

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 10월 22일 (22.10.2015)

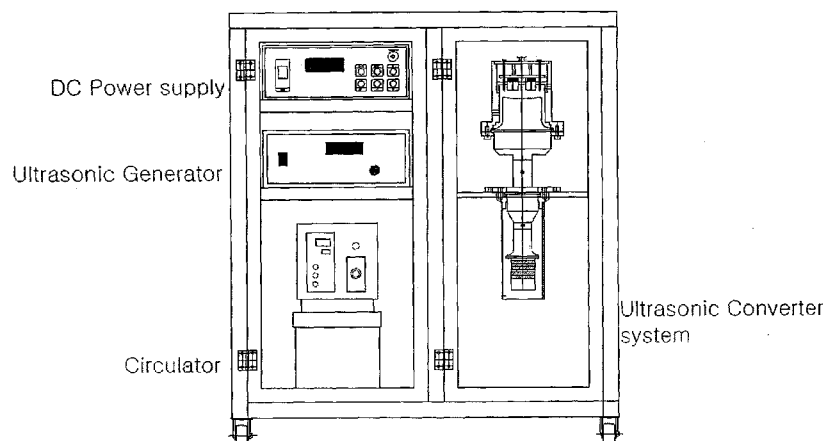


(10) 국제공개번호
WO 2015/160007 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) G01N 29/22 (2006.01)
G01N 29/44 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/003340
- (22) 국제출원일: 2014년 4월 17일 (17.04.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0045783 2014년 4월 17일 (17.04.2014) KR
- (71) 출원인: 한림대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) [KR/KR]; 200-702 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교 (옥천동), Gangwon-do (KR).
- (72) 발명자: 박영재 (PARK, Young Jae); 431-815 경기도 안양시 동안구 관평로 170 번길 15 (관양동), Gyeonggi-do (KR). 박정호 (PARK, Jeong Ho); 431-815 경기도 안양시 동안구 관평로 170 번길 15 (관양동), Gyeonggi-do (KR). 최은경 (CHOI, Eun Kyoung); 431-815 경기도 안양시 동안구 관평로 170 번길 15 (관양동), Gyeonggi-do (KR). 김용선 (KIM, Yong Sun); 431-815 경기도 안양시 동안구 관평로 170 번길 15 (관양동), Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 강성혜 (KANG, Seong-Hea); 305-340 대전시 유성구 대덕대로 530, 다-205 (도룡동), Daejeon (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING INFINITESIMAL PATHOGENIC PRION PROTEIN

(54) 발명의 명칭 : 극미량 병원성 프리온 단백질 검출방법 및 장치



(57) Abstract: The present invention relates to a method for infinitesimal diagnosis of a transmissible spongiform encephalopathy (also known as prion disease) which uses an improved ultrasonic apparatus and, more specifically, improves detection ability by amplifying an infinitesimal pathogenic prion protein by applying electricity to an improved ultrasonic apparatus. It has been confirmed that the ultrasonic apparatus of the present invention improves amplification of a pathogenic prion protein by improving the existing protein misfolding cyclic amplification (PMCA) function, and can detect more minute amounts compared to the existing PMCA condition by modifying the upper cross section of a vial and a horn made of a glass material to be a curved surface in order to increase cavitation.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/160007 A1



본 발명은 개선된 초음파 장비를 이용한 전염성해면상뇌증(일명; 프리온 질환)의 극미량 진단법에 관한 것으로서, 좀 더 상세하게는 개선된 초음파 장비에 전기를 인가함으로써 극미량의 병원성 프리온 단백질을 증폭하여 검출능력을 향상시킨 것이다. 본 발명의 초음파 장비는 기존 PMCA(Protein misfolding cyclic amplification) 기능을 향상시켜 병원성 프리온 단백질의 증폭을 향상시켰고, 뿐만 아니라, 공동현상(cavitation)을 증가시키기 위하여 유리 재질의 바이알 및 혼상부 단면을 곡면으로 개조하여 기존 PMCA 조건보다 더욱 극미량 검출이 가능함을 확인하였다.

명세서

발명의 명칭: 극미량 병원성 프리온 단백질 검출방법 및 장치 기술분야

- [1] 본 발명은 개선된 초음파 장치를 이용한 전염성해면상뇌증(프리온 질환)의 극미량 진단법에 관한 것으로서, 좀더 자세하게는 개선된 초음파 장비를 통하여 극미량의 병원성 프리온 단백질을 증폭하여 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 크로이츠펔트 야콥병(CJD) 진단은 특징적인 임상적 증상과 함께 뇌파/뇌척수액/방사선 검사 및 임상 경과를 지켜보고 실험실적 검사방법을 통해 확진을 수행한다. 실험실적 진단으로는 뇌척수액에서 14-3-3 단백질 검출, CJD 환자의 뇌와 편도 조직에서 PrP^{Sc} 검출, 프리온 유전자의 염기서열 분석 및 조직병리학적 검사가 이루어진다. 하지만, 이 모든 진단법은 질병 발병 후 진단 및 확진을 위한 검사법으로서 사전 예방을 위한 조기진단은 불가능한 것이 현실이다. 또한 혈액 수혈로 인한 CJD 감염은 프리온 질환의 조기진단 연구가 시급함을 부각시켰다.
- [3] 국내에서 인간 프리온 질환의 확진은 병에 걸린 환자가 사망한 후 뇌조직에서 PrP^{Sc} 검출을 통해서만 이루어지고 있다. 하지만, CJD에 걸려 사망한 환자의 부검은 기피되고 있으며, CJD에 감염된 초기에는 PrP^{Sc}가 충분히 축적되지 않아 진단에 어려움이 있다. 따라서, 극미량 PrP^{Sc}의 검출한계 문제점을 해결하기 위하여 민감도와 정확성이 높은 진단기술을 개발하려는 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구의 결과들로서 병원성 PrP^{Sc}를 증폭시켜 진단이 가능하도록 한 PMCA(protein misfolding cyclic amplification) 기법, 면역-PCR 기법, QUIC 반응(Quaking-induced conversion) 등의 최신 검출 분석법이 연구되고 있다(Aguzzi A. et al., *Annu Rev Neurosci.*, 2008, 31, 439-477).
- [4] PMCA(protein misfolding cyclic amplification) 기법은 2001년 Claudio Soto 연구진이 Nature에 발표한 이후, PMCA 장치를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다(Saborio G.P., et al., *Nature*, 2001, 411, 810-813). 뇌조직보다 구하기 쉬운 시료(뇌척수액, 혈액, 소변 등)에서 진단할 수 있도록 민감도와 정확성이 높은 진단기술 개발연구가 진행되었는데, 2004년 이후로는 PMCA를 이용한 조기진단 검출법에 관한 논문이 발표되고 있으며, 실험동물 혈액에서 조기진단이 가능한 것으로 발표되었다. 2007년 일본 Yuichi Murayama 연구진과 2008년 Claudio Soto 연구진은 실험동물 소변으로부터 PrP^{Sc} 검출에 관한 논문을 발표하였다. PMCA를 이용한 변형 프리온의 증폭은 인간 프리온 병원체의 확인 및 극미량 검출을 가능하게 만들었다(Saa P. et al., *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 35245-35252). 2011년 미국의 Baskakov 연구진은 PMCAb 기법을 발표하였는데, 이는 PMCA 과정에서 테플론 비드(Teflon beads)를 첨가함으로써 PrP^{Sc}

단편화(fragmentation)의 효율을 증가시켜 변형 프리온 단백질의 증폭을 개선한 것이다(Gonzalez M. N. et al., *PLoS Pathog.*, 2011, 7(2), 1-10). PMCAb 기법을 CWD의 증폭에 관하여 실험한 결과, 변형프리온 단백질이 효과적으로 증폭됨을 확인하였다(Johnson C. J. et al., *PLoS ONE*, 2012, 7(4), 1-7).

- [5] PMCA 원리를 이용한 장치는 Claudio Soto 연구진과 미국 Misonix사와 제휴로 자동화된 PMCA 모델을 판매 중에 있으며(Castilla J. et al., *Methods Enzymol.*, 2006, 412, 3-21), 전세계의 많은 과학자들이 Misonix사의 자동화 PMCA 장치를 연구에 이용하고 있다. 따라서 본 발명자들도 'Misonix Model 4000'을 구입하여 실험을 진행하였으나 혼(horn)의 부식(corrosion), 컵혼(cup horn)의 온도 불균일(공냉식열유지기 방식), 출력과워 등의 문제점이 발생하였다.
- [6] 이를 해결하기 위해서 본 연구진은 2011년 "극미량 병원성 프리온 단백질 검출방법 및 장치"라는 명칭으로 대한민국특허 제1098185호를 등록하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 상기 지적인 종래 PMCA 장치의 문제점을 개선하여 배양과정 동안 증폭 효과를 높인 극미량 병원성 프리온 단백질 검출방법 및 장치를 제공하려는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 초음파 처리 과정 동안 공동현상(cavitation)을 증가시키기 위해서 시료 튜브 재질로서 유리를 선택하고, 혼 단면을 곡면으로 제작함으로써 기존 PMCA보다 더욱 병원성 프리온 단백질을 효과적으로 증폭하려는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명자들은 PMCA 배양과 초음파 처리 사이클의 반복 과정 중에서 배양 과정 동안 음극과 양극에 전기적 에너지(electric energy)를 인가하여 병원성 프리온 단백질의 증폭을 향상시켰다 (이하 본 발명에서는 종래 PMCA 기술에 배양 과정 동안 전기적 에너지를 인가하는 기술을 "ePMCA"와 혼용한다). 뿐만 아니라, 초음파의 공동현상(cavitation)을 증가시키기 위해서 유리재질의 바이알 및 혼 단면을 곡면으로 제작하였으며, 완충액과 계면활성제 첨가제의 적절한 조합으로 기존 PMCA 조건보다 향상된 증폭 기술로 극미량 병원성 PrP^{Sc}의 검출이 가능함을 확인하였다.

발명의 효과

- [10] 상술한 바와 같이, 본 발명은 자동화된 ePMCA 장치를 이용한 극미량 병원성 프리온 단백질 검출을 하고자 노력한 결과, 기존 PMCA 장치에서 압전소자, 혼(horn), 부스터(booster), 컨버터(converter)등 초음파를 발생시키는 소자를 개선하였으며, 공동현상을 증가시키기 위하여 유리재질의 시료 튜브 및 혼 단면을 곡면으로 개조하였으며, 수냉식 열유지기(항온순환시스템)를 장착하여 온도조절을 용이하게 하여 프리온 단백질 검출 한계를 향상시켰다.

- [11] 또한, 본 발명은 완충액으로서 MES, PIPES, ACES, MOPSO, TES, HEPES 및 HEPPS 중 1종 이상을 이용하였으며 농도는 50 ~ 500mM를 사용하여 프리온 단백질의 검출한계를 더욱 향상시켰다.
- [12] 또한, 본 발명은 0.5 ~ 2% 함량의 Tween 80, Triton X-100, Brij, Lubrol, PEG 등의 비이온 계면활성제를 첨가하여 실험한 결과 더욱 극미량의 병원성 프리온 단백질 검출이 가능하였다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 본 발명의 단백질 미스폴딩 사이클 증폭장치(ePMCA와 혼용함)를 개략적으로 도시한 것이다.
- [14] 도 2의 좌측은 본 발명자들의 특허 제1098185호에 의한 단백질 미스폴딩 사이클 증폭장치 중 초음파 컨버터 시스템을 나타내는 것이고, 우측은 혼 상측 단면을 중앙이 오목한 곡면으로 형성한 것을 도시한 것이다.
- [15] 도 3의 좌측은 본 발명자들의 특허 제1098185호에 의한 단백질 미스폴딩 사이클 증폭장치 중 초음파 컨버터 시스템을 나타내는 것이고, 우측은 혼 상측 단면을 중앙이 오목한 곡면으로 형성하고, 컵혼 수조 내에 전기를 지속적으로 인가할 수 있도록 음극과 양극을 설치한 상태를 도시한 것이다.
- [16] 도 4는 본 발명에 의한 단백질 미스폴딩 사이클 증폭장치(ePMCA)의 항온순환시스템의 개략도를 도시한 것이다.
- [17] 도 5는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification)을 위한 PrP^C와 PrP^{Sc} 시료 제조 후 예비실험으로 웨스턴 블롯을 수행한 것이다. PrP^C 및 PrP^{Sc}를 농도별 단백질 분해효소(PK)로 처리한 다음 웨스턴 블롯한 결과이다. PK: 단백질 분해효소, +: 처리함, -: 처리하지 않음.
- [18] 레인 1, 0.05% PrP^C, PK 처리하지 않은 것;
- [19] 레인 2, 10% PrP^C, PK 50 μ g/ml 처리한 것;
- [20] 레인 3, 10% PrP^C, PK 100 μ g/ml 처리한 것;
- [21] 레인 4, 10% PrP^C, PK 200 μ g/ml 처리한 것;
- [22] 레인 5, 0.05% PrP^{Sc}, PK 처리하지 않은 것;
- [23] 레인 6, 0.1% PrP^{Sc}, PK 50 μ g/ml 처리한 것;
- [24] 레인 7, 0.1% PrP^{Sc}, PK 100 μ g/ml 처리한 것;
- [25] 레인 8, 0.1% PrP^{Sc}, PK 200 μ g/ml 처리한 것;
- [26] 레인 9, 0.5% PrP^{Sc}, PK 50 μ g/ml 처리한 것;
- [27] 레인 10, 0.5% PrP^{Sc}, PK 100 μ g/ml 처리한 것;
- [28] 레인 11, 0.5% PrP^{Sc}, PK 200 μ g/ml 처리한 것.
- [29] 도 6은 본 발명의 장치(ePMCA), 본 연구진의 한국특허 제1098185호에 의한 장치(ilsong-PMCA) 및 Misonix-PMCA 장치를 이용한 비교분석 실험이다. PrP^C는 recHamPrP(recombinant Hamster Prion Protein)를 사용하였다. PrP^{Sc}는 263K에 감염된 햄스터 뇌조직을 균질화하고, 각각의 농도(10^{-6} ~ 10^{-30})로 만들어 실험을

수행하였다. PrP^C로 100 μ g/ml recHamPrP를 사용하고, PrP^{Sc}를 계속 1/100의 농도로 희석한 것을 PrP^C에 첨가하여 ePMCA, ilsong-PMCA 및 Misonix-PMCA를 수행하였다. 도 6a는 ePMCA 장치를 이용한 실험으로서, 레인 1은 100 μ g/ml recHamPrP에 0.001%(10⁻⁵) PrP^{Sc}를 넣고 1.5 라운드를 수행하였다. 레인 2 ~ 15는 0.0001%(10⁻⁶) PrP^{Sc}를 계속 1/100씩 희석한 것을 100 μ g/ml recHamPrP에 첨가하여 ePMCA를 수행한 결과를 보여준다. ePMCA는 10⁻³⁰의 농도에서 검출됨을 확인하였다. 이는 ePMCA 장치가 가장 증폭이 잘 되는 것을 확인한 결과이다. 도 6b는 ilsong-PMCA 장치를 이용한 실험으로서, 레인 1은 100 μ g/ml recHamPrP에 0.001%(10⁻⁵) PrP^{Sc}를 넣고 1.5 라운드를 수행하였다. 레인 2 ~ 8은 0.0001%(10⁻⁶) PrP^{Sc}를 계속 1/100씩 희석한 것을 100 μ g/ml recHamPrP에 첨가하여 ePMCA를 수행한 결과를 보여준다. ilsong-PMCA는 10⁻¹⁸의 농도에서 검출됨을 확인하였다. 도 6c는 Misonix-PMCA 장치를 이용한 실험으로서, 레인 1은 100 μ g/ml recHamPrP에 0.001%(10⁻⁵) PrP^{Sc}를 넣고 1.5 라운드를 수행하였다. 레인 2 ~ 8은 0.0001%(10⁻⁶) PrP^{Sc}를 계속 1/100씩 희석한 것을 100 μ g/ml recHamPrP에 첨가하여 ePMCA를 수행한 결과를 보여준다. Misonix-PMCA는 10⁻¹²의 농도에서 검출됨을 확인하였다. PK: 단백질 분해효소, +: 처리함, -: 처리하지 않음.

- [30] 도 7은 본 발명의 ePMCA 장치의 시제품 사진이다. 우측 상, 하 두 개의 사진과 좌측 하단의 사진은 모두 시료 튜브를 꽂는 튜브 랙의 상측을 확대한 사진이며, 음극과 양극이 설치되어 있음을 볼 수 있다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명은
- [32] (a) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,
- [33] (b) 시료와 비병원성 이형태체를 항온처리하여 배양함에 있어서 전기에너지를 가하고,
- [34] (c) 상기 (a) 또는 (b) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,
- [35] (c) 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 상기 (b) 단계 및 (c) 단계는 (d) 단계 실시예 앞서 2회 이상 반복 실시되는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification)을 수행하기 위하여 초음파 발생기, 컨버터, 부스터 및 혼을 포함하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭장치에 있어서,
- [36] 상기 (c)의 응집체를 분해하는 단계를 수행하기 위하여 초음파를 발생시키기 위해 전기 에너지를 제공하는 초음파 발생기,
- [37] 상기 초음파 발생기에 의해 제공되는 전기 에너지를 초음파 진동으로 변환시키는 압전소자를 포함하는 컨버터,
- [38] 상기 컨버터에 의해 변환된 초음파 진동을 증폭시키는 부스터,
- [39] 상기 부스터에 의해 증폭된 초음파 진동을 시료에 전달하는 혼,

- [40] 상기 혼의 상부에 결합되며 그 내부에 항온수조가 형성되어 시료를 항온처리할 수 있는 컵혼 수조,
- [41] 상기 컵혼 수조 상부에 시료가 든 시료 튜브를 위치시키는 튜브 랙 및
- [42] 상기 컵혼 수조에 물을 공급하고 배출시키는 항온순환시스템과,
- [43] 상기 (b) 단계의 배양 과정에서 직류 전기를 공급하기 위하여 전기적 에너지(electric energy)를 지속적으로 인가하는 직류전기 공급부재와,
- [44] 컵혼 수조 내에 상기 직류전기 공급부재와 각각 연결되는 음극과 양극을 포함함을 특징으로 하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 장치를 제공한다.
- [45] 또한, 본 발명에서 상기 항온순환시스템은 컵혼 수조의 물 또는 시료의 온도를 측정하는 온도센서를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [46] 또한, 본 발명에서 상기 시료 튜브는 유리 재질인 것을 특징으로 한다. 시료 튜브가 유리 재질인 경우, 폴리프로필렌 등의 합성수지 재질인 경우보다 열 전도도가 높아 증폭 효율이 증대된다.
- [47] 또한, 본 발명에서 상기 혼의 상측 단면은 중앙부가 오목하도록 곡면으로 형성된 것을 특징으로 한다. 혼의 상측 단면이 곡면이 아니라 평면인 경우 튜브 랙에 여러 개의 시료를 담은 시료 튜브가 있을 때는 혼을 통해서 시료 튜브에 전달되는 초음파가 균일하지 않고, 중앙에 위치한 시료 튜브에만 강한 초음파가 전달되기 때문에 이러한 문제를 해결하기 위하여 혼의 상측 단면을 중앙부가 오목한 형태로 제조하였다. 중앙부가 오목해진 혼의 상측 단면은 공동 현상(cavitation)이 활발하게 일어나 더 강한 초음파를 시료에 전달할 수 있어 증폭 효율을 증대시킨다.
- [48] 또한, 본 발명은
- [49] (a) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,
- [50] (b) 시료와 비병원성 이형태체를 항온처리하는 배양 과정에서 음극과 양극 사이에 직류전기를 지속적으로 가하고,
- [51] (c) 상기 (a) 또는 (b) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,
- [52] (d) 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 상기 (b) 단계 및 (c) 단계는 (d) 단계 실시예 앞서 2회 이상 반복 실시되는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 방법으로 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법을 제공한다. 이때 직류전기는 DC 5~50V 및 10~100W의 범위가 바람직하며, 가장 바람직하게는 24V/30W이다. 직류전기 에너지가 너무 강하면 장비가 부식되기 쉽고, 너무 약하면 증폭 효율이 저하된다.
- [53] 또한, 본 발명은 상기 방법에서 완충액으로서 pH 7.0~8.0의 술폰산 함유 완충액을 가하는 것을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.

- [54] 또한, 본 발명은 상기 술폰산 함유 완충액이 2-(*N*-모르폴리노)에탄술폰산(MES), 피페라진-*N,N'*-비스(2-에탄술폰산)(PIPES), *N*-2-아세트아미도-2-아미노에탄술폰산(ACES), 3-(*N*-모르폴리노)-2-히드록시프로판술폰산(MOPSO), *N*-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술폰산(TES) 및 *N*-2-히드록시에틸피페라진-*N'*-2-프로판술폰산(HEPPS)으로 이루어진 군 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [55] 또한, 본 발명은 상기 완충액에 비이온 계면활성제를 임계 마이셀 농도 이하 혹은 이상을 첨가하는 것을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.
- [56] 또한, 본 발명은 상기 비이온 계면활성제가 Tween 80, Triton X-100, Brij, Lubrol 및 폴리에틸렌글라이콜로 이루어진 그룹 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [57] 또한, 본 발명은 상기 비이온 계면활성제가 0.5~2%(w/w) 범위임을 특징으로 한다.
- [58] 본 발명의 개선된 PMCA(protein misfolding cyclic amplification) 방법은
- [59] (a) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,
- [60] (b) 시료와 비병원성 이형태체를 향한 배양하면서, 양극과 음극 간에 지속적으로 직류전기를 인가하고,
- [61] (c) 상기 (a) 또는 (b) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,
- [62] (d) 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 통상 상기 (b) 단계 및 (c) 단계는 (d) 단계 실시애 앞서 2회 이상 반복 실시된다. 상기 향한 배양 과정에서 직류전기를 지속적으로 인가하였다. 상기 응집체 분해 단계는 일반적으로 초음파를 이용하여 수행된다. 종래 PMCA 장치도 초음파를 이용하여 응집체를 분해하는 방식을 채택하고 있다.
- [63] 본 발명의 개선된 PMCA 장치는 상기 (c)의 응집체를 분해하는 단계를 수행하기 위하여 초음파를 발생시키기 위해 전기에너지를 제공하는 초음파 발생기, 상기 초음파 발생기에 의해 제공되는 전기 에너지를 초음파 진동으로 변환시키는 컨버터, 상기 컨버터에 의해 변환된 초음파 진동을 증폭시키는 부스터, 상기 부스터에 의해 증폭된 초음파 진동을 시료에 전달하는 혼, 상기 혼의 상부에 결합되며 그 내부에 항온수조가 형성되어 시료를 항온처리할 수 있는 컵혼 수조, 상기 컵혼 수조에 물을 공급하고 배출시키는 항온순환시스템, 상기 컵혼 수조 상측에 시료 튜브가 위치하도록 고정시키는 튜브 랙을 포함하여 구성된다.
- [64] 본 발명자들은 컨버터에 사용할 압전소자로서 전기기계 결합계수 및 기계적 품질계수 값이 커서 내구성이 우수하고 고효율을 생산할 수 있는 압전소자를 선택하였다. 이 압전소자는 전기에너지를 기계적 진동으로 변환시키는 소자

중에서 PbO, TiO₂, ZrO₂, Sb₂O₃, Nb₂O₅ 및 MnO₂ 등의 복합 압전소자 재료를 선정하였다. 복합 압전소자에 알루미늄 또는 스테인레스 스틸 등의 금속재질로 된 초음파 방사면을 접착시키고, 통상적으로 60Hz의 전기 신호를 인가하면 20KHz 주파수의 진동이 발생하며, 0 ~ 2000W까지 출력파워 조절기능을 할 수 있도록 컨버터(converter)를 구성하였다. 이 컨버터에 가늘고 긴 금속으로 된 프로브(probe)를 부착시키면 진동이 프로브를 따라 지나면서 진동의 세기가 증폭되게 되는데, 부스터(booster) 및 혼(horn)은 티타늄(titanium) 재질 등으로 만들어 강한 컨버터의 출력을 증폭시키는 소재로 사용하였다. 부스터에 의하여 강력하게 증폭된 초음파는 컵혼(cup horn) 속의 용액으로 퍼져나가도록 설계되었다. 상세한 도면은 도 1에 나타내었다.

- [65] 종래 PMCA 장치는 37°C로 30분간 유지되는 상태에서 포텐시(potency) 40~60% 초음파를 40초 인가하는 것을 1 사이클(cycle)로 한다. 통상 96사이클을 1라운드(round)로 하여 이틀간 실시한다. Misonix 사의 PMCA 장치는 모두 37°C가 유지되는 인큐베이터(incubator) 내에 넣어 1, 2, 3, ... 라운드를 계속 진행하여 실험하며, 때로는 15일에서 30일까지 계속적으로 사이클을 돌린다. Misonix사의 PMCA 장비는 공랭식 열유지 방식으로 온도를 유지하게 된다. 프리온 단백질의 증폭이 잘 일어나게 하기 위해서 Supattapone 연구진이 4°C, 25°C 그리고 37°C에서 PMCA 실험을 진행한 결과 37°C에서 가장 좋은 증폭결과를 얻었다(Lucassen R. et al., *Biochemistry*, 2003, 42, 4127-4135). 그리하여 본 발명자들은 Misonix사의 PMCA 장치를 인큐베이터에 넣어 실험할 때 발생할 수 있는 온도 변화에 의한 실험적 오차를 개선하고자 하였으며, 균일한 온도조건을 제공할 수 있는 수냉식 열유지 방식의 항온순환시스템을 혼 및/또는 컵혼에 장착하는 것을 발명하였다. 도 1과 같이 컵혼 내부의 항온수조에 물이 들어가고 나오는 입수관과 출수관을 컵혼 수조 외부에 형성하였으며, 컵혼 수조를 혼의 아래 부분과 밀착시켜 혼의 중간 부분에서 컵혼 수조 표면까지 물이 지속적으로 흐르도록 제작하였으며, 초음파가 발생하는 동안 시료에 영향을 주지 않도록 고안하였으며, 온도에 의한 실험 오차를 줄였다. 또한 컵혼 수조 내 물의 온도를 실시간 점검 및 조절할 수 있도록 온도센서를 컵혼 수조에 장착하여 고온으로 인한 단백질 변성을 억제할 수 있도록 하였으며, 온도를 유지하며 초음파 소음을 억제할 수 있는 보호 박스(protection box)도 일체형으로 이동이 가능하게 부가할 수 있다. 또한, 본 발명에서는 평면의 혼 모양을 초음파가 균일하게 전달되도록 구형으로 그 각도를 조절하였다.

- [66] 본 발명자들이 특허 제1098185호를 통하여 종래 PMCA 장치와 본 발명자들이 앞서 개선한 ilsong-PMCA 장치를 이용하여 프리온 단백질 증폭을 비교 검증하는 실험을 진행한 결과, ilsong-PMCA 장치가 기존 Misonix사의 장치보다 검출한계가 향상됨을 확인하였다(특허 제1098185호 공보 참조). 이는 개선된 PMCA 장치가 균일한 온도를 유지하여 초음파 인가 후 발생하는 고온으로부터 사용자가 설정한 온도까지 즉시 바꾸어 유지시키므로 고온에 의한 단백질

변성을 억제하여 주기 때문이다. 또한, 컨버터의 압전소자에서 초음파 강도를 0 ~ 2000W까지 다양하게 설정할 수 있으므로 종래 PMCA 장치(최대 600W 파워출력)보다 강한 초음파 인가가 가능하다.

- [67] 본 발명자들은 또한 특허 제1098185호 등록공보에서, 종래 PMCA 방법에서 사용하던 CB(conversion buffer)(PBS, 0.15M NaCl, 1% Triton X-100, 완전 프로테아제 저해제 각테일, pH 7.0 ~ 7.3)를 가한 동일한 조건에서 종래 PMCA 장치 및 개선된 PMCA 장치로 실험한 것을 웨스턴 블롯팅 하여 프리온 단백질 검출 결과를 살펴 보았을 뿐만 아니라, PMCA 장비에서 PrP^{Sc}의 검출한계를 개선하고자 완충액 및 계면활성제를 다양하게 첨가하여 실험하여 보았다. 먼저, PMCA 방법에 우선적으로 적용되던 CB(conversion buffer)인 PBS를 다른 완충액으로 바꾸어 실험을 진행하였다. 2-(N-모르폴리노)에탄술포산(MES), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술포산)(PIPES), N-2-아세트아미도-2-아미노에탄술포산(ACES), 3-(N-모르폴리노)-2-히드록시프로판술포산(MOPSO), N-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술포산(TES), N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-프로판술포산(HEPPS) 등을 이용하였다. PBS가 아닌 MES, PIPES, ACES, HEPES, MOPS, CHES 등의 완충액으로 바꾸어 실험한 결과, 프리온 단백질 검출한계가 더욱 향상되어, 극미량 PrP^{Sc}를 검출할 수 있었다.

- [68] 본 발명자들은 프리온 단백질 검출 한계를 더욱 높이기 위하여 첨가제로서 계면활성제를 가하였다. 계면활성제는 계면에 흡착하여 계면장력을 현저히 저하시키는 물질로서 용도에 따라 유화제(emulsifier), 가용화제(solubilizer), 습윤제(wetting agent), 세정제(detergent)라 불린다. 구조적으로 β -시트의 구성이 높아 용해도(solubility)가 낮은 PrP^{Sc}에 계면활성제를 가하는 경우 PrP^{Sc}의 용해도를 높일 것으로 예상하여 계면활성제를 소량 첨가하여 PrP^{Sc}의 용해도를 증가시키므로써 정상 프리온과 변형 프리온의 접촉을 용이하게 하며, PMCA 기법을 적용하는 동안 접촉된 PrP^C가 PrP^{Sc}로 전환이 잘 되도록 만들어주었다. 그리하여 변형 프리온 단백질의 용해도를 증가시키기 위하여 소량의 계면활성제를 첨가하면 배양 → 초음파 분쇄의 1사이클 진행과정에서 더욱 많은 PrP^C가 PrP^{Sc}로 전환되었다는 결과를 얻었다. 하지만, 임계 마이셀농도(critical micelle concentration, CMC) 이상의 농도에서는 수중유형(O/W) 형태의 마이셀(micelle)을 형성하여 PrP^C와 PrP^{Sc}의 접촉을 마이셀이 억제하는 작용을 할 수 있다. 따라서 계면활성제의 농도가 증가하면 계면활성제의 분자 또는 이온 몇몇이 회합체를 형성하여 용해되며 다양한 회합콜로이드가 형성된다. 이 회합체를 마이셀이라고 하는데 이는 CMC 이상의 농도에서 형성된다. CMC를 경계로 계면활성제의 용해 상태가 용액에서 회합콜로이드로 변하기 때문에 표면장력, 총괄성질 등 용액의 물리화학적 성질이 현저히 변화한다. 본 발명자들은 CMC 농도 이상의 계면활성제를 가한 경우에 PrP^C에서 PrP^{Sc}로의

전환이 억제된다는 실험결과를 얻었다. 이는 CMC 이상으로 과량 첨가된 계면활성제는 마이셀을 형성하기 때문에 정상 프리온 단백질과 변형 프리온 단백질의 접촉을 억제하는 것으로 보인다. Tween 80, Triton X-100, Brij, 루브롤(Lubrol), PEG 등의 비이온 계면활성제는 1~2% 농도로 첨가하면 프리온 단백질 검출한계가 향상됨을 확인하였다(특히 제1098185호 등록공보 참조).

발명의 실시를 위한 형태

- [69] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [70]
- [71] 실시예 1: 본 발명의 장치(ePMCA)
- [72] 본 발명자들은 초음파 진동자(ultrasonic transducer)로 이용하기 위하여 세라믹 압전소자 중에서 PbO, TiO₂, ZrO₂, Sb₂O₃, Nb₂O₅ 및 MnO₂ 등의 복합 압전소자 재료를 선정하였다. 60Hz의 전기 신호를 주면 20KHz의 주파수가 나오며, 0~2000W까지 출력과위를 조절할 수 있도록 컨버터를 구성하였다. 부스터 및 혼은 티타늄 소재로 제작하였다. PMCA 원리를 적용하기 위하여 종래 기술과 같이 인큐베이터 장치 내에 PMCA 장치를 넣어 배양 과정을 진행시키는 것이 아니라, 컵혼 수조에서 원하는 온도가 균일하게 잘 적용되도록 항온순환시스템을 적용하여 특히 제1098185호 ilsong-PMCA 장치를 제작하였다. 컵혼 수조에 급수 및 배수관을 연결하고 유속을 조절할 수 있도록 하였다. 또한 온도 센서를 컵혼 수조에 장착하여 온도 변화를 최소화하며 실시간으로 수조의 수온을 측정하였다. 시료는 수조에 담겨있으므로 수조의 수온과 시료의 온도는 같다고 볼 수 있다. 실제로 초음파가 인가된 후 시료의 온도는 고온(50~60°C)을 나타낸다. 따라서 고온에서 단백질의 변성, 수분의 증발로 인한 불균일한 증폭 등의 문제점을 해결하고자 하였다.
- [73] 본 발명자들은 ilsong-PMCA 장치를 좀 더 개선하여 도 3의 우측과 같이 컵혼 내에 음극과 양극이 위치하도록 하고 직류전기 공급부재를 음극 및 양극과 연결하여 배양과정 동안 지속적으로 음극과 양극에 직류전기를 공급하였다.
- [74] 또한, 본 발명자들은 튜브 랙에 꽂는 다수 개의 시료 튜브에 초음파를 고루 전달하기 위하여 혼의 상측 단면을 곡면으로 형성하되 중앙부가 오목하게 형성하였다.
- [75] 또한, 본 발명자들은 시료 튜브를 기존의 폴리프로필렌 튜브 대신 유리 재질의 튜브로 교체하였다.
- [76]
- [77] 실시예 2: ePMCA를 위한 Pr^{PC}와 Pr^{Sc} 시료제조
- [78] 실험동물로서 6주령의 인브레드 마우스(C57BL/6J, SJL/J, ICR, MB)와 골든 시리안 햄스터(golden syrian hamster, SHa)를 (주)중앙실험동물로부터 주문하여

사용하였다. 스크래피 질환을 유발하는 스크래피 스트레인 ME7, 139A, 22L, 87V, 263K, 139H는 신경질환연구소(neuropathogenesis unit, edinburgh, scotland)의 알란 디킨스 박사로부터 제공받았다.

- [79] 실험은 스크래피에 감염된 실험군과 동일한 연령의 정상동물로 구성된 대조군으로 나누어 실시하였다. ME7과 139A 스크래피 스트레인은 SJL, ME7, ICR 마우스에 감염시키고, 22L 스크래피 스트레인은 C57BL 마우스에 감염시켰다. 87V 스크래피 스트레인은 MB 마우스에, 263K 및 139H 스크래피 스트레인은 햄스터에 감염시켰다. 감염방법은 스크래피 스트레인에 감염된 1%(w/v) 뇌 균질액이 포함된 0.01M 인산 완충액(PBS, pH 7.4)을, 마우스의 경우에는 30 μ l를, 햄스터의 경우에는 50 μ l를 대뇌에 주입시켰다. 스크래피 스트레인 263K에 감염된 햄스터는 감염 후 70일, 스크래피 스트레인 22L에 감염된 마우스는 152일, 스크래피 스트레인 ME7, 139A 및 139H에 감염된 실험동물은 158일, 스크래피 스트레인 87V에 감염된 실험동물은 287일에 명백하게 발병된 임상적 증상이 있을 때 희생시켜 뇌조직을 적출하였다. 적출에 사용된 각각의 스크래피에 감염된 뇌 및 감염되지 않은 대조군의 뇌조직을 -70°C에 보관하였다.

- [80] 이렇게 적출하여 보관된 뇌조직을 각각 실험에 맞추어 선정된 CB 완충액에 넣고 균질기(homogenizer)를 사용하여 균질화하여 10%(w/v)의 농도로 만들었다. 그 후 원심분리기를 이용하여 1,500rpm에서 30초간 원심분리를 행하고, 상층액(supernatant)과 침전층(pellet)으로 분리하였다. 이때 상층액을 조심스럽게 취하여 실험에 사용하였다. 감염된 실험동물 뇌조직은 실험을 할 때 바로 뇌조직을 적출하여 사용해야 증폭이 잘 되었다.

[81]

[82] 실시예 3: cPMCA 실험조건

- [83] PMCA 기법은 배양(incubation) → 초음파 분쇄(sonication)를 1 사이클로 하여 반복 구성되는 방법으로서, 본 실시예에서는 배양 과정이 29분 20초 동안 이루어지는 과정에서 DC 24V/30W의 전기를 가하였으며, 마지막 40초 동안 초음파 분쇄가 행해졌다. 초음파 분쇄 파워는 40~60%로 실험에 맞게 최적화하였다. PMCA를 수행하는 동안 온도는 37°C를 유지하는 것이 가장 좋았다. 37°C도 이상에서는 수분이 많이 상승하여 튜브 뚜껑으로 증발되었다. 따라서 실험 시료가 담긴 튜브 내의 상태가 균일하지 못하고, 수분 증발로 인하여 초음파가 인가되는 밑 부분의 농도가 진해지므로 증폭 효율이 떨어졌다. 통상 1 사이클은 30분으로 구성되고, 96 사이클(48시간, 2일)을 1 라운드(round)라 부르며, 보통 1 라운드, 2 라운드, 3 라운드 등으로 계속 진행한다. PMCA 실험과 관련한 실험조건은 Soto C. 연구진의 방법을 사용했다(Castilla J. et al., *Methods Enzymol.* 2006, 412, 3-21).

[84]

[85] 실시예 4: PrP^C와 PrP^{Sc}의 웨스턴 블롯 분석

- [86] 웨스턴 블롯은 상기 실시예 2에서 수득한 프리온 질환을 유발시킨 실험동물의 뇌조직에서 변형된 단백질이 병원성 프리온 단백질임을 확인하기 위하여 정상 및 변형 프리온 단백질 농도별로 단백질 분해효소 K(PK)를 우선 처리하였다. 또한, 단백질 분해효소 K의 농도 및 온도, 항-프리온 항체(3F4, 3F10)를 변화시켜가며 기초조건 실험을 진행하였다.
- [87] 스크래피 스트레인에 감염된 햄스터, 마우스의 뇌조직 추출물의 불용성 분획을 버티컬 전기영동장치(Bio-Rad사) 상의 15% SDS 폴리아크릴아미드 겔(SDS-PAGE)에 로딩하여 70V, 30mA에서 전기영동하였다. 이를 니트로셀룰로즈 막으로 옮기고 5% 스킴밀크와 0.1% 트윈-20(Tween-20)이 포함된 TBS를 처리하여 비특이적 면역반응을 방지한 후, 항-프리온 항체 3F10(1: 5,000), 3F4(1: 5,000)를 처리하여 반응시킨 다음 0.1% 트윈-20이 포함된 TBS로 처리하여 니트로셀룰로즈 막을 세척하였다(Choi J.K., et al., *Hybridoma (Larchmt)*, 2006, 25, 271-277). 그 다음 퍼옥시다제가 표지된 항-마우스 IgG를 처리한 후 화학형광 발광법을 시행하여 햄스터와 마우스의 뇌조직 프리온 단백질 존재 여부와 함량을 탐지하였다. 상기 마우스 단일클론 3F4, 3F10 항-프리온 항체는 PrP^C과 PrP^{Sc}를 모두 검출할 수 있는 항체이다.
- [88] 263K 스크래피 스트레인에 감염된 햄스터의 뇌조직 추출물을 단백질 분해효소 K로 처리한 후 수득한 불용성 분획에서는 PrP^{Sc}가 검출되었다(도 5, PK: 단백질 분해효소 K, +: 처리함, -: 처리하지 않음).
- [89]
- [90] 결과 1: 개선된 PMCA 장치
- [91] PMCA 원리를 이용한 장치는 미국 Misonix사에서 자동화된 PMCA 모델을 판매 중에 있으며(Castilla, J. et al., *Methods Enzymol.*, 2006, 412, 3-21), 전 세계의 많은 과학자들이 Misonix사의 자동화 PMCA 장비를 이용하여 실험하고 있다. 따라서, 본 발명자들도 'Misonix Model 4000'을 구입하여 실험을 진행하였으나, PMCA 장치의 개선이 필요하였다.
- [92] 본 발명자들에 의해 1차 개선된 PMCA 장치는 특허 제1098185호에 개시된 것과 같이 공랭식 대신 수냉식 열유지기(항온순환시스템)를 혼에 장착하고, 컵혼 수조로 물이 들어오고 나가도록 구성한 것이다(ilsong-PMCA라 칭함).
- [93] 본 발명에서는 상기 ilsong-PMCA를 좀 더 개선하였다. 본 발명의 개선된 PMCA 장치(ePMCA라 칭함)를 도 1~3에 나타내었다. 종래 PMCA 장치(Misonix)는 모두 37°C가 유지되는 공랭식 열유지기 방식의 인큐베이터 내에 넣어 작동시키며, 때로 15일에서 30일까지 계속 작동시킨다. 그러나, 이때 발생하는 온도 변화로 인하여 증폭 효과가 저하된다. 그리하여 본 발명자들은 종래 PMCA 장치를 공랭식 열유지기 방식의 인큐베이터에 넣어 실험할 때 발생할 수 있는 온도에 의한 실험적 오차를 개선하고자 공랭식 열유지기 방식을 변형하여 균일한 온도조건을 제공할 수 있는 수냉식 열유지기(항온순환시스템)를 혼에 장착하고, 도 4와 같이 컵혼 수조로 물이 들어오고 나가도록 구성하였다. ilsong-PMCA

장치에는 온도를 실시간 점검 및 조절할 수 있도록 온도감지센서를 컵혼에 장착하여 설정 온도 범위 이상이 되면 고온으로 인하여 단백질이 변성되는 문제가 발생하므로 이를 억제하기 위하여 공급되는 물의 온도를 낮추도록 하였으며, 온도를 유지하며 초음파 소음을 억제할 수 있는 보호박스(protection box)도 일체형으로 제작하였다.

[94] 또한, 초음파를 발생시키는 컨버터에 PbO, TiO₂, ZrO₂, Sb₂O₃, Nb₂O₅, MnO₂ 등의 복합 압전소자 재료를 이용하였으며, 알루미늄 또는 스테인레스 스틸 등의 금속재질로 된 초음파 방사면을 접착시켜 통상 60Hz의 전기 신호를 인가하면 20KHz 주파수의 진동이 발생하며, 0 ~ 2,000W 까지 출력과워 조절기능을 할 수 있도록 컨버터를 구성하였다. 그리하여 사용자의 필요에 따라 0 ~ 2,000W 출력과워를 선택하여 실험할 수 있도록 하였다. 혼을 구성하는 소재는 티타늄으로서 종래 장치의 혼 재질인 알루미늄과 티타늄의 합금보다 강도가 강하며, 강한 혼의 출력을 전달할 수 있도록 컨버터도 티타늄으로 제작하였다. ilsong-PMCA 장치는 사용 결과 안정성이 확보되었음을 확인하였다.

[95] 이에 더하여, 본 발명에서는 배양 과정에서 직류 전기를 공급하기 위하여 전기적 에너지(electric energy)를 지속적으로 인가하는 직류전기 공급부재와, 컵혼 수조 내에 상기 직류전기 공급부재와 각각 연결되는 음극과 양극을 부가하여 좀 더 개선된 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 장치를 제조하였다.

[96] 또한, 본 발명에서는 혼의 상측 단면이 곡면이 아니라 평면인 경우 튜브 랙에 여러 개의 시료를 담은 시료 튜브가 있을 때는 혼을 통해서 시료 튜브에 전달되는 초음파가 균일하지 않고, 중앙에 위치한 시료 튜브에만 강한 초음파가 전달되는 문제를 해결하기 위하여 혼의 상측 단면을 중앙부가 오목한 형태로 제조하였다. 중앙부가 오목해진 혼의 상측 단면은 공동 현상(cavitation)이 활발하게 일어나 더 강한 초음파를 시료에 전달할 수 있어 증폭 효율을 증대시킨다.

[97]

[98] 결과 2: PrP^C와 PrP^{Sc}의 웨스턴 블롯 분석

[99] 실험동물의 뇌조직을 확보하여 단백질 분해효소 K를 농도별로 처리하였다. 50, 100 그리고 200 μ g/ml을 이용하여 실험조건을 설정하였다. 단백질 분해효소 K(PK)는 45°C, 150rpm의 셰이커에서 처리하였다. 실험 결과 PrP^C는 모두 분해되어 깨끗한 웨스턴 블롯을 볼 수 있었다(도 5). 하지만, 스크래피 스트레인에 감염된 실험동물의 뇌조직에서는 위와 같이 처리하였을 경우 전형적인 PrP^{Sc}의 웨스턴 블롯이 관찰되었다. 감염된 실험동물의 뇌조직 농도를 0.1%와 0.5%로 설정하고 각각 단백질 분해효소 K를 50, 100 그리고 200 μ g/ml씩 처리하였을 경우, 단백질 분해효소 K의 농도에 비례하여 PrP^{Sc}의 분해가 일어나지는 않았다. 즉, 단백질 분해효소 K의 농도가 강하거나 약하거나 PrP^{Sc}의 패턴은 동일하게 나타났다.

[100]

[101] 결과 3: 개선된 장치(ePMCA, Ilsong-PMCA)와 Misonix-PMCA 를 이용한 비교 실험

[102]

Misonix-PMCA 장치와 본 발명자들이 발명한 ePMCA, ilsong-PMCA 장치를 비교 실험하였다. 도 6a~6c와 같이 PMCA를 실시하지 않은 것(0 라운드)에서는 웨스턴 블롯 결과 PrP^{Sc} 밴드가 나타나지 않는다. 이번 비교실험조건에서 PrP^C는 100 μ g/ml recHamPrP [recHamPrP(recombinant Hamster Prion Protein)] 을 기질(substrate)로 넣어주고, PrP^{Sc}는 263K에 감염된 햄스터 뇌조직을 균질화하고, 각각의 농도(10^{-6} ~ 10^{-30})로 만들어 실험을 수행하였다. PrP^C로 100 μ g/ml recHamPrP를 사용하고, PrP^{Sc}를 계속 1/100의 농도로 희석한 것을 PrP^C에 첨가하여 ePMCA, ilsong-PMCA 및 Misonix-PMCA를 수행하였다. 도 6a는 ePMCA 장치를 이용한 실험으로서, 레인 1은 100 μ g/ml recHamPrP에 0.001%(10^{-5}) PrP^{Sc}를 넣고 1.5 라운드를 수행하였다. 레인 2 ~ 15는 0.0001%(10^{-6}) PrP^{Sc}를 계속 1/100씩 희석한 것을 100 μ g/ml recHamPrP에 첨가하여 ePMCA를 수행한 결과를 보여준다. ePMCA는 10^{-30} 의 농도에서 검출됨을 확인하였다. 이는 ePMCA 장치가 가장 증폭이 잘 되는 것을 확인한 결과이다. 도 6b는 ilsong-PMCA 장치를 이용한 실험으로서, 레인 1은 100 μ g/ml recHamPrP에 0.001%(10^{-5}) PrP^{Sc}를 넣고 1.5 라운드를 수행하였다. 레인 2 ~ 8은 0.0001%(10^{-6}) PrP^{Sc}를 계속 1/100씩 희석한 것을 100 μ g/ml recHamPrP에 첨가하여 ePMCA를 수행한 결과를 보여준다. ilsong-PMCA는 10^{-18} 의 농도에서 검출됨을 확인하였다. 도 6c는 Misonix-PMCA 장치를 이용한 실험으로서, 레인 1은 100 μ g/ml recHamPrP에 0.001%(10^{-5}) PrP^{Sc}를 넣고 1.5 라운드를 수행하였다. 레인 2 ~ 8은 0.0001%(10^{-6}) PrP^{Sc}를 계속 1/100씩 희석한 것을 100 μ g/ml recHamPrP에 첨가하여 ePMCA를 수행한 결과를 보여준다. 개선된 ePMCA와 ilsong-PMCA 장치를 이용한 실험에서는 Misonix-PMCA 장치에 의한 실험보다도 PrP^{Sc}의 함량이 더 많이 나타났다(도 6a-6c). ePMCA는 10^{-30} 의 농도까지 검출되며, ilsong-PMCA 는 10^{-18} 의 농도에서 검출되었고, 마지막으로 Misonix-PMCA는 10^{-12} 의 농도에서 검출됨을 확인하였다. 이는 ePMCA > ilsong-PMCA > Misonix-PMCA 순서로 증폭이 잘 됨을 확인한 결과이다. 이로써 본 발명의 ePMCA가 가장 효율이 높은 장비라는 결과를 얻었다.

산업상 이용가능성

[103]

본 발명은 극미량 시료를 이용하여 프리온 질환을 진단하는데 유용하다.

[104]

[105]

본 출원은 보건복지부 보건의료기술 연구개발사업 "국내 발생 인간 프리온 질환의 병원체 시료확보를 통한 발병기전, 중간전이, 조기진단 및 치료법 개발 연구" 과제 및 미래창조과학부 해외거점활용연구센터사업 "단백질응집 관련 퇴행성 뇌질환의 기술융합적 연구를 위한 한림-읍살라 연구센터" 과제 수행의

일환으로 출원하는 것입니다.

청구범위

[청구항 1]

(a) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,
 (b) 시료와 비병원성 이형태체를 항온처리하여 배양함에 있어서 전기에너지를 가하고,
 (c) 상기 (a) 또는 (b) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,
 (d) 상기 응집체가 분해된 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 상기 (b) 단계 및 (c) 단계는 (d) 단계 실시예 앞서 2회 이상 반복 실시되는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification)을 수행하기 위하여 초음파 발생기, 컨버터, 부스터 및 혼을 포함하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭장치에 있어서,
 상기 (c)의 응집체를 분해하는 단계를 수행하기 위하여 초음파를 발생시키기 위해 전기 에너지를 제공하는 초음파 발생기,
 상기 초음파 발생기에 의해 제공되는 전기 에너지를 초음파 진동으로 변환시키는 압전소자를 포함하는 컨버터,
 상기 컨버터에 의해 변환된 초음파 진동을 증폭시키는 부스터,
 상기 부스터에 의해 증폭된 초음파 진동을 시료에 전달하는 혼,
 상기 혼의 상부에 결합되며 그 내부에 항온수조가 형성되어 시료를 항온처리할 수 있는 컵혼 수조,
 상기 컵혼 수조 상부에 시료가 든 시료 튜브를 위치시키는 튜브 랙 및
 상기 컵혼 수조에 물을 공급하고 배출시키는 항온순환시스템과,
 상기 (b) 단계의 배양 과정에서 직류 전기를 공급하기 위하여 전기적 에너지(electric energy)를 지속적으로 인가하는 직류전기 공급부재와,
 컵혼 수조 내에 상기 직류전기 공급부재와 각각 연결되는 음극과 양극을 포함함을 특징으로 하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 장치.

[청구항 2]

청구항 1에 있어서,
 상기 항온순환시스템은 컵혼 수조의 물 또는 시료의 온도를 측정하는 온도센서를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭 장치.

[청구항 3]

청구항 1에 있어서,
 상기 시료 튜브는 유리 재질인 것을 특징으로 하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭 장치.

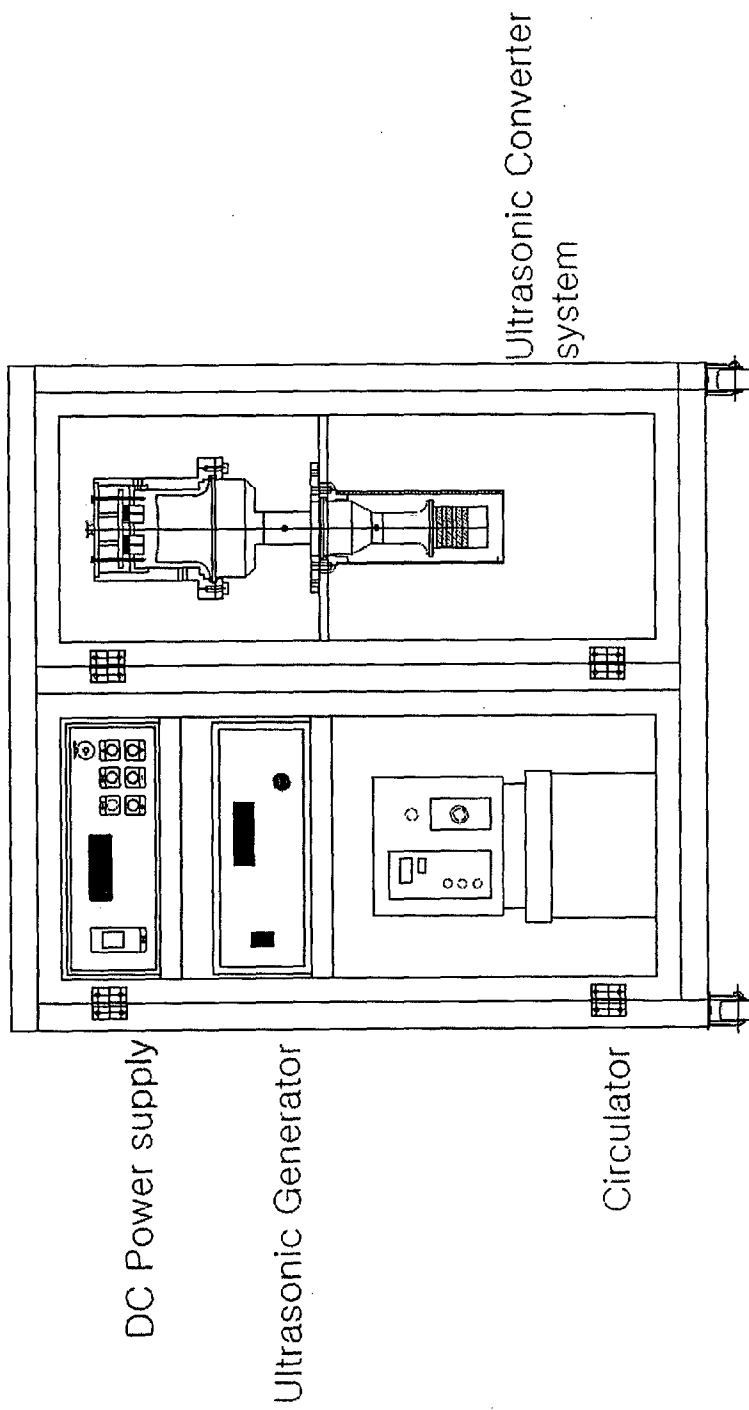
[청구항 4]

청구항 1에 있어서,

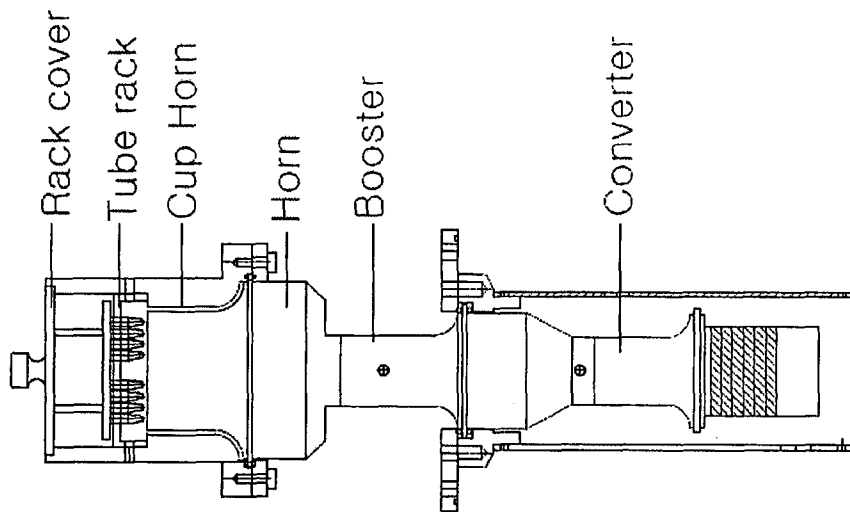
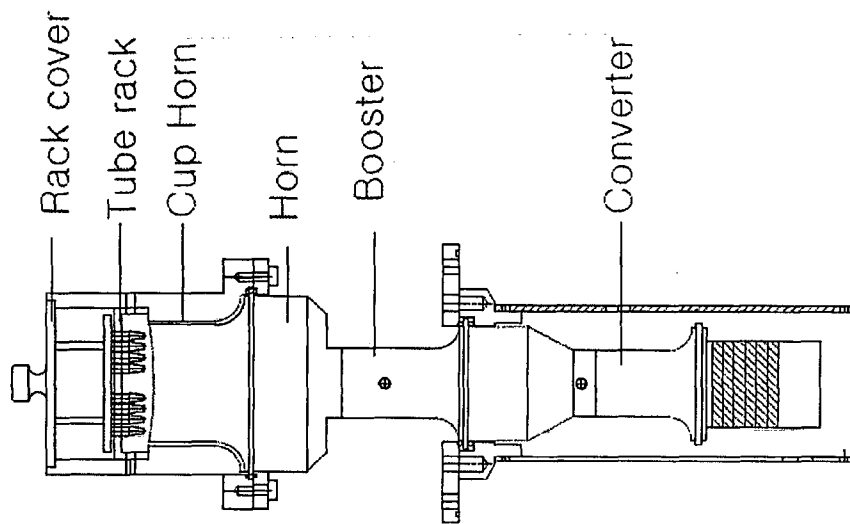
- 상기 혼의 상측 단면은 중앙부가 오목하도록 곡면으로 형성된 것을 특징으로 하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭 장치.
- [청구항 5] (a) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,
(b) 시료와 비병원성 이형태체를 컵혼 수조 내에서 항온처리하는 배양 과정에서 수조 내에 직류전기를 지속적으로 가하고,
(c) 상기 (a) 또는 (b) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,
(d) 상기 응집체가 분해된 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 상기 (b) 단계 및 (c) 단계는 (d) 단계 실시예 앞서 2회 이상 반복 실시되는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 방법으로 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서,
상기 직류전기는 DC 5~50V 및 10~100W의 범위임을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법
- [청구항 7] 청구항 5에 있어서,
상기 (a) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키는 단계에서 완충액으로서 pH 7.0~8.0의 술폰산 함유 완충액을 가하는 것을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서,
상기 술폰산 함유 완충액이 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산(MES), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산)(PIPES), N-2-아세트아미도-2-아미노에탄술폰산(ACES), 3-(N-모르폴리노)-2-히드록시프로판술폰산(MOPSO), N-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술폰산(TES) 및 N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-프로판술폰산(HEPPS)으로 이루어진 군 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법.
- [청구항 9] 청구항 7에 있어서,
상기 완충액에 비이온 계면활성제를 임계 마이셀 농도 이하 혹은 이상을 첨가하는 것을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서,
상기 비이온 계면활성제는 Tween 80, Triton X-100, Brij, Lubrol 및 폴리에틸렌글라이콜로 이루어진 그룹 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법.
- [청구항 11] 청구항 9에 있어서,

상기 비이온 계면활성제는 0.5~2%(w/w) 범위로 가함을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법.

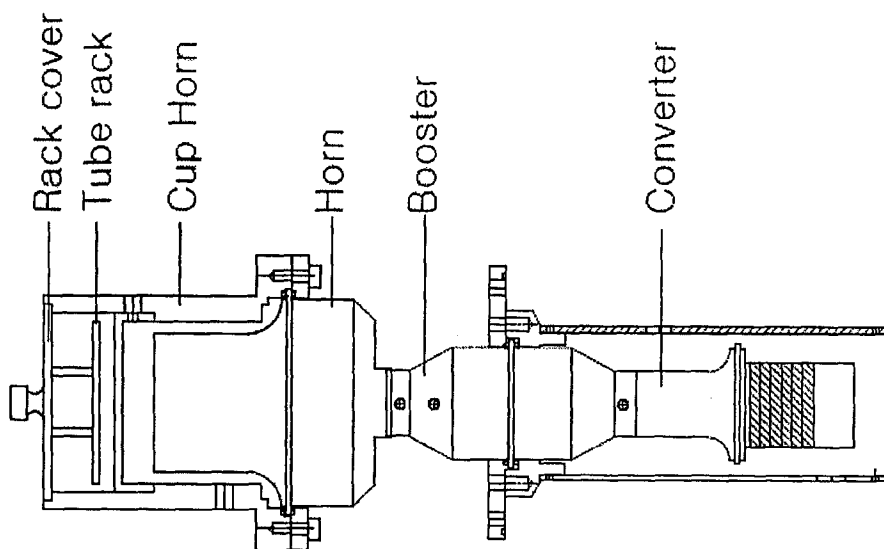
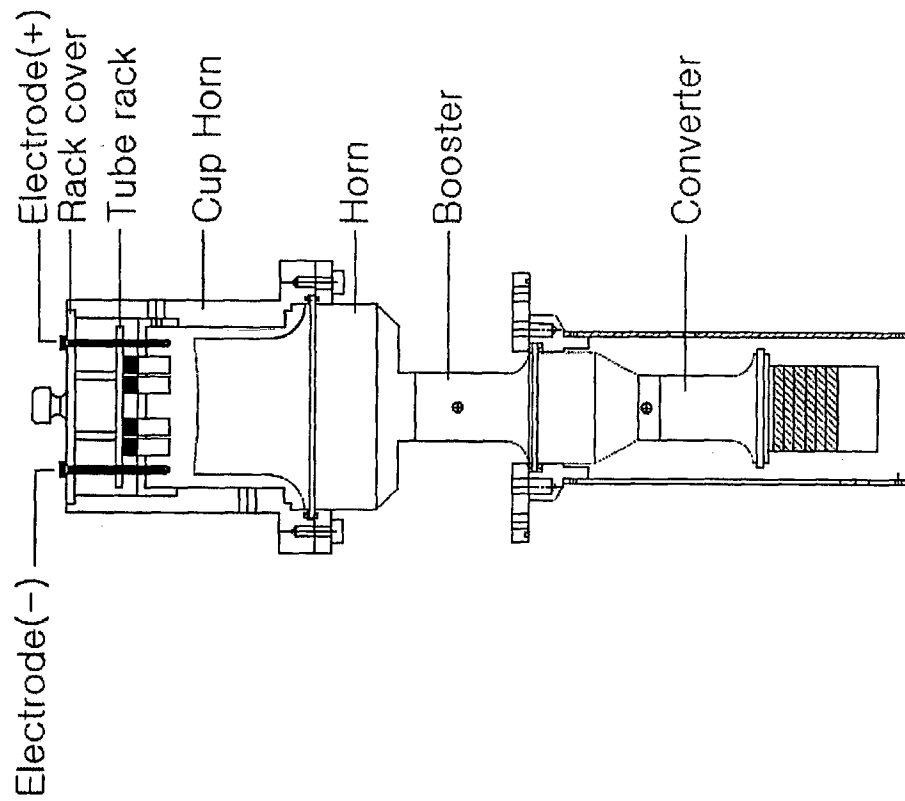
[Fig. 1]



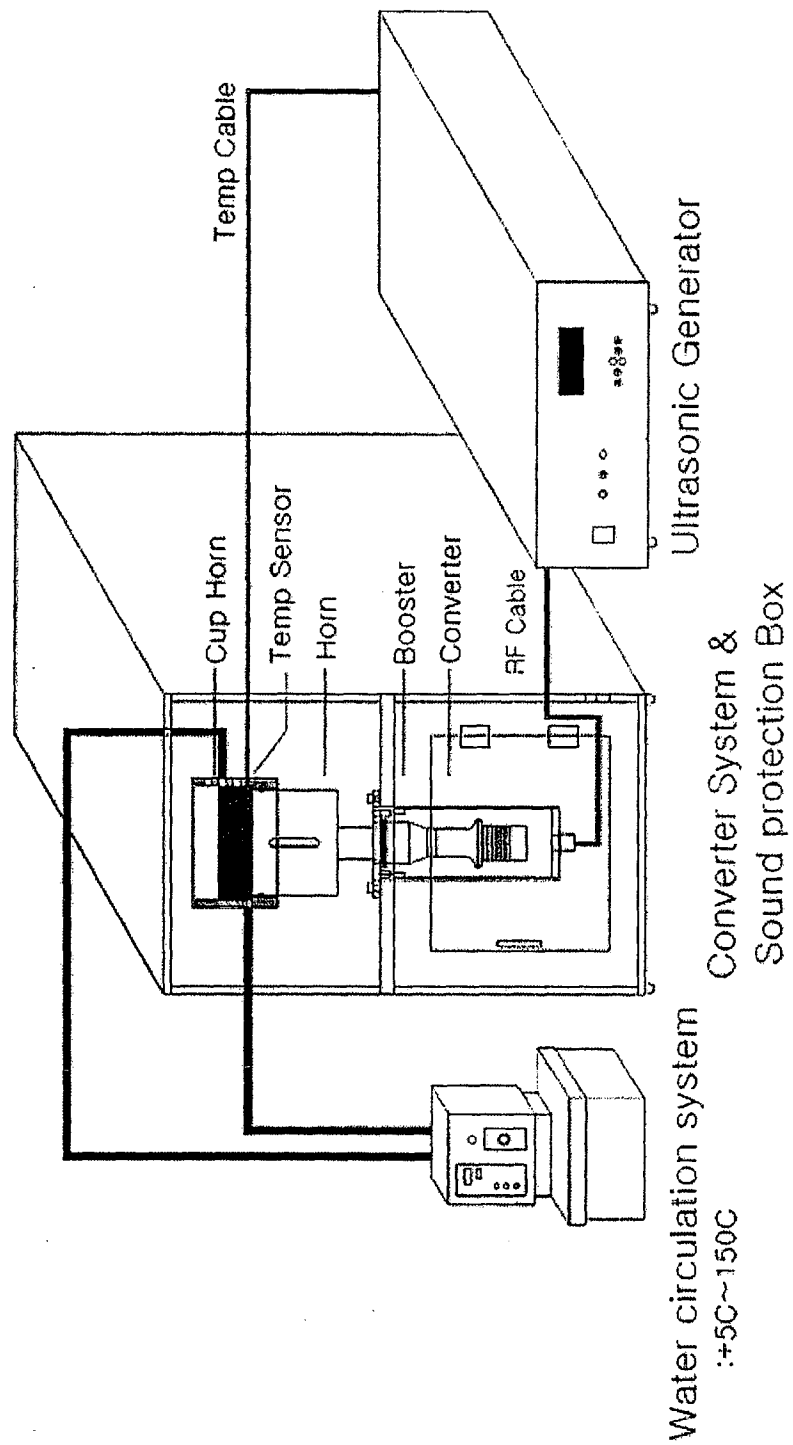
[Fig. 2]



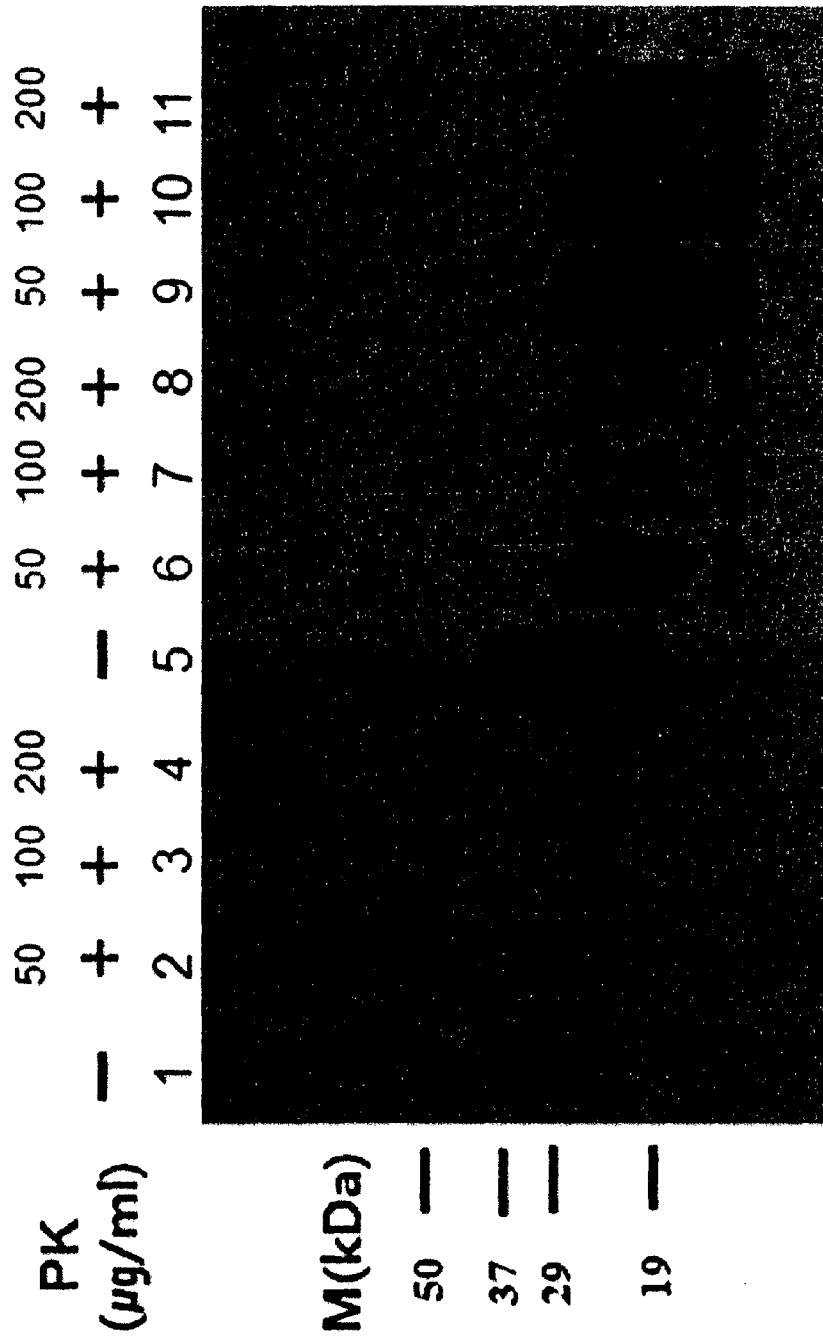
[Fig. 3]



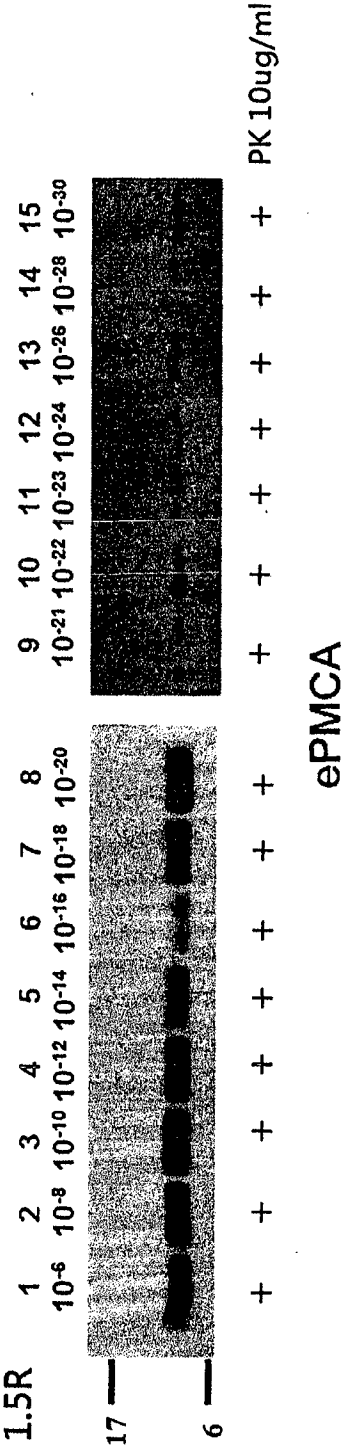
[Fig. 4]



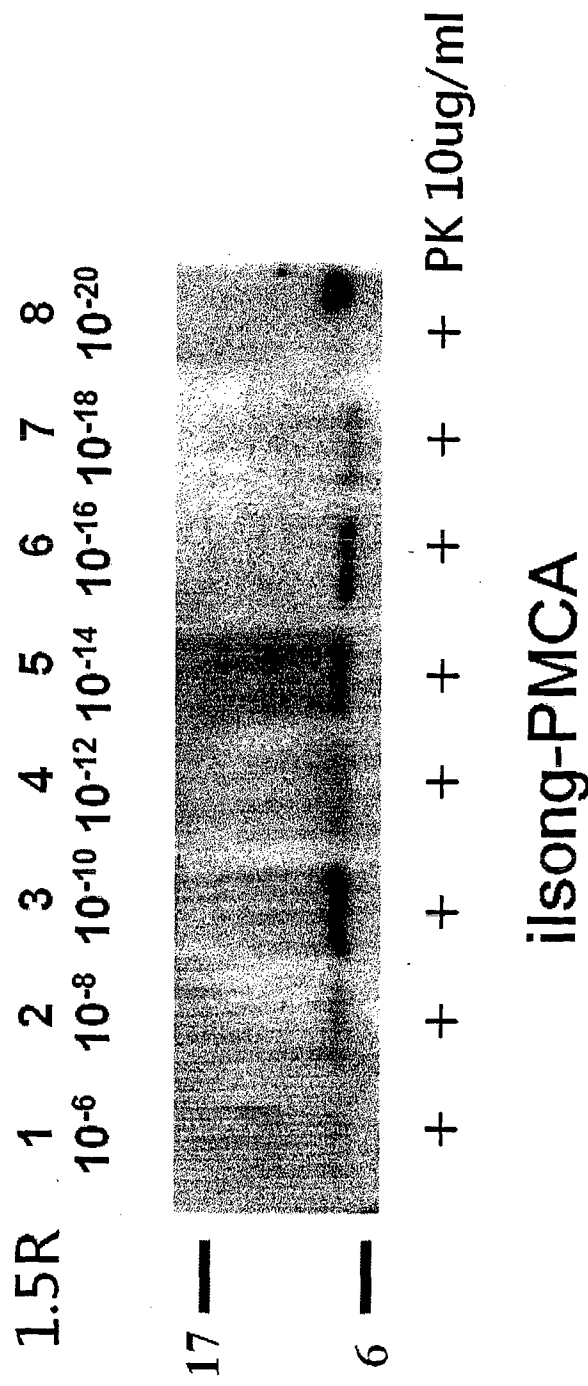
[Fig. 5]



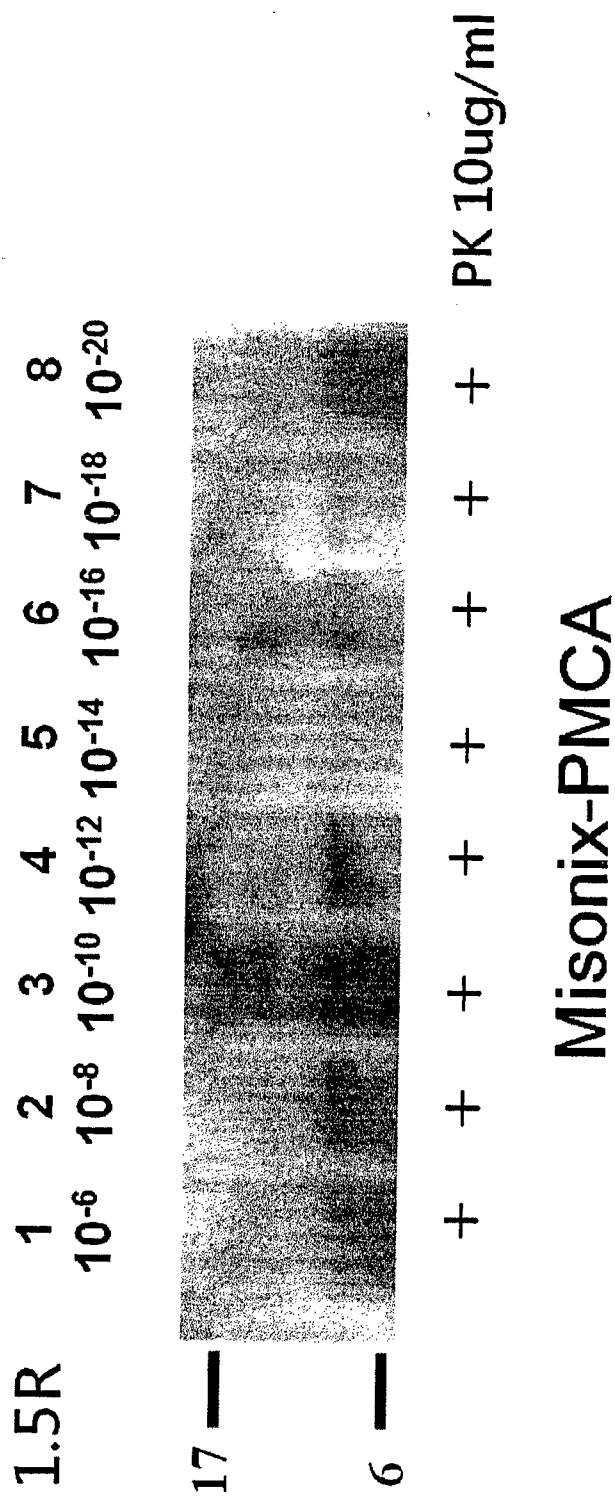
[Fig. 6a]



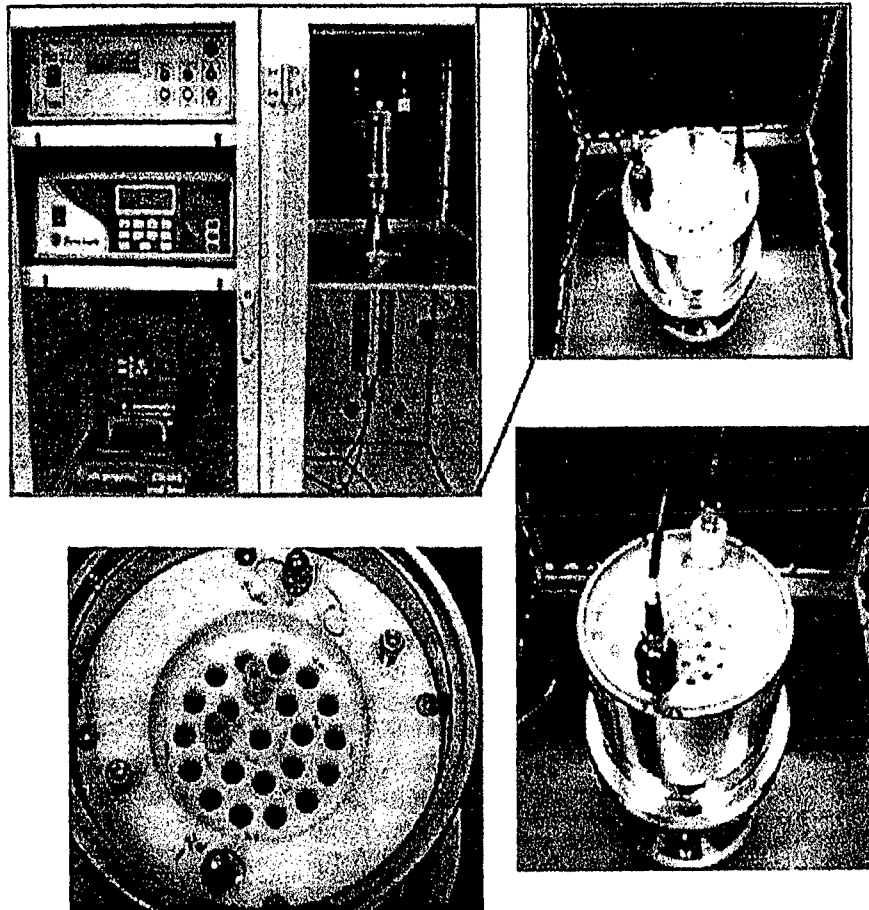
[Fig. 6b]



[Fig. 6c]



[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003340**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/68(2006.01)i, G01N 29/44(2006.01)i, G01N 29/22(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/68; C07K 14/47; G01N 29/44; G01N 33/15; C07K 1/02; C12Q 1/70; G01N 33/50; C12M 1/34; G01N 29/22

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: prion, PrPsc, PMCA, ePMCA, prion, protein misfolding cyclic amplification

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2280028 A1 (INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 02 February 2011 See the entire document.	1-11
A	KR 10-1098185 B1 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 23 December 2011 See the entire document.	1-11
A	KR 10-2003-0036257 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.) 09 May 2003 See the entire document.	1-11
A	US 2006-0263769 A1 (LUO, Yuling et al.) 23 November 2006 See the entire document.	1-11
A	US 2011-0124843 A1 (MURAYAMA, Yuichi et al.) 26 May 2011 See abstract.	1-11
A	JP 2007-527504 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.) 27 September 2007 See abstract.	1-11



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

"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

08 JANUARY 2015 (08.01.2015)

Date of mailing of the international search report

09 JANUARY 2015 (09.01.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/003340

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
EP 2280028 A1	02/02/2011	EP 2280028 A4	04/01/2012
		EP 2280028 B1	27/03/2013
		JP 5209711 B2	12/06/2013
		WO 2009-145194 A1	03/12/2009
		WO 2009-145194 A1	03/12/2009
KR 10-1098185 B1	23/12/2011	KR 10-2011-0083320 A	20/07/2011
KR 10-2003-0036257 A	09/05/2003	AU 2001-264089 B2	30/03/2006
		AU 2001-64089 A1	21/01/2002
		CA 2413078 A1	17/01/2002
		CA 2413078 C	03/08/2010
		EP 1299729 A2	09/04/2003
		EP 1299729 B1	02/08/2006
		EP 1712920 A1	18/10/2006
		EP 1712920 B1	25/03/2009
		JP 2004-503748 A	05/02/2004
		JP 4790966 B2	12/10/2011
		US 2005-0064505 A1	24/03/2005
		US 7351526 B2	01/04/2008
		WO 02-004954 A3	24/10/2002
		WO 02-04954 A2	17/01/2002
US 2006-0263769 A1	23/11/2006	CA 2606723 A1	16/11/2006
		EP 1880206 A2	23/01/2008
		EP 1880206 A4	30/09/2009
		EP 1880206 B1	14/11/2012
		US 2011-0171644 A1	14/07/2011
		US 8628918 B2	14/01/2014
		US 8632970 B2	21/01/2014
		WO 2006-122002 A2	16/11/2006
		WO 2006-122002 A3	26/04/2007
US 2011-0124843 A1	26/05/2011	AU 2009-252392 A1	03/12/2009
		AU 2009-252392 B2	02/02/2012
		CA 2725100 A1	03/12/2009
		CA 2725100 C	18/02/2014
		EP 2280029 A1	02/02/2011
		EP 2280029 A4	01/10/2014
		JP 5209712 B2	12/06/2013
		NZ 589487 A	30/03/2012
		WO 2009-145195 A1	03/12/2009
JP 2007-527504 A	27/09/2007	AU 2004-248302 A1	23/12/2004
		AU 2004-248302 B2	30/07/2009
		AU 2009-232094 A1	19/11/2009
		CA 2525517 A1	23/12/2004
		EP 1636592 A1	22/03/2006
		EP 1636592 B1	19/12/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/003340

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		ES 2401645 T3	23/04/2013
		IL 172354 A	29/12/2011
		JP 2007-527504 T	27/09/2007
		JP 5133561 B2	30/01/2013
		NO 20060165 A	11/01/2006
		US 2007-0020682 A1	25/01/2007
		US 2009-0317380 A1	24/12/2009
		US 7598046 B2	06/10/2009
		WO 2004-111652 A1	23/12/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/68(2006.01)i, G01N 29/44(2006.01)i, G01N 29/22(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/68; C07K 14/47; G01N 29/44; G01N 33/15; C07K 1/02; C12Q 1/70; G01N 33/50; C12M 1/34; G01N 29/22 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: prion, PrPsc, PMCA, ePMCA, 프리온, 단백질 미스폴딩 사이클 증폭		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	EP 2280028 A1 (INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 2011.02.02 전문 참조.	1-11
A	KR 10-1098185 B1 (한림대학교 산학협력단) 2011.12.23 전문 참조.	1-11
A	KR 10-2003-0036257 A (어플라이드 리서치 시스템스 에이알에스 홀딩 엔.브이.) 2003.05.09 전문 참조.	1-11
A	US 2006-0263769 A1 (LUO YULING 외 1명) 2006.11.23 전문 참조	1-11
A	US 2011-0124843 A1 (MURAYAMA YUICHI 외 8명) 2011.05.26 요약 참조.	1-11
A	JP 2007-527504 A (어플라이드 리서치 시스템스 에이알에스 홀딩 엔.브이.) 2007.09.27 요약 참조.	1-11
☐ 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 “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 2015년 01월 08일 (08.01.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 01월 09일 (09.01.2015)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 문동현 전화번호 +82-42-481-3482 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
EP 2280028 A1	2011/02/02	EP 2280028 A4 EP 2280028 B1 JP 5209711 B2 WO 2009-145194 A1 WO 2009-145194 A1	2012/01/04 2013/03/27 2013/06/12 2009/12/03 2009/12/03
KR 10-1098185 B1	2011/12/23	KR 10-2011-0083320 A	2011/07/20
KR 10-2003-0036257 A	2003/05/09	AU 2001-264089 B2 AU 2001-64089 A1 CA 2413078 A1 CA 2413078 C EP 1299729 A2 EP 1299729 B1 EP 1712920 A1 EP 1712920 B1 JP 2004-503748 A JP 4790966 B2 US 2005-0064505 A1 US 7351526 B2 WO 02-004954 A3 WO 02-04954 A2	2006/03/30 2002/01/21 2002/01/17 2010/08/03 2003/04/09 2006/08/02 2006/10/18 2009/03/25 2004/02/05 2011/10/12 2005/03/24 2008/04/01 2002/10/24 2002/01/17
US 2006-0263769 A1	2006/11/23	CA 2606723 A1 EP 1880206 A2 EP 1880206 A4 EP 1880206 B1 US 2011-0171644 A1 US 8628918 B2 US 8632970 B2 WO 2006-122002 A2 WO 2006-122002 A3	2006/11/16 2008/01/23 2009/09/30 2012/11/14 2011/07/14 2014/01/14 2014/01/21 2006/11/16 2007/04/26
US 2011-0124843 A1	2011/05/26	AU 2009-252392 A1 AU 2009-252392 B2 CA 2725100 A1 CA 2725100 C EP 2280029 A1 EP 2280029 A4 JP 5209712 B2 NZ 589487 A WO 2009-145195 A1	2009/12/03 2012/02/02 2009/12/03 2014/02/18 2011/02/02 2014/10/01 2013/06/12 2012/03/30 2009/12/03
JP 2007-527504 A	2007/09/27	AU 2004-248302 A1 AU 2004-248302 B2 AU 2009-232094 A1 CA 2525517 A1 EP 1636592 A1 EP 1636592 B1	2004/12/23 2009/07/30 2009/11/19 2004/12/23 2006/03/22 2012/12/19

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		ES 2401645 T3	2013/04/23
		IL 172354 A	2011/12/29
		JP 2007-527504 T	2007/09/27
		JP 5133561 B2	2013/01/30
		NO 20060165 A	2006/01/11
		US 2007-0020682 A1	2007/01/25
		US 2009-0317380 A1	2009/12/24
		US 7598046 B2	2009/10/06
		WO 2004-111652 A1	2004/12/23