



(51) 국제특허분류:

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

B01D 15/26 (2006.01)

B01D 61/14 (2006.01)

B01D 63/02 (2006.01)

B01J 20/289 (2006.01)

B01J 31/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/001622

(22) 국제출원일:

2019년 2월 11일 (11.02.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0037375 2018년 3월 30일 (30.03.2018) KR

(71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 신용 (SHIN, Yong); 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, 아산생명과학연구원 융합연구관 6층, Seoul (KR). 류혜방 (LIU, Huifang); 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동), Seoul (KR).

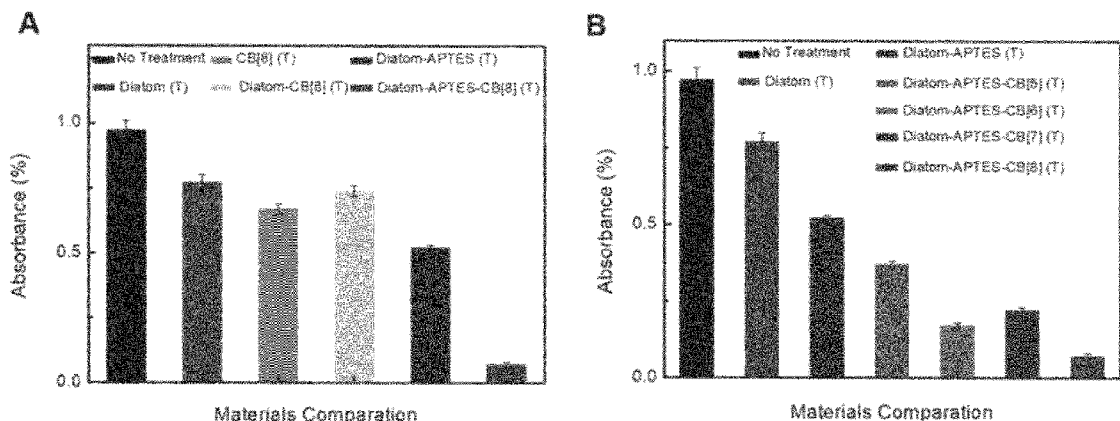
(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: METHOD FOR CONCENTRATING PATHOGEN USING DIATOMS AND CUCURBITURILS

(54) 발명의 명칭: 규조류 및 쿠커비투릴을 이용한 병원체 농축 방법

[도 2]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for concentrating a pathogen using diatoms and cucurbiturils. According to the present invention, a diatom-cucurbituril composite, which is prepared by modifying the surface of diatoms with a silane compound and binding cucurbiturils to an amine group of the silane compound via non-covalent bonds, can effectively capture (remove) a pathogen from a sample containing the pathogen and concentrate the pathogen. Thus, when the diatom-cucurbituril composite is used, a pathogen may be easily removed from a sample containing the pathogen, or from various biological samples isolated from a subject suspected of being infected with the pathogen. In addition, the diatom-cucurbituril composite of the present invention may be used in columns, filters, and the like, and thus can be applied to various fields.



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 구조류 및 쿠키비투릴을 이용한 병원체 농축 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 구조 표면을 실란 화합물로 개질시키고, 상기 실란 화합물의 아민기에 쿠키비투릴을 비공유결합으로 결합시켜 제조되는 구조-쿠키비투릴 복합체는 병원체가 함유된 시료에서 병원체를 효과적으로 포획(제거) 및 농축시킬 수 있는 바, 이를 이용하면 병원체가 함유된 시료, 또는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체로부터 분리된 다양한 생물 시료로부터 병원체를 용이하게 제거할 수 있다. 또한, 본 발명의 구조-쿠키비투릴 복합체는 컬럼, 필터 등에 적용되어 다양한 분야에 응용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 규조류 및 쿠커비투릴을 이용한 병원체 농축 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 규조류 및 쿠커비투릴을 이용한 병원체 포획 및 농축 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 규조류(Diatom)는 2 μm ~ 2 mm 까지의 다양한 크기로 분포하는 단세포 조류로 지구상에서 흔히 볼 수 있는 대표적인 식물성 플랑크톤이다. 규조류는 육상 총 1차 생산량의 20 ~ 25%를 차지하고, 해상 생물량 생산의 40%를 차지하고 있기 때문에 수백만 년 동안 해양의 생산자로서 생태계에 중요한 역할을 담당해오고 있다. 또한, 규조토(Diatomaceous earth)는 규조류 세포막의 주성분인 천연 규산질 소재로서, 450°C에서 가소되고, 표면에 하이드록실기가 풍부한 실리카로 구성되므로 바이오-실리카(bio-silica)라고도 알려져 있다. 바이오-실리카의 크기는 대략 10 ~ 20 μm 정도이다. 최근, 규조류 또는 규조토를 이용하여 무기소재, 생물환경 소재, 나노공학 소재 또는 산업적 응용 소재로써 활용하려는 연구가 활발히 진행 중에 있다.
- [3] 쿠커비투릴은 1905년 베렌드(R. Behrend), 마이어(E. Meyer), 러셰(F. Rusche)에 의하여 최초로 보고된 물질로서, 1981년 목(W. Mock)과 공동 연구자들은 상기 물질이 여섯 개의 단량체가 모여 고리를 이룬 거대한 고리 화합물로 $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_{24}\text{O}_{12}$ 의 화학식을 갖는다는 사실을 밝혀냈으며, X-선 회절법에 의해 그 구조를 확인하였다(J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 7367). 이들은 상기 화합물을 쿠커비투릴[6]이라고 명명하였다. 이후 2000년에 들어서면서 김기문과 공동 연구자들은 기존의 쿠커비투릴[6]의 합성방법을 개선하여 쿠커비투릴[6] 뿐만 아니라 동족체인 쿠커비투릴[n] (n = 5, 7, 8)들을 합성 및 분리하였고, 각각의 구조를 X-선 회절법으로 확인하였다(J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 540).
- [4] 쿠커비투릴은 거대고리분자 화합물로서 친유성의 동공을 가지고, 친수성의 입구를 양쪽에 가지고 있다. 그러므로, 쿠커비투릴은 동공 내에서는 친유성 상호작용이 이루어지며, 6개의 카르보닐기가 위치한 상하의 두 입구에서는 각각 수소결합, 극성상호작용, 양이온-극성 상호작용 등이 이루어져, 다양한 종류의 화합물들과 대단히 안정적인 비공유결합을 통한 포집 효과를 나타낸다. 특히 아미노기, 카르복실산 등의 작용기를 가진 화합물에 대해서 매우 안정적인 비공유결합을 통한 복합체를 형성하며, 이러한 특성으로 인해 다양한 약물전달시스템 개발에 지속적으로 연구되고 있다.
- [5] 한편, 물은 많은 다양한 종류의 바이러스와 같은 나노 크기의 병원체를 함유하고 있다. 다양한 환경에서, 이러한 바이러스들은 물이 사용되기 전에 반드시 제거되어야 한다. 그러나, 현대 정수 수단에도 불구하고, 저개발 국가 등

많은 인구는 위험에 처해 있으며, 증가하는 인구 밀도, 부족한 수 자원, 수 처리 시설의 미비로 오염된 물에 노출되어 치명적인 결과를 야기한다. 또한, 최근 들어 생명공학을 비롯한 진단의학, 약물의학, 대사의학 등 다양한 분야에서도 생물 시료로부터 보다 신속하고 순수하게 병원체를 분리하고자 하는 노력이 계속되고 있다.

- [6] 이에, 다양한 시료로부터 병원체를 제거하는 새로운 기술의 개발이 필요한 실정이며, 규조류에 쿠커비투릴 접목을 통한 병원체 농축 및 제거 기술은 현재까지 보고된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

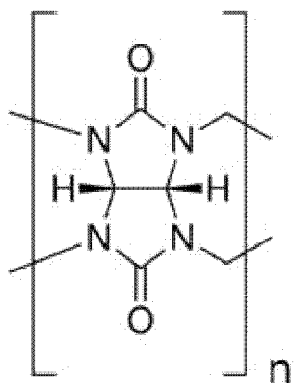
- [7] 본 발명의 목적은 실란 화합물로 개질된 규조 및 쿠커비투릴을 함유하는 복합체를 포함하는 병원체 농축용 조성물, 이를 이용한 병원체 농축용 키트, 병원체 농축용 멤브레인 필터를 제공하는 데에 있다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 복합체를 이용한 병원체 농축 방법을 제공하는 데에 있다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 병원체 농축을 위한 상기 복합체의 용도를 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 실란 화합물로 개질된 규조(Diatom); 및 하기 화학식 1로 표시되며, 상기 실란 화합물의 아민기에 결합하는 쿠커비투릴(cucurbituril)을 함유하는 복합체를 포함하는 병원체 농축용 조성물을 제공한다.

- [11] [화학식 1]

[12]



- [13] 상기 화학식 1에서 n 은 5 내지 8의 정수임.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원체 농축용 키트를 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원체 농축용 멤브레인 필터를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 복합체를 병원체가 함유된 시료와 반응시키는 단계를

포함하는 병원체 농축 방법을 제공한다.

- [17] 또한, 본 발명은 병원체 농축을 위한 상기 복합체의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [18] 본 발명에 따르면, 규조 표면을 실란 화합물로 개질시키고, 상기 실란 화합물의 아민기에 쿠커비투릴을 비공유결합으로 결합시켜 제조되는 규조-쿠커비투릴 복합체는 병원체가 함유된 시료에서 병원체를 효과적으로 포획(제거) 및 농축시킬 수 있는 바, 이를 이용하면 병원체가 함유된 시료, 또는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체로부터 분리된 다양한 생물 시료로부터 병원체를 용이하게 제거할 수 있다. 또한, 본 발명의 규조-쿠커비투릴 복합체는 컬럼, 필터 등에 적용되어 다양한 분야에 응용될 수 있다.

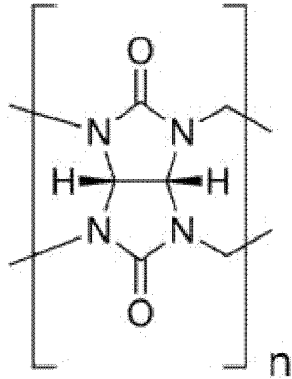
도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조에 쿠커비투릴을 결합시킨 규조-쿠커비투릴 복합체를 도시하여 나타낸 것이다.
- [20] 도 2는 규조 단독(D), 쿠커비투릴(CB[X]), 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조(DA), 규조-쿠커비투릴(D-CB[X]), 및 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조-쿠커비투릴(DA-CB[X])의 병원체 포획 효율을 비교한 결과이다.
- [21] 도 3은 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조-쿠커비투릴(DA-CB[X])의 병원체 포획 및 농축 효율을 DNA 추출 및 실시간 중합효소 연쇄 반응으로 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 본 발명의 발명자들은 규조 표면을 APTES로 처리하여 아민기로 개질시키고, 상기 아민기에 쿠커비투릴을 비공유결합으로 결합시켜 규조-쿠커비투릴 복합체를 제조하였으며, 상기 규조-쿠커비투릴 복합체가 병원체가 함유된 시료에서 병원체 포획(제거) 및 농축 효율을 증가시키는 것을 확인하며 본 발명을 완성하였다.
- [23]
- [24] 본 발명은 실란 화합물로 개질된 규조(Diatom); 및 하기 화학식 1로 표시되며, 상기 실란 화합물의 아민기에 결합하는 쿠커비투릴(cucurbituril)을 함유하는 복합체를 포함하는 병원체 농축용 조성물을 제공한다.
- [25] [화학식 1]

[26]

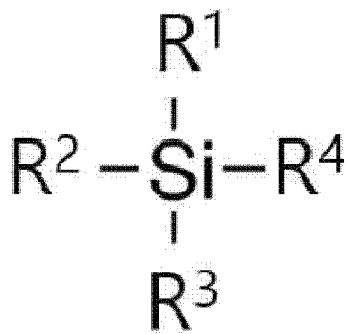
[27] 상기 화학식 1에서 n 은 5 내지 8의 정수임.

[28]

[29] 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[30] [화학식 2]

[31]

[32] 상기 식에서, R^1 내지 R^3 는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R^4 는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

[33] 보다 바람직하게는, 상기 실란 화합물은

(3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),

(3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),

(1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),

(2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),

(4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),

(5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),

(6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),

3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane),

N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylene diamine),

[3- (2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및
3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[34] 상기 실란 화합물의 아민기는 쿠커비투릴과 비공유결합으로 결합될 수 있다.

[35] 상기 병원체는 미생물일 수 있으며, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[36]

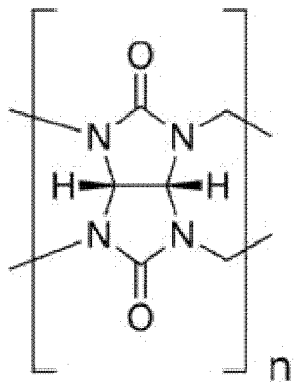
[37] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원체 농축용 키트를 제공한다. 상기 멤브레인 필터는 역삼투압 필터, 중공사막 필터, 한외여과막 필터, 나노- 및 마이크로-여과막 필터로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[38]

[39] 또한, 본 발명은 실란 화합물로 개질된 규조(Diatom); 및 하기 화학식 1로 표시되며, 상기 실란 화합물의 아민기에 결합하는 쿠커비투릴(cucurbituril)을 함유하는 복합체를 병원체가 함유된 시료와 반응시키는 단계를 포함하는 병원체 농축 방법을 제공한다.

[40] [화학식 1]

[41]



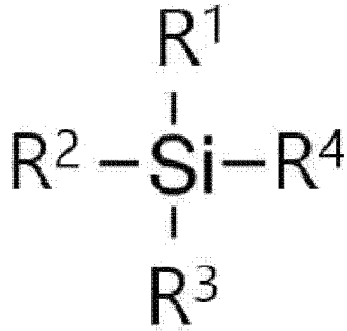
[42] 상기 화학식 1에서 n은 5 내지 8의 정수임.

[43] 상기 시료는 병원체가 함유되어 있는 시료를 포함하여, 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직 등 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체로부터 분리된 다양한 생물 시료일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[44] 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[45] [화학식 2]

[46]



[47] 상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

[48] 상기 실란 화합물은

(3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
 (3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
 (1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
 (2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),
 (4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
 (5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
 (6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylene diamine),
 [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및
 3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[49]

[50] 또한, 본 발명은 병원체 농축을 위한 상기 복합체의 용도를 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[51] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[52]

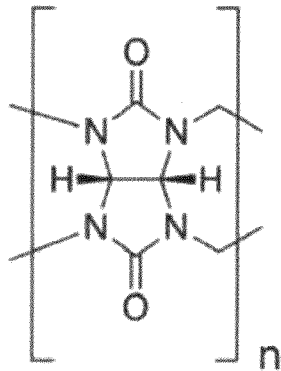
[53] 실시예 1: 규조-쿠커비투릴 복합체 제조

- [54] 하기 화학식 1 및 하기 표 1과 같이, 쿠커비투릴(cucurbituril; CB)은 5-8 개의 단량체가 모여 고리를 이룬 거대고리 화합물로 CB[5], CB[6], CB[7], CB[8], 4개의 동족체가 존재한다. 쿠커비투릴은 친유성의 동공을 가지고, 친수성의 입구를 양쪽에 가지고 있어, 동공 내에서는 친유성 상호작용이 이루어지며, 카르보닐기가 위치한 상하의 두 입구에서는 각각 수소결합, 극성상호작용, 양이온-극성 상호작용 등이 이루어져, 다양한 종류의 화합물들과 대단히 안정적인 비공유결합을 통한 포접 효과를 나타낸다. 특히 아미노기, 카르복실산 등의 작용기를 가진 화합물에 대해서 매우 안정적인 비공유결합을 통한 복합체의 형성이 가능하다.

[55]

[56] [화학식 1]

[57]



[58]

[59] [표 1]

	Molecular	Price	Solubility (in DW)	Outer / Cavity / Portal (Diameter / Å) Height / Å, Cavity volume / Å ³
CB[5]	C ₃₀ H ₃₀ N ₂₀ O ₁₀ (830.24 g/mol)	133,000 W / 100mg	~1 * 10 ⁻² mol (0.0083 g/ mL)	13.1Å / 4.4Å / 2.4Å 9.1Å / 82Å ³
CB[6]	C ₃₆ H ₃₆ N ₂₄ O ₁₂ (996.29 g/mol)	194,000 W / 1g	~1 * 10 ⁻⁵ mol (0.00000996 g/mL)	14.4Å / 5.8Å / 3.9Å 9.1Å / 164Å ³
CB[7]	C ₄₂ H ₄₂ N ₂₈ O ₁₄ (1162.34 g/mol)	272,000 W / 100mg	~1 * 10 ⁻² mol (0.0116 g/mL)	16Å / 7.3Å / 5.4Å 9.1Å / 279Å ³
CB[8]	C ₄₈ H ₄₈ N ₃₂ O ₁₆ (1328.39 g/mol)	562,000 W / 100mg	~1 * 10 ⁻⁵ mol (0.00001328 g/mL)	17.5Å / 8.8Å / 6.9Å 9.1Å / 479Å ³

[60]

- [61] 본 발명에서는 도 1과 같이, 규조(Diatom)에 (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES)을 처리하여 규조 표면을 아민기(amine group)로 개질시켰다. 간략하게, 규조토를

탈이온수(deionized water)에 침전시켜 정제한 후, 정제된 규조토 1 g을 95% EtOH 용액 100 ml에 넣고, APTES 3 ml를 첨가하여 상온에서 4시간 동안 반응시켰다. 이후 에탄올로 세척하고 진공 건조시켜 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조(amine-functionalized D; DA)를 제조하였다.

- [62] 상기 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조에 다양한 유형의 쿠커비투릴을 각각 처리하여 규조-쿠커비투릴(DA-CB[X], X=5-8) 복합체를 제조하였다. 본 발명에서 사용된 쿠커비투릴 CB[5] (ca. 545198), CB[6] (ca. 94544), CB[7] (ca. 545201) 및 CB[8] (ca. 545228)은 Sigma-Aldrich에서 구매하였으며, 미네랄 워터를 이용하여 0.001 g/ml 농도의 CB[X] 용액으로 제조하여 사용하였다. 복합체 제조를 위해서, 상기 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조 9 ml(50 mg/ml)에 CB[X] 1 ml(0.001 mg/ml)을 넣고 상온(room temperature)에서 20분 동안 반응시켰다. 제조된 복합체는 실험에 따라 필요한 용량을 사용하였다.

[63]

- [64] **실시예 2: 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조 및 쿠커비투릴 복합체의 병원체 포획 효율 분석**

- [65] 큐벳(Cuvette, 4 ml)에 병원체(대장균, Abs : 0.99)가 함유되어 있는 시료를 3 ml 첨가하고, 규조 단독(D), 쿠커비투릴(CB[X]), 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조(DA), 규조-쿠커비투릴(D-CB[X]), 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조-쿠커비투릴(DA-CB[X]) 용액을 각각 50 mg/ml의 농도로 제조한 후, 각 용액을 상기 큐벳에 100 μ l씩 첨가하였다. 이후 2분 동안 혼합하고 50분 동안 반응시킨 다음 100 μ l의 상층액을 취하였다. 분광광도계(spectrophotometer, Biochrom Libra S22 UV/Vis)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하고, 병원체 포획 효율을 분석하였다.

- [66] 그 결과, 도 2A는 병원체가 함유된 시료에 규조 단독(D), 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조(DA), 쿠커비투릴8(CB[8]), 규조-쿠커비투릴8(D-CB[8]), 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조-쿠커비투릴8(DA-CB[8])을 처리한 후 흡광도를 측정한 것으로, DA-CB[8] 복합체의 평균 흡광도가 약 0.07 (표준편차: 0.01)로 다른 물질들 보다 병원체 포획능이 안정적이고 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다.

- [67] 도 2B는 병원체가 함유된 시료에 쿠커비투릴의 유형을 달리한 DA-CB[X](X = 5, 6, 7, 8)를 처리한 후 흡광도를 측정한 것으로, DA 단독에 비해 DA-CB[X] 복합체를 처리한 경우, 병원체 포획능이 증가하였으며, 복합체 중에서도 DA-CB[8] 복합체가 가장 우수한 병원체 포획능을 나타내었다.

[68]

- [69] **실시예 3: 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조 및 쿠커비투릴 복합체의 병원체 농축 효율 분석**

- [70] 아민기-함유 실란 화합물로 개질된 규조(DA)에 CB 유형을 달리한 DA-CB[X] 용액을 각각 50 mg/ml의 농도로 제조한 후, 병원체(대장균, CFU : 10^5)가

함유되어 있는 시료 1 ml에 40 μ l씩 첨가하였다. 대조군으로는 50 μ l의 탈이온수를 사용하였다. 이후 2분 동안 혼합하고 30분 동안 반응시킨 다음 원심분리하였으며, 100 μ l의 상층액(도 3, supernatant of add DA-CB[X]) 및 튜브 침전물(도 3, eluted from DA-CB[X])에 각각 200 μ l의 용해 완충액을 첨가하여 병원체 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA로 실시간 중합효소 연쇄 반응(Real time-PCR)을 수행하여 병원체 DNA의 양을 비교하였다.

[71] 그 결과, 도 3A 및 도 3B는 각 조건에서 추출된 병원체 DNA의 형광 신호 및 용융 곡선을 나타낸 것으로, DA-CB[X] 복합체와 함께 침전된 침전물(eluted from DA-CB[X])의 DNA 형광 신호가 병원체(positive, 양성 대조군) 또는 상층액(supernatant of add DA-CB[X])으로부터 추출된 DNA 보다 더 빠른 cycle threshold를 나타내는 것을 확인한 바, DA-CB[X] 복합체가 시료에 함유되어 있는 병원체를 효율적으로 포획 및 농축하는 것을 확인할 수 있었다.

[72]

[73] 즉, DA-CB[X]의 삼원 복합체는 병원체가 함유되어 있는 시료에서 병원균 포획(제거) 및 농축에 효과적이며, 다양한 쿠커비투릴 유형 중 CB[8]이 가장 우수한 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[74]

[75] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

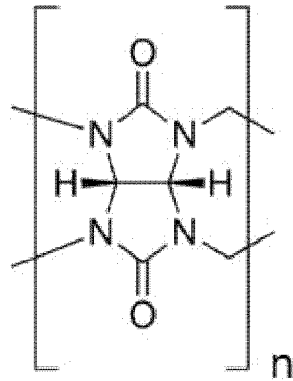
[76]

본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 실란 화합물로 개질된 규조(Diatom); 및 하기 화학식 1로 표시되며, 상기 실란 화합물의 아민기에 결합하는 쿠커비투릴(cucurbituril)을 함유하는 복합체를 포함하는 병원체 농축용 조성물:

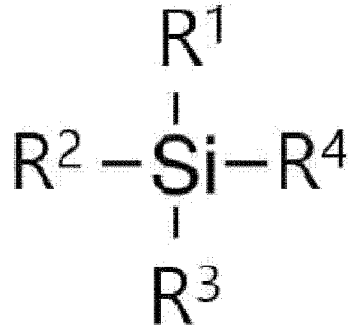
[화학식 1]



상기 화학식 1에서 n은 5 내지 8의 정수임.

- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 병원체 농축용 조성물:

[화학식 2]



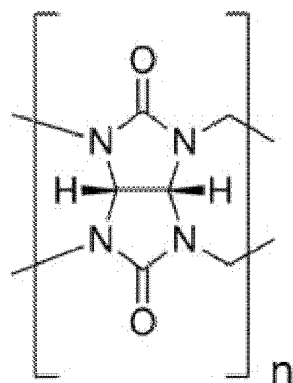
상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 실란 화합물은
 (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
 (3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
 (1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
 (2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),

(4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
 (5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
 (6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine),
 [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및
 3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 병원체 농축용 조성물.

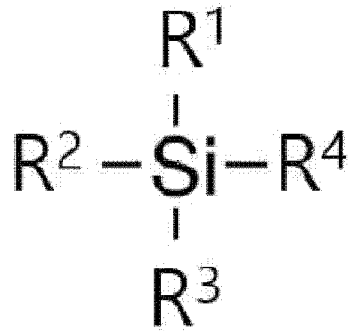
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 실란 화합물의 아민기는 쿠커비투릴과 비공유결합으로 결합되는 것을 특징으로 하는 병원체 농축용 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 병원체는 미생물인 것을 특징으로 하는 병원체 농축용 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타인 것을 특징으로 하는 병원체 농축용 조성물.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 병원체 농축용 키트.
- [청구항 8] 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 병원체 농축용 멤브레인 필터.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 멤브레인 필터는 역삼투압 필터, 중공사막 필터, 한외여과막 필터, 나노- 및 마이크로-여과막 필터로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 병원체 농축용 멤브레인 필터.
- [청구항 10] 실란 화합물로 개질된 규조(Diatom); 및 하기 화학식 1로 표시되며, 상기 실란 화합물의 아민기에 결합하는 쿠커비투릴(cucurbituril)을 함유하는 복합체를 병원체가 함유된 시료와 반응시키는 단계를 포함하는 병원체 농축 방법:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 n은 5 내지 8의 정수임.

- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 방법:
[화학식 2]



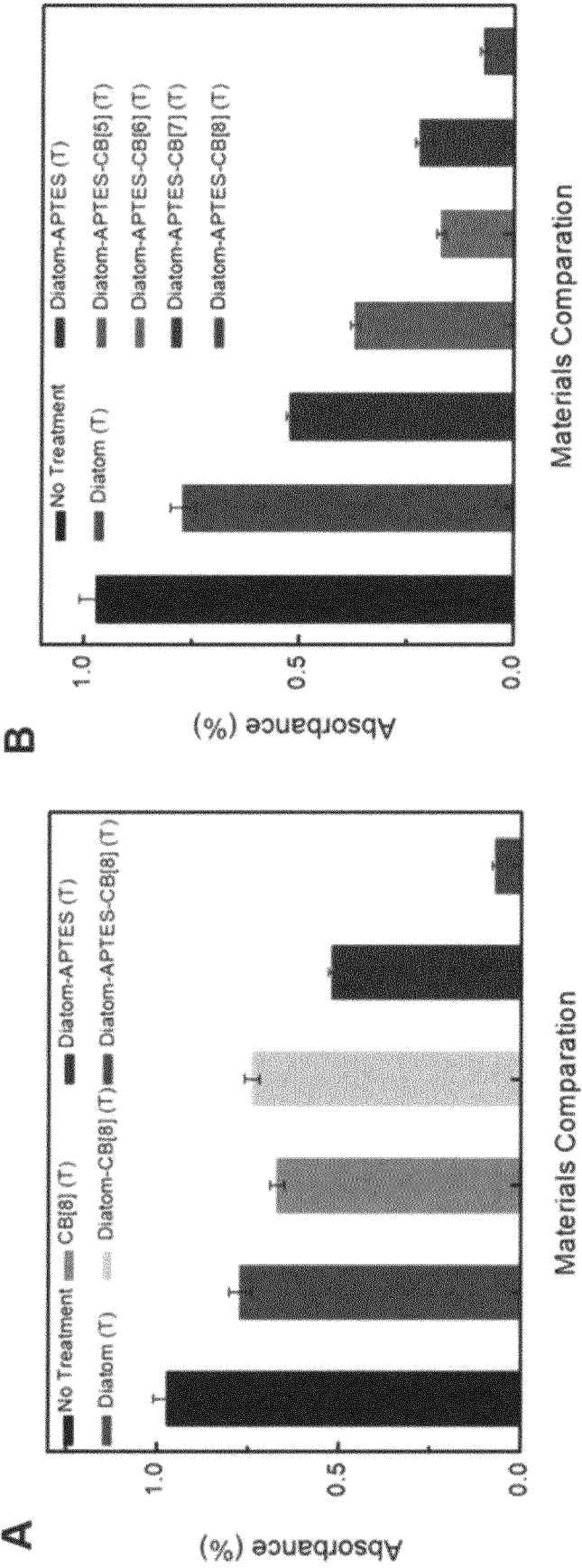
상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

- [청구항 12] 제 11항에 있어서, 상기 실란 화합물은
(3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
(3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
(1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
(2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),
(4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
(5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
(6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane),
N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine),
[3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및
3-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 방법.

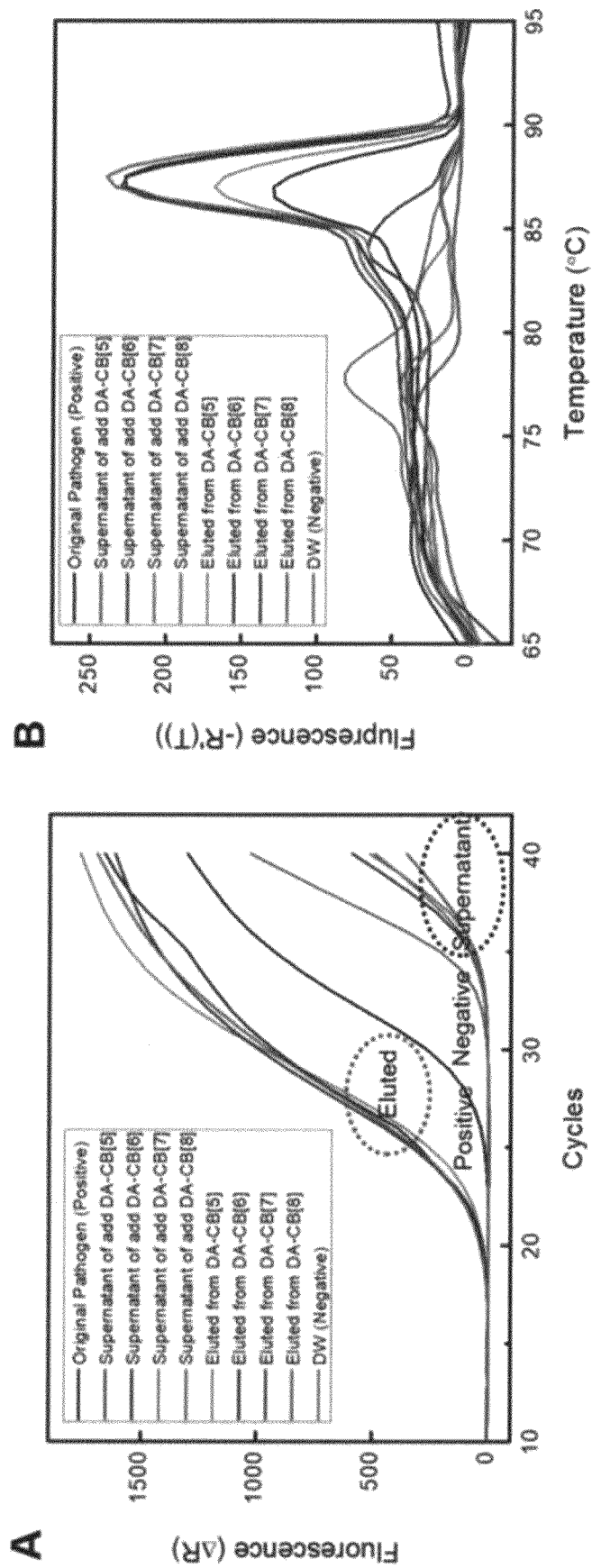
[도 1]



[도 2]



[도 3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/001622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/02(2006.01)i, C12N 7/00(2006.01)i, B01D 15/26(2006.01)i, B01D 61/14(2006.01)i, B01D 63/02(2006.01)i, B01J 20/289(2006.01)i, B01J 31/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/02; A01N 65/00; C07C 51/42; C07C 57/12; C08G 77/388; G01N 21/65; G01N 33/553; C12N 7/00; B01D 15/26; B01D 61/14; B01D 63/02; B01J 20/289; B01J 31/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: diatom, silan, reforming, amine group, cucurbituril, pathogen, concentration, membrane filter

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-0528959 B1 (POSTECH FOUNDATION) 16 November 2005 See abstract; claim 1.	1-12
A	CN 107382707 A (SHANXI KANGHUI ZHONGTIAN MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 24 November 2017 See claims 1, 9.	1-12
A	US 2015-0338403 A1 (OREGON STATE UNIVERSITY) 26 November 2015 See the entire document.	1-12
A	US 9578883 B2 (MATHIS, J. L. et al.) 28 February 2017 See the entire document.	1-12
A	KARCHER, S. et al. Removal of reactive dyes by sorption/complexation with cucurbituril. Water Science and Technology. 1999, vol. 40, nos 4-5, pages 425-433 See the entire document.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 MAY 2019 (24.05.2019)

Date of mailing of the international search report

24 MAY 2019 (24.05.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/001622

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0528959 B1	16/11/2005	AU 2004-212090 A1	26/08/2004
		AU 2004-212090 B2	20/09/2007
		CN 1747986 A	15/03/2006
		CN 1747986 C	13/08/2008
		EP 1594912 A1	16/11/2005
		EP 1594912 B1	12/09/2012
		JP 2006-521263 A	21/09/2006
		JP 4461137 B2	12/05/2010
		US 2006-0207938 A1	21/09/2006
		US 7504029 B2	17/03/2009
		WO 2004-072151 A1	26/08/2004
CN107382707 A	24/11/2017	None	
US 2015-0338403 A1	26/11/2015	WO 2014-121134 A2	07/08/2014
		WO 2014-121134 A3	25/09/2014
US 9578883 B2	28/02/2017	US 2013-0101654 A1	25/04/2013
		US 2015-0208660 A1	30/07/2015
		US 2017-164610 A1	15/06/2017
		US 8999361 B2	07/04/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/02(2006.01)i, C12N 7/00(2006.01)i, B01D 15/26(2006.01)i, B01D 61/14(2006.01)i, B01D 63/02(2006.01)i, B01J 20/289(2006.01)i, B01J 31/02(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 1/02; A01N 65/00; C07C 51/42; C07C 57/12; C08G 77/388; G01N 21/65; G01N 33/553; C12N 7/00; B01D 15/26; B01D 61/14; B01D 63/02; B01J 20/289; B01J 31/02

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 구조, 실란, 개질, 아민기, 쿠커비투릴, 병원체, 농축, 멤브레인 필터

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-0528959 B1 (학교법인 포항공과대학교) 2005.11.16 요약; 청구항 1 참조.	1-12
A	CN 107382707 A (SHANXI KANGHUI ZHONGTIAN MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 2017.11.24 청구항 1, 9 참조.	1-12
A	US 2015-0338403 A1 (OREGON STATE UNIVERSITY) 2015.11.26 전체 문헌 참조.	1-12
A	US 9578883 B2 (MATHIS, J. L. 등) 2017.02.28 전체 문헌 참조.	1-12
A	KARCHER, S. 등, "Removal of reactive dyes by sorption/complexation with cucurbituril", Water Science and Technology, 1999, 제40권, 제4-5호, 페이지 425-433 전체 문헌 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 05월 24일 (24.05.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 05월 24일 (24.05.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



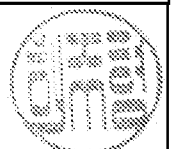
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0528959 B1	2005/11/16	AU 2004-212090 A1 AU 2004-212090 B2 CN 1747986 A CN 1747986 C EP 1594912 A1 EP 1594912 B1 JP 2006-521263 A JP 4461137 B2 US 2006-0207938 A1 US 7504029 B2 WO 2004-072151 A1	2004/08/26 2007/09/20 2006/03/15 2008/08/13 2005/11/16 2012/09/12 2006/09/21 2010/05/12 2006/09/21 2009/03/17 2004/08/26
CN107382707 A	2017/11/24	없음	
US 2015-0338403 A1	2015/11/26	WO 2014-121134 A2 WO 2014-121134 A3	2014/08/07 2014/09/25
US 9578883 B2	2017/02/28	US 2013-0101654 A1 US 2015-0208660 A1 US 2017-164610 A1 US 8999361 B2	2013/04/25 2015/07/30 2017/06/15 2015/04/07