

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2024년 12월 19일 (19.12.2024) WIPO | PCT

WO 2024/258052 A1

- (51) 국제특허분류: C12Q 1/70 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/005857
- (22) 국제출원일: 2024년 4월 30일 (30.04.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2023-0075834 2023년 6월 13일 (13.06.2023) KR
- (71) 출원인: 주식회사 씨젠 (SEEGENE, INC.) [KR/KR]; 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 임소정 (LIM, So Jung); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR). 이정우 (LEE, Jungwoo); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR). 전지현 (JEON, Ji Hyun); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR). 박태영 (PARK, Taeyeong); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR). 김민선 (KIM, Minseon); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR). 강초은 (KANG, Choeun); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 제일특허법인(유) (FIRSTLAW P.C.); 06775 서울특별시 서초구 마방로 60, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF BK VIRUS AND CYTOMEGALOVIRUS IN SAMPLE

(54) 발명의 명칭: 샘플 내의 BK 바이러스 및 사이토메갈로바이러스의 동시 정량 방법

(57) Abstract: The present invention relates to a multiplexing assay method for the quantification of BK virus (BKV) and cytomegalovirus (CMV) in a sample. According to the present invention, BKV and CMV in a sample can be simultaneously quantified by one reaction, thereby reducing inspection costs such as a reduction in the amount of the sample, a reduction in inspection time, and a reduction in inspection equipment and administration manpower. In addition, the oligonucleotide set used in the method of the present invention enables more accurate diagnosis of BKV and CMV with high sensitivity and specificity. Furthermore, the method of the present invention can increase the diagnosis rate of opportunistic infection in kidney transplanted patients and contribute to the improvement of the survival rate of transplanted organs and patients in the long term.

(57) 요약서: 본 발명은 샘플 내의 BK 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 정량을 위한 멀티플렉싱 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명은 하나의 반응으로 샘플 내의 BKV 및 CMV를 동시에 정량할 수 있으므로, 샘플 양의 감소, 검사 시간 단축, 검사 장비 및 투여 인력의 단축 등의 검사 비용 절감 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 방법에 사용되는 올리고뉴클레오타이드 세트는 높은 민감도 및 특이도로 보다 정확한 BKV 및 CMV의 진단을 가능하게 한다. 나아가, 본 발명의 방법은 신장 이식 환자에서 기회 감염의 진단율을 높이고 장기적으로 이식 장기와 환자의 생존율 향상에 기여할 수 있다.



WO 2024/258052 A1

명세서

발명의 명칭: 샘플 내의 BK 바이러스 및 사 이토메갈로바이러스의 동시 정량 방법

기술분야

[1] 본 발명은 샘플 내의 BK 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 인간 폴리오마바이러스 유형 BK 바이러스는 약 5,300 bp의 원형, 이중 가닥의 DNA 게놈을 가진 비외피 바이러스이다. 상기 게놈은 3개의 캡시드 구조 단백질, 즉 바이러스 캡시드 단백질 1(VP1), VP2 및 VP3뿐만 아니라 큰 T 및 작은 t 항원을 코딩한다.

[4] BK 바이러스는 1971년에 "B.K."라는 이니셜을 갖는 요관 협착증(ureteric stenosis) 환자에서 신장 이식 후 소변으로부터 처음으로 분리되었다. BK 바이러스 감염은 널리 퍼져 있지만, 감염된 개인은 일반적으로 무증상이거나 약한 증상(예컨대, 호흡기 감염 또는 열)만을 나타낸다. 초기 감염 후, BK 바이러스는 전형적으로 요상피(uroepithelium) 및 신장 관상 상피 세포에서 잠복한다. 인구의 80% 이상이 이러한 잠복기 형태의 바이러스를 함유하고 있다고 여겨진다.

[5] 그러나, 면역억제되고/거나 면역손상된 개인에 대한 BK 바이러스 감염의 증상은, 예를 들어, 장기 이식의 환경에서 상당히 심각하다. 장기 이식의 경우, 임상적 발현은 신장 기능장애와 소변 내에 신장 관형 세포 및 염증성 세포의 존재를 포함할 수 있다. 특히, 면역억제 및/또는 면역손상 환경에서, BK 바이러스는 재활성화하고 복제하여, 관형 세포 용해 및 바이러스뇨(viruria)로부터 시작하는 일련의 사건을 촉발한다. 이후, BK 바이러스는 간질(interstitium)에서 증폭하고 관주위 모세혈관을 가로질러, 바이러스혈증(viremia)을 유발하고 결국 동종이식편을 침범하여, 다양한 관 간질성 병변(tubulointerstitial lesion) 및 BK 바이러스 신병증(BK virus Nephropathy, BKVN)을 야기한다. BK 바이러스는 이식편 손실 가능성을 크게 높인다. BK 바이러스는 이식후 기회감염적 바이러스 감염이며, 이식후 첫해에 신장 이식 환자의 약 15%에 영향을 미친다. 치료되지 않으면, BKVN이 동종이식 실패로 진행될 것이다.

[6] 면역억제 및/또는 면역손상이 BK 바이러스 감염의 주 위험 인자이지만, 남성 성별, 고령, 이전 거부 에피소드, 인간 백혈구 항원 미스매칭 정도, 장기간 냉 허혈(cold ischemia) 시간, BK 혈청상태, 및 요관 스텐트 배치와 같은 다른 위험 인자가 있다. 증상이 있는 BK 바이러스 감염 환자를 위한 치료 옵션은 제한적이며, 효과적인 예방은 없다. 치료의 초석은 면역억제를 감소시키는 것인데, 이는 동종이식편 거부 위험을 증가시킨다. 항바이러스 약물이 사용되지만, 결과가 일관성이

없다. BK 바이러스는 현재 신장이식 환자에서 간질 신염 및 동종이식 실패의 주 원인으로 인식된다.

- [7] BK 바이러스 감염은 BK 바이러스 혈액 검사나 데코이(decoy) 세포에 대한 소변 검사에 의해 진단된다. 데코이 세포의 존재는 민감한 척도이긴 하지만, BKVN의 진단에서 낮은 양성 예측값을 갖는다(Mbianda, et al. *Journal of Clinical Virology* 71:59-62 (2015) 참조). DNA나 mRNA를 이용하여 혈장 및 소변에서 바이러스 부하를 정량하는 방법이 BKVN을 진단하는 데 사용되어 왔다. 그러나, 이식 신장 생검이 여전히 BKVN을 진단하는 표준이다. 하지만, 이식 신장 생검은 시간 소모적이고, 침습적이며, 번거로운 절차이다.
- [8]
- [9] 사이토메갈로바이러스(CMV)는 약 236,000 kb의 선형, 이중 가닥 DNA 게놈을 갖는 유비쿼터스 헤르페스 유형 바이러스이다. CMV는 사춘기 전에 인간의 40-80%를 감염시킨다. CMV는 1차 감염 후에 잠복하며 종종 무증상이다. 심지어 재감염도 대부분의 경우 무증상이거나 면역능력이 있는 숙주에서 약한 질병만을 일으킨다. 그러나, 선천적으로 감염된 유아 및 동종 이식 환자나 자가면역 결핍 증후군(AIDS) 환자와 같은 면역손상된 환자에서, CMV는 심각하고 때로는 생명을 위협하는 질환, 예컨대 망막염, 위장 장애 및 뇌염을 유발할 수 있다. 동종 줄기 세포 수여자의 절반이 이식 후 100일 내에 CMV 감염에 걸린다. CMV 말단-기관 질환은 동종 줄기 세포 이식의 심각하고 빈번한 합병증이다.
- [10] 항 바이러스 약물(예컨대, 간시클로비르 및 포스카넛)의 조기 투여가 환자의 예후에 상당히 유익한 영향을 미칠 수 있으므로, 조기 및 민감한 진단이 상당히 중요하다.
- [11] CMV를 분석하기 위해 다양한 방법이 사용되고 있다. CMV 감염을 위한 마커로서 항-CMV 항체, 특히 IgM 항체가 사용될 수 있다. 그러나, 항-CMV 항체의 검출은 잠복 및 활성 감염의 구별에서 제한적이다.
- [12] 가장 최근에 이용된 바이러스 검출 방법은 감염이 증상을 보일지 여부를 명확하게 예측할 수 없다. 혈청학적 방법은 간접적이며 종종 민감도가 부족하다. 혈구로부터의 바이러스 배양과 같은 바이러스 배양은 CMV 바이러스혈증에 대한 보다 직접적인 진단 파라미터이지만, 상기 방법은 기술적으로 어렵고 시간이 오래 걸린다. 더욱이, 바이러스 배양이 반드시 CMV 질환에 상응하지는 않는다. 말초 백혈구로부터 바이러스를 분리하는 것은 일부 면역억제된 환자에서 임상적 증상을 예측하지 못할 수 있다.
- [13]
- [14] 전술한 바와 같이, 건강한 성인의 대부분은 낮은 수치의 BK 바이러스 및 CMV 바이러스를 갖는 반면, 신장 이식 환자에서 면역억제제의 사용시 상기 바이러스들은 활성화되거나 기회 감염되어 높은 수치를 나타낼 수 있다. 따라서, 생물학적 샘플에서 BK 바이러스와 CMV 바이러스를 동시에 정량하기 위한 신속하고, 신뢰성 있고, 민감한 방법이 당업계에 필요하다.

[15]

[16] 명세서 전체에 걸쳐 다수의 인용문헌 및 특허 문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[17]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[18] 본 발명자들은 보다 향상된 민감도 및 특이도로 샘플 내의 BKV와 CMV를 동시에 정량할 수 있는 신규한 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 BKV의 VP2 유전자에 혼성화가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 CMV의 UL55 유전자에 혼성화가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트를 사용한 방법에 의해 하나의 반응에서 샘플 내의 BKV 및 CMV를 효과적으로 동시에 정량할 수 있음을 확인하였다.

[19] 따라서, 본 발명의 목적은 샘플 내의 BK 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량 방법을 제공하는 것이다.

[20] 본 발명의 다른 목적은 샘플 내의 BK 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량 방법을 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[21] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위와 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다.

[22]

과제 해결 수단

[23] 본 발명의 일 양태에서, 하기 단계를 포함하는, 샘플 내의 BK 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량 방법이 제공된다:

[24] (a) 단일 반응 용기에서 샘플을 BKV의 VP2 유전자에 혼성화가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 CMV의 UL55 유전자에 혼성화가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트와 접촉시키는 것을 포함하는 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계로서, 상기 핵산 증폭 반응은 샘플 내에 BKV의 존재시 BKV의 VP2 유전자의 증폭을 나타내는 제1 증폭 곡선을 생성하고, 샘플 내에 CMV의 존재시 CMV의 UL55 유전자의 증폭을 나타내는 제2 증폭 곡선을 생성하며; 및

[25] (b) 상기 생성된 제1 증폭 곡선을 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선과 비교하여 상기 샘플 내의 BKV의 양을 결정하고, 상기 생성된 제2 증폭 곡선을 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선과 비교하여 상기 샘플 내의 CMV의 양을 결정하는 단계.

- [26] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 보체에 혼성화가 가능한 복수의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [27] 특정 구현예에서, 상기 복수의 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 1-3개의 데옥시이노신을 갖고; 상기 데옥시이노신 중 1개 또는 2개는 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 있는 3번째 뉴클레오타이드 내지 6번째 뉴클레오타이드 범위의 코어 영역에 위치하며, 나머지는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 있는 4번째 뉴클레오타이드 내지 3'-말단에 있는 7번째 뉴클레오타이드 범위의 영역에 위치한다.
- [28] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 JC 바이러스 또는 시미안 바이러스 40의 게놈 서열에 혼성화가 가능한 올리고뉴클레오타이드를 포함하지 않는다.
- [29] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함한다.
- [30] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함한다.
- [31] 특정 구현예에서, 상기 프로브는 검출 가능한 형광 표지 및 상기 형광 표지로부터의 시그널을 퀘칭할 수 있는 퀘칭 모이어티를 포함한다.
- [32] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 보체에 혼성화가 가능한 복수의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [33] 특정 구현예에서, 상기 복수의 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 1-3개의 데옥시이노신을 갖고; 상기 데옥시이노신 중 1개 또는 2개는 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 있는 3번째 뉴클레오타이드 내지 6번째 뉴클레오타이드 범위의 코어 영역에 위치하며, 나머지는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 있는 4번째 뉴클레오타이드 내지 3'-말단에 있는 7번째 뉴클레오타이드 범위의 영역에 위치한다.
- [34] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 헤르페스 심플렉스 바이러스 1, 인간 헤르페스바이러스 2, 인간 헤르페스바이러스 4, 인간 헤르페스바이러스 6B, 인간 헤르페스바이러스 6, 또는 인간 헤르페스 7 바이러스의 게놈 서열에 혼성화가 가능한 올리고뉴클레오타이드를 포함하지 않는다.
- [35] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함한다.
- [36] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함한다.

- [37] 특정 구현예에서, 상기 프로브는 검출가능한 형광 표지 및 상기 형광 표지로부터의 시그널을 쿼칭할 수 있는 쿼칭 모이어티를 포함한다.
- [38] 특정 구현예에서, 상기 핵산 증폭 반응은 실시간 PCR 또는 등온 증폭 반응이다.
- [39] 특정 구현예에서, 상기 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플은 각각 10^1 copies/uL 내지 10^{10} copies/uL로부터 선택된 양을 포함하는 3개 이상이다.
- [40] 특정 구현예에서, 상기 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플은 각각 10^1 copies/uL 내지 10^{10} copies/uL로부터 선택된 양을 포함하는 3개 이상이다.
- [41] 특정 구현예에서, 상기 샘플은 신장 이식을 받은 대상체로부터 채취한 전혈, 혈장 또는 혈청이다.
- [42] 특정 구현예에서, 상기 대상체는 신장 이식을 받은 후 1년 이하이다.
- [43] 특정 구현예에서, 상기 샘플은 5 내지 15 ul의 부피를 가지며, 상기 핵산 증폭 반응의 총 부피는 20 내지 30 ul이다.
- [44] 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기를 포함하는, 샘플 내의 BKV 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량을 위한 조성물을 제공한다:
- [45] (a) BKV의 VP2 유전자에 혼성화가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트;
- [46] (b) CMV의 UL55 유전자에 혼성화가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트; 및
- [47] (c) 중합효소, dNTPs, 및 버퍼를 포함하는 핵산 증폭용 시약.
- [48] 특정 구현예에서, 상기 조성물은 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플 및 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플을 추가로 포함한다.
- [49] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함한다.
- [50] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함한다.
- [51] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함한다.
- [52] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함한다.

[53]

발명의 효과

- [54] 본 발명의 방법은 하나의 반응으로 샘플 내의 BKV 및 CMV를 동시에 정량할 수 있으므로, 샘플 양의 감소, 검사 시간 단축, 검사 장비 및 투여 인력의 단축 등의 검사 비용 절감 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 방법에 사용되는 올리고뉴클레오타이드 세트는 높은 민감도 및 특이도로 보다 정확한 BKV 및 CMV의 진

단을 가능하게 한다. 나아가, 본 발명의 방법은 신장 이식 환자에서 기회 감염의 진단율을 높이고 장기적으로 이식 장기와 환자의 생존을 향상에 기여할 수 있다.

[55]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[56]

I. 동시 정량 방법

[57]

일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 샘플 내의 BK 바이러스 (BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량 방법을 제공한다:

[58]

(a) 단일 반응 용기에서 샘플을 BKV의 VP2 유전자에 혼성화가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 CMV의 UL55 유전자에 혼성화가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트와 접촉시키는 것을 포함하는 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계로서, 상기 핵산 증폭 반응은 샘플 내에 BKV의 존재시 BKV의 VP2 유전자의 증폭을 나타내는 제1 증폭 곡선을 생성하고, 샘플 내에 CMV의 존재시 CMV의 UL55 유전자의 증폭을 나타내는 제2 증폭 곡선을 생성하며; 및

[59]

(b) 상기 생성된 제1 증폭 곡선을 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선과 비교하여 상기 샘플 내의 BKV의 양을 결정하고, 상기 생성된 제2 증폭 곡선을 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선과 비교하여 상기 샘플 내의 CMV의 양을 결정하는 단계.

[60]

[61]

이하, 각 단계에 따라 본 개시의 내용을 보다 상세하게 설명한다:

[62]

[63]

단계 (a): 핵산 증폭 반응의 수행

[64]

본 개시의 단계 (a)에서는, BKV 및 CMV의 타겟 핵산에 대한 핵산 증폭 반응을 수행한다.

[65]

구체적으로, 단일 반응 용기에서 샘플을 BKV의 VP2 유전자에 혼성화가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 CMV의 UL55 유전자에 혼성화가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트와 접촉시키는 것을 포함하는 핵산 증폭 반응이 수행된다.

[66]

본 발명의 방법에 따르면, BKV의 타겟 핵산을 증폭시키기 위한 과정과 CMV의 타겟 핵산을 증폭시키기 위한 과정이 하나의 반응 용기에서 하나의 반응에 의해 동시에 발생할 뿐만 아니라 이들의 결과물도 함께 제공된다. 따라서, 본 발명의 방법은 "멀티플렉스 분석", "멀티플렉스 반응", "멀티플렉스 증폭" 등의 용어로도 지칭된다.

[67]

본원에서 사용된 용어 "용기(vessel, container, carrier)" 또는 "반응 용기"는 상기 BKV 및 CMV에 대한 핵산 증폭 반응에 사용되는 구성요소들이 수용되는 물리적 구획 또는 공간을 지칭한다.

- [68] 상기 용기의 비제한적인 예는 튜브, 플레이트 등을 포함한다. 상기 용기는, 예를 들어 캡에 의해 또는 적합한 실링 머신을 통한 필름에 의해 밀봉될 수 있다.
- [69] 특정 구현예에서, "단일 반응 용기"는 웰 플레이트, 예컨대 48-웰 플레이트, 96-웰 플레이트, 192-웰 플레이트, 또는 384-웰 플레이트에서의 하나의 웰이다.
- [70] 본원에서 사용되는 용어 "샘플"은 검출하고자 하는 핵산을 포함하거나 포함하고 있을 것으로 의심되는 임의의 분석 물질을 의미할 수 있다. 예컨대, 상기 샘플은 생물학적 샘플(예컨대, 세포, 조직 및 체액) 및 비생물학적 샘플(예컨대, 음식물, 물 및 토양)을 포함하며, 상기 생물학적 샘플은 예컨대, 바이러스, 세균, 조직, 세포, 혈액(전혈, 혈장 및 혈청 포함), 림프, 골수액, 타액, 객담(sputum), 도말물(swab), 흡인액(aspiration), 우유, 소변, 분변, 안구액, 정액, 뇌 추출물, 척수액, 관절액, 흉선액, 기관지 세척액, 복수 또는 양막액일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [71] 일 구현예에 따르면, 상기 샘플은 대상체, 특히 포유동물, 보다 특히 인간으로부터 얻을 수 있으며, 예를 들어, 도말물(swab), 타액(saliva), 객담(sputum), 흡인액(aspiration), 기관지폐포세척(bronchoalveolar lavage; BAL), 가글(gargle) 또는 혈액일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [72] 특정 구현예에 있어서, 상기 샘플은 전혈, 혈장 또는 혈청이다.
- [73] 상기 샘플은 대상체로부터 유래될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "대상체(subject)"는 본 개시의 방법을 이용하여 분석하고자 하는 타겟 핵산이 유래된 병원체, 즉 BKV 및/또는 CMV에 감염되었을 것으로 의심되는 개체 또는 상기 병원체의 검사 또는 진단을 필요로 하는 개체를 의미한다. 상기 대상체의 예는 비제한적으로 개, 고양이, 설치류, 영장류, 인간 등의 포유동물을 들 수 있으며, 특히 인간이다.
- [74] 특정 구현예에서, 대상체는 신장 이식을 받은 대상체이다. 보다 특정 구현예에서, 대상체는 신장 이식을 받은 후 1년 이하의 대상체이다.
- [75] 상기 대상체의 맥락에서, 상기 샘플은 신장 이식을 받은 대상체로부터 채취한 전혈, 혈장 또는 혈청, 또는 신장 이식을 받은 후 1년 이하의 대상체로부터 채취한 전혈, 혈장 또는 혈청일 수 있다.
- [76] 일 구현예에 따르면, 상기 샘플은 효율적인 증폭 반응을 위해 본 기술분야에서 공지된 핵산 추출(nucleic acid extraction) 및/또는 정제 과정을 거칠 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 상기 핵산 추출 및/또는 정제 과정은 샘플의 종류에 따라 달라질 수 있다.
- [77]
- [78] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산", "핵산 서열" 또는 "핵산 분자"는 단일-가닥 형태 또는 이중-가닥 형태의 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 폴리머를 의미하며, 상기 뉴클레오타이드는 자연(naturally occurring) 뉴클레오타이드와 동일한 방식으로 기능(function)할 수 있는 자연 뉴클레오타이드

의 유도체, 비-자연 뉴클레오타이드 또는 변형 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [79] 본 명세서에서 사용되는 용어 "타겟 핵산", "타겟 핵산 서열" 또는 "타겟 서열"은 검출하고자 하는 핵산 서열을 의미한다. 상기 타겟 핵산은 반응에서 새롭게 생성된 것뿐만 아니라 샘플 내에 초기에 존재하는 것을 포함한다.
- [80] 본원에서 타겟 핵산은 BKV로부터의 타겟 핵산 및 CMV로부터의 타겟 핵산을 포함하며, 이들은 모두 이중 가닥의 DNA이다. 이러한 이중 가닥의 타겟 핵산은 본 발명의 방법에 적용하기 위해 단일-가닥 또는 부분적 단일-가닥 형태로 분리될 수 있다. 상기 가닥을 분리하기 위한 알려진 방법은 가열, 알칼리, 포름아미드, 우레아 및 글리콕살 처리, 효소적 방법(예, 헬리카아제 작용) 및 결합 단백질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 가닥 분리는 80°C-105°C의 온도 범위에서 가열하여 달성될 수 있다. 이러한 처리를 달성하기 위한 일반적인 방법은 문헌[Joseph Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)]에 의해 제공된다.
- [81] 일 구현예에 따르면, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 BK 바이러스(BKV)로부터의 핵산이고, 다른 하나는 사이토메갈로바이러스(CMV)로부터의 핵산이다.
- [82] 특정 구현예에서, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 BKV의 VP2 유전자 또는 이의 일부이고, 다른 하나는 CMV의 UL55 유전자 또는 이의 일부이다.
- [83] 특정 구현예에서, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 Genbank Accession No. NC_001538 하의 BKV 전체 게놈에서의 624번째 뉴클레오타이드부터 1679번째 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성(identity)을 갖는 서열을 갖고, 다른 하나는 Genbank Accession No. NC_006273 하의 CMV 전체 게놈에서의 82066번째 뉴클레오타이드부터 84789번째 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖는다.
- [84] 특정 구현예에서, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 Genbank Accession No. NC_001538 하의 BKV 전체 게놈에서의 948번째 뉴클레오타이드부터 1108번째 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖고, 다른 하나는 Genbank Accession No. NC_006273 하의 CMV 전체 게놈에서의 82871번째 뉴클레오타이드부터 83019번째 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖는다.
- [85] 다시 말하면, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 Genbank Accession No. NC_001538 하의 BKV 전체 게놈 중 VP2 유전자에서의 325번째 뉴클레오타이드부터 485번째 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을

갖는 서열을 갖고, 다른 하나는 Genbank Accession No. NC_006273 하의 CMV 전체 게놈 중 UL55 유전자에서의 806번째 뉴클레오타이드부터 954번째 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

- [86] 특정 구현예에서, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 Genbank Accession No. NC_001538 하의 BKV 전체 게놈에서의 948번째 뉴클레오타이드부터 1108번째 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성(identity)을 갖는 서열을 갖고, 다른 하나는 Genbank Accession No. NC_006273 하의 CMV 전체 게놈에서의 82871번째 뉴클레오타이드부터 83019번째 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖는다.
- [87] 특정 구현예에서, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 Genbank Accession No. NC_001538 하의 BKV 전체 게놈에서의 748번째 뉴클레오타이드 내지 948번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드부터 1108번째 뉴클레오타이드 내지 1308번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖고, 다른 하나는 Genbank Accession No. NC_006273 하의 CMV 전체 게놈에서의 82671번째 뉴클레오타이드 내지 82871번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드부터 83019번째 뉴클레오타이드 내지 83219번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖는다.
- [88] 특정 구현예에서, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 Genbank Accession No. NC_001538 하의 BKV 전체 게놈에서의 848번째 뉴클레오타이드 내지 948번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드부터 1108번째 뉴클레오타이드 내지 1208번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖고, 다른 하나는 Genbank Accession No. NC_006273 하의 CMV 전체 게놈에서의 82771번째 뉴클레오타이드 내지 82871번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드부터 83019번째 뉴클레오타이드 내지 83119번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

- [89] 특정 구현예에서, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 Genbank Accession No. NC_001538 하의 BKV 전체 게놈에서의 898번째 뉴클레오타이드 내지 948번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드부터 1108번째 뉴클레오타이드 내지 1158번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖고, 다른 하나는 Genbank Accession No. NC_006273 하의 CMV 전체 게놈에서의 82821번째 뉴클레오타이드 내지 82871번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드부터 83019번째 뉴클레오타이드 내지 83069번째 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 뉴클레오타이드까지의 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖는다.
- [90] 특정 구현예에서, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖고, 다른 하나는 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 서열, 또는 이에 대해 90% 이상, 예컨대 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과와 동일성을 갖는 서열을 갖는다.
- [91] 특정 구현예에서, 타겟 핵산은 2개이며, 그 중 하나는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖고, 다른 하나는 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.
- [92]
- [93] 본 발명자들은 BKV의 다양한 유전자 중에서 VP2 유전자, 특히 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 타겟팅하는 것이 가장 높은 특이성 및 민감성으로 BKV를 정량할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 CMV의 다양한 유전자 중에서 UL55 유전자, 특히 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 서열을 타겟팅하는 것이 가장 높은 특이성 및 민감성으로 CMV를 정량할 수 있음을 확인하였다(데이터는 미제시).
- [94] 본원에서 BKV의 VP2 유전자의 특정 서열 및 CMV의 UL55 유전자의 특정 서열이 언급되었으나, 상기 서열은 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트에 의해 분석되는 서열을 예시한 것일 뿐, BKV 및 CMV의 서브타입 또는 변이체의 VP2 및 UL55 유전자의 다양한 서열이 본원에서 언급된 타겟 핵산에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [95]
- [96] 본 발명의 방법에서는, BKV 및 CMV로부터의 타겟 핵산의 동시 정량을 위해 BKV의 타겟 핵산 검출용 조성물 및 CMV의 타겟 핵산 검출용 조성물이 사용된다.

- [97] 상기 BKV의 타겟 핵산 검출용 조성물은 BKV의 타겟 핵산, 즉 VP2 유전자에 특이적이며, 상기 CMV의 타겟 핵산 검출용 조성물은 CMV의 타겟 핵산, 즉 UL55에 특이적이다.
- [98] 본원에서 문구 "타겟 핵산 검출용 조성물이 타겟 핵산에 특이적"이라는 것은 상기 타겟 핵산 검출용 조성물이 상기 타겟 핵산을 검출하는 데 관여하지만, 그 외 핵산을 검출하는 데 관여하지 않는다는 것을 의미한다. 달리 말하면, 상기 문구는 상기 타겟 핵산 검출용 조성물이 상기 타겟 핵산과 상호작용하지만 그 외 핵산과는 상호작용하지 않는다는 것을 의미한다.
- [99] 본원에서 상기 BKV의 타겟 핵산 검출용 조성물은 BKV의 타겟 핵산에 특이적이거나 CMV의 타겟 핵산에는 비특이적이고, 상기 CMV의 타겟 핵산 검출용 조성물은 CMV의 타겟 핵산에는 특이적이거나 BKV의 타겟 핵산에는 비특이적이다.
- [100] 본원에서 사용되는 BKV의 타겟 핵산 검출용 조성물 및 CMV의 타겟 핵산 검출용 조성물은 하나의 반응에서 함께 사용되며, 따라서 하나의 반응액 또는 반응 용기 내에 함께 존재한다.
- [101] 본원에서 사용된 용어 "타겟 핵산 검출용 조성물"은 타겟 핵산을 검출하기 위해 사용되는 구성요소들을 함유하는 조성물을 의미한다.
- [102] 상기 타겟 핵산 검출용 조성물에 포함되는 구성요소의 예는, 비제한적으로 타겟 핵산을 증폭 또는 검출하기 위해 사용되는 올리고뉴클레오타이드 세트, 표지, 핵산 중합효소, 버퍼, 중합효소 보조인자, 및 dNTPs 등을 포함한다. 선택적으로, 상기 타겟 핵산 검출용 조성물은 반응을 촉진하기 위한 물질, 핵산 중합효소 활성을 억제하기 위한 분자, 오염을 방지하기 위한 분자 등의 다양한 추가 구성요소를 포함할 수 있다. 또한, 상기 타겟 핵산 검출용 조성물은 양성 대조군, 음성 대조군 또는 내부 대조군 반응을 실시하는 데 필요한 올리고뉴클레오타이드 또는 시약을 포함할 수 있다. 또한, 상기 타겟 핵산 검출용 조성물은 절대 정량을 위한 기지의 양의 표준 타겟 핵산을 함유하는 참조 샘플을 포함할 수 있다.
- [103] 본 발명의 방법에 사용되는 각 구성요소의 최적량은 본 개시사항의 이점을 알고 있는 당업자에 의해서 용이하게 결정될 수 있다.
- [104] 상기 타겟 핵산 검출용 조성물의 구성요소들은 반응 전에 하나의 용기에 함께 보관되거나 또는 복수의 용기 내에 나뉘어 보관될 수 있다.
- [105] 본 발명의 방법에 따르면, BKV의 타겟 핵산 검출용 조성물은 BKV의 VP2 유전자에 혼성화가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함한다.
- [106] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 보체에 혼성화가능한 복수의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다: 5'-GTTTCCACTGTAGGCCTCTATCAGCAATCAGGCATGGCTTTGGAATTGTTTAACCCAGATGAGTACTATGATATTCTGTTTCCTGGTGTAATACTTTTGTTAATAATATTCAATACCTTGATCCTAGGCATTGGGGTCCTTCTTTG

- TTTGCTACTATTTTC-3' (서열번호: 1). 상기 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열은 BKV의 VP2 유전자 내의 보존 영역(conserved region)의 대표적인 예이다.
- [107] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트에 포함된 복수의 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 1-3개의 테옥시이노신을 갖고; 상기 테옥시이노신 중 1개 또는 2개는 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 있는 3번째 뉴클레오타이드 내지 6번째 뉴클레오타이드 범위의 코어 영역에 위치하며, 나머지는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 있는 4번째 뉴클레오타이드 내지 3'-말단에 있는 7번째 뉴클레오타이드 범위의 영역에 위치한다.
- [108] 멀티플렉스 증폭 반응에 사용되는 복수의 올리고뉴클레오타이드 중 일부가 전술한 바와 같이 특정 위치에 특정 개수의 테옥시이노신을 갖도록 디자인하는 것은 반응에서 비특이적 증폭 산물, 특히 프라이머 다이머의 형성을 억제하고, 핵산 증폭 효율을 감소시키며, 올리고뉴클레오타이드의 설계를 용이하게 하는 것으로 알려져 있다(국제특허공개 제WO2018-124665호 참조).
- [109] 본 발명의 방법은 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 내의 일부 또는 모든 올리고뉴클레오타이드가 전술한 요건을 만족하도록 상기 올리고뉴클레오타이드에 테옥시이노신을 혼입시킴으로써 보다 효과적인 타겟 핵산의 검출을 가능하게 한다.
- [110] 본 발명의 방법에 따르면, CMV의 타겟 핵산 검출용 조성물은 CMV의 UL55 유전자에 혼성화가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함한다.
- [111] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 보체에 혼성화가능한 복수의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다: 5'-CAGTACGGTCAACTGGGCGAGGACAAC GAAATCCTGTTGGGCAACCACCGCACTGAGGAATGTCAGC TTCCAGCCTCAAGATCTTCATCGCCGGGAAGCTCGGCCTA CGAGTACGTGGACTACCTCTTCAAACGCATGATTGACCTCAG-3' (서열번호: 5). 상기 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 서열은 CMV의 UL55 유전자 내의 보존 영역의 대표적인 예이다.
- [112] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트에 포함된 복수의 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 1-3개의 테옥시이노신을 갖고; 상기 테옥시이노신 중 1개 또는 2개는 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 있는 3번째 뉴클레오타이드 내지 6번째 뉴클레오타이드 범위의 코어 영역에 위치하며, 나머지는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 있는 4번째 뉴클레오타이드 내지 3'-말단에 있는 7번째 뉴클레오타이드 범위의 영역에 위치한다.
- [113] 상기 테옥시이노신의 포함에 관한 세부사항은 전술한 국제특허공개 제WO2018-124665호를 참조한다.
- [114]
- [115] 일 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트 각각은 프라이머 쌍 및 프로브를 포함한다.

- [116] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머"는 타겟 핵산(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 가리킨다. 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정된다.
- [117] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프로브(probe)"는 타겟 핵산에 실질적으로 상보적인 부위 또는 부위들을 포함하는 단일-가닥 핵산 분자를 의미한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 프로브의 3'-말단은 "블록킹"되어 그의 연장이 방지된다. 블록킹은 종래 방법에 따라 달성될 수 있다. 예를 들면, 블록킹은 마지막 뉴클레오타이드의 3'-히드록실기에 바이오틴, 표지, 포스페이트기, 알킬기, 비-뉴클레오타이드 링커, 포스포로티오에이트 또는 알칸-디올 잔기와 같은 화학적 모이어티(moiety)를 추가하여 실시할 수 있다. 택일적으로, 블록킹은 마지막 뉴클레오타이드의 3'-히드록실기를 제거하거나 또는 다이디옥시뉴클레오타이드와 같이 3'-히드록실기가 없는 뉴클레오타이드를 이용하여 실시할 수 있다.
- [118] "상보적"은 소정의 어닐링 조건 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, "실질적으로 상보적(substantially complementary)" 및 "완전히 상보적(perfectly complementary)"인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [119] 용어 "실질적으로 상보적"은 올리고뉴클레오타이드가 충분히 상보적이어서 지정된 어닐링 조건 또는 혼성화 조건하에서 선택적으로 주형 핵산 서열에 혼성화될 수 있어, 어닐링된 올리고뉴클레오타이드가 중합효소에 의해 연장되어 주형에 상보적인 복사본을 형성할 수 있음을 의미한다. 따라서, 이 용어는 "완전히 상보적인" 또는 이와 관련된 용어와는 다른 의미를 갖는다.
- [120] 본 명세서에서 사용되는 용어 "비-상보적(non-complementary)"은 지정된 어닐링 조건 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화되지 않을 정도로 충분히 비-상보적인 것을 의미하며, 용어 "실질적으로 비-상보적(substantially non-complementary)" 및 "완전히 비-상보적(perfectly noncomplementary)"인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 비-상보적인 것을 의미한다.
- [121] 프라이머 또는 프로브는 단일쇄일 수 있다. 프라이머 또는 프로브는 디옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 또는 이의 조합을 포함한다. 본 발명에서 이용되는 프라이머 또는 프로브는 자연 (naturally occurring) dNMP (즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [122] 용어 "어닐링" 또는 "프라이밍"은 주형 핵산에 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.
- [123] 본 명세서에서 용어 "혼성화"는 소정의 혼성화 조건 하에 2개의 단일-가닥 폴리뉴클레오타이드가 상보적인 뉴클레오타이드 서열 간의 비공유 결합을 통해 이중-가닥을 형성하는 것을 지칭한다.
- [124] 용어 "어닐링"과 "혼성화"는 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용되어 사용될 것이다.
- [125]
- [126] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 JC 바이러스 또는 시미안 바이러스 40의 게놈 서열에 혼성화가능한 올리고뉴클레오타이드를 포함하지 않는다.
- [127] 상기 JC 바이러스 및 시미안 바이러스 40은 BKV와 유전적 상동성이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서, BKV와 유전적 상동성이 높은 서열을 고려하지 않고 BKV의 타겟 서열만을 고려하여 디자인된 올리고뉴클레오타이드는 JC 바이러스나 시미안 바이러스 40으로부터의 게놈 서열에 혼성화할 가능성이 높으며, 예를 들어 BKV가 존재하지 않지만 JC 바이러스나 시미안 바이러스 40이 존재하는 샘플에 대해, 위양성(false positive) 결과를 야기할 수 있다.
- [128] 이를 방지하기 위해, 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 이것이 JC 바이러스 또는 시미안 바이러스 40의 게놈 서열에 혼성화하지 않도록 JC 바이러스 및 시미안 바이러스 40 모두의 게놈 서열을 고려하여 디자인된다.
- [129] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프라이머를 포함한다"
- [130] 5'-GTTTCCACTGTAGGCCTTATCAGIAATC-3' (서열번호: 2)
- [131] 5'-GAAATAGTAGCAAACAAIGAAGGACCICAA-3' (서열번호: 3).
- [132] 상기 서열에서 보는 바와 같이, 상기 2개의 프라이머는 특정 위치에 테옥시이노신(T로 표시됨)이 혼입될 수 있다.
- [133] 상기 상동성의 계산시, 상기 테옥시이노신은 그 정렬에서 맞은편에 있는 자연 발생 염기와 매치되는 것으로 간주된다.
- [134] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함한다.

- [135] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 4의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프로브를 포함한다:
- [136] 5'-TGGAATTGTTTAACCCAGATGAGTACTATGATAT-3' (서열번호: 4).
- [137] 상기 서열에서 보는 바와 같이, 상기 프로브는 테옥시이노신을 함유하지 않는다.
- [138] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함한다.
- [139] 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 541개의 BKV의 다양한 서브타입 및 변이체의 VP2 유전자 서열에 대해 100% 타겟 커버리지를 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 본원의 표 3에 열거된 47종의 균주의 게놈 서열을 검출하지 않는다. 이와 같이, 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 높은 특이성으로 BKV의 타겟 핵산을 검출한다.
- [140]
- [141] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 헤르페스 심플렉스 바이러스 1, 인간 헤르페스바이러스 2, 인간 헤르페스바이러스 4, 인간 헤르페스바이러스 6B, 인간 헤르페스바이러스 6, 또는 인간 헤르페스 7 바이러스의 게놈 서열에 혼성화가능한 올리고뉴클레오타이드를 포함하지 않는다.
- [142] 상기 헤르페스 심플렉스 바이러스 1, 인간 헤르페스바이러스 2, 인간 헤르페스 바이러스 4, 인간 헤르페스바이러스 6B, 인간 헤르페스바이러스 6, 및 인간 헤르페스 7 바이러스는 CMV와 유전적 상동성이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서, CMV와 유전적 상동성이 높은 서열을 고려하지 않고 CMV의 타겟 서열만을 고려하여 디자인된 올리고뉴클레오타이드는 전술한 헤르페스바이러스로부터의 게놈 서열에 혼성화할 가능성이 높으며, 예를 들어 CMV가 존재하지 않지만 전술한 헤르페스바이러스가 존재하는 샘플에 대해, 위양성(false positive) 결과를 야기할 수 있다.
- [143] 이를 방지하기 위해, 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 이것이 헤르페스 심플렉스 바이러스 1, 인간 헤르페스바이러스 2, 인간 헤르페스바이러스 4, 인간 헤르페스바이러스 6B, 인간 헤르페스바이러스 6, 또는 인간 헤르페스 7 바이러스의 게놈 서열에 혼성화하지 않도록 전술한 헤르페스바이러스 전체의 게놈 서열을 고려하여 디자인된다.
- [144] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프라이머를 포함한다:

- [145] 5'-CAGTACIGTCAACTGGGIGAGG-3' (서열번호: 6)
- [146] 5'-CTGAGGTTAATCATGCGTTTGAAGG-3' (서열번호: 7).
- [147] 상기 서열에서 보는 바와 같이, 상기 2개의 프라이머는 특정 위치에 테옥시이노신(T로 표시됨)이 혼입되어 있다.
- [148] 상기 상동성의 계산시, 상기 테옥시이노신은 그 정렬에서 맞은편에 있는 자연 발생 염기와 매치되는 것으로 간주된다.
- [149] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함한다.
- [150] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프로브를 포함한다:
- [151] 5'-CCACCGCACTGAGGAATGTCAG-3' (서열번호: 8).
- [152] 상기 서열에서 보는 바와 같이, 상기 프로브는 테옥시이노신을 함유하지 않는다.
- [153] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함한다.
- [154] 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 523개의 CMV의 다양한 서브타입 및 변이체의 UL55 유전자 서열에 대해 실질적으로 100% 타겟 커버리지를 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 본원의 표 4에 열거된 47종의 균주의 게놈 서열을 검출하지 않는다. 이와 같이, 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 높은 특이성으로 CMV의 타겟 핵산을 검출한다.
- [155]
- [156] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 BKV의 타겟 핵산 검출용 조성물, 특히 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 BKV의 VP2 유전자에 특이적으로 혼성화된 올리고뉴클레오타이드의 절단에 의존적인 방식으로 형광 표지로부터 시그널을 발생시킨다.
- [157] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 CMV의 타겟 핵산 검출용 조성물, 특히 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 CMV의 UL55 유전자에 특이적으로 혼성화된 올리고뉴클레오타이드의 절단에 의존적인 방식으로 형광 표지로부터 시그널을 발생시킨다.
- [158] 특히, 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트에 의한 시그널의 발생은 타겟 핵산에 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 프로브가 혼성화된 다음, 이의 절단에 의해 이뤄질 수 있다.
- [159] 이러한 시그널 발생의 예는, 비제한적으로 TaqMan 프로브 방법(미국 특허 제 5,210,015호 및 미국 특허 제 5,538,848호)을 포함한다.

- [160] TaqMan 프로브 방법에 의한 시그널 발생을 위해, 타겟 핵산 검출용 조성물은 프라이머 쌍 및 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 세트뿐만 아니라 5'-뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 중합효소를 포함한다. 상기 타겟 핵산에 혼성화된 프로브는 타겟 핵산의 증폭 동안 절단되어 상기 타겟 핵산의 존재를 나타내는 시그널을 발생시킨다.
- [161] TaqMan 프로브 방법에 의해 시그널을 발생시키는 특정 예는 다음의 단계를 포함한다: (a) 상기 타겟 핵산을 프라이머 쌍 및 적절한 표지(예컨대, 상호작용적 이중 표지)를 갖는 프로브와 혼성화시키는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 결과물 및 5'뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 중합효소를 이용하여 타겟 핵산을 증폭하는 단계로서; 상기 프로브는 절단되어 상기 표지를 방출하고; 및 (c) 상기 방출된 표지로부터 시그널 발생을 검출하는 단계.
- [162] 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트에 의한 시그널 발생은 전술한 방법 외에도 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 이뤄질 수 있다.
- [163]
- [164] 일 구현예에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 내에 포함된 프로브 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트 내에 포함된 프로브 각각은 검출가능한 형광 표지 및 상기 형광 표지로부터의 시그널을 퀀칭할 수 있는 퀀칭 모이어티를 포함한다.
- [165] 본원에서 형광 표지 및 퀀칭 모이어티는 상호작용 이중 표지로 지칭될 수 있고, 형광 표지는 형광 리포터 분자로 지칭될 수 있으며, 퀀칭 모이어티는 퀀처 분자로 지칭될 수 있다.
- [166] 상기 상호작용 이중 표지를 포함하는 상호작용 표지 시스템의 대표적 예는 형광 리포터 분자(공여체 분자) 및 퀀처 분자(수용체 분자)를 포함하는 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 시스템을 포함한다. FRET에서 에너지 공여체는 형광성이나, 에너지 수용체는 형광성 또는 비-형광성일 수 있다. 상호작용 표지 시스템은 "접촉-매개 퀀칭(contact-mediated quenching)"에 기반한 이중 표지를 포함할 수 있다(Salvatore 등, *Nucleic Acids Research*, 2002 (30) no.21 e122 and Johansson 등, *J. AM. CHEM. SOC* 2002 (124) pp 6950-6956). 상기 상호작용적 표지 시스템은 최소 2개의 분자(예컨대, 염료) 간의 상호작용에 의해 시그널 변화를 유도하는 어떠한 표지 시스템도 포함할 수 있다.
- [167] 본 발명에서 유용한 리포터 분자 및 퀀처 분자는 당업계에 알려진 어떠한 분자도 포함할 수 있다. 그 예는 다음과 같다: Cy2™ (506), YO-PRO™-1 (509), YOYO™-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorX™ (519), Alexa™ (520), Rhodamine 110 (520), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rhodamine Green™ (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium Green™(531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), Dil (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium

Orange™ (575), Phycoerythrin R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium Orange™ (576), Pyronin Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), Texas Red (615), Nile Red (628), YO-PRO™-3 (631), YOYO™-3 (631), Rphycocyanin (642), C-Phycocyanin (648), TO-PRO™-3 (660), TOTO3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5™ (670), Thiadicarbocyanine (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), Biossearch Blue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610 (610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), Fluorescein (520), Fluorescein-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705) 및 Quasar 705 (610). 괄호의 숫자는 나노미터 단위로 표시한 최대 발광 파장이다. 바람직하게는, 리포터 분자 및 퀀처 분자는 JOE, FAM, TAMRA, ROX 및 플루오레세인-기반 표지를 포함할 수 있다.

- [168] 적합한 형광 분자 및 적합한 리포터-퀀처 쌍은 다음과 같이 다양한 문헌에 개시되어 있다: Pesce 등, editors, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971); White 등, Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Color AND Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Edition (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996); 미국 특허 제3,996,345호 및 제4,351,760호.
- [169] 본 발명에서, 광범위 파장 또는 특정 파장의 형광을 퀀칭할 수 있는 비-형광 퀀처 분자(예컨대, 블랙 퀀처 또는 다크 퀀처)가 이용될 수 있다는 것은 주목할 만하다.
- [170] 리포터 및 퀀처 분자를 포함하는 시그널링 시스템에서, 상기 리포터는 FRET의 공여체를 포함하고 퀀처는 FRET의 나머지 파트너(수용체)를 포함한다. 예를 들어, 플루오레세인 염료(fluorescein dye)는 리포터로 이용되고 로다민 염료(rhodamine dye)는 퀀처로 이용될 수 있다.
- [171] 일 구현예에서, 상기 상호작용 이중 표지는 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 내의 프로브에 연결된다.
- [172] 일 구현예에서, 상기 상호작용 이중 표지는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트 내의 프로브에 연결된다.
- [173] 타겟 핵산이 존재하지 않는 경우, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트 내의 각각의 프로브는 헤어핀 또는 랜덤 코일 구조의 단일-가닥 상태로 존재하고, 이 경우 상기 퀀처 분자가 상기 리포터 분자에 근

접하여 상기 리포터 분자로부터 시그널을 퀘칭함으로써 시그널이 발생하지 않는다.

- [174] 반면, 타겟 핵산이 존재하는 경우, 적절한 혼성화 조건 하에서 상기 각각의 프로브는 타겟 핵산에 혼성화되어 이합체를 형성하고, 이에 따라 상기 퀘칭 분자가 상기 리포터 분자로부터 분리되어 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 언퀘칭함으로써 시그널을 발생시키며, 또한 상기 프로브가 뉴클레아제의 작용에 의해 절단됨에 따라 상기 퀘칭 분자와 상기 리포터 분자 간의 분리가 강화된다.
- [175] 본 발명에 따르면, 제1 올리고뉴클레오타이드 세트에 포함된 프로브에 연결된 형광 표지는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트에 포함된 프로브에 연결된 형광 표지와 상이하다. 두 형광 표지가 상이하다는 것은 상기 형광 표지로부터 발생하는 시그널이 실질적으로 상이한 시그널 특성(예컨대, 광학적 특성, 발광 파장 등)으로 인해 2개의 검출 채널을 사용하여 쉽게 구별되는 것을 의미한다.
- [176] 일 구현예에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 세트에 포함된 프로브에 연결된 형광 표지는 FAM 또는 이의 등가물이다.
- [177] 일 구현예에서, 제2 올리고뉴클레오타이드 세트에 포함된 프로브에 연결된 형광 표지는 Cal Red 610 또는 이의 등가물이다.
- [178]
- [179] 본 발명에 따르면, BKV의 VP2 유전자 및 CMV의 UL55 유전자에 대한 핵산 증폭 반응이 수행된다.
- [180] 상기 핵산 증폭 반응은 하나의 반응 용기에서 2개의 타겟 핵산을 동시에 증폭시키는 멀티플렉스 반응이다.
- [181] 일 구현예에 있어서, 상기 타겟 핵산의 증폭은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 실시될 수 있다.
- [182] 중합효소 연쇄반응은 타겟 핵산을 증폭하기 위해 해당 기술 분야에서 폭넓게 사용되고 있으며, 타겟 핵산 서열의 변성, 타겟 핵산 서열 및 프라이머 간의 어닐링(혼성화) 및 프라이머 연장으로 이루어진 사이클의 반복을 포함한다(미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호; Saiki et al., (1985) Science 230, 1350-1354).
- [183] 타겟 핵산이 이중-가닥인 경우, 이중-가닥을 단일-가닥 또는 부분적인 단일-가닥 형태로 만드는 것이 바람직하다. 이중-가닥을 분리하는 방법에는 가열, 알칼리, 포름아미드, 우레아 및 글리콥살 처리, 효소적 방법(예컨대, 헬리카아제 작용) 및 결합 단백질 등이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 가닥의 분리는 80°C 내지 105°C 범위의 온도에서 가열함으로써 달성될 수 있다. 이러한 처리를 달성하기 위한 일반적인 방법은 Joseph Sambrook, et. al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)에 의해 제공된다.
- [184] 프라이머와 타겟 핵산의 어닐링은 최적화 절차에 의하여 일반적으로 결정되는 적합한 혼성화 조건하에서 실시될 수 있다. 온도, 성분의 농도, 혼성화와 세척 횟

수, 버퍼 성분, 및 이들의 pH와 이온 강도 등과 같은 조건은 프라이머와 타겟 핵산 서열의 길이 및 GC 함량을 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook et. al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y. (1999)에서 확인할 수 있다.

- [185] 타겟 핵산에 어닐링된 프라이머는 주형-의존적 중합효소에 의해 연장되며, 이는 *E. coli* DNA 중합효소 I의 "클레나우" 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 본 개시의 일 구현예에서, 주형-의존적 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 수득된 열안정성 DNA 중합효소이다.
- [186] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 뉴클레아제 활성(예컨대, 5'뉴클레아제 활성 또는 3'뉴클레아제 활성)을 갖는 핵산 중합효소가 사용될 수 있다.
- [187] 본 발명에서 유용한 핵산 중합효소는 *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* 및 *Aquifex aeolicus*를 포함하는, 다양한 박테리아 종으로부터 얻은 열안정성 DNA 중합효소이다. 특히, 상기 열안정성 DNA 중합효소는 Taq 중합효소이다.
- [188] 중합 반응을 실시할 때, 반응에 필요한 성분들은 반응 용기에 과량으로 제공될 수 있다. 연장 반응의 성분들과 관련하여 과량은 기대하는 연장을 달성하는 능력이 상기 성분들의 농도에 의해 실질적으로 제한되지 않을 정도의 각 성분들의 양을 의미한다. 원하는 반응이 일어나게 하기 위해 Mg^{2+} 와 같은 필요한 보조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP들을 충분한 양으로 반응 혼합물에 제공하는 것이 바람직하다.
- [189] 본 발명의 방법에 따르면, 정량의 민감도를 높이기 위해 증가된 부피의 샘플을 사용할 수 있다. 상기 사용되는 샘플의 부피는, 비제한적으로 5 내지 15 ul, 특히 8 ul, 9 ul, 10 ul, 11 ul 또는 12 ul일 수 있다.
- [190] 또한, 정량의 민감도를 높이기 위해, 본 발명의 방법은 증가된 총 반응 부피를 가질 수 있다. 본 발명에 따른 핵산 증폭 반응에서의 총 반응 부피는, 비제한적으로 20 내지 30 ul, 특히 25 ul, 26 ul, 27 ul, 28 ul, 29 ul, 또는 30 ul일 수 있다.

- [191] mRNA를 출발 물질로 이용하는 경우, 어닐링 단계 실시 이전에 역전사 단계가 필수적이며, 이의 상세한 내용은 문헌[Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); 및 Noonan, K. F. 등, *Nucleic Acids Res.* 16:10366 (1988)]에 개시되어 있다. 역전사 반응을 위해, mRNA의 폴리 A 테일에 혼성화가능한 올리고뉴클레오타이드 dT 프라이머, 랜덤 프라이머 또는 타겟-특이적 프라이머가 이용될 수 있다.
- [192] 다른 구현예에 따르면, 상기 타겟 핵산을 증폭하기 위한 방법으로 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR, 참조 Wiedmann M, 등, "Ligase chain reaction (LCR)- overview and applications." *PCR Methods and Applications* 1994 Feb;3(4):S51-64), 갭 필링 LCR(gap filling LCR; GLCR, 참조 WO 90/01069, 유럽 특허 제439182호 및 WO 93/00447), Q-베타 리플리카제 증폭(Q-beta replicase amplification; Q-beta, 참조 Cahill P, 등, *Clin Chem.*, 37(9): 1482-5(1991), 미국 특허 제5556751호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification; SDA, 참조 G T Walker 등, *Nucleic Acids Res.* 20(7):16911696(1992), 유럽 특허 제497272호), 핵산 서열-기반 증폭(nucleic acid sequence-based amplification; NASBA, 참조 Compton, J. *Nature* 350(6313):912(1991)), 전사 매개 증폭(Transcription-Mediated Amplification; TMA, 참조 Hofmann WP 등, *J Clin Virol.* 32(4):289-93(2005); 미국 특허 제5888779호), 롤링 서클 증폭(Rolling Circle Amplification; RCA, 참조 Hutchison C.A. 등, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 102:1733217336(2005)), RPA(Recombinase polymerase amplification) 또는 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 등을 이용할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [193] 상기 상술한 증폭 방법은 온도를 변화시키거나 변화시키지 않는 일련의 반응들의 반복을 통하여 타겟 핵산을 증폭시킬 수 있다. 상기 일련의 반응들의 반복을 포함하는 증폭의 단위는 "사이클(cycle)"로 표현된다. 상기 사이클의 단위는 증폭 방법에 따라 반복 횟수 또는 시간으로 표현될 수 있다.
- [194] 예를 들어, 시그널의 검출은 증폭의 각 사이클, 선택된 일부 사이클, 또는 반응의 엔드-포인트(end-point of reaction)에서 실시될 수 있다.
- [195] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 타겟 핵산의 증폭은 비대칭 PCR(asymmetric PCR)에 의해 달성된다. 상기 프라이머의 비율은 다운스트림 올리고뉴클레오타이드의 절단 또는 혼성화를 고려하여 선택될 수 있다.
- [196]
- [197] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 타겟 핵산 검출용 조성물은 내부 대조군 반응을 위한 올리고뉴클레오타이드 세트를 추가로 포함한다. 상기 내부 대조군 반응은 본 발명에 따른 BKV의 VP2 유전자 및 CMV의 UL55 유전자의 핵산 증폭 반응과 동시에 수행될 수 있다. 본원에서 "내부 대조군"은 반응의 적합성을 확인하기 위한 물질을 의미하며, 이는 타겟 핵산의 존재 여부, 핵산 추출시 타겟 핵산의 손실 여부, 증폭 반응에서의 저해 물질의 존재 등을 확인시켜 준다.
- [198] 일 구현예에서, 상기 내부 대조군은 HBB(human hemoglobin subunit beta)이다.

- [199] 일 구현예에서, 내부 대조군 반응에 필요한 올리고뉴클레오타이드 세트는 상기 내부 대조군과 혼성화가능한 프라이머 쌍 및 프로브를 포함한다.
- [200] 일 구현예에서, 상기 내부 대조군 반응에 사용되는 프로브는 검출가능한 형광 표지 및 상기 형광 표지로부터의 시그널을 퀀칭할 수 있는 퀀칭 모이어티를 포함한다.
- [201] 일 구현예에서, 상기 내부 대조군 반응에 사용되는 프로브에 연결된 형광 표지는 Quasar 670 또는 이의 등가물이다.
- [202] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 타겟 핵산 검출용 조성물은 양성 대조군 반응을 위한 양성 대조군을 추가로 포함한다. 상기 양성 대조군 반응은 본 발명에 따른 BKV의 VP2 유전자 및 CMV의 UL55 유전자의 핵산 증폭 반응과 동시에 또는 이전 또는 이후에 수행될 수 있다. 상기 양성 대조군은 전술한 BKV의 VP2 유전자 이거나 전술한 CMV의 UL55의 유전자일 수 있다. 상기 양성 대조군은 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트에 의해 증폭 및/또는 검출될 수 있다.
- [203] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 타겟 핵산 검출용 조성물은 음성 대조군 반응을 위한 음성 대조군을 추가로 포함한다. 상기 음성 대조군 반응은 본 발명에 따른 BKV의 VP2 유전자 및 CMV의 UL55 유전자의 핵산 증폭 반응과 동시에 또는 이전 또는 이후에 수행될 수 있다. 상기 음성 대조군은 타겟 핵산을 함유하지 않는 멸균수, 특히 초순수(ultrapure) PCR 등급의 물일 수 있다.
- [204] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 타겟 핵산 검출용 조성물은 UDG(Uracil DNA Glycosylase)를 추가로 포함한다. UDG는 이전 반응의 결과물(예컨대, cDNA 또는 증폭 산물)이 다양한 경로로 새로 수행되는 반응을 오염시키는 캐리-오버(carry-over) 오염을 방지할 수 있다. 구체적으로, dNTPs 중에서 dTTP 대신 dUTP를 사용하여, 역전사 반응 또는 증폭 반응을 수행한다. 이들의 결과물(즉, cDNA 또는 증폭산물)은 dUTP를 포함하고 있으며, 새로운 반응을 수행하기 이전에 UDG를 처리하여 dUTP를 포함하는 이전 결과물들을 가수분해시킴으로써 캐리-오버 오염을 방지할 수 있다.
- [205] 적합한 UDG의 예로서, 열 취약성 UDG(heat labile Uracil DNA Glycosylase)를 이용할 수 있다. 상기 열 취약성 UDG는 저온성 생명체로부터 유래된 UDG, 예컨대, 호냉성(psychrophilic) 박테리아 또는 알래스카 대구(Atlantic cod)로부터 유래된 UDG를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이들 효소는 각각 50°C 또는 55°C의 온도에 노출되면, 빠르게 비가역적으로 불활성화되는 특징을 갖는다. 따라서, 열 취약성 UDG는 역전사 반응이 시작되기 전에 불활성화되어, 역전사 반응에 의한 cDNA 생성 과정에는 전혀 영향을 미치지 않고, 캐리-오버 오염 물질만을 제거할 수 있다.
- [206]

- [207] 본 발명에 따른 타겟 핵산 검출용 조성물은 이의 상응하는 타겟 핵산의 존재 하에 시그널을 발생시키고, 상기 발생된 시그널의 검출에 의해 타겟 핵산을 정량할 수 있게 한다.
- [208] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 핵산 증폭 반응은 타겟 핵산 검출용 조성물에 의한 시그널 발생과 함께 타겟 증폭이 가능한 조건하에서 실시된다.
- [209] 일 구현예에 따르면, 상기 시그널의 발생은 표지로부터 "시그널 발생 또는 소멸" 및 "시그널 증가 또는 감소"를 포함한다. 본원에서 시그널의 발생은 유의한 시그널, 즉 타겟 핵산의 존재를 나타내는 시그널의 발생을 의미한다. 예를 들어, 유의한 시그널, 즉 타겟 핵산의 존재를 나타내는 시그널은 백그라운드 시그널의 강도 또는 타겟 핵산의 부재시에 발생할 수 있는 시그널의 강도를 초과하는 강도를 갖는 시그널을 의미하거나, 또는 유의한 시그널, 즉 타겟 핵산의 존재를 나타내는 시그널은 발생한 시그널의 강도로부터 백그라운드 시그널의 강도 또는 타겟 핵산의 부재시에 발생할 수 있는 시그널의 강도를 차감한 후의 강도를 갖는 시그널을 의미한다. 시그널은 발생하였지만 그의 강도가 백그라운드 시그널의 강도 또는 타겟 핵산의 부재시에 발생할 수 있는 시그널의 강도와 비슷하거나 낮은 경우, 상기 시그널의 발생은 본 발명의 방법에서 시그널 또는 시그널의 발생으로 간주되지 않는다.
- [210]
- [211] 본 발명의 방법에 따르면, 상기 핵산 증폭 반응은 샘플 내에 BKV의 존재시 BKV의 VP2 유전자의 증폭을 나타내는 제1 증폭 곡선을 생성하고, 샘플 내에 CMV의 존재시 CMV의 UL55 유전자의 증폭을 나타내는 제2 증폭 곡선을 생성한다.
- [212] 본원에서, 증폭 곡선은 증폭 반응으로부터 얻은 타겟 핵산에 대한 데이터 세트를 플롯팅함으로써 수득된 곡선을 지칭한다. 일 구현예에서, 상기 데이터 세트는 사이클 번호 및 신호값을 포함하는 복수의 데이터 지점을 포함한다.
- [213] 본 발명에서 용어 "사이클"은 일정한 조건의 변화를 수반한 복수의 측정에 있어, 상기 조건의 변화 단위를 말한다. 상기 일정한 조건의 변화는 예를 들어 온도, 반응시간, 반응횟수, 농도, pH, 측정 대상(예를 들어 핵산)의 복제 횟수 등의 증가 또는 감소를 의미한다. 따라서 사이클은 시간(time) 또는 과정(process) 사이클, 단위 운영(unit operation) 사이클 및 재생산(reproductive) 사이클일 수 있다.
- [214] 일 예로 기질의 농도에 따른 효소의 기질 분해 능력을 측정하는 경우, 기질 농도를 달리하여 수 차례 효소의 기질 분해 정도를 측정한 후, 이로부터 효소의 기질 분해 능력을 분석한다. 이때 일정한 조건의 변화는 기질 농도의 증가이며, 사용된 기질 농도 증가 단위가 하나의 사이클로 설정된다.
- [215] 다른 일 예로 핵산의 등온증폭 반응(isothermal amplification)의 경우 하나의 샘플을 반응시간을 달리하여 수차례 측정을 할 수 있으며, 이 경우 반응시간이 조건의 변화이며, 반응시간 단위가 하나의 사이클로 설정된다.

- [216] 보다 구체적으로, 용어 "사이클"은 일정한 과정의 반응을 반복하거나 일정한 시간 간격 기준으로 반응을 반복하는 경우, 상기 반복의 하나의 단위를 의미한다.
- [217] 일 예로 중합효소 연쇄 반응(PCR)의 경우 하나의 사이클은 핵산의 변성단계(denaturation), 프라이머의 어닐링 단계 및 프라이머의 연장 단계(extension)를 포함하는 반응을 의미한다. 이 경우 일정한 조건의 변화는 반응의 반복 횟수의 증가이며, 상기 일련의 단계를 포함하는 반응의 반복 단위가 하나의 사이클로 설정된다.
- [218] 본 명세서에서 용어 "신호값"은 핵산 증폭 반응의 사이클에서 측정된 신호의 수준(예컨대, 신호의 세기)을 일정한 스케일에 따라 수치화한 값 또는 이들의 변형값을 의미한다. 상기 변형값은 상기 측정된 신호값의 수학적으로 가공된 신호값을 포함할 수 있다. 실제로 측정된 신호값(즉, 원시 데이터 세트의 신호값)의 수학적으로 가공된 신호값의 예는 로그값 또는 도함수값(derivatives)을 포함할 수 있다.
- [219] 본 명세서에 용어 "데이터 지점(data point)"은 사이클 및 신호값을 포함하는 하나의 좌표값(a coordinate value)을 의미한다. 용어 "데이터"는 데이터 세트를 구성하는 모든 정보를 의미한다. 예컨대, 증폭 반응의 사이클 및 신호값 각각은 데이터이다.
- [220] 증폭 반응에 의해 얻어진 데이터 지점들은 2차원 직교 좌표계에 나타낼 수 있는 좌표값으로 표시될 수 있다. 상기 좌표값에서 X-축은 해당 사이클 수를 나타내며, Y-축은 해당 사이클에서 측정 또는 가공된 신호값을 나타낸다.
- [221] 본 명세서에 용어 "데이터 세트"는 상기 데이터 지점들의 집합을 의미한다. 예를 들어, 데이터 세트는 타겟 핵산에 특이적인 올리고뉴클레오타이드 세트의 존재 하에서 수행된 증폭 반응을 통하여 직접적으로 획득되는 데이터 지점의 집합일 수 있으며 또는 이의 변형된 데이터 세트일 수 있다. 상기 데이터 세트는 증폭 반응에 의해 획득되는 복수의 데이터 지점들 또는 이의 변형된 데이터 지점들의 일부 또는 전체일 수 있다.
- [222] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 증폭 곡선은 종래 공지된 방법에 따라 백그라운드 시그널을 차감함으로써 획득된 것이다.

[223]

[224] **단계 (b): BKV 및 CMV의 양의 결정**

- [225] 본 개시의 단계 (b)에서는, 상기 생성된 제1 증폭 곡선을 이용하여 샘플 내의 BKV의 양을 결정하고, 상기 생성된 제2 증폭 곡선을 이용하여 샘플 내의 CMV의 양을 결정한다.
- [226] 구체적으로, 상기 생성된 제1 증폭 곡선을 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선과 비교하여 상기 샘플 내의 BKV의 양을 결정하고, 상기 생성된 제2 증폭 곡선을 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다

른 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선과 비교하여 상기 샘플 내의 CMV의 양을 결정한다.

[227] VP2 유전자에 대한 표준 곡선과 UL55에 대한 표준 곡선은 상기 단계 (b)의 이전에 또는 동시에 준비된다.

[228] 본원에서, VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선은 "VP2 유전자에 대한 표준 곡선" 또는 "BKV에 대한 표준 곡선"으로 지칭될 수 있고, UL55 유전자를 함유하는 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선은 "UL55 유전자에 대한 표준 곡선" 또는 "CMV에 대한 표준 곡선"으로 지칭될 수 있다.

[229]

[230] 이하, 각 표준 곡선에 대해 설명하기로 한다.

[231] VP2 유전자에 대한 표준 곡선은 다양한 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플을 사용한 핵산 증폭 반응으로부터 얻어진다.

[232] 마찬가지로, UL55 유전자에 대한 표준 곡선은 다양한 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플을 사용한 핵산 증폭 반응으로부터 얻어진다.

[233] 상기 표준 곡선을 얻기 위한 핵산 증폭 반응은 전술한 단계 (a)에서의 핵산 증폭 반응과 별도로 수행되며, 이는 표준 핵산 증폭 반응 또는 참조 핵산 증폭 반응으로 불릴 수 있다.

[234] 일 구현예에서, 상기 VP 유전자에 대한 표준 곡선 또는 UL55 유전자에 대한 표준 곡선은 당업계에 공지된 절대 정량법에 의해 획득될 수 있다.

[235] 특정 구현예에서, 상기 VP 유전자에 대한 표준 곡선 또는 UL55 유전자에 대한 표준 곡선은 하기 단계로부터 얻어진다: (i) 기지의 양의 VP 유전자 또는 UL55 유전자를 함유하는 참조 샘플을 사용한 핵산 증폭 반응에 의해 증폭 곡선을 얻는 단계, (ii) 상기 증폭 곡선으로부터 역치 사이클(Ct)를 결정하는 단계, 및 (iii) 상기 역치 사이클을 상기 VP 유전자 또는 UL 유전자의 기지의 양의 로그(log) 값에 대해 플롯팅하는 단계.

[236] 전술한 구현예에서, 단계 (i)에서 사용되는 기지의 양의 VP2 유전자 또는 기지의 양의 UL55 유전자는 상업적으로 또는 비상업적으로 입수가 가능한 표준 물질일 수 있다.

[237] 또한, 상기 유전자의 기지의 양은 상기 유전자의 양의 희석 시리즈일 수 있다.

[238] 상기 유전자의 양의 희석 시리즈는 일련의 희석된 양의 유전자를 함유하는 참조 샘플을 지칭하며, 이는 샘플, 특히 임상 샘플에서 일반적으로 존재하는 것으로 알려진 타겟 핵산의 양을 고려하여 준비될 수 있다.

[239] 일 구현예에서, 상기 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플은 각각 10^1 copies/uL 내지 10^{10} copies/uL로부터 선택된 양을 포함하는 3개 이상이다.

[240] 특정 구현예에서, 상기 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플은 10^3 copies/uL의 VP2 유전자를 포함하는 참조 샘플, 10^5 copies/uL의 VP2 유전자를 포

- 함하는 참조 샘플 및 10^7 copies/uL의 VP2 유전자를 포함하는 참조 샘플을 포함한다.
- [241] 일 구현예에서, 상기 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플은 각각 10^1 copies/uL 내지 10^{10} copies/uL로부터 선택된 양을 포함하는 3개 이상이다.
- [242] 특정 구현예에서, 상기 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플은 10^3 copies/uL의 UL55 유전자를 포함하는 참조 샘플, 10^5 copies/uL의 UL55 유전자를 포함하는 참조 샘플 및 10^7 copies/uL의 UL55 유전자를 포함하는 참조 샘플을 포함한다.
- [243] 전술한 구현예에서, 참조 샘플에 대한 핵산 증폭 반응의 조건은 본 발명에 따른 샘플에 대한 핵산 증폭 반응의 조건과 동일하다. 예를 들어, 참조 샘플을 사용한 핵산 증폭 반응의 조건(예컨대, 온도, 시간 등), 용기(또는 용기의 종류(예컨대, 플레이트 등)) 및 사용된 장치(또는 장치의 종류(예컨대, 열순환기(thermocycler) 등) 등은 샘플을 사용한 핵산 증폭 반응의 조건, 용기 및 사용된 장치 등과 동일하다.
- [244] 전술한 구현예에서, 단계 (ii)에서의 역치 사이클(Ct)의 결정은 당업계에 공지된 다양한 방식에 의해 수행될 수 있다.
- [245] 상기 역치 사이클은 샘플 내에 존재하는 타겟 핵산의 양과 선형 상관관계를 나타낸다. 높은 역치 사이클은 샘플 내에 존재하는 타겟 핵산의 양이 적다는 것을 나타내는 반면, 낮은 역치 사이클은 샘플 내에 존재하는 타겟 핵산의 양이 많다는 것을 나타낸다.
- [246] 따라서, 10^3 copies/uL의 VP2 유전자를 포함하는 참조 샘플, 10^5 copies/uL의 VP2 유전자를 포함하는 참조 샘플 및 10^7 copies/uL의 VP2 유전자를 포함하는 참조 샘플에 대한 핵산 증폭 반응으로부터 역치 사이클을 결정하는 경우, 10^3 copies/uL의 VP2 유전자를 포함하는 참조 샘플이 가장 높은 역치 사이클을 나타낼 것이고, 10^7 copies/uL의 VP2 유전자를 포함하는 참조 샘플이 가장 낮은 역치 사이클을 나타낼 것이다. 이는 UL55의 참조 샘플에도 동일하게 적용될 것이다. 그러나, VP2 유전자와 UL55 유전자의 양이 동일하더라도, 이들로부터 수득되는 역치 사이클은 서로 상이할 수 있음에 유의한다.
- [247] 상기 역치 사이클은 증폭 곡선에 미리 결정된 역치를 적용하여 상기 역치에 교차하는 점으로서 결정되거나, 또는 US 6,503,720호, US 6,783,934, US 10,176,293, US 8,285,489, US 7,565,250 등에 개시된 FDM(first derivative maximum), SDM(second derivative maximum) 등으로서 결정될 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다. 또한, 당업자라면 상기 역치 사이클 대신에 다른 파라미터, 예컨대 Cp(crossing point), Cq(quantification cycle), Δ Ct, Δ Cp 또는 Δ Cq가 사용될 수 있음을 이해할 것이다.
- [248] 전술한 구현예에서, 상기 역치 사이클을 상기 VP 유전자 또는 UL 유전자의 기지의 양의 로그(log) 값에 대해 플롯팅함으로써 각 표준 곡선이 수득된다.

- [249] 일 구현예에서, 표준 곡선은 y 축에 역치 사이클을 갖고 x 축에 각 유전자의 양(출발 양, 로그 값)을 갖는다.
- [250]
- [251] 전술한 바와 같이 참조 샘플로부터 생성된 각 표준 곡선은 제1 증폭 곡선 및 제2 증폭 곡선 중 상응하는 증폭 곡선과 비교된다. 즉, 제1 증폭 곡선은 VP2 유전자에 대한 표준 곡선과 비교되고, 제2 증폭 곡선은 UL55 유전자에 대한 표준 곡선과 비교된다.
- [252] 일 구현예에서, 샘플에 대한 제1 증폭 곡선으로부터 역치 사이클이 획득되고, VP2 유전자에 대한 표준 곡선에서 상기 역치 사이클(예컨대, y 축의 값)에 상응하는 VP2 유전자의 양(예컨대, x 축의 값)이 획득되며, 상기 획득된 양이 샘플 내의 BKV의 양으로 결정된다.
- [253] 마찬가지로, 일 구현예에서, 제2 증폭 곡선으로부터 역치 사이클이 획득되고, UL55 유전자에 대한 표준 곡선에서 상기 역치 사이클(예컨대, y 축의 값)에 상응하는 UL55 유전자의 양(예컨대, x 축의 값)이 획득되며, 상기 획득된 양이 샘플 내의 CMV의 양으로 결정된다.
- [254]
- [255] 전술한 바와 같이, 본 발명의 방법은 BKV의 VP2 유전자에 혼성화가 가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 CMV의 UL55 유전자에 혼성화가 가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트를 사용하여 샘플 내의 BK 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량을 가능하게 한다.
- [256] 본 발명의 방법에 따른 정량 결과는 샘플 내의 BKV의 정성 분석에 적용될 수 있다.
- [257] 일 구현예에서, 특정 샘플에 대해 본 발명의 방법에 따라 결정된 BKV 또는 CMV의 양이 미리 결정된 수준을 초과하면 상기 샘플은 양성인 것으로 결정되는 반면, 상기 BKV 또는 CMV의 양이 미리 결정된 수준 이하이면 상기 샘플은 음성인 것으로 결정된다.
- [258] 일 예로서, 특정 샘플에 대해 본 발명의 방법에 따라 결정된 BKV의 양이 500 copies/ml 및 1000 copies/ml 중 선택된 수준을 초과하면 상기 샘플은 양성인 것으로 결정되는 반면, 상기 수준 이하이면 상기 샘플은 음성인 것으로 결정될 수 있다.
- [259] 다른 예로서, 특정 샘플에 대해 본 발명의 방법에 따라 결정된 BKV의 양이 34.5 IU/ml 및 137 IU/ml 중 선택된 수준을 초과하면 상기 샘플은 양성인 것으로 결정되는 반면, 상기 수준 이하이면 상기 샘플은 음성인 것으로 결정될 수 있다.
- [260] 전술한 바와 같은, 미리 결정된 수준은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.
- [261]
- [262] **II. 동시 정량을 위한 조성물**
- [263] 일 양태에 따르면, 하기를 포함하는, 샘플 내의 BK 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량을 위한 조성물을 제공한다:

- [264] (a) BKV의 VP2 유전자에 혼성화가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트;
- [265] (b) CMV의 UL55 유전자에 혼성화가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트; 및
- [266] (c) 중합효소, dNTPs, 및 버퍼를 포함하는 핵산 증폭용 시약.
- [267] 전술한 (a), (b) 및 (c)의 구성요소는 전술한 섹션 I에서 이미 설명하였으므로, 본 섹션에서는 그 설명을 생략하기로 한다.
- [268] 특정 구현예에서, 상기 조성물은 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플 및 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플을 추가로 포함한다.
- [269] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프라이머를 포함한다.
- [270] 특정 구현예에서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 4의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프로브를 포함한다.
- [271] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함한다.
- [272] 특정 구현예에서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 서열 또는 이에 적어도 90% 상동성, 예컨대 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 상동성을 갖는 서열을 갖는 프로브를 포함한다.
- [273] 본 명세서에서 달리 정의되어 있지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미와 동일한 의미를 갖는다.

[274]

발명의 실시를 위한 형태

- [275] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 첨부된 청구항에 제시된 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

[276]

[277] 실시예

[278] 실시예 1: 올리고뉴클레오타이드 세트의 타겟 커버리지(coverage) 확인

[279] BKV를 검출하기 위한 타겟 핵산으로서 BKV의 VP2 유전자를 결정하였다. 상기 BKV의 VP2 유전자 내에서 서열 변이가 적은 보존 영역(conserved region)을 선택하였고, 상기 보존 영역에 혼성화가능한 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머, 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 프라이머, 및 서열번호: 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 디자인하였다. 상기 프로브의 경우, 하나의 말단에 FAM 형광 표지 및 다른 말단에 BHQ-2가 연결되어 있다. 상기 디자인된 프라이머 및 프로브를 제1 올리고뉴클레오타이드 세트로 총칭하였다.

[280] 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트의 타겟 커버리지를 다음과 같이 분석하였다.

[281] 먼저, NCBI의 데이터베이스로부터 BKV(taxonomy ID: 1891762)의 게놈 서열을 수집하였다. 상기 수집 결과, 총 541개의 타겟 핵산 서열이 수집되었다. 이후, 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 내의 서열번호: 2의 서열, 서열번호: 3의 서열, 및 서열번호: 4의 서열 각각을 상기 수집된 타겟 핵산 서열 각각과 비교하여 미스매치의 개수를 확인하였다.

[282] 상기 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[283] [표1]

서열 번호	미스매치 개수									커버리 지(%)
	0	1	2	3	4	5	6	7	>=8	
2	541 /541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	100
3	541 /541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	100
4	541 /541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	0/541	100

[284] 상기 표는 서열번호: 2, 3 및 4의 서열 각각에 대해 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8개의 미스매치된 뉴클레오타이드를 갖는 타겟 핵산의 개수를 보여준다. 상기 표 1에서 보는 바와 같이, 서열번호: 2, 3 및 4의 서열 각각은 541개의 타겟 핵산 모두와 0개의 미스매치를 갖는 것으로 나타났으며, 이는 본 발명에 따른 서열번호: 2, 3 및 4의 프라이머 및 프로브가 수집된 541개의 BKV의 게놈 서열과 100% 매치하며, 따라서 100% 타겟 커버리지를 나타낸다는 것을 입증한다.

[285]

[286] 한편, CMV를 검출하기 위한 타겟 핵산으로서 CMV의 UL55 유전자를 결정하였다. 상기 CMV의 UL55 유전자 내에서 서열 변이가 적은 보존 영역을 선택하였

고, 상기 보존 영역에 혼성화가능한 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머, 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 프라이머, 및 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 디자인하였다. 상기 프로브의 경우, 하나의 말단에 Cal Red 610 형광 표지 및 다른 말단에 BHQ-2가 연결되어 있다. 상기 디자인된 프라이머 및 프로브를 제2 올리고뉴클레오타이드 세트에 총칭하였다.

[287] 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트의 타겟 커버리지를 다음과 같이 분석하였다.

[288] 먼저, NCBI의 데이터베이스로부터 CMV(taxonomy ID: 10359)의 게놈 서열을 수집하였다. 상기 수집 결과, 총 523개의 타겟 핵산 서열이 수집되었다. 이후, 제2 올리고뉴클레오타이드 세트 내의 서열번호: 6의 서열, 서열번호: 7의 서열, 및 서열번호: 8의 서열 각각을 상기 수집된 타겟 핵산 서열 각각과 비교하여 미스매치의 개수를 확인하였다.

[289] 상기 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[290] [표2]

서열 번호	미스매치 개수									커버리 지(%)
	0	1	2	3	4	5	6	7	>=8	
6	523 /523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	100
7	521 /523	2/523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	99.6
8	521 /523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	0/523	99.6

[291] 상기 표는 서열번호: 6, 7 및 8의 서열 각각에 대해 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8개의 미스매치된 뉴클레오타이드를 갖는 타겟 핵산의 개수를 보여준다.

[292] 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 서열번호: 6의 서열은 523개의 타겟 핵산 모두에 대해 0개의 미스매치를 갖는 것으로 나타났으며, 따라서, 상기 서열은 100% 타겟 커버리지를 나타내었다. 또한, 서열번호: 7 및 8의 서열은 523개의 타겟 핵산 중 521개의 타겟 핵산에 대해 0개의 미스매치를 갖고, 2개의 타겟 핵산에 대해 1개의 미스매치를 갖는 것으로 나타났다. 상기 서열번호: 7 및 8의 서열은 1개의 미스매치를 갖는 타겟 핵산에도 혼성화가능할 것으로 예상되므로, 본 발명에 따른 서열번호: 6, 7 및 8의 프라이머 및 프로브가 실질적으로 100% 타겟 커버리지를 나타낸다는 것을 확인하였다.

[293]

[294] 실시예 2: 올리고뉴클레오타이드 세트의 특이도 확인

- [295] 실시예 1에서 디자인된 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트의 특이도를 확인하였다.
- [296] 먼저, BK 바이러스의 특이도 실험을 위해, 폴리오마 바이러스에 속하며 BK 바이러스와 유전적 상동성이 높은 JC 바이러스와 시미안 바이러스 40, 및 그 외에 사람에게 존재하는 것으로 알려져 있으나 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트에 의해 검출되지 않아야 하는 균주를 포함하여 총 47종의 특이도 균주를 선택하였다.
- [297] 상기 47종의 균주 각각의 지놈 DNA 10 μ l, 상기 실시예 1에서 디자인된 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 6.25 μ l, 4X Master mix(final, 200 μ M dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U의 Taq DNA 중합효소, 0.1 U의 UDG) 6.25 μ l, 및 증류수 2.5 μ l를 혼합하여 실시간 PCR을 위한 반응 혼합물을 준비하였다.
- [298] 상기 제조된 반응 혼합물 각각을 서로 상이한 튜브에 넣어 실시간 열순환기 (CFX96 Real-time Cycler, Bio-Rad)에서 95°C에서 15분 동안 변성시키고, 95°C에서 10초, 60°C에서 15초 및 72°C에서 10초의 45 사이클을 수행하였다. 상기 각 사이클 동안 72°C에서 시그널을 측정하여 증폭 곡선을 수득하였다.
- [299] 상기 증폭 곡선에 미리 결정된 역치를 적용하여 각 타겟 핵산의 존재 여부를 결정하였다.
- [300] 상기 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[301] [표3]

No.	Analyte	Result
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	N.D.
2	<i>Citrobacter freundii</i>	N.D.
3	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	N.D.
4	<i>Corynebacterium striatum</i>	N.D.
5	<i>Corynebacterium urealyticus</i>	N.D.
6	<i>Escherichia coli</i> (O138:K81(B):H14)	N.D.
7	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	N.D.
8	<i>Enterococcus faecium</i>	N.D.
9	<i>Escherichia coli</i>	N.D.
10	<i>Escherichia fergusonii</i>	N.D.
11	<i>Escherichia hermannii</i>	N.D.
12	<i>Escherichia vulneris</i>	N.D.
13	<i>Haemophilus aegyptius</i>	N.D.
14	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	N.D.

15	Listeria seeligeri	N.D.
16	Listeria innocua Seeliger	N.D.
17	Neisseria lactamica Hollis et al.	N.D.
18	Neisseria mucosa	N.D.
19	Pantoea agglomerans	N.D.
20	Serratia marcescens	N.D.
21	Staphylococcus capitis subsp. capitis	N.D.
22	Staphylococcus hominis subsp. hominis	N.D.
23	Staphylococcus epidermidis	N.D.
24	Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus	N.D.
25	Streptococcus pseudopneumoniae	N.D.
26	Streptococcus australis	N.D.
27	Streptococcus bovis	N.D.
28	Streptococcus intermedius	N.D.
29	Bacillus cereus	N.D.
30	Bacillus subtilis	N.D.
31	Salmonella bongori	N.D.
32	Herpes simplex virus 1 (Strain: MacIntyre)	N.D.
33	Herpes herpesvirus 2	N.D.
34	Human herpesvirus 4, Epstein Barr virus (EBV)	N.D.
35	Human herpesvirus 6B	N.D.
36	Human herpesvirus 6	N.D.
37	Human Herpes 7 virus (SB strain)	N.D.
38	Dengue virus Type 2	N.D.
39	La Crosse Virus	N.D.
40	Measles Virus	N.D.
41	St. Louis Encephalitis Virus	N.D.
42	International Standard for Hepatitis B virus	N.D.
43	International Standard for Hepatitis C virus	N.D.
44	Coxsackievirus B1_titering	N.D.

45	Varicella zoster virus	N.D.
46	JC virus	N.D.
47	Simian virus 40	N.D.

[302] (N.D.: Not Detected)

[303] 상기 표 3에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 BKV와 높은 유전적 상동성을 갖는 JC 바이러스 및 시미안 바이러스 40을 포함하여 임상적으로 중요한 다른 균주를 검출하지 않는 것으로 나타났으며, 이는 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트의 높은 타겟 특이성을 입증한다.

[304]

[305] 다음으로, CMV 바이러스의 특이도 실험을 위해, 헤르페스 바이러스과에 속하며 CMV 바이러스와 유전적 상동성이 높은 헤르페스 심플렉스 바이러스 1 (균주: MacIntyre), 인간 헤르페스바이러스 2, 인간 헤르페스바이러스 4 엡스타인 바 바이러스(EBV), 인간 헤르페스바이러스 6B, 인간 헤르페스바이러스 6 및 인간 헤르페스 7 바이러스(SB 균주), 및 그 외에 사람에게 존재하는 것으로 알려져 있으나 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드 세트에 의해 검출되지 않아야 하는 균주를 포함하여 총 47종의 특이도 균주를 선택하였다.

[306] 상기 47종의 균주 각각의 지놈 DNA 10 μ l, 상기 실시예 1에서 디자인된 제2 올리고뉴클레오타이드 세트 6.25 μ l, 4X Master mix(final, 200 uM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 U의 Taq DNA 중합효소, 0.1 U의 UDG) 6.25 μ l, 및 증류수 2.5 μ l를 혼합하여 실시간 PCR을 위한 반응 혼합물을 준비하였다.

[307] 상기 제조된 반응 혼합물 각각을 서로 상이한 튜브에 넣어 실시간 열순환기 (CFX96 Real-time Cycler, Bio-Rad)에서 95°C에서 15분 동안 변성시키고, 95°C에서 10초, 60°C에서 15초 및 72°C에서 10초의 45 사이클을 수행하였다. 상기 각 사이클 동안 72°C에서 시그널을 측정하여 증폭 곡선을 획득하였다.

[308] 상기 증폭 곡선에 미리 결정된 역치를 적용하여 각 타겟 핵산의 존재 여부를 결정하였다.

[309] 상기 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[310] [표4]

No.	Analyte	Result
1	Acinetobacter baumannii	N.D.
2	Citrobacter freundii	N.D.
3	Corynebacterium diphtheriae	N.D.
4	Corynebacterium striatum	N.D.
5	Corynebacterium urealyticus	N.D.

6	<i>Escherichia coli</i> (O138:K81(B):H14)	N.D.
7	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	N.D.
8	<i>Enterococcus faecium</i>	N.D.
9	<i>Escherichia coli</i>	N.D.
10	<i>Escherichia fergusonii</i>	N.D.
11	<i>Escherichia hermannii</i>	N.D.
12	<i>Escherichia vulneris</i>	N.D.
13	<i>Haemophilus aegyptius</i>	N.D.
14	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	N.D.
15	<i>Listeria seeligeri</i>	N.D.
16	<i>Listeria innocua</i> Seeliger	N.D.
17	<i>Neisseria lactamica</i> Hollis et al.	N.D.
18	<i>Neisseria mucosa</i>	N.D.
19	<i>Pantoea agglomerans</i>	N.D.
20	<i>Serratia marcescens</i>	N.D.
21	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	N.D.
22	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	N.D.
23	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	N.D.
24	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	N.D.
25	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	N.D.
26	<i>Streptococcus australis</i>	N.D.
27	<i>Streptococcus bovis</i>	N.D.
28	<i>Streptococcus intermedius</i>	N.D.
29	<i>Bacillus cereus</i>	N.D.
30	<i>Bacillus subtilis</i>	N.D.
31	<i>Salmonella bongori</i>	N.D.
32	Herpes simplex virus 1 (Strain: MacIntyre)	N.D.
33	human herpesvirus 2	N.D.
34	Human herpesvirus 4, Epstein Barr virus (EBV)	N.D.
35	Human herpesvirus 6B	N.D.

36	Human herpesvirus 6	N.D.
37	Human Herpes 7 virus (SB strain)	N.D.
38	Dengue virus Type 2	N.D.
39	La Crosse Virus	N.D.
40	Measles Virus	N.D.
41	St. Louis Encephalitis Virus	N.D.
42	International Standard for Hepatitis B virus	N.D.
43	International Standard for Hepatitis C virus	N.D.
44	Coxsackievirus B1_titring	N.D.
45	Varicella zoster virus	N.D.
46	JC virus	N.D.
47	Simian virus 40	N.D.

[311] (N.D.: Not Detected)

[312] 상기 표 4에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 CMV와 높은 유전적 상동성을 갖는 헤르페스 심플렉스 바이러스 1 (균주: MacIntyre), 인간 헤르페스바이러스 2, 인간 헤르페스바이러스 4 엡스타인 바 바이러스(EBV), 인간 헤르페스바이러스 6B, 인간 헤르페스바이러스 6 및 인간 헤르페스 7 바이러스(SB 균주)를 포함하여 임상적으로 중요한 다른 균주를 검출하지 않는 것으로 나타났으며, 이는 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드 세트의 높은 타겟 특이성을 입증한다.

[313]

[314] 실시예 3: 타겟 핵산의 정량

[315] 실시예 1에서 디자인된 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트가 타겟 핵산을 정량하는 데 효과적인지 확인하였다.

[316] 먼저, BKV에 대해 임상적으로 양성인 것으로 확인된 혈장 샘플 32개 및 BKV에 대해 음성인 것으로 확인된 혈장 샘플 98개를 포함하는 총 130개의 혈장 샘플 각각에 대하여 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트를 이용한 실시간 PCR을 수행하였다.

[317] 상기 혈장 샘플로부터 QIASymphony DSP Virus/pathogen Midi Kit(Qiagen, Cat. No. 937055)를 사용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 이후, 상기 추출된 게놈 DNA를 상기 실시예 1에 기재된 실시간 PCR에 적용하여 제1 증폭 곡선을 획득하였다.

[318] 그 다음, 상기 제1 증폭 곡선에 역치로서 RFU 300을 적용하여 Ct 값을 계산하였다.

[319] 이후, 미리 준비된 BKV의 VP2 유전자에 대한 표준 곡선에 상기 제1 증폭 곡선에서의 Ct 값을 대입하여 BKV의 양을 계산하였다.

[320] 상기 계산된 BKV의 양이 500 copies/ml을 초과하면 샘플을 양성으로 결정하고, 상기 수준 이하이면 샘플을 음성으로 결정하였다.

[321] 상기 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[322] [표5]

	양성 결정	음성 결정
양성 샘플 = 32개	32개	0개
음성 샘플 = 98개	0개	98개

[323] 상기 표 5에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 를 사용한 실시간 PCR은 BKV에 대한 양성 샘플 32개를 모두 양성으로 결정하였고, 음성 샘플 98개를 모두 음성으로 결정하였다. 따라서, 본 발명에 따른 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 BKV의 양성 및 음성 샘플을 정확히 정량/정성할 수 있음이 확인되었다.

[324]

[325] 다음으로, CMV에 대해 임상적으로 양성인 것으로 확인된 혈장 샘플 33개 및 CMV에 대해 음성인 것으로 확인된 혈장 샘플 97개를 포함하는 총 130개의 혈장 샘플에 대하여 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드를 이용한 실시간 PCR을 수행하였다.

[326] 상기 혈장 샘플로부터 QIASymphony DSP Virus/pathogen Midi Kit(Qiagen, Cat. No. 937055)를 사용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 이후, 상기 추출된 게놈 DNA를 상기 실시예 1에 기재된 실시간 PCR에 적용하여 제2 증폭 곡선을 획득하였다.

[327] 그 다음, 상기 제2 증폭 곡선에 역치로서 RFU 300을 적용하여 Ct 값을 계산하였다.

[328] 이후, 미리 준비된 CMV의 UL55 유전자에 대한 표준 곡선에 상기 제2 증폭 곡선에서의 Ct 값을 대입하여 CMV의 양을 계산하였다.

[329] 상기 계산된 CMV의 양이 34.5 IU/ml을 초과하면 샘플을 양성으로 결정하고, 상기 수준 이하이면 샘플을 음성으로 결정하였다.

[330] 상기 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[331] [표6]

	양성 결정	음성 결정
양성 샘플 = 33개	33개	0개
음성 샘플 = 98개	5개	92개

[332] 상기 표 6에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드 세트 를 사용한 실시간 PCR은 CMV에 대한 양성 샘플 33개 모두를 양성으로 결정하였고, CMV에 대한 음성 샘플 97개 중 92개는 음성으로 결정하였으나 5개는 양성으로 결정하였다.

- [333] 본 발명에 따른 실시간 PCR에 의해 양성으로 판정된 음성 샘플 5개에 대해, 시퀀싱에 의해 CMV를 함유하고 있는지 확인하였다. 시퀀싱 결과, 상기 음성 샘플 5개는 모두 CMV를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 하지만, 상기 수집된 음성 샘플은 CMV의 양이 137 IU/ml 이하일 때 음성 샘플로 결정하는 반면, 본 발명의 방법의 경우 CMV의 양이 34.5 IU/ml 초과이면 음성으로 결정한다. 상기 5개의 샘플은 34.5 IU/ml 내지 137 IU/ml 사이의 CMV의 양을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 차이는 음성으로 결정하는 기준의 차이에 의한 것일 뿐, 본 발명에 따른 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 CMV의 양성 및 음성 샘플을 정확히 정량/정성할 수 있음이 확인되었다.
- [334]
- [335] 상기 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 방법은 높은 민감도 및 특이도로 보다 정확한 BKV 및 CMV의 동시 진단을 가능하게 한다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 단계를 포함하는, 샘플 내의 BK 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량 방법:
- (a) 단일 반응 용기에서 샘플을 BKV의 VP2 유전자에 혼성화가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트 및 CMV의 UL55 유전자에 혼성화가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트와 접촉시키는 것을 포함하는 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계로서, 상기 핵산 증폭 반응은 샘플 내에 BKV의 존재시 BKV의 VP2 유전자의 증폭을 나타내는 제1 증폭 곡선을 생성하고, 샘플 내에 CMV의 존재시 CMV의 UL55 유전자의 증폭을 나타내는 제2 증폭 곡선을 생성하며; 및
- (b) 상기 생성된 제1 증폭 곡선을 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선과 비교하여 상기 샘플 내의 BKV의 양을 결정하고, 상기 생성된 제2 증폭 곡선을 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플로부터 생성된 표준 곡선과 비교하여 상기 샘플 내의 CMV의 양을 결정하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 보체에 혼성화가능한 복수의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 복수의 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 1-3개의 테옥시이노신을 갖고; 상기 테옥시이노신 중 1개 또는 2개는 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 있는 3번째 뉴클레오타이드 내지 6번째 뉴클레오타이드 범위의 코어 영역에 위치하며, 나머지는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 있는 4번째 뉴클레오타이드 내지 3'-말단에 있는 7번째 뉴클레오타이드 범위의 영역에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 JC 바이러스 또는 시미안 바이러스 40의 게놈 서열에 혼성화가능한 올리고뉴클레오타이드를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 프로브는 검출가능한 형광 표지 및 상기 형광 표지로부터의 시그널을 퀀칭할 수 있는 퀀칭 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 보체에 혼성화가능한 복수의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 복수의 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 1-3개의 테옥시이노신을 갖고; 상기 테옥시이노신 중 1개 또는 2개는 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 있는 3번째 뉴클레오타이드 내지 6번째 뉴클레오타이드 범위의 코어 영역에 위치하며, 나머지는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 있는 4번째 뉴클레오타이드 내지 3'-말단에 있는 7번째 뉴클레오타이드 범위의 영역에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 헤르페스 심플렉스 바이러스 1, 인간 헤르페스바이러스 2, 인간 헤르페스바이러스 4, 인간 헤르페스바이러스 6B, 인간 헤르페스바이러스 6, 또는 인간 헤르페스 7 바이러스의 게놈 서열에 혼성화가능한 올리고뉴클레오타이드를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 프로브는 검출가능한 형광 표지 및 상기 형광 표지로부터의 시그널을 쿼칭할 수 있는 쿼칭 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 핵산 증폭 반응은 실시간 PCR 또는 등온 증폭 반응인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플은 각각 10^1 copies/uL 내지 10^{10} copies/uL로부터 선택된 양을 포함하는 3개 이상인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제1항에 있어서, 상기 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플은 각각 10^1 copies/uL 내지 10^{10} copies/uL로부터 선택된 양을 포함하는 3개 이상인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제1항에 있어서, 상기 샘플은 신장 이식을 받은 대상체로부터 채취한 전혈, 혈장 또는 혈청인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 대상체는 신장 이식을 받은 후 1년 이하인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 제1항에 있어서, 상기 샘플은 5 내지 15 ul의 부피를 가지며, 상기 핵산 증폭 반응의 총 부피는 20 내지 30 ul인 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 20] 하기를 포함하는, 샘플 내의 BK 바이러스(BKV) 및 사이토메갈로바이러스(CMV)의 동시 정량을 위한 조성물:
(a) BKV의 VP2 유전자에 혼성화가능한 제1 올리고뉴클레오타이드 세트;
(b) CMV의 UL55 유전자에 혼성화가능한 제2 올리고뉴클레오타이드 세트; 및
(c) 증합효소, dNTPs, 및 버퍼를 포함하는 핵산 증폭용 시약.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 조성물은 기지의 양의 VP2 유전자를 함유하는 참조 샘플 및 기지의 양의 UL55 유전자를 함유하는 또 다른 참조 샘플을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 22] 제20항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 23] 제20항에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 24] 제1항에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 25] 제1항에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/70(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) C12Q 1/70(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6844(2018.01); C12Q 1/6876(2018.01)		
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: BK 바이러스 (BK virus, BKV), 폴리오마바이러스 (polyomavirus), 사이토메갈로바이러스 (cytomegalovirus, CMV), 헤르페스 바이러스 (herpes virus), 바이러스 캡시드 단백질 (virus capsid protein), VP2, UL55 (glycoprotein B), 동시 검출 (simultaneous detection), 신장 이식 환자 (renal transplant recipient), 실시간 중합효소 연쇄 반응 (real-time PCR/quantitative real-time PCR/qPCR)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WU, C. et al. Simultaneous monitoring of CMV and BKV by quantitative PCR in renal transplant recipients. Journal of Virological Methods. 2014, vol. 210, pp. 40-44. See abstract; pages 41 and 42; and table 1.	1-25
Y	AHMED, H. H. et al. Molecular detection and glycoprotein B (UL55) genotyping of cytomegalovirus among sudanese renal transplant recipients. BioMed Research International. 31 May 2022 (publication date), vol. 2022, article no. 5403694, inner pp. 1-9. See abstract; and inner page 2.	1-25
Y	KR 10-2019-0092611 A (SEEGENE, INC.) 07 August 2019 (2019-08-07) See paragraphs [0016], [0021] and [0067].	3,9
A	CN 102344970 A (THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF WENZHOU MEDICAL COLLEGE) 08 February 2012 (2012-02-08) See entire document.	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 05 August 2024		Date of mailing of the international search report 07 August 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005857

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102363818 A (TARCINE BIOMED (BEIJING) INC.) 29 February 2012 (2012-02-29) See entire document.	1-25
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005857

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/005857

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR	10-2019-0092611	A	07 August 2019	AU 2017-385830 A1	05 July 2018
				AU 2017-385830 B2	01 April 2021
				AU 2021-204329 A1	29 July 2021
				AU 2021-204329 B2	23 November 2023
				AU 2024-201214 A1	21 March 2024
				BR 11-2019-012432 A2	14 April 2020
				CA 3046303 A1	05 July 2018
				CN 110168103 A	23 August 2019
				CN 110168103 B	08 September 2023
				EP 3562958 A1	06 November 2019
				EP 3562958 A4	19 August 2020
				EP 3562958 B1	03 November 2021
				EP 4001428 A1	25 May 2022
				EP 4001428 B1	22 November 2023
				EP 4293127 A2	20 December 2023
				EP 4293127 A3	13 March 2024
				ES 2903538 T3	04 April 2022
				IL 267372 A	29 August 2019
				IL 267372 B1	01 October 2023
				IL 267372 B2	01 February 2024
				IL 302090 A	01 June 2023
				JP 2020-504621 A	13 February 2020
				JP 6938641 B2	22 September 2021
				KR 10-2019-0092611 A	07 August 2019
				KR 10-2021-0090748 A	20 July 2021
				KR 10-2022-0073865 A	03 June 2022
				KR 10-2023-0073345 A	25 May 2023
				KR 10-2279689 B1	22 July 2021
				KR 10-2402712 B1	26 May 2022
				KR 10-2535892 B1	26 May 2023
				KR 10-2651626 B1	26 March 2024
				US 2019-0316193 A1	17 October 2019
				WO 2018-124665 A1	05 July 2018
<hr/>					
CN	102344970	A	08 February 2012	CN 102344970 B	23 January 2013
<hr/>					
CN	102363818	A	29 February 2012	CN 102363818 B	02 January 2013
<hr/>					

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/70(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/70(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6844(2018.01); C12Q 1/6876(2018.01) 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: BK 바이러스 (BK virus, BKV), 폴리오마바이러스 (polyomavirus), 사이토메갈로바이러스 (cytomegalovirus, CMV), 헤르페스 바이러스 (herpes virus), 바이러스 캡시드 단백질 (virus capsid protein), VP2, UL55 (glycoprotein B), 동시 검출 (simultaneous detection), 신장 이식 환자 (renal transplant recipient), 실시간 중합효소 연쇄 반응 (real-time PCR/quantitative real-time PCR/qPCR)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WU, C. 등, "Simultaneous monitoring of CMV and BKV by quantitative PCR in renal transplant recipients", Journal of Virological Methods, 2014년, 210권, 페이지 40-44 요약; 페이지 41, 42; 표 1	1-25
Y	AHMED, H. H. 등, "Molecular detection and glycoprotein B (UL55) genotyping of cytomegalovirus among sudanese renal transplant recipients", BioMed Research International, 2022년 05월 31일(공개일), 2022호, 기사번호 5403694, 내부페이지 1-9 요약; 내부페이지 2	1-25
Y	KR 10-2019-0092611 A (주식회사 씨젠) 2019.08.07 단락 [0016], [0021], [0067]	3,9
A	CN 102344970 A (THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF WENZHOU MEDICAL COLLEGE) 2012.02.08 문헌 전체	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "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	국제조사보고서 발송일	
2024년08월05일 (05.08.2024)	2024년08월07일 (07.08.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CN 102363818 A (TARCINE BIOMED (BEIJING) INC.) 2012.02.29 문헌 전체	1-25

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

- 1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 - 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

- 2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

- 3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0092611 A	2019/08/07	AU 2017-385830 A1	2018/07/05
		AU 2017-385830 B2	2021/04/01
		AU 2021-204329 A1	2021/07/29
		AU 2021-204329 B2	2023/11/23
		AU 2024-201214 A1	2024/03/21
		BR 11-2019-012432 A2	2020/04/14
		CA 3046303 A1	2018/07/05
		CN 110168103 A	2019/08/23
		CN 110168103 B	2023/09/08
		EP 3562958 A1	2019/11/06
		EP 3562958 A4	2020/08/19
		EP 3562958 B1	2021/11/03
		EP 4001428 A1	2022/05/25
		EP 4001428 B1	2023/11/22
		EP 4293127 A2	2023/12/20
		EP 4293127 A3	2024/03/13
		ES 2903538 T3	2022/04/04
		IL 267372 A	2019/08/29
		IL 267372 B1	2023/10/01
		IL 267372 B2	2024/02/01
		IL 302090 A	2023/06/01
		JP 2020-504621 A	2020/02/13
		JP 6938641 B2	2021/09/22
		KR 10-2019-0092611 A	2019/08/07
		KR 10-2021-0090748 A	2021/07/20
		KR 10-2022-0073865 A	2022/06/03
		KR 10-2023-0073345 A	2023/05/25
		KR 10-2279689 B1	2021/07/22
		KR 10-2402712 B1	2022/05/26
		KR 10-2535892 B1	2023/05/26
KR 10-2651626 B1	2024/03/26		
US 2019-0316193 A1	2019/10/17		
WO 2018-124665 A1	2018/07/05		
-----	-----	-----	-----
CN 102344970 A	2012/02/08	CN 102344970 B	2013/01/23
-----	-----	-----	-----
CN 102363818 A	2012/02/29	CN 102363818 B	2013/01/02
-----	-----	-----	-----