



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0010127
(43) 공개일자 2023년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C01G 9/00 (2006.01) *C01G 9/02* (2006.01)

B82Y 40/00 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C01G 9/00 (2013.01)

A61K 31/496 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0090179

(22) 출원일자 2021년07월09일

심사청구일자 2021년07월09일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

신용

서울특별시 강동구 양재대로 1650, 102동 602호(명일동, 래미안 솔베뉴)

류혜방

서울특별시 서대문구 연세로7안길 42(창천동)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 16 항

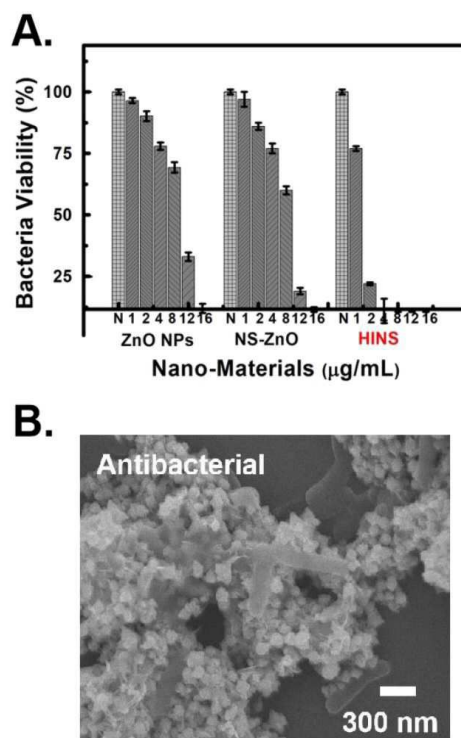
(54) 발명의 명칭 개질된 산화아연 나노복합체, 이를 함유하는 항생 조성물 및 병용 제제

(57) 요약

본 발명은 동형 2기능성 이미도에스테르 화합물에 의해 개질된 산화아연 나노복합체 및 이를 유효 성분으로 함유하는 항생 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 산화아연 나노복합체 및 항진균제를 함유하는 병용 제제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 산화아연 나노복합체는 우수한 항생 활성, 예를 들어 항바이러스 활성, 항박테

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5



리아 활성 또는 항진균 활성을 나타내면서도 독성이 낮은 항생 조성물을 제공할 수 있다. 이에 따라, 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이에 의한 오염이나 감염을 예방하거나, 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이의 성장을 저해하거나, 또는 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이에 의한 감염을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 기존의 항진균제와 함께 조합하여 사용했을 때 항진균제의 효능을 향상시켜 주어 시너지 효과를 발휘한다. 이에, 우수한 항진균성 병용 제제로도 사용 가능하며, 이로써 기존의 항진균제를 저용량으로 사용할 수 있게 하여 독성으로 인한 부작용을 경감시켜줄 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)

A61K 33/30 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 9/0014 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A61P 31/10 (2018.01)

A61P 31/12 (2018.01)

C01G 9/02 (2013.01)

B82Y 40/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711107933
과제번호	2020R1A2C2007148
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	감염성 질환 동시 진단 및 치료를 위한 밴드타입의 통합 테라그노스틱 시스템 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

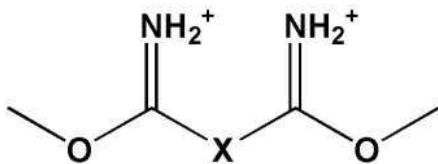
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물로 개질된 산화아연 나노복합체:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, X 는 $(CH_2)_n$ 이고, n 은 5 내지 10의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 디메틸 아디피미데이트, 디메틸 피멜리미데이트, 디메틸 수베르미미데이트, 또는 3,3'-디티오비스프로피온이미데이트인 것을 특징으로 하는 산화아연 나노복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 개질은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 염을 산화아연 나노결정과 혼합함으로써 얻어진 것을 특징으로 하는 산화아연 나노복합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 산화아연 나노결정은 100 내지 300 nm의 크기인 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 산화아연 나노결정은 스핀들(spindle) 형상의 결정인 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 산화아연 나노복합체는 표면 양성 전하를 나타내는 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 7

제1항에 기재된 산화아연 나노복합체를 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 항바이러스 활성, 항박테리아 활성, 또는 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 그람 음성 박테리아에 대한 항박테리아 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 대장균 또는 살모넬라균에 대한 항박테리아 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 아스퍼질러스속(Aspergillus)의 곰팡이에 대한 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항생

조성물.

청구항 12

제7항에 있어서, 추가의 항진균제와 함께 사용되는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

청구항 13

제7항에 있어서, 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이에 의한 감염이나 오염을 예방하거나, 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이의 성장을 저해하거나, 또는 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이에 의한 감염을 치료하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

청구항 14

제7항에 있어서, 주사용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

청구항 15

제1항에 기재된 산화아연 나노복합체 및 항진균제를 함유하는 항진균성 병용 제제.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 항진균제는 이트라코나졸 또는 암포테리신 B 인 것을 특징으로 하는 항진균성 병용 제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 개질된 산화아연 나노복합체, 이를 함유하는 항생 조성물, 및 병용 제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항생제의 오남용으로 인한 항생제 내성은 전세계적으로 주요한 공중 보건의 위협이다. 특히, 다중약물 내성 박테리아 (슈퍼박테리아), 곰팡이, 그람 음성 박테리아, 또는 메티실린-내성 *S. aureus* (MRSA)에 의해 야기되는 감염증은 다수의 항생제에 대한 내성으로 인하여 치료가 어렵다. 또한, 곰팡이 감염은 환자의 면역 체계를 약화시키므로 암 환자나 장기이식 환자에 있어서 사망률 증가의 원인이 되고 있다. 따라서, 미생물 감염의 새로운 치료법을 찾기 위한 새로운 전략을 개발하는 것이 중요하다.

[0003] 한편, 종래의 항생제 사용에 있어서의 다른 문제점 중 하나는 혈액의 점도를 높여서 혈전을 야기한다는 것이다. 이에 따라, 근래 나노의약 산업은 혈류에서의 응고, 특히 정맥 주사 이후의 혈액 응고를 방지하기 위한 방안을 찾기 위해 많은 노력을 기울이고 있다.

[0004] 이에 따라, 우수한 항생 효능을 나타낼 뿐만 아니라 주사제로도 사용가능한 항생 물질에 대한 개발의 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일 목적은 우수한 항생 활성을 나타내면서도 주사제로도 사용가능한 항생물질을 제공하는 것이다.

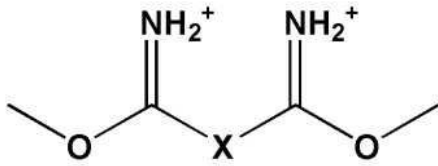
[0006] 본 발명의 다른 일 목적은 전술한 항생물질을 유효성분으로 함유하는 항생 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또다른 일 목적은 기존의 항생제, 예를 들어 항바이러스제, 항박테리아제, 또는 항진균제와 함께 사용가능하고, 이들 항생제의 효능을 향상시킬 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물로 개질된 산화아연 나노복합체가 제공된다:

[0009] [화학식 1]



[0010]
[0011] 상기 화학식 1에서, X 는 $(CH_2)_n$ 이고, n 은 5 내지 10의 정수이다.

[0012] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 전술한 산화아연 나노복합체를 유효 성분으로 함유하는 항생 조성물이 제공된다.

[0013] 본 발명의 또다른 일 양태에 따르면, 전술한 산화아연 나노복합체 및 항진균제를 함유하는 항진균성 병용 제제가 제공된다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 산화아연 나노복합체는 우수한 항생 활성, 예를 들어 항바이러스 활성, 항박테리아 활성 또는 항진균 활성을 나타내면서도 독성이 낮은 항생 조성물을 제공할 수 있다. 이에 따라, 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이에 의한 오염이나 감염을 예방하거나, 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이의 성장을 저해하거나, 또는 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이에 의한 감염을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 기존의 항진균제와 함께 조합하여 사용했을 때 항진균제의 효능을 향상시켜 주어 시너지 효과를 발휘한다. 이에, 우수한 항진균성 병용 제제로도 사용 가능하며, 이로써 기존의 항진균제를 저용량으로 사용할 수 있게 하여 독성으로 인한 부작용을 경감시켜줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 HINS 복합체의 구조와 합성 방법을 개략적으로 도시하는 도면이다.

도 2 에서 도 2의 A 는 균일한 나노스핀들 구조로 합성된 NS-ZnO (대략 200 nm)의 SEM 이미지이다. 도 2의 B 는 합성 NS-ZnO의 크기 분포를 보여주는 동적 광 산란(Dynamic light scattering, DLS) 분석 그래프이다.

도 3 에서 도 3의 A 는 ZnO 나노 물질 (ZnO NP 및 NS-ZnO)의 UV-가시광선 흡수 스펙트럼이다. 도 3의 B 는 ZnO-NP (대략 100 nm) 및 NS-ZnO (대략 200 nm)의 제타 전위를 나타내는 도면이다. 도 3의 C 는 ZnO NP 및 HI 개질 이후 물질의 UV-가시광선 흡수 스펙트럼 (red shift)이다. 도 3의 D 는 NS-ZnO 및 HI 개질 이후의 물질 (HINS 복합체)의 UV-가시광선 흡수 스펙트럼 (blue shift)이다.

도 4 는, HI-개질된 ZnO 나노물질의 제타 전위를 보여주며, 이를 가용성 ZnO NP-HI와 HINS 복합체를 30분 동안 방치한 이후를 보여주는 사진과 함께 나타낸 것이다.

도 5 에서 도 5의 A는 다양한 농도 (1 내지 16 $\mu\text{g/mL}$)에서 ZnO 나노물질의 항박테리아 활성을 E. coli 에 대해 테스트한 결과를 나타낸다 (12시간 배양). 도 5의 B 는 NS-ZnO (대략 200 nm)가 E. coli 를 용균하는 것을 보여주는 SEM 이미지이다.

도 6 은 ZnO 나노물질의 항진균 활성을 시험한 결과를 보여준다 (2000 아스페질러스 포자/디쉬, 25℃ 배양, 배양 7일후). 도 6의 A는 0.6 mg/mL 에서 ZnO 나노물질을 사용하여 7일간 배양한 아스페질러스 콜로니를 보여주며, B 는 다양한 농도의 ZnO 나노물질 (0.1 내지 1.0 mg/mL)을 사용했을 때 농도에 따른 아스페질러스 콜로니의 비율을 보여주는 그래프이다.

도 7은 ZnO 나노물질 (0.2 mg/mL, 50 μL)의 항진균 활성을 시험한 결과를 보여준다(400 아스페질러스 포자/디쉬, 25℃ 배양, 10일간의 배양 조건). 도 7의 A 는 ZnO 나노물질의 배양 4일째 되는 날에 관찰된 아스페질러스 콜로니를 보여준다. 도 7의 B 는 10일 동안의 배양 동안에 관찰된 아스페질러스 콜로니의 성장 속도를 보여주는 그래프이다.

도 8 에서 A 는 ROS 영향을 보여주는 그래프이고, B 는 주변 이온에 의한 영향을 보여주는 그래프이며, C 는 브로쓰의 pH 에 따른 영향을 보여주는 그래프이고, D 는 매질의 pH 에 따른 영향을 보여주는 그래프이다.

도 9 에서 A 는 HINS 복합체를 다른 항생 물질과 조합하여 사용했을 때의 시너지 효과에 대한 항진균 메커니즘

가설을 보여주는 도면이며, B 는 아스퍼질러스 콜로니 사진으로서 다른 항생 물질과의 조합을 통한 효과를 보여주며, C 는 25℃에서 9일 동안 아스퍼질러스 콜로니의 직경을 매일 기록한 결과를 보여준다 (400 포자/디쉬, 0.1 mg/mL의 ZnO 나노물질, 이트라코나졸 6 µg/mL, 50 µL 중에서).

도 10 에서 A 는 *in vitro* 혈액 테스트 방법을 개략적으로 보여주는 도면이고, B 는 ZnO 나노물질의 흡광도 초기 값 (IV)과 *in vitro* 혈액 테스트 이후의 흡광도 값 (OV)을 보여주는 그래프이고, C 내지 D 는 각각, 혈액 중 ZnO NP-HI 및 HINS 복합체 시스템의 상층을 보여주는 현미경 사진이다.

도 11 은 HINS 복합체를 사용한 *in vivo* 독성 및 생체적합성 테스트 결과이다. NS-ZnO 또는 HINS 복합체를 저용량(LD) 및 고용량(HD)으로 정맥 투여하고 14일 동안 마우스의 체중을 모니터링하였다. 도 11의 A는 수컷 마우스의 체중 변화, B 는 암컷 마우스의 체중 변화이다. 도 11의 C와 D 는 저용량(LD)과 고용량(HD)의 NS-ZnO 또는 HINS 복합체를 정맥 투여한지 14일 후에 마우스의 신장 (도 11의 C) 및 간 (도 11의 D)의 중량 변화를 보여준다. 마우스를 안락사시킨 후, 혈액 중 전체 단백질(TP) 및 알부민의 양을 도 11의 E 에 나타내었으며, 콜레스테롤 (T-Chol) 및 트리글리세리드 (TG)의 양을 도 11의 F 에 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016]

이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0017]

본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 구현예를 설명하기 위해 사용된 것으로서 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다.

[0018]

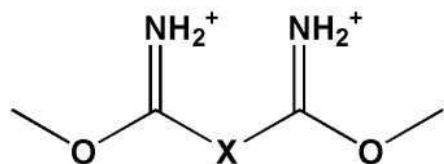
명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다, "함유" 한다, "가지다" 라고 할 때, 이는 특별히 달리 정의되지 않는 한, 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0020]

본 발명의 일 양태에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물로 개질된 산화아연 나노복합체가 제공된다:

[0021]

[화학식 1]



[0022]

상기 화학식 1에서, X 는 (CH₂)_n 이고, n 은 5 내지 10의 정수이다.

[0023]

[0024]

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 동형 2기능성 이미도에스테르 화합물이라고 할 수 있다. 상기 화학식 1로 표시되는 동형 2기능성 이미도에스테르 화합물로는 디메틸 아디피미데이트, 디메틸 피멜리미데이트, 디메틸 수베르이미데이트, 및 3,3'-디티오비스프로피온이미데이트이 포함될 수 있다. 이에, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 디메틸 아디피미데이트, 디메틸 피멜리미데이트, 디메틸 수베르이미데이트, 또는 3,3'-디티오비스프로피온이미데이트, 예를 들어, 디메틸 피멜리미데이트 또는 디메틸 수베르이미데이트로 개질된 산화아연 나노복합체가 제공될 수 있다. 상기 화합물은 표면 에너지를 교차할 수 있고 산화아연 밴드 갭을 활성화할 수 있는 아민기를 산화아연 나노결정의 표면에 충분히 추가할 수 있다.

[0025]

본 발명에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물로 개질된 산화아연 나노복합체의 상기 개질은 화학식 1로 표시되는 화합물의 염을 산화아연 나노결정과 혼합함으로써 얻어지는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 산화아연 나노복합체는 산화아연 나노결정을 제조하는 단계 및 상기 제조된 산화아연 나노결정을 화학식 1로 표시되는 화합물의 염, 예를 들어 HCl 염과 혼합하는 단계에 의해 제조된 것일 수 있다. 여기서 상기 산화아연 나노결정은 수열 합성에 의해 제조될 수 있으며, 예를 들어 상기 수열 합성은 아연 전구체를 물과 함께 85 내지 95℃에서 30 내지 80분 동안 가열하여 수행될 수 있고, 이 때 상기 아연 전구체를 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드(hexadecyltrimethylammonium bromide)와 같은 계면활성제와 함께 가열하여도 된다.

- [0026] 본 발명의 산화아연 나노복합체를 위한 상기 산화아연 나노결정은 나노 크기의 결정 형태일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 산화아연 나노결정은 100 내지 300 nm 크기, 예를 들어 130 내지 230 nm 크기의 나노 결정일 수 있다. 또한, 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 산화아연 나노결정은 구형 입자의 형태 또는 스핀들(spindle) 형태일 수 있다. 상기 스핀들 형태는 양단이 뾰족하고 중간 부분이 볼록한 형태를 말하며, 예를 들어 본 명세서의 도 2의 A에 나타나 있는 형태일 수 있다. 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면 상기 산화아연 나노결정이 화학식 1의 화합물에 의해 개질된, 본 발명의 산화아연 나노복합체도 구형 입자 또는 스핀들 형태를 가질 수 있다. 상기 스핀들 형태는 혈액 내에서 산화아연 나노복합체의 유속을 증가시킨다는 장점이 있는데 이는 정맥 주사와 같은 주사 치료에 있어서 응집 가능성을 감소시켜준다. 또한, 스핀들 형태의 첨예한 양단은 바이러스, 박테리아, 곰팡이와 같은 미생물의 세포벽을 파괴하는데 도움이 될 수 있으므로 항생 효과의 증가에도 기여할 수 있다. 따라서, 상기 산화아연 나노복합체는 스핀들 형태를 가지는 것이 바람직하다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 산화아연 나노복합체는 표면 양성 전하를 가질 수 있다. 이와 같이 상기 복합체가 양성 전하를 나타냄에 따라 바이러스, 박테리아나 곰팡이와 같은 미생물을 끌어들이는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면 전술한 산화아연 나노복합체를 유효 성분으로 함유하는 항생 조성물이 제공될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "항생 조성물(antibiotic composition)"은 바이러스, 곰팡이(fungi), 원생동물(protozoa) 및 박테리아(bacteria)을 포함하는 미생물을 사멸하거나 성장을 억제시키는 항생 물질(antibiotics)을 함유한 조성물을 의미한다. 따라서, 상기 항생 물질은 항생 활성, 즉, 항바이러스 활성, 항박테리아 활성, 또는 항진균 활성을 갖는다. 이에, 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 상기 항생 조성물은 항바이러스 활성, 항박테리아 활성, 또는 항진균 활성을 갖는 조성물일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 항생 조성물은 그람 음성 박테리아에 대한 항박테리아 활성을 갖는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 복합체는 박테리아에 의한 오염이나 감염을 예방하거나 박테리아의 번식을 저해하거나 박테리아에 의한 감염을 치료하는데 유효한 성분이다. 상기 그람 음성 박테리아로는 대장균, 살모넬라균, 이질균, 티푸스균, 콜레라균, 임균, 수막염균 등을 예로 들 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 조성물은 대장균 또는 살모넬라균에 대해 항박테리아 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 항생 조성물은 항진균 활성을 갖는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 복합체는 곰팡이에 의한 오염이나 감염을 예방하거나 곰팡이의 성장을 저해하거나 곰팡이에 의한 감염을 치료하는데 유효한 성분이다. 본 발명에 따른 항진균 활성을 갖는 조성물은 병원성 곰팡이, 예를 들어 캔디다 알비칸(*Candida albicans*), 크립토크코스 네오포르만(*Cryptococcus neoformans*), 캔디다 글라바타(*Candida glabrata*), 캔디다 리시타니에(*Candida lusitaniae*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*), 아스퍼질러스 휴미거투스(*Aspergillus fumigatus*), 푸자리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 등에 대해 항진균 활성을 나타낼 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 조성물은 아스퍼질러스속(*Aspergillus*)의 곰팡이에 대한 항진균 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물로 개질된 산화아연 나노복합체를 유효 성분으로 함유하는 바이러스 감염증, 박테리아 감염증, 또는 곰팡이 감염증의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물이 제공될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 항생 조성물은 추가의 항진균제와 함께 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 다른 일 양태에 따르면 전술한 산화아연 나노복합체 및 항진균제를 함유하는 항진균성 병용 제제가 제공된다. 본 발명에 따른 항생 조성물과 함께 사용되는 상기 항진균제 또는 본 발명에 따른 산화아연 나노복합체와 함께 병용 제제에 포함되는 항진균제는 예를 들어 케토코나졸, 이트라코나졸, 플루코나졸, 미코나졸, 클로트리마졸, 펜티코나졸, 에코나졸, 비포나졸, 옥시코나졸, 클로코나졸, 몰시클레이트, 암포테리신 B, 플루사이

토신, 그리세오폴빈, 터비나핀, 니스타틴, 톨나프테이트, 나프티핀, 할로프로진, 사이클로피록스, 트리클로산, 노프로락신, 시프로락신 및 염으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 것일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 항진균제는 이트라코나졸 또는 암포테리신 B일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 산화아연 나노복합체를 함유하는 항생 조성물은 이트라코나졸 또는 암포테리신 B를 투여할 때 동시에 또는 시간차를 두고 함께 투여될 수 있거나, 또는 본 발명에 따른 산화아연 나노복합체를 이트라코나졸 또는 암포테리신 B와 함께 병용 제제로 제형화하여 투여할 수도 있다.

[0039] 본 발명의 전술한 항생 조성물, 약제학적 조성물, 또는 병용 제제는 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 더 포함할 수도 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 약제학 분야에서 통상적으로 사용되는 것일 수 있으며, 부형제 (예를 들어, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로스, 락토스, 소르비톨, 만니톨, 셀룰로오스 등) 또는 희석제 (예를 들어, 생리식염수, 정제수 등)일 수 있다.

[0040] 또한, 필요에 따라, 본 발명의 항생 조성물, 약제학적 조성물, 또는 병용 제제는 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 이외의 약학적으로 허용 가능한 첨가제, 예를 들어, 결합제, 붕해제, 활택제, 제피제, 필름 코팅 기재, 장용성 필름 코팅 기재, 연질 캡슐 기재, 용해보조제, 유화제, 현탁화제, 안정화제, 완충제, 향산화제, 계면활성제, 감미제, 교미제, 보존제, 점증제, 방향제, 또는 착색제를 더 포함할 수도 있다.

[0041] 본 발명의 항생 조성물, 약제학적 조성물, 또는 병용 제제는 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구의 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 본 발명의 약제학적 조성물은 고체 제형의 형태로 제형화될 수 있다. 액제의 경우, 활성 성분을 정제수, 생리식염수 등과 같은 담체, 및 필요에 따라 모노스테아린산수크로스 등과 같은 용해보조제, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 안정화제 등과 함께 제제화할 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 항생 조성물, 약제학적 조성물, 또는 병용 제제는 주사용, 예를 들어 정맥내 주사용으로 사용되는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 항생 조성물, 약제학적 조성물, 또는 병용제제의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 병활성율, 및 병용되는 약물의 종류를 고려하여 결정할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0045] 한편, 본 발명에 따른 조성물은 반드시 인간 또는 인간 이외의 동물에 투여될 필요는 없으며, 적절한 희석제 등과 함께 조합되어, 곰팡이 또는 박테리아에 의한 오염을 예방하거나 번식을 저해할 목적으로, 필요한 장소 또는 기구에 분무 또는 도포되는 형태로 제형화되어 사용되어도 된다.

[0047] 이하에서는 본 발명의 실시예를 참조하여 발명을 더욱 구체적으로 설명하겠다. 실시예는 발명의 설명을 위해 제시되는 것이므로, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] [합성예]

[0050] (1) ZnO 나노스핀들(NS) 결정의 제조

[0051] ZnO NS 결정은 알카라인 배지에서 수열합성법에 의해 합성하였다. 간단히 설명하면, 250 mL 플라스크에서 1 mL의 1 M $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (Sigma, 228737-100G) 및 1 mL의 1 M 세틸트리메틸암모늄 브로마이드 (cetyltrimethylammonium bromide; CTAB, DaeJung Chemicals, 2544-4105)을 98 mL Milli-Q water에 첨가하고, 95°C 에서 50분 동안 가열하면서 마그네틱으로 교반하였다 (500 rpm). 이후, 안정적인 교반 조건하에서, 2 mL의 수산화암모늄 용액(ammonium hydroxide solution; DaeJung Chemicals, 1065-3300)을 반응 혼합물에 적가하여 첨가하였다. 교반하면, 우윳빛의 콜로이드성 용액이 되었다. ZnO NS의 성장을 중단시키기 위해, 반응 플라스크를 즉시 0°C 냉동고에 두었다. 약 10분 후, 50 mL 튜브에 옮겼고, 원심분리하였다. 이 후, 상등액을 제거하였고, 잔여 이온을 씻어내기 위해서 Milli-Q water로 침전물을 재현탁시켰다 (3번 반복). 최종적으로, Drying Oven (Yamato, DX312C)에서 56°C로 밤새도록 침전물을 건조시켰다.

[0052] ZnO 나노입자가 스핀들 구조를 형성하도록 유도하였다. 도 2에서 A 는 균일한 나노스핀들 구조로 합성된 NS-ZnO (대략 200 nm)의 SEM 이미지이다. 상기 SEM 이미지로부터 뾰족한 양단 및 볼록한 중심부 구조를 갖는 스핀들 구조의 균일한 NS-ZnO 결정이 형성되었음을 확인할 수 있었다. 도 2에서 B는 NS-ZnO 나노물질의 크기 분포 데이터를 나타내며, 상기 제조된 NS-ZnO 의 크기가 180 내지 200 nm 범위에 주로 분포되어 있음을 알 수 있다.

[0053] 또한, 도 3에 나타낸 바와 같은 자외선 가시광선 분광 분석을 통해 금속 원소의 특성 및 형태학적 특성을 나타내었다. 상업적 ZnO NP (~100 nm)에 비해, 본 발명자들이 합성한 스핀들 구조의 ZnO NSs (~200 nm)는 390 nm에서 특징적인 피크를 나타냈고 (도 3에서 A 참고), ZnO NS의 성장은 순수한 ZnO이며, 피크의 너비(빨강 선) 또한 스핀들 형태의 ZnO NS인 것을 확인하였다. 순수 ZnO 나노소재의 표면 전하는 제타 전위로 측정하여 도 3에서 B에 나타내었다. ZnO-NS (~200 nm) 상의 특별한 양성 표면 전하는 ZnO NS가 본 발명의 개량된 NH₄OH 합성 과정에서 유래하는 NH₄⁺ 그룹으로 커버되어 있고, 가벼운 용해능을 유도한다는 것을 나타낸다. 또한, 양성 표면 전하는 추가적인 생체적합성 적용에 대한 최적 조건을 제공할 수 있다.

[0055] (2) 동형 2기능성 이미도에스터(homobifunctional imidoester; HI) 개질

[0056] 다음으로, 동형 2기능성 이미도에스터(homobifunctional imidoester; HI) 개질을 수행하였다. 디메틸 피멜리미데이트 디하이드로클로라이드(dimethyl pimelimidate Dihydrochloride; DMP, Sigma, D8388-5G) 또는 디메틸 수베리미데이트 디하이드로클로라이드(dimethyl suberimidate Dihydrochloride; DMS, Sigma, 179523-5G)의 2종류 HI를 사용하였다. 간단히 설명하면, 4mg ZnO NS (40 mg/mL, 100 uL) 및 4mg HI (DMP 또는 DMS, 10 mg/mL, 400uL)를 1.5mL EP 튜브 에 총 500 uL 용액으로 용해시켰다. Oscillating machine (Magic-mixer TMM-5)을 통해, 혼합물을 진동시켰다. 12시간 후, 혼합물을 12000 rpm으로 5분 동안 원심분리시켰다(Mini-Centrifuge, Labogene). 상등액을 제거하였고, 침전물은 Milli-Q water로 2번 씻어냈다. 최종적으로, 10 mg/mL ZnO NS-HI를 얻기 위해서, 400uL Milli-Q water를 사용하여 침전물을 재현탁하였다. 이후, Drying Oven (Yamato, DX312C)에서 56℃로 밤새도록 침전물을 건조시켰다.

[0057] 도 3의 C와 D에 나타낸, HI 개질된 ZnO 나노소재에 대한 UV-가시광선 흡수 스펙트럼은 ZnO NS-HI_DMP 및 ZnO NS-HI_DMS를 나타낸다. 도 3의 C에서의 경우 HI-개질된 ZnO NP에서의 red shift를 보여주는데 이는 HI (DMS) 개질로 인한 에너지 손실에 의해 야기되었을 수 있으며, 피크 범위의 너비가 넓어진 것은 용융 또는 응집으로 인한 입자의 모폴로지 변화를 말한다. 도 3의 D에서의 경우 HINS 복합체의 blue shift 를 보여주며 이는 명확한 모폴로지 용융 또는 응집이 없었다.

[0058] 도 4 는, HI-개질된 ZnO 나노물질의 제타 전위를 보여주며, 이를 가용성 ZnO NP-HI와 HINS 복합체를 30분 동안 방치한 이후를 보여주는 사진과 함께 나타낸 것이다. 겔보기 표면 제타 전위 값은 소재의 표면 활성을 나타낸다. HI 개질 후 ZnO NS에 있어서, 겔보기 제타 전위는 +40까지 증가하였는데, 이는 활성 용액 전도를 나타낸다. 대조적으로, ZnO NP는 HI 개질에 있어 반대 조건을 나타냈다. ZnO NP-HI(DMP)는 보다 쉽게 응집된다. 여기서, HI(DMP) 개질된 ZnO 나노소재를 동일한 농도(1mg/mL)로 가만히 5분 동안 유지시키면, ZnO NP-HI(DMP)는 보다 쉽게 응집되었고 침전되었는데, ZnO NS-HI(DMP)는 보다 좋은 용해도를 나타냈다. 한편, ZnO NS-HI의 전도도(conductivity)는 ZnO NP-HI 에 비해 102 배 증가하였다(Zetasizer Nano Series, Malvern로 시험).

[0060] [시험예 1] 항생 활성 평가

[0061] (1) 항박테리아 활성 평가

[0062] 그람 음성 박테리아 (*Escherichia coli* 및 *Salmonella*)를 사용하여 항박테리아 활성을 시험하였으며, 박테리아 부유액이 포함된 튜브에 10 μg/mL의 시험 나노소재를 넣었다. 37℃에서 210 rpm으로 밤새도록 반응시킨 후, OD 600 nm에서 각 샘플의 흡광도를 측정하였다. 1 μg/mL 내지 16 μg/mL의 연속적인 농도의 ZnO 나노소재에 대한 박테리아 생존능을 확인하였다. 도 5 의 A로부터, 매우 낮은 농도 (4 μg/mL)에서도 HINS (ZnO NS-HI(DMP))는 박테리아의 성장을 완전히 저해하였음을 알 수 있으며, 이는 다른 ZnO 나노물질, 즉, ZnO NP 및 ZnO NS 보다 훨씬 더 우수한 항박테리아 특성을 보이는 것이다. 또한 NS-ZnO 의 항박테리아 활성이 동일 농도에서 ZnO NP에 비해 더 우수하였으며, 이는 활성 표면 특성 (양성 표면 전하가 박테리아를 쉽게 유인함) 및 물리적 형태 (NS-ZnO의 첨예한 돌기)로 인한 것으로 보인다. 한편, 도 5의 B에 나타낸 SEM 이미지에서는 ZnO NS가 병

원균 (*E. coli*)에 흡착되고, 병원균의 멤브레인이 용해되는 것을 나타낸다.

(2) 항진균 활성 평가

항진균 활성을 평가하기 위해서, 아스퍼질러스 곰팡이 (*Aspergillus fumigatus*)가 사용되었다. SEM 이미지에서, 본 발명자들은 포자가 ZnO 나노소재를 뒤덮고 있는 것을 확인하였고, 멤브레인은 약해졌고 파괴되었다 (도 6의 B).

두 가지 방법을 사용하였으며, 먼저, 멸균 아가 플레이트 내 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/mL 농도의 ZnO 나노소재와 곰팡이를 혼합하여 배양하였다(2000 포자, 25°C, 7일). 항진균 분석을 수행하기 위해서, 텍스트로스 아가 배지를 준비하였다. 다양한 용량의 시험 나노소재(ZnO 나노소재)를 포함한 특정 고체 배지를 제조하였다. 매 12시간 마다 성장 사진을 기록 하였고, 곰팡이의 성장 영역을 Image-J로 측정하였으며, 대조군 샘플과 비교하여 각 처리군의 성장율을 분석하였다. 상기 연속 배양에 있어서 콜로니 성장 비율을 확인하였다. 도 6의 B로부터, 약물 농도가 증가함에 따라 진균 포자의 생존율이 감소한다는 것을 알 수 있었다. 0.4 mg/mL 농도의 HINS 복합체는 현저한 저해능을 나타내었고, 이는 다른 나노물질의 더 높은 농도 (0.6 mg/mL)에 비교하여서도 훨씬 더 강한 저해능이었다. 도 6의 A로부터 HINS 복합체 0.6 mg/mL 에서, 배양 한천이 깨끗하다는 것을 확인할 수 있으며, 이는 HINS 복합체가 곰팡이 포자의 성장을 저해할 뿐만 아니라 이들을 사멸시킨다는 것도 보여주는 것이다.

도 7에서는 콜로니를 한천 중심부에 이식하여 퍼져나가는 것을 관찰하였으며, 성장 속도는 콜로니 표면적을 측정하여 계산할 수 있었다. 매일 각 콜로니 (400 포자/디쉬, 0.01 mg/mL 약물 농도)의 표면적을 기록하고 성장 속도를 도 7의 B에 그래프로 나타내었다. 처음 7일 동안은 HI로 개질한 나노물질 (ZnO NP-HI 및 HINS 복합체)을 사용했을 때의 성장 속도가 다른 나노물질에 비해 현저히 느렸고, 그 후 7일 내지 14일의 기간 동안에는 HI로 개질한 나노물질은 성장 속도가 거의 일정한 상태로 되었다. 이는 본 발명에 따른 HI 개질에 의해 항진균 활성이 장기간 지속된다는 것을 확인하는 것이다.

[시험예 2] 환경에 따른 영향 평가

DCFDA-ROS 키트 테스트를 수행하였으며, 그 결과를 도 8의 A에 나타내었다. 본 실험에서 사용한 ZnO 나노물질은 ROS 강도가 일반 세포 환경에서보다 1.5배 더 높았고 (단, 산화 스트레스의 안전한 세포 밸런스 범위 내에 있음), HI (DMS 및 DMP) 개질 후에 L929 세포 환경의 산화 스트레스가 증가하였음을 보여준다 (단, 여전히 수용 가능한 세포 밸런스 범위 내에 있음).

진균 성장에 대한 이온의 영향을 알아보기 위하여 염 용액을 높은 분자 농도 (10 M, 10 μ L) 및 낮은 분자 농도 (0.1 M, 10 μ L)로 첨가하였으며, 37°C에서 1000 아스퍼질러스 포자/디쉬의 조건으로 배양하였다. 배양 3일째 되는 날의 콜로니에 기초하여 결과를 도 8의 B에 나타내었다. $Zn(NO_3)_2$ 및 $ZnCl_2$ 에 의해 공급된 Zn^{2+} 이온이 Na_2CO_3 , NaCl, $MgSO_4$, 및 $(NH_4)_2CO_3$ 에 의해 공급되는 Na^+ , Mg^{2+} 또는 NH_4^+ 이온에 비하여 더 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있으며, 고농도 mol (10 M)의 Zn^{2+} 를 보충했을 때 효과가, 순수한 NS-ZnO에 비하여 거의 두 배였다.

pH에 따른 영향을 알아보기 위하여 브로쓰(broth)의 pH를 조정하였으며, 그 결과를 도 8의 C에 나타내었다. pH를 산성으로 조정함에 따라 HINS 복합체의 항진균 활성이 없어졌다는 것을 알 수 있다. 그러나, pH 테스트를 한천 배지에서 수행한 경우에는 NS-ZnO 및 HINS 복합체 모두가 항진균 특성을 유지하였고, 이는 도 8의 D에서 확인할 수 있다. 인체 내에서의 유사한 pH 값으로서 pH 7.5 (혈액), pH 4.5 (장), 및 pH 2.5 (위)를 설정하였다. 도 8의 D로부터 각 pH에서 HINS 복합체의 우수한 항진균 활성을 확인할 수 있으며, 이는 HINS 복합체가 상처 표면에 의약 연고(ointment)로 사용될 수 있다는 것을 시사한다. 또한, 혈액 pH 배지에서 활성이 유지되었다는 것은 안전하게 정맥 투여가능하다는 점을 시사한다.

[0075]

[시험예 3] 다른 항생제와의 병용 실험

[0077]

도 9의 A 는 본 발명의 복합체와 기존의 항생제의 병용에 따른 시너지 효과를 설명하는 메커니즘 가설을 보여주는 것으로서, HINS 복합체의 향상된 항진균 특성은 이미도에스테르 관능기가 ROS 및 Zn²⁺의 수명을 연장시키고 포자 벽/멤브레인을 손상시키는데 도움을 주기 때문인 것으로 보인다.

[0079]

전술한 병용에 따른 시너지 효과를 확인하기 위해 NS-ZnO 와 이트라코나졸(itraconazole)을 사용하였고, 여기서 이트라코나졸의 농도는 6 µg/mL 로 하고, ZnO 나노물질의 농도는 0.1 mg/mL 로 하였다. 아스페질러스 콜로니의 직경을 매일 기록하였고 그 결과를 도 9의 B와 C에 나타내었다. 도 9의 B 는 배양 6일의 아스페질러스 콜로니를 보여준다. 결과에 따르면 병용에 의해 항진균 활성이 향상되었을 뿐만 아니라 배양 9일 이후까지 저해능이 유지되는 것으로 나타났다. 5일째 되는 날에 HINS 복합체는 70%의 저해율을 나타내는데 반해, ZnO NP-HI 의 저해율은 35% 였다. 대조군에 비해 HINS 복합체를 사용했을 때 아스페질 콜로니의 성장 속도가 느리다는 것은 HINS 복합체를 장기간 투여에 사용할 수 있고 용량 빈도를 줄여도 된다는 것을 의미한다. 특히, 배양 6일 이후에 이트라코나졸 단독 투여군과 ZnO 단독 투여군의 경우에는 성장 속도가 빠르게 증가하였는데 이는 위의 약물이 새로운 포자의 성장을 저해하지 못한다는 것을 의미한다. 이에 반해, HINS 복합체와 이트라코나졸의 병용 투여군의 경우, 시너지 효과로 인해 저해 효과는 배양 6일에도 거의 90% 였다.

[0081]

[시험예 4] *in vitro* 혈액 테스트

[0082]

신선한 양(sheep)의 혈액을 사용하였으며, HI-개질된 ZnO 나노물질을 상기 혈액에 첨가하고 튜브를 10분 동안 방치하였다. 오른쪽 튜브에 있는 HINS 복합체는 침전된 반면에 왼쪽 튜브는 불명료하였는데, 이와 같이 명확한 침전이 없다는 것은 ZnO NP-HI가 혈액 세포와 융합되어 세포 독성 및 혈전을 일으킬 수 있다는 것을 가리킨다. 혼합물이 얇은 유연성 플루이드 칩 (길이: 45 cm, 부피: 350 µL)을 통과하게 하였으며 배출된 물질 중의 ZnO 양을 UV-가시광선 분광계로 확인하였다. 인간 혈액의 가장 느린 속도가 대략 7 cm/s 이므로, 펌프를 그보다 더 낮은 1 cm/s 의 유속이 되도록 하였으며 수집한 데이터는 도 10의 B 에 나타내었다. 도 10의 B 로부터, ZnO NP-HI 시스템에 비하여 HINS 복합체 시스템에서 ZnO 손실이 더 적었다는 것을 알 수 있다. HI 개질은 HINS 복합체가 혈장에서 더욱 원활하게 움직이도록 도와주며 그의 모양은 HINS 복합체가 흐름 저항을 낮춰서 유연하게 흐를 수 있도록 도와준다는 것을 알 수 있다. 도 10의 C 로부터, 다량의 ZnO NP-HI가 혈액 세포에 부착하였음을 확인할 수 있으나 도 10의 D 로부터 HINS 복합체는 상태가 상당히 우수하다는 것을 확인할 수 있다.

[0083]

위의 결과로부터 HINS 복합체는 혈액 중의 단백질 활성이 유지되도록 하여주고 혈전을 일으키지 않으므로, 우수한 생체 적합성을 가졌으며 정맥 투여에 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0085]

[시험예 5] *in vivo* 독성 및 생체적합성 테스트

[0086]

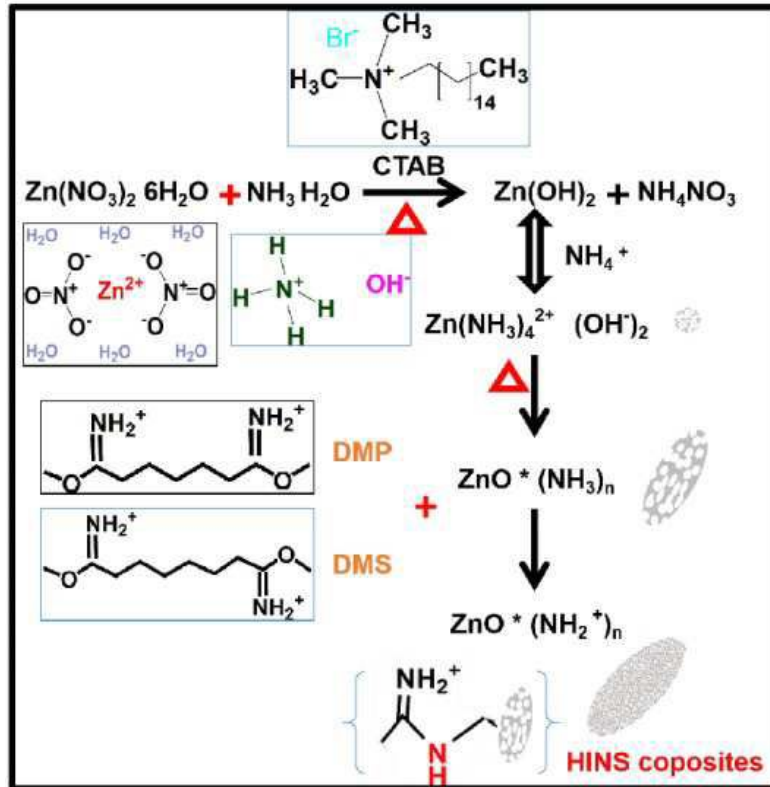
ZnO의 정맥 주입 후, 모든 동물들에 대해 떨림, 경련, 타액 분비, 구역질, 구토, 설사, 체중 변화, 죽음을 포함하는 독성 임상 지표를 14일 동안 매일 관측하였다. 모든 실험에서 죽음은 없었다. 저용량(LD) ZnO NS-HI(DMP) 및 고용량(HD) ZnO NS-HI(DMP) 그룹 모두에서 체중 변화 또는 어떠한 독성 증상에 있어 유의성은 없었다. 14 일 후에 동물들을 희생시켰고, 뇌, 심장, 폐, 비장, 정소 또는 자궁을 포함하는 주요 장기를 수집하였으며, 수컷 및 암컷으로 나누어 무게를 측정하였다. ZnO NS-HI(DMP) 및 대조군 사이의 차이점은 없었다. 또한, 혈액 시험 결과, 간[손상 신호: 혈액 내 알라닌 아미노전이효소(Alanine Aminotransferase; ALT) 및 빌리루빈(T-Bili) 방출] 및 신장[손상 신호: 혈액 내 혈중요소질소(Blood urea nitrogen, BUN) 및 크레아티닌(crea) 방출]은 잘 기능하는 것으로 나타났다. 이상의 생체 내 실험 결과를 통해, 마우스 내에서 ZnO NS-HI(DMP)의 우수한 생체 적합성을 검증하였다

[0088]

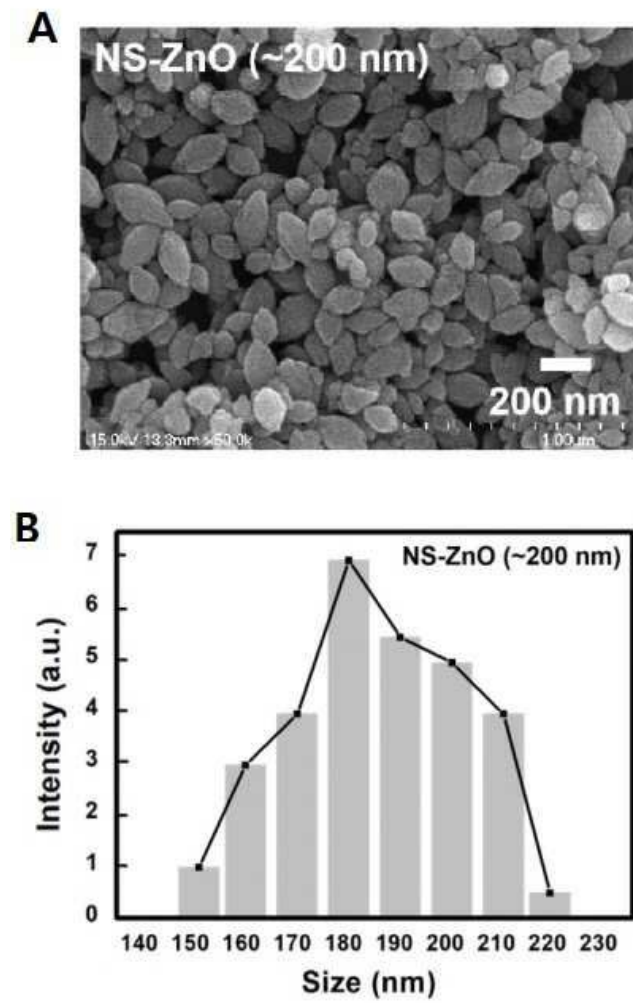
상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

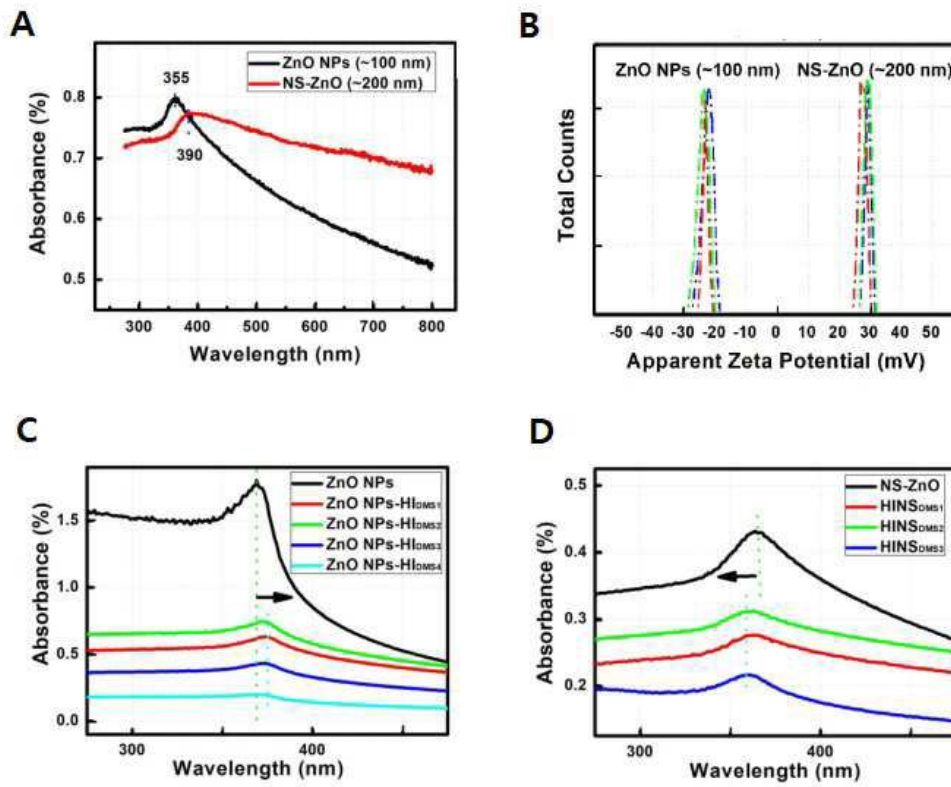
도면1



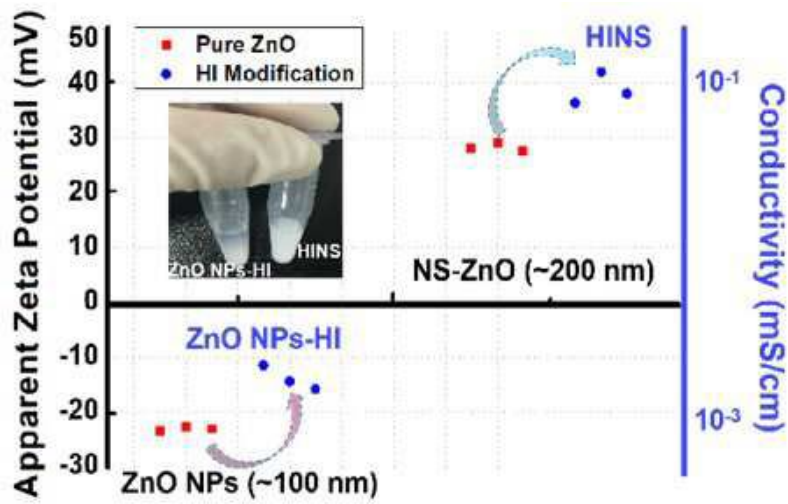
도면2



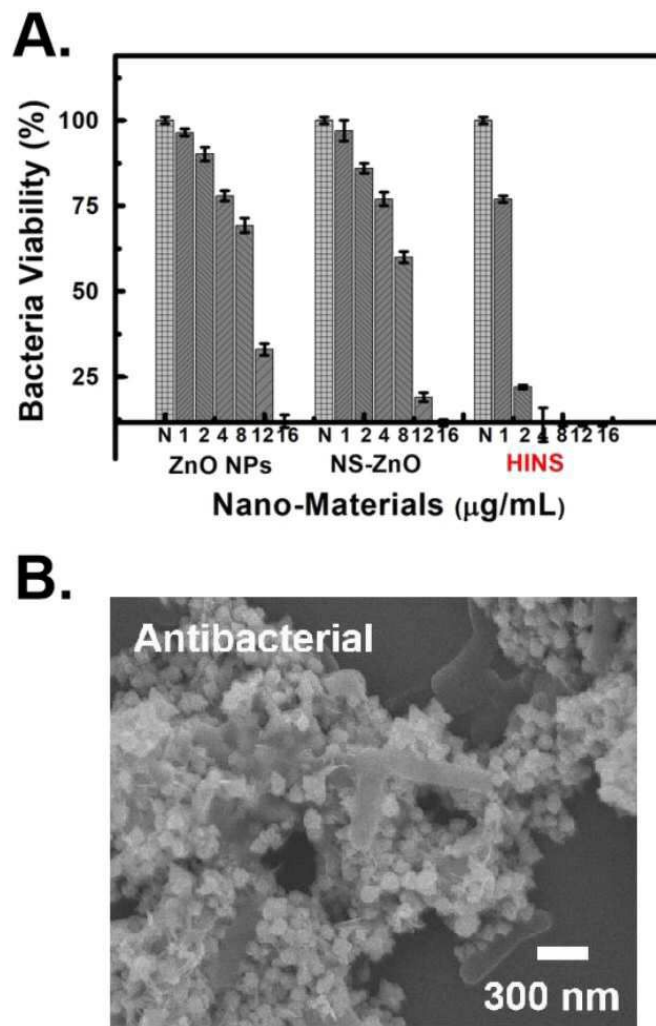
도면3



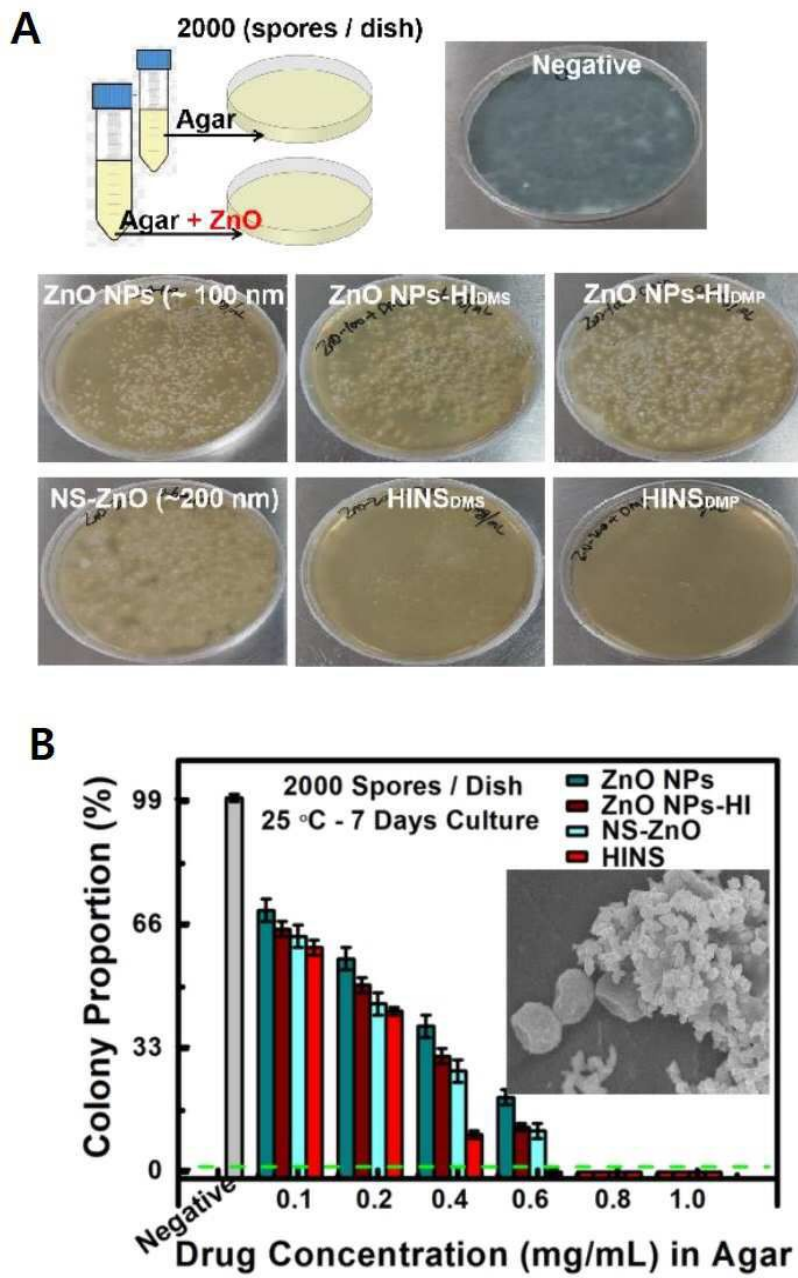
도면4



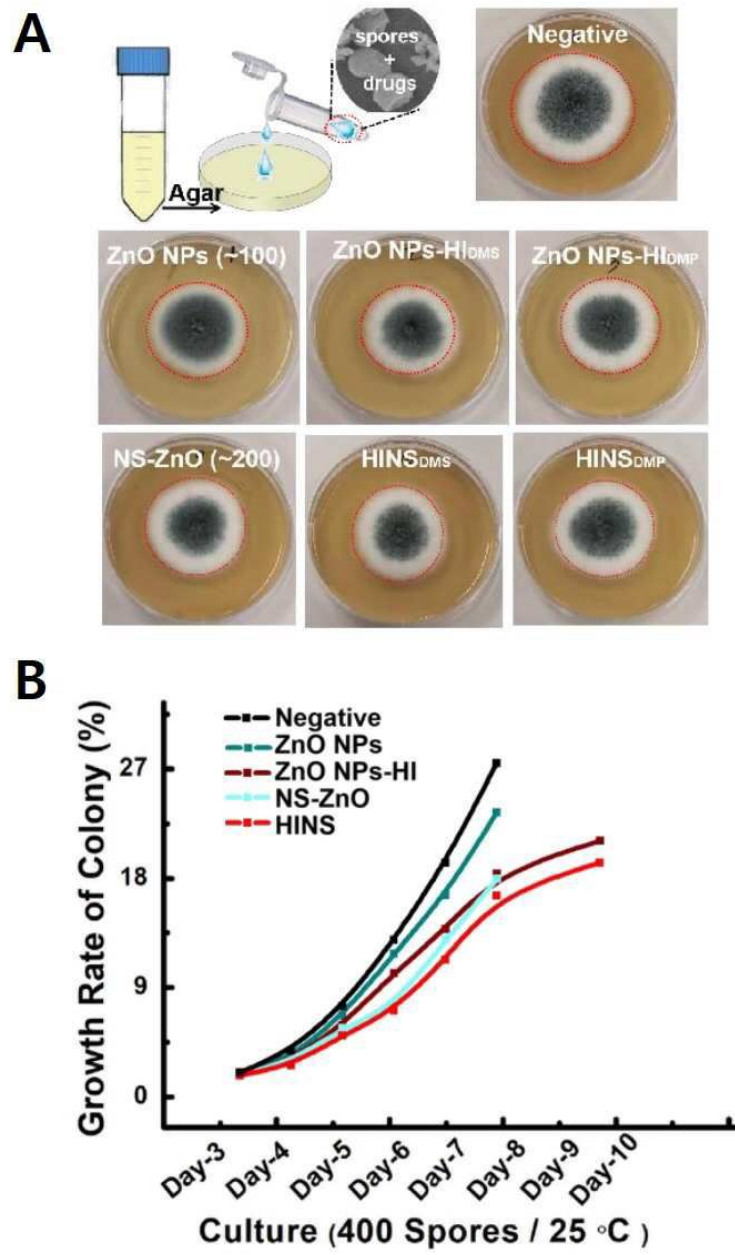
도면5



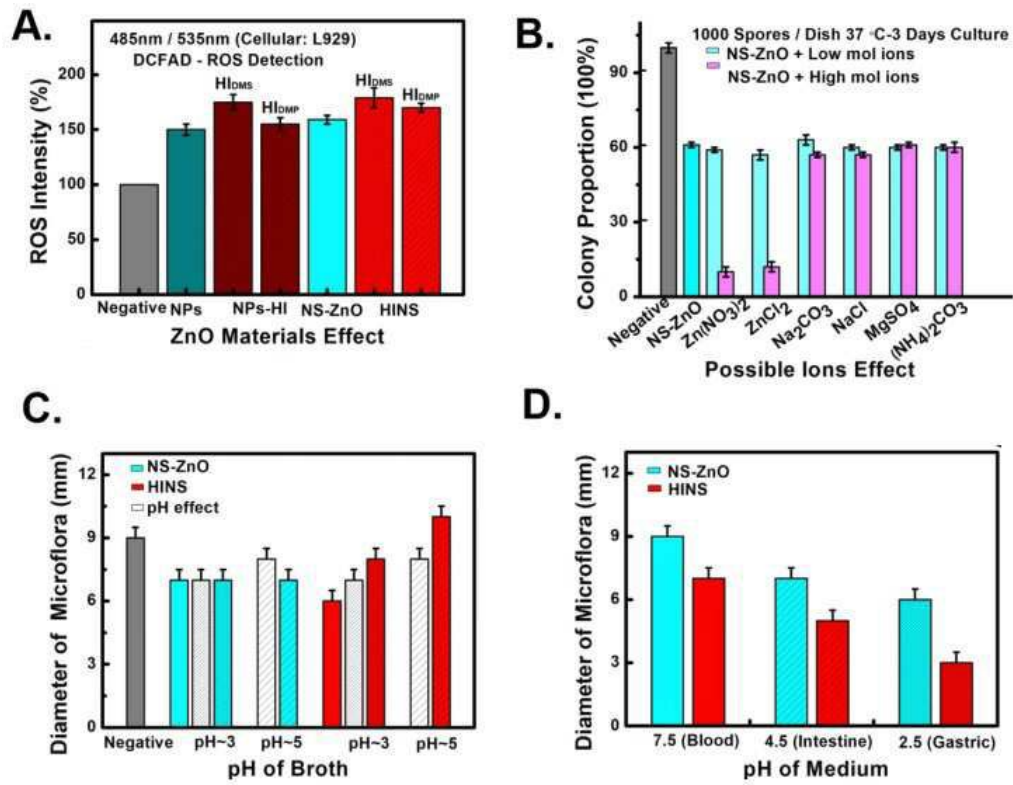
도면6



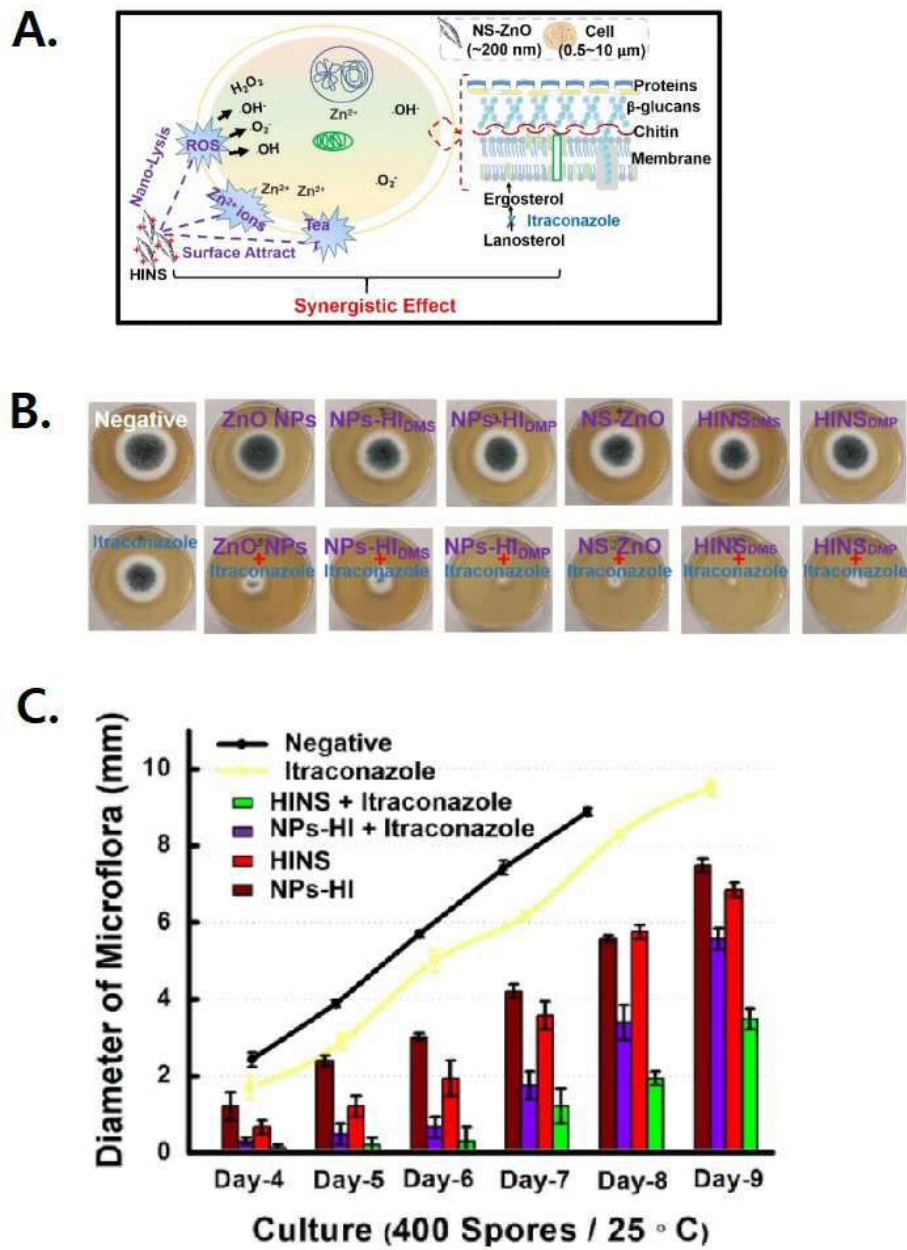
도면7



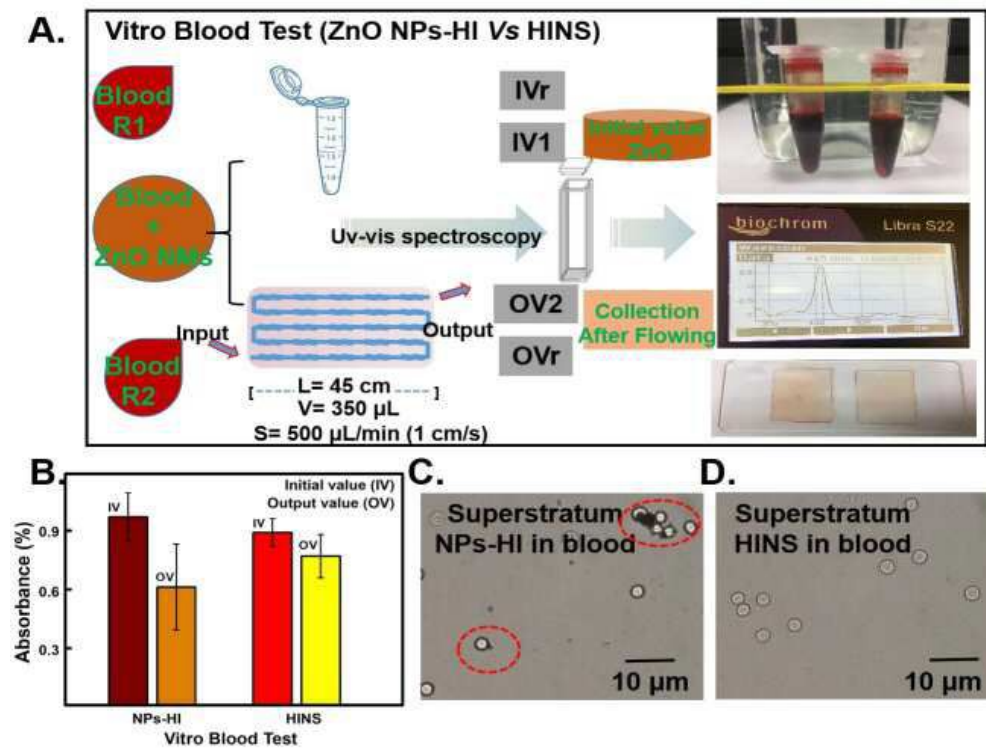
도면8



도면9



도면10



도면11

