



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2022년01월07일  
(11) 등록번호 10-2348484  
(24) 등록일자 2022년01월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/569 (2017.01) C07H 15/203 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
G01N 33/56983 (2013.01)  
C07H 15/203 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7031383
- (22) 출원일자(국제) 2014년04월01일  
심사청구일자 2019년03월28일
- (85) 번역문제출일자 2015년10월30일
- (65) 공개번호 10-2016-0018479
- (43) 공개일자 2016년02월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/032567
- (87) 국제공개번호 WO 2014/165536  
국제공개일자 2014년10월09일
- (30) 우선권주장  
61/807,185 2013년04월01일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
JP2000501748 A\*  
(뒷면에 계속)

- (73) 특허권자  
백톤 디킨슨 앤드 컴퍼니  
미국, 뉴저지 07417-1880, 프랭클린 레이크스, 1  
백톤 드라이브
- (72) 발명자  
캠벨, 로버트  
미국 노스캐롤라이나 27507 블록 썸머 브리지 레  
인 9553  
돌란, 케빈, 지.  
미국 노스캐롤라이나 27540 홀리 스프링스 볼타  
플레이스 113  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
김순용

전체 청구항 수 : 총 154 항

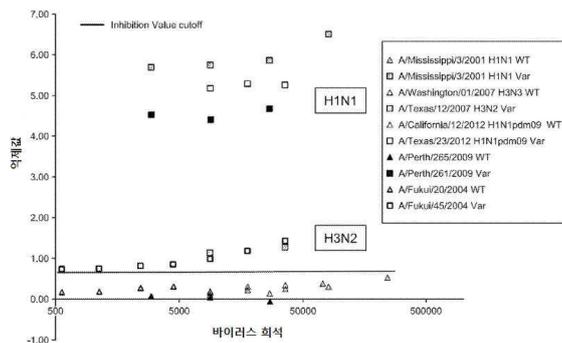
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 **인플루엔자의 진단을 위한 방법 및 키트**

**(57) 요약**

여기에 제공된 일부 구현에는 결합된 분석에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 인플루엔자 유형 A 또는 인플루엔자 유형 B를 식별하기 위한 분석은 항바이러스 약물에 대한 인플루엔자 뉴라미니다제의 민감도를 판단하기 위한 분석과 결합된다.

**대표도 - 도8**



- (52) CPC특허분류  
G01N 2333/11 (2013.01)  
G01N 2333/924 (2013.01)  
G01N 2500/02 (2013.01)
- (72) 발명자  
**펠로우스, 에릭**  
미국 노스캐롤라이나 27502 에이팩스 앨버슨스 플  
레이스 1301  
**호크, 랜달, 에이.**  
미국 노스캐롤라이나 27513 캐리 큐물러스 코트  
104  
**제이콥슨, 로스**  
미국 노스캐롤라이나 27278 힐스버러 엔씨 하이웨  
이 86 엔. 4911  
**제이. 브루스 피트너**  
미국 노스캐롤라이나 27712 더럼 퀸스무어 로드  
2903  
**봉크, 글렌**  
미국 노스캐롤라이나 27526 퍼웨이 버리나 파이니  
그로브- 월본 로드 2717  
**카체, 라자셰이커**  
미국 노스캐롤라이나 27519 캐리 킹스톤 그로브 드  
라이브 1218  
**굴라티, 우파마**  
미국 노스캐롤라이나 27519 캐리 파크맨 그랜트 드  
라이브 309  
**히멜, 허먼**  
미국 뉴저지 07417 프랭클린 레이크스 백톤 드라이  
브 1 백 톤, 디킨슨 앤드 컴퍼니 내  
**에반스-스툼스, 로즈메리, 비.**  
미국 노스캐롤라이나 27707 더럼 케트런 코트 5
- (56) 선행기술조사문헌  
US20080286758 A1  
JP2010525298 A  
JP3134999 B2  
EP02063270 A1  
WO2007053487 A2  
WO2010139047 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
-

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법:

- (a) 시료와 인플루엔자 바이러스 유형 A 또는 인플루엔자 바이러스 유형 B를 검출하기 위한 면역분석의 면역분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 면역분석 검사 시료를 수득하는 단계;
- (b) 면역분석 검사 시료의 제1 부분을 수득하고, 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석을 포함하는 검사에 대하여 면역분석 검사 시료의 제1 부분을 접촉시킴으로써, 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계;
- (c) 면역분석 검사 시료의 제2 부분을 수득하고, 면역분석 검사 시료의 제2 부분과 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 매트릭스를 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 수득하는 단계; 및
- (d) 뉴라미니다제 검사 시료와 뉴라미니다제 분석(assay)을 접촉시킴으로써, 시료 내 뉴라미니다제의 존재를 검출하는 단계,

여기서, 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성을 억제함.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 (c) 및 (d)는 동일한 용기에서 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 용기는 다수의 챔버를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 용기는 매트릭스를 포함하는 챔버, 및 뉴라미니다제 분석을 위한 시료를 포함하는 챔버를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 매트릭스는 가교결합된 다당류를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 매트릭스는 세파덱스(sephadex) 및 세파로스(sepharose)로 구성된 균으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 7

제2항에 있어서, 상기 면역분석 검사 시료 및 뉴라미니다제 검사 시료는 중력, 모세관 작용, 및 확산으로부터 선택된 1 이상의 힘에 의해 용기 내에서 이동하는 것인 방법.

#### 청구항 8

제2항에 있어서, 상기 용기는 카트리지(cartridge)를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 9

제2항에 있어서, 상기 용기는 광전자 증배관(photomultiplier)을 이용하여 관독되도록 구성된 멀티웰(multiwell) 카트리지를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 광전자 증배관은 광전자 증배관 튜브 및 마이크로-광전자 증배관 튜브로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 상기 광전자 증배관은 이동이 가능한 것인 방법.

**청구항 12**

제9항에 있어서, 상기 광전자 증배관은 휴대용 관독기 내에 있는 것인 방법.

**청구항 13**

제9항에 있어서, 상기 광전자 증배관 튜브 표면은 등글머 6 mm 내지 9 mm의 직경을 가지거나, 또는 상기 마이크로-광전자 증배관 튜브는 직사각형이며 1 mm 내지 3 mm의 크기를 갖는 것인 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 하기 단계를 포함하는 것인 방법:

- (a) 억제값 비율을 수득하는 단계로서, 상기 억제값 비율은 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치 사이의 비율이며; 및
- (b) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 억제 임계점은 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단되는 것인 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 유형 A 바이러스가 검출되는 경우 제1 억제 임계점이 사용되고, 유형 B 바이러스가 검출되는 경우 제2 억제 임계점이 사용되는 것인 방법.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 제1 억제 임계점은 제2 억제 임계점보다 낮은 것인 방법.

**청구항 19**

제15항에 있어서, 상기 억제 임계점은 검사 화합물에 의해 판단되는 것인 방법.

**청구항 20**

제15항에 있어서, 인플루엔자 치료용 검사 화합물을 선택하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 21**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 신호 효소(signaling enzyme)를 포함하는 이 중 효소 분석을 포함하는 것인 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성은 신호 효소의 기질을 생성하는 것인 방법.

**청구항 23**

제21항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid) 및 루시페린(luciferin)의 복합체(conjugate) 또는 이들의 유도체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 24**

제21항에 있어서, 뉴라미니다제 활성은 신호 효소에 대한 억제제를 생성하는 것인 방법.

**청구항 25**

제21항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤(trifluoromethylketone)의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤(trifluoromethylketone)의 복합체의 유도체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 26**

제21항에 있어서, 상기 신호 효소는 루시페라제(luciferase)를 포함하는 것인 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 면역분석 완충용액은 루시페라제 활성을 억제하는 것인 방법.

**청구항 28**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성의 수치는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정되는 것인 방법.

**청구항 29**

제15항에 있어서, 상기 검사 화합물은 항바이러스 약물인 것인 방법.

**청구항 30**

제15항에 있어서, 상기 검사 화합물은 오셀타미비르(Osetamivir), 자나미비르(Zanamivir), 라니나미비어(Lanamivir), 및 페라미비르(Peramivir)로 구성된 군으로부터 선택된 항바이러스 약물인 것인 방법.

**청구항 31**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역분석은 샌드위치 분석을 포함하는 것인 방법.

**청구항 32**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 피험자(subject)로부터 수득하는 것인 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 상기 피험자는 인플루엔자를 갖는 것으로 의심되는 것인 방법.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 상기 피험자는 인간인 것인 방법.

**청구항 35**

하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법:

(a) 시료와 뉴라미니다제 분석의 뉴라미니다제 분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 수득하는 단계;

(b) 뉴라미니다제 검사 시료의 제1 부분을 수득하고, 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석을 포함하는 검사에 대하여 뉴라미니다제 검사 시료의 제1 부분을 접촉시키고, 여기서 뉴라미니다제 검사 시료는 면역분석 완충용액을 포함하는 매트릭스와 접촉함으로써, 면역분석 검사 시료를 수득하고 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; 및

(c) 뉴라미니다제 검사 시료의 제2 부분을 수득하고, 뉴라미니다제 검사 시료의 제2 부분과 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 시료 내 뉴라미니다제의 존재를 검출하는 단계,

여기서, 뉴라미니다제 분석 완충용액은 인플루엔자 유형 A 및 인플루엔자 유형 B로 이루어진 균으로부터 선택된 항원에 대한 항체의 특이적 결합을 억제함.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 매트릭스는 동결건조된 또는 건조된 면역분석 완충용액을 포함하는 것인 방법.

**청구항 37**

제35항에 있어서, 상기 단계 (c)는 다수의 챔버를 포함하는 용기 내에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 상기 용기는 광전자 증배관 튜브 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브를 이용하여 관독되도록 구성된 멀티웰 카트리지가 또는 스트립을 포함하는 것인 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 상기 광전자 증배관 튜브 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브는 이동이 가능한 것인 방법.

**청구항 40**

제38항에 있어서, 상기 광전자 증배관 튜브는 휴대용 관독기 내에 있는 것인 방법.

**청구항 41**

제38항에 있어서, 상기 광전자 증배관 튜브 표면은 둥글며 6 mm 내지 9 mm의 직경을 가지거나, 또는 상기 마이크로-광전자 증배관 튜브는 직사각형이며 1 mm 내지 3 mm의 크기를 갖는 것인 방법.

**청구항 42**

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 하기 단계를 포함하는 것인 방법:

(a) 억제값 비율을 수득하는 단계로서, 상기 억제값 비율은 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치 사이의 비율이며; 및

(b) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 상기 억제 임계점 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단되는 것인 방법.

**청구항 45**

제44항에 있어서, 유형 A 바이러스가 검출되는 경우 제1 억제 임계점이 사용되고, 유형 B 바이러스가 검출되는 경우 제2 억제 임계점이 사용되는 것인 방법.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 상기 제1 억제 임계점은 제2 억제 임계점보다 낮은 것인 방법.

**청구항 47**

제43항에 있어서, 상기 억제 임계점은 검사 화합물에 의해 판단되는 것인 방법.

**청구항 48**

제43항에 있어서, 인플루엔자 치료용 검사 화합물을 선택하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 49**

제43항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 신호 효소를 포함하는 이중 효소 분석을 포함하는 것인 방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성화는 신호 효소의 기질을 생성하는 것인 방법.

**청구항 51**

제43항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체의 유도체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 52**

제43항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성화는 신호 효소에 대한 억제제를 생성하는 것인 방법.

**청구항 53**

제49항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체의 유도체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 54**

제49항에 있어서, 상기 신호 효소는 루시페라제를 포함하는 것인 방법.

**청구항 55**

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성화의 수치는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정되는 것인 방법.

**청구항 56**

제43항에 있어서, 상기 검사 화합물은 항바이러스 약물인 것인 방법.

**청구항 57**

제43항에 있어서, 상기 검사 화합물은 오셀타미비르, 자나미비르, 라니나미비어, 및 페라미비르로 구성된 군으로부터 선택된 항바이러스 약물인 것인 방법.

**청구항 58**

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역분석은 샌드위치 분석을 포함하는 것인 방법.

**청구항 59**

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 피험자로부터 취득하는 것인 방법.

**청구항 60**

제59항에 있어서, 상기 피험자는 인플루엔자를 갖는 것으로 의심되는 것인 방법.

**청구항 61**

제60항에 있어서, 상기 피험자는 인간인 것인 방법.

**청구항 62**

하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 치료용 검사 화합물을 선택하는 방법:

- (a) 시료와 인플루엔자 바이러스 유형 A 또는 인플루엔자 바이러스 유형 B를 검출하기 위한 면역분석의 면역분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 면역분석 검사 시료를 수득하는 단계;
- (b) 면역분석 검사 시료의 제1 부분을 수득하고, 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역 분석을 포함하는 검사에 대하여 면역분석 검사 시료의 제1 부분을 접촉시킴으로써, 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계;
- (c) 면역분석 검사 시료의 제2 부분을 수득하고, 면역분석 검사 시료의 제2 부분과 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 매트릭스를 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 수득하는 단계;
- (d) 뉴라미니다제 검사 시료와 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계로서, 판단은 하기 단계를 포함한다:
  - (i) 억제값 비율을 수득하는 단계로서, 상기 억제값 비율은 1 이상의 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 1 이상의 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치 사이의 비율이며, 및
  - (ii) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계; 및
- (e) 뉴라미니다제 활성을 억제하는 것으로 판단된 1 이상의 검사 화합물로부터 검사 화합물을 선택하는 단계.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 상기 억제 임계점은 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단되는 것인 방법.

**청구항 64**

제62항에 있어서, 유형 A 바이러스가 검출된다면 제1 억제 임계점이 사용되고, 유형 B 바이러스가 검출된다면 제2 억제 임계점이 사용되는 것인 방법.

**청구항 65**

제64항에 있어서, 상기 제1 억제 임계점은 제2 억제 임계점보다 낮은 것인 방법.

**청구항 66**

제62항에 있어서, 상기 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성의 분석을 억제하는 것인 방법.

**청구항 67**

제62항에 있어서, 상기 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성을 억제하는 것인 방법.

**청구항 68**

제62항에 있어서, 상기 단계 (c) 및 (d)는 동일한 용기에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 69**

제68항에 있어서, 상기 용기는 다수의 챔버를 포함하는 것인 방법.

**청구항 70**

제68항에 있어서, 상기 용기는 매트릭스를 포함하는 챔버, 및 뉴라미니다제 분석을 위한 시약을 포함하는 챔버를 포함하는 것인 방법.

**청구항 71**

제62항에 있어서, 상기 매트릭스는 가교결합된 다당류를 포함하는 것인 방법.

**청구항 72**

제71항에 있어서, 상기 매트릭스는 세파텍스 및 세파로스로 구성된 균으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 73**

제68항에 있어서, 상기 면역분석 검사 시료 및 뉴라미니다제 검사 시료는 중력, 모세관 작용, 및 확산으로부터 선택된 1 이상의 힘에 의해 용기 내로 이동하는 것인 방법.

**청구항 74**

제68항에 있어서, 상기 용기는 카트리지를 포함하는 것인 방법.

**청구항 75**

제68항에 있어서, 상기 용기는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 판독되도록 구성된 멀티웰 카트리지를 포함하는 것인 방법.

**청구항 76**

제75항에 있어서, 상기 광전자 증배관 튜브는 이동이 가능한 것인 방법.

**청구항 77**

제75항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 신호 효소를 포함하는 이중 효소 분석을 포함하는 것인 방법.

**청구항 78**

제77항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성화는 신호 효소의 기질을 생성하는 것인 방법.

**청구항 79**

제77항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체의 유도체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 80**

제77항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성화는 신호 효소에 대한 억제제를 생성하는 것인 방법.

**청구항 81**

제80항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체의 유도체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 82**

제77항에 있어서, 상기 신호 효소는 루시페라제를 포함하는 것인 방법.

**청구항 83**

제62항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역분석 완충용액은 루시페라제 활성을 억제하는 것인 방법.

**청구항 84**

제62항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성화의 수치는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정되는 것인 방법.

**청구항 85**

제62항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검사 화합물은 항바이러스 약물인 것인 방법.

**청구항 86**

제62항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검사 화합물은 오셀타미비르, 자나미비르, 라니나미비어 및 페라미비르로 구성된 군으로부터 선택된 항바이러스 약물인 것인 방법.

**청구항 87**

제62항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역분석은 샌드위치 분석을 포함하는 것인 방법.

**청구항 88**

제62항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 피험자로부터 획득하는 것인 방법.

**청구항 89**

제88항에 있어서, 상기 피험자는 인플루엔자를 갖는 것으로 의심되는 것인 방법.

**청구항 90**

제88항에 있어서, 상기 피험자는 인간인 것인 방법.

**청구항 91**

하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 치료용 검사 화합물을 선택하는 방법:

(a) 시료와 뉴라미니다제 분석의 뉴라미니다제 분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 획득하는 단계;

(b) 뉴라미니다제 검사 시료의 제1 부분을 획득하고, 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석을 포함하는 검사에 대하여 뉴라미니다제 검사 시료의 제1 부분을 접촉시키고, 여기서 뉴라미니다제 검사 시료는 면역분석 완충용액을 포함하는 매트릭스와 접촉함으로써, 면역분석 검사 시료를 획득하고 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; 및

(c) 뉴라미니다제 검사 시료의 제2 부분을 획득하고, 뉴라미니다제 검사 시료의 제2 부분과 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 검사 시료의 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계로서, 판단은 하기 단계를 포함한다:

(i) 억제값 비율을 획득하는 단계로서, 상기 억제값 비율은 1 이상의 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 1 이상의 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치 사이의 비율이며, 및

(ii) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계; 및

(e) 뉴라미니다제 활성을 억제하는 것으로 판단된 1 이상의 검사 화합물로부터 검사 화합물을 선택하는 단계;

여기서 뉴라미니다제 분석 완충용액은 인플루엔자 유형 A 및 인플루엔자 유형 B로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 대한 항체의 특이적 결합을 억제함.

**청구항 92**

제91항에 있어서, 상기 억제 임계점은 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단되는 것인 방법.

**청구항 93**

제92항에 있어서, 유형 A 바이러스가 검출된다면 제1 억제 임계점이 사용되고, 유형 B 바이러스가 검출된다면 제2 억제 임계점이 사용되는 것인 방법.

**청구항 94**

제93항에 있어서, 상기 제1 억제 임계점은 제2 억제 임계점보다 낮은 것인 방법.

**청구항 95**

제91항에 있어서, 상기 매트릭스는 동결건조된 또는 다른 방법으로 건조된 면역분석 완충용액을 포함하는 것인 방법.

**청구항 96**

제91항에 있어서, 상기 단계 (c)는 동일한 용기에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 97**

제96항에 있어서, 상기 단계 (c)는 다수의 챔버를 포함하는 용기 내에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 98**

제96항에 있어서, 상기 용기는 광전자 증배관 튜브 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브를 이용하여 판독되도록 구성된 멀티웰 스트립 또는 카트리지를 포함하는 것인 방법.

**청구항 99**

제98항에 있어서, 상기 광전자 증배관 튜브 마이크로-광전자 증배관 튜브는 이동이 가능한 것인 방법.

**청구항 100**

제98항에 있어서, 상기 광전자 증배관 튜브는 휴대용 판독기 내에 있는 것인 방법.

**청구항 101**

제98항에 있어서, 상기 광전자 증배관 튜브 표면은 등글머 6 mm 내지 9 mm의 직경을 가지거나, 또는 상기 마이크로-광전자 증배관 튜브는 직사각형이며 1 mm 내지 3 mm의 크기를 갖는 것인 방법.

**청구항 102**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자 치료용 검사 화합물을 선택하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

**청구항 103**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 신호 효소를 포함하는 이중 효소 분석을 포함하는 것인 방법.

**청구항 104**

제103항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성화는 신호 효소의 기질을 생성하는 것인 방법.

**청구항 105**

제104항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체의 유도체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 106**

제103항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성화는 신호 효소에 대한 억제제를 생성하는 것인 방법.

**청구항 107**

제106항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체의 유도체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 108**

제103항에 있어서, 상기 신호 효소는 루시페라제를 포함하는 것인 방법.

**청구항 109**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성화의 수치는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정되는 것인 방법.

**청구항 110**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검사 화합물은 항바이러스 약물인 것인 방법.

**청구항 111**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검사 화합물은 오셀타미비르, 자나미비르, 라니나미비어, 및 페라미비르로 구성된 군으로부터 선택된 항바이러스 약물인 것인 방법.

**청구항 112**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역분석은 샌드위치 분석을 포함하는 것인 방법.

**청구항 113**

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 피험자로부터 취득되는 것인 방법.

**청구항 114**

제113항에 있어서, 상기 피험자는 인플루엔자를 갖는 것으로 의심되는 것인 방법.

**청구항 115**

제113항에 있어서, 상기 피험자는 인간인 것인 방법.

**청구항 116**

하기를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위한 진단 시스템:

검사 시료 내 뉴라미니다제 활성을 판단하기 위한 카트리지, 여기서 카트리는 검사 시료 및 면역분석 완충용액을 포함하는 면역분석 시료를 검사 시료 및 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 뉴라미니다제 분석 시료가 되도록 처리하도록 구성되고, 여기서 면역분석 완충용액은 검출을 억제하며;

검사 시료에서 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 검사 유닛, 여기서 검사 유닛은 검사 시료 및 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 뉴라미니다제 분석 시료를 검사 시료 및 면역분석 완충용액을 포함하는 면역분석 시료가 되도록 처리하도록 구성되며, 여기서 뉴라미니다제 분석 완충용액은 검출을 억제하며;

검사 유닛으로부터 신호를 측정하도록 구성된 제1 검출기; 및

카트리지로부터 신호를 측정하도록 구성된 제2 검출기.

**청구항 117**

제116항에 있어서, 상기 카트리는 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 카트리지 매트릭스, 및 뉴라미니다제 활성 판단을 위한 시약을 포함하는 시약 챔버;를 포함하는 매트릭스 챔버를 포함하는 것인 시스템.

**청구항 118**

제117항에 있어서, 상기 카트리지 매트릭스는 가교결합된 다당류를 포함하는 것인 시스템.

**청구항 119**

제118항에 있어서, 상기 카트리지 매트릭스는 세파텍스 및 세파로스로 구성된 군으로부터 선택된 것인 시스템.

**청구항 120**

제117항에 있어서, 상기 매트릭스 챔버 및 카트리지 챔버는 매트릭스 챔버에 적용된 시료가 매트릭스 챔버로부터 시약 챔버로 흐르도록 유체 연통(fluid communication) 내에 있는 것인 시스템.

**청구항 121**

제120항에 있어서, 상기 시료는 중력, 모세관 작용, 및 확산으로부터 선택된 1 이상의 힘에 의해 카트리지 내에서 흐르는 것인 시스템.

**청구항 122**

제116항에 있어서, 상기 카트리지는 광전자 증배관 튜브 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브를 이용하여 판독되도록 구성된 멀티웰 카트리지를 포함하는 것인 시스템.

**청구항 123**

제116항에 있어서, 상기 검사는 면역분석을 포함하는 것인 시스템.

**청구항 124**

제123항에 있어서, 상기 면역분석은 샌드위치 분석인 것인 시스템.

**청구항 125**

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검사 유닛은 면역분석 완충용액을 포함하는 매트릭스를 포함하는 것인 시스템.

**청구항 126**

제125항에 있어서, 상기 매트릭스는 니트로셀룰로오스(nitrocellulose)를 포함하는 것인 시스템.

**청구항 127**

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역분석 완충용액은 동결건조된 또는 건조된 것인 시스템.

**청구항 128**

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 검출기는 루미노미터(luminometer)를 포함하는 것인 시스템.

**청구항 129**

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 검출기는 광전자 증배관 튜브 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브를 포함하는 것인 시스템.

**청구항 130**

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치는 제1 및 제2 검출기를 포함하는 것인 시스템.

**청구항 131**

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 검출기는 동일한 것인 시스템.

**청구항 132**

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치는 이동이 가능한 것인 시스템.

**청구항 133**

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치는 소형(handheld)인 것인 시스템.

**청구항 134**

하기를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위한 키트:

검사 시료 내 뉴라미니다제 활성을 판단하기 위한 카트리지, 카트리지는 검사 시료 및 면역분석 완충용액을 포함하는 면역분석 시료를 검사 시료 및 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 뉴라미니다제 분석 시료가 되도록 처리하도록 구성되고, 여기서 면역분석 완충용액은 검출을 억제하며; 및

검사 시료에서 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 검사 유닛, 여기서 검사 유닛은 검사 시료 및 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 뉴라미니다제 분석 시료를 검사 시료 및 면역분석 완충용액을 포함하는 면역분석 시료가 되도록 처리하도록 구성되며, 여기서 뉴라미니다제 분석 완충용액은 검출을 억제함.

**청구항 135**

제134항에 있어서, 하기를 더 포함하는 키트:  
 카트리리지로부터 신호를 측정하도록 구성된 제1 검출기; 및  
 검사 유닛으로부터 신호를 측정하도록 구성된 제2 검출기.

**청구항 136**

제134항에 있어서, 뉴라미니다제 활성 분석을 위한 시약을 더 포함하는 것인 키트.

**청구항 137**

제136항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 활성 분석 시약은 루시페라제, N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체의 유도체, N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체의 유도체, 및 항바이러스 약물로 구성된 군으로부터 선택된 것인 키트.

**청구항 138**

제137항에 있어서, 상기 항바이러스 약물은 오셀타미비르, 자나미비르, 라니나미비어, 및 페라미비르로 구성된 군으로부터 선택된 것인 키트.

**청구항 139**

제134항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 면역분석을 위한 시약을 더 포함하는 것인 키트.

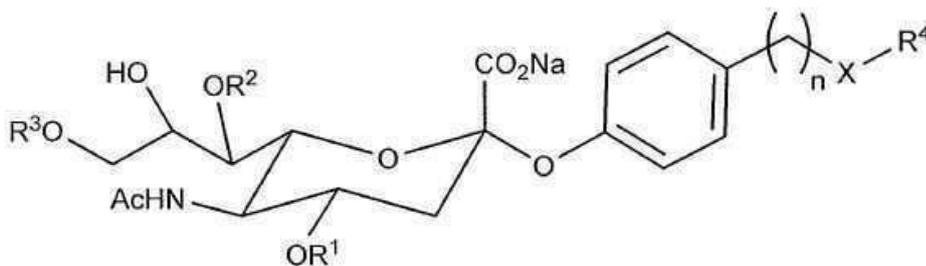
**청구항 140**

제139항에 있어서, 상기 면역분석 시약은 인플루엔자 유형 A 항원에 특이적인 항체, 및 인플루엔자 유형 B 항원에 특이적인 항체로 구성된 군으로부터 선택된 것인 키트.

**청구항 141**

화학식 (I)의 구조를 갖는, 이중 효소 인플루엔자 뉴라미니다제 민감도 분석에 사용하기 위한 차폐된 억제제 화합물:

[화학식 (I)]



여기서:

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>은 각각 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-5</sub> 알킬이고;

n은 0, 1, 2 또는 3이고;

R<sup>4</sup>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(=O)CF<sub>3</sub>이고;

m은 0 또는 1이고;

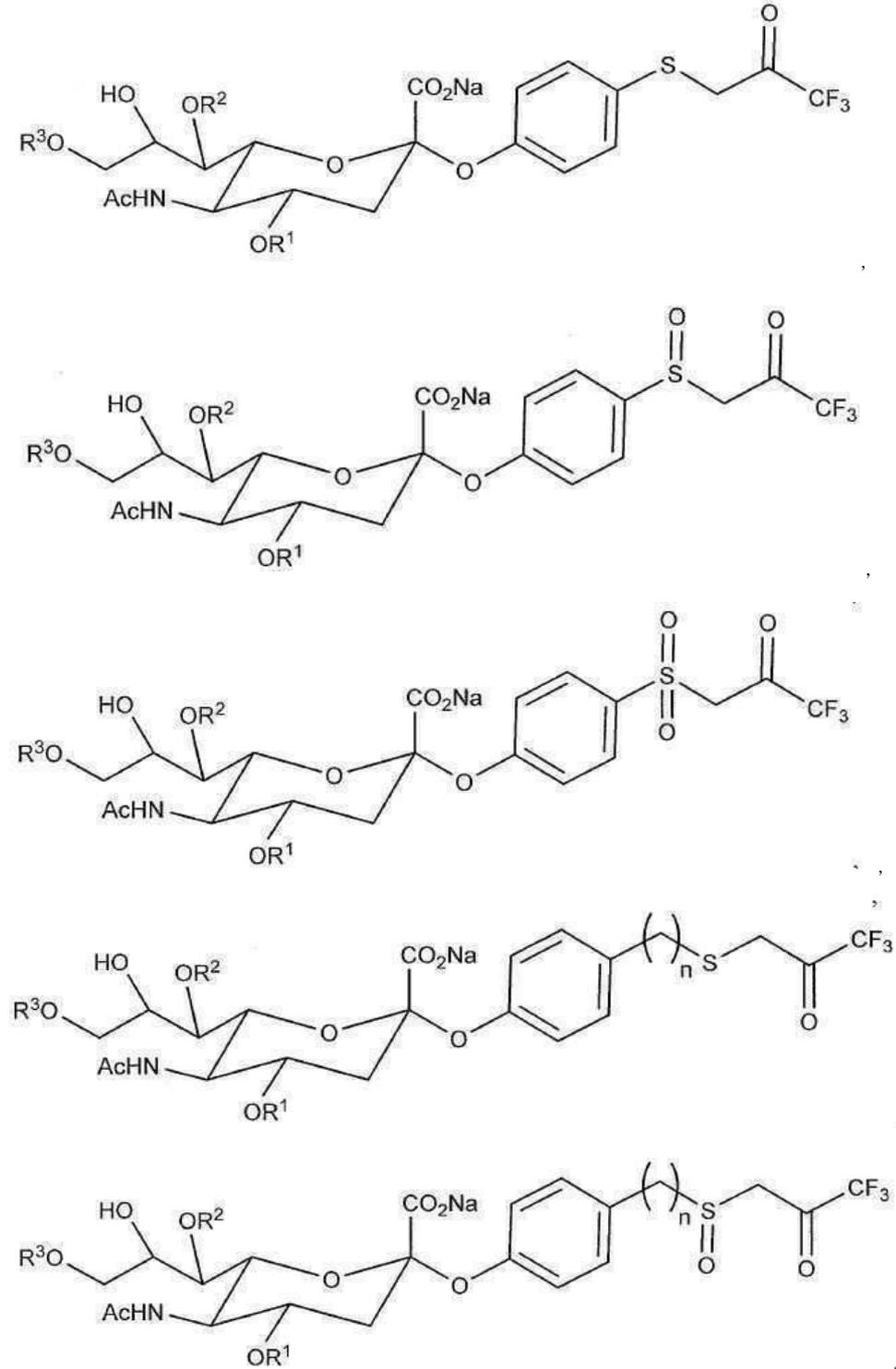
X는 -S(O)<sub>z</sub>- 또는 -CH(R<sup>5</sup>)-이고;

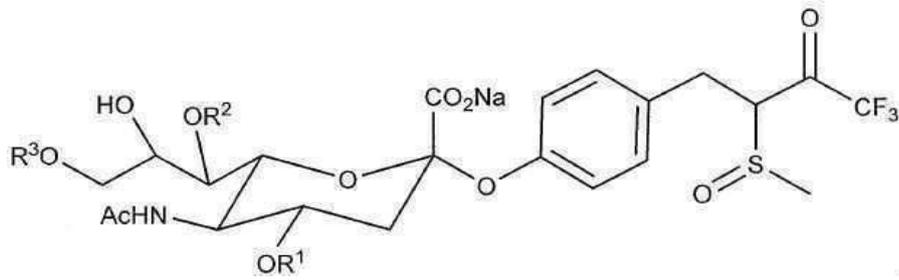
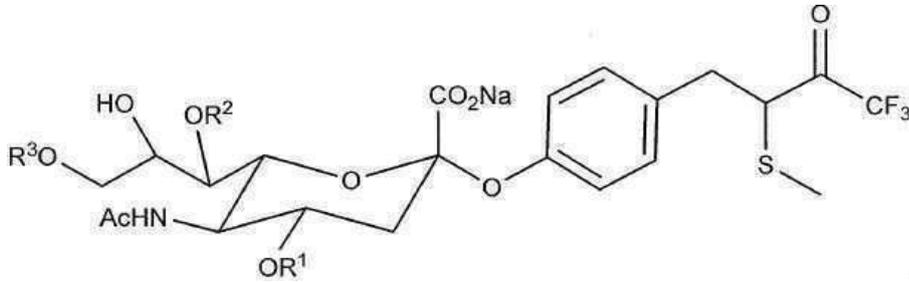
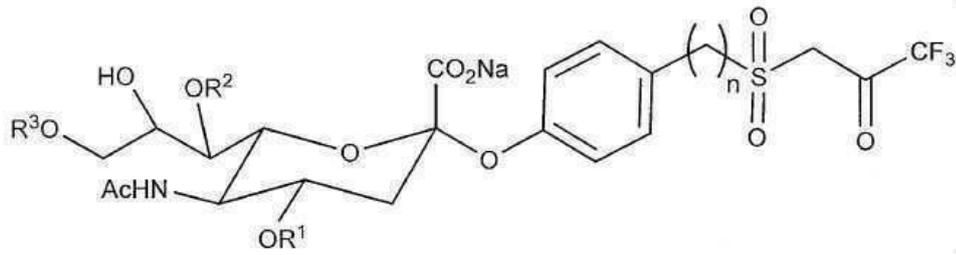
R<sup>5</sup>는 -S(O)<sub>z</sub>CH<sub>3</sub>이며;

z는 0, 1 또는 2이다.

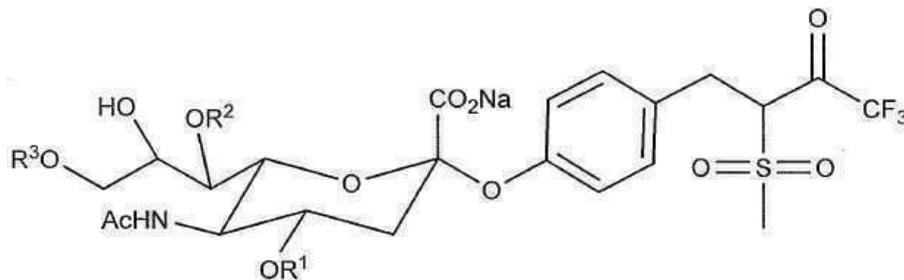
청구항 142

제141항에 있어서, 하기로 구성된 군으로부터 선택된 것인 차폐된 억제제 화합물:





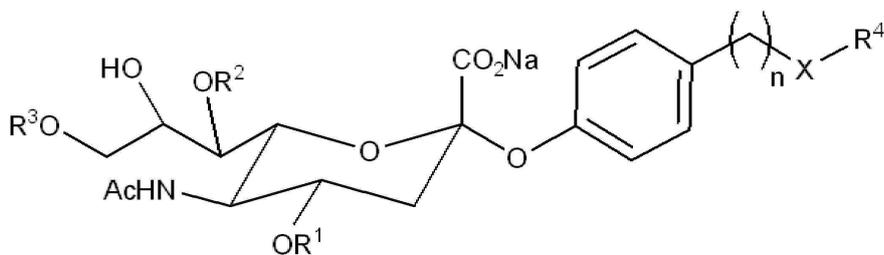
2, 및



청구항 143

제25항에 있어서, N-아세틸뉴라민산과 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산과 트리플루오로메틸케톤의 복합체는 하기 화학식 (I)의 구조를 갖는 이중 효소 인플루엔자 뉴라미니다제 민감성 분석에 사용하기 위한 차폐된 억제제 화합물을 포함하는 것인, 방법:

[화학식 (I)]



여기서:

$R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 각각 독립적으로 수소 또는  $C_{1-5}$  알킬이고;

$n$ 은 0, 1, 2 또는 3이고;

$R^4$ 는  $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$ 이고;

$m$ 은 0 또는 1이고;

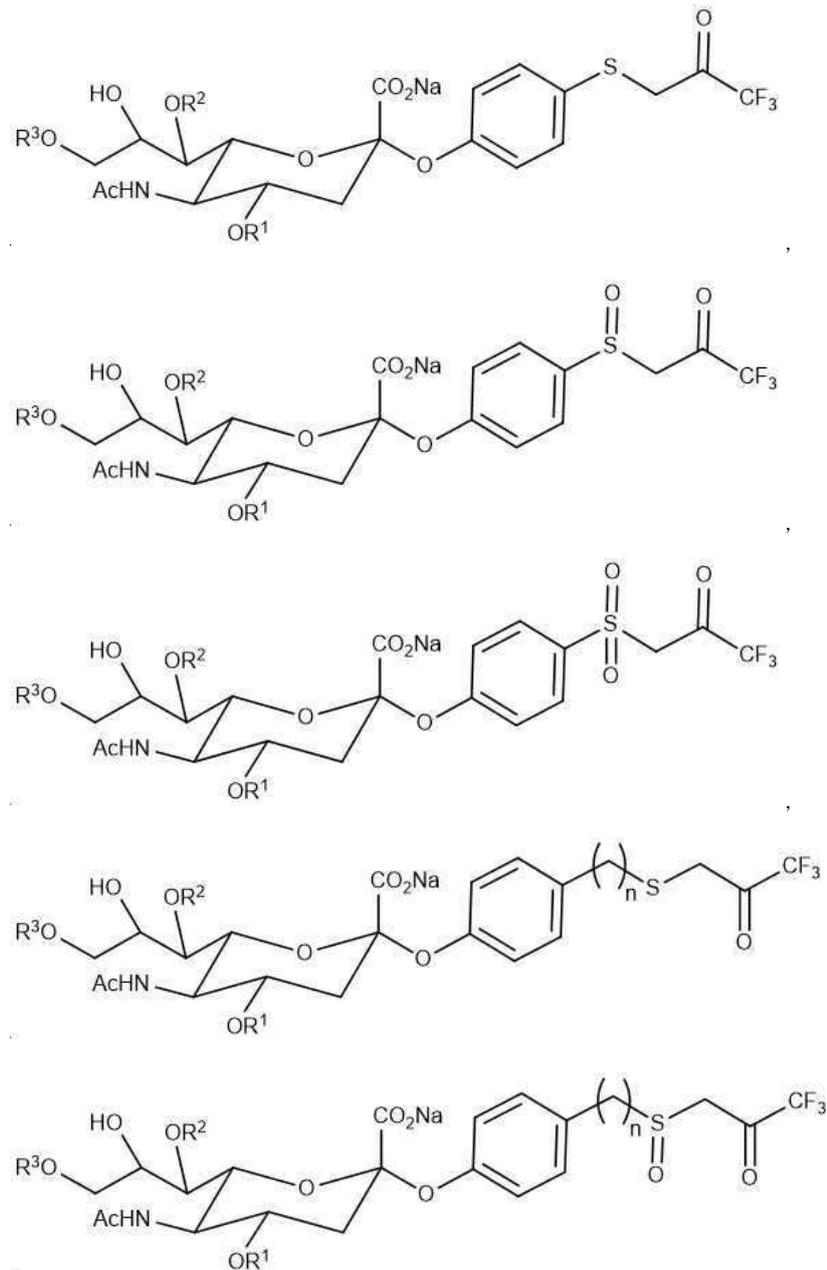
$X$ 는  $-S(O)_z-$  또는  $-CH(R^5)-$ 이고;

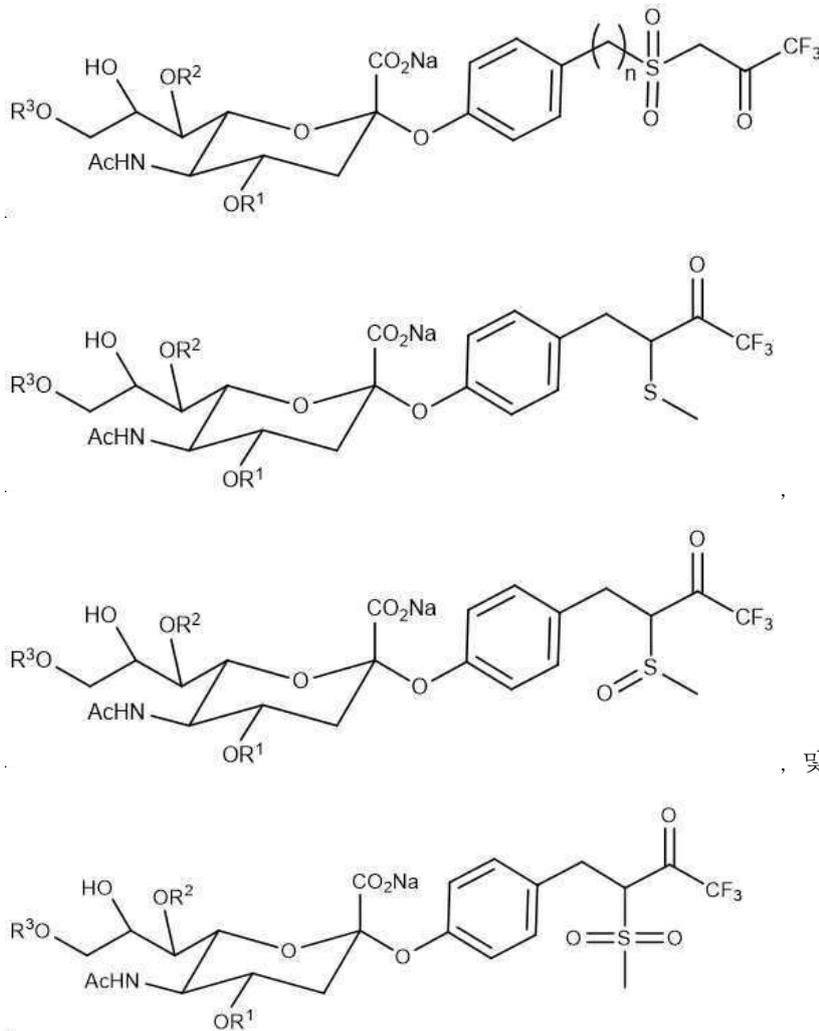
$R^5$ 는  $-S(O)_zCH_3$ 이며;

$z$ 는 0, 1 또는 2이다.

**청구항 144**

제143항에 있어서, 차폐된 억제제 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 방법:



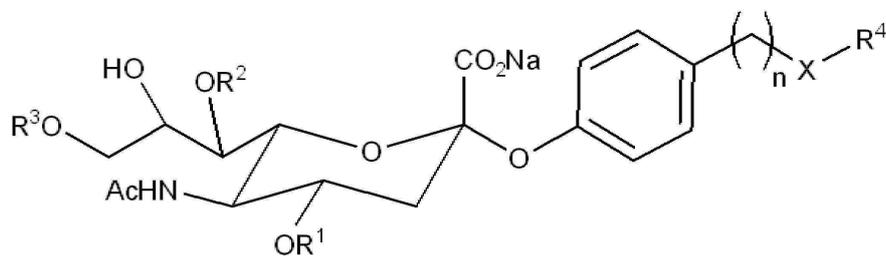


, 및

**청구항 145**

제53항에 있어서, N-아세틸뉴라민산과 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산과 트리플루오로메틸케톤의 복합체는 하기 화학식 (I)의 구조를 갖는 이중 효소 인플루엔자 뉴라미니다제 민감성 분석에 사용하기 위한 차폐된 억제제 화합물을 포함하는 것인, 방법:

[화학식 (I)]



여기서:

$R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 각각 독립적으로 수소 또는  $C_{1-5}$  알킬이고;

$n$ 은 0, 1, 2 또는 3이고;

$R^4$ 는  $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$ 이고;

$m$ 은 0 또는 1이고;

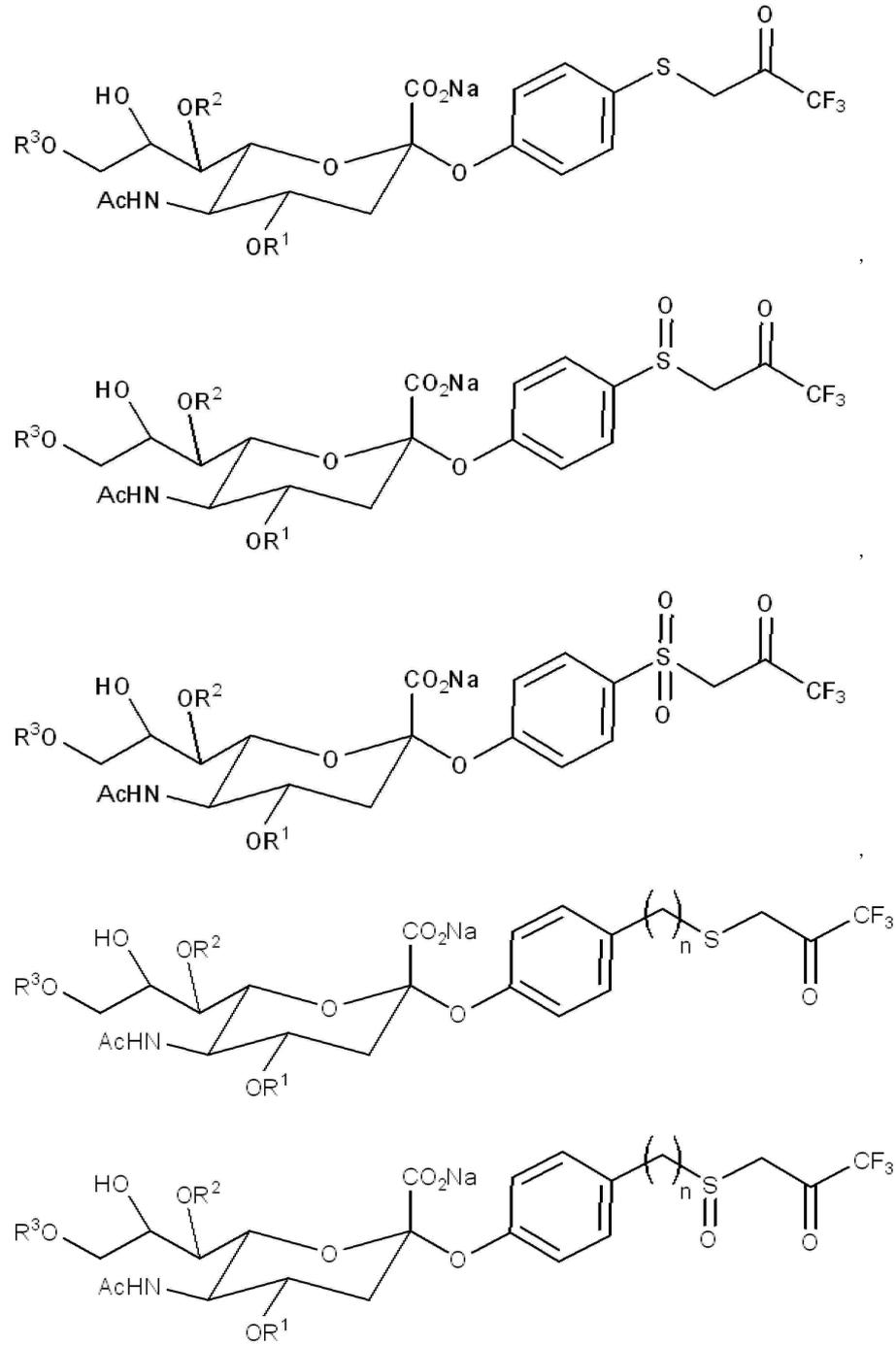
X는  $-S(O)_z-$  또는  $-CH(R^5)-$ 이고;

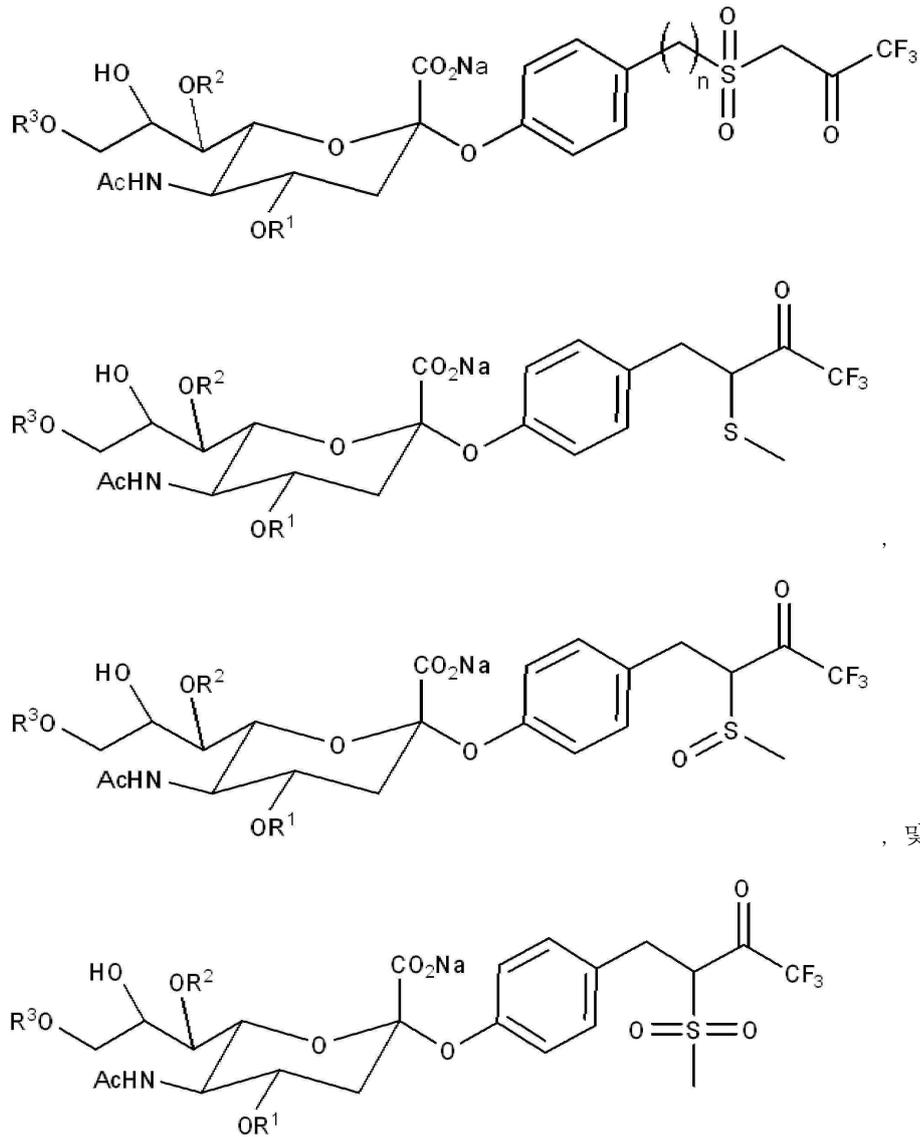
$R^5$ 는  $-S(O)_2CH_3$ 이며;

z는 0, 1 또는 2이다.

**청구항 146**

제145항에 있어서, 차폐된 억제제 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 방법:



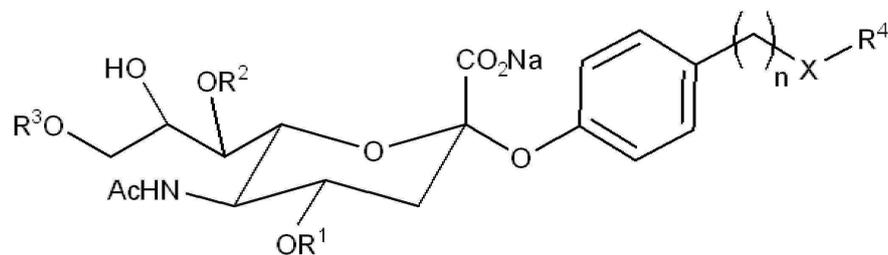


, 및

청구항 147

제81항에 있어서, N-아세틸뉴라민산과 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산과 트리플루오로메틸케톤의 복합체는 하기 화학식 (I)의 구조를 갖는 이중 효소 인플루엔자 뉴라미니다제 민감성 분석에 사용하기 위한 차폐된 억제제 화합물을 포함하는 것인, 방법:

[화학식 (I)]



여기서:

$R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 각각 독립적으로 수소 또는  $C_{1-5}$  알킬이고;

$n$ 은 0, 1, 2 또는 3이고;

$R^4$ 는  $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$ 이고;

$m$ 은 0 또는 1이고;

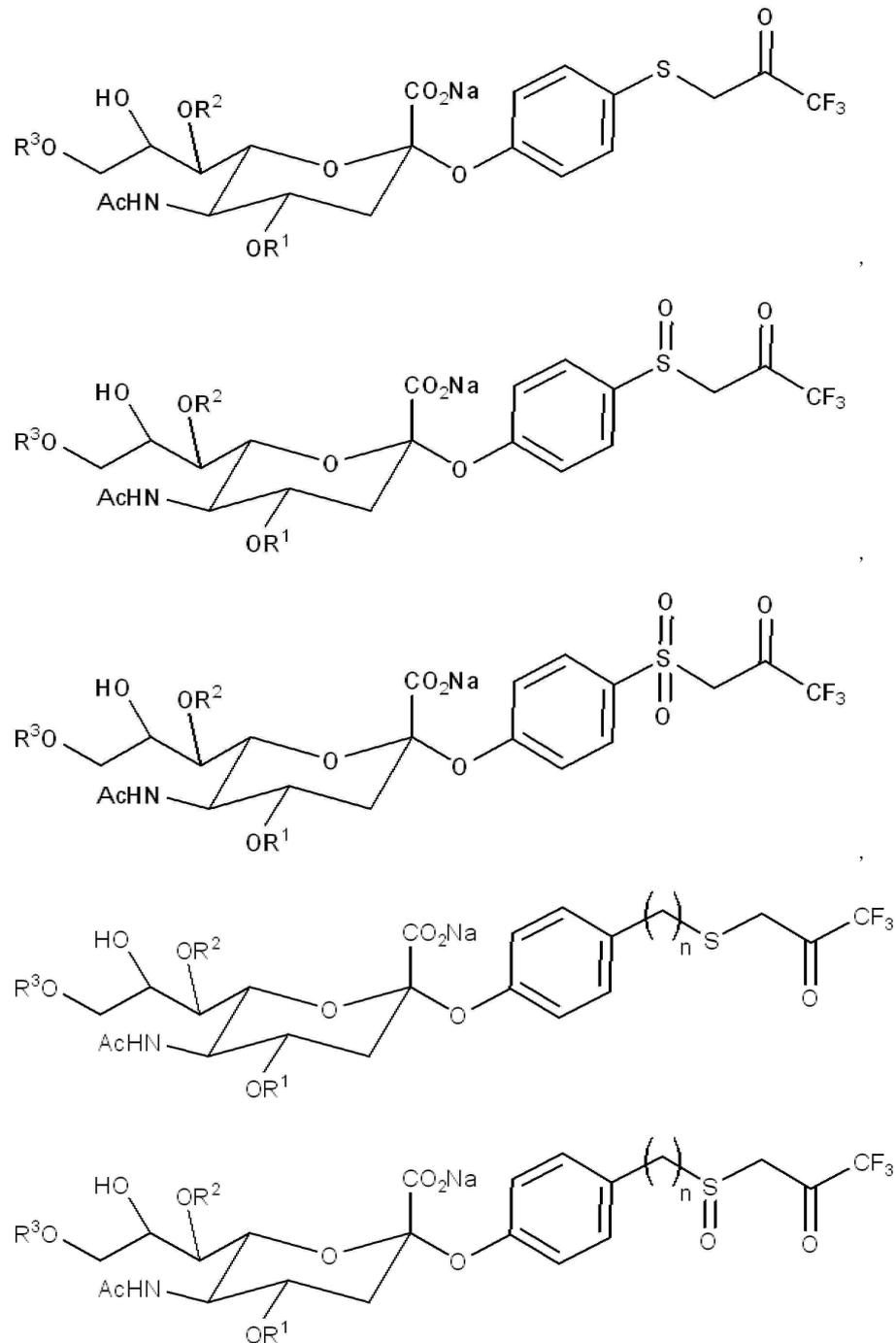
$X$ 는  $-S(O)_z-$  또는  $-CH(R^5)-$ 이고;

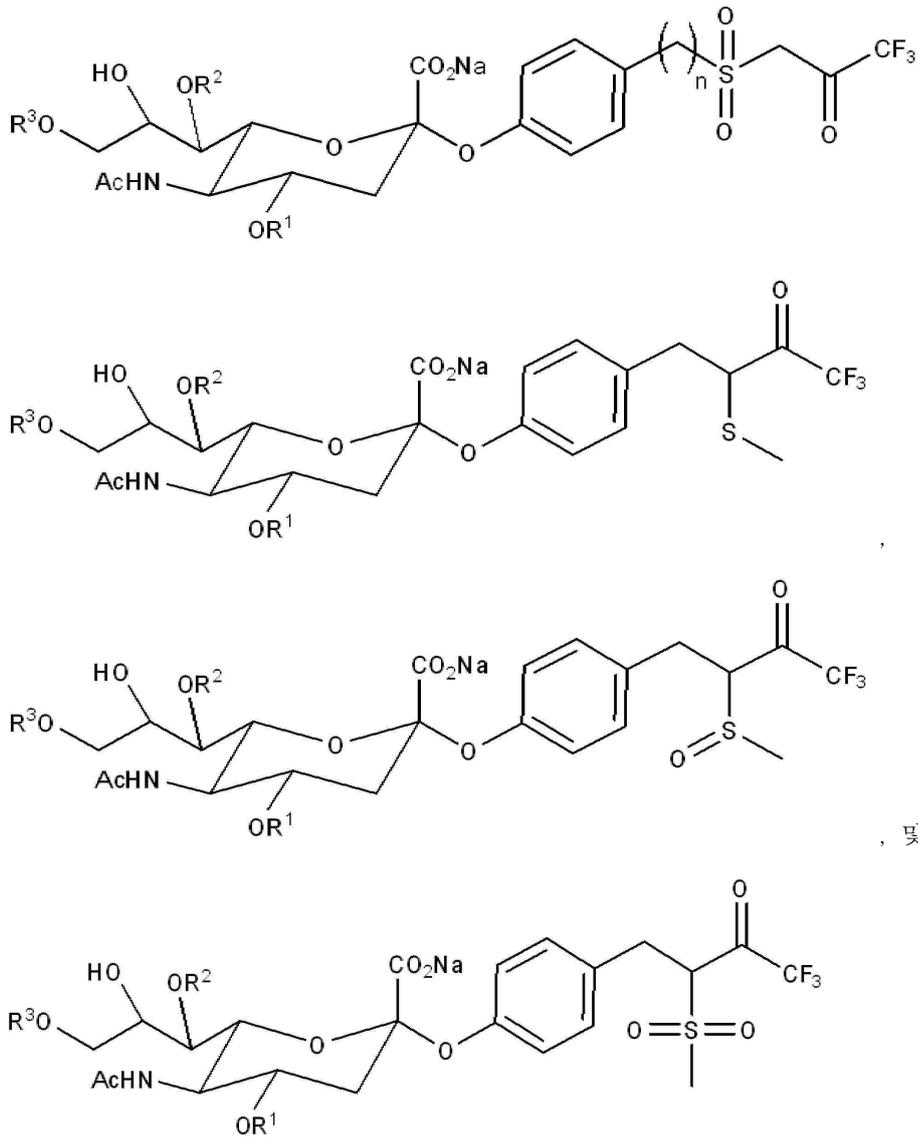
$R^5$ 는  $-S(O)_zCH_3$ 이며;

$z$ 는 0, 1 또는 2이다.

**청구항 148**

제147항에 있어서, 차폐된 억제제 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 방법:



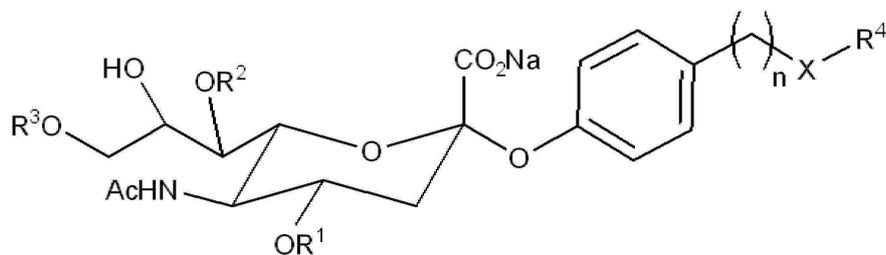


, 및

청구항 149

제107항에 있어서, N-아세틸뉴라민산과 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산과 트리플루오로 메틸케톤의 복합체는 하기 화학식 (I)의 구조를 갖는 이중 효소 인플루엔자 뉴라미니다제 민감성 분석에 사용하기 위한 차폐된 억제제 화합물을 포함하는 것인, 방법:

[화학식 (I)]



여기서:

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>은 각각 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-5</sub> 알킬이고;

n은 0, 1, 2 또는 3이고;

$R^4$ 는  $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$ 이고;

$m$ 은 0 또는 1이고;

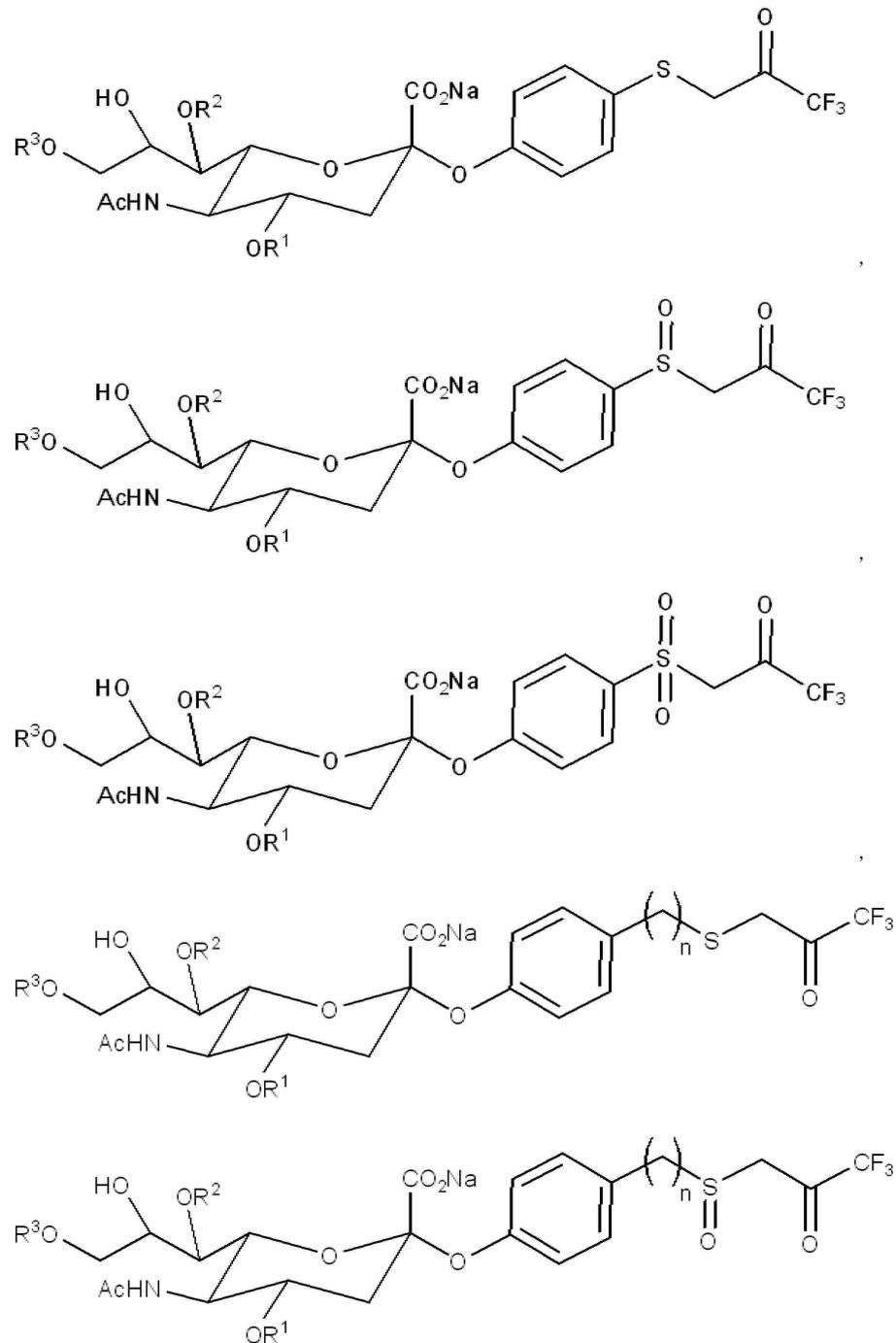
$X$ 는  $-S(O)_z-$  또는  $-CH(R^5)-$ 이고;

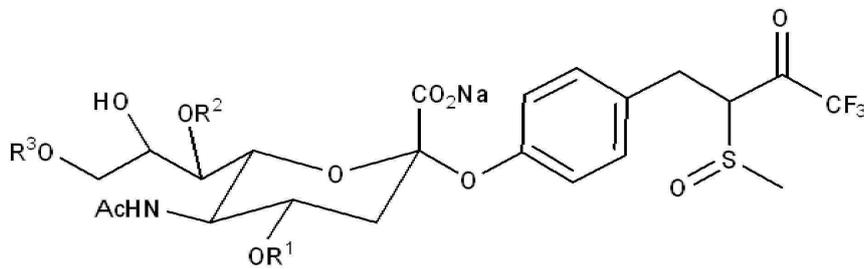
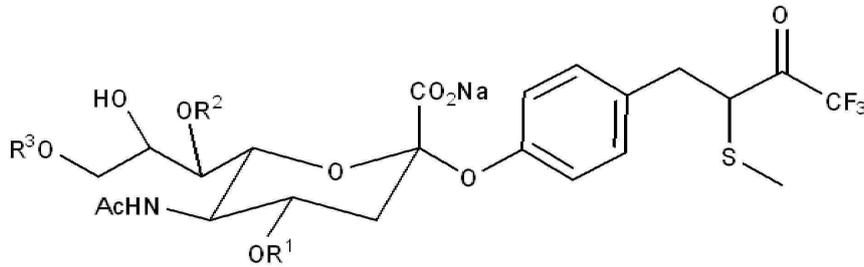
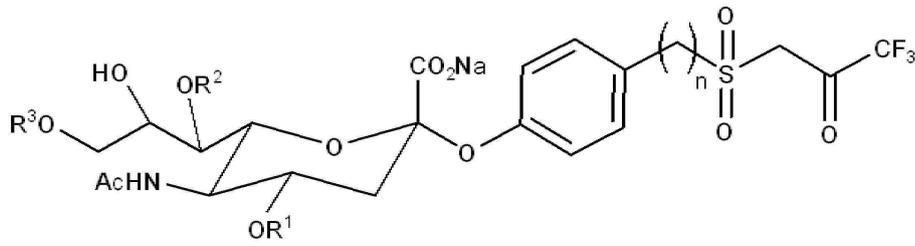
$R^5$ 는  $-S(O)_zCH_3$ 이며;

$z$ 는 0, 1 또는 2이다.

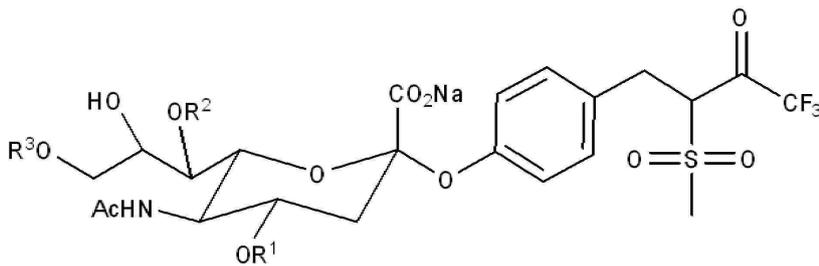
**청구항 150**

제149항에 있어서, 차폐된 억제제 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 방법:





, 및



**청구항 151**

제25항에 있어서, N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체의 유도체는 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(1,1,1-Trifluoro-4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-one)(파라), 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(메타), 및 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(오쏘)로 이루어진 군으로부터 선택된 차폐된 억제제를 포함하는 것인 방법.

**청구항 152**

제53항에 있어서, N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체의 유도체는 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(1,1,1-Trifluoro-4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-one)(파라), 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(메타), 및 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(오쏘)로 이루어진 군으로부터 선택된 차폐된 억제제를 포함하는 것인 방법.

**청구항 153**

제81항에 있어서, N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체의 유도체는 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(1,1,1-Trifluoro-4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-one)(파라), 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(메타), 및 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(오쏘)로 이루어진 군으로부터 선택된 차폐된 억제제를 포함하는 것인 방법.

루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(오쏘)로 이루어진 군으로부터 선택된 차폐된 억제제를 포함하는 것인 방법

**청구항 154**

제107항에 있어서, N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체의 유도체는 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(1,1,1-Trifluoro-4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-one)(파라), 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(메타), 및 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(오쏘)로 이루어진 군으로부터 선택된 차폐된 억제제를 포함하는 것인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원의 상호-참조

[0002] 이 출원은 본원에 전체적으로 참고로 인용된, 2013년 4월 1일자로 출원된 미국 가출원 번호 61/807,185의 "Point Of Care (POC) Influenza Antiviral Susceptibility Test"의 이익을 주장한다.

**배경 기술**

[0003] 인플루엔자는 공중 보건에 지속적이고 심각한 위협이다. 매년, 미국에서 인플루엔자 관련 질병은 대략 200,000명의 입원 및 36,000명의 죽음을 야기한다. 국가에 미치는 영향의 관점에서, 2010년에 인플루엔자로 인한 총 경제적 비용은 290억 달러로 추정되었다. 인플루엔자에 대한 항바이러스 치료는 적시에 치료로서 또는 예방을 위하여 제공됐을 때 효과적이다. 몇몇 연구는 뉴라미니다제 약물이 증상의 지속시간을 감소시키는 것으로 결론을 내렸다. 타미플루(Tamiflu) 및 리렌자(Relenza)는 모두 계절 독감에 대한 예방에 있어 80% 효과적이었다. 인플루엔자 환자를 치료하는 경우, 환자가 48 시간 이내에 증상의 치료를 시작하는 것이 권고되며 지연이 짧을수록 좋다. 신속한 진단 및 항바이러스 치료의 개시는 환자에 있어 최고의 결과로 이어진다.

[0004] M2 채널 차단제(channel blockers)에 대한 광범위한 저항에 기초하여, 뉴라미니다제 억제제의 광범위한 사용이 궁극적으로 계절 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 있어 저항성의 발현으로 이어질 수 있음을 추측하는 것은 무리가 아니다. 많은 뉴라미니다제 억제제 저항성 돌연변이가 임상 연구 중 확인되었다. 3년의 관찰 기간 동안, 오셀타미비르(oseltamivir)에 대한 민감성이 10배 넘게 감소된 8개의 바이러스 변종이 분리되었다. 이러한 발견은 계절 독감의 관리를 위한 뉴라미니다제 억제제-기반의 약물의 많은 분포를 고려할 때 일시 정지의 원인이 되어야 한다. 2007-2008 겨울 시즌 동안의 전염성 오셀타미비르-저항성 인플루엔자 바이러스의 발현 및 H5N1 및 유행성 인플루엔자 H1N1에서 오셀타미비르 저항성의 검출(2009)에 따라, 2010년 WHO는 홍콩에서 항바이러스 저항성에 대한 첫번째 세계적 협의를 개최하였다. 이 협의에서 중요한 결과는 임상 현장 또는 국가적 관찰의 일환으로, 인플루엔자에 대한 항바이러스 저항성의 공식적인 상태 보고에 대한 필요성이었다. 또한, 오셀타미비르와 같은 일부 항바이러스제는 부작용을 유발할 수 있으므로 오직 필요한 경우에만 처방하는 것이 중요하다. 다양한 항바이러스 약물의 보급은 공급자에 따라 달라질 수 있으며 환자에 대하여 다른 비용을 가질 수 있다. 의사는 오직 필요한 것을 처방할 책임이 있다. 비용은 효과에 비해 2차적이지만, 만일 환자가 덜 비싼 약물로 이를 얻을 수 있다면, 의사는 환자가 선택권을 인식하게 할 의무를 가진다. 따라서, 부작용을 피하기 위한 특정 균주의 진단을 제공하고, 약물 저항성의 진화를 늦추고, 환자 및 미국 의료 시스템에 대한 절감 효과를 만들 수 있는 현장 진단 검사의 목적에 대해 아직은 충족되지 않은 필요성이 존재한다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 여기에 제공된 방법, 키트, 시스템, 및 조성물의 일부 구현에는 하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법을 포함한다: (a) 시료와 인플루엔자 바이러스 유형 A 또는 인플루엔자 바이러스 유형 B를 검출하기 위한 면역분석에 적합한 면역분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 면역분석 검사 시료를 획득하는 단계; (b) 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석을 포함하는 검사에 대하여 면역분석 검사 시료의 제1부분을 접촉시킴으로써, 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; (c) 면역분석 검사 시료의 제2부분과 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 매트릭스를 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 획득하는 단계; 및 (d) 뉴라미니다제 검사 시료와 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 시료

내 뉴라미니다제의 존재를 검출하는 단계. 일부 구현예에서, 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성의 분석에 부적합하다. 일부 구현예에서, 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성을 억제한다. 일부 구현예에서, 단계 (c) 및 (d)는 동일한 용기에서 수행된다.

[0006] 여기에 제공된 일부 구현예는 하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법을 포함한다: (a) 시료와 뉴라미니다제 분석에 적합한 뉴라미니다제 분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 수득하는 단계; (b) 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석을 포함하는 검사에 대하여 뉴라미니다제 검사 시료의 제1 부분을 접촉시키고, 여기서 뉴라미니다제 검사 시료는 면역분석 완충용액을 포함하는 매트릭스와 접촉함으로써, 면역분석 검사 시료를 수득하고 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; 및 (c) 뉴라미니다제 검사 시료의 제2 부분과 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 시료 내 뉴라미니다제의 존재를 검출하는 단계. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석 완충용액은 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석에 부적합하다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석 완충용액은 인플루엔자 유형 A 및 인플루엔자 유형 B로 구성된 균으로부터 선택된 항원에 대한 항체의 특정 결합을 억제한다. 일부 구현예에서, 매트릭스는 동결건조된 또는 건조된 면역분석 완충용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 다수의 챔버를 포함하는 용기에서 수행된다.

[0007] 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법의 일부 구현예에서 용기는 다수의 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 용기는 매트릭스를 포함하는 챔버, 및 뉴라미니다제 분석을 위한 시약을 포함하는 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 매트릭스는 가교결합된 다당류를 포함한다. 일부 구현예에서, 매트릭스는 세파덱스(sephadex) 및 세파로스(sepharose)로 구성된 균으로부터 선택된다.

[0008] 일부 구현예에서, 면역분석 검사 시료 및 뉴라미니다제 검사 시료는 중력, 모세관 작용, 및 확산으로부터 선택된 1 이상의 힘에 의해 용기 내로 이동한다.

[0009] 일부 구현예에서, 용기는 카트리지(cartridge)를 포함한다. 일부 구현예에서, 용기는 광전자 증배관(photomultiplier)을 이용하여 관독되기에 적합한 멀티웰 카트리지를 포함한다. 일부 구현예에서, 광전자 증배관은 광전자 증배관 튜브 및 마이크로-광전자 증배관 튜브로 구성된 균으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 광전자 증배관은 이동이 가능하다. 일부 구현예에서, 광전자 증배관은 1차 진료의실에 적합한 휴대용 관독기 내에 있다. 일부 구현예에서, 광전자 증배관 튜브 표면은 둥글며 6 mm 내지 9 mm의 직경을 가지거나, 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브는 직사각형이며 약 1 mm 내지 3 mm의 크기를 갖는다.

[0010] 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 하기 단계를 포함한다: (a) 억제값 비율을 수득하는 단계로서, 상기 비율은 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 비교하여 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치를 포함한다; 및 (b) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계. 일부 구현예에서, 억제 임계점은 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단된다. 일부 구현예에서, 유형 A 바이러스가 검출되는 경우 제1 억제 임계점이 사용되고, 유형 B 바이러스가 검출되는 경우 제2 억제 임계점이 사용된다. 일부 구현예에서, 제1 임계점은 제2 임계점보다 낮다. 일부 구현예에서, 억제 임계점은 검사 화합물에 의해 판단된다.

[0011] 일부 구현예는 또한 인플루엔자 치료용 검사 화합물을 선택하는 단계를 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 신호 효소를 포함하는 이중 효소 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성은 신호 효소의 기질을 생성한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid) 및 루시페린(luciferin)의 복합체(conjugate) 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성은 신호 효소에 대한 억제체를 생성한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤(trifluoromethylketone)의 복합체 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 효소는 루시페라제(luciferase)를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역분석 완충용액은 루시페라제 활성을 억제한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성의 수치는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정된다.

[0013] 일부 구현예에서, 검사 화합물은 항바이러스 약물이다. 일부 구현예에서, 검사 화합물은 오셀타미비르, 자나미비르, 라나미비르, 및 페라미비르로 구성된 균으로부터 선택된 항바이러스 약물이다.

[0014] 일부 구현예에서, 면역분석은 샌드위치 분석을 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 시료는 피험자(subject)로부터 수득된다. 일부 구현예에서, 피험자는 인플루엔자를 갖는 것으

로 의심된다. 일부 구현예에서, 피험자는 인간이다.

[0016] 여기에 포함된 일부 구현예는 하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 치료를 선택하는 방법을 포함한다: (a) 시료와 인플루엔자 바이러스 유형 A 또는 인플루엔자 바이러스 유형 B를 검출하기 위한 면역분석에 적합한 면역분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 면역분석 검사 시료를 수득하는 단계; (b) 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역 분석을 포함하는 검사에 대하여 면역분석 검사 시료의 제1 부분을 접촉시킴으로써, 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; (c) 면역분석 검사 시료의 제2 부분과 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 매트릭스를 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 수득하는 단계; (d) 뉴라미니다제 검사 시료와 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계로, 판단은 하기 단계를 포함한다: (i) 억제값 비율을 수득하는 단계로서, 상기 비율은 1 이상의 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 비교하여 1 이상의 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치를 포함하며, 및 (ii) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계; 및 (e) 뉴라미니다제 활성을 억제하는 것으로 판단된 1 이상의 검사 화합물로부터 검사 화합물을 선택하는 단계. 일부 구현예에서, 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성의 분석에 부적합하다. 일부 구현예에서, 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성을 억제한다. 일부 구현예에서, 단계 (c) 및 (d)는 동일한 용기에서 수행된다.

[0017] 여기에 제공된 일부 구현예는 하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 치료를 선택하는 방법을 포함한다: (a) 시료와 뉴라미니다제 분석에 적합한 뉴라미니다제 분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 수득하는 단계; (b) 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석을 포함하는 검사에 대하여 뉴라미니다제 검사 시료의 제1 부분을 접촉시키고, 여기서 뉴라미니다제 검사 시료는 면역분석 완충용액을 포함하는 매트릭스와 접촉함으로써, 면역분석 검사 시료를 수득하고 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; 및 (c) 뉴라미니다제 검사 시료의 제2 부분과 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 검사 시료의 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계로, 판단은 하기 단계를 포함한다: (i) 억제값 비율을 수득하는 단계로서, 상기 비율은 1 이상의 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 비교하여 1 이상의 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치를 포함하며, 및 (ii) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계; 및 (e) 뉴라미니다제 활성을 억제하는 것으로 판단된 1 이상의 검사 화합물로부터 검사 화합물을 선택하는 단계. 일부 구현예에서, 매트릭스는 동결건조된 또는 다른 방법으로 건조된 면역분석 완충용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 동일한 용기에서 수행된다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 다수의 챔버를 포함하는 용기에서 수행된다.

[0018] 인플루엔자 바이러스 치료를 선택하는 방법의 일부 구현예에서, 억제 임계점은 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단된다. 일부 구현예에서, 유형 A 바이러스가 검출되는 경우 제1 억제 임계점이 사용되고, 유형 B 바이러스가 검출되는 경우 제2 억제 임계점이 사용된다. 일부 구현예에서, 제1 임계점은 제2 임계점보다 낮다.

[0019] 일부 구현예에서, 용기는 광전자 증배관 튜브 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브를 이용하여 관독되기에 적합한 멀티웰 스트립 또는 카트리지를 포함한다. 일부 구현예에서, 광전자 증배관 튜브 마이크로-광전자 증배관 튜브는 이동이 가능하다. 일부 구현예에서, 광전자 증배관 튜브는 1차 진료의실에 적합한 휴대용 관독기 내에 있다. 일부 구현예에서, 광전자 증배관 튜브 표면은 둥글며 6 mm 내지 9 mm의 직경을 가지거나, 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브는 직사각형이며 약 1 mm 내지 3 mm의 크기를 갖는다.

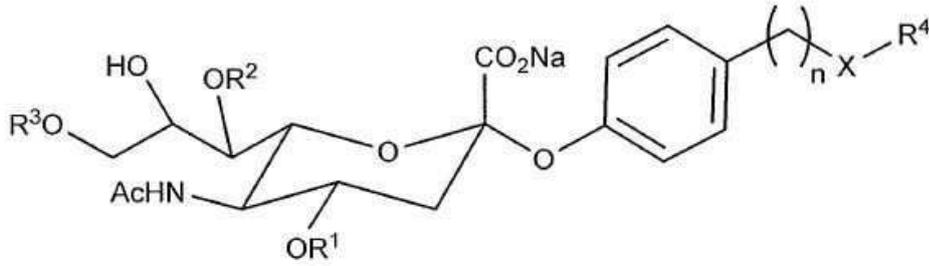
[0020] 일부 방법은 또한 인플루엔자 치료용 검사 화합물을 선택하는 단계를 포함한다.

[0021] 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 신호 효소를 포함하는 이중 효소 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성은 신호 효소의 기질을 생성한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성은 신호 효소에 대한 억제제를 생성한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 효소는 루시페라제를 포함한다.

[0022] 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성의 수치는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정된다.

[0023] 일부 구현예에서, 검사 화합물은 항바이러스 약물이다. 일부 구현예에서, 검사 화합물은 오셀타미비르, 자나미비르, 라나미비르, 및 페라미비르로 구성된 군으로부터 선택된 항바이러스 약물이다.

- [0024] 일부 구현예에서, 면역분석은 샌드위치 분석을 포함한다.
- [0025] 일부 구현예에서, 시료는 피험자로부터 취득된다. 일부 구현예에서, 피험자는 인플루엔자를 갖는 것으로 의심된다. 일부 구현예에서, 피험자는 인간이다. 일부 구현예에서, 피험자 시료는 피험자로부터 취득되고, 피험자는 인플루엔자를 치료하기 위하여 선택된 검사 화합물을 투여하도록 권고된다. 일부 구현예에서, 피험자 시료를 피험자로부터 취득하고, 피험자는 인플루엔자를 치료하기 위하여 선택된 검사 화합물을 제공받는다.
- [0026] 일부 구현예는 하기를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위한 진단 시스템을 포함한다: 시료 내 뉴라미니다제 활성을 판단하기 위한 카트리지, 여기서 카트리지는 판단에 부적합한 완충용액을 포함하는 시료에 대하여 판단에 적합한 완충용액을 포함하는 시료가 되도록 구성된다; 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 검사, 여기서 검사는 검출에 부적합한 완충용액을 포함하는 시료에 대하여 검출에 적합한 완충용액을 포함하는 시료가 되도록 구성된다; 검사로부터 신호를 측정하도록 구성된 제1 검출기; 및 카트리지로부터 신호를 측정하도록 구성된 제2 검출기.
- [0027] 일부 구현예에서, 카트리지는 판단에 적합한 완충용액을 포함하는 카트리지 매트릭스, 및 뉴라미니다제 활성 판단을 위한 시약을 포함하는 시약 챔버를 포함하는 매트릭스 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 카트리지 매트릭스는 가교결합된 다당류를 포함한다. 일부 구현예에서, 카트리지 매트릭스는 세파텍스 및 세파로스로 구성된 균으로부터 선택된다.
- [0028] 일부 구현예에서, 매트릭스 챔버 및 카트리지 챔버는 매트릭스 챔버에 적용된 시료가 매트릭스 챔버로부터 시약 챔버로 흐르도록 유체 연통(fluid communication) 내에 있다. 일부 구현예에서, 시료는 중력, 모세관 작용, 및 확산으로부터 선택된 1 이상의 힘에 의해 카트리지 내에서 흐른다.
- [0029] 일부 구현예에서, 카트리지는 광전자 증배관 튜브 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브를 이용하여 판독되기에 적합한 멀티웰 카트리지를 포함한다.
- [0030] 일부 구현예에서, 검사는 면역분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역분석은 샌드위치 분석이다. 일부 구현예에서, 검사는 검출에 적합한 완충용액을 포함하는 매트릭스를 포함한다. 일부 구현예에서, 매트릭스는 니트로셀룰로오스(nitrocellulose)를 포함한다. 일부 구현예에서, 검출에 적합한 완충용액은 동결건조되거나 또는 건조된다.
- [0031] 일부 구현예에서, 제1 검출기는 루미노미터(luminometer)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 검출기는 반사율 판독기(반사율 판독기)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 검출기는 광전자 증배관 튜브 또는 마이크로-광전자 증배관 튜브를 포함한다. 일부 구현예에서, 장치는 제1 및 제2 검출기를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 검출기는 동일하다.
- [0032] 일부 구현예에서, 장치는 이동이 가능하다. 일부 구현예에서, 장치는 소형(handheld)이다.
- [0033] 일부 구현예는 하기를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위한 키트를 포함한다: 시료 내 뉴라미니다제 활성을 판단하기 위한 카트리지, 여기서 카트리지는 판단에 부적합한 완충용액을 포함하는 시료를 판단에 적합한 완충용액을 포함하는 시료가 되도록 처리하도록 구성된다; 및 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 검사, 여기서 검사는 검출에 부적합한 완충용액을 포함하는 시료를 검출에 적합한 완충용액을 포함하는 시료가 되도록 처리하도록 구성된다. 일부 구현예는 검사로부터 신호를 측정하도록 구성된 제1 검출기; 및 카트리지로부터 신호를 측정하도록 구성된 제2 검출기를 포함한다. 일부 구현예는 뉴라미니다제 활성 분석을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성 분석 시약은 루시페라제, N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체 또는 이들의 유도체, N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤 또는 이들의 유도체, 및 항바이러스 약물로 구성된 균으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 항바이러스 약물은 오셀타미비르, 자나미비르, 라나미비르, 및 페라미비르로 구성된 균으로부터 선택된다. 일부 구현예는 면역분석을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역분석 시약은 인플루엔자 유형 A 항원에 특이적인 항체, 및 인플루엔자 유형 B 항원에 특이적인 항체로 구성된 균으로부터 선택된다.
- [0034] 일부 구현예는 하기 화학식 (I)의 구조를 갖는, 이중 효소 인플루엔자 뉴라미니다제 민감도 분석에 사용하기 위한 차폐된 억제제 화합물을 포함한다:



[0035]

[0036]

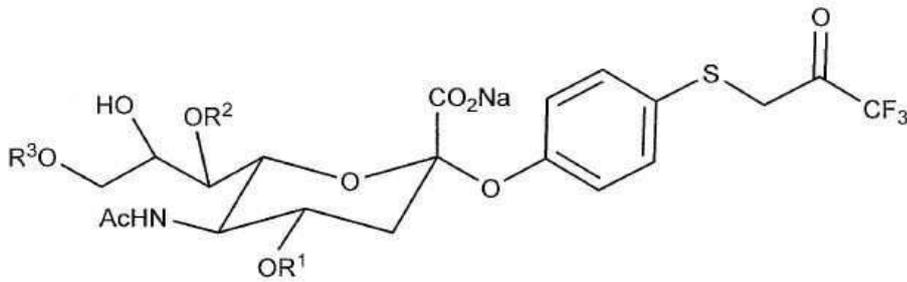
(I)

[0037]

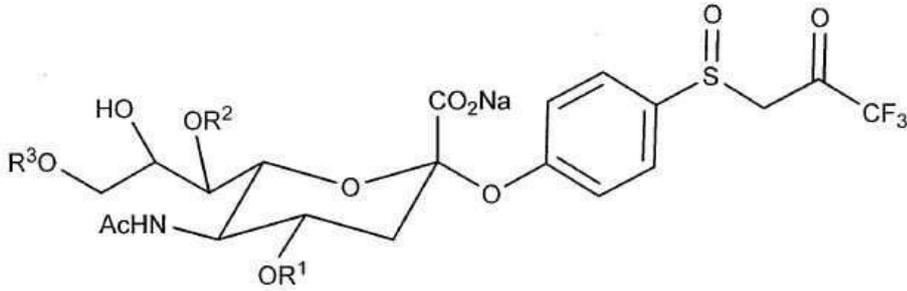
여기서:  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 각각 독립적으로 수소 또는  $C_{1-5}$ 알킬이고;  $n$ 은 0, 1, 2 또는 3이고;  $R^4$ 는  $-(CH_2)_mC(=O)CF_3$ 이고;  $m$ 은 0 또는 1이고;  $X$ 는  $-S(O)_z-$  또는  $-CH(R^5)-$ 이고;  $R^5$ 는  $-S(O)_zCH_3$ 이며; 및  $z$ 는 0, 1 또는 2이다.

[0038]

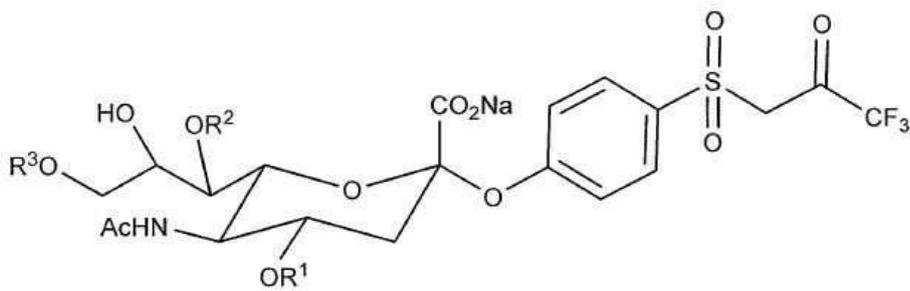
일부 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



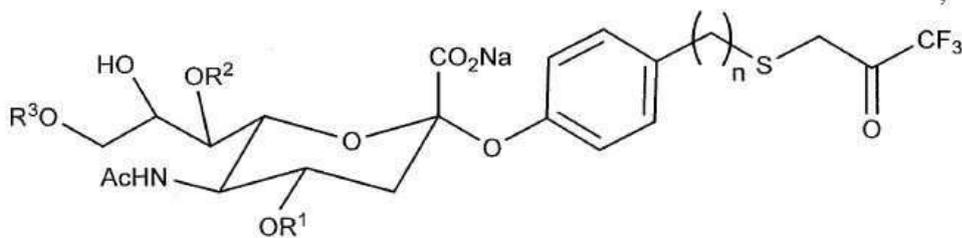
[0039]



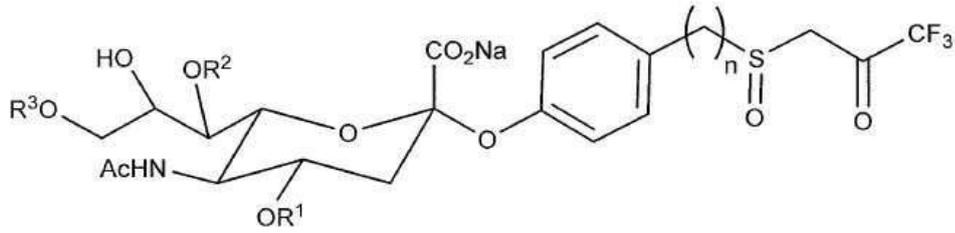
[0040]



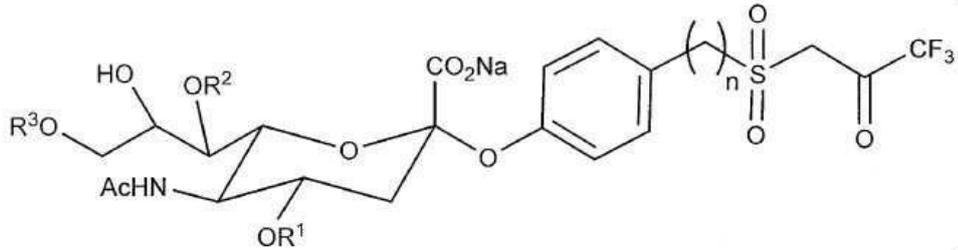
[0041]



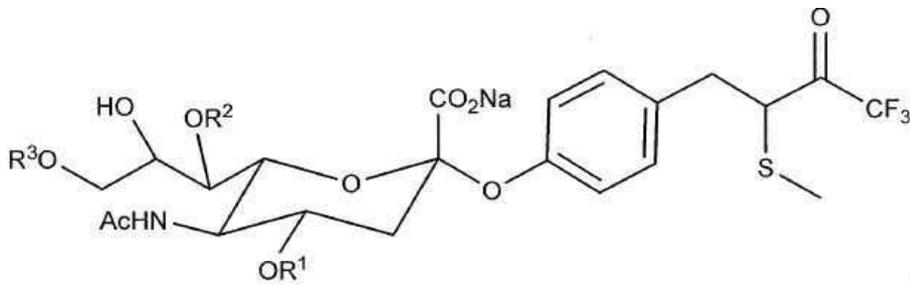
[0042]



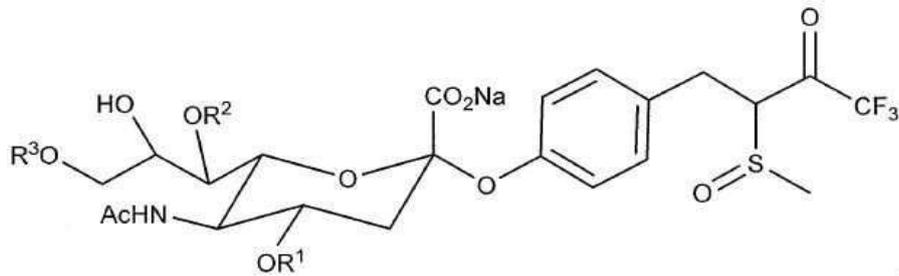
[0043]



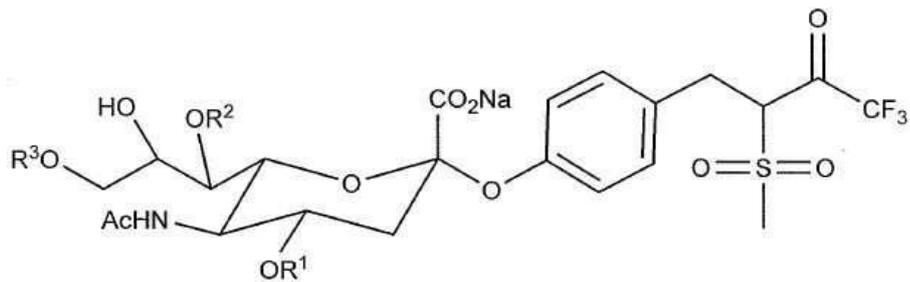
[0044]



[0045]



[0046]



[0047]

**도면의 간단한 설명**

- [0048] 도 1은 Veritor System(Becton Dickinson.)에 대한 면역분석 검사 스트립 및 판독기의 구현예를 도시한다.
- 도 2는 측방 유동(lateral flow) 면역분석 및 약물 민감성 분석의 결합에 대한 워크플로우의 구현예를 도시한다.
- 도 3은 약물 민감성 분석시 신호 비율을 판단하기 위한 구현예를 도시한다.
- 도 4는 차폐된 억제제의 합성의 구현예를 도시한다.
- 도 5는 운동 흐름(kinetic flow) 뉴라미니다제 분석을 위한 카트리지의 구현예를 도시한다.

도 6은 휴대용 판독기를 이용해 측정된 상대적인 광 단위 및 형광 조절 농도의 그래프이다.

도 7은 뉴라미니다제 분석에 대한 상대적인 광 단위의 그래프이며, 치료시 최선의 NA-기반의 항바이러스제를 선택하기 위한 이중 효소 분석의 능력을 나타낸다. 예에서, 리렌자(Relenza)는 타미플루(Tamiflu)를 능가한다.

도 8은 다양한 유형 A 인플루엔자 바이러스의 다양한 희석도에 대한 억제값의 그래프이고, 독감 A 약물 민감성 균주로부터 독감 A 약물 저항성을 판별하는데 사용될 수 있는, 독감 B 균주에 대한 값과 별개인, 별개의 억제값이 존재하며, A/B 판정을 제공하는 종래의 독감 ID 검사 후 AST 검사가 수행될 때 BD는 POC 설정에 있어 판단을 내릴 수 있다는 것을 나타낸다.

도 9는 다양한 유형 B 인플루엔자 바이러스의 다양한 희석도에 대한 억제값의 그래프이고, 독감 B 약물 민감성 균주로부터 독감 B 약물 저항성을 판별하는데 사용될 수 있는, 독감 A 균주에 대한 값과 별개인, 별개의 억제값이 존재하며 A/B 판정을 제공하는 종래의 독감 ID 검사 후 AST 검사가 수행될 때 BD는 POC 설정에 있어 판단을 내릴 수 있다는 것을 나타낸다.

도 10은 바이러스의 혼합물의 다양한 희석도에 대한 억제값의 그래프이고, 바이러스가 혼합된 배지 내에 존재할 때 약물 저항성 균주의 존재를 표시하여 여기에 설명된 기술의 능력을 증명한다. 더욱 중요한 것은 pH 민감성 NA를 갖는 높은 약물 저항성 인플루엔자를 표시하여 증명한 능력이다.

도 11은 바이러스 민감성 검사에 대한 이중 효소 캐스케이드의 구현예에서 사용된 예시적 뉴라미니다제 기질, NANA-CF3 (차폐된 억제제) 및 트리플루오로케톤(유리 억제제)의 화학적 구조를 나타낸다.

도 12는 차폐된 유리 억제제를 포함하는 완전한 이중 효소 캐스케이드의 구현예를 도시한다.

도 13은 2개의 다른 이중 효소 분석의 그래프이며, 이중 효소 검출 화합물로 수행될 수 있는 민감도의 범위를 나타낸다.

도 14는 스트립 상에 사전에 배치된 면역분석 뉴클레오캡시드 추출 시약을 포함하는 면역분석 측방 유동 검사 스트립의 구현예를 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0049] 여기에 제공된 방법, 조성물, 키트, 장치 및 시스템의 일부 구현예는 인플루엔자 A 또는 B를 식별하고 항바이러스 치료를 유도할 수 있는 현장 진단(point of care, POC) 조합 진단을 포함한다. 일부 구현예에서, 휴대용 플랫폼은 제한된 실험적 기술을 가진 의료인에 의해 작동될 수 있다. 일부 구현예는 임의의 세포 배양 증폭 없이 임상적 분리로부터 직접 항바이러스제 저항성 균주를 검출하기 위한 분석과 함께 인플루엔자 검출을 위한 측방 유동 기술을 포함한다.

[0050] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현예는 (1) 시료 내 유형 A 또는 유형 B 인플루엔자 바이러스의 식별; 및 (2) 1 이상의 항바이러스 약물에 대한 인플루엔자 바이러스 뉴라미니다제의 민감도를 위해 시료를 분석하는 조합 분석을 포함한다. 일반적으로, 유형 A 또는 유형 B 인플루엔자 바이러스를 식별하기 위하여 면역분석시 사용하기 위해 제조되는 시료는 바이러스 뉴라미니다제 활성에 관한 분석시 부적합하다. 예를 들어, 면역분석시 사용을 위한 용균 완충액은 뉴라미니다제 활성 분석을 억제할 수 있다. 여기에 제공된 방법 및 조성물의 구현예는 분석 중 하나에 적합한 초기 완충용액 내 단일 시료에 대한 면역분석 및 뉴라미니다제 활성 분석을 이용하기 위한 방법을 포함한다. 일부 이러한 구현예는 인플루엔자 유형에 대한 빠른 검사를 제공하며 치료를 위한 항바이러스 약물의 선택의 유도를 제공한다.

[0051] 또한, 여기에 제공된 일부 구현예는 이러한 분석의 민감도를 크게 향상시킨다. 일부 구현예에서, 시료 내 인플루엔자의 유형을 식별하기 위한 분석은 항바이러스 약물에 대한 인플루엔자 뉴라미니다제의 민감성 또는 저항성을 판단하기 위한 분석에 대하여 유리하게 영향을 미친다. 일부 구현예에서, 특정 항바이러스 약물에 대한 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 임계점 억제값이 선택될 수 있으며, 뉴라미니다제가 항바이러스 약물에 대하여 민감성 또는 저항성인지 여부를 판단하기 위하여 사용될 수 있다.

[0052] 여기에 제공된 일부 구현예는 환자에게 더 큰 이점을 위하여 2개의 분석의 통합을 제공한다. 여기에 제공된 구현예는 인플루엔자 식별 분석의 민감도를 극적으로 향상시킨다. 또한, 양 분석은 동일한 크기의 표본으로 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 새로운 임상 시험에 이미 상용화된 분석을 제출할 필요가 없도록, 초기 면역분석 및 이러한 분석에 유용한 추출 완충용액은 바꾸지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 독감 유형을 판단하기 위하여 독감 면역분석에 적합한 완충용액 내 표본은 뉴라미니다제 약물 민감도 분석에 적합한 완충용액 내 표본으로

전환될 수 있다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 약물 민감도 분석에 적합한 완충용액 내 표본은 독감 유형을 판단하기 위하여 독감 면역분석에 적합한 완충용액 내 표본으로 전환될 수 있다. 전술한 구현예 중 일부에서, 전환은 현장 진단 검사에 적합한 기간 내에 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 현장 진단 검사에 적합한 기간은 약 1 일 미만, 약 12 시간 미만, 약 6 시간 미만, 3 시간 미만, 약 1 시간 미만, 30 분 미만, 약 10 분 미만, 5 분 미만, 약 1 분 미만, 및 전술한 시간 중 임의의 시간 사이의 기간을 포함할 수 있다.

[0053] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현예는 뉴라미니다제 약물 민감도 분석시 이전의 다른 분석보다 현저하게 낮은 특정 약물 억제값을 제공할 수 있다. 이러한 약물 억제값은 인플루엔자 변종이 약물 저항성 또는 약물 민감성인지 여부를 판단할 수 있도록 한다. 사실 이것이 약물 저항성이 아닌 것으로 식별되는 독감에 있어서, 향상된 민감도는 잘못된 결과를 더 적게 야기한다.

[0054] 일부 구현예는 검출을 위하여 나노입자를 활용하는 측방 유동 면역분석을 포함하는 독감 식별 성분을 포함하고, 인플루엔자 뉴클레오캡시드(nucleocapsid)의 존재에 초점을 맞추며 자동으로 독감 판정 결과(독감 A vs. 독감 B)를 판독기 모듈에 전달할 수 있는 판독기를 가짐으로써 약물 저항성으로부터 약물 민감도를 구별하기 위한 후속 검사에 사용하기 위한 가장 적절한 약물 억제값을 적용한다. 일부 구현예에서, 독감 식별 성분은 더 이상의 인간의 개입 없이 약물 민감도 성분에 대하여 독감 유형에 관한 정보를 제공한다.

[0055] 일부 구현예는 인플루엔자 뉴라미니다제의 활성에 영향을 미치는 약물 민감성 검사를 위한 이중 또는 두 개의-효소 분석을 포함하며, 이로써 제1 효소(뉴라미니다제)는 신호 생성과 관련된 제2 효소에 의해 작용할 수 있는 제2 기질을 방출하는 제1 기질에 작용한다.

[0056] 여러 버전의 두개의-효소 분석 또는 이중 효소 분석은 여기에 개시된 구현예에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 효소-기질 반응의 결과는 제2 효소에 의해 작용하는 기질일 수 있으며, 신호는 다른 인플루엔자 항원에 의해 증가하고 효과적인 인플루엔자 항바이러스제가 존재하는 경우 감소한다. 일부 구현예에서, 제1 효소-기질 반응의 결과는 제2 효소 반응의 억제제로서 기능하는 화합물일 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 기질은 억제제에 대한 전구체인 차폐된 억제제이다. 일부 구현예에서, 다른 인플루엔자 항원이 존재하는 경우 신호는 내려가며 효과적인 인플루엔자 항바이러스제가 존재하는 경우 신호는 올라간다. 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현예는 인플루엔자 뉴라미니다제에 대한 좋은 민감도를 제공할 수 있는 이중 효소 분석을 포함하며 민감도는 10 picomolar 내지 100 femtomolar 범위일 수 있다.

[0057] 현재 인플루엔자 치료에 있어 가장 효과적인 항바이러스제는 뉴라미니다제를 표적으로 한다. 두 개의 주력 뉴라미니다제 억제제 약물은 자나미비르(RELENZA™) 및 오셀타미비르(TAMIFLU™)이다. 이들 약물에 대한 독감 균주 저항성은 초기에 의사를 방문하는 동안 검출되지 않을 수 있으며, 환자에게 POC 항바이러스 약물 저항성 검사를 방지할 수 있는 추가적인 스트레스를 유발할 수 있다. 미국 및 다른 선진국에서는, 항바이러스 민감성 검사는 주로 일차 진료 의사 방문이 지난 오랜 후에, 관찰의 일환으로서 환자에서 멀리 떨어진 정부 연구소에 의해 수행된다. 최근까지 이러한 검사가 의사의 사무실에서 수행될 수 있다는 것을 생각할 수 없었다. 또한, 민감도가 부족한 항바이러스성 민감성 시약은 비-배양 증폭된 표본에서 직접적인 검사를 고려할 필요가 있다. 동일한 또는 더 나은 민감도 및 독립적인 항원과 관련된 화합물이 필요하였으며 반사율(reflectance), 형광(fluorescence), 발광(luminescence)과 같은 신호 출력을 판독할 수 있는 휴대용 판독기가 없었다. 따라서, 항바이러스 치료법의 더욱 합리적인 사용을 촉진할 인플루엔자 약물 저항성에 대한 민감하고 빠른 검사의 필요성이 존재한다.

[0058] 여기에 제공된 일부 구현예는 인플루엔자 A+B의 존재에 대한 POC 검사를 포함하며, 이는 면역분석 및 별도의 인플루엔자 항원, 뉴라미니다제 표적에 의한 인플루엔자 약물 저항성 평가를 통해 한 세트의 인플루엔자 에피토프를 표적한다. 이들 항원의 결합은 치료를 위한 가이드를 제공하는 동시에, 전체적으로 더 나은 독감 검출로 이어진다.

[0059] 여기에 제공된 일부 구현예는 뉴클레오캡시드에 대한 민감성 면역분석 및 뉴라미니다제 활성을 측정하기 위한 운동역학적 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 운동역학적 분석은 이중 효소 운동역학적 분석을 포함할 수 있다. 뉴클레오캡시드에 대한 면역분석과 함께 뉴라미니다제 활성에 대한 이중 효소 운동역학적 분석은 제2 효소로서 루시페라제와 기질로서 루시페린-기반의 복합체를 포함할 수 있다. 인플루엔자 유형 A 및 B 바이러스는 알파-케토시드에 의해 연결된, 때때로 Neu5Ac로 언급되는 N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuramic acid)을 포함하는 기질의 가수분해가 가능한 표면 당단백질, 뉴라미니다제를 가진다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제-기반의 항바이러스성 민감성 검사에 사용하기 위한 기질은 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린으로 구성되는 혼성 분자(복합체)일 수 있다. 루시페린이 루시페라제의 존재시 방출되는 경우, 빛은 표본 내 잔여 뉴라미니다제 활성에 직접적으

로 비례하는 양으로 생성된다. 일부 구현예에서, N-아세틸뉴라민산-반딧불이 루시페린 복합체는 Cellex QFlu™ Combo 키트 내에서 사용되는 것들을 포함할 수 있다.

[0060] 여기에 제공된 일부 구현예는 판독기를 포함한다. 일부 구현예에서, 판독기는 발광 능력을 포함하는 Veritor™ 시스템(Beckton Dickinson)의 판독기를 포함한다. 루미노미터는 Veritor™ 시스템, 및 마이크로웰 스트립에서 사용되는 측방 유동 카트리지를 포함하는 다양한 검사 용품과 함께 사용될 수 있다. 추가적 민감도 및 이용가능한 유연성은 오직 인플루엔자 A 또는 B의 존재를 식별하는데 사용되는 현재 표본으로부터 제2의 결과를 이끌어내는 유용한 선택일 수 있다.

[0061] 현재 인플루엔자가 지역사회로 들어오는 경우, 표본이 얻어지고 일차 진료 의사에 의해 인플루엔자 A 또는 B의 판단이 이루어질 수 있다. 남아있는 표본은 약물 민감성 검사를 위하여 관찰 실험실로 보내질 수 있고 지역사회 내 다른 의사가 보기 위해 정부 웹사이트에 결과를 게시할 수 있다. 여기에 제공된 방법 및 조성물 중 일부는 의사에게 최고의 뉴라미니다제 억제제(NAI) 항바이러스제를 제시하고자 하며, 이러한 구현예는 또한 뉴라미니다제 및 뉴클레오캡시드 모두가 동일한 표본에서 측정될 수 있으므로 민감도면에서 기본적인 의사의 사무실 내 인플루엔자 검사에 대한 추가적 개선을 제공한다. 여기에 제공된 방법 및 조성물 중 일부는 또한 이 주제에 대한 많은 주요 기관들이 바이러스가 종래의 고된 IC<sub>50</sub> 약물 민감도 분석에서 요구되는 단계인 MDCK 배양에 의해 증폭되는 경우 실제 뉴라미니다제 표현형이 변할 수 있다고 믿을 수 있을 만큼, 관찰을 위해 정확한 항바이러스 저항성 데이터를 수집할 기회를 제공한다.

[0062] 약물이 있고 없을 때의 뉴라미니다제 활성 측정은 인플루엔자의 성분 관찰로서 전세계 실험실에서 통상적으로 수행된다. 뉴라미니다제 활성 분석에 기반한 조직 배양은 추가적 표준화의 장점이 있을 수 있으나, 충분한 양의 바이러스가 세포 배양에 의해 생성된 후의 분석은 임상 표본에 대한 약물 저항성을 판단하기 위한 수용가능하고 신뢰할 수 있는 방법이다. NA-Star™(Applied Bio시스템)과 같은 화학발광 기질은 인플루엔자 뉴라미니다제 활성을 측정하는데 통상적으로 사용된다. 반대로, 여기에 제공된 방법 및 조성물 중 일부는 뉴라미니다제 반응에 의해 생성되는 기질에 작용할 수 있는 시약 각테일에 대한 또다른 효소를 포함한다. 이 과정에서, 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부는 원래의 인플루엔자 바이러스 효소에 의해 생성되는 신호를 증폭시킨다. 제2 효소는 결국 더 종래의 실험실 관찰 절차에서 사용되는 배양 증폭 단계를 대체하는 역할을 한다. 일부 구현예에서, Veritor™ 시스템으로부터의 면역분석 신호는, IC<sub>50</sub> 분석을 설정할 때 종종 수행되는 단계인 고된 바이러스 적정을 대신하는 뉴라미니다제 분석에 대해 충분한 바이러스 항원이 존재한다는 것을 확인할 수 있다. 특정 신호 강도가 면역분석에 도달하면, 발광 신호 비율(약물이 없을 때의 효소 활성: 약물의 존재시의 효소 활성)이 유효하다.

[0063] 여기에 제공된 방법 및 조성물 중 일부는 빠르고, 사용하기 쉽고, 값이 저렴한 플랫폼을 포함한다. 일부 구현예는 POC 의사의 사무실 및 높은 처리량을 필요로 하는 실험실을 위한 도구를 제공하는 복수의 검사 시나리오를 표적할 수 있다. 이들의 동일한 품질은 원료-제한 설정(resource-limited settings) 및 전염병이 유행하는 동안에 유용하다.

[0064] 여기에 제공된 방법 및 조성물 중 일부는 만일 원한다면, 휴대용, 소형 Veritor™ 시스템을 포함하며, 시스템은 상당 부분 새로운 사유의(proprietary) 검출기 입자로 인하여 개선된 민감도를 갖는다. 도 1을 참조하라. 장치화된 판독은 제안된 항바이러스 민감성 검사에 요구되는 시스템 속성을 정량할 수 있는 가능성을 만든다.

[0065] 넓은 분포에 유용한 Veritor™ 시스템의 특성의 일부는 하기를 포함한다: 1) 비교적 비숙련된 보호자에 의한 사용의 용이성 및 멀리 떨어진 검사 위치(의사 사무실, 약국, 재활센터 및 잠재적으로 휴대적 사용)로 보내기에 충분한 이동성 2) 제1 POC(Point of Care) 인플루엔자 항바이러스 민감성 검사에 초점을 맞춘 최대한 넓은 범위의 환자. 3) 생물학적 환경에서의 사용. 4) 낮은 배포 비용. 5) 인플루엔자의 약물 저항성 균주를 표시하는 능력을 가진 비강 면봉(nasal swabs), 비인두 세척액(nasopharyngeal wash) 또는 흡인물(aspirates)에 존재하는 인플루엔자 A 및 B를 판단하는데 사용되는 조합 시스템. 진단, 치료 및 관찰을 강화하는 결과로서. 6) 배터리 구동. 7) 작은 풋프린트(footprint) - 15 cm (W) x 15 cm (H) x 15 cm (D)를 가진 가벼운 판독기.

[0066] 도 1에 나타난 측방 유동 디자인 및 막(membrane)은 다른 화합물을 포함하는 둘 이상의 분석을 통합하는데 유용하다. 측방 유동 기질은 두 개의 별개의 효소를 포함하는 화학적 반응이 완충용액이 교환될 수 있고, 다른 시약이 미리 준비될 수 있으며 다른 유형의 신호가 측방 유동 기질의 다른 구역에서 판독될 수 있는 적절한 순서로

배치되도록 한다.

- [0067] 일부 구현예에서, 반응 패드 및 검출기 입자에서 사용되는 니트로셀룰로오스(nitrocellulose)와 같은 고체 지지체(solid supports)은 측방 유동 분석 장치 내 공통의 성분이다. 예를 들어, 각각 양적 측방 유동과 관련되고 본원에 전체적으로 참조로 포함된 US 5,998,221 및 US 6,194,220를 참조하라. 일부 구현예에서, 양적 측방 유동은 적절한 바이러스성 항원이 항바이러스 저항성 검사에 이용 가능한지를 확인하는데 유용한 단계이다. 일부 구현예에서, 측방 유동 스트립은 표본 패드 및 복합체 패드에 대해 별도의 막을 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 측방 유동 스트립은 다수의 막을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 측방 유동 스트립은 4개의 막을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 측방 유동 스트립은 측방 유동 카세트 내 4개의 막을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 하나의 막은 표본을 수용하고 건조된 복합체를 유지하는데 모두 사용된다.
- [0068] 여기에 제공된 방법 및 조성물 중 일부는 이중 효소 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, Cellex 기질-효소 시약 시스템의 성분이 사용될 수 있다. 에스테라아제(esterase) 이중 효소 화합물에 대한 더욱 자세한 내용은 하기 출판물에서 찾을 수 있다: 각각 전체적으로 참조로 포함되는 Mize 등, Dual Enzyme Cascade, Analytical Chemistry, 179, (1989) p229-235; 미국 특허 4,904,583; 및 미국 특허 4,835,099.
- [0069] 여기에 제공된 방법 및 조성물 중 일부는 개질된 루시페라제 효소 및 뉴라민산-루시페린 복합체를 포함하는 이러한 효소에 대한 기질을 포함한다. 일부 구현예에서, 다른 제2 효소(에스테라아제) 및 플루오로케톤-기반의 차단된(차폐된) 억제제를 도입함으로써 더욱 증폭될 수 있다. 도 4는 차폐된 에스테라아제 억제제의 구현예에 대한 합성을 나타낸다. 도 4는 뉴라미니다제 기질로서 카바메이트 또는 카보네이트 결합을 포함하는 기질의 구현예를 나타낸다.
- [0070] 여기에 제공된 방법 및 조성물 중 일부는 가능한 형식 구성의 범위를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역분석 및 이중 효소 분석의 완전한 실행은 측방 유동 형식을 포함할 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 동일한 추출 시약에 의해 처리된 표본은 측방 유동 시료 패드에 담지될 수 있고 잠시 후 측방 유동 카세트의 중단부는 인플루엔자의 존재를 관측할 수 있으며 치료를 위한 추천 정보도 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 색깔 변화는 반사율 관측기를 이용해 측정할 수 있다. 일부 구현예에서, 반사율 측정과 같은 측정은 인플루엔자 검출을 위하여 측방 유동막으로부터 직접 수행될 수 있고, 화학발광, 형광, 또는 발색단(chromophore) 측정과 같은 또다른 유형의 측정은 약물 민감성을 위하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 측정은 검사 스트립에서와 같이 검출 및/또는 정량 데이터를 위한 기구로 언급되는 관측기를 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 관측기는 전체적으로 참조로 포함된 미국특허 출원번호 6,267,722, 6,394,952 및 6,867,051에서 개시되고 설명된다. 일부 구현예에서, 반사율 관측기는 형광 또는 임의의 파장의 전자기 복사를 포함하는 반사된 빛을 이용하는 검사 스트립을 관측하도록 적용된 기구를 나타낸다. 반사율은 광검출기 또는 전하결합소자(charge coupled diodes, CCD)와 같은 다른 검출기를 이용하여 검출될 수 있다.
- [0071] 면역분석 및 민감성 신호는 모두 CCD 카메라와 같은 공통의 검출기를 이용하여 관찰될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역분석 및 민감성 분석은 CCD 및 광전자 증배관 튜브와 같은 다른 검출기를 이용하여 관측될 수 있다. 일부 구현예에서, 양적 "현장(on field)" 화학발광 측정을 위한 휴대용 냉각(cooled) CCD 카메라가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 화학발광 항바이러스 민감성 분석은 또한 저잡음 증폭기를 가진 PIN 다이오드에 의해 관측될 수 있다.
- [0072] 일부 구현예에서, 이중 효소 분석 내 제1 효소 반응이 면역분석 시약과 함께 사용될 수 없고, 이중 효소 분석의 앞부분이 오프라인(off line)으로 수행되며, 절단된 기질을 갖는 부분적으로 처리된 표본은 측방 유동 시료 패드에 담지되고, 이것은 루시페라제 및 발광 신호를 생성하는데 필요한 다른 시약을 포함하는 고체 지지체로의 모세관 작용에 의해 측방 유동 스트립을 따라 이동할 수 있다. 이 구성에서, 면역분석 및 민감성 신호는 CCD 카메라와 같은 공통적 검출기를 이용하여 관측될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역분석 및 민감성 분석은 CCD 및 광전자 증배관 튜브와 같은 다른 검출기를 이용하여 관측될 수 있다.
- [0073] 일부 구현예에서, 측방 유동에서 이중 효소 분석은 절단된 루시페린을 포함하는 처리된 측방 유동 카세트의 부분을 루시페라제 및 발광 신호를 생성하는데 필요한 다른 시약을 가진 웰로 침수시킴으로써 달성될 수 있다. 이중 효소 분석으로부터 생성된 빛은 그 후 Luminoskan TL Pus 또는 상당하는 튜브 루미노미터에 의해 측정된다.
- [0074] 일부 구현예에서, 면역분석은 측방 유동 카세트(cassette) 상에서 수행되고 관측되며 이중 효소 분석은 웰 스트립 상에서 수행되고 관측된다. 두개의 분석은 공통적으로 추출된 표본을 공유할 수 있으나, 다른 형식으로 수행되므로, 측방 유동 반사율 및 웰 스트립 화학발광(또는 형광 또는 다른 광신호)을 제공할 수 있는 공통적 기구

상에서 판독된다. 면역분석 및 민감성 신호 모두 CCD 카메라와 같은 공통적 검출기를 사용하여 관찰될 수 있거나, 또는 면역분석 및 이중 효소 분석은 CCD 및 광전자 증배관 튜브와 같은 다른 검출기를 사용하여 판독될 수 있다.

[0075] 구현예를 판단하기 위한 일반적인 접근:

[0076] 도 2에 나타난 바와 같이, 출원인은 단일 시료에서 독감-관정 및 항바이러스 민감도 검사를 수행하기 위한 몇몇 선택을 탐구하였다. 일 구현예에서, 표본은 나뉘지고, 표본의 각 부분이 오직 하나의 분석에 사용되도록 2개의 다른 추출 완충용액으로 처리되었다. 이 접근법의 제한은 일부 상황에서 독감 ID 및 AST 분석 모두를 수행할 수 있는 표본이 불충분하다는 것이다. 일 구현예에서, 양 분석에 적합한 공통적 추출 시약 및 완충용액이 검사되었다. 이 접근법의 한계는 면역분석 및 운동역학적 분석에 대한 조건이 달라 최적이지 아닌 공통적 완충용액이 사용된다는 것이다. 또다른 구현예에서, 독감 ID 또는 AST 분석에 적절한 단일 추출 완충용액이 실시간으로 서로 다른 분석에 대한 완충용액으로 전환되며 사용되었다. 이 구현예는 양 분석에 대한 충분한 시료 부피 및 민감도를 제공한다. 도 2는, 또한 개발된 독감 ID 및 민감성 검사 모두에 대한 분석 형식의 복수의 구현예를 나타낸다. 결합된 측방 유동 면역분석 및 이중-효소 분석에 적절한 판독기 및 용품(들)이 사용된다(예를 들어, 만일 웰 스트립이 AST에 사용될 수 있다면, 별도의 웰 스트립 판독기가 사용될 수 있는 반면, 만일 측방 유동 스트립이 사용된다면, 단일 측방 유동 판독기가 양 검사에 사용될 수 있다).

[0077] 일부 구현예에서, 면역분석 및 항바이러스 저항성 측정 모두에서 공통의 추출 시약이 사용된다.

[0078] 일부 구현예에서, 측방 유동 형식은 니트로셀룰로오스 패드를 통해 통과하는 뉴라미니다제에서 항바이러스 저항성을 측정하는 면역분석 및 이중 효소 분석에 모두 사용된다. 일부 구현예에서, 분석은 면역분석 측방 유동 카트리지가 담지된 후 종종 남아있는 ~150 μl 표본에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 또는 양 부피는 균질분석으로서 웰 스트립(well strip)에서 측정될 수 있다.

[0079] 일부 구현예에서, 시스템은 Tropix 또는 Bethold와 같은 루미노미터, Shanghi Huguo Science 기구 Company의 HG-2와 같은 휴대용 루미노미터를 포함한다.

[0080] 일부 구현예에서, 바이러스원은 인간 비강 분비물(nasal secretions)의 존재시 기능적 운동역학적 및 면역분석을 확인하기 위한 동결된, 공지된 독감 양성, 임상적 표본을 포함할 수 있다.

[0081] 이중 효소 항바이러스 민감성 분석

[0082] 도 3에 나타난 바와 같이, 뉴라미니다제 활성화에 대한 이중 효소 운동역학적 분석의 일부 구현예는 제2 효소로서 루시페라제를, 기질로서 루시페린-기반의 복합체를 포함할 수 있다. Yolken은 1980년에 뉴라미니다제에 대한 형광 기질에 대하여 보고하였다. Buxton은 2000년에 뉴라미니다제에 대한 화학발광 기질을 보고하였으며 Hamilton은 2004년에 인플루엔자 식별을 위하여 화학발광 뉴라미니다제 기질을 사용하는 FDA 승인된 ZestatFlu-II 검사를 나란히 비교하였다. 단일 효소-단일 기질 시스템은 의사의 사무실에서 수행하기에 적합한 신뢰성 있는 약물 민감성 검사로 개발되지 않았다. 이는 더 나은 신호 증폭 시스템에 의해 다룰 수 있는 민감도의 문제일 수 있다. 여기에 제공된 일부 구현예는 루시페린 복합체를 포함하는 이중-효소 시스템을 포함한다. 일단 인플루엔자 뉴라미니다제에 의해 작용하면, 복합체는 결국 루시페라제에 의해 작용되는 유리 루시페린을 방출한다. 여기에 개시된 구현예에서, 이러한 이중 효소 화학발광 시스템은 POC 항바이러스 민감성 진단을 위한 충분한 증폭을 제공할 수 있다. 여기에 제공된 방법 및 조성물과 사용하기에 유용한 시약의 예시는 Cellex에 의한 QFlu™ Combo 검사에서 사용되는 시약을 포함한다.

[0083] 공통의 추출된 표본에서 독감 A/B 면역분석 및 약물 민감성 검사를 수행하는 능력의 증명

[0084] 여기에 제공된 일부 구현예는 분석 반응 단계 / 시약이 동일한 시간 및 만일 동일하지 않다면 인접한 공간에서 수행되는 경우 호환된다는 것의 증명을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오킵시드에 대한 면역분석 및 뉴라미니다제 활성화에 대한 이중-효소 분석은 민감도, 특이성, 분석 범위, 해상도 및 결과까지의 시간에 대한 손실을 면밀히 모니터링할 수 있다. 성공하기 위하여 두개의 분석의 모든 단계가 호환되어야 하는 것은 아니다. 일부 구현예에서, Veritor™ 면역분석 시약 및 Cellex QFlu™ 분석(현재 관찰 목적으로 사용되는)에서 현재 사용되는

이중-효소 시약은 개시된 방법, 조성물, 키트, 장치 및 시스템에서 활용된다. 평가된 하나의 시약은 양 분석에서 사용되는 용균 시약이었다. 일부 구현예에서, Veritor™ 면역분석의 용균 시약은 독감 A/B 및 약물 민감도 검사 모두에서 사용되는 시료의 제조에 사용된다. 또다른 구현예에서 Cellex QFlu™ 분석의 용균 시약은 독감 A/B 및 약물 민감도 검사 모두에서 사용되는 시료의 제조에 사용된다.

[0085] 항바이러스 민감성/저항성 분석에 대한 간접 스크리닝

[0086] 인플루엔자 유형 A 및 B 바이러스는 알파-케토시드에 의해 연결된, 때때로 Neu5Ac로 언급되는 N-아세틸뉴라민산 (N-acetylneuramic acid)을 포함하는 기질의 가수분해가 가능한 표면 당단백질, 뉴라미니다제를 가진다. 뉴라미니다제-기반의 항바이러스 민감성 검사에 사용하기 위한 기질은 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린으로 구성되는 혼성 분자(복합체)를 포함하였다. 루시페라제의 존재시 루시페린이 방출되는 경우, 빛은 표본 내 잔여 뉴라미니다제 활성에 직접적으로 비례하는 양으로 생성된다. 일 구현예에서, 현재 관찰 응용을 위해 분포된 Cellex QFlu™ Combo 키트 내에서 사용된 N-아세틸뉴라민산-반딧불이 루시페린 복합체가 평가되었다. 일부 구현예에서, 벤치마킹 실험은 배양된 바이러스성 보관주(stock)를 이용하여 수행되고, 이로써 두 개의 별도의 반응이 각 검사 조건에 대해 수행되며, 예를 들어 항바이러스제(예를 들어: 오셀타미비르) 및 다른 뉴라미니다제 활성 측정을 포함하는 하나의 반응이 항바이러스성 억제제 없이 수행된다. 대조군 표본은 개발 중인 빠른 방법 및 권고되는 WHO IC50 방법 중 하나에 의해 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, 항바이러스 민감성 시약의 스크리닝은 마이크로웰(microwell), 튜브 또는 큐벳(cuvette) 또는 플레이트에서 수행될 수 있으며 화학발광 또는 형광을 관측할 수 있다. 스크리닝은 인플루엔자의 항바이러스 저항성 및 민감성 균주를 이용하여 수행될 수 있다. 급한 경우, 순수한 뉴라미니다제를 표본에 첨가하고 간접 스크리닝에 사용할 수 있다. 냉각된 공기 양성 임상 표본은 또한 주로 비강 분비물의 다른 성분이 이중-효소 분석을 방해하지 않음을 확인하기 위하여 정기적으로 검사될 수 있다.

[0087] 면역분석에 대한 간접 스크리닝

[0088] 일부 구현예에서, 인플루엔자 검출(면역분석) 시약에 대한 스크리닝은 현재 FDA 승인된 CLIA Waived Veritor™ 제품에서 수행되는 것과 같이 측방 유동 형식으로 수행되고, 반사율로 관측될 수 있다. BD Veritor™ 면역분석은 인플루엔자 뉴클레오캡시드에 대한 두 개의 단일클론 항체를 이용한다. 하나의 항체는 사육의 금 입자의 표면에 고정되며 다른 것은 측방 유동 카세트 내 니트로셀룰로오스에 고정된다. 니트로셀룰로오스 반응 스트립에서 검출된 신호의 양은 표본 내 인플루엔자 바이러스의 양과 비례한다. Veritor™ 면역분석에 대한 잠재적인 간섭을 위한 이중-효소 시약의 검사는 적당한 양성(~5배 수치의 검출)에 해당하는 최종 농도를 획득하기 위해 제조된 인플루엔자 A(독감 A/PR/8/34) 및 인플루엔자 B(독감 B/Lee/40) 양성 시료의 존재시 수행될 수 있다. 검사 간섭은 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 음성 시료를 가진 거짓 양성 결과 또는 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 양성 시료를 가진 거짓 음성 시료의 형태로 볼 수 있다. 간섭을 나타내지 않는 이중 효소 시약만이 진행될 수 있다. 급한 경우, 순수한 뉴라미니다제를 표본에 첨가하고 수행을 위한 스크리닝에 사용할 수 있다.

[0089] 다른 이중 효소 화합물

[0090] 다른 이중 효소 시약 시스템은 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린 복합체 성분을 포함하나 다른 연결기(linker)를 활용하는 Cellex 시스템과 유사한 기질을 포함한다. 일부 구현예에서, 다른 루시페라제 효소가 사용될 수 있다.

[0091] 약물 민감성 분석을 위한 형식/용품의 판단

[0092] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현예는 결합된 분석에 대한 적절한 형식의 선택을 포함한다. 일부 구현예에서, 적합한 화합물이 발견된 경우, 그 후 면역분석 및 이중 효소 분석의 완전한 실행은 측방 유동 형식에서 가장 잘 다뤄질 수 있다. 측방 유동 형식이 양 분석에서 사용되는 경우, 동일한 추출 시약에 의해 처리된 표본은 측방 유동 시료 패드에 담지될 수 있고 잠시 후 측방 유동 카세트의 종단부는 A/B 유형을 포함하는 인플루엔자의 존재를 관측할 수 있으며, 약물 민감성에 기반한 치료를 위한 추천 정보도 제공될 수 있다. 반사율 측정은

인플루엔자 검출을 위하여 측방 유동막으로부터 직접 수행될 수 있고 화학발광 측정은 약물 민감성을 위하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 양적 "현장(on field)" 화학발광 측정을 위한 휴대용 냉각 CCD 카메라가 사용될 수 있다.

[0093] 일부 구현예에서, 이중 효소 분석 내 제1 효소 반응은 다른 면역분석 시약과 함께 사용될 수 없고, 이중 효소 분석의 앞부분이 오프라인(offline)으로 수행되며, 절단된 기질을 갖는 부분적으로 처리된 표본은 측방 유동 시료 패드에 담지되고, 이것은 루시페라제 및 발광 신호를 생성하는데 필요한 다른 시약을 포함하는 고체 지지체의 모세관 작용에 의해 측방 유동 스트림을 따라 이동할 수 있다.

[0094] 일부 구현예에서, 측방 유동에서 이중 효소 분석은 절단된 루시페린을 포함하는 처리된 측방 유동 카세트의 부분을 루시페라제 및 발광 신호를 생성하는데 필요한 다른 시약을 가진 웰로 침수시킴으로써 달성될 수 있다. 이중 효소 분석으로부터 생성된 빛은 그 후 Luminoskan TL Pus 또는 상당하는 튜브 루미노미터에 의해 측정된다.

[0095] 일부 구현예에서, 면역분석이 수행되고 측방 유동 카세트 상에서 판독되며 streamlined Cellex Qflu™ Combo 분석이 수행되고 웰 스트립 상에서 판독된다. 두 개의 분석은 공통의 추출된 표본을 공유할 수 있으나, 다른 형식으로 수행되므로, 측방 유동 반사울 및 웰 스트립 화학발광을 제공할 수 있는 공통적 기구상에서 판독된다. 일부 구현예에서, 두 개의 별도의 기구가 사용된다. 일부 구현예에서, 단일 또는 복수의 장치는 의사의 사무실에 배치하기에 적합한, 예를 들어, 작업대(counter top) 또는 휴대용 의료 스탠드에 맞는 크기의 작은 풋프린트를 가진 휴대용 배터리 구동 장치이다.

[0096] 시스템 검증

[0097] 20개의 인플루엔자 균주의 검사 세트는 배양되고 열거될 수 있으므로, 최종 조합 플랫폼(통합된 용품, 판독기 및 시약)이 10E3 바이러스성 입자(TCID<sub>50</sub>/ml 또는 CEID<sub>50</sub>/ml 단위로 정의된)의 농도에 대한 민감도 저하에 대해 분석될 수 있도록 한다. 20개의 균주의 검사 세트는 인플루엔자 A 및 B 균주의 균형을 포함할 수 있다. 인플루엔자 A 균주는 인플루엔자 H1N1 및 H3N2의 혼합일 수 있다. 검사 세트는 타미플루™(TamiFlu™) 저항성 및 민감성 균주를 함유할 수 있다. 검사 세트는 또한 2차 NAI 약물에 대한 저항성 및 민감성 균주를 포함할 수 있다. 벤치마킹 과정 및 최종 통합된 시스템에 대하여, 거의 100개의 냉각된 공기 양성 임상 분리주가 사용될 수 있다.

[0098] 개발 및 검증을 위한 항바이러스제

[0099] 표 1은 여기에 제공된 방법 및 조성물에 유용한 NAI(뉴라미니다제 억제제) 항바이러스제의 예시를 제공한다. 집단은 오셀타미비르 및 자나미비르에 대하여 항상 민감성이기 위해 새로운 인플루엔자 순환 균주에 의존할 수 없기 때문에, Biota 약물과 함께 POC 항바이러스 민감성 진단 데이터를 생성하는 것이 바람직하다.

**표 1**

[0100]

NAI 항바이러스제 및 제조사
타미플루™(TamiFlu™) 오셀타미비르 카복실레이트(Oseltamivir Carboxylate)(활성) / 오셀타미비르 포스페이트(Oseltamivir phosphate)(전구약물), 경구 전달, 자나미비르의 지식 및 DANA 기반 Roche, USP, Sequoia Res Labs
리렌자™(Relenza™) 자나미비르(Zanamivir), 흡입(inhaled), DANA 기반-DANA보다 높은 친화도 GSK
이나비르™(Inavir™) 라니나미비르 옥토노에이트(Laninamivir octonate), 흡입, 2 <sup>nd</sup> 생성 =길게 작용하는 NAI, 자나미비르 기반 Biota Pharmaceuticals, recent Biota and NABI Merger / Daiichi Sankyo Co, Limited
래피악타™(Rapiacta™) / 파라미플루™(Peramiflu™) 페라미비르(Peramivir), 비경구(parenteral), DANA 기반, 자나미비르 및 오셀타미비르의 특징을 가짐

DANA = 2,3,-디히드로-2-디옥시-N-아세틸뉴라민산(2,3,-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid)  
 McKimm-Breschkin (2012) Influenza neuraminidase inhibitors: Antiviral action and mechanisms of resistance. Influenza and other Respiratory Viruses 7 (Suppl.1), 25-36.  
 Wathen M, Barro M, Bright R, (2012) Antivirals in seasonal and pandemic influenza-future perspectives. Influenza and Other Respiratory Viruses 7 (Suppl), 76-80.

[0101] 인플루엔자 균주, 분리주 및 대조군 수거

[0102] 표 2는 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현예에 사용하기 위한 특정 표현형 및 유전자형의 예시를 함유한다. 개발을 위하여 뉴라미니다제 약물에 대한 저항성뿐 아니라 민감성인 인플루엔자 A 및 인플루엔자 B 균주(BSL-2)가 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 여기에 제공된 방법 및 조성물은 주요 독감 A 아류형 뉴라미니다제 및 독감 B 뉴라미니다제를 포함한다.

**표 2**

[0103]

광범위하게 특징지어진 약물 저항성 균주  ~20 분리주	ISIRV 8-Member 패널 저항성 독감 B WT+ 유전자형 D1973, 독감 A (H3N2) WT + 유전자형 E119V, 독감 A (H1N1) WT + 유전자형 H275Y, 독감 A (H1N1 pdm09) WT + 유전자형 H275Y의 혼합 <i>Oselt</i> 저항성  A/Washington/29/2009(H1N1pdm) H275Y <i>Oselt</i> (IC50=1462) A/Georgia/20/2006 (H1N1) H274Y <i>Oselt</i> (IC50=383) A/Massachusetts/5/2007 (H1N1) H274Y <i>Oselt</i> (IC50=258) A/Texas/12/2007 (H3N2) E119V <i>Oselt</i> (IC50=9.18) Zana 저항성  A/Montana/8/2007 (H3N2) D151V/D Zana (IC50=191.9) <i>Oselt</i> + Zana 저항성 B/Hong Kong/36/2005 B) R371K <i>Oselt</i> (IC50=1778) Zana (IC50= 154) <i>Oselt</i> 저항성(recovered from pts with no prior history of oselt therapy)
공지된 독감 양성  100개까지의 분리주	흡인물, 비인두 세척액, 면봉 등으로부터 수거될 수 있는 공지된 독감 양성 배지의 모음. 많은 경우에 BD는 오직 독감 A/B으로 알 수 있다. 일부 경우에 뉴라미니다제 및 헤마글루틴(hemagglutinin) 명칭이 알려질 수 있다.
독감 음성 NPW  10개까지 수거	음성 대조군 목적 및 첨가된 독감 항원의 희석을 위하여 수거된 비인두 세척액

[0104] 벤치마킹 검사

[0105] 여기에 제공된 일부 구현예는 단일포인트 QFlu™ Combo 및 면역분석에 대한 IC<sub>50</sub>의 수행을 포함한다. Veritor™ 및 QFlu™ 시스템은 포장 삽입물에 따라 사용될 수 있다. Applied / Life Technologies의 NA-Star™ 키트와 같이 IC<sub>50</sub> 제조된 키트에 대한 많은 선택권이 있다. 표 3은 항바이러스 검사시 사용될 수 있는 용품의 공급원 및 부품 번호의 예시를 제공한다.

**표 3**

[0106]

설명	판매회사	카탈로그 번호
NA-Star™ 인플루엔자 NAI 저항성 검출 키트 (Primary)	Applied Biosytem	4374348
NA-XTD™ 인플루엔자 NAI 저항성 검출 키트 (Alternate)		4457534
NA-Fluor™ 인플루엔자 NAI 저항성 검출 키트 (Alternate)		4457091
NA-Star™ + NA-XTD™ 검출 마이크로플레이트	Applied Biosytem	4374349
벤치마킹시 포장 삽입물마다 사용되는 Intact Cellex QFlu™ Combo 키트	Cellex	

벤치마킹시 포장 삽입물마다 사용되는 Intact BD Veritor™ 키트	Becton Dickinson
---	------------------

[0107] IC<sub>50</sub> 방법

[0108] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현에는 NA-Star® 완충용액(26mM MES, 4mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.0), NA-Star® 기질, NA-Star® 가속기, 및 96-웰 고체 흰색 플레이트를 포함하는 시판중인 NA-Star® 키트 (Applied Biosytem, Foster City, CA)로 수행되는 화학발광 NAI 분석과 비교될 수 있다. 카탈로그 4374348 및 4374349. 더욱 자세한 IC<sub>50</sub> 방법, 제조 및 분석은 본원에 전체로서 참조로 포함된 ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Sept. 2008, p. 3284-3292 Vol. 52, No. 9에서 찾을 수 있다.

[0109] 표본 선택(면봉 vs. 세척액 vs. 흡인물) 및 분석 민감도에 대한 영향

[0110] 일부 구현에는 3개의 표본 선택권(면봉으로부터 직접 검사 vs. 비인두 세척액 또는 흡인물로부터 검사)을 포함한다. 일부 구현에는 냉각된 표본 및 배양으로부터 검사, 및 단일 수거로부터 뉴클레오캡시드 면역분석 및 뉴라미니다제 활성 분석을 수행하는 능력을 포함한다.

[0111] 면봉으로부터 직접 검사

[0112] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현에는 표본을 수거하기 위한 면봉의 사용을 포함한다. 제1 Veritor™ 면역분석은 건조 면봉 수거에 기반하므로 전체 표본을 의도적으로 "처리 시약(Processing Reagent)"(400 µl 부피)에 넣고 한시간 이내에 측방 유동 스트립에 적용될 수 있도록 표본에 대한 포장 삽입물을 꺼냈다. 일반적으로 ~80 µl 부피가 측방 유동 카세트에 담지된 후 몇백 마이크로리터(microliters)가 남으며, 항바이러스 민감성 검사가 될 수 있는 많은 양의 사용되지 않은 처리된 항원을 남긴다. 이 표본 처리 경로는 바이러스성 배양을 위해 시료를 분배하는 반면, 일부 구현예에서, 면역 및 운동역학적 분석 모두 나중에 PCR 검출을 위한 핵산 안정화제로 보충될 수 있는 남아있는 일부 표본으로 이들의 검출의 피크 수치에서 또는 그 근처에서 수행될 수 있다.

[0113] 비인두 세척액 / 흡인물 검사

[0114] Veritor™ 플랫폼은 농축된 점액 용해 시약(mucolytic reagent)이 측방 유동 카세트에 담지되기 전 3개의 부분 내지 1개의 부분에서 수거된 표본에 첨가되는 방법을 포함한다. 각 유기체 현탁액의 300 \ microliters가 BD (예를 들어, 독감 A&B의 빠른 진단을 위한 Veritor™ 시스템에 대한 키트(Product No. 256045)에서)에 의해 판매되는 RV 시약 C 또는 RV 시약 D를 포함하는 유니트화된(unitized) 튜브에 첨가된다. 10개 이상의 보존-수송 배지(preservation-transport media)가 이들 세척액 / 흡인물 표본을 이용하여 성공적으로 검사되었다. 보존-수송 배지의 예시는 하기를 포함한다: M4RT, M4, M5, UTM, Ames 배지(액체), Bartel Vira Trans™ 배지, Hanks 평형 염류용액(Balanced Salt Solution), 생리식염수(Normal Saline), 인산 완충 식염수. M4RT 배지는 25 °C에서 pH 7.3이고 Hank의 평형염류용액을 포함한다: CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 글루코스. 따라서, 일부 구현예에서, 바이러스 증식을 위한 시료는 점액 용해제(mucolytic agent)가 첨가되기 전 비인두 세척액 / 흡인물을 이용하여 수거될 수 있다. 가능한 항원의 희석 효과는 비인두 세척액 / 흡인물 표본을 이용할 때 고려될 수 있다. Veritor™ 분석은 시중에 나와 있는 어느 다른 빠른 분석보다 더 큰 민감도를 갖는다.

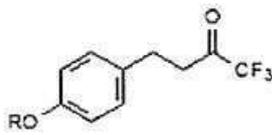
[0115] 감도를 측정하기 위한 화학발광 방법 및 척도(metrics)

[0116] 여기에 제공된 방법 및 조성물에 유용한 화학발광 방법은 각각 전체적으로 참조로 포함된, 미국특허 출원번호 8,221,976; 8,163,237; 7,947,820; 7,642,060; 7,291,488; 5,736,365; 5,639,428; 5,561,044; 5,518,884; 5,470,723; 5,457,027; 5,314,801; 5,017,473; 및 4,810,631에 개시된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 이

중 효소 검사의 척도(metrics)는 Veritor™ 면역분석을 이용하여 수득한 독감 바이러스(virion)의 검출 수치와 같은 척도와 실질적으로 유사하다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제의 존재를 검출하기 위한 화합물은 또한 약물 및 약물 없이 수행되는 반응 사이에서 발견되는 신뢰성 있는 5:1 비율을 고려하여 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>에서 충분한 신호를 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, 민감도 및 긴 선형 범위가 모두 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, Cellex가 사용될 수 있다.

[0117] 특정 화합물

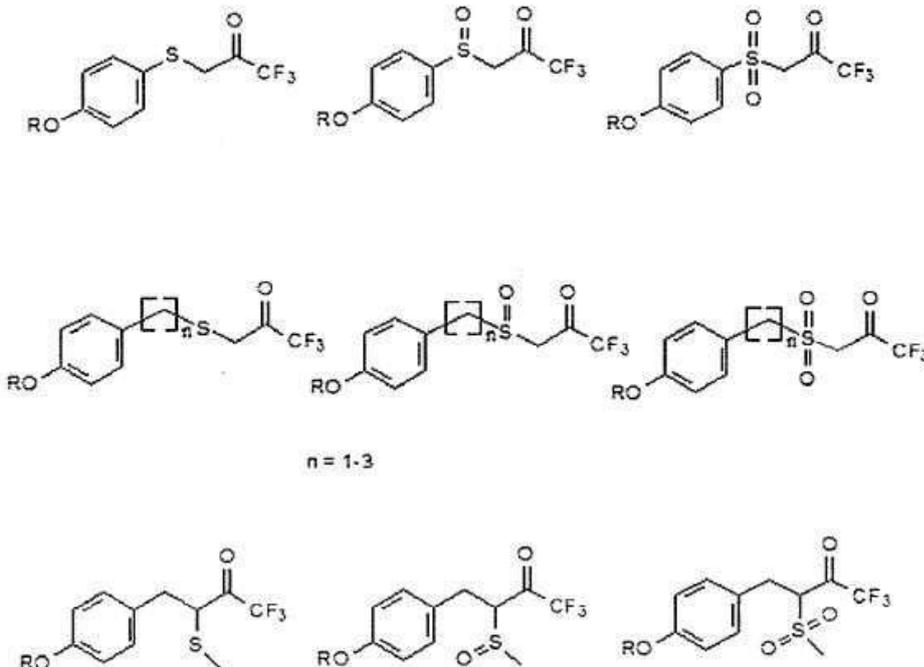
[0118] 도 12는 뉴라미니다제 활성을 분석하기 위하여 여기에 제공된 조성물 및 방법에 사용될 수 있는 에스테라아제-기반의 화합물을 나타낸다. 여기에 제공된 방법 및 조성물의 구현예에 유용한 방법은 하기에 개시된 것들을 포함한다: 본원에 전체적으로 참조로 포함된, Mize 등, Dual Enzyme Cascade, Analytical Chemistry, 179, (1989) p229-235; 미국특허 4,904,583; 미국특허 4,835,099. 일부 구현예는 개질된 루시페라제 효소 및 개질된 뉴라민산-루시페린 복합체와 같은 이들의 기질을 포함한다. 사용될 수 있는 다른 억제제는 하기를 포함한다:



R = H      Esterase Inhibitor  
R = NANA   Masked Esterase Inhibitor

[0119]

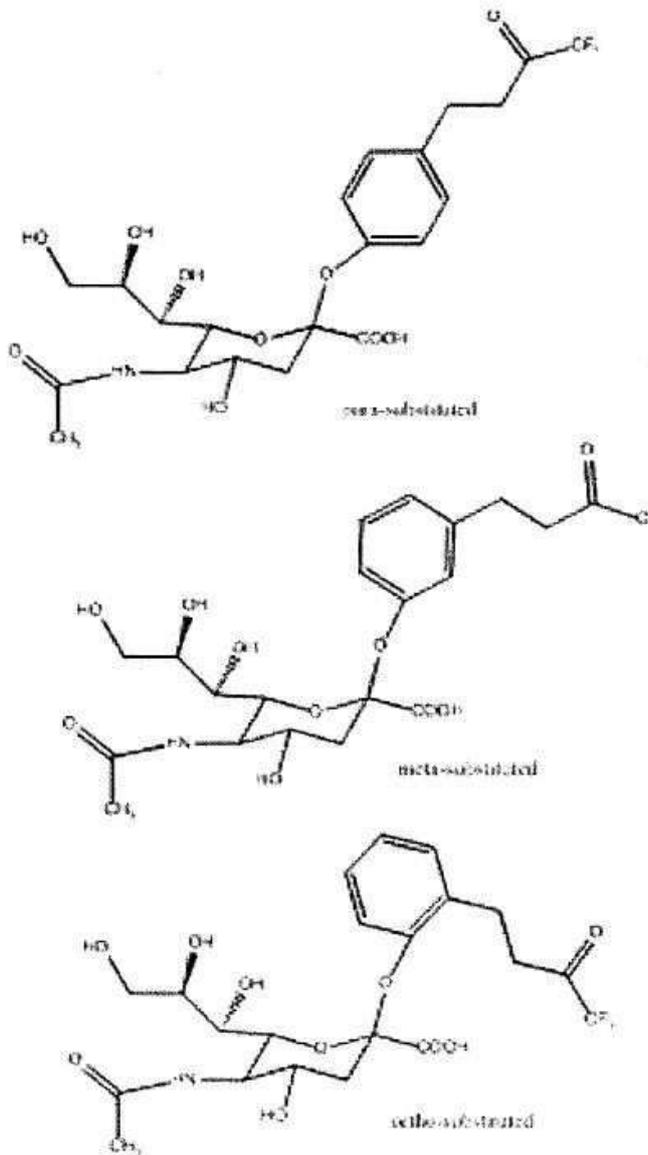
Some Possible Beta-thio Variants Inhibitor / masked Inhibitor



[0120]

[0121] 도 12 내 화합물은 파라 위치에 트리플루오로케톤을 갖는다. 또한 에스테라아제 억제제는 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(1,1,1-Trifluoro-4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-one)(파라); 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(메타); 및 1,1,1-트리플루오로-4-(4-히드록시페닐)부탄-2-온(오쏘)를 포함한다.

[0122] 여기에 개시된 구현예에서 사용하기 위한 차폐된 억제제 기질의 대안은 하기에 제공된 바와 같이 -메타 및 -오쏘 위치에 트리플루오로케톤을 갖는 것들을 포함한다:



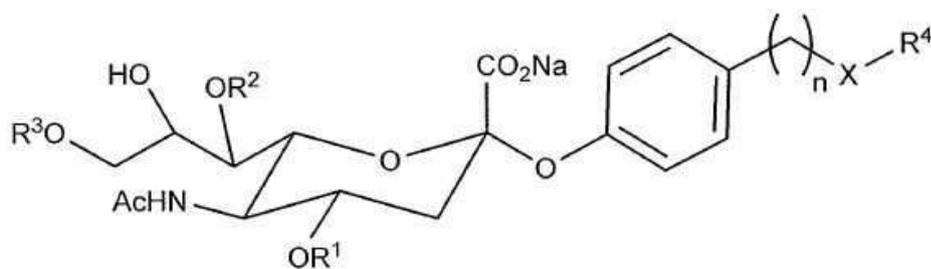
[0123]

[0124]

또다른 구현예에서, 4,7 메틸화된 N-아세틸뉴라민산 (NANA)-트리플루오로케톤은 DE 차폐된 억제제 분석, 더욱 구체적으로는 인플루엔자 뉴라미니다제에 대하여 사용될 수 있다.

[0125]

일부 구현예는 화학식 (I)의 구조를 갖는, 이중 효소 인플루엔자 뉴라미니다제 민감도 분석에 사용하기 위한 차폐된 억제제 화합물을 포함한다:



[0126]

[0127]

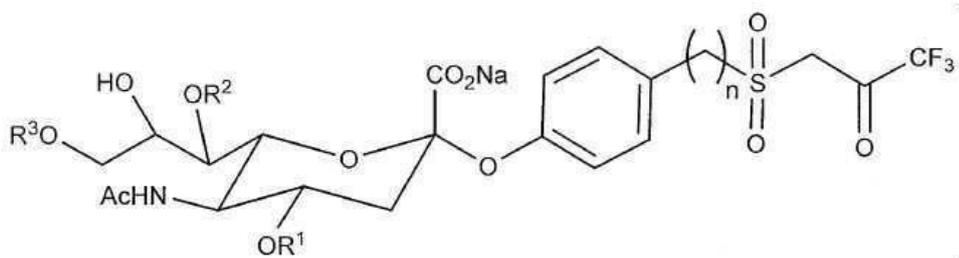
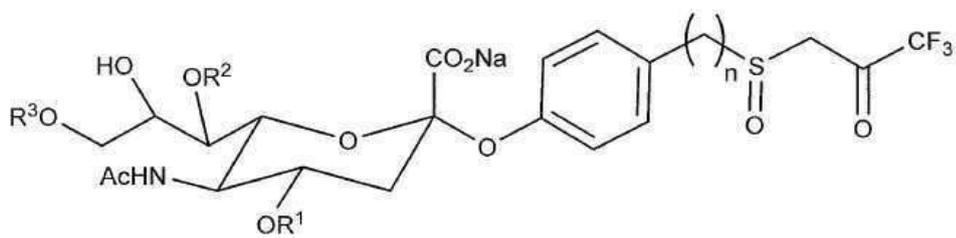
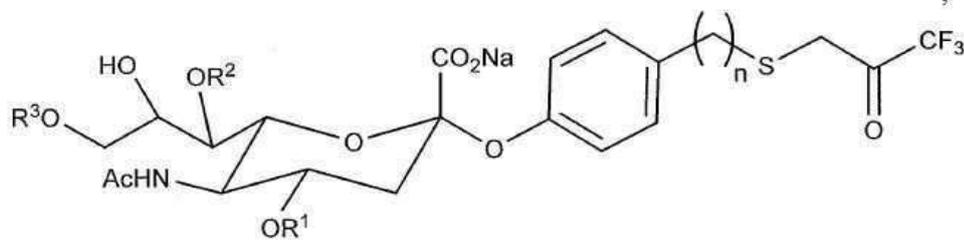
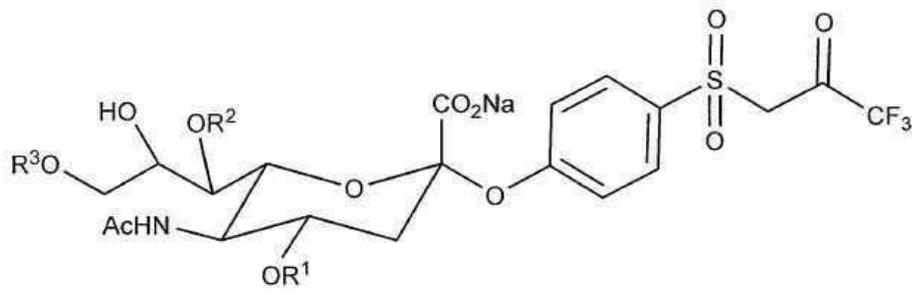
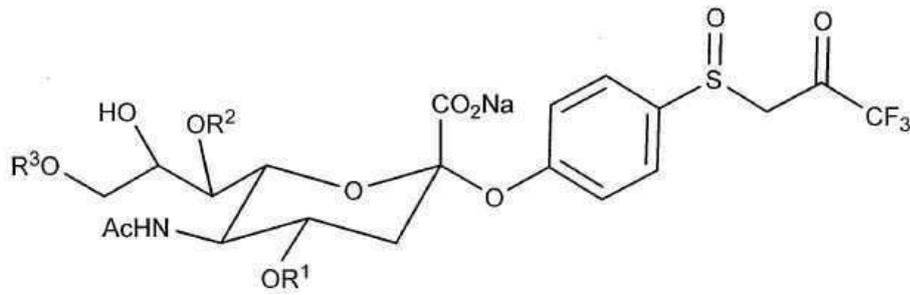
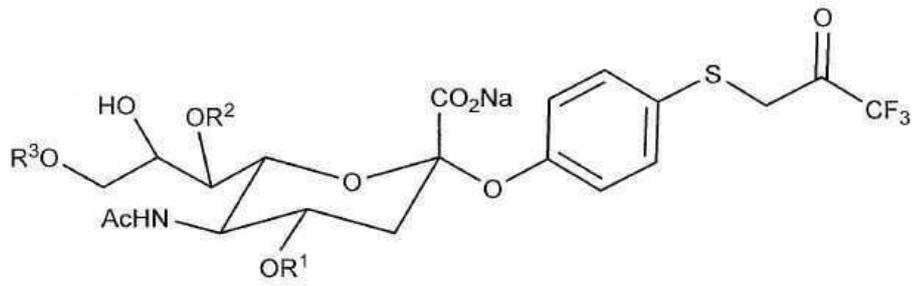
(I)

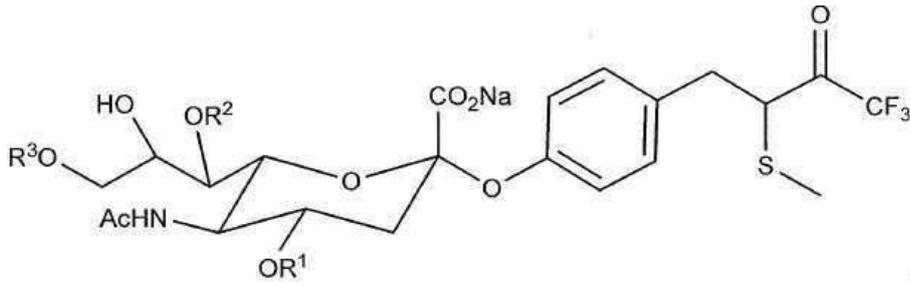
[0128]

여기서: R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>은 각각 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-5</sub>알킬이고; n은 0, 1, 2 또는 3이고; R<sup>4</sup>는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(=O)CF<sub>3</sub>이고; m은 0 또는 1이고; X는 -S(O)<sub>z</sub>- 또는 -CH(R<sup>5</sup>)-이고; R<sup>5</sup>는 -S(O)<sub>z</sub>CH<sub>3</sub>이며; 및 z는 0, 1 또는 2이다.

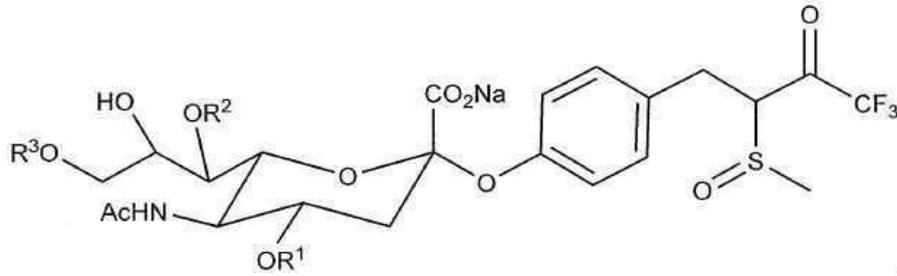
[0129]

일부 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:

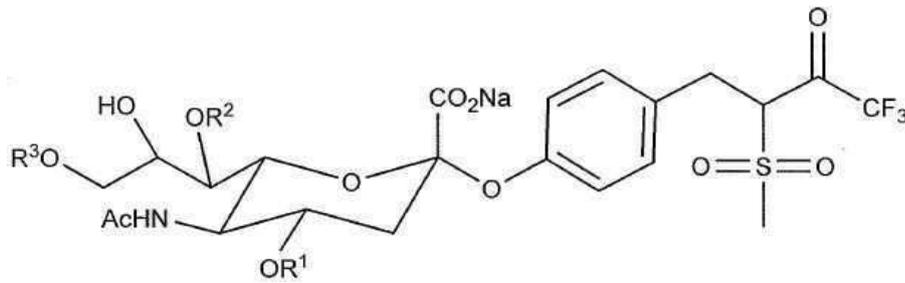




[0136]



[0137]



[0138]

[0139] DNA 석염기서열분

[0140] 일부 구현예에서, 유전자형 데이터는 표본의 독감 비리온(virion)으로부터 얻을 수 있다. 일부 구현예에서, 특정 바이러스 분리주는 빠른 POC 검사로부터 유래한 프로파일과는 다른 벤치마크(benchmark) 조직 배양 IC<sub>50</sub> 방법을 이용한 약물 민감도 프로파일을 생성할 수 있다. 다른 프로파일은 뉴라미니다제 활성 부위 내 잔기에서의 돌연변이 때문일 수 있으며 특정 인플루엔자 아류형에서 저항성을 부여하거나 또는 NA 내 다른 곳의 틀(framework)을 치환하도록 하는 것으로 알려져 있다. 표본으로부터 핵산을 서열 분석하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0141] 다른 병원균의 간섭

[0142] 일부 구현예에서, 독감이 감염된 것으로 의심되는 환자의 일부 표본이 뉴라미니다제를 생성하는 다른 병원균을 포함할 수 있다는 것이 예상된다. 표 4는 독감 양성 임상 표본에서 대부분 공통적으로 발견되는 병원균의 예시를 제공한다.

표 4

[0143]

참조	빈번한 동시감염
Peci 등, Community-acquired respiratory viruses and co-infection among patients of Ontario sentinel practices (2012) 1750-2659	인플루엔자와 RSV 인플루엔자와 엔트로바이러스 인플루엔자와 리노바이러스 인플루엔자와 파라 인플루엔자 1, II 및 III 인플루엔자와 코로나바이러스 인플루엔자와 아데노바이러스

Wang 등, Influenza and Bacterial Pathogen Coinfections in the 20 <sup>th</sup> Century, Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, Volume 2011 (2011) Article ID 146376	인플루엔자와 S. pneumonia
Shimasaki 등, Rapid Diagnostics: the detection of neuraminidase activity as a technology for high-specificity targets, The Royal Society, (2001) 356, 1925-1931  By ZymeTx Inc, makers of the ZstatFlu Dx.	파라 인플루엔자 유형 1 파라 인플루엔자 유형 2 파라 인플루엔자 유형 3 멤프스 바이러스 호흡기 바이러스 아데노바이러스

[0144] 표 5는 표본 간섭 검사시 검사될 수 있는 병원균의 예시를 제공한다. 이러한 병원균은 여기에 제공된 방법 및 조성물에 영향을 미치는지 검사될 수 있다. 전체 바이러스 또는 정제된 뉴라미니다제를 이용한 간섭 검사. 이들 병원균은 임상 수거물에 존재할 것으로 예상되는 농도에서 분석될 수 있다.

**표 5**

바이러스	인간 호흡기 세포융합 바이러스, 균주 9320 (ATCC- VR-955)
	인간 파라 인플루엔자 바이러스 1, 균주 C35 (ATCC VR-94)
	인간 파라 인플루엔자 바이러스 2, 균주 Greer (ATCC VR-92)
	인간 파라 인플루엔자 바이러스 3, 균주 C243 (ATCC VR-93)
	인간 코로나바이러스, 균주 OC43 (ATCC 1558)
	인간 리노바이러스 17, 균주 33342 (ATCC VR-1633)
	인간 엔테로바이러스 71, 균주 H (ATCC 1432)
	인간 아데노바이러스 1, 균주 Adenoid 71 (ATCC VR-1)
박테리아	폐렴연쇄상구균( <i>Streptococcus pneumonia</i> ) (ATCC-6301)

[0146] 일부 구현예에서, 시료는 비인두 세척액, 흡인물 및 면봉을 포함할 수 있다.

[0147] 인플루엔자 유형 A 또는 인플루엔자 유형 B의 검출

[0148] 여기에 제공된 구현예의 일부는 표본 내 인플루엔자 유형 A 바이러스 또는 인플루엔자 유형 B 바이러스의 존재를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 구현예는 A/B와 같은 독감 유형을 구별할 수 있는 바이러스성 항원을 식별하기 위한 면역분석의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 뉴클레오캡시드이다. 일부 구현예에서, 면역분석은 샌드위치 분석을 포함한다. 일부 이러한 구현예에서, 제1 항체는 구체적으로 표적 항원에 연결되며, 연결된 항원 및 제1 항체는 그 후 구체적으로 신호를 생성하는 제2 항체에 연결된다. 일부 구현예에서, 신호는 비색(colorimetric), 형광, 화학발광, 및 방사성이다. 일부 구현예에서, 면역분석은 측방 유동 시스템을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 검사 스트립은 면역분석을 포함한다. 여기에 제공된 방법 및 조성물에 유용한 시스템 및 조성물은 독감 A+B의 빠른 검출을 위한 Veritor™ 시스템을 포함한다(Becton Dickinson). 어떠한 경우에는 검사 스트립으로부터의 출력은 반사율일 것이다. 일부 구현예에서, 검사 스트립으로부터의 출력은 반사율 관독기를 이용하여 측정될 수 있는 색 변화일 것이다. 또한 측방 유동 면역분석 형식에 대하여, 유형-A 또는 유형-B 인플루엔자 바이러스를 판단하기 위한 구현예는 막, 표면, 및 입자와 같은 기질에서 용액상 내 분자 및 면역검출을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 마이크로웰 ELISA, 나노태그-자기분리 분석(nanotag-magnetic separation assays), 및 입자 응집(particle agglutinations). 분자 검출 분석의 예시는 Xpert® 독감 시스템(Cepheid, Sunnyvale, CA)을 포함한다. 나노태그를 포함하는 구현예는 표면-증강 라만 분광법(Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) 나노태그를 포함한다. 예를 들어, 본원에 전체적으로 참조로서 포함된 ACS Nano, 2009, 3 (10), pp 2859-2869를 참조하라. 입자 응집을 포함하는 구현예는 잘 알려져 있으며 항원-입자에 코팅된 항체와 같은 항원-결합 요소와 유체 내에서 접촉시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본원에 전체적으로 참조로서 포함된 미국 4,590,169를 참조하라.

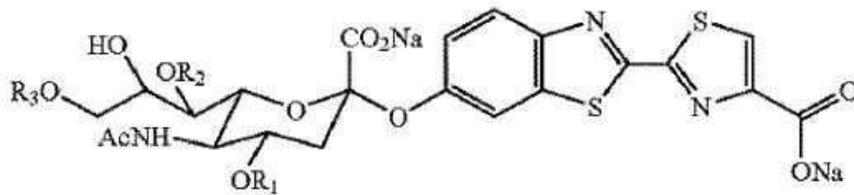
[0149] 여기에 제공된 구현예의 일부는 표본 내 인플루엔자 유형 A 바이러스 또는 인플루엔자 유형 B 바이러스의 존재를 검출하는 단계를 포함하며, 비-면역분석 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 인플루엔자 유형 A 바이러스 또는 인플루엔자 유형 B의 존재는 PCR, 핵산 혼성, 및 핵산 서열 분석과 같은 핵산-기반의 방법을 이용하여 검출

될 수 있다.

[0150] 뉴라미니다제 활성의 측정

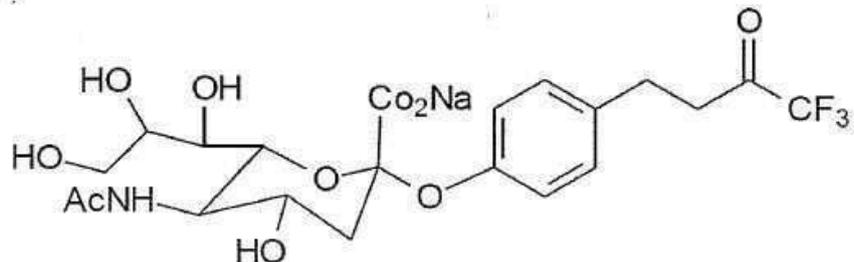
[0151] 여기에 제공된 일부 구현예는 시료 내 뉴라미니다제 활성을 검출 및/또는 측정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제는 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B 뉴라미니다제와 같은 바이러스성 뉴라미니다제이다. 일부 구현예에서, 검출되는 효소는 시알리다아제(sialidase)이다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성은 이중 효소 분석을 이용하여 측정될 수 있다. 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현예에서 유용한 시약은 QFlu™ NI 분석(Cellex, Inc., Maryland) 및 QFlu™ Combo 분석의 시약을 포함한다.

[0152] 일부 구현예에서, 뉴라미니다제에 대한 기질은 에스테라아제와 같은, 루시페라제와 같은 제2 효소에 대한 기질로 전환된다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제에 대한 기질은 N-아세틸뉴라민산(sialic acid)의 유도체 및 루시페린의 유도체의 복합체를 포함한다. 일부 구현예에서, N-아세틸뉴라민산 또는 이의 유도체와 루시페린간의 복합체는, N-아세틸뉴라민산의 당당류 고리(sugar ring)에서 --OH기를 통한 글루코시드 결합을 통해 함께 연결된다. 일부 구현예에서, 당당류 고리의 위치는 인플루엔자 뉴라미니다제가 글리코시드 결합을 선호하기 때문에 2' 위치이다. 시알산(sialic acid) 유도체의 예시는 4-알킬 또는 7-알킬 또는 4,7 알킬 N-아세틸뉴라민산(예를 들어 본원에 전체로서 참조로 포함된 미국특허 출원번호 6,303,764 및 미국특허 출원번호 6,420,552, 6,680,054에 설명된 것)을 포함한다. 하나의 예시는 4,7 메틸화된 N-아세틸뉴라민산-반딧불이 루시페린 복합체이다. 이러한 복합체의 구현예는 본원에 전체로서 참조로 포함된 미국특허 출원번호 7,893,272에 제공된다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 기질로서 사용된 복합체는 Na 염으로 나타낸 하기 식으로 나타낼 수 있다:

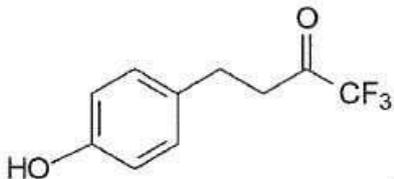


[0153] 일부 구현예에서, R1, R2, R3은 각각, 서로 독립적으로 1-5 탄소 원자를 갖는 수소 또는 알킬이다.

[0155] 일부 구현예에서, 뉴라미니다제에 대한 기질은 에스테라아제와 같은, 루시페라제와 같은 제2 효소에 대한 억제제로 전환된다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제에 대한 기질은 N-아세틸뉴라민산(sialic acid)의 유도체 및 트리플루오로메틸케톤(CF3)의 유도체의 복합체를 포함한다. N-아세틸뉴라민산의 유도체는 상기에 설명된다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제에 대한 기질은 하기와 같다:



[0156] 일부 구현예에서, 트리플루오로메틸케톤 억제제는 하기를 포함한다:



[0159] 일부 구현예에서, 뉴라미니다제에 대한 기질이 에스테라아제와 같은 제2 효소에 대한 억제제로 전환되는 경우, 기질은 또한 차폐된 억제제로서 알려진다. 여기에 제공된 방법의 일부에 유용한 차폐된 억제제의 예시는 여기에

개시된다.

[0160] 합성의 예시를 도 4에 나타낸다. 일부 구현예에서, 시료는 인플루엔자 바이러스와는 다른 출처로부터 뉴라미니다제를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 원치않는 뉴라미니다제는 특정 항체 및 억제제를 이용하여 억제된다. 원치않는 뉴라미니다제 활성은 특정 다중클론 또는 단일클론 항체를 이용하여 억제된다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스성 뉴라미니다제의 검출을 위하여, 박테리아종 폐렴연쇄상구균(*Streptococcus pneumoniae*) 및 방선균(*Actinomyces viscosus*)과 같은 시료 내 유기체를 오염시킬 것 같은 것으로부터 비-특정 뉴라미니다제 활성은 이들 출처의 뉴라미니다제에 대한 특이적인 항체를 이용하여 억제된다. 다른 유기체의 뉴라미니다제는 별개의 아미노산 서열을 갖기 때문에 이 접근법은 가능하며, 이는 종-특정, 또는 하위-종-특정, 뉴라미니다제 항체의 생성을 허용한다. 예를 들어, 특정 항체는 뉴라미니다제 중화 분석(neutralization assays)시 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다제 아류형을 분화시키는데 공통적으로 이용된다.

[0161] 조합 분석

[0162] 여기에 제공된 일부 구현예는 (1) 시료 내 유형 A 또는 유형 B 인플루엔자 바이러스의 식별; 및 (2) 특정 항바이러스 약물에 대한 인플루엔자 바이러스 뉴라미니다제의 민감도를 위해 시료를 분석하는 조합 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 시료 내 유형 A 또는 유형 B 인플루엔자 바이러스의 식별을 위한 면역분석은 특정 항바이러스 약물에 대한 인플루엔자 바이러스 뉴라미니다제의 민감도를 측정하기 위한 분석과 다른 완충용액에서 수행된다.

[0163] 일부 구현예에서, 표본은 수득된다. 일부 구현예에서, 표본은 비인두 세척액, 흡인물 및 면봉을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 다른 완충용액 내 몇몇 초기 시료를 제조하기 위하여 충분하지 않은 양의 표본이 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 표본은 제1 분석을 위한 제1 검사 시료를 수득하기 위해 제1 완충용액 내 위치한다. 일부 구현예에서, 제1 검사 시료는 제2 분석에 부적합한 완충용액을 포함한다. 예를 들어, 제1 완충용액은 제2 분석을 억제할 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 제1 검사 시료는 제2 분석에 사용할 수 있는 제2 완충용액을 포함하는 제2 검사시료로 전환된다. 일부 구현예에서, 제1 또는 제2 분석은 시료 내 유형 A 또는 유형 B 인플루엔자 바이러스의 식별을 위한 면역분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 또는 제2 분석은 특정 항바이러스 약물에 대한 인플루엔자 바이러스 뉴라미니다제의 민감도를 판단하기 위한 분석이다.

[0164] 일부 구현예에서, 표본은 면역분석 검사 시료를 제조하기 위하여 유형 A 또는 유형 B 인플루엔자 바이러스의 식별을 위한 면역분석에 적합한 제1 완충용액에 첨가된다. 면역분석 검사 시료의 제1 부분은 유형 A 또는 유형 B 인플루엔자 바이러스의 식별을 위한 면역분석에 적용될 수 있다. 제2 부분은 뉴라미니다제 활성 분석에 적합한 제2 완충용액과 평형인 교환 매트릭스(exchange matrix)에 면역분석 검사 시료를 접촉시킴으로써 뉴라미니다제 분석 검사 시료로 전환될 수 있다. 매트릭스의 예시는 세파텍스 및 세파로스와 같은 가교결합된 다당류를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제는 매트릭스를 포함하는 챔버를 포함하는 카트리지를 포함한다. 세파텍스 종류는 G25 medium(중간), G25 coarse(굵은), G25 fine(미세한)일 수 있다. 베드(bed) 높이는 어디든지 1 센티미터 내지 15 센티미터일 수 있다. 일부 구현예에서, 수지(resin)는 인플루엔자 뉴라미니다제 방출 및 그 후 뉴라미니다제 활성 측정을 촉진시키는 완충용액 내에서 미리-세척되고 미리-평형이 될 수 있다. 이러한 시약은 NA-STARTM 및 NA-FLUORM 키트 및 ZstatFluTM 제품에서 발견되는 것들과 유사하다. 이들 완충용액은 일반적으로 100mM 미만이므로 종종 10mM 미만과 같이 낮은 염화나트륨 함량을 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 염화나트륨 함량은 100 mM 내지 0.1 mM, 100 mM 내지 1 mM, 10 mM 내지 0.1 mM, 및 10 mM 내지 1 mM이다. 이들 완충용액은 가장 최상의 뉴라미니다제 활성 측정을 얻기 위하여, 일반적으로 0.1 mm 내지 50 mM, 1mm 내지 20 mM, 또는 4 mm 내지 10 mM 범위의 칼슘 및/또는 마그네슘 이온을 포함할 것이다. 수지의 평형을 맞추는데 사용되는 완충용액의 pH는 이후에 뉴라미니다제 활성 분석이 치명적인 인플루엔자 H7N9와 같은 pH 민감성 뉴라미니다제를 포함하는 드문 균주에서 수행될 수 있음을 확인하기 위하여 5 내지 8 사이에 있어야한다. 수지 카트리지를 통해 통과하는 독감 표본은 독감 정제 면역분석에 있어 뉴클레오펙시드를 방출하는데 사용되는 세척제와 유사한 소량의 세척제를 포함할 수 있다. 세척제는 NP-40, 담즙염(bile salts), Brij-35 및 Tritons를 포함할 수 있다. Triton의 예시는 Triton-X-100이다. 담즙염의 예시는 소듐 디옥시콜레이트이다. 이들 조직 및 바이러스 용균제(lysing agents)는 액체 저장주에 들어갈 수 있으며 다른 경우 고체로서 가능할 수 있다. Tritons 및 NP 40은 수지 카트리지를 통해 통과하는 시료 내 0.01% 내지 10% v/v, 또는 0.5% 내지 3% V/V에서 존재할 수 있다. 고체 세척제는 0.1% 내지 10% W/V, 또는 0.5% 내지 2% W/V 범위의 농도에서 존재할 수 있다.

[0165] 일부 구현예에서, 표본은 뉴라미니다제 분석 검사 시료를 제조하기 위하여 뉴라미니다제 활성 분석에 적합한 제

1 완충용액에 첨가된다. 뉴라미니다제 분석 검사 시료의 제1 부분은 뉴라미니다제 활성 분석에 적용될 수 있다. 제2 부분은 유형 A 또는 유형 B 인플루엔자 바이러스의 식별을 위하여 면역분석에 적합한 제2 완충용액과 평형 인 교환 매트릭스에 뉴라미니다제 분석 검사 시료를 접촉시킴으로써 면역분석 검사 시료로 전환될 수 있다. 이러한 매트릭스의 예시는 세파텍스, 세파로스, 및 니트로셀룰로오스와 같은 가교결합된 다당류를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역분석은 검사 스트립을 포함하며, 매트릭스는 니트로셀룰로오스를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 완충용액은 매트릭스로 동결건조되거나 또는 다른 방법으로 건조된다. 뉴클레오캡시드가 면역분석 검출이 가능하도록 고안된 추출 완충용액은 표본 패드, 복합체 패드, 또는 모두에 미리 배치된다. 이들 패드(membranes)의 적합한 예시는 glass fiber Millipore G041, Millipore GFDX 및 cellulosic Millipore C083, Millipore C048, Millipore C068, Millipore C083, Millipore C248를 포함하며, 적합한 Millipore 패드의 특정한 계열은 SureWick Product Line이다. 다른 적합한 예시는 Healthcare CF1, CF3, CF4 cotton linter, Whatman Fusion 5, Std 14 및 Std 15이며, 폴리에스터 표본-복합체 패드는 다른 예시이다. 도 14는 면역분석 측방 유동 검사 스트립에 사전에 배치된 면역분석 뉴클레오캡시드 추출 시약의 구현예를 도시한다.

[0166] 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제의 민감도의 측정

[0167] 여기에 제공된 일부 구현예는 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제의 민감도를 측정하는 단계를 포함한다. 검사 화합물은 인플루엔자에 대한 항바이러스 약물과 같은 항바이러스 약물을 포함한다. 구현예에서, 뉴라미니다제의 활성은 검사 화합물의 존재 및 부존재시 측정된다. 활성 비율은 억제값을 판단하는데 사용될 수 있으며, 억제값은 뉴라미니다제가 검사 화합물에 대하여 민감성 또는 저항성인지 여부를 판단하기 위하여 선택된 억제 임계점과 비교될 수 있다.

[0168] 일부 구현예에서, 억제 임계점 값은 특정 검사 화합물에 대한 공지된 민감성 또는 저항성을 가진 다른 바이러스의 패널(panel)에 대하여 억제값을 판단함으로써 판단될 수 있다. 각 바이러스에 대한 억제값은 그래프로 나타낼 수 있으며, 판단된 억제 임계점은 검사 화합물에 대하여 민감성인 바이러스의 억제값, 및 검사 화합물에 대하여 저항성인 바이러스의 억제값 사이에 놓인다. 출원인은 예기치않게 인플루엔자 유형 A 및 인플루엔자 유형 B에 대한 억제 임계점이 다르다는 것을 발견하였다. 일부 구현예에서, 유형 A 바이러스는 특정 검사 화합물에 대하여 유형 B 바이러스 보다 낮은 억제 임계점을 갖는다. 일부 구현예에서, 단일 시료 내 인플루엔자 바이러스의 유형이 공지되었다면(예를 들어, 유형 A 또는 유형 B), 분석의 민감도를 현저히 증가시킬 수 있는 적절한 억제 임계점 수치가 검사된 화합물에 적용될 수 있으며, 이는 어떠한 종류의 약물 저항성을 나타내지 않는 이들 균주로부터 오직 낮은 수치의 약물 저항성을 갖는 독감 균주를 분석할 수 있는 능력을 가능하게 한다.

[0169] 뉴라미니다제 검사 카트리지

[0170] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현예는 뉴라미니다제 분석을 위한 검사 카트리지를 포함한다. 일부 구현예에서, 검사 약물 및/또는 항바이러스 약물과 같은 검사 화합물에 대한 민감도를 판단하기 위한 뉴라미니다제 분석은 매트릭스 챔버 및 시약 챔버를 포함하는 카트리지 내에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 카트리지는 1 이상의 검사 챔버를 포함할 수 있다. 검사 챔버는 하기에 대한 1 이상의 검사 챔버를 포함할 수 있다: 검사 화합물이 없는, 표본 + 분석 시약; 표본 또는 검사 화합물이 없는, 분석 시약; 표본 + 분석 시약 + 검사 화합물; 및 표본이 없는, 분석 시약 + 검사 화합물. 일부 구현예에서, 복수의 검사 화합물이 검사되며, 각각의 추가적 검사 화합물에 대하여 표본 + 분석 시약 + 검사 화합물, 및 표본이 없는 분석 시약 + 검사 화합물에 대한 추가적 검사 챔버가 포함된다(예를 들어 제1, 제2, 제3, 제4, 등 검사 화합물). 표본 + 분석 시약 및/또는 분석 시약에 대한 대조군 검사 챔버는 카트리지에서 검사되는 모든 검사 화합물에 대하여 활용될 수 있다. 일부 구현예에서, 매트릭스 챔버는 표본을 포함하도록 선택되는 챔버와 같은 1 이상의 다른 챔버를 가진 유체 연통 내에 있다. 일부 구현예에서, 검사 챔버는 하기를 포함한다: (1) 표본, 반응 혼합물 및 검사 약물을 포함하는, 약물을 이용한 검사군; (2) 표본 및 반응 혼합물을 포함하는, 약물이 없는 검사군; (3) 반응 혼합물을 포함하는, 반응 혼합물에 대한 대조군; 및 (4) 반응 혼합물 및 약물을 포함하는, 검사 약물에 대한 대조군. 일부 구현예에서, 다른 대조군은 포함될 수 있다.

[0171] 일부 구현예에서, 유체 시료는 매트릭스 챔버에 첨가된다. 유체 시료는 확산, 모세관 흐름, 및 중력으로부터 선택된 1 이상의 힘에 의해 매트릭스 챔버에서 시료를 포함하도록 선택된 챔버를 통해 흐른다. 챔버에서 발생하는 반응으로부터의 신호는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정될 수 있다. 카트리지의 예시는 도 5에 나타난다.

- [0172] 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법
- [0173] 여기에 제공된 일부 구현에는, 시료와 인플루엔자 바이러스 유형 A 또는 인플루엔자 바이러스 유형 B를 검출하기 위한 면역분석에 적합한 면역분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 면역분석 검사 시료를 수득하는 단계; 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석을 포함하는 검사 스트립에 대하여 면역분석 검사 시료의 제 1 부분을 접촉시킴으로써, 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; 면역분석 검사 시료의 제 2 부분과 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 매트릭스를 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 수득하는 단계; 및 뉴라미니다제 검사 시료와 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 시료 내 뉴라미니다제의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 구현에서, 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성화에 대한 분석에 부적합하다. 일부 구현에서, 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성을 억제한다.
- [0174] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현에는 하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법을 포함한다: 시료와 뉴라미니다제 분석에 적합한 뉴라미니다제 분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 수득하는 단계; 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석을 포함하는 검사 스트립에 대하여 뉴라미니다제 검사 시료의 제 1 부분을 접촉시키고, 여기서 뉴라미니다제 검사 시료는 면역분석 완충용액을 포함하는 매트릭스와 접촉함으로써, 면역분석 검사 시료를 수득하고 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; 및 뉴라미니다제 검사 시료의 제 2 부분과 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 시료 내 뉴라미니다제의 존재를 검출하는 단계. 일부 구현에서, 뉴라미니다제 분석 완충용액은 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석에 부적합하다. 일부 구현에서, 뉴라미니다제 분석 완충용액은 인플루엔자 유형 A 및 인플루엔자 유형 B로 구성된 군으로부터 선택된 항원에 대한 항체의 특정 결합을 억제한다. 일부 구현에서, 매트릭스는 동결건조된 면역분석 완충용액을 포함한다.
- [0175] 일부 구현에서, 뉴라미니다제 분석 완충용액, 및 뉴라미니다제 분석을 위한 시약을 포함하는 매트릭스는 카트리지와 같이 동일한 용기 내에 존재한다. 일부 구현에서, 용기는 매트릭스를 포함하는 챔버, 및 뉴라미니다제 분석을 위한 시약을 포함하는 챔버와 같이 다수의 챔버를 포함한다. 일부 구현에서, 매트릭스는 세파텍스 및 세파로스와 같은 가교결합된 다당류를 포함한다. 일부 구현에서, 용기는 휴대용 광전자 증배관 튜브와 같은 광전자 증배관 튜브를 이용하여 관독되기에 적합한 멀티웰 카트리지를 포함한다. 멀티웰 스트립 또는 멀티웰 스트립-수지 카트리지는 그후 검출기 바로 아래의 각 웰에 위치한 레일(rail)을 가로질러 이동한다. 레일을 가로지르는 이동은 정지 및 각 웰이 계산되도록 프로그램된 스텝핑 모터(steping motor)에 의해 수행된다.
- [0176] 일부 구현에서, 면역분석 검사 시료 및 뉴라미니다제 검사 시료는 중력, 모세관 작용, 및 확산으로부터 선택된 1 이상의 힘에 의해 용기 내로 이동한다.
- [0177] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현에는 하기 단계를 포함하는 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계를 포함한다: (a) 억제값 비율을 수득하는 단계로서, 상기 비율은 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 비교하여 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치를 포함한다; 및 (b) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계. 억제 임계점을 초과하는 억제값 비율은 뉴라미니다제 활성이 검사 화합물에 대하여 민감하며, 따라서 독감 균주가 검사 화합물에 대하여 민감성임을 나타내고, 임계점 미만의 비율은 뉴라미니다제 활성이 검사 화합물에 대하여 민감하지 않으며, 따라서 독감 균주가 검사 화합물에 대하여 저항성임을 나타낸다. 일부 구현에서, 억제 임계점은 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단된다. 일부 구현에서, 억제 임계점은 검사 화합물에 의해 판단된다. 일부 구현에서, 검사 화합물은 인플루엔자를 치료하기 위하여 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제의 민감도에 따라 선택될 수 있다. 일부 구현에서, 검사된 독감 균주에 앓고 있는 환자는 검사 화합물을 투여하도록 권고될 수 있거나, 또는 뉴라미니다제가 검사 화합물에 대하여 민감성인 경우, 검사 화합물이 환자에게 제공될 수 있다.
- [0178] 일부 구현에서, 뉴라미니다제 분석은 신호 효소를 포함하는 이중 효소 분석을 포함한다. 일부 구현에서, 뉴라미니다제 활성은 신호 효소의 기질을 생성한다. 일부 구현에서, 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현에서, 뉴라미니다제 활성은 신호 효소에 대한 억제제를 생성한다. 일부 구현에서, 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현에서, 신호 효소는 루시페라제를 포함한다. 일부 구현에서, 면역분석 완충용액은 루시페라제 활성을 억제한다. 일부 구현에서, 뉴라미니다제 활성의 수치는 광전자 증배

관 튜브를 이용하여 측정된다.

- [0179] 일부 구현예에서, 검사 화합물은 항바이러스 약물이다. 일부 구현예에서, 검사 화합물은 오셀타미비르, 자나미비르, 페라미비르 및 라니미비르(lanimivir)로 구성된 군으로부터 선택된 항바이러스 약물이다.
- [0180] 일부 구현예에서, 면역분석은 샌드위치 분석을 포함한다.
- [0181] 일부 구현예에서, 시료는 인간과 같은, 인플루엔자를 갖는 것으로 의심되는 피험자와 같은 피험자로부터 취득된다.
- [0182] 일부 구현예에서, 여기에 설명된 조합 분석은 최소한 2000 TCID<sub>50</sub>/ml, 1000 TCID<sub>50</sub>/ml, 500 TCID<sub>50</sub>/ml, 200 TCID<sub>50</sub>/ml, 100 TCID<sub>50</sub>/ml, 또는 이들 값 중 임의의 2개에 의해 정의되는 범위의 감염량(infectious dose)의 관점에서 인플루엔자 바이러스의 검출의 한계를 갖는다. 물을 기준으로 개시된 조합 검사는 최소한 1000 fM, 500 fM, 100 fM, 10 fM, 또는 이들 값 중 임의의 2개에 의해 정의되는 범위에서 뉴라미니다제를 검출하는 능력을 갖는다.
- [0183] 치료를 선택하기 위한 방법
- [0184] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현예는 하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 치료를 선택하는 방법을 포함한다 (a) 시료와 인플루엔자 바이러스 유형 A 또는 인플루엔자 바이러스 유형 B를 검출하기 위한 면역분석에 적합한 면역분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 면역분석 검사 시료를 취득하는 단계; (b) 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역 분석을 포함하는 측방 유동 검사 스트립에 대하여 면역분석 검사 시료의 제1 부분을 접촉시킴으로써, 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; (c) 면역분석 검사 시료의 제2 부분과 뉴라미니다제 분석 완충용액을 포함하는 매트릭스를 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 취득하는 단계; (d) 뉴라미니다제 검사 시료와 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 검사 화합물(예를 들어 인플루엔자 항바이러스 약물)에 대한 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계로, 판단은 하기 단계를 포함한다: (i) 억제값 비율을 취득하는 단계로서, 상기 비율은 1 이상의 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 비교하여 1 이상의 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치를 포함하며, 및 (ii) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계; 및 (e) 뉴라미니다제 활성을 억제하는 것으로 판단된 1 이상의 검사 화합물로부터 검사 화합물을 선택 또는 식별하는 단계. 일부 구현예에서, 억제 임계점은 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단된다. 일부 구현예에서, 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성의 분석에 부적합하다. 일부 구현예에서, 면역분석 완충용액은 뉴라미니다제 활성을 억제한다. 일부 구현예에서, 단계 (c) 및 (d)는 동일한 용기 내에서 수행된다. 일부 구현예에서, 피험자는 인플루엔자를 갖는 것으로 의심된다. 일부 구현예에서, 피험자는 인간이다.
- [0185] 여기에 제공된 방법 및 조성물의 일부 구현예는 하기 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 치료를 선택하는 방법을 포함한다: (a) 시료와 뉴라미니다제 분석에 적합한 뉴라미니다제 분석 완충용액을 접촉시킴으로써, 뉴라미니다제 검사 시료를 취득하는 단계; (b) 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 면역분석을 포함하는 검사 스트립에 대하여 뉴라미니다제 검사 시료의 제1 부분을 접촉시키고, 여기서 뉴라미니다제 검사 시료는 면역분석 완충용액을 포함하는 매트릭스와 접촉함으로써, 면역분석 검사 시료를 취득하고 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B의 존재 또는 부존재를 검출하는 단계; 및 (c) 뉴라미니다제 검사 시료의 제2 부분과 뉴라미니다제 분석을 접촉시킴으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 검사 시료의 뉴라미니다제의 민감도를 판단하는 단계로, 판단은 하기 단계를 포함한다: (i) 억제값 비율을 취득하는 단계로서, 상기 비율은 검사 화합물의 부존재시 뉴라미니다제 활성의 수치와 비교하여 검사 화합물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 수치를 포함하며, 및 (ii) 억제값 비율과 억제 임계점을 비교함으로써, 검사 화합물에 대한 뉴라미니다제 활성의 민감도를 판단하는 단계; 및 (e) 뉴라미니다제 활성을 억제하는 것으로 판단된 검사 화합물을 선택하는 단계. 일부 구현예에서, 억제 임계점은 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단된다. 일부 구현예에서, 매트릭스는 동결건조된 면역분석 완충용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 동일한 용기에서 수행된다.
- [0186] 일부 구현예에서, 억제 임계점은 유형 A 또는 유형 B 바이러스의 검출에 의해 판단되며, 여기서 유형 A 바이러스가 검출되는 경우 제1 억제 임계점이 사용되고, 유형 B 바이러스가 검출되는 경우 제2 억제 임계점이 사용된다. 일부 구현예에서, 억제 임계점은 만일 유형 A 독감 바이러스가 검출된다면 만일 유형 B 독감 바이러스가 검출되는 경우보다 낮다.

- [0187] 일부 구현예에서, 용기는 매트릭스를 포함하는 챔버, 및 뉴라미니다제 분석을 위한 시약을 포함하는 챔버와 같은 다수의 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 매트릭스는 세파텍스 및 세파로스와 같은 가교결합된 다당류를 포함한다.
- [0188] 일부 구현예에서, 용기는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 관독되기에 적합한 멀티웰 카트리지와 같은 카트리지를 포함한다. 일부 구현예에서, 광전자 증배관 튜브는 이동이 가능하다.
- [0189] 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 신호 효소를 포함하는 이중 효소 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성은 신호 효소의 기질을 생성한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석은 N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성은 신호 효소에 대한 억제제를 생성한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 분석 N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 효소는 루시페라제를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성의 수치는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정된다.
- [0190] 일부 구현예에서, 검사 화합물은 항바이러스 약물이다. 일부 구현예에서, 검사 화합물은 오셀타미비르, 자나미비르, 페라미비르 및 라나미비르 로 구성된 군으로부터 선택된 항바이러스 약물이다.
- [0191] 일부 구현예에서, 면역분석은 샌드위치 분석을 포함한다.
- [0192] 일부 구현예에서, 시료는 피험자로부터 획득한다.
- [0193] 시스템 및 키트
- [0194] 여기에 제공된 일부 구현예는 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위한 진단 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 시스템은 시료 내 뉴라미니다제 활성을 판단하기 위한 카트리지, 여기서 카트리지는 판단에 부적합한 완충용액을 포함하는 시료를 판단에 적합한 완충용액을 포함하는 시료가 되도록 처리하도록 구성된다; 및 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 검사 스트립, 여기서 측방 유동 스트립과 같은 검사 스트립은 검출에 적합한 완충용액을 포함하는 시료에 대하여 검출에 부적합한 완충용액을 포함하는 시료가 되도록 처리하도록 구성된다,를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 시스템은 또한 카트리지로부터 신호를 측정하도록 구성된 제1 검출기; 및 검사 스트립으로부터 신호를 측정하도록 구성된 제2 검출기를 포함한다.
- [0195] 일부 구현예에서, 카트리지는 판단에 적합한 완충용액을 포함하는 카트리지 매트릭스, 및 뉴라미니다제 활성 판단을 위한 시약을 포함하는 시약 챔버를 포함하는 매트릭스 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 카트리지 매트릭스는 가교결합된 다당류를 포함한다. 일부 구현예에서, 카트리지 매트릭스는 세파텍스 및 세파로스 로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 매트릭스 챔버 및 카트리지 챔버는 매트릭스 챔버에 적용된 시료가 매트릭스 챔버로부터 시약 챔버로 흐르도록 유체 연통 내에 있다. 일부 구현예에서, 시료는 중력, 모세관 작용, 및 확산으로부터 선택된 1 이상의 힘에 의해 카트리지 내에서 흐른다. 일부 구현예에서, 카트리지는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 관독되기에 적합한 멀티웰 카트리지를 포함한다.
- [0196] 일부 구현예에서, 검사 스트립은 면역분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역분석은 샌드위치 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 검사 스트립은 검출에 적합한 완충용액을 포함하는 매트릭스를 포함한다. 일부 구현예에서, 매트릭스는 니트로셀룰로오스를 포함한다. 일부 구현예에서, 검출에 적합한 완충용액은 동결건조된다.
- [0197] 일부 구현예에서, 제1 검출기는 루미노미터를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 검출기는 반사율 관독기를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 검출기는 광전자 증배관 튜브를 포함한다. 일부 구현예에서, 장치는 제1 및 제2 검출기를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 검출기는 동일하다. 일부 구현예에서, 장치는 이동이 가능하다. 일부 구현예에서, 장치는 소형이다. 일부 구현예에서, 측방 유동 스트립 및 멀티웰 스트립/ 수지 카트리지는 두 개의 검출 양상을 가진 공통의 플랫폼상에서 관독되나, 공통의 전원을 공유하며 ID 및 AST 모두의 결과를 검토하여 나타낸다.
- [0198] 여기에 제공된 일부 구현예는 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위한 진단 키트를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 키트는 시료 내 뉴라미니다제 활성을 판단하기 위한 카트리지, 여기서 카트리지는 판단에 부적합한 완충용액을 포함하는 시료를 판단에 적합한 완충용액을 포함하는 시료가 되도록 처리하도록 구성된다; 및 시료 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 검출하기 위한 검사 스트립, 여기서 검사 스트립은 검출에 부적합한 완충용액

을 포함하는 시료를 검출에 적합한 완충용액을 포함하는 시료가 되도록 처리하도록 구성된다, 를 포함한다.

[0199] 일부 구현예는 또한 카트리지로부터 신호를 측정하도록 구성된 제1 검출기; 및 검사 스트립으로부터 신호를 측정하도록 구성된 제2 검출기를 포함한다.

[0200] 일부 구현예는 또한 뉴라미니다제 활성 분석을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴라미니다제 활성 분석 시약은 루시페라제, N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체 또는 이들의 유도체, N-아세틸뉴라민산 및 트리플루오로메틸케톤의 복합체 또는 이들의 유도체, 및 항바이러스 약물로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 항바이러스 약물은 오셀타미비르, 자나미비르, 페라미비르 및 라나미비르로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0201] 일부 구현예는 또한 면역분석을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역분석 시약은 인플루엔자 유형 A 항원에 특이적인 항체, 및 인플루엔자 유형 B 항원에 특이적인 항체로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0202] **실시예**

[0203] 실시예 1. 조합 분석

[0204] 이 실시예는 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B 검사, 및 뉴라미니다제 약물 저항성 검사에 대한 예시적 워크플로우를 나타낸다. 면역분석 추출 완충용액 및 구멍을 가진 덮개(lid)를 포함하는 도포용 튜브(applicator tube); 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 식별하기 위한 측방 유동 면역분석을 포함하는 제1 검사 장치; 및 뉴라미니다제 약물 저항성을 판단하기 위한 운동 흐름 분석을 포함하는 제2 검사 장치를 포함하는 키트는 포장 및 환자의 신원이 표시된 각 성분으로부터 개봉된다. 표본은 면봉을 이용하여 환자의 코로부터 수거한다. 면봉을 추출 완충용액에 넣고 벽 안쪽에 대하여 3번 저어준다. 튜브의 측면을 짜내는 동안 면봉을 추출 완충용액으로부터 제거하고, 폐기한다. 도포용 튜브의 덮개는 튜브에 부착된다.

[0205] 도포용 튜브를 뒤집고 3방울(~ 85 μl)의 추출 완충용액을 덮개를 통해 짜내고 제1 검사 장치에 도포한다. 제1 검사 장치는 제1 검사를 위하여 제1 검사 완충용액을 포함하는 검출기 시약과 비-중첩하는 표본 패드를 포함한다. 표본은 제1 검사 완충용액을 통해 제1 검사 장치의 검사 부위로 확산된다. 제1 검사 장치는 10 분 동안 배양되고, 제1 검사의 결과는 판독기를 이용하여 측정된다. 판독기는 유형 A 또는 유형 B 인플루엔자 바이러스가 시료 내에 존재하는지 여부의 표시를 제공한다.

[0206] 도포용 튜브를 뒤집고 남아있는 추출 완충용액을 덮개를 통해 짜내고 제2 검사 장치에 도포한다. 이 검사에서, 뉴라미니다제의 증가는 루시페라제 신호가 증가되는 결과를 가져온다. 제2 장치는 완충용액 교환 챔버(aka 매트릭스 챔버) 및 반응 챔버를 포함한다. 표본은 완충용액 교환 챔버를 통해 뉴라미니다제 약물 저항성 분석을 위한 반응 챔버로 확산된다. 억제값은 검사 약물이 없을 때의 신호에 대한, 검사 약물이 있을 때의 신호의 비율이며, 반응 혼합물 및 검사 약물에 의해 생성되는 신호의 배경 수치를 고려한다. 반응 챔버는 표 5a에 나타난다.

**【표 5a】**

반응 챔버	설명	챔버의 내용물
1	약물 없이 검사	반응 혼합물 + 표본
2	약물과 함께 검사	반응 혼합물 + 표본 + 검사 항바이러스 약물
3	반응 혼합물에 대한 대조군	반응 혼합물
4	반응 혼합물 및 검사 약물에 대한 대조군	반응 혼합물 + 검사 항바이러스 약물

[0207]

[0208] 제2 검사 장치는 배양되고 각 챔버로부터의 신호는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정된다. 억제값은 각 반응 챔버로부터의 신호로부터 하기 식을 이용하여 판단된다:

[0209] 
$$\text{억제값} = \frac{(\text{약물과 함께 검사}) - (\text{약물에 대한 대조군})}{(\text{약물 없이 검사}) - (\text{반응 혼합물에 대한 대조군})} \times \text{증폭기}$$

[0210] 각 검사 항바이러스 약물에 대한 약물 민감도 임계점 수치는 제1 검사시 판단된 인플루엔자 유형, 및 사용된 검사 항바이러스 약물에 따라 선택된다. 만일 억제값이 억제 임계점 값보다 낮은 경우, 뉴라미니다제는 검사 항바이러스 약물에 대하여 민감성으로 판단된다.

[0211] 실시예 2. 광전자 증배관 튜브 장치의 민감도

[0212] 이 실시예는 Hamamatsu TO-Can 광전자 증배관 튜브 장치의 민감도 및 휴대용 소형 시스템에서 낮은 다크노이즈 (dark noise) 판독을 수행하는 능력을 나타낸다. 상대적인 광 단위(RLU)는 대조군 시약(Cell Titer Glo)이 생성하는 다양한 농도의 양성 화학발광 신호에서 Hamamatsu TO-Can 광전자 증배관 튜브 장치를 이용하여 측정되었다. 대조군은 배경 대조군 및 다크카운트(dark count) 대조군을 포함하였다. 그 결과를 도6에 나타낸다.

[0213] 실시예 3. 이중 효소 분석

[0214] 이 실시예는 자나미비르에 대하여 민감성이며 오셀타미비르에 대하여 저항성인 뉴라미니다제를 포함하는 검사 균주 A/Mississippi/03/2001 A(H1N1) H275Y에 대한 이중 효소 분석을 나타낸다. 검사 균주를 포함하는 표본을 1/3000 또는 1/9000로 희석하고 운동 흐름 검사 장치에 도포하였다. 운동 흐름 검사 분석 내 검사 챔버는 표 5A의 경우와 같이 하기를 포함하였다: (1) 반응 혼합물 + 표본; (2) 반응 혼합물 + 표본 + 검사 항바이러스 약물; (3) 대조군: 반응 혼합물; 및 (4) 대조군: 반응 혼합물 + 검사 항바이러스 약물. 각 검사 챔버로부터의 신호는 광전자 증배관 튜브 장치를 이용하여 측정되었다. 그 결과를 도 7에 나타낸다. 분석은 검사 균주가 오셀타미비르 보다 자나미비르에 대하여 더욱 민감성을 나타내었다.

[0215] 실시예 4. 다양한 인플루엔자 A 균주의 민감도

[0216] 이 실시예는 오셀타미비르에 대하여 공지된 민감성 또는 저항성인 유형 A 인플루엔자 바이러스의 패널에 대한 억제 임계점 수치를 판단하는 단계를 나타낸다. 표본은 다양한 인플루엔자 A 균주의 다양한 희석액으로부터 준비하였고, 오셀타미비르와 함께 운동 흐름 검사 장치에 도포하였다. 운동 흐름 분석상의 검사 챔버는 표 5A의 경우와 같이 하기를 포함하였다: (1) 반응 혼합물 + 표본; (2) 반응 혼합물 + 표본 + 검사 항바이러스 약물; (3) 대조군: 반응 혼합물; 및 (4) 대조군: 반응 혼합물 + 검사 항바이러스 약물. 검사 챔버로부터의 신호는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정되었다. 각 균주에 대한 억제값은 실시예 1에서와 같이 판단되었다. 각 균주의 다양한 희석액에 대한 억제값을 그래프에 도시하였고, 그래프로부터 억제값이 판단되었다. 약물 저항성으로부터 약물 민감성을 구별하기 위한 억제값, 또는 절단값(cutoff value)은 약 0.6이었다. 절단은 약물 민감성 균주의 에러막대(error bars)가 독감 저항성 균주와 중첩하지 않는 값이 되도록 결정되었다. 도 8을 참조하라.

[0217] 실시예 5. 다양한 인플루엔자 B 균주의 민감도

[0218] 이 실시예는 오셀타미비르에 대하여 공지된 민감성 또는 저항성인 유형 A 인플루엔자 바이러스의 패널에 대한 억제 임계점 수치를 판단하는 단계를 나타낸다. 표본은 실시예 4에서와 같이 제조되고 검사되었다. 각 균주에 대한 억제값이 판단되었다. 각 균주의 다양한 희석액에 대한 억제값을 그래프에 도시하였고, 그래프로부터 억제값이 판단되었다. 약물 저항성으로부터 약물 민감성을 구별하기 위한 억제값, 또는 절단값은 약 1.55였다. 도 9를 참조하라.

[0219] 실시예 6. 측방 유동 분석에서 완충용액 교환의 효과

[0220] 이 실시예는 운동 흐름 뉴라미니다제 분석 완충용액으로부터 완충용액을 교환한 후 표본 내 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B를 판단하기 위한 측방 유동 면역분석의 민감도를 나타낸다. 인플루엔자 바이러스의 다양한 희석액의 표본: A/PR/8/34, B/Florida/4/2006, 및 A/Texas/12/2007은 (1) 포장 삽입물에 따른 측방 유동 Veritor™ 분석, 또는 (2) 운동 흐름 분석 추출 완충용액에서 측방 유동 패드 내 존재하는 면역분석 추출 완충용액으로 완충용액을 교환한 측방 유동 Veritor™ 분석을 이용하여 검사되었다. 신호는 측정되었으며 판독기는 각 시료 내 인플루엔자 유형 A 및/또는 유형 B의 존재 또는 부존재의 판단을 제공하였다. 표 6은 그 결과를 요약한다. 특히, 인플루엔자 유형 A 또는 유형 B는 포장 삽입물에 따른 Veritor™ 분석보다 완충용액을 교환한 Veritor™의 프로

토콜을 이용한 분석시 더욱 희석된 표본에서 식별되었다.

표 6

[0221]

바이러스	Veritor™				완충용액을 교환한 Veritor™			
	희석	판독기 출력		원시 반사율 데이터	희석	판독기 출력		원시 반사율 데이터
		독감 A	독감 B			독감 A	독감 B	
A/PR/8/34	2,500:1	+	-	5.92	2,500:1	+	-	6.9
	5,000:1	+	-	3.04	5,000:1	+	-	4.3
	10,000:1	-	-	1.54	10,000:1	+	-	2.23
	20,000:1	-	-	0.95	20,000:1	-	-	0.86
B/Florida/4/2006	100:1	-	+	8.57	100:1	-	+	11.31
	200:1	-	+	3.31	200:1	-	+	5.52
	400:1	-	-	1.4	400:1	-	+	2.77
	800:1	-	-	0.67	800:1	-	-	0.94
A/Texas/12/2007	10000:1	+	-	5.6	10000:1	+	-	14.97
	20000:1	+	-	3.06	20000:1	+	-	8.1
	40000:1	-	-	1.38	40000:1	+	-	4.19
	80000:1	-	-	0.48	80000:1	-	-	1.67

[0222]

실시예 7. 면역분석 및 이중 효소 (DE) 분석의 민감도

[0223]

오셀타미비르에 대한 Veritor 면역분석 및 이중 효소 뉴라미니다제 운동 흐름 분석을 인플루엔자 바이러스의 다양한 희석액에서 수행하였다: A/Perth/211/2001 WT. 표 7은 두개의 실험의 결과를 요약한다. 이들 결과는 뉴라미니다제 활성 완충용액과 미리 평형을 유지하고 있는 G25M 세파텍스에 대하여 면역분석 추출 완충용액 내 표본을 도포하는 것이 표준(Std) DE 분석의 민감도에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. Std DE 분석은 임상적으로 관련된 표본 농도에서 약물 민감도 결과를 제공할 수 있다.

표 7

[0224]

표본 희석	Veritor 결과	카트리지 처리된 표본에서 이중 효소 분석 결과	억제값
1:250	+ / +	ND	ND
1:500	+ / +	ND	ND
1:1K	+ / -	ND	ND
1:3K	- / -	+ / +	1.48 / 1.34

ND: 판단되지 않음

[0225]

실시예 8. 혼합된 인플루엔자 표본에서 약물 저항성의 검출

[0226]

표본의 다양한 희석액은 항바이러스 약물, 오셀타미비르에 대한 운동 흐름 분석을 이용하여 분석하였다. 표본은 A\Bethesda (H3N2 R); A\Fukui(H3N2 S); 및 혼합물 A\Bethesda (V) + AFukui (WT)를 포함하였다. 신호는 광전자 증배관 튜브를 이용하여 측정하고, 억제값을 판단하였다. 그 결과를 도10에 요약한다. 독감 B로부터 독감 A를 구별하는 분석(도포하기에 가장 적절한 억제값이 되도록 하는)이 뒤따르고, 단일 양성자 검출을 가진 PMT를 이용하며 배경 제거(background subtraction)를 적용하는 경우, 이들 결과는 Std 이중 효소 AST 검출 화합물이 약물 민감성 균주를 가진 표본 내 존재할 때 약물 저항성 균주를 식별할 수 있음을 나타낸다.

[0227]

실시예 9. 이중 효소 분석의 비교

[0228]

이 실시예는 두개 유형의 이중 효소 분석의 민감도를 비교한다. 정제된 인플루엔자 H3N2 뉴라미니다제의 다양한 희석액은 (1) 루시페라제에 대한 전구체 억제제인 뉴라미니다제 기질(NANA-CF3; 도 11 참조); 및 (2) 루시페라제에 대한 전구체 기질인 뉴라미니다제 기질(N-아세틸뉴라민산 및 루시페린의 복합체) 중 어느 하나를 포함하는 이중 효소 분석으로 분석되었다. 뉴라미니다제 활성은 NANA-CF3를 에스테라아제 억제제, CFC로 절단한다. 에스테라아제가 루시페라제를 포함하는 분석에서, 뉴라미니다제 활성은 CFC 억제제가 존재하는 결과를 가져오며, 이

는 발광 생성물에 대한 루시페라제 기질의 전환이 감소되는 결과를 가져오는 루시페라제 활성을 억제한다. 도 12를 참조하라. 분석의 결과를 도13에 나타낸다. 분석(1, 이중 효소 분석 w/ 차폐된 억제제)의 검출(LOD) 수치는 약 10 pM이었다. 반대로, 분석(2, 표준 이중 효소 분석)의 검출 수치는 약 0.1 pM 미만이었다.

[0229] 실시예 10. 배경 신호 조절의 효과

[0230] 이 실시예는 항바이러스 약물의 존재시 뉴라미니다제 활성의 억제값을 계산할 때 실시예 1의 식에서 설명된 바와 같은 배경 수치 제거의 효과를 나타낸다. 억제값은 실시예 1에서와 같이 특정 항바이러스 약물에 대한 바이러스의 특정 균주의 다양한 농도에 대해 판단하였다. 반응 혼합물 + 표본 + 검사 항바이러스 약물(약물과 함께 검사), 및 반응 혼합물 + 표본 (약물 없이 검사)를 포함하는 챔버로부터의 신호에 대한 배경 제거 없는 억제값은 하기 식을 이용하여 판단하였다:

[0231] 
$$\text{억제값} = \frac{(\text{약물과 함께 검사})}{(\text{약물 없이 검사})} \times \text{증폭기}$$

[0232] 그 결과를 표 8에 나타낸다. 표 8에서, 왼쪽에서 오른쪽으로의 컬럼은 바이러스의 농도의 감소로 인한 것이다. 실시예 1에 나타낸 바와 같이 억제값의 계산시 배경 수치의 제거는 분석의 민감도를 증가시킨다.

표 8

[0233]

	억제값										
배경 제거 없음	0.92	0.95	0.98	0.99	1.09	1.13	1.36	1.70	2.31	3.41	5.04
배경 제거 있음	0.91	0.94	0.96	0.94	0.99	0.95	1.00	0.98	0.93	0.92	0.92

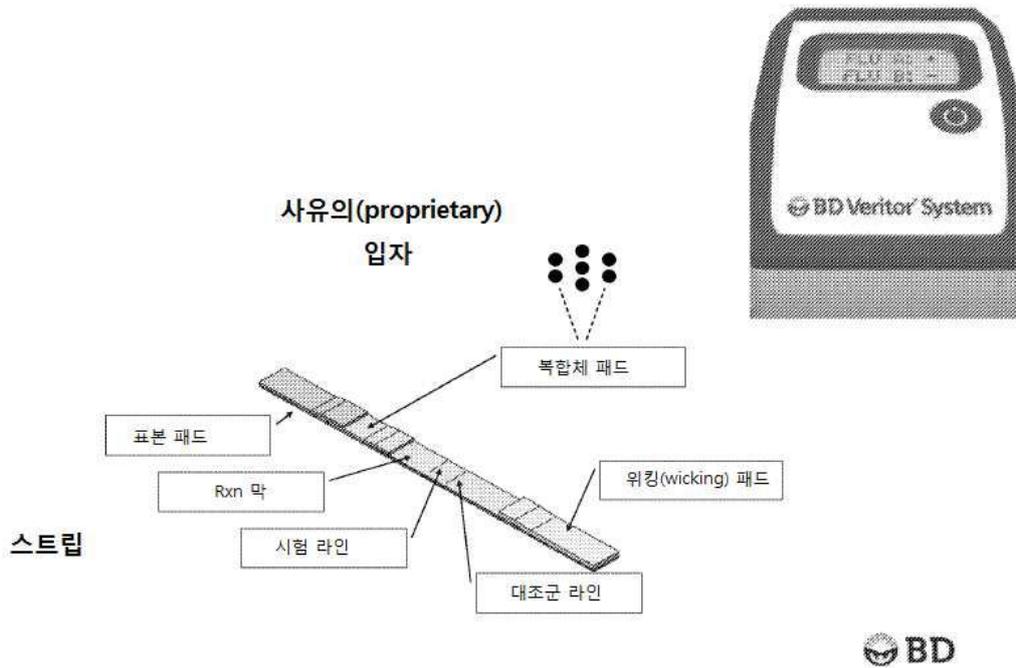
[0234] 여기에 사용된 용어 "포함하는(comprising)"는 "포함하는(including)," "함유하는(containing)," 또는 "특징되는(characterized by),"과 동의어이고 포괄적이고 개방적이며, 추가적인, 인용되지 않은 요소 또는 방법 단계를 제외하지 않는다.

[0235] 상기 설명은 본 발명의 몇몇 방법 및 물질을 개시한다. 본 발명은 제조 방법 및 장치의 변경뿐만 아니라 방법 및 물질이 변경되기 쉽다. 이러한 변경은 여기에 개시된 본 발명의 개시사항 또는 연습을 고려하여 당업계의 숙련된 자에게 명백해질 수 있다. 따라서, 본 발명은 여기에 개시된 특정 구현예로 제한되는 것이 아니며, 본 발명의 실제 범위 및 사상 내에 들어오는 모든 변경 및 대안을 포함한다.

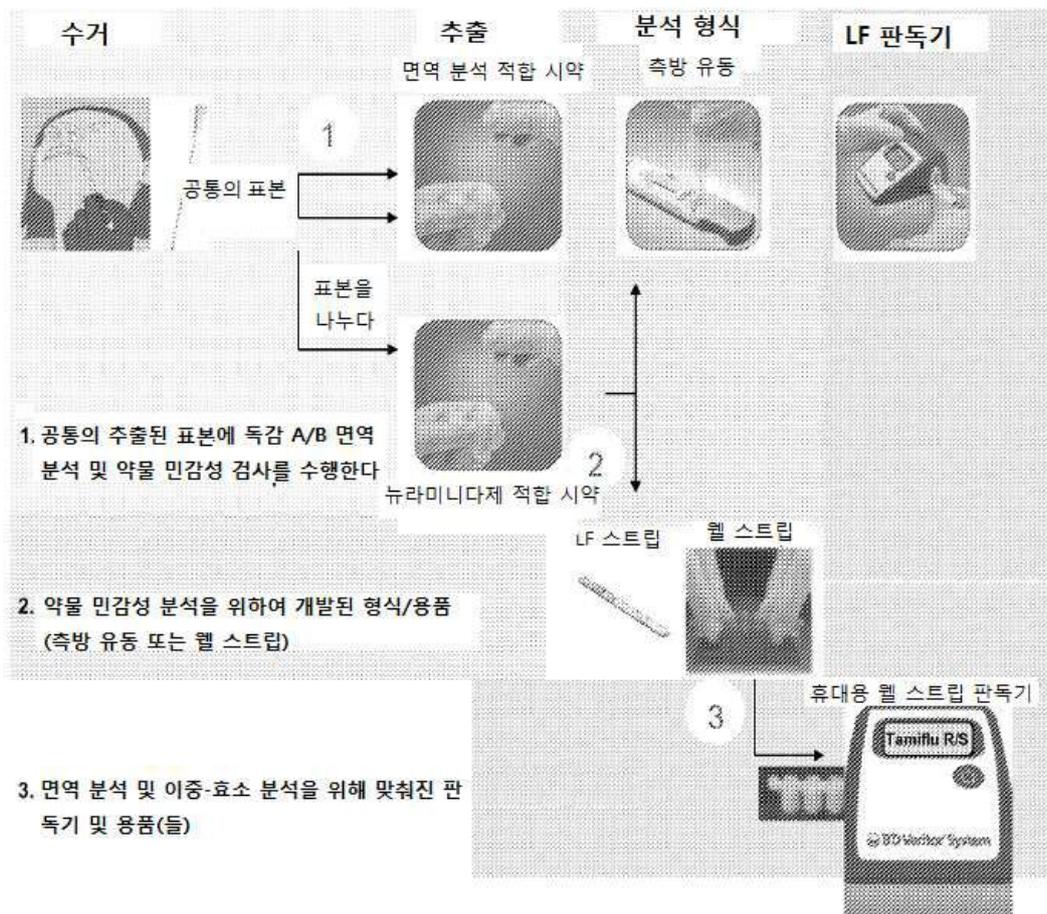
[0236] 본원에 인용된, 출판 및 미출판된 출원, 특허, 및 문헌 참조를 포함하나 제한하지 않는 모든 참조는 본원에 전체적으로 참조로서 포함되며 이로써 본 명세서의 일부가 된다. 참조로서 포함된 출판물 및 특허 또는 특허 출원이 본 명세서 내에 포함된 개시사항과 모순되는 점에서는, 명세서는 임의의 이러한 모순된 물질을 대체하거나 및/또는 이에 대하여 우선한다.

도면

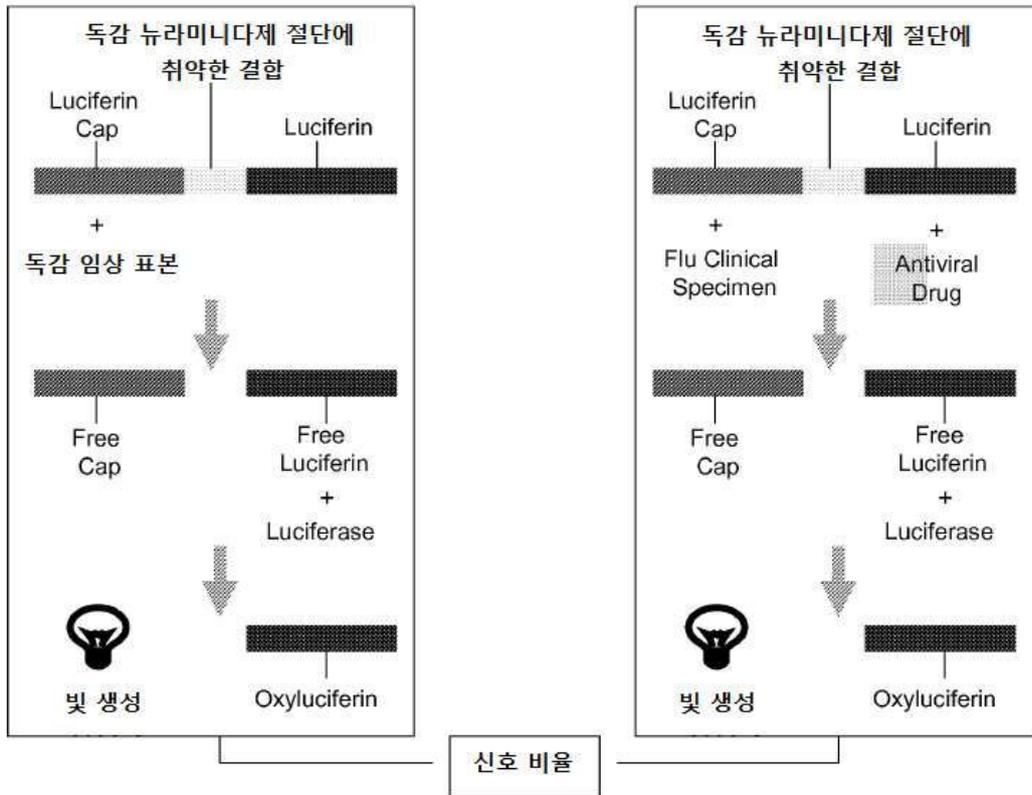
도면1



도면2



도면3



도면4

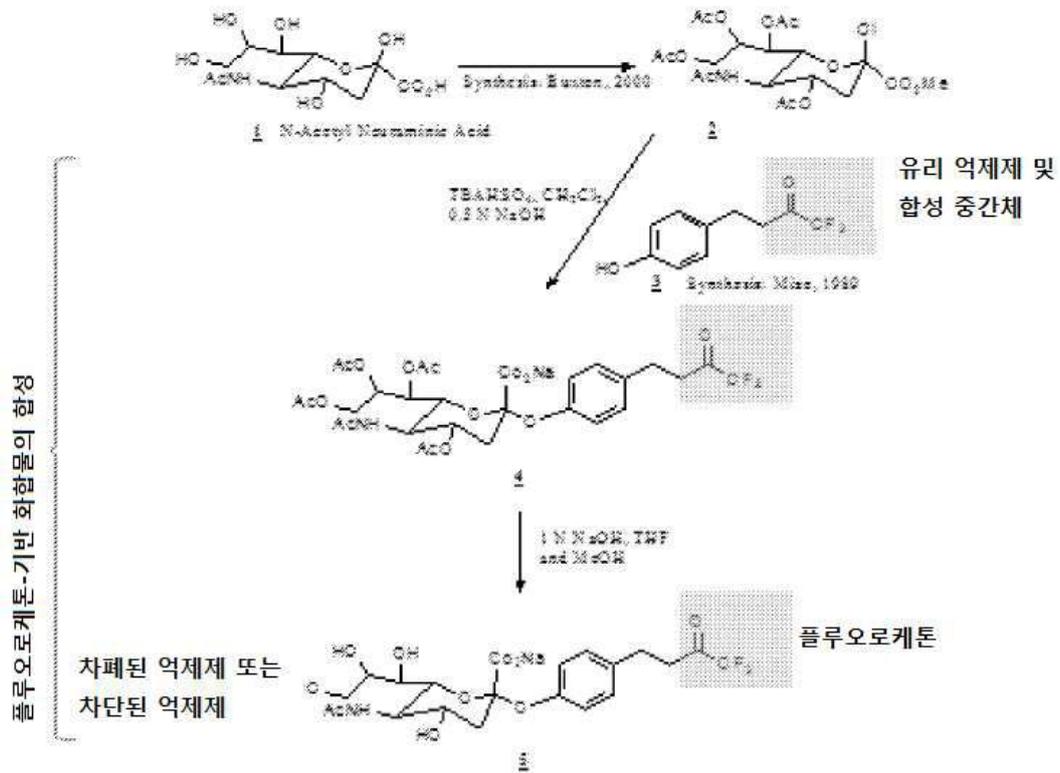
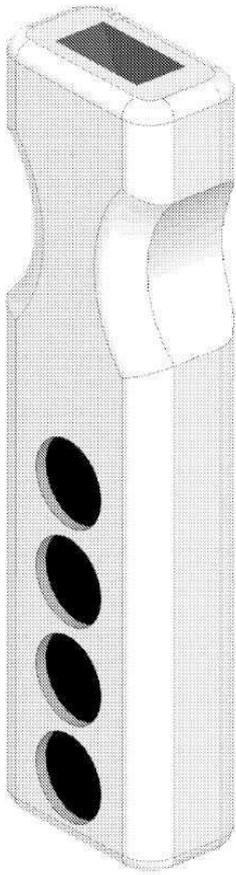
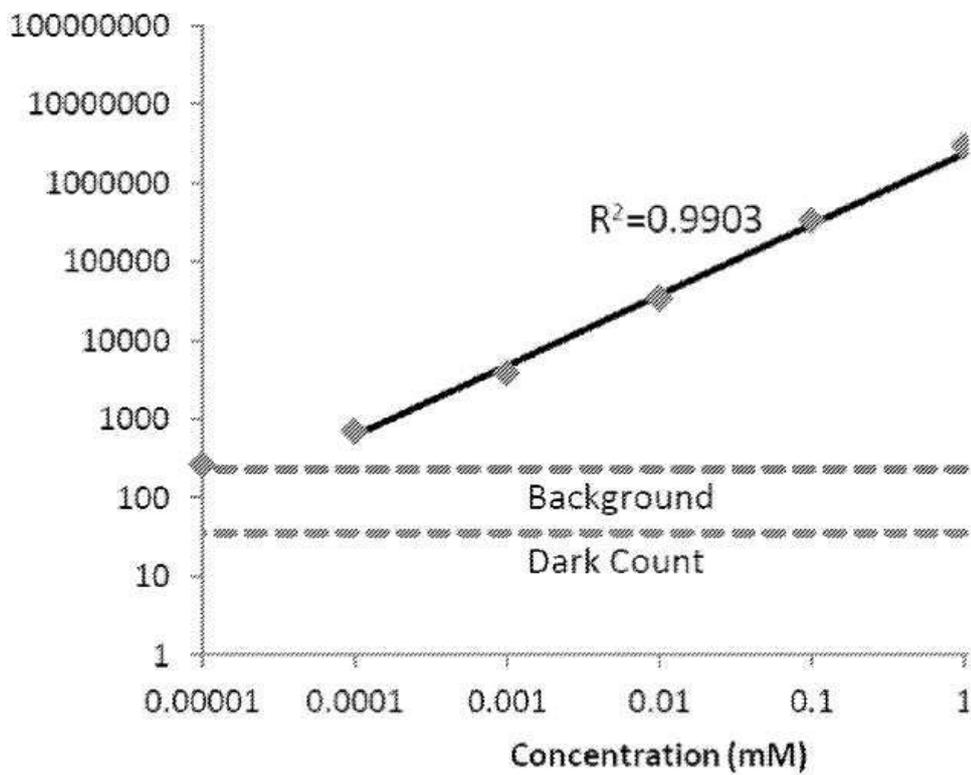


Figure. Synthetic scheme for masked sialosidase inhibitor 5 from N-acetylneuraminic acid (1).

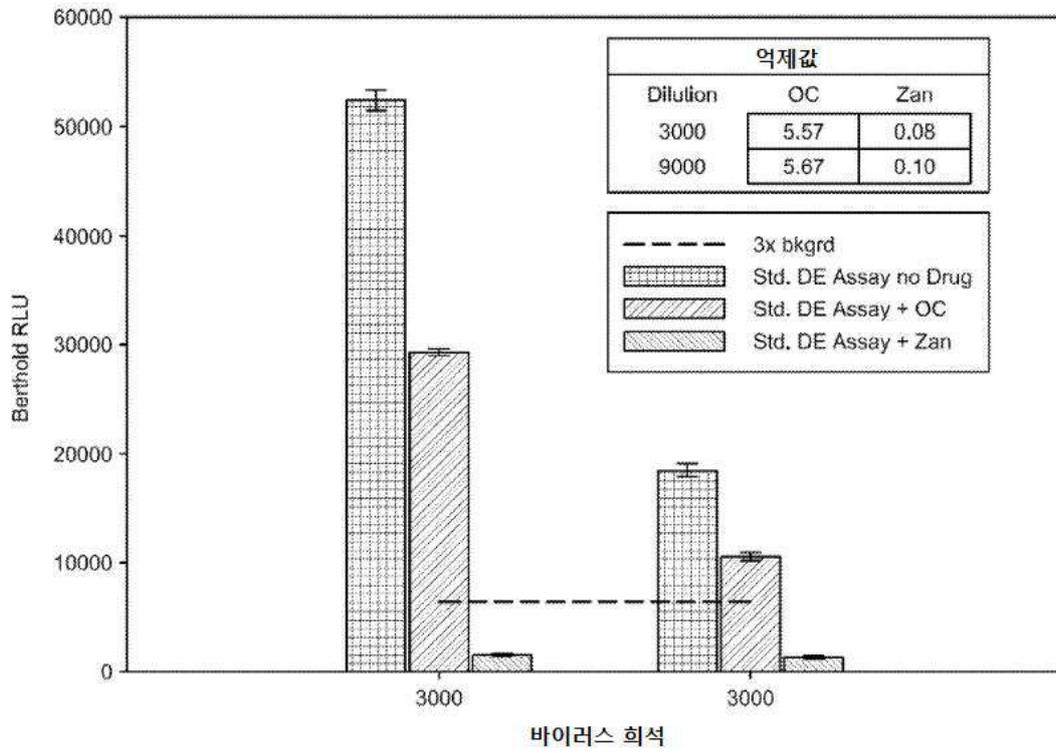
도면5



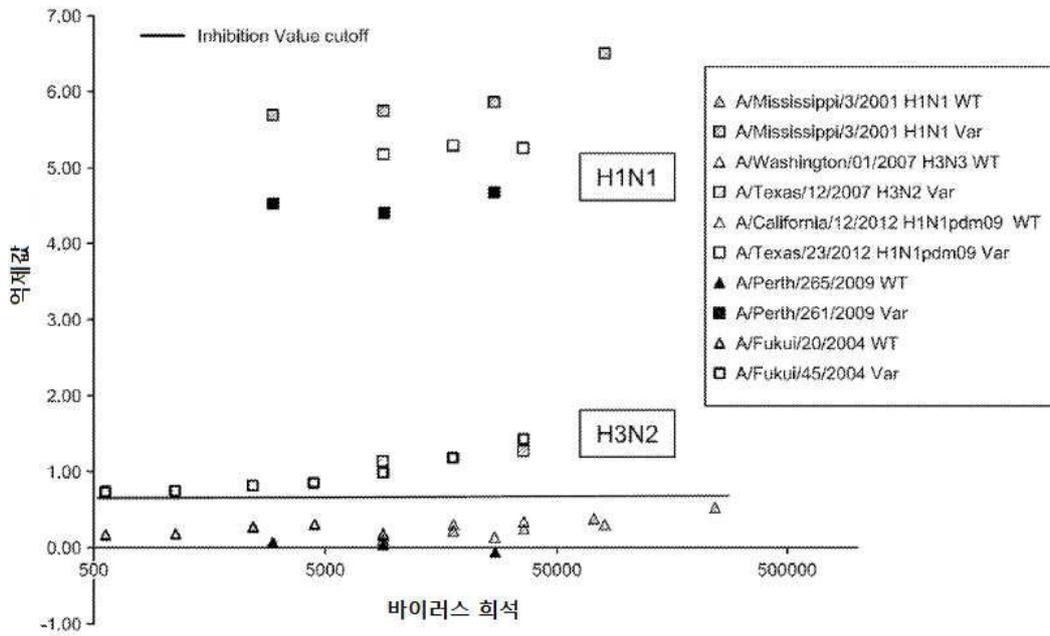
도면6



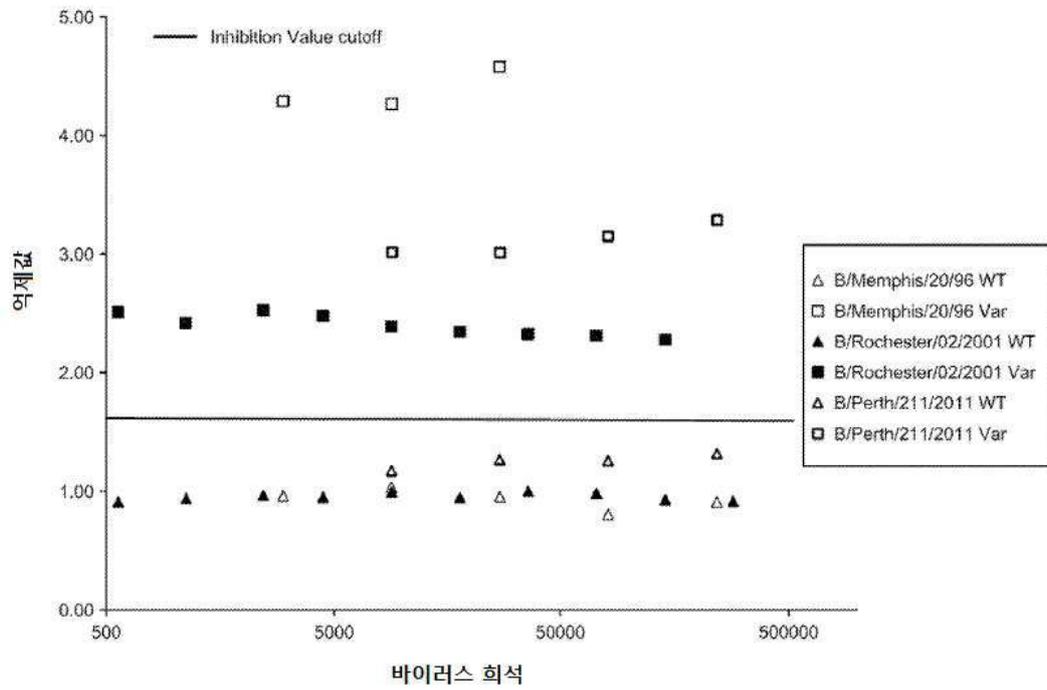
도면7



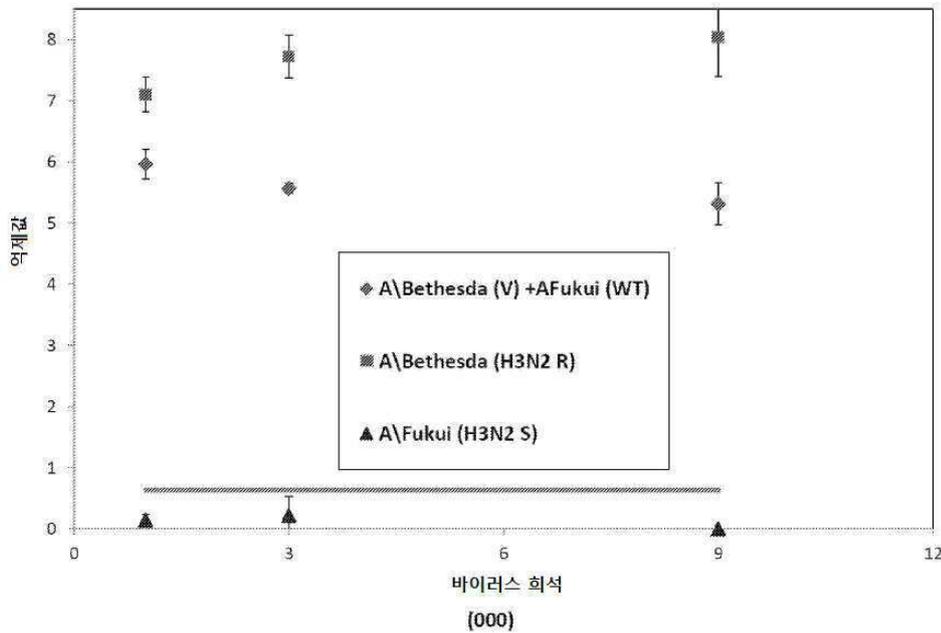
도면8



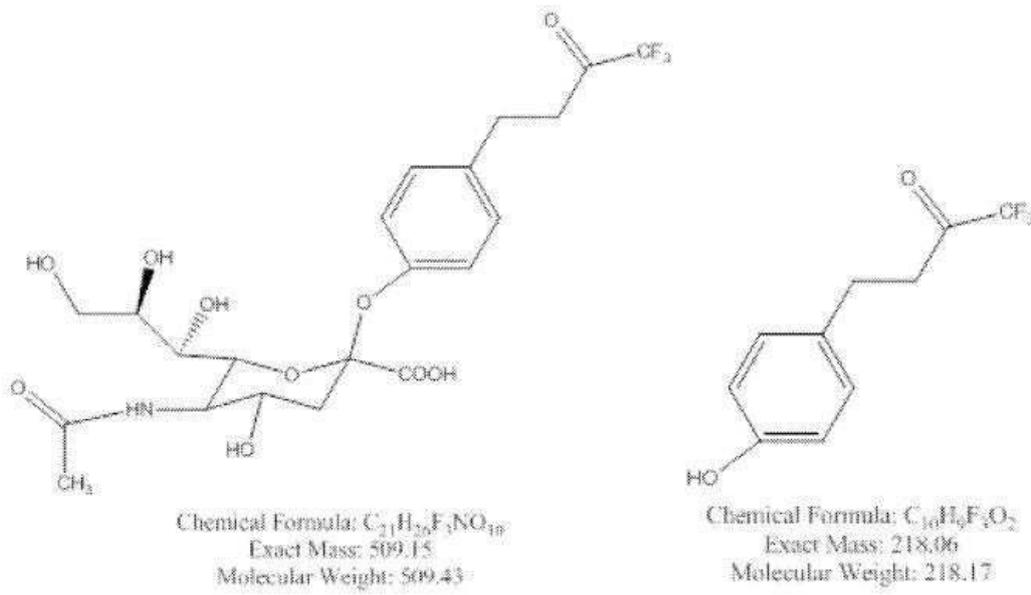
도면9



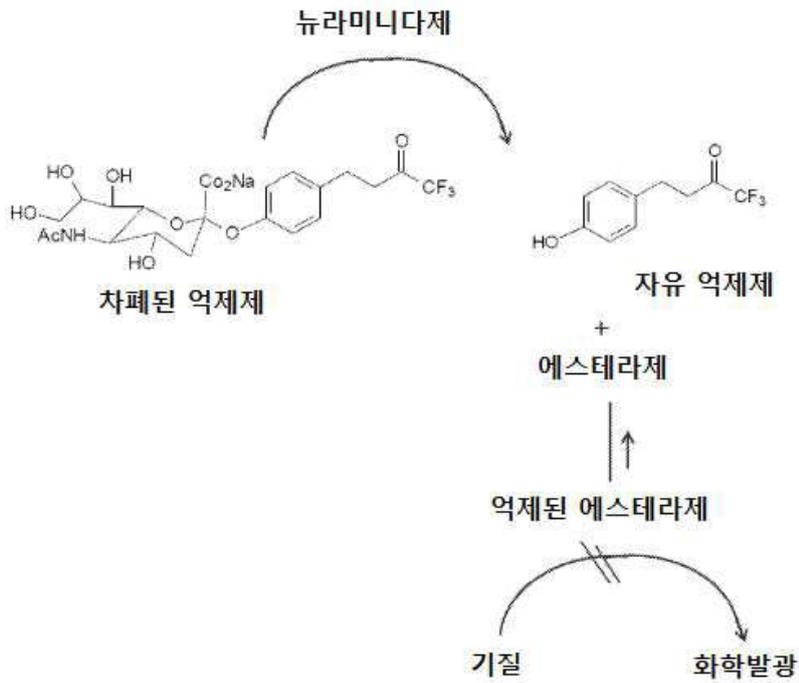
도면10



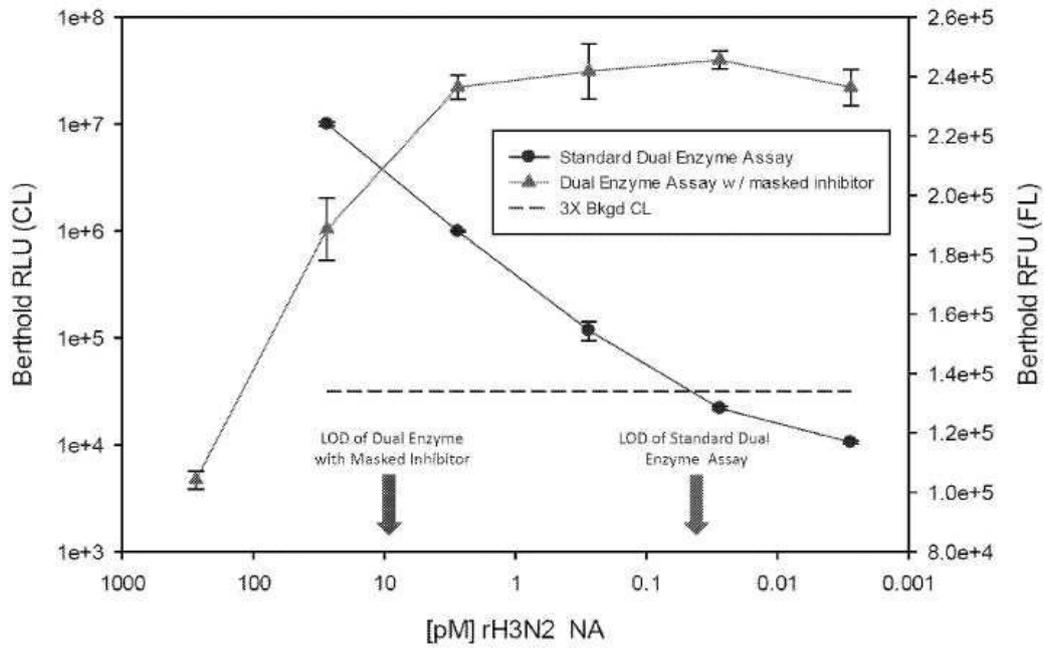
도면11



도면12



도면13



도면14

