



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0009596  
(43) 공개일자 2023년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/30 (2006.01) A61K 31/496 (2006.01)  
A61K 31/7048 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)  
A61P 31/12 (2006.01) C01G 9/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 33/30 (2013.01)  
A61K 31/496 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0090180

(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

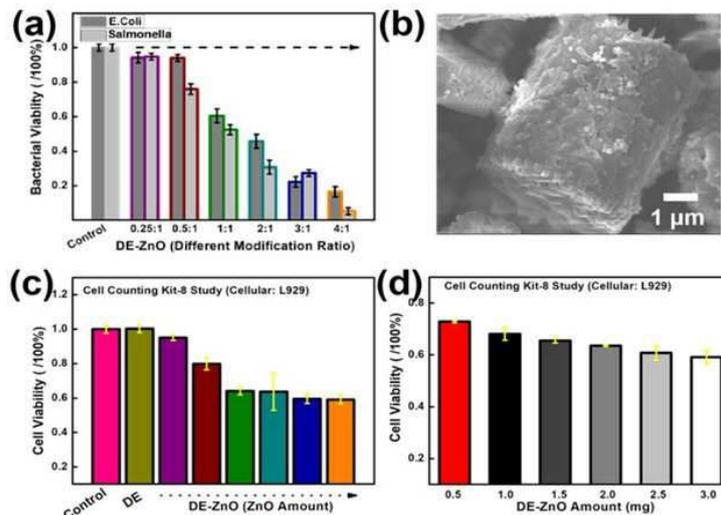
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 구조토와 산화 아연의 복합체를 포함하는 항생 조성물 및 이의 병용 제제

(57) 요약

본 발명은 구조토 상에 산화아연을 포함하는 구조토-산화아연 복합체를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항생 조성물, 및 구조토 상에 산화아연을 포함하는 구조토-산화아연 복합체 및 항진균제를 함유하는 항진균성 병용 제제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항생 조성물은 우수한 항생 활성, 예를 들어 항바이러스 활성, 항박테리아 활성 또는 항진균 활성을 나타내면서도 독성이 낮다. 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.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

- A61K 31/7048 (2013.01)
- A61K 45/06 (2013.01)
- A61K 47/52 (2017.08)
- A61P 31/04 (2018.01)
- A61P 31/10 (2018.01)
- A61P 31/12 (2018.01)
- C01G 9/02 (2013.01)
- A61K 2300/00 (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

규조토 상에 산화아연을 포함하는 규조토-산화아연 복합체를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 산화아연은 규조토 상에서 수열 합성에 의해 합성되고 성장한 나노결정인 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 산화아연은 적어도 하나의 첨예한 돌기 형상을 갖는 나노결정인 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 산화아연은 직경이 200 내지 400 nm의 나노결정인 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 규조토-산화아연 복합체는 표면 양성 전하를 나타내는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 규조토-산화아연 복합체에서 상기 산화아연은 규조토에 대하여 1 이상의 반응 비로 포함되는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 산화아연 대 규조토의 반응 비가 1:1 내지 4:1의 범위인 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

#### 청구항 8

제1항에 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

제8항에 있어서, 아스퍼질러스속(*Aspergillus*)의 곰팡이에 대한 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 추가의 항진균제와 함께 사용되는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이에 의한 오염이나 감염을 예방하거나, 바이러스, 박테리아, 또는 곰팡이의 성장을 저해하거나, 또는 바이러스, 박테리아 또는 곰팡이에 의한 감염을 치료하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 항생 조성물.

**청구항 14**

규조토 상에 산화아연을 포함하는 규조토-산화아연 복합체 및 항진균제를 함유하는 항진균성 병용 제제.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 항진균제는 이트라코나졸 또는 암포테리신 B 인 것을 특징으로 하는 항진균성 병용 제제.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 규조토와 산화 아연의 복합체를 포함하는 항생 조성물 및 이의 병용 제제에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 항생제 내성과 항생제 독성은 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.

[0003] 곰팡이 감염 중에서도 침습성 아스페르길러스증 감염(Invasive Aspergillosis infection, IAI)은 치사율이 높은 감염증이다. 아스페르길러스(*Aspergillus*) 감염을 치료하기 위한 항진균제로는 아졸계 (예를 들어 이트라코나졸), 폴리엔계(예를 들어 암포테리신 B), 에키노칸딘(*echinocandins*)이 있으나, 이들 약물은, 메스꺼움, 설사, 복통, 발진, 두통, 및 장기 손상과 같은 심각한 부작용을 수반하므로, 이의 임상적 사용은 극히 제한적이다.

[0004] 이에 따라, 독성이 적으면서도 개선된 효능을 나타낼 수 있는 항생물질에 대한 개발의 필요성이 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 본 발명의 일 목적은 항바이러스 활성, 항박테리아 활성, 또는 항진균 활성을 나타내면서도 독성이 낮은 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 일 목적은 기존의 항바이러스제, 항박테리아제 또는 항진균제와 함께 조합하여 사용가능하고, 이들 항바이러스제, 항박테리아제 또는 항진균제의 효능을 향상시킬 수 있으며, 독성이 낮은 조성물을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0007] 본 발명의 일 양태에 따르면, 규조토 상에 산화아연을 포함하는 규조토-산화아연 복합체를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항생 조성물이 제공된다.

[0008] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 규조토 상에 산화아연을 포함하는 규조토-산화아연 복합체 및 항진균제를 함유하는 항진균성 병용 제제가 제공된다.

**발명의 효과**

[0009] 본 발명에 따른 항생 조성물은 우수한 항생 활성, 예를 들어 항바이러스 활성, 항박테리아 활성 또는 항진균 활성을 나타내면서도 독성이 낮다. 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**

- [0010] 도 1에서 도 1(a)는 본 발명의 일 구현예에 따른 규조토 (DE)-산화아연 (ZnO) 복합체의 합성 과정을 간략히 나타낸 그림이다. 도 1(b)는 ZnO 나노물질의 UV-가시광선 흡수 스펙트럼이며, 도 1(c)는 합성된 ZnO 나노물질의 SEM 이미지이다.
- 도 2에서 도 2(a)는 DE의 SEM 이미지이고, 도 2(b)는 상기 DE를 사용하여 본 발명에 따라 제조된 DE-ZnO 복합체의 SEM 이미지이다.
- 도 3에서 도 3(a)는 DE-ZnO 의 에너지 분산형 X선 결과를 나타내고, 도 3(b)는 DE-ZnO 복합체의 제타 전위를 나타낸다.
- 도 4에서 도 4(a)는 그람 음성 박테리아 (E. coli, S. enterica)에 대한 항박테리아 효능을 실험한 그래프이고, 도 4(b)는 병원균 접촉 후의 DE-ZnO 복합체 표면을 보여주는 SEM 이미지이고, 도 4(c)는 DE-ZnO의 세포독성에 대해 실험한 결과이며, 도 4(d)는 DE-ZnO의 용량에 따른 세포 독성에 대해 실험한 결과이다.
- 도 5에서 도 5(a)는 항진균 활성 (1000 conidia, 25℃, 3일 배양)에 대해 DE-ZnO 복합체의 양이 미치는 영향을 살펴본 실험 결과를 나타내는 것이고, 도 5(b)는 DE-ZnO 복합체 상에 흡수된 곰팡이 Aspergillus의 SEM 이미지이다.
- 도 6에서 도 6(a)는 DE-ZnO 복합체, 이트라코나졸(itraconazole), 및 DE-ZnO와 이트라코나졸 병용군의 항진균 활성을 나타내고 (배양 3일째, 1000 conidia), 도 6(b)는 DE-ZnO 복합체, 암포테리신 B (amphotericin B), 및 DE-ZnO 복합체와 암포테리신 B 병용군의 항진균 활성을 나타내고 (배양 4일째, 1000 포자), 도 6(c)는 장기 배양(15일)시 콜로니의 성장 속도를 나타내는 그래프이고, 도 6(d)는 DE-ZnO와 기존 항생제의 병용으로부터 발휘되는 시너지 효과를 설명하는 개략도이다.
- 도 7에서 도 7(a) 내지 7(b)는 각각 수컷 및 암컷 마우스의 체중을 14일 동안 관찰한 결과를 나타내며, 도 7(c) 내지 7(d)는 경구 투여 14일 이후의 마우스 장기 중량 변화를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0011] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0012] 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.
- [0013] 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.
- [0015] 본 발명의 일 양태에 따르면 규조토 상에 산화아연을 포함하는 규조토-산화아연 복합체를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항생 조성물이 제공된다.
- [0017] 상기 규조토는 다공성 규조토일 수 있으며, 산화아연을 위한 매트릭스의 역할을 한다. 상기 규조토는 독성이 없다고 알려져 있으며 이에 생체 적합성이 있다. 상기 규조토는 표면적으로 음성 전하를 나타내지만, 상기 산화아연이 합성 및 성장 동안에 표면이 양이온 (예를 들어, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)에 의해 코팅되는 등의 이유로 표면 양성 전하를 나타내고, 이에 따라 상기 규조토-산화아연 복합체는 표면 양성 전하를 나타낸다. 이와 같이 상기 복합체가 양성 전하를 나타냄에 따라 바이러스, 박테리아나 곰팡이와 같은 미생물을 끌어들이는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0019] 상기 산화아연은 나노 크기의 결정 형태일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 산화아연은 직경이 200 내지 400 nm의 나노 결정일 수 있다. 또한, 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 산화아연은 적어도 하나의 층

예한 돌기 형상을 갖는 나노결정, 예를 들어 복수의 침예한 돌기가 환상으로 배열된 나노스타 형상의 나노결정일 수 있다. 이와 같이 산화아연이 침예한 돌기 형상을 가짐으로써 표면 양성 전하에 의해 유인된 바이러스, 박테리아나 곰팡이와 같은 미생물의 세포벽을 파괴하는데 도움이 될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 산화아연은 구조상에서 수열 합성에 의해 합성되고 성장한 나노결정일 수 있다. 상기 수열 합성은 아연 전구체를 물과 함께 85 내지 95°C에서 30 내지 80분 동안 가열하여 수행될 수 있으며, 이 때 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드(hexadecyltrimethylammonium bromide)와 같은 계면활성제와 함께 가열하여도 된다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 구조상-산화아연 복합체에서 상기 산화아연은 구조상에 대하여 1 이상의 반응 비로 포함된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 산화아연 대 구조상의 반응 비는 1:1 내지 4:1의 범위일 수 있다. 여기서 상기 산화아연의 양이 많을수록 항생 활성이 더 우수하다. 상기 반응 비와 관련하여, 구조상 상의 산화아연의 중량 백분율은 예를 들어 산화아연 대 구조상의 반응 비가 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 및 4:1 인 경우에 각각 대략 2 내지 2.1 중량%, 대략 4 내지 5 중량%, 6 내지 7 중량%, 10 내지 11 중량%, 13 내지 14 중량%, 및 23 내지 24 중량% 인 것일 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 항생 조성물은 항생 활성을 갖는다. 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 조성물은 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.

[0025] 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 오염을 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.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 항생 조성물은 항진균 활성을 갖는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 복합체는 곰팡이에 의한 오염을 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*), 크립토크커스 네오포르만(*Cryptococcus neoformans*), 캔디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 캔디다 리시타나에(*Candida lusitanae*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*), 아스퍼질러스 휴미거투스(*Aspergillus fumigatus*), 푸자리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 사카로마이세스 세레비지애(*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.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 항생 조성물은 추가의 항진균제와 함께 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 다른 일 양태에 따르면 구조상 상에 산화아연을 포함하는 구조상-산화아연 복합체 및 항진균제를 함유하는 항진균성 병용 제제가 제공된다. 본 발명에 따른 항생 조성물과 함께 사용되는 상기 항진균제 또는 본 발명에 따른 구조상-산화아연 복합체와 함께 병용 제제에 포함되는 항진균제는 예를 들어 케토코나졸, 이트라코나졸, 플루코나졸, 미코나졸, 클로트리마졸, 펜티코나졸, 에코나졸, 비포나졸, 옥시코나졸, 클로코나졸, 몰시클레이트, 암포테리신 B, 플루사이토신, 그리세오플빈, 터비나핀, 니스타틴, 톨나프테이트, 나프티핀, 할로프로진, 사이클로피록스, 트리클로산, 노프로삭신, 시프로삭신 및 염으로 이루어진 균으로부터 1종 이상 선택된 것일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 항진균제는 이트라코나졸 또는 암포테리신 B일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 구조상-산화아연 복합체를 함유하는 항생 조성물은 이트라코나졸 또는 암포테리신 B를 투여할 때 동시에 또는 시간차를 두고 함께 투여될 수 있거나, 또는 본 발명에 따른 구조상-산화아연

복합체를 이트라코나졸 또는 암포테리신 B와 함께 병용 제제로 제형화하여 투여할 수도 있다.

[0031] 본 발명에 따른 조성물 또는 병용 제제의 투여방법은 특별히 제한되지 않으나, 비경구 투여 또는 경구 투여에 의할 수 있으며, 이에 따라 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제 등과 함께 조합되어 사용될 수 있다. 한편, 본 발명에 따른 조성물은 반드시 인간 또는 인간 이외의 동물에 투여될 필요는 없으며, 적절한 희석제 등과 함께 조합되어, 바이러스, 곰팡이, 또는 박테리아에 의한 오염을 예방하거나 번식을 저해할 목적으로, 필요한 장소 또는 기구에 분무 또는 도포되는 형태로 제형화되어 사용되어도 된다.

[0033] 이하에서는 본 발명의 실시예를 참조하여 발명을 더욱 구체적으로 설명하겠다. 실시예는 발명의 설명을 위해 제시되는 것이므로, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] **[합성에]**

[0036] **(1) ZnO의 합성**

[0037] 도 1(a)에 있는 바와 같이, 1 mL의 1M CTAB (헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드)를 초순수(Milli-Q water) 98 mL에 첨가하고 90°C에서 500 rpm으로 교반하였다. 그 후, 1 mL의 1M Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O를 첨가하여 50분 동안 추가로 교반하였다. 항속 교반 및 항온배양 조건 하에, 2 mL의 수산화암모늄 용액을 적가하였다. 희색 침전물이 형성되었고, 반응 용기를 얼음조로 옮겨서 반응을 중단시켰다. 상기 흰색 침전물을 원심분리하여 수집하고, 초순수(Milli-Q water)로 3회 세척하여 잔류 이온을 제거하였다. 그 후, 상기 흰색 침전물을 56°C에서 하룻밤 동안 건조하였다. 도 1(b)는 ZnO 나노물질의 UV-가시광선 흡수 스펙트럼이며, ZnO의 특징적 피이크인 381 nm에서의 피이크로부터 ZnO가 생성되었음을 확인하였다. 상기 흰색 침전물에 대한 SEM 이미지를 도 1(c)에 나타내었으며, 이는 균일한 크기의 ZnO-S (대략 300 nm)였다.

[0039] **(2) 규조토(DE)-산화아연(ZnO) 복합체의 제조**

[0040] 규조토를 증류수 중에서 중력에 의한 정제를 하고, 균일한 규조토 (0.5 g)을 98 mL의 초순수 (Milli-Q water)에 용해시켰다. 상기 사용된 다공성 규조토 (DE)의 SEM 이미지를 도 2(a)에 나타내었다. 그 후, 1M의 Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O 및 1mL의 1M CTAB를 상기 DE 용액에 첨가하였다. 50분 동안 90°C에서 500 rpm으로 교반함에 따라 Zn<sup>2+</sup>가 확산되어 반데르발스 힘에 의해 규조토 표면에 부착되었다. 그 후, 항속 교반 및 항온배양 조건 하에, 2 mL의 수산화암모늄 용액을 적가하였다. 결정 방향으로 ZnO 나노물질이 성장하였고, 이에 따라 반응 용액의 색깔이 벽돌색(규조토)에서 pink-white 색으로 변하였다. 그 후, 반응 용기를 얼음조에 넣어서 반응을 중단시켰다. 생성된 침전물은 원심분리에 의해 수집하고 초순수 (Milli-Q water)로 3회 세척하여 잔류 이온을 씻어냈다. 중력 침전을 이용하여 규조토에 결합하지 않은 ZnO는 제거하였다. 마지막으로 상기 침전물을 56°C 오븐에서 하룻밤 동안 건조하였다. 이렇게 얻어진 규조토-ZnO 복합체 (DE-ZnO)의 SEM 이미지를 도 2(b)에 나타내었다. 도 2(b)로부터, ZnO (대략 300 nm 크기)가 규조토의 표면에 균일하게 분포하고 있다는 점을 확인할 수 있다.

[0042] **(3) DE-ZnO 복합체에서 DE와 ZnO 사이의 반응 비율의 최적화**

[0043] ZnO와 DE 사이의 반응 비율을 최적화하기 위하여 ZnO:DE = 0.25:1; 0.5:1; 1:1; 2:1; 3:1; 및 4:1의 반응 비율로 실험하였다.

[0044] DE-ZnO 복합체의 에너지 분산형 X선 결과를 도 3(a)에 나타내었으며, 이에 의하면, DE 상의 ZnO의 백분율은 각 반응 비율 (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 및 4)에 따라 각각 2.04%, 4.38%, 6.19%, 10.61%, 13.74%, 및 23.85% (중량%)로 나타났다.

[0045] DE-ZnO 복합체의 제타 전위를 도 3(b)에 나타내었다. 도 3(b)로부터, DE-ZnO의 표면 전하는 양성(positive)이고, 코팅된 ZnO-S의 총량에 따라 양의 상관 관계를 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0046] 음성 표면 전하를 나타내는 잘 세척된 규조토(DE) 상에, 양성 표면 전하를 나타내는 합성 ZnO-S의 양을 증가시

키면, DE-ZnO 복합체 주변에 양성 전하가 상당히 풍부하게 나타날 수 있다.

[0048] [시험예 1] 항박테리아 활성 및 세포독성 평가

[0049] 그람 음성 박테리아에 대한 항박테리아 효과를 알아보기 위하여 그람 음성 박테리아로서 대장균(*E. coli*) 및 살모넬라균(*S. enterica*) 부유액을 사용하고, 10 µg/mL의 DE-ZnO를 여러 반응 비율로 사용하여 항박테리아 활성을 측정하였다. 이를 위해, 10 µg/mL의 DE-ZnO 복합체를  $1 \times 10^7$  CFU/mL 박테리아 부유물 0.1 mL 및 LB 배지 2 mL가 포함된 튜브에 첨가하였다. 210 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 16 시간 동안 항온배양한 후, OD 600 nm에서 각 시료의 광학 밀도를 측정하여 박테리아 생존율을 확인하였다. 도 4(a)에 나와 있는 바와 같이, 대장균과 살모넬라균 모두에서, ZnO : DE의 비가 4:1이었을 때 가장 높은 항박테리아 활성을 나타내었으며, DE-ZnO 복합체 내의 ZnO 비율이 증가할수록 항박테리아 특성은 더 높아졌다. 도 4(b)는 DE-ZnO 복합체가 박테리아의 셀 멤브레인을 최소 영역으로 파괴하여 박테리아를 완전히 흡수할 수 있었음을 보여준다.

[0051] 비색 분석 키트(Cell Counting Kit-8)를 사용하여 본 발명의 복합체에 대한 세포 독성을 측정하였다. 0.25 mg의 용량으로 반응 비율 (ZnO:DE = 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 및 4:1)을 달리하면서 DE-ZnO 복합체의 세포 독성을 측정하였으며 그 결과를 도 4(c)에 나타내었다. 그 후, 용량에 따른 세포 독성을 알아보기 위하여 96-웰 마이크로플레이트에서, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 mg (in DMEM) 농도의 DE-ZnO (ZnO : DE = 2:1) 샘플을 부착성 L929 세포(비-암세포성)에 적용하였으며, 그 결과를 도 4(d)에 나타내었다. 3 mg 이내의 DE-ZnO 복합체에서의 L929 세포 생존율은 상대적으로 안정적이었는데 (70~60%), 이는 우수한 생체적합성을 나타낸다.

[0053] [시험예 2] 항진균 활성 평가

[0054] 본 발명의 복합체의 항진균 활성을 확인하기 위해서, 아스퍼질러스(*Aspergillus fumigatus*) (10000 conidia, 25°C)를 사용하고, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 mg/mL 농도의 DE-ZnO (ZnO : DE = 2:1, 10.61%의 ZnO)를 접종된 상기 아스퍼질러스와 혼합하여 배양하였다. 곰팡이의 성장 상태를 14일 동안 모니터링 하였으며 곰팡이의 성장 사진은 12시간마다 기록하고 성장 영역은 Image-J로 측정하였다. 7일째 되는 날의 방사형 microflora의 직경을 측정하여 도 5(a)에 나타내었다. 곰팡이는 복합체 4.0 mg/mL의 농도 하에서는 거의 성장하지 않았다는 것을 확인할 수 있다. 이는 DE-ZnO 복합체가 곰팡이 성장을 저해할 뿐만 아니라 곰팡이의 세포벽을 파괴하여 곰팡이 활성을 죽이기도 하는 것이다.

[0056] 추가 실험으로, DE-ZnO 복합체를 3분 동안 곰팡이 포자 용액에 첨가하였다. 도 5(b)에 DE-ZnO 복합체 상에 흡수된 곰팡이 아스퍼질러스의 SEM 이미지를 나타내었다. 도 5(b)에서 보는 바와 같이, DE-ZnO는 곰팡이 포자를 잘 흡수하였는데, 이는 DE-ZnO 복합체의 포획 농축 특성(capture enrichment property)으로 인한 것이며, 해당 특성이 항진균 활성에 중요한 이점이 된다.

[0058] 위 결과로부터 DE-ZnO 복합체의 항진균 활성을 요약하면, 첫번째로 곰팡이의 세포벽과 DE-ZnO 복합체의 활성 표면 사이에 포획-농축 단계(capture-enrich step)가 표면 전하 흡착 및 반데르발스 힘을 통해 달성되고, 두번째로 DE-ZnO의 나노-용균 단계로서 곰팡이의 세포 멤브레인을 파괴하여 용균하는 것으로 이해할 수 있다.

[0060] [시험예 3] 다른 항생제와의 병용 실험

[0061] 상업적으로 판매하는 항생제(암포테리신 B 및 이트라코나졸)과 본 발명의 복합체의 병용에 따른 효과를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이트라코나졸 6.0 µg/mL 또는 0.5 mg/L 암포테리신 B 및 2.0 mg/mL의 DE-ZnO 복합체를 초기 농도로 사용하였다. 도 6(a)에 DE-ZnO와 이트라코나졸의 단독 사용과 병용 사용의 각각의 효과를, 도 6(b)에 DE-ZnO와 암포테리신 B의 단독 사용과 병용 사용의 각각의 효과를 나타내었으며, 병용에 따른 시너지 효과를 확인할 수 있다. 즉, 이트라코나졸 및 DE-ZnO의 조합 결과와, 암포테리신 B 및 DE-ZnO의 조합 결과에서 보여지듯이 DE-ZnO구조체는 기존 항생제의 효과를 향상시키는 것을 알 수 있다.

[0063] 도 6(c)는 대조군, 항생제 단독 투여군, 항생제와 DE-ZnO 병용 투여군에서 곰팡이 콜로니의 성장 속도를 나타내는 그래프이다. 그래프의 기울기 “ $a_1 > b_1 > c_1$ ”로부터 DE-ZnO 복합체가 항생제의 항진균 활성을 향상시킨다는 것을 알 수 있다. 또한, 7일 이후의 그래프 기울기 “ $a_2 > a_1 ; b_2 > b_1$ ”로부터 7일 이후에는 곰팡이의 성장이 대조군과 항생제 단독 투여군에서 더 빨라졌는데, 이에 반해 “ $c_2 < c_1$ ”라는 점으로부터 DE-ZnO 복합체와 항생제 병용 투여군에서는 장기간의 강한 저해 효과를 발휘한다는 것을 알 수 있다.

[0065] 도 6(d)는 DE-ZnO와 기존 항생제의 병용으로부터 발휘되는 시너지 효과를 설명하는 개략도인데, 위의 장기간에 걸친 효과 발휘는 이온과 ROS 의 지연 방출로 인한 것이라고 이해된다.

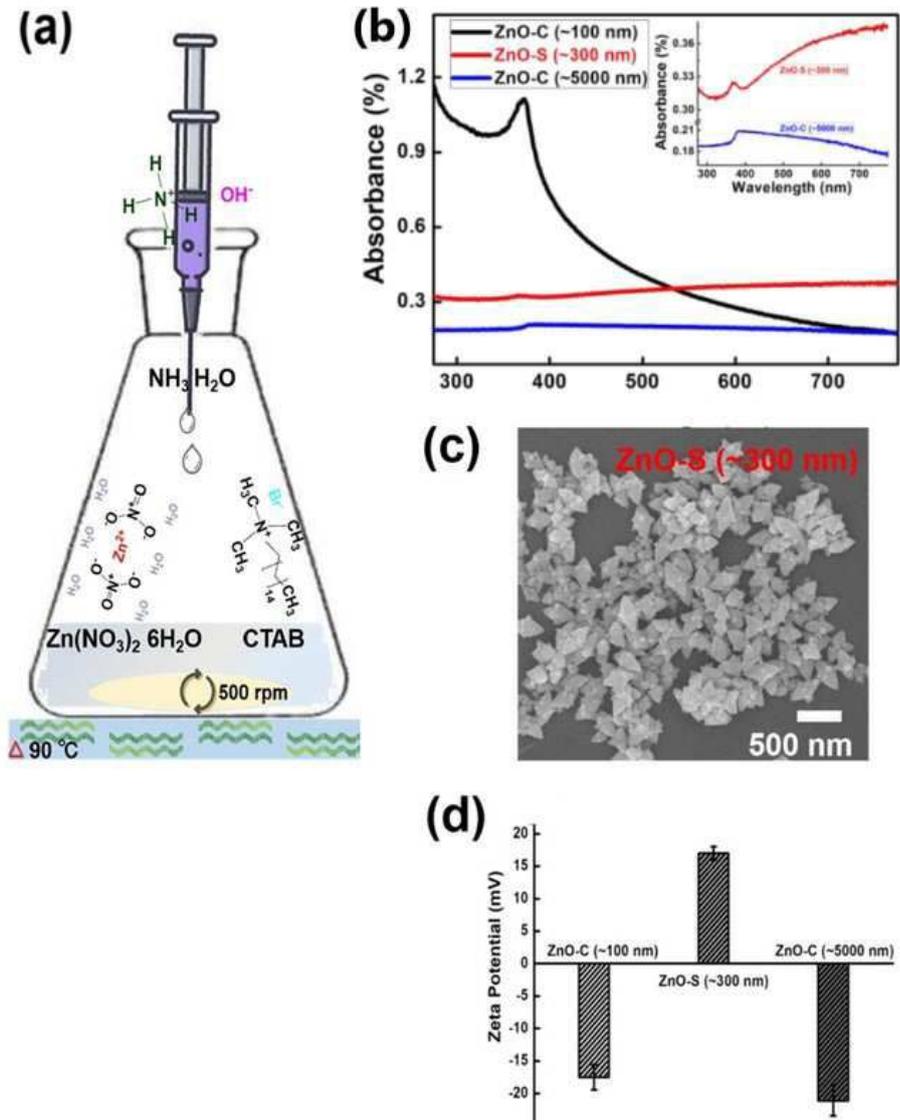
[0067] **[시험예 4] in vivo 실험-독성 테스트**

[0068] 독성 테스트를 위해서, 마우스 구성은 암수 각각 경구 투여 정상대조군, 2 mg/kg 용량 (저용량, LD) 및 10 mg/kg 용량 (고용량, HD)의 DE-ZnO 경구 투여군으로 구성하였다. 시험물질 투여 후 6시간 동안 일반증상을 관찰하였고, 부검일 전까지 14일 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였으며, 동물의 체중 측정은 주3회 측정하였다. 시험 최종일에 개복하여 복대 정맥으로 채혈 후, 장기를 육안 관찰하였고, 뇌, 심장, 폐, 간, 비장, 신장 및 고환/난소를 적출하여 장기 중량을 측정하였다. 실험결과, 관찰기간 동안의 모든 용량의 시험물질 투여군에서 사망사례는 관찰되지 않았다. 결론적으로 본 시험의 조건하에서 DE-ZnO를 ICR 마우스에 2 mg/kg의 용량 또는 10 mg/kg의 용량으로 단회 경구 투여한 결과, 독성은 관찰되지 않았으며 개략의 치사량은 암수 모두 10 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

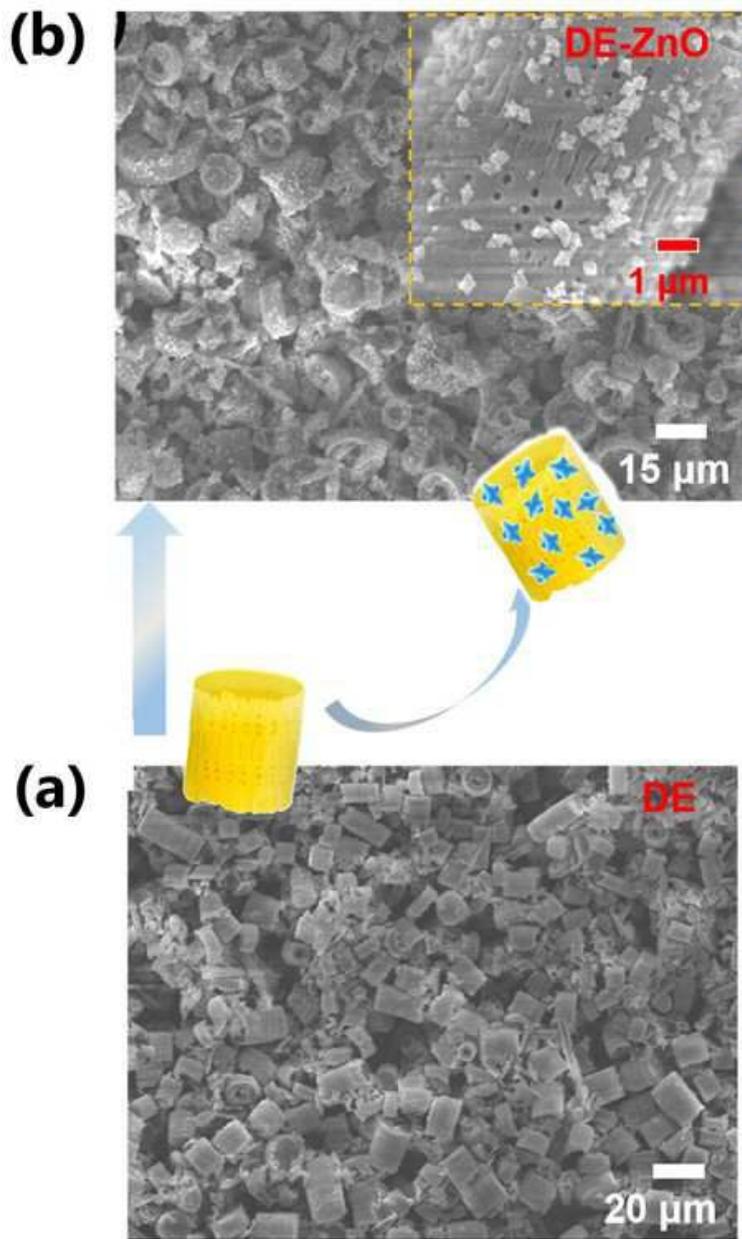
[0070] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

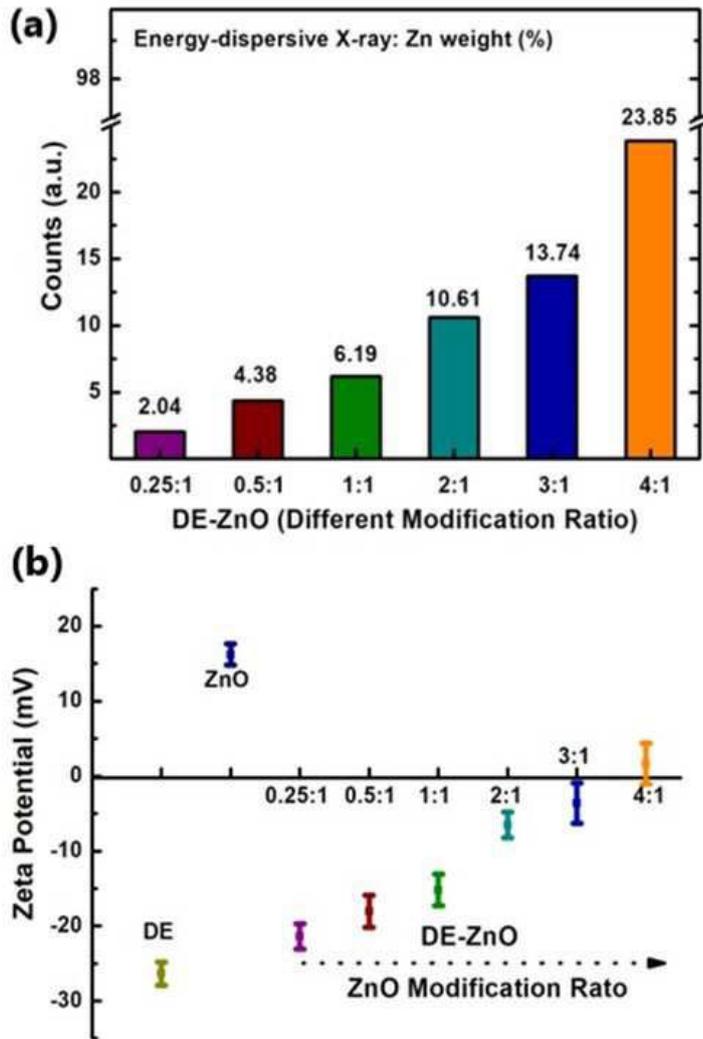
도면1



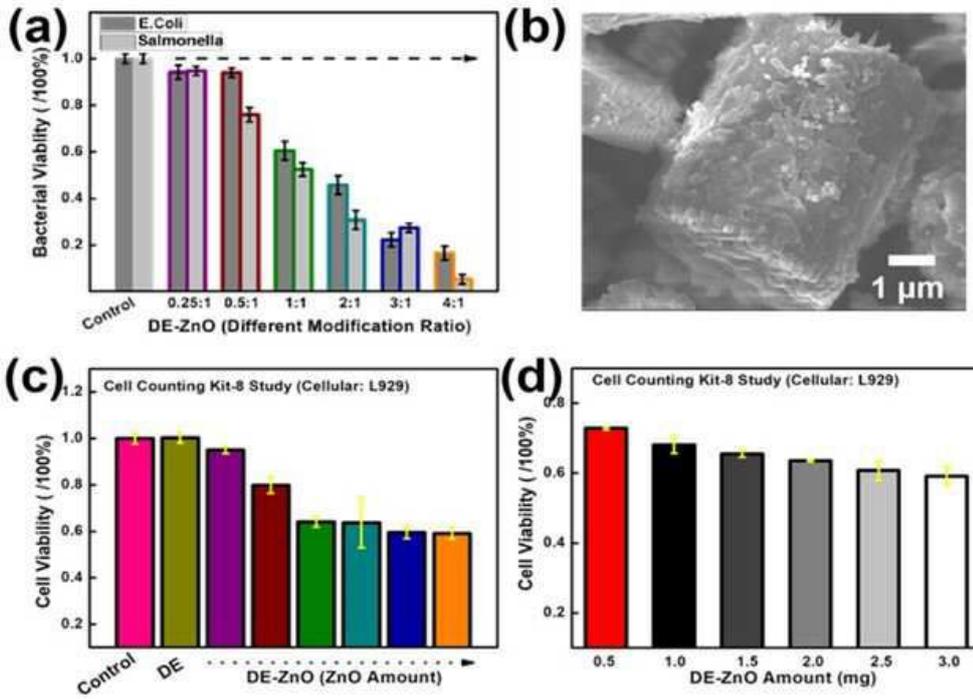
도면2



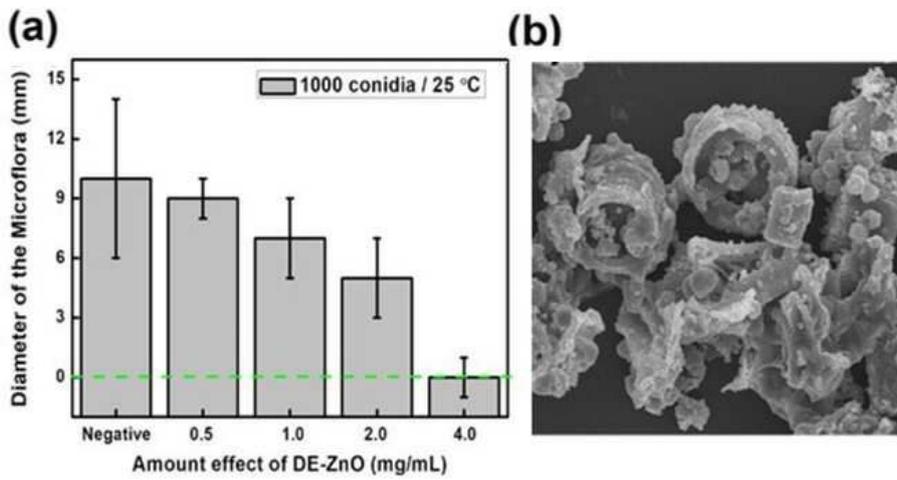
도면3



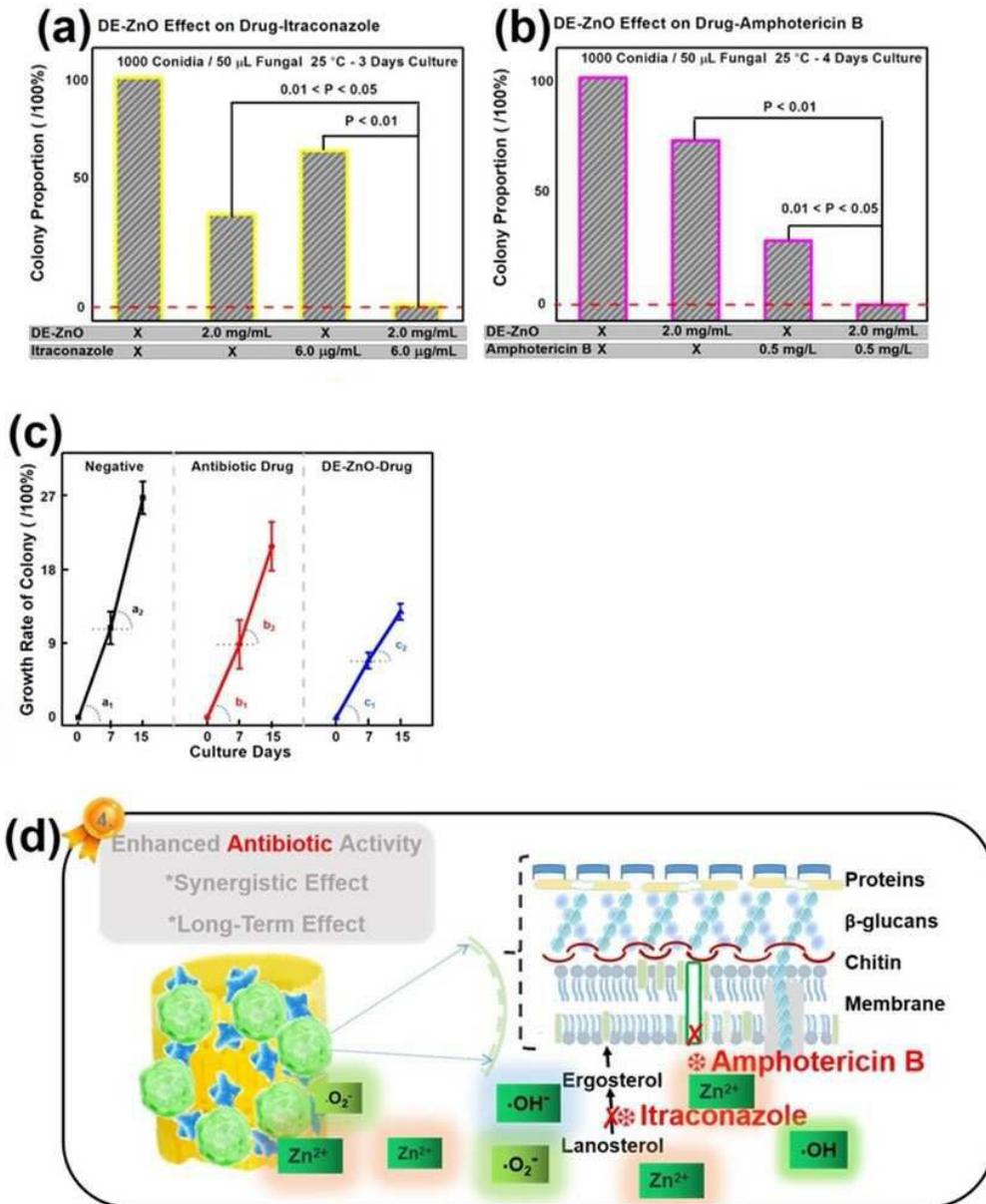
도면4



도면5



도면6



도면7

