

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0117953

(43) 공개일자 2022년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/66 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01) C12N 9/48 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01) G01N 21/76 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/66 (2013.01)

C07K 14/43595 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0021142

(22) 출원일자 2021년02월17일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

박정은

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 206동 901호(전민동, 엑스포아파트)

(74) 대리인

리앤목특허법인

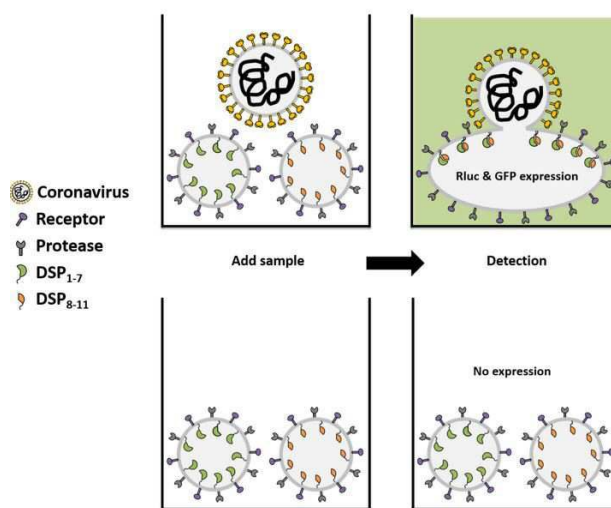
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 화학 발광 기반의 코로나 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

일 양상에 따른 코로나 바이러스 검출용 조성물, 키트 및 검출 방법에 따르면, 코로나 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있고, 화학 발광을 기반으로 검출을 수행하여, 고감도 및 저비용의 검출을 수행할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0069 (2013.01)
C12N 9/48 (2013.01)
C12N 9/485 (2013.01)
C12Q 1/37 (2013.01)
C12Y 113/12007 (2013.01)
C12Y 304/14005 (2013.01)
C12Y 304/17023 (2013.01)
G01N 21/76 (2013.01)
C12N 2740/16022 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545020865
과제번호	119057022SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	가축질병대응기술개발(R&D)
연구과제명	화학발광 기반 조류인플루엔자 진단기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및

안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며,

상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 코로나 바이러스(Coronavirus) 검출용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및

안지오텐신 전환효소 2 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며,

상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 사스 코로나 바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus: SARS-CoV) 검출용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및

디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며,

상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 메르스 코로나 바이러스(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: MERS-CoV) 검출용 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3중 어느 한 항에 있어서, 상기 루시페레이스 단편은 루시페레이스의 이중 분할 단백질(dual split protein: DSP)인 것인, 검출용 조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 3중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 더 포함하는 것인, 검출용 조성물.

청구항 6

청구항 1의 검출용 조성물을 포함하는 코로나 바이러스 검출용 진단 키트.

청구항 7

안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계;

상기 생물학적 시료와 접촉된 검출용 조성물 세트에 염기성 버퍼를 첨가하는 단계; 및

상기 염기성 버퍼가 첨가된 검출용 조성물 세트에 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 첨가하는 단계를 포함하는, 코로나 바이러스 검출 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편의 융합, 또는 상기 제3 루시페레이스 단편 및 제4 루시페레이스 단편의 융합에 의한 화학 발광을 통해 코로나 바이러스를 검출하는 것인, 검출 방법.

청구항 9

청구항 7 또는 8에 있어서, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편의 융합에 의한 화학 발광을 통해 코로나 바이러스를 검출하는 것인, 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 코로나 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이며, 본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품 기술기획평가원의 가축질병대응기술개발사업의 지원을 받아 연구된 것이다(과제번호: 119057-02).

배경 기술

[0002] 코로나 바이러스(Coronavirus)는 코로나바이러스과(Coronaviridae)의 코로나바이러스아과(Coronavirinae)에 속하는 RNA 바이러스로, 사람과 동물의 호흡기와 소화기계 감염을 유발하며 주로 점막전염, 비말전파로 쉽게 감염된다.

[0003] 사스(severe acute respiratory syndrome) 바이러스는 신종 코로나바이러스 바이러스에 속하며, 세계 보건기구(WHO)에 의하여 사스-코로나바이러스(SARS-Coronavirus)로 명명되었다(이하 사스 바이러스라고도 한다). 사스 바이러스는 중증급성호흡기증후군(severe acute respiratory syndrome)을 유발하는 것으로 알려져 있다. 사스 바이러스는 기존에는 알려지지 않았던 새로운 종으로 RNA바이러스이고, 게놈은 약 29,730bp로 구성되었으며 유전자 조성은 다른 코로나바이러스와 유사한 것으로 알려져 있다.

[0004] 메르스 코로나 바이러스(MERS-CoV)는 2012년 9월 사우디아라비아에서 급성 폐렴 및 신부전 증세를 보이는 60대 남성의 허파에서 채취된 표본을 분석하여 코로나바이러스의 변종인 플러스-센스, 외가닥 RNA의 신종 휴먼 베타 코로나바이러스를 확인하였다. 초기에는 '2012년 신종 코로나바이러스', '신종 코로나바이러스'로 통용되었으며, 'SARS 유사 바이러스', '중동 사스', '사우디 사스'로도 명명된다. 2013년 5월, 국제바이러스 분류 위원회(ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses)에서는 과거 사람에게서는 발견되지 않은 이 신종 코로나바이러스를 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)라 명명하였으며, 세계 보건기구에서도 이를 받아들여 메르스(Middle East Respiratory Syndrome; MERS)를 일으키는 이 병원체를 'MERS(Middle East Respiratory Syndrome)-CoV'로 명명하였다.

[0005] 메르스는 메르스 코로나바이러스의 인체 감염에 의한 호흡기 감염증으로 발열 및 기침, 호흡곤란 등의 호흡기 증상을 동반한다. 대부분의 환자에서 중증급성호흡기도질환(폐렴), 경한 급성상기도 질환을 나타내고, 일부 무증상인 경우도 있지만 심한 경우에는 패혈성 쇼크(septic shock), 다발성 장기 부전(multi organ dysfunction)에 의한 장기 손상을 일으켜 사망에 이르기기도 한다.

[0006] 이러한 코로나 바이러스의 감염으로 인한 피해를 감소시키기 위하여, 코로나 바이러스의 감염을 조기에 진단할 수 있는 방법을 개발하려는 연구가 활발히 진행되어왔다(한국등록특허 제10-1886272). 그러나, 기존에 공지된 방법은 PCR 등을 일반적으로 이용하여 진단에 시간 및 인력이 많이 소요되는 문제점이 있다.

[0007] 따라서, 본 발명자들은 적은 시간 및 비용으로 신속하게 코로나 바이러스를 진단할 수 있는 기술을 개발하여, 위와 같은 문제점을 해결하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 코로나 바이러스(Coronavirus) 검출용 조성물을 제공한다.

[0009] 다른 양상은 상기 검출용 조성물을 포함하는 코로나 바이러스 검출용 진단 키트를 제공한다.

[0010] 다른 양상은 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계; 상기 생물학적 시료와 접촉된 검출용 조성물 세트에 염기성 버퍼를 첨가하는 단계; 및 상기 염기성 버퍼가 첨가된 검출용 조성물 세트에 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 첨가하는 단계를 포함하는, 코로나 바이러스 검출 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 일 양상은 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 코로나 바이러스(Coronavirus) 검출용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 명세서에서 용어 "코로나 바이러스(Coronavirus)"는 코로나바이러스과의 코로나바이러스아과에 속하는 RNA 바이러스로, S(Spike), M(Membrane), E(Envelope), 및 N(Nucleocapsid) 단백질로 구성되어 있는 것을 의미한다. 상기 S 단백질은 S1 또는 S2의 서브유닛일 수 있으며, S1 서브유닛은 수용체 결합 도메인(Receptor Binding Domain: RBD)를 포함하고 있다.

[0013] 상기 코로나 바이러스는, 알파코로나바이러스속(*Alphacoronavirus*), 베타코로나바이러스속(*Betacoronavirus*), 감마코로나바이러스속(*Gammacoronavirus*), 델타코로나바이러스속(*Deltacoronavirus*)일 수 있다.

[0014] 또한, 상기 코로나 바이러스는 인간 코로나 바이러스일 수 있다.

[0015] 일 구체예에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 인간 코로나 바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나 바이러스 OC43(HCoV-OC43), 사스 코로나 바이러스(SARS-CoV), 뉴헤븐 코로나 바이러스(HCoV-NL63), 인간 코로나 바이러스 HKU1, 메르스 코로나 바이러스(MERS-CoV), 및 코로나 바이러스-19(2019-nCoV)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 인간 코로나 바이러스는 사스 코로나 바이러스(SARS-CoV) 또는 메르스 코로나 바이러스(MERS-CoV)일 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 용어 "사스 코로나 바이러스(SARS-CoV)"는 중증급성호흡기 증후군을 일으키는 베타코로나바이러스 속의 코로나 바이러스주를 의미한다.

[0017] 본 명세서에서 용어 "메르스 코로나 바이러스(MERS-CoV)"는 중증호흡기증후군을 일으키는 베타코로나바이러스 속의 코로나 바이러스주를 의미한다.

[0018] 상기 코로나 바이러스는 S1 서브유닛 단백질에 수용체 결합 도메인을 포함하는 것일 수 있다. 상기 코로나 바이러스는, 바이러스 외피의 단백질을 이용하여, 숙주 세포 표면의 코로나 바이러스 수용체와 부착 또는 흡착하여 숙주 세포를 감염시키는 것일 수 있다.

[0019] 일 구체예에 있어서, 상기 나노입자는 단백분해효소를 추가적으로 발현하는 것일 수 있다. 또한, 상기 검출용 조성물은 추가적으로 단백분해효소를 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 상기 단백분해효소는 바이러스의 막 단백질의 구조를 분해하는 효소를 총칭하는 것일 수 있다. 구체적으로, 단백분해효소는 바이러스의 막 구조를 분해함으로써, 바이러스가 숙주 세포 안으로 침입할 수 있게 돕는 역할을 하는 것일 수 있다.

[0021] 일 구체예에 있어서, 상기 단백분해효소는 TMPRSS2(transmembrane protease serine subtype 2), TMPRSS11a(transmembrane protease serine subtype 11a), TMPRSS11d(transmembrane protease serine subtype

11d) 및 트립신(Trypsin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 것일 수 있다.

- [0022] 본 명세서에서 용어 "검출용 조성물 세트"는 시료 내 코로나 바이러스의 존재를 판단하기 위한 복수의 나노입자를 의미하는 것일 수 있다. 상기 나노입자는 코로나 바이러스 수용체 및 루시페레이스 단편을 포함하며, 2개의 나노입자가 융합되는 특징을 가질 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 용어, "나노입자(Nanoparticle)"은 막으로 구분된 내부를 포함하는 물질을 총칭할 수 있다. 구체적으로, 상기 나노입자는 바이러스 또는 유사바이러스(pseudoviruses)일 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 용어, "바이러스 유사 입자(Virus-Like Particle: VLP)"는 바이러스성 단백질을 수반하는 비감염성 바이러스성 소단위체를 의미하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 바이러스 유사 입자는 바이러스와 유사한 형태를 띠고 있는 재조합 단백질을 의미하는 것일 수 있다. 또한, 상기 바이러스-유사 입자는 하기에 "제1입자" 또는 "입자" 등으로 명명되기도 한다.
- [0025] 일 구체예에 있어서, 상기 나노입자는 표면에 코로나 바이러스 수용체를 포함하는 것일 수 있다. 상기 나노입자는 표면에 코로나 바이러스 수용체를 포함함으로써, 숙주 세포 표면의 코로나 바이러스 수용체와 부착 또는 흡착하여 숙주 세포를 감염시키는 것일 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 "코로나 바이러스 수용체"는 코로나 바이러스의 표면 단백질과 결합하는 숙주 세포의 수용체를 의미한다.
- [0027] 일 구체예에 있어서, 상기 코로나 바이러스 수용체는 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4)일 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 "안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2)"는(metallo-carboxypeptidase)의 하나로, 안지오텐신 전환효소와 상동하는 1형 막관통 단백질이다. 일 구체예에 있어서, 상기 나노입자는 코로나 바이러스와 복합체(ACE2-바이러스 복합체)를 형성하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 "디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4)"는 아데노신 아미나제 복합 단백질 2(adenosine deaminase complexing protein 2) 또는 CD26(cluster of differentiation 26)이라고도 명명되며, 인간에서 DDP4 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. 일 구체예에 있어서, 상기 나노입자는 코로나 바이러스와 복합체(DDP4-바이러스 복합체)를 형성하는 것일 수 있다.
- [0030] 일 구체예에 있어서, 상기 검출용 조성물은 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 안지오텐신 전환효소 2 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 사스 코로나 바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus: SARS-CoV) 또는 코로나바이러스-19 검출용 조성물일 수 있다.
- [0031] 일 구체예에 있어서, 상기 검출용 조성물은 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 메르스 코로나 바이러스(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: MERS-CoV) 검출용 조성물일 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 "루시페레이스(luciferase)"는 생물적 또는 화학적 발광을 생성하는 산화 효소를 총칭하는 것이며, 루시페레이스 기질을 산화시켜 화학 발광을 유도하는 효소를 총칭할 수 있다.
- [0033] 상기 나노입자는 루시페레이스(luciferase) 단편을 포함하는 것일 수 있다.
- [0034] 일 구체예에 있어서, 상기 루시페레이스는 레닐라 루시페레이스(Renilla luciferase)일 수 있다.
- [0035] 일 구체예에 있어서, 상기 루시페레이스 단편은 루시페레이스의 이중 분할 단백질(dual split protein: DSP)일 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서 용어 "이중 분할 단백질(dual split protein: DSP)"은, 온전한 1개의 단백질이 두 개의 구조로 나뉘어져 있는 것을 의미한다. 구체적으로, 제1 및 제2 나노입자는 루시페레이스(luciferase)단편을 포함하여, 상기 입자가 융합되는 경우 온전한 루시페레이스(luciferase)가 형성되는 것일 수 있다.
- [0037] 일 구체예에 있어서, 상기 검출용 조성물은 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 더 포함하는 것일 수

있다.

- [0038] 일 구체예에 있어서, 상기 제1 및 제2 나노입자가 융합되는 경우, 제1 및 제2 루시페레이스 단편이 융합하여 온전한 루시페레이스가 생성되고, 상기 루시페레이스가 루시페레이스 기질과 접촉하는 경우 화학발광이 유도되는 것일 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 "화학발광(chemiluminescence)"은 화학반응을 이용하여 빛을 생성하는 것을 의미하여, 외부 광원을 필요로 하지 않을 수 있다. 또한, 용어 "형광(fluorescence)"은 외부 광원으로 인해 반응의 에너지 준위를 높여 빛을 방출하는 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [0040] 상기 나노입자는 형광단백질(fluorescence protein)의 단편을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 형광단백질의 단편은 상기 나노입자가 결합할 경우, 온전한 형광단백질을 생성하여, 형광 반응이 유도되는 것일 수 있다.
- [0041] 상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein: GFP), 플루오레세인(Fluorecein), 바이오디피-FL(Biodipy-FL), 알렉사 플루오르그린(Alexa Fluor Green), R-피코에리트린(R-phycoerythrin), 피코에리트린-텍사스 레드(Phycoerythrin-Texas Red), 피코에리트린-시아닌5(Phycoerythrin-cyanine5), 피코에리트린-시아닌7(Phycoerythrin-cyanine7), 페리딘-클로로필 단백질(Peridinin-chlorophyll protein), 알로피코시아닌(Allophycocyanin) 및 알로피코시아닌-시아닌7(Allophycocyanin-cyanine7)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질일 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 "녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein: GFP)"은, 238 개의 아미노산 잔기(26.9 kDa)로 구성된 단백질로 청색에서 자외선 범위의 빛에 노출되었을 때 밝은 녹색 형광을 나타내는 단백질을 의미할 수 있다.
- [0043] 상기 나노입자는 공지된 코로나 바이러스 검출 항체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0044] 일 구체예에 있어서, 상기 코로나 바이러스 수용체, 루시페레이스 단편, 형광 단백질 단편 또는 항체는 재조합 발현 벡터에 의해 도입 또는 형질감염된 것일 수 있다.
- [0045] 일 구체예에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 아데노연관 바이러스 벡터일 수 있다.
- [0046] 다른 양상은 일 양상은 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 포함하며, 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편은 융합되어 화학 발광 현상을 유도하는 것인, 코로나 바이러스(Coronavirus) 검출용 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0047] 상기 검출용 조성물의 제조 방법에서, 검출용 조성물, 루시페레이스, 나노입자, 코로나 바이러스, 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 는 전술한 바와 같다.
- [0048] 상기 방법은, HEK293세포에 루시페레이스 단편 유전자를 PEI를 이용하여 나노입자를 형질전환시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0049] 상기 방법은, 상기 나노입자에 단백분해효소 유전자를 추가로 형질전환시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0050] 다른 양상은 상기 검출용 조성물을 포함하는 코로나 바이러스 검출용 키트를 제공한다.
- [0051] 상기 코로나 바이러스 검출용 키트에서, 검출용 조성물, 루시페레이스, 나노입자, 코로나 바이러스, 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 는 전술한 바와 같다.
- [0052] 상기 검출용 키트는 상기 검출용 조성물을 포함하는 진단 스트립 또는 웰(well)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0053] 상기 진단 스트립은 시료 패드 및 루시페레이스 기질 패드를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 진단 스트립은 버퍼 로딩 패드를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0054] 일 구체예에 있어서, 상기 시료 패드는 상기 검출용 조성물을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 시료 패드는 생물학적 시료를 투입하는 영역을 별도로 구비할 수도 있다.

- [0055] 상기 생물학적 시료는 개체는 코로나 바이러스 감염이 의심되는 개체로부터 수득한 것일 수 있다.
- [0056] 일 구체예에 있어서, 상기 개체는 포유류 또는 조류일 수 있다. 구체적으로, 상기 개체는 인간, 개, 고양이, 페럿, 햄스터, 마우스, 말, 소, 원숭이, 닭, 참새, 비둘기, 앵무새, 칠면조, 오골계, 침팬치 등일 수 있다.
- [0057] 일 구체예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 적혈구, 백혈구, 유관액, 복수, 늑막 유출물 (pleural efflux), 수유관액(nipple aspirate), 림프액, 골수 흡인물, 타액, 소변, 대변(즉, 배설물), 가래, 기관지 세척액, 눈물, 기타 체액, 조직 시료일 수 있다.
- [0058] 상기 생물학적 시료는 오염물을 제거하는 전처리 과정을 거친 것일 수 있다.
- [0059] 상기 패드의 막(membrane)은 니트로셀룰로오스(Nitrocellulose), 나일론(Nylon) 또는 PVDF(Polyvinylidene fluoride)일 수 있다.
- [0060] 상기 루시페레이스 기질 패드는 루시페레이스 기질을 포함하는 패드를 의미할 수 있다.
- [0061] 상기 버퍼 로딩 패드는 검출을 위한 버퍼를 부어주는 패드를 의미할 수 있다. 상기 버퍼는 염기성일 수 있다. 구체적으로, pH 1 내지 6, 2 내지 5.5 또는 3 내지 5.5일 수 있으며, 바람직하게는 약 pH 5 내지 5.5일 수 있다.
- [0062] 일 실시예에 있어서, 상기 시료 패드에 생물학적 시료를 투입하고, 상기 버퍼 로딩 패드에 버퍼를 부어주면, 시료 내에 코로나 바이러스가 존재하는 경우에는 버퍼가 이동하면서 제1 입자; 제2 입자 및 시료의 복합체가 반응하고, 상기 반응체가 기질과 결합하여 형광 또는 화학 발광을 유도하는 것일 수 있다. 따라서, 상기 검출용 키트는 화학 발광(chemiluminescence) 또는 형광(fluorescence) 검출에 기반한 것일 수 있다.
- [0063] 다른 양상은 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계; 상기 생물학적 시료와 접촉된 검출용 조성물 세트에 염기성 버퍼를 첨가하는 단계; 및 상기 염기성 버퍼가 첨가된 검출용 조성물 세트에 루시페레이스 기질(luciferase substrate)을 첨가하는 단계를 포함하는, 코로나 바이러스 검출 방법을 제공한다.
- [0064] 상기 코로나 바이러스, 검출, 코로나 수용체, 나노입자, 루시페레이스, 생물학적 시료, 개체 등은 전술한 바와 같다.
- [0065] 도 1은 일 양상의 화학발광기반 코로나 진단 기술의 개요를 나타낸 이미지이다.
- [0066] 상기 방법은, 코로나가 의심되는 개체에서 수득한 생물학적 시료에서 오염물을 제거하는 전처리를 선순위로 수행하는 것일 수 있다.
- [0067] 상기 방법은, 도 1에 나타난 것과 같이, 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 제1 루시페레이스(luciferase) 단편이 발현된 제1 나노입자; 및 안지오텐신 전환효소 2 또는 디펩티딜 펩티데이즈 4 및 제2 루시페레이스 단편이 발현된 제2 나노입자를 포함하는 검출용 조성물 세트를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0068] 이후, 상기 방법은, 도 1에 나타난 것과 같이, 상기 결합된 검출용 조성물 세트에 염기성 버퍼를 첨가하여 양 입자의 결합으로 인해 입자 내부에 온전한 루시페레이스가 형성되는 단계를 포함한다.
- [0069] 이후, 상기 방법은, 상기 염기성 버퍼가 첨가된 검출용 조성물 세트에 루시페라아제 기질을 처리하여, 결합된 입자 내의 루시페레이스 및 루시페레이스 기질이 반응하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 반응은 산화 반응으로 인한 화학발광일 수 있다.
- [0070] 상기 방법은, 루시페레이스 단편의 융합에 의한 화학 발광을 통해 코로나 바이러스를 검출하는 것일 수 있다.
- [0071] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 상기 제1 루시페레이스 단편 및 제2 루시페레이스 단편의 융합, 또는 상기 제3 루시페레이스 단편 및 제4 루시페레이스 단편의 융합에 의한 화학 발광 현상을 통해 코로나 바이러스를 검출하는 것일 수 있다.
- [0072] 이후, 상기 방법은 코로나 바이러스 감염 여부를 판단하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0073] 일 구체예에 있어서, 상기 판단하는 단계는 상기 제1 및 제2 입자에 의한 화학발광이 유도된 경우 코로나 바이

러스가 검출된 것으로 판단하는 단계; 또는 단백질분해효소에 의한 화학발광이 유도된 경우 판단하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0074] 일 양상에 따른 코로나 바이러스 검출용 조성물, 키트 및 검출 방법에 따르면, 코로나 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있고, 화학 발광을 기반으로 검출을 수행하여, 고감도 및 저비용의 검출을 수행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 일 양상의 화학발광기반 코로나 진단 기술의 개요를 나타낸 이미지이다.

도 2는 루시페레이스의 이중 분할 단백질을 나타낸 도이다.

도 3은 루시페레이스 분석을 이용하여 이중 분할 단백질의 화학 발광 효과를 확인한 이미지이다.

도 4는 이중 분할 단백질을 포함하는 나노입자 및 이를 이용한 화학 발광 효과를 나타낸 도이다.

도 5는 일 양상의 코로나 바이러스 검출용 조성물로 사스 코로나 바이러스를 검출한 그래프이다.

도 6은 일 양상의 코로나 바이러스 검출용 조성물로 메르스 코로나 바이러스를 검출한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0077] 실시예 1. 이중 분할 단백질(DSP)을 포함하는 입자의 자가 조립 특성 확인

[0078] 1.1 이중 분할 단백질을 포함하는 나노입자의 제조

[0079] S15-DSP는 DSP의 N-termail 에 S15 sequence를 추가하여 제조하였다.

[0080] 이중 분할 단백질(Dual split protein: DSP)을 발현하는 나노입자를 제작하기 위해, DSP1-7 또는 DSP8-11 유전자를 발현하는 플라스미드 및 사스 코로나 바이러스 수용체 또는 메르스 코로나 바이러스 수용체를 발현하는 플라스미드 및 HEK293세포에 HIV 코어를 발현하는 플라스미드를 혼합하여 함께 형질전환시켰다.

[0081] 구체적으로, 음성대조군(PBS), S15-DSP1-7만을 포함하는 군, S15-DSP-8-11만을 포함하는 군 및 S15-DSP1-7 및 S15-DSP-8-11을 발현하는 군을 실험군으로 설정하였다.

[0082] 도 2는 루시페레이스의 이중 분할 단백질을 나타낸 도이다.

[0083] 구체적으로, 도 2에 나타난 것과 같이, 상기 DSP를 발현하는 플라스미드는 루시페레이스 및 녹색 형광 단백질의 단편을 포함하였다. 상기 S15-DSP1-7(서열번호 1 및 2) 또는 S15-DSP-8-11(서열번호 3 및 4)는 레닐라 루시페레이스 및 녹색 형광 단백질의 단편을 발현하고 있는 이중 분할 단백질이다.

[0084] 1.2 상기 나노입자의 자가 조립 특성 확인

[0085] 상기 실시예 1.1에서 제조한 유사-바이러스 입자의 화학 발광 효과를 확인하기 위하여, 형질감염 48시간 후, 세포 내의 녹색형광단백질(GFP)의 발현을 확인하였다. 또한, 상기 유사-바이러스 입자의 세포 상층액을 이용하여 레닐라 루시페레이스 분석(renilla luciferase assay)을 수행하였다.

[0086] 도 3은 루시페레이스 분석을 이용하여 이중 분할 단백질의 화학 발광 효과를 확인한 이미지이다.

[0087] 도 4는 이중 분할 단백질을 포함하는 나노입자 및 이를 이용한 화학 발광 효과를 나타낸 도이다.

[0088] 그 결과, 도 3 및 4에 나타난 것과 같이, DSP1-7과 DP8-11을 함께 감염시킨 유사-바이러스 세포의 상층액에서 특이적으로 레닐라 루시페레이스 활성이 검출된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, DSP가 세포막 및 나노입자에 효과적으로 도입될 수 있으며, 자가 조립(self-assembly) 특성이 있고, 자가조립 후에만 특이적으로 형광 또는 화학 발광 반응을 보인다는 것을 의미한다.

[0089] 실시예 2. DSP 나노입자를 이용한 사스 코로나바이러스 검출 확인

[0090] 사스 코로나 바이러스를 발현하는 나노입자의 사스 코로나 검출 가부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1.1의 제

조방법과 같이, 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 및 TMPRSS2를 표면에 발현하는 나노입자를 바이러스 유사 입자와 1시간 반응시켰다. 바이러스 유사 입자는 표면 스파이크가 없는 BALDpp, SARS-CoV의 S 단백질을 발현하는 SARSpp 또는 MERS-CoV의 S 단백질을 발현하는 MERSpp을 이용하였다. 반응 후, Rluc(Renilla-luciferin 2-monooxygenase)의 활성을 검출하였다.

도 5는 일 양상의 코로나 바이러스 검출용 조성물로 사스 코로나 바이러스를 검출한 그래프이다.

그 결과, 도 5에 나타난 것과 같이, 사스 코로나 바이러스의 S 단백질을 발현하는 SARSpp와 반응한 경우만, 높은 Rluc 반응을 보였다. 이러한 결과는, ACE2와 TMPRSS2를 발현하는 나노파티클이 특이적으로 사스 코로나 바이러스를 검출할 수 있음을 나타낸다.

실시예 3. DSP 나노입자를 이용한 메르스 코로나바이러스 검출 확인

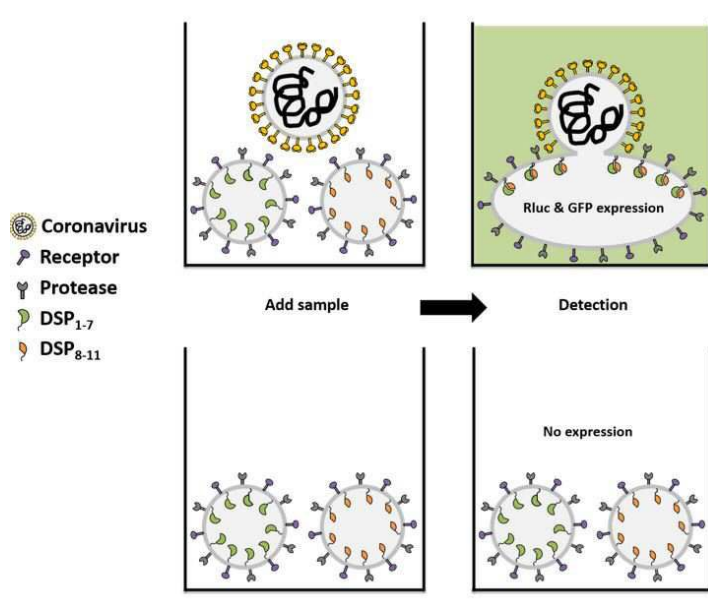
메르스 코로나 바이러스를 발현하는 나노입자의 메르스 코로나 바이러스검출 가부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1.1의 제조방법과 같이, 디펩티딜 펩티데이즈 4(Dipeptidyl peptidase-4: DPP4) 및 TMPRSS2를 표면에 발현하는 나노입자를 바이러스 유사 입자와 1시간 반응시켰다. 바이러스 유사 입자는 표면 스파이크가 없는 BALDpp, SARS-CoV의 S 단백질을 발현하는 SARSpp 또는 MERS-CoV의 S 단백질을 발현하는 MERSpp을 이용하였다. 반응 후, Rluc의 활성을 검출하였다.

도 6은 일 양상의 코로나 바이러스 검출용 조성물로 메르스 코로나 바이러스를 검출한 그래프이다.

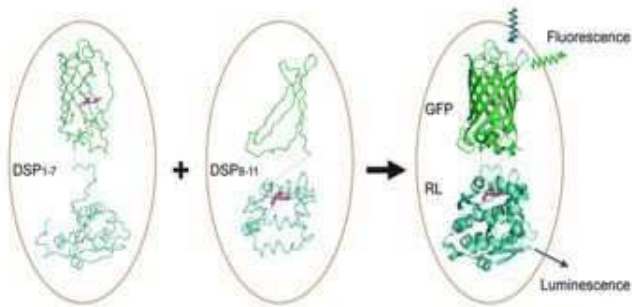
그 결과, 도 6에 나타난 것과 같이, 메르스 코로나 바이러스의 S 단백질을 발현하는 MERSpp과 반응한 경우만, 높은 Rluc 반응을 보였다. 이러한 결과는, DPP4와 TMPRSS2를 발현하는 나노파티클이 특이적으로 메르스 코로나 바이러스를 검출할 수 있음을 나타낸다.

도면

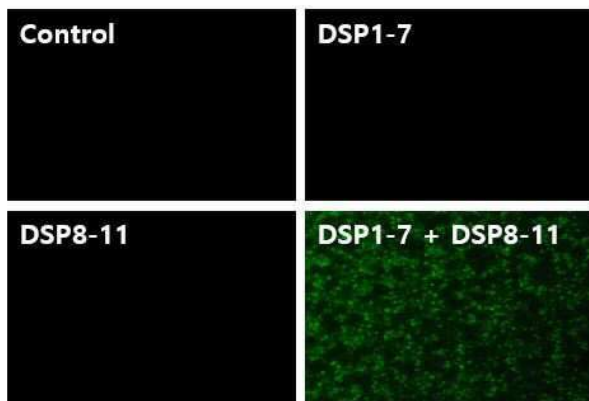
도면1



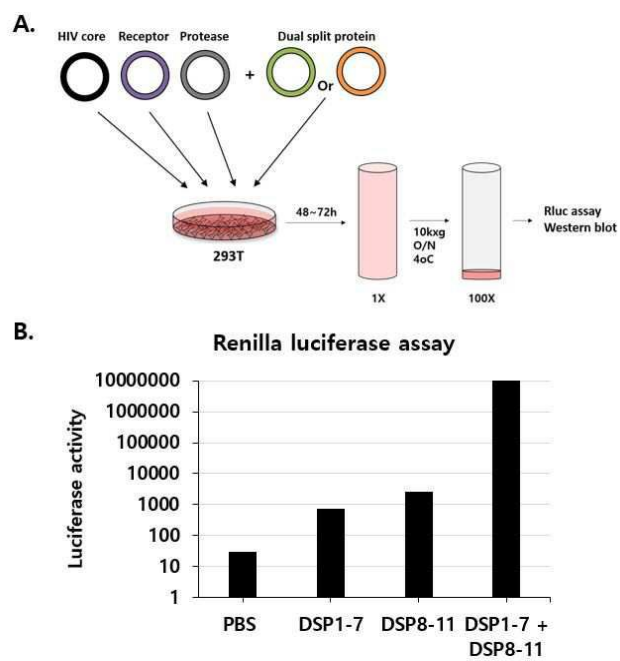
도면2



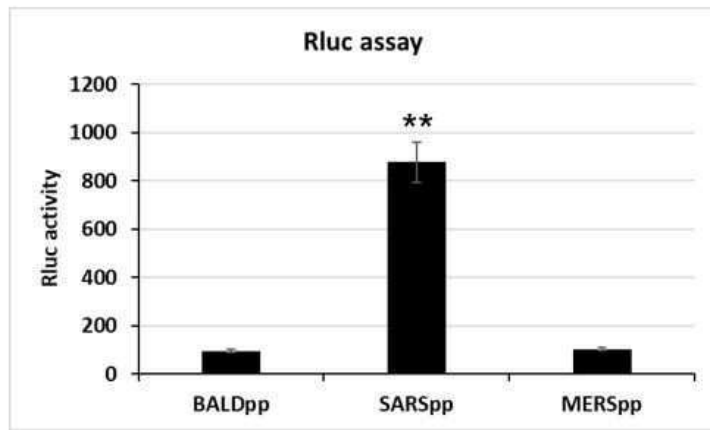
도면3



도면4



도면5



도면6

