

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 1월 19일 (19.01.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/010759 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/58 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)
C12N 9/86 (2006.01) G01N 33/573 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/007476
- (22) 국제출원일: 2016년 7월 11일 (11.07.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0101192 2015년 7월 16일 (16.07.2015) KR
10-2016-0084344 2016년 7월 4일 (04.07.2016) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 안대로 (AHN, Dae Ro); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 민선준 (MIN, Sun Joon); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 히엔 타이 바오 디에우 (HIEN, Thai Bao Dieu); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 박연준 (PARK, Yeon Joon); 06544 서울시 서초구 신반포로 270, 121-2202, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 리앤록 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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.

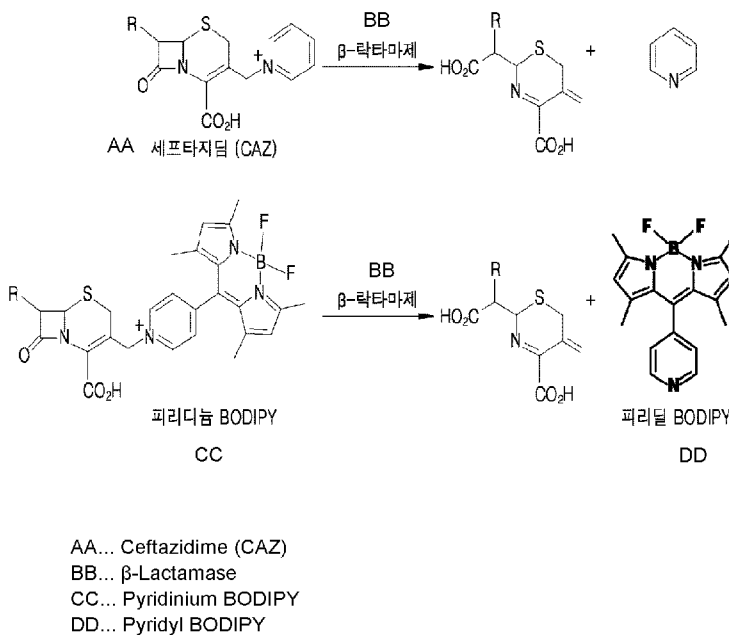
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 제 21 조(3))
- 청구범위 보장 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: PROBE FOR DETECTING DRUG-RESISTANT BACTERIA IN SAMPLE AND USE OF SAME

(54) 발명의 명칭 : 시료 내 약물-내성 박테리아 검출용 프로브 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a probe for detecting drug-resistant bacteria in a sample, a composition comprising same, a kit, and a detection method. A compound according to an aspect of the present invention and a probe including same enable β -lactamase or ESBL to be detected with high sensitivity, and thus the present invention can be applied to various biochemical studies. In addition, unlike the typical method based on a pH indicator, antibiotic-resistant bacteria can be clinically detected and an antibiotic-resistant bacterial infection can be molecularly diagnosed. Also, antibiotic-resistant bacteria from a target sample can be analyzed with high sensitivity. Therefore, the present invention can be effectively applied to medicinal uses such as *in vitro* diagnosis.

(57) 요약서: 시료 내 약물-내성 박테리아 검출용 프로브, 이를 포함하는 조성물, 키트, 및 검출 방법에 관한 것으로, 일 양상에 따른 화합물 및 그를 포함하는 프로브에 의하면, β -락타마제 또는 ESBL을 높은 민감도로 검출할 수 있어, 다양한 생화학적 연구들에 적용시킬 수 있을 뿐만 아니라, 종래의 pH 지시인자-기반된 방법에서 가능하지 않은

항생제 내성 박테리아의 임상적 검출이 가능하고, 항생제 내성 박테리아 감염 질환의 분자적 진단과 목적 시료로부터 항생제 내성 박테리아를 높은 민감도로 분석할 수 있어, 체외 진단과 같은 의학 용도로 효과적으로 적용할 수 있는 효과가 있다.

명세서

발명의 명칭: 시료 내 약물-내성 박테리아 검출용 프로브 및 이의 용도

기술분야

- [1] 시료 내 약물-내성 박테리아 검출용 프로브, 이를 포함하는 조성물, 키트, 및 검출 방법에 관한 것이다.

배경기술

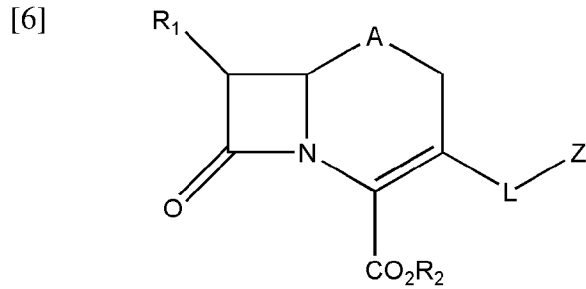
- [2] 항생제 내성 박테리아의 출현은 공중 위생에 대한 위협을 초래하였다. 내성의 가장 일반적인 기작들 중 하나가 항생제의 β -락탐 고리를 절단할 수 있는 β -락타마제(Bla)의 발현으로, 이는 상기 약물의 활성 손실을 일으킨다. 더욱이, 확장된 스펙트럼의 β -락타마제(ESBL) 생산자로 분류된 상당한 수의 상술한 박테리아들은 하나의 타입의 약물뿐 아니라 다양한 β -락탐-기반된 항생제에 대한 내성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 상기 약물 내성 박테리아를 치료하는 차세대 항생제의 개발이 시간-소모적이고 비용이 많이 드는 과정인 반면에, 초기 검출 및 민감성 검출에 기반된 상기 감염된 개인의 동정은 관련 상황을 다루는 선택적인 방법으로, 이는 상기 약물-내성 박테리아에 의한 감염이 광범위하게 번지는 것을 예방할 수 있다. 상기 박테리아를 빠르고 효율적으로 검출하는 두 개의 접근방법들이 있다: (1) pH 센서-기반된 프로브 및 (2)형광성 기질 프로브. 대부분 β -락탐 항생제의 가수분해는 용액의 pH를 낮추어, 박테리아의 약물 내성을 검출하기 위해 pH 지시인자로 용이하게 모니터링될 수 있다. 하지만, 상기 용액의 pH는 반응 환경에 의해 매우 다양할 수 있기 때문에 상기 pH 지시인자-기반된 Bla 어세이는 종종 거짓-음성 결과들을 제공한다. 특히, Bla에 의한 세팔로스포린-유래 β -락탐 항생제인 세프타지딴(ceftazidime, CAZ)의 가수분해는 약물의 효소적 분해에 따라 배출되는 피리딘의 완충 효과로 인해 배지의 산성을 유도하지 않는다. CAZ의 가수분해를 직접적으로 모니터링하기 위해, 산성 센서 대신에 Bla의 형광성 기질을 이용할 수 있다. 상술한 기질은 항생제를 형광물질(fluorophores) 및 퀀처로 표지하거나 또는 형광성 모이어티로 변형시킴으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 이전에 보고된 형광성 기질 내 프로-형광물질은 CAZ와 어떠한 구조적 유사성을 공유하지 않아 CAZ-내성 스트레인들에 대한 선택적 시그널링을 초래할 수 있다.
- [3] 상술한 단점들을 극복하기 위해 ESBL을 발현하는 항생제 내성 박테리아의 존재를 보다 정확하고 효율적으로 검출할 수 있는 방법이 당업계에서 시급히 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물;

[5] [화학식 1]



[7] (코어 구조(core-structure)-L-Z)을 제공하는 것이다.

[8] 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 항생제 내성 박테리아 검출용 프로브를 제공하는 것이다.

[9] 또 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 항생제 내성 박테리아 검출용 시약 조성물을 제공하는 것이다.

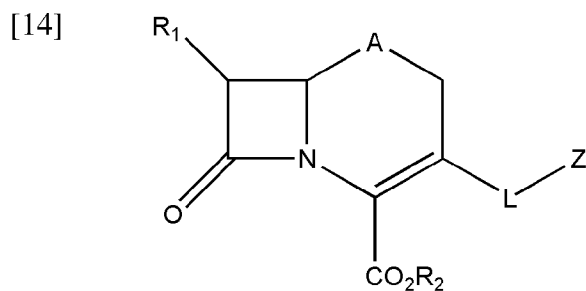
[10] 또 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 항생제 내성 박테리아 감염 진단 키트를 제공하는 것이다.

[11] 또 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 생물학적 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 항생제 내성 박테리아 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

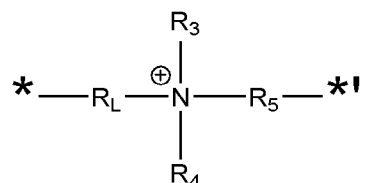
[13] [화학식 1]



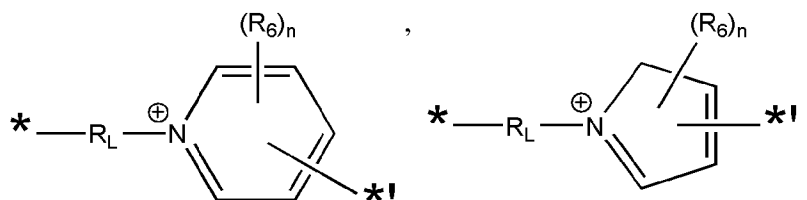
[15] (코어 구조(core-structure)-L-Z).

[16]

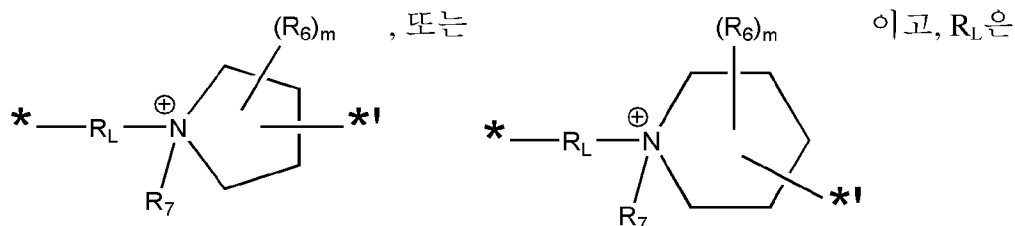
[17] 식 중, R₁은 세팔로스포린계 항생제의 코어 구조의 7번 위치의 치환기로부터 선택되는 것일 수 있다. 또한, 상기 A는 S, O, SO, SO₂, 및 CH₂로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 L은 코어 구조와 Z를 연결하는 링커일 수 있다. 구체적으로, 상기 L은



[18]

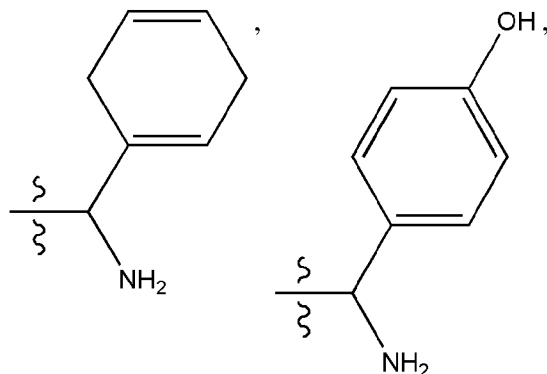


[19]

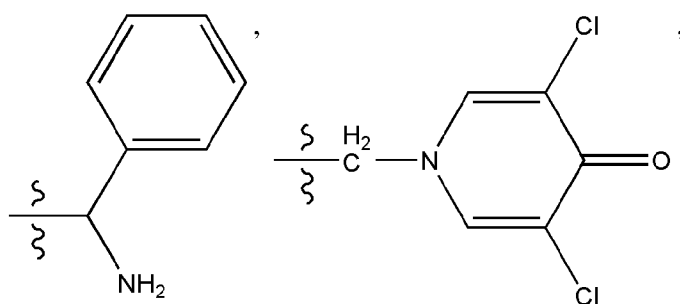


단일결합이거나, C_{1-6} 알킬렌기, C_{2-6} 알케닐렌기, 또는 C_{2-6} 알키닐렌기이고, R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬기, C_{2-6} 알케닐기, 또는 C_{2-6} 알키닐기이고, R_5 는 단일결합이거나, C_{1-6} 알케닐기이고, R_6 및 R_7 는 각각 독립적으로, 수소 또는 C_{1-6} 알킬기, C_{2-6} 알케닐기, 또는 C_{2-6} 알키닐기이고, n 은 1 내지 4의 정수이고, m 은 1 내지 9의 정수이고, *는 코어 구조와의 결합 부위이고, *'는 Z와의 결합 부위일 수 있다.

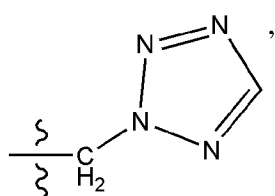
[20] 상기 Z는 형광 모이어티이다.

[21] 또한 식 중 상기 R_1 은 H, $-NH_2$, 및 $-NHCO-R'$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고, R' 는 $-CH_2-CN$, $-CH_2S-CF_3$,

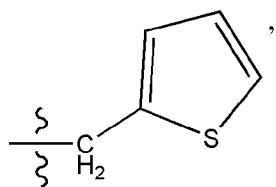
[22]



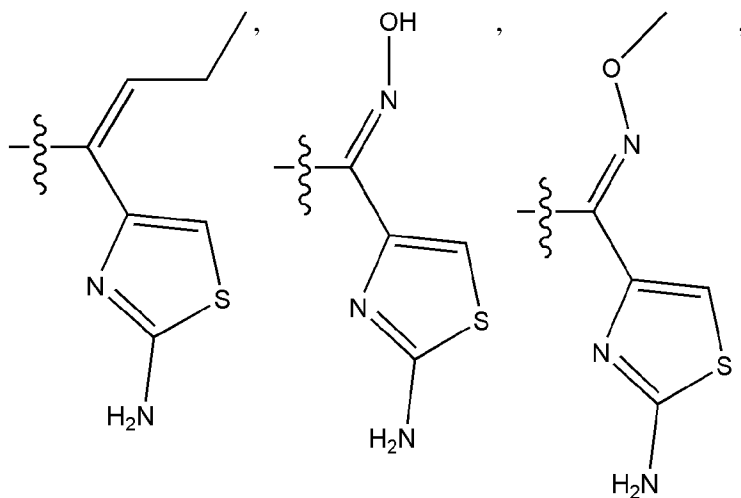
[23]



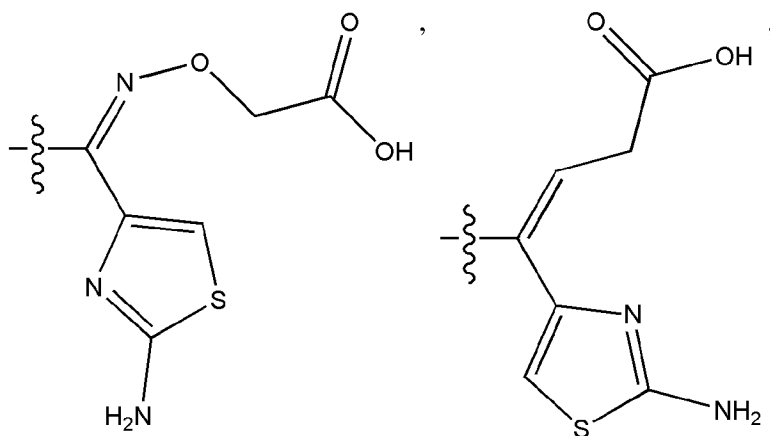
[24]



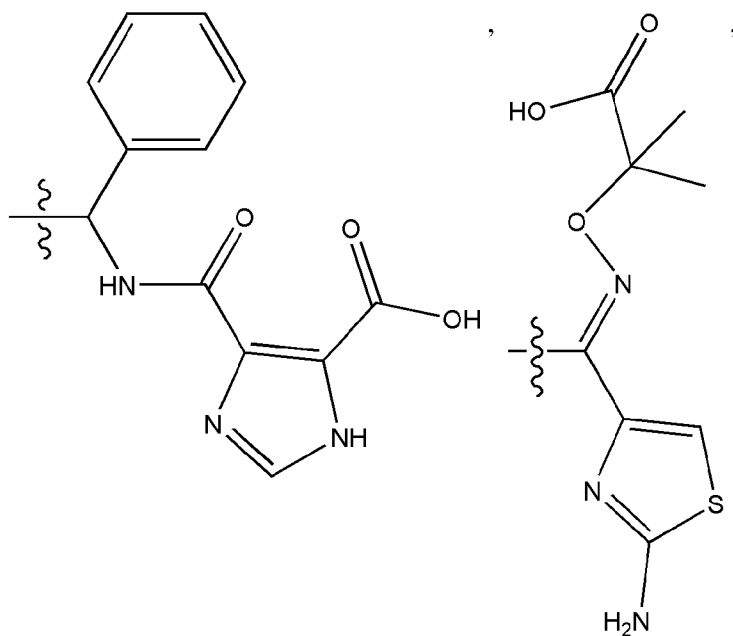
[25]



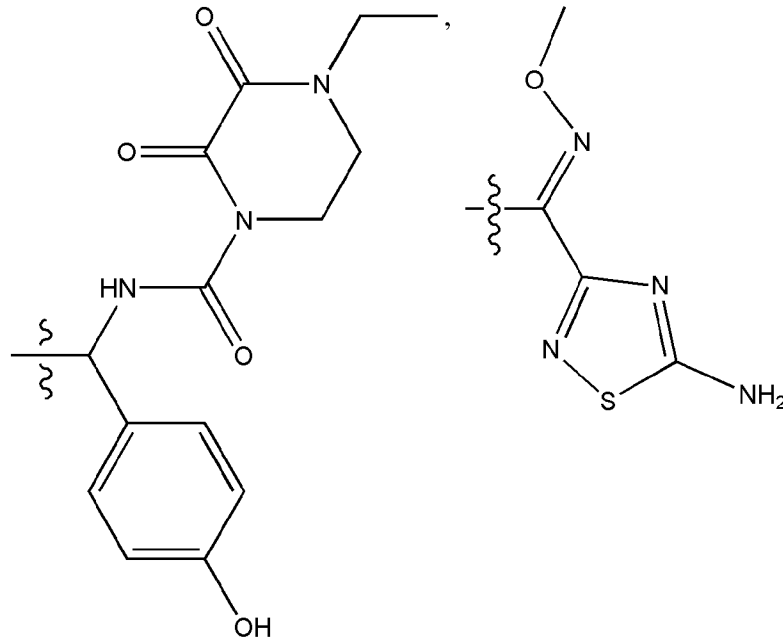
[26]



[27]



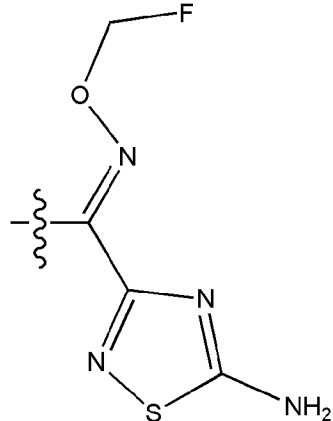
[28]



[29]

및

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

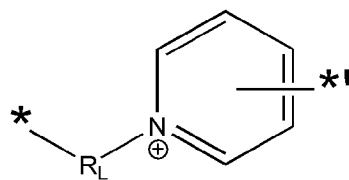


[30]

일 구체예에 있어서,

[31]

상기 L은

이고, 상기 식 중 R_L , *, 및 *'는 상기에서

정의한 바와 같다. 예를 들면, 상기 R_L 은 단일결합이거나, 메틸 또는 에틸일 수 있다.

[32]

본 명세서 중 C_1 - C_6 알킬기는 탄소수 1 내지 6의 선형 또는 분지형 지방족 탄화수소 1가(monovalent) 그룹을 의미하며, 구체적인 예에는, 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소부틸기, sec-부틸기, ter-부틸기, 펜틸기, iso-아밀기, 또는 헥실기 등을 포함할 수 있다. 본 명세서 중 C_1 - C_6 알킬렌기는 상기 C_1 - C_6 알킬기와 동일한 구조를 갖는 2가(divalent) 그룹을 의미할 수 있다.

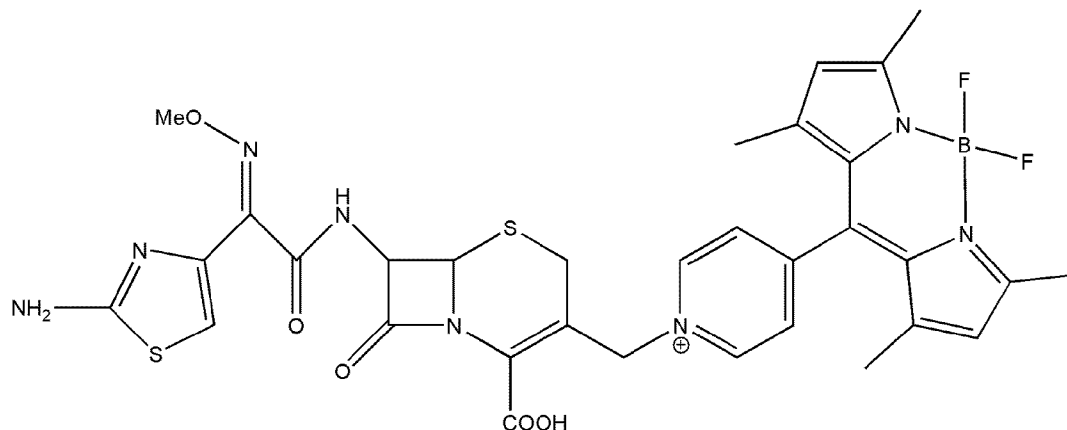
[33]

본 명세서 중 C_1 - C_6 알케닐기는 상기 C_1 - C_6 알킬기의 중간 또는 말단에 하나 이상의 탄소 이중 결합을 포함한 구조를 가지며, 이의 구체적인 예에는,

에테닐기, 프로페닐기, 또는 부테닐기 등을 포함할 수 있다. 본 명세서 중 C₁-C₆ 알케닐렌기는 상기 C₁-C₆알케닐기와 동일한 구조를 갖는 2가 그룹을 의미할 수 있다.

- [34] 본 명세서 중 C₁-C₆알키닐기는 상기 C₁-C₆알킬기의 중간 또는 말단에 하나 이상의 탄소 삼중 결합을 포함한 구조를 가지며, 이의 구체적인 예에는, 에티닐기(ethynyl), 또는 프로피닐기(propynyl) 등을 포함할 수 있다. 본 명세서 중 C₁-C₆알키닐렌기는 상기 C₁-C₆알키닐기와 동일한 구조를 갖는 2가 그룹을 의미할 수 있다.
- [35] 본 명세서에서 사용되는 용어 "형광성 모이어티(fluorescent moiety)"는 화학식 1로부터 분리됨에 따라 특정 주파수의 광(예컨대, UV 광)을 흡수하여 형광 시그널을 발생시키는 형광 분자 또는 이의 유도체 또는 컨쥬게이트를 의미할 수 있다. 예를 들면, 상기 형광성 모이어티는 퀀칭 염료(quencher dye)일 수 있다. 형광성 모이어티의 예는 움벨리페론(umbelliferone), 플루오레세인 및 레소루핀 같은 폐놀성 염료(dyes); 방향성 아민, 및 로다민 같은 다른 화합물들 등을 포함할 수 있다. 또한, 예를 들면, 상기 형광성 모이어티는 쿠마린 및 이와 관련된 염료; 플루오레세인, 로돌, 및 로다민 같은 크산텐(xanthene) 염료; 레소루핀; 시아닌 염료; 바이메인 염료(bimanes); 아크리딘; 이소인돌; 단실(dansyl) 염료; 루미놀 및 이소루미놀 유도체 같은 아미노프탈성 히드라지드(aminophthalic hydrazides); 아미노프탈 이미드; 아미노나프탈이미드; 아미노벤조퓨란; 아미노퀴놀린; 디시아노히드로퀴논; BODIPY; 및 유로퓸 및 터븀 복합체 및 이와 관련된 화합물을 포함할 수 있다. 상기 BODIPY는 피리딜 BODIPY, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [36] 또한, 상기 형광성 모이어티는 자유 카르복실기, 에스테르(예컨대, N-하이드로숙신이미드(NHS) 에스테르) 또는 말레이미드 유도체를 추가적으로 포함할 수 있으며, 또한 스트렙타비딘, 바이오틴, 팔로이딘, 아민, 아자이드 또는 이오도아세트아미드 컨쥬게이트를 포함할 수 있다.
- [37] 일 구체예에 있어서, 상기 형광성 모이어티는 상기 링커를 통해 세팔로스포린계 화합물에 결합된 것일 수 있다. 따라서, 일 구체예에 따른 형광성 모이어티는 L(링커)과 함께 β-락타마제 또는 확장된 스펙트럼 β-락타마제(extended spectrum β-lactamase: ESBL)에 의해 상기 화학식 1로부터 분리되어 형광을 나타내는 것일 수 있다.
- [38] 일 구체예에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다;
- [39] [화학식 2]

[40]



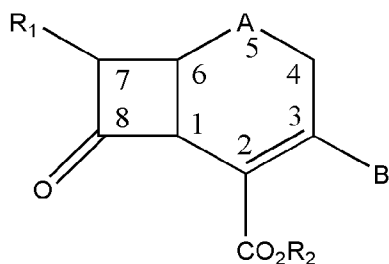
[41] 상기 화학식 1의 화합물은,

[42] 하기 화학식 3으로 표시되는 세팔로스포린계 항생제의 3번 탄소 부위의 기능기(B)를 링커로 치환하는 단계; 및 상기 링커를 통해 세팔로스포린계 항생제의 코어 구조와 연결된 형광 모이어티를 결합시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[43] 또한, 예를 들면, 상기 화학식 1의 화합물은 링커와 형광 모이어티를 결합시키 링커-형광 모이어티 복합체를 제조하는 단계; 및 상기 링커-형광 모이어티의 복합체로 하기 화학식 3으로 표시되는 세팔로스포린계 항생제의 3번 탄소 부위의 기능기(B)를 치환하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[44] [화학식 3]

[45]



[46] 예를 들면, 상기 화학식 1의 화합물은 도 2에 개시된 바와 같이 제조되는 것일 수 있다.

[47]

[48] 도 1에 나타낸 바와 같이, 일 구체예에 따른 화합물은 시료내 β -락타마제 또는 ESBL의 존재 시 높은 형광 시그널(예를 들면, 2.5배 이상의 형광)을 방출하고 이를 육안으로도 확인할 수 있어, 음성 대조군과 비교하여 β -락타마제 또는 ESBL을 발현하는 항생제 내성 박테리아의 존재를 효율적으로 검출할 수 있어, 항생제 내성 박테리아 검출용 화합물, 시약 조성물, 항생제 내성 박테리아 감염 진단 키트, 항생제 내성 박테리아 검출 방법, 항생제 내성 박테리아 감염 진단 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

[49]

[50] 이하에서, 상기 화학식 1의 용도를 상세히 설명한다.

- [51] 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 항생제 내성 박테리아 검출용 프로브를 제공한다.
- [52] 또 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 항생제 내성 박테리아 검출용 시약 조성물 또는 어세이 조성물을 제공하는 것이다.
- [53] 또 다른 양상은 항생제 내성 박테리아 검출용 프로브, 어세이 조성물, 또는 시약 조성물의 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 용도를 제공한다.
- [54] 화학식 1로 표시되는 화합물에 대해서는 상기한 바와 같다.
- [55] 일 구체예에 있어서, 상기 항생제 내성 박테리아는 베타-락탐을 포함하는 항생제에 의해 효과적으로 항균되지 않는 박테리아를 의미할 수 있다. 상기 항생제 내성 박테리아는 β -락타마제 또는 확장된-스펙트럼 β -락타마제(ESBL)를 발현하는 박테리아인 것일 수 있다. 상기 β -락타마제 또는 ESBL을 발현하는 박테리아의 예는 엔테로박터 종(*Enterobacter* spp.), 에스체리시아 종(*Escherichia* spp.), 살모넬라 종(*Salmonella* spp.), 프로테우스 종(*Proteus* spp.), 시트로박터 종(*Citrobacter* spp.), 모르가넬라 종(*Morganella* spp.), 박테로이데스 종(*Bacteroides* spp.), 프로비덴시아 종(*Providencia* spp.), 세라티아 종(*Serratia* spp.), 클렙시엘라 종(*Klebsiella* spp.), 쉬겔라 종(*Shigella* spp.), 슈도모나스 종(*Pseudomonas* spp.), 아시네토박터 종(*Acinetobacter* spp.) 또는 클루이베라 종(*Kluyvera* spp.)을 포함할 수 있다. 또한, 계속해서 예를 들면, 상기 박테리아의 예는 엔테로박터 클로아케(*E. cloacae*), 엔테로박터 애로게네스(*E. aerogenes*), 에스체리시아 콜라이(*E. coli*), 살모넬라 엔테리카(*S. enterica*), 살모넬라 티피(*S. typhi*), 살모넬라 파라티피(*S. paratyphi*), 프로테우스 불가리스(*P. vulgaris*), 프로테우스 미라빌리스(*P. mirabilis*), 시트로박터 브라아키(*C. braaki*), 시트로박터 프레운디(*C. freundii*), 시트로박터 디베르수스(*C. diversus*), 모르가넬라 모르가니(*M. morganii*), 박테로이데스 프라길리스(*B. fragilis*), 박테로이데스 불가투스(*B. bulgatus*), 프로비덴시아 레트게리(*P. rettgeri*), 프로비덴시아 스투아르티(*P. stuartii*), 세라티아 마르세센스(*S. marcescens*), 세라티아 폰티콜라(*S. fonticola*), 세라티아 리퀴파시엔스(*S. liquefaciens*), 클렙시엘라 뉴모니아(*K. pneumoniae*), 클렙시엘라 옥시토카(*K. oxytoca*), 쉬겔라 디센테리아(*S. dysenteriae*), 쉬겔라 소네이(*S. sonnei*), 슈도모나스 에루기노사(*P. aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii*), 클루이베라 아스코르바타(*K. ascorbata*) 및 클루이베라 게오르기아나(*K. georgiana*)를 포함할 수 있다.
- [56] 일 구체예에 있어서, 상기 박테리아가 내성을 갖는 항생제는 베타-락탐 고리를 갖는 항생제를 포함할 수 있으며, 예를 들면, 페니실린계 항생제, 또는 세팔로스포린계 항생제일 수 있다. 상기 페니실린계 항생제의 예는 일반적으로 아미노-페니실린(예컨대, 아목시실린, 암피실린, 에피실린, 등) 또는 카르복시-페니실린(예컨대, 카르베니실린, 테모실린, 등)을 포함할 수 있다. 상기 세팔로스포린계 항생제의 예는 1-세대 세팔로스포린(예컨대, 세파졸린, 세팔로틴, 세파피린 등) 및 2-세대 세팔로스포린(예컨대, 세파클로르, 세파만돌,

세프미녹스, 등)에 다양한 내성을 나타내지만, 3-세대 세팔로스포린(예컨대, 세프트지덤, 세포탁심, 세픽심, 세포디짐, 아즈트레오남 등) 및 4-세대 세팔로스포린(예컨대, 세페핌, 세프피롬, 세프퀴놈, 세포조프란, 등)을 포함할 수 있다.

[57]

[58] 또 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 항생제 내성 박테리아 감염 진단 키트를 제공한다.

[59] 또 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 생물학적 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 항생제 내성 박테리아를 검출하는 방법을 제공한다.

[60] 또 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 생물학적 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 항생제 내성 박테리아 감염을 진단하는 방법을 제공한다.

[61] 또 다른 양상은 항생제 내성 박테리아 감염 진단 키트의 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 용도를 제공한다.

[62] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 항생제 내성 박테리아에 대해서는 상기한 바와 같다.

[63] 일 양상에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물로부터 발생하는 형광은 시료 내 ESBL 또는 이를 포함하는 박테리아의 존재에 대한 지표가 될 수 있으며, 이를 통해 상기 박테리아에 의해 유발되는 감염 질환의 진단에 이용될 수 있다.

[64] 본 명세서에서 사용되는 용어 "감염 질환(infectious disease)"은 대상자(subject) 또는 환자 내에 또는 이와 접촉하는 생물체(감염성 제제)의 존재와 관계되는 질환 또는 상태, 특히 "박테리아 감염 질환(bacterial infectious disease)"을 의미할 수 있다. 예를 들어, "베타-락탐 항생제 내성 박테리아 감염 질환"은 베타-락탐 포함 항생제들에 의해 효과적으로 치료되지 않는 항생제 내성 박테리아 감염 질환을 의미할 수 있다.

[65] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)(예컨대, 감염 질환 또는 상태의 동정, 상기 질환의 치료에 대한 반응성 및 이의 효과 판단)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함할 수 있다. 상기 개체는 인간을 포함하는 포유류 일 수 있다.

[66] 일 구체예에 있어서, 상기 검출하는 방법 또는 진단하는 방법은 상기 화학식 1의 화합물을 목적 시료와 접촉시키는 단계; 및 상기 목적 시료에서 상기 화학식 1의 화합물로부터 발생된 형광을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[67] 상기 접촉시키는 단계를 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는 조성물에

전처리된 상기 생물학적 시료 또는 목적 시료를 첨가하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 시료의 전처리는 통상의 당업자가 목적하는 용도에 맞게 적절하게 수행할 수 있다.

- [68] 목적 시료와 접촉(반응)시켜 상기 화학식 1의 화합물의 가수분해에 따른 형광 방출을 측정함으로써 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써 항생제 내성 박테리아에 의한 감염 질환을 진단하거나 항생제 내성 박테리아를 검출할 수 있다. 상기 형광 시그널 분석은 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 실시될 수 있으며, 당업계에서 이용 가능한 적합한 장치(apparatus)에 의해 관독되고 프로세싱된다. 예를 들어, 형광 분석기, 마이크로플레이트 관독기, 로봇 장치들을 이용한 자동화 프로세싱, 레이저 스캐닝 시스템을 포함하는 당업계에 알려진 프로토콜 및 과정들이 이용될 수 있다.

- [69] 상기 시료는 박테리아 세포의 용해물로부터 얻어지는 생물학적 시료들 또는 박테리아 세포 배양액의 상층액, 또는 동물 기관 또는 세포(예컨대, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액, 분비물, 림프액, 투석액(dialysate), 체액(sap), 소변, 대변 등)을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [70] 일 양상에 따른 화합물 및 그를 포함하는 프로브에 의하면, β -락타마제 또는 ESBL을 높은 민감도로 검출할 수 있어, 다양한 생화학적 연구들에 적용시킬 수 있을 뿐만 아니라, 종래의 pH 지시인자-기반된 방법에서 가능하지 않은 항생제 내성 박테리아의 임상적 검출이 가능하고, 항생제 내성 박테리아 감염 질환의 분자적 진단과 목적 시료로부터 항생제 내성 박테리아를 높은 민감도로 분석할 수 있어, 체외 진단과 같은 의학 용도로 효과적으로 적용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [71] 도 1은 β -락타마제에 의한 세프타지딴(위쪽 패널) 및 BODIPY-기반된 형광성 기질(아래쪽 패널)의 가수분해를 보여주는 화학반응 결과이다.

- [72] 도 2는 일 구체예에 따른 프로브 화합물의 합성 과정을 나타내는 도면이다. a) i) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (14:1), 상온, 72시간; 및 ii) DDQ(2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone), 상온, 4시간; b) i- Pr_2NEt , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , 상온, 12시간, 21%(2 단계); c) i) MSTFA, CH_2Cl_2 , 40°C , 2시간; ii) TMSI, CH_2Cl_2 , 0°C 내지 상온, 1시간; 및 iii) 2, CH_3CN , 상온, 12시간, 33%. DDQ = 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논/MSTFA = N-메틸-N-(트리메틸실릴) 트리플루오로아세트아미드/이오도트리메틸실란.

- [73] 도 3a는 일 구체예에 따른 프로브가 TEM-1 β -락타마제와 반응 전(검은색 선) 및 반응 후(빨간색 선)에 490 nm에서 여기하는 경우, 일 구체예에 따른 프로브(1 μM)의 형광 방출 프로파일을 나타낸다; 삽입(inset) 이미지는 효소의 부존재(왼쪽) 및 존재(오른쪽) 하에서 상기 프로브 용액을 나타낸다;

- [74] 도 3b는 TEM-1 β -락타마제의 농도에 따라 일 구체예에 따른 프로브(200 nM)의

효소적 분해에서의 시그널 증가를 보여주는 결과이다.

[75] 도 4a는 일 구체예에 따른 프로브($2\ \mu\text{M}$)에 대한 효소 반응에서 시간-의존적 형광 시그널 증가를 보여주는 그래프이다.

[76] 도 4b는 4의 효소적 분해에 대한 미카엘리스-멘톤 플롯을 보여주는 그래프이다.

[77] 도 5a는 CAZ-내성 박테리아 용해물에 일 구체예에 따른 프로브의 처리 후 30분, 60분 및 90분째에 측정된 형광 시그널 결과를 나타내는 그래프이다; $\text{MIC} < 0.5\ \text{mg/mL}$ 또는 $\text{MIC} \geq 0.5\ \text{mg/mL}$ CAZ으로 처리된 박테리아로부터 관찰된 시그널들은 각각 빗금 막대 또는 빈 막대로 표현하였다.

[78] 도 5b는 일 구체예에 따른 프로브의 CAZ-내성 박테리아 용해물과의 반응에서 측정된 형광 강도를 CAZ의 MIC에 대해 플롯팅한 결과를 나타내는 그래프이다; 형광 강도는 90분에서의 강도에서 0분에서의 강도를 뺀 값이다.

[79] 도 6a는 CAZ 및 CTX 내성 박테리아 용해물에 일 구체예에 따른 프로브의 처리 후 30분, 60분 및 90분째에 측정된 형광 시그널 결과를 나타내는 그래프이다; $(\text{MIC}_{\text{CAZ}} + \text{MIC}_{\text{CTX}}) < 1\ \text{ug/ml}$ 또는 $(\text{MIC}_{\text{CAZ}} + \text{MIC}_{\text{CTX}}) > 1\ \text{ug/ml} < 0.5\ \text{mg/mL}$ 또는 $\text{MIC} \geq 0.5\ \text{mg/mL}$ CAZ으로 처리된 박테리아로부터 관찰된 시그널들은 각각 빈 막대 또는 빗금 막대로 표현하였다; ESBL 생산 균주는 별표로 표시하였다.

[80] 도 6b는 일 구체예에 따른 프로브의 CAZ 및 CTX 내성 박테리아 용해물과의 반응에서 측정된 형광 강도를 CAZ 및 CTX의 MIC에 대해 플롯팅한 결과를 나타내는 그래프이다; 형광 강도는 90분에서의 강도에서 0분에서의 강도를 뺀 값이다; ESBL 생산자는 삼각형으로 나타내었고, 각 데이터 값은 두 개의 독립된 실험의 평균 값이다; 동그라미 내에 들어가있는 삼각형은 CTX-M-9 균주를 나타낸다.

[81] 도 7은 일 구체예에 따른 프로브의 CAZ 및/또는 CTX 내성 박테리아 용해물과의 반응에서 측정된 형광 강도를 나타낸 그래프이다; S 및 R는 각각 항생제에 대한 민감성 및 내성을 나타낸다; 형광 강도는 90분에서의 강도에서 0분에서의 강도를 뺀 값이다.

발명의 실시를 위한 형태

[82] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[83]

[84] **참조예**

[85] TEM-1 β -락타마제는 Prospec(USA)로부터 구매하였다. 다르게 기재되지 않는 한, 모든 물질들은 Sigma-Aldrich(USA)로부터 구매하여 추가적인 정제없이 이용하였다. UV 흡수 스펙트럼 및 형광 방출 스펙트럼의 프로파일은 각각 Libra S22 UV/Vis 분광 광도계(Biochrom, UK) 및 F-7000 형광 분광계(Hitachi,

Japan)에서 기록하였다. pH-의존성 실험들 및 효소 어세이에서 이용된 합성된 프로브의 형광 강도는 Appliskan™ 멀티모드 마이크로플레이트 판독기(Thermo Scientific, USA)에서 측정하였다.

[86]

[87] 실시예 1. 항생제 내성 박테리아 검출을 위한 프로브의 제조

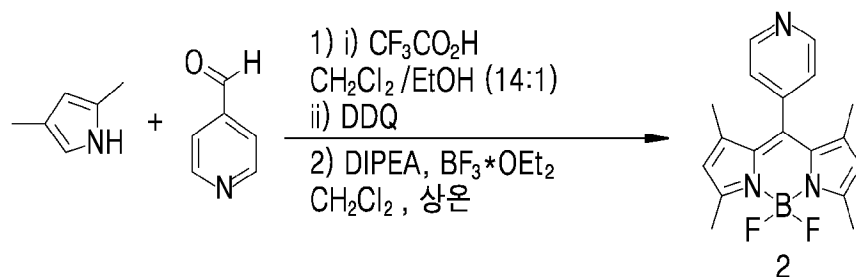
[88] BODIPY-기반된 형광성 프로브는 도 2에 도시된 대로 합성하였다. 이전에 보고된 과정(J. Bartelmess and W. W. Weare, *Dyes Pigm.*, 2013, 97, 1.)에 따라, 트리플루오로아세트산의 존재 하에서 4-피리딘카르복스알데히드와 2,4-디메틸피롤의 응축시킨 후 DDQ로 산화시킴으로써 비스피롤 피리딘 (화합물 1)을 먼저 합성하였다. 보론 트리플루오리드 디에틸 에테레이트 및 훔니그 염기(Hunig's base)를 이용한 화합물 1의 처리는 암적색 파우더로서 BODIPY 유도체 2를 제공하였다. 다음으로, 브라운 등(R. F. Brown, M. D. Kinnick, J. M. Jr. Morin, R. T. Vasileff, F. T. Counter, E. O. Davidson, P. W. Ensminger, J. A. Eudaly, J. S. Kasher, A. S. Katner, *J. Med. Chem.*, 1990, 33, 2114.)에 의해 보고된 방법에 따른 3단계 순서로 화합물 2와 세포탁심 (화합물 3)의 커플링 반응을 실시하였다. MSTFA를 이용한 화합물 3의 실릴화는 상응하는 TMS 에스테르를 산출하였고, 이후 디클로메탄에 녹여진 이오도트리메틸실란과 반응시켜 3'-요오드 중간산물을 생산하였다. 마지막으로, BODIPY 2로 요오드의 대체는 붉은색 분말의 프로브 (화합물 4)를 생산하였다. 상기의 과정을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[89]

[90] 1.1.

1,3,5,7-테트라메틸-8-(4-피리딜)-4,4'-디-플루오로보라디아자인다센(1,3,5,7-Tetramethyl-8-(4-pyridyl)-4,4'-di-fluoroboradiazaindacene)(2)의 제조

[91]



[92]

[93] 2,4-디메틸피롤(300 μL , 2.91 mmol) 및 4-피리딘카르복스알데히드(137 μL , 1.46 mmol)를 에탄올/디클로메탄의 산소 제거된 1:14(v/v) 혼합물(30mL)에 녹였다. 여러 점적의 트리플루오로아세트산을 첨가하고 반응 혼합물을 상온에서 72시간 동안 교반시켰다. 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논(330 mg, 1.46 mmol)을 상기 용액에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 추가적으로 4시간 동안 교반시켰다. 이후 용매를 감압 하에서 제거하였고, 결과 잔류물을 건조

디클로로메탄(30 mL)에 용해시켰다. 이후 N,N-디이소프로필에틸아민(1.49 mL, 8.32 mmol) 및 보론 트리플루오라이드 디에틸 에테레이트(1.59 mL, 12.85 mmol)를 첨가하고 상기 반응 혼합물을 12시간 동안 교반시켰다. 형성된 암적색 침전물을 여과하였고, 그 여과물을 진공 하에서 농축시켰다. 상기 조 물질을 실리카 젤 상에서 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄/에틸 아세테이트, 4:1(v/v))로 정제하여 암적색 분말의 화합물 2(100 mg, 21%)를 생산하였다.

[94] Melting Point(MP): 235.3-236.2°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.78 (d, J = 4.4, 1.6 Hz, 2H), 7.30 (dd, J = 4.3, 1.6 Hz, 2H), 6.01 (s, 2H), 2.56 (s, 6H), 1.41(s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 156.9, 150.7, 143.6, 142.7, 137.7, 130.4, 123.3, 121.8, 14.62, 14.58.

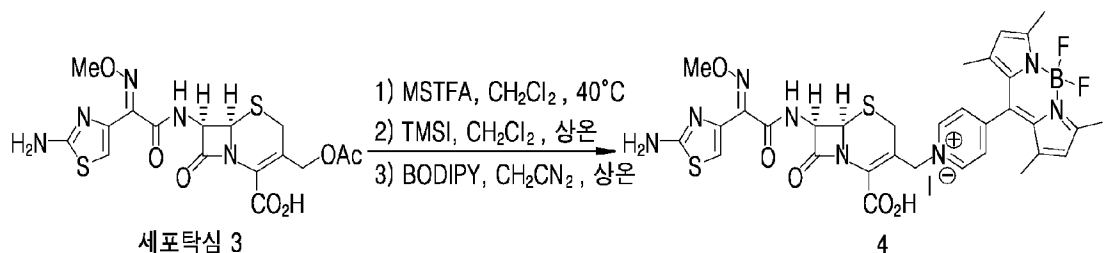
[95]

[96] 1.2.

(E)-10-(1-((7-(2-(2-아미노티아졸-4-일)-2-(메톡시이미노)아세트아미도)-2-카르복시-8-옥소-5-티아-1-아자비시클로[4.2.0]옥트-2-엔-3-일)메틸)피리딘-1-이움-4-일)-5,5-디플루오로-1,3,7,9-테트라메틸-5H-디피롤로[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]디아자보리닌-4-이움-5-우이드

이오디드((E)-10-(1-((7-(2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)-2-Carboxy-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-3-yl)methyl)pyridin-1-ium-4-yl)-5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide iodide)(4)의 제조

[97]



[98] 세포탁심 (화합물 3)(80 mg, 0.18 mmol)을 질소 대기 하에서 디클로로메탄(5 mL)에 현탁하였다. N-메틸-N-(트리메틸실릴) 트리플루오로아세트아미드(127 μL, 0.68 mmol)를 첨가하고 혼합물을 40°C까지 잠시 동안 가온 하였다. 세팜트리메틸실릴 에스테르의 균질성 용액을 상온까지 냉각시킨 후 트리메틸실릴 이오디드(77 μL, 0.54 mmol)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 1시간 동안 교반시킨 후, 용매를 진공 하에서 증발시켜 오일로서 3'-아이오도메틸 세팜을 제조하였다. 상기 잔류물을 아세토니트릴(4 mL)에 녹이고 테트라히드로퓨란(64 μL, 0.8 mmol)을 첨가하여 과량의 트리메틸실릴 이오디드를 파괴시켰다. 피리딘-치환된 BODIPY 2(59 mg, 0.18)를 아세토니트릴(1 mL)에 용해시키고, 일정 부분을 상기 반응 용액에 첨가하였다. 상기 반응은 상온에서 12시간 동안 교반시킨 후 5% 메탄올성 아세톤(20 mL)에 첨가하여 트리메틸실릴 기를 가수분해시켰다. 수소 아이오다이드 염(hydrogen

iodide salt)으로 분리된 상기 조 산물을 여과하였으며 에틸 아세테이트/디클로로메탄으로 세척하고 진공 하에서 건조시켰다. 상기 결과 고체(디클로로메탄에 녹지 않음)를 열여과(hot filtration)로 정제하여 붉은색 분말(50 mg, 33%)인 화합물 4를 생산하였다.

- [99] MP: 107.0-110.0°C(decomp). ¹H NMR (400 MHz, CD 3 OD) δ 9.23 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 8.23 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 6.80 (s, 1H), 6.07 (s, 2H), 5.80 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.79 (d, J = 14.4 Hz, 1H), 5.44 (d, J = 14.4 Hz, 1H), 5.19 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.69 (d, J = 18.4 Hz, 1H), 3.27 (d, J = 18.4 Hz, 1H), 2.41 (s, 6H), 1.37 (s, 6H). HRMS-ESI (m/z): C₃₂H₃₂BF₂N₈O₅S₂⁺ 721.1998에 대해 산출된 [M]⁺는 721.1997이었다.

[100]

[101] 1.3. 양자 수율의 결정

- [102] 상기 합성된 프로브의 형광성 양자 수율(Φ_F)은 방정식 (1)을 이용하여 피리딜 BODIPY (화합물 2)의 알려진 값(디클로로메탄에서 $\Phi_{ref} = 0.3$)(Bartelmeess, J., Weare, W.W., Dyes Pigm. 2013, 97 (1), 1.)에 기반하여 산출하였다.

[103]

$$\Phi_F = \Phi_R \frac{\eta^2}{\eta_R^2} \frac{I}{I_R} \frac{OD_R}{OD} \quad (1)$$

- [104] 식 중, η 는 용매의 굴절률(refractive index)이다. I는 통합된 형광 강도이고, OD는 여기 과정에서 흡광도이다. 상기 통합된 형광성 영역은 F-7000 형광 분광계를 이용한 상기 화합물의 방출 스펙트럼으로부터 얻었다. 그 결과, 상기 실시예 1.에서 합성된 프로브의 상대적인 양자 수율(Φ_{fl})은 피리딜 BODIPY의 양자 수율($\Phi_{fl} = 0.3$)에 대해 상대적으로 0.09로 결정되었다.

[105]

[106] 실험예 1. β -락타마제에 대한 프로브의 시그널링 특성 분석

- [107] β -락타마제에 대한 프로브의 시그널링 특성 분석을 위해 효소 동역학 분석을 수행하였다.

- [108] 구체적으로, 96-블랙 웰에 100 mM Tris-HCl(pH 7)에 존재하는 형광성 프로브(2 내지 150 μ M)에 0.1 내지 2.0 U/ μ L의 TEM-1 Bla를 첨가하였다. 효소 처리 후 즉시 형광 강도를 측정하였고 시그널 강도를 마이크로플레이트 판독기에서 5분 간격으로 60분 동안 지속적으로 모니터링하였고 그 결과를 도 3에 나타내었다. 대조군에는 TEM-1 Bla를 처리하지 않았다. 또한, 상기 효소에 의한 상기 프로브의 분해 반응의 촉매 상수(kcat) 및 미카엘리스 상수(Km)를 결정하기 위해, 증가된 강도들이 프로브 농도에 따라 플롯팅되었고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 이후, 상기 파라미터들은 곡선의 비-선형 피팅(fitting)에 의해 얻었다.

- [109] 도 3a에 나타낸 바와 같이, 상기 프로브를 효소와 반응시키는 경우, 512 nm에서의 형광 강도가 2.5-배까지 증가하였음을 알 수 있었다. 또한,

- 턴-온(turn-on) 녹색 시그널은 광 조사기(490 nm) 하에서 육안에서조차 확인할 수 있었다.
- [110] 또한, 도 3b에 나타낸 바와 같이, TEM-1의 검출에 대한 상기 프로브의 민감성은 0.03125 U/mL으로 낮음을 알 수 있었다. 상기의 결과로 상기 프로브가 성공적으로 Bla의 효소 활성을 검출할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [111] 도 4a에 나타낸 바와 같이, 시그널을 시간에 따라 측정하는 경우, 형광 강도는 개시 시간에 빠르게 증가하여 45분 후에 포화된 값에 도달하였음을 알 수 있었다.
- [112] 또한, 도 4b에 나타낸 바와 같이, 다양한 농도의 프로브에서의 강도 측정은 $12 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ 의 kcat 및 $51 \pm 12 \text{ }\mu\text{M}$ 의 Km을 제공하였다. kcat /Km 값에 의해 추정된 TEM-1의 효소적 효율은 $230,000 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ 이었고, 이것은 TEM-1에 의한 형광성 기질 CC1(kcat = $52 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ 및 Km = $70 \pm 7 \text{ }\mu\text{M}$) 및 CCF₂(kcat = $29 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ 및 Km = $23 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$)의 가수분해에 대해 이전에 보고된 값들(W. Gao, B. Xing, R. Y. Tsien and J.Rao, J Am Chem Soc.,2003, 125, 11146.)보다 현저하게 높은 값이다.
- [113]
- [114] 실험예 2. 박테리아 용해물에서의 CAZ 및/또는 CTX-내성 박테리아의 검출
- [115] CAZ 및/또는 CTX-내성 박테리아의 검출에 상기 실시예 1에서 합성된 프로브를 이용하고자 시도하여 형광성 기질의 실제적인 유용성을 추가적으로 테스트하였다.
- [116] 구체적으로, 확장된-스펙트럼 β -락타마제(ESBL)를 검출함에 있어서, 이중-반응성 프로브를 이용한 형광 테스트의 실행을 평가하는 데, CAZ 및/또는 CTX-내성 박테리아를 이용하였다. 상기 균주들은 여러 한국 병원들 또는 Nordmann 박사(Switzerland)로부터 제공받았다. 상술한 균주들은 디스크 강화 방법(W. Song, I.K Bae, Y.N Lee, C.H Lee, S.H Lee and S.H Jeong, J ClinMicrobiol,2007, 45, 1180)을 이용하여 기존에 ESBL 생산을 위해 스크리닝되었으며 blaCTX-M을 위한 멀티플렉스 PCR 및 시퀀싱을 통해 분자 수준에서 β -락타마제 함량에 대해 특징지어졌다.
- [117] 균주를 물러-힌톤 아가(아산, 대한민국)에서 분리하였고 형광 테스트를 실시하기 전에 16-24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 박테리아 단백질의 추출은 이전에 기재된 대로 실시하였다(P. Nordmann, L. Poirel and L. Dortet, Emerg. Infect. Dis.,2012, 18, 1503.). 간략하게는, 하나의 계산된 접종 루프(10 μL)의 상기 테스트 균주들을 150 μL 의 200 mM Tris-HCl 용해 완충액(B-PERII, 박테리아 단백질 추출 시약; Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA)에 재현탁하였으며, 1분 동안 볼텍싱하였고 상온에서 30분 동안 추가적으로 반응시켰다. 이러한 박테리아 현탁액을 상온에서 5분 동안 10,000 x g로 원심분리시켰다. 30 μL 의 상층액을 상기 실시예 1에서 제조한 100 μL 의 형광성 프로브(100 nM, 100 mM Tris-HCl, pH = 8)와 96-웰 트레이에서 혼합하였다.
- [118] 형광 시그널은 동력 모드로 Infinite F200pro(Tecan Croup Ltd.,Mannedorf,

Switzerland) 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 측정하였다. 여기 및 방출 파장은 각각 485 nm(대역폭 20 nm) 및 535 nm(대역폭 25 nm)로 셋팅되었다. 각 웰에 130 μ L의 최대 용량을 가지는 폴리스티렌 블랙 96 바닥이 평평한 웰 마이크로플레이트(Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)를 이용하였다. 각 테스트 시료의 형광 시그널을 5분 마다 90분 동안 측정하였고, 그 결과를 도 5 내지 7에 나타내었다. 양성 대조군으로서는 페놀 레드 어세이를 수행하였다. 구체적으로, 페놀 레드 어세이를 위해, 이전(P. Nordmann, L. Poirel and L. Dortet, *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, 18, 1503)에 보고된 대로 30 μ L의 상층액을 페놀 레드 용액(pH 7.8)을 포함하는 6 mg/mL 세프트리지덤 나트륨 염으로 이루어진 100 μ L의 용액과 혼합하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[119]

[120] 도 5a 및 6a에 나타낸 바와 같이, 상기 CAZ 및/또는 CTX 내성 박테리아는 0.5 mg/mL 또는 1 μ g/mL보다 더 낮은 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 가지는 약물-민감성 박테리아와 명확하게 구별되었다.

[121] 또한, 도 5b 및 6b에 나타낸 바와 같이 증가된 시그널은 박테리아에 대한 CAZ 및/또는 CTX의 최소 억제 농도에 다소 의존적임을 알 수 있는데, 이는 CAZ 및/또는 CTX 가수분해 활성화에 대한 상기 프로브의 특이성을 나타낸다.

[122] 또한, 도 7에 나타낸 바와 같이, 형광 강도가 CAZ 내성이면서, CTX 민감성인 균주, CAZ 민감성이면서, CTX 내성인 균주, 및 CAZ 및 CTX 둘 모두에 내성이 균주에서는 형광 강도가 증가하였으나, CAZ 및 CTX 둘 모두에 민감성인 균주에서는 형광강도가 증가하지 않았음을 알 수 있다. 상기의 결과로 일 구체예에 따른 프로브가 세팔로스포린계 항생제 내성인 균주를 검출할 수 있음을 나타낸다.

[123]

[124] [표1]

박테리아	페놀 레드	실시예 1의 프로브
CTX-M-14 (4)	음성	양성
CTX-M-15 + SHV-12 (128)	음성	양성
SHV-28 + TEM-1 (64)	음성	양성
CTX-M-9 (0.25)	음성	음성
BL1560 (8)	음성	양성
BL1679 (8)	음성	양성
BL2161 (4)	음성	양성
BL2514 (8)	음성	양성
BL2750 (0.125)	음성	음성
BL2780 (0.125)	음성	음성
BL2784 (0.5)	음성	음성
BL2788 (0.06)	음성	음성

[125]

[126] 참고: (a) 괄호 안의 숫자, CAZ의 MIC; (b) BL1560 같은 BL 시리즈, BL은 혈액(blood)으로 혈액에서 온 균주; 및 (c) 양성, 해당 프로브(페놀 레드 또는 실시예 1의 프로브)에 의해 신호가 검출된 경우(즉, 프로브의 신호 생성이 안 된 경우는 음성임).

[127]

[128] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 기존에 기술인 페놀 레드법은 효과적으로 항생제 내성 박테리아를 검출할 수 없는데 반해, 일 구체예에 따른 프로브는 항생제 내성 박테리아를 효과적으로 검출할 수 있음을 알 수 있다.

[129]

[130] **실험예 3. 임상 시료에서의 항생제 내성 박테리아 검출**

[131] **3.1. 혈액 시료 내 항생제 내성 박테리아 감별 능력 평가**

[132] 혈액 시료는 강남성모병원으로부터 총 185개를 제공받았다. 그 중 환자수는 119명이었고, 그 중 63명의 환자의 시료를 호기성 또는 혐기성 배양 조건에서 배양하여 얻어진 세균이 126개이었고, 1명의 환자의 시료는 호기성 및 혐기성 배양 조건에서 세균이 각각 2개씩 4개가 배양되어 얻어졌고, 55명의 환자 시료로부터는 혐기성 또는 호기성 배양 조건 중 하나의 조건에서만 세균이(호기성 -21개/혐기성-28개) 배양 되어 얻어졌다. 결과로, 혐기성 배양 조건에서 얻어진 균의 시료는 총 96개이고, 호기성 배양 조건에서 얻어진 균

시료는 총 93개 이었으며, 총 185개의 시료 중 44개가 ESBL 양성이었고, 141개가 ESBL 음성이었다. 이들의 균종 분류는 하기 표 2 내지 5와 같다.

[133]

[134] [표2]

ESBL 양성 균주	No.
<i>Escherichia coli</i>	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Kluyvera cryocrescens</i>	1
Total	44

[135]

[136] [표3]

ESBL 음성 균주	No.
<i>Achromobacter denitrificans</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
<i>Citrobacter braakii</i> , <i>Escherichia coli</i>	2
<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6
<i>Enterobacter cloacae</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	78
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Salmonella</i> , non-typhi	1
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> ,	2
total	141

[137]

[138] [표4]

실험에 사용된 185개의 시료

프로브 시험 185개 시료의 균종	No.
<i>Achromobacter denitrificans</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6
<i>Enterobacter cloacae</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	105
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Salmonella</i> , non-typhi	1
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Kluyvera cryocrescens</i>	1
<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	2
<i>Citrobacter braakii</i> , <i>Escherichia coli</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	2
Total	185

[139]

[140] [표5]

혈액샘플 종류	185
호기성혈액배양	63
혐기성혈액배양	126
ESBL	
양성	44
음성	141
환자수	119
호기성, 혐기성 샘플 동시	62*
호기성 샘플만	32**
혐기성 샘플만	25
* - 1인의 환자는 호기성, 혐기성 2set 4개의 sample 있음	
** - 2인의 환자는 혐기성 샘플만 2개	

[141]

[142] 균종에 있어서, 4명이 두 개 이상의 균이 있었으며, 각각 *Citrobacter freundii*와 *Kluyvera cryocrescens*, *Escherichia coli*와 *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter braakii*와 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*와 *Enterobacter cloacae*가 함께 자랐다.

[143] 혐기성 시료의 처리는 다음과 같이 수행하였다. 10 mL 혈액 배양액을 원심분리한 후, 침사를 제외한 상층액을 제거하였다. 10 ml 염수로 3회 세척한 후, 침사에 0.5 ml 염수를 첨가하여 침사를 부유시킨 뒤 100 ul, 400 ul 씩 두 개의 1.5 ml 튜브에 옮겼다. 이후에 다시 원심분리 후 400 ul을 분주한 튜브의 상층액을 버린 뒤에 B-PER 300 ul을 넣고, 4 °C에서 볼텍싱을 30분 동안 수행하였다. 이후에 라이시스(lysis)가 끝난 시료를 원심 분리후 상층액을 형광 강도 측정에 사용하였다. 100 ul을 분주한 튜브는 원심분리 후 상층액을 제거하고 DW 100 ul을 넣은 후 10 °C에서 10분간 가열하고 원심분리하여 상층액을 PCR 실험에 사용하였다.

[144] 호기성 시료의 처리는 다음과 같이 수행하였다. 10 mL 혈액 배양액을 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 암모늄 클로라이드 1ml, 5 % 사포닌 용액 5 ml를 침사와 섞은 후 10분간 방치하였다. 이후 원심분리 후 상층액을 제거한 뒤 10 ml 염수로 3회 세척한 후, 상기 혐기성 시료와 같은 과정으로 처리하였다.

[145] 형광의 측정은 실험군으로서 상기 실시예 1에서 제조된 프로브를 사용하였고,

양성 대조군으로서 페놀 레드를 사용하였다. 상기 일 구체예에 따른 프로브가 10 nM으로 들어가 있는 10 ul의 형광 용액에 전처리가 완료된 상기 시료 30 ul을 96-웰 트레이에서 혼합하였다. 페놀 레드 어세이는 상기 실험예 1에 기재된 것과 같이 수행하였다. 형광 시그널을 동력 모드로 Infinite F200pro(Tecan Croup Ltd.,Mannedorf, Switzerland) 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 측정하였다. 여기 및 방출 파장은 각각 485 nm(대역폭 20 nm) 및 535 nm(대역폭 25 nm)로 셋팅되었다. 형광 강도는 시료가 들어간 웰의 형광값을 시료가 들어가지 않은 대조군 웰(B-PER만 들어간 웰)의 형광값의 평균을 빼어 측정하였다.

[146] 상기의 결과에 대해 ROC 곡선을 확인하였다. 그 결과, 일 구체예에 따른 프로브는 10 분의 AUC가 0.967로 가장 좋은 결과를 보였으므로 이 시간대의 수치로 민감도와 특이도를 계산하였다.

[147] 각 시험법의 박테리아 검출의 특이도와 민감도는 진실 양성을 통해 산출하였고, 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다. 진실 양성은 Vitek2(제조사: bioMerieux)의 ESBL 검사에서 양성인 나온 균주를 PCR로 확인하고, PCR이 음성인 균주를 대상으로 표현형 테스트를 시행하여 양성을 나타내는 균주를 양성으로 판별함으로써 수행하였다.

[148]

[149] [표6]

검사법	ESBL 검출		CTX 또는 CAZ 내성 검출	
	민감도	특이도	민감도	특이도
실시예 1의 프로브	90.9%(40/44)	87.9%(123/141)	84.2%(48/57)	92.2%(118/128)
페놀 레드	88.6%(39/44)	99.3%(140/141)	68.4%(39/57)	99.2%(127/128)

[150]

[151] 또한, 추가적으로 ESBL의 유전자형 별로 일 구체예에 따른 프로브의 민감도 및 특이도를 분석하였고, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

[152] 또한, ESBL이 아닌 균에서도 CTX/CAZ 내성이 일정 정도 이상이면 감별 가능한지 확인하기 위해, ESBL을 발현하면서 특정 MIC를 갖는 균주에 대한 형광 강도를 분석하였고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

[153] [표7]

	실시예 1의 프로브		페놀 레드	
β -락타마제 종류	sensitivity (%)	specificity (%)	sensitivity (%)	specificity (%)
only CTX-M	96.30	97.83	96.30	100.00
including CTX-M	96.67	97.83	96.67	100.00
only TEM	42.86	97.83	0.00	100.00
including TEM	55.56	97.83	22.22	100.00
only SHV	100.00	97.83	0.00	100.00
including SHV	100.00	97.83	11.11	100.00
cAmpC	100.00	97.83	64.71	100.00
DHA	100.00	97.83	0.00	100.00
CIT	100.00	97.83	0.00	100.00
CMY	100.00	97.83	0.00	100.00
Total	93.51	97.83	45.45	100.00

[154]

[155] [표8]

β-락타마제 종류		종	No. of isolate s	Positivity of assays		Resistant rate of MIC by EUCAST			
				실시예 1의 프로브		CTX [2<]		CAZ [4<]	
ESB	L								
	CTX-M	Escherichia coli	14	13	92.9%	13	92.9%	8	57.1%
		Serratia marcescens	5	5	100.0%	5	100.0%	4	80.0%
		Klebsiella pneumoniae	3	3	100.0%	3	100.0%	2	66.7%
		Citrobacter freundii	3	3	100.0%	3	100.0%	2	66.7%
		Enterobacter cloacae	1	1	100.0%	1	100.0%	1	100.0%
		Samonella typhimurium	1	1	100.0%	1	100.0%	1	100.0%
	CTX-M total		27	26	96.3%	26	96.3%	18	66.7%
	TEM	Escherichia coli	5	2	40.0%	2	40.0%	3	60.0%
		Proteus mirabilis	1	1	100.0%	1	100.0%	0	0.0%
		Providencia stuartii	1	0	0.0%	0	0.0%	1	100.0%
	TEM total		7	3	42.9%	3	42.9%	4	57.1%
	SHV	Escherichia coli	3	3	100.0%	3	100.0%	3	100.0%
		Klebsiella pneumoniae	2	2	100.0%	2	100.0%	1	50.0%
		Serratia	1	1	100.0%	1	100.0%	1	100.0%

		marcescens			%				
	SHV total		6	6	100.0 %	6	100.0%	5	83.3%
	CTX- M+TE M	Citrobacter freundii	1	1	100.0 %	1	100.0%	1	100.0%
	CTX- M+SH V	Escherichia coli	1	1	100.0 %	1	100.0%	1	100.0%
		Enterobacter cloacae	1	1	100.0 %	1	100.0%	1	100.0%
	SHV+ TEM	Klebsiella pneumoniae	1	1	100.0 %	1	100.0%	1	100.0%
Amp C									
	cAmp C	Escherichia coli	6	6	100.0 %	6	100.0%	6	100.0%
		Citrobacter freundii	6	6	100.0 %	6	100.0%	6	100.0%
		Serratia marcescens	5	5	100.0 %	5	100.0%	2	40.0%
	cAmp C total		17	17	100.0 %	17	100.0%	14	82.4%
	DHA	Klebsiella pneumoniae	7	7	100.0 %	2	28.6%	6	85.7%
	CIT	Escherichia coli	4	4	100.0 %	1	25.0%	3	75.0%
	CMY	Escherichia coli	2	2	100.0 %	2	100.0%	1	50.0%
		Proteus mirabilis	2	2	100.0 %	2	100.0%	2	100.0%
	MOX	Klebsiella pneumoniae	1	1	100.0 %	1	100.0%	1	100.0%

β-락 타마 제충			77	72	93.5%	64	83.1%	58	75.3%
	Negati ve	Escherichia coli	44	1	2.3%	0	0.0%	0	0.0%
		Klebsiella pneumoniae	2	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
총			123	73	59.3%	64	52.0%	58	47.2%

[156]

[157] **3.2. 소변 시료 내 항생제 내성 박테리아 감별 능력 평가**

[158] 소변 시료는 강남성모병원으로부터 제공받아 사용하였다. 대상 균주로는, ESBL 양성 균주가 총 53개로 그 중 *Escherichia coli*가 43개였고, *Klebsiella pneumoniae*가 10개였으며, ESBL 음성 균주는 총 51개로 *Escherichia coli*가 43개, *Klebsiella pneumoniae*가 5개, 그리고 *Klebsiella oxytoca*가 3개였다.

[159] 소변 시료의 전처리는 다음과 같이 수행하였다. 소변 7 ml를 4000 g로 원심분리하여 상층액을 버리고 펠렛은 PBS 7 ml로 2번 세척하여 사용하였다. 마지막 세척 과정에서 펠렛을 350 ul의 PBS로 녹인 후에 70 ul를 DNA 분리에 사용하였고, 180 ul는 다시 원심 분리 후 200 ul의 B-PER 용액에 넣고 30분간 볼텍싱하였다.

[160] 이후에는 상기 실험예 3.1의 방법과 동일한 방법으로 형광 측정 및 페놀 레드 실험을 수행하였다. 그 결과, 일 구체예에 따른 프로브는 ESBL 검출, 및 CTX 또는 CAZ 내성에 따른 ROC 커브의 90분의 AUC가 각각 0.725 및 0.739로 가장 결과가 좋아 이 시간대의 수치로 민감도와 특이도를 계산하였고, 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

[161]

[162] [표9]

검사법	ESBL 검출		CTX 또는 CAZ 내성 검출	
	민감도	특이도	민감도	특이도
실험예 1의 프로브	63.0%(34/54))	80%(40/50)	64.8%(35/54))	82%(41/50)
페놀 레드	31.5%(17/54))	100%(50/50)	31.5%(17/54))	100%(50/50)

[163]

[164] 상기 표 6 내지 표 9에 나타낸 바와 같이, 일 구체예에 따른 프로브는 실제 임상

시료에서도 ESBL 발현 박테리아 및 항생제 내성 박테리아를 높은 민감도 및 특이도로 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.

[165]

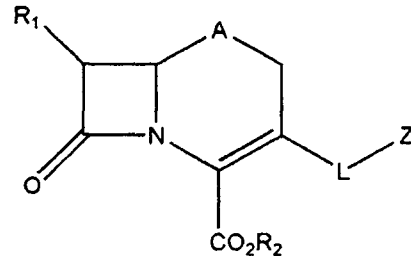
[166] 이상의 결과로, 일 구체예에 따른 프로브는 β -락타마제 또는 ESBL을 높은 민감도로 검출할 수 있어, 다양한 생화학적 연구들에 적용시킬 수 있을 뿐만 아니라, 종래의 pH 지시인자-기반된 방법에서 가능하지 않은 항생제 내성 박테리아의 임상적 검출이 가능하고, 항생제 내성 박테리아 감염 질환의 분자적 진단과 목적 시료로부터 항생제 내성 박테리아를 높은 민감도로 분석할 수 있음을 알 수 있다.

[167]

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물;

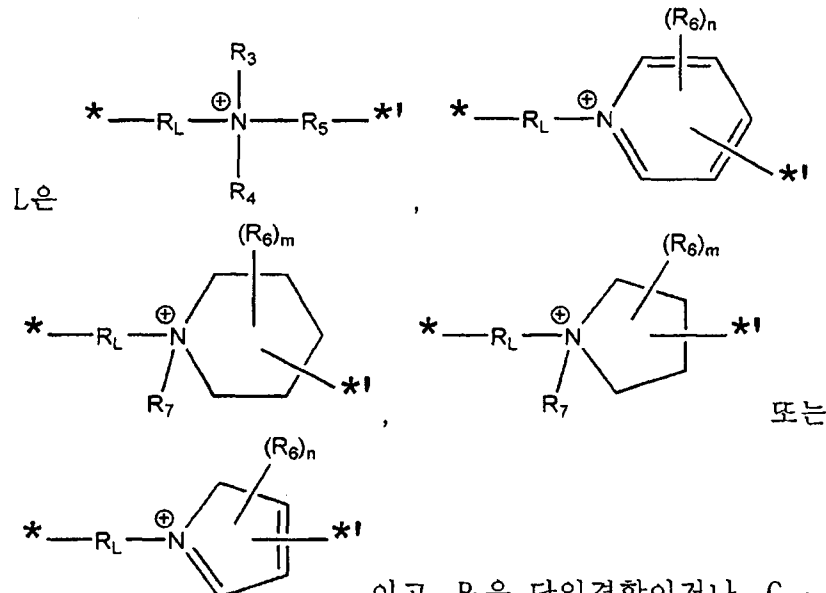
[화학식 1]



(코어 구조(core-structure)-L-Z)

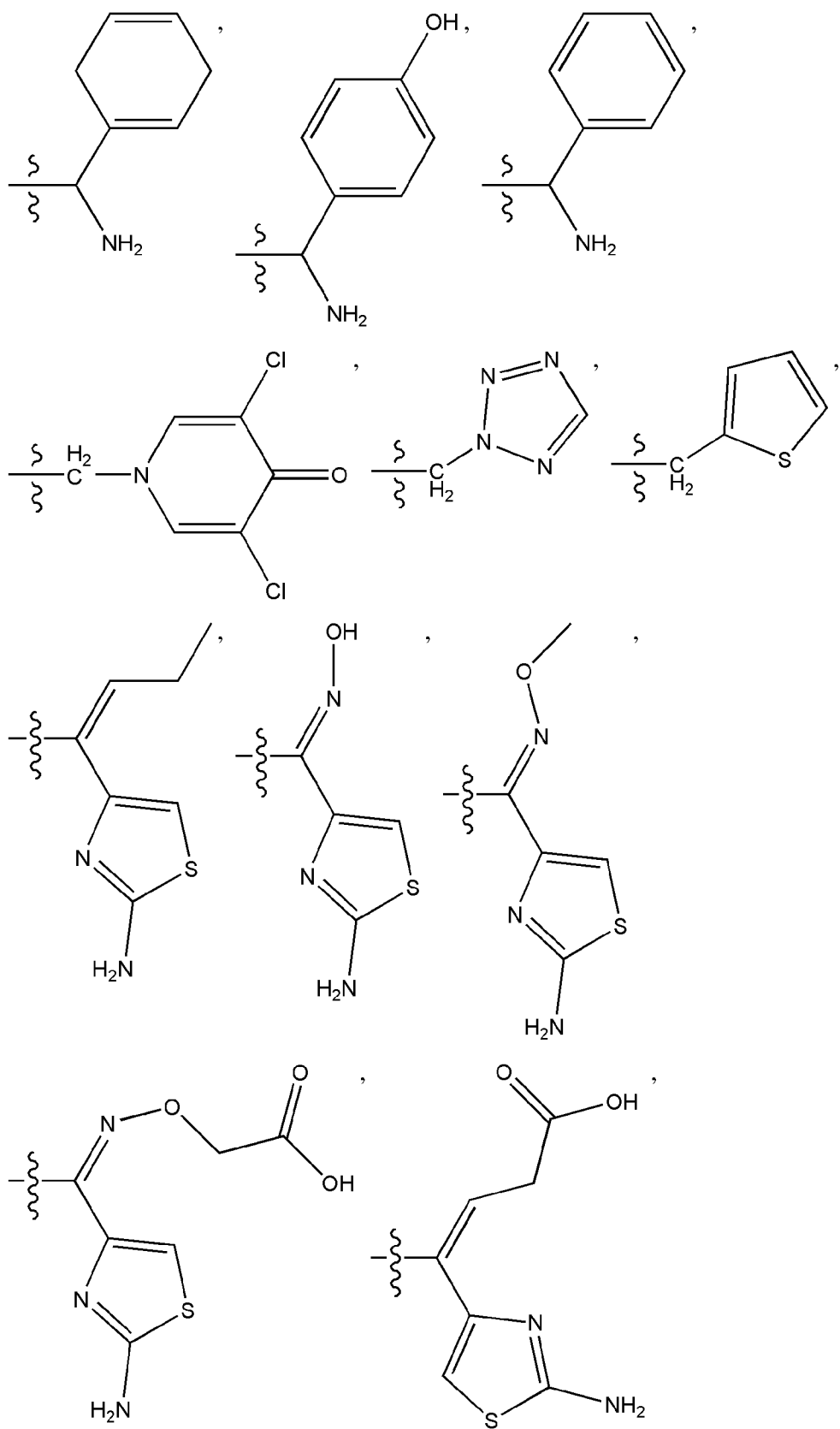
식 중, R₁은 세팔로스포린계 항생제의 코어 구조의 7번 위치의 치환기로부터 선택되고,

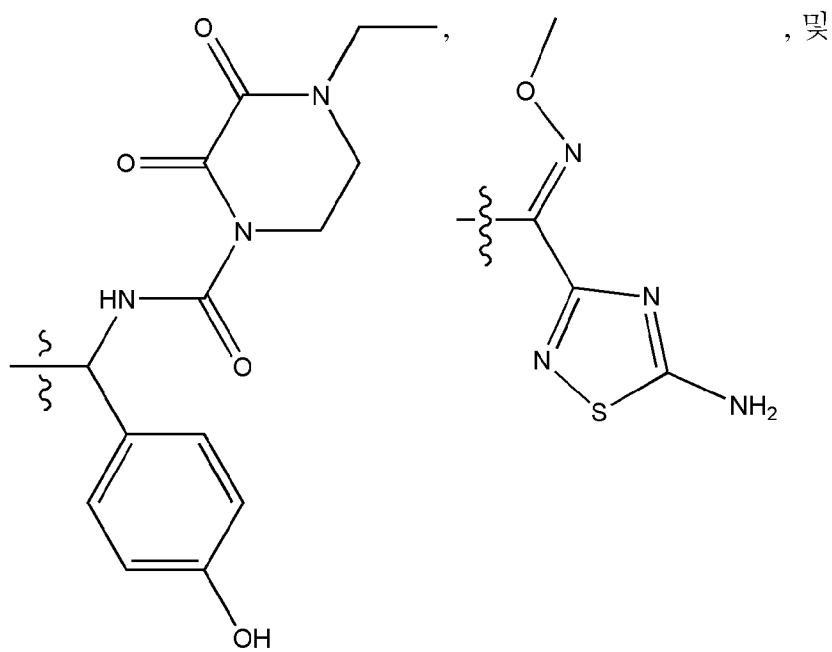
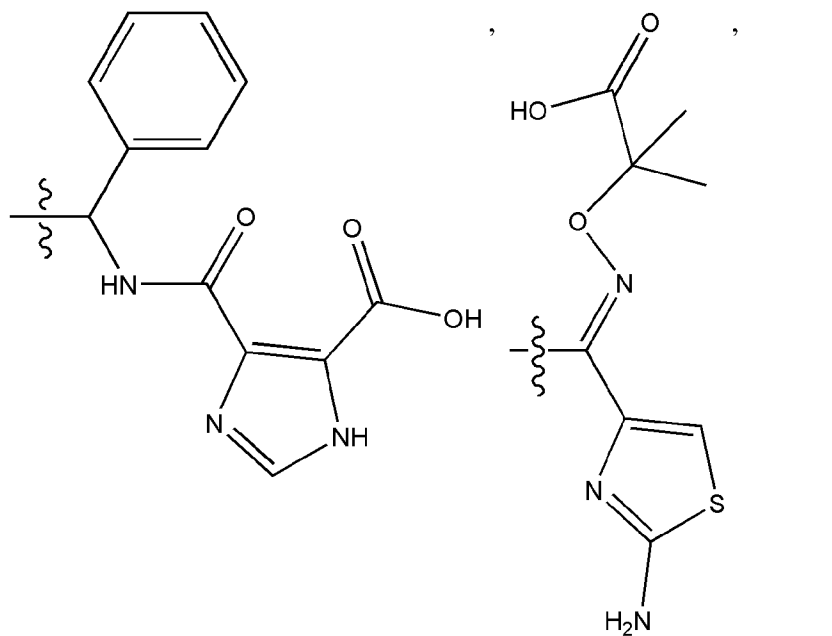
A는 S, O, SO, SO₂, 및 CH₂로 이루어진 군으로부터 선택되고,



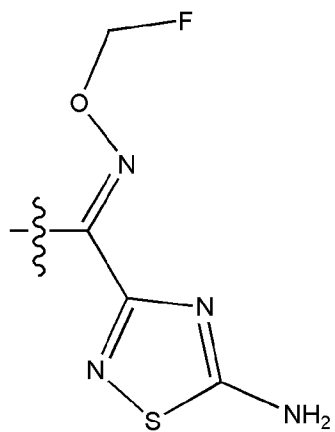
이고, R_L은 단일결합이거나, C₁₋₆ 알킬렌기, C₂₋₆ 알케닐렌기, 또는 C₂₋₆ 알키닐렌기이고, R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 C₁₋₆ 알킬기, C₂₋₆ 알케닐기, 또는 C₂₋₆ 알키닐기이고, R₅는 단일결합이거나, C₁₋₆ 알케닐기이고, R₆ 및 R₇는 각각 독립적으로, 수소 또는 C₁₋₆ 알킬기, C₂₋₆ 알케닐기, 또는 C₂₋₆ 알키닐기이고, n은 1 내지 4의 정수이고, m은 1 내지 9의 정수이고, *는 코어 구조와의 결합 부위이고, *'는 Z와의 결합 부위이고, 및 Z는 형광 모이어티이다.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, R₁은 H, -NH₂, 및 -NHCO-R'로 이루어진 군으로부터 선택되고, R'는 -CH₂-CN, -CH₂S-CF₃,



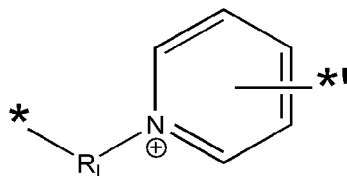


로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 화합물.



[청구항 3] 청구항 1에 있어서,

상기 L은



이고, 상기 식 중 R_L은

단일결합이거나, 메틸 또는 에틸이고, *는 코어 구조와의 결합 부위이고, *'는 Z와의 결합 부위인 것인 화합물.

[청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 형광 모이어티는

BODIPY(boron-dipyrromethene)인 것인 화합물.

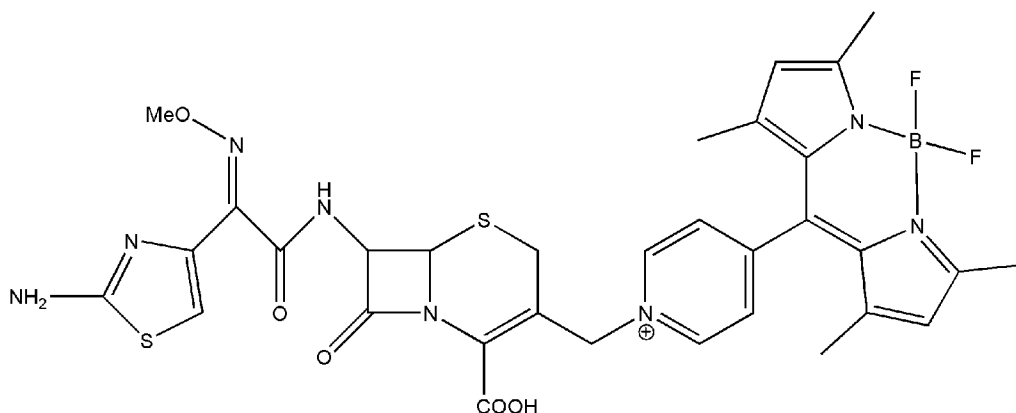
[청구항 5]

청구항 4에 있어서, 상기 BODIPY는 피리딜 BODIPY, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 화합물.

[청구항 6]

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것인 화합물;

[화학식 2]



[청구항 7]

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1의 Z는 L과 함께 β -락타마제 또는 확장된 스펙트럼 β -락타마제(extended spectrum β -lactamase: ESBL)에 의해 상기 화학식 1로부터 분리되어 형광을 나타내는 것인 화합물.

[청구항 8]

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 항생제 내성 박테리아 검출용 프로브.

[청구항 9]

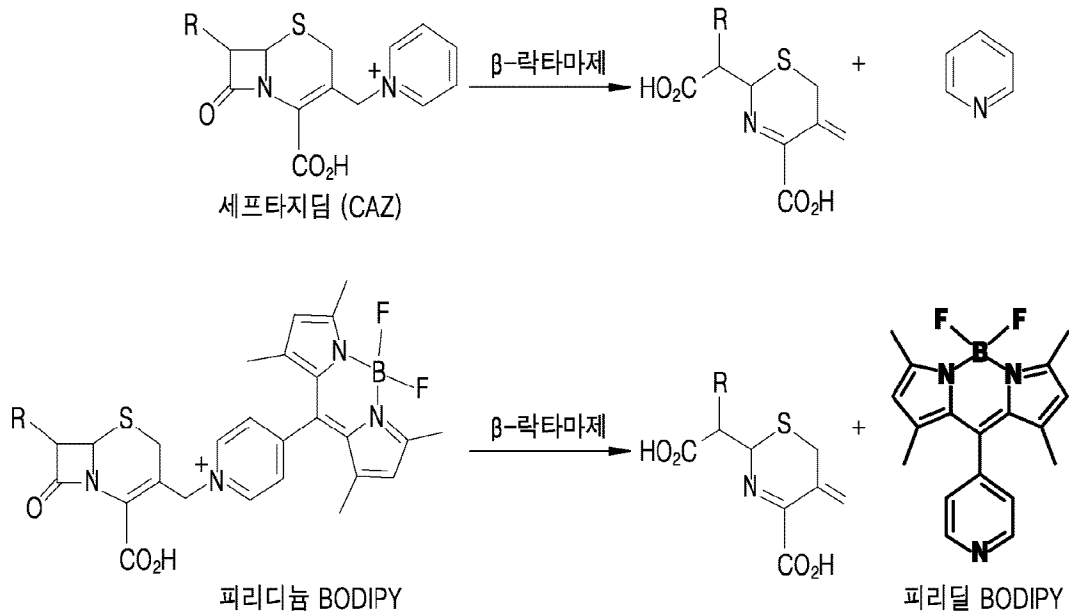
청구항 8에 있어서, 상기 항생제 내성 박테리아는 β -락타마제 또는 확장된-스펙트럼 β -락타마제(ESBL)를 발현하는 박테리아인 것인 프로브.

[청구항 10]

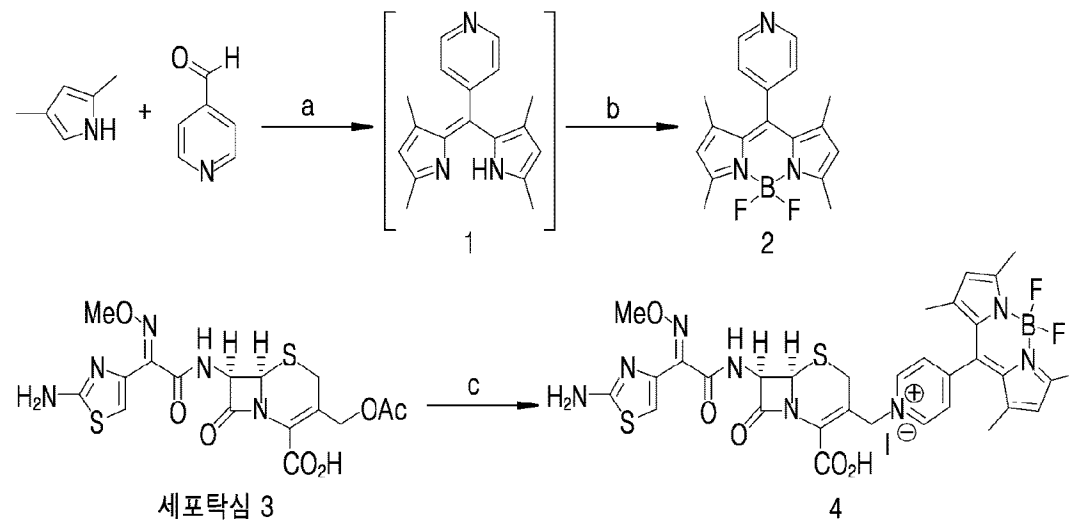
청구항 9에 있어서, 상기 ESBL을 발현하는 박테리아는 엔테로박터 종(*Enterobacter* spp.), 에스체리시아 종(*Escherichia* spp.), 살모넬라 종(*Samonella* spp.), 프로테우스 종(*Proteus* spp.), 시트로박터 종(*Citrobacter* spp.), 모르가넬라 종(*Morganella* spp.), 박테로이데스 종(*Bacteroides* spp.), 프로비덴시아 종(*Providencia* spp.), 세라티아 종(*Serratia* spp), 클렙시엘라 종(*Klebsiellasp.*), 쉬겔라 종(*Shigella* spp.), 슈도모나스 종(*Pseudomonas*

- spp.), 아시네토박터 종(*Acinetobacter* spp.) 및 클루이베라 종(*Kluyvera* spp.)으로부터 구성된 군으로부터 선택되는 박테리아인 것인 프로브.
- [청구항 11] 청구항 8에 있어서, 상기 항생제는 세팔로스포린(cephalosporin)계 항생제인 것인 프로브.
- [청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 세팔로스포린계 항생제는 세포탁심 또는 세프타지딤인 것인 프로브.
- [청구항 13] 청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 항생제 내성 박테리아 검출용 시약 조성물.
- [청구항 14] 청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 항생제 내성 박테리아 감염 진단용 키트.
- [청구항 15] 청구항 14에 있어서, 상기 박테리아 감염은 ESBL을 발현하는 박테리아 감염인 것인 키트.
- [청구항 16] 청구항 15에 있어서, 상기 ESBL을 발현하는 박테리아 감염에 의한 질환은 피부 및 연조직 감염, 발열성 호중구감소증, 기도관 감염, 상기도관 감염, 세기관지염, 폐렴(병원성), 폐혈증, 뇌수막염, 수술 중 감염, 이질, 전염성 부비동염, 복막염, 탄저병, 라임병, 골수염, 레지오넬라증, 브루셀라병(*Brucellosis*), 급성 장염, 공동체-획득성 호흡 감염, 트라코마, 신생아의 봉입체결막염, 보툴리눔 식중독, 급성식중독, 설사, 출혈성 대장염, 기관지염, 위궤양, 심장 내막염, 살모넬라증, 위장염, 적리, 기회 감염, 중이염, 부비동염, 인두염, 여드름, 모공성각화증(*keratosis pilaris*), 주사비, 할리퀸 어린선, 색소성 건피증, 각화증, 습진 및는 뇌사성 근막염으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인 키트.
- [청구항 17] 청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 화합물을 목적 시료와 접촉시키는 단계; 및
상기 목적 시료에서 청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 화합물로부터 발생된 형광을 검출하는 단계를 포함하는 항생제 내성 박테리아를 검출하는 방법.
- [청구항 18] 청구항 17에 있어서, 상기 시료는 세포 배양액, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 대변 및 그들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인 방법.

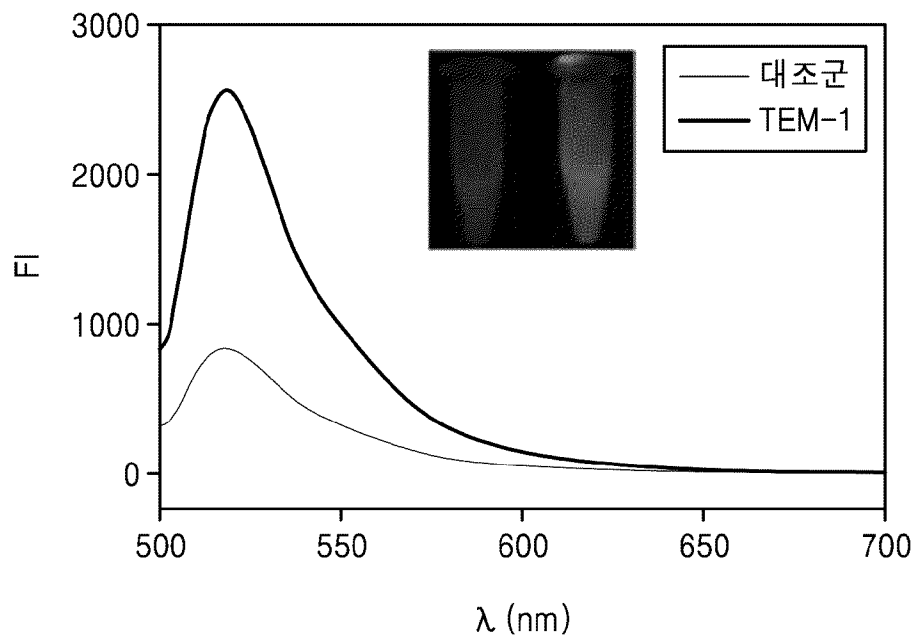
[도1]



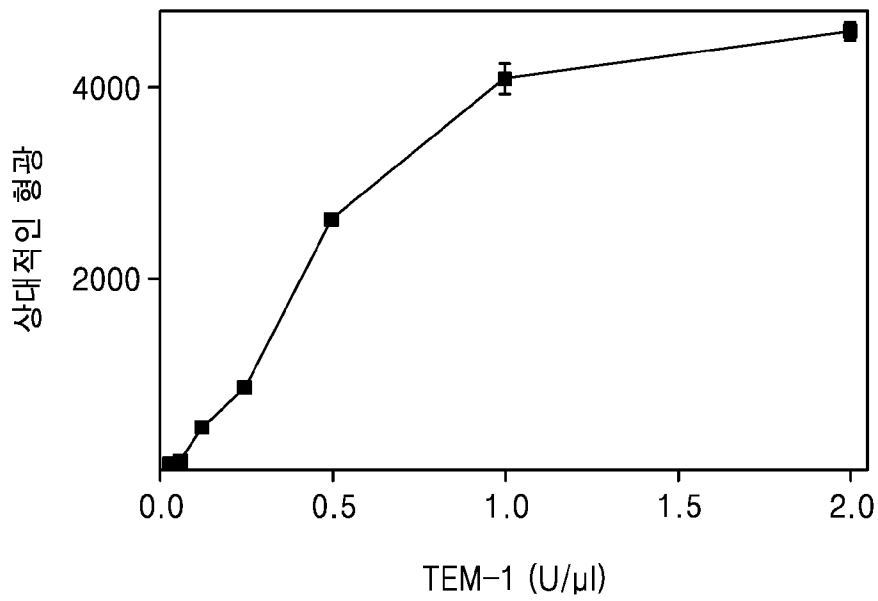
[도2]



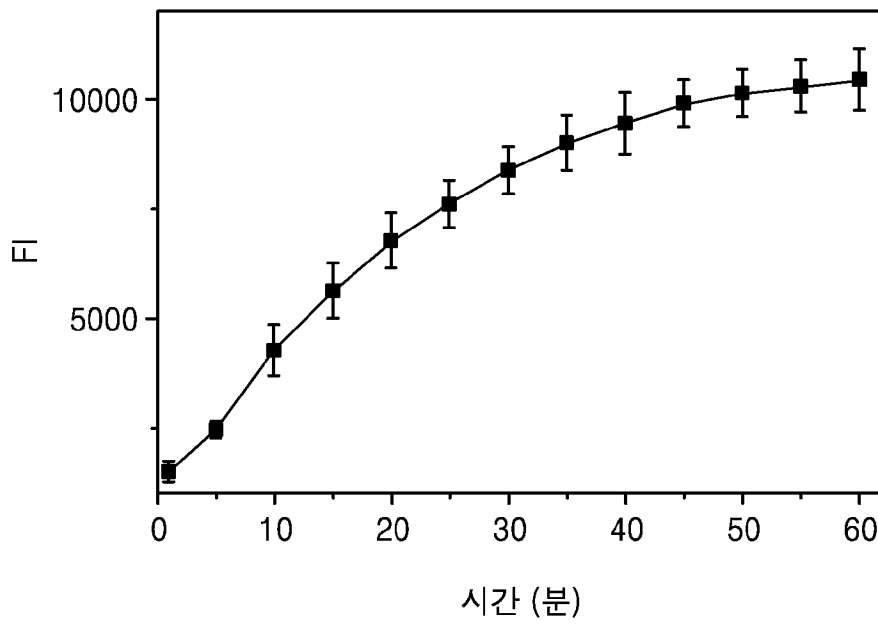
[도3a]



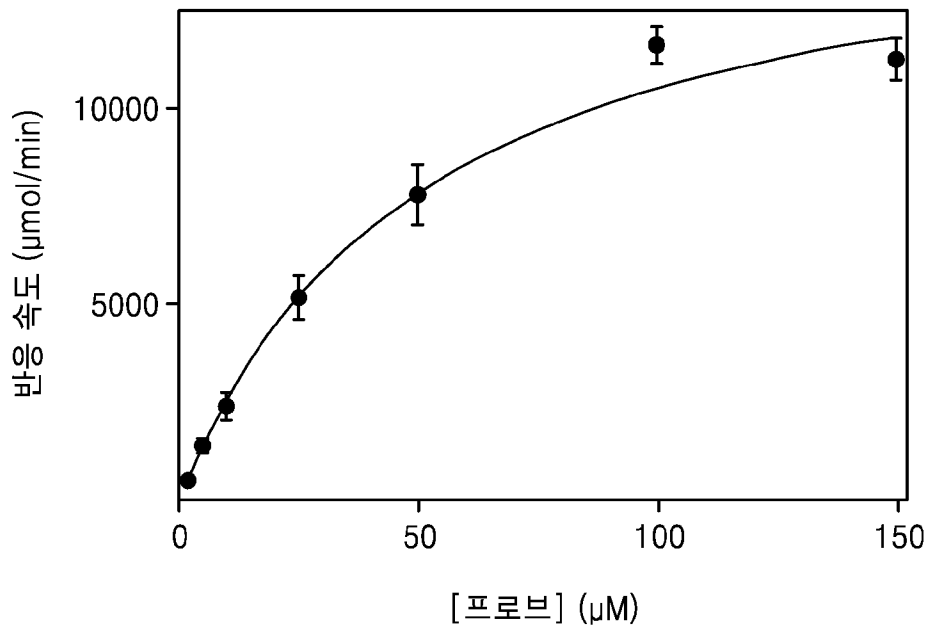
[도3b]



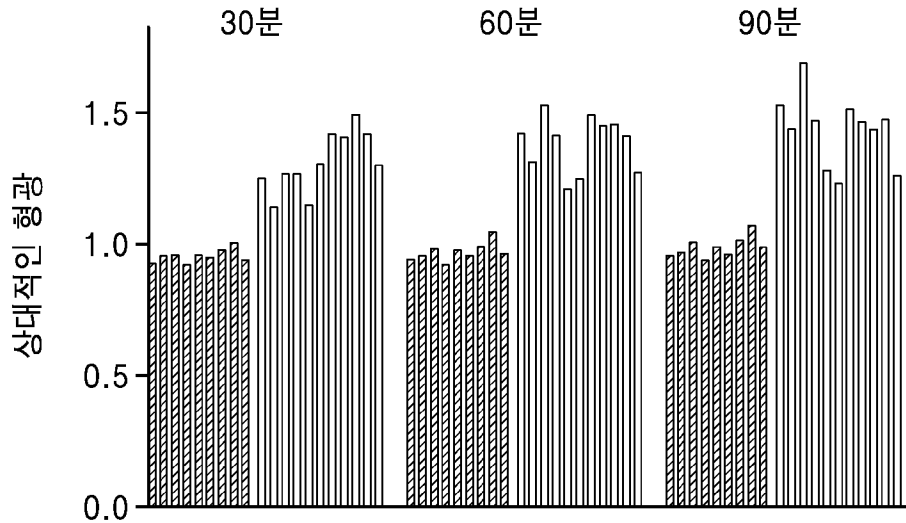
[도4a]



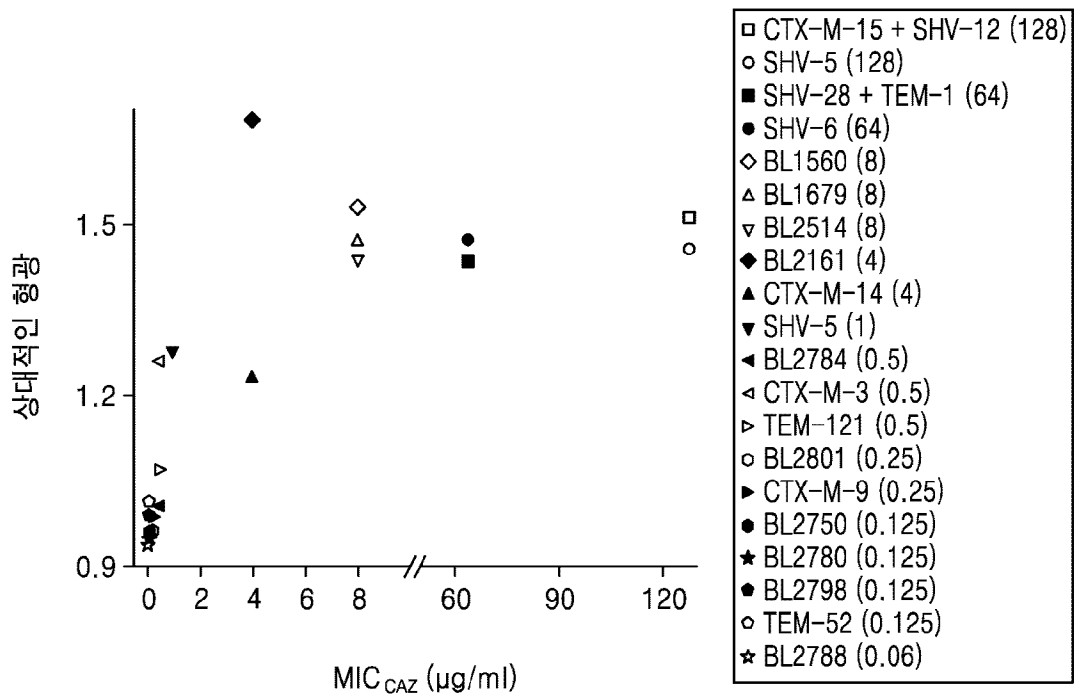
[도4b]



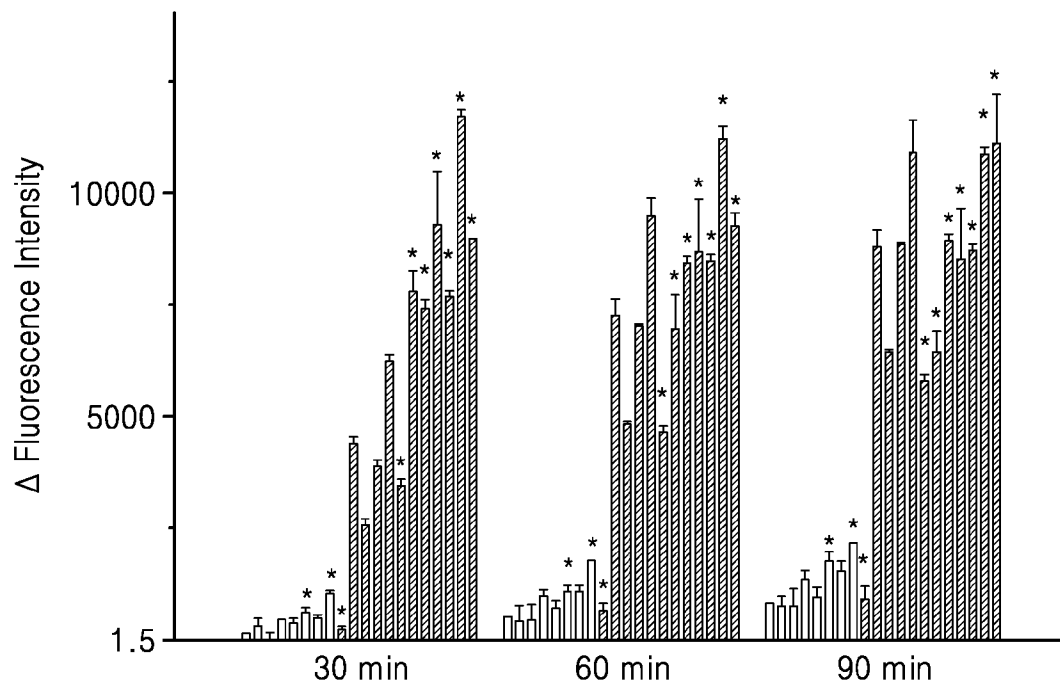
[도5a]



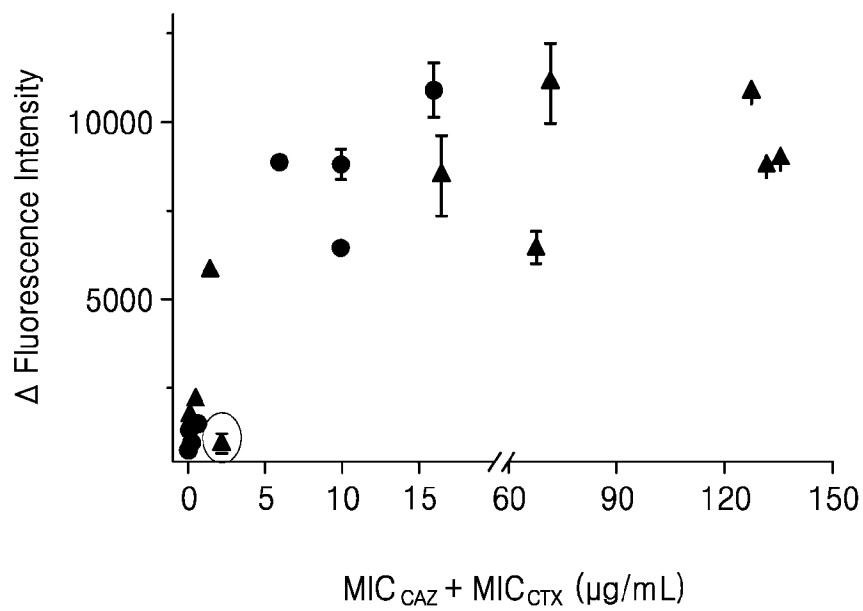
[도5b]



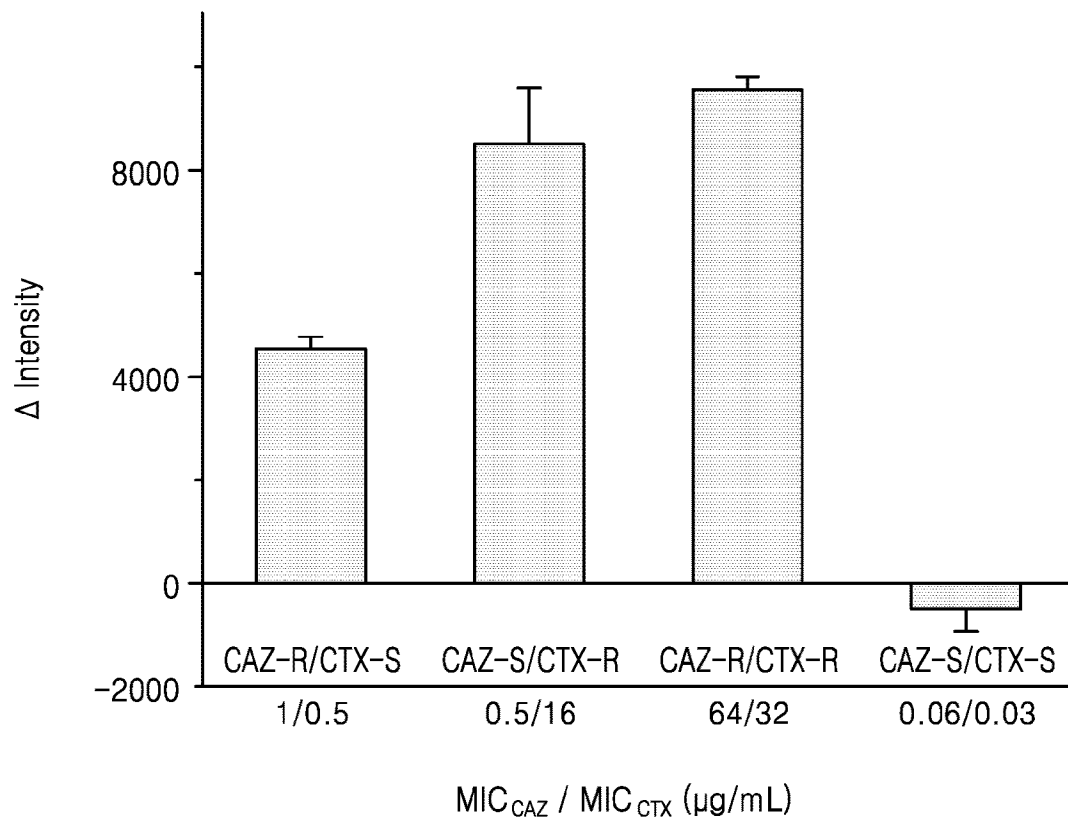
[도6a]



[도6b]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007476**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/58(2006.01)i, C12N 9/86(2006.01)i, G01N 33/569(2006.01)i, G01N 33/573(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)

G01N 33/58; C12Q 1/34; C07D 501/04; C07D 501/56; C12Q 1/00; C12N 9/86; G01N 33/569; G01N 33/573

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), STN (Registry, Caplus), Google & Keywords: antibiotic resistance, bacteria, detection, beta-lactamase, extended-spectrum-beta-lactamase, ESBL, cephalosporin, BODIPY, probe, kit, detection method

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007-0020715 A1 (TSIEN, R. Y. et al.) 25 January 2007 See abstract; paragraphs [0009]-[0011], [0013], [0019], [0046], [0060]-[0061], [0070], [0084]-[0086], [0108]; figures 7-8.	1-2,4-5,7-18
Y		3,6
Y	BARTELMESS, J. et al., "Preparation and Characterization of Multi-cationic BODIPYs and their Synthetically Versatile Precursors", Dyes and Pigments, 2013, vol. 97, no. 1, pages 1-8. See abstract; pages 2, 7; diagrams 2-3.	3,6
A	WO 2009-137062 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 12 November 2009 See abstract; pages 22-23, 31-33, 36-37, 56, 72.	1-18
A	KOWADA, T. et al., "BODIPY-based Probes for the Fluorescence Imaging of Biomolecules in Living Cells", Chem. Soc. Rev., [Electronic publishing] 24 March 2015, vol. 44, pages 4953-4972. See abstract; page 4956; figure 6.	1-18
A	WO 2005-071096 A2 (MOLECULAR PROBES, INC.) 04 August 2005 See abstract; claims 1, 15, 24.	1-18



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

23 NOVEMBER 2016 (23.11.2016)

Date of mailing of the international search report

23 NOVEMBER 2016 (23.11.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/007476

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2007-0020715 A1	25/01/2007	AU 1996-55266 B2	17/08/2000
		CA 2215310 A1	03/10/1996
		CA 2215310 C	21/05/2002
		CN 1066731 C	06/06/2001
		CN 1184479 A	10/06/1998
		CN 1213144 C	03/08/2005
		CN 1296078 A	23/05/2001
		EP 0817785 A2	08/03/2000
		EP 0817785 B1	04/04/2001
		EP 0982398 A1	01/03/2000
		EP 1405922 A2	07/04/2004
		EP 1405922 A3	29/09/2004
		EP 1405922 B1	24/08/2011
		JP 11-502714 A	09/03/1999
		JP 2005-021172 A	27/01/2005
		JP 3633940 B2	30/03/2005
		JP 3856807 B2	13/12/2006
		US 2003-0003526 A1	02/01/2003
		US 2003-0119085 A1	26/06/2003
		US 2005-0118669 A1	02/06/2005
		US 2005-0181469 A1	18/08/2005
		US 2007-0184513 A1	09/08/2007
		US 5741657 A	21/04/1998
		US 5955604 A	21/09/1999
		US 6291162 B1	18/09/2001
		US 6472205 B1	29/10/2002
		US 7157575 B2	02/01/2007
		US 7396926 B2	08/07/2008
		US 7427680 B2	23/09/2008
		US 8071761 B2	06/12/2011
		WO 2006-085978 A2	17/08/2006
		WO 2006-085978 A3	04/01/2007
		WO 96-30540 A2	03/10/1996
		WO 96-30540 A3	09/01/1997
WO 2009-137062 A2	12/11/2009	EP 2285381 A2	23/02/2011
		EP 2285381 A4	09/01/2013
		EP 2285381 B1	16/12/2015
		EP 3056497 A1	17/08/2016
		US 2011-0112059 A1	12/05/2011
		WO 2009-137062 A3	30/12/2009
WO 2005-071096 A2	04/08/2005	EP 1711504 A2	18/10/2006
		US 2005-0227309 A1	13/10/2005
		US 2009-0047692 A1	19/02/2009
		US 2012-0040380 A1	16/02/2012
		US 2013-0090470 A1	11/04/2013
		US 2016-0139135 A1	19/05/2016
		US 8318450 B2	27/11/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/007476

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 8865891 B2	21/10/2014
		WO 2005-071096 A3	15/12/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/58(2006.01)i, C12N 9/86(2006.01)i, G01N 33/569(2006.01)i, G01N 33/573(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/58; C12Q 1/34; C07D 501/04; C07D 501/56; C12Q 1/00; C12N 9/86; G01N 33/569; G01N 33/573

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), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: 항생제 내성, 박테리아, 검출, 베타-락타마제, 확장된 스펙트럼 베타-락타마제, ESBL, 세팔로스포린, BODIPY, 프로브, 키트, 검출 방법

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2007-0020715 A1 (TSIEN, R. Y. 등) 2007.01.25 요약; 단락 [0009]-[0011], [0013], [0019], [0046], [0060]-[0061], [0070], [0084]-[0086], [0108]; 도면 7-8 참조.	1-2, 4-5, 7-18
Y		3, 6
Y	BARTELMESS, J. 등, "Preparation and characterization of multi-cationic BODIPYs and their synthetically versatile precursors", Dyes and Pigments, 2013, 97권, 1호, 페이지 1-8. 초록; 페이지 2, 7; 도식 2-3 참조.	3, 6
A	WO 2009-137062 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2009.11.12 요약; 페이지 22-23, 31-33, 36-37, 56, 72 참조.	1-18
A	KOWADA, T. 등, "BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells", Chem. Soc. Rev., [전자공개] 2015.03.24, 44권, 페이지 4953-4972. 초록; 페이지 4956; 도면 6 참조.	1-18
A	WO 2005-071096 A2 (MOLECULAR PROBES, INC.) 2005.08.04 요약; 청구항 1, 15, 24 참조.	1-18

☐ 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

2016년 11월 23일 (23.11.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 11월 23일 (23.11.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2007-0020715 A1	2007/01/25	AU 1996-55266 B2 CA 2215310 A1 CA 2215310 C CN 1066731 C CN 1184479 A CN 1213144 C CN 1296078 A EP 0817785 A2 EP 0817785 B1 EP 0982398 A1 EP 1405922 A2 EP 1405922 A3 EP 1405922 B1 JP 11-502714 A JP 2005-021172 A JP 3633940 B2 JP 3856807 B2 US 2003-0003526 A1 US 2003-0119085 A1 US 2005-0118669 A1 US 2005-0181469 A1 US 2007-0184513 A1 US 5741657 A US 5955604 A US 6291162 B1 US 6472205 B1 US 7157575 B2 US 7396926 B2 US 7427680 B2 US 8071761 B2 WO 2006-085978 A2 WO 2006-085978 A3 WO 96-30540 A2 WO 96-30540 A3	2000/08/17 1996/10/03 2002/05/21 2001/06/06 1998/06/10 2005/08/03 2001/05/23 2000/03/08 2001/04/04 2000/03/01 2004/04/07 2004/09/29 2011/08/24 1999/03/09 2005/01/27 2005/03/30 2006/12/13 2003/01/02 2003/06/26 2005/06/02 2005/08/18 2007/08/09 1998/04/21 1999/09/21 2001/09/18 2002/10/29 2007/01/02 2008/07/08 2008/09/23 2011/12/06 2006/08/17 2007/01/04 1996/10/03 1997/01/09
WO 2009-137062 A2	2009/11/12	EP 2285381 A2 EP 2285381 A4 EP 2285381 B1 EP 3056497 A1 US 2011-0112059 A1 WO 2009-137062 A3	2011/02/23 2013/01/09 2015/12/16 2016/08/17 2011/05/12 2009/12/30
WO 2005-071096 A2	2005/08/04	EP 1711504 A2 US 2005-0227309 A1 US 2009-0047692 A1 US 2012-0040380 A1 US 2013-0090470 A1 US 2016-0139135 A1 US 8318450 B2	2006/10/18 2005/10/13 2009/02/19 2012/02/16 2013/04/11 2016/05/19 2012/11/27

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 8865891 B2 WO 2005-071096 A3	2014/10/21 2005/12/15