기들의 나노입자 응집체가 본 발명에서 이용될 수 있다. 본 발명의 일부 실시형태들에 있어서, 나노입자 응집체는 5 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 갖는다. 예를 들면, 나노입자 응집체는 2 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 나노입자 응집체는 예컨대, 1 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 대안적으로, 나노입자 응집체는 0.7 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 가질 수 있다.
- [0061] 더 작은 나노입자 응집체도 바람직할 수 있다. 따라서, 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 나노입자 응집체는 0.5 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 갖는다. 예를 들면, 나노입자 응집체는 0.4 마이크로미터 이하

의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 나노입자 응집체는 예컨대, 0.3 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 대안적으로, 나노입자 응집체는 0.1 마이크로미터 이하와 같이 0.2 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 가질 수 있다.

- [0062] 유체역학적 반경은 바람직하게는 동적 광 산란기(Dynamic Light Scatter; DLS)를 이용하여 측정된다.
- [0063] 통상적으로, 나노입자 응집체는 적어도 5nm, 및 바람직하게는 적어도 10 nm의 유체역학적 반경을 갖는다.
- [0064] 언급한 바와 같이, 제1 입자는 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함한다.
- [0065] 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 제1 입자는 칼슘을 포함한다.
- [0066] 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 제1 입자는 스트론튬을 포함한다.
- [0067] 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 제1 입자는 칼슘 및 스트론튬을 포함한다.
- [0068] 제1 입자는 예컨대, 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 염을 포함하거나 심지어 이로 구성될 수 있다.
- [0069] 제1 입자는 제1 입자의 총 중량에 대하여 칼슘 및/또는 스트론튬의 염을 적어도 50%(w/w)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 제1 입자는 칼슘 및/또는 스트론튬의 염의 적어도 70%(w/w)를 포함할 수 있다. 제1 입자는 예컨대, 칼슘 및/또는 스트론튬의 염의 적어도 80%(w/w)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 제1 입자는 적어도 95%(w/w)와 같이, 칼슘 및/또는 스트론튬의 염의 적어도 90%(w/w)를 포함할 수 있다.
- [0070] 염은 칼슘 및/또는 스트론튬 및 예컨대, 음이온성 유기 중합체의 형태의 적절한 유기 음이온을 함유하는 유기염일 수 있다.
- [0071] 대안적으로, 염은 칼슘 및/또는 스트론튬 및 적절한 무기 음이온을 함유하는 무기염일 수 있다. 그러한 무기 음이온들의 비한정 예는 인산염 중, 황산염, 탄산염 또는 이의 혼합물이다. 따라서, 무기염은 인산염 중, 황산염 및/또는 탄산염을 포함할 수 있다.
- [0072] 인산염 중은 예를 들면, 인산염(PO_4^{3-}), 일수소 인산염(HPO_4^{2-}), 피로인산염 또는 이인산염($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$)일 수 있다. 인산염 중은 인산염(PO_4^{3-}), 또는 대안적으로 인산염(PO_4^{3-}) 및 일수소 인산염(HPO_4^{2-})의 조합이 현재 바람직하다.
- [0073] 따라서, 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 제1 입자는 칼슘 및/또는 스트론튬의 무기염을 포함하거나 심지어 이로 구성될 수 있다.
- [0074] 바람직하게는, 제1 입자는 제1 입자의 총 중량에 대하여 칼슘 및/또는 스트론튬의 무기염을 적어도 50%(w/w)를 포함한다. 예를 들면, 제1 입자는 칼슘 및/또는 스트론튬의 무기염의 적어도 70%(w/w)를 포함할 수 있다. 제1 입자는 예컨대, 칼슘 및/또는 스트론튬의 무기염의 적어도 80%(w/w)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 제1 입자는 적어도 95%(w/w)와 같이, 칼슘 및/또는 스트론튬의 무기염의 적어도 90%(w/w)를 포함할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 제1 입자는 칼슘 및 스트론튬을 방출할 수 있다. 이러한 칼슘 및/또는 스트론튬의 방출은 바람직하게는 나노입자 응집체가 생물막과 접촉하거나 이에 근접한 경우에 발생한다. 예를 들면, 나노입자 응집체는 바람직하게는 예컨대, 타액 또는 구강 생물막과 같은 구강의 액체막에 존재하는 경우 칼슘 및/또는 스트론튬을 방출할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 일부 현재 바람직한 실시형태들에 있어서, 제1 입자는 나노입자이다, 즉, 제1 입자는 1 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 갖는다. 예를 들면, 제1 입자의 유체역학적 반경은 0.8 마이크로미터 이하일 수 있다. 제1 입자의 유체역학적 반경은 예컨대, 0.6 마이크로미터 이하일 수 있다. 대안적으로, 제1 입자의 유체역학적 반경은 0.4 마이크로미터 이하일 수 있다.
- [0077] 심지어 더 작은 입자들이 바람직할 수 있어서, 제1 입자는 0.2 마이크로미터 이하의 유체역학적 반경을 가질 수 있다. 예를 들면, 제1 입자의 유체역학적 반경은 0.1 마이크로미터 이하일 수 있다. 제1 입자의 유체역학적 반경은 예컨대, 0.05 마이크로미터 이하일 수 있다. 대안적으로, 제1 입자의 유체역학적 반경은 0.01 마이크로미터 이하일 수 있다.
- [0078] 통상적으로, 제1 입자의 유체역학적 반경은 적어도 3 nm이고, 바람직하게는 적어도 5 nm이다.
- [0079] 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 나노입자 응집체의 적어도 일부는 하나 이상의 OPN 분자들이 결합되어 있는 단일한 제1 입자를 함유한다. 나노입자 응집체의 제1 입자는 예를 들면, OPN의 단층에 의하여 둘러

싸일 수 있다. 그러한 나노입자 응집체의 예는 Holt 등(FEBS Journal; vol. 276; 2308 내지 2323 페이지; 2009)에서 찾을 수 있다.

[0080] 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 나노입자 응집체의 적어도 일부는 제1 입자와 동일한 유형의 제2 입자 및 아마도 심지어 다른 입자들을 포함한다. 그러므로, 그러한 나노입자 응집체는 복수의 OPN 분자들에 더하여 칼슘 및/또는 스트론튬을 함유하는 복수의 입자들을 각각 함유하는 더 복잡한 구조이다.

[0081] 본 발명의 일부 바람직한 실시형태들에 있어서, 제1 입자는 인산 칼슘을 포함하거나 심지어 이로 필수적으로 구성될 수 있다. 예를 들면, 제1 입자는 제1 입자의 중량에 대하여 적어도 50%(w/w)의 인산 칼슘의 총량을 포함할 수 있다. 제1 입자는 예컨대, 적어도 70%(w/w) 또는 심지어 적어도 80%(w/w)와 같이, 제1 입자의 중량에 대하여 적어도 60%(w/w)의 인산 칼슘의 총량을 포함할 수 있다. 대안적으로, 제1 입자는 제1 입자의 중량에 대하여 적어도 90%(w/w)의 인산 칼슘의 총량을 포함할 수 있다. 제1 입자의 잔류분은 예컨대, 제1 입자를 제조하는데 이용되는 칼슘 및 인산염의 소스들로부터 나온 불순물들일 수 있다.

[0082] 제1 입자는 예컨대, 하기 화학양론식을 가질 수 있다:

[0083] $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO₃), (SO₄), (HSO₄), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10이며; (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 2.5를 초과한다.

[0084] 본 발명의 다른 양태는 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체로서; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO₃), (SO₄), (HSO₄), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 2.5를 초과하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.

[0085] 본 발명의 맥락에서, '공격자점'이라는 용어는 미네랄 내에서 점 결함의 유형으로서 이해된다. 미네랄 크리스탈은 본질적으로 '결정질 결함'이라고 종종 지칭되는 불완전성을 소지한다. 원자가 격자 부위들 중 하나로부터 결여된 결함은 '공격자점' 결함으로 알려져 있다.

[0086] 일 실시형태에 있어서, A'은 Ca이다.

[0087] 다른 실시형태에 있어서, A'은 Sr이다.

[0088] 또 다른 실시형태에 있어서, A'은 Ca 및 Sr의 혼합물이다.

[0089] 일 실시형태에 있어서, A는 Na, K, Rb, Cs, Mg, Zn, Ba, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0090] 다른 실시형태에 있어서, A는 Na, K, Mg, Zn, Ba, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0091] 또 다른 실시형태에 있어서, A는 Na, K, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0092] 또 다른 실시형태에 있어서, B는 (CO₃), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0093] 또 다른 실시형태에 있어서, C는 F, Cl, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0094] 일 실시형태에 있어서, (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 5 초과와 같이, 10 초과와 같이, 15 초과와 같이, 20 초과와 같이, 25 초과와 같이, 30 초과와 같이, 35 초과와 같이, 40 초과와 같이, 45 초과와 같이, 50 초과와 같이, 100 초과와 같이, 200 초과와 같이, 300 초과와 같이, 400 초과와 같이, 500 초과와 같이, 1000 초과와 같이, 10,000 초과와 같이, 20,000 초과와 같이, 50,000 초과와 같이, 100,000 초과와 같이 2.5 초과이다.

[0095] 또 다른 실시형태에 있어서, A'는 Ca 및 Sr의 혼합물이며; 여기서, Ca 및 Sr 사이의 비율은 1:900 내지 900:1,

예컨대, 1:850 또는 850:1의 범위 내에서와 같이, 1:800 내지 800:1, 예컨대, 1:750 또는 750:1의 범위 내에서와 같이, 1:700 내지 700:1, 예컨대, 1:650 또는 650:1의 범위 내에서와 같이, 1:600 내지 600:1, 예컨대, 1:550 또는 550:1의 범위 내에서와 같이, 1:500 내지 500:1, 예컨대, 1:450 또는 450:1의 범위 내에서와 같이, 1:400 내지 400:1, 예컨대, 1:350 또는 350:1의 범위 내에서와 같이, 1:300 내지 300:1, 예컨대, 1:250 또는 250:1의 범위 내에서와 같이, 1:200 내지 200:1, 예컨대, 1:150 또는 150:1의 범위 내에서와 같이, 1:100 내지 100:1, 예컨대, 1:75 또는 75:1의 범위 내에서와 같이, 1:50 내지 50:1, 예컨대, 1:25 또는 25:1의 범위 내에서와 같이, 1:15 내지 15:1, 예컨대, 1:10 또는 10:1의 범위 내에서와 같이, 1:5 내지 5:1, 예컨대, 1:5 또는 5:1의 범위 내에서와 같이, 1:2.5 내지 2.5:1, 예컨대, 1:2.5 또는 2.5:1, 예컨대, 1:1의 범위 내에서와 같이, 1:1000 내지 1000:1의 범위 내에 있다.

[0096] 일 실시형태에 있어서, X는 0 내지 8의 범위 내와 같이, 0 내지 7의 범위 내와 같이, 0 내지 6의 범위 내와 같이, 0 내지 5의 범위 내와 같이, 0 내지 4의 범위 내와 같이, 0 내지 3의 범위 내와 같이, 0 내지 2의 범위 내와 같이, 0 내지 1의 범위 내와 같이 0 내지 9의 범위 내에 있다.

[0097] 다른 실시형태에 있어서, X는 0.1 내지 9.0, 예컨대 0.2의 범위 내와 같이, 0.3 내지 8.5, 예컨대, 0.4의 범위 내와 같이, 0.5 내지 8.0, 예컨대, 0.6의 범위 내와 같이, 0.7 내지 7.5, 예컨대, 0.8의 범위 내와 같이, 0.9 내지 7.0, 예컨대, 1.0의 범위 내와 같이, 1.1 내지 6.5, 예컨대, 1.2의 범위 내와 같이, 1.3 내지 6.0, 예컨대, 1.4의 범위 내와 같이, 1.5 내지 5.5, 예컨대, 1.6의 범위 내와 같이, 1.7 내지 5.0, 예컨대, 1.8의 범위 내와 같이, 1.9 내지 4.5, 예컨대, 2.0의 범위 내와 같이, 2.1 내지 4.0, 예컨대, 2.2의 범위 내와 같이, 2.3 내지 3.5, 예컨대, 2.4의 범위 내와 같이, 2.5 내지 3.5, 예컨대, 3.0의 범위 내와 같이, 0 내지 9.5의 범위 내에 있다.

[0098] 일 실시형태에 있어서, Y는 0 내지 4의 범위 내와 같이, 0 내지 3의 범위 내와 같이, 0 내지 2의 범위 내와 같이, 0 내지 1의 범위 내와 같이, 0 내지 5의 범위 내에 있다.

[0099] 다른 실시형태에 있어서, Y는 0.1 내지 4.0, 예컨대 0.2의 범위 내와 같이, 0.3 내지 4.0, 예컨대, 0.4의 범위 내와 같이, 0.4 내지 4.0, 예컨대, 0.5의 범위 내와 같이, 0.6 내지 4.0, 예컨대, 0.7의 범위 내와 같이, 0.8 내지 4.0, 예컨대, 0.9의 범위 내와 같이, 1.0 내지 3.5, 예컨대, 1.2의 범위 내와 같이, 1.3 내지 3.5, 예컨대, 1.4의 범위 내와 같이, 1.5 내지 3.5, 예컨대, 1.6의 범위 내와 같이, 1.7 내지 3.5, 예컨대, 1.8의 범위 내와 같이, 1.9 내지 3.5, 예컨대, 2.0의 범위 내와 같이, 2.1 내지 3.0, 예컨대, 2.2의 범위 내와 같이, 2.3 내지 3.0, 예컨대, 2.4의 범위 내와 같이, 2.5 내지 3.0의 범위 내와 같이, 0 내지 4.5의 범위 내에 있다.

[0100] 일 실시형태에 있어서, Z는 0 내지 1의 범위 내와 같이 0 내지 2의 범위 내에 있다.

[0101] 일 실시형태에 있어서, Z는 0.1 내지 1.9, 예컨대, 0.2의 범위 내와 같이, 0.3 내지 1.9, 예컨대, 0.4의 범위 내와 같이, 0.5 내지 1.9, 예컨대, 0.6의 범위 내와 같이, 0.7 내지 1.9, 예컨대, 0.8의 범위 내와 같이, 0.9 내지 1.9, 예컨대, 1.0의 범위 내와 같이, 1.0 내지 1.8, 예컨대, 1.1의 범위 내와 같이, 1.2 내지 1.7, 예컨대, 1.3의 범위 내와 같이, 1.4 내지 1.6, 예컨대, 1.5의 범위 내와 같이, 0 내지 1.9의 범위 내에 있다.

[0102] 일 실시형태에 있어서, B는 (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0103] 또 다른 실시형태에 있어서, A는 Na, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0104] 또 다른 실시형태에 있어서, B는 (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며; 그리고 A는 Na, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0105] 또 다른 실시형태에 있어서, B는 (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며; 그리고 A는 K, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0106] 일 실시형태에 있어서, m은 1×10^{-10} 내지 0.20의 범위 내와 같이, 예컨대, 1×10^{-10} 내지 0.15의 범위 내와 같이, 1×10^{-10} 내지 0.10의 범위 내와 같이, 예컨대, 1×10^{-10} 내지 0.09의 범위 내와 같이, 1×10^{-10} 내지 0.08의 범위 내와 같이, 예컨대, 1×10^{-10} 내지 0.07의 범위 내와 같이, 1×10^{-10} 내지 0.06의 범위 내와 같이, 예컨대, 1×10^{-10} 내지 0.05의 범위 내와 같이, 1×10^{-10} 내지 0.04의 범위 내와 같이, 예컨대, 1×10^{-10} 내지 0.03의 범위 내와 같이, 1×10^{-10} 내지 0.02의 범위 내와 같이, 예컨대, 1×10^{-10} 내지 0.01의 범위 내와 같이, 1×10^{-10} 내지 0.25의 범위 내

에 있다.

- [0107] 일 실시형태에 있어서, m 은 1×10^{-9} 내지 0.20의 범위 내와 같이, 예컨대, 1×10^{-8} 내지 0.15의 범위 내와 같이, 1×10^{-7} 내지 0.10의 범위 내와 같이, 예컨대, 1×10^{-6} 내지 0.09의 범위 내와 같이, 1×10^{-5} 내지 0.08의 범위 내와 같이, 예컨대, 1×10^{-4} 내지 0.07의 범위 내와 같이, 0.001 내지 0.06의 범위 내와 같이, 예컨대, 0.002 내지 0.05의 범위 내와 같이, 0.003 내지 0.04의 범위 내와 같이, 예컨대, 0.005 내지 0.03의 범위 내와 같이, 0.006 내지 0.02의 범위 내와 같이, 예컨대, 0.007 내지 0.01의 범위 내와 같이, 1×10^{-10} 내지 0.30의 범위 내에 있다.
- [0108] 또 다른 실시형태에 있어서, m 은 0.00016 내지 0.009와 같이, 0.0009 내지 0.0035와 같이, 0.0018 내지 0.003과 같이, 0.00016 내지 0.011의 범위 내에 있다.
- [0109] 다른 실시형태에 있어서, n 은 0.01 내지 100, 예컨대, 0.05, 0.1 내지 90, 예컨대, 0.2의 범위 내와 같이, 0.3 내지 85, 예컨대, 0.4의 범위 내와 같이, 0.5 내지 80, 예컨대, 0.6의 범위 내와 같이, 0.7 내지 75, 예컨대, 0.8의 범위 내와 같이, 0.9 내지 70, 예컨대, 1.0의 범위 내와 같이, 1.2 내지 65, 예컨대, 1.4의 범위 내와 같이, 1.6 내지 60, 예컨대, 1.8의 범위 내와 같이, 2.0 내지 55, 예컨대, 2.2의 범위 내와 같이, 2.4 내지 50, 예컨대, 2.4의 범위 내와 같이, 2.6 내지 45, 예컨대, 2.8의 범위 내와 같이, 3.0 내지 40, 예컨대, 3.2의 범위 내와 같이, 3.4 내지 35, 예컨대, 3.6의 범위 내와 같이, 3.8 내지 30, 예컨대, 4.0의 범위 내와 같이, 4.2 내지 25, 예컨대, 4.4의 범위 내와 같이, 4.6 내지 20, 예컨대, 4.8의 범위 내와 같이, 5.0 내지 15, 예컨대, 5.2의 범위 내와 같이, 5.4 내지 14, 예컨대, 5.6의 범위 내와 같이, 5.8 내지 13, 예컨대, 6.0의 범위 내와 같이, 6.2 내지 12, 예컨대, 6.4의 범위 내와 같이, 6.6 내지 11, 예컨대, 6.8의 범위 내와 같이, 7.0 내지 10, 예컨대, 7.2의 범위 내와 같이, 7.4 내지 9, 예컨대, 7.6, 7.8 내지 8.8, 예컨대, 8.0의 범위 내와 같이, 0 내지 100의 범위 내에 있다.
- [0110] 본 발명의 또 다른 양태는 약제로서의 사용을 위한 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체로서; 여기서 A' 는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A 는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, $X=0$ 내지 9이고; B 는 (CO_3) , (SO_4) , (HSO_4) , (HPO_4) , (H_2PO_4) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, $Y=0$ 내지 5이고; C 는 F, Cl, Br, I, (CO_3) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, $Z=0$ 내지 2이고; $n=0$ 내지 10 및 $m>0$ 이며; (PO_4) 및 (HPO_4) 사이의 몰비는 2.5를 초과하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.
- [0111] 본 발명의 또 다른 양태는 세균 감염을 치유, 완화 또는 방지 하기 위한 약제로서의 사용을 위한 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체로서; 여기서 A' 는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A 는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, $X=0$ 내지 9이고; B 는 (CO_3) , (SO_4) , (HSO_4) , (HPO_4) , (H_2PO_4) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, $Y=0$ 내지 5이고; C 는 F, Cl, Br, I, (CO_3) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, $Z=0$ 내지 2이고; $n=0$ 내지 10 및 $m>0$ 이며; (PO_4) 및 (HPO_4) 사이의 몰비는 2.5를 초과하는 나노입자 응집체에 관한 것이다.
- [0112] 일 실시형태에 있어서, A 는 Zn, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0113] 다른 실시형태에 있어서, B 는 (CO_3) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0114] 또 다른 실시형태에 있어서, C 는 F, H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0115] 또 다른 실시형태에 있어서, A 는 Na, H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, $X=0$ 내지 9이고; B 는 (CO_3) 이며, $Y=0$ 내지 5이고; C 는 H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, $Z=0$ 내지 2이고; $n=0$ 내지 10 및 $m>0$ 이다.
- [0116] 일 실시형태에 있어서, A 는 Na, H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, $X=0$ 내지 2이

고; B는 (CO_3) 이며, Y=0 내지 1이고; C는 H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 $m>0$ 이다.

[0117] 일 실시형태에 있어서, A는 Na, Zn, H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO_3) , (HPO_4) , (H_2PO_4) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, (CO_3) , H_2O , 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 $m>0$ 이며; (PO_4) 및 (HPO_4) 사이의 몰비는 2.5를 초과한다.

[0118] 다른 실시형태에 있어서, 나노입자 응집체는 무정형이다. 제1 입자는 예를 들면, 실질적으로 무정형일 수 있다.

[0119] 대안적으로, 제1 입자는 실질적으로 결정질일 수 있다.

[0120] 또 다른 실시형태에 있어서, 나노입자 응집체는 히드록실 인회석의 X-선 회절 패턴과 매칭되는 결정질 물질을 함유한다.

[0121] 본 발명의 맥락에서, ‘나노결정질’이라는 용어는 나노결정의 적어도 하나의 수치가 100 nm 미만인 결정질 물질로 이해된다.

[0122] 또 다른 실시형태에 있어서, 나노입자 응집체는 히드록실 인회석의 X-선 회절 패턴과 매칭되는 결정질 물질을 함유하고, 상기 결정질 물질은 나노결정질이다.

[0123] 일 실시형태에 있어서, 나노입자 응집체는 히드록실 인회석의 X-선 회절 패턴과 매칭되는 결정질 물질을 함유하고, 상기 결정질 물질은 나노결정질이며; 상기 나노결정은 미소 결정의 최대 형태학적인 축과 일치하는 결정학적 c-축이 있는 이방성의 미소 결정 크기를 갖는다.

[0124] 다른 실시형태에 있어서, 나노입자 응집체는 히드록실 인회석의 X-선 회절 패턴과 매칭되는 결정질 물질을 함유하고, 상기 결정질 물질은 나노결정의 적어도 하나의 수치가 80 nm 미만, 예컨대, 70 nm 미만과 같이, 60 nm 미만, 예컨대, 50 nm 미만과 같이, 40 nm 미만, 예컨대, 30 nm 미만과 같이, 20 nm 미만, 예컨대, 10 nm 미만과 같이 90 nm 미만이라는 의미에서 나노결정질이다.

[0125] 본 발명자들은 본 나노입자 응집체가 OPN-결합 세균의 하나 이상의 종들을 함유하는 생물막을 방지하거나 불안정하게 하는데 특히 적합하다는 시사를 관찰하였다.

[0126] 본 발명의 일부 실시형태들에 있어서, 생물막은 세포당 적어도 50 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유한다. 예를 들면, 생물막은 세포당 적어도 100 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유할 수 있다. 생물막은 예컨대, 세포당 적어도 200 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유할 수 있다. 대안적으로, 생물막은 세포당 적어도 400 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유할 수 있다.

[0127] 세균종의 OPN 결합 능력은 우유로부터 단리된 전장 OPN을 이용하여 Ryden 등, Eur. J. Biochem., 184, 331-336 (1989)에 따라 측정된다.

[0128] 본 발명의 일부 실시형태들에 있어서, 생물막은 세포당 적어도 800 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유한다. 예를 들면, 생물막은 세포당 적어도 2,000 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유할 수 있다. 생물막은 예컨대, 세포당 적어도 10,000 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유할 수 있다. 대안적으로, 생물막은 예컨대, 세포당 적어도 100,000 개의 OPN 분자들 또는 심지어 세포당 적어도 500,000 개의 OPN 분자들과 같이 세포당 적어도 50,000 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유할 수 있다.

[0129] 생물막은 예컨대, 세포당 적어도 1,000,000 개의 OPN 분자들의 OPN 결합 능력을 갖는 세균을 함유할 수 있다.

[0130] 예를 들면, 생물막은 스트렙토코커스 종(*Streptococcus spp.*), 스테필로코커스 종(*Staphylococcus spp.*), 슈도모나스 종(*Pseudomonas spp.*), 악티노마이세스 종(*Actinomyces spp.*), 락토바실러스 종(*Lactobacillus spp.*), 아그레가티박터 종(*Aggregatibacter spp.*), 박테로이데스 종(*Bacteroides spp.*), 리스테리아 종(*Listeria spp.*), 캄필로박터 종(*Campylobacter spp.*), 아이케넬라 종(*Eikenella spp.*), 포르피로모나스 종(*Porphyromonas spp.*), 프레보텔라 종(*Prevotella spp.*), 트레포네마 종(*Treponema spp.*) 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세균을 함유하거나 심지어 이로 이루어질 수 있다.

- [0131] 치은염의 경우, 생물막은 통상적으로 *아그레가티박터 악티노마이세템코미탄스*(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), *박테로이데스 포르시투스*(*Bacteroides forsythus*), *캠필로박터 렉투스*(*Campylobacter rectus*), *아이케넬라 코로덴스*(*Eikenella corrodens*), *포르피로모나스 진지발리스*(*Porphyromonas gingivalis*), *프레보텔라 인터메디아*(*Prevotella intermedia*), *프레보텔라 니그레스센스*(*Prevotella nigrescens*), 및/또는 *트레포네마 덴티콜라*(*Treponema denticola*) 세균 중 하나 이상을 함유한다.
- [0132] 충치의 경우, 생물막은 통상적으로 *스트렙토코커스 오랄리스*(*Streptococcus oralis*), *스트렙토코커스 다우네이*(*Streptococcus downei*), *스트렙토코커스 미티스*(*Streptococcus mitis*), *스트렙토코커스 생귀니스*(*Streptococcus sanguinis*) 및 *악티노마이세스 나이슬런디*(*Actinomyces naeslundii*) 세균 중 하나 이상을 함유한다.
- [0133] 생물막은 OPN-결합 세균에 더하여 OPN에 전혀 결합하지 않거나 낮은 결합을 갖는 세균을 더 함유할 수 있다.
- [0134] 일 양태는 OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체의 *스트렙토코커스* 종 및/또는 *악티노마이세스* 종에 의하여 형성된 세균성 생물막을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0135] 본 발명의 또 다른 양태는 OPN 및 인산 스트론튬/칼슘을 포함하는 나노입자 응집체의 *스트렙토코커스* 종 및/또는 *악티노마이세스* 종에 의하여 형성된 세균성 생물막을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0136] 또 다른 양태는 OPN 및 인산 스트론튬을 포함하는 나노입자 응집체의 *스트렙토코커스* 종 및/또는 *악티노마이세스* 종에 의하여 형성된 세균성 생물막을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0137] 또 다른 양태는 OPN 및 인산 스트론튬과 인산 칼슘의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체의 *스트렙토코커스* 종 및/또는 *악티노마이세스* 종에 의하여 형성된 세균성 생물막을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0138] 다른 양태는 a) OPN 및 b) 인산 스트론튬, 인산 칼슘 및 이의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체의 *스트렙토코커스* 종 및/또는 *악티노마이세스* 종에 의하여 형성된 세균성 생물막을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0139] 또 다른 양태는 OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체의 *스트렙토코커스* 종 및/또는 *악티노마이세스* 종의 세균성 부착을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0140] 치아 생물막(플라크)의 형성, 세균성 생성물에 의한 치아의 염색, 치석(타르타르) 충치의 형성, 근관(root canal) 감염 및 치주병과 같이 치료적으로뿐만 아니라 표면적으로 치아의 관리와 연계하여 많은 문제점들이 발생한다.
- [0141] 치태는 구강 내의 딱딱한 조직(치아) 상에 축적되는 복잡한 생물막이다. 치아 생물막이 500 가지를 초과하는 세균성 종들을 함유한다고 해도, 콜로니화는 에나멜 타액 피막(enamel salivary pellicle)에 최초 이주종(colonizer)의 부착이 있는 조직화된(regimented) 패턴을 따르며, 이후 세균성 공-부착을 통해 2차 콜로니화가 있다. 일련의 *스트렙토코커스* 종 및 *악티노마이세스* 종은 초기 이식종들에 속한다는 것은 주지의 사실이다. 그러므로, 이러한 세균의 접촉 및 뒤이은 생물막 형성을 조절하는 것은 중요하다. 다양한 부착인자들 및 수용체들이 타액-코팅된 표면에 세균성 부착, 세균성 공응집(coaggregation), 세균-매트릭스 상호작용에 관련되고, 생물막 전개에 기여하여 궁극적으로는 카리에스, 근관 감염 및 치주병과 같은 질병들에 기여한다.
- [0142] 일 양태는 OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체의 구강 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0143] 나노입자 응집체가 구강 생물막을 치료, 방지 또는 감소시키는데 이용되는 경우, 구강으로 투여되는 것이 바람직하다. 또한, 나노입자 응집체는 구강 투여에 적합한 제형으로 존재하는 것이 바람직하다.
- [0144] 본 발명의 다른 양태는 OPN 및 인산 스트론튬/칼슘을 포함하는 나노입자 응집체의 구강 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0145] 또 다른 양태는 OPN 및 인산 스트론튬을 포함하는 나노입자 응집체의 구강 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0146] 또 다른 양태는 OPN 및 인산 스트론튬과 인산 칼슘의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체의 구강 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0147] 다른 양태는 a) OPN 및 b) 인산 스트론튬, 인산 칼슘 및 이의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체의 구강 생물

막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.

- [0148] 다른 양태는 a) OPN 및 b) 인산 스트론튬, 인산 칼슘 및 이의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체의 구강 생물막 부착을 감소시키거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0149] 일 실시형태에 있어서, OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체는 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 가지며; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO₃), (SO₄), (HSO₄), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 2.5를 초과한다.
- [0150] 본 발명의 다른 양태는 동물 또는 인간 피검자의 생물막-관련 질병을, 본원에 정의된 나노입자 응집체를 피검자에게 투여함으로써 완화시키고/거나 방지하기 위한 치유 방법에 관한 것이다.
- [0151] 본 발명의 일 양태는 본원에 정의된 나노입자 응집체의 구취를 감소시키고, 제거하고/하거나 방지하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0152] 본 발명의 추가적인 양태는 동물 또는 인간 피검자 내에서 또는 상에서 미생물 생물막 성장을, 본원에 정의된 나노입자 응집체를 피검자에게 투여함으로써 감소시키거나 방지하는 방법에 관한 것이다.
- [0153] 상기 언급된 바와 같이, 치료되고, 감소되거나 방지될 대상인 생물막은 예컨대, 나노입자 응집체의 구강 투여가 바람직한 경우에서, 구강 생물막일 수 있다.
- [0154] 동물 피검자는 예컨대, 가축화된(domesticated) 포유류, 가축화된 어류 또는 가축화된 조류와 같은 가축화된 동물일 수 있다.
- [0155] 본 발명의 추가적인 양태는 동물 또는 인간 피검자의 구취를, 본원에 정의된 나노입자 응집체를 피검자에게 투여함으로써 감소시키고, 제거하고/하거나 방지하는 방법에 관한 것이다. 나노입자 응집체는 바람직하게는 구강으로 투여된다.
- [0156] 또한, 본 발명의 일 양태는 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하기 위한 a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 나노입자 응집체의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 일부 실시형태들에 있어서, 이 용도는 요법에 의한 인간 또는 동물 신체의 치료가 아님을 요구한다.
- [0157] 생물막은 이론적으로 본원에 언급된 생물막들중 어느 하나일 수 있으며, 예를 들면, 하기의 세균들 중 하나 이상을 함유할 수 있다: *스트렙토코커스* 종, *스테필로코커스* 종, *슈도모나스* 종, *악티노마이세스* 종, *락토바실러스* 종, *아그레가티박터* 종, *박테로이데스* 종, *리스테리아* 종, *캠필로박터* 종, *아이케렐라* 종, *포르피로모나스* 종, *프레보텔라* 종, *트레포네마* 종.
- [0158] 그러나, 본 발명의 일부 실시형태들에 있어서, 상기 용도는 요법에 의한 인간 또는 동물 신체의 치료가 아니다. 생물막은 예를 들면, 살아있는 인간 또는 살아있는 동물과 접촉되지 않는 생물막일 수 있다.
- [0159] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 정의된 나노입자 응집체를 포함하는 치아 제형에 관한 것이다.
- [0160] 치아 제형은 예를 들면, 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체를 포함하며; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO₃), (SO₄), (HSO₄), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 2.5를 초과한다.
- [0161] 치아 제형은 예를 들면, 치분, 치아 겔, 치아 바니쉬, 치아 구강 세정제, 구강 스프레이 또는 씹임 검과 같은 구강 위생에 적절한 임의의 크림 치약(dentifrice) 또는 관련 제품일 수 있다.
- [0162] 일 실시형태에 있어서, 치아 제형은 치약, 치분, 치아 겔, 치아 바니쉬, 치아 구강 세정제, 구강 스프레이 또는

휴입 검의 형태이다.

[0163] WO 2005/053,628에 개시된 바와 같이, 오스테오폰틴의 양은 주로 치아 제형 1 kg 당 약 50 mg OPN 및 약 1500 mg 오스테오폰틴 사이에 있으며, 이보다 더 적은 양도 효과를 가질 것이다. 더 많은 양이 이용될 수 있지만, 효과는 필수적으로 증가되지 않을 것이다. 유용한 양은 1 kg 당 100 내지 1000 mg OPN, 바람직하게는 200 내지 500 mg, 및 가장 바람직하게는 약 300 mg이다. 더 많은 양은 아마도 더 양호한 결과를 제공하지 않을 것이므로, 추천되지 않는데, 이는 OPN은 다소간 비싼 성분이기 때문이다. 놀랍게도, OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체는 본 발명의 발명자들에 의하여 미생물 생물막 성장을 감소시키거나 방지하는데 상승 효과를 갖는 것으로 보였다. 그러므로, 본 발명은 치아 제형 1 kg 당 오스테오폰틴의 유효량을 감소시킨다.

[0164] 본 발명의 맥락에서, “구강 생물막 성장”이라는 용어는 구강의 딱딱한 조직 및 부드러운 조직(구강 점막, 혀, 치아 표면) 상의 생물막 성장 및 구강 내에 삽입된 물질(임플란트, 교정용 브라켓 및 충전재, 치관 및 틀니와 같은 수복재) 상의 생물막 성장을 의미한다.

[0165] 대상 발명의 바람직한 조성물은 이미 언급된 바와 같이 치약, 치아 바니쉬, 치아-겔 및 치분의 형태이다. 그러한 치약 및 치아-겔의 성분은 하기의 성분들 중 하나 이상을 포함한다: 치과용 연마제(약 10% 내지 약 50%), 계면활성제(약 0.5% 내지 약 10%), 증점제(약 0.04% 내지 약 0.5%), 습윤제(약 0.1% 내지 약 3%), 향미제(약 0.04% 내지 약 2%), 감미제(0.1% 내지 약 3%), 착색제(약 0.01% 내지 약 0.5%) 및 물(2% 내지 45%).

[0166] 달리 언급되지 않으면, 본 발명의 조성물 또는 생성물의 일부를 형성하는 성분들의 백분율은 조성물 또는 생성물의 총 중량에 대한 퍼센트 중량이다.

[0167] 카리에스 조절제는 OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체 0.001% 내지 약 1%를 함유할 수 있다. 항-치석제는 OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체 약 0.1 % 내지 약 13 %를 함유할 수 있다.

[0168] 물론 치분은 실질적으로 모든 액체 성분이 없다.

[0169] 대상 발명의 다른 바람직한 조성물은 구강 스프레이를 포함하는 치아 구강 세정제이다. 그러한 구강 세정제 및 구강 스프레이의 성분은 통상적으로 하기의 성분들 중 하나 이상을 포함한다: 물(약 45% 내지 약 95%), 에탄올(약 0% 내지 약 25%), 습윤제(약 0% 내지 약 50%), 계면활성제(약 0.01% 내지 약 7%), 향미제(약 0.04% 내지 약 2%), 감미제(약 0.1% 내지 약 3%), 및 착색제(약 0.001% 내지 약 0.5%), OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체를 포함하는 항-카리에스제(약 0.001% 내지 약 1%) 및 항치석제(약 0.1% 내지 약 13%).

[0170] 제3 영역의 응용은 일반적인 용어의 다양한 조성물들의 휴입 검 제형에 있다.

[0171] 스트론튬(Sr)은 뼈 형성을 촉진하는 것으로 보고되었으며, 골다공증의 치료용으로 승인된다.

[0172] 또 다른 양태는 본원에 정의된 나노입자 응집체를 포함하는 코팅 조성물에 관한 것이다.

[0173] 코팅 조성물은 예를 들면, 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체를 함유할 수 있으며; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO₃), (SO₄), (HSO₄), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 2.5를 초과한다.

[0174] 코팅 조성물은 예컨대, OPN 및 인산 칼슘을 포함하는 나노입자 응집체를 포함할 수 있다.

[0175] 코팅 조성물은 뼈 질병, 뼈 골절 또는 임플란트와 연계되어 이용될 수 있다.

[0176] 일 양태는 본 발명에 따른 코팅 조성물을 의료 장치를 코팅하기 위한 용도에 관한 것이다.

[0177] 다른 양태는 본원에 정의된 나노입자 응집체를 포함하는 식품 또는 음료 제품에 관한 것이다.

[0178] 식품 또는 음료 제품은 예를 들면, 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체를 포함할 수 있으며; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO₃), (SO₄), (HSO₄), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내

지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 2.5를 초과한다.

- [0179] 본 발명의 목적은 표면 상에서 생물막의 감소를 개선하는 것이다.
- [0180] 일 양태는 벌크부(bulk part) 및 표면 영역을 포함하는 제품에 관한 것으로; 제1 표면 영역 코팅은 상기 표면 영역의 적어도 제1 부 상에 코팅되고; 상기 제1 표면 영역 코팅은 본원에 정의된 나노입자 응집체를 포함한다.
- [0181] 제1 표면 영역 코팅은 예컨대, 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체를 포함할 수 있으며; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO₃), (SO₄), (HSO₄), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 2.5를 초과한다.
- [0182] 일 실시형태에 있어서, 표면 영역은 금속, 산화 금속, 무기 물질, 유기 물질 및 중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함한다.
- [0183] 다른 실시형태에 있어서, 표면 영역은 양으로 대전된다.
- [0184] 또 다른 실시형태에 있어서, 표면 영역은 음으로 대전된다.
- [0185] 또 다른 실시형태에 있어서, 표면 영역은 비대전된다.
- [0186] 본 발명의 맥락에서, '항-생물막제'는 표면으로의 미생물 부착을 방지하고/하거나 감소시키고/거나 미생물 생물막 형성을 방지하고/하거나 감소시키고/거나 미생물 생물막을 교란시키고/거나 불안정하게 하는 작용제로서 이해된다.
- [0187] 본 발명의 일 양태는 a) OPN 및 b) 칼슘 및/또는 스트론튬을 포함하는 제1 입자를 포함하는 항-생물막제에 관한 것이다.
- [0188] 항 생물막제는 예를 들면, a) OPN 및 b) 인산 스트론튬, 인산 칼슘 또는 이의 혼합물을 포함하는 나노입자 응집체를 포함할 수 있다.
- [0189] 항-생물막제는 예컨대, 화학양론식 $A'_{10-X}A_X(PO_4)_{6-Y}B_Y(OH)_{2-Z}C_Z \cdot OPN_m \cdot (H_2O)_n$ 을 갖는 나노입자 응집체를 포함할 수 있으며; 여기서 A'는 Ca, Sr 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; A는 Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Zn, Ba, H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, X=0 내지 9이고; B는 (CO₃), (SO₄), (HSO₄), (HPO₄), (H₂PO₄), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Y=0 내지 5이고; C는 F, Cl, Br, I, (CO₃), H₂O, 공격자점 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, Z=0 내지 2이고; n=0 내지 10 및 m>0이며; (PO₄) 및 (HPO₄) 사이의 몰비는 2.5를 초과한다.
- [0190] 본 발명의 다른 양태는
- [0191] a) PO₄³⁻로서 인산염을 포함하는 제1 수용액으로서, pH는 6 내지 14의 범위 내에 있는 제1 수용액을 제공하는 단계;
- [0192] b) Ca²⁺ 및/또는 Sr²⁺를 포함하는 제2 수용액으로서; pH는 6 내지 14의 범위 내 있는 제2 수용액을 제공하는 단계로서; 제1 수용액, 제2 수용액 중 어느 하나 또는 양 수용액들은 OPN을 포함하는 단계;
- [0193] c) 상기 제1 및 제2 수용액들을 혼합하여, 1) OPN, 2) 인산 스트론튬, 인산칼슘 또는 이의 혼합물, 및 3) 수용성 전해질을 포함하는 나노입자 응집체를 포함하는 현탁액을 형성하는 단계;
- [0194] d) 선택적으로, 상기 수용성 전해질의 실질적인 양을 현탁액으로부터 제거하는 단계; 및
- [0195] e) 선택적으로, 상기 나노입자 응집체를 수상으로부터 분리하는 단계를 포함하는, OPN 및 칼슘 포스페이트에 의하여 형성된 나노입자 응집체의 제조방법에 관한 것이다.

- [0196] 본 발명의 맥락에서, ‘수용액’이라는 용어는 물을 적어도 50% w/w 포함하는 액체로서 이해된다.
- [0197] 본 발명의 맥락에서, ‘현탁액’이라는 용어는 침강하기에 충분히 큰 고체 입자들을 함유하는 이종 유체로서 이해된다.
- [0198] 본 발명의 맥락에서, ‘전해질’이라는 용어는 물질을 전기적으로 전도성이 있도록 하는 자유 이온들을 함유하는 물질로서 이해된다. 본 발명에서, 전해질은 물에 녹을 수 있어야 한다.
- [0199] 일 실시형태에 있어서, 현탁액의 수상의 pH는 7.4 내지 14.0, 예컨대, 7.6 초과와 범위 내와 같이, 7.8 내지 13.5, 예컨대, 8.0 초과와 범위 내와 같이, 8.5 내지 13.0, 예컨대, 9.0 초과와 범위 내와 같이, 9.5 내지 12.5, 예컨대, 10.0 초과와 범위 내와 같이, 10.5 내지 12.0, 예컨대, 11.0 초과와 범위 내와 같이 7 초과이다.
- [0200] 일 실시형태에 있어서, 공정은 단계 d)를 포함한다.
- [0201] 다른 실시형태에 있어서, 공정은 단계 d)를 더 포함하며, 분리는 투석에 의하여 수행된다.
- [0202] 본 발명의 맥락에서, ‘투석’이라는 용어는 반투과성막의 기공들을 통해 현탁된 콜로이드성 입자들을 작은 치수(결정상)의 용해된 이온들 또는 분자들로부터 이들의 확산의 불균등한 속도에 의하여 분리하는 것으로 이해된다.
- [0203] 일 실시형태에 있어서, 공정은 단계 d)를 더 포함한다.
- [0204] 다른 실시형태에 있어서, 제1 및 제2 수용액들 내에서의 오스테오폰틴의 총 농도는 3 내지 1000 mg/ml, 예컨대, 5 mg/ml 초과와 범위 내와 같이, 10 내지 500 mg/ml, 예컨대, 12 mg/ml 초과와 범위 내와 같이, 15 내지 100 mg/ml, 예컨대, 18 mg/ml 초과와 범위 내와 같이, 20 내지 50 mg/ml, 예컨대, 25 mg/ml 초과와 범위 내와 같이, 30 내지 45 mg/ml, 예컨대, 35 mg/ml 초과와 범위 내와 같이 2.5 mg/ml 초과이다.
- [0205] 일 실시형태에 있어서, 공정은 얻어진 나노입자 응집체를 살균하는 단계 f)를 더 포함한다.
- [0206] 다른 실시형태에 있어서, 공정은 단계 f)를 더 포함하며, 살균화 단계는 가열에 의하여 수행된다.
- [0207] 또 다른 실시형태에 있어서, 공정은 단계 f)를 더 포함하며, 살균화 단계는 80℃로 가열하고, 온도를 이 수준에서 1 시간 이상 동안 유지함으로써 수행된다.
- [0208] 본 발명자들은 건조 질량(즉, 200℃에서 건조함으로써 얻어지는 질량을 지칭함)의 약 33 wt%의 오스테오폰틴 농도의 상한이 있으며, 여기서 오스테오폰틴은 나노입자 응집체 내에 더 이상 포함되지 않는 것으로 보인다는 것을 알게 되었다. 이는 약 20 mg/l의 첨가된 OPN 양에서 시작된다. 따라서, 일 실시형태에 있어서, 제1 및 제2 수용액들 내에서 오스테오폰틴의 총 농도는 2.5 내지 35 mg/ml의 범위 내에 있다. 그러나, 이 한계는 상이한 수용성 전해질들의 농도에 따라 변할 수 있다.
- [0209] 일 실시형태에 있어서, 오스테오폰틴은 제1 수용액 내에서만 존재한다.
- [0210] 다른 실시형태에 있어서, 오스테오폰틴은 제2 수용액 내에서만 존재한다.
- [0211] 또 다른 실시형태에 있어서, 오스테오폰틴은 제1 수용액 및 제2 수용액 양쪽 모두 내에 존재한다.
- [0212] 일 실시형태에 있어서, 단계 c)는 10 내지 50℃의 범위 내, 예컨대, 20 내지 40℃의 범위 내, 22 내지 28℃의 범위 내와 같이, 섭씨 5 내지 80 도의 범위 내의 온도에서 수행된다.
- [0213] 일 실시형태에 있어서, 제1 수용액, 제2 수용액 중 어느 하나 또는 양 수용액들은 Ca/Sr-결합 형광 염료를 포함한다. 용액 내에 추가적인 Ca/Sr-결합 염료는 형광(만약 형광 염료라면) 또는 채색 나노입자 응집체가 될 것이다.
- [0214] 본 발명의 양태들 중 하나의 맥락에서 기재된 실시형태들 및 특징들도 본 발명의 다른 양태들에 적용된다는 것에 주목해야 된다.
- [0215] 본 출원에 인용된 모든 특허 및 비-특허 문헌들은 본원에 그대로 참조로 포함된다.
- [0216] 본 발명은 이제 하기의 비-한정 예들에서 더 상세히 기술될 것이다.

- [0217] **실시예**
- [0218] 실시예 1: 나노입자 응집체의 합성
- [0219] 나노입자 응집체의 합성을 위해, 하기의 방법이 이용되었다
- [0220] 1) 3 가지 용액들이 동일한 체적으로 제조되었는데, 제1 용액은 0.36 M Na_3PO_4 (0.36 M NaH_2PO_4 및 0.72 M NaOH 인 용액을 제조함으로써 용이하게 제조됨), 제2 용액은 0.6 M CaCl_2 를 함유하며 제3 용액은 OPN의 소기의 최종량의 3 배를 함유한다.
- [0221] 2) CaCl_2 및 OPN 용액들이 우선 혼합되었고, 이후 Na_3PO_4 용액이 첨가되었다. 이 혼합으로 탁한 젤-유사 현탁액을 생성하였다. 젤-유사 구조는 자석 교반기 상에서 교반하면서 붕괴되었다. 용액은 주문 설계된 온도 제어 수조를 이용하여 25℃에서 24 시간 동안 교반되었다.
- [0222] 3) 24 시간 이후에, 용액은 투석 부대로 옮겨져서 여분의 NaCl 을 제거하였다. 투석은 자석 교반기에 의하여 천천히 교반된 물의 용액 체적의 100 배를 함유하는 저수조 내에서 24 시간 동안 수행되었다. 저수조 물은 12 시간의 투석 이후에 변화되었다.
- [0223] 4) 투석 이후에, 나노입자 응집체는 4800 rpm에서 원심분리되며, 물로 2 회 세척되었다.
- [0224] 5) 세척 이후에, 나노입자 응집체는 투석 전에 60℃에서 건조되었다.
- [0225] 아래에 토의된 결과는 25℃에서 반응(상기 단계 2)에 의하여 얻어졌다; 반응은 더 높고 더 낮은 다른 온도들에서 똑같이 양호하게 수행될 수 있다. 증가된 온도에서, 반응은 더 빨라진다. 또한, 합성은 인산염 소스로서 K_3PO_4 를 이용하여 수행되었다. 또한, 반응은 더 낮은(더 높은) 시약의 농도로 완료되어 더 낮은(더 높은) 수율로 이어질 수 있다.
- [0226] 상이한 양의 OPN을 갖는 표본들이 제조되었다. 0, 0.001, 0.0025, 0.01, 0.025, 0.1, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 12.5, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 및 34.0 mg/ml을 함유하는 표본들이 합성되었다(전체 17 개의 상이한 농도들).
- [0227] 생물막 실험용 나노입자 응집체는 투석 저수조 액체가 pH 및 0.9 wt% NaCl 을 갖도록 변경한 것 외에, 상기 기재된 바와 같이 12.5 mg/ml의 첨가된 OPN 양으로 합성되었다. 24 시간 투석한 이후에, 얻어진 현탁액은 폐쇄된 용기 내에서 현탁액을 80℃로 1 시간 동안 가열함으로써 살균되었다. 상기 단계 4) 및 5)는 생물막 실험에 대한 나노입자 응집체의 제조에서 생략되었다.
- [0228] 나노입자 응집체는 XRD, FTIR 및 TGA에 의하여 특징화되었다. XRD 및 FTIR 측정을 위하여, 건조 입자들은 측정 전에 고운 분말로 분쇄되었다. XRD는 브래그-브렌타노(Bragg-Brentano) 셋업을 갖는 리가쿠 스마트랩(Rigaku SmartLab) 상에서 측정되었다. 측정용 매개변수들은 다음과 같다: 6 내지 120° 2θ , 단계 크기 0.02, 4° /분. 각 표본에 대하여 스캔을 2회 수행하였고 평균되었다. 도 9는 조합된 데이터의 선택된 세그먼트를 도시한다. 리트벨트 정제는 충분한 결정도를 갖는 모든 표본들에 대하여 수행되었다. 이러한 표본들은 리트벨트 정제를 복잡하게 하는 높은 무정형 함량을 가졌기 때문에 20 mg/ml 이상의 OPN 함량을 갖는 표본들은 정제되지 않았다. 리트벨트 정제된 표본들에 대하여, 선택된 매개변수들은 추출되었으며 도 10에 제시되어 있다. FTIR은 Nicolet 380 FT-IR, Smart Orbit(Thermo electron 사)에 대하여 수행되었다. 표본들은 측정하기 직전에 60℃에서 건조되었다. 배경은 각각의 개별적인 스펙트럼에 대하여 피팅되고, 공제되었다. 보정된 데이터는 도 13에서 볼 수 있다. 표본들의 인산염(1200 내지 900 cm^{-1}), 탄산염(890 내지 840 cm^{-1}) 및 유기물 함량(1720 내지 1595 cm^{-1}) 사이에 비교를 위해 구체적인 피크들의 통합이 이루어졌다. FTIR 미네랄: 유기 및 미네랄: 탄산염 피크 비율들 사이에서 비교가 도 14에 도시되어 있다.
- [0229] Ar 및 O_2 의 분위기를 이용하여, Netzsch STA 449 C(NETZSCHGerätebau 사, Selb, 독일)에 대하여 TGA 데이터가 기록되었다. TGA 데이터는 도 11에 도시되어 있는 반면에, 추출된 질량 손실들은 도 12에 도시되어 있다.
- [0230] XRD 데이터는 결정질 물질이 20 mg/ml 미만의 OPN을 갖는 모든 표본들에 대하여 형성되었다는 것을 보여주었다. 20 mg/ml 이상에서, 매우 많은 양의 무정형 물질이 관찰되었다. 30 및 34 mg/ml에서, 약한 피크들은 무정형 산란의 정점에서 관찰되었다. 결정질 물질에 대한 회절 피크는 결정질 물질이 나노결정질이라는 것을 반영하는 실험적 해상도보다 현저히 더 넓었다. 최대 15 mg/ml OPN 및 이를 포함하는 X-선 회절 데이터는 리트벨트 정제에

의하여 모델화되어 평균 나노결정 크기에 대한 정보를 추출하게 되었다. 나노결정은 크기가 이방성이고, 결정학적 c-축과 일치하는 긴 형태학적인 축이 있는 바늘 형상인 것이다. 추출된 미소 결정 크기는 도 10에 도시되어 있다. 매우 낮은 OPN 함량에서, 양쪽의 형태학적 방향으로(도 10에서 바닥 플롯) 미소 결정 크기에 급속한 감소가 있었고, 이후 크기는 최대 약 1 mg/ml의 OPN 함량까지 거의 일정하게 유지되었고, 이후 이는 10 mg/ml의 OPN 함량까지 다시 감소되었다. 12.5 및 15 mg/ml에 대하여, 입자 응집체는 10 mg/ml에 대한 것보다 더 큰 나노결정을 함유하였지만, 배경 및 피크 높이들 사이의 비교에서는 이 표본들에서 대량의 무정형 물질이 있었다는 것을 보여주었다. 물, 유기 성분 및 탄산염의 함량은 도 11에 도시된 바와 같이 TGA 측정에 의하여 평가되었다. 질량 손실이 도 12에서 보고된다; 유기 및 탄산염 함량에 해당하는 질량 손실들은 건조 질량으로 보정되었다(즉, 물의 최초 손실 이후에 잔류하는 질량에 의하여 정규화됨). 물 함량은 모든 경우에 있어서 15 wt% 미만이었다. 이는 비결정질 물질에 대한 것보다 무정형 화합물(약 10 wt%)에 대하여 현저히 더 높았다. 나노결정질 물질에 대하여, OPN 함량에 대하여 선형으로 증가하는 물 함량은, OPN이 mg/ml로 첨가된 OPN인 하기 $3.1+0.12 \cdot \text{OPN}$ 에서 관찰되었다. 탄산염 함량은 각각 나노결정질에 대하여 약 2.4 건조 wt% 및 무정형 물질에 대하여 4.8 건조 wt%였다. 유기물 함량은 더 적은 유기물 함량을 보여주는 12.5 및 15 mg/ml를 갖는 최대 10 mg/ml까지 첨가된 OPN과 함께 증가하였다; 고 농도에서, 유기물 함량은 약 33 건조 wt%에서 포화되었다. FTIR은 도 13 및 14에서 도시된 바와 같은 상기 관찰을 확인해 주었다.

[0231] 실시예 2: 충치 모델 생물막의 성장

[0232] 인간 구강 세균 단리물들인 *스트렙토코커스 오칼리스* SK248, *스트렙토코커스 다우나이* HG594, *스트렙토코커스 미티스* SK24, *스트렙토코커스 생키니스* SK150 및 *악티노마이세스 나이슬런디* AK6이 실험들에 이용되었다. 유기물들은 혈액 한천(SSI, 코펜하겐, 덴마크) 상에서 혐기적으로 배양되었고, 실험적 사용 이전에 중간 내지 말기 대수증식기(exponential phase)까지 35°C에서 THB(Roth, 칼스루헤, 독일)에 옮겨졌다.

[0233] 유동 세포(ibiTreat, μ -slide VI, Ibidi, 뮌헨, 독일)는 1/10 THB(pH 7.0)으로 사전조정되었다. 550 nm(2 내지 5×10^9 세포/ml에 해당)에서 0.4의 광학 밀도로 조절된 세균성 배양물은 하기의 순서로 흐름 채널로 순차적으로 접종되었다: 1. *스트렙토코커스 오칼리스* SK248; 2. *악티노마이세스 나이슬런디* AK6; 3. *스트렙토코커스 미티스* SK24; 4. *스트렙토코커스 다우나이* HG594; 5. *스트렙토코커스 생키니스* SK150. 각 유기체의 0.4 ml이 살균 바늘들(BD Microlance, 27G, 드로이다, 아일랜드)을 이용하여 인-포트에서 실리콘 튜빙을 통해 주입되었으며, 주입 구멍들은 실리콘 풀(다우 코닝(Dow Corning), 비스바덴, 독일)로 밀봉되었다. 주입 이후에, 흐름은 30 분 동안 정지되어 세균 부착이 일어나도록 하였다. 비부착성 유기체들은 다음 유기체의 주입 이전에 10 분의 흐름에 의하여 제거되었다. 접종 절차 이후에, 생물막은 연동 펌프(Watson Marlow 205 U, 윌밍턴, 메사추세츠, 미국)에 의하여 제공된 1/10 THB(pH 7.0)의 일정한 흐름(250 μ l/분; 28.3 mm/분) 하에서 35°C에서 26 시간 동안 성장되었다.

[0234] 실시예 3: 카리에스 모델 생물막에서 OPN의 세균과의 결합

[0235] OPN은 제작자의 지시사항(Invitrogen, 타스트립, 덴마크)에 따라 플루오레세인으로 라벨링되었다. 성장상 이후에, 생물막은 35°C에서 라벨링된 단백질 100 μ l과 함께 45 분 동안 배양되었으며, 488 nm 레이저 라인 및 500 내지 550 nm 밴드 패스 필터(band pass filter)를 이용하여 영상화되었다. XY 해상도는 0.1 μ m/화소로 설정되었고, Z 해상도는 1 에어리 단위(Airy unit)(0.8 μ m 광학 슬라이스 두께)에 해당하였다(도 1A).

[0236] 실시예 4: OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체의 생체 내 성장한 치아 생물막과의 결합

[0237] 생체 내 성장한 치아 생물막은 살균 큐렛으로 치아 표면으로부터 긁어 내어졌고 유리 슬랩(4x4x1 mm) 상에 수집되었다. 유리 슬랩은 뒤집어졌고, 생물막은 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체와 함께 35°C에서 30 분 동안 배양되었다. 0.9% NaCl로 세척한 이후에, 생물막은 생물막 및 나노입자 응집체 내에서 세균을 표적하는 30 μ M C-SNARF-4(시그마-알드리치, 브론즈비, 덴마크)로 염색되었다. 63 배 유침 대물 렌즈, 1.4 개구수(Plan-Apochromat)를 갖는 Zeiss LSM 510 META(제나, 독일)은 영상 획득을 위해 이용되었다. 프로브는 543 nm 레이저 라인(250 내지 300 μ W)을 통해서 빠져 나왔고, 형광 방출은 2 에어리 단위들(1.6 μ m 광학 슬라이스 두께)로 설정된 편환을 가지고 576 내지 608 nm 간격(META 검출기) 내에서 모니터링되었다. 영상은 크기가 364x364 화소들

($143 \times 143 \mu\text{m}^2$)이고, 픽셀 채류 시간 $18 \mu\text{s}$, 선 평균 2, $0.4 \mu\text{m}/\text{화소}$ (줄 1), 12-비트 세기 해상도로 획득되었다(도 1B).

[0238] 실시예 5: 플랑크톤 배양물 내에서 세균 성장에 미치는 OPN의 영향

[0239] 세균은 THB 또는 $26.5 \mu\text{mol/l}$ OPN을 함유하는 THB로 옮겨졌다. $100 \mu\text{l}$ 의 분취량들이 96 웰 플레이트(Sarstedt, Newton, 노스 캐롤라이나, 미국)로 옮겨졌고, 550 nm 에서 OD는 분광광도계(BioTek PowerWave XS2, Bad Friedrichshall, 독일)로 측정되었다. 실험은 3 별로 수행되었고 1회 반복되었다(도 2).

[0240] 실시예 6: 카리에스 모델 내에서 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체의 생물막 성장에 미치는 영향

[0241] 생물막은 상기 기재된 바와 같이 성장되었고 성장하는 동안에(접종 절차 후 3 시간, 9 시간 및 24 시간) OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체로 3 회 처리되었다. 실험 1에서 획득된 나노입자 응집체 현탁액은 강하게 흔들었고, 10 분 동안 가라앉도록 하였으며, 0.4 ml 가 현탁액의 상단으로부터 흡입되었다. 흡입된 현탁액은 대략 3%(w/v)의 나노입자 응집체의 함량을 가졌다. 이후, 흐름은 정지되고 나노입자 응집체를 포함하는 흡입된 현탁액은 세균 접종에 대하여 기재된 바와 같이 채널에 주입되었다. 배양 한지 1 시간 이후에, 흐름은 재개되었다. 오스테오폰틴이 없는 인산 칼슘 나노입자 응집체, 상이한 크기의 실리슘 디옥사이드(silicium dioxide) 입자들(직경 100 nm , 500 nm 및 2000 nm ; 0.9% NaCl에서 3.5% (w/v); 시그마-알드리치, 브론드비, 덴마크), 폴리스티렌 입자들(1000 nm 직경; 증류수에서 3.5% (w/v); 시그마-알드리치) 및 용해된 OPN(0.9% NaCl에서 0.9 g/l)와 동일한 방법으로 대조군 처리가 수행되었다. 0.9% NaCl과 함께 배양된 채널들은 음성 대조군의 역할을 하였다. 6 개의 복제 생물막들이 각각의 실험 셋팅에 대하여 성장되었다. 생물막 성장 이후에, THB는 종이점들로 흡인에 의하여 흐름 채널로부터 제거되었다. 채널은 증류수로 행귀내고, 재차 건조되며, 2% 크리스탈 바이올렛 용액 $100 \mu\text{l}$ 으로 1 시간 동안 염색되었다. 채널은 증류수로 재차 행귀내고, 건조되었으며, 100% 에탄올(시그마-알드리치, 브론드비, 덴마크)의 $120 \mu\text{l}$ 가 30 분 동안 첨가되어 생물막의 얼룩을 제거하였다. 이후, $100 \mu\text{l}$ 의 1:8로 희석된, 염색된 에탄올 용액들이 96 웰 플레이트(Sarstedt, Newton, 노스 캐롤라이나, 미국)로 옮겨졌고, 585 nm 에서 광학 밀도는 분광광도계(BioTek PowerWave XS2, Bad Friedrichshall, 독일)로 측정되었다. 빈 흐름 채널은 동일한 방식으로 처리되었고, 배경 공제를 위해 이용되었다(도 3).

[0242] 도 3은 크리스탈 바이올렛 염색에 의하여 측정된, 카리에스 모델에서 생물막 형성에 미치는 상이한 작용제들의 효과를 도시한다. OPN(HAP-OPN)을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체는 1000 nm 폴리스티렌 입자, 실리카 입자(150 nm , 500 nm 및 2000 nm), OPN이 없는 인산 칼슘 입자 응집체 및 0.9 g/l OPN과 비교하여 유동 세포 내에서 형성된 생물막의 양을 강하게 감소시킨다.

[0243] 따라서, 실시예 6은 칼슘-함유 입자에 결합된 OPN을 이용함으로써 상승적인 항-생물막 효과를 얻는다는 것을 보여주는 통계학적으로 유의한 증거를 제공한다.

[0244] 실시예 7: OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체의 크리스탈 바이올렛 결합

[0245] OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체 $100 \mu\text{l}$ 가 유동 세포(ibiTreat, μ -slide VI, Ibidi, 뮌헨, 독일)에 주입되었고, 하룻밤 동안 건조되도록 설정되었다. 흐름 채널들은 크리스탈 바이올렛으로 15 분 동안 염색되었고, PBS로 2회 세척되었고, 건조되었으며, 100% 에탄올 $120 \mu\text{l}$ 로 15 분 동안 충진되었다. 1:64로 희석된, 염색된 에탄올 용액 $100 \mu\text{l}$ 는 96 웰 플레이트에 옮겨졌고, 585 nm 에서 광학 밀도가 측정되었다. 오스테오폰틴이 없는 인산 칼슘 나노입자 응집체, 실리슘 디옥사이드 입자들(직경 500 nm ; 0.9% NaCl에서 3.5% (w/v)), 폴리스티렌 입자들(1000 nm 직경; 증류수에서 3.5% (w/v)), 용해된 OPN(0.9% NaCl에서 0.9 g/l) 및 0.9 g/l NaCl은 대조군으로 역할하였다. 실험은 3 별로 수행되었다(도 4).

[0246] 실시예 8: OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체의 생체 내 구강 생물막 형성에 미치는 영향

[0247] 구강 생물막은 1200 그릿(grit)의 표면 거칠기를 갖는 주문-제작된 유리 슬랩($4 \times 4 \times 1 \text{ mm}$)(Menzel, 브라운슈바이크, 독일) 상에 성장되었다. 유리 슬랩은 개별적으로 설계된 구강내 장치의 협측 연(buccal flanges) 내에서 움푹 들어가게 장착되었다. 2 명의 자원자들이 칫솔질 하는 동안에 물 이외의 식품 또는 액체를 섭취하고 나노입

자 응집체를 적시는 동안을 제외하고는 장치가 구강 내에서 72 시간 동안 유지되게 하였다. 장치의 일측은 실시예 1에서 제조된 0.9% NaCl 및 대략 3%(w/v) 나노입자 응집체를 함유하는 현탁액에 매일 5 내지 6회(30 내지 60 분) 적었다. 동시에 장치의 타측은 0.9% NaCl에 적셔졌고, 음성 대조군으로 역할을 하였다. 72 시간 이후에, 유리 슬랩은 제거되었으며, 생물막은 공초점 현미경 분석 이전에 C-SNARF-4로 염색되었다(도 6).

[0248] 도 6은 OPN을 함유하는 칼슘-함유 나노입자 응집체가 생체 내 경구 생물막 성장을 강하게 감소시키는 것을 도시한다. A: 유리 슬랩 상에 성장한 생물막은 72 시간 동안 구강 내에서 유지되었다. 매일 5 내지 6 회의 NaCl 적심(30 내지 60 분)이 수행되었다. B: 유리 슬랩 상에 성장한 생물막은 72 시간 동안 구강 내에서 유지되었다.

[0249] 따라서, 실시예 8은 실시예 6에서 관찰된 항-생물막 효과도 생체 내에서 존재한다는 것을 확인한다.

[0250] 실시예 9: OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체의 플랑크톤 세균 배양물의 pH에 미치는 영향

[0251] 세균 배양물이 THB 내에서 중간-대수증식기까지 성장되고, 2회 세척되며, 살균 타액에 옮겨졌다. OD는 1.0(550 nm)으로 조절되었고, 0.4% 글루코오스(w/w)는 첨가되고 세균 현탁액 1 mL는 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체 1 mL 또는 0.9% NaCl 1 mL와 혼합되었다. pH는 20 시간 동안 측정되었다. 실험은 2 번 수행되었으며, 1 회 반복되었다(도 7a 내지 7e).

[0252] 실시예 10: OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체의 카리에스 모델 생물막에서 pH에 미치는 영향

[0253] 배양 절차는 상기에 기재된 바와 같이 수행되었다. 이후, 생물막은 1/10 희석된 THB 상에서 250 μ L/분의 유량으로 35°C에서 8 시간 동안 성장되었다. 이 때까지, 안정한 얇은 생물막이 형성되었다. 이후, 배지는 탄수화물이 없는 우육 추출물(Scharlau, 바르셀로나, 스페인)로 바뀌었고, 유량은 50 μ L/분으로 감소되어 유동 세포 내에서 전단력을 최소화 시켰다. 배지 교환 후 1 시간, 12 시간 및 17 시간에, HAP-OPN 입자가 주입되었고 상기 기재된 바와 같이 생물막과 함께 1 시간 동안 배양되었다. 대조군 채널은 0.9% NaCl과 함께 배양되었다.

[0254] 레이쇼메트릭(ratiometric) pH-민감성 프로브 C-SNARF-4의 공초점 현미경 캘리브레이션: 30 μ M의 농도인 C-SNARF-4를 함유하는 HEPES 완충제 용액(50 mM; 0.1 pH 단위의 단계에서 pH 4.5 내지 8.5로 조절됨)은 흐름 채널 내에서 영상화되었다. 63 배 유침 대물 렌즈, 1.4 개구수(Plan-Apochromat)를 갖는 Zeiss LSM 510 META(제나, 독일)은 영상 획득을 위해 이용되었다. 프로브는 543 nm 레이저 라인(250 내지 300 μ W)을 가지고 빠져 나왔고, 형광 방출은 2 에어리 단위들(1.6 μ m 광학 슬라이스 두께)로 설정된 핀홀을 가지고 576 내지 608 nm (녹색) 및 629 내지 661 nm (적색) 간격(META 검출기) 내에서 동시에 모니터링되었다. 영상은 크기가 364x364 화소들(143x143 μ m²)이고, 픽셀 체류 시간 18 μ s, 선 평균 2, 0.4 μ m/화소(줄 1), 12-비트 세기 해상도로 획득되었다. 매 3번째 pH 수치에 대하여, 측정은 배경 공제를 위해 무염색된 HEPES 완충제(50 mM, pH 8.5)에 대하여 수행되었다. 추가적으로, 글루코오스(20% w/v) 및 락테이트(20% w/v)의 무염색된 용액, 1/10 희석된 THB(pH 7), 살균 타액, PBS(pH 7.4, 시그마-알드리치, 브론즈비, 덴마크), 비처리된 생물막 및 HAP-OPN 입자 현탁액은 동일한 현미경 및 레이저 셋팅으로 영상화되었다. 576 내지 608 nm 및 629 내지 661 nm의 파장 범위에 있는 이러한 대조군들 중 어느 하나에 의하여도 자가형광 신호가 방출되지 않았다.

[0255] 비율 계산을 위하여, 100 x 100 화소들의 영역들은 각각의 영상 내에서 정의되었고, 평균 및 표준 편차들은 LSM 취득 소프트웨어를 이용하여 결정되었다. 이어서, 비율 R, 표준 편차 S_R 및 평균의 표준 오차 S_R는 방정식 (1), (2) 및 (3)에 따라 각각의 pH 수치에 대하여 계산되었다:

$$(1) \quad R = \frac{g - b_g}{r - b_r}$$

$$(2) \quad s_R = \frac{1}{((r - b_r)^2)^{1/2}} \left(s_g^2 + s_{bg}^2 + \frac{(g - b_g)^2}{(r - b_r)^2} (s_r^2 + s_{br}^2) \right)^{1/2}$$

$$(3) \quad S_R = \frac{1}{(100^2)^{1/2}} (s_R^2)^{1/2}$$

[0256]

[0257] g , r , s_g 및 s_r 는 각각의 녹색 및 적색 이미지들에서 정의된 100 x 100 화소 영역 내에서 평균 및 표준 편차들이 다. b_g , b_r , s_{bg} 및 s_{br} 는 배경 이미지들에 대한 해당 수치들이다. R의 얻어진 수치들은 MATLAB(MathWorks, Natick, 매사추세츠, 미국)에서 플롯팅되고 함수에 피팅되었다:

$$(4) \quad pH = \ln\left(\frac{-1.6546}{R-1.7469} - 1\right) \frac{1}{(2.3981)} + 5.9799$$

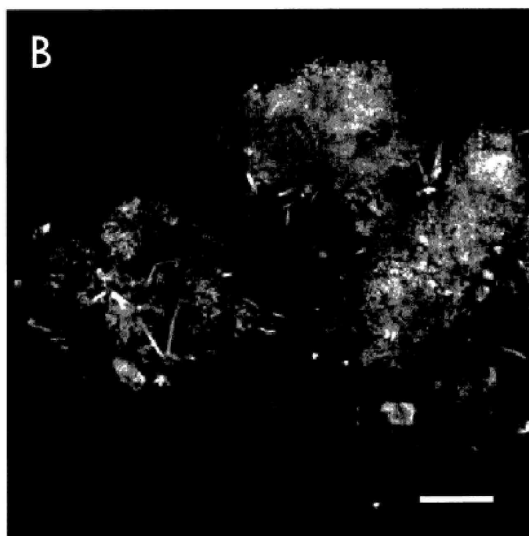
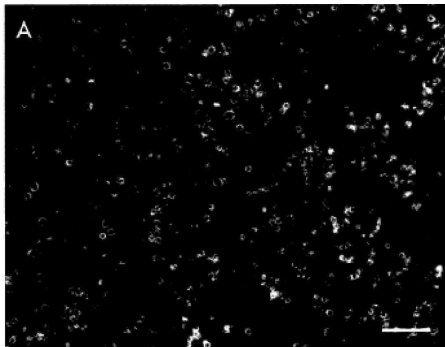
[0258]

[0259] 측정은 2회 수행되었고, 고도로 재현성이 있는 것으로 증명되었다.

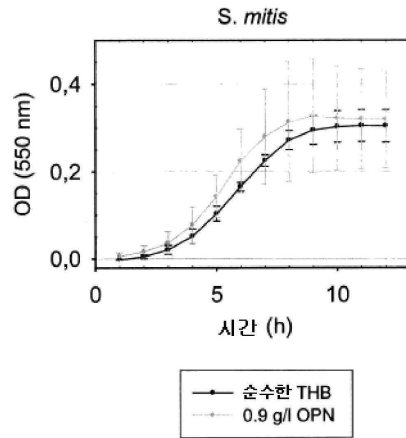
[0260] 생물막 pH 영상화: 3 개의 생물막들이 평행으로 성장되었고, 이중 하나는 상기에 기재된 바와 같이 OPN을 함유하는 인산 칼슘 나노입자 응집체로 처리된 것이었다. 이후, 생물막은 살균 타액으로 2회 세척되었고, C-SNARF-4는 30 μ M의 농도에 첨가되었다. 유동 세포는 XL 배양기(PeCon, 에르바흐, 독일)를 이용하여 37°C에서 유지되었으며, 기준선(baseline) pH 이미지들은 생물막들의 최저층에서 획득되었다. 이어서, 글루코오스가 없는 타액은 3 개 채널들 중 2 개에서 0.4% (w/v) 글루코오스 및 C-SNARF-4의 30 μ M를 함유하는 타액 용액으로 교체되었다. 3 개 생물막들 중 각각에서, pH 이미지들은 무작위로 선택한 16 개 현미경 시야에서 획득되었다. XY 위치들은 LSM 소프트웨어에서 표시되었고, 글루코스를 첨가한 후 60 분에, 동일한 현미경 시야들이 다시 동일한 순서로 영상화되었다. 배경 공제를 위하여 이미지들은 543 nm 레이저의 스위치를 끈 채로 획득되었다. 현미경 및 레이저 셋팅들은 보정 측정의 것들과 동일하였다. 실험을 5 회 독립적으로 반복하여 수행되었다(도 8a 내지 8e).

도면

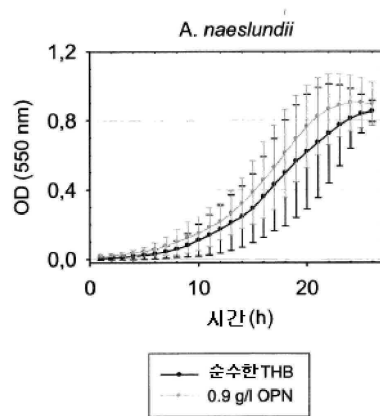
도면1



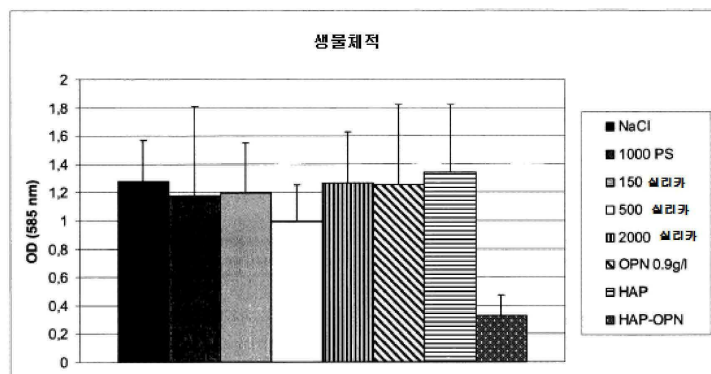
도면2a



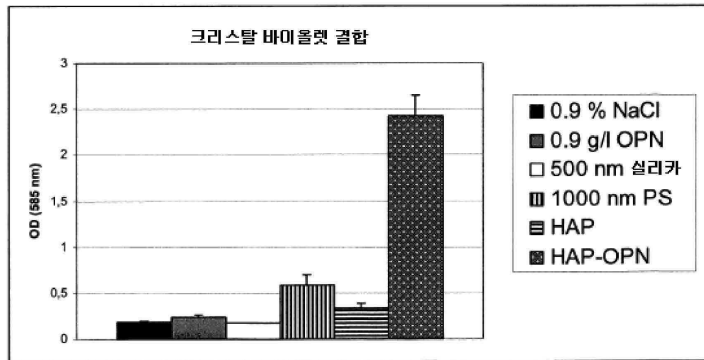
도면2b



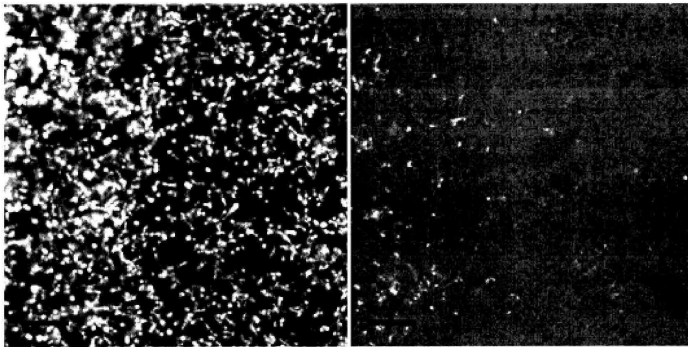
도면3



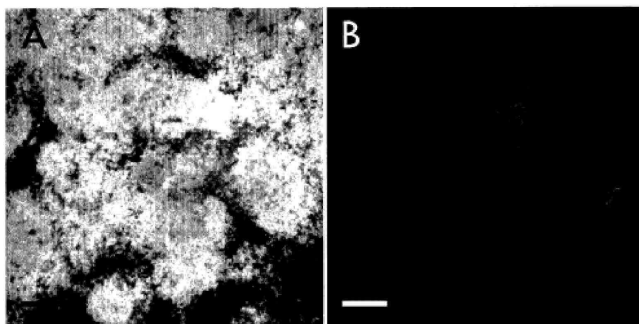
도면4



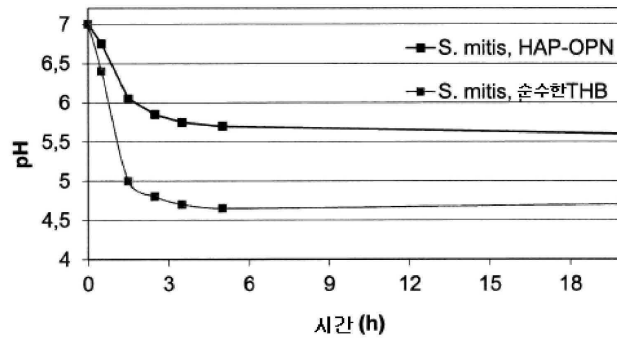
도면5



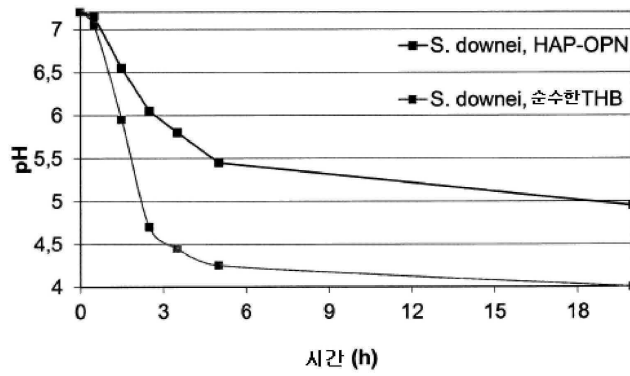
도면6



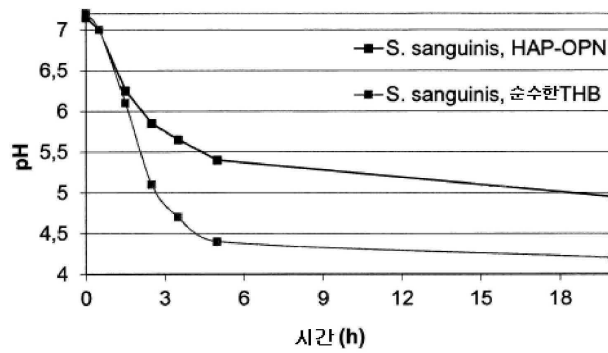
도면7a



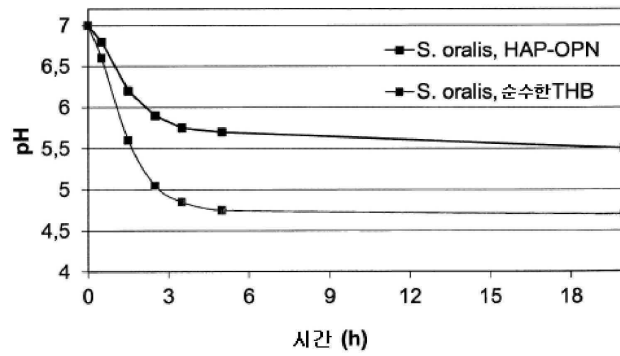
도면7b



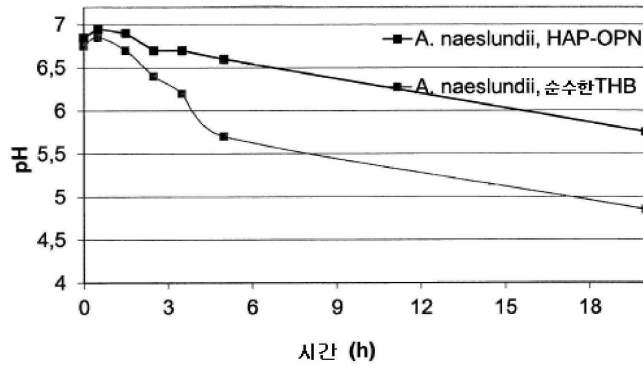
도면7c



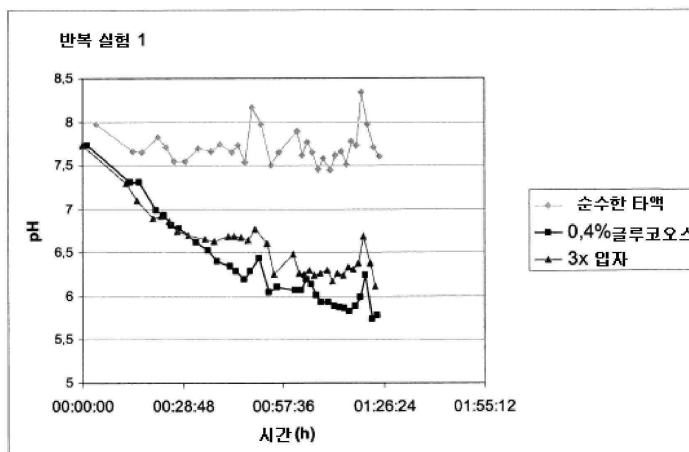
도면7d



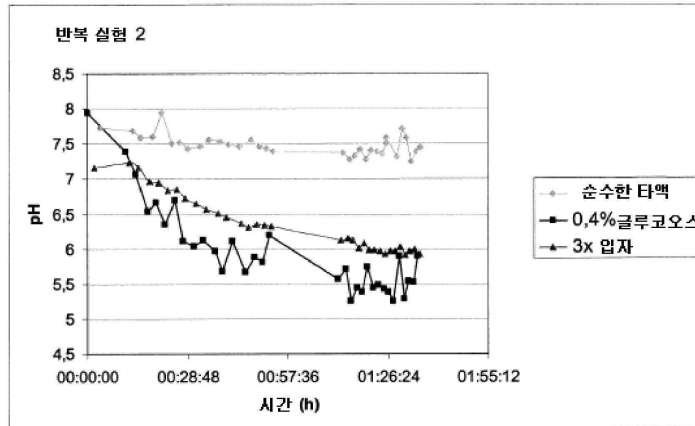
도면7e



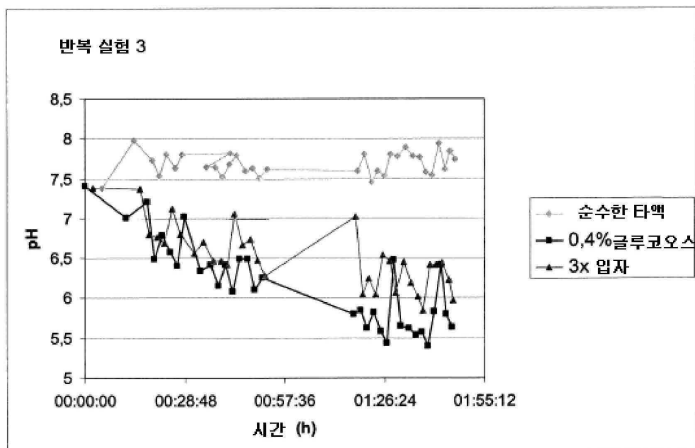
도면8a



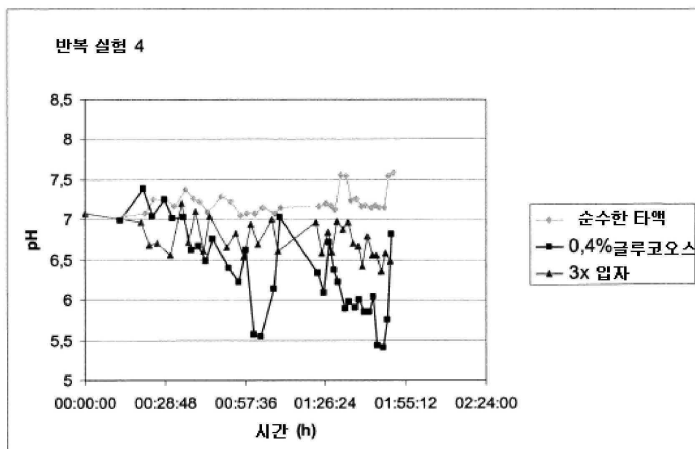
도면8b



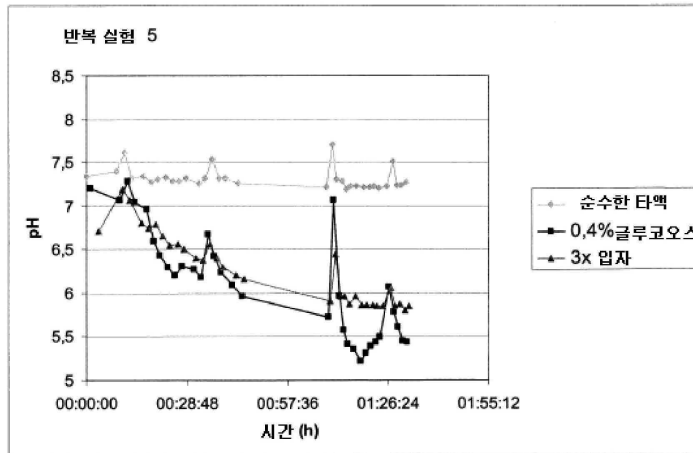
도면8c



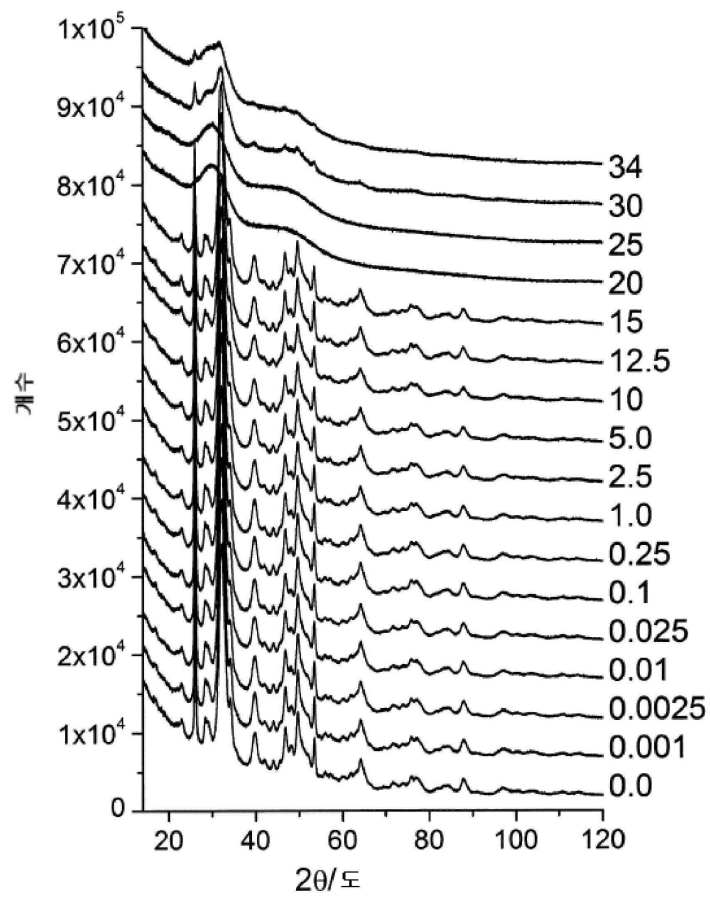
도면8d



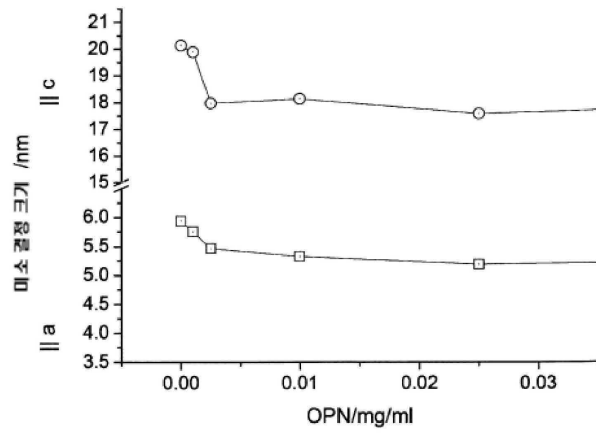
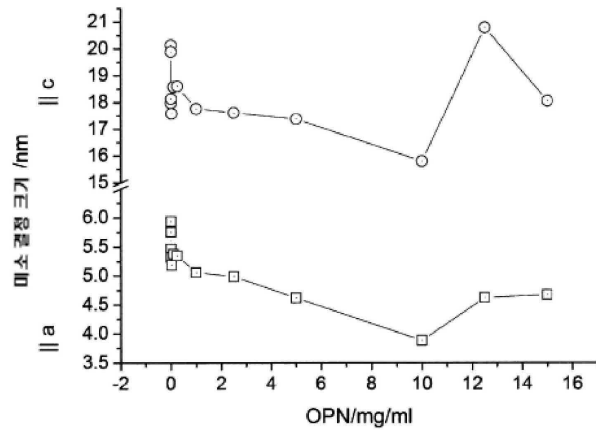
도면8e



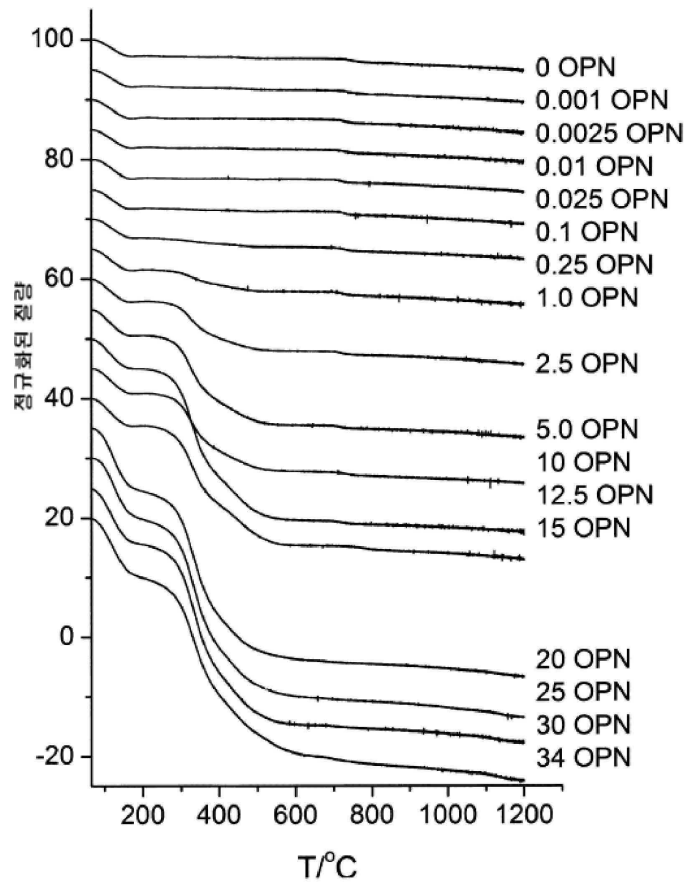
도면9



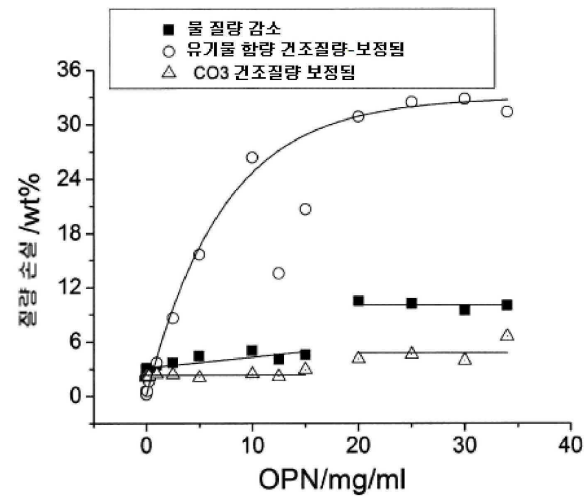
도면10



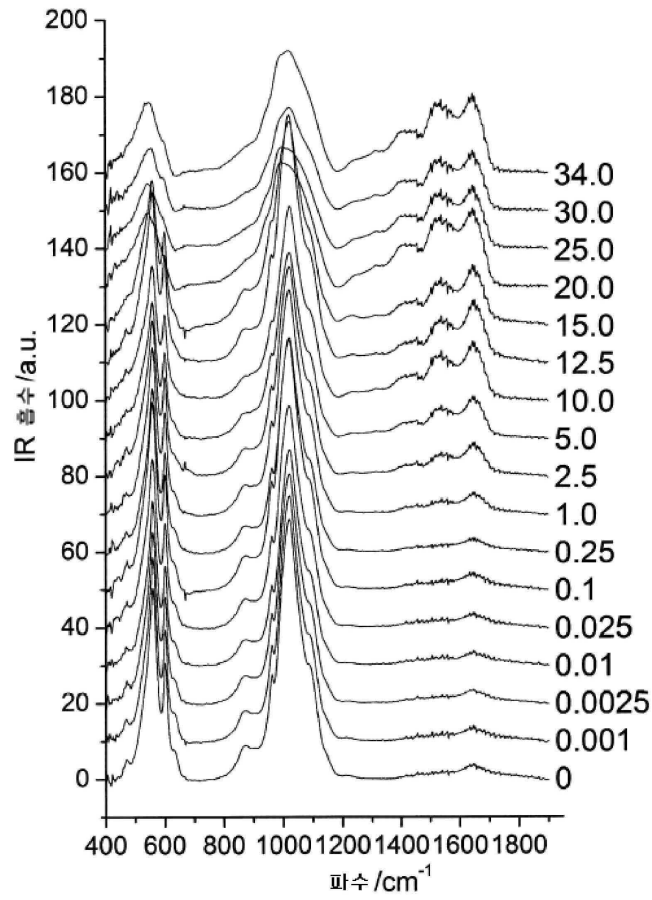
도면11



도면12



도면13



도면14

