



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월08일
(11) 등록번호 10-2131844
(24) 등록일자 2020년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/552 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56983 (2013.01)
G01N 33/5436 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0125995
(22) 출원일자 2018년10월22일
심사청구일자 2018년10월22일
(65) 공개번호 10-2020-0045216
(43) 공개일자 2020년05월04일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160145813 A*
KR100784437 B1
KR1020180031612 A
Jikun Liu et al, Biosensors and Bioelectroics (2016), vol 86, pp 150-155.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
대한민국(관리부서 질병관리본부장)
충청북도 청원군 강외면 오송생명2로 187, 오송생명과학단지보건의료행정타운
피씨엘 (주)
서울특별시 금천구 디지털로 9길 99, 701호 (가산동, 스타밸리)
(72) 발명자
이주연
대전광역시 서구 둔산남로 127 목련아파트 201-901
김성순
충청북도 청주시 흥덕구 오송생명5로 202, 롯데캐슬 305동 2204호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 8 항

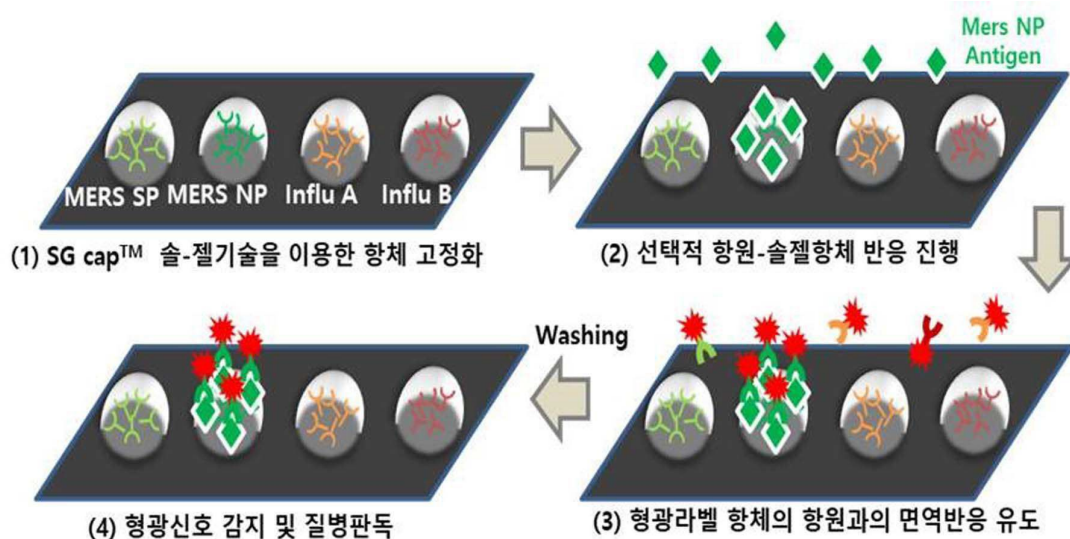
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 인플루엔자와 중동호흡기증후군을 동시에 검출하는 방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 인플루엔자 (Influenza)와 중동호흡기증후군 (Middle East Respiratory Syndrome: MERS)을 동시에 진단하는 방법, 인플루엔자와 중동호흡기증후군을 동시에 진단하기 위한 키트, 및 인플루엔자와 중동호흡기증후군을 동시에 진단하기 위한 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체 및 중동호흡기증후군에 결합하는 항체 각각을 실리카이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는 솔-겔 조성물에 로딩하여, 개체로부터 분리된 생물학적 샘플과 반응시키는 단계를 포함하는 인플루엔자와 중동호흡기증후군의 동시 진단방법, 진단키트 및 인플루엔자와 중동호흡기증후군의 동시 진단을 위한 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



- (52) CPC특허분류
G01N 33/552 (2013.01)
G01N 2333/11 (2013.01)
G01N 2333/165 (2013.01)

송환문

경기도 안양시 만안구 연현로 29 104-902

양수정

경기도 안양시 동안구 학의로 146 201-601

- (72) 발명자

양정선

충청북도 청주시 흥덕구 오송생명5로 202 오송롯데
캐슬@ 306-103

김준원

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 연제길 3-20 102호

김소연

서울특별시 서초구 서초중앙로 188 C-2010

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-NG47003-01

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 질병관리본부

연구사업명 감염병관리기술개발연구

연구과제명 신변종 호흡기바이러스 출현대비 신속대응을 위한 진단자원개발

기여율 50/100

주관기관 질병관리본부

연구기간 2016.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465025049

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 질병관리본부

연구사업명 감염병관리기술개발연구

연구과제명 POCT 기반의 코로나바이러스(메르스 등 4종) 다중신속검출 시스템 개발

기여율 50/100

주관기관 (주)피씨엘

연구기간 2017.07.07 ~ 2018.07.06

명세서

청구범위

청구항 1

개체로부터 분리된 생물학적 샘플을 다음의 솔-겔 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 (Influenza) 및 중동호흡기증후군 (Middle East Respiratory Syndrome: MERS)의 동시 진단에 정보를 제공하는 방법:

(i) 인플루엔자 A 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체, TMOS(테트라메틸오르토실리케이트) 1.9 내지 2.3 부피부, 20mM HCL 7.6 내지 9.2 부피부, 10mM 소듐포스페이트 버퍼 3.8 내지 4.6 부피부 및 증류수 19 내지 23 부피부를 포함하는 솔-겔 조성물; 및/또는

(ii) 인플루엔자 B 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체, TMOS(테트라메틸오르토실리케이트) 1.9 내지 2.3 부피부, 30mM HCL 7.6 내지 9.2 부피부, 10mM 소듐포스페이트 버퍼 3.8 내지 4.6 부피부 및 증류수 19 내지 23 부피부를 포함하는 솔-겔 조성물; 및

(iii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV) spike protein 에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 nucleocapsid protein에 특이적으로 결합하는 항체, TMOS(테트라메틸오르토실리케이트) 1.9 내지 2.3 부피부, 30mM HCL 3.8 내지 4.6 부피부, 10mM 소듐포스페이트 버퍼 3.8 내지 4.6 부피부 및 증류수 19 내지 23 부피부를 포함하는 솔-겔 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 비강액, 인후액, 타액 및 객담으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

(i) 인플루엔자 A 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체, TMOS(테트라메틸오르토실리케이트) 1.9 내지 2.3 부피부, 20mM HCL 7.6 내지 9.2 부피부, 10mM 소듐포스페이트 버퍼 3.8 내지 4.6 부피부 및 증류수 19 내지 23 부피부를 포함하는 솔-겔 조성물; 및/또는

(ii) 인플루엔자 B 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체, TMOS(테트라메틸오르토실리케이트) 1.9 내지 2.3 부피부, 30mM HCL 7.6 내지 9.2 부피부, 10mM 소듐포스페이트 버퍼 3.8 내지 4.6 부피부 및 증류수 19 내지 23 부피부를 포함하는 솔-겔 조성물; 및

(iii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV) spike

protein 에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 nucleocapsid protein에 특이적으로 결합하는 항체, TMOS(테트라메틸오르토실리케이트) 1.9 내지 2.3 부피부, 30mM HCL 3.8 내지 4.6 부피부, 10mM 소듐포스페이트 버퍼 3.8 내지 4.6 부피부 및 증류수 19 내지 23 부피부를 포함하는 솔-겔 조성물이 스팟팅된 검출부를 포함하는, 개체로부터 분리된 생물학적 샘플 중 인플루엔자 및 중동호흡기증후군을 동시에 진단하기 위한 키트.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 비강액, 인후액, 타액 및 객담으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 13

제7항에 있어서, 상기 검출부에서 상기 솔-겔 조성물들은 직경 0.1 마이크로미터 내지 0.4 마이크로미터의 원형으로 스팟팅되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 14

제7항에 있어서, 상기 검출부에서 상기 솔-겔 조성물들은 상호 0.4 마이크로미터 내지 1.0 마이크로미터의 간격으로 이격되어 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 15

(i) 인플루엔자 A 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체, TMOS(테트라메틸오르토실리케이트) 1.9 내지 2.3 부피부, 20mM HCL 7.6 내지 9.2 부피부, 10mM 소듐포스페이트 버퍼 3.8 내지 4.6 부피부 및 증류수 19 내지 23 부피부를 포함하는 솔-겔 조성물; 및/또는

(ii) 인플루엔자 B 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체, TMOS(테트라메틸오르토실리케이트) 1.9 내지 2.3 부피부, 30mM HCL 7.6 내지 9.2 부피부, 10mM 소듐포스페이트 버퍼 3.8 내지 4.6 부피부 및 증류수 19 내지 23 부피부를 포함하는 솔-겔 조성물을 포함하는,

인플루엔자 바이러스 검출용 솔-겔 조성물.

청구항 16

중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV) spike protein 에 특이적으로 결합하는 항체 및/또는 nucleocapsid protein에 특이적으로 결합하는 항체, TMOS(테트라메틸오르토실리케이트) 1.9 내지 2.3 부피부, 30mM HCL 3.8 내지 4.6 부피부, 10mM 소듐포스페이트 버퍼 3.8 내지 4.6

부피부 및 증류수 19 내지 23 부피부를 포함하는 술-겔 조성물을 포함하는, MERS-CoV 검출용 술-겔 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 (Influenza)와 중동호흡기증후군 (Middle East Respiratory Syndrome: MERS)을 동시에 진단하는 방법, 인플루엔자와 중동호흡기증후군을 동시에 진단하기 위한 키트, 및 인플루엔자와 중동호흡기증후군을 동시에 진단하기 위한 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체 및 중동호흡기증후군에 결합하는 항체 각각을 실리케이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물에 로딩하여, 개체로부터 분리된 생물학적 샘플과 반응시키는 단계를 포함하는 인플루엔자와 중동호흡기증후군의 동시 진단방법, 진단키트 및 인플루엔자와 중동호흡기증후군의 동시 진단을 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인플루엔자 (influenza)는 흔히 '독감'이라 알려져 있고, 인플루엔자 바이러스 (influenza virus)에 의해서 발병되는 급성 호흡기 질환이다. 인플루엔자는 매년 전 세계적으로 크고 작은 유행을 일으키며, 유행이 시작되면 2-3주 내에 통상 인구의 10-20%가 감염될 정도로 전염성이 대단히 큰 질병이다.

[0004] 원인 병원체인 인플루엔자 바이러스는 구형 (직경 80~120nm)의 바이러스로 오소믹소바이러스 패밀리 (Orthomyxoviridae family)의 구성원이다. 인플루엔자 바이러스는 nucleocapsid (NP)와 matrix (M) 단백질의 항원성 차이에 의해 기초하여 A형, B형 및 C형으로 분류된다. 인플루엔자 A 바이러스는 사람뿐만 아니라 조류 및 돼지도 감염시킨다. C형 인플루엔자는 사람에서 경미한 질병만 일으킨다. 인플루엔자 바이러스는 표면 단백질인 헤마글루타닌 (HA) 항원과 뉴라미다아제 (NA) 항원 유전자의 변화에 의해 기존의 항원형과는 전혀 다른 새로운 항원형으로 변하는 항원 대변이 (antigenic shift)와 동일한 인플루엔자 아형 내에서 약간의 유전적 변화만 생기는 항원 소변이 (antigenic drift)라는 특성을 가진다. 항원 대변이는 인플루엔자 A형에서 주로 일어나며 B형과 C형은 이에 비해 변이가 적고, 특히 C형에 의한 사람의 감염은 드문 것으로 알려져 있다 (Lamb, RA & Krug, RM 1996, Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. in DM Knipe, PM Howley & BN Fields (eds), Fields Virology).

[0005] 인플루엔자 A 바이러스는 서브타입 또는 타입, 지리적 기원, 균주 번호 및 단리 연도를 포함하는 명명법에 의하여, 예를 들면 A/베이징/353/89로 기술된다. 또한, 인플루엔자 A 바이러스는 표면항원인 헤마글루타닌 (HA) 항원과 뉴라미다아제 (NA) 항원에 의해 아형이 결정된다. HA 항원은 H1-H16까지 알려져 있으며, NA 항원은 N1-N9까지 알려져 있어, 이들의 조합에 의해 총 144종의 아형 발생이 이론적으로 가능하다. 인플루엔자 A 바이러스의 유전자는 8개의 유전자 조각으로 구성되어 있으며, 이러한 이유로 유전자 재조합이 일어날 수 있다. 모든 서브타입은 조류에서 발견되나, H1-H3 및 N1-N2는 인간, 돼지 및 말에서 발견되는 것으로 알려져 있다.

[0006] 유전자는 단일 가닥의 분절화된 (-) RNA로 되어 있고 나선 캡시드 (capsid)로 싸여 있다. A와 B형 바이러스는 각각 8개의 다른 RNA 분절을 갖는 반면에, C형은 7개의 분절이 있다. 유전자는 각각 당단백질 (glycoprotein)인 HA와 NA, polymerase protein인 PB2, PB1 및 PA, 유전물질을 보호하는 NP와 M, 비구조단백질인 NS1과 NS2로 구성되어 있다. 이중 HA와 NA 단백질은 바이러스 피막의 지질층에 매몰되어 있으면서 바이러스 표면에 돌출되어 항체 반응에 중요한 역할을 한다.

[0007] 인플루엔자 바이러스에 감염되는 경우 감염 24시간 내에 38-40℃의 갑작스런 고열, 두통, 근육통 및 피로감 등의 전신 증상과 인후통, 기침, 객담 및 비염 등의 호흡기 증상이 나타날 수 있다. 심장질환자 및 면역저하자 등은 폐렴과 같은 합병증이 발생하여 사망할 수 있으며 이외에 뇌증, 척수염 (transverse myelitis), Reye

증후군, 근염, 심근염 및 심낭염 등의 합병증이 동반될 수 있다. 소아의 경우 성인에서와 비슷한 증상을 보이지만, 열이 더 높게 나고, 열성 경련이 일어날 수 있으며 중이염, 위막성후두염 (croup) 및 근육통도 더 흔하게 발생할 수 있다.

[0008] 이와 같은 인플루엔자에 대한 관심이 증대하고 있으며, 선제적 진단 및 치료기술 확보가 시급한 실정이다.

[0009] 한편, 중동호흡기증후군 (Middle East Respiratory Syndrome: MERS)은 2012 년에 처음 확인된 바이러스성 감염 증으로, 코로나바이러스(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus ; MERS-CoV)에 의한 호흡기 감염증이다. MERS-CoV는 플러스-센스, 외가닥 RNA의 신종 베타코로나바이러스로, 베타코로나바이러스(Betacoronavirus) 속의 종이다.

[0010] MERS-CoV는 스파이크 단백질(spike protein)을 이용해 인간의 DPP4 (Dipeptidyl peptidase 4) 수용체에 결합하여 세포 내로 침투함으로써 (Wang N, Shi X, Jiang LJ, Zhang S, Wang D, Tong P, Guo D, *et al.*, Cell Research. 2013;23:986), 1주일 정도의 잠복기를 가지며, 고열, 기침, 호흡곤란 등 심한 호흡기 증상을 일으킨다.

[0011] 현재 MERS-CoV 진단을 위한 진단검사의학적 검사로 PCR법을 이용한 MERS-CoV 유전자 검출법이 확진검사법으로 이용되고 있다. WHO 실험실 표준검사지침은 1차적으로 upE 유전자를 스크리닝하여 MERS에 감염되었는지 확인한 후, 양성 시료에 대하여 ORF1a 또는 ORF1b 유전자를 스크리닝하여 확진하는 것을 권고하고 있다. 그러나, ORF1b 유전자는 ORF1a에 비해 민감도에 대한 효율이 떨어지므로 2차 확진검사에서는 사용을 권고하고 있지 않다. 다만, 2차 확진검사에서도 불명확한 시료에 대해서만 ORF1b 유전자에 대한 염기서열 분석을 권장하고 있으나, 감염자가 많은 경우에는 이러한 검사가 현실적으로 불가능하다.

[0012] 따라서, 진단이 용이하면서도 MERS-CoV에 대한 민감도가 높은 진단방법의 개발이 필요하다.

[0013] 이러한 기술 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 다양한 바이러스를 정확하게 구분하면서도, 신속하고 정확한 진단이 가능하도록, 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체와 MERS-CoV에 결합하는 항체를 사용하여, 인플루엔자 바이러스와 MERS-CoV를 동시에 검출할 수 있도록 함으로써, 인플루엔자와 중동호흡기증후군을 동시에 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 생물학적 샘플로부터 인플루엔자 및 중동호흡기증후군을 동시에 정확하고 신속하게 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 목적은 생물학적 샘플로부터 인플루엔자 및 중동호흡기증후군을 동시에 정확하고 신속하게 검출하기 위한 진단키트를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 목적은 생물학적 샘플로부터 인플루엔자 및 중동호흡기증후군을 동시에 정확하고 신속하게 검출하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 샘플을 다음의 솔-겔 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 (Influenza) 및 중동호흡기증후군 (Middle East Respiratory Syndrome: MERS)의 동시 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공한다: (i) 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산 (acid), 버퍼 및 용매를 포함하는 솔-겔 조성물; 및 (ii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV)에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는 솔-겔 조성물.

[0020] 본 발명은 또한, (i) 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산 (acid), 버퍼 및 용매를 포함하는 솔-겔 조성물; 및 (ii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV)에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는 솔-겔 조성물이 스팟팅된, 개체로부터 분리된 생물학적 샘플 중 인플루엔자 및 중동호흡기증후군을 동시에 진단하기 위한 키트를 제공한다.

[0021] 본 발명은 더욱이, (i) 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산 (acid), 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물; 및 (ii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV)에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는, 개체로부터 분리된 생물학적 샘플 중 인플루엔자 및 중동호흡기증후군을 동시에 진단하기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따르면, 인플루엔자 바이러스 및 중동호흡기증후군 바이러스의 항원 각각에 결합하는 항체를 통해 생물학적 샘플에서 인플루엔자 바이러스 및 중동호흡기증후군 바이러스를 특이적으로 동시에 검출할 수 있고, 바이러스를 개별로 검사하여 다수의 샘플을 처리하는데 소요되는 시간과 비용을 획기적으로 줄일 수 있으며, 높은 예민성(민감성) 및 정확도로 인플루엔자 및 중동호흡기증후군을 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따라 항체가 로딩된 술-겔 조성물 및 레퍼런스 (reference) 마커가 로딩된 술-겔 조성물을 스팟팅하여 제작한 인플루엔자 및 중동호흡기증후군 동시 진단 키트의 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따른 술겔-항체 조성물의 스팟 반응에 대한 모식도이다.

도 3은 술겔-항체 조성물과 항원의 반응에 따른 형광신호 이미지를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 항체가 로딩된 술-겔 조성물을 스팟팅한 키트의 예시를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0027] 일 관점에서, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 샘플을 다음의 술-겔 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 인플루엔자 (Influenza) 및 중동호흡기증후군 (Middle East Respiratory Syndrome: MERS)의 동시 진단에 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다: (i) 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산 (acid), 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물; 및 (ii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV)에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물.

[0028] 본 발명에 따르면, 인플루엔자와 중동호흡기증후군을 동시 진단할 수 있으며, 종래 인플루엔자 바이러스와 중동호흡기증후군 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 진단 키트가 전무한 상황이다. 복수의 질환을 동시에 진단하므로, 각각 진단하는 것에 비해 훨씬 빠르고, 간편하며, 경제적으로 진단할 수 있다.

[0029] 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 샘플을 (i) 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산 (acid), 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물; 및 (ii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV)에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물과 반응시키는 단계를 포함한다.

[0030] 상기 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체는 인플루엔자 바이러스 A 및/또는 인플루엔자 바이러스 B에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 상기 인플루엔자 바이러스 A에 특이적으로 결합하는 항체는 다음 표 1에 기재된 항체일 수 있다. 상기 인플루엔자 바이러스 B에 특이적으로 결합하는 항체는 다음 표 2에 기재된 항체일 수 있다.

표 1

[0031]

번호	제조사	제품번호	제품명
1	antibodies-online	ABIN235631	Influenza A (Nucleoprotein) antibody
2	hytest	3IN5-InA245	Influenza A nucleoprotein, antibody

3	medix biomedica	100083	Anti-Influenza A 7307 SPTN-5
---	-----------------	--------	---------------------------------

표 2

[0032]

번호	제조사	제품번호	제품명
1	Fitzgerald	10-155F	INFLUENZA B ANTIBODY
2	medix biomedica	100117	Anti-Influenza B 9901 SPTNZ-5
3	medix biomedica	100472	Anti-Influenza B 9905 SPTN-5
4	Arista Biologicals	ABINF-0402	Influenza B mAb, clone 2

[0034]

상기 MERS-CoV에 결합하는 항체는 MERS-CoV spike protein 및/또는 MERS-CoV nucleocapsid protein에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 상기 MERS-CoV spike protein에 특이적으로 결합하는 항체는 다음 표 3에 기재된 항체일 수 있다. 상기 MERS-CoV nucleocapsid protein에 특이적으로 결합하는 항체는 다음 표 4에 기재된 항체일 수 있다.

표 3

[0035]

번호	제조사	제품번호	제품명
1	Sino Biological	40069-MM23	MERS-CoV (NCoV / Novel coronavirus) Spike Protein S1 Antibody, Mouse Mab

표 4

[0036]

번호	제조사	제품번호	제품명
1	Sino Biological	40068-MM10	MERS-CoV (NCoV / Novel coronavirus) Nucleocapsid Antibody, Mouse Mab

[0037]

하나의 실시예에서, 상기 솔-겔 조성물은 (A) 실리케이트 단량체; (B) 산; (C) 버퍼; 및 (D) 증류수를 포함할 수 있다.

[0038]

상기 (A) 실리케이트 단량체는 솔-겔의 주요한 단위체로, 증류수(H₂O)와의 반응으로 하이드록시기(-OH)를 가지게 되며, 하이드록시기를 가지는 단량체들 사이의 탈수-축합 반응을 통해 솔-겔을 형성할 수 있다. 상기 (A) 실리케이트 단량체는 예를 들어, 테트라메틸오르토실리케이트 (TMOS), 테트라에틸오르토실리케이트 (TEOS), 메틸트리메톡시실란 (MTMOS), 에틸트리에톡시실란 (ETrEOS), 트리메톡시실란 (TMS), 메틸트리메톡시실리케이트 (MTMS) 및 3-아미노프로필트리메톡시실리케이트(3-ATMS)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0039]

상기 (A) 실리케이트 단량체는 예를 들어, 1 내지 3 부피부, 구체적으로 1.5 내지 2.5 부피부, 더욱 구체적으로 1.9 내지 2.3 부피부로 포함될 수 있다. 상기 범위의 부피부 미만으로 포함되는 경우 솔-겔의 형성에 필요한 단량체 수가 부족하게 될 수 있고, 상기 범위의 부피부를 초과하여 포함되는 경우 솔-겔을 형성하고 남은 단량체들이 생물학적 샘플이 유동하는 통로를 막을 수 있다.

[0040]

상기 (B)의 산은 H⁺를 생성하여, 하이드록시기를 가지는 단량체들이 나타내는 하이드록시기(-OH)를 보호하여, 하이드록시기를 가지는 단량체들 사이에서 급속하게 탈수-축합반응을 방지할 수 있다. 상기 (B)의 산은 예를 들어, 염산, 황산, 포름산으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 (B)의 산은 예를 들

어, 5 내지 10 부피부, 구체적으로 7.5 내지 9.5 부피부, 더욱 구체적으로 7.6 내지 9.2 부피부로 포함될 수 있다.

- [0041] 상기 (C)의 버퍼는 (B) 산의 첨가로 야기될 수 있는 급격한 pH 변화를 방지하는 역할을 하며, 예를 들어 소듐포스페이트 및 아세트산으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 (C)의 버퍼는 예를 들어 10mM 1가 소듐포스페이트 및 아세트산으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 (C)의 버퍼는 예를 들어, 3 내지 5 부피부, 구체적으로 3.5 내지 4.8 부피부, 더욱 구체적으로 3.8 내지 4.6 부피부로 포함될 수 있다.
- [0042] 상기 (D) 증류수는 용매의 역할을 하고, 실리케이트 단량체가 하이드록시기(-OH)를 띠도록 한다. 상기 (D) 증류수는 예를 들어, 15 내지 30 부피부, 구체적으로 17 내지 25 부피부, 더욱 구체적으로 19 내지 23 부피부로 포함될 수 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 솔-겔 조성물은 (A) 실리케이트 단량체; (B) 산; (C) 버퍼; 및 (D) 증류수를 위에서 정의한 부피비로 혼합하여 제조될 수 있으며, 이러한 솔-겔 조성물에 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체 및 중동호흡기증후군 코로나바이러스에 결합하는 항체 각각을 로딩할 수 있다. 솔-겔이 (A) 내지 (D)의 성분 및 부피비의 조합을 가질 때, 항체를 용이하게 포획할 수 있다.
- [0044] 상기 솔-겔 조성물에 로딩되어 포획된 항체는 개체로부터 분리된 생물학적 샘플 중 인플루엔자 바이러스 예를 들어, 인플루엔자 바이러스 A 및/또는 인플루엔자 바이러스 B가 존재하는 경우, 및/또는 중동호흡기증후군 코로나바이러스가 존재하여 MERS-CoV spike protein 및/또는 MERS-CoV nucleocapsid protein이 존재하는 경우, 이들은 항원으로 인식하고 항체와 항원의 면역반응을 일으킨다.
- [0045] 상기 항체와 항원의 결합은 예를 들어, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법, 샌드위치면역분석법, 형광면역분석법, 방사면역분석법, 발광면역분석법 등 다양한 당업계의 공지, 관용된 면역학적 분석 방법에 의해서 가능하나, 구체적으로, 샌드위치면역분석법을 이용하여 항원-항체를 결합하고, 형광면역분석법을 이용하여 대상 항원의 존재여부를 검출하는 것이 보다 더 효율적이고 바람직하다(도 2 참조).
- [0046] ELISA법에서는 효소와 결합된 이차항체가 사용될 수 있으며, 이 때 사용되는 효소는 퍼옥시다제(POD), 알칼린포스파타제, β-갈락토시다제, 호시 래디쉬 퍼옥시다아제, 우레아제, 카탈라제, 글루코스옥시다제, 락트산 탈수소 효소, 아밀라제 등일 수 있다.
- [0047] 형광면역분석법에서는 예를 들어, 플루오레세인이소티오시아네이트, 테트라메틸로다민이소티오시아네이트, 치환로다민이소티오시아네이트, 디클로로트리아진이소티오시아네이트, 알렉사 (Alexa) 또는 알렉사플루오로 (AlexaFluoro) 등의 형광성 물질 또는 형광단과 결합된 항체가 사용될 수 있다.
- [0048] 하나의 실시예에서, 상기 항체와 항원의 결합은 형광면역분석법을 통해 검출할 수 있다. 상기 항체에 특이적으로 결합하는 항원에 별도로 결합하는 2차 항체에 형광 염료를 표지 함으로써, 면역반응을 가시화할 수 있다. 도 2에 도시된 바와 같이, 항체와 항원이 선택적으로 반응하고, 항체에 결합된 항원에 결합하는 형광 염료가 표지된 2차 항체로부터 도 3에서와 같은 형광 신호가 감지되는 경우 생물학적 샘플 중 인플루엔자 바이러스 예를 들어, 인플루엔자 바이러스 A 및/또는 인플루엔자 바이러스 B, 및/또는 중동호흡기증후군 코로나바이러스의 spike protein 및/또는 nucleocapsid protein이 존재하는 것으로 확인할 수 있으며, 개체가 인플루엔자 바이러스 A 및/또는 인플루엔자 바이러스 B 및/또는 중동호흡기증후군 코로나바이러스에 감염된 것으로 진단할 수 있다.
- [0049] 방사 면역 측정법에는 예를 들어, 트리튬, 요오드(¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), 인(³²P), 황(³⁵S), 금속류(예를 들면, ⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ge, ⁵⁴Mn, ⁹⁹Mo, ⁹⁹Tc, ¹³³Xe 등) 등의 방사성 동위원소와 결합된 항체가 사용될 수 있다.
- [0050] 발광면역분석법에는 예를 들어, 루시페라제 방법, 루미놀 퍼옥시다제 방법 등이 디옥세탄 화합물 등의 발광성 물질 등과 함께 사용될 수 있다.
- [0051] 상기 생물학적 샘플은 본 명세서에서 검액 또는 검체와 혼용하여 사용될 수 있으며, 인플루엔자 바이러스 A 및/또는 인플루엔자 바이러스 B, 및/또는 중동호흡기증후군 코로나바이러스 감염이 의심되는 진단 대상 개체에서 분리된 비강액, 인후액, 타액 및 객담으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0052] 상기 비강액, 인후액, 타액 및 객담은 상기 솔-겔 조성물과 반응시키기 전에, 전처리될 수 있다.
- [0053] 본 발명은 또한, (i) 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산(acid), 버퍼 및 용매를 포

합하는 술-겔 조성물; 및 (ii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV)에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물이 스팟팅된 검출부를 포함하는, 개체로부터 분리된 생물학적 샘플 중 인플루엔자 및 중동호흡기증후군을 동시에 진단하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0054] 본 발명에 따른 키트는 (i) 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산 (acid), 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물; 및 (ii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV)에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물이 스팟팅되어 고정된 검출부를 포함한다.

[0055] 하나의 실시예에서, 상기 검출부는 도 1에 도시된 바와 같다. 상기 술-겔 조성물은 직경 0.1 마이크로미터 내지 0.4 마이크로미터, 구체적으로 0.2 마이크로미터 내지 0.3 마이크로미터의 원형으로 스팟팅될 수 있다. 이 때, 인플루엔자 바이러스 A 및/또는 인플루엔자 바이러스 B에 결합하는 항체를 포함하는 술-겔 조성물과 MERS-CoV spike protein 및/또는 MERS-CoV nucleocapsid protein에 결합하는 항체를 포함하는 술-겔 조성물의 순서는 임의로 결정될 수 있으며, 상호 변경될 수 있다.

[0056] 항체와 항원의 반응이 다른 항체와 항원의 반응을 방해하지 않도록, 상기 술-겔 조성물은 상호 0.4 마이크로미터 내지 1.0 마이크로미터의 간격, 구체적으로 0.5 내지 0.8 마이크로미터의 간격으로 이격될 수 있다.

[0057] 본 발명에 따른 키트는 인플루엔자 바이러스 A 및/또는 인플루엔자 바이러스 B, MERS-CoV spike protein 및/또는 MERS-CoV nucleocapsid protein에 결합하는 항체와 생물학적 샘플 중 인플루엔자 바이러스 A 및/또는 인플루엔자 바이러스 B, MERS-CoV spike protein 및/또는 MERS-CoV nucleocapsid protein 항원의 상호작용을 확인하는 검출부 이외에, 진단방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치 등의 다양한 구성요소를 추가로 포함할 수 있다.

[0058] 상기 진단키트는 생물학적 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 시약을 포함하는 용기 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성요소들을 함유한다.

[0059] 본 발명의 명세서에서, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 키트는 예를 들어, 개체로부터 분리된 생물학적 샘플이 함유된 용기 장착부, 생물학적 표지자를 포함하는 반응 시약 보관부; 검출 대상 물질과 반응하지 않은 물질을 제거하기 위한 세척 용액을 포함하는 세척 용액 보관부; 검출부에서 반응 후의 잔존 물질 또는 미반응 물질을 제거하는 폐기물 보관부; 및 피펫 팁 (pipet tip) 형태의 운반 수단이 장착된 홀 등을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 구성의 키트는 예를 들어, 국제공개특허 제W02018-056700호에 구체적으로 예시되어 있으며, 본 출원에 참조로서 도입될 수 있다.

[0061] 본 발명은 더욱이, (i) 인플루엔자 바이러스에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산 (acid), 버퍼 및 용매를 포함하는 술-겔 조성물; 및 (ii) 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS-CoV)에 결합하는 항체, 실리케이트 단량체, 산, 버퍼 및 용매를 포함하는, 개체로부터 분리된 생물학적 샘플 중 인플루엔자 및 중동호흡기증후군을 동시에 진단하기 위한 조성물에 관한 것이다.

[0062] 상기 조성물의 (i) 및 (ii)에 포함된 각 구성에 대한 구체적 내용은 앞서 설명한 바와 동일하게 적용된다.

[0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0066] **실시예 1: 술-겔 조성물 제조**

[0067] 상온, 상압에서 25ul의 TMOS를 1.5ml E-tube (Eppendorf tube)에 넣은 후 파이프팅 10회 후, 볼텍스를 10초간 하여 섞고 여기에 증류수를 250ul 첨가한 후 볼텍스를 10초간 한 후에, 소니케이션 10초간 하는 과정을 28회 반복하였다(4분20초). 미니-스핀 (mini-spin)을 이용하여 스핀-다운 (spin-down)한다. 이 과정에서 혼합물의 투명함과 스핀-다운시, 벽을 타고 혼합물이 흐름을 확인하였다. 20mM HCL를 100ul, 10mM 소듐포스페이트 버퍼를 50ul 첨가한 후 볼텍스를 10초간 볼텍스를 강하게 하여 잘 섞고 미니-스핀 (mini-spin)을 이용하여 스핀-다운 (spin-down) 하였다.

[0069] **실시예 2 : 항체가 로딩된 술-겔 조성물의 제조 방법**

[0070] [조성물의 구체적 구성]

[0071] 1. Influenza A 스파팅용 솔-겔 조성물

[0072] TMOS 1.9~2.3nL; 20mM HCL 7.6~9.2nL; 10mM 소듐포스페이트 버퍼(pH 5.8) 3.8~4.6nL; 증류수 19~23nL; 및 Influenza A 항체 27ng~33ng

[0073] [표 1]

번호	제조사	제품번호	제품명
1	antibodies-online	ABIN235631	Influenza A (Nucleoprotein) antibody
2	hytest	3IN5-InA245	Influenza A nucleoprotein, antibody
3	medix biomedica	100083	Anti-Influenza A 7307 SPTN-5

[0074]

[0076] 2. Influenza B 스파팅용 솔-겔 조성물

[0077] TMOS 1.9~2.3nL; 30mM HCL 7.6~9.2nL; 10mM 소듐포스페이트 버퍼(pH 5.8) 3.8~4.6nL; 증류수 19~23nL; 및 Influenza B 항체 27ng~33ng

[0078] [표 2]

번호	제조사	제품번호	제품명
1	Fitzgerald	10-I55F	INFLUENZA B ANTIBODY
2	medix biomedica	100117	Anti-Influenza B 9901 SPTNZ-5
3	medix biomedica	100472	Anti-Influenza B 9905 SPTN-5
4	Arista Biologicals	ABINF-0402	Influenza B mAb, clone 2

[0079]

[0081] 3. MERS-CoV (spike protein) 스파팅용 솔-겔 조성물

[0082] TMOS 1.9~2.3nL; 30mM HCL 3.8~4.6nL; 10mM 소듐포스페이트 버퍼(pH 5.8) 3.8~4.6nL; 증류수 22.8~27.6nL; 및 MERS-CoV (spike protein) 항체 27ng~33ng

[0083] [표 3]

번호	제조사	제품번호	제품명
1	Sino Biological	40069-MM23	MERS-CoV (NCoV / Novel coronavirus) Spike Protein S1 Antibody, Mouse Mab

[0084]

[0086] 4. MERS-CoV (Nucleocapsid protein) 스파팅용 솔-겔 조성물

[0087] TMOS 1.9~2.3nL; 30mM HCL 3.8~4.6nL; 10mM 소듐포스페이트 버퍼(pH 5.8) 3.8~4.6nL; 증류수 22.8~27.6nL; 및 MERS-CoV (Nucleocapsid protein) 항체 27ng~33ng

[0088] [표 4]

번호	제조사	제품번호	제품명
1	Sino Biological	40068-MM10	MERS-CoV (NCoV / Novel coronavirus) Nucleocapsid Antibody, Mouse Mab

[0089]

[0091] 실시예 2-1: Influenza A 항체가 로딩된 솔-겔 조성물

[0092] 상온, 상압에서 Influenza A의 항체를 10mM PBS에 첨가하여, Influenza A 항체 조성물을 형성하였다 (비중 또는 밀도 : 10 내지 20 mg/ml). 상기 Influenza A 항체 조성물과 실시예 1에 따른 솔-겔 조성물을 1:7로 혼합하여 Influenza A 항체가 로딩된 솔-겔 조성물을 수득하였다. 상기 Influenza A 항체가 로딩된 솔-겔 조성물에 포함된 Influenza A 항체의 질량은 36ug이었다.

[0094] 실시예 2-2 : Influenza B 항체가 로딩된 솔-겔 조성물

[0095] Influenza A 대신에 Influenza B 를 첨가하는 것을 제외하고는, 실시예 2-1 과 동일한 방법으로 Influenza B 항체가 로딩된 솔-겔 조성물을 제조하였다.

[0097] 실시예 2-3 : MERS-CoV (spike protein) 항체가 로딩된 솔-겔 조성물

[0098] Influenza A 대신에 MERS-CoV (spike protein)를 첨가하는 것을 제외하고는, 실시예 2-1과 동일한 방법으로 Influenza B 항체가 로딩된 솔-겔 조성물을 제조하였다.

[0100] 실시예 2-4 : MERS-CoV (Nucleocapsid protein) 항체가 로딩된 솔-겔 조성물

[0101] Influenza A 대신에 MERS-CoV (Nucleocapsid protein)를 첨가하는 것을 제외하고는, 실시예 2-1 과 동일한 방법으로 Influenza B 항체가 로딩된 솔-겔 조성물을 제조하였다.

[0102] 실시예 2-5: Reference 마커가 로딩된 솔-겔 조성물

[0103] 상온, 상압에서 HiLyteTM Fluor 647와 1X PBS로 제조된 1mg/ml BSA 를 아래 표 5의 분량대로 혼합하여 볼텍스 하여 섞고 스핀-다운 (spin-down)하여 레퍼런스 (reference) 마커가 로딩된 솔-겔 조성물을 제조하였다.

표 5

원료명	제조사/Cat#	첨가농도
HiLyte TM Fluor 647	Anaspec / AS-81256	37.5 μM
BSA	Sigma Aldrich/A7906	1mg/ml

[0106] 실시예 3 : Influenza A, B 및 MERS 동시 진단 키트의 제조

[0107] [어레이어 장비를 이용한 항체가 로딩된 솔-겔 조성물의 스팟팅]

[0108] 다중동시검출 키트의 플라스틱 사출물은 사전에 이물-먼지를 제거하고 제조에 투입하였다. 검출 키트의 반응검출부에 스팟팅을 위한 어레이어 장비 (sciFLEXARRYAER SX, Scienion AG사)는 사용 전 세척 과정을 완료하고 노즐을 세팅 및 세척하여 분주에 최적화된 상태로 준비하였다. 키트제조는 청정실에서 진행되며 청정실은 아래 표 6의 환경기준을 갖추어야 한다.

표 6

온도	20±2℃
습도	65±15% RH

[0110] 상기 어레이어 장비를 이용하여, 실시예 2에 따라 제조된 항체가 로딩된 솔-겔 조성물들 및 레퍼런스 (reference) 마커가 로딩된 솔-겔 조성물을 도 4와 같이 스팟팅하여, Influenza A, B 및 MERS 동시 진단 키트를 제조하였다.

[0112] [2차 접합체 분주 및 겔화 진행]

[0113] 다중동시검출 키트에 스팟팅이 완료된 후, 사전에 농축 준비된 2차 접합체액을 키트의 반응시약 보관부에 8 μl 씩 분주를 진행하였다. 위의 2차 접합체액은 각 검출항목의 항체를 AnaTagTM HiLyteTM Fluor 647 Protein Labeling Kit *Ultra Convenient* (Cat No. AS-81256, 제조사: Anaspec)를 이용하여 형광체를 라벨링을 진행하였다.

[0114] 분주가 완료되면 동시검출 키트를 청정실의 20±2℃, 65±15% 조건 하에서 24시간 동안 반응검출부의 솔-겔 항체 스팟팅 겔화 진행 및 반응시약 보관부는 2차 접합체의 건조를 동시 진행하였다.

- [0116] [블로킹 진행 및 세척액 분주, 호일용착 진행]
- [0117] 반응 검출부의 겔화 진행 완료된 스포트를 블로킹액으로 키트 반응검출부 웰에 100ul씩 넣고 2시간 동안 반응(15-30℃)시키고, 반응이 끝나면 반응검출부 웰의 내용물을 제거한 후 진공 데시케이터에 넣고 2시간 동안 카트리지를 건조시켰다.
- [0118] 건조가 완료된 후 세척용액 보관부에 세척액을 0.8mL을 주입하고 폐기물 보관부에는 2차오염 방지용 흡수패드를 삽입하였다.
- [0119] 준비된 용착호일을 열용착기로 이용하여 실시예 3 에 따른 키트의 각 웰의 입구부분을 열 용착 (120℃, 5초) 진행하여 건조된 2차 접합체/세척액/ 흡수패드를 장기간 보존 밀봉 진행하였다.
- [0121] **실험예 1: 인플루엔자 A 및 B와 MERS 표준검체에 대한 반응결과 테스트**
- [0122] 실시예 3 에 따른 Influenza A, B 및 MERS 동시 진단 키트에 형광면역반응(Immunofluorescence)을 일으키기 위하여, 2차 항체로서 AnaTag제 HiLyte제 Fluor 647 Protein Labeling Kit *Ultra Convenient* (Cat No. AS-81256, 제조사: Anaspec) 를 사용하여, 각 항체에 형광 라벨링을 진행하였다.
- [0123] 이후, 표준검체의 아종 균주 (Subtype strain)에서 Influenza A 6종과 Influenza B 4종 대한 성능테스트와 메르스 검체 (KNIH 002 strain, EMC strain)에 대한 성능테스트를 진행하였다. Influenza의 표준검체는 Zeptomatrix Panel로 진행하였고 메르스검체는 국내 질병관리본부에서 공급받아 BL3시설내에서 인플루엔자 A 및 B와 MERS 표준검체에 대한 진단 테스트를 진행하였다.
- [0124] 그 결과를 표 7에 나타내었으며, 검사결과의 Pos(+)는 양성/Neg(-)는 음성결과에 대한 표식이다

표 7

검체 정보			검출 여부			
Virus	Strain	Titer (TCID ₅₀ /ml)	MERS-CoV (spike protein)	MERS-CoV (Nucleocapsid protein)	Influenza a A	Influenza a B
MERS	KNIH 002	5x10 ⁵	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)	Neg(-)
	EMC	5x10 ⁵	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)	Neg(-)
Influenza A	New Caledonia/20/99	10 ^{5.15}	Neg(-)	Neg(-)	Pos(+)	Neg.
	Singapore/63/04	10 ^{5.39}	Neg(-)	Neg(-)	Pos(+)	Neg.
	A/California/07/2009	10 ^{5.15}	Neg(-)	Neg(-)	Pos(+)	Neg.
	Mexico/4108/09	10 ^{5.15}	Neg(-)	Neg(-)	Pos(+)	Neg.
	Texas/50/12	10 ^{5.15}	Neg(-)	Neg(-)	Pos(+)	Neg.
	Victoria/361/11	10 ^{5.15}	Neg(-)	Neg(-)	Pos(+)	Neg.
Influenza B	Lee/40	10 ^{5.55}	Neg(-)	Neg(-)	Neg.	Pos(+)
	B/Florida/02/06	10 ^{5.15}	Neg(-)	Neg(-)	Neg.	Pos(+)
	Brisbane/60/08	10 ^{5.07}	Neg(-)	Neg(-)	Neg.	Pos(+)
	Massachusetts/2/12	10 ^{5.07}	Neg(-)	Neg(-)	Neg.	Pos(+)

- [0125]
- [0127] 각 검출항목에 대한 다양한 표준검체의 검증으로 검출키트의 항원-항체 면역반응이 이루어짐을 확인하였고, 상호교차반응 (Cross Reactivity)이 발생되지 않음을 검증할 수 있었다. 표 7의 형광 이미지 결과를 표 8에 나타

내었다.

표 8

인플루엔자 A/B와 메르스 표준검체 형광이미지

Virus	Strain	Titer (TCID ₅₀ /ml)	형광이미지 결과
MERS	KNIH 002	5x10 ⁵	
	EMC	5x10 ⁵	
Influenza A	New Caledonia/20/99	10 ^{5.15}	
	Singapore/63/04	10 ^{5.39}	
	A/California/07/2009	10 ^{5.15}	
	Mexico/4108/09	10 ^{5.15}	
	Texas/50/12	10 ^{5.15}	
	Victoria/361/11	10 ^{5.15}	

[0129]

Influenza B	Lee/40	10 ^{5.55}	
	B/Florida/02/06	10 ^{5.15}	
	Brisbane/60/08	10 ^{5.07}	
	Massachusetts/2/12	10 ^{5.07}	

[0130]

[0132] [실험예 2] LOD 성능 비교테스트

[0133] 다중동시검출 키트를 이용하여 각 검출항목에 대한 검출한계 (LOD: Limit of detection)의 성능을 비교 분석하였다.

[0134] (1) Mers CoV

[0135] 검출키트는 메르스 항원에 대한 Spike protein 과 Nucleocapsid protein을 동시에 진단할 수 있는 목적으로 개발되었으며 이를 위한 LOD 평가는 2종의 Strain: KNIH 002, EMC로 실시하였다.

표 9

[0136]

Strain: KNIH 002 (TCID ₅₀ /ml)		5x10 ⁵	1x10 ⁵	5x10 ⁴	1x10 ⁴	5x10 ³	1x10 ³	5x10 ²
실시예 3	spike protein	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.
	Nucleocapsid protein	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.

표 10

[0137]

Strain: EMC (TCID ₅₀ /ml)		5x10 ⁵	1x10 ⁵	5x10 ⁴	1x10 ⁴	5x10 ³	1x10 ³
실시예 3	spike protein	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.
	Nucleocapsid protein	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.

[0138] 위의 표 9 및 표10의 결과와 같이, 실시예 3 에 따른 키트는 1개의 항원 안에 2개의 단백질 사이트(protein site)에 대하여 특이적인 면역반응이 발생되어 동시 검출이 가능함을 알 수 있었고, 타사제품과 비교하여 LOD에 대한 분석적 민감도 성능이 우수함을 알 수 있었다.

[0140] (2) Influenza A

[0141] Influenza A 항원에 Subtype에 대한 H1N1 아형과 H3N2 아형 등에 대한 진단할 수 있는 목적으로 개발되었으며, 이를 위한 LOD 평가는 비교장비로 Rapid kit 국내제품(SD사), 형광면역 해외제품(Quidel사)과 함께 비교분석 하였고, H1N1 아형의 Strain: New Caledonia/20/99과 H3N2 아형의 Strain: Texas/50/12로 실시하였다.

표 11

[0142]

Strain: New Caledonia/20/99 (TCID ₅₀ /ml)		10 ^{5.15}	10 ^{4.15}	10 ^{3.15}	10 ^{2.15}	10 ^{1.15}	10 ^{0.15}
실시예 3		Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)
타사비교장비	Rapid kit (S사)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)	Neg(-)
	형광면역장비(Q사)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)

표 12

[0143]

Strain: Texas/50/12 (TCID ₅₀ /ml)		10 ^{5.15}	10 ^{4.15}	10 ^{3.15}	10 ^{2.15}	10 ^{1.15}	10 ^{0.15}
실시예 3		Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)
타사비교장비	Rapid kit (S사)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	형광면역장비(Q사)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)

[0144] 위의 표 11 및 표 12의 결과에서와 같이 Influenza A의 대표적인 Subtype H1N1, H3N2의 아형에 특이적인 면역 반응이 진행됨을 알 수 있었고 타사제품과 비교하여 Rapid kit 국내제품(SD사) 대비 10~100배 LOD 민감도가 우수한 성능, 형광면역 해외제품(Quidel사) 대비 동등한 결과로 산출되었다.

[0146] (3) Influenza B

[0147] Influenza B 항원은 Yamagata 계통과 Victoria 계통에 대하여 모두 진단할 수 있는 목적으로 개발되었으며 이를 위한 LOD 평가는 비교장비로 Rapid kit 국내제품(SD사), 형광면역 해외제품(Quidel사) 와 함께 비교분석

하였고, Yamagata 계통의 Strain: Massachusetts/2/12과 Victoria계통의 Strain: Brisbane/60/08로 실시하였다.

표 13

[0148]

Strain: Massachusetts/2/12 (TCID ₅₀ /ml)		10 ^{5.07}	10 ^{4.07}	10 ^{3.07}	10 ^{2.07}	10 ^{1.07}	10 ^{0.07}	10 ^{-0.93}
실시예 3		Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)
타사비교장비	Rapid kit (S사)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	형광면역장비(Q사)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)	Neg(-)

표 14

[0149]

Strain: Brisbane/60/08 (TCID ₅₀ /ml)		10 ^{5.07}	10 ^{4.07}	10 ^{3.07}	10 ^{2.07}	10 ^{1.07}	10 ^{0.07}	10 ^{-0.93}
실시예 3		Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)	Neg(-)
타사비교장비	Rapid kit (S사)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	형광면역장비(Q사)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Pos(+)	Neg(-)

[0150] 위의 표 13 및 표 14의 결과에서와 같이 Influenza B에 대한 Yamagata과 Victoria계통에 대한 특이적인 면역반응이 진행됨을 알 수 있었고 타사제품과 비교하여 Rapid kit 국내제품(SD사) 대비 10~100배 LOD 민감도가 우수한 성능, 형광면역 해외제품(Quidel사) 대비 10배~1/10배 민감도성능으로 동등한 결과로 산출되었다.

[0152] [실험예 3] 다양한 Virus 및 Bacteria를 이용한 교차반응 성능평가

[0153] Zeptomatrix - NIBSC 등에 구매된 교차반응-상용패널을 이용하여 비특이 반응에 대한 테스트를 진행하였다. 검체의 농도는 Virus: 10⁵ TCID₅₀/ml, Bacteria: 10⁶ CFU/ml 이상의 고역가로 테스트를 진행하였다.

표 15

검체 종류			술-겔 동시검출 키트			
대분류	소분류	농도	MERS-CoV (spike protein)	MERS-CoV (Nucleocapsid protein)	Influenza A	Influenza B
Virus	Adenovirus type 1	3.16 x 10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Adenovirus type 2	5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Adenovirus type 7	1 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Influenza A H1N1 California/07/09	1.41 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	Neg(-)	Neg(-)	Pos(+)	Neg(-)
	Influenza A H3N2 Brisbane/10/07	1.41 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	Neg(-)	Neg(-)	Pos(+)	Neg(-)
	Influenza B Florida/07/04	2.45 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Pos(+)
	Cytomegalovirus (CMV) Strain: AD-169	1 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Coronavirus Strain: OC43	1 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Coronavirus Strain: 229E	1 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Enterovirus Type 71 (2003 Isolate)	1 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Epstein Barr Virus (EBV)	2.47 x 10 ⁹ copies/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Parainfluenza Virus Type 1	1 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Parainfluenza Virus Type 2	1 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Parainfluenza Virus Type 3	1 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Measles virus	5 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Human Metapneumovirus(hMPV)20 Type A2	1 x 10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Mumps virus	5 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Respiratory syncytial virus Type B	1 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Rhinovirus	5 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
	Bacteria	<i>Bordetella pertussis</i> E431	4.33 x 10 ⁹ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Escherichia coli</i>		3 x 10 ⁹ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Haemophilus influenzae</i>		1 x 10 ⁶ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Moraxella catarrhalis</i> Ne 11		1.38 x 10 ⁸ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		1.36 x 10 ⁶ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Neisseria meningitidis</i>		1 x 10 ⁶ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1 x 10 ⁶ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1 x 10 ⁶ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		1 x 10 ⁶ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Streptococcus pyogenes</i>		1 x 10 ⁶ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Streptococcus salivarius</i>		1 x 10 ⁶ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)
<i>Staphylococcus aureus</i>		1 x 10 ⁶ CFU/ml	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)	Neg(-)

[0154]

[0156]

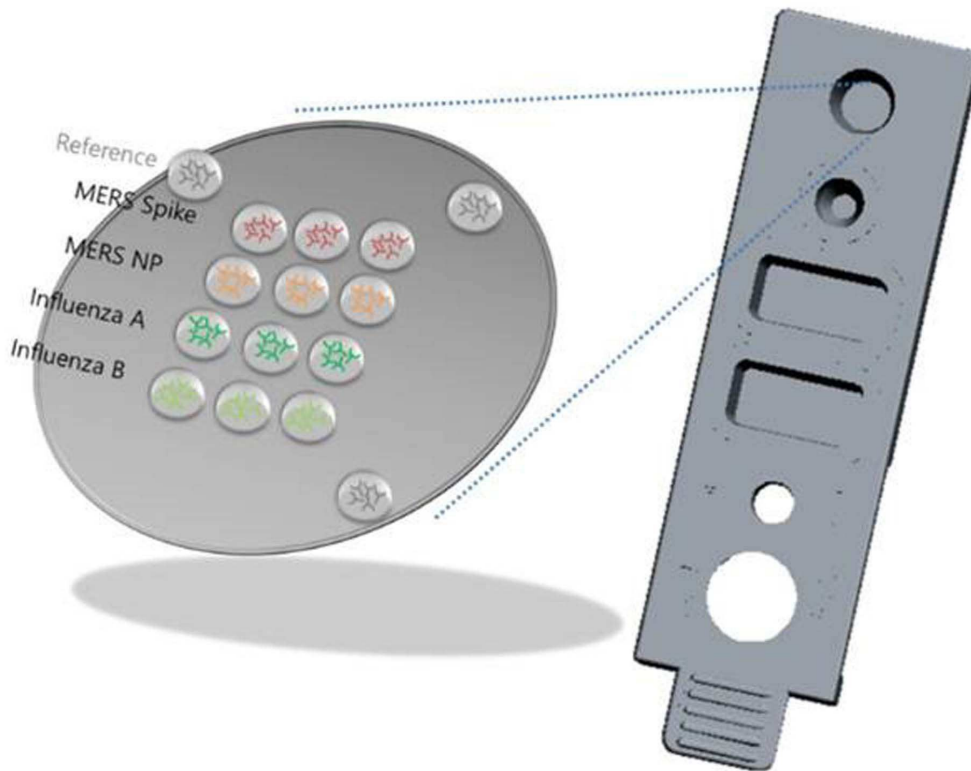
위의 표 15의 결과에서와 같이 다중동시진단 키트로 구성된 술-겔 항체 스팟에서 19종의 Virus와 12종의 Bacteria의 고역가 검체에서 비특이 면역반응이 없으며, 특이적인 항원 (Influenza A/B 에서만) 면역반응이 일부 진행됨을 확인하였으며, 이를 통해 선택적인 항원에만 반응이 진행됨을 확인하였다.

[0158]

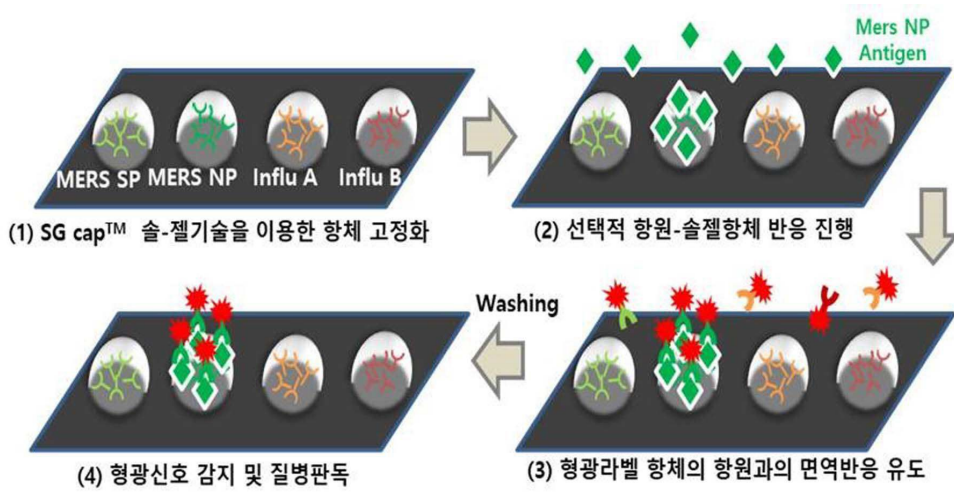
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

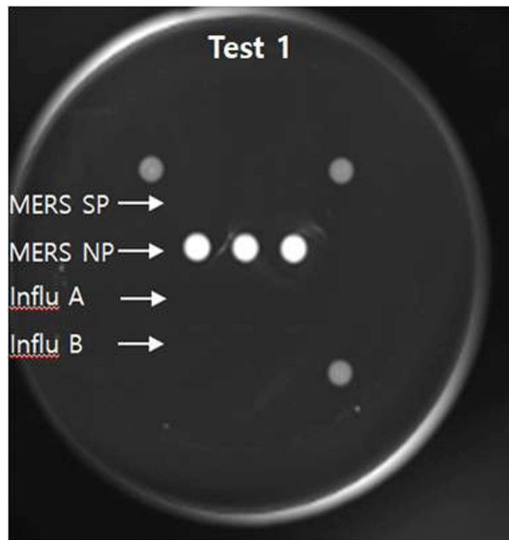
도면1



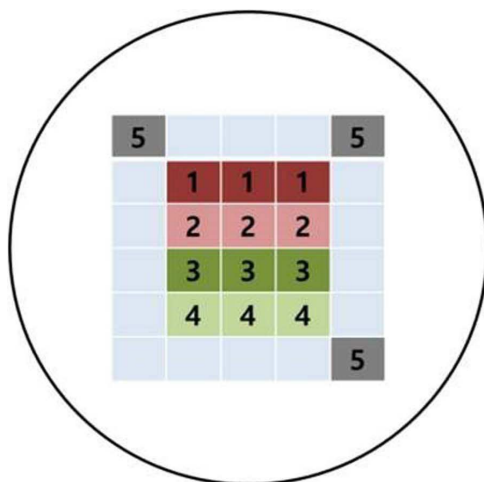
도면2



도면3



도면4



- 1 : MERS-CoV (spike protein)
- 2 : MERS-CoV (Nucleocapsid protein)
- 3 : Influenza A
- 4 : Influenza B
- 5 : Reference