



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월21일

(11) 등록번호 10-1575747

(24) 등록일자 2015년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 31/22 (2006.01) A61K 31/19 (2006.01)
C07C 229/38 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 31/22 (2013.01)
A61K 31/19 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0048664

(22) 출원일자 2015년04월06일

심사청구일자 2015년04월06일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130022896 A

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자

임은경

대전광역시 유성구 과학로 125

정주연

대전광역시 유성구 과학로 125

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 6 항

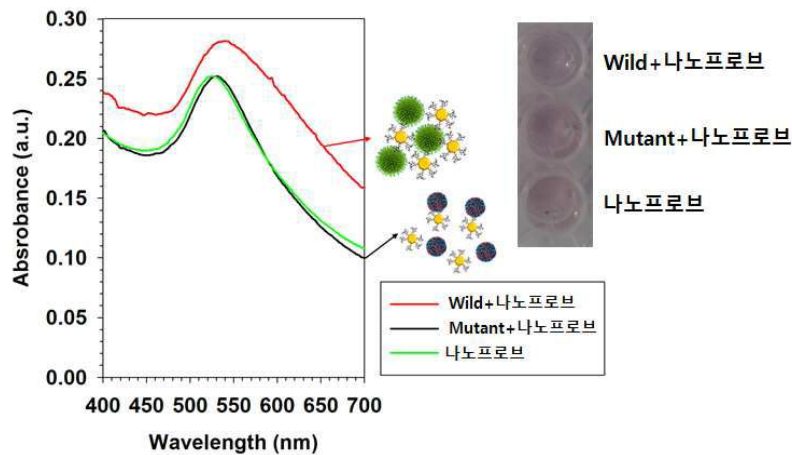
심사관 : 김도현

(54) 발명의 명칭 항바이러스제-감수성/저항성 바이러스 검출 시스템

(57) 요약

본 발명은 항바이러스제 저항성 바이러스 검출용 나노입자에 관한 것이다. 본 발명을 이용하면 육안으로 오셀타미비르(타미플루) 감수성/저항성 바이러스를 빠르고 편리하게 진단/검출할 수 있다. 따라서 신속하게 인플루엔자 바이러스에 감염된 환자의 치료 계획을 세우는데 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

C07C 229/38 (2013.01)

G01N 33/56983 (2013.01)

(72) 발명자

허민희

대전광역시 유성구 과학로 125

정봉현

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014060507

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업(글로벌프론티어)

연구과제명 약물 저항성 바이오 유해물질 신속 검출을 위한 바이오 컨텐츠 설계 및 활용기술 개발

기여율 50/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014003797

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업(미래유망)

연구과제명 원자현미경 적용을 위한 바이오컨텐츠 발굴, 생산 및 활용기술 개발

기여율 20/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM1121521

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 국가과학기술연구회

연구사업명 주요사업(2015-2018)

연구과제명 나노바이오메디컬 융복합 기술개발사업

기여율 30/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

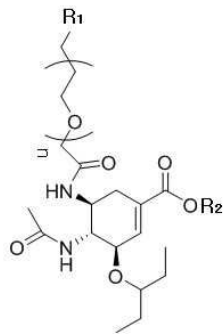
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 기재되는 오셀타미비르 유사체가 결합된, 오셀타미비르 저항성 인플루엔자 바이러스 검출용 나노입자.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, n은 10 이하의 정수이고,

R₁은 SH 또는 NH₂이고,

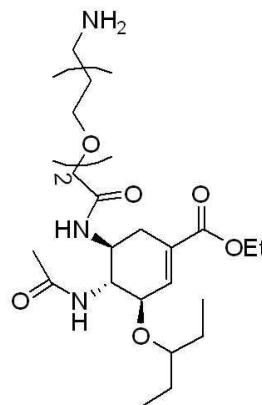
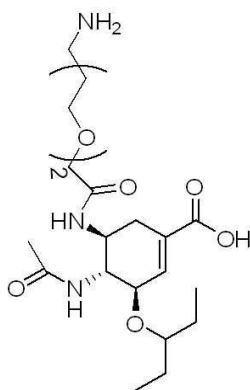
R₂는 H 또는 C₂H₅이다.

청구항 2

화학식 2로 기재되는 오셀타미비르 에틸렌글리콜 아마이드 에시드(Oseltamivir EGamine acid) 또는 화학식 3으로 기재되는 오셀타미비르 에틸렌글리콜 아마이드-에스테르(Oseltamivir Ethyleneglycol amino-ester, Oseltamivir EGamide-ester)가 결합된, 오셀타미비르 저항성 인플루엔자 바이러스 검출용 나노입자.

[화학식 2]

[화학식 3]



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 나노입자는 금나노입자, 은나노입자, 또는 형광 나노입자인 나노입자.

청구항 4

- 1) 인플루엔자 바이러스에 감염된 대상체로부터 분리된 시료를 화학식 1로 기재되는 오셀타미비르 유사체가 결합된 나노입자와 접촉시키는 단계;
- 2) 인플루엔자 바이러스가 존재하지 않는 시료에 화학식 1로 기재되는 오셀타미비르 유사체가 결합된 나노입자를 접촉시킨 경우에 나타나는 색상과, 상기 1) 단계에서 나노입자와 접촉시킨 시료에서 나타나는 색상을 비교하는 단계; 및
- 3) 상기 2) 단계에서 양 색상이 동일하게 나타나는 경우, 상기 대상체가 감염된 인플루엔자 바이러스가 오셀타미비르 저항성 바이러스라고 판단하는 단계를 포함하는, 오셀타미비르 저항성 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항의 나노입자를 포함하는 오셀타미비르 저항성 인플루엔자 바이러스 검출용 키트.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 2) 단계의 비교는 흡광도 측정 또는 육안 관찰로 수행되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항바이러스제-감수성/저항성 바이러스 검출 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 인플루엔자 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스를 구별하는 방법에 대해 개시하고 있다. 그러나 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 검출용 나노입자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 본 발명은 상기 나노입자를 이용하여 항바이러스제에 저항성을 나타내는 바이러스를 검출하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

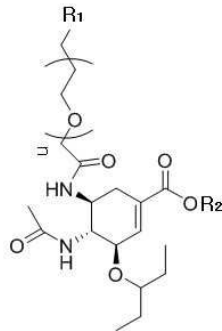
[0007] 본 발명은 상기 나노입자를 포함하는 항바이러스제 저항성 바이러스 검출용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 항바이러스제 저항성 바이러스 검출용 나노입자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명의 나노입자는 하기 화학식 1로 기재되는 오셀타미비르 유사체가 나노입자에 결합된 것이다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 화학식 1에서, n은 1 이상의 정수이다. 바람직하게는 n은 10 이하의 정수일 수 있고, 예를 들어 n은 5 이하의 정수일 수 있으며, 또 다른 예로서 n은 2일 수 있다. 그러나 n의 수는 이에 제한되지 않으며, 나노입자에 따라 적절히 조정될 수 있다.

[0013] 상기 화학식 1에서, R₁은 나노입자에 결합하기에 적합한 작용기가 될 수 있으며, 예를 들어 Thiol(SH), amine(NH₂), hydroxyl, carboxyl, Isothiocyanate, NHS ester, Aldehyde, Epoxide, Carbonate, HOBt ester, Glutaraldehyde, Imidazole carbamate, Maleimide, Aziridine, Vinylsulfone, aldehyde, hydrazine, phenyl azide, benzophenone, anthraquinone, Diene 기가 될 수 있다. 그러나 작용기는 이에 제한되지 않으며, 나노입자에 도입 가능한 어떠한 작용기라도 사용할 수 있다.

[0014] 각 작용기는 공지의 방법에 의해 합성될 수 있고 또한 나노입자에 결합될 수 있다.

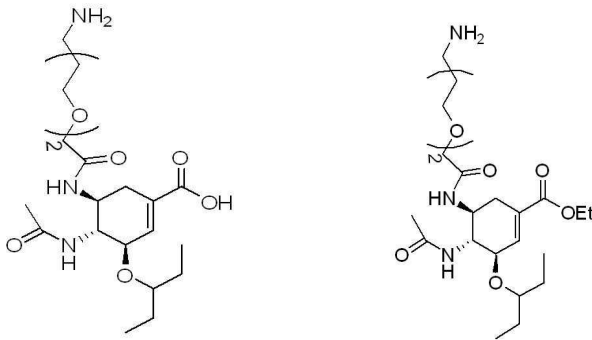
[0015] 상기 화학식 1에서, R₂는 H 또는 C₂H₅가 될 수 있다.

[0016] 본 발명의 나노입자는 직경이 1~100 나노미터 단위인 입자로서 육안 또는 흡/형광 장비로 확인이 가능한 임의의 나노입자가 될 수 있으며, 예를 들어 금나노입자, 은나노입자, 형광 나노입자, 형광 염색약 등이 될 수 있다. 상기 금나노입자 및 은나노입자는 100 나노미터 이하의 직경을 가진 다양한 형태(구형, 다각형 등)의 입자를 말한다. 상기 형광 나노입자는 형광 특성을 보이는 100 나노미터 이하의 나노 입자로, 동일한 물질이라 하더라도 입자의 크기에 따라 형광파장이 달라져 다양한 파장대의 형광을 얻을 수 있다. 형광 나노입자의 예는 형광 염색약이 포함된 다양한 나노 입자 및 Quantum dots (양자점 입자)로, 약 2~10nm 크기의 중심(core)과 주로 ZnS 등으로 이루어진 껍질(shell)로 구성된 것을 들 수 있다. 상기 양자점을 이루는 II-VI 또는 III-V족 화합물은 예를 들어 CdSe, CdSe/ZnS, CdTe/CdS, CdTe/CdTe, ZnSe/ZnS, ZnTe/ZnSe, PbSe, PbS InAs, InP, InGaP, InGaP/ZnS 및 HgTe로 구성된 군에서 선택될 수 있다(단일 코어(core) 또는 코어(core)/셸(shell) 형태). 형광 염색약은 예를 들어 형광성을 보이는 유기 분자 (예, 파이렌 (Pyrene) 또는 이의 유도체), 시아닌(Cyanine, Cy) 시리즈, 알렉사플루오르(Alexa Fluor) 시리즈, 보디피 (BODIPY) 시리즈, DY 시리즈, 로다민 (rhodamine) 또는 이의 유도체, 플루오레신(Fluorescein) 또는 이의 유도체, 쿠마린 (coumarin) 또는 이의 유도체, 아크리딘 호모다이머 (Acridine homodimer) 또는 이의 유도체, 아크리딘 오렌지(Acridine Orange) 또는 이의 유도체, 7-아미노액티노마이신 D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD) 또는 이의 유도체, 액티노마이신 D(Actinomycin D) 또는 이의 유도체, 에이씨엡에이(ACMA, 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine) 또는 이의 유도체, 디에이피아이(DAPI) 또는 이의 유도체, 디하이드로에티듐(Dihydroethidium) 또는 이의 유도체, 에티듐 브로마이드(Ethidium bromide)

또는 이의 유도체, 에티듐 호모다이머-1(EthD-1) 또는 이의 유도체, 에티듐 호모다이머-2(EthD-2) 또는 이의 유도체, 에티듐 모노아자이드(Ethidium monoazide) 또는 이의 유도체, 헥시디움 아이오다이드(Hexidium iodide) 또는 이의 유도체, 비스벤지마이드(bisbenzimidazole, Hoechst 33258) 또는 이의 유도체, 호에크스트 33342(Hoechst 33342) 또는 이의 유도체, 호에크스트 34580(Hoechst 34580) 또는 이의 유도체, 하이드록시스티바미딘(hydroxystilbamidine) 또는 이의 유도체, 엘디에스 751(LDS 751) 또는 이의 유도체, 프로피디움 아이오다이드(Propidium Iodide, PI) 또는 이의 유도체, 칼세인(Calcein) 또는 이의 유도체, 오레건 그린(Oregon Green) 또는 이의 유도체, 마그네슘 그린(Magnesium Green) 또는 이의 유도체, 칼슘 그린(Calcium Green) 또는 이의 유도체, JOE 또는 이의 유도체, 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine) 또는 이의 유도체, TRITC 또는 이의 유도체, TAMRA 또는 이의 유도체, 피로닌 Y(Pyronin Y) 또는 이의 유도체, 리싸민(Lissamine) 또는 이의 유도체, ROX 또는 이의 유도체, 칼슘크림선(Calcium Crimson) 또는 이의 유도체, 텍사스 레드(Texas Red) 또는 이의 유도체, 나일 레드(Nile Red) 또는 이의 유도체, 티아디카복시아닌(Thiadicarbocyanine) 또는 이의 유도체, 단실아마이드(dansylamide) 또는 이의 유도체, 캐스캐이드 블루 (cascade blue), DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole), FITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 등)이 있다. 그러나 나노입자의 종류는 이에 제한되지 않는다. 각 나노입자는 공지의 방법에 의해 합성될 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 나노입자는 화학식 2로 기재되는 오셀타미비르-에틸렌글리콜 아마이드-에시드(Oseltamivir-EGamine-acid) 또는 화학식 3으로 기재되는 오셀타미비르-에틸렌글리콜 아마이드-에스테르(Oseltamivir-EGamide-ester)가 결합된 나노입자가 될 수 있다.

[0018] [화학식 2] [화학식 3]



[0019]

[0020] 상기 Oseltamivir-EGamine-acid 및 Oseltamivir-EGamide-ester는 오셀타미비르 유사체로서, 2회 반복되는 폴리에틸렌글리콜 링커와 아민 작용기를 통해 나노입자에 결합된 것이다. 상기 나노입자는 금나노입자가 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 나노입자에서 결합된 오셀타미비르 유사체에서, 오셀타미비르에 폴리에틸렌 링커가 결합된 위치가 매우 중요한데, 이는 어디에 결합되느냐에 따라 적절하게 반응이 일어날지 여부가 달라지기 때문이다.

[0022] 오셀타미비르 저항성 인플루엔자 바이러스는 통상적으로 H274Y 부위에 돌연변이가 일어나는 것으로 알려져 있다. 오셀타미비르는 인플루엔자 바이러스에 결합하여 뉴라미니다제(neuraminidase, NA) 활성을 감소시키는 방식으로 바이러스를 사멸시키는데, H274Y 부위에 돌연변이가 일어나면 오셀타미비르가 바이러스에 결합하기가 어렵다.

[0023] 본 발명의 나노입자에 결합된 오셀타미비르 유사체는 H274Y 부위에 돌연변이가 일어나 오셀타미비르에 저항성을 나타내는 바이러스에는 결합하지 않으며, 오셀타미비르에 감수성이 있는 바이러스에만 결합한다. 본 발명의 나노입자가 바이러스에 결합했는지 여부는 육안으로 색상을 비교함으로써(비색법) 확인할 수 있다. 따라서 본 발명은 매우 간단하고 편리한 방법으로 대상체가 감염된 바이러스가 오셀타미비르 저항성 바이러스인지 여부를 확인할 수 있다.

[0024] 본 발명은 상기 나노입자를 이용하여 오셀타미비르 저항성 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명의 방법은, 1) 인플루엔자 바이러스에 감염된 대상체로부터 분리된 시료를 화학식 1로 기재되는 오셀타미비르 유사체가 결합된 나노입자와 접촉시키는 단계; 2) 인플루엔자 바이러스가 존재하지 않는 시료에 상기 나노입자를 접촉시킨 경우에 나타나는 색상과 동일한 색상이 상기 1) 단계의 시료에서 나타나는 경우 대상체가 감

염된 인플루엔자 바이러스가 오셀타미비르 저항성 바이러스라고 판단하는 단계를 포함한다.

[0026] 상기 대상체는 인간 또는 그 밖의 동물, 예컨대 조류 또는 포유류가 될 수 있다.

[0027] 상기 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.

[0028] 본 발명은 상기 나노입자를 포함하는 오셀타미비르 저항성 인플루엔자 바이러스 검출용 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 기타 검출에 필요한 물품들을 더 포함할 수 있으며, 사용 지침(instruction)을 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명을 이용하면 오셀타미비르 저항성 인플루엔자 바이러스를 육안으로 빠르고 편리하게 검출할 수 있다. 따라서 신속하게 인플루엔자 바이러스에 감염된 환자의 치료 계획을 세우는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 합성된 금나노입자의 모양을 전자현미경(TEM)으로 확인한 도이다.

도 2는 합성된 금나노입자의 흡광도를 UV-vis spectroscopy로 확인한 도이다.

도 3 내지 5는 단백질 수준에서 각 물질이 오셀타미비르 감수성 바이러스와 오셀타미비르 저항성 바이러스의 뉴라미니다제 활성을 억제하는 정도를 확인한 것이다. 도 3의 좌측 도는 오셀타미비르 포스페이트, 도 3의 우측 도는 오셀타미비르 카복실레이트, 도 4는 Oseltamivir-EGAmide-acid, 도 5는 Oseltamivir-EGAmide-ester에 대한 것이다.

도 6 내지 8은 바이러스 수준에서 각 물질이 오셀타미비르 감수성 바이러스와 오셀타미비르 저항성 바이러스의 뉴라미니다제 활성을 억제하는 정도를 확인한 것이다. 도 6은 오셀타미비르 포스페이트, 도 7은 Oseltamivir-EGAmide-acid, 도 8은 Oseltamivir-EGAmide-ester에 대한 것이다.

도 9는 본 발명의 나노입자와 오셀타미비르 감수성 바이러스 및 오셀타미비르 저항성 바이러스의 결합 양상을 나타낸 모식도이다.

도 10은 Oseltamivir-EGAmide-acid가 결합된 금나노입자를 오셀타미비르 감수성 바이러스와 오셀타미비르 저항성 바이러스와 각각 반응시켰을 때 흡광도를 확인한 그래프(좌측 도) 및 색상 차이를 육안으로 확인한 도(우측 도)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 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.

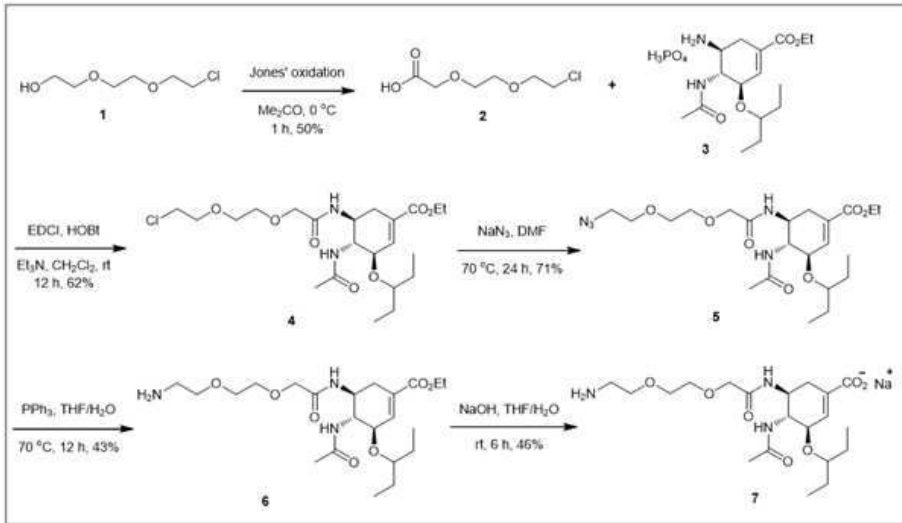
[0032] 또한, 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)[®]로부터 구입한 것이다.

[0033] **실시예 1. 나노입자의 제조**

[0034] **1-1. 오셀타미비르 유도체 합성**

[0035] 오셀타미비르 유도체를 하기의 반응식에 따라 합성하였다.

[0036] [반응식]



[0037] 구체적인 합성 방법은 하기와 같다.
 [0038]

[0039] **2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)acetic acid (2) 합성**

[0040] 실온에서 chromium(VI) oxide (14.7 g, 164 mmol)의 1.5 M H₂SO₄(300 mL)용액을 교반하면서 alcohol 1 (8.31 g, 49.2 mmol)의 acetone (300 mL) 용액을 천천히 적가하였다. 반응 혼합물을 6시간 동안 교반한 후 농축하여 유기 용매를 제거하고, 농축액을 CH₂Cl₂(3x50 mL)로 추출하고, 유기 층을 합쳐 무수 MgSO₄로 건조한 후 농축했다. 농축액을 column chromatography (Hexanes:EtOAc = 1:1 ~ 1:2)를 이용하여 분리해서 연한 노란색 액체의 acid 2 (4.51 g, 50%)를 얻었다.

[0041] **Oseltamivir-EGamide-chloride (4) 합성**

[0042] 실온에서 acid 2 (1.60 g, 8.78 mmol)의 CH₂Cl₂(30mL)용액을 교반하면서 oseltamivir Phosphate (3) (3.00 g, 7.31 mmol), 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide hydrochloride (2.80 g, 14.6 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (1.97 g, 14.6 mmol)과 triethylamine (2.03 ml, 14.6 mmol)을 가했다. 실온에서 12시간 동안 교반한 후, 반응혼합물에 증류수를 가해서 반응을 종결했다. 혼합물을 CH₂Cl₂(3x30 mL)로 추출하고, 유기 층을 합쳐 무수 Na₂SO₄ 건조, 여과한 후 농축했다. 농축액을 column chromatography (EtOAc:MeOH = 20:1)를 이용하여 분리하여 노란색 액체의 chloride 4 (2.16 g, 62%)을 얻었다.

[0043] **Oseltamivir-EGamide-azide (5) 합성**

[0044] 실온에서 chloride 4 (1.32 g, 2.77 mmol)의 DMF (15 mL) 용액을 교반하면서 sodium azide (540 mg, 8.31 mmol)을 가했다. 반응 용기를 70 °C에서 24시간 동안 가열했다. 반응혼합물에 증류수를 가하여 반응을 종결했다. 혼합물을 EtOAc(3x20 mL)로 추출하고, 유기 층을 합쳐 무수 Na₂SO₄ 건조, 여과한 후 농축했다. 농축액을 column chromatography (EtOAc:MeOH = 20:1)를 이용하여 분리하여 노란색 액체의 azide 5 (950 mg, 71%)을 얻었다.

[0045] **Oseltamivir-EGamide-ester (6) 합성**

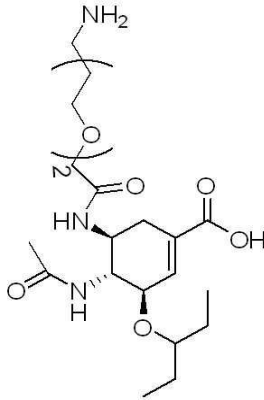
[0046] 실온에서 azide 5 (950 mg, 1.96 mmol)의 THF/H₂O (10:1, v/v, 15 mL)용액을 교반하면서 triphenylphosphine (1.54 mg, 5.89 mmol)을 가했다. 반응 용기를 70 °C에서 12시간 동안 가열한 후, 반응 용매를 제거했다. 농축액을 column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH=20:1-7:1)를 이용하여 분리하여 노란색 액체의 혼합물을 얻었다. 혼합물을 CH₂Cl₂/MeOH에서 재결정하여 흰색 고체의 amine 6(화학식 3) (385 mg, 43%)을 얻었다.

[0047] **Oseltamivir-EGamide-acid (7) 합성**

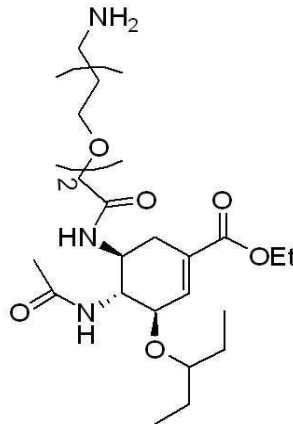
[0048] 실온에서 ester 6(화학식 3) (250 mg, 0.546 mmol)의 THF/H₂O (4:1, v/v, 5 mL)용액을 교반하면서 1 M NaOH 수

용액 (0.573 mL, 0.573 mmol)을 가했다. 반응 혼합물을 6시간 동안 교반한 후, 반응 용매를 제거했다. 농축액을 CH₂Cl₂/MeOH에서 재결정하여 흰색 고체의 acid 7(화학식 2) (113 mg, 46%)을 얻었다.

[0049] [화학식 2]



[화학식 3]



[0050]

[0051] **1-2. 금나노입자 합성**

[0052] 100 mL의 증류수에 1 wt%의 HAuCl₄ 용액 (1 mL)를 넣고 95 °C에서 강렬하게 교반시켰다. 그 상태에서, 즉시 1 wt%의 Sodiumcitrate (5 mL)를 천천히 주입하고, 30분간 같은 조건에서 반응시켰다. 합성된 금나노입자의 모양을 전자현미경(TEM)으로 (도 1), 흡광도를 UV-vis spectroscopy 로 각각 확인하였다(도 2).

[0053] **1-3. 나노입자-오셀타미비르 유도체 결합**

[0054] 1-2에서 합성된 금나노입자 용액의 5 mL을 15000 rpm, 10분간 원심분리하여 과량의 sodium citrate를 제거하였다. 상층액은 버리고, 1 mL의 증류수로 재 분산한 뒤, 15000 rpm, 10분간 원심분리하였다. 해당 과정을 2회 더 반복하였다. 마지막 단계에서 상층액은 버리고, 증류수에 분산된 오셀타미비르 유도체 (2 mg/mL) 1 mL를 첨가하였다. 그리고, 12시간 이상 voltexing 하여, 오셀타미비르 유도체 (Oseltamivir-EGamide-acid) 가 금나노입자에 결합되도록 하였다.

[0055] **실시예 2. 단백질 수준에서의 뉴라미니다제 활성 비교**

[0056] 이하 실시예 2에서 NA-Fluor™ Influenza Neuraminidase Assay Kit (AB Applied biosystem, Prod No. 4457091)를 이용하여 뉴라미니다제(NA) 활성도를 측정하였다.

[0057] 구체적으로, Kit 내의 working solution (5.52 mL)에 Na-flour (480 uL)를 녹여 용액 A를 준비하였다. 2.9 mL의 working solution에 0.2 mL의 Wild NA protein (Influenza H1N1 NA, Sino biological Inc.) (0.5 mg/mL)를 첨가하였다(용액 B-wild). Mutant NA protein (Influenza H1N1 NA (H274), Sino biological Inc.)도 용액 B-wild와 동일한 조건으로 준비하였다(용액 B-mutant). 2 mL의 증류수에 오셀타미비르 유도체 19.3 mg을 녹여 준비하였다(용액 C). 96 well plate의 각 well에 용액 A를 50 uL 넣고, 각각 용액 B-wild와 용액 B-mutant를 50 uL 넣었다. 용액 C를 농도를 달리하여 준비된 well에 50 uL 씩 첨가하였다(비교군에서는 증류수만 첨가). 즉, 각 well 당 용액 A + 용액 B-wild (또는 용액 B-mutant)+ 용액 C를 넣은 것이다. 37°C에서 1시간 배양한 뒤, 각 well 에 Na-flour stop buffer 용액을 50 uL 씩 넣었다. Ex: 360 nm, Em: 450nm 으로 형광을 측정하여 단백질 수준에서의 NA 활성도를 측정하였다. NA 활성도가 높을수록 형광 강도가 높음을 의미한다.

[0058] **2-1. 오셀타미비르 포스페이트**

[0059] 오셀타미비르 포스페이트는 타미플루의 주성분이다. 상기 방법으로 오셀타미비르 포스페이트(CAS 등록번호 204255-11-8)가 NA 활성에 미치는 영향을 확인하였을 때, Wild의 NA 활성이 매우 낮게 나타나나, Mutant의 NA 활성은 높게 유지됨을 알 수 있다 (도 3 좌측 도).

[0060] 이는 H274Y 변이가 일어난 인플루엔자 바이러스가 오셀타미비르에 저항성을 보임을 확인 한 것이다.

[0061] **2-2. 오셀타미비르 카복실레이트**

- [0062] 오셀타미비르 카복실레이트는 잘 알려진 오셀타미비르 유사체이다. 상기 방법으로 오셀타미비르 카복실레이트 (CAS 등록번호 187227-45-8)가 NA 활성에 미치는 영향을 확인하였을 때, 오셀타미비르 카복실레이트는 실험 농도 전 범위에서 Wild의 NA 활성을 억제하며, 고농도로 사용되었을 때에는 Mutant의 NA 활성도 억제함을 확인하였다(도 3 우측 도).
- [0063] 이와 같이 실험에 사용한 Wild 와 Mutant NA 단백질은 오셀타미비르 포스페이트(타미플루), 오셀타미비르 카복실레이트에 감수성과 저항성을 보였으므로, 해당 실험에 적당한 단백질을 확인하였다.
- [0064] **2-3. 오셀타미비르-에틸렌글리콜 아마이드-에시드 (Oseltamivir EGamide-acid)**
- [0065] 상기 방법으로 실시예 1에서 제조한 본 발명의 Oseltamivir-EGamide-acid가 NA 활성에 미치는 영향을 확인하였을 때, Wild의 NA 활성은 낮게 나타나나, Mutant의 NA 활성은 높게 유지됨을 알 수 있다(도 4). 감수성이 있는 경우와 없는 경우의 차이가 분명하므로 본 발명의 Oseltamivir-EGamide-acid는 오셀타미비르 감수성/저항성 바이러스 검출에 적절하다고 판단하였다.
- [0066] **2-4. 오셀타미비르-에틸렌글리콜 아마이드-에스테르 (Oseltamivir-EGamide-ester)**
- [0067] 상기 방법으로 실시예 1에서 제조한 본 발명의 Oseltamivir-EGamide-ester가 NA 활성에 미치는 영향을 확인하였을 때, Wild의 NA 활성은 낮게 나타나나, Mutant의 NA 활성은 높게 유지됨을 알 수 있다(도 5). 감수성이 있는 경우와 없는 경우의 차이가 분명하므로 본 발명의 Oseltamivir-EGamide-ester는 오셀타미비르 저항성 바이러스 검출에 적절하다고 판단하였다.
- [0068] **실시예 3. 바이러스에서의 뉴라미니다제 활성 비교**
- [0069] 이하 실시예 3에서 NA-Fluor™ Influenza Neuraminidase Assay Kit (AB Applied biosystem, Prod No. 4457091)를 이용하여 NA 활성도를 측정하였다.
- [0070] 구체적으로, Kit 내의 working solution (5.52 mL)에 Na-flour (480 uL)를 녹여 용액 A를 준비하였다. 바이러스 용액은 각 well 당 각각 100개, 또는 1000개의 바이러스가 들어 있도록 준비하였다. Wild type (항 바이러스제 감수성 바이러스)은 pandemic H1N1 virus (A/04/2009/California) (pandemic H1N1), mutant type (항 바이러스제 저항성 바이러스)은 Influenza A/Korea/2785/2009 (pandemic H1N1)를 사용하였다. 2 mL의 증류수에 오셀타미비르 유도체 19.3 mg을 녹여 준비하였다(용액 C). 96 well plate의 각 well에 용액 A를 50 uL 넣고, 각각 바이러스 시료 용액을 넣었다. 용액 C를 농도를 달리하여 준비된 well 에 50 uL 씩 첨가하였다(비교군에서는 증류수만 첨가). 즉, 각 well 당 용액 A+각 바이러스 용액(wild type 또는 mutant type)+용액 C를 넣었다. 37 ℃에서 1시간 배양한 뒤, 각 well 에 Na-flour stop buffer 용액을 50uL 씩 넣었다. Ex: 360 nm, Em: 450 nm 으로 형광을 측정하여 단백질 수준에서의 NA 활성도를 측정하였다. NA 활성도가 높을수록 형광 intensity 가 높음을 의미한다.
- [0071] **3-1. 오셀타미비르 포스페이트**
- [0072] 상기 방법으로 오셀타미비르 포스페이트가 NA 활성에 미치는 영향을 확인하였을 때, Wild의 NA 활성이 매우 낮게 나타나나, Mutant의 NA 활성은 높게 유지됨을 알 수 있다 (도 6).
- [0073] **3-2. 오셀타미비르-에틸렌 글리콜 아마이드-에시드 (Oseltamivir-EGamide-acid)**
- [0074] 상기 방법으로 Oseltamivir-EGamide-acid가 NA 활성에 미치는 영향을 확인하였을 때, 오셀타미비르 포스페이트와 마찬가지로 Wild의 NA 활성이 매우 낮게 나타나나, Mutant의 NA 활성은 높게 유지됨을 알 수 있다 (도 7).
- [0075] **3-3. 오셀타미비르 에틸렌글리콜 아마이드-에스테르 (Oseltamivir-EGamide-ester)**
- [0076] 상기 방법으로 Oseltamivir-EGamide-ester가 NA 활성에 미치는 영향을 확인하였을 때, 오셀타미비르 포스페이트와 마찬가지로 Wild의 NA 활성이 매우 낮게 나타나나, Mutant의 NA 활성은 높게 유지됨을 알 수 있다 (도 8).
- [0077] 상기 결과를 통하여 오셀타미비르 유사체 중 Oseltamivir-EGamide-acid와 Oseltamivir-EGamide-ester가 오셀타미비르 포스페이트에 감수성이 있는 바이러스의 NA 활성을 감소시키는 역할을 함을 확인하였다.
- [0078] **실시예 4. 오셀타미비르-금나노입자를 이용한 항바이러스제 감수성/저항성 바이러스 검출 시스템 개발 및 효능 평가**
- [0079] 본 발명의 오셀타미비르 유사체-나노입자는 오셀타미비르 감수성 바이러스에만 결합하므로 상기 나노입자를 오

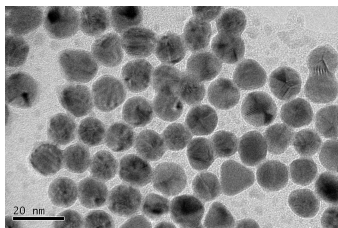
셀타미비르 저항성 바이러스에 가했을 경우와 색상 변화가 발생하여, 육안으로 바이러스의 오셀타미비르 감수성 여부를 검출할 수 있게 된다. (도 9의 모식도 참조).

[0080]

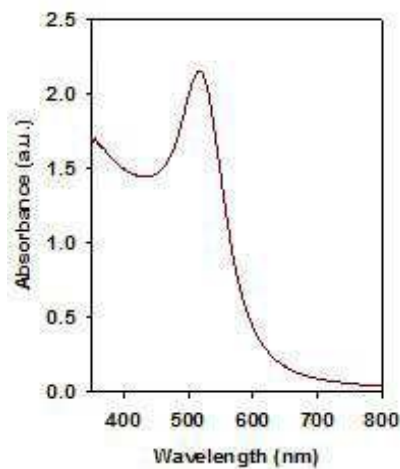
96 well plate의 각 well 당 바이러스가 100개, 또는 1000개의 바이러스가 들어 있도록 준비하였다. Wild type (항 바이러스제 감수성 바이러스)은 pandemic H1N1 virus (A/04/2009/California) (pandemic H1N1), mutant type (항 바이러스제 저항성 바이러스)는 Influenza A/Korea/2785/2009 (pandemic H1N1)을 사용하였다. 준비된 각 well 당 실시예 1에서 제조한 오셀타미비르 유사체-금나노입자 100 uL을 첨가한 뒤, 흡광도를 400-750 nm 범위에서 측정하여 항바이러스제 감수성/ 저항성 바이러스를 색변화를 통하여 검출 하였다. 감수성 바이러스의 경우 저항성 바이러스 또는 대조군 (바이러스 미처리) 에 비하여 흡광 파장이 이동하는 것을 확인하였으며, 또한 대조군과 Mutant 처리 군은 붉은색을 보이나, wild 처리 군은 보라색으로 변함을 육안으로 확인하였다(도 10).

도면

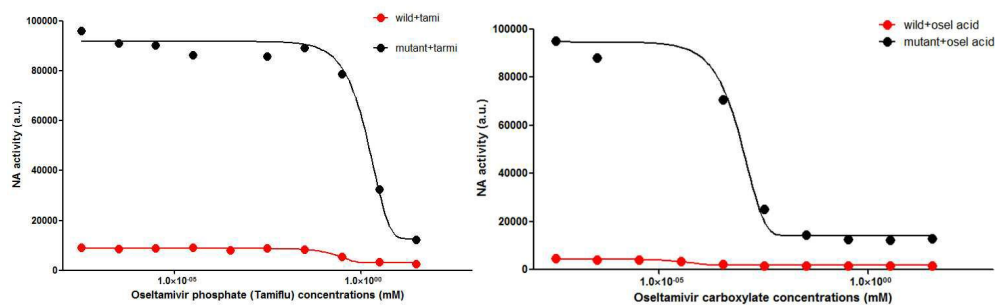
도면1



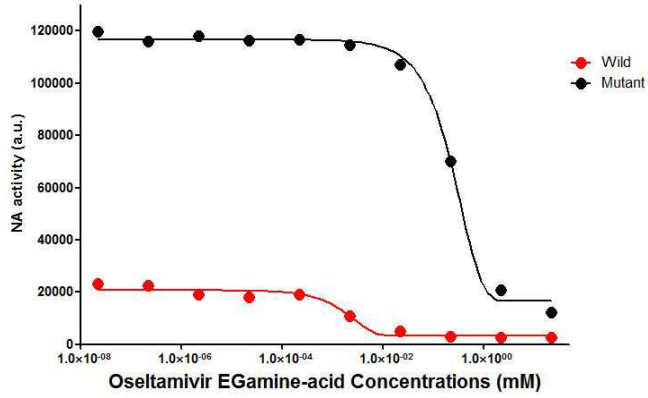
도면2



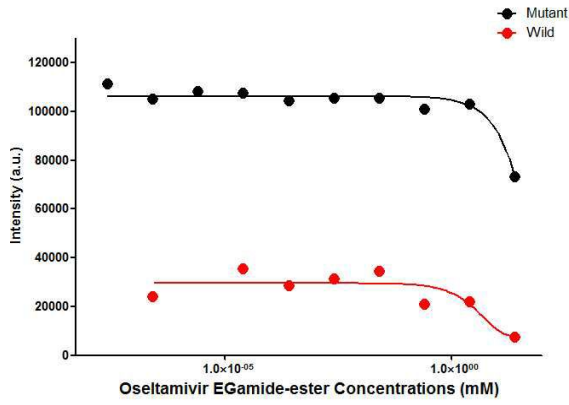
도면3



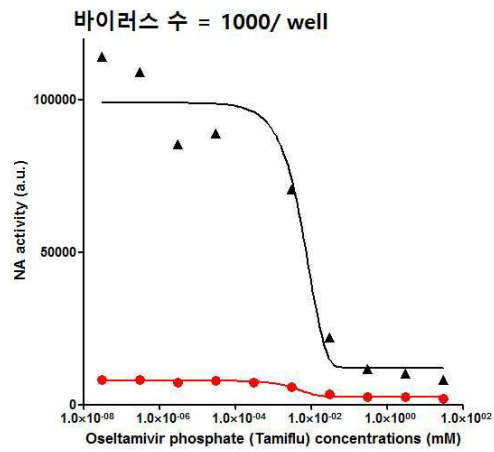
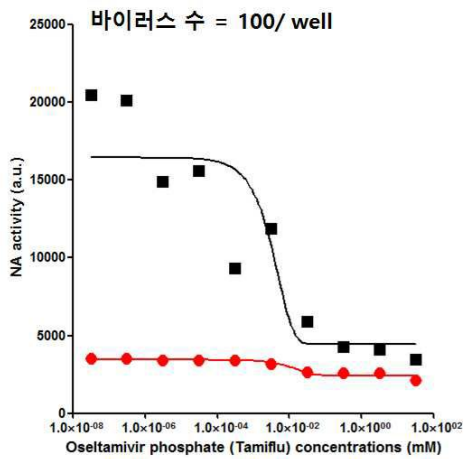
도면4



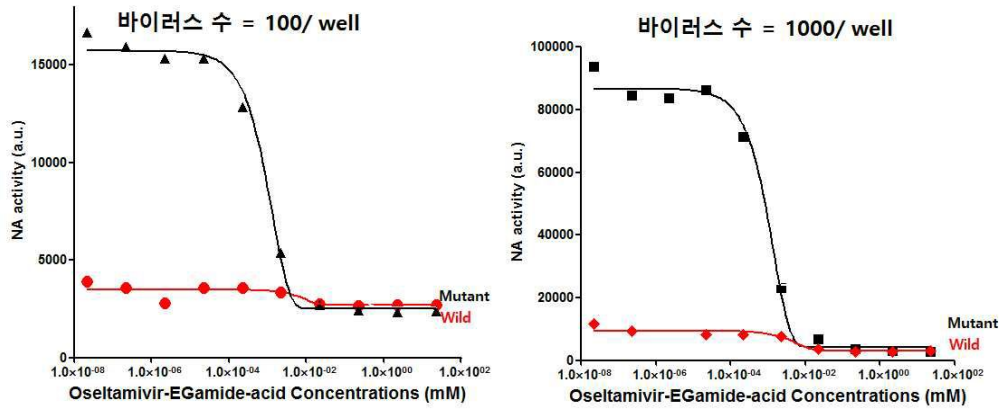
도면5



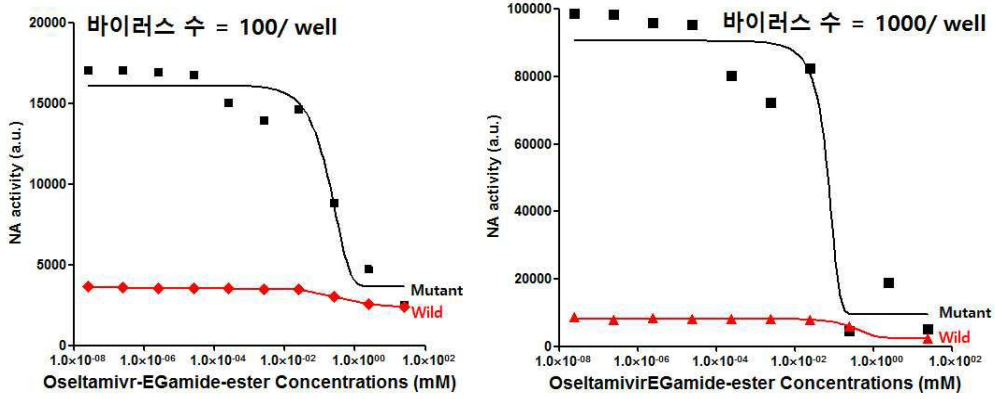
도면6



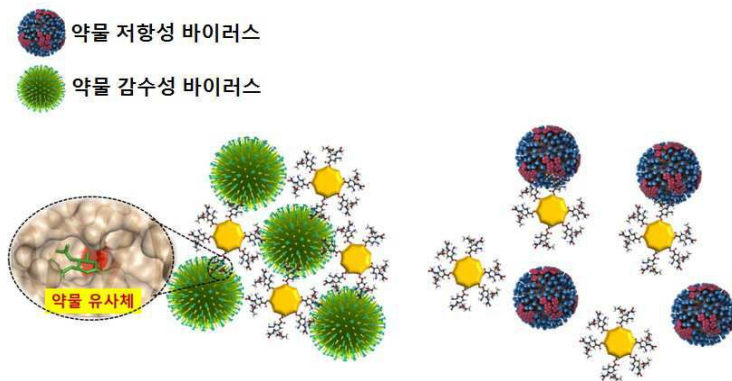
도면7



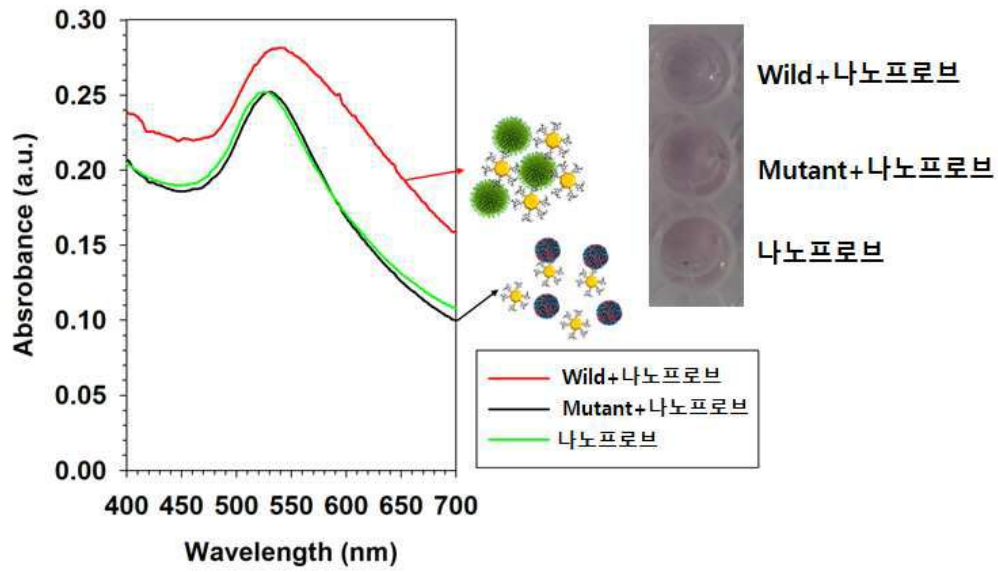
도면8



도면9



도면10



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제2항

【변경진】

Oseltamivir Ethyleneglycol amino acid

【변경후】

Oseltamivir EGamine acid