

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 4월 22일 (22.04.2021) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2021/075912 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/689 (2018.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/014175

(22) 국제출원일: 2020년 10월 16일 (16.10.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0129647 2019년 10월 18일 (18.10.2019) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 08308 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자: 임채승 (LIM, Chae Seung); 14101 경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 302-804, Gyeonggi-do (KR). 윤정 (YOON, Jung); 08308 서울시 구로구 구로동로 148 고려대부속구로병원 진단검사의학, Seoul (KR).

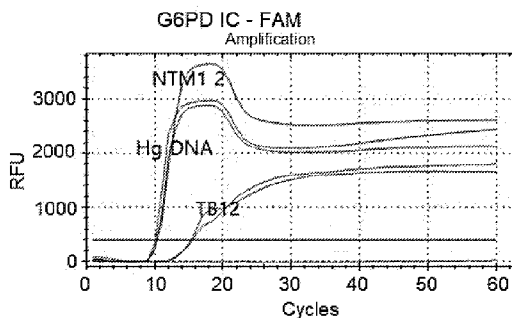
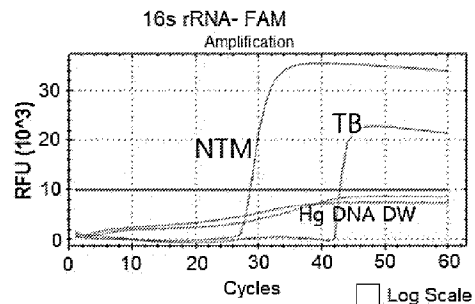
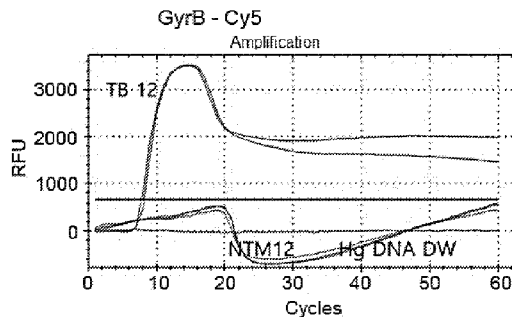
(74) 대리인: 특허법인 다해 (DAHAI INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM); 06141 서울시 강남구 테헤란로27길 8, 다운빌딩 10층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) Title: PRIMER SET FOR HIGH-SENSITIVITY MULTI-ISOTHERMAL AMPLIFICATION REACTION CAPABLE OF SIMULTANEOUSLY SCREENING AND DETECTING MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AND NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA

(54) 발명의 명칭: 결핵균 및 비결핵항산균을 동시에 감별하여 검출할 수 있는 고감도 다중 등온증폭반응용 프라이머 세트



Sample	Gyr B(Cy5)		G6PD IC (FAM)	
	Ct	RFU	Ct	RFU
TB 1	7.75	1995	15.47	1791
TB 2	8.16	1497	15.24	1662
NTM1	N/A	396	10.29	2125
NTM 2	N/A	482	10.35	2610
N.C(hg DNA)	N/A	510	10.06	2420
D.W	N/A	1.44	N/A	15.8

(57) Abstract: The present invention relates to a primer set for a multi-isothermal amplification reaction capable of simultaneously screening and detecting *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and nontuberculous mycobacteria (NTM) and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*: MTB)과 비결핵항산균(Nontuberculous mycobacteria: NTM)을 동시에 감별하여 검출할 수 있는 다중 등온증폭반응용 프라이머 세트 등에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/075912 A1

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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 결핵균 및 비결핵항산균을 동시에 감별하여 검출할 수 있는 고감도 다중 등온증폭반응용 프라이머 세트

기술분야

- [1] 본 발명은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*: MTB)과 비결핵항산균(Nontuberculous mycobacteria: NTM)을 동시에 감별하여 검출할 수 있는 다중 등온증폭반응용 프라이머 세트 등에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*: MTB)에 의한 비말 감염 질환으로 지난 수세기 동안 수백만 명의 사망자가 발생한 감염성 질환 사망의 주요 원인 중 하나이다. 또한 매년 1천만 건의 새로운 사례와 약 2백만 건의 사망 원인으로 추정된다.
- [4] 한편, 비결핵항산균(Nontuberculous mycobacteria: NTM)은 자연수와 토양 등 자연환경에 널리 상재하는 균으로 NTM 감염증은 폐질환이 가장 흔하며 대부분의 경우 균이 공기를 통해 호흡기에 감염되어 발생한다. 역학적으로 *M. avium* complex가 60-80%를 차지하며, 외국의 경우 *M. kansasii*가 15-20%를, 국내의 경우 *M. abscessus*가 20-30%를 차지하며 국내에서 임상 검체에서 NTM이 분리되는 빈도와 NTM 폐질환으로 진단 및 치료 받는 환자들이 크게 늘고 있다
- [5] 기존의 결핵 검출법으로는 흉부방사선 검사, 직접도말 표본의 항산성염색 (Acid fast stain), 고체 배지 및 액체 배지 배양법이 있다. 배양에서 양성을 확인하는 것이 확진 방법이나, 배양 기간이 6-8주로 매우 길다는 점에서 그 한계가 있다. 또한 직접도말 표본의 항산성염색의 경우 MTB와 NTM을 구분할 수 없다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 MTB, NTM 구분 및 진단을 위해 결핵균 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)검사가 이러한 도말검사와 배양검사의 단점을 보완하여 민감하고 신속하게 MTB 및 NTM 검출 및 동정을 위하여 사용되고 있으며 결핵진료지침에도 의심되는 환자의 경우 균동정을 위해 PCR을 사용할 것을 권고하고 있다. 하지만, PCR을 이용한 MTB 및 NTM 검출법은 숙련된 검사자 및 고급 실험실 기반을 필요로 한다. 따라서 전문적인 의료 서비스를 이용할 수 없는 지역이나 단기간에 많은 수의 선별 검사를 해야 할 필요가 있는 곳에서는 검사에 한계점이 있다.
- [6] 최근, 온도 변화 없이 일정한 온도에서 유전자를 증폭하는 등온 증폭 반응법(loop-mediated isothermal amplification reaction, LAMP)이 개발되었다. LAMP법은 주형에 상보적인 프라이머 6개를 사용하여 각기 다른 8개의 부위를 인식하여 유전자 증폭을 진행한다. 기존의 PCR법과 비교하였을 때, 온도의 변화 없이 증폭할 수 있다는 점에서 검사의 소모시간을 단축할 수 있고, 온도 변화를

위한 값비싼 장비 없이 검사를 진행할 수 있다

- [7] 이에, 본 발명자들은 LAMP법을 이용하여 숙련된 검사자 및 값비싼 장비 없이도 MTB 및 NTM을 동시에 동정하는 방법에 대해 예의 연구하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 결핵균 검출 프라이머 세트와 결핵균 및 비결핵항산균 검출 프라이머 세트를 제공하고, 상기 각각의 프라이머 세트를 포함하여 결핵균과 비결핵항산균을 감별하여 검출할 수 있는 프라이머 세트 및 키트와 이를 이용하여 결핵균 및 비결핵항산균을 감별하여 검출하는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 6의 프라이머를 포함하는, 결핵균 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 서열번호 7 내지 12의 프라이머를 포함하는, 결핵균 및 비결핵항산균 검출용 LAMP 프라이머 세트를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 6의 프라이머 및 서열번호 7 내지 12의 프라이머를 포함하는 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출용 프라이머 세트를 제공한다.
- [14] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 13 내지 18의 프라이머를 추가로 포함할 수 있다.
- [15] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 서열번호 5 ; 서열번호 11 ; 및/또는 서열번호 18;의 프라이머는 형광물질로 표지된 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 형광물질은 서열번호 5의 15번째 염기인 티민(T)에 표지될 수 있으며, 서열번호 11의 18번째 염기인 티민에 표지될 수 있고, 서열번호 18의 18번째 염기인 티민에 표지될 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 형광물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사

플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 써아디카르보시아닌(thiadibococyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [18] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 서열번호 5; 서열번호 11; 및 서열번호 18 프라이머는 서로 다른 파장을 발하는 형광물질로 표시될 수 있다.
- [19] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 6의 프라이머를 포함하는 결핵균 검출용 키트를 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 서열번호 7 내지 12의 프라이머를 포함하는 비결핵항산균 검출용 키트를 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 18의 프라이머 세트를 포함하는 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출용 키트를 제공한다.
- [22] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 키트는 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 시약에는 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상이 포함될 수 있다.
- [23] 또한, 본 발명은 (1) 생물학적 시료의 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1 내지 6의 MTB primer set; 및 서열번호 7 내지 12의 MTB 및 NTM primer set;를 포함하는 프라이머 세트를 이용하여 등온증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 (3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출 및 진단 방법을 제공한다.
- [24] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 호흡기 질환 환자의 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration) 및 기관지세척액(bronchial washing), 및 체액(body fluid)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [25] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (2) 단계의 프라이머 세트는 서열번호 13 내지 18의 internal control primer set를 추가로 포함할 수 있다.
- [26] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (3) 단계는 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정, 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있으나, 바람직하게는 형광 측정 방법에 의할 수 있다.
- [27] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 (3) 단계 이후에 MTB primer set; 및 MTB 및 NTM primer set에 의해 증폭된 산물이 모두 검출되는 경우 MTB 양성으로 해석하고, MTB primer set에 의한 증폭 산물은 검출되지 않았으나 MTB 및 NTM primer set에 의해 증폭된 산물은 검출되는 경우 NTM 양성으로 해석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [28] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 (3) 단계 이후에 internal control

primer set에 의한 증폭산물이 검출되고 다른 primer set에 의한 증폭 산물은 검출되지 않는 경우 음성으로 해석하는 단계를 포함할 수 있다.

- [29] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 (3) 단계 이후에 (3) 단계의 검출 시간을 측정하여 MTB 및/또는 NTM을 정량화 하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 “정량화”는 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용한 증폭반응 수행 시의 표준곡선과 비교하여 DNA 농도에 따른 형광물질 검출 시간을 정량화하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 단계 (c)의 증폭 산물을 형광지표를 이용하여 검출함으로써 형광물질 검출 시간을 측정하여 DNA 농도를 정량화하는 것일 수 있다.

[30]

발명의 효과

- [31] 본 발명의 프라이머 세트는 실시간 다중 등온증폭반응(real-time multiplex LAMP)을 기반으로 하여 종래에 PCR, real time PCR 기반의 검출 보다 폐질환의 원인균 동정 시간을 단축시키고, LAMP를 기반으로 하기 때문에 검사에 온도변화가 필요치 않아 종래 PCR 기기와 비교하여 단순하고 경제적이고 가벼운 기기를 이용할 수 있는 장점이 있다. 또한, 본 발명은 multiplex로 검사하여 MTB 및 NTM을 모두 검출하고 동시에 이를 감별할 수 있다는 점에서 시간과 비용 측면에 유리하여 기존의 결핵 검출법을 대체하는 분자진단검사방법으로 이용될 것으로 기대된다.

[32]

도면의 간단한 설명

- [33] 도 1은 결핵 GYRB 유전자 서열 특이적인 MTB 프라이머 세트, 비결핵항산균과 결핵균 모두 증폭할 수 있는 16S rRNA 유전자 서열 특이적인 MTB 및 NTM 프라이머 세트, 인간의 G6PD를 증폭하는 internal control 프라이머 세트를 이용하여 실제 MTB, NTM 감염 및 정상인 비감염 검체, 증류수 검체 테스트 결과이다.
- [34] 도 2는 결핵 GYRB 유전자 서열 특이적인 MTB 프라이머 세트의 검출한계를 plasmid를 이용하여 테스트한 결과이다.
- [35] 도 3은 결핵 GYRB 유전자 서열 특이적인 MTB 프라이머 세트가 MTB에 특이적으로 증폭하고 비결핵항산균 NTM에 비특이적인지 확인하기 위하여 교차반응 유무를 실제 MTB, NTM 감염 검체를 대상으로 테스트한 결과이다.

[36]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 본 발명자들은 현장에서 감염성 폐질환 환자의 병원균을 빠르고 정확하게 동정할 수 있는 방법에 대해 예의 연구하여 본 발명을 완성하였다.
- [38] 구체적으로, 본 발명자들은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*: MTB)의 *gyrB* 유전자에 특이적인 프라이머와 결핵균과 비결핵항산균(Nontuberculous

mycobacteria: NTM)의 16S rRNA에 특이적인 프라이머 세트를 LAMP 기반으로 제작하였다. 본 발명의 LAMP 기반의 프라이머 세트는 전통적인 PCR과 달리 온도변화를 요구하지 아니하여 단순하고 가벼운 증폭 기기를 이용할 수 있고 분석에 소요되는 시간을 획기적으로 감소시킬 수 있다.

[39] 또한, 본 발명은 상기 *gyrB*에 특이적인 프라이머 세트와 상기 16S rRNA에 특이적인 프라이머 세트를 포함하여 multiplex LAMP를 수행함으로써 결핵균과 비결핵균을 동시에 감별하여 검출할 수 있도록 함으로써 균체 동정 시간을 단축시킬 수 있다.

[40] 또한, 본 발명은 G6PD 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 제작하여 Internal control primer set로 제공함으로써 상기 multiplex LAMP 분석 결과에 신뢰도를 향상시킬 수 있다.

[41] 구체적으로, 본 발명은 MTB에 특이적으로 작용하는 프라이머 (MTB primer), 25종의 NTM 및 MTB에 동시에 작용하는 프라이머 (MTB 및 NTM primer) 및 internal control로 증폭 여부를 확인할 수 있는 프라이머 (Internal control primer) 세트를 제공한다.

[42] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 MTB 박테리아 검출용 조성물을 제공한다. 하기 표 1의 서열번호 1-6은 MTB를 위한 6개의 프라이머 세트이며 (MTB primer), 서열번호 7-12은 25종의 NTM 및 MTB를 위한 6개의 프라이머 세트 (MTB 및 NTM primer) 이며, 서열번호 13-18은 internal control로 G6PD 유전자를 증폭할 수 있는 6개의 프라이머 (Internal control primer) 세트이다. 표 1의 프라이머 세트 및 이를 포함하는 조성물은 Multiplex LAMP 법을 이용한 MTB, NTM 박테리아 검출법에 사용될 수 있다.

[43] 본 발명의 MTB 및 NTM 감별 검출을 위한 multiplex LAMP 프라이머 세트의 구성은 하기 표 2와 같으며, 반응 시간 및 온도는 하기 표 3과 같다.

[44] 한편, 본 발명의 상기 세 프라이머 세트에 형광물질을 부착하여 Multiplex real-time LAMP를 수행할 수 있으며, 상기 프라이머 세트마다 부착된 형광을 달리하여 한 번의 검사로 균체 동정 결과를 얻을 수 있다. 구체적으로, MTB primer 및 MTB 및 NTM primer에서 모두 증폭된 경우 MTB로 해석한다. MTB 및 NTM primer는 증폭이 되었으나 MTB primer에서 증폭이 되지 않은 경우 NTM으로 해석한다. 검사결과가 음성으로 나왔을 때 internal control primer에서 증폭이 된 경우 참 음성으로 해석하며, 결과가 음성이나 internal control primer도 음성인 경우 재검할 것을 권고한다.

[45] 상기 프라이머 세트에 부착되는 형광물질은 형광을 발하는 것이라면 제한되지 아니하나, 그 비제한적인 예로서 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine),

FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 써아디카르보시아닌(thiadibocyanine) 등이 있다.

- [46] 한편, 본 발명은 MTB 프라이머 세트의 서열번호 5의 염기로 구성된 정방향고리프라이머 (Forward loop primer: FLP)에서 15번째 염기인 티민(thymine)에 형광물질을 부착하고, MTB 및 NTM 프라이머 세트의 서열번호 11로 구성된 FLP에서 18번째 염기인 티민에 형광물질을 부착하고, internal control primer set의 서열번호 18의 역방향 고리프라이머(Backward loop primer: BLP)에서 18번째 염기인 티민에 형광신호를 부착하여 타겟 유전자의 증폭에 간섭하지 않고 빠르고 강하게 형광을 발할 수 있도록 하였다. 형광물질을 붙이는 티민의 위치는 프라이머 올리고서열 3' 말단에 마지막 4개의 염기서열에 위치하고, 티민 앞에는 G나 C가 위치하고, 티민의 말단 두염기에도 GG GC CC등의 염기가 위치함으로 티민의 형광발현을 최적화 하도록 고안되었다.
- [47] 본 발명에서 생물학적 시료는 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration) 및 기관지세척액(bronchial washing), 체액(body fluid) 등을 포함하는 신체의 다양한 부분의 세포 또는 조직을 포함할 수 있다.
- [48] 본 발명에 있어서, “등온증폭반응(LAMP; Loop-mediated isothermal amplification)”은 기존 PCR법과 달리 PCR 사이클이 필요 없는 Bst, Gsp 등의 중합효소를 이용하여 등온의 조건에서 반응을 수행하는 방법으로, 기본적으로 4개의 프라이머를 이용하여, 양끝을 고리(loop) 구조로 합성하여 유전자의 특정 부위를 무한대로 증폭하고, 증폭된 DNA 산물을 형광 검출용 시약을 이용하거나 침전 반응시켜 증폭 유무를 확인하는 방법으로서, 바람직하게는 형광 검출용 시약을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [49] 또한, 본 발명에 있어서, “실시간 다중 등온증폭반응”은 증폭 유무를 실시간으로 확인하는 방법으로서, 다양한 유전자를 동시에 검출할 수 있으며, 바람직하게는 실시간으로 시료에서 MTB 및/또는 NTM를 동시에 검출 및 판별할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [50] 본 발명의 프라이머 세트는 등온증폭반응(LAMP; Loop-mediated isothermal amplification)에 사용되는 것이 바람직하며, 등온증폭반응은 표적 DNA를 LAMP에 의하여 증폭하는 단일-단계(one-step) LAMP일 수 있고, 실시간 LAMP(real-time LAMP)일 수 있으며, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [51] 본 발명에 있어서, “프라이머 (primer)”란 적절한 완충용액 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시

DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 말한다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.

- [52] 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제), 방사성 동위원소(예를 들어, ^{32}P), 형광성 분자, 화학그룹(예를 들어, 바이오틴) 등이 있다.
- [53] 본 발명에 있어서, “내부 프라이머(inner primer)”는 주형 DNA에 결합하여 새로운 DNA 사슬 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [54] 본 발명에 있어서, “외부 프라이머(outer primer)”는 내부 프라이머가 주형 DNA에 결합한 위치보다 더 바깥쪽에서 주형 DNA에 결합하는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 내부 프라이머가 주형 DNA에 결합하여 DNA 사슬이 신장된 이후, 외부 프라이머와 주형 DNA의 결합으로 사슬 변위(strand displacement)가 발생하여 먼저 형성된 사슬이 떨어져 나오게 된다.
- [55] 본 발명에 있어서, “고리 프라이머(loop primer)”는 상기 내부 프라이머 및 외부 프라이머가 주형 DNA에 결합하여 형성된 초기 줄기 고리(stem loop) 구조 사슬이 고리(loop) 구조 생성 횟수를 증가시켜 결과적으로 전체 반응을 가속화시킬 수 있도록 하는, 뉴클레오티드 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [56] 한편, 본 발명에서 고리 프라이머에서 형광물질이 부착된 염기를 특정하기 위한 염기의 번호매김은 통상적으로 올리고뉴클레오티드의 염기 순서를 확인하는 방법과 동일하게 3'에서 5' 순서로 이루어진다.

[57]

발명의 실시를 위한 형태

- [58] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지

기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[59]

[60] **[재료 및 방법]**

[61] **1. MTB 박테리아 및 NTM의 DNA**

[62] 고려대학교 구로병원에서 결핵환자와 비결핵항산균 감염환자의 객담 및 기관지 흡인액에서 추출된 MTB 박테리아와 NTM의 핵산을 (DNA) 확보하였으며, 각 샘플의 감염 여부는 병원에서 임상적으로 확인되었다.

[63]

[64] **2. 임상 검체**

[65] MTB 20개, NTM 20개, 결핵음성 20개, 총 60개의 검체는 고려대학교 구로병원에서 받아 사용하였다.

[66]

[67] **3. MTB 박테리아 및 NTM 검출용 프라이머 세트, LAMP 혼합물 조성 및 반응 조건**

[68] MTB 박테리아의 *GyrB* 유전자 서열과 *Mycobacterium* 박테리아 (MTB, NTM 모두 포함)의 16S rRNA 유전자 서열을 바탕으로 MTB 박테리아 및 25종의 NTM 검출용 프라이머 세트를 설계/제작하였다. 각 프라이머 세트의 고리 프라이머에는 각각 FAM와 HEX을 연결하였으며, 프라이머 세트의 구체적인 정보는 하기 표 1에 정리하였다. 하기 표 1에서 형광물질로 표지된 염기는 붉은 글씨로 표시하였다. LAMP를 이용한 결핵 검출은 EIKEN사의 Loop amp DNA Amplification kit를 구입하여 사용하였다. real-time LAMP를 위한 반응 혼합물의 시약 조성은 하기 표 2에 나타내었으며, real-time LAMP은 하기 표 3의 반응 조건 및 시간에 따라 수행하였다.

[69] [표1]

서 열 번 호	Name	Sequence (5'-3')		Tar get gen e	leng th
1	Mycoba cterium tubercul osis	F3	GCGATATCTGGTGGTCTGCA	Gyr B	20
2		B3	CCGTGGTTTCGAAAACAGC		19
3		FIP	ACCCGTCGCGCTTGATCTCGTCG GCGTGTCGGTGGTTA		38
4		BIP	GAGAAAGTCGGAACCCCTGGGCG CACCGTTGACCCCGT		37
5		FLP	GACTTCGAGCCGGG <u>GTGG</u>		17
6		BLP	AGGGGCGCCGACCAAGAA		18
7	Non tubercul ous Mycoba cterium	F3	CCAACCTACGTGCCAGCAG	16S rRN A	18
8		B3	ACCGGTGTTTCCTCCTGAT		18
9		FIP	RCCTACGAGCTCTTTACGCCCAC CGCGGTAATACGTAGGGT		41
10		BIP	GCGATACGGGCAGACTDGAGCA TTCCACCGCTACACCAG		39
11		FLP	GTAATTCCGGACAACG <u>CTCG</u>		20
12		BLP	TACTGCAGGGGAGACTGGAA		20

13	Internal control	F3	TGTCACCAGCAACATCTCGA	G6PD	20
14		B3	TCCTCAGGGAAGCAAATGAC		20
15		FIP	ATAGCAGAGAGGCTGCCTACGGT TTTGATGTCCCCTGTCCCACCA		45
16		BIP	AAGAAAAGCAGACGCAGCAGCT TTTTGGGGCTGTTTGCGGATT		43
17		FLP	GGGGTGGCCATGGAGTGC		18
18		BLP	TCCCAACCTCAATGCCCTGC		20

[70] [표2]

LAMP 구성요소	
구분	부피
2X Reaction buffer	12.5 μ l
Enzyme buffer	1 μ l
Fluorescent dye	1 μ l
Primer(FIP,BIP,FLP,BLP)	각 최종 농도 800 nM
Primer (F3 ,B3)	각 최종 농도 100 nM
Distilled water	8.5 μ l
Template DNA	2 μ l
Total volume	25 μ l

[71] [표3]

LAMP 온도 조건 및 시간		
65°C	1 min	60 cycle
80°C	5 min	
Total reaction time	75 min	

[72] [실험결과]

[73] 실시예 1. LAMP용 프라이머 세트의 MTB 검출 한계 확인

[74] 본 발명의 multiplex LAMP용 프라이머 세트의 MTB 검출 한계를 확인하기 위해 MTB의 genomic DNA 1 ng/ μ L를 3차 증류수로 10까지 희석하여 민감도를

확인하였다. 테스트에 사용된 핵산은 비사용 시 -50°C에 보관하였다. 10분의 1희석배수를 이용하여 농도별 분석능을 검증한 결과 10 fg/ μ L에서 증폭이 확인되었다(도 2). 하기 표 4는 희석농도에 따른 *Mycobacterium tuberculosis* LAMP 프라이머 세트의 Ct 값을 나타낸 것이다.

[75]

[76] [표4]

No	μ g/ μ l	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 박테리아	
		Ct value	RFU
1	10 ⁰	9.33	18258
2	10 ⁻¹	10.25	19964
3	10 ⁻²	11.45	23781
4	10 ⁻³	13.18	17775
5	10 ⁻⁴	14.24	19911
6	10 ⁻⁵	16.42	16799
7	10 ⁻⁶	17.72	23854
8	10 ⁻⁷	33.90	23316
9	10 ⁻⁸	45.38	20499
10	10 ⁻⁹	N/A	4665

[77] 실시예 2. LAMP용 프라이머 세트의 NTM에 대한 교차 반응 확인

[78] 상기 결핵환자의 객담 및 기관지 흡인액에서 추출된 DNA 샘플을 대상으로 한 real-time LAMP의 *Mycobacterium tuberculosis* 박테리아의 각 서열에 대한 특이 반응을 확인하기 위해 NTM 박테리아의 서열과 상호 교차 반응을 실시하였다. *Mycobacterium tuberculosis*의 LAMP 교차반응에 따른 검출 Ct 값은 하기 표 5 및 도 3에 나타내었으며, 결과에 따라 상호 교차 반응 및 비 특이 반응에 대한 결과는 없음을 확인할 수 있었다.

[79] [표5]

Mycobacterium tuberculosis		
Sample	Ct. value	RFU
MTB 1	7.75	1995
MTB 2	8.16	1497
NTM 1	N/A	396
NTM 2	N/A	482
non-infected human gDNA	N/A	510
D.W	N/A	1.44

[80] 실시예 3. LAMP용 프라이머 세트의 MTB, NTM, 및 결핵음성 임상
검체에서의 검출 Ct 값 확인

[81] 고려대학교 구로 병원에서 얻은 MTB 20개, NTM 20개, 결핵음성 20개, 총
60개의 검체로 임상실험을 실시하였다. 상기 검체에서 추출된 DNA 샘플을
대상으로 real-time LAMP을 수행하고 *Mycobacterium tuberculosis* 박테리아의
검출 결과를 확인하였다. 그 결과는 하기 표 6과 같으며 원내 진단결과와
동일하게 확인되었다.

[82]

[83] [표6]

Sample	NO.	원내 PCR 결과	LAMP	
		Ct<40	Ct<30	RFU
MTB	1	35.6	24.98	19692
	2	27	14.67	14309
	3	33.3	18.51	17017
	4	22.7	13.39	19391
	5	31	16.48	12619
	6	30.9	16.20	27559
	7	18.3	11.32	23126
	8	28	14.91	17555
	9	30.8	16.12	15324
	10	36.7	19.99	28758
	11	28.4	15.34	23078
	12	34.7	18.72	21257
	13	30.3	17.07	19650
	14	39.1	20.67	22392
	15	34.8	18.59	21175
	16	30.7	15.65	19386
	17	22.4	11.43	17174
	18	39.2	22.34	16850
	19	32.1	18.90	23138
	20	31.4	16.13	15903

NTM	1	N/A	N/A	N/A
	2	N/A	N/A	N/A
	3	N/A	N/A	N/A
	4	N/A	N/A	N/A
	5	N/A	N/A	N/A
	6	N/A	N/A	N/A
	7	N/A	N/A	N/A
	8	N/A	N/A	N/A
	9	N/A	N/A	N/A
	10	N/A	N/A	N/A
	11	N/A	N/A	N/A
	12	N/A	N/A	N/A
	13	N/A	N/A	N/A
	14	N/A	N/A	N/A
	15	N/A	N/A	N/A
	16	N/A	N/A	N/A
	17	N/A	N/A	N/A
	18	N/A	N/A	N/A

결핵음성	1	N/A	N/A	N/A
	2	N/A	N/A	N/A
	3	N/A	N/A	N/A
	4	N/A	N/A	N/A
	5	N/A	N/A	N/A
	6	N/A	N/A	N/A
	7	N/A	N/A	N/A
	8	N/A	N/A	N/A
	9	N/A	N/A	N/A
	10	N/A	N/A	N/A
	11	N/A	N/A	N/A
	12	N/A	N/A	N/A
	13	N/A	N/A	N/A
	14	N/A	N/A	N/A
	15	N/A	N/A	N/A
	16	N/A	N/A	N/A
	17	N/A	N/A	N/A
	18	N/A	N/A	N/A
	19	N/A	N/A	N/A
	20	N/A	N/A	N/A

[84] 이 상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[85]

산업상 이용가능성

[86] 본 발명은 결핵균과 비결핵항산균을 동시에 감별할 수 있는 프라이머 세트 등에 관한 것으로서, 본 발명의 의해 무겁고 복잡한 PCR 기기 없이도 빠르고 정확하게 MTB와 NTM을 검출할 수 있고 이를 감별하여 진단할 수 있는바 본 발명은 기존의 결핵 검출법을 대체하는 분자진단 검사법으로 이용될 것으로 기대된다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 내지 6의 프라이머를 포함하는, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 서열번호 5의 프라이머는 15번째 염기인 티민(thymine)에 형광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, 결핵균 검출용 LAMP 프라이머 세트.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 형광물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein),
HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor),
JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein),
ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein),
TRITC(terramethylrhodamine isothiocyanate),
TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및
씨아디카르보시아닌(thiadibocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 결핵균 검출용 LAMP 프라이머 세트.
- [청구항 4] 서열번호 7 내지 12의 프라이머를 포함하는, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 비결핵항산균(Nontuberculous mycobacteria) 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 서열번호 11의 프라이머는 18번째 염기인 티민(thymine)에 형광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, 결핵균 및 비결핵항산균 검출용 LAMP 프라이머 세트.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 형광물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein),
HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl

rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor),

JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein),

ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein),

TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate),

TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl)

ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및

씨아디카르보시아닌(thiadibocyanine)으로 구성된 군으로부터

선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 결핵균 및 비결핵항산균 검출용 LAMP 프라이머 세트.

[청구항 7] 제1항의 프라이머 세트와 제4항의 프라이머 세트를 포함하는, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 비결핵항산균(Nontuberculous mycobacteria) 감별 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 프라이머 세트는 서열번호 13 내지 18의 프라이머를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출용 LAMP 프라이머 세트.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 서열번호 5, 11, 및 18의 프라이머는 형광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출용 LAMP 프라이머 세트.

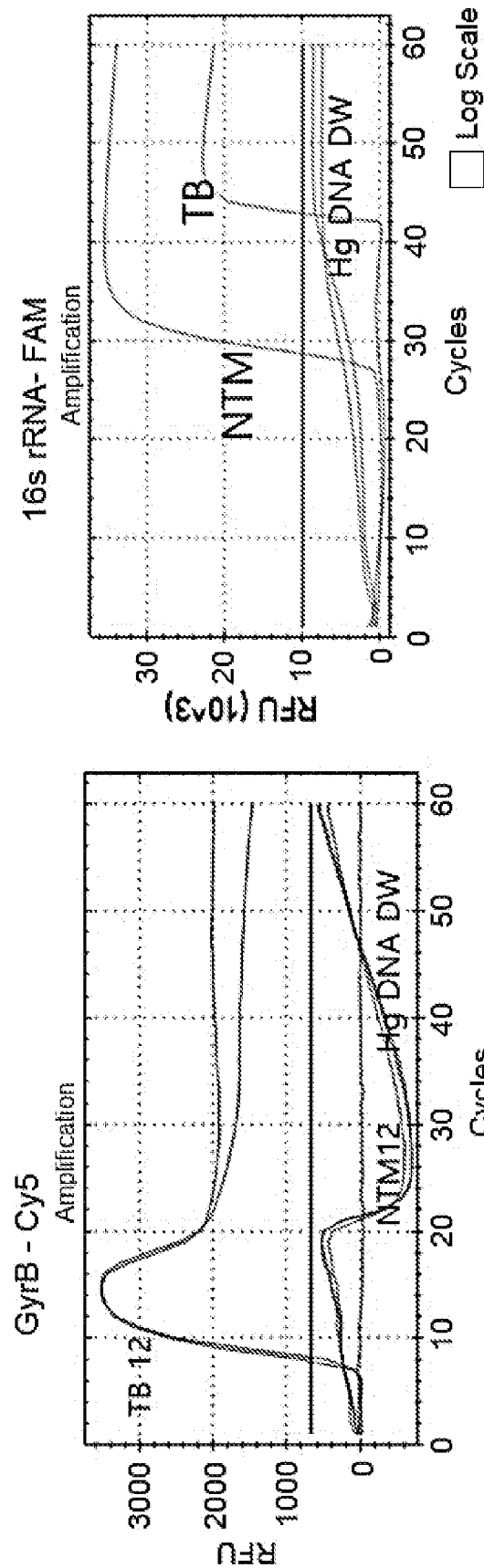
[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 서열번호 5의 15번째 염기인 티민(thymine)에 형광물질이 부착되었고,
상기 서열번호 11의 18번째 염기인 티민에 형광물질이 부착되었고,
상기 서열번호 18의 18번째 염기인 티민에 형광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출용 LAMP 프라이머 세트.

[청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 형광물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein),
HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor),
JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein),
ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein),

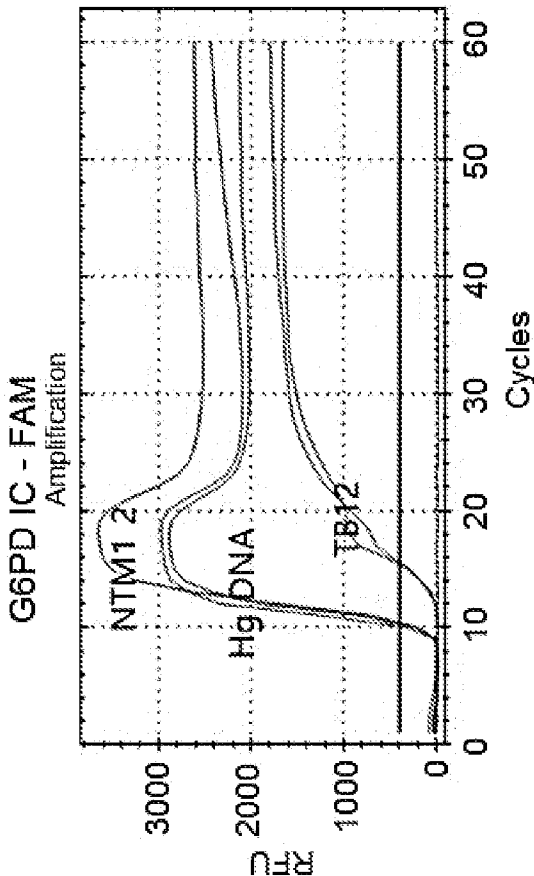
TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 써아디카르보시아닌(thiadibocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출용 LAMP 프라이머 세트.

- [청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 서열번호 5, 11, 및 18에 부착된 형광물질은 각각 상이한 파장을 발하는 형광물질인 것을 특징으로 하는, 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출용 LAMP 프라이머 세트.
- [청구항 13] 제7항의 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출용 키트.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출용 키트.
- [청구항 15] (1) 생물학적 시료의 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계;
(2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 제9항의 프라이머 세트를 이용하여 등온증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
(3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출 방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 (1) 단계의 생물학적 시료는 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration) 및 기관지세척액(bronchial washing), 및 체액(body fluid)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 결핵균 및 비결핵항산균 감별 검출 방법.

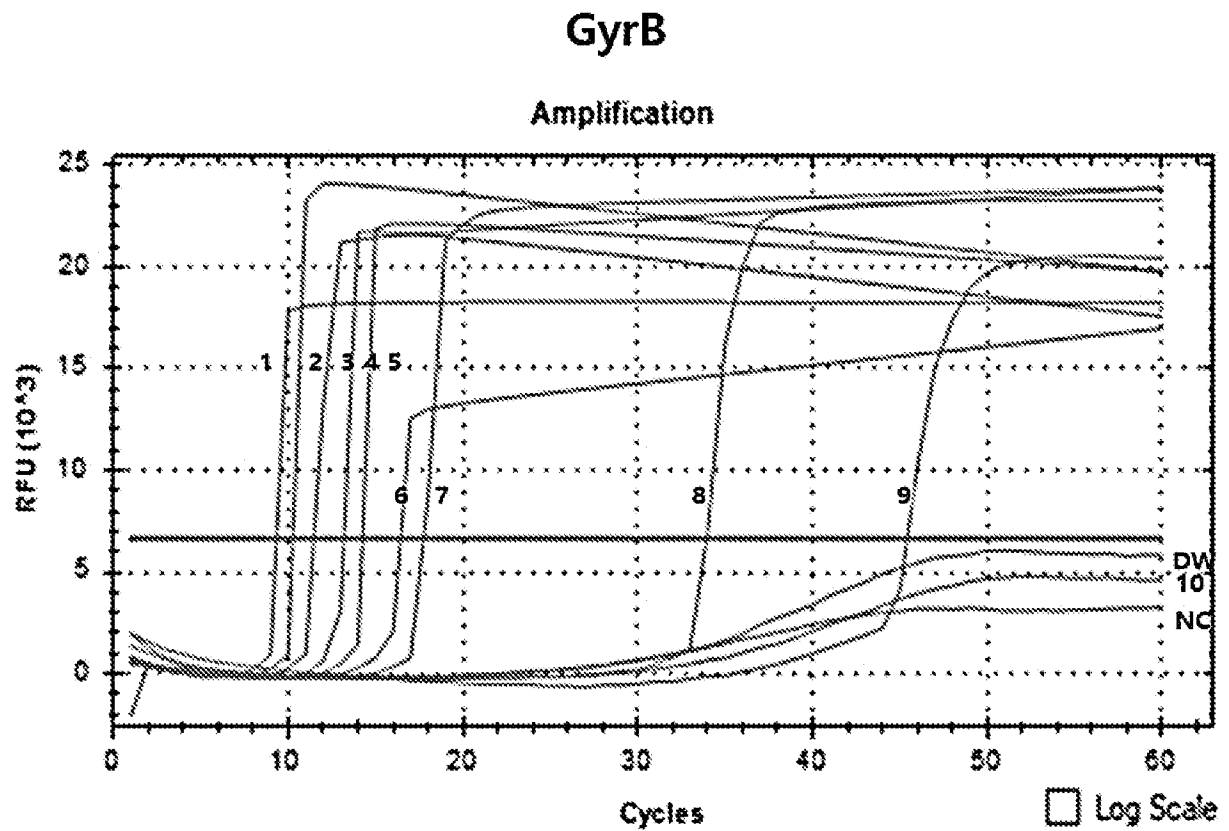
[표 1]



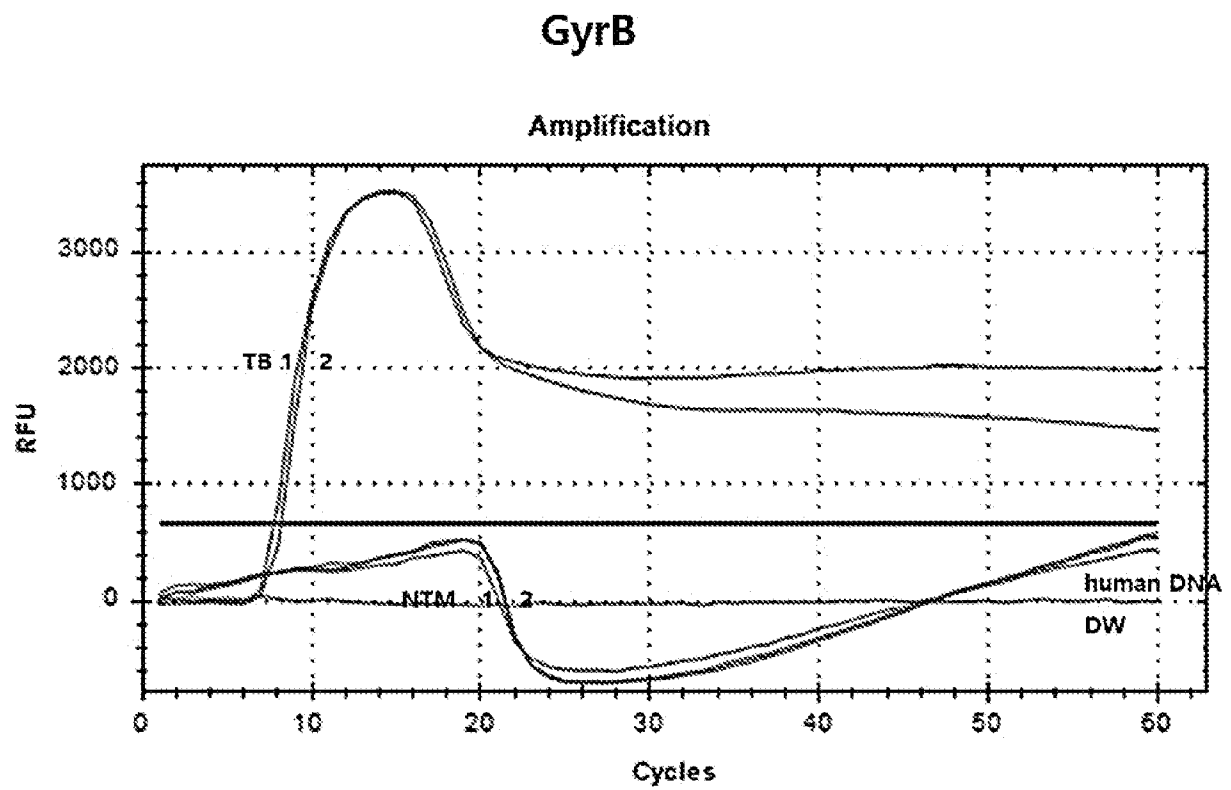
Sample	Gyr B(Cy5)		G6PD IC (FAM)	
	Ct	RFU	Ct	RFU
TB 1	7.75	1995	15.47	1791
TB 2	8.16	1497	15.24	1662
NTM1	N/A	396	10.29	2125
NTM 2	N/A	482	10.35	2610
N.C(hg DNA)	N/A	510	10.06	2420
D.W	N/A	1.44	N/A	15.8



[도2]



[도3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/014175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/689(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 1/689; C12N 15/09; C12Q 1/04; C12Q 1/68; C12Q 1/6844 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: 결핵균(Mycobacterium tuberculosis), 비결핵항산균(Nontuberculous mycobacteria), LAMP, 프라이머(primer), GyrB, 16s rRNA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101942511 A (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 12 January 2011. See abstract; and paragraph [0040].	1-6
Y	GenBank: MG995415.1 (03 April 2019). See entire document.	1-3
Y	KR 10-1765677 B1 (YD LIFE SCIENCE CO., LTD.) 08 August 2017. See abstract; claim 1; and table 1.	4-6
A	CN 108531624 A (CHONGQING GAOSHENG BIOLOGICAL MEDICINE CO., LTD.) 14 September 2018. See entire document.	1-6
A	JP 2004-344065 A (ASAHI KASEI CORP.) 09 December 2004. See entire document.	1-6
☐ 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 15 February 2021		Date of mailing of the international search report 15 February 2021
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/KR2020/014175

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **8-16**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 8-16 refer to claim 7 which violates the manner of referring to dependent claims (PCT Rule 6.4(a)),
and thus are unclear.
3. ☒ Claims Nos.: **7**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/014175

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	101942511	A	12 January 2011	None	
KR	10-1765677	B1	08 August 2017	None	
CN	108531624	A	14 September 2018	None	
JP	2004-344065	A	09 December 2004	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/689(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/689; C12N 15/09; C12Q 1/04; C12Q 1/68; C12Q 1/6844

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: 결핵균(Mycobacterium tuberculosis), 비결핵항산균(Nontuberculous mycobacteria), LAMP, 프라이머(primer), GyrB, 16s rRNA

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	CN 101942511 A (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 2011.01.12 요약; 단락 [0040] 참조.	1-6
Y	GenBank: MG995415.1 (2019.04.03) 전체 문헌 참조.	1-3
Y	KR 10-1765677 B1 ((주) 와이드생명과학) 2017.08.08 요약; 청구항 1; 표 1 참조.	4-6
A	CN 108531624 A (CHONGQING GAOSHENG BIOLOGICAL MEDICINE CO., LTD.) 2018.09.14 전체 문헌 참조.	1-6
A	JP 2004-344065 A (ASAHI KASEI CORP.) 2004.12.09 전체 문헌 참조.	1-6

☐ 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 가진 국제출원일 이후 “X”에 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

2021년 02월 15일 (15.02.2021)

국제조사보고서 발송일

2021년 02월 15일 (15.02.2021)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 8-16
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 8-16은 종속항 기재방법(PCT 규칙 6.4(a))를 위반한 청구항 7을 인용하고 있어 불명료합니다.
3. ☒ 청구항: 7
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

CN 101942511 A

2011/01/12

없음

KR 10-1765677 B1

2017/08/08

없음

CN 108531624 A

2018/09/14

없음

JP 2004-344065 A

2004/12/09

없음