



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월28일  
(11) 등록번호 10-2379423  
(24) 등록일자 2022년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/02 (2017.01) C12Q 1/06 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/025 (2013.01)  
C12Q 1/06 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0153885  
(22) 출원일자 2019년11월27일  
심사청구일자 2019년11월27일  
(65) 공개번호 10-2021-0065306  
(43) 공개일자 2021년06월04일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020180064585 A\*  
KR1020190126838 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
영남대학교 산학협력단  
경상북도 경산시 대학로 280 (대동)  
(72) 발명자  
변정훈  
경상북도 경산시 대학로 280 (대동, 영남대학교)  
기계관 205호  
황정호  
서울특별시 강남구 도곡로13길 19, 102동 901호(역삼동, 역삼동 롯데캐슬 노블)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 7 항

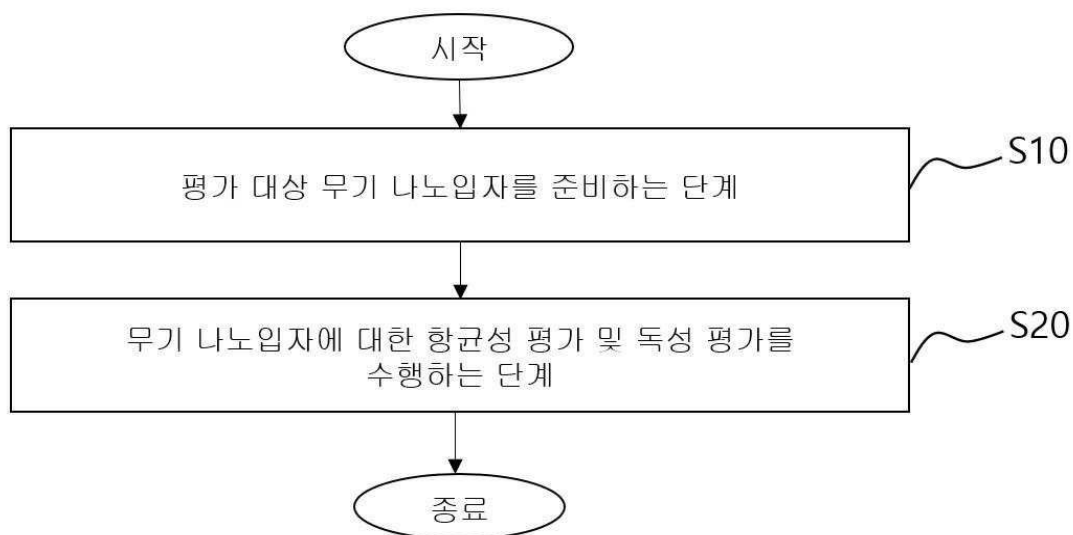
심사관 : 김현주

(54) 발명의 명칭 무기 나노입자의 항균성 및 독성 단기 평가 방법

(57) 요약

본 출원은 무기 나노입자의 항균성 및 독성 단기 평가 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 항균성이 우수하면서도 독성이 적은 무기 나노입자를 짧은 기간 이내에 구별할 수 있는 단기 평가 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**박대훈**

서울특별시 영등포구 63로 45, 2동 26호(여의도동,  
여의도시범아파트)

**박성재**

서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 12동 1203호  
(압구정동, 현대아파트)

**남강식**

경기도 부천시 상일로 71, 1808동 604호(상동, 반  
달마을)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A2A1A05020683

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 재단법인 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 전기방사/열공정을 이용한 초다공성 항바이러스 활성탄소섬유 생산 및 에어로졸 기

법을 이용한 성능평가

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

평가 대상 무기 나노입자를 준비하는 단계; 및

상기 무기 나노입자에 대한 항균성 평가 및 독성 평가를 수행하는 단계를 포함하며,

상기 항균성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성되며, 상기 독성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성되고,

항균성 생체외 평가는 항균 효능(antibacterial efficiency) 평가 및 최소저지농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 평가에 의해서 병행 수행되고,

항균성 생체내 평가는 소정의 감염균에 의하여 감염된 감염부위를 갖는 실험 대상 동물에 소정의 농도의 무기 나노입자를 투여하는 단계; 및 소정의 기간 후 실험 대상 동물의 몸무게 및 생존율을 관찰하는 단계를 포함하고,

상기 독성 생체내 평가는 실험 대상 동물에 소정의 농도의 무기 나노입자를 투여하는 단계; 및 소정의 기간 후 실험 대상 동물의 체중 및 생존율 평가에 의해서 병행 수행되며,

독성 생체외 평가는 세포 사멸 정도(cell viability) 평가 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 평가에 의해서 병행 수행되며,

항균성 생체외 평가에서, 항균 효능 평가 및 최소저지농도 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 1 점수 및 제 2 점수가 합산되어, 제 3 점수가 부여되고,

항균성 생체내 평가에서, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의하여 제 4 점수가 부여되며,

독성 생체외 평가에서, 세포 사멸 정도 평가 및 활성산소종 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 5 점수 및 제 6 점수가 합산되어, 제 7 점수가 부여되고,

독성 생체내 평가에서, 체중 평가 및 생존율 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 8 점수 및 제 9 점수가 합산되어, 제 10 점수가 부여되며,

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성된 항균성 평가에 의하여 부여된 점수와

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성된 독성 평가에 의하여 부여된 점수의 통합 점수를 연산하고, 평가 대상 무기 나노입자의 총 질량은 0.1 g 이하이고, 항균성 생체내(in vivo) 평가는 5일 이내에 결과를 도출하며, 독성 생체내(in vivo) 평가는 18일 이내에 결과를 도출하는 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 항균 효능 평가는

상기 무기 나노입자에 타겟 박테리아를 노출시키는 단계;

상기 타겟 박테리아를 소정의 기간 동안 배양하는 단계;

상기 배양된 타겟 박테리아에 대하여 개체수 측정법(colony counting method)을 수행하는 단계; 및

상기 개체수 측정법 분석의 결과에 의하여, 박테리아의 사멸 정도를 정량화하는 단계를 포함하는 평가 방법.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 최소저지농도 평가는

상기 무기 나노입자를 타겟 박테리아에 노출시키는 단계;

상기 타겟 박테리아를 소정의 기간 동안 배양하는 단계;

상기 무기 나노입자의 최소저지농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 판단하는 단계를 포함하는 평가 방법.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 세포 사멸 정도 평가는

상기 무기 나노입자를 타겟 세포에 노출시키는 단계;

상기 타겟 세포를 소정의 기간 동안 배양하는 단계;

상기 배양된 타겟 세포를 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 염료로 염색하는 단계; 및

상기 타겟 세포의 색 변화를 관찰하여, 세포 사멸 정도(cell viability)를 측정하는 단계를 포함하는 평가 방법.

#### 청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 활성산소종 평가는

상기 무기 나노입자를 타겟 세포에 노출시키는 단계;

상기 타겟 세포를 소정의 기간 동안 배양하는 단계;

상기 배양된 타겟 세포를 DCFH-DA(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate) 염료로 염색하는 단계; 및

상기 타겟 세포로부터 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 측정하는 단계를 포함하는 평가 방법.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

### 청구항 13

삭제

### 청구항 14

삭제

### 청구항 15

무기 나노입자의 항균능 및 독성을 평가하는 단기 평가 방법으로서,

평가 대상 무기 나노입자를 준비하는 단계;

상기 무기 나노입자에 대한 항균성 생체외(in vitro) 평가 및 독성 생체외(in vitro) 평가와

상기 무기 나노입자에 대한 항균성 생체내(in vivo) 평가 및 독성 생체내(in vivo) 평가를 각각 수행하는 단계를 포함하며,

상기 항균성 생체외(in vitro) 평가 및 독성 생체외(in vitro) 평가는 각각 2일 이내에 결과를 도출하고,

상기 항균성 생체내(in vivo) 평가는 5일 이내에 결과를 도출하며,

상기 독성 생체내(in vivo) 평가는 18일 이내에 결과를 도출하고

항균성 생체외 평가에서, 항균 효능 평가 및 최소저지농도 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 1 점수 및 제 2 점수가 합산되어, 제 3 점수가 부여되고,

항균성 생체내 평가에서, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의하여 제 4 점수가 부여되며,

독성 생체외 평가에서, 세포 사멸 정도 평가 및 활성산소종 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 5 점수 및 제 6 점수가 합산되어, 제 7 점수가 부여되고,

독성 생체내 평가에서, 체중 평가 및 생존율 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 8 점수 및 제 9 점수가 합산되어, 제 10 점수가 부여되며,

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성된 항균성 평가에 의하여 부여된 점수와

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내 (in vivo) 평가로 구성된 독성 평가에 의하여 부여된 점수를 통합 연산하여 최종 점수를 도출하며

평가 대상 무기 나노입자의 총 질량은 0.1 g 이하인 평가 방법.

### 청구항 16

삭제

### 청구항 17

항균성 생체외(in vitro) 평가 장치;

항균성 생체내(in vivo) 평가 장치;

독성 생체외(in vitro) 평가 장치;

독성 생체내(in vivo) 평가 장치; 및

상기 평가 장치들과 각각 연통되어, 각각의 평가 장치로부터 부여된 점수 데이터를 수신하여, 통합 점수를 연산하는 제어 장치를 포함하는 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 시스템으로서,

항균성 생체외 평가에서, 항균 효능 평가 및 최소저지농도 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 1 점수 및 제 2 점수가 합산되어, 제 3 점수가 부여되고,

항균성 생체내 평가에서, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의하여 제 4 점수가 부여되며,

독성 생체외 평가에서, 세포 사멸 정도 평가 및 활성산소종 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가

기준(reference)에 의한 제 5 점수 및 제 6 점수가 합산되어, 제 7 점수가 부여되고,

독성 생체내 평가에서, 체중 평가 및 생존율 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 8 점수 및 제 9 점수가 합산되어, 제 10 점수가 부여되며,

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성된 항균성 평가에 의하여 부여된 점수와

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내 (in vivo) 평가로 구성된 독성 평가에 의하여 부여된 점수를 계산하여 최종 점수를 도출하며,

평가 대상 무기 나노입자의 총 질량은 0.1 g 이하이고,

항균성 생체내(in vivo) 평가는 5일 이내에 결과를 도출하며,

독성 생체내(in vivo) 평가는 18일 이내에 결과를 도출하는 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 시스템.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 출원은 무기 나노입자의 항균성 및 독성 단기 평가 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 항균성이 우수하면서도 독성이 적은 무기 나노입자를 짧은 기간 이내에 구별할 수 있는 단기 평가 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 광범위한 스펙트럼 활성을 갖는 항균제는 의료 및 위생 용도로 오랫동안 (약 90 년) 사용되어 왔으며, 생물 산업 및 생물 의학 분야에서 박테리아의 성장을 억제 또는 방지하기 위해 다양한 항균성 제형 및 코팅이 널리 사용되어 왔다. 그러나 이러한 제제의 광범위하고 부적절한 사용으로 인해 항균성 제형 및 코팅에 대해 항균 저항성(antimicrobial resistance, AMR)을 초래하였다. 이로 인하여, 특히 기후 변화로 인한 급격한 세계 보건 문제 및 환경 문제가 되었다. 또한, 항균제를 부적절하게 사용하면 부반응과 독성이 생길 수 있다. AMR과 관련된 문제는 매우 긴급한 문제이기 때문에, 관련 사회 경제적 비용을 추정하는데 동기를 부여하였다. 효과적인 항균제에 광범위한 스펙트럼 활동과 효율적인 생산 공정을 제공하기 위해서는 보다 혁신적인 접근법이 필요하다. 그러나, 생체안전성 평가의 비용이나 임상 시험의 요구 사항으로 인해, 새로운 약물을 적시에 구현하기 어려워, 항균제에 대한 R&D는 수익성이 거의 없다고 알려져 있다.

[0003] 고분자 항균성 나노 시스템 및 관련 합성 접근법이 최근 AMR에 대한 대안적 접근법으로 제안되었지만, 광범위한 활성, 비용 효율적인 생산 공정, 항균 메커니즘, 신진 대사 경로 효과 및 독성 프로파일을 갖도록 요구되는 항균제의 최적화에는 중요한 과제가 여전히 많이 남아 있다. 더욱이, 후보 물질의 제조, 저장 및 검증 절차는 전통적인 다단계 화학 공정 및 정제에 기초하기 때문에, 후보 물질을 신속하게 스크리닝하기 어렵다.

[0004] 최근 몇 년 동안 나노 무기 항균제는 그들의 광범위한 스펙트럼 활성과 비용 효율성 때문에 점점 더 많이 연구되고 있다. 그러나, 무기 나노 물질은 반응성 산소종 (ROS) 생성 및 물리적 손상에 의해 박테리아를 손상시켜, 효소 활성, DNA 합성 및 에너지 전달을 저해한다. 이러한 제제는 급성 독성은 낮고 장기 안정성이 2,3이지만, 특정 농도 임계 값 이상에서는 독성이 존재한다. 독성 프로파일을 개선하기 위해, 최소 독성으로 효과적인 항균 활성을 보장하도록, 조성물/결정질 변형 및/또는 친수성 표면 처리가 사용되어 왔다. 이를 위해, 나노 무기 항 박테리아의 친환경 화합물 매개 또는 생체-합성 등이 도입되었다. 이러한 환경 친화적인 화합물 또는 박테리아는 무기 이온의 환원제로 사용되며 0가 나노 무기 구조물의 형성으로 이어진다. 그러나, 이들 접근법은 다수의 열수 반응 및 분리 절차를 필요로 하며, 특정 정보만을 제공하여, 최적의 나노 무기 항 박테리아의 효율적인 스크리닝을 위한 플랫폼으로서 적용 범위가 제한된다. 따라서, 이러한 접근법은 항균제에 대한 R&D 투자의 태생적 한계를 해결하지 못하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 대한민국 특허 공개 10-2012-0084681호(2012년 7월 30일 공개)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 출원의 일 실시예에 따르면, 무기 나노입자의 항균성 평가 방법 및 독성 평가 방법을 제공하여, 이를 통하여 제공된 결과를 이용하여, 무기 나노입자의 적용 가능성을 손쉽게 판단할 수 있는 단기간 평가 방법을 제공하고 자 한다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 본 출원의 일 측면은 평가 대상 무기 나노입자를 준비하는 단계; 및 상기 무기 나노입자에 대한 항균성 평가 및 독성 평가를 수행하는 단계를 포함하며, 상기 항균성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성되며, 상기 독성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성되는 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 방법이다.

[0008] 본 출원의 다른 일 측면은 무기 나노입자의 항균능 및 독성을 평가하는 단기 평가 방법으로서, 평가 대상 무기 나노입자를 준비하는 단계; 상기 무기 나노입자에 대한 항균성 생체외(in vitro) 평가 및 독성 생체외(in vitro) 평가와 상기 무기 나노입자에 대한 항균성 생체내(in vivo) 평가 및 독성 생체내(in vivo) 평가를 각각 수행하는 단계를 포함하며, 상기 항균성 생체외(in vitro) 평가 및 독성 생체외(in vitro) 평가는 각각 2일 이내에 결과를 도출하고, 상기 항균성 생체내(in vivo) 평가는 5일 이내에 결과를 도출하며, 상기 독성 생체내(in vivo) 평가는 18일 이내에 결과를 도출하는 평가 방법이다.

[0009] 본 출원의 또 다른 일 측면은 항균성 생체외(in vitro) 평가 장치; 항균성 생체내(in vivo) 평가 장치; 독성 생체외(in vitro) 평가 장치; 독성 생체내(in vivo) 평가 장치; 및 상기 평가 장치들과 각각 연통되어, 각각의 평가 장치로부터 부여된 점수 데이터를 수신하여, 통합 점수를 연산하는 제어 장치를 포함하는 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 시스템이다.

### 발명의 효과

[0010] 본 출원의 일 실시예에 따르면, 무기 나노입자의 항균성을 생체외 및 생체내 평가할 수 있다.

[0011] 본 출원의 일 실시예에 따르면, 무기 나노입자의 독성을 생체외 및 생체내 평가할 수 있다.

[0012] 본 출원의 일 실시예에 따르면, 무기 나노입자의 항균성 및 독성을 생체외 및 생체내 평가할 수 있다.

[0013] 본 출원의 일 실시예에 따르면, 소량의 평가 대상 물질만으로도 단기간내에 무기 나노입자의 항균성 및 독성을 생체외 및 생체내 평가할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 방법의 플로우 차트이다.

도 2는 무기 나노입자를 제조하는 방법을 설명하기 위한 개략도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 구성요소 등이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 구성요소 등이 존재하지 않거나 부가될 수 없음을 의미하는 것은 아니다.

[0016] 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. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0017] 본 출원에서 용어 "나노"는 나노 미터(nm) 단위의 크기를 의미할 수 있고, 예를 들어, 1 내지 1,000 nm의 크기를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 명세서에서 용어 "나노 입자"는 나노 미터(nm) 단

위의 평균 입경을 갖는 입자를 의미할 수 있고, 예를 들어, 1 내지 1,000 nm의 평균입경을 갖는 입자를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 출원의 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 방법 및 시스템을 상세히 설명한다. 다만, 첨부된 도면은 예시적인 것으로, 본 출원의 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 방법 및 시스템의 범위가 첨부된 도면에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 출원에 의하면, 무기 나노입자로 만들어진 항균제를 3주 안에 유효성을 평가하는 프로토콜을 제시할 수 있다.

[0020] 항균제는 인체(또는 환경)에 유해한 균을 저감시키는 (약제)역할을 한다. 그러나 이러한 항균제가 균을 저감시키는 역할이 뛰어나다 하더라도, 인체(또는 환경) 자체에 독성을 갖는다면 이 항균제는 약, 항균 코팅 등의 많은 어플리케이션에 적용되는 데에 걸림돌이 된다. 즉, 그 유효성이 떨어진다고 판단할 수 있다. 현재 항균제에 대해서 항균성과 독성에 관련하여 명확한 평가 기준이 제시된 바 없는데, 본 출원은 이러한 평가 기준을 제시할 수 있다.

[0021] 도 1은 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 방법의 플로우 차트이다.

[0022] 도 1에 도시한 바와 같이, 본 출원의 일 실시형태는 평가 대상 무기 나노입자를 준비하는 단계(S10) 및 상기 무기 나노입자에 대한 항균성 평가 및 독성 평가를 수행하는 단계(S20)를 포함한다.

[0023] 본 출원에서 무기 나노물질(inorganic nanomaterial)은 나노 크기를 갖는 무기질이라면 어떤 것이든 무관하며, 이것의 유효능을 평가하여 항균제로서의 우선순위를 매길 수 있다. 후술하는 바와 같이, Cu-Te(copper-tellurium)를 중심으로 본 출원을 설명하지만, 이는 하나의 예시에 불과하며, 본 출원이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] Cu-Te 나노물질은 이온  $Cu^{2+}$ ,  $TeO_3^{2-}$  및  $TeO_4^{2-}$ 가 방출되어, 박테리아 단백질과 상호 작용하고 박테리아 단백질을 비활성화하기 때문에 박테리아에 매우 유독하다. 더불어, Te(다른 칼코겐과 화학적으로 유사)는 포유 동물 세포에서 유의한 독성을 나타내지 않으며, 인간과 관련된 시험에서 위해한 특성을 갖지 않는다.

[0025] 이러한 무기 나노물질을 준비하는 방법은 특별히 한정되는 것은 아니다. 이러한 무기 나노물질을 제조하는 방법 중 하나를 도 2에 도시한다.

[0026] 도 2에 도시한 바와 같이, 챔버내에서 2개의 전극(Cu 전극 및 Te 전극)이 이격되도록 배치되며, 챔버내는 질소 분위기로 제어한 후, 전극 사이에 스파크를 발생시켜, Cu-Te 나노구조체를 생성한다. 생성된 Cu-Te 나노구조체를 플로우 히터(flow heater)에 의하여, 인-플라이트(in-flight) 상태에서 소결하며, 이 때 온도에 따라 상이한 Cu-Te 나노구조체로 분류한다. 생성된 Cu-Te 나노구조체를 수집한 후 전술한 바와 같은 다양한 평가를 위하여 사용한다. 특히 스파크 플라즈마를 이용하여, 플러그-인 시스템에서 열수 화학 공정이나 후처리 공정 없이도 대부분의 전도체 물질을 제거할 수 있다. 스파크 플라즈마 기반 시스템을 통해, 주변 조건(ambient condition) 하에서 플러그인 방식으로 NP (Ag, Cu, Zn 또는 Mg)와 NP 복합체 (Cu-Ag)의 제조를 가능하게 한다.

[0027] 플로우 히터로 무기 나노물질이 도입되기 전에, 나노입자 공급시 크기 분포 변화는 하기 방정식 (1)을 사용하여 계산할 수 있다.

[0028] [방정식 (1)]

$$\frac{dN_i}{dt} = -\frac{dC_{vap}}{dt} - \left\{ N_i \sum_{j=1}^n \beta_{i,j} N_j \right\} \rho_g,$$

[0029] ,

[0030] 여기서,  $N_i$  및  $N_j$  각각은 1차 입자 및 응집체 입자의 농도의 수이고,  $\beta_{i,j}$  는 i 성분과 j 성분 사이의 충돌 커널(collision kernel)이며,  $\rho_g$ 는 가스 밀도이다.

[0031] 기화된 무기물질 성분의 농도( $C_{vap}$ )는 하기 방정식 (2)를 사용하여 계산할 수 있다.



[0032] [방정식 (2)]

$$C_{vap} = \frac{p_v M_v}{p_v M_v + (p_{atm} - p_v) M_g},$$

[0033]

[0034]  $p_v$  및  $p_{atm}$  각각은 부분 증기 및 대기 압력이며,  $M_v$  and  $M_g$  각각은 증기 및 가스의 분자량이다. 스파크 애블레이션(spark ablation) 온도는 하기 방정식 (3)을 사용하여 계산할 수 있다.

[0035] [방정식 (3)]

$$T_{spark} \sim \left( \frac{E_{spark}}{C_v v_{spark} \rho_g} \right) + T_g,$$

[0036]

[0037] 여기서,  $E_{spark}$ 는 스파크 애블레이션 에너지이고,  $C_v$ 는 일정 부피에서의 비열이며,  $v_{spark}$  는 스파크 채널의 부피이고,  $T_g$ 는 가스의 온도이다.

[0038] 또한, 상이한 Cu-Te 구조체를 형성하기 위하여, 플로우 히터에 전기장을 인가할 수 있다. 상이한 온도에 나노입자의 공극상의 변화( $P_{pore}$ )를 통해 5초안에 상이한 Cu-Te 구조체를 조립하도록 제어하며, 하기 방정식 (4)에 따라 조절될 수 있다.

[0039] [방정식 (4)]

$$\frac{dP_{pore}}{dt} = \frac{cD\gamma a_0^3}{l^3 k_B T},$$

[0040]

[0041] 여기서  $c$ 는 공극상과 관련된 상수이며,  $D$ 는 확산 계수이고,  $\gamma$ 는 표면 에너지이며,  $a_0$ 는 격자 간격이고,  $l$ 은 단위 입 입자의 크기이며,  $k_B$ 는 볼츠만 상수이고,  $T$ 는 작동 온도이다.

[0042] 이러한 제어를 통하여, 상온(RT), 400 °C 또는 800 °C에서 Cu-Te 구조체(텐드라이트형, 스파이크형 및 큐브형)를 제작할 수 있다. 후술하는 바와 같이, 각각 Cu-Te-RT, Cu-Te-400, 및 Cu-Te-800으로 명명한다.

[0043] 그리고, 상기 무기 나노입자에 대한 항균성 평가 및 독성 평가를 수행한다(S20).

[0044] 상기 항균성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성되며, 상기 독성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내 (in vivo) 평가로 구성된다.

[0045] 상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성된 항균성 평가에 의하여 부여된 점수와 상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내 (in vivo) 평가로 구성된 독성 평가에 의하여 부여된 점수를 계산하여 무기 나노입자의 항균능 및 독성을 단기간에 평가할 수 있다.

[0046] 여기서 계산하는 방법은 사용자의 의도에 따라 다양하게 적용될 수 있다. 예를 들어, 부여된 점수를 각각 합산할 수 도 있으며, 일부 평가에 소정의 가중치를 부여한 후 합산할 수 도 있다. 이러한 방법이 본 출원을 한정하는 것은 아니다.

## [0047] 1. 항균성 평가

[0048] 여기서, 항균성 생체외 평가는 항균 효능 평가 및 최소저지농도 평가 중 하나의 평가에 의해서 단독 수행되거나 둘의 평가에 의해서 병행 수행될 수 있다. 또한, 항균성 생체내 평가는 항균 효능 평가에 의해서 수행될 수 있다.

### [0049] 1.1.1. 항균성 평가(생체외): 항균 효능 평가

[0050] 상기 항균 효능 평가(antibacterial efficiency)는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 상기 무기 나노입자에 타겟 박테리아를 노출시키는 단계, 상기 타겟 박테리아를 소정의 기간 동안 배양하는 단계, 상기 배양된 타겟 박테리아에 대하여 개체수 측정법(colony counting method)을 수행하는 단계, 및 상기 개체수 측정법 분석의 결과에

의하여, 박테리아의 사멸 정도를 정량화하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0051] 일 예시에서, E. coli (ATCC-11775) 및 S. epidermidis (ATCC-14990) 및 MDR 균주 ESBL-생산 E. coli (ATCC-25922) 및 MRSA (ATCC-33591)를 Cu-Te로 처리하고, 620 nm의 파장에서 작동하는 UV-가시 광선 분광 광도계를 이용하여, 통상적인 개체수 측정법(colony counting method)( $1 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> 기준)을 사용하여 항균 효율을 측정한다.
- [0052] 구체적으로, 100  $\mu$ L의 입자 분산액을 2-mL 박테리아 용액에 첨가하고, 생성된 혼합물을 37 °C에서 24 시간 동안 진탕 배양기에서 배양한다. 이어서, 용액을 탈 이온수로 희석하여 콜로니 계수를 위한 원하는 농도를 확보한다. 용액을 최종적으로 한천 플레이트에 펼치고 24 시간 동안 37 °C에서 배양한다. 항균 효능은 처리되지 않은 박테리아 배양물로부터의 CFU의 수를 비교함으로써 측정한다.
- [0053] **1.1.2. 항균성 평가(생체의): 최소저지농도 평가**
- [0054] 상기 최소저지농도(MIC) 평가는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 상기 무기 나노입자를 타겟 박테리아에 노출시키는 단계; 상기 타겟 박테리아를 소정의 기간 동안 배양하는 단계; 상기 무기 나노입자의 최소저지농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 판단하는 단계를 포함할 수 있다. 후술하는 실험예에서 이를 보다 상세히 설명한다.
- [0055] 일 예시에서, 박테리아에 대한 Cu-Te의 MIC를 브로쓰 미세 희석 방법(broth microdilution method)을 사용하여 측정한다. 간단히, 박테리아 ( $1 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> 기초)를 96-웰 마이크로 타이터 플레이트 (SPL34096, SPL Life Sciences, Korea)에 분주하고 상이한 질량 농도를 갖는 100  $\mu$ L 분취량의 트립신 소이 브로스(TSB)의 입자 분산액을 추가하고, 37 °C에서 24 시간 동안 배양한다. MIC는 상이한 입자 농도에서 박테리아 성장의 억제 분석함으로써 최종적으로 결정된다.
- [0056] 다른 예시에서, 보조적으로 평가할 수 있는 방법으로서, 박테리아 손상은 SEM을 사용하여 처리되지 않은 균주와 처리된 균주 사이의 형태학적 차이를 관찰함으로써 세균 손상을 조사한다. 37 °C에서 24 시간 동안 Cu-Te (30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>)을 함유하는 TSB에서 박테리아 ( $1 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>)의 배양물로부터 표본을 수득한다. 처리된 박테리아를 세척하고 탈 이온수에 재현탁시킨 후, 현탁액 5  $\mu$ L를 실리콘 웨이퍼 (Wanxiang, China) 위에 놓는다. 표본을 대기 중에서 건조시키고, 진공 백금 코터에 최종적으로 삽입한다. 나노입자로 처리된 박테리아를 37 °C에서 1 시간 동안 회전 배양한 후 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits (L7012, Invitrogen, USA)를 사용하여 공 초점 레이저를 이용하여 박테리아를 염색하여 손상을 추가로 조사할 수도 있다.
- [0057] 여기서, 상기 항균성 생체의 평가에서, 항균 효능 평가 및/또는 최소저지농도 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 1 점수 및/또는 제 2 점수가 부여되며, 각각 하나의 평가만 수행되는 경우에는 제 1 점수 또는 제 2 점수를 사용할 수 있다. 다만, 상기 둘의 평가에 의해서 병행 수행되는 경우 제 1 점수 및 제 2 점수가 합산되어, 제 3 점수가 부여된다. 여기서 제 1 점수 및 제 2 점수가 합산하는 방법은 사용자의 의도에 따라 다양하게 적용될 수 있다. 예를 들어, 부여된 점수를 각각 합산할 수도 있으며, 일부 평가에 소정의 가중치를 부여한 후 합산할 수도 있다. 이러한 방법이 본 출원을 한정하는 것은 아니다.
- [0058] 예를 들어, 항균 효능 평가는 타겟 균(기본적으로는 그람 양성균 S.aureus, 그람 음성균 E.coli)에 대해 90 % 이상인 경우에 점수를 부여할 수 있으며, 다른 예시에서는 다른 레벨의 수치를 기준으로 다양한 방법으로 차등하여 점수를 부여할 수도 있다. 또한, 최소저지농도 평가는 타겟 균(기본적으로는 그람 양성균 S.aureus, 그람 음성균 E.coli)에 대해 100  $\mu$ g/mL 이하인 경우에 점수를 부여할 수 있으며, 다른 예시에서는 다른 레벨의 수치를 기준으로 다양한 방법으로 차등하여 점수를 부여할 수도 있다. 본 출원이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0059] **1.2. 항균성 평가(생체내): 동물 실험**
- [0060] 또한, 상기 항균성 생체내 평가는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 소정의 감염균에 의하여 감염된 감염부위를 갖는 실험 대상 동물에 소정의 농도의 무기 나노입자를 투여하는 단계; 및 소정의 기간 후 실험 대상 동물의 몸 무게 및 생존율을 관찰하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0061] 여기서, 상기 항균성 생체내 평가에서, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의하여 제 4 점수가 부여될 수 있다.
- [0062] 예를 들어, 항균 효능 평가는 타겟 균(기본적으로는 그람 양성균 S.aureus, 그람 음성균 E.coli)에 대해 80 % 이상인 경우에 점수를 부여할 수 있으며, 다른 예시에서는 다른 레벨의 수치를 기준으로 다양한 방법으로 차등

하여 점수를 부여할 수도 있다. 본 출원이 이에 한정되는 것은 아니다.

## 2. 독성 평가

여기서, 상기 독성 생체의 평가는 세포 사멸 정도 평가 및 활성산소종 평가 중 하나의 평가에 의해서 단독 수행되거나 둘의 평가에 의해서 병행 수행될 수 있다. 또한, 독성 생체내 평가는 체중 및 생존율 평가 중 하나의 평가에 의해서 단독 수행되거나 둘의 평가에 의해서 병행 수행될 수 있다.

### 2.1.1. 독성 평가(생체의): 세포 사멸 정도 평가

상기 세포 사멸 정도(cell viability) 평가는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 상기 무기 나노입자를 타겟 세포에 노출시키는 단계; 상기 타겟 세포를 소정의 기간 동안 배양하는 단계; 상기 배양된 타겟 세포를 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 염료로 염색하는 단계; 및 상기 타겟 세포의 색 변화를 관찰하여, 세포 사멸 정도(cell viability)를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 후술하는 실험예에서 이를 보다 상세히 설명한다.

일 예시에서, MTT 분석을 사용하여 Cu-Te 과 24 시간 및 48 시간 배양 후 HDF 및 WI-38 세포 (한국 세포주 은행, 한국)의 시험관내 생존율을 결정한다. 구체적으로, 이들 실험에서, HDF 및 WI-38 세포를 웰당  $1 \times 10^4$  세포로 96-웰 플레이트에 분주하고, 비교를 위해 Cu-Te 또는 Te 또는 Cu 입자에 노출시켰다. MTT 시약 (1.25 mg mL<sup>-1</sup>, 웰당 100  $\mu$ L)을 각 웰에 첨가하고, 24 시간 또는 48 시간 배양 후, 포르마잔 결정을 DMSO (세포 등급)에 용해시키고 마이크로 플레이트 판독기(Multiskan EX, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 570 nm의 파장에서 용액의 흡광도 값을 측정한다.

### 2.1.2. 독성 평가(생체의): 활성산소종 평가

또한, 상기 활성산소종(ROS) 평가는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 상기 무기 나노입자를 타겟 세포에 노출시키는 단계; 상기 타겟 세포를 소정의 기간 동안 배양하는 단계; 상기 배양된 타겟 세포를 DCFH-DA(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate) 염료로 염색하는 단계; 및 상기 타겟 세포로부터 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 후술하는 실험예에서 이를 보다 상세히 설명한다.

일 예시에서, Cu-Te로 처리된 HDF 및 WI-38 세포에서의 ROS 생성은 산화 민감성 형광 염료인 DCFH-DA를 사용하여 측정된다. 처리된 (24 또는 48 시간) 세포를 인산 버퍼 식염수(PBS)로 2 회 세척한 다음, DCFH-DA 용액 (30  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>)과 함께 30 분 동안 어둠 속에서 배양한다. 세포를 PBS로 다시 세척하고, 형광 현미경을 사용하여 ROS 생성을 나타내는 형광 신호를 관찰하여, 세포 독성을 평가한다.

상기 독성 생체의 평가에서, 세포 사멸 정도 평가 및/또는 활성산소종 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 5 점수 및/또는 제 6 점수가 부여되며, 각각 하나의 평가만 수행되는 경우에는 제 5 점수 또는 제 6 점수를 사용할 수 있다. 다만, 상기 둘의 평가에 의해서 병행 수행되는 경우 제 5 점수 및 제 6 점수가 합산되어, 제 7 점수가 부여된다. 여기서 제 5 점수 및 제 6 점수가 합산하는 방법은 사용자의 의도에 따라 다양하게 적용될 수 있다. 예를 들어, 부여된 점수를 각각 합산할 수 도 있으며, 일부 평가에 소정의 가중치를 부여한 후 합산할 수 도 있다. 이러한 방법이 본 출원을 한정하는 것은 아니다.

## 2.2. 독성 평가(생체내): 동물 실험

상기 독성 생체내 평가는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 실험 대상 동물에 소정의 농도의 무기 나노입자를 투여하는 단계; 소정의 기간 후 실험 대상 동물의 몸무게 및 생존율을 관찰하는 단계; 및 소정의 기간 후 실험 대상 동물을 해부하여, 조직병리학적 분석 및 생화학적 혈액 검사를 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 후술하는 실험예에서 이를 보다 상세히 설명한다.

30 마리의 수컷 ICR 마우스를 각각 6 마리 마우스의 하나의 대조군 및 4 개의 처리 군으로 무작위로 나누었다. 마우스에 100mg kg<sup>-1</sup>의 단일 용량으로 입자 구조물을 복강 내 투여하고, 대조군 마우스를 생리 식염수로 처리하였다. 주사 후 3 일마다 마우스를 칭량하고 행동 변화에 대해 평가하고 18 일 후에 희생시켰다.

또한, 보조적 평가로서, 세포 형태를 관측하여 평가할 수 있다. 구체적으로, HDF 및 WI-38 세포를 웰당  $1 \times 10^5$  세포로 12-웰 플레이트에 분주하고 밤새 성장시킨 후 Cu-Te에 노출시킨다. 처리된 세포를 24 시간 또는 48 시간 배양후 세척하고, 현미경 이미지를 역현미경(CXK41SF, Olympus, Japan)을 사용하여 확인하여, 형태의 변화에 대한 평가를 할 수 있다.

- [0076] 상기 독성 생체내 평가에서, 체중 평가 및/또는 생존을 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 8 점수 및/또는 제 9 점수가 부여될 수 있으며, 상기 둘의 평가에 의해서 병행 수행되는 경우 제 8 점수 및 제 9 점수가 합산되어, 제 10 점수가 부여될 수 있다.
- [0077] 예를 들어, 체중 평가는 타겟 동물의 체중이 18일 동안 유의미한 변화가 없는 경우에 점수를 부여할 수 있으며, 다른 예시에서는 다른 레벨의 수치를 기준으로 다양한 방법으로 차등하여 점수를 부여할 수도 있다. 또한, 생존을 평가는 타겟 동물이 18일 동안 생존해 있는 경우에 점수를 부여할 수 있으며, 다른 예시에서는 다른 레벨의 수치를 기준으로 다양한 방법으로 차등하여 점수를 부여할 수도 있다.
- [0078] 그 외 체중과 생존을 변화를 설명하기 위해 실험 대상 동물을 해부하여, 조직병리학적 분석 및 생화학적 혈액 검사를 수행하는 단계를 거쳐야하며 그 결과 투약에 의한(체중과 생존을 관련) 유의미한 변화가 없어야 부여할 수 있으며, 다른 예시에서는 다른 레벨의 수치를 기준으로 다양한 방법으로 차등하여 점수를 부여할 수도 있다. 본 출원이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 이러한 생체의 평가는 2 일 이내에 수행될 수 있으며, 생체내 평가는 18일 이내에 수행될 수 있다. 또한, 생체외 평가 및 생체내 평가는 21일(3주) 이내에 수행될 수 도 있다.
- [0080] 본 출원의 다른 일 측면은 무기 나노입자의 항균능 및 독성을 평가하는 단기 평가 방법으로서, 평가 대상 무기 나노입자를 준비하는 단계; 상기 무기 나노입자에 대한 항균성 생체외(in vitro) 평가 및 독성 생체외(in vitro) 평가와 상기 무기 나노입자에 대한 항균성 생체내(in vivo) 평가 및 독성 생체내(in vivo) 평가를 각각 수행하는 단계를 포함하며, 상기 항균성 생체외(in vitro) 평가 및 독성 생체외(in vitro) 평가는 각각 2일 이내에 결과를 도출하고, 상기 항균성 생체내(in vivo) 평가는 5일 이내에 결과를 도출하며, 상기 독성 생체내(in vivo) 평가는 18일 이내에 결과를 도출하는 평가 방법이다.
- [0081] 상기 평가 방법에 사용되는 평가 대상 무기 나노입자의 총 질량은 0.1 g 이하, 바람직하게, 0.09 g 이하, 0.08 g 이하, 0.07 g 이하, 0.06 g 이하, 0.05 g 이하, 0.04 g 이하, 0.03 g 이하, 0.02 g 이하, 또는 0.01 g 이하 일 수 있다. 매우 소량의 샘플만으로도 다양한 평가를 수행할 수 있다.
- [0082] 여기서, 생체외 평가는 독성 생체외 평가와 항균성 생체외 평가가 개별적으로 수행되지만, 독성 생체내 평가과 항균성 생체내 평가가 동일한 공정을 통하여 수행될 수 있다.
- [0083] 전술한 본 측면에서 기술되었던 설명 중 본 측면에 해당되는 내용은 특별히 언급하지 하지 않아도, 본 측면에 적용가능하다.
- [0084] 본 출원의 또 다른 일 측면은 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 시스템으로서, 항균성 생체외(in vitro) 평가 장치; 항균성 생체내(in vivo) 평가 장치; 독성 생체외(in vitro) 평가 장치; 독성 생체내(in vivo) 평가 장치; 및 상기 평가 장치들과 각각 연통되어, 각각의 평가 장치로부터 부여된 점수 데이터를 수신하여, 통합 점수를 연산하는 제어 장치를 포함할 수 있다. 여기서, 각각의 장치는 특별히 한정되는 것은 아니며, 본 출원이 의도하고자 하는 바에 따라 적용가능한 것이라면 어떠한 것이라도 적용가능하다.
- [0085] 전술한 본 측면에서 기술되었던 설명 중 본 측면에 해당되는 내용은 특별히 언급하지 하지 않아도, 본 측면에 적용가능하다.
- [0087] 이하, 실험예를 통하여 본 출원을 보다 상세히 설명한다.
- [0088] **[실험예 1]**
- [0089] 항균성 생체외 평가(항균성 평가)를 위하여, 하기 실험을 수행하였다.
- [0090] E. coli (ATCC-11775) 및 S. epidermidis (ATCC-14990) 및 MDR 균주 ESBL-생산 E. coli (ATCC-25922) 및 MRSA (ATCC-33591)를 Cu-Te로 처리하고, 620 nm의 파장에서 작동하는 UV-가시 광선 분광 광도계를 이용하여, 통상적인 개체수 측정법(colony counting method)( $1 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> 기준)을 사용하여 항균 효율을 측정하였다.
- [0091] 구체적으로, 100  $\mu$ l 분취량의 입자 분산액을 2-mL 박테리아 용액에 첨가하고, 생성된 혼합물을 37 °C에서 24 시간 동안 진탕 배양기에서 배양한다. 이어서, 용액을 탈 이온수로 희석하여 콜로니 계수를 위한 원하는 농도를 확보하였다. 용액을 최종적으로 한천 플레이트에 펼치고 24 시간 동안 37 °C에서 배양한다. 항균 효능은 처리되지 않은 박테리아 배양물로부터의 CFU의 수를 비교함으로써 측정하였다.
- [0092] **[실험예 2]**



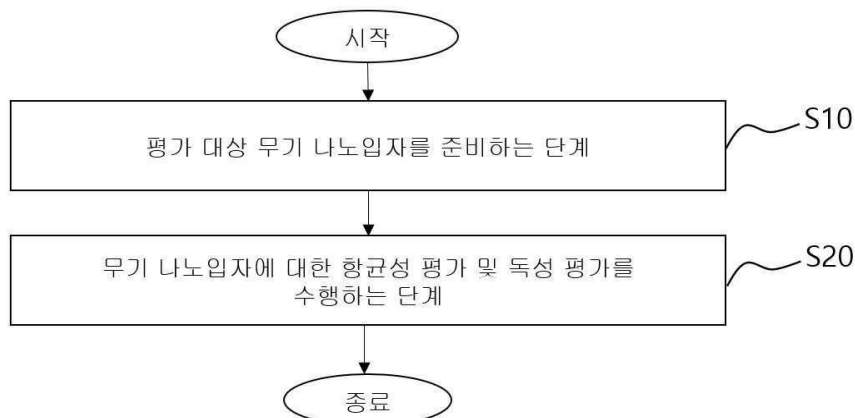
- [0093] 항균성 생체의 평가(MIC 평가)를 위하여, 하기 실험을 수행하였다.
- [0094] 박테리아에 대한 Cu-Te의 MIC를 브로쓰 미세 희석 방법(broth microdilution method)을 사용하여 측정하였다. 간단히, 박테리아 ( $1 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> 기초)를 96- 웰 마이크로 타이터 플레이트 (SPL34096, SPL Life Sciences, Korea)에 분주하고 상이한 질량 농도를 갖는 100  $\mu$ L 분취량의 트립신 소이 브로스(TSB)의 입자 분산액을 추가하고, 37  $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 배양한다. MIC는 상이한 입자 농도에서 박테리아 성장의 억제를 분석함으로써 최종적으로 측정하였다.
- [0095] **[실험예 3]**
- [0096] 독성 생체의 평가(세포 생존률 평가)를 위하여, 하기 실험을 수행하였다.
- [0097] MTT 분석을 사용하여 Cu-Te 과 24 시간 및 48 시간 배양 후 HDF 및 WI-38 세포 (한국 세포주 은행, 한국)의 시험관내 생존율을 결정하였다. 구체적으로, 이들 실험에서, HDF 및 WI-38 세포를 웰당  $1 \times 10^4$  세포로 96-웰 플레이트에 분주하고, 비교를 위해 Cu-Te 또는 Te 또는 Cu 입자에 노출시켰다. MTT 시약 (1.25 mg mL<sup>-1</sup>, 웰당 100  $\mu$ L)을 각 웰에 첨가하고, 24 시간 또는 48 시간 배양 후, 포르마잔 결정을 DMSO (세포 등급)에 용해시키고 마이크로 플레이트 판독기(Multiskan EX, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 570 nm의 파장에서 용액의 흡광도 값을 측정하였다.
- [0098] **[실험예 4]**
- [0099] 독성 생체의 평가(ROS 평가)를 위하여, 하기 실험을 수행하였다.
- [0100] Cu-Te로 처리된 HDF 및 WI-38 세포에서의 ROS 생성은 산화 민감성 형광 염료인 DCFH-DA를 사용하여 측정하였다. 처리된 (24 또는 48 시간) 세포를 인산 버퍼 식염수(PBS)로 2 회 세척한 다음, DCFH-DA 용액 (30  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>)과 함께 30 분 동안 어둠 속에서 배양하였다. 세포를 PBS로 다시 세척하고, 형광 현미경을 사용하여 ROS 생성을 나타내는 형광 신호를 관찰하여, 세포 독성을 평가한다. 24시간 동안 37  $^{\circ}$ C에서 Cu-Te 구조체(48  $\mu$ g/mL)로 처리된 박테리아의 ROS 생성의 경우, DCFH-DA 처리된 박테리아 셀은 상층액의 제거를 위하여 원심분리하였다. 유세포 분석(BD Biosciences, USA)을 위해 세포를 PBS에 재현탁시켰다.
- [0101] **[실험예 5]**
- [0102] 독성 생체내 평가(체중 및 생존률 평가)를 위하여, 하기 실험을 수행하였다.
- [0103] 30 마리의 수컷 ICR 마우스를 각각 6 마리 마우스의 하나의 대조군 및 4 개의 처리 군으로 무작위로 나누었다. 마우스에 100mg kg<sup>-1</sup>의 단일 용량으로 입자 구조물을 복강 내 투여하고, 대조군 마우스를 생리 식염수로 처리하였다. 주사 후 3 일마다 마우스의 체중을 측정하고 행동 변화에 대해 평가하고 18 일 후에 희생시켰다.
- [0104] **[실험예 6]**
- [0105] 체중과 생존율 변화를 설명하기 위해 실험 대상 동물을 해부하여, 조직병리학적 분석 및 생화학적 혈액 검사를 수행하는 단계를 수행하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.
- [0106] 조직 병리학적 분석을 위해, 모든 동물로부터 뇌, 심장, 간, 비장, 폐 및 신장 조직을 절제하고, 10 % 중성 완충 포르말린에 고정시키고, 자동화된 조직 프로세서(Shandon Citadel 2000, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 파라핀에 포매시키고, 마이크로톰 (RM2255, Leica Biosystems, Germany)을 사용하여 3 내지 4  $\mu$ m로 절단하였다. 이어서, 각 섹션을 H&E로 염색하고, 광학 현미경 (Model Eclipse 80i, Nikon, Japan)을 사용하여 관찰하였다.
- [0107] 또한, 표준 심장 천자 수집 기술(standard cardiac puncture collection technique)에 기초하여, 혈액학 분석을 위해 마취된 마우스로부터 혈액을 채취하였다. 혈액 분석을 위해, 18 일째에 처리된 마우스로부터 1mL의 혈액 분취량을 수집하고 4  $^{\circ}$ C에서 15 분 동안 3000 rpm으로 원심 분리하여 혈청을 수득하였다. 백혈구, 적혈구, HGB, HCT 등과 같은 혈액학적 파라미터를 조사하였다. 또한, 간 기능에 대한 치료의 효과를 평가하기 위해 ALP 및 AST의 혈청 수준을 분석하였다. 신독성(nephrotoxicity)을 검사하기 위해 BUN 및 CRE 레벨을 분석하였다.
- [0108] **[실험예 6]**
- [0109] 항균성 생체내 평가를 위하여, 하기 실험을 수행하였다.
- [0110] 실험 전에 수컷 ICR 마우스 (30 내지 40g; 6 주령)를 엄격한 12/12 시간의 명암주기에서  $22 \pm 2$   $^{\circ}$ C 및 40-60

% 상대 습도에서 일주일 동안 유지하여, 개별 통풍 케이지(특정 병원체가 없는 상태)에 적응시켰다. 이전에 설명한대로 *S. epidermidis*를 ICR 마우스의 피부 감염시켰다. 간략하게, 마우스를 마취시키고 (케타민/자일라진 혼합; 0.1 mL / 20 g), 에탄올 (70 %)로 소독하고, 등을 면도하고(약 3 cm<sup>2</sup>), 면도 부위에서 테이프로 벗겨 내고(2.5 cm<sup>2</sup>), 1 x 10<sup>7</sup> CFU / mL의 농도로 *S. epidermidis*의 균주 200 µL로 피하 주사하고, 밤새 유지하여 마우스를 감염시켰다. 이어서 감염된 마우스를 6 개의 그룹으로 무작위로 분류하고, 각 그룹마다 3 마리의 마우스를 포함시켰다. 감염된 6 개 그룹을 3 일 동안 24 시간 간격으로 200 µL의 정상 식염수 (양성 대조군; PC) 또는 CHL을 포함하여 25 mg/kg의 용량으로 Cu-Te 구조체 또는 Te 입자(상온)로 피하 주사 하였다. 한 그룹은 감염시키지 않았으며, 음성 대조군(NC)으로 처리하였다. 실험 기간 중 마우스의 부종, 발적 및 다른 염증 반응을 특징으로하는 피부 농양 및 병변의 발달을 모니터링 하였다. 처리 4 일째에, 마우스를 희생시키고, 300 mg의 상처(1 cm<sup>2</sup> 이하)를 제거하고, 3 mL의 포스포이트 완충액으로 균질화시켰다. 10 µL의 균질 액을 최종적으로 수득하여, 주입 평판법(pour plate technique)을 수행하여, 살아있는 박테리아의 CFU를 측정하고 다른 그룹과 비교하였다.

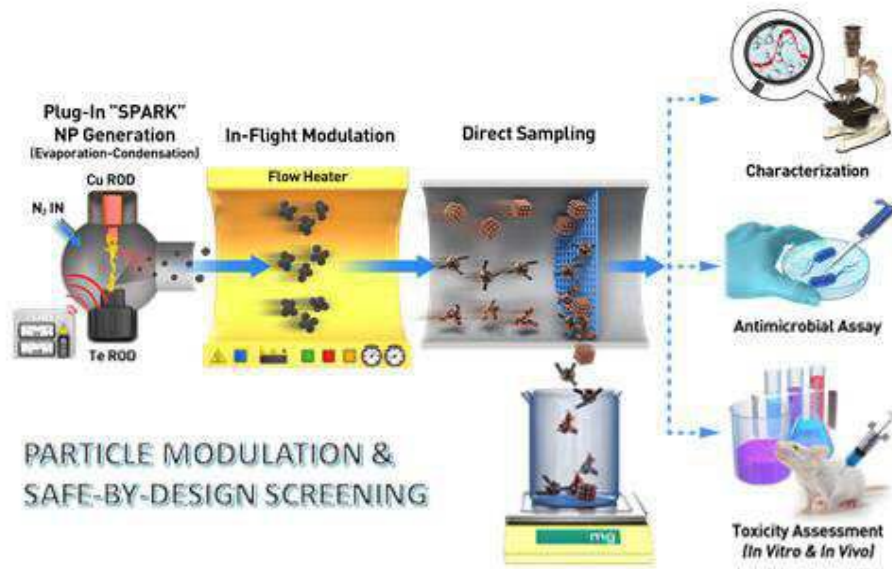
[0112] 상기에서는 본 출원의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 출원을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

## 도면

### 도면1



도면2



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

평가 대상 무기 나노입자를 준비하는 단계; 및

상기 무기 나노입자에 대한 항균성 평가 및 독성 평가를 수행하는 단계를 포함하며,

상기 항균성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성되며, 상기 독성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성되고,

항균성 생체외 평가는 항균 효능(antibacterial efficiency) 평가 및 최소저지농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 평가에 의해서 병행 수행되고,

항균성 생체내 평가는 소정의 감염균에 의하여 감염된 감염부위를 갖는 실험 대상 동물에 소정의 농도의 무기 나노입자를 투여하는 단계; 및 소정의 기간 후 실험 대상 동물의 몸무게 및 생존율을 관찰하는 단계를 포함하고,

상기 독성 생체내 평가는 실험 대상 동물에 소정의 농도의 무기 나노입자를 투여하는 단계; 및 소정의 기간 후 실험 대상 동물의 체중 및 생존율 평가에 의해서 병행 수행되며,

독성 생체외 평가는 세포 사멸 정도(cell viability) 평가 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 평가에 의해서 병행 수행되며,

항균성 생체외 평가에서, 항균 효능 평가 및 최소저지농도 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 1 점수 및 제 2 점수가 합산되어, 제 3 점수가 부여되고,

항균성 생체내 평가에서, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의하여 제 4 점수가 부여되며,

독성 생체외 평가에서, 세포 사멸 정도 평가 및 활성산소종 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 5 점수 및 제 6 점수가 합산되어, 제 7 점수가 부여되고,

독성 생체내 평가에서, 체중 평가 및 생존율 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 8 점수 및 제 9 점수가 합산되어, 제 10 점수가 부여되며,

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성된 항균성 평가에 의하여 부여된 점수와

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성된 독성 평가에 의하여 부여된 점수의 통합

점수를 연산하고, 평가 대상 무기 나노입자의 총 질량은 0.1 g 이하이고, 항균성 생체내(in vivo) 평가는 5일 이내에 결과를 도출하며, 독성 생체내(in vivo) 평가는 18일 이내에 결과를 도출하는 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 방법.

【변경후】

평가 대상 무기 나노입자를 준비하는 단계; 및

상기 무기 나노입자에 대한 항균성 평가 및 독성 평가를 수행하는 단계를 포함하며,

상기 항균성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성되며, 상기 독성 평가는 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성되고,

항균성 생체외 평가는 항균 효능(antibacterial efficiency) 평가 및 최소저지농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 평가에 의해서 병행 수행되고,

항균성 생체내 평가는 소정의 감염균에 의하여 감염된 감염부위를 갖는 실험 대상 동물에 소정의 농도의 무기 나노입자를 투여하는 단계; 및 소정의 기간 후 실험 대상 동물의 몸무게 및 생존율을 관찰하는 단계를 포함하고,

상기 독성 생체내 평가는 실험 대상 동물에 소정의 농도의 무기 나노입자를 투여하는 단계; 및 소정의 기간 후 실험 대상 동물의 체중 및 생존율 평가에 의해서 병행 수행되며,

독성 생체외 평가는 세포 사멸 정도(cell viability) 평가 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 평가에 의해서 병행 수행되며,

항균성 생체외 평가에서, 항균 효능 평가 및 최소저지농도 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 1 점수 및 제 2 점수가 합산되어, 제 3 점수가 부여되고,

항균성 생체내 평가에서, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의하여 제 4 점수가 부여되며,

독성 생체외 평가에서, 세포 사멸 정도 평가 및 활성산소종 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 5 점수 및 제 6 점수가 합산되어, 제 7 점수가 부여되고,

독성 생체내 평가에서, 체중 평가 및 생존율 평가에 대한 결과 각각을 통하여, 기 설정된 평가 기준(reference)에 의한 제 8 점수 및 제 9 점수가 합산되어, 제 10 점수가 부여되며,

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내(in vivo) 평가로 구성된 항균성 평가에 의하여 부여된 점수와

상기 생체외(in vitro) 평가 및 생체내 (in vivo) 평가로 구성된 독성 평가에 의하여 부여된 점수의 통합 점수를 연산하고, 평가 대상 무기 나노입자의 총 질량은 0.1 g 이하이고, 항균성 생체내(in vivo) 평가는 5일 이내에 결과를 도출하며, 독성 생체내(in vivo) 평가는 18일 이내에 결과를 도출하는 무기 나노입자의 항균능 및 독성 단기 평가 방법.