



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월20일
(11) 등록번호 10-2242449
(24) 등록일자 2021년04월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 33/587 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0047915

(22) 출원일자 2017년04월13일

심사청구일자 2019년08월13일

(65) 공개번호 10-2018-0115514

(43) 공개일자 2018년10월23일

(56) 선행기술조사문헌

KR101575747 B1*

KR1020160085718 A*

KR1020170004838 A*

US20140272942 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

고려대학교 세종산학협력단

세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511 (고려대학교세종캠퍼스내)

(72) 발명자

함승주

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제1공학관
에스501호 (신촌동, 연세대학교)

이재면

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 신관 249호 (신촌동, 연세대학교 의과대학)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 12 항

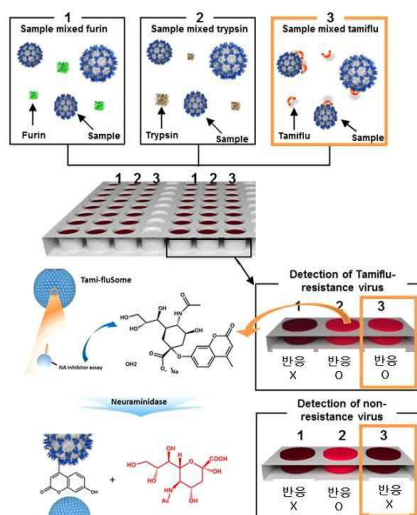
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 검출용 나노입자

(57) 요약

본 발명은 인플루엔자 바이러스가 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 갖는 것인지 검출할 수 있는 나노입자, 상기 나노입자를 포함하는 조성물, 키트 및 이를 이용하여 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성여부를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 나노입자를 이용하면, 인플루엔자 바이러스가 뉴라미니다아제 저해제에 내성을 갖는 바이러스인지를 간단하고 신속한 방법으로 확인할 수 있고, 검출 감도가 우수하며, 더욱이 본 발명의 키트를 이용하는 경우 해당 바이러스의 고병원성 및 저병원성 여부도 동시에 확인할 수 있어, 바이러스 치료제의 처방을 위한 진단 등의 분야에 활용될 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

김현욱

서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 367에이
(신촌동, 연세대학교)

김지혜

서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 367에이
(신촌동, 연세대학교)

송대섭

대전광역시 유성구 지족로 343, 210동 1402호(지족
동, 반석마을아파트2단지)

나운성

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명3로 111,
603동 303호(오송호반베르디움아파트)

염민주

경기도 수원시 권선구 매송고색로691번길 9, 207동
1204호(고색동, 고색2차태산아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017-11-0556
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	글로벌프론티어사업
연구과제명	3D 유무기 하이브리드 소재기반 나노구조체 개발(3/3)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.05.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016-22-0057
부처명	연세대학교
과제관리(전문)기관명	연세대학교
연구사업명	교비배정연구
연구과제명	[미래선도-2015선정-2차년] 질병의 진단 및 치료를 위한 고감도 무표지 세포 모방형

바이오 하이브리드 기술 개발

기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2016.09.01 ~ 2017.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

2'-(4-메틸롬벨리페릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA) 및 양친성 입자를 포함하고,

상기 4-MUNANA는 양친성 입자의 표면에 컨쥬게이션되며,

상기 양친성 입자는 자기-소광된 염료, 형광 염료, 전기화학발광 물질, 인광염료 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 표지자를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 검출할 수 있는 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 뉴라미니다아제 저해제는 오셀타미비르, 자미비르, 페라미비르 및 라니나미비르로 이루어진 군에서 선택된 것인, 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 양친성 입자는 친수성 고분자 및 소수성 고분자를 포함하는 것인, 나노입자.

청구항 4

제1항에 따른 나노입자를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 검출용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

4-MUNANA를 2.3×10^{-3} mM 이상 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 따른 나노입자를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 검출용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 키트는 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 효소를 더 포함하는 것인, 키트.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 키트는 퓨린을 포함하는 제1챔버; 트립신을 포함하는 제2챔버; 및 뉴라미니다아제 저해제를 포함하는 제3챔버를 더 포함하는 것인, 키트.

청구항 9

시료에 뉴라미니다아제 저해제를 처리하는 것;

상기 저해제 처리된 시료에 제1항에 따른 나노입자를 처리하여 반응시키는 것; 및

상기 나노입자 처리된 시료에서 반응신호를 측정하는 것을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저

해제에 대한 내성을 확인하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 나노입자 처리된 시료에서 반응신호가 있는 경우, 시료 내의 바이러스는 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 갖는 것으로 판단하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 11

제8항에 따른 키트의 제1챔버, 제2챔버 및 제3챔버 각각에 시료를 처리하는 것;

상기 시료 처리된 제1챔버, 제2챔버 및 제3챔버에 4-MUNANA를 포함하는 나노입자를 각각 처리하는 것; 및

각 챔버에서 반응신호를 측정하는 것;을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 및 고/저병원성 여부를 동시에 확인하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

제1챔버에서 반응신호가 확인된 경우 고병원성 바이러스 또는 제1챔버에서 반응신호가 측정되지 않고, 제2챔버에서만 반응신호가 측정된 경우 저병원성 바이러스로 판단; 및

제3챔버에서 반응신호가 측정되는 경우 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 갖는 바이러스로 판단하는 것;을 더 포함하는, 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인플루엔자 바이러스가 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 갖는 것인지 검출할 수 있는 나노입자, 상기 나노입자를 포함하는 조성물, 키트 및 이를 이용하여 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성여부를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인플루엔자 A 바이러스는 9개의 구조 단백질로 이루어져 있으며, 부가적으로 조절 기능을 갖춘 2개 NS1 비구조 단백질을 코딩하고 있다. 바이러스 계통의 분절화된 특성으로 인해, 하나의 세포에 여러가지 바이러스 균주들이 혼성 감염된 경우에 유전자 재조합(genetic reassortment) 기전이 이루어질 수 있다. 인플루엔자 A 바이러스는 바이러스 표면에 제시되는 상이한 혈구 응집소(HA: hemagglutinin)와 뉴라미니다제(NA: neuraminidase)에 따라 다양한 서브타입들로 분류된다. 인플루엔자 A 바이러스 서브타입들은 2종의 바이러스 표면 당단백질, 혈구 응집소(HA 또는 H) 및 뉴라미니다제(NA 또는 N)로 동정된다. 각 인플루엔자 바이러스 서브타입은 H와 N단백질의 조합에 따라 동정된다. 공지된 HA 서브타입은 16종이며, 타입A 인플루엔자의 공지된 NA 서브타입은 9종이다.

또한, 타입B 인플루엔자의 타입 B 뉴라미니다아제가 밝혀져있다.

[0003] 인플루엔자 바이러스에 대한 치료제는 뉴라미니다아제 저해제의 개발이 타깃 구조를 기반으로 이루어지고 있고, 현재 오셀타미비르(타미플루)와 자나미비르(틸렌자)가 승인을 받은 상태이다. 그 외 페라미비르(Peramivir)와 같은 약물이 임상 실험 또는 개발 단계에 있다. 오셀타미비르(타미플루)와 자나미비르(틸렌자)는 점액성 분비물 내로의 자손 비리온의 방출과 분산을 예방하여, 바이러스 감염성을 낮추는 역할을 한다. 인플루엔자 바이러스 표면 상에 발현되는 뉴라미니다아제(NA)는 바이러스 세포막에 있는 섬유질의 줄기에 의해 고정된 동형사중체(homotetramer) 당단백질 이다. 감염 주기에서 이 효소의 첫 번째 역할은 감염된 세포로부터 자세포를 분리하는 것이지만, 점액 분비를 통한 바이러스의 움직임에 관해서도 역할을 한다고 알려져 있다.

[0004] 현재까지 많은 수의 항바이러스제가 개발되어 치료에 이용되어 왔으나 인플루엔자와 같은 RNA 바이러스의 경우 DNA 바이러스 보다 수백 배 이상 변이가 자주 일어나므로 쉽게 내성이 생기므로, 효율적인 치료를 위해서는 치료제에 대한 내성여부를 신속하게 확인할 수 있는 필요가 있어, 이를 위해 많은 연구가 진행 중이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같이 내성에 의한 바이러스의 변이가 쉽게 일어나는 인플루엔자 바이러스에서 치료제에 대한 내성 여부를 손쉽게 확인하여, 바이러스 치료제의 처방여부 등을 먼저 확인함으로써 과도한 의약 처방 또는 투약을 방지함으로써 치료효율을 높일 수 있는 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 갖는 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있는 나노입자 및 이를 포함하는 조성물, 키트 그리고 이용한 검출방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은, 2'-(4-메틸롬벨리페릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 검출할 수 있는 나노입자를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 2'-(4-메틸롬벨리페릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)을 포함하는 나노입자를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 검출용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 2'-(4-메틸롬벨리페릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)을 포함하는 나노입자를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 검출용 키트를 제공한다:

[0009] 또한, 본 발명은 상기 나노입자, 조성물 또는 키트를 이용하여 시료에 뉴라미니다아제 저해제를 처리하는 것; 상기 저해제 처리된 시료에 2'-(4-메틸롬벨리페릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)을 포함하는 나노입자를 처리하여 반응시키는 것; 및 상기 나노입자 처리된 시료에서 반응신호를 측정하는 것을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 확인하는 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 나노입자, 조성물 또는 키트를 이용하여 키트의 제1챔버, 제2챔버 및 제3챔버 각각에 시료를 처리하는 것; 상기 시료가 처리된 제1챔버, 제2챔버 및 제3챔버 각각에 4-MUNANA를 포함하는 나노입자를 처리하는 것; 및 각 챔버에서 반응신호를 측정하는 것;을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 및 바이러스의 고/저병원성 여부를 동시에 확인하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 나노입자를 이용하면, 인플루엔자 바이러스가 뉴라미니다아제 저해제에 내성을 갖는 바이러스인지를 간단하고 신속한 방법으로 확인할 수 있고, 더욱이 본 발명의 키트를 이용하는 경우 해당 바이러스의 고병원성 및 저병원성 여부도 동시에 확일 수 있어, 바이러스 치료제의 처방을 위한 진단 등의 분야에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 4-MUNANA가 쿼주게이션된 양친성 입자의 전자현미경 사진이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 4-MUNANA가 컨쥬게이션된 양친성 고분자의 농도에 따른 뉴라미니다아제 저해제에 내성을 갖는 바이러스의 검출 가능성을 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 4-MUNANA가 컨쥬게이션된 양친성 고분자를 이용하여 뉴라미니다아제 저해제에 내성 여부 검출이 가능한 바이러스의 최저 농도를 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 4-MUNANA가 컨쥬게이션된 나노입자를 이용하여 뉴라미니다아제 저해제에 내성을 갖는 바이러스의 검출 가능 나노입자의 최저 농도를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 4-MUNANA가 컨쥬게이션된 나노입자를 이용하여 뉴라미니다아제 저해제에 내성 여부 검출이 가능한 바이러스의 최저 농도를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 키트 및 이를 이용한 검출과정을 나타내는 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 다양한 변형을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 이하에서 기술하는 특정 실시예 및 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0014] 이하에서, 본 발명의 에 대하여 상세히 설명한다.
- [0016] 본 발명은 2'-(4-메틸롬벨리퍼릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 검출할 수 있는 나노입자를 제공한다.
- [0017] 본 발명에서 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 갖는지 검출 가능한 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 바이러스 A, 인플루엔자 바이러스 B 및 인플루엔자 바이러스 C를 모두 포함하는 것으로, 구체적인 아형의 종류에 한정되지 않고, 고병원성/저병원성 인플루엔자 바이러스를 모두 포함한다.
- [0018] 본 발명에서 내성이란 약물에 대하여 성장 또는 증식의 저해 또는 바이러스의 사멸효과가 나타나지 않는 것을 의미하는 것으로, 유전자형의 변이에 의하여 특정 약물로 저해/사멸되지 않는 바이러스는 상기 약물에 대하여 내성을 갖는다고 할 수 있다. 본 발명에 있어서는 뉴라미니다아제의 변이에 의하여 종래 뉴라미니다아제 저해제의 처리에도 불구하고, 바이러스의 증식 억제, 사멸 또는 치료효과가 나타나지 않는 경우, 상기 바이러스는 뉴라미니다아제 저해제에 내성을 갖는다고 할 수 있다. 이 경우, 효율적인 치료가 어려운 바, 대상 바이러스가 대상 약물에 내성을 갖는지 검출하는 것은 치료에 있어서 매우 중요하다.
- [0019] 본 발명에서 2'-(4-메틸롬벨리퍼릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제(NA)와 반응하여 형광 발현을 나타내는 표지자 일 수 있다. 뉴라미니다아제 저해제에 의하여 바이러스의 NA효소가 불활성화 되는 경우에는 4-MUNANA의 분해 반응을 일으키지 못해 형광 발현이 검출되지 않는다. 종래에 4-MUNANA는 뉴라미니다아제의 효소 활성을 평가하는 용도로 사용되었으나, 이를 이용하여 바이러스가 뉴라미니다아제 저해제에 내성을 갖는 것인지에 대한 검출 가능여부에 대하여 연구되지 못한 바, 본 발명의 발명자들은 이를 포함하는 나노입자를 통해서 바이러스의 내성 여부를 검출할 수 있음을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 또한, 본 발명의 4-MUNANA를 포함하는 나노입자를 이용하여 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 검출하는 경우, 4-MUNANA 만을 이용하여 뉴라미니다아제 효소의 활성을 평가하거나, 나노입자에 컨쥬게이션 되지 않은 경우 보다 검출 감도를 향상시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 4-MUNANA를 포함하는 나노입자를 이용하는 경우 4-MUNANA 결합된 고분자만으로 바이러스를 검출하는 경우보다 더 낮은 농도의 바이러스까지 검출할 수 있음을 실험적으로 확인하였다.
- [0021] 상기 4-MUNANA는 나노입자의 표면에 컨쥬게이션 된 것 일 수 있다.
- [0022] 일 실시예에 있어서, 상기 나노입자가 양친성 고분자 또는 양친성 고분자를 포함하는 나노입자인 경우, 한쪽의 카르복실기와 다른 한쪽의 이민기가 탈수축합하는 산아미드 결합으로 컨쥬게이션 된 것 일 수 있다. 또한, 상기 나노입자의 종류에 따라서 별도의 링커 등을 이용하여 컨쥬게이션 될 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 뉴라미니다아제 저해제는 뉴라미니다아제 효소를 저해할 수 있는 약물의 한 종류로, 항바이러스제

의 일종 일 수 있다. 바이러스의 뉴라미니다아제를 저해하여 숙주세포로부터 바이러스의 재증식을 억제하는 역할을 하는 것이라면, 모두 본 발명에 포함될 수 있고, 그 구체적인 종류에 한정되지 않는다.

[0024] 일 구체예에서 뉴라미니다아제 저해제는 오셀타미비르(Oseltamivir, 타미플루: Tamiflu), 자미비르(Zanamivir, 릴렌자: Relenza), 페라미비르(Peramivir, 페라미플루) 및 라니나미비르(Laninamivir, Inavir)로 이루어진 군에서 선택된 것 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 상기 나노입자는 바이러스의 내성여부를 확인할 수 있다는 점에서 프로브 일 수 있다. 상기 나노입자는 양친성 고분자; 양친성 입자; 유무기 입자; 항체; 압타머; 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것 일 수 있다. 양친성이란 양친매성이라고도 하며, 친수성과 소수성의 성질을 모두 가진 것을 의미한다. 상기 양친성 나노입자의 형태는 양친성을 나타내기만 하면 특별히 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에서, 양친성 입자는 친수성을 나타내는 영역과 소수성을 나타내는 영역을 갖는 입자를 의미한다. 양친성 입자는 친수성 영역 및 소수성 영역이 있는 입자이지만 하면 제한 없이 이용 가능하다. 양친성 입자는 친수성 고분자, 소수성 고분자, 지질 고분자 및 이들의 조합을 포함한다. 상기 고분자는 공중합체 형태로 포함될 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 양친성 고분자는 통상적으로 알려진 중합방법으로 제조하여 얻어질 수 있고, 일 예로 mPEG-아민(mPEG-amine) 또는 카르복시-PEG-아민(carboxy(CM)-PEG-amine)과 Leu-NCA 를 N,N'-디메틸포름아미드(N,N'-Dimethylformamide)에 녹이고 개환중합(Ring Opening Polymerization, ROP) 반응을 통해 얻을 수 있다.

[0028] 상기 양친성 고분자의 경우 친수성 고분자와 소수성 고분자를 1 : 1 내지 1000의 몰 비율, 바람직하게는 1 : 10 내지 100의 몰 비율로 혼합하여 중합하는 방법으로 얻을 수 있다.

[0029] 한 구체예에서, 상기 양친성 입자는 4-MUNANA가 결합된 양친성고분자 및 양친성 고분자를 1 : 1 내지 9의 몰 비율로 혼합하여 제조된 것 일 수 있다. 이 경우 내성 여부 검출능이 우수한 나노입자의 제조가 가능하다.

[0030] 또한, 상기 나노입자는 4-MUNANA가 결합된 양친성 고분자에 의하여 형성된 양친성 입자일 수 있다. 상기 4-MUNANA와 고분자의 컨쥬게이션은 통상적인 고분자 결합방법에 의하여 수행될 수 있고, 일 예로 4-MUNANA와 카르복시-PEG-아민을 1 : 0.1 내지 30의 몰 비율, 바람직하게는 1 : 0.5 내지 20 또는 1 : 0.8 내지 10의 몰 비율로 혼합하여 N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드/4-디메틸아민피리딘(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide(DCC)/4-Dimethylaminopyridine(DMAP)) 반응을 통해 고분자의 카르복실기와 무나나의 하이드록시기를 결합시키고, 디에틸에테르에서 침전시킨 후 불순물을 제거하는 방법으로 수행할 수 있다.

[0031] 한 구체예에서, 친수성 고분자는 폴리알킬렌글리콜(PAG), 폴리아크릴릭애시드(PAA), 폴리아크릴로니트릴(PAN), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리비닐아세테이트(PVAc), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아미드 및 친수성 폴리아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 및 그 유도체를 포함한다. 예를 들어, 친수성 고분자는 (모노)메톡시폴리에틸렌글리콜, (모노)아세톡시폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌과 프로필렌글리콜의 공중합체, 폴리비닐피롤리돈, 폴리글루타민, 폴리글루탐산, 폴리트레오닌, 폴리아스파라긴, 폴리아르기닌 및 폴리세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 또한 상기 친수성 고분자는 그 유도체를 포함한다. 예를 들어, 상기 폴리에틸렌글리콜의 유도체는 메톡시 폴리에틸렌글리콜(mPEG)일 수 있다.

[0032] 한 구체예에서, 소수성 고분자는 친수성 고분자와 함께 양친성 입자를 형성할 수 있는 물질이면 제한 없이 이용 가능하다. 예를 들어, 소수성 고분자는 폴리에스테르, 폴리엔하이드라이드, 소수성 폴리아미노산, 폴리오르소에스테르 및 폴리포스파진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상 일 수 있다. 상기 폴리아미노산은 폴리루신, 폴리이소루신, 폴리발린, 폴리페닐알라닌, 폴리프롤린, 폴리글리신, 폴리트립토판, 폴리알라닌, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 및 폴리메티오닌으로 이루어진 군에서 하나 이상을 포함한다. 또한 상기 소수성 고분자는 그 유도체를 포함한다.

[0033] 본 명세서에서 사용한 용어, "지질" 또는 "지질 고분자"는 이중층의 막 구조를 형성할 수 있는 것이라면 인지질, 지질단백질, 당지질, 양이온성 지질 등을 모두 포함하며, 그 종류에 제한되지 않는다. 또한, 상기 지질은 자연적으로 유도되어 얻어진 것 및 합성된 지질 유도체를 모두 포함한다. 상기 인지질(phospholipids)은 글리세로인지질(glycerophospholipids) 및 스펅고인지질(spingophospholipid, Phosphosphingolipid)을 포함한다. 상기 글리세로인지질은 다이아크릴글리세라이드 구조를 갖는 것일 수 있고, 구체적으로 포스파티산(phosphatidate, Phosphatidic acid, PA), 레시틴(lecithin, Phosphatidylcholine, PC), 세팔린(cephalin) 및

포스포이노시티드류(Phosphoinositides)를 포함한다. 상기 세팔린 인지질은 포스파티딜세린(Phosphatidylserine, PS) 및 포스파티딜에탄올아민(Phosphatidylethanolamine, PE)을 포함한다. 또한, 상기 포스포이노시티드류 인지질은 포스파티딜이노시톨(Phosphatidylinositol, PI), 포스파티딜이노시톨 포스페이트(Phosphatidylinositol phosphate, PIP), 포스파티딜이노시톨 이인산(Phosphatidylinositol bisphosphate, PIP2) 및 포스파티딜이노시톨 삼인산(Phosphatidylinositol triphosphate, PIP3)을 포함한다. 상기 스핑고인지질은 세라마이드 포스포리콜린(Ceramide phosphorylcholine, Sphingomyelin, SPH), 세라마이드 포스포리레타노라민(Ceramide phosphorylethanolamine, Sphingomyelin, Cer-PE) 및 세라마이드 포스포리피드(Ceramide phosphorlipid)를 포함한다.

- [0034] 상기 합성 인지질 유도체는 그 종류에 제한되는 것은 아니나, 일 구체예로 1,2-다이도데카노이-sn-글리세로-3-포스포콜린(EPC, 1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine), 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DOPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에타놀라민(POPE, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포-L-세린(POPS, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것 일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 예에 따른 양친성 입자는 공지된 방법을 자유롭게 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 친수성 영역과 소수성 영역을 포함하는 양친성 블록 공중합체를 수용액에 분산시킨 뒤 초음파를 가하는 방법, 유기용매에 분산 또는 용해 시킨 뒤 과량의 물로 유기용매를 추출 또는 증발시키는 방법, 유기용매에 분산 또는 용해시킨 뒤 과량의 물로 투석하는 방법, 유기용매에 분산 또는 용해시킨 뒤 균질기 또는 고압유화기를 이용하여 강하게 용매를 증발시키는 방법, 또는 얇은 필름 수화법(Thin film hydration) 등을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 양친성 고분자 및 4-MUNANA가 컨주게이션된 양친성 고분자를 혼합하여 용매에 녹인 후 다량의 물로 투석하는 방법으로 양친성 입자를 제조하였다.
- [0037] 상기 양친성 입자에 사용되는 고분자의 종류, 제조방법에 의하여 다양한 구조 및 형태를 갖는 나노입자가 형성될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일 구체예에서, 양친성 입자는 막 구조를 가진 입자일 수 있고, 구체적으로 마이셀(micelle), 폴리머솜(polymersome), 콜로이드솜(colloidsome), 베지클(vesicle), 리포솜(liposome), 액적(droplet), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 구조 일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 구체예에서, 양친성 입자가 하기 식 1에 따라 계산된 질량 분율(mass fraction)이 0.25 내지 0.40을 만족할 때, 양친성 입자는 폴리머솜 형태를 나타내고, 질량 분율이 0.40 초과 0.70 이하일 때 양친성 입자는 마이셀 구조를 나타낸다.
- [0040] [식 1]
- [0041] 질량 분율(mass fraction)=친수성 고분자의 질량/(친수성 고분자의 질량 + 소수성 고분자의 질량)
- [0042] 또한, 상기 질량 분율을 질량 %(percent)로 나타내는 경우, 질량%가 25% 내지 40%을 만족할 때, 양친성 입자는 폴리머솜 형태를 나타내고, 질량%가 40% 초과 70% 이하일 때 양친성 입자는 마이셀 구조를 나타낸다.
- [0043] 한 구체예에서, 양친성 입자의 크기는 제한되지 않는다. 양친성 입자는 나노 또는 마이크로 입자일 수 있으며, 예를 들어 양친성 입자의 평균 입경은 50 내지 10000 nm일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 일 예에 따르면, 나노입자는 "유무기 입자"일 수 있다. 본 발명에서 사용한 용어, "유무기 입자"는 유기물질과 무기물질을 포함하는 입자를 의미한다. 구체적으로, 무기물질로 이루어진 코어의 표면(또는 쉘)에 유기물질이 코팅 또는 결합되어 있는 형태의 입자일 수 있다. 상기 유무기 입자의 형태는 제한되지 않고, 한 구체예에 따라 로드(rod)형, 구형, 실린더형, 판(flat)형, 타원형 또는 링 형 등의 형태 일 수 있다.
- [0045] 상기 무기물질은 금속으로 이루어진 것일 수 있고, 상기 금속은 일 예로 금, 은, 이들을 포함하는 혼합물 및 그 조합일 수 있다. 바람직하게는 금, 은 및 이들의 조합 일 수 있다.
- [0046] 상기 유기물질은 무기물질의 안정화제 일 수 있다. 본 발명에 있어서, 용어 안정화제는 입자의 응집을 방지하기 위한 물질을 의미하며, 분산제와 혼용하여 사용된다. 상기 안정화제는 바람직하게는 금속의 안정화제 일 수 있다. 상기 안정화제는 무기물질이 용매 내에서 잘 분산된 상태로 유지되도록 하는 것이면 그 종류에 상관없이 포함되고, 일 예로, 계면활성제(surfactant) 일 수 있다.

- [0047] 상기 계면활성제의 구체적인 예에 제한되지 않고, 양이온성 계면활성제와 비이온성 계면활성제를 모두 포함한다. 구체적으로 세틸 트라이메틸암모늄 브로마이드(Cetyl trimethylammonium bromide, CTAB, Hexadecyltrimethylammonium bromide), 테트라데실 트라이메틸암모늄 브로마이드(Tetradecyl Trimethyl Ammonium Bromide, TTAB), 도데실트라이메틸암모늄 브로마이드(dodecyltrimethylammonium bromide, DTAB), Tween 20(polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate), Tween 40(polyoxyethylene(20) sorbitan monopalmitate), Tween 80(polyoxyethylene(20) sorbitan monooleate) 및 Triton X-100로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 구체예에 따라, 유무기 입자는 양친성 고분자를 더 포함할 수 있다. 상기 양친성 고분자는 유무기 입자의 표면에 양친성 고분자가 결합된 상태이거나, 양친성 고분자 층 또는 양친성 고분자 셸(shell) 구조로 코팅된 상태 일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 구체예에 따라, 양친성 고분자를 더 포함하는 유무기 입자는 양친성 고분자와 유무기 입자의 표면 사이에 작용기층을 더 포함할 수 있다. 구체적인 예로, 상기 작용기 층은 무기입자의 표면에 결합이 잘되는 작용기를 갖는 화합물을 결합시키고, 상기 화합물에 고분자층을 결합하는 구조일 수 있다.
- [0050] 상기 작용기를 갖는 화합물은 무기입자 표면에 -SH 결합이 가능한 것이면 모두 사용할 수 있고, 일 예로 시스테인(cysteamine)을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 무기입자가 금인 경우, 금 입자의 표면에 SH 결합이 가능한 화합물을 결합하여 작용기층을 형성하고, 상기 작용기 와 양친성 고분자를 결합하는 구조를 가질 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 구체예에 따라, 상기 양친성 고분자를 포함하는 유무기 입자는 작용기층과 양친성 고분자의 결합 사이에 아미노산 중합을 개시하기 위한 작용기를 더 포함할 수 있다. 상기 작용기는 NH_2 일 수 있다.
- [0053] 상기 양친성 고분자는 친수성 A 블록 및 소수성 B 블록을 포함하는 A-B 타입의 양친성 블록 공중합체 또는 B-A-B 타입의 삼중 블록 공중합체 형태일 수 있다. 또한 상기 양친성 고분자는 지질 일 수 있다.
- [0054] 한 구체예에서, 친수성 A 블록은 친수성 고분자로 폴리알킬렌글리콜(PAG), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐알콜(PVA), 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴릭애시드(PAA), 폴리아크릴로니트릴(PAN), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리비닐아세테이트(PVAc), 친수성 폴리아미노산 및 그의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 바람직하게는, 친수성 A 블록은 모노메톡시폴리에틸렌글리콜, 모노아세톡시폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌과 프로필렌글리콜의 공중합체, 폴리글루타민, 폴리글루탐산, 폴리트레오닌, 폴리아스파라긴, 폴리아르기닌 및 폴리세린 및 폴리비닐피롤리돈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 친수성 A 블록은 200 내지 50,000 달톤 또는 1,000 내지 20,000 달톤의 수 평균 분자량을 갖는다.
- [0055] 한 구체예에서, 소수성 B 블록은 소수성 고분자 일 수 있다. 구체적으로 폴리에스테르, 폴리엔하이드라이드, 소수성 폴리아미노산, 폴리오르소에스테르 및 폴리포스파진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 바람직하게는, 소수성 B 블록은 폴리루신, 폴리이소루신, 폴리발린, 폴리페닐알라닌, 폴리프롤린, 폴리글리신 및 폴리메티오닌, 폴리트립토판, 폴리알라닌, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리디옥산-2-온, 폴리락타이드와 글리콜라이드의 공중합체, 폴리락타이드와 디옥산-2-온의 공중합체, 폴리락타이드와 카프로락톤의 공중합체, 및 폴리글리콜라이드와 카프로락톤의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 소수성 B 블록은 50 내지 50,000 달톤, 또는 200 내지 20,000 달톤의 수 평균 분자량을 갖는다.
- [0056] 상기 유무기 입자는 안정화제로서 양친성 고분자의 존재 하에서, 이온 상태의 무기물과 상기 무기물을 환원시킬 수 있는 환원제를 함께 반응시켜 제조할 수 있다. 유무기 입자 제조 시, 사용되는 안정제로 세틸 트리메틸암모늄 브로마이드를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 유무기 입자가 양친성 고분자 층을 더 포함하는 경우 유무기 입자의 안정제 역할을 할 수 있는 이중층 구조를 갖는 것이 바람직하다.
- [0057] 한 구체예에서, 유무기 입자의 크기는 제한되지 않으며, 나노 또는 마이크로 크기일 수 있다. 예를 들어 유무기 입자의 평균 입경은 50 내지 1000 nm일 수 있다.
- [0058] 본 발명의 유무기 입자는 예멸전 법, 얇은 막 수화법(Thin film hydration) 또는 투석 방법(dialysis)을 이용하여 제조될 수 있고, 구체적인 제조 조건은 유기물질 및 무기물질 그리고 고분자의 종류에 따라서 통상적으로 사용되는 범위 내에서 변경하여 수행될 수 있다.

- [0059] 본 발명의 유무기 입자는 바이러스와의 반응 여부를 더욱 명확하게 판단하기 위하여, 표지자를 더 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 일 예에 따르면, 나노입자는 "압타머(aptamer)" 일 수 있다. 본 발명에서 사용한 용어, "압타머(aptamer)"는 단일, 이중 나선의 DNA, RNA 형태로 표적분자에 결합할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 일 예에 따르면, 나노입자는 "항체(antibody)" 일 수 있다. 본 발명에서 사용한 용어, "항체(antibody)"는 아미노산과 당사슬로 결합된 단백질로 표적분자에 결합할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0062] 본 발명에서 상기 표적분자는 바이러스 또는 바이러스의 항원성을 나타낼 수 있는 단편 일 수 있고, 상기 압타머 또는 항체는 표적분자에 특이적으로 결합할 수 있는 것으로, 바람직하게는 표적분자에 상보적으로 결합할 수 있는 구조를 가진 것 일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 일 구체예에 따라, 나노입자는 막(membrane) 구조를 가질 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 사용한 용어, "막(membrane) 구조"란 막 또는 셸(shell)에 의하여 내부가 둘러싸여 있는 구조를 의미한다. 베지클(vesicle), 인공세포(artificial cell) 또는 마이크로캡슐 같은 캡슐 형태의 입자(encapsulation particle)는 그 종류를 제한하지 않고 모두 포함한다. 본 명세서에서 상기 막 구조는 셸(shell) 구조와 혼용하여 사용한다. 상기 막 구조는 상기 내부에는 유체 또는 별도의 구성을 포함하는 구조까지 포함한다.
- [0065] 상기 막(membrane)은 단일층(mono layer) 또는 이중층(bilayer) 구조를 포함한다. 상기 단일층(mono layer)은 "소수성 영역-친수성 영역"을 포함하는 막 구조로, 일 구체예로 수용성 용액 내에서 소수성 코어와 친수성 셸을 포함하는 구조일 수 있다. 상기 이중층(bilayer)은 "친수성 영역-소수성 영역-소수성 영역-친수성 영역"을 포함하는 막 구조이다. 일 구체예로, 상기 이중층(bilayer)은 상기 단일층(mono layer) 2 개가 결합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 이중층(bilayer)은 친수성 코어와 상기 친수성 코어를 둘러싸고 있는 소수성 영역 및 상기 소수성 영역을 둘러싸고 있는 친수성 셸을 포함하는 구조일 수 있다.
- [0066] 상기 막(membrane) 구조는 단일막(single membrane) 및 단일막을 2 이상 있는 다중막(multi membrane)을 모두 포함한다. 일 예로, 단일막을 갖는 입자가 다시 하나의 단일막으로 둘러싸인 경우, 다중막을 갖는 입자가 될 수 있다. 상기 단일막 및 다중막은 단일층 및 이중층과 구별되는 개념이다. 구체적으로, 이중층(bilayer) 구조의 막을 하나만 포함하는 입자는 단일막을 갖는 것이며, 단일층(monolayer) 구조의 막을 포함하는 입자를 다시 단일층 구조의 막이 둘러싸고 있는 입자는 다중막 구조의 입자를 의미한다.
- [0067] 상기 막 구조를 갖는 나노입자는 본 발명이 속하는 통상의 방법에 의하여 제조될 수 있고, 일 구체예에 따라 미세용액화 장비를 이용한 미세유동화 방법(microfluidization), 초고압 균질법(High-pressure homogenization), 에멀전법(Emulsion method) 또는 초음파 등을 이용하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 상기 막구조를 갖는 입자는 그 종류에 제한되지 모두 본 발명의 나노입자에 포함될 수 있다. 일 구체예로 베지클(vesicle), 마이셀(micelle), 폴리머솜(polymersome), 콜로이드솜(colloidsome), 베지클(vesicle), 리포솜(liposome), 액적(droplet) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것을 포함하나, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 상기 "마이셀(micelle)"은 소수성 코어와 친수성 셸을 갖는 입자를 의미한다. 한 구체예에서, 상기 마이셀은 계면활성제의 마이셀 또는 고분자 자기조립 마이셀 일 수 있다. 자기조립에 의한 마이셀의 경우 공중합체를 형성하는 고분자의 종류에 따라 다양한 형태를 띌 수 있고, 그 형태에 제한을 받는 것은 아니다. 상기 마이셀은 단일층(monolayer)을 2 이상 포함하는 다중막 형태도 포함한다. 상기 마이셀은 그 형태의 제한은 없으나, 일 예에 따라 구형, 타원형(ellipsoid) 또는 실린더형(cylinder)을 포함한다. 상기 마이셀 구조의 나노입자는 소수성 코어 영역에 표지자 및 무기 입자와 같은 구성을 더 포함할 수 있다.
- [0070] 상기 "폴리머솜(polymersome)"은 "친수성 영역-소수성 영역-소수성 영역-친수성 영역"을 갖는 2중층 막 구조를 갖고, 상기 소수성 및 친수성 영역에 고분자 또는 공중합체를 포함하는 입자를 의미한다. 상기 고분자 또는 공중합체는 인위적으로 합성된 것과 지질(lipid)을 함께 포함하거나, 인위적으로 합성된 것 포함하는 것 일 수 있다. 상기 인위적으로 합성된 것은 자연적으로 발생하는 지질(lipid)을 제외한 모든 고분자 및 공중합체를 포함하는 의미이다. 상기 폴리머솜은 이중층 막구조의 단일막 및 단일막을 2 이상 포함하는 다중막을 모두 포함한다.
- [0071] 상기 폴리머솜은 리포솜과 구분하여 인위적으로 합성된 고분자 또는 공중합체를 포함할 수 있다. 상기 폴리머솜은 이중층 형태의 막으로만 이루어진 단일막 및 상기 2중층의 단일막을 2 이상 포함하는 다중막 형태도 포함한다.

다.

- [0072] 상기 "리포솜(liposome)"은 적어도 하나의 지질 이중층을 갖는 입자를 의미한다. 양친매성의 생체막을 모방한 지질막을 갖는 것이라면, 단일막 및 다중막을 모두 포함한다. 리포솜을 형성하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 통상적으로 인지질을 염류 수용액 중에 현탁하거나, 인지질을 포함하는 수용액을 초음파 처리 등을 하여 수득할 수 있으나, 제조방법에 의하여 본 발명이 제한되지 않는다.
- [0073] 상기 "콜로이드솜"은 1nm 내지 1000nm 크기의 콜로이드상 입자 또는 상기 입자가 치밀하게 패키징된 구조물을 의미한다. 막을 형성하는 친수성 및 소수성 영역의 고분자의 종류에 따라서 단일층 및 이중층을 포함할 수 있다. 또한 단일막 및 다중막을 모두 포함한다.
- [0074] 상기 "액적(droplet)"은 상기 막 구조 입자 중에서 물방울 모양의 형태를 나타내는 것을 의미한다. 단일층 및 이중층을 포함하고, 단일막 및 다중막을 모두 포함한다.
- [0075] 본 발명의 나노입자는 형태(shape)에 따라서 구분할 수 있으나, 상기 형태에 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 나노입자의 형태(shape)는 로드(rod), 구, 링(ring), 판(flat), 실린더, 타원형, 막으로 둘러싸인 형태 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0076] 상기 로드(rod)형태는 막대, 봉 또는 장대와 같은 일직선 모양의 형태를 총칭하는 의미이다. 상기 구 형태는 둥근 모양의 형태를 의미하는 것으로, 완전 구형과 불완전 구형을 모두 포함한다. 상기 링(ring) 형태는 일반적으로 구 또는 원형의 모양에서 가운데가 비어있는 형태를 의미한다. 상기 판(flat) 형태는 얇고 평평한 모양의 평판, 판상의 형태를 의미한다. 일 구체예에 따라, 판 형태의 나노입자는 기재 또는 담체의 상부 또는 외부에 판형의 나노입자가 코팅된 형태 일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 나노입자는 표지자를 더 포함할 수 있다. 상기 나노입자는 상기 표지자를 나노입자의 내부에 담지하거나 상기 표지자와 결합된 형태 일 수 있다. 본 발명에서 "표지자"는 프로브와 활성형 바이러스의 반응여부를 판별할 수 있는 물질을 의미한다. 표지자의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 프로브의 반응 전 후의 변화에 따라 특성이 변화하고, 시험 등을 통하여 상기 변화된 특성을 확인할 수 있는 표지자이면 제한 없이 이용 가능하다. 예를 들어, 프로브의 융합 여부를 판별할 수 있는 표지자는 자기-소광된 염료(sel-quenched dye), 형광 염료(dye), 전기화학발광 물질, 인광염료 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것 일 수 있다.
- [0078] 본 발명에서, 자기-소광된 염료는 염료(sel-quenched dye)가 서로 인접한 위치에 있는 경우에는 소광 작용이 일어나고, 묻쳐있는 염료가 방출되어 퍼지게 되면 탈소광 작용에 의하여 형광이 나타나는 물질을 의미한다.
- [0079] 한 구체예에서, 자기-소광된 염료는 3,3-디옥타데실옥사카보시아닌 퍼클로레이트(3,3-Dioctadecyloxacarboxyanine Perchlorate; Dio; Dioc), 3,3-디옥타데실-5,5-디(4-설포페닐)옥사카보시아닌 소듐염(3,3-di(4-sulfophenyl)oxacarboxyanine sodium salt), 4-(4-(디헥사데실아미노)스티릴)-N-메틸피리디늄 이오다이드(4-(4-(dihexadecylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide; DiA; 4-Di-16-ASP), 4-(4-(디데실아미노)스티릴)-N-메틸피리디늄 이오다이드(4-(4-(Didecylamino)Styryl)-N-Methylpyridinium Iodide; 4-Di-10-ASP), 1,1-디옥타데실-3,3,3,3-테트라메틸인도카보시아닌 퍼클로레이트(1,1-di(4-sulfophenyl)-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; DiI), 1,1-디옥타데실-6,6-디(4-설포페닐)-3,3,3,3-테트라메틸인도카보시아닌 (1,1-Dioctadecyl-6,6-Di(4-Sulfophenyl)-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine), 4,4-디이소티오시아나토스틸벤-2,2-디설포산 디소듐염(4,4-diisothiocyanatostilbene-2,2-disulfonicacid disodium salt; DIDS), 1,1-디옥타데실-3,3,3,3-테트라메틸인도트리카보시아닌 이오다이드(1,1-di(4-sulfophenyl)-3,3,3,3-tetramethylindotricarbocyanine iodide; DiR), 1,1-디올레일-3,3,3,3-테트라메틸인도카보시아닌(1,1-di(4-sulfophenyl)-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine), 플루오레신(fluorescein), 보디피(BODIPY), 테트라메틸로다민(Trtramethylrhodamine), 옥타데실 로다민 B 클로라이드(R18), 알렉사(Alexa), 시아닌(Cyanine) 및 알로피코시아닌(allopicocyanine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 상기 형광 염료의 평균 입경은 200nm 이하, 또는 50nm 내지 10000nm일 수 있다.
- [0080] 한 구체예에서, 전기화학발광 물질은, 이에 제한되는 것은 아니나, 트리스(2,2'-비피리딜)루테늄(II) [Ru(bpy)3²⁺]을 포함한다.
- [0081] 본 발명에서 형광 염료(dye)는 형광을 나타내는 물질로, 광에 포함된 파장을 흡수하여 색광을 바꾸어 재방사하는 성질을 갖는 물질을 의미한다. 형광 염료는 발광염료라고도 하며, 당업계에 잘 알려져 있는 형광 염료를 제한없이 이용할 수 있다. 한 구체예에서, 형광 염료는 텍사스 레드(Texas red), 플루오레세인(fluorescein), 4-클로로-7-니트로벤조퓨라잔(4-chloro-7-nitrobenzofurazan; NBD-Cl), 루미놀(luminol), 플러렌(fullerene) 및 방

향족기를 포함하는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

- [0082] 한 구체예에서, 인광 염료는 조명광 안에서 흡수한 광장을 바꾸어 재방사 함으로써 광휘성 효과를 나타내는 물질을 의미한다. 일 예로, 황화광물(X_mZ_n , X는 금속원소, Z는 비금속원소) 또는 알칼리토금속의 황화물 일 수 있으나, 그 종류에 제한되지 않는다.
- [0084] 본 발명은 2'-(4-메틸롬벨리퍼릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)을 포함하는 나노입자를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 검출용 조성물을 제공한다.
- [0085] 상기 조성물은 2'-(4-메틸롬벨리퍼릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)을 2.3×10^{-3} mM 이상으로 포함할 수 있다. 상기 4-MUNANA는 나노입자에 결합된 형태로 포함될 수 있다. 상기 농도로 이하로 포함하는 경우, 바이러스의 뉴라미니다아제 효소에 의한 반응신호가 미미하여 내성여부의 검출이 어려울 수 있다.
- [0086] 상기 4-MUNANA는 양친성 고분자에 컨쥬게이션된 형태로 조성물에 포함될 수 있다.
- [0088] 또한, 본 발명은 2'-(4-메틸롬벨리퍼릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)을 포함하는 나노입자를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 검출용 키트를 제공한다.
- [0089] 상기 키트는 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 효소를 더 포함할 수 있다.
- [0090] 상기 효소는 푸린, 트립신, 세린, 엔도프로테아제(endoprotease) 및 카복시펩티다아제(carboxypeptidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0091] 하나의 구체 예에서, 상기 효소는 단백질 분해 효소일 수 있다. 일 예로 최초 합성된 형태로는 비활성화되어 있으나, 특정 부위가 제거(또는 절단)되면 활성을 나타내는 단백질에서 단백질 분해 효소는 상기 특정 부위를 절단(cleave)하여 비활성화 단백질을 활성화시킨다. 단백질 분해 효소는 특정 부위를 절단할 수 있는 것이면 종류에 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0092] 일 구체예에서 단백질 분해 효소는 푸린(furin), 트립신(trypsin), 세린(serine), 엔도프로테아제(endoprotease) 및 카복시펩티다아제(carboxypeptidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 단백질 분해 효소는 유도체 또는 개질된 형태를 모두 포함한다. 예를 들어, 단백질 분해 효소는 제조합 인간 푸린, 제조합 마우스 푸린, 트립신-EDTA, 아세틸화된 트립신, TPCK-트립신(N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone-trypsin), 아크릴릭 트립신(Trypsin-acrylic), 푸린형 프로테아제(Furin like protease), 켁스2 프로테아제(Kex2 proteases), 막통과 세린 프로테아제 (Transmembrane protease serine), TMPRSS2, TMPRSS4, 트립타아제 클라라(Tryptase clara), 플라즈민(plasmin), 세린계 프로테아제(serine protease), 서브틸리신형 엔도프로테아제(subtilisin like endoprotease), 카복시펩티다아제(carboxypeptidase) 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0093] 일 구체예에서 트립신이 인플루엔자 바이러스의 표면 단백질인 헤마글루티닌(HA)과 반응하는 경우, 트립신의 효소 분해 작용은 His57-Asp102-Ser195 위치에서 일어나며, 푸린의 효소 분해 작용은 His194-Asp153-Ser368 위치에서 일어난다. 트립신은 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌을 모두 분해할 수 있기 때문에, 트립신을 이용하여 고/저병원성 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있다. 또한, 푸린은 고병원성 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌만을 분해할 수 있기 때문에, 푸린을 이용하여 고병원성 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있다. 저병원성 인플루엔자 바이러스의 절단 부위는 C-말단이 -R-로 이루어지며, 고병원성 인플루엔자 바이러스의 절단 부위는 R/K-R-K-K-R로 이루어진다.
- [0094] 본 발명의 키트는 시료를 처리할 수 있는 챔버를 1개 이상 포함할 수 있다. 바람직한 형태로 제1챔버, 제2챔버 및 제3챔버를 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 푸린 또는 트립신을 각각 서로 다른 챔버에 포함할 수 있다. 1개 이상의 챔버를 포함하는 경우 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 갖는지, 그리고 시료 내의 바이러스가 고병원성 인지 또는 저병원성 인지를 동시에 검출할 수 있다는 점에서 우수하다.
- [0095] 본 발명에서 "시료"는 바이러스의 검출을 위해 개체를 대표하도록 채취된 것을 의미한다. 한 구체예에서, 시료는 타액, 비루(rhinorrhea), 구강 점막 또는 분뇨 시료일 수 있다.
- [0096] 본 발명의 키트 또는 조성물은 상기 나노입자를 단일 종류만 포함하거나, 2 종류 이상의 나노입자를 함께 포함

할 수 있다.

- [0097] 본 발명의 한 구체예에서, 키트 또는 조성물은 pH 6 이하의 산성 물질을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, pH 6 이하의 산성 물질은 산성 용액일 수 있으며, 상기 pH 범위의 산성 용액을 키트에 포함할 수도 있고, 사용시 직접 제조하여 사용할 수도 있다. pH 6 이하의 산성 용액은 상기 pH 조건을 만족하는 용액이면 제한 없이 사용할 수 있다. 시판되는 스톡 용액을 이용할 수도 있고, 직접 제조하여 사용할 수도 있다. 예를 들어, 진한 산성 용액인 스톡 용액(stock solution)을 pH 6 이하가 되도록 물에 희석하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 산성 용액은 pH 4 내지 6 또는 pH 5 내지 pH 5.7일 수 있다. 상기 범위가, 숙주 세포 내의 pH 범위와 유사하므로, 검출 효율을 높일 수 있다.
- [0098] 한 구체예에서, 본 발명의 키트 및 조성물은 반응 보조제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0099] 상기 반응 보조제는 생체 분자와 바이러스의 반응을 도와주는 생체 분자의 반응 보조제 일 수 있고, 또는 나노입자와 표적분자의 반응을 도와주는 반응 보조제 일 수 있다. 구체적인 일 예로, 단백질 분해 효소와 표면 단백질의 반응을 도와주는 보조제, 또는 나노입자와 활성형 바이러스 활성화된 표면 단백질, 활성형 바이러스의 항원성 단백질을 포함하는 표적분자와의 반응을 도와주는 보조제 일 수 있다.
- [0100] 본 발명에서 사용한 용어, 보조제는 상기 등의 작용을 통해서 바이러스의 검출 민감도 및/또는 특이도를 높일 수 있는 것이라면 모두 포함하는 의미이다. 상기 바이러스의 검출 민감도 및/또는 특이도를 높이는 것의 예로 반응의 속도를 빠르게 하거나, 반응이 일어나는 최소값을 낮추는 작용 또는 표면 단백질과 생체 분자의 반응 외에 다른 반응을 억제하는 작용이 있으나, 상기 메커니즘에 제한되지 않는다. 보조제는 생체 분자 및 이와 반응하는 표면 단백질의 종류에 따라서 검출 민감도 및/또는 특이도를 높일 수 있는 것이면 종류에 제한 없이 모두 포함한다.
- [0101] 구체적인 일 예로 상기 보조제는 케톤 일 수 있다.
- [0102] 상기 케톤 화합물은 예를 들어 페닐에틸 클로로메틸 케톤, 토실 페닐알라닐 플로로메틸 케톤(TPCK, Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0103] 본 발명의 일 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 검출 시 보조제로 케톤을 더 포함할 수 있다. 이 경우, 다른 효소의 활성을 낮추고, 헤마글루티닌(HA) 분해 효소, 특히 트립신의 활성을 높여주어 키트의 민감도를 더욱 높일 수 있다.
- [0105] 본 발명은 시료에 뉴라미니다아제 저해제를 처리하는 것; 상기 저해제 처리된 시료에 2'-(4-메틸롬벨리페릴)- α -D-N-아세틸뉴라미닉산(2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid, 4-MUNANA)을 포함하는 나노입자를 처리하여 반응시키는 것; 및 상기 처리된 시료에서 반응신호를 측정하는 것을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 확인하는 방법을 제공한다.
- [0106] 상기 뉴라미니다아제 저해제의 처리량 및 처리시간은 저해제의 종류에 따라 달리하여 정할 수 있다. 본 발명의 실시예에 따른 예로, 타미플루를 이용하는 경우 실온에서 시료에 1 내지 30 mg/mL의 타미플루를 10 분 내지 50 분 동안 처리할 수 있다. 그러나 이는 저해제의 종류에 따라 조건을 달리할 수 있는 것인바, 상기 조건에 한정되는 것은 아니다.
- [0107] 본 발명의 내성여부 판단하는 방법은 상기 나노입자 처리된 신호에서 반응신호가 있는 경우, 시료 내의 바이러스는 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 갖는 것으로 판단하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [0108] 본 발명에 있어서, 반응신호란 시료 내의 바이러스 또는 이의 효소와 본 발명의 나노입자가 반응하여 나타내는 신호를 의미하는 것으로, 반응 전과 후를 구분할 수 있는 신호라면 모두 본 발명에 포함되며, 일 예로 색의 변화, 시료 물질의 응집, 형광 발현, 형광 강도의 변화, 전기신호의 변화, 나노입자의 증강 라만 산란 신호 변화 또는 나노입자의 라만 스펙트럼의 변화 등을 모두 포함하는 것으로, 구체적인 종류에 한정되지 않는다.
- [0109] 본 발명의 일 실시예 있어서, 타미플루가 처리된 바이러스 시료에 나노입자를 처리한 후, Ex/Em: 355/400 내지 500nm에서 형광의 발현이 있는 경우 반응신호가 있다고 할 수 있고, 이 경우 시료 내 포함된 바이러스는 타미플루에 저항성을 가지는 것이라고 할 수 있다.
- [0110] 따라서, 상기 반응신호의 측정이란 Ex/Em: 355/400 내지 500nm에서 형광의 발현을 측정하는 것 일 수 있다. 바람직하게는 나노입자에 결합된 4-MUNANA의 형광 발현을 측정하는 것 일 수 있다.
- [0111] 또한, 상기 반응신호의 측정은 일 예로 퓨린 또는 트립신을 포함하는 시료에서 바이러스와 본 발명의 나노입자

를 반응시키는 경우, 상기 효소에 의하여 바이러스가 활성형이 되는지 여부에 따라 나노입자 내의 자기소광 염료에 의한 발광-소광의 변화를 육안으로 확인하는 것 일 수 있다. 이 경우 시료에서 발광반응이 일어나는 경우 바이러스가 활성형이 된 것으로, 퓨린과 반응한 경우라면 상기 반응신호 측정에 의하여 시료 내 바이러스가 고병원성임을 검출할 수 있다.

[0112] 이러한 측면에서 본 발명은 키트의 제1챔버, 제2챔버 및 제3챔버 각각에 시료를 처리하는 것; 상기 시료 시료 처리된 제1챔버, 제2챔버 및 제3챔버 각각에 4-MUNANA를 포함하는 나노입자를 처리하는 것; 및 각 챔버의 상기 처리된 나노입자의 변화를 측정하는 것;을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성 및 바이러스의 고/저병원성 여부를 동시에 확인하는 방법을 제공한다.

[0113] 이 경우, 제1챔버에서 반응신호가 확인된 경우 고병원성 바이러스로 판단할 수 있다. 또한, 제1챔버에서 반응신호가 측정되지 않고, 제2챔버에서만 반응신호가 측정된 경우 상기 시료 내 바이러스는 저병원성 바이러스로 판단할 수 있다. 또한, 제3챔버에서 반응신호가 측정되는 경우 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 갖는 바이러스로 판단하는 것;을 더 포함 할 수 있다.

[0115] 이하, 본 발명을 제조에 및 실험예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0116] [실시예]

[0117] [제조예 1] 뉴라미니다아제 활성 검출 물질이 컨쥬게이션된 양친성 고분자의 제조

[0118] 양친성 고분자는 하기 방법을 통해 합성하여 사용하였다. D,L-류신(D,L-Leucine)과 트리포스젠(Triphosgene)을 용매 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran)에 녹이고, 2시간 반응시킨 뒤 결과물을 n-헥산(n-Hexane)에서 침전시켰다. 12시간 이상 냉동실에서 식힌 후, 감압분리와 n-헥산(n-Hexane) 세척을 반복하여, Leu-NCA(Leucine N-carboxyanhydride)를 합성하였다. 또한, mPEG-아민(mPEG-amine) 또는 카르복시-PEG-아민(carboxy(CM)-PEG-amine) 1g과 Leu-NCA 2.43g을 N,N'-디메틸포름아미드(N,N'-Dimethylformamide)에 녹이고(물비율 1:30), 개환중합(Ring Opening Polymerization, ROP) 반응을 통해 mPEG-b-pLeu 또는 CM-PEG-b-pLeu 을 제조하였다. 디에틸에테르(Diethyl ether)의 존재 하에서 침전하고, 여러 번 세척하여 불순물을 제거하여, 최종적으로 3g의 고분자를 수득하였다.

[0120] 상기에서 합성한 양친성 고분자를 이용하여, 무나나(2'-(4-Methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminic acid)를 컨쥬게이션 하는 방법으로 박테리아 또는 바이러스의 뉴라미니다아제에 대한 활성을 검출할 수 있는 양친성 고분자 MUN-PEG-b-pLeu를 N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드/4-디메틸아민피리딘(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide(DCC)/4-Dimethylaminopyridine(DMAP)) 반응을 통해 카르복시-PEG-b-pLeu(CM-PEG-b-pLeu)의 카르복실기와 무나나의 하이드록시기를 결합시켜 제조하였다.

[0121] 구체적으로, 4-MUNANA 2mg과 카르복시-PEG-b-pLeu 150mg을 DMSO 10ml에 용해하고, 용해하고 80 °C 에서 2시간 교반한 뒤, 40 °C 로 온도를 낮추고 DMAP 28 mg/DMSO 1 ml 와 DCC 1.2 ml/DMSO 1 ml를 동시에 첨가하여 반응시켰다. 24시간 후 반응물을 디에틸에테르(Diethyl ether)에 침전하고 과량의 물로 투석하여 무나나가 결합된 양친성 고분자(MUN-PEG-b-pLeu)를 제조하였다.

[0123] [제조예 2] 자기-소광된 염료(Self-quenched dye)가 담지되고 뉴라미니다제 검출물질이 결합(conjugation)된 숙주세포 모방형 양친성 입자(Tami-FluSome) 제조

[0124] 숙주 세포 표면과 같은 양친성 이중층 입자를 제조하기 위하여, MUN-PEG-b-pLeu과 무나나가 결합되지 않은 양친성 고분자 mPEG-b-pLeu를 2:8 의 비율로 혼합하여 마이셀(Micelle) 또는 폴리머솜(Polymersome) 형태의 양친성 입자를 제조하였다.

[0125] 구체적으로, 디메틸설폭사이드(Dimethylsulfoxide, DMSO) 용매에 제조예1에서 제조한 MUN-PEG-b-pLeu 과 mPEG-b-pLeu 을 2:8 의 물 비율로 용해시키고, 자기-소광된 염료 DiO(Ex: 484nm) 및 DiI(Em: 565nm)를 용해시킨 후, 과량의 물로 투석하여 자기-소광된 염료가 담지된 양친성 입자를 제조하였다.

[0126] 상기 제조된 자기-소광된 염료가 담지된 양친성 입자를 전자현미경(transmission electron microscope, TEM)으로 관찰한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 양친성 입자의 형상을 TEM 이미지로 확인한 결과, 소수성 코어와 친수성 셸을 갖는 마이셀 형태의 구형 입자가 제조되었음을 확인할 수 있었다. 또한, DLS(dynamic light scattering) 법을 이용하여 양친성 입자의 크기를 측정한 결과, 양친성 입자의 크기가 188.2 ± 66.08 nm 임을

확인하였다.

[시험예 1] 무나나를 포함하는 양친성 고분자에 의한 저해제 내성 검출가능성 확인

1-1. 고분자 농도에 따른 검출능 확인

제조예 1에서 제조한 무나나를 포함한 양친성 고분자 MUN-PEG-b-pLeu의 뉴라미니다아제 활성 검출 효과를 확인 하기 위하여, 타미플루에 내성이 있는 바이러스(H1N1, 직접 환자로부터 수득)와 내성이 없는 바이러스(CA04, H1N1)를 각각 포함하는 시료(각 시료에 포함된 바이러스는 $10^{9.5}$ TCID₅₀/mL)에 타미플루 6mg/mL로 30분 동안 처리 한 후, 상기 무나나를 포함한 양친성 고분자 MUN-PEG-b-pLeu의 농도를 달리하여 처리하고, 시간에 따른 형광 발 현세기의 변화를 SpectraMax i3x(Molecular Devices)로 Ex-355, Em-460에서 확인하였다.

구체적으로, 무나나를 포함하는 양친성 고분자(MUN-PEG-b-pLeu)를 처리하는 경우, 최초 농도 2.8×10^{-2} mM(Poly 5^{^(0)}) 처리군)부터 1/5씩 희석한 농도의 고분자를 처리하였고, 각 농도의 고분자 처리군에 대하여 0 분 내지 120분 동안 15분 간격으로 형광변화를 측정하였다.

결과는 타미-플루줌 처리 후 각 시간별 형광 측정값에서 타미-플루줌 처리 전 바이러스와 타미플루만 존재하는 시료의 형광측정값을 뺀 것으로, 하기 식 1에 따라 계산하여 표 1에 결과를 나타내었다.

[식 1]

(타미-플루줌 처리 후 각 시간별 형광) 측정값 - (타미-플루줌 처리전 형광) 측정값

표 1

time	무나나의 농도									
	Poly 5 ^{^(0)}	Poly 5 ^{^(-1)}	Poly 5 ^{^(-2)}	Poly 5 ^{^(-3)}	Poly 5 ^{^(-4)}	Poly 5 ^{^(-5)}	Poly 5 ^{^(-6)}	Poly 5 ^{^(-7)}	Poly 5 ^{^(-8)}	Poly 5 ^{^(-9)}
0	6,067,710	4,517,342	4,134,863	4,112,949	3,974,316	4,192,070	3,655,057	3,865,851	3,956,091	3,927,123
15	9,619,908	5,553,747	4,146,142	3,965,438	4,072,848	4,133,368	3,638,744	3,709,141	3,745,037	3,761,863
30	13,110,542	6,453,359	4,358,359	4,022,244	4,117,360	4,135,542	3,670,226	3,728,370	3,547,617	3,709,509
45	15,635,242	6,658,871	4,581,670	4,133,781	4,152,120	4,206,427	3,735,742	3,794,287	3,587,899	3,825,677
60	17,328,708	7,151,655	4,631,637	4,161,068	4,129,300	4,267,360	3,706,828	3,663,090	3,597,663	3,743,071
75	19,737,922	7,128,780	5,121,224	4,056,246	4,504,775	4,258,603	3,653,056	3,701,697	3,517,746	3,674,969
90	21,708,848	8,055,775	4,827,186	4,112,497	4,162,832	4,377,468	3,737,228	3,617,839	3,512,213	3,709,469
105	24,034,174	8,362,767	4,928,119	4,271,503	4,017,014	4,156,597	3,692,689	3,683,670	3,541,515	3,709,529
120	26,263,160	8,911,181	4,992,770	4,217,039	4,018,420	4,363,115	4,077,525	3,656,215	3,363,811	3,734,189

상기 표 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 내성이 없는 바이러스의 경우, 뉴라미니다아제 저해제인 타미플루에 의 해 바이러스의 뉴라미니다아제가 불활성화되어 무나나와 반응하지 않으므로, 형광 발현을 보이지 않았고, 내성 이 있는 바이러스의 경우, 뉴라미니다아제 저해제에 의한 불활성화가 일어나지 못한바, 고분자에 결합된 무나나 의 농도가 5.6×10^{-3} mM 이상일 때부터, 형광 발현이 검출되었고, 시간이 지남에 따라 형광 세기가 증가함을 확인 하였다. 따라서, 본 발명의 무나나가 결합된 고분자를 이용하여, 바이러스의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내 성여부를 검출할 수 있음을 확인하였다.

1-1. 바이러스 농도에 따른 검출능 확인

제조예 1에서 제조한 무나나를 포함한 양친성 고분자 MUN-PEG-b-pLeu의 뉴라미니다아제 활성 검출 효과를 확인 하기 위하여, 타미플루에 내성이 있는 바이러스와 내성이 없는 바이러스(CA04, H1N1)를 각각 농도를 달리하여 포함하는 시료에 타미플루 6mg/mL로 30분 동안 처리한 후, 상기 무나나를 포함한 양친성 고분자 MUN-PEG-b-pLeu

를 무나나 농도 2.8×10^{-2} mM로 처리하여 시간에 따른 형광(Ex/Em: 355/440 nm) 발현세기를 SpectraMax i3x(Molecular Devices)로 확인하였다.

[0140] 구체적 인 바이러스의 농도는 하기 표 2에 나타난 바와 같고, 결과는 타미-플루존 처리 후 각 시간별 형광 측정 값에서 타미-플루존 처리전 바이러스와 타미플루만 존재하는 시료의 형광측정값을 뺀 것으로, 결과는 하기 식 1에 따라 계산하여 표 3 및 도 3에 나타내었다.

[0141] [식 1]

[0142] (타미-플루존 처리 후 각 시간별 형광) 측정값 - (타미-플루존 처리전 형광) 측정값

표 2

[0143]

비-내성(EID50/ml)	타미플루-내성(EID50/ml)
167	5
33.4	1
6.7	0.2
1.3	0.4×10^{-1}
2.7×10^{-1}	0.8×10^{-2}
5.3×10^{-2}	1.6×10^{-3}
1.1×10^{-2}	3.2×10^{-4}

표 3

[0144]

time	바이러스 농도									
	Virus 5 ^{^(0)}	Virus 5 ^{^(-1)}	Virus 5 ^{^(-2)}	Virus 5 ^{^(-3)}	Virus 5 ^{^(-4)}	Virus 5 ^{^(-5)}	Virus 5 ^{^(-6)}	Virus 5 ^{^(-7)}	Virus 5 ^{^(-8)}	Virus 5 ^{^(-9)}
0	4906516	2581512	1195526	781562	681201	699772	684523	597901	645137	618659
15	7922354	5446590	2047967	985761	711976	645343	703319	646283	678572	659292
30	11075981	7754519	2903451	1157252	752925	671303	735918	655604	645702	677035
45	12971526	10161384	3906298	1279257	808628	743463	691118	686447	712576	682964
60	15182404	12298402	4684359	1493792	854566	765410	734937	689744	684567	646000
75	16571086	14531799	5213991	1644420	884443	766401	754150	697220	694886	658001
90	19078002	16113730	6102155	1738188	879394	810370	723800	675528	701456	672839
105	20925842	17508104	7072473	1940278	897741	804827	766811	652766	685485	656806
120	22483502	18837244	7655436	2179491	967243	823281	792728	735257	696689	725070

[0145] 표3 및 도 3에 나타난 바와 같이, 타미플루에 내성이 없는 바이러스의 경우, 뉴라미니다아제가 타미플루에 의해 불활성화되므로 고분자에 컨쥬게이션된 무나나의 검출 파장대에서 형광이 발현되지 않았고, 내성이 있는 바이러스의 경우, 바이러스 농도가 0.2 EID50/ml 이상일 때 형광 발현여부로 검출이 가능함을 확인하였다.

[0147] [시험예 2] 나노입자에 의한 저해제 내성 검출가능성 확인

[0148] 2-1. 나노입자의 농도에 따른 검출효과 확인

[0149] 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 검출할 수 있는 나노입자의 최소 농도를 확인하기 위한 실험을 실시하였다.

[0150] 구체적으로, 나노입자는 MUN-PEG-b-pLeu/mPEG-b-pLeu을 이용하여 제조예 2에서 제조한 나노입자(이하, Tami-

FluSome)를 이용하였고, 타미플루에 내성이 있는 바이러스와 내성이 없는 바이러스(CA04, H1N1)를 포함하는 시료(각 시료에 포함된 바이러스는 $10^{9.5}$ TCID₅₀/mL)를 각각 준비하였다. 상기 시료 각각에 타미플루 6mg/mL로 30분 동안 처리한 후, 농도가 다른 나노입자를 각각 처리하여 SpectraMax i3x(Molecular Devices)로 Ex-355, Em-460에서 형광 발현세기를 확인하였다.

[0151] 처리된 나노입자의 농도 및 무나나의 농도는 하기 표 4에 나타낸 바와 같다.

표 4

[0152]

Tami-FluSome(mg/ml)	4-MUNANA(mM)
0.77	2.3×10^{-3}
0.15	4.6×10^{-4}
0.03	9.2×10^{-5}
6×10^{-3}	1.8×10^{-5}
1.2×10^{-3}	3.7×10^{-6}
2.5×10^{-4}	7.4×10^{-7}
4.9×10^{-5}	1.5×10^{-7}

[0153] 도 4에 나타낸 바와 같이, 내성이 없는 바이러스의 경우, 뉴라미니다아제가 타미플루에 의해 불활성화되어 본원 발명 나노입자의 검출 파장대인 Ex/Em: 355/460nm에서 형광이 발현되지 않았고, 타미플루에 대한 내성이 있는 바이러스의 경우, 나노입자 농도가 0.77mg/ml(입자에 포함된 무나나 농도: 2.3×10^{-3} mM) 이상일 때 해당 파장대에서 유의미하게 형광이 발현되는 것을 확인하였다.

[0155] 2-2. 바이러스의 농도에 따른 검출효과 확인

[0156] 본 발명의 뉴라미니다아제 저해제에 대한 내성을 검출할 수 있는 나노입자를 이용하는 경우 검출가능한 바이러스의 최소 농도를 확인하기 위한 실험을 실시하였다.

[0157] 구체적으로 타미플루에 내성이 있는 바이러스와 내성이 없는 바이러스(CA04, H1N1)를 농도를 달리하여 시료를 준비하고, 각각 타미플루 6mg/mL로 30분 동안 처리하고, 제조예 2에서 제조한 Tami-FluSome(0.77 mg/ml, 무나나 농도: 2.3×10^{-3} mM)를 처리 한 후, 형광 파장대 (Ex/Em: 355/460 nm)에 따른 형광 발현세기를 확인하였다.

[0158] 각 시료의 바이러스의 농도는 하기 표 5에 나타낸 바와 같다.

표 5

[0159]

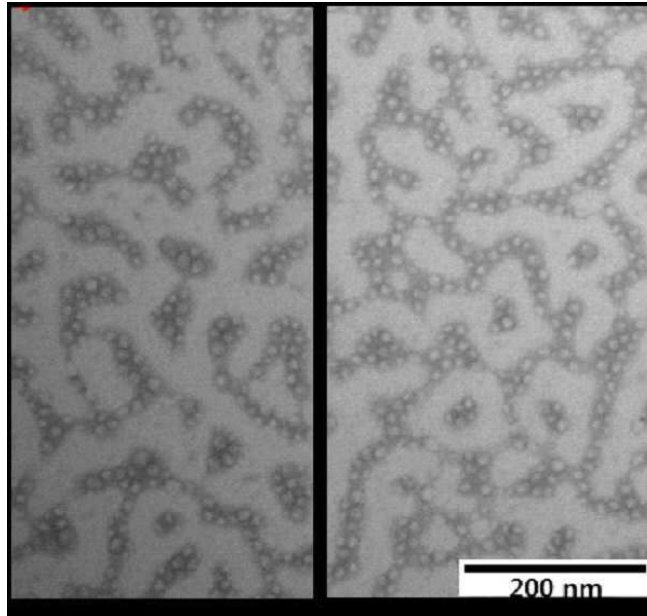
비-내성 바이러스 (EID50/ml)	타미플루-내성 바이러스 (EID50/ml)
167	5
16.7	0.5
1.7	0.5×10^{-1}
1.7×10^{-1}	0.5×10^{-2}
1.7×10^{-2}	0.5×10^{-3}
1.7×10^{-3}	0.5×10^{-4}
1.7×10^{-4}	0.5×10^{-5}

[0160] 도 5에 나타낸 바와 같이, 내성이 없는 바이러스의 경우, 뉴라미니다아제가 타미플루에 의해 불활성화되어 나노입자에 결합된 무나나의 검출 파장대인 Ex/Em: 355/440nm에서 형광이 매우 낮게 발현되었고, 내성이 있는 바이

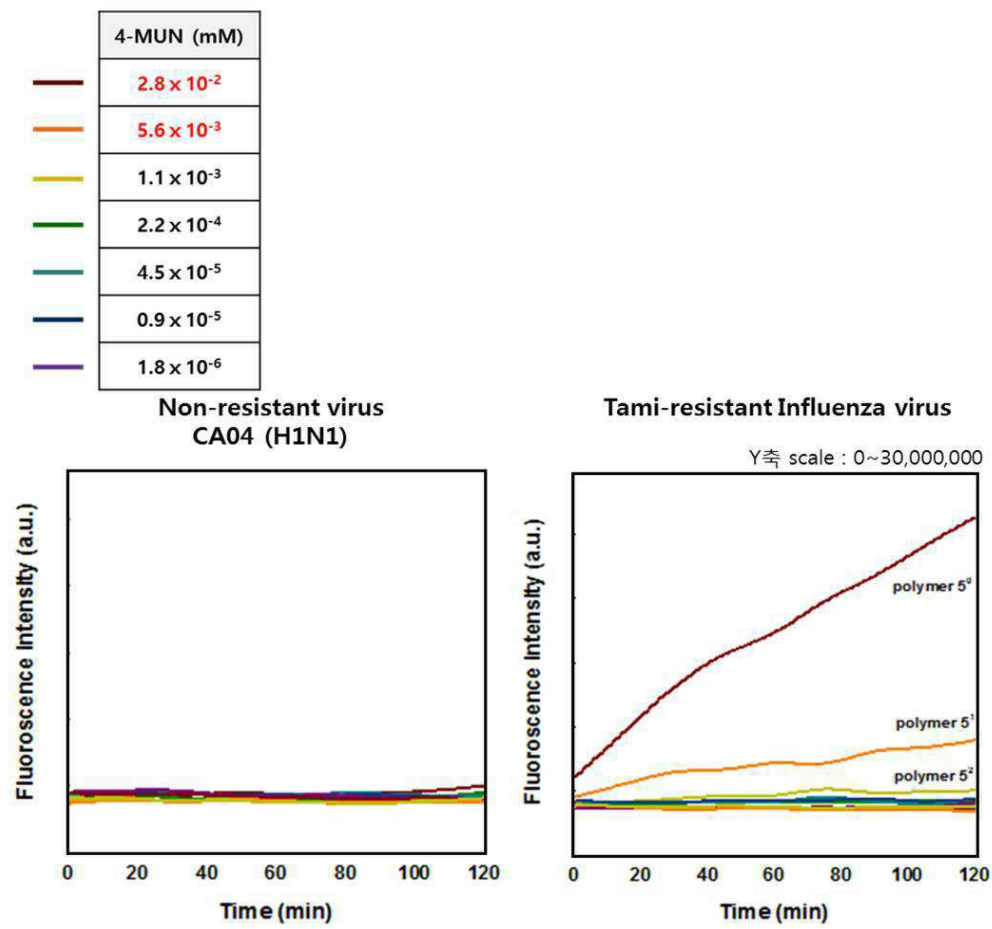
러스의 경우, 바이러스의 농도가 0.5×10^{-2} EID₅₀/ml 이상일 때 해당 파장대에서 형광이 발생되어 유의미한 차이를 보임을 확인하였고, 이를 통해 바이러스의 경우 10^{-4} 희석 농도까지 본 발명의 나노입자로 진단이 가능함을 확인하였다.

도면

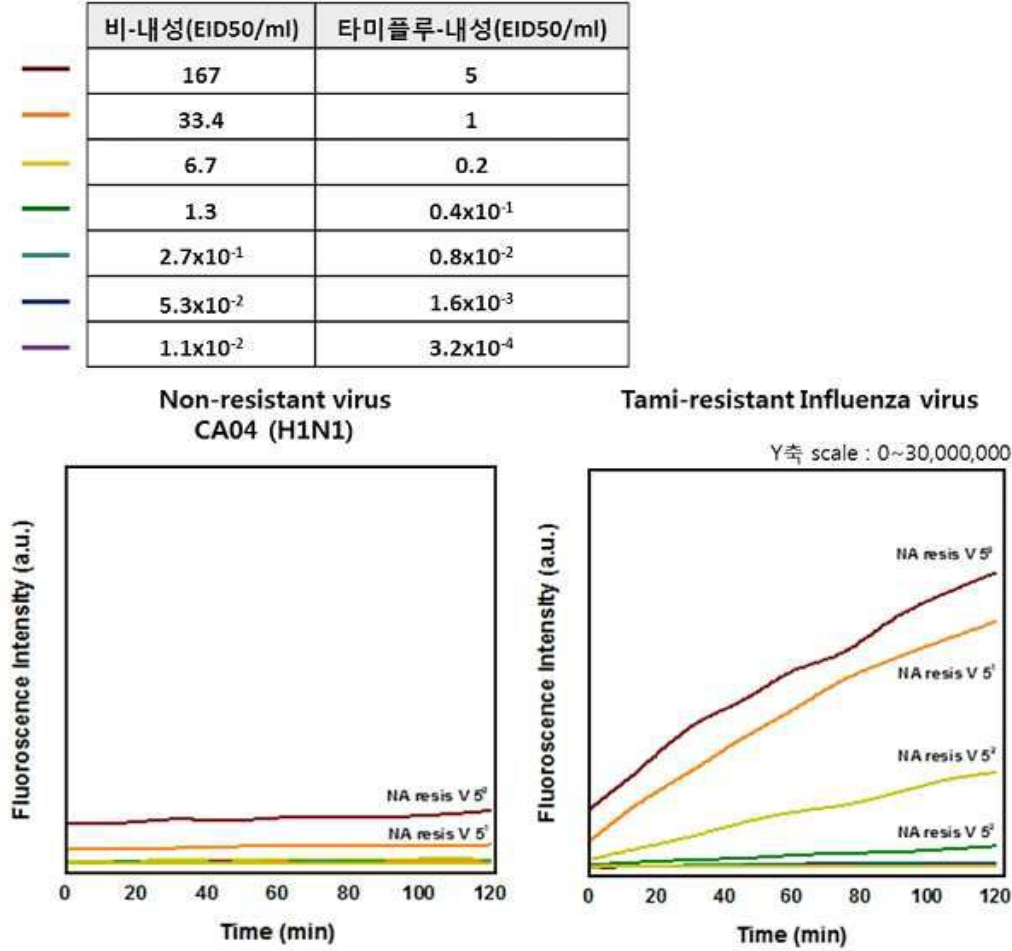
도면1



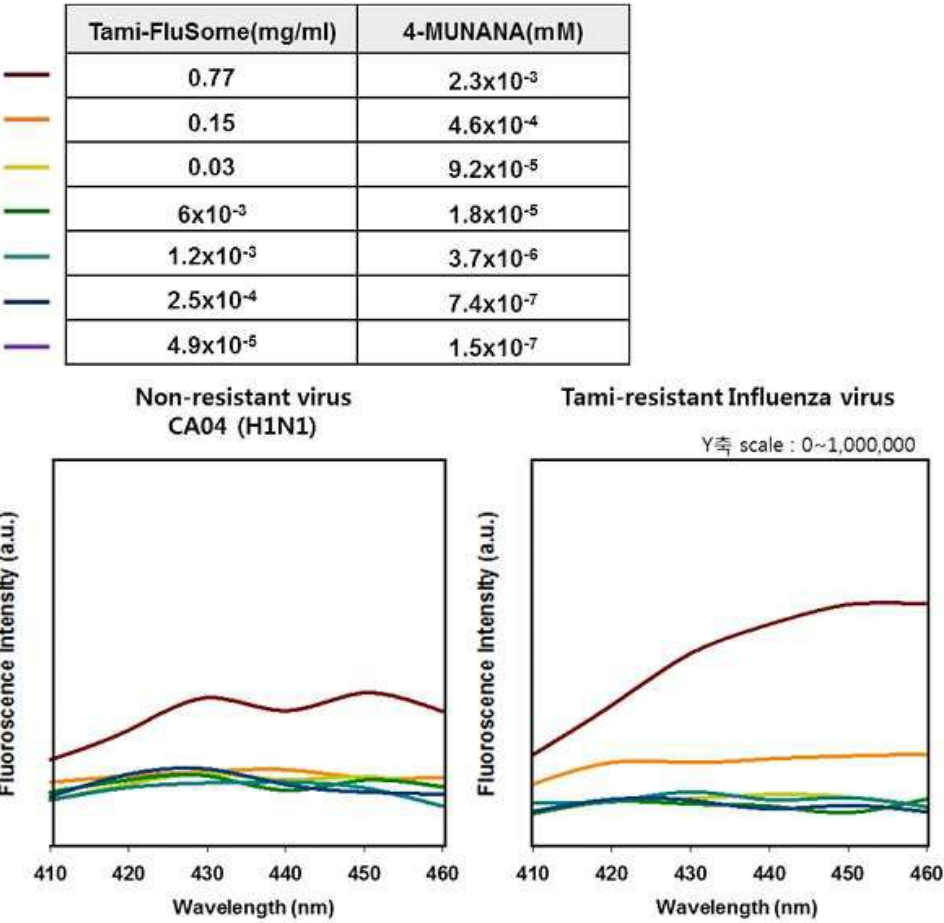
도면2



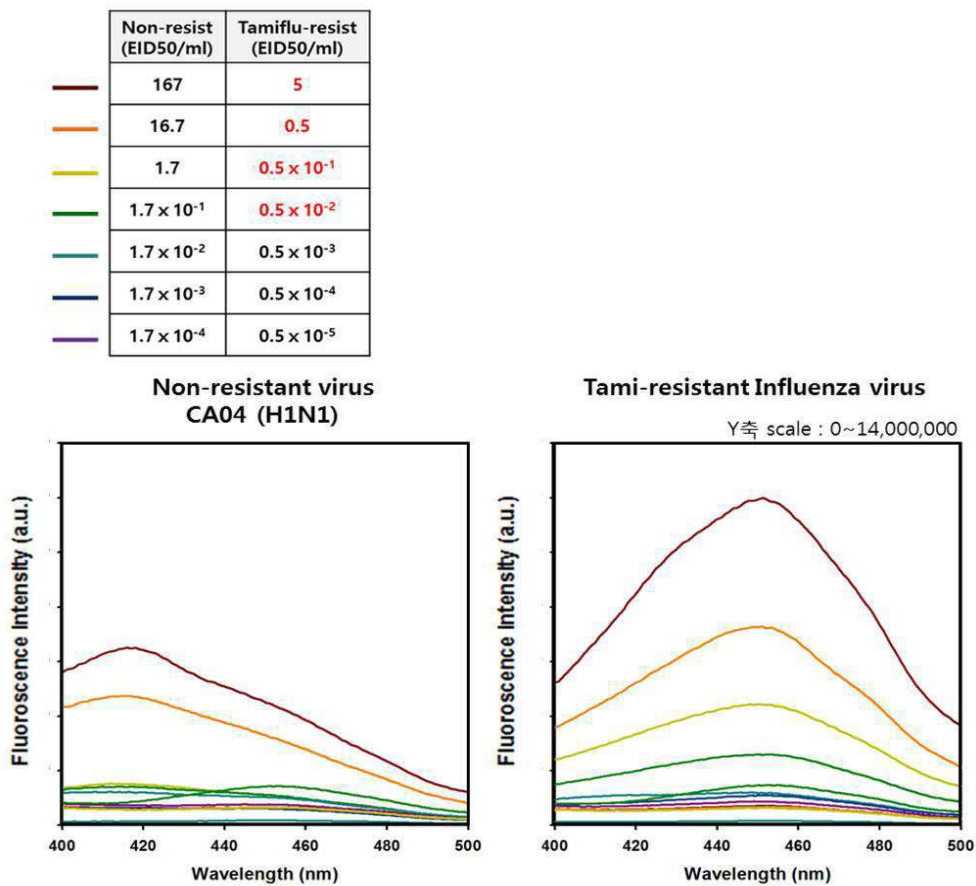
도면3



도면4



도면5



도면6

