

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 8월 23일 (23.08.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/112012 A2

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12Q 1/04* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001262
- (22) 국제출원일: 2012년 2월 20일 (20.02.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0014807 2011년 2월 18일 (18.02.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **주식회사 엘지생명과학 (LG LIFE SCIENCES LTD.)** [KR/KR]; 서울특별시 종로구 새문안로 58 (신문로 2가), 110-062 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **유은주 (YOO, Eun Joo)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 문지로 188 (문지동, (주)LG 생명과학 기술연구원), 305-380 Daejeon (KR). **박영석 (PARK, Young Suk)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 문지로 188 (문지동, (주)LG 생명과학 기술연구원), 305-380 Daejeon (KR). **강진석 (KANG, Jin Seok)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 문지로 188 (문지동, (주)LG 생명과학 기술연구원), 305-380 Daejeon (KR). **허지은 (HEO, Ji Eun)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 문지로 188 (문지동, (주)LG 생명과학 기술연구원), 305-380 Daejeon (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 테헤란로 87길 36, 6층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), 135-973 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: SIMULTANEOUS DIAGNOSIS KIT FOR A DISEASE DUE TO A RESPIRATORY VIRUS

(54) 발명의 명칭 : 호흡기 바이러스로 인한 질환의 동시진단용 키트

(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting a specific gene from a virus causing a respiratory disease to diagnose the disease caused by the respiratory virus, a primer set for diagnosing the disease caused by the respiratory virus and for use in the method, a composition for simultaneously diagnosing the disease caused by the respiratory virus and including the primer set; and a kit for simultaneously diagnosing the disease caused by the respiratory virus and including the composite. When the primer set for diagnosing the disease caused by the respiratory virus is used, fourteen kinds of respiratory virus may be simultaneously detected by only one reaction through a real-time multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction to diagnose whether the respiratory disease caused by the virus is present. Thus, the simultaneous diagnosis kit may be widely used for more quickly diagnosing and treating the respiratory disease.

(57) 요약서: 호흡기 질환을 유발하는 원인 바이러스에 특이적인 유전자를 검출함으로써 호흡기 바이러스로 인한 질환을 진단하는 방법, 상기 방법에 사용되는 호흡기 바이러스로 인한 질환 진단용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 호흡기 바이러스로 인한 질환 동시진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 호흡기 바이러스로 인한 질환의 동시진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 호흡기 바이러스 진단용 프라이머 세트를 이용하면, 실시간 다중 역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 1번의 반응만으로 14종의 호흡기 바이러스를 동시에 검출하여 이들 바이러스에 의한 호흡기 질환의 발병여부를 진단할 수 있으므로, 보다 신속한 호흡기 질환의 진단 및 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

WO 2012/112012 A2

명세서

발명의 명칭: 호흡기 바이러스로 인한 질환의 동시진단용 키트 기술분야

- [1] 본 발명은 호흡기 바이러스로 인한 질환의 동시진단용 키트에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명은 호흡기 질환을 유발하는 원인 바이러스에 특이적인 유전자를 검출함으로써 호흡기 바이러스로 인한 질환을 진단하는 방법, 상기 방법에 사용되는 호흡기 바이러스로 인한 질환 진단용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 호흡기 바이러스로 인한 질환 동시진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 호흡기 바이러스로 인한 질환의 동시진단용 키트에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 호흡기 바이러스는 급성 호흡기 감염의 주요 원인이며, 나이나 성별에 관계없이 가장 흔한 질병이라 할 수 있다. 특히 영아나 노인, 심폐기능과 면역기능이 저하된 사람들의 경우 후유증을 유발하여 사망에 이를 수 있는 것으로 알려져 있다. 호흡기 바이러스와 관련된 질환은 가장 흔하게는 감기 증상으로 시작하여, 인두염, 만성 천식의 악화, 폐렴에 이르기까지 다양하다. 이런 호흡기 바이러스를 조기에 진단하게 되면 불필요한 항생제의 남용을 예방할 수 있고, 바이러스의 유형을 조기에 발견하여 적절한 환자 치료를 수행할 수 있는 장점이 있다.
- [4] 이러한 호흡기 바이러스의 진단방법은 전통세포배양법, 신속세포배양법, 신속 항원 비면역형광검사법, 신속 항원면역형광검사법, 전기영동방식을 이용한 분자진단법 등이 있다. 현재 표준 검사법인 세포 배양법의 경우는 검사결과를 확인하는데 5~9일 이상이 소요되어 호흡기 바이러스 감염의 조기 진단과 치료에 어려움이 있으며, 이런 단점을 보완하기 위해 24~72시간 내에 결과를 확인하면서 민감도는 전통 배양법과 비슷한 R-mix 바이러스 배양법 등이 시행되고 있지만 역시 조기 진단과 치료에는 한계를 보이고 있다. 신속 항원 비면역형광검사법은 빠른 시간에 결과를 확인할 수 있지만 민감도가 전통 배양법 보다 낮아 위음성이 많은 단점이 있고, 전기영동 방식을 이용한 분자진단법의 경우는 민감도 문제는 해결했으나, 2 단계로 진행되어 오염의 문제가 발생할 수 있고, 시간이 오래 걸리는 단점이 있다.
- [5]
- [6] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 민감도, 오염 및 장시간이 소요되는 호흡기 바이러스 진단법의 문제점을 극복할 수 있는 방법을 찾기 위하여 예의 노력한 결과, 14종의 바이러스에 특이적인 유전자를 증폭할 수 있는 각 프라이머 세트 및 프로브를 개발하고, 상기 개발된 각 프라이머 세트 및 프로브를 사용할 경우

높은 민감도와 특이도로 14종의 호흡기 바이러스를 동시에 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명의 하나의 목적은 호흡기 질환을 유발하는 원인 바이러스에 특이적인 유전자를 검출함으로써 호흡기 바이러스로 인한 질환을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 사용되는 호흡기 바이러스로 인한 질환 진단용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 포함하는 호흡기 바이러스로 인한 질환 동시진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 호흡기 바이러스로 인한 질환의 동시진단용 키트를 제공하는 것이다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 실시양태로서, 본 발명은 호흡기 바이러스의 감염여부를 확인할 수 있도록, 서열번호 1-14 및 17-33의 염기서열을 포함하는 프라이머를 제공한다.

[14]

[15] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태를 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 기존의 다양한 호흡기 바이러스에 특이적인 유전자의 발현 유무를 확인하여 호흡기 바이러스에 의해 야기되는 질병의 발병 여부 및 발병 후 항바이러스 약제 치료과정에서의 예후를 확인하는 것이다.

[16]

[17] 본 발명의 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(DNA 중합효소 또는 역전사 효소) 및 상이한 4가지 dNTP(deoxynucleoside triphosphate)의 존재하에서 DNA합성을 개시할 수 있다. 본 발명에 의하면, 상기 프라이머는 10 내지 30개의 염기서열을 가지는 각각의 정방향 및 역방향의 핵산으로 구성됨이 바람직하다.

[18] 상기 프라이머는 호흡기 바이러스의 감염여부를 확인할 수 있도록 호흡기 바이러스에 특이적인 유전자를 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭시킬 수 있는데, 상기 호흡기 바이러스는 특별히 이에 제한되지 않으나, 코로나 바이러스 229E(Corona Virus 229E), 코로나 바이러스 OC43(Corona Virus OC43), 코로나

바이러스 NL63(Corona Virus NL63), 인플루엔자 A 바이러스(Influenza A Virus), 인플루엔자 B 바이러스(Influenza B Virus), 파라인플루엔자 바이러스 1(Parainfluenza Virus 1), 파라인플루엔자 바이러스 2(Parainfluenza Virus 2), 파라인플루엔자 바이러스 3(Parainfluenza Virus 3), Rs 바이러스 A(Respiratory Syncytial Virus A), Rs 바이러스 B(Respiratory Syncytial Virus B), 아데노 바이러스(Adeno Virus), 라이노 바이러스 A, B, C(Rhino Virus A, B, C), 메타뉴모바이러스(Metapneumovirus), 보카바이러스(Boca Virus) 등을 들 수 있고, 상기 각 호흡기 바이러스를 다른 바이러스와 구별시킬 수 있는 유전자는 특별히 이에 제한되지 않으나, 코로나 바이러스 229E의 핵단백질(N) 유전자(nucleoprotein (N) gene), 코로나 바이러스 OC43의 핵단백질(N) 유전자(nucleoprotein (N) gene), 코로나 바이러스 NL63의 폴리단백질 (1a) 유전자(polyprotein (1a) gene), 인플루엔자 A 바이러스의 기질 단백질(M) 유전자(matrix protein (M) gene), 인플루엔자 B 바이러스의 헤머글루티닌(HA) 유전자(hemagglutinin (HA) gene), 파라인플루엔자 바이러스 1의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자(hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene), 파라인플루엔자 바이러스 2의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자(hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene), 파라인플루엔자 바이러스 3의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자(hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene), Rs 바이러스 A의 융합 단백질 유전자(fusion protein gene), Rs 바이러스 B의 융합 단백질 유전자(fusion protein gene), 아데노 바이러스의 헥손 단백질 유전자(hexon protein gene), 또는 라이노 바이러스 A, B, C의 5'TR, 메타뉴모바이러스의 핵단백질(N) 유전자(nucleoprotein (N) gene), 보카 바이러스의 뉴클레오캡시드(NP) 단백질 유전자(nucleocapsid protein (NP) gene, Viral protein (VP) gene) 등을 들 수 있다.

- [19] 본 발명에서 제공하는 프라이머는 특별히 이에 제한되지 않으나, 코로나 바이러스 229E의 핵단백질(N) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 1 또는 2의 염기서열을 갖는 프라이머; 코로나 바이러스 OC43의 핵단백질(N) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 3 또는 4의 염기서열을 갖는 프라이머; 코로나 바이러스 NL63의 폴리단백질 (1a) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 갖는 프라이머; 파라인플루엔자 바이러스 1의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 7 및 8의 염기서열을 갖는 프라이머; 파라인플루엔자 바이러스 2의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 9 및 10의 염기서열을 갖는 프라이머; 파라인플루엔자 바이러스 3의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 11 및 12의 염기서열을 갖는 프라이머; 인플루엔자 A 바이러스의 기질 단백질(M) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 13 및 14의 염기서열을 갖는 프라이머; 인플루엔자 B 바이러스의 헤머글루티닌(HA) 유전자를 증폭시킬 수 있는

서열번호 17 및 18의 염기서열을 갖는 프라이머; Rs 바이러스 A의 융합 단백질 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 19 및 20의 염기서열을 갖는 프라이머; Rs 바이러스 B의 융합 단백질 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 21 및 22의 염기서열을 갖는 프라이머; 아데노 바이러스의 핵산 단백질 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 25 및 26의 염기서열을 갖는 프라이머; 라이노 바이러스 A, B, C의 5'UTR을 증폭시킬 수 있는 서열번호 27 내지 31의 염기서열을 갖는 프라이머; 메타뉴모바이러스의 핵단백질(N) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 23 및 24의 염기서열을 갖는 프라이머; 보카 바이러스의 뉴클레오캡시드(NP) 단백질을 증폭시킬 수 있는 서열번호 32 및 33의 염기서열을 갖는 프라이머 등을 사용함이 바람직하다.

- [20] 또한, 상기 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 또한, 본 발명의 프라이머 핵산 서열은 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제), 방사성 동위원소(예를 들어, ³²P), 형광성 분자, 화학그룹(예를 들어, 바이오틴) 등이 있다.
- [21] 아울러, 상기 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있는데, 바람직하게는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 다양한 연결체(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)의 부가 등의 방법으로 변형시킬 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [22]
- [23] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 호흡기 바이러스 동시진단용 조성물을 제공한다.

[24]

- [25] 본 발명의 호흡기 바이러스 동시진단용 조성물은 상술한 코로나 바이러스 229E의 핵단백질(N) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 1 또는 2의 염기서열을 갖는 프라이머; 코로나 바이러스 OC43의 핵단백질(N) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 3 또는 4의 염기서열을 갖는 프라이머; 코로나 바이러스 NL63의 폴리단백질 (1a) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 갖는 프라이머; 파라인플루엔자 바이러스 1의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 7 및 8의 염기서열을 갖는 프라이머; 파라인플루엔자 바이러스 2의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 9 및 10의 염기서열을 갖는 프라이머; 파라인플루엔자 바이러스 3의

햄버그루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 11 및 12의 염기서열을 갖는 프라이머; 인플루엔자 A 바이러스의 기질 단백질(M) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 13 및 14의 염기서열을 갖는 프라이머; 인플루엔자 B 바이러스의 햄버그루티닌(HA) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 17 및 18의 염기서열을 갖는 프라이머; Rs 바이러스 A의 융합 단백질 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 19 및 20의 염기서열을 갖는 프라이머; Rs 바이러스 B의 융합 단백질 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 21 및 22의 염기서열을 갖는 프라이머; 아데노 바이러스의 핵소 단백질 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 25 및 26의 염기서열을 갖는 프라이머; 라이노 바이러스 A, B, C의 5'UTR을 증폭시킬 수 있는 서열번호 27 내지 31의 염기서열을 갖는 프라이머; 메타뉴모바이러스의 핵단백질(N) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 23 및 24의 염기서열을 갖는 프라이머; 보카 바이러스의 뉴클레오캡시드(NP) 단백질을 증폭시킬 수 있는 서열번호 32 및 33의 염기서열을 갖는 프라이머를 포함하고, 바람직하게는 상기 프라이머쌍으로 구성된 세트중에서 2이상을 포함하여, 상술한 호흡기 바이러스중에서 둘 이상을 동시에 진단하는데 사용할 수 있다.

- [26] 상기 조성물은 호흡기 바이러스의 특이적인 유전자를 보다 효과적으로 검출할 수 있도록 서열번호 34 내지 40 및 제 42 내지 52의 염기서열을 가지는 프로브를 추가로 포함할 수 있다.
- [27] 본 발명의 용어 "프로브"란, 상보적인 염기서열과 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 염기서열의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 또한, 실시간 PCR을 수행하기 위해서는 형광표지된 프로브를 이용할 수 있다. 보다 구체적으로 TaqMan 프로브를 이용하는 경우 5' 말단은 형광물질로 3' 말단은 quencher 물질로 수식한 올리고뉴클레오타이드를 PCR 반응액에 첨가한다. 또한, Cycling 프로브를 이용한 실시간 PCR은 RNA와 DNA로 이루어지는 키메라 프로브와 RNase H로 구성된 고감도의 검출방법이다. 이 역시 프로브의 5' 말단은 형광물질로 3' 말단은 quencher 물질로 표식한다.
- [28] 본 발명자들은 실시간 PCR을 수행하여 그 증폭 산물을 검출하는 경우에는 그 증폭 산물의 증가를 실시간으로 모니터링할 수 있으므로 DNA 및 RNA의 정확한 정량이 가능하고, 전기영동이 필요없어 신속하고 간편하게 해석할 수 있으며 오염의 위험이 적음에 착안하여, 실시간 PCR 방법을 이용하여 호흡기 바이러스를 보다 효과적으로 진단하고자 형광표식 프로브를 제작하였다. 상기 프로브는 특별히 이에 제한되지 않으나, 코로나 바이러스 229E의 핵단백질(N) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 34의 염기서열을 가지는 프로브, 코로나

바이러스 OC43의 핵단백질(N) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 35의 염기서열을 가지는 프로브, 코로나 바이러스 NL63의 폴리단백질 (1a) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 36의 염기서열을 가지는 프로브, 파라인플루엔자 바이러스 1의 헴어글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 37의 염기서열을 가지는 프로브, 파라인플루엔자 바이러스 2의 헴어글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 38의 염기서열을 가지는 프로브, 파라인플루엔자 바이러스 3의 헴어글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 39의 염기서열을 가지는 프로브, 인플루엔자 A 바이러스의 기질 단백질(M) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 40의 염기서열을 가지는 프로브, 인플루엔자 B 바이러스의 헴어글루티닌(HA) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 42의 염기서열을 가지는 프로브, Rs 바이러스 A의 융합 단백질 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 43의 염기서열을 가지는 프로브, Rs 바이러스 B의 융합 단백질 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 44의 염기서열을 가지는 프로브, 메타뉴모바이러스의 핵단백질(N) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 45의 염기서열을 가지는 프로브, 아데노 바이러스의 핵소 단백질 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 46-49의 염기서열을 가지는 프로브, 라이노 바이러스 A, B, C의 5'UTR을 검출할 수 있는 서열번호 50-51의 염기서열을 가지는 프로브, 보카 바이러스의 뉴클레오캡시드(NP) 단백질 유전자(nucleocapsid protein (NP) gene, Viral protein (VP) gene)을 검출할 수 있는 서열번호 52의 염기서열을 가지는 프로브 등을 사용함이 바람직하다.

- [29] 또한, RNA 추출과정의 유효성에 대한 판단기준을 제공하기 위하여, Human RNase P를 표적으로 하는 내부대조군 프라이머로서 서열번호 15 및 16의 염기서열을 가지는 프라이머 또는 서열번호 41의 염기서열을 가지는 프로브를 추가로 포함할 수 있다.
- [30] 아울러, 상술한 프라이머와 동일하게, 본 발명에서 제공하는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있는데, 바람직하게는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 다양한 연결체(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)의 부가 등의 방법으로 변형시킬 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [31] 상기 본 발명의 호흡기 바이러스 진단용 조성물은 상기 프로브 뿐만 아니라, 중합효소 연쇄반응을 수행하기 위한 DNA 중합효소를 추가로 포함할 수도 있는데, 상기 DNA 중합효소는 특별히 이에 제한되지 않으나, Hot start Taq DNA 중합효소를 사용함이 바람직하다.
- [32] 또한, 본 발명의 호흡기 바이러스 진단용 조성물은 시료에서 추출된 RNA를

시료로서 이용할 수도 있는데, 이처럼 RNA를 시료로서 이용하기 위하여는 역전사 중합효소 연쇄반응을 추가로 수행하고 상기 역전사 PCR 반응의 반응산물을 대상으로하여 호흡기 바이러스의 특이적인 유전자가 존재하는지의 여부를 확인하여야만 하므로, 상기 조성물은 상기 프로브와 DNA 중합효소 이외에도 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하기 위한 역전사 효소를 추가로 포함할 수 있다.

[33]

[34] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 프라이머 세트 또는 조성물을 포함하는 호흡기 바이러스 동시진단용 키트를 제공한다.

[35]

[36] 본 발명의 호흡기 바이러스 진단용 키트는 상술한 호흡기 바이러스 진단용 조성물과 동일하게, 상기 프라이머 세트 중 둘 이상을 포함하거나 또는 상기 조성물을 포함하여, 상술한 호흡기 바이러스중에서 둘 이상을 동시에 진단하는데 사용할 수 있다.

[37]

또한, 본 발명의 키트는, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 진단용 키트는, 검출 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 역전사 반응 및 실시간 다중 PCR(real-time multiplex PCR)을 수행하기 위해 필요한 구성요소인 호흡기 바이러스의 유전자인 RNA로부터 상보적인 cDNA를 합성하기 위한 역전사 효소, 상보적인 DNA를 증폭하기 위한 DNA 중합효소, 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Hot start Taq-폴리머라아제 및 역전사 표소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 추가로 포함하는, 호흡기 바이러스 동시 진단용 키트가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[38]

[39] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 조성물 또는 키트를 이용한 호흡기 바이러스로 인한 질환의 진단방법 또는 호흡기 바이러스로 인한 질환의 진단을 위한 정보의 제공방법을 제공한다.

[40]

[41] 보다 구체적으로, 본 발명의 호흡기 바이러스로 인한 질환의 진단방법은 (i) 상기 프라이머, 상기 프로브, DNA 중합 효소 및 역전사 효소를 혼합하여 반응 혼합물을 수득하는 단계; (ii) 상기 반응 혼합물에 검체로부터 수득한 DNA 또는 RNA를 가하여, 역전사 반응 및 실시간 PCR 반응을 순차적으로 수행하여 반응산물을 수득하는 단계; 및, (iii) 상기 반응산물을 분석하여 1 내지 14종의 상기 원인 바이러스를 동시에 검출하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 호흡기 바이러스는 특별히 이에 제한되지 않으나, 코로나 바이러스 229E, 코로나 바이러스 OC43, 코로나 바이러스 NL63, 인플루엔자 A 바이러스, 인플루엔자 B

바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 1, 파라인플루엔자 바이러스 2, 파라인플루엔자 바이러스 3, Rs 바이러스 A, Rs 바이러스 B, 아테노 바이러스, 라이노 바이러스 A, B, C, 메타뉴모바이러스, 보카 바이러스 등을 사용함이 바람직하다.

- [42] 본 발명의 용어 "검체"란, 다양한 호흡기 바이러스 감염에 의해 상기 각 바이러스에 특이적인 유전자의 발현 수준이 차이 나는 침 또는 가래(Nasopharyngeal swabs(NPS), Nasla swabs(NS), Throat swabs(TS), Nasal aspirates(NA))와 같은 시료를 포함하나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[43]

발명의 효과

- [44] 본 발명의 호흡기 바이러스 진단용 프라이머 세트를 이용하면, 실시간 다중 역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 1번의 반응만으로 14종의 호흡기 바이러스를 동시에 검출하여 이들 바이러스에 의한 호흡기 질환의 발병여부를 진단할 수 있으므로, 보다 신속한 호흡기 질환의 진단 및 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[45]

발명의 실시를 위한 형태

[46]

- [47] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[48]

- [49] **실시예 1**: 호흡기 바이러스 특이적인 프라이머 및 프로브의 제작

[50]

- [51] 비인두의 흡인물 혹은 swab한 검체(Nasopharyngeal swabs(NPS), Nasal swabs(NS), Throat swabs(TS), Nasal aspirates(NA)) 를 대상으로 호흡기 바이러스 14종의 검출 및 구분을 수행하기 위한 프라이머 및 프로브를 제작하였다.

[52]

- [53] **실시예 1-1**: 호흡기 바이러스 특이적인 프라이머의 제작

[54]

- [55] 본 발명자들은 코로나 바이러스 229E의 핵단백질(N) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 1 및 2의 염기서열을 가지는 프라이머, 코로나 바이러스 OC43의 핵단백질(N) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 3 및 4의 염기서열을 가지는 프라이머, 코로나 바이러스 NL63의 폴리단백질 (1a) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 5 및 6의 염기서열을 가지는 프라이머, 파라인플루엔자 바이러스 1의 헴어글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 7 및 8의 염기서열을 가지는 프라이머, 파라인플루엔자 바이러스 2의

헴어글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 9 및 10의
 염기서열을 가지는 프라이머, 파라인플루엔자 바이러스 3의
 헴어글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 11 및
 12의 염기서열을 가지는 프라이머, 인플루엔자 A 바이러스의 기질 단백질(M)
 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 13 및 14의 염기서열을 가지는 프라이머,
 RNase P를 표적으로 하는 내부 대조군으로서 RNA 추출과정의 유효성에 대한
 판단기준을 제공하는 서열번호 15 및 16의 염기서열을 가지는 프라이머,
 인플루엔자 B 바이러스의 헴어글루티닌(HA) 유전자를 증폭시킬 수 있는
 서열번호 17 및 18의 염기서열을 가지는 프라이머, Rs 바이러스 A의 융합 단백질
 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 19 및 20의 염기서열을 가지는 프라이머,
 Rs 바이러스 B의 융합 단백질 유전자를 증폭시킬 수 있는 서열번호 21 및 22의
 염기서열을 가지는 프라이머, 아데노 바이러스의 핵소 단백질 유전자를
 증폭시킬 수 있는 서열번호 25 및 26의 염기서열을 가지는 프라이머, 라이노
 바이러스 A, B, C의 5'UTR을 증폭시킬 수 있는 서열번호 27 및 31의 염기서열을
 가지는 프라이머, 메타뉴모바이러스의 핵단백질(N) 유전자를 증폭시킬 수 있는
 서열번호 23 및 24의 염기서열을 가지는 프라이머, 보카 바이러스의 nucleocapsid
 protein (NP) gene, Viral protein (VP) gene을 증폭시킬 수 있는 서열번호 32 및 33의
 염기서열을 가지는 프라이머를 통상의 방법을 이용하여 각각 작제하였다(참조:
 표 1).

[56]

[57] 표 1

[Table 1]

프라이머의 염기서열

이름	염기서열	길이	서열번호
229E-F	CAGTCAAATGGGCTGATGCA	20	1
229E-R	AAAGGGCTATAAAGAGAATAAGGTATTC T	29	2
OC43-F	AYGAGGCTATTCCGACTAGGT	21	3
OC43-R	CTTCCTGAGCCTTCAATATAGTAACC	26	4
NL63-F	ACGTACTTCTATTATGAAGCATGATATTA A	30	5
NL63-R	AGCAGATTTAATGTTATACTTAAACTAC G	30	6
PIV1-F	GTTGTCAATGTCTTAATYCGTATCAATAA TT	31	7
PIV1-R	TAGCCTMCCYTCGGCACCTAA	21	8
PIV2-F	TTTCCAATYTTTCAGGACTATGAA	25	9
PIV2-R	TCCTGGTATRGCAGTGACTGAA	26	10
PIV3-2-F	CAGGATATAGGAAAATCATATCAAGT	26	11
PIV3-2-R	ACATGACTTYCTATTGTCATTTATGTT	27	12
IfA-F	AGACCAATYYTGTCACCTCT	20	13
IfA-R	TGGACAAAKCGTCTACGCT	19	14
RNaseP-F	AGATTTGGACCTGCGAGCG	19	15
RNaseP-R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	20	16
IfB-F	AARTACGGTGGATTAAAYAAAAGCAA	26	17
IfB-R	AATAGTTTTGCAGGMGGTCTATATTTGG	28	18
RSV A-1-F	ATTGTTATCATTAATTGCTGTTGGA	25	19
RSV A-1-R	CTAAATGCAATATTATTTATACCACTCAG	29	20
RSV B-1-F	TGCAGTRACAGAATTACAGCTACTT	25	21
RSV B-1-R	TTAGTGGTATTGATTGTRTAGTTCA	25	22
MPV-2-F	TCATCAGGYAAYATYCCACA	20	23
MPV-2-R	ACTTCTATDGTTGATGCTAGYTT	23	24

AdV-F	CACNGTGGGGTTTCTRAACTT	21	25
AdV-R	CARTGGKWCWTACATGCAYATC	21	26
RV-1-F	TGTGAAGAGCCSCRTGTG	18	27
RV-2-F	TGTGAAGACTCGCATGTGCT	20	28
RV-3-F	GTGYGAAGAGYCTANTGTGCT	21	29
RV-R	GGACRCCCAAAGTAGTYGGTYC	22	30
RV-2-R	GGACAYCCCAAAGTAGTYGGTYC	22	31
BoV-1-F	GAAATGCTTTCTGCTGYTGAAAG	23	32
BoV-1-R	GGTTCACCGTTWTCAAGWGGATT	23	33

[58]

[59]

[60]

[61]

실시예 1-2 : 호흡기 바이러스 특이적인 프로브의 제작

본 발명자들은 코로나 바이러스 229E의 핵단백질(N) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 34의 염기서열을 가지는 프로브, 코로나 바이러스 OC43의 핵단백질(N) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 35의 염기서열을 가지는 프로브, 코로나 바이러스 NL63의 폴리단백질 (1a) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 36의 염기서열을 가지는 프로브, 파라인플루엔자 바이러스 1의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 37의 염기서열을 가지는 프로브, 파라인플루엔자 바이러스 2의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 38의 염기서열을 가지는 프로브, 파라인플루엔자 바이러스 3의 헤머글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 39의 염기서열을 가지는 프로브, 인플루엔자 A 바이러스의 기질 단백질(M) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 40의 염기서열을 가지는 프로브, 내부 대조군으로서 RNase P를 검출할 수 있는 서열번호 41의 염기서열을 가지는 프로브, 인플루엔자 B 바이러스의 헤머글루티닌(HA) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 42의 염기서열을 가지는 프로브, Rs 바이러스 A의 융합 단백질 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 43의 염기서열을 가지는 프로브, Rs 바이러스 B의 융합 단백질 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 44의 염기서열을 가지는 프로브, 메타뉴모바이러스의 핵단백질(N) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 45의 염기서열을 가지는 프로브, 아데노 바이러스의 핵소 단백질 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 46 내지 49의 염기서열을 가지는 프로브, 라이노 바이러스 A, B, C의 5'UTR을 검출할 수 있는 서열번호 50 및 51의 염기서열을 가지는 프로브, 보카바이러스의 뉴클레오캡시드(NP) 단백질을 검출할 수 있는 서열번호 52의 염기서열을 가지는 프로브를, 통상의 방법을 이용하여 각각

제작하였다(참조: 표 2).

[62]

[63] 표 2

[Table 2]

프로브의 염기서열

<u>이름</u>	<u>5</u>	<u>염기서열</u>	<u>3</u>	<u>길이</u>	<u>서열번호</u>
<u>229E-P-rev</u>	<u>FAM</u>	<u>CCCTGACGACCACGTTGTGG</u> <u>TTCA</u>	<u>TAMR</u> <u>A</u>	<u>24</u>	<u>34</u>
OC43-P	HEX	CGCCTGGCACGGTACTCCCTC	TAMR A	21	35
NL63-P	Cy5	ATTGCCAAGGCTCCTAAACG TACAGGTGTT	BHQ3	30	36
PIV1-P	FAM	AGGCCAAAGATTGTTGTCGA GACWATTCCAAT	TAMR A	32	37
PIV2-P	HEX	CYATTTACCTAAGTGATGGA ATCAATCGCAA	TAMR A	31	38
PIV3-2-P	Cy5	CAGACTTGGTACCTGACTTA AATCCYAGGA	BHQ3	30	39
IfA-P	FAM	ACGCTCACCGTGCCAGT	TAMR A	18	40
RNaseP-P	HEX	TTCTGACCTGAAGGCTCTGCG CG	TAMR A	23	41
IfB-P	Cy5	TGCAAARGCMATAGGRAATT GCCCA	BHQ3	25	42
RSV A-1-P	FAM	CTGTAAGGCCAGAAGCACAC CARTCACAC	TAMR A	29	43
RSV B-1-P	Cy5	CGGGCCAGAAGAGAAGCACC ACAGTA	BHQ3	26	44
MPV-2-P	HEX	CAGAGRCCYTCAGCACCAGA CACAC	TAMR A	25	45
AdV-1-P	FAM	TGCACCAGCCCGGGGCTCAG GTACT	TAMR A	25	46
AdV-2-P	FAM	TGCACCAGACCSGGACTCAG GTACT	TAMR A	25	47
AdV-3-P	FAM	TGCACCAGGCCCGGGGCTCAG RTACT	TAMR A	25	48

AdV-4-P	FAM	TGCACCAGCCCGGKACTCAG GTAYT	TAMR A	25	49
RV-P	HEX	CCGGCCCCTGAATGYGGCTA AYC	TAMR A	23	50
RV-2-P	HEX	CCGGCYCCYGAATGTGGCTA ACC	TAMR A	23	51
BoV-1-P	Cy5	CCTRGAGGGTGGGTGCTKCC T	BHQ3	21	52

[64]

[65] 실시예 2: 호흡기 바이러스 진단

[66]

[67] 실시예 2-1: 필요 용액의 준비

[68]

[69] 하기 표 3의 시약을 준비하였다. 이들은 사용 전에 상온에 방치하여
해동시켰으며, 상온에서 30분 이상 방치하지 않는 것이 바람직하다.

[70]

[71] 표 3

[Table 3]

구성물 및 구성성분

번호	구성	구성성분	서열번호
1	RT-PCR Premix	One-step RT-PCR premix	
2	프라이머/프로브 혼합액1(primer/probe Mixture1)	Corona Virus primer/probe mix1. 229E primer probe mix (FAM)2. OC43 primer probe mix (HEX)3. NL63 primer probe mix (Cy5)	1-2, 343-4, 355-6, 36
3	프라이머/프로브 혼합액2(primer/probe Mixture2)	Parainfluenza Virus (PIV)primer/probe mix1. PIV1 primer/probe mix (FAM)2. PIV2 primer/probe mix (HEX)3. PIV3 primer/probe mix (Cy5)	7-8, 379-10, 3810-11, 39
4	프라이머/프로브 혼합액3(primer/probe Mixture3)	Influenza Virus/ RNase P primer/probe mix1. Influenza A primer/probe mix (FAM)2. RNase P primer/probe mix (HEX)3. Influenza B primer/probe mix (Cy5)	13-14, 4015-16, 4117-18, 42
5	프라이머/프로브 혼합액4(primer/probe Mixture4)	Respiratory syncytial Virus (RSV) primer/probe mix1. RSV A primer/probe mix (FAM)2. RSV B primer/probe mix (Cy5)3. Metapneumovirus primer/probe mix (HEX)	19-20, 4321-22, 4423-24, 45
6	프라이머/프로브 혼합액5(primer/probe Mixture5)	Adeno Virus / Rhino Virus primer probe mix1. Adeno Virus primer/probe mix (FAM)2. Rhino Virus A,B,C primer/probe mix (HEX)3. Boca Virus primer/probe mix (Cy5)	25-26, 46-4927-31, 50-5132-33, 52
7	양성대조액(Positive Control)	Positive control containing 12 types of Respiratory Virus, RNase P primer/probe binding sequences	
8	음성대조액(Negative Control)	Negative control containing RNase P primer/probe binding sequences	

[72]

[73] 실시예 2-2: 검체의 준비

[74]

[75] 비인두의 흡인물 혹은 swab한 검체(Nasopharyngeal swabs(NPS), Nasal swabs(NS), Throat swabs(TS), Nasal aspirates(NA))를 사용하였다.

[76]

[77] 실시예 2-3: 호흡기 바이러스 진단방법

[78]

[79] 상기 실시예 2-2에서 준비된 검체에서 RNA 추출 키트를 이용하여 RNA를 추출하였다. RT-PCR Premix가 10 μ l씩 분주되어 있는 200 μ l PCR 튜브를 시료와 양성대조액, 음성대조액을 더한 수 만큼 준비하였다. 미리 분주되어 제공된 각 RT-PCR Premix 튜브에 RVP 프라이머/프로브 혼합액 5 μ l와 추출한 시료 혹은 양성, 음성대조액을 5 μ l씩 첨가하였다(참조: 표 4).

[80]

[81] 표 4

[Table 4]

검체 및 구성물

검체 및 구성물명		1 테스트당 사용량(μ l)
RT-PCR Premix		10
RV 프라이머/프로브 혼합액		5
투입검체양	추출한 시료, 양성대조액 또는 음성대조액	5
합 계		20

[82]

[83] 뚜껑을 닫고 원심분리 한 후 잘 섞어 주었다. 원심분리한 후 실시간 PCR 사이클러(real-time PCR cycler)에 넣어 반응을 진행하였다. 구체적인 실시간 PCR 반응 조건은 하기와 같다(참조: 표 5).

[84]

[85] 표 5

[Table 5]

실시간 PCR 반응 조건

진행		온도	시간	반복 회수(회)
Reverse-transcript ion	Step 1	45°C	10분	1회
	Step 2	94°C	5분	
PCR 반응	Step 3	94°C	5초	40회(* <u>Signal detection</u> <u>반응 구간</u>)
	Step 4	53°C	30초	
	Step 5*	72°C	30초	

[86]

[87] PCR반응 결과는 real-time PCR detection system에 의해 실시간으로 측정하고, 반응이 완료된 후에 한계값(Cut-off value)(기기명: SLAN, FAM: 0.06, HEX: 0.06, CY5: 0.04)을 입력하였다.

[88]

[89] 실시예 2-4 : 결과 판정

[90]

[91] (1) 각 대조군 별 Ct값

[92]

[93] 대조군을 대상으로 반응하였을 때의 Ct값(threshold cycle : 한계값을 통과하는 사이클 수)은 다음과 같고(참조: 표 6 및 표 7), 시료의 Ct값이 각 항목(FAM, HEX 및 CY5) 모두 37 이하인 경우에 양성으로 판정하였다(참조: 표 6 및 표 7).

[94]

[95] 표 6

[Table 6]

양성대조액의 판정기준

양성대조액	FAM	HEX	CY5
프라이머/프로브 혼합액1	30 ± 3	30 ± 3	30 ± 3
프라이머/프로브 혼합액2	30 ± 3	30 ± 3	30 ± 3
프라이머/프로브 혼합액3	30 ± 3	30 ± 3	30 ± 3
프라이머/프로브 혼합액4	30 ± 3	30 ± 3	30 ± 3
프라이머/프로브 혼합액5	30 ± 3	30 ± 3	30 ± 3

[96]

[97] 표 7

[Table 7]

음성대조액의 판정기준

음성대조액	FAM	HEX	CY5
프라이머/프로브 혼합액1	No Ct	No Ct	No Ct
프라이머/프로브 혼합액2	No Ct	No Ct	No Ct
프라이머/프로브 혼합액3	No Ct	30 ± 3	No Ct
프라이머/프로브 혼합액4	No Ct	No Ct	No Ct
프라이머/프로브 혼합액5	No Ct	No Ct	No Ct

[98]

[99] 상기 표 6 및 7에서 보듯이, 양성대조액의 경우 Ct값이 각 파장별로 30 ± 3 의 범위내에 들어와야 하고, 음성대조액의 경우는 인터널 컨트롤인 RNase P만 Ct값이 나타나고 나머지 호흡기 바이러스들은 Ct값이 나오지 않아야(No Ct) 결과가 유효함을 알 수 있었다.

[100]

[101] (2) 결과 분석

[102]

[103] 각 반응별로 FAM, HEX, CY5 파장의 시그널 형성을 확인하여 다음 표와 같이 반응 유효성과 양성, 음성을 분석하였다(참조: 표 8).

[104]

[105] 표 8

[Table 8]

반응 유효성 및 양성과 음성의 분석기준

항목	FAM	HEX	CY5	결과 해석
프라이머 프로브 혼합액 1	+	-	-	229E
	-	+	-	OC43
	-	-	+	NL63
	-	-	-	Corona Virus 음성
프라이머 프로브 혼합액 2	+	-	-	PIV1
	-	+	-	PIV2
	-	-	+	PIV3
	-	-	-	Parainfluenza Virus 음성
프라이머 프로브 혼합액 3	+	+	-	Influenza A
	-	+	+	Influenza B
	-	+	-	Influenza A/B 음성
	-	-	-	재시험
프라이머 프로브 혼합액 4	+	-	-	RSV A
	-	-	+	RSV B
	-	-	+	Metapneumovirus
	-	-	-	RSV A/B/Metapneumovirus 음성
프라이머 프로브 혼합액 5	+	-	-	Adeno Virus
	-	+	-	Rhino Virus A,B,C
	-	-	+	Boca Virus
	-	-	-	Adeno/Rhino/Boca Virus 음성

[106]

[107] 상기 표 8은 호흡기바이러스의 음양성 판단을 나타내는 각 유형별 결과 분석표이다. 예를 들어 프라이머프로브 혼합액 1을 사용하여 FAM 항목에서만 Ct값이 37보다 작은 숫자로 나올 경우(양성), 코로나바이러스 229E에 감염되었음을 의미한다. 아울러, 상기 표에서 재시험으로 표시된 것은 인터널 컨트롤이 검출되지 않아, 다시 실험해야 한다는 것을 의미한다.

[108]

청구범위

[청구항 1]

(i) 호흡기 질환이 발병하거나 또는 발병이 의심되는 개체에서 분리된 시료내의 DNA 또는 RNA를 서열번호 1 내지 14 및 17 내지 33의 염기서열로 구성된 군으로부터 선택되는 염기서열을 갖는 프라이머로 증폭시키는 단계; 및

(ii) 코로나 바이러스 229E(Corona Virus 229E), 코로나 바이러스 OC43(Corona Virus OC43), 코로나 바이러스 NL63(Corona Virus NL63), 인플루엔자 A 바이러스(Influenza A Virus), 인플루엔자 B 바이러스(Influenza B Virus), 파라인플루엔자 바이러스 1(Parainfluenza Virus 1), 파라인플루엔자 바이러스 2(Parainfluenza Virus 2), 파라인플루엔자 바이러스 3(Parainfluenza Virus 3), Rs 바이러스 A(Respiratory Syncytial Virus A), Rs 바이러스 B(Respiratory Syncytial Virus B), 아데노 바이러스(Adeno Virus), 라이노 바이러스 A(Rhino Virus A), 라이노 바이러스 B, 라이노 바이러스 C, 메타뉴모 바이러스(Metapneumovirus) 및 보카 바이러스(Boca Virus)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 바이러스를 각각 독립적으로 또는 동시에 검출하는 단계를 포함하는, 호흡기 바이러스로 인한 질환의 진단방법.

[청구항 2]

제1항에 있어서,
서열번호 1 또는 2의 염기서열을 갖는 프라이머는 코로나 바이러스 229E의 핵단백질(N) 유전자를 특이적으로 증폭하고;
서열번호 3 또는 4의 염기서열을 갖는 프라이머는 코로나 바이러스 OC43의 핵단백질(N) 유전자를 특이적으로 증폭하며;
서열번호 5 또는 6의 염기서열을 갖는 프라이머는 코로나 바이러스 NL63의 폴리단백질 (1a) 유전자를 특이적으로 증폭하고;
서열번호 7 또는 8의 염기서열을 갖는 프라이머는 파라인플루엔자 바이러스 1의 헴어글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 특이적으로 증폭하며; 서열번호 9 또는 10의 염기서열을 갖는 프라이머는 파라인플루엔자 바이러스 2의 헴어글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 특이적으로 증폭하고;
서열번호 11 또는 12의 염기서열을 갖는 프라이머는 파라인플루엔자 바이러스 3의 헴어글루티닌-뉴라미니다제(HN) 유전자를 특이적으로 증폭하며; 서열번호 13 또는 14의 염기서열을 갖는 프라이머는 인플루엔자 A 바이러스의 기질 단백질(M) 유전자를 특이적으로 증폭하고; 서열번호 17 또는 18의 염기서열을 갖는 프라이머는 인플루엔자 B 바이러스의 헴어글루티닌(HA) 유전자를 특이적으로 증폭하며; 서열번호 19

또는 20의 염기서열을 갖는 프라이머는 Rs 바이러스 A의 융합 단백질 유전자를 특이적으로 증폭하고; 서열번호 21 또는 22의 염기서열을 갖는 프라이머는 Rs 바이러스 B의 융합 단백질 유전자를 특이적으로 증폭하며; 서열번호 25 또는 26의 염기서열을 갖는 프라이머는 아데노 바이러스의 핵산 단백질 유전자를 특이적으로 증폭하고; 서열번호 27 내지 31로 구성된 군으로부터 선택되는 염기서열을 갖는 프라이머는 라이노 바이러스 A, B, C의 5'UTR을 특이적으로 증폭하며; 서열번호 23 또는 24의 염기서열을 갖는 프라이머는 메타뉴모바이러스의 핵단백질(N) 유전자를 특이적으로 증폭하고; 및 서열번호 32 또는 33의 염기서열을 갖는 프라이머는 보카 바이러스의 뉴클레오캡시드(NP) 단백질 유전자를 특이적으로 증폭하는 것인 방법.

[청구항 3]

제1항에 있어서,
내부 대조군으로서 RNase P를 검출할 수 있는 서열번호 15 및 16의 염기서열을 가지는 프라이머를 이용하여 유전자를 특이적으로 증폭하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

[청구항 4]

제1항에 있어서,
상기 유전자를 서열번호 34 내지 40 및 42 내지 52의 염기서열로 구성된 군으로부터 선택되는 염기서열을 갖는 프로브를 이용하여 검출하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

[청구항 5]

제4항에 있어서,
내부 대조군으로서 RNase P를 검출할 수 있는 서열번호 41의 염기서열을 가지는 프로브를 이용하여 유전자를 검출하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

[청구항 6]

제1항에 있어서,
상기 (i) 단계는 1 내지 5개의 반응용기에서 수행되는 것인 방법.

[청구항 7]

제1항에 있어서,
상기 시료는 침 또는 가래(Nasopharyngeal swabs(NPS), Nasla swabs(NS), Throat swabs(TS), Nasal aspirates(NA))인 것인 방법.

[청구항 8]

서열번호 1 및 2의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 11 및 12의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 13 및 14의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 15 및 16의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 17 및 18의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 19 및 20의

염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 21 및 22의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 23 및 24의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 25 및 26의 염기서열을 갖는 프라이머 세트; 서열번호 27 내지 29의 염기서열을 가지는 정방향 프라이머와 서열번호 30 및 31의 염기서열을 가지는 역방향 프라이머의 조합으로 구성된 프라이머 세트; 및, 서열번호 32 및 33의 염기서열을 갖는 프라이머 세트로 구성된 그룹으로 선택되는 호흡기 바이러스로 인한 질환 진단용 프라이머 세트.

[청구항 9]

제8항에 있어서,
상기 바이러스는 코로나 바이러스 229E(Corona Virus 229E), 코로나 바이러스 OC43(Corona Virus OC43), 코로나 바이러스 NL63(Corona Virus NL63), 인플루엔자 A 바이러스(Influenza A Virus), 인플루엔자 B 바이러스(Influenza B Virus), 파라인플루엔자 바이러스 1(Parainfluenza Virus 1), 파라인플루엔자 바이러스 2(Parainfluenza Virus 2), 파라인플루엔자 바이러스 3(Parainfluenza Virus 3), Rs 바이러스 A(Respiratory Syncytial Virus A), Rs 바이러스 B(Respiratory Syncytial Virus B), 아데노 바이러스(Adeno Virus), 라이노 바이러스 A(Rhino Virus A), 라이노 바이러스 B, 라이노 바이러스 C, 메타뉴모 바이러스(Metapneumovirus) 또는 보카 바이러스(Boca Virus)인 것인 프라이머 세트.

[청구항 10]

제8항의 프라이머 세트를 포함하는 호흡기 바이러스로 인한 질환 동시진단용 조성물.

[청구항 11]

제10항에 있어서,
서열번호 34 내지 40 및 제 42 내지 52의 염기서열로부터 선택되는 염기서열을 가지는 프로브를 추가로 포함하는 것인 조성물.

[청구항 12]

제10항에 있어서,
Hot start Taq DNA 중합효소 및 역전사 효소를 추가로 포함하는 것인 조성물.

[청구항 13]

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 호흡기 바이러스로 인한 질환의 동시진단용 키트.