

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 7월 14일 (14.07.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/111572 A1

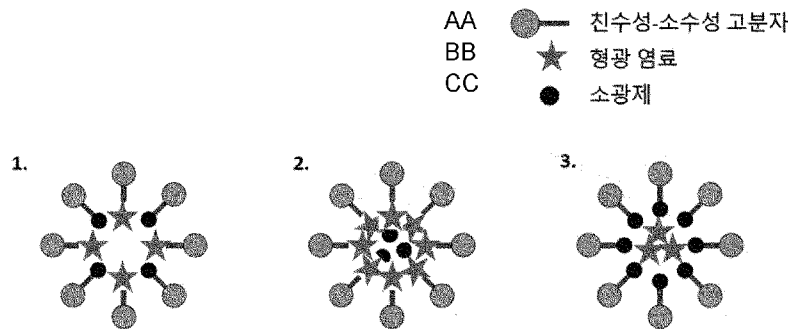
- (51) 국제특허분류:
G01N 33/569 (2006.01) G01N 21/78 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01) C12Q 1/37 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/000163
- (22) 국제출원일: 2016년 1월 8일 (08.01.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0002793 2015년 1월 8일 (08.01.2015) KR
10-2015-0008955 2015년 1월 19일 (19.01.2015) KR
10-2015-0008956 2015년 1월 19일 (19.01.2015) KR
10-2016-0002305 2016년 1월 7일 (07.01.2016) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

- (72) 발명자: 함승주 (HAAM, Seungjoo); 03722 서울시 서대문구 연세로 50, 제 1 공학관 에스 501 호 (신촌동), Seoul (KR). 김현욱 (KIM, Hyun-Ouk); 03722 서울시 서대문구 연세로 50, 제 1 공학관 367 에이 (신촌동), Seoul (KR). 김지혜 (KIM, Jihye); 03722 서울시 서대문구 연세로 50, 제 1 공학관 367 에이 (신촌동), Seoul (KR). 송대섭 (SONG, Daesub); 34069 대전시 유성구 반석동로 33, 502 동 501 호 (반석동, 반석마을 5단지아파트), Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: KIT FOR DETECTING VIRUS

(54) 발명의 명칭: 바이러스 검출용 키트



AA ... Hydrophilic-hydrophobic polymer
BB ... Fluorescent dye
CC ... Quencher

(57) Abstract: The present invention relates to a kit for detecting a virus, a composition for detecting a virus, and a method for detecting a virus. According to the present invention, a virus may be detected at a low cost, in a short time, and with high efficiency, and a kit having a more improved sensitivity and accuracy may be prepared.

(57) 요약서: 본 발명은 바이러스 검출용 키트, 바이러스 검출용 조성물 및 바이러스 검출방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 저가의 비용으로 바이러스를 단시간 내에 고효율로 검출할 수 있고, 민감도 및 정확도가 더욱 향상된 키트를 제조할 수 있다.



WO 2016/111572 A1



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 바이러스 검출용 키트

기술분야

- [1] 본 발명은 바이러스 검출용 키트, 바이러스 검출방법, 바이러스 검출용 조성물 및 바이러스 검출용 키트의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 바이러스는 세균보다 크기가 작은 전염성 병원체이다. 유전물질인 RNA 또는 DNA와 그 유전물질을 둘러싸고 있는 단백질로 구성된다. 바이러스는 숙주의 종류에 따라서 식물 바이러스, 동물 바이러스 및 세균 바이러스(파지)로 구분할 수 있다. 그러나, 대부분의 경우 핵산의 종류에 따라 DNA바이러스 아문과 RNA바이러스 아문으로 나뉘며, 이들은 다시 강, 목, 과로 세분화된다.
- [3] 이러한 바이러스 중에서, 조류 인플루엔자는 닭, 오리, 또는 야생 조류에서 조류 인플루엔자 바이러스(Avian influenza virus)의 감염으로 인해 발생하는 급성 바이러스성 전염병이며 드물게 사람에서도 감염증을 일으킨다. 조류 인플루엔자 바이러스는 병원성에 따라 고병원성, 저병원성 및 비병원성의 3 종류로 구분되며, 2003년 말부터 2008년 2월까지 사람에게 전염될 수도 있는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스(highly pathogenic avian influenza A, H5N1)의 인체 감염 사례가 640건 이상 보고되었다. 조류 인플루엔자는 조류의 높은 폐사율과 산란율 저하로 막대한 경제적 피해를 야기하며, 인체 감염 가능성이 높은 것은 아니지만, 인체에 감염되는 경우 높은 사망률을 나타낸다. 근본적인 백신 개발이 어렵고, 확산 속도가 매우 빠르므로 조기 진단을 통해 질병의 확산 및 경제적 손실을 최소화하는 것이 필요하다.
- [4] 이와 같은 바이러스의 진단 방법으로는 효소 결합 면역 흡수 검정법(ELISA), 효소 면역 검정법(EIA) 및 면역 형광 검정법(IFA) 등의 면역학적 검출방법과 RT-PCR에 의한 RNA 검출방법 등이 알려졌으나, 이러한 방법은 바이러스 진단에 과도한 시간이 소요되거나, 고가의 검사 비용이 필요하거나, 비특이적 반응으로 인한 특이도 및 민감도가 저하되는 등의 문제가 있다.
- [5] 따라서, 저비용으로 단시간 내에 효율적으로 바이러스를 검출하는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 단시간 내에 효율적으로 바이러스의 검출이 가능한 바이러스 검출용 키트, 바이러스의 검출방법 및 바이러스 검출용 조성물을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명은 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자 및 상기 생체 분자에 의해 활성화된 바이러스와 반응하는 프로브를 포함하고, 상기

프로브는 양친성 고분자와 결합된 표지자를 포함하는 바이러스 검출용 키트를 제공한다.

- [8] 본 발명은 또한, 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자 및 상기 생체 분자에 의해 활성화된 바이러스와 반응하는 프로브를 포함하고, 상기 프로브는 양친성 고분자와 결합된 표지자를 포함하는 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.
- [9] 본 발명은 또한, 개체로부터 수득한 시료를 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자와 접촉시키는 단계 및 상기 생체 분자와 접촉된 시료를 상기 생체 분자에 의해 활성화된 바이러스와 반응하는 프로브를 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 프로브는 양친성 고분자와 결합된 표지자를 포함하는 바이러스 검출방법을 제공한다.
- [10] 본 발명은 또한, 양친성 고분자와 표지자를 결합시키는 단계를 포함하는 바이러스 검출용 프로브 또는 검출용 키트의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 본 발명에 따르면, 저가의 비용으로 바이러스를 단시간 내에 고효율로 검출할 수 있고, 종래 바이러스 검출 키트와 비교하여 표지자의 초기 방출이 억제되어 검출 민감도 및 정확도를 높고, 제조과정에서 투석(세척)하는 단계를 실시하지 않아도 되므로 제조 효율을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 프로브의 구조를 보여주는 도면이다.
- [13] 도 2는 본 발명의 일 예에 따른 프로브의 이미지를 보여주는 도면이고, 기준자(scale bar)는 100nm를 나타낸다.
- [14] 도 3은 본 발명의 일 예에 따른 프로브의 이미지를 보여주는 도면이고, 기준자(scale bar)는 100nm를 나타낸다.
- [15] 도 4는 본 발명의 일 예에 따른 프로브의 이미지를 보여주는 도면이고, 기준자(scale bar)는 100nm를 나타낸다.
- [16] 도 5는 본 발명의 일 예에 따른 프로브의 평균 사이즈의 비교를 나타내는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [17] 인플루엔자 바이러스, 에볼라 바이러스를 포함하여 모든 바이러스는 숙주 세포 침입을 위하여 숙주 세포에 결합하는 표면 단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA), 성숙한 비리온(virion)들이 숙주 세포로부터 빠져나오는 데에 관여하는 뉴라미니다아제(neuraminidase), 수소 이온 농도의 균형을 조절하는 M2 이온 채널, 바이러스의 유전 정보를 간직하고 있는 RNP(Ribonucleoprotein) 등으로 이루어져 있다. 본 발명자들은 위에서 기술한 바이러스의 공통된 특성에 기초하여, 바이러스를 조기에 검출할 수 있는 방법을 개발하고자 연구하였다. 그 결과, 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로

반응하는 생체 분자를 통하여 바이러스를 활성화하고, 이렇게 활성화된 바이러스와 반응하여 상기 바이러스의 존재 여부를 검출할 수 있는 프로브를 이용하여, 간단한 방법으로 바이러스를 검출할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

- [18] 따라서, 본 발명은 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자 및 상기 생체 분자에 의하여 활성화된 바이러스와 반응하는 프로브를 포함하고, 상기 프로브는 양친성 고분자와 결합된 표지자를 포함하는 바이러스 검출용 키트를 제공한다.
- [19] 본 발명의 프로브는 "양친성 고분자와 결합된 표지자"를 포함한다. 상기 "양친성 고분자와 결합된 표지자"는 "표지자가 결합된 양친성 고분자" 일 수 있다.
- [20] 본 발명에서 사용된 용어, "프로브"는 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자에 의하여 활성화된 바이러스와 반응하여, 상기 바이러스 또는 활성형 바이러스의 존재 여부를 검출할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브는 바이러스 이외의 물질 또는 비활성형 바이러스와 비교하여 활성형 바이러스와의 반응 능력이 월등히 우수하거나, 활성형 바이러스와 특이적으로 반응하여, 활성형 바이러스의 존재 여부를 유의하게 검출할 수 있는 물질이면 모두 포함되고, 그 종류 및 형태는 특별히 제한되지 않는다. 본 명세서에서 상기 프로브는 "검출인자"와 혼용하여 사용된다.
- [21] "양친성 고분자와 결합된 표지자"를 포함하는 본 발명의 프로브의 경우, 막을 형성하여 캡슐 역할 또는 담체 역할을 하는 고분자와 표지자가 직접 결합되어 있으므로, 검출 과정에서 표지자가 초기에 방출되는 것을 제어할 수 있어, 검출 민감도 및 정확도를 향상시킬 수 있고, 제조단계에서 투석하는 과정을 생략할 수 있어 제조효율이 우수한 효과가 있다.
- [22] 본 발명에서 사용된 용어 "결합"은 원자나 이온이 만나 분자를 형성하는 것을 의미한다. 상기 양친성 고분자와 표지자 사이의 원자 또는 이온이 만나서 형성할 수 있는 형태의 결합이면 공유 결합, 이온 결합, 금속 결합 및 배위 결합 등을 포함한 결합의 종류에 제한되지 않는다.
- [23] 예를 들어, 상기 결합은 에스터 결합, 아마이드 결합, 이민 결합, 하이드라존 결합 또는 아세탈 결합일 수 있다.
- [24] 본 발명에서 "표지자"는 프로브와 활성형 바이러스의 반응여부를 판별할 수 있는 또는 있게 해주는 물질을 의미한다. 표지자의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 프로브의 반응 전 후의 변화에 따라 프로브의 변화 또는 신호를 확인할 수 있게 해주는 표지자이면 제한 없이 이용 가능하다.
- [25] 본 발명의 구체예에 따라, 상기 표지자는 양친성 고분자에 결합된 표지자(제1 표지자)와 다른 종류의 표지자(제2 표지자)를 더 포함할 수 있다.
- [26] 상기 제 2 표지자는 고분자와 결합 또는 담지된 형태일 수 있다. 즉, 본 발명의 프로브는 양친성 고분자와 결합된 제1 표지자와 상기 프로브의 내부에 담지하여

제2 표지자를 더 포함하거나, 또는 제1 표지자가 결합된 친수성 고분자 및 제2 표지자가 결합된 친수성 고분자를 각각 포함할 수 있다.

[27] 본 발명의 일 구체예에 따라, 상기 표지자는 자기-소광된 염료(self-quenched dye), 형광 염료, 전기화학발광 물질, 소광제, 발광 염료 및 인광 염료로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.

[28] 상기 양친성 고분자에 결합된 표지자는 1 종 이상 일 수 있다. 또한, 같은 종류의 표지자 중에서도 1 이상의 서로 다른 물질이 각각 양친성 고분자와 결합된 형태일 수 있다. 일 구체예에 따라 제1 표지자가 형광염료인 경우, 제 2 표지자는 소광제 일 수 있고, 다른 구체예에 따라 제1 표지자가 소광제인 경우, 제 2 표지자가 형광 염료일 수 있다.

[29] 본 발명의 일 구체예에 따라, 상기 프로브는 양친성 고분자와 결합된 염료 및/또는 양친성 고분자와 결합된 소광제를 포함할 수 있다.

[30] 본 발명에서 염료는 특정 파장의 광을 선택적으로 흡수 또는 방출하는 물질을 의미한다. 상기 특정 파장의 광은 자외선광, 적외선광 또는 가시광 일 수 있다.

[31] 본 발명에서, 자기-소광된 염료는 염료(self-quenched dye)가 서로 인접한 위치에 있는 경우에는 소광 작용이 일어나고, 뭉쳐있는 염료가 방출되어 퍼지게 되면 탈소광 작용에 의하여 형광이 나타나는 물질을 의미한다.

[32] 한 구체예에서, 자기-소광된 염료는 3,3-디옥타데실옥사카보시아닌 퍼클로레이트(3,3 -Dioctadecyloxacarbocyanine Perchlorate; Dio; Dioc), 3,3-디옥타데실-5,5-디(4-설포페닐)옥사카보시아닌 소듐염(3,3 -dioctadecyl-5,5 -di(4-sulfophenyl)oxacarbocyanine sodium salt), 4-(4-(디헥사데실아미노)스티릴)-N-메틸피리디늄 이오다이드(4-(4-(dihexadecylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide; DiA; 4-Di-16-ASP), 4-(4-(디데실아미노)스티릴)-N-메틸피리디늄 이오다이드(4-(4-(Didecylamino)Styryl)-N-Methylpyridinium Iodide; 4-Di-10-ASP), 1,1-디옥타데실-3,3,3,3-테트라메틸인도카보시아닌 퍼클로레이트(1,1 -dioctadecyl-3,3,3,3 -tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Dil), 1,1-디옥타데실-6,6-디(4-설포페닐)-3,3,3,3-테트라메틸인도카보시아닌 (1,1 -Dioctadecyl-6,6 -Di(4-Sulfophenyl)-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine), 4,4-디이소티오시아나토스틸벤-2,2-디설포산 디소듐염(4,4 -diisothiocyanatostilbene-2,2 -disulfonicacid disodium salt; DIDS), 1,1-디옥타데실-3,3,3,3-테트라메틸인도트리카보시아닌 이오다이드(1,1 -dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindotricarbocyanine iodide; DiR), 1,1-디올레일-3,3,3,3-테트라메틸인도카보시아닌(1,1 -dioleoyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine), 플루오레신 (fluorescein), 보디피 (BODIPY), 테트라메틸로다민 (Trtramethylrhodamine), 옥타데실 로다민 B 클로라이드(R18), 알렉사(Alexa), 시아닌(Cyanine) 및 알로피코시아닌(allopicocyanine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나

이상일 수 있다. 상기 형광 염료의 평균 입경은 200nm 이하, 또는 50nm 내지 10000nm일 수 있다.

- [33] 한 구체예에서, 전기화학발광 물질은, 이에 제한되는 것은 아니나, 트리스(2,2'-비피리딜)루테튬 (II) [Ru(bpy)₃]²⁺을 포함한다.
- [34] 한 구체예에서, 형광 염료(dye)는 광에 포함된 파장을 흡수하여 색광을 바꾸어 재방사하는 성질을 갖는 물질을 의미한다. 형광 염료는 발광염료 라고도 하며, 본 발명이 속하는 분야에 통상적으로 알려져 있는 형광 염료를 제한 없이 이용할 수 있다. 한 구체예에서, 형광 염료는 텍사스 레드(Texas red), 플루오레세인(fluorescein), 4-클로로-7-니트로벤조퓨라잔(4-chloro-7-nitrobenzofurazan; NBD-Cl), 루미놀(luminol), 풀러렌(fullerene) 및 방향족기를 포함하는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [35] 한 구체예에서, 소광제(quencher)는 분자의 들뜸 에너지를 제거하고, 발광 또는 형광을 저해하는 물질을 의미한다. 상기 소광제는 본 발명이 속하는 분야에 통상적으로 알려져 있고, 그 종류에 제한없이 사용할 수 있다. 한 구체예에 따라, 소광제는 BHQ-1, BHQ-2, 및 BHQ-3로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 것일 수 있다.
- [36] 한 구체예에서, 인광 염료는 조명광 안에서 흡수한 파장을 바꾸어 재방사함으로써 광휘성 효과를 나타내는 물질을 의미한다. 일 예로, 황화광물(X_mZ_n, X는 금속원소, Z는 비금속원소) 또는 알칼리토금속의 황화물 일 수 있으나, 그 종류에 제한되지 않는다.
- [37] 본 발명에서 사용된 용어 "양친성" 이란 양친매성이라고도 하며, 친수성과 소수성의 성질을 모두 가진 것을 의미한다. 또한, 양친성 입자는 친수성을 나타내는 영역과 소수성을 나타내는 영역을 갖는 입자를 의미한다. 상기 양친성 고분자는 친수성 고분자 A 및 소수성 고분자 B를 포함하는 A-B 타입의 블록 공중합체, B-A-B 타입의 삼중 블록 공중합체, 지질 고분자 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.
- [38] 한 구체예에서, 친수성 고분자는 폴리알킬렌글리콜(PAG), 폴리아크릴릭애시드(PAA), 폴리아크릴로니트릴(PAN), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리비닐아세테이트(PVAc), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아미드, 폴리비닐알코올(PVA) 및 친수성 폴리아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 바람직하게는, 친수성 고분자는 모노메톡시폴리에틸렌글리콜, 모노아세톡시폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌과 프로필렌글리콜의 공중합체, 폴리비닐피롤리돈, 폴리글루타민, 폴리글루탐산, 폴리트레오닌, 폴리아스파라긴, 폴리아르기닌 및 폴리세린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 친수성 A 블록은 200 내지 50,000 달톤 또는 1,000 내지

20,000 달톤의 수 평균 분자량을 가질 수 있다.

- [39] 한 구체예에서, 소수성 고분자는 친수성 고분자와 함께 양친성 고분자를 형성할 수 있는 물질이면 제한 없이 이용 가능하다. 한 구체예에서, 소수성 고분자 B 블록은 폴리에스테르, 폴리언하이드라이드, 소수성 폴리아미노산, 폴리오르소에스테르 및 폴리포스파진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 바람직하게는, 소수성 고분자 B 블록은 폴리루신, 폴리이소루신, 폴리발린, 폴리페닐알라닌, 폴리프롤린, 폴리글리신, 폴리메티오닌, 폴리트립토판, 폴리알라닌, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리디옥산-2-온, 폴리락타이드와 글리콜라이드의 공중합체, 폴리락타이드와 디옥산-2-온의 공중합체, 폴리락타이드와 카프로락톤의 공중합체, 및 폴리글리콜라이드와 카프로락톤의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 또한 상기 소수성 고분자는 그 유도체를 포함한다. 소수성 B 블록은 50 내지 50,000 달톤, 또는 200 내지 20,000 달톤의 수 평균 분자량을 갖는다.

- [40] 본 명세서에서 사용한 용어, "지질 고분자"는 "지질"이라고도 한다. 이중층의 막 구조를 형성할 수 있는 것이라면 인지질, 지질단백질, 당지질, 양이온성 지질 등을 모두 포함하며, 그 종류에 제한되지 않는다. 또한, 상기 지질은 자연적으로 유도되어 얻어진 것 및 합성된 지질 유도체를 모두 포함한다. 상기 인지질(phospholipids)은 글리세로인지질(glycerophospholipids) 및 스펡고인지질(spingophospholipid, Phosphosphingolipid)을 포함한다. 상기 글리세로인지질은 다이아크릴글리세라이드 구조를 갖는 것일 수 있고, 구체적으로 포스파티산(phosphatidate, Phosphatidic acid, PA), 레시틴(lecithin, Phosphatidylcholine, PC), 세팔린(cephalin) 및 포스포이노시티드류(Phosphoinositides)를 포함한다. 상기 세팔린 인지질은 포스파티딜세린(Phosphatidylserine, PS) 및 포스파티딜에탄올아민(Phosphatidylethanolamine, PE)을 포함한다. 또한, 상기 포스포이노시티드류 인지질은 포스파티딜이노시톨(Phosphatidylinositol, PI), 포스파티딜이노시톨 포스페이트(Phosphatidylinositol phosphate, PIP), 포스파티딜이노시톨 이인산(Phosphatidylinositol bisphosphate, PIP2) 및 포스파티딜이노시톨 삼인산(Phosphatidylinositol triphosphate, PIP3)을 포함한다. 상기 스펡고인지질은 세라마이드 포스포릴콜린(Ceramide phosphorylcholine, Sphingomyelin, SPH), 세라마이드 포스포리레타노라민(Ceramide phosphorylethanolamine, Sphingomyelin, Cer-PE) 및 세라마이드 포스포리피드(Ceramide phosphoryllipid)를 포함한다.

- [41] 상기 합성 인지질 유도체는 그 종류에 제한되는 것은 아니나, 일 구체예로 1,2-다이도데카노이-sn-글리세로-3-포스포콜린(EPC, 1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine), 1,2-다이올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DOPC,

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine),
 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에타놀라민(POPE,
 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine),
 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포-L-세린(POPS,
 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine)으로 이루어진 군에서 선택된
 것 일 수 있다.

- [42] 본 발명의 일 예에 따른 프로브는 공지된 방법을 자유롭게 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 친수성 영역과 소수성 영역을 포함하는 양친성 블록 공중합체를 수용액에 분산시킨 뒤 초음파를 가하는 방법, 유기용매에 분산 또는 용해 시킨 뒤 과량의 물로 유기용매를 추출 또는 증발시키는 방법, 유기용매에 분산 또는 용해시킨 뒤 과량의 물로 투석하는 방법, 유기용매에 분산 또는 용해시킨 뒤 균질기 또는 고압유화기를 이용하여 강하게 용매를 증발시키는 방법, 또는 얇은 필름 수화법(Thin film hydration) 등을 사용하여 제조할 수 있다.
- [43] 본 발명의 이 예에 따른 프로브는 친수성 영역과 소수성 영역을 포함하는 양친성 블록 또는 고분자가 자가조립하여 입자화된 것 일 수 있다.
- [44] 본 발명의 프로브는 검출 대상 바이러스 또는 바이러스의 표면 단백질의 종류, 사용되는 고분자의 종류, 제조방법에 따라 다양한 구조 또는 형태를 나타낼 수 있다.
- [45] 본 발명의 일 구체예에서, 프로브는 막(membrane) 구조를 나타낼 수 있다.
- [46] 본 발명에서 사용한 용어, "막(membrane) 구조"란 막 또는 셸(shell)에 의하여 내부가 둘러싸여 있는 구조를 의미한다. 베지클(vesicel), 인공세포(artificial cell) 또는 마이크로캡슐 같은 캡슐 형태의 입자(encapsulation particle)는 그 종류를 제한하지 않고 모두 포함한다. 본 명세서에서 상기 막 구조는 셸(shell) 구조와 혼용하여 사용한다. 상기 막 구조는 상기 내부에는 유체 또는 별도의 구성을 포함하는 구조까지 포함한다.
- [47] 상기 막(membrane)은 단일층(mono layer) 또는 이중층(bilayer) 구조를 포함한다. 상기 단일층(mono layer)은 "소수성 영역-친수성 영역"을 포함하는 막 구조로, 일 구체예로 수용성 용액 내에서 소수성 코어와 친수성 셸을 포함하는 구조일 수 있다. 상기 이중층(bilayer)은 "친수성 영역-소수성 영역-소수성 영역-친수성 영역"을 포함하는 막 구조이다. 일 구체예로, 상기 이중층(bilayer)은 상기 단일층(mono layer) 2 개가 결합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 이중층(bilayer)은 친수성 코어와 상기 친수성 코어를 둘러싸고 있는 소수성 영역 및 상기 소수성 영역을 둘러싸고 있는 친수성 셸을 포함하는 구조일 수 있다.
- [48] 상기 막(membrane) 구조는 단일막(single membrane) 및 단일막을 2 이상 있는 다중막(multi membrane)을 모두 포함한다. 일 예로, 단일막을 갖는 입자가 다시 하나의 단일막으로 둘러싸인 경우, 다중막을 갖는 입자가 될 수 있다. 상기 단일막 및 다중막은 단일층 및 이중층과 구별되는 개념이다. 구체적으로, 이중층(bilayer) 구조의 막을 하나만 포함하는 입자는 단일막을 갖는 것이며,

단일층(monolayer) 구조의 막을 포함하는 입자를 다시 단일층 구조의 막이 둘러싸고 있는 입자는 다중막 구조의 입자를 의미한다.

- [49] 상기 막 구조를 갖는 프로브는 본 발명이 속하는 통상의 방법에 의하여 제조될 수 있고, 일 구체예에 따라 미세용액화 장비를 이용한 미세유동화 방법(microfluidization), 초고압 균질법(High-pressure homogenization), 에멀전법(Emulsion method) 또는 초음파 등을 이용하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [50] 상기 막구조를 갖는 입자는 그 종류에 제한되지 모두 본 발명의 프로브에 포함될 수 있다. 일 구체예로 베지클(vesicle), 마이셀(micelle), 폴리머솜(polymersome), 콜로이드솜(colloidsome), 베지클(vesicle), 리포솜(liposome) 또는 액적(droplet) 일 수 있으나, 상기 예에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 키트는 서로 상이한 막 구조를 갖는 1 종 이상의 프로브를 포함할 수 있다.
- [51] 상기 "마이셀(micelle)"은 소수성 코어와 친수성 셸을 갖는 입자를 의미한다. 한 구체예에서, 상기 마이셀은 계면활성제의 마이셀 또는 고분자 자기조립 마이셀 일 수 있다. 자기조립에 의한 마이셀의 경우 공중합체를 형성하는 고분자의 종류에 따라 다양한 형태를 띌 수 있고, 그 형태에 제한을 받는 것은 아니다. 상기 마이셀은 단일층(monolayer)을 2 이상 포함하는 다중막 형태도 포함한다. 상기 마이셀은 그 형태의 제한은 없으나, 일 예에 따라 구형, 타원형(ellipsoid) 또는 실린더형(cylinder)을 포함한다. 상기 마이셀 구조의 프로브는 소수성 코어 영역에 표지자 및 무기 입자와 같은 구성을 더 포함할 수 있다.
- [52] 상기 "폴리머솜(polymersome)"은 "친수성 영역-소수성 영역-소수성 영역-친수성 영역"을 갖는 2중층 막 구조를 갖고, 상기 소수성 및 친수성 영역에 고분자 또는 공중합체를 포함하는 입자를 의미한다. 상기 고분자 또는 공중합체는 인위적으로 합성된 것과 지질(lipid)을 함께 포함하거나, 인위적으로 합성된 것 포함하는 것 일 수 있다. 상기 인위적으로 합성된 것은 자연적으로 발생하는 지질(lipid)을 제외한 모든 고분자 및 공중합체를 포함하는 의미이다. 상기 폴리머솜은 이중층 막구조의 단일막 및 단일막을 2이상 포함하는 다중막을 모두 포함한다.
- [53] 상기 폴리머솜은 리포솜과 구분하여 인위적으로 합성된 고분자 또는 공중합체를 포함할 수 있다. 상기 폴리머솜은 이중층 형태의 막으로만 이루어진 단일막 및 상기 2중층의 단일막을 2 이상 포함하는 다중막 형태도 포함한다.
- [54] 상기 "리포솜(liposome)"은 적어도 하나의 지질 이중층을 갖는 입자를 의미한다. 양친매성의 생체막을 모방한 지질막을 갖는 것이라면, 단일막 및 다중막을 모두 포함한다. 리포솜을 형성하는 방법은 당업계에 잘 알려져있고, 통상적으로 인지질을 염류 수용액 중에 현탁하거나, 인지질을 포함하는 수용액을 초음파 처리 등을 하여 수득할 수 있으나, 제조방법에 의하여 본 발명이 제한되지 않는다.

- [55] 상기 "콜로이드솜"은 1nm 내지 1000nm 크기의 콜로이드상 입자 또는 상기 입자가 치밀하게 패킹된 구조물을 의미한다. 막을 형성하는 친수성 및 소수성 영역의 고분자의 종류에 따라서 단일층 및 이중층을 포함할 수 있다. 또한 단일막 및 다중막을 모두 포함한다.
- [56] 상기 "액적(droplet)"은 상기 막 구조 입자 중에서 물방울 모양의 형태를 나타내는 것을 의미한다. 단일층 및 이중층을 포함하고, 단일막 및 다중막을 모두 포함한다.
- [57] 본 발명의 프로브는 형태(shape)에 따라서 구분할 수 있으나, 상기 형태에 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 프로브의 형태(shape)는 로드(rod), 구, 링(ring), 판(flat), 실린더, 타원형, 막으로 둘러싸인 형태 및 이들의 조합을 포함한다.
- [58] 상기 로드(rod)형태는 막대, 봉 또는 장대와 같은 일직선 모양의 형태를 총칭하는 의미이다. 상기 구 형태는 둥근 모양의 형태를 의미하는 것으로, 완전 구형과 불완전 구형을 모두 포함한다. 상기 링(ring) 형태는 일반적으로 구 또는 원형의 모양에서 가운데가 비어있는 형태를 의미한다. 상기 판(flat) 형태는 얇고 평평한 모양의 평판, 판상의 형태를 의미한다. 일 구체예에 따라, 판 형태의 프로브는 기재 또는 담체의 상부 또는 외부에 판 형의 프로브가 코팅 된 형태 일 수 있다.
- [59] 본 발명의 일 구체예에서, 양친성 입자가 하기 식 1에 따라 계산된 질량 분율(mass fraction)이 0.25 내지 0.40을 만족할 때, 양친성 입자는 폴리머솜 형태를 나타내고, 질량 분율이 0.40 초과 0.70 이하일 때 양친성 입자는 마이셀 구조를 나타낸다.
- [60] [식 1]
- [61]
$$\text{질량 분율(mass fraction)} = \frac{\text{친수성 고분자의 질량}}{\text{친수성 고분자의 질량} + \text{소수성 고분자의 질량}}$$
- [62] 또한, 상기 질량 분율을 질량 %(percent)로 나타내는 경우, 질량%가 25% 내지 40%을 만족할 때, 양친성 입자는 폴리머솜 형태를 나타내고, 질량%가 40% 초과 70% 이하일 때 양친성 입자는 마이셀 구조를 나타낸다.
- [63] 한 구체예에서, 프로브의 크기는 제한되지 않는다. 프로브는 나노 또는 마이크로 입자일 수 있으며, 예를 들어 평균 입경은 50 내지 10000 nm일 수 있다.
- [64] 본 발명의 다른 일 예에 따르면, 프로브는 바이러스와의 반응 여부를 더욱 명확하게 판단하기 위하여 금, 은 및 이들의 조합에서 선택된 무기 입자를 더 포함할 수 있다.
- [65] 본 발명의 키트 또는 조성물은 상기 프로브를 단일 종류만 포함하거나, 2 종류 이상의 프로브를 함께 포함할 수 있다.
- [66] 본 발명에서 사용한 용어 "바이러스"는 편성 세포 내 기생체(obligatory intracellular parasite)로서 핵산으로 DNA 또는 RNA을 갖고, 증식은 핵산으로 시작되고 2분열법으로 증식되지 않으며 ATP 생산에 필요한 효소계를 갖고 있지

않은 것을 의미한다.

- [67] 본 발명의 바이러스는 노출 바이러스(naked virus)와 외막 바이러스(enveloped virus)를 포함하고, 구체적으로 본 발명의 일 예에 따른 바이러스는 외막 바이러스(enveloped virus) 일 수 있다.
- [68] 상기 외막 바이러스는 구체적으로 헤르페스바이러스(herpesvirus), 폭스바이러스(poxvirus) 및 헤파드나바이러스(hepadnavirus)를 포함하는 DNA 바이러스와 플라비바이러스(flavivirus), 토가바이러스(togavirus), 코로나바이러스(coronavirus), 헤파티티스 D(hepatitis D), 오소믹소바이러스(orthomyxovirus), 파라믹소바이러스(paramyxovirus), 랍도바이러스(rhabdovirus), 분야바이러스(bunyavirus), 필로바이러스(filovirus) 및 레트로바이러스(retrovirus)를 포함하는 RNA 바이러스에 속하는 것이면 모두 포함한다.
- [69] 상기 오소믹소바이러스는 인플루엔자 바이러스 A, 인플루엔자 바이러스 B, 인플루엔자 바이러스 C, 이사바이러스(isavirus), 소고토바이러스(thogotovirus) 및 쿼란자바이러스(quarantavirus) 속에 포함되는 모든 바이러스를 포함한다.
- [70] 상기 코로나바이러스는 알파코로나바이러스(alphacoronavirus), 베타코로나바이러스(betacoronavirus), 감마코로나바이러스(gammacoronavirus) 및 델타코로나바이러스(deltacoronavirus) 속에 포함되는 모든 바이러스를 포함한다.
- [71] 상기 파라믹소바이러스는 파라믹소바이러스, 루블라바이러스, 모빌리바이러스 및 뉴모바이러스 속에 포함되는 모든 바이러스를 포함한다.
- [72] 상기 바이러스는 핵산과 이를 둘러싸고 있는 단백질을 포함한다. 이와 같은 바이러스의 단백질은 바이러스 유전체를 보호하고, 바이러스 입자가 세포에 흡착하는데 관여하며, 바이러스의 항원성을 결정하고, 바이러스의 형태를 유지하는 구조 단백질(structural protein)과 단백질과 핵산 등을 합성하는데 관련되는 단백질인 비구조 단백질(non-structural protein)을 포함한다.
- [73] 본 발명에서 사용한 용어 "바이러스의 표면 단백질"은 상기 구조 단백질을 의미한다. 예를 들어, "표면 단백질"은 바이러스의 특이 항원성을 가지고 있고, 바이러스의 흡착과 감염된 세포의 융합에 관여하는 당단백질(glycoprotein)일 수 있고, 세포와의 융합(fusion)에 관여하는 융합 단백질(fusion protein)일 수 있다.
- [74] 본 발명의 일 예에 따르면 상기 바이러스의 표면 단백질은 헤마글루티닌(HA), 스파이크 단백질(spike protein) 또는 F 단백질(F protein) 일 수 있다.
- [75] 본 발명의 일 예에 따르면, 본 발명의 바이러스는 숙주세포의 세포막에 흡착하여 막융합을 일으키는 표면 단백질을 포함하는 것 일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 바이러스는 비활성형 상태로 존재하는 표면 단백질이 생체 분자에 의하여 활성형으로 변하면, 숙주세포의 세포막과 흡착 및/또는 막융합을 일으키는 성질을 갖는 표면 단백질을 포함하는 것 일 수 있다.
- [76] 본 발명의 일 예에 따르면, "바이러스"는 인플루엔자 바이러스 또는 고병원성

인플루엔자 바이러스일 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 "바이러스의 표면 단백질"로 당단백질인 헤마글루티닌(HA)을 포함한다. 헤마글루티닌은 하나의 폴리펩티드(전구체 HA0)로 발현된 후, 단백질 가수분해에 의하여 HA0의 절단 부위(cleavage site)가 HA1 및 HA2로 나누어지면, 산성 조건 하에서 소수성 아미노산 잔기들로 구성된 융합 펩타이드(fusion peptide)가 활성화된다. HA는 인플루엔자 바이러스의 병원성 정도에 따라 절단 부위의 아미노산과 융합 펩타이드의 아미노산 구성이 다르다.

- [77] 본 발명의 다른 일 예에 따르면, "바이러스"는 코로나 바이러스 일 수 있다. 코로나 바이러스는 표면 단백질로 스파이크 단백질(spike protein)을 포함하고, 상기 스파이크 단백질은 S₁과 S₂ 부위를 포함한다. 스파이크 단백질의 S₁ 부위가 숙주세포에 결합하면, 단백질 분해 효소(protease)에 의하여 S₁과 S₂로 절단되고, S₂의 끝 부분에 있는 소수성 부위가 노출되어 활성화 된다.
- [78] 본 발명의 또 다른 일 예에 따르면, "바이러스"는 파라믹소 바이러스 일 수 있다. 파라믹소 바이러스는 표면 단백질로 HN 단백질(HN protein)을 포함한다. HN 단백질은 바이러스를 숙주세포에 부착 또는 흡착시키는 부착(또는 흡착) 단백질로, 바이러스 비활성 상태에서는 전구체(precursor) HN₀로 존재하나, 가수분해에 의하여 C-말단에서 아미노산 잔기가 제거되면 활성화 된다. 또한, 파라믹소 바이러스는 표면 단백질로 F 단백질(F protein)을 포함한다. F 단백질은 바이러스 비활성 상태에서 전구체 F₀로 존재하나 생체분자에 의하여 F₁과 F₂로 절단된 후, 새로운 N-말단 형태의 F₁으로 활성화 된다. 상기 F 단백질은 절단부위에 다염기성 잔기를 갖는 것과 단일염기성 잔기를 갖는 것으로 모두 포함한다. 바람직하게는 다염기성 잔기를 갖는 F 단백질 일 수 있다.
- [79] 본 발명에서 사용한 용어, "반응"은 어떤 물질이 다른 물질과 접촉하여 상태, 색, 형상 또는 화학 결합 등의 물리 및/또는 화학적 상태의 변화가 일어나는 것 또는 그 현상을 의미한다. 일 구체 예에서 바이러스의 표면 단백질이 생체 분자와 반응하는 경우 바이러스의 표면 단백질이 변화되어 융합 펩타이드 등을 형성하는 등의 활성화된 바이러스로 상태 변화가 일어난다. 다른 구체 예에서 활성화된 바이러스와 프로브의 반응은 융합반응 또는 응집반응일 수 있다. 상기 융합반응은 한 구체예에 따라, 활성화형 바이러스와 본 발명의 프로브의 일부가 결합되는 현상 일 수 있다. 융합반응은 융합에 의하여 프로브 내부의 물질 등이 밖으로 배출되는 현상까지 포함하는 것으로 이해될 수 있다. 일 예로, 활성화형 바이러스의 표면 단백질에 존재하는 융합 펩타이드가 엔도솜의 세포막을 융합하는 원리를 이용하여, 활성화형 바이러스와 프로브의 융합 여부를 확인함으로써 활성화형 바이러스를 검출할 수 있다. 상기 응집반응은 용액 안에서 분자 또는 입자 등이 서로 달라붙어 뭉치는 현상을 의미한다. 본 발명의 한 구체예에서, 응집반응은 검출대상인 바이러스에 의하여 본 발명의 프로브의 안정성이 낮아져 프로브끼리 서로 뭉쳐서 응집 및/또는 침전되는 현상을 의미한다.

- [80] 본 발명에서 사용한 용어, "생체 분자(biomolecule)"는 생물의 구조, 기능, 정보전달 등에 필요한 분자를 의미한다. 상기 생체 분자는 기능, 정보전달 등을 수행하기 위한 특이적 구조 및/또는 부위를 포함할 수 있다. 이러한 생체 분자의 특이적 구조는 분자간 결합 반응을 통하여 반응을 일으키는 원동력이다. 생체 분자는 아미노산과 단백질, 당과 탄수화물, 지방산과 지질, 및 뉴클레오티드와 핵산 등을 포함하고, 생체 내에서 만들어진 것 및/또는 인위적으로 합성된 것을 모두 포함한다. 본 발명의 일 예에 따르면, "생체 분자"는 약 62개 내지 2500개의 아미노산 잔기로 이루어진 단백질인 효소일 수 있다.
- [81] 하나의 구체 예에서 효소는 단백질 분해 효소일 수 있다. 일 예로 최초 합성된 형태로는 비활성화되어 있으나, 특정 부위가 제거(또는 절단)되면 활성을 나타내는 단백질에서 단백질 분해 효소는 상기 특정 부위를 절단(cleave)하여 비활성화 단백질을 활성화시킨다. 단백질 분해 효소는 특정 부위를 절단할 수 있는 것이면 종류에 제한 없이 사용할 수 있다.
- [82] 일 구체예에서 단백질 분해 효소는 푸린(furin), 트립신(trypsin), 세린(serine), 엔도프로테아제(endoprotease) 및 카복시펩티다아제(carboxypeptidase)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함한다. 상기 단백질 분해 효소는 유도체 또는 개질된 형태를 모두 포함한다. 예를 들어, 단백질 분해 효소는 제조합 인간 푸린, 제조합 마우스 푸린, 트립신-EDTA, 아세틸화된 트립신, TPCK-트립신(N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone-trypsin), 아크릴릭 트립신(Trypsin-acrylic), 푸린형 프로테아제(Furin like protease), 켄스2 프로테아제(Kex2 proteases), 막통과 세린 프로테아제 (Transmembrane protease serine), TMPRSS2, TMPRSS4, 트립타아제 클라라(Tryptase clara), 플라즈민(plasmin), 세린계 프로테아제(serine protease), 서브틸리신형 엔도프로테아제(subtilisin like endoprotease), 카복시펩티다아제(carboxypeptidase) 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [83] 일 구체예에서 트립신이 인플루엔자 바이러스의 당단백질인 헤마글루티닌(HA)과 반응하는 경우, 트립신의 효소 분해 작용은 His57-Asp102-Ser195 위치에서 일어나며, 푸린의 효소 분해 작용은 His194-Asp153-Ser368 위치에서 일어난다. 트립신은 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌을 모두 분해할 수 있기 때문에, 트립신을 이용하여 고/저병원성 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있다. 또한, 푸린은 고병원성 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌만을 분해할 수 있기 때문에, 푸린을 이용하여 고병원성 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있다.
- [84] 다른, 일 구체예에서 단백질 분해효소와 코로나 바이러스의 표면 단백질이 반응하는 경우, 가수분해 효소의 작용은 S1 과 S2의 부위의 경계에서 일어난다. 따라서, 상기 가수분해 효소의 작용에 의하여 절단 후 S2의 소수성 부위가 노출됨에 따라 코로나 바이러스가 활성화되어, 본 발명의 프로브를 이용하여 검출할 수 있다.

- [85] 또 다른 일 구체예에서, 파라믹소 바이러스의 표면 단백질과 반응하는 생체분자는 C-말단(Carboxyl side)의 아르기닌 잔기에서 절단이 가능한 단백질 분해효소 또는 카르복시펩티다아제(carboxypeptidase) 일 수 있다. 상기 단백질 분해효소는 R-X-K/R-R 배열 포함하는 F 단백질을 인식하여 절단할 수 있다. 구체적인 예로, 푸린 또는 서브틸리신형 엔도프로테아제(subtilisin-like endoprotease) 일 수 있다.
- [86] 본 발명에서 사용한 용어, "활성형 바이러스" 또는 "활성화된 바이러스"는 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자에 의하여 바이러스의 표면 단백질이 활성화된 바이러스를 의미한다. 여기서 바이러스의 표면 단백질이 활성화되었다는 것은 바이러스의 표면 단백질이 숙주세포 및/또는 프로브와 반응, 예를 들어 특이적으로 반응할 수 있는 상태로 변화되었다는 것을 의미한다. 여기서 "바이러스의 활성화"는 비활성형 바이러스가 상기 활성형 바이러스로 변환되는 과정을 의미한다. 바이러스가 감염을 일으키기 위해서는 바이러스의 활성화 과정이 필수적으로 요구되므로, 상기 활성형 바이러스의 존재 여부를 검출함으로써, 바이러스에 의한 감염 여부를 판별할 수 있다.
- [87] 하나의 구체 예에서, 바이러스 표면 단백질이 활성화된 것이란 바이러스의 표면 단백질에 존재하는 융합단백질 또는 융합펩타이드가 숙주세포의 막 또는 본 발명의 프로브의 표면과 융합 반응을 일으킬 수 있는 상태임을 의미한다.
- [88] 하나의 구체 예에서, 인플루엔자 바이러스의 경우, 활성화된 바이러스란 표면 단백질인 헤마글루티닌(HA)이 효소에 의해 분해되어, 비활성 상태에서 헤마글루티닌의 내부에 존재하는 융합 펩타이드가 노출된 형태로 변환된 것을 의미한다.
- [89] 즉, 상기 HA의 절단 부위를 특이적으로 분해하는 효소에는 푸린 및/또는 트립신이 포함된다. 푸린은 고병원성 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌만을 분해할 수 있기 때문에, 인플루엔자 바이러스의 HA가 푸린에 의하여 분해되는 경우 상기 인플루엔자 바이러스는 고병원성을 나타낸다. 또한, 트립신은 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌을 모두 분해할 수 있기 때문에, 트립신에 의하여 분해되는 경우에는 고병원성 또는 저병원성을 나타내게 된다. 저병원성 인플루엔자 바이러스의 절단 부위는 C-말단이 -R-로 이루어지며, 고병원성 인플루엔자 바이러스의 절단 부위는 R/K-R-K-K-R로 이루어진다.
- [90] HA의 절단 부위를 특이적으로 분해하는 효소에 의하여 HA가 활성화되면, HA의 재배열이 일어나 HA 내의 융합 펩타이드가 바깥쪽으로 노출되어 활성형 바이러스가 된다. 이와 같이, 산성 조건 하에서 활성화된 인플루엔자 바이러스가 본 발명의 일 예에 따른 프로브와 만나면, 인플루엔자 바이러스의 융합 펩타이드에 의하여 인플루엔자 바이러스와 프로브의 반응이 일어나게 된다. 프로브의 반응에 따라 변하는 신호를 측정함으로써 바이러스 감염 여부를

검출할 수 있다.

- [91] 다른 구체 예에서, 코로나 바이러스의 경우 활성화된 바이러스란 표면 단백질인 스파이크 단백질(S protein)이 생체분자에 의해 비활성 상태에서 스파이크 단백질의 내부에 존재하던 소수성 부위가 노출된 형태로 변환된 것을 의미한다. 구체적으로, 스파이크 단백질의 S1 부분이 숙주세포와 결합하면, 단백질 분해효소(protease)에 의하여 S1과 S2로 절단되고, S2의 끝 부분에 있는 소수성 부위가 노출되어 바이러스가 활성화 된다. 상기 S2에서 노출된 소수성 부위가 숙주세포의 세포막 내 소수성 영역에 부착되고, 다른 한쪽은 바이러스 외막과 결합된 상태에서 S2 부위의 가운데가 접히는 구조변형(conformation change)이 일어나면서 막 융합이 일어난다. 따라서, 본 발명의 프로브와 활성화된 코로나 바이러스가 만나면 반응하면, 프로브의 안정성에 변화가 일어나 다양한 신호를 발생되고, 상기 변화를 측정함으로써 바이러스 감염 여부를 검출할 수 있다.
- [92] 또 다른 구체예에서, 파라믹소바이러스에서 활성화된 바이러스란 HN 단백질이 생체분자에 의하여 C-말단의 잔기가 제거된 상태를 의미한다. 구체적으로, HN 단백질은 불활성화 상태(HN₀)를 유지하고 있다가 C-말단의 약 90개의 잔기가 제거되면, HN 단백질이 활성화 되어 숙주세포 또는 표적의 막에 파라믹소바이러스가 부착하게 된다. 또한, 활성형 파라믹소바이러스는 F 단백질이 생체분자에 의하여 F₁과 F₂로 절단된 상태를 의미한다. 비활성형 파라믹소바이러스에서 F 단백질은 전구체 F₀ 상태에서, 생체분자와 만나면 F₁과 F₂로 절단되고, 숙주세포의 세포막과 융합할 수 있는 활성형 바이러스가 된다. 즉, SS-결합쇄 F₁과 F₂를 함유하는 활성 표면 단백질을 형성하고, 광범위한 소수성을 나타내는 F₁의 N-말단 잔기를 숙주세포의 세포막 또는 타겟의 세포막에 고정하면서 막 융합이 시작된다. 따라서, 파라믹소바이러스는 본 발명의 생체분자가 표면 단백질과 반응하여 활성화 되고, 다시 활성화된 바이러스가 본 발명의 프로브와 반응하여, 프로브의 변화를 일으키게 된다. 따라서 상기 변화를 측정함으로써 바이러스를 검출할 수 있다.
- [93]
- [94] 본 발명의 한 구체예에서, 키트 또는 조성물은 pH 6 이하의 산성 물질을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, pH 6 이하의 산성 물질은 산성 용액일 수 있으며, 상기 pH 범위의 산성 용액을 키트에 포함할 수도 있고, 사용시 직접 제조하여 사용할 수도 있다. pH 6 이하의 산성 용액은 상기 pH 조건을 만족하는 용액이면 제한 없이 사용할 수 있다. 시판되는 스톡 용액을 이용할 수도 있고, 직접 제조하여 사용할 수도 있다. 예를 들어, 진한 산성 용액인 스톡 용액(stock solution)을 pH 6 이하가 되도록 물에 희석하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 산성 용액은 pH 4 내지 6 또는 pH 5 내지 pH 5.7일 수 있다. 상기 범위가, 숙주 세포 내의 pH 범위와 유사하므로, 검출 효율을 높일 수 있다.
- [95] 한 구체예에서, 본 발명의 키트 및 조성물은 반응 보조제를 추가로 포함할 수

있다.

- [96] 상기 반응 보조제는 생체 분자와 바이러스의 반응을 도와주는 생체 분자의 반응 보조제 일 수 있고, 또는 프로브와 표적분자의 반응을 도와주는 반응 보조제 일 수 있다. 구체적인 일 예로, 단백질 분해 효소와 표면 단백질의 반응을 도와주는 보조제, 또는 프로브와 활성형 바이러스 활성화된 표면 단백질, 활성형 바이러스의 항원성 단백질을 포함하는 표적분자와의 반응을 도와주는 보조제 일 수 있다.
- [97] 본 발명에서 사용한 용어, 보조제는 상기 등의 작용을 통해서 바이러스의 검출 민감도 및/또는 특이도를 높일 수 있는 것이라면 모두 포함하는 의미이다. 상기 바이러스의 검출 민감도 및/또는 특이도를 높이는 것의 예로 반응의 속도를 빠르게 하거나, 반응이 일어나는 최소값을 낮추는 작용 또는 표면 단백질과 생체 분자의 반응 외에 다른 반응을 억제하는 작용이 있으나, 상기 메커니즘에 제한되지 않는다. 보조제는 생체 분자 및 이와 반응하는 표면 단백질의 종류에 따라서 검출 민감도 및/또는 특이도를 높일 수 있는 것이면 종류에 제한 없이 모두 포함한다.
- [98] 상기 보조제는 케톤 일 수 있다.
- [99] 상기 케톤 화합물의 예는 페닐에틸 클로로메틸 케톤, 토실 페닐알라닐 플로로메틸 케톤(TPCK, Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [100] 본 발명의 일 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 검출 시 보조제로 케톤을 더 포함할 수 있다. 이 경우, 다른 효소의 활성을 낮추고, 헤마글루티닌(HA) 분해 효소, 특히 트립신의 활성을 높여주어 키트의 민감도를 더욱 높일 수 있다.
- [101]
- [102] 본 발명은 바이러스 검출방법에 관한 것이다.
- [103] 본 발명의 검출방법은 시료 생체 분자를 접촉시키는 단계 및 상기 생체 분자와 접촉된 시료를 프로브와 접촉시키는 단계를 포함한다. 구체적으로 개체로부터 수득한 시료를 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자와 접촉시키는 단계; 및 상기 생체 분자와 접촉된 시료를 상기 생체 분자에 의해 활성화된 바이러스와 반응하는 프로브를 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 프로브는 양친성 고분자와 결합된 표지자를 포함한다.
- [104] 본 발명의 검출방법은 상기 접촉에 의하여 일어나는 반응의 여부를 확인함으로써 바이러스를 검출 할 수 있다. 일 예로, 활성형 바이러스의 표면 단백질에 존재하는 융합 펩타이드가 엔도솜의 세포막을 융합하는 원리를 이용하여, 활성형 바이러스와 프로브의 융합 반응 여부를 확인함으로써 활성형 바이러스를 검출할 수 있다. 다른 예로, 활성형 바이러스의 표면 단백질에 존재하는 융합 펩타이드가 프로브의 안정성을 낮추는 원리를 이용하여, 프로브의 응집 반응 여부를 확인함으로써 활성형 바이러스를 검출할 수 있다.
- [105] 본 발명에서 반응의 여부를 확인하는 방법으로, 반응에 의하여 변하는 신호

또는 변화를 측정할 수 있다. 일 예로, 활성형 바이러스와 프로브가 반응하는 경우 변화하는 신호는, 형광 강도, 발광 강도, 인광 강도, 흡광 강도, 전기적 신호, 표면증강 라만 분광(surface-enhanced Raman spectroscopy; SERS) 신호, FET(field-effect transistor), 색 및 프로브의 분산도로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 변화일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [106] 예를 들어, 프로브의 반응 여부를 판별할 수 있는 표지자로 자기-소광된 염료를 이용하는 경우, 활성형 바이러스에 의하여 프로브와의 반응이 일어나, 프로브의 고분자에 결합된 자기-소광된 염료와 같은 표지자가 방출 또는 프로브 외부로 노출된다. 표지자가 노출 또는 방출된 프로브에서는 탈소광 작용에 의하여 형광이 나타나게 된다. 따라서, 형광 강도의 변화를 측정함으로써, 바이러스의 존재 여부를 검출할 수 있다.
- [107] 또한, 프로브의 반응 여부를 판별할 수 있는 표지자로 형광 염료를 이용하는 경우, 활성형 바이러스에 의하여 프로브와의 반응이 일어나면, 프로브 입자의 고분자막 붕괴에 의하여 프로브의 고분자와 결합된 형광염료가 막 외부로 노출 또는 프로브 내부에 담지된 형광염료가 고분자 막 외부로 용출되게 되므로, 이때의 형광 강도를 측정함으로써, 바이러스의 감염 여부를 검출할 수 있다. 발광 강도, 인광 강도, 흡광 강도 역시 형광 강도와 마찬가지로 과장에 따라 달라지기 때문에, 이들을 측정하여 바이러스의 감염 여부를 검출할 수 있다. 특히, 형광 염료 중에서, 루미놀이나 플러렌 등은 특별한 기기에 의한 형광 강도의 측정 없이, 육안으로도 색의 변화를 감지할 수 있다.
- [108] 또한, 표지자로 형광 염료와 소광제 각각을 하나의 프로브에 포함하는 경우, 활성형 바이러스와 프로브의 반응이 일어나면, 고분자막의 붕괴되지 않는 경우 막 내부에 소광제와 형광염료가 함께 존재하면서 발광하지 않으나, 막 붕괴에 의하여 염료가 노출 또는 용출되는 경우 프로브의 형광 강도가 변화하므로, 상기 변화를 측정하여 바이러스의 존재 여부를 검출할 수 있다.
- [109] 형광 염료 이외에도, 트리스(2,2'-비피리딜)루테늄 (II) [Ru(bpy)₃2+)]와 같은 전기화학발광 물질을 포함할 수 있으며, 이 경우 육안으로 색의 변화 관찰이 가능하다.
- [110] 또한, 나노갭 센서를 이용하여 전기적 신호를 측정함으로써 바이러스를 검출할 수 있다. 전기적 신호는 전류 변화를 측정하거나, 또는 FET (Field-effect transistor)를 이용하여 측정할 수도 있다. 나노갭 센서란 갭의 간격이 약 100nm 이하인 전극이 포함된 센서를 의미한다. 예를 들어, 프로브의 반응 여부를 판별할 수 있는 표지자로 형광 염료를 이용하는 경우, 활성형 바이러스와 프로브가 반응하면, 프로브 내부의 형광 염료가 방출되어 나노갭 센서의 나노갭에 위치하게 된다. 이 때, 나노갭 센서에 미리 위치시킨 금, 은, 크롬, 티타늄, 백금, 구리, 팔라듐, ITO(indium tin oxide), 또는 알루미늄 등의 금속 입자의 전류 변화를 측정함으로써, 바이러스의 감염 여부를 검출할 수 있다. 금속 입자의 평균 입경은 수 나노미터일 수 있으며, 예를 들어, 2 내지 4nm일 수

있다.

- [111] 또한, 표면증강 라만 분광 신호를 측정하여 바이러스를 검출할 수 있다. 표면증강 라만 분광 신호를 측정하기 위하여, 시료와 결합 가능한 기재를 이용할 수 있다. 기제는 나노입자, 콜로이드, 액상 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 프로브의 융합 여부를 판별할 수 있는 표지자로 형광 염료를 이용하는 경우, 활성형 바이러스와 프로브가 반응하면, 프로브 내부의 형광 염료가 방출된다. 방출된 형광 염료를 기재와 결합시킨 후, 상기 기재와 결합된 형광 염료에 다시 금속 입자를 도입한다. 금, 은 등의 금속 입자를 도입함으로써, 라만 분광을 증폭시킬 수 있다. 그 후, 라만 분광기로 상기 형광 염료의 라만 스펙트럼을 측정함으로써, 바이러스의 감염 여부를 검출할 수 있다.
- [112] 다른 예로, 활성형 바이러스에 의하여 프로브의 응집이 일어남에 따라 프로브의 응집 여부, 즉, 분산도의 변화를 확인함으로써 바이러스를 검출할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 무기 입자를 포함하는 경우, 활성형 바이러스에 의하여 프로브의 안정성이 낮아짐에 따라 상기 입자의 응집이 일어나게 된다.
- [113] 한 구체예에서, 적어도 하나 이상의 단계는 pH 6 이하의 조건 하에서 수행될 수 있다. 예를 들어, pH 4 내지 pH 6, pH 5 내지 pH 5.5의 산성 조건 하에서 수행될 수 있다. 본 발명의 일 구체예로 인플루엔자 바이러스를 검출하는 경우, 산성 조건에서 수행하는 것이, 숙주 세포 내 환경과 매우 유사한 조건을 제공할 수 있어, 검출 정확도를 높일 수 있는 이점이 있다.
- [114] 본 발명의 일 구체예에 따른 인플루엔자 검출 방법에 대한 모식도를 도 3에 나타내었다. 요약하면, pH 6 이하, pH 4 내지 pH 6, 또는 pH 5 내지 pH 5.5 하에서, 퓨린 및/또는 트립신이 존재하는 웰에 개체로부터 수득한 시료를 넣어 상기 시료 내에 존재하는 인플루엔자 바이러스를 활성화한 후, 본 발명의 일 예에 따른 프로브를 처리한다. 인플루엔자 바이러스가 존재하는 경우, 융합 펩타이드에 의하여 활성형 인플루엔자 바이러스와 프로브의 반응이 일어나게 되고, 반응 여부에 따라 변하는 신호를 측정함으로써 인플루엔자 바이러스의 존재 유무를 알 수 있다. 상기에서 기술한 바와 같이, 활성형 인플루엔자 바이러스와 프로브의 반응은, 융합 또는 응집일 수 있다. 상기 활성형 인플루엔자 바이러스와 프로브의 반응 및 이에 따라 변하는 신호에 대하여는 전술한 바와 같다.
- [115] 본 발명에서 사용한 용어, "시료"는 바이러스의 검출을 위해 모체를 대표하도록 채취된 것을 의미한다. 한 구체예에서, 시료는 타액, 구강 점막 또는 분뇨 시료일 수 있다.
- [116]
- [117] 본 발명은 또한, 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자 및 상기 생체분자에 의하여 활성화된 바이러스와 반응하는 프로브를 포함하는 바이러스 검출용 조성물에 관한 것이다. 상기에서 바이러스 검출 키트 및 바이러스 검출 방법에 대하여 기술한 모든 내용이 바이러스 검출용 조성물에도

적용 또는 준용될 수 있다.

[118]

[119] 본 발명은 또한, 양친성 고분자와 표지자를 결합시키는 단계를 포함하는 바이러스 검출용 프로브 또는 검출용 키트의 제조방법에 관한 것이다.

[120] 일 구체예에 따라, 양친성 고분자와 제1 표지자를 결합시키는 단계 및 상기 양친성 고분자와 결합된 표지자로 막구조의 입자를 형성하는 단계를 포함한다.

[121] 다른 일 구체예에 따라, 상기 입자 형성 단계 이전에 제1 표지자가 결합된 양친성 고분자 및 제2 표지자를 용매에 분산 시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 제2 표지자가 함께 분산된 용액으로부터 막 구조의 입자를 형성하면 제2 표지자가 담지된 프로브를 제조할 수 있다.

[122] 또 다른 일 구체예에 따라, 양친성 고분자와 제1 표지자를 결합시키는 단계, 양친성 고분자와 제2 표지자를 결합시키는 단계 및 상기 제1 표지자 결합된 양친성 고분자 및 제2 표지자 결합된 양친성 고분자를 용매에 분산시키고 막구조의 입자를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[123] 상기 막구조의 입자를 형성하는 단계는 본 발명이 속하는 분야에서 통상적으로 사용되는 콜로이드, 리포솜, 마이셀 또는 폴리머솜을 형성하는 방법에 따라 수행할 수 있고, 일 예로 친수성 영역과 소수성 영역을 포함하는 양친성 블록 공중합체를 수용액에 분산시킨 뒤 초음파를 가하는 방법, 유기용매에 분산 또는 용해 시킨 뒤 과량의 물로 유기용매를 추출 또는 증발시키는 방법, 유기용매에 분산 또는 용해시킨 뒤 과량의 물로 투석하는 방법, 유기용매에 분산 또는 용해시킨 뒤 균질기 또는 고압유화기를 이용하여 강하게 용매를 증발시키는 방법, 또는 얇은 필름 수화법(Thin film hydration) 등을 사용하여 막 구조의 입자를 제조할 수 있다.

[124] 상기 막구조의 입자를 형성하는 단계에서 표지자가 결합되지 않은 양친성 고분자와 표지자가 결합된 양친성 고분자는 고분자 비율이 1:1 내지 10의 중량비 범위에서 혼합하여 사용될 수 있다.

[125] 본 발명의 제조방법에 따른 프로브는 막을 형성하여 캡슐 역할 또는 담체 역할을 하는 고분자와 표지자가 직접 결합되어 있으므로, 검출 과정에서 초기에 표지자가 방출되는 것을 제어할 수 있고, 표지자의 방출이 제어되므로, 제조단계에서 투석단계를 거치지 않아도 되므로 바이러스 검출용 키트의 제조 효율이 우수하다는 장점이 있다.

[126] 상기에서 바이러스 검출 키트 및 바이러스 검출 방법에 대하여 기술한 모든 내용이 바이러스 검출용 프로브 제조방법에도 적용 또는 준용될 수 있다.

[127]

[128] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[129]

[130] [실시예]

[131]

[132] [제조예 1] 친수성 고분자-소수성 고분자-형광염료가 결합된 고분자를 포함하는 입자 내부에 소광제를 담지한 프로브의 제조

[133]

[134] 양친성 공중합체를 이용하여, 표지자로 형광염료를 결합시키고, 그 내부에 소광제를 담지하고 있는 마이셀(Micelle) 또는 폴리머솜(Polymersome) 형태의 프로브를 제조하였다. mPEG-NH₂는 Laysan bio, Cy5.5-NHS 에스터는 GE Healthcare, BHQ3-NHS 에스터는 iosearch Technologies, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 및 다이메틸설폭사이드는 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

[135] 구체적으로, mPEG-b-PLeu 10 mg에 Cy5.5-NHS 에스터 2.5mg 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 8.9mg를 다이메틸설폭사이드 2mL에 녹인 후 12시간 상온에서 반응시켰다. 반응이 종료된 용액을 차가운 에틸 에테르 4mL로 침전시키고, 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 동결건조 후, 친수성 고분자-소수성 고분자-형광염료 결합체를 얻었다.

[136] mPEG-b-PLeu과 mPEG-b-PLeu-형광염료 결합체를 고분자 1:1 비율로하여 10 mg을 준비하고, BHQ3-NHS 에스터 0.04 mg와 혼합하고 투석하여 입자를 형성하는 방법으로 프로브를 제조 하였다. 투석 단계 이후, 세척 단계는 생략하였다.

[137] 제조된 프로브의 형상을 TEM(transmission electron microscope) 이미지로 확인하여 도 2에 나타내었고, 제조된 프로브 입자의 크기를 DLS(dynamic light scattering) 법을 이용하여 측정하여 평균 직경을 도 5에 나타내었다.

[138]

[139] 도 2 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 불완전 구형 또는 타원형의 형태를 띄고, 평균 직경은 62.5 ± 3.6 nm인 프로브가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

[140] 또한, 상기 프로브 중에서 폴리머솜 형태의 프로브는 분자량이 6500 g/mol이었고, 마이셀 형태의 프로브는 분자량이 3300 g/mol 였다.

[141]

[142] [제조예 2] 친수성 고분자-소수성 고분자-소광제가 결합된 고분자를 포함하는 입자 내부에 형광염료를 담지한 프로브의 제조

[143]

[144] 양친성 고분자에 소광제를 결합시키고, 형광염료를 담지시킨 것 외에 제조예 1과 동일한 방법으로 프로브를 제조하였다.

[145] mPEG-NH₂는 Laysan bio, Cy5.5-NHS 에스터는 GE Healthcare, BHQ3-NHS 에스터는 iosearch Technologies, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 및 다이메틸설폭사이드는 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

[146]

[147] 구체적으로, mPEG-b-PLeu 10 mg, BHQ3-NHS 에스터 1.8 mg 및

1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 8.9mg을 다이메틸설폭사이드 2mL에 녹인 후 12시간 상온에서 반응시켰다. 반응이 종료된 용액을 차가운 에틸 에테르 4mL로 침전시키고 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 동결건조 후, 친수성 고분자-소수성 고분자-소광제 결합체를 얻었다.

[148] mPEG-b-PLeu 과 mPEG-b-PLeu-소광제 결합체를 고분자 기준으로 1:1 비율하여 10 mg 준비하고, cy5.5-NHS 에스터 0.04 mg과 혼합하고, 투석하여 입자를 형성하는 방법으로 프로브를 제조하였다.

[149] 제조된 프로브의 형상을 TEM(transmission electron microscope) 이미지로 확인하여 도 3 나타내었고, 제조된 프로브 입자의 크기를 DLS(dynamic light scattering) 법을 이용하여 측정하여 평균 직경을 도 5에 나타내었다.

[150]

[151] 도 3 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 불완전 구형 또는 타원형의 형태를 띄고, 평균 직경은 48.4 ± 4.5 nm인 프로브가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

[152]

[153] [제조예 3] 친수성 고분자-소수성 고분자-소광제가 결합된 고분자 및 친수성 고분자-소수성 고분자-형광염료가 결합된 고분자를 포함하는 프로브의 제조

[154]

[155] 형광염료가 결합된 고분자 및 소광제가 결합된 고분자를 이용하여 프로브를 제조한 것 외에, 제조예 1과 동일한 방법으로 프로브를 제조하였다.

[156] mPEG-NH₂는 Laysan bio, Cy5.5-NHS 에스터는 GE Healthcare, BHQ3-NHS 에스터는 iosearch Technologies, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 및 다이메틸설폭사이드는 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

[157] 구체적으로, mPEG-b-PLeu 10 mg에 Cy5.5-NHS 에스터 2.5mg 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 8.9mg을 다이메틸설폭사이드 2mL에 녹인 후 12시간 상온에서 반응시켰다. 반응이 종료된 용액을 차가운 에틸 에테르 4mL로 침전시키고 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 동결 건조 후, 친수성 고분자-소수성 고분자-형광염료 결합체를 얻었다.

[158] mPEG-b-PLeu 10 mg에 BHQ3-NHS 에스터 1.8 mg 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 8.9mg을 다이메틸설폭사이드 2mL에 녹인 후 12시간 상온에서 반응시켰다. 반응이 종료된 용액을 차가운 에틸 에테르 4mL로 침전시키고 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 동결건조 후, 친수성 고분자-소수성 고분자-소광제 결합체를 얻었다.

[159] 상기 각각 얻어진 결합체를 고분자를 기준으로 1:1 비율로 10mg을 준비하고, 투석하여 양친성 입자 프로브를 제조하였다.

[160] 제조된 프로브의 형상을 TEM(transmission electron microscope) 이미지로 확인하여 도 4 나타내었고, 제조된 프로브 입자의 크기를 DLS(dynamic light scattering) 법을 이용하여 측정하여 평균 직경을 도 5에 나타내었다.

[161]

- [162] 도 4 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 불완전 구형 또는 타원형의 형태를 띄고, 평균 직경은 52.7 ± 2.2 nm인 프로브가 제조되었음을 확인할 수 있었다.
- [163]
- [164] [실험예 1] 프로브의 바이러스 검출효과 확인
- [165] 제조예 1의 방법에 의해 제조된 프로브에 의한 바이러스 검출효과를 확인 하였다.
- [166] 구체적으로, 검출 대상 바이러스로는 3가지 타입의 고병원성 인플루엔자 바이러스로 H5N1_01, H5N1_02 및 H5N6, 11가지 타입의 저병원성 인플루엔자 바이러스로 H1N1_01, H1N1_02, H2N1, H2N4, H3N8, H5N2, H5N3, H7N9, H7N7, H9N2_01 및 H9N2_02에 대해서 실험을 실시하였다. 바이러스와 반응하는 생체 분자로 인플루엔자 바이러스의 표면 단백질인 헤마글루티닌을 특이적으로 분해할 수 있는 푸린(furin)과 트립신(trypsin)을 이용하였다. 저병원성 인플루엔자 바이러스는 녹십자 수의약품에서, 고병원성 바이러스는 Hanoi university of agriculture에서 제공받아 사용하였다. pH 조건은 산성 스톡 용액(stock solution)을 이용하여 적정 pH에 맞추어 실시하였다.
- [167] 96-well plate에서 하나의 well에 각 처리군에 맞는 효소를 넣고, 효소가 담지된 웰에 검출대상 바이러스를 넣어 접촉시켰다. 그 다음 본 발명의 프로브를 넣어 접촉 시킨 후, 상기 프로브의 형광 강도 변화를 측정 하였다(Ex: 675 nm, Em: 694 nm).
- [168] 인플루엔자 바이러스 총 14종에 대해서, 검출 환경(well의 pH 조건)을 pH 5.5 및 pH 7.4로 구분하고, 각 pH 조건에 따라 1) 푸린 단독 처리군, 2) 트립신 단독 처리군, 3) 푸린 및 트립신 처리군, 4) 푸린 및 분변 처리군, 5) 트립신 및 분변 처리군 및 6) 분변 단독 처리군(효소 미처리) 나누어서 실험을 실시하였다. 그 결과를 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.
- [169]

[170] [Table 1]

Sample	pH 5.5		pH 7.4		Furin + Trypsin		효소 미처리	
	Furin	Trypsin	Furin	Trypsin	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4
H5N1_01	2841	2952	348	483	2521	371	540	497
H5N1_02	2133	2958	316	594	2858	573	469	451
H5N6	2415	2744	389	501	2384	408	406	544
H1N1_01	492	3353	316	573	4316	550	303	419
H1N1_02	594	4548	301	499	4429	409	371	374
H2N1	371	2213	306	552	2877	520	564	378
H2N4	426	4025	333	472	4800	427	457	585
H3N8	399	3600	423	348	3370	413	440	317
H5N2	429	2369	589	378	2124	473	427	576
H5N3	482	3252	595	587	4455	367	427	571
H7N9	545	3992	341	329	4045	572	391	397
H7N7	432	2605	308	434	2606	524	593	442
H9N2_01	353	3754	332	576	3534	451	451	382
H9N2_02	418	3282	551	370	3520	346	571	337

[171] [Table 2]

Sample	효소 + 분변(pH 5.5)		분변 처리군(효소미처리)	
	Furin	Trypsin	pH 5.5	pH 7.4
H5N1_01	2444	2662	358	477
H5N1_02	2281	2879	596	480
H5N6	2833	2732	419	551
H1N1_01	4152	3604	330	339
H1N1_02	4218	3701	399	340
H2N1	2285	2934	571	426
H2N4	3334	4147	354	565
H3N8	3050	4373	356	422
H5N2	2676	2927	487	429
H5N3	4043	3217	420	578
H7N9	4146	3871	358	357
H7N7	2632	2931	546	323
H9N2_01	3117	4842	433	386
H9N2_02	3748	4485	590	504

[172]

[173] 표 1 및 표 2에 나타낸 바와 같이, 효소 미처리군, 비산성조건 실험군에서는 프로프의 형광 변화가 관찰되지 않았다. 그러나, 고병원성 인플루엔자 바이러스 실험군에서 산성 조건이 만족된 경우, 프로브와 트립신을 함께 처리한 경우, 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 실험군 모두에서 형광 변화가 확인 되었고, 푸린을 처리한 경우에는 고병원성 인플루엔자 실험군에서만 형광 변화가 확인되었다. 트립신을 통해서만 고병원성 및 저병원성 인플루엔자를 모두 검출할 수 있고, 푸린을 이용하는 경우 저병원성 인플루엔자를 검출 할 수 있음을 알 수 있다. 또한 효소와 분변을 함께 처리한 경우에도 산성 조건 및 효소가 존재하는 경우 형광 변화가 감지되는 것을 확인하였고, 이로써 다른 물질의 혼합에도 검출 능력을 유지할 수 있음을 확인 하였다.

[174]

[175] [실험예 2] 프로브의 바이러스 검출효과 확인

[176] 제조예 2의 방법에 의해 제조된 프로브에 의한 바이러스 검출효과를 확인 하였다.

[177] 구체적인 실험 방법은 제조예1의 프로브 대신 제조예 2의 프로브를 사용한 것

외에는 상기 실험에 1과 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 형광 강도 측정 결과를 하기 표 3 및 표 4에 나타내었다.

[178]

[179] [Table 3]

Sample	pH 5.5		pH 7.4		Furin + Trypsin		효소 미처리군	
	Furin	Trypsin	Furin	Trypsin	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4
H5N1_01	4682	4001	459	557	4445	469	547	361
H5N1_02	4837	4544	480	588	4261	310	440	404
H5N6	2719	2761	399	302	2203	330	386	422
H1N1_01	374	4023	560	371	3632	353	513	505
H1N1_02	364	4719	306	529	4072	314	540	579
H2N1	333	2117	397	364	2788	479	353	473
H2N4	347	3090	377	400	4530	443	582	363
H3N8	442	4072	552	446	4537	479	507	442
H5N2	323	2340	438	388	2639	425	380	477
H5N3	590	4733	357	310	3136	395	447	584
H7N9	461	4599	537	562	4529	414	303	539
H7N7	401	2067	481	330	2187	330	389	595
H9N2_01	443	4577	591	365	4767	404	327	407
H9N2_02	571	4716	359	566	4144	386	533	354

[180] [Table 4]

sample	효소 + 분변(pH 5.5)		분변 처리군(효소 미처리)	
	Furin	Trypsin	pH 5.5	pH 7.4
H5N1_01	3762	4226	345	572
H5N1_02	3442	4806	523	545
H5N6	2821	2031	318	377
H1N1_01	4923	3062	449	507
H1N1_02	4376	4432	353	521
H2N1	2672	2526	550	396
H2N4	4433	3280	579	403
H3N8	4992	4650	350	337
H5N2	2104	2791	554	338
H5N3	4068	3311	541	318
H7N9	3216	4080	420	467
H7N7	2237	2287	373	375
H9N2_01	4322	3557	419	481
H9N2_02	4266	3219	339	423

[181]

[182] 표 3 및 표 4에 나타낸 바와 같이, 푸린을 처리한 경우, 효소 미처리군, 비산성조건 실험군에서는 프로프의 형광 변화가 관찰되지 않았다. 그러나, 고병원성 인플루엔자 바이러스 실험군에서 산성 조건이 만족된 경우, 프로브와 트립신을 함께 처리한 경우, 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 실험군 모두에서 형광 변화가 확인 되었고, 푸린을 처리한 경우에는 고병원성 인플루엔자 실험군에서만 형광 변화가 확인되었다. 트립신을 통해서만 고병원성 및 저병원성 인플루엔자를 모두 검출할 수 있고, 푸린을 이용하는 경우 저병원성 인플루엔자를 검출할 수 있음을 알 수 있다. 또한 효소와 분변을 함께 처리한 경우에도 산성 조건 및 효소가 존재하는 경우 형광 변화가 감지되는 것을

확인하였고, 이로써 다른 물질의 혼합에도 검출 능력을 유지할 수 있음을 확인하였다.

[183]

[184] [실험예 3] 프로브의 바이러스 검출효과 확인

[185] 제조예 3의 방법에 의해 제조된 프로브에 의한 바이러스 검출효과를 확인하였다.

[186] 구체적인 실험 방법은 제조예1의 프로브 대신 제조예 3의 프로브를 사용한 것 외에는 상기 실험예 1과 동일한 조건으로 실험을 실시하였다. 형광 강도 측정 결과를 하기 표 5 및 표 6에 나타내었다.

[187]

[188] [Table 5]

Sample	pH 5.5		pH 7.4		Furin + Trypsin		효소 미처리군	
	Furin	Trypsin	Furin	Trypsin	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4
H5N1_01	4329	3406	412	594	3497	536	352	345
H5N1_02	4999	4360	342	381	3890	552	396	559
H5N6	2251	2030	328	426	2198	599	554	596
H1N1_01	327	3719	528	361	4656	321	426	338
H1N1_02	490	3152	391	407	4702	485	381	444
H2N1	569	2064	544	406	2655	381	503	395
H2N4	477	3458	482	595	3179	365	380	597
H3N8	313	3397	414	409	4690	320	588	387
H5N2	512	2671	388	586	2919	336	556	351
H5N3	377	3571	421	339	3437	579	478	407
H7N9	528	3249	554	586	3628	528	311	512
H7N7	575	2513	365	570	2470	326	577	386
H9N2_01	461	3514	375	596	3182	390	372	391
H9N2_02	306	3733	585	420	4052	317	475	500

[189]

[190] [Table 6]

Sample	효소 + 분변(pH 5.5)		분변 처리군(효소 미처리)	
	Furin	Trypsin	pH 5.5	pH 7.4
H5N1_01	4846	4804	540	308
H5N1_02	4335	3015	447	508
H5N6	2501	2584	477	317
H1N1_01	4964	4105	520	544
H1N1_02	3146	4577	521	387
H2N1	2286	2367	533	569
H2N4	4127	3409	540	454
H3N8	4245	3828	385	358
H5N2	2660	2614	509	430
H5N3	3157	3571	464	495
H7N9	3222	4952	565	577
H7N7	2175	2493	347	390
H9N2_01	4766	4463	583	450
H9N2_02	4607	4134	381	452

[191]

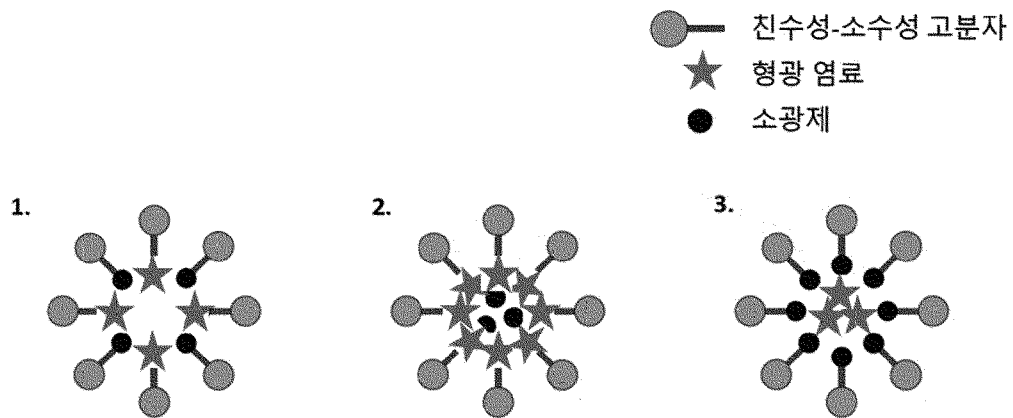
[192] 표 5 및 표 6에 나타낸 바와 같이, 푸린을 처리한 경우, 효소 미처리군, 비산성조건 실험군에서는 프로프의 형광 변화가 관찰되지 않았다. 그러나, 고병원성 인플루엔자 바이러스 실험군에서 산성 조건이 만족된 경우, 프로브와 트립신을 함께 처리한 경우, 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 실험군 모두에서 형광 변화가 확인 되었고, 푸린을 처리한 경우에는 고병원성 인플루엔자 실험군에서만 형광 변화가 확인되었다. 트립신을 통해서만 고병원성 및 저병원성 인플루엔자를 모두 검출할 수 있고, 푸린을 이용하는 경우 저병원성 인플루엔자를 검출할 수 있음을 알 수 있다. 또한 효소와 분변을 함께 처리한 경우에도 산성 조건 및 효소가 존재하는 경우 형광 변화가 감지되는 것을 확인하였고, 이로써 다른 물질의 혼합에도 검출 능력을 유지할 수 있음을 확인하였다.

청구범위

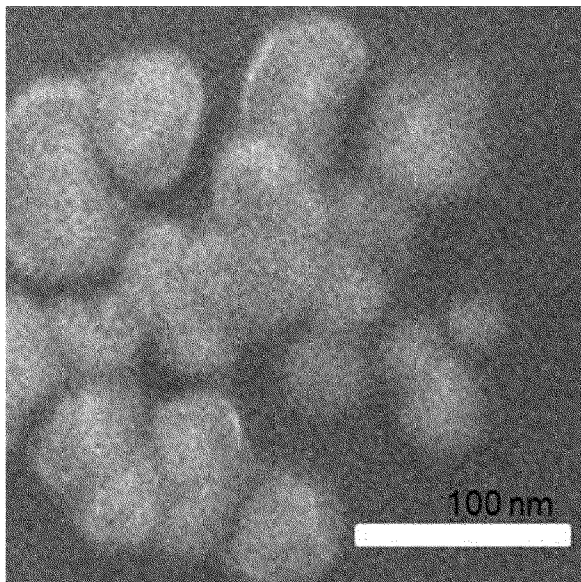
- [청구항 1] 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자 및 상기 생체 분자에 의하여 활성화된 바이러스와 반응하는 프로브를 포함하고,
상기 프로브는 양친성 고분자와 결합된 표지자를 포함하는 바이러스 검출용 키트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 표지자는 자기-소광된 염료(self-quenched dye), 형광 염료, 전기화학발광 물질, 소광제, 발광 염료 및 인광 염료로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 바이러스 검출용 키트
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 프로브는 양친성 고분자와 결합된 염료 및 양친성 고분자와 결합된 소광제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 바이러스 검출용 키트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 양친성 고분자는 친수성 고분자 A 및 소수성 고분자 B를 포함하는 A-B 타입의 블록 공중합체, B-A-B 타입의 삼중 블록 공중합체, 지질 고분자 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 바이러스 검출용 키트.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 프로브는 마이셀(micelle), 폴리머솜(polymersome), 콜로이드솜(colloidsome), 베지클(vesicle), 리포솜(liposome) 또는 액적(droplet)인 바이러스 검출용 키트.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스, 코로나 바이러스 또는 파라믹소 바이러스인 바이러스 검출용 키트.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자는 효소인 바이러스 검출용 키트.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 효소는 푸린, 트립신, 세린, 엔도프로테아제(endoprotease) 및 카복시펩티다아제(carboxypeptidase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 바이러스 검출용 키트.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 키트는 pH 6 이하의 산성 물질을 추가로 포함하는 바이러스 검출용 키트.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,

- 상기 키트는 반응 보조제를 추가로 포함하는 바이러스 검출용 키트.
- [청구항 11] 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자 및 상기 생체 분자에 의하여 활성화된 바이러스와 반응하는 프로브를 포함하고,
상기 프로브는 양친성 고분자와 결합된 표지자를 포함하는 바이러스 검출용 조성물.
- [청구항 12] 개체로부터 수득한 시료를 바이러스의 표면 단백질과 특이적으로 반응하는 생체 분자와 접촉시키는 단계 및
상기 생체 분자와 접촉된 시료를 상기 생체 분자에 의해 활성화된 바이러스와 반응하는 프로브를 접촉시키는 단계를 포함하고,
상기 프로브는 양친성 고분자와 결합된 표지자를 포함하는 바이러스 검출방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 접촉은 pH 6 이하의 조건 하에서 수행되는 것인 바이러스 검출방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 검출방법은 시료와 접촉한 프로브의 변화를 측정하는 단계를 추가로 포함하는 바이러스 검출방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 프로브의 변화는 형광 강도, 발광 강도, 인광 강도, 흡광 강도, 전기적 신호, 표면 증강 라만 분광(surface-enhanced Raman spectroscopy; SERS) 신호, 색 및 프로브의 분산도로 이루어진 군에서 하나 이상의 변화를 측정하는 것인 바이러스 검출방법.

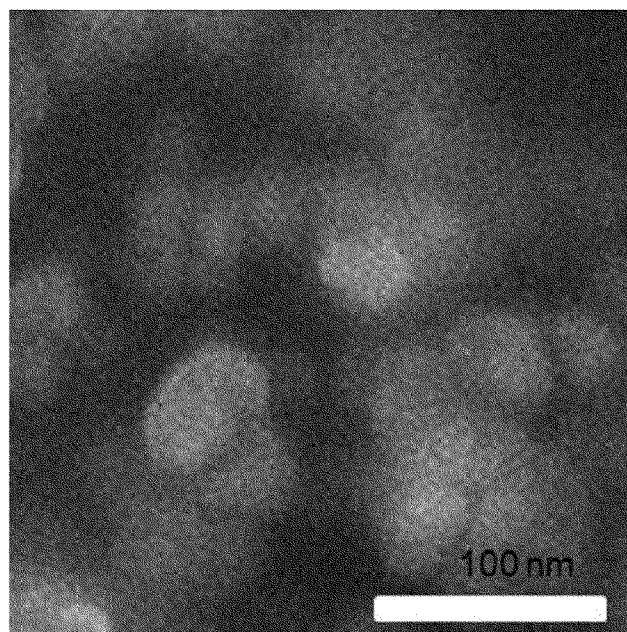
[Fig. 1]



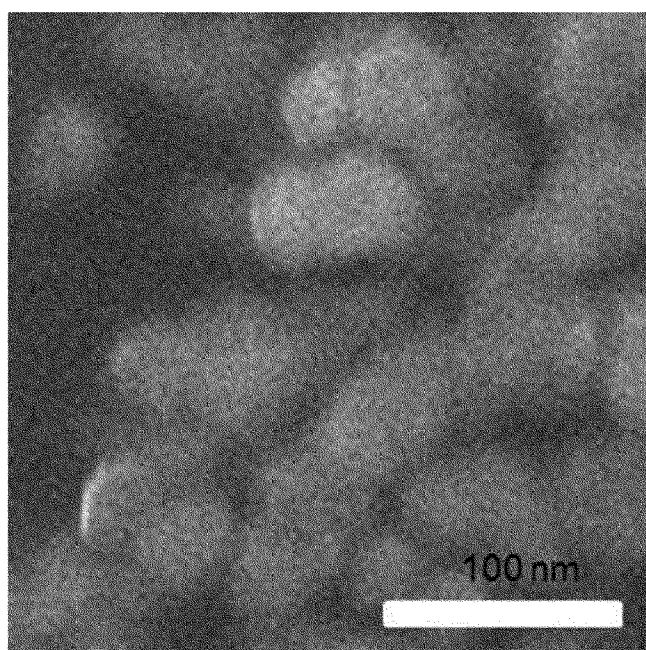
[Fig. 2]



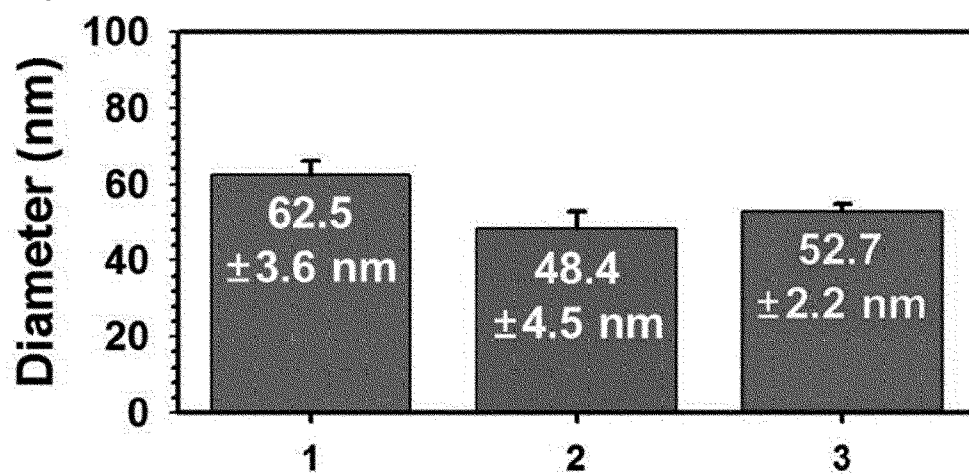
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/000163**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/569(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 21/78(2006.01)i, C12Q 1/37(2006.01)i**

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/569; G01N 33/53; G01N 33/58; G01N 21/78; C12Q 1/37

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: virus, detection, diagnosis, influenza, hemagglutinin, enzyme, trypsin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MITTAL, A. et al., "Kinetics of Influenza Hemagglutinin-Mediated Membrane Fusion as a Function of Technique", Analytical Biochemistry, 2002, vol. 303, pages 145-152 See abstract; and pages 145-146.	1-15
A	GAMBOTTO, A. et al., "Human Infection with Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus", The Lancet, 2008, vol. 371, pages 1464-1475 See the entire document.	1-15
A	BRANDENBURG, B. et al., "Mechanisms of Hemagglutinin targeted Influenza Virus Neutralization", PloS One, 2013, vol. 8, no. 12, paper number e80034, inner pages 1-14 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2009-0044763 A (REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT: ANIMAL AND PLANT QUARANTINE AGENCY)) 07 May 2009 See the entire document.	1-15
A	KR 10-1997-7003432 A (THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 03 July 1997 See the entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 APRIL 2016 (14.04.2016)

Date of mailing of the international search report

14 APRIL 2016 (14.04.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/000163

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0044763 A	07/05/2009	KR 10-0954992 B1	29/04/2010
KR 10-1997-7003432 A	03/07/1997	EP 0760013 A1	09/08/2000
		JP 10-500574 A	20/01/1998
		JP 3621995 B2	23/02/2005
		US 6150131 A	21/11/2000
		WO 95-32309 A1	30/11/1995

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/569(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 21/78(2006.01)i, C12Q 1/37(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/569; G01N 33/53; G01N 33/58; G01N 21/78; C12Q 1/37

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 바이러스, 검출, 진단, 인플루엔자, 헤마글루티닌, 효소, 트립신

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MITTAL, A. 등, 'Kinetics of influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion as a function of technique', Analytical Biochemistry, 2002년, 303권, 페이지 145-152 초록; 및 페이지 145-146 참조.	1-15
A	GAMBOTTO, A. 등, 'Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus', The Lancet, 2008년, 371권, 페이지 1464-1475 문헌 전체 참조.	1-15
A	BRANDENBURG, B. 등, 'Mechanisms of hemagglutinin targeted influenza virus neutralization', PloS One, 2013년, 8권, 12호, 논문번호 e80034, 내부페이지 1-14 문헌 전체 참조.	1-15
A	KR 10-2009-0044763 A (대한민국(관리부서 : 농림수산식품부 국립수의과학검역원) 등) 2009.05.07 문헌 전체 참조.	1-15
A	KR 10-1997-7003432 A (더 마운트 시나이 스쿠올 오브 메디신 오브 더 시티 유니버시티 오브 뉴욕) 1997.07.03 문헌 전체 참조.	1-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 04월 14일 (14.04.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 04월 14일 (14.04.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

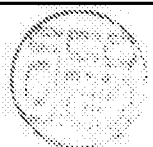
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이동욱

전화번호 +82-42-481-8163



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2009-0044763 A

2009/05/07

KR 10-0954992 B1

2010/04/29

KR 10-1997-7003432 A

1997/07/03

EP 0760013 A1

2000/08/09

JP 10-500574 A

1998/01/20

JP 3621995 B2

2005/02/23

US 6150131 A

2000/11/21

WO 95-32309 A1

1995/11/30