

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 8월 15일 (15.08.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/167289 A1

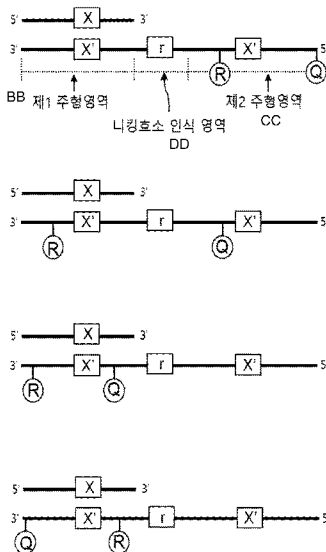
- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/6848* (2018.01) *C12Q 1/6818* (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/001759
- (22) 국제출원일: 2024년 2월 6일 (06.02.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2023-0016010 2023년 2월 7일 (07.02.2023) KR
- (71) 출원인: 주식회사 씨젠 (SEEGENE, INC.) [KR/KR]; 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 고오성 (KO, Ohsung); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR). 이효빈 (LEE, Hyobeen); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR). 한성현 (HAN, Seong Hyun); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR).

- (KR). 김소영 (KIM, Soyoung); 05548 서울특별시 송파구 오금로 91, 지하 1층, 3층, 4층, 5층, 6층, 7층, 8층, 9층, 10층, 11층, 12층, Seoul (KR). 박유람 (PARK, Yuram); 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,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING TARGET OLIGONUCLEOTIDE BY USING DETECTION OLIGONUCLEOTIDE

(54) 발명의 명칭: 검출 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법

<검출 올리고뉴클레오타이드 예시> AA



AA ... Detection oligonucleotide example
BB ... First template region
CC ... Second template region
DD ... Nicking enzyme recognition region

(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting a target oligonucleotide by using a detection oligonucleotide. The method of the present invention is an isothermal amplification method and can very accurately and rapidly detect a target oligonucleotide with high sensitivity.

(57) 요약서: 본 발명은 검출 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 등온 증폭방법으로서 매우 정확하게 신속하면서도, 높은 민감도로 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출할 수 있다.

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))

명세서

발명의 명칭: 검출 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 검출 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 핵산 증폭 기술은 분자생물학 및 생명공학 분야에서 주로 사용되는 기술로 샘플 내에 존재하는 소량의 타겟 핵산을 검출하고 분석할 수 있는 방법이다. 핵산 증폭을 위해 PCR(Polymerase chain reaction) 기술이 가장 흔히 사용되며, 이는 이중 가닥 DNA를 단일 가닥 DNA로 변성시킨 후, 여기에 프라이머를 어닐링시키고, 어닐링된 프라이머를 중합효소에 의해 연장시키는 일련의 과정을 반복한다.
- [4] 형광물질을 이용한 실시간 PCR 방법은 PCR 과정 중에 핵산 증폭에 따른 형광 세기의 증가를 검출하는 방법이다. 실시간 PCR 방법은 타겟마다 상이한 형광 염료를 사용함으로써 멀티플렉스 검출이 가능한 장점이 있으나, 미세한 온도 조절을 위한 고가의 장비를 필요로 하고, 검출까지 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.
- [5] PCR 방법의 대안으로서, 고가의 실시간 PCR 장비가 필요 없으며 PCR에 비해 더 빠른 시간 내에 타겟 핵산을 검출할 수 있는 등온 증폭법(Isothermal amplification method)이 개발되었다. 등온 증폭법은 현장진단(point-of-care testing, POCT) 시스템에 적용할 수 있는 기술로, DNA 변성 (denaturation), 프라이머의 접합 (annealing), 중합효소의 신장 (extension)에 필요한 온도 변화 과정 없이 일정한 온도에서 증폭 반응의 수행이 가능한 기술이다.
- [6] 등온 증폭법의 예로는 RCA(rolling circle amplification, M. M. Ali, F. Li, Z. Zhang, K. Zhang, D.-K. Kang, J. A. Ankrum, X. C. Le and W. Zhao, Chem. Soc. Rev., 2014, 43, 3324-3341.), LAMP(loop-mediated isothermal amplification, Y. Mori, H. Kanda and T. Notomi, J. Infect. Chemother., 2013, 19, 404-411), RPA(recombinase polymerase amplification, J. Li, J. Macdonald and F. von Stetten, Analyst, 2018, 144, 31-67), NASBA(nucleic acid sequence based amplification, A. Borst, J. Verhoef, E. Boel and A. C. Fluit, Clin. Lab., 2002, 48, 487-492), SDA(strand displacement amplification, B. J. Toley, I. Covelli, Y. Belousov, S. Ramachandran, E. Kline, N. Scarr, N. Vermeulen, W. Mahoney, B. R. Lutz and P. Yager, Analyst, 2015, 140, 7540-7549), HDA(helicase dependent amplification, M. Vincent, Y. Xu and H. Kong, EMBO Rep., 2004, 5, 795-800), TMA(transcription-mediated amplification, L. Comanor, Am. J. Gastroenterol., 2001, 96, 2968-2972), EXPAR(exponential

amplification reaction, J. V. Ness et al., Proc . Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100(8), 4504 - 4509) 등이 있다.

- [7] 이러한 등온 증폭 기술은 온도 조절이 필요하지 않기 때문에 보다 빠른 시간 내에 타겟 핵산의 증폭을 가능하게 한다. 또한, 등온 증폭 기술은 온도 변화에 따른 DNA 손실 및 손상을 예방할 수 있어 매우 높은 증폭 효율을 보인다는 장점이 있다. 이들 등온 증폭 기술 중에서도, LAMP 기술은 약 1시간의 짧은 반응 시간 내에 최대 109배의 표적 핵산의 증폭 효율을 구현함으로써, 현장 진단 기술로서의 높은 활용 가능성을 보유한 기술로 간주되어 왔다. 하지만, LAMP 기술은 프라이머 디자인이 복잡하며, 많은 종류의 프라이머를 사용하기 때문에 프라이머 간 무작위적 혼성화에 따라 비특이적 증폭 반응이 발생하고, 이에 따른 배경 시그널 또한 빠르게 증폭된다는 단점이 있다.

- [8] 한편, EXPAR 기술은 등온의 반응 조건 하에서 DNA 중합효소와 니킹 효소를 이용하여 다소 짧은 단일 가닥의 타겟 핵산을 기하급수적으로 증폭하는 기술이다. EXPAR는 증폭 효율이 좋고 반응 시간이 30분 정도로 짧아 타겟 핵산 분석을 비롯한 다양한 생체분자 분석에 활용되고 있으며, 특히 microRNA 분석 등에 효과적으로 사용되었다. 그러나 EXPAR는 타겟 핵산이 없는 경우에도 증폭 반응이 진행되는, 이른바 비특이적 증폭 반응이 일어나는 큰 문제점을 가지고 있다. 이러한 EXPAR의 비특이적 증폭 반응의 원인은 명확히 밝혀지지 않았으나, 등온 반응 조건 상에서 EXPAR 주형의 2차 구조 형성 및 이와 효소와의 반응으로 인해 일어나는 것으로 여겨지고 있다(E. Tan et al., Biochemistry, 2008, 47, 9987 - 9999). 이러한 비특이적 증폭 반응으로 인해 EXPAR의 특이도 및 재현성이 떨어지며, 다중 타겟 분석도 어렵다.

- [9] 이에, 비특이적 증폭 반응으로 인한 타겟 핵산 검출의 성능 저하를 개선할 수 있는 새로운 등온 핵산 증폭 기술을 개발하고자 예의 노력한 결과, EXPAR 주형의 민감도를 향상시킴으로써 특이적 증폭에 의해 검출되는 시그널과 비특이적 증폭에 의해 검출되는 시그널을 명확히 구별할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

- [10] 본 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.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명자들은 비특이적 증폭 반응으로 인한 타겟 핵산 검출의 성능 저하를 개선할 수 있는 새로운 등온 핵산 증폭 기술을 개발하고자 예의 노력한 결과, 단일의 등온 반응에서 시그널의 증폭 및 검출을 동시에 제공할 수 있는 니킹 효소 인

식 영역을 포함하는 주형을 구현함으로써, 타겟 핵산의 검출 성능을 개선시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[13] 따라서, 본 발명의 목적은 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하기 위한 키트를 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다.

[16]

과제 해결 수단

[17] 본 발명의 일 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법을 제공한다:

[18] (a) 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출 올리고뉴클레오타이드와 혼성화하는 단계로서;

[19] 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 3'에서 5' 방향으로 제1 주형 영역, 니킹 효소(nicking enzyme) 인식 영역 및 제2 주형 영역을 포함하고,

[20] 상기 제1 주형 영역 및 제2 주형 영역은 서로 독립적으로, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며,

[21] 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 리포터 분자 및 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 쿼칭할 수 있는 쿼처 분자를 포함하는 상호작용적 이중 표지로 표시되어 있고,

[22] 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 혼성화되며;

[23] (b) 등온 조건 하에서, 상기 단계 (a)의 결과물을 니킹 효소 및 가닥 치환(strand displacement) 핵산 중합효소와 인큐베이팅하는 단계로서;

[24] 상기 제1 주형 영역에 혼성화된 타겟 올리고뉴클레오타이드는 상기 가닥 치환 핵산 중합효소에 의해 연장되어 상기 검출 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 연장 가닥을 생성하고, 상기 연장 가닥은 상기 니킹 효소에 의해 상기 니킹 효소 인식 영역에서 절단되며, 상기 절단된 가닥은 상기 가닥 치환 핵산 중합효소에 의해 그의 3'-말단으로부터 연장되어 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드를 방출하며; 및

[25] (c) 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널을 검출하는 단계로서;

[26] 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 초래하여 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 검출 가능한 시그널을 제공한다.

- [27] 일 구현예에서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화는 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다.
- [28] 일 구현예에서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제2 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다.
- [29] 일 구현예에서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자 중 하나는 제1 주형 영역에 위치하고 다른 하나는 제2 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다.
- [30] 일 구현예에서, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성 전에는 상기 퀀처 분자는 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 퀀칭하는 반면, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성은 상기 리포터 분자와 상기 퀀처 분자를 서로 분리시켜 상기 리포터 분자로부터 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다.
- [31] 일 구현예에서, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 관심 병원체로부터 유래된 또는 생성된 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [32] 일 구현예에서, 상기 가닥 치환 핵산 중합효소는 Bst 큰 단편 중합효소, Bst 2.0, Bst 3.0, Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), Φ 29 파아지, MS-2 파아지, Z-Taq, KOD, 클레나우 단편, GspSSD, GspF, OmniAmp 중합효소, SD 중합효소 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [33] 일 구현예에서, 상기 니킹 효소는 Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nb.BsrDI, Nt.BstNBI, Nb.BssSI, Nt.Alw 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [34] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 다음을 포함하는 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하기 위한 키트를 제공한다:
- [35] (a) 검출 올리고뉴클레오타이드;
- [36] 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 3'에서 5' 방향으로 제1 주형 영역, 니킹 효소(nicking enzyme) 인식 영역 및 제2 주형 영역을 포함하고,
- [37] 상기 제1 주형 영역 및 제2 주형 영역은 서로 독립적으로, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며,
- [38] 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 리포터 분자 및 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 퀀칭할 수 있는 퀀처 분자를 포함하는 상호작용적 이중 표지로 표지되어 있고;

- [39] (b) 가닥 치환 핵산 중합효소;
- [40] (c) 니킹 효소; 및
- [41] (d) dNTPs.
- [42] 일 구현예에서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화는 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다.
- [43] 일 구현예에서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제2 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다.
- [44] 일 구현예에서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자 중 하나는 제1 주형 영역에 위치하고 다른 하나는 제2 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다.
- [45] 일 구현예에서, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 관심 병원체의 존재하에 유래된 또는 생성된 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [46] 일 구현예에서, 상기 가닥 치환 핵산 중합효소는 Bst 큰 단편 중합효소, Bst 2.0, Bst 3.0, Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), Φ29 파아지, MS-2 파아지, Z-Taq, KOD, 클레나우 단편, GspSSD, GspF, OmniAmp 중합효소, SD 중합효소 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [47] 일 구현예에서, 상기 니킹 효소는 Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nb.BsrDI, Nt.BstNBI, Nb.BssSI, Nt.Alw 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[48]

발명의 효과

- [49] 본 발명의 특징 및 장점은 하기와 같이 요약될 것이다:
- [50] (a) 본 발명은 타겟 올리고뉴클레오타이드의 증폭으로 인해 검출된 시그널과 비타겟 핵산의 비특이적 증폭으로 인해 검출된 시그널을 명확히 구별할 수 있어, 보다 정확하고, 높은 민감도를 나타낼 수 있다.
- [51] (b) 특히, 본 발명은 타겟 올리고뉴클레오타이드의 증폭 및 시그널 발생이 단일 증폭 반응에서 진행되는 검출 시스템을 구현하는 바, 보다 신속하게 타겟 올리고뉴클레오타이드를 우수한 효율로 검출할 수 있다.
- [52] (c) 본 발명은 온도 조절 등을 위한 장비를 필요로 하지 않으므로, 현장 분자진단이 필요한 대형 병원, 수탁 검사 기관, 연구소 등에서 유용하게 적용될 수 있다.

[53] (d) 본 발명은 타겟 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 반응 후, 니킹 효소와 핵산 중합효소의 작용으로 인해 타겟 올리고뉴클레오타이드가 지수함수적으로 증폭되는 EXPAR 기술을 현저히 개선하는데 기여할 수 있다.

[54]

도면의 간단한 설명

[55] 도 1은 EXPAR 기술의 주형을 도식화한 것이다.

[56] 도 2는 EXPAR 기술의 등온 증폭 반응 과정을 도식화한 것이다.

[57] 도 3은 종래 EXPAR 기술의 주형과 CTO를 이용한 검출 반응을 도식화한 것이다.

[58] 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 검출 올리고뉴클레오타이드를 도식화한 것이다.

[59] 도 5는 실시예 1의 타겟 올리고뉴클레오타이드 농도별 실험에서 수득된 증폭 곡선이다.

[60] 도 6은 실시예 1의 특이도 분석 실험에서 수득된 증폭 곡선이다.

[61] 도 7은 실시예 2의 타겟 올리고뉴클레오타이드 농도별 실험에서 수득된 증폭 곡선이다.

[62]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[63] 본 발명의 가장 큰 특징은 등온 증폭법을 통해 타겟 핵산을 검출할 때, 증폭 및 시그널 발생이 단일 반응에서 동시에 진행되는 검출 시스템을 이용하여 높은 효율로 신속하게 타겟 핵산을 검출하는 것이다. 종래 EXPAR 시스템은 비특이적 증폭으로 인한 시그널과 특이적 증폭으로 인한 시그널이 구별되지 않는 낮은 특이도로 인해 타겟 핵산의 검출 정확도가 좋지 않은 문제가 있었다.

[64] 이에 반해, 본 발명의 검출 방법은 주형 영역 - 니킹 효소 인식 영역 - 주형 영역으로 구성되고 리포터 분자와 퀀처 분자가 표지된 검출 올리고뉴클레오타이드를 디자인함으로써, 민감도 및 특이도를 향상시켜 이와 같은 문제를 해결하였다.

[65]

[66] I. 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법

[67] 본 발명의 일 양태는, 다음의 단계를 포함하는 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법을 제공한다:

[68] (a) 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출 올리고뉴클레오타이드와 혼성화하는 단계로서;

[69] 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 3'에서 5' 방향으로 제1 주형 영역, 니킹 효소(nicking enzyme) 인식 영역 및 제2 주형 영역을 포함하고,

[70] 상기 제1 주형 영역 및 제2 주형 영역은 서로 독립적으로, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며,

- [71] 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 리포터 분자 및 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 쿼칭할 수 있는 쿼처 분자를 포함하는 상호작용적 이중 표지로 표시되어 있고,
- [72] 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 혼성화되며;
- [73] (b) 등온 조건 하에서, 상기 단계 (a)의 결과물을 니킹 효소 및 가닥 치환(strand displacement) 핵산 중합효소와 인큐베이팅하는 단계로서;
- [74] 상기 제1 주형 영역에 혼성화된 타겟 올리고뉴클레오타이드는 상기 가닥 치환 핵산 중합효소에 의해 연장되어 상기 검출 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 연장 가닥을 생성하고, 상기 연장 가닥은 상기 니킹 효소에 의해 상기 니킹 효소 인식 영역에서 절단되며, 상기 절단된 가닥은 상기 가닥 치환 핵산 중합효소에 의해 그의 3'-말단으로부터 연장되어 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드를 방출하며; 및
- [75] (c) 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널을 검출하는 단계로서;
- [76] 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 초래하여 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 검출 가능한 시그널을 제공한다.
- [77]
- [78] 단계 (a): 검출 올리고뉴클레오타이드와 타겟 올리고뉴클레오타이드의 혼성화
- [79] 본 단계는, 3'to 5' 순서로 제1 주형 영역, 니킹 효소(nicking enzyme) 인식 영역 및 제2 주형 영역을 포함하는 검출 올리고뉴클레오타이드와 타겟 올리고뉴클레오타이드를 반응시킨다.
- [80] 본원에서 사용되는 용어 "타겟 올리고뉴클레오타이드"는 검출 또는 정량하고자 하는 핵산의 영역을 의미하며, 타겟 핵산, 타겟 핵산 서열, 또는 타겟 영역과 상호교환적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 타겟 올리고뉴클레오타이드는 샘플에 존재하거나 특정 주형 등에 의한 기타 반응에 의해 생성된 핵산 서열의 카피를 포함한다. 즉, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 특정 반응에서 새롭게 생성된 서열뿐만 아니라 채취된 샘플 내에 초기에 존재하는 서열을 포함한다.
- [81] 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 단일 또는 이중-가닥 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체를 포함할 수 있으며, 비제한적인 예로서, 유전자의 코딩 또는 비-코딩 서열, 센스 및 안티센스 서열, 엑손, 인트론, 게놈 DNA, cDNA, 프리-mRNA, mRNA, rRNA, siRNA, miRNA, tRNA, 리보자임, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 단리 및 정제된 자연 발생 DNA 또는 RNA 서열, 합성 RNA 및 DNA 서열, 핵산 프로브, 프라이머, 단편, 유전자 구조물, 벡터 및 변형된 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 출발 물질로서 상기 타겟 올리고뉴클레

오타이드가 이중 가닥인 경우, 상기 두 가닥을 단일 가닥 또는 부분적 단일 가닥 형태로 만드는 것이 바람직하다.

- [82] 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 임의의 자연발생 원핵세포, 진핵세포(예를 들어, 원생동물 및 기생동물, 균류, 효모, 고등 식물, 하등 및 포유동물 및 인간을 포함하는 고등 동물), 바이러스(예를 들어, 헤르페스 바이러스, HIV, 인플루엔자 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 간염 바이러스, 폴리오 바이러스 등), 또는 비로이드 핵산을 포함한다. 또한, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 재조합에 의해 또는 화학적으로 생산되거나 생산될 수 있는 임의의 핵산 분자일 수 있다. 따라서, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 자연에서 발견되거나 발견되지 않을 수 있다.
- [83] 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 지정된 시점에 알려진 서열 또는 지정된 시점 이후로 이용가능한 서열로 제한하는 것으로 해석되지 않아야 하며, 대신에 현재 또는 미래의 어느 시점에 이용가능하거나 알려질 수 있는 서열을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 본 발명의 방법을 실시하는 시점에 알려지거나 알려지지 않을 수 있다. 미지의 핵산 서열의 경우, 그의 서열은 본 발명의 방법을 실시하기 전에 종래의 시퀀싱 방법 중 하나에 의해 결정될 수 있다.
- [84] 예를 들어, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 생물학적 샘플 내의 관심 병원체의 핵산 서열, 이의 일부 서열 또는 이와 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 관심 병원체로부터 유래된 또는 생성된 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [85] 일 구현예에서, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 변이를 포함할 수 있다.
- [86] 본원에서 사용되는 용어 "뉴클레오타이드 변이"는 서열이 유사한 연속적 DNA 세그먼트 중 특정 위치의 DNA 서열에서의 임의의 단일 또는 복수의 뉴클레오타이드 치환, 결실 또는 삽입을 의미한다. 이러한 연속적 DNA 세그먼트들은 하나의 유전자 또는 하나의 염색체의 임의의 다른 부위를 포함한다. 이러한 뉴클레오타이드 변이는 돌연변이(mutant) 또는 다형성 대립유전자 변이(polymorphic allele variations)일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 검출되는 뉴클레오타이드 변이는 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP), 돌연변이(mutation), 결실, 삽입, 치환 및 전좌를 포함한다. 뉴클레오타이드 변이의 예는, 인간 게놈 내의 다양한 변이(예컨대, 메틸렌사수소 엽산 환원효소(methylenetetrahydrofolate reductase; MTHFR) 유전자의 변이), 병원체의 약제 내성과 관련된 변이 및 종양 형성-유발 변이를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "뉴클레오타이드 변이"는 핵산 서열의 특정 위치에서의 임의의 변이를 포함한다. 즉, 용어 "뉴클레오타이드 변이"는 핵산 서열의 특정 위치에서의 야생형 및 그의 임의의 돌연변이형을 포함한다.

- [87] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "샘플"은 생물학적 공급원으로부터의 세포, 조직 또는 유체, 또는 본 발명에 따라 유익하게 평가될 수 있는 어떠한 다른 미디엄 (medium)을 의미한다. 상기 샘플은 바이러스, 세균, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 림프, 우유, 소변, 분변, 안구액, 타액, 정액, 뇌 추출물, 척수액, 충수, 비장 및 편도 조직 추출물, 양수, 복수 및 비-생물학적 시료(예컨대, 식품 및 물)를 포함한다. 또한, 상기 샘플은 생물학적 공급원으로부터 단리된 자연(natural-occurring)의 핵산 분자 및 합성한 핵산 분자를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 샘플은 자궁경부 스왑(cervical swab) 샘플 또는 액상 세포검사(liquid based cytology) 샘플이다.
- [88] 본원에서 사용되는 용어 "검출 올리고뉴클레오타이드"는 타겟 올리고뉴클레오타이드와 반응하여 타겟 올리고뉴클레오타이드를 증폭시키는 역할을 하면서도 검출되는 시그널의 발생에 관여하는 올리고뉴클레오타이드를 총칭한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 실제 시그널 발생에 관여하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 타겟 올리고뉴클레오타이드와 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 비-혼성화가 시그널 발생을 결정한다.
- [89] 본 개시내용에 따르면, 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 3'to 5' 순서로 제1 주형 영역, 니킹 효소 인식 영역 및 제2 주형 영역을 포함한다.
- [90] EXPAR 기술은 도 1에 나타난 바와 같은 주형(template)을 이용하는 것이 알려져 있다. 본원에서 사용되는 용어 "EXPAR (exponential isothermal amplification reaction)"는 짧은 길이의 핵산을 핵산 중합효소와 니킹 효소(nicking enzyme)를 이용하여 증폭시키는 분자생물학적 기술로서, 올리고뉴클레오타이드 서열, 핵산 중합효소 및 절단 효소를 사용하여 특정 핵산 절편을 특이적으로 증폭시키는 신속한 등온 증폭 방법이다.
- [91] 일 구현예에서, 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 도 1의 주형과 같이 타겟 올리고뉴클레오타이드와 결합할 수 있는, 즉, 이에 상보적인 염기 서열을 3'및 5'양 말단에 모두 포함하고 있으며, 그 사이에는 니킹 효소 인식 영역을 포함할 수 있다.
- [92] 구체적으로, 상기 제1 주형 영역 및 제2 주형 영역은 서로 독립적으로, 타겟 올리고뉴클레오타이드와 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "혼성화"는 상보적인 단일가닥 핵산들이 이중가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전한 경우나 일부 미스매치 염기가 존재하는 경우 발생할 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다.
- [93] 일 구현예에서, 상기 제1 주형 영역 및 상기 제2 주형 영역은 실질적으로 동일한 핵산 서열을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 제1 주형 영역 및 제2 주형 영역은 서로 다른 핵산 서열을 포함하고, 상기 제2 주형 영역에 상보적인 염기 서열이 상기 제1 주형 영역에 혼성화될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 제2 주형 영

역은 상기 제1 주형 영역보다 긴 핵산 서열을 포함할 수 있고, 말단에 니킹 효소 인식 서열을 더 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 제1 주형 영역과 타겟 올리고뉴클레오타이드의 결합 친화도가 제2 주형 영역과 타겟 올리고뉴클레오타이드의 결합 친화도보다 우수할 수 있다. 이와 같은 구조를 이용하면, 도 2에 나타난 바와 같은 메커니즘으로 타겟 올리고뉴클레오타이드가 제1 주형 영역에 혼성화되고, 이후 반응을 통해 제2 주형 영역에서 타겟 올리고뉴클레오타이드와 동일한 단편이 생성되는 등은 증폭을 수행할 수 있다. 이에 대해서는 이하 단계 (b)에서 보다 자세히 기술한다.

- [94] 본 개시내용에 따르면, 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 리포터 분자 및 퀀처 분자를 포함하는 상호작용적 이중표지를 포함한다.
- [95] 예를 들어, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 모두 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 위치할 수 있다. 또한, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 모두 검출 올리고뉴클레오타이드의 제2 주형 영역에 위치할 수 있다. 또한, 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역이 리포터 분자 및 퀀처 분자를 포함하는 상호작용적 이중 표지 중 하나를 갖고, 제2 주형 영역이 상호작용적 이중 표지 중 나머지 하나를 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 주형 영역에 리포터 분자가 위치하고, 제2 주형 영역에 퀀처 분자가 위치하거나, 상기 제1 주형 영역에 퀀처 분자가 위치하고, 제2 주형 영역에 리포터 분자가 위치할 수 있다. 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 일 예시도 도 4에 도시되어 있다.
- [96] 상기 상호작용적 형광 표지 시스템의 대표적 예로서, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 형광 표지 시스템은 형광 리포터 분자(공여체 분자) 및 퀀처 분자(수용체 분자)를 포함한다. FRET에서 에너지 공여체는 형광성이나, 에너지 수용체는 형광성 또는 비-형광성일 수 있다. 상호작용적 표지 시스템의 다른 형태에서, 에너지 공여체는 비-형광성, 예컨대, 발색단(chromophore)이고 에너지 수용체는 형광성이다. 상호작용적 표지 시스템의 또 다른 형태에서, 에너지 공여체는 발광성(luminescent), 예컨대, 생물발광성, 화학발광성 또는 전기화학발광성이며 수용체는 형광성이다. 상호작용적 표지 시스템은 "접촉-매개 퀀칭(contact-mediated quenching)"에 기반한 이중 표지를 포함한다(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 포함한다.
- [97] 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

GreenTM(531), Calcium GreenTM (533), TO-PROTM-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), Dil (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), Cy3TM (570), AlexaTM 546 (570), TRITC (572), Magnesium OrangeTM (575), Phycoerythrin R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium OrangeTM (576), Pyronin Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine RedTM (590), Cy3.5TM (596), ROX (608), Calcium CrimsonTM (615), AlexaTM 594 (615), Texas Red (615), Nile Red (628), YO-PROTM-3 (631), YOYOTM-3 (631), Rphycocyanin (642), C-Phycocyanin (648), TO-PROTM-3 (660), TOTO3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5TM (670), Thiadicarbocyanine (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), Biosearch 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 포함한다.

- [98] 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.
- [99] 본 발명에서, 광범위 파장 또는 특정 파장의 형광을 퀀칭할 수 있는 비-형광 퀀처 분자(예컨대, 블랙 퀀처 또는 다크 퀀처)가 이용될 수 있다.
- [100] 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 이용된다.
- [101] 상기 상호작용적 이중 표지를 포함하는 검출 올리고뉴클레오타이드가 단일 가닥 상태로 존재하는 경우, 상기 가닥은 헤어핀 또는 랜덤 코일 구조를 형성하여 상호작용적 이중 표지 간의 퀀칭을 유도할 수 있다. 상기 검출 올리고뉴클레오타이드가 타겟 올리고뉴클레오타이드와 혼성화하거나 또는 이의 혼성화로 인한 연장반응이 일어나는 경우, 상기 퀀칭은 줄어든다.

- [102] 이와 같이, 3'to 5' 순서로 제1 주형 영역, 니킹 효소 인식 영역 및 제2 주형 영역을 포함하면서, 제1 주형 영역 및/또는 제2 주형 영역에 상호작용적 이중표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자를 포함하는 구조를 가지는 검출 올리고뉴클레오타이드는 타겟 올리고뉴클레오타이드와 혼성화할 수 있으며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드가 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 혼성화될 수 있다.
- [103]
- [104] 단계 (b): 등은 증폭 반응의 수행
- [105] 본 단계는, 상기 단계 (a)의 결과물을 니킹 효소 및 가닥 치환(strand displacement) 핵산 중합효소와 함께 인큐베이팅하는 단계이다. 예를 들어, 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역과 타겟 올리고뉴클레오타이드의 혼성화물을, 니킹 효소 및 가닥 치환 핵산 중합효소와 함께 인큐베이팅하여 등은 증폭 반응을 실시할 수 있다.
- [106] 본원에서 사용되는 용어, "가닥 치환 핵산 중합효소"는 핵산 중합 반응시 주형 가닥의 상류 영역에 결합되어 있는 가닥을 밀어내는 활성으로 인해 새로운 가닥으로 치환하는 핵산 중합효소를 의미한다. 상기 가닥 치환 핵산 중합효소는 Bst 큰 단편 중합효소, Bst 2.0, Bst 3.0, Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), Φ 29 파아지, MS-2 파아지, Z-Taq, KOD, 클레나우 단편, GspSSD, GspF, OmniAmp 중합효소, SD 중합효소 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 중합 활성 및 치환 활성을 가지는 핵산 중합효소라면 어떤 것이든 사용할 수 있다.
- [107] 본원에서 사용되는 용어, "니킹 효소"는 완전한 또는 부분적 이중 가닥의 뉴클레오타이드 서열을 인식하고, 인식 영역에 대해 특이적 위치에서 하나의 가닥만을 절단시키는 엔도뉴클레아제를 지칭한다. 상기 인식 영역은 절단 효소에 따라 상이하다. 예를 들어, Nt.BstNBI는 5'-GAGTCNNNNN-3'서열을 인식하여 5'to 3'방향으로 네번째 N 및 다섯번째 N 사이를 절단할 수 있다. 상기 니킹 효소는 Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nb.BsrDI, Nt.BstNBI, Nb.BssSI, Nt.Alw 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 절단 활성을 가지는 효소라면 어떤 것이든 사용할 수 있다.
- [108] 상기 등은 증폭 반응은 도 2를 참조하여 설명할 수 있다. 한편, 도 2에 도시된 주형은 본 발명의 일 구현예에 따른 검출 올리고뉴클레오타이드에서 상호작용적 이중 표지가 생략된 구조이다. 단계 (a)에서 전술한 바와 같이, 타겟 올리고뉴클레오타이드가 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 혼성화될 수 있다. 이후, 상기 제1 주형 영역에 혼성화된 타겟 올리고뉴클레오타이드는 핵산 중합 효소에 의해 상기 검출 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 연장 서열을 포함하는 연장 가닥을 생성한다. 니킹 효소 인식 영역을 비롯하여 제2 주형 영역을 주형

으로 하여 연장된 연장 가닥은 결과적으로 상기 제2 주형 영역에 상응하는 위치에 타겟 올리고뉴클레오타이드와 동일한 핵산 서열을 포함한다.

[109] 다음으로, 상기 연장 가닥은 니킹 효소에 의해 상기 니킹 효소 인식 영역에서 절단이 유도될 수 있다. 이와 같이 절단이 발생한 영역에서, 가닥 치환 핵산 중합효소에 의해 연장 가닥의 3'말단이 연장되면서 절단 산물이 방출된다. 상기 절단 산물은 타겟 올리고뉴클레오타이드와 실질적으로 동일한 서열을 포함한다.

[110] 따라서, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드가 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 혼성화되면, 가닥 치환 핵산 중합효소 및 니킹 효소에 의해 절단 산물인 타겟 올리고뉴클레오타이드의 지수함수적 증폭을 구현할 수 있다.

[111]

[112] 단계 (c): 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널 검출

[113] 본 단계는 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널을 검출한다. 이때, 상기 시그널은 전술한 검출 올리고뉴클레오타이드로부터 제공될 수 있다.

[114] 본 발명자들은 EXPAR 기술의 민감도 및 특이도를 보다 높이고자 연구하는 과정에서, 도 1에 기재된 주형 올리고뉴클레오타이드와 캡처링 앤드 템플레이팅 올리고뉴클레오타이드(Capturing and Templating Oligonucleotide; CTO; 미국 특허 제8,809,239호 참조)를 조합하여 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널을 발생시키는 등온 증폭 반응을 고안하였다.

[115] 도 3에 개략적으로 나타난 바와 같이, 이는 도 1의 주형에 의해 지수함수적으로 증폭된 타겟 올리고뉴클레오타이드가 CTO의 3' 캡처링 부위에 혼성화되어 시그널을 발생시키는 방법이다. 상기 CTO는 3' to 5' 방향으로 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위 및 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 템플레이팅 부위를 포함한다. CTO는 템플레이팅 부위에 퀀처 분자 및 형광 리포터 분자로 구성된 상호작용적 이중 표지를 포함한다.

[116] 타겟 올리고뉴클레오타이드가 존재하는 경우, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드가 CTO의 캡처링 부위에 어닐링되고, CTO의 템플레이팅 부위 상에서 연장되어 CTO와 연장이합체(이합체 CTO)를 형성한다. 상기 연장이합체의 형성은 시그널을 제공하며, 연장이합체-형성 온도에서 시그널을 측정함으로써 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재에 의존적으로 발생하는 시그널을 검출할 수 있다.

[117] 상기 CTO를 이용하는 방법은 CTO에 혼성화된 타겟 올리고뉴클레오타이드가 연장되어 연장 가닥을 형성한 후, 상기 연장 가닥이 검출되는 프로세스로 분류될 수 있다. 상기 CTO를 이용하는 방법은 상기 연장 가닥의 형성을 상기 연장 가닥 및 상기 CTO 간의 이합체를 이용하여 검출하는 것을 특징으로 한다.

[118] 이하 실시예 1에서 설명한 바와 같이, CTO를 이용한 EXPAR 기술은 기존의 인터칼레이팅 염료를 이용한 형광 발생 방식에 비해 타겟 올리고뉴클레오타이드 검출에 대한 민감도 및 특이도를 동등 수준 이상으로 개선하였다.

- [119] 이에, 본 발명자들은 EXPAR 기술의 검출 효율을 보다 향상시키고자, 상호작용적 이중 표지를 이용하여 시그널을 발생시키는 방식을 사용하되, 보다 신속하면서도 비특이적 증폭으로 인한 시그널과 명확하게 구별할 수 있는 방법을 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 EXPAR 증폭과 시그널 검출을 동시에 구현할 수 있는 검출 올리고뉴클레오타이드를 개발하였다. 일 구현예에 따른 검출 올리고뉴클레오타이드는 도 4에 나타낸 바와 같다.
- [120] 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 이의 연장 가닥은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널의 변화를 초래하여 검출 가능한 시그널을 제공하고, 상기 시그널의 검출은 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타낸다. 구체적으로, 타겟 올리고뉴클레오타이드의 지수함수적 증폭을 구현하는 검출 올리고뉴클레오타이드 자체에 상호작용적 이중 표지가 위치하기 때문에, 상기 단계 (b)의 등온 증폭 반응은 타겟 올리고뉴클레오타이드의 증폭과 동시에 이의 존재를 나타내는 시그널을 발생시킬 수 있다.
- [121] 상기 검출 올리고뉴클레오타이드에 포함되는 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자의 위치에 따라, 시그널 발생 메커니즘이 일부 달라질 수 있으나, 상기 시그널 발생 메커니즘은 모두 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역과 타겟 올리고뉴클레오타이드의 혼성화를 기반으로 한다.
- [122] 일 구현예에서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 위치하며, 타겟 올리고뉴클레오타이드와 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화는 상호작용적 이중표지로부터의 시그널의 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다(도 4에서 3번째 및 4번째 구조 참조). 예를 들어, 단계 (a)의 타겟 올리고뉴클레오타이드와 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화는 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널을 발생시키며, 단계 (b)의 등온 증폭 반응을 통해 지수함수적으로 생성되는 타겟 올리고뉴클레오타이드가 단계 (a)를 통해 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널을 발생시킬 수 있다.
- [123] 일 구현예에서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 검출 올리고뉴클레오타이드의 제2 주형 영역에 위치하며, 타겟 올리고뉴클레오타이드의 연장 가닥 생성은 상호작용적 이중표지로부터의 시그널의 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다(도 4에서 1번째 구조 참조). 예를 들어, 단계 (a)의 타겟 올리고뉴클레오타이드와 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화로 인해 유발되는 단계 (b)의 등온 증폭 반응은 타겟 올리고뉴클레오타이드의 증폭과 동시에 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널을 발생시키며, 이때 지수함수적으로 생성되는 타겟 올리고뉴클레오타이드는 단계 (a)를 통해 검출 올리고뉴클레오타이드에 혼성화되고 단계 (b)를 통해 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널을 발생시킬 수 있다.

- [124] 일 구현예에서, 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역이 리포터 분자 및 퀀처 분자를 포함하는 상호작용적 이중 표지 중 하나를 갖고, 제2 주형 영역이 상호작용적 이중 표지 중 나머지 하나를 가지며, 타겟 올리고뉴클레오타이드와 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 및 이의 연장 가닥 생성은 상호작용적 이중표지로부터의 시그널의 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공할 수 있다(도 4에서 2번째 구조 참조).
- [125] 또한, 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역 및 제2 주형 영역 각각이 리포터 분자 및 퀀처 분자를 모두 포함할 수 있다. 이 경우, 타겟 올리고뉴클레오타이드와 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화뿐만 아니라, 혼성화 후 증폭 반응에서도 타겟의 존재를 나타내는 시그널을 제공하는 바, 보다 강한 시그널 세기를 나타낼 수 있다.
- [126] 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드가 상기 검출 올리고뉴클레오타이드에 혼성화되거나 이의 연장 가닥이 생성되기 이전에는 상기 퀀처 분자는 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 퀀칭한다. 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 이의 연장 가닥의 생성은 상기 리포터 분자와 상기 퀀처 분자를 서로 분리시켜 상기 리포터 분자로부터 검출 가능한 시그널이 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재에 의존적으로 일어나는 검출 올리고뉴클레오타이드와 타겟 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 및/또는 혼성화된 타겟 올리고뉴클레오타이드의 연장으로 인해 형성된 이합체의 형성에 의존적으로 시그널이 제공될 수 있다.
- [127]
- [128] **II. 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하기 위한 키트**
- [129] 본 발명의 다른 양태에서, 다음을 포함하는 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하기 위한 키트를 제공한다.
- [130] 검출 올리고뉴클레오타이드; 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 3'to 5' 순서로 제1 주형 영역, 니킹 효소 인식 영역 및 제2 주형 영역을 포함하고, 상기 제1 주형 영역 및 제2 주형 영역은 서로 독립적으로, 타겟 올리고뉴클레오타이드와 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며, 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 리포터 분자 및 퀀처 분자를 포함하는 상호작용적 이중표지를 포함하고;
- [131] (b) 가닥 치환 핵산 중합효소;
- [132] (c) 니킹 효소; 및
- [133] (d) dNTP.
- [134] 본 발명의 일 구현예에 따른 키트는 양태 I의 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법을 실시하기 위해 제조되므로, 이들 사이의 공통된 내용은 본 명세서의 복잡성을 초래하는 과도한 중복을 피하기 위해 생략한다. 예를 들어, 상기 키트에 적용되는 검출 올리고뉴클레오타이드, 가닥 치환 핵산 중합효소, 니킹 효소

에 관한 내용은 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법에서 전술한 바와 같다.

- [135] 일 구현예에서, 상기 키트는 양태 I의 방법을 기재한 설명서를 포함할 수 있다. 상기 설명서는 적합한 기록 매체에 기록될 수 있다. 예를 들어, 설명서는 종이 및 플라스틱과 같은 기관에 인쇄될 수 있다. 다른 구현예에서, 설명서는 **CD-ROM** 및 디스켓과 같은 적합한 컴퓨터 해독가능한 기록매체 상에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로 존재할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 키트 내에 실질적인 설명서는 포함되지 않으며, 다만 원격 소스로부터, 예컨대 인터넷을 통해, 설명서를 얻는 수단이 제공된다. 상기 구현예의 한 예는 설명서를 볼 수 있는 웹 주소 및/또는 설명서를 다운로드할 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다.

[136]

- [137] 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.

[138]

발명의 실시를 위한 형태

- [139] 실시예

[140]

- [141] 실험에 사용된 서열 정보는 아래 표 1에 나타낸 바와 같다:

- [142] [표1]

이름	서열(5'→3')	서열 번호
X'rX'	CTCCTGTAGCCCGACCGTAGACTCTCTCC TGTAGCCCGAC(C3)	1
CTO	/5BHQ1/GTCCCGCAATAGCGTTACGG[T(Cal Fluor Orange 560)]GGCTCCTGTAGCCCGAC(C3)	2
RQ-X'rX'	CTCCTGTAGCCCGACCGTAGACTC/iFAM_T/ CTCCTGTAGCCCGAC/3BHQ1/	3
타겟 올리고뉴클레오타이드	GTCGGGCTACAGGAG	4

- [143] * X'= 타겟 올리고뉴클레오타이드 결합 영역(제1 주형 영역 또는 제2 주형 영역; 볼드체로 표시됨)

- [144] r= 니킹 효소 인식 영역(밑줄로 표시됨)

- [145] RQ= 리포터 및 퀀처

- [146] (C3)= C3 Spacer

[147]

[148] 실시예 1: 인터칼레이팅 염료 및 CTO 이용한 타겟 검출 비교

[149]

[150] <타겟 검출 시약의 제조>

[151] 종래 EXPAR 시스템의 인터칼레이팅 염료를 이용한 형광 시그널 검출 방식에 비해, CTO를 이용하는 검출 방식을 비교하기 위하여, 하기와 같이, 2 종류의 타겟 검출 시약을 제조하였다.

[152] (i) 인터칼레이팅 염료를 포함하는 타겟 검출 시약

[153] 타겟 올리고뉴클레오타이드 검출을 위해 증폭용 올리고뉴클레오타이드로서 X'rX'(서열번호: 1) 1.25 pmole, 0.75 μ L Nt.BstNBI(NEB, R0607L), 0.3 μ L Bst 2.0 WarmStart DNA 중합효소(NEB, M0538L), 0.3 mM 테옥시뉴클레오타이드(dNTP) 용액 믹스(NEB, N0447L), 2 mM 황산마그네슘($MgSO_4$) 용액(NEB, B1003S), 인터칼레이팅 염료로서 Quant-iT PicoGreen dsDNA 시약(Invitrogen, P7581), 5X 완충액(40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 150 mM KCl, 4 mM $MgSO_4$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 mM DTT)을 포함하여 최종 20 μ L의 타겟 검출 시약 (i)을 제조하였다.

[154] (ii) CTO를 포함하는 타겟 검출 시약

[155] 타겟 올리고뉴클레오타이드 검출을 위해 증폭용 올리고뉴클레오타이드로서 X'rX'(서열번호: 1) 1.25 pmole, CTO(Capturing and Templating Oligonucleotides, 서열번호: 2) 1.25 pmole, 0.75 μ L Nt.BstNBI(NEB, R0607L), 0.3 μ L Bst 2.0 WarmStart DNA 중합효소(NEB, M0538L), 0.3 mM 테옥시뉴클레오타이드 (dNTP) 용액 믹스 (NEB, N0447L), 2 mM 황산마그네슘($MgSO_4$) 용액(NEB, B1003S), 5X 완충액 (40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 150 mM KCl, 4 mM $MgSO_4$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 mM DTT)을 포함하여 최종 20 μ L의 타겟 검출 시약 (ii)를 제조하였다.

[156] CTO는, 3' to 5' 방향으로, (i) 타겟 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 캡처링 부위 및 (ii) 타겟 올리고뉴클레오타이드에 비상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 템플레이팅 부위를 포함한다. CTO는 5'-말단에 퀀처 분자(BHQ-1) 및 템플레이팅 부위에 형광 리포터 분자(Cal Fluor Orange 560)로 표지되었다.

[157] 주형 및 CTO는 연장을 방지하기 위해 3'-말단에 카본 스페이서로 블록킹되어 있다.

[158] 타겟 올리고뉴클레오타이드가 존재하는 경우, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드가 CTO의 캡처링 부위에 어닐링되고, CTO의 템플레이팅 부위 상에서 연장되어 CTO와 연장이합체(이합체 CTO)를 형성한다. 상기 연장이합체의 형성은 시그널을 제공하며, 연장이합체-형성 온도에서 시그널을 측정함으로써 증폭 곡선을 얻을 수 있다. 본 실시예에서, 타겟 올리고뉴클레오타이드에 대한 상기 연장이합체의 서열 및 길이는 55°C에서 상기 이합체를 형성하여 시그널을 제공하도록 디자인하였다.

[159]

[160] <민감도 분석>

[161] 상기 제조된 20 μL 의 타겟 검출 시약 (i) 및 (ii) 각각을 네가지 농도(농도 1: 2×10^9 copies/ μL , 농도 2: 2×10^7 copies/ μL , 농도 3: 2×10^5 copies/ μL , 농도 4: 2×10^3 copies/ μL)의 타겟 올리고뉴클레오타이드 5 μL (서열번호: 4)와 혼합하여 최종 부피 25 μL 로 반응 혼합물을 제조하였다.

[162] 상기 반응 혼합물을 함유하고 있는 튜브를 실시간 열순환기(CFX96, Bio-Rad)에 위치시켜 55°C에서 반응시켰으며, 시그널의 검출은 매 17초마다 측정하였다. Ct 값은 Auto calculated single threshold에 의해 계산되었으며, 모든 실험은 2회씩 반복 실험하였다. 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드(서열번호: 4) 대신 증류수 5 μL 를 넣은 반응 혼합물을 이용하여 상기와 동일한 조건으로 음성 대조군 반응도 함께 실시하였다. 시그널 검출 결과를 도 5 및 표 2에 나타내었다.

[163] [표2]

타겟 올리고뉴클레오타이드의 농도		농도 1	농도 2	농도 3	음성 대조군
평균 Ct	타겟 검출 시약 (i)	3.25	13.08	21.14	24.27
	타겟 검출 시약 (ii)	6.24	13.79	20.48	22.07

[164]

[165] 분석 결과, 종래 EXPAR 시스템의 인터칼레이팅 염료를 이용한 형광 시그널 검출 방식(타겟 검출 시약 (i))에 비해, CTO를 이용하는 검출 방식(타겟 검출 시약 (ii))이 동등 수준 이상으로 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 것을 확인하였다.

[166]

[167] <특이도 분석>

[168] 본 실시예에서는 비타겟 핵산과의 반응에서 비특이 시그널이 검출되는지를 비교하였다. 비타겟 핵산으로, Human Genomic DNA(Promega, G1521)을 사용하였다.

[169] 상기 제조된 20 μL 의 타겟 검출 시약 (i) 및 (ii) 각각을 80 ng/ μL 의 Human Genomic DNA (hgDNA) 5 μL 를 혼합하여 최종 부피 25 μL 로 반응 혼합물을 제조하였다.

[170] 상기 반응 혼합물을 함유하고 있는 튜브를 실시간 열순환기(CFX96, Bio-Rad)에 위치시켜 55°C에서 반응시켰으며, 시그널의 검출은 매 17초마다 측정하였다. Ct 값은 Auto calculated single threshold에 의해 계산되었으며, 모든 실험은 2회씩 반복 실험하였다. 상기 hgDNA 대신 증류수 5 μL 를 넣은 반응 혼합물을 이용하여 상기와 동일한 조건으로 음성 대조군 반응도 함께 실시하였다. 시그널 검출 결과를 도 6 및 표 3에 나타내었다.

[171] [표3]

비타겟 핵산		hgDNA	음성대조군
평균 Ct	타겟 검출 시약 (i)	14.41	26.03
	타겟 검출 시약 (ii)	21.20	21.14

[172]

[173]

종래의 인터칼레이팅 염료를 이용한 방식(타겟 검출 시약 (i))은 검출 대상이 아닌 hgDNA에 대한 시그널의 평균 Ct 값이 음성 대조군에서의 비특이적 반응에 의한 시그널의 평균 Ct 값과 분명한 차이를 나타내는 바, 특이도가 다소 떨어지는 것을 알 수 있다. 이에 반해, CTO를 이용한 방식(타겟 검출 시약 (ii))은 hgDNA에 대한 시그널과 음성 대조군의 시그널의 평균 Ct 값이 거의 동일한 바, 타겟 올리고뉴클레오타이드에 대한 특이도가 인터칼레이팅 염료 방식에 비해 우수한 것을 알 수 있다.

[174]

[175]

[176]

실시예 2: CTO 및 검출 올리고뉴클레오타이드를 이용한 타겟 검출 비교

본 실시예에서는 CTO를 이용하는 검출 방식과 본 발명에 따른 검출 올리고뉴클레오타이드를 이용한 검출 방식을 비교하기 위하여, 하기와 같이, 2 종류의 타겟 검출 시약을 제조하였다.

[177]

대조군으로서, 5X 완충액(40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 150 mM KCl, 4 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1.2 mM EGTA)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1에서의 타겟 검출 시약 (ii)와 동일한 조성으로, 최종 20 µL의 타겟 검출 시약 (iii)을 제조하였다.

[178]

또한, 타겟 올리고뉴클레오타이드 검출을 위해 증폭 및 검출을 단일 반응에서 구현할 수 있는 검출 올리고뉴클레오타이드의 일 예시로서 RQ-XrX'(서열번호: 3) 1.25 pmole, 0.75 µL Nt.BstNBI(NEB, R0607L), 0.3 µL Bst 2.0 WarmStart DNA 중합효소(NEB, M0538L), 0.3 mM 데옥시뉴클레오타이드(dNTP) 용액 믹스(NEB, N0447L), 2 mM 황산마그네슘(MgSO₄) 용액(NEB, B1003S), 5X 완충액(40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 150 mM KCl, 4 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1.2 mM EGTA)을 포함하여 최종 20 µL의 타겟 검출 시약 (iv)를 제조하였다.

[179]

20 µL의 타겟 검출 시약 (iii) 및 (iv)에 세가지 농도(농도 1: 2×10¹⁰ copies/µL, 농도 2: 2×10⁸ copies/µL, 농도 3: 2×10⁶ copies/µL)의 타겟 올리고뉴클레오타이드 5 µL (서열번호: 4)을 혼합하여 최종 부피 25 µL로 반응 혼합물을 제조하였다.

[180]

상기 반응 혼합물을 함유하고 있는 튜브를 실시간 열순환기(CFX96, Bio-Rad)에 위치시켜 55°C에서 반응시켰으며, 시그널의 검출은 매 17초마다 측정하였다. Ct 값은 Auto calculated single threshold에 의해 계산되었으며, 모든 실험은 2회씩 반복 실험하였다. 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드(서열번호: 4) 대신 증류수 5 µL를 넣은 반응 혼합물을 이용하여 상기와 동일한 조건으로 음성 대조군 반응도 함께 실시하였다. 시그널 검출 결과를 도 7, 표 4 및 표 5에 나타내었다.

[181]

[표4]

타겟 올리고뉴클레오타이드의 농도		농도 1	농도 2	농도 3	음성대조군
평균 Ct	타겟 검출 시약 (iii)	9.91	17.80	24.07	25.58
	타겟 검출 시약 (iv)	3.51	8.53	11.66	12.90

[182] [표5]

타겟 올리고뉴클레오타이드의 농도		농도 1	농도 2	농도 3
*Ct %	타겟 검출 시약 (iii)	61.27	30.42	5.90
	타겟 검출 시약 (iv)	72.78	33.85	9.58

[183] * Ct % = [(Ct 음성 대조군 - Ct 타겟 올리고뉴클레오타이드)/Ct 음성 대조군]×100

[184]

[185] 본 발명의 일 구현예에 따른 검출 올리고뉴클레오타이드를 이용한 검출 방법은 CTO 이용 방식에 비해 TAT(turn around time)가 월등히 짧으며, 모든 농도에 민감도가 우수한 것을 확인할 수 있다. 아울러, 본 발명의 일 구현예에 따른 방법은 실험한 모든 농도에서 Ct%가 높아 비특이적 반응과 확연히 구별되는 바, 신속하면서도 정확한 등온 증폭법을 구현하는 것을 알 수 있다.

[186] 특히, 상기 CTO 이용 방식이 종래의 인터컬레이팅 염료 방식에 비해 검출 특이도 및 민감도가 모두 우수하게 구현되는 것을 실시예 1에서 확인한 바 있다. 따라서, 본 발명의 검출 올리고뉴클레오타이드는 단일의 등온 증폭 반응에서 증폭 및 시그널 검출을 동시에 구현하여, 종래 기술에 비하여 보다 정확하고 신속한 방식으로 타겟 핵산 서열을 검출하는 것을 추론할 수 있다.

[187]

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

청구범위

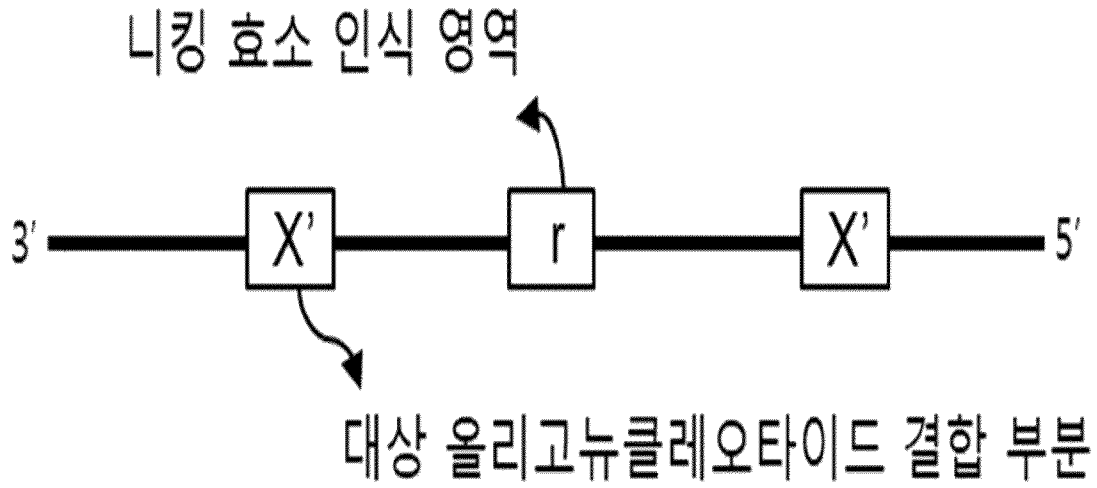
- [청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법:
- (a) 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출 올리고뉴클레오타이드와 혼성화하는 단계로서;
- 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 3'에서 5' 방향으로 제1 주형 영역, 니킹(nicking) 효소 인식 영역 및 제2 주형 영역을 포함하고,
- 상기 제1 주형 영역 및 제2 주형 영역은 서로 독립적으로, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며,
- 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 리포터 분자 및 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 켜칠 수 있는 켜처 분자를 포함하는 상호작용적 이중표지로 표시되어 있고,
- 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 혼성화되며;
- (b) 등온 조건 하에서, 상기 단계 (a)의 결과물을 니킹 효소 및 가닥 치환(strand displacement) 핵산 중합효소와 인큐베이팅하는 단계로서;
- 상기 제1 주형 영역에 혼성화된 타겟 올리고뉴클레오타이드는 상기 가닥 치환 핵산 중합효소에 의해 연장되어 상기 검출 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 연장 가닥을 생성하고, 상기 연장 가닥은 상기 니킹 효소에 의해 상기 니킹 효소 인식 영역에서 절단되며, 상기 절단된 가닥은 상기 가닥 치환 핵산 중합효소에 의해 그의 3'-말단으로부터 연장되어 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드를 방출하며; 및
- (c) 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 시그널을 검출하는 단계로서;
- 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 초래하여 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 존재를 나타내는 검출 가능한 시그널을 제공한다.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 켜처 분자는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화는 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 켜처 분자는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제2 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중

- 표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자 중 하나는 제1 주형 영역에 위치하고 다른 하나는 제2 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성 전에는 상기 퀀처 분자는 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 퀀칭하는 반면, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성은 상기 리포터 분자와 상기 퀀처 분자를 서로 분리시켜 상기 리포터 분자로부터 검출 가능한 시그널이 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 관심 병원체의 존재 하에 유래된 또는 생성된 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 가닥 치환 핵산 중합효소는 Bst 큰 단편 중합효소, Bst 2.0, Bst 3.0, Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), Φ29 파아지, MS-2 파아지, Z-Taq, KOD, 클레나우 단편, GspSSD, GspF, OmniAmp 중합효소, SD 중합효소 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 니킹 효소는 Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nb.BsrDI, Nt.BstNBI, Nb.BssSI, Nt.Alw 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 9] 다음을 포함하는 타겟 올리고뉴클레오타이드를 검출하기 위한 키트:
 (a) 검출 올리고뉴클레오타이드;
 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 3'에서 5' 방향으로 제1 주형 영역, 니킹(nicking) 효소 인식 영역 및 제2 주형 영역을 포함하고,
 상기 제1 주형 영역 및 제2 주형 영역은 서로 독립적으로, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 실질적으로 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 가지며,
 상기 검출 올리고뉴클레오타이드는 리포터 분자 및 상기 리포터 분자로부터의 시그널을 퀀칭할 수 있는 퀀처 분자를 포함하는 상호작용적 이중표지로 표지되어 있고;
 (b) 가닥 치환 핵산 중합효소;
 (c) 니킹 효소; 및

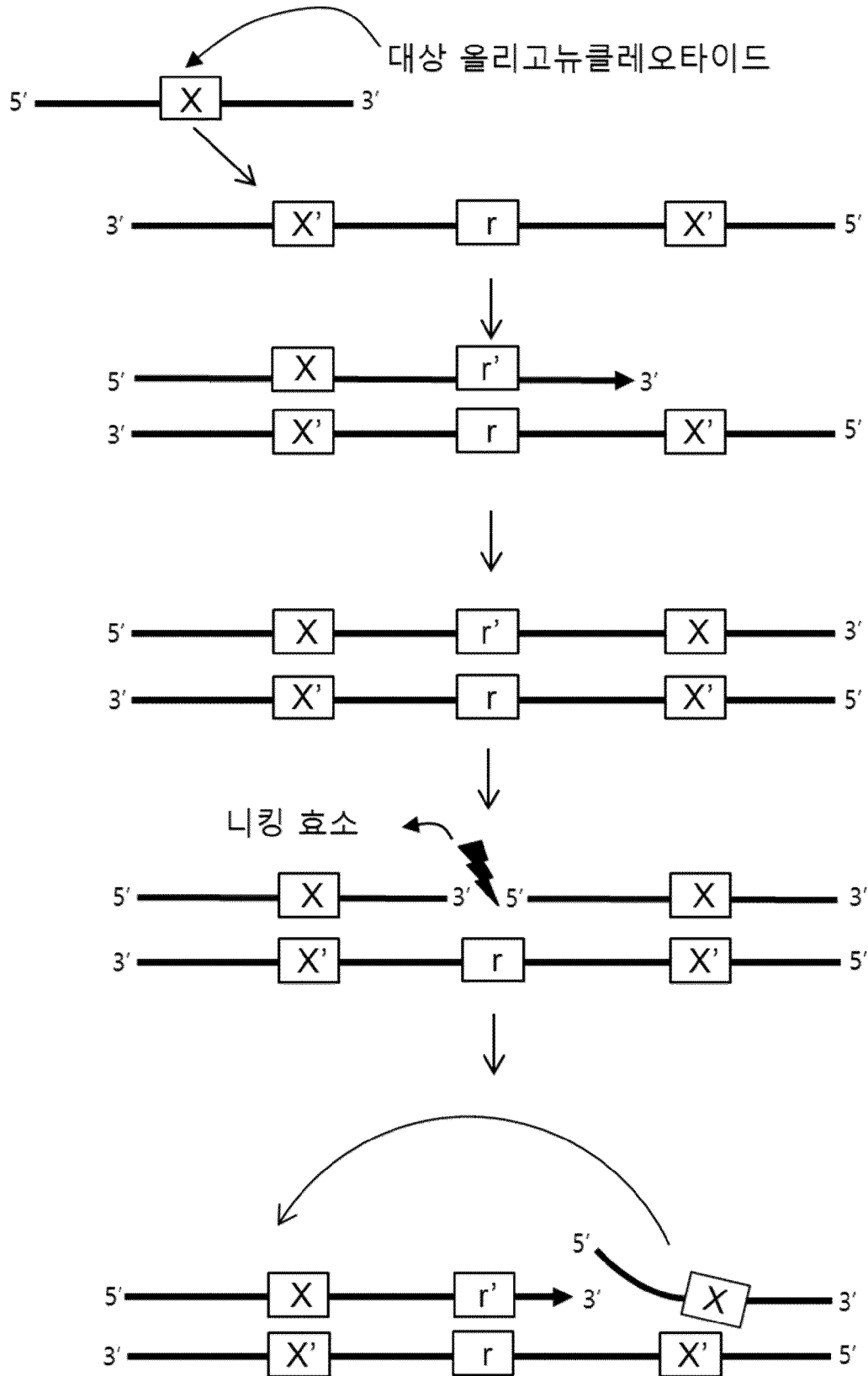
(d) dNTPs.

- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제1 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화는 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자는 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 제2 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드의 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중 표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 상호작용적 이중 표지의 리포터 분자 및 퀀처 분자 중 하나는 제1 주형 영역에 위치하고 다른 하나는 제2 주형 영역에 위치하며, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드와 상기 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 또는 상기 연장 가닥의 생성은 상기 상호작용적 이중표지로부터의 시그널 변화를 유도하여 검출 가능한 시그널을 제공하는 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 타겟 올리고뉴클레오타이드는 관심 병원체의 존재 하에 유래된 또는 생성된 핵산 서열 또는 이의 상보적인 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 14] 제9항에 있어서, 상기 가닥 치환 핵산 중합효소는 Bst large fragment 중합효소, Bst 2.0, Bst 3.0, Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), Φ 29 파아지, MS-2 파아지, Z-Taq, KOD, 클레나우 단편, GspSSD, GspF, OmniAmp 중합효소, SD 중합효소 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 키트.
- [청구항 15] 제9항에 있어서, 상기 니킹 효소는 Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nb.BsrDI, Nt.BstNBI, Nb.BssSI, Nt.Alw 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 키트.

[도 1]

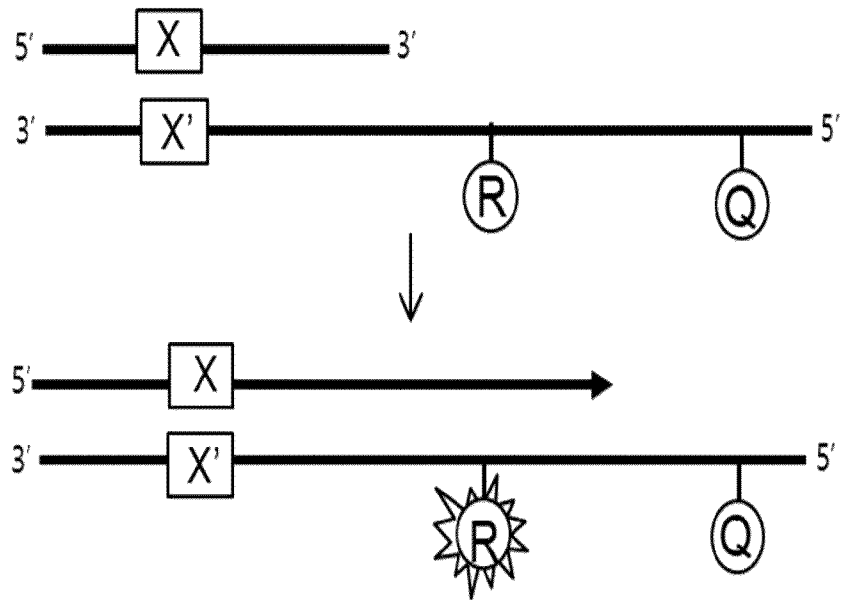


[도2]



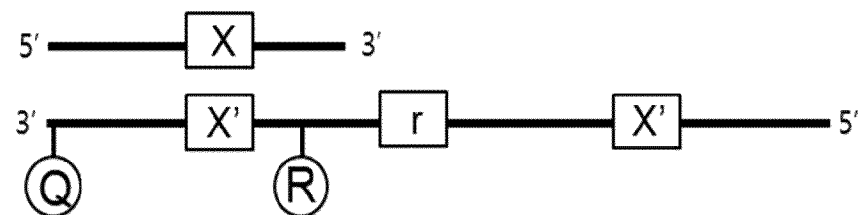
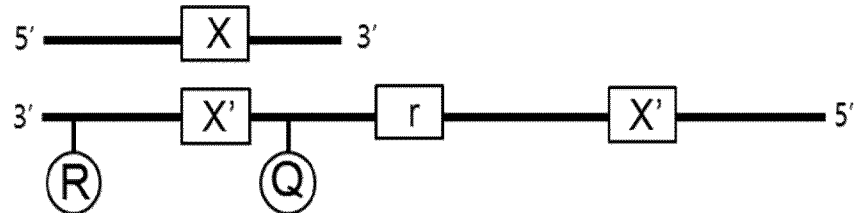
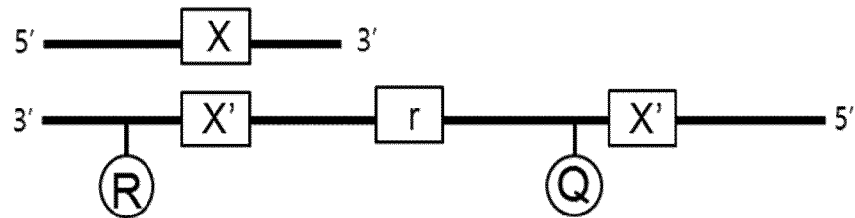
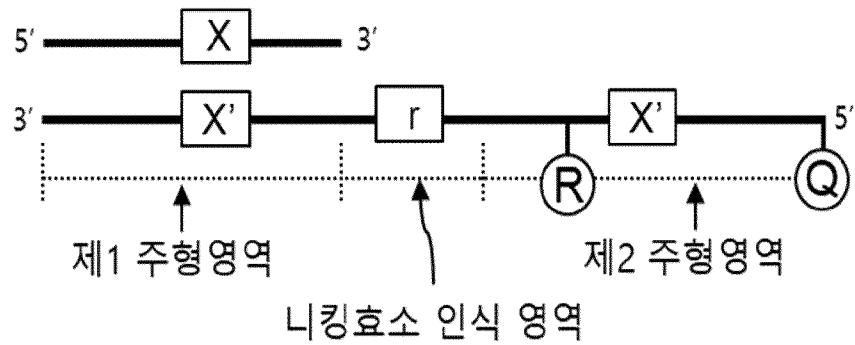
[도3]

<CTO를 이용한 검출>

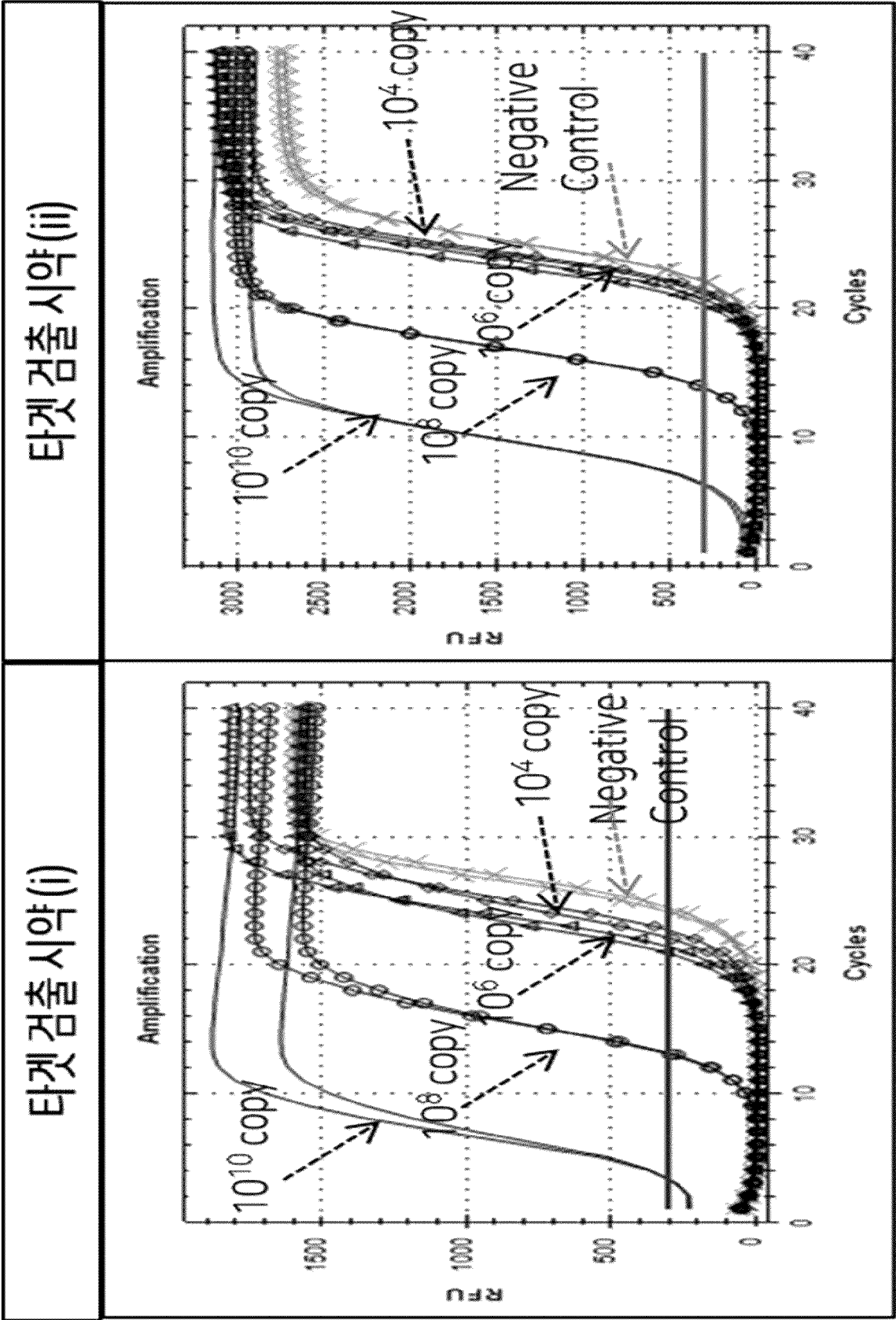


[도4]

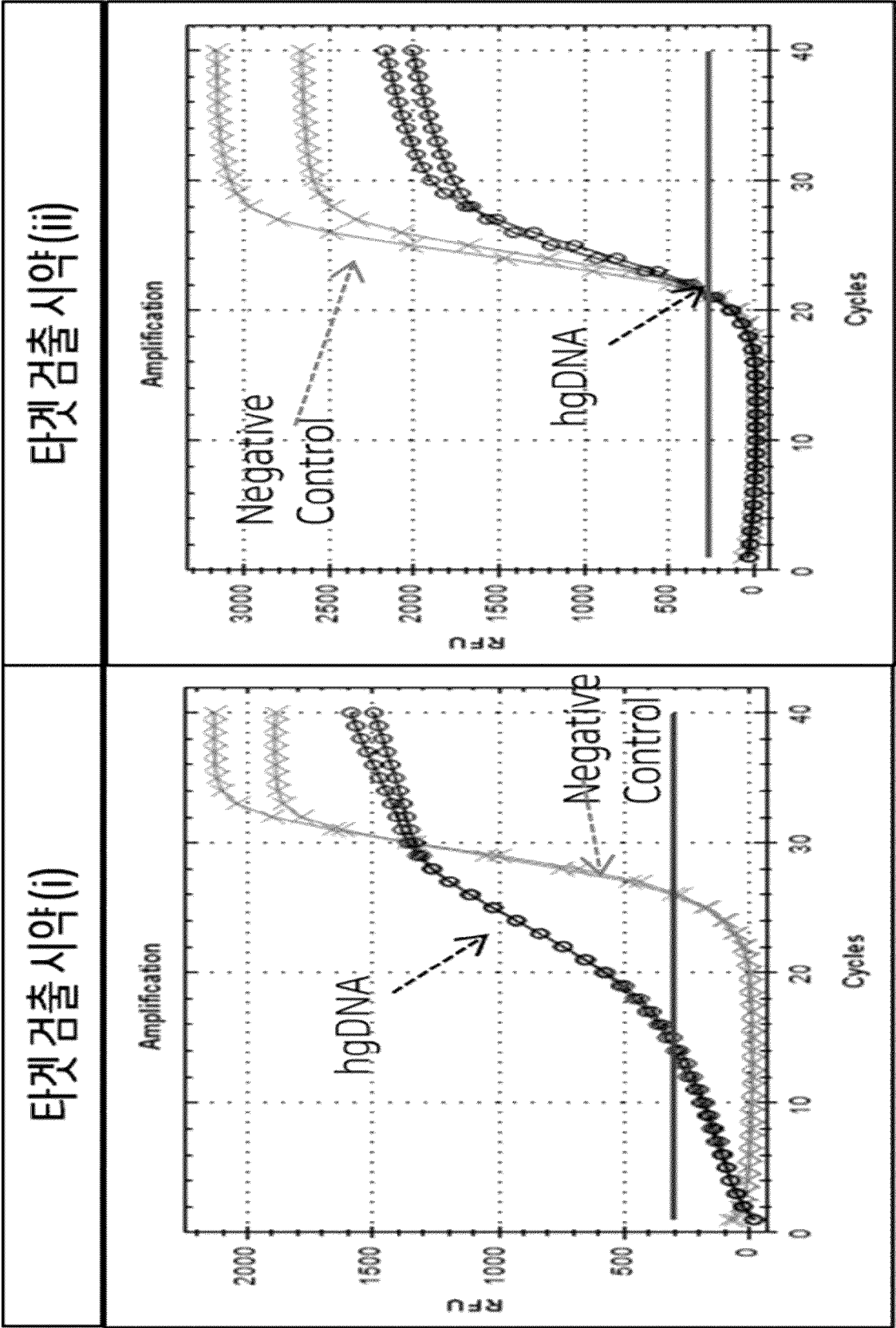
<검출 올리고뉴클레오타이드 예시>



[도5]

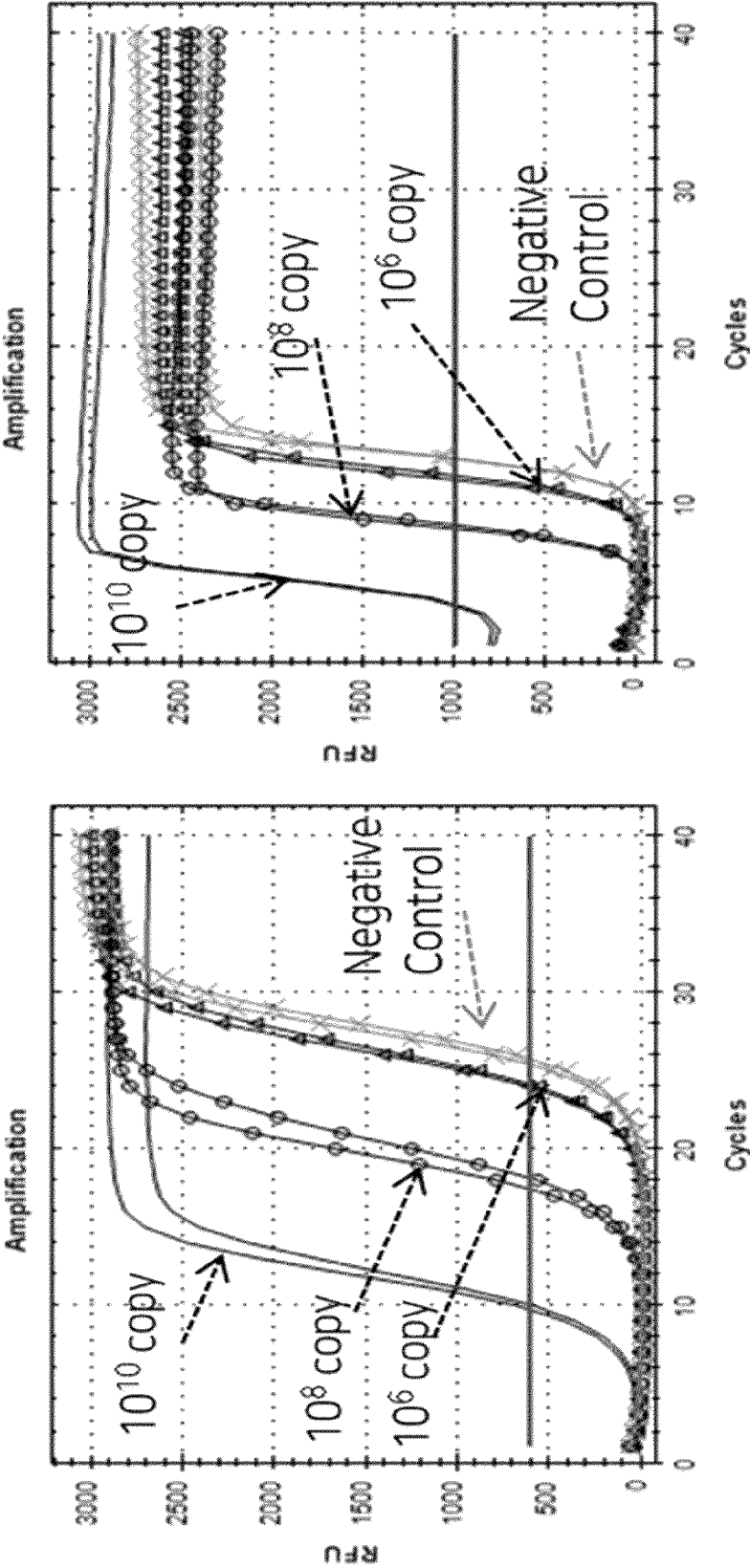


[도6]



[도7]

10¹⁰ copy — 10⁸ copy ⊖	10⁶ copy ▴ NTC ✕
타겟 검출 시약 (iii)	
10¹⁰ copy — 10⁸ copy ⊖	10⁶ copy ▴ NTC ✕
타겟 검출 시약 (iv)	



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/001759

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C12Q 1/6848(2018.01)i; C12Q 1/6818(2018.01)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 1/6848(2018.01); C07H 21/04(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 9/22(2006.01); C12Q 1/34(2006.01);
C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6832(2018.01); G01N 21/64(2006.01)

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: 지수합수적 증폭 반응(Exponential Amplification Reaction, EXPAR), 검출
(detection), 주형(template), 니킹 효소(nicking enzyme), 리포터(reporter), 퀀처(quencher), 시그널(signal), 중합효소
(polymerase), 혼성화(hybridization), 연장(extension)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022-117816 A1 (THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM) 09 June 2022 (2022-06-09) See entire document.	1-15
A	MOK, E. et al. Comprehensive evaluation of molecular enhancers of the isothermal exponential amplification reaction. Scientific Reports. 02 December 2016, vol. 6, thesis no. 37837, pp. 1-10. See entire document.	1-15
A	KR 10-2013-0006477 A (SEEGENE, INC.) 16 January 2013 (2013-01-16) See entire document.	1-15
A	US 2018-0346974 A1 (FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA) 06 December 2018 (2018-12-06) See entire document.	1-15
A	WO 2018-195044 A1 (MONTANA STATE UNIVERSITY) 25 October 2018 (2018-10-25) See entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

“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

09 May 2024

Date of mailing of the international search report

13 May 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/KR2024/001759

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106929563 B (SHANDONG NORMAL UNIVERSITY) 12 October 2018 (2018-10-12) See entire document.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/001759

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/KR2024/001759

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2022-117816	A1	09 June 2022	CN	117460838	A	26 January 2024
				EP	4256082	A1	11 October 2023
				JP	2023-553860	A	26 December 2023
				WO	2022-117816	A9	24 August 2023
KR	10-2013-0006477	A	16 January 2013	AU	2012-205956	A1	31 January 2013
				AU	2012-205956	B2	16 July 2015
				AU	2015-203677	A1	23 July 2015
				AU	2015-203677	B2	23 June 2016
				CN	102959092	A	06 March 2013
				CN	102959092	B	13 January 2016
				CN	103866037	A	18 June 2014
				CN	103866037	B	07 September 2016
				EP	2572004	A2	27 March 2013
				EP	2572004	B1	04 March 2015
				EP	2708608	A1	19 March 2014
				EP	2708608	B1	15 March 2017
				EP	2826868	A1	21 January 2015
				EP	2826868	B1	08 March 2017
				EP	3168311	A1	17 May 2017
				EP	3168311	B1	15 May 2019
				EP	3543352	A1	25 September 2019
				EP	3543352	B1	20 October 2021
				EP	3967774	A1	16 March 2022
				JP	2013-538041	A	10 October 2013
				JP	2015-070848	A	16 April 2015
				JP	2017-070298	A	13 April 2017
				JP	5756854	B2	29 July 2015
				JP	6054357	B2	27 December 2016
				JP	6244440	B2	06 December 2017
				KR	10-1462192	B1	14 November 2014
				KR	10-2012-0081482	A	19 July 2012
				KR	10-2012-0105811	A	26 September 2012
				US	10280453	B2	07 May 2019
				US	10519489	B2	31 December 2019
				US	11306349	B2	19 April 2022
				US	2013-0109588	A1	02 May 2013
				US	2015-0086984	A1	26 March 2015
				US	2016-0312271	A1	27 October 2016
				US	2017-0073744	A1	16 March 2017
				US	2020-0087718	A1	19 March 2020
				US	2022-0213535	A1	07 July 2022
				US	8809239	B2	19 August 2014
				US	9540681	B2	10 January 2017
				WO	2012-096430	A1	19 July 2012
				WO	2012-096523	A2	19 July 2012
				WO	2012-096523	A3	06 December 2012
				WO	2012-096523	A9	23 January 2014
				ZA	201209536	B	26 March 2014
US	2018-0346974	A1	06 December 2018	CA	3003829	A1	26 May 2017
				CN	106711102	A	24 May 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/001759

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CN 106711102 B	06 September 2019
		CN 106712473 A	24 May 2017
		CN 106712473 B	01 October 2019
		CN 108291239 A	17 July 2018
		CN 108291804 A	17 July 2018
		CN 108291804 B	08 January 2021
		CN 108291805 A	17 July 2018
		CN 108291805 B	08 September 2020
		EP 3377083 A1	26 September 2018
		EP 3377638 A1	26 September 2018
		EP 3377651 A1	26 September 2018
		EP 3377651 B1	11 September 2019
		EP 3377652 A1	26 September 2018
		EP 3377652 B1	04 September 2019
		EP 3377849 A1	26 September 2018
		EP 3377849 B1	06 July 2022
		EP 3377850 A1	26 September 2018
		EP 3377850 B1	19 April 2023
		JP 2018-533967 A	22 November 2018
		JP 2018-536161 A	06 December 2018
		JP 2019-505759 A	28 February 2019
		JP 6797914 B2	09 December 2020
		JP 6961588 B2	05 November 2021
		KR 10-2018-0086215 A	30 July 2018
		KR 10-2234309 B1	01 April 2021
		KR 10-2337014 B1	09 December 2021
		US 10084446 B2	25 September 2018
		US 10299506 B2	28 May 2019
		US 10302418 B2	28 May 2019
		US 10319686 B2	11 June 2019
		US 10947564 B2	16 March 2021
		US 2017-0136290 A1	18 May 2017
		US 2017-0140944 A1	18 May 2017
		US 2017-0141019 A1	18 May 2017
		US 2017-0141048 A1	18 May 2017
		US 2017-0141775 A1	18 May 2017
		US 2018-0328723 A1	15 November 2018
		US 2018-0332888 A1	22 November 2018
		US 2019-0055584 A1	21 February 2019
		US 9698087 B2	04 July 2017
		US 9893001 B2	13 February 2018
		US 9974997 B2	22 May 2018
		WO 2017-085080 A1	26 May 2017
		WO 2017-085627 A1	26 May 2017
		WO 2017-085650 A1	26 May 2017
		WO 2017-085655 A1	26 May 2017
		WO 2017-085659 A1	26 May 2017
		WO 2017-085662 A1	26 May 2017
----- WO 2018-195044 A1 25 October 2018		AU 2018-255266 A1	17 October 2019
		AU 2018-255266 B2	20 April 2023

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/001759

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 3058202 A1	25 October 2018
		EP 3612547 A1	26 February 2020
		JP 2020-516317 A	11 June 2020
		JP 7026416 B2	01 March 2022
		US 2020-0048691 A1	13 February 2020
CN 106929563 B	12 October 2018	CN 106929563 A	07 July 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6848(2018.01)i; C12Q 1/6818(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6848(2018.01); C07H 21/04(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 9/22(2006.01); C12Q 1/34(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6832(2018.01); G01N 21/64(2006.01) 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: 지수함수적 증폭 반응(Exponential Amplification Reaction, EXPAR), 검출(detection), 주형(template), 니킹 효소(nicking enzyme), 리포터(reporter), 퀸처(quencher), 시그널(signal), 중합효소(polymerase), 혼성화(hybridization), 연장(extension)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2022-117816 A1 (THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM) 2022.06.09 전체 문헌	1-15
A	MOK, E. 등, 'Comprehensive evaluation of molecular enhancers of the isothermal exponential amplification reaction', Scientific Reports, 2016.12.02, 6권, 논문번호 37837, 1-10 페이지 전체 문헌	1-15
A	KR 10-2013-0006477 A (주식회사 씨젠) 2013.01.16 전체 문헌	1-15
A	US 2018-0346974 A1 (FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA) 2018.12.06 전체 문헌	1-15
A	WO 2018-195044 A1 (MONTANA STATE UNIVERSITY) 2018.10.25 전체 문헌	1-15
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “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 2024년05월09일(09.05.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년05월13일(13.05.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 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
WO 2022-117816 A1	2022/06/09	CN 117460838 A	2024/01/26
		EP 4256082 A1	2023/10/11
		JP 2023-553860 A	2023/12/26
		WO 2022-117816 A9	2023/08/24
KR 10-2013-0006477 A	2013/01/16	AU 2012-205956 A1	2013/01/31
		AU 2012-205956 B2	2015/07/16
		AU 2015-203677 A1	2015/07/23
		AU 2015-203677 B2	2016/06/23
		CN 102959092 A	2013/03/06
		CN 102959092 B	2016/01/13
		CN 103866037 A	2014/06/18
		CN 103866037 B	2016/09/07
		EP 2572004 A2	2013/03/27
		EP 2572004 B1	2015/03/04
		EP 2708608 A1	2014/03/19
		EP 2708608 B1	2017/03/15
		EP 2826868 A1	2015/01/21
		EP 2826868 B1	2017/03/08
		EP 3168311 A1	2017/05/17
		EP 3168311 B1	2019/05/15
		EP 3543352 A1	2019/09/25
		EP 3543352 B1	2021/10/20
		EP 3967774 A1	2022/03/16
		JP 2013-538041 A	2013/10/10
		JP 2015-070848 A	2015/04/16
		JP 2017-070298 A	2017/04/13
		JP 5756854 B2	2015/07/29
		JP 6054357 B2	2016/12/27
		JP 6244440 B2	2017/12/06
		KR 10-1462192 B1	2014/11/14
		KR 10-2012-0081482 A	2012/07/19
		KR 10-2012-0105811 A	2012/09/26
		US 10280453 B2	2019/05/07
		US 10519489 B2	2019/12/31
		US 11306349 B2	2022/04/19
		US 2013-0109588 A1	2013/05/02
		US 2015-0086984 A1	2015/03/26
		US 2016-0312271 A1	2016/10/27
		US 2017-0073744 A1	2017/03/16
		US 2020-0087718 A1	2020/03/19
		US 2022-0213535 A1	2022/07/07
		US 8809239 B2	2014/08/19
		US 9540681 B2	2017/01/10
		WO 2012-096430 A1	2012/07/19
		WO 2012-096523 A2	2012/07/19
		WO 2012-096523 A3	2012/12/06
		WO 2012-096523 A9	2014/01/23
		ZA 201209536 B	2014/03/26
US 2018-0346974 A1	2018/12/06	CA 3003829 A1	2017/05/26
		CN 106711102 A	2017/05/24

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CN 106711102 B	2019/09/06
		CN 106712473 A	2017/05/24
		CN 106712473 B	2019/10/01
		CN 108291239 A	2018/07/17
		CN 108291804 A	2018/07/17
		CN 108291804 B	2021/01/08
		CN 108291805 A	2018/07/17
		CN 108291805 B	2020/09/08
		EP 3377083 A1	2018/09/26
		EP 3377638 A1	2018/09/26
		EP 3377651 A1	2018/09/26
		EP 3377651 B1	2019/09/11
		EP 3377652 A1	2018/09/26
		EP 3377652 B1	2019/09/04
		EP 3377849 A1	2018/09/26
		EP 3377849 B1	2022/07/06
		EP 3377850 A1	2018/09/26
		EP 3377850 B1	2023/04/19
		JP 2018-533967 A	2018/11/22
		JP 2018-536161 A	2018/12/06
		JP 2019-505759 A	2019/02/28
		JP 6797914 B2	2020/12/09
		JP 6961588 B2	2021/11/05
		KR 10-2018-0086215 A	2018/07/30
		KR 10-2234309 B1	2021/04/01
		KR 10-2337014 B1	2021/12/09
		US 10084446 B2	2018/09/25
		US 10299506 B2	2019/05/28
		US 10302418 B2	2019/05/28
		US 10319686 B2	2019/06/11
		US 10947564 B2	2021/03/16
		US 2017-0136290 A1	2017/05/18
		US 2017-0140944 A1	2017/05/18
		US 2017-0141019 A1	2017/05/18
		US 2017-0141048 A1	2017/05/18
		US 2017-0141775 A1	2017/05/18
		US 2018-0328723 A1	2018/11/15
		US 2018-0332888 A1	2018/11/22
		US 2019-0055584 A1	2019/02/21
		US 9698087 B2	2017/07/04
		US 9893001 B2	2018/02/13
		US 9974997 B2	2018/05/22
		WO 2017-085080 A1	2017/05/26
		WO 2017-085627 A1	2017/05/26
		WO 2017-085650 A1	2017/05/26
		WO 2017-085655 A1	2017/05/26
		WO 2017-085659 A1	2017/05/26
		WO 2017-085662 A1	2017/05/26
----- WO 2018-195044 A1	2018/10/25	AU 2018-255266 A1	2019/10/17
		AU 2018-255266 B2	2023/04/20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CA 3058202 A1	2018/10/25
		EP 3612547 A1	2020/02/26
		JP 2020-516317 A	2020/06/11
		JP 7026416 B2	2022/03/01
		US 2020-0048691 A1	2020/02/13
CN 106929563 B	2018/10/12	CN 106929563 A	2017/07/07