



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월07일
(11) 등록번호 10-1935429
(24) 등록일자 2018년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) C07C 211/26 (2006.01)
C07C 321/10 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/56983 (2013.01)
C07C 211/26 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0033422
(22) 출원일자 2016년03월21일
심사청구일자 2016년03월21일
(65) 공개번호 10-2017-0109379
(43) 공개일자 2017년09월29일
(56) 선행기술조사문헌
US20160061741 A1*
KR101575747 B1
'약물 저항성 바이오 유해물질 신속 검출을 위한 바이오 킨텐츠 설계 및 활용기술 개발', 정부과제 연구보고서, (2015.06.), pp 1-45.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자
임은경
대전광역시 유성구 과학로 125
정주연
대전광역시 유성구 과학로 125
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 4 항

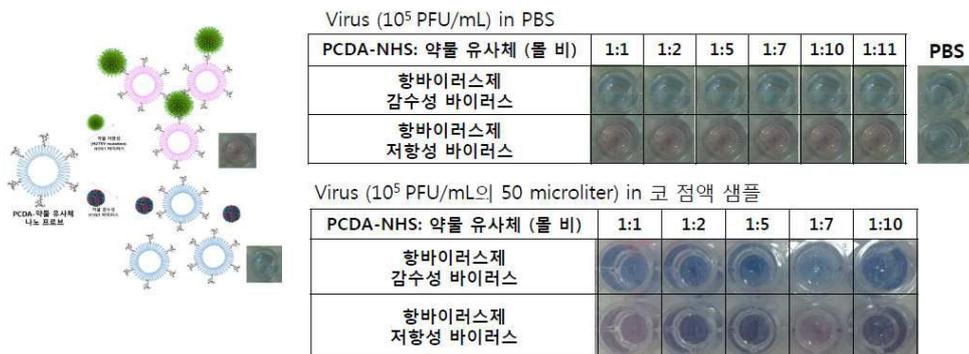
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **항바이러스제-저항성 바이러스 검출용 유기 나노 시스템**

(57) 요약

본 발명은 항바이러스제 저항성 또는 감수성 바이러스 검출용 유기 나노 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사디아노익산 나노입자는 타겟 바이러스에 결합한 경우 붉은색을, 결합하지 않은 경우 푸른색을 나타낸다. 이는 육안으로 빠르고 편리하게 확인 가능하므로, 신속하게 인플루엔자 바이러스에 감염된 환자의 치료 계획을 세우는데 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



- (52) CPC특허분류
C07C 321/10 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
G01N 2333/11 (2013.01)

황슬기

대전광역시 유성구 과학로 125

- (72) 발명자
국경혜
대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015043206
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
연구사업명 원천기술개발사업(글로벌프론티어)
연구과제명 약물 저항성 바이오 유해물질 신속 검출을 위한 바이오 컨텐츠 설계 및 활용기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한국생명공학연구원
연구기간 2015.09.01 ~ 2016.06.30
공지예외적용 : 있음

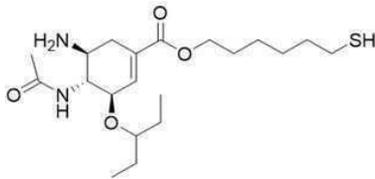
명세서

청구범위

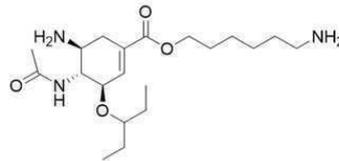
청구항 1

화학식 1 또는 2의 화합물이 결합된, 10, 12-펜타코사다이노익산(10, 12-pentacosadiynoic acid) 나노입자.

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 2

제1항의 나노입자를 포함하는, H275 돌연변이를 포함하는 항바이러스제 저항성 바이러스 검출용 키트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 10, 12-펜타코사다이노익산 나노입자는 NHS(N-hydroxysuccinimide)로 개질(modification)된 것인, 10, 12-펜타코사다이노익산(10, 12-pentacosadiynoic acid) 나노입자.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

바이러스에 감염된 대상체로부터 분리된 시료를 제1항의 나노입자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 대상체가 감염된 바이러스가 H275 돌연변이를 포함하는 항바이러스제 저항성 바이러스인지 여부에 대한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항바이러스제-저항성 또는 감수성 바이러스 검출용 유기 나노 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자(influenza, 독감)는 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 의해 사람 및 동물(조류, 돼지, 개, 말 등)의 호흡기를 통해 전파되는 호흡기성 질병이다. 사람 인플루엔자(Human influenza)의 경우 매년 전 세계 10-20% 인구에서 발생하며, 전염성이 높아 매년 세계적 규모로 유행하는 경향이 있다. 인플루엔자의 증상은 고열, 두통, 근육통, 인후의 염증, 통증, 기침 등의 호흡기질환을 수반하며 심한 경우 노약자, 만성질환보유자 등의 사망을 유발할 수 있다.

[0003] 인플루엔자 감염이 의심되면 신속하게 치료하여 위험한 상황이 초래되는 것을 막고 다른 사람들에게 추가적으로 전파되는 것을 방지해야 한다. 현재 인플루엔자 감염의 치료에는 오셀타미비르 포스페이트(타미플루)가 주로 이용되고 있는데, 근래에 오셀타미비르에 저항성을 나타내는 바이러스 변이주 발생이 증가하고 있다. 바이러스를 구별할 수 있는 방법에 대해서는 다수의 문헌에서 보고된 바 있는데, 예를 들어 Marin MJ *et al.*은 인간 인플루

엔자 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스를 구별하는 방법에 대해 개시하고 있다. 그러나 인플루엔자 감염이 의심되는 환자가 오셀타미비르 저항성 바이러스에 감염되었는지 여부를 확인할 수 있는 효과적인 방법은 현재까지 개발된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Marin MJ et al. (Glyconanoparticles for the plasmonic detection and discrimination between human and avian influenza, Org Biomol Chem. 2013 Nov 7; 11(41):7101-7)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된, 10, 12-펜타코사다이노익산(10, 12-pentacosadiynoic acid) 나노입자를 제공한다.

[0006] 본 발명은 상기 나노입자를 포함하는 항바이러스제 저항성 바이러스 검출용 키트 및 항바이러스제 감수성 바이러스 검출용 키트를 제공한다.

[0007] 본 발명은 바이러스에 감염된 대상체로부터 분리된 시료를 상기 나노입자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 대상체가 감염된 바이러스가 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스인지 여부에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된, 10, 12-펜타코사다이노익산(10, 12-pentacosadiynoic acid) 나노입자를 제공한다.

[0009] 본 발명은 항바이러스제 저항성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사다이노익산 나노입자를 포함하는, 항바이러스제 저항성 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 항바이러스제 저항성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사다이노익산 나노입자를 포함하는, 항바이러스제 저항성 바이러스 검출용 키트를 제공한다.

[0011] 본 발명은 바이러스에 감염된 대상체로부터 분리된 시료를, 항바이러스제 저항성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사다이노익산 나노입자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 대상체가 감염된 바이러스가 항바이러스제 저항성 바이러스인지 여부에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구현예로서, 당업계에서 알려진 통상의 진단 방법에 의하여 대상체가 바이러스에 감염되었고 그 바이러스가 어떤 바이러스인지 추정할 수 있다. 그러면 그 추정되는 바이러스와 동일한 종의 바이러스 중 해당 바이러스에 사용되는 항바이러스제에 저항성을 나타내는 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사다이노익산 나노입자를 준비하고, 상기 대상체로부터 분리된 시료를 상기 나노입자와 접촉시키면, 상기 대상체가 감염된 바이러스가 항바이러스제 저항성 바이러스인지 여부인지를 알 수 있다.

[0012] 또한 본 발명은 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사다이노익산 나노입자를 포함하는, 항바이러스제 감수성 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사다이노익산 나노입자를 포함하는, 항바이러스제 감수성 바이러스 검출용 키트를 제공한다.

[0014] 본 발명은 바이러스에 감염된 대상체로부터 분리된 시료를, 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사다이노익산 나노입자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 대상체가 감염된 바이러스가 항바이러스제 감수성 바이러스인지 여부에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 구현예로서, 당업계에서 알려진 통상의 진단 방법에 의하여 대상체가 바이러스에 감염되었고 그 바이러스가 어떤 바이러스인지 추정할 수 있다. 그러면 그 추정되는 바이러스와 동일한 종의 바이러스 중 해당 바이러스에 사용되는 항바이러스제에 감수성을 나타내는 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사다이노

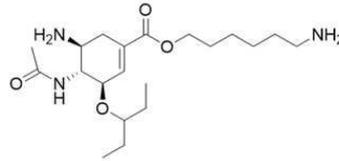
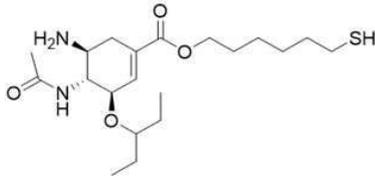
익산 나노입자를 준비하고, 상기 대상체로부터 분리된 시료를 상기 나노입자와 접촉시키면, 상기 대상체가 감염된 바이러스가 항바이러스제 감수성 바이러스인지 여부인지를 알 수 있다.

- [0015] 본 발명에 있어서 "감수성"이란 항바이러스제가 치료 효과를 나타내는 바이러스를 의미하고, "저항성"이란 항바이러스제가 치료 효과를 나타내지 않는 바이러스를 의미한다. 예를 들어, 상기 항바이러스제 저항성 바이러스는 I223R 및/또는 H275Y 돌연변이가 발생하여 오셀타미비르(타미플루™)에 저항성을 나타내는 인플루엔자 바이러스, 상기 항바이러스제 감수성 바이러스는 I223R 및/또는 H275Y 돌연변이가 발생하지 않아 오셀타미비르에 감수성을 나타내는 인플루엔자 바이러스가 될 수 있다. 그러나 상기 항바이러스제의 종류는 이에 제한되지 않으며, 임의의 항바이러스제가 될 수 있다. 또한 상기 바이러스의 종류 역시 인플루엔자 바이러스에 제한되지 않으며 임의의 바이러스가 될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 바이러스는 플라비비리대(*Flaviviridae*)에 속하는 바이러스가 될 수 있다. 플라비비리대는 하기 3개의 속으로 구분된다.
- [0017] (1) 플라비바이러스(*Flavivirus*). 이 속은 뎅기 바이러스 그룹 (뎅기 바이러스, 뎅기 바이러스 유형 1, 뎅기 바이러스 유형 2, 뎅기 바이러스 유형 3, 뎅기 바이러스 유형 4), 일본 뇌염 바이러스 그룹 (Alfuy 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, Kookaburra 바이러스, Koutango 바이러스, Kunjin 바이러스, Murray Valley 뇌염 바이러스, St. Louis 뇌염 바이러스, Stratford 바이러스, Usutu 바이러스, West Nile 바이러스), Modoc 바이러스 그룹, Rio Bravo 바이러스 그룹 (Apoi 바이러스, Rio Brovo 바이러스, Saboya 바이러스), Ntaya 바이러스 그룹, 진드기매개뇌염 그룹 (진드기매개뇌염 바이러스), Tyulenyi 바이러스 그룹, Uganda S 바이러스 그룹 및 황열 바이러스 그룹을 포함한다. 이 주요 그룹외에, 분류되지 않는 몇몇 추가의 플라비바이러스가 존재한다.
- [0018] (2) 헤파시바이러스(*Hepacivirus*). 이 속은 C형 간염 바이러스(HCV) 하나의 종류만을 포함한다. C형 간염 바이러스에는 다양한 하위그룹(subtype)이 존재한다.
- [0019] (3) 페스티바이러스(*Pestivirus*). 이 속은 소바이러스성 설사바이러스-2 (BVDV-2), 페스티바이러스 유형 1 (BVDV 포함), 페스티바이러스 유형 2 (돼지콜레라 바이러스 포함) 및 페스티바이러스 유형 3 (Border Disease Virus)을 포함한다.
- [0020] C형 간염 플라비바이러스에 대하여 활성인 것으로 확인된 항바이러스제의 예는:
- [0021] (1) 인터페론 및 리마비린(Battaglia, A. M. et al. *Ann. Pharmacother.* 2000,34, 487; Berenguer, M. et al. *antivir. Ther.* 1998, 3 (Suppl. 3), 125);
- [0022] (2) α 케토아미드 및 하이드라지노우레아를 포함하는 기질-기초 NS3 프로테아제 저해제(Attwood et al. PCT WO 98/22496, 1998; Attwood et al. *antivirus Chemistry and Chemotherapy* 1999,10,259; Attwood et al. German Patent Publication DE 19914474 ; Tung et al. PCT WO 98/17679), 및 보론산 또는 포스페이트와 같은 친전자체로 끝나는 저해제(Llinas-Brunet et al, *HepatIIIs C inhibitor peptide analogues*, PCT WO 99/07734);
- [0023] (3) 아미드상에서 14 개의 탄소 쇄로 치환된 RD3-4082 및 파라-페녹시페닐 그룹을 갖는 RD3-4078을 포함하는, 2,4,6-트리하이드록시-3-니트로-벤즈아미드 유도체(Sudo K. et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 238, 643-647; Sudo K. et al. *antivirus Chemistry and Chemotherapy*, 1998, 9, 186)와 같은 비-기질-기초 저해제;
- [0024] (4) NS3/4A 융합 단백질 및 NS5A/5B 기질을 사용하는 역상 HPLC 분석에서 관련된 저해성을 보이는 티아졸리딘 유도체(Sudo K. et al., *항바이러스 Research*, 1996, 32, 9-18), 특히, 긴 알킬 쇄로 치환된 융합된 신나모일 부위를 갖는 화합물 RD-1-6250, RD4 6205 및 RD4 6193;
- [0025] (5) Kakiuchi N. et al. *J. EBS Letters* 421, 217-220; Takeshita N. et al. *Analytical Biochemistry*, 1997, 247, 242-246에서 확인된 티아졸리딘 및 벤즈아닐리드;
- [0026] (6) SDS PAGE 및 오토라디오그래피 분석에서 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.), Sch 68631의 발효 배양액으로부터 분리된 프로테아제(Chu M. et al., *Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 7229-7232), 및 섬광 근접 분석에서 진균 페니실리움 그리스코풀럼(*Penicillium griscofuluum*), Sch 351633으로부터 분리된 프로테아제(Chu M. et al., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 1949)에 대하여 활성을 갖는 페난-트레네퀴논;
- [0027] (7) 거머리로부터 분리된, 매크로분자 에글린 c(eglin c)에 기초한 선택적 NS3 저해제(Qasim M. A. et al., *Biochemistry*, 1997, 36, 1598);

- [0028] (8) HCV 헬리카아제 저해제(Diana G. D. et al., U. S. Patent No. 5,633,358 and Diana G. D. et al. PCT WO 97/36554) ;
- [0029] (9) 뉴클레오타이드 유사체, 글리오톡신(Ferrari R. et al. Journal of Virology, 1999, 73, 1649), 및 천연 세루레닌(Lohmann V. et al., Virology, 1998, 249, 108)과 같은 폴리머라아제 저해제;
- [0030] (10) 바이러스의 5' 비-코딩 영역(NCR)에서 서열 스트레치에 상보적인 안티센스 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드(Alt M. et al., Hepatology, 1995, 22, 707), 또는 NCR의 3' 말단을 포함하는 뉴클레오타이드 326-348 또는 HCV RNA의 코어 코딩 영역에 위치하는 뉴클레오타이드 371-388(Alt M. et al., Archives of Virology, 1997, 142, 589; Galderisi U. et al., Journal of cellular Physiology, 1999, 181, 2151);
- [0031] (11) IRES-의존 해독 저해제(Ikeda N et al., Agent for the prevention and treatment of hepatitis C, 일본특허 공개 JP-08268890; Kai Y. et al. Prevention and treatment of virus diseases, 일본특허 공개 JP-10101591);
- [0032] (12) 뉴클레아제-내성 라이보자임(Maccjak D. J. et al., Hepatology, 1999, 30, 초록 995);
- [0033] (13) 아만타딘, 예로서 리만타딘(Smith, Abstratct from Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and AASLD, 1996);
- [0034] (14) 퀴놀론, 예로서 오플록사신, 시프로플록사신 및 베로플록사신(AASLD Abstratcts, Hepatology, Oct. 1994, Program Issue, 20 (4), pt. 2, abstract no. 293);
- [0035] (15) 2'-테옥시-L-뉴클레오시드 (Watanabe et al. WO 01/34618), 및 1-β -1-리보푸라노실)-1,2,4-트리아졸-3-카복사미드 (레보비린™) (Tam WO 01/46212) 을 포함하는 뉴클레오시드 유사체 (Ismaili et al. WO 01/60315 ; Storer WO 01/32153); 및
- [0036] (16) 1-아미노-알킬사이클로헥산(미국특허 제6,034,134호, Gold et al.), 알킬 리피드(미국특허 제5,922,757호, Chojkier et al.), 비타민 E 및 다른 항산화제(미국특허 제5,922,757호, Chojkier et al.), 스퀴알렌, 아만타딘, 담즙산(미국특허 제5,846,964호, Ozeki et al), N-(포스포노아세틸)-1-아스파르트산(미국특허 제5,830,905호, Diana et al.), 벤젠디카복사미드(미국특허 제5,633,388호, Diana et al.), 폴리아테닐산 유도체(미국특허 제5,496,546호, Wang et al.), 2',3'-디데옥시이노신(미국특허 제5,026,687호, Yarchoan et al.), 및 벤즈이미다졸(미국특허 제5,891,874호, Colacino et al.), 글루카민 (Mueller et al. WO 01/08672), 치환된-1, 5-이미노-D-글루시톨 화합물(Mueller et al. WO 00/47198)을 포함하는 여러 다른 화합물을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 바이러스는 오르토믹소비리대(*Orthomyxoviridae*)에 속하는 바이러스가 될 수 있다. 오르토믹소비리대는 하기 3개의 속으로 구분된다.
- [0038] (1) 인플루엔자바이러스 A, B. 이 속은 각각 8개의 별개의 RNA 분절을 포함하는 인플루엔자 A 및 B 바이러스를 포함한다. 인간에게 감염되는 주요 형태는 인플루엔자 바이러스 H1N1 및 H3N2이다.
- [0039] (2) 인플루엔자바이러스 C. 이 속은 단지 7개의 별개의 RNA 분절만을 포함하는인플루엔자 C, 단 하나의 종만을 포함한다.
- [0040] (3) 인플루엔자바이러스 D. 이 속은 인플루엔자 A, B 및 C와 구조 및 유전적으로 유사한, 유일한 진드기-매개성 바이러스인 인플루엔자 D이다.
- [0041] 인플루엔자 A 바이러스에 대하여 활성인 것으로 확인된 항바이러스제의 예는
- [0042] (1) 액토마이신 D (Barry, R. D. et al."Participation of deoxyribonucleic acid in the multiplication of influenza virus" Nature, 1962,194,1139-1140);
- [0043] (2) 아만타딘 (Van Voris, L. P. et al."antiviruses for the chemoprophylaxis and treatment of influenza" Semin Respir Infect, 1992,7,61-70);
- [0044] (3) 4-아미노- 또는 4-구아니디노-2-테옥시-2,3-디데하이드로-D-N-아세틸뉴로아민산-4- 아미노- 또는 4-구아니디노-Neu 5 Ac2en (von Itzstein, M. et al."Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication" Nature, 1993,363, 418-423);
- [0045] (4) 리바비린(Van Voris, L. P. et al."antiviruses for the chemoprophylaxis and treatment of influenza"

Semin Respir Infect, 1992,7,61-70);

- [0046] (5) 인터페론(Came, P. E. et al."Antiviral activity of an interferon-inducing synthetic polymer"Proc Soc Exp Biol Med, 1969,131,443-446; Gerone, P. J. et al. "Inhibition of respiratory virus infections of mice with aerosols of synthetic double stranded ribonucleic acid" Infect Immun, 1971,3,323-327; Takano, K. et al."Passive interferon protection in mouse influenza" J Infect Dis, 1991,164,969-972);
- [0047] (6) 불활성화된 인플루엔자 A 및 B 바이러스 백신 ("Clinical studies on influenza vaccine-1978" Rev Infect Dis, 1983,5,721-764; Galasso, G. T. et al."Clinical studies on influenza vaccine-1976" J Infect Dis, 1977,136 (suppl), S341-S746 ; Jennings, R. et al. "Responses of volunteers to inactivated influenza virus vaccines" J Hyg, 1981,86,1-16; Kilbourne, E. D."Inactivated influenza vaccine" In: Plotkin SA, Mortimer EA, eds. Vaccines Philadelphia: Saunders, 1988, 420-434; Meyer, H. M., Jr. et al."Review of existing vaccines for influenza" Am J Clin Pathol, 1978,70,146-152; "Mortality and Morbidity Weekly Report. Prevention and control of influenza : Part I, Vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)" MMWR, 1993,42 (RR-6), 1-14; Palache, A. M. et al."antibody response after influenza immunization with various vaccine doses: A double-blind, placebo-controlled, multi-centre, dose-response study in elderly nursing-home residents and young volunteers" Vaccine, 1993,11,3-9; Potter, C. W."Inactivated influenza virus vaccine" In : Beare AS, ed. Basic and applied influenza research, Boca Raton, FL: CRC Press, 1982,119-158)
- [0048] (7) 오셀타미비르, 자나미비르 등을 포함한다.
- [0049] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 바이러스는 파라믹소비리과(*Paramyxoviridae*)에 속하는 바이러스가 될 수 있다. 파라믹소비리과는 두개의 아과로 구성되고, 각 아과는 각각 3개, 1개의 속을 포함한다.
- [0050] (1) 파라믹소비리과(*Paramyxovirinae*). 이 아과는 세개의 속을 포함한다:
- [0051] a) 파라믹소바이러스 이 속은 센다이 바이러스(Sendai virus)로 나타내고 인간 파라인플루엔자 바이러스 1 및 3을 포함한다;
- [0052] b) 루블라바이러스(Rubulavirus) 이 속은 뎀프스바이러스, 원숭이 바이러스 5, 뉴캐슬 질환 바이러스 및 인간 파라인플루엔자 바이러스 2 및 4로 나타낸다;
- [0053] c) 홍역바이러스. 이 속은 홍역바이러스로 나타낸다.
- [0054] (2) 뉴모비리과(Pneumovirinae). 이 아과는 하나의 속을 포함한다.
- [0055] a) 뉴모바이러스(Pneumovirus). 이 속은 호흡기세포융합바이러스 (호흡기세포융합바이러스)(RSV)로 나타내고 소 (BRSV), 양 RSV (ORSC), 염소 RSV (CRSV), 마우스의 폐렴 바이러스 및 칠면조 비기관염 바이러스 (TRTV) 또한 포함한다.
- [0056] RSV에 대하여 활성인 것으로 확인된 항바이러스제의 예는
- [0057] (1) 리바비린 (Hruska, J. F. et al."In vivo Inhibition of respiratory syncytialvirus by Ribavirin" antimicrob Agents Chemother, 1982,21,125-130); 및
- [0058] (2) 정제된 인간 정맥내 IgG-IVIG (Prince, G. A. et al."Effectiveness of topically administered neutralizing antibodies in experimental immunotherapy of respiratory syncytialvirus infection in cotton rats" J Virol, 1987,61,1851 1954; Prince, G. A. et al."Immunoprophylaxis and immunotherapy of respiratory syncytialvirus infection in cotton rats" Infect Immun, 1982,42,81 87)을 포함한다.
- [0059] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 화합물은 항바이러스제 감수성 바이러스보다 항바이러스제 저항성 바이러스에 특이적으로 강하게 결합하는 화합물이 될 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 1로 기재되는 오셀타미비르 헥실티올(oseltamivir hexylthiol) 또는 하기 화학식 2로 기재되는 오셀타미비르 헥실아민(oseltamivir hexylamine)이 될 수 있다.
- [0060] [화학식 1] [화학식 2]



[0061]

[0062]

그러나 본 발명의 PCDA 나노입자에 결합될 수 있는, 항바이러스제 감수성 바이러스보다 항바이러스제 저항성 바이러스에 특이적으로 강하게 결합하는 화합물의 종류는 이에 제한되지 않으며, 항바이러스제 감수성 바이러스보다 항바이러스제 저항성 바이러스에 특이적으로 강하게 결합하는 성질을 갖고 있는 임의의 화합물이 될 수 있다.

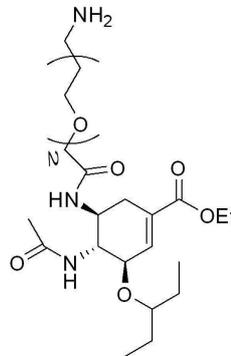
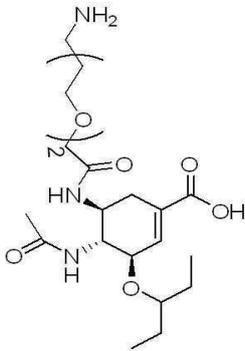
[0063]

본 발명의 다른 구현예로서, 상기 화합물은 항바이러스제 저항성 바이러스보다 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 강하게 결합하는 화합물이 될 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 3으로 기재되는 오셀타미비르 에틸렌글리콜-아마이드 에시드(Oseltamivir Ethyleneglycol EGamine-acid) 또는 화학식 4로 기재되는 오셀타미비르 에틸렌글리콜 아마이드-에스테르(Oseltamivir EGamide-ester)가 될 수 있다.

[0065]

[화학식 3]

[화학식 4]



[0066]

[0067]

상기 화학식 3 또는 화학식 4로 기재되는 화합물은 국내 등록특허 제10-1575747호에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0068]

본 발명의 PCDA 나노입자에 결합될 수 있는, 항바이러스제 저항성 바이러스보다 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 강하게 결합하는 화합물의 종류는 이에 제한되지 않으며, 항바이러스제 저항성 바이러스보다 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 강하게 결합하는 성질을 갖고 있는 임의의 화합물이 될 수 있다.

[0069]

본 발명의 PCDA 나노입자가 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합했는지 여부는 육안으로 색상을 관찰함으로써 확인할 수 있다. PCDA 나노입자에 결합된 화합물의 종류 및 농도, 키트에 사용된 재질, 시료의 종류, 시료 내 포함된 다른 물질, 시료 내 포함된 바이러스의 양에 따라 다소 다르게 관찰될 수 있지만, PCDA 나노입자가 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스에 결합하지 않은 경우 푸른색을 나타내나, 결합한 경우 이보다 붉은색을 띠게 된다. 예를 들어, 본 명세서도 4의 우측 상단 도에서 PBS 내에서 PCDA 나노입자가 항바이러스제 저항성 바이러스에 결합한 경우 푸른색, 결합하지 않은 경우 붉은색이 확연히 나타나나, 도 4의 우측 하단 도에서 코 점액 시료에서 확인한 경우에는 푸른색과 붉은색의 차이가 PBS에서처럼 확연히 나타나지는 않는다. 그러나 이 경우에도 항바이러스제 저항성 바이러스에 결합한 경우 그렇지 않은 경우보다 분명히 붉은색을 띠는 것을 알 수 있다. 이와 같이 색상 비교(비색법)를 통해 통상의 기술자는 본 발명의 PCDA 나노입자가 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합했는지 여부를 용이하게 구별할 수 있다.

[0070]

본 발명의 PCDA 나노입자는 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물과 보다 잘 결합할 수 있도록 적절히 개질(modification)될 수 있다. modification의 종류에는 제한이 없으며, 상기 화합물의 구조에 따라 당업계에 알려진 다양한 modification 방법을 적용할 수 있다. 예를 들어, 상기 modification은 가교제(cross-linker)를 PCDA 나노입자에 결합시키는 것이 될 수 있다. 예컨대 상기 화합물이 아민(amine)기를 포함하는 경우 PCDA 나노입자에 NHS(N-hydroxysuccinimide)를 결합시킬 수 있다.

- [0071] 본 발명이 적용될 수 있는 대상체는 인간 또는 그 밖의 동물, 예컨대 조류 또는 포유류가 될 수 있다.
- [0072] 본 발명이 적용될 수 있는 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 혈액 세포, 내피 세포, 조직 생검, 림프액, 복수액, 간질액, 골수, 뇌척수액 (CSF), 정액, 타액, 점액, 객담, 땀 또는 소변일 수 있다.
- [0073] 본 발명의 키트는 기타 검출에 필요한 물품들을 더 포함할 수 있으며, 사용 지침(instruction)을 더 포함할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 키트는 다양한 형태로 구현 가능하다. 예를 들어 검출 용액 키트, 래피드 키트(rapid kit)(랩온어칩을 이용하여 키트에 소량의 시료를 떨어뜨리면 시료가 키트상에서 이동하여 신속하게 결과를 확인할 수 있는 키트) 또는 플라스틱 스틱, 종이 스틱, 그 외 다양한 형태의 스트립의 형태로 구현할 수 있다. 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 키트는 1개 이상의 패드(pad)가 부착된 종이 스틱이 될 수 있다. 여기에서 패드는 임의의 소재로 만들어진 것일 수 있다. 패드에는 본 발명의 PCDA 나노입자가 결합되어, 시료와 접촉시 색상 변화가 일어날 수 있다. 색상 비교를 보다 용이하게 하기 위하여 하나의 종이 스틱에 2개의 패드를 부착시키고 그 중 하나의 패드에만 본 발명의 PCDA 나노입자를 결합시킬 수 있다.
- [0075] 기존에 개발되어 있던 키트는 항체를 이용하여 열과 pH에 약하여 유통과 사용에 제한이 있고, 유전자 분석의 경우 검출 기기가 필요하나, 본 발명의 경우 화합물을 이용하기 때문에 온도가 높은 지역에서도 사용할 수 있고 장기간 보관이 가능하며 여러 형태로 제품화할 수 있다는 장점이 있다.

발명의 효과

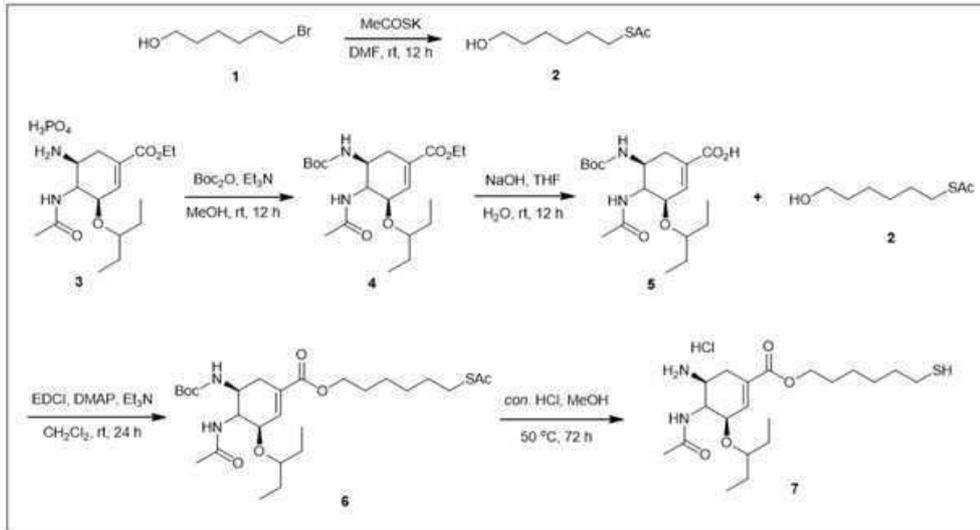
- [0076] 본 발명의 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스에 특이적으로 결합하는 화합물이 결합된 10, 12-펜타코사디노익산 나노입자는 타겟 바이러스에 결합한 경우 붉은색을, 결합하지 않은 경우 푸른색을 나타낸다. 이는 육안으로 빠르고 편리하게 확인 가능하므로, 신속하게 인플루엔자 바이러스에 감염된 환자의 치료 계획을 세우는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0077] 도 1은 PCDA 나노입자를 제조하는 과정에 대한 모식도이다.
 도 2의 좌측 도는 제조된 PCDA 나노입자를 254 nm의 UV에서 촬영한 사진이고, 중앙 도는 UV를 조사하지 않고 전자현미경으로 관찰한 것이고, 우측 도는 254 nm의 UV에서 전자현미경으로 관찰한 것이다.
 도 3은 오셀타미비르 유사체가 결합된 PCDA 나노입자가 오셀타미비르 저항성 바이러스에 결합하는 경우와 결합하지 않는 경우에 각각 붉은색 또는 푸른색을 나타내는 것을 보여주는 모식도이다.
 도 4의 우측 상단 도는 PBS 내에 오셀타미비르 저항성 바이러스가 존재하는 경우 및 존재하지 않는 경우 오셀타미비르 유사체가 결합된 PCDA 나노입자가 나타내는 색상을 보여주는 도이고, 우측 하단 도는 코 점액 내에 오셀타미비르 저항성 바이러스가 존재하는 경우 및 존재하지 않는 경우 오셀타미비르 유사체가 결합된 PCDA 나노입자가 나타내는 색상을 보여주는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0078] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 실시예 1. 나노입자의 제조
- [0080] 1-1. 오셀타미비르 헥실티올(Oseltamivir Hexylthiol) 합성
- [0081] 오셀타미비르 헥실티올을 하기 scheme으로 합성하였다. 이하에서 화합물명 다음에 괄호 내에 표시한 숫자는 하기 scheme에서 화합물 하단에 표시한 숫자를 의미한다.



[0082]

[0083]

S-6-Hydroxyhexyl ethanethioate (2) 합성

[0084]

실온에서 1-bromohexanol (1) (5.00 g, 27.6 mmol)의 DMF (50 mL) 용액을 교반하면서 potassium ethanethioate (6.31 g, 55.2 mmol)을 천천히 적가했다. 반응 혼합물을 12시간 동안 교반한 후 증류수 (30 mL)로 희석했다. 혼합물을 Et₂O(3x30mL)로 추출하고, 유기 층을 합쳐 무수 MgSO₄로 건조, 여과한 후 농축했다. 농축액을 컬럼 크로마토그래피 (Hexanes:EtOAc = 2:1 - 1:1)를 이용하여 분리해서 연한 노란색 액체의 화합물 2 (4.20 g, 86%)를 얻었다.

[0085]

(3R,5S)-Ethyl 4-acetamido-5-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(pentan-3-yloxy) cyclohex-1-enecarboxylate (4) 합성

[0086]

실온에서 Oseltamivir phosphate salt (3) (10.0 g, 24.4 mmol)의 MeOH (50 mL) 용액을 교반하면서 di-tert-butyl dicarbonate (7.84 mL, 34.1 mmol)과 triethylamine (6.80 mL, 48.8 mmol)을 적가했다. 반응 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반했다. 혼합물에 증류수 (100 mL)를 가해서 1시간 동안 교반한 후, 생성된 흰색 고체를 여과하고 증류수로 세척했다. 여과물을 진공 오븐에서 건조하여 흰색 고체의 화합물 4 (5.71 g, 56%)를 얻었다.

[0087]

(3R,5S)-4-acetamido-5-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylic acid (5) 합성

[0088]

실온에서 화합물 4 (5.70 g, 13.8 mmol)의 THF/H₂O(10:1, v/v, 30mL)용액을 교반하면서 NaOH (663 mg, 16.6 mmol)을 가했다. 반응 혼합물을 24시간 동안 교반한 후, 농축하여 반응 용매를 제거했다. 농축액을 증류수 (20 mL)로 희석하고, 반응 용기를 0 °C로 냉각했다. 혼합물에 1 M HCl 수용액을 가하여 pH 5까지 산성화한 후, 1시간 동안 교반했다. 생성된 흰색 고체를 여과하고 증류수로 세척했다. 여과물을 진공 오븐에서 건조하여 흰색 고체의 화합물 5 (4.0 g, 75%)를 얻었다.

[0089]

(3R,5S)-6-(Acetylthio)hexyl-4-acetamido-5-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate (6) 합성

[0090]

실온에서 화합물 5 (4.00 g, 10.4 mmol)의 CH₂Cl₂(30mL)용액을 교반하면서 화합물 2(2.20 g, 12.5 mmol), 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide hydrochloride (2.79 g, 14.6 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (1.52 g, 12.5 mmol)과 triethylamine (2.90 mL, 20.8 mmol)을 순차적으로 가했다. 실온에서 24시간 동안 교반한 후, 반응혼합물에 증류수를 가해서 반응을 종결했다. 혼합물을 CH₂Cl₂(3x30mL)로 추출하고, 유기 층을 합쳐 무수 Na₂SO₄로 건조, 여과한 후 농축했다. 농축액을 컬럼 크로마토그래피 (Hexanes:EtOAc = 2:1 - 1:1)를 이용하여 분리하여 무색 액체의 화합물 6 (3.51 g, 62%)를 얻었다.

[0091]

Oseltamivir Hexylthiol (7) 합성

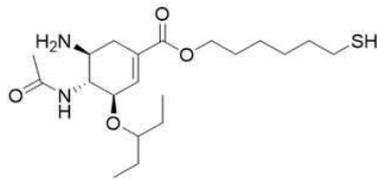
[0092]

실온에서 화합물 6 (3.50 g, 6.45 mmol)의 MeOH (30 mL) 용액을 교반하면서 진한 염산 (2.15 mL, 25.8 mmol)을

천천히 적가했다. 반응 용기를 50 °C에서 72시간 동안 가열했다. 반응혼합물을 실온으로 냉각한 후 농축하여 반응 용매를 제거했다. 농축액을 MeOH (5 mL)로 희석하고 교반하면서 Et₂O를 천천히 가하였다. 생성된 흰색 고체를 여과하고 Et₂O로 세척했다. 여과물을 진공 오븐에서 건조하여 흰색 고체의 화합물 7(오셀타미비르 핵실티올) (560 mg, 20%)을 얻었다.

[0093] 상기 오셀타미비르 핵실티올은 하기 화학식 1로 표시된다.

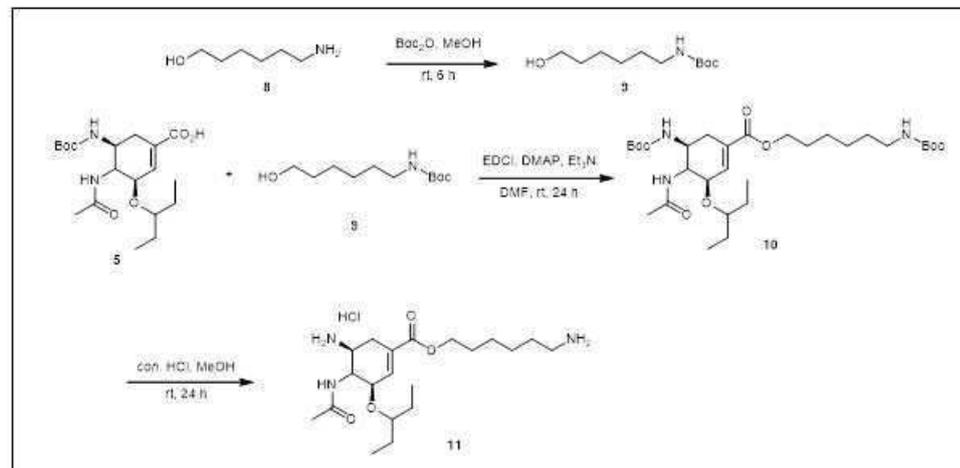
[0094] [화학식 1]



[0095]

[0096] 1-2. 오셀타미비르 핵실아민 (Osetamivir Hexylamine) 합성

[0097] 오셀타미비르 핵실아민을 하기 scheme으로 합성하였다. 이하에서 화합물명 다음에 괄호 내에 표시한 숫자는 하기 scheme에서 화합물 하단에 표시한 숫자를 의미한다.



[0098]

[0099] tert-Butyl 6-hydroxyhexylcarbamate (9) 합성

[0100] 실온에서 화합물 8 (3.00 g, 25.6 mmol)의 MeOH (30 mL) 용액을 교반하면서 di-tert-butyl dicarbonate (6.47 mL, 28.2 mmol)를 적가했다. 반응혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 후 농축했다. 농축액을 column chromatography (Hexanes:EtOAc = 2:1 - 1:1)를 이용하여 분리해서 연한 노란색 액체의 화합물 9 (4.10 g, 74%)를 얻었다.

[0101] (3R,5S)-6-(tert-Butoxycarbonylamino)hexyl-4-acetamido-5-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-enecarboxylate (10) 합성

[0102] 실온에서 화합물 5 (3.50 g, 9.10 mmol)의 DMF (20 mL) 용액을 교반하면서 화합물 9 (2.18 g, 10.0 mmol), 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide hydrochloride (2.44 g, 12.7 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (1.33 g, 10.9 mmol)과 triethylamine (2.54 mL, 18.2 mmol)을 순차적으로 가했다. 실온에서 24시간 동안 교반한 후, 반응혼합물에 증류수를 가해서 반응을 종결했다. 혼합물을 EtOAc (3 x 20 mL)로 추출하고, 유기 층을 합쳐 무수 Na₂SO₄로 건조, 여과한 후 농축했다. 농축액을 컬럼 크로마토그래피 (Hexanes:EtOAc = 2:1 - 1:1)를 이용하여 분리하여 연한 노란색 액체의 화합물 10 (2.41 g, 45%)을 얻었다.

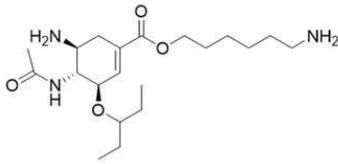
[0103] Osetamivir Hexylamine (11) 합성

[0104] 실온에서 화합물 10 (2.45 g, 4.20 mmol)의 MeOH (20 mL) 용액을 교반하면서 진한 염산 (1.75 mL, 21.0 mmol)을 천천히 적가했다. 실온에서 24시간 동안 교반한 후, 반응혼합물을 농축하여 반응 용매를 제거했다. 농축액을 MeOH (5 mL)로 희석하고 교반하면서 Et₂O를 천천히 가하였다. 생성된 흰색 고체를 여과하고 Et₂O로 세척했다. 여

과물을 진공 오븐에서 건조하여 흰색 고체의 화합물 11(오셀타미비르 핵실아민)(1.15 g, 65%)을 얻었다.

[0105] 상기 오셀타미비르 핵실아민은 하기 화학식 2로 표시된다.

[0106] [화학식 2]



[0107]

[0108] **1-3. PCDA 나노입자 제조**

[0109] 10, 12-pentacosadiynoic acid(이하 "PCDA")(1.00 g, 2.7 mmol)의 무수 디클로로메탄(DCM, 27 mL, 0.1 M), 용액에, N-hydroxysuccinimide (NHS) (0.35 g, 3.0 mmol) 과 EDC-HCl (0.57 g, 3.1 mmol)을 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이 반응 혼합물을 디클로로메탄과 물로 3시간 동안 추출하고 염수 용액(brine solution)으로 세척하였다. 유기 층(organic layer)을 MgSO₄ 상에서 증발시키고, 여과한 후, 회전 증발에 의해 유기 용매를 증발시켜 PCDA-NHS를 얻었다.

[0110] PCDA와 상기 PCDA-NHS를 9:1(v/v)로 포함하는, 총 4 mL의 아세톤 내에 1 mM의 PCDA를 포함하는 용액을 준비하고, 이를 20 mL의 탈이온화수에 급속 주입한 후 격하게 교반하였다. 그리고 밤새 교반하여 아세톤을 증발시키고, 4 °C에서 밤새 냉각시킴으로써 PCDA 나노입자와 PCDA-NHS 나노입자가 9:1로 혼합된 나노입자 혼합물을 제조하였다(도 1의 모식도). 이와 같이 가교제를 갖는 PCDA 나노입자가 혼합되도록 함으로써 화합물과의 결합을 증가시킬 수 있다.

[0111] 도 2의 좌측 도는 제조된 PCDA 나노입자를 254 nm의 UV 에서 촬영한 사진으로, 푸른색으로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 도 2의 중앙 도는 제조된 PCDA 나노입자에 UV를 조사하지 않고 전자현미경으로 관찰한 것이고, 도 2의 우측 도는 254 nm의 UV를 조사한 PCDA 나노 입자를 관찰한 것이다.

[0112] **1-4. PCDA 나노입자-오셀타미비르 유사체 결합**

[0113] 1-3에서 합성된 PCDA 나노입자 용액의 1 mL를 254nm의 UV를 30분간 조사하였다. 해당 나노 입자 용액에 오셀타미비르 핵실 아민 (10 mg/mL) 1mL 넣고 12시간 이상 voltexing 하여, PCDA 나노입자에 결합되도록 하였다.

[0114] **실시예 2. 항바이러스제 감수성에 따른 색상 비교**

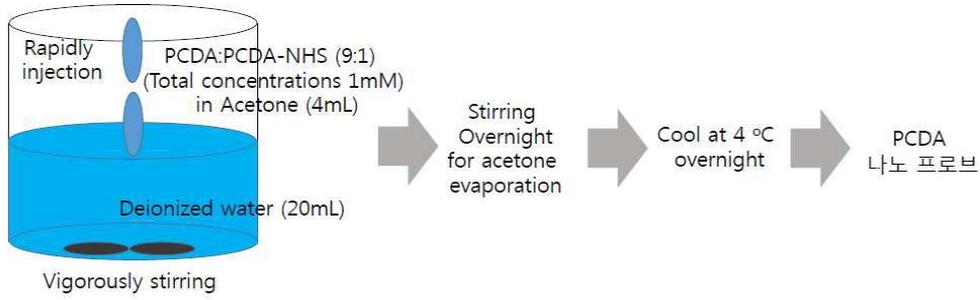
[0115] 상기 1-3에서 확인한 바에 따르면, 푸른색으로 보이는 오셀타미비르 유사체가 결합된 PCDA 나노입자가 타겟에 결합하면 PCDA 나노입자가 붉은색을 나타낼 것이라고 예상하였다(도 3의 모식도).

[0116] 이를 확인하고자, 96 well plate의 각 웰에 H275Y 돌연변이가 일어난 인플루엔자 바이러스(항바이러스제 저항성 바이러스) 또는 H275Y 돌연변이가 일어나지 않은 인플루엔자 바이러스(항바이러스제 감수성 바이러스)를 PBS 1 mL 당 10⁵ PFU로 첨가하였다. 그리고 상기 1-4에서 준비된, 항바이러스제 저항성 바이러스가 결합 타겟인 오셀타미비르 유사체가 결합된 PCDA 나노입자를 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스가 들어있는 웰에 각각 첨가하였다. 그 결과, 육안으로 관찰하였을 때 오셀타미비르 유사체가 결합된 PCDA 나노입자가 항바이러스제 감수성 바이러스와 접촉한 경우 푸른색으로 나타났으나, 항바이러스제 저항성 바이러스와 접촉한 경우 붉은색으로 나타났다. 오셀타미비르 유사체가 결합된 PCDA 나노입자를 바이러스를 첨가하지 않은 PBS에 접촉시킨 경우에도 푸른색으로 나타났다(도 4 우측 상단 도).

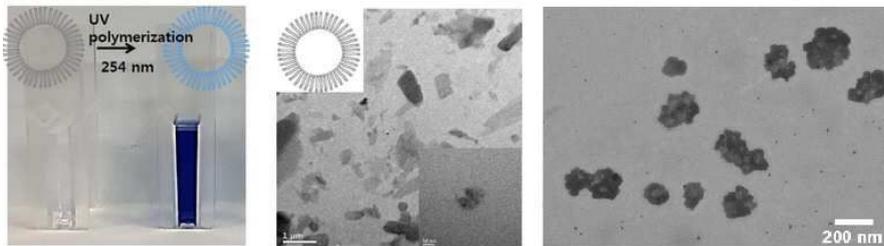
[0117] 또한 면봉으로 사람 코 속의 점액을 채취하고 식염수에 분산시켜 코 점액 시료를 준비하고, 상기 코 점액 시료 50 microliter 당 10⁵ PFU/mL로 항바이러스제 저항성 바이러스 또는 항바이러스제 감수성 바이러스를 첨가한 용액이 들어있는 웰에, 항바이러스제 저항성 바이러스가 결합 타겟인 오셀타미비르 유사체가 결합된 PCDA 나노입자를 첨가하였다. 그 결과, 육안으로 관찰하였을 때 오셀타미비르 유사체가 결합된 PCDA 나노입자가 항바이러스제 감수성 바이러스와 접촉한 경우 푸른색으로 나타났고, 항바이러스제 저항성 바이러스와 접촉한 경우에는 붉은색 또는 자주색으로 나타났다(도 4 우측 하단 도).

도면

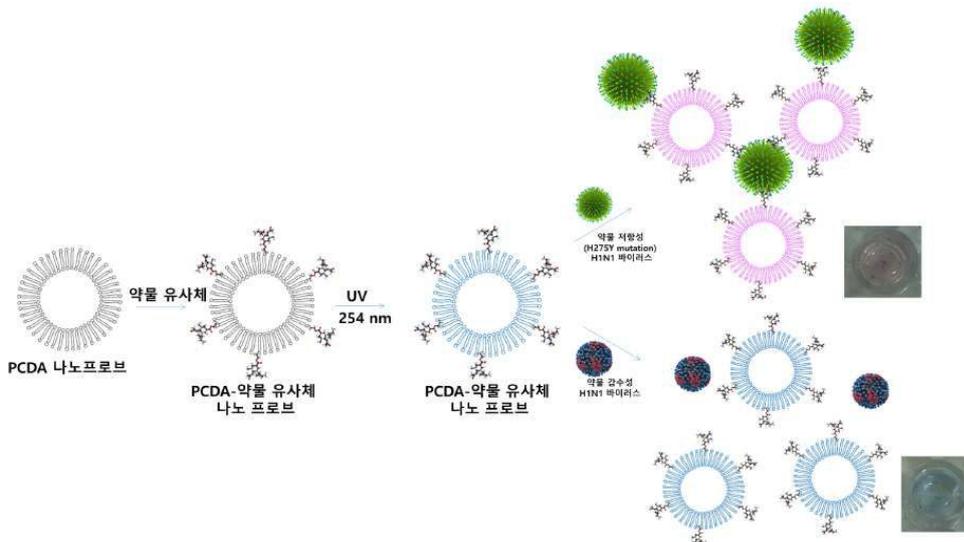
도면1



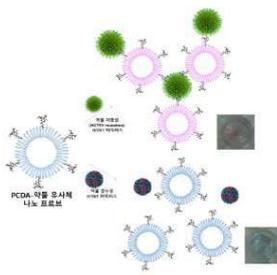
도면2



도면3



도면4



Virus (10⁵ PFU/mL) in PBS

PCDA-NHS: 약물 유사체 (물 비)	1:1	1:2	1:5	1:7	1:10	1:11	PBS
항바이러스제 감수성 바이러스							
항바이러스제 저항성 바이러스							

Virus (10⁵ PFU/mL의 50 microliter) in 코 점액 샘플

PCDA-NHS: 약물 유사체 (물 비)	1:1	1:2	1:5	1:7	1:10
항바이러스제 감수성 바이러스					
항바이러스제 저항성 바이러스					