

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2020년 6월 4일 (04.06.2020)

WIPO | PCT

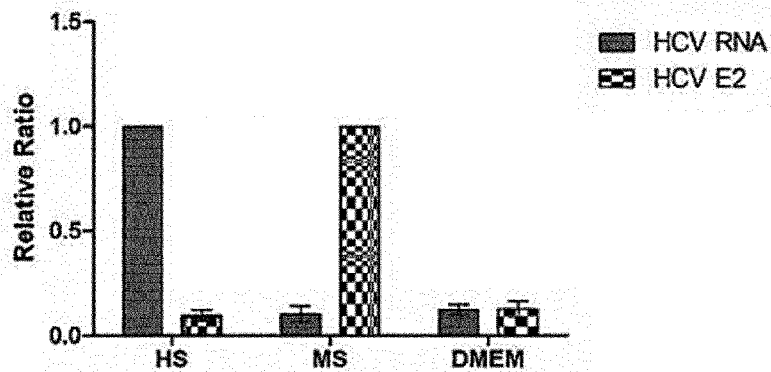
WO 2020/111708 A1

- (51) 국제특허분류: SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
G01N 1/30 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/016321
- (22) 국제출원일: 2019년 11월 26일 (26.11.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0152642 2018년 11월 30일 (30.11.2018)KR
- (72) 발명자: 곁
- (71) 출원인: 이홍재 (LEE, Hong Jai) [KR/KR]; 05501 서울시 송파구 올림픽로 99 잠실엘스아파트 146동 2102호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이재영 (LEE, Jae Young); 06151 서울시 강남구 테헤란로43길 14 청수빌딩 7층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: SAMPLE PRETREATMENT METHOD FOR VIRUS DETECTION

(54) 발명의 명칭: 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting a virus and, more particularly, to a method for detecting a virus having a lipid bilayer envelope, wherein the method enables a surface antigen, which is an envelope protein, to be effectively exposed by lipoproteins for covering all or a part of the envelope protein of the lipid bilayer so that the surface antigen, which is covered by the lipoproteins, is exposed, and thus a virus can be detected with high sensitivity in a short time by using a probe such as an antibody.

(57) 요약서: 본 발명은 바이러스의 검출 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 지질막 이중층 (lipid bilayer)의 외피(envelope)를 포함하는 바이러스의 검출 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 지질막 이중층의 외피 단백질의 전부 또는 일부를 가리는 지방단백질로부터 외피 단백질인 표면 항원을 효율적으로 노출시킴으로써, 상기 지방단백질에 의해 가려져 있던 표면 항원이 드러나도록 하기 때문에 항체 등의 프로브를 사용하여 빠른 시간 내에 고감도로 상기 바이러스를 검출할 수 있다.



WO 2020/111708 A1

명세서

발명의 명칭: 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 외피 바이러스인 C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus; HCV)의 표면 항원을 검출하기 위하여, HCV의 외피(envelope) 단백질인 HCeAg E1, E2를 노출시킬 수 있도록 생물학적 시료를 전처리하는 방법 및 이를 이용하는 HCV 외피 항원의 검출 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 일반적으로 숙주 세포에 감염될 수 있는 능력을 가지고 있는 바이러스 입자인 비리온(virion)은, DNA 또는 RNA의 유전물질을 포함하는 중심부 유전체(genome)와, 이와 같은 유전물질을 보호하는 역할을 하는 단백질 껍질인 캡시드(capsid) 및 외피를 포함하는 바이러스의 경우 외피(envelope)로 구성되어 있다. 외피를 포함하는 바이러스 종류에는 DNA 바이러스인 헤르페스바이러스(Herpesvirus), RNA 바이러스인 플라비바이러스(Flavivirus), 그리고 레트로바이러스(Retrovirus)가 있다.
- [3] 감염을 일으키는 바이러스(Hepatitis virus)는 외피를 포함하는 바이러스(enveloped virus; B형, C형, D형)와 외피를 포함하지 않는 바이러스(non-enveloped virus; A형, E형)로 구분될 수 있다. 상기 외피를 포함하는 바이러스 중에서, 전 세계적으로 감염율이 약 3억 5천만명 정도로 추정되는 B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, 이하 'HBV'라함)는 만성간질환의 주요 원인이다. HBV는 헤파드나바이러스 패밀리에 속하는 DNA 게놈을 갖는 바이러스로서, 급성 및 만성 감염을 유발한다. 특히 한국 및 중국에서 만성 감염자가 약 5 내지 8%에 이르는 HBV 유병율은 현재, 백신의 개발로 어느 정도 저하되었지만 여전히 모체로부터 수직 감염에 따른 발생이 지속되어 만성 감염 환자가 상당수 존재하고 있는 현실이다. HBV의 만성 감염은 간염, 간경변 뿐만 아니라 간암을 유발하며, WHO의 조사에 따르면 약 80%의 간암은 만성 B형 간염이 원인인 것으로 확인될 정도로, 비 감염자에 비하여 간암 발생빈도가 감염자에서 약 300배 높게 나타난다.
- [4] 한편, C형 간염바이러스(Hepatitis C virus, 이하 'HCV'라함)의 경우, 혈액 내에 존재하는 HCV 바이러스 입자를 직접 검출할 수 있는 방법이 개발되어 있지 않고, 다만 HCV RNA와 HCV 항체로 진단하는 실정이다. RNA 자체가 불안정하기 때문에 운반 과정, 온도, 검사 소요 시간 등의 요인에 의해 정확한 양의 측정에 편차가 심할 수 있다. 또한, 종(species)이 다른 경우 현재 인체 검체에 사용되는 RT-PCR를 위하 처리 방법으로는 HCV RNA를 검출할 수 없는 한계가 있다. 감염 직후에는 항체가 형성되지 않기 때문에 항체가 혈액 중에

발생되기 전의 시기인 항체 미형성 기간 동안에는 일반적으로 사용하는 항체 검사를 통해 검출해 낼 수 없다. 또한, C형 간염 환자의 치료에 관여하는 각종 인터페론이나 리바비린과 같은 약제가 매우 유용하게 사용될 수 있으나, 이와 같은 치료 방법의 선택적 적용과 치료 경과의 관찰을 위해서 항체의 양을 측정하는 것만으로는 부족한 현실이다.

- [5] 상기 HCV 유전자의 검출 방법에는 핵산 증폭법(nucleic acid amplification tests; NAT)과 DNA 프로브법이 있으며, 현재 임상 현장에서 널리 이용되고 있다. 핵산 증폭법은 감도가 높은 반면, PCR (Polymerase Chain Reaction)을 실시하기 위한 역전사 과정에서 RNA의 손실과 오염 등이 발생할 수 있고, 특수한 증폭 설비 등을 필요로 한다는 단점이 존재한다. 나아가, DNA 프로브법은 검출 감도가 낮고 결과를 얻을 때까지 약 20 시간을 필요할 뿐만 아니라, HCV 감염자의 혈중 농도에 존재하는 HCV의 RNA는 10^2 내지 10^7 I.U./ml에 불과하다는 한계점이 존재한다.
- [6] 이러한 한계점을 극복하기 위하여, 간편하고 신속히 또 대량으로 스크리닝이 가능한 HCV 표면 항원인 E1, E2 단백질 검출법이 주목받고 있으나, 현재 임상에서 간편하게 HCV의 존재 유무를 검사할 방법이 개발되어 있지 않다. 나아가, 환자의 혈액 내 HCV의 항체 존재 유무에 따라 또는 장시간 많은 비용이 발생하는 HCV RNA를 RT-PCR에 의해 검출해야 하는 한계점이 존재한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 일 목적은 지질막 이중층의 외피를 포함하는 바이러스의 외피 단백질을 검출하기 위한 시료의 전처리 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 지질막 이중층의 외피를 포함하는 바이러스의 외피 단백질을 검출하기 위한 바이러스의 전처리용 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 외피 바이러스의 검출 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명자는 HCV의 표면 E항원(이하, 'HCeAg'라함)이 사람의 혈액 내에서는 저밀도 콜레스테롤(LDL-cholesterol)과 같은 지방단백질(lipoprotein)에 가려져 있어 검출이 어려운 상태를, 고농도의 담즙산, 담즙산 유도체 또는 약 산성을 전처리하는 경우 지방단백질에 의해 가려져 검출이 어려웠던 HCeAg를 노출시켜 매우 효율적으로 검출할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [12] 본 발명의 일 구현 예는 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법을 제공한다.
- [13] 본 발명의 상기 전처리 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적

시료에서, 지질막 이중층(lipid bilayer)의 외피를 포함하는 외피 바이러스를 분리하는 단계; 및 상기 외피 바이러스에 담즙산, 담즙산 유도체 및 pH 조절제로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 처리하는 단계를 포함한다.

[14] 본 발명의 상기 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스란, DNA 또는 RNA와 같은 유전물질을 포함하는 중심부 유전체 (genome)와, 이와 같은 유전물질을 보호하는 역할을 하는 단백질 껍질인 캡시드 (capsid) 및 지질막 이중층 (lipid bilayer)과 같은 지방단백질을 포함하는 외피 (envelope)로 구성된 외피 바이러스일 수 있다.

[15] 본 발명의 상기 바이러스는 바이러스 자체를 구성하는 캡시드 이외에 지질막 이중층을 포함하는 외피를 더 포함하고 있는 바이러스라면 모두 포함될 수 있고, 예를 들면, DNA를 유전물질로 하는 헤파드나바이러스 (hepadnavirus), 폭스바이러스 (Poxvirus), 헤르페스바이러스 (Herpesvirus) 등일 수 있고, RNA를 유전물질로 하는 코로나바이러스 (Coronavirus), 필로바이러스 (filovirus), 랍도바이러스 (rhabdovirus) 아레나바이러스 (arenavirus), 플라비바이러스 (flavivirus), 그리고 레트로바이러스 (Retrovirus) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 간염 바이러스 (Hepatitis virus)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 HCV(Hepatitis C virus)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[16] 본 발명의 상기 처리하는 단계는 지질막 이중층으로부터 외피 단백질을 노출시키는 것일 수 있다. 상기 외피 바이러스 특히, HCV는 게놈 RNA가 코어 단백질에 의해 패키징되고, 이를 둘러싸는 지질막 이중층에 외피 단백질, 예를 들면, 상기 외피 바이러스의 표면 항원 E1 또는 E2와 같은 HCcAg이 앵커링 되어 있는 형태로 외피 바이러스 감염 환자 혈중 내 존재하며, 혈중 내 존재하는 지방단백질에 의해 HCcAg의 일부 또는 전부가 가려지거나 결합된 형태로 존재한다. 따라서, 본 발명의 목적상 상기 담즙산 또는 담즙산 유도체나, pH 조절제를 이용하여 시료의 산성도를 조절하는 경우, 한번의 단계를 통해 지방단백질에 의해 검출이 어렵던 HCcAg가 외부로 노출됨으로써, 프로브 또는 항체를 이용한 검출에 적합한 상태로 만들 수 있다는 장점이 존재한다.

[17] 본 발명의 상기 담즙산은 인간의 경우, 간에서 콜레스테롤로부터 합성되는 1차 담즙산으로 콜린산(choilic acid)과 케노데옥시콜산 (chenodeoxycholic acid)으로 나누어지며, 2차 담즙산은 대장에서 장내 세균에 의해 대사되어, 콜산이 디옥시콜린산 (deoxycholic acid) 또는 케노데옥시콜산이 리토콜린산 (lithocholic acid)으로 대사된다. 또한, 상기 담즙산은 간에서 글리신 (glycine)이나 타우린 (taurine)과 접합 (conjugation) 되어 타우로콜린산 (taurocholic acid)과 글라이코콜린산 (glycocholic acid) (이상 콜산 유도체, derivatives of cholic acid), 타우로케노데옥시콜린산 (taurochenodeoxycholic acid)과 글라이코케노데옥시콜린산 (glycochenodeoxycholic acid) (이상 케노데옥시콜산 유도체, derivatives of chenodeoxycholic acid), 글라이코데옥시콜린산 (glycodeoxycholic acid)과 타우로데옥시콜린산 (taurodeoxycholic acid),

데옥시콜산 유도체, derivatives of deoxycholic acid), 글라이코리토콜린산 (glycolithocholic acid)과 타우로리토콜린산 (tauroolithocholic acid), 리토콜산 유도체(derivatives of lithocholic acid)으로 변환될 수 있다. 한편, 설치류의 2차 담즙산은 뮤리콜린산 (muricholic acid)이 존재한다.

- [18] 본 발명의 상기 담즙산 또는 담즙산 유도체는 콜린산, 케노데옥시콜산, 디옥시콜린산, 리토콜린산, 타우로콜린산, 글라이코콜린산, 타우로케노데옥시콜린산, 글라이코케노데옥시콜린산, 글라이코데옥시콜린산, 타우로데옥시콜린산, 글라이코리토콜린산, 타우로리토콜린산 및 뮤리콜린산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 타우로케노디옥시콜린산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [19] 본 발명의 상기 담즙산 또는 담즙산 유도체는 10 내지 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 처리될 수 있고, 바람직하게는 50 내지 100 $\mu\text{mol/L}$ 더욱 바람직하게는 80 내지 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 처리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 담즙산의 농도가 10 $\mu\text{mol/L}$ 미만인 경우에는 상기 바이러스의 외피를 가리는 지질단백질 등으로부터 상기 외피 단백질을 충분히 노출시킬 수 없고, 100 $\mu\text{mol/L}$ 초과인 경우에는 상기 바이러스의 외피를 포함한 입자 구조의 안정성 등이 저해될 수 있다.
- [20] 본 발명에서 상기 pH 조절제는, 상기 HCV를 포함한 혈청 내 pH를 조절하여 담즙산 또는 담즙산 유도체가 외피를 가리고 있는 지질단백질로부터 외피 단백질을 노출시킬 수 있도록 하는 것으로서, 예를 들면, 염산, 황산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 트리클로로아세트산, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아 등일 수 있고, 바람직하게는 염산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [21] 상기 pH 조절제는 상기 HCV의 배양 환경의 pH를 pH 4 내지 pH 7로 적정하는 것일 수 있다. 바람직하게는 pH 5 내지 pH 7일 수 있다. 상기 HCV의 배양 환경이 pH 4 미만 또는 pH 7 초과인 경우, 단백질로 구성되어 있는 외피 바이러스, 특히 HCV의 표면 단백질의 변성이 유도되어 오히려 검출 효율이 저하될 수 있다.
- [22] 본 발명의 상기 목적하는 개체는 외피 바이러스, 특히 HCV가 감염되어 있거나 감염되어 있을 것으로 예상되는 개체로서, 사람(정상인 또는 환자)뿐만 아니라, 동물(실험 동물 등)을 모두 포함할 수 있다.
- [23] 본 발명의 상기 생물학적 시료는 목적하는 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 세포 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [24] 본 발명의 상기 전처리 방법은 상기 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스의 검출을 위한 통상적인 방법을 수행함과 동시에 또는 그 이전에 수행될 수 있다.
- [25]
- [26] 본 발명의 다른 구현 예에서는 바이러스 검출을 위한 시료 전처리용 조성물을

제공한다.

- [27] 본 발명의 상기 조성물은 담즙산, 담즙산 유도체 및 pH 조절제로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함한다.
- [28] 본 발명에서 상기 조성물에 의해 지질막 이중층, 특히 지방단백질에 의해 일부 또는 전부가 가려져 있는 외피 단백질, 특히 HCV의 외피 단백질인 HCEAg가 노출될 수 있도록 함으로써 상기 외피 바이러스의 검출 효율을 현저하게 증대시킬 수 있다.
- [29] 본 발명의 상기 조성물은 담즙산 또는 담즙산 유도체 이외에, 지방단백질 등에 의해 전부 또는 일부가 가려져 있는 HCEAg를 노출시킬 수 있는 물질, 예를 들면 계면 활성제, 산성화제 등과 같은 물질을 더 포함할 수 있다.
- [30] 본 발명의 상기 조성물에서 사용되는 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스는 앞서 언급한 전처리 방법에 사용될 수 있기 때문에, 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스, 담즙산, 담즙산 유도체, pH 조절제 등과 관련된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [31]
- [32] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 외피 바이러스의 검출 방법을 제공한다.
- [33] 본 발명의 상기 외피 바이러스의 검출 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스를 분리하는 단계; 상기 외피 바이러스에 담즙산, 담즙산 유도체 및 pH 조절제로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 처리하는 단계; 및 상기 바이러스에 특이적인 항체를 첨가하는 단계를 포함한다.
- [34] 본 발명의 상기 외피 바이러스의 검출 방법은 본 발명의 상기 외피 바이러스 검출을 위한 전처리 방법 이후에 바이러스를 검출하기 위한 통상의 방법, 예를 들면 바이러스의 항원에 특이적인 항체와 반응시키는 단계를 더 수행함으로써 달성될 수 있다. 상기 외피 바이러스의 검출 방법은 상기 바이러스에 특이적인 항체가 항원-항체 반응이 일어난 경우 상기 생물학적 시료에 외피 바이러스가 존재하는 것으로 판단할 수 있다.
- [35] 본 발명의 상기 항체는 상기 바이러스의 외피 단백질, 예를 들면 표면 항원 E1 또는 E2 단백질에 특이적인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [36] 본 발명의 상기 외피 바이러스를 검출하기 위한 통상의 방법은 면역조직화학염색, 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석 (Floresence immunoassay: FIA) 및 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 본 발명의 상기 외피 바이러스의 검출 방법에서 사용되는 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스는 앞서 언급한 전처리 방법 이후에 수행될 수

있는 것으로, 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스, 담즙산, 담즙산 유도체, pH 조절제, 생물학적 시료, 외피 단백질, 외피 단백질의 노출, 목적하는 개체 등과 관련된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [38] 본 발명의 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법은 지질막 이중층의 외피 단백질의 전부 또는 일부를 가리는 지방단백질로부터 외피 단백질인 표면 항원을 효율적으로 노출시킴으로써, 상기 지방단백질에 의해 가려져 있던 표면 항원이 드러나도록 하기 때문에 항체 등의 프로브를 사용하여 빠른 시간 내에 고감도로 상기 바이러스를 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [39] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 HCV 숙주 및 비숙주 체액성 환경에 따른 HCV의 E2 표면 항원 및 유전체의 안정성에 관한 결과를 나타낸 것이다.
- [40] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 HCV 숙주 및 비 숙주 체액성 환경에 따른 HCV의 파괴, 즉 지방단백질로부터 노출되는 HCV 코어 항원의 검출에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- [41] 도 3 a 내지 d는 본 발명의 일 실시예에 따른 HCV의 숙주 및 비 숙주 체액성 환경에 따른 HCV 존재 유무에 따른 지질과 상호작용에 관한 결과를 나타낸 것이다.
- [42] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 담즙산 유도체의 농도에 따른 HCV의 RNA 검출 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [43] 도 5은 본 발명의 일 실시예에 따른 담즙산 유도체의 농도에 따른 HCV의 E2 표면 항원의 검출 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 6a 및 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 HCV의 배양 환경에서 pH 변화에 따른 HCV의 RNA 및 E2 표면 항원 검출 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [45] 본 발명의 일 구체 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 지질막 이중층(lipid bilayer)의 외피를 포함하는 외피 바이러스를 분리하는 단계; 및 상기 외피 바이러스에 담즙산, 담즙산 유도체 및 pH 조절제로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 처리하는 단계를 포함하는, 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법을 제공한다.
- [46] 본 발명의 다른 구체 예에서는 담즙산, 담즙산 유도체 및 pH 조절제로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 외피 바이러스 검출을 위한 시료 전처리용 조성물을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [47] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에

따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[48]

[49] 실시예

[50]

[51] [준비예] 외피 바이러스 분리

[52] 원주 세브란스 병원(윤리위원회 승인 번호, CR316312)으로부터 정상 혈청(HBV(Hepatitis B virus) 및 HCV(Hepatitis C virus) 음성)과 만성 C형 간염 환자 혈청(HCV 양성)을 분양 받았다. 또한, 쥐(Balb c)의 혈청(cat no. IMSBC-SER)은 이노베이티브(Inovative)사로부터 구입하였다.

[53] 20 g/L의 수크로즈, 50 mmol/L의 Tris-HCl(pH 7.5) 및 30 mmol/L의 NaCl이 포함된 완충 버퍼(cushion buffer)가 3 ml 들어있는 튜브에 상기 혈청 각각을 넣고, 이 혼합물을 220,000 g의 RPM으로 1시간 동안 원심분리 하였다. 이후, 상기 튜브에서 상등액을 제거하고, 상기 튜브에 5 ml의 PBS(Phosphate-buffered saline) 용액을 넣어 희석하였다. 그런 다음, 상기 희석액에 포함되어 있는 HCV의 RNA를 로슈사 (Roche)의 COBAS TaqMan system을 이용한 Real-time PCR을 통해 측정하여 분리된 바이러스의 농도를 측정하였다.

[54]

[55] [실시예 1] HCV의 E2 표면 항원 및 유전체의 안정성 확인

[56] 비 숙주 체액성 환경이 HCV의 유전체의 안정성과 표면 항원성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다.

[57] 인간의 혈액으로부터 분리된 혈청, 마우스의 혈액으로부터 분리된 혈청 및 세포 배양 배지인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 상기 제조예에서 분리된 HCV를 넣고, 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양액에 포함되어 있는 HCV의 RNA의 농도를 로슈사 (Roche)의 COBAS TaqMan system을 이용한 Real-time PCR을 통해 측정하였다.

[58] 또한, 100 μ l/well의 HCV Anti-E2 항체 (Santa Cruz biotech, cat no. sc-57769, 미국)를 마이크로 ELISA 플레이트에 넣고, 4 °C에서 밤새도록 반응시킨 뒤에, 200 μ l/웰의 1X ELISA/ELISPOT Diluent(Invitrogen, 미국)를 추가로 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 각각의 웰에, 상기 HCV가 포함된 배양액을 넣은 뒤, 2시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 100 μ l의 1X ELISA/ELISPOT Diluent에 1: 30의 비율로 희석된 HCV Anti-E2 항체를 상기 플레이트에 넣고, 1시간 동안 반응시킨 뒤에 100 μ l의 HRP가 결합된 anti-rabbit IgG와 함께 30분간 추가로 반응시켰다. 이후 각각의 웰에 100 μ l의 TMB 용액(Invitrogen, 미국)을 넣고, 450 nm에서 마이크로리더기를 통해 흡광도를 측정하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[59] 도 1에서 보는 바와 같이, HCV의 RNA는 인간의 혈청(HS)에서 높은 수준으로 존재하는 반면, 마우스(MS)의 혈청과 DMEM에서는 매우 낮은 수준으로

존재하였다. HCV의 E2 항원의 경우에는 인간의 혈청에서는 낮은 수준으로 존재하였으나, 마우스의 혈청에서는 매우 높은 수준으로 존재하였다.

- [60] 상기 결과를 통해, HCV RNA는 숙주인 인간의 혈청에서 비숙주 혈청에서 보다 월등히 높게 존재하여, 즉 바이러스 입자는 수적으로 많이 존재하지만, HCV E2는 비숙주인 마우스 혈청에서 높게 나와, 이로 미루어 숙주인 인간 혈청 내에서는 HCV의 외피가 지질단백질 등에 의해 가려져 있음을 알 수 있다. 한편 인간과 마우스의 담즙산 구성 비율이 상이하기 때문에, 즉 수용성이 더 높은 담즙산 (dihydroxy bile acid)이 마우스에 높은 비율로 존재하여, 담즙산의 종류에 따른 외피단백질의 노출 정도가 영향을 받는다는 것을 알 수 있다.

[61]

[62] [실시예 2] 비 숙주 체액성 환경에서 HCV의 코어 확인

- [63] HCV의 비숙주인 마우스 혈청에서 HCV RNA가 현저히 감소되고, E2가 증가되는 이유가 HCV의 파괴 때문인지 알고자, HCV의 코어 (core) 단백질의 검출 여부를 확인하였다.

- [64] 상기 실시예 1과 동일하게 인간의 혈액으로부터 분리된 혈청, 마우스의 혈액으로부터 분리된 혈청 및 세포 배양 배지인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 상기 제조예에서 분리된 HCV를 넣고, 1시간, 2시간 또는 6시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1의 E2 항원 검출과 동일한 ELISA 방식으로 HCV 코어의 검출 여부를 확인하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 다만, ELISA에 사용되는 항체는 항-HCV 코어 항원 항체(anti-HCV core antigen antibody) (Abcam, cat no. ab50288)을 사용하였다.

- [65] 도 2에서 보는 바와 같이, HCV를 마우스의 혈청에서 배양한 경우 1시간에서 숙주보다 비숙주인 마우스 혈청에서 HCV 코어의 검출이 높게 나왔고, 시간이 흐르면서 비숙주 마우스 혈청과 세포 배양 배지 DMEM에서 숙주 사람 혈청에서보다 HCV 코어의 검출 정도가 증가된 것을 확인하였다.

- [66] 상기 결과를 통해, 비 숙주 환경에서 외피로 둘러싸인 코어가 노출된 점으로 미루어 HCV 바이러스 입자가 파괴되고, 이를 통해 외피의 검출이 증가될 수 있음을 알 수 있다.

[67]

[68] [실시예 3] HCV의 지질 상호작용 확인

- [69] 상기 실시예 1과 동일하게 인간의 혈액으로부터 분리된 혈청, 마우스의 혈액으로부터 분리된 혈청 및 세포 배양 배지인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 상기 제조예에서 분리된 HCV를 넣고, 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 배양액 내 존재하는 지질의 양을 ADVIA 1800 (Siemens)을 이용하여 측정하고, 그 결과를 도 3a 내지 3d에 나타내었다.

- [70] 도 3a 내지 3d에서 보는 바와 같이, HCV 유무와 관계없이 마우스의 혈청에 포함되어 있는 콜레스테롤의 양에 비해 인간의 혈청에 포함되어 있는 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 트리글리세라이드 모두 높은

수준으로 존재하였다. 또한, HCV가 존재하는 경우 인간의 혈청에서는 상기 콜레스테롤의 양이 감소되는 반면, 마우스의 혈청에서는 HCV가 존재하는 경우에도 콜레스테롤의 양에 변화를 확인할 수 없었다.

[71] 상기 결과를 통해, 비숙주 마우스의 혈청에서 보다 인간의 혈청에서 HCV의 표면인 외피에 지질이 잘 붙는 조건으로 인간 혈액 내에서는 HCV는 지질이나 지단백질에 의해 외피 단백질이 잘 가려짐을 알 수 있다.

[72]

[73] [실시예 4] 담즙산에 의한 HCV의 E2 표면 항원 및 유전체의 안정성 확인

[74] 상기 실시예들의 결과를 바탕으로 인간과 마우스의 혈청 내 포함되어 있는 담즙산의 조성이 상이하다는 점에 기초하여, 담즙산에 의해 HCV가 어떠한 영향을 받는지 확인하였다.

[75] 상기 실시예 1과 동일하게 세포 배양 배지인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 상기 제조예에서 분리된 HCV를 넣고, 담즙산 tCA (taurocholate) 또는 tCDCA(taurochenodeoxycholate)를 0 내지 100 $\mu\text{mol/L}$ 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 HCV의 RNA와 HCV의 E2 항원을 검출하여, 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[76] 도 4에서 보는 바와 같이, 담즙산 tCA 100 $\mu\text{mol/L}$ 를 처리한 경우에서 다른 농도보다 또 다른 담즙산 tCDCA보다 월등히 HCV의 RNA가 검출되었다.

[77] 도 5에서 보는 바와 같이, HCV의 E2 항원은 처리되는 담즙산의 용량 의존적으로 증가되었고, tCDCA를 처리한 경우에서 tCA를 처리한 경우보다 HCV의 표면 항원성이 더 높은 것을 확인하였다.

[78] 상기 결과를 통해, 담즙산 또는 담즙산 유도체를 HCV에 처리하는 경우 HCV의 외피를 가리고 있는 지단백질 등이 제거되어 노출된 HCV의 E2 표면 항원을 검출함으로써 HCV 감염을 더욱 효율적으로 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[79]

[80] [실시예 5] pH에 의한 HCV의 E2 표면 항원 및 유전체의 안정성 확인

[81] 담즙산이 포함되지 않은 세포 배양 배지인 DMEM에 상기 제조예에서 분리된 HCV를 400 μl 의 볼륨으로 넣고, 상기 DMEM의 pH를 HCL 또는 NaOH를 이용하여 pH 5, 6, 7.4, 8, 9 및 10으로 조정된 뒤, 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 HCV의 RNA와 HCV의 E2 항원을 검출하여, 그 결과를 도 6의 A 및 B에 나타내었다.

[82] 도 6a 및 6b에서 보는 바와 같이, 염기성인 pH9 및 pH10에 비하여, 약 산성인 pH 5, 6 및 7의 범위에서 검출되는 HCV의 RNA가 높은 수준으로 검출되었다. 또한, HCV E2 항원의 경우 pH 5 내지 pH 7에서 염기성에 비해 높은 수준으로 검출되었다.

[83] 상기 결과를 통해 pH를 약 산성 과 중성 범위인 pH 5 - pH 7의 환경에 HCV를 노출시키는 경우, HCV의 표면 항원과 RNA가 높은 수준으로 노출되어 HCV의 검출을 더욱 용이하게 할 수 있음을 알 수 있다.

[84]

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

산업상 이용가능성

[86] 본 발명은 바이러스의 검출 방법은 지질막 이중층의 외피 단백질의 전부 또는 일부를 가리는 지방단백질로부터 외피 단백질인 표면 항원을 효율적으로 노출시킴으로써, 상기 지방단백질에 의해 가려져 있던 표면 항원이 드러나도록 하기 때문에 항체 등의 프로브를 사용하여 빠른 시간 내에 고감도로 상기 바이러스를 검출할 수 있다.

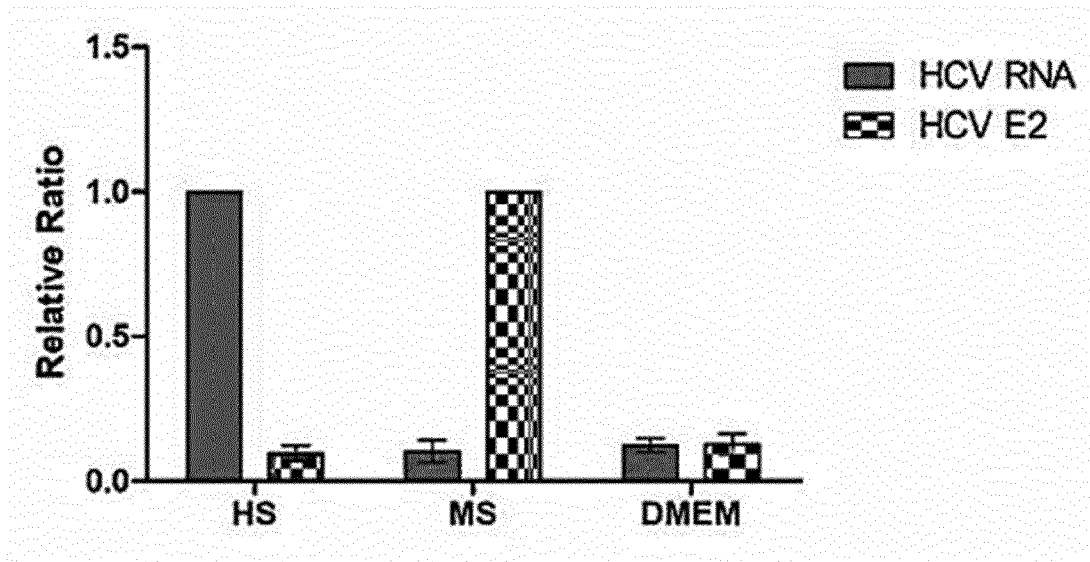
청구범위

- [청구항 1] 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 지질막 이중층(lipid bilayer)의 외피를 포함하는 외피 바이러스를 분리하는 단계; 및 상기 외피 바이러스에 담즙산, 담즙산 유도체 및 pH 조절제로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 처리하는 단계를 포함하는, 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 처리하는 단계는 지질막 이중층으로부터 외피 단백질을 노출시키는 것인, 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 외피 단백질은 외피 바이러스의 표면 항원 E1 또는 E2 단백질인 것인, 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스는 간염 바이러스(Hepatitis virus)인 것인, 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 간염 바이러스는 HCV(Hepatitis C virus)인 것인, 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 담즙산 유도체는 케노데옥시콜산 (chenodeoxycholic acid), 디옥시콜린산 (deoxycholic acid), 리토콜린산 (lithocholic acid), 타우로콜린산 (taurocholic acid), 글라이코콜린산 (glycocholic acid), 타우로케노데옥시콜린산 (taurochenodeoxycholic acid), 글라이코케노데옥시콜린산 (glycochenodeoxycholic acid), 글라이코데옥시콜린산 (glycodeoxycholic acid), 타우로데옥시콜린산 (taurodeoxycholic acid), 글라이코리토콜린산 (glycolithocholic acid), 타우로리토콜린산 (tauroolithocholic acid) 및 뮤리콜린산 (muricholic acid)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 담즙산 또는 담즙산 유도체는 10 내지 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 처리되는 것인, 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 pH 조절제는 상기 외피 바이러스의 배양 환경의 pH를 pH 4 내지 pH 7로 적정하는 것인, 바이러스 검출용 시료의 전처리 방법.
- [청구항 9] 담즙산, 담즙산 유도체 및 pH 조절제로 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 외피 바이러스 검출을 위한 시료

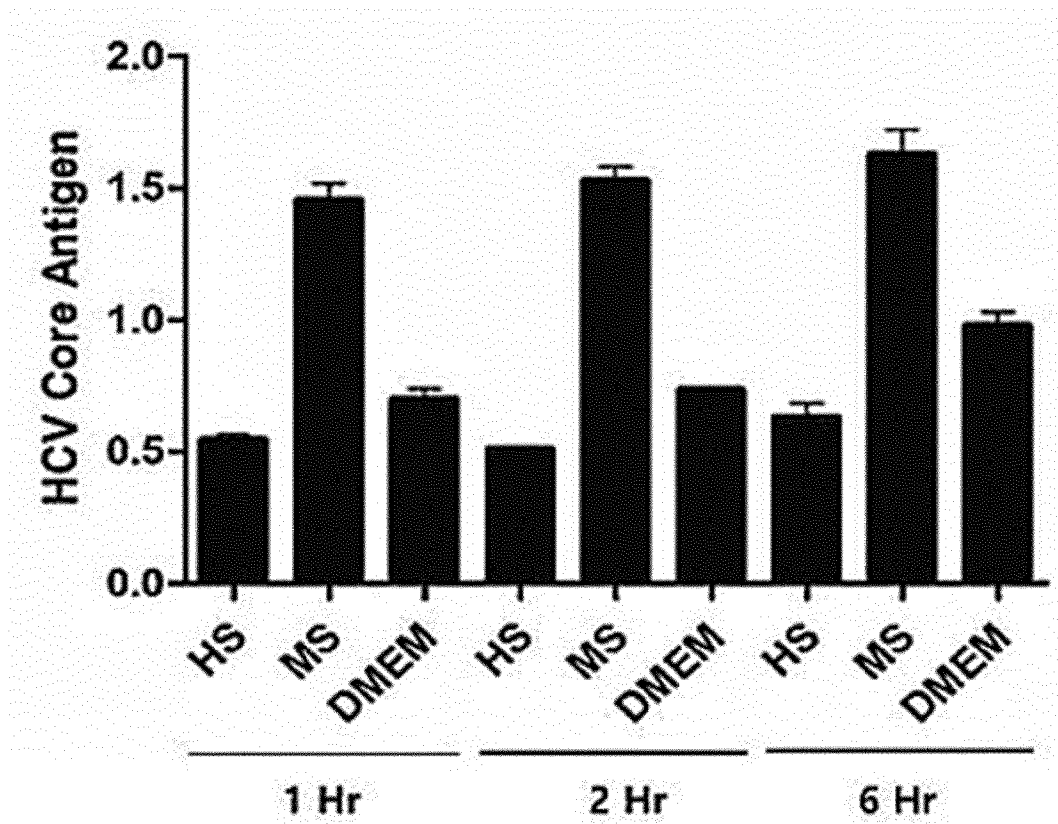
- 전처리용 조성물.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서,
상기 외피 바이러스는 지질막 이중층의 외피를 포함하는 것인, 바이러스 검출을 위한 시료 전처리용 조성물.
- [청구항 11] 제 9항에 있어서,
상기 담즙산 유도체는 케노데옥시콜산, 디옥시콜린산, 리토콜린산, 타우로콜린산, 글라이코콜린산, 타우로케노데옥시콜린산, 글라이코케노데옥시콜린산, 글라이코데옥시콜린산, 타우로데옥시콜린산, 글라이코리토콜린산, 타우로리토콜린산 및 뮤리콜린산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 바이러스 검출을 위한 시료 전처리용 조성물.
- [청구항 12] 제 9항에 있어서,
상기 pH 조절제는 상기 외피 바이러스의 배양 환경의 pH를 pH 4 내지 pH 7로 적정하는 것인, 바이러스 검출을 위한 시료 전처리용 조성물.
- [청구항 13] 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 지질막 이중층의 외피를 포함하는 외피 바이러스를 분리하는 단계;
상기 외피 바이러스에 담즙산, 담즙산 유도체 및 pH 조절제로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 처리하는 단계; 및
상기 바이러스에 특이적인 항체를 첨가하는 단계를 포함하는, 외피 바이러스의 검출 방법.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서,
상기 처리하는 단계는 지질막 이중층으로부터 외피 단백질을 노출시키는 것인, 외피 바이러스의 검출 방법.
- [청구항 15] 제 13항에 있어서,
상기 항체는 외피 바이러스의 외피 단백질의 표면 항원 E1 또는 E2 단백질에 특이적인 것인, 외피 바이러스의 검출 방법.
- [청구항 16] 제 13항에 있어서,
상기 지질막 이중층의 외피 포함하는 외피 바이러스는 간염 바이러스(Hepatitis virus)인 것인, 외피 바이러스의 검출 방법.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서,
상기 간염 바이러스는 HCV(Hepatitis C virus)인 것인, 외피 바이러스의 검출 방법.
- [청구항 18] 제 13항에 있어서,
상기 담즙산 유도체는 케노데옥시콜산, 디옥시콜린산, 리토콜린산, 타우로콜린산, 글라이코콜린산, 타우로케노데옥시콜린산, 글라이코케노데옥시콜린산, 글라이코데옥시콜린산, 타우로데옥시콜린산, 글라이코리토콜린산, 타우로리토콜린산 및 뮤리콜린산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인,

외피 바이러스의 검출 방법.

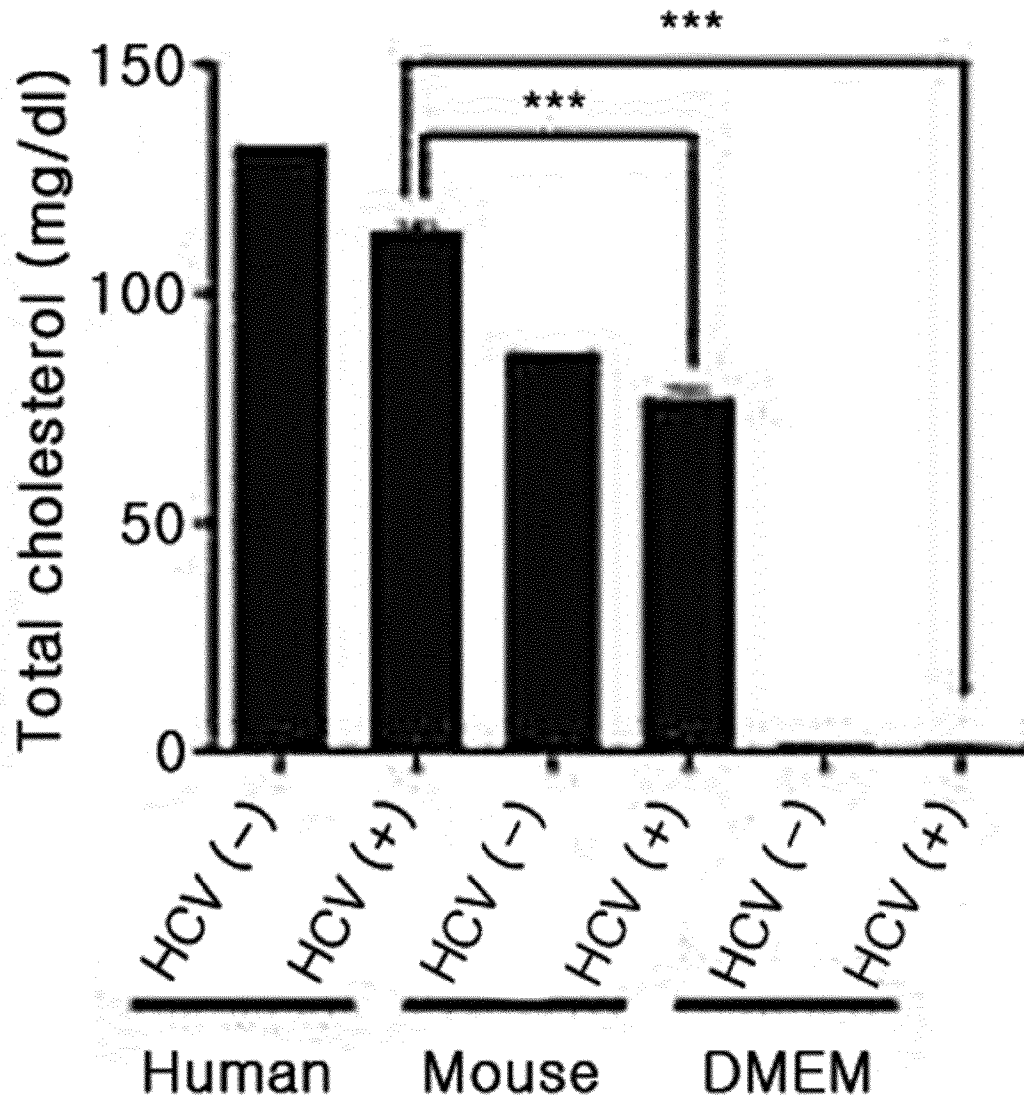
[도1]



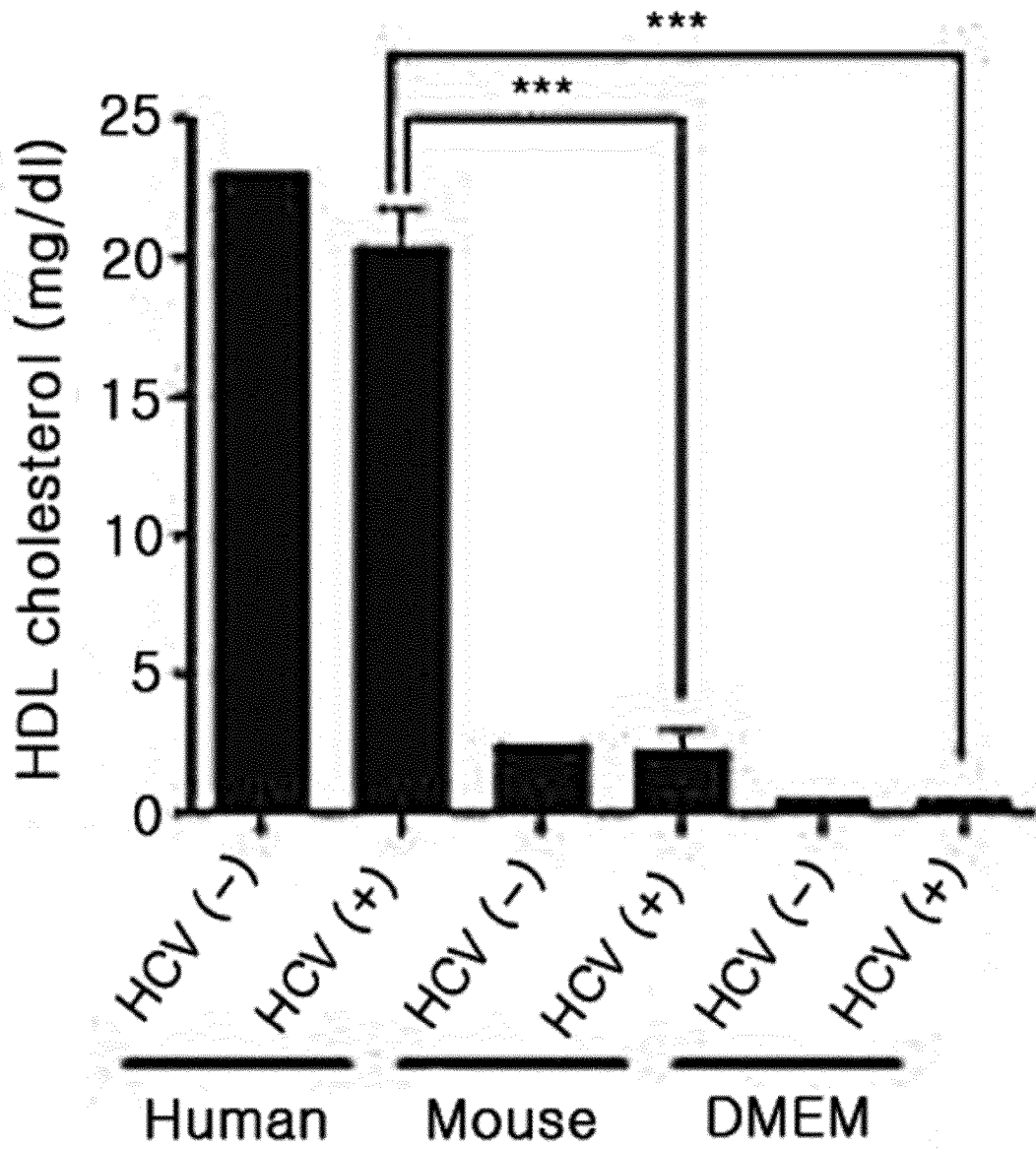
[도2]



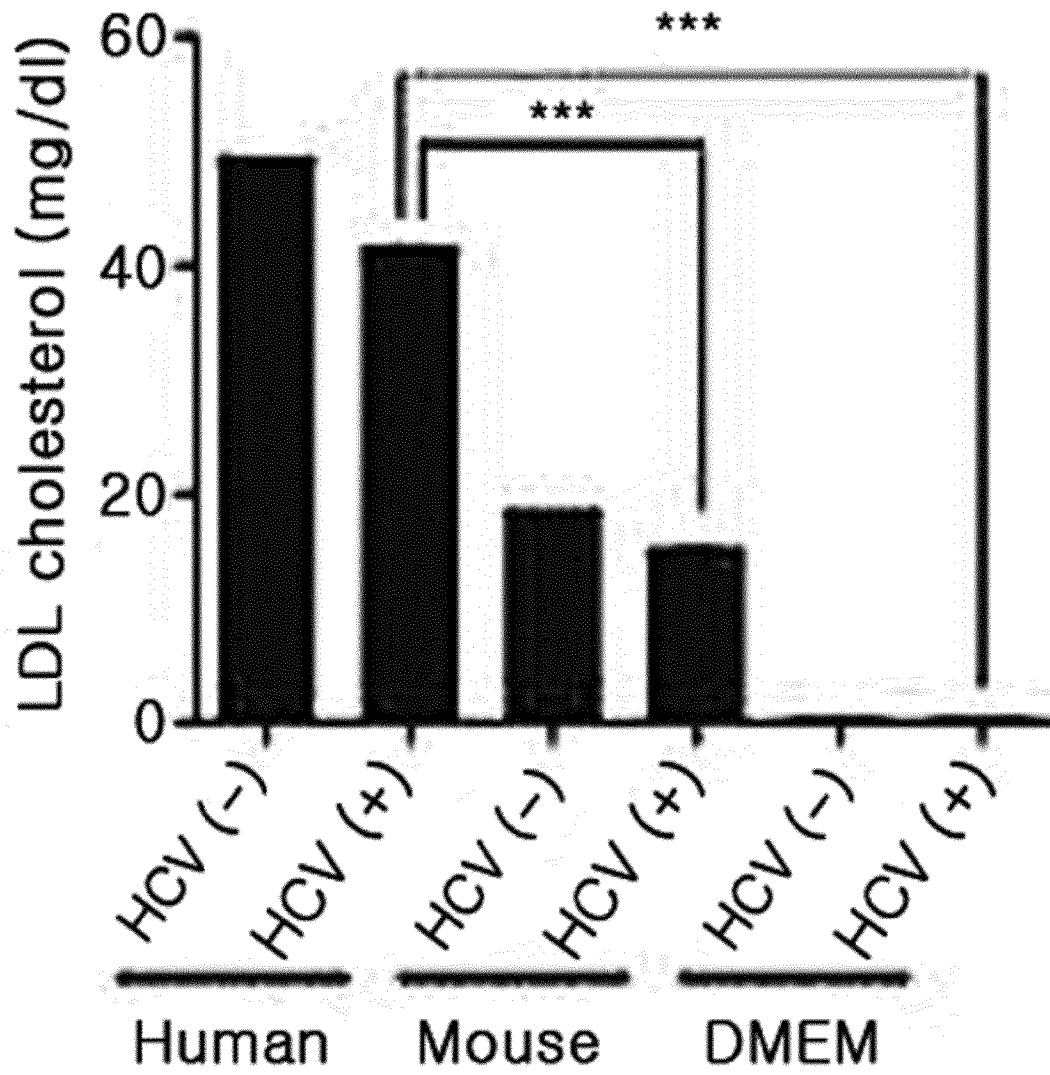
[도3a]



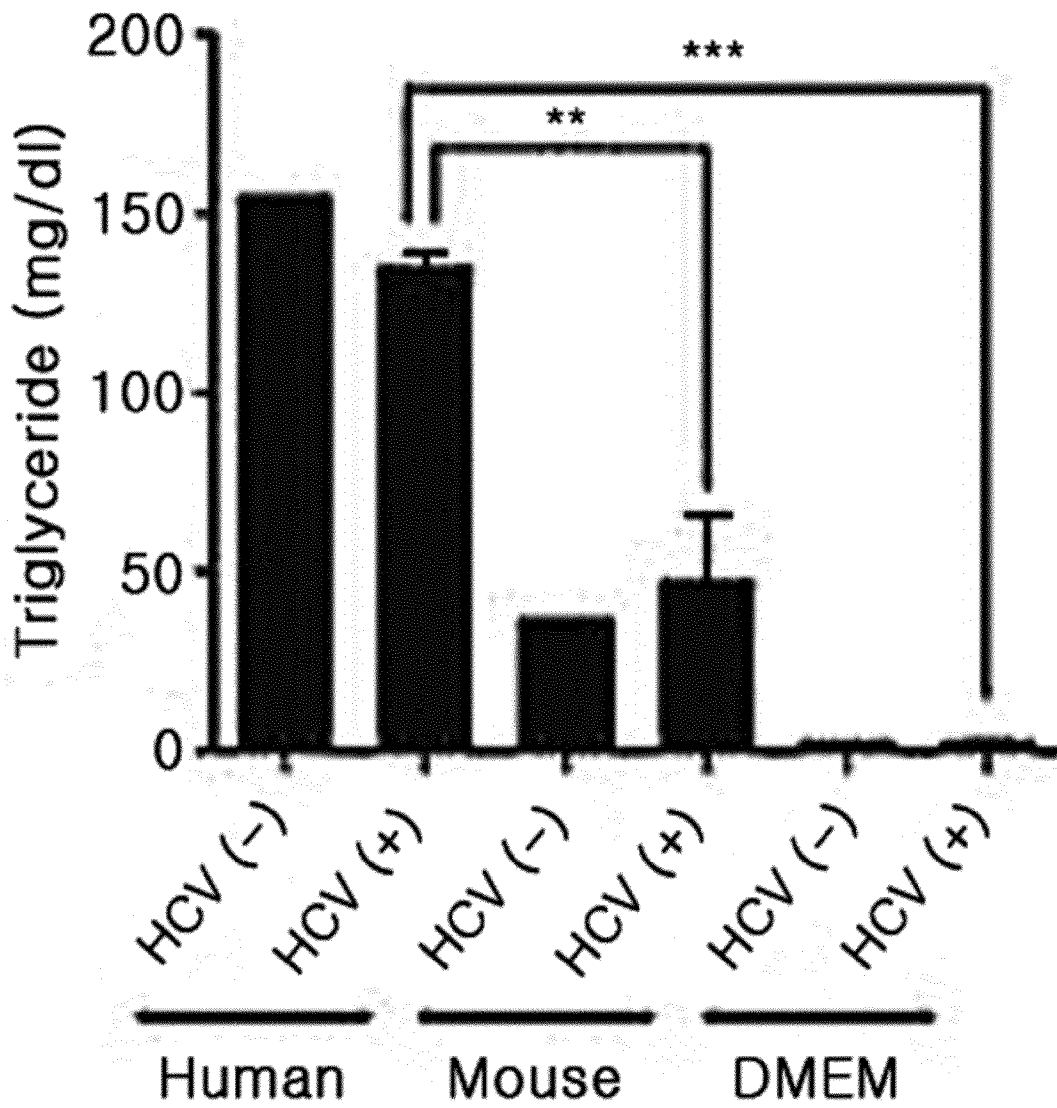
[도3b]



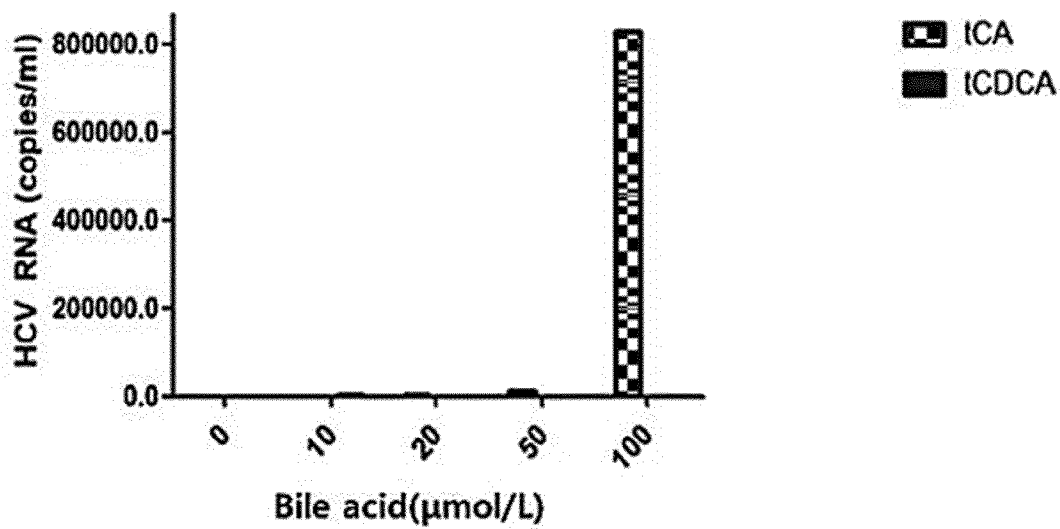
[도3c]



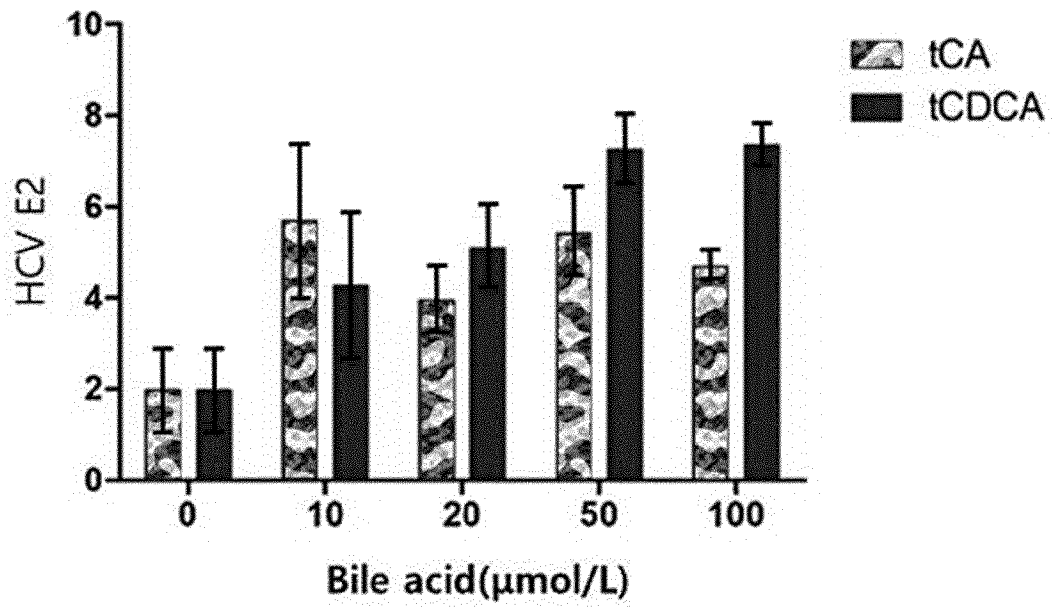
[도3d]



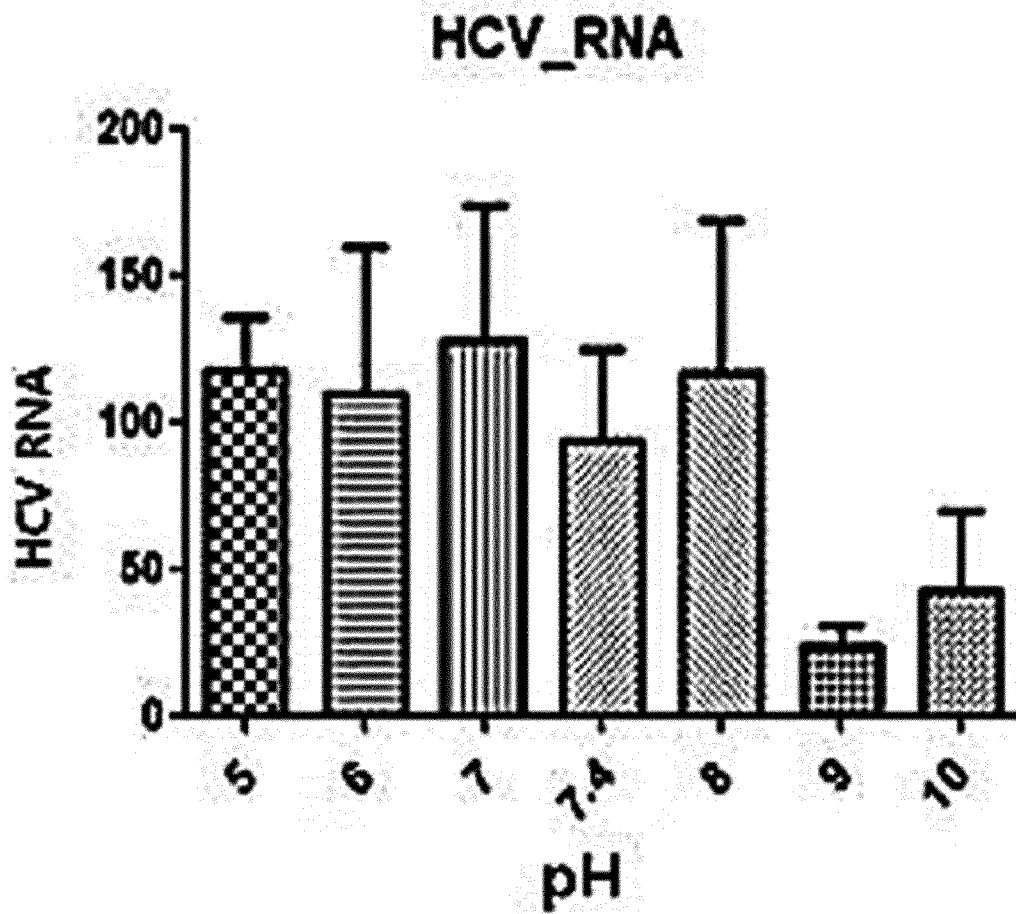
[도4]



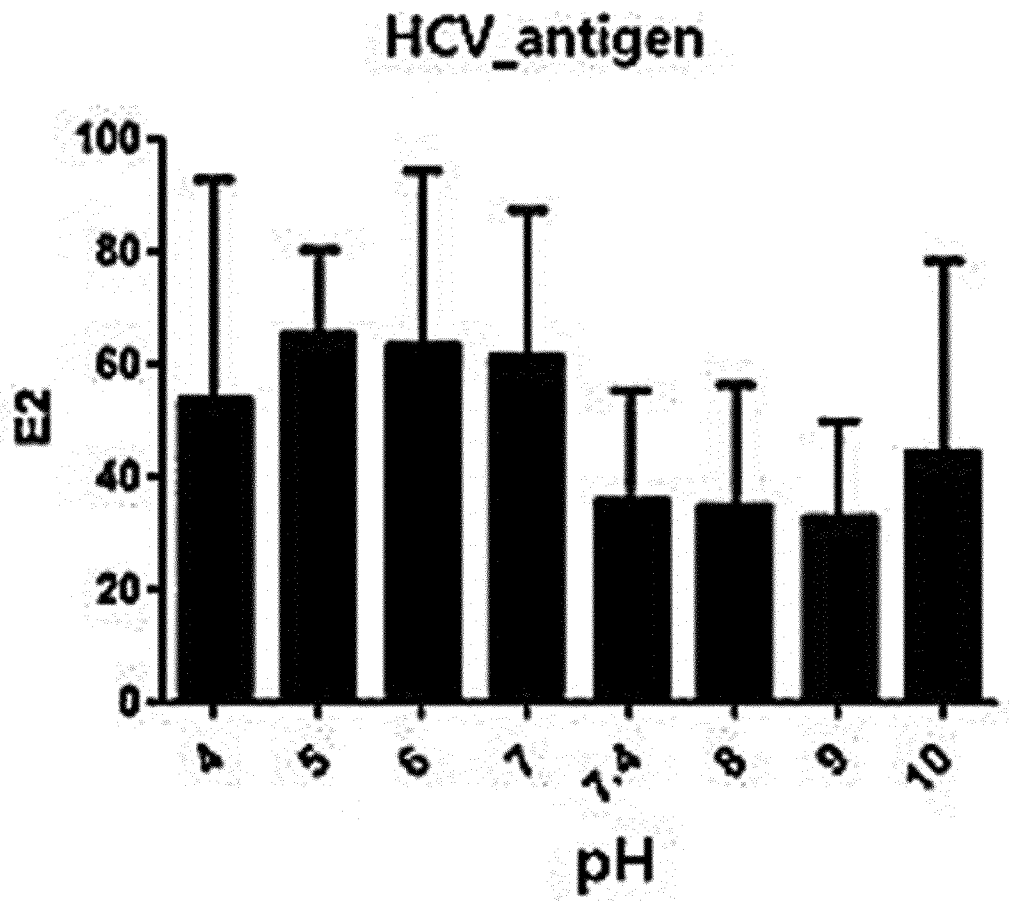
[도5]



[도6a]



[도6b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/016321

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 1/30(2006.01)i, G01N 33/576(2006.01)i, G01N 33/68(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 1/30; A61K 39/215; A61K 39/29; A61P 31/14; C07K 1/14; C12Q 001/70; G01N 033/53; G01N 33/569; G01N 33/576; G01N 33/68

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, lipid bilayer, HCV(hepatitis C virus), protein, pH, bile acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017-207595 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH. et al.) 07 December 2017 See page 20, line 5-page 21, line 15 and claims 1, 4, 5, 11, 12.	9,11,12
Y		1-8,10,13-18
Y	KR 10-2016-0072423 A (HANSOO SWINE RESEARCH INSTITUTE) 23 June 2016 See paragraphs [0072]-[0076] and claim 1.	1-8,10,13-18
A	JP 2006-516955 A (INNOGENETICS N.V.) 13 July 2006 See claims 1-5.	1-18
A	KR 10-0661760 B1 (ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC.) 28 December 2006 See claims 1-3.	1-18
A	US 2002-0037868 A1 (BUDKOWSKA et al.) 28 March 2002 See claim 2.	1-18

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"I" 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

05 MARCH 2020 (05.03.2020)

Date of mailing of the international search report

05 MARCH 2020 (05.03.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/016321

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2017-207595 A1	07/12/2017	BR 112018074527 A2	19/03/2019
		CN 109154617 A	04/01/2019
		EP 3465216 A1	10/04/2019
		JP 2019-522188 A	08/08/2019
		KR 10-2019-0010636 A	30/01/2019
		US 2019-0086413 A1	21/03/2019
		KR 10-2016-0072423 A	23/06/2016
JP 2006-516955 A	13/07/2006	AU 2003-283365 A1	07/06/2004
		CA 2504711 A1	21/05/2004
		EP 1558283 A2	03/08/2005
		US 2004-151735 A1	05/08/2004
		WO 2004-041853 A2	21/05/2004
		WO 2004-041853 A3	15/07/2004
		KR 10-0661760 B1	28/12/2006
CA 2267207 C	28/10/2008		
CA 2491918 A1	11/02/1999		
CA 2491918 C	16/10/2007		
CA 2493240 A1	11/02/1999		
CA 2493558 A1	11/02/1999		
CA 2493558 C	17/03/2009		
CA 2607990 A1	11/02/1999		
CA 2607990 C	22/09/2009		
CN 1207569 C	22/06/2005		
CN 1239548 A	22/12/1999		
CN 1492231 A	28/04/2004		
CN 1492231 C	29/11/2006		
DE 69837703 T2	10/01/2008		
EP 0967484 A1	29/12/1999		
EP 0967484 B1	02/05/2007		
EP 1801591 A2	27/06/2007		
EP 1801591 A3	03/09/2008		
EP 1801591 B1	28/12/2016		
ES 2286852 T3	01/12/2007		
JP 11-051940 A	26/02/1999		
JP 11-108932 A	23/04/1999		
JP 2001-215228 A	10/08/2001		
JP 2001-226400 A	21/08/2001		
JP 2002-277472 A	25/09/2002		
JP 3171827 B2	04/06/2001		
JP 3176570 B2	18/06/2001		
JP 3408793 B2	19/05/2003		
JP 3510232 B2	22/03/2004		
JP 3623162 B2	23/02/2005		
KR 10-0523685 B1	26/10/2005		
KR 10-2003-0070138 A	27/08/2003		
US 2011-0262892 A1	27/10/2011		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/016321

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 7776542 B1	17/08/2010
		WO 99-06836 A1	11/02/1999
US 2002-0037868 A1	28/03/2002	US 2003-0022155 A1	30/01/2003
		WO 00-63444 A2	26/10/2000
		WO 00-63444 A3	21/03/2002

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
G01N 1/30(2006.01)i, G01N 33/576(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 1/30; A61K 39/215; A61K 39/29; A61P 31/14; C07K 1/14; C12Q 001/70; G01N 033/53; G01N 33/569; G01N 33/576; G01N 33/68

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(virus), 지질막 이중층(lipid bilayer), HCV(hepatitis C virus), 단백질(protein), pH, 담즙산(bile acid)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2017-207595 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH 등) 2017.12.07 페이지 20, 라인 5 - 페이지 21, 라인 15 및 청구항 1, 4, 5, 11, 12	9, 11, 12
Y		1-8, 10, 13-18
Y	KR 10-2016-0072423 A (주식회사 한수양돈연구소) 2016.06.23 단락 [0072]-[0076] 및 청구항 1	1-8, 10, 13-18
A	JP 2006-516955 A (INNOGENETICS N.V.) 2006.07.13 청구항 1-5	1-18
A	KR 10-0661760 B1 (가부시끼가이샤 센탈 세메 가가꾸 겐꾸쇼) 2006.12.28 청구항 1-3	1-18
A	US 2002-0037868 A1 (BUDKOWSKA 등) 2002.03.28 청구항 2	1-18

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “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
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2020년 03월 05일 (05.03.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 03월 05일 (05.03.2020)
--------------------------------------------	-------------------------------------------

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 이현길 전화번호 +82-42-481-8525
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2017-207595 A1	2017/12/07	BR 112018074527 A2 CN 109154617 A EP 3465216 A1 JP 2019-522188 A KR 10-2019-0010636 A US 2019-0086413 A1	2019/03/19 2019/01/04 2019/04/10 2019/08/08 2019/01/30 2019/03/21
KR 10-2016-0072423 A	2016/06/23	없음	
JP 2006-516955 A	2006/07/13	AU 2003-283365 A1 CA 2504711 A1 EP 1558283 A2 US 2004-151735 A1 WO 2004-041853 A2 WO 2004-041853 A3	2004/06/07 2004/05/21 2005/08/03 2004/08/05 2004/05/21 2004/07/15
KR 10-0661760 B1	2006/12/28	CA 2267207 A1 CA 2267207 C CA 2491918 A1 CA 2491918 C CA 2493240 A1 CA 2493558 A1 CA 2493558 C CA 2607990 A1 CA 2607990 C CN 1207569 C CN 1239548 A CN 1492231 A CN 1492231 C DE 69837703 T2 EP 0967484 A1 EP 0967484 B1 EP 1801591 A2 EP 1801591 A3 EP 1801591 B1 ES 2286852 T3 JP 11-051940 A JP 11-108932 A JP 2001-215228 A JP 2001-226400 A JP 2002-277472 A JP 3171827 B2 JP 3176570 B2 JP 3408793 B2 JP 3510232 B2 JP 3623162 B2 KR 10-0523685 B1 KR 10-2003-0070138 A US 2011-0262892 A1	1999/02/11 2008/10/28 1999/02/11 2007/10/16 1999/02/11 1999/02/11 2009/03/17 1999/02/11 2009/09/22 2005/06/22 1999/12/22 2004/04/28 2006/11/29 2008/01/10 1999/12/29 2007/05/02 2007/06/27 2008/09/03 2016/12/28 2007/12/01 1999/02/26 1999/04/23 2001/08/10 2001/08/21 2002/09/25 2001/06/04 2001/06/18 2003/05/19 2004/03/22 2005/02/23 2005/10/26 2003/08/27 2011/10/27

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2002-0037868 A1	2002/03/28	US 7776542 B1 WO 99-06836 A1	2010/08/17 1999/02/11
		US 2003-0022155 A1 WO 00-63444 A2 WO 00-63444 A3	2003/01/30 2000/10/26 2002/03/21